



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104027359 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201410265423. 6

(22) 申请日 2007. 01. 23

(30) 优先权数据

60/760, 951 2006. 01. 23 US

(62) 分案原申请数据

200780010465. 3 2007. 01. 23

(71) 申请人 阿特西斯公司

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 R. W. 迈斯 R. J. 迪恩斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 刘健 孟慧岚

(51) Int. Cl.

A61K 35/50 (2006. 01)

A61K 35/44 (2006. 01)

A61K 35/28 (2006. 01)

A61K 35/26 (2006. 01)

A61K 35/407 (2006. 01)

A61P 9/10 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书28页 附图11页

(54) 发明名称

无附加的免疫抑制治疗的 MAPC 治疗法

(57) 摘要

本发明涉及无附加的免疫抑制治疗的 MAPC 治疗法。本发明涉及用 MAPCs 治疗各种损伤、障碍、功能异常、疾病等,而不需要附加的免疫抑制治疗。

试验方案

第0天:接受MCA1中风的成年大鼠



第7天:MAPC大脑内移植或对照移植



移植后第14、28、42和56天:行为试验

1. 细胞在用于制备在可能罹患、正在罹患或已经罹患损伤、功能异常、障碍和 / 或疾病的受试者中治疗损伤、功能异常、障碍和 / 或疾病的药物中的用途, 其中该细胞不是胚胎干细胞、胚胎生殖细胞或生殖细胞; 并且可以分化成内胚层的、外胚层的和中胚层的胚细胞系中的至少两种中每种胚细胞系的至少一种细胞类型并且通过有效途径并以有效治疗所述损伤、功能异常、障碍和 / 或疾病的量施用; 还无附加于所述细胞施用免疫抑制治疗, 其中所述细胞对于所述受试者是同种异体的或异种的。

2. 根据权利要求 1 的用途, 其中所述细胞在所述受试者中不是免疫原性的。

3. 根据权利要求 1 或 2 的用途, 其中所述细胞可以分化成内胚层的、外胚层的和中胚层的胚细胞系中每种胚细胞系的至少一种细胞类型, 所述细胞表达端粒酶和 / 或所述细胞对 oct-3/4 呈阳性。

4. 根据权利要求 1 或 2 的用途, 其中所述细胞在它们施用于所述受试者之前在培养物中已经历至少 10 至 40 次细胞倍增。

5. 根据权利要求 1 或 2 的用途, 其中所述细胞是人细胞。

6. 根据权利要求 1 或 2 的用途, 其中所述细胞得自从以下任一项分离的细胞: 胎盘组织、脐带组织、脐带血、骨髓、血液、脾组织、胸腺组织、脊髓组织、脂肪组织和肝脏组织。

7. 根据权利要求 1 或 2 的用途, 其中所述受试者是人。

8. 根据权利要求 1 或 2 的用途, 其中所述细胞以一种或更多种剂量施用于所述受试者, 所述剂量包括 10^4 至 10^8 所述细胞 / 千克所述受试者质量, 包括以一种或更多种剂量施用于所述受试者, 所述剂量包括 10^6 至 5×10^7 所述细胞 / 千克所述受试者质量。

9. 根据权利要求 1 或 2 的用途, 其中除所述细胞之外, 一种或更多种生长因子、分化因子、信号因子和 / 或增加归巢的因子被施用于所述受试者。

10. 根据权利要求 1 或 2 的用途, 其中进一步地将抗微生物剂、抗真菌剂和 / 或抗病毒剂的一种或更多种的任意组合的一种或更多种施用于所述受试者。

无附加的免疫抑制治疗的 MAPC 治疗法

[0001] 本申请是申请日为 2007 年 1 月 23 日的中国专利申请 200780010465.3“无附加的免疫抑制治疗的 MAPC 治疗法”的分案申请。

[0002] 相关申请的参考

[0003] 本申请要求系列号列举如下的各个申请和全部申请的优先权,并且以其全部内容通过引用并入本文:

[0004] 2006 年 1 月 23 日提交的美国临时专利申请系列号 No. 60/760,951,其中本申请是部分-继续申请;2006 年 11 月 9 日提交的 PCT/US/43804,其中本申请是部分-继续申请,并且其为 2005 年 11 月 9 日提交的美国申请专利 No. 11/269,736 的部分-继续申请,其为 2005 年 6 月 13 日提交的美国申请系列号 No. 11/151,689 的部分-继续申请,其为 2004 年 10 月 11 日提交的美国申请系列号 No. 10/963,444(被放弃)的部分-继续申请,其为 2002 年 2 月 1 日提交的美国申请系列号 No. 10/048,757 的部分-继续申请,其为 2000 年 8 月 4 日提交的 PCT/US00/21387 的美国国家阶段申请并且于 2001 年 2 月 15 日以 WO 01/11011 作英文公开,其根据 35U. S. C. § 119(e) 要求 1999 年 8 月 5 日提交的美国临时申请系列号 No. 60/147,324、和 1999 年 11 月 10 日提交的美国临时申请系列号 No. 60/164,650、以及 2003 年 8 月 11 日提交的美国申请系列号 No. 10/467,963 的部分继续申请的优先权,其为 2002 年 2 月 14 日提交的 PCT/US02/04652 的美国国家阶段申请并且于 2002 年 8 月 22 日以 WO 02/064748 作英文公开,其根据 35U. S. C. § 119(e) 要求 2001 年 2 月 14 日提交的美国临时申请系列号 No. 60/268,786、2001 年 2 月 15 日提交的美国临时申请系列号 No. 60/269,062、2001 年 8 月 7 日提交的美国申请系列号 No. 60/310,625、以及 2001 年 10 月 25 日提交的美国申请系列号 No. 60/343,836 的优先权,所有申请和出版物以其全部内容通过引用并入本文,本申请主张它们的全部权益。

技术领域

[0005] 本发明的领域是使用多能成体祖细胞(multipotent adult progenitor cells,“MAPCs”、)治疗损伤、障碍、功能异常和疾病,而不需要附加的免疫抑制治疗。

背景技术

[0006] 细胞治疗法有望治疗多种疾病,包括许多非常重要的健康问题。例如,脑损伤,包括脑疾病,在美国和全世界都是一种主要的健康问题。许多脑损伤起因于缺氧,包括通常由给脑供应血液的狭窄或阻塞引起的局部性缺氧,和通常由压缩受试者的空气供应引起的弥散性缺氧。局部性缺氧可导致,例如,皮层梗死(cortical infarcts)和中风。弥散性缺氧可导致缺氧性缺血性脑损伤(“HI 损伤”)。皮层梗死和中风以及 HI 损伤是重要的健康关注点。

[0007] HI 损伤及其相关的结果每年影响着显著数量的活产。在儿童中测定缺血性和缺氧性脑损伤的发病率和影响是复杂的;但是,通过任何评估的染病患者数目都是巨大的。HI 损伤发病率高达 1/4000 的活产。参见 Nelson et al., Lancet Neurol. 3:150-158(2004)。

这些婴儿大多数存活,具有相当多的认知和运动缺陷。参见 Barker, Ann Med. 31 :Suppl1 : 3-6 (1999)。因所有原因所致新生儿脑病发生于每 1000 个出生中的 1 至 6 个。参见,例如,美国妇产科学会 (American College of Obstetricians and Gynecologists) 网址 :www.acog.org。产时新生儿窒息的风险估计有全部活产的 2.5%。参见 Heinonen et al., BJOG 109 : 261-264 (2002)。此大量的婴儿中,较少量会经历明显足以产生与运动和认知残疾相关的脑损伤的 HI 脑病。在美国,大脑性瘫痪,或者慢性、非进行性运动残疾,每 1000 个人中影响到 1 至 2 个。这些患者的约 6% 通过与 HI 损伤相关的产伤而获得其残疾。参见,例如, NINDS 网址 :www.ninds.nih.gov。

[0008] 目前 HI 损伤的足月儿全部临床结果很少。所有罹患 HI 损伤的足月新生儿中,10% 死亡,30% 永久的神经损伤。参见 Volpe, NEUROLOGY OF THE NEWBORN, 4th Ed., W. B. Saunders, Philadelphia (2001)。近来公开的 I 期低体温试验,即在足月儿中缺氧性 - 缺血性脑病的低体温的随机对照试验的对照组产生的统计结果中,甚至发现更高水平的死亡率:所包括的新生儿中 37% 死亡,25% 神经性损伤。参见 Shankaran et al., N Engl J Med. 353 : 1574-1584 (2005)。

[0009] 除了支持疗法以外, HI 损伤的治疗是有限的。在新生儿 HI 治疗中的多中心 I 期临床试验中,已报道全身低体温是安全并且有益的。然而,治疗的有效性显示限于出生后的短时间内。参见上文引述的 Shankaran (2005)。

[0010] 治疗的缺少、患病个体数量、结合便于护理和终生康复所需费用,显示 HI 损伤代表了流行的、重要的、尚未满足的医学需要。还同样适用于多种其它病症,所述病症特征在于损伤脑组织,特别是皮层脑组织,例如由缺氧、梗死及其它损伤和 / 或创伤所导致的那些,例如产生缺血和 / 或坏死的损伤,例如导致和 / 或相关于 HI 脑损伤、脑意外和 / 或中风的缺血和 / 或坏死。因此需要改进的方法,以用于治疗这些以及相关和相似的损伤、病理和疾病。

[0011] 干细胞的应用针对此目的已引起了一些兴趣,并且在此领域有一些令人鼓舞的观测结果。在近年有多种干细胞已被分离和表征。它们是从高度受限的分化潜能和在培养物中生长的有限能力的那些,到明显不受限的分化潜能和在培养物中生长的无限能力的那些。前者通常更容易衍生,并且能够从不同的成人组织获得。后者必须衍生自生殖细胞和胚胎,并且被称为胚胎干 (“ES”) 细胞、胚胎生殖 (“EG”) 细胞和生殖细胞。胚胎干 (“ES”) 细胞能无限的自我更新,并且可分化成所有的组织类型。ES 细胞得自胚泡的内细胞群。胚胎生殖 (“EG”) 细胞得自植入后胚胎的原始生殖细胞。得自成体组织的干细胞价值有限,原因是它们是免疫原性的,具有有限的分化潜能,并且具有有限的在培养物中繁殖的能力。ES、EG 和生殖细胞不会遇到这些不利点,但是它们具有在同种异体宿主中形成畸胎瘤的明显倾向,提高了它们在医学治疗中的预期担忧。对于此原因,尽管它们的有利地扩大的分化潜能,但令人悲观的是有关它们在临床应用中的效用。得自胚胎的干细胞还受到伦理学的争论,其可能妨碍它们在治疗疾病中的应用。

[0012] 寻找替代 ES、EG 和生殖细胞的一些努力已集中于得自成体组织的细胞。虽然成体干细胞已在大多数哺乳动物组织中被鉴别,它们的分化潜能是有限的,并且比 ES、EG 和生殖细胞狭窄得多。事实上许多这类细胞仅能引起一种或少数的分化细胞类型,并且许多其它的细胞限于单一的胚细胞系。例如,造血干细胞仅能分化形成造血细胞系,神经干细胞分

化成仅神经外胚层的起源的细胞,并且间质干细胞(“MSCs”)限于间质起源的细胞(中胚层的细胞类型)。相应地,这些类型的干细胞固有地限于它们的治疗适用性。

[0013] 相应地,有需要可用于治疗损伤、功能异常、障碍和/或疾病等的干细胞,所述干细胞具有ES、EG和生殖细胞的自我更新和分化能力但不是免疫原性的;当对于宿主是同种异体移植的或异种移植的时候不会形成畸胎瘤;不会出现与ES、EG和生殖细胞相关的其它安全问题;保持ES、EG和生殖细胞的其它优点;容易从易得来源中分离,该易得来源例如胎盘、脐带、脐带血、血液和骨髓;可以长时间安全保存;可以容易获得并且对志愿者、供体或患者以及其它表示同意者无风险;以及不会使人承担与获得和操作ES、EG和生殖细胞相关的技术和后勤的困难。

[0014] 一种在本文称为多能成体祖细胞(“MAPCs”)的细胞类型已被分离和表征(参见,例如,美国专利No. 7,015,037,通过引用以其全部内容并入本文)。(“MAPCs”还称为“MASCs”)。这些细胞提供了ES、EG和生殖细胞的许多优点而无它们的多数缺点。例如MAPCs能够无限的生长而不丧失它们的分化潜能。它们在NOD-SCID小鼠中随多重发育谱系显示高效、长期的移入和分化,并且同时没有畸胎瘤形成(ES、EG和生殖细胞常见)的迹象(Reyes, M. and C. M. Verfaillie Ann NY Acad Sci. 938 :231-5(2001))。

[0015] 用于治疗的其他细胞的应用引起了不良的免疫应答,该不良的免疫应答需要用附加的免疫抑制治疗来治疗,而所述附加的免疫抑制治疗通常仅部分有效或者根本不起作用。因此,有用细胞治疗损伤、功能异常、障碍和/或疾病等的对细胞和方法的需求,所述细胞不会产生对附加的免疫抑制治疗的需求。

发明内容

[0016] 因此,在它的一些实施方案中,本发明提供了细胞,该细胞:(i)不是胚胎干细胞、不是胚胎生殖细胞并且不是生殖细胞;(ii)可以分化成内胚层的、外胚层的和中胚层的胚细胞系中的至少两种中每种胚细胞系的至少一种细胞类型;和(iii)治疗对此治疗敏感的损伤、功能异常、障碍或疾病是有效的,而不需要附加的免疫抑制治疗。

[0017] 在本发明的一些实施方案中,所述细胞在这方面单独使用,或者与其它治疗剂和形式一起作为主要治疗形式使用。在本发明的一些实施方案中,所述细胞作为唯一治疗剂使用。在一些实施方案中,所述细胞与一种或多种其它治疗剂一起使用。在一些实施方案中,所述细胞单独使用或者与一种或多种其它治疗剂在一种或多种主要治疗形式中使用。在一些实施方案中,所述细胞单独使用或者与一种或多种其它治疗剂在一种或多种附加治疗形式中使用。在一些实施方案中,所述细胞单独使用或者与一种或多种其它治疗剂在一种或多种主要治疗形式中或在一种或多种附加治疗形式中使用。

[0018] 在一些方面和实施方案中,本发的主题进一步说明性地描述于下文编号段落中。所述段落是说明而非限制本发明,并且本发明的全部理解仅通过阅读本公开的全部内容即可获得,所述全部内容包括全部正文、全部附图、由此提供的摘要,并且所述全部内容根据所述观点以及用与此相关的和本发明适合的本领域技术人员的知识和经验说明性地描述来解释本文的主题。

[0019] 在任一给定编号段落中引述的短语“根据上文或下文任一项的”表示该段落的主题单独地与任意一个或多个其它编号段落的主题呈各种可能组合。在此关注中,所述段落

明确地支持要求本文引述主题的所有这些组合。在某些实例中,其中编号段落的主题被从不同编号段落的主题组合中排除,所述的排除是通过短语“根据上文或下文任一项的,除了某编号以外”来表示的,其中所述的编号被当作该被排除的段落。

[0020] 1. 在受试者中通过施用干细胞 (MAPCs) 而无附加的免疫抑制治疗来治疗损伤、功能异常、障碍和 / 或疾病的方法,其包括:给可能罹患、正在罹患或已经罹患所述损伤、功能异常、障碍和 / 或疾病的受试者,并且通过有效途径并以有效治疗所述损伤、功能异常、障碍和 / 或疾病的量,施用细胞 (MAPCs),该细胞:不是胚胎干细胞、胚胎生殖细胞或生殖细胞;可以分化成内胚层的、外胚层的和中胚层的胚细胞系中的至少两种中每种胚细胞系的至少一种细胞类型;并且治疗所述功能异常是有效的,而且还未附加于所述细胞 (MAPCs) 施用免疫抑制治疗。

[0021] 2. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞在所述受试者中不是免疫原性的。

[0022] 3. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞可以分化成内胚层的、外胚层的和中胚层的胚细胞系中每种胚细胞系的至少一种细胞类型。

[0023] 4. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞表达端粒酶。

[0024] 5. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞对 oct-3/4 呈阳性。

[0025] 6. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞在它们施用于所述受试者之前在培养物中经历至少 10 至 40 细胞倍增。

[0026] 7. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞是哺乳动物细胞。

[0027] 8. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞是人、马、牛、山羊、绵羊、猪、大鼠或小鼠细胞。

[0028] 9. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞是人、大鼠或小鼠细胞。

[0029] 10. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞是人细胞。

[0030] 11. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞得自从以下任一项分离的细胞:胎盘组织、脐带组织、脐带血、骨髓、血液、脾组织、胸腺组织、脊髓组织、脂肪组织和肝脏组织。

[0031] 12. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞得自从以下任一项分离的细胞:胎盘组织、脐带组织、脐带血、骨髓、血液和脾组织。

[0032] 13. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞得自从以下任一项分离的细胞:胎盘组织、脐带组织、脐带血、骨髓或血液。

[0033] 14. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞得自从骨髓或血液中的任意一种或多种分离的细胞。

[0034] 15. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞对于所述受试者是同种异体的。

[0035] 16. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞对于所述受试者是异种的。

[0036] 17. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞对于所述受试者是自体的。

[0037] 18. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的受试者是哺乳动物。

[0038] 19. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的受试者是哺乳宠物动物、哺乳家畜动物、哺乳研究动物或非人类灵长动物。

- [0039] 20. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的受试者是人。
- [0040] 21. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞以一种或多种剂量施用于所述受试者,所述剂量包括 10^4 至 10^8 所述细胞 / 千克所述受试者质量。
- [0041] 22. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞以一种或多种剂量施用于所述受试者,所述剂量包括 10^5 至 10^7 所述细胞 / 千克所述受试者质量。
- [0042] 23. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞以一种或多种剂量施用于所述受试者,所述剂量包括 5×10^6 至 5×10^7 所述细胞 / 千克所述受试者质量。
- [0043] 24. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞以一种或多种剂量施用于所述受试者,所述剂量包括 2×10^7 至 4×10^7 所述细胞 / 千克所述受试者质量。
- [0044] 25. 根据上述或下述任一项的方法,其中除所述细胞之外,一种或多种因子被施用于所述受试者。
- [0045] 26. 根据上述或下述任一项的方法,其中除所述细胞之外,一种或多种生长因子、分化因子、信号因子和 / 或增加归巢 (Homing) 的因子被施用于所述受试者。
- [0046] 27. 根据上述或下述任一项的方法,其中除所述细胞之外,一种或多种细胞因子被施用于所述受试者。
- [0047] 28. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞附加于另一治疗施用于受试者,所述另一治疗是在所述细胞施用之前、同时或之后施用。
- [0048] 29. 根据上述或下述任一项的方法,其中另外的一种或多种抗生素剂被施用于所述受试者。
- [0049] 30. 根据上述或下述任一项的方法,其中另外的一种或多种抗真菌剂被施用于所述受试者。
- [0050] 31. 根据上述或下述任一项的方法,其中另外的一种或多种抗病毒剂被施用于所述受试者。
- [0051] 32. 根据上述或下述任一项的方法,其中抗生素剂和 / 或抗真菌剂和 / 或抗病毒剂中的两种或多种的其它任意组合被施用于所述受试者。
- [0052] 33. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞在制剂中被施用,该制剂包含一种或多种其它药物活性剂。
- [0053] 34. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞在制剂中被施用,该制剂包含一种或多种抗生素剂。
- [0054] 35. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞在制剂中被施用,该制剂包含一种或多种抗真菌剂。
- [0055] 36. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞在制剂中被施用,该制剂包含一种或多种抗病毒剂。
- [0056] 37. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞通过肠胃外途径施用于所述受试者。
- [0057] 38. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞通过下述肠胃外途径中的任意一种或多种施用于所述受试者: 静脉内、动脉内、心脏内、脊柱内、鞘内、骨内、关节内、滑液内、皮内、真皮内、皮下和肌内注射。
- [0058] 39. 根据上述或下述任一项的方法,其中所述的细胞通过下述肠胃外途径中的任

意一种或多种施用：静脉内、动脉内、皮内、真皮内、皮下和肌内注射。

[0059] 40. 根据上述或下述任一项的方法，其中所述的细胞通过下述肠胃外途径中的任意一种或多种施用：静脉内、动脉内、皮内、皮下和肌内注射。

[0060] 41. 根据上述或下述任一项的方法，其中所述的细胞通过皮下注射针头经注射器施用于所述受试者。

[0061] 42. 根据上述或下述任一项的方法，其中所述的细胞通过导液管施用于所述受试者。

[0062] 43. 根据上述或下述任一项的方法，其中所述的细胞通过外科植入施用。

[0063] 44. 根据上述或下述任一项的方法，其中所述的细胞通过使用关节镜操作经植入施用于所述受试者。

[0064] 45. 根据上述或下述任一项的方法，其中所述的细胞通过立体定位注射施用于所述受试者。

[0065] 46. 根据上述或下述任一项的方法，其中所述的细胞在支持体内或支持体上施用于所述受试者。

[0066] 47. 根据上述或下述任一项的方法，其中所述的细胞以包囊化的形式施用于所述受试者。

[0067] 48. 根据上述或下述任一项的方法，其中所述的细胞被配制成适合通过下述途径中的任意一种或多种施用：口服、直肠、皮肤外 (epicutaneous)、眼、鼻和肺。

[0068] 49. 根据上述或下述任一项的方法，其中所述的细胞以一个剂量施用于所述患者。

[0069] 50. 根据上述或下述任一项的方法，其中所述的细胞是在连续两个或多个剂量的系列中施用于所述受试者。

[0070] 51. 根据上述或下述任一项的方法，其中所述的细胞是以单个剂量、两个剂量或多于两个剂量施用，其中所述剂量相同或不同，并且它们是以它们之间相等或不等的间隔施用。

[0071] 52. 根据上述或下述任一项的方法，其中所述的细胞是历经以下的期间施用的：少于 1 天至 1 周、1 周至 1 月、1 月至 1 年、1 年至 2 年、或长于 2 年。

[0072] 53. 根据上述任一项的方法，其中所述的损伤、功能异常、障碍和 / 或疾病是以下任意一种或组合：骨质疏松症，佩吉特氏病 (Paget's disease)，骨折，骨髓炎，骨坏死，软骨发育不全，成骨不全，遗传性多发性外生骨疣，多发性骨骺发育不良，马方综合征，粘多糖增多症，神经纤维瘤病，脊柱侧凸，脊柱裂，半椎体，融合的椎骨 (fused vertebrae)，四肢畸形 (limb anomalies)，肿瘤损坏组织的重建，年龄相关疾病或损伤，运动相关损伤，类风湿性关节炎，牛皮癣关节炎、Reiter's 关节炎，溃疡性结肠炎，Crohn's 病，强直性脊柱炎，骨关节炎 (osteoarthritis)，整形外科，美容外科，II 型糖尿病，创伤，Duchene 肌肉营养不良，贝克肌营养不良，强直性肌营养不良，骨骼肌病，骨骼肌损伤，胃肠系统的发育异常例如食管闭锁、肠闭锁、肠套叠，血管损伤，动脉粥样硬化，动脉瘤，糖尿病神经病变，远曲小管或肾小球旁组织的致密斑，心肌梗死，充血性心力衰竭，缺陷性瓣膜和附加的瓣膜换置术，先天性心脏畸形，心肌疾病，心内膜炎，脊髓损伤，神经变性障碍例如亨廷顿舞蹈病、帕金森病、多发性硬化和阿尔茨海默氏病，中枢神经系统传染疾病，中风，肌萎缩侧索硬化，脑癌，第 VIII 因子缺乏，先天性神经变性障碍，贮积障碍例如脑白质营养不良（球样细胞

脑白质营养不良、Canavan 病)、岩藻糖苷沉积症、GM2 神经节苷脂沉积症、神经鞘磷脂沉积 (Niemann-Pick)、圣菲利波综合征 (Sanfilippo syndrome)、沃尔曼病 (Wolman disease) 和泰 - 萨克斯病 (Tay Sachs disease), CNS 出血, CNS 创伤, 周围神经系统障碍例如脊髓损伤或脊髓空洞症, 视网膜障碍例如视网膜剥离、黄斑变性、糖尿病性视网膜病、其它变性的视网膜障碍, 皮肤障碍, 脱发, 皮肤缺损, 灼烧创伤, 白化病, 器官疾病, 先天性肝障碍例如胆红素增高障碍如克里格勒 - 纳贾尔综合征 (Crigler-Najjar syndrome), 氨障碍例如尿素循环的先天性缺陷, 鸟氨酸脱羧酶缺乏, 瓜氨酸血症, 精氨基琥珀酸尿, 氨基酸和有机酸的先天性缺陷例如苯丙酮尿症, 遗传性高酪氨酸血症, α - 抗胰蛋白酶, 凝血功能障碍例如 IX 因子缺乏, 胆障碍例如胆 cirrhosis 和胆道闭锁, 胰脏障碍例如胰脏闭锁、胰腺炎症, 糖尿病肠闭锁, 炎性肠病, 肠梗塞和肠切除。

附图说明

[0073] 图 1 是流程图, 其显示用于本文描述的某些实施例的一般试验方案, 如实施例 1 所述。

[0074] 图 2 是一组图, 其显示同基因性和同种异体 MAPC 移植物促进新生 HI 大鼠行为恢复, 如实施例 2 所述。运动和神经功能的行为试验是在第 7 天和第 14 天、在接受同基因性和同种异体 MAPC 移植物的动物中进行。在移植后第 7 天动物开始显示更少行为缺乏的趋势, 然后到移植后第 14 天显示明显减少的运动异常, 其与对照比较。星号表示统计学显著性为 $p < 0.05$, 其与阴性对照比较 (介质输注)。

[0075] 图 3 是一个图, 其显示 MAPC 移植物减少 CA3 神经元细胞在 HI 受损动物中的损失, 如实施例 3 所述。该图显示了由海马切片组织分析观测的存活细胞。在移植 MAPCs 后第 14 天将动物处死。制备脑切片, Nissl 染色, 检查 MAPC 和介质治疗动物的海马神经元的存活率。对每一切片受损伤的和未受损伤的对侧海马区域计算每个视野存活的细胞, 并且比较这些计数。未受损伤的海马细胞数取值为 100%。该数据证明了 MAPC 移植后 CA3 区域中神经元的统计学显著性保护。(ANOVA F 值为 35.33, $df = 2, 19$ 和 $p < 0.0001$; Fisher posthoc 为 $p < 0.0001$)。

[0076] 图 4 是一组图, 其显示异种 MAPC 移植物外科诱导缺血性中风之后促进成年大鼠行为恢复, 如实施例 7 所述。运动和神经功能的行为试验在诱导中风之后第 14 和 21 天进行 (颅内移植后第 7 和 14 天)。动物接受 100,000、200,000 和 400,000 异种 MAPC 细胞或者仅为对照的介质 PBS。星号表示对照组和 MAPC 实验组之间的显著差异 (重复测定 ANOVA, $p < 0.0001$; Fisher's PLSD posthoc t- 检验, $p' s < 0.0001$)。

[0077] 图 5 是一个图, 其显示在大鼠缺血性中风之后异种和同种异体 MAPC 移植物促进持久的和统计学显著性的运动恢复。运动功能的行为试验在第 14 天进行, 以及在此后 56 天中每第 14 天进行, 如实施例 10 所述。星号表示统计学显著性为 $p < 0.0001$, 其与阴性对照比较 (非存活的辐照的 MAPCs)。

[0078] 图 6 是一个图, 其显示在大鼠缺血性中风之后异种和同种异体 MAPC 移植物促进持久的和统计学显著性的神经恢复。神经功能的行为试验在第 14 天进行, 以及在此后 56 天中每第 14 天进行, 如实施例 10 所述。星号表示统计学显著性为 $p < 0.0001$, 其与阴性对照比较 (非存活的辐照的 MAPCs)。

[0079] 图 7 是一个图,其显示给缺血性中风大鼠施用异种 MAPCs 后运动功能的剂量依赖性改善,如实施例 12 所述。运动功能的行为试验在第 14 天进行,以及在此后 56 天中每第 14 天进行。星号表示统计学显著性为 $p < 0.01$,其与阴性对照比较(非存活的辐照的 MAPCs)。

[0080] 图 8 是一个图,其显示用异种 MAPCs 治疗的缺血性中风大鼠的神经功能的剂量依赖性改善,如实施例 12 所述。神经功能的 Bederson 试验在第 14 天进行,以及在此后 56 天中每第 14 天进行。星号表示统计学显著性为 $p < 0.01$,其与阴性对照比较(非存活的辐照的 MAPCs)。

[0081] 图 9 是一个图,其显示用异种 MAPCs 治疗的缺血性中风大鼠的运动功能的剂量依赖性改善,如实施例 14 所述。测定运动功能的 EBST 是在 IV 输注之后 1 周进行,然后 8 周中每周 1 次进行,以证明长期效果。延迟 1 表示诱导缺血性损伤之后接受细胞 1 天的组,延迟 2 表示损伤之后接受细胞 2 天的组,以及延迟 7 为缺血性损伤之后接受细胞 7 天的组。星号表示统计学显著性为 $p < 0.001$,其与阴性对照比较(中风后第 7 天提供的非存活的辐照的 MAPCs)。

[0082] 图 10 是一个图,其显示剂量依赖性地改善用异种 MAPCs 治疗的缺血性中风大鼠的神经功能,如实施例 14 所述。测定神经功能的 Bederson 试验是在 IV 输注之后 1 周进行,然后 8 周中每周 1 次进行,以证明长期效果。延迟 1 表示诱导缺血性损伤之后接受细胞 1 天的组,延迟 2 表示缺血性损伤之后接受细胞 2 天的组,以及延迟 7 表示缺血性损伤之后接受细胞 7 天的组。星号表示统计学显著性为 $p < 0.001$,其与阴性对照比较(中风后第 7 天提供的非存活的辐照的 MAPCs)。

[0083] 图 11 是图和照片,其显示缺血性中风大鼠内源性神经元细胞损失通过 IV 输注 MAPCs 随时间而减小,如实施例 16 所述。在 MAPC 输注开始之后第 56 天将动物处死。为测定神经元的存活率,制备脑切片,Nissl 染色。在全部植入的动物中测定存活率,在损伤之后不同时间接受 MAPCs 的动物中比较神经元存活率。对同一切片对侧区域中每一受损伤位置和未受损伤位置计算每个视野存活的细胞,并且比较结果。未受损伤的对侧位置数值设为 100%。显示于图 11 的该数据表明了 MAPC 移植后半影区中神经元的统计学显著性保护。星号表示统计学显著性为 $p < 0.05$,其与其它组比较。该图上方的嵌入物显示了受损伤位置的代表性的横切面。

[0084] 词汇表

[0085] 一般地,术语和短语根据它们本领域已确定的含义应用于本文。但是,为了避免可能的歧义,本文所用的某些术语和短语的含义描述如下:

[0086] “A”或“an”表示一个或多个;至少一个。

[0087] “附加的”表示共同地、一起、除...之外还、结合,等。

[0088] “脑梗死(cerebral infract)”、“脑梗死(ceberal infarction)”是指大脑的缺血性病症,其由到达或通过大脑的血流梗阻引起。脑梗死通常导致组织坏死,该组织已经因该梗阻致丧失血流而失氧。脑梗死通常导致持久的病灶神经缺乏。

[0089] “脑血管意外”与中风含义相同。

[0090] “脑缺血”是指当流到大脑的血液降低到维持正常神经功能的最小需求以下时所发生的病症。脑缺血通常由以下引起:颈动脉狭窄、基底动脉狭窄、椎动脉狭窄和脑血管闭塞性疾病。其还可由烟雾病(moyamoya disease)和 Takayasu 氏动脉炎引起。

[0091] “共同施用”可包括同时或连续施用两种或多种药物。

[0092] “皮层的”是指器官或部分器官等的外侧部分。例如大脑的外侧部分是指大脑皮层。人大脑皮层为2-4mm(0.08-0.16英寸)厚并且在许多复杂的脑功能中发挥中枢作用。人大脑皮层的表面是褶皱的,并且皮层表面的三分之二以上位于所述褶皱的沟中,称为“沟”。大脑皮层的种系发育较老的部分称为海马。更近发育的部分称为新-皮层。

[0093] “皮层梗死”是指与到脑皮层的血液供应丧失相关的梗死;通常是与到大脑的血液供应丧失相关的梗死;皮层梗死具有几乎与脑梗死相同的含义。

[0094] “细胞因子”是指诱导或提高细胞运动的细胞因子,例如MAPCs或其它干细胞、祖细胞或分化细胞的归巢。细胞因子还可刺激此类细胞分裂。

[0095] 如用于本文的,“有害的”表示有害的。顺便说明,如用于本文的,“有害的免疫应答”表示有害的免疫应答,例如不足或太弱的那些,太强的那些,和/或指向错误的那些。此外有害的免疫应答是干扰药物作用的免疫应答,包括其它方面的正常免疫应答。实例包括涉及排斥移植体和移植物的免疫应答,以及引起移植物抗宿主病的在移植物和移植物中免疫活性细胞的应答。

[0096] “分化因子”是指细胞因子,例如生长因子,其诱导谱系定型。

[0097] “功能异常”表示,如用于本文的,障碍、疾病或不同于正常过程的有害作用。顺便说明,皮层梗死和氧缺乏(缺氧)可引起功能异常,例如或导致缺血性损伤。其它功能异常还包括,例如,涉及排斥移植体和移植物的免疫应答,以及引起移植物抗宿主病的免疫活性细胞在移植物和移植物中的应答,然后其通常必需用免疫抑制治疗法来治疗。

[0098] “EC细胞”是指胚胎癌细胞。

[0099] “有效量”、“有效剂量”等通常表示一种量,其提供了需要的局部和全身作用。例如有效量是足以实现有益的或需要的临床结果的量。有效量可以在单次施用中一次性全部提供,或者分成几份量并在多次施用中提供有效量。例如,MAPCs的有效量可在一次或多次施用中被施用,并且可以包括任何预先选择量的细胞。应当考虑的精确计算有效量可以基于每一受试者的个体因素,包括他们的大小、年龄、损伤、和/或待治疗的疾病或损伤、从操作发生或疾病开始时的时间量。对于给定受试者,基于本领域常规的考虑,本领域技术人员能够确定有效量。因此,例如,本领域熟练技术人员,例如医生,基于如本文和本领域公开的MAPCs的已知性质,同时考虑前述因素,将能够确定对于给定受试者的有效量。如用于本文的,“有效剂量”与“有效量”含义相同。

[0100] 通常,在本上下文中的术语有效表示足以达到需要的结果,其可为在一些关注项中改善的预后和/或更好的患者状态。通常它是指损伤、功能异常、障碍或疾病的好转或治愈。在脑损伤、功能异常、障碍或疾病的情况中,例如,有效剂量可以是达到需要的神经学结果的那种,所述神经学结果可包括减少未用“有效”量治疗时将会发生的细胞损伤、整个地阻止进一步的细胞损伤、和/或使细胞损伤反转。在本上下文中,“有效”还可定义为临床结果,例如无进一步的神经功能下降和/或神经功能改善。在此方面,为此目的,神经功能的改善可经由看护提供者通过多种试验和测量的任意一种来判断。

[0101] 几乎同样地将有效剂量和量用于其它损伤、功能异常、障碍和疾病。

[0102] “EG细胞”是指胚胎生殖细胞。

[0103] “移入”是指细胞接触并掺合到存在的感兴趣的体内组织中。

[0104] “富集的群体”表示相对于原始群体中的其它的细胞或组分而言 MAPCs 数目的相对增加,例如相对于培养物例如原始培养物或者体内中的一种或多种非 -MAPC 细胞类型而言 MAPCs 数目的增加。

[0105] “ES 细胞”是指胚胎干细胞。

[0106] “扩张”是指未分化的一个或者多个细胞的繁殖。

[0107] “GVHD”是指移植物抗宿主病,其表示的是进程,该进程最初发生于免疫妥协的宿主中,此时其经由移植物的免疫活性细胞被认为是非自身的。

[0108] “HVG”是指宿主抗移植物应答,其表示当宿主排斥移植物时发生的进程。通常,当移植物被认为是外来的(非自身的)时,该 HVG 是通过宿主的免疫活性细胞而被触发。

[0109] “缺氧”是指氧缺乏。在神经学的语境中,它是指到达脑的氧减少,虽然供血充足它也可能发生。缺氧可能起因于气哽、抑制(strangling)、窒息、头部创伤、一氧化碳中毒、心脏停搏、以及全身麻醉及血流闭塞或阻塞的并发症。脑缺氧导致事件的级联,该级联会导致细胞损伤和细胞死亡。脑缺氧/缺血可由影响心血管泵送系统或呼吸系统的广泛疾病谱引起。脑缺氧/缺血被分成四类:局部脑缺血、整体脑缺血、弥散性脑缺氧和脑梗死。

[0110] 局部脑缺血(FCI)是由脑中的血凝块引起,该血凝块减少了患病区域的血流。FCI 的严重度不同,并且通常对敏感神经元引起不可逆的损伤。整体脑缺血(GCI)由心室纤颤或心搏暂停引起,其终止了到达脑的血流。从持续长于 5 至 10 分钟的 GCI 恢复是有问题的。更长的 GCI 通常是致命的。弥散性脑缺氧(DCH)是由血氧合作用不足引起,并且通常导致轻度至中度低氧血症。纯粹的 DCH 引起脑功能异常,但是不会导致不可逆的脑损伤。其可由肺部疾病、高空病、或严重贫血引起。脑梗死(CI)起因于脑区域中的局部血管闭塞,其可引起坏死。

[0111] “免疫抑制”是指在受试者中防止、抑制和/或反转免疫应答,例如对外来抗原的免疫应答,例如同种异体或异种细胞或组织。在某些情况下,例如,免疫抑制治疗需要抑制受试者的免疫应答,该免疫应答可能对用细胞或器官的移植物治疗受试者的需要的临床结果不利。

[0112] “梗死(infarct)”、“梗死(infarction)”是指组织中的坏死区域,其起因于缺血(血流梗阻),所述缺血通常由血栓或栓塞引起。它还是指血流中的梗阻,导致缺血,其通常由血栓或栓塞引起。

[0113] “缺血”是指血液供应的限制,通常是由于血管阻塞,导致对该阻塞的血管供氧的组织的功能异常或损伤。缺血还指到达身体部位的血流不足,其由血管的收缩或阻塞引起。脑组织中缺血引发了一个级联(称为缺血性级联),其导致蛋白水解酶、活性氧簇、和可损伤并最终杀死脑组织的其它物质释放。

[0114] “分离的”是指一种细胞或多种细胞,它们与一种或多种细胞或者一种或多种细胞组分不相关联,而后者与体内或原始培养物中的一种或多种细胞相关联。

[0115] “MAPC”是“多能成体祖细胞”的首字母缩写。它是指非 -ES、非 -EG、非 -生殖细胞,其可产生一种以上胚层的细胞谱系,例如所有三种胚层(即,内胚层、中胚层和外胚层)。MAPCs 还具有端粒酶活性。它们对 oct-3/4(例如,人 oct-3A)可以是阳性的。它们还表达 rex-1、rox-1、sox-2、SSEA-4 和/或 nanog 中的一种或多种。在 MAPC 中的术语“成体”是非限制性的。其仅表示不是 ES、EG 或生殖细胞的那些细胞。通常,如用于本文的,MAPC 是单数,

MAPCs 是复数。MAPCs 还称为多能成体干细胞 (MASCs)。参见,例如美国专利 No. 7, 015, 037, 其通过引用并入本文,作为本文公开的方法,以用于分离和生长 MAPCs/MASCs,此类方法仅仅是示例性和说明性的,并且不以任何方式限制可根据本发明使用的此类方法。

[0116] “MASC”参见 MAPC。

[0117] “MNC”是指单核细胞。

[0118] “形式”表示类型、途径、手段或方法,例如,治疗形式;即治疗的类型。

[0119] “MSC”是间质干细胞的缩写。

[0120] 有关 MAPCs 的“多能”是指分化时可产生一种以上胚层的细胞谱系,例如所有三种原始胚层(即,内胚层、中胚层和外胚层)。

[0121] “持久性”是指细胞在体内抵抗排斥的能力,以及随时间(例如,数日、数周、数月或数年)在数目上保持和/或增加的能力。

[0122] “原始培养物”是指细胞群体,其直接得自来自生物体的物质在传代培养前的分离块。通常,原始培养物是通过以下建立的:(a) 从生物体分离组织;(b) 将该组织解剖和/或分解,和(c) 使来自该组织的细胞开始生长,可混悬于介质中或者,更典型的,附加到培养容器的表面。原始培养物不包括,并且优选地,传代培养分离块的细胞,例如通过细分或稀释该细胞以及将它们重新接种于新鲜介质和/或新鲜培养容器中。通常,附着细胞的原始培养物是通过使细胞从附着于适宜底物的组织碎片中迁移出来而获得,或者是通过将该组织经机械或酶分解以产生细胞混悬液而获得,然后将它们中的一些附着于底物。

[0123] 用于多能成体祖细胞 (MAPCs) 的“祖 (Progenitor)”表示这些细胞可以产生其它细胞,例如进一步分化的细胞。该术语是非限制性的,并且并不是将这些细胞限于具体的谱系。

[0124] “自我更新”是指产生复制子代干细胞的能力,该子代干细胞具有分化成相同于其起源的那些细胞的潜能。用于本上下文的类似术语是“增殖”。

[0125] “中风”是急性神经损伤。其通过中断到达脑的血液供应而引起 80% 的病例(指的是缺血性中风),该供应的中断扰乱(梗死)、并且通常是打断了脑的血液灌注。该打断可产生于动脉血流中的中断,但它还可产生于静脉流中的中断。灌注被扰乱的那部分脑不能接受足够的氧,造成细胞损伤和死亡。其结果是中风。

[0126] 中风可导致暂时的神经损伤、永久损伤或死亡。损伤可能是局部性的或全身性的。缺血性中风通常分类为血栓性中风、栓塞性中风、全身性灌注不足 (Watershed 或 BorderZone 中风) 或静脉血栓。血栓性中风是由动脉狭窄通过血栓(通常包括动脉粥样硬化斑块)引起的。栓塞性中风通过栓塞(最常见为血凝块)阻塞动脉而造成的。

[0127] “受试者”是脊椎动物,例如哺乳动物,例如人。哺乳动物包括,但不限于,人类、畜养动物、体育动物和宠物。通过本发明方法需要治疗的受试者包括罹患障碍、功能异常或疾病的那些,所述疾患例如皮层梗死和/或缺氧性缺血性脑损伤、或者其副作用、或者其治疗,其可受益于作为主要的或附加的治疗的 MAPCs 的施用。

[0128] 如用于本文的,“移植物”表示引入到受试者中的细胞、组织或器官。该移植物可得自所述受试者、得自培养物或者得自非受试者来源。

[0129] “治疗 (treat)”、“治疗 (treating)”、“治疗 (treatment)”等与患者的处理和护理有关,特别是有关与障碍或疾病的斗争,其包括但不限于预防、改善、抑制和/或治愈缺乏、

功能异常、障碍或疾病或其它导致有害作用的其它进程,例如斗争、预防、改善、抑制和 / 或治愈损伤、功能异常、障碍或疾病。还参见有效、有效量、有效剂量。

[0130] “治疗 (therapy)” 是治疗 (treatment) 的同义词。

具体实施方式

[0131] 本发明不同的实施方案提供了使用 MAPCs 的方法和相关的主题,以用于排除、预防、治疗、改善、减轻、减少、减到最小、消除和 / 或治愈损伤、功能异常、障碍或疾病而无附加的免疫抑制治疗。

[0132] 本发明不同的实施方案提供了使用 MAPCs 以用于治疗的方法,包括排除、预防、斗争、改善、减轻、减少、减到最小、消除和 / 或治愈等的治疗损伤、功能异常、障碍和 / 或疾病而无附加的免疫抑制治疗,其通过参考脑的损伤、功能异常、障碍和 / 或疾病的方式说明于本文;但是,在许多实施方案中本发明不限于这些示例性的说明。本文公开的用 MAPCs 无需附加的免疫抑制治疗的治疗损伤、功能异常、障碍和 / 或疾病的方法可用于治疗非常广泛多样的损伤、功能异常、障碍和疾病,包括前述任意一项,用 MAPCs 对于前述任意一项作细胞治疗是有效的。

[0133] 因此,在它的一些实施方案中,本发明提供了细胞,该细胞:(i) 不是胚胎干细胞、不是胚胎生殖细胞并且不是生殖细胞;(ii) 可以分化成内胚层的、外胚层的和中胚层的胚细胞系中的至少两种中每种胚细胞系的至少一种细胞类型;和(iii) 治疗损伤、功能异常、障碍和 / 或疾病是有效的而无需附加的免疫抑制治疗。

[0134] 在本发明的一些实施方案中,所述细胞在这方面单独使用或者和其它治疗剂和形式作为主要治疗形式一起使用。在本发明的一些实施方案中,所述细胞作为唯一治疗剂使用或者与其它治疗剂一起使用。在本发明的一些实施方案中,所述细胞单独使用或与其它治疗剂或形式使用,均在一种或多种主要治疗形式中以及在一种或多种附加的治疗形式中。

[0135] 可在实施方案中通过施用如本文所述的 MAPCs 而无附加的免疫抑制治疗而被治疗的损伤、功能异常、障碍和疾病包括但不限于:骨质疏松症,佩吉特氏病 (Paget's disease),骨折,骨髓炎,骨坏死,软骨发育不全,成骨不全,遗传性多发性外生骨疣,多发性骨骺发育不良,马方综合征,粘多糖增多症,神经纤维瘤病,脊柱侧凸,脊柱裂,半椎体,融合的椎骨 (fused vertebrae),四肢畸形 (limb anomalies),肿瘤损坏组织的重建,年龄相关疾病或损伤,运动相关损伤,类风湿性关节炎,牛皮癣关节炎、Reiter's 关节炎,溃疡性结肠炎, Crohn's 病,强直性脊柱炎,骨关节炎 (osteoarthritis),整形外科,美容外科, II 型糖尿病,创伤, Duchene 肌肉营养不良, 贝克肌营养不良, 强直性肌营养不良, 骨骼肌病, 骨骼肌损伤, 胃肠系统的发育异常例如食管闭锁、肠闭锁、肠套叠, 血管损伤, 动脉粥样硬化, 动脉瘤, 糖尿病神经病变, 远曲小管或肾小球旁组织的致密斑, 心肌梗死, 充血性心力衰竭, 缺陷性瓣膜和附加的瓣膜换置术, 先天性心脏畸形, 心肌疾病, 心内膜炎, 脊髓损伤, 神经变性障碍例如亨廷顿舞蹈病、帕金森病、多发性硬化和阿尔茨海默氏病, 中枢神经系统传染疾病, 中风, 肌萎缩侧索硬化, 脑癌, 第 VIII 因子缺乏, 先天性神经变性障碍, 贮积障碍例如脑白质营养不良 (球样细胞脑白质营养不良、Canavan 病)、岩藻糖苷沉积症、GM2 神经节苷脂沉积症、神经鞘磷脂沉积 (Niemann-Pick)、圣菲利波综合征 (Sanfilippo syndrome)、沃尔曼病

(Wolman disease) 和泰 - 萨克斯病 (Tay Sachs disease), CNS 出血, CNS 创伤, 周围神经系统障碍例如脊髓损伤或脊髓空洞症, 视网膜障碍例如视网膜剥离、黄斑变性、糖尿病性视网膜病、其它变性的视网膜障碍, 皮肤障碍, 脱发, 皮肤缺损, 灼烧创伤, 白化病, 器官疾病, 先天性肝障碍例如胆红素增高障碍如克里格勒 - 纳贾尔综合征 (Crigler-Najjar syndrome), 氨障碍例如尿素循环的先天性缺陷, 鸟氨酸脱羧酶缺乏, 瓜氨酸血症, 精氨基琥珀酸尿, 氨基酸和有机酸的先天性缺陷例如苯丙酮尿症, 遗传性高酪氨酸血症, α - 抗胰蛋白酶, 凝血功能障碍例如 IX 因子缺乏, 胆障碍例如胆 cirrhosis 和胆道闭锁, 胰脏障碍例如胰脏闭锁、胰腺炎症, 糖尿病肠闭锁, 炎性肠病, 肠梗塞和肠切除。

[0136] MAPCs

[0137] 根据本发明的细胞在此作更详细地描述, 并且在本文通常是指“多能成体祖细胞”, 以及首字母缩写“MAPC”(并且“MAPCs”通常用作复数)。应当理解, 这些细胞不是 ES、不是 EG、并且不是生殖细胞, 并且它们具有分化成三种原始胚层谱系(外胚层、中胚层和内胚层)中的至少两种的细胞类型, 例如分化成所有三种原始谱系的细胞。

[0138] MAPCs 可以形成以下细胞, 例如, 特别值得一提的是, 内脏中胚层细胞、肌细胞, 骨细胞, 软骨细胞, 内分泌细胞、外分泌细胞、内皮细胞、毛发形成细胞、牙形成细胞、内脏中胚层细胞、造血细胞、基质细胞、骨髓基质细胞、神经元细胞、神经外胚层的细胞、上皮细胞、眼细胞、胰脏细胞和肝细胞类细胞, 以及特别值得一提的许多相同谱系的细胞。例如, 在由 MAPCs 形成的细胞中是成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、骨骼肌肉细胞、骨骼肌细胞、胆上皮细胞、胰腺腺泡细胞 (pancreatic acinary cells)、系膜细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、cardiomyocytes、骨细胞、血管形成细胞、少突胶质细胞、神经元(其包括 5-羟色胺能、GABA 能、多巴胺能神经元)、神经胶质细胞、小神经胶质细胞、胰脏上皮细胞、肠上皮细胞、肝上皮细胞、皮肤上皮细胞、肾上皮细胞、肾脏上皮细胞、胰岛细胞、成纤维细胞、肝细胞, 以及特别值得一提的是如前述的相同谱系的其它细胞。

[0139] MAPCs 具有端粒酶活性, 其对于自我更新以及避免复制性衰老是必需的。通常它们还表达 oct-3/4。Oct-3/4(在人中为 oct-3A) 特别不同于 ES、EG 和生殖细胞。它被认为是具有广泛分化能力的未分化细胞的标志物。Oct-3/4 通常还被认为具有维持细胞在未分化状态下的作用。Oct-4(在人中为 oct-3) 是一种转录因子, 其表达于原肠形成前期胚胎、早期卵裂期胚胎、胚泡的内细胞群的细胞和胚胎癌 (“EC”) 细胞 (Nichols, J. et al. (1998) Cell 1195 :379-91), 并且当细胞被诱导分化时其被下调。oct-4(在人中为 oct-3) 基因转录到人的至少两种剪接变体即 oct-3A 和 oct-3B 中。oct-3B 剪接变体发现于许多分化细胞中, 然而 oct-3A 剪接变体(以前还表示成 oct-3/4) 被报道对未分化的胚胎干细胞是特异的。参见 Shimosaki et al. (2003) Development 130 :2505-12。oct-3/4 的表达在决定胚胎发生和分化的早期步骤中发挥重要作用。Oct-3/4 与 rox-1 一起引起 Zn- 指蛋白 rex-1 的转录激活, 其还被要求保持 ES 细胞呈未分化的状态 (Rosfjord, E. and Rizzino, A. (1997) Biochem Biophys Res Commun 203 :1795-802 ; Ben-Shushan, E. et al. (1998) Mol Cell Biol 18 :1866-78)。

[0140] MAPCs 还可表达其它标记物。它们是 rex-1、rox-1 和 sox-2。rex-1 被 oct-3/4 控制, 该 oct-3/4 激活 rex-1 的下游区表达。rox-1 和 sox-2 在非 -ES 细胞中表达。

[0141] 在本发明的一些实施方案中, 将 MAPCs 与一种或多种其它药物和 / 或治疗形式作

为主要治疗形式使用。在本发明的一些实施方案中,所述细胞作为附加的治疗形式使用,即作为另一主要治疗形式的附加物。在一些实施方案中,所述细胞用作附加的治疗形式的唯一活性剂。在其它实施方案中,所述细胞与一种或多种其它药物或治疗形式一起作为附加的治疗形式使用。在一些实施方案中,所述细胞既作为主要的又作为附加的治疗药物和 / 或形式使用。在此两方面,细胞可以单独在主要的和 / 或在附加的形式中使用。它们还可以与其它治疗剂或形式一起,在主要的或在附加的形式中或者在两种形式中使用。

[0142] 如上文所述,主要的治疗,例如治疗药物、治疗、和 / 或治疗形式,靶向于(即,将作用于)主要的功能异常,例如疾病,也就是待治疗的。附加的治疗,例如治疗和 / 或治疗形式,可以与主要治疗(例如治疗药物、治疗、和 / 或治疗形式)组合施用,以作用于主要的功能异常,例如疾病,以及所述主要的治疗的补充的作用,从而增加该治疗方案的总体效果。也可以施用附加的治疗,例如药物、治疗、和 / 或治疗形式,以作用于主要的功能异常的并发症和 / 或副作用,所述功能异常例如疾病和 / 或由治疗例如治疗药物、治疗、和 / 或治疗形式引起的那些。关于这些应用的任一种,一种、两种、三种或更多种主要的治疗可以与一种、两种、三种或更多种附加的治疗一起使用。

[0143] 在一些实施方案中,将 MAPCs 在功能异常例如疾病和 / 或副作用发病之前施用于受试者。在实施方案中,将所述细胞在功能异常发展时施用。在一些实施方案中,将所述细胞在功能异常确立之后施用。MAPCs 可以在功能异常的发展、持久、和 / 或传播的任何阶段或者其消退之后施用。

[0144] 如上文所述,本发明的实施方案提供了用于主要的或附加的治疗的细胞和方法。在本发明的某些实施方案中,所述细胞被施用于同种异体受试者。在一些实施方案中,它们对于所述受试者是自体的。在一些实施方案中,它们对于所述受试者是同基因性的。在一些实施方案中,所述细胞对于受试者是异种。不论是同种异体、自体的、同基因性的、或异种的,在本发明不同的实施方案中,所述 MAPCs 在所述受试者中仅是弱免疫原性的或者是非 - 免疫原性的。在实施方案中,所述的 MAPCs 具有充分低的免疫原性或者是非 - 免疫原性的,并且有害的免疫应答大体上基本没有,即当施用于同种异体受试者时,它们可用作“万能”供体细胞而无组织分型和匹配。根据本发明不同的实施方案,所述的 MAPCs 还可保存并维持在细胞库中,并且因此可保持在需要时有效使用。

[0145] 此外,在此方面,不同实施方案中的 MAPCs 可以被施用而无附加的免疫抑制治疗。

[0146] 在所有的这些和其它方面,本发明的实施方案提供了来自哺乳动物的 MAPCs,该哺乳动物包括,在一种实施方案中为人类;在其它实施方案中为非人类灵长动物,大鼠和小鼠,以及狗、猪、山羊、绵羊、马和牛。从如上文所述的哺乳动物制备的 MAPCs 可以用于本文所述的本发明所有方法和其它方面。

[0147] 根据本发明不同实施方案的 MAPCs 可以从此类哺乳动物的不同隔室和组织中分离,其中它们发现于,包括但不限于,骨髓、外周血液、脐带血、血液、脾脏、肝脏、肌肉、脑、脂肪组织、胎盘和其它下文讨论的。在一些实施方案中,MAPCs 在使用之前被培养。

[0148] 在一些实施方案中,MAPCs 是遗传工程的,例如改善它们的免疫调节性质。在一些实施方案中,遗传工程的 MAPCs 是通过体外培养产生的。在一些实施方案中,遗传工程的 MAPCs 是从转基因的生物体产生的。

[0149] MAPCs 的作用机理

[0150] 对于 MAPCs 性质、活性和作用,不限于任意一种或多种解释性机理,值得一提的是,它们可发挥有益的作用,例如通过不同的形式用 MAPCs 治疗的作用。例如,MAPCs 可具有直接有益的作用。此直接的作用可以主要地是 MAPCs 与宿主细胞之间直接接触的事件。该接触可以用细胞的结构组件或者用在它们的直接环境中的组分。此类直接机理可涉及直接接触、扩散、摄取、或本领域技术人公知的其它过程。MAPCs 的该直接活性和作用可能是空间上受限的,例如限于局部沉积的区域或者限于经注射到达的身体腔室。

[0151] MAPCs 还可“归巢 (Home)”以应答“归巢”信号,例如在损伤或疾病位置释放的那些。由于归巢通常由信号介导,该信号的固有的功能是将细胞召集到需要修复的位置,该归巢行为可能是将 MAPCs 浓集到治疗靶位的有力工具。此作用可以通过如下文讨论的特殊因子刺激。

[0152] MAPCs 还可通过其对因子的应答来调节有益的作用,例如用 MAPCs 治疗的作用。这可发生另外的或可选的直接调节。此类因子可包括归巢因子、促细胞分裂剂和其它刺激因子。它们还可包括分化因子、以及激发具体细胞过程的因子。后者是这样的因子,即它们通过其它特定因子的细胞(例如涉及召集细胞的那些,例如干细胞(包括 MAPCs))引起向损伤或疾病的位置分泌。

[0153] 除了上述和另选的那些,MAPCs 可分泌作用于内源性细胞例如干细胞或祖细胞的因子。所述因子可作用于其它细胞,以引起、提高、减少、或抑制它们的活性。MAPCs 可以分泌作用于干细胞、祖细胞或分化细胞的因子,造成这些细胞分裂和/或分化。归巢到需要修复的位置的 MAPCs 可分泌吸引其它细胞到此位置的营养因子。这样,MAPCs 可以吸引干细胞、祖细胞或分化细胞到它们需要的位置。MAPCs 还可以分泌造成这些细胞分裂和分化的因子。

[0154] 此类因子包括营养因子的分泌可归功于 MAPCs 在例如以下中的作用:限制炎症损伤、限制血管渗透、改善细胞生存、以及引起和/或增加修复细胞到达损伤位置的归巢。此类因子还直接影响 T- 细胞增殖。通过减少它们的吞噬性和抗原呈递活性,此类因子还可影响树状突细胞,其还可影响 T- 细胞的活性。

[0155] 通过这些和其它机理,MAPCs 可在不同的损伤、功能异常、障碍和疾病的治疗中提供有益的作用。

[0156] MAPC 施用

[0157] MAPC 制备

[0158] MAPCs 可以从不同的组织制备,例如从骨髓细胞,如本文其它处更详细讨论的。

[0159] 在许多实施方案中,供施用于受试者的 MAPCs 的纯度约为 100%。在其它实施方案中,它是 95%至 100%。在一些实施方案中,它是 85%至 95%。特别在与其它细胞的混合物的情况下,MAPCs 的百分数可以为 2% -5%、3% -7%、5% -10%、7% -15%、10% -15%、10% -20%、15% -20%、20% -25%、25% -30%、30% -35%、35% -40%、40% -45%、45% -50%、60% -70%、70% -80%、80% -90%或 90% -95%。

[0160] 在给定体积中 MAPCs 的数目可以通过公知的和常规的操作和仪器测定,其中使用存在和/或不存在的某些标记物,包括本文描述的那些,例如端粒酶 (telomerase),以及,此时需要的是分化成三种如本文所述三种原始谱系中的一种以上的细胞的能力。在给定体积细胞混合物中的 MAPCs 百分数可以通过计数细胞(例如在一等份样品中的细胞)和测定

为 MAPCs 的细胞的数目来测定,其中使用前述鉴别 MAPCs 的操作。细胞可以容易地被人工计数,或者通过使用自动细胞计数器计数。MAPCs 可以被测定,例如在给定体积中的 MAPCs,其是通过特异性染色,例如使用特异性结合试剂,其通常为结合到荧光标记物的抗体,接着目测或计数,或者通过自动鉴别和计数仪器例如通过 FACS(荧光激活细胞分析器)仪。

[0161] 以 MAPCs 治疗障碍或疾病等可以用未分化的 MAPCs。治疗还可使用已经处理的 MAPCs 以便它们定型到分化的途径。治疗还可包括已被处理分化成具有有限分化潜能的低效能干细胞的 MAPCs。其还包括已被处理分化成具有最终分化的细胞类型的 MAPCs。MAPCs 的最佳类型或混合物可通过它们使用的具体环境来确定,对于本领域技术人员而言其为常规设计的情形,以确定在此方面 MAPCs 的有效类型或组合。

[0162] 制剂

[0163] 对于给定的应用,供施用 MAPCs 的制剂选择取决于不同的因素。它们中突出的是受试者的物种,待治疗障碍、功能异常或疾病的性质及其在所述受试者中的状态和分布,被施用的其它治疗和药物的性质,施用 MAPCs 的最佳途径,MAPCs 经由该途径的残存率,给药方案,以及对于本领域技术人员而言将会明显的其它因素。特别地,例如,适宜的载体和其它添加物的选择将取决于确切的施用途和特定剂型的性质。

[0164] 细胞存活可能是使用 MAPCs 的治疗效果的重要决定因素。对于主要的和附加的治疗均如此。当靶位对细胞播种和细胞生长均不适宜时产生了另一顾虑。这可能妨碍治疗性 MAPCs 到达该位置和 / 或移入到那里。在实施方案中,本发明包括测量增加细胞生存和 / 或克服由播种和 / 或生长的障碍产生的问题的用途。

[0165] 包含 MAPCs 的组合物的实例包括液体制剂,其包括溶液剂、混悬剂和供肌肉内或静脉内施用的制剂(例如可注射的施用),例如无菌混悬剂或乳剂。此类组合物可包括 MAPCs 与适宜载体、稀释剂或赋形剂的混合物,所述载体、稀释剂或赋形剂例如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等。该组合物还可以是冷冻干燥的。该组合物可以含有辅助性物质例如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲剂、凝胶化或增粘添加物、防腐剂、调味剂、着色剂等,取决于施用途和所需要的制剂。可以参考标准教科书例如“REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE,”第 17 版,1985(其通过引用并入本文)以制备适宜的制剂,而不必过多的试验。

[0166] 本发明的组合物通常方便地以液体制剂提供,例如等渗水溶液剂、混悬剂、乳剂、或粘稠组合物,其可以被缓冲至选择的 pH 值。液体制剂通常比凝胶剂、其它粘稠组合物和固体组合物更容易制备。此外,液体组合物稍微更为方便施用,尤其是通过注射。另一方面,粘稠组合物可以配制到适宜的粘度范围,以提供与特定组织更长的接触期。

[0167] 通常将会包括多种添加物,以提高该组合物的稳定性、无菌性和等渗性,例如抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂是特别值得一提的。预防微生物的作用可通过多种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯类、氯代丁醇、苯酚、山梨酸等来保证。在许多情况下,期望包括等渗剂,例如糖类、氯化钠等。通过使用延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶,可以使可注射药物制剂的吸收延长。然而,根据本发明,所用的任何载体、稀释剂、添加物应当与所述细胞相容。

[0168] 除了细胞外,MAPC 溶液、混悬液和凝胶通常含有大量的水(优选纯化的、无菌水)。还可以存在少量的其它成分,例如 pH 调节剂(例如,碱例如 NaOH)、乳化剂或分散剂、缓冲剂、防腐剂、润湿剂和胶凝剂(例如甲基纤维素)。

[0169] 通常该组合物是等渗的,即当它们适宜地制备以供施用时具有与血液和体液相同的渗透压。

[0170] 本发明组合物需要的等渗性可使用氯化钠或其它药学可接受的试剂例如右旋糖、硼酸、酒石酸钠、丙二醇、或其它无机或有机溶质来实现。对于含有钠离子的缓冲剂而言氯化钠是特别优选的。

[0171] 如果需要,使用药学可接受的增稠剂,可以将组合物的粘度维持在选定的水平。甲基纤维素是优选的,原因是它容易且经济可得,而且它容易处理。其它适宜的增稠剂包括,例如,黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、卡波姆等。增稠剂的优选浓度取决于所选择的试剂。重点是使用一定的量,此量将达到所选择的粘度。粘稠组合物通常从溶液通过添加此类增稠剂来制备。

[0172] 药学可接受的防腐剂或细胞稳定剂可以用于增加 MAPC 组合物的保存期。如果包括此防腐剂,其将在本领域技术人员公知的选择不会影响 MAPCs 的存活性和效果的组合物的范围内。

[0173] 本领域技术人员将认识到,所述组合物的组分应当是化学惰性的。这对于熟知化学和药学原则的本领域技术人员而言将不会存在问题。通过参考标准教科书或通过简单试验(不涉及过度的试验)使用本公开、本文引用的资料和本领域通常可得的信息,可以容易地避免所述问题。

[0174] 根据需要,通过将在需要量的适宜溶剂中的实施本发明所用的细胞与不同量的其它成分合并,可以制备无菌可注射溶液。

[0175] 还优选的是注射用溶液,包括立体定位注射剂和输液剂,例如 IV 输液剂。

[0176] 在一些实施方案中,MAPCs 被配制成单剂量可注射的剂型,例如溶液剂、混悬剂或乳剂。适合 MAPCs 注射的药物制剂通常是无菌水溶液和分散体。可注射制剂的载体可以是含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如甘油、丙二醇、液态聚乙二醇等)及其适宜的混合物的溶剂或分散介质。

[0177] 熟练技术人员可容易确定在以本发明方法施用的组合物中的细胞和任选添加物、介质和/或载体的量。通常,任何添加物(除了所述细胞外)是以在溶液(例如在磷酸盐缓冲盐水)中的 0.001-50wt% 的量存在。所述活性成分是以微克至毫克级的量存在,例如约 0.0001 至约 5wt%,优选约 0.0001 至约 1wt%,最优选约 0.0001 至约 0.05wt%,或者约 0.001 至约 20wt%,优选约 0.01 至约 10wt%,最优选约 0.05 至约 5wt%。

[0178] 对于任何待施用于动物和人的组合物,以及对于任何特别的施用方法,优选的是确定:毒性,例如通过测定在适宜动物模型中的致死剂量(LD)和 LD50,所述动物例如啮齿类例如小鼠或大鼠;以及,组合物的剂量、其中的组分的浓度、和施用所述组合物的时间,其引发了适宜的应答。根据本领域技术人员知识、本公开、和本文引述的资料,此类测定不需要过度的试验。并且,连续施用的时间可以被确定,而不必过多的试验。

[0179] 在一些实施方案中,MAPCs 被包裹以供施用,特别是其中包裹提高了治疗的有效性,或者提供了处理和/或保存时间的益处。结果是,在一些增加免疫抑制介导的 MAPC 的作用的实施方案中,包裹还可减少对免疫抑制药物治疗的需求。

[0180] 此外,在一些实施方案中包裹提供了对受试者免疫系统的屏障,其可进一步减少受试者对 MAPCs 的免疫应答(其通常在同种异体移植物中是无免疫原性的或者仅仅是弱免

疫原性的),从而减少任何在施用所述细胞时可能会发生的移植物排斥或炎症。

[0181] 在其中 MAPCs 与另一类型的细胞(其在同种异体或异种环境中更具有典型的免疫原性)混合使用的不同的实施方案中,如果该混合的细胞是具有免疫能力的并且将该宿主识别为非自身的时,包囊可减少或消除不良的宿主对该非-MAPC 细胞和/或 GVHD 的免疫应答,所述减少或消除可发生在免疫妥协的宿主中。

[0182] 在植入之前可以通过薄膜和胶囊将 MAPCs 包囊。预计许多可用的细胞包囊方法的任一种均可使用。在一些实施方案中,细胞各自被包囊。在一些实施方案中,许多细胞被包囊在相同的膜中。在植入后所述细胞将被移除的实施方案中,包囊许多细胞的相对更大的结构,例如在单一的膜中,可以提供用于回收的便利的手段。

[0183] 广泛变化的材料可用于不同的实施方案中以用于 MAPCs 的微包囊。此类材料包括,例如,聚合物胶囊、藻酸盐-聚-L-赖氨酸-藻酸盐微胶囊、聚-L-赖氨酸-藻酸盐微胶囊、聚丙腈/聚氯乙烯(PAN/PVC)空心纤维和聚醚砜(PES)空心纤维。

[0184] 用于可供 MAPCs 施用的细胞微包囊的技术是本领域技术人员已知的,例如在 Chang, P., et al., 1999; Matthew, H. W., et al., 1991; Yanagi, K., et al., 1989; Cai Z. H., et al., 1988; Chang, T. M., 1992 中以及在美国专利 No. 5, 639, 275 (例如,其描述了用于稳定表达生物活性分子的细胞的长期维持的生物相容的胶囊)中。包囊的另外的方法是在欧洲专利公开号 No. 301, 777 以及美国专利 No. 4, 353, 888、4, 744, 933、4, 749, 620、4, 814, 274、5, 084, 350、5, 089, 272、5, 578, 442、5, 639, 275 和 5, 676, 943 中。前述全部文献与 MAPCs 的包囊相关的部分通过引用并入本文。

[0185] 某些实施方案将 MAPCs 掺入到聚合物中,例如生物聚合物或合成聚合物。生物聚合物的实例包括,但不限于,纤连蛋白、fibrin、血纤蛋白原、凝血酶、胶原和蛋白聚糖。其它因子,例如上文讨论的细胞因子,也可以掺入到该聚合物中。在本发明的其它实施方案中,MAPCs 可以被掺入到三维凝胶的间隙中。通常,大量的聚合物或凝胶将以外科植入。可以配制在足够小的粒子或纤维中的聚合物或凝胶可以通过其它常用的、更方便的、非外科的途径施用。

[0186] 本发明的药物组合物可以制备成许多形式,其包括片剂、硬或软明胶胶囊剂、水性溶液剂、混悬剂和脂质体,以及其它缓释制剂,例如成形的聚合物凝胶。口服液体药物组合物可以是例如以下的形式:水性或油性混悬剂、溶液剂、乳剂、糖浆剂、或酞剂,或者可以以干燥产物呈现,以供用水或其它适宜的介质在使用前重构。此类液体药物组合物可含有常规添加物,例如混悬剂、乳化剂、非水性介质(其可包括食用油)或防腐剂。可以配制这样的口服剂型,其中细胞在穿过胃后释放到肠中。此类制剂描述于美国专利 No. 6, 306, 434 以及其中包含的文献中。

[0187] 适合直肠施用的药物组合物可以制备成单位剂量的栓剂。适宜的载体包括盐水溶液和其它本领域常用的材料。

[0188] 对于通过吸入施用,细胞可以方便地从吸入器、雾化器或加压包装递送,或者从递送气雾剂的其它方便手段递送。加压包装可包括适宜的推进剂例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它适宜的气体。在加压气雾剂的情况下,可通过提供阀以递送计量化的量来确定剂量单位。

[0189] 另选的,对于通过吸入或吹入施用,可以采用干粉组合物形式的方式,例如调节剂

和适宜的粉末基例如乳糖或淀粉的粉末混合物。该粉末组合物可以以单位剂型存在于例如胶囊或药筒 (cartridges) 中,或者例如存在于明胶或泡罩包装中,所述粉末可以在吸入器或吹入器的帮助下从上述形式中施用。对于鼻内施用,可以通过液体喷雾例如通过塑料瓶雾化器施用细胞。

[0190] 其它活性成分

[0191] MAPCs 可以与其它药物活性剂施用。在一些实施方案中,此类活性剂的一种或多种与 MAPCs 一起配制以供施用。在一些实施方案中,MAPCs 和一种或多种活性剂是在分离的制剂中。在一些实施方案中,包含 MAPCs 和 / 或一种或多种活性剂的所述组合物以彼此附加的应用而被配制。

[0192] MAPCs 可以在包含免疫抑制剂的制剂中施用,例如任何数目的皮质类固醇、环孢菌素 A、环孢菌素类免疫抑制剂、环磷酰胺、抗胸腺细胞球蛋白、硫唑嘌呤、FK-506 和除 FK-506 以外的大环内酯类免疫抑制剂、以及雷帕霉素的任何组合。在某些实施方案中,此类药物包括皮质类固醇、环孢菌素 A、硫唑嘌呤、环磷酰胺、雷帕霉素和 / 或 FK-506。根据前文的免疫抑制剂可以是唯一的此类另外的药物,或者可以与其它药物例如本文记述的其它药物组合。其它免疫抑制剂包括他克莫司、麦考酚酸吗乙酯和西罗莫司。

[0193] 此类药物还包括抗生素剂、抗真菌剂和抗病毒剂,以指定可根据本发明实施方案使用的几种其它药理活性物质和组合物。

[0194] 典型的抗生素或抗真菌化合物包括,但不限于,青霉素、链霉素、两性霉素、氨苄西林、庆大霉素、卡那霉素、麦考酚酸、萘啶酸、新霉素、制霉菌素、巴龙霉素、多粘菌素、噻罗霉素、利福霉素 (rifampicin)、大观霉素、四环素、泰洛星、zeocin,以及头孢菌素类、氨基糖苷类和棘球白素类 (echinocandins)。

[0195] 此类其它添加物涉及这样的事实,即 MAPCs,像其它干细胞,施用于受试者之后可以“归巢”到有利于其生长和功能的环境中。此“归巢”通常在其需要的位置浓缩所述细胞,例如免疫障碍、功能异常或疾病的位置。已知许多物质刺激归巢。它们包括生长因子和营养信号因子例如细胞因子。它们可用于刺激 MAPCs 的归巢以治疗靶向的位置。它们可以在用 MAPCs 治疗之前、与 MAPCs 一起或在 MAPCs 施用之后施用于受试者。

[0196] 某些细胞因子,例如,改变或影响 MAPCs 或其分化的相似物迁移到治疗所需位置,例如免疫妥协的位置。可用于此方面的细胞因子包括,但不限于,基质细胞衍生的因子-1 (SDF-1)、干细胞因子 (SCF)、血管生成素-1、胎盘衍生的生长因子 (PIGF)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、刺激内皮黏附分子例如 ICAMs 和 VCAMs 表达的细胞因子、和引起或促进归巢的细胞因子。

[0197] 它们可以作为预处理施用于受试者、与 MAPCs 一起施用、或者在 MAPCs 已被施用之后施用,以通过改善归巢或通过其它机理促进归巢到需要的位置并且达到改善的治疗作用。此类因子可以与 MAPCs 合并到适合它们一起施用的制剂中。或者,此类因子可以分别地配制和施用。

[0198] 特别值得一提的是,因子 (例如上文讨论的细胞因子) 和 MAPCs 的施用顺序、制剂、剂量、给药频率和施用途通常随所治疗的障碍或疾病、其严重度、受试者、被施用的其它治疗、障碍或疾病的阶段和预后因素而改变。对于其它治疗已经确立的一般方案提供了一个在 MAPC- 介导的直接或附加的治疗中确定适宜给药的框架。这些,与本文提供的其

它信息一起,将使本领域技术人中能够确定根据本发明实施方案的适宜的施用操作,而无需过多的试验。

[0199] 在实施方案中,细胞被配制成适合治疗脑损伤,如下文实施例中所述的。在实施方案中,例如实施例的某些说明性实施方案,制剂可有效地用于肠胃外施用。在实施方案中,所述的制剂可有效地用于 I.V. 输注。在实施方案中,所述的制剂可有效地用于立体定位注射。

[0200] 途径

[0201] 通过任何本领域技术人员已知的可用于将细胞施用于受试者的各种途径,可以将 MAPCs 施用于受试者。

[0202] 在不同的实施方案中,可以将所述 MAPCs 通过有效递送细胞治疗的任何途径施用于受试者。在一些实施方案中,所述细胞通过注射(包括局部和/或全身注射)施用。在某些实施方案中,所述细胞在待治疗的功能异常的位置内和/或接近于该位置施用。在一些实施方案中,所述细胞在功能异常的局部而不是接近于该位置通过注射施用。在一些实施方案中,所述细胞通过全身注射例如静脉注射施用。

[0203] 可用于本发明实施方案所关注的方法是用于通过肠胃外途径施用 MAPCs 的方法。特别值得一提是,用于本发明不同的实施方案中的施用的肠胃外途径包括通过静脉内、动脉内、心脏内、脊柱内、鞘内、骨内、关节内、滑液内、皮内、真皮内、皮下和/或肌内注射施用。在一些实施方案中,使用静脉内、动脉内、皮内、真皮内、皮下和/或肌内注射。在一些实施方案中,使用静脉内、动脉内、皮内、皮下和/或肌内注射。

[0204] 在本发明不同的实施方案中,MAPCs 通过全身注射施用。对于施用 MAPCs 而言,全身注射,例如静脉注射,提供了一种最简单及最小侵入的途径。在某些情况下,为了最佳效能和/或通过 MAPCs 归巢到靶位,这些途径可能要求高的 MAPC 剂量。在许多种实施方案中,MAPCs 可以通过靶向和/或局部注射施用,以确保在靶位的最佳作用。

[0205] 在本发明某些实施方案中,MAPCs 可以通过皮下注射针头经注射器施用于所述受试者。在不同的实施方案中,MAPCs 通过导液管施用于所述受试者。在许多种实施方案中,MAPCs 通过外科植入施用。在此进一步的方面,在本发明不同的实施方案中,MAPCs 通过使用关节镜操作植入施用于所述受试者。在一些实施方案中,MAPCs 通过立体定位注射施用于所述受试者。在一些实施方案中,MAPCs 在固体支持体内或固体支持体上施用于所述受试者,该固体支持体例如聚合物或凝胶。在不同的实施方案中,MAPCs 以包囊化的形式施用于所述受试者。

[0206] 在本发明另外的实施方案中,MAPCs 被适宜地配制成供口服、直肠、皮肤外(epicutaneous)、眼、鼻和/或肺递送,并且相应地被施用。

[0207] 在以下实施例说明性地描述的实施方案中,肠胃外施用被用于治疗脑损伤。在实施方案中,如实施例所述,使用 IV 输注。在实施方案中,如实施例所述,使用立体定位注射。

[0208] 给药

[0209] 组合物可以在剂型中施用,或者通过医学和兽医学领域技术人员公知的技术施用,其中考虑例如以下的因素:年龄、性别、体重、具体患者的条件、以及将要施用的制剂(例如固体还是液体)。对于人类或其它哺乳动物的剂量可以根据本公开、本文引述的资料

和本领域的知识,通过本领域技术人员确定而无不必过多试验。

[0210] 适合于根据本发明不同的实施方案使用的 MAPCs 的剂量将取决于许多因素。其可能考虑不同的环境而变化。对于主要的和附加的治疗,决定待施用的 MAPCs 最佳剂量的参数通常包括以下的部分或全部:所治疗的疾病及其阶段;受试者的物种,其健康、性别、年龄、体重和代谢速率;受试者的免疫反应能力;被施用的其它治疗;根据受试者病史或遗传型所预期的潜在并发症。所述参数还包括:MAPCs 是同基因性的、自体的、同种异体的还是异种的;它们的效能(特异活性);对于 MAPCs 必需靶向有效的位置和/或分布;以及所述位置的此类特征:例如对于 MAPCs 和/或 MAPCs 的移入物的可接受性。另外的参数包括与其它因子(例如生长因子和细胞因子)的 MAPCs 同时施用。在给定情况下的最佳剂量还将考虑细胞被配制的方式、它们被施用的方式、以及施用之后细胞集中于靶位的程度。最后,最佳剂量的确定必将提供有效的剂量,该有效的剂量既不会低于最大有益作用的阈值,也不会高于与 MAPCs 剂量相关的有害作用大于增加剂量的益处的阈值。

[0211] 对于一些实施方案,MAPCs 的最佳剂量将在供自体的单核骨髓移植使用的剂量范围内。根据动物研究通过外推法,考虑大小(质量)和代谢因素的差异,以及根据对于其它细胞治疗(例如移植治疗)所确立的剂量需求,可以估计出上述的剂量范围。

[0212] 在实施方案中,每次施用的最佳剂量范围为 10^4 至 10^9 MAPC 细胞/kg 受者质量。在实施方案中,每次施用的最佳剂量为 10^5 至 10^8 MAPC 细胞/kg。在实施方案中,每次施用的最佳剂量为 5×10^5 至 5×10^7 MAPC 细胞/kg。在实施方案中,每次施用的最佳剂量为 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9×10^6 的任一个至 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9×10^7 的任一个。

[0213] 通过参考,在前述中的一些中-高剂量是类似于自体的单核骨髓移植的有核细胞的剂量。一些中-低剂量类似于用于自体的单核骨髓移植的 $CD34^+$ 细胞/kg 的数目。

[0214] 应当理解,单一剂量可以一次、分次或经一定时间连续递送。全部剂量还可以递送到单个位置或者经数个位置分开扩散。

[0215] 在不同的实施方案中,MAPCs 可以在初始剂量中施用,然后通过进一步施用 MAPCs 来维持。MAPCs 可以通过最初的一种方法施用,然后通过相同的方法或者通过一种或多种不同的方法施用。受试者的 MAPC 水平可以通过细胞继续进行的施用来维持。不同的实施方案通过静脉注射,既可以初始施用 MAPCs,也可以维持其在受试者中的水平,或者两者均可。在许多种实施方案中,使用了施用的其它形式,其取决于本文其它处所讨论的患者的病症和其它因素。

[0216] 应当注意,人受试者通常比试验动物治疗得更长;但是,治疗通常具有与疾病过程和治疗有效的长度相称的长度。本领域技术人员考虑使用人和/或动物例如大鼠、小鼠、非人类灵长动物等进行的其它操作的结果,以确定对于人的适宜剂量。根据这些因素并考虑由本公开和现有技术提供的指导,此类确定将使本领域技术人员能够这样做而不必过多试验。

[0217] 对于初始施用和进一步的剂量或者对于后续的施用的适宜方案可以全部相同或者可以变化。适宜的方案可以通过熟练技术人员根据本公开、本文引述的文献、和本领域的知识确定。

[0218] 剂量、频率、治疗持续时间将取决于许多因素,包括疾病的性质、受试者和其它可以施用的治疗。因此,广泛变化的方案可用于施用 MAPCs。

[0219] 在一些实施方案中, MAPCs 以一个剂量施用于受试者。在其它实施方案中, MAPCs 是在连续两个或多个剂量的系列中施用于受试者。在一些其它实施方案中, 其中 MAPCs 以单次剂量、两次剂量和 / 或两次以上剂量施用, 所述剂量可以相同或者不同, 并且它们可以以相互之间相等或不等的间隔施用。

[0220] MAPCs 可以在宽范围的时间中以许多频率施用, 例如直到达到需要的治疗效果。在一些实施方案中, MAPCs 历经少于一天的时间施用。在其它实施方案中历经两天、三天、四天、五天或六天施用。在一些实施方案中, MAPCs 每周施用一次或多次, 历经数周时间。在其它实施方案中, 它们历经数周时间达一至数月施用。在不同的实施方案中, 它们可以历经数月时间施用。在其它实施方案中, 它们可以历经一年或多年的时间施用。治疗的一般时限将会与疾病过程时长、所用治疗法的效果和被治疗的受试者的病症和应答相称。

[0221] 在一些实施方案中, MAPCs 施用一次、两次、三次或三次以上, 直到达到需要的治疗效果, 或者施用不再显示出可能对所述受试者提供益处。在一些实施方案中, MAPCs 连续施用达一定时间, 例如通过静脉滴注。MAPCs 的施用可以是短的时间, 达数天、数周、数月、数年或更长的时间。

[0222] 在实施例中说明的实施方案提供如下。在实施方案中, 施用单次弹丸浓注治疗脑损伤。在实施方案中, 如以下实施例说明的, 两个或多个单次弹丸浓注的施用是在时间上经一天或多天分开施用。在实施方案中, 每一剂量历经从数分钟至数小时时间的任何时限通过 I. V. 输注施用。在实施方案中, 单次剂量的细胞是通过立体定位注射施用。在实施方案中, 两个或多个剂量是通过立体定位注射施用到脑的相同或不同区域。在此方面的涉及弹丸浓注、IV 和立体定位注射以用于治疗脑损伤的实施方案中, 每一施用的细胞剂量是每一施用 10^4 至 10^9 MAPC 细胞 / kg 受者质量。在实施方案中, 所述的剂量是 10^5 至 10^8 MAPC 细胞 / kg。在实施方案中, 所述的剂量是 5×10^5 至 5×10^7 MAPC 细胞 / kg。在实施方案中, 所述的剂量是 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9×10^6 至 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9×10^7 中的任一个。

[0223] 如美国专利 No. 7, 015, 037 中描述的 MAPCs

[0224] 人 MAPCs 描述于现有技术中。对于人和小鼠, 分离 MAPC 的方法是现有技术已知的。因此目前对于本领域技术人员而言可能的是: 获得骨髓抽吸物、脑或肝活组织检查物、和其它器官, 并使用本领域技术人中可得的阳性和 / 或阴性选择技术分离, 这依赖于表达 (或未表达) 在那些细胞中的基因 (例如, 通过机能或形态学分析, 例如上文引用申请中公开的那些, 其通过引用并入本文)。说明性的方法描述于例如, 美国专利 No. 7, 015, 037 中, 其内容通过引用并入本文以用于 MAPCs 的说明和制备的方法。

[0225] 如美国专利 No. 7, 015, 037 中描述的 MAPCs 的分离和生长

[0226] 来自例如人、大鼠、小鼠、狗和猪的 MAPC 分离的方法是本领域已知的。说明性的方法描述于, 例如, 美国专利 No. 7, 015, 037 和 PCT/US02/04652 (以 W002/064748 公开) 中, 以及这些方法, 连同本文公开的 MAPCs 的特征, 仅通过说明和非限制性实例的方式, 通过引用并入本文。

[0227] MAPCs 最初从骨髓中分离, 随后从包括脑和肌肉的其它组织建立 (Jiang, Y. et al., 2002)。MAPCs 可以从包括但不限于以下的许多来源分离: 骨髓、胎盘、脐带和脐带血、肌肉、脑、肝、脊髓、血液、脂肪组织和皮肤。例如, MAPCs 可以得自骨髓抽吸物, 其可通过本领域技术人员可得的标准方式获得 (参见, 例如, Muschler, G. F., et al., 1997; Batinic, D.,

et al., 1990)。

[0228] 在美国专利 No. 7, 015, 037 所述条件下的人 MAPC 表型

[0229] 通过 22-25 细胞倍增之后获得的人 MAPCs 的 FACS 免疫表型分析, 显示所述细胞不表达 CD31、CD34、CD36、CD38、CD45、CD50、CD62E 和 -P、HLA-DR、Muc18、STRO-1、cKit、Tie/Tek; 并且表达低水平的 CD44、HLA-I 型和 β 2- 微球蛋白, 但表达 CD10、CD13、CD49b、CD49e、CDw90、Flk1 ($N > 10$)。

[0230] 在培养物中以约 $2 \times 10^3 / \text{cm}^2$ 重复播种, 一旦细胞经历 > 40 的倍增, 所述表型变得更同质, 并且没有细胞表达的 HLA-I 型或者 CD44 ($n = 6$)。当细胞以更高的融合生长时, 它们表达高水平的 Muc18、CD44、HLA-I 型和 β 2- 微球蛋白, 其类似于针对 MSC 所述的表型 ($N = 8$) (Pittenger, 1999)。

[0231] 免疫组织化学显示, 以约 $2 \times 10^3 / \text{cm}^2$ 播种密度生长的人 MAPCs 表达 EGF-R、TGF-R1 和 -2、BMP-R1A、PDGF-R1a 和 -B, 并且 MAPCs 的小的亚群体 (在 1 和 10% 之间) 用抗 -SSEA4 抗体染色 (Kannagi, R, 1983)。

[0232] 使用 Clontech cDNA 阵列, 测定了人 MAPCs 的表达的基因图, 其以约 2×10^3 细胞 / cm^2 的播种密度培养 22 和 26 细胞倍增。

[0233] A. MAPCs 不表达 CD31, CD36, CD62E, CD62P, CD44-H, cKit, Tie, IL1, IL3, IL6, IL11, G CSF, GM-CSF, Epo, Flt3-L, CNTF 的受体, 以及低水平的 HLA-I 型、CD44-E 和 Muc-18mRNA。

[0234] B. MAPCs 表达针对细胞因子 BMP1、BMP5、VEGF、HGF、KGF、MCP1 的 mRNA; 细胞因子受体 Flk1、EGF-R、PDGF-R1 α 、gp130、LIF-R、activin-R1 和 -R2、TGFR-2、BMP-R1A; 粘着受体 CD49c、CD49d、CD29; 以及 CD10。

[0235] C. MAPCs 表达针对 hTERT 和 TRF1 的 mRNA; POU 域转录因子 oct-4、sox-2 (要求有 oct-4 以保持未分化状态的 ES/EC, Uwanogho D., 1995)、sox11 (神经发育)、sox9 (软骨形成) (Lefebvre V., 1998); homeodeomain 转录因子: Hox-a4 和 -a5 (颈和胸廓细节 (specification); 呼吸道器官发生) (Packer AI, 2000)、Hox-a9 (髓细胞生成) (Lawrence H, 1997)、Dlx4 (头的前脑和边缘结构的细节) (Akimenko MA, 1994)、MSX1 (胚胎的中胚层、成年的心脏和肌肉、软骨 - 和骨发生) (Foerst-Potts L. 1997)、PDX1 (胰脏) (Offield MF, 1996)。

[0236] D. oct-4、LIF-R 和 hTERT mRNA 的存在通过 RT-PCR 证实。

[0237] E. 此外, RT-PCR 显示 rex-1mRNA 和 rox-1mRNA 在 MAPCs 中表达。

[0238] 将 Oct-4、rex-1 和 rox-1 在得自人和鼠科动物骨髓以及得自鼠科动物肝脏和脑的 MAPCs 中表达。人 MAPCs 表达 LIF-R, 并用 SSEA-4 阳性染色。最后, 发现 oct-4、LIF-R、rex-1 和 rox-1mRNA 水平增加培养超过 30 细胞倍增的 MAPCs, 其导致表型更同质的细胞。相反, 以高密度培养的 MAPCs 损失了这些标记物的表达。这与在 40 细胞倍增之前的衰老以及分化到不同于成软骨细胞、成骨细胞和脂肪细胞的细胞的损失有关。因此, 与 rex-1、rox-1 和 sox-2 结合的 oct-4 的存在与 MAPCs 培养物中的大多数原始细胞的存在相关。

[0239] 培养 MAPCs 的方法是本领域公知的 (参见例如, 美国专利 No. 7, 015, 037, 其关于培养 MAPCs 的方法通过引用并入本文)。培养 MAPCs 的密度可以从约 100 细胞 / cm^2 或约 150 细胞 / cm^2 至约 10,000 细胞 / cm^2 变化, 包括约 200 细胞 / cm^2 至约 1500 细胞 / cm^2 至约 2000 细胞 / cm^2 。该密度可以在物种之间变化。另外, 最佳的密度可以根据培养条件和细胞来源而变化。对于给定培养条件和细胞的组, 确定最佳密度是在本领域普通技术人员的技能范

围内。

[0240] 而且, 低于约 10% 的有效大气氧浓度, 包括约 3-5%, 可以在培养物中的 MAPCs 分离、生长期和分化的任何时间使用。

[0241] 本发明通过以下说明性的、非限制性的实施例作附加描述。

[0242] 实施例

[0243] 实施例 1: 在大鼠中用 MAPCs 的缺氧性 - 缺血性损伤以及用 MAPCs 和免疫抑制治疗

[0244] 通过单侧颈动脉结扎术的方法, 接着通过 8% 缺氧, 将 7 日龄 Sprague Dawley (SD) 大鼠幼崽 (每试验组 $n = 7$) 经受 HI 损伤, 如描述于 Rice et al., Ann Neurol. 9: 131-141 (1981), 其通过引用以其全部内容并且特别是有关此方法并入本文。损伤之后 7 天, 用冷藏保存的 MAPCs (移植前临时融化) 使动物经受脑功能区定位 (stereotaxic) 移植到海马区域, 所述 MAPCs 得自 SD 大鼠 (同基因性的, GFP- 标记的, 每只动物 200,000 个细胞) 或 Fisher 大鼠 (同种异体, β -gal- 标记的, 每只动物 200,000 个细胞)。在整个生命过程中全部动物每天用免疫抑制治疗 (CSA, 1mg/kg, i. p.)。在移植后的第 7 天和第 14 天, 进行提高身体摆动试验 (Elevated Body Swing Test, EBST) 和旋转棒试验, 以揭示全身性的和协调的运动和神经功能, 如描述于 Borlongan et al., J Neurosci., 15: 5372-5378 (1995) 中的, 其通过引用以其全部内容特别是有关这些评价行为性能的方法并入本文。在试验之后第 14 天, 使动物安乐死以用于移植的 MAPCs 的免疫组织化学分析。试验的流程图描绘于图 1。在试验过程期间在接受 MAPC 移植物的动物中未观察到死亡。

[0245] 实施例 2A: HI- 损伤大鼠在 MAPC 注射后第 7 天和第 14 天的运动技能的评价。

[0246] 将动物如实施例 1 所述处理。与介质灌注损伤的动物相比较, 在移植后第 7 天, MAPC 移植的 HI 损伤动物显示出由 EBST 测定的较少的运动不对称倾向 (64% -65% 对 75%), 以及在旋转棒 (rotarod) 上花费更长的时间 (14.1-16.5 对 18 秒)。比之于接受介质灌注的那些对照动物, 在移植后第 14 天, MAPC 移植的动物显示出明显减少运动不对称 (66% -70% 对 87%), 以及在旋转棒上花费更长的时间 (27.3-28.3 对 21 秒)。在它们的行为改善方面, 在两个试验期间, 移植到受损伤动物中的同基因性和同种异体 MAPCs 无显著差异。结果在图 2 中作图示性描述。通过运动和神经测定, 结果显示了在大鼠 HI 损伤模型中注射 MAPCs 的治疗作用。

[0247] 实施例 2B: MAPC 注射到 HI 大鼠脑之后第 14 天 MAPC 植入物的组织分析

[0248] 将动物如实施例 1 所述处理。在移植后第 14 天处死之后的 HI 损伤动物的脑检中, 通过组织学检查来检测移植的 MAPCs。检测 GFP- 阳性同基因性移植植物主要在原始的海马 CA3 移植位置和邻近的 CA2 区域, 其用 DAPI 共同标记。通过抗 - β -gal 染色和用 DAPI 共同标记检测的同种异体移植植物显示了在 HI 损伤的脑中移植存活的相似模式。在 14 天时移植植物存活为 0.96% (ANOVA F 值为 24.27, $df = 2, 19$ 以及 $p < 0.0001$; Fisher posthoc 为 $p < 0.0001$)。结果显示, 在大鼠 HI 损伤模型动物中直接脑内注射后, 同种异体和同基因性 MAPCs 植入到注射位置, 并且持续至少 2 周。

[0249] 实施例 3: 植入的 MAPCs 保护内源性神经

[0250] 将动物如实施例 1 所述处理。多数如实施例 2B 所述进行组织分析, 但将预备的脑切片 Nissl 染色, 以测定内源性神经元存活的水平。与用对照介质注射的动物相比, 用同基

因的或同种异基因的 MAPCs 注射的动物中内源性神经元死亡显著减少。该结果图示性地描述于图 3。结果显示,MAPC 施用保护了来自缺氧性缺血性损伤的内源性神经元,导致神经元成活率增加。

[0251] 实施例 4:通过标记物分析显示植入的 MAPCs 和神经元的共区域化

[0252] 将动物如实施例 1 所述处理。对于上文所述 MAPC 标记物(对于同基因性 MAPCs 为 GFP,或者对于同种异体 MAPCs 为 β -gal),同时对于 MAP2 即一种良好表征的神经元标记物,将由 MAPC 治疗的大鼠产生的脑切片共染色。表达各个 MAPC 标记物和神经元标记物的少数细胞被发现于同基因性和同种异体植入的动物中,显示一些 MAPCs 已分化成神经元;尽管可能的是,一些双重染色细胞是植入的 MAPC 细胞与内源性神经元细胞的融合的罕见结果。在大鼠 HI 损伤模型中施用于动物中之后第 14 天,该结果显示了 MAPCs 的早期表型神经元分化。

[0253] 实施例 5:当通过立体定位注射或通过 I. V. 输注施用而无免疫抑制时,MAPCs 在新生大鼠 HI 损伤模型中是治疗有益的

[0254] 通过单侧颈动脉结扎术,接着通过 8%缺氧,将 7 日龄 Sprague Dawley (SD) 大鼠幼崽(每试验组 $n = 7$) 经受 HI 损伤,如上文实施例 1 和本文引述的参考文献所述。HI 损伤 7 天之后,用冷藏保存的 MAPCs(移植前临时融化)使动物经受脑功能区定位移植到海马区域,所述 MAPCs 得自 Fisher 大鼠(同种异体, β -gal- 标记的,每只动物 200,000 个细胞)。在移植后的第 7 天和第 14 天,使用 EBST 试验和旋转棒试验进行行为试验,以揭示全身性的和协调的运动和神经功能。到第 14 天,与仅接受 PBS 的对照组相比,在 EBST 和旋转棒试验中,MAPC 治疗的动物在颅内和 IV 递送组中均显示出统计学显著的改善(两个试验均为 $p < 0.05$)。

[0255] 实施例 6:在 MCA 闭塞啮齿动物中风模型中用异种(人)MAPCs 治疗中风

[0256] 28 只 SD 成年大鼠经历大脑中动脉(MCA)闭塞手术,以诱发动手术中风。诱发中风 7 天之后,将动物分成四组,每组 7 只。各组接受直接大脑内施用以下中的一种:(1) $3 \mu l$ 的 PBS 注射液(对照), (2) $3 \mu l$ 的 PBS 注射液,其含有 100,000 人 MAPCs, (3) $3 \mu l$ 的 PBS 注射液,其含有 200,000 人 MAPCs,和 (4) $3 \mu l$ 的 PBS 注射液,其含有 400,000 人 MAPCs。如以下实施例所述测试动物,并于第 21 天处死动物。

[0257] 实施例 7:在中风模型中由运动和神经试验证实的 MAPC 施用的治疗益处

[0258] 将动物如实施例 6 所述处理。在细胞移植之后第 7 和第 14 天,将各动物经历 EBST 和 Bederson 试验,以确定运动和神经功能,如上文所述。与对照相比,在移植之后第 7 天,接受 200,000 或 400,000 细胞的动物在 EBST 的摇摆偏移中观察到统计学显著改善。经过 14 天,与对照组相比,全部三组接受人 MAPC 注射的动物显示显著改善。结果描绘于图 4 左侧的上和下图。

[0259] 同时进行但是与 EBST 分开,将各大鼠经历四个任务 Bederson 板,以评价 MCA 闭塞中风之后 14 天和 21 天的神经功能。对于四个试验的每一个,将四个试验记分为 0(无可观测的神经缺损)至 3(严重的神经缺损)。然后将四个得分取均值,得到神经功能的总测量值。MAPC 移植后第 7 天,与对照动物相比,接受 200,000 或 400,000 细胞的动物在神经功能方面显示出统计学显著改善。经过 14 天,与对照组相比,接受人 MAPC 注射的全部 3 组证明了显著的改善。结果描绘于图 4 右侧的上和下图。

[0260] 在用 200,000 或 400,000MAPCs 处理的动物的运动和神经试验中,根据第一试验点(注射后 7 天),结果显示动物的剂量依赖性、统计学显著改善。(用 100,000MAPCs 处理的动物比之后仅用对照介质处理的动物未显示统计学显著改善)。该结果证明,当与仅用介质处理的动物相比时,通过直接大脑内注射到大鼠中风脑中,在早到注射后至少一周并且保持长到注射后至少二周,在运动和神经有益性试验中施用异种 MAPCs 均得到了统计学显著改善。

[0261] 实施例 8:在大鼠 HI 中风模型中 MAPC 植入到脑中

[0262] 将动物如上文实施例 6 所述处理。在 MAPC 移植后第 14 天最后的行为测定之后,将动物处死,再收集脑。将石蜡植入组织的半-薄切片用 DAPI 染色,以显现所有的细胞核和小鼠抗-HuNu(人细胞核)多克隆抗体,接着用 FITC-结合羊抗小鼠单克隆抗体以染色植入的人 MAPCs。在皮层(CTX)、室下区(SVZ)和纹状体(STR)中发现 MAPCs。结果显示在大脑内注入大鼠后,人 MAPCs 生存并且植入,其显示 MAPC 施用的显著治疗作用。细胞的分布显示,MAPCs 迁移到脑的第二区域以及在原始位置的植入处,在此处细胞被注入。对于 100,000 和 200,000MAPCs 注射可见到生存和迁移的相同模式。在仅注射介质的对照中风动物的脑中,未检测到 HuNu 免疫反应性。在中风之后 14 天,对于 100,000、200,000 和 400,000MAP 植入剂量,移植存活百分数分别为 0.55%、0.7%和 0.51%。该结果清楚地显示,在中风模型脑中,MAPCs 不但存活并且植入到注射的位置,而且它们还迁移并植入到远离注射位置的第二位置。总之,到直接大脑内注射后至少两周,异种人 MAPCs 存在于损伤和注射(纹状体)的位置,并且存在于受注射的脑的第二位置,包括皮层和在室下区中。

[0263] 实施例 9:在大鼠手术模型中用同种异体(大鼠)MAPCs、用异种(人)MAPCs,并且均同时用和不用免疫抑制治疗缺血性中风

[0264] 35 只 SD 大鼠经受大脑中动脉(MCA)结扎手术以诱导动物手术性中风。在诱导中风之后 7 天,将各动物分成 5 组,每组 7 只动物。每组接受直接大脑内施用以下中的一种:(1)3 μ l 的 PBS 注射液,其含有 400,000 大鼠 MAPCs,无免疫抑制;(2)3 μ l 的 PBS 注射液,其含有 400,000 大鼠 MAPCs,有免疫抑制治疗(CSA,1mg/kg, i. p.);(3)3 μ l 的 PBS 注射液,其含有 400,000 人 MAPCs,无免疫抑制;(4)3 μ l 的 PBS 注射液,其含有 400,000 人 MAPCs,有免疫抑制治疗(CSA,1mg/kg, i. p.),和(5)3 μ l 的 PBS 注射液,其含有 400,000 辐照的、不可存活的人 MAPCs,有免疫抑制治疗(CSA,1mg/kg, i. p.)。

[0265] 实施例 10:在大鼠手术模型中用同种异体(大鼠)MAPCs、用异种(人)MAPCs,并且均同时用和不用免疫抑制治疗缺血性中风的行为和神经学评价

[0266] 将动物如实施例 9 所述处理。在细胞移植之后 14 天,以及此后 8 周每隔 14 天,将各动物经历 EBST 和 Bederson 试验以测定运动和神经功能。在有和没有免疫抑制治疗的情况下,在 EBST 和 Bederson 评价中,异种和同种异体 MAPCs 的施用均导致统计学显著的和持续的改善。该结果显示,缺血性损伤之后 7 天移植 MAPCs 在行为和神经功能方面得到了统计学显著的长期(8-周)的持续治疗益处。该结果进一步显示,对于证实的治疗作用而言不需要免疫抑制。结果图示性地描述于图 5 和 6。

[0267] 实施例 11:在大鼠手术模型中用异种(人)MAPCs 经注射或 I. V. 输注递送,并且用和不用免疫抑制治疗缺血性中风

[0268] 42 只 SD 大鼠经受大脑中动脉(MCA)结扎手术以诱导动物手术性中风。在诱导

中风之后 7 天,将各动物分成 6 组,每组 7 只动物。每组接受静脉内施用以下中的一种:(1)400,000 人 MAPCs,有免疫抑制治疗(CSA,1mg/kg, i. p.);(2)400,000 人 MAPCs,无免疫抑制;(3)1,000,000 人 MAPCs,有免疫抑制治疗(CSA,1mg/kg, i. p.);(4)1,000,000 人 MAPCs,无免疫抑制治疗;(5)1,000,000 辐照的、不可存活的人 MAPCs,有免疫抑制治疗(CSA,1mg/kg, i. p.),和(6)1,000,000 辐照的、不可存活的人 MAPCs,无免疫抑制治疗。

[0269] 实施例 12:在大鼠手术模型中用异种(人)MAPCs 经注射或 I. V. 输注递送,并且用和不用免疫抑制治疗缺血性中风-行为和神经学评价

[0270] 将动物如实施例 11 所述处理。在细胞移植之后 14 天,以及此后 8 周每隔 14 天,分别通过 EBST 和 Bederson 试验评价各动物的运动和神经功能。

[0271] 在试验之后移植后的第 56 天将动物处死。

[0272] 在运动功能方面结果显示显著的剂量依赖性治疗作用。用 1,000,000 存活的 MAPCs 输注的动物比之于用辐照的 MAPCs 治疗的相应对照组显示出显著的改善。有和没有免疫抑制时均获得相同的结果。用 400,000 存活的 MAPCs 输注的动物比之于用辐照的 MAPCs 治疗的相应对照组没有显著的改善。有和没有免疫抑制时均获得相同的结果。

[0273] 在神经功能方面结果也显示出显著的剂量依赖性治疗作用。用 400,000 和 1,000,000 存活的 MAPCs 治疗的动物比之于用辐照的 MAPCs 治疗的相应对照组均显示出显著的改善。在用 400,000 细胞治疗的动物中历经 56 天的试验有恢复下降的倾向,但用 1,000,000 细胞治疗的动物无此倾向。有和没有免疫抑制时均获得相同的结果。

[0274] 总之,在运动和神经功能方面,在整个 8 周的试验过程中,用 1,000,000 存活的 MAPCs 治疗的动物显示出统计学显著的、持续的改善。此外,治疗作用不需要免疫抑制。有和没有 CSA 时结果相同。

[0275] 结果图示性地描述于图 7 和 8。

[0276] 实施例 13:时间对大鼠手术模型用异种(人)MAPCs 经 I. V. 输注递送治疗缺血性中风的影响

[0277] 28 只 SD 大鼠历受大脑中动脉 MCA 结扎手术以诱导动物手术性中风。将动物分成 4 组,每组 7 只动物。每组通过静脉内输注接受 1,000,000 异种(人)MAPCs,无免疫抑制。除了在诱导中风之后的不同时间施用 MAPCs 之外,所有组别均相同处理。根据诱导之后的以下天数将 MAPCs 施用于各组:(1)1 天,(2)2 天,和(3)7 天。此外,在诱导之后第 7 天,第(4)组接受 1,000,000 辐照的、不可存活的 MAPCs。

[0278] 研究期间在接受 MAPCs 的动物中未观察到死亡。

[0279] 实施例 14:时间对大鼠手术模型用异种(人)MAPCs 经 I. V. 输注递送治疗缺血性中风的影响-运动和神经功能

[0280] 将动物如实施例 13 所述处理。在细胞移植之后 7 天,以及此后 8 周每隔 7 天,分别通过 EBST 和 Bederson 试验评价各动物的运动和神经功能。

[0281] 在运动和神经功能方面,与用辐照的 MAPCs 治疗的对照组(第 4 组)相比,全部三组用存活的 MAPCs 治疗的动物的结果显示统计学显著的、持续的改善。用存活的 MAPCs 治疗的三组所获得的运动功能的结果之间无统计学差异。对于神经功能的三组的结果也同样。

[0282] 结果证明,当在缺血性脑损伤之后第一天至第七天通过 IV 施用时,在运动和神经功能方面,MAPCs 均提供了治疗益处。

[0283] 结果图示性地描述于图 9 和 10。

[0284] 实施例 15 :时间对大鼠手术模型用异种 (人)MAPCs 经 I. V. 输注递送治疗缺血性中风的影响 - 植入

[0285] 将动物如实施例 12 所述处理。各组在第 56 天的最终行为试验之后将动物处死。从处死的动物中采集脑。由脑制备蜡植入组织的半 - 薄切片。将切片用 DAPI 染色以显现所有的细胞核,再用多克隆小鼠抗 HuNu (人细胞核) 抗体、接着用 FITC- 结合羊抗鼠单克隆抗体以染色植入的人 MAPCs。对 DAPI 染色的细胞和 FITC 染色的细胞计数。根据 FITC 染色的细胞数目确定植入细胞的总数目。注射的 MAPCs 植入物的百分数是根据植入细胞总数比输注到各动物的细胞总数的比值计算的。

[0286] 结果显示在损伤之后施用的早期植入的细胞稍少。损伤之后施用 MAPCs1 天的动物平均为 0.75% 植入。损伤之后施用 MAPCs2 天的动物平均为 1.1% 植入的细胞。损伤之后施用 MAPCs7 天的动物平均为 1.27% 存活的植入的细胞。此趋势无统计学显著性;但是,这表明,中风后即刻的缺血性损伤的炎症环境可能对 MAPCs 的植入和长期生存益处较小,然后此环境在此后仅存在少数几天。

[0287] 实施例 16 :时间对大鼠手术模型用异种 (人)MAPCs 经 I. V. 输注递送治疗缺血性中风的的影响——神经元保护作用

[0288] 将动物如实施例 12 所述处理。如实施例 14 所述制备脑切片。将备用的切片 (针对实施例 14 使用的那些) 用 Nissl 染色以确定内源性神经元的存活。结果显示施用 MAPC 时统计学显著地减少内源性神经元的死亡。MAPCs 对内源性神经元的存活的保护作用随着中风诱导与 MAPC 施用之间的时间的减少而增加。比之于中风诱导后第 2 天接受 MAPCs 的动物,在中风诱导后第 1 天接受 MAPCs 的动物中有更多存活神经元,并且此差异是统计学显著的。类似地,比之于中风诱导后第 7 天接受 MAPCs 的动物,在中风诱导后第 2 天接受 MAPCs 的动物中有更多存活神经元,并且此差异也是统计学显著的。结果表明,缺血性事件之后施用 MAPCs 越早,对内源性神经元存活的保护作用越大。

[0289] 结果图示性地描述于图 11。

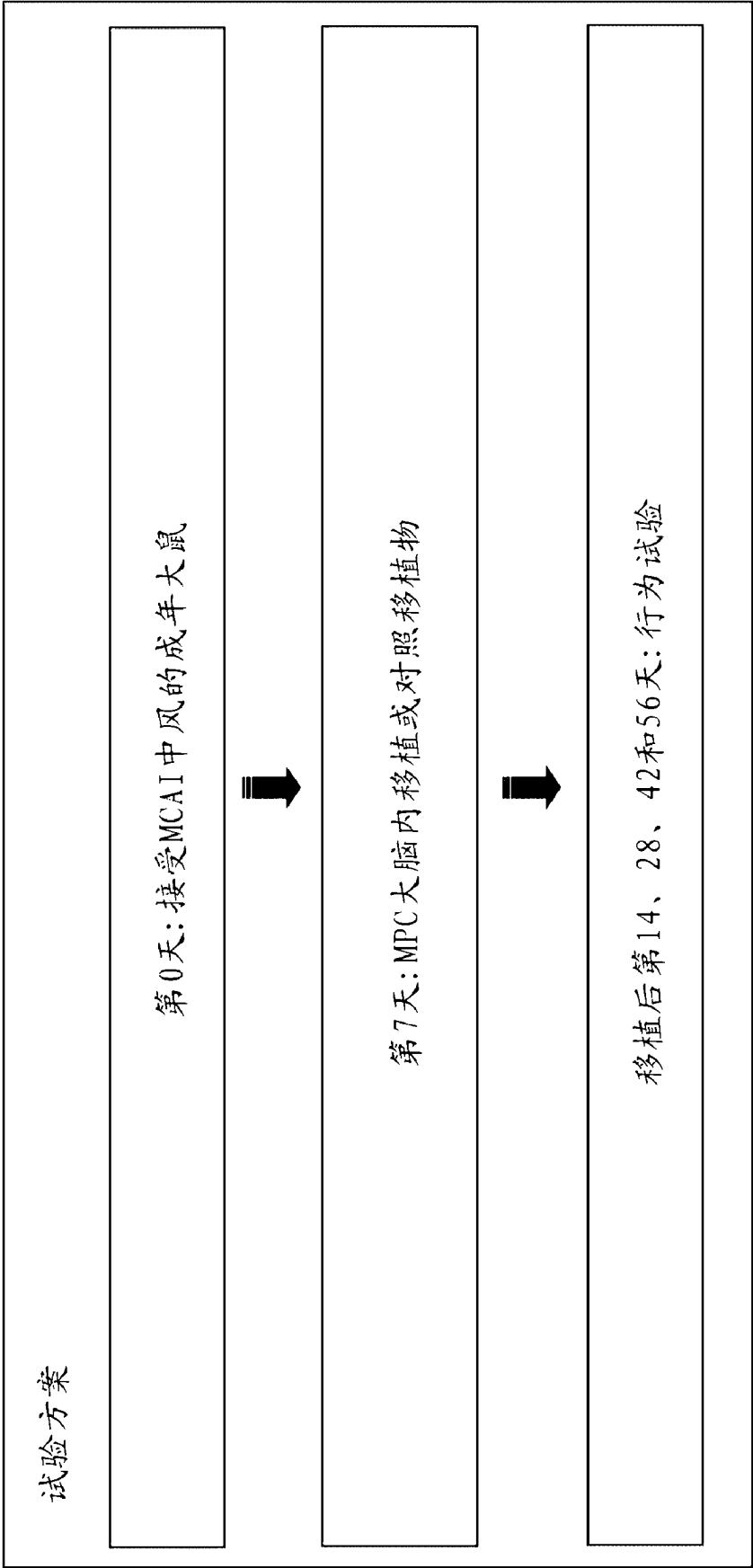


图 1

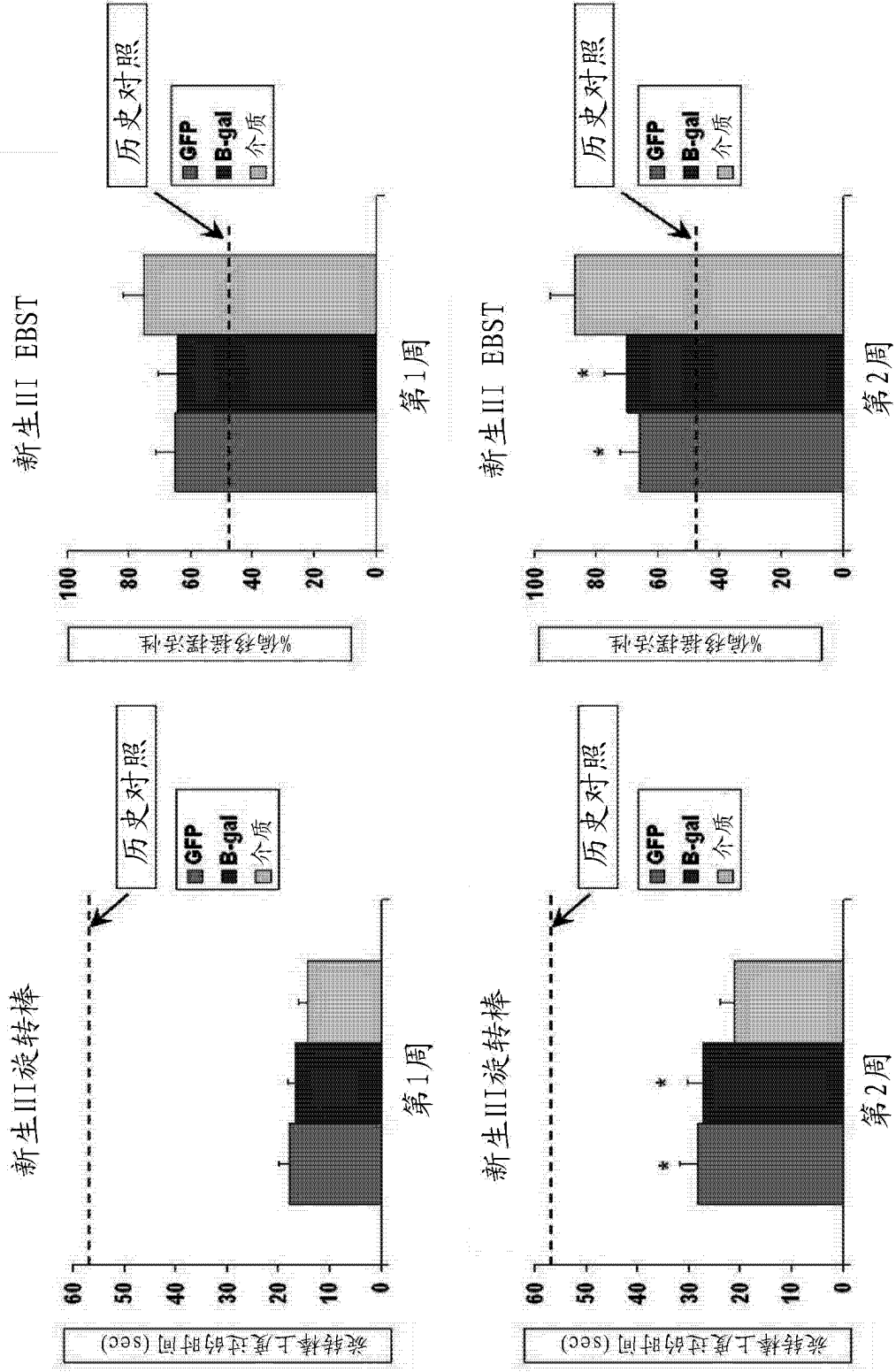


图 2

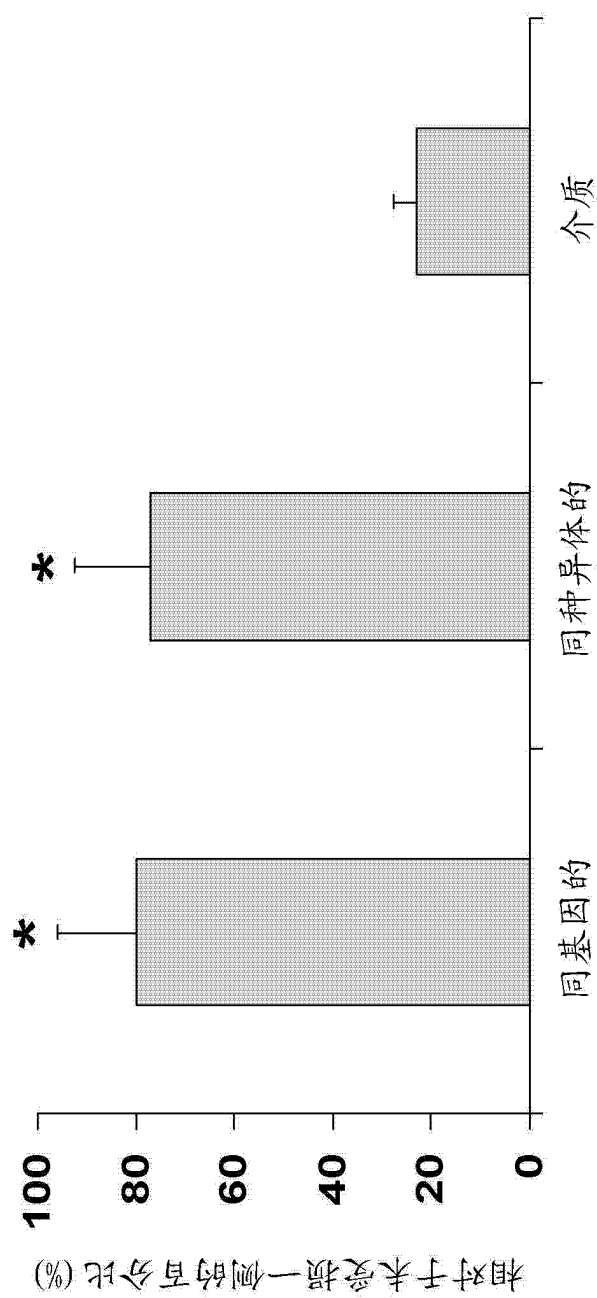


图 3

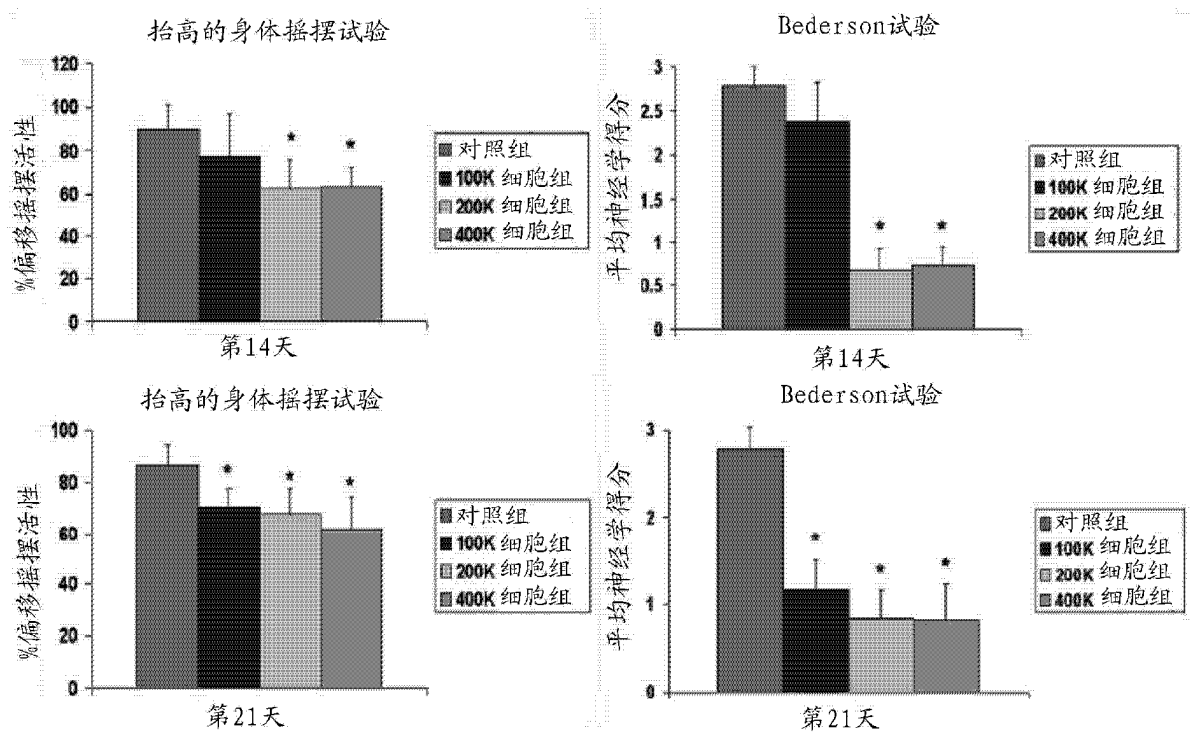


图 4

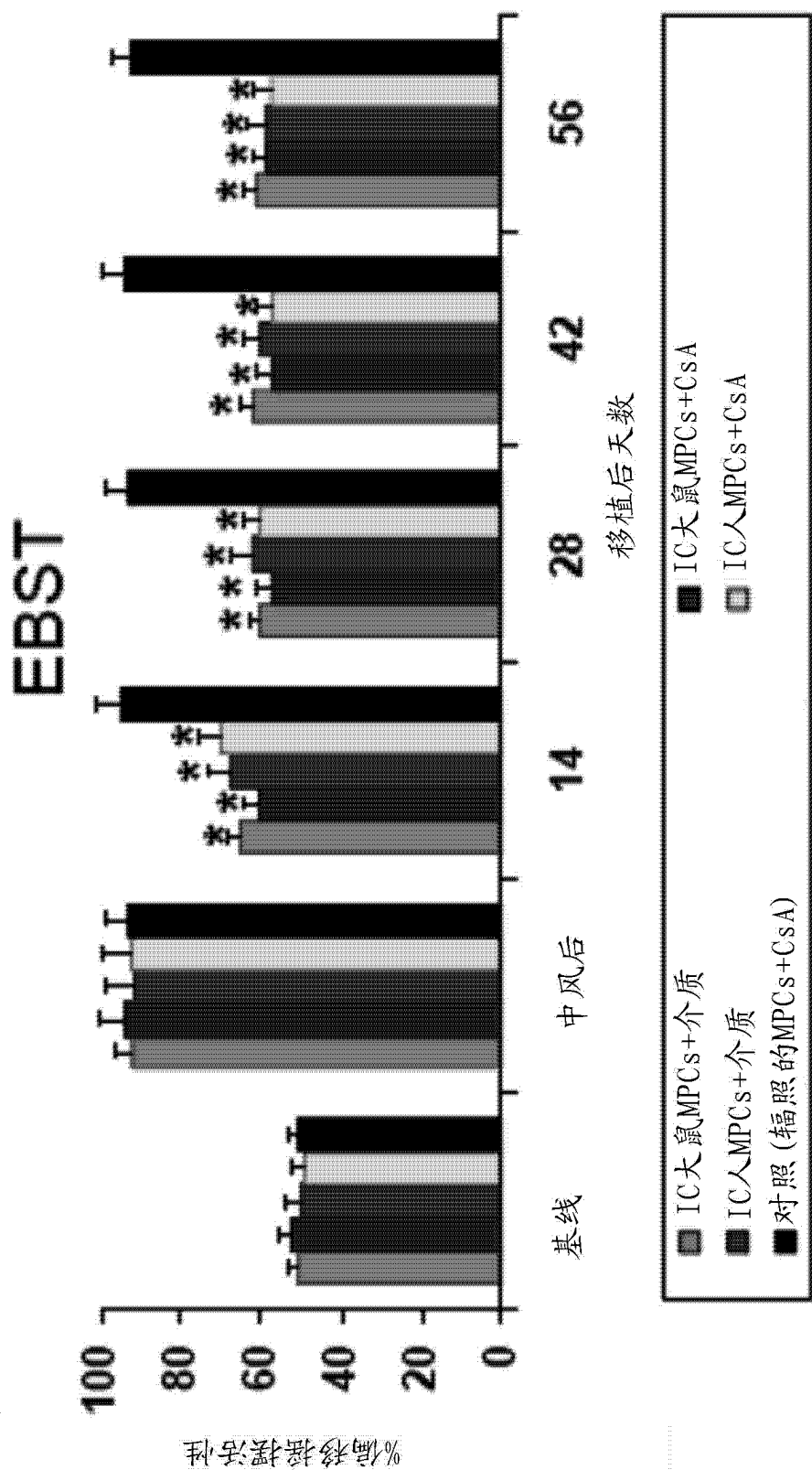


图 5

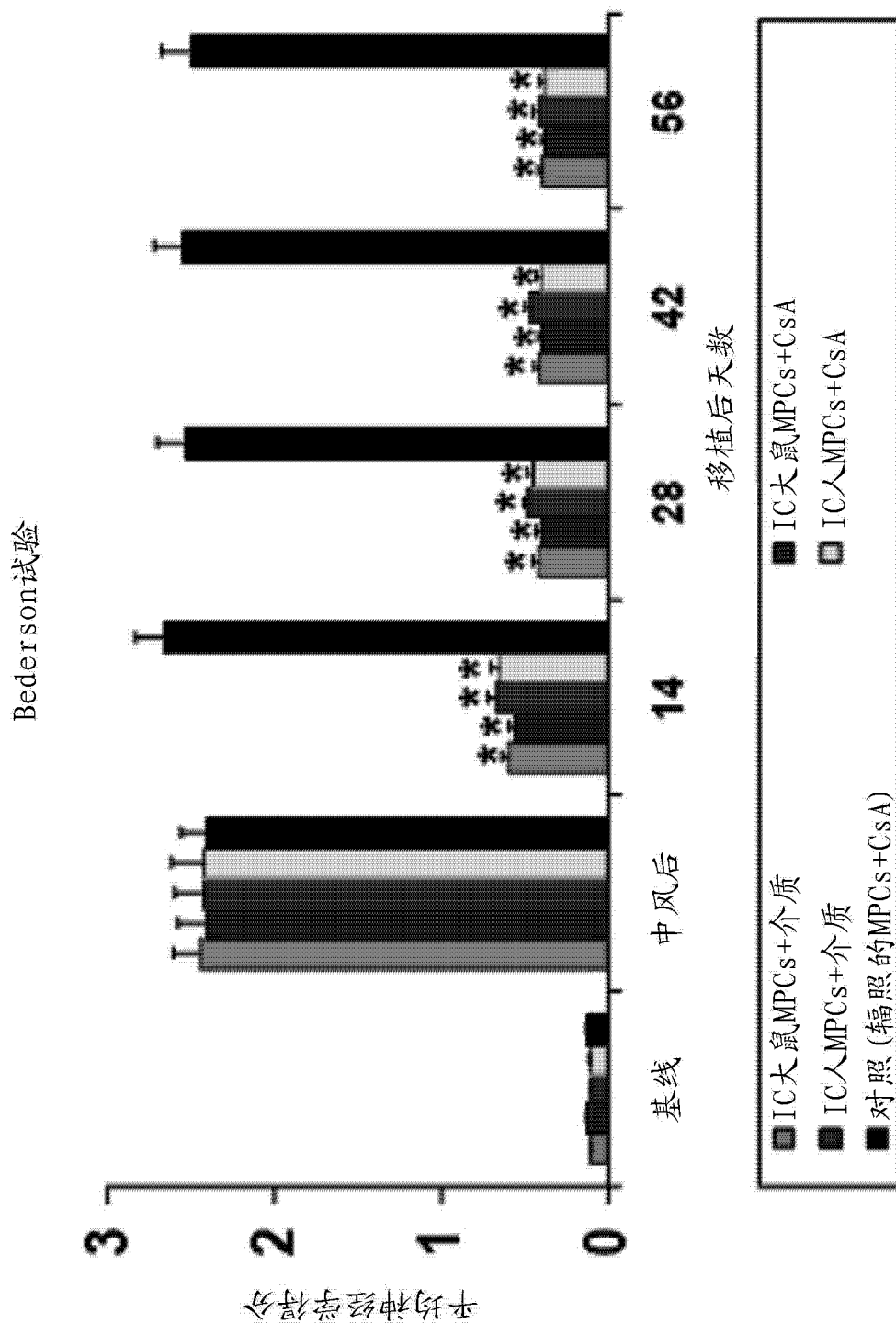


图 6

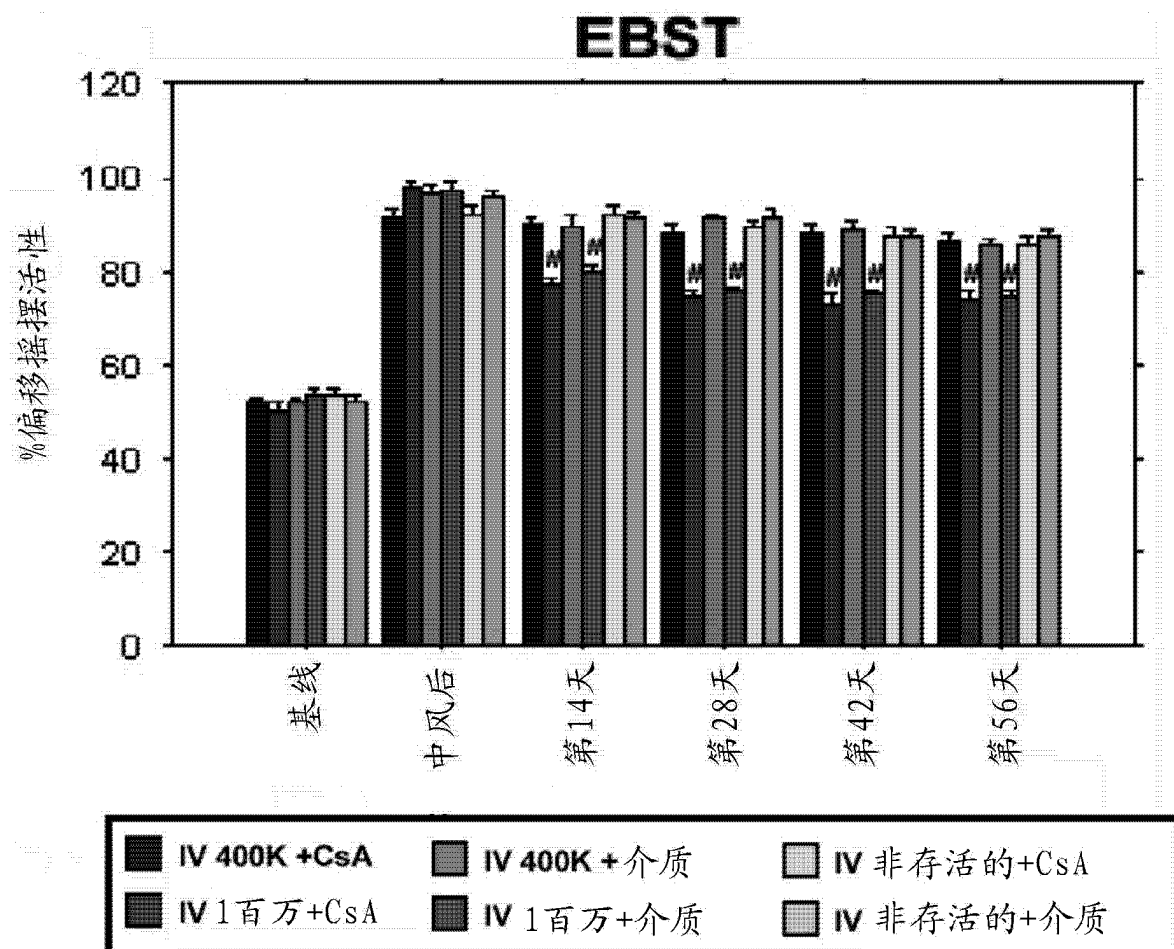


图 7

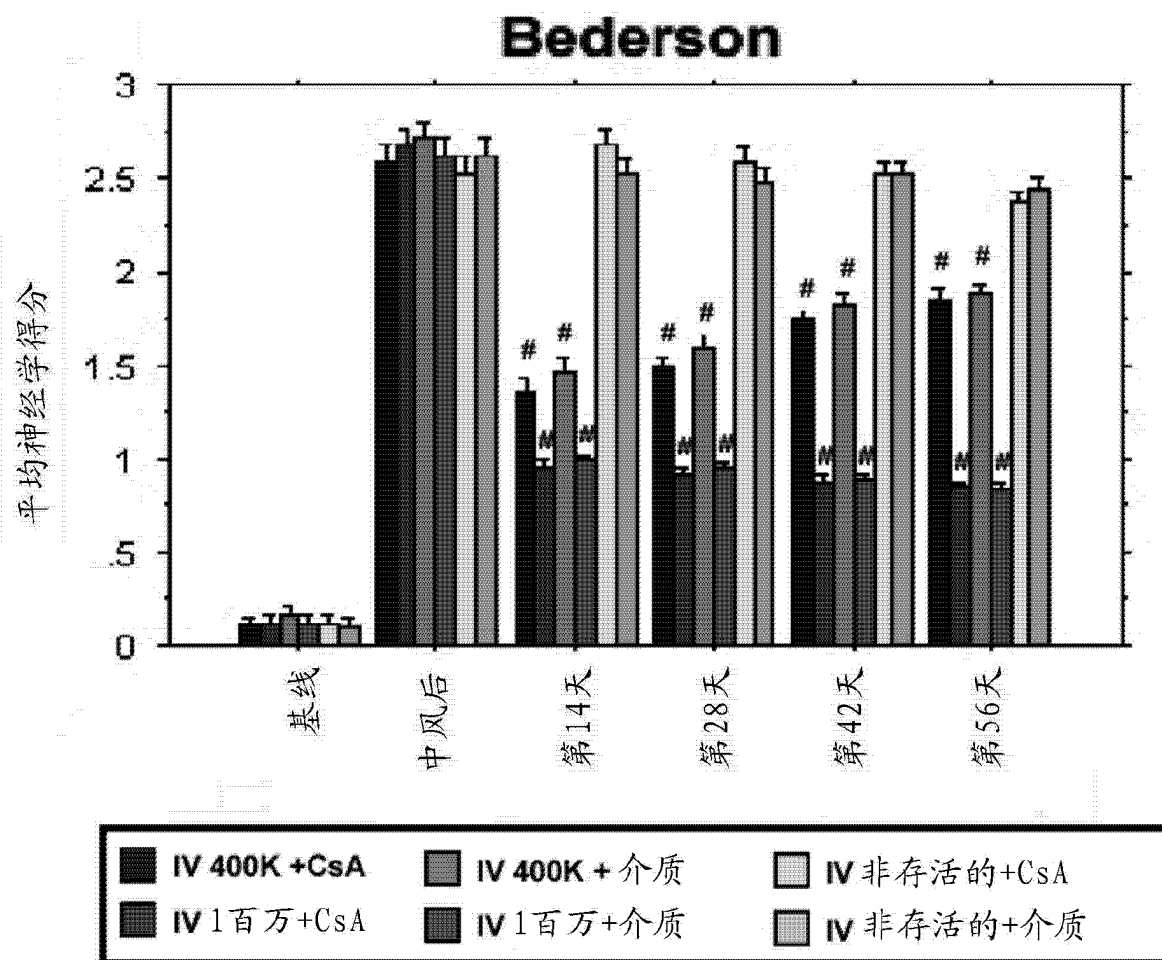


图 8

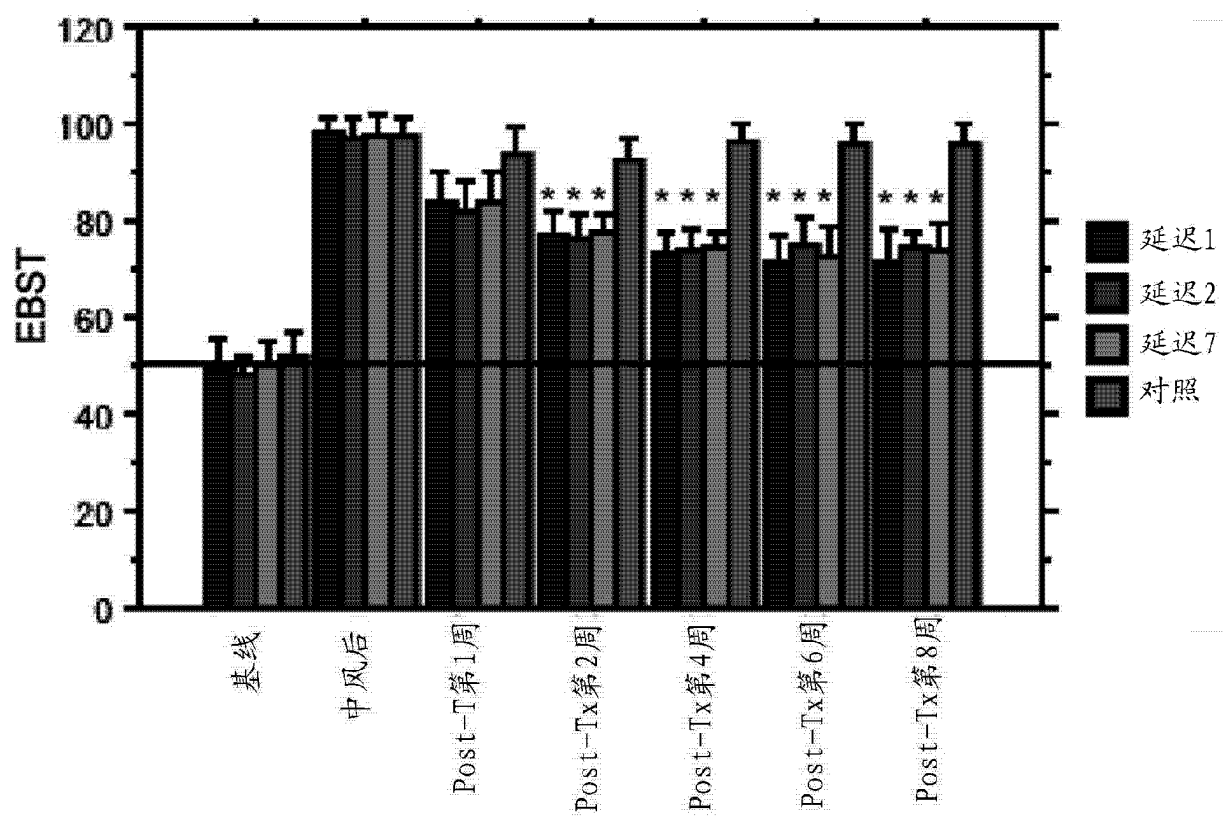


图 9

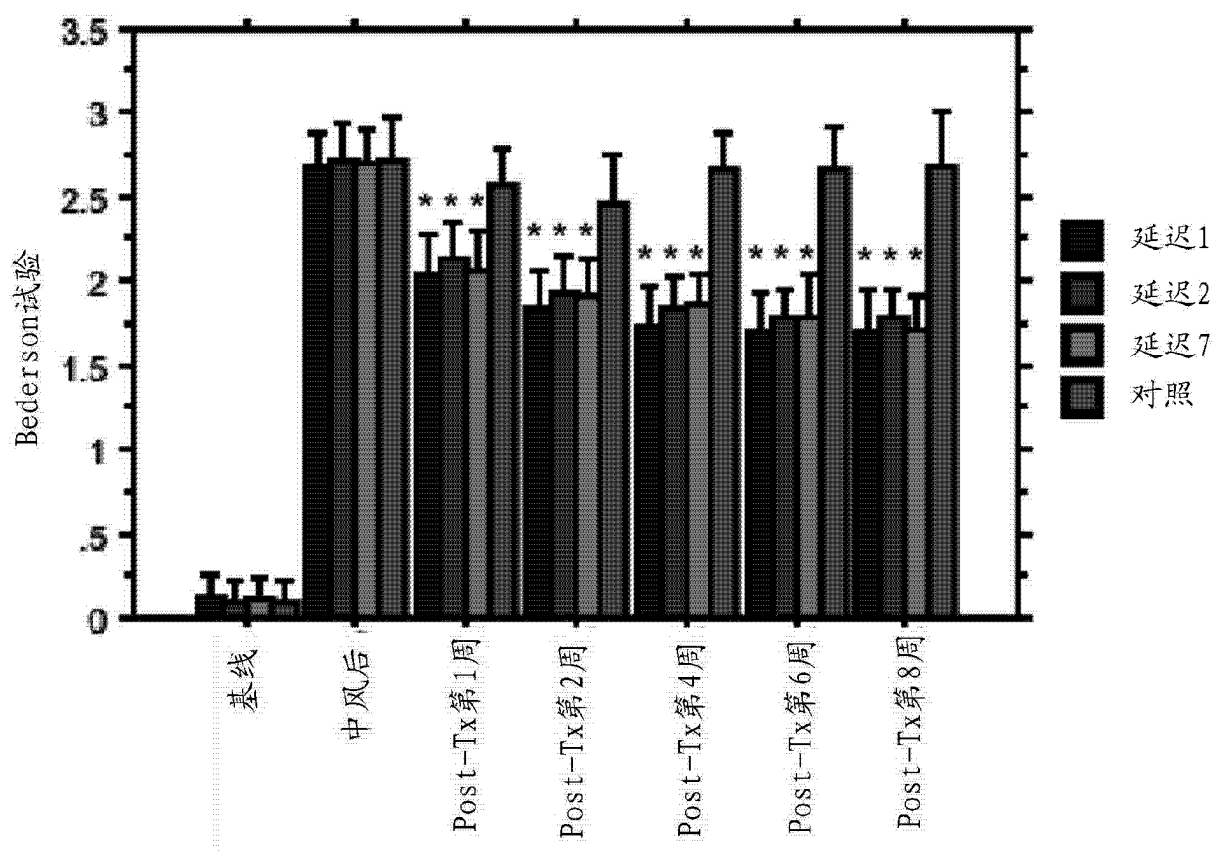


图 10

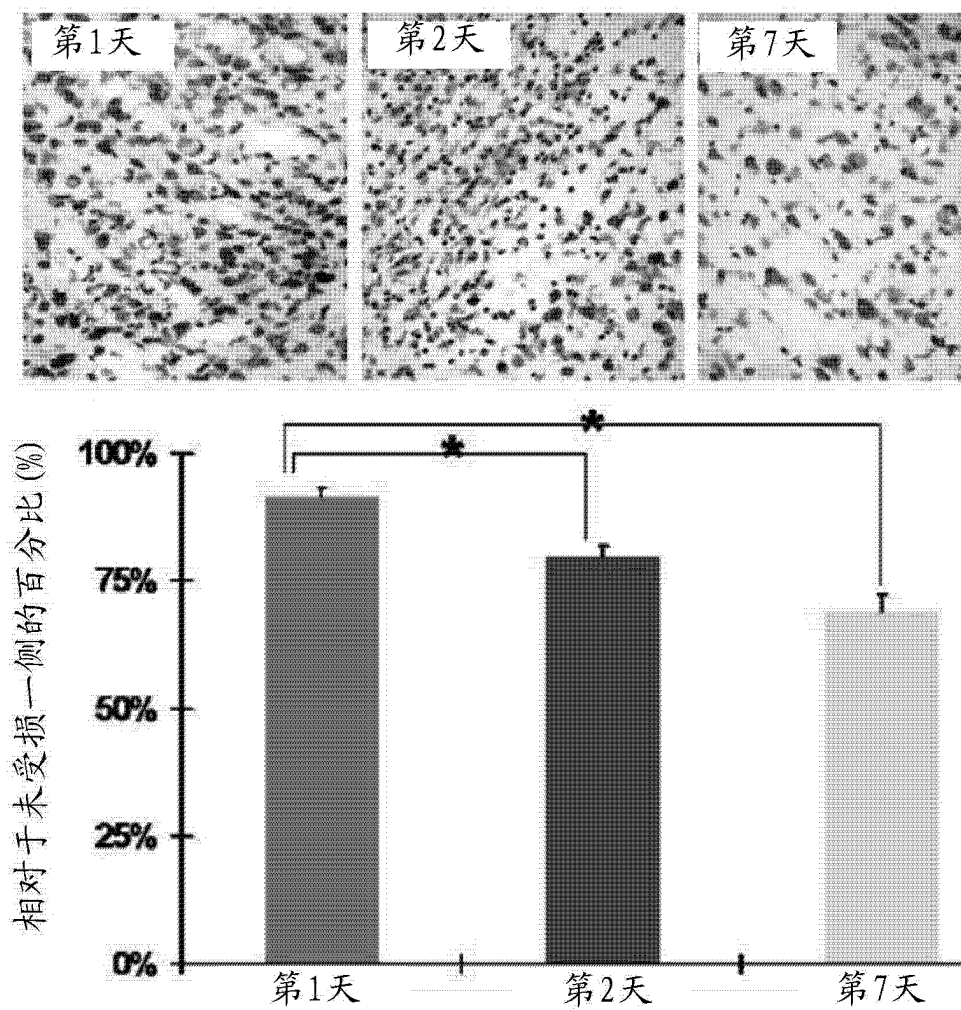


图 11

Abstract

The invention relates to the treatment of MAPC therapeutics without adjunctive immunosuppressive treatment. The invention relates to the treatment of various injuries, disorders, dysfunctions, diseases, and the like with MAPCs, without the need for adjunctive immunosuppressive treatment.

Abstract Fig.:

