



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116507733 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 28

(21) 申请号 202180075229.X

(22) 申请日 2021.09.07

(30) 优先权数据

20382792.8 2020.09.07 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.05.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/074612 2021.09.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/049306 EN 2022.03.10

(71) 申请人 希门尼斯迪亚兹健康研究基金会研
究所

地址 西班牙马德里

申请人 能源环境和技术研究中心OAMP
生物学网络研究财团中心

(72) 发明人 罗萨里奥·赫瓦斯·萨尔塞多
达米安·加西亚·奥尔莫

马利亚诺·加西亚·阿兰茨

米里亚姆·荷南德·罗德里格斯

胡安·安东尼奥·布埃伦·龙赛罗
罗莎·玛丽亚·亚涅斯·冈萨雷斯
玛丽亚·费尔南德斯·加西亚
梅赛德斯·洛佩斯·桑塔拉
玛丽娜·英玛拉达·盖琳·费雷拉

(74) 专利代理机构 华进联合专利商标代理有限
公司 44224

专利代理师 陈习 黄爱娇

(51) Int.Cl.

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 15/24 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书13页

序列表2页 附图43页

(54) 发明名称

共表达CXCR4和IL-10的间充质干细胞及其
用途

(57) 摘要

本发明涉及间充质干细胞(MSC),其特征在
于所述间充质干细胞用整合表达载体转导以稳
定地共表达趋化因子受体4型CXCR4和白介素IL-
10。本发明还涉及所述MSC用作药物的用途,特别
是用于治疗炎症性疾病和/或自身免疫性疾病。

1. 一种DNA表达盒, 包含:
 - a. 启动子;
 - b. 编码趋化因子受体4型CXCR4的序列; 和
 - c. 编码白介素IL-10的序列。
2. 根据权利要求1所述的表达盒, 其特征在于, 所述编码趋化因子受体4型CXCR4的序列为SEQ ID NO:1, 并且所述编码白介素IL-10的序列为SEQ ID NO:3。
3. 根据权利要求1或2任一项所述的表达盒, 还包含用于增加转基因表达的调控元件。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的表达盒, 其中所述调控元件为土拨鼠肝炎病毒调控元件(WPRE)RNA输出信号序列或其功能变体或片段。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的表达盒, 还包含位于所述编码趋化因子受体4型CXCR4的序列和所述编码白介素IL-10的序列之间的编码自催化肽的序列。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的表达盒, 其中所述自催化肽为E2A, 优选SEQ ID NO:2。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的表达盒, 其中所述启动子为人磷酸甘油酸激酶(PGK) 启动子序列或其功能同源物或变体。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的表达盒, 按5' 至3' 的顺序包含:
 - a. 人磷酸甘油酸激酶(PGK) 启动子序列或其功能同源物或变体;
 - b. 编码趋化因子受体4型CXCR4的序列;
 - c. 编码自催化肽E2A的序列;
 - d. 编码白介素IL-10的序列; 和
 - e. 土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的表达盒, 按5' 至3' 的顺序包含:
 - a. 人磷酸甘油酸激酶(PGK) 启动子序列或其功能同源物或变体;
 - b. 编码趋化因子受体4型CXCR4的SEQ ID NO:1;
 - c. 编码自催化肽E2A的SEQ ID NO:2;
 - d. 编码白介素IL-10的SEQ ID NO:3; 和
 - e. 土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。
10. 一种重组基因递送整合载体, 包含权利要求1至9中任一项所述的表达盒。
11. 根据权利要求10所述的重组基因递送整合载体, 其特征在于, 所述重组基因递送整合载体为慢病毒载体。
12. 一种细胞, 包含权利要求1至9中任一项所述的表达盒, 或权利要求10或11任一项所述的重组基因递送整合载体。
13. 根据权利要求12所述的细胞, 其特征在于, 所述细胞为源自骨髓、胎盘、脐带、羊膜、月经血、外周血、唾液腺、皮肤和包皮、滑液、羊水、子宫内膜、脂肪组织、脐带血和/或牙齿组织的间充质干细胞。
14. 一种药物组合物, 包含权利要求10或11任一项所述的重组基因递送整合载体, 或权利要求12或13任一项所述的细胞, 以及任选地, 药学上可接受的赋形剂或载体。
15. 用作药物用途的权利要求10或11任一项所述的基因递送整合载体, 或权利要求12或13任一项所述的细胞。

16. 根据权利要求15所述用途的权利要求10或11任一项所述的基因递送整合载体,或权利要求12或13任一项所述的细胞,其用于治疗炎症性疾病。

17. 根据权利要求15或16任一项所述用途的权利要求10或11任一项所述的基因递送整合载体或权利要求12或13任一项所述的细胞,其用于治疗移植物抗宿主病 (GvHD)、败血症、类风湿性关节炎、或炎症性肠病。

共表达CXCR4和IL-10的间充质干细胞及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及医学领域。特别地,本发明涉及间充质干细胞(MSC),其特征在于所述间充质干细胞用整合表达载体转导,以稳定地共表达趋化因子受体4型CXCR4和白介素IL-10。本发明还涉及所述MSC用作药物的用途,特别是用于治疗炎症性疾病和/或自身免疫性疾病。

背景技术

[0002] MSC是对活化的淋巴样细胞(包括T细胞、B细胞、自然杀伤细胞和树突细胞)具有免疫调节作用的多能成体基质细胞。MSC展示在发炎部位归巢的能力,在发炎部位它们可以调节炎症性反应并有助于修复受损组织。

[0003] 在动物模型中,已经在再生医学以及炎症性疾病模型和自身免疫性疾病模型中证明MSC的效力。在I/II期临床试验中,已证明MSC的安全特性,并且已显示对不同疾病(如,类固醇抗性移植抗宿主病(GVHD)、严重系统性红斑狼疮、复杂肛周瘘、膝骨关节炎或慢性完全性截瘫等)的临床益处的初步证据。尽管在动物模型和早期临床试验中获得了结果,但仅在三种III期临床试验中,MSC的治疗效力相比标准疗法显示统计学显著性。这些临床试验包括治疗复杂肛周瘘(NCT00475410),儿童类固醇难治性GVHD(NCT02336230)和慢性晚期缺血性心力衰竭(NCT01768702)。

[0004] 在可能降低MSC治疗效力的参数中,值得一提的是,这些细胞的离体扩增已显示降低在MSC中观测到的归巢受体的适度表达,并且还诱导这些细胞的衰老。

[0005] 因此,本发明集中于改善MSC的治疗效力,特别是通过改善MSC向发炎部位的迁移,以及通过分泌免疫抑制细胞因子和抗炎细胞因子,从而增强标准未修饰MSC的治疗效力。

发明内容

[0006] 发明简述

[0007] 如上所述,本发明集中于相比于标准未修饰MSC,改善MSC的治疗效力,特别是通过增强MSC向发炎部位的迁移并且通过增强免疫抑制细胞因子和抗炎细胞因子的释放。

[0008] 为此,本发明的发明人使用了用共表达趋化因子受体4型CXCR4和白介素IL-10的整合表达载体转导的MSC。

[0009] 特别地,在本发明的背景下构建了编码CXCR4和IL-10的慢病毒载体。该表达载体用于转导MSC,从而以稳定的方式共表达CXCR4和IL-10。

[0010] 实施例2.1显示,用CXCR4-IL10 mRNA转染的MSC在局部炎症的小鼠模型中产生抗炎特性。然而,与WT MSC相比,这些细胞未显示增强的抗移植抗宿主病(GvHD)特性(实施例2.2)。与用CXCR4-IL10 mRNA转染的MSC相反,相比于WT MSC,用携带CXCR4-IL10序列的慢病毒载体转导的MSC(实施例2.3),不仅产生增强的体外免疫调节特性(实施例2.4和2.5)和体内局部抗炎作用(实施例2.3至2.6),而且还明显地形成了显著的抗GvHD作用,如本发明的实施例2.7所示。

[0011] 事实上,本发明包括的体外实验显示,这些分子的稳定共表达高效地增强MSC向SDF-1的迁移并改善这些细胞的免疫抑制特性。此外,在诱导局部足垫炎症(pad inflammation)的小鼠模型中证明异位表达CXCR4和IL10的MSC优先归巢到发炎的足垫。总之,这些结果证明,与WT MSC相比,人MSC中的特异性归巢分子和抗炎分子(如CXCR4和IL10)的稳定共表达在这些细胞中赋予增强的抗炎潜力。这种用共表达CXCR4和IL10的整合表达载体转导的新一代MSC的使用,将对治疗炎症性疾病和/或自身免疫性疾病的临床细胞疗法具有显著的影响。

[0012] 因此,总体而言,本文提出了用共表达CXCR4和IL-10二者的整合表达载体转导的MSC用作药物的用途,特别是用于治疗炎症性疾病和/或自身免疫性疾病。

[0013] 因此,本发明的第一实施方式涉及包含DNA序列的表达盒(以下称为本发明的表达盒),所述DNA序列依次包含:a)启动子,b)编码趋化因子受体4型CXCR4的序列,和c)编码白介素IL-10的序列。在优选实施方式中,表达盒还包含用于增加转基因表达的调控元件。在优选实施方式中,调控元件是土拨鼠肝炎病毒调控元件(WPRE)RNA输出信号序列或其功能变体或片段。在优选实施方式中,表达盒还包含位于编码趋化因子受体4型CXCR4的序列和编码白介素IL-10的序列之间的编码自催化肽的序列。在优选实施方式中,自催化肽是E2A。在优选实施方式中,启动子是人磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子序列或其功能同源物或变体。在优选实施方式中,表达盒按5'至3'的顺序包含:a)人磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子序列或其功能同源物或变体,b)编码趋化因子受体4型CXCR4的序列,c)编码自催化肽E2A的序列,d)编码白介素IL-10的序列;和d)土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。

[0014] 在优选实施方式中,表达盒包含人基因CXCR4(SEQ ID NO:1)和IL10(SEQ ID NO:3)的非天然密码子优化的序列。在优选实施方式中,编码自催化肽E2A的序列是SEQ ID NO:2,其用于使两种分子(CXCR4和IL10)易于共表达。

[0015] 本发明的第二实施方式涉及包含上述定义的表达盒的重组基因递送载体(下文称为本发明的重组基因递送载体)。在优选实施方式中,重组基因递送载体是慢病毒载体。在优选实施方式中,本发明的载体是永久合并入宿主染色体的整合载体。

[0016] 本发明的第三实施方式涉及包含本发明的表达盒或重组基因递送载体的细胞(下文称为本发明的细胞)。在优选实施方式中,细胞是源自骨髓、胎盘、脐带、羊膜、月经血、外周血、唾液腺、皮肤和包皮、滑液、羊水、子宫内膜、脂肪组织、脐带血和/或牙齿组织的MSC。

[0017] 本发明的第四实施方式涉及药物组合物,其包含本发明的重组基因递送载体或细胞,以及任选地,药学上可接受的赋形剂或载体(carrier)。

[0018] 本发明的第五实施方式涉及用作药物用途的本发明的基因递送载体或细胞。在优选实施方式中,本发明涉及用于治疗炎症性疾病和/或自身免疫性疾病(例如,移植物抗宿主病(GvHD)、败血症或类风湿性关节炎)的本发明的基因递送载体或细胞。或者,该实施方式涉及用于治疗炎症性疾病和/或自身免疫性疾病(例如,移植物抗宿主病(GvHD)、败血症或类风湿性关节炎)的方法,该方法包括向患者施用治疗有效剂量或量的本发明的基因递送载体或细胞,或包含本发明的基因递送载体或细胞的药物组合物。

[0019] 为了本发明的目的,定义以下术语:

[0020] • “包含”意指包括但不限于词语“包含”之后的任何一个。因此,术语“包含”的使用表示所列元素是必需或强制性的,但是其他元素是任选的并且可以存在或可以不存在。

[0021] • “由……组成”意指“包括且限于”短语“由……组成”之后的任何一个。因此，短语“由……组成”表示所列元素是必需或强制性的，并且不可以存在其他元素。

[0022] • “药学上可接受的赋形剂或载体”是指可以任选地包括在本发明的药物组合物中并且对患者不造成显著的毒理学副作用的赋形剂。

[0023] • “治疗有效剂量或量”在本发明中是指细胞或药物组合物如上所述施用并在患有炎症性或自身免疫性疾病的对象中引起积极治疗反应的情况。所需的确切量将在对象之间变化，取决于对象的种族、年龄和一般状况，所治疗病症的严重程度，施用方式等。在任何个别情况下，适当的“有效”量可以由本领域普通技术人员使用常规实验基于本文提供的信息来确定。

附图说明

[0024] 图1.用双顺反子CXCR4-IL10 mRNA转染的MSC在小鼠局部炎症模型中的体内效力的证据。与WT-MSC相比，观测到用CXCR4-IL10 mRNA转染的MSC的抗炎作用增强。

[0025] 图2.用双顺反子CXCR4-IL10 mRNA转染的MSC在GVHD小鼠模型中没有体内效力。A)存活曲线，B)体重，和C)临床评分。

[0026] 图3. (A) 用于共表达CXCR4和IL-10的DNA双顺反子慢病毒载体的设计。与WT-MSC相比，CXCR4/IL10-MSC中 (B) CXCR4水平，(C) IL-10分泌和 (D) 每个细胞的载体拷贝数目 (VCN/细胞)。N.D. 未检出。

[0027] 图4.用DNA-PGK-CXCR4-IL10慢病毒载体转导的MSC的体外特性。A) 与WT-MSC相比，CXCR4/IL10-MSC的免疫表型。B) 与WT-MSC相比，CXCR4/IL10-MSC分化成骨组织的能力。C) 与WT-MSC相比，CXCR4/IL10-MSC分化成脂肪组织的能力。

[0028] 图5.与WT-MSC相比，用DNAPGK-CXCR4-IL10慢病毒载体转导的MSC的迁移能力增强。A) WT-MSC和CXCR4/IL10-MSC对SDF-1反应的迁移能力的代表图。B) WT-MSC和CXCR4/IL10-MSC对SDF-1反应的迁移能力的定量。

[0029] 图6.用DNA PG-CXCR4-IL10慢病毒载体转导的MSC的体外免疫抑制能力增强。A) 用于评估MSC体外免疫抑制活性的实验系统方案。B) 相比WT-MSC，CXCR4/IL10-MSC显示改善的免疫抑制能力。

[0030] 图7.用DNAPGK-CXCR4-IL10慢病毒载体转导的MSC在小鼠局部炎症模型中的体内效力增强。A) 用于评估WT-MSC和CXCR4/IL10-MSC的体内抗炎作用的实验系统方案。B) 与WT-MSC相比，用PGK-CXCR4-IL10慢病毒载体转导的MSC抗炎作用增强。

[0031] 图8.与WT-MSC相比，用DNAPGK-CXCR4-IL10 LV转导的MSC的抗GVHD增强：GVHD临床症状的分析。A) 用于评估WT-MSC和CXCR4/IL10-MSC的体内抗-GVHD的实验系统方案。B) 比较不同实验组的GVHD评分。

[0032] 图9.与WT-MSC相比，用DNAPGK-CXCR4-IL10 LV转导的MSC的抗GVHD增强。A) 受体小鼠的外周血中人CD45⁺细胞的流式细胞术分析显示GVHD人源化小鼠模型中异种供体白细胞的扩增减少。B) 对GVHD人源化小鼠模型的脾脏中的人CD45⁺细胞进行流式细胞术分析，证实异种供体白细胞在该免疫器官中的浸润减少。

[0033] 图10.与WT-MSC相比，用DNAPGK-CXCR4-IL10 LV转导的MSC的抗GVHD增强：表达IFN- γ 或IL10的供体淋巴细胞的浸润分析。A) 在输注CXCR4-IL10-MSC的NSG小鼠的脾脏中负

责GVHD病的分泌INF γ 的人T细胞含量降低。B)在用CXCR4-IL10-MSC处理具有GVHD的NSG小鼠的脾脏中分泌IL10的人T细胞含量增加。

[0034] 图11.与WT-MSC相比,用DNAPGK-CXCR4-IL10 LV转导的MSC的抗GvHD增强:通过qPCR定量受体小鼠中的人因子。A)用WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC处理的NSG脾脏中促炎因子(IFN γ 、IL-17和IL-22)的分析。B)用WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC处理的NSG脾脏中抗炎因子(IL-5或FoxP3)的分析。

[0035] 图12.移植人单核细胞并输注WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC的NSG小鼠的体重和GVHD临床评分的变化。(A)随时间显示为百分比的体重的变化,假定第0天的体重对应于100%。(B)不同移植组中随时间确定的疾病临床评分。在体重减轻、体态、活动、毛发质地、皮肤完整性和出现腹泻方面评估总体GVHD评分。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ 。

[0036] 图13.移植人单核细胞并输注WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC的NSG小鼠在移植之后3周外周血中循环人细胞的流式细胞术分析。(A)循环人CD45 $^{+}$ 细胞的百分比。(B)循环人CD3 $^{+}$ T细胞的百分比。(C)将CD3 $^{+}$ T细胞表征为人CD4 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ 或CD4 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T细胞。每个柱代表平均值 $\pm$ SEM。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ 。

[0037] 图14.移植人单核细胞并输注WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC的NSG小鼠中循环人CD4 $^{+}$ 和CD8 $^{+}$ T细胞(初始、效应和记忆T细胞)的表型特征。(A)CD4 $^{+}$ T细胞中的效应T/初始T细胞比率。(B)CD8 $^{+}$ T细胞中的效应T/初始T细胞比率。每个柱代表平均值 $\pm$ SEM。 $*p<0.05$, $**p<0.01$ 。

[0038] 图15.NSG小鼠移植人单核细胞并输注WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC之后3周外周血中循环人T细胞中的活化标志物的流式细胞术分析。标记为CD3 $^{+}$ CD45 $^{+}$ 的T细胞的活化特性。每个柱代表来自两个不同供体的MNC的两个不同实验的数据的平均值 $\pm$ SEM($n=10-12$ 只小鼠/组)。 $*p<0.05$ 。

[0039] 图16.NSG小鼠移植人单核细胞并输注WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC之后3周外周血中循环人CD3 $^{+}$ T细胞中的耗竭标志物的分析。CD3 $^{+}$ CD45 $^{+}$ 人T细胞的抑制特性。

[0040] 图17.移植人单核细胞并输注WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC之后3周NSG移植小鼠的血清中涉及GVHD的人细胞因子和生长因子水平。每个柱代表平均值 $\pm$ SEM。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ 。

[0041] 图18.NSG小鼠移植人单核细胞并输注WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC之后3周脾脏中造血细胞的流式细胞术分析。以CD3 $^{+}$ 、CD19 $^{+}$ 、CD56 $^{+}$ 、CD14 $^{+}$ 和CD15 $^{+}$ 细胞分布的循环人CD45 $^{+}$ 细胞的百分比。每个柱代表平均值 $\pm$ SEM。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ 。

[0042] 图19.脾脏中T细胞亚群的表型特征。(A)CD3 $^{+}$ CD45 $^{+}$ 细胞群中人CD4 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ 或双阳性T细胞的分布。(B)CD4 $^{+}$ T细胞群中初始、效应和记忆亚群的分布。(C)CD8 $^{+}$ T细胞群中初始、效应和记忆亚群的分布。每个柱代表平均值 $\pm$ SEM。

[0043] 图20.NSG小鼠移植人单核细胞并输注WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC之后3周脾脏中人T细胞的活化特性的流式细胞术分析。(A)CD3 $^{+}$ CD45 $^{+}$ 标记的T细胞的活化特性。(B)CD4 $^{+}$ T细胞亚群的活化特性。(C)CD8 $^{+}$ T细胞亚群的活化特性。每个柱代表平均值 $\pm$ SEM。 $*p<0.05$, $**p<0.01$ 。

[0044] 图21.NSG小鼠移植人单核细胞并输注WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC之后3周脾脏中人T细胞的耗竭特性的流式细胞术分析。(A)CD3 $^{+}$ CD45 $^{+}$ T细胞的抑制特性。(B)CD4 $^{+}$ T细胞亚群的

抑制特性。(C) CD8⁺T细胞亚群的活化特性。每个柱代表平均值±SEM。*p<0.05。

[0045] 图22. 人CD19⁺B细胞亚群在脾脏中的表型特征(初始B细胞CD24⁻CD38⁻CD27⁻; 过渡B细胞CD24^{低/+}CD38⁺CD27⁻; 记忆B细胞和浆细胞CD24^{低/+}CD38⁺CD27⁺)。每个柱代表平均值±SEM。*p<0.05。

[0046] 图23. 移植人单核细胞并输注WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC之后3周NSG小鼠的脾脏中人B细胞向调节性B细胞极化的流式细胞术分析。(A) 每组的代表性流式细胞术分析和IL10⁺过渡B细胞百分比的图示。(B) 每组的代表性流式细胞术分析和IL10⁺记忆B细胞百分比的图示。每个柱代表平均值±SEM。*p<0.05。

[0047] 图24. 移植人单核细胞并输注WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC的NSG小鼠的肺的组织病理学分析。(A) H/E染色(左)、人抗-CD3免疫组织化学染色(中间)和人抗-CD8免疫组织化学染色(右)的代表性图像。(B) 肺中浸润性CD3⁺T细胞的定量。(C) 肺中浸润性CD8⁺T细胞的定量。每个柱代表平均值±SEM。*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001。

[0048] 图25. 移植人单核细胞并输注WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC的NSG小鼠的肝脏的组织病理学分析。(A) H/E染色(左)、人抗-CD3免疫组织化学染色(中间)和人抗-CD8免疫组织化学染色(右)的代表性图像。(B) 肝脏中浸润性CD3⁺T细胞的定量。(C) 肝脏中浸润性CD8⁺T细胞的定量。每个柱代表平均值±SEM。*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001。

[0049] 图26. DSS诱导结肠炎的实验设计。在饮用水中使用范围为2.5%至3%的不同浓度的葡聚糖硫酸钠(DSS), 7天期间自由饮用。第5天腹膜内输注单剂量的WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC(3×10⁶个细胞/小鼠)。为了长期评估, 12周后进行饮用水中DSS 7天周期的再次激发。

[0050] 图27. 腹膜内施用WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC后小鼠的DSS诱导的结肠炎状态。疾病活动指数(DAI) (A), 体重倍数变化(B) 和存活(C)。用DSS处理后第10天结肠组织的代表性图像(放大4倍和10倍) (D)。健康, n=14; DSS, n=26; DSS+WT-MSC, n=21; 以及DSS+CXCR4/IL10-MSC, n=26。数据表示为疾病活动指数以及以百分比表示的相对于第0天随时间的体重倍数变化的平均值和标准误。存活以百分比表示。通过Mann-Whitney U检验和长秩检验(long rank test)分析显著性, 并通过以下表示:*p<0.05和****p<0.0001DSS相比健康; \$p<0.05DSS+WT-MSC相比DSS; &p<0.05和&p<0.01DSS+CXCR4/IL10-MSC相比DSS; 以及#p<0.05DSS+CXCR4/IL10-MSC相比DSS+WT-MSC。结果对应于5个独立实验。

[0051] 图28. 施用WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC的3个月之后DSS诱导的小鼠结肠炎状态。疾病活动指数(DAI) (A), 体重倍数变化(B) 和存活(C)。健康, n=10; DSS, n=15; DSS+WT-MSC, n=15; 以及DSS+sCXCR4-IL10-MSC, n=15。数据表示为疾病活动指数以及以百分比表示的相对于第0天随时间的体重倍数变化的平均值和标准误。存活以百分比表示。通过Mann-Whitney U检验和长秩检验分析显著性, 并通过以下表示:**p<0.01和****p<0.0001DSS相比健康; &p<0.05DSS+CXCR4/IL10-MSC相比DSS; 以及#p<0.05和##p<0.01DSS+CXCR4/IL10-MSC相比DSS+WT-MSC。结果对应于3个独立实验。

[0052] 发明详述

[0053] 本发明通过以下示出的实施例进行说明, 但是并无限制本发明保护范围的意图。

[0054] 实施例1材料和方法

[0055] 实施例1.1脂肪来源MSC(Ad-MSC)的产生和扩增

[0056] 在知情同意后,通过手术切除从健康供体获得脂肪组织样品。将脂肪组织分解并用胶原酶A(Serva,德国)以2mg/ml最终浓度于37℃消化4小时。将经消化的样品通过100μm尼龙过滤器(BD Bioscience,USA)过滤并离心10分钟。将细胞沉淀重新悬浮于补充有5%血小板裂解物(Cook medical,USA)、1%青霉素/链霉素(Gibco)和1ng/ml人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF,Peprotech,USA)的α-MEM(Gibco,USA)中。将细胞以10,000个细胞/cm²的浓度接种于培养瓶(Corning,USA)中并于37℃培养。为了扩增Ad-MS,每2至4天更换一次细胞培养基,并且在达到接近汇合(70%-90%)时使用0.25%胰蛋白酶/EDTA(Sigma-Aldrich,USA)连续传代贴壁细胞。使用4至8代的Ad-MS进行体外和体内研究。

[0057] 实施例1.2WT-MS和CXCR4/IL10-MS的表征

[0058] 如通过间充质细胞试剂盒(Immunostep,西班牙)所述,通过流式细胞仪(Fortessa,BD Bioscience,USA)对WT-MS和用CXCR4-IL10慢病毒载体转导的MS(CXCR4/IL10-MS)进行免疫表型表征。这些研究中包括的单克隆抗人抗体如下:CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD166、CD45、CD19、HLA-DR、CD14和CD34。用FlowJo X版本(FlowJo LLC,USA)分析数据。

[0059] 根据制造商的方案,分别使用NH-OsteoDiff培养基和NH-AdipoDiff培养基(Miltenyi Biotec,德国)测定Ad-MS的成骨分化能力和脂肪分化能力。利用Fast BCIP/NCP(Sigma-Aldrich)染色后可看见碱性磷酸酶沉积物,同时利用光学显微镜(Nikon,德国)可看见脂质液滴。

[0060] 实施例1.3DNACXCR4/IL10慢病毒载体的构建

[0061] 通过用AgeI和SacII限制性酶(New England Biolabs,USA)同时消化pCCL.PGK.FANCA.Wpre*质粒(9087bp)来获得含有慢病毒骨架和PGK启动子(7362bp)的片段,所述AgeI和SacII限制性酶的限制性位点分别在5'端和3'端消除FANCA转基因。利用NucleoSpin凝胶和PCR Clean-up试剂盒(Macherey-Nagel,德国)从琼脂糖凝胶纯化经消化的无转基因的慢病毒骨架。通过聚合酶链式反应(PCR),以用于mRNA合成的pUC57质粒作为模板,获得含有人CXCR4和IL10的密码子优化序列的片段。每个质粒使用两个特异性引物进行PCR,所述引物包括5'端AgeI和SacII限制性位点以及CXCR4或IL10转基因的最前或最后20bp。根据靶大小,按照Herculase II融合酶的方案(Agilent,USA)进行扩增,不使用二甲基亚砜(DMSO),并建立58℃的退火温度。PCR产物用AgeI和SacII同时进行消化,并使用NucleoSpin凝胶和PCR Clean-up试剂盒通过柱进行纯化。

[0062] 将经消化的慢病毒骨架和感兴趣的片段与T4 DNA连接酶(New England Biolabs)连接,保持靶:载体比为5:1。将连接的产物转化入Stable3细菌,以获得pCCL.PGK-CXCR4-IL10.Wpre*质粒。

[0063] 实施例1.4慢病毒载体的产生

[0064] 在该工作中使用的所有自失活HIV-1衍生载体都是通过第二代包装系统在HEK293T细胞中产生,以获得VSV-G假型病毒。将总量 12×10^6 个细胞在前一天铺板于150mm直径平板中。按照以前描述的CaCl₂ DNA沉淀法,细胞在150mm直径平板中以70%-80%汇合时进行转染。简言之,转染前1小时用含有10% HyClone(GE Healthcare,USA)和1%青霉素/链霉素的新鲜DMEM-Glutamax更换培养基。新鲜制备含有转基因、病毒基因组和包装构建体的三种质粒的等分子混合物。每个平板的HEK293 T细胞用22.5μg基因转移质粒、12μg

携带异源VSVg包膜的pMD2.VSVg包装质粒(PlasmidFactory,德国)和27.5μg携带gag-pol-rev病毒基因的pCMVdR8.74包装质粒(PlasmidFactory)进行转染。以3.8mL超纯H₂O的最终体积来制备这些质粒混合物,并小心地加入450μl 2.5M CaCl₂。室温下孵育5min之后,逐滴地加入3.8mL2X Hank's缓冲盐水(HBS)缓冲液(100mM HEPES(Gibco)、281mM NaCl、1.5mM Na₂HPO₄,pH=7.13),允许形成Ca²⁺沉淀。将该溶液加入HEK293 T细胞中使那些沉淀整合。5小时之后,用新鲜培养基更换含有沉淀的培养基。转染后48小时收集上清液。收获上清液,使用0.22μm孔径的过滤器(Millipore,Merck KGaA,德国)过滤,并于4℃以20,000rpm超离心2小时来进行浓缩。然后,将病毒沉淀于4℃悬浮于DMEM中至少1小时,旋转以丢弃细胞碎片,并以100μl的等分试样于-80℃保存。

[0065] 实施例1.5 Ad-MSC的转导

[0066] 实施两种不同的策略以转导人Ad-MSC:贴壁MSC的转导和悬浮MSC的转导。在这组实验中,在转导过程期间加入转导增强子(TE),目的是提高转导效率。

[0067] 实施例1.6 CXCR4和IL-10蛋白共表达

[0068] 利用PE缀合的抗-人CXCR4抗体(Biolegend,USA)于4℃标记30min之后,通过流式细胞术测定CXCR4在Ad-MSC细胞表面的表达。使用人IL10 Quantikine ELISA试剂盒(R&D System,USA)测量培养细胞的上清液中的Ad-MSC分泌的IL10水平。

[0069] 使用含有蛋白酶抑制剂混合物(Merck Millipore,德国)的RIPA缓冲液(ThermoFisher Scientific,USA)从Ad-MSC分离出总蛋白提取物。将20微克的每种细胞裂解物溶解于4%-12%聚丙烯酰胺凝胶(Bio-Rad,USA)中并转移到PVDF膜(Bio-Rad)。用含5%v/v脱脂干奶粉的0.1%Tween-20 PBS封闭膜。样品通过与在封闭溶液中稀释的兔单克隆抗-人CXCR4抗体(Abcam,UK)孵育来进行免疫印迹。将小鼠抗-人Vinculin(Abcam)用作上样对照。使用ChemiDoc MP系统和ImageLab软件(Bio-Rad),利用Clarity Western ECL底物(Bio-Rad)对印迹进行可视化。

[0070] 实施例1.7细胞迁移实验

[0071] 在具有8μm孔聚碳酸酯膜插入物(Costar,Cambridge,MA)的transwell中实施迁移实验。将5×10³个Ad-MSC置于transwell组件的上插入室中。下室含有最终浓度为100ng/ml的鼠SDF-1或人SDF-1(Peprotech,USA)。孵育24小时后,用棉签轻轻刮擦膜的上部以去除未迁移的细胞,并用PBS洗涤。将膜用3.7%-4%福尔马林于4℃固定过夜,并用苏木精于室温染色4小时。迁移细胞的数目通过在Nikon Eclipse E400显微镜(10X)(Nikon,UK)下每孔四个随机视野的计数来确定,并用Leica DFC420照相机(Leica,UK)获得照片。

[0072] 实施例1.8体外免疫抑制实验

[0073] 知情同意后,通过Ficoll-Paque PLUS(GE Healthcare Bioscience,瑞典)密度梯度从获自健康供体的肝素化外周血样品获得外周血单核细胞(MNC)。在共培养之前,按照先前描述的方案,用细胞内荧光染料CFSE(羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯,Molecular Probe,USA)标记MNC。将WT-MSC和CXCR4/IL10-MSC以5×10⁴个细胞/孔的浓度铺板于24孔板中。24小时后,在10μg/mL植物凝集素(PHA)(Sigma-Aldrich)的存在下,向每个孔中加入5×10⁵个MNC来诱导T细胞增殖。孵育3天之后,通过流式细胞术分析从培养孔收获细胞的细胞增殖。用ModFit LT™(Verity Software House,USA)进行数据分析。

[0074] 实施例1.9分泌细胞因子和因子的定量

[0075] 将WT-MSC和CXCR4/IL10-MSC以 1×10^5 个细胞/孔的浓度接种于6孔板中。转染后4小时,收集上清液并通过ELISA(R&D System,USA)定量分泌的PGE2和TGF β 1。按照制造商的方案,使用LEGENDplex™人Th细胞细胞因子试剂盒(Biolegend,USA)通过流式细胞术定量分泌的IL-6、IFN γ 和TNF α 。

[0076] 实施例1.10基因表达分析

[0077] 来自WT-MSC和CXCR4/IL10-MSC的RNA使用RNAeasy®Plus Mini试剂盒来分离并用RETR0script(ThermoFisher Scientific,Waltham,USA)进行逆转录。使用FastStart通用SYBR Green反应液混合物(Roche,Indianapolis,USA)和人白细胞介素和不同因子的特异性引物对cDNA进行实时定量PCR(qPCR)。用7,500快速实时PCR系统(ThermoFisher Scientific)进行qPCR。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法将结果归一化为人GAPDH表达和对照样品表达。

[0078] 实施例1.11LPS诱导的足垫炎症模型

[0079] 将FVB/NJ小鼠圈养于CIEMAT(Madrid,西班牙)的动物设施(登记号:ES280790000183)。根据FELASA程序对小鼠进行病原体的常规筛查,并自由饮水和取食。所有实验程序根据西班牙和欧洲法规(西班牙RD 53/2013和法律6/2013,欧洲指令2010/63/UE)实施。根据批准的生物安全性和生物伦理学指导方针,CIEMAT动物实验伦理委员会批准了该程序。使FVB/NJ小鼠镇静并向右足垫单次注射30 μ l PBS中的40 μ g大肠杆菌LPS。类似地,将30 μ l PBS注射至左足垫,作为对照。Ad-MSC转染之后4小时,通过尾静脉静脉内输注 5×10^5 个WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC。LPS施用后24小时、48小时和72小时通过数字卡尺测量厚度来确定足垫炎症。实验结束时,通过CO $_2$ 吸入法处死小鼠。收集外周血细胞,以使用血液分析仪Abacus(Diatron,USA)分析小鼠血液学参数。

[0080] 实施例1.12 NSG小鼠中移植抗宿主病(GvHD)的人源化小鼠模型

[0081] 为了建立模型,NSG小鼠用2Gy照射,并且第二天用 5×10^6 个人MNC移植。3天后,静脉内输注一百万个WT-MSC或CXCR4/IL10-MSC。每天对动物进行称重并监测GVHD的可能症状,如体重减轻、弓背、竖毛和腹泻。GVHD的严重程度从0(无GVHD)到8(严重GVHD)分级。当动物显示安乐死GVHD标准(>20%体重减轻或评分 ≥ 6.5)时,将动物人道地处死。

[0082] 实施例1.13统计学分析

[0083] 使用Graph Pad Prism 7.0软件(Graph Pad Software,USA)进行统计学分析。体外测试的数据表示为平均值 $\pm$ 标准差(SD),体内测试的数据表示为平均值 $\pm$ 平均值的标准误(SEM)。通过Shapiro-Wilks试验分析正态分布。为了比较两个以上的组,正态分布使用参数检验(单因素ANOVA),非正态分布使用非参数检验(Kruskal-Wallis检验)。进行适当的事后分析来比较平均值。P值<0.05被认为是统计学上显著的。

[0084] 实施例1.14 GVHD小鼠模型中的组织病理学分析

[0085] 手术切除肺和肝脏并用福尔马林固定过夜。固定后,以标准方式处理组织样品,将组织样品包埋于石蜡中以形成块。为了评估组织形态,用切片机制备石蜡块的3 μ m-5 μ m切片,并使用标准技术进行苏木精-伊红染色。组织的解释遵循先前建立的GVHD分级系统。

[0086] 实施例1.15 GVHD小鼠模型中的免疫组织化学分析

[0087] 按照标准方案,将带有样品的载玻片脱蜡并再水化。用人CD3和CD8标记肺和肝脏样品。使用压力锅(Dako,Agilent Technologies),利用柠檬酸钠缓冲液(1.8mM柠檬酸-一水合物和8.2mM柠檬酸三钠二水合物;pH 6)实施CD3标记样品的抗原暴露。为了暴露用CD8染

色的样品,使用Tris-EDTA缓冲液(Target Retrieval Solution pH 9;Dako)和同一压力锅。用溶解于甲醇的0.2%过氧化氢抑制内源性过氧化物酶10分钟。用溶解于PBS中的10%马血清于37℃封闭非特异性表位30分钟。将一抗于4℃在稀释的封闭溶液中孵育过夜。将与生物素缀合的二抗于室温在稀释的封闭溶液中孵育1小时。为了放大信号,使用生物素-亲和素-过氧化物酶系统(VECTASTAIN elite ABC HRP试剂盒,Vector Laboratories),于室温孵育30分钟。使用二氨基联苯胺作为过氧化物酶底物(DAB试剂盒,Vector Laboratories)使信号可视化。最后,将样品用苏木精复染,使用标准程序脱水,并使用安装胶粘剂(CV Mount,Leica Biosystems)进行安装。用光学显微镜(Olympus BX41)和数码相机(Olympus DP21)拍摄图像。利用ImageJ程序对每个样品进行标记百分比分析。

[0088] 实施例1.16葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导结肠炎的诱导和评估

[0089] 在饮用水中使用范围为2.5%至3%的不同浓度葡聚糖硫酸钠(DSS;36,000-50,000MW,MP Biomedicals,Irvine CAUSA),自由饮水7天。第5天腹膜内输注单剂量的天然或CXCR4/IL-10-修饰的MSC(3×10^6 个细胞/小鼠)。

[0090] 为了进行长期评估,进行饮用水中DSS 7天周期的再次激发(图26)。

[0091] 结肠炎评分或疾病活动指数(DAI)定义如下:(1)体重减轻(0:无减轻;1:1%-5%;2:5%-10%;3:10%-20%;4:>20%体重减轻;以及5:无存活);(2)粪便粘稠度(0:正常粪便;1:稀便;2:水样腹泻;3:带血的水样腹泻;以及4:无存活);以及(3)一般身体活动(0:正常;1-2:中等活动;3:无活动;以及4:无存活)。体重倍数变化通过限定时间点时的体重相对于DSS处理开始前第0天初始体重的差异来计算,以百分比表示。

[0092] 还通过结肠组织学分析评估结肠炎评分。结肠经手术取出并用福尔马林固定过夜。48小时时切割1cm结肠组织,包埋于石蜡中并用苏木精/伊红染色。切片进行浸润性单核细胞检查并使用光学显微镜对肠道上皮和粘膜下层结构进行分析。

[0093] 实施例2结果

[0094] 为了清楚起见,请注意在实施例2.1和2.2中提供的针对用双顺反子CXCR4-IL10 mRNA转染的MSC的结果仅作为比较实施例包括,以显示用共表达CXCR4和IL10的整合表达载体转导MSC时这些结果如何得到改善(实施例2.3至2.7)。

[0095] 实施例2.1用双顺反子CXCR4-IL10 mRNA转染的MSC显示显著的局部抗炎作用

[0096] 我们测试了用双顺反子CXCR4-IL10 mRNA转染的MSC在LPS诱导的局部炎症模型的小鼠模型中的体内效力。WT-MSC和CXCR4-IL10-RNA-MSC都能够显示显著的抗炎作用,但是用双顺反子CXCR4-IL10 mRNA转染的MSC与WT-MSC相比显著更高效。参见图1,其中显示用双顺反子CXCR4-IL10 mRNA转染的MSC在小鼠局部炎症模型中的体内效力的分析。与WT-MSC相比,观测到用CXCR4-IL10 mRNA转染的MSC的抗炎作用增强。

[0097] 实施例2.2用双顺反子CXCR4-IL10 mRNA转染的MSC在移植物抗宿主病小鼠模型中没有体内效力

[0098] 我们还测试了用双顺反子CXCR4-IL10 mRNA转染的MSC在移植物抗宿主病小鼠模型中的体内效力。通过将来自C57B1/6供体小鼠的BM细胞移植到预先用11Gy的致死剂量照射的B6D2F1受体小鼠中建立单倍体相合造血移植的小鼠模型。所有受体静脉内注射 10×10^6 个BM供体细胞。为了诱导移植物抗宿主病(GVHD),受体还接受了总数为 2×10^8 个供体脾细胞。GVHD诱导之后1天,小鼠经尾静脉施用盐水(GVHD组)、WT-MSC或mRNA转染的MSC($1 \times$

10⁶)。每天观测移植受体的GVHD症状,如体重减轻、弓背、竖毛和腹泻。GVHD的严重程度从0(没有GVHD)到8(严重GVHD)分级。当动物表现出安乐死GVHD标准(>20%体重减轻或评分 $\geq$ 6.5)时,将动物人道地处死。图2显示用双顺反子CXCR4-IL10 mRNA转染的MSC在GVHD小鼠模型中的体内效力的分析。A)存活曲线,B)体重,和C)临床评分。如图2A所示,我们未观测到WT-MSC和CXCR4-IL10 mRNAMSC对抑制GVHD的任何差异。

[0099] 实施例2.3用于改善WT MSC抑制移植抗宿主病效力的用双顺反子DNA CXCR4-IL10慢病毒载体转导的MSC的产生

[0100] 在这些研究中,我们已经产生了慢病毒载体,其中CXCR4和IL10基因的优化序列已克隆到人生理启动子PGK下的双顺反子慢病毒载体中(图3A)。

[0101] 在测试不同的Ad-MSC转导方法以及不同量的载体后,获得了经修饰的Ad-MSC(CXCR4/IL10-MSC)群体。该CXCR4/IL10-MSC群体过表达CXCR4,约80% MSC对CXCR4是阳性的。与未经修饰的MSC(WT-MSC)相比,CXCR4/IL10-MSC分泌的IL10浓度更高。通过qPCR在这些CXCR4/IL10-MSC中分析载体拷贝数(图3B)。

[0102] 实施例2.4CXCR4/IL10-MSC与WT-MSC相比的体外表征

[0103] 按照ISCT(国际细胞治疗学会)为间充质细胞建立的标准,对用双顺反子PGK-CXCR4-IL10慢病毒载体修饰的MSC进行表征。

[0104] 体外表征显示,与未经修饰的间充质细胞(WT-MSC)相比,用双顺反子慢病毒载体修饰MSC既不影响它们的免疫表型(图4A),也不影响它们分化为骨(图4B)和脂肪(图4C)组织的能力。

[0105] 实施例2.5CXCR4/IL10-MSC与WT-MSC相比的体外功能

[0106] 为了研究用双顺反子慢病毒载体(CXCR4/IL10-MSC)修饰的间充质细胞的体外功能,首先进行对CXCR4配体SDF-1反应的Transwell迁移实验(图5A)。该实验结果显示,与WT-MSC相比,CXCR4/IL10-MSC的迁移能力增强(图5B)。

[0107] 第二项体外功能表征研究由免疫抑制实验组成,其中与WT-MSC相比,评估CXCR4/IL10-MSC抑制活化的单核细胞(MNC)增殖的能力(图6A)。

[0108] 如前所述,WT-MSC显示抑制活化的MNC增殖的能力很强。然而,当用PGK-CXCR4-IL10慢病毒载体转导MSC时,这种抑制显著更强(图6B)。这些研究证明,与WT-MSC相比,用双顺反子慢病毒载体转导MSC显著改善这些细胞的免疫调节能力。

[0109] 实施例2.6CXCR4/IL10-MSC与WT-MSC相比增强抑制局部炎症的体内效力

[0110] 为了测试用PGK-CXCR4-IL10慢病毒载体转导的MSC的体内效力,在LPS诱导的局部炎症模型的小鼠模型中测试细胞。

[0111] 用LPS注射每只小鼠的右足垫。LPS注射后1天,静脉内输注不同类型的Ad-MSC(WT-MSC和CXCR4/IL10-MSC)(n=7至14只小鼠/组)。用数字卡尺肉眼测量炎症,将每只小鼠的左足垫用作对照(图7A)。

[0112] 结果显示,输注Ad-MSC之后24小时(LPS注射之后48小时),所有接受Ad-MSC的小鼠控制了炎症,而炎症在仅接受LPS注射的小鼠组中继续增长。

[0113] 然而,在接受CXCR4/IL10-MSC的小鼠组中,炎症的控制统计学上更高(图7B)。

[0114] 实施例2.7用DNA双顺反子慢病毒载体转导的MSC与WT MSC相比改善抑制移植抗宿主病(GvHD)的效力

[0115] 同样在移植物抗宿主病 (GvHD) 小鼠模型中测试了用双顺反子慢病毒载体转导的 MSC 的治疗效力, 该模型基于在免疫缺陷 NSG 小鼠中输注外周血人单核细胞 (MNC) (图 8A)。为了建立模型, 小鼠用 2Gy 照射, 并在第二天小鼠用 5×10^6 个人 MNC 移植。3 天后, 静脉内输注一百万个 WT-MSC 或 CXCR4/IL10-MSC。每天称重动物并监测可能的 GVHD 关键体征 (图 8B)。

[0116] 如图 8B 所示, 在接受 CXCR4/IL10-MSC 的 NSG 小鼠组中的 GVHD 评分与不仅 GVHD 组而且 WT-MSC 组相比均显著更好。

[0117] 输注 MNC 后 2 周, 仅接受人 MNC 的小鼠 (GvHD 组) 开始显示疾病的症状 (体重减轻, 弓背)。因此, 此时处死所有三组的受体小鼠来分析外周血 (PB) 和脾脏 (SP) 中人 CD45⁺ 细胞的百分比。发现在接受 WT-MSC 的小鼠中, 浸润性人 CD45⁺ 细胞的百分比显著降低。然而, 在用 CXCR4/IL10-MSC 输注的小鼠中, 在 PB 和脾脏中观测到的降低显著更多 (图 9A-B)。

[0118] 通过流式细胞术在 GVHD 人源化小鼠模型中分析负责 GVHD 病的人 CD45⁺CD3⁺ 细胞。值得注意的是, 与 GvHD 对照组相比, 用 CXCR4/IL10-MSC 处理而不是用 WT-MSC 处理的 NSG 小鼠显示促炎 T 细胞 (CD3⁺IFN γ ⁺) 的百分比在统计学上降低 (图 10A)。此外, 与 GvHD 对照组相比, 在接受 CXCR4/IL10-MSC 而不是 WT-MSC 的组中也观测到抗炎 T 细胞 (CD3⁺IL10⁺) 的百分比在统计学上显著增加 (图 10B)。

[0119] 通过流式细胞术观测到的这些数据通过 qPCR 证实。与对照 GvHD 组相比, 在小鼠接受 CXCR4/IL10-MSC 而不是 WT-MSC 的情况下, 促炎因子如 IFN γ 、IL-17 和 IL-22 显著降低。抗炎因子如 IL-5 或 FoxP3 的表达水平的定量显示, 相对于对照 GvHD 组, 在小鼠接受 CXCR4/IL10-MSC 而不是 WT-MSC 的情况下, 这些因子在统计学上增加 (图 11)。

[0120] 实施例 2.8 在移植物抗宿主病 (GvHD) 的人源化模型中测试 CXCR4/IL10-MSC 的体内效力

[0121] 为了测试 CXCR4/IL10-MSC 相对于 WT-MSC 的体内效力, 开发了移植物抗宿主病 (GvHD) 的人源化模型。在没有接受任何类型 Ad-MSC 的 GvHD 组中观测到最大的体重减轻。此外, 与在 GvHD 组以及接受 WT-MSC 的组中观测到的明显体重减轻相比, 在接受 CXCR4/IL10-MSC 的组中未观测到体重减轻 (图 12A)。此外, 与未经 MSC 处理的小鼠相比, 尽管接受 WT-MSC 的组显示较低的 GvHD 评分 (较轻的临床症状), 但是在接受 CXCR4/IL10-MSC 的小鼠中 GvHD 评分显著更低 (图 12B)。

[0122] 移植小鼠的外周血中人白细胞的分析显示, 在接受 Ad-MSC 的小鼠中显著减少 (hCD45 细胞%; 图 13A)。然而, 用 CXCR4/IL10-MSC 处理的小鼠显示最低比例的人白细胞, 在所有情况下大部分的人白细胞是人 CD3⁺T 细胞 (图 13B), 并且在 CD4⁺、CD8⁺ 或双阳性 T 细胞之间没有差异 (图 13C)。

[0123] 人 CD4⁺ 或 CD8⁺T 细胞在初始 T 细胞、效应 T 细胞和记忆 T 细胞中的分布分析显示, 在接受 CXCR4/IL10-MSC 的小鼠中具有效应表型的 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞百分比显著降低 (图 14C 和 14F)。

[0124] 研究了小鼠外周血中循环人 T 细胞的活化概况。接受任何类型 Ad-MSC 的组显示 CD25⁺T 细胞的百分比增加, 用 CXCR4/IL10-MSC 处理的小鼠在统计学上更高。此外, 这些细胞是 CD25⁺CD4⁺ 淋巴细胞, 这表明在该组中存在循环调节性 T 细胞 (图 15)。

[0125] 还使用 CTLA4、PD1、TIGIT 和 TIM3 标志物分析外周血中循环人 CD3⁺T 细胞的耗竭特性。在 MNC 移植后 3 周, 在接受 Ad-MSC 的两组中观测到针对 CTLA4 阳性的循环 CD3⁺ 细胞的增

加,在小鼠接受CXCR4/IL10-MSC的情况下显著更高(图16)。

[0126] 分析了这些小鼠的血清中的参与GvHD发展的循环人细胞因子和因子。如图17所示,相对于GvHD对照组,用任何类型Ad-MSC处理的组显示循环促炎人细胞因子如IFN γ 、IL17A、IL1 α 、IL8、IL12或TNF α 的水平在统计学上显著降低。另外,接受Ad-MSC的这两组经历了循环人抗炎因子如IL10、TGF β 或IL6的增加。明显地,相对于接受WT-MSC的小鼠,接受CXCR4/IL10-MSC的小鼠中细胞因子分泌从促炎性变化到更具有抗炎特性的变化在统计学上更显著(图17)。

[0127] 这些结果表明,相对于对应于用WT-MSC处理的小鼠的值,输注CXCR4/IL10-MSC使外周血中循环人T细胞的百分比显著降低。另外,与WT-MSC相比,输注CXCR4/IL10-MSC之后,外周血T细胞显示更强的免疫抑制特性。

[0128] 总之,该数据表明,在移植人白细胞的NSG免疫缺陷小鼠中,CXCR4/IL10-MSC在系统水平上诱导了显著降低的炎症环境和增强的免疫调节环境。

[0129] 在脾脏中研究了如下不同人造血谱系之间的分布:CD3⁺T细胞、CD19⁺B细胞、CD56⁺NK细胞、CD14⁺单核细胞和CD15⁺粒细胞。移植后3周观测到GvHD组的脾脏中约70%的人CD45⁺细胞为人CD3⁺T细胞($64.98 \pm 4.14\%$),而该百分比在接受WT-MSC的组中降低($59.22 \pm 4.56\%$),在接受CXCR4/IL10-MSC的组中显著更低($48.67 \pm 3.58\%$)。另外,当分析脾脏中人CD19⁺B细胞的百分比时,与GvHD组($6.73 \pm 1.03\%$)或接受WT-MSC的组($8.99 \pm 1.53\%$)相比,在用CXCR4/IL10-MSC处理的组中检测到该群体显著增加($14.62 \pm 1.52\%$)。最后,移植小鼠的脾脏中CD56⁺NK细胞、CD14⁺单核细胞和CD15⁺粒细胞的百分比非常低并且在不同的研究组之间没有差异。

[0130] 在研究组之间的脾脏中未发现CD4⁺、CD8⁺或双阳性细胞之间的T细胞分布有显著差异(图19A)。在最具特征的亚群(初始T细胞、效应T细胞和记忆T细胞)中在人CD4⁺或CD8⁺T细胞的分布方面,未观测到不同研究组之间有差异(图19B和图19C)。

[0131] 在脾脏中观测到的活化模式与在外周血中观测到的活化模式非常相似。仅在脾脏中CD25表达方面发现各组之间有差异(图20A)。相对于GvHD组,接受任何类型Ad-MSC的组显示CD25⁺T细胞百分比的显著增加,与接受WT-MSC的组相比,接受CXCR4/IL10-MSC处理的小鼠中CD25⁺T细胞百分比更高。这些细胞特别是CD25⁺CD4⁺T细胞(图20B),表明脾脏中这些CD4⁺T细胞的免疫调节表型。

[0132] 在MNC移植后3周,NSG移植小鼠的脾脏中抑制受体的分析显示,相对于未用AdMSC处理的小鼠的GvHD对照组,用CXCR4/IL10-MSC处理的小鼠中人CD3⁺T细胞(图23A)以及CD4⁺或CD8⁺细胞(分别为图21B和图21C)中的TIM3⁺T细胞显著增加(图21)。相对于所分析的其他耗竭标志物,在各组之间未观测到差异。

[0133] 脾脏中B细胞的流式细胞术分析显示,在无MSC处理组和接受任何类型AdMSC的组之间,初始B细胞亚群无变化。然而,与接受WT-MSC的组($24.3 \pm 5.18\%$)和未输注任何MSC的GvHD对照组($17.47 \pm 2.21\%$)相比,尚未分化成抗体产生B细胞的过渡B细胞的百分比在接受CXCR4/IL10-MSC的小鼠中更高($34.78 \pm 7.09\%$)。最后,仅在接受CXCR4/IL10-MSC的组中观测到完全分化的B细胞百分比略有降低(图22)。

[0134] 这些结果表明,WT-MSC和更显著的CXCR4/IL10-MSC将B细胞群维持在过渡状态,而没有完成其向记忆B细胞或浆细胞的分化。

[0135] 在接受WT-MS C的小鼠中,过渡B细胞群中Breg细胞的百分比更高(图23A)。此外,在用CXCR4/IL10-MS C输注的小鼠中,该百分比在统计学上更高。在分泌IL10的记忆B细胞群中观测到相同的模式(图23B)。

[0136] 总之,这些结果表明,相对于WT-MS C,CXCR4/IL10-MS C的输注不仅显著地促进具有免疫调节表型的T细胞的发育,而且还改善了B细胞的发育,具有对抗GvHD发展的有益效果。

[0137] 在急性人GvHD的最后阶段,供体效应T细胞通过直接细胞毒活性或炎性细胞因子产生来介导不同器官中的组织损伤。在该疾病的靶器官如肺或肝脏中进行了GvHD的组织病理学症状分析。肺的组织学分析显示,相对于其他两组,接受CXCR4/IL10-MS C的小鼠显示实质中人T细胞浸润大大减少,这显示与无疾病的对照组相似的结构(图24A)。通过定量存在的人CD3⁺和CD8⁺T细胞,发现输注任何类型Ad-MS C降低了肺中这两种细胞类型的百分比。值得注意的是,用CXCR4/IL10-MS C处理的小鼠中,针对人CD3⁺细胞(图24B)和CD8⁺细胞(图24C),减少更为显著。

[0138] 移植小鼠肝脏的组织病理学分析显示实质的人T细胞浸润水平以及血管周围炎症,它们在输注任何类型Ad-MS C后大大减少。更重要地,这种炎症在用CXCR4/IL10-MS C处理的小鼠中实际上不存在(图25A)。另一方面,Ad-MS C的施用显著减少肝脏中人CD3⁺和CD8⁺细胞的存在,当小鼠接受CXCR4/IL10-MS C时,这种减少更为显著(图25B和图25C)。

[0139] 实施例2.9稳定表达CXCR4和IL10的CXCR4/IL10-MS C在葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的炎症性肠病(IBD)实验模型中的效力增强

[0140] 我们还测试了表达CXCR4和IL10的经遗传修饰的MS C在新的炎症实验模型——DSS诱导的炎症性肠病(IBD)中的体内效力。

[0141] 根据图26所示的实验设计(材料和方法),与未用MS C处理的小鼠或用WT-MS C处理的小鼠相比,用单剂量CXCR4/IL10-MS C处理的结肠炎小鼠的疾病活动指数(DAI)显著降低(图27A)。此外,在第一个7天DSS周期期间,在将CXCR4/IL10-MS C处理的小鼠的体重减轻(图27B)和存活率(图27C)与WT-MS C和无MS C处理的组进行比较时,观测到显著差异。在组织学上,相对于无MS C输注的结肠炎小鼠,在CXCR4/IL10-MS C处理的结肠炎小鼠中观测到结肠形态保存更好且白细胞浸润减弱(图27D)。

[0142] 为了研究CXCR4/IL10-MS C在结肠炎小鼠中诱导的长期作用,根据图26所示的实验设计进行实验。在第一次DSS处理起3个月的潜伏期后进行7天DSS周期的第二次激发。相对于无MS C输注的结肠炎小鼠,输注的CXCR4/IL10-MS C诱导显著降低的DAI(图28A),以及降低不太明显的体重(图28B)和存活(图28C)。

[0143] 这些数据显示,在DSS诱导的结肠炎模型中,与WT-MS C相比,CXCR4/IL10-MS C具有增加的免疫调节特性,表明与WT MS C相比,这些经遗传修饰的MS C可以代表用于治疗炎症性肠病的更有效的基于MS C的细胞治疗产品。

序列表

<110>	希门尼斯迪亚兹健康研究基金会研究所(FIIS-FJD) 能源环境和技术研究中心OAMP(CIEMAT) 生物医学网络研究财团中心(CIBER)	
<120>	共表达CXCR4和IL-10的间充质干细胞及其用途	
<130>	905 345	
<160>	3	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	1068	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	1	
	atgtcaatcc ccctgccact gctgcagatc tacacaagcg ataactacac cgaagaaatg	60
	ggctccggcg actacgactc tatgaaggag ccatgcttca gggaggaaaa cgccaatttc	120
	aacaagatct ttctgcccac aatctacagc atcatttttc tgactggaat cgtgggaaat	180
	ggcctgggtca ttctgggtcat gggctaccag aagaaactgc gatccatgac tgacaagtat	240
	cggctgcacc tgtctgtcgc agatctgctg ttcgtgatca ccctgccatt ttgggccgctc	300
	gacgccgtgg ctaattggta tttcggcaac tttctgtgca aagccgtcca cgtgatctac	360
	acagtcaatc tgtatagctc cgtgctgata ctggctttca ttagtctgga tcgctacctg	420
	gcaattgtgc atgccactaa cagccagcgg cccagaaagc tgctggctga gaaagtggctc	480
	tatgtcgggg tgtggatccc cgcactgctg ctgaccatcc ctgacttcat ttttgccaat	540
	gtgagcgaag ctgacgatag gtacatttgt gaccgctttt atcctaacga tctgtgggtg	600
	gtcgtgttcc agtttcagca catcatggtc gggctgattc tgccaggaat tgtgatcctg	660
	tcatgctact gtatcattat cagcaagctg tcccactcta aaggccatca gaagcgaaaa	720
	gccctgaaga ccacagtgat tctgatcctg gctttctttg catgctggct gccctactat	780
	attgggatca gcattgattc cttcatcctg ctggagatta tcaagcaggg ctgtgagttt	840
	gaaaataaccg tgcacaaatg gatctccatt acagaagcac tggccttctt tcattgctgt	900
	ctgaacccta tcctgtatgc tttcctgggc gcaaagttta aaacttccgc ccagcatgct	960
	ctgaccagtg tgtcaagagg ctctagtctg aaaatcctgt ctaaggggaa aaggggcggg	1020
	cactcaagcg tgtctacaga gagtgaatcc tctagtttcc attcaage	1068
<210>	2	
<211>	60	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 人工序列

<400> 2

caatgtacta actacgcttt gttgaaactc gctggcgatg ttgaaagtaa ccccggtcct 60

<210> 3

<211> 537

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 3

atgcattcat ccgctctgct gtgctgtctg gtgctgctga ccggcgtgcg ggcaagtcca 60

ggccagggaa ctcagtccga aaactcctgc acccaattcc ccgggaacct gcctaataatg 120

ctgcgagacc tgcgggatgc ctttagcagg gtgaaaacat tctttcagat gaaggaccag 180

ctggataacc tgctgctgaa agagagcctg ctggaagact tcaagggcta cctgggggtgt 240

caggctctgt ccgaaatgat ccagttttat ctggaggaag tgatgccaca ggcagagaac 300

caggacccccg acatcaaggc ccacgtcaac tctctgggag agaattctgaa gactctgagg 360

ctgcgcctgc ggagatgcca tagattcctg ccctgtgaga ataagtctaa agccgtggaa 420

cagggtcaaaa acgcttttaa taagctgcag gagaaaggca tctacaaggc tatgagttaa 480

ttcgacatct tcatcaacta catcgaggca tatatgacca tgaagattcg caattga 537

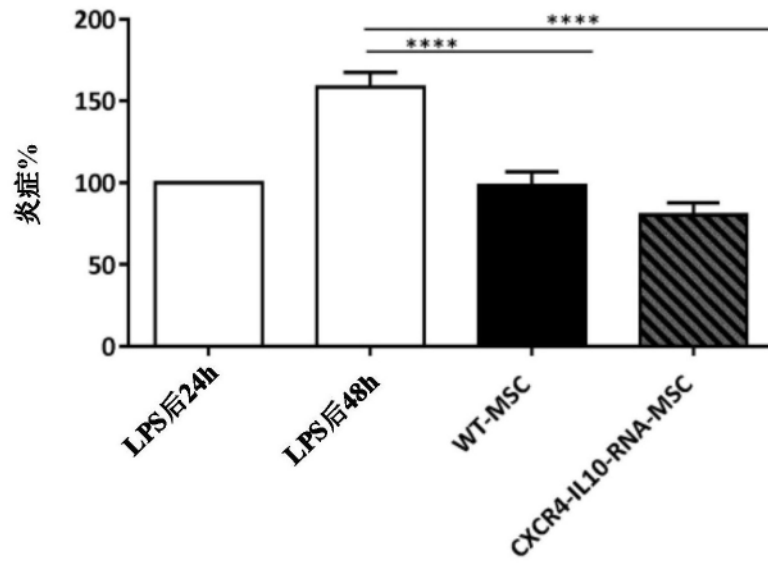
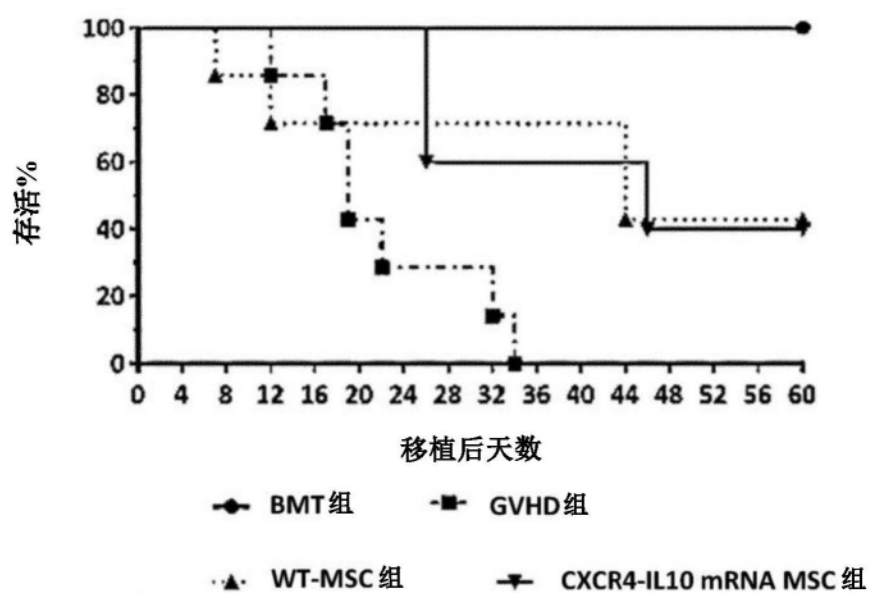


图1

A



B

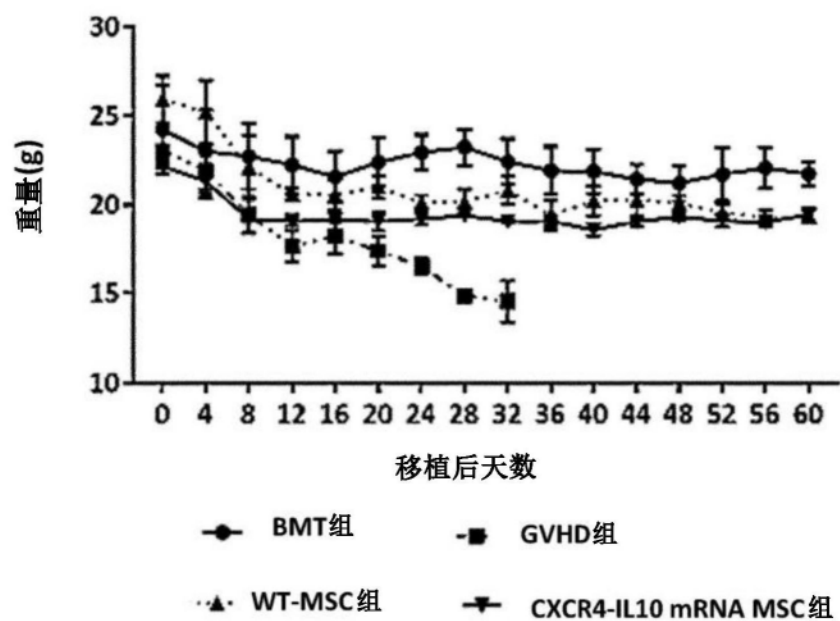


图2

C

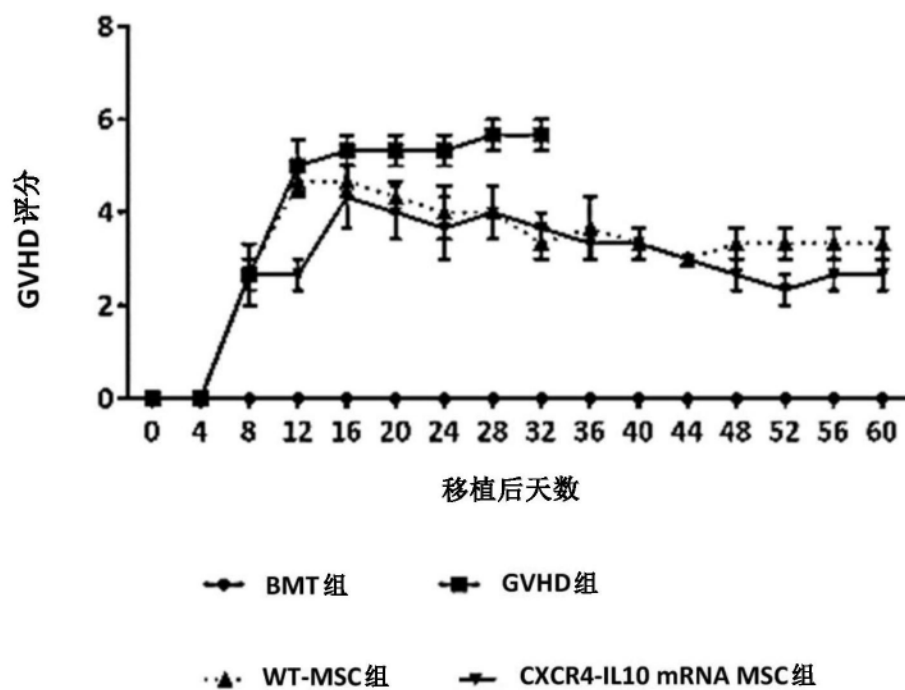


图2续

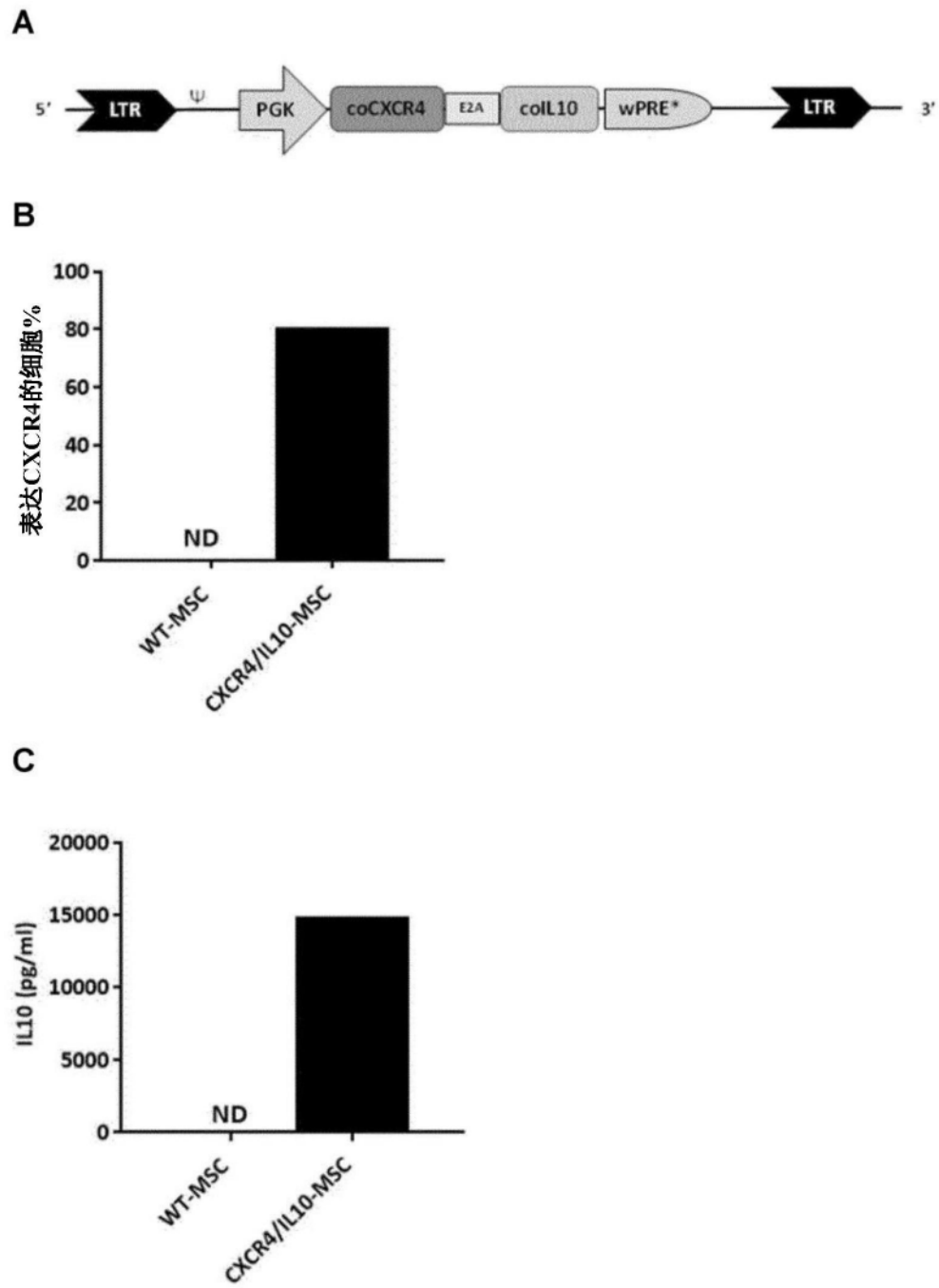


图3

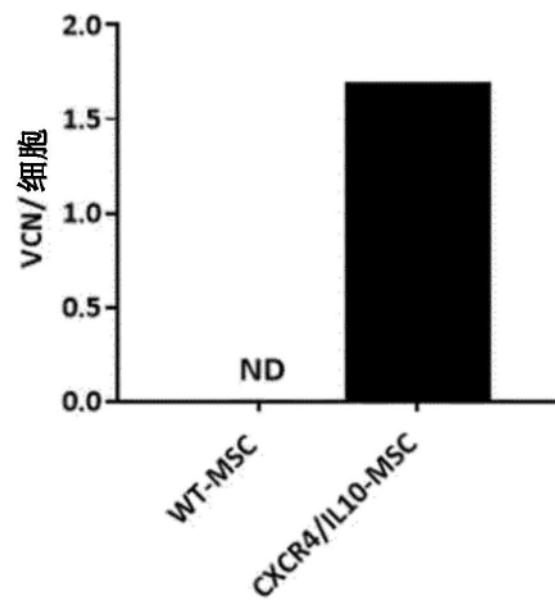
D

图3续

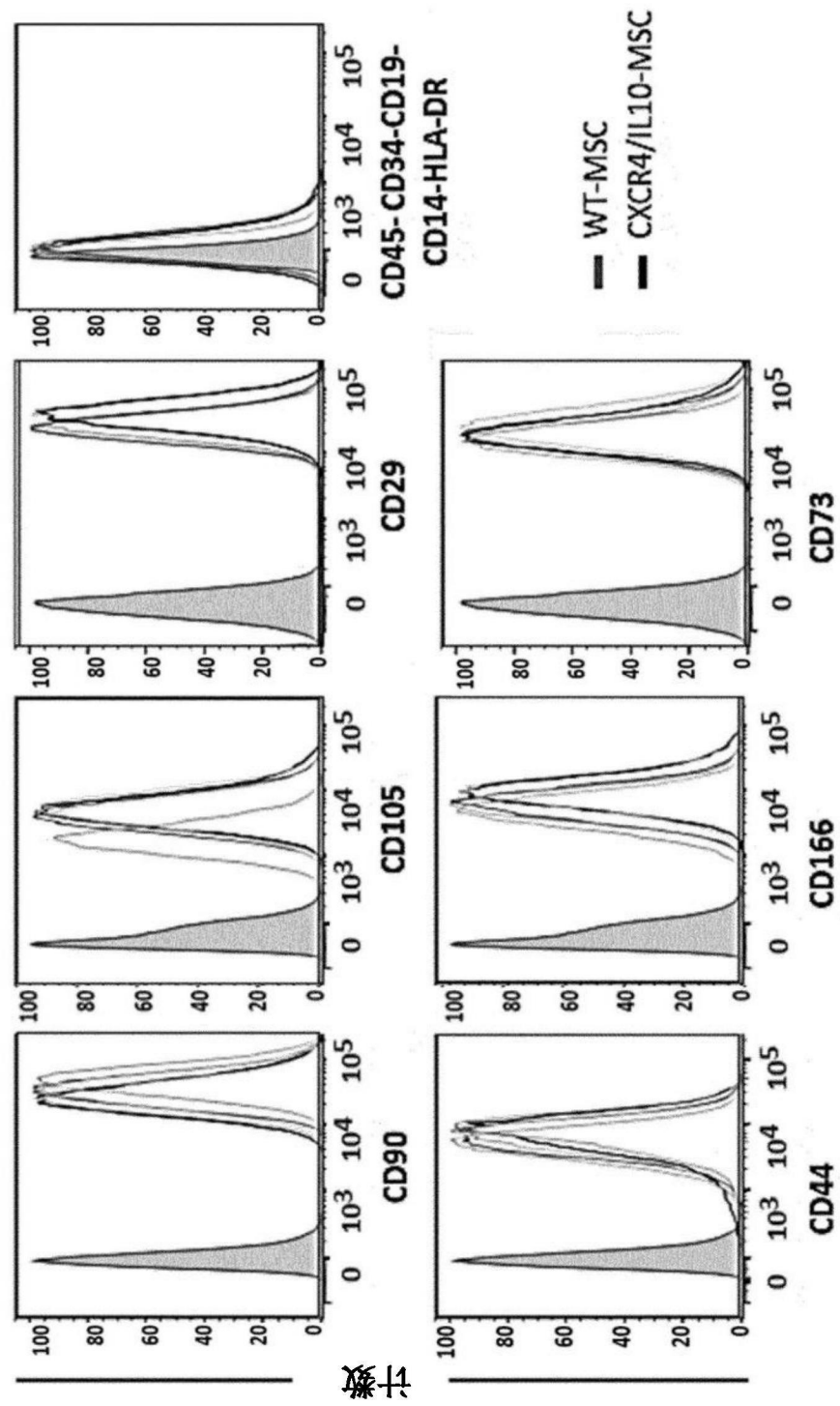
A

图4

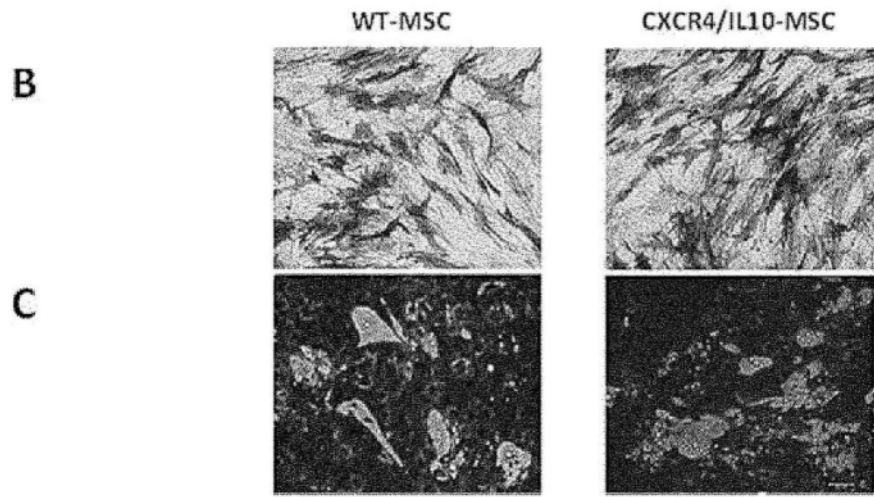


图4续

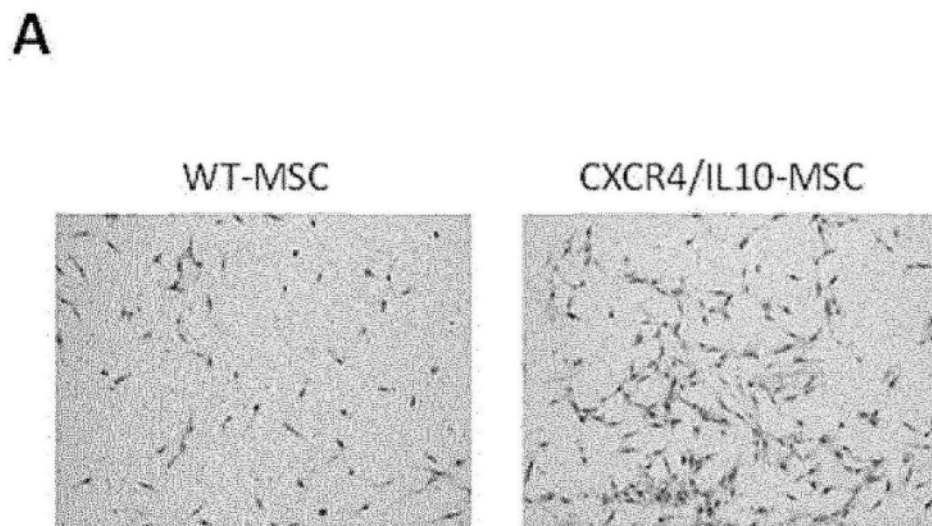


图5

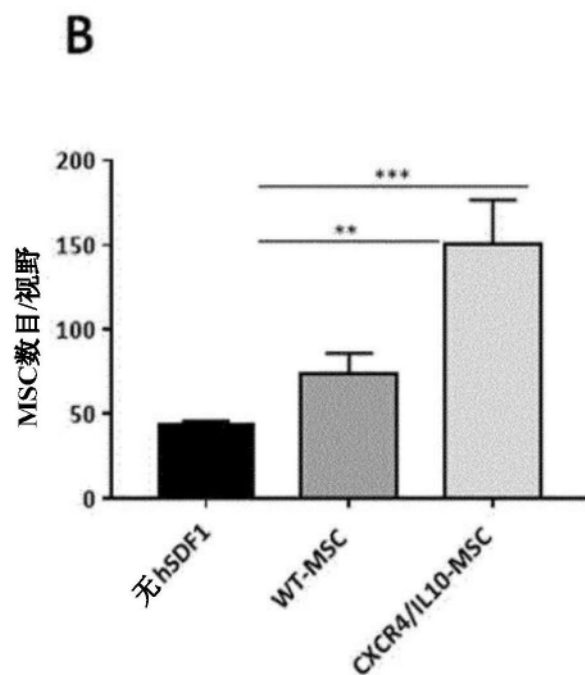


图5续

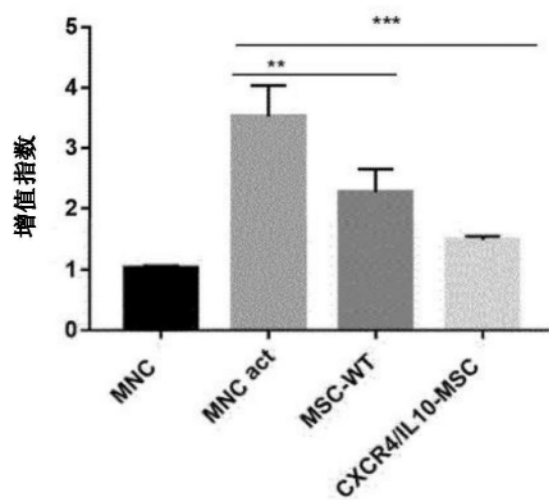
A**B**

图6

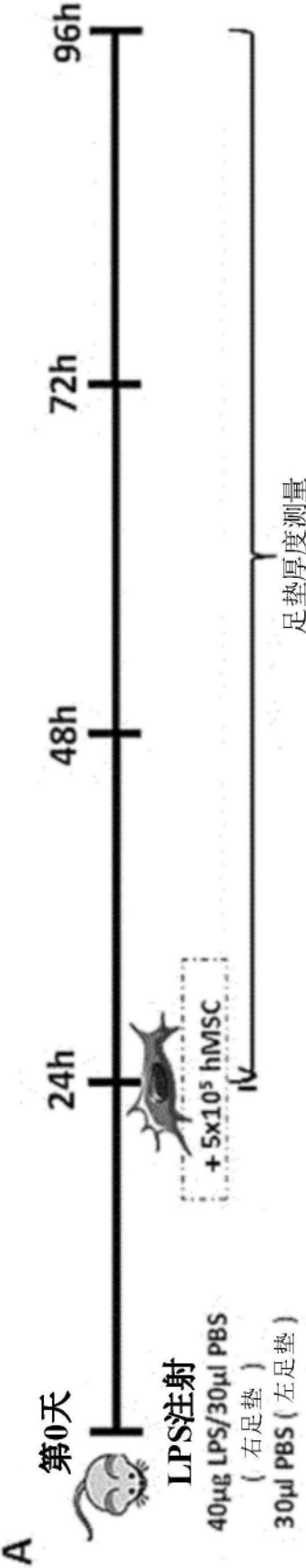


图7

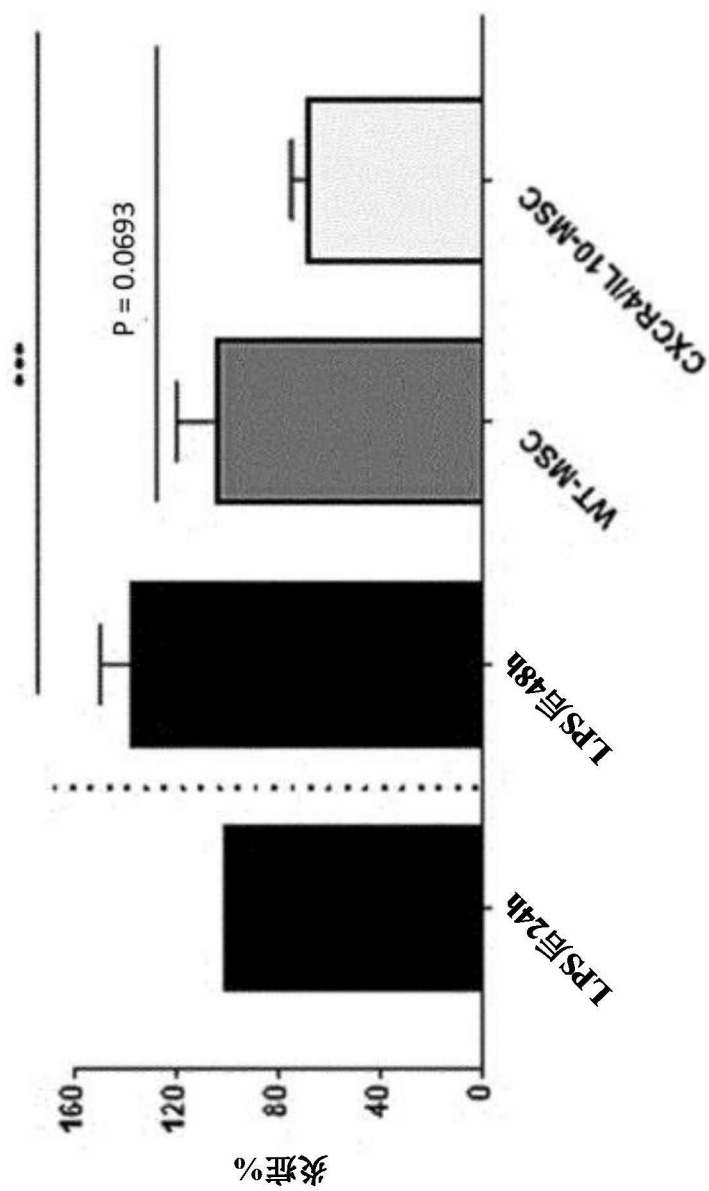


图7续

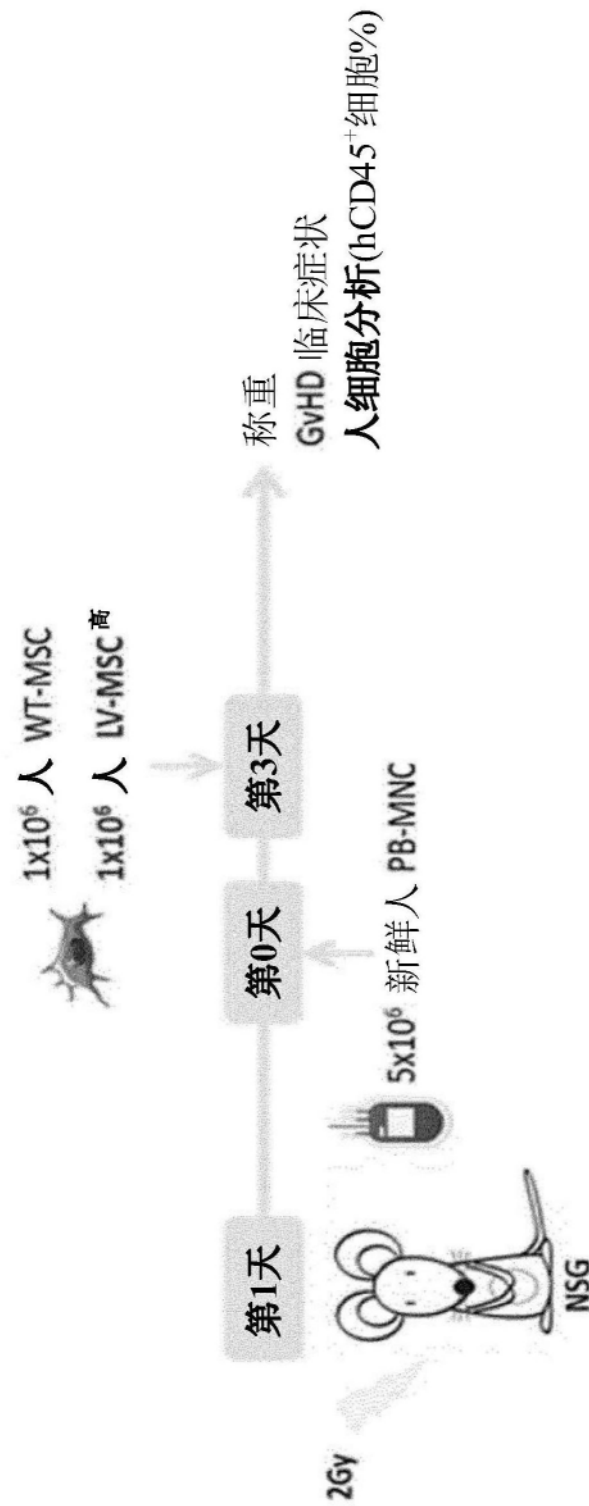
A

图8

B

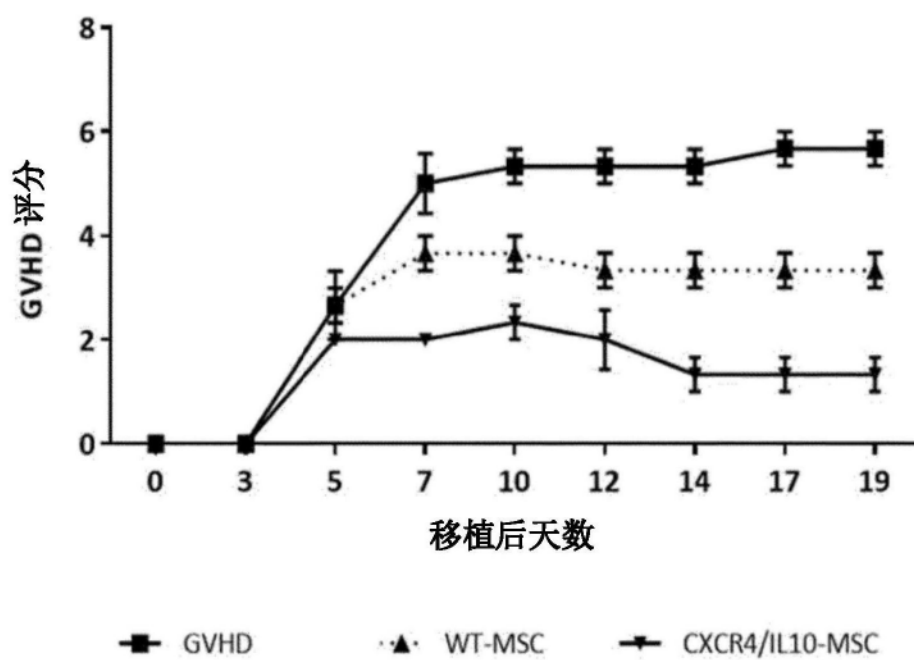


图8续

A

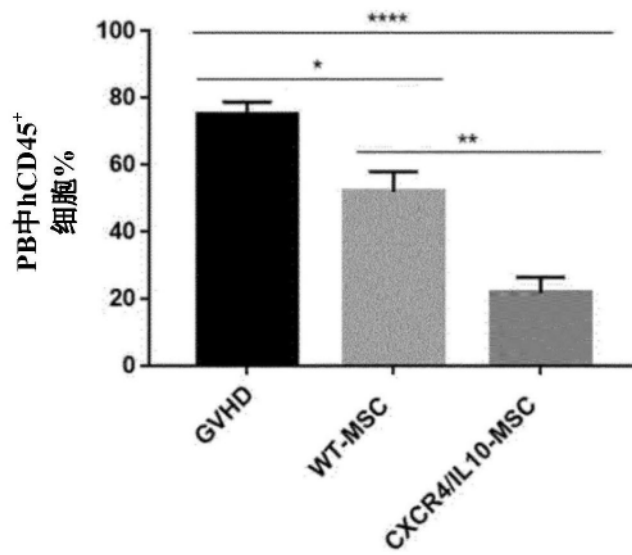


图9

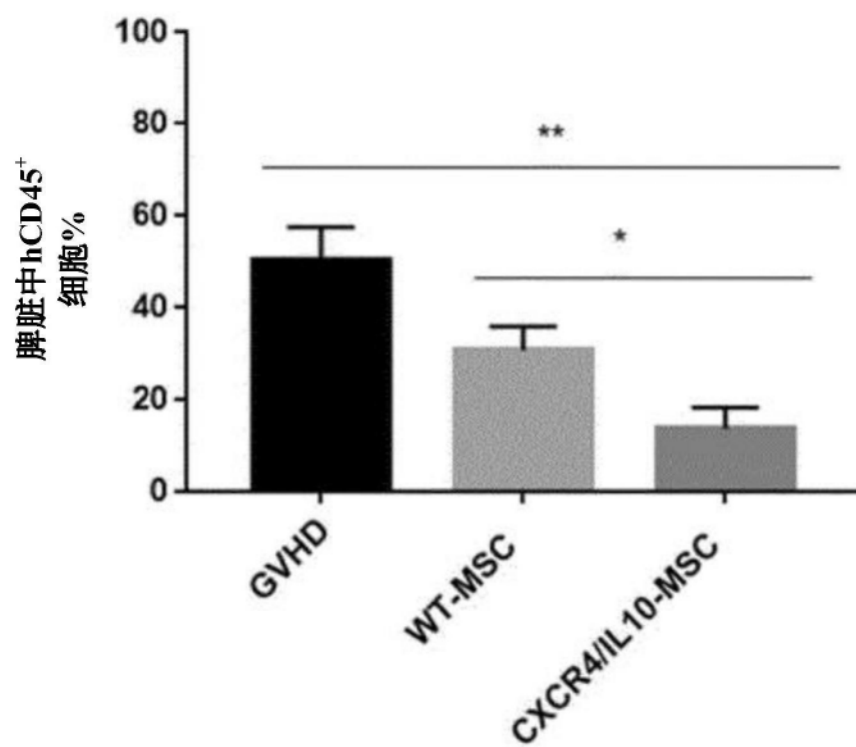
B

图9续

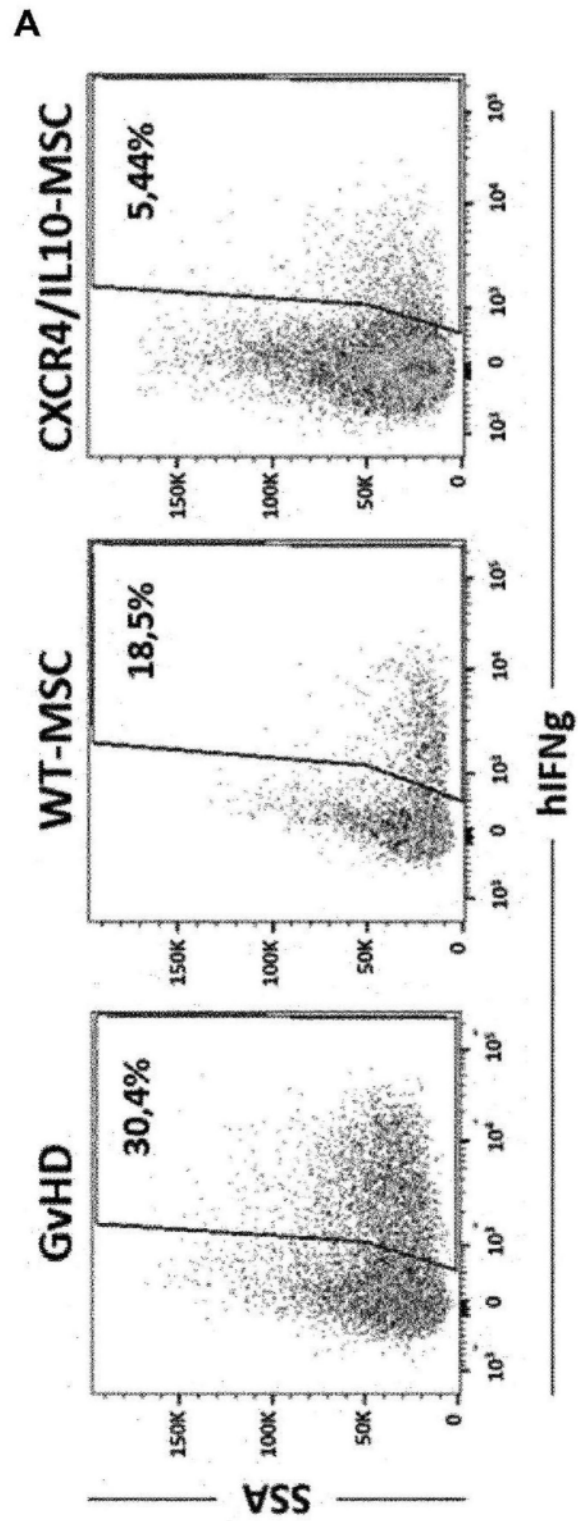


图10

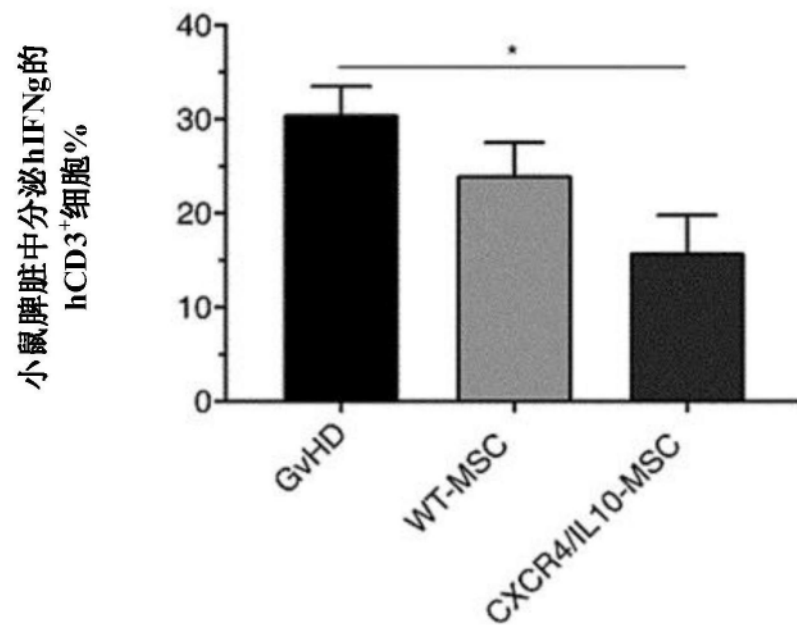
A

图10续

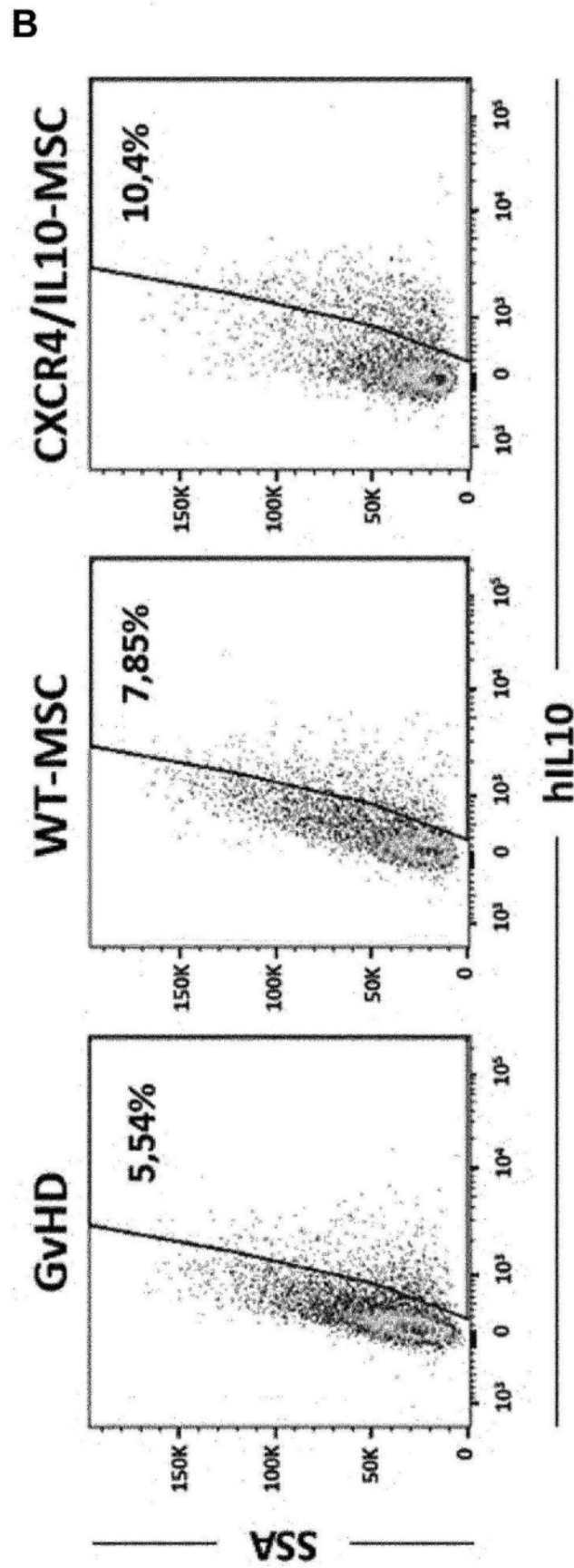


图10续

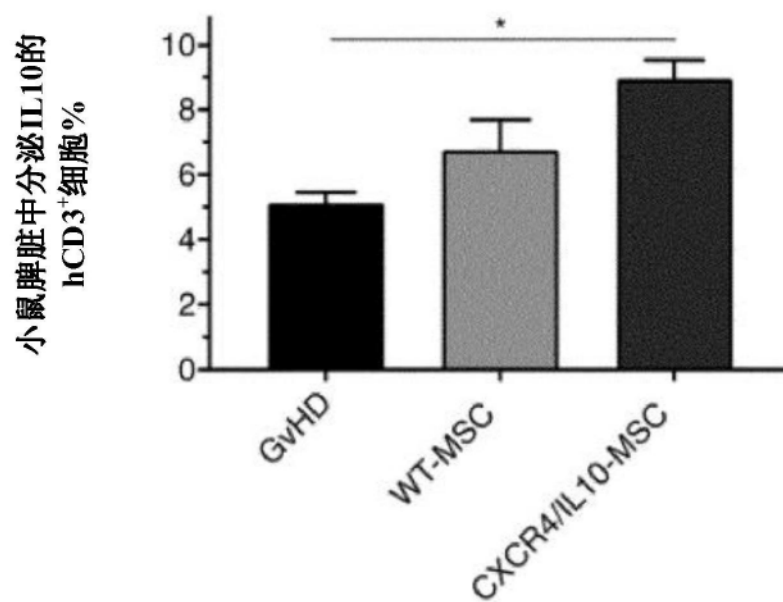
B

图10续

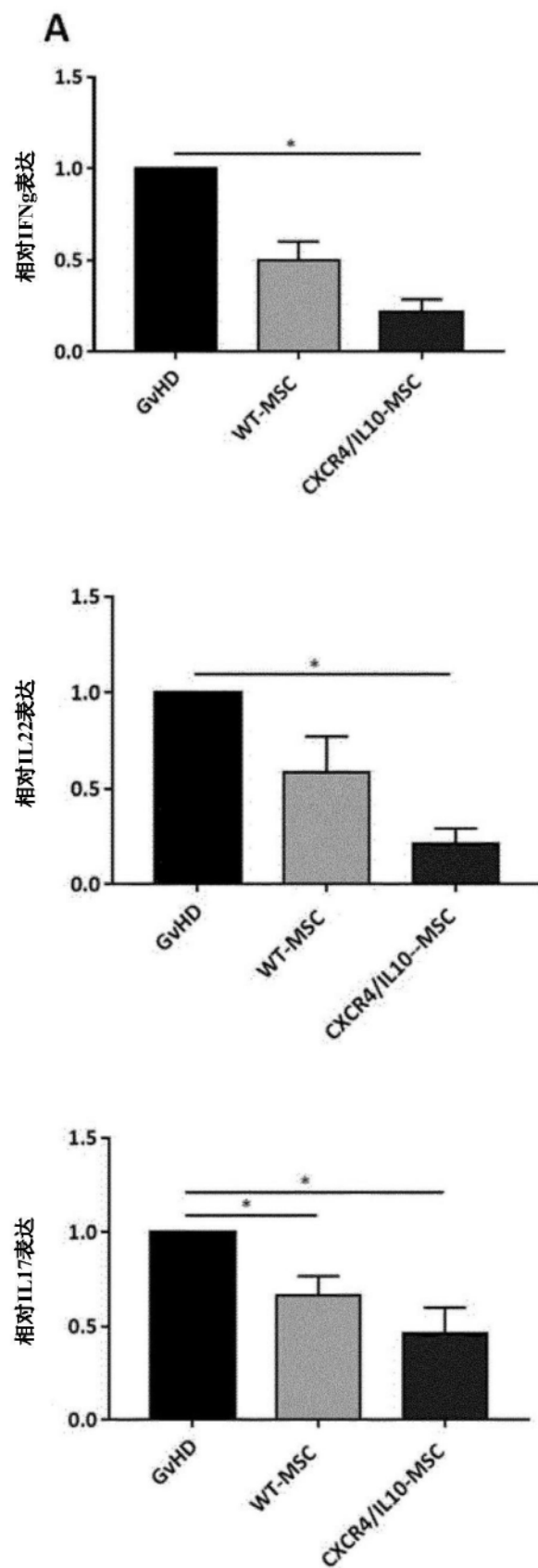


图11

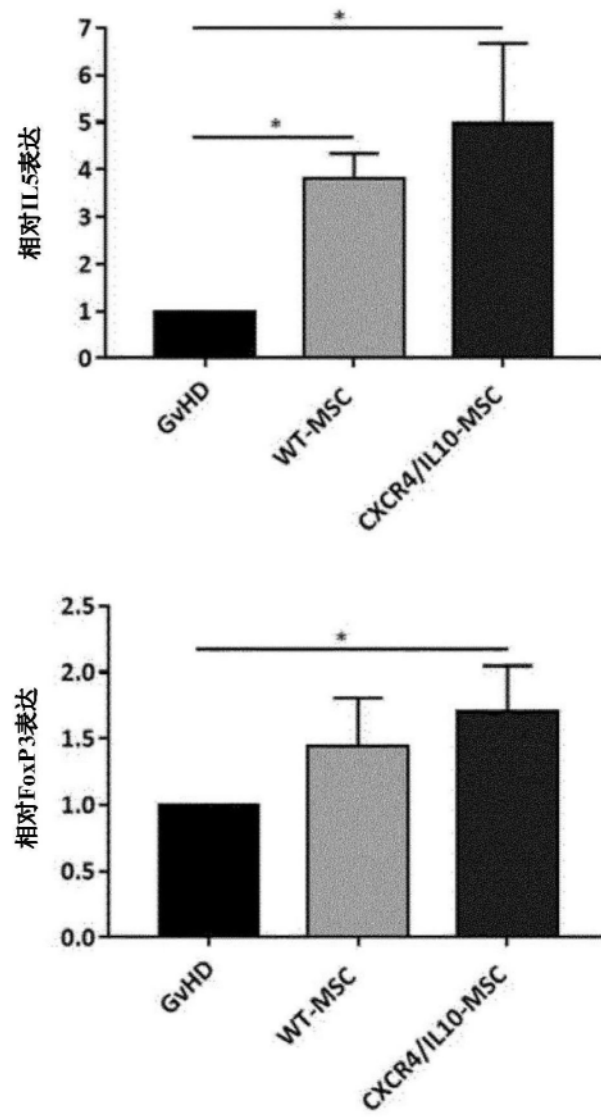
B

图11续

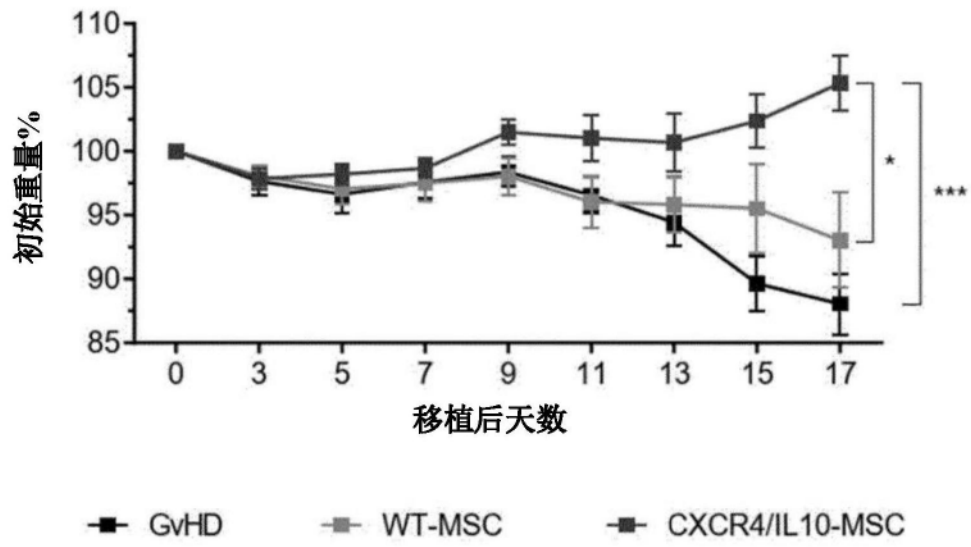
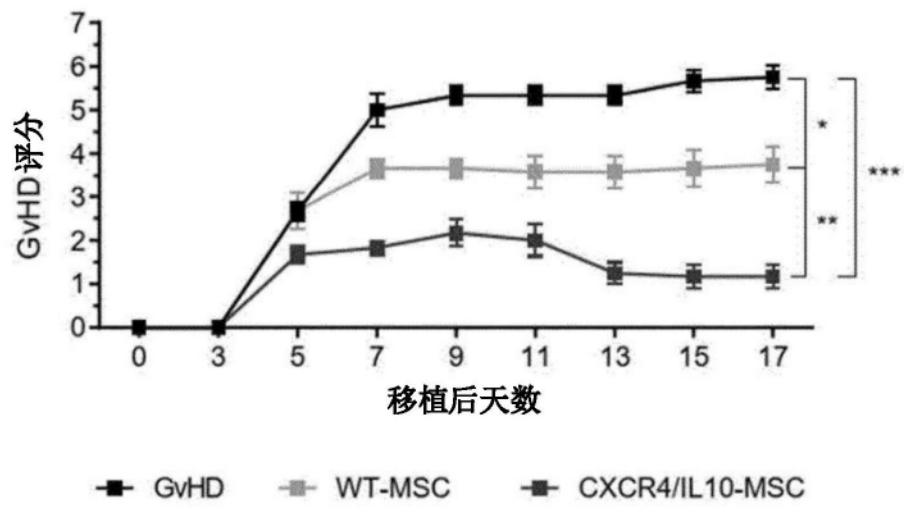
A**B**

图12

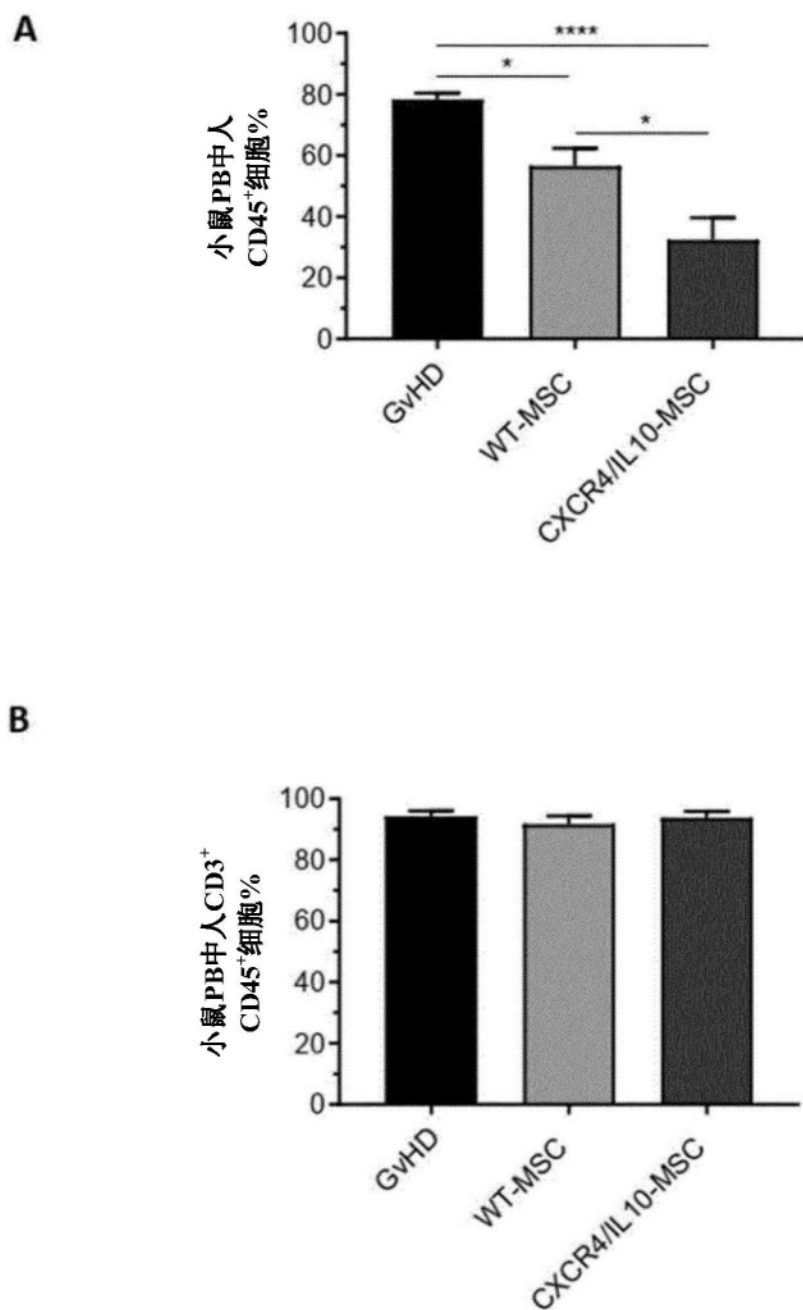


图13

C

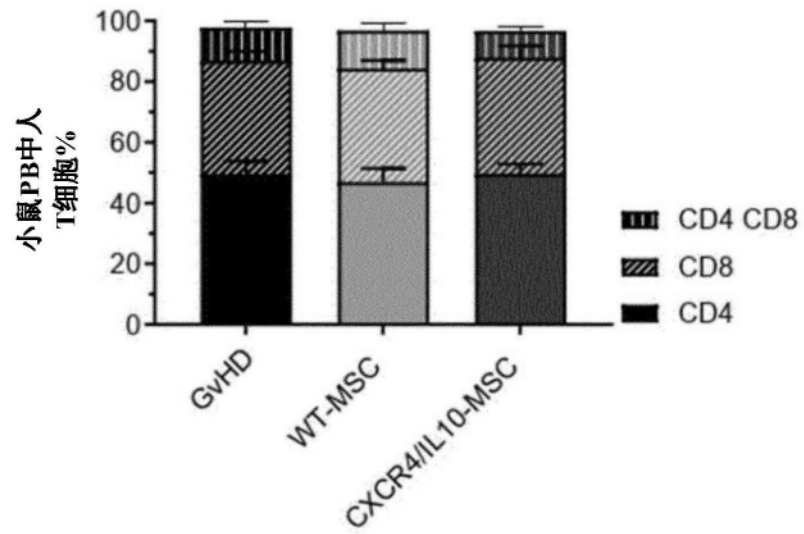


图13续

A

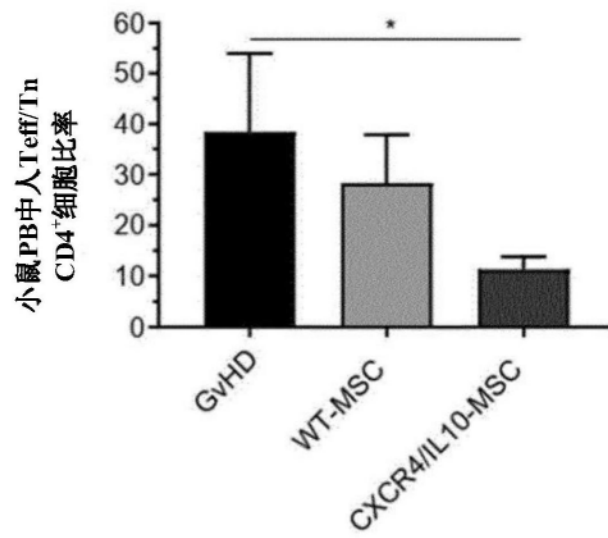


图14

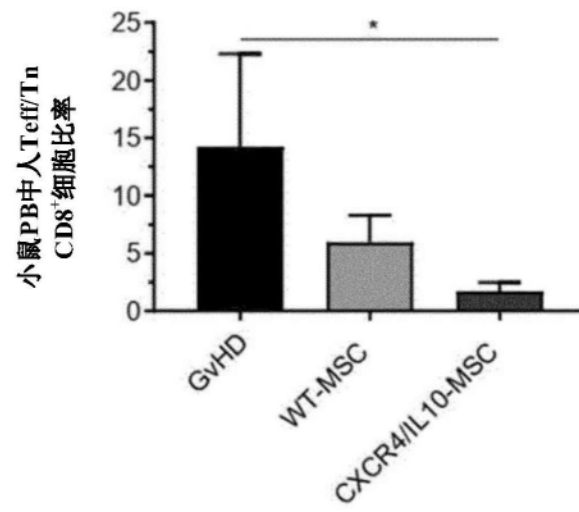
B

图14续

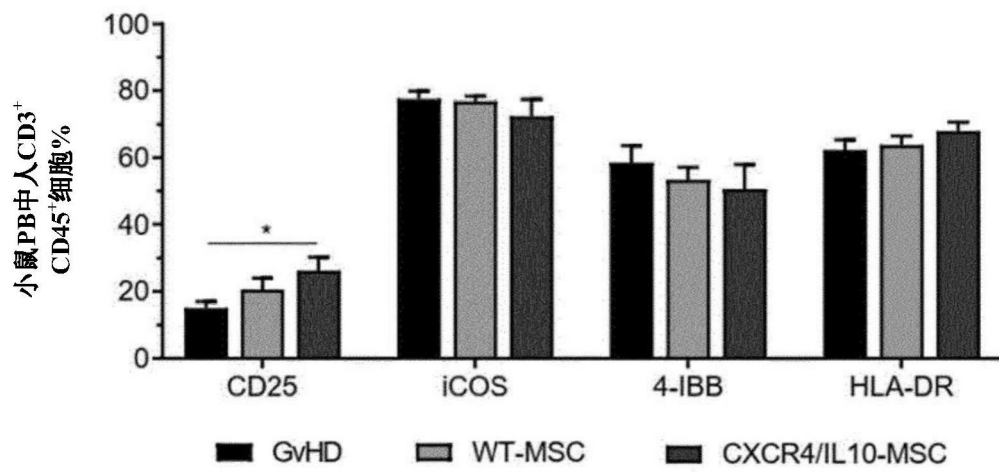


图15

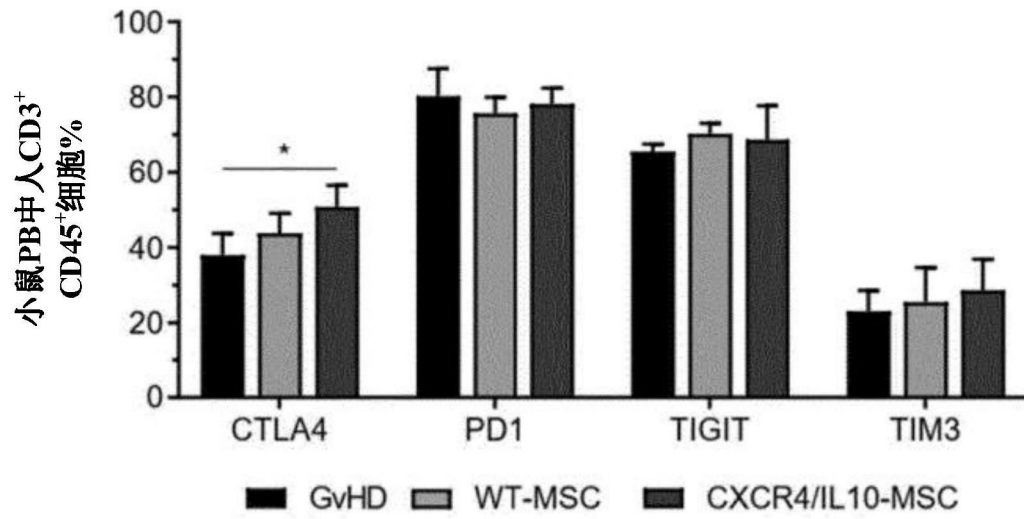


图16

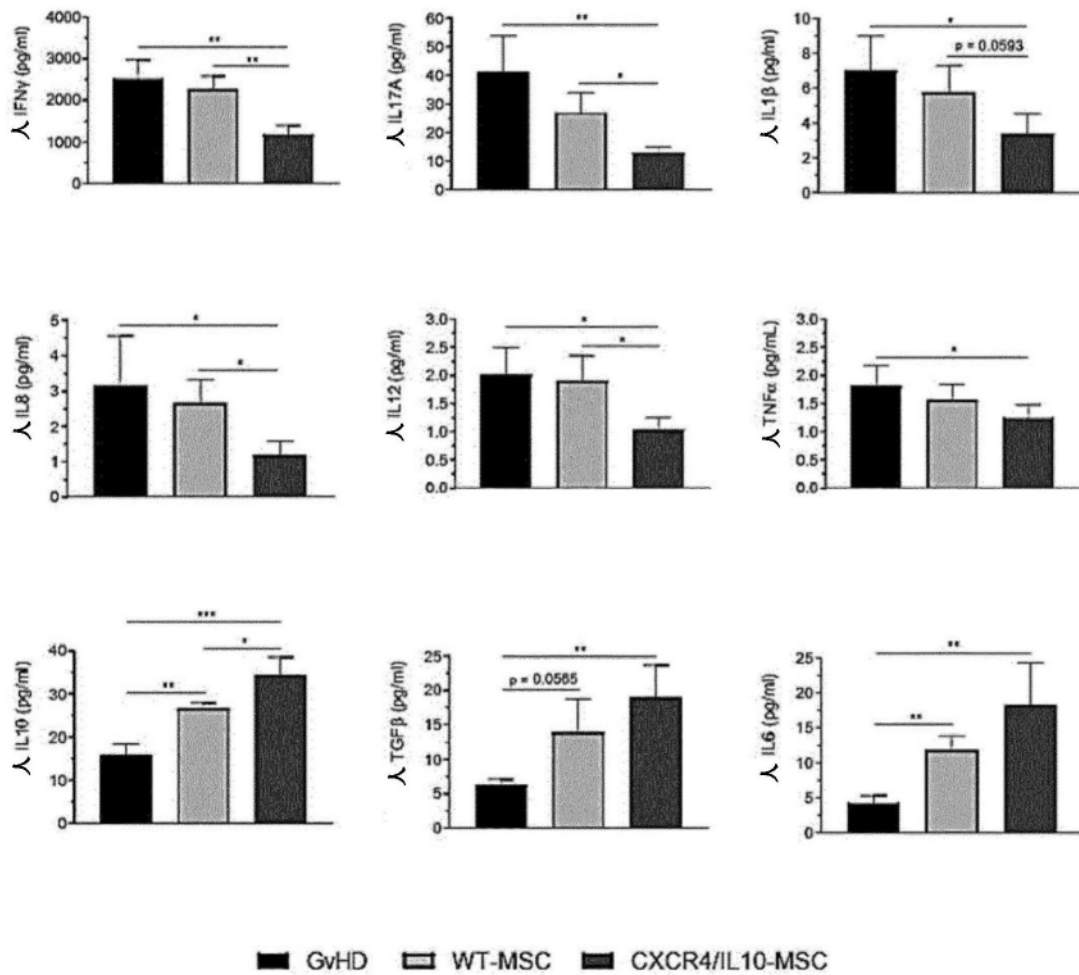


图17

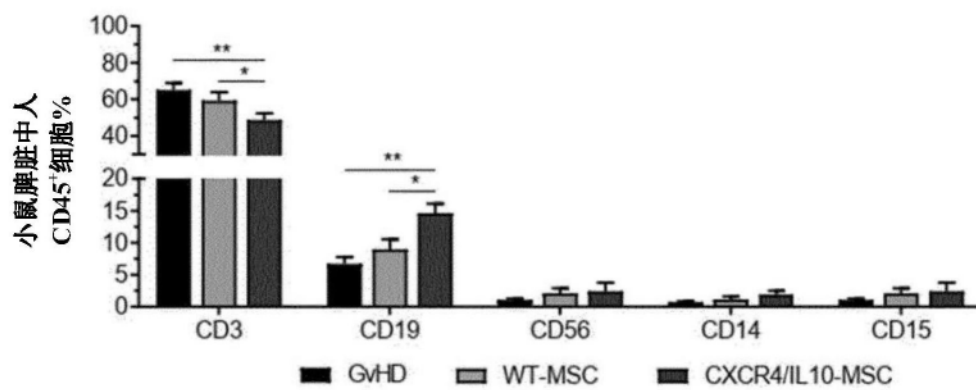


图18

A

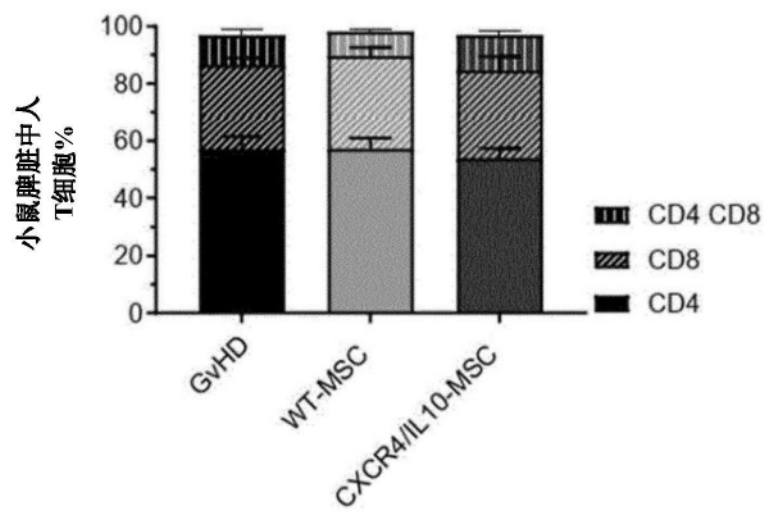


图19

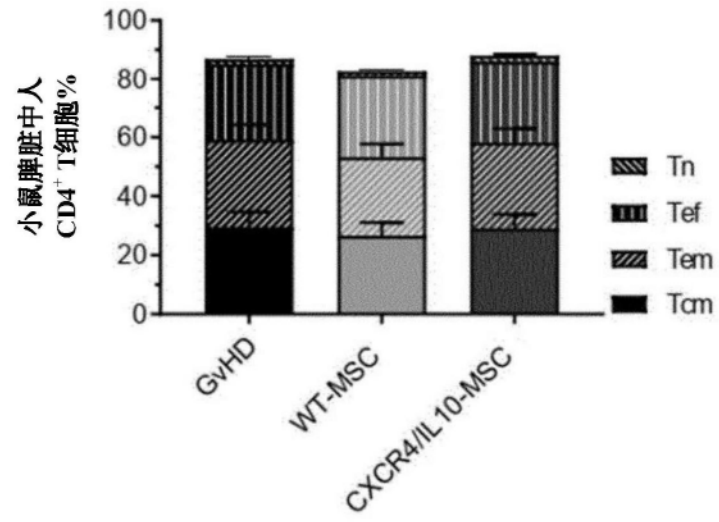
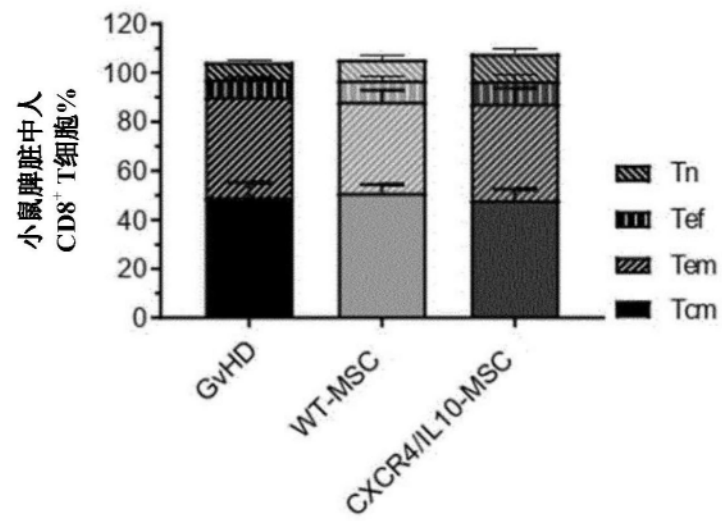
B**C**

图19续

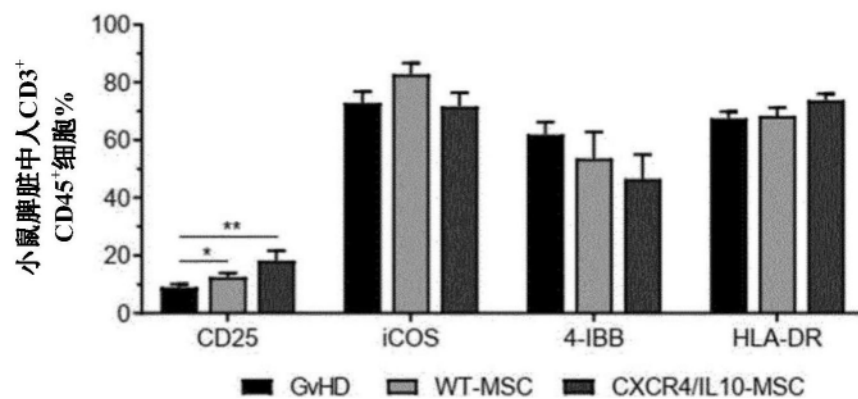
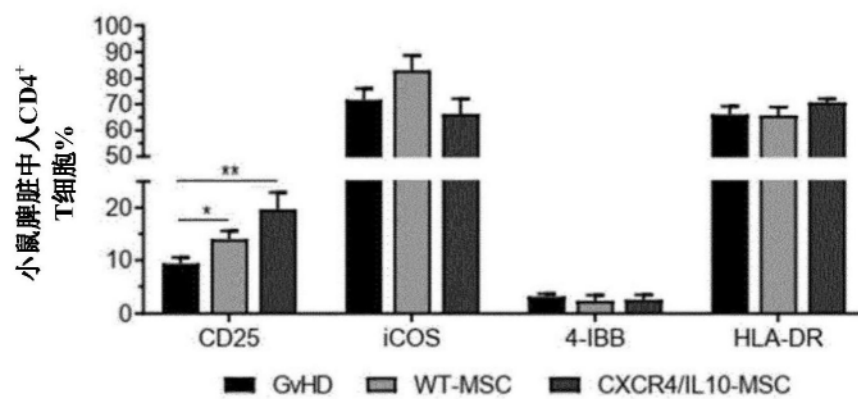
A**B**

图20

C

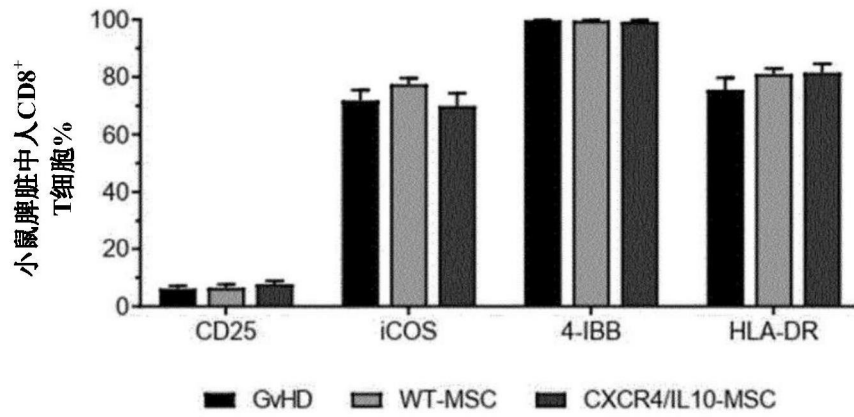


图20续

A

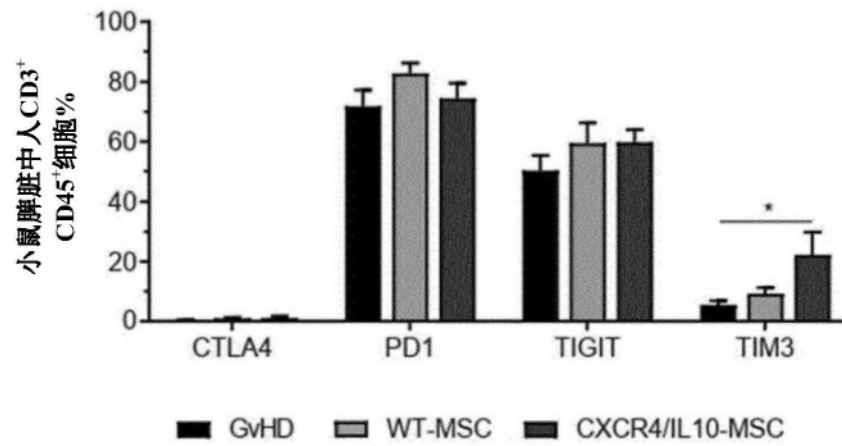


图21

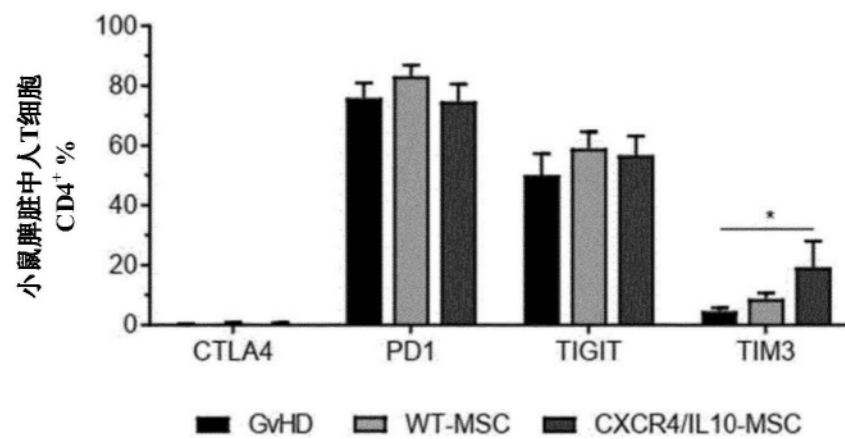
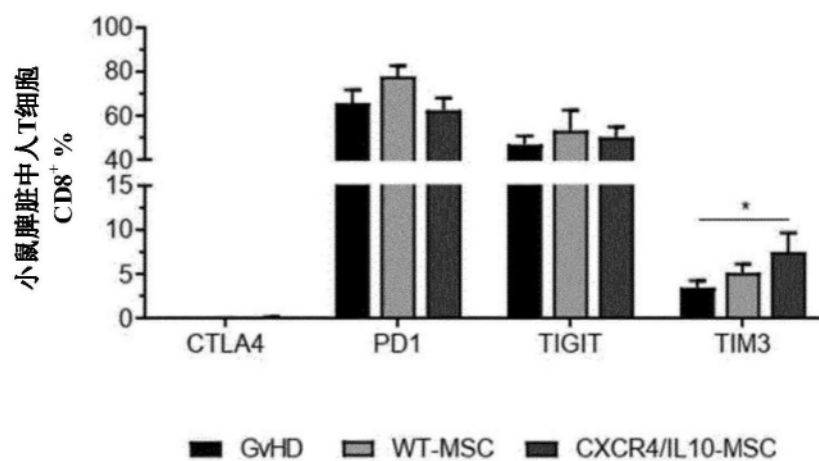
B**C**

图21续

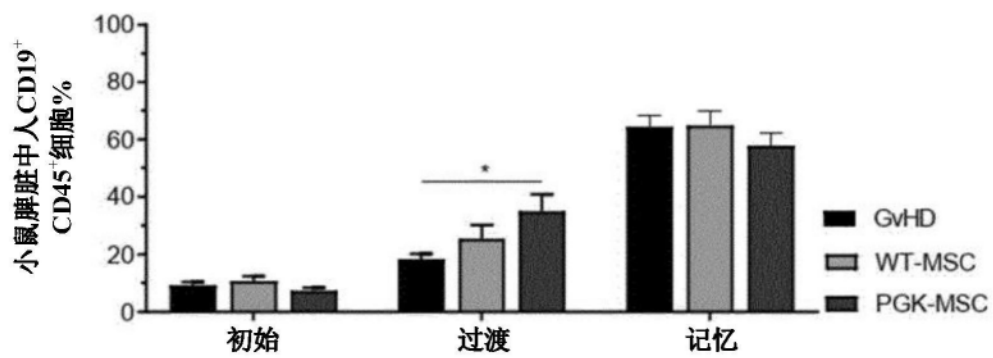


图22

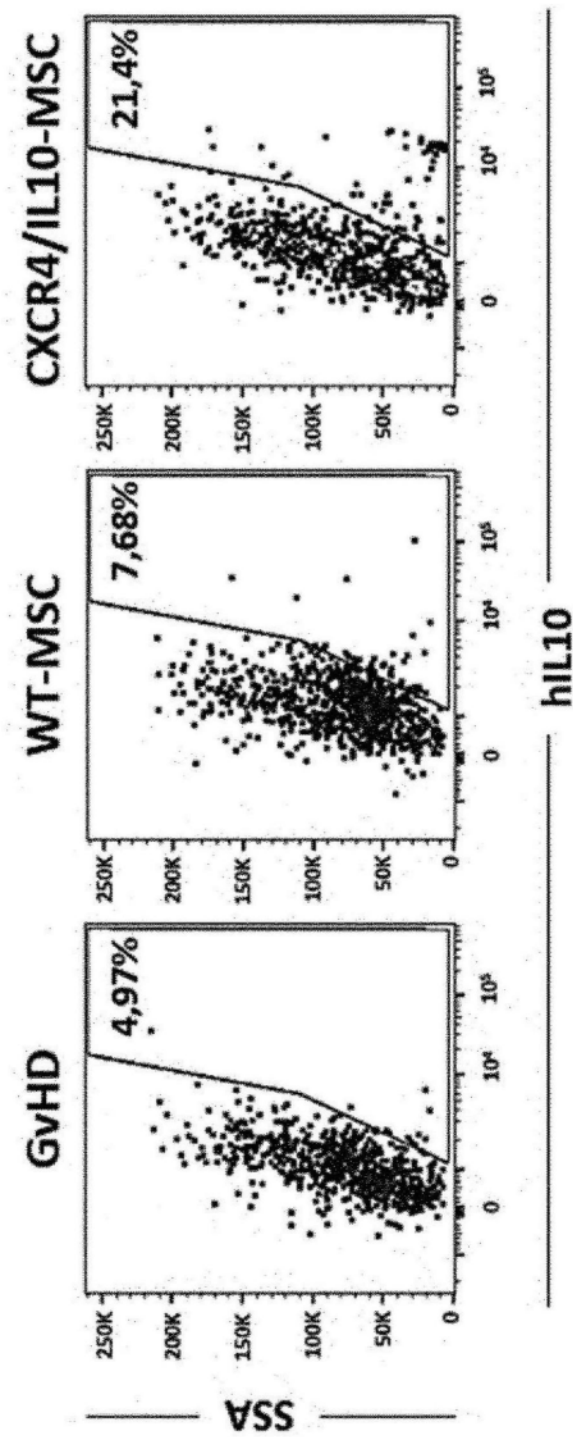
A

图23

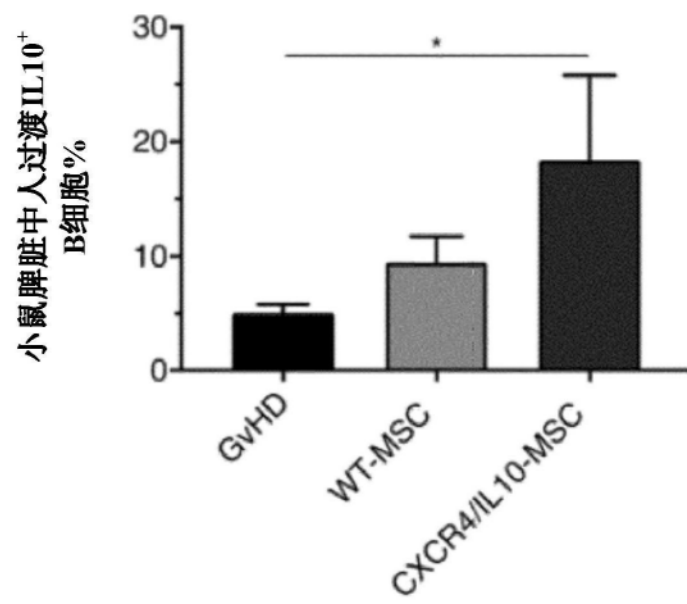
A

图23续

B

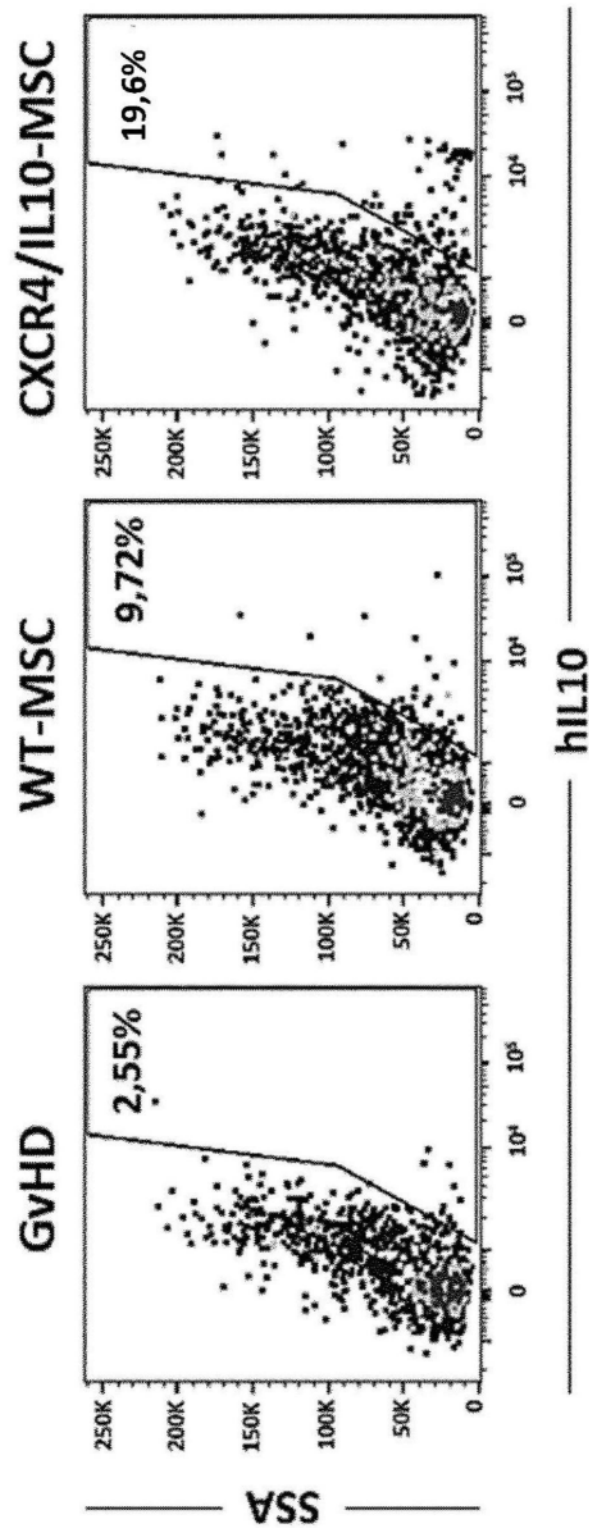


图23续

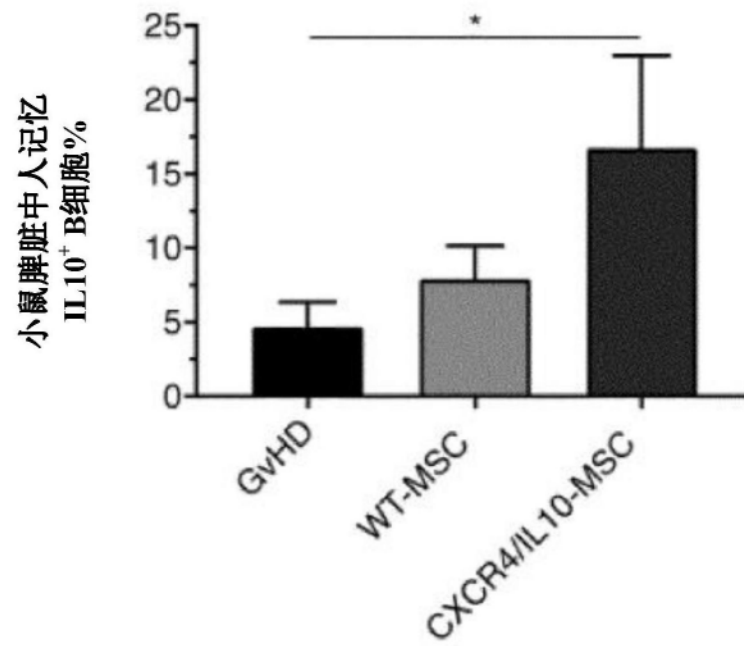
B

图23续

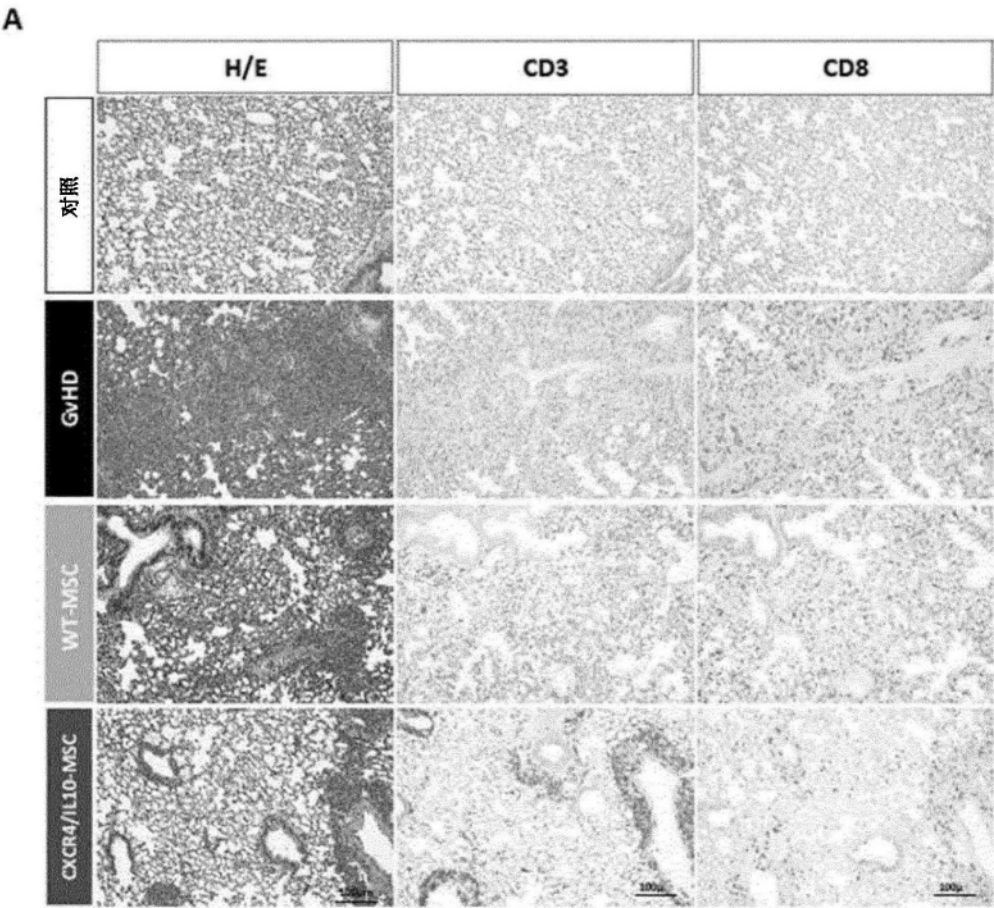


图24

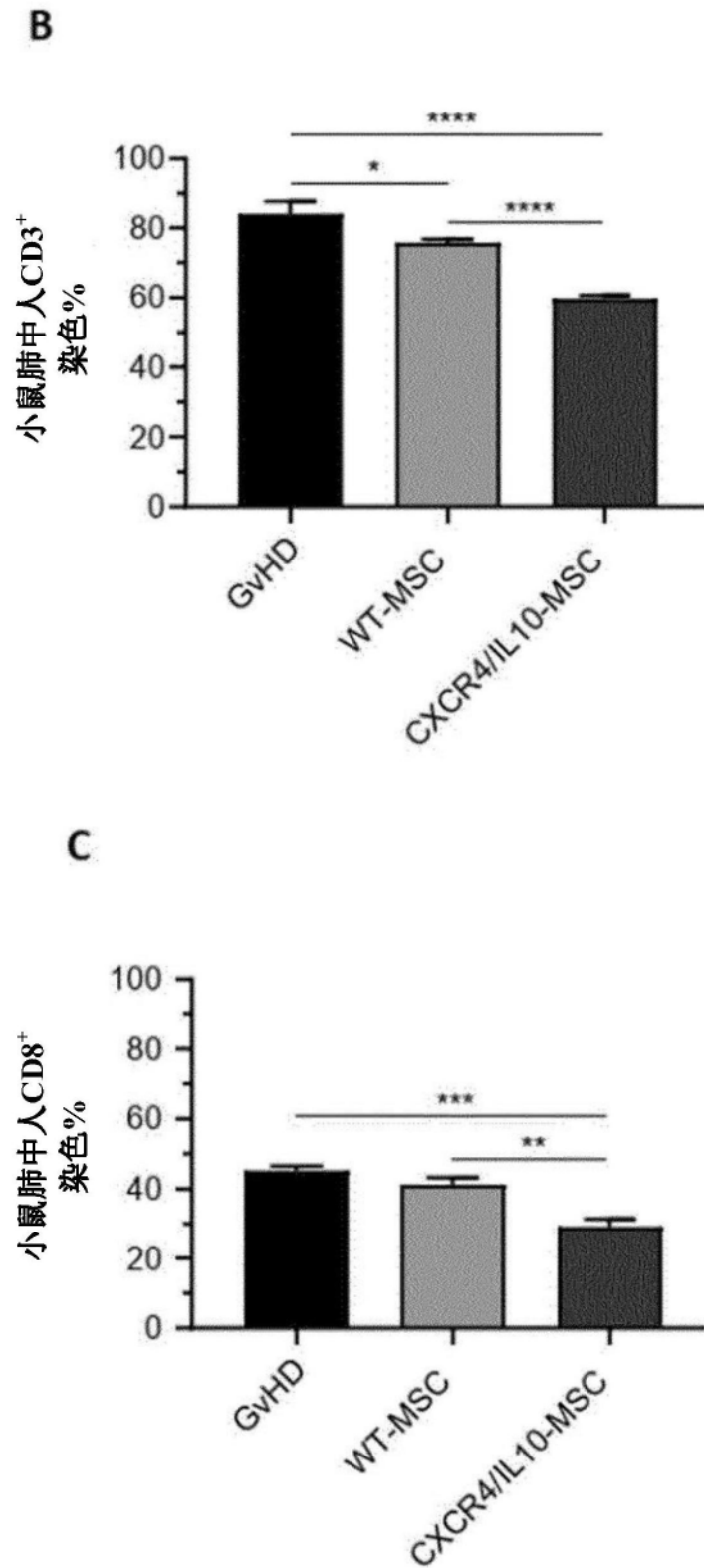


图24续

A

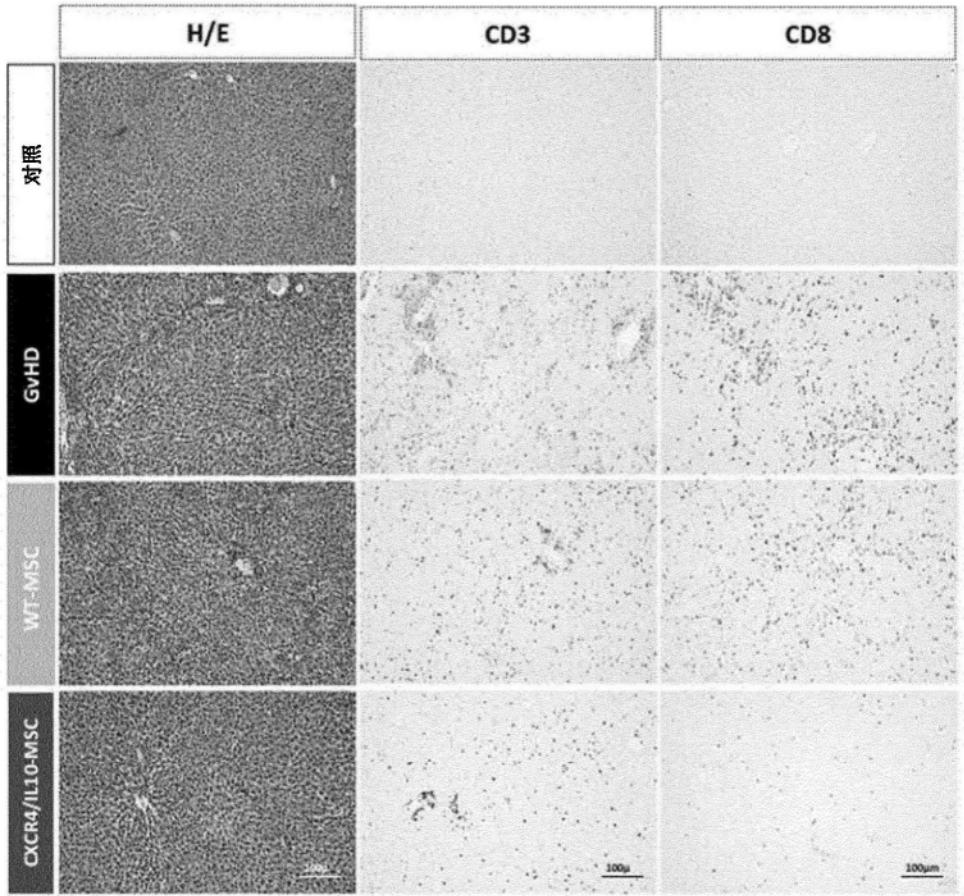


图25

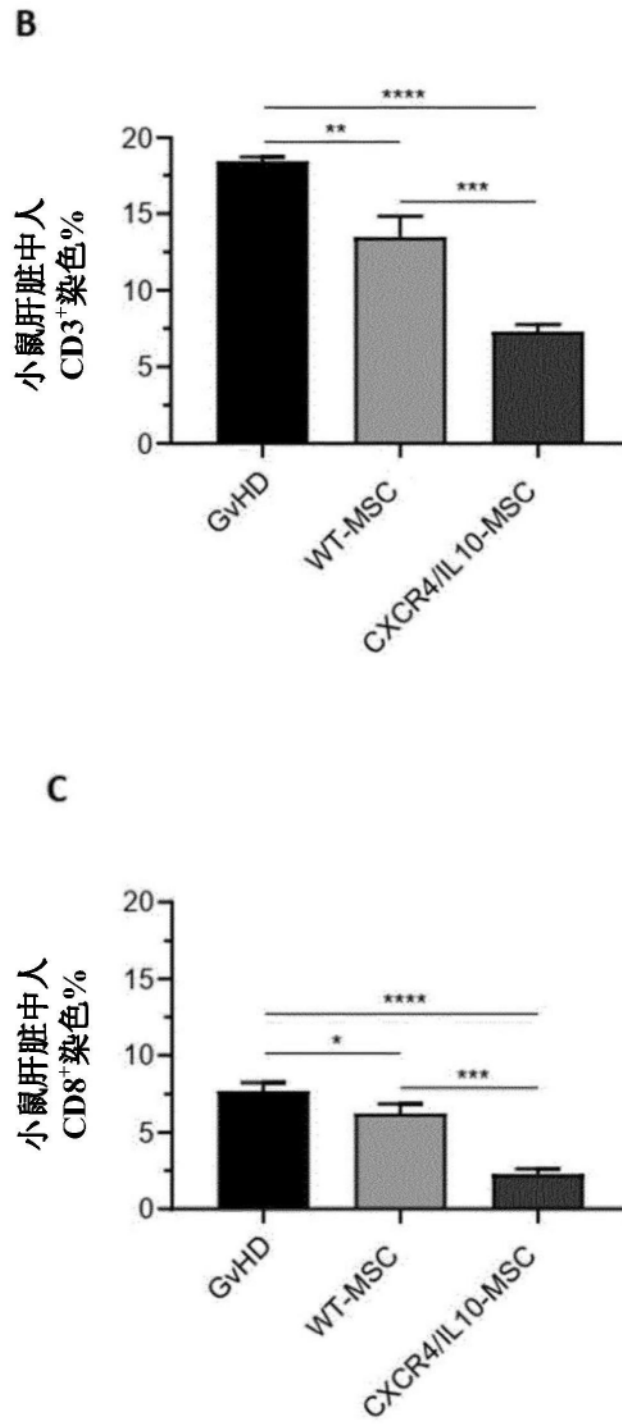


图25续

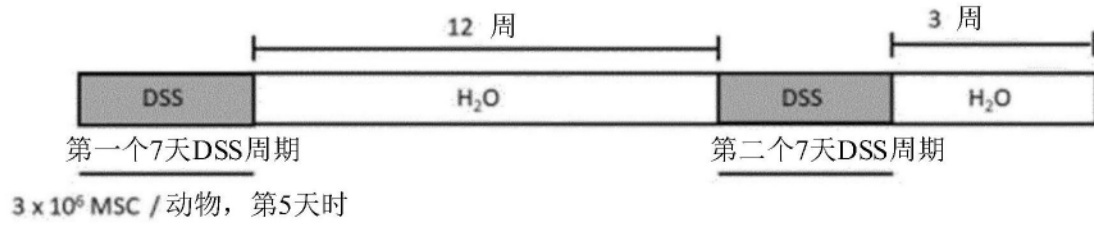


图26

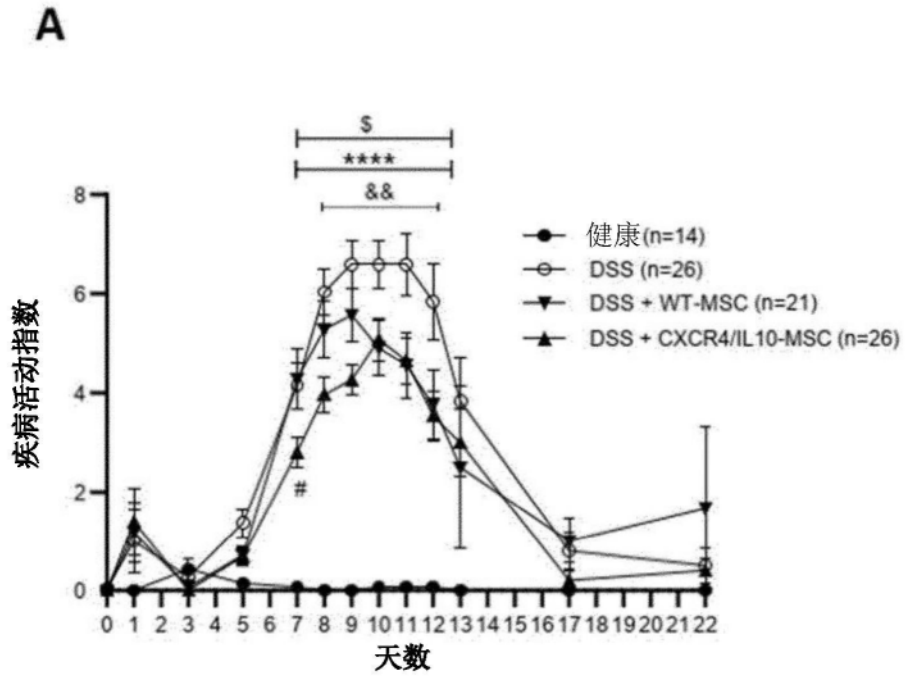


图27

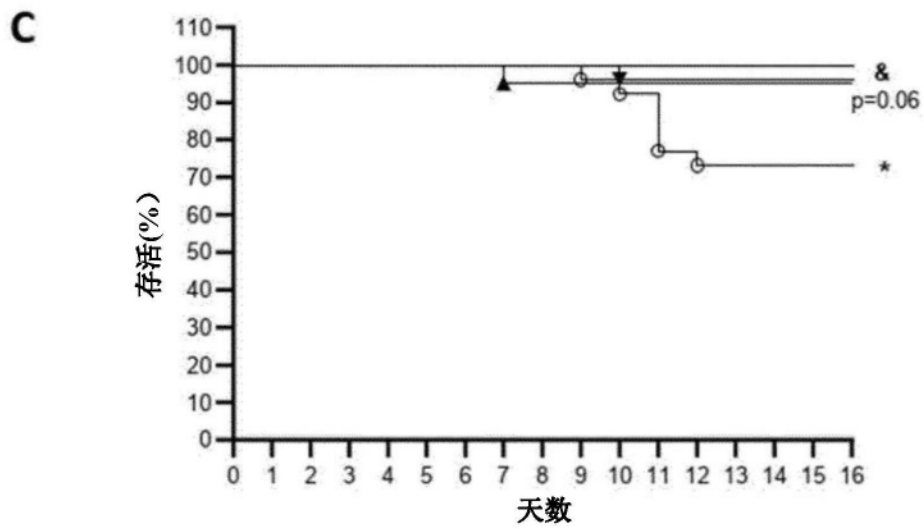
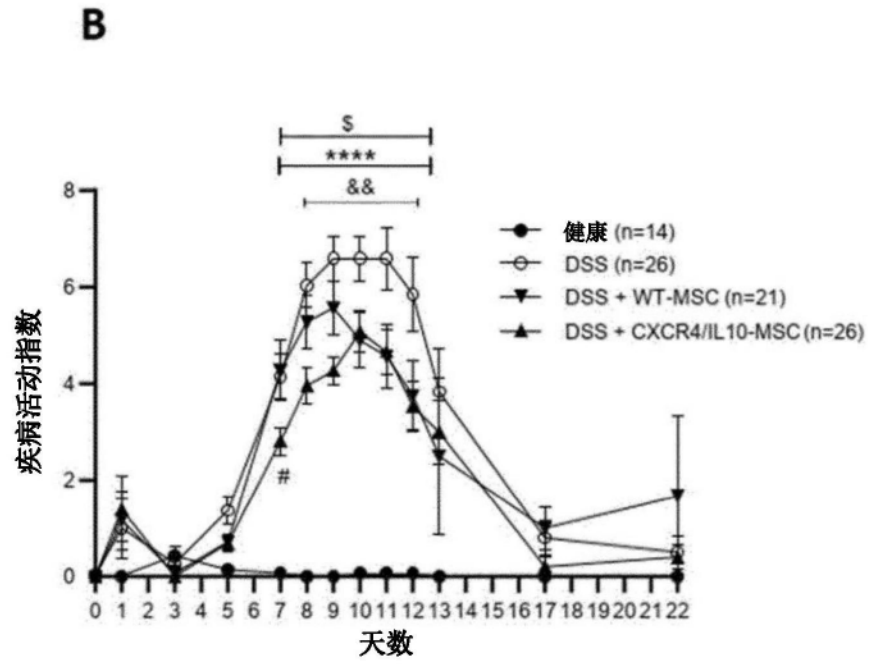


图27续

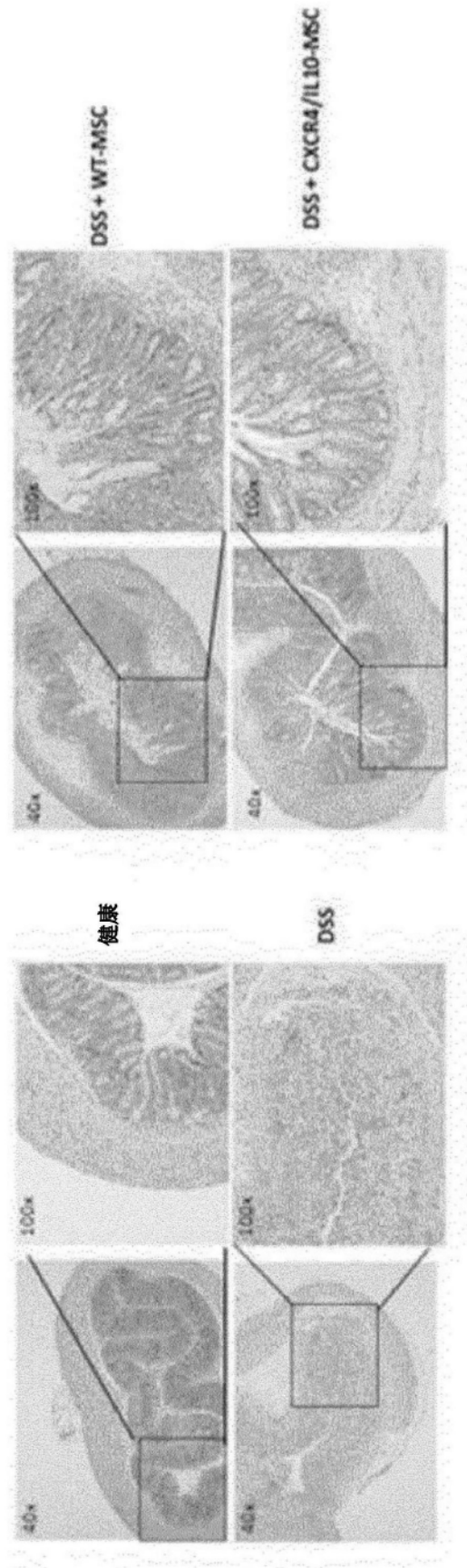
D

图27续

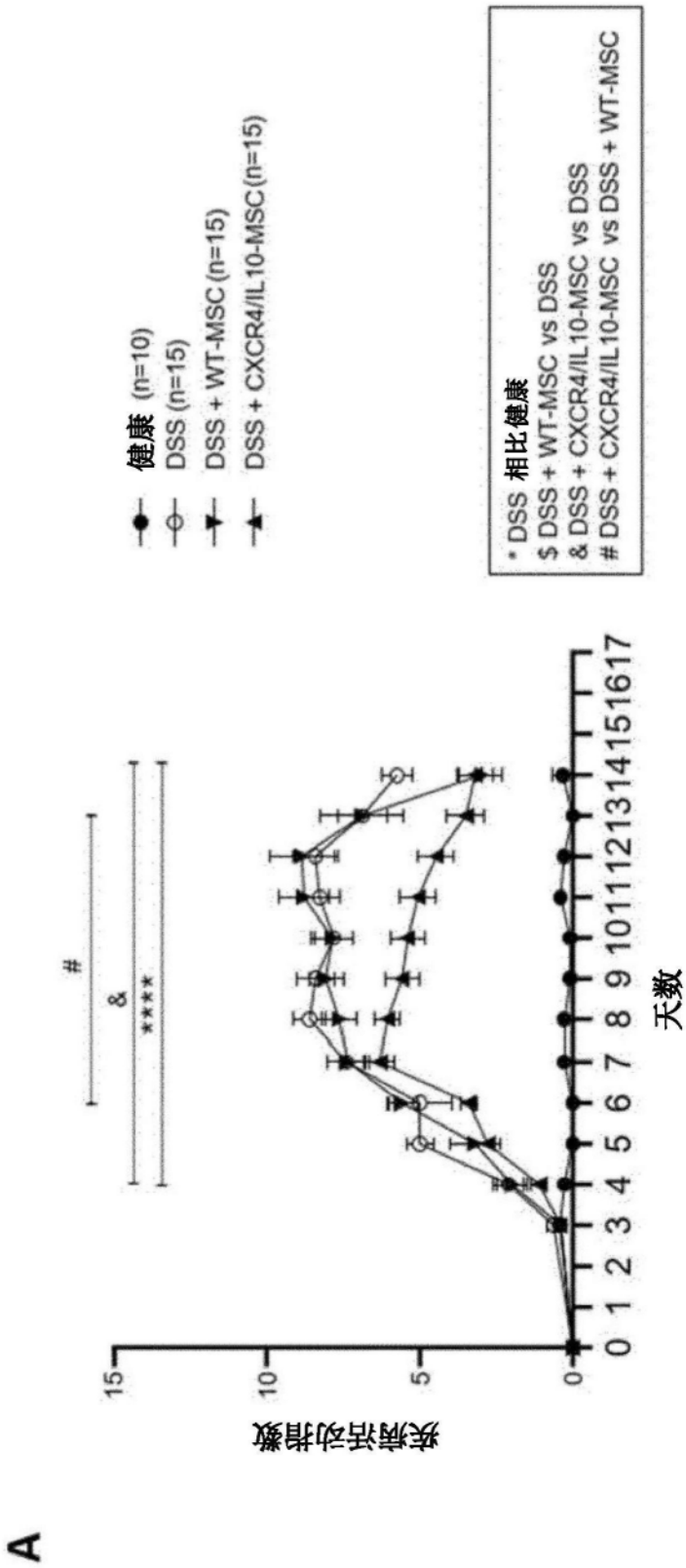


图28

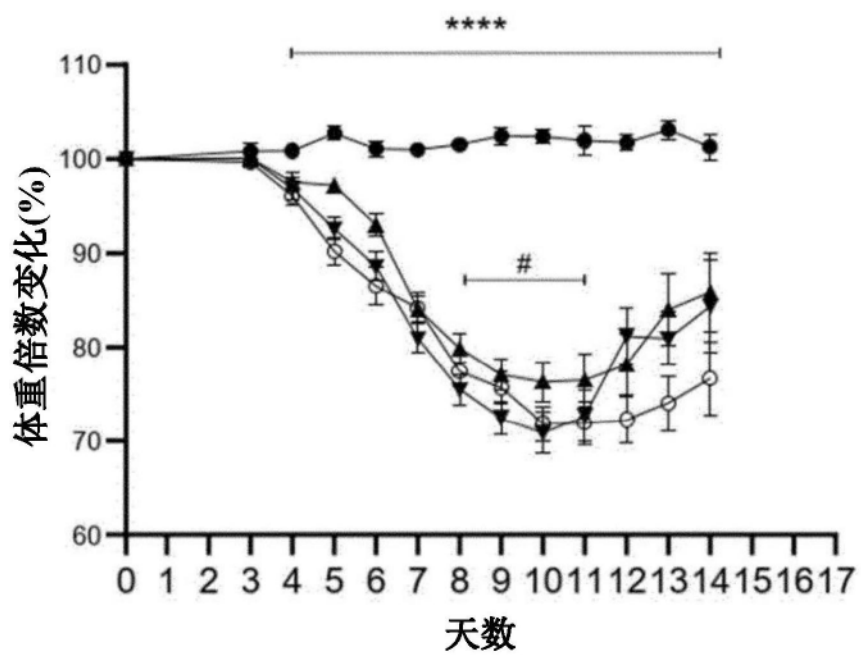
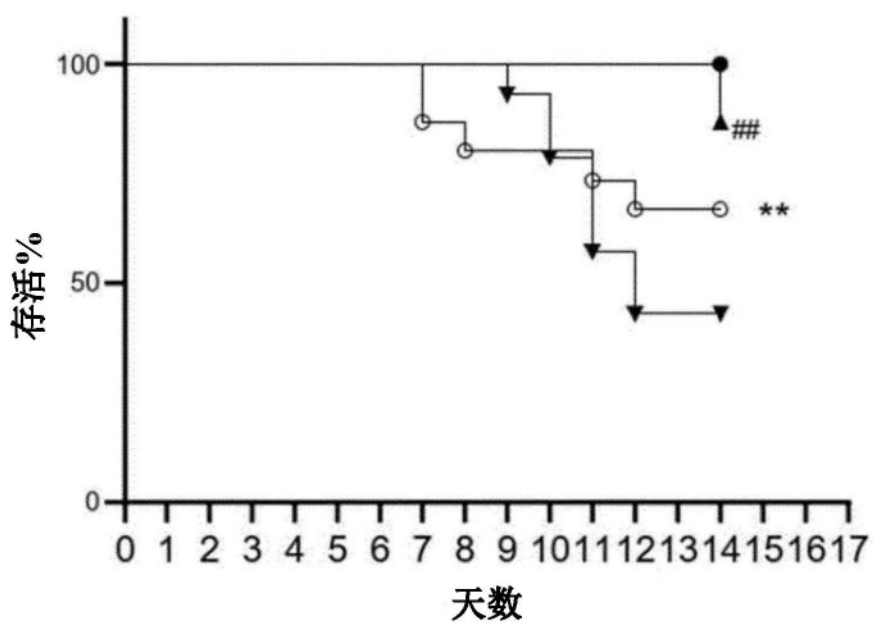
B**C**

图28续