



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103143055 A

(43) 申请公布日 2013. 06. 12

(21) 申请号	201210400991. 3	<i>A61P 1/00</i> (2006. 01)
(22) 申请日	2006. 05. 16	<i>A61P 9/14</i> (2006. 01)
(30) 优先权数据		<i>A61P 1/16</i> (2006. 01)
	11/167, 061 2005. 06. 24 US	<i>A61P 15/00</i> (2006. 01)
(62) 分案原申请数据		<i>A61P 15/02</i> (2006. 01)
	200680030622. 2 2006. 05. 16	<i>A61P 11/00</i> (2006. 01)
(71) 申请人	塞勒里克斯有限公司	<i>A61P 13/10</i> (2006. 01)
地址	西班牙马德里	<i>A61P 11/02</i> (2006. 01)
申请人	马德里自治大学	<i>A61P 25/00</i> (2006. 01)
(72) 发明人	马利亚赫马·费尔南德兹米格尔 曼努埃尔安赫尔·冈萨雷斯德拉培 尼亚 罗萨阿尼娅·加西亚卡斯特罗 马利亚诺·加西亚阿兰斯 达米安·加西亚奥尔莫	<i>A61P 43/00</i> (2006. 01)
(74) 专利代理机构	北京英赛嘉华知识产权代理 有限责任公司 11204	<i>C12N 5/0775</i> (2010. 01)
代理人	王达佐 洪欣	
(51) Int. Cl.		
	<i>A61L 17/08</i> (2006. 01)	
	<i>A61L 24/00</i> (2006. 01)	
	<i>A61L 27/38</i> (2006. 01)	
	<i>A61K 35/12</i> (2006. 01)	

权利要求书2页 说明书22页 附图6页

(54) 发明名称

脂肪组织衍生的基质干细胞在治疗痿中的用途

(57) 摘要

本发明提供采用脂肪组织衍生的基质干细胞治疗痿的新方法和组合物。

1. 含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物,其中所述组合物包含的所述脂肪组织衍生的基质干细胞的至少约 85% 表达 CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49A、CD51、CD54、CD55、CD58、CD59、CD90 和 CD105 标志物。

2. 如权利要求 1 所述的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物,其中所述组合物包含的所述脂肪组织衍生的基质干细胞的至少约 95% 表达 CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49A、CD51、CD54、CD55、CD58、CD59、CD90 和 CD105 标志物。

3. 如权利要求 2 所述的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物,其中所述组合物包含的所述脂肪组织衍生的基质干细胞的至少约 99% 表达 CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49A、CD51、CD54、CD55、CD58、CD59、CD90 和 CD105 标志物。

4. 如权利要求 3 所述的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物,其中所述组合物包含的所述脂肪组织衍生的基质干细胞的少于约 5% 表达 CD34、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD31、CD34、CD45、CD49f、CD102、CD104、CD106 和 / 或 CD133 标志物。

5. 如权利要求 1 所述的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物,其还包含林格溶液和 HSA。

6. 如权利要求 5 所述的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物,其中所述组合物包含的所述脂肪组织衍生的基质干细胞的浓度为至少约 10×10^6 细胞 /mL。

7. 如权利要求 6 所述的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物,其中所述组合物包含的所述脂肪组织衍生的基质干细胞的浓度为至少约 20×10^6 细胞 /mL。

8. 如权利要求 1 所述的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物,其还包含粘合剂。

9. 如权利要求 8 所述的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物,其中所述粘合剂为纤维蛋白胶或凝胶。

10. 包含权利要求 1 的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物的支持物。

11. 如权利要求 10 所述的支持物,其中所述支持物为缝线。

12. 如权利要求 10 所述的支持物,其中所述支持物为贴片。

13. 制备用于瘘修复的粘合剂的方法,包括用基于纤维蛋白的聚合物悬浮权利要求 1 的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物。

14. 脂肪组织衍生的基质干细胞,其表达 CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49A、CD51、CD54、CD55、CD58、CD59、CD90 和 CD105 标志物,不表达 CD34、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD31、CD34、CD45、CD49f、CD102、CD104、CD106 和 / 或 CD133 标志物。

15. 同种异体的脂肪组织衍生的基质干细胞在制备用于治疗个体中瘘的药物组合物中的用途。

16. 如权利要求 15 所述的用途,其中所述脂肪组织衍生的基质干细胞包括权利要求 1 至 9 中任一权利要求定义的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物或者权利要求 14 所述的脂肪组织衍生的基质干细胞。

17. 如权利要求 15 所述的用途,其中所述药物组合物包含至少约 10×10^6 脂肪组织衍生的基质干细胞。

18. 如权利要求 15 所述的用途,其中在用缝线封闭瘘道内孔后将所述药物组合物作为第一剂被递送至所述封闭的内孔。

19. 如权利要求 15 所述的用途,其中在用缝线封闭瘘道内孔后将所述药物组合物作为

第一剂被递送至所述瘘道壁的一个或多个部位。

20. 如权利要求 18 或 19 所述的用途,其中所述药物组合物包含至少约 10×10^6 脂肪组织衍生的基质干细胞。

21. 如权利要求 18 或 19 所述的用途,其中在所述第一剂所述药物组合物之后,向所述封闭缝合的内孔或瘘道壁的一个或多个部位递送第二剂所述药物组合物。

22. 如权利要求 21 所述的用途,其中所述第二剂所述药物组合物包含至少约 20×10^6 脂肪组织衍生的基质干细胞。

23. 如权利要求 15 所述的用途,其中所述脂肪组织衍生的基质干细胞被包含在缝线中。

24. 如权利要求 15 所述的用途,其中所述脂肪组织衍生的基质干细胞被递送至用于填充瘘道的材料。

25. 如权利要求 24 所述的用途,其中所述材料为基于纤维蛋白的聚合物或粘合剂,例如纤维蛋白胶或凝胶。

26. 如权利要求 24 所述的用途,其中所述瘘为肛门直肠瘘、肛瘘、粪瘘、动静脉瘘、胆瘘、子宫颈瘘、鼻脑脊液瘘、肠肠瘘、肠皮瘘、肠阴道瘘、胃瘘、子宫腹膜瘘外淋巴、肺动静脉瘘、直肠阴道瘘、脐瘘、气管食管瘘或膀胱阴道瘘。

27. 如权利要求 26 所述的用途,其中所述瘘为肛门直肠瘘、肠直肠瘘、肠皮瘘、直肠阴道瘘或膀胱阴道瘘。

28. 如权利要求 24 所述的用途,其中所述药物组合物与治疗剂被联合给药至所述治疗中的个体。

29. 如权利要求 28 所述的用途,其中所述治疗剂被全身给药或在缝合部位局部给药。

30. 如权利要求 29 所述的用途,其中所述药物组合物包含所述治疗剂。

31. 如权利要求 28 所述的用途,其中所述治疗剂相对于所述包含所述脂肪组织衍生的基质干细胞的药物组合物被分开给药。

32. 如权利要求 28 所述的用途,其中所述治疗剂为抗炎剂、免疫抑制剂、生物试剂、抗生素或止泻剂。

脂肪组织衍生的基质干细胞在治疗瘘中的用途

[0001] 相关申请参考

[0002] 本申请是 2005 年 2 月 25 日提交的美国专利申请 11/065,461 的部分继续申请以及 2005 年 2 月 14 日提交的美国专利申请 11/056,241 的部分继续申请,在此将这些申请的内容整体通过参考明确并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 一般而言,瘘是正常情况下不连接的器官或脉管之间的异常连接或通道。瘘可以发生在身体的多个部位。例如,瘘的种类,以它们在身体中发生的区域命名,包括肛门直肠瘘或肛瘘或粪瘘(直肠或其它肛门直肠部位与皮肤表面之间)、动静脉瘘或 A-V 瘘(动脉和静脉之间)、胆瘘(胆管和皮肤表面之间,通常由胆囊手术造成)、子宫颈瘘(子宫颈中的异常开口)、鼻脑脊液瘘(颅内腔和鼻旁窦之间)、肠肠瘘(肠的两个部位之间)、肠皮肤瘘(肠和皮肤表面之间,即从十二指肠或空肠或回肠起)、肠阴道瘘(肠和阴道之间)、胃瘘(胃和皮肤表面之间)、子宫腹膜瘘(子宫和腹膜腔之间)、外淋巴瘘(中耳和内耳之间的膜之间的裂口)、肺动静脉瘘(肺的动脉和静脉之间,导致血液分流)、直肠阴道瘘(直肠和阴道之间)、脐瘘(脐和肠之间)、气管食管瘘(呼吸和饲管之间)以及膀胱阴道瘘(膀胱和阴道之间)。瘘的病因包括创伤、内科治疗的并发症和疾病。

[0005] 瘘的治疗随病因和瘘的程度而变,但是一般涉及外科手术。多种手术方法被经常使用,最经常的是瘘道切开术、放置泄液线(穿过瘘的通道的绳索用于保持其开放而引流)、或直肠内瓣方法(其中健康组织被拉过来置于瘘的内侧以使粪便或其它物质不会再感染该通道)。对于肛门直肠瘘的手术并非没有副作用,包括复发、再感染和失禁。

[0006] 诸如克罗恩病和溃疡性结肠炎的炎性肠病为肛门直肠瘘、肠肠瘘、肠皮肤瘘的主要病因。在克罗恩病中所报道的瘘发生率为 17% 至 50%。对克罗恩病患者中瘘的治疗仍代表了极有挑战性的问题,因为很多这类瘘对可用的疗法没有反应。这类瘘以及它们的复发是非常让人痛苦的并发症,它们显著地降低了受累患者的生活质量。内科疗法的最新改进(例如用 **Infliximab®** 治疗)和专业的手术处理已经减少了对复杂手术的需要。然而,许多患者未被治愈。瘘治愈失败可能是由于受克罗恩病影响的组织的非最佳质量。实际上,克罗恩瘘为一些最坏的可能条件下的伤口愈合提供了模式系统。

[0007] 瘘的另一主因是诸如由强奸或由分娩期间持续损伤引起的对阴道和膀胱和 / 或直肠的创伤,导致直肠阴道瘘和膀胱阴道瘘。在发展中国家每年大约有 100,000 妇女在梗阻性分娩期间遭受这类瘘(也称为产科瘘)。梗阻性分娩期间,婴儿的头对母亲骨盆的压力切断了对该区域脆弱组织的血液供应。死组织脱落,该妇女留下膀胱阴道瘘,有时还有直肠阴道瘘。这种孔导致永久性的尿和 / 或粪便失禁。联合国人口基金会 (UNFPA) 估计产科瘘受害者的全球人数超过两百万。这个计算结果可能是显著的低估。首次手术修补的成功率在 88% 至 93%,但随后的尝试的成功率会降低。因此,大比例的妇女具有不能通过手术修复的产科瘘。

[0008] 亟需瘘的新疗法。

发明内容

[0009] 除了其它方面以外,本发明提供新的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物。本文描述的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物具有独特的表型,并表现出比以前描述的脂肪组织衍生的基质干细胞组合物更好的表型同质性,因此使得它们比以前描述的组合物更适合用于治疗瘻和伤口。含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物可以与溶液或其它物质一起配制,以用作药物或医疗用具,例如缝线或粘合剂。此外,还提供采用脂肪组织衍生的基质干细胞治疗瘻和伤口的新方法以及用于实施该方法的试剂盒。

[0010] 本发明的这些实施方案、其它实施方案以及它们的特点和特征将会由于以下的说明、附图和权利要求而显而易见。

[0011] 附图简要说明

[0012] 图 1 显示了由实施例 1 的方法分离的细胞通过免疫荧光染色的表征结果。免疫阳性细胞的频率表示如下:-, 小于 5%;+/-, 6-15%;+, 16-50%;++, 51-85%;以及 +++, 86-100%。P, 传代次数。

[0013] 图 2 显示了脂肪组织衍生的基质干细胞的间接免疫荧光表征。来自患者 #001 的细胞在植入 no. 6 后传代 6 细胞。蓝色表示 DAPI 染色的核。(A) CD90; (B) c-Kit; (C) 波形蛋白。

[0014] 图 3 总结了采用本发明的一些方法和组合物获得的临床结果。F, 女性;M, 男性;NI, 未植入;NA, 未分析。

[0015] 图 4 显示了脂抽吸物衍生的细胞在不同 FBS 浓度 (0.5、2.5 和 10%, 如所指明的) 时的生长曲线。人滑液成纤维细胞在 5% 或 10% FBS 存在下培养。以 595nm 处的吸光度显示细胞数目 $\pm$ SD。数据来自三个重复孔的有代表性试验。

[0016] 图 5 显示在靠近缝合的内开口处注射细胞后直肠粘膜中的泡。

[0017] 图 6 显示注射细胞之前 (A) 和 8 周后 (B) 瘻的照片。

[0018] 图 7A 显示了荧光免疫细胞计量的直方图,其对应于从参与本项研究的患者的吸脂样品分离的细胞在传代 6 次时获得的表面标志物谱 (CD3、CD9、CD10、CD11b、CD13、CD14、CD 15、CD16、CD18、CD19、CD28、CD29、CD31、CD34、CD36、CD38、CD44、CD45、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e 和 CD49f)。

[0019] 图 7B 显示了荧光免疫细胞计量的直方图,其对应于从参与本项研究的患者的吸脂样品分离的细胞在传代 6 次时获得的表面标志物谱 (CD50、CD51、CD54、CD55、CD56、CD58、CD59、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD90、CD95、CD102、CD104、CD105、CD106、CD133、CD166、glicoforina、 β 2 微球蛋白、HLA I、HLA II 和 NGFR)。

[0020] 发明详细说明

[0021] 1. 定义:

[0022] 用在本文时,以下的术语和短语应具有以下指出的意义。除非另有说明,在此使用的所有科技术语都与本发明所属领域普通技术人员所通常理解的意义相同。

[0023] 冠词“a”和“an”指该冠词语法对象的一个或多个 (即至少一个)。举例而言,“an element”指一个或多个元件。

[0024] “脂肪组织”指任何脂肪组织。脂肪组织可以是衍生自皮下、网膜 / 内脏、乳房、生殖腺或其它脂肪组织部位的棕色或者白色脂肪组织。优选地,该脂肪组织为皮下白色脂肪

组织。这类细胞可以包含原代细胞培养物或永生细胞系。该脂肪组织可以来自任何具有脂肪组织的器官。优选地,该脂肪组织是哺乳动物脂肪组织,最优选的脂肪组织是人脂肪组织。方便的脂肪组织源来自吸脂手术,但是脂肪组织源或分离脂肪组织的方法对本发明并不关键。如果基质细胞为向个体自体移植所需,则脂肪组织分离自该个体。

[0025] “脂肪组织衍生的基质干细胞”指源自脂肪组织的间充质干细胞。

[0026] 术语“粘合剂”指将表面联合或结合在一起的任何物质,例如胶。

[0027] 术语“细胞组合物”指细胞制剂,该制剂除了细胞之外还可以包括非细胞组分,例如细胞培养基,如蛋白、氨基酸、核酸、核苷酸、辅酶、抗氧化剂、金属等等。此外该细胞组合物可具有不影响该细胞组分生长或存活力的组分,但是它们用于将细胞以特定形式提供,例如,作为聚合物基质用于包囊或药物制剂。

[0028] 术语“培养 (culture)”指培养基中的细胞、生物体、多细胞实体或组织的任何生长。术语“培养 (culturing)”指实现这种生长的任何方法,可以包括多个步骤。术语“进一步培养 (further culturing)”指培养细胞、生物体、多细胞实体或组织至某个生长阶段,然后用另一培养方法使所述细胞、生物体、多细胞实体或组织达到另一生长阶段。“细胞培养”指细胞在体外生长。在这种培养中,细胞增殖,但是它们本身不组织成组织。“组织培养”指组织的维持或生长,例如原始器官或成体器官的体外外植体,以便保持其结构和功能。“单层培养”指这样的培养:细胞在适合的培养基中增殖,但主要是相互附着并附着到基底。此外,“悬浮培养”指细胞增殖但悬浮在合适培养基中的培养。类似地,“连续流动培养”指在新鲜培养基的连续流中培养细胞或外植体以维持细胞生长,例如存活力。术语“条件培养基”指在与培养细胞接触一段时间以便培养基被改变而包括某些由所述细胞产生并分泌到培养物中的旁分泌和 / 或自分泌因子后得到的上清液,例如不含培养细胞 / 组织。“会合培养”指所有细胞都接触因而培养容器的整个表面都被覆盖的细胞培养,其意味着细胞已经达到了它们的最大密度,但是会合不一定指分裂停滞或群体在体积上不会增加。

[0029] 术语“培养基 (culture medium)”或“培养基 (medium)”在本领域中是普遍接受的,一般指用于培养活细胞的任何物质或制剂。当结合细胞培养使用时,术语“培养基”包括围绕细胞的环境组分。培养基可以是固体、液体、气体或多相和物质的混合物。培养基包括液体生长培养基以及不支持细胞生长的液体培养基。培养基还包括凝胶状培养基,如琼脂、琼脂糖、明胶和胶原基质。示例性的气体培养基包括生长在培养皿或其它固体或半固体支持物上的细胞暴露在其中的气相。术语“培养基”还指打算用在细胞培养中的物质,即使其还没有和细胞接触。换言之,为细菌培养制备的富营养液是培养基。类似地,当与水或其它液体混合时变得适合于细胞培养的粉末混合物可以被称为“粉末培养基”。“确定成分培养基”指由化学上明确(通常纯化的)成分组成的培养基。“确定成分培养基”不含有未充分表征的生物提取物,例如酵母提取物和牛肉汁。“丰富培养基”包括被设计用来支持特定物种的大多数或所有活体形式的生长的培养基。丰富培养基经常包括复杂的生物提取物。“适合于高密度培养物的生长的培养基”为任何在其它条件(例如温度和氧转移率)允许的情况下使得细胞培养物 OD600 达到 3 或以上的培养基。术语“基础培养基”指促进不需要任何特殊营养补充的多种微生物的生长的培养基。大多数基础培养基通常包括四个基本的化学组:氨基酸、碳水化合物、无机盐和维生素。基础培养基通常用作更复杂培养基的基础,向其中加入补充物,例如血清、缓冲剂、生长因子、脂质等等。基础培养基的例子包括但

不限于Eagles基本培养基、基本必需培养基 (Minimum Essential Medium)、Dulbecco改良的Eagle培养基、Medium 199、Nutrient Mixtures Ham's F-10 and Ham's F-12、Mc Coy's 5A、Dulbecco's MEM/F-12、RPMI 1640 和 Iscove 改良的 Dulbecco 培养基 (IMDM)。

[0030] 术语“包含 (comprise)”和“包含 (comprising)”在开放式包括的意义上使用,意味着其它的元素可以被包括进来。

[0031] 术语“分化”指表达标志物的细胞的形成,这些标志物已知与更特化的和更接近成为不能进一步分裂或分化的终末分化细胞有关。例如,在胰脏方面,可在含有升高比例的 β 上皮细胞的岛样细胞簇的产生中看到分化,其产生更大量的胰岛素。术语“进一步”或“更”分化指与从其培养而来的细胞相比,更特化和更接近成为不能进一步分裂或分化的终末分化细胞的细胞。术语“最终分化”指已经成为不能进一步分裂或分化的终末分化细胞的细胞。

[0032] 术语“瘻”指任何异常的通道或连通或连接,通常是两内脏器官之间或从内脏器官到身体表面。瘻的实例包括但不限于肛门直肠瘻或肛瘻或粪瘻、动静脉瘻或 A-V 瘻、胆瘻、子宫颈瘻、鼻脑脊液瘻、肠肠瘻、肠皮瘻、肠阴道瘻、胃瘻、子宫腹膜瘻外淋巴、肺动静脉瘻、直肠阴道瘻、脐瘻、气管食管瘻以及膀胱阴道瘻。

[0033] 术语“包括”用在本文中是指“包括但不限于”。“包括”和“包括但不限于”可互换使用。

[0034] “标志物”指这样的生物分子,其存在、浓度、活性或磷酸化状态可以被检测并用于鉴定细胞表型。

[0035] “贴片 (patch)”指用来覆盖或保护创伤或其它伤口的敷料或覆盖物。

[0036] 待用本发明方法治疗的“患者”、“个体”或“宿主”可以指人或非人动物。

[0037] 用在本文的短语“药物上可接受的”指那些化合物、材料、组合物和 / 或剂型,在合理的医学判断范围内,它们适合用于与人和动物的组织接触,而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其它问题或并发症,与合理的利益 / 风险比相称。

[0038] 用在本文时,短语“药物可接受的载体”指药物可接受的材料、组合物或介质,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂包囊材料,涉及将题述化合物从身体的一个器官或部分携带至或输送至身体的另一器官或部分。每种载体就与制剂的其它成分相容而言必须是“可接受的”并且对患者无害。术语“表型”指可观测到的细胞特征,例如大小、形态、蛋白表达等。

[0039] 术语“祖细胞”指有能力产生比其分化程度更高的后代的细胞。例如,该术语可以指未分化的细胞或未分化至最终分化程度的细胞,其能够增殖并产生更多能够产生大量母细胞的祖细胞,母细胞能够接着产生分化的或可分化的子代细胞。在优选的实施方案中,术语祖细胞指一般化的母细胞,其后代 (子代) 通过分化 (例如通过获得完全个体特征) 通常向多个方向特化,如同在胚细胞和组织的逐步多样化中所发生的。细胞分化是复杂的过程,通常通过许多次细胞分裂发生。分化的细胞可能衍生自多能细胞,该多能细胞自身衍生自多能细胞,等等。尽管这些多能细胞的每一种都可能被认为是干细胞,但是每一种可以产生的细胞类型可以有相当大的变化。一些分化的细胞也具有产生具有更大发育潜力的细胞的能力。这种能力可以是天然的,或者在用多种因子处理后人工诱导。就此定义而言,干细胞也可以是祖细胞以及更接近终末分化细胞的前体。

[0040] “增殖”指细胞数量的增加。“增殖 (proliferating)”和“增殖 (proliferation)”指细胞经历有丝分裂。

[0041] 用在本文时,术语“溶液”包括药物可接受的载体或稀释剂,在其中本发明的细胞保持存活力。

[0042] 就脂肪组织衍生的干细胞群而言,术语“基本上纯的”指相对于组成全部细胞群的脂肪组织衍生的基质干细胞来说,脂肪组织衍生的干细胞群为至少约 75%、优选至少约 85%、更优选至少约 90%、最优选至少约 95% 纯。换言之,术语“基本上纯的”指这样的本发明的脂肪组织衍生的基质干细胞群,其在随后的培养和扩增之前的最初的未扩增和分离群中含有少于约 20%、更优选少于约 10%、最优选少于约 5% 的谱系定型细胞。

[0043] 用在本文时,“支持物”指可以用作脂肪组织衍生的基质干细胞的生长基础或基质的任何装置或材料。

[0044] 术语“缝线”指能用于缝合伤口的线、纤维或其它扎紧材料。

[0045] 用在本文时,“治疗”指修复瘘或伤口以及防止瘘或伤口的恶化或复发。

[0046] “治疗剂 (therapeutic agent)”或“治疗剂 (therapeutic)”指能够对宿主具有期望的生物学效果的试剂。化疗剂和遗传毒剂为治疗剂的实例,它们普遍已知为化学来源而非生物来源,或者分别通过特定的作用机制产生治疗效果。生物来源的治疗剂的实例包括生长因子、激素和细胞因子。现有技术中已知多种治疗剂,且可以通过它们的效果而被鉴定。某些治疗剂能够调节细胞增殖和分化。实例包括化疗核苷酸、药物、激素、非特异性 (非抗体) 蛋白、寡核苷酸 (例如结合靶核酸序列 (例如 mRNA 序列) 的反义寡核苷酸)、肽以及模拟肽。

[0047] “伤口”是物理手段引起的对组织的损伤或损害,导致组织的正常连续性的中断。

[0048] 2. 新的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物

[0049] 一方面,本发明涉及含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物,其具有某些特征,例如特定表型。例如,本发明细胞组合物中该脂肪组织衍生的基质干细胞可以通过细胞表面标志物表达、大小、葡萄糖消耗、乳酸盐产生和细胞产量 / 存活力来表征。本发明的另一方面关注含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物,其包括作为细胞组分的具有特定表型的脂肪组织衍生的基质干细胞或其后代的基本上纯的制剂。本发明的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物不仅包括基本上纯的祖细胞群,还可以包括细胞培养组分,例如包括氨基酸、金属、辅酶因子以及其它小基质细胞群的培养基,例如,该小基质细胞群中的一些可以通过本发明细胞的随后分化而产生。此外,其它的非细胞组分可包括在特定环境下使得细胞组分适合于支持物的那些物质,例如植入,例如连续培养,或者使得细胞组分适合于用作生物材料或药物组合物的那些物质。

[0050] 在某些实施方案中,含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物通过部分 4 中和例证中描述的培养方法来产生。

[0051] 在一个实施方案中,提供了含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物,其中至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、或优选至少约 96%、97%、98% 或 99% 的干细胞表达 CD9、CD10、CD 13、CD29、CD44、CD49A、CD51、CD54、CD55、CD58、CD59、CD90 和 / 或 CD105 标志物。在含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物的某些实施方案中,少于约 15%、约 10%、约 5% 以及优选约 4%、3%、2% 或 1% 的干细胞表达

CD34、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD31、CD34、CD45、CD49f、CD102、CD104、CD106 和 / 或 CD133 标志物。

[0052] 在另一实施方案中,提供了含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物,其中至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、或优选至少约 96%、97%、98% 或 99% 的干细胞表达 c-Kit、波形蛋白和 / 或 CD90 标志物。在含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物的某些实施方案中,少于约 15%、约 10%、约 5% 以及优选约 4%、3%、2% 或 1% 的干细胞表达 CD34、因子 VIII、 α 肌动蛋白、结蛋白 (desmin)、S-100 和 / 或角蛋白标志物。还提供表达 c-Kit、波形蛋白和 CD90 标志物但不表达 CD34、因子 VIII、 α 肌动蛋白、结蛋白、S-100 和角蛋白标志物的脂肪组织衍生的基质干细胞群。

[0053] 通过表面标志物对细胞群的表型表征可以通过对细胞的单独染色 (流式细胞术) 或通过对该细胞群的原位组织学切割来进行,根据标准方法进行。通过抗体来确定表面标志物的表达谱,免疫表型表征,可以是采用标记的抗体直接的,或采用针对细胞标志物的初级特异抗体的第二标记抗体间接的,由此实现信号放大。另一方面,存在或不存在对抗体的结合可以通过不同方法来确定,包括但不限于免疫荧光显微技术和放射显影。类似地,有可能通过流式细胞术对抗体结合水平进行监测,其中流式细胞术是使得荧光染料的水平与存在于细胞表面特异结合标记抗体的抗原的量相关的技术。细胞群上一系列表面标志物的差异表达提供了鉴定和分离所述群的方法。

[0054] 在某些实施方案中,含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物为脂肪组织衍生的基质干细胞在各种溶液或材料中的悬浮液,例如用作药物或生物材料,如下文进一步详述的。在一个实施方案中,该细胞组合物包含题述脂肪组织衍生的基质干细胞的林格氏溶液悬浮液和 HAS。在另一实施方案中,该细胞组合物包含题述脂肪组织衍生的基质干细胞在例如聚合物、胶、凝胶等材料中的悬浮液。这类悬浮液例如可以通过从培养基沉淀出题述脂肪组织衍生的基质干细胞并将它们在合适的溶液或材料中重悬浮而制得。例如可以通过离心、过滤、超滤等将细胞沉淀和 / 或交换出培养基。

[0055] 题述脂肪组织衍生的基质干细胞在包含题述脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物中的浓度可以是至少约 5×10^6 细胞 / mL、至少约 10×10^6 细胞 / mL、至少约 20×10^6 细胞 / mL、至少约 30×10^6 细胞 / mL 或至少约 40×10^6 细胞 / mL。

[0056] 相应地,本发明的另一方面涉及题述脂肪组织衍生的基质干细胞的子代,例如从脂肪组织衍生的基质干细胞衍生的那些细胞。这些子代可包括脂肪组织衍生的基质干细胞的后代以及谱系定型细胞,其中谱系定型细胞通过在将题述脂肪组织衍生的基质干细胞从外植体分离后诱导其分化产生,例如体外诱导。在某些实施方案中,在亲本群传代约 2 代、约 3 代、约 4 代、约 5 代、约 6 代、约 7 代、约 8 代、约 9 代、或约 10 代后获得子代细胞。但是,子代细胞可以在从亲本群传代任何次后获得。

[0057] 在某些实施方案中,本发明的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物将作为药物组合物的一部分提供,例如无菌、不存在不想要的病毒、细菌和其它病原体以及无热原的制剂。即,对于向人给药,该题述组合物应该满足无菌、无热原以及一般的安全和纯度标准,如 FDA 生物标准部门所要求的。

[0058] 在某些实施方案中,这类含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物可用于移植进动物,优选哺乳动物,并更优选人。所述细胞可优选相对于移植宿主而言是自体的,但也可

为同种异体的或异种的。由于在获得足够的自体干细胞方面有困难,来自同种异体供者的脂肪组织衍生的基质干细胞组成了用于治疗用途的有价值的另一干细胞源。现有技术中已知骨髓基质干细胞和脂肪组织衍生基质细胞在体外不会引起同种异体淋巴细胞的应答,因此,来自供者的同种异体脂肪组织衍生的基质干细胞理论上可用于任何患者,不考虑 MHC 不相容。

[0059] 在本文有详细说明的将含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物向个体,尤其是人类个体,给药的方法包括将细胞注射或植入个体中的靶部位,细胞可被插入递送装置中,该装置通过注射或植入有助于将细胞引入该个体。这类递送装置包括用于将细胞和液体注射进接受个体体内的管,如导管。在优选的实施方案中,所述管还具有针头,例如注射器,通过其可将含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物在期望部位引入个体。含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物可以不同形式被插入到这种递送装置,如注射器中。例如,当容纳在这种递送装置中时,含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物包括悬浮在溶液或包埋的支持基质中的脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物。

[0060] 药物可接受的载体和稀释剂包括盐水、缓冲水溶液、溶剂和 / 或分散介质。这些载体和稀释剂的使用是现有技术中已知的。该溶液优选是无菌的且流动性达到易于注射。优选地,所述溶液在制备和储存条件下是稳定的,并通过使用例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来防止微生物如细菌和真菌的污染作用。是本发明的脂肪组织衍生的基质干细胞组合物的溶液可通过将本文描述的脂肪组织衍生的基质干细胞并入药物可接受的载体或稀释剂以及,如果需要的话,以上列举的其它成分中,随后过滤灭菌而制备。

[0061] 可用作药物可接受载体的材料和溶液的一些实例包括:(1) 糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2) 淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3) 纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;(4) 西黄蓍胶粉;(5) 麦芽;(6) 明胶;(7) 滑石;(8) 赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;(9) 油类,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10) 二醇类,例如丙二醇;(11) 多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;(12) 酯类,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13) 琼脂;(14) 缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;(15) 褐藻酸;(16) 无热原水;(17) 等张盐水;(18) 林格溶液;(19) 乙醇;(20) pH 缓冲溶液;(21) 聚酯、聚碳酸酯和 / 或聚酐;以及 (22) 其它在药物制剂中采用的无毒的可配伍物质。

[0062] 在某些实施方案中,含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物还包含粘合剂。在某些实施方案中,该粘合剂为基于纤维蛋白的粘合剂,例如纤维蛋白凝胶或纤维蛋白胶或基于纤维蛋白的聚合物或粘合剂,或其它组织粘合剂或手术胶,例如氰基丙烯酸酯、胶原、凝血酶和聚乙二醇。其它可用的材料包括但不限于藻酸钙,琼脂糖, I、II、IV 型或其它亚型胶原,聚乳酸 / 聚乙醇酸、透明质酸衍生物或其它材料 (PerkaC. et al. (2000) J. Biomed. Mater. Res. 49:305-311; Sechriest VF. et al. (2000) J. Biomed. Mater. Res. 49:534-541; Chu CR et al. (1995) J. Biomed. Mater. Res. 29:1147-1154; Hendrickson DA et al. (1994) Orthop. Res. 12:485-497)。在其它实施方案中,所述粘合剂为液体绷带,其中该方法的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物与液体绷带材料混合。“液体绷带”为包含化合物如聚合材料的溶液,其被喷雾器或刷子涂到伤口上,然后通过蒸发除去溶剂以在伤口上提供保护膜。

[0063] 本文还提供用于制备含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物的方法,该组合物包含用于修复瘰或伤口的化合物或材料。在一个实施方案中,制备这类材料的方法包括将题述细胞组合物的脂肪组织衍生的基质干细胞与该材料一起悬浮。在一个实施方案中,脂肪组织衍生的基质干细胞从培养基被沉淀出并被重悬浮在纤维蛋白胶或凝胶中。纤维蛋白胶和凝胶和其它基于纤维蛋白的聚合物和粘合剂在现有技术中是公知的,并可购得。例如,可购得的纤维蛋白胶试剂盒为Tissucol® Duo 2.0,其它的可购得的纤维蛋白密封剂包括Crosseal®、TISSEELVH Fibrin Sealant®等。

[0064] 本发明含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物也可以用于包被支持物,如医学装置。例如,该支持物可以为缝线、线、半月板修复装置、铆钉、大头钉、吻合器、螺丝钉、骨板、骨板系统、外科网、贴片(例如修复贴片、心血管贴片或心包贴片)、悬带、矫形针、粘合屏障(adhesion barrier)、支架、引导的组织修复/再生装置、关节软骨修复装置、神经导管、腱修复装置、房中隔缺损修复装置、膨胀或填充剂、血管瓣、骨髓支架、半月板再生装置、韧带和腱移植植物、眼细胞植入物、脊柱融合笼、皮肤替代物、硬脊膜替代物、骨移植植物替代物、骨桩(bone dowel)、伤口辅料、胶、聚合物或止血钳。

[0065] 可在其中并入或嵌入含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物或可在其上包被含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物的支持物包括基质(matrice),其为接受者相容的并被降解成对接受者无害的产物。天然和/或合成生物可降解基质为这类基质的实例。天然生物可降解的基质包括血浆凝块和胶原基质,该血浆凝块例如来自哺乳动物。合成的可生物降解基质包括合成聚合物,例如聚酐、聚酯和聚乳酸。合成聚合物的其它实例和将细胞并入或嵌入这些基质的方法是现有技术中已知的。参见,例如美国专利 4,298,002 和美国专利 5,308,701。这些基质在体内为脆弱细胞提供支持和保护。

[0066] 所述支持物可用本领域技术人员已知的任何方式以细胞包被,例如通过浸泡、喷雾、涂抹、印刻等。

[0067] 在一个实施方案中,所述支持物为缝线、吻合器、可吸收线、不可吸收线、天然线、合成线、单丝线或多丝线(也称为编织物)。制备包被有脂肪组织衍生的基质干细胞的缝线和其它用于封闭伤口的支持物的优选方法公开在 2005 年 2 月 14 日递交的美国专利申请 11/056,241 “缝合用生物材料”中,将其整体通过参考并入本文。本文公开的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物代表了新的可用于美国专利申请 11/056,241 公开的方法的组合物。

[0068] 此外,在任何含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物中,至少一种治疗剂可以被并入该组合物。例如,组合物可以含有止痛剂来协助治疗瘰或伤口部位的炎症或疼痛,或者含有抗感染剂来防止用该组合物治疗部位的感染。

[0069] 更具体地,可用的治疗剂的非限定性实例包括以下治疗剂种类:镇痛剂,如非甾体类抗炎药、阿片激动剂和水杨酸盐;抗感染剂,如驱虫剂、抗厌氧菌剂、抗生素、氨基糖苷类抗生素、抗真菌抗生素、头孢菌素抗生素、大环内酯类抗生素、多种 β -内酰胺类抗生素、青霉素抗生素、喹诺酮抗生素、氨基磺胺抗生素、四环素抗生素、抗分枝杆菌剂、抗结核抗分枝杆菌剂、抗原生动物剂、抗疟抗原生动物剂、抗病毒剂、抗逆转录病毒剂、杀芥螨剂、抗炎剂、皮质类固醇抗炎剂、止痒剂/局部麻醉剂、局部抗感染剂、抗真菌局部抗感染剂、抗病毒局部抗感染剂;电解质和肾脏试剂,如酸化剂、碱化剂、利尿剂、碳酸酐酶抑制剂利尿剂、髓袢

利尿剂、渗透压性利尿剂、保钾利尿剂、噻嗪类利尿剂、电解质替代物和排尿酸剂；酶，例如胰酶和血栓溶解酶；胃肠剂，例如止泻药、止吐药、胃肠抗炎剂、水杨酸盐胃肠抗炎剂、抗酸抗溃疡剂、胃酸泵抑制剂抗溃疡剂、胃粘膜抗溃疡剂、H₂ 阻断剂抗溃疡剂、胆石溶解剂、消化剂、催吐药、缓泻药、多库酯钠胶囊剂 (stool softener) 以及促运动剂；全身麻醉剂，例如吸入麻醉剂、卤代吸入麻醉剂、静脉内麻醉剂、巴比妥酸盐静脉内麻醉剂、苯并二氮卓类静脉内麻醉剂、以及阿片激动剂静脉内麻醉剂；激素和激素调节剂，如堕胎药、肾上腺药、皮质类固醇肾上腺药、雄激素、抗雄激素；免疫生物学剂，如免疫球蛋白、免疫抑制剂、类毒素和疫苗；局部麻醉剂，例如酰胺局部麻醉剂和酯局部麻醉剂；肌骨骼剂，如抗通风抗盐剂、皮质类固醇抗炎剂、金化合物抗炎剂、免疫抑制抗炎剂、非甾体类抗炎药 (NSAID)、水杨酸盐抗炎剂、矿物；维生素，例如维生素 A、维生素 B、维生素 C、维生素 D、维生素 E 和维生素 K。

[0070] 以上类别中优选的有用治疗剂种类包括：(1) 通用镇痛剂，例如利多卡因或其衍生物，以及非甾体抗炎药物 (NSAIDs) 镇痛药，包括双氯芬酸、布洛芬、酮基布洛芬和萘普生；(2) 阿片激动剂麻醉剂，例如可待因、芬太尼、氢吗啡酮和吗啡；(3) 水杨酸盐镇痛剂，例如阿司匹林 (ASA) (肠溶衣包被 ASA)；(4) H₁- 阻断剂抗组胺剂，例如克立马丁和特非那定；(5) 抗感染剂，例如莫匹罗星；(6) 抗厌氧菌抗感染剂，例如氯霉素和林大霉素；(7) 抗真菌抗生素抗感染剂，例如两性霉素 b、克霉唑、氟康唑和酮康唑；(8) 大环内酯类抗生素抗感染剂，如阿齐红霉素和乙琥红霉素；(9) 多种 β - 内酰胺类抗生素抗感染剂，例如氨曲南和亚胺培南；(10) 青霉素抗生素抗感染剂，例如萘夫西林、苯唑西林、青霉素 G 和青霉素 V；(11) 喹诺酮抗生素抗感染剂，例如环丙沙星和氟哌酸；(12) 四环素抗生素抗感染剂，如脱氧土霉素、米诺环素和四环素；(13) 抗结核抗分枝杆菌抗感染剂，如异烟肼 (INH) 和利福平；(14) 抗原生动物抗感染剂，例如阿托伐醌和氨苯砒；(15) 抗疟抗原生动物抗感染剂，例如氯喹和乙胺嘧啶；(16) 抗逆转录病毒抗感染剂，例如利托那韦和齐多夫定；(17) 抗病毒抗感染剂，例如阿昔洛韦、更昔洛韦、干扰素 α 和金刚乙胺；(18) 抗真菌局部抗感染剂，如两性霉素 B、克霉唑、咪康唑和制霉菌素；(19) 抗病毒局部抗感染剂，例如阿昔洛韦；(20) 电解质和肾脏试剂，例如乳果糖；(21) 髓祥利尿剂，例如利尿磺胺；(22) 保钾利尿剂，例如三氨蝶呤；(23) 噻嗪类利尿剂，例如氢氯噻嗪 (HCTZ)；(24) 排尿酸剂，例如丙磺舒；(25) 酶，例如 RNA 酶和 DNA 酶；(26) 止吐药，例如丙氯拉嗪；(27) 水杨酸盐胃肠抗炎剂，例如柳氮磺吡啶；(28) 胃酸泵抑制剂抗溃疡剂，例如奥美拉唑；(29) H₂- 阻断剂抗溃疡剂，例如西米替丁、法莫替丁、尼扎替丁和雷尼替丁；(30) 消化剂，例如胰脂酶；(31) 促运动剂，例如乙琥红霉素；(32) 酯局部麻醉剂，例如苯佐卡因和普鲁卡因；(33) 肌骨骼皮质类固醇抗炎剂，例如倍氯米松、倍他米松、可的松、地塞米松、氢化可的松和泼尼松；(34) 肌骨骼抗炎免疫抑制剂，例如硫唑嘌呤、环磷酰胺和氨甲喋呤；(35) 肌骨骼非甾体抗炎药物 (NSAIDs)，例如双氯芬酸、布洛芬、酮基布洛芬、酮咯酸 (ketorlac) 和甲氧萘丙酸；(36) 矿物，例如铁、钙和镁；(37) 维生素 B 化合物，例如氰钴维他命 (维生素 B₁₂) 和烟酸 (维生素 B₃)；(38) 维生素 C 化合物，例如抗坏血酸；以及 (39) 维生素 D 化合物，例如钙三醇。

[0071] 在某些实施方案中，所述治疗剂可以是生长因子或其它影响细胞分化和 / 或增殖的分子。诱导最终分化状态的生长因子在现有技术中是公知的，可以选自己已经被证实诱导最终分化状态的任何这种因子。用在本文描述的方法中的生长因子在一些实施方案中可以是天然产生的生长因子的变体或片段。例如，可以通过进行保守氨基酸改变产生变体，并在

上述功能测定之一或其它现有技术中已知的功能测定中测试得到的变体。保守氨基酸置换指具有类似侧链的残基的可互换性。例如,具有脂肪族侧链的一组氨基酸为甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;具有脂肪族羟基侧链的一组氨基酸为丝氨酸和苏氨酸;具有含酰胺侧链的一组氨基酸为天冬酰胺和谷氨酰胺;具有芳香族侧链的一组氨基酸为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;具有碱性侧链的一组氨基酸为赖氨酸、精氨酸和组氨酸;以及具有含硫侧链的一组氨基酸为半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸置换组为:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0072] 本领域技术人员应理解的是,多肽生长因子的变体或片段可以采用常规技术产生,例如诱变,包括产生离散的点突变或者通过截短。例如,突变可产生变体,与其来源多肽生长因子的生物活性相比,该变体保留了基本上相同的生物活性或仅仅部分生物活性。

[0073] 3. 制备新的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物的方法

[0074] 还提供制备包含在上述含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物中的脂肪组织衍生的基质干细胞的方法。在一个实施方案中,方法包括:(a) 从个体收集脂肪组织;(b) 通过酶消化获得细胞悬浮液;(c) 沉淀细胞悬浮液并在培养基中重悬浮细胞;(d) 培养细胞至少约 10 天;以及 (g) 至少传代两次扩张细胞。

[0075] 优选地,脂肪组织衍生的基质干细胞分离自个体脂肪组织,该个体是最终的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物要被引入的个体。但是,基质干细胞也可以分离自与该个体相同或不同种的任何生物体。任何具有脂肪组织的生物体均可以是潜在候选者。优选地,该生物体为哺乳动物,更优选地,该生物体为人。

[0076] 在某些实施方案中,所述细胞被培养至少约 15 天、至少约 20 天、至少约 25 天或至少约 30 天。优选将细胞在培养中扩张更长时间以改善细胞群中细胞表型的同质性。

[0077] 在某些实施方案中,所述细胞在培养中扩张传代至少三次或“传代至少三次”。在另一实施方案中,细胞传代至少四次、至少五次、至少六次、至少七次、至少八次、至少九次或至少十次。优选地,细胞传代超过三次以改善细胞群中细胞表型的同质性。实际上,细胞可以在培养中无限扩展,只要细胞表型的同质性被改善以及分化能力被保持。

[0078] 细胞可以通过现有技术中任何已知用于培养干细胞的技术来培养。对各种培养技术的讨论以及它们的扩大可以在 Freshney, R. I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (动物细胞培养:基本技术手册), 4th Edition, Wiley-Liss 2000 中找到。在某些实施方案中,细胞通过单层培养来培养。在一个实施方案中,细胞如下文实施例 1 所述进行培养和传代。

[0079] 可以使用任何能够在组织培养中支持基质细胞的培养基。支持成纤维细胞生长的培养基制剂包括但不限于 Dulbecco 改良的 Eagle' 培养基 (DMEM)、 α 改良的基本必需培养基 (. alpha. MEM)、以及 Roswell Park Memorial Institute Media 1640 (RPMI Media 1640) 等。通常,向上述培养基中加入 0 至 20% 胎牛血清 (FBS) 或 1-20% 马血清以支持基质细胞和 / 或软骨细胞的生长。但是,如果 FBS 中基质细胞和软骨细胞所必需的生长因子、细胞因子和激素被鉴定出来并以合适的浓度提供在培养基中,则也可使用确定成分培养基。可在本发明方法中使用的培养基可以含有一种或多种感兴趣的化合物,包括但不限于用于基质细胞的抗生素促有丝分裂或分化的化合物。所述细胞培养在 31 摄氏度和 37 摄氏度之间的

加湿孵育箱中。二氧化碳含量维持在 2% 至 10%，氧含量在 1% 至 22%，细胞可以被保留在这种环境中多至 4 周。

[0080] 可补充到培养基中的抗生素包括但不限于青霉素和链霉素。在化学上成分确定培养基中青霉素的浓度为约 10 单位 /ml 至约 200 单位 /ml。在化学上成分确定培养基中链霉素的浓度为约 10 μ g/ml 至约 200 μ g/ml。

[0081] 采用质粒、病毒或其它载体策略，脂肪组织衍生的基质干细胞可以被目的核酸稳定或瞬时转染或转导。目的核酸包括但不限于这样的核酸，其编码的基因产物增加例如肠壁或阴道壁的待修复组织类型中存在的细胞外基质成分的产生。

[0082] 可用通过氯化铯带或其它方式纯化的病毒载体（腺病毒、逆转录病毒、腺相关病毒或其它载体）以 10:1 至 2000:1 的感染复数（病毒单位：细胞）将携带调节基因的病毒载体转导进基质干细胞。细胞在无血清或含血清培养基中、在不存在或存在诸如聚乙烯亚胺或 Lipofectamine. TM 的阳离子去垢剂时暴露于病毒 1-24 小时 (Byk T. et al. (1998) Human Gene Therapy 9:2493-2502; Sommer B. et al. (1999) Calcif. Tissue Int. 64:45-49)。

[0083] 其它适合的用于转移载体或质粒进入干细胞的方法包括脂质 /DNA 复合物，例如描述在美国专利 5,578,475 ;5,627,175 ;5,705,308 ;5,744,335 ;5,976,567 ;6,020,202 ;和 6,051,429 中的那些。适合的试剂包括 lipofectamine, 聚阳离子脂 2,3-二油酰氧基-N-[2-(精胺羧基酰胺)乙基]-N,N-二甲基-1-丙铵三氟乙酸盐 (DOSPA) (化学文摘登记名:N-[2-(2,5-双[(3-氨基丙基)氨基]-1-oxpentyl)氨基)乙基]-N,N-二甲基-2,3-双(9-十八烯基氧基)-1-丙铵三氟乙酸盐)与中性脂二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 以 3:1(w/w) 的比例在膜过滤水中的脂质体制剂。实例为制剂 Lipofectamine 2000TM (可从 Gibco/Life Technologies 得到, #11668019)。其它的试剂包括: FuGENETM 6 转染试剂 (非脂质体形式的脂类和其它化合物在 80% 乙醇中的混合物, 可从 Roche Diagnostics Corp. 得到, #1814443); 和 LipoTAXITM 转染试剂 (来自 Invitrogen Corp. 的脂质制剂, #204110)。转染干细胞可通过电穿孔进行, 例如 M. L. Roach and J. D. McNeish (2002) Methods in Mol. Biol. 185:1 中所描述的。用于产生带有稳定遗传改变的干细胞的适合的病毒载体系统可以基于腺病毒和逆转录病毒, 并且可以采用可购得的病毒组件制备。

[0084] 将带有调节基因的质粒载体转染进基质干细胞中可通过采用磷酸钙 DNA 沉淀或阳离子去垢剂方法 (Lipofectamine. TM., DOTAP) 被引入单层培养细胞或者通过直接将质粒 DNA 载体并入生物相容性聚合物而被引入三维培养细胞中 (Bonadio J. et al. (1999) Nat. Med. 5:753-759)。

[0085] 为了示踪和检测这些基因编码的功能蛋白, 病毒或质粒 DNA 载体将含有容易检测的标志物基因, 例如绿色荧光蛋白或 β 半乳糖苷酶, 这二者都可通过组织化学手段示踪。

[0086] 4. 治疗瘰和伤口的的方法

[0087] 本发明的另一方面涉及采用脂肪组织衍生的基质干细胞治疗瘰和伤口的的新方法。在优选的实施方案中, 脂肪组织衍生的基质干细胞源自待治疗个体的脂肪组织。在其它优选的实施方案中, 脂肪组织衍生的基质干细胞构成本文所述的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物。但是, 脂肪组织衍生的基质干细胞的其它制剂可以用于本文所述方法, 例如描述在美国专利 6,777,231 和 6,555,374 以及 2005 年 2 月 25 日递交的美国专利申请 11/065,461 "Identification and Isolation of Multipotent Cells From

Non-Osteochondral Mesenchymal Tissue(从非骨软骨间充质组织鉴定和分离多能干细胞)”中的那些。

[0088] 在一个实施方案中,在个体中治疗瘰的方法包括:(a)用缝线封闭内孔和(b)向封闭缝合的内孔递送至少约 10×10^6 、至少约 20×10^6 、至少约 30×10^6 或至少约 40×10^6 脂肪组织衍生的基质干细胞,例如处于本发明含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物中。在某些实施方案中,例如其中第一次递送的细胞不足,该方法还可以包括:(c)向封闭缝合的内孔递送第二剂至少约 20×10^6 、至少约 30×10^6 、或至少约 40×10^6 脂肪组织衍生的基质干细胞,例如处于本发明含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物中。

[0089] 在另一实施方案中,用在该方法中的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物中至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或优选至少约96%、97%、98%或99%的干细胞表达CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49A、CD51、CD54、CD55、CD58、CD59、CD90和/或CD105标志物。

[0090] 在另一实施方案中,用在该方法中的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物中至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或优选至少约96%、97%、98%或99%的干细胞表达c-Kit、波形蛋白和/或CD90标志物。

[0091] 将本发明的细胞向个体尤其是人类个体给药的常用方法,一些方法在本文有详细说明,包括将细胞注射或植入个体靶部位,本发明的细胞可被插入递送装置,该装置通过注射或植入有助于将细胞引入该个体。这类递送装置包括用于将细胞和液体注射进接受个体体内的管,如导管。在优选的实施方案中,所述管还具有针头,例如注射器,通过其本发明的细胞可在期望部位被引入个体。本发明的细胞可以不同形式被插入这种递送装置,如注射器中。例如,当容纳在这种递送装置中时,所述细胞被悬浮在溶液或包埋的支持基质中。药物可接受的载体和稀释剂包括盐水、缓冲水溶液、溶剂和/或分散介质。这些载体和稀释剂的使用是现有技术中已知的。该溶液优选是无菌的且流动性达到易于注射。优选地,所述溶液在制备和储存条件下是稳定的,并通过使用例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来防止微生物如细菌和真菌的污染作用。本发明的溶液可通过将本文描述的祖细胞并入药物可接受的载体或稀释剂以及,如果需要的话,以上列举的其它成分中,随后过滤灭菌而制备。

[0092] 在其它实施方案中,治疗个体中瘰的方法包括:(a)用包含例如来自本发明含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物的脂肪组织衍生的基质干细胞的缝线封闭内孔。这类被含有题述脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物中的细胞包被的缝线在2005年2月14日递交的美国专利申请11/056,241中有详细描述,将其通过参考并入本文。

[0093] 在一些实施方案中所述方法还可以包括:(d)深入刮除至少一个瘰道和(e)用材料填充所述瘰道。在某些实施方案中,所述方法还可以包括向所述材料递送至少约 10×10^6 脂肪组织衍生的基质干细胞,例如来自题述细胞组合物。优选地,所述材料为基于纤维蛋白的聚合物或粘合剂,例如纤维蛋白胶或凝胶。在某些实施方案中,至少约 10×10^6 脂肪组织衍生的基质干细胞已经被包裹在所述材料中,例如使得该材料包含含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物。

[0094] 在另一实施方案中,治疗个体中瘰的方法包括:

[0095] (i) 深入刮除至少一个瘰道

[0096] (ii) 用缝线封闭刮除瘻道的内孔

[0097] (iii) 向所述封闭缝合的内孔递送至少约 10×10^6 、至少约 20×10^6 、至少约 30×10^6 、或至少约 40×10^6 脂肪组织衍生的基质干细胞,例如处于本发明含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物中。

[0098] 在某些实施方案中,例如,其中第一次递送的细胞不足,该方法还包括:

[0099] (iv) 向所述封闭缝合的内孔递送第二剂至少约 20×10^6 、至少约 30×10^6 、或至少约 40×10^6 脂肪组织衍生的基质干细胞,例如处于本发明含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物中。

[0100] 步骤(i) 优选通过深入刮除所有的待治疗瘻道来进行,例如,刮除针被引入瘻道,并通过刮除瘻道壁而产生诱导出血以获得天然纤维蛋白,其将填充该瘻道。本发明人最近的临床研究提示通过这种刮除方法产生的天然纤维蛋白相对于使用人工纤维蛋白密封剂是优选的,因而在本发明方法的优选实施方案中待治疗瘻道不会填充这种材料。

[0101] 步骤(iv) 优选通过沿瘻道注射进瘻道壁局部递送细胞,例如含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物来进行。例如,沿 3cm 的瘻道两次注射一千万细胞。

[0102] 本发明的方法可被用于治疗任何瘻,包括但不限于肛门直肠瘻或肛瘻或粪瘻、动静脉瘻或 A-V 瘻、胆瘻、子宫颈瘻、鼻脑脊液瘻、肠肠瘻、肠皮瘻、肠阴道瘻、胃瘻、子宫腹膜瘻外淋巴、肺动静脉瘻、直肠阴道瘻、脐瘻、气管食管瘻以及膀胱阴道瘻。优选地,所述方法可用于治疗肠瘻,例如连接肠与其自身或另一器官的瘻,例如直肠阴道瘻、肠肠瘻、肠皮瘻和肠阴道瘻。在另一优选的实施方案中,所述方法可用于治疗阴道或子宫瘻,例如连接阴道或子宫与其自身或另一器官的瘻,例如子宫颈瘻、直肠阴道瘻、肠阴道瘻和膀胱阴道瘻。

[0103] 可以通过现有技术中任何已知的方法如切口、导管等接近瘻,用于手术修复。

[0104] 在另一实施方案中,治疗患者中伤口的方法包括:(a) 用缝线封闭伤口和 (b) 向封闭缝合的伤口递送至少约 10×10^6 、至少约 20×10^6 、至少约 30×10^6 或至少约 40×10^6 脂肪组织衍生的基质干细胞,例如处于含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物中。在某些实施方案中,例如其中第一次递送的细胞不足,该方法还可以包括:(c) 向封闭缝合的伤口递送第二剂至少约 20×10^6 细胞、至少约 30×10^6 、或至少约 40×10^6 脂肪组织衍生的基质干细胞,例如处于含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物中。在其它实施方案中,伤口可以用本发明的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物填充,例如,一剂包裹在材料中的至少约 10×10^6 脂肪组织衍生的基质干细胞,例如使得所述材料包含该细胞组合物,其中所述材料例如为粘合剂或胶。在其它实施方案中,治疗个体伤口的方法包括:(a) 用包含例如来自题述含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物的脂肪组织衍生的基质干细胞的缝线封闭伤口。这类被来自题述含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物中的细胞包被的缝线在 2005 年 2 月 14 日递交的美国专利申请 11/056,241 中有详细描述,将其通过参考并入本文。

[0105] 上述方法还可以包括向待治疗个体给予治疗剂,例如全身性地或在缝合部位的局部。在某些实施方案中,脂肪组织衍生的基质干细胞被配制在含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物中,该组合物含有如上所述的治疗剂。在其它实施方案中,治疗剂被单独给药,例如与所述方法同时,在进行所述方法之前,或在进行所述方法之后。在一些实施方案中,在对个体进行所述方法之前、之间和之后向所述个体给予治疗剂。示例性治疗剂在上文有述。在优选的实施方案中,向所述个体给予用于治疗克罗恩病的治疗剂。示例性的克罗

恩病治疗剂为抗炎剂,例如包含马沙拉嗪(mesalamine)的试剂,免疫抑制剂,如6-巯基嘌呤和硫唑嘌呤;生物试剂,如英夫利昔单抗(**Remicade®**)、抗生素和止泻药例如地芬诺酯、氯苯哌酰胺和可待因。

[0106] 在使用同种异体干细胞的实施方案中,可能需要支持性治疗。例如,根据现有技术中已知的方法,可能会在治疗之前、之中和/或之后给予免疫抑制剂以防止GVHD。在给药之前,还可以根据现有技术中已知的方法修饰细胞以抑制个体对所述细胞的免疫反应或相反方向的免疫反应。

[0107] 任何治疗剂的计量都将随患者的症状、年龄和体重,待治疗或预防的病症的性质和严重性,给药途径,以及试剂的形式而变化。任何题述制剂都可以以单次剂量或以多次剂量给药。治疗剂的剂量可通过本领域技术人员已知的或本文所说明的技术容易地确定。此外,可以给予多种治疗剂的混合物或者在分开的组合物中给予多种治疗剂。

[0108] 治疗剂可以口服给药、胃肠外给药、通过吸入喷雾、局部地、经直肠、经鼻、含服、经阴道或经植入储库给药。用在本文时,术语胃肠外包括皮下、静脉内、肌内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘膜内、损伤内以及颅内注射或输注技术。

[0109] 任何特定治疗剂的对给定患者产生最有效治疗的精确给药时间和量将取决于特定化合物的活性、药物动力学和生物利用度,患者的生理条件(包括年龄、性别、疾病类型和阶段、总体健康状况、对给定剂量和药物类型的应答情况)、给药途径等等。这里提供的指导可以用于优化治疗,例如,确定给药的最佳时间和/或量,其仅需要由监测个体并调整剂量和/或时间构成的常规试验。

[0110] 在个体治疗期间,患者的健康可以通过在24小时中的预定时间测量一个或多个相关指标来监测。可以根据这种监测的结果优化治疗,包括补充物、量、给药时间以及制剂。可以通过测量相同参数对患者进行定期再评估来确定改善程度,第一次这种再评估常常在从治疗开始的第四周结束时进行,随后的再评估在治疗期间每四至八周进行,随后每三月进行一次。治疗可以持续几个月或甚至几年,最少一月是对人进行治疗的典型长度。可以基于这些再评估进行对治疗剂的给药量的调整以及可能的对给药时间的调整。

[0111] 治疗可以以少于化合物最佳剂量的较小剂量开始。之后,通过小增量增加剂量,直至获得最佳的治疗效果。

[0112] 几种治疗剂的组合使用可以减少任何单个组分所需的剂量,因为不同组分的作用起始和持续时间可以是互补的。在这种联合治疗中,不同活性试剂可以一起递送或分开递送并在一天中同时或在不同时间递送。

[0113] 题述化合物的毒性和疗效可以通过标准药物方法在细胞培养物或试验动物中确定,例如确定 LD_{50} 和 ED_{50} 。显示大治疗指数的组合物是优选的。尽管可以使用显示毒副作用的化合物,但是应注意设计将治疗剂靶向期望位点的递送系统以减少副作用。

[0114] 从细胞培养测定和动物试验获得的数据可以用于形成人用剂量的范围。任何治疗剂或其中任何组分的剂量优选位于包括 ED_{50} 的循环浓度的范围内,几乎没有或没有毒性。在此范围内剂量可以随采用的剂型和所用的给药途径而变化。对于本发明的治疗剂,治疗有效剂量可以最初从细胞培养测定评估。可以在动物模型中形成剂量以实现包括 IC_{50} (即,实现对症状的最大抑制的一半的测试化合物浓度)的循环血浆浓度范围,如在细胞培养中所确定的。这些信息可以用于更精确地确定人体内的有用剂量。例如,可以通过高效液相

色谱测量血浆中的水平。

[0115] 5. 试剂盒

[0116] 在其它实施方案中,本发明关注试剂盒,其包括含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物和任选地关于其使用的说明书。包括本发明药物组合物和生物材料的试剂盒也位于本发明范围内。试剂盒组分可以包装为用于手动或部分或全部自动实施前述方法。这类试剂盒可以具有多种用途,例如包括治疗、修复、制备生物材料和其它应用。

[0117] 例证

[0118] 本发明已经被概要说明,并将通过参考以下实施例更容易被理解,包括这些实施例仅用于解释本发明的某些方面和实施方案,无意限制本发明。

[0119] 实施例 1:从脂抽吸物制备具有改善的同质性的干细胞

[0120] 在局部麻醉和全身镇静情况下,通过吸脂作用获得脂肪组织。将空的钝尖插管经小切口(直径小于 0.5cm)导入皮下空间。轻轻抽吸,插管在脂肪组织腹壁区室移动以便机械破碎脂肪组织。将盐水溶液和血管收缩剂肾上腺素注射进脂肪组织区室以使血液丧失减至最低。依此方式,从每个待治疗患者获得 80 至 100ml 粗脂抽吸物。

[0121] 将粗脂抽吸物用无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS;Gibco BRL,Paisley,Scotland,UK)充分洗涤以除去血细胞、盐水和局部麻醉剂。在 37° C 下用 II 型胶原酶(0.075%;Gibco BRL)溶液在平衡盐溶液(5mg/ml;Sigma,St. Louis,USA)中消化细胞外基质 30 分钟,以释放细胞组分。然后,通过加入等体积的含有 10% 胎牛血清(FBS;Gibco BRL)的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM;Gibco BRL)使胶原酶失活。以 250x g 离心细胞悬浮液 10 分钟。将细胞重悬在 0.16M NH_4Cl 中,让其在室温(RT)下静置 10 分钟以溶解红细胞。混合物以 250x g 离心,并将细胞重悬在加有 10% FBS 和 1% 氨苄青霉素/链霉素混合物(Gibco,BRL)的 DMEM 中,随后以 $10\text{--}30 \times 10^3$ 细胞/ cm^2 的浓度接种在 100-mm 组织培养皿中。

[0122] 将细胞在 37° C、5% CO_2 下培养 24 小时。接着,将培养皿用 PBS 洗涤以除去非粘附细胞和细胞碎片。将细胞在相同培养基和相同条件下维持培养,直至它们达到大约 80% 汇合,其中每 3 至 4 天更换一次培养基。然后将细胞用胰蛋白酶-EDTA(Gibco BRL)以 1:3 的稀释度传代,这对应大约 $5\text{--}6 \times 10^3$ 细胞/ cm^2 的细胞密度。对于移植,我们使用传代 1 和 3 次之间的细胞,其中已经传代两次以上的细胞是优选的,以便分离高同质性的细胞群。采用传代 1 至 9 次的细胞进行细胞表征。实施例 2. - 对来自脂抽吸物的、具有改善的同质性的干细胞的表征

[0123] 为了通过免疫荧光染色表征细胞,将细胞以低密度接种在 24 孔板中玻璃盖玻片上加有 10%FBS 的 DMEM 中。对于免疫组化研究,以 PBS 洗涤细胞并在 -20° C 在丙酮中固定 10 分钟。对于 α 肌动蛋白的染色,将细胞在室温下在 4% 多聚甲醛中固定 10 分钟。用含有 4% 山羊血清和 0.1% Triton X-100 的 PBS 封闭后,将细胞在 4° C 与所指明稀释度的针对以下细胞标志物的第一抗体孵育过夜 [(i) α 肌动蛋白;Dako,Glostrup,Denmark;1/50;(ii) 波形蛋白;Sigma,St. Louis,USA;1/200;(iii) CD 90;CYMBUS,Biotechnology LTD,Chandlers Ford,Hants,UK;1/50;(iv) 因子 VIII;Dako;1/100;(v) CD 34;Chemicon,CA,USA;1/100;(vi) c-Kit;Chemicon;1/100;(vii) 结蛋白;Dako;1/100;(viii) 细胞角蛋白;Dako;1/100 and (ix) S-100;Dako;1/50]。然后用适当的异硫氰酸荧光素(FITC)偶联的或四甲基若丹明异硫氰酸盐(TRITC)偶联的

第二抗体 (Sigma; 1/50) 在室温下孵育细胞 45 分钟。对于阴性对照, 我们省略了第一抗体。细胞核用 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 复染。然后将细胞包埋进 Mobiglow (MoBiTec, Gottingen, Germany) 并用落射荧光显微镜 Eclipse TE300 (Nikon, Tokyo, Japan) 观察。在每种情况下, 我们确定了不同视野中免疫阳性细胞的数量并将它们与染色的细胞核数目进行比较。随机选择的视野通过 Spot1 相机 (Diagnostic Instruments Inc., Tampa, FL, USA) 输出到计算机 (Macintosh G3; Apple Computer Inc., Cupertino, Ca, USA)。人动脉平滑肌细胞、人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 和人滑液成纤维细胞被用作各种抗体免疫染色的阳性对照。

[0124] 在传第 1 代, 高比例 (90-95%) 的脂肪衍生基质干细胞表达波形蛋白, 一种间充质细胞骨架细胞的标志物 (图 1)。波形蛋白的表达维持在相同水平, 直至并包括传第 9 代。但是其它标志物的水平随时间下降。例如, 传第 1 代中在 17% LPA 衍生细胞中发现的 α 肌动蛋白在传第 7 代中未再发现。内皮细胞的标志物血管性血友病因子 (因子 VIII) 和也在内皮细胞表面发现的 CD34 仅在传第 1 代至传第 3 代被检测到 (分别为 7% 和 12% 的免疫阳性细胞)。相反, 细胞增殖标志物 c-Kit (CD 117) 的表达随时间增加, 从传第 4 代起有 99% 的免疫阳性细胞 (图 2)。起初在约 80% 的 LPA 衍生细胞中表达的成纤维细胞标志物 CD90 从第 6 次传代起在 99% 的细胞中发现 (图 3)。任何时间在任何 LPA 衍生细胞中都没有观察到神经外胚层标志物 S100 或外胚层标志物角蛋白的表达。当传代次数增加时观察到的标志物变化表明所获得的细胞制剂的同质性增加。

[0125] 为了对细胞生长进行定量, 将细胞以 5×10^3 细胞 / cm^2 的浓度接种在 24 孔板中。在细胞附着到基底后 (3 小时), 用补充了 1% 抗生素和 0.5%、2%、5% 或 10% FBS 的 DMEM 更换培养基。作为测试每批血清的阳性对照, 也培养人滑液成纤维细胞并确定它们的生长速率。每两天更换一次培养基。以 24 小时的间隔, 将细胞用 1% 戊二醛固定并确定每孔的细胞数目, 通过在结晶紫核染色后监测 595nm 处的吸光度来进行。构建了标准曲线来建立每孔细胞数量和 595nm 处的吸光度的关系 ($r^2=0.99$)。

[0126] 从所有 7 个脂抽吸物 (LPAs) 成功分离并培养了有存活力的脂肪组织衍生基质细胞。这些细胞在培养中生长并以 7 至 10 天的间隔传代。在一些情况下, 细胞被冷藏保存, 在植入前融化。脂肪组织衍生的基质干细胞 (ADSC) 的生长速率取决于血清浓度, 在 5% 和 10% FBS 之间增殖最大 (图 4)。在这些血清浓度下的平均细胞群倍增时间是 37.6 ± 0.6 小时, 这与相同条件下培养的人滑液成纤维细胞的细胞群倍增时间无显著差异 (35.6 ± 1.4 小时; $p > 0.05$; t 检验; 结果来自三个独立实验)。

[0127] 为了以更加标准化和较少主观性的方式分析细胞, 使细胞也接受荧光激活细胞分选 (FACS) 分析。通常, 流式细胞分析允许通过抗体检测表面抗原, 这些抗体直接 (共价地) 或者间接地 (第二荧光标记抗体) 连接到荧光标记。另一方面, 上述免疫组化分析需要透化细胞并随后用抗体染色。因此, 后者需要依据靶蛋白和抗体的单独优化方法。此外, 由于细胞膜的透化, 不可能区分内部 (非膜结合的) 和细胞外标志蛋白。即, 采用免疫组化分析, 可能知道蛋白标志物是否被表达, 但是不可能区分是在细胞表面还是在细胞内表达。

[0128] 用在免疫细胞计量中的检测表面抗原的方法是标准化的, 仅需要适当的阴性对照。此外, FACS 分析使得能够评估阳性细胞 (表达表面抗原的细胞) 百分比和表达水平 (一个细胞上有很少或许多表面抗原)。采用免疫组化时这些评估仅是主观性的, 并随不同

实验变化,但这不发生在 FACS 分析中。

[0129] 所述细胞的这类免疫表型表征可以在新鲜分离的细胞上进行,以及在培养一段时间后进行,例如在培养的第 7 天、培养 4 周后和培养 3 个月后。在不同时间进行细胞标志物的分析使得能够评估培养期间表型的同质性。在 2005 年 2 月 25 日递交的美国专利申请 11/065,461 中详细地描述了这种分析的实例和数据,证实在 0 至 3 个月的培养期间从得自 3 个健康供者的样品中获得的表型,通过参考将其并入本文。

[0130] 通过上述方法分离后,在功能上对来自一个患者的脂肪组织衍生的基质干细胞就一系列表面标志物的存在 / 不存在进行了表征。为此,通过流式细胞术监测了以下表面标志物的表达:

[0131] 整合素:CD11b, CD18, CD29, CD49a, CD49b, CD49d, CD49e, CD49f, CD51, CD61, CD104。

[0132] 造血标志物:CD3, CD9, CD10, CD13, CD16, CD14, CD19, CD28, CD34, CD38, CD45, CD90, CD133, glycoforine。

[0133] 生长因子受体:CD105, NGFR。

[0134] 细胞外基质受体:CD15, CD31, CD44, CD50, CD54, CD62E, CD62L, CD62P, CD102, CD106, CD146, CD166。

[0135] 其它:CD36, CD55, CD56, CD58, CD59, CD95, HLA-I, HLA-II, β 2- 微球蛋白。

[0136] 通过胰蛋白酶的温和消化收集待表征的细胞、用 PBS 洗涤并在 4° C 用针对每一个待分析表面标志物的荧光素 (FITC) 或藻红蛋白 (PE) 标记的抗体标记物孵育 30 分钟。洗涤细胞标志物并立即采用 Epics-XL 细胞计数器 (Coulter) 进行分析。作为对照,使用以 FITC 或 PE 标记的对应同种型的非特异抗体染色的细胞。

[0137] 从对表面标志物表达谱的分析 (图 7A/7B),用于确定哪些标志物定义了细胞群并能够使其相对于其它细胞类型被鉴别和区分的标准如下:

[0138] 1. 抛弃实验中在样品间或在培养期间随时间变化的标志物,该实验为在 2005 年 2 月 25 日递交的美国专利申请 11/065,461 中用健康供者的脂肪组织衍生的基质干细胞进行的实验。

[0139] 2. 选择作为它们生物学相关性函数的标志物,抛弃表征特定细胞类型的标志物 (例如,CD3 是淋巴细胞的专有标志物)。

[0140] 采用这个标准,多能干细胞群被表征为 CD9+, CD10+, CD13+, CD29+, CD44+, CD49A+, CD51+, CD54+, CD55+, CD58+, CD59+, CD90+ 和 CD105+ 阳性;并缺乏 CD11b, CD 14, CD 15, CD 16, CD31, CD34, CD45, CD49f, CD102, CD104, CD106 和 CD133 的表达。

[0141] 实施例 3:包含纤维蛋白胶的干细胞制剂用于治疗瘘

[0142] 对于临床用途,如上制备的细胞可以在传代 3 次或更少次数后使用 (图 3),但是如上所述优选在传代两次或更多次后使用,以便提供具有更高同质性的细胞制剂。用于临床用途的细胞培养物在 37° C 下胰蛋白酶消化 3 分钟。通过加入加有 FBS 的 DMEM 终止胰蛋白酶消化,并将悬浮液以 110xg 离心 5 分钟。在 PBS 中洗涤细胞,将悬浮液以 150xg 再离心 5 分钟。细胞以 3 至 30x10⁶ 细胞 /ml 重悬于 1 至 2ml 的林格乳酸盐溶液,并置于适合的注射器中。可以任选地向林格乳酸盐溶液中加入人血清白蛋白 (HSA)。在某些情况下,在合并纤维蛋白胶试剂盒 (Tissucol® Duo 2.0;Baxter, Madrid, Spain) 的两组分之前,将一半的细胞重悬浮于该试剂盒的凝血酶组分中,目的是改善瘘道的密闭。使用纤维蛋白胶填充瘘

道口在现有技术中是已知的;但是其作为瘻的单独治疗不是有效的。向本文所述的含有脂肪组织衍生的基质干细胞的组合物中添加纤维蛋白胶是用于将细胞保留在局部,并且我们观察到细胞在纤维蛋白胶和凝胶中生长良好。

[0143] 实施例 4:改善的手术方法以采用来自脂抽吸物的干细胞制剂修复瘻

[0144] 我们进行了采用上述脂肪组织基质干细胞组合物治疗克罗恩瘻的 I 期临床试验,其设计用来测试自体干细胞移植的可行性和安全性。该方案在 2002 年 4 月 12 日得到 La Paz Hospital 的临床试验和伦理委员会的批准,并形成了详细的知情同意表用于患者签字。在整个临床试验期间伦理委员会一直被告知研究进度。

[0145] 方法

[0146] 根据以下选择标准选择患者:年龄超过 18 岁;在试验前至少 5 年诊断出克罗恩病;存在一个或多个复杂克罗恩瘻(肠皮瘻、上括约肌瘻和/或直肠阴道瘻),其已经对内科治疗无反应并且被常规手术不成功的治疗至少两次;同意参加,签署知情同意表。淘汰标准如下:没有达到选择标准;精神残疾;太瘦;对局部麻醉过敏;之前诊断出癌症;以及 AIDS。

[0147] 5 名患者(编号 001-005)参加了这项研究。三名男性和两名女性,平均年龄是 35.1 ± 2.4 岁(范围:31.2 至 37.5 岁)。进行了 9 次细胞植入:直肠阴道瘻中三次;肠皮瘻中 5 次(一个患者四个不同的瘻);上括约肌肛周瘻中 1 次。所有的肠皮瘻具有低流动,少于每天 50cc,并处于腹壁中(表 1)。没有患者在该过程中同时用完全胃肠外营养、Remicaid 或奥曲肽治疗。由于在第一次吸脂后,没有干细胞在冷藏保存中存活,患者 001 和 002 需要两次吸脂过程。

[0148] 由于培养细胞的细菌污染,一名患者被排除在外。我们用第三次传代或更早的自体脂肪组织衍生的基质干细胞(ADSC)接种四个患者中的 9 个瘻。8 个接种的瘻每周观察,持续至少 8 周。在第 8 周结束时,在 6 个瘻中,外部开口被上皮细胞覆盖,因此这些瘻被认为治愈(75%)。在另两个瘻中,外部开口仅不完全封闭,排出的液流减少(没有治愈;25%)。在随访期结束时(至少 6 个月,不超过两年),没有在任何患者中观察到副作用。

[0149] 对于肠皮瘻,所有的瘻道都被深入刮除。对于直肠阴道瘻,我们采用了阴道途径,分离后阴道壁。缺口被完全分开并用 3/0 可吸收缝线封闭直肠开口。直肠粘膜已经被克罗恩病破坏,极其脆弱。对于肛周瘻,主瘻道被取出核心,直肠孔用 3/0 可吸收缝线通过硬化粘膜封闭。

[0150] 对于肠皮瘻,我们利用针将细胞注射进瘻道壁。对于直肠阴道瘻和肛周瘻,我们将细胞注射进直肠粘膜,接近缝合的内部开口。所有情况下,注射后我们都观察到注射区域上的液体填充泡(图 5)。注射的细胞数量为 3 至 30×10^6 ,这取决于培养细胞的生长情况(图 3)。

[0151] 从制备接种物开始到注射结束的时间在所有情况下都少于 90 分钟。对于肠皮瘻,用纤维蛋白胶填充瘻道,然后缝合皮肤。对于直肠阴道瘻,构建了前徙阴道瓣。当检查到副瘻道时,也用纤维蛋白胶填充。

[0152] 手术后没有使用绷带。在该过程结束 12 小时后开始液体摄入,固体食物在随后的 6 小时后摄入。手术后的 1 至 3 天,解散患者,在门诊部定时随访。

[0153] 获得两个组织病理学样品。一个样品(患者号 002)从肠皮瘻(植入 #2 后 7 个月

和植入 #3 后 10 天) 的区域获得。另一个样品 (患者号 001) 在第一次植入后 1 年, (植入 #1), 在与植入 #6 有关的手术过程期间从直肠阴道壁获得。将样品包埋进石蜡, 切片, 用苏木精和伊红染色, 并评估。

[0154] 手术后每周定期随访, 持续 8 周。当外部开口的总体上皮形成在 8 周后是明显的时, 则认为患者治愈, 与之前的观察相独立。8 周后, 每月随访, 持续至少 6 个月但不超过两年。

[0155] 结果

[0156] 这项研究包括 5 名患者, 进行了 7 次吸脂 (图 3)。在植入过程中将患者 003 号从这项试验中排除, 因为发现培养的脂提取物细胞被革兰氏阳性细菌污染。细菌被鉴定为 *Oerkovia xanthineolytica*。将患者 002 的肠皮瘘从研究中排除, 因为对导致极性感毒症的新膀胱肠瘘进行了紧急腹部手术。剖腹术需要切除植入区域。因而, 这种情况下我们无法坚持最小 8 周的随访安排。

[0157] 用传代 3 次或更少次的 ADSC 接种四名患者的 9 个瘘 (图 3)。8 个瘘被认为适合保留在这项研究中, 并随访至少 8 周 (图 3)。在 6 个瘘中, 在第 8 周时外部开口已形成上皮, 这些瘘被认为治愈 (75%) (图 6)。另两个在外部开口仅有不完全封闭, 排出流量减小, 如患者所报告的 (25%; 没有治愈; 图 3)。注射的细胞数量或培养时间和过程的成功没有直接关系。患者性别或年龄与治愈也没有直接关系。我们已经进行的随后研究表明最初的 20×10^6 细胞的剂量是合适的。我们已经确定在第一剂失败时可以使用第二剂 40×10^6 细胞。优选更大量的细胞, 因为我们已经观察到更大量的细胞在组织修复方面有更好的疗效。

[0158] 手术和植入过程在所有 9 个治疗的瘘中没有其它技术困难。在研究的任何病例中都没有观察到直接副作用 (例如, 过敏反应、变应性反应)。

[0159] 在手术后的 7 个月 (肠皮瘘) 和 1 年 (直肠阴道瘘) 时获得两个组织病理学样品。在完整系列的组织病理学切片中没有检测到细胞学转化。讨论

[0160] 在以前的报道中, 我们描述了对患有复发直肠阴道瘘的年轻妇女的成功的基于细胞的治疗, 其中该复发直肠阴道瘘已经对内科疗法无反应。因此, 我们设计了当前的 I 期临床试验来评估这种自体脂肪组织基质干细胞移植 (在起始方案中有改进) 用于治疗无应答克罗恩瘘的可行性和安全性, 以及测试脂肪组织基质干细胞与纤维蛋白胶的联合使用。

[0161] 我们选择脂肪组织作为干细胞源是因为它们的生肌分化能力和瘘对肌肉移植反应良好的事实。此外, 吸脂作用的脂肪可大量获得, 并且可在对患者具有最小副作用的情况下收集。其它小组曾用骨髓衍生的干细胞, 但是这些情况下, 需要细胞动员过程, 其对一些患者可能是危险的, 例如对患有心肌梗塞的患者。在我们的研究中, 所有的吸脂过程都产生了临床上有用数量的具干细胞特征的细胞。

[0162] 我们根据预定程序对我们的患者进行随访, 我们观察到 8 个过程中的 6 个完全治愈。值得注意的是, 克罗恩病对瘘的手术方法提供了最差条件, 这是由于这些患者中组织脆弱以及与治愈有关的诸多问题。我们的患者被选择是因为他们已经对内科治疗和至少两次之前的手术过程无应答, 但是我们的治疗看起来相当有效。然而, 在任何给定患者中克罗恩病的新发作可能仍会产生新瘘, 它们需要采用来自该患者的冷藏保存自体细胞再次治疗。

[0163] ADSC 移植治疗成功背后的生物学机制是未知的。干细胞可能分化为结缔组织、肌肉组织或瘢痕组织。或者, 干细胞分泌的生长因子可能促进了伤口愈合。我们在组织病理学

检查的瘻中看到典型的瘢痕组织,但是我们没有办法区分移植的和局部的结缔组织细胞。采用我们的疗法在 75% 的病例中观察到完全痊愈。

[0164] 参考文献

[0165] 除非另有说明,本发明的实施将采用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学中的常规技术,它们由本领域技术人员所掌握。这些技术在文献中有充分说明。参见,例如, Molecular Cloning A Laboratory Manual (分子克隆:实验室手册), 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989); DNA Cloning (DNA 克隆), Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (寡核苷酸合成) (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U. S. Patent No:4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (核酸杂交) (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (转录和翻译) (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (动物细胞培养) (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (固定的细胞和酶) (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (分子克隆的实践指南) (1984); 论文, Methods In Enzymology (酶学方法) (Academic Press, Inc., N. Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (基因传递:用于哺乳动物细胞的载体) (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology (酶学方法), Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (细胞和分子生物学中的免疫化学方法) (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology (实验免疫学手册), Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the Mouse Embryo (小鼠胚胎操作), (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986)。

[0166] 本文提到的所有出版物和专利,包括以下列出的文献,都将其整体通过参考并入本文,如同明确地和分别地指明将每一单独的出版物或专利通过参考并入。出现矛盾时,本申请,包括本文中的任何定义,将起支配作用。

[0167] 1. American Gastroenterological Association Medical Position Statement: Perianal Crohn's Disease (美国胃肠病学会医学立场声明:肛周克罗恩病). Gastroenterology (2003) 125:1503-1507.

[0168] 2. Levy C, Tremaine WJ. Inflamm Bowel Dis (2002) 8(2):106-11.

[0169] 3. Pennincke F, D'Hoore A, Filez L. Acta Gastroenterol Belg (2001) 64(2):223-226.

[0170] 4. Rius J, Nessim A, Nogueras JJ, Wexner SD. Eur J Surg (2000) 166(3):218-222.

[0171] 5. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Plastic Reconstr Surg (2002) 109(1):199-209.

[0172] 6. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Tissue Eng (2001) 7(2):211-228.

[0173] 7. Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Gomez-Garcia L et al. Int J Colorectal Dis (2003) 18:451-454.

- [0174] 8. Abkowitz JL. New Engl J Med(2002) 346(10):770-772.
- [0175] 9. Matsubara H. Lancet(2004) 363:746-747.
- [0176] 10. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, et al. Nat Biotechnol. (2004) 22(5):560-7.
- [0177] 11. Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo MA. New Eng J Med(2003) 349:1480-1481.
- [0178] 12. Osawa M., Hanada K., Hanada H. and Nakauchi H. (1996) Science 273, 242-245.
- [0179] 13. Morrison S. J., Uchida N. and Weissman I. L. (1995) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 11, 35-71.
- [0180] 14. Ivanova N. B., Dimos J. T., Schaniel C, Hackney J. A., Moore K. A., Lemischka I. R. (2002) Science 298, 601-604.
- [0181] 15. Phillips RL. (2000) Curr Top Microbiol Immunol. 251, 13-19.
- [0182] 16. Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. (2002) Science 298, 597-600.
- [0183] 17. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. (2003) Cells Tissues Organs 174(3), 101-109.
- [0184] 18. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN, Exp Hematol. (1976) Sep;4(5):267-74.
- [0185] 19. Caplan AI J Orthop Res. (1991) Sep;9(5):641-50.
- [0186] 20. Pittenger, M. F. et al. (1999) Science 284:143-147.
- [0187] 21. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME, J Cell Sci(1992) Jun;102(Pt 2):341-51.
- [0188] 22. Yoo JU, Johnstone B, Clin Orthop. (1998) Oct; (355 Suppl):S73-81.
- [0189] 23. Wakitani S. et al. (1995) Muscle Nerve 18:1417-1426.
- [0190] 24. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI, Bone. 1992;13(1):81-8.
- [0191] 25. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR, Exp Neurol. (2000) Aug;164(2):247-56.
- [0192] 26. Rogers JJ, Young HE, Adkison LR, Lucas PA, Black AC Jr, Am Surg. (1995) Mar;61(3):231-6.
- [0193] 27. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM, Exp Hematol. (2002) Aug;30(8):896-904.
- [0194] 28. Caplan AI, Bruder SP, Trends Mol Med. (2001) Jun;7(6):259-64.
- [0195] 29. Stanford, CM. et al. (1995) J Biol Chem 270:9420-9428.
- [0196] 等同物

[0197] 除了其它方面,本发明提供治疗和预防痿的方法和组合物。尽管已经讨论了本发明具体实施方案,但以上的说明是解释性的而不是限制性的。在阅读本说明书后,本发明的很多变化对本领域技术人员而言是显而易见的。所附的权利要求并非旨在要求保护所有

的这样的实施方案和变化,本发明的全部范围应参考权利要求书连同它们等同物的全部范围,以及说明书连同这类变化来确定。

抗原	P1	P3	P4	P6	P7	P9
CD 34 (干细胞标志物)	+	+/-	-	-	-	-
CD 90 (干细胞标志物, 成纤维细胞)	+	++	++	+++	+++	+++
c-Kit (干细胞标志物)	+	+	++	+++	+++	+++
因子 VIII (分化标志物)	+	+/-	+/-	-	-	-
α-肌动蛋白 (血管平滑肌细胞标志物)	+	+	+/-	-	-	-
波形蛋白 (中胚层起源标志物; 间充质蛋白)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
结蛋白 (中胚层起源标志物; 肌细胞)	+	-	-	-	-	-
S-100 (神经外胚层起源标志物)						
角蛋白 (外胚层起源标志物)						

图 1

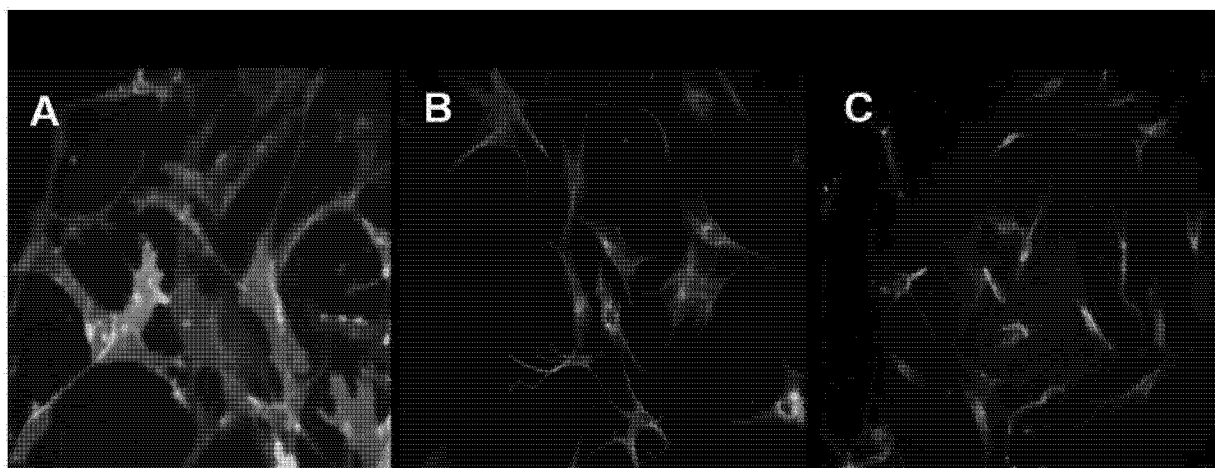


图 2

植入物 编号	患者 编号	年龄 (岁)	性别	瘻的类型	传代 次数	培养 时间 (天)	细胞 数量 ($\times 10^6$)	结果
1	001	35	F	直肠-阴道	1	6	6.1	治愈
2	002	40	F	肠皮 正中	1	9	9.0	治愈
3	002	40	F	肠皮 脐周	1	7	8.0	未分析
未植入	003	36	M	会阴	1	未分析	未植入	未分析
4	002	40	F	直肠-阴道	2	14	10.0	未治愈
5	002	41	F	肠皮 耻骨上	2	8	3.5	治愈
6	001	37	F	直肠阴道	1	12	20.0	治愈
7	004	36	M	直肠阴道 右下四分之一区域	2	16	30.0	未治愈
8	005	32	M	会阴	2	31	20.0	治愈
9	002	41	F	直肠阴道 右下四分之一区域	3	12	15.0	治愈

图 3

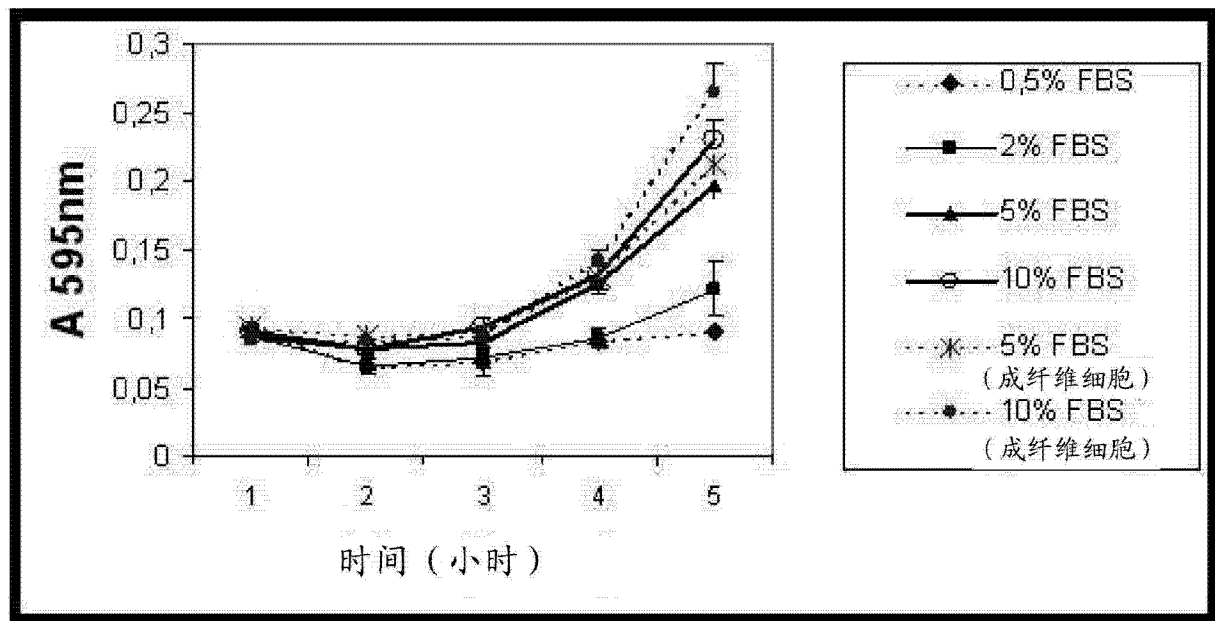


图 4



图 5

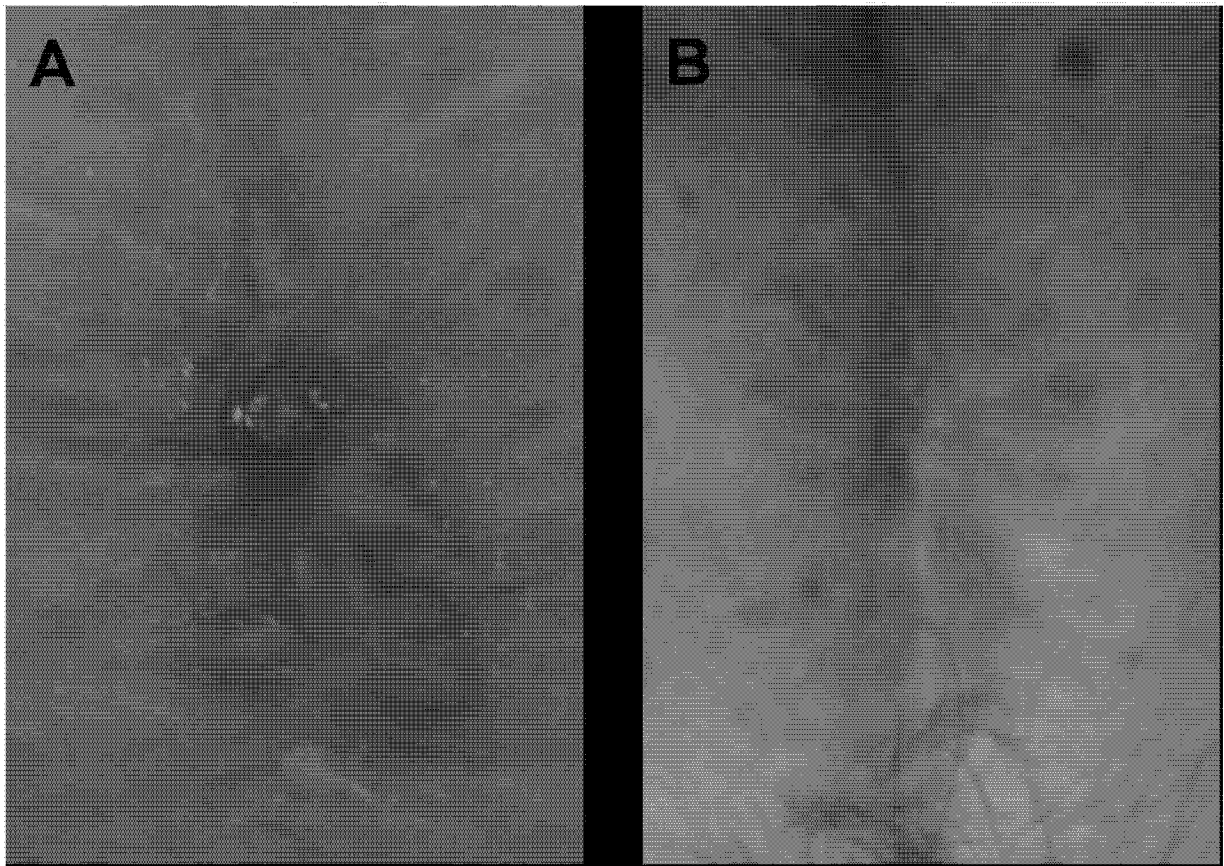


图 6

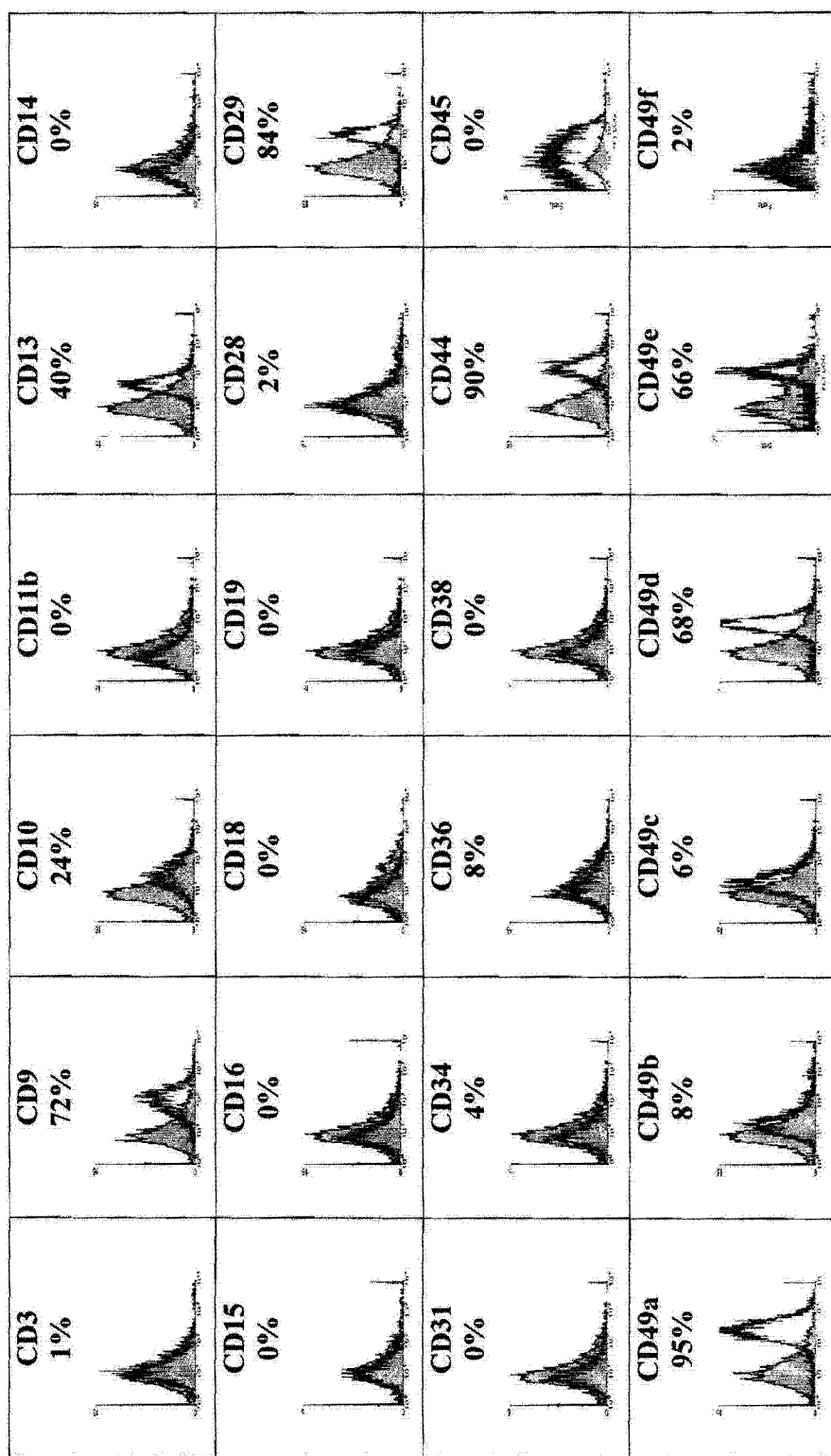


图 7A

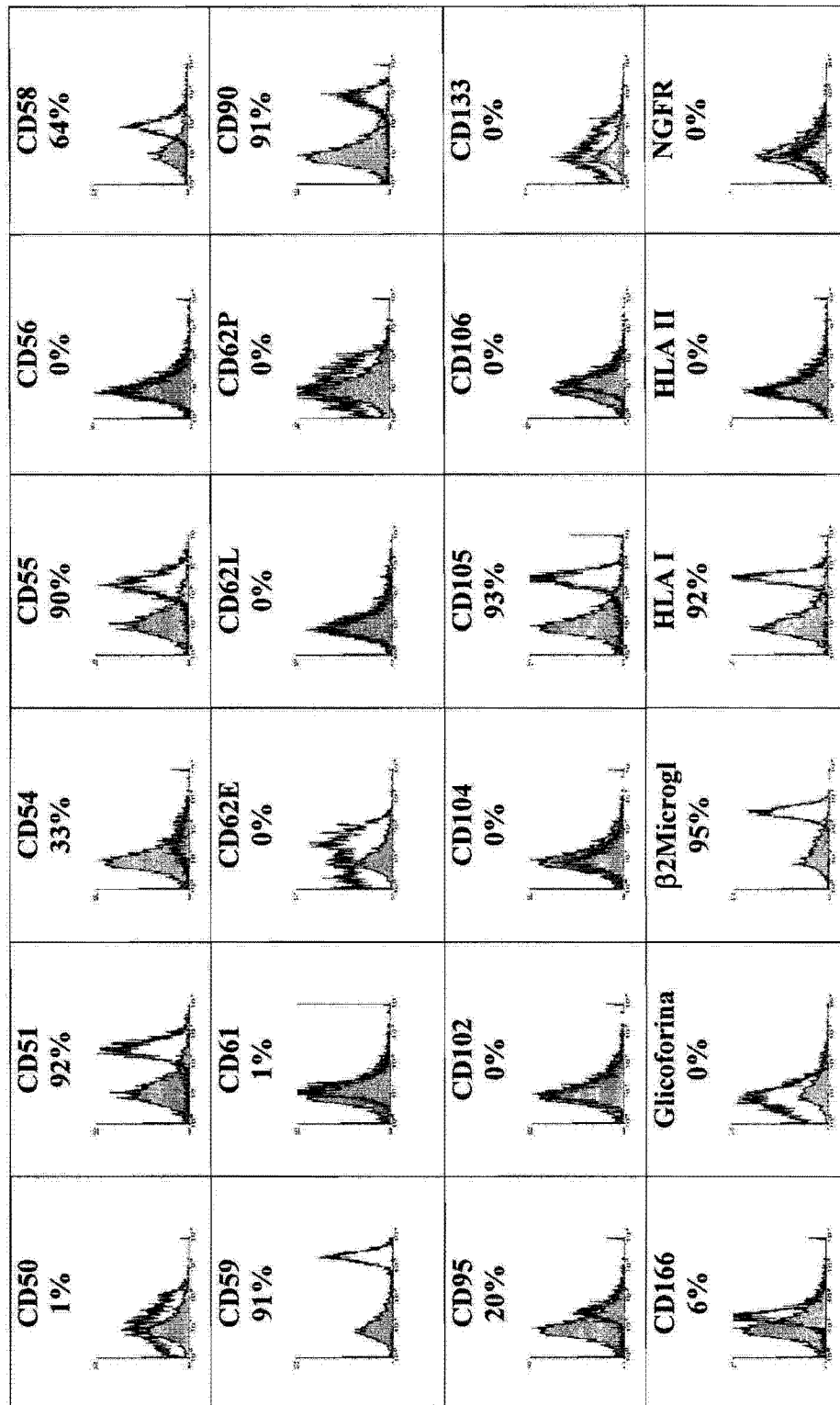


图 7B