



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106692193 B

(45) 授权公告日 2021.01.05

(21) 申请号 201611001568.0

A61P 37/06 (2006.01)

(22) 申请日 2012.04.06

C12N 15/85 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106692193 A

(43) 申请公布日 2017.05.24

(30) 优先权数据

61/516,637 2011.04.06 US

61/541,248 2011.09.30 US

(62) 分案原申请数据

201280024630.1 2012.04.06

(73) 专利权人 桑比欧公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 M·道 C·凯斯

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

代理人 李程达

(51) Int. Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 35/28 (2015.01)

(56) 对比文件

WO 2009023251 A1, 2009.02.19

WO 03012441 A1, 2003.02.13

CN 102027118 A, 2011.04.20

陈峰.mIL-10基因转染修饰骨髓间充质干/祖细胞在H-2单倍型骨髓移植aGVHD模型中的免疫生物学研究.《中国博士学位论文全文数据库医药卫生科技辑》.2010, (第04期), E060-2.

Sascha Rutz等.Notch regulates IL-10 production by T helper 1 cells.《Proc Natl Acad Sci》.2008, 第105卷(第9期), 第3497-3502页.

Laurence Bugeon等.Cutting Edge: Notch Signaling Induces a Distinct Cytokine Profile in Dendritic Cells That Supports T Cell-Mediated Regulation and IL-2-Dependent IL-17 Production.《J Immunol.》.2008, 第181卷(第12期), 第8189-8193页.

审查员 于淼

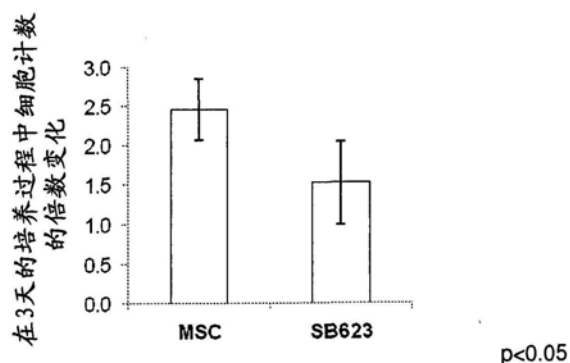
权利要求书2页 说明书19页 附图15页

(54) 发明名称

用于调节外周免疫功能的方法和组合物

(57) 摘要

本文中公开了用于调节各种外周免疫功能的细胞制剂,用于制备所述细胞制剂的方法以及它们的使用方法。



1. 细胞在制备用于将T淋巴细胞(T-细胞)的细胞因子特征谱从促炎性细胞因子特征谱转化成抗炎细胞因子特征谱的试剂中的用途,其中所述细胞通过如下步骤获得:

(a) 提供骨髓基质细胞的培养物;

(b) 将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch-1细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸接触,其中所述多核苷酸不编码全长Notch-1蛋白;

(c) 选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞;和

(d) 在不存在选择的情况下进一步培养步骤(c)的选择的细胞。

2. 权利要求1的用途,其中T细胞产生的干扰素 γ (IFN- γ)减少。

3. 权利要求1的用途,其中T细胞产生的白介素10 (IL-10)增加。

4. 细胞在制备用于将T淋巴细胞(T-细胞)的群体从富含Th1辅助T细胞的群体转化成富含Th2辅助T细胞和/或调节性T细胞(T_{reg}S)的群体的试剂中的用途,其中所述细胞通过如下步骤获得:

(a) 提供骨髓基质细胞的培养物;

(b) 将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch-1细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸接触,其中所述多核苷酸不编码全长Notch-1蛋白;

(c) 选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞;和

(d) 在不存在选择的情况下进一步培养步骤(c)的选择的细胞。

5. 权利要求4的用途,其中Th1细胞产生干扰素 γ (IFN- γ)。

6. 权利要求4的用途,其中Th2细胞和/或T_{reg}细胞产生白介素10 (IL-10)。

7. 细胞在制备用于刺激原态T-细胞分化为调节性T细胞(T_{reg}S)的试剂中的用途,其中所述细胞通过如下步骤获得:

(a) 提供骨髓基质细胞的培养物;

(b) 将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch-1细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸接触,其中所述多核苷酸不编码全长Notch-1蛋白;

(c) 选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞;和

(d) 在不存在选择的情况下进一步培养步骤(c)的选择的细胞。

8. 权利要求7的用途,其中T_{reg}细胞产生白介素10 (IL-10)。

9. 权利要求7的用途,其中T_{reg}细胞产生FoxP3转录因子。

10. 细胞在制备试剂中的用途,所述试剂用于增加T-细胞群体中的Th17辅助T-细胞的数目,其中所述细胞通过如下步骤获得:

(a) 提供骨髓基质细胞的培养物;

(b) 将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch-1细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸接触,其中所述多核苷酸不编码全长Notch-1蛋白;

(c) 选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞;和

(d) 在不存在选择的情况下进一步培养步骤(c)的选择的细胞。

11. 权利要求10的用途,其中Th17细胞产生白介素17 (IL-17)。

12. 细胞在制备试剂中的用途,所述试剂用于增加T-细胞群体中的白介素17 (IL-17)的产生,其中所述细胞通过如下步骤获得:

(a) 提供骨髓基质细胞的培养物;

(b) 将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch-1细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸接触,其中所述多核苷酸不编码全长Notch-1蛋白;

(c) 选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞;和

(d) 在不存在选择的情况下进一步培养步骤(c)的选择的细胞。

13. 细胞在制备试剂中的用途,所述试剂用于促进单核细胞群体中的抗炎细胞因子的产生,其中所述细胞通过如下步骤获得:

(a) 提供骨髓基质细胞的培养物;

(b) 将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch-1细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸接触,其中所述多核苷酸不编码全长Notch-1蛋白;

(c) 选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞;和

(d) 在不存在选择的情况下进一步培养步骤(c)的选择的细胞。

14. 权利要求13的用途,其中所述抗炎细胞因子是白介素10(IL-10)。

用于调节外周免疫功能的方法和组合物

[0001] 本申请是申请号为2012800246301的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求2011年4月6日提交的美国临时专利申请号61/516,637和2011年9月30日提交的61/541,248的利益,将所述美国临时专利申请的公开内容为了所有目的通过引用整体并入本文。

[0004] 关于联邦政府资助的声明

[0005] 不适用。

[0006] 领域

[0007] 本公开内容在免疫调节(例如,免疫抑制)的领域内。

[0008] 背景

[0009] 脊椎动物的外周(即,非CNS)免疫通过两个系统调节:先天性免疫系统和适应性免疫系统。先天性免疫系统提供了对损伤和/或感染的早期非特异性反应。相反地,适应性免疫系统被产生来随后在损伤或感染的过程中起作用,并且对于侵入的病原体是特异性的。进化上更古老的先天性免疫系统在植物、无脊椎动物和脊椎动物中是活跃的,然而适应性免疫系统仅在脊椎动物中活跃。

[0010] 如上文所指出的,先天性免疫系统在感染后在感染部位立即变得活跃,并且不依赖于先前对感染性病原体的暴露。其因此提供了一组对于任何特定病原体是非特异性的一般防御机制。先天性免疫系统的细胞元件包括巨噬细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞和天然杀伤(NK)细胞。先天性免疫系统的大分子组分包括防卫素肽和补体系统。先天性免疫的其它元件包括针对感染的物理屏障(例如皮肤的角质化、上皮细胞之间的紧密连接、胃酸和由许多上皮组织分泌的粘液)和细胞固有应答例如吞噬作用(有时与吞噬材料的溶酶体融合偶联)以及双链RNA的降解。

[0011] 先天性免疫系统的活化部分地通过病原体相关分子(例如含N-甲酰基甲硫氨酸的多肽、细胞壁肽聚糖、细菌鞭毛、脂多糖、磷壁质酸和真菌特异性分子例如甘露聚糖、葡聚糖和壳多糖)的识别介导。此外,某些对于微生物是共同的核酸序列(例如非甲基化的CpG二核苷酸)能触发先天性免疫应答。此类病原体相关的免疫刺激物的识别导致炎症应答的产生和通过巨噬细胞、嗜中性粒细胞和/或树突细胞产生的病原体的吞噬。

[0012] 上述病原体相关的免疫刺激物中的某一些在被称为病原体相关分子模式(PAMP)的重复模式中产生,所述模式可被先天性免疫系统细胞表面上的模式识别受体识别。这类受体包括补体系统的可溶性成员和膜结合受体例如Toll-样受体家族(TLR)的成员和所谓的NOD蛋白。膜结合受体能刺激吞噬作用和激活负责各种先天性和适应性免疫应答的基因表达的程序。

[0013] 最后,先天性免疫系统部分地通过分泌细胞外信号转导分子(其刺激适应性免疫系统的细胞的增殖和分化),以及还通过加工抗原并且将抗原呈递至适应性免疫系统的细胞来参与活化适应性免疫。

[0014] 与先天性免疫系统相反,适应性免疫系统在感染后不被立即活化,并且产生针对

病原体的特异性持久应答。适应性免疫系统的活化不在损伤部位而是在淋巴样器官中发生,并且依赖于通过先天性免疫系统的组分对抗原的呈递(以活化适应性免疫系统的细胞)。适应性免疫系统的主要细胞是合成和分泌抗体的B淋巴细胞(B细胞),以及T淋巴细胞(T细胞)。

[0015] 存在3个主要种类的T细胞:细胞毒性、辅助性和调节性(或抑制)T细胞。细胞毒性T细胞能够杀死感染的宿主细胞。辅助性T细胞通过分泌细胞因子和/或通过表面表达许多不同的共刺激分子之一参与巨噬细胞、树突细胞、B细胞和细胞毒性T细胞的活化。存在两种类型的辅助性T细胞: T_H1 细胞参与巨噬细胞、细胞毒性T细胞和B细胞的活化以提供对细胞内病原体的免疫和分泌巨噬细胞活化性细胞因子干扰素 γ (IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)。 T_H1 细胞还能够刺激炎症应答。 T_H2 细胞帮助活化B细胞以产生抗体,主要响应于细胞外病原体,并分泌细胞因子白细胞介素4 (IL4) 和白细胞介素10 (IL10)。原态辅助性T细胞至 T_H1 细胞的发育由白细胞介素12 (IL12) 刺激;而树突细胞的病原体诱导的Jagged蛋白表达将指导原态辅助性T细胞发育成产生IL4的 T_H2 细胞,所述IL4刺激B细胞产生抗体。调节性T细胞(T_{reg})抑制细胞毒性T细胞、辅助性T细胞和树突细胞的功能,并且在表达Foxp3转录因子中是独特的。因此,辅助性T细胞与调节性T细胞之间的相互作用帮助保持免疫应答平衡,以充足的活性清除侵入的病原体而无对宿主的过度损害。

[0016] 适应性免疫系统中的被称为记忆细胞的一类淋巴细胞保留针对感染和清除后的病原体的受体,从而使得宿主生物能够引发更快速的对随后遭遇相同病原体的适应性免疫应答,并且为天然或接种诱导的针对许多感染性疾病的免疫提供基础。相反地,先天性免疫系统不保留这样的免疫记忆。

[0017] 已用表达Notch细胞内结构域(NICD)的质粒转染的间充质干细胞(MSC,也称为“骨髓基质细胞”或“骨髓粘附干细胞”)用于治疗许多中枢和外周神经系统的疾病和障碍。参见,例如,美国专利号7,682,825(2010年3月23日);美国专利申请公布号2006/0216276(2006年9月28日);美国专利申请公布号2010/0034790(2010年2月11日);美国专利申请公布号2010/0310523(2010年12月9日);国际专利申请公布号W0 08/102460(2008年8月28日);Yasuhara等人(2009)Stem Cells and Development 18:1501-1513和Glavaski-Joksimovic等人(2009)Cell Transplantation 18:801-814。

[0018] 被称为SB623细胞的此类细胞拯救受损神经组织的能力与它们的各种营养因子的分泌和它们的各种细胞外基质组分的建立部分相关。参见,例如,美国专利申请公布号2010/0266554(2010年10月21日)和美国专利申请公布号2010/0310529(2010年12月9日)。

[0019] 现有细胞移植疗法具有明显的不利方面,包括例如针对移植细胞的宿主外周免疫反应。此外,炎症也是许多神经变性疾病例如帕金森病和多发性硬化的标志。Villoslada等人(2008)Clin.Immunol.128:294-305。已报道MSC通过机制(包括阻断抗原呈递细胞的产生和改变辅助T细胞的细胞因子谱)减弱外周免疫活性。Kong等人(2009)J.Neuroimmunol.207:83-91。然而,MSC具有有限的再生潜能,在离体操作后变得衰老。Wagner等人(2008)PLoS One 3:e2213;Jin等人(2010)Biochem Biophys Res Commun.391:1471-1476。虽然衰老细胞分泌许多对于组织再生可以是有益的细胞因子,但总体上衰老细胞分泌特征谱是促炎性的。Rodier等人(2009)Nature Cell Biol.11:973-979;Coppé等人(2008)PLoS Biol.6:2853-2868;Freund等人(2010)Trends Mol.Med.16(5):238-246。

[0020] 因为这些和其它原因,仍然需要不激起宿主外周免疫应答和/或减小炎症以及其它免疫应答的用于细胞移植的方法和组合物。

[0021] 概述

[0022] 本发明人已在利用编码Notch细胞内结构域的序列转染的MSC的培养物以及它们的后代(即,SB623细胞)内鉴定了一群衰老的细胞。虽然已显示SB623细胞能够治疗许多中枢神经系统障碍,但本申请公开了SB623细胞调节许多外周免疫功能的令人惊讶的能力。例如,SB623细胞能在同种异体和异种混合的淋巴细胞反应中抑制人T细胞增殖,刺激T细胞产生IL-10,并且阻止单核细胞分化成树突细胞。SB623细胞还抑制树突细胞的成熟并且,相较于亲代MSC,SB623细胞对树突细胞成熟产生更大的抑制作用,如通过共刺激分子CD86的表面表达的更多减少所证明的。SB623细胞还能将T细胞群体的细胞因子特征谱从促炎性细胞因子特征谱转化成抗炎细胞因子特征谱。此外,根据研究,SB623细胞的这些性质是令人惊讶的和出乎意料的,所述研究报道衰老细胞分泌促炎性细胞因子。Orjalo等人(2009) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 106:17031-17036。

[0023] 因此,SB623细胞和/或它们的衰老细胞亚群对于许多治疗方法是有用的,如下列实施方案中举例说明的。

[0024] 1.用于受试者的外周免疫抑制的方法,所述方法包括给受试者施用有效量的SB623细胞;其中所述SB623细胞通过如下步骤获得:(a)提供间充质干细胞的培养物;(b)将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸接触,其中所述多核苷酸不编码全长Notch蛋白;(c)选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞;和(d)在不存在选择的情况下进一步培养步骤(c)的选择的细胞。

[0025] 2.用于抑制受试者的外周炎症应答的方法,所述方法包括给受试者施用有效量的SB623细胞;其中所述SB623细胞通过如下步骤获得:(a)提供间充质干细胞的培养物;(b)将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸接触,其中所述多核苷酸不编码全长Notch蛋白;(c)选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞;和(d)在不存在选择的情况下进一步培养步骤(c)的选择的细胞。

[0026] 3.实施方案2的方法,其中外周炎症应答由同种异体移植、局部缺血或坏死引起。

[0027] 4.一种用于抑制受试者的外周T细胞活化的方法;所述方法包括给所述受试者施用有效量的SB623细胞;其中所述SB623细胞通过如下步骤获得:(a)提供间充质干细胞的培养物;(b)将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸接触,其中所述多核苷酸不编码全长Notch蛋白;(c)选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞;和(d)在不存在选择的情况下进一步培养步骤(c)的选择的细胞。

[0028] 5.实施方案4的方法,其中所述外周T细胞活化包括T细胞的CD69和/或HLA-DR的表达。

[0029] 6.实施方案4的方法,其中所述外周T细胞活化包括CD4⁺T-细胞的增殖。

[0030] 7.一种抑制受试者的外周辅助T细胞的功能的方法;所述方法包括给所述受试者施用有效量的SB623细胞;其中所述SB623细胞通过如下步骤获得:(a)提供间充质干细胞的培养物;(b)将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸接触,其中所述多核苷酸不编码全长Notch蛋白;(c)选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞;和(d)在不存在选择的情况下进一步培养步骤(c)的选择的细胞。

- [0031] 8. 实施方案7的方法, 其中所述外周辅助T细胞功能是细胞因子分泌。
- [0032] 9. 实施方案7的方法, 其中所述外周辅助T细胞功能与类风湿性关节炎的病理学相关。
- [0033] 10. 一种用于扩增受试者的外周调节性T细胞(T_{reg})的群体的方法; 所述方法包括给所述受试者施用有效量的SB623细胞; 其中所述SB623细胞通过如下步骤获得: (a) 提供间充质干细胞的培养物; (b) 将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸接触, 其中所述多核苷酸不编码全长Notch蛋白; (c) 选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞; 和(d) 在不存在选择的情况下进一步培养步骤(c)的选择的细胞。
- [0034] 11. 一种用于调节受试者的细胞因子的外周产生的方法; 所述方法包括给所述受试者施用有效量的SB623细胞; 其中所述SB623细胞通过如下步骤获得: (a) 提供间充质干细胞的培养物; (b) 将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸接触, 其中所述多核苷酸不编码全长Notch蛋白; (c) 选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞; 和(d) 在不存在选择的情况下进一步培养步骤(c)的选择的细胞。
- [0035] 12. 实施方案11的方法, 其中所述细胞因子是促炎性细胞因子并且所述细胞因子的产生减少。
- [0036] 13. 实施方案12的方法, 其中所述细胞因子由T细胞产生。
- [0037] 14. 实施方案13的方法, 其中所述细胞因子是干扰素 γ (IFN- γ)。
- [0038] 15. 实施方案12的方法, 其中所述细胞因子由单核细胞产生。
- [0039] 16. 实施方案15的方法, 其中所述细胞因子是肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。
- [0040] 17. 实施方案11的方法, 其中所述细胞因子是抗炎细胞因子并且细胞因子的产生被刺激。
- [0041] 18. 实施方案17的方法, 其中所述细胞因子是白细胞介素-10 (IL-10)。
- [0042] 19. 实施方案18的方法, 其中所述细胞因子由T细胞或单核细胞产生。
- [0043] 20. 实施方案19的方法, 其中所述T细胞是辅助T细胞。
- [0044] 21. 实施方案20的方法, 其中所述辅助T细胞是 T_H1 细胞。
- [0045] 22. 实施方案19的方法, 其中所述细胞因子由调节性T细胞产生。
- [0046] 23. 实施方案22的方法, 其中所述调节性T细胞是 T_R1 细胞。
- [0047] 24. 一种用于抑制受试者的外周单核细胞至树突细胞的分化的方法; 所述方法包括给所述受试者施用有效量的SB623细胞; 其中所述SB623细胞通过如下步骤获得: (a) 提供间充质干细胞的培养物; (b) 将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸接触, 其中所述多核苷酸不编码全长Notch蛋白; (c) 选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞; 和(d) 在不存在选择的情况下进一步培养步骤(c)的选择的细胞。
- [0048] 25. 一种用于抑制受试者的外周树突细胞的成熟的方法; 所述方法包括给所述受试者施用有效量的SB623细胞; 其中所述SB623细胞通过如下步骤获得: (a) 提供间充质干细胞的培养物; (b) 将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸接触, 其中所述多核苷酸不编码全长Notch蛋白; (c) 选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞; 和(d) 在不存在选择的情况下进一步培养步骤(c)的选择的细胞。
- [0049] 26. 实施方案25的方法, 其中成熟包括树突细胞的CD86表达的增加。
- [0050] 27. 一种用于治疗受试者的GVHD的方法; 所述方法包括给所述受试者施用有效量

的SB623细胞;其中所述SB623细胞通过如下步骤获得:(a)提供间充质干细胞的培养物;(b)将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸接触,其中所述多核苷酸不编码全长Notch蛋白;(c)选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞;和(d)在不存在选择的情况下进一步培养步骤(c)的选择的细胞。

[0051] 28.一种用于抑制受试者的移植排斥的方法;所述方法包括给所述受试者施用有效量的SB623细胞;其中所述SB623细胞通过如下步骤获得:(a)提供间充质干细胞的培养物;(b)将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸接触,其中所述多核苷酸不编码全长Notch蛋白;(c)选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞;和(d)在不存在选择的情况下进一步培养步骤(c)的选择的细胞。

[0052] 29.一种用于治疗受试者的外周自身免疫障碍的方法;所述方法包括给所述受试者施用有效量的SB623细胞;其中所述SB623细胞通过如下步骤获得:(a)提供间充质干细胞的培养物;(b)将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸接触,其中所述多核苷酸不编码全长Notch蛋白;(c)选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞;和(d)在不存在选择的情况下进一步培养步骤(c)的选择的细胞。

[0053] 30.实施方案29的方法,其中所述外周自身免疫障碍选自多发性硬化、溃疡性结肠炎、慢性阻塞性肺病(COPD)、哮喘、狼疮和I型糖尿病。

[0054] 31.前述实施方案的任一个的方法,其中所述受试者是实验动物。

[0055] 32.实施方案1-30的任一个的方法,其中所述受试者是人。

[0056] 附图概述

[0057] 图1显示通过流式细胞术对MSC和SB623细胞中的CFSE稀释度的测量。

[0058] 图2显示在3天的培养后通过台盼蓝排除法测定的MSC和SB623细胞的培养物中的细胞计数的变化。每一个培养物始于100万个细胞。

[0059] 图3A和3B显示MSC和SB623细胞的培养物的碘化丙啶染色的结果。图3A显示代表性FACS数据。标记为“M1”的峰代表静止(G0/G1)期细胞。图3B显示通过测量图3A中的M1峰的面积测定的MSC和SB623细胞的细胞周期的静止期中的细胞的分。

[0060] 图4显示MSC和SB623细胞中的p16Ink4A水平的测量。

[0061] 图5显示MSC和SB623细胞中的某些表面标志物的水平。

[0062] 图6显示MSC和SB623细胞中的CD54表达的测量。

[0063] 图7显示MSC和SB623细胞中某些细胞因子的水平。

[0064] 图8显示MSC和SB623细胞中转化生长因子 β -1(TGF- β -1)和血管内皮生长因子-A(VEGF-A)的水平。

[0065] 图9A和9B显示SB623细胞和MSC对同种异基因MLR中的T细胞活化的效应。图9A显示对照的未受刺激的人T细胞(左上图框,以“-”标示);受同种异体PBMC刺激的人T细胞(右上图框,以“MLR”标示);先前的MLR和 10^4 MSC(左下图框,以“MLR+MSC”标示)以及先前的MLR和 10^4 SB623细胞(右下图框,以“MLR+SB623”标示)的针对CFSE和藻红蛋白标记的抗-CD69门控的代表性FACS描述。图9B显示MLR培养物中的CD69表达的定量。对照(未受刺激的T细胞培养物)以“血清”标示;混合淋巴细胞反应中的PBMC刺激的T细胞以“MLR”标示;在间充质干细胞存在的情况下先前的混合淋巴细胞反应以“MSC”标示;在SB623细胞存在的情况下先前的混合淋巴细胞反应以“SB623”标示。“MSC”和“SB623”的值是3个培养物的平均值,每一个培养

物包含来自不同供体的MSC或SB623细胞。

[0066] 图10A和10B显示通过测量CFSE稀释度定量的同种异体MLR中的T细胞增殖率的比较。图10A显示对照的未受刺激的人T细胞的代表性FACS描述(左上图框,以“单独的T细胞”标示);受同种异体PBMC刺激的人T细胞(右上图框,以“MLR”标示);先前的MLR和 10^4 MSC(左下图框,以“MLR+MSC”标示)以及先前的MLR和 10^4 SB623细胞(右下图框,以“MLR+SB623”标示)的代表性FACS描述。图10B显示MLR培养物中CFSE稀释度的定量。培养物的组成示于图10A中。

[0067] 图11显示在不同培养条件下HLA-DR表达的比较。对照(未受刺激的T细胞培养物)以“血清”标示;混合淋巴细胞反应中的PBMC刺激的T细胞以“MLR”标示;在间充质干细胞存在的情况下混合淋巴细胞反应以“MSC”标示;在SB623细胞存在的情况下混合淋巴细胞反应以“SB623”标示。“MSC”和“SB623”的值是3个培养物的平均值,每一个培养物包含来自不同供体的MSC或SB623细胞。

[0068] 图12显示SB623细胞和MSC对异种淋巴细胞刺激反应中的T细胞增殖的效应。通过PKH26(一种可渗透细胞的染料)的稀释度测量增殖。测量未受刺激的T细胞(“单独的T细胞”);与神经胶质混合物细胞共培养的T细胞(“xeno-MLR”);与神经胶质混合细胞和间充质干细胞共培养的T细胞(“xeno-MLR+MSC”)以及与神经胶质混合细胞和SB623细胞共培养的T细胞(“xeno-MLR+SB623”)的含PKH26的CD32⁺T细胞的百分比。MSC和SB623细胞的制剂获自3个不同供体,如图中所标示的。

[0069] 图13A和13B显示使用CD4和CD25的共表达作为T_{reg}的标志物进行的体外T细胞培养物中的调节性T细胞(T_{reg})的测定。图13A显示代表性FACS描述,其测量IL-2刺激的T细胞(“T细胞”)和利用间充质干细胞(“T细胞+MSC”)或SB623细胞(“T细胞+SB623细胞”)共培养7天的IL-2刺激的T细胞的CD4和CD25。图13B显示MSC和SB623细胞的5个不同匹配批次的平均CD4/CD25表达水平。注意,对于“供体1PBL”,在利用SB623细胞的共培养物中相较于利用MSC的共培养物观察到CD4⁺CD25⁺细胞的显著增加。

[0070] 图14A和14B显示通过用缀合有PE的抗FoxP3抗体对细胞内FoxP3染色,随后通过流式细胞术分析测量的在IL-2存在的情况下培养的T细胞中的FoxP3转录因子的水平。图14A显示在IL-2不存在的情况下培养的T细胞(以“RPMI/10%FBS”标示)、在10ng/ml IL-2中培养的T细胞(标示为“+IL-2”)、与MSC共培养的如上于IL-2中培养的T细胞(标示为“+MSC”)以及于SB623细胞共培养的如上于IL-2中培养的T细胞(标示为“+SB623”)的代表性FACS描述。

[0071] 图14B显示在IL-2存在的情况下培养后(标示为“单独的T细胞”)或在IL-2存在的情况下利用MSC(“T细胞+MSC”)或SB623细胞(“T细胞+SB623”)共培养后表达FoxP3的T细胞的平均百分比。利用3个不同匹配批次的MSC和SB623细胞进行共培养。

[0072] 图15A和15B显示在IL-2存在的情况下培养的CD4⁺T细胞中细胞内IL-10水平的测量的结果。图15A显示在IL-2存在的情况下培养的T细胞(“单独的T细胞”)、利用MSC共培养的如上在IL-2中培养的T细胞(标示为“T细胞+MSC”)和利用SB623细胞共培养的如上在IL-2中培养的T细胞(标示为“T细胞+SB623”)的代表性FACS描述。表示IL-10水平的Alexa 488荧光示于横坐标上。图15B显示T细胞与3个不同匹配批次的MSC(“T细胞+MSC”)和SB623细胞(“T细胞+SB623”)的共培养物中相较于未共培养的T细胞(“单独的T细胞”)的IL-10阳性细胞的平均百分比。

[0073] 图16A和16B显示在IL-2不存在和非最大诱导水平的PMA和离子霉素存在的情况下培养的T细胞中的细胞因子的水平。在图16A中,显示了培养前新鲜分离的T细胞(“新鲜细胞”)、在其它细胞不存在的情况下培养7天的T细胞(“培养对照”)、用SB623细胞共培养7天的T细胞(“SB623”)和用MSC共培养7天的T细胞(“MSC”)中的干扰素- γ (IFN- γ)的水平。在图16B中,显示了培养前新鲜分离的T细胞(“新鲜细胞”)、在其它细胞不存在的情况下培养7天的T细胞(“培养对照”)、用SB623细胞共培养7天的T细胞(“SB623”)以及用MSC共培养7天的T细胞(“MSC”)中的白细胞介素-10 (IL-10)的水平。“MSC”和“SB623”的值为3个培养物的平均值,每一个培养物包含来自不同供体的MSC或SB623细胞。

[0074] 图17显示了IL-23刺激的T细胞中的IL-17的水平。在用荧光抗体针对IL-17对细胞进行染色后,通过流式细胞术测定百分比表达。用或不用IL-23 (如所标示的),以及单独地培养或用MSC或SB623细胞共培养(如所标示的)T细胞。

[0075] 图18A和18B显示在7天的培养或共培养后单核细胞培养物的CD1a和CD14的水平。图18A显示针对CD1A和CD14染色的细胞的代表性FACS描述。单核细胞包含一群CD1A⁺CD14⁺树突细胞前体(最左边的图框)。当单核细胞在IL-4和GM-CSF存在的情况下培养7天时,该树突细胞前体群体减少并且被一群CD1A⁺CD14⁻树突细胞(左起第二图框)替代。当在IL-4和GM-CSF存在的条件下用MSC(左起第三图框)或SB623细胞(最右边的图框)共培养单核细胞时,CD1A⁺CD14⁻树突细胞群体减少并且CD1A⁺CD14⁺前体细胞群体增加。图18B显示单核细胞(最左边的成对条柱)、在IL-4和GM-CSF存在的情况下培养7天的单核细胞(左起第二对的条柱)、在IL-4和GM-CSF存在的条件下用MSC共培养7天的单核细胞(左起第三对条柱)或在IL-4和GM-CSF存在的条件下用SB623细胞共培养7天的单核细胞(最右边成对的条柱)的平均表达数据。共培养实验的结果获自3个不同匹配批次的MSC和SB623细胞。

[0076] 图19显示TNF- α -刺激的单核细胞培养物中的CD86的水平(表示为平均荧光强度)。以“对照”标示的培养物包含在IL-4和GM-CSF存在的情况下培养5天、随后在TNF- α 中再培养48小时的PBMC。“以CsA”标示的培养物包含在IL-4和GM-CSF存在的情况下培养5天、随后在TNF- α +1 μ g/ml环孢霉素A中再培养48小时的PBMC。以“MSC”标示的培养物包含在IL-4和GM-CSF存在的情况下培养5天、随后在TNF- α +10⁴MSC中再培养48小时的PBMC。以“SB623”标示的培养物包含在IL-4和GM-CSF存在的情况下培养5天、随后在TNF- α +10⁴SB623细胞中再培养48小时的PBMC。MSC和SB623细胞的结果为3个实验的平均值,每一个实验使用来自不同供体的样品。单核细胞供体在所有情况下都是相同的。所有培养物始于10⁵PBMC。

[0077] 图20A和20B显示单核细胞中细胞因子表达的测量。图20A显示培养物中表达炎症细胞因子TNF- α 的单核细胞的百分比。图20B显示培养物中表达抗炎细胞因子IL-10的单核细胞的百分比。在如下情况下培养基于CD14的表面表达选择的单核细胞:不使用补充物(“阴性”),使用巨噬细胞集落刺激因子(“MCSF”),使用粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(“GMCSF”),使用MSC或使用SB623细胞。MSC和SB623细胞获自3个不同的供体,在图中标示为D52、D55和D65。

[0078] 详细描述

[0079] 除非另有所指,否则本公开内容的实践使用细胞生物学、毒理学、分子生物学、生物化学、细胞培养、免疫学、肿瘤学、重组DNA及相关领域内的标准方法和常规技术,这在本领域技术人员能力之内。此类技术描述于文献中,从而是本领域技术人员可获得的。参见,

例如,Alberts,B.等人,“Molecular Biology of the Cell,”第5版,Garland Science,New York,NY,2008;Voet,D.等人“Fundamentals of Biochemistry:Life at the Molecular Level,”第3版,John Wiley&Sons,Hoboken,NJ,2008;Sambrook,J.等人,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual,”第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001;Ausubel,F.等人,“Current Protocols in Molecular Biology,”John Wiley&Sons,New York,1987,定期更新;Freshney,R.I.,“Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique,”第5版,Wiley,New York,2005;以及系列“Methods in Enzymology,” Academic Press, San Diego, CA。在例如“Current Protocols in Immunology,” (R.Coico, 系列编辑), Wiley (2010年8月更新的) 中描述了免疫学的标准技术。

[0080] 为了本公开内容的目的,术语“外周的”用于指中枢神经系统外的身体的部分。这些部分包括例如骨髓、外周循环和淋巴样器官。

[0081] SB623细胞的制备

[0082] 间充质干细胞(MSC)可通过从骨髓选择粘附细胞来获得,并且可被诱导以通过在粘附细胞中表达Notch细胞内结构域(NICD)来形成SB623细胞。在一个实施方案中,将MSC的培养物与包含编码编码NICD的序列的多核苷酸接触(例如,通过转染),随后通过药物选择和进一步培养富集转染的细胞。参见,例如,美国专利号7,682,825(2010年3月23日);美国专利申请公布号2010/0266554(2010年10月21日);和WO 2009/023251(2009年2月19日);为了描述间充质干细胞的分离和间充质干细胞至SB623细胞的转化(在这些文献中称为“神经前体细胞”和“神经再生细胞”),将所有其公开内容通过引用整体并入本文。

[0083] 在这些方法中,可使用编码Notch细胞内结构域的任何多核苷酸(例如,载体),可使用用于选择和富集转染的细胞的任何方法。例如,在某些实施方案中,包含编码Notch细胞内结构域的序列的载体还包含编码抗药性标记物(例如,对G418的抗性)的序列。在这些实施方案中,在用载体转染细胞培养物后进行选择:通过以足以杀死不包含所述载体的细胞但留下包含所述载体的细胞的量将选择剂(例如,G418)添加至细胞培养物中来实现。选择不存在使得必需除去所述选择剂或使其浓度降至不杀死不包含所述载体的细胞的水平。

[0084] SB623细胞的衰老

[0085] 如上所描述的,SB623细胞通过在培养的MSC中表达NICD来从MSC衍生而来。因为已在培养中经历操作的MSC通常变得衰老;因此测试来源于其的SB623细胞的衰老。

[0086] SB623细胞在软琼脂中不形成集落,这表明它们不是转染的细胞。此外,当用二醋酸羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)(一种通过细胞分裂稀释的可渗透细胞的染料)预标记SB623细胞时,在5天的培养后,细胞的一个亚群保持高浓度的CFSE(图1)。在MSC培养物中未观察到该缓慢增殖(或非增殖)的亚群。还观察到SB623细胞群中的某些细胞对于 β -半乳糖苷酶(细胞衰老的标志)的强烈染色,并且此类细胞在SB623培养物中比在MSC培养物中更丰富。这些结果与SB623细胞群中的非增殖衰老细胞的群体的存在一致。

[0087] 通过将100万个MSC或SB623细胞涂板并且在培养3天后,利用台盼蓝排除法测量活细胞来测量细胞增殖。图2显示在MSC培养物中观察到更大量的活细胞,表明SB623细胞的较低的增殖指数。细胞周期状态通过碘化丙啶染色来评估,所述染色显示在SB623培养物中更大比例的细胞处于静止期(G0/G1)(图3),从而为SB623细胞的减小的增殖率提供了进一步

支持。

[0088] 通过就p16Ink4A蛋白的表达对SB623细胞群体杂色来进行衰老的另外的评估。p16Ink4A抑制细胞周期的G1期至S期的进展并且在衰老细胞中表达。图4显示相较于MSC,在SB623细胞的培养物中检测到更高百分比的表达p16Ink4A的细胞。此外,当测试SB623培养物中在5天的培养后保持高CFSE水平的细胞的p16Ink4A表达时,表达p16Ink4A的SB623细胞的亚群与含高CFSE水平的级分一致。这些结果一起表明在SB623培养物中存在衰老细胞的亚群。

[0089] 表面标志和细胞因子表达

[0090] SB623细胞表达许多与MSC共同的表面标志物。这些标志物包括CD29,CD44,CD73,CD90,CD105以及血管细胞粘附分子-1 (VCAM-1或CD 106)。相较于MSC,在SB623细胞中,CD44和CD73的水平更高,VCAM-1水平更低。SB623细胞还表达细胞间粘附分子-1 (ICAM-1或CD54),其通常不由MSC表达。参见图5和6。MSC和SB623细胞不表达细胞表面标志物CD31、CD34和CD45。

[0091] SB623细胞还分泌许多细胞因子和营养因子。此类因子的某些因子的身份通过用布雷菲德菌素A阻断蛋白质分泌、随后通过抗体染色和流式细胞术测试细胞内细胞因子来确定。这些研究显示SB623细胞产生,除其它因子以外,白细胞介素1 α (IL-1 α)、白细胞介素-6 (IL-6)、粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、血管内皮生长因子-A (VEGF-A) 和转化生长因子 β -1 (TGF β -1)。见图7和8。SB623细胞产生的IL-6和GM-CSF的量通常大于MSC产生的量。

[0092] 因为已报道衰老细胞合成和分泌某些生长刺激细胞因子和营养因子(Orjalo等人(2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:17031-17036),所以SB623培养物中的衰老细胞群体的存在表明SB623细胞移植以支持各种类型的组织再生的功用。然而,还已报道衰老细胞的分泌特征谱是促炎性的,如果对于SB623细胞情况是如此,则这可能削弱SB623细胞用于细胞移植疗法的有用性。

[0093] 令人惊讶地,尽管在SB623培养物中存在衰老细胞的群体,但是SB623细胞具有许多免疫抑制性质,如本文中公开的。例如,SB623细胞抑制T细胞的增殖和活化,改变T细胞的细胞因子特征谱,阻断单核细胞至树突细胞的分化,以及在减慢树突细胞的成熟上优于它们的亲代MSC。

[0094] SB623细胞对T细胞活化和T细胞增殖的抑制

[0095] 将SB623细胞添加至含有10⁵CFSE标记的外周血T细胞和10⁵外周血单核细胞(来自不相关供体)的混合淋巴细胞反应(MLR)。测量CD69(T细胞活化的早期标志物)的水平以检查SB623细胞调节T细胞活化的能力。在对照混合淋巴细胞反应中,CD69的表面表达被强劲诱导。然而,在10⁴SB623细胞存在的情况下一天后,CD4⁺T细胞(即,辅助T细胞)在表达表面CD69的MLR中的分数显著减少。参见实施例4。

[0096] 在SB623细胞存在的情况下5天后,预标记的CD4⁺T细胞中CFSE的稀释度(表示细胞增殖)表明MLR中CD4⁺T细胞的增殖在SB623细胞存在的情况下减少。参见实施例4。因此,SB623细胞能够抑制T细胞增殖和T细胞活化。

[0097] SB623细胞对T细胞功能的另一个作用包括减少表面HLA-DR表达(本文中的实施例4),在原态T细胞的体外培养物中增加调节性T细胞的产生(本文中的实施例6)和改变细胞

因子分泌(本文中的实施例7和8)。SB623细胞在异种淋巴细胞活化系统中减少T细胞增殖上也是有效的。参见本文的实施例5。

[0098] SB623细胞对树突细胞发育的抑制

[0099] 可通过将单核细胞暴露于细胞因子白细胞介素-4 (IL-4) 和粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 来体外刺激单核细胞至树突细胞(一种抗原呈递细胞)的分化和树突细胞的进一步成熟。该分化可被白细胞介素-6 (IL-6) 或血管内皮生长因子 (VEGF) 阻断,所述两种细胞因子都是已知由SB623细胞分泌的细胞因子。参见,例如,Tate等人(2010) *Cell Transplant.* 19:973-984和WO 2009/023251。

[0100] 本发明人在本文中显示单核细胞与SB623细胞的共培养减少单核细胞至CD1a⁺树突细胞的分化和树突细胞至CD86⁺状态的成熟。参见下文中的实施例9和10。由于它们的减少新树突细胞产生和抑制现有树突细胞功能的能力,SB623细胞可用于治疗和/或改善因T细胞的活化(通过由抗原呈递细胞例如树突细胞呈递肽进行)而引起的移植物抗宿主疾病(GVHD)。

[0101] 由于它们的各自免疫抑制性质(如本文中所描述的),SB623细胞可用于代替其它生物学和化学免疫抑制剂(例如,环孢菌素、他罗利姆、西罗莫司、干扰素、麦考酚酸、芬戈莫德、多球壳菌素、硫唑嘌呤、巯基嘌呤、更生霉素、丝裂霉素C、博来霉素、光辉霉素、葱环、甲氨蝶呤、FK506、环磷酰胺、亚硝基脲、铂化合物和糖皮质激素)。此外,在细胞疗法、例如用于神经再生和神经系统障碍的治疗中无需使用免疫抑制剂来伴随SB623的同种异体移植。

[0102] 祖细胞

[0103] 可被转化成SB623细胞的祖细胞可以是任何类型的非终末分化细胞。例如,在例如美国专利号5,843,780;6,200,806和7,029,913中公开的全能干细胞可用作祖细胞。可培养全能干细胞(例如,美国专利号6,602,711和7,005,252),将其分化成各种类型的多潜能细胞(例如,美国专利号6,280,718;6,613,568和6,887,706),所述多潜能细胞也可在公开的方法的实践中用作祖细胞。

[0104] 祖细胞的另一个示例性类型是骨髓粘附基质细胞(MASC),也称为骨髓粘附干细胞、骨髓基质细胞(BMSC)和间充质干细胞(MSC)。在美国专利申请公布号2003/0003090;Prockop(1997) *Science* 276:71-74和Jiang(2002) *Nature* 418:41-49中提供了MASC的示例性公开内容。用于MASC的分离和纯化的方法可见于例如美国专利号5,486,359;Pittenger等人(1999) *Science* 284:143-147和Dezawa等人(2001) *Eur. J. Neurosci.* 14:1771-1776中。人MASC是可商购获得的(例如,BioWhittaker, Walkersville, MD) 或可通过例如骨髓穿刺、随后选择粘附骨髓细胞来从供体获得。参见,例如,WO 2005/100552。

[0105] MASC还可从脐带血分离而来。参见例如,Campagnoli等人(2001) *Blood* 98:2396-2402;Erices等人(2000) *Br. J. Haematol.* 109:235-242和Hou等人(2003) *Int. J. Hematol.* 78:256-261。

[0106] MSC至SB623细胞的转化已描述于例如美国专利号7,682,825(2010年3月23日)和WO 2009/023251(2009年2月19日)中;为了描述间充质干细胞的分离和间充质干细胞至SB623细胞(在这些文献中称为“神经前体细胞”和“神经再生细胞”)的转化,将所述两者的公开内容通过引用整体并入本文。

[0107] Notch细胞内结构域

[0108] Notch蛋白是在所有后生动物(metazoan)中发现的跨膜受体,其通过细胞内信号转导影响细胞分化。Notch细胞外结构域与Notch配体(例如,Delta,Serrate,Jagged)的接触导致Notch蛋白的两个蛋白水解切割,其中第二个切割由 γ -分泌酶催化并且将Notch细胞内结构域(NICD)释放进入细胞质。在小鼠Notch蛋白中,该切割发生在氨基酸gly1743与val1744之间。NICD转位至细胞核,在细胞核中其用作转录因子,招募另外的转录调节蛋白(例如,MAM、组蛋白乙酰化酶)以解除各种靶基因(例如,Hes 1)的转录抑制。

[0109] 关于Notch信号转导的其它详细内容和信息见例如Artavanis-Tsakonas等人(1995) Science 268:225-232;Mumm和Kopan(2000) Develop.Biol.228:151-165和Ehebauer等人(2006) Sci.STKE 2006(364),cm7.[DOI:10.1126/stke.3642006cm7]。

[0110] 细胞培养和转染

[0111] 用于细胞培养的标准方法在本领域中是已知的。参见,例如,R.I.Freshney“Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique,”第5版,Wiley,New York,2005。

[0112] 用于将外源DNA引入细胞的方法的(即,转染)在本领域也是公知的。参见,例如,Sambrook等人“Molecular Cloning:A Laboratory Manual,”第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001;Ausubel等人,“Current Protocols in Molecular Biology,”John Wiley&Sons,New York,1987和定期更新。

[0113] 自身免疫障碍和过敏反应

[0114] 自身免疫障碍由攻击正常健康组织的免疫应答引起。示例性自身免疫障碍包括但不限于肌萎缩侧索硬化、强直性脊柱炎、血小板减少性紫癜、桥本甲状腺炎、格-巴二氏综合征、恶性贫血、皮炎(dermatosyositis)、阿狄森病、I型糖尿病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮(“狼疮”)、皮炎、**Sjögren's**综合征、多发性硬化、重症肌无力、多肌炎、胆汁性肝硬化、银屑病、反应性关节炎、格雷夫病、溃疡性结肠炎、炎性肠病、脉管炎、克罗恩病和乳糜泻-口炎性腹泻(谷蛋白敏感性肠病)。

[0115] 过敏症由针对通常不刺激免疫应答的外来物质的免疫超敏性引起。常见过敏原包括花粉、霉菌、宠物羽毛和灰尘。某些食物和药物也可引起过敏性反应。

[0116] 本文中公开的SB623细胞的免疫抑制性质使SB623细胞对于治疗治疗自身免疫障碍和过敏症是有用的。

[0117] 制剂、试剂盒和施用途径

[0118] 还提供了包含本文中公开的SB623细胞的治疗性组合物。此类组合物通常包含细胞和药学上可接受的载体。

[0119] 本文中公开的治疗性组合物,除其它以外,用于免疫调节(例如,减少免疫活化)和逆转各种免疫障碍的进展。因此,包含SB623细胞的组合物的“治疗有效量”可以是预防或逆转免疫活化的量。例如,剂量可从约100;500;1,000;2,500;5,000;10,000;20,000;50,000;100,000;500,000;1,000,000;5,000,000变化至10,000,000个细胞或更多细胞;施用频率是例如每天1次、每周2次、每周1次、每月2次、每月1次,这取决于例如体重、施用途径、疾病严重程度等。

[0120] 还可将补充性活性化合物掺入组合物。例如,将SB623细胞与其它免疫调节剂例如环孢霉素组合用于治疗例如自身免疫疾病或抑制移植物排斥和/或GVHD。因此,本文中公开

的治疗性组合物可包含SB623细胞和环孢霉素(或任何其它免疫抑制剂)。当将SB623细胞的组合物与另一种治疗剂组合使用时,还可指称组合的治疗有效剂量,所述治疗有效剂量是SB623细胞和导致免疫调节的另一种试剂的组合物,无论是组合地、相继地还是同时施用。超过一个的浓度组合可以是治疗上有效的。

[0121] 根据本公开内容,用于其制备和使用的各种药物组合物和技术对于本领域技术人员来说是已知的。关于适当的药物组合物和用于其施用的技术的详细列表,可参考教科书例如《雷氏药理学大全》(Remington's Pharmaceutical Sciences)第17版,1985;Brunton等人,“Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,”McGraw-Hill,2005;University of the Sciences in Philadelphia(eds.),“Remington:The Science and Practice of Pharmacy,”Lippincott Williams&Wilkins,2005;和University of the Sciences in Philadelphia(eds.),“Remington:The Principles of Pharmacy Practice,”Lippincott Williams&Wilkins,2008。

[0122] 可将本文中描述的细胞悬浮于生理上相容的载体以用于移植。如本文中所用,术语“生理上相容的载体”是指与制剂的其它成分相容并且对其接受者无害的载体。本领域技术人员熟知生理上相容的载体。适当的载体的实例包括细胞培养基(例如,伊格尔最小必需培养基)、磷酸缓冲盐溶液、Hank's平衡盐溶液+/-葡萄糖(HBSS)以及多元电解质溶液例如Plasma-Lyte™ A(Baxter)。

[0123] 给患者施用的SB623细胞悬液的体积将取决于植入的部位、治疗目的和溶液中细胞数目而变化。通常地,给患者施用的细胞的量将是治疗有效量。如本文中所用,“治疗有效量”或“有效量”是指实现特定障碍的治疗,即产生与该障碍相关的症状的量和/或严重度的减小所需的移植细胞的数目。治疗有效量还指足以导致相关医学病况的症状的完全或部分改善或这样的病况的治疗、治愈、预防或改善比率的增加的组合物的那个量。例如,在移植物抗宿主病的治疗的情况下,治疗有效量的SB623细胞的移植通常导致移植细胞的免疫抑制。例如,如果障碍是移植物排斥,则治疗有效量是当移植时导致宿主的充足的免疫抑制以便移植物被接受的SB623的那个数目。治疗有效量通常随疾病或障碍的类型、疾病或障碍的广度范围以及遭受所述疾病或障碍的生物体的尺寸变化而变化。

[0124] 本文公开的治疗性组合物还包括药学上可接受的材料、组合物或媒介物例如脂质或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装材料即载体。此类载体可以例如稳定SB623细胞和/或有利于SB623细胞在体内的存活。每一种载体在与制剂的其它成分相容的意义上应当是“可接受的”并且对受试者无损害。可用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:糖类例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;黄蓍胶粉;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,例如可可脂和栓剂石蜡;油,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇类,例如丙二醇;多元醇,例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;磷酸盐缓冲溶液;以及用于药物制剂的其它无毒相容性物质。湿润剂、乳化剂和润滑剂例如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、释放剂、包衣剂、增甜剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可存在于组合物中。

[0125] 本公开内容的另一个方面涉及用于进行SB623细胞(任选地与另一种治疗剂组合)

至受试者的施用的试剂盒。在一个实施方案中,试剂盒包含:于药学载体中配制的SB623细胞的组合物,任选地包含:在一种或多种单独的药学制剂中的例如视情况配制的环孢霉素或另一种免疫抑制剂。

[0126] 示例性制剂包括但不限于适合用于胃肠外施用(例如肺内、静脉内、动脉内、眼内、颅内、脑膜下或皮下施用)的制剂,包括封装在胶束、脂质体或药物释放胶囊的制剂(活性剂掺入设计用于缓慢释放的生物相容性包衣内);可摄取制剂;用于局部使用的制剂,例如滴眼剂、乳膏剂、软膏和凝胶;以及其它制剂例如吸入剂、气雾剂和喷雾剂。本公开内容的组合物的剂量将根据对治疗的需要的程度和严重度、施用组合物的活性、受试者的一般健康以及对于本领域技术人员来说是公知的其它考虑而变化。

[0127] 在其它实施方案中,局部递送本文中描述的组合物。局部递送允许非全身性递送组合物,从而相较于全身性递送减少组合物的全身负荷。这样的局部递送可以例如通过使用各种医学移植装置来实现,所述装置包括但不限于支架和导管,或可通过吸入、静脉切开术、注射或手术来实现。用于包被、植入、包埋和将期望的试剂附着至医学装置例如支架和导管的方法是本领域中已建立的和本文中涉及的。

实施例

[0128] 实施例1:MSC和SB623细胞的制备

[0129] 来自成人供体的骨髓抽吸物获自Lonza Walkersville, Inc. (Walkersville, MD), 并且被涂板在补充有10%胎牛血清(Hyclone, Logan, UT)、2mM L-谷氨酰胺(Invitrogen, Carlsbad, CA)和青霉素/链霉素(Invitrogen)的 α -MEM(Mediatech, Herndon, VA)上。将细胞在37°C和5%CO₂培养3天以获得单层贴壁细胞。在除去非贴壁细胞后,将培养物在相同条件下继续培养2周。在该时间过程中,使用0.25%胰蛋白酶/EDTA将细胞传代2次。将一部分来自第二传代的细胞冷冻作为MSC。

[0130] 将来自第二传代的剩余细胞涂板,并且使用Fugene6(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN),利用含有效地连接于巨细胞病毒启动子的编码Notch细胞内结构域的序列的质粒(pCMV-hNICD1-SV40-Neo^R)进行转染。该质粒还包含处于SV40启动子的转录控制之下的编码对新霉素和G418的抗性的序列。将转染的细胞在37°C和5%CO₂中培养于补充有100 μ g/ml G418(Invitrogen, Carlsbad, CA)的上述段落中描述的生长培养基中。7天后,扩增抗G418菌落,将培养物传代2次。在第二传代后,收集细胞,将其冷冻作为SB623细胞。

[0131] 按需解冻如本文中所述制备的MSC和SB623细胞,将其用于进一步研究。

[0132] 实施例2:MSC和SB623细胞的增殖能力

[0133] 为了定量细胞增殖,将100万个MSC或SB623细胞涂板,培养3天。在第3天通过台盼蓝排除法计数活细胞。图2显示相较于MSC培养物,在SB623培养物中存在更少的活细胞。

[0134] MSC和SB623培养物的细胞周期特征谱通过碘化丙啶染色来进行评估。碘化丙啶是DNA嵌入染料,其对处于细胞周期的静止期细胞的染色强于正在增殖的细胞。在3天的培养后,将100万个MSC或SB623细胞在4°C于70%的乙醇中固定过夜。在PBS/2%FBS中洗涤2次后,将细胞在1ml的PBS/2%FBS中的染色缓冲液(50 μ g/ml碘化丙啶,50 μ g/ml RNase)(Sigma, St. Louis, MO)中于黑暗处温育30分钟。在FACSCAliburTM流式细胞仪(BD Biosciences)上,使用CellQuestProTM程序(BD Biosciences, San Jose, CA)在FL-2线性通

道进行获取和分析。图3显示相较于MSC,SB623细胞的更大的碘化丙啶染色,这表明在SB623细胞培养物中更高分数的细胞处于细胞周期的G0/G1静止期。

[0135] 细胞自主性染料(cell-autonomous dye) 5-(-6-) 二醋酸羧基荧光素(CFSE)的稀释度用作增殖动力学的另外量度。为了进行该分析,在室温用5 μ M的5-(-6-) 二醋酸羧基荧光素(Invitrogen,Carlsbad,CA) 标记等数目的MSC和SB623细胞2分钟,随后培养5天。在FACSCalibur™流式细胞仪(BD Biosciences) 上使用FL-1对数通道进行流式细胞术获取和分析(对于CFSE)。结果(图1) 显示相较于MSC,SB623细胞培养物包含具有高CFSE含量的细胞的群体,这表明在SB623细胞培养物中存在非分裂或缓慢分裂的细胞的群体。

[0136] 如下估量MSC和SB623细胞的细胞内p16Ink4A蛋白的水平。将细胞培养3天,随后用4%多聚甲醛固定,用含有0.1%Triton X-100的PBS进行透化。在含有2%胎牛血清的PBS(PBS/2%FBS) 中洗涤2次后,将细胞沉淀重悬浮于0.2ml的PBS/2%FBS中,分成两个样品。一个细胞样品用缀合有藻红蛋白(PE) 的抗-p16Ink4A抗体(BD Biosciences, San Jose,CA) 染色,另一个样品用缀合有PE的小鼠IgG(作为同种型对照) 来进行温育。在FACSCalibur™流式细胞仪(BD Biosciences) 上通过流式细胞术分析样品,通过对针对p16Ink4A染色呈阳性和针对IgG染色呈阴性的细胞进行门控,将数据转换成培养物中表达p16Ink4A的细胞的百分比。图4显示SB623细胞培养物包含显著更大分数的表达p16Ink4A的细胞。

[0137] 实施例3:MSC和SB623细胞的表面标志物和细胞因子表达

[0138] 为了测量细胞表面标志物,使用0.25%胰蛋白酶/EDTA(Invitrogen,Carlsbad,CA) 从培养物收获MSC或SB623细胞,于PBS/2%FBS中洗涤,重悬浮于1ml的PBS/2%FBS中。将细胞与缀合有荧光染料的抗CD29、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90(全部来自BD Biosciences, San Jose,CA) 或CD105(Invitrogen,Carlsbad,CA) 抗体在冰上温育15分钟。随后用PBS/2%FBS洗涤细胞一次,在FACSCalibur™流式细胞仪(BD Biosciences, San Jose,CA) 上获取细胞。将CellQuestPro™软件(BD Biosciences) 用于数据分析。结果表达为dMFI(“ Δ 平均荧光强度”),使用IgG作为对照;即,从对于给定的表面标志物获得的MFI扣除IgG的MFI来获得dMFI。

[0139] 结果示于图5和6中。图5显示,尽管MSC和SB623细胞都表达CD44、CD73和CD105,但SB623细胞恒定地表达更高水平的这些表面标志物。图6显示相较于MSC,SB623细胞还恒定地表达更高水平的CD54。

[0140] 为了检测细胞内细胞因子,将细胞培养3天,在收获前用布雷菲德菌素A的1:1,000稀释物(eBioscience, San Diego,CA, 终浓度为3 μ g/ml) 处理6小时。固定细胞,如上所述进行透化以测量细胞内pInk4A,将细胞与缀合有荧光染料的抗人GM-CSF(BD)、IL-1 α (eBioscience, San Diego,CA)、IL-6(BD) 或TGF β -1(R&D Systems, Minneapolis,MN) 的抗体温育1小时,随后用PBS/2%FBS洗涤2次。在BD FACSCalibur™仪上,使用CellQuestPro™软件进行数据获取和分析。

[0141] 图7中显示的这些分析的结果显示MSC和SB623细胞的大致相同的IL-1 α 、IL-6和GM-CSF表达水平;图8显示MSC和SB623细胞产生旗鼓相当水平的TGF- β -1和VEGF-A。

[0142] 实施例4:同种异体混合淋巴细胞反应(allo-MLR)

[0143] 同种异体混合淋巴细胞反应的细胞获自10ml健康无关个体的外周血样品。为了获得响应者T细胞(responder T-cell),按照制造商的说明书使用RosetteSep T细胞富集试

剂盒 (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada)。在室温用5uM 5-(6-) 二醋酸羧基荧光素 (CFSE) (获自Invitrogen, Carlsbad, CA) 标记富集的T细胞 (响应者细胞) 2分钟。在血清淬灭和于PBS中洗涤3次后, 将标记的响应者细胞于0.1ml体积的完全淋巴细胞培养基 (RPMI (Mediatech, Manassas, VA) +10%FBS (Lonza, Allendale, NJ), 含有 10^5 个细胞) 中涂板在96孔U形底板的孔中。

[0144] 为了制备刺激者细胞 (stimulator cell), 在Ficoll™密度梯度离心后回收外周血血沉棕黄层细胞。添加红细胞裂解缓冲液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 在37℃进行10分钟; 随后用PBS/2%热灭活FBS洗涤细胞2次。将单核刺激者细胞添加至含有响应者细胞 (10^5 个细胞, 于0.1ml的体积中) 的孔中或将 10^5 个刺激者细胞与 10^4 个SB623细胞或 10^4 个MSC混合, 离心, 将沉淀的细胞重悬浮于0.1ml的体积的完全淋巴细胞培养基 (如上所述的) 中, 随后将其添加至装有如上所述制备的CFSE标记的响应者细胞的孔中。

[0145] 在反应开始2天后, CD69 (早期T细胞活化标志物) 在培养物中的CD4⁺T细胞表面上的展示用作T细胞活化的测定。为了分析CD69表达, 2天后通过移液器收集细胞, 用缀合有多甲藻黄素叶绿素蛋白 (PerCP) 的抗-CD69抗体 (eBioscience, San Diego, CA) 染色, 通过针对CD4⁺淋巴细胞门控, 使用FACSCalibur™流式细胞仪 (Becton, Dickinson&Co., San Jose, CA) 进行分析。

[0146] 为了测量T细胞增殖, 在7天的培养后收获细胞, 用缀合有藻红蛋白 (PE) 的抗CD4抗体 (BD) 进行染色。将BD FACSCalibur流式细胞仪用于数据获取。

[0147] 在对照allo-MLR中, 2天后, CD4⁺群体内的其中表面CD69的表达已被诱导的T细胞的分显著增加 (图9A和9B)。

[0148] 还评估了利用MSC和SB623细胞的共培养对MLR中T细胞的活化的作用。在这些实验中, 将10,000个MSC或10,000个SB623细胞添加至在MLR起始时的培养物中。在这些条件下, 在2天后于对照培养物中观察到的表达表面CD69的细胞的增加被利用MSC或SB623细胞的共培养显著减少 ($p < 0.05$; 图9A和9B)。

[0149] 作为T细胞活化的另一个量度, 在MLR开始后7天测定CD4⁺T细胞的增殖率。对于这些实验, 利用移液器从MLR收获细胞, 用PE标记的抗-CD4抗体染色。使用Becton-Dickinson FACSCalibur™装置进行流式细胞术, 针对CD4⁺细胞进行门控; 将CFSE的稀释度评估为CD4⁺响应者T细胞的增殖率的指标。在对照allo-MLR中, 超过80%的CD4⁺响应者T细胞在7天后已增殖。在SB623细胞或MSC存在的情况下, T细胞增殖显著减少 (即, 观察到更高水平的CFSE染色, 图10)。

[0150] 表面HLA-DR表达的诱导也是T细胞活化的量度。SB623细胞和MSC减少allo-MLR中表达HLA-DR的T细胞的百分比 (图11)。

[0151] 因此, 通过许多不同的独立标准, SB623细胞抑制T细胞活化。阻断T细胞活化的能力表明SB623细胞用于免疫抑制的效用。

[0152] 实施例5: 异种淋巴细胞活化反应

[0153] 还在异种移植模型系统中证明了SB623细胞的免疫抑制性质。使用Sprague-Dawley大鼠神经胶质混合细胞 (包含星形细胞和小胶质细胞) 作为刺激者和人外周血T细胞 (按照制造商的说明书 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 用PKH26标记的) 作为反应者建立异种淋巴细胞反应。为了获得神经胶质混合细胞, 在出生后第9天, 获取大鼠脑, 研磨, 随后用

0.25%胰蛋白酶处理30分钟。将细胞悬浮液通过70 μ M细胞过滤器过滤,覆盖在FicollTM上,随后离心。将神经胶质混合细胞于DMEM/F12/10%FBS/pen-strep中培养14天,然后用于测定。在5天的时期中使用与用于同种异体MLR的细胞比率相似的细胞比率(100,000个神经胶质混合细胞:100,000个CFSE标记的人T细胞;和任选地10,000个MSC或SB623细胞)进行异种反应。通过流式细胞术估量人CD3-门控的T细胞(其包括CD4⁺和CD8⁺T细胞)中的PKH26稀释度。

[0154] 如在同种异体MLR中一样,SB623细胞或MSC至异种系统的添加减小了在被神经胶质混合细胞刺激后观察到的响应者T细胞的增殖程度(图12)。因此,MSC和SB623细胞的免疫抑制性质不限于自体或同种异体环境。

[0155] 实施例6:SB623细胞对调节性T细胞的发育的作用

[0156] 调节性T细胞(T_{reg})能够减弱或抑制免疫应答。因此,研究了SB623细胞支持T_{reg}的产生的能力。为此目的,在白细胞介素-2(IL-2)存在的情况下,培养如实施例2中所述纯化的来自外周血的富集的T细胞,已显示所述白细胞介素-2刺激原态T细胞至T_{reg}的分化;评估了利用MSC或SB623细胞的共培养对该过程的作用。共培养物包含比率为10:1的T细胞和SB623细胞或比率为10:1的T细胞和MSC(10⁵个T细胞:10⁴个MSC或SB623细胞)。表面标志物CD4和CD25的共表达、细胞因子白细胞介素-10(IL-10)的分泌和转录因子FoxP3的细胞内产生用作T_{reg}的标志物。

[0157] 对于这些实验,按照制造商的方案,使用T细胞分离试剂盒(StemCell Technologies,Vancouver,Canada)从外周血富集人T细胞。将富集的T细胞在RPMI-1640/10%热灭活的FBS/pen/strep培养过夜,随后使用。在前一天,以每孔10,000个MSC或SB623细胞将所述细胞涂板在96孔U形底的板中。在共培养测定的第0天,将100,000个富集的T细胞转移至预先建立的MSC或SB623细胞单层的每一个孔(也包含10ng/ml IL-2)。作为内部对照,还在MSC或SB623细胞不存在的情况下维持T细胞培养物。在第7天,对细胞的表面CD4(辅助T细胞标志物)和CD25(IL-2受体 α 链)以及细胞内FoxP3进行染色。

[0158] 用于表面标志物CD4和CD25的测定的结果示于图13中。SB623细胞与IL-2刺激的T细胞的共培养物显著增加了CD4⁺CD25⁺T_{reg}细胞的数目(比较图13A的最左边与最右边的图框),并且,当用SB623细胞共培养T细胞时T_{reg}发育的该刺激大于用MSC共培养它们时的刺激(比较图13A的中间与右边图框)。

[0159] 用于叉头框P3(FoxP3)蛋白的测定确认了这些结果。FoxP3是调节T_{reg}的发育和功能的转录因子。通过培养或共培养T细胞7天(如上所述的)检测细胞内FoxP3,随后固定细胞,用CytoFix/Perm(eBioscience, San Diego, CA)透化细胞。将缀合有PE的抗-FoxP3抗体(克隆PCH101,eBioscience,1:50的稀释度)用于对细胞染色,进行30分钟,通过基于细胞尺寸对淋巴细胞门控的流式细胞术分析染色的细胞。图14中显示的结果证明:在IL-2存在的情况下利用MSC和SB623细胞的共培养增加T细胞的FoxP3表达(相较于在未共培养的T细胞中的表达)。

[0160] 通过T_{reg}进行的免疫抑制的一个机制是通过抗炎细胞因子例如白细胞介素-10(IL-10)的分泌。因此,在7天的培养或共培养后,利用缀合有荧光染料的抗IL-10抗体对细胞内IL-10染色测定了含IL-2的T细胞培养物中或利用MSC或SB623的共培养物中产生IL-10的T细胞的百分比。

[0161] 因此,在7天的培养或共培养后,用1:1,000稀释度的布雷菲德菌素A(eBioscience, San Diego California) (以阻止细胞外蛋白质的分泌)处理细胞6小时,用2%多聚甲醛固定15分钟,随后用的PBS/2%FBS中的0.05% (v/v) Triton-X-100在冰上透化细胞15分钟。随后添加缀合有Alexa 488的抗人IL-10抗体(eBioscience, San Diego, CA),将培养物在冰上温育30分钟。用2%胎牛血清/0.01% (v/v) Tween20洗涤孔2次;通过移液器获得细胞,使用FACSCalibur™流式细胞仪(Becton, Dickinson&Co., San Jose, CA)进行分析。使用CellQuestPro™软件(Becton, Dickinson&Co., San Jose, CA)进行数据分析。

[0162] 该分析的结果显示在IL-2存在的情况下培养的T细胞不表达细胞内IL-10;然而当在IL-2存在的情况下用SB623细胞或MSC共培养CD4⁺T细胞时,其产生低水平的IL-10,利用SB623细胞共培养的T细胞产生略微更多的IL-10(图15)。

[0163] 实施例7:通过SB623细胞进行的促炎性细胞因子特征谱至抗炎细胞因子特征谱的转换

[0164] MSC和SB623细胞的共培养对由T细胞产生的促炎和抗炎细胞因子的相对量的影响,通过测量已通过利用吡啶醇肉豆蔻酸乙酸酯(PMA)和离子霉素的处理亚最适活化的T细胞的IL-10(抗炎细胞因子)和干扰素- γ (IFN- γ , 促炎性细胞因子)的水平来进行估量。为了进行这些实验,从外周血富集T细胞,除在IL-2不存在的情况下进行培养外,如上所描述(实施例6)培养所述T细胞,或将其与MSC或SB623细胞共培养。在第7天,在3 μ g/ml布雷菲德菌素A(eBioscience, San Diego, CA)存在的情况下添加非活化剂量的25ng/ml的佛波醇12-十四酸酯13-乙酸酯(PMA)/0.5 μ M离子霉素(Io)(两者都来自Sigma-Aldrich, St Louis, MO)并且在6小时后,收获细胞,分析其的IL-10和IFN- γ 的细胞内表达。用于这些实验的非活化剂量的PMA和离子霉素不诱导T细胞增殖,但足以诱导T细胞的细胞因子合成。如实施例6中所描述的,使用缀合有Alexa 488的抗人IL-10抗体(eBioscience, San Diego, CA)测量IL-10水平。使用PE标记的抗人IFN- γ 抗体(eBioscience, San Diego, CA)通过FACS测量IFN- γ 水平。

[0165] 该分析的结果示于图16中。在利用PMA/离子霉素进行亚最适刺激后,超过20%的新鲜分离的T细胞表达IFN- γ ,少于1%表达IL-10(即,表达IFN- γ 或IL-10的细胞当中,超过95%表达IFN- γ ,少于5%表达IL-10)。然而,在7天的利用SB623细胞或MSC的共培养后,在表达IFN- γ 或IL-10的细胞当中,超过95%表达IL-10,少于5%表达IFN- γ 。因此,利用MSC或SB623细胞的共培养将T细胞分泌蛋白质组从促炎性T细胞分泌蛋白质组转化成抗炎性T细胞分泌蛋白质组。

[0166] 炎症细胞因子IFN- γ 的分泌是辅助T细胞的Th1亚组的特征;而IL-10分泌是Th2细胞和T_{reg}细胞的特征。因此,在原态T细胞与SB623细胞或MSC的共培养后观察到的IFN- γ 分泌至IL-10分泌的转换与富含Th1细胞的群体至包含大量Th2细胞、T_{reg}细胞或两者的群体的转换一致。该结果还表明利用SB623细胞或MSC的共培养部分地通过改变T细胞的细胞因子产生来指导T细胞从炎性群体(特征在于Th1细胞)至更加抗炎性的群体(特征在于Th2细胞作/或T_{reg}细胞)的分化。

[0167] 实施例8:MSC和SB623细胞的共培养对T细胞的IL-17产生的作用

[0168] 还已知由MSC和SB623细胞分泌的细胞因子中的两种细胞因子TGF β -1和IL-6(参见上文中的实施例3)在Th17辅助T细胞(即,分泌IL-17的辅助性T细胞)的发育中起作用。因

此,在IL-23(已知其刺激Th17辅助T细胞的发育)存在的情况下培养T细胞,并且测定利用MSC或SB623细胞的共培养对Th17细胞数目的作用。

[0169] 为了进行这些实验,分离人T细胞,如上文实施例中所述,通过向培养物中添加10ng/ml的IL-23(Peprotech,Rocky Hill,NJ)来进行培养。在利用布雷菲德菌素A处理6小时后,如实施例7中所述收集细胞,固定细胞,透化,用缀合有PE的抗-IL17抗体(eBioscience)进行染色,通过流式细胞术进行分析。结果表明在IL-23存在的情况下T细胞的培养增加了表达IL-17的细胞的数目。此外,T细胞与MSC或SB623细胞的共培养导致在IL-23不存在或存在的情况下表达IL-17的细胞的数目的少量增加(图17)。

[0170] 实施例9:利用SB623细胞的共培养抑制单核细胞至树突细胞的分化

[0171] 单核细胞(表达CD14)至树突细胞(其表达CD1a)的发育的正常过程可通过在白细胞介素-4(IL-4)和粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)存在的情况下培养单核细胞来进行体外重演。当与单核细胞体外共培养时,MSC能够阻断单核细胞至树突细胞的分化,这是部分通过MSC分泌白细胞介素-6(IL-6)介导的效应。Chomarat等人(2000) *Nature Immunology* 1:510-514;Djouad等人(2007) *Stem Cells* 25:2025-2032。SB623细胞还分泌IL-6。参见美国专利申请公布号2010/0266554(2010年10月21日)。也由MSC和SB623细胞分泌的VEGF还参与树突细胞分化。因此,研究了SB623细胞对单核细胞分化的作用。

[0172] 从健康供体收集外周血,使用Ficoll-Paque™(GE Healthcare,Piscataway,NJ)将其经历密度梯度离心。通过抽吸血沉棕黄层回收单核细胞,将其重悬浮于RPMI/10%胎牛血清,并且涂板。在37℃,5%CO₂培养过夜后,洗掉非贴壁细胞,使用0.25%胰蛋白酶/2mM EDTA回收贴壁单核细胞。利用缀合有FITC的抗-人CD14抗体(Becton,Dickinson&Co.,San Jose,CA)的染色显示这些制剂中超过90%的细胞是单核细胞。

[0173] 将单核细胞在含有10%胎牛血清(Lonza,Allendale,NJ)、2mM L-谷氨酰胺、2mM L-丙酮酸钠、100个单位/ml青霉素、100ug/ml链霉素、40ng/ml GM-CSF(Peprotech,Rocky Hill,NJ)和20ng/ml IL-4(Peprotech,Rocky Hill,NJ)的RPMI-1640(Meiatech,Manassas,VA)中进行培养。以10:1的单核细胞对SB6323细胞(或MSC)比率(即100,000个单核细胞对10,000个SB623细胞或MSC)进行利用SB623细胞(或MSC,作为对照)的共培养。在7天的培养(或共培养)后,使用胰蛋白酶/EDTA(如上所述)收集一部分细胞,将所述细胞与缀合有PE的抗-CD14抗体和缀合有FITC的抗-CD1a抗体(两者都来自eBioscience,San Diego,CA)一起温育。使用FACSCalibur™细胞分选器,利用CellQuestPro™软件(两者都来自Becton,Dickinson&Co.,San Jose,CA)进行获取和分析。另一部分培养物通过相差显微镜来观察。

[0174] 细胞分选分析的结果(图18)显示在单核细胞与SB623细胞或MSC共培养后存在更高百分比的CD14⁺细胞(即,更高分数的单核细胞)。此外,当将单核细胞与SB623细胞一起培养时,相较于利用MSC的共培养,作用更大。此外,在共培养物中观察到更少的CD1a⁺树突细胞。这些结果表明SB623细胞(和,在较低的程度,上,MSC)能够阻断单核细胞至树突细胞的分化。

[0175] 显微镜分析确认了这些观察。在单核细胞培养物中,通过显微镜术容易地观察到成簇的树突细胞;但在利用MSC或SB623细胞的共培养物中,极少观察到这样的簇。

[0176] 实施例10:通过利用SB623细胞的共培养进行的树突细胞成熟的抑制

[0177] 在从单核细胞分化后,树突细胞成熟成表达CD86表面标志物的细胞。该成熟可通过在肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 存在的情况下培养树突细胞来体外重现。已显示IL-6和VEGF阻断树突细胞的成熟。Park等人(2004) J. Immunol. 173:3844-3854;Takahashi等人(2004) Cancer Immunol. Immunother 53:543-550。由于SB623细胞分泌这两种细胞因子,因此研究了SB623共培养对树突细胞分化的作用。

[0178] 为了评估SB623细胞的共培养对树突细胞成熟的作用,从外周血获得单核细胞,如实施例9中所述,将其在体外分化成树突细胞。在5天的培养后,将人TNF- α (Peprotech, Rocky Hill, NJ) 添加至培养物中至10ng/ml的终浓度。在一些培养物中,还在此时添加SB623细胞或MSC。所有样品包含 10^5 个单核细胞,在共培养物中 10^4 个MSC或SB623细胞。作为对照,将抑制树突细胞至CD86⁺状态的成熟的环孢霉素A添加至TNF- α 刺激的培养物至1 μ g/ml的终浓度。两天后,用缀合有PE的抗-CD86抗体(Becton Dickinson&Co., San Jose, CA)对细胞进行染色,在FACSCaliburTM细胞分选仪上获得所述细胞,使用CellQuest ProTM软件(两者都来自Becton, Dickinson&Co., San Jose, CA)进行分析。

[0179] 图19中显示的结果表明显著分数的TNF- α 成熟的树突细胞表达CD86,并且该分数被利用环孢霉素A的处理减少,如所预期的。利用SB623细胞和MSC的共培养也减少CD86⁺细胞的分数。值得注意地,相较于MSC,SB623细胞对树突细胞成熟具有更强的抑制作用,如通过CD86表达测量的。

[0180] 实施例11:利用SB623细胞的共培养进行的对单核细胞/巨噬细胞的分泌特征谱的改变

[0181] 使用抗CD14包被的磁珠(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)通过磁性选择从血沉棕黄层的细胞获得表达CD14细胞表面标志物的人外周单核细胞(即,巨噬细胞前体)。将CD14⁺单核细胞的单独培养物暴露于粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),所述因子将它们转化成M1(促炎)巨噬细胞;或暴露于巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF),所述因子将它们转化成M2(抗炎)巨噬细胞;或与SB623细胞或MSC共培养。

[0182] 如下测定这些培养物中表达肿瘤坏死因子- α (TNF- α , M1巨噬细胞的促炎性细胞因子特征)和白细胞介素10(IL-10, M2巨噬细胞的抗炎细胞因子特征)的细胞的百分比。将培养物暴露于100ng/ml细菌脂多糖(LPS, Sigma, St. Louis, MO),进行24小时。在对LPS的暴露的最后6小时中,将布雷菲德菌素A和莫能星(两者来自eBioscience San Diego, CA;并且以1:1,000的稀释度使用)添加至培养物。随后用缀合有PE的抗-TNF- α 或缀合有FITC的抗-IL-10对细胞进行染色,通过流式细胞术进行分析。

[0183] 图20中显示的这些研究的结果表明利用MSC或SB623细胞的共培养增加了培养物中产生抗炎细胞因子的单核细胞的分数。利用MSC或SB623细胞的共培养不增加产生TNF- α 的细胞的百分比,如对于GM-CSF的暴露所表现的一样(图20A)。值得注意地,当将单核细胞与MSC共培养时,表达抗炎细胞因子IL-10的细胞的百分比增加,当将单核细胞与SB623细胞共培养时,所述百分比增加得更多(图20B)。

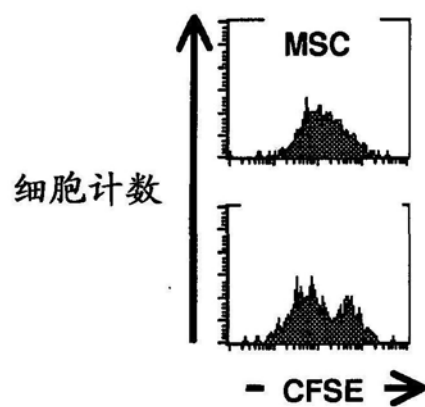


图1

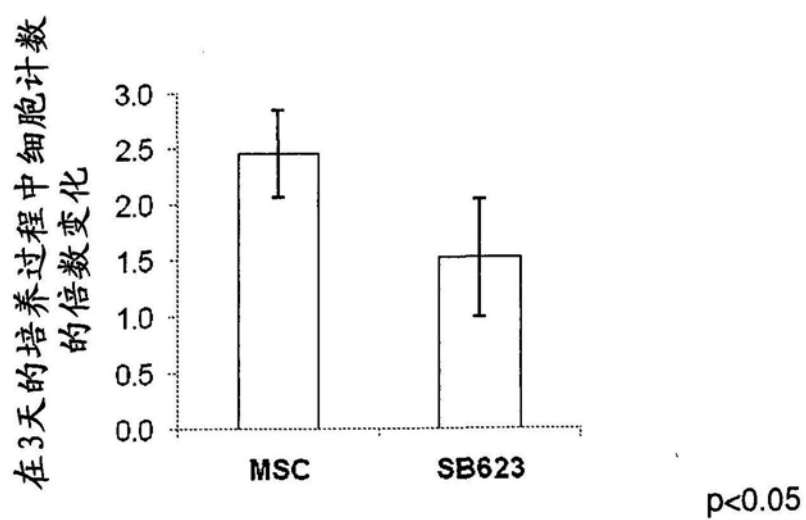


图2

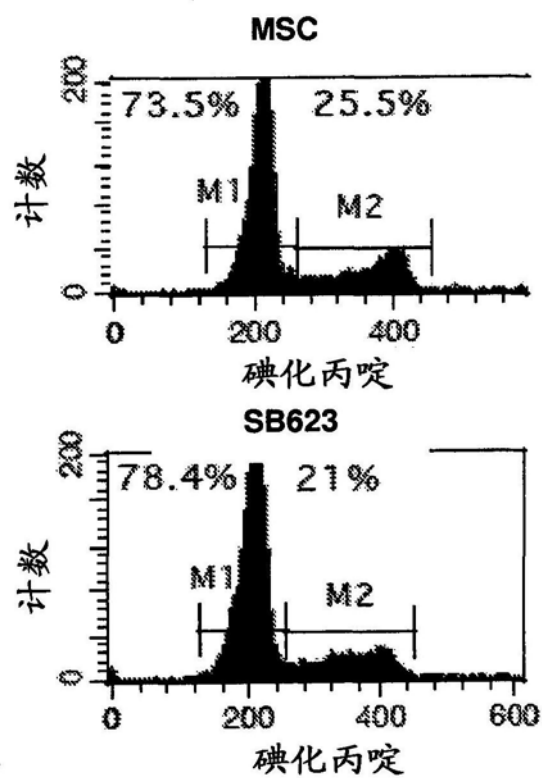
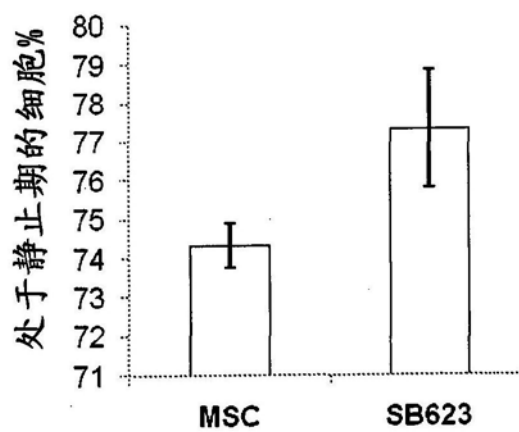
A**B**

图3

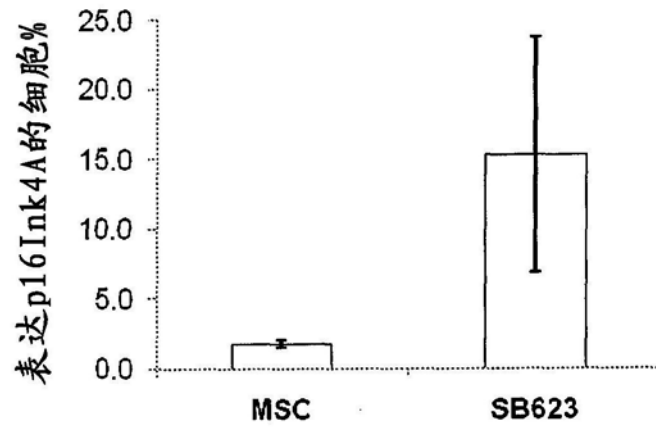


图4

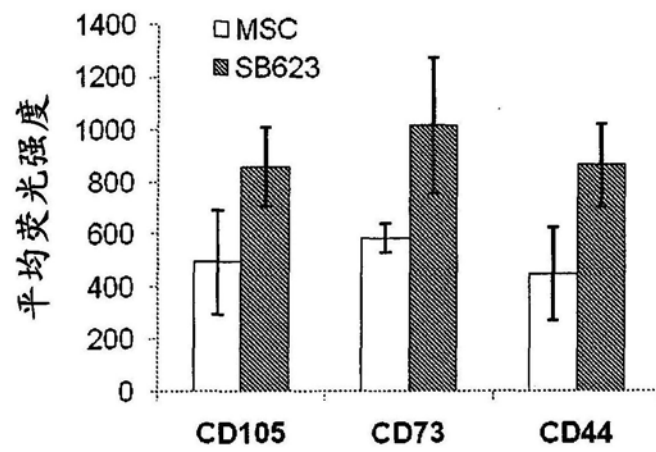


图5

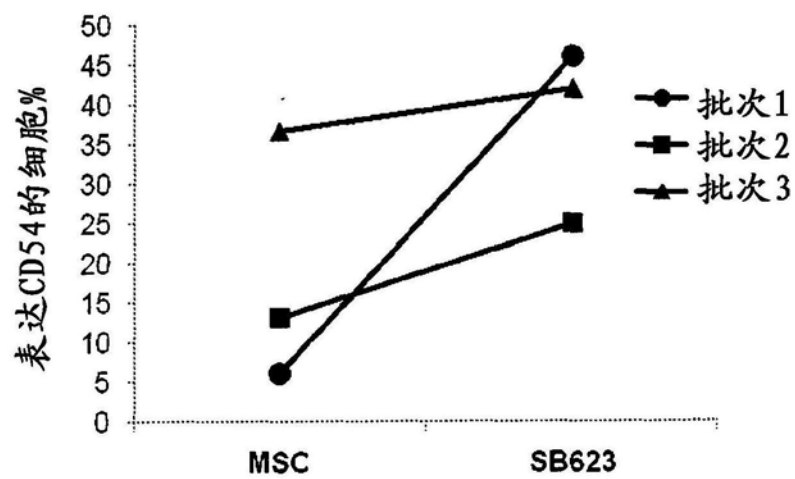


图6

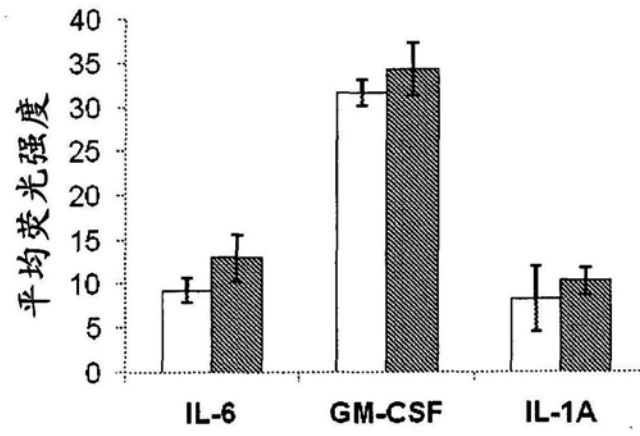


图7

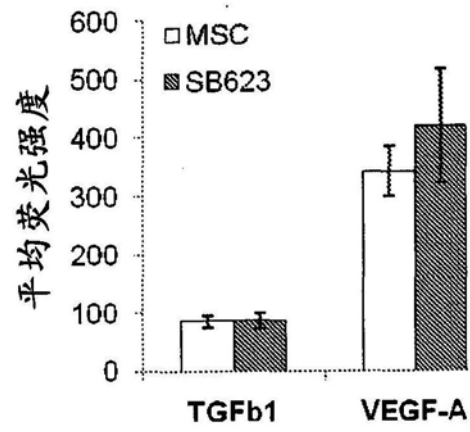


图8

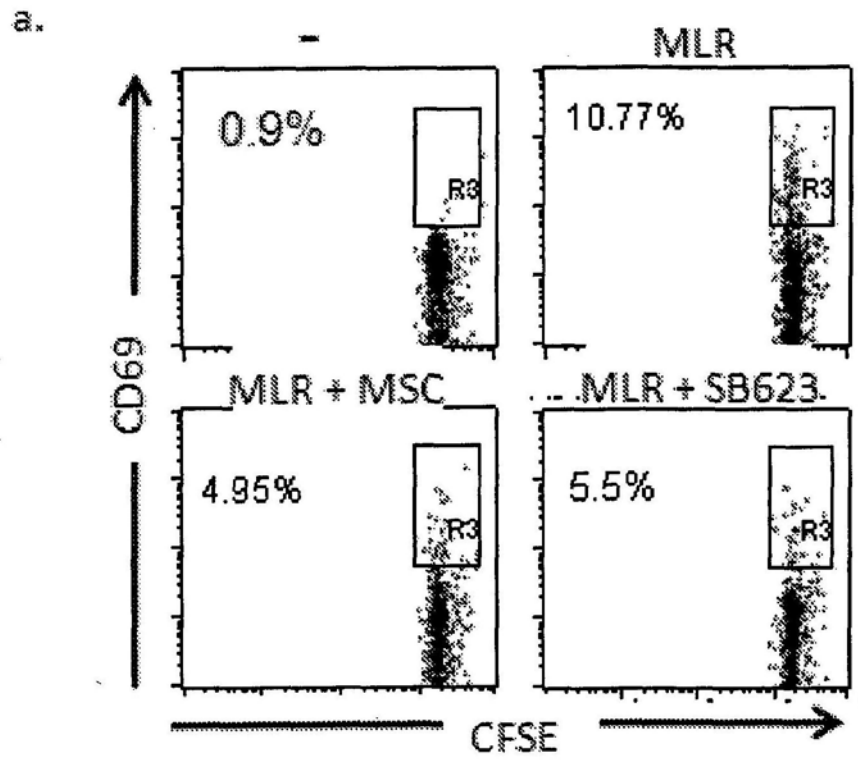
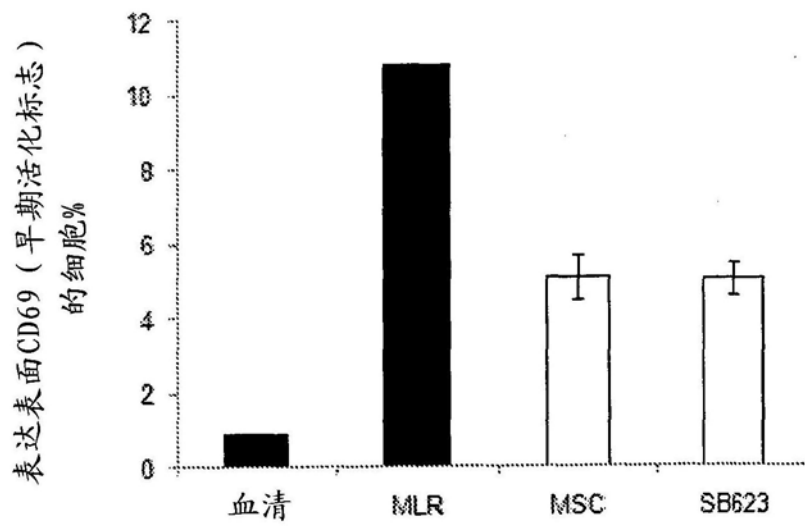
A**B**

图9

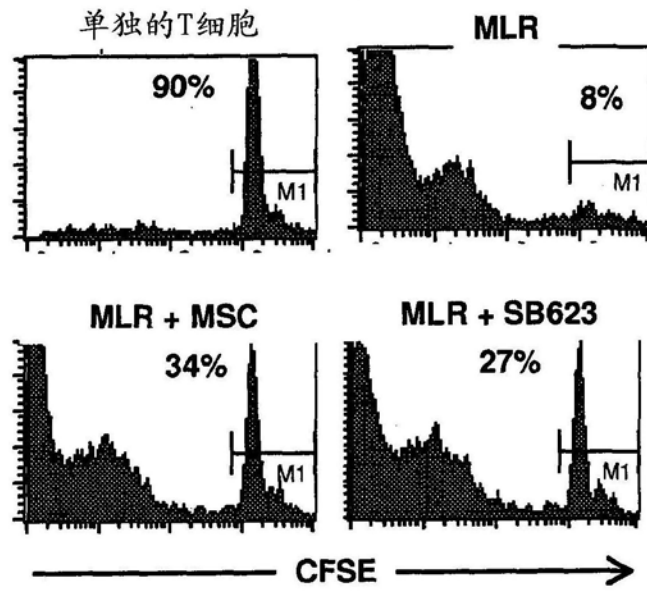
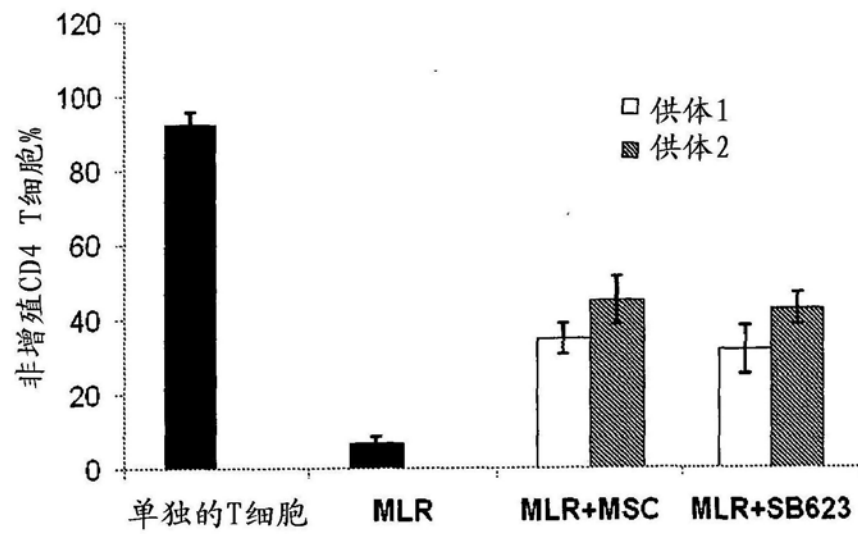
A**B**

图10

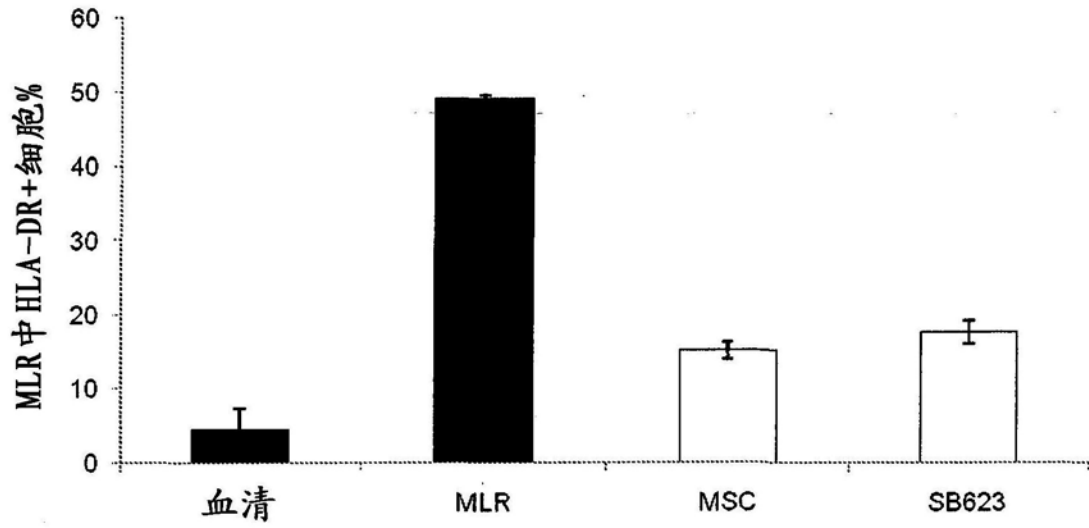


图11

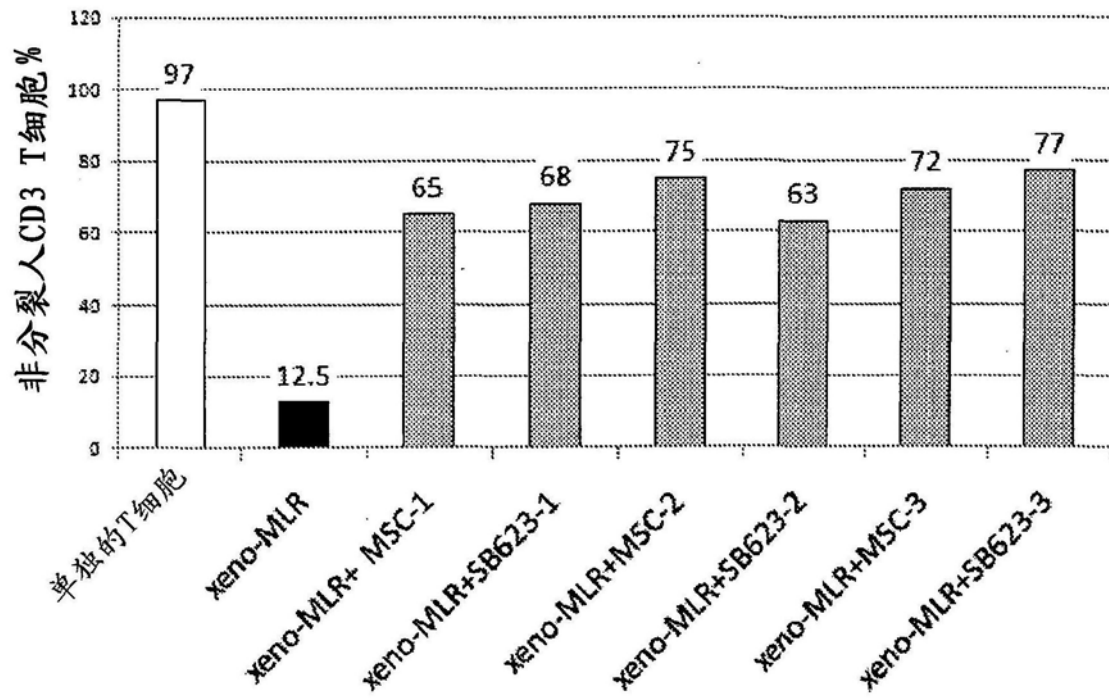


图12

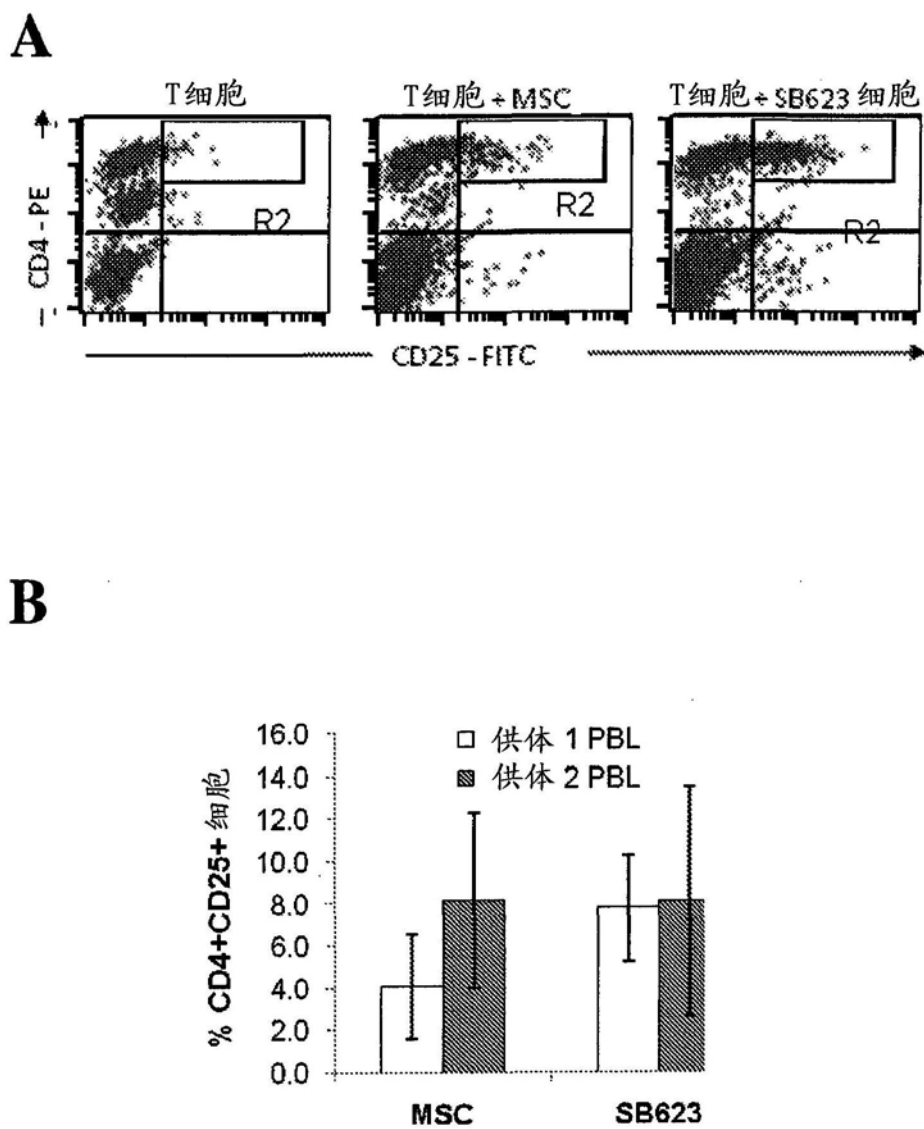


图13

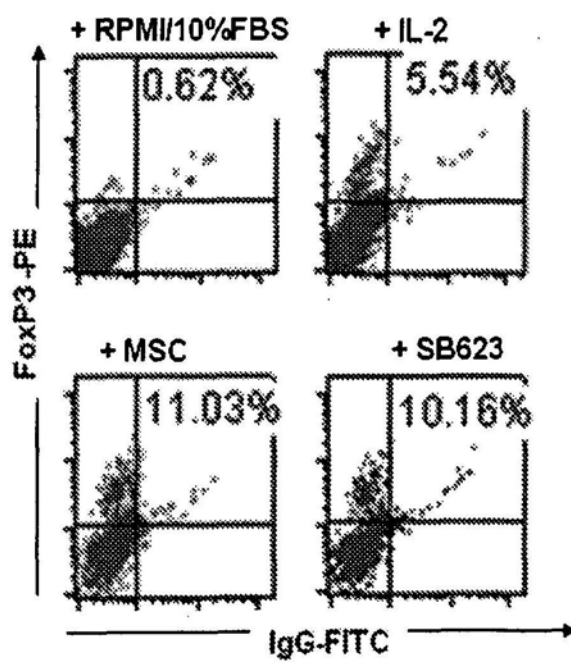
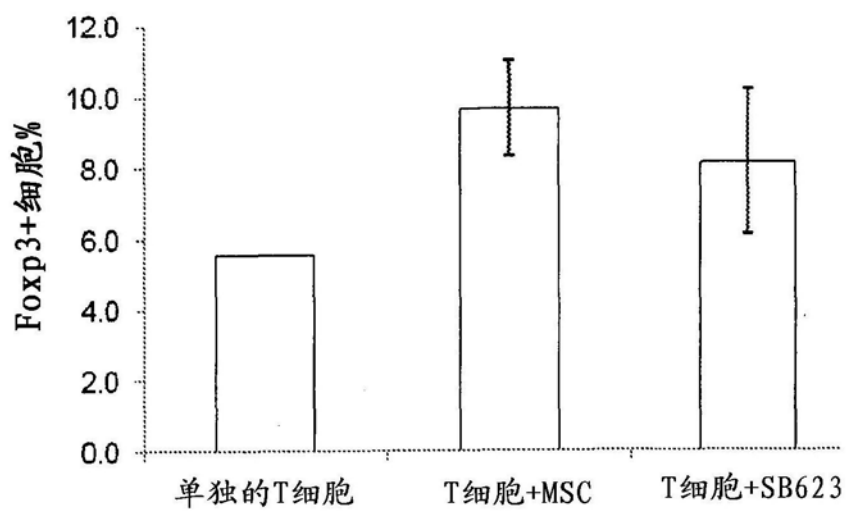
A**B**

图14

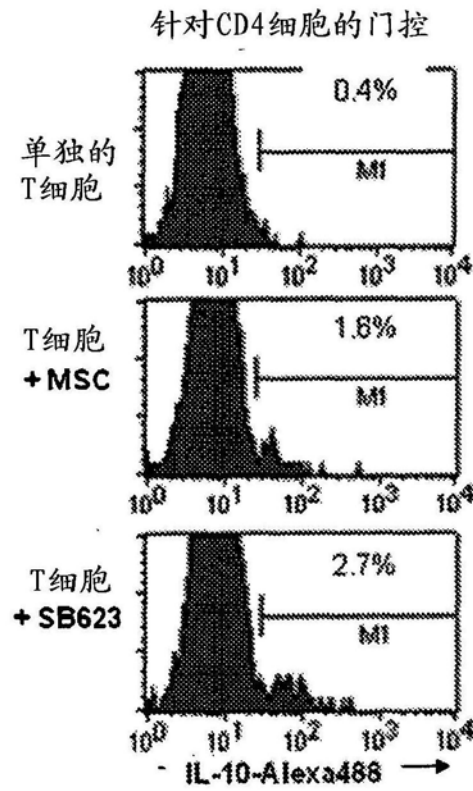
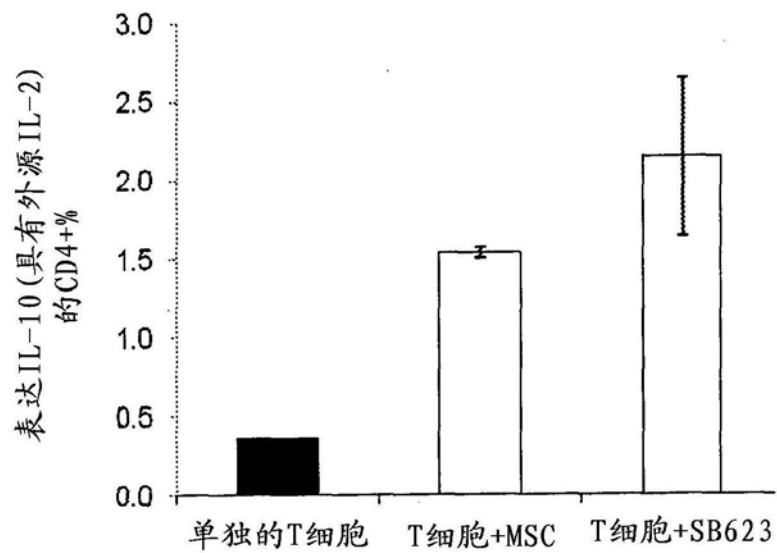
A**B**

图15

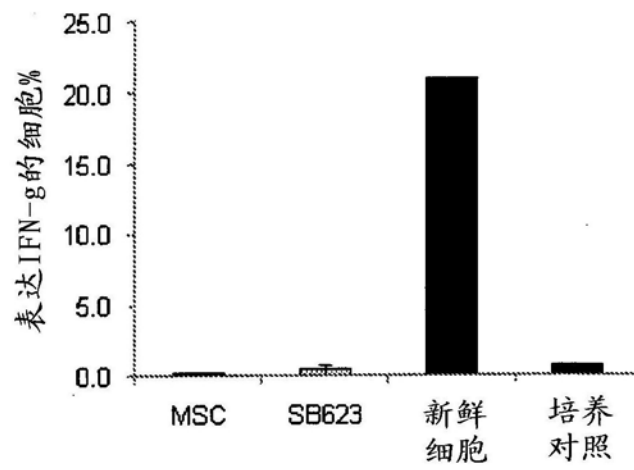
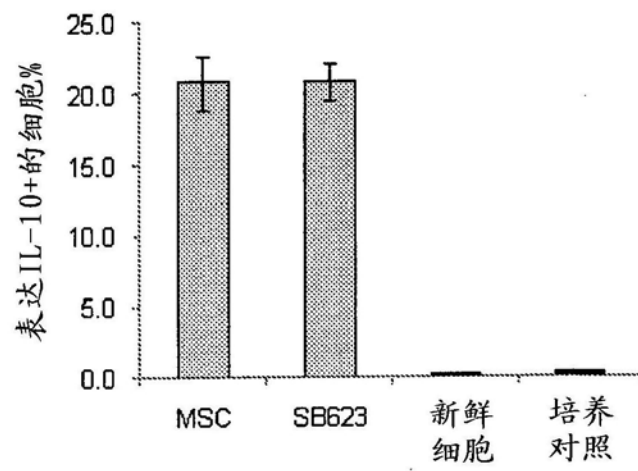
A**B**

图16

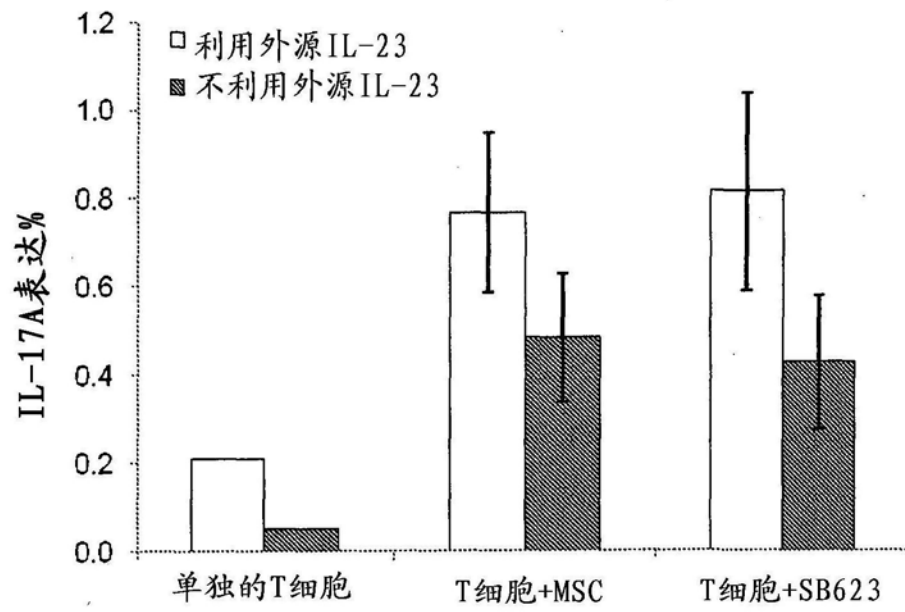


图17

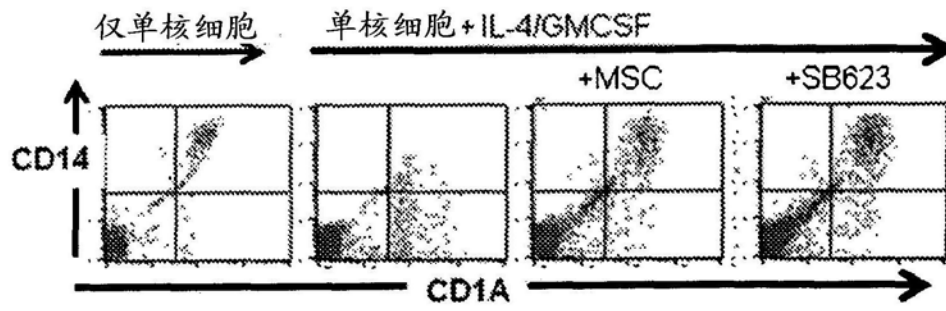
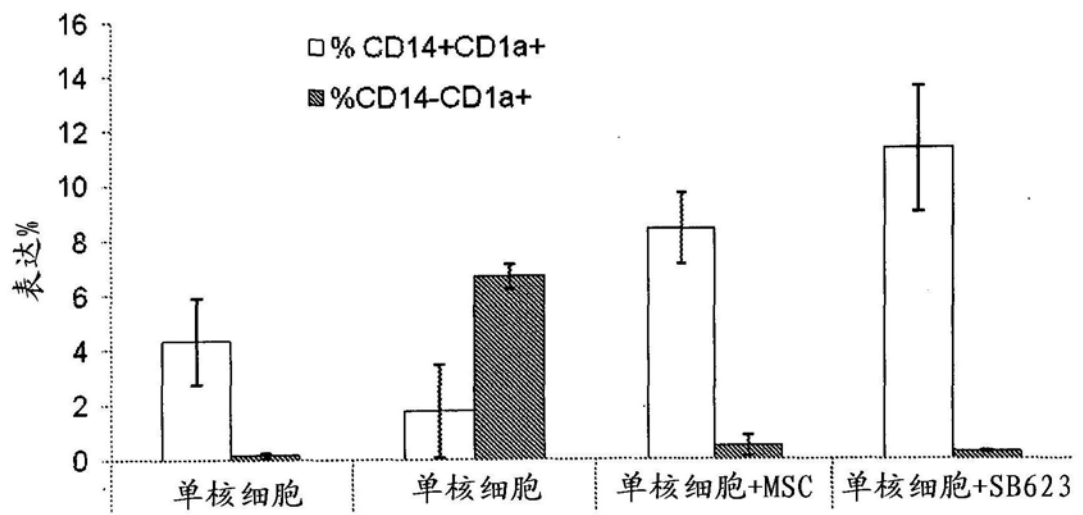
A**B**

图18

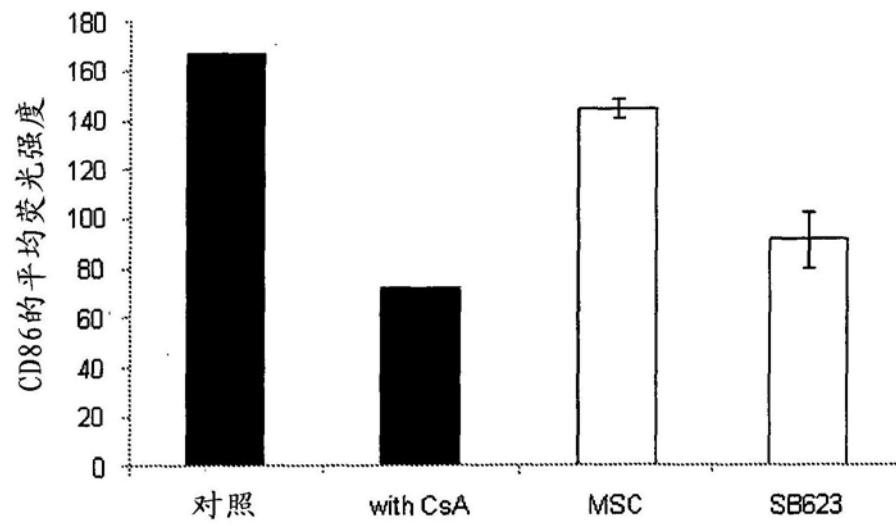


图19

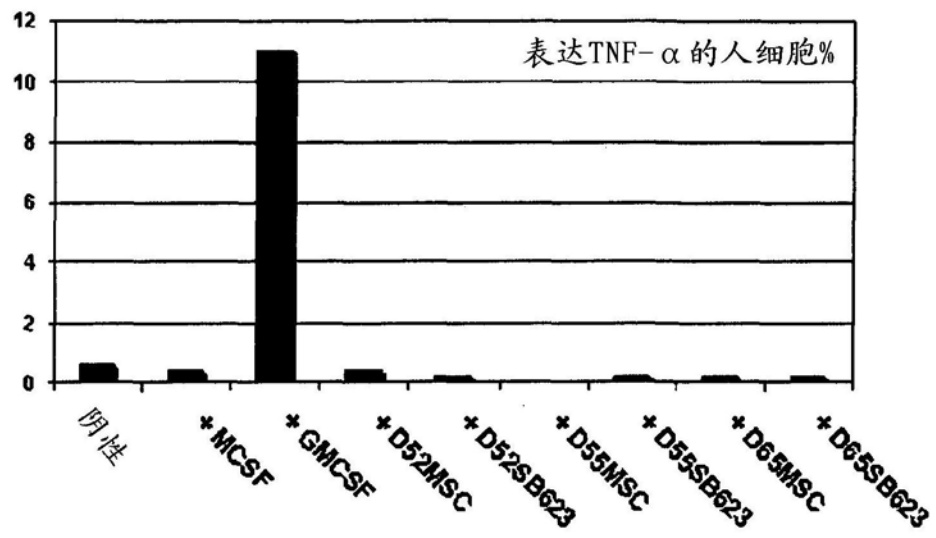
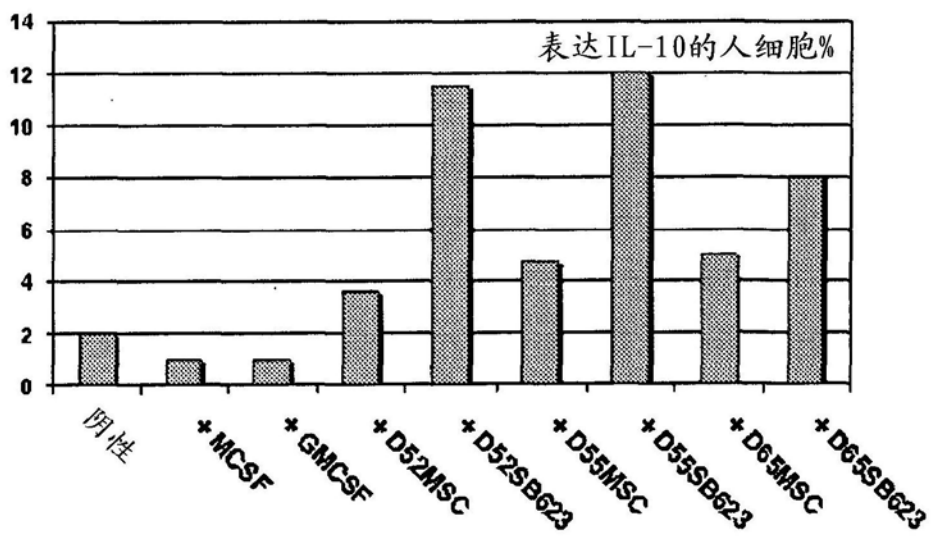
A**B**

图20