



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103181932 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 03

(21) 申请号	201210579281. 1	<i>A61K 35/26</i> (2006. 01)
(22) 申请日	2008. 09. 04	<i>A61K 45/00</i> (2006. 01)
(30) 优先权数据		<i>A61P 25/28</i> (2006. 01)
60/971, 284	2007. 09. 11 US	<i>A61P 25/16</i> (2006. 01)
12/109, 066	2008. 04. 24 US	<i>A61P 9/10</i> (2006. 01)
(62) 分案原申请数据		<i>A61P 35/00</i> (2006. 01)
200880107049. X	2008. 09. 04	<i>A61P 25/00</i> (2006. 01)
(71) 申请人	威廉·H·弗雷二世	<i>A61P 25/18</i> (2006. 01)
地址	美国明尼苏达州	<i>A61P 25/14</i> (2006. 01)
申请人	卢西·达尼埃良	<i>A61P 25/08</i> (2006. 01)
	克里斯托夫·H·格莱特	
(72) 发明人	威廉·H·弗雷二世	
	卢西·达尼埃良	
	克里斯托夫·H·格莱特	
(74) 专利代理机构	广州嘉权专利商标事务所有 限公司 44205	
代理人	张海文	
(51) Int. Cl.		
	<i>A61K 35/12</i> (2006. 01)	

权利要求书1页 说明书25页

(54) 发明名称

将治疗性细胞给予哺乳动物中枢神经系统的方法、药物组合物和制品

(57) 摘要

用于预防和治疗经历 CNS 细胞丧失或死亡的受损和 / 或退化 CNS 的方法和组合物。本发明的各种实施方式通过鼻内施加至鼻腔上三分之一处而将治疗有效量的至少一种治疗性细胞运输至 CNS, 从而绕过血脑屏障。本发明的药物组合物可包含至少一种治疗性细胞、至少一种递送增强剂、至少一种抗生素、至少一种调节剂和 / 或至少一种免疫抑制剂, 其中所述组合物递送至鼻腔的上三分之一处。一旦递送至 CNS, 所述治疗性细胞优先迁移至受损或退化或受伤的区域。

1. 一种通过鼻内递送用于治疗包括哺乳动物中枢神经系统受损或退化或受伤的神经疾病的药物组合物,包括:

有效量的治疗性细胞,其有效量范围为 $50-10^8$ 个细胞,其特征在于:将有效量的治疗性细胞施加于鼻腔上三分之一处,使其绕过血脑屏障直接递送到中枢神经系统,其中治疗性细胞优先迁移到中枢神经系统的一个或多个受损或退化或受伤区域,以便治疗该受损或退化或受伤区域。

2. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于:所述治疗性细胞的有效量范围为 10^3-10^8 个细胞。

3. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于:所述治疗性细胞的有效量范围为 10^4-10^8 个细胞。

4. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于:剂量体积范围为 0.015-1.0ml。

5. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于:剂量体积范围为 0.03-0.6ml。

6. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于:还包括一个药学上可接受的载体。

7. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于:还包括至少一种递送增强剂。

8. 根据权利要求 7 所述的药物组合物,其特征在于:所述至少一种递送增强剂包括透明质酸酶。

9. 根据权利要求 7 所述的药物组合物,其特征在于:所述至少一种递送增强剂还包括神经调节蛋白和迁移-诱导活性物质。

10. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于:还包括至少一种抗生素。

11. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于:还包括至少一种免疫抑制剂。

12. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于:还包括至少一种调节剂。

13. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于:所述治疗性细胞包括真核细胞。

14. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于:所述治疗性细胞包括干细胞。

15. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于:所述治疗性细胞包括治疗性淋巴细胞。

16. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于:所述神经学疾病或病症包括阿尔茨海默病。

17. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于:所述神经学疾病或病症包括帕金森症。

18. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于:所述神经学疾病或病症包括缺血和/或中风。

19. 根据权利要求 15 所述的药物组合物,其特征在于:所述神经学疾病或病症包括肿瘤。

20. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于:所述神经学疾病或病症包括外科损伤。

21. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于:所述神经学疾病或病症包括多发性硬化症。

将治疗性细胞给予哺乳动物中枢神经系统的方法、药物组合物和制品

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2007 年 9 月 11 日提交的名为“鼻内递送治疗性细胞至中枢神经系统”的临时申请号 60/971,284 的优先权,其全文通过引用纳入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及将治疗性细胞给予哺乳动物鼻腔上三分之一处的方法和药物组合物,使得该治疗性细胞能绕过血脑屏障从而预防和/或治疗该哺乳动物受损的和/或退化的和/或受伤的中枢神经系统。

背景技术

[0004] 中枢神经系统的某些细胞群体因衰老、患病或受损而破坏或丧失,即,死亡导致了许多神经学病症。这些病症中受破坏或损坏的细胞在本质上不会被替换,因此,中枢神经系统受破坏和/或退化从而导致功能丧失。最近的证据证明可能通过细胞移植治疗而进行神经元置换(neuronal replacement)和神经元回路的部分重建。该领域的许多初期研究利用胎儿细胞治疗。然而,最近了解到发育中、甚至成年哺乳动物神经系统含有一定群体的未分化、多能神经干细胞,这些干细胞显示的可塑特性对于为许多神经学病症设计更有效的神经再生方案有利。

[0005] 受破坏和/或退化的 CNS,即,细胞死亡导致的所述神经学病症、疾病和/或损伤包括阿尔茨海默病、轻度认知缺损、年龄相关的记忆缺陷、帕金森病、脑血管疾病,包括中风,克罗伊茨费尔特-雅各布病、家族性肌萎缩性侧索硬化、路维小体痴呆症、动脉粥样硬化、精神分裂症、孤独症、迟发性运动障碍、多发性硬化症、癫痫、威尔逊病、进行性核上性麻痹、哈-斯二氏综合征、多系统萎缩(multisystem atrophy)、亨廷顿病、家族性基底神经节变性(familial basal ganglia degeneration)、唐氏综合征、白内障、血色病、珠蛋白生成障碍性贫血、脑出血、蛛网膜下出血、颅脑损伤和脊髓损伤。此外,某些医学过程,例如冠状动脉旁路搭桥(CABG)外科手术与导致中枢神经系统破坏和/或退化和相伴的细胞死亡的神经学并发症有关。以 CABG 为例,每年全球实施该外科手术的患者超过 800,000 人。进行的许多 CABG 手术与神经学并发症有关。在具有外科手术后损伤的患者中,这些并发症从最多 16% 的中风到 50% 的一般性认知降低以及一些患者中在随后 5 年认知逐渐降低。此外,一些 CABG 患者表现出身体和行为受损。参见 Newman M F 等, N. Eng. J. Med. 344:395-402(2001); Brillman J., Neurol. Clin. 11:475-495(1993); 和 Selnes, O. A., Ann. Thorac. Surg. 67:1669-1676(1999)。

[0006] 神经干细胞已显示能在细胞置换治疗中替代受损和/或退化的 CNS 中丧失和濒死的细胞以及丧失的神经回路。例如,用 MPTP-一种选择性破坏脑中多巴胺能细胞的药物-治疗小鼠,然后移植神经干细胞群导致由供者和宿主细胞构成的重建多巴胺能细胞群。在小鼠中利用缺氧-缺血脑损伤模型的相似研究显示移植神经干细胞提高了受损系

统的恢复 (Park 等, (1999) J. Neurotrauma 16:675-687 和 Park 等, (1997) Soc. Neurosci. Abst. 23:346)。在中风患者中, 移植人神经元细胞系的细胞显示改善了神经学功能 (Kondziolka D. 等, (2000) “Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke (为中风患者移植培养的人神经元细胞)”. Neurology. 55:565-9)。在阿尔茨海默病的小鼠模型中, 将神经干细胞移植入前额和顶骨皮质极大缓解了胆碱能不足和 AD 相关的近期记忆破坏 (Wang, Q. 等, (2006) “Neural stem cells transplantation in cortex in a mouse model of Alzheimer’s disease (阿尔茨海默病小鼠模型的皮层中的神经干细胞移植)”. J. Med. Invest., 53:61-9)。

[0007] 此外, 在帕金森病中, 在哺乳动物中枢神经系统中退化的神经元包括黑质的多巴胺能神经元。晚期帕金森病患者的最新细胞置换方案包括纹状体内移植 6 到 9 周龄人胚胎的黑质多巴胺能神经元。移植后首个 6-24 个月内逐渐产生临床改善 (Olanow 等, (1996) Trends Neurosci. 19:102-109 和 Lindvall 等, (1999) Mov. Disord. 14:201-205)。现已证明不同来源, 例如造血、胚胎干细胞移植在严重帕金森病患者中产生若干益处 (Freed, CR 等, “Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson’s disease (严重帕金森病的胚胎多巴胺神经元移植)”. N Engl J Med 2001; 344:710-719)。

[0008] 进行性多发性硬化症患者也可体会到相似的益处 (Ni XS 等., (2006) “Autologous hematopoietic stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: report of efficacy and safety at three yr of follow up in 21 patients (进行性多发性硬化症的自体造血干细胞移植: 21 位患者中 3 年随访的效力和安全性报道)”. Clin Transplant. 20:485-9) (进一步提示 MS 治疗应将免疫调节与神经保护性调节, 例如细胞治疗相结合以实现最大的治疗益处)。

[0009] 此外, 在具有中度进行性亨廷顿病的 3 位非痴呆患者中首次研究了人胎儿到成年人纹状体移植。1 年时的磁共振成像评估记录了移植物存活和生长情况, 周围的组织未置换。所有患者在认知功能的某些方面得到改善 (Kopyov 等, (1998) J. Exp. Neurol. 149:97-108)。还参见 Date 等, (1997) J. Exp. Neurol. 147:10-17。

[0010] 基于治疗性细胞的治疗的已知模型和方法各自需要外科手术介入, 即, 采用不靶向中枢神经系统的受损区域的侵入性移植技术和 / 或全身性递送方法移植神经干细胞。提供能以非侵入性和高度靶向方式供应治疗性细胞 (包括但不限于神经干细胞) 的方法、药物组合物和 / 或制品或试剂盒是极具优势的。

[0011] 例如, 优选采用能避免全身性接触的方法将这种治疗性细胞递送至退化的中枢神经系统。目前已知的方法或药物组合物均不能提供这种优势。本发明通过将治疗性细胞施加于鼻腔上三分之一处来提供这些优点, 从而能绕过血脑屏障并将治疗性细胞和其它化合物直接递送至中枢神经系统。

[0012] 本发明的某些实施方式包括用鼻部和 / 或粘膜抗生素帮助保护对象患者以免在施加治疗性细胞和 / 或药物化合物后鼻部细菌沿神经通路迁移。这种抗生素熟知是局部应用的, 但不知道与治疗性细胞和 / 或药物化合物的鼻内应用组合作为预处理、共同治疗和 / 或后续治疗而全身性和 / 或鼻内给予。

[0013] 例如, 在一个研究中, 涂抹在鼻内的莫匹罗星将感染率减半或更高。金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus) 是一种广泛分布的细菌, 其通常寄居在约 25-30% 的所有住院

患者的鼻孔中,而不会造成伤害。但该细菌可污染手术部位,导致严重的、经常是致死性的感染,特别是在免疫系统虚弱的人中。

[0014] 另一项研究发现鼻木糖醇 (nasal xylitol) (在保健食品店中出售的非处方药) 能减少鼻部细菌以及减弱它们驻留在鼻粘膜上和感染鼻粘膜中细胞的能力。其它研究发现防卫素 (人粘膜中发现的一种天然抗生素) 能保护免遭细菌感染并增强保护性免疫功能。哺乳动物防卫素是由宿主编码的小的、阳离子性抗菌肽,认为它们是先天免疫力的重要抗生素样效应物。通过利用树突细胞和 T 细胞上的趋化因子受体,防卫素还可能调节抵御微生物侵袭的宿主继承性免疫力。防卫素具有强大的免疫学佐剂活性, β -防卫素或选择的趋化因子与独特型淋巴瘤抗原相连产生了强效的抗肿瘤疫苗。某些趋化因子具有抗微生物活性的报道支持了防卫素和趋化因子之间在功能上有重叠。虽然在活性和总体四级结构上显示相似性,但防卫素和趋化因子之间的进化关系尚未测定 (De Yang 等, *Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal* (免疫力中的哺乳动物防卫素: 不仅是抗菌). *Trends Immunol.* 2002 年 1 月; 23(6): 291-612072367)。

[0015] 此外,熟知包括营养性和生长因子,例如促红细胞生成素 (EPO)、脑源性神经营养因子 (BDNF)、神经生长因子 (NGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF) 和表皮生长因子 (EGF) 的调节剂在干细胞的体外和体内存活和分化中起到至关重要的作用 (Erickson 等, *Roles of insulin and transferrin in neural progenitor survival and proliferation* (胰岛素和转移在神经祖细胞存活和增殖中的作用). *J Neurosci Res.* 2008 年 2 月 21 日; Bossolasco 等, *Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro* (人骨髓干细胞的体外神经-胶质分化). *Exp Neurol.* 2005 年 1 月; 193(2): 312-25)。在同时应用 EPO 的情况中,外科手术移植细胞显示存活更好 (Kanaan 等, *Exogenous erythropoietin provides neuroprotection of grafted dopamine neurons in a rodent model of Parkinson's disease* (在帕金森病的啮齿类模型中外源性促红细胞生成素为移植的多巴胺神经元提供神经保护作用). *Brain Res.* 2006 年 1 月 12 日; 1068(1): 221-9)。然而,将这些调节性因子或试剂与鼻内应用治疗性细胞和 / 或其药物组合物联合引入鼻腔的上三分之一处,从而能绕过血脑屏障是未知的。

[0016] 此外,熟知包含各种生长因子 (包括胰岛素样生长因子 -I (IGF-I)、神经生长因子 (NGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)) 的调节剂能调节外周和中枢神经系统发育期间神经细胞的存活和分化。调节剂,例如神经营养因子也是发育期间的神经生长所需的 (Tucker 等, (2001) *Nature Neurosci.* 4: 29-37)。在成熟的神经系统中,这些营养性因子维持神经细胞的形态学和神经化学特征并在功能性上加强了活性突触连接。这些调节因子可用于改善本发明的细胞置换治疗。

[0017] 例如, bFGF 增强体外神经元的存活和生长。此外,当移植的神经元经遗传学工程改造而表达 bFGF 时, bFGF 在体内对移植的神经元产生强效的生长促进作用 (Takayama 等, (1995) *Nat. Med.* 1: 53-8)。此外,植入将表皮生长因子和 bFGF 分泌入移植的胎儿腹侧中脑组织 (fetal ventral mesencephalic tissue) 的基于聚合物的生物活性棒改善了功能特征并提高了细胞存活 (Tornqvist 等, (2000) *Exp. Neurol.* 164: 130-138)。

[0018] 神经生长因子 (NGF) 还显示能影响 CNS 中的移植组织。例如,将胆碱能神经元移植入毗邻移植细胞含有 NGF- 释放性颗粒的脑组织中,该神经元中 ChAT 活性 (表明胆

碱能细胞活性的试验)显著升高(Mahoney等,(1999)Med. Sci. 96:4536-4539)。IGF-I也显示能促进有丝分裂后哺乳动物CNS神经干细胞的分化并影响人红细胞系祖细胞的凋亡。参见,例如Arsenijevic等,(1998)J. Neurosci. 18:2118-2128;Tanigachi等,(1997)Blood 90:2244-2252;Reboarcet等,(1996)J. Biol. Reprod. 55:1119-1125;Muta等,(1994)J. Clin. Invest. 94:34-43;和Muta等,(1993)J. Cell. Phys. 156:264-271。此外,现已证明某些生长相关蛋白,例如GAP-43和CAP-23起到促进受损轴突再生的作用,还可能支持脊髓和CNS再生。参见,例如Bomze等,(2001)Nature Neurosci. 4:38-43和Woolf等,(2001)Nature Neurosci. 4:7-9。

[0019] 然而,给予调节剂作为改善经历神经再生,即,基于治疗性细胞方案的哺乳动物的临床结果的手段遇到了困难。这些试剂通常不能全身性给予。此外,许多调节剂不能有效穿过血脑屏障。虽然脑室内给药是递送调节剂的有效方法,但其是临床情况中不优选的侵入性技术。植入含有调节剂的聚合物也是侵入性的,并且还受限于聚合物植入体中调节剂能诱发效应的半径较小。此外,虽然已对移植的细胞进行了遗传学改造以表达调节剂,但植入后细胞的稳定转染和存活仍成问题。

[0020] 本发明特别提供了这些问题的解决方法。

发明内容

[0021] 鉴于上述的情况,需要将治疗性细胞和/或药物组合物有效而非侵入性地递送至破坏和/或退化的中枢神经系统的方法。

[0022] 本发明特别涉及预防和/或治疗因疾病或其它病症导致CNS细胞丧失或死亡而受到破坏和/或退化的中枢神经系统。具体地说,本发明提供通过鼻内应用至鼻腔上三分之一处而将治疗有效量的至少一种治疗性细胞转运至CNS的方法、药物组合物和制品,从而绕过血脑屏障并避免了不良的全身性接触以及侵入性递送方法。

[0023] 本发明的各种实施方式包括鼻内预防、预治疗、后续治疗和/或作为药物组合物的组分,所述药物组合物包含治疗有效量的治疗性细胞和递送增强剂来增强治疗性细胞递送至CNS。还有其它实施方式包括至少一种鼻内和/或全身性应用的抗生素作为预治疗、共同治疗(同时给予或作为包含治疗性细胞的治疗组合物的组分给予)和/或后续治疗方法以在治疗性细胞治疗期间保护患者。还有其它实施方式包括将治疗有效量的至少一种调节剂给予至哺乳动物鼻腔上三分之一处作为预治疗、后续治疗和/或作为包含治疗性细胞的药物组合物的一部分。还有其它实施方式包括至少一种鼻内和/或全身性应用的免疫抑制剂作为预治疗、共同治疗(同时给予或作为包含治疗性细胞的治疗组合物的组分给予)和/或后续治疗方法在治疗性细胞治疗期间提高治疗性细胞的活力。本发明可用于改善经历神经再生方案的哺乳动物的临床结果,包括使得治疗性细胞直接运输到该哺乳动物的CNS中而绕过血脑屏障。

[0024] 本发明的各种实施方式涉及预防和治疗神经破坏和退化,即,CNS中细胞丧失和死亡以及所导致的结果的方法和药物组合物,包括但不限于治疗和改善具有以下医学病症风险或诊断到以下医学病症的患者因缺血和/或神经退化所致的记忆丧失:阿尔茨海默病、轻度认知缺损、年龄相关的记忆缺陷、帕金森病、脑血管疾病,包括中风,克罗伊茨费尔特-雅各布病、家族性肌萎缩性侧索硬化、路维小体痴呆症、动脉粥样硬化、精神分裂症、孤

独症、迟发性运动障碍、多发性硬化症、癫痫、威尔逊病、进行性核上性麻痹、哈-斯二氏综合征、多系统萎缩、亨廷顿病、家族性基底神经节变性、唐氏综合征、白内障、血色病、珠蛋白生成障碍性贫血、脑出血、蛛网膜下出血、颅脑损伤、脊髓损伤和影响 CNS 的代谢失调。

具体实施方式

[0025] 定义

[0026] 本文所用的“中枢神经系统”(CNS)指大脑和脊髓及相关组织。

[0027] 本文所用的“神经学病症和 CNS 疾病”指包括缺血的脑疾病和病症,即脑缺血、缺血、中风、神经退化、以下疾病所致的神经并发症,例如阿尔茨海默病、帕金森病、威尔逊病、路维小体痴呆症、多发性硬化症、癫痫、小脑性共济失调、进行性核上性麻痹、肌萎缩性侧索硬化、孤独症、情感障碍、焦虑障碍、影响 CNS 的代谢失调、和 / 或精神分裂;细胞破坏;以下疾病导致的神经破坏:脑血管疾病,例如脑或脊髓中风,包括脑膜炎和 HIV 在内的 CNS 感染,脑和脊髓肿瘤、朊病毒疾病和正常衰老、头和 / 或脑损伤或脊髓损伤所致 CNS 疾病(例如,嗅觉丧失)和任何其它医学疾病以及本文在神经细胞丧失、破坏和 / 或退化中提及的病症。

[0028] 细胞和 / 或试剂的“有效量”是足以预防、治疗、减轻和 / 或缓解上述病症或疾病的症状和 / 或潜在病因的用量。在一些情况中,“有效量”足以消除那些疾病的症状,并且可能克服疾病本身。优选地,对于长期或单次应用,剂量范围是 $50-10^8$ 个细胞的有效量的所述细胞,和 / 或剂量范围是 0.001-2.0mg/kg 的有效量试剂产生的组织浓度为每毫升组织 $10-10^5$ 个细胞,试剂为约 10^{-13} 摩尔到约 10^{-5} 摩尔,但浓度可以更高只要能避免毒性。

[0029] 就本发明而言,术语“治疗”和“疗法”等指已导致或正导致 CNS 中细胞死亡的现有疾病或病症的缓解、减缓其进展、预防、减弱或治愈。本文所用的“防止”指推迟、延迟、减缓、抑制或终止、减轻或缓解这些疾病或病症的发作。优选在无毒性水平应用足够大量的细胞和 / 或试剂,从而提供抵御疾病的有效水平活性。本发明方法可用于任何动物,例如哺乳动物或鸟(禽),更优选哺乳动物。家禽是优选的鸟类。示范性哺乳动物包括但不限于:大鼠、小鼠、猫、狗、马、牛、绵羊、猪,更优选人。

[0030] 本文将“治疗性细胞”定义为包括通过鼻内施加于对象鼻腔上三分之一处而运输入经历细胞置换治疗的对象的受损和 / 或退化 CNS 中的至少一种或一类细胞,例如但不限于神经干细胞。治疗性细胞可源自任何来源,可以处于发育分化各阶段,只要该治疗性细胞足以防止或减轻按照本发明细胞置换疗法治疗的神经学病症、疾病和 / 或状况的形态学和 / 或行为神经学症状。此外,应知道治疗性细胞可以是宿主异体或自体的。异体是要表示该治疗性细胞源自患者对象以外的哺乳动物,而自体治疗性细胞源自该患者对象,该治疗性细胞经离体操作并通过本发明方法输回患者对象的 CNS 中。还可采用本发明(方法)将治疗性淋巴细胞给予至鼻腔上三分之一处从而能靶向中枢神经系统和淋巴。淋巴细胞起到部分身体防御的功能,包括天然杀伤细胞(NKT 细胞)、T 细胞和 B 细胞。这种细胞可用于治疗脑肿瘤和其它 CNS 及淋巴疾病。下文进一步讨论了治疗性细胞,各方面均包括在“治疗性细胞”的定义中。

[0031] 本文所用的“调节剂”指对本发明的移植供者细胞具有生长、增殖、分化或营养作用的任何分子。可通过本发明方法给予能调节移植的供者细胞发育的任何调节剂。参见,例如通过引用纳入本文的 Mackay-Sim 等, (2000) Prog. Neurobiol. 62:527-559。下文进一

步讨论了调节剂,各方面均包括在“调节剂”的定义中。

[0032] 就本发明而言,术语“治疗”和“疗法”及“治疗性”等指已涉及 CNS 细胞丧失或死亡的 CNS 受损或退化的缓解、减缓其进展、预防、减弱或治愈。该定义还包括推迟、延迟、减缓、抑制或终止、减轻或缓解涉及 CNS 细胞丧失或死亡的 CNS 受损或退化。本发明方法可用于任何动物,例如哺乳动物或鸟(禽),更优选哺乳动物。家禽是优选的鸟类。示范性哺乳动物包括但不限于:大鼠、小鼠、猫、狗、马、牛、绵羊、猪,更优选人。

[0033] 本文所用的术语“分化”和“成熟”指某细胞从可能分化成至少两个不同细胞谱系的阶段变成特定细胞的进程。出于本发明的目的,这些术语可互换使用。术语“谱系”指从最早的祖细胞到完全成熟细胞(即,特定细胞)所有阶段的发育细胞类型。因此,转运的本发明治疗性细胞可以源自多能细胞谱系,优选神经谱系,可以处于分化的任何阶段。因此,本发明包括经天然编程而只分化成一类谱系的治疗性细胞。这些类型的细胞可包括一些种类的成纤维细胞或简单分化的星形神经胶质细胞、神经元、少突胶质细胞、小胶质细胞或内皮细胞,它们可源自或恰好分离自死亡供者的组织。

[0034] 下文讨论了这些术语的其它方面,各方面均包括在这些术语的定义中。

[0035] 本文所用的术语“多能干细胞”指能分化成各种谱系的细胞。多能治疗性细胞,例如干细胞的特征在于它们能经历连续的细胞增殖以再生自身的精确拷贝(自身更新),从而产生大量的区域性细胞后代,并且对损伤或疾病起反应而产生新细胞。“多能细胞群体”指不能分化成细胞的所有谱系但至少能分化成两种细胞谱系的细胞的组合物。目前的研究业已证明来自非神经区域的多能干细胞不局限于它们发育起点的谱系,在接触合适的环境诱因时能产生区域特异性神经元(Lamga 等,(2001)J. Neurosci. 20:8727-8735)。

[0036] 本文将“神经干细胞”定义为存在于神经系统中的不成熟以及未定型多能细胞(Ourednik 等,(1999)Clinical Genetics 56:267-278)。在特定条件下,神经干细胞能产生最终能分化成神经元和神经胶质(即,星形细胞(I 和 II 型)和少突胶质细胞)的子细胞。它们同时存在于发育中的神经系统和成年人神经系统中。神经干细胞的详细表征可见,例如 McInnes 等,(1999)Clin. Genet. 56:267-278。

[0037] “神经元祖细胞”是源自神经干细胞,并且经特定分化途径而定型的未分化细胞,其不显示自我维持,其合适条件下会分化成成神经细胞(产生神经元的细胞)或成纤维细胞(产生神经胶质的细胞)。本领域已知将用于移植的这种多能神经细胞谱系。参见,例如 Snyder 等,(1992)Cell 68:33,其中多能神经元细胞系移植入大鼠小脑以形成神经元和神经胶质细胞。还可参见 Campell 等,(1995)Neuron 15:1259-1273;Fishell 等,(1995)Development 121:803-812;Olsson 等,(1995)Eur. J. Neurosci. 10:71-85。

[0038] 本文将“缺血”或“缺血事件或情况”定义为包括其中大脑或大脑的诸部分未接受足够的血流以维持正常的神经学功能的缺血情况,从而导致 CNS 细胞丧失或死亡以及相伴的 CNS 破坏和/或退化。各种情况和/或疾病可导致缺血,包括但不限于中风。本文定义和讨论的一些 CNS 的神经学病症和疾病的特征在于一定水平的缺血。本文定义和讨论的 CNS 的神经学病症和疾病适合于采用本发明治疗性细胞置换方案治疗。

[0039] 包含治疗性细胞的本发明药物组合物的治疗性细胞和/或组分的“有效量”是足以预防、治疗、减轻和/或缓解述及的任何病症或疾病的症状、神经元破坏和/或潜在病因的用量。在一些情况中,“有效量”足以消除那些疾病症状和克服疾病本身。仅出于说明性目

的,下文提供了通常涉及本文所述治疗剂的示范性治疗方案,包括剂量范围、体积和频率:

[0040] 递送增强剂、调节剂、免疫抑制剂和/或抗生素的有效剂量范围包括 0.0001-1.0mg/kg。

[0041] 更优选的剂量范围可以是 0.005-1.0mg/kg。

[0042] 最优选的剂量范围可以是 0.05-1.0mg/kg。

[0043] 治疗性细胞的有效量,即,有效剂量范围包括 50 个细胞- 10^8 个细胞。

[0044] 治疗性细胞的更优选剂量范围包括 10^3 个细胞- 10^8 个细胞。

[0045] 治疗性细胞的最优选剂量范围包括 10^4 个细胞- 10^8 个细胞。

[0046] 剂量体积(适用于鼻喷剂或滴剂)范围可以是 0.015ml-1.0ml。

[0047] 优选的剂量体积(适用于鼻喷剂或滴剂)范围可以是 0.03ml-0.6ml。

[0048] 对于单次剂量,以上提供的剂量范围可能达到的脑浓度为:每 ml 组织 $10-10^8$ 个细胞和 0.1nM-5 μ M。在多剂量治疗方案期间,最高脑浓度可以高达每 ml 组织 10^6 个细胞,50 μ M 的递送增强剂、调节剂、免疫抑制剂和抗生素。

[0049] 因此,本发明提供方法和药物组合物以改善用于再生神经组织的细胞疗法,所述组织已遭任何 CNS 疾病或病症破坏或正经历退化,即,CNS 细胞丧失或死亡。本发明范围内的 CNS 病症包括,例如头损伤、脊髓损伤、中风和缺血。本发明范围内的 CNS 疾病还包括神经退化性疾病,例如但不限于包括缺血的大脑疾病和病症,即大脑缺血、缺血、中风、神经退化、以下疾病所致的神经学并发症,例如阿尔茨海默病、帕金森病、威尔逊病、路维小体痴呆症、多发性硬化症、小脑性共济失调、进行性核上性麻痹、肌萎缩性侧索硬化、情感障碍、焦虑障碍、孤独症和/或精神分裂;细胞破坏;以下疾病导致的神经破坏:脑血管疾病,例如脑或脊髓中风,包括脑膜炎和 HIV 在内的 CNS 感染,脑和脊髓肿瘤,朊病毒疾病和正常衰老、头和/或脑损伤或脊髓损伤所致 CNS 疾病(例如,嗅觉丧失)和/或影响 CNS 的代谢障碍。

[0050] 因此,本发明的实施方式可用于增强经历神经再生,即基于细胞的方案的动物中遭破坏神经元组织的再生或修复,所述方案包括通过所述动物鼻腔上三分之一处将至少一种治疗性细胞鼻内应用入该哺乳动物的 CNS,从而绕过血脑屏障以治疗涉及缺血和/或 CNS 细胞丧失或死亡的 CNS 神经学疾病或病症。

[0051] 包括将供者细胞移植入宿主 CNS 的神经再生方案是本领域已知的。然而,治疗性细胞绕过血脑屏障是未知的,因此通过鼻内施加于鼻腔上三分之一处将这种细胞直接转运入宿主对象的受损或退化 CNS(是未知的)。利用至少一种递送增强剂有助于治疗性细胞的转运,利用至少一种免疫抑制剂有助于治疗性细胞的活力,和/或利用至少一种调节剂进行发育调节,同时可利用至少一种抗生素使患者免遭绕过血脑屏障的粘膜细菌的感染,各组分可通过本发明方法给予,如下文进一步讨论的,可全身性和/或鼻内给予治疗方法的某些组分。

[0052] 绕过血脑屏障的转运途径

[0053] 嗅觉神经

[0054] 本发明的各种方法包括将本发明的治疗性细胞和/或药物组合物给予受嗅神经支配的组织,其位于鼻腔上三分之一处。可通过施加于鼻腔上三分之一处将本发明的治疗性细胞和/或药物组合物递送至嗅觉区域。

[0055] 嗅神经的纤维是位于鼻粘膜上三分之一处的嗅觉受体细胞的无髓鞘轴突。嗅觉受

体细胞 是双极神经元,其伸入鼻腔内隆起 (swelling) 覆盖有毛发样纤毛。在另一端,这些细胞的轴突集中成聚集体,进入鼻顶部的颅腔 (cranial cavity)。嗅觉神经围绕有软膜的薄管,穿过含有 CSF 的蛛网膜下隙并进入嗅球下面。一旦将本发明的治疗性细胞和 / 或药物组合物施加至鼻腔的上三分之一处,本发明的治疗性细胞和 / 或药物组合物可经鼻粘膜转运入嗅球和 CNS 的其它区域,例如嗅前核、额皮质、海马结构、扁桃样核、迈内特基底核、下丘脑、中脑、小脑、颈部脊髓等。

[0056] 神经元转运

[0057] 本发明方法的实施方式包括通过施加于哺乳动物对象鼻腔上三分之一处而将本发明治疗性细胞和 / 或药物组合物给予该对象。以此方式施加的本发明治疗性细胞和 / 或药物组合物确保所述治疗性细胞和 / 或药物组合物沿神经通路转运至 CNS、大脑和 / 或脊髓,从而减少全身性损失和全身性接触。神经通路包括通过或借助流过神经元的淋巴,通过或借助流过神经元或神经通路的血管的血管周隙,通过或借助流过神经元或神经通路的血管的外膜,或通过血管淋巴系统 (hemangiolymphatic system) 而在神经元内或沿着神经元转运。

[0058] 本发明包括治疗性细胞和 / 或药物组合物通过神经通路,而不是通过循环系统的转运,因此可将不能 (或难于) 穿过血脑屏障而从血流进入大脑的调节剂递送至淋巴系统、CNS、大脑和 / 或脊髓。本发明治疗性细胞和 / 或药物组合物一旦通过血脑屏障并进入 CNS,即可通过淋巴通道,通过血管周隙,或通过或沿着神经元转运而递送至大脑或脊髓的各区域。在一个实施方式中,治疗性细胞迁移至 CNS 内破坏和 / 或退化的区域。

[0059] 利用神经通路将调节剂转运至大脑、脊髓或中枢神经系统的其它组分避开了血脑屏障所设置的障碍,因此,能将正常情况下不能穿过该屏障的药物,即,本发明的治疗性细胞和 / 或药物组合物直接递送至 CNS,例如大脑和脊髓。此外,本发明能将更浓缩水平的本发明治疗性细胞和 / 或药物组合物递送至神经细胞,因为本发明的治疗性细胞和 / 或药物组合物不会被血流中存在的液体稀释。因此,本发明提供将本发明治疗性细胞和 / 或药物组合物递送至包括大脑和 / 或脊髓在内的 CNS 的改善方法。

[0060] 嗅神经通路

[0061] 本发明的一个实施方式包括将调节剂递送至对象,所述递送方式使得调节剂能沿嗅神经通路转运入 CNS,例如大脑和 / 或脊髓。这种实施方式通常包括将调节剂给予受嗅神经支配的鼻腔内组织。嗅神经通路主要支配鼻腔上三分之一处的嗅觉上皮,如上所述。将调节剂施加于受嗅神经支配的组织能将该调节剂递送至 CNS、大脑和 / 或脊髓的受损神经元或细胞。嗅神经元支配该组织,据信,因为它们在嗅觉中起作用而能直接连接 CNS、大脑和 / 或脊髓。

[0062] 通过嗅神经元途径递送可利用淋巴系统,该系统经嗅神经到达大脑各区域并从该处进入 CNS 各部分 (例如脊髓) 相关的硬脑膜淋巴系统。沿嗅神经转运还能将调节剂递送至嗅球。血管周围通路和 / 或血管淋巴通路,例如流过大脑血管外膜的淋巴隙可为将治疗性调节剂从受嗅神经支配的组织转运至大脑和脊髓提供额外的机制。

[0063] 可通过,例如位于鼻腔上三分之一处的嗅觉上皮将治疗性细胞和 / 或其药物组合物递送至嗅神经。这种给药可采用调节剂的胞外或胞内 (例如,跨神经元 (transneuronal)) 顺行和逆行转运,从而通过嗅神经进入大脑及其脑膜,进入脑干或进入

脊髓。一旦治疗性细胞和 / 或其药物组合物在受嗅神经支配的组织中或其上分散, 该治疗性细胞和 / 或其药物组合物和 / 或诸组分可经该组织转运并沿嗅神经元运输入 CNS 的诸区域, 包括脑干、小脑、脊髓、脑脊液、嗅球和皮层及皮层下结构。

[0064] 本发明通过将治疗性细胞和 / 或包含治疗性细胞的药物组合物施加于鼻腔上三分之一处而绕过血脑屏障。本发明的治疗性细胞和 / 或药物组合物通过筛板 (cribriform plate) 中的孔从鼻粘膜沿嗅神经通路迁移入 CNS。参见下文的实施例 1, 其提供了以假定方式绕过血脑屏障的实验性证据。

[0065] 因此, 利用神经通路对鼻腔给药能将本发明的治疗性细胞 (包括但不限于真核细胞和干细胞) 和 / 或包含治疗性细胞的药物组合物递送至淋巴系统、脑干、小脑、脊髓及皮层和皮层下结构。单用本发明治疗性细胞和 / 或药物组合物可促进进入 CNS, 即大脑和 / 或脊髓的这种迁移。或者, 运载体和 / 或递送增强剂可有助于本发明治疗性细胞和 / 或药物组合物进入和沿着神经通路转运。因此, 将本发明治疗性细胞和 / 或药物组合物给予至鼻腔上三分之一处通过自鼻粘膜和 / 或上皮到 CNS, 即大脑和脊髓的转运系统而绕过了血脑屏障。

[0066] 本发明的各种实施方式将本发明的治疗性细胞和 / 或药物组合物给予至受嗅神经支配的组织。这种神经系统可直接连接外部环境与大脑, 因此能将调节剂有利地递送至 CNS, 包括大脑、脑干和 / 或脊髓。本发明治疗性细胞和 / 或药物组合物不能穿过或不能有效地穿过血脑屏障而自血流进入大脑。因此, 本发明方法能借助嗅神经而非循环系统来递送本发明治疗性细胞和 / 或药物组合物。该给药方法能将本发明治疗性细胞和 / 或药物组合物有效递送至 CNS、大脑或脊髓而没有全身性损失或接触。

[0067] 按照本发明的各种实施方式, 可将免疫抑制剂和 / 或抗生素单独或在包含治疗性细胞的药物组合物中全身性递送或递送至鼻腔上三分之一处。

[0068] 其它通路

[0069] 上述嗅神经通路的其它通路包括技术人员熟知的沿着支配鼻腔的其它神经的通路, 例如三叉神经通路。

[0070] 治疗性细胞

[0071] 本发明的治疗性细胞可源自任何胎儿或成年哺乳动物组织, 包括骨髓, 或神经组织, 包括来自海马、嗅觉上皮、嗅球、室下区域、小脑、脊髓、皮层 (即, 运动或躯体感觉皮层)、纹状体、基底前脑 (胆碱能神经元)、腹侧中脑 (黑质的细胞) 和蓝斑 (中枢神经系统的神经肾上腺素细胞 (neuroadrenaline cell)) 的组织。此外, 治疗性细胞可包括但不限于: 神经和 / 或多能干细胞、神经祖细胞、遗传改造的细胞、t- 细胞和 / 或自体细胞。

[0072] 发育中的和成年动物中枢神经系统含有本发明特别感兴趣的可作为治疗性细胞的神经干细胞和祖细胞群体。本领域已知源自不同发育阶段的不同组织的各种神经祖细胞的分离和移植方法, 包括, 例如纹状体皮层 (Winkler 等, (1998) Mol. Cell. Neurosci. 11:99-116; Hammang 等, (1997) Exp. Neurol. 147:84-95); 皮层 (Brustle 等, (1998) Nat. Biotechnol. 16:1040-1044 和 Sabate 等, (1995) Nat. Genet. 9:256-260); 人端脑 (Flax 等, (1998) Nature 392:18-24 和 Vescovi 等, (1999) Neuron 11:951-966); 海马 (Gage 等, (1995) J. Neurobiol. 36:249-266 和 Suhonen 等, (1996) Nature 383:624-627); 基底前脑 (Minger 等, (1996) Exp. Neurol. 141:12-24); 腹侧中脑 (Winkler 等, (1998) Mol.

Cell. Neurosci. 11:99-116 ;Svendsen 等, (1996)Exp. Neurol137:376-388 ;Hammang 等, (1997)Exp. Neurol. 147:84-95 ;Studer 等, (1997)Nat. Neurosci. 1:290-295 ;Milward 等, (1997)J. Neurosci. Res. 50:862-871) ;和室下区域 (Milward 等, (1997)Milward 等, (1997)J. Neurosci. Res. 50:862-871)。这些参考文献各自通过引用纳入本文。此外,分离神经干细胞后代的方法和促进它们分化的方法也可见通过引用纳入本文的美国专利号 6,071,889 和美国专利号 6,103,530。

[0073] 本发明的治疗性细胞还可以是神经旁起源的。这种细胞的优选实施例是肾上腺髓状嗜铬细胞。参见,例如 Bjorklund 等, (1985)Neural Grafting in the Mammalian CNS(哺乳动物 CNS 中的神经移植)(阿姆斯特丹:埃尔赛维公司(Elsevier)),第 3-11 页和 Lindvall 等 (1997)Ann. Neurol22:457-468,其证明嗜铬细胞可用于治疗帕金森病。

[0074] 非神经来源但经改变能产生神经学感兴趣的物质的本发明治疗性细胞也属于本发明的范围内。优选的细胞类型是易于获得和培养的人包皮成纤维细胞(参见,例如美国专利号 6,060,048)。这种细胞优选采用本领域已知的方法作了遗传学改变来表达神经生长因子、神经递质、神经肽或参与脑代谢的酶。参见,例如通过引用纳入本文的 Gage 等, (1987)Neurosci. 23:795-807 ;Rosenberg 等, (1988)Science242:1575-1578 ;Shimohama 等, (1989)Mol. Brain Res. 5:271-278。或者,源自非神经元来源的治疗性细胞,例如上皮细胞可以转变或转分化成不同类型的神经元细胞。参见,例如美国专利号 6,087,168。

[0075] 可先遗传学改变本发明的治疗性细胞再移植入宿主。本文所用的术语“遗传学改变”指引入了外来核酸,例如 DNA 的细胞。可通过各种技术引入外来核酸,包括但不限于磷酸钙介导的转染、DEAE-介导的转染、显微注射、病毒转化、原生质体融合和脂质转染。遗传学改变的细胞可以瞬时或长期的方式表达外来核酸。当外来 DNA 未稳定整合入转染细胞的染色体 DNA 时,通常发生瞬时表达。相比之下,当外来 DNA 稳定整合入转染细胞的染色体 DNA 时,发生外来 DNA 的长期表达。

[0076] 这种感兴趣的基因包括神经递质-合成酶(即,酪氨酸水解酶 (TH) 和胆碱乙酰基转移酶)。这种方法是本领域公知的。例如,分离了来自大脑各种区域并处于不同发育阶段的治疗性供者细胞,并通过遗传学改变使之无限增殖化。例如,利用病毒 myc(v-myc) 癌基因使嗅觉和小脑细胞无限增殖化,从而产生具有神经元和神经胶质表型的细胞系 (Ryder 等, (1990)J. Neurobiol. 21:356)。Snyder 等 ((1992)Cell68:33) 进行的类型研究产生了多能神经元细胞系,这些细胞系可植入大鼠小脑以形成神经元和神经胶质细胞。在其它研究中,用含有 c-myc 的逆转录病毒载体使小鼠神经上皮细胞无限增殖化,并用生长因子培养从而形成类似于星形细胞和神经元的分化细胞类型 (Barlett 等, (1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA85:3255)。

[0077] 此外,鼻内递送的本发明治疗性遗传学工程改造的细胞可包含能进入 CNS 并释放患者的 CNS 中缺乏或缺失的物质的“生物学工厂”。例如,在脂质贮积病 (lipid storage disease) 和遗传性代谢障碍,例如苯丙酮尿症 (PKU)、威尔逊病、泰-萨病 (Tay Sachs)、溶菌酶体贮积病 (lysosomal storage diseases) 或尼曼-皮克病 (Nieman Pick disease) 中,自出生起大脑中即有某种酶缺失。本发明的治疗性细胞可包含该特定的缺失酶。然后可将这种遗传学工程改造的治疗性细胞递送至鼻腔上三分之一处,从而细胞能绕过血脑屏障并进入大脑以实施缺失的代谢功能。更具体地说,本发明的遗传学工程改造的治疗性细

胞可用作迷你“生物学工厂”，从而产生和释放一种或多种有益于有此需要的对象的以下物质：酶、生长因子、抗炎剂、神经递质、神经调节物质、抗氧化剂等。或者，本发明的治疗性遗传学工程改造细胞可包括分泌促性腺激素释放激素的遗传学工程改造细胞以增强有此需要的对象的生育力。

[0078] 递送增强剂

[0079] 本发明可利用某些化合物，即递送增强剂来帮助治疗性细胞递送至中枢神经系统和其中受损的区域。优选的递送增强剂包括透明质酸酶，当在施加本发明治疗性细胞之前将其以有效量作为预处理施加于鼻腔上三分之一处，作为包含治疗性细胞的本发明药物组合物的组分，或作为不同化合物与治疗性细胞和 / 或药物组合物基本上同时鼻内施加至鼻腔上三分之一处时观察到能非常明显增加治疗性细胞递送至 CNS。据信，透明质酸酶作用于胞外基质中的透明质酸以增强治疗性细胞和 / 或包含治疗性细胞的药物组合物递送至 CNS。以下实施例 2 阐明了这种递送增强剂对治疗性细胞递送至 CNS 的效力。

[0080] 其它递送增强剂包括神经调节蛋白、迁移 - 诱导活性和白血病抑制因子。这些递送增强剂，例如透明质酸酶、亲脂性试剂、神经调节蛋白、迁移 - 诱导活性和白血病抑制因子可单独或以任何组合使用来增强本发明治疗性细胞递送至 CNS。因此，至少一种递送增强剂可用作预处理来转运治疗性细胞和 / 或药物组合物和 / 或用作包含治疗性细胞的药物组合物的组分。

[0081] 进一步增强本发明的治疗性细胞和 / 或包含治疗性细胞的药物组合物递送的其它递送增强剂包括酶抑制剂，特别是本领域熟知的蛋白酶抑制剂。蛋白酶抑制剂可包括但不限于：抗痛素、奥代美宁 (arphamenine) A 和 B、苄肼 HCl、AEBSF、CA-074、钙蛋白酶抑制剂 I 和 II、卡尔帕平 (calpeptin)、胃蛋白酶抑制剂 A、放线酰胺素、抑氨肽酶素、苯丁抑制素、硼亮氨酸 (boroleucine)、卡托普利、氯乙酰基 -HOLeu-Ala-Gly-NH₂、DAPT、抑二肽素 (diprotin) A 和 B、厄比内酯 (ebelactone) A 和 B、甲羟米辛 (foroxymithine)、亮肽酶素、胃蛋白酶抑制剂 A、磷酸阿米酮、抑肽酶、嘌呤霉素、BB1、大豆胰蛋白酶抑制剂、苯甲基磺酰氟化物、E-64、糜蛋白酶抑制素、1, 10- 二氮菲、EDTA 和 EGTA。

[0082] 还有其它递送增强剂包括但不限于：表面活性剂、胆盐、二氢夫西地酸钠、生物粘合剂、磷脂添加剂、混合的胶束、脂质体、或运载体、醇类、烯胺、阳离子聚合物、NO 供体化合物、长链两亲分子、小的疏水性穿透促进剂；水杨酸钠或水杨酸衍生物、乙酰乙酸的甘油酯、环糊精或 β - 环糊精衍生物、中链脂肪酸、螯合剂、氨基酸或其盐、N- 乙酰氨基酸或其盐、粘液溶解剂、特异性靶向选择的膜组分的酶、脂肪酸合成抑制剂和胆固醇合成抑制剂。本发明考虑单用或作为有效量的药物化合物而与治疗性细胞联用一种或多种，即至少一种以上递送增强剂。

[0083] 调节剂

[0084] 调节 CNS 中所递送治疗性细胞生长和分化的某些调节剂属于本发明的范围，包括，例如通过调节免疫和炎症反应而促进供者细胞存活的有效量的调节剂。这种调节剂包括，例如环孢菌素和各种其它免疫调节剂，包括白介素（即，IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10）；肿瘤坏死因子（即，TNF- α 和 TNF- β ）；干扰素（即，IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IFN- ω 和 IFN- τ ）；及其任何生物学活性变体。通过本发明方法给予这些免疫调节剂的其它细节可见 2000 年 12 月 9 日提交的，名为

“Methods for Administering a Cytokine to the Central Nervous System and the Lymphatic System(将细胞因子给予中枢神经系统和淋巴系统的方法)”的美国专利系列号 09/733, 168, 其通过引用纳入本文。

[0085] 本发明方法可用的其它调节剂包括 CAP23, 一种主要皮层细胞骨架相关的和钙调蛋白结合蛋白, 和 GAP43, 一种神经生长相关蛋白。参见, 例如 Frey 等, (2000) J. Cell. Biol. 7:1443-1453。感兴趣的其它试剂包括成骨蛋白 -1 (OP-1), 其是刺激生长、分化和分化维持的形态发生蛋白 (美国专利号 6, 153, 583); sonic hedgehog, 其显示能促进多巴胺能神经元存活的一种多肽 (Miao 等, (1996) Cell Transplant 55:2-17); 各种其它神经胶质生长因子 (美国专利号 5, 716, 930; 6, 147, 190 和 5, 530, 109); 和它们的任何生物学活性变体。所有这些参考文献通过引用纳入本文。

[0086] 属于本发明范围的其它感兴趣调节剂包括生长因子。本文所用的“生长因子”指能调节移植的供者细胞发育的多肽。可用于本发明方法的生长因子包括但不限于: 神经营养因子家族的成员 (即, 神经生长因子 (NGF)、脑源性神经营养因子 (BDNF)、神经营养因子 -3 (NT-3) 和神经营养因子 -4 (NT-4, 也称为 NT-4/5 或 NT-5); 成纤维细胞生长因子 (FGF, 即, 碱性成纤维细胞生长因子); 表皮生长因子家族 (即, EGF、TGF- α 、双向调节因子、肝素-结合 EGF-样生长因子 (HB-EGF)、乙胞素 (batacelluin) (BTC) 和神经调节蛋白组); 血小板衍生的生长因子; 胰岛素; 胰岛素-样生长因子 (即, IGF-I 和 IGF-2); 睫状节神经细胞营养因子 (CNTF)、神经胶质细胞系-衍生的神经营养因子家族 (GDNF) (即, GDNF 和神经营养因子 (neurturin) (NTN)、珀赛芬 (persephin) (PSP) 和阿特明 (artemin) (ART)); 转化生长因子 β 超家族 (即, 亚家族包括 TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3、TGF β 4、TGF β 5、苯丙酸诺龙、抑制素、皮肤生长因子 (decapentaplegic)); 生长分化因子 (GDF) (即, GDF1、GDF2、GDF3、GDF5、GDF6、GDF7、GDF8、GDF9、GDF9B、GDF10、GDF11 和 GDF15); 神经胶质衍生的微管连接蛋白; 活性依赖性神经营养因子 (ADNF); 神经胶质生长因子 (GGF); 等等。还知道这些生长因子的任何生物学活性变体可用于本发明方法。

[0087] 本发明的调节剂可来自任何动物种类, 包括但不限于: 啮齿类、禽类、犬、牛、猪、马和优选的人。所给予的调节剂优选来自所治疗动物的同一物种。

[0088] 本发明各种方法和药物组合中还包括调节性多肽 (即, 生长因子, 例如 IGF-I、NGF 和碱性 FGF、细胞因子等) 的生物学活性变体。这种变体应保留该调节剂的生物学活性, 特别是调节供者细胞发育的能力 (即, 促进存活、维持所需表型和 / 或调节供者细胞产生的发育指令)。例如, 当调节性多肽是生长因子, 例如 IGF-I、NGF 或 FGF 家族某一成员时, 则保留与它们各自受体位点结合的能力。可采用标准生物学测定检测这种受体结合活性。

[0089] 可用于本发明的一种这样的调节剂 (生长因子) 是 IGF-I。本文所用的术语“IGF-I”指胰岛素-样生长因子 I (IGF-I), 其是具有 70 个氨基酸, 分子量约为 7, 600 道尔顿的单链肽。胰岛素-样生长因子 I 刺激细胞发育相关的有丝分裂和生长过程。本领域已知 IGF-I 的氨基酸和核苷酸序列。参见, 例如美国专利号 5, 324, 639 公开了人 IGF-I 序列; Genbank 登录号 X15726 公开了牛 IGF-I 的序列; Genbank 登录号 X06043 公开了大鼠 IGF-I 的序列。这些参考文献各自通过引用纳入本文。

[0090] 在本发明的另一实施方式中, 调节剂可包含生长因子的 FGF 家族成员和 / 或其生物学活性变体。成纤维细胞生长因子家族包括以高亲和力结合肝素的一组结构相关蛋白

质。FGF 家族成员具有促分裂原活性,诱导各种细胞类型的增殖。FGF 家族成员还参与血管生成、分化、细胞迁移、胚胎发育和神经元维持/存活。本文所用的术语“FGF”指成纤维细胞生长因子家族的成员,包括,例如 FGF-1(酸性 FGF)、FGF-2(碱性 FGF)、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-8、FGF-9、FGF-98、或其生物学活性片段或变体。本领域熟知许多 FGF 家族成员的氨基酸序列及其制备方法。

[0091] 在本发明的另一实施方式中,调节剂可以是神经生长因子(NGF)或其生物学活性变体。最初分离的 NGF 是分子量为 130kDa、沉降系数为 7S 的复合物。该 7S 复合物包含三类亚基,其中“ β ”亚基具有 NGF 的所有生物学活性。神经生长因子刺激细胞,特别是神经细胞的有丝分裂和生长过程并调节发育(即,影响修复、存活和分化)。通过引用纳入本文的美国专利号 5,288,622 提供了人前-原-NGF 和人成熟 NGF 的优选氨基酸序列。

[0092] 本发明所用的 NGF 可采用其基本上纯化、天然、重组产生的形式或化学合成的形式。例如,可从天然表达 NGF 的细胞直接分离 NGF。NGF 还可在真核细胞或原核细胞表达系统中重组产生,例如通过引用纳入本文的 Edwards 等,(1988)Mol. Cell. Biol. 8:2456;美国专利号 5,986,070 和美国专利号 6,005,081 所述。或者,本发明的调节剂可包含促红细胞生成素(EPO)、脑源性神经营养因子(BDNF)和表皮生长因子(EGF)。本文所述的各调节剂在本发明方法和药物组合物中的治疗性细胞的体内存活和分化中起至关重要的作用。

[0093] 通过本发明方法单独给予或与治疗性细胞组合给予有效量的至少一种调节剂,即,鼻内给予至鼻腔上三分之一处可调节转运至 CNS 的治疗性细胞的发育。本文的短语“调节发育”表示调节剂增强所转运治疗性细胞的存活、分化、轴突发育、树突细胞发育和/或增殖;改善所转运治疗性细胞与周围组织的粘附(即,掺入实质组织);改善转运的治疗性细胞与宿主神经元建立突触连接的能力(即,增强供者细胞中的神经纤维形成;增加供者细胞的神经纤维的伸展长度;或提高供者细胞的神经纤维密度);和/或给转运的治疗性细胞发出定型为特定神经谱系的指令(即,采取神经元(γ -氨基丁酸能神经元、多巴胺能神经元、胆碱能神经元、海马神经元等)、星形细胞或寡聚树突细胞(oligodendritic cell)命运)。还应知道调节剂能通过调整对象的免疫反应而增强移植的供者细胞的存活。“调整”表示下调免疫或炎性反应(即,影响全身性免疫功能、抗原呈递、细胞因子产生、淋巴细胞增殖和淋巴细胞及巨噬细胞进入 CNS)。

[0094] 此外,给予调节剂已知通过影响移植的供者细胞释放的发育指令(即,促进供者细胞释放神经递质,例如多巴胺、乙酰胆碱、GABA 或其它神经保护因子)来调节侵入性移植的供者细胞的发育。因此,可通过本发明的非侵入性方法提高周围宿主组织的功能和修复(即,增强神经纤维形成、神经纤维的伸展长度和/或神经纤维密度)。

[0095] 将有效量的一种或多种,即至少一种调节剂递送至哺乳动物的 CNS 可通过给予包含治疗有效剂量的该试剂的药物组合物来实现。或者,可将有效量的所述至少一种调节剂作为施加本发明药物组合物和/或治疗性细胞的预治疗、共同治疗和/或后续治疗而鼻内递送至鼻腔上三分之一处和/或全身性递送。“有效量”表示就调节供者细胞的发育而言,有效引发所需治疗作用的调节剂浓度,如本文所述。因此,与仅用细胞置换方案治疗的动物相比,有效量的调节剂提升了细胞置换疗法的临床结果。因此,可通过所治疗 CNS 病症相关神经缺陷的减轻来测定治疗有效剂量,因此其特征在于临床结果的改善。

[0096] 定量测定神经损伤的程度和测定 CNS 病症是否已得到治疗的方法是本领域技术

人员熟知的。这种方法包括但不限于组织学方法、分子标记试验和功能 / 行为分析。例如, 可通过检测各种功能, 包括认知、感觉、运动和内分泌的恢复情况来测定供者细胞的功能性整合是否增强和 / 或周围神经元组织的功能和修复是否增强。运动测试包括定量测定远离大脑退化侧的旋转运动的那些测试和测定运动的平衡性、协调性、缓慢性、僵硬性和颤抖的那些测试。认知测试包括记忆测试和空间学习。用于测试神经学疾病的治疗情况的具体试验根据该疾病而有所不同。

[0097] 有利于转运的治疗性细胞发育的所需生物学活性包括, 例如增强所转运治疗性细胞的存活和 / 或增殖; 改善所转运治疗性细胞与宿主神经元建立突触连接的能力; 和 / 或对所转运治疗性细胞发出定型为特定神经谱系的指令。本领域已知测定这些事件的方法。例如, 可采用各种非侵入性扫描, 例如计算机控制轴向断层扫描术 (CAT 扫描或 CT 扫描)、核磁共振或磁共振成像 (NMR 或 MRS) 或正电子发射断层摄影 (PET) 扫描测定给予调节剂后所转运治疗性细胞存活有无改善。或者, 可通过显微检测所转运治疗性细胞的移植区域来死后测定所转运治疗性细胞的存活情况。可通过, 例如测定所转运治疗性细胞的特异性分子标记, 或者通过事先掺入痕量染料来鉴定所转运治疗性细胞的区域。这种染料包括, 例如罗丹明 - 或荧光 - 标记的微球、速蓝 (fast blue) 或逆转录病毒引入的组织化学标记。

[0098] 有效量取决于许多因素, 例如, 所治疗的 CNS 病症、移植入哺乳动物的供者细胞的类型和经历治疗的对象的反应。还应知道治疗有效量将取决于所转运治疗性细胞的发育调节的所需类型 (即, 增强所转运治疗性细胞的存活和 / 或增殖; 改善所转运治疗性细胞与宿主神经元建立突触连接的能力; 调节所转运治疗性细胞释放的发育指令; 或改善周围神经组织的功能和修复情况)。本领域技术人员已知测定效力和剂量的方法。

[0099] 例如, 在帕金森病中, 退化的神经元是黑质的多巴胺能神经元。晚期帕金森病患者的细胞置换方案是已知的, 包括, 例如纹状体内移植 6 到 9 周龄人胚胎的黑质多巴胺能神经元 (Olanow 等, (1996) Trends Neurosci. 19:102-109 和 Lindvall 等, (1999) Mov. Disord. 14:201-205)。将药理学活性的调节剂递送至受帕金森病影响的脑区域 (即, 中脑和黑质) 是本领域已知的, 然而, 与鼻内递送治疗性细胞组合从而绕过血脑屏障未知。

[0100] 如本文所用的, 采用本发明给药方法与转运的本发明治疗性细胞和 / 或包含治疗性细胞的药物组合物联用来治疗帕金森病的调节剂的“有效量”足以减少或减轻帕金森病的临床症状。因此, 本发明方法给予的有效量调节剂 (即, 生长因子) 将增强为治疗帕金森病而在本发明指导下实施的细胞置换方案。因此, 与单用细胞置换方案治疗的动物相比, 本发明方法提高了所治疗动物的存活和 / 或改善了临床状态。帕金森病临床状态的改善包括, 例如腹侧中脑移植效率的改善 (就阿朴吗啡诱导的旋转运动降低而言)、纹状体神经支配密度的增强和神经元存活的增强 (Tornqvist 等, (2000) Exp. Neurol. 164:130-138)。

[0101] 亨廷顿病的特征在于进行性神经退化, 特别是在纹状体和皮层中, 其诱导运动和认知功能严重损伤。目前的细胞置换疗法通过移植纹状体祖细胞替换从纹状体到其它结构, 例如苍白球的抑制性连接。将药理学活性的调节剂递送至受亨廷顿病影响的脑区域 (即, 尾状壳核、丘脑、间脑 (diencephalon)、小脑和额皮层) 是本领域已知的, 然而, 从未与本发明的治疗性细胞和 / 或包含治疗性细胞的药物组合物联用从而绕过血脑屏障。

[0102] 如本文所用的, 采用本发明给药方法来治疗亨廷顿病的调节剂的“有效量”足以减少或减轻亨廷顿病的临床症状。因此, 本发明方法给予的有效量调节剂 (即, 生长因

子)将增强为治疗亨廷顿病而在本发明指导下通常实施的细胞置换方案。因此,与单用细胞置换方案治疗的动物相比,本发明方法提高了所治疗动物的存活和/或改善了临床状态。临床状态的改善包括,例如苍白球输出的解抑制、降低运动兴奋过度、恢复复杂的运动和认知行为、和受损纹状体中新的习惯学习系统的重建。参见,例如 Bjorklund 等,(1994) *Functional Neural Transplantation*(功能性神经元移植)(雷文公司(Raven),纽约),第 157-195 页;Dunnett 等,(1995) *Behav. Brain Res.* 66:133-142;Kendall 等,(1998) *Nat. Med.* 4:727-729;Palfi 等,(1998) *Nat. Med.* 4:963-966;Brasted 等,(1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:10524-10529;和 Wictorin 等,(1992) *Prog. Neurobiol.* 38:611-639;所有这些参考文献通过引用纳入本文。通过本发明方法给予调节剂将足以改善细胞置换疗法的临床结果。本领域技术人员不难采用这些试验来测定为有效治疗亨廷顿病而选择的剂量范围和/或合适的调节剂。

[0103] 例如,心脏停搏或冠状动脉阻塞,或脑动脉阻塞或中风可造成 CNS 缺血性损伤(以及导致细胞丧失和死亡)。已采用各种细胞置换方案重建了缺血性事件后受损的 CNS 的神经回路。例如,对于病灶缺血性事件,已进行了将胚胎纹状体移植入受损的纹状体(Hodges 等(1994) *Functional Neural Transplantation*(功能性神经移植)(雷文公司,纽约),第 347-386 页)和移植源自人畸胎瘤细胞系的神经元(Borlongan 等,(1998) *Exp. Neurol.* 149:310-321 和 Borlongan 等,(1998) *Neuroreport* 9:3703-3709)。参见,例如 Hodges 等,(1996) *Neurosci.* 72:959-988;Sorensen 等,(1996) *Exp. Neurol.* 138:227-235 和 Sinden 等,(1997) *Neurosci.* 81:599-608。

[0104] 如本文所用的,治疗缺血性损伤的调节剂的“有效量”足以减少或减轻缺血性事件的临床症状。因此,本发明方法给予的有效量调节剂将增强为治疗缺血性损伤而通常按照本发明实施的细胞置换方案。临床状态的改善包括,例如梗塞大小、水肿和/或神经缺陷减少(即,运动、感觉、平衡运动(vestibulomotor)和/或躯体感应功能恢复的改善)。改善还包括神经缺陷的减轻,因而改善了运动、感觉、平衡运动和/或躯体感应功能的恢复。

[0105] 测定缺血性事件是否得到治疗,特别是缺血性损伤(包括梗塞大小、水肿和神经缺陷产生)是否减轻的方法是本领域技术人员熟知的。例如,缺血性损伤后, $\omega 3$ (外周型苯并二氮杂)结合位点的密度显著增加(Benazodes 等,(1990) *Brain Res.* 522:275-289)。检测 $\omega 3$ 位点的方法是已知的,可用于测定缺血性损伤的程度。参见,例如 Gotti 等,(1990) *Brain Res.* 522:290-307 及其中引用的参考文献。或者,可利用生长相关蛋白-43(GAP-43)作为缺血性事件后新轴突生长的标记。参见,例如 Stroemer 等,(1995) *Stroke* 26:2135-2144 和 Vaudano 等,(1995) *J. Neurosci.* 15:3594-3611。还可通过经治疗的哺乳动物中运动机能、认知功能、感知觉、说话的改善和/或癫痫倾向性的降低来检测疗效。用于评估感觉运动和反射功能的这种功能/行为测试描述于,例如 Bederson 等,(1986) *Stroke* 17:472-476;DeRyck 等,(1992) *Brain Res.* 573:44-60;Markgraf 等,(1992) *Brain Res.* 575:238-246;Alexis 等,(1995) *Stroke* 26:2338-2346。还可采用斯基的纳维亚中风量表(SSS)或巴塞尔指数检测神经元存活的改善情况。本领域技术人员不难采用这些试验来测定为有效治疗缺血性事件而选择的剂量范围和/或合适的调节剂。

[0106] 在鼻内转运入 CNS 以绕过哺乳动物中的血脑屏障后,出于调节本发明治疗性细胞发育的目的,治疗有效量或剂量的调节剂可包括约 0.002 毫克/公斤-约 2.0 毫克/公斤

体重或约 0.03 毫克 / 公斤 - 约 0.6 毫克 / 公斤体重。或者,可给予 0.0004、0.001、0.005、0.007、0.009、0.01、0.04、0.06、0.08、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 或 2.0 毫克 / 公斤体重的调节剂。还应知道较低剂量范围的某些调节剂(即,ADNF)可能是优选的。在这些实施方式中,可以给予约 0.1ng/kg - 约 20ng/kg 的调节剂。或者,可以给予 0.2、0.4、0.6、0.8、1、2、4、8、12、15、18 和 19 纳克 / 公斤体重的调节剂。

[0107] 抗生素制剂

[0108] 在各种实施方式中,本发明还可包括有效量的至少一种抗生素,或者可采用在将本发明药物组合物施加至鼻腔上三分之一处之前给予至少一种抗生素预治疗,或它们的任何组合,以保护经历治疗性细胞治疗的患者。此外,可全身性和 / 或通过施加至鼻腔上三分之一处来递送抗生素作为预治疗、共同治疗和 / 或后续治疗。本发明利用这种抗生素是为了降低施加治疗性细胞和 / 或药物组合物期间鼻腔内发现的细菌可能进入鼻腔上三分之一处的鼻组织,穿过血脑屏障并感染 CNS 内其它组织的风险。所关注的特定组织包括但不限于:大脑、脑膜、血液、脊髓和其它外周组织。优选的实施方式是用抗生素预治疗患者和 / 或在将递送增强剂,例如透明质酸酶施加于鼻腔上三分之一处的同时治疗患者。

[0109] 单用或组合使用以帮助保护接受本发明治疗性细胞和 / 或药物组合物的患者的本发明所用示范性抗生素包括:莫匹罗星、防卫素、庆大霉素、遗传霉素、头孢甲肟(cefminoxime)、青霉素、链霉素、木糖醇、或其它抗生素。本领域技术人员不难知道参考文献中大量报道了这种抗生素在鼻部治疗中的应用,然而,将这种鼻部治疗与治疗性细胞和 / 或包含治疗性细胞的药物组合物的鼻内施加于鼻腔上三分之一处联用来绕过血脑屏障未见报道。

[0110] 免疫抑制剂

[0111] 本发明的其它实施方式还可包括有效量的至少一种免疫抑制剂,通过保护治疗性细胞免遭宿主免疫活性细胞的炎性反应和 / 或活化而增强其活力。免疫抑制剂可以作为预治疗、与治疗性细胞和 / 或药物组合物同时和 / 或作为治疗性细胞和 / 或药物组合物的后续治疗而递送。这种免疫抑制剂治疗与施加至鼻腔上三分之一处的治疗性细胞和 / 或药物组合物联用可改善这种细胞的存活。

[0112] 当 CNS、鼻粘膜和鼻粘膜与 CNS 之间的神经通路的宿主免疫活性细胞检测到施加的本发明治疗性细胞时,可导致宿主免疫活性细胞的炎性反应和 / 或活化。这一系列事件会降低治疗性细胞的存活。因此,可在将治疗性细胞施加于鼻腔上三分之一处之前、期间和 / 或之后利用免疫抑制剂,从而在治疗性细胞的存活和活力中起着至关重要的作用。可将免疫抑制剂鼻内施加于鼻腔上三分之一处和 / 或全身性施加。在本发明中可单用或组合使用的常规且熟知的免疫抑制剂包括环孢菌素 A、他克莫司、泼尼松龙、硫唑嘌呤、甲基泼尼松龙、霉酚酸酯和西罗莫司。另一种免疫抑制剂包括施加表达 Fas 配体的遗传工程改造细胞。

[0113] 药物组合物

[0114] 除了给予至哺乳动物鼻腔上三分之一处的有效量的至少一种治疗性细胞外,可将药物组合物施加或给予至鼻腔上三分之一处。除有效量的至少一种治疗性细胞外,这种药物组合物可包含,例如至少一种上文所述调节剂、至少一种上文所述递送增强剂、至少一种抗生素和 / 或至少一种免疫抑制剂,均如上文所述并且下文还将进一步描述。本发明的药物组合物可与采用全身性施加和 / 或施加至鼻腔上三分之一处的至少一种调节剂、递送增

强剂、抗生素和 / 或免疫抑制剂的任何组合的预治疗、共同治疗和后续治疗组合。

[0115] 在可与药物组合物中的治疗性细胞组合的备选方案中,能增强调节剂经鼻腔粘膜或上皮吸收从而到达 CNS 中受损和 / 或退化的细胞的递送增强剂是,例如亲脂性试剂。调节剂可单独与亲脂性试剂或辅助剂混合或与运载体组合,或者可与一种或几种类型的胶束或脂质体物质组合。优选的亲脂性物质是包含一种或多种磷脂酰胆碱、脂质转染试剂、DOTAP 等的阳离子脂质体。

[0116] 优选的递送增强剂包括透明质酸酶,当将其作为施加本发明治疗性细胞的预治疗,或作为包含治疗性细胞的本发明药物组合物的组分施加至鼻腔上三分之一处时观察到能非常明显增加治疗性细胞递送至 CNS。其它递送增强剂包括神经调节蛋白和迁移 - 诱导活性。这些递送增强剂,例如透明质酸酶、亲脂性试剂、神经调节蛋白、迁移 - 诱导活性可单独或以任何组合使用来增强本发明治疗性细胞递送至 CNS。因此,至少一种递送增强剂可用作预治疗方法来转运治疗性细胞和 / 或药物组合物和 / 或作为包含治疗性细胞的药物组合物的组分。

[0117] 本发明的药物组合物还可包含至少一种抗生素,或者可在将药物组合物施加至鼻腔上三分之一处之前采用抗生素预治疗,或它们的任何组合,来保护经历治疗性细胞疗法的患者。此外,可将抗生素作为预治疗、共同治疗和 / 或后续治疗而鼻内和 / 或全身性给予。本发明利用这种抗生素是为了降低施加治疗性细胞和 / 或药物组合物期间鼻腔内发现的细菌可能进入鼻腔上三分之一处的鼻组织,穿过血脑屏障并感染 CNS 内其它组织的风险。所关注的特定组织包括但不限于:大脑、脑膜、血液、脊髓和其它外周组织。优选的实施方式是用抗生素预治疗患者和 / 或在单独递送增强剂,例如透明质酸酶或包含在药物组合物中施加于鼻腔上三分之一处的同时治疗患者。

[0118] 单用或组合使用以帮助保护接受本发明治疗性细胞和 / 或药物组合物的患者的本发明所用示范性抗生素包括:莫匹罗星、防卫素、庆大霉素、遗传霉素、头孢甲肟、青霉素、链霉素、木糖醇、或其它抗生素。本领域技术人员不难知道参考文献中大量报道了这种抗生素在鼻部治疗中的应用。

[0119] 本发明还可包括至少一种免疫抑制剂,其可以作为预治疗、与治疗性细胞和 / 或药物组合物同时和 / 或作为治疗性细胞和 / 或药物组合物的后续治疗而递送。这种免疫抑制剂治疗与施加至鼻腔上三分之一处的治疗性细胞和 / 或药物组合物联用可改善这种细胞的存活。当 CNS、鼻粘膜和鼻粘膜与 CNS 之间的神经通路的宿主免疫活性细胞检测到施加的本发明治疗性细胞时,可导致宿主免疫活性细胞的炎性反应和 / 或活化。这一系列事件会降低治疗性细胞的存活。因此,可在将治疗性细胞施加于鼻腔上三分之一处之前、期间和 / 或之后利用免疫抑制剂,从而在治疗性细胞的存活和活力中起着至关重要的作用。可将免疫抑制剂鼻内施加于鼻腔上三分之一处和 / 或全身性施加。在本发明中可单用或组合使用的常规且熟知的免疫抑制剂包括环孢菌素 A、他克莫司、泼尼松龙、硫唑嘌呤、甲基泼尼松龙、霉酚酸酯和西罗莫司。另一种免疫抑制剂包括施加表达 Fas 配体的遗传工程改造细胞。

[0120] 此外,本发明药物组合物可包含能促进该制剂在受三叉神经或嗅神经支配的组织内转运或通过该组织转运,或沿着或通过神经通路转运的任何药学上可接受的添加剂、运载体和 / 或辅助剂。

[0121] “药学上可接受的运载体”是本领域中常规用于促进本发明药物组合合物中治疗性细胞、调节剂、递送增强剂、抗生素和 / 或免疫抑制剂的储存、给予和 / 或生物学活性的运载体。运载体还可降低这种药物组合合物中组分的任何不良副作用。合适的运载体应是稳定的, 即, 不能与制剂中的其它成分反应。在治疗所采用的剂量和浓度下, 其不应在受者中产生明显的局部或全身性不利作用。这种运载体通常是本领域已知的。

[0122] 本发明各种实施方式的合适运载体包括常规用于大的稳定大分子的那些运载体, 例如白蛋白、明胶、胶原、多糖、单糖、聚乙烯吡咯烷酮、聚乳酸、聚乙醇酸、多聚氨基酸、不挥发性油、油酸乙酯、脂质体、葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露糖、右旋糖、葡聚糖、纤维素、甘露醇、山梨醇、聚乙二醇 (PEG), 等。其它药物组合合物可包含微粒、用作细胞粘合材料的有机和无机化合物以及在本发明各种实施方式中可转运至 CNS 的细胞聚集体, 从而减少了细胞从鼻粘膜转运至 CNS 的损失。这些化合物可包括几类粘合分子、凝胶 (用作细胞的包裹和 / 或 包埋材料)、胞外基质的组分和有机和 / 或无机颗粒, 例如纤维蛋白或粘连蛋白碳 - 或粘土 - 和葡聚糖颗粒以及它们的组合物。

[0123] 水、盐水、水性右旋糖和甘油是优选的液体运载体, 尤其是 (等渗时) 对于溶液。这些运载体可选自各种油, 包括石油、动物、植物或合成来源的那些油, 例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油, 等等。合适的药物赋形剂包括淀粉、滑石粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸镁、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇, 等等。可对这些组合合物进行常规药学处理, 例如灭菌, 可含有常规药物添加剂, 例如防腐剂、稳定剂、润湿剂或乳化剂、调节渗透压所用的盐、缓冲剂, 等等。当运载体是液体时, 该运载体优选与体液是低渗或等渗的, pH 在 4.5-8.5。

[0124] 药物组合合物中的其它可接受组分包括但不限于: 等渗性修饰剂, 例如水、盐水和包含磷酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、乙酸和其它有机酸或它们的盐的缓冲液。药学上可接受的运载体通常还包括一种或多种稳定剂、还原剂、抗氧化剂和 / 或抗氧化剂螯合剂。本领域熟知缓冲液、稳定剂、还原剂、抗氧化剂和螯合剂在制备蛋白质组合合物, 特别是药物组合合物中的应用。参见, 例如 Wang 等, (1980) J. Parent. Drug Assn. 34(6):452-462; Wang 等, (1988) J. Parent. Sci. Tech. 42:S4-S26 (增刊); Lachman 等, (1968) Drug and Cosmetic Industry 102(1):36-38, 40, 和 146-148; Akers (1988) J. Parent. Sci. Tech. 36(5):222-228; 和 Methods in Enzymology (酶学方法), 第 XXV 卷, Colowick 和 Kaplan 编, “Reduction of Disulfide Bonds in Proteins with Dithiothreitol” (用二硫苏糖醇还原蛋白质中的二硫键), Konigsberg, 第 185-188 页。

[0125] 本发明药物组合合物的各种实施方式包含合适的缓冲液, 例如乙酸盐、己二酸盐、苯甲酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、马来酸盐、磷酸盐、酒石酸盐、硼酸盐、三 (羟甲基氨基甲烷)、琥珀酸盐、甘氨酸、组氨酸、各种氨基酸的盐, 等等, 或它们的组合。参见, Wang (1980), 同时, 第 455 页。合适的盐和等渗调节剂 (isotonicifier) 包括氯化钠、右旋糖、甘露醇、蔗糖、海藻糖等。

[0126] 本发明组合合物的各种实施方式还可包含合适的还原剂, 其维持还原性半胱氨酸的还原状态并包括 0.01%-0.1%wt/wt 的二硫苏糖醇 (DTT, 也称为 Cleland 试剂) 或二硫赤藓糖醇; 0.1%-0.5% 的乙酰半胱氨酸或半胱氨酸 (pH2-3); 和 0.1%-0.5% 的硫代甘油 (pH3.5-7.0) 及谷胱甘肽。合适的抗氧化剂包括亚硫酸氢钠、亚硫酸钠、偏重亚硫酸钠、硫代

硫酸钠、甲醛次硫酸钠和抗坏血酸。螯合微量金属以防止微量金属催化还原性半胱氨酸氧化的合适螯合剂包括柠檬酸盐、酒石酸盐、乙二胺四乙酸 (EDTA) 的二钠、四钠和钙二钠盐、以及二亚乙三胺五乙酸 (DTPA)。参见, 例如 Wang (1980), 同上, 第 457-458 页和 460-461 页, 和 Akers (1988), 同上, 第 224-227 页。

[0127] 本发明药物组合物的各种实施方式还可包含一种或多种防腐剂, 例如苯酚、甲酚、对氨基苯甲酸、BDSA、硝酸异山梨醇酯、氯己定、苯扎氯铵等。合适的稳定剂包括碳水化合物, 例如海藻糖或甘油。组合物可包含稳定剂, 例如一种或多种微晶纤维素、硬脂酸镁、甘露醇或蔗糖以稳定, 例如组合物的物理形式; 和甘氨酸、精氨酸、水解胶原或蛋白酶抑制剂中的一种或多种以稳定, 例如组合物的化学结构。

[0128] 本发明药物组合物的各种实施方式还可包含合适的悬浮剂, 例如羧甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、透明质酸、藻酸盐、硫酸软骨素、葡聚糖、糊精麦芽糖、硫酸葡聚糖等。组合物可包含乳化剂, 例如聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 80、普朗尼克 (pluronic)、三油精、大豆油、卵磷脂、角鲨烯和角鲨烷、失水山梨糖醇三油酸酯 (sorbitan trioleate) 等。

[0129] 本发明药物组合物还可包含至少一种抗微生物剂, 例如苯乙醇、苯酚、甲酚、苯扎氯铵、苯氧乙醇、硫柳汞 (thimerosal) 等。合适的增稠剂包括天然多糖, 例如甘露聚糖、阿拉伯聚糖、藻酸盐、透明质酸、右旋糖等; 以及合成的多糖, 例如低分子量的 PEG 水凝胶; 上述悬浮剂可以包含在本发明药物组合物中。

[0130] 本发明药物组合物还可包含辅助剂, 例如十六烷基三甲基溴化铵、BDSA、胆酸盐、脱氧胆酸盐、聚山梨醇酯 20 和 80、夫西地酸等。合适的糖包括甘油、苏糖、葡萄糖、半乳糖、甘露醇和山梨醇。

[0131] 本发明药物组合物的各种实施方式还可包含一种或多种溶解度增强添加剂, 优选环糊精; 亲水性添加剂, 优选单糖或寡糖; 吸收促进添加剂, 优选胆酸盐、脱氧胆酸盐、夫西地酸或壳聚糖; 阳离子表面活性剂, 优选十六烷基三甲基溴化铵; 粘度增强剂, 优选促进组合物的在给药部位的驻留时间, 优选羧甲基纤维素、麦芽糊精、藻酸、透明质酸或硫酸软骨素; 或者缓释基质, 优选聚酐、聚原酸酯、水凝胶、颗粒缓释长效系统, 优选聚丙交酯共乙交酯 (PLG)、长效泡沫、淀粉微球或纤维素衍生的口腔系统; 基于脂质的运载体, 优选乳剂、脂质体、类脂囊泡 (niosome)、或胶束。该组合物可包含双层稳定性添加剂, 优选磷脂酰乙醇胺; 促融添加剂 (fusogenic additive), 优选胆固醇半琥珀酸酯。

[0132] 药物组合物还可包含增溶化合物以提高调节剂或其生物学活性变体的稳定性。对于 IGF-I, 优选的增溶剂包括能提高其溶解度的胍盐。这种增溶性化合物的例子包括在 pH5.5 或更高时保留了增强 IGF-I 或其生物学活性变体溶解度的能力的氨基酸精氨酸以及精氨酸的氨基酸类似物。这种类似物包括但不限于: 含有精氨酸的二肽和三肽。“增强溶解度”表示与 pH5.5 或更高时生长因子或其生物学活性变体在组分相同但缺乏含胍盐化合物的溶液中能溶解的量相比, 该蛋白质在有含胍盐化合物存在下, 在 pH5.5 或更高的溶液中溶解的量增加。可采用本领域熟知的方法测定含胍盐化合物增强生长因子或其生物学活性变体溶解度的能力。组合物中增溶性化合物的浓度通常已知是约 10mM- 约 1M, 例如, 以化合物精氨酸为例, 浓度范围是约 20mM- 约 200mM。

[0133] 运载体和添加剂的这些清单并不完整, 本领域技术人员可从药物制品所允许的 GRAS (通常视作安全的) 清单的化学品种和目前局部及胃肠外制剂所允许的那些化学品种中

择赋形剂。

[0134] 此外,本领域通常知晓配制药物组合物的方法。配制和选择药学上可接受的运载体、稳定剂和 isomolyte 的详细讨论可参见通过引用纳入本文的 Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿药物科学)(第 18 版;宾夕法尼州伊顿市马克出版公司(Mack Publishing Company, Eaton, Pa.), 1990)。

[0135] 出于本发明的目的,可将本文所述的药物组合物配制成用于施加到鼻腔上三分之一处的单位剂型以及诸如溶液、混悬液、或乳液等形式。要施加和给予至受嗅神经元支配的鼻腔组织上三分之一处的药物组合物可以是粉末、颗粒、溶液、喷剂(例如,气溶胶)、软膏、输注液、滴剂或缓释组合物,例如聚合物圆盘。用于给药的组合物的其它形式包括颗粒物的混悬液,例如乳液、脂质体、缓慢释放药物组合物的植入物,等等。粉末或颗粒形式的药物组合物可与溶液以及稀释剂、分散剂或表面活性调节剂相组合。组合物还可以是可在给药前转变成溶液、混悬液或乳液的冻干粉末形式。包含至少一种调节剂的药物组合物优选经膜过滤除菌,并保存在单位剂量或多剂量容器,例如密封的小瓶或安瓿中。

[0136] 治疗性细胞和 / 或药物组合物的给予

[0137] 按照本发明方法给予治疗性细胞可包括单独施加治疗性细胞或将治疗性细胞与一种或多种上述化合物配制成药物组合物并将该药物组合物鼻内给予至动物对象或宿主,包括人患者的鼻腔上三分之一处。可采用各种剂量之一来给予治疗性细胞和 / 或其药物组合物的其它组分,例如递送增强剂、调节剂、抗生素和 / 或免疫抑制剂,所述剂量足以在所需位点提供有效量的治疗性细胞和 / 或药物组合物组分。人和其它哺乳动物的剂量可以是约 0.001mg/kg - 约 100mg/kg, 优选约 0.01mg/kg - 约 10mg/kg, 优选约 0.1mg/kg - 约 1-10mg/kg。应注意,可将增强剂、调节剂、抗生素和 / 或免疫抑制剂作为治疗性细胞和 / 或药物组合物的预防、共同治疗和 / 或后续治疗而单独或作为药物组合物的某种组分递送,当不包含在药物组合物中时,可全身性递送或递送至鼻腔上三分之一处。

[0138] 对于作为混悬液、气溶胶、喷雾剂或滴剂施加到鼻腔上三分之一处,可根据药物制剂领域熟知的技术制备治疗性细胞和 / 或药物组合物。可用溶液将组合物制备成细胞悬液,所述溶液可包含盐,例如盐水,诸如磷酸盐、琥珀酸盐或柠檬酸盐缓冲剂等组分以维持 pH, 渗透调节和渗透剂,例如牛磺酸,以及合适的防腐剂,吸收促进剂以提高生物利用度,碳氟化合物或本领域已知的其它增溶剂或分散剂。将药物组合物鼻内施加至鼻腔上三分之一处的方式可以是各种形式,例如粉末、喷雾剂、凝胶或鼻滴剂。

[0139] 给予治疗性细胞和 / 或药物组合物或其成分的其它形式组合物包括颗粒物的混悬液,例如乳液、脂质体、或缓释形式以延长药学活性剂在个体中的存在时间。粉末或颗粒形式的药物组合物可与溶液以及稀释剂、分散剂或表面活性剂相组合。用于给药的其它组合物包含生物粘合剂以将该制剂维持在鼻腔上三分之一处的给药部位,例如施加于粘膜的喷雾剂、涂布剂或药签。生物粘合剂可指天然或合成的亲水性聚合物,从亲水性名称上可知其是水溶性或水可溶胀的,并与药物组合物相容。这种粘合剂起着将制剂粘附于鼻腔上三分之一处的粘膜组织的作用。这种粘合剂包括但不限于:羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素、乙基纤维素、羧甲基纤维素、葡聚糖、瓜尔胶、聚乙烯吡咯烷酮、果胶、淀粉、明胶、酪蛋白、丙烯酸聚合物、丙烯酸酯聚合物、丙烯酸共聚物、乙烯基聚合物、乙烯基共聚物、乙烯醇的聚合物、烷氧基聚合物、聚环氧乙烷聚合物、聚醚、和它们的组合。组合物还

可以是可在给药前转变成溶液、混悬液或乳液的冻干粉末形式。药物组合物优选经膜过滤除菌,并保存在单位剂量或多剂量容器,例如密封的小瓶或安瓿中。

[0140] 可将药物组合物配制成缓释形式以延长活性剂在受治疗个体中的存在时间。本领域已知制备缓释制剂的许多方法,参见“雷明顿药物科学”。通常可将治疗性细胞、药物组合物和/或药物组合物的诸组分,即,递送增强剂、调节剂、抗生素和/或免疫抑制剂包裹在固体疏水性聚合物制成的半透基质中。可将该基质制成薄膜或微囊的形式。基质可包括但不限于:聚酯、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸的共聚物、聚交酯、聚乳酸、聚乙醇酸、水凝胶、不可降解的乙烯乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物、透明质酸凝胶和藻酸混悬液。合适的微囊还可包含羟甲基纤维素或明胶和聚甲基丙烯酸甲酯。还可利用微乳剂或胶状药物递送系统,例如脂质体和白蛋白微球。

[0141] 递送系统

[0142] 还可将本发明治疗性细胞和/或包含治疗性细胞的药物组合物和/或该药物组合物的诸组分作为粉末化或液体鼻喷剂、混悬液、鼻滴剂、凝胶、薄膜或软膏,通过试管或导管、通过注射器、包装尾(packtail)、纱布(小的平坦吸收垫)、鼻塞或粘膜下输注而鼻内分散和施加到鼻腔上三分之一处。在本发明的一些方面,这些方法包括借助递送装置将治疗性细胞和/或其药物组合物给予至个体鼻腔上三分之一处。可利用装置递送鼻部药物,所述装置包括但不限于:单位剂量容器、泵喷雾剂、滴管、挤压瓶、无空气和无防腐剂的喷雾剂、喷雾器(用于将液体药物改成气溶胶颗粒形式的装置)、计量剂量的吸入器和加压的计量剂量吸入器。在一些方面,直接置于鼻腔的上三分之一处和其上的生物粘合剂贴片内含有精确的有效剂量。

[0143] 可利用加压包或喷雾器和合适的推进剂,包括但不限于二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、烃、加压空气、氮气或二氧化碳将本发明的治疗性细胞和/或包含治疗性细胞的药物组合物和/或治疗性组合物的诸组分以气溶胶喷雾剂的形式方便地递送到鼻腔上三分之一处。技术人员不难知道,气溶胶系统要求推进剂对于治疗性细胞和/或药物组合物是惰性的。以加压气溶胶为例,可通过提供阀门来控制剂量单位从而递送精确计量的量。

[0144] 将本发明治疗性细胞或包含治疗性细胞的药物组合物和/或药物组合物的诸组分作为粉末递送至鼻腔上三分之一处的方式可以是,例如通过鼻吹入器装置(将气体、粉末或蒸汽吹入体腔的装置)或加压气溶胶罐递送的微球等形式。吹入器产生精细分级的云雾状干粉或微球。可给吹入器提供确保给予基本上计量用量的药物组合物的器件。给予的粉末或微球应是干燥的、空气可分散的形式。粉末或微球可直接用于装有粉末或微球所用瓶子或容器的吹入器。或者,可将粉末或微球填充在胶囊,例如明胶胶囊,或适于鼻部给药的其它单剂量装置中。吹入器可具有诸如针头等器件来打开胶囊或其它装置以提供孔道,从而粉末组合物喷射物可通过该孔道递送至鼻腔上三分之一处。在该实施方式中,治疗性细胞可以是脱水和/或冻干的,随后在鼻粘膜中再水合。

[0145] 间断和循环给药

[0146] 在本发明的各种实施方式中,可将治疗性细胞和/或包含有效量的治疗性细胞的药物组合物和/或药物组合物的诸组分作为单剂量和单次剂量给予,或者可多次或间断给予治疗性细胞和/或药物组合物的诸组分。“间断给予”表示给予有效量的治疗性细胞和/

或药物组合物诸组分,停止一段时间,然后给予另一有效量,等等。可通过连续方式实现有效量的治疗性细胞和 / 或药物组合物诸组分的给予,例如利用缓释制剂,或者可按照所需每日剂量方案实现,例如每日给予一次、两次、三次或更多次。“停止一段时间”表示治疗性细胞和 / 或药物组合物诸组分的连续缓释或每日给予的中断。停止的时间可以长于或短于连续缓释或每日给药的时间。在停止期间,相关组织中治疗性细胞和 / 或药物组合物诸组分的水平基本上低于治疗期间达到的最高水平。停止时间的优选长度取决于所用治疗性细胞和 / 或药物组合物诸组分有效量的浓度和剂型。停止期间可以是至少 2 天,优选至少 4 天,更优选至少 1 周,通常不超过 4 周。当利用缓释制剂时,因为调节剂在受损部位的驻留时间更长而必须延长停止时间。或者,可随之降低有效剂量的缓释制剂的给药频率。给予治疗性细胞和 / 或药物组合物诸组分的间断方案可持续直至获得所需疗效并最终治疗疾病或病症。

[0147] 在还有另一实施方式中,有效量的治疗性细胞和 / 或药物组合物诸组分的间断给药是循环的。“循环的”表示在给药期间伴有中断的间断给药,其中周期从约 1 个月到约 2、3、4、5 或 6 个月。例如,给药方案可以是间断给予有效剂量的治疗性细胞和 / 或药物组合物诸组分,其中在 4 周期间每周给予一次短期剂量,然后停止间断给药 3 个月,再进行 4 周期间每周给予一次短期剂量的间断给药,然后停止间断给药 3 个月,等等。再例如,可以在 2 周期间每周给予一次短期剂量,然后停止间断给药 1 个月,再在 2 周期间每周给予一次短期剂量,然后停止间断给药 1 个月,等等。将治疗性细胞和 / 或药物组合物诸组分给予对象的循环间断方案可以持续直至获得所需疗效并最终治疗疾病或病症。

[0148] 出于调节治疗性细胞发育,从而减轻或防止所治疗神经学疾病的临床表现的目的,可在初始施加本发明治疗性细胞和 / 或药物组合物的数分钟、数小时、数天或甚至数周内鼻内给予一种或多种治疗有效剂量的至少一种调节剂。例如,可在施加本发明治疗性细胞和 / 或药物组合物后的约 2 - 4 小时内,约 2 - 6 小时内,约 8 小时内,约 10 小时内,约 15 小时内,约 24 小时内,约 36 小时、48 小时、72 小时、或约 96 小时或更长时间内给予初始治疗剂量的所述至少一种调节剂。可在初始剂量后的数小时、数日或数周期间给予一次或多次额外剂量的调节剂。此外,根据患者护理方案,可以随时间间断地给予经历本发明实施方式的细胞置换再生治疗的动物其它调节剂和 / 或治疗性细胞和 / 或药物组合物。因此,例如,可在初始施加之前、期间或之后给予经历细胞置换治疗的动物一次或多次治疗有效剂量的本发明调节剂、治疗性细胞和 / 或药物组合物。类似地,可在初始施加本发明治疗性细胞和 / 或药物组合物之前、期间或之后给予递送增强剂、免疫抑制剂和 / 或抗生素试剂。本文提供的间断和循环给药方案仅是示范性而非限制性的。本领域技术人员应知道各病例的各种给药方案 / 频率,各种这样的给药方案 / 频率属于本发明的范围。

[0149] 制品和制备方法

[0150] 本发明还包括提供本发明治疗性细胞和 / 或包含治疗性细胞的药物组合物和 / 或药物组合物诸组分的制品,从而鼻内给予至鼻腔上三分之一处,随后绕过血脑屏障并运输至 CNS。该制品可包括含有干燥或液体形式的适于本发明方法的组合物以及任何运载体的小瓶或其它容器。该制品还包括实施本发明方法的说明书,所述说明书可以是容器上的标签形式和 / 或包含在包装该容器的盒子中的插页形式。所述说明书还可以打印在包装小瓶的盒子上。所述说明书含有诸如有效剂量的信息和给药信息,从而某对象或本领域工作人

员能给予本发明的治疗性细胞和 / 或包含治疗性细胞的药物组合物和 / 或药物组合物的诸组分。预计本领域工作人员包括可能给予本发明的治疗性细胞和 / 或包含治疗性细胞的药物组合物和 / 或药物组合物的任何医生、护士、技术人员、配偶或其他护理人员。还可由该对象自己给予治疗性细胞和 / 或药物组合物的诸组分。

[0151] 参考以下实施例可以更好地理解本发明。这些实施例应是本发明具体实施方式的代表,而不是打算限制本发明的范围。

[0152] 实施例

[0153] 实施例 1- 在帕金森病大鼠模型中将治疗性细胞鼻内施加到鼻腔上三分之一处后能绕过血脑屏障

[0154] 发明人在健康啮齿类动物(小鼠和大鼠)和用 6-OHDA 处理从而产生帕金森病模型的大鼠中测试了治疗性细胞确实绕过了血脑屏障的假设。在本实施例中,将间充质干细胞,即真核细胞鼻内给予至成年健康小鼠的鼻腔上三分之一处和 6- 羟基多巴胺 (6-OHDA) 所致单侧病损大鼠来建立帕金森病患者的受损和 / 或退化 CNS 的模型。此外,将神经胶质瘤细胞鼻内给予至年轻健康大鼠的鼻腔上三分之一处。在给予 / 施加后 1 小时内,两种细胞类型到达健康动物的嗅球、皮层、海马、纹状体和小脑。在帕金森病的 6-OHDA 大鼠模型中,给药后 4 小时检测细胞。在两种情况中,细胞可能在不到 1 小时内到达大脑。细胞穿过筛板后,观察到两种迁移途径:(1) 迁移入嗅球,也迁移入大脑的其它部分,包括皮层和纹状体;和(2) 进入脑脊液,沿着皮层表面移动随后进入大脑实质。

[0155] 实施例 2- 递送增强剂对鼻内施加至鼻腔上三分之一处后治疗性细胞的运输的作用

[0156] 将 CFDA 或烟酸己可碱 (Hoechst) 染料标记的大鼠间充质干细胞 (MSC) 鼻内施加至 7 周龄 C57b1/6 小鼠的鼻腔上三分之一处,因而在治疗性细胞的给予和施加以及运输中绕过血脑屏障后,评估治疗性细胞鼻内递送至大脑的效率。

[0157] 首先,将动物分成三组(各组 n=5):1)A 组只接受鼻内治疗性细胞;2)B 组在鼻内施加细胞前 30 分钟鼻内接受递送增强剂透明质酸酶;3)C 组鼻内接受运载体(24 微升 PBS)。细胞施加 1 小时后,麻醉处死动物,-80℃ 冷冻颅骨,然后切成径向或横向的切片(20 微米),用含 DAPI 或 PI 的培养基固定,通过荧光显微镜分析。

[0158] 在只鼻内递送治疗性细胞的 A 组动物中,Hoechst 染料标记的细胞出现在嗅球、纹状体、皮层的所有层,心室外侧壁和附近,和小脑中。在嗅球中,细胞分布在 A 和 B 组动物的所有层中。与 A 组那些动物相比,鼻内给予透明质酸酶(B 组中 100U/ 动物)增加了大脑中 MSC 的数目,特别是在嗅球中。

[0159] A 和 B 组中 MSC 在不同皮层中的分布提示治疗性细胞从表面迁移到实质中。许多细胞定位于已到达皮层上层的 MSC 附近的蛛网膜下腔。这些细胞中的一些具有提示它们分化进展的过程。施加 1 小时后,大量的鼻内施加 CFDA- 标记 MSC 维持在上鼻腔,表明治疗性细胞从鼻粘膜经筛板进入大脑的迁移可能维持数小时,甚至可能数日。

[0160] 在一层中达到一定细胞密度后观察到细胞从皮层表面分步迁移入更深层中;更深层中的细胞聚集体只出现在接近皮层表面的细胞行列(cell row)附近。

[0161] 实施例 3- 鼻内施加至鼻腔上三分之一处后治疗性细胞靶向迁移到 CNS 内的病损处

[0162] 由于以上实施例获得和所述的结果显示除皮层,嗅球和小脑外,鼻内施加的治疗性细胞还出现在纹状体区域,我们决定利用在成年大鼠中以 6-OHDA 诱导单侧病损的模型来研究神经变性是否使所施加细胞的迁移靶向病损侧。

[0163] 通过单侧注射(左半球)神经毒素 6-羟基多巴胺(6-OHDA)在成年大鼠中诱导纹状体损伤从而诱导了帕金森型模型。将细胞施加给两组动物(各组中 n=5):1)在病损后 3 天鼻内给予细胞之前 30 分钟未用鼻内透明质酸酶治疗(200U/动物)或 2)在病损后 3 天鼻内给予细胞之前 30 分钟用鼻内透明质酸酶治疗(200U/动物)。施加细胞后 4 小时取出动物的大脑,-80℃冷冻。为显示 6-OHDA-病损后左(病损的)纹状体中的变性改变,将离前囟 5mm-8mm 的区域的各动物的 10 个横向切片作酪氨酸羟化酶(TH)染色。

[0164] 与无病损侧几乎全部纹状体被 TH 强烈染色相反,病损侧 TH 的表达明显降低。用荧光显微术筛选脑切片显示病损和对侧之间在细胞数量上有明显差异:大量 CFDA 标记的 MSC 位于嗅球(OB)、病损的皮层中和病损纹状体内,而只有极少细胞位于对侧半球的纹状体、皮层和 OB 中。在切片中,偶见一些 MSC 被 TH 染色:令人感兴趣的是,OB 中发现的 MSC 极少表达 TH,而位于病损附近皮层中的大量细胞是 TH 阳性的。

[0165] 这些结果提供了在 6-OHDA-病损啮齿类动物中,靶向干细胞优先迁移至病损部位的证据。此外,采用本发明实施方式证明与无病损侧的细胞相比,在病损半球中,骨髓干细胞更好地递送至大脑。

[0166] 实施例 4-在帕金森模型中鼻内施加至鼻腔上三分之一处后包含肿瘤细胞的治疗性细胞绕过血脑屏障

[0167] 本项研究调查了鼻内给予后,是只有治疗性干细胞,还是肿瘤细胞也可递送至大脑。将人 Φ -黄(Phi-Yellow)和 CFDA-标记的 T406 神经胶质瘤细胞鼻内给予至 10-日龄大鼠(n=5)鼻腔的上三分之一处。给予后 1 小时,处死动物。通过荧光显微术加工动物全脑(包括颅骨和大脑)的径向切片(20 微米)。在鼻腔、筛板、嗅球、额皮层和海马区域中鉴定到 CFDA-标记的神经胶质瘤细胞。

[0168] 在本项研究中,证明鼻内递送的真核细胞(干细胞以及肿瘤细胞)进入啮齿类动物的完整和病损大脑。脑肿瘤由细胞分裂异常或不受控导致的颅内肿瘤构成,其可以发生在大脑、脑膜、颅神经或中枢神经系统的血管或淋巴系统中。在儿童中,大多数原发性脑肿瘤发生在颅后窝(即,脑干神经胶质瘤),在成年人中,发生在大脑两半球的前部分。儿科脑肿瘤约占儿科癌症的四分之一。在美国,脑肿瘤每年造成约 10,000 例以上的死亡。大多数原发性脑肿瘤源自中枢神经系统中的神经胶质细胞。然而,从身体它处的癌症产生并转移至大脑的继发性脑肿瘤甚至更常见。肿瘤可从肺、皮肤、肾脏、乳腺、结肠和其它器官转移至大脑。

[0169] 脑肿瘤难以治疗,因为大多数化疗剂难以穿过血脑屏障并且不能安全而成功地除去某些类型的脑肿瘤,例如脑干神经胶质瘤,因为它们的位置接近大脑中控制关键性自律功能,例如呼吸、心脏功能等的区域。

[0170] 目前,开发和测试脑肿瘤的新疗剂的研究人员需要将肿瘤细胞手术植入动物的大脑以产生可用于测试新药物的动物脑肿瘤模型。我们在此证明通过将肿瘤细胞给予鼻腔上三分之一处可将它们非侵入性地引入大脑,并且利用透明质酸酶和其它试剂可促进该过程。因此,本实施例证明采用本发明的实施方式可非侵入性地产生脑肿瘤模型而没有神经

手术和直接植入肿瘤细胞的相关问题。

[0171] 已参考各种具体的和优选的实施方式及技术描述本发明。然而,应该知道可作出许多改变和改进而仍维持在本发明的构思和范围内。