



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105658217 B

(45) 授权公告日 2021. 03. 19

(21) 申请号 201480037499.1	(72) 发明人 孙兆黎 乔治·梅尔维尔·威廉姆斯 青·林
(22) 申请日 2014.04.29	
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 105658217 A	(74) 专利代理机构 北京同达信恒知识产权代理 有限公司 11291
(43) 申请公布日 2016.06.08	代理人 黄志华 石磊
(30) 优先权数据 61/816,827 2013.04.29 US 61/907,624 2013.11.22 US	(51) Int.Cl. A61K 31/395 (2006.01) A61K 31/4433 (2006.01) A61K 38/19 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01) A61P 17/02 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2015.12.29	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2014/035793 2014.04.29	(56) 对比文件 W0 2011072216 A2,2011.06.16
(87) PCT国际申请的公布数据 W02014/179266 EN 2014.11.06	审查员 孙迎琪
(73) 专利权人 约翰霍普金斯大学 地址 美国马里兰州	权利要求书2页 说明书23页 序列表3页 附图31页

(54) 发明名称
经由自体干细胞动员的创伤愈合

(57) 摘要
本发明涉及创伤愈合领域。更具体地,本发明提供了可用于经由自体干细胞动员改善创伤愈合的方法和组合物。在一个实施方式中,用于改善患者的创伤愈合的方法包括向所述患者施用治疗有效量的干细胞动员剂和低剂量的免疫抑制剂。

1. 一种治疗有效量的干细胞动员剂和免疫抑制剂在制备用于改善患者的创伤愈合的药物中的用途，

其中，所述免疫抑制剂为他克莫司，并且所述他克莫司以0.004mg/kg至0.008mg/kg的范围施用给所述患者，

并且其中，所述创伤愈合不涉及器官移植。

2. 如权利要求1所述的用途，其中所述干细胞动员剂选自由AMD3100、AMD3465、TG-0054、BKT140、G-CSF、GM-CSF、SDF-1和SCF构成的组。

3. 如权利要求1所述的用途，其中所述干细胞动员剂为CXCR4拮抗剂。

4. 如权利要求3所述的用途，其中所述干细胞动员剂为AMD3100。

5. 如权利要求1所述的用途，其中所述免疫抑制剂以低剂量施用。

6. 如权利要求1所述的用途，其中所述干细胞动员剂和所述免疫抑制剂为相同的化合物。

7. 一种治疗有效量的干细胞动员剂和低剂量的免疫抑制剂在制备用于改善患者的创伤愈合的药物中的用途，

其中，所述免疫抑制剂为他克莫司，并且所述低剂量为0.004mg/kg至0.008mg/kg，

并且其中，所述创伤愈合不涉及器官移植。

8. 一种治疗有效量的AMD3100和低剂量的他克莫司在制备用于改善患者的创伤愈合的药物中的用途，

其中，所述低剂量为0.004mg/kg至0.008mg/kg，

并且其中，所述创伤愈合不涉及器官移植。

9. 一种治疗有效量的药剂和低剂量的免疫抑制剂在制备用于改善患者的创伤愈合的药物中的用途，所述药剂动员CD34⁺干细胞和/或CD133⁺干细胞，

其中，所述免疫抑制剂为他克莫司，并且所述低剂量为0.004mg/kg至0.008mg/kg，

并且其中，所述创伤愈合不涉及器官移植。

10. 如权利要求9所述的用途，其中动员CD34⁺干细胞和/或CD133⁺干细胞的所述药剂为AMD3100。

11. 一种低剂量的他克莫司在制备用于改善患者的创伤愈合的药物中的用途，所述改善患者的创伤愈合包括以足以将干细胞动员至接受者的外周血的量向所述患者施用低剂量的他克莫司，

其中，所述低剂量为0.004mg/kg至0.008mg/kg，

并且其中，所述创伤愈合不涉及器官移植。

12. 如权利要求11所述的用途，所述药物还包括第二药剂，以将干细胞动员至所述外周血。

13. 如权利要求12所述的用途，其中所述第二药剂为干细胞动员剂，所述干细胞动员剂选自由AMD3100、AMD3465、TG-0054、BKT140、G-CSF、GM-CSF、SDF-1和SCF构成的组。

14. 如权利要求12所述的用途，其中所述第二药剂为干细胞动员剂，所述干细胞动员剂为CXCR4拮抗剂。

15. 如权利要求12所述的用途，其中所述第二药剂为干细胞动员剂，所述干细胞动员剂为AMD3100。

16. 一种低剂量的他克莫司在制备用于改善患者的创伤愈合的药物中的用途, 所述改善患者的创伤愈合包括以足以将CD34⁺干细胞和/或CD133⁺干细胞动员至外周血的量向所述患者施用低剂量的他克莫司,

其中, 所述低剂量为0.004mg/kg至0.008mg/kg,

并且其中, 所述创伤愈合不涉及器官移植。

17. 一种他克莫司在制备用于改善患者的创伤愈合的药物中的用途, 所述改善患者的创伤愈合包括以0.004mg/kg至0.008mg/kg的剂量向所述患者施用他克莫司, 其中所述剂量范围足以将CD34⁺干细胞和/或CD133⁺干细胞动员至外周血, 并且其中所述创伤愈合不涉及器官移植。

18. 如权利要求1-17中任一项所述的用途, 其中所述患者为糖尿病患者或者遭受烧伤。

经由自体干细胞动员的创伤愈合

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2013年11月22日提交的美国临时申请第61/907,624号以及于2013年4月29日提交的美国临时申请第61/816,827号的权益,所述美国临时申请中的每一个通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及创伤愈合领域。更具体地,本发明提供了可用于经由自体干细胞动员改善创伤愈合的方法和组合物。

[0004] 以电子方式提交的材料通过引用并入

[0005] 本申请包含序列表。序列表已经以标题为“P12415-03_ST25.txt”的ASCII文本文件经由EFS-Web以电子方式提交。序列表的大小为2,713字节,并且创建于2014年4月24日。据此通过引用整体并入。

背景技术

[0006] 在美国每年有多于125万人遭受烧伤以及650万人具有由压力、静脉淤滞或糖尿病引起的慢性皮肤溃疡(Singer and Clark,1999)。这些病况的治疗仍不完善并且费用昂贵。希望干细胞疗法可以证明是有益的,因为已经越来越明确确定的是干细胞在创伤愈合中起着重要作用。例如,已经显示,人工皮肤替代物在将干细胞掺入这些膜时更有效。烧伤愈合的质量得到改善(Leonardi等,2012),减少了瘢痕形成并且重建皮肤附属器(Mansilla等,2010;Tamai等,2011;Huang和Burd,2012)。慢性静态糖尿病溃疡的治疗已经通过将患者的骨髓(BM)间充质干细胞(MSC)与埋入可生物降解的胶原膜(ColadermR)的自体皮肤成纤维细胞组合使用而得到改善(Vojtassak等,2006)。已经显示来自胚胎来源和出生后来源的BM细胞修复胶原合成中的遗传缺陷和基膜缺陷,从而促进皮肤创伤愈合(Chino等,2008;Tolar等,2009;Fujita等,2010)。最近,临床试验发现在患有由缺乏Col 7引起的发泡皮肤病症的人中的同种异体的全BM移植致使皮肤完整性恢复以及Col 7在基膜中表达(Wagner等,2010)。

[0007] 许多基础的细胞研究也已经强调皮肤与BM之间的可塑关系。在具有造血谱系和间充质谱系的真皮中的成纤维细胞样细胞来源于BM,并且这些细胞的数目在皮肤创伤之后增加(Fathke等,2004;Ishii等,2005)。在BM移植之后,供体细胞已经替换一些角化细胞并且已经在表皮中存留至少3年(Korbling等,2002)。BM细胞有助于胎儿皮肤形成,因为将绿色荧光蛋白(GFP) BM细胞输注入小鼠的子宫中导致GFP-阳性细胞在形成的皮肤中积聚,所述皮肤特别是与形成毛囊相关的(Chino等,2008)。

[0008] 这些大量的研究记录BM干细胞在创伤愈合中的重要性并且提出了令人向往的可能性:可利用细胞过程制定实用的治疗方案来治疗需要立即治疗的大量全皮层烧伤和大量软组织损伤。通过利用干细胞改善创伤修复的可能性使用NIH登记簿列出的基于MSC的疗法通过存在的90个临床试验得以证实(Cerqueira等,2012)。

[0009] 为避免价格昂贵且耗时的内源干细胞的制备,我们计划在这些研究中将内源干细胞与AMD3100和他克莫司(Tacrolimus)药理动员。已经显示AMD3100能在动物和人中将来自BM的内源干细胞驱向血流。低剂量的他克莫司证明具有协同效应,组合治疗有望成为将干细胞呈递至损伤区域的简单、安全且迅速的方法。在此,我们在小鼠和大鼠中治愈全皮层皮肤创伤来检验这一假设。发现该治疗能够将完全愈合的时间减少25%,我们描绘了创伤中干细胞/祖细胞和相关细胞因子/生长因子的特性并且使用谱系示踪证实动员的CD133+干细胞在创伤区的血管生成和毛囊再生中的重要作用。

发明内容

[0010] 本发明至少部分基于这样的发现:干细胞动员剂和免疫抑制剂可被用于促进或改善患者中的创伤愈合。事实上,如本发明的实施方案中所述的内源性干细胞的药理学扩增是吸引人的,因为它提供了向损伤区呈递干细胞的简单、迅速的方法。

[0011] 如本文所述,本发明人假设:用AMD3100(即普乐沙福(plerixafor))与低剂量的他克莫司组合动员骨髓干细胞将在一些实施方式中促进再上皮化以及在进一步实施方式中促进毛囊的再生,从而产生较迅速的正常皮肤的恢复。为检验该假设,我们首先检查普乐沙福、他克莫司或双重药物对全皮层皮肤切除的小鼠模型中的创伤愈合的效果。第二,我们描述了创伤区中干细胞/祖细胞和相关的细胞因子/生长因子的特征。最后,我们通过使用谱系示踪来评估动员的CD133+干细胞对创伤区的血管生成和毛囊再生的贡献。

[0012] 更具体地,在特定实施方式中,低剂量而非高剂量的他克莫司(FK-506)经由将产生SDF-1的巨噬细胞募集至创伤区来改善创伤愈合。另外,用普乐沙福与低剂量的他克莫司组合动员骨髓干细胞加速创伤愈合、促进再上皮化以及促进毛囊再生。事实上,低剂量的他克莫司与普乐沙福的组合通过促进皮肤组分的再上皮化和分化来改善创伤愈合。

[0013] 因此,在一方面,本发明提供了可用于改善患者的创伤愈合的方法和组合物。在一个实施方式中,用于改善患者的创伤愈合的方法包括向患者施用治疗有效量的干细胞动员剂和免疫抑制剂。在一些实施方式中,干细胞动员剂选自AMD3100、AMD3465、TG-0054、BKT140、G-CSF、GM-CSF、SDF-1和SCF构成的组。在具体实施方式中,干细胞动员剂为CXCR4拮抗剂。在更具体的实施方式中,干细胞动员剂为AMD3100。在其它实施方式中,免疫抑制剂选自他克莫司、环孢菌素、莫罗单抗-CD3(Orthoclone OKT3)、麦考酚酯和西罗莫司构成的组。在具体实施方式中,免疫抑制剂为他克莫司。在特定实施方式中,以低剂量施用免疫抑制剂。在某些实施方式中,干细胞动员剂和免疫抑制剂为相同化合物。

[0014] 在另一实施方式中,改善患者的创伤愈合的方法包括向患者施用治疗有效量的干细胞动员剂和低剂量的免疫抑制剂。在更具体的实施方式中,改善患者的创伤愈合的方法包括向患者施用治疗有效量的AMD3100和低剂量的他克莫司。在甚至更具体的实施方式中,低剂量的他克莫司为约0.01mg/kg至约0.05mg/kg。

[0015] 本发明还提供改善患者的创伤愈合的方法,其包括向患者施用治疗有效量的药剂(agent)和低剂量的免疫抑制剂,所述药剂动员CD34⁺和/或CD133⁺干细胞。在某些实施方式中,动员CD34⁺和/或CD133⁺干细胞的药剂为AMD3100并且免疫抑制剂为他克莫司。

[0016] 在另一方面,药剂充当干细胞动员剂和免疫抑制剂两者。在一个实施方式中,改善患者的创伤愈合的方法包括以足以将干细胞动员至接受者的外周血的量向患者施用低剂

量的他克莫司。在具体实施方式中,低剂量的他克莫司为约0.01mg/kg至约0.05mg/kg。在另一实施方式中,低剂量的他克莫司导致约0.1ng/ml至约10ng/ml的血液浓度范围。在更具体的实施方式中,低剂量的他克莫司为约0.01mg/kg至约0.05mg/kg。在另一实施方式中,低剂量包括约0.1 μ g/kg至1 mg/kg。

[0017] 在某些实施方式中,所述方法还包括施用第二药剂以将干细胞动员至外周血。在一个实施方式中,干细胞动员剂选自AMD3100、AMD3465、TG-0054、BKT140、G-CSF、GM-CSF、SDF-1和SCF构成的组。在具体实施方式中,干细胞动员剂为CXCR4拮抗剂。在更具体的实施方式中,干细胞动员剂为AMD3100。

[0018] 本发明还提供改善患者的创伤愈合的方法,其包括以足以将CD34⁺和/或CD133⁺干细胞动员至外周血的量向患者施用低剂量的他克莫司。在具体实施方式中,低剂量的他克莫司为约0.05mg/kg至约0.5mg/kg (在啮齿动物中,所述量可由本领域普通技术人员转化成人类剂量)。

[0019] 在另一实施方式中,改善患者的创伤愈合的方法包括以约0.01mg/kg/天至约0.05mg/kg/天的剂量向患者施用他克莫司,其中所述剂量范围足以将CD34⁺和/或CD133⁺干细胞动员至外周血。在另一实施方式中,改善患者的创伤愈合的方法包括以约0.01mg/kg至约0.075mg/kg的剂量向患者施用他克莫司,其中所述剂量范围足以将CD34⁺和/或CD133⁺干细胞动员至外周血。在特定实施方式中,患者为糖尿病患者或者遭受烧伤。

[0020] 在某些实施方式中,低剂量的他克莫司导致约0.1ng/ml至约10ng/ml的血液浓度。在其它实施方式中,可施用低于约0.075mg/kg/天(口服)或低于约0.01mg/kg/天(IV)的任何量。

[0021] 用于免疫抑制的他克莫司的正常剂量为约0.1mg/kg/天至0.3mg/kg/天(口服)以及约0.01mg/kg/天至0.05mg/kg/天(IV)。在某些实施方式中,他克莫司的低剂量为约正常剂量的1/10,例如约0.01mg/kg/天至0.03mg/kg/天(口服)以及约0.001mg/kg/天至0.005mg/kg/天(IV)。

[0022] 本发明提供了在用于改善对象中创伤愈合的方法中使用的干细胞动员剂和免疫抑制剂,其中干细胞动员剂和免疫抑制剂以治疗有效量施用于对象,并且其中以本文所述的低剂量施用免疫抑制剂。动员CD34⁺和/或CD133⁺干细胞的药剂以及低剂量的免疫抑制剂用于治疗器官移植接受者的方法中,其中所述干细胞动员剂和所述免疫抑制剂以治疗有效量施用于接受者。干细胞动员剂和免疫抑制剂,其中动员CD34⁺和/或CD133⁺干细胞的药剂为AMD3100并且免疫抑制剂为他克莫司。根据此处所述的任一实施方式中所使用的干细胞动员剂和免疫抑制剂,其中所述干细胞动员剂和所述免疫抑制剂为相同化合物。

附图说明

[0023] 图1示出用低剂量的他克莫司和AMD3100组合治疗的小鼠中加速的创伤愈合。(a) 模型:在第0天,在C57BL/6或CD133⁺/C-L小鼠中创建四个圆形切除创伤。(b) 创伤测量。使用Adobe Photoshop软件测定创伤区域。(c) 早期愈合。小鼠(n=6)中代表性的创伤照片在第5天开始显示出显著差异。(d) 小鼠(n=6)中创伤闭合的定量分析。*p<0.05。(e) 在第5天时创伤的H&E显微照片。比例尺:200 μ m。(f) 用夹板固定的(splinted)创伤模型。(g) 在用夹板固定的小鼠中皮肤创伤愈合的肉眼可见分析。(h) 在用夹板固定的小鼠(n=6)中创伤闭合的

定量分析。 $*p<0.05$ 。所有数据表示平均值 $\pm$ SEM。

[0024] 图2示出在用双重药物治疗治疗的小鼠的愈合皮肤中毛囊再生增加以及瘢痕形成减少。(a)再上皮化创伤的代表性肉眼可见的外观(第15天)。(b)来自瘢痕中部的代表性显微镜可见的H&E-染色切片显示愈合创伤内新的毛囊。瘢痕区通过虚线描画出轮廓。两条竖直的点线有助于区别具有与在盐水处理组中愈合的瘢痕区的长度相同的区域。比例尺:200 μ m。(c)用Masson三色法染色的相邻切片。(d)在创伤后15天双重药物治疗的动物的代表性照片显示出在再上皮化创伤中毛发生长。(e)在愈合的瘢痕内(2mm)毛囊的定量。数据表示平均值 $\pm$ SEM($n=9$)。 $*p<0.01$ 。

[0025] 图3示出用双重药物治疗募集BM干细胞。(a)在损伤之后第5天通过流式细胞术定量分析外周血中的谱系阴性(Lin⁻)c-Kit⁺、CD34⁺和CD 133⁺细胞。数据表示平均值 $\pm$ SEM($n=3$)。 $*p<0.05$ 。(b)在损伤之后第5天对来自受伤小鼠的组织切片中的干细胞标志物c-Kit、CD34和CD133以及内皮细胞标志物CD31进行免疫荧光染色。框区显示在较高放大倍数下,接受双重药物治疗的小鼠具有管状排列的CD133细胞,其与CD31共染色。细胞核被DAPI染成蓝色。代表性照片为每组 $n=3$ 的个体受损皮肤样本。epi,表皮;we,创伤边缘。比例尺:200 μ m。

[0026] 图4示出SDF-1和CD133在用双重药物治疗治疗的小鼠的皮肤创伤中的表达增加。在损伤后5天对受伤皮肤中的肉芽组织进行半定量RT-PCR分析。(a)吸引子分子SDF-1的mRNA表达在低剂量的他克莫司治疗组中显著增加,并在双重治疗组中进一步升高。(b)干细胞标志物CD133mRNA水平在双重治疗组的创伤中也显著较高,所述水平平行SDF-1基因表达。所有数据表示平均值 $\pm$ SEM($n=3$)。 $*p<0.05$ 。(c)在损伤之后5天对SDF-1和F4/80(巨噬细胞的标志物)进行双重免疫荧光染色。epi,表皮;we,创伤边缘。比例尺:200 μ m。

[0027] 图5示出用双重药物治疗治疗的受伤小鼠中促血管生成因子表达增加。(a)肉芽组织的半定量PCR分析(第5天)显示VEGF、bFGF和HGF的mRNA上调。(b)通过计算生长因子与 β -肌动蛋白比率来确定mRNA表达增加的图示。值表示平均值 $\pm$ SEM($n=3$)。 $*p<0.05$ 。(c)双重荧光染色显示:在肉芽组织(第5天)中,大部分表达HGF的细胞与内皮标志物CD31共染色,并且这些细胞在双重治疗组中的丰度更高。较下行中的图为对于 α -SMA的染色并且显示这些产生基质的细胞的丰度,平行于CD31的发现。Epi,表皮;we,创伤边缘。比例尺:200 μ m。

[0028] 图6示出CD133⁺干细胞在双重治疗组的CD133⁺/C-L小鼠中生成毛囊和上皮。(a)分析在CD133-谱系中他莫昔芬诱导的Cre-依赖性GFP表达的方案。(b)未受损的小鼠皮肤组织显示毛囊中显著的GFP和CD133(lacZ⁺)表达。(c)在损伤后第15天CD133⁺/C-L-Rosa26EGFP创伤皮肤的相同切片的的同时的GFP荧光、 β -半乳糖苷酶(lacZ)和H&E染色。(d)较高倍(higher power)显微照片。在框区中,箭头表示在GFP⁺(左图)、lacZ⁺(中图)和H&E(右图)染色的相同切片中的毛囊。箭头指向GFP和lacZ阳性上皮。epi,表皮;we,创伤边缘。比例尺:200 μ m。(e)在皮肤创伤愈合中组合治疗的治疗机制的图示。

[0029] 图7示出AMD3100与低剂量的他克莫司的治疗提高受伤大鼠中创伤闭合的速度。(a)全皮层切除创伤的大鼠模型的示例性照片。以指定时间间隔测量5-mm打孔活组织检查的创伤区直至到达完全闭合。(b)大鼠皮肤创伤愈合的动力学分析。显示出 $n=6$ 只动物/组的代表性图像。(c)显示出在每个时间点相对于最初创伤区的创伤区百分数。数据表示 $n=6$ 只动物/组的平均值 $\pm$ SEM。 $*p<0.05$ 双重治疗的大鼠相对于媒介物治疗的大鼠。

[0030] 图8示出高剂量的他克莫司和AMD3100对小鼠皮肤创伤愈合的影响。(a)皮肤切除

创伤愈合的动力学分析。在指定时间拍照创伤部位。代表性照片是 $n=3$ 或4只动物/组的照片。(b)在每个时间点处与最初创伤区相比创伤区百分比的变化。数据表示 $n=3$ 或4只动物/组的平均值 $\pm$ SEM。与用盐水处理的小鼠中的创伤闭合相比,定量评价未显示出用他克莫司(1.0mg kg^{-1})或AMD3100(5.0mg kg^{-1})治疗的小鼠中的创伤闭合的显著差异。

[0031] 图9示出双重药物治疗刺激创伤后大鼠皮肤中的毛囊再生并降低瘢痕形成。全皮层皮肤切除的大鼠模型如上所述。(a)在创伤后第20天通过H&E(左图和中图)和Masson三色法(右图)染色评估毛囊再生。显示出每组 $n=12$ 个个体皮肤样本的代表性图像:瘢痕用虚线描画出轮廓,并且箭头指向愈合瘢痕内的新生毛囊。比例尺: $200\mu\text{m}$ 。(b)大鼠愈合的瘢痕(2mm)或未受损的皮肤内再生的毛囊的定量。数据表示每组 $n=12$ 个个体样本的平均值 $\pm$ SEM。 $*p<0.05$ 。

[0032] 图10示出CD133+干细胞在双重治疗组的CD133+/C-L小鼠的受伤皮肤中生成血管。在创伤后第5天对CD133+/C-L创伤的相同切片进行同时的GFP-荧光(上图)、 β -半乳糖苷酶(中图)和H&E染色(下图),表明CD133+祖细胞为新形成的毛细血管的来源之一,特别是在双重治疗的CD133+/C-L小鼠中。右边显示出在较高放大倍数下的框区。箭头指向相同切片中(GFP+,上图)、(lacZ+中图)、(H&E,下图)的毛细血管。epi,表皮;we,创伤边缘。比例尺: $200\mu\text{m}$ 。

[0033] 图11示出在用盐水治疗、单独用低剂量的他克莫司(0.1mg/kg/剂量)治疗、AMD3100(1.0mg/kg/剂量)单一疗法或者低剂量的他克莫司与AMD3100的组合治疗之后烧伤皮肤的总的和显微镜可见的时程照片。在患糖尿病的大鼠($n=4$ 或5)中的皮肤创伤的代表性照片显示出组合的疗法对增强创伤愈合的显著效果。

[0034] 图12示出用低剂量的他克莫司和AMD3100的组合疗法改善小鼠烧伤之后的创伤闭合。(a)在用盐水治疗、单独用低剂量的他克莫司(0.1mg/kg/剂量)治疗、AMD3100(1.0mg/kg/剂量)单一疗法或者低剂量的他克莫司与AMD3100的组合治疗之后烧伤皮肤的总的和显微镜可见的时程照片。在烧伤皮肤的小鼠($n=7$)中的代表性照片显示出组合的疗法对增强烧伤创面的显著效果。(b)在烧伤之后连续多天定量创伤区。显示出平均值 $\pm$ SEM($n=7$)。 $*p<0.05$ 双重治疗的小鼠对于媒介物治疗的小鼠。(c)用Kaplan-Meier存活分析来分析创伤闭合($n=7$)。

[0035] 图13示出双重药物治疗降低烧伤后的瘢痕形成。显示出在烧伤后60天盐水和双重药物-治疗的小鼠的瘢痕尺寸(1.44cm^2)($n=3$);照片(左图)和定量(右图)。实线表示瘢痕边界。 $*P<0.05$ 。

具体实施方式

[0036] 应理解本发明不限于本文所述的特定方法和组分等,因为这些可以变化。还应理解本文使用的术语仅用于描述特定实施方式的目的,并且不意为限制本发明的范围。应注意,如本文以及在所附权利要求中使用的,单数形式“一个/一种(a/an)”和“所述”包括复数指代物,除非上下文中另外清楚地指定。因此,例如,提及的“蛋白质”是指一种或多种蛋白质,并且包括本领域技术人员已知的它们的等同物等。

[0037] 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相同意义。描述了具体方法、装置和材料,但是与本文所述的那些方

法和材料类似或等同的任何方法和材料可用于实施或测试本发明。

[0038] 本文引用的所有出版物据此通过引用并入,所述出版物包括所有期刊论文、书籍、手册、公布的专利申请以及公布的专利。另外,提供了在说明书、实施例和所附权利要求中使用的某些术语和短语的意义。定义在本质上并非意在限制性的并且用于提供本发明的某些方面的更清楚的理解。

[0039] I、定义

[0040] “药剂”是指这样的所有材料,所述材料可以用作药物组合物或用在药物组合物中或者可以为化合物,诸如小的合成的或天然来源的有机化合物、核酸、多肽、抗体、片段、亚型、变体或为了此类目的单独使用的其它材料,所有依照本发明。

[0041] “拮抗剂”是指下调(例如,阻抑或抑制)蛋白质的至少一种生物活性的药剂。拮抗剂可以为抑制或降低蛋白质与另一分子之间的相互作用的化合物,所述另一分子为例如,靶标肽或酶底物。拮抗剂也可以为下调基因表达或降低存在的表达蛋白质的量的化合物。

[0042] “造血作用”是指血细胞形成和内稳态的高度协调过程。出生前,造血作用发生在卵黄囊,然后肝脏以及最终骨髓中。在正常成人中,它发生在骨髓和淋巴组织中。所有血细胞源自多能干细胞。多能细胞分化成定型至三种、两种或一种造血分化途径的干细胞。然而,这些干细胞中没有一个是形态学上可区别的。

[0043] 术语“免疫抑制剂”是指抑制、减缓或逆转免疫系统活性的药剂。免疫抑制剂通过直接地(例如,通过作用于免疫细胞)或间接地(通过作用于其它调节细胞)阻抑响应的免疫细胞(包括,例如,T细胞)的功能起作用。

[0044] 术语“干细胞”和“造血干细胞”在本文可互换使用。干细胞通过两个重要的特征区别于其它细胞类型。首先,干细胞为能够通过细胞分裂、有时是在长期失活之后自我更新的非特化细胞。第二,在特定生理或实验条件下,干细胞可被诱导变成具有特定功能的组织或器官特异性细胞。在一些器官中,如肠和骨髓,干细胞有规律地分裂以修复和替代磨损或受损组织。然而,在其它器官中,如胰脏和心脏,干细胞仅在特定条件下分裂。

[0045] 术语“干细胞”可指能够分化成包括红细胞、白细胞和血小板在内的所有血细胞的多能干细胞。例如,本发明中使用的“造血干细胞”或“干细胞”不仅包含在骨髓中,而且还包含在脐带血来源的细胞中。

[0046] 如本文所述,“干细胞动员剂”、“造血干细胞或祖细胞的动员剂”或“动员”(互换使用)是指任何化合物,无论它是合成的或天然来源的小的有机分子或多肽,如生长因子或集落刺激因子或它们的活性片段或模拟物、核酸、碳水化合物、抗体或起到增强干细胞从骨髓迁移到外周血的任何其它药剂。干细胞动员剂可以增加外周血中造血干细胞或造血祖细胞/前体细胞的数目,从而允许用于创伤愈合的干细胞的更可达的来源。在特定实施方式中,干细胞动员剂是指动员CD34+和/或CD133+干细胞的任何药剂。在其它实施方式中,干细胞动员剂破坏表达CXCR4的细胞的CXCL12(SDF-1)-介导的化学诱导。

[0047] 待被本发明方法治疗的“患者”、“对象”或“宿主”是指人或非人动物,如灵长类、哺乳动物和脊椎动物。

[0048] “小分子”是指分子量小于约3千道尔顿(kDa)、小于约1.5千道尔顿、或小于约1千道尔顿的组合物。小分子可以为核酸、肽、多肽、模拟肽、碳水化合物、脂质或其它有机(含有碳)或无机分子。“小的有机分子”为分子量小于约3千道尔顿、小于约1.5千道尔顿或小于约

1kDa的有机化合物(或者与无机化合物(例如,金属)复合的有机化合物)。

[0049] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”、“治疗(treat)”等是指获得期望的药理学和/或生理学效果。术语也用于施用“治疗有效量”的药剂(例如,干细胞动员剂和/或免疫抑制剂)的上下文中。效果在完全或部分防止特定结果、疾病或其症状方面可以为预防性的,和/或在部分或完全治愈疾病和/或归于疾病的不利影响方面可以为治疗性的。如本文所用,“治疗”涵盖在对象中尤其是人类中的疾病的任何治疗,并包括:(a)防止在可能有患病倾向但尚未诊断为患有该疾病的对象中的疾病发生;(b)抑制疾病,即阻止其发展;以及(c)缓解疾病,例如,使疾病逆转,例如,完全或部分去除疾病症状。在特定实施方式中,在促进或改善患者的创伤愈合的上下文中使用所述术语。

[0050] II、干细胞动员剂

[0051] 本发明涉及用干细胞动员剂与免疫抑制剂组合治疗创伤。通常,干细胞动员剂包括但不限于小的有机分子、多肽、核酸和碳水化合物。

[0052] 在多肽的情况下,干细胞动员剂可以包括细胞因子、集落刺激因子、蛋白酶或趋化因子。更具体地,细胞因子可以包括但不限于白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-3(IL-3)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-11(IL-11)、白细胞介素-7(IL-7)和白细胞介素-12(IL-12)。

[0053] 在集落刺激因子的情况下,干细胞动员剂可以包括但不限于粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、干细胞因子、FLT-3配体或它们的组合。

[0054] 在另一实施方式中,蛋白酶干细胞动员剂可以包括但不限于金属蛋白酶(如MMP2或MMP9)、丝氨酸蛋白酶(如组织蛋白酶G或弹性蛋白酶)、半胱氨酸蛋白酶(如组织蛋白酶K)和二肽基肽酶-1(DDP-1或CD26)。

[0055] 在另一实施方式中,趋化因子干细胞动员剂可以包括但不限于CXCL12、IL-8、Mip-1 α 和Gro β 。

[0056] 在另一实施方式中,核酸干细胞动员剂为DNA或RNA分子。在更具体的实施方式中,核酸可为小干扰RNA(siRNA)分子或CXCL12特异的反义分子。

[0057] 在碳水化合物的情况下,干细胞动员剂可为硫酸化的碳水化合物,可以包括但不限于岩藻多糖和硫酸化的葡聚糖。岩藻多糖为由摩尔比例为1:1.23:0.36的L-岩藻糖、硫酸盐和乙酸盐组成的碳水化合物并且可分离自太平洋褐藻岩藻(*Fucus evanescens*)。参见Bilan等,337(8) CARBOHYDRATE RESEARCH 719-30(2002)。硫酸化的葡聚糖是指一系列具有可变的硫酸化模式的多糖。参见,例如Pomin等,15(12) GLYCOBIOLOGY 1376-1385(2005); Melo等,279(2) J. BIOL. CHEM. 20824-20835(2004);以及Farias等,275(38) J. BIOL. CHEM. 29299-29307(2000)。

[0058] 干细胞动员剂还可以包括但不限于AMD3100;间质细胞来源的因子(SDF-1);SDF-1类似物(例如,CTCE-0214(Chemokine Therapeutics Corp.));抗-SDF-1抗体;环磷酰胺;干细胞因子(SCF);非格司亭;安西司亭;骨髓祖细胞抑制因子-1(MPIF-1)(参见美国专利公布号20080274109);以及极晚期抗原(VLA-4)拮抗剂(例如, α -4整合素拮抗剂,如抗体,包括那他珠单抗或抗-磷酸-整合素 α 4(Ser988)、克隆6.33(Upstate Cell Signaling Solutions)或肽(例如,苯基乙酰基-leu-asn-phe-D-脯氨酸酰胺(Cytel Corp., San Diego

Calif.)))。

[0059] 在特定实施方式中,干细胞动员剂包括CXCR4拮抗剂。在具体实施方式中,CXCR4拮抗剂为TG-0054(TaiGen Biotechnology有限公司(台北,台湾))。在其它具体实施方式中,CXCR4拮抗剂为AMD3465。在其它实施方式中,CXCR4拮抗剂为AMD3100。AMD3100(1,1'-[1,4-亚苯基双(亚甲基)]双-1,4,8,11-四氮杂环-十四烷)为CXCR4趋化因子受体的对称的双环拉胺(bicyclam)、原型非肽拮抗剂。参见美国专利第6,835,731号和第6,825,351号。术语“AMD”或“AMD3100”与普乐沙福、rINN、USAN、JM3100及其商品名Mozobil™互换使用。为了方便,术语“普乐沙福”始终用于指CXCR4拮抗剂。

[0060] 本发明还预期使用AMD3100的模拟物。位于衬在CXCR4受体的主要配体结合袋的TM-III、TM-IV、TM-V、TM-VI和TM-VII中在16个位置处的突变取代已经鉴别出以下三个酸残基作为AMD3100的主要相互作用点:Asp¹⁷¹(AspIV:20)、Asp²⁶²(AspVI:23)和Glu²⁸⁸(GluVII:06)。分子建模表明AMD3100的一个环拉胺环与TM-IV中的Asp¹⁷¹相互作用,然而其它环分别夹在来自TM-VI和TM-VII的Asp²⁶²和Glu²⁸⁸的羧酸基团之间。在一项研究中,发现在位置VII:06处仅引入Glu以及在位置VII:02处去除中和的Lys残基致使AMD3100的亲合力增加1000倍至CXCR4中AMD3100的亲合力的10倍内。因此,可设计模拟物,诸如例如,具有改善的口服生物利用度的肽拮抗剂或非肽拮抗剂以有效地且选择性地阻断CXCR4受体。

[0061] 在其它实施方式中,干细胞动员剂为BKT140(Biokin Therapeutics,Ltd.(雷霍沃特,以色列))。与用AMD3100获得的值相比,BKT140(4F-苯甲酰基-TN14003)结合并抑制具有高亲合力的CXCR4趋化因子受体,显示出IC₅₀为约1nmol/L。而且,与针对普乐沙福的IC₅₀值为51±17nmol/L相比,BKT140阻碍IC₅₀值在0.5nmol/L至2.5nmol/L内的CXCL12刺激的细胞迁移,这表明高的动员能力。参见Peled等,20CLIN.CANCER RES.469-79(2013)。

[0062] III、免疫抑制剂

[0063] 与干细胞动员剂相结合,免疫抑制剂可用于改善患者的创伤愈合。术语“免疫抑制剂”是指抑制、减缓或逆转免疫系统活性的药剂。免疫抑制剂通过直接地(例如,通过作用于免疫细胞)或间接地(通过作用于其它调解细胞)阻抑响应的免疫细胞(包括,例如T细胞)的功能起作用。

[0064] 许多免疫抑制剂可用于改善患者的创伤愈合。此类免疫抑制剂包括但不限于钙神经素抑制剂(例如,环孢菌素(CsA)及其类似物;ISA(TX)247和他克莫司(FK-506));硫唑嘌呤(AZ);吗替麦考酚酯(MMF);咪唑立宾(MZ);来氟米特(LEF);肾上腺皮质类固醇(也被称为肾上腺皮质激素类、皮质类固醇或类皮质激素)如泼尼松龙(prednisolon)和甲基泼尼松龙(methylprednisolon);西罗莫司(也被称为雷帕霉素);依维莫司;FK778;TAF-93;脱氧精胍菌素(DSG);和FTY720(化学名称:2-氨基-2-[2-(4-辛基苯基)乙基]-1,3-丙二醇盐酸盐)。

[0065] 在其它实施方式中,免疫抑制剂可包括但不限于环磷酰胺;15-脱氧精胍菌素(Gusperimus)、干扰素、柳氮磺吡啶、mimoribine、米索前列醇、抗-IL-2受体抗体、沙立度胺(thalidomide)、抗肿瘤坏死因子抗体、抗-CD2抗体、抗-CD147抗体、抗-CD4抗体、抗-CD8抗体和抗胸腺细胞球蛋白抗体。免疫抑制剂还包括 ORTHOCLONE® (OKT3) (Ortho Biotech,Raritan,N.J.)、SANDIMMUNE® ORAL(环孢菌素)(Sandoz

Pharmaceuticals, Hanover, N.J.)、**PROGRAF®** (他克莫司) (Fujisawa Pharmaceuticals, 迪尔菲尔德, III)、**CELLCEPT®** (麦考酚酯) (Roche Pharmaceuticals, 纳特利, N.J.) 和 **RAPAMUNE®** (西罗莫司) (Wyeth, 科利奇维尔, Pa.)。任选地, 免疫抑制剂为雷帕霉素、他克莫司、霉酚酸、硫唑嘌呤或环磷酰胺。

[0066] 免疫抑制剂还可包括白细胞介素-2 α -链阻断剂(例如, 巴利昔单抗和达珠单抗); 肌苷一磷酸脱氢酶的抑制剂(例如, 吗替麦考酚酯); 和二氢叶酸还原酶的抑制剂(例如, 甲氨蝶呤)。

[0067] 在特定实施方式中, 免疫抑制剂为他克莫司。他克莫司(也为FK-506或藤霉素)为在同种异体的器官移植之后主要用于降低患者免疫系统的活性以及因此降低器官排斥风险的免疫抑制药物。它通过T细胞降低白细胞介素-2 (IL-2) 的产生。还可将它用于治疗严重的特应性皮炎(湿疹)、骨髓移植之后严重难治性葡萄膜炎和皮肤病况白癜风的外用制剂中。它是1984年从含有细菌链霉菌 (*Streptomyces tsukubaensis*) 的日本土壤样品的发酵液中发现的23-元大环内酯物。药物以商品名 **Prograf®** (每天给定两次)、**Advagraf®** (缓释制剂, 允许每天给药一次) 和 **Protopic®** (外用制剂) 出售。在特定实施方式中, 低剂量的他克莫司与干细胞动员剂, 例如, 普乐沙福组合使用。显然, 在某些实施方式中, 低剂量的他克莫司可充当干细胞动员剂和免疫抑制剂。因此, 在此类实施方式中, 低剂量的他克莫司可用于改善创伤愈合。

[0068] IV、药物组合物和施用

[0069] 因此, 本发明的药物组合物可以包含有效量的干细胞动员剂和/或免疫抑制剂。本发明还预期使用具有干细胞动员剂和免疫抑制剂特征的药剂。例如, 他克莫司可以用作干细胞动员剂和免疫抑制剂。此外, 本发明预期使用有效量的至少一种干细胞动员剂和/或至少一种免疫抑制剂。如本文所用, 术语“有效的”意指足以实现期望的、预料的或预期的结果。更具体地, “有效量”或“治疗有效量”可互换使用并且指提供期望的“治疗”(本文定义的)或治疗效果所必需的干细胞动员剂和/或免疫抑制剂的量, 例如, 有效防止、减轻、治疗或改善疾病的症状或延长正治疗的对象的存活量, 所述干细胞动员剂和/或免疫抑制剂可能与另一治疗剂进一步组合。在特定实施方式中, 本发明的药物组合物以治疗有效量施用以改善患者的创伤愈合。如本领域普通技术人员所理解, 所需的精确量随对象而不同, 这取决于对象的年龄、一般状况、正治疗的病况的严重性、施用的特定化合物和/或组合物等。在任何单独病例中适当的“治疗有效量”可由本领域普通技术人员通过参考相关的文章和文献和/或通过使用常规实验来确定。

[0070] 在某些实施方式中, 免疫抑制剂(例如, 他克莫司)以低剂量施用。在本发明的上下文中, 短语他克莫司(与干细胞动员剂组合或单独的)的“低剂量(low dose)”或“低剂量(low dose amount)”指使用低于通常用于免疫抑制的免疫抑制剂(例如, 他克莫司)的特定量。在某些实施方式中, 低剂量为用于免疫抑制的量的约1/10。在其它实施方式中, 他克莫司的低剂量为用于免疫抑制的量的约1/2、约1/3、约1/4、约1/5、约1/6、约1/7、约1/8或约1/9。在进一步实施方式中, 他克莫司的低剂量比通常用于特定情形的量少约0.9倍、约0.8倍、约0.7倍、约0.6倍、约0.5倍、约0.4倍、约0.3倍、约0.2倍、约0.1倍、约0.09倍、约0.08倍、约0.07倍、约0.06倍、约0.05倍、约0.04倍、约0.03倍、约0.02倍、约0.01倍、约0.009倍、约0.08

倍或约0.07倍(即,通常的免疫抑制量可以不同)。在具体实施方式中,低剂量的免疫抑制剂(例如,他克莫司)为约0.01mg/kg至约0.5mg/kg,更具体地,约0.01mg/kg至0.5mg/kg、约0.01mg/kg至约0.45mg/kg、约0.01mg/kg至约0.4mg/kg、约0.01mg/kg至约0.35mg/kg、约0.06mg/kg至约0.45mg/kg、约0.07mg/kg至约0.4mg/kg、约0.08mg/kg至约0.35mg/kg、约0.09mg/kg至约0.3mg/kg、约0.1mg/kg至约0.25mg/kg等。在具体实施方式中,低剂量的他克莫司为约0.01mg/kg至0.074mg/kg。

[0071] 用于免疫抑制的他克莫司的正常剂量为约0.1mg/kg/天-0.3mg/kg/天(口服)以及约0.01mg/kg/天-0.05mg/kg/天(IV)。在某些实施方式中,他克莫司的低剂量为正常剂量的约1/10,例如,约0.01mg/kg/天-0.03mg/kg/天(口服)以及约0.001mg/kg/天-0.005mg/kg/天(IV)。在其它实施方式中,他克莫司的低剂量为用于免疫抑制的正常剂量的约1/5、1/6、1/7、1/8、1/9、1/10、1/11、1/12、1/13、1/14或至少1/15。

[0072] 在其它实施方式中,低剂量的他克莫司包括低于用于口服施用的约0.075mg/kg/天的任何量。低剂量可包括低于约0.07、0.065、0.06、0.055、0.05、0.045、0.04、0.035、0.03、0.029、0.028、0.027、0.026、0.025、0.024、0.023、0.022、0.021、0.020、0.019、0.018、0.017、0.016、0.05、0.014、0.013、0.012、0.011、0.010、0.009、0.008、0.007、0.006、0.005、0.004、0.003、0.002或0.001mg/kg/天的任何量。

[0073] 对于静脉内施用,他克莫司的低剂量包括低于约0.01mg/kg/天的任何量。低剂量可包括低于约0.01、0.009、0.008、0.007、0.006、0.005、0.004、0.003、0.002或0.001mg/kg/天的任何量。

[0074] 在进一步实施方式中,低剂量的他克莫司导致约0.1ng/ml至约10ng/ml的血液浓度范围。浓度可低于约10ng/ml、9ng/ml、8ng/ml、7ng/ml、6ng/ml、5ng/ml、4ng/ml、3ng/ml、2ng/ml、1ng/ml、0.9ng/ml、0.8ng/ml、0.7ng/ml、0.6ng/ml、0.5ng/ml、0.4ng/ml、0.3ng/ml、0.2ng/ml或0.1ng/ml。在更具体的实施方式中,对于口服和IV而言,血液中他克莫司浓度低于约5ng/ml。

[0075] 本发明的药物组合物为适于体内施用于对象的生物上相容的形式。药物组合物还可包括药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的”意指由美国联邦或州政府的管理机构批准的、或在药典或其它公知的药典中列出的,以用于动物,且更具体地用于人。术语“载体”是指与干细胞动员剂和/或免疫抑制剂一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。此类药物载体可为无菌液体,如水和油,包括石油来源、动物来源、植物来源或合成来源的油,包括但不限于花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当口服施用药物组合物时,水可以为载体。当静脉内施用药物组合物时,盐水和水性右旋糖可以为载体。盐溶液和水性右旋糖以及甘油溶液可以用作可注射溶液的液体载体。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、丙三醇、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。药物组合物还可以含有微量的润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。

[0076] 本发明的药物组合物可采用溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、缓释制剂的形式等。可将组合物配制成含有常规的粘合剂和载体如甘油三酯的栓剂。口服制剂可以包括标准载体,如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。在具体实施方式中,药物组合物包含有效量的干细胞动员剂和/或免疫抑制剂以及合适量的药

学上可接受的载体以便向患者提供适当的施用形式。剂型应适合施用方式。

[0077] 本发明的药物组合物可以通过任何特定的施用途径施用,所述施用途径包括但不限于口服方式、肠胃外方式、皮下方式、肌肉方式、静脉内方式、关节内(intrarticular)、支气管内方式、腹内方式、囊内方式、软骨内方式、腔内方式、体腔内方式、小脑内(intracerebellar)方式、脑室内方式、结肠内方式、颈管内方式、胃内方式、肝内方式、心肌内方式、骨骼内(intraosteal)方式、骨内(intraosseous)方式、骨盆内方式、心包内(intrapericardiac)、腹膜内方式、胸膜内方式、前列腺内方式、肺内方式、直肠内方式、肾内方式、视网膜内方式、脊柱内方式、滑膜内方式、胸廓内方式、子宫内方式、膀胱内方式、推注方式、阴道方式、直肠方式、颊部方式、舌下方式、鼻内方式、离子电渗疗法方式或经皮方式。大多数合适的途径为口服施用或注射。在某些实施方式中,皮下注射为优选的。

[0078] 通常,本文公开的包含干细胞动员剂和/或免疫抑制剂的药物组合物可以单独使用(例如,免疫抑制剂与干细胞动员剂一起施用)或与以通过常规试验限定的适当剂量的其它治疗剂同时使用以便获得最佳功效同时使任何潜在的毒性最小化。利用本发明的药物组合物的给药方案可以根据多种因素选择,所述因素包括患者的类型、种类、年龄、体重、性别、医学状况;待治疗的病况的严重性;施用途径;患者的肾功能和肝功能;以及使用的特定药物组合物。本领域普通医师可容易地确定防止、抵抗或停滞疾患的进展所需的有效量的药物组合物(以及包括治疗剂在内的潜在的其它药剂)并开处方。

[0079] 在产生最大功效以及具有最小毒性的范围内实现治疗方案(例如,包含干细胞动员剂和/或免疫抑制剂的药物组合物与另一治疗剂组合)的浓度的最佳精度可以需要基于一个或多个靶位点的药物组合物的可用性的动力学的方案。当确定治疗方案的最佳浓度时,可以考虑药物组合物的分布、平衡和消除。当组合以实现期望的效果时,可以调节本文公开的药物组合物的剂量。另一方面,药物组合物和各种治疗剂的剂量可以独立地优化并组合以实现协同结果,其中病状的减少大于任一单独使用的病状减少。

[0080] 具体地,本文公开的药物组合物的毒性和治疗功效可以通过标准药理学方法在细胞培养或实验动物中测定,例如测定LD₅₀(50%群体致死的剂量)和ED₅₀(在50%群体中治疗有效的剂量)。毒性作用与治疗效果之间的剂量比率为治疗指数并且它可以表示为比率LD₅₀/ED₅₀。显示出大的治疗指数的药物组合物为优选的,除了组合物的细胞毒性为期望的活性或治疗结果。虽然可以使用显示出毒性副作用的药物组合物,但递送系统可将此类组合物靶向受影响的组织部位以便对未感染细胞的潜在损伤最小化,从而降低副作用。通常,本发明的药物组合物可以以使功效最大化且使毒性最小化的方式来施用。

[0081] 从细胞培养测定和动物研究获得的数据可以用于配制用于人类的一系列剂量。此类组合物的剂量优选位于一系列循环浓度内,所述循环浓度包括具有很少或无毒性的ED₅₀。剂量可以在该范围内变化,这取决于使用的剂量形式和利用的施用途径。对于在本发明的方法中使用的任何组合物,可以由细胞培养测定最初估计治疗有效剂量。可以在动物模型中配制剂量以实现包括在细胞培养中测定的IC₅₀(实现症状的半数最大抑制的测试组合物的浓度)的循环血浆浓度范围。此类信息可以用于精确地测定人中有用的剂量。例如可以通过高效液相色谱法来测量血浆水平。

[0082] 而且,本发明的组合物的剂量施用可以使用药物代谢动力学/药效动力学建模系统进行优化。例如,可以选择一个或多个给药方案并且药物代谢动力学/药效动力学模型可

以用于测定一个或多个给药方案的药物代谢动力学/药效动力学曲线(profile)。然后,可以选择用于施用的其中一个给药方案,基于特定的药物代谢动力学/药效动力学曲线,所述给药方案实现期望的药物代谢动力学/药效动力学响应。参见WO 00/67776,其通过引用完全明确地并入本文。

[0083] 更具体地,药物组合物可以以每日单剂量施用,或者总的每日剂量可以以每日两次、三次或四次的分剂量施用。在口服施用的情况下,组合物的每日剂量可以在约0.1ng/患者/天至约1,000mg/患者/天的宽范围间变化。更具体地,范围可以为约0.001ng/kg体重/天至10mg/kg体重/天,对于成人(约60kg)而言,为约0.1-100μg/天、约1.0-50μg/天或约1.0-20mg/天。

[0084] 药物组合物的每日剂量可以在约0.1ng/成人/天至约1000mg/成人/天的宽范围内变化。对于口服施用,组合物可以以片剂形式提供,对于给药于待治疗患者的症状调节,所述片剂含有约0.1ng至约1000mg的组合物或0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、800、900或1000毫克的组合物。有效量的药物组合物通常以约0.1ng/kg体重/天至约20mg/kg体重/天的剂量水平提供。在一个实施方式中,范围为约0.2ng/kg体重/天至约10mg/kg体重/天。在另一实施方式中,范围为约0.5ng/kg体重/天至约10mg/kg体重/天。药物组合物可以以约1至约10次/天的方案施用。

[0085] 在注射的情况下,通常方便的是通过静脉内途径给予成人(约60kg)每天约0.0001μg-30mg、约0.01μg-20mg或约0.01mg-10mg的量。在其它动物的情况下,针对60kg计算的剂量也可以施用。更具体地,在注射的情况下,通常方便的是通过皮下途径给予以下量的他克莫司:约0.01mg/kg至约0.5mg/kg,更具体地,约0.01mg/kg至0.5mg/kg、约0.02mg/kg至约0.5mg/kg、约0.03mg/kg至约0.5mg/kg、约0.04mg/kg至约0.45mg/kg、约0.06mg/kg至约0.45mg/kg、约0.07mg/kg至约0.4mg/kg、约0.08mg/kg至约0.35mg/kg、约0.09mg/kg至约0.3mg/kg、约0.1mg/kg至约0.25mg/kg等。

[0086] 本发明的药物组合物的剂量可任选地包括0.0001μg/kg/施用至1000mg/kg/施用、或0.001μg/kg/施用至100.0mg/kg/施用、0.01μg/kg/施用至10mg/kg/施用、0.1μg/kg/施用至10mg/kg/施用,包括但不限于:0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99和/或100-500mg/kg/施用或它们的任何范围、数值或部分,或以实现以下血清浓度:0.1、0.5、0.9、1.0、1.1、1.2、1.5、1.9、2.0、2.5、2.9、3.0、3.5、3.9、4.0、4.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、20、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14.0、14.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、12、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14、14.5、15、15.5、15.9、16、16.5、16.9、17、17.5、17.9、18、18.5、18.9、19、19.5、19.9、20、20.5、20.9、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、96、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500和/或5000μg/ml血清浓度/单

次或多次施用或它们的任何范围、数值或部分。

[0087] 作为非限制性实例,对象的治疗可使用单次剂量、输注剂量或重复剂量在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40天中的至少之一,或者可选地或另外地,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51或52周中的至少之一,或者可选地或另外地,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20年中的至少之一,或者它们的任何组合提供一次或定期剂量的本发明的组合物:0.1ng/kg/天至100mg/kg/天,如0.0001、0.001、0.01、0.1、0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90或100mg/kg/天。

[0088] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物的剂量可任选地包括约0.01mg/kg至约0.5mg/kg的他克莫司,包括但不限于0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4和/或0.5mg/kg/施用或它们的任何范围、数值或部分,或者以实现约2.0、2.5、2.9、3.0、3.5、3.9、4.0、4.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、20、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14.0、14.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、12、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14、14.5、15、15.5、15.9、16、16.5、16.9、17、17.5、17.9、18、18.5、18.9、19、19.5、19.9、20ng/ml的血液水平的他克莫司。

[0089] 具体地,可以将本发明的药物组合物在几周的病程内一周施用至少一次。在一个实施方式中,将药物组合物在几周至几月内一周施用至少一次。在另一实施方式中,将药物组合物在四周至八周内一周施用一次。在另一实施方式中,将药物组合物在四周内一周施用一次。

[0090] 更具体地,药物组合物可以如下施用:一天至少一次保持约2天、一天至少一次保持约3天、一天至少一次保持约4天、一天至少一次保持约5天、一天至少一次保持约6天、一天至少一次保持约7天、一天至少一次保持约8天、一天至少一次保持约9天、一天至少一次保持约10天、一天至少一次保持约11天、一天至少一次保持约12天、一天至少一次保持约13天、一天至少一次保持约14天、一天至少一次保持约15天、一天至少一次保持约16天、一天至少一次保持约17天、一天至少一次保持约18天、一天至少一次保持约19天、一天至少一次保持约20天、一天至少一次保持约21天、一天至少一次保持约22天、一天至少一次保持约23天、一天至少一次保持约24天、一天至少一次保持约25天、一天至少一次保持约26天、一天至少一次保持约27天、一天至少一次保持约28天、一天至少一次保持约29天、一天至少一次保持约30天或一天至少一次保持约31天。

[0091] 可选地,药物组合物可以如下施用:每1天约一次、每两天约一次、每3天约一次、每4天约一次、每5天约一次、每6天约一次、每7天约一次、每8天约一次、每9天约一次、每10天约一次、每11天约一次、每12天约一次、每13天约一次、每14天约一次、每15天约一次、每16天约一次、每17天约一次、每18天约一次、每19天约一次、每20天约一次、每21天约一次、每22天约一次、每23天约一次、每24天约一次、每25天约一次、每26天约一次、每27天约一次、每28天约一次、每29天约一次、每30天约一次或每31天约一次。

[0092] 本发明的药物组合物可替代地可以如下施用：每一周约一次、每两周约一次、每3周约一次、每4周约一次、每5周约一次、每6周约一次、每7周约一次、每8周约一次、每9周约一次、每10周约一次、每11周约一次、每12周约一次、每13周约一次、每14周约一次、每15周约一次、每16周约一次、每17周约一次、每18周约一次、每19周约一次、每20周约一次。

[0093] 可替代地，本发明的药物组合物可以如下施用：每1个月约一次、每两个月约一次、每3个月约一次、每4个月约一次、每5个月约一次、每6个月约一次、每7个月约一次、每8个月约一次、每9个月约一次、每10个月约一次、每11个月约一次或每12个月约一次。

[0094] 可替代地，药物组合物可以如下施用：一周至少一次保持约两周、一周至少一次保持约3周、一周至少一次保持约4周、一周至少一次保持约5周、一周至少一次保持约6周、一周至少一次保持约7周、一周至少一次保持约8周、一周至少一次保持约9周、一周至少一次保持约10周、一周至少一次保持约11周、一周至少一次保持约12周、一周至少一次保持约13周、一周至少一次保持约14周、一周至少一次保持约15周、一周至少一次保持约16周、一周至少一次保持约17周、一周至少一次保持约18周、一周至少一次保持约19周或一周至少一次保持约20周。

[0095] 可替代地，药物组合物可以如下施用：一周至少一次保持约1个月、一周至少一次保持约两个月、一周至少一次保持约3个月、一周至少一次保持约4个月、一周至少一次保持约5个月、一周至少一次保持约6个月、一周至少一次保持约7个月、一周至少一次保持约8个月、一周至少一次保持约9个月、一周至少一次保持约10个月、一周至少一次保持约11个月或一周至少一次保持约12个月。

[0096] 本发明的药物组合物（例如，干细胞动员剂和/或免疫抑制剂）可通过相同或不同的施用途径同时或相继施用。药物组合物还可以与一种或多种另外的治疗剂组合。用于本发明的方法中的药物组合物的特性和量的确定可由本领域普通的医学从业者使用本领域已知的标准技术容易地进行。在具体实施方式中，本发明的干细胞动员剂可以与有效量的免疫抑制剂组合施用。在其它具体实施方式中，干细胞动员剂和免疫抑制剂可以与有效量的另一干细胞动员剂、另一免疫抑制剂或另一治疗剂组合施用。

[0097] 在多种实施方式中，本发明的干细胞动员剂结合免疫抑制剂（以及任选地另一干细胞动员剂、另一免疫抑制剂或另一治疗剂）可以如下施用：在大约同时、间隔小于1分钟、间隔小于2分钟、间隔小于5分钟、间隔小于30分钟、间隔1小时、间隔约1小时、间隔约1至约2小时、间隔约2小时至约3小时、间隔约3小时至约4小时、间隔约4小时至约5小时、间隔约5小时至约6小时、间隔约6小时至约7小时、间隔约7小时至约8小时、间隔约8小时至约9小时、间隔约9小时至约10小时、间隔约10小时至约11小时、间隔约11小时至约12小时、间隔约12小时至18小时、间隔18小时至24小时、间隔24小时至36小时、间隔36小时至48小时、间隔48小时至52小时、间隔52小时至60小时、间隔60小时至72小时、间隔72小时至84小时、间隔84小时至96小时或间隔96小时至120小时。在特定实施方式中，在就诊的相同患者内施用两种或更多种疗法。

[0098] 在某些实施方式中，组合的本发明的干细胞动员剂结合免疫抑制剂（以及任选地另一干细胞动员剂、另一免疫抑制剂或另一治疗剂）循环施用。循环疗法涉及施用第一疗法（例如，干细胞动员剂）保持一段时间，随后施用第二疗法（例如，免疫抑制剂）保持一段时间，任选地，随后施用可能的第三疗法保持一段时间等，并重复该相继施用，例如，循环，以

便降低对其中一种疗法形成抗性,避免或降低其中一种疗法的副作用和/或改善治疗的功效。在某些实施方式中,可以重复本发明的组合疗法的施用并且施用可以隔开至少1天、2天、3天、5天、10天、15天、30天、45天、2个月、75天、3个月或至少6个月。

[0099] 无需进一步详述,据信本领域技术人员使用前面描述,可在最大程度上利用本发明。下述实施例仅为示例性的,并且不以任何方式限制本公开的其余部分。

[0100] 实施例

[0101] 提出下列实施例以便为本领域普通技术人员提供本文所述和要求保护的化合物、组合物、制品、装置和/或方法如何制得和评价的完整的公开内容和说明,旨在是纯粹示例性的,并且不旨在限制发明人视为的发明范围。虽然就数字(例如,量、温度等)而言已努力确保准确,但仍应该对某些误差和差异在此处进行说明。除非另外指出,否则份是重量份,温度以℃计或为环境温度,并且压力等于或接近大气压。存在以下反应条件的许多变型和组合:例如,组分浓度、所需要的溶剂、溶剂混合物、温度、压力以及可以用于优化从所描述的工艺中获得的产品纯度和产率的其它反应范围和条件。仅需要合理的和常规的实验来优化这类工艺条件。

[0102] 在全皮层切除之后内源性干细胞的药理学动员显著促进皮肤再生:AMD3100和他克莫司的协同活性

[0103] 干细胞疗法已经在治疗包括皮肤创伤在内的多种病状中显示出希望,但实际应用仍难以实现。在此,我们显示由AMD3100和低剂量的他克莫司产生的内源性干细胞动员能够将完全治愈由手术切除产生的全皮层创伤的时间减少25%。同样重要的是,治愈伴随着瘢痕形成减少以及毛囊再生。寻找机制中,我们发现与低剂量的他克莫司组合的AMD3100动员增加数目的谱系-阴性c-Kit^b、CD34^b和CD133^b干细胞。低剂量的他克莫司还增加创伤部位中含有SDF-1的巨噬细胞的数目,从而增强动员的干细胞至创伤的“拉入”。谱系示踪显示CD133干细胞在增强毛细血管和毛囊新生起关键作用,有助于更迅速且完美的治愈。我们的发现提供对于创伤愈合和组织再生的重要治疗方法。

[0104] 材料和方法

[0105] 动物。C57BL/6J小鼠购买自Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) 并且在本研究中被命名为野生型小鼠。CD133⁺/C-L小鼠 (Zhu等, 2009) 获得自St Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN)。mT/mG小鼠由Steven D. Leach博士友情提供。mT/mG在Cre切除之前表达细胞膜靶向的tdTomato (“mT”), 并且在Cre切除之后表达细胞膜靶向的EGFP (“mG”), 从而允许实时可视化和区别重组细胞和非重组细胞 (Muzumdar等, 2007)。当mT/mG小鼠与CD133-Cre小鼠杂交时 (Zhu等, 2009), mG标记的GFP可通过可诱导的CD133-Cre转基因系生成 (Zhu等, 2009)。DA (RT1Aa) 大鼠购买自Harlan Sprague-Dawley (Indianapolis, IN, USA)。将所有动物保持在Johns Hopkins医疗机构 (Johns Hopkins Medical Institutions) 的无特定病原的设施中。根据NIH指导方针并且在Johns Hopkins大学动物护理委员会 (Johns Hopkins University Animal Care Committee) 批准的方案下护理动物。将年龄-和性别-匹配的小鼠和大鼠用于实验。需要医疗照顾的动物提供有适当的兽医护理或执业的兽医的治疗并且从所述的研究中排除。

[0106] 体内切除创伤模型。将8-12周龄的动物用异氟烷麻醉。刮剃背部皮肤并用聚维酮碘和70%乙醇清洗。在小鼠中,将中线和在中线各侧1cm的四个点通过钢笔做标记。两个点

在肋缘水平,两个点在指定用于切除的部位的髂嵴处(图1A)。在大鼠中,四个切除创伤位于中线任一侧1cm以及肋缘与髂嵴之间中点的上方和下方1cm(图7a)。将消毒的一次性活检穿孔器(直径为5mm;Miltex)垂直对齐标记的中心,通过施加压力并且同时扭动穿通皮肤和肉膜。重复相同程序,从而在每只动物上生成四处创伤(Tomlinson和Ferguson,2003)。在恢复意识之后,将动物各自饲养。对于用夹板固定创伤的小鼠模型,在中背部上的中线的各侧进行一个5mm切除。然后,将直径为创伤直径两倍的炸面圈形、0.5mm厚的硅酮夹板(Grace Bio-Laboratories,Bend,OR)居中、缝合并粘牢(KrazyGlue®;Elmer's Inc.,Columbus,OH)(图1F;Galiano等,2004)。

[0107] 对动物皮下注射AMD3100 (AMD) (1.0mg kg^{-1} ,每两天,Sigma-Aldrich,St Louis,MO) 或他克莫司(T) (0.1mg kg^{-1} ,每天,购买自Johns Hopkins医院的药房)。从第0天至完全闭合当天,将较高剂量的AMD (5.0mg kg^{-1} ,每两天) 或T (1.0mg kg^{-1} ,每天) 施用至受伤小鼠以测定剂量-响应。

[0108] 以指定的时间间隔对每个创伤部位数码拍照,并且使用Adobe Photoshop(版本7.0;Adobe Systems,San Jose,CA) 测定照片上的创伤区。将随着时间的推移创伤区的变化表达为最初创伤区的百分比(图1B)。

[0109] 通过局部皮内注射抗-SDF-1抗体使SDF-1失活。在另外一系列实验中,在产生创伤之后,在用双重药物疗法(AMD+低剂量的T) 治疗之前,将含50 μl 的 $15\mu\text{g ml}^{-1}$ (Xu等,2013) 中和的抗-SDF-1抗体(MAB310,R&D Systems,Minneapolis,MN) 的盐水皮内注射至右侧的两个创伤,而将在左侧的其它两个创伤用等量的同种型匹配IgG(MCA 1209,AbD Serotec,Raleigh,NC) 处理作为对照。将流体以每日一次注入接近创伤的皮肤并且注入创面,随后进行组合方案治疗直至创伤闭合。在整个观察期,这些行为平行于单独用盐水处理的另一阴性(媒介物) 对照组。

[0110] 组织学和显微术。在损伤之后第3天、第5天、第7天、第9天和第15天收集来自创伤部位的组织。

[0111] 谱系示踪研究:双重治疗的小鼠的创伤部位的CD 133+细胞的主要积聚(图3B) 促进使用体内谱系示踪系统以进一步探究CD 133+干细胞/祖细胞在皮肤再生中的作用。为激活由CD133C-L基因座表达的CreERT2,从而不可逆地激活在CD133+细胞及其后代中GFP的表达,在手术之前7天,将成年mT/mG;CD133+/C-L-RosaEGFP小鼠腹膜内注射溶解于玉米油中的5.0mg他莫昔芬(Sigma)(图6a;Muzumdar等,2007)。参考描述CD133谱系示踪小鼠的生成的文章(Nature 2009;457:603-607;Genesis 2007;45:593-605) 定义他莫昔芬的剂量和时间。在指定时间点通过CO₂安乐死术处死动物,将包括创伤区及创伤区周围的皮肤样本切除,固定在2%多聚甲醛中于4℃过夜,在30%蔗糖中于4℃冷冻保护过夜并在OCT(最佳切割温度) 冷冻。使用Leica低温恒温器获得冷冻的切片并在PBS中洗涤载玻片5min。用商用的 β -半乳糖苷酶染色试剂盒(BioVision Inc.Milpitas,CA) 利用X-gal作为底物进行lacZ分析。在用70%甘油封固之后,在Zeiss显微镜下观察蓝色显影的切片。对于GFP显微术,将皮肤切片用含有DAPI的封固介质(Vector Laboratories Inc.,伯林盖姆,CA) 覆盖并用共焦荧光显微术(Carl Zeiss Microscopy,索恩伍德,NY) 成像。为鉴别lacZ-和GFP-阳性组织和细胞的结构,根据制造商的说明,将相同切片相继用针对GFP荧光研究的DAPI染色,随后用X-gal及苏木精和伊红(H&E) 染色(IHC World,伍德斯托克,MD)。

[0112] 毛囊的定量分析:再生毛囊的数目以双盲方式定量。在未受伤的皮肤中,在来自与创伤相同位置的区域中的毛囊数目进行计数,并将该毛囊数目与实验组进行比较(图2A和图9A;虚线指示创伤边缘)。Masson三色法(来自Polysciences, Inc. Warrington, PA的商业试剂盒)用于检测胶原纤维(蓝色)。

[0113] 免疫荧光染色:对于免疫荧光染色,将冷冻的切片用丙酮(-20°C)固定10min并在室温下干燥1h。将含有1%BSA和5%标准驴血清的PBS用于阻断非特异性背景。将切片用第一抗体在室温孵育1.5h,第一抗体包括:对CD133特异的兔多克隆抗体(1:100, ab19898, Abcam, 坎布里奇, MA)、对c-Kit特异的兔多克隆抗体(1:100, sc-168, Santa Cruz Biotechnology, 圣克鲁兹, CA)、对CD34特异的的山羊多克隆抗体(1:100, AF4117, R&D Systems, 明尼阿波利斯, MN)、对SDF-1特异的的小鼠单克隆抗体(1:100, MAB310, R&D Systems)、对F4/80特异的FITC-偶联的大鼠单克隆抗体(1:100, 11-4801, eBioscience, 圣地亚哥, CA)、对 α -SMA特异的的小鼠单克隆抗体(1:100, ab7817, Abcam)、对CD31特异的的大鼠单克隆抗体(1:100, 14-0311, eBioscience)或对HGF特异的兔多克隆抗体(1:100, sc-7949, 圣克鲁兹)或者它们中的两个针对双荧光染色的组合。在用PBS漂洗之后,将切片用以下的第二抗体在室温再孵育1h: Cy3驴抗-兔IgG(1:200, 711-166-152, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)、Cy3驴抗-山羊IgG(1:200, 705-166-147, Jackson ImmunoResearch)、Cy3驴抗-小鼠IgG(1:200, 715-615-151, Jackson ImmunoResearch)、FITC驴抗-小鼠IgG(1:200, 715-096-150, Jackson ImmunoResearch)或FITC驴抗-大鼠IgG(1:200, 712-097-003, Jackson ImmunoResearch)或者它们中具有不同颜色的两种(Cy3和FITC)针对双荧光染色的组合。用DAPI将细胞核染成蓝色。通过共聚焦显微镜(Carl Zeiss显微术, 索恩伍德, NY)分析组织切片。

[0114] 流式细胞术。在通过心脏内穿刺处死之前取出外周血。用红血细胞裂解缓冲液Hybri-MaxTM(sigma)裂解红细胞。洗涤残余的细胞并分析悬浮液(1×10^6)的谱系阴性c-Kit⁺、CD34⁺和CD133⁺干细胞标志物的表达。使用的所有抗体来自商业来源,第一抗体包括:CD133(1:100, ab19898, Abcam)、CD34(1:100, AF4117, R&D Systems)、c-Kit(1:100, 14-1171, eBioscience)、小鼠造血谱系组(panel)(eBioscience)包括的生物素-偶联的CD3(1:100, 13-0031)、CD45R/B220(1:100, 13-0452)、CD11b(1:100, 13-0112)、TER-119(1:200, 13-5921)和Ly-6G(1:200, 13-5931);第二抗体包括:FITC抗大鼠IgG(1:200, 712-096-150, Jackson ImmunoResearch)、PE抗兔IgG(1:200, 12-4739, eBioscience)、APC抗山羊IgG(1:200, 705-136-147, Jackson ImmunoResearch)和链霉亲和素-PerCP(1:200, 554064, BD Pharmingen)。将非特异性抗体结合用标准驴血清(Sigma)阻断30min。将细胞用第一抗体在 4°C 孵育30min,随后用第二抗体在 4°C 孵育30min,并使用CELLQuest软件(Becton-Dickinson, 贝德福德, MA)通过流式细胞术对阳性细胞进行计数(荧光激活细胞分选术[FACS])。

[0115] 半定量逆转录聚合酶链式反应分析。将皮肤样本在 -80°C 保持冷冻直至使用TRIzol试剂(Invitrogen, 卡尔斯巴德, CA, USA)匀质化用于RNA提取。然后,根据制造商的说明,使用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR; Invitrogen)的superscript第一链合成系统进行 $5\mu\text{g}$ 总RNA的第一链cDNA的合成。在 $50\mu\text{L}$ 反应溶液中,PCR含有 $1\mu\text{L}$ 脱氧核苷三磷酸混合物(每种dNTP为 10mM)、 $1\mu\text{L}$ $10\mu\text{M}$ 的每种引物、 $0.4\mu\text{L}$ ($5\text{IU}\mu\text{L}^{-1}$) Platinum Taq聚合酶

(Invitrogen)、1.5 μ L 50mM MgCl₂和2 μ L总DNA作为模板。热循环开始为:94 $^{\circ}$ C,保持4min,一个循环。随后为94 $^{\circ}$ C,保持30s;59 $^{\circ}$ C保持30s;72 $^{\circ}$ C保持30s;25-35个循环,以及72 $^{\circ}$ C保持10min用于最终延伸。将PCR产物在1.2%琼脂糖凝胶上进行电泳移动,用GelStar[®]染色(Lonza Rockland Inc.,Rockland,ME)可视化。对于小鼠样品,使用了下述引物:SDF-1(GenBank登录号NM_021704.3):5'-GACGGTAAACCAGTCAGCCT-3'(正向)(SEQ ID NO:1)和5'-CACACTTGTCTGTTGTTGTTCTTC-3'(反向)(SEQ ID NO:2);CD133(NM_008935.2):5'-TCCAGCAAACAAGCAACAAG-3'(正向)(SEQ ID NO:3)和5'-CCTATGCCGAACCAGAACA-3'(反向)(SEQ ID NO:4);VEGF(NM_001025250.3):5'-CACTGGACCCTGGCTTTACT-3'(正向)(SEQ ID NO:5)和5'-GGTGATGTTGCTCTCTGACG-3'(反向)(SEQ ID NO:6);b-FGF(NM_008006.2):5'-CAAGGGAGTGTGTGCCAA-3'(正向)(SEQ ID NO:7)和5'-TGCCCAGTTCGTTTCAGT-3'(反向)(SEQ ID NO:8);HGF(NM_010427.4):5'-ATGAGAGAGGCGAGGAGAAG-3'(正向)(SEQ ID NO:9)和5'-GTAGCCCCAGCCGTAAATA-3'(反向)(SEQ ID NO:10); β -肌动蛋白(NM_007393.3):5'-TGGCACCACACCTTCTACAAT-3'(正向)(SEQ ID NO:11)和5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'(反向)(SEQ ID NO:12)。靶标mRNA的表达水平通过光密度法定量并用对应的内控标准化。

[0116] 统计。连续变量呈现为平均值 $\pm$ SEM。两分法变量呈现为数值和百分比值。使用针对所有分析呈现的初步数据集进行功效分析以确定进行足够的统计功效必需的样本大小。对于所有动物研究,将小鼠和大鼠随机分配给治疗组。创伤闭合和毛囊再生的分析以盲式进行。预先制定对于动物研究或样本分析的所有入选/排除标准。使用学生t检验(双尾)分析流式细胞术、RT-PCR和新生毛囊计数的数据,通过Fisher精确检验(双尾)分析两分法变量。Newman-Keuls检验的单向ANOVA用于群组之间皮肤创伤闭合的动力学分析。对于每个图,基于数据的群体分布和比较数目(个体或多个)选择适当的统计检验。所有数据满足使用的统计检验的假设。在每组数据内存在方差的估算。群组之间的方差是相似的。使用SPSS[®](SPSS,芝加哥,IL,USA)进行所有分析。 $p < 0.05$ 被认为是显著的。

[0117] 结果

[0118] 实施例1:在全皮层皮肤切除之后AMD3100+低剂量的他克莫司加速创伤愈合。在野生型C57/B6小鼠的刮剃背部通过5mm直径的圆形切除产生四个全皮层创伤(图1A)。以指定的时间间隔对每个创伤部位数码拍照,并且使用Adobe Photoshop软件计算创伤区。将随着时间的推移创伤区的变化表达为最初创伤区的百分比(图1b)。将受伤小鼠随机分成四个实验组并在创伤之后立即接受盐水或药物的皮下注射直至完全治愈:1)对照组,用盐水处理,2)他克莫司组,每天用低剂量(0.1mg kg⁻¹)处理,3)AMD3100组,每隔一天处理(1.0mg kg⁻¹)以及4)组合组,给予低剂量的他克莫司和AMD3100。全部创伤评价为双盲的。

[0119] 在第1组(n=6)中,在手术之后第12天创伤达到完全闭合(图1c和图1d),这与在该建立的模型中已知的愈合动力学相一致(Shinozaki等,2009;Mack等,2012)。与盐水对照组相比,单独用他克莫司或AMD3100治疗的6只动物显示出显著地但仅适度较快的愈合(图1d),因为在第11天创伤达到完全闭合。在用AMD3100+低剂量的他克莫司治疗的第4组小鼠中,治愈时间减少至九天或减少25%。数码图像显示用双重药物治疗在第5天时具有立即降低皮肤缺陷大小的显著作用(图1d),第5天为创伤愈合的再上皮化阶段的开始。肉眼可见地,在双重药物治疗组中在创伤后第5天在皮肤边缘处观察到极小的溃疡和早期上皮内向生长,而在其它三组中的创伤很少显示(如果有的话)任何上皮化以及继续溃疡(图1c和

图1h)。我们在大鼠中重复这些研究并且发现接受双重药物治疗的大鼠也具有将完全愈合的时间从18天显著减少至13天或减少28%的等效效果(图7)。

[0120] 小鼠皮肤是易变的,并且收缩占创伤闭合的大部分。为阻止该机制,我们进行了切除创伤夹板疗法模型,其中夹板固定环紧紧地固定创伤周围的皮肤(图1e)。因此,创伤通过肉芽形成和再上皮化愈合,该过程类似于大多数人类皮肤缺陷的治愈。我们发现:与对照(盐水)组相比,在用低剂量的他克莫司或AMD3100单一疗法治伤的夹板固定的创伤中创伤修复加速,同时在接受双重治疗的动物中发现最为加速的愈合(图1f和图1g)。因此,AMD3100+低剂量的他克莫司的治疗效果主要为皮肤创伤上皮化。将其它组的小鼠用高剂量的AMD3100(5.0mg kg^{-1})或他克莫司(1.0mg kg^{-1})治疗,并且我们发现高剂量的他克莫司阻碍皮肤创伤愈合,然而增加AMD3100的剂量未显示出显著差异(图8)。

[0121] 实施例2:AMD3100+低剂量的他克莫司改善瘢痕形成并促进毛囊再生。皮肤创伤修复开始于出血停止,随后出现炎症应答、在创伤空间内形成肉芽组织、创伤的纤维化以及再上皮化,最后产生瘢痕。

[0122] 在组织学上,第15天时对照组中的再上皮化创伤显示出无组织的表皮,表皮与真皮之间的边界模糊(图2b)。在第1组、第2组和第3组小鼠中存在很少的毛囊,并且胶原为丰富的且无组织的(图2c),这与公布的研究结果相一致(Devine等,2004)。相比之下,双重药物治疗的动物具有含有结构良好的毛囊的薄且组织有序的表皮以及更佳组织化的胶原(图2b和图2c;下图)。最惊人的发现为:在15天之后,仅在双重药物治疗的动物的再上皮化创伤中出现毛囊(图2a和2d)。不令人惊讶的是,与对照组相比,在双重药物治疗的动物中,再上皮化创伤的组织切片中毛囊的数目显著较高(图2e)。我们发现双重药物治疗还刺激大鼠中毛囊再生并降低瘢痕形成(图9)。因此,低剂量的他克莫司和AMD3100的组合通过促进再上皮化和皮肤组分的分化来改善创伤愈合。

[0123] 实施例3:AMD3100和低剂量的他克莫司协同动员谱系阴性(Lin⁻)c-Kit+CD34+CD133+干细胞,然而低剂量的他克莫司增加产生SDF-1的巨噬细胞的数目。我们对血液样品进行流式细胞术以测定通过用普乐沙福和他克莫司治疗而动员的干细胞组分。Lin⁻c-Kit⁺、Lin⁻CD34⁺、Lin⁻CD133⁺细胞和Lin⁻三个一组阳性(c-Kit+CD34+CD133+)细胞的数目在损伤后5天于接受组合药物治疗的动物的外周血中显著较高(图3a)。创伤组织切片的免疫荧光染色显示:如c-Kit⁺和CD34⁺细胞,CD133⁺的数目通过组合治疗增加(图3b)。在创伤的新形成的肉芽组织中特别发现了这些细胞。有趣地是,在第5天时间点时,许多CD 133⁺细胞与CD31共染色,CD31为内皮细胞的标志物(图3b;右图)。

[0124] 肉芽组织的半定量PCR分析显示:与第1组、第2组和第3组相比,在创伤之后5天,吸引子分子、间质细胞来源的因子(SDF)-1和干细胞标志物CD133的mRNA表达在第4组中显著增加(图4a和图4b)。免疫荧光染色显示SDF-1和F4/80(巨噬细胞的标志物)阳性细胞的数目在损伤后5天在仅接受低剂量的他克莫司或用双重药物治疗的动物的创伤部位中显著较高(图4c)。有趣地是,SDF-1与一些F4/80⁺细胞共染色,这表明这些巨噬细胞产生或呈递SDF-1(图4c;下图)。

[0125] 实施例4:双重药物治疗在创伤后五天增加血管生成细胞因子的表达。肉芽组织的半定量PCR分析显示:与第1组、第2组和第3组相比,血管生成细胞因子、血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)、重要的干细胞动员和归位因子、肝细胞生长因

子(HGF)的mRNA表达在第4组中显著增加(图5a和图5b)。免疫荧光染色显示HGF阳性细胞的数目在损伤后5天从第4组小鼠恢复的肉芽组织中显著增加。类似地,与第1组、第2组和第3组相比,肉芽组织中CD31+内皮细胞的数目在第4组小鼠中显著增加。这些CD31+细胞中的一些在肉芽组织中形成管状结构(图5c;右图),其也对HGF进行染色,从而强调了HGF在新血管形成中的重要作用。管状结构还与CD133共染色(图3b;右图),这表明HGF可能参与来自CD133前体的内皮细胞的分化。

[0126] 我们寻求增强产生促进基质的细胞的证据,事实上,免疫荧光染色显示:与第1组相比, α -平滑肌肌动蛋白(SMA)阳性成肌纤维细胞的数目在从第2组和第3组小鼠中恢复的肉芽组织中增加,而第4组小鼠在第5天在肉芽组织中明显地募集更多的成肌纤维细胞(图5c;下图)。

[0127] 实施例5:谱系示踪显示通过将AMD3100和低剂量的他克莫司组合CD133干细胞在改善创伤愈合中的关键作用。进行谱系示踪研究以确认CD 133干细胞在创伤愈合中的关键作用。使用含有Rosa26GFP报告等位基因(CD133+/CL X mTmG后代)的成年CD133+/C-L小鼠。在创伤前7天,用他莫昔芬诱导CreERT2活性(图6a)。在该小鼠模型中,CD133祖细胞为lacZ阳性,然而CD133后代为GFP阳性。如其他人所报道的(Charruyer等,2012),仅在未受损的小鼠皮肤的毛囊中观察到LacZ阳性细胞和GFP阳性细胞(图6b)。

[0128] 在创伤之后5天,lacZ阳性细胞和GFP阳性细胞在肉芽组织中增加(图10;上图和中图)。与第1组相比,在第2组和第3组小鼠中恢复的肉芽组织中的lacZ阳性细胞和GFP阳性细胞的数目显著较高,但是最大数目的lacZ和GFP阳性细胞发现于第4组小鼠的肉芽组织中(图10)。在第1组、第2组和第3组中,大多数LacZ阳性细胞在第15天时消失,而它们的后代CD133GFP阳性细胞保留在愈合组织中(图6c)。然而,在第4组小鼠中,新生成的脉管系统、表皮和毛囊保持LacZ阳性和GFP阳性(图6d)。这些结果暗示在药理上动员的CD133干细胞以及它们的后代为皮肤再生的主要贡献者。

[0129] 讨论

[0130] AMD3100(普乐沙福或Mozobil)为CXCR4的直接拮抗剂并且已经在临床上用于将人的造血干细胞驱逐出BM,而进入外周血,在那,它们可以恢复并保存直至完成烧蚀辐射和/或化学疗法。也发现AMD3100可应用于组织损伤的修复(Jujo等,2010、2013;Nishimura等,2012)。单剂量的注射增强BM来源的内皮祖细胞(EPC)的动员,所述动员与小鼠心肌梗死之后较快速的新血管形成以及功能恢复相关(Jujo等,2010)。在缺血/再灌注损伤(Jujo等,2013)之后,急性注射以内皮一氧化氮合酶依赖性方式将促血管生成的BM细胞重新分配至缺血性心肌并促进小鼠心脏功能的恢复。AMD3100的单一局部施用促进患糖尿病的小鼠的创伤愈合(Nishimura等,2012),这与增加细胞因子产生、增加骨髓EPC的数目以及增加成纤维细胞和单核细胞/巨噬细胞的活性相关。血管生成和血管发生均增加(Nishimura等,2012)。我们的结果证实并显著扩展了那些发现。事实上,AMD3100单一疗法将创伤愈合增强至中等程度,这与干细胞至创伤部位的较温和的募集相关(图3b)。我们的重要贡献是以下发现:将低剂量的他克莫司与AMD3100组合在我们的全皮层皮肤切除的啮齿类模型中产生更多积聚的干细胞以及更为迅速再生的正常皮肤。以免疫抑制剂剂量的1/10给定的他克莫司与AMD3100在干细胞至血流和创伤的募集中具有显著的协同效应,所述干细胞特别是携带组合的单核细胞和SDF-1标志物的那些干细胞。

[0131] 他克莫司为有效的免疫抑制药物,但令人惊讶地,他克莫司的亚免疫抑制剂量也增强细胞再生和修复(Francavilla等,1989;Carroll等,1994;Gold,1997)。低剂量(0.1mg kg^{-1})但非标准免疫抑制剂量(1.0mg kg^{-1})的他克莫司促进大鼠中结肠吻合的治愈(Kiyama等,2002)。他克莫司治疗促进患有扁平苔藓和糖尿病的75岁妇女的下肢皮肤溃疡的愈合(Miller,2008)。Bai等(Bai等,2010)显示低(20ng ml^{-1})剂量而非高(2000ng ml^{-1})剂量的他克莫司体外治疗使BM-来源的巨噬细胞的极化向活跃的M2巨噬细胞表型倾斜。在我们的研究中,我们还证明低剂量的他克莫司增强与在手术后第5天显著增加皮肤创伤中产生SDF-1的巨噬细胞的数目相关的皮肤创伤愈合。来自此类细胞的信息促成其它炎性细胞和血小板产生的多个信息,其召集细胞,从而致使治愈。因此,AMD3100从干细胞的BM生态位强“推”干细胞以及低剂量的他克莫司增强创伤部位的因子强“拉”循环的干细胞,最好地解释了用双重AMD3100/他克莫司治疗使干细胞在创伤部位较大积聚以及更迅速恢复正常皮肤的原因。

[0132] 双重药物募集干细胞与创伤中VEGF、b-FGF和HGF mRNA的表达升高相关。有趣的是,抗-HGF抗体与CD31+细胞共染色,所述CD31+细胞还为CD133+ (图5c)。HGF具有许多刺激作用并且其也已经显示是造血干细胞和祖细胞增殖和分化的有效调节剂(Nishino等,1995)以及血管生成的强大刺激物(Ding等,2003)。也已经显示HGF在创伤-愈合模型中对MSC产生强的趋化作用(Neuss等,2004)。因此,双重药物治疗促进产生SDF-1的巨噬细胞的积聚,所述巨噬细胞致使更多的干细胞募集。反过来,HGF以及其它自分泌或旁分泌介质的加工产生更多的促血管生成因子,从而完成正反馈回路(图6e)。

[0133] CD133干细胞在新血管形成和毛囊再生中起重要作用,所述新血管形成和毛囊再生是完美的皮肤再生必不可少的(Sun等,2011)。此类细胞具有沿内皮谱系进行体外分化的潜能(Hollemann等,2012)并且已知的是响应于介质(VEGF和SDF-1)迁移至新血管形成部位。免疫荧光双染色显示许多CD133细胞与CD31共染色(图2b),所述CD31为早期内皮细胞标志物。在成熟过程中,CD133标志物减弱,获得CD31表型(Hollemann等,2012)。增强的血管生成与创伤部位增加的浸润CD133+CD31+祖细胞数目相关并加强新血管形成中这些细胞的作用。

[0134] 表皮和毛囊的干细胞可在创伤之后经历重编程以变成重新住入表皮祖细胞(Ito等,2005)。谱系分析还显示毛囊可由毛囊干细胞生态位之外的细胞产生,表明在表皮中发现的细胞可假定毛囊干细胞表型(Ito等,2007)。最近研究报道CD133为在注入免疫缺陷小鼠之后形成毛囊和表皮的长期重新住入鼠表皮干细胞和CD133+角质细胞的标志物(Charruyer等,2012)。从我们的谱系示踪研究中明显的是由双重药物治疗产生的增加数目的CD133干细胞促成毛囊再生。

[0135] 总之,我们在此报道将内源性干细胞动员至皮肤创伤的新型治疗策略产生更好且更快的愈合。定量和定性差异的程度为高度显著的并且大于在正常动物创伤愈合的任何其它研究中发现的程度。我们的研究未公开这些可塑细胞分化成组织成分的分子机制,如对于Fgf9(Gay等,2013)或Sept4/ARTS(Fuchs等,2013)的报道。有趣的发现为当存在丰富的干细胞时,分化步骤完美地进行,从而产生几乎正常的皮肤。这是证明AMD3100和低剂量的他克莫司在产生更快愈合并分化成正常皮肤中存在的所有组织的内源干细胞的动员、募集和保留中存在显著的协同效应的首次报道。这些发现可以容易地应用于临床。

[0136] 内源性干细胞的药理学动员加速患糖尿病的大鼠的皮肤创伤愈合且改善小鼠中烧伤创面的愈合

[0137] 材料和方法

[0138] 动物。Lewis大鼠和C57BL/6J小鼠购买自Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) 并保持在Johns Hopkins医疗机构的无特定病原的设施中。根据NIH指导方针并且在Johns Hopkins大学动物护理委员会批准的方案下护理动物。

[0139] 患糖尿病的大鼠模型。链脲霉素 (STZ) 为可引起胰腺β-细胞破坏的抗生素, 因此其在实验上被广泛地用作能够诱导胰岛素依赖性糖尿病 (IDDM) (也被称为1型糖尿病 (T1DM)) 的药剂。人糖尿病的最常见动物模型为链脲霉素 (STZ) 诱导的患糖尿病的大鼠。链脲霉素 (STZ) 诱导的患糖尿病的大鼠模型用于测定皮肤创伤愈合。在STZ注射 (50mg/kg, i.p.) 之后2周, 所有大鼠 (12-16周龄) 患有糖尿病 (血糖>450mg/dL)。四个切除创伤位于中线任一侧1cm以及肋缘与髂嵴之间中点的上方和下方1cm。将消毒的一次性活检穿孔器 (直径为5mm; Miltex) 垂直对齐标记的中心, 通过施加压力并且同时扭动穿过皮肤和肉膜。重复相同程序, 从而在每只动物上生成四处创伤。

[0140] 烧伤创面的小鼠模型。将24-30月龄的小鼠使用麻醉机用3%异氟烷 (Baxter Healthcare Co., 迪尔菲尔德, IL, USA) 麻醉, 刮剃背部并用Nair乳剂 (Church&Dwight Co., 普林斯顿, NJ, USA) 脱毛。如先前所报道生成烧伤创面 (Arch Surg 2010;145:259-266)。简言之, 定制的100g铝棒在100℃水浴中加热5min。在每只小鼠的背部产生一处直径1.2cm的烧伤。为保证烧伤一致性, 仅棒的重量提供皮肤表面的压力。选择用节拍器测量的4s接触时间以产生标准化的全皮层烧伤。烧伤为三度, 包括皮肤、皮下组织和肉膜的破坏。皮下施用丁丙诺啡 (0.1 mg/kg) 用于镇痛。

[0141] 治疗和创伤测量。在恢复意识之后, 将动物单独饲养, 并从第0天至完全闭合当天皮下注射AMD3100 (AMD) (1.0mg/kg, 每两天, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 或/和他克莫司 (T) (0.1mg/kg, 每天, 购买自Johns Hopkins医院的药房)。

[0142] 以指定的时间间隔对每个创伤部位数码拍照, 并且使用Adobe Photoshop (版本7.0; Adobe Systems, San Jose, CA) 测定照片上的创伤区。将随着时间的推移创伤区的变化表达为最初创伤区的百分比。所有创伤评价为双盲的。

[0143] 结果

[0144] 实施例6: AMD3100+低剂量的他克莫司加速患糖尿病的大鼠中的皮肤创伤愈合。在未患糖尿病的大鼠的对照组手术之后18天, 创伤达到完全闭合, 这与该建立模型中已知的愈合动力学相一致。然而, 在用盐水治疗的患糖尿病的大鼠中愈合显著延迟, 在手术后第23天创伤达到完全闭合。与盐水对照组相比, 单独用他克莫司或AMD3100治疗的动物 (n=4或5) 显示出明显地但仅稍微更快的治愈, 创伤在第21天达到完全闭合。在用AMD3100+低剂量的他克莫司治疗的患糖尿病的大鼠中, 愈合时间减少至18天或减少22%。数码图像显示双重药物治疗的治疗在刚第7天便对降低皮肤缺陷的大小具有显著效果 (图11)。

[0145] 实施例7: AMD3100+低剂量的他克莫司改善小鼠中烧伤创面的愈合。在不同时间点通过测量创伤区分析皮肤病损。在对照 (盐水) 组 (n=7, 5只C57BL/6J+2只129S1/SvImJ小鼠) 中, 在烧伤之后26天创伤达到完全闭合。与盐水对照组相比, 单独用他克莫司或AMD3100治疗的动物显示出显著加速创伤闭合, 创伤分别在第21天和第23天达到完全闭合。有趣地

是,用AMD3100+低剂量的他克莫司治疗的小鼠的创伤区的减少甚至更有效,已经从第13天开始。在第17天,在该组合治疗组中的所有创伤被上皮覆盖,并且被认为是闭合的,证明组合疗法对烧伤创面愈合具有显著效果(图12)。双重药物治疗也在烧伤后2个月显著减少瘢痕形成(图13)。

[0146] 结论

[0147] 总之,我们证实创伤愈合方面确实适用于患糖尿病的大鼠和小鼠烧伤模型。结果显示内源性干细胞的药理学动员加速患糖尿病的大鼠的皮肤创伤愈合(愈合时间减少至18天(从23天)或减少22%)并且改善小鼠的烧伤创面的愈合(治愈时间减少至17天(从26天)或减少34%)。我们相信在我们的研究中发现的原理在组织修复和再生中具有重要意义。

序列表

	<110> 约翰霍普金斯大学	
	<120> 经由自体干细胞动员的创伤愈合	
	<130> P12415-03	
	<150> 61907624	
	<151> 2013-11-22	
	<150> 61816827	
	<151> 2013-04-29	
	<160> 12	
	<170> PatentIn版本 3.5	
	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于小鼠SDF-1的正向引物	
	<400> 1	
	gacggtaaac cagtcagcct	20
[0001]	<210> 2	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于小鼠SDF-1的反向引物	
	<400> 2	
	cacacttgtc tgttggtgtt cttc	24
	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于小鼠CD133的正向引物	
	<400> 3	
	tccagcaaac aagcaacaag	20
	<210> 4	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于小鼠CD133的反向引物	
	<400> 4	
	cctatgccga accagaaca	19

	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于小鼠VEGF的正向引物	
	<400> 5	
	cactggaccc tggttttact	20
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于小鼠VEGF的反向引物	
	<400> 6	
	ggtgatgttg ctctctgacg	20
	<210> 7	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于小鼠b-FGF的正向引物	
[0002]	<400> 7	
	caagggagtg tgtgcaa	18
	<210> 8	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于小鼠b-FGF的反向引物	
	<400> 8	
	tgcccagttc gtttcagt	18
	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于小鼠HGF的正向引物	
	<400> 9	
	atgagagagg cgaggagaag	20
	<210> 10	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	用于小鼠HGF的反向引物	
	<400>	10	
		gtagccccag ccgtaaata	19
	<210>	11	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
[0003]	<223>	用于小鼠 β -肌动蛋白的正向引物	
	<400>	11	
		tggcaccaca ctttctacaa t	21
	<210>	12	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	用于小鼠 β -肌动蛋白的反向引物	
	<400>	12	
		accagaggca tacagggaca	20

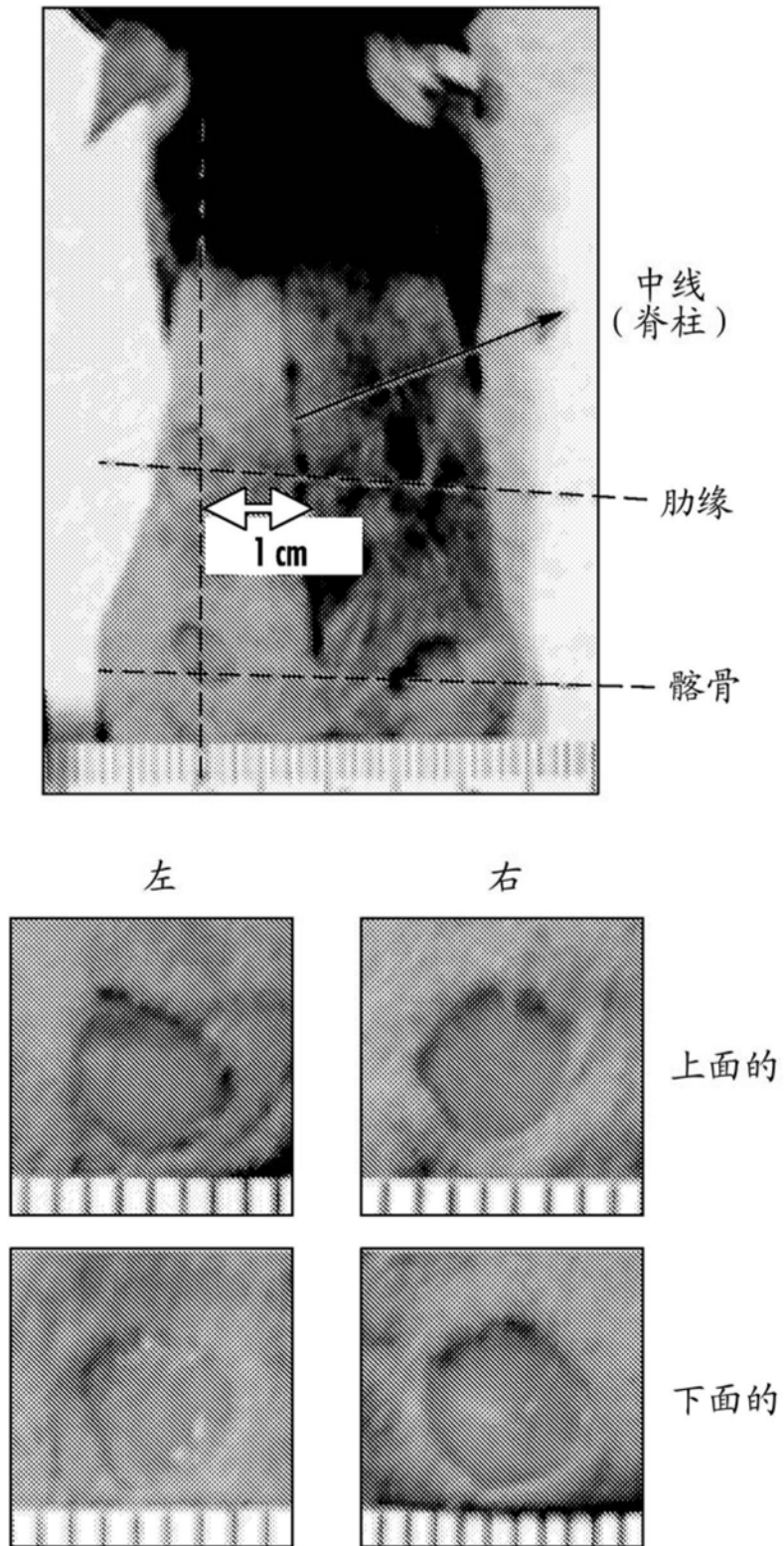


图1A

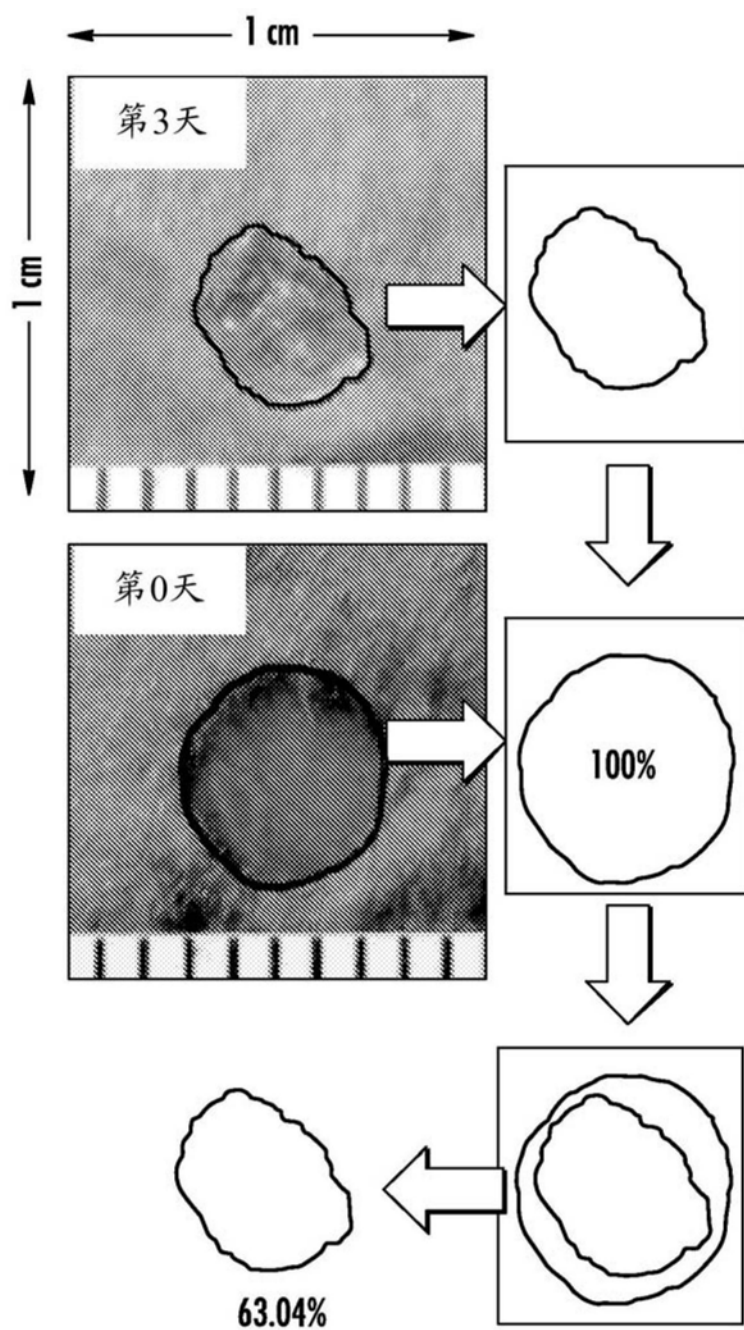


图1B

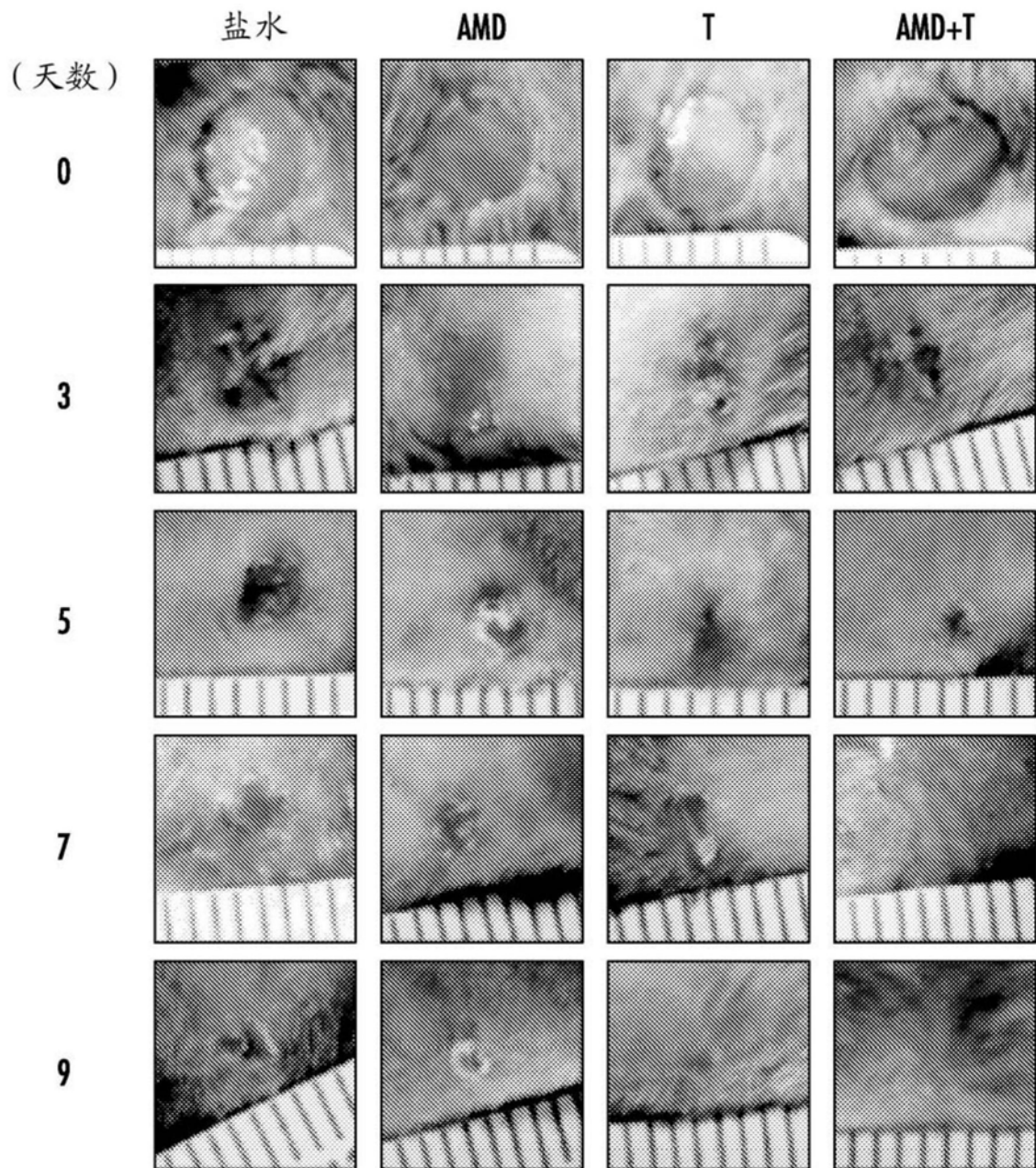


图1C

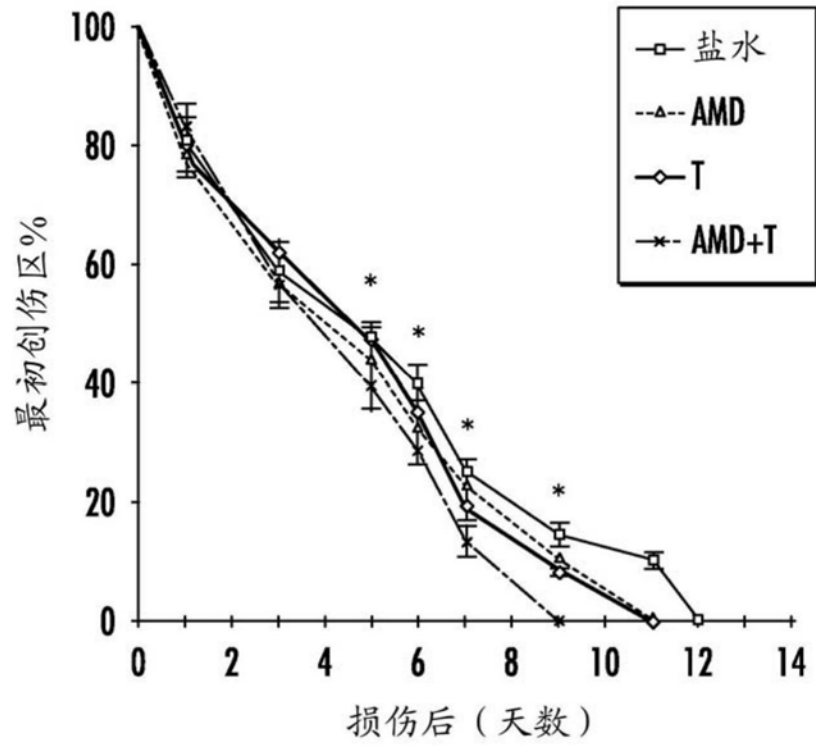


图1D

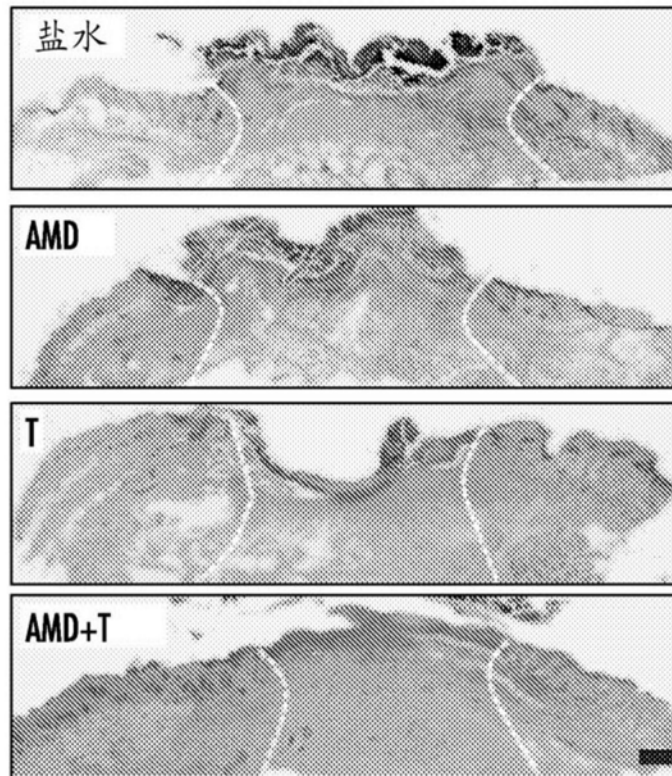


图1E

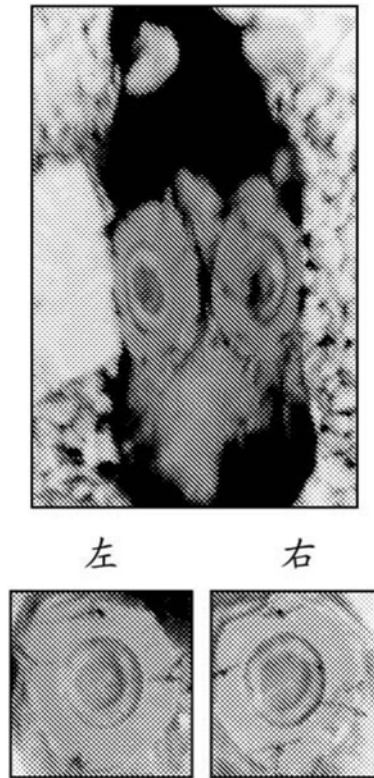


图1F

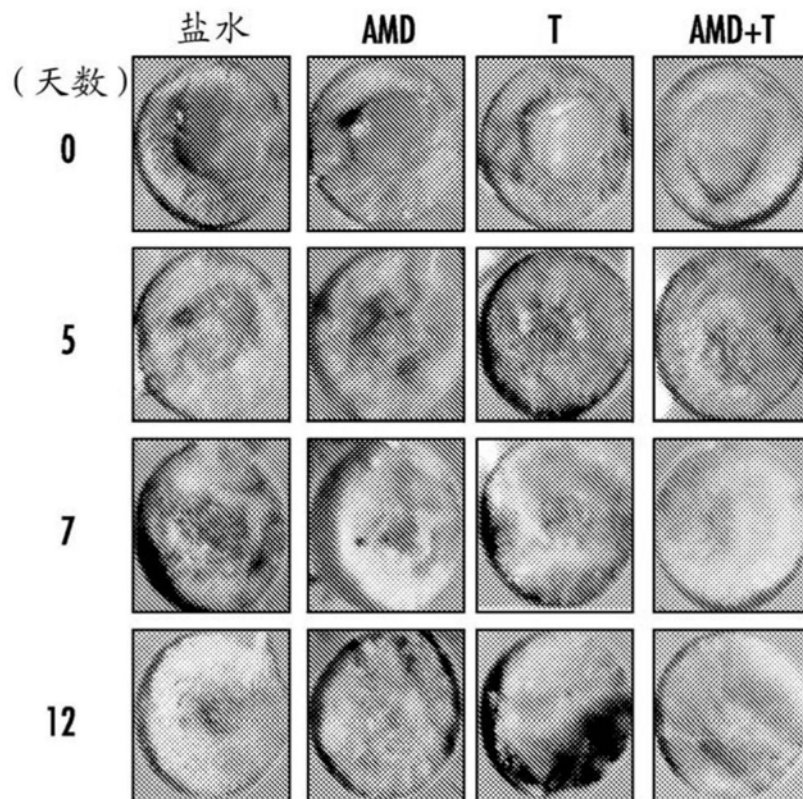


图1G

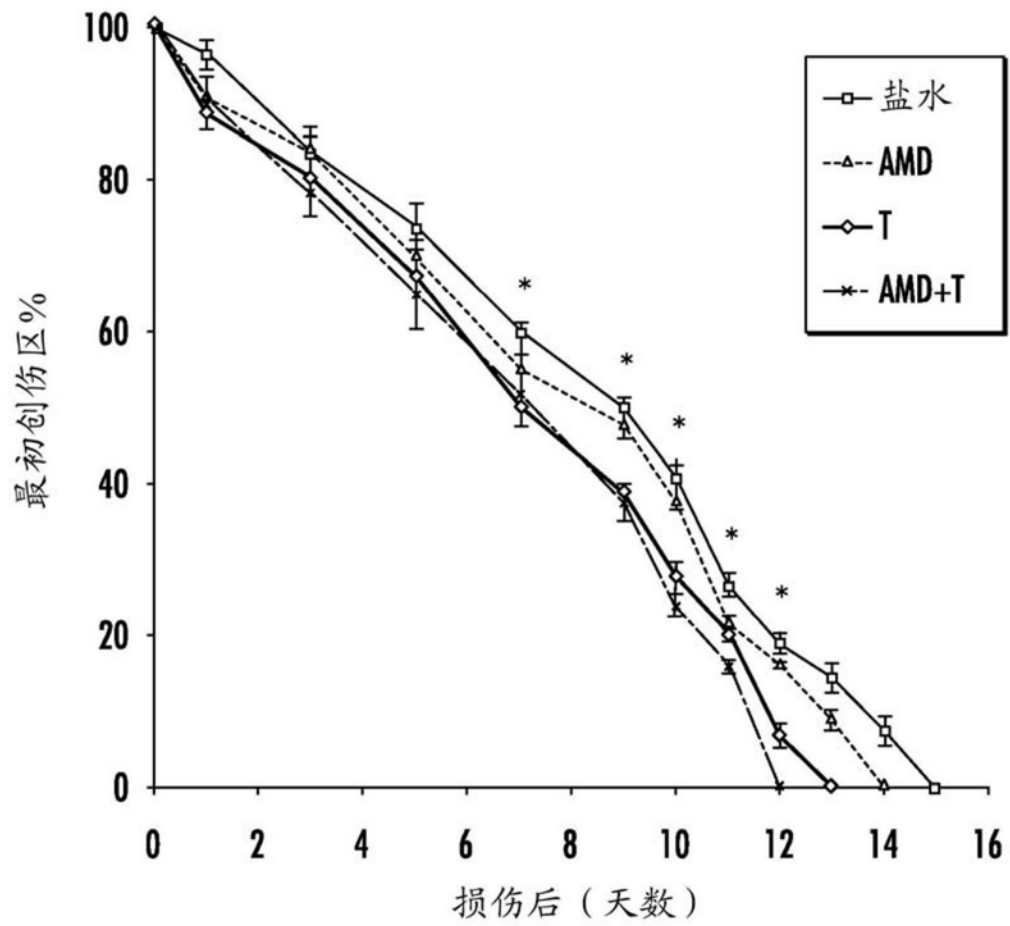


图1H

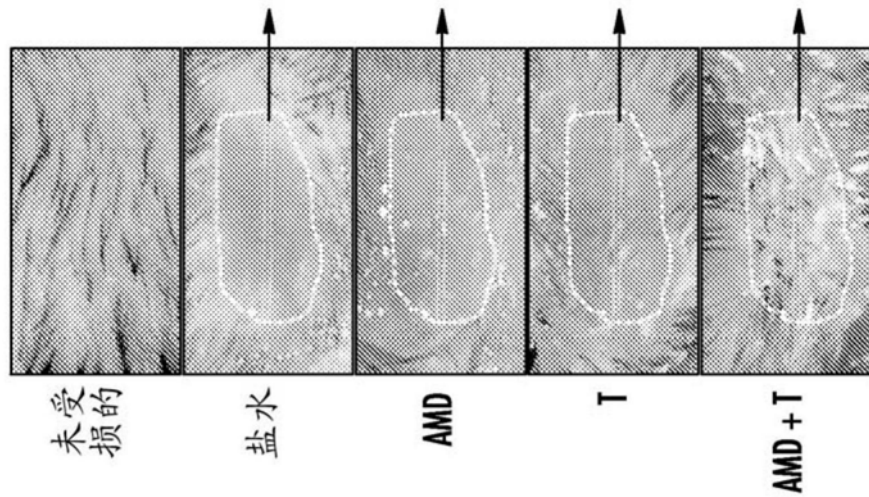


图2A

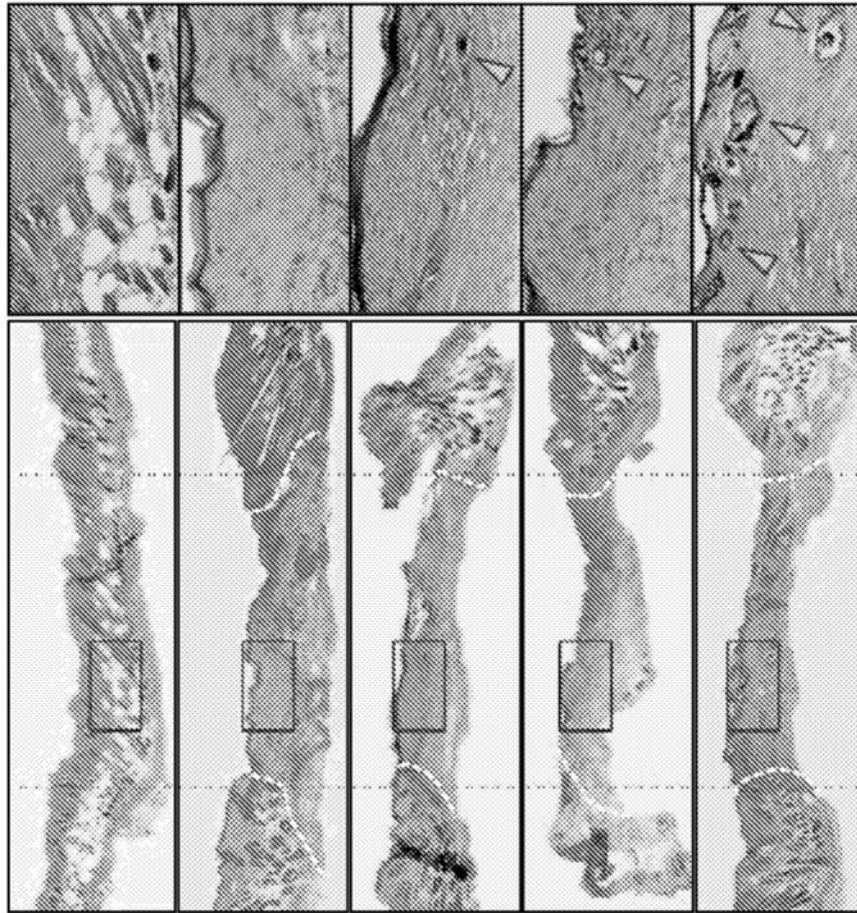


图2B



图2C

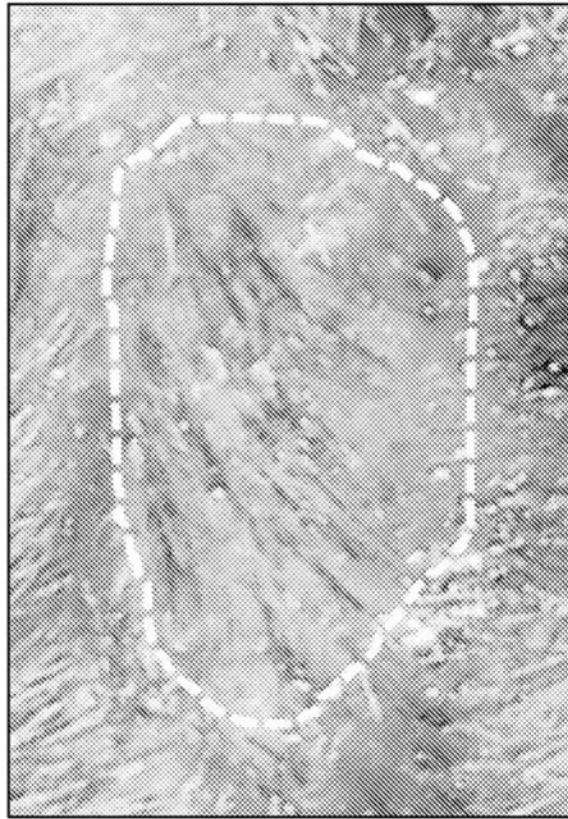


图2D

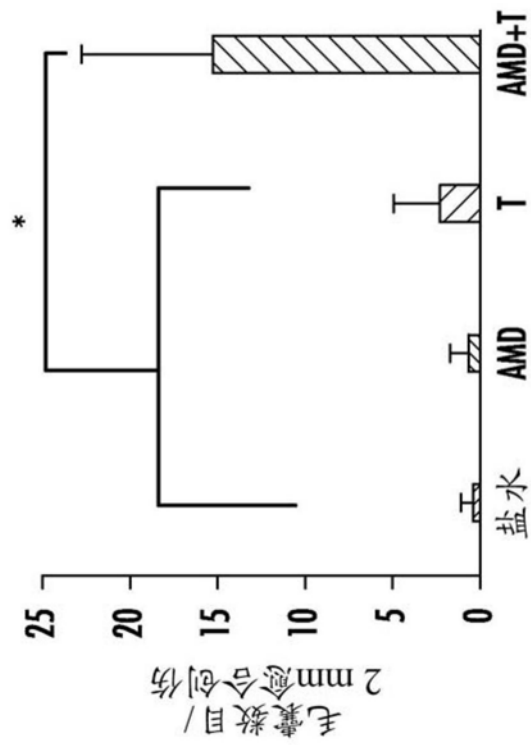


图2E

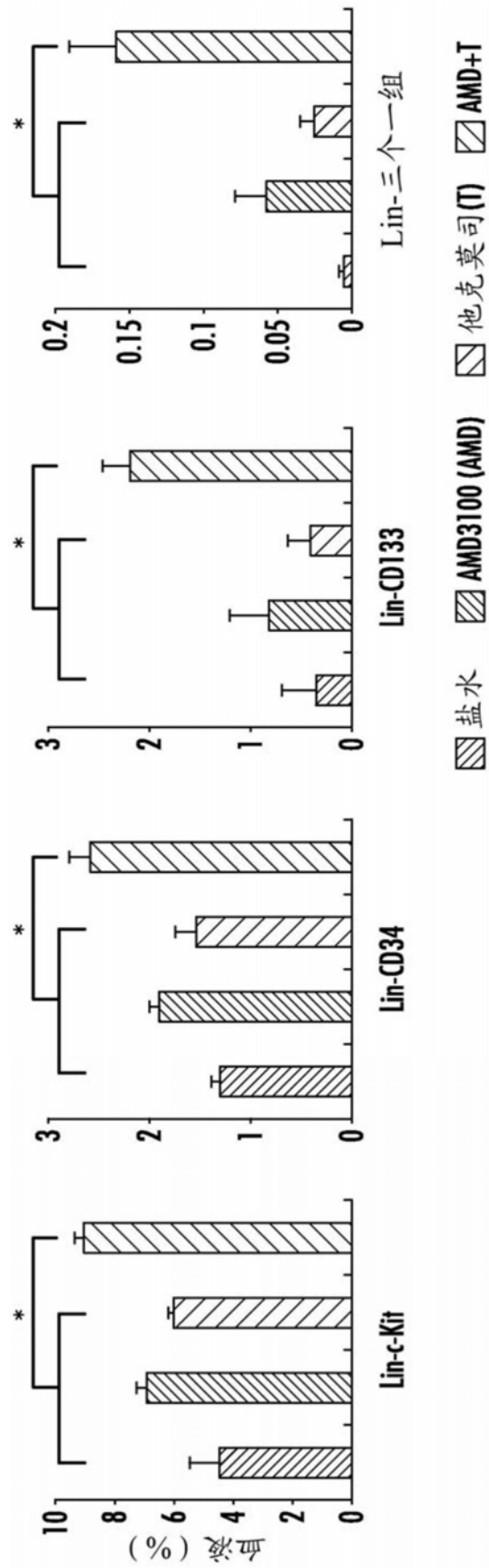


图3A

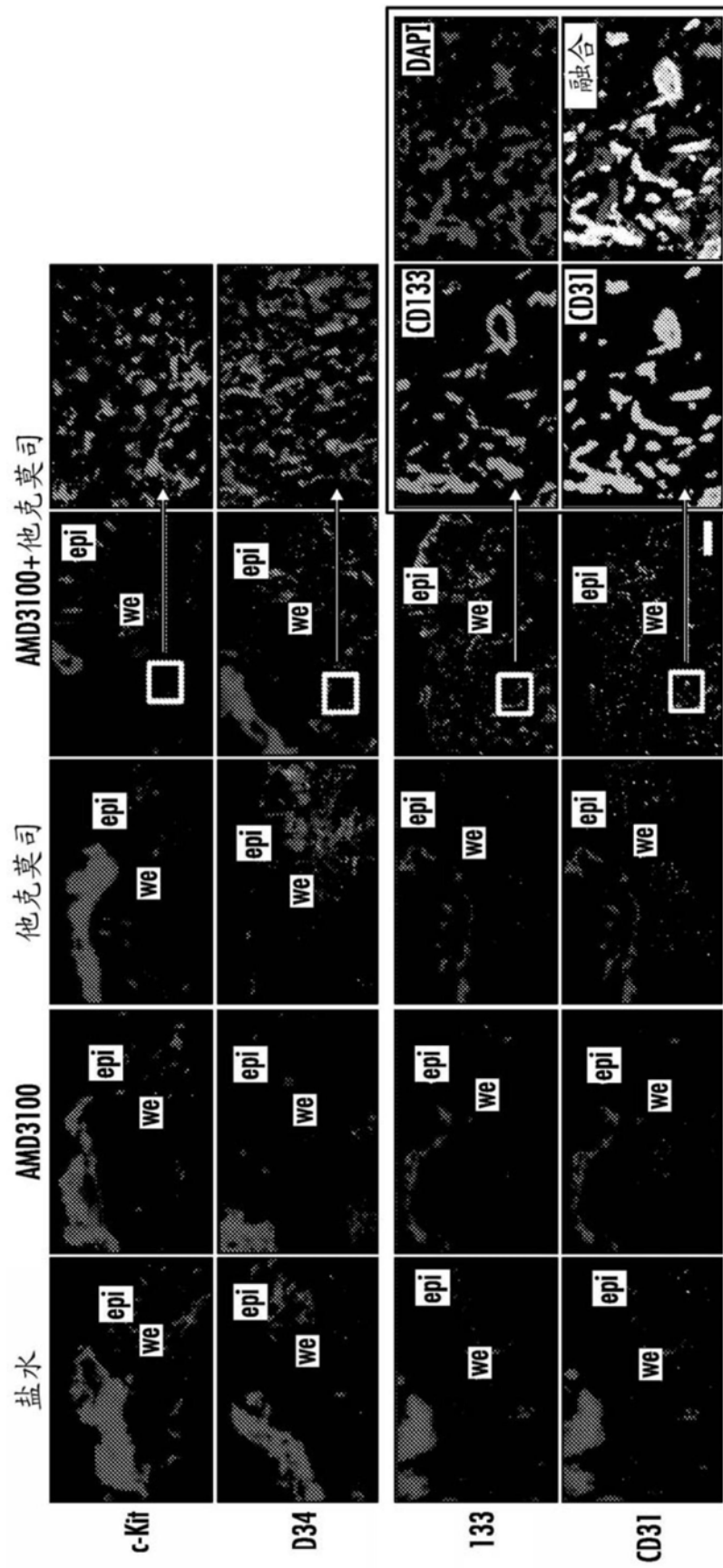


图3B

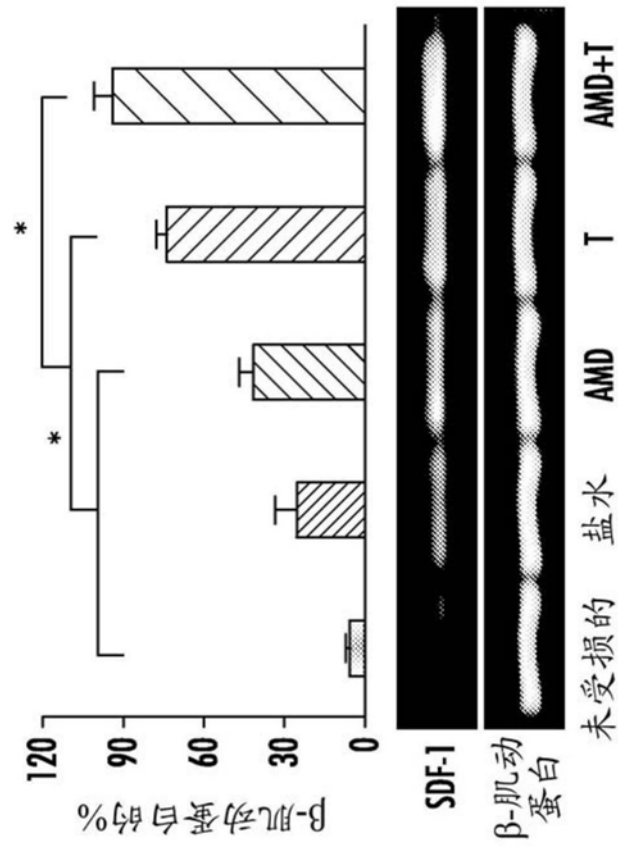


图4A

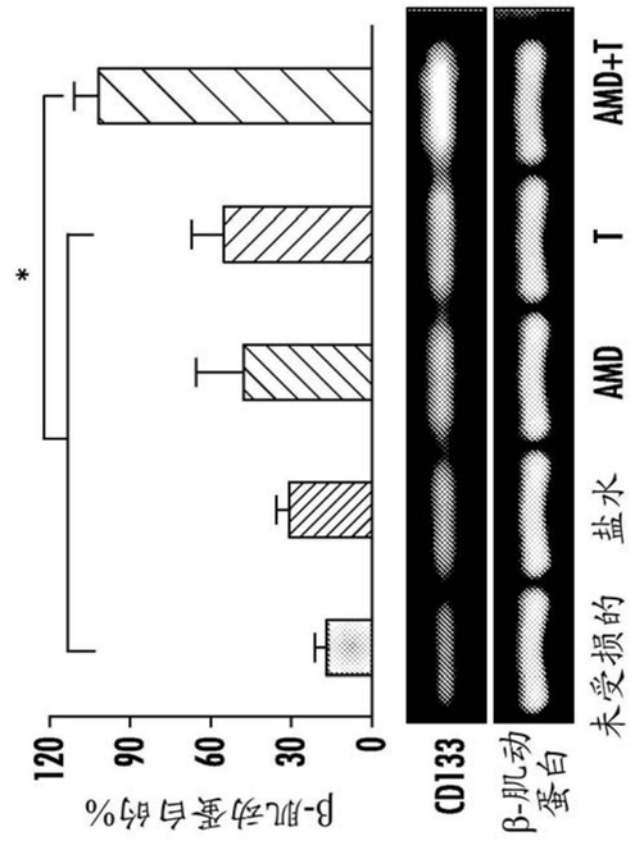


图4B

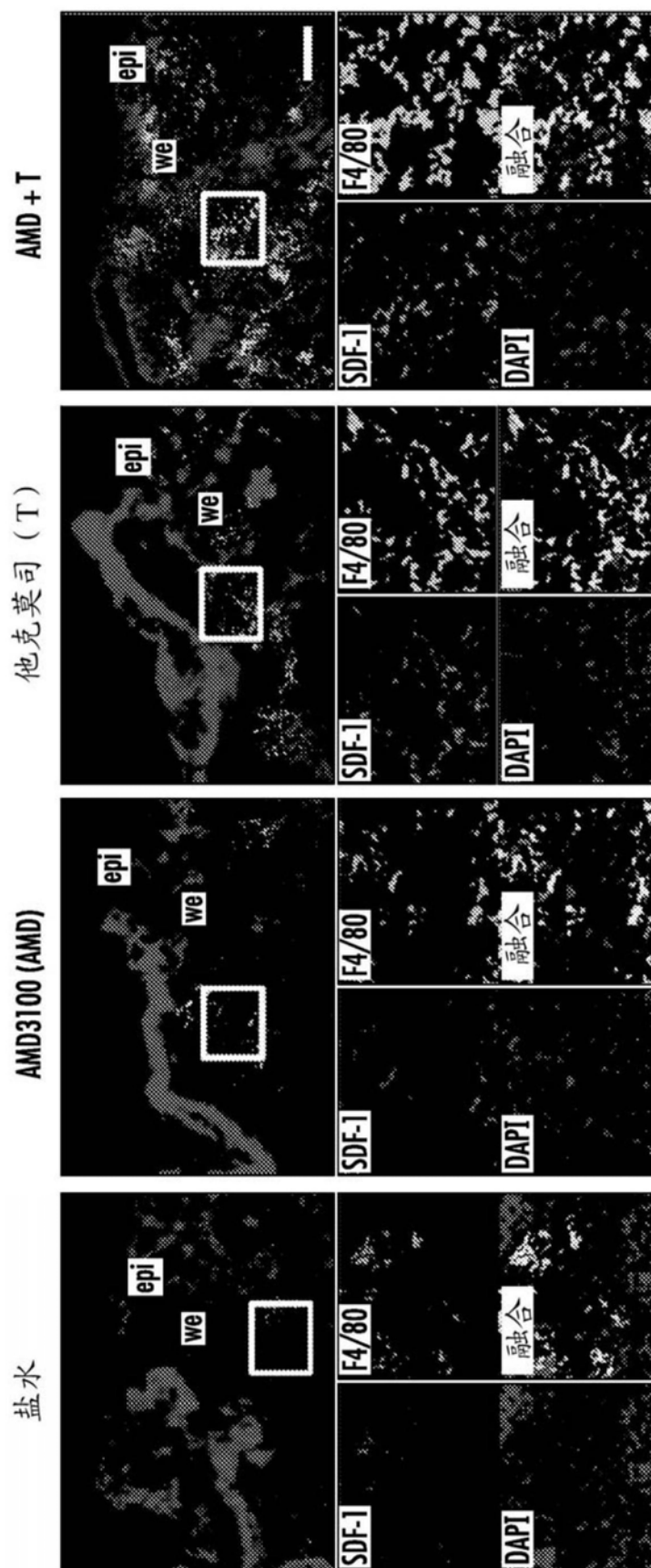


图4C

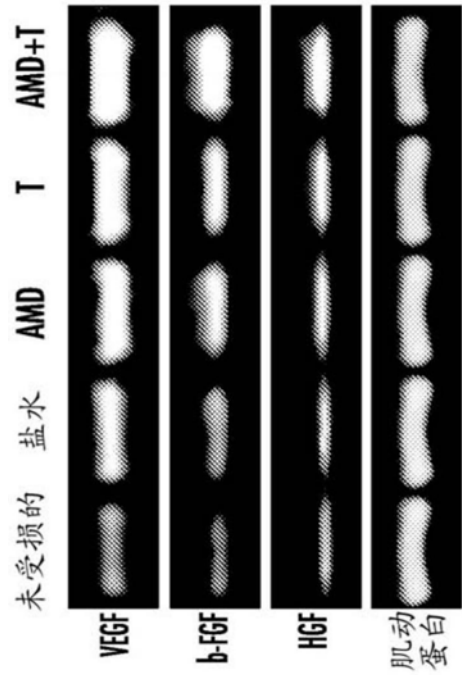


图5A

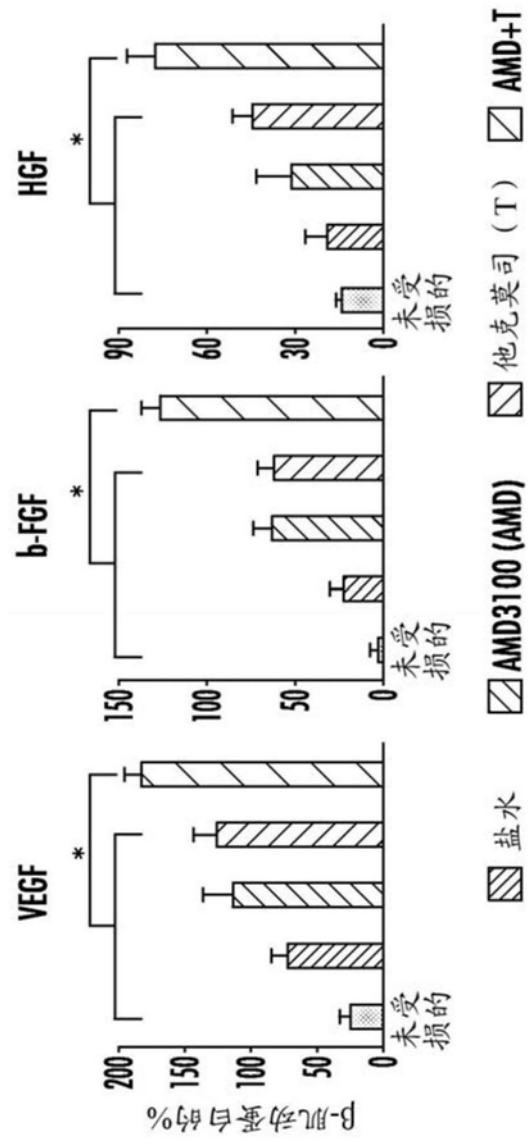


图5B

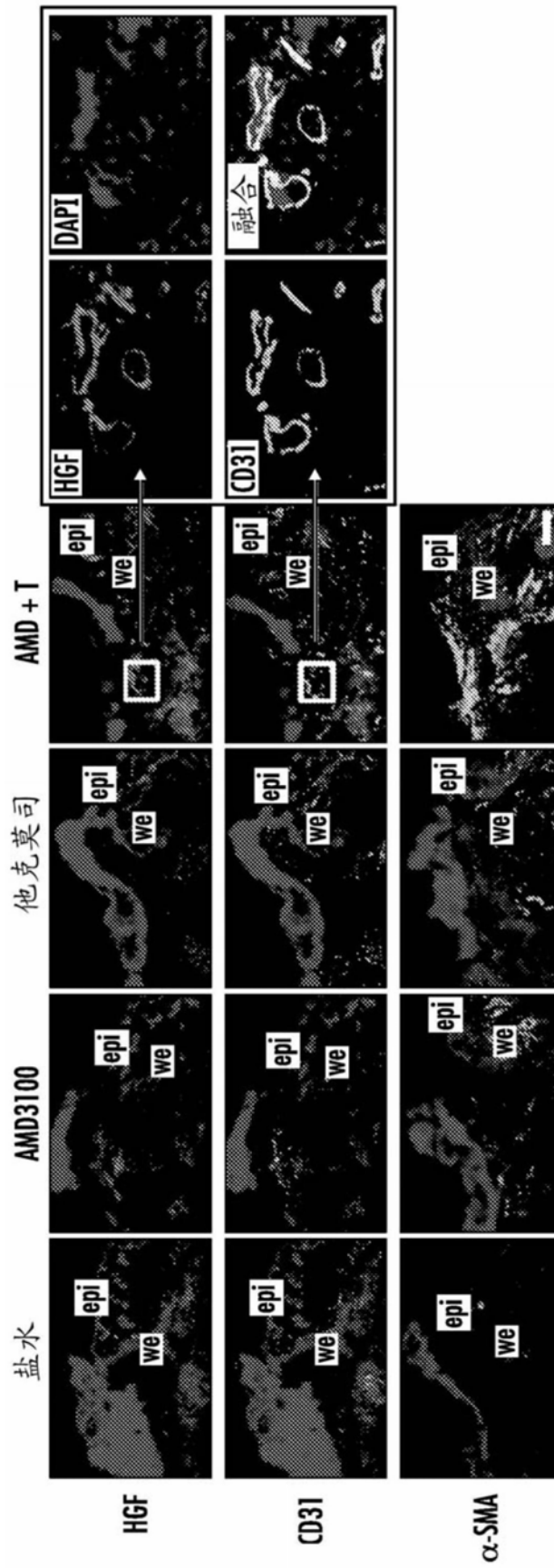


图5C

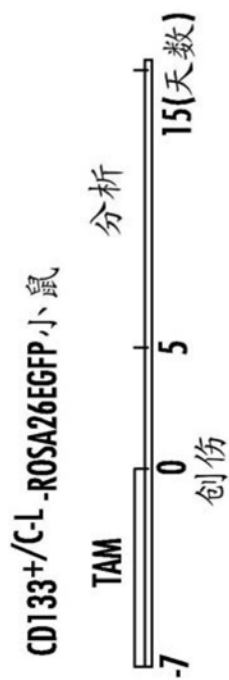


图6A

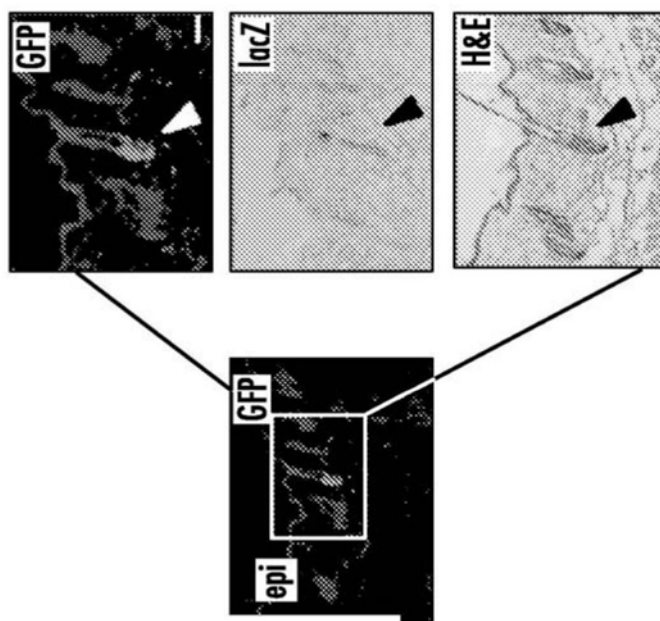


图6B

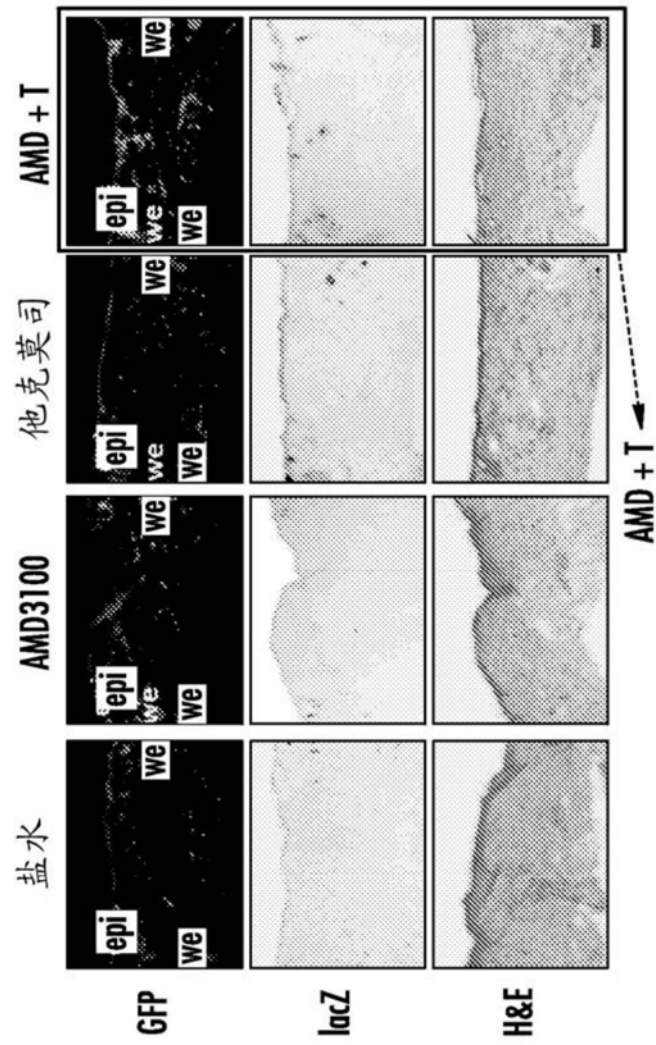


图6C

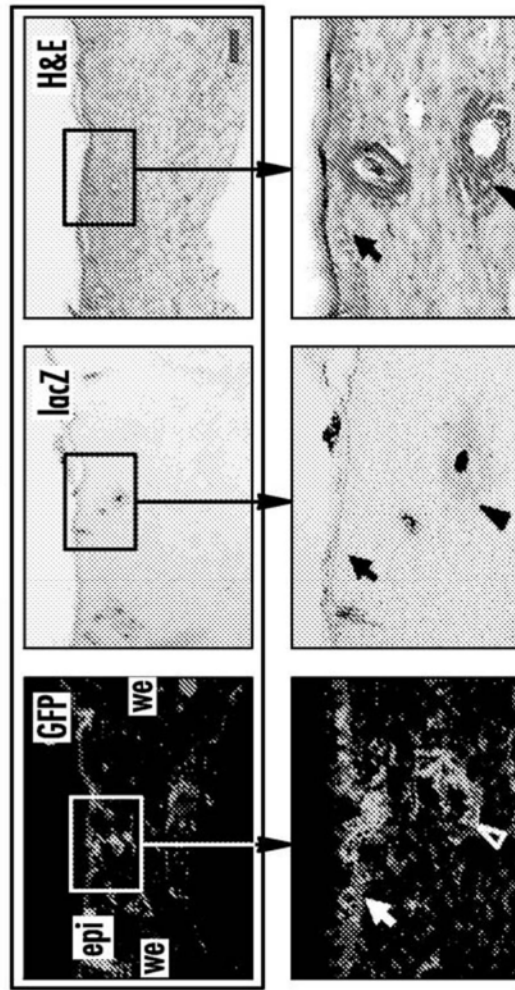


图6D

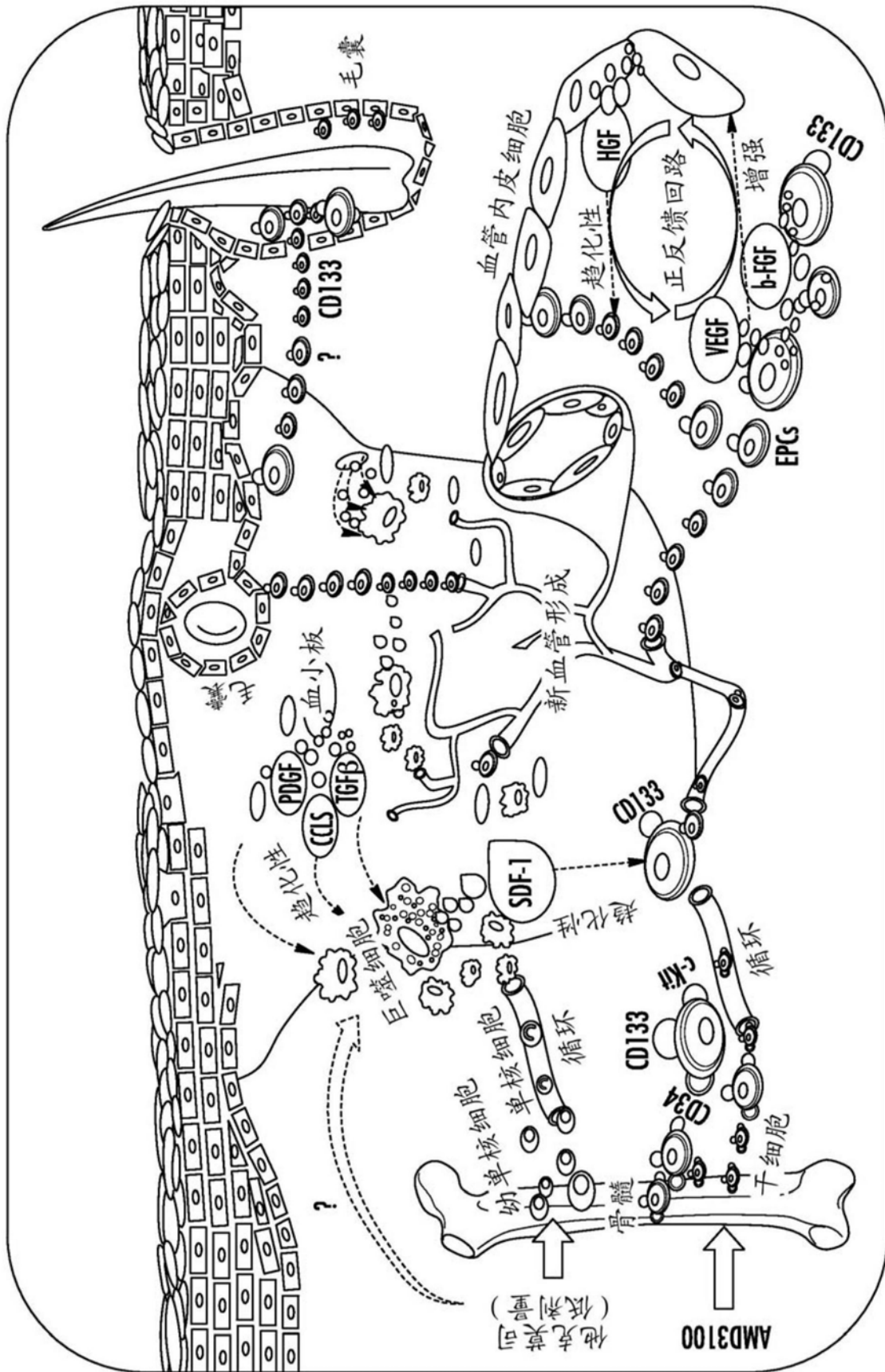


图6E

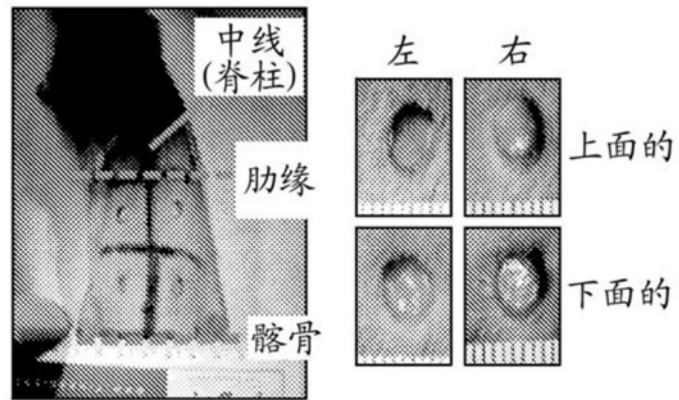


图7A

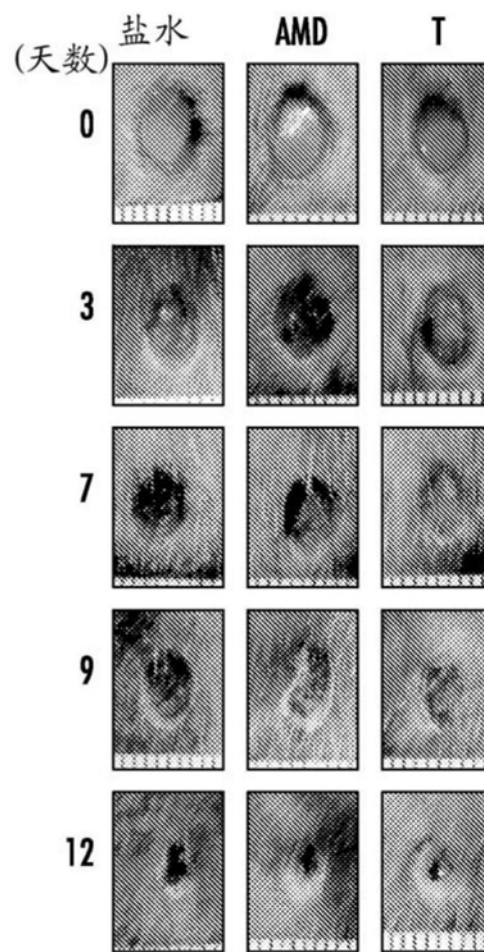


图7B

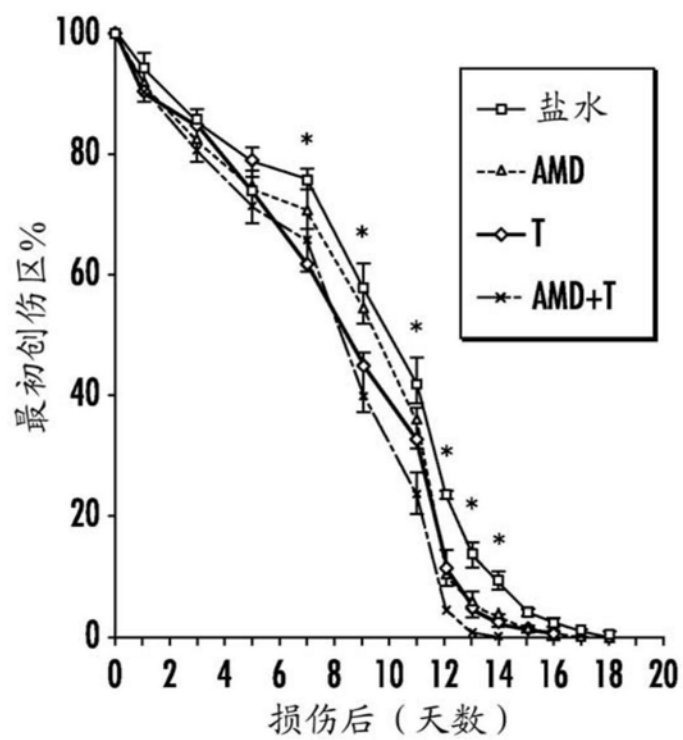


图7C

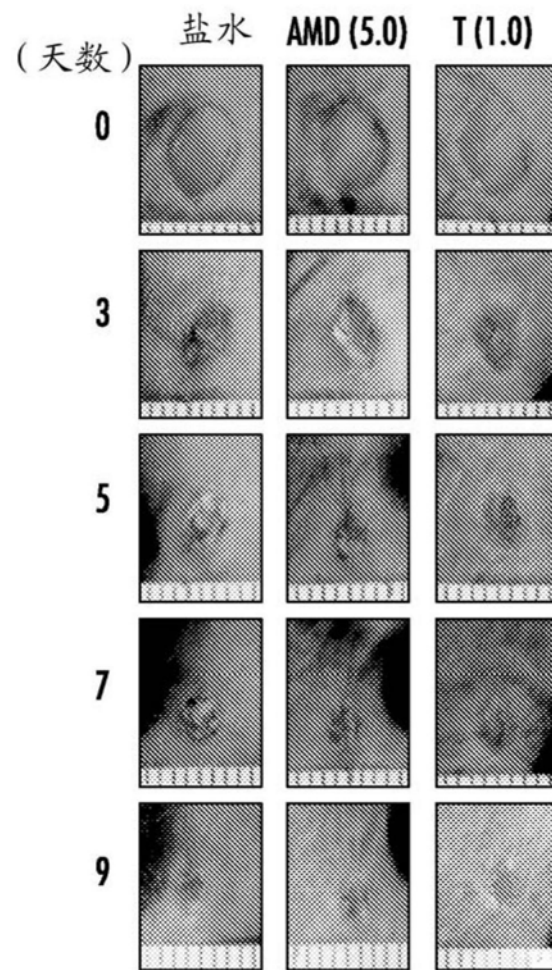


图8A

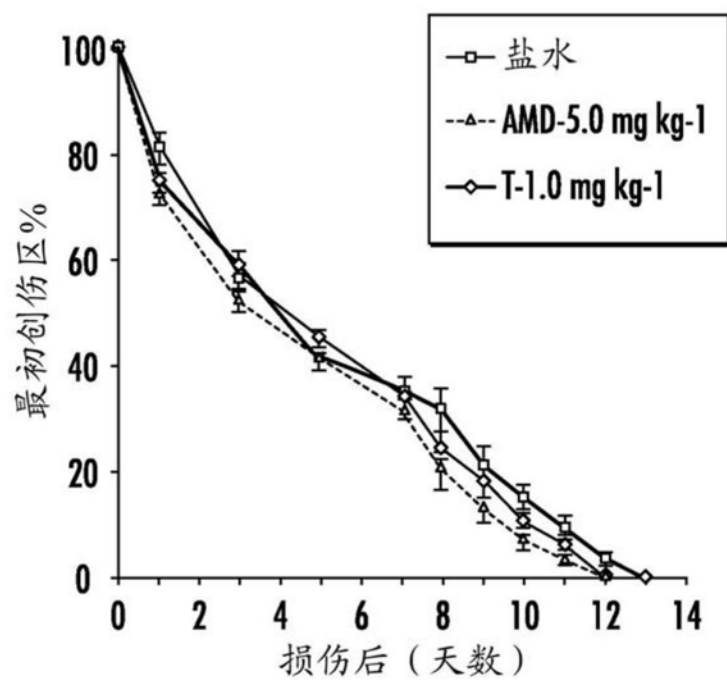


图8B

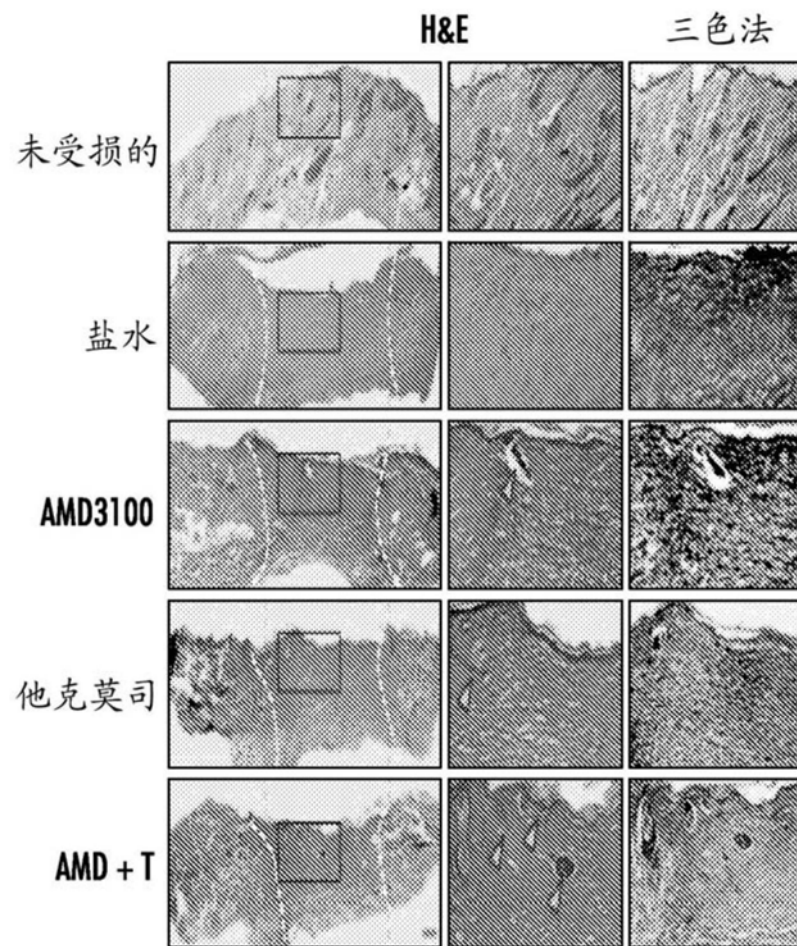


图9A

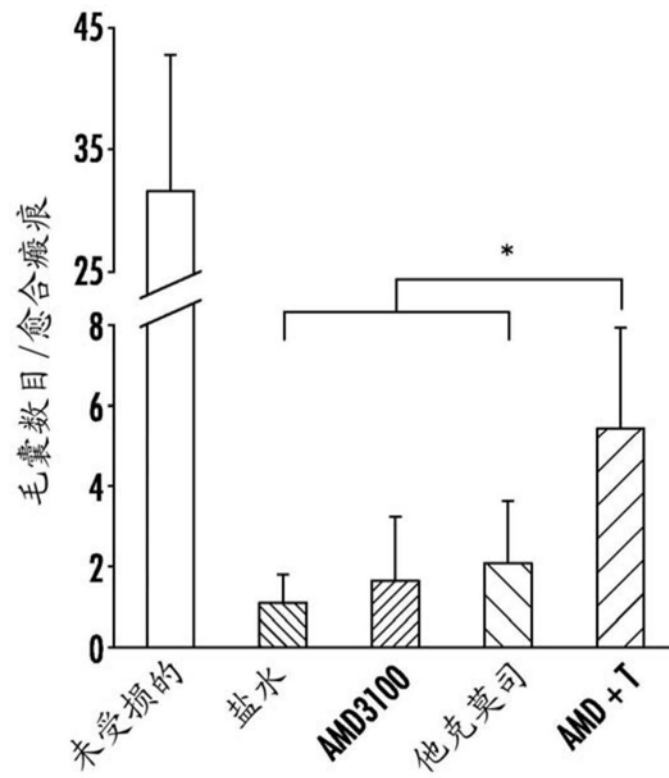


图9B

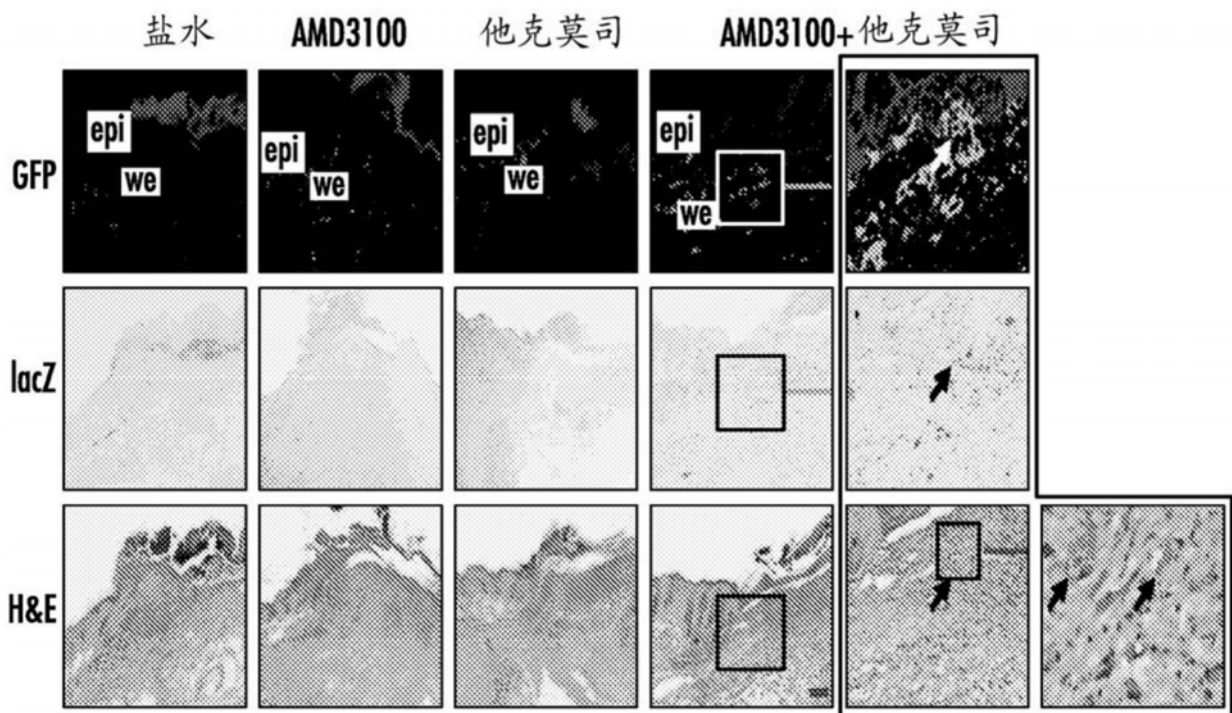


图10

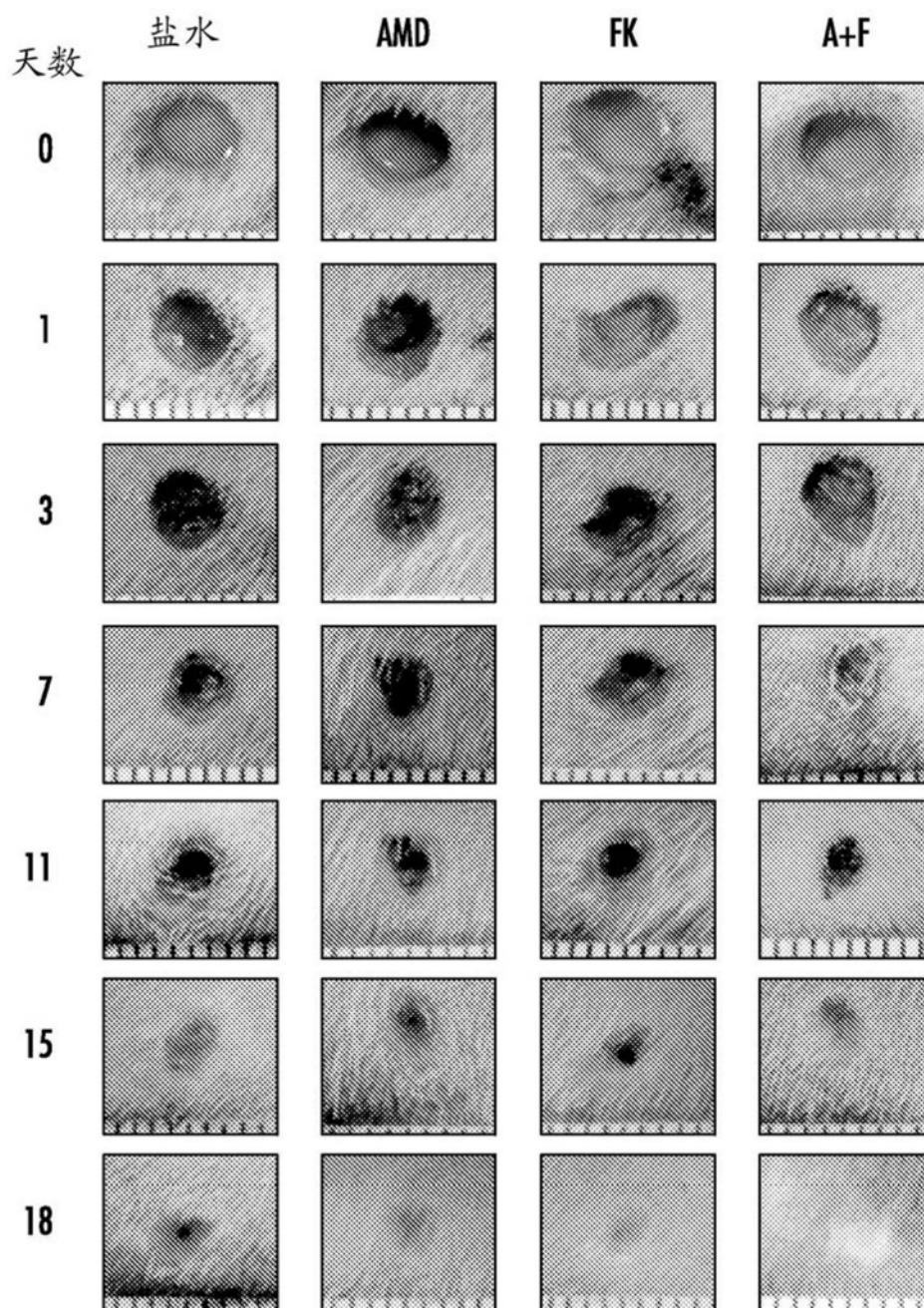


图11

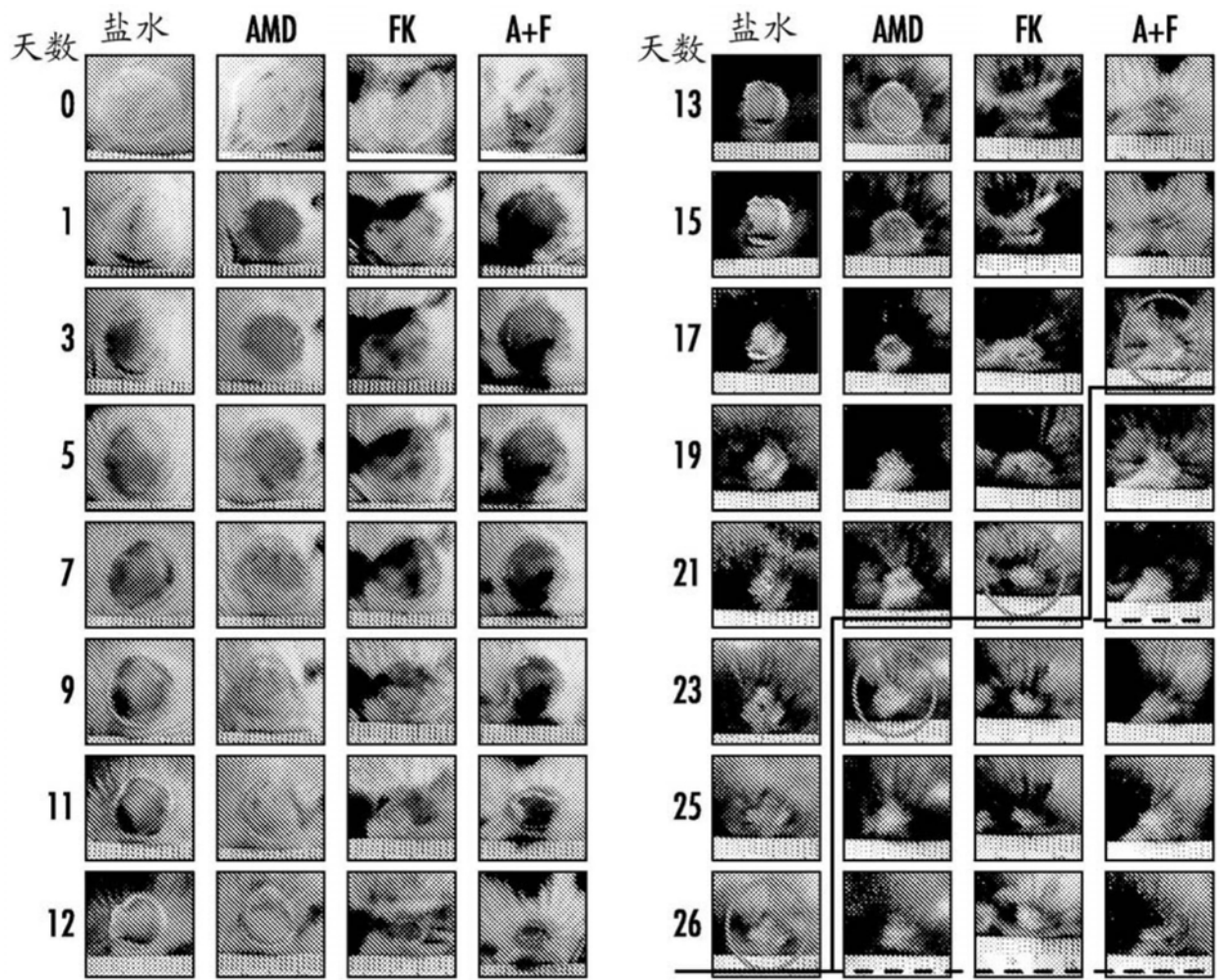


图12A

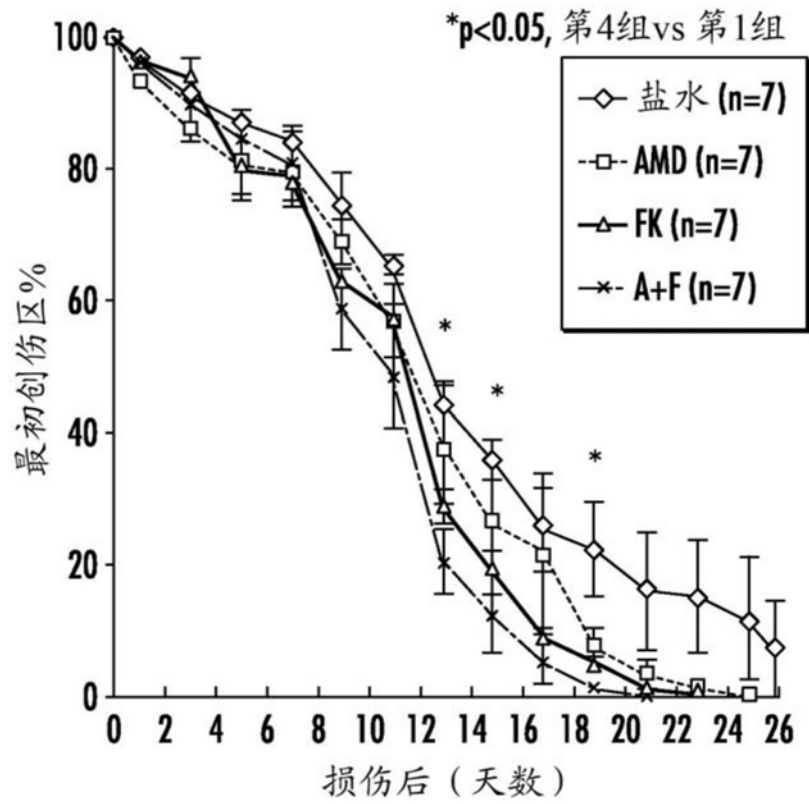


图12B

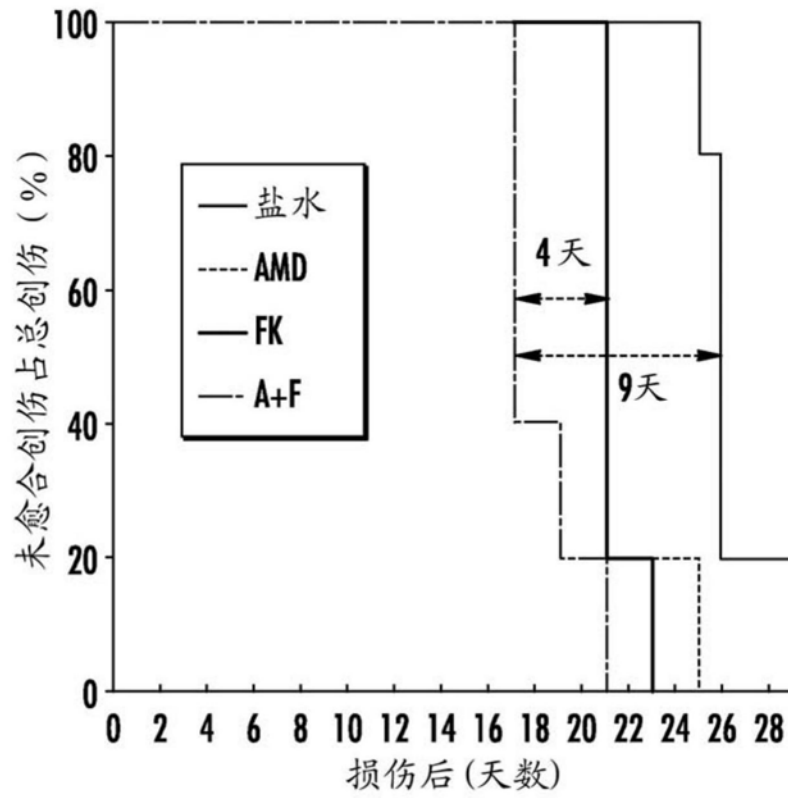


图12C

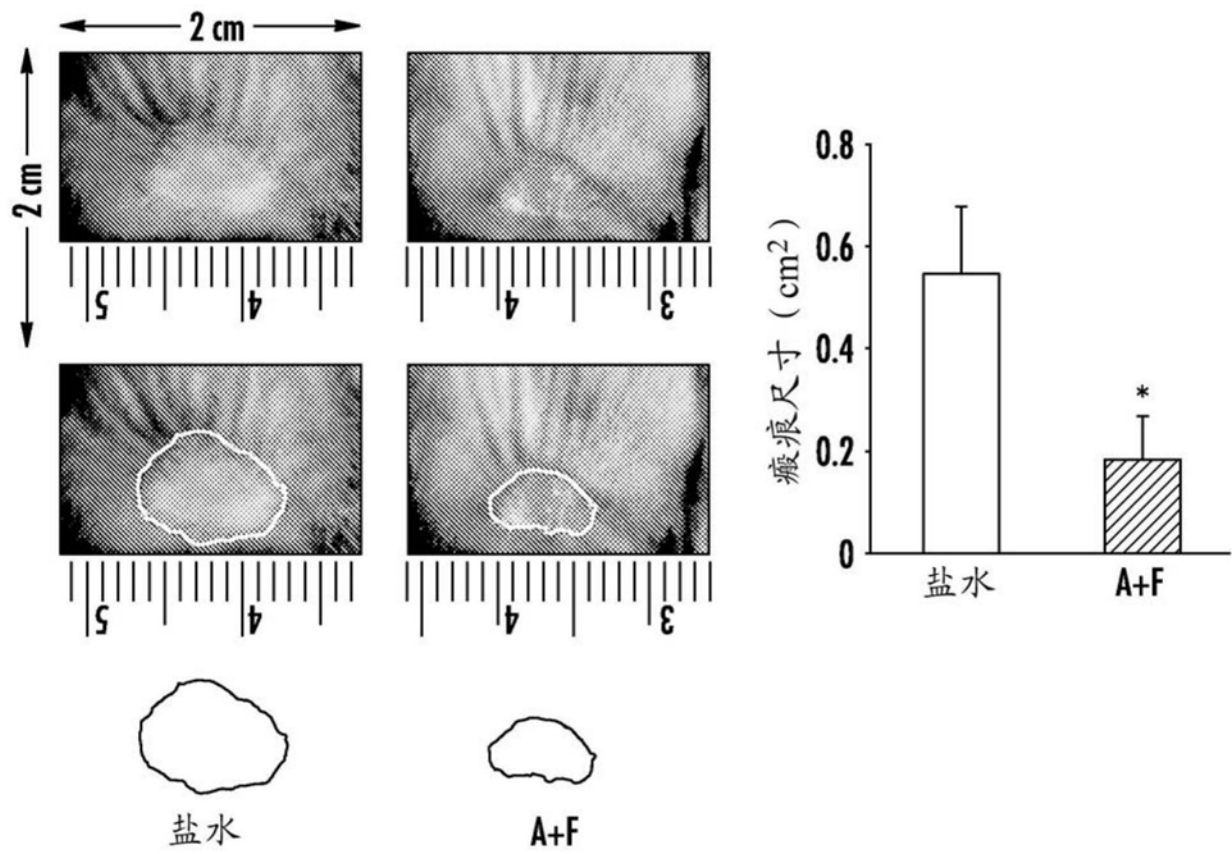


图13