(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107723274 B
(45)授权公告日 2021.05.07

(21)申请号 201710721089.4

(22)申请日 2006.09.22

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107723274 A

(43)申请公布日 2018.02.23

(30)优先权数据
05077186.4 2005.09.23 EP

(62)分案原申请数据
200680043425.4 2006.09.22

(73)专利权人 塞勒里克斯有限公司
地址 西班牙马德里

(72)发明人 德克·布斯彻
曼努埃尔安赫尔·冈萨雷斯德拉培尼亚
马里奥·德尔格多莫拉

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.
C12N 5/0775(2010.01)
C12N 5/0783(2010.01)
A61K 35/28(2015.01)
A61K 35/17(2015.01)
A61P 37/06(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 19/02(2006.01)
A61P 1/00(2006.01)

(56)对比文件
US 2003082152 A1,2003.05.01
CN 1620309 A,2005.05.25
Damián García-Olmo, M.D.等.A Phase I Clinical Trial of the Treatment of Crohn's Fistula by Adipose Mesenchymal Stem Cell Transplantation.《Diseases of the Colon ℜ》.2005,第48卷(第7期),第1416-1423页.
Daniel A. De Ugarte等.Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow.《Immunology Letters》.2003,第89卷第267-270页.
Nak Gyun Chung等.Cotransplantation of Marrow Stromal Cells May Prevent Lethal Graft-versus-Host Disease in Major Histocompatibility Complex Mismatched Murine Hematopoietic Stem Cell Transplantation.《International Journal of HEMATOLOGY》.2004,第80卷第370-376页.

审查员 唐洁

权利要求书1页 说明书28页 附图19页

(54)发明名称

具有免疫调节活性的细胞群及其分离方法和用途

(57)摘要

本发明提供了通过表达吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)而应答干扰素γ(IFN-γ)的结缔组织衍生的细胞群,其用于预防、治疗或缓解与病症相关的一种或多种症状,在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的,所述病症包括但不限于自身免疫性疾病、炎性病症和包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病。

CN 107723274 B

1.从结缔组织分离细胞群的方法,其中所述细胞群的细胞表现出的表型特征在于(i)它们不表达来自APC的特异标志物;(ii)它们不组成型表达IDO;(iii)以IFN-γ刺激时它们表达IDO;以及(iv)它们表现出分化为至少两种细胞谱系的能力,所述方法包括以下步骤:

(i)从结缔组织样品制备细胞悬液;

(ii)从所述细胞悬液回收细胞;

(iii)在使得细胞能粘附到固体表面并增殖的条件下,在适合的细胞培养基中于固体表面上孵育所述细胞;

(iv)孵育后洗涤所述固体表面以除去非粘附细胞;

(v)选择在这种培养基中传代至少两次后仍粘附在所述固体表面的细胞;以及

(vi)确认所选择的细胞群表现目的表型,

其中步骤(vi)中的所述确认包括在所选择的细胞群中确定IFN-γ可诱导的IDO活性。

具有免疫调节活性的细胞群及其分离方法和用途

发明领域

[0001] 本发明涉及预防、治疗或缓解病症的一种或多种症状，在所述病症中采用衍生于成体组织的细胞群调节个体的免疫系统是有益的。具体地，本发明提供了通过表达吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)而应答干扰素γ(IFN-γ)的结缔组织衍生的细胞群，所述细胞用于预防、治疗或缓解与病症相关的一种或多种症状，在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的，所述病症包括但不限于自身免疫性疾病、炎性病症和包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病。

[0002] 发明背景

[0003] 高等脊椎动物的免疫系统代表了对可进入脊椎动物机体的各种抗原的一线防御，这些抗原包括微生物，如为多种疾病病原体的细菌、真菌和病毒。另外，免疫系统也参与了多种其它疾病或病症，包括自身免疫性疾病或免疫病理性疾病、免疫缺陷综合征、动脉粥样硬化和各种肿瘤性疾病。尽管有些用于治疗这些疾病的方法，但是很多当前治疗没能提供足够适当的结果。在新出现的治疗策略中，基于细胞治疗的那些似乎构成了用于治疗大量疾病的潜在有益手段。因而，现在研究人员正尽力实现所述目的。

[0004] 自身免疫性疾病

[0005] 当旨在保护机体免于细菌、病毒和任何其它外来物的机体的免疫系统机能障碍并产生针对健康组织、细胞和器官的病理反应时，导致了自身免疫性疾病。抗体、T细胞和巨噬细胞提供有益保护，但也可产生有害的或致命的免疫反应。

[0006] 自身免疫性疾病可为器官特异的或全身的，并由不同的病理机制引起。器官特异的自身免疫的特征在于异常表达主要组织相容性复合物(MHC)抗原、抗原模拟和MHC基因中的等位基因变异。全身性自身免疫性疾病涉及多克隆B细胞活化和免疫调节性T细胞、T细胞受体和MHC基因的异常。器官特异的自身免疫性疾病的实例为糖尿病、甲状腺功能亢进、自身免疫性肾上腺机能不全、单纯红细胞性贫血、多发性硬化和风湿性心炎。代表性的全身性自身免疫性疾病为全身性红斑狼疮、慢性炎症、肖格伦氏(Sjogren's syndrome)综合征、多发性肌炎、皮肌炎和硬皮病。

[0007] 目前对自身免疫性疾病的治疗涉及给予免疫抑制剂，例如可的松、阿司匹林衍生物、羟氯喹、氨甲喋呤、硫唑嘌呤和环磷酰胺或其组合。但是，给予免疫抑制剂时所面临的困难是，自身免疫性疾病越有效地被治疗，就越让患者对感染缺乏抵抗力，并也更易于发展肿瘤。因此，亟需新的疗法来治疗自身免疫性疾病。

[0008] 炎性病症

[0009] 炎症是机体的白细胞和分泌的因子保护我们的机体免受外来物质如细菌和病毒感染的过程。称为细胞因子和前列腺素的分泌的因子控制了这个过程，它们以有序和自我限制的级联被释放至血液或受累组织中。

[0010] 炎性肠病(IBD)

[0011] IBD为一族慢性、特发性、复发性和组织破坏性疾病，特征在于粘膜T细胞的机能障碍、改变的细胞因子生成和细胞炎症，最终导致末梢小肠和结肠粘膜的破坏。IBD在临床上

被分为两种表型:克罗恩病(Crohn's disease,CD)和溃疡性结肠炎。CD是现在不可治愈的疾病,患病率0.05%,其引起慢性炎症,导致一系列的胃肠和肠外症状,包括腹痛、直肠出血、腹泻、体重减轻、皮肤和眼病症,以及生长迟缓和儿童性成熟(sexual maturation)。这些症状严重地影响了患者机体健康、生活质量和活动能力。由于CD是慢性的,且通常在30岁之前发病,患者一般需要长期治疗。尽管其病因仍是未知的,但是有间接证据将CD和粘膜免疫系统未能减弱对内源性抗原的免疫反应联系起来。

[0012] 目前用于CD的治疗剂包括氨基水杨酸盐、皮质激素、硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤、抗生素和氨甲喋呤不完全有效,具有非特异性,并具有多种副作用。大多数情况下,手术切除是最终的选择。因此,目前的治疗策略是发现特异调节疾病的两种组成部分即炎性反应和T细胞驱动的反应的药物或制剂。

[0013] 最近,药物英夫利昔单抗(infliximab)被批准用于治疗对标准疗法无反应的中度至重度克罗恩病以及治疗开放性引流瘘。特别批准的用于克罗恩病第一种治疗剂英夫利昔单抗为抗肿瘤坏死因子(TNF)抗体。TNF为免疫系统产生的可以引起与克罗恩病有关的炎症的蛋白。抗-TNF在TNF到达肠之前将其从血流中除去,由此预防炎症。但是,由于其具有全身性作用,并且TNF是非常多效的因子,所以严重的副反应相对常见,并且其长期安全性还有待确定。此外,其效果也是有限的,因为患者中出现的很多炎性过程并非依赖于TNF信号传导。

[0014] 类风湿性关节炎(RA)

[0015] 类风湿性关节炎和青少年类风湿性关节炎为炎性关节炎类型。关节炎是描述关节炎症的一般术语。一些但不是所有的关节炎类别为错误导向的炎症的结果。类风湿性关节炎影响全球人口的约1%,基本上会导致残疾。类风湿性关节炎为自身免疫性疾病,其中机体的免疫系统将在关节中分泌润滑液的滑膜识别为外来物。产生炎症,软骨、关节内和关节周围的组织被损伤或破坏。机体以瘢痕组织替换损伤的组织,引起关节内的正常空间变窄和骨融合在一起。

[0016] 在类风湿性关节炎中,存在持续的抗原呈递、T细胞刺激、细胞因子分泌、滑膜细胞活化和关节破坏的自身免疫循环。

[0017] 目前可用于关节炎的治疗集中于以抗炎或免疫抑制药物减弱关节炎症。任何关节炎的一线疗法通常都是抗炎药,例如阿司匹林、布洛芬和Cox-2抑制剂如塞来考昔(celecoxib)和罗非考昔(rofecoxib)。也使用抗TNF人源化单克隆抗体,如英夫利昔单抗;但是,其具有很多继发效应或副作用,并且其功效相当低。"二线药物"包括金、氨甲喋呤和类固醇。尽管这些为良好建立的关节炎治疗,但是几乎没有患者由于这些药物的单独治疗而减轻,对患有类风湿性关节炎的患者来说仍存在治疗困难的问题。

[0018] 一般而言,目前对慢性炎性病症的治疗具有非常有限的效果,它们中的很多具有高发生率的副作用或者不能完全防止疾病进展。迄今,对于这些类型的疾病来说,没有治疗是理想的且没有治愈。因此,亟需用于治疗炎性病症的新疗法。

[0019] 抑制T细胞反应

[0020] 所有的免疫反应都受T细胞控制。有可能引起自身免疫反应的自身反应性细胞包括一部分正常的T细胞储备库,但是在健康状态下,它们的活化被抑制性细胞阻止。尽管抑制性T细胞早在上世纪七十年代就有描述,但是T细胞亚群表征的重要进展只是最近才实

现,这时它们被重新命名为调节性T细胞。

[0021] 具有调节(抑制)活性的有不同的$CD4^+$、$CD8^+$、天然杀伤细胞和γδT细胞亚群。在$CD4^+$群中已表征了两种主要的调节性T细胞(T-reg细胞)类型,即天然存在的胸腺生成的T-reg细胞,和外周诱导的IL-10或TGF-β分泌的T-reg细胞(Tr1细胞)。表达$CD4^+CD25^+$、Foxp3的天然存在的T-reg细胞在胸腺生成,迁移并在外周维持。它们的胸腺生成和在外周维持的信号不完全明确,尽管看起来需要CD28刺激和IL-2。虽然$CD4^+CD25^+$T-reg细胞无免疫性并易于凋亡以及它们的起源部位胸腺经历与年龄有关的演变,但这些细胞在外周中的数量不随年龄减少。这提示$CD4^+CD25^+$T-reg细胞池在外周维持。几个试验模型支持从$CD4^+CD25^-$T细胞外周生成$CD4^+CD25^+$T-reg细胞的观点。基本上不知控制$CD4^+CD25^+$T-reg细胞外周扩展的内源性因子和机制。

[0022] 有证据证明细胞因子转化生长因子-β(TGF-β)在血液中循环的胸腺来源的特化的CD4+CD25+前体扩展方面起重要作用。TGF-β还参与了外周诱导的CD4+和CD8+调节亚群的产生。

[0023] 但是,最近的试验数据提示免疫耐受的机制可依赖于色氨酸代谢,尤其是酶吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)的活性,该酶为细胞内含血红素的酶,催化色氨酸沿犬尿氨酸途径降解的起始限速步骤。

[0024] 有相当多的证据支持这样的假说,即表达IDO的细胞可抑制T细胞反应并促进耐受(Mellor and Munn,Nat Rev Immunol.2004Oct;4(10):762-74)。IDO在一些树突状细胞(DC)亚群中表达,所述树突状细胞亚群为免疫反应的关键调节者(致耐受性DC)。这些DC能够在体内通过局部清除色氨酸而抑制T细胞反应(美国专利2002/0155104)。除了单核细胞衍生的DC和巨噬细胞之外,几种肿瘤细胞系、肠细胞和滋养母细胞表达IDO。IDO在滋养母细胞中的表达看起来为组成型的,并且已与耐受来自胎儿的同种异体组织密切相关。IDO被认为在T细胞中诱导凋亡,以及产生对肝脏同种异体移植物的自发耐受。

[0025] IDO免疫抑制活性背后的分子机制是未知的。但是,已证实,表达IDO的DC能够诱导调节性T细胞的生成。在人细胞中IDO被包括干扰素和脂多糖(LPS)在内的几种炎性介质诱导,以及被病毒感染诱导。几项研究已显示,在体内宿主免疫系统对同种异体肿瘤细胞的排斥上调IDO,这种作用由IFN-γ介导。

[0026] 最近的研究已指出了骨髓衍生的间质干细胞(MSC)和脂肪衍生的干细胞(ASC)在体外的免疫抑制能力,以及MSC的体内免疫抑制能力。已经在骨髓移植物中研究了该体内活性,其中输注扩增的MSC似乎减弱了急性和慢性移植物抗宿主病(GVHD)。在实验中,该体外作用以抑制淋巴细胞的增殖为特征,其中淋巴细胞通过混合的淋巴细胞反应(MLR)或植物血细胞凝集素(PHA)刺激而被活化。但是,负责所述细胞的免疫抑制作用的分子机制还未被明确鉴定。

[0027] 发明概述

[0028] 本发明基于这样的发现,即存在于不同结缔组织中的具有多谱系潜能的某些细胞群能够在体内和体外用作免疫调节剂。发明人已分离了结缔组织衍生的细胞群,其通过表达吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)而应答干扰素γ(IFN-γ)。所述细胞的免疫调节作用可用于预防、治疗或缓解与病症有关的一种或多种症状,在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的,所述病症包括但不限于自身免疫性疾病、炎性病症和包括移植器官和组织排斥在内

的免疫介导的疾病。

[0029] 因此，一方面，本发明涉及来自结缔组织的分离细胞群，其中所述细胞群的细胞：(i)不表达来自抗原呈递细胞(APC)的特异标志物，换言之，不表达抗原呈递细胞特异的标志物；(ii)不组成型表达吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)；(iii)以干扰素γ(IFN-γ)刺激时表达IDO；以及(iv)表现出分化为至少两种细胞谱系的能力。

[0030] 另一方面，本发明涉及分离所述细胞群的方法。可根据所述方法获得的细胞群构成了本发明的另一方面。

[0031] 另一方面，本发明涉及用于预防、治疗或缓解与病症有关的一种或多种症状，在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的。

[0032] 另一方面，本发明涉及所述细胞群，其用作药物、用于诱导移植耐受、用于治疗自身免疫性疾病或用于治疗炎性疾病。在特定实施方案中，所述炎性疾病为慢性炎性疾病，例如炎性肠病(IBD)或类风湿性关节炎(RA)。

[0033] 在另一方面，本发明涉及所述细胞群在制备药物中的用途，所述药物例如用于预防、治疗或缓解与病症有关的一种或多种症状的药物，在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的，例如用于诱导移植耐受的药物，或用于治疗自身免疫性疾病的药物，或用于治疗炎性疾病的药物。

[0034] 在另一方面，本发明涉及所述细胞群在制备或产生调节性T细胞(T-reg)中的用途。所述T-reg细胞群及其分离方法构成了本发明其它方面。

[0035] 在另一方面，本发明涉及所述T-reg细胞群，其用作药物、用于诱导移植耐受、用于治疗自身免疫性疾病或用于治疗炎性疾病。

[0036] 在另一方面，本发明涉及所述T-reg细胞群在制备药物中的用途，所述药物例如为用于预防、治疗或缓解与病症有关的一种或多种症状的药物，在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的，例如用于诱导移植耐受的药物，或用于治疗自身免疫性疾病的药物，或用于治疗炎性疾病的药物，或用于治疗诸如但不限于IV型超敏反应的变态反应的药物。

[0037] 另一方面，本发明涉及用于分离经照射的细胞群的方法，其包括在合适的条件下用可控制的电离辐射源照射所述细胞群。所述经照射的细胞群构成了本发明的另一方面。

[0038] 在另一方面，本发明涉及所述经照射的细胞群，其用作药物、用于诱导移植耐受、用于治疗自身免疫性疾病或用于治疗炎性疾病。

[0039] 在另一方面，本发明涉及所述经照射的细胞群在制备药物中的用途，所述药物例如为用于预防、治疗或缓解与病症有关的一种或多种症状的药物，在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的，例如用于诱导移植耐受的药物，或用于治疗自身免疫性疾病的药物，或用于治疗炎性疾病的药物。

[0040] 在另一方面，本发明涉及一种方法，其包括让所述细胞群经受干扰素γ(IFN-γ)处理。所述IFN-γ处理的细胞群构成了本发明的另一方面。

[0041] 在另一方面，本发明涉及所述经IFN-γ处理的细胞群，其用作药物、用于诱导移植耐受、用于治疗自身免疫性疾病或用于治疗炎性疾病。

[0042] 在另一方面，本发明涉及所述经IFN-γ处理的细胞群在制备药物中的用途，所述药物例如为用于预防、治疗或缓解与病症有关的一种或多种症状的药物，在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的，例如用于诱导移植耐受的药物，或用于治疗自身免疫性疾病

的药物，或用于治疗炎性疾病的药物。

[0043] 在另一方面，本发明涉及一种方法，其包括让所述细胞群(i)经受照射和(ii)IFN-γ刺激，其中处理(i)和(ii)以任何顺序进行。所述经照射的IFN-γ预刺激的细胞群或IFN-γ预刺激的经照射的细胞群构成了本发明的另一方面。

[0044] 在另一方面，本发明涉及所述经照射的IFN-γ预刺激的细胞群或IFN-γ预刺激的经照射的细胞群，其用作药物、用于诱导移植耐受、用于治疗自身免疫性疾病或用于治疗炎性疾病。

[0045] 在另一方面，本发明涉及所述经照射的IFN-γ预刺激的细胞群或IFN-γ预刺激的经照射的细胞群在制备药物中的用途，所述药物例如为用于预防、治疗或缓解与病症有关的一种或多种症状的药物，在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的，例如用于诱导移植耐受的药物，或用于治疗自身免疫性疾病的药物，或用于治疗炎性疾病的药物。

[0046] 另一方面，本发明涉及所述细胞群、所述T-reg细胞群、所述经照射的细胞群、所述经IFN-γ处理的细胞群、所述经照射的IFN-γ预刺激的细胞群或所述IFN-γ预刺激的经照射的细胞群用于预防、治疗或缓解与自身免疫性疾病、炎性病症或包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病有关的一种或多种症状的用途。

[0047] 在另一方面，本发明涉及在患有任何自身免疫性疾病、炎性病症或免疫介导的疾病的个体中预防、治疗或缓解与所述病症或疾病有关的一种或多种症状的方法，其包括向需要这种治疗的所述个体给予预防上或治疗上有效量的所述细胞群、所述T-reg细胞群、所述经照射的细胞群、所述经IFN-γ处理的细胞群、所述经照射的IFN-γ预刺激的细胞群或所述IFN-γ预刺激的经照射的细胞群。本发明还涉及这类方法在联合治疗中的用途，换言之，本发明的细胞群与一种或多种制剂共给药，或者是与第二种制剂或另一种制剂同时给药，或者是分开给药，例如顺序给药。

[0048] 在另一方面，本发明涉及一种药物组合物，其包含所述细胞群、所述T-reg细胞群、所述经照射的细胞群、所述经IFN-γ处理的细胞群、所述经照射的IFN-γ预刺激的细胞群或所述IFN-γ预刺激的经照射的细胞群以及药学上可接受的载体。

[0049] 在另一方面，本发明涉及用于区分成体多能细胞与分化细胞的方法，其包括证实在用IFN-γ刺激时所述细胞是否表达IDO的步骤。

[0050] 在另一方面，本发明涉及一种试剂盒，其包括所述细胞群、所述T-reg细胞群、所述经照射的细胞群、所述经IFN-γ处理的细胞群、所述经照射的IFN-γ预刺激的细胞群或所述IFN-γ预刺激的经照射的细胞群。

[0051] 附图简要说明

[0052] 图1显示了本发明提供的细胞的生长动力学，这些细胞分离自人脂肪组织并离体培养超过25细胞群体倍增数。

[0053] 图2显示了荧光免疫细胞计数的柱状图，其对应于从本发明提供的分离自人脂肪组织的细胞获得的表面标志物的特征。对应于同种型对照(阴性对照)的柱状图以灰色阴影显示。

[0054] 图3显示了将本发明提供的分离自人脂肪组织的细胞与不同促炎剂孵育不同时间段后对IDO表达的分析，通过RT-PCR(图3A)或Western印迹(图3B)检测。IL-1，白介素1；TNF-α，肿瘤坏死因子α；LPS，脂多糖；IFN-γ，干扰素γ；C-，阴性对照；C+，阳性对照；n.i.，未经

IFN-γ诱导的细胞。GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)被用作RT-PCR的上样对照。

[0055] 图4显示了本发明提供的分离自不同人组织(脂肪、骨髓、软骨和皮肤)的细胞经48小时IFN-γ处理后IDO表达的Western印迹检测。Ctrl-,阴性对照(培养基);Ctrl+,阳性对照;(-),未经IFN-γ处理的细胞;(+),经IFN-γ处理48小时的细胞。

[0056] 图5显示TNBS(2,4,6-三硝基苯磺酸)给药处理的小鼠中的体重减轻。该图显示了以本发明提供的分离自人脂肪组织的细胞给药后体重增加的剂量依赖性改善。10天后,接受了$1x10^6$细胞的小鼠与对照组相比无显著重量差异。

[0057] 图6显示了以本发明提供的分离自人脂肪组织的细胞给药后经TNBS处理的小鼠的存活率。同样,可观察到剂量依赖性,$1x10^6$细胞显示比$0.3x10^6$细胞更强的作用,尽管在两种情况下,所述细胞都显著改善了经TNBS处理的小鼠的存活率。

[0058] 图7显示了以$1x10^6$本发明提供的分离自人脂肪组织的细胞和$1x10^6$经30ng/ml IFN-γ预刺激48小时的相同细胞给药后经TNBS处理的小鼠体重的比较。该图显示,经TNBS处理的小鼠显示了严重的体重减轻,以及接受了细胞的小鼠3天后的明显改善。在8天后,这些小鼠甚至显示出体重增加,而对照小鼠(TNBS处理的小鼠,无细胞给药)仍显示了严重的体重减轻。此外,与未预刺激的细胞相比,经IFN-γ预刺激的细胞显示了从TNBS处理中更快速和更强的恢复。

[0059] 图8显示了图7的数据(作为“实验1”)和实施例5中描述的另外数据组“实验2”的另外数据。该图显示经TNBS处理的小鼠体重显著减轻和接受了细胞的小鼠中明显的改善。这种改善也可通过结肠炎的严重性来测量。

[0060] 图9显示,与未治疗小鼠相比,经细胞治疗的动物结肠中(局部反应)和血清中(全身反应)所有测试的促炎细胞因子(TNF-α、IL-6、IL-1b、IL-12和IFN-γ)和趋化因子(MIP-2和RANTES)都较少。

[0061] 图10显示了通过MPO活性测量的中性白细胞渗透在ASC治疗的小鼠中较低,当细胞经IFN-γ预刺激时则甚至更低。

[0062] 图11显示,通过细胞计数法,CFSE标记的细胞定位在经治疗的动物的引流淋巴结中。如果给药的细胞作为APC起作用,则这是预期的定位。

[0063] 图12显示IFN-γ处理在人ASC中诱导APC标志物。上列:未处理ASC的细胞计量柱状图;下列:用IFN-γ处理4天后ASC的细胞计量柱状图。同种型对照以灰色阴影显示。

[0064] 图13显示本发明的细胞降低CIA发病率和严重性。在注射有确定的CIA的小鼠中,通过临床评分或爪厚度测量,评估关节炎严重性。括号内的数字代表对照、i.p.和i.a.组中关节炎的发病率(第50天时关节炎评分>2的小鼠%)。照片显示了不同实验组小鼠爪肿胀的代表性实例(对照和ASC i.p.)。n=8-11只小鼠/每组。32天后相对于对照$p<0.001$。髓过氧化物酶(MPO)活性衡量中性白细胞在关节中的渗透。相对于对照*$p<0.001$。

[0065] 图14显示了对炎性反应的抑制。在免疫后第35天测定了炎性介质在未治疗(对照)或经ASC治疗的CIA小鼠中的全身和局部表达。A,关节中细胞因子/趋化因子的含量。通过分析未经免疫的小鼠的爪以评估基础反应。B,血清TNF-α和IL-1β水平。n=6-8只小鼠/组。相对于对照*$p<0.001$。

[0066] 图15显示了本发明的细胞下调CIA中Th1介导的反应。A,在第30天从未治疗(对照)或经ASC治疗的CIA小鼠中分离并在体外用不同浓度CII刺激的引流淋巴结(DLN)细胞的增

殖反应和细胞因子产生。用抗CD3抗体刺激DLN细胞(▼,未治疗的CIA小鼠;▽,AM治疗的CIA小鼠)被用于评估非特异性刺激。具有3个未免疫的DBA/1DLN细胞的池库被用于评估基础反应。n=5只小鼠/组。B,CII特异的产生细胞因子的T细胞的数量。来自未治疗(对照)或ASC治疗的CIA小鼠的DLN细胞在体外用CII(10μg/ml)再次刺激,并通过流式细胞计量法分析CD4和细胞内细胞因子表达(门控的CD4T细胞中IFN-γ/TNFα或IL-4/IL-10表达)。显示了相对于10^4CD4T细胞表达IFN-γ、IL-4和IL-10的T细胞的数量。所显示的数据代表了来自两个独立实验的合并值。C,从未治疗(对照)或经ASC治疗的CIA小鼠中分离并在体外用CII(10μg/ml)刺激48小时的滑膜细胞中CII特异的增殖反应。数据显示了来自每组3只动物的合并的滑膜细胞的结果。D,在35天时从未治疗(对照)的或经ASC治疗的CIA小鼠(8-12只小鼠/组)收集的血清中CII特异的IgG、IgG1和IgG2a水平。相对于对照*$p<0.001$。

[0067] 图16A显示了与未治疗(对照)的CIA小鼠相比,经本发明细胞治疗的CIA小鼠DLN和滑膜诱导了调节性T细胞($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)数量的增加,而没有效应T细胞数量的任何增加。

[0068] 图16B显示,经本发明细胞治疗的CIA小鼠,而不是对照(未治疗的)CIA小鼠含有特异抑制针对CII的效应T细胞反应的调节性T细胞。

[0069] 图17显示了ASC和淋巴细胞的共培养导致了对淋巴细胞增殖的抑制。

[0070] 图18显示了以5000个细胞/cm^2接种并以3ng/ml IFN-γ刺激多至120小时的ASC产生IDO,其活性通过采用HPLC测定的色氨酸代谢和犬尿酸产生来衡量。

[0071] 图19显示了以5000个细胞/cm^2接种并以3pg/ml IFN-γ刺激多至120小时没能产生IDO。没有检测到犬尿酸。

[0072] 图20显示了以500个细胞/cm^2接种并以3ng/ml IFN-γ刺激多至120小时没能产生显著量的IDO。

[0073] 图21A显示了明场像中已吞噬了葡聚糖FITC的细胞。图21B显示了采用绿色荧光蛋白滤片通过荧光显微镜测定的相同群。

[0074] 发明详细说明

[0075] 如先前所提及的,发明人已发现,存在于多种(如果不是所有的)结缔组织中并通过表达吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)而应答干扰素γ(IFN-γ)的具有多谱系潜能的某些细胞群能够在体内和体外用作免疫调节剂。所述细胞的免疫抑制性免疫调节作用可被用于预防、治疗或缓解一种或多种与病症有关的症状,在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的,所述病症包括但不限于自身免疫性疾病、炎性病症和包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病。

[0076] 定义

[0077] 为了方便理解本发明说明书,以下将解释本发明上下文中一些术语和用语的含义。需要时可伴随说明包括其它的定义。

[0078] 术语“抗原呈递细胞”(APC)指在其表面展示与MHC(主要组织相容性复合物)复合的外来抗原的细胞群。尽管机体内几乎每个细胞都能够将抗原呈递至T细胞,但术语“抗原呈递细胞”(APC)在本文限于那些特化的细胞,也称为专职APC,它们在表面表达HLAII,且衍生自单核-巨噬细胞谱系(例如,树突状细胞)。

[0079] 术语“自身免疫性疾病”指个体的一种异常状况,其特征在于该个体针对其自身细

胞、组织和/或器官的免疫反应导致细胞、组织和/或器官损伤。可用本发明细胞群治疗的自身免疫性疾病的说明性、非限定性实例包括斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森病、肾上腺的自身免疫性疾病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少症、贝切特病、大疱性类天疱疮、心肌病、口炎性腹泻-皮炎、慢性疲劳免疫缺乏综合征(CFIDS)、慢性炎性脱髓鞘性多神经病、许尔-斯特劳斯(Churg-Strauss综合征)、疤痕性类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、盘状狼疮、特发性混合性冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球肾炎、Graves病、格林巴利综合症(Guillain-Barre)、桥本氏甲状腺炎、特发性肺纤维变性、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA神经病、幼年型关节炎、扁平苔藓、梅尼挨病、混合型结缔组织病、多发性硬化、1型或免疫介导的糖尿病、重症肌无力、寻常天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多发性软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬变、牛皮癣、牛皮癣性关节炎、雷诺氏现象、莱特尔综合征、肉样瘤病、硬皮病、进行性全身性硬皮病、肖格伦氏综合征、古德帕斯彻综合征、僵人综合征、全身性红斑狼疮、红斑狼疮、大动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、眼葡萄膜炎、诸如疱疹样皮炎血管炎的血管炎、白癜风、韦格纳肉芽肿病,等等。

[0080] 术语“免疫调节剂”指抑制或减弱免疫系统的一种或多种生物学活性的制剂。免疫调节剂为抑制或减弱一种或多种免疫细胞(例如,T细胞)的一种或多种生物学活性(例如,增殖、分化、启动、效应子功能、产生细胞因子或表达抗原)的制剂。

[0081] 术语“炎性疾病”指个体的一种异常状况,其特征在于炎症,例如慢性炎症。炎性病症的说明性、非限定性实例包括但不限于类风湿性关节炎(RA)、炎性肠病(IBD)、哮喘、脑炎、慢性阻塞性肺病(COPD)、炎性骨质溶解、变态反应性疾病、脓毒性休克、肺纤维化(例如,特发性肺纤维化)、炎性血管炎(例如,结节性多动脉炎、韦格纳肉芽肿病、高安氏动脉炎、颞动脉炎以及淋巴瘤样肉芽肿)、创伤后血管成形术(例如血管成形术后再狭窄)、未分化脊椎关节病、未分化关节病、关节炎、炎性骨质溶解、慢性肝炎,以及慢性病毒感染或细菌感染导致的慢性炎症。

[0082] 应用于细胞群的术语“分离的”指从人或动物体分离的细胞群,其基本上不含在体内或体外与所述细胞群有关的一种或多种细胞群。

[0083] 术语“MHC”(主要组织相容性复合物)指编码细胞表面抗原呈递蛋白的基因亚型。在人类中,这些基因被称为人白细胞抗原(HLA)基因。这里,缩写MHC或HLA可互换使用。

[0084] 术语“个体”指动物,优选哺乳动物,包括非灵长类(例如,牛、猪、马、猫、狗、大鼠或小鼠)和灵长类(例如,猴或人)。在优选的实施方案中,所述个体是人。

[0085] 术语“T细胞”指免疫系统的细胞,其为表达T细胞受体(TCR)的淋巴细胞亚群。

[0086] 术语“调节性T细胞”(T-reg细胞)指有效抑制免疫系统活化和预防病理性自身反应即自身免疫性疾病的T细胞亚群。

[0087] 用在本文时,术语“治疗”指缓解与病症有关的一种或多种症状,其源于以本发明的细胞群、本发明的T-reg细胞群、经IFN-γ预刺激的本发明的细胞群或包含它们的药物组合物向需要所述治疗的个体给药,其中所述病症包括但不限于炎性病症、自身免疫性疾病或包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病。

[0088] 术语“联合治疗”指与其它活性制剂或治疗方式一起以本发明的方式使用本发明

的细胞群，用于缓解与病症有关的一种或多种症状，所述症状包括但不限于炎性病症、自身免疫性疾病或包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病。这些其它制剂或治疗可以包括已知用于治疗这类病症的药物和疗法。本发明的细胞群还可以与皮质激素、非类固醇类抗炎化合物或其它可用于治疗炎症的制剂联合。本发明的制剂与这些其它疗法或治疗方式的联合使用可以是同时的，或顺序给予，即，两种治疗可以分开，使得本发明细胞群或包含所述细胞群的药物组合物可以在所述其它疗法或治疗形式之前或之后给予。主治医师可以决定合适的顺序来给予与其它制剂、疗法或治疗形式联合的所述细胞群或包含所述细胞群的药物组合物。

[0089] 本发明的细胞

[0090] 一方面，本发明涉及来自结缔组织的分离的细胞群，以下称为“本发明的细胞群”，特征在于所述细胞群的细胞：

[0091] (a)不表达抗原呈递细胞(APC)特异的标志物；

[0092] (b)不组成型表达吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)，其中组成型理解为无需任何特异诱导就表达基因；

[0093] (c)以干扰素γ(IFN-γ)刺激时表达IDO；以及

[0094] (d)表现出分化为至少两种细胞谱系的能力。

[0095] 本发明的细胞群的细胞(以下称为本发明的细胞)来自结缔组织。术语“结缔组织”指衍生自间质组织，包括几种特征在于其细胞包括在细胞外基质内的组织。在结缔组织的不同类型中，包括脂肪和软骨组织。在一个特定的实施方案中，本发明的细胞来自脂肪组织的间质部分。在另一特定实施方案中，本发明的细胞从软骨细胞(在透明软骨中发现的唯一细胞)获得。在另一特定实施方案中，本发明的细胞从皮肤获得。此外，在另一特定实施方案中，本发明的细胞从骨髓获得。

[0096] 本发明的细胞可从来自任何适合动物(包括人)的任何适合的结缔组织源获得。通常，所述细胞从非病理性的出生后哺乳动物结缔组织获得。在一个优选的实施方案中，本发明的细胞得自结缔组织源，例如脂肪组织的间质部分、透明软骨、骨髓、皮肤等。此外，在一个优选的实施方案中，本发明的细胞群的细胞来自哺乳动物，例如啮齿类、灵长类等，优选来自人。

[0097] 如上所述，本发明的细胞的特征在于(i)不表达来自APC的特异标志物；(ii)不组成型表达IDO；(iii)以干扰素γ(IFN-γ)刺激时它们表达IDO；以及(iv)它们表现出分化为至少两种细胞谱系的能力。

[0098] 标志物

[0099] 本发明的细胞对于以下标志物CD11b、CD11c、CD14、CD45和HLAII中的至少一种、两种、三种、四种或优选全部为阴性，这些标志物为APC谱系的特异标志物。因此，本发明的细胞不构成之前描述的特化APC的亚群。

[0100] 此外，本发明的细胞对于以下细胞表面标志物中的至少一种、两种或优选全部为阴性：CD31、CD34和CD133。

[0101] 用于本文时，就细胞表面标志物而言，“阴性”指采用常规方法和装置(例如，Beckman Coulter Epics XL FACS系统，与可购得的抗体一起使用，采用现有技术中已知的标准操作)时，包含本发明细胞的细胞群中少于10％、优选9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、

2%、1%的细胞或没有细胞在流式细胞计量术中显示高于背景信号的特异性细胞表面标志物的信号。在一个特定实施方案中，本发明的细胞的特征在于它们表达以下细胞表面标志物中的至少一种、两种、三种、四种或优选全部：CD9、CD44、CD54、CD90和CD105；即本发明的细胞对于至少一种、两种、三种、四种和优选所有的所述细胞表面标志物(CD9、CD44、CD54、CD90和CD105)为阳性。优选地，本发明的细胞的特征在于它们具有显著表达水平的至少一种、两种、三种、四种和优选所有的所述细胞表面标志物(CD9、CD44、CD54、CD90和CD105)。本文所使用的用语“显著表达”指，采用常规方法和装置(例如，Beckman Coulter Epics XL FACS系统，与可购得的抗体一起使用，采用现有技术中已知的标准操作)时，包含本发明细胞的细胞群中多于10%、优选20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的细胞或所有细胞在流式细胞计量术中显示高于背景信号的特异性细胞表面标志物的信号。背景信号定义为与用于在常规FACS分析中检测每个表面标志物的特异抗体有相同同种型的非特异性抗体给出的信号强度。因此，对于被认为阳性的标志物，采用常规方法和装置(例如，Beckman Coulter Epics XL FACS系统，与可购得的抗体一起使用，采用现有技术中已知的标准操作)时，所观察到的特异信号比背景信号强度高10%、优选20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、500%、1000%、5000%、10000%或更多。

[0102] 任选地，本发明的细胞还为细胞表面标志物CD106(VCAM-1)阴性。这类细胞的实例为如本文所述的脂肪组织衍生的间质干细胞的某些群。

[0103] 可购得的和已知的针对所述细胞表面标志物(例如，细胞受体和跨膜蛋白)的单克隆抗体可被用于鉴定本发明的细胞。

[0104] IDO的表达

[0105] 本发明的细胞不组成型表达IDO，但是它们在用IFN-γ刺激时表达IDO。本发明的发明人进行的实验证实，通过常规RT-PCR和Western印迹分析测定，在用它们自身的其它促炎介质刺激时不诱导IDO表达，所述其它促炎介质例如为以浓度3ng/ml使用的白介素-1(IL-1)、以浓度50ng/ml使用的肿瘤坏死因子α(TNF-α)或以浓度100ng/ml使用的内毒素LPS。以IFN-γ(例如3ng/ml或更高)刺激还可诱导本发明细胞中HLAII的表达，产生按本文定义的细胞表面标志物的阳性信号。所述表达可由本领域技术人员采用任何已知的使得能检测特异蛋白表达的技术检测。优选地，所述技术为细胞计量术。

[0106] 分化

[0107] 本发明的细胞表现出增殖和分化为至少两种、更优选三种、四种、五种、六种、七种或更多种细胞谱系的能力。本发明的细胞可分化的细胞谱系的说明性、非限定性实例包括骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞、肌腱细胞、肌细胞、心肌细胞、造血支持性基质细胞、内皮细胞、神经元、星形细胞和肝细胞。

[0108] 通过常规方法可使本发明的细胞增殖并分化为其它谱系的细胞。鉴定和随后从它们的未分化的对应物分离分化细胞的方法也可通过现有技术中公知的技术来进行。

[0109] 本发明的细胞也能够离体扩增。即，分离后，本发明的细胞可被维持，并且能够在培养基中离体增殖。这种培养基例如由含有抗生素(例如，100单位/ml青霉素和100μg/ml链霉素)或不含抗生素的杜尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)和2mM谷氨酰胺组成，并补加有2-20%的胎牛血清(FBS)。当所用细胞需要时，改变或调节培养基和/或培养基补加成分的浓度在本领域技术人员的技术范围内。血清通常含有存活和扩增所需的细胞因子和非细胞因

子和组分。血清的实例包括FBS、牛血清(BS)、小牛血清(CS)、胎牛血清(FCS)、新生小牛血清(NCS)、山羊血清(GS)、马血清(HS)、猪血清、绵羊血清、兔血清、大鼠血清(RS)等。还考虑到，如果本发明的细胞为人来源的，则向细胞培养基添加人血清，优选自体来源的人血清。应理解，如果认为使补体级联的组分失活是必要的，则血清可在55-65℃被加热失活。调节血清浓度，从培养基取出血清也可用于促进一种或多种需要的细胞类型的存活。优选地，约2％至约25％的FBS浓度有益于本发明的细胞。在另一实施方案中，本发明的细胞可在具有确定组分的培养基中扩增，其中血清被血清白蛋白、血清转铁蛋白、硒和重组蛋白的组合替换，所述重组蛋白包括但不限于胰岛素、血小板衍生生长因子(PDGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)，这是现有技术中已知的。

[0110] 很多细胞培养基已经含有氨基酸；但是，一些需要在培养细胞前补加。这类氨基酸包括但不限于L-丙氨酸、L-精氨酸、L-天门冬氨酸、L-天门冬酰胺、L-半胱氨酸、L-胱氨酸、L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、L-甘氨酸等。

[0111] 通常也在细胞培养物中使用抗微生物剂，以减轻细菌、支原体和真菌污染。通常，所使用的抗生素或抗霉菌化合物为青霉素/链霉素混合物，但是还可包括，但不限于，两性霉素(Fungizone®)、氨苄青霉素、庆大霉素、博来霉素、潮霉素、卡那霉素、丝裂霉素等。

[0112] 也可在细胞培养物中有利地使用激素，所述激素包括但不限于D-醛固酮、乙烯雌酚(DES)、地塞米松、b-雌二醇、氢化可的松、胰岛素、催乳素、妊娠素、生长抑素/人生长激素(HGH)等。

[0113] 本发明细胞的维持条件也可含有使细胞保持在未分化形式的细胞因子。对本领域技术人员来说显而易见的是，在分化前，必须将抑制细胞分化的添加物从培养基中除去。还显然的是，不是所有的细胞都需要这些因子。实际上，根据细胞类型这些因子可引起不希望的作用。

[0114] 有利的是，本发明的细胞在体内无致瘤活性。因此，所述细胞的特征在于它们不表现致瘤活性，即它们不表现出产生肿瘤细胞的改变的行为或增殖表型。

[0115] 在一个实施方案中，本发明的细胞可被给予至患有自身免疫性疾病、炎性疾病或诸如移植器官和组织排斥的免疫介导的疾病的个体，以抑制免疫反应。因此，本发明的细胞不表现致瘤活性是必要的。

[0116] 可通过采用免疫缺陷小鼠品系进行动物研究来测试本发明细胞的致瘤活性。这些实验中，将数百万细胞皮下植入受体动物，所述动物饲养数周并分析肿瘤形成。在实施例3中公开了具体的测定。

[0117] 本发明的细胞可被转染或经遗传工程化为表达至少一种抗原性多肽。在一个实施方案中，所述抗原包括纯化多肽或合成多肽或重组多肽，其呈特定抗原，所述抗原被希望诱导耐受，或者来自这种抗原的氨基酸序列的短合成多肽片段。优选地，抗原的来源包括由供体组织移植物表达的抗原。还优选地，抗原的来源包括患者具有的自身免疫性病症所针对的蛋白。

[0118] 分离表达IDO的细胞的方法

[0119] 一方面，本发明涉及用于从结缔组织分离细胞群的方法，其中所述细胞群的细胞表现出的表型特征在于(i)不表达来自APC的特异标志物；(ii)不组成型表达IDO；(iii)以IFN-γ刺激时它们表达IDO；以及(iv)它们表现出分化为至少两种细胞谱系的能力，所述方

法包括以下步骤：

[0120] (i)从结缔组织样品制备细胞悬液；

[0121] (ii)从所述细胞悬液回收细胞；

[0122] (iii)在使得细胞能粘附到固体表面并增殖的条件下，在适合的细胞培养基中于固体表面上孵育所述细胞；

[0123] (iv)孵育后洗涤所述固体表面以除去非粘附细胞；

[0124] (v)选择在这种培养基中传代至少两次后仍粘附在所述固体表面的细胞；以及

[0125] (vi)确认所选择的细胞群表现目的表型。

[0126] 用在本文时，术语“固体表面”指任何允许本发明细胞粘附的材料。在一个特定实施方案中，所述材料为塑料材料，其经处理以促进哺乳动物细胞粘附至其表面，例如可购得的任选涂覆有聚D-赖氨酸或其它试剂的聚苯乙烯板。

[0127] 步骤(i)-(vi)可通过本领域技术人员已知的常规技术进行。简言之，本发明的细胞可通过常规手段从任何适合的结缔组织源获得，该结缔组织来自任何适合的动物，包括人，例如来自人脂肪组织或软骨组织。动物可为活的或死的，只要该动物的结缔组织细胞是有活力的。通常，采用公知的操作，如手术或脂肪抽吸术，从活供体获得人脂肪组织细胞。实际上，由于脂肪抽吸操作是如此广泛，脂肪抽吸流出物为本发明细胞来自的特别优选来源。因此，在一个特定实施方案中，本发明的细胞来自通过脂肪抽吸而获得的人脂肪组织的间质部分。在另一特定实施方案中，本发明的细胞来自通过关节镜技术获得的人透明关节软骨。在另一特定实施方案中，本发明的细胞来自通过活检技术获得的人皮肤。还在另一特定实施方案中，本发明的细胞来自通过抽吸术获得的人骨髓。

[0128] 优选，将结缔组织样品进行洗涤然后处理乙分离本发明的细胞与材料的剩余部分。在一个方案中，结缔组织样品用生理上适合的盐水溶液(例如，磷酸盐缓冲盐水(PBS))洗涤，然后有力搅动并让其沉降，这为从该组织除去松弛物质(例如，损伤组织、血液、红细胞等)的步骤。因此，通常重复洗涤和沉降步骤，直至上清液相对无碎片。剩余的细胞通常以不同大小的团块存在，并采用被设计为在最小化对细胞自身损伤的同时解离粗结构的步骤继续操作。一种实现此目的的方法为用减弱或破坏细胞间连接的酶(例如，胶原酶、分散酶、胰蛋白酶等)处理洗过的细胞团块。这种酶促处理的量和持续时间将随所采用的条件而变化，但是这类酶的使用在现有技术中是公知的。作为这种酶促处理的替换或与其结合，细胞团块可采用其它处理解离，例如机械搅动、声能、热能等。如果通过酶促方法实现解离，最好在合适的时间段之后中和酶，以使对细胞的有害作用降至最低。

[0129] 解离步骤通常产生聚集细胞的浆液或悬液和大体上不含基质细胞(例如，红细胞、平滑肌细胞、内皮细胞、成纤维细胞和干细胞)的液体部分。分离过程的下一阶段为将聚集的细胞与本发明的细胞分开。这可通过离心实现，离心迫使细胞成为被上清液覆盖的沉淀物。然后，可弃去上清液，并将沉淀物悬浮在生理上适合的液体中。此外，悬浮的细胞通常包括红细胞，在大多数方案中，最好是将它们裂解。选择性裂解红细胞的方法在现有技术中是已知的，任何适合的方案都可采用(例如，在高渗或低渗介质中孵育，通过采用氯化铵裂解，等等)。当然，如果红细胞被裂解，则剩下的细胞应与裂解物分离，例如通过过滤、沉淀或密度分级分离。

[0130] 无论红细胞是否被裂解，悬浮的细胞都可被连续的洗涤、再离心和重悬浮一次或

多次，以得到更大的纯度。或者，可基于细胞表面标志物情况或基于细胞大小和粒度分离细胞。

[0131] 在最后的分离和重悬浮之后，可培养细胞，并且，如果需要，测定数量和活力来评估产率。合乎需要地，采用适合的细胞培养基，以合适的细胞密度和培养条件于使细胞不分化的情况下在固体表面上培养。因此，在一个特定的实施方案中，在适合的细胞培养基[例如，DMEM，通常补加有5-15％(例如10％)的合适血清，例如胎牛血清或人血清]存在下，于使细胞不分化的情况下在固体表面(通常由塑料材料制成，例如陪替培养皿(Petri dish)或细胞培养瓶)上培养细胞，并且在使得细胞能粘附到固体表面并增殖的条件下孵育。孵育后，洗涤细胞以除去非粘附细胞和细胞碎片。使细胞在相同培养基中和相同条件下培养维持，直至它们达到足够的融合，通常是约80％的细胞汇合，必要时置换细胞培养基。在达到期望的细胞汇合后，可采用分离剂如胰蛋白酶并以合适的细胞密度(通常2,000-10,000个细胞/cm^2)接种至更大的细胞培养表面通过连续传代使细胞扩增。因此，细胞然后在这种培养基中在不分化情况下传代至少两次，而同时仍保留它们的发育表型，更优选地，细胞传代至少10次(例如，至少15次或甚至至少约20次)而不丧失发育表型。通常，细胞以适合的密度接种，例如在约100个细胞/cm^2至约100,000个细胞/cm^2之间(例如约500个细胞/cm^2至约50,000个细胞/cm^2，或者更具体地，在约1,000个细胞/cm^2至约20,000个细胞/cm^2之间)。如果以低密度接种(例如，约300个细胞/cm^2)，则细胞可较容易地同源分离。例如，几天之后，以这种密度接种的细胞将增殖为同质群。在一个特定实施方案中，细胞密度在2,000-10,000个细胞/cm^2之间。

[0132] 选择经这种处理之后仍粘附在固体表面的包括至少两次传代的细胞，通过常规方法分析目的表型以确认本发明细胞的身份，如下文将提及的。在第一代后仍粘附在固体表面的细胞为异质来源的；因此，所述细胞必须经过至少另一次传代。作为上述方法的结果，获得了具有目的表型的同质细胞群。实施例1描述了从人脂肪组织和从人软骨组织分离本发明细胞的详细方式。

[0133] 通常，在第二代后仍粘附在固体表面的细胞显示出目的表型，尽管还需要证实所述细胞可被用于本发明。因此，在至少两代后细胞粘附至固体表面构成了用于选择本发明细胞的本发明优选实施方案。可通过使用常规手段进行目的表型的确认。

[0134] 可通过任何适合的常规技术鉴定细胞表面标志物，通常是基于阳性/阴性选择；例如，可使用针对待确认其是否存在于细胞内的细胞表面标志物的单克隆抗体；尽管其它的技术也可使用。因此，在一个特定的实施方案中，使用针对CD11b、CD11c、CD14、CD45、HLAII、CD31、CD34和CD133中的一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种或优选其全部的单克隆抗体，以证实所述标志物不存在于所选细胞中；并且使用针对CD9、CD44、CD54、CD90和CD105中的一种、两种、三种、四种或优选其全部的单克隆抗体以证实所述标志物的至少一种并优选其全部的存在或者可检测的表达水平。所述单克隆抗体为已知的，可购得或者可由本领域技术人员通过常规方法获得。

[0135] 选择的细胞中IFN-γ可诱导的IDO活性可通过任何适合的测定法确定。例如，所选择的细胞可用IFN-γ刺激，并测定IDO表达；然后可进行IDO蛋白表达的常规Western印迹分析，并且可通过色氨酸-犬尿酸转化测量在IFN-γ刺激后所选细胞的IDO酶活性，例如通过高压液相色谱(HPLC)分析和光度计测定上清液中犬尿酸浓度作为读数。由于本发明的细胞

在特定条件下表达IDO，任何允许检测IFN-γ刺激后IDO活性的适合技术可以被用于选择本发明的细胞。在实施例2中公开了在所选细胞中确定IFN-γ可诱导的IDO活性的适合的测定法。所产生的IDO的量取决于每平方厘米的细胞数量和IFN-γ的浓度，其中细胞数量优选在5000个细胞/cm^2或更高的水平，但是不限于该浓度，IFN-γ的浓度理想地为3ng/ml或更多，但是不限于该浓度。在所描述的情况下所产生的IDO的活性在24小时或更长时间后导致产生可检测的μM范围的犬尿酸。

[0136] 所选细胞分化为至少两种细胞谱系的能力可通过现有技术中已知的常规方法测定。

[0137] 如果需要，可采用适用于克隆细胞群的方法同源扩增本发明提供的细胞和细胞群。例如，增殖的细胞群可通过物理方式挑取并接种进不同板(或多孔板的孔)中。或者，可以以有利于将单个细胞置于每孔中的统计比例将细胞亚克隆至多孔板(例如，约0.1至约1个细胞/孔，或甚至约0.25至约0.5个细胞/孔，如0.5个细胞/孔)。当然，可通过将细胞以低密度接种(例如，在陪替培养皿或其它适合的基质中)并采用诸如克隆环的设备将它们与其它细胞分离，来克隆所述细胞。克隆群的产生可在任何合适的培养基中扩增。任何情况下，所分离的细胞可被培养至适合的可评估其发育表型的点。

[0138] 发明人进行的其它研究已证实在不诱导分化情况下本发明细胞的离体扩增可在延长的时间段实现，例如通过使用特异筛选的适合的血清批次(例如胎牛血清或人血清)。测定活力和产率的方法在现有技术中是已知的(例如，台盼蓝排除法)。

[0139] 如果需要，分离本发明细胞群的细胞的任何步骤和操作可手动进行。或者，可通过一种或多种适合的设备促进和/或自动进行分离所述细胞的过程，所述适合的设备的实例在现有技术中是已知的。

[0140] 本发明细胞的用途

[0141] 本发明的细胞可被用于预防、治疗或缓解与病症有关的一种或多种症状，在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的，所述病症包括但不限于自身免疫性疾病、炎性病症和包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病。

[0142] 因此，在另一方面，本发明的细胞被用作药物。在一个特定实施方案中，含有本发明细胞的药物可以被用于在患有自身免疫性疾病或炎性病症或包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病的个体中诱导移植耐受或用于治疗并由此缓解所述病症或疾病的症状。因此，本发明的细胞可被用于在治疗上或预防上治疗并由此缓解患有任何所述病症的个体中自身免疫性病症或炎性病症的症状或缓解患有所述疾病的个体中免疫介导的疾病的症状。

[0143] 本文所使用的术语“病症”和“疾病”可互换使用，指个体的异常状况。具体地，术语“自身免疫性疾病”与术语“自身免疫性病症”可互换使用，指个体中以该个体针对其自身细胞、组织和/或器官的免疫反应而引起细胞、组织和/或器官损伤为特征的异常状况。术语“炎性疾病”与术语“炎性病症”可互换使用，指个体中以炎症、优选慢性炎症为特征的异常状况。自身免疫性疾病可以与或者不与炎症相关。此外，炎症可以由或者不由自身免疫性病症引起。因此，某些病症可以以自身免疫性病症和炎性病症为特征。

[0144] 通常不是很清楚一些个体中可以导致自身免疫的某些异常状况的机制，但是可以涉及遗传和外部因素。例如，细菌、病毒或药物可以在已具有自身免疫性病症遗传倾向的个

体中触发自身免疫反应方面起作用。例如，有人提出，具有某些普通变态反应的个体更容易患有自身免疫性病症。

[0145] 实际上，任何自身免疫性疾病、炎性病症或免疫介导的疾病都可用本发明的细胞治疗。可被治疗的所述疾病和病症的说明性、非限定性实例为之前列在标题“定义”下的那些。在一个特定实施方案中，所述炎性疾病为慢性炎性疾病，例如IBD或RA。

[0146] 另一方面，本发明涉及本发明的细胞在制备用于预防、治疗或缓解与病症有关的一种或多种症状的药物中的用途，，在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的，所述病症包括但不限于自身免疫性疾病、炎性病症和包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病。因此，本发明还涉及本发明的细胞在制备药物中的用途，所述药物用于抑制免疫反应，或用于诱导移植耐受，或用于治疗自身免疫性疾病，或用于治疗炎性病症。所述自身免疫性疾病和炎性疾病的实例在上文已有说明。在一个特定实施方案中，疾病为炎性疾病，例如慢性炎性疾病，如IBD或RA。

[0147] 另一方面，本发明涉及本发明的细胞用于制备或产生调节性T细胞(T-reg)的用途，所述调节性T细胞即有效抑制免疫系统的活化并预防病理性自身反应(即自身免疫性疾病)的细胞。

[0148] 本发明的T-reg细胞

[0149] 另一方面，本发明还涉及调节性T细胞(T-reg)，即，有效抑制免疫系统活化和预防病理性自身反应即自身免疫性疾病的细胞(包括Foxp3+CD4+CD25+T-reg和产生IL-10/TGFb的Tr1细胞)，可从本发明的细胞获得，以下称为本发明的T-reg细胞。

[0150] 因此，另一方面，本发明涉及用于分离本发明T-reg细胞群的方法，其包括：

[0151] (a)使本发明的细胞群与外周血淋巴细胞接触，以及

[0152] (b)选择本发明的T-reg细胞群。

[0153] 随后，本发明的细胞可被用于产生T细胞亚群，即本发明的T-reg细胞，其构成了本发明的另一方面。可通过本领域技术人员已知的常规手段分离本发明的T-reg细胞。

[0154] 本发明的T-reg细胞可被用于预防、治疗或缓解与病症有关的一种或多种症状，在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的，所述病症包括但不限于自身免疫性疾病、炎性病症和包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病。所述用途构成了本发明的另一方面。

[0155] 因此，在另一方面，本发明的T-reg细胞被用作药物。在一个特定实施方案中，含有本发明T-reg细胞的药物可以被用于在患有自身免疫性病症或炎性病症或包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病的个体中诱导移植耐受或用于治疗并由此缓解所述病症或疾病的症状。因此，本发明的T-reg细胞可被用于在治疗上或预防上治疗并由此缓解患有任何所述病症的个体中自身免疫性病症或炎性病症的症状或缓解患有所述疾病的个体中免疫介导的疾病的症状。

[0156] 实际上，任何自身免疫性疾病、炎性病症或免疫介导的疾病都可用本发明的T-reg细胞治疗。可被治疗的所述疾病和病症的说明性、非限定性实例为之前列在标题“定义”下的那些。在一个特定实施方案中，所述炎性疾病为慢性炎性疾病，例如IBD或RA。

[0157] 另一方面，本发明涉及本发明的T-reg细胞在制备药物中的用途，所述药物为用于预防、治疗或缓解与病症有关的一种或多种症状的药物，在所述病症中调节个体的免疫系

统是有益的，这些病症包括但不限于自身免疫性疾病、炎性病症和包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病。因此，本发明还涉及本发明的T-reg细胞在制备药物中的用途，所述药物为用于抑制免疫反应、或用于诱导移植耐受、用于治疗自身免疫性疾病或用于治疗炎性病症的药物。所述自身免疫性疾病和炎性疾病的实例在上文已有说明。在一个特定实施方案中，疾病为炎性疾病，例如慢性炎性疾病，如IBD或RA。

[0158] 本发明还提供了本发明的细胞群在产生对所选抗原或抗原组具有特异性的T-reg细胞中的用途，以及它们在治疗与该抗原或抗原组有关的疾病或病症中的用途。这类抗原的实例为在自身免疫性疾病中起作用的那些，例如类风湿性关节炎、克罗恩病、IV型超敏反应、狼疮、牛皮癣以及本领域中已知的和本文其它部分描述的其它自身免疫性病症。简言之，在所选抗原、抗原组或表达和/或呈递该抗原或抗原组的细胞类型的存在下，在体外培养本发明的细胞群。本发明的细胞群可任选地使用IFN-γ、LPS或本领域已知的其它活化剂预刺激。在培养约2、4、6、12、24、48或更多小时后，优选约12至24小时后，让本发明的细胞群进一步与从个体获得的外周血白细胞共培养，这任选地在除去抗原、抗原组或携带所述抗原的细胞后进行。这种共培养将导致产生对所选抗原具有特异性的T-reg细胞，其可被用于治疗该个体。任选地，采用本领域已知的培养技术，可使这些T-reg细胞在给予患者之前在数量上离体扩增。不希望被理论束缚，发明人相信本发明的细胞群能够在细胞表面通过II型HLA呈递所选抗原(看起来由IFN-γ诱导)至外周血白细胞，由此T-reg细胞在外周血白细胞群内被增加和/或活化。如实施例11所示，发明人已证实本发明的细胞群能够吞噬小分子量的分子并由此能够在IFN-γ刺激后通过II型HLA分子呈递这类分子。通过这种机制呈递所选抗原以及与外周血白细胞的相互作用被认为导致上述T-reg细胞的产生。作为备选的处理方法，如实施例7中所描述的，本发明的细胞群可在没有任何共培养情况下被直接给予体内，并可产生特异的T-reg细胞，继而其可治疗病症。

[0159] 因此，本发明提供了在体外获得对所选抗原或抗原组具有特异性的T-reg细胞的方法，其包括：

[0160] (a)使本发明的细胞群与所选抗原或抗原组接触；

[0161] (b)使所述细胞群与外周血白细胞接触；

[0162] (c)选择对所述所选抗原或抗原组具有特异性的T-reg细胞群。

[0163] 本发明还提供了步骤(c)的特异T-reg细胞在治疗与所述所选抗原或抗原组有关的疾病和病症中的用途，其通过将所述T-reg细胞给予外周血白细胞从其获得的个体而实现。用在这种方法中的本发明的细胞群可以来自所述个体(自体的)或来自供体(同种异体的)。

[0164] 本发明的经照射的细胞

[0165] 如果需要，本发明的细胞可采用适合的可控制的电离辐射源照射，例如γ辐射器。本领域技术人员必须通过实验调节照射条件，以确定赋予引起本发明细胞长期生长停滞的照射剂量所需的暴露时间。所述照射剂量可为例如1-100、5-85、10-70、12-60Gy，更优选15-45Gy。

[0166] 由于本发明的细胞可被用于治疗用途，在向个体给药之前照射本发明的细胞可以是有益的，因为所述照射处理使细胞不能在该个体内长期增殖或存活。所述经照射的细胞构成了本发明的另一方面。

[0167] 本发明的经照射细胞可被用于预防、治疗或缓解与病症有关的一种或多种症状，在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的，所述病症包括但不限于自身免疫性疾病、炎性病症和包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病。所述用途构成了本发明的另一方面。

[0168] 因此，另一方面，本发明的经照射的细胞被用作药物。在一个特定实施方案中，含有本发明的经照射的细胞的药物可以被用于在患有自身免疫性病症或炎性病症或包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病的个体中诱导移植耐受或用于治疗并由此缓解所述病症或疾病的症状。因此，本发明的经照射的细胞可被用于在治疗上或预防上治疗并由此缓解患有任何所述病症的个体中自身免疫性病症或缓解炎性病症的症状或患有所述疾病的个体中免疫介导的疾病的症状。

[0169] 实际上，任何自身免疫性疾病、炎性病症或免疫介导的疾病都可用本发明的经照射的细胞治疗。可被治疗的所述疾病和病症的说明性、非限定性实例为之前列在标题“定义”下的那些。在一个特定的实施方案中，所述炎性疾病为慢性炎性疾病，例如IBD或RA。

[0170] 另一方面，本发明涉及本发明的经照射的细胞在制备药物中的用途，所述药物为用于预防、治疗或缓解与病症有关的一种或多种症状的药物，在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的，所述病症包括但不限于自身免疫性疾病、炎性病症和包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病。因此，本发明还涉及本发明的经照射的细胞在制备药物中的用途，所述药物为用于抑制免疫反应、用于诱导免疫耐受、用于治疗自身免疫性疾病或用于治疗炎性病症的药物。所述自身免疫性疾病和炎性疾病的实例在上文已有说明。在一个特定实施方案中，疾病为炎性疾病，例如慢性炎性疾病，如IBD或RA。

[0171] 本发明的经IFN-γ预刺激的细胞

[0172] 另外，如果需要，本发明的细胞可用IFN-γ预刺激。用IFN-γ预刺激的方法能对本领域技术人员来说是显而易见的，并在实施例2中给出操作。优选地，采用浓度0.1至100、0.5至85、1至70、1.5至50、2.5至40ng/ml或更优选3至30ng/ml浓度的IFN-γ预刺激细胞，刺激时间优选长于12小时，如13、18、24、48、72小时或更长的时间。

[0173] 由于本发明的细胞可被用于治疗用途，在向个体给药前用IFN-γ预刺激本发明的细胞可以是有益的，因为经IFN-γ预刺激的细胞的给药和个体中IDO表达之间的时间可被缩短。

[0174] 因此，另一方面，本发明涉及一种方法，其包括用IFN-γ处理本发明的细胞，以预刺激所述细胞。可通过所述方法获得的细胞，以下称为“本发明的经IFN-γ预刺激的细胞”，构成了本发明的另一方面。本发明的经IFN-γ预刺激的细胞可通过本领域技术人员已知的常规方法分离。

[0175] 本发明的经IFN-γ预刺激的细胞可被用于预防、治疗或缓解与病症有关的一种或多种症状，在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的，所述病症包括但不限于自身免疫性疾病、炎性病症和包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病。所述用途构成了本发明的另一方面。

[0176] 因此，在另一方面，本发明的经IFN-γ预刺激的细胞被用作药物。在一个特定实施方案中，含有本发明经IFN-γ预刺激的细胞的药物可以被用于在患有自身免疫性病症或炎性病症或包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病的个体中诱导移植耐受或用于

治疗并由此缓解所述病症或疾病的症状。因此，本发明的经IFN-γ预刺激的细胞可被用于在治疗上或预防上治疗并由此缓解患有任何所述病症的个体中自身免疫性病症或炎性病症的症状或缓解患有所述疾病的个体中免疫介导的疾病的症状。

[0177] 实际上，任何自身免疫性疾病、炎性病症或免疫介导的疾病都可用本发明的经IFN-γ预刺激的细胞治疗。可被治疗的所述疾病和病症的说明性、非限定性实例为之前列在标题“定义”下的那些。在特定实施方案中，所述炎性疾病为慢性炎性疾病，例如IBD或RA。

[0178] 另一方面，本发明涉及本发明的经IFN-γ预刺激的细胞在制备药物中的用途，所述药物为用于预防、治疗或缓解与病症有关的一种或多种症状的药物，在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的，所述病症包括但不限于自身免疫性疾病、炎性病症和包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病。因此，本发明还涉及本发明的经IFN-γ预刺激的细胞在制备药物中的用途，所述药物为用于抑制免疫反应、用于诱导移植耐受、用于治疗自身免疫性疾病或用于治疗炎性病症的药物。所述自身免疫性疾病和炎性疾病的实例在上文已有说明。在一个特定实施方案中，疾病为炎性疾病，例如慢性炎性疾病，如IBD或RA。

[0179] 本发明的经照射的经IFN-γ预刺激的细胞和本发明的经IFN-γ预刺激的经照射的细胞

[0180] 另外，如果需要，本发明的细胞可经任意顺序的照射和IFN-γ刺激处理，即，本发明的细胞可首先经照射，所得到的细胞随后经IFN-γ刺激，反之亦然，本发明的细胞可首先经IFN-γ刺激，所得到的细胞随后经照射。

[0181] 因此，一方面，本发明的细胞可用IFN-γ预刺激，并且所得到的细胞(本发明的经IFN-γ预刺激的细胞)可经照射而生成经照射的细胞，以下称为“本发明的经照射的经IFN-γ预刺激的细胞”。

[0182] 另一方面，本发明的细胞可经照射，所得到的细胞(本发明的经照射的细胞)可经IFN-γ预刺激而生成经IFN-γ预刺激的细胞，以下称为“本发明的经IFN-γ预刺激的经照射的细胞”。

[0183] 以IFN-γ预刺激细胞的方法以及照射细胞的方法是本领域技术人员公知的，上文之前已提及它们中的一些。任何所述方法都可使用。

[0184] 因此，另一方面，本发明涉及一种方法，其包括使本发明的细胞经历(i)照射，和(ii)IFN-γ刺激，其中处理(i)和(ii)可以任何顺序进行，以便照射经IFN-γ预刺激的细胞，或INF-γ预刺激经照射的细胞。可根据所述方法获得的细胞，下文分别称为“本发明的经照射的经IFN-γ预刺激的细胞”或“本发明的经IFN-γ预刺激的经照射的细胞”，构成了本发明的其它方面。本发明的所述经照射的经IFN-γ预刺激的细胞以及本发明的所述经IFN-γ预刺激的经照射的细胞可通过本领域技术人员已知的常规方法分离。

[0185] 由于本发明的细胞可被用于治疗用途，在向个体给予先前经照射和IFN-γ刺激(以任何顺序)的本发明的细胞可以是有益的，原因之前已提及，例如，让细胞接受照射处理以使细胞不能在个体中长期增殖或存活，而向个体给药前用IFN-γ预刺激细胞可以涉及经IFN-γ预刺激的细胞的给药和个体中IDO表达之间的时间的缩短。

[0186] 本发明的经照射的经IFN-γ预刺激的细胞以及本发明的经IFN-γ预刺激的经照射的细胞可被用于预防、治疗或缓解与病症有关的一种或多种症状，在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的，所述病症包括但不限于自身免疫性疾病、炎性病症和包括移植器

官和组织排斥在内的免疫介导的疾病。所述用途构成了本发明的另一方面。

[0187] 因此，另一方面，本发明的经照射的经IFN-γ预刺激的细胞以及本发明的经IFN-γ预刺激的经照射的细胞被用作药物。在一个特定实施方案中，含有本发明的经照射的经IFN-γ预刺激的细胞或本发明的经IFN-γ预刺激的经照射的细胞的药物可以被用于在患有自身免疫性病症或炎性病症或包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病的个体中诱导移植耐受或用于治疗并由此缓解所述病症或疾病的症状。因此，本发明的经照射的经IFN-γ预刺激的细胞以及本发明的经IFN-γ预刺激的经照射的细胞可被用于在治疗上或预防上治疗并由此缓解患有任何所述病症的个体中自身免疫性病症或炎性病症的症状或缓解患有所述疾病的个体中免疫介导的疾病的症状。

[0188] 实际上，任何自身免疫性疾病、炎性病症或免疫介导的疾病都可用本发明的经照射的经IFN-γ预刺激的细胞或本发明的经IFN-γ预刺激的经照射的细胞治疗。可被治疗的所述疾病和病症的说明性、非限定性实例为之前列在标题“定义”下的那些。在一个特定实施方案中，所述炎性疾病为慢性炎性疾病，例如IBD或RA。

[0189] 另一方面，本发明涉及本发明的经照射的经IFN-γ预刺激的细胞或本发明的经IFN-γ预刺激的经照射的细胞在制备药物中的用途，所述药物为用于预防、治疗或缓解与病症有关的一种或多种症状的药物，在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的，所述病症包括但不限于自身免疫性疾病、炎性病症和包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病。因此，本发明还涉及本发明的经照射的经IFN-γ预刺激的细胞或本发明的经IFN-γ预刺激的经照射的细胞在制备药物中的用途，所述药物为用于抑制免疫反应、用于诱导免疫耐受、用于治疗自身免疫性疾病或用于治疗炎性病症的药物。所述自身免疫性疾病和炎性疾病的实例在上文已有说明。在一个特定实施方案中，疾病为炎性疾病，例如慢性炎性疾病，如IBD或RA。

[0190] 药物组合物

[0191] 本发明提供了用于治疗、预防和缓解与病症有关的一种或多种症状的药物组合物，在所述病症中调节个体的免疫系统是有益的，所述病症例如为自身免疫性疾病、炎性病症和包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病。

[0192] 因此，在另一方面，本发明涉及药物组合物，以下称为本发明的药物组合物，其包含本发明的细胞、本发明的T-reg细胞、本发明的经照射的细胞、本发明的经IFN-γ预刺激的细胞、本发明的经照射的经IFN-γ预刺激的细胞或本发明的经IFN-γ预刺激的经照射的细胞以及药学上可接受的载体。两种或多种所述类型细胞的组合包括在本发明提供的药物组合物的范围内。

[0193] 本发明的药物组合物包含预防上或治疗上有效量的一种或多种预防剂或治疗剂(即，本发明的细胞、本发明的T-reg细胞、本发明的经照射的细胞、本发明的经IFN-γ预刺激的细胞、本发明的经照射的经IFN-γ预刺激的细胞或本发明的经IFN-γ预刺激的经照射的细胞，或其组合)和药学上可接受的载体。在一个特定实施方案中，术语“药学上可接受的”指联邦或州政府的管理机构批准的或在美国药典、欧洲药典或其它普遍认可的药典中列出的用在动物、更尤其人中的那些。术语“载体”指稀释剂、佐剂、赋形剂或与治疗剂一起给药的介质。如果需要，该组合物也可含有小量的pH缓冲剂。适合的药物组合物的实例描述在E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿制药学)”中。这类组合

物会含有预防或治疗上有效量的预防剂或治疗剂，优选纯化的形式，连同适量的载体，以便提供适合向个体给药的形式。制剂应该与给药模式匹配。在一个优选的实施方案中，药物组合物为无菌的，形式适合于给药至个体，优选动物个体，更优选哺乳动物个体以及最优选人个体。

[0194] 本发明的药物组合物可以为多种形式。这包括例如固体、半固体和液体剂型，例如冻干制剂、液体溶液或混悬液、可注射和可输注溶液等。优选的形式取决于预期的给药模式和治疗应用。

[0195] 本发明的细胞群或含有所述细胞群的药物组合物向有需要的个体给药可通过常规手段进行。在一个特定实施方案中，将所述细胞群通过这样的方法给予个体，即包括将细胞转移至体外(例如，作为植入或移植前的移植物)或者体内的所需组织，转移至所需组织而直接转移至动物组织的方法。可通过任何适合的方法将细胞转移至所需组织，这通常随组织类型变化。例如，通过用含有细胞的培养基浸泡(或输注)移植物，可将细胞转移至该移植物。或者，可将细胞接种至组织内的所需位点而建立细胞群。可采用诸如导管、套针、套管、支架(其可接种有细胞)等的装置将细胞转移至体内位点。

[0196] 本发明的细胞可在向个体给药前经照射。这种处理使得细胞不能在个体内长期增殖或存活。因此，在一个特定实施方案中，本发明的药物组合物包含本发明的经照射的细胞。

[0197] 本发明的细胞还可在向个体给药前使用IFN-γ预刺激，以缩短细胞给药和个体内IDO表达之间的时间。因此，在一个特定实施方案中，本发明的药物组合物包含本发明的经IFN-γ预刺激的细胞。

[0198] 此外，本发明的细胞可在向个体给药前以任意顺序被照射和被IFN-γ预刺激。因此，在一个特定实施方案中，本发明的药物组合物包含本发明的经照射的经IFN-γ预刺激的细胞或本发明的经IFN-γ预刺激的经照射的细胞。

[0199] 本发明的细胞群和药物组合物可用在联合治疗中。在一个特定实施方案中，该联合治疗被给药至患有炎性病症的个体，该炎性病症对一种或多种抗炎剂不显疗效。在另一实施方案中，该联合治疗与其它类型的抗炎剂结合使用，所述其它抗炎剂包括但不限于非甾体抗炎药(NSAID)、甾体抗炎药、β-激动剂、抗胆碱能剂(anticholingeric)以及甲基黄嘌呤。NSAID的实例包括但不限于布洛芬、塞来考昔、双氯酚酸、依托度酸、非诺洛芬、吲哚美辛、酮咯酸(ketoralac)、噁丙嗪、萘布美酮、舒林酸、托美丁(tolmentin)、罗非考昔、甲氧萘丙酸、酮基布洛芬、萘布美酮等。这类NSAID通过抑制环氧合酶(例如，COX-1和/或COX-2)起作用。甾体抗炎药物的实例包括但不限于糖皮质激素、地塞米松、可的松、氢化可的松、泼尼松、泼尼松龙、去炎松、柳氮磺胺吡啶以及类花生酸类，如血栓烷和白细胞三烯类。也可使用单克隆抗体，如英夫利昔单抗。

[0200] 根据上述实施方案，本发明的联合治疗可在这类抗炎剂给药之前、同时或之后使用。此外，这类抗炎剂不包括这里表征为淋巴组织诱导剂和/或免疫调节剂的制剂。

[0201] 区分成体多能细胞和分化细胞的方法

[0202] 在IFN-γ刺激时表达IDO可被用于区分表达所述酶的细胞和不表达IDO的细胞。

[0203] 因此，在另一方面，本发明涉及区分成体多能细胞和分化细胞的方法，包括验证在用IFN-γ刺激时多能细胞是否表达IDO的步骤。测定使用IFN-γ刺激时的IDO可通过任何常

规技术进行;在一个实施方案中,测定使用IFN-γ刺激时的IDO可按实施例2中公开的进行。

[0204] 如上所述,本方面细胞群的细胞的特征在于其不组成型表达IDO,而是仅在用IFN-γ刺激时表达。此外,除了IFN-γ,其它的促炎分子如IL-1、TNF-α或内毒素自身不诱导本发明细胞群的细胞中IDO的表达。这个特征可被用于区分本发明细胞群的细胞和其它细胞。

[0205] 试剂盒

[0206] 另一方面,本发明涉及包括细胞群的试剂盒,该细胞群含有(i)本发明的细胞和/或(ii)本发明的T-reg细胞和/或(iii)本发明的经照射的细胞和/或(iv)本发明的经IFN-γ预刺激的细胞和/或(v)本发明的经照射的经IFN-γ预刺激的细胞和/或(vi)本发明的经IFN-γ预刺激的经照射的细胞。本发明的试剂盒可以包含一种、两种、三种、四种、五种或所有这些细胞类型。

[0207] 治疗方法

[0208] 另一方面,本发明涉及一种细胞群用于预防、治疗或缓解与自身免疫性疾病、炎性病症或包括移植器官和组织排斥在内的免疫介导的疾病有关的一种或多种症状的用途,所述细胞群含有本发明的细胞、本发明的T-reg细胞群、本发明的经照射的细胞、本发明的经IFN-γ预刺激的细胞、本发明的经照射的经IFN-γ预刺激的细胞或本发明的经IFN-γ预刺激的经照射的细胞。在一个特定实施方案中,所述细胞群可以被用于在患有自身免疫性病症或炎性病症或免疫介导的疾病的个体中诱导移植耐受或用于治疗并由此缓解所述病症或疾病的症状。所述自身免疫性疾病和炎性疾病的实例上文已有描述。在一个特定实施方案中,疾病为炎性疾病,例如慢性炎性疾病,如IBD或RA。

[0209] 另一方面,本发明提供了在患有自身免疫性疾病、炎性病症或免疫介导的疾病的个体中预防、治疗或缓解与所述病症或疾病有关的一种或多种症状的方法,其包括向需要这种治疗的所述个体给予预防上或治疗上有效量的含有本发明的细胞、本发明的T-reg细胞、本发明的经照射的细胞、本发明的经IFN-γ预刺激的细胞、本发明的经照射的经IFN-γ预刺激的细胞或本发明的经IFN-γ预刺激的经照射的细胞的细胞群。在一个特定实施方案中,所述细胞群可以被用于在患有所述病症或疾病的个体中诱导移植耐受,或用于治疗并由此缓解自身免疫性病症或炎性病症或免疫介导的疾病的症状。所述自身免疫性疾病和炎性疾病的实例在前文已有描述。在一个特定实施方案中,疾病为炎性疾病,例如慢性炎性疾病,如IBD或RA。

实施例

[0210] 以下将通过实施例更详细地描述本发明,这些实施例决非意于限制本发明的范围,相反,这些实施例将用于参照附图解释本发明。

[0211] 实施例1

[0212] 分离和扩增本发明的细胞

[0213] I.材料和方法

[0214] 从脂肪组织分离本发明的细胞

[0215] 在局部麻醉和全身镇静情况下,通过吸脂术获得人脂肪组织。将空的钝头插管通过小切口(直径小于0.5cm)引入皮下空间。随着轻轻抽吸,将插管移动穿过脂肪组织腹壁区室以机械破坏脂肪组织。将盐水溶液和血管收缩剂肾上腺素注射进脂肪组织区室以使失血

降至最低。以此方式，从每个待治疗患者获得80ml至100ml的粗脂肪抽吸物。

[0216] 将该粗脂肪抽吸物用无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS;Gibco BRL,Paisley,Scotland,UK)充分洗涤以除去血细胞、盐水和局部麻醉剂。37℃下，在平衡盐溶液(5mg/ml;Sigma,St.Louis,USA)中用II型胶原酶溶液(0.075％;Gibco BRL)消化细胞外基质30分钟以除去细胞部分。接着通过加入等体积的细胞培养基(含有10％胎牛血清(FBS;Gibco BRL)的杜尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM;Gibco BRL))使胶原酶失活。将细胞悬液以250x g离心10分钟。将细胞重悬在0.16M NH_4Cl中并让其在室温(RT)下静置5分钟以裂解红细胞。将混合物以250x g离心，并将细胞在加有10％FBS和1％氨苄青霉素/链霉素混合物(Gibco BRL)的DMEM中重悬浮，然后使它们滤过40μm网并以10-30x 10^3个细胞/cm^2接种在组织培养瓶中。

[0217] 从关节软骨中分离本发明的细胞

[0218] 通过关节镜技术从供体的膝关节获得人透明关节软骨。从股骨髁的外缘取出约4cm^2的软骨，但是活检组织的大小可以随供体年龄、关节结构和外科医生的判断而改变。将活检组织悬浮在无菌盐水溶液中，并保存在3-8℃，直至使用。活软骨样品不应保存超过48小时。

[0219] 将软骨活检组织转移至1ml的含1％FBS的无菌细胞培养基中，并切碎以获得尽可能小的组织碎片。将所得到的软骨碎片悬浮在含有0.1％(w/v)胶原酶的类似培养基中，并在连续和轻微搅拌下于37℃孵育。消化后，将所获得的细胞悬液滤过40μm网并以10-30x 10^3个细胞/cm^2接种在组织培养瓶中。

[0220] 细胞的离体扩增

[0221] 在含5％CO_2的空气气氛中，于37℃下分别培养来自脂肪组织和关节组织的细胞24小时。接着，将培养瓶用PBS洗涤以除去非粘附细胞和细胞碎片。将细胞在相同培养基和相同条件下培养维持，直至它们达到约80％汇合，其中每3至4天置换培养基。然后以胰蛋白酶-EDTA(Gibco BRL)以1:3的稀释度使细胞传代，该稀释度对应于大约5-6x 10^3个细胞/cm^2的细胞密度。从人脂肪组织分离的和离体培养超过25个细胞群倍增数的细胞的细胞生长动力学显示在图1中。

[0222] 细胞表征

[0223] 采用培养传代1至25次的细胞进行细胞表征。采用以荧光标记物标记的抗体通过流式细胞计量法分析来自脂肪组织和关节软骨组织的细胞是否存在一系列表面标志物，这些表面标志物包括：

[0224] -抗原呈递细胞(APC)标志物:CD11b、CD11c、CD14、CD45和HLAII；

[0225] -内皮细胞标志物:CD31；

[0226] -其它标志物:CD9、CD34、CD90、CD44、CD54、CD105和CD133。

[0227] 流式细胞计量法中所用的抗体如下：

[0228] -CD9:MM2/57克隆小鼠IgG2b-FITC标记的抗体(Serotec)；

[0229] -CD11b:ICRF44克隆小鼠IgG1-FITC标记的抗体(Serotec)；

[0230] -CD11c:BU15克隆小鼠IgG1-FITC标记的抗体(Serotec)；

[0231] -CD14:UCHM1克隆小鼠IgG2a-FITC标记的抗体(Serotec)；

[0232] -CD31:WM59克隆小鼠IgG1-FITC标记的抗体(Serotec)；

[0233] -CD34:QBEND 10克隆小鼠IgG1-FITC标记的抗体(Serotec)；

[0234] -CD44:F10-44-2克隆小鼠IgG2a-FITC标记的抗体(Serotec)；

[0235] -CD45:F10-89-4克隆小鼠IgG2a-FITC标记的抗体(Serotec)；

[0236] -CD54:15.2克隆小鼠IgG1-FITC标记的抗体(Serotec)；

[0237] -CD90:F15-42-1克隆小鼠IgG1-FITC标记的抗体(Serotec)；

[0238] -CD105:SN6克隆小鼠IgG1-FITC标记的抗体(Serotec)；以及

[0239] -抗人HLA II型DP、DQ、DR:WR18克隆小鼠IgG2a-FITC标记的抗体(Serotec)；

[0240] -CD133:293C3克隆小鼠IgG2b-PE标记的抗体(Miltenyi Biotec)。

[0241] II.结果

[0242] 结果总结在图2中，其显示所分析的细胞为CD9、CD44、CD54、CD90和CD105阳性，CD11b、CD11c、CD14、CD31、CD34、CD45、CD133和HLAII阴性。所述细胞对于内皮或APC谱系的所有特异性测试标志物(CD11b、CD11c、CD14、CD45和HLAII)为阴性。

[0243] 实施例2

[0244] 通过干扰素γ(IFN-γ)诱导吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)

[0245] I.材料和方法

[0246] 将从人脂肪组织(实施例1)分离的本发明的细胞以10,000个细胞/cm^2的密度接种在组织培养板上，并在之前用于细胞扩增的条件下孵育48小时。接着，将不同的促炎刺激剂加入至培养基，包括：

[0247] ●白介素-1(IL-1):3ng/ml

[0248] ●干扰素γ(IFN-γ):3ng/ml

[0249] ●肿瘤坏死因子α(TNF-α):5ng/ml

[0250] ●脂多糖(LPS):100ng/ml

[0251] 将细胞在相应刺激剂存在下孵育30分钟至48小时的时间，然后通过胰蛋白酶消化收集它们，并在含有蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液(50mM Tris-HCl pH 7.4,150mM NaCl,1mM PMSF(苯基-甲基磺酰氟)、1mM EDTA(乙二胺四乙酸)、5μg/ml抑肽酶、5μg/ml亮肽酶素、1％Triton x-100、1％去氧胆酸钠、0.1％SDS)中裂解。然后将细胞裂解液用在采用IDO特异性单克隆抗体的Western印迹中(小鼠单克隆IgG,克隆10.1,来自Upstate cell signaling solutions(Upstate细胞信号传导溶液))。另外，从经处理的细胞分离RNA，并采用IDO cDNA(GenBank登录号M34455(GI:185790))的特异引物通过逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)实验进行测试。

[0252] (正向5'GGATTCTTCCTGGTCTCTCTATTGG 3'；

[0253] 反向5'CGGACTGAGGGATTTGACTCTAATG 3')。

[0254] II.结果

[0255] 本实验的结果[图3A(RT-PCR)和3B(Western印迹)]显示，本发明提供的细胞不组成型表达IDO。在IFN-γ刺激后2小时诱导了IDO mRNA，但是蛋白的表达仅在诱导8-24小时之间可检测到。

[0256] 当本发明的细胞从其它的人组织(包括：骨髓、关节软骨和皮肤)分离时，得到了类似的结果(图4)。

[0257] 实施例3

[0258] 致瘤行为

[0259] I.材料和方法

[0260] 用如实施例1中描述的分离自人脂肪组织的本发明细胞进行本实验。在皮下植入免疫缺陷小鼠(5x 10^6个细胞/小鼠)之前,将细胞样品培养2-7周。该小鼠为从Charles River Laboratories得到的nu/nu株。小鼠缺乏胸腺,为T细胞缺陷的。在处死和病理研究前,追踪观察经植入的小鼠4个月。

[0261] 病理学研究:在所有动物上进行尸检。检查动物脑、肺、心脏、肝、肾、脾、腹部淋巴结和注射位点中的肉眼可见异常。收集组织用于组织学检查(石蜡切片和苏木精-伊红(H&E)染色),包括注射位点、肺和淋巴结。

[0262] 将畸胎瘤细胞系(N-TERA)用作阳性对照,其在相同条件下植入。

[0263] II.结果

[0264] 结果显示,尽管植入畸胎瘤细胞的所有小鼠都在数周后出现了肿瘤,但是植入本发明细胞的动物无一在植入后的前4个月内出现肿瘤[数据未示出]。

[0265] 实施例4

[0266] 治疗小鼠中实验上诱导的IBD

[0267] I.材料和方法

[0268] 按以前的描述(Neurath,M.F.,et al.1995.Antibodies to IL-12abrogate established experimental colitis in mice(抗IL-12抗体消除了小鼠中已建立的实验性结肠炎).J.Exp.Med.182,1281-1290)在Balb/c小鼠(6-8周龄,Jackson Laboratories,Bar Harbor,ME)中诱导结肠炎。简言之,以氟烷轻度麻醉小鼠,从肛门将3.5F导管插入直肠内4cm。为了诱导结肠炎、将100μl于50%乙醇中的50或30mg/ml的TNBS(2,4,6-三硝基苯磺酸)(Sigma Chemical Co,St.Louis,MO)(以破坏肠上皮屏障)通过所述装于1ml注射器的导管缓慢给予肠腔。对照小鼠仅接受50%乙醇(100μl)。在TNBS灌注后12小时,用不同数量的如实施例1中所描述的从人脂肪组织获得的本发明细胞(0.3x 10^6和1x 10^6细胞,悬浮于磷酸缓冲盐水,PBS)直肠内给药治疗动物。在一些实验中,所述细胞在注射前用200U/ml IFN-γ预处理24小时。每天监测动物的存活、腹泻表现和体重减轻(图5、6和7)。

[0269] II.结果

[0270] 如图5所示,在给予本发明的细胞后,有体重增加的剂量依赖性改善。实际上,在图6中可观察到剂量依赖性,1x10^6细胞显示比0.3x10^6细胞更强的作用。在两种情况下,所述细胞都显著改善了经TNBS处理的小鼠的存活率。

[0271] 此外,与未经预刺激的细胞相比,经IFN-γ预刺激的细胞显示了从TNBS处理中更快和更强的恢复(图7)。该图显示,经TNBS处理的小鼠体重明显减轻,以及接受了细胞的小鼠中明显的改善。

[0272] 实施例5

[0273] 在另外的小鼠实验中治疗实验诱导的炎性肠病(IBD):

[0274] I.材料和方法

[0275] 在实施例4相同实验的扩展中,按先前所描述的(Neurath,M.F.,et al.1995.Antibodies to IL-12abrogate established experimental colitis in mice(抗IL-12抗体消除小鼠中已建立的实验性结肠炎).J.Exp.Med.182,1281-1290)在Balb/c小鼠(6-8周龄,Jackson Laboratories,Bar Harbor,ME)中诱导结肠炎。简言之,以氟烷轻

度麻醉小鼠，从肛门将3.5F导管插入直肠内4cm。为了诱导结肠炎、将100μl于50％乙醇中的50或30mg/ml的TNBS(2,4,6-三硝基苯磺酸)(Sigma Chemical Co,St.Louis,MO)(以破坏肠上皮屏障)通过所述装于1ml注射器的导管缓慢给予肠腔。对照小鼠仅接受50％乙醇(100μl)。在TNBS灌注后12小时，用不同数量的如实施例1中所描述的从人脂肪组织(ASC)获得的本发明细胞(0.3x 10^6和1x10^6细胞，悬浮于磷酸缓冲盐水，PBS)直肠内或腹膜内(i.p.)给药治疗动物。在一些实验中，所述细胞在注射前用200U/ml IFN-γ预处理24小时。另外，在一些实验中，在向小鼠给药之前用CFSE(荧光探针)标记细胞。每天监测动物的存活、腹泻表现和严重程度以及体重减轻。在疾病的急性期(第3天)收集血清和从结肠获得蛋白提取物。通过ELISA测定蛋白提取物中和血清中的细胞因子/趋化因子含量。通过流式细胞计数法分析肠系膜淋巴结中是否存在CSFE标记细胞。

[0276] II.结果

[0277] 所有情况下，与未治疗小鼠相比，用本发明细胞(ASC)治疗的小鼠显示了它们的炎性症状明显改善。当细胞局部(直肠内)或全身(i.p.)给药时，这种改善是剂量依赖的，对于测试的所有参数都是统计学显著的，尽管后一途径似乎更有效。如之前在图5中所显示的，在给予本发明细胞后，有体重增加的剂量依赖性改善。事实上，可在图6、7和8中观察到剂量依赖性，1x10^6细胞显示了比0.3x10^6细胞更强的作用。在两种情况下，所述细胞都显著改善了经TNBS的处理小鼠的存活率。

[0278] 此外，与未经预刺激的细胞相比，经IFN-γ预刺激的细胞显示了从TNBS处理中更快和更强的恢复(图8)。该图显示，经TNBS处理的小鼠体重明显减轻，以及接受了细胞的小鼠中明显的改善。这种改善也可通过结肠炎的严重性来衡量。

[0279] 在本发明细胞治疗的动物中，炎性免疫反应显著减弱。如图9所示，与未治疗小鼠相比，经细胞治疗的动物的结肠中(局部反应)和血清中(全身反应)所有测试的促炎细胞因子(TNF-a、IL-6、IL-1b、IL-12和IFN-γ)和趋化因子(MIP-2和RANTES)都较少。这种抑制性反应在经IFN-γ预刺激的细胞治疗的动物中被增强。另一方面，与未治疗的TNBS损伤动物和对照动物相比，ASC治疗小鼠的结肠中免疫调节细胞因子IL-10增加。此外，通过MPO活性测量的中性白细胞渗透在ASC治疗的动物中较低，当细胞经IFN-γ预刺激时甚至更低(图10)。

[0280] 通过细胞计量法发现标记的细胞定位在经治疗动物的引流淋巴结中(图11)。如果所给药的细胞被用作APC，则这是预期的定位。

[0281] 实施例6

[0282] IFN-γ刺激后在本发明的细胞中诱导APC标志物

[0283] I.材料与方法

[0284] 如实施例1中所描述的，本发明的细胞从人皮下脂肪组织(ASC)获得。在最少3次培养传代后，让细胞在标准培养基或含有3ng/ml IFN-γ的标准培养基中孵育4天。之后，对细胞的一些与免疫反应相关(特别与抗原呈递细胞(APC)的活性相关)的表面标志物进行染色。这些标志物包括以下：

[0285] ●HLA-II(DP、DQ、DR)，该受体向T细胞呈递外来抗原片段，引发适应性免疫反应(这是T细胞活化的第一信号)。本发明的细胞不组成型表达HLA-II。所用的抗体得自Serotec。

[0286] ●CD40,该蛋白结合在活化的T细胞表面表达的CD40L。本发明的细胞组成型表达不可检测的或非常低水平的CD40。所用的抗体得自Serotec。

[0287] ●ICAM-1(CD54),为参与T细胞和APC结合的主要蛋白。其表达为APC和T细胞之间其它相互作用正确进行所需要的。本发明的细胞组成型表达低至中等水平的ICAM-1。所用的抗体得自Serotec。

[0288] ●共刺激蛋白的B7家族成员(它们为T细胞活化输送第二信号):

[0289] ○CD80(B7-1),得自Serotec的抗体。

[0290] ○CD86(B7-2),得自Serotec的抗体。

[0291] ○ICOSL(B7-H2),得自e-Bioscience的抗体。

[0292] ○B7-H4,得自e-Bioscience的抗体。

[0293] ○PD-L1(B7-H1),得自e-Bioscience的抗体。

[0294] ○PD-L2(B7-DC),得自e-Bioscience的抗体。

[0295] 前四个主要输送刺激性信号(促进诱导T细胞效应性克隆),而PD-L1和PD-L2主要是致耐受性的(促进诱导T细胞无反应性失活)。本发明的细胞不组成型表达它们中的任一个。

[0296] II.结果

[0297] 在IFN-γ处理后,本发明的细胞诱导HLA-II、PD-L1和PD-L2的表达,以及CD40和ICAM-1的显著上调。本实验的结果显示在图12中。

[0298] 这些结果是极其相关的,因为,连同诱导IDO活性,它们证实本发明的细胞在IFN-γ处理时显示致耐受性APC的表型特征。

[0299] 实施例7

[0300] 用ASC治疗胶原诱导的关节炎(CIA)

[0301] I.材料与方法

[0302] 通过皮下(s.c.)注射含有200μg于完全弗氏佐剂(CFA)中的鸡II型胶原(CII)和200μg的结核分支杆菌(Mycobacterium tuberculosis)H37RA的乳剂,在DBA1/Jlac雄性小鼠(6-8周龄)中诱导实验性关节炎。根据之前已制定的评分系统,通过测量上肢和下肢关节的炎症-发红-关节僵硬,由两个不同的技术人员每天跟踪CIA的进展。

[0303] 当临床症状显示了CIA的确立时(免疫后(p.i.)23天),用如实施例1所描述的从人脂肪组织获得的$2x10^5$本发明细胞(ASC)腹腔内注射动物,每天一次,持续5天,或者用PBS注射作为对照。或者,CIA小鼠在受累关节的一个中关节内(i.a.)注射一次。如前所述跟踪的经处理的动物的进展,在免疫后50天时对它们实施安乐死。测量血液和关节内的几个参数,包括:关节细胞因子、血清细胞因子、免疫球蛋白同种型以及表型和淋巴细胞的细胞因子产生。

[0304] II.结果

[0305] 如图13、14和15所示,本发明的细胞明显降低小鼠模型中的CIA发病率和严重性。尤其是,对免疫反应的作用与对Th1反应(IFN-γ、TNFα、IL-2、IL-1β、IL-6、IL-12、MIP2、RANTES和IgG2a)的强烈抑制一致,没有Th2反应(IL-4、IgG1)的任何增强,并诱导高水平的免疫调节型细胞因子(IL-10和TGF-β)。

[0306] 实施例8

[0307] 用本发明的细胞体内诱导调节性T细胞

[0308] I.材料与方法

[0309] 在类似于实施例7描述的研究中，通过细胞计量法从未治疗和经ASC治疗的CIA小鼠的引流淋巴结(DLN)和滑膜分离效应T细胞($CD4^+CD25^-Foxp3^-$)和调节性T细胞($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)，并评估每个细胞群中的细胞数量。

[0310] 为了评估存在于经ASC治疗的CIA小鼠中调节性T细胞抑制CII特异性效应细胞的能力，进行了增殖性测定，其中从CIA小鼠分离的自身反应T细胞与来自未治疗的(对照)或经ASC治疗的CIA小鼠的增加量的DLN T细胞(调节性T细胞)共培养(比例为1/64至1/1)，并用CII(10μg/ml)和脾APC刺激。

[0311] II.结果

[0312] 如图16A所示，与未经治疗(对照)的CIA小鼠相比，本发明细胞治疗的CIA小鼠的DLN和滑膜诱导了调节性T细胞($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)数量的增加，而没有效应性T细胞数量的任何增加。

[0313] 显示在图16B中的数据证实，用本发明细胞治疗的小鼠，而不是对照(未治疗)CIA小鼠，含有特异抑制应答CII的效应T细胞的调节性T细胞。

[0314] 总之，用本发明的细胞治疗实验性自身免疫性疾病(CIA)动物模型诱导了能够抑制自身反应性T细胞效应性反应的抗原特异性调节性T细胞的出现。

[0315] 实施例9

[0316] 淋巴细胞增殖测定

[0317] 将通过实施例1的方法获得的本发明的脂肪衍生ASC以5000个细胞/cm^2接种(含有或不含200.000个淋巴细胞(活化的，w/10μgPHA/ml))，并共培养3天。通过H3掺入测量淋巴细胞的增殖。如图17所示，ASC与淋巴细胞的共培养导致对淋巴细胞增殖的86％抑制。加入不同浓度1甲基-色氨酸(1-MT)逆转了这种抑制。1-MT为不可代谢的色氨酸类似物。该测定证实通过IDO的色氨酸代谢为诱导本发明细胞的免疫抑制活性所需。

[0318] 实施例10

[0319] 与细胞数量和IFN-γ浓度有关的ASC效力(IDO产生)

[0320] 材料和方法

[0321] HPLC:

[0322] 采用Waters 1515等强度HPLC泵、Waters 717自动进样器和Waters 2487双波长吸光度检测器进行常规HPLC。

[0323] HPLC-操作

[0324] 在于磷酸钾缓冲液(50mM pH 6.0)的10％乙腈中配制范围100μM至100mM的色氨酸和犬尿酸新鲜溶液。从这些储备溶液中，将50μl色氨酸和10μl犬尿酸以及940μl BSA(70g/l)或10％FCS组合以制成对照样品并在-80℃储存。

[0325] 样品制备：将来自样品(细胞培养物)的200μl或更多悬浮液收集在Eppendorf管中并在-80℃保存。融解样品和对照样品，向Eppendorf管中的每200μl样品加入200μl的50mM磷酸钾缓冲液(pH6.0)。将50μl的2M TCA(三氯乙酸)加至Eppendorf管。涡旋震荡该管并在4℃以13.000g离心10分钟。从该Eppendorf管取出150μl用于测量。

[0326] 用于HPLC测量的柱制备

[0327] 以本领域已知的方法制备HPLC柱并用流动相平衡，该流动相由于5％乙腈中的40mM柠檬酸钠(pH5)组成。将150μl样品的50μl上述样品注入柱(C18反相)中。通过700μl/分钟的等强度流速进行分离。在365nm进行L-犬尿酸的光度计检测，对于L-色氨酸，在280nm检测。

[0328] 结果

[0329] 如图18显示的，以5000个细胞/cm^2接种并以3ng/ml IFN-γ刺激多至120小时的ASC产生IDO，其活性通过采用HPLC测定的色氨酸代谢和犬尿酸产生来衡量。以5000个细胞/cm^2接种并以3pg/ml IFN-γ刺激多至120小时的ASC不产生IDO。没有犬尿酸被检测到(图19)。类似地，以500个细胞/cm^2接种并以3ng/ml IFN-γ刺激多至120小时的ASC不产生显著量的IDO(图20)。

[0330] 实施例10

[0331] ASC吞噬小分子的能力:

[0332] 材料与方法

[0333] 将4kDa-葡聚糖-FITC(Sigma)加至实施例1中培养24小时的细胞。洗涤细胞并分析荧光FITC的掺入。

[0334] 结果

[0335] 图21A显示经洗涤的细胞群的细胞明场像。图21B显示了通过本领域已知的采用绿色荧光蛋白滤片的荧光显微镜检测的相同细胞群。在图21B中可见的对荧光标记物的摄取显示了细胞能够吞噬小重量分子，这表明，这些细胞能够经由通过用IFN-γ另外处理细胞而诱导的II型HLA呈递抗原。

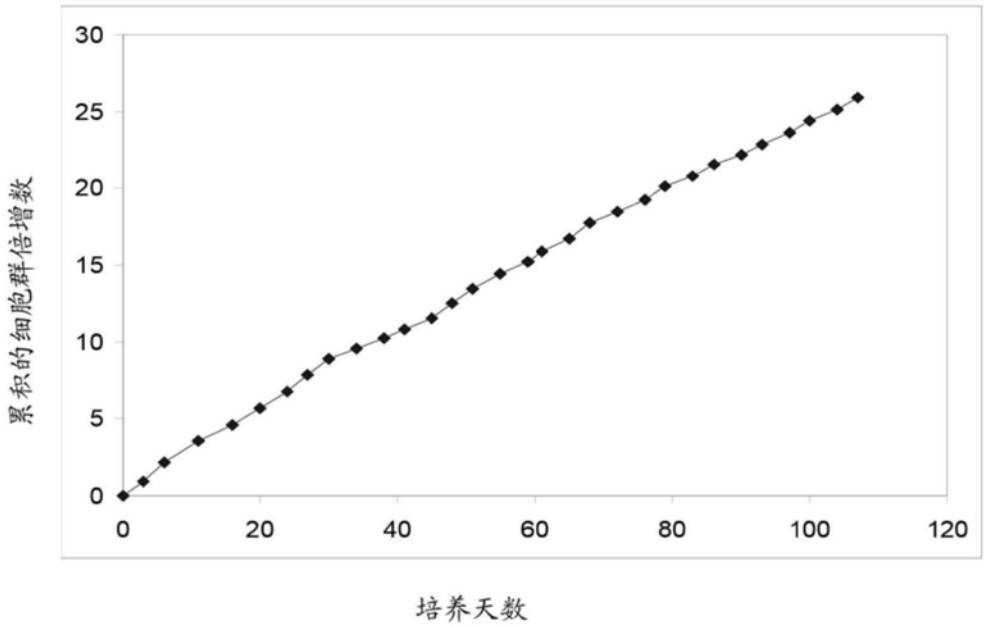


图1

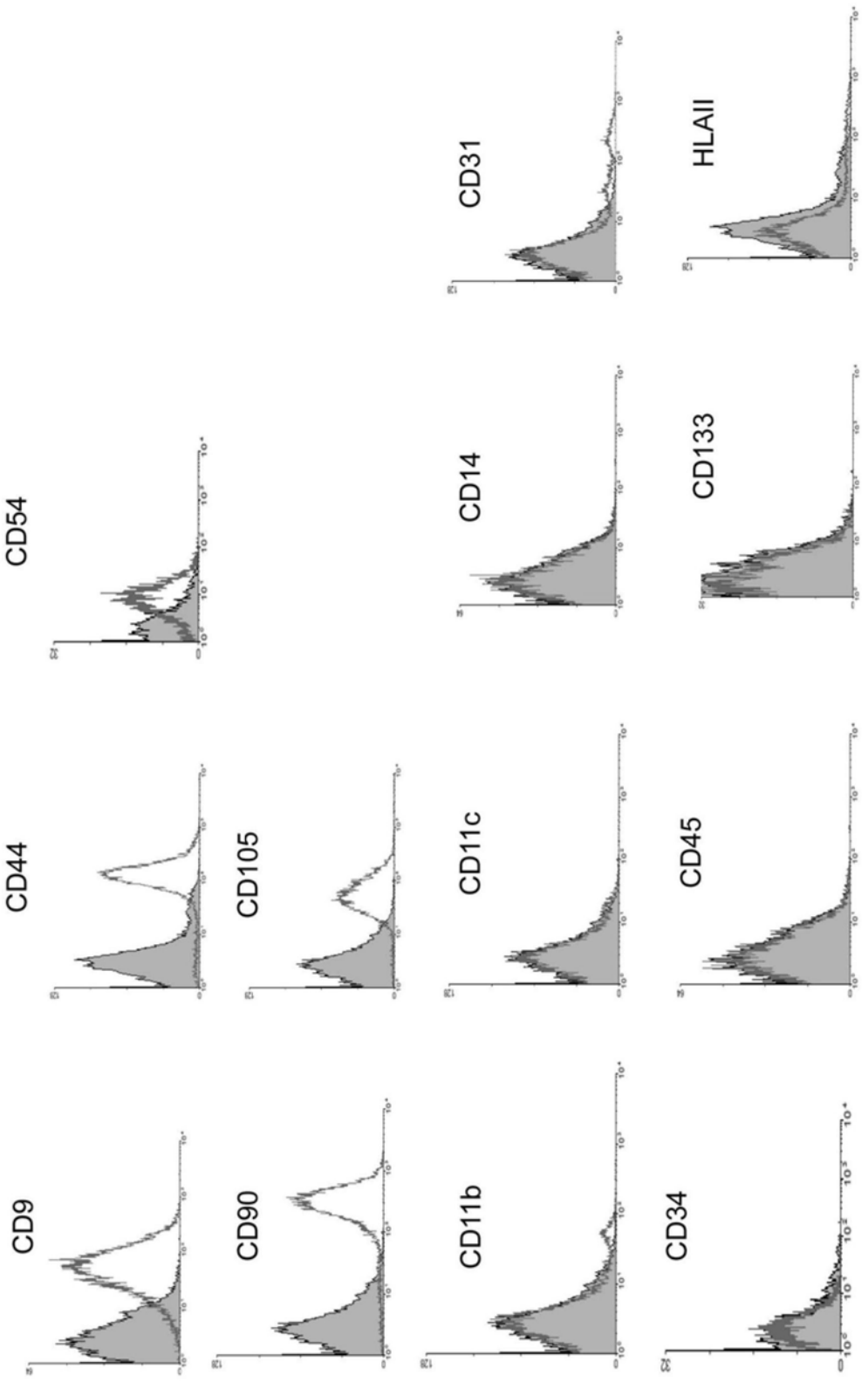

CD54
CD44
CD105
CD14
CD133
CD31
HLAII
CD9
CD90
CD11b
CD11c
CD45
CD34

图2

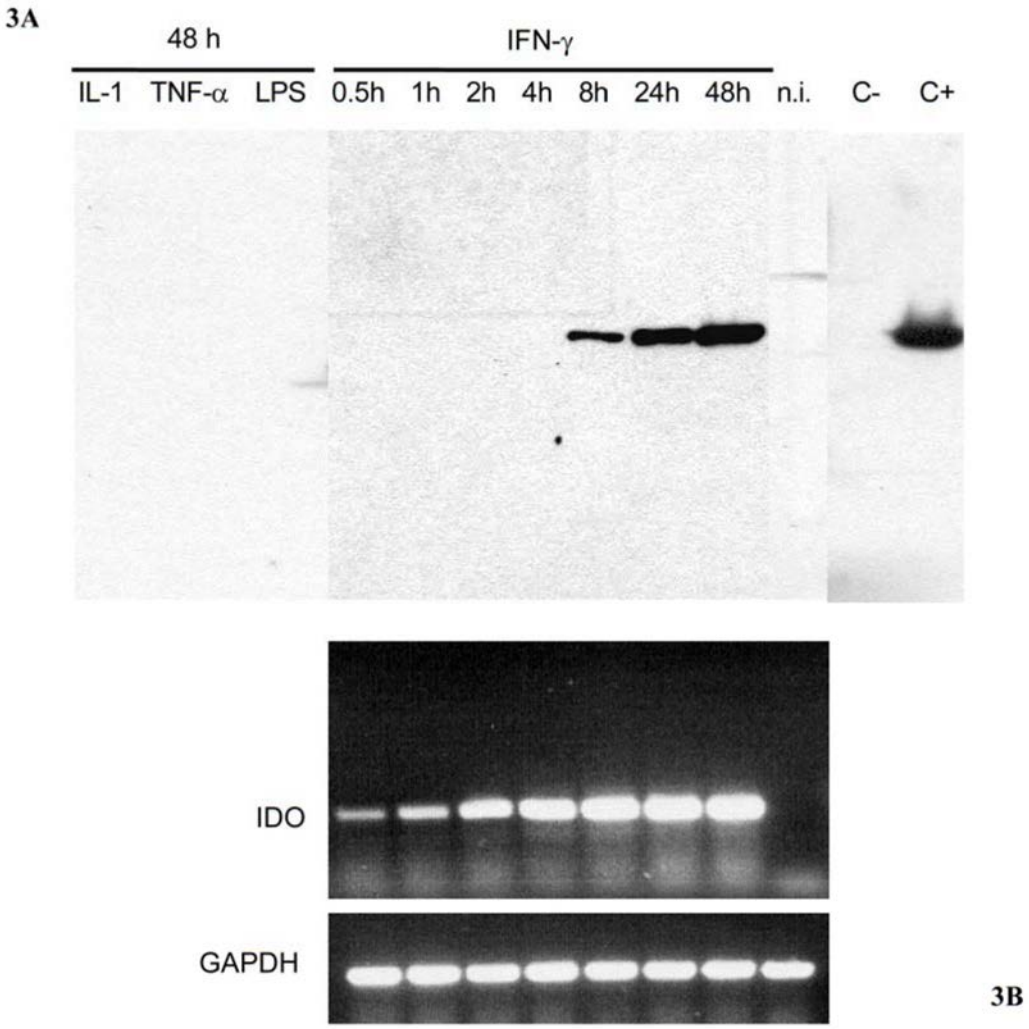

3A
48 h
IFN-γ
IL-1
TNF-α
LPS
0.5h
1h
2h
4h
8h
24h
48h
n.i.
C-
C+
IDO
GAPDH
3B

图3

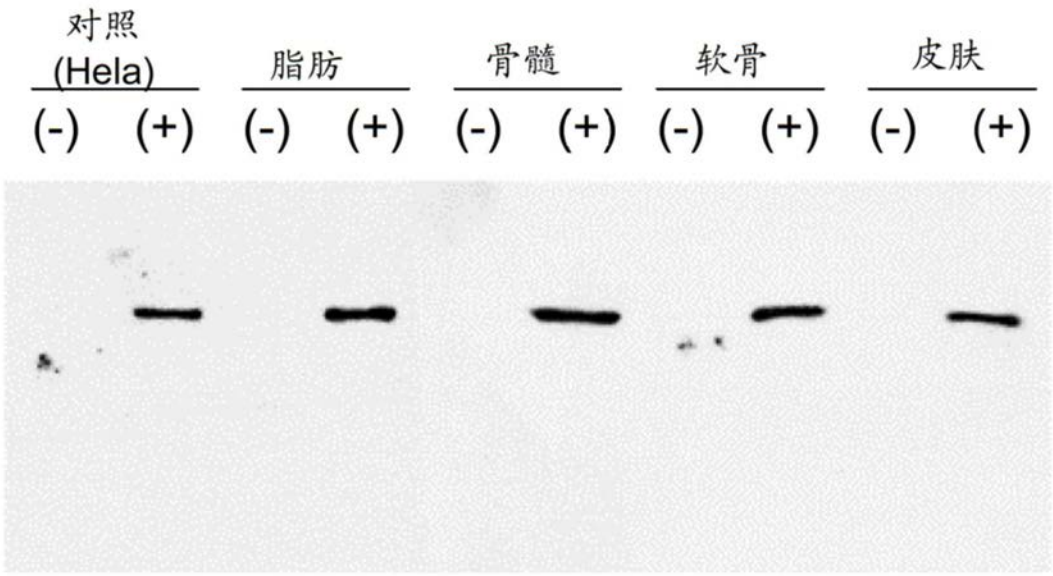


图4

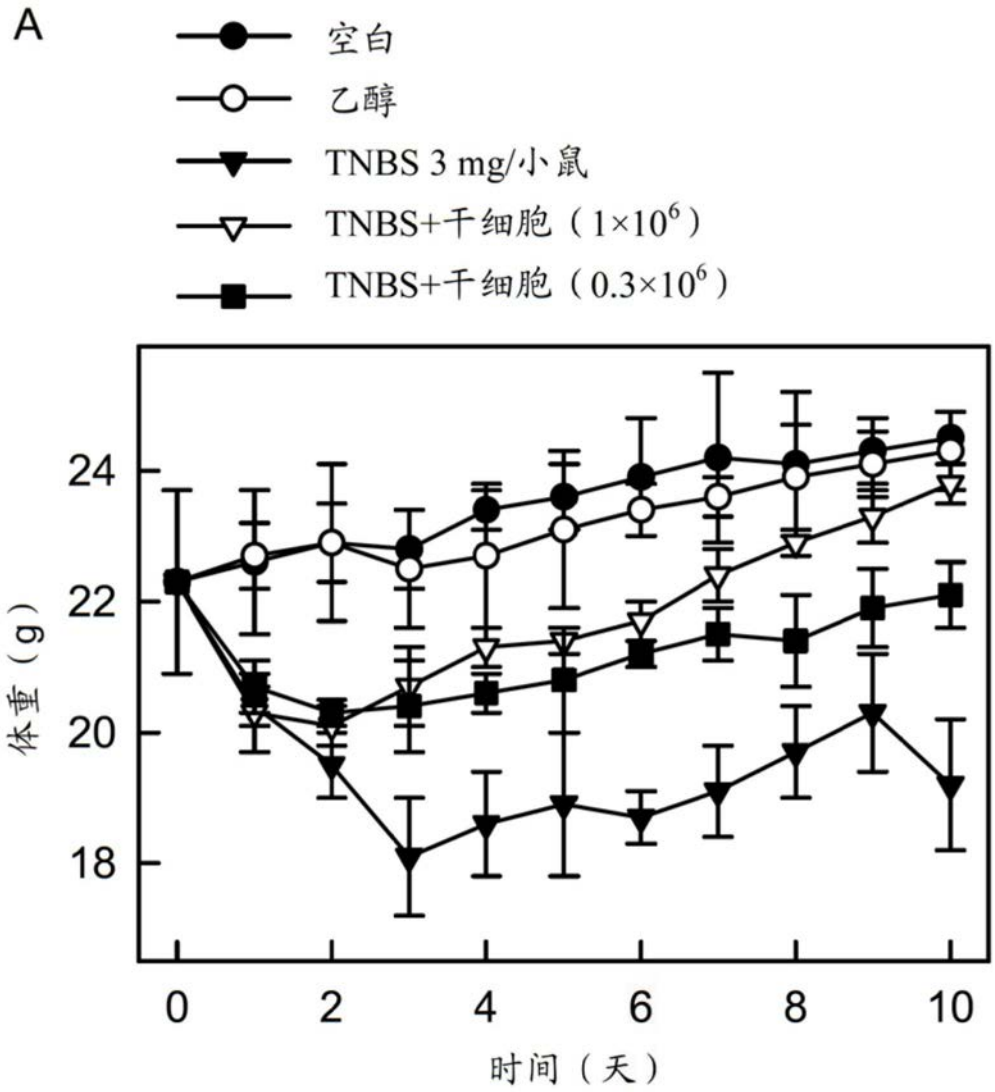

A
空白
乙醇
TNBS 3 mg/小鼠
TNBS+干细胞（1×10^6）
TNBS+干细胞（0.3×10^6）
体重（g）
24
22
20
18
0
2
4
6
8
10
时间（天）

图5

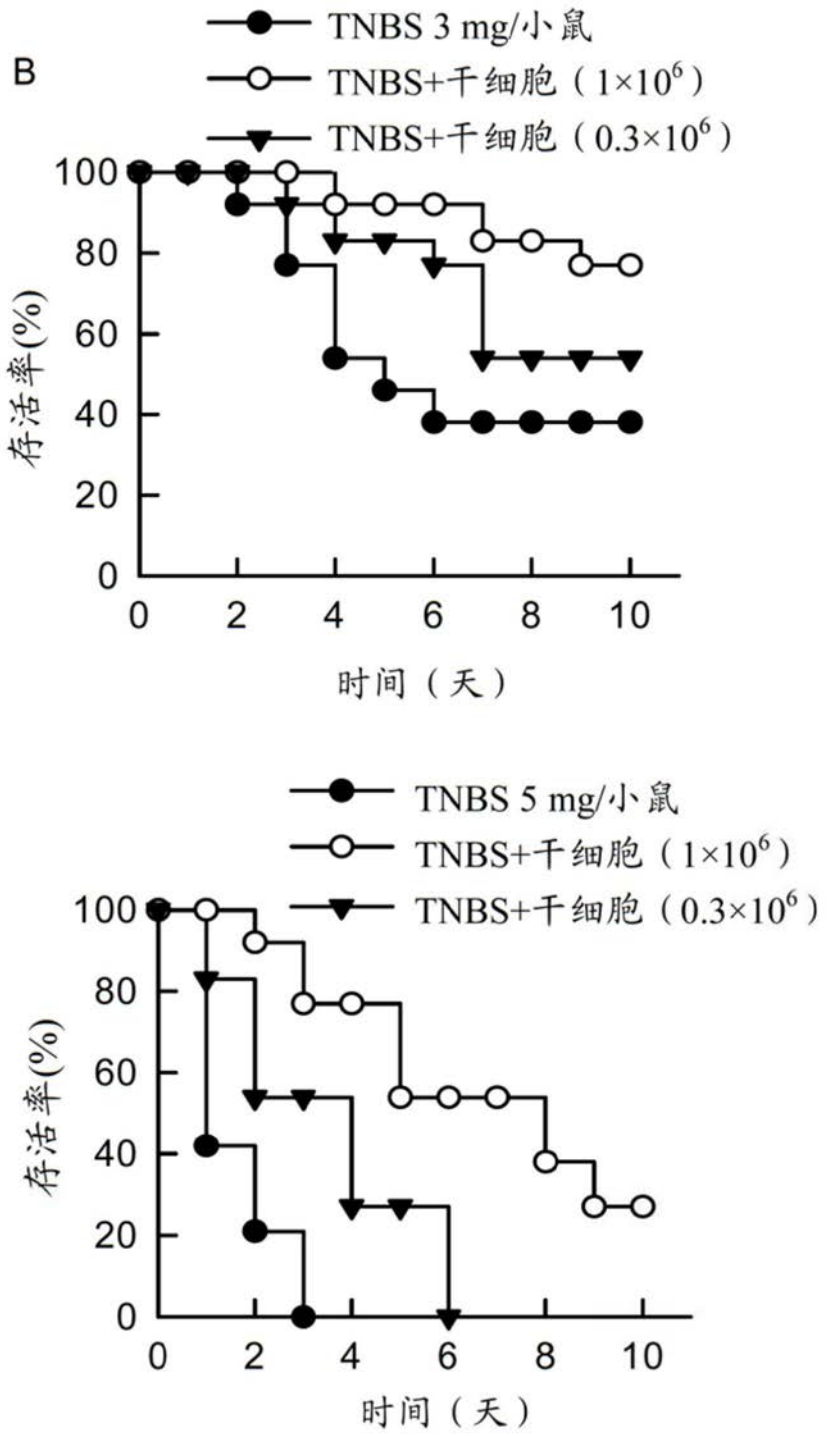

B
TNBS 3 mg/小鼠
TNBS+干细胞（1×10⁶）
TNBS+干细胞（0.3×10⁶）
存活率(%)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
时间（天）
TNBS 5 mg/小鼠
TNBS+干细胞（1×10⁶）
TNBS+干细胞（0.3×10⁶）
存活率(%)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
时间（天）

图6

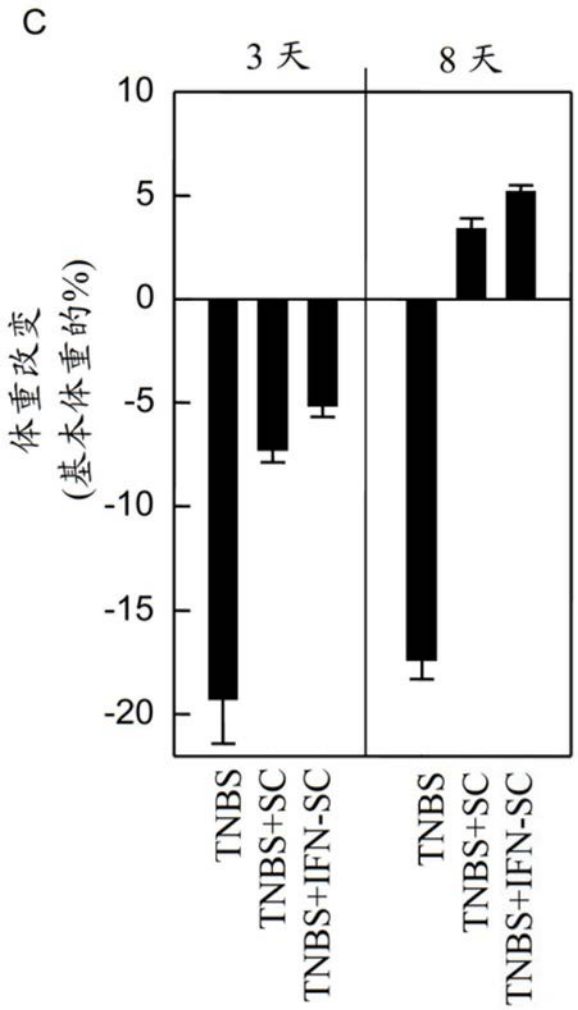

C
3 天
8 天
10
5
0
-5
-10
-15
-20
体重改变
(基本体重的%)
TNBS
TNBS+SC
TNBS+IFN-SC
TNBS
TNBS+SC
TNBS+IFN-SC

图7

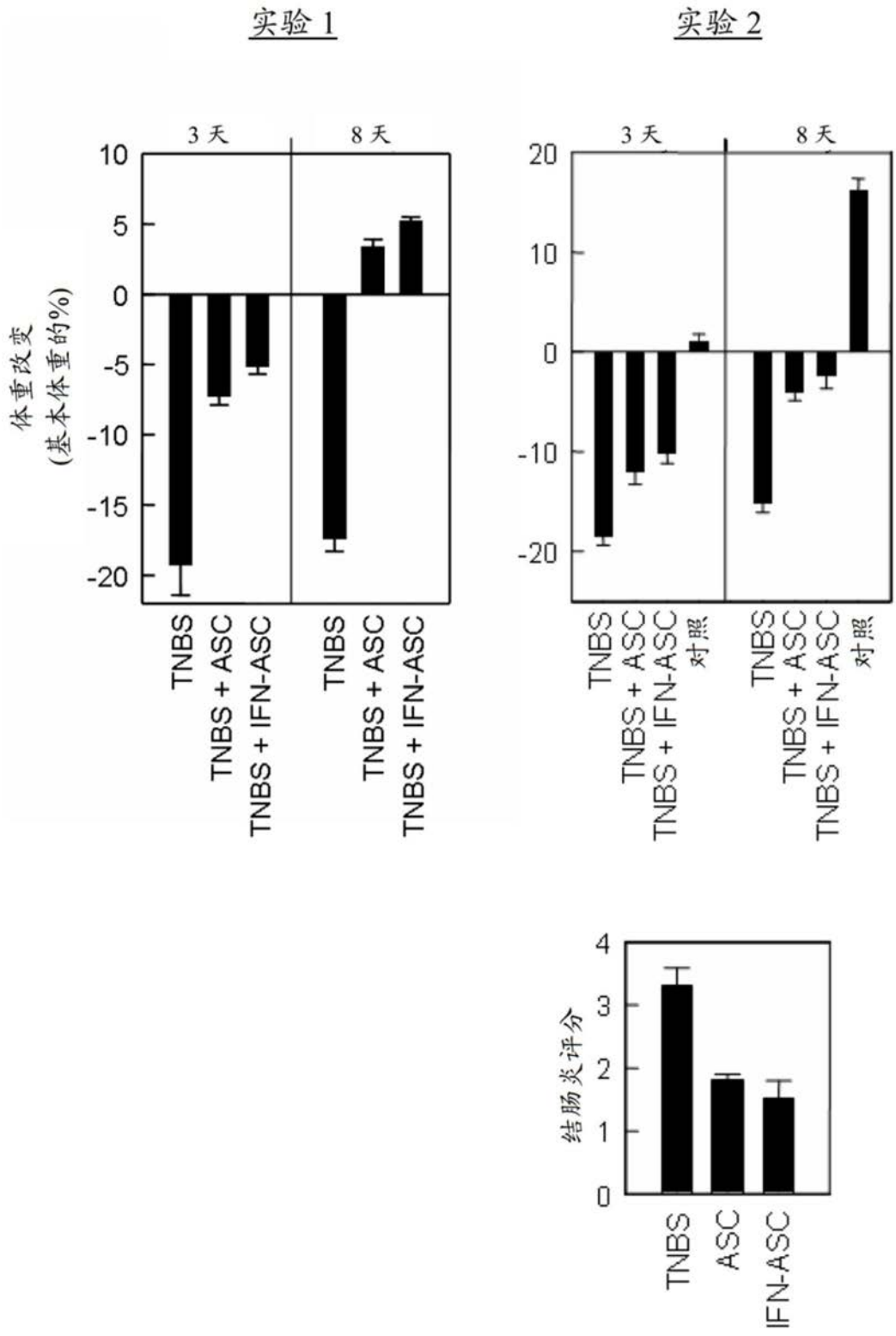

实验 1
实验 2
3 天
8 天
体重改变
(基本体重的%)
10
5
0
-5
-10
-15
-20
TNBS
TNBS + ASC
TNBS + IFN-ASC
对照
20
结肠炎评分
4
3
2
1
ASC
IFN-ASC

图8

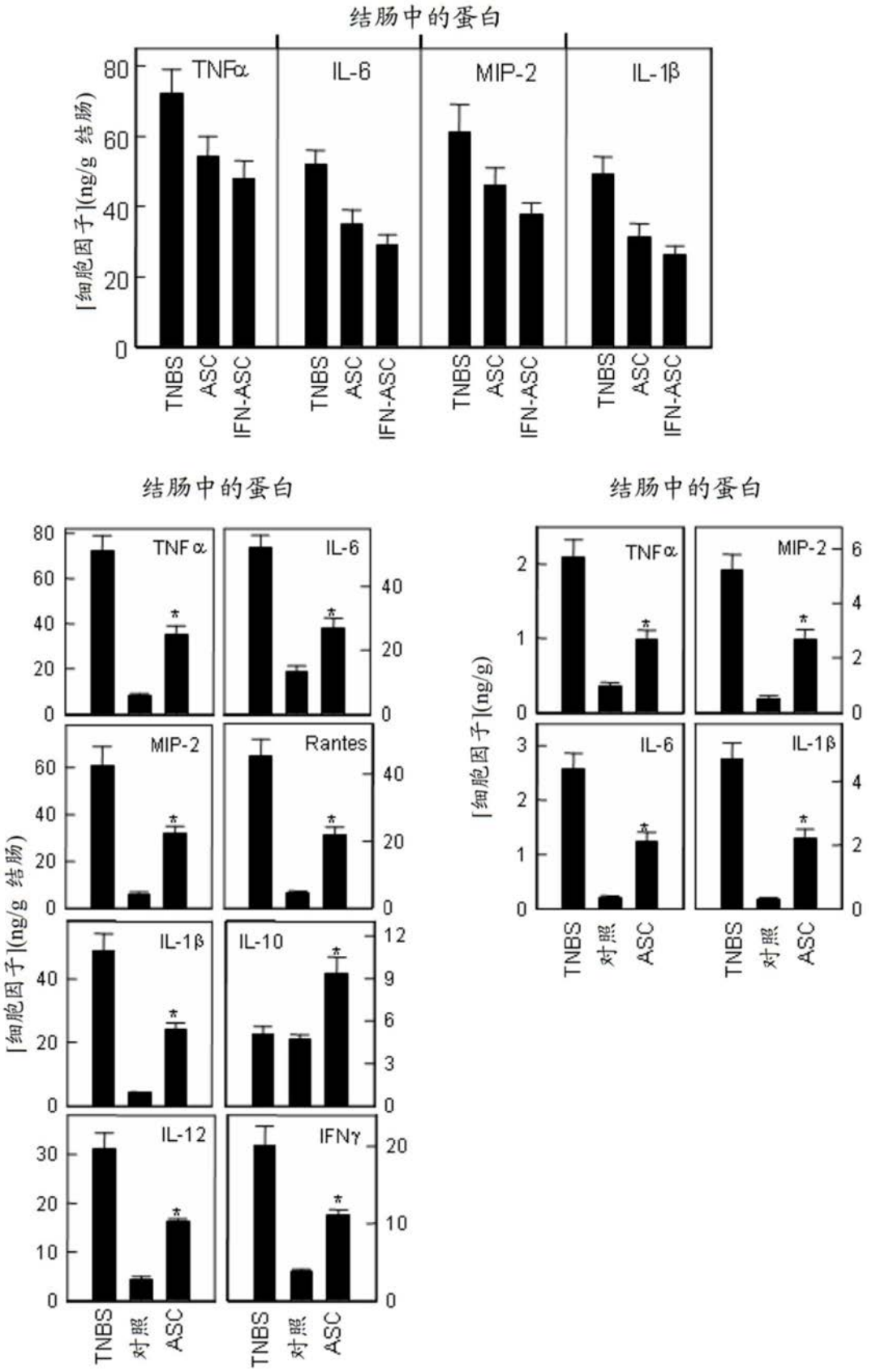

结肠中的蛋白
[细胞因子](ng/g 结肠)
TNFα
IL-6
MIP-2
IL-1β
TNBS
ASC
IFN-ASC
结肠中的蛋白
结肠中的蛋白
[细胞因子](ng/g)
Rantes
IL-10
IL-12
IFNγ
对照

图9

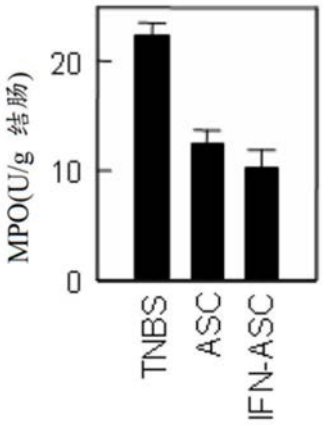

MPO(U/g 结肠)
20
10
0
TNBS
ASC
IFN-ASC

图10

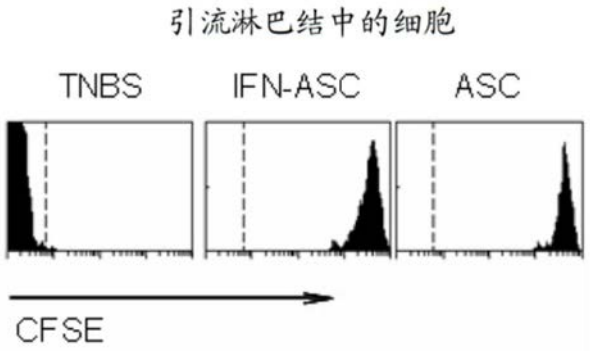

引流淋巴结中的细胞
TNBS
IFN-ASC
ASC
CFSE

图11

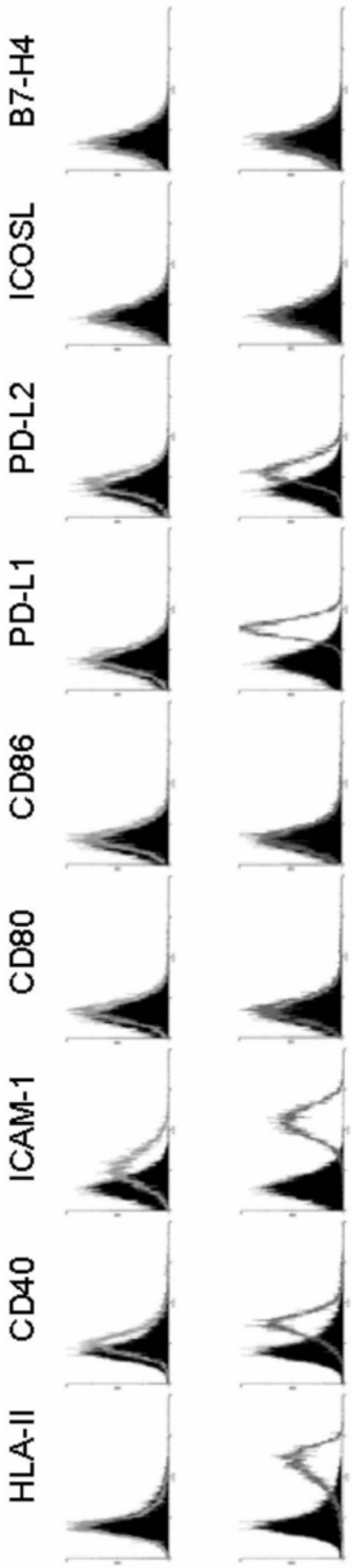


图12

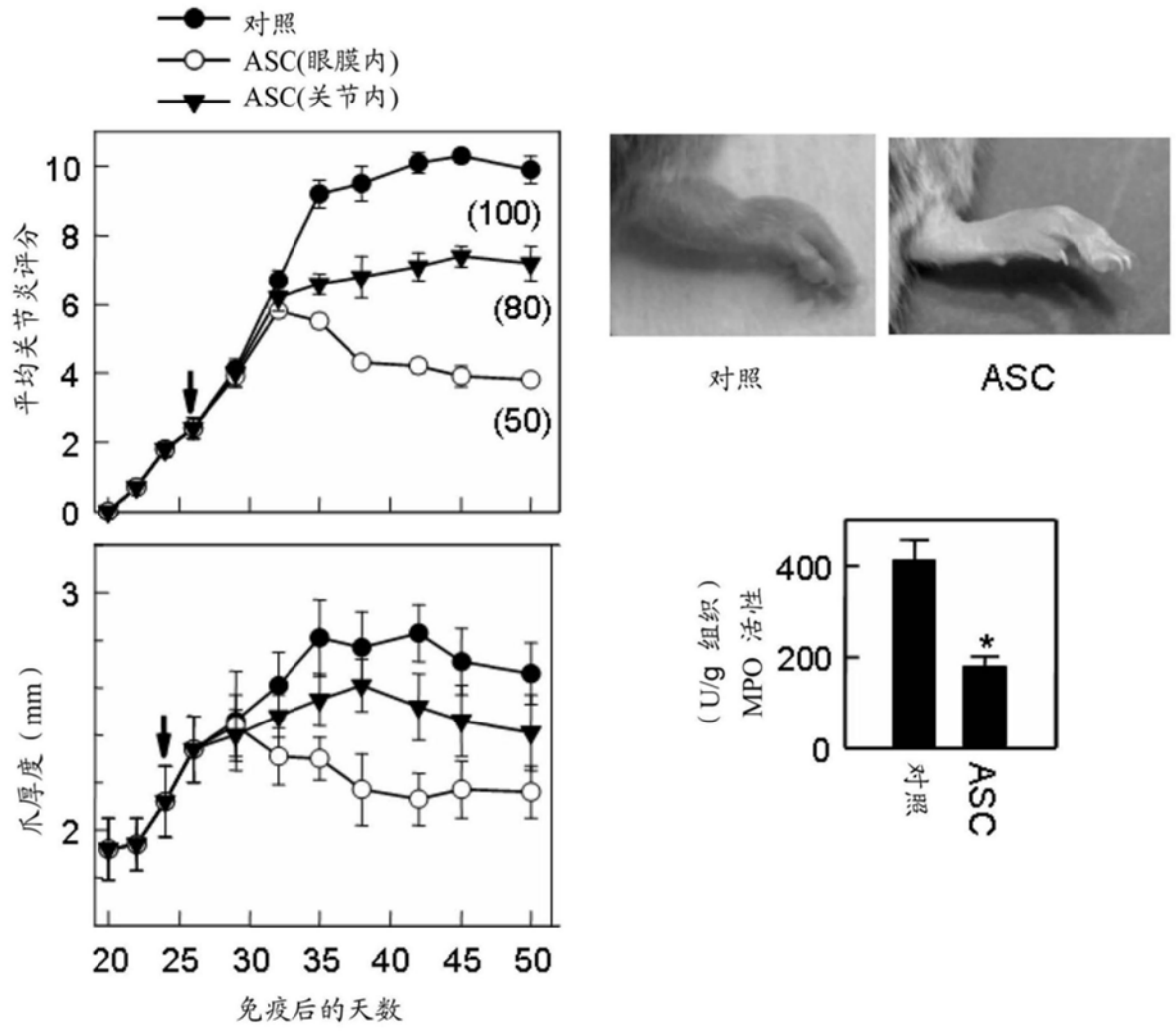
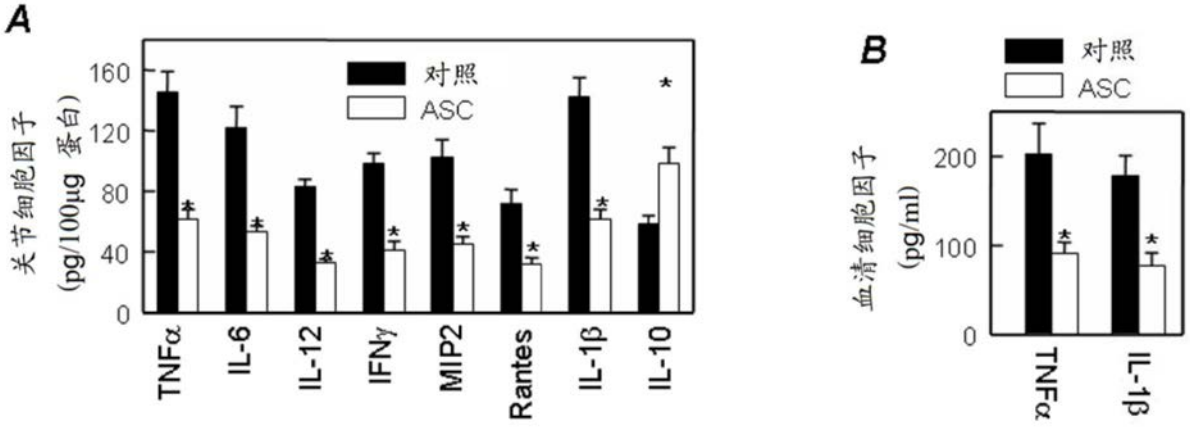
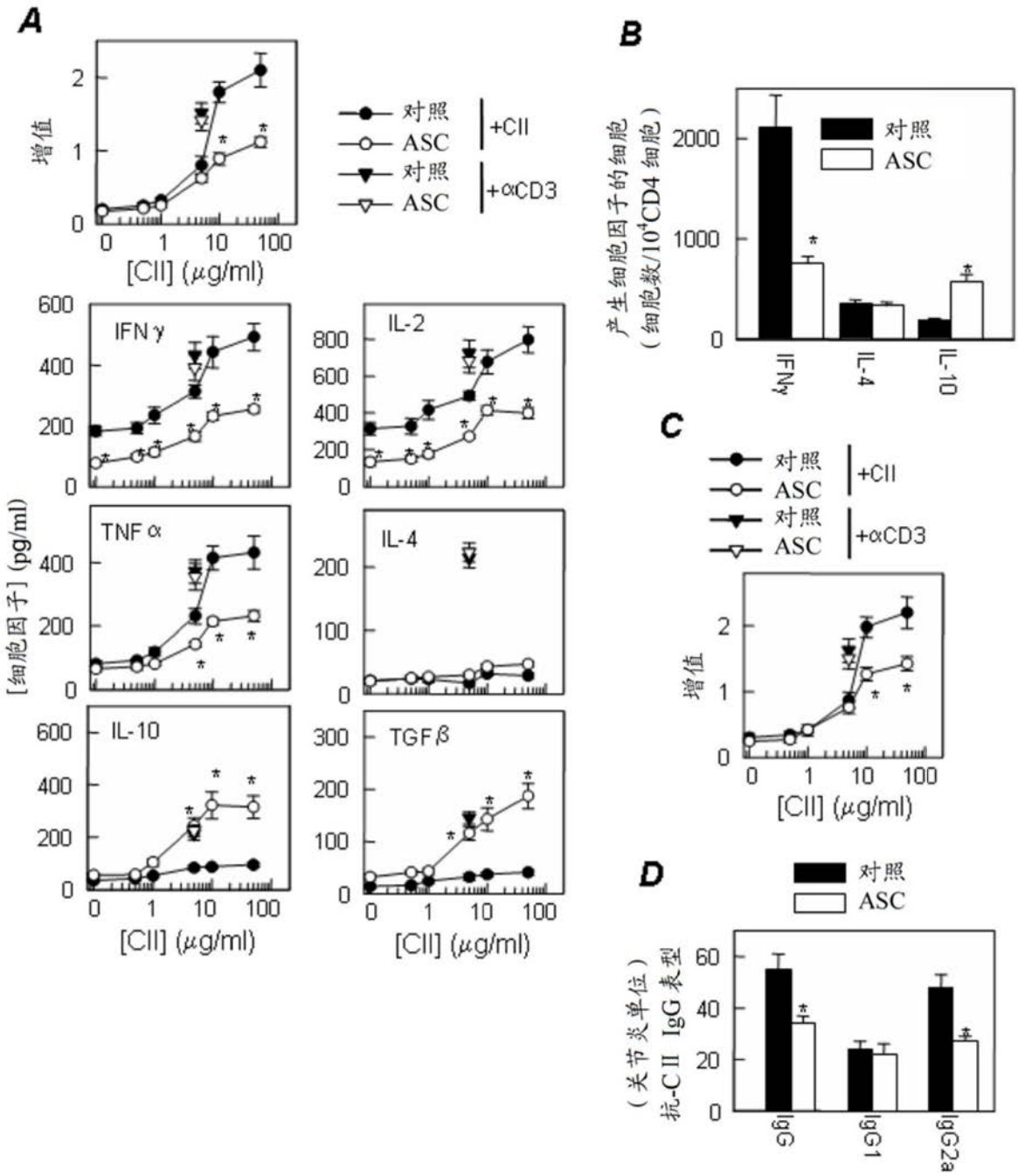


图13



相对于对照*p<0.001

图14



相对于对照*p<0.001

图15

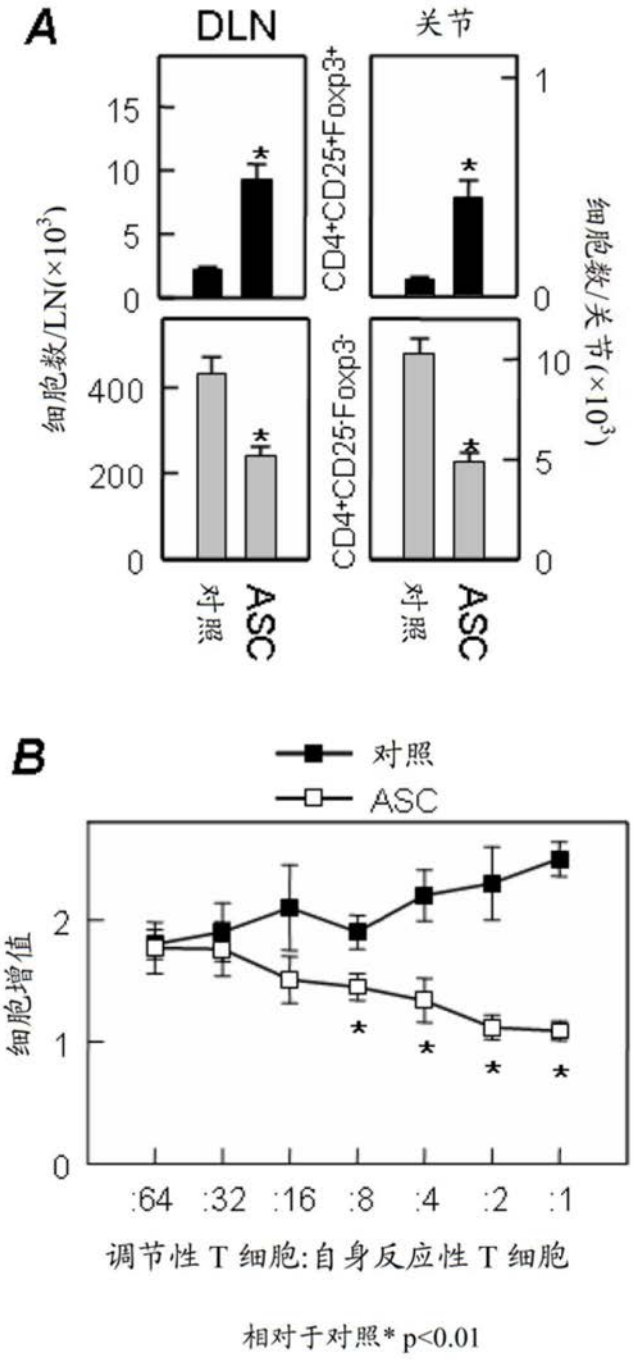
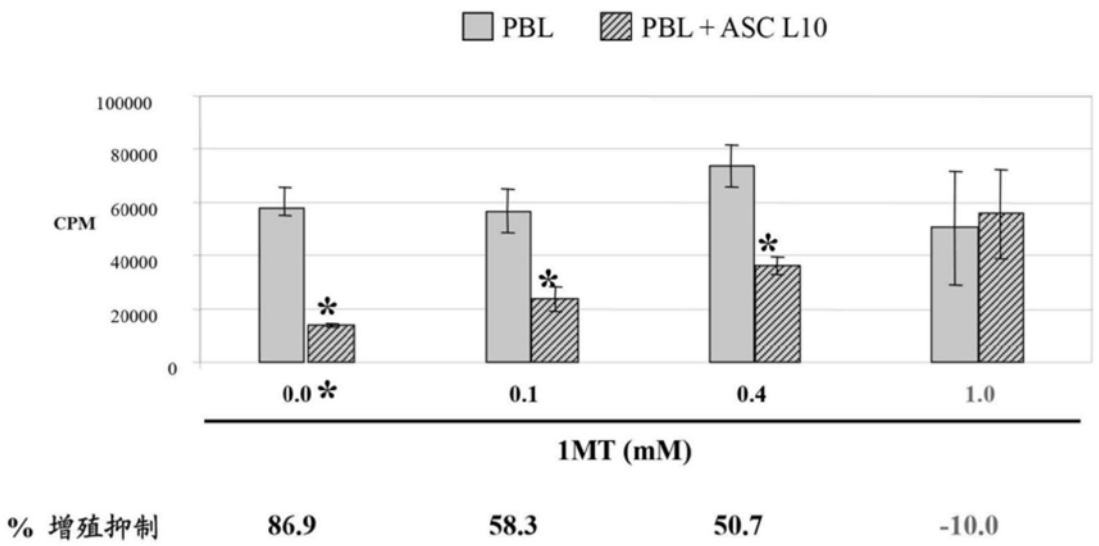

A
DLN
关节
CD4+CD25+Foxp3+
CD4+CD25-Foxp3-
细胞数/LN(×10³)
细胞数/关节(×10³)
15
10
5
0
400
200
1
10
对照
ASC
B
对照
ASC
细胞增值
2
1
:64
:32
:16
:8
:4
:2
:1
调节性 T 细胞:自身反应性 T 细胞
相对于对照* p<0.01

图16



% 增殖抑制	86.9	58.3	50.7	-10.0

图17

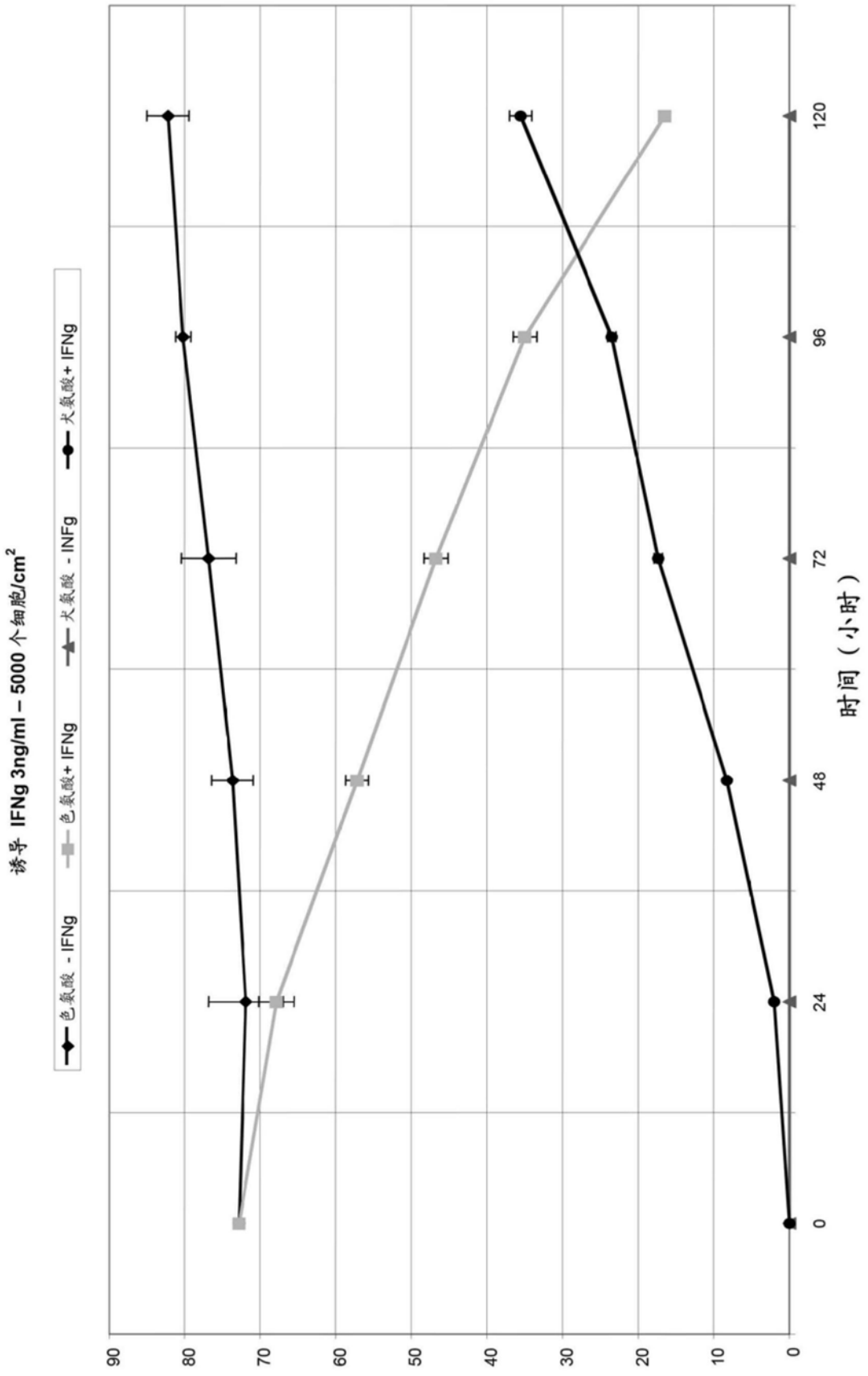

诱导 IFNg 3ng/ml – 5000 个细胞/cm²
色氨酸 - IFNg
色氨酸+ IFNg
犬氨酸 - INFg
犬氨酸+ IFNg
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
0
24
48
72
96
120
时间（小时）

图18

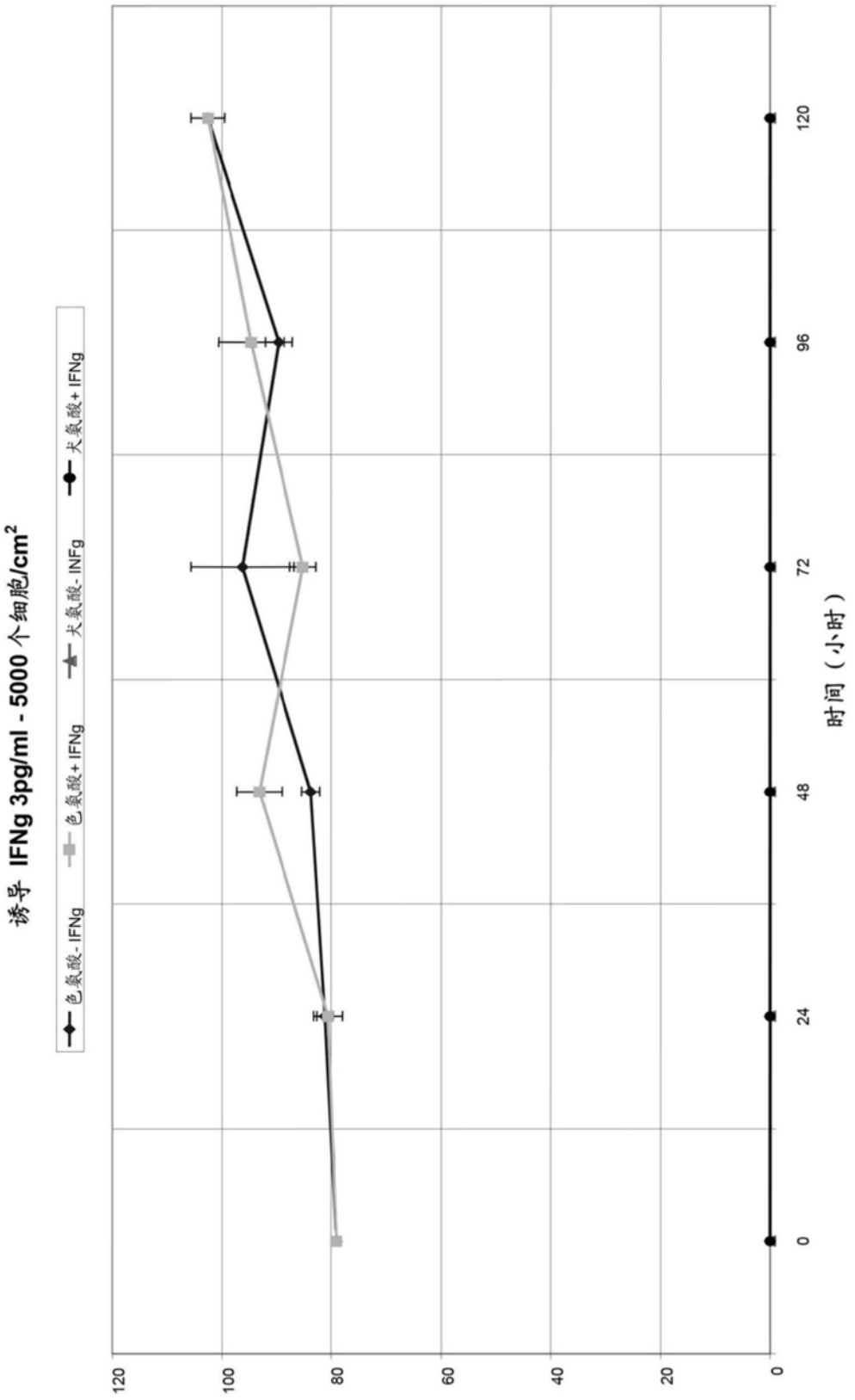

诱导 IFNg 3pg/ml - 5000 个细胞/cm²
色氨酸- IFNg
色氨酸+ IFNg
犬氨酸- INFg
犬氨酸+ IFNg
120
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
120
时间（小时）

图19

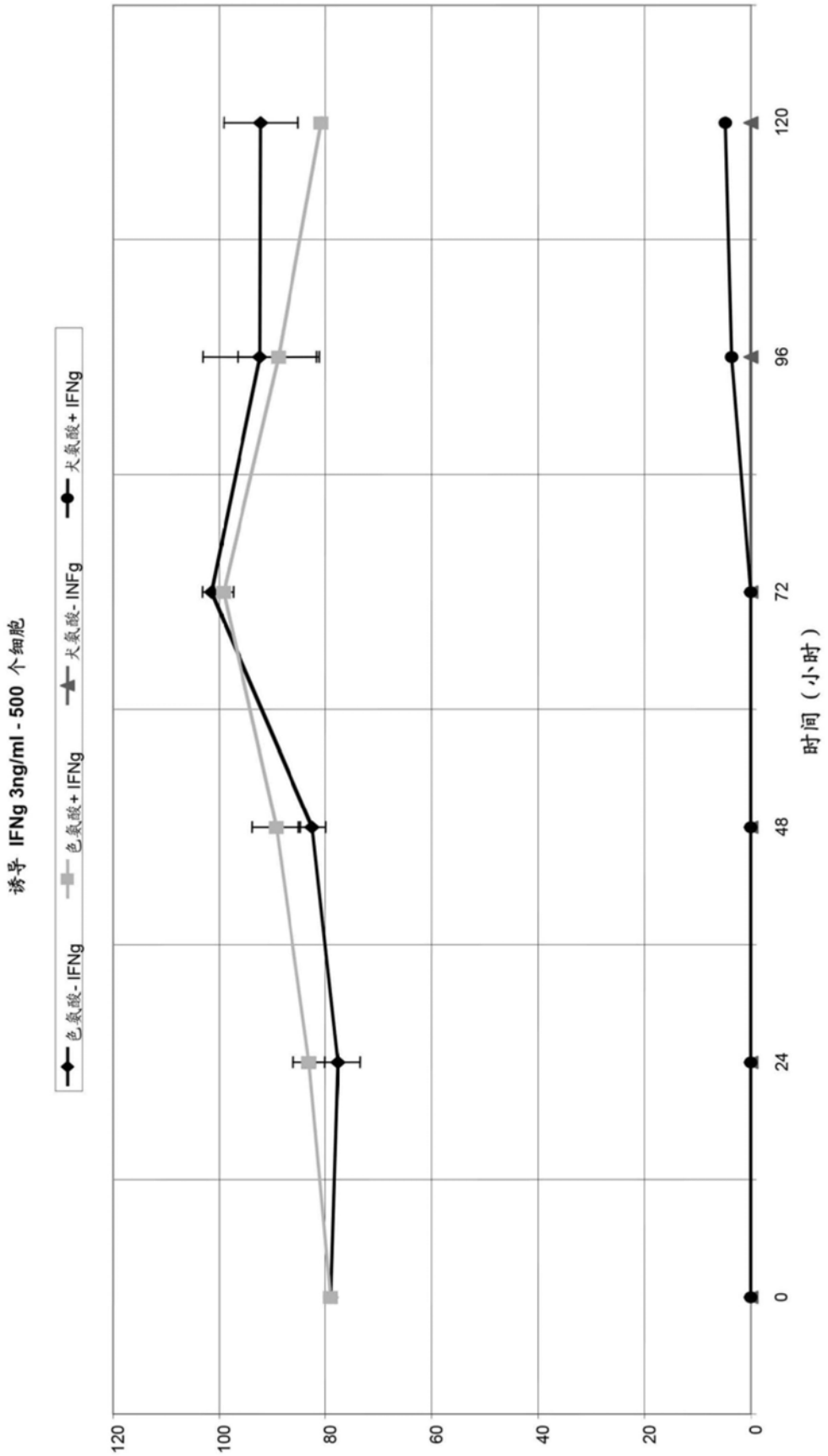

诱导 IFNg 3ng/ml - 500 个细胞
色氨酸- IFNg
色氨酸+ IFNg
犬氨酸- INFg
犬氨酸+ IFNg
120
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
120
时间（小时）

图20

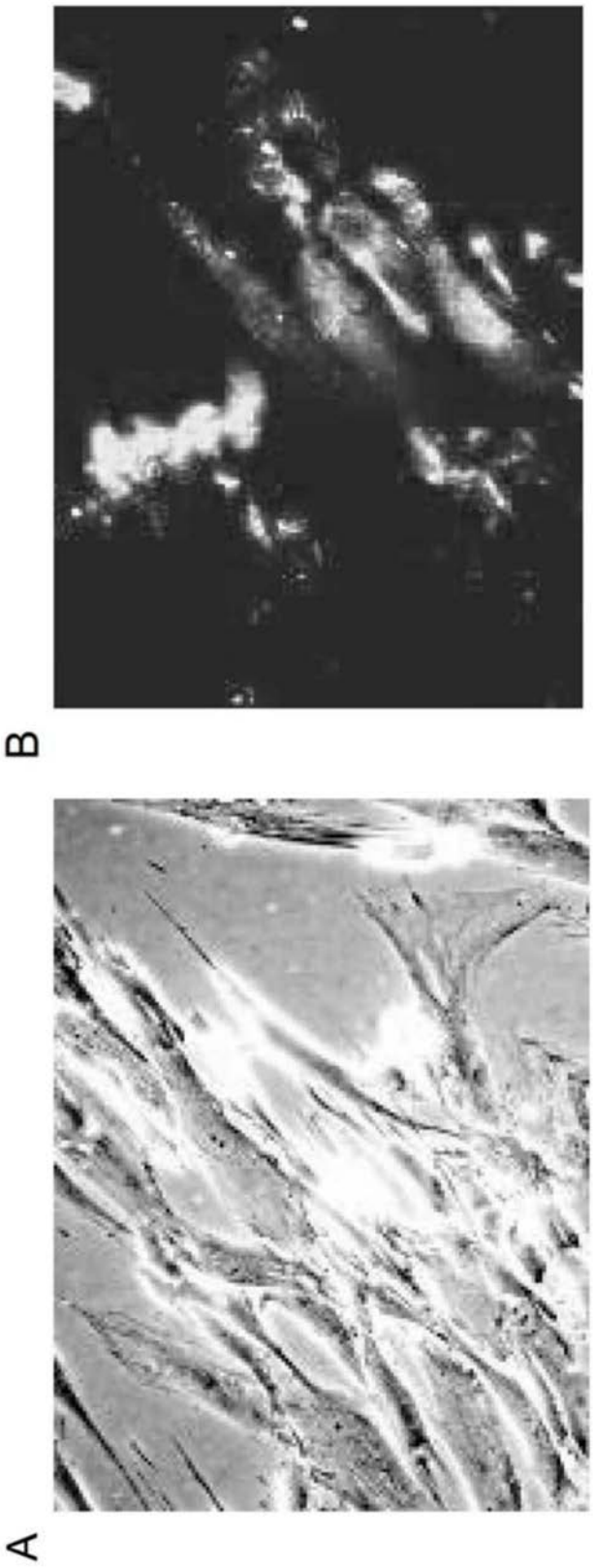


图21