



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102549147 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 04

(21) 申请号 201080030890. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 07. 09

C12N 5/0783 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 5/0775 (2006. 01)

61/224, 275 2009. 07. 09 US

C12N 5/077 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 01. 09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2010/001968 2010. 07. 09

(87) PCT申请的公布数据

W02011/004264 EN 2011. 01. 13

(71) 申请人 塞拉瑞克斯公司

地址 西班牙马德里

(72) 发明人 埃莱乌特里奥·罗姆巴杜

迪尔克·巴斯切尔

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 刘慧 杨青

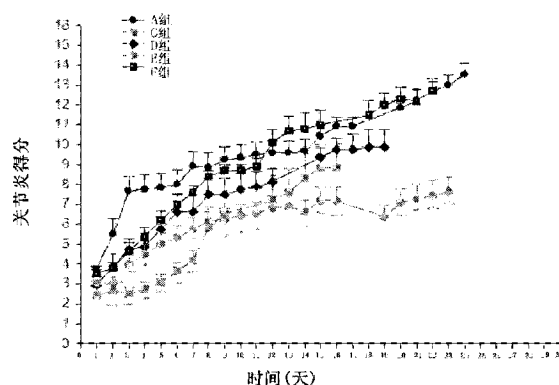
权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 1 页

(54) 发明名称

用于细胞治疗的方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供了细胞治疗的淋巴内给药方法。本发明还提供了与这类方法相关的组合物、试剂盒及其应用。



CIA小鼠的关节炎得分(实施例1)

1. 在具有受损组织和 / 或具有与炎性和 / 或免疫障碍相关的一种或多种症状的对象中用于治疗或修复受损组织和 / 或用于治疗、减轻、预防和 / 或改善炎性和 / 或免疫障碍的方法,所述方法包含向所述对象的淋巴系统给药预防或治疗有效量的、包含干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞的组合物。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述干细胞是间充质干细胞。

3. 权利要求 1 或 2 任一项的方法,其还包含向所述对象的淋巴系统给药抗原。

4. 权利要求 3 的方法,其中所述抗原在干细胞、调节性 T- 细胞或成纤维细胞给药之前、同时或之后给药。

5. 权利要求 3 的方法,其中所述抗原在干细胞、调节性 T- 细胞或成纤维细胞给药之前或之后至少 1、2、3、5 或 10 小时给药。

6. 前述权利要求任一项的方法,其中所述治疗被给予到淋巴器官。

7. 前述权利要求任一项的方法,其中所述治疗被给予到外周淋巴器官。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述外周淋巴器官是淋巴结。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述淋巴结是腋窝淋巴结或腹股沟淋巴结。

10. 前述权利要求任一项的方法,其中所述给予利用注射器执行。

11. 权利要求 10 的方法,其还包含使用放射学、超声或成像装置来监测注射针头的位置的步骤。

12. 干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞,其应用于下述方法中:

i. 治疗或修复受损组织 ;和 / 或

ii 治疗、减轻、改善和 / 或预防与炎性和 / 或免疫障碍相关的一种或多种症状 ;
其中细胞被给予到淋巴系统。

13. 权利要求 12 的用于所述权利要求的应用的细胞,其中所述干细胞是间充质干细胞。

14. 权利要求 12 至 13 任一项的用于所述权利要求的应用的细胞,其中所述方法还包含向所述对象的淋巴系统给药抗原。

15. 权利要求 14 的用于所述权利要求的应用的细胞,其中所述抗原在干细胞、调节性 T- 细胞或成纤维细胞给药之前、同时或之后给药。

16. 权利要求 14 的用于所述权利要求的应用的细胞,其中所述抗原在干细胞、调节性 T- 细胞或成纤维细胞给药之前或之后至少 1、2、3、5 或 10 小时给药。

17. 权利要求 12 至 16 任一项的用于所述权利要求的应用的细胞,其中干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞被给予到淋巴器官。

18. 权利要求 12 至 16 任一项的用于所述权利要求的应用的细胞,其中干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞被给予到外周淋巴器官。

19. 权利要求 18 的用于权利要求 19 的应用的细胞,其中所述外周淋巴器官是淋巴结。

20. 权利要求 19 的用于权利要求 19 的应用的细胞,其中所述淋巴结是腋窝淋巴结或腹股沟淋巴结。

21. 权利要求 12 至 20 任一项的用于所述权利要求的应用的细胞,其中所述给予利用注射器执行。

22. 权利要求 21 的用于所述权利要求的应用的细胞,其还包含使用放射学、超声或成

像装置来监测注射针头的位置的步骤。

23. 试剂盒,其包含 i) 包含干细胞、调节性 T-细胞和 / 或成纤维细胞群体的药物,以及 ii) 用于权利要求 1 的方法的使用说明书。

24. 干细胞和 / 或成纤维细胞在制造药物中的应用,所述药物通过将干细胞、调节性 T-细胞和 / 或成纤维细胞给予到淋巴系统中用于治疗或修复受损组织和 / 或用于治疗、减轻、预防和 / 或改善与炎性和 / 或免疫障碍相关的一种或多种症状。

25. 权利要求 1 至 11 任一项的方法,其中所述障碍选自乳糜泻、类风湿性关节炎、炎性肠病和多发性硬化症。

26. 权利要求 12 至 22 任一项的用于所述权利要求的应用的细胞,其中所述障碍选自乳糜泻、类风湿性关节炎、炎性肠病和多发性硬化症。

27. 权利要求 24 的应用,其中所述障碍选自乳糜泻、类风湿性关节炎、炎性肠病和多发性硬化症。

28. 干细胞、调节性 T-细胞或成纤维细胞,其用于给予到淋巴系统。

29. 权利要求 28 的干细胞、调节性 T-细胞或成纤维细胞,其用于治疗中。

30. 用于给予到淋巴系统的药物组合物,其包含干细胞、调节性 T-细胞和 / 或成纤维细胞、以及抗原。

31. 权利要求 30 的药物组合物,其中所述抗原是胶原蛋白、谷蛋白、谷蛋白组分、髓磷脂或髓磷脂组分。

用于细胞治疗的方法和组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于提供细胞治疗的方法、及其治疗应用。

背景技术

[0002] 高等脊椎动物中的免疫系统代表了抵抗能够进入脊椎动物身体的各种抗原、包括作为各种疾病的病原体的微生物例如细菌、真菌和病毒在内的第一道防线。此外，免疫系统还参与各种其他疾病或障碍，包括自身免疫或免疫病理疾病、免疫缺陷综合征、动脉粥样硬化和各种肿瘤疾病。尽管存在可用于治疗这些疾病的方法，但许多现有疗法不能提供足够的结果。在新出现的治疗策略中，基于细胞治疗的策略似乎构成了用于治疗大量疾病的潜在有用的工具。因此，为了实现所述目的，研究人员目前正在进行大量努力，

[0003] 自身免疫疾病

[0004] 当为身体抵御细菌、病毒和任何其他外来产物的身体的免疫系统机能障碍并产生针对健康组织、细胞和器官的病理性应答时，引起自身免疫疾病。抗体、T 细胞和巨噬细胞提供有益保护作用，但是也能产生有害或致死的免疫应答。

[0005] 自身免疫疾病可以是器官特异性或系统性的，并由不同的致病机制引起。器官特异性自身免疫的特征为主要组织相容性复合物 (MHC) 抗原的异常表达、抗原模拟和 MHC 基因中的等位基因变异。系统性自身免疫疾病涉及多克隆 B 细胞的活化和免疫调节 T 细胞、T 细胞受体和 MHC 基因的异常。器官特异性自身免疫疾病的实例是糖尿病、甲状腺机能亢进、自身免疫性肾上腺功能不全、纯红细胞性贫血、多发性硬化症和风湿性心脏炎。代表性的系统性自身免疫疾病是系统性红斑狼疮、慢性炎症、舍格伦综合征、多肌炎、皮炎和硬皮病。

[0006] 目前的自身免疫疾病治疗包括给药免疫抑制剂例如可的松、阿司匹林衍生物、羟氯喹、氨甲蝶呤、硫唑嘌呤和环磷酰胺或其组合。然而，当给药免疫抑制剂时所面对的困境是，自身免疫疾病的治疗越有效，患者剩余的对感染攻击的抵御力越低，并且对发生肿瘤的易感性也更高。因此，对用于治疗自身免疫疾病的新疗法存在着极大需求。

[0007] 炎症障碍

[0008] 炎症是身体的白细胞和分泌的因子保护我们的身体以对抗外来物质例如细菌和病毒的感染的过程。分泌的被称为细胞因子和前列腺素的因子控制这一过程，并以有序和自限的级联方式释放到血液或受影响组织中。

[0009] 炎症肠病 (IBD)

[0010] IBD 是一类慢性、特发性、复发性和组织破坏性疾病，其特征为黏膜 T 细胞机能障碍、细胞因子生产改变和细胞炎性，最终引起远端小肠和结肠黏膜的损伤。IBD 在临床上细分成两种表型：克隆病 (CD) 和溃疡性结肠炎。CD 是发病率为 0.05%、目前不可治愈的自身免疫疾病，其导致慢性炎症，引起各种胃肠和肠外症状，包括腹痛、直肠出血、腹泻、体重减轻、皮肤和眼的障碍以及儿童生长和性成熟延迟。这些症状可以极大影响患者的健康、生活质量和功能能力。因为 CD 是慢性病，并且典型在 30 岁以前发作，因此患者一般需要终生治疗。尽管它的病因仍然未知，但存在间接证据将 CD 与黏膜免疫系统不能减弱针对内源抗原

的免疫应答相联系。

[0011] 目前用于 CD 的治疗药剂包括氨基水杨酸盐、皮质类固醇、硫唑嘌呤、6- 巯基嘌呤、抗生素和氨甲蝶呤,不是完全有效的,是非特异性的并具有多种不利副作用。在大多数病例中,外科切除是最终可选方案。因此,目前的治疗策略是发现特异性调节疾病的两种要素、即炎性和 T- 细胞驱动的应答的药物或药剂。

[0012] 最近,药物英利昔单抗已被批准用于对标准疗法无响应的中度到重度克隆病的治疗以及开放引流瘘管的治疗。英利昔单抗,第一种获批的特异性用于克隆病的治疗,是一种抗肿瘤坏死因子 (TNF) 抗体。TNF 是由免疫系统产生的、可以引起与克隆病相关的炎症的蛋白。抗 TNF 抗体在 TNF 达到肠之前将其从血流中移除,从而阻止炎症。然而,因为它具有系统性效应,并且 TNF 是非常多效的因子,因此严重副作用相对常见,并且其长期安全性仍有待确定。此外,因为在患者中发生的许多炎性过程不依赖于 TNF 信号传导,因此效能也是有限的。

[0013] 类风湿性关节炎 (RA)

[0014] 类风湿性关节炎和青少年类风湿性关节炎是炎性关节炎类型。关节炎是描述关节中的炎症的通用术语。一些、但不是所有关节炎类型是炎性误导的结果。类风湿性关节炎影响世界人口的约 1%。并且实质上是致残的。类风湿性关节炎是一种自身免疫障碍,其中身体的免疫系统将关节中分泌润滑液的滑膜不合适地识别为外来物。炎症发生,并且关节内和附近的软骨和组织受到损伤或破坏。身体用瘢痕组织替换受损组织,导致关节内的正常空间变窄,骨骼融合在一起。

[0015] 在类风湿性关节炎中,存在着持久性抗原呈递、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。

[0016] 目前的关节炎疗法集中于使用抗炎或免疫抑制药物减轻关节的炎症。任何关节炎的第一线治疗通常是消炎药,例如阿司匹林、布洛芬和 Cox-2 抑制剂例如塞来昔布和罗非昔布。抗 TNF 人源化单克隆抗体例如英利昔单抗也可以使用,但是它具有许多次级效应或副作用,并且其效能相当低。“第二线药物”包括金、氨甲蝶呤和留族化合物。尽管这些是沿用已久的关节炎疗法,但极少有患者在单独进行这些治疗后复原,对于患有类风湿性关节炎的患者来说,仍然存在着治疗困难的问题。

[0017] 总的来说,目前用于慢性炎性障碍的治疗方法具有非常有限的效率,并且它们中的许多具有副反应的高发生率或不能完全阻止疾病进展。到目前为止,没有一种疗法是理想的,并且这些类型的疾病无法治愈。因此,对用于治疗炎性障碍的新疗法存在极大需求。

[0018] 发明概述

[0019] 本发明提供了用于对需要的患者进行细胞治疗的改进方法。本发明的其他方面提供了在淋巴内递送的细胞治疗中使用的试剂盒和组合物。

[0020] 一方面,描述了在具有受损组织和 / 或具有与炎性和 / 或免疫障碍相关的一种或多种症状的对象中,用于治疗或修复受损组织、和 / 或用于治疗、减轻、预防和 / 或改善与炎性和 / 或免疫障碍相关的一种或多种症状的方法,所述方法包含向所述对象的淋巴系统给药预防或治疗有效量的包含干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞的组合物。在一个实施方案中,本发明提供了在个体中预防、治疗或改善免疫和 / 或炎性疾病的方法,所述方法包含将细胞治疗直接递送到淋巴器官。在本发明的一个实施方案中,细胞治疗与抗原组合

递送。

[0021] 另一方面,描述了干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞,其使用在下述方法中:

[0022] i. 治疗或修复受损组织 ;和 / 或

[0023] ii 治疗、减轻、改善和 / 或预防与炎性和 / 或免疫障碍相关的一种或多种症状 ;

[0024] 其中细胞被给予到淋巴系统。

[0025] 另一方面,描述了试剂盒,所述试剂盒包含 i) 包含干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞群体的药物,以及 ii) 用于所描述的在需要治疗的对象中治疗或修复受损组织和 / 或用于治疗、减轻、预防和 / 或改善与炎性和 / 或免疫障碍相关的一种或多种症状的方法的使用说明书,所述方法包含向所述对象的淋巴系统给药预防或治疗有效量的包含干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞的组合物。

[0026] 另一方面,描述了干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞在制造药物中的应用,所述药物用于治疗或修复受损组织和 / 或用于治疗、减轻、预防和 / 或改善与炎性和 / 或免疫障碍相关的一种或多种症状,所述应用包含将干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞给予到淋巴系统中。

[0027] 另一方面涉及用于给予到淋巴系统的干细胞、调节性 T- 细胞或成纤维细胞。另一方面涉及所述细胞在治疗中的应用。

[0028] 另一方面涉及用于给予到淋巴系统的组合物,其包含干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞以及抗原。

[0029] 从公开内容和权利要求书,其他方面、特点和优点将更充分地显现。

[0030] 定义

[0031] 为了便于理解本说明书,下面将解释一些术语和表述在本发明的情形中的意义。如果需要,其他定义将包含在整个说明书中。

[0032] 根据本发明,术语“适用于淋巴内注射”或“适用于淋巴结内注射”或“适用于直接注射到腋窝淋巴节和 / 或腹股沟淋巴节中”,是指适用于淋巴内或淋巴结内注射的细胞治疗,优选包含免疫调节细胞、更优选包含干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞以及包含它们的药物和药物组合物,具有对于将其作为医学治疗注射到个体、特别是人类、更优选为人类患者的淋巴组织中,在需要所述治疗的对象中用于治疗或修复受损组织(优选为间充质组织)和 / 或用于治疗、减轻、预防和 / 或改善炎性和 / 或免疫障碍的一种或多种症状来说必需或有益的物理、化学、生物或其他特征。此外,根据本发明,“适用于淋巴内注射”或“适用于淋巴结内注射”的免疫调节细胞以及包含它们的药物和药物组合物,其包含的组合物所有组成成分的浓度允许在适合的体积中将适量的所有组成成分施加到淋巴组织中,所述体积优选为最多 0.01mL、优选最多 0.05mL、优选最多 0.1mL、优选最多 0.2mL、优选最多 0.3mL、优选最多 0.4mL、优选最多 0.6mL、优选最多 0.8mL、优选最多 1.0mL、优选最多 2mL 的体积。此外,“适用于淋巴内或淋巴结内注射”的组合物应该不含或仅含有限量的如果以过大的量使用将可能损伤淋巴组织的潜在有害物质,例如溶剂和佐剂。淋巴组织的损伤是指由于对细胞的毒性效应、由于细胞的化学破坏引起的直接损伤,以及例如通过诱导炎症反应、坏死等而引起的对细胞的间接损伤。

[0033] 此外,根据本发明,理想情况下“适用于淋巴内或淋巴结内注射”的组合物具有某

些类型的安全机制,以防在注射错过淋巴组织的情况下意外地、系统性地施用免疫调节细胞以及包含它们的药物和药物组合物,以及在最糟情况下导致将免疫调节细胞以及包含它们的药物和药物组合物直接注射到血液循环中。这样的安全机制包括生物活性物质的短的细胞外半衰期。

[0034] 当在本文中使用时,术语“注射”以其在本技术领域中的通常意义使用,是指通过刺穿身体的部分、通常为皮肤而将药剂递送至身体。该术语包括使用中空注射器和高压喷射注射装置。

[0035] 当在本文中使用时,术语“同种异体的”将取其来自于同一物种的不同个体的意义。当在一个或多个基因座处的基因不一致时,两个或更多个个体被称为彼此是同种异体的。

[0036] 当在本文中使用时,术语“自体的”将取其来自于同一个体的意义。

[0037] 术语“免疫疾病”是指对象中以由对象的免疫反应所引起的细胞、组织和 / 或器官损伤为特征的病症。术语“自身免疫疾病”是指对象中和以由对象对自身细胞、组织和 / 或器官的免疫反应所引起的细胞、组织和 / 或器官损伤为特征的病症。可以使用本发明的免疫调节细胞治疗的自身免疫疾病的说明性的非限制性实例包括斑秃、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、乳糜泻 - 皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征 (CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、丘 - 斯综合征、瘢痕性类天疱疮、CREST 综合征、冷血凝素病、盘状红斑狼疮、原发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛 - 纤维肌炎、肾小球肾炎、突眼性甲状腺肿、吉 - 巴综合征、桥本病、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、IgA 神经病、幼年型关节炎、扁平苔癣、美尼尔氏病、混合型结缔组织病、多发性硬化症、I 型或免疫介导的糖尿病、重症肌无力、寻常性天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多内分泌腺综合征、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、银屑病、银屑病关节炎、雷诺现象、赖特综合征、肉样瘤病、硬皮病、进行性系统性硬化症、舍格伦综合征、肺出血 - 肾炎综合征、僵人综合征、系统性红斑狼疮、红斑狼疮、多发性大动脉炎、颞动脉炎 / 巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、眼色素层炎、血管炎例如疱疹样皮炎、脉管炎、白癜风、韦格纳肉芽肿、抗肾小球基底膜疾病、抗磷脂综合征、神经系统的自身免疫疾病、家族性地中海热、朗伯 - 伊顿肌无力综合征、交感性眼炎、多内分泌腺疾病、银屑病等。

[0038] 术语“免疫介导的炎性疾病”是指以慢性或急性炎症为特征,由正常免疫应答的调节异常引起、与其相关或由其触发的任何疾病,例如克罗恩病、1 型糖尿病、类风湿性关节炎、炎性肠病、银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮、桥本病、移植物抗宿主疾病、舍格伦综合征、恶性贫血、阿狄森病、硬皮病、肺出血 - 肾炎综合征、溃疡性结肠炎、自身免疫性溶血性贫血、不育症、重症肌无力、多发性硬化症、突眼性甲状腺肿、血小板减少性紫癜、吉 - 巴综合征、过敏症、哮喘、特应性疾病、动脉硬化、心肌炎、心肌病、肾小球性肾炎、再生不良性贫血和器官移植后的排斥。

[0039] “乳糜泻”也称为腹腔疾病、口炎性腹泻、非热带脂肪泻,地方性口炎性腹泻、谷蛋白肠病或谷蛋白敏感性肠病和谷蛋白不耐受。

[0040] 出于本文描述的发明的目的,“免疫障碍”包括自身免疫疾病和免疫介导的疾病。

[0041] 术语“炎性疾病”是指对象中的以炎症例如慢性炎症为特征的病症。炎性障碍的说明性的非限制性实例包括但不限于乳糜泻、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、过敏性障碍、脓毒性休克、肺纤维变性 (例如特发性肺纤维变性)、炎性血管炎 (例如结节性多动脉炎、韦格纳肉芽肿、多发性大动脉炎、颞动脉炎和淋巴瘤样肉芽肿)、创伤后血管成形术 (例如血管成形术后再次狭窄)、未分化脊柱关节病、未分化关节病、关节炎、炎性骨质溶解、慢性肝炎以及由慢性病毒或细菌感染引起的慢性炎症。

[0042] 术语“分离的”在用于细胞群体时是指从人类或动物身体分离的细胞群体,其基本上不含在体内或体外与所述细胞群体相伴的一种或多种细胞群体。术语“MHC”(主要组织相容性复合物)是指编码细胞表面抗原呈递蛋白的基因亚类。在人类中,这些基因被称为人类白细胞抗原 (HLA) 基因。在本文中,缩写 MHC 或 HLA 可互换使用。术语“对象”是指动物,优选为哺乳动物包括非灵长动物 (例如奶牛、猪、马、猫、狗、大鼠或小鼠) 和灵长动物 (例如猴或人)。在优选实施方案中,对象是人。

[0043] 术语“免疫调节”是指抑制或降低免疫系统的一种或多种生物活性,其包括但不限于免疫应答和炎性状态的下调一级细胞因子分布情况、细胞毒性活性和抗体生产的变化。术语“抗原特异性免疫调节”是指抑制或降低免疫系统的与特定抗原、包括同种异体抗原和自体抗原两者相关的一种或多种生物活性。术语“免疫调节”将包含“抗原特异性免疫调节”。

[0044] 当在本文中使用时,术语“阴性”或“-”当用于细胞表面标记物时,是指在细胞群体中,少于 20%、10%、优选少于 9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1% 的细胞或没有细胞表达所述标志物。细胞表面标志物的表达可以例如使用常规方法和装置 (例如 BeckmanCoulter Epics XL FACS 系统,并使用可商购抗体和本技术领域已知的标准流程),通过用于特定细胞表面标志物的流式细胞术来确定。

[0045] 当在本文中使用时,术语“淋巴系统”具有其在本技术领域中的通常的意义,是指通过淋巴管和淋巴毛细管的输导系统相连的淋巴组织。术语“淋巴器官”是指淋巴节,更优选为腋窝淋巴节或腹股沟淋巴节,或者对于缺少淋巴结或淋巴结具有缺陷的个体来说,是指淋巴组织或免疫细胞。

[0046] 当在本文中使用时,术语“间充质干细胞”(在本文中也称为“MSC”)是指最初源于间充质的能够产生多种不同细胞类型的细胞。该术语是指能够分化成成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞或肌细胞中的至少一种的细胞。MSC 可以从任何类型的组织分离。一般来说, MSC 将从骨髓、脂肪组织、脐带或外周血分离。在某些实施方案中,在本发明中使用的 MSC 可以从骨髓 (BM-MSC) 或脂肪组织 (ASC) 分离。在本发明的优选情况下, MSC 从脂肪吸取物分离,所述脂肪吸取物本身从脂肪组织获得。

[0047] 当在本文中使用时,表述“显著表达”或其等价术语“阳性”和“+”当用于细胞表面标志物时,是指在细胞群体中,超过 20%、优选超过 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99% 或甚至所有的细胞表达所述标志物。

[0048] 细胞表面标志物的表达可以例如使用常规方法和装置 (例如 Beckman Coulter Epics XL FACS 系统,并使用可商购抗体和本技术领域已知的标准流程),通过用于特定细胞表面标志物的流式细胞术来确定,例如使用常规方法和装置 (例如 Beckman Coulter

Epics XL FACS 系统,并使用可商购抗体和本技术领域已知的标准流程),在流式细胞术中检测对于特定细胞表面受体来说显示出高于背景信号的信号。背景信号被定义为在常规 FACS 分析中将同一同种型的非特异性抗体作为用来检测每种表面标志物的特异性抗体时给出的信号强度。对于被认为是阳性的标志物来说,在使用常规方法和装置(例如 BeckmanCoulter Epics XL FACS 系统,并使用可商购抗体和本技术领域已知的标准流程)时观察到的特异性信号比背景信号强度强 20%以上、优选强 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、500%、1000%、5000%、10000%或更高。

[0049] 此外,可以使用可商购的和已知的针对所述细胞表面受体(例如细胞受体和跨膜蛋白)的单克隆抗体来鉴定相关细胞。

[0050] 术语“结缔组织”是指源于间充质的组织,并包括几种组织,其特征在于它们的细胞包含在细胞外基质中。结缔组织的实例包括但不限于脂肪和软骨组织。

[0051] 当在本文中使用时,术语“成纤维细胞”将包括成纤维细胞样滑膜细胞。

[0052] 术语“T-细胞”是指作为免疫系统的表达 T 细胞受体(TCR)的淋巴细胞亚类的细胞。术语“调节性 T-细胞”(在本文中也称为 T-reg 细胞)是指积极抑制免疫系统的活化并阻止病理性自体反应性即自身免疫疾病的 T 细胞亚类。术语“调节性 T-细胞”或“T-reg 细胞”将包括天然存在的 T-细胞(FoxP3+T-reg 细胞)和不表达 FoxP3 分子的适应性 T-细胞(也称为 Tr1 细胞或 Th3 细胞)两者。

[0053] 术语“谷蛋白”是指在组分中包含麦醇溶蛋白和谷蛋白的蛋白质。

[0054] 当在本文中使用时,术语“治疗”当直接用于指称患者或对象时,是指与障碍相关的一种或多种症状的改善,所述障碍包括但不限于炎症障碍、自身免疫疾病或免疫介导的疾病包括被移植器官和组织的排斥,其中所述改善由向需要所述治疗的对象给药本发明的免疫调节细胞或包含它们的药物组合物来获得。

[0055] 当在本文中使用时,术语“修复”当直接用于指称受损组织时,是指通过直接机制例如受损组织的再生以及通过间接机制例如降低炎症从而使组织形成这两种机制改善所述损伤。

[0056] 术语“组合治疗”是指以本发明的方式将本发明的免疫调节细胞或包含它们的药物组合物与其他活性药剂或治疗方式一起使用,用于改善与障碍相关的一种或多种症状,所述障碍包括但不限于炎症障碍、自身免疫疾病或免疫介导的疾病包括被移植器官和组织的排斥。这些其他药剂或治疗可以包括用于治疗所述障碍的已知药物和疗法,例如但不限于皮质类固醇和非甾体抗炎化合物。

[0057] 本发明的免疫调节细胞或包含它们的药物组合物,也可以与可用于治疗炎症的其他治疗方案例如皮质类固醇、非甾体抗炎化合物或其他药剂相组合。本发明的药剂与这些其他疗法或治疗方案的组合使用可以是同时的,或相继提供,也就是说,这两种治疗可以分开,使得所述免疫调节细胞或包含它们的药物组合物可以在其他疗法或治疗方案之前或之后给药。主治医师可以决定与其他药剂、疗法或治疗方案相组合的免疫调节细胞或包含它们的药物组合物给药的适合顺序。

附图说明

[0058] 图 1 说明了在胶原蛋白诱导的关节炎小鼠模型中给药扩增的脂肪源干细胞降低

了关节炎得分,并且淋巴内给药在治疗上比静脉内途径更有效。A组:未治疗的对照;C组:在连续5日中IV给药一百万个ASC;D组:在第1日给药三百万个ASC并在第3和5日给药一百万个ASC;E组:在第1和7日淋巴内给药320,000个ASC;F组:在第1和7日淋巴内给药介质。

[0059] 发明详述

[0060] 一方面,本发明提供了用于在需要治疗的对象中治疗或修复受损组织(优选为间充质组织)和/或治疗、减轻、预防和/或改善与炎性和/或免疫障碍相关的一种或多种症状的方法,所述方法包含向所述对象的淋巴系统给药预防或治疗有效量的包含细胞治疗的组合物。因此,另一方面,本发明提供了优选包含免疫调节细胞、最优选包含干细胞、调节性T-细胞和/或成纤维细胞的细胞治疗,其用于治疗或修复受损组织(优选为间充质组织)和/或用于治疗、减轻、预防和/或改善与炎性和/或免疫障碍相关的一种或多种症状,其中细胞治疗被给予到淋巴系统。淋巴内给药优选通过淋巴内注射来执行。细胞治疗适用于淋巴内给药、优选为淋巴内注射。

[0061] 将干细胞、调节性T-细胞和/或成纤维细胞直接给予到淋巴系统中,与现有技术、即所述干细胞、调节性T-细胞和/或成纤维细胞的常规皮下注射相比具有几个优点,例如较少量的免疫调节细胞就已足够,所述治疗对于患者来说不比常规皮下注射更痛苦,以及存在较少的不利副作用。此外,通过直接施用到淋巴组织,例如通过淋巴结内注射,免疫调节细胞被递送至与受损组织的治疗或修复位点更近的地方。

[0062] 本发明的免疫调节细胞以及包含它们的药物和药物组合物可以在淋巴内给药的同时,通过常规途径例如皮下给药或舌下给药、经口、透皮(表面疫苗接种)、真皮内、髓内、鞘内、心室内、鼻内、结膜、支气管内、透过真皮、直肠内、腹膜内、肌肉内、肺内、阴道、直肠或眼内给药。

[0063] 优选情况下,本发明的细胞治疗包含干细胞、调节性T-细胞和/或成纤维细胞。特别优选情况下,所述干细胞是间充质干细胞(在后文中也称为MSC),最优选为脂肪源间充质干细胞(在后文中也称为ASC),其是源于脂肪组织、一般为人类脂肪组织的MSC(hASC)。

[0064] 在本发明中使用的成纤维细胞是间充质来源的结缔组织,其与细胞外基质的合成和维持相关,并将包括成纤维细胞样滑膜细胞。成纤维细胞可以从任何适合的动物、最优选为人类获得。

[0065] 在本发明中使用的调节性T-细胞(有时被称为抑制性T-细胞)可以源于任何适合来源,例如血液或脾脏。调节性T-细胞可以是天然存在的 $CD4^+Foxp3^+$ 细胞,或者它们可以是离体分离和/或扩增的调节性T-细胞。用于调节性T-细胞的离体扩增的方法在本技术领域是已知的,包括从全血分离(例如作为PBMC级份的一部分)然后使用例如间充质干细胞或雷帕霉素进行扩增。

[0066] 在本发明的方法中使用的MSC优选源于结缔组织。在优选实施方案中,所述MSC源于脂肪组织,在另一个优选实施方案中,源于脂肪组织的基质部分。在可选实施方案中,所述MSC从透明软骨的软骨细胞获得。在另一个实施方案中,所述MSC从皮肤获得。在另一个实施方案中,所述MSC从骨髓获得。

[0067] MSC可以从任何适合动物、最优选为人类的任何适合的结缔组织来源获得。优选情况下,所述细胞从无病原体哺乳动物来源、优选为出生后(例如啮齿动物或灵长动物)

来源获得。在优选实施方案中, MSC 从结缔组织来源获得, 例如但不限于脂肪组织的基质部分、透明软骨、骨髓或皮肤。最优选情况下, 本发明方法的 MSC 从无病原体出生后人类基质脂肪组织获得。

[0068] 相对于按照本发明的方法给药的免疫调节细胞的目标受体来说, 在如上描述的所述方法中使用的 MSC、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞可以是同种异体 (供体) 或自体 (对象) 来源的。在方法的一个实施方案中, 所述 MSC、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞是同种异体来源的。在方法的一个实施方案中, 所述 MSC、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞是自体来源的。

[0069] 优选情况下, 在本发明的方法中使用的 MSC、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞的特征为 (i) 它们不表达特异性针对抗原呈递细胞的标志物, (ii) 它们不组成性表达 IDO (吡啶胺 2,3- 双加氧酶), (iii) 它们在用 IFN- γ 刺激后表达 IDO, 并且在 MSC 的情况下, (iv) 它们表现出分化成至少两种细胞谱系的能力。

[0070] 本发明的干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞优选在适合于注射的生理可接受载体中递送。一般来说, 已知可用的任何生理可接受载体都可用于本发明的实践。这些载体的选择包括但不限于林格 (Ringer) 溶液、水、标准盐水溶液、葡萄糖溶液和白蛋白水, 并且无疑是在本领域的技术范围之内。

[0071] 任选地, 在注射操作过程中可以使淋巴系统或其一部分例如淋巴管或淋巴器官的局部区域、优选为淋巴节可视化。可以使用超声波、放射学或其他可视化手段例如计算机轴向断层摄影术 (CAT 扫描) 来可视化淋巴节并监测针头的位置和淋巴结中的变化, 例如膨胀。由于易于进行超声波指导的定位和注射, 注射到腋窝淋巴节和腹股沟淋巴节中是优选的。

[0072] 用于注射的技术在本领域的技术范围之内。一种方法是使用含有细胞液体制剂的单室注射器。

[0073] 另一方面, 本发明提供了在需要治疗的对象中治疗或修复受损组织 (优选为间充质组织) 和 / 或治疗、减轻、预防和 / 或改善与炎性和 / 或免疫障碍相关的一种或多种症状的方法, 所述方法包含向所述对象的淋巴系统给药预防或治疗有效量的包含细胞治疗 (最优选包含 MSC、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞) 的组合物, 并且还包含将抗原直接给予到所述对象的淋巴系统。所述抗原可以在给药细胞治疗之前、同时或之后给药。抗原可以在给药细胞治疗之前或之后至少 1、2、3、5 或 10 个小时给药。

[0074] 所述方法中使用的抗原可以是所选抗原、抗原组或表达和 / 或呈递所述抗原的细胞类型。在一个实施方案中, 抗原选自: 源于经受自身免疫的患者的自体抗原混合物、肽抗原、核酸、改变的肽配体、重组蛋白或其片段。在一个实施方案中, 所述抗原与关节炎相关 (例如但不限于胶原蛋白抗原)。在可选实施方案中, 所述抗原与乳糜泻相关。与乳糜泻相关的抗原是谷蛋白家族的成员, 包括某些形式的醇溶谷蛋白 (例如但不限于麦醇溶蛋白、大麦醇溶蛋白和 / 或裸麦醇溶蛋白的抗原)。在另一个实施方案中, 所述抗原与多发性硬化症相关 (例如但不限于髓磷脂抗原)。用于分离、纯化和制备这些抗原的方法, 对于本技术领域的专业人员来说是已知的。

[0075] 在特别优选情况下, 本发明的所有方面的细胞治疗直接给予到淋巴器官, 最优选为外周淋巴器官, 包括但不限于淋巴节, 最优选为腋窝淋巴节或腹股沟淋巴节。在缺少淋巴

结或淋巴结具有缺陷的个体中,细胞治疗可以递送至淋巴组织或免疫细胞。

[0076] 淋巴内给药的方法在本技术领域是已知的,并通常利用注射装置(例如注射器)来执行。可以利用成像装置例如但不限于放射学、超声波和计算机轴向断层摄影术(CAT 扫描)来辅助和观察给药。这允许细胞治疗的精确给药并监测淋巴器官的不利事件。在方法的一个方面,对象用多剂淋巴内给药的细胞治疗进行治疗。优选情况下以一定时间间隔给药至少 2、3、4、5、10 或 15 剂。在方法的另一方面,每剂所述药剂包含 10,000 至 5,000,000 个细胞。在优选实施方案中,每剂所述药剂包含 10,000 至 100,000 个细胞、100,000 至 500,000 个细胞、500,000 至 1,000,000 个细胞或 1,000,000 至 5,000,000 个细胞。

[0077] 另一方面,本发明提供了用于给药至淋巴系统的干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞。

[0078] 在本发明的另一方面,提供了干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞作为药物的应用,通过将干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞给予到淋巴系统中,用于治疗或修复受损组织(优选为间充质组织)和 / 或治疗、减轻、预防和 / 或改善与炎性和 / 或免疫障碍相关的一种或多种症状。

[0079] 本发明的可选方面提供了干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞在药物制造中的应用,所述药物通过将干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞给予到淋巴系统中,用于治疗或修复受损组织(优选为间充质组织)和 / 或治疗、减轻、预防和 / 或改善与炎性和 / 或免疫障碍相关的一种或多种症状。

[0080] 另一方面,本发明提供了用于给药至淋巴系统的药物组合物,其包含干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞。所述药物组合物用于治疗、修复、预防和 / 或改善受损组织或与炎性和 / 或免疫障碍相关的一种或多种症状,例如但不限于自身免疫疾病、炎症障碍和免疫介导的疾病,包括被抑制器官和组织的排斥。在本发明的一个实施方案中,药物组合物还可以包含抗原、抗原组或表达和 / 或呈递所述抗原的细胞类型。在一个实施方案中,抗原选自:源于经受自身免疫的患者的自体抗原混合物、肽抗原、核酸、改变的肽配体、重组蛋白或其片段。在一个实施方案中,所述抗原与关节炎相关,例如但不限于胶原蛋白抗原。在可选实施方案中,所述抗原与乳糜泻相关。与乳糜泻相关的抗原是谷蛋白家族的成员,包括某些形式的醇溶谷蛋白(例如但不限于麦醇溶蛋白、大麦醇溶蛋白和 / 或裸麦醇溶蛋白的抗原)。谷蛋白及其组分麦谷蛋白和麦醇溶蛋白,是与乳糜泻相关的优选抗原。在另一个实施方案中,所述抗原与多发性硬化症相关,例如但不限于髓磷脂抗原和髓磷脂组分抗原例如髓磷脂碱性蛋白(MBP)、髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、蛋白脂质蛋白(PLP)和髓磷脂糖脂例如半乳糖脑苷脂。用于分离、纯化和制备这些抗原的方法,对于本技术领域的专业人员来说是已知的。

[0081] 本发明的药物组合物包含预防或治疗有效量的干细胞、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞、任选的抗原和药用载体。每种这些细胞类型的剂量和剂量方式的实例在上文中给出。适合的药用载体在本技术领域是已知的,并且优选是由美国联邦或州政府的管理机构批准或列于美国药典(U S Pharmacopeia)或欧洲药典(European Pharmacopeia)或其他公认药典中可用于动物、更具体为人类中的药用载体。术语“载体”是指与治疗药剂一起给药的稀释剂、佐剂、赋形剂或介质。如果需要,组合物也可以包含少量 pH 缓冲

剂。适合的药用载体的实例描述在 E W Martin 的《Remington 药理学》(Remington's Pharmaceutical Sciences) 中。这样的组合物将含有预防或治疗有效量的优选采取纯化形式的预防或治疗药剂以及适量的载体,以提供用于适当给予到对象的形式。制剂应该适合于给药方式。在优选实施方案中,药物组合物是无菌的,并采取适合给药于对象、优选为动物对象、更优选为哺乳动物对象、最优选为人类对象的形式。

[0082] 本发明的药物组合物可以采取各种形式。它们包括例如半固体和液体剂型,例如冷冻干燥制备物、液体溶液或悬液、可注射和可输注溶液等。正如上面指出的,药物组合物优选为可注射的。

[0083] 优选情况下,本发明的方法、药物、组合物和细胞用于治疗或修复受损组织(优选为间充质组织)和/或治疗、减轻、预防和/或改善与炎性和/或免疫障碍相关的一种或多种症状。因此,本发明的方法和细胞可用于治疗以任一或所有所述症状为特征的任何障碍。这样的障碍的代表性而非穷举的名单提供在定义部分中。特别优选的是将本发明的方法、药物、组合物和细胞应用于免疫介导的炎性疾病的治疗。此外,优选将本发明的方法、药物、组合物和细胞应用于糖尿病、类风湿性关节炎(RA)、炎性肠病(IBM,包括克罗恩病和/或溃疡性结肠炎)和多发性硬化症(MS)的治疗。更特别优选情况下,将本发明的方法、药物、组合物和细胞应用于类风湿性关节炎的治疗。

[0084] 在本发明的方法或组合物包含一种或多种抗原的情形中,优选将方法或组合物用于与所述抗原相关或由其诱导的障碍的治疗中,例如在抗原是胶原蛋白的情形中,方法或组合物可用于治疗关节炎,在抗原是谷蛋白组分的情形中,方法或组合物可用于治疗乳糜泻,在抗原是髓磷脂组分的情形中,方法或组合物可用于治疗多发性硬化症。因此,优选的组合物包含:MSC、优选为 ASC,以及胶原蛋白,用于治疗关节炎;MSC、优选为 ASC,以及谷蛋白和/或谷蛋白组分,用于治疗乳糜泻;MSC、优选为 ASC,以及髓磷脂和/或髓磷脂组分,用于治疗多发性硬化症。

[0085] 另一方面,本发明提供了试剂盒,其包含 i) 包含干细胞,调节性 T- 细胞和/或成纤维细胞群体的药物,以及 ii) 根据本发明的方法使用它们的说明书。

[0086] 在另一个实施方案中,所述试剂盒还可以包含 iii) 一种或多种抗原。

[0087] MSC 表型标志物

[0088] 在本发明的优选方法中使用的 MSC 优选对与 APC(抗原呈递细胞)表型相关的标志物为阴性。因此,优选情况下,所述 MSC 对至少一种、两种、三种或四种或优选所有下述标志物阴性:CD 11b;CD 11c;CD 14;CD45;HLAII。此外,MSC 优选对至少一种、两种或优选所有下述细胞表面标志物阴性:CD31;CD34;CD 133。

[0089] 在具体实施方案中,优选情况下,本发明方法中使用的 MSC 的特征为它们表达至少一种、两种、三种、四种或优选所有下述细胞表面标志物(即对它们阳性):CD9、CD44、CD54、CD90 和 CD 105。优选情况下,MSC 的特征为它们具有至少一种、两种、三种、四种和优选所有所述细胞表面标志物 CD9、CD44、CD54、CD90 和 CD 105 的显著表达水平。

[0090] 任选地,MSC 也可以对细胞表面标志物 CD 106(VCAM-1) 阴性。适用于本发明方法的 MSC 的实例在本技术领域已有描述,例如在 W02007039150 中,在此以其全文引为参考。

[0091] 分化

[0092] 适用于本发明方法的 MSC 优选为多能干细胞,并可以表现出增殖和分化成至少两

种、更优选三、四、五、六、七或更多种细胞谱系的能力。所述 MSC 可以分化成的细胞谱系的说明性而非限制性实例包括骨细胞、脂肪组织细胞、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、星形胶质细胞和肝细胞。MSC 通过常规方法能够增殖并分化成其他谱系的细胞。鉴定以及随后将分化的细胞与其未分化对应物分离开的方法,也可以通过本技术领域公知的方法来执行。

[0093] MSC 分离

[0094] 用于分离 MSC 的方法在本技术领域中公知的,并且可以使用任何适合的方法。在一个实施方案中,ASC 的分离可以包含下列步骤:

[0095] (i) 从脂肪样品制备细胞悬液;

[0096] (ii) 从所述细胞悬液回收细胞;

[0097] (iii) 将所述细胞在固体表面上,在适合的细胞培养基中,在允许细胞附着于固体表面并增殖的条件下进行温育;

[0098] (iv) 在温育后清洗所述固体表面以除去非黏附细胞;

[0099] (v) 选择在这样的培养基中传代至少两次后附着于所述固体表面的细胞;以及

[0100] (vi) 证实所选细胞群体表现出目标表型。

[0101] 当在本文中使用时,术语“固体表面”是指 ASC 能够附着在其上的任何材料。在具体实施方案中,所述材料是经过处理以促进哺乳动物细胞与其表面的黏附的塑料材料,例如任选包被有聚 D- 赖氨酸或其他试剂的可商购聚苯乙烯板。

[0102] 步骤 (i)-(vi) 可以通过本技术领域的专业人员已知的常规技术来执行。简单来说,ASC 可以通过常规手段,从如上所讨论的任何适合动物的任何适合的结缔组织来源获得。典型情况下,人类脂肪细胞使用公认的流程例如手术或脂肪抽吸术从活供体获得。事实上,由于脂肪抽吸法如此常见,因此脂肪抽吸流出物是可以从其产生 ASC 的特别优选的来源。因此,在具体实施方案中,ASC 来自于通过脂肪抽吸术获得的人类脂肪组织的基质部分。

[0103] 优选情况下,在将组织进行处理以将 ASC 与其余材料分离之前,对组织进行清洗。在一种常用方案中,将组织样品用生理相容的盐水溶液(例如磷酸盐缓冲盐水(PBS))进行清洗,然后剧烈搅拌并静置沉降,该步骤从组织中移除松散物质(例如受损组织、血液、红细胞等)。因此,清洗和沉降步骤一般重复至上清液相对不含碎片。剩余的细胞一般以各种大小的团块存在,并使用检定过的降解总体结构同时最小化对细胞自身的损伤的步骤继续流程。实现这一目标的一种方法是用减弱或破坏细胞之间的连接的酶(例如胶原蛋白酶、分散酶、胰蛋白酶等)处理洗过的细胞团块。这种酶处理的量和持续时间随着所使用的条件而变,但是这类酶的使用在本技术领域中公知的。可选地,或与这样的酶处理相结合,可以使用其他处理例如机械搅拌、声能、热能等来降解细胞团块。如果通过酶方法实现降解,理想情况下在适当时间段后中和酶,以最小化对细胞的有害效应。

[0104] 降解步骤典型地产生聚集细胞的浆液或悬液和通常不含基质细胞(例如红细胞、平滑肌细胞、内皮细胞、成纤维细胞和干细胞)的流体级份。分离过程中的下一个阶段是从 ASC 分离聚集的细胞。这可以通过离心来实现,所述离心迫使细胞成为被上清液覆盖的沉淀。然后将上清液丢弃,将沉淀悬浮在生理相容流体中。此外,悬浮的细胞典型地包括红细胞,并且在大多数方案中希望裂解它们。用于选择性裂解红细胞的方法在本技术领域

中是已知的,并且可以使用任何适合的方案(例如在高渗或低渗介质中温育,使用氯化铵裂解等)。当然,如果红细胞被裂解,然后将通过例如过滤、沉降或密度分级将细胞与裂解液分离开。

[0105] 不论是否裂解红细胞,可以将悬浮的细胞连续清洗、重新离心并重悬浮一次或多次,以获得更高的纯度。可选地,可以在细胞表面标志物情况的基础上或在细胞尺寸和粒度的基础上分离细胞。

[0106] 在最后的分离和重新悬浮之后,可以将细胞培养,并且如果需要测定数量和生活力以评估收率。优选情况下,使用适合的固体细胞培养基,在适合的细胞密度和培养条件下,将细胞不分化地培养在固体表面上。因此,在具体实施方案中,将细胞在适合的细胞培养基[例如 DMEM,典型地增补有 5-15% (例如 10%) 的适当血清例如胎牛血清或人血清]存在下,在通常由塑料材料制成的固体表面例如皮氏培养皿或细胞培养瓶上不分化地进行培养,并在允许细胞附着于固体表面并增殖的条件下进行温育。在温育后,对细胞进行清洗以便移除非黏附细胞和细胞片段。将细胞维持在相同培养基中和相同条件下,直到它们达到足够合生,其中在需要时更换细胞培养基。在达到所需的细胞合生后,可以使用拆解剂例如胰蛋白酶并以适合的细胞密度(通常为 2,000-10,000 个细胞/cm²)接种到新的细胞培养表面上,利用连续传代来扩增细胞。因此,然后将细胞在这样的培养基中不分化地、同时仍保留其发育表型地传代至少两次,更优选情况下,细胞可以传代至少 10 次(例如至少 15 次或甚至至少 20 次)而不失去发育表型。典型情况下,将细胞以所需密度例如约 100 个细胞/cm² 至约 100,000 细胞/cm² 之间(例如约 500 个细胞/cm² 至约 50,000 个细胞/cm² 之间,或更特别情况下约 1,000 个细胞/cm² 至约 20,000 个细胞/cm² 之间)铺板。如果以更低的密度(例如约 300 细胞个/cm²)铺板,细胞可以更容易地克隆分离。例如,在几天后,以这样的密度铺板的细胞将增殖成均匀群体。在具体实施方案中,细胞密度在 2,000-10,000 个细胞/cm² 之间。

[0107] 正如下面所提到的,选择在这种包含至少两次传代的处理后保持附着于固体表面的细胞,并通过常规方法分析目标表型,以便证实 ASC 的身份。在第一次传代后保持附着于固体表面的细胞来自于非均质来源;因此,必须对所述细胞进行至少另一次传代。作为上述方法的结果,获得了具有目标表型的均质细胞群体。在至少两次传代后细胞附着于固体表面,构成了本发明用于选择人 ASC 的优选实施方案。目标表型的证实可以使用常规手段来进行。

[0108] 优选情况下,通过将所述群体至少 1 次、至少 2 次、至少 3 次、至少 4 次、至少 5 次、至少 10 次、至少 15 次或至少 20 次复制两倍或三倍,来进行所述扩增。在另一个实施方案中,所述扩增继续进行至少 1 次、至少 2 次、至少 3 次、至少 4 次、至少 5 次、至少 10 次、至少 15 次或至少 20 次传代。

[0109] 细胞表面标志物可以通过任何适合的通常基于阳性/阴性筛选的常规技术来鉴定;例如,可以使用针对需要证实其在细胞中的存在/不存在的细胞表面标志物的单克隆抗体,尽管也可以使用其他技术。因此,在特定实施方案中,使用针对 CD11b、CD11c、CD14、CD45、HLAII、CD31、CD34 和 CD133 中的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或优选所有标志物的单克隆抗体,以便证实在所选细胞中不存在所述标志物;并使用针对 CD9、CD44、CD54、CD90 和 CD105 中的一个、两个、三个、四个或优选所有标志物的单克隆抗体,以便证实

至少一个和优选所有所述标志物的存在或其可检测的表达水平。所述单克隆抗体是已知的、可商购的或可以由本技术领域的专业人员通过常规方法获得。

[0110] 所选细胞中 IFN- γ 可诱导的 IDO 活性可以通过任何适合的常规测定法来测定。例如,所选细胞可以用 IFN- γ 刺激并测定 IDO 的表达;然后可以执行常规的 Western 印迹来分析 IDO 蛋白的表达,并可以通过色氨酸向犬尿氨酸的转化,例如通过用上清液中犬尿氨酸浓度的高效液相色谱 (HPLC) 分析和光度测定作为读出值,来测量所选细胞在 IFN- γ 刺激后的 IDO 酶活性。因为 ASC 在某些条件下表达 IDO,因此允许检测 IFN- γ 刺激后的 IDO 酶活性的任何适合的技术都可用于选择 ASC。产生的 IDO 的量取决于每平方厘米的细胞数量,其优选处于 5000 个细胞/cm² 或以上的水平,但不限于该浓度,还取决于 IFN- γ 的浓度,其理想情况下为 3ng/ml 或以上,但不限于该浓度。在所描述的条件产生的 IDO 活性,将在 24 小时或更长时间内引起 μ M 范围内的可检测的犬尿氨酸生产。

[0111] 所选细胞分化成至少两种细胞谱系的能力,可以通过本技术领域已知的常规方法来测定。

[0112] 如果需要,可以使用用于克隆细胞群体的适合方法对 ASC 进行克隆扩增。例如,可以将增殖的细胞群体物理挑出并接种到分开的表面(或多孔板的孔)中。可选地,可以将细胞在多孔板上以统计比率进行亚克隆,所述统计比率便于将单个细胞置于每个孔中(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,例如 0.5 个细胞/孔)。当然,可以通过将细胞以低密度铺板(例如在皮氏培养皿或其他适合基质上)并使用装置例如克隆环将它们与其他细胞分离开,来克隆细胞。克隆群体的生产可以在任何适合的培养基中扩增。在任何情况下,可以将分离的细胞培养至适合的时间点,此时可以评估它们的发育表型。

[0113] 已经显示,通过例如使用适合血清(例如胎牛血清或人血清)的特殊筛选的批次,可以在长时期内实现不诱导分化的 ASC 离体扩增。用于测量生活力和产率的方法在本技术领域是已知的(例如台盼蓝拒染试验)。

[0114] 如果需要,用于分离本发明细胞群体的细胞的任何步骤和程序,都可以手动进行。可选地,分离这样的细胞的方法可以通过一种或多种适合的装置来促进和/或自动化,所述装置的实例在本技术领域是已知的。

[0115] MSC 细胞培养

[0116] 所述 MSC 也能够离体扩增。也就是说,在分离后,所述 MSC 可以在细胞培养基中维持并允许其离体增殖。这样的培养基包含例如 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM),含抗生素(例如 100 单位/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素)或不含抗生素,含有 2mM 谷氨酰胺并增补有 2-20% 胎牛血清 (FBS)。根据所使用的细胞的需要修改或调整培养基和/或培养基增补剂的浓度,在本技术领域的专业人员的技术范围之内。血清通常含有细胞和非细胞因子,以及生活力和扩增所必需的组分。血清的实例包括胎牛血清 (FBS)、牛血清 (BS)、小牛血清 (CS)、胎小牛血清 (FCS)、出生后小牛血清 (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。在本发明的范围内还包括下述情况,即如果所述 MSC 是人类来源的,细胞培养基增补有人血清、优选为自体来源的。应该理解,如果认为需要失活补体级联的组分,可以将血清在 55-65 $^{\circ}$ C 热失活。血清浓度的调节和/或从培养基中撤出血清,也可用于促进一种或多种所需细胞类型的存活。优选情况下,所述 MSC 将

得益于约 2% 至约 25% 的 FBS 浓度。在另一个实施方案中, MSC 可以在确定组成的细胞培养基中扩增, 在所述培养基中血清被血清白蛋白、血清转铁蛋白、硒以及重组蛋白的组合代替, 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), 正如本技术领域中所已知的。

[0117] 许多细胞培养基已经包含氨基酸, 然而某些培养基在培养细胞之前需要增补。这样的氨基酸包括但不限于 L- 丙氨酸、L- 精氨酸、L- 天冬氨酸、L- 天冬酰胺、L- 半胱氨酸、L- 胱氨酸、L- 谷氨酸、L- 谷氨酰胺 \ L- 甘氨酸等。

[0118] 典型情况下, 抗微生物剂也可用于细胞培养中, 以减轻细菌、支原体和真菌感染。典型情况下, 使用的抗生素或抗真菌化合物是青霉素 / 链霉素的混合物, 但是也可以包括但不限于两性霉素 (Fungizone®)、氟康唑、庆大霉素、博来霉素、潮霉素、卡那霉素、丝裂霉素等。

[0119] 有利情况下, 激素也可用于细胞培养中, 并且包括但不限于 D- 醛甾酮、二乙基己烯雌酚 (DES)、地塞米松、 β - 雌二醇、氢化可的松、胰岛素、催乳素、孕酮、生长激素释放抑制因子 / 人生长激素 (HGH) 等。

[0120] 扩增的细胞

[0121] 在一个实施方案中, MSC、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞在用于本发明的方法之前可能已被扩增。用于细胞扩增的方法在本技术领域中所已知的。

[0122] 遗传工程改造的细胞

[0123] 在另一个实施方案中, MSC、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞可以是遗传工程改造的细胞 (例如用外源核酸转导或转染过), 或源于遗传工程改造的细胞。

[0124] 例如, 所述细胞可以被遗传工程改造以组成性表达吡哆胺 2, 3- 双加氧酶 (IDO), 这可以通过例如用编码所述酶和任选的适合的启动子序列的适合的核酸构建物进行转染来进行。细胞的遗传工程在本技术领域中所已知的, 并可以由本技术领域的专业人员来执行。

[0125] 辐照过的细胞

[0126] 在另一个实施方案中, MSC、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞在用于本发明的方法之前可能已被辐照。细胞的辐照降低了它们的增殖能力和存活时间。

[0127] 辐照可以使用适合的受控电离辐射源例如 γ - 辐射体装置来进行。辐照条件必须由本技术领域的专业人员通过实验进行调整, 以确定提供引起 MSC、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞的长期生长停止的辐射剂量所需的暴露时间。在一个实施方案中, 所述辐射剂量在选自 1-100Gy、5-85Gy、10-70Gy、12-60Gy 的范围内, 然而, 特别优选情况下, 所述辐射剂量在 15-45Gy 的范围内。

[0128] CD26 拮抗剂处理的细胞

[0129] 在另一个实施方案中, MSC、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞在用于本发明的方法之前, 可以用 CD26 拮抗剂或抑制剂进行处理。CD26 拮抗剂和抑制剂在本技术领域中所已知的, 并包括但不限于氨基甲基吡啶、P32/98、NVP DPP728、PSN9301、异亮氨酸噻唑烷、地那列汀、西他列汀、维达列汀、沙格列汀、阿格列汀、抑二肽素 A, 并且这样的处理可以由本技术领域的专业人员来执行。

[0130] IFN- γ 刺激的细胞

[0131] 在另一个实施方案中, MSC、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞在用于本发明的方法之前, 可以用 γ - 干扰素进行处理。MSC 的 IFN- γ 处理以对其进行刺激在本技术领域是已知的, 并可以由本技术领域的专业人员来执行。

[0132] 抗原刺激的细胞

[0133] 在另一个实施方案中, MSC、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞在用于本发明的方法之前, 可以用抗原进行刺激。MSC 的抗原处理以对其进行刺激在本技术领域是已知的, 并可以由本技术领域的专业人员来执行。

[0134] 丝裂霉素 C 处理的 MSC

[0135] 在另一个实施方案中, MSC、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞在用于本发明的方法之前, 可以用丝裂霉素 C 进行处理。MSC 的丝裂霉素 C 处理在本技术领域是已知的, 并可以由本技术领域的专业人员来执行。

[0136] 此外, 如果需要, MSC、调节性 T- 细胞和 / 或成纤维细胞在用于本发明的方法之前, 可以进行选自辐照、IFN- γ 刺激和丝裂霉素 C 处理的两种或三种处理的组合。

[0137] 所述 MSC 的维持条件也可以含有允许细胞保持在未分化形式中的细胞因子。对于本技术领域的专业人员来说, 显然在分化之前, 必须从培养基中除去抑制细胞分化的增补剂。此外, 显然不是所有细胞都需要这些因子。事实上, 取决于细胞类型, 这些因子可能引发不想要的效应。

[0138] 通过下面的非限制性实施例, 本发明的特点和优点将得到更充分的说明, 其中除非另有指明, 否则所有份数和百分比以重量计。

[0139] 实施例 1: 使用 ASC 治疗胶原蛋白诱导的关节炎 (CIA)

[0140] 材料和方法

[0141] 胶原蛋白诱导的关节炎 (CIA) 小鼠模型

[0142] 在 DBA1/(H-2^d) 雄性小鼠 (6-8 周龄) 中诱导实验性关节炎。在开始研究的当天, 使用第一剂鸡 II 型胶原蛋白 (CII) (终浓度为 1mg/ml) 在弗氏完全佐剂 (结核分枝杆菌 (Mycobacterium Tuberculosis) 终浓度为 1mg/ml) (CFA) 中的乳液, 以 0.1ml/ 动物的乳液体积对每只小鼠在尾部 (距身体 2-3cm) 进行皮下注射。在第一次注射胶原蛋白后 21 天, 向每只动物给药第二次 CII 注射 (加强针) (0.1ml/ 动物), 仍然是在尾部皮下给药, 但是在与第一次注射不同的位置处。这次, 使用弗氏不完全佐剂 (IFA) 制备胶原蛋白悬液。

[0143] 当关节炎得分值在 2-4 左右时, 将动物用扩增的脂肪源干细胞或作为对照的介质 (林格溶液) 进行治疗。通过按照预先建立的得分系统测量上下肢关节的炎症 - 发红 - 关节强硬, 每日 (从星期一至星期五) 跟踪 CIA 的演变。

[0144] 在给药测试物或介质后, 每日测量每只动物的两只后爪的体积, 并计算两只爪的平均值。此外, 将在第 1 日测量的每只动物的后爪体积 (在第一次胶原蛋白注射之前, 并取为基线体积) 从其后每日测量的爪体积中减去, 以获得每只动物的爪体积的净增加 (或浮肿)。此外, 按照下面的关节炎指数得分系统, 以相同的频率和时间对前爪和后爪中关节炎的严重性进行记分:

[0145] 0: 无关节炎迹象

[0146] 1: 爪或 1 个指头肿胀和 / 或发红

[0147] 2: 两组关节发炎 (肿胀和 / 或发红)

[0148] 3:多于两组关节发炎(肿胀和/或发红)

[0149] 4:整个爪的炎症。严重关节炎

[0150] 最后的得分值是四只爪的得分值的总和。最高得分值为 16。

[0151] 实验设计

[0152] 对照

[0153] A 组=无治疗

[0154] 静脉内给药

[0155] C 组=静脉内注射,每剂 1 百万个细胞,每日 1 剂连续给药,总共 5 剂。

[0156] D 组=静脉内注射,第一剂 3 百万个细胞,第二和第三剂 1 百万个细胞,每隔一日给药 1 剂,总共 3 剂。

[0157] 淋巴内给药

[0158] E 组=淋巴内注射,每剂 320,000 个细胞(右侧腹股沟淋巴结 160,000 个,左侧 160,000 个),总共 2 剂,第二剂在第一剂后 7 天给药。

[0159] 介质对照

[0160] F 组=淋巴内注射林格溶液,总共 2 剂,第二剂在第一剂后 7 天给药。

[0161] N = 12 只小鼠 / 组。

[0162] 静脉内给药

[0163] 使用无菌蝴蝶针(25G),通过尾静脉对测试物进行静脉内给药。动物连续 5 日或 3 个隔日接受药剂(每日 1 剂)。动物接受 0.2ml 测试物,以 0.05ml/min 的速率通过尾静脉进行静脉内输注。

[0164] 淋巴内给予到腹股沟淋巴结中

[0165] 通过经鼻罩吸入 2.0%至 2.5%异氟烷将 DBA1 小鼠麻醉,并躺置在 37℃的加温板上。在脱毛(Veet 敏感型脱毛膏)并用 70%乙醇对腹股沟区域消毒后,在腹股沟区域中制造 6mm 至 8mm 切口。定位腹股沟脂肪中的淋巴结,并使用带有 30 号针头的 Hamilton 注射器向淋巴结内注射 8 μ l 介质或带有 ASC 的介质(密度为 2 千万个细胞/ml)。通过一个或两个结缝合切口,并在另一侧腹股沟淋巴结中重复该程序。使小鼠从麻醉中恢复。7 日后,重复该程序。

[0166] 扩增的脂肪源于细胞的制备

[0167] 在局部麻醉和普通镇静下通过吸脂术获得人类脂肪组织。通过小切口(直径小于 0.5cm)将中空钝头套管导入到皮下空间中。在轻柔抽吸下,将套管移动通过脂肪组织腹壁区室,用于脂肪组织的机械破裂。将盐水溶液和血管收缩剂肾上腺素注射到脂肪组织区室中以将失血减至最少。通过这种方式,从每个待治疗患者获取 80ml 至 100ml 原始脂肪吸取物。

[0168] 将原始脂肪吸取物用无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS;Gibco BRL, Paisley, Scotland, UK)大量清洗,以除去血细胞、盐水和局部麻醉剂。将细胞外基质用平衡盐溶液(5mg/ml; Sigma, St. Louis, USA)中的 II 型胶原蛋白酶(0.075%;Gibco BRL)在 37℃下消化 30 分钟,以释放出细胞级份,然后通过加入等体积细胞培养基(含有 10%胎牛血清(FBS;Gibco BRL)的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM;GibcoBRL))将胶原蛋白酶失活。将细胞悬液以 250x g 离心 10 分钟。将细胞重悬浮在 0.16M NH_4Cl 中,并允许其在室温(RT)下静置 5

分钟以裂解红细胞。将混合物以 250x g 离心,并将细胞重悬浮在添加 10% FBS 和 1%青霉素 / 链霉素混合物 (Gibco BRL) 的 DMEM 中,然后将它们通过 40 μ m 筛网过滤,并以 10-30x 10³ 个细胞 /cm² 的密度铺于组织培养瓶中。

[0169] 将细胞在 37℃ 下,在含有 5% CO₂ 的空气气氛下培养 24 小时。然后将培养瓶用 PBS 清洗以除去非黏附细胞和细胞碎片。将细胞维持在相同培养基和相同条件下的培养中,直至它们达到约 80% 合生,其间每 3 至 4 日更换培养基。然后将细胞以 1 : 3 的稀释率用胰蛋白酶-EDTA (Gibco BRL) 进行传代,所述稀释率对应于约 5-6 x 10³ 个细胞 /cm² 的细胞密度。

[0170] 对于实验来说,将复制加倍 12-16 次的细胞用胰蛋白酶处理,并以所需细胞密度悬浮在介质 (林格溶液) 中。然后转移至注射器并注射到小鼠中。

[0171] 统计分析

[0172] 结果的统计学显著性使用统计学程序 GraphPad InStat 3 来评估。结果被表示成平均值 $\pm$ 平均值的标准误差,其中 (n) 是动物数量。

[0173] 图 1 的注解说明了 A 组与 E 组的比较的 p- 值。显著差异被表示成 : *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001。组之间的差异通过用于不成对数据的 Kruskal-Wallis 检验和 Dunn 形式多重比较的事后检验来评估。P 值 < 0.05 被当作是显著的。

[0174] 结果

[0175] 通过注射鸡胶原蛋白 II 在 DBA1 小鼠中诱导了关节炎。当小鼠显示出 2-4 的关节炎得分值时,使用扩增的 ASC 通过静脉内或淋巴内途径对它们进行治疗。作为淋巴内给药的对照,将小鼠用介质进行处理。每日监测关节炎得分值 (参见表 1)。尽管未治疗小鼠或用介质处理的小鼠显示出以时间依赖性方式增加的爪的高度炎症,但用淋巴结内递送的扩增的 ASC 治疗的小鼠显示出明显减轻的炎症。此外,淋巴内给药的疗效高于静脉内给药 (参见图 1)。

[0176] 结论

[0177] 本研究显示,人类 ASC 向 DBA1 小鼠的淋巴内给药引起关节炎严重性的统计学显著的降低 (正如通过关节炎指数得分值所表明的)。

[0178] 此外,淋巴内给药总共 640,000 个 ASC (在两剂药剂中) 的疗效显著高于静脉内给药总共 5 百万个细胞。这些结果表明淋巴内给药途径更加有效,因为使用较低数量的细胞达到了较高疗效。

[0179] 因此,尽管在本文中已经参考本发明的具体方面、特点和说明性实施方案对本发明进行了描述,但应该认识到,本发明的用途不限于此,而是扩展到并涵盖大量其他方面、特点和实施方案。因此,权利要求书打算相应广义地解释为包括其精神和范围之内所有这样的方面、特点和实施方案。

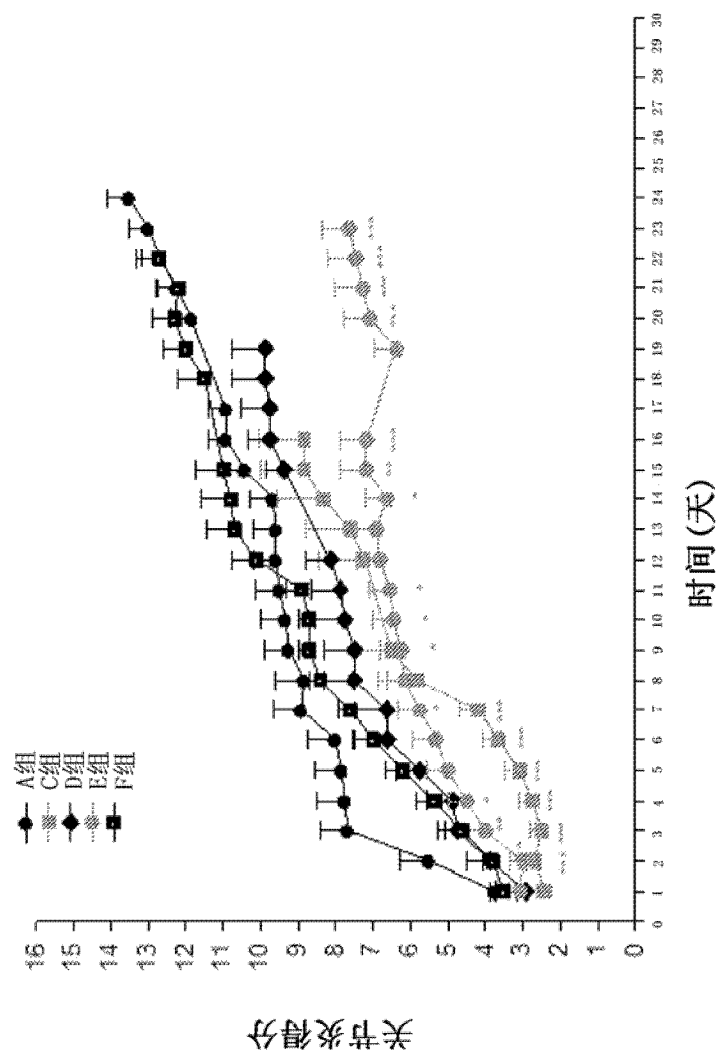


图1: CIA小鼠的关节炎得分(实施例1)