

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1926234 B

(45) 授权公告日 2011.10.12

(21) 申请号 200480036089.1

(22) 申请日 2004.11.16

(30) 优先权数据

0328245.6 2003.12.05 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.06.05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2004/004826 2004.11.16

(87) PCT申请的公布数据

WO2005/056780 EN 2005.06.23

(73) 专利权人 伯明翰大学

地址 英国伯明翰

(72) 发明人 C·M·邦斯

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 程金山

(51) Int. Cl.

C12N 5/08 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

(56) 对比文件

叶韵斌等. 造血细胞生长因子对脐血 CD34+ 细胞短期体外扩增的作用. 福建医科大学学报 37 2. 2003, 37(2), 第 149 页左栏第 3-14 行.

单守杰等. 骨髓干细胞移植治疗缺血性心脏病的研究进展. 中国临床药理学与治疗学 2002 5. 2002, 2002(5), 第 473 页右栏第 4-14 行.

Junko Okabe-Kado et al. Inhibitory Action of nm23 Proteins on Induction of Erythroid Differentiation of Human Leukemia Cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1267 2-3. 1995, 第 104 页左栏第 22-26 行, 图 4.

Roel Willems et al. Extracellular Nucleoside Diphosphate Kinase NM23/NDPK Modulates Normal Hematopoietic Differentiation. *Experimental Hematology* 30 7. 2002, 30(7), 第 642 页第 12-29 行.

审查员 李美宣

权利要求书 1 页 说明书 16 页

序列表 2 页 附图 8 页

(54) 发明名称

使用 NM23 的细胞培养, 包含 NM23 的细胞培养基和在 NM23 存在下培养的细胞的治疗性用途

(57) 摘要

本发明公开了将蛋白质 NM23 作为维持在培养物中未分化的生物细胞的试剂。该 NM23 蛋白质可以作为这些被培养细胞的存活因子, 或防止培养细胞的分化和成熟。NM23 蛋白质的使用可以被应用于干细胞和 / 或祖细胞的培养, 并且特别应用于被培养和适用于治疗性应用的这些细胞。本发明提供用在生物细胞的培养中的方法, 培养基和培养基添加物, 并且还提供制备用于治疗性应用的生物细胞, 以及利用生物细胞治疗的方法, 和包含适用于治疗性应用的生物细胞的药剂。

1. NM23 蛋白在防止培养的干细胞和祖细胞的分化和成熟中的应用,其中所述 NM23 蛋白被添加到培养基中,所述培养基中包含仅单独或组合选自由白细胞介素 -3 和干细胞生长因子组成的组的细胞因子。

2. 按照权利要求 1 的应用,其中所述干细胞和祖细胞用于治疗性应用。

3. 按照权利要求 1 的应用,其中所述干细胞和祖细胞用于非治疗性应用。

4. 按照权利要求 1 的应用,其中所述培养的干细胞和祖细胞选自包含间充质细胞,造血细胞,中枢神经系统 (CNS) 的细胞和表皮细胞的组。

5. 按照权利要求 1 的应用,其中所述干细胞和祖细胞收集自血液或骨髓。

6. 一种制备用于治疗性应用的干细胞和祖细胞的方法,所述方法包括连续或并行的下列步骤:

iii) 在存在 NM23 蛋白质的情况下利用培养基培养干细胞和祖细胞,其中所述培养基中包含仅单独或组合选自由白细胞介素 -3 和干细胞生长因子组成的组的细胞因子;和

ii) 使所述干细胞和祖细胞适用于治疗性应用。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述用于治疗性应用的适用包含生物细胞数量在活体外的扩增。

8. 权利要求 6 的方法,其中所述细胞选自包含间充质细胞,造血细胞,中枢神经系统 (CNS) 的细胞和表皮细胞的组。

9. 权利要求 6 的方法,其中所述细胞收集自血液或骨髓。

10. 权利要求 6 的方法,其中用于治疗性应用的适用是用在基因疗法中的适用。

11. 权利要求 6 的方法,其中用于治疗性应用的适用是用在干细胞疗法中的适用。

12. 权利要求 6 的方法,其中用于治疗性应用的适用是用在免疫疗法中的适用。

13. 一种促进培养物中干细胞和祖细胞存活而不分化的细胞培养基,所述培养基被补充以 NM23 蛋白质,所述培养基中包含仅单独或组合选自由白细胞介素 -3 和干细胞生长因子组成的组的细胞因子。

14. 按照权利要求 13 的培养基,其中待培养的细胞选自包含间充质细胞,造血细胞,中枢神经系统 (CNS) 的细胞和表皮细胞的组。

15. 按照权利要求 13 的培养基,其中待培养的细胞收集自血液或骨髓。

16. 按照权利要求 13-15 任一项的培养基,其中所述培养基包含 RPMI1640 培养基。

17. 按照权利要求 13-15 任一项的培养基,其中所述培养基包含 DMEM 培养基。

18. NM23 蛋白质被配制作作为干细胞和祖细胞培养基的添加物的应用,所述培养基中包含仅单独或组合选自由白细胞介素 -3 和干细胞生长因子组合的组的细胞因子,并且不包含其他细胞因子。

使用 NM23 的细胞培养, 包含 NM23 的细胞培养基和在 NM23 存在下培养的细胞的治疗性用途

[0001] 本发明涉及制备用于治疗性应用的生物细胞的方法, 以及使用生物细胞的治疗的方法, 和包含适合于治疗性应用的生物细胞的药物。本发明还提供用在生物细胞的培养中, 特别是用于维持培养物中未分化的生物细胞的方法和培养基。治疗性应用或待培养的生物细胞可以优选地是干细胞或祖细胞。

[0002] 在越来越多的情况中, 认识到生物细胞可以被治疗性地应用。也许包括生物细胞的应用的疗法的最佳已知例子是:

[0003] i) 基因疗法, 其中生物细胞被修饰从而表达治疗基因产物, 并且被修饰的细胞被施用于需要治疗的受试者;

[0004] ii) 干细胞疗法, 其中当细胞被施用于需要治疗的受试者时将干细胞或祖细胞的多能性质用于产生治疗效应(例如, 通过形成新的组织, 其可以取代或加强受试者中受损或异常的组织)和

[0005] iii) 免疫疗法, 其中生物细胞的免疫活性性质被修饰从而产生治疗效应, 并且被修饰的细胞被施用于需要治疗的受试者。

[0006] 在上述实例的每个中, 生物细胞可以是或衍生自, 分离自接受治疗的受试者的细胞。在这些情形中, 治疗基于使用自体细胞从而获得治疗效应。

[0007] 在基于生物细胞的疗法中的进展产生了对于在它们的治疗性应用前可以在活体外(ex vivo)维持生物细胞的技术的需要。使用现存技术, 干细胞或祖细胞的培养特别存在问题。目前的技术利用添加了血清, 或细胞因子诸如白细胞介素-3(IL-3), 白细胞介素-11(IL-11), 干细胞生长因子(SCF)和Flt-3配体的培养基的活性, 从而促进干细胞或祖细胞在活体外的增殖。然而, 这些现存的技术具有许多局限, 特别是在它们在充足时间内维持生物细胞以容许它们的治疗性适用而不会诱导细胞成熟和分化的能力方面。出于多方面原因, 维持干细胞或祖细胞而不会导致细胞的成熟或分化的能力是在使利用生物细胞的疗法的有效性最大化中是最重要的。

[0008] 首先, 在干细胞疗法的情形中, 适用的细胞的治疗效应依赖于它们的多能性质, 这容许细胞在需要治疗的受试者中产生替代组织。如果待用于治疗的细胞在培养的过程中经过了未受控制的分化, 则它们可以形成的可能谱系的数量会减少, 而且因此它们最终的治疗潜能也会降低。

[0009] 第二, 在其它的治疗背景下, 可能理想的是在它们施用于需要治疗的受试者之前, 诱导生物细胞被控制分化成为需要的细胞类型。这些受控的分化容许细胞被操控从而产生具有最大的治疗价值的所需细胞类型, 并且协助适用细胞随后靶向需要治疗活性的组织。现存技术, 其中分化没有以专业人员的方向发生, 而是在存在与血清中的细胞因子的“混合物”或细胞因子添加培养基的未受控制的作用下, 这阻止了所需的细胞谱系的有目的的产生并且可以导致混合的细胞群的产生, 并由此减少治疗效力。

[0010] 到目前为止, 没有现有技术持续足够成功来容许它们在基于生物细胞的疗法中的广泛临床应用。因此, 存在对于开发制备用于治疗性应用的生物细胞的改善的方法, 和使用

生物细胞的治疗的改善的方法的需要。

[0011] 此外,还将理解的是根据上述,存在对于开发能够促进生物细胞生长而不会导致成熟和 / 或分化的新的或改善的细胞培养方法,条件和培养基的需要。这些新的或改善的细胞培养源可以不仅用在干细胞和 / 或祖细胞的治疗性适用中,还可以用在生物细胞(特别是干细胞和 / 或祖细胞)的培养中从而用于研究和 / 或开发目的。尽管理想的是能够培养这些细胞(例如,容许细胞数量的扩大而不成熟或分化),通常现有技术中的技术人员可获得的适合的资源是缺乏的。

[0012] 按照本发明的第一个方面,存在提供制备用于治疗性应用的生物细胞的方法,所述方法包括连续或并行的步骤:

[0013] i) 在存在 NM23 蛋白质的情况下,培养生物细胞 ;和

[0014] ii) 使所述生物细胞适用于治疗性应用。

[0015] 按照本发明的第二个方面,提供治疗方法,所述方法包括连续或并行的步骤:

[0016] i) 获得生物细胞 ;

[0017] ii) 在存在 NM23 蛋白质的情况下,培养生物细胞 ;和

[0018] iii) 使所述生物细胞适用于治疗性应用并且还包括将适用的生物细胞施用给需要这种治疗的受试者。

[0019] 所述 NM23 基因家族包括 8 个人类成员,被称为 NM23-H1 到 NM23-H8,其编码 NM23 蛋白质的 8 个不同同工型。已经报道 NM23-H1 蛋白质和 NM23-H2 蛋白质具有 88% 的同源性,并且 NM23-H3 蛋白质与 NM23-H1 和 NM23-H2 蛋白质具有 70% 的同源性。在其它哺乳动物物种中,还存在已知的同系物,诸如 NM23-H1 的哺乳动物同系物 NM23-M1。本发明一般涉及使用 NM23 蛋白质,但是优选地涉及使用人 NM23 蛋白质,并且最优选地涉及使用 NM23-H1 蛋白质。

[0020] NM23-H1 蛋白质的氨基酸序列显示为序列 ID No. 1,编码该蛋白质的 cDNA 的序列显示为序列 ID No. 2。适合于按照本发明的各个方面使用的 NM23 蛋白质可以与序列 ID No. 1 的序列具有至少 60% 的同源性,优选地可以具有至少 70% 的同源性。更优选地,按照本发明的 NM23 蛋白质可以与序列 ID No. 1 具有至少 80% 的同源性,甚至更优选地具有至少 90% 的同源性,并且最优选地具有至少 95% 的同源性。尽管优选使用与 NM23-H1 具有同源性的 NM23 蛋白质,将理解的是在选择适合的试剂以按照本发明的应用中最重要因子之一是与 NM-23 共有的序列同一性的程度。因此,适合的试剂可以与序列 ID No. 1 的氨基酸序列具有至少 60% 的同一性,尽管优选的试剂可以具有至少 70% 的同一性,更优选地具有 80% 的序列同一性,甚至更优选地具有至少 90% 的序列同一性,并且最优选地具有至少 95% 的序列同一性。

[0021] 从在前的段落中将理解的是,本发明不仅涉及 NM23 蛋白质的野生型同工型,还涉及能够发挥与野生型同工型相同的生物作用的这些蛋白质的突变形式,片段,衍生物和类似物。这些突变蛋白质,片段衍生物和类似物可以来自任何物种的 NM23 的蛋白质,但是优选地来自哺乳动物 NM23 蛋白质,更优选来自人 NM23 的蛋白质,最优选来自 NM23-H1。适合于按照本发明使用的突变蛋白质,蛋白质片段,衍生物和类似物可以优选地比野生型蛋白质更具有生物学活性,和 / 或对降解更具有抗性。因此,突变蛋白质,蛋白质片段,蛋白质衍生物和类似物可以优选地具有对于培养细胞的更大的生物利用率,和确实可以在培养条件

下具有延长的半寿期。

[0022] 本发明者已经令人惊讶地发现使其适合于按照本发明的各个方面使用的 NM23 的有益作用也能够跨越物种界线发挥。特别地, 本发明人已经发现人 NM23 蛋白质 (诸如重组人 NM23-H1) 能够在鼠细胞的培养物中产生有利的生物作用。即使当使用人 NM23 蛋白质时, 技术人员将立即理解这种令人惊讶的发现表明本发明的应用方法和细胞培养基适合于用在其中生长非人细胞的应用 (除了治疗性应用) 中。通过实例的方式, 啮齿类动物的细胞的培养物代表了用在研究和开发应用的范围中的常用工具, 并且将理解的是, 这些培养物可以从来自人和其它非 - 啮齿类动物物种中的 NM23 蛋白质的使用中获益。等同地, 人细胞的培养物也可以从来自非人来源的 NM23 蛋白质的添加中获益。

[0023] 本发明基于本发明人的发现, 即, NM23 蛋白质能够作为培养细胞的存活因子发挥功能, 也能作为能够预防细胞分化和成熟的试剂发挥功能。因此, 在本发明的第三个方面, 提供了使用 NM23 蛋白质来在培养物中维持未分化的生物细胞。

[0024] 在本发明的另一个方面, 还提供了将 NM23 蛋白质用作存活因子, 并且在另一个方面, 提供将 NM23 蛋白质用于预防培养的生物细胞的分化和成熟。

[0025] 考虑到它们作为存活因子的活性和预防细胞分化和成熟的能力, 技术人员将理解 NM23 蛋白质大大有利于将被适用于治疗性应用中的细胞的培养, 因为在存在 NM23 的情况下培养细胞保持最大可能的治疗效力。NM23 蛋白质也用在用于非治疗性目的的生物细胞的培养中, 因为这些蛋白质的相同的生物学作用也在广泛的非治疗性目的, 包括 (但不限于) 研究和开发应用所采用的细胞培养物中具有应用。

[0026] 本发明人已经发现 NM23 蛋白质能够在已经经过深低温保藏的细胞上施加它们的有益影响, 并且认识到这种益处提供了许多优势。例如, 了解到深低温保藏的冻融细胞的过程与这样保藏的细胞中的某种程度的死亡有关。在进行深低温保藏的小细胞种群中, 这种细胞损失可具有特别不利的后果, 因为损失的细胞数量可能经常代表实际上有相对更大比例的存在的细胞总数的细胞损失。这些小细胞种群的典型实例可以包括临床或其它治疗样品, 其中仅有相对少量的细胞可以通过可用的收集方法而获得。

[0027] 技术人员还将理解深低温保藏代表这样的常规技术, 其用在预定为不管是用于治疗性目的还是非治疗性目的施用的干细胞和 / 或祖细胞的贮藏和 / 或运输中, 并且本发明的各个方面用于“存档”深低温保藏原种 (即, 现存的治疗性或非治疗性细胞的原种) 中的适用性也是特别有利的。

[0028] 常规现有技术依赖于将多种细胞因子的“混合物”用于在活体外促进干细胞或祖细胞的增殖中。细胞因子典型地作为血清添加物的部分或除此之外进行提供。准备用在干细胞群的增殖中的商购培养基包括因子诸如白细胞介素 -3 和白细胞介素 -11 (IL-3 和 IL-11), 干细胞生长因子和 Flt-3 配体。这些细胞因子的存在, 尽管有助于促进细胞分裂, 却导致了培养细胞的成熟和分化。这种成熟超出了专业人员的控制, 并且代表了主要的不利方面, 因为其减少了细胞可以最终形成的不同细胞谱系的数量并且可能阻止细胞受控制分化成优选的细胞类型。

[0029] 与现有技术形成对比, 本发明人已经发现用 NM23 蛋白质添加细胞培养基促进了细胞存活而不伴随分化, 并且不需要提供血清或外源生长因子。在存在 NM23 蛋白质情况下培养并且适用于治疗性应用的多能细胞在治疗中特别有益, 因为它们保持了它们形成广泛

范围的细胞类型的能力（即，保持它们的多能特性）。按照这种发现，将理解的是，在本发明的优选实施方式中，细胞在存在 NM23 蛋白质，并且培养基中缺乏其它细胞因子或血清的情况下进行培养。在 NM23 蛋白质用于无血清或无细胞因子条件的这种应用中，NM23 的主要功能可能是给培养细胞提供存活信号。

[0030] 在本发明的另一个方面中，提供了添加了 NM23 蛋白质的培养基以促进培养物中的细胞存活而不伴随分化。本发明还涵盖了被配制用作培养基的添加物的 NM23 蛋白质。该培养基可以优选地是无血清培养基和 / 或无细胞因子培养基。

[0031] 在本发明的备选优选实施方式中，可以将 NM23 的添加和其它细胞培养添加物组合使用，所述其它细胞培养添加物诸如血清，或细胞因子（其可以，例如，包括这样的试剂诸如白细胞介素 -3，白细胞介素 -6，血小板生成素，Flt-3 配体和 / 或干细胞生长因子）。在这样的实施方式中，本发明人认为 NM23 蛋白质可能用于，响应添加的细胞因子的活性，提高培养细胞的增殖（即，NM23 可以用于响应已知细胞因子添加方式增进增殖）。因此，可以选择添加的细胞因子提供增殖刺激的能力，否则，所述增殖刺激可能在存在 NM23 蛋白质的情况下在培养的细胞中缺乏。本发明人还认为 NM23 蛋白质可以发挥作用阻止培养细胞的分化，而这种分化在其它情况下在响应于添加的细胞因子的信号时可能发生（即，添加了 NM23 蛋白质的培养条件可以用于刺激细胞增殖，同时抑制由已知细胞因子添加方式提供的分化和 / 或成熟信号）。

[0032] 在遵循上述的作用方式中，本发明人已经发现 NM23 的添加容许干细胞群在培养物中扩增，所述培养物使用比前面所用的细胞因子混合物要简单（例如，增殖可以在单独存在白细胞介素 -3 和干细胞生长因子的情况下实现）。可以预计这些相对更简单的细胞因子混合物给这样培养的细胞提供减少的分化刺激。此外，本发明人已经发现用 NM23 蛋白质进行添加增加了在干细胞和 / 或祖细胞群中发生的“自我更新”分裂的数量。这些自我更新的分裂组成干细胞活性和种群的确定特性，并且增加这些分裂发生的数量的能力在维持和 / 或增加干细胞和 / 或祖细胞在培养的细胞种群中的数量的方面是有利的，在所述自我更新分裂中，分裂细胞形成子细胞，其中一个子代保持与母细胞相同的成熟状态。

[0033] 本发明人已经发现 NM23 添加的有益效果可以通过持续暴露于 NM23 蛋白质直到已经成功获得所需的生物学结果（例如，本文考虑的细胞种群扩增或其它有利效应）而获得。或者，该有益效果还可以通过将干细胞和 / 或祖细胞早期暴露于 NM23，例如在随后的移去 NM23 添加物之前的第 1，第 2，第 5，第 10 或第 15 天培养中。

[0034] 优选的是可以将 NM23 蛋白质提供为细胞外蛋白质，例如作为细胞（或组织）培养基的添加物。提供的 NM23 蛋白质可以是外源的或重组的蛋白质。如果 NM23 蛋白质将在细胞培养基中进行提供，其量可以优选地以介于 $0.01 \mu\text{g/ml}$ 和 1mg/ml 之间，更优选地以介于 $0.25 \mu\text{g/ml}$ 和 $500 \mu\text{g/ml}$ ，甚至更优选地以介于 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 和 $50 \mu\text{g/ml}$ 之间，并且最优选地以介于 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 和 $5 \mu\text{g/ml}$ 之间进行提供。

[0035] 适当地，提供作为被培养细胞的细胞外蛋白质的 NM23 蛋白质可以通过已知技术产生。例如，该蛋白质可以纯化自 NM23 蛋白质的天然存在来源。当然，可以诱导 NM23 蛋白质的这些天然存在来源以表达提高水平的蛋白质，所述蛋白质接着可以使用众所周知的常规技术进行纯化。或者，可以诱导不天然表达 NM23 蛋白质的细胞来表达这些蛋白质。一个适合的技术包括 NM23 蛋白质 /his 构建体的细胞表达。被表达的构建体随后可以通过其

his 标记被高度纯化。

[0036] 或者,按照本发明培养的细胞可以被诱导以过量表达 NM23 蛋白质。这种效果可以通过操控内源 NM23 蛋白质表达,或导致培养的细胞表达外源 NM23 蛋白质来获得。可以通过用众所周知的载体转化细胞来诱导外源 NM23 蛋白质的表达,可以将编码 NM23 蛋白质的 cDNA 插入所述载体中。可以优选的是由培养的细胞瞬时表达外源 NM23 蛋白质(例如,这种情况,即,表达仅在活体外培养过程中发生并在将所述细胞施用给需要治疗的受试者后停止)。

[0037] 将理解的是,编码 NM23 蛋白质的基因可以被递送给生物细胞而必将基因整合到载体中。例如,该 NM23 基因可以被整合到脂质体或病毒颗粒中。备选地,“裸”DNA 分子可以通过适合的方式,例如直接的胞吞吸收来插入生物细胞中。

[0038] 外源 NM23 基因(包含在载体中或其它方式)可以通过转染,感染,显微注射,细胞融合,原生质体融合或弹道轰击来转移到生物细胞中。例如,转移可以通过用包被的金颗粒弹道转染,包含外源基因的脂质体,和提供直接的 DNA 吸收的方式(例如,胞吞作用)进行。

[0039] 本发明的方法适合使用广泛范围的生物细胞类型,但是优选地使用干细胞或祖细胞。出于本发明的目的,取包含全能性细胞或多潜能细胞和祖细胞(或前体细胞)的干细胞从而包含多能细胞。全能性细胞是能够在机体中发现的任何类型的分化细胞的那些细胞,而多潜能细胞是能够分化成一些不同的最终分化细胞类型的那些细胞。多能细胞是能够产生响应适合的环境刺激(诸如,可溶解的生长因子的作用,或细胞或其后代定位的基质的作用)产生多样的细胞类型的细胞。

[0040] 本发明的方法可以使用间充质干细胞或祖细胞。这些细胞能够产生脂肪细胞,骨细胞或软骨细胞,并且可以按照本领域已知的技术收集自血液,骨髓,和脾或脂肪组织。

[0041] 将被理解的是被选择按照本发明进行使用的生物细胞的确切性质可以在该细胞将进行治疗性应用的基础上来确定。例如,在需要实现造血系统的治疗的情形中,可以优选的是使用来自造血系统的生物细胞。类似地,当希望实现中枢神经系统(CNS)的治疗时,将优选的是使用来自 CNS 的生物细胞,当希望实现表皮的治疗时,将优选的是使用表皮细胞。等同地,当细胞培养物将用于非治疗性目的时,可以参考要获得的最终目的,选择选定的细胞。因此,在细胞培养的研究和开发应用中,待培养的细胞将通常基于要调查的研究或开发目的进行选择。收集生物细胞进行按照本发明的治疗性或非治疗性应用的适合的方法将按照待使用的细胞的来源变化。细胞收集方法是众所周知的,并且优选的方法可以容易地为本领域那些技术人员确定。

[0042] 优选地,用在本发明的方法中的细胞收集自血液或骨髓,最优选地收集自外周血。收集生物细胞以按照本发明使用的最优选的方法在下面实施例的 1.1 中进行描述。

[0043] 按照本发明的方法应用的优选的培养条件可以参考待培养的生物细胞的类型来确定。应该考虑细胞(例如,干细胞或祖细胞)的性质,细胞的来源,以及细胞将适用的方式(在按照本发明的治疗性应用的情形中)。适合的培养条件对于本领域那些技术人员是众所周知的。确实,本发明特别有利的一个特点是现存的细胞培养技术可以通过结合 NM23 蛋白质和排除其它的补充细胞因子或血清被容易地进行修饰以按照本发明的第一个和第二个方面进行应用。

[0044] 通过实例的方式,可以优选的是在添加了 NM23 蛋白质的 RPMI 1640 培养基中培养

血液来源的细胞,或在添加了 NM23 蛋白质的 DMEM 培养基(可容易地从供应商诸如 Gibco BRL 进行商购的培养基)中来培养间充质细胞。本发明人已经发现特别优选的是按照下面实施例的 1.2 中提供的方法来培养细胞。

[0045] 按照本发明培养细胞(例如,本发明的第一个方面的步骤 i),或本发明的第二个方面的步骤 ii),还可以包含在活体外的生物细胞数量的扩增。这样的扩增可以在生物细胞的适用之前,之中或之后发生。当在体外扩增细胞数量时, NM23 蛋白质的包含(本发明人已经发现其充当培养细胞的存活因子)是特别有用的。

[0046] 优选地,按照本发明的培养,还可以包含生物细胞从人或非人供体中的分离。优选地,该供体可以是需要治疗的受试者。

[0047] 将理解的是,按照本发明的第一个方面的方法形成的细胞可以用于在宫内(in utero)的紊乱的诊断,并且按照本发明的第一个和第二个方面的方法可以用在这些紊乱的矫正中。

[0048] 本发明的第一个和第二个方面的方法可以在提供已经适用于(adapted)表达具有治疗活性的酶的生物细胞中特别有用。这些细胞可以用于替代或加强受试者的受损的,失去的或异常的细胞。

[0049] 生物细胞可以通过许多不同的方式适用于按照本发明的治疗性应用。将采取的适用的性质将通过适用的细胞待进行的治疗性应用来确定。

[0050] 可以按照本发明对生物细胞采取典型适用(adaptation)从而使它们能够进行治疗性应用,所述典型适用包括:

[0051] i) 适用于用在基因疗法中

[0052] ii) 适用于用在干细胞疗法中;和

[0053] iii) 适用于用在免疫治疗中。

[0054] 按照本发明,在下面详细考虑进行治疗性应用的生物细胞的适用的实例。下页考虑了将生物细胞用于治疗或预防许多疾病和病症,所述生物细胞已经按照本发明的方法进行了治疗性适应。除了上下文另外需要,将理解的是这些疾病和病症的治疗或预防可以使用本发明第二个方面的所有实施方案来获得,并且不限于下面考虑的具体适用。

[0055] i) 适用于基因疗法

[0056] 基因疗法是一种这样的技术,通过所述技术,基因或小 DNA 或 RNA 分子可以被转移到细胞中,以修正存在的遗传缺陷或预防或治疗遗传相关的疾病。这种治疗代表潜在地非常有效的方法,通过所述方法可以治疗广泛范围的医学疾病。术语“基因疗法”涵盖能够以许多方式获得治疗效应的不同技术,但是在其最广泛的形式可以被认识是使用被转移到生物细胞中以获得治疗效应的任何重组遗传物质(诸如 DNA, RNA 或杂交分子)。

[0057] 本发明可以特别适用于“在活体外”的基因疗法,其中在培养物中进行基因转移并且接着将适用的细胞施用给需要治疗的受试者。在活体外的基因疗法是高度有效的,容许紧密控制细胞的处理以及将治疗基因持久整合到适用的细胞中。

[0058] 与体内基因转移(其中载体被直接注射到待治疗的患者中)的使用相比,在活体外基因疗法方法的使用具有许多优势。这种方法的最明显的优势之一是在将细胞插入被治疗的患者之前进行广泛安全的控制的能力。此外,可能可以产生更高水平的治疗基因的表达,因为可以选择细胞以在它们注射到患者中之前,产生高水平的治疗蛋白质。因为由治疗

性适用的细胞的培养物中的稳定和可能的扩增所提供的进一步进行治疗性处理和测试的可能,在活体外的基因疗法的优势大量出现。不幸的是,在活体外基因疗法的施用直到现在仍被缺乏适合的培养技术所限制,所述适合的培养技术容许适用细胞的生长和处理。

[0059] 可以通过使用所谓的短的,干扰 RNA (siRNAs) 设计基因疗法从而阻断有害的缺陷基因,诸如涉及亨廷顿舞蹈病的那些的作用。基因疗法还可以用于修复在来源自缺陷基因的信使 RNA 中的错误,并且认为该技术可以具有治疗各种形式的癌症(包括,黑素瘤,白血病/淋巴瘤,前列腺、卵巢和肺癌)以及其它疾病诸如囊性纤维化和地中海贫血症的潜能。基因疗法已经用在治疗患有严重的综合免疫缺陷疾病的儿童中,并且已经提出基因疗法可以在神经变性疾病诸如帕金森病的治疗中是有用的。可以使用基因疗法治疗的其它疾病包括血友病,家族性高胆固醇血症,脊肌萎缩症,AIDS 和心血管疾病。

[0060] 基因疗法还容许开发 DNA 疫苗(其可以用在治疗疾病诸如疟疾和 AIDS 中,以及地方性癌症诸如伯基特淋巴瘤中),和产生可以用于移植的替代性组织和器官(表达治疗性基因)。

[0061] 生物细胞使其适合于按照本发明的基因疗法的适用可以典型地包括转化细胞从而表达典型为治疗基因产物的治疗产物。本领域那些技术人员已知许多以这种方式使生物细胞(诸如干细胞和祖细胞)适用的适合的方法。典型地,细胞可以用编码治疗产物的核酸(在本文指“治疗基因”)进行转染。

[0062] 治疗基因必须能够被适用的生物细胞表达(优选地在体外以及当施用于受试者时),产生直接地或间接地具有治疗活性的产物。所谓“直接地”,我们意为基因表达的产物本身即具有治疗活性(例如,取代或加强受试者中异常蛋白质表达的蛋白质)。所谓“间接地”,我们意为治疗性基因表达的产物经历或介导(例如,作为酶)至少一个另外的反应从而提供具有治疗效应的试剂。

[0063] 该治疗基因可以被包含在适合的载体中以形成重组载体。该载体可以例如,是质粒,黏粒或噬菌体。这些重组载体对于以外源基因转化细胞是高度有用的。

[0064] 重组载体还可以包含其它功能元件。例如,重组载体可以被设计从而该载体将自发在细胞核中复制。在该情形中,在重组载体中可以需要诱导 DNA 复制的元件。或者,可以设计该重组载体从而使该载体和重组 DNA 分子整合到细胞的基因组中。在该情形中,需要有利于靶向整合(例如,通过同源重组)的 DNA 序列。重组载体还可以具有编码基因的 DNA,其可以被用作在克隆过程中的可选择标志物。

[0065] 重组载体还可以包含启动子或调节子以根据需要控制基因的表达。

[0066] 可以将治疗基因,或基因插入反转录病毒载体。这些载体可以有利地被充分整合到宿主基因组中。这种长期基因表达的结果,与整合的基因一起被传递到子代细胞上。

[0067] 优选的是,将该治疗基因插入腺病毒载体。使用腺病毒载体避免了插入突变的危险,因为载体保持是片断的(episodic)并且没有整合到基因组中。此外,腺病毒载体在休眠的,未分裂的,高度分化的细胞中具有良好的转导能力,一种如果在它们施用于受试者之前需要诱导适用细胞的分化时可以证明是有用的性质。

[0068] 将理解的是,在基因没有被结合到载体中的情况下,治疗基因,或基因可以被递送到生物细胞中。例如,治疗基因,或基因可以被结合到脂质体或病毒颗粒中。或者,“裸”DNA 分子可以通过适合的方式,例如直接的胞吞作用吸收被插入生物细胞中。

[0069] 治疗基因或基因（包含在载体中或相反）可以通过转染,感染,显微注射,细胞融合,原生质体融合或弹道轰击来转移到生物细胞中。例如,转移可以通过用包被的金颗粒弹道转染,包含外源基因的脂质体,和提供直接的 DNA 吸收的方式（例如,胞吞作用）进行。

[0070] 可以优选的是按照本发明的方法培养并适用于基因疗法的细胞可以在它们施用于患者前被诱导分化并采用需要的细胞谱系或表型。这样的分化在确保适用的细胞在患者中正确靶向是特别有益的（即,确保细胞进入优选的待治疗的组织区室）。可以在分化发生之前或之后,将按照本发明的实施方案诱导分化的细胞用治疗基因,或基因进行转化。诱导需要的分化的适合的因子将对于本领域那些技术人员是众所周知的,并且可以参考细胞需要采用的谱系或表型来进行确定。

[0071] ii) 用于干细胞疗法的适用

[0072] 干细胞疗法代表可以治疗变性疾病（如由身体不能替代的细胞类型的过早死亡或功能障碍引发的那些）的治疗性方法。希望干细胞的加入可以帮助成核和促进功能性细胞和 / 或组织的发育以替代损失的那些,由此恢复正常的健康活性。最终可能在活体外再生出新的功能性组织,随后可以将其施用到需要治疗的受试者体内。

[0073] 生物学细胞用于干细胞疗法的适用一般可以包括干细胞或祖细胞数目的在活体外的扩增以产生增多的干细胞群,该细胞适于施用到需要这种治疗的受试者体内。为了具有治疗效力,当施用给受试者时用于干细胞疗法的细胞（其可以是真正的干细胞或者是某些类型的祖细胞）必须保持它们的分化成多种细胞系的能力。当前干细胞疗法的应用受到缺少适合方法的限制,通过所述方法干细胞可以增殖而不用经历分化和成熟。

[0074] 在 NM23 蛋白存在时培养的细胞可以用于干细胞疗法的方法,因为它们促进干细胞在培养物中存活,并且因此有助于干细胞数目的扩增,但不诱导培养细胞的分化。

[0075] 认为干细胞疗法可以对于广泛的疾病具有广泛应用。例如干细胞疗法可以用于治疗血液病症（如白血病和镰形细胞贫血）,脑和神经系统疾病（如帕金森病和阿尔茨海默症）,肌肉 - 骨骼病症（如肌肉萎缩,关节炎和骨质疏松症）,肝疾病（如肝硬化和肝炎）,脊髓损伤,心脏疾病和糖尿病。

[0076] 干细胞疗法还可以用来替代因为损伤、外伤或细胞毒性伤害的结果而损失的受伤组织。例如,这些疗法可以用于神经变性疾病,其中源于 CNS 的干细胞可以用来替代或增加受损的体细胞,如位于脑或脊髓中的那些。干细胞可以治疗性地用于循环系统受损害的环境中,如血管阻塞后的局部缺血组织损害。在这些环境中可以施用合适的干细胞以引发新血管的形成,或替代其它受损的组织。扩增的干细胞群还可以用于肝细胞受损的情形中,以便诱导损伤组织的再生。

[0077] iii) 用于免疫疗法的适用

[0078] 免疫疗法涉及广泛的治疗方法,其中对生物细胞的免疫学特性进行操作从而当施用给需要治疗的受试者时使细胞发挥治疗效应。因而按照本发明的基于免疫疗法的适用包含使得细胞适用于基于免疫疗法的方法的生物学细胞的任何适用。

[0079] 可以采用在 NM23 蛋白存在时适用干细胞和祖细胞培养物,从而对它们的免疫学特性进行操作,同时保持这些细胞的多能特性。例如这种操作可以包括细胞的在活体外适用以呈现抗原呈递细胞 (APCs) 的特性。随后可以对具有 APC 特征的细胞进一步操作以便表达与希望从受试者体内除去的微生物或细胞相关联的抗原。例如,可以对生物细胞进行在

活体外的操作以呈现癌细胞的抗原特征。在将适用细胞施用给受试者后这些适用细胞（具有 APC 特征）能够激活 T 细胞由此诱导受试者对于靶标的适应性免疫反应并且杀死存在的癌细胞。

[0080] 按照本发明第二方面的治疗方法可以在癌症的治疗中作为单一疗法利用已经进行过这些基于免疫疗法的适用的生物细胞（即单独使用基于生物细胞的疗法）或者可以与本领域已知的其它癌症疗法一起组合使用，或作为其辅助而使用。

[0081] 按照本发明第二方面的治疗性适用的细胞的施用一般可以通过将所述细胞引入受试者身体中而进行。这种施用可以优选地通过注射、植入或吸入的方式实现。优选的施用途径可以参照待治疗的疾病而容易地确定。

[0082] 将会理解的是按照本发明制备和适用的生物细胞也适用于制备和生产药剂。所以按照本发明的又一方面提供了生物学细胞作为药剂的用途，所述生物细胞是在 NM23 蛋白存在时培养并适用进行治疗性使用的。按照本发明这一方面的药剂适用于上面考虑过的疾病、紊乱和损伤的治疗。

[0083] 按照本发明的药剂可以根据本领域众所周知的方案进行配制。基于药剂施用的优选途径可以确定合适的剂型。优选地按照本发明的药剂可以以适合于通过吸入，通过注射，或通过植入施用的形式制备。

[0084] 优选地吸入用的制剂可以优选包含在合适的液体载体中提供的生物学细胞。这种液体载体优选地是非免疫原性的，并且可以包含盐溶液、细胞培养基，或蒸馏水。注射用制剂可以如上所述，或者也可以以凝胶的形式提供，其可以优选地能够被治疗的受试者身体所分解。适合于植入的制剂可以采取对于注射或吸入所述的形式，并且还可以包含在支架或基质中提供的生物细胞，所述支架或基质能够提供新组织发育的基础。

[0085] 在按照本发明的第二方面的两种方法中，以及在按照本发明的药剂的用途中，应当将治疗有效量的适应进行治疗性使用的生物细胞施用给需要治疗的受试者。“治疗有效量”是任何量的治疗上适用的细胞，其当施用给患有—种疾病的受试者时导致疾病的减弱、缓解或消退，相对于所述疾病，该治疗上适用的细胞是有效的。“受试者”可以是人，或任何其它动物，特别是家养的或农业上的哺乳动物。

[0086] 将要通过下列实施例，并且参照附图对本发明作进一步说明，其中：

[0087] 图 1 涉及 Nm23H1 的同—性。图 1 提供 NM23 H1 的氨基酸序列（序列 ID No. 1）而序列 ID No. 2 提供用于编码序列 ID No. 1 中定义的蛋白质的表达的相应的 cDNA 序列；

[0088] 图 2 举例说明了 NM23H1 作为骨髓细胞存活因子的功能。该图显示添加 NM23 对于原初 AML 细胞培养物中存活细胞数目的结果，所述 AML 细胞是在 ficol hypaque 密度离心后从单一 AMNL 患者的外周血中获得的。将 AML 细胞以 10^6 细胞 /ml 的密度在含有 ITS⁺ 和数剂 (doses) 重组人 NM23H1 的 RPM 1640 培养基里置于培养物中，如图表所示。左手板显示的结果是获自不含其它细胞因子（除了 NM23 之外）的培养物的那些，而右手板上的结果是获自还用 IL-3 和 SCF 处理的培养物的结果。在第 5 天收集培养物并通过相差显微镜测定剩余存活细胞的数目。左板中的虚线显示在第 0 天用来接种培养物的存活细胞的数目。在第 5 天接受 NM23 H1 结合 IL3 和 SCF 的全部培养物都具有大于 10^6 的细胞数目。使用 students T-test 来获得 p 值，这些 p 值被显示以用于含有 2mg/ml NM23 的培养物与其各自无 NM23 的对照之间的比较。

[0089] 图 3 举例说明 Nm23 H1 增加了来自多个 AML 患者的培养细胞的存活。在缺乏和存在 2mg/ml rNm23H1 的情况下,将如在文章和图 2 中所述制备和培养的 AML 细胞培养在无血清培养基中。5 天后,如前收集培养物并且来确定存活细胞的数目。举例说明的数据是针对 9 个连续的 AML 样品的(空心圆)并且它们的平均值 \pm s. e. P 值使用成对 t- 检验 (paired t-test) 而获得。阴影线代表用于在第 0 天接种培养物的细胞的数目。没有培养物包含 IL3 或 SCF ;

[0090] 图 4 显示 Nm23 H1 容许来自脐带血的 CD34⁺ 细胞的培养物中的细胞数量的扩增。CD34⁺ 细胞获自如是在下面的实施例中描述的脐带血 (UCB)。得到的细胞在添加了 ITS⁺, IL3 和 SCF 的 RPMI 1640 培养基中并且在 rNm23 H1 存在或缺乏的情况下以 10⁶/ml 进行培养。以显示的时间取培养物的样品以容许对存活细胞进行计数。按照需要给培养物进料从而防止培养基的过度生长或耗尽 ;

[0091] 图 5 举例说明 NM23 H1 的作用通过在新分离的细胞和它们的子代上的活性获得。如上面图 4 分离和培养 UCB。细胞在不存在 NM23 H1 (更大的实心圆) 或存在 NM23 添加的情况下进行培养。在被研究的一些培养物中, NM23 H1 添加物在第 5 天被移去 (实心三角形), 而在其它的培养物中, NM23 H1 添加物持续了研究的整个时期 (空心圆)。该数据显示用两种不同的 NM23 H1 添加方式处理的细胞的增殖是相同的。有趣的是, 尽管这些培养物仅维持到第 16 天, 在这段时期内, NM23 H1 处理组的行为接近来自单独的供体的细胞, 所述供体起初在图 4 中显示并且在这里重复为阴影线。这些数据可以指示 NM23 的作用对细胞是具有指导性的并且“所得到”的信息在第 5 天后持续 (即, 即使当添加物随后被移去, NM23 添加物的生物学作用在早期的时间点继续)。或者, 这些数据可以用于举例说明在培养的早期天数中由 NM23 H1 提供的关键存活信号容许更多的细胞有助于培养物的随后扩增 ;

[0092] 图 6 显示 NM23 H1 添加物的作用在来自流动的成人外周血的 CD34⁺ 细胞的培养物中再获。CD34⁺ 细胞完全选自由在伯明翰的 Blood Transfusion Service 干细胞实验室提供的流动的血液单核细胞制剂。得到的细胞在添加了 ITS⁺, IL3 和 SCF 的 RPMI 1640 培养基中并且在 rNm23 H1 存在或缺乏的情况下以 10⁶/ml 进行培养。以显示的时间取培养物的样品以容许对存活细胞进行计数。按照需要给培养物进料从而防止培养基的过度生长或耗尽 ;

[0093] 图 7 容许分析在来自流动的血液的 CD34⁺ 细胞的培养物中的早期成熟事件。在显示的时间从在图 6 中所述的培养物中收集细胞的样品, 并且通过使用 Becton Dickenson FACS 测量器进行双重荧光染料细胞分选分析来进行分析。左手板显示 CD34⁺/CD117⁻ 细胞在培养物中的动力学。中间的板和右手板分别显示 CD34⁺/CD117⁺ 和 CD34⁻/CD117⁺ 细胞的动力学。上面的板显示的数据为表达标志物的细胞的百分比, 下面的板显示表达标志物的细胞的绝对数量。空心圆代表来自添加了 NM23 H1 的培养物的数据, 而实心圆代表了来自未添加 NM23 H1 的培养物的数据。值得注意的是, 当缺乏 NM23 H1 添加物时, CD34⁻ 单阳性 (即, CD34⁺/CD117⁻) 的数目渐渐或多或少的下降, 而这些细胞的数量在添加了 NM23 蛋白质的培养物中, 在第 12 到第 16 天, 这些细胞的数目扩增。

[0094] 图 8 显示添加 NM23 H1 蛋白质促进了贮存的深低温保藏的 CD34⁺ 细胞的恢复 (rescue)。深低温保藏的造血干细胞代表被预期广泛用治疗广泛疾病中的细胞的来源。这种应用的一个实例是在重度骨髓抑制治疗白血病后施用同系干细胞移植。目前, 深低

温保藏后细胞的相对低质量 / 恢复构成了对现存的现有技术方法成功的限制。在图中显示的数据来自三个分别的实验,其中 CD34⁺ 细胞已经纯化自深低温保藏的流动的外周血单核细胞制剂的单独的小瓶。在所有的三种情形中,这些细胞的细胞存活通过添加 NM23 H1 被明显增加 (空心符号);和

[0095] 图 9 举例说明添加 NM23 H1 还导致了在液体培养物中的鼠祖细胞数量的扩增。将确定的方法 (J. Exp. Med. 183 :1797-1806(1996)) 用于将来自正常小鼠的骨髓的“侧群”(SP) 小鼠干细胞分选为三个部分,并且该细胞在添加了马血清和细胞因子混合物的 DMEM 中培养 5 天,所述细胞因子混合物被设计用于扩增干细胞 / 祖细胞数量 (SCF 20ng/ml, TPO 25ng/ml, IL3 10ng/ml, IL6 10ng/ml 和 Flt-3_L10ng/ml)。这些培养物在缺乏或存在 NM23 H1 时建立。5 天后,将细胞转移到长期培养物中,在缺乏 NM23H1 时,启动细胞 (LTC-IC) 测定。在所用的测定中,原始干细胞和 / 或祖细胞向下面通过预形成的基质培养物,而更多的成熟细胞留在基质层的上面。当原始细胞开始增殖时,它们首先在基质细胞下这样做,而当它们开始成熟时,它们则穿过于细胞层。在基质层下的祖细胞的增殖产生具有“鹅卵石”外形的形式。评价这些集落容许估计在用于接种 LTC-IC 测定的细胞种群中存在的干细胞 / 祖细胞数目。在产生鹅卵石集落中存在时间差异,其中更原始的细胞在数天后产生集落,而更成熟的祖细胞更快地给出集落。此处显示的数据针对在建立 LTC-IC 测定 2 周后所鉴定的集落。认为这次检测的集落来自多潜能造血干细胞 / 祖细胞,其与正分选的人 CD34⁺ 细胞具有类似的重构性质。该数据显示,在所有的三个部分的 SP 细胞中,并且尽管存在丰富的支持性细胞因子混合物,同时用 NM23 蛋白质添加在液体培养物中导致种群恢复 (repopulating) 的细胞的更多的保藏或这些细胞的增加的扩增。

[0096] 实施例 1

[0097] 方法

[0098] 1.1. 细胞收集

[0099] 使用 Ficoll Hypaque 细胞密度离心从外周血 (在得到允许后提供) 中分离 AML 母细胞。

[0100] 1.2. 细胞培养

[0101] 收集后,在 RPMI 1640 培养基中过夜培养细胞,所述培养基中添加了商业血清替代物 (ITS⁺) 并包含人重组白细胞介素 3 (IL3) 和干细胞因子 (SCF) (都在 5ng/ml)。

[0102] 次日,将细胞洗涤两次 (RPMI 1640 ;没有 ITS⁺ 也没有细胞因子),对其进行计数并在 RPMI 1640 中调整到 1×10^6 细胞 /ml,所述 RPMI 1640 添加了 ITS⁺ 并且添加了或未添加 IL-3 和 SCF。在存在和缺乏重组人 Nm23H1 (以多到最大 $2 \mu M$ 的浓度进行提供) 的情况下,将细胞接种为 1ml 的培养物 (在 48 孔板中)。

[0103] 5 天后,收集细胞并且通过使用血细胞计数器和相差显微镜来确定活细胞 /ml 培养物的数量。数据显示对 Nm23 H1 的剂量反应是对于单 AML 样品的并且该数据点是四个重复培养物的平均值 \pm SE。第三个图的数据是针对 $n = 9$ 连续的 AML 样品,所述样品被接收到实验室中并且在存在 IL-3 和 SCF 的情况下起始过夜培养后符合具有高生存力的细胞的标准 ($> 90\%$)。这些实验使用不含有细胞因子的培养基,并且存在或不存在 $2 \mu g/ml$ 的 Nm 23 H1。

[0104] 1.3. 重组 NM23 H1 的表达和纯化

[0105] 将编码 NM23 H1 的 cDNA 插入携带 N- 端 His 尾的 pET15b 质粒 (Novagen)。

[0106] 将该质粒的蛋白质产物 (即, 具有 N- 末端 His 尾的 NM23 H1) 在大肠杆菌 BL-21 (DE3) 菌株中进行表达。按照标准方法, 使用异丙基 - β -D- 硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达。按照提供的手册, 使用常规的 Nickel 离子螯合 NTA 琼脂糖系统纯化重组蛋白质 (Ni-NTA His-Bind Kit, Novagen)。

[0107] 结果

[0108] 1. 4. 重组 Nm23 H1 充当干细胞和祖细胞存活因子并且不导致培养细胞的分化。

[0109] 本发明人测试是否按照上面 1. 3 提出的方法产生和纯化的重组 NM23H1 蛋白质能够促进原发急性髓细胞白血病 AML 细胞 (其提供干细胞或祖细胞的实验模型) 的存活而不诱导它们的分化。

[0110] 图 2 显示获自单一 AML 样品的数据, 所述样品在缺乏支持性细胞因子 (左板) 或在存在白细胞介素 -3 (IL-3) 和干细胞因子 (SCF) (右板) 的情况下与增加的 N23 H1 浓度一起温育。

[0111] 在第 0 天, 以 10×10^5 细胞接种培养物 (虚线)。该数据显示 NM23 H1 在缺乏细胞因子的情况下提高细胞的存活, 而在它们存在的情况下提高整个增殖。此外, 在缺乏其它细胞因子的情况下培养的 AML 细胞在它们培养的时期内没有经历成熟或分化。

[0112] 图 3 显示来自 $n = 9$ AML 样品的收集数据, 所述样品在存在或缺乏 $2 \mu\text{g/ml}$ 的 Nm23 H1 情况下 (不含支持细胞因子) 培养 5 天。虚线再次限定第 0 天接种的细胞的数量。

[0113] 图 3 中显示的数据举例说明在缺乏 NM23 H1 时培养的 AML 样品 (9 个测试的培养物中的 9 个) 在 5 天的测试时期内遭受了细胞的损失。与此相对, 在存在 NM23 H1 的情况下培养样品没有遇到细胞损失, 并且在这些培养物中, 细胞数量保持相同或增加。

[0114] 结论

[0115] 1. 5.

[0116] 在该实施例中给出的结果举例说明, 在干细胞或祖细胞培养的实验模型中, 在存在 NM23 蛋白质 (并且没有加入其它的细胞因子) 的情况下生长的细胞的种群能够进行扩增并且不进行分化或成熟。

[0117] 这些结果举例说明 NM23 蛋白质在生物细胞的增殖中的有效性, 所述生物细胞可以在这种培养之前, 之中或之后, 适用于治疗性应用。

[0118] 实施例 2

[0119] 2. 1 实验设计

[0120] 进行下列实验以研究 Nm23 H1 对人 CD34⁺ 干细胞或祖细胞的活性。该实验研究 NM23H1 对这些来自新生儿脐带血或流动的外周血的细胞的影响。

[0121] 选定的人干细胞或祖细胞来源代表目前使用在常规干细胞疗法中的仅有的干细胞群。所用的关于这些细胞的干细胞疗法采取将干细胞移植到受体中的形式, 所述受体已经进行了治疗诸如重度骨髓抑制疗法 (例如, 在白血病的治疗中)。接着, 移植的干细胞能够重新组成受体的造血系统。更通常地, 上述类型的干细胞移植使用来自流动的外周血的干细胞。该方法利用这样的事实, 即用适合的细胞因子, 诸如粒细胞集落形成刺激因子 (G-CSF) 处理的患者的干细胞, 成为“流动的”并且离开骨髓进入外周血液中。结果, 流动的干细胞可以相对容易地从供体的循环中收集。

[0122] 一般认为 CD34 表达构成干细胞和祖细胞的有用标志物。在实施上述干细胞移植技术中 CD34⁺ 细胞通常不进行分选但是它们在流动部分中的数目却被认为是存在于该部分中的干细胞数目的精确计数器。受体一般接受可变数目的总供体细胞,其中它们接受恒定数目的 CD34⁺ 细胞。

[0123] 在一些异源基因移植方案中必需从供体干细胞制剂中去除 T-淋巴细胞以便预防(或至少限制)植入物抗宿主疾病的危险。利用诸如免疫磁力分离的技术选择 CD34⁺ 细胞允许实现 T-细胞的 3-4 log 的消除,而同时在细胞群中保留高数目的造血干细胞或祖细胞进行移植(最近在 Platzbecker U 等:Leuk Lymphoma. 2004 Mar ;45(3):447-53)中进行了综述)。

[0124] 能够重新组成成人造血系统的干细胞或祖细胞的第二种来源包含出生时取的脐带血(UCB)。UCB 比成人血液包含多得多数目的循环性干细胞并且这些细胞能够在产后从胎盘中收获。作为收集自流动血液中的干细胞或祖细胞的情况,从 UCB 中分选的 CD34⁺ 细胞能够作为重新建群的干细胞而起作用。

[0125] 下列实验研究了 NM23 蛋白对于免疫磁性选择的 CD34⁺ 细胞的效果,所述 CD34⁺ 细胞源自流动的外周血还源自 UCB,已经人工地将干细胞流入所述流动的外周血。

[0126] 2.2 方案

[0127] 经地方研究伦理道德委员会(LREC)的批准和经由伯明翰女子医院(University Hospitals of Birmingham Trust)产房征得父母的同意下提供 UCB。在提供有关捐赠品之前获得承诺使用多余的流动血。

[0128] 利用 RPMI 1640 培养基将脐带血稀释 1:3,并通过铺于 Ficoll Hypaque 之上和离心来制备单核细胞制剂。在选择 CD34⁺ 细胞之间用含有 2% FBS(胎牛血清)的 PBS 将收获的细胞洗涤两次。通过 Blood Transfusion Service Stem Cell laboratories, Birmingham 提供流动血作为单核制剂。

[0129] 使用生产商间接选择试剂盒和方案,利用磁力细胞分离柱(Miltenyi)分选 CD34⁺ 细胞。将分选的细胞置于无血清的添加了可商购的血清替代品(ITS⁺:Becton Dickenson)并且包含 rh-IL3 和 rh-SCF(如上早先使用 AML 细胞进行的研究中所用的)的 RPMI 1640 培养基中。

[0130] 在源自流动血的单核细胞的情况下,还利用标准的保存存活细胞的方案将细胞样品保存在液氮中并且在融化冷冻的细胞贮存液后选择 CD34⁺ 细胞。

[0131] 将直接分选的 CD34⁺ 细胞以 1×10^6 /ml 铺平板,而从融化的贮存液中分选的细胞以 1.5×10^6 /ml 铺平板。在存在或缺少 $2 \mu\text{g/ml}$ rh-Nm23H1 的气氛下,将培养物于 37°C 在加湿的含有 5% CO₂ 的环境中温育。

[0132] 2.3 结果.

[0133] NM23 蛋白对于来自脐带血的干细胞或祖细胞的作用

[0134] 图 4 和 5 图示了由利用收集自 UCB 的 CD34⁺ 细胞的实验生成的代表性数据。

[0135] 2.3.1

[0136] 图 4 图示了这样一种实验的结果,其中收集 CD34⁺ 细胞并且随后培养 28 天。如图 4 中所图示的与未用 NM23 H1 处理的培养物相比,用 NM23 H1 处理的培养物呈现出显著的细胞数目扩增。到培养的第十六天 NM23 处理和未处理的培养物都包含许多 CD34⁺ 细胞,但是

与在未处理的培养物中发现的细胞数相比,这些在 NM23 处理的培养物中的细胞数目大大提高。

[0137] 2.3.2

[0138] 图 5 图示了来自独立实验的数据,所述独立实验利用源自培养物中保持了总共十六天的 UCB 的 CD34⁺ 细胞。为了说明性的目的也将在实验 2.3.1 中来自 NM23 H1 处理组的数据包括在图 5 中。

[0139] 在此第二实验中将纯化的 CD34⁺ 细胞分成如下三组:

[0140] a) 在实验中不提供 NM23 H1 的培养物(在图 5 中标记为"cont");

[0141] b) 在实验持续过程中添加了 NM23 H1 的培养物;和

[0142] c) 在培养的前 5 天中提供 NM23 H1 的培养物,随后在第 5 天除去 NM23 添加物。

[0143] 由图 5 中可见 b) 和 c) 组 NM23 H1 都与来自实验 2.3.1 的 NM23 H1 处理的细胞呈现相同的种群动力学。这一发现说明在第 5 天从 c) 组中去除 NM23 H1 并未导致在整个实验中与在用 NM23 处理组中观察到的效应相比细胞数目减少。这些观察结果表明 NM23 H1 处理的细胞维持效应作用在 CD34⁺ 干细胞或祖细胞群上,并且不作用在它们的分化后代上。

[0144] NM23 蛋白对于分离自外周血的流动(mobilized)干细胞或祖细胞的作用

[0145] 2.3.3

[0146] 图 6 显示 NM23 H1 对于扩增 CD34⁺ 细胞的作用,所述 CD34⁺ 细胞收获自含有流动干细胞或祖细胞的外周血。如所示观察到的干细胞或祖细胞数目的扩增与利用源自 UCB 的干细胞或祖细胞获得的扩增相似(与实验 2.3.1 和 2.3.2 的结果相比)。该数据说明干细胞或祖细胞培养物补充以 NM23 不仅能够实现维持 CD34⁺ 细胞还能实现它们的数目扩增(与图 7 中所示结果可比较的扩增),所述干细胞或祖细胞培养物源自流入外周血的细胞。

[0147] 2.3.4

[0148] 在流入外周血的 CD34⁺ 细胞的定型-分化过程中的早期事件能够通过获得 CD117 表达以及随后的 CD34 表达的丧失来进行监测。因而当细胞分化时它们遵循下列顺序,首先为"CD34 单一阳性"(即表达 CD34 但不表达 CD117),其后变为"CD34/CD117 双阳性"(即表达 CD34 和 CD117),其后最终变为"CD177 单一阳性"(表达 CD117 但不表达 CD34)。

[0149] 图 7 的上板图示了通过在实验 2.3.3(其结果显示于图 6 中)中所述的培养物的 FACS 分析获得的数据。在图 7 中所图示的结果显示 CD34 单一阳性细胞的渐渐下降,CD34/CD117 双阳性的瞬时扩增以及 CD177 单一阳性的随后升高。

[0150] 这些数据说明在添加了 NM23 H1 的培养条件中发生了某种程度的细胞成熟,不过当结合细胞数目数据(图示于图 6 中)和百分比数据(来自图 7 的上板)考虑这些结果时,显而易见存在于添加了 NM23 的培养物中的 CD34 单一阳性细胞的总数目经历了明显的扩增,如图 7 的下板中所示。

[0151] 在图 7 的下板中所示的数据说明在添加了 NM23 H1 的培养物中 CD34 单一阳性细胞的实际数目(具有最低程度的分化和成熟的干细胞或祖细胞的指征)不仅得以维持,还得以显著扩增。例如,可以见到十九天后在细胞培养条件中那些添加了 NM23 蛋白的培养物包含为最初导入培养物中的将近两倍多的 CD34 单一阳性(第 0 天的值图示在图表中)。

[0152] 因而这些结果提供这样一种事件的清楚说明,所述事实是添加了 NM23 蛋白的细

胞培养物允许干细胞和 / 或祖细胞数目的明显扩增。这些干细胞和 / 或祖细胞得以维持而无分化并且伴随着存在于培养物中的未成熟干细胞和 / 或祖细胞数目得以显著提高。

[0153] 2.3.4

[0154] 还研究了 NM23 H1 蛋白致使可移植的干细胞和 / 或祖细胞扩增的稳定性, 所述细胞已经进行过低温保藏。本发明人进行了添加 NM23 的 CD34⁺ 细胞的细胞培养, 所述 CD34⁺ 细胞已经在低温保藏的流动的血液单核细胞样品融化后进行过免疫磁性选择。这一研究的结果显示于图 8 中。

[0155] 图 8 显示来自 CD34⁺ 细胞的数据, 所述 CD34⁺ 细胞分别地纯化自源自相同流动血液捐赠样品的三个单个融化的单核细胞制品小瓶。在每种情况下, 并且如在上面报道的在先实验中所观察到的, 添加 NM23 H1 的细胞培养条件导致 CD34⁺ 细胞数目扩增超过最初接入培养物中的干细胞或祖细胞的最初数目并在极大的程度上超过在平行的对照培养物中观察到的扩增。

[0156] 这些结果清楚地说明 NM23 蛋白能够发挥其对于干细胞和 / 或祖细胞的有益生物学作用, 所述干细胞和 / 或祖细胞保存在低温保藏条件下 (一般用于运输或存档保存预定进行临床或研究使用的干细胞和 / 或祖细胞的条件)。将会容易理解的是这一发现进一步说明用 NM23 添加或处理细胞培养物提供的益处, 因为它显示 NM23 蛋白能够扩增预存的存档干细胞或祖细胞样品中的干细胞和 / 或祖细胞数目, 并且还能够在克服细胞损失程度, 所述的损伤一般是与保存细胞的“冷冻”相关联的 (在通过收获方法只获得相对少数目的干细胞或祖细胞的情况下是重要的)。

[0157] 人 NM23 蛋白对非人细胞培养物的作用

[0158] 2.3.5

[0159] 本发明人对人 NM23 蛋白促进干细胞和 / 或祖细胞扩增和存活的能力进行了初步研究, 所述干细胞和 / 或祖细胞源自不同的哺乳动物物种。这些结果表明添加 NM23 的益处跨越物种界限上是广泛有效的, 因而极大地提高的本发明可以有利的范围 (特别是涉及研究和 / 或开发的环境)。

[0160] 在预实验中, 本发明人取代表极原始造血干细胞的小鼠“侧”群细胞并且在存在或缺少 rh-NM23 H1 的情况下在具有支持性细胞因子混合物的液体培养基 (含有 SCF 20ng/ml, 血小板生成素 25ng/ml, IL-3 10ng/ml, IL-6 10ng/ml 和 Flt-3 配体 10ng/ml) 中培养这些细胞 5 天时间。

[0161] 随后将获得的培养细胞置于长期培养起始细胞 (LTCIC) 测定法中。在这种测定法中祖细胞的集落可以通过它们的特征性“鹅卵石”外表进行鉴定, 所述“鹅卵石”外表是由于它们在 LTCIC 测定法中所用的基质细胞下的增殖而产生的。在祖细胞经历过终端分化定型后, 它们随后穿过基因细胞层迁移并且在所述基质细胞上面分化。因而存在的鹅卵石的数目提供了干细胞 / 祖细胞数目的测量, 所述干细胞 / 祖细胞被引入细胞周期但其未曾经历终端分化。随后时间推移新的鹅卵石出现, 而后期发育出来的集落的发展反映出更多原始干细胞 / 祖细胞存在于用来接种 LTCIC 培养物的细胞群中。

[0162] 本发明人利用三种源自共同供体小鼠的独立分离的侧群起始 LTCIC 培养物。细胞培养条件的 15 天后对所述培养物分析鹅卵石区的存在和数目。这些实验的结果显示在图 9 中。

[0163] 在每种情况下都从 NM23 H1 处理的细胞中出现显著更高数目的鹅卵石集落,表明小鼠造血祖细胞 / 干细胞也在液体培养物中受提供 NM23 H1 的支持。尽管他们不希望被任何假说所束缚,本发明人相信这种效应可以作为这种事实的结果而出现,所述事实是 NM23 H1 的蛋白质序列及其小鼠同源物 (NM23M1) 是高度保守的。

[0164] 2.4 讨论.

[0165] 以上描述的实验说明添加 NM23 蛋白如 NM23-H1 在传统的和已确立的干细胞理论舞台上具有价值。CD34 单一阳性细胞能够得以维持并且事实上它们的数目在培养物中于大约三周的时期内提高的观察结果进一步说明本发明在干细胞介导的基因治疗中的适用性,因为培养时间与目前对于细胞的体外操作方案所需的时间是可比的。

[0166] 在我们的培养系统中 NM23 显示了延迟干细胞或祖细胞培养物作为整体成熟的一些能力,并且更令人注目的是,还在每个间隔区中扩增细胞的数目。有可能将添加 NM23 与有益的细胞因子混合物 (特别是除于在上述实验中所用的细胞因子之外的细胞因子混合物) 组合在一起可以进一步延迟成熟并且由此提供甚至更大的干细胞数目响应于 NM23 处理的扩增。

[0167] 除了由预定进行治疗性操作和使用的干细胞或祖细胞群添加 NM23 而提供的潜在临床益处外,这里给出的数据说明在 NM23 存在时的培养可以在为了科学研究和开发的目的的干细胞和 / 或祖细胞培养物的环境中具有显著的益处。全世界对于造血祖细胞和干细胞的生物学进行了大量的研究,但是直到现在这种研究受到缺少合适的细胞培养条件,方案和能够令人满意地支持干细胞和 / 或祖细胞扩增的培养基 (特别是在不存在细胞分化和 / 或成熟的情况下) 的限制。添加 NM23 蛋白能够克服,或者至少减少这些问题,所以将会意识到的是 NM23 蛋白如 NM23 H1 促进干细胞或祖细胞离体存活的能力具有相当的价值和科学重要性。上面给出的结果进一步说明添加 NM23 在源自不同哺乳动物物种的细胞的培养中是有效的。

[0001]

序列表

<110> 伯明翰大学, C.M. 邦斯

<120> 使用NM23的细胞培养, 包含NM23的细胞培养基和在NM23存在下培养的细胞的治疗性用途

<130> W072537PPC

<140> GB04/004826

<141> 2004-11-16

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 152

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Ala Asn Cys Glu Arg Thr Phe Ile Ala Ile Lys Pro Asp Gly Val
 1 5 10 15

Gln Arg Gly Leu Val Gly Glu Ile Ile Lys Arg Phe Glu Gln Lys Gly
 20 25 30

Phe Arg Leu Val Gly Leu Lys Phe Met Gln Ala Ser Glu Asp Leu Leu
 35 40 45

Lys Glu His Tyr Val Asp Leu Lys Asp Arg Pro Phe Phe Ala Gly Leu
 50 55 60

Val Lys Tyr Met His Ser Gly Pro Val Val Ala Met Val Trp Glu Gly
 65 70 75 80

Leu Asn Val Val Lys Thr Gly Arg Val Met Leu Gly Glu Thr Asn Pro
 85 90 95

Ala Asp Ser Lys Pro Gly Thr Ile Arg Gly Asp Phe Cys Ile Gln Val
 100 105 110

Gly Arg Asn Ile Ile His Gly Ser Asp Ser Val Glu Ser Ala Glu Lys
 115 120 125

[0002]

Glu Ile Gly Leu Trp Phe His Pro Glu Glu Leu Val Asp Tyr Thr Ser
 130 135 140

Cys Ala Gln Asn Trp Ile Tyr Glu
 145 150

<210> 2

<211> 459

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> NM23 H1蛋白的cDNA

<400> 2
 atggccaact gtgagcgtac cttcattgcg atcaaaccag atgggggtcca gcggggtctt 60
 gtgggagaga ttatcaagcg ttttgagcag aaaggattcc gccttgttgg tctgaaattc 120
 atgcaagctt ccgaagatct tctcaaggaa cactacgttg acctgaagga cegtccattc 180
 ttgccggcc tgggtgaaata catgcactca gggccggtag ttgccatggt ctgggagggg 240
 ctgaatgtgg tgaagacggg ccgagtcatg ctcggggaga ccaaccctgc agactccaag 300
 cctgggacca tccgtggaga cttctgcata caagtggca ggaacattat acatggcagt 360
 gattctgtgg agagtgcaga gaaggagatc ggcttgggt ttcaccctga ggaactggta 420
 gattacacga gctgtgctca gaactggatc tatgaatga 459

1 mancertia ikpdgvqrgl vgeiikrfeq kgfrlvglkf mqasedllke hyvdldkdrpf
61 faglvkymhs gpvvamvweg lrvvtgrvm lgetnpadsk pgtirgdfci qvgrniihgs
121 dsvesaekel glwfhpeelv dytscaqrwi ye

序列 ID NO. 1

1 atggccaact gtgagcgtac cticattgcg atcaaaccag atggggcca gcggggtctt
61 gtgggagaga ttatcaagcg tttgagcag aaaggatcc gcctgttgg tctgaaattc
121 atgcaagctt ccgaagatct tctcaaggaa cactacgttg acctgaagga ccgtccattc
181 tttgccggcc tgggtgaaata catgcactca gggccggtag ttgccatggt ctgggagggg
241 ctgaatgtgg tgaagacggg ccgagtcattg ctgggggaga ccaaccctgc agactccaag
301 cctgggacca tccgtggaga ctctgcata caagtggca ggaacattat acatggcagt
361 gattctgtgg agagtgcaga gaaggagatc ggcttgtgtt ttcaccctga ggaactggta
421 gattacacga gctgtgctca gaactggatc tatgaatga

序列 ID NO. 2

图 1

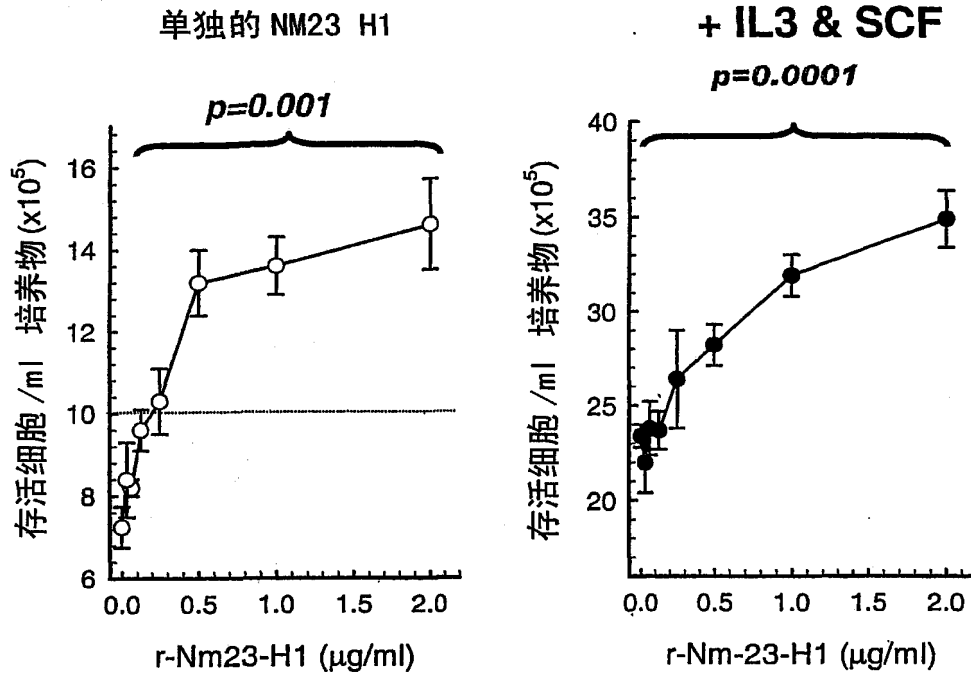


图 2

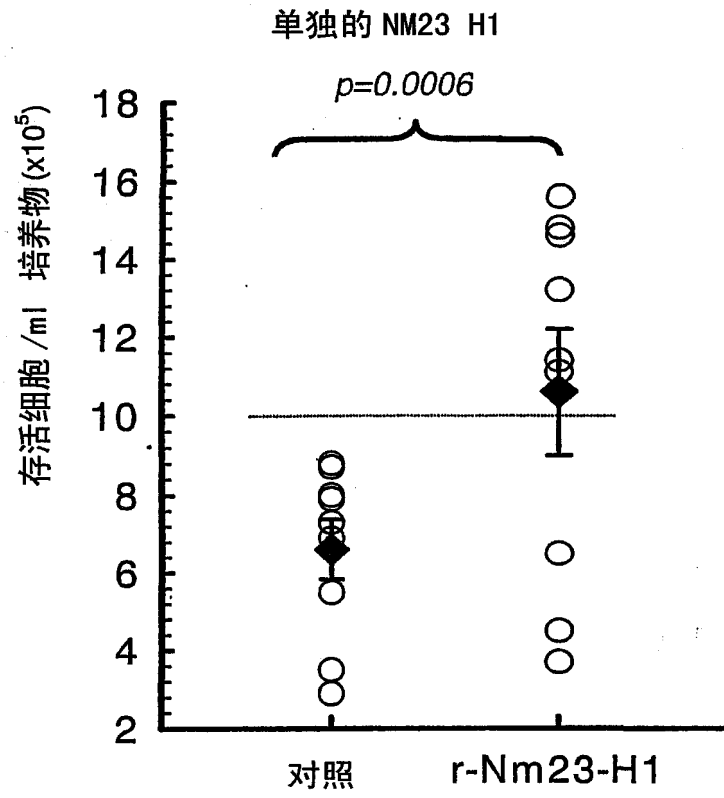


图 3

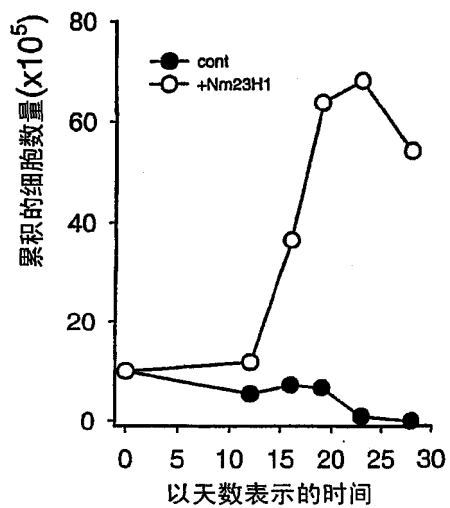


图 4

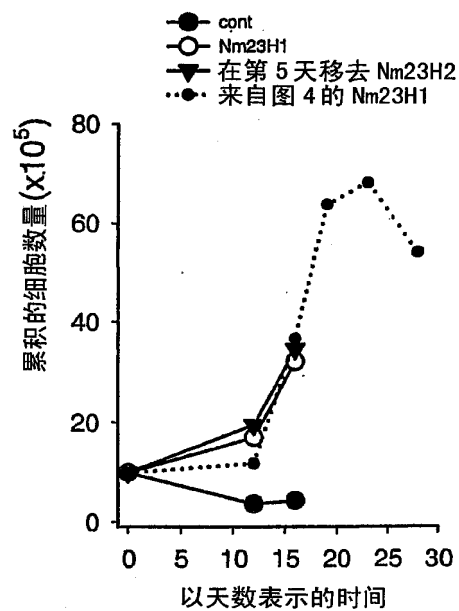


图 5

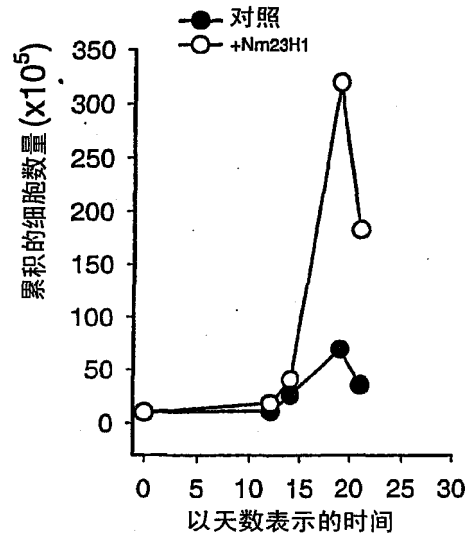


图 6

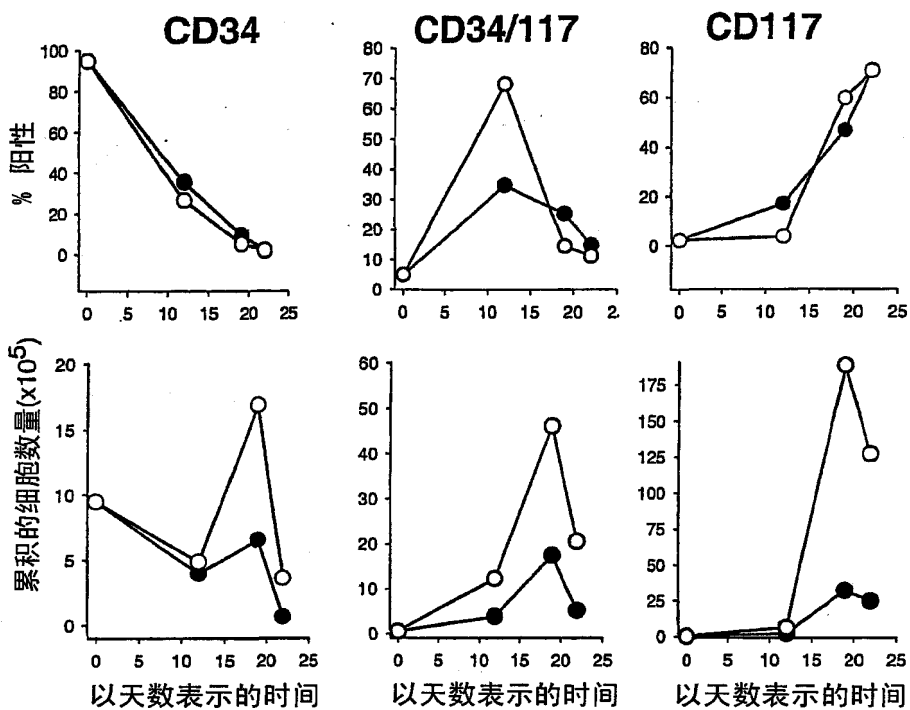


图 7

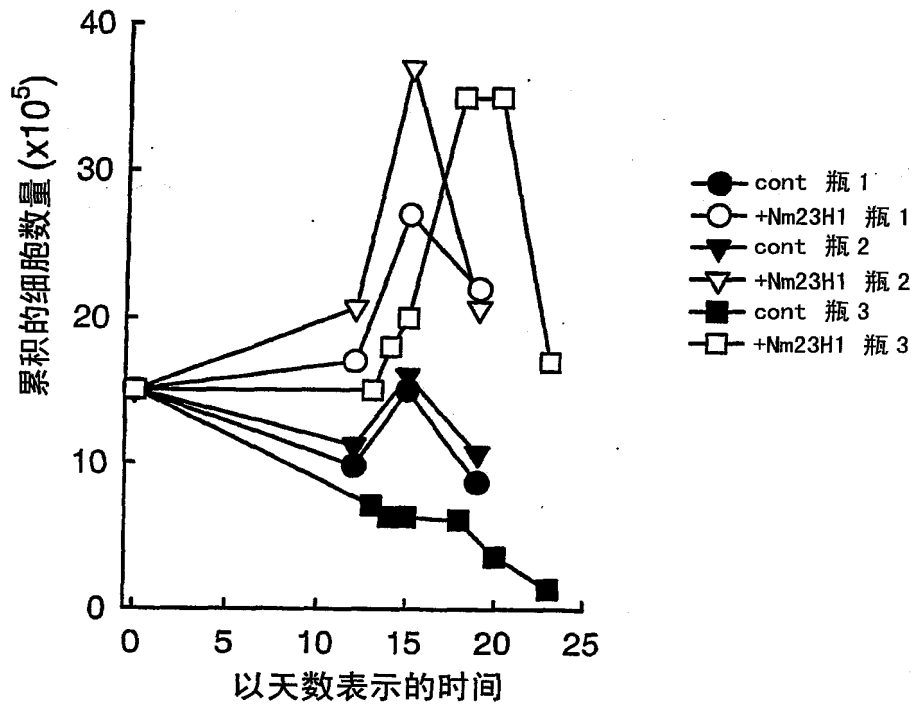


图 8

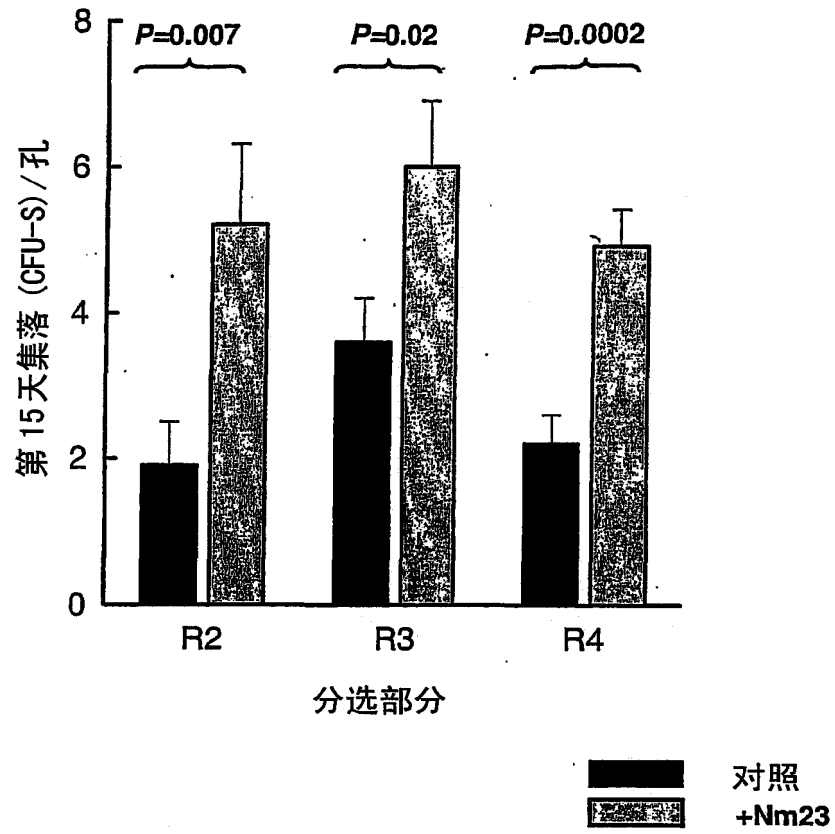


图 9