



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101553565 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 06

(21) 申请号 200780034935. X

(22) 申请日 2007. 09. 11

(30) 优先权数据

RM2006A000498 2006. 09. 20 IT

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 03. 20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2007/059531 2007. 09. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/034740 EN 2008. 03. 27

(73) 专利权人 桑克斯特姆责任有限公司

地址 意大利乌迪内

(72) 发明人 A·加巴科塔 M·普莱蒂尼

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 陈迎春

(51) Int. Cl.

C12N 5/06(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1436843 A, 2003. 08. 20, 全文.

CN 1667119 A, 2005. 09. 14, 全文.

Yong Zhao et al. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. 《PNAS》. 2003, 第 100 卷 (第 4 期), p2426-2431.

审查员 方晓云

权利要求书1页 说明书9页 附图8页

(54) 发明名称

从血液特别是外周血扩增成体干细胞的方法
及在医药领域的相关应用

(57) 摘要

从血液,特别是但不仅限于外周血扩增成体干细胞的方法,其包含第一个步骤-血液干细胞的扩增,该步骤在取血后立即利用浓度为 8-15nM 的 MCSF 进行体外处理,以及第二个步骤-扩增的干细胞的纯化。

1. 从血液中扩增成体干细胞的方法,其包含下述步骤:
 - a) 第一个步骤 - 扩增血液干细胞,其在取血后立即利用浓度为 8-15nM 的 MCSF 体外处理进行,其中所述使用 MCSF 的体外步骤的持续时间为 24-96 小时,及
 - b) 第二个步骤 - 纯化扩增的干细胞。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述血液是外周血。
3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述使用 MCSF 的体外步骤的持续时间为 48-72 小时。
4. 权利要求 1 或 2 的方法,其中该体外处理在样品采集后不超过 10 分钟内立即开始。
5. 权利要求 4 的方法,其中该体外处理在样品采集后不超过 5 分钟内立即开始。
6. 权利要求 1 或 2 的方法,其中提供了进一步的步骤:
 - c) 利用浓度为 35-55nM 的 MCSF 进行体外处理扩增步骤 b) 中纯化的血液干细胞 24-72 小时。
7. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述步骤 a) 中的 MCSF 浓度是 10nM。
8. 权利要求 6 的方法,其中所述步骤 c) 中的 MCSF 浓度是 50nM。
9. 权利要求 6 的方法,其中所述步骤 c) 中的 MCSF 浓度是 45nM。
10. 权利要求 1 或 2 的方法,其中步骤 a) 中的 MCSF 体外处理持续 24-48 小时。
11. 权利要求 10 的方法,其中步骤 a) 中的 MCSF 体外处理持续 45-48 小时。
12. 权利要求 6 的方法,其中步骤 c) 中的 MCSF 体外处理持续 24-48 小时。
13. 权利要求 12 的方法,其中步骤 c) 中的 MCSF 体外处理持续 45-48 小时。
14. 权利要求 1 或 2 的方法,其中纯化步骤 b) 利用菲克梯度分级分离而进行。

从血液特别是外周血扩增成体干细胞的方法及在医药领域的相关应用

[0001] 本发明涉及从成年哺乳动物血液,尤其但不仅限于从外周血扩增干细胞的方法及在医药领域(特别是在兽医领域)用于治疗损害、慢性和/或急性炎症性病症、神经学的和神经变性的病症的相关应用。

[0002] 在本说明书的此处及下文,以及如在文献中所已知的,词汇“扩增”是指或者通过细胞分裂,或着如在本发明所公开和要求保护的特定情况下通过“去分化”增加细胞数目的方法,即,正如下文将要看到的,通过其存在于血液中的细胞经过合适的体外处理后转化成干细胞的方法。

[0003] 近年来,由于在治疗先前被认为不能治愈的多种病症中取得了成功,干细胞的治疗应用已经获得巨大的认可。然而,截止目前,已知的获取干细胞的方法仍然费力且花费巨大。

[0004] 多能干细胞(PSC)是可用的来源,其不仅用于研究,也用于创制药物和移植(Wagers A. J. 等人,2002 ;Griffith L. G. 等人,2002)。

[0005] 有两大类干细胞-胚胎干细胞和成体干细胞:第一类来源于胚胎,更确切地来源于8日龄的胚泡,与此相反,成体干细胞主要能从骨髓、脂肪、肌肉组织或外周血获取。

[0006] 干细胞的定义不断在更新,目前,没有分离或鉴别干细胞的普遍一致的意见或标准方法。对于所有这些胚胎干细胞(ES)和成体干细胞(造血干细胞(HSC)和间充质干细胞(MSC))(Kuwana M. 等人,2003),已经鉴定了不同的遗传标记,其中某些标记对许多细胞类型是共有的(Condomines M. 等人,2006 ;Kang W. J. 等人,2006 ;Zhao Y. 等人,2003 ;Rabinovitch M. 等人,1976)。

[0007] 特别地,Zhao 等人既在论文“A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells”(“人外周血单核细胞来源的亚型充当多能干细胞”)也在 WO 2004/043990 中公开了制备单核细胞来源的干细胞的方法,其包括下述步骤:分离外周血单核细胞,将它与促有丝分裂的成分接触,然后在适于该细胞增殖的条件下培养外周血单核细胞。

[0008] 该方法首先需要分离单核细胞的步骤,其次需要在培养基中的扩增步骤,为获取显著数目的干细胞,该方法需要15-20天的非常长的时间,并且不能获取全能型干细胞,全能型干细胞是非特异的、适于从第一次提取起在非常短时间内直接注射给患者的干细胞。

[0009] 很多科学工作描述了干细胞再生不同类型损害、再生由机械损伤的或由多种病症损伤的组织、从根本上消除产生损伤的原因而不是简单地作用于其效应上的能力。

[0010] 目前,研究被更多地导向于使用分离自胚胎组织、胎儿或脐带的干细胞,但这引起了各种法律问题和伦理问题。最重要的是,时至今日,这些细胞的使用带来了各种禁忌征,如:感染的风险、移植时的排斥风险以及在马类中发生畸胎瘤。

[0011] 因此,为避免这些问题,人们想到在“体内”治疗中优选使用分离自骨髓、脂肪组织或外周血的自体干细胞。这些从成体干细胞开始用起的方法提供了利用特定分化诱导因子在“体外”(或“离体”)分化干细胞为目标细胞系的步骤,以及随后的将获取的分化细胞系

“体内”移植的步骤。在这些方法中,限制归因于下述事实:由于再引入患者体内的分化细胞不被识别为自身细胞,发生可观察到的排斥现象,这是由于在体外诱导的分化步骤中,它们丧失了自身识别的因子。

[0012] 在人类中,从外周血中获取干细胞必须需要通过一个称为“单采血液成分术”或“白细胞单采血液成分术”的方法纯化它们。在实践中,从血液提取和收集细胞,然后在化疗或放疗后立即将其注射入患者。在单采血液成分术中,其持续6到8小时,从臂部静脉或颈部静脉或胸部静脉抽取血液,并使血液流过用于移除干细胞的机器。将由此纯化的血液输回患者,而收集的细胞利用液氮冷冻进行保藏(Condomines M. 等人,2006;Kang W. J. 等人,2006)。该技术不仅令患者疼痛,也令患者感到极度的压力。此外,它对于小型动物或大型动物也不适用;最重要的是,该技术未提供对循环系统中干细胞的真正辨别和/或纯化。

[0013] 目前,在兽医科学领域,干细胞主要在有损伤的肌腱和韧带的重建中得到成功应用。主要的纯化技术如下:

[0014] - 使用生长因子或血小板衍生物(TGF- β , VEGF),但提取这些物质的经济费用贵不可攀(Hou M. 等人,2006);

[0015] - 分离取自骨髓的干细胞。该技术仅能将包含在提取的物质中的15%的细胞进行纯化并将其用于治疗;

[0016] - 分离取自脂肪组织的干细胞。该技术需要从供体动物预先外科手术去除大量组织,且不允许静脉给药;

[0017] - 称作Tendotrophin的IGF-1(胰岛素样生长因子1)(Fiedler J. 等人,2006);

[0018] -UBM(膀胱基质):这是来源于猪的含有细胞因子的衍生物(但不是有核细胞),其诱导伤口的瘢痕形成而不是损伤区域的再生(Zhang Y. S. 等人,2005)。

[0019] 考虑到上面所有的因素,显然需要从容易取得的来源扩增和纯化成体干细胞的方法,其也必须能够获得适于用作医学-兽医领域药物的干细胞,一旦给药哺乳动物,该干细胞不引起排斥现象且易于保存。

[0020] 显然也需要获得多能干细胞和全能型干细胞(即非特异性的),能将其直接注射给患者,且具有比目前提供的那些短得多的生产时间。

[0021] 现在,本发明的发明人改善了从外周血体外扩增和纯化干细胞的方法,以能够获得干细胞,该干细胞不引起副作用,如排斥现象、感染、畸胎瘤,一旦给药于成年哺乳动物,其能“体内”分化并且表现为多能干细胞。

[0022] 本发明人观察到,根据治疗的动物的需求和病症,如此扩增的细胞一旦被局部或静脉注射,就在“体内”(不是在“体外”,如在本领域现状中利用合适的生长因子和/或化学刺激物的已知方法中(Gulati R. 等人,2003;Katz R. L. 等人,2002;Okazaki T. 等人,2005))获得了巨噬细胞、淋巴细胞、上皮细胞、内皮细胞、神经细胞和肝细胞的所有形态特征和化学特征。本方法比截止目前使用的收集干细胞的其他方法具有更小的侵入性、无痛(如与单采血液成分术相比较)、经济并且在技术上最适用于所有动物物种(小型动物和大型动物)。

[0023] 最后,容易地获取这些细胞以及之后能够在液氮冷冻下长时间保藏它们的可能性,使得根据本发明的方法获取的细胞适于自体移植,以用于治疗许多人类和兽医病症(各种类型的损害、代谢病、急性和慢性神经学的和炎症性病症)或用于改善某些动物如马

的竞争性能。

[0024] 因此,本发明特别涉及一种从血液,特别是但不仅限于外周血扩增成体干细胞的方法,其包含下述步骤。

[0025] 第一个步骤包括两个子步骤:

[0026] a) 血液,特别是但不仅限于外周血的干细胞的第一个扩增子步骤,利用浓度为 8-15nM 优选 10nM 的 MCSF (巨噬细胞集落刺激因子) 的体外处理在采集干细胞后立即进行;根据进行体外处理的条件,扩增步骤可能具有可变的持续时间,发明人已经通过实验证实,用 MCSF 体外处理的持续时间在 24-96 小时之间,优选在 48-72 小时之间,导致扩增的稳定,通过标记 CD90、CD34 和混合的 CD90/CD34 的同时存在可确认。该条件被认为是最佳的一个条件。

[0027] 术语“立即”是指从血细胞提取到开始体外处理之间可能的最短时间,在任何情况下其不超过 10 分钟,有利地,不超过 5 分钟。

[0028] b) 在第一个子步骤之后是纯化的第二子步骤,优选通过菲克梯度分级分离。

[0029] 该纯化步骤从根本上讲旨在破坏红细胞。

[0030] 因此,与本领域现状相反,本发明提供了首先通过将细胞与 MCSF 和可能的抗凝血剂接触(例如在合适的试管中)扩增细胞的步骤;该扩增步骤在血细胞从患者提取后立即进行,而未分离其特定部分且未使用任何培养基。

[0031] 在纯化步骤后提供另一个步骤:

[0032] c) 在步骤 b) 中纯化的血液,特别是但不仅限于外周血的干细胞的进一步扩增,其使用浓度为 35-55nM,优选 50nM,更优选 45nM 的 MCSF 进行体外处理。

[0033] 该步骤也可能具有 24-96 小时、优选 48-72 小时的可变持续时间。

[0034] 据观察,在使用浓度超过 55nM (即 70nM) 的 MCSF 24 小时后,细胞不保持多能干细胞的表型(请参见附图 12)。具体地,先前的在取血后立即使用 MCSF 在悬浮液中的扩增步骤 a) 允许增加涉及单核细胞和巨噬细胞群的干细胞的百分比(请参见附图 13)。随后的步骤允许获得多能干细胞,该多能干细胞在体内直接分化而不导致排斥现象或感染。

[0035] 本发明也涉及根据上面公开的扩增方法获得的成体干细胞在制备用于

[0036] 治疗损害的药物中的用途。可治疗的损害选自:哺乳动物皮肤损害、腱损

[0037] 害、韧带损害、骨损害、粘膜损害或骨折。

[0038] 本发明也涉及根据上面公开的方法获得的成体干细胞在制备用于治疗神经学的或神经变性病征的药物中的用途,所述病症选自:库欣病、摇头病、Wobbler 氏综合征、呼吸困难、肢体轻瘫;急性或慢性炎性病征,其选自:蹄叶炎、骨膜炎、胃炎、关节病、以及由病毒、细菌、寄生虫和真菌性媒介导致的炎症;哺乳动物胃膨胀扭转。

[0039] 本发明也涉及根据本发明的方法获得的干细胞在治疗母马不育、小马早熟和提高哺乳动物竞争性能中的用途。本发明也涉及包含作为活性成分的,根据上述扩增方法获得的成体干细胞以及可药用佐剂和/或赋形剂的药物组合物。

[0040] 根据一个特别优选的具体实施方案,根据上面公开的方法获得的用作活性成分的成体干细胞以 $90-250 \times 10^3$ 个细胞/ml,优选 150×10^3 个细胞/ml 的浓度与可药用佐剂和/或赋形剂共同存在于组合物中,所述组合物配制为用于静脉注射的形式。

[0041] 根据另一个具体实施方案,根据上面定义的扩增方法获得的,用作活性成分的成

体干细胞以 $4-40 \times 10^6$ 个细胞 /ml 的浓度与可药用佐剂和 / 或赋形剂共同存在于组合物中, 所述组合物配制为用于局部施用 (在外伤的情况下也称为局部应用) 的形式。

[0042] 根据本发明的一个特别优选的具体实施方案, 上述药物组合物也能包含作为活性成分的抗生素, 其浓度为 5-15nM, 优选 10nM。优选地, 所述抗生素是庆大霉素或阿米卡星 (amicacin)。

[0043] 本发明也涉及上述药物组合物 (即适用于局部施用的, 含或不含抗生素) 作为治疗损害的药物用途, 所述损害选自: 哺乳动物的皮肤损害、腱损害、韧带损害、骨损害、粘膜损害。

[0044] 根据另一个特点, 本发明涉及上述药物组合物 (即适用于局部施用的, 含或不含抗生素) 作为治疗哺乳动物骨折的药物的用途。

[0045] 本发明也涉及上述药物组合物 (即适用于静脉注射给药的) 作为治疗神经学的或神经变性病征的药物的用途, 所述病症包括: 哺乳动物的库欣病、摇头病、Wobbler 氏综合征、呼吸困难、肢体轻瘫。

[0046] 根据另一个具体实施方案, 本发明涉及上述药物组合物 (即适用于静脉注射给药的) 作为治疗急性或慢性炎性病症的药物的用途, 所述病症选自: 哺乳动物的蹄叶炎、骨膜炎、胃炎、关节炎、以及由病毒、细菌、寄生虫和真菌性媒介导致的炎症。

[0047] 本发明也涉及上述药物组合物 (即适用于静脉给药的) 作为治疗哺乳动物胃膨胀扭曲综合征的药物的用途。根据本发明的药物组合物在胆囊病症、心血管病症、具有继发抑郁的应激、繁殖、母马不育、小马早熟及提高动物竞争活力中也有用。

[0048] 在本发明的优选具体实施方案中, 在医学领域的用途优选应用于兽医领域, 治疗的哺乳动物选自马、犬、猫或人。

[0049] 现在, 本发明将通过特别参考附图, 以其优选具体实施方案中的非限制性实施例形式公开, 其中:

[0050] 图 1: 显示了母马后跗节和第一趾骨间含有梭状芽孢杆菌和伸肌腱破坏的 20cm 损害;

[0051] 图 2: 显示了局部应用根据本发明的干细胞三个月后图 1 的相同母马;

[0052] 图 3: 显示了治疗六个月后的母马;

[0053] 图 4: 显示了具有 80% 表面屈肌腱损害的马的超声波扫描;

[0054] 图 5: 显示了用根据本发明的干细胞局部治疗大约 3 个半月后的马的超声波扫描;

[0055] 图 6: 显示了用干细胞局部治疗大约 3 个半月后马的超声波扫描;

[0056] 图 7: 显示了局部治疗大约 4 个月后马的超声波扫描; 注意腱几乎完全再生且缺少瘢痕组织;

[0057] 图 8: 显示了具有较小实体 (直径小于 1cm) 的腱损害的母马的超声波扫描;

[0058] 图 9: 显示了局部治疗一个月后图 7 的相同母马的超声波扫描;

[0059] 图 10: 显示了用本发明的干细胞治疗前的患有全身无力、因疝气而进行过手术的 17 岁龄的马;

[0060] 图 11: 显示了静脉注射本发明的干细胞治疗 1 年后 17 岁龄马的性能;

[0061] 图 12: 显示了用不同数量 MCSF 处理来自外周血的经分离培养的细胞的复制;

15nM(具有叉的虚线)、25nM(具有三角形的虚线,顶点向下);35nM(具有三角形的虚线,顶点向上);50nM(具有黑圆圈的虚线),60nM(具有白色方块的虚线),70nM(具有白圆圈的虚线);结果是三份外周血样计数的细胞的平均值;

[0062] 图 13:显示了来自外周血的经分离培养的细胞的复制:用 MCSF 预处理(具有黑点的折线),未用 MCSF 处理(具有叉的折线);结果是三份外周血样的细胞计数的平均值;

[0063] 实施例 1:从外周血扩增、纯化成体干细胞及其医药用途

[0064] 在根据本发明扩增后,分离自外周血的细胞在体内充当多能干细胞(PSC)并能在几个月的时间内消退不可治愈的或用经典方法和/或药物仅能缓慢治愈的损害或病症。

[0065] 材料和方法

[0066] 取样

[0067] 每份外周血样由大约 5-7ml 组成,其取自马和犬的后肢并立即置于含有例如肝素(150U)和 MCSF(10nM)的试管中。

[0068] 然而,可以用其他合适的抗凝血物质替换肝素。

[0069] 纯化

[0070] 以 1:5 的比例将血样(5-7ml)稀释到含有 NH_4Cl (200mM) 的 PBS(磷酸盐缓冲液)中以导致红细胞裂解,10,000g 离心,用 PBS 洗涤两次并 200g 再离心一次。获得的有核细胞在 37℃ 孵育 7-12 小时,优选 10-12 小时,并利用菲克梯度分级分离进行纯化,然后分离并用 RPMI 培养基 1640 洗涤三次(Life Technologies, Grand Island, New York)。一旦进行了纯化,含有大约 95% 单核细胞的细胞(如利用 FACSscan-Becton Dickinson 流式光度计并利用细胞荧光光度术分析测定的)在 50ng/ml MCSF 45nM 中再孵育 24 小时,然后扩增以获得局部施用所必需的细胞数,或者 10,000g 离心处理并且以大约 90×10^3 个细胞/ml 的浓度重悬在 PBS 中,用于静脉治疗。

[0071] 细胞培养

[0072] 于 37℃ (8% CO_2), 15cm 直径的平板上以每个平板大约 $2-3 \times 10^5$ 个细胞的浓度孵育细胞 8-12 小时,优选 10-12 小时;随后在培养基中洗涤以去除未贴壁细胞,然后用 10ml 补充了 10% FBS、青霉素(100 单位/ml)、链霉素(100mg/ml)、L-谷氨酰胺(2mM)和 MCSF(巨噬细胞趋化因子 50ng/ml) 的 RPMI 培养基孵育另外 48 小时。当用 MCSF 孵育时,某些与干细胞共同分离的这些细胞显示了延长的形态,当与 MCSF 孵育时其能恢复成纤维细胞样(Zhao Y. 等人, 2003)。除非另外指明,所有使用的产品均购自 Sigma Aldrich。如已经描述的,用溶于 PBS 的 2% 利多卡因(Sigma)孵育 5-8 分钟后,通过吸打获得细胞悬液(Rabinovitch M. 等人, 1976)。一旦分开,用 PBS 洗涤细胞两次并在 2000g 离心 5 分钟,加入庆大霉素(10nM)并稀释到终浓度为 $5-7 \times 10^6$ 个细胞/ml,优选 6×10^6 个细胞/ml(除了那些指明更高浓度的)。

[0073] 在预实验中,利用 Randall 等人 1998 年已经描述的技术将一定量的细胞用于测定标记 CD34,其是造血干细胞的主要标记之一。

[0074] 免疫染色

[0075] 为了鉴定细胞表型,用 PBS 洗涤细胞,然后于 20℃ 用溶于 PBS 的 4% 甲醛将其固定在载玻片上 20 分钟。

[0076] 为鉴定细胞内蛋白质,在 20℃ 用 0.5% Triton X-100 渗透处理细胞 5 分钟,然后

用稀释于 PBS 并含 1% BSA(以封闭非特异性抗原位点)的一抗孵育 1 小时。在连续洗涤三次后,载玻片用偶联了最合适的荧光染料 (FITC 或四甲基异硫氰酸若丹明 B (TRITC) 或 Cy5) 的二抗孵育 45 分钟。

[0077] 所有的二抗均使用驴作为宿主由 Jackson ImmunoResearch 研发。免疫细胞化学在 4℃ 和湿度饱和空气中进行。在洗涤三次后,载玻片使用“gelvatol-PBS”进行固定。然后利用使用定向抗甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (Cortex Biochem 生产的绵羊多克隆抗体, San Leandro, CA) 的免疫荧光作为内标的荧光显微术获得荧光图像。作为阴性对照并为了校准荧光背景水平,使用与样品所用的相同的同种型非特异抗体孵育载玻片。

[0078] 获得的图像显示了细胞,该图像通过相差显微镜并叠加了用尼罗红染色的脂质的荧光图像和用 DAPI (4',6-联脒-2-苯基吡啶) 染色的细胞核的图像而得到。参考标尺表示 40 μm 的大小。利用定量比率成像显微术检查 MCSF 处理的细胞和巨噬细胞间的相对荧光强度。

[0079] 使用上面公开的方法鉴别研究的所有标记 (CD90, CD34, CD90/CD34)。

[0080] 结果

[0081] 局部应用

[0082] 在外伤的情况下直接应用细胞。与此相反,在腱损害、韧带损害和骨折的情况下,根据损害的严重程度,除非另外指明,以终浓度 $5-10 \times 10^6$ 个细胞 /ml 在损害位点直接接种细胞;在不能将细胞精确注入损害位置的情况下,使用下述方法:

[0083] ● 对于侧副韧带的损害,在第二和第三趾骨间进行注射,

[0084] ● 对于足舟骨 (navicular) 损害,在腕管进行注射,

[0085] ● 对于骶髂的关节损害和 Wobbler 氏综合征的情况下,在第五和第六颈椎间或第六和第七颈椎间进行注射。

[0086] 皮肤损害

[0087] 母马病例,其在前跗节和第一趾骨间具有直径 20cm 的创伤,并患有导致下面组织 (包含伸肌腱) 破坏的梭状芽孢杆菌并发症 (图 1)。在意外事件和进行两次外科手术以去除瘢痕瘤一年后,通过使用重悬于含庆大霉素的生理溶液中的 $10-400 \times 10^6$ 个细胞进行了第一次施用,并以 15 天的时间间隔再重复三次。100 天后,伤口完全愈合 (图 2),6 个月后,在 70% 疤痕区域重新出现了毛发 (图 3)。

[0088] 腱

[0089] 治疗了具有 80% 浅表屈肌腱损害的三匹马,其在使用大约 300×10^6 个细胞治疗三个月后对超声波检测不再显示低回声区 (hypoecogenic zones),并且与此相反,显示腱的厚度 (其在撕裂和炎症性过程后已经增加) 明显降低了 80%,正如能从图 4-7 显示的超声波扫描所看到的。

[0090] 具有更小腱损害 (直径 1cm) 的其他马在治疗一个月后不再显示损害 (图 8 和 9)。

[0091] 韧带

[0092] 在治疗损害中,我们在踝关节下插入了导致随后跛行的悬吊韧带 (suspender ligament): 在局部接种后不到三个月,该马开始再次工作且没有跛行,而且 1 年后没有复发。

[0093] 治疗的其他在前部和尾部悬吊韧带的分支和中心体具有损害的马也全部治愈。

[0094] 骨折

[0095] 在治疗的骨折中,我们拥有股骨骨折的狗的病例,其在外科手术 4 个月后仍没有形成骨痂。在局部应用 10×10^6 个细胞后,在 30 天内得到了完全康复。

[0096] 粘膜

[0097] 关于粘膜损害的治愈,治疗了许多慢性溃疡。最具轰动性的病例是患有多处口腔溃疡的盛装舞步马,已经对其进行了两次整形外科手术。随着治疗的进行,该马在局部应用 4×10^5 个细胞三天后已经停止流血。15 天后,损害彻底治愈。

[0098] 总之,在腱、韧带、关节和骨折上局部施用利用我们的方法富集的分细胞后,在几个星期内最多在 4 个月内,超过 80% 的病例获得了极好的恢复。剩下的 20% 病例无论如何也显示了相当大的改善。当今的兽医科学在这些病例中通常使用的方法在治疗大约 6-15 个月后,只能在不超过 60% 的病例中给出阳性结果并且仅在 5% 病例中得到改善。

[0099] 静脉使用

[0100] 在下述病症中经静脉使用细胞 (1 个剂量 = 150×10^3 个细胞) :

[0101] 库欣病:这是一种归因子具有下丘脑生产多巴胺降低的中间脑下垂体过度增大的病症,其与人类的帕金森病非常相似。

[0102] 治疗了一匹受到影响的矮种马,其除了具有该病的典型症状外还具有降低的免疫防御和溶血。在以每次治疗使用 150×10^3 个细胞,时间间隔为 5 天治疗三次后,观察到了改善。在以 40 天间隔重复四个循环后,症状彻底消失。以相同方式治疗的另外四匹马也得到了相同的结果。

[0103] 摇头病:具有三叉神经继发并发症的中枢神经系统的神经学病症,其导致连续的摇头和畏光问题。被治疗的马已经患有这些症状 6 个月。时间间隔为 1 周、每次 150×10^3 个细胞的为期 5 周的治疗周期是所需的。在第 3 周时症状已经消失。用相同治疗方案治疗的其他两匹马显示了相同的结果。

[0104] Wobbler 氏综合征的三个病例:这是一种先天的颈部神经压迫病症。通过间隔 1 周 3 个剂量 (静脉和局部施用) 的给药治疗,病例在治疗后显示了症状的完全缓解。

[0105] 使用公开的方法扩增和纯化的干细胞的静脉使用显示了这些细胞是如何能在体内解决影响神经元组织的病症,已经在治疗一周后得到了第一个 结果。

[0106] 血管重建。在蹄叶炎 (破坏了足部外周血管形成,结果产生了极度疼痛的跛行以至于阻止了运动) 影响的马匹中,接种入趾脉管的一个给药剂量后 12-24 小时,疼痛几乎已经消失。在另两个也被相同病症影响的马匹病例中也获得了相同的结果。

[0107] 其他将细胞经静脉给药的一般病例是 :

[0108] - 患有足舟骨骨折的马匹病例,在外周血管、足舟骨粘液囊和深部屈肌腱与足舟骨间的关节面同时施用干细胞后,该马匹重新开始了其的竞争性活动。

[0109] - 患有骨膜炎的马匹病例,其在静脉给药两个剂量后改善了它的跛行 ;

[0110] -17 岁龄的马匹病例,其接受了疝气手术,然后因为由于持续的全身无力状态不再能够继续进行竞争性活动而被置于牧场。在每 5 天给予一剂共 3 个剂量的循环经过 4 个之后,该马再次开始了竞争性活动,参与了竞争并获得了它之前从未有过的结果 (图 10 和图 11) ;

[0111] -20 岁龄的马匹病例,其具有导致 3 条马腿协调障碍的疑似脑缺血,其在基于可的

松新生物的药物治疗后仍继续保持不确定的、摇晃欲倒的步调。在以 1 周的时间间隔施用两个剂量后,该动物重新开始了其正常活动而不再显示任何症状;

[0112] -23 岁龄的母马病例,其在 21 岁龄时具有妊娠,并且其在哺乳周期结束后经静脉施用两个剂量的细胞进行了治疗。治疗后,该母马重新开始了它的全部竞争性活动(认为 20 岁龄的马匹对于竞争性活动而言太老);

[0113] -患有骨盆骨折的马匹病例,其在给予两个剂量的细胞后重新开始了国际性竞争活动;

[0114] -患有呼吸困难且肌肉性状非常发达的 15 岁龄马匹病例,其在用两个剂量治疗后再次开始了国际水平的竞争活动且没有最轻微的呼吸困难;

[0115] -两个马匹病例,其患有超过 2 年的由于第一和第二趾骨间的侧副韧带拉伤而导致的极度跛行。认为该病症在 75% 的病例中是不可逆的。在用 3 个剂量治疗 3 个月后,治疗的两匹马均复原到正常竞争状态;

[0116] -13 岁龄马匹病例,在其 7 岁龄时进行疝气手术,在 12 岁龄时进行阉割。在进行第二个手术后,尽管用抗生素和消炎药进行了治疗,该动物还是患非发射性(non-emittent)细菌性并发症。而且,胃镜检查证明该动物患有慢性胃炎。在以间隔 1 周的方式给药 4 个剂量后,再次对该马匹进行胃镜检查,结果显示了胃黏膜的完全再生。在另外的 10 匹奔马中获得了相同的结果;

[0117] -具有心脏全收缩期杂音和众多不规则杂音,并且伴有对疱疹病毒 1 型活性形式血检呈阳性的马匹病例,该疱疹病毒导致神经问题和平衡缺失;在该病例中,以 5 天的时间间隔分 3 次静脉给药 3 个剂量,然后在脊椎的水平施用第 4 个剂量。在 2 个月后,该马就已经开始再次移动,几乎完全

[0118] 恢复了平衡;

[0119] -19 岁龄马匹病例,由于全身性体质恶化,其几乎完全从竞争性活动中退役,对其以 1 周的时间间隔给予两次 200×10^3 个细胞并重复治疗,3 个月后其复原为其所在类别中最好之一(跳跃竞争,跳跃过度为 1.35-1.40 米)。

[0120] 在非常年老的狗中也应用了相同类型的治疗并得到了相同的结果。在狗中,治疗了下述病症:

[0121] -两个患有胃扭转的狗病例:第一个是 6 岁龄大丹狗,其接受了外科手术但在 1 周后复发,因此又接受了一次手术;在第一次给药 150×10^3 个细胞后,该狗开始再次进食,在以 1 周时间间隔给予两个剂量后,该狗复

[0122] 原到它的正常状况;第二个病例是 10 岁龄雌性大丹狗,其患有关节病,并诊断患有糖尿病,已经进行了子宫切除术和卵巢切除术;在手术后 4 个月,它患有胃扭转,随后进行了外科手术,然而,手术并未带来大的改善。在此时,以 1 周的时间间隔给予两个剂量并在随后的 4 个月中进行了另外 4 个循环。今天,在最后一个循环后 8 个月,该狗不但具有正常的糖血,它走路的能力也提高了 80%;

[0123] -13 岁龄雄性杂种狗病例,其后肢轻瘫并失禁;直到那时,仅用可的松治疗且没有得到可看到的结果。在停止使用可的松 15 天后,提取细胞,以 1 周的时间间隔给予该狗 2 个剂量的一个循环。在最后的治疗后 6 天,该狗不但能再次使用它的腿,也能正常排尿和排便。

[0124] 由于目前没有“体内”技术提供扩增的多能细胞的事实,根据本发明的方法获得的结果使该过程变得非常通用。此外,在所有上面报道的病史中,在给药后均未发生任何形式的排斥或感染,这使得该技术适用于自体移植过程。

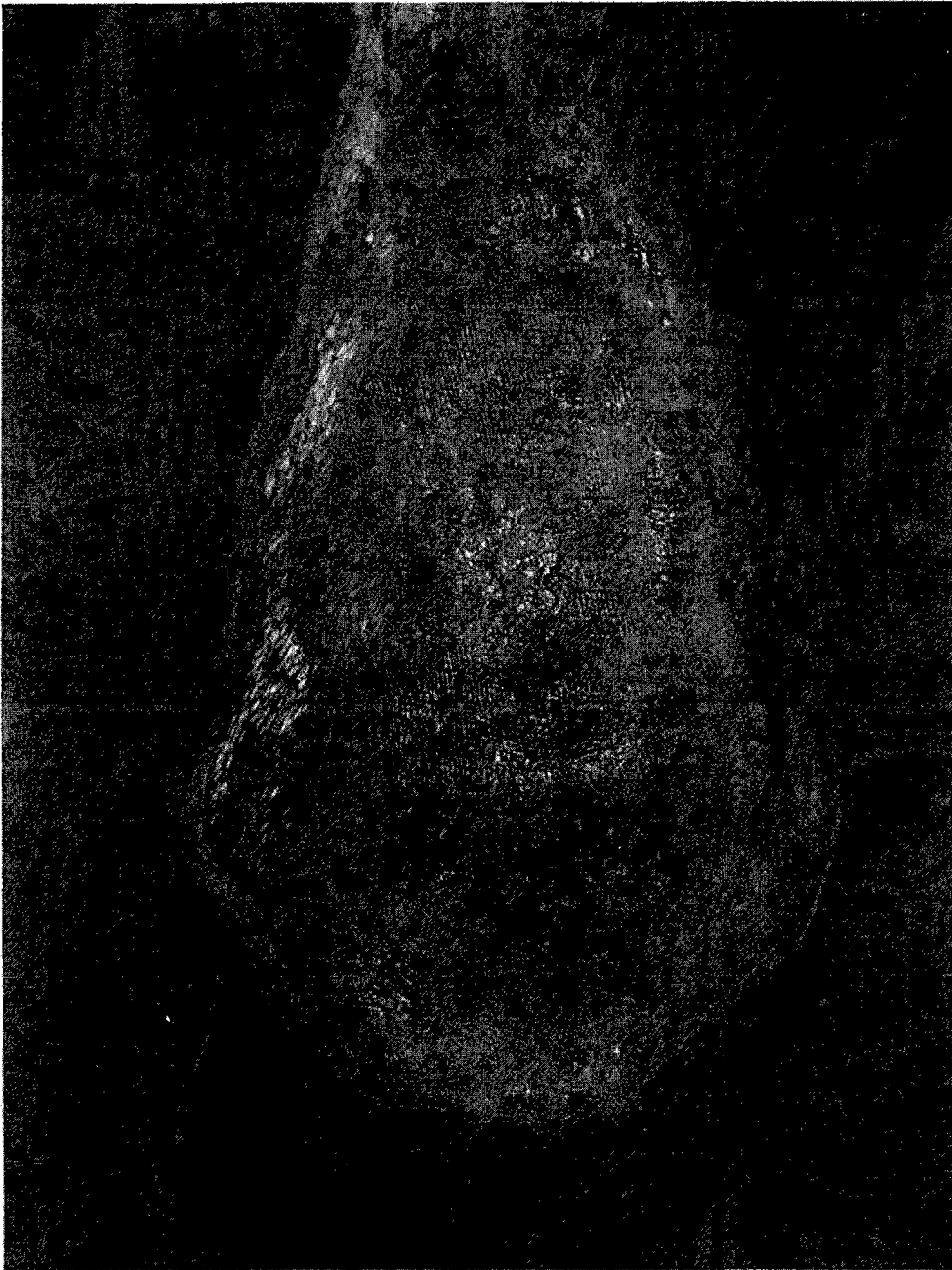


图 1



图 2

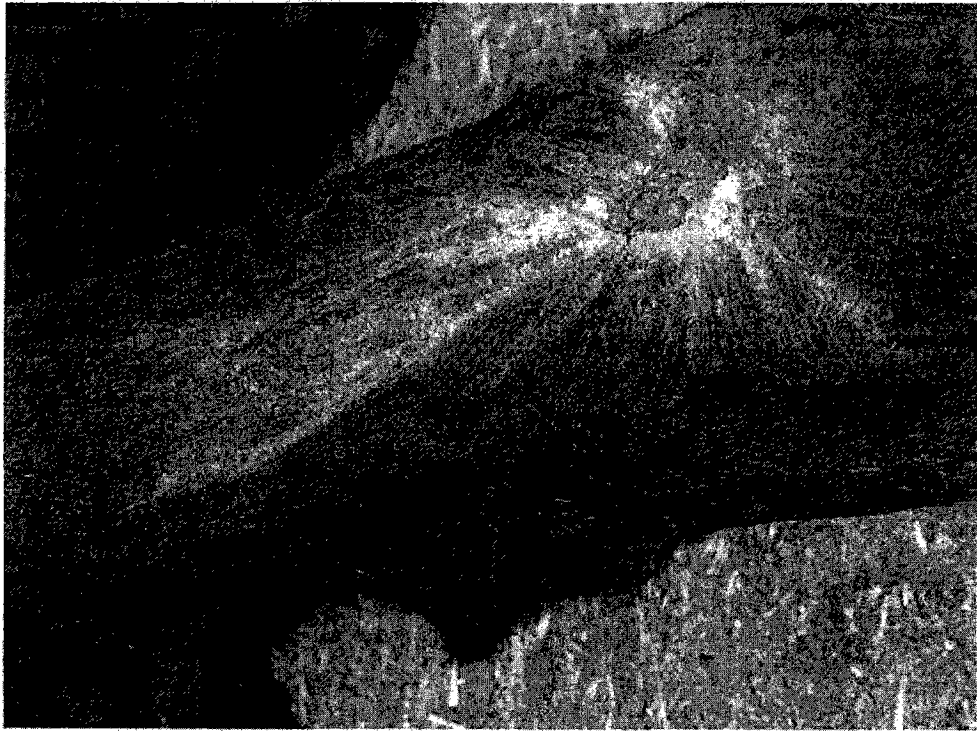


图 3

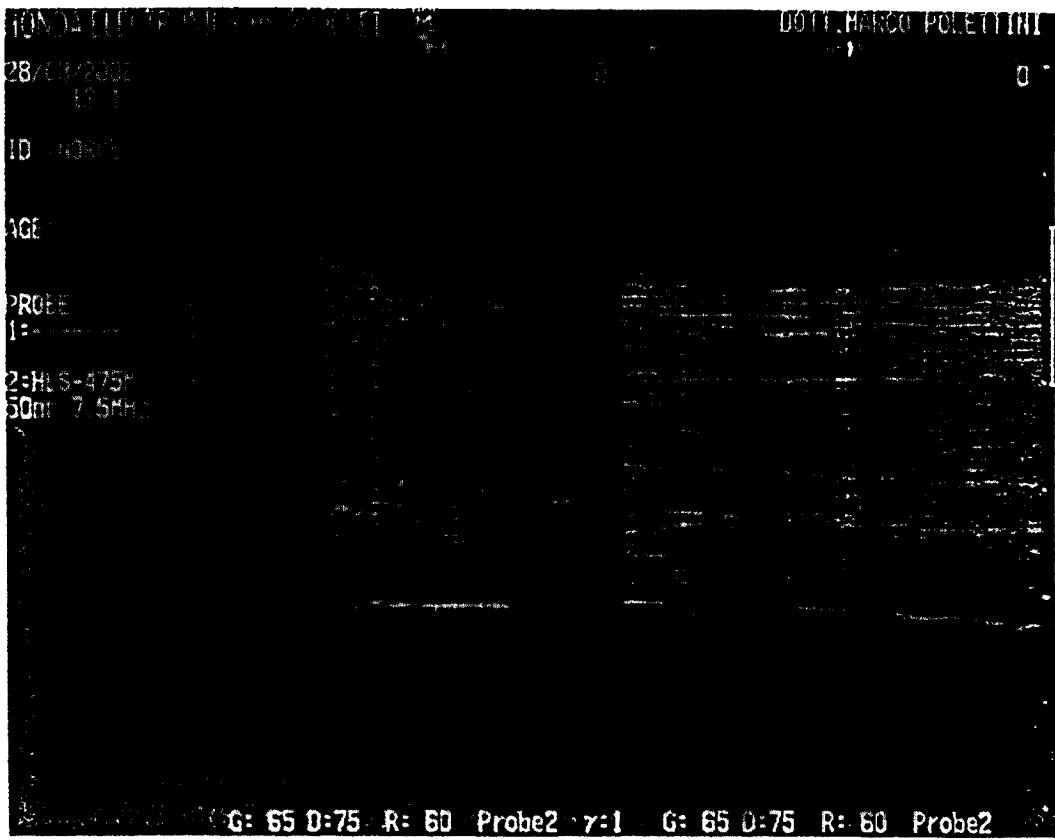


图 4



图 5

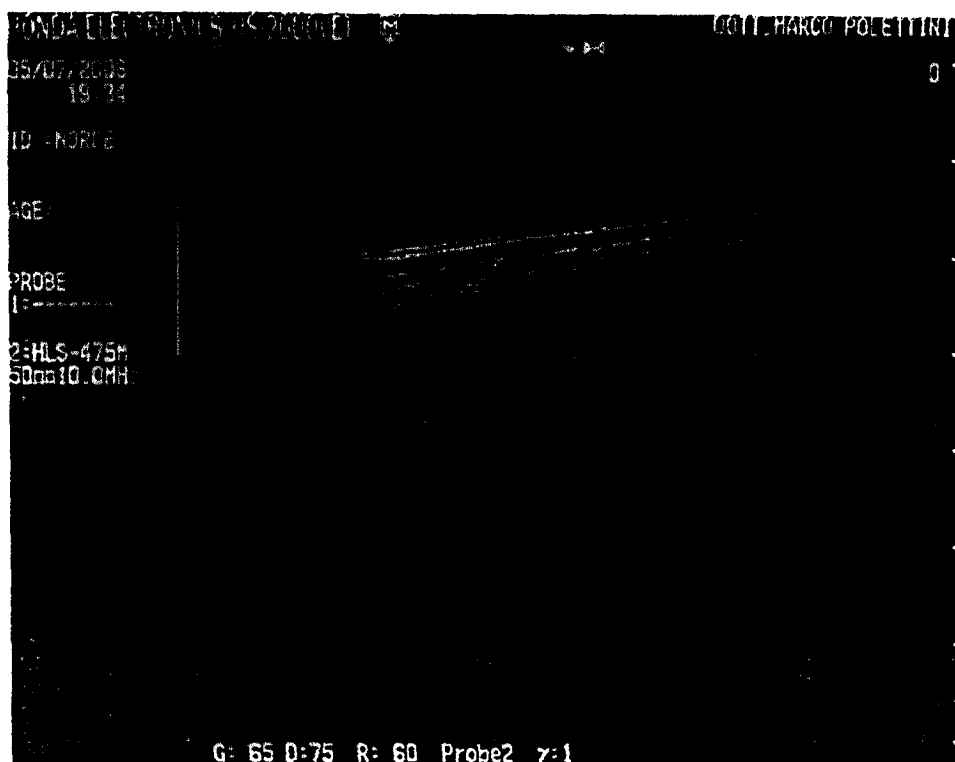


图 6

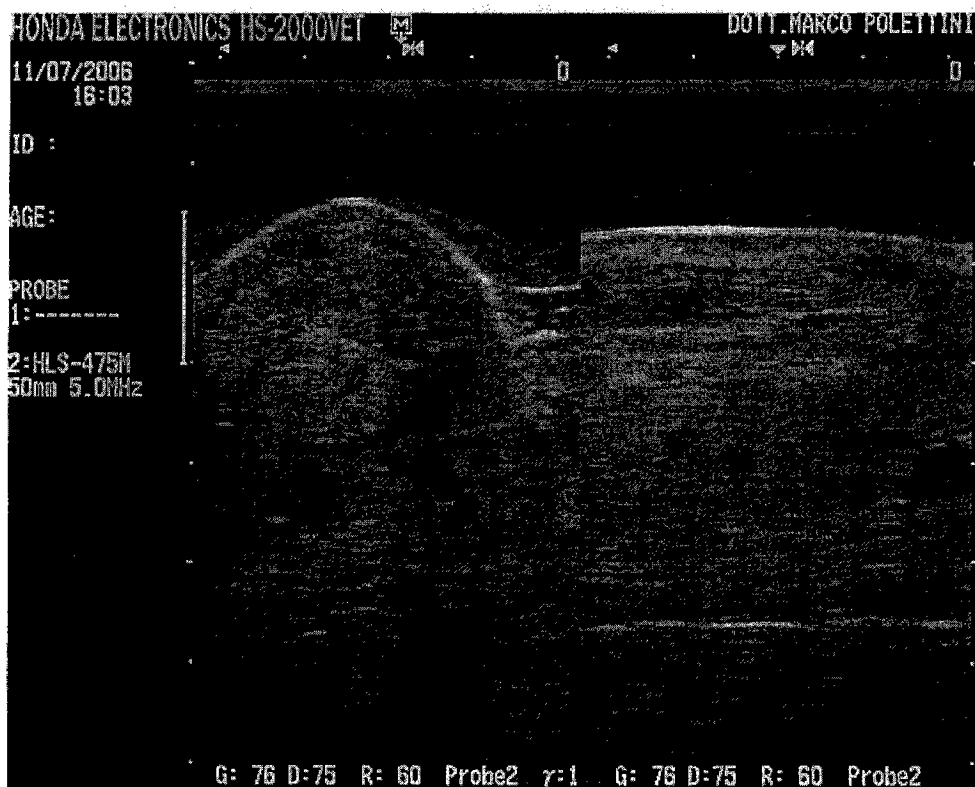


图 7

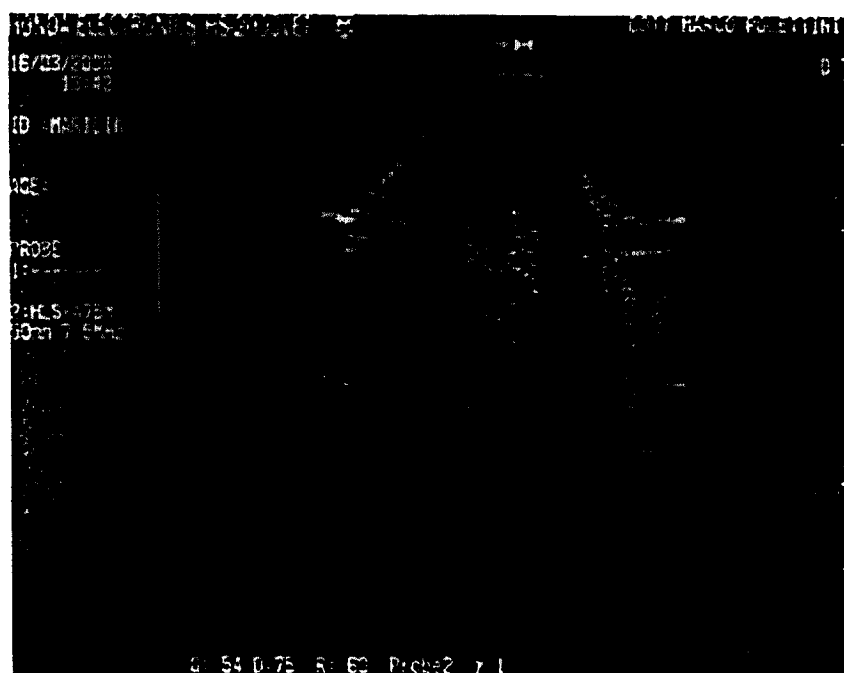


图 8

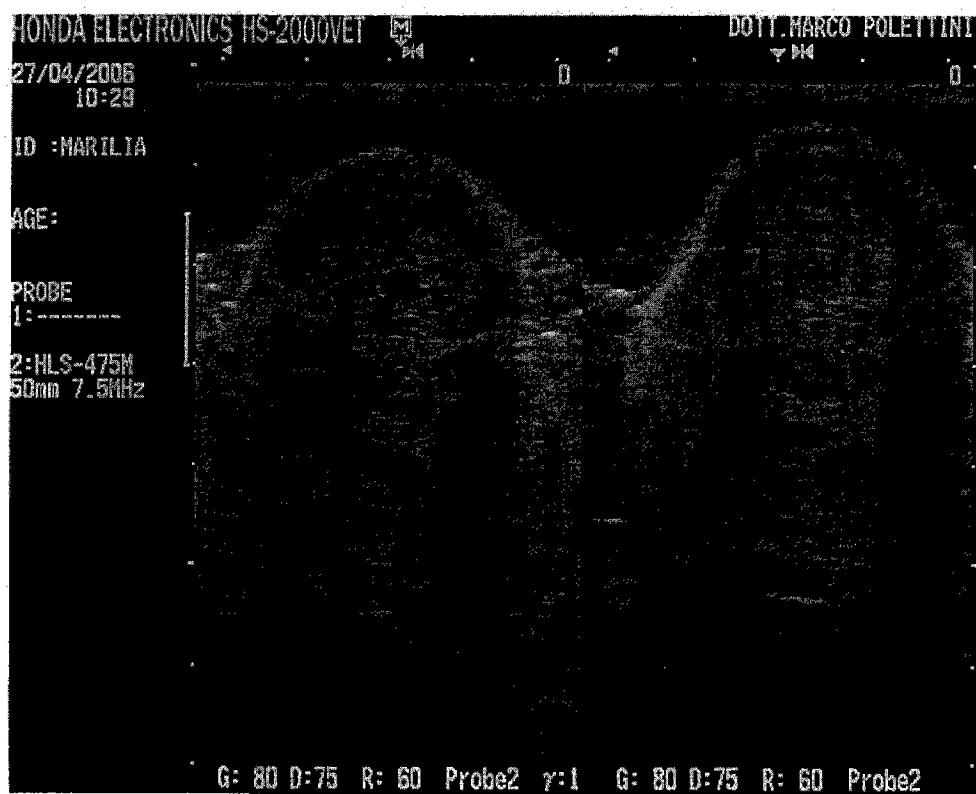


图 9



图 10



图 11

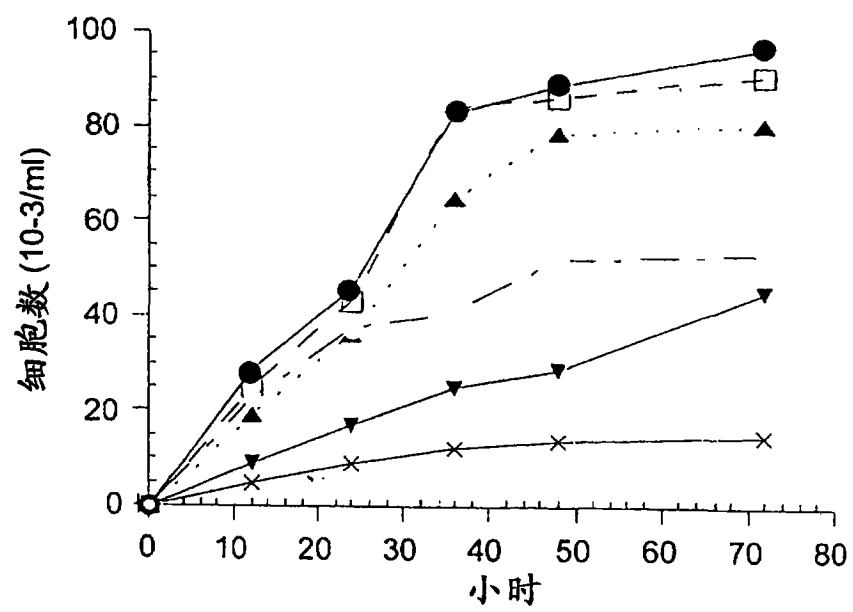


图 12

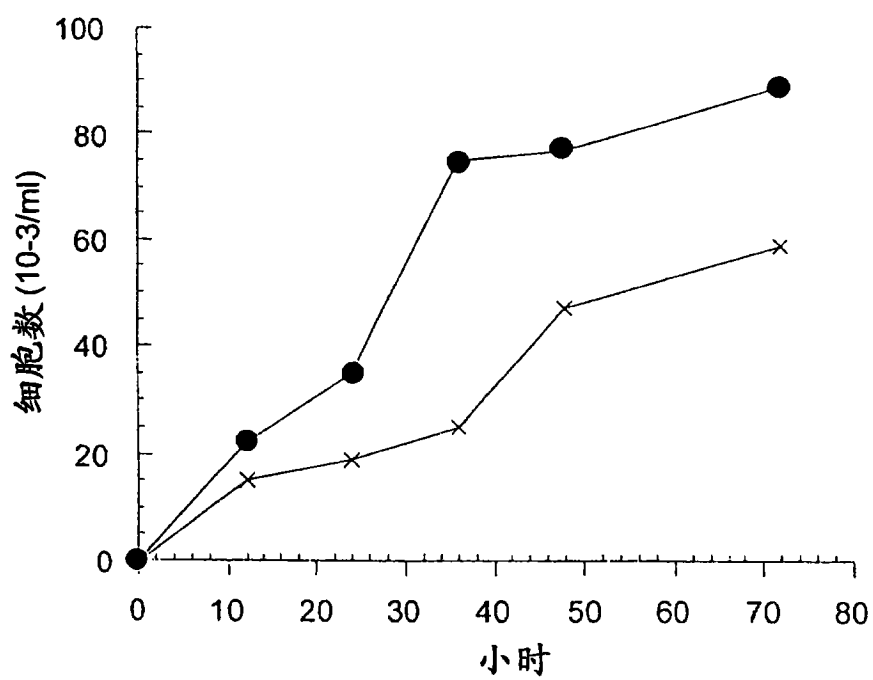


图 13