



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106573017 B

(45) 授权公告日 2021.06.11

(21) 申请号 201580042833.7

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

(22) 申请日 2015.06.30

有限责任公司 11204

(65) 同一申请的已公布的文献号

代理人 王达佐 洪欣

申请公布号 CN 106573017 A

(51) Int.Cl.

A61K 35/28 (2015.01)

(43) 申请公布日 2017.04.19

A61P 31/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 31/04 (2006.01)

14175095.0 2014.06.30 EP

A61P 11/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2017.02.09

CN 103648509 A, 2014.03.19

(86) PCT国际申请的申请数据

US 2014134140 A1, 2014.05.15

PCT/IB2015/054923 2015.06.30

WO 2005093044 A1, 2005.10.06

(87) PCT国际申请的公布数据

WO 2010015929 A3, 2010.04.29

W02016/001846 EN 2016.01.07

US 2014134140 A1, 2014.05.15

(73) 专利权人 泰根尼克斯独资有限公司

白冰心等.脓毒症的免疫治疗进展.《中国新药与临床杂志》.2015, 第34卷(第3期), 161-165.

地址 西班牙马德里

葛翠翠等.人脐带间充质干细胞对炎症性肠病小鼠模型的治疗作用.《生物技术通讯》.2014, 第25卷(第6期), 813-816.

(72) 发明人 维尔弗里德·达尔曼斯

审查员 储巧玲

埃莱乌特里奥·隆巴尔多

权利要求书1页 说明书19页 附图6页

罗伯特·德克尔

(54) 发明名称

用于治疗脓毒症的间充质基质细胞

(57) 摘要

本发明涉及间充质基质细胞(MSC)在治疗受者的脓毒症中的用途。本发明提供了用于治疗脓毒症的组合物、用途和方法。

1. 包含脂肪组织来源的基质细胞(ASC)的组合物在制备用于治疗受试者的脓毒症的药物中的用途,其中所述脓毒症继发于由细菌引起的肺炎,以及其中所述组合物通过静脉内途径施用。
2. 如权利要求1所述的用途,其中所述脓毒症是严重脓毒症。
3. 如权利要求1或2所述的用途,其中所述肺炎是社区获得性肺炎。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述细胞是扩增的脂肪组织来源的基质细胞。
5. 如权利要求1-4中任一项所述的用途,其中所述ASC是同种异体的。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的用途,其中所述组合物包含约 0.25×10^6 个细胞/kg受试者体重至约 5×10^6 个细胞/kg受试者体重。
7. 如权利要求1-6中任一项所述的用途,其中向所述受试者重复施用所述ASC。
8. 如权利要求7所述的用途,其中在第1天和第3天向所述受试者施用所述ASC。
9. 如权利要求1-8中任一项所述的用途,其中至少约50%的所述ASC表达标志物CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49A、CD51、CD54、CD55、CD58、CD59、CD90和CD105中的一种或多种。
10. 如权利要求1-9中任一项所述的用途,其中至少约50%的所述ASC不表达标志物因子VIII、 α -肌动蛋白、结蛋白、S-100、角蛋白、CD11b、CD11c、CD14、CD45、HLAII、CD31、CD34、CD45、STRO-1和CD133。
11. 如权利要求1-10中任一项所述的用途,其中所述ASC在药学上可接受的载体和/或稀释剂中进行施用。
12. 如权利要求1-11中任一项所述的用途,其中所述ASC与一种或多种其它治疗试剂联合施用。

用于治疗脓毒症的间充质基质细胞

背景技术

[0001] 全身炎症反应综合征(SIRS)是没有特定感染源的全身的炎性状态。它可以由许多因素引起,所述因素包括但不限于创伤、手术、肾上腺功能不全、肺栓塞、心肌梗死、出血、过敏反应、药物过量、免疫缺陷和烧伤。SIRS存在如下所列出的四种主要诊断症状,但这些中存在任意两种就足以进行诊断(参见,例如Nystrom(1998) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, Suppl.A, 1-7)。

[0002] i) 心率超过每分钟90次;

[0003] ii) 体温低于36°C或高于38°C;

[0004] iii) 呼吸速率超过每分钟20次呼吸(呼吸急促);和

[0005] vi) 白细胞计数低于4000个细胞/mm³或高于12000个细胞/mm³,或存在超过10%的未成熟嗜中性粒细胞。

[0006] SIRS引起急性期免疫原性蛋白的广泛活化,从而影响补体系统和凝血途径,继而导致对脉管系统以及内部器官的损伤。随后激活各种神经内分泌反调节系统,这也经常使问题复杂化。

[0007] 脓毒症是SIRS的一种特定形式,并且是重症监护病房中最常见的死亡原因。它由怀疑的或检测到的感染引起。其特征在于内源性促炎细胞因子的过度活跃和网络失衡,并且常常导致广泛的炎症和血液凝结,这可导致发红、发热、肿胀、疼痛、器官功能障碍或器官衰竭。脓毒症期间的血液凝结也可导致至肢体和重要器官的血流减少,并且可导致器官衰竭或坏疽发作。

[0008] 与SIRS一样,脓毒症通常导致遍及全身的急性炎症,因此其通常与发烧和白细胞增多(白细胞计数升高)相关。脓毒症的现有理论是宿主对感染的免疫应答触发了SIRS,继而呈现上述症状。感染和脓毒症之后,组织灌注和氧递送可能减少,导致了脓毒性休克。为了诊断脓毒性休克,必须存在患者感染和顽固性低血压的证据。

[0009] SIRS、脓毒症和脓毒性休克是严重的医学病况。即使立即且积极治疗,这些疾病也可能发展到多器官功能障碍综合征,甚至可导致死亡。

[0010] 迄今为止,大多数的治疗策略靶向促炎介质,但在大型多中心临床试验中研究发现,其并未改善患者的存活。被设计用以阻断一种单一细胞因子(例如TNF α 和IL-1 β)的疗法显示出有限的功效,这可能是由于这些炎症细胞因子的早期和瞬态动力学。最近,国际重症监护和传染病专家已开发了管理指南以改善给予患有SIRS、脓毒症或脓毒性休克的患者的治疗。这些指南意图将复杂的诊断和治疗决策转化为简单的“关键任务”工作,并且在其他治疗中建议施用广谱抗生素、类固醇和Drotrecogin Alfa(活化的)。

[0011] 然而,与脓毒症相关的死亡率仍然在30%至50%,而脓毒性休克的死亡率据报道甚至更高,为50%至60%。据报道,每年大约有750,000个新的脓毒症病例,其中至少210,000个导致死亡。随着医学治疗变得更具攻击性,SIRS、脓毒症和脓毒性休克的发生率也可能增加,因此需要一种用于这些病况的新的可靠的治疗。

发明内容

[0012] 已发现,施用间充质基质细胞(MSC),尤其是人脂肪组织来源的基质细胞(hASC),可用于治疗SIRS、脓毒症、严重脓毒症和脓毒性休克。例如,已发现MSC,尤其是hASC,在肺炎相关的脓毒症中免于死亡,这提供了MSC可用于治疗SIRS、脓毒症和脓毒性休克的证据。已发现, MSC在数个水平上起作用以调节SIRS、脓毒症、严重脓毒症和脓毒性休克的关键方面,这包括通过降低各种炎性细胞因子和趋化因子的系统性水平以及通过抑制白细胞向各种靶器官的浸润。

[0013] 在一个方面中,本发明因此提供了包含间充质基质细胞(MSC)的组合物,其用于治疗患肺炎或患肺炎后的受试者的脓毒症,例如用于治疗患肺炎或患肺炎后的受试者的脓毒症的方法。

[0014] 本发明还提供了间充质基质细胞(MSC)在制备用于治疗患肺炎或患肺炎后的受试者的脓毒症的药物中的用途。

[0015] 本发明还提供了治疗患肺炎或患肺炎后的受试者的脓毒症的方法,其包括向所述受试者施用间充质基质细胞(MSC)。

[0016] 以下更详细地描述了本发明的这些方面以及其它方面。

[0017] 附图简述

[0018] 图1-4:感染后48小时各种组织中的细菌负荷。A和B示出了来自两个独立实验的结果。PLACEBO=用林格氏(Ringer's)乳酸盐处理;ASC=用ASC处理;CFU=菌落形成单位。图1:血液;图2:肺匀浆;图3:肝匀浆;以及图4:脾匀浆。

[0019] 图5-8:感染后48小时肺匀浆中的细胞因子和趋化因子水平。A和B示出了来自两个独立实验的结果。PLACEBO=用林格氏乳酸处理;ASC=用ASC处理。图5:TNF α ;图6:IL1 β ;图7:IL6;以及图8:Mip-2。

[0020] 图9-12:感染后各种组织中的细菌负荷。PLACEBO=用林格氏乳酸处理;ASC=用ASC处理;CFU=菌落形成单位。图9:血液;图10:肺匀浆;图11:肝匀浆;以及图12:脾匀浆。

[0021] 定义

[0022] 如本文所使用,以下术语和短语应具有以下示出的含义。除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0023] 冠词“(a/an)”是指一个或多于一个(即至少一个)该冠词的语法上的宾语。例如,“元件”意指一个元件或多于一个元件。

[0024] 当与数值连用时,术语“约”是指数值±10%。

[0025] “脂肪组织”意指任何的脂肪组织。脂肪组织可以是来自例如皮下、网膜/内脏、乳腺、性腺或其它脂肪组织部位的棕色或白色脂肪组织。优选地,脂肪组织是皮下白色脂肪组织。脂肪组织可以包括原代细胞培养物或永生化细胞系。脂肪组织可以来自任何具有脂肪组织的生物体。在一些实施方案中,脂肪组织是哺乳动物,在另外的实施方案中,脂肪组织是人。脂肪组织的便利来源是脂肪抽吸手术。然而,应当理解,脂肪组织的来源和分离脂肪组织的分离方法对本发明都不重要。如果需要本文所述的细胞用于自体移植入受试者,将从该受试者中分离脂肪组织。

[0026] “脂肪组织来源的基质细胞(ASC)”是指源自脂肪组织的MSC,通常是指源自人类脂

肪组织的MSC (hASC)。

[0027] 术语“生物医药产品”应理解为意指用于治疗用途的基于蛋白质或核酸的药物物质,其通常通过除了从天然(非工程化)生物来源直接提取之外的方法进行制备。

[0028] 本文所用的术语“细胞/kg”应理解为意指向每千克患者体重施用的细胞(例如MSC)的数量。

[0029] 术语“组成型”应理解为意指没有任何特异性诱导的基因表达。

[0030] 术语“培养物”是指细胞、生物体、多细胞实体或组织在培养基中的生长。术语“培养”是指实现此类生长的任何方法,并且可包括多个步骤。术语“进一步培养”是指将细胞、生物体、多细胞实体或组织培养至某一生长阶段,然后使用另一种培养方法使所述细胞、生物体、多细胞实体或组织达到另一生长阶段。“细胞培养物”是指细胞在体外的生长。在这样的培养中,细胞增殖,但它们本身不组织成组织。“组织培养物”是指组织的维持或生长,例如器官原基或成体器官的体外外植体,以便保持其结构和功能。“单层培养物”是指这样的培养物,其中细胞在合适的培养基中繁殖,且大部分彼此连接并粘附到基底上。此外,“悬浮培养物”是指这样的培养物,其中细胞在合适的培养基中繁殖,且悬浮于该合适的培养基中。同样,“连续流动培养物”是指在连续流动的新鲜培养基中培养细胞或外植体以维持细胞生长,例如活力。术语“条件培养基”是指在与培养的细胞接触一段时间后使得培养基已改变为包括由细胞产生并分泌到培养物中的某些旁分泌和/或自分泌因子而产生的上清液(例如,没有培养的细胞/组织)。“汇合培养物”是这样的细胞培养物,其中所有细胞都相接触,因此覆盖了培养容器的整个表面,并且这意味着细胞也已达到它们的最大密度,尽管汇合不一定意指分裂将停止或群体大小不增长。

[0031] 术语“培养基(culture medium)”或“培养基(medium)”是本领域公认的,并且通常是指用于培养活细胞的任何物质或制备物。如在提及细胞培养中所使用的术语“培养基”包括细胞周围环境的组分。培养基可以是固体、液体、气体或相和材料的混合物。培养基包括液体生长培养基以及不维持细胞生长的液体培养基。培养基还包括凝胶状培养基,例如琼脂、琼脂糖、明胶和胶原基质。示例性气体培养基包括在培养皿或其他固体或半固体支持物上生长的细胞所暴露的气相。术语“培养基”还指意图用于细胞培养的材料,即使其尚未与细胞接触。换言之,准备用于细菌培养的营养丰富的液体是培养基。类似地,当与水或其它液体混合时变得适于细胞培养的粉末混合物可被称为“粉状培养基”。“限定的培养基”是指由化学上限定的(通常是纯化的)组分制成的培养基。“限定的培养基”不包含表征不明的生物提取物,如酵母提取物和牛肉肉汤。“丰富培养基”包括被设计用以支持特定物种的大多数或所有可行形式的生长的培养基。丰富培养基通常包括复杂的生物提取物。“适于高密度培养物生长的培养基”是允许细胞培养物达到OD 600为3或更高的任何培养基(当其它条件(例如温度和氧转移速率)允许此类生长时)。术语“基础培养基”是指促进不需要任何特殊营养补充剂的许多类型的微生物生长的培养基。大多数基础培养基通常包含四种基本化学基团:氨基酸、碳水化合物、无机盐和维生素。基础培养基通常用作更复杂的培养基的基础,向该基础培养基中加入补充剂如血清、缓冲液、生长因子、脂质等。基础培养基的实例包括但不限于伊格尔(Eagles)基础培养基、最小必需培养基、达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、培养基199、营养混合物Ham's F-10和Ham's F-12、McCoy's 5A、达尔伯克MEM/F-I 2、RPMI 1640和伊斯科夫改良达尔伯克培养基(Iscove'

s Modified Dulbecco's Medium) (IMDM)。

[0032] 术语“包含 (comprise)”和“包含 (comprising)”是以包括性的、开放的含义使用，这意味着可以包括另外的元件。

[0033] 当涉及细胞时，本文所用的术语“扩增的”应理解为具有其在本领域中的通常含义，即已在体外增殖的细胞。可以扩增MSC以提供在标准培养条件下保留MSC的至少一种生物学功能(通常是粘附到塑料表面的能力)的细胞群。扩增的细胞群可以保留分化成一种或多种细胞类型的能力。

[0034] 术语“包括”在本文用于意指“包括但不限于”。“包括”和“包括但不限于”可互换使用。

[0035] “标志物”是指可检测其存在、浓度、活性或磷酸化状态并用于鉴定细胞表型的生物分子。

[0036] “间充质基质细胞(在本文中也称为“MSC”)是多能基质细胞，即它们是能够产生多种不同类型细胞的细胞。

[0037] 通过题述方法治疗的“患者”、“受试者”或“宿主”可以指人或非人动物。

[0038] 术语“药物组合物”是指意图用于治疗的组合物。本发明的组合物是意图用于治疗SIRS、脓毒症、严重脓毒症、脓毒性休克和脓毒症样病况的药物组合物。除了MSC之外，本发明的组合物可包括非细胞组分。此类非细胞组分的实例包括但不限于细胞培养基，其可包含蛋白质、氨基酸、核酸、核苷酸、辅酶、抗氧化剂和金属中的一种或多种。

[0039] 短语“药学上可接受的”在本文用于指这样一类化合物、材料、组合物和/或剂型，其在合理的医学判断范围内适合用于与人和动物的组织接触而没有与合理的效益/风险比相称的过度的毒性、刺激性、过敏反应或者其它问题或并发症。

[0040] 如本文所用的短语“药学上可接受的载体”意指将题述化合物从一个器官或身体的一部分携带或运输到另一个器官或身体的一部分中涉及的药学上可接受的材料、组合物或媒介物，例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂包封材料。从与制剂的其它成分相容并且对患者无害的意义上说，各载体必须是“可接受的”。

[0041] 术语“表型”是指细胞的可观察特征，例如大小、形态、蛋白质表达等。

[0042] “增殖”是指细胞数量的增加。“增殖 (Proliferating)”和“增殖 (proliferation)”是指细胞经历有丝分裂。

[0043] “难治的”应理解为当用于治疗疾病时，没有显著的临床益处，例如，没有明显改善或改良症状或随后的疾病复发。

[0044] 如本文所用，术语“溶液”包括使本发明中所用的MSC保持存活的药学上可接受的载体或稀释剂。

[0045] 对于MSC群，术语“基本上纯的”是指这样的细胞群，其中按数量计至少约75%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的细胞是MSC。换言之，对于MSC群，术语“基本上纯的”是指这样的细胞群，其包含按数量计小于约20%、小于约10%或小于约5%的谱系定型细胞。

[0046] 本文所用的“支持物”是指可以用作脂肪组织来源的基质干细胞生长的基础或基质的任何装置或材料。

[0047] “治疗试剂”或“治疗剂”是指能在宿主中具有所需生物学作用的试剂。化疗剂和基

因毒性剂是治疗试剂的实例,其通常被认为是化学来源,而不是生物学来源,或分别通过特定作用机理产生治疗效果。生物学来源的治疗试剂的实例包括生长因子、激素和细胞因子。多种治疗试剂是本领域已知的并且可通过它们的效果进行鉴定。某些治疗试剂能够调节细胞增殖和分化。实例包括化疗核苷酸、药物、激素、非特异性(非抗体)蛋白、寡核苷酸(例如结合靶核酸序列(例如mRNA序列)的反义寡核苷酸)、肽和肽模拟物。

[0048] 详细说明

[0049] 本发明提供了包含间充质基质细胞(MSC)的组合物,其用于治疗受试者的脓毒症。在另一个实施方案中,本发明还提供了间充质基质细胞(MSC)在制备用于治疗受试者的脓毒症的药物中的用途。在另一个实施方案中,本发明还提供了治疗受试者的脓毒症的方法,其包括向受试者施用间充质基质细胞(MSC)。应当理解,在本发明的上下文中,“受试者”通常是需要治疗的受试者。因此,本发明还提供了治疗患肺炎或患肺炎后有需要的受试者的脓毒症的方法,其包括向受试者施用间充质基质细胞(MSC)。

[0050] 优选地,所述脓毒症与炎性肺病(通常是肺炎)相关、由其引起或在其后发生。在一个实施方案中,脓毒症继发于肺炎。优选地,所述脓毒症是严重脓毒症并且其与炎性肺病(通常是肺炎)相关、由其引起或在其后发生。在一个实施方案中,脓毒症是严重脓毒症,其继发于肺炎。所述肺炎可由真菌、细菌或病毒引起。在一个实施方案中,肺炎由细菌如革兰氏阴性细菌引起(革兰氏阴性肺炎)。革兰氏阴性细菌可以包括克雷伯菌属(*Klebsiella*),例如肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*),如肺炎克雷伯菌血清型2。在其它实施方案中,肺炎由肺炎链球菌(*Streptococcus pneumonia*)引起,在可替代的实施方案中,肺炎可由流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、肺炎衣原体(*Chlamydophila pneumonia*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)或真菌耶氏肺孢子虫(*Pneumocystis jiroveci*)引起。肺炎可以是社区获得性的、医疗保健相关的、医院获得性的或呼吸机相关的肺炎。肺炎可以是大叶性肺炎、支气管肺炎或急性间质性肺炎。

[0051] 已发现MSC有免疫调节效应,尤其是在炎症部位。已发现外源施用的MSC通常沉积在肺中。因此, MSC在治疗继发于炎性肺病(例如肺炎)的脓毒症中特别有效。

[0052] 实例示出了静脉内施用的ASC例如通过减少各种器官(包括血液和肺)中的细菌负荷,以及降低肺中的细胞因子和趋化因子的水平来降低肺炎相关的脓毒症的严重性。

[0053] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了MSC(例如ASC),其用于治疗人受试者的肺炎相关的脓毒症的方法中,其中与未治疗受试者中的通常的全身总细菌负荷相比,施用(例如通过静脉内注射)MSC将全身(例如血液)总细菌负荷(CFU/ml)降低至统计学显著水平,例如降低10倍或更多倍、50倍或更多倍或者100倍或更多倍。总细菌负荷可以通过本领域技术人员公知的方法测定,例如半定量细菌培养或定量PCR。

[0054] 本发明的细胞

[0055] MSC是具有分化为其他细胞能力的未分化基质细胞,并且通常来源于结缔组织,因此是非造血细胞。术语“结缔组织”是指来源自间充质的组织并且包括数种组织,所述组织的特征在于它们的细胞包括在细胞外基质内。在不同类型的结缔组织中,包括脂肪组织和软骨组织。在一个实施方案中, MSC来自脂肪组织的基质部分。在另一个实施方案中, MSC获得自软骨细胞,例如透明软骨。在另一个实施方案中, MSC获得自皮肤。此外,在另一个实施方案中, MSC获得自骨髓。MSC的可替代来源包括但不限于骨膜、牙髓、脾、胰腺、韧带、腱、骨

骼肌、脐带和胎盘。

[0056] MSC可以获得自任何合适的来源和任何合适的动物(包括人)。通常,所述细胞获得自产后哺乳动物的结缔组织。在优选的实施方案中, MSC获得自结缔组织来源,例如脂肪组织的基质部分、透明软骨、骨髓、皮肤等。此外,在特定实施方案中, MSC来自哺乳动物,例如啮齿动物、灵长类动物等,优选来自人类。通常, MSC获得自人脂肪组织的基质部分,即它们是脂肪组织来源的基质细胞(ASC)。

[0057] MSC在标准培养条件下与塑料粘附。

[0058] MSC是未分化的多能细胞,具有分化成体细胞例如中胚层细胞(例如脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞)或向其分化以及任选地分化成内胚层和/或外胚层细胞类型或谱系或向其分化的能力。通常,细胞具有分化成选自脂肪细胞、软骨细胞和成骨细胞谱系中的至少两种或全部细胞类型或向其分化的能力。

[0059] 在一个实施方案中, MSC可以是干细胞,通常是脂肪组织来源的干细胞。通常, MSC (i) 不表达APC特异的标志物; (ii) 不组成型表达IDO; (iii) 不组成型显著表达MHC II。通常,可通过IFN- γ 刺激诱导IDO或MHC II的表达。

[0060] 通常, MSC可表达标志物CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49A、CD51、CD54、CD55、CD58、CD59、CD90和CD105中的一种或多种(例如两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、八种或更多种,九种或更多种或十种或更多种(例如,直至13种))。例如, MSC可表达标志物CD29、CD59、CD90和CD105中的一种或多种(例如,两种、三种或全部),例如,CD59和/或CD90。

[0061] 通常, MSC可以不表达标志物因子VIII、 α -肌动蛋白、结蛋白、S-100、角蛋白、CD11b、CD11c、CD14、CD45、HLAII、CD31、CD34、CD45、STRO-1和CD133中的一种或多种(例如两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、八种或更多种、九种或更多种或十种或更多种(例如,直至15种)),例如MSC不表达标志物CD34、CD45、CD31和CD14中的一种或多种(例如两种、三种或全部),例如,CD31和/或CD34。

[0062] 扩增的MSC

[0063] 在一个实施方案中, MSC是体外培养扩增的MSC或其体外培养扩增的子代(在下文中,两者都被称为扩增的MSC或“eMSC”)。用于制备eMSC的方法是本领域已知的,例如,如 WO2007039150 中所述。eMSC保留了MSC的若干表型特征,例如,eMSC在标准培养条件下粘附于塑料并保持未分化的表型。

[0064] eMSC是未分化的多潜能细胞,其具有分化成体细胞(例如中胚层细胞)的能力。然而, MSC具有向至少一种或多种特化细胞谱系例如但不限于脂肪细胞、软骨细胞和成骨细胞谱系分化的能力;通常,在eMSC中,这种分化能力是降低的或甚至可能不存在。例如,鉴于 MSC 可向至少成骨细胞和脂肪细胞谱系分化,但源自其的eMSC可能仅向脂肪细胞谱系分化。这可有利于细胞的治疗应用,其中可以将细胞施用于患者,这是因为可以合理地预期:不太可能发生eMSC的意外的和潜在有害的分化。

[0065] 在一个实施方案中, eMSC可以是干细胞的子代。通常, eMSC (i) 不表达APC特异的标志物; (ii) 不组成型表达IDO; (iii) 不显著组成型表达MHC II。通常,可以通过IFN- γ 刺激诱导IDO或MHC II表达。

[0066] 通常, eMSC可表达标志物CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49A、CD51、CD54、CD55、

CD58、CD59、CD90和CD105中的一种或多种(例如两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、八种或更多种、九种或更多种或十种或更多种(例如,直至13种)),例如MSC可以表达标志物CD29、CD59、CD90和CD105中的一种或多种(例如,两种、三种或全部),例如,CD59和/或CD90。

[0067] 通常,eMSC可以不表达标志物因子VIII、 α -肌动蛋白、结蛋白、S-100、角蛋白、CD11b、CD11c、CD14、CD45、HLAII、CD31、CD34、CD45、STRO-1和CD133中的一种或多种(例如,两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、八种或更多种、九种或更多种或十种或更多种(例如,直至15种)),例如, MSC不表达标志物CD34、CD45、CD31和CD14中的一种或多种(例如,两种、三种或全部),例如,CD31和/或CD34。此外, MSC可任选地不表达标志物STRO-1。

[0068] 细胞群

[0069] 在一个方面,本发明提供了用于如本文所述的治疗用途的MSC和/或eMSC群,这些群在下文中可被称为“本发明的细胞群”。通常, MSC是扩增的人类ASC,通常是同种异体扩增的人类ASC。通常,本发明的细胞群是同质或基本上同质的MSC和/或eMSC群。本发明的细胞群包含或基本上包含MSC和/或eMSC,然而本发明的细胞群还可包含其他细胞类型。因此,在一个实施方案中,本发明提供了本发明的细胞群,其中至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%的细胞是MSC和/或eMSC。

[0070] 通常,本发明的细胞群是培养扩增的MSC群,其包含或基本上包含eMSC,然而本发明的细胞群还可包含其它细胞类型。因此,在一个实施方案中,本发明提供了本发明的细胞群,其中至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%的细胞是eMSC。在一个实施方案中,eMSC是eASC,例如人类eASC。在一个具体实施方案中,细胞相对于待治疗的受试者是同种异体的。

[0071] 通常,本发明的细胞群可以具有向至少一种或多种特化的细胞谱系例如但不限于脂肪细胞、软骨细胞和成骨细胞谱系分化的能力。在一个实施方案中,本发明的细胞群可以具有分化成选自脂肪细胞、软骨细胞和成骨细胞谱系中的至少两种或全部细胞类型或向其分化的能力。然而,在可替代的实施方案中,这种分化能力是降低的或甚至可能不存在。例如,鉴于MSC可向至少成骨细胞和脂肪细胞谱系分化,但源于其的eMSC群可能仅向脂肪细胞谱系分化。这可有利于细胞的治疗应用,其中可以将细胞施用于患者,这是因为可以合理地预期:不太可能发生eMSC的意外的和潜在有害的分化。

[0072] 通常,本发明的细胞群可以表达标志物CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49A、CD51、CD54、CD55、CD58、CD59、CD90和CD105中的一种或多种(例如,两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、八种或更多种、九种或更多种或十种或更多种(例如,直至13种)),例如, MSC可以表达标志物CD29、CD59、CD90和CD105中的一种或多种(例如两种、三种或全部),例如CD59和/或CD90。因此,在一个实施方案中,本发明提供了本发明的细胞群,其中至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少

约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%的细胞表达标志物CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49A、CD51、CD54、CD55、CD58、CD59、CD90和CD105中的一种或多种(例如,两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、八种或更多种、九种或更多种或十种或更多种(例如,直至13种)),例如, MSC可表达标志物CD29、CD59、CD90和CD105中的一种或多种(例如两种、三种或全部),例如,CD59和/或CD90。在可替代的实施方案中,本发明提供了本发明的细胞群,其中标志物CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49A、CD51、CD54、CD55、CD58、CD59、CD90和CD105中的一种或多种(例如,两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、八种或更多种、九种或更多种或十种或更多种(例如,直至13种))的表达水平是至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%,例如,本发明的细胞群可以以上述水平表达标志物CD29、CD59、CD90和CD105中的一种或多种(例如,两种、三种或全部),例如,CD59和/或CD90。

[0073] 通常,本发明的细胞群可以不表达标志物因子VIII、 α -肌动蛋白、结蛋白、S-100、角蛋白、CD11b、CD11c、CD14、CD45、HLAII、CD31、CD34、CD45、STRO-1和CD133中的一种或多种(例如,两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、八种或更多种、九种或更多种或十种或更多种(例如,直至15种)),例如, MSC不表达标志物CD34、CD45、CD31、CD14中的一种或多种(例如,两种、三种或全部),例如,CD31和/或CD34。此外, MSC可任选地不表达标志物STRO-1。

[0074] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了本发明的细胞群,其中至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%的细胞不表达标志物因子VIII、 α -肌动蛋白、结蛋白、S-100、角蛋白、CD11b、CD11c、CD14、CD45、HLAII、CD31、CD34、CD45、STRO-1和CD133中的一种或多种(例如,两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、八种或更多种、九种或更多种或十种或更多种(例如,直至15种)),例如, MSC可表达标志物CD34、CD45、CD31和CD14中的一种或多种(例如,两种、三种或全部),例如,CD31和/或CD34。在可替代的实施方案中,本发明提供了本发明的细胞群,其中标志物因子VIII、 α -肌动蛋白、结蛋白、S-100、角蛋白、CD11b、CD11c、CD14、CD45、HLAII、CD31、CD34、CD45、STRO-1和CD133中的一种或多种(例如,两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、八种或更多种、九种或更多种或十种或更多种(例如,直至15种))的表达水平低于至少约35%、至少约30%、至少约25%、至少约20%、至少约25%、至少约5%、至少约1%,例如,本发明的细胞群可以以上述水平表达标志物CD34、CD45、CD31和CD14中的一种或多种(例如,两种、三种或全部),例如,CD31和/或CD34。

[0075] 在一些实施方案中, MSC或eMSC被预刺激以增强其增殖能力、迁移能力、存活能力、治疗效果和免疫调节性质中的一种或多种。通常,至少约40%(例如,至少约50%、至少约

60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%)的本发明的细胞群被预刺激,以增强其增殖能力、迁移能力、存活能力、治疗效果和免疫调节性质中的一种或多种。在一些实施方案中,可以通过将MSC与细胞因子接触来实现预刺激。在本发明的一些实施方案中,可以通过将MSC与IFN- γ 接触来实现预刺激。

[0076] 本发明的组合物

[0077] 在一个实施方案中,本发明提供了包含本发明的细胞群的组合物,其用于根据本发明的治疗方法中。优选所述组合物是药物组合物。本发明的组合物可以包含基本上纯的MSC或eMSC群,例如,基本上纯的ASC或eASC群,例如,人类eASC。MSC、eMSC、ASC或eASC可以是干细胞。本发明的组合物还可以包含细胞培养组分,例如,包含一种或多种氨基酸、金属和辅酶因子的培养基。组合物可以包括少量其它基质细胞群。组合物还可以包含其它非细胞组分,其可以在特定情况(例如,植入、在连续培养中生长或用作生物材料或组合物)下支持MSC的生长和存活。

[0078] 本发明的组合物中的MSC和/或eMSC的浓度可以为至少约 1×10^4 个细胞/mL、至少约 1×10^5 个细胞/mL、至少约 1×10^6 个细胞/mL、至少约 10×10^6 个细胞/mL或至少约 40×10^6 个细胞/mL。通常,浓度为约 1×10^6 个细胞/mL至 1×10^7 个细胞/mL,例如约 5×10^6 个细胞/mL至 1×10^7 个细胞/mL。

[0079] 本发明的组合物通常包含药学上可接受的载体和/或稀释剂。此类载体和稀释剂的实例是本领域公知的,并且可以包括:糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;粉状黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;油,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,例如丙二醇;多元醇,例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;pH缓冲溶液;聚酯、聚碳酸酯和/或聚酰酐;和药物制剂中使用的其它无毒的相容性物质。典型地,本发明的组合物包含作为载体的DMEM,其可任选地补充有血清(例如HSA),其浓度例如至多约5%、至多约10%、至多约15%、至多约20%、至多约25%、至多约30%。

[0080] 本发明的组合物可以是无菌的和/或流体以达到容易注射的程度。此外,组合物在制备和储存条件下可以是稳定的,并且通过使用例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸和硫柳汞防止微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。

[0081] 制备方法

[0082] 用于分离和培养MSC以提供本发明的eMSC和细胞群以及包含本发明的细胞群的组合物的方法是本领域已知的。通常,用于制备包含细胞群的组合物的方法包括以下步骤:

[0083] (i) 从组织中分离MSC并通过粘附到合适的表面(例如,塑料)进行选择。

[0084] (ii) 扩增MSC以提供包含eMSC的本发明的细胞群。

[0085] 任选地,本发明的细胞群可以在扩增步骤(ii)期间和/或之后冷冻保存。任选地,可以在扩增步骤(ii)期间和/或之后评估本发明的细胞群的表型。任选地,可以在扩增步骤(ii)之后分离本发明的细胞群,并将其重悬于药学上可接受的载体和/或稀释剂中。

[0086] 用于本发明的MSC可以从任何合适的组织中分离,合适的组织例如但不限于外周

血、骨髓、胎盘、脂肪组织、骨膜、牙髓、脾、胰腺、韧带、皮肤、肌腱、骨骼肌、脐带和胎盘。在优选的实施方案中，MSC获得自结缔组织来源，例如脂肪组织的基质部分、透明软骨、骨髓、皮肤等。

[0087] 在一个实施方案中，MSC来自脂肪组织的基质部分。在另一个实施方案中，MSC获得自软骨细胞，例如获得自透明软骨。在另一个实施方案中，MSC获得自皮肤。此外，在另一个实施方案中，MSC获得自骨髓。

[0088] MSC可获得自任何合适的来源和任何合适的动物(包括人类)。通常，所述细胞获得自产后哺乳动物的结缔组织。

[0089] MSC也可以从作为受试者的相同或不同物种的任何生物体中分离。具有MSC的任何生物体都可以是潜在的候选者。在一个实施方案中，生物体可以是哺乳动物，在另一个实施方案中，生物体是人类。

[0090] 脂肪来源的MSC可以通过本领域任何标准方法获得。典型地，通常通过用消化酶(例如胶原酶)处理组织，从组织源(例如，脂肪抽吸物或脂肪组织)中分离细胞来获得所述细胞。然后，通常通过约20微米至1mm的过滤器过滤所消化的组织物质。然后，分离细胞(通常通过离心)并在粘附表面(通常是组织培养板或烧瓶)上培养。此类方法是本领域已知的，例如美国专利第6777231号中所公开的。根据该方法，从脂肪组织中获得脂肪抽吸物且由其得到细胞。在该方法的过程中，可以洗涤细胞以除去污染性碎片和红细胞(优先用PBS)。用在PBS中的胶原酶(例如，在37℃下30分钟，0.075%胶原酶；I型，Invitrogen，Carlsbad，CA)消化细胞。为了去除剩余的红细胞，可以洗涤消化的样品(例如，用10%胎牛血清)，用160mmol/L C1NH4处理，最后悬浮于DMEM完全培养基(DMEM含有10%的FBS、2mmol/L谷氨酰胺和1%的青霉素/链霉素)。可以通过40-μm尼龙网过滤细胞。

[0091] 将细胞培养于合适的组织培养容器中，所述组织培养容器包括适合于MSC粘附的表面，例如，塑料。例如通过在合适的缓冲液中洗涤除去非贴壁细胞以提供贴壁的基质细胞(例如MSC)的分离群。以这种方式分离的细胞可接种(优选 $2-3 \times 10^4$ 个细胞/cm²)于组织培养瓶上，并在37℃和5%的CO₂下扩增，每3-4天更换培养基。当培养物达到90%的汇合度时，优选将细胞转移到新培养瓶(1,000个细胞/cm²)中。

[0092] 优选在无菌或GMP条件下进行细胞分离。

[0093] 在某些实施方案中，可以将细胞培养至少约15天、至少约20天、至少约25天或至少约30天。通常，培养中细胞的扩增改善了细胞群中的细胞表型的同质性，从而获得基本上纯的或同质的群。

[0094] 当培养物达到约75%、80%、85%、90%或95%的汇合度时，优选地从粘附表面分离细胞(例如，通过胰蛋白酶的方式)并转移至新的培养容器(传代)中。

[0095] 在某些实施方案中，将细胞在培养中繁殖至少三次培养传代或“传代至少三次”。在其它实施方案中，将细胞传代至少四次、至少五次、至少六次、至少七次、至少八次、至少九次或至少十次。

[0096] 在某些实施方案中，细胞在培养中扩增至少三次群体倍增。在某些实施方案中，细胞在培养中扩增至少四、五、六、七、八、九、十或15次群体倍增。在某些实施方案中，细胞在培养中扩增少于七、八、九、十或15次群体倍增。在某些实施方案中，细胞在培养中扩增约5至10次群体倍增。

[0097] 可以通过本领域已知的用于培养基质干细胞的任何技术来培养细胞。各种培养技术及其规模化的讨论示于Freshney, RI, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 第4版, Wiley-Liss, 2000。可以使用适合于大规模扩增的培养瓶或生物反应器来扩增细胞。适合于大规模扩增间充质基质细胞的生物反应器是可商购的,并且其可以包括2D(即,基本上是平面的)和3D扩增生物反应器。此类生物反应器的实例包括但不限于活塞流生物反应器、灌注生物反应器、连续搅拌罐生物反应器、固定床生物反应器。

[0098] 在某些实施方案中,通过单层培养来培养细胞。可以使用能够在组织培养中支持MSC的任何培养基。能支持MSC生长的培养基制剂包括但不限于达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)、 α 改良的最小必需培养基(α MEM)以及洛斯维·帕克纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute)培养基1640(RPMI培养基1640)。通常,将0至20%的胎牛血清(FBS)加入到上述培养基中以支持基质细胞的生长。然而,如果确定了FBS中的用于基质细胞和软骨细胞的必需生长因子、细胞因子和激素,并将其以适当的浓度提供在生长培养基中,则可以使用限定的培养基。可用于本发明方法的培养基可以含有一种或多种目标化合物,其包括但不限于抗生素、基质细胞的促有丝分裂或分化的化合物。本发明的细胞可以在湿润的培养箱中在31℃至37℃的温度下生长。二氧化碳含量可以保持在2%至10%,氧含量可以保持在1%至22%。

[0099] 可以加入到培养基中的抗生素包括但不限于青霉素和链霉素。化学上限定的培养基中的青霉素的浓度可以是约10至约200个单位/毫升。化学上限定的培养基中的链霉素的浓度可以是约10至约200 μ g/ml。

[0100] 通常,用于本发明方法的MSC是扩增的细胞群,优选扩增所述细胞以提供基本上纯的或同质的群。

[0101] 在一个实施方案中,扩增所述细胞群,直至与新鲜分离的未扩增的细胞相比,标志物CD34的表达降低。例如,扩增细胞群,直至标志物CD34的表达降低至低于群体中细胞的50%、低于群体中细胞的35%、低于群体中细胞的30%或低于群体中细胞的5%的水平,例如,群体中细胞的35-5%或20-10%。通常,扩增细胞群,直至标志物CD34的表达降低至低于群体中细胞的5%的水平。因此,本发明的eMSC群包含低于50%、低于35%、低于30%或低于5%(例如,35-5%或20-10%)的表达CD34的细胞。

[0102] 在一个实施方案中,扩增所述细胞群,直至与新鲜分离的未扩增的细胞相比,标志物STRO-1的表达降低。例如,扩增细胞群,直至标志物STRO-1的表达降低至低于群体中细胞的50%、低于群体中细胞的35%、低于群体中细胞的30%或低于群体中细胞的5%的水平,例如,群体中细胞的35-5%或20-10%。通常,扩增细胞群,直至标志物STRO-1的表达降低至低于群体中细胞的5%的水平。因此,本发明的eMSC群包含低于50%、低于35%、低于30%或低于5%(例如,35-5%或20-10%)的表达STRO-1的细胞。

[0103] 通常,扩增细胞群,直至与新鲜分离的未扩增的细胞相比,标志物CD34和STRO-1的表达降低。例如,扩增细胞群,直至标志物CD34和STRO-1的表达降低至低于群体中细胞的50%、低于群体中细胞的35%、低于群体中细胞的30%或低于群体中细胞的5%的水平,例如,群体中细胞的35-5%或20-10%。通常,扩增细胞群,直至标志物CD34和STRO-1的表达降低至低于群体中细胞的5%的水平。因此,本发明的eMSC群包含低于50%、低于35%、低于30%或低于5%(例如,35-5%或20-10%)的表达CD34和STRO-1的细胞。

[0104] 扩增的MSC群(例如,表达5%或更少的CD34和/或STRO-1的那些群)是有利的,这是因为它们呈现出比新鲜分离的细胞更低的多能性,即与天然存在的未扩增的MSC相比,它们可具有更低的、降低的或没有分化成其它细胞表型的能力。

[0105] 对于本领域技术人员显而易见的是,用于制备本发明的组合物的方法不是限制性的,并且以任何方式制备的本发明的组合物都包括在本发明的范围内。在一个实施方案中,本发明提供了制备本发明组合物的方法,其包括:(a)从供体收集组织;(b)通过酶处理获得细胞悬液;(c)沉淀细胞悬液并将细胞重悬于培养基中;(d)将细胞培养至少约5天或5次群体倍增。

[0106] 在一个实施方案中,在施用前,例如,在扩增期间和/或扩增之后,细胞可以是冷冻保存的。因此,本发明还提供了本发明的冷冻保存的细胞。细胞冷冻保存的方法是本领域已知的,并且通常需要使用合适的冷冻保护剂(例如DMSO)。可以在分离和/或扩增阶段中的任何时间点冷冻保存细胞,并在施用前解冻。通常,可以在第3代、4代、5代、6代、7代、8代、9代、10代、12代、15代或更高代冷冻保存细胞,例如,可以在第3-10代或5-10代冷冻保存细胞。任选地,可以在施用前将细胞重新铺板并进行培养。

[0107] 在一个实施方案中,在施用之前,可以从冷冻保存和/或培养基中分离细胞,并重悬于药学上可接受的载体和/或稀释剂(例如,DMEM,任选地补充有血清)中。

[0108] 在一些实施方案中,本发明的组合物中的本发明的细胞群可以被预刺激以增强其增殖能力、迁移能力、存活能力、治疗效果和免疫调节性质中的一种或多种。在一些实施方案中,可以通过将MSC与细胞因子接触来实现预刺激。在本发明的一些实施方案中,可以通过将MSC与IFN- γ 接触来实现预刺激。

[0109] 在本发明的某些实施方案中,可以使用0.1ng/ml至100ng/ml浓度的IFN- γ 预刺激MSC。在其它实施方案中,可以使用0.5ng/ml至85ng/ml、1ng/ml至70ng/ml、1.5ng/ml至50ng/ml、2.5ng/ml至40ng/ml或3ng/ml至30ng/ml浓度的IFN- γ 预刺激MSC。预刺激可以经长于约12小时的刺激时间进行。预刺激可以经长于约13小时、长于约18小时、长于约24小时、长于约48小时或长于约72小时的刺激时间进行。

[0110] 在一个实施方案中,本发明的MSC可以使用质粒、病毒或可替代的载体策略稳定或瞬时转染或转导目标核酸。目标核酸包括但不限于编码增强待修复组织类型(例如,肠壁或阴道壁)中所发现的细胞外基质成分的产生的基因产物的那些核酸。

[0111] 可以用病毒载体(其包括但不限于纯化的腺病毒、逆转录病毒或腺相关病毒(例如,通过氯化铯带纯化))按照约10:1至2000:1的感染复数(病毒单位:细胞),将携带有调节基因的病毒载体转导到基质细胞中。在不存在或存在阳离子去污剂(例如,聚乙烯亚胺或LipofectamineTM)的情况下,可在无血清或含血清的培养基中将细胞暴露于病毒约1小时至约24小时(Byk T.等人,(1998),Human Gene Therapy 9:2493-2502;Sommer B.等人,(1999),Calcif.Tissue Int.64:45-49)。

[0112] 用于将载体或质粒转移到基质细胞中的其它合适的方法包括脂质/DNA复合物,例如,如美国专利第5,578,475号;第5,627,175号;第5,705,308号;第5,744,335号;第5,976,567号;第6,020,202号和第6,051,429号中所述的那些。合适的试剂包括lipofectamine、聚阳离子脂质2,3-二油基氧基-N-[2-(精胺甲酰氨基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙铵三氟乙酸盐(DOSPA)(化学文摘登记名:N-[2-(2,5-双[(3-氨基丙基)氨基]-1-氧戊基(oxpenty1)]氨基

基)乙基]-N,N-二甲基-2,3-双(9-十八烯基氧基)-1-丙胺三氟乙酸盐)和中性脂质二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)在膜过滤水中的3:1(w/w)脂质体制剂。示例是制剂Lipofectamine 2000TM(可获得自Gibco/Life Technologies#11668019)。其它试剂包括:FuGENETM 6转染试剂(非脂质体形式的脂质和其它化合物在80%乙醇中的混合物,可获得自Roche Diagnostics Corp.#1814443);以及LipoTAXITM转染试剂(来自Invitrogen Corp.的脂质制剂,#204110)。基质细胞的转染可以通过电穿孔进行,例如,如M.L.Roach和J.D.McNeish (2002) Methods in Mol.Biol.185:1中所述。用于产生具有稳定遗传改变的基质细胞的合适的病毒载体系统可基于腺病毒和逆转录病毒,并且可以使用可商购的病毒组分进行制备。

[0113] 可以在单层培养中通过使用磷酸钙DNA沉淀或阳离子去污剂的方法(LipofectamineTM,DOTAP)或在三维培养中通过将质粒DNA载体直接掺入到生物相容性聚合物中来实现将携带有调节基因的质粒载体转染进MSC中(Bonadio J.等人(1999) Nat.Med.5:753-759)。

[0114] 为了追踪和检测由这些基因编码的功能性蛋白质,病毒或质粒DNA载体可以含有容易检测的标志物基因,例如绿色荧光蛋白或β-半乳糖苷酶,二者均可通过组织化学方法进行追踪。

[0115] 在扩增之后,优选分析本发明的细胞群以测定特征标志物的表达以证实其表型,这可通过使用常规方法来进行。

[0116] 术语“表达”用于描述细胞内标志物的存在。为了被认为是表达的,标志物必须以可检测水平存在。“可检测水平”意指可以使用标准实验室方法(例如,PCR、印迹或FACS分析)之一来检测标志物。MSC群的表型表面标志物表征可以通过本领域已知的任何方法进行。示例但不限于,这种表型表征可通过单个细胞染色进行。此类染色可通过使用抗体来实现。这可以是使用标记抗体的直接染色或使用针对特异于细胞标志物的第一抗体的第二标记抗体的间接染色。可以通过本领域已知的任何方法检测抗体结合。也可以通过流式细胞术、免疫荧光显微术或放射线照相术检测抗体结合。

[0117] 或者或另外,如果在30个PCR循环后可合理地检测到表达,则认为基因被本发明的细胞群表达,这对应于细胞中至少约100个拷贝/细胞的表达水平。术语“表达(express)”和“表达(expression)”具有一致的含义。在表达水平低于这一阈值时,认为标志物不表达。本发明的成体基质细胞中的标志物表达水平与另一种细胞(例如胚胎干细胞)中的同一标志物表达水平之间的比较可优选通过比较从同一物种分离的两种细胞类型来进行。优选地,该物种是哺乳动物,更优选地,该物种是人类。可使用逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)实验方便地进行此类比较。

[0118] 可以通过任何合适的常规技术,通常基于阳性/阴性选择来鉴定细胞表面标志物;例如,可以使用抗细胞表面标志物(其在待确认细胞中存在/不存在)的单克隆抗体;但也可以使用其它技术。因此,在具体的实施方案中,使用抗CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49A、CD51、CD54、CD55、CD58、CD59、CD90和CD105中的一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种或全部的单克隆抗体,以确认所选细胞中不存在所述标志物;使用抗因子VIII、α-肌动蛋白、结蛋白、S-100、角蛋白、CD11b、CD11c、CD14、CD45、HLAII、CD31、CD34、CD45、STR0-1和CD133中的一种、两种、三种、四种或全部的单克隆抗体,以确认所述标志物中的至少一种(且优选

全部)的存在或可检测的表达水平。

[0119] 在另一个实施方案中,使用抗CD34、CD45、CD31、CD14中的至少一种、两种、三种或全部(例如,CD31和/或CD34)的单克隆抗体,以确认所述标志物的存在或可检测的表达水平。在另一个实施方案中,使用抗CD34的单克隆抗体,以确认所选细胞中不存在所述标志物。在另一个实施方案中,使用抗STRO-1的单克隆抗体,以确认所选细胞中不存在所述标志物。在另一个实施方案中,使用抗CD29、CD59、CD90、CD105中的至少一种、两种、三种或全部(例如,CD59和/或CD90)的单克隆抗体,以确认标志物的存在或可检测的表达水平。

[0120] 所述单克隆抗体是已知的、可商购的或可由本领域技术人员通过常规方法获得的。

[0121] 可以通过任何合适的常规分析来测定所选细胞中的IFN- γ 诱导型IDO活性。例如,可以用IFN- γ 刺激所选细胞并分析IDO表达;然后,可以进行用于IDO蛋白表达的常规蛋白质印迹分析,并且可以利用例如经高效液相色谱(HPLC)分析和光度法测定上清液中犬尿氨酸浓度作为读数,通过色氨酸至犬尿氨酸的转化来测量所选细胞的IFN- γ 刺激后的IDO酶活性。由于本发明的细胞在某些条件下表达IDO,因此,能在IFN- γ 刺激后检测IDO活性的任何合适的技术都可用于选择本发明的细胞。用于测定所选细胞中IFN- γ 诱导型IDO活性的合适的分析公开于WO2007039150中。产生的IDO的量取决于每平方厘米的细胞数和IFN- γ 的浓度,其中所述细胞数优选为5000个细胞/cm²或更高的水平,但不限于此浓度,IFN- γ 的浓度理想地是3ng/ml或更高,但不限于此浓度。在所述条件下产生的IDO的活性将导致在24小时或更长时间后 μ M范围的可检测的犬尿氨酸的产生。

[0122] 施用

[0123] 在一个实施方案中,可以制备本发明的组合物用于全身施用(例如,直肠、鼻、颊、阴道、经植入的储库或经吸入)。在另一个实施方案中,可以制备本发明的组合物用于局部施用。本发明的组合物可以通过胃肠外途径施用。组合物可以通过皮下途径、皮内途径、静脉内途径、肌内途径、关节内途径、滑膜内途径、胸骨内途径、鞘内途径、病灶内途径、淋巴内途径和颅内途径施用。优选的施用途径是静脉内。优选的MSC是ASC。

[0124] 因此,本发明提供了用于治疗患者中继发于肺炎的脓毒症的MSC(例如ASC),其中将MSC通过静脉内途径施用。通常,患者是人类。

[0125] 在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗患者(例如,人类患者)中继发于肺炎的脓毒症的ASC,其中将ASC例如通过静脉内途径,例如通过静脉内注射,例如通过淋巴内注射到淋巴器官(例如外周淋巴器官,其包括但不限于淋巴结,最优选为腋窝淋巴结或腹股沟淋巴结)全身施用。在各个这些实施方案中,MSC可以是ASC,例如eASC。如本文所用,术语“淋巴系统”被赋予其在本领域中的通常含义,并且是指通过淋巴管和淋巴毛细管的传导系统连接的淋巴组织(例如,淋巴器官)。术语“淋巴器官”是指淋巴结,最优选为腋窝淋巴结或腹股沟淋巴结。在一个实施方案中,ASC不直接施用于肺或通过气管内途径施用。在一个实施方案中,相对于待治疗的受试者,本发明中使用的MSC可以是自体的。在另一个实施方案中,相对于待治疗的受试者,本发明中使用的MSC可以是同种异体的或异种的。来源于供体的同种异体脂肪组织来源的基质细胞理论上可用于治疗任何患者,而不考虑MHC的不相容性。

[0126] 在一个实施方案中,本发明的组合物可以通过在待治疗的受试者的一个或多个靶位点处注射或植入组合物来施用。在另一个实施方案中,本发明的组合物可以被插入到递

送装置中,该递送装置有助于通过注射或植入将组合物引入受试者。在一个实施方案中,递送装置可包括导管。在另一个实施方案中,递送装置可包括注射器。

[0127] 剂量

[0128] MSC和任何其它治疗试剂的剂量将根据患者的症状、年龄和体重、待治疗或预防的病症的性质和严重性、施用途径以及其它治疗试剂的形式而变化。本发明的组合物可以以单剂量或分剂量施用。MSC和任何其它治疗试剂的合适剂量可以通过已知技术来确定。

[0129] 通常,所述剂量为约 10×10^6 个细胞/kg受试者体重或更低、约 9×10^6 个细胞/kg或更低、约 8×10^6 个细胞/kg或更低、约 7×10^6 个细胞/kg或更低、约 6×10^6 个细胞/kg或更低、约 5×10^6 个细胞/kg或更低。在可替代的实施方案中,所述剂量可以为约 0.25×10^6 个细胞/kg至约 5×10^6 个细胞/kg;或更优选地,约 1×10^6 个细胞/kg至约 5×10^6 个细胞/kg。因此,在其它可替代的实施方案中,剂量可以为约 0.25×10^6 个细胞/kg、 0.5×10^6 个细胞/kg、 0.6×10^6 个细胞/kg、 0.7×10^6 个细胞/kg、 0.8×10^6 个细胞/kg、 0.9×10^6 个细胞/kg、 1.1×10^6 个细胞/kg、 1.2×10^6 个细胞/kg、 1.3×10^6 个细胞/kg、 1.4×10^6 个细胞/kg、 1.5×10^6 个细胞/kg、 1.6×10^6 个细胞/kg、 1.7×10^6 个细胞/kg、 1.8×10^6 个细胞/kg、 1.9×10^6 个细胞/kg或 2×10^6 个细胞/kg。在其它实施方案中,剂量可以为10万个细胞至1百万个细胞/kg、或1百万个细胞至2百万个细胞/kg、或2百万个细胞至3百万个细胞/kg、或3百万个细胞至4百万个细胞/kg、或4百万个细胞至5百万个细胞/kg、或5百万个细胞至6百万个细胞/kg、或6百万个细胞至7百万个细胞/kg、或7百万个细胞至8百万个细胞/kg、或8百万个细胞至9百万个细胞/kg、或9百万至1千万个细胞/kg。

[0130] 在可替代的实施方案中,细胞可按固定剂量施用给患者,而与患者体重无关。通常,所述剂量为约1千万至5亿个细胞,例如,所述剂量为约 10×10^6 个细胞、 50×10^6 个细胞、 10×10^7 个细胞、 50×10^7 个细胞。

[0131] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗人类受试者的继发于肺炎的脓毒症(例如,继发于肺炎的严重脓毒症)的MSC(例如ASC),其中通过静脉内途径(例如,通过静脉内注射)施用MSC,剂量为约 0.25×10^6 个细胞/kg至约 5×10^6 个细胞/kg受试者体重。典型剂量为 4×10^6 个细胞/kg受试者体重。脓毒症可继发于细菌性肺炎(例如,革兰氏阴性肺炎)。

[0132] 在可以与上述实施方案任选组合的另一个实施方案中,本发明提供了用于治疗人类受试者的继发于肺炎的脓毒症(例如继发于肺炎的严重脓毒症)的MSC(例如ASC),其中,重复施用所述MSC,即施用两个或更多个剂量,例如至少3个剂量,至少4个剂量、5个剂量、6个剂量、7个剂量、8个剂量、9个剂量或10个剂量。在一个实施方案中,施用两个剂量。在另一个实施方案中,施用三个剂量。在另一个实施方案中,施用四个剂量。剂量之间的间隔可以是一天、一周或一个月。通常,间隔为一天。MSC可以历经不超过1周的时间段(例如,以每日间隔,例如在第1天和第3天,或第1天、第3天和第5天,或第1天、第3天、第5天和第7天)施用。在一个实施方案中,MSC的两次剂量按一天间隔,即在第1天和第3天(第1天表示MSC的第一次剂量)施用。

[0133] 在给定患者中产生最有效治疗的任何特定药剂的准确施用时间和量将取决于药剂的活性、药代动力学和生物利用度,患者的生理状况(包括年龄、性别、疾病类型和阶段、一般身体状况、对给定剂量和药物类型的反应性),给药途径等。本文呈现的信息可用于优

化治疗,例如,确定施用的最佳时间和/或数量,其将仅需要常规实验,例如监测受试者并调整剂量和/或时间。在治疗受试者时,可以通过在24小时期间的预定时间测量一个或多个相关指数以监测受试者的健康。可以根据此类监测的结果来优化治疗方案,包括剂量、施用时间和制剂。

[0134] 可以以小于最佳剂量的较小剂量开始治疗。此后,可以通过较小增量来增加剂量,直至达到最佳治疗效果。

[0135] 数种治疗试剂的组合使用可以减少任一单独组分的所需剂量,这是因为不同组分的起效和作用持续时间可以是互补的。在此类联合治疗中,不同的活性药剂可以一起递送或分开递送,并且可以同时递送或在一天内的不同时间递送。

[0136] 辅助治疗

[0137] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物可以含有一种或多种(或两种或更多种,或三种或更多种,例如,1种、2种、3种、4种或5种)其它治疗试剂或者可选地可以与其联合施用。

[0138] 在一些实施方案中,可以将MSC和一种或多种其它治疗试剂同时施用给受试者。在其它实施方案中,可以将MSC和一种或多种其它治疗试剂依次施用给受试者。可以在施用MSC之前或之后施用一种或多种其它治疗试剂。

[0139] 所述治疗试剂可以选自以下:止痛剂,例如非甾体抗炎药、阿片激动剂或水杨酸盐;抗感染剂,例如抗蠕虫剂、抗厌氧菌剂、抗生素、氨基糖昔抗生素、抗真菌抗生素、广谱抗生素、头孢菌素抗生素、大环内酯抗生素、 β -内酰胺抗生素、青霉素抗生素、喹诺酮抗生素、磺胺抗生素、四环素抗生素、抗分支杆菌剂、抗结核抗分枝杆菌剂、抗原生动物剂、抗疟疾抗原生动物剂、抗病毒剂、抗逆转录病毒剂、抗疥螨剂、抗炎剂、皮质类固醇抗炎剂、止痒剂/局部麻醉剂、局部抗感染剂、抗真菌局部抗感染剂、抗病毒局部抗感染剂;电解质和肾剂,例如酸化剂、碱化剂、利尿剂、碳酸酐酶抑制剂利尿剂、袢利尿剂、渗透性利尿剂、保钾利尿剂、噻嗪利尿剂、电解质置换剂和排尿酸剂;酶,例如胰酶和溶血栓酶;胃肠用剂,例如止泻剂、止吐剂、胃肠抗炎剂、水杨酸盐胃肠抗炎剂、抗酸抗溃疡剂、胃酸泵抑制剂抗溃疡剂、胃粘膜抗溃疡剂、H2阻断剂抗溃疡剂、去胆结石剂(cholelitholytic agent)、消化剂、催吐剂、轻泻剂和粪便软化剂以及促运动剂;全身麻醉剂,例如吸入麻醉剂、卤化吸入麻醉剂、静脉麻醉剂、巴比妥酸盐静脉麻醉剂、苯二氮静脉麻醉剂和阿片激动剂静脉麻醉剂;激素或激素调节剂,例如堕胎剂、肾上腺剂、皮质类固醇肾上腺剂、雄性激素、抗雄性激素,免疫生物剂例如免疫球蛋白、免疫抑制剂、类毒素和疫苗;局部麻醉剂,例如酰胺局部麻醉剂和酯局部麻醉剂;肌肉骨骼剂,例如抗痛风抗炎剂、皮质类固醇抗炎剂、金化合物抗炎剂、免疫抑制性抗炎剂、非甾体抗炎药(NSAID)、水杨酸盐抗炎剂、矿物质;以及维生素,例如维生素A、维生素B、维生素C、维生素D、维生素E和维生素K。

[0140] 在另一个实施方案中,其它治疗试剂可以是生长因子或影响细胞增殖或活化的其它分子。在另一个实施方案中,生长因子可诱导最终分化。在另一个实施方案中,生长因子可以是天然存在的生长因子的变体或片段。产生此类变体的方法是本领域熟知的,并且可包括例如进行保守氨基酸改变,或通过诱变和测定用于所需功能的所得变体。

[0141] 现将通过以下实施例进一步说明本发明。这些实施例仅以说明的方式提供,并不意图限制本发明。

[0142] 实施例1

[0143] ASC治疗对肺炎相关的脓毒症的效果

[0144] 目的:测定感染后6h施用的ASC对细菌的进展和传播以及肺中促炎细胞因子水平的影响。

[0145] 小鼠:

[0146] • 8至12周龄,无特异病原体的雌性C57BL/6小鼠

[0147] • 在实验前,将小鼠随机化并饲养7天以适应环境

[0148] • 对实验中的动物每天观察两次。如果病情严重,根据动物伦理委员会的要求,需要且有必要进行更频繁(6×)的观察

[0149] 肺炎:

[0150] 通过鼻内滴注活肺炎克雷伯菌血清型2(1×10^4 CFU;ATCC43816;美国典型培养物保藏中心)诱导革兰氏阴性肺炎。将细菌在胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)培养基和血液琼脂(BA)平板中培养。

[0151] 第-1天:开始培养

[0152] 将一滴-80℃的肺炎克雷伯菌菌种置于50ml TSB培养基中并在37℃下生长过夜(16小时)。

[0153] 第0天:制备接种物

[0154] 将1ml培养物(第-1天)重悬于100ml(温热的)TSB培养基中并生长直至OD=1.0(±2.5-3小时)。用冷的无菌的0.9%的NaCl(Baxter)洗涤10ml培养物,于4℃以4000rpm离心10分钟。除去上清液,如上所述再洗涤2次。将细胞团重悬于10ml NaCl中,细菌浓度为约 0.4×10^9 CFU/ml。将其稀释2000倍至约 20×10^4 CFU/ml。通过将接种物的50μl的 10^2 - 10^4 倍的稀释物在三个BA平板上铺板来检查接种物的浓度。在37℃过夜培养后,对CFU进行计数(第1天)。接种小鼠:

[0155] 接种物:50μl/小鼠→ 1×10^4 CFU

[0156] 干细胞:

[0157] 鼻内接种小鼠后6小时,静脉内施用ASC(1×10^6 个扩增的人类脂肪组织来源的干细胞)或安慰剂(林格氏乳酸盐(Ringer's lactate))。

[0158] 研究设计

[0159] T=0小时

[0160] • 异氟醚麻醉

[0161] • 所有小鼠:鼻内滴注活肺炎克雷伯菌血清型2(50μl, 1×10^4 CFU)

[0162] T=6小时

[0163] • 组I:(n=8)1×静脉内(IV)注射200μl安慰剂(林格氏乳酸盐)

[0164] • 组II:(n=8)1×IV注射 1×10^6 个ASC(在200μl林格氏乳酸盐中)

[0165] T=48小时:处死小鼠

[0166] 研究终点

[0167] • 肺、脾、肝和血液中的细菌负荷(半定量培养)

[0168] • 炎症:肺匀浆中的细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)和趋化因子(MIP-2)

[0169] 结果:

[0170] 图1-8示出了来自两个独立实验(分别标记为A和B)的结果。如图1-4所示,与安慰剂相比,感染6小时后用ASC处理减少了血液(图1)和肺(图2)中的细菌负荷,还减少了肝(图3)或脾(图4)中的细菌负荷。此外,如图5-8所示,与安慰剂相比,用ASC处理后,肺匀浆中促炎细胞因子和趋化因子的水平降低了。这些结果表明用ASC处理降低了肺炎相关的脓毒症的严重性。在各种情况中细菌负荷和促炎细胞因子/趋化因子水平降低了,这包括与肺炎相关的靶器官,如血液和肺。因此, MSC(例如ASC)在肺炎相关的脓毒症的治疗中是惊人有用的。

[0171] 来自其它研究的结果示于图9-12中,这再次证明了在肺炎相关的脓毒症中,静脉内施用ASC减少了各种器官(例如血液)中的细菌负荷。

[0172] 实施例2

[0173] 在患有严重脓毒症或脓毒性休克的严重肺炎患者中进行临床试验。在诊断为脓毒症的24小时内登记患者。

[0174] 在研究中登记的大约一半患者接受由供体来源(同种异体)的扩增的脂肪基质细胞(eASC)在林格氏乳酸盐溶液中的悬浮液组成的药物产品的治疗。另一半接受由林格氏乳酸盐溶液的悬浮液组成的安慰剂。治疗组中的患者接受单剂量的4百万个细胞/kg患者体重的药物产品。安慰剂组中的患者接受单剂量的安慰剂。在这两种情况下都通过静脉内输注施用。

[0175] 药物产品是在一次性小瓶中的于无菌缓冲溶液中的含有同种异体来源的脂肪来源的基质细胞(eASC)的细胞悬液,该eASC通过从健康个体进行脂肪抽吸而获得并在体外扩增。药物产品被供应为在6mL小瓶中提供的用于病灶内施用的无菌、澄清、无色的悬浮液(每mL含有人血清白蛋白的达尔伯克改良伊格尔培养基[DMEM]中有1千万eASC的悬浮液)。药物产品在悬浮于林格氏乳酸盐溶液后,以4ml/min的输注速率进行施用。

[0176] 以4ml/min的输注速率病灶内施用林格氏乳酸盐溶液进行安慰剂研究。将相应体积的安慰剂(林格氏乳酸盐溶液)施用给来自安慰剂组的各个受试者。根据受试者的体重计算安慰剂体积。

[0177] 药物产品制备

[0178] 同种异体eASC药物产品由从健康供体的皮下脂肪组织提取的活成体基质细胞的细胞悬液组成。从健康供体抽吸皮下脂肪组织并将其转移到GMP制造设备中。根据指令2004/23/EC的要求并因此在指令2006/17/EC和2006/83/EC下进行捐赠、获得和测试。通过用I型胶原酶消化脂肪组织,随后离心来分离ASC。将获得的细胞沉淀重悬,在红细胞裂解液中裂解并离心。将由细胞团获得的基质血管部分置于含培养基和抗生素的细胞培养容器中,在37°C和5%的CO₂以及湿润气氛中进行孵育。铺板后24-48h,除去培养基以除去未附着的细胞部分。将粘附在塑料培养板上的ASC在体外条件下进行扩增。每3-4天,在达到90-95%的汇合度后,更换培养基,将细胞用胰蛋白酶/EDTA分离、收集、离心并在无抗生素的情况下扩增至所需的倍数(duplication)。然后将其收获并冷冻保存直至使用。在指定的施用日期之前,解冻足够的冷冻保存的小瓶以提供所需的施用剂量。通过铺板和培养将ASC从其冷冻保存状态中恢复(以确认活力)。在装入并包装小瓶当日,用磷酸盐缓冲液以及胰蛋白酶/EDTA洗涤培养物。将ASC立即重悬于所选赋形剂(达尔伯克改良伊格尔培养基和人白蛋白血清)中以配制药品。

[0179] 根据基于细胞的药物产品指南 (EMEA/CHMP/410869/2006) 和干细胞的反思报告 (EMA/CAT/571134/2009) ,在同一性(表型谱)、纯度、效力、形态、活力和细胞生长动力学方面表征eASC。

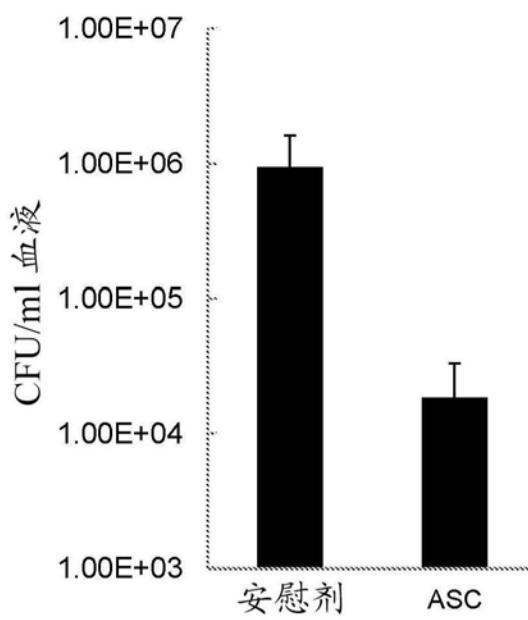
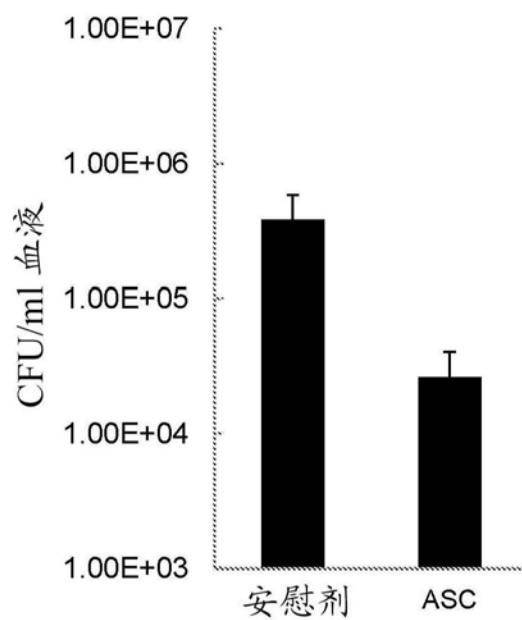
A**B**

图1

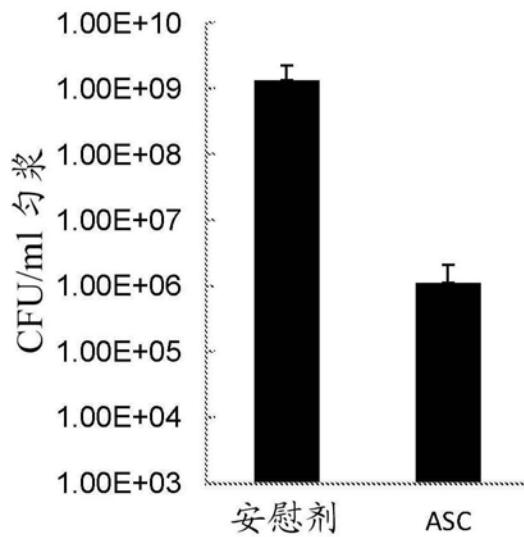
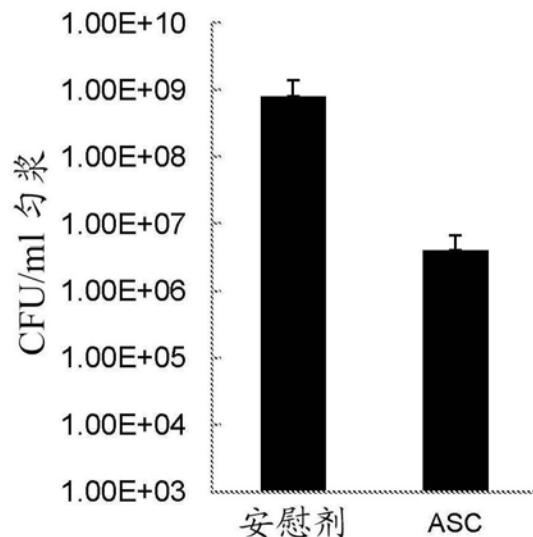
A**B**

图2

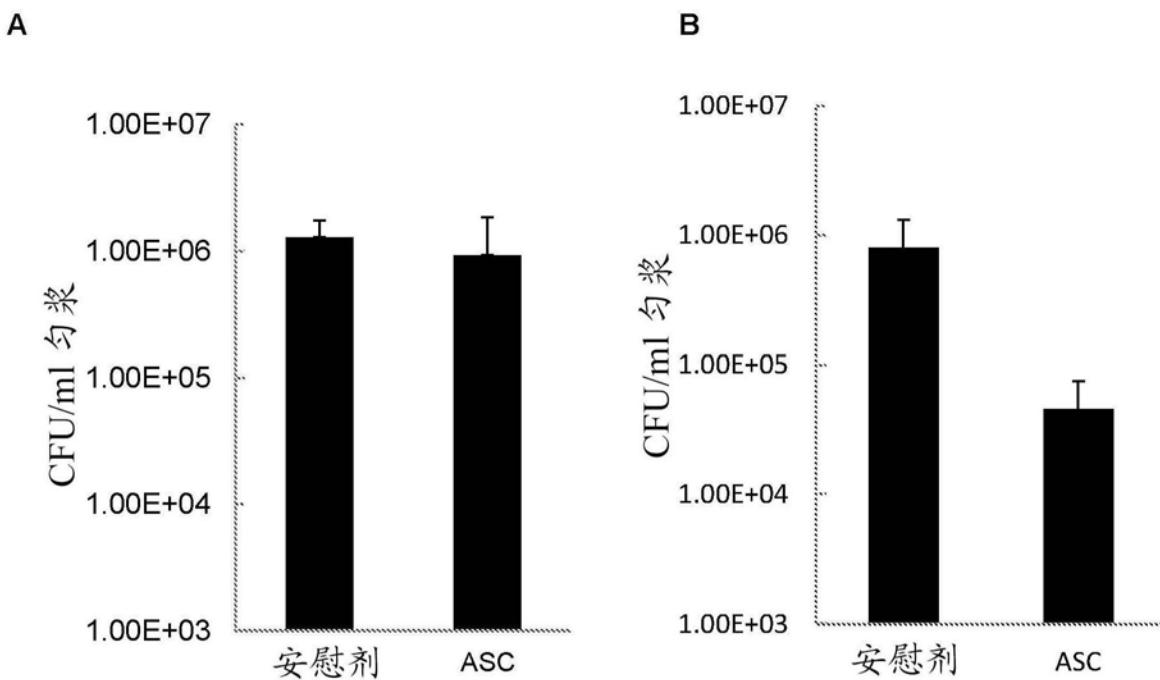


图3

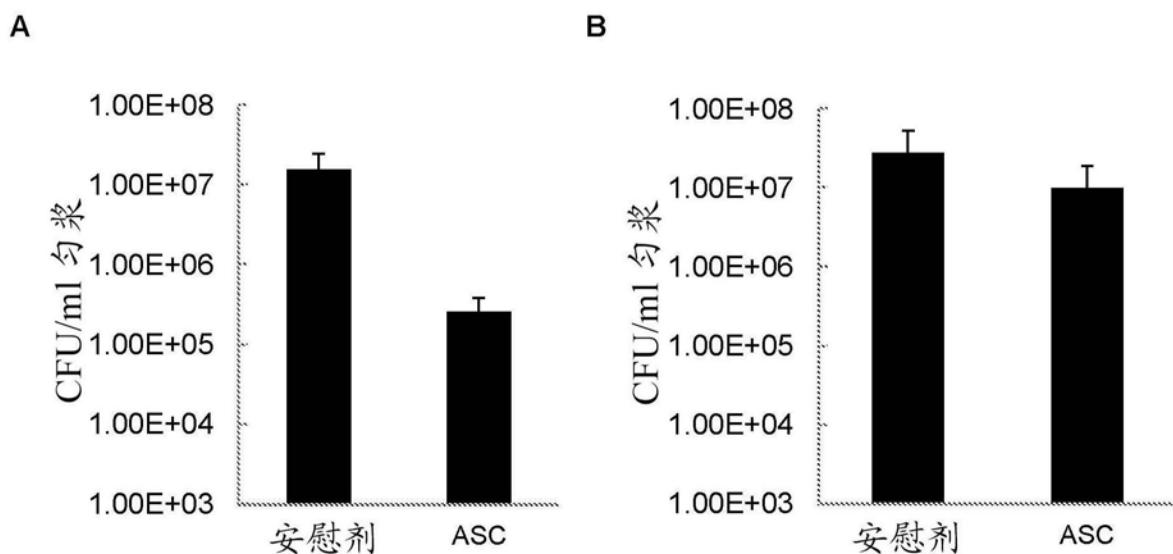


图4

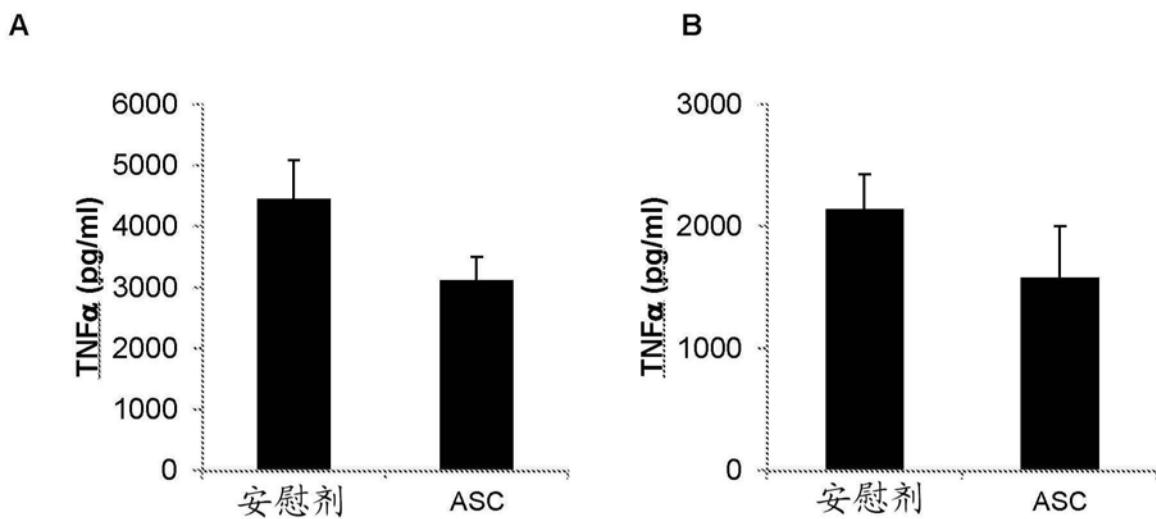


图5

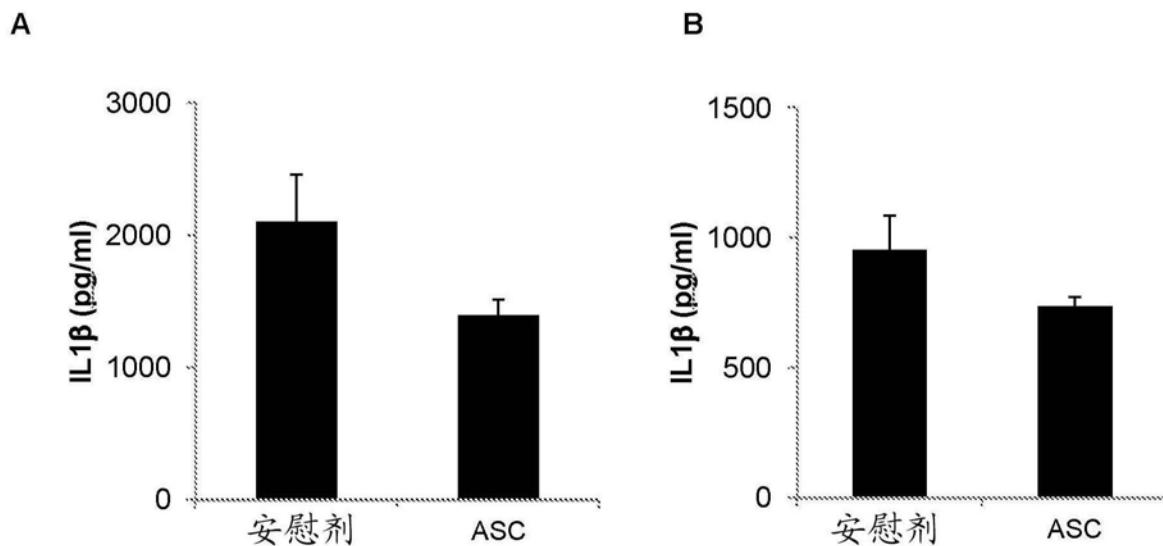


图6

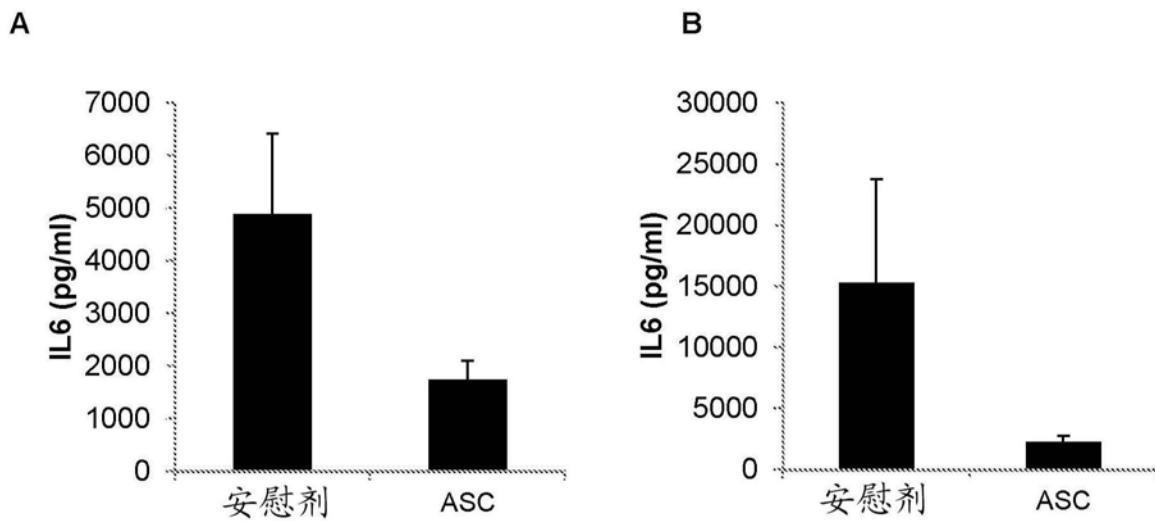


图7

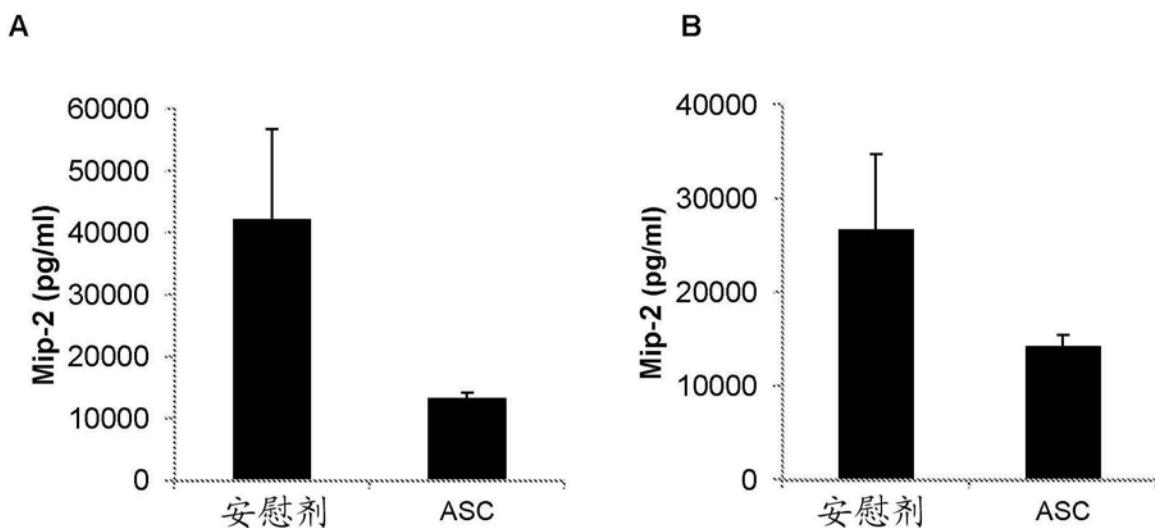


图8

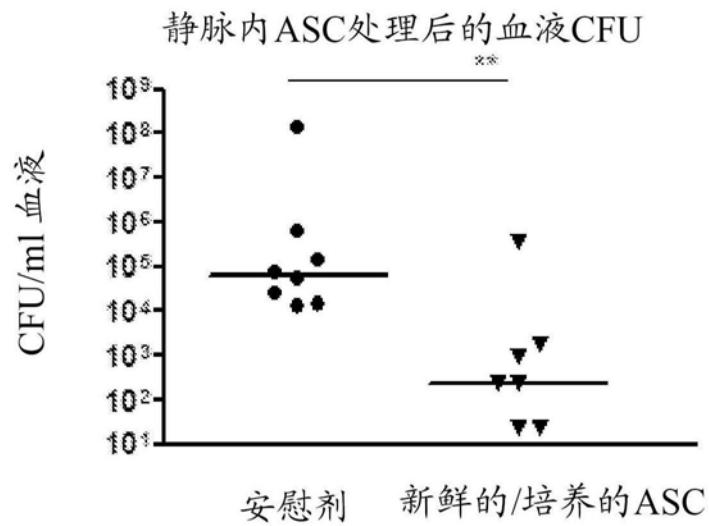


图9

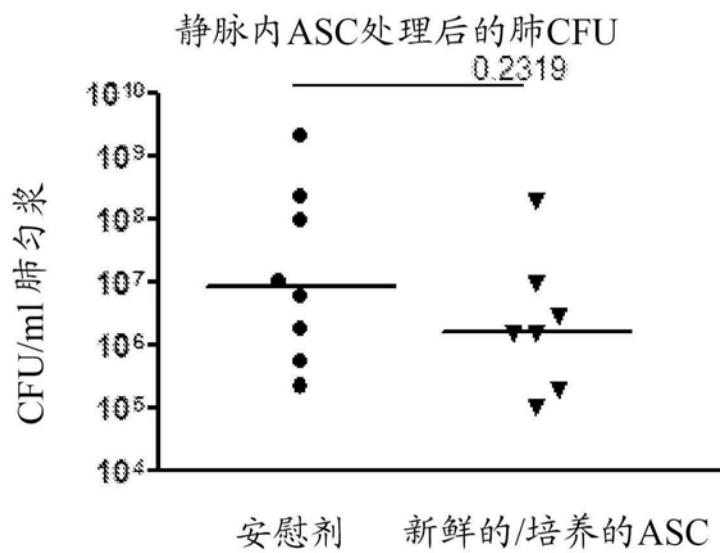


图10

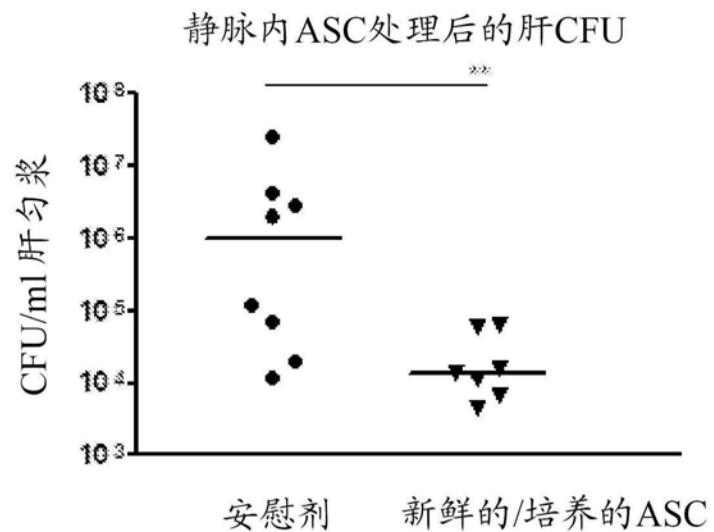


图11

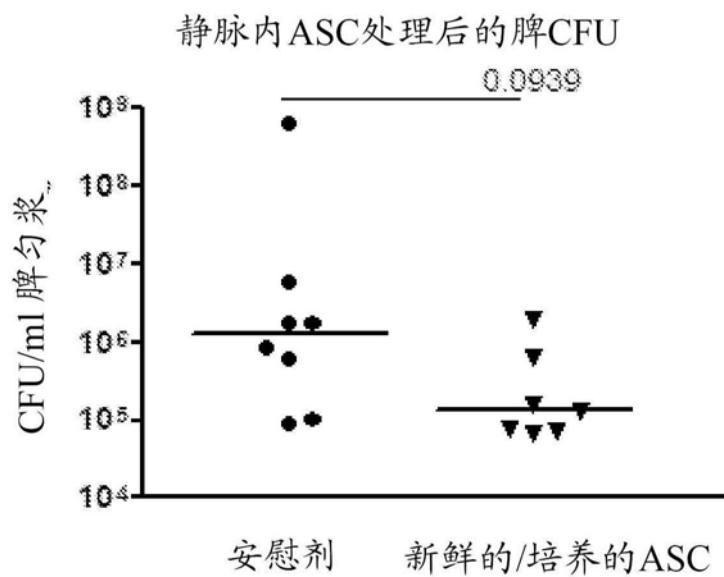


图12