201625280

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201625280 A

(43)公開日： 中華民國 105 (2016) 年 07 月 16 日

(21)申請案號：104138263 (22)申請日： 中華民國 104 (2015) 年 11 月 19 日

(51)Int. Cl.： *A61K35/28 (2015.01)* *A61P19/00 (2006.01)*

(30)優先權：2014/11/19 美國 62/081,880

(71)申請人：幹細胞生物科技股份有限公司 (美國) STEMBIOS TECHNOLOGIES, INC. (US)
美國

(72)發明人：王 俊麟 WANG, JAMES (US)

(74)代理人：惲軼群

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：1 共 15 頁

(54)名稱

用於治療骨骼缺損之體幹細胞

SOMATIC STEM CELLS FOR TREATING BONE DEFECTS

(57)摘要

一種治療一個體內的骨骼缺損的方法，其包含投與有效量之經單離的體幹細胞至需要其之個體內的骨骼缺損處，其中該體幹細胞大小為大約 2 至 8.0μm 且為 Lgr5+或 CD349+。

A method of treating a bone defect in a subject, comprising administering to a subject in need thereof at a bone defect site an effective amount of isolated somatic stem cells, wherein the somatic stem cells are about 2 to 8.0 μm in size and are Lgr5+ or CD349+.

201625280

發明摘要

※ 申請案號：104138263

※ 申請日：104.11.19　　※IPC 分類：A61K 35/28 (2015.01)
A61P 19/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

用於治療骨骼缺損之體幹細胞
SOMATIC STEM CELLS FOR TREATING BONE DEFECTS

【中文】

一種治療一個體內的骨骼缺損的方法，其包含投與有效量之經單離的體幹細胞至需要其之個體內的骨骼缺損處，其中該體幹細胞大小爲大約2至8.0 μm且爲Lgr5+或CD349+。

【英文】

A method of treating a bone defect in a subject, comprising administering to a subject in need thereof at a bone defect site an effective amount of isolated somatic stem cells, wherein the somatic stem cells are about 2 to 8.0 μm in size and are Lgr5+ or CD349+.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（　　）圖。(無)

【本代表圖之符號簡單說明】：

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)。

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】（中文/英文）

用於治療骨骼缺損之體幹細胞

SOMATIC STEM CELLS FOR TREATING BONE DEFECTS

【技術領域】

相關申請案之交叉引述

[0001]本申請案主張2014年11月19日提申之美國專利臨時申請案第62/081,880之優先權，其之整體內容係併入本文以作爲參考資料。

發明領域

[0002]本發明係有關於用於治療骨骼缺損之體幹細胞。

【先前技術】

發明背景

[0003]幹細胞爲多潛能的或全能的幹細胞，其等能於活體內或活體外分化成許多的或者全部的細胞譜系。由於其等之多能性，胚胎幹(ES)細胞保有治療各種各樣的疾病之巨大潛力。然而，道德的考量業已妨礙了人類ES細胞的用途。一種非胚胎起源的幹細胞能規避此障礙。此等成體幹細胞具有如同ES細胞一樣的分化能力。

[0004]業已單離源自骨髓之多潛能的成體前驅細胞，其等能分化成外胚層、中胚層以及內胚層。其他類型的細胞，包括骨髓單離的成體多譜系可誘導的細胞以及衍生自骨髓的單一的細胞殖株，亦具有相同多潛能的分化能力。此等

多潛能的體細胞不易獲得、培養，及擴增。

【發明內容】

發明概要

[0005]本文所描述的是一種治療一個體內的骨骼缺損的方法。該方法包括投與有效量之經單離的體幹細胞至需要其之個體內的骨骼缺損之處。該體幹細胞大小爲大約2至8.0 μm且爲Lgr5+或CD349+。

[0006]該經單離的體幹細胞可以藉由下列的程序來獲得：於一容器中以EDTA或肝素來培養源自一供體個體的樣本直到該樣本分離成上層和下層；收集該上層；以及從該上層單離一體幹細胞族群，其等大小爲大約2至8.0 μm且爲Lgr5+或CD349+。

[0007]以下的附圖及說明中列舉一個或更多個具體例之細節。從本說明及圖示，以及從請求項將更明瞭該等具體例之其他特徵、目的及優點。

【圖式簡單說明】

[0008]圖1爲一組影像，其展現出利用SB細胞進行之顱缺損的修復。(A)：陽性和陰性對照。(B)：SB細胞。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

[0009]意外地發現小成體幹細胞(small adult stem cells)，亦即SB細胞，可以從來自個體的樣本單離。SB細胞爲多潛能的或全能的幹細胞，其等能分化成與三種胚胎胚層，即外胚層、內胚層及中胚層，有關聯的細胞類型。參見，

US2012/0034194。

[0010]從一種生物樣本(例如，一種骨髓樣本)單離的SB細胞大小爲大約2至6.0 μm，CD133-、CD34-、CD90-、CD66e-、CD31-、Lin1-、CD61-、Oct4+、Nanog+，以及Sox2-。在SB細胞族群之中，有一種獨特的細胞亞族群，其等爲CD9-及Lgr5+ ("Lgr5+SB細胞")。有另一種SB細胞亞族群，其等爲CD9+及CD349+ ("CD349+ SB細胞")。

[0011]SB細胞可以使用下列的程序從一樣本單離。該樣本係用EDTA或肝素於一容器中(例如，於EDTA管中)培養，直到該樣本分離成上層和下層。培養可以在4℃下執行歷時6至48小時。由以上的培養步驟生產的上層含有SB細胞(例如，Lgr5+ SB細胞及CD349+ SB細胞)，其等之單離可以使用根據細胞大小的方法(例如，離心和過濾)，或者根據細胞表面標誌的該等方法(例如，流動式細胞測量術、抗體，以及磁力分選)。

[0012]爲了濃化(enrich)SB細胞，可以從上層中的該細胞族群移除Lin+細胞及CD61+細胞。任擇地，可以從該細胞族群選擇Lin-細胞及CD61-細胞。Lin+及CD61+細胞可以使用本技藝已知的方法予以移除或選擇，例如，EasySep Biotin Selection Kit及EasySep PE Selection Kit。

[0013]爲了進一步濃化SB細胞，在從該個體獲得一樣本之前，可以投與顆粒球群落(colony)刺激因子(GCSF)或褐藻醣膠(fucoidan)至該個體。舉例而言，在獲得樣本以前，該個體可以注射以5μg/kg/每天的GCSF歷時1至5天。以下所

描述的資料顯示GCSF可以動員SB細胞。GCSF-動員的SB細胞之大小爲稍微大一些，亦即，大約4至8 μm。

[0014]SB細胞可以從一種樣本單離，例如血液、骨髓、骨骼肌，或者脂肪的組織樣本。於樣本爲一種骨骼肌或者脂肪組織樣本的一個具體例中，在培養步驟以前，組織樣本首先可以用一膠原蛋白酶來消化以從細胞外的基質釋放個別的細胞。該樣本可以獲得自一人類個體。

[0015]經單離的SB細胞，Lgr5+ SB細胞，或者CD349+ SB細胞可以於一種非分化培養基中進一步的增殖超過10、20、50，或者100族群的倍增，而沒有顯示自發性的分化、衰老、形態變異、增高的生長速率，或者分化能力改變的情況。此等幹細胞在使用前可以用標準的方法予以儲存。

[0016]術語“幹細胞”係提及一種細胞，其爲全能或多潛能的，亦即能夠分化成一些最終的、分化細胞類型。全能幹細胞典型地具有發展成任一種細胞類型的能力。全能的幹細胞之起源可以爲胚胎或者非胚胎。多潛能的細胞典型爲細胞，其等能夠分化成數種的不同的、最終分化的細胞類型。單潛能幹細胞僅可以生產一種細胞類型，但是其具有能與非幹細胞區分的自我更新的性質。此等幹細胞可以發源自各種各樣的組織或者器官系統，包括血液、神經、肌肉、皮膚、腸、骨骼、腎臟、肝臟、胰臟、胸腺，以及類似物。

[0017]於此所揭示的幹細胞爲實質純的。術語"實質純的"，當參照幹細胞或者幹細胞衍生的細胞(例如，分化的

細胞)來使用時，係意指該特定的細胞組成製備物中多數的細胞(亦即，超過20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%，或者95%)。一般說來，一種實質純化的細胞族群組成製備物中至少大約70%的細胞，通常爲製備物中大約80%的細胞，以及特別地爲製備物中至少大約90%的細胞(例如，95%、97%、99%或者100%)。

[0018]當於本文中交換地使用，有關於細胞之術語"增生(proliferation)"和"擴增(expansion)"，係意指相同類型的細胞數目藉由分裂而增加。術語"分化"係提及一種發展過程，藉由此發展過程細胞變成特化成一種特定的功能，舉例而言，細胞獲得與最初的細胞類型相異的一種或多種形態特徵及/或功能。術語"分化"包括譜系確定(lineage commitment)及終末分化(terminal differentiation)過程二者。分化之評估可以，舉例而言，透過使用免疫組織化學法或者本技藝熟習此藝者已知的其他程序，來監測存在或者缺少譜系標誌。衍生自前驅細胞之分化的後代細胞可以，但是非必需，相關於幹細胞的來源組織相同的胚層或者組織。舉例而言，神經前驅細胞及肌肉前驅細胞可以分化成造成血細胞譜系。

[0019]當於本文中交換地使用，術語"譜系確定(lineage commitment)"及"規格(specification)"，係提及一種幹細胞經歷的過程，其中該幹細胞產生一種前驅細胞確定會形成一種特定的限定範圍的分化細胞類型。確定的前驅細胞通常能夠自我更新或者細胞分裂。

[0020]術語"終末分化"係提及一種細胞成爲成熟、完全分化的細胞之最終的分化。舉例而言，神經前驅細胞及肌肉的前驅細胞可以分化成造血細胞譜系，其等之終末分化導致一種特定的細胞類型之成熟的血液細胞。通常，終末分化係與退出細胞週期及增生中斷有關聯。當使用於本文中，術語“前驅細胞”係提及一種細胞，其確定會成一種特定的細胞譜系，其係藉由一系列的細胞分裂來產生此譜系的細胞。一種前驅細胞之實例會是一種肌母細胞(myoblast)，其僅僅能夠分化成一種細胞類型，但是其自身不是完全成熟或者完全分化的。

[0021]Lgr5+或者CD349+ SB細胞可以使用來治療或修復一病人體內的骨骼缺損。爲了治療一病人體內的骨骼缺損，Lgr5+或者CD349+ SB細胞可以單獨地投與至該個體缺損處。該等細胞也可以連同骨骼移植物(例如，一種自體移植物或同種異體移植物)或骨骼移植物代用品(例如，去礦質骨骼基質、膠原蛋白爲基的基質、羥磷石灰、磷酸鈣，以及硫酸鈣)一起投與。

[0022]Lgr5+或者CD349+ SB細胞亦可以先植入於一種支架或基質內。該支架或基質繼而植入缺損處。組成幹細胞支架之一種或多種材料(例如，膠原蛋白、瓊脂糖、藻酸鹽、透明質酸(hyaluronan)、幾丁聚醣、PLGA，以及PEG)爲本技藝已知的。

[0023]“骨骼缺損”係提及於骨骼中的一區域缺少或者缺乏骨骼組織(亦即，礦化的骨骼基質)。骨骼缺損可以起因

於各種各樣的原因，例如創傷、癌症，或者先天性疾病。

[0024]異源性及自體的Lgr5+或者CD349+ SB細胞二者均可以使用來治療的一病人。設若使用異源性細胞，應該要進行HLA-配型(HLA-matching)以避免宿主反應或者使宿主反應減到最少。自體的細胞可以從一個體濃化及純化以及儲存以備後用。該等細胞可以於擬體內(ex vivo)宿主或者移植物T細胞存在下予以培養，以及再導入至宿主內。此可能有的優點爲宿主將細胞識別爲自我的以及於T細胞活性提供更佳縮減。

[0025]遺傳工程建造組織可相容的全適供應者(histocompatible universal donor) Lgr5+或者CD349+ SB細胞，亦可以使用本技藝已知的方法來製備。更特別地，本文所描述的幹細胞可以予以遺傳工程建造成不表現其等之表面第II型MHC分子。該等細胞亦可以予以工程建造成不表現實質全部的細胞表面第I型和第II型MHC分子。當使用於本文中，術語"不表現"係意指不足以引出一反應的量表現於細胞表面上，或者表現的蛋白質是有缺陷的且因而不會引出一反應。

[0026] “治療(Treating)”係提及投與至一種組成物(例如，一種細胞組成物))至一個體，該個體罹患該失調或者處於發展該失調的風險，目的爲了治癒、緩和、緩解、醫治(remedy)、延遲發作、預防，或者減輕該失調，失調的症狀，失調續發的疾病狀態，或者損傷/失調之素因。“有效量”係提及組成物的量能夠於一治療的個體內產生醫學上所欲的

結果。治療的方法可以單獨地執行或者結合其他的藥物或者療法來執行。

[0027]以下特定的實施例要解讀爲僅僅作例證的，以及無論以任何方式不限制本揭示的其餘部分。在沒有進一步詳細闡述的情況下，據信熟習此藝者根據本文的說明、能夠最大程度地使用本揭示。本文中列舉的全部出版物係以其等之整體併入以作爲參考資料。

實施例

[0028]從一人類個體取出一種骨髓樣本以及放置於於抗凝血的EDTA管中。在4℃下培養歷時6至48小時之後，該樣本分離成二層。頂層含有一種體幹細胞族群(SB細胞s)，其經由C6 accuri流動式細胞測量術、免疫細胞化學法，以及RT-PCR予以進一步的分析。底層含有紅及白血液細胞，其等小於6.0 μm。

[0029]使用分級小珠來進行流動式細胞測量術，決定SB細胞的大小。SB細胞的大小係介於2和6微米之間。SB細胞不是Lgr5+就是CD349+。P2閘中的細胞族群之32%表現Lgr5。

[0030]吾人發現SB細胞可以藉由注射GCSF予以動員。相同的人類個體注射以5μg/kg/每天的GCSF歷時5天。最後的注射大約3.5小時之後，收集周邊的血液樣本。SB細胞係如以上所述從血液樣本單離以及經由流動式細胞測量術來分析。當與GCSF注射以前從該個體單離的SB細胞比較，細胞的大小增加至4~8微米以及Lgr5+細胞的百分比也增加。

[0031]將正常的人類血液(購自於AllCell)放置於抗凝血的EDTA管中，添加HetaStarch(購自於StemCell)。血液樣本分離成二層。CD61+血小板和Lin+細胞，其包括紅及白血液細胞，係分別依照製造商的說明來使用EasySep Biotin Selection Kit和EasySep PE Selection Kit而從頂層移開。之後，移動Lin+和CD61+細胞，獲得一種經純化的Lgr5+或者CD349+ SB細胞族群。

[0032]一百萬個以上經純化的SB細胞連同膠原蛋白海綿的一起植入至SCID小鼠於顱缺損處，該處係透過從顱骨移除一塊骨骼所創造的。於SB細胞植入於缺損處3或5個月之後，透過微型電腦斷層攝影影像來分析小鼠。如同圖1中所顯示的，SB細胞能夠形成骨骼結構以修復缺損處。一種以人類骨髓細胞來治療的小鼠，該人類骨髓細胞過度表現一種人類骨成形性蛋白質7(hBMP7)，係用作爲陽性對照。一種用只有膠原蛋白海綿的及PBS來治療的小鼠係用作爲陰性對照。

其他的具體例

[0033]本說明書所揭示的全部特徵可以組合以任何組合。本說明書所揭示的各個特徵可以用提供相同的、均等的，或者相似的目的之替代的特徵來代替。因而，除非另有明確陳述，否則所揭示的各個特徵僅僅爲一種通用系列的均等物或者相似的特徵之實例。

[0034]從以上的說明，熟悉此藝者可以容易地確定所描述具體例之必須的特徵，以及在沒有背離其精神和範疇的

情況下，可以做出具體例各種各樣的改變和修飾以適應各種各樣的用法和條件。因而，其他的具體例亦落在請求項的範圍內。

【符號說明】

(無)

申請專利範圍

1. 一種治療一個體內的骨骼缺損的方法，其包含投與有效量之經單離的體幹細胞至需要其之個體內的骨骼缺損之處，其中該體幹細胞大小爲2至8.0μm且爲Lgr5+或CD349+。
2. 如請求項1之方法，其中該體幹細胞爲CD133-、CD34-、CD90-、CD66e-、CD31-、Lin1-、CD61-、Oct4+、Nanog+，以及Sox2-。
3. 如請求項1或2之方法，其中該體幹細胞爲Lgr5+。
4. 如請求項1或2之方法，其中該體幹細胞係藉由下列的程序來獲得：

   於一容器中以EDTA或肝素培養源自一供體個體的樣本直到該樣本分離成一上層和一下層，

   收集該上層，以及

   從該上層單離一體幹細胞族群，其等大小爲2至8.0μm且爲Lgr5+或CD349+。
5. 如請求項4之方法，其中該樣本爲血液或骨髓樣本。
6. 如請求項5之方法，其中，在從該供體個體獲得該樣本之前，該供體個體被投與顆粒球群落(colony)刺激因子或褐藻醣膠(fucoidan)。
7. 如請求項1或2之方法，其中該體幹細胞對該個體爲自體的或異源性的。
8. 如請求項1或2之方法，在該投與步驟之前，該方法進一

步包含：

於一容器中以EDTA或肝素來培養源自一供體個體的樣本直到該樣本分離成一上層和一下層，

收集該上層，以及

從該上層單離一體幹細胞族群，其等大小爲大約2至8.0 μm且爲Lgr5+或CD349+。

9. 如請求項8之方法，其中該樣本爲血液或骨髓樣本。

10. 如請求項9之方法，其進一步包含從該上層移除Lin+細胞及CD61+細胞。

11. 如請求項9或10之方法，其中，在從該供體個體獲得該樣本之前，該供體個體被投與顆粒球群落刺激因子或褐藻醣膠。

12. 如請求項11之方法，其中該供體個體爲具有骨骼缺損之供體或是另一個個體。

13. 如請求項1-12中任一項之方法，其進一步包含投與一骨骼移植物或骨骼移植物代用品至該骨骼缺損之處。

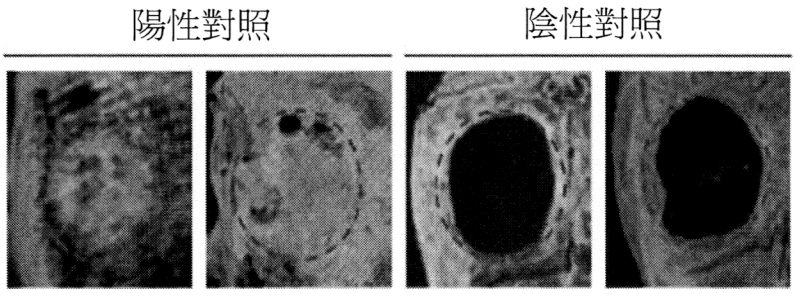
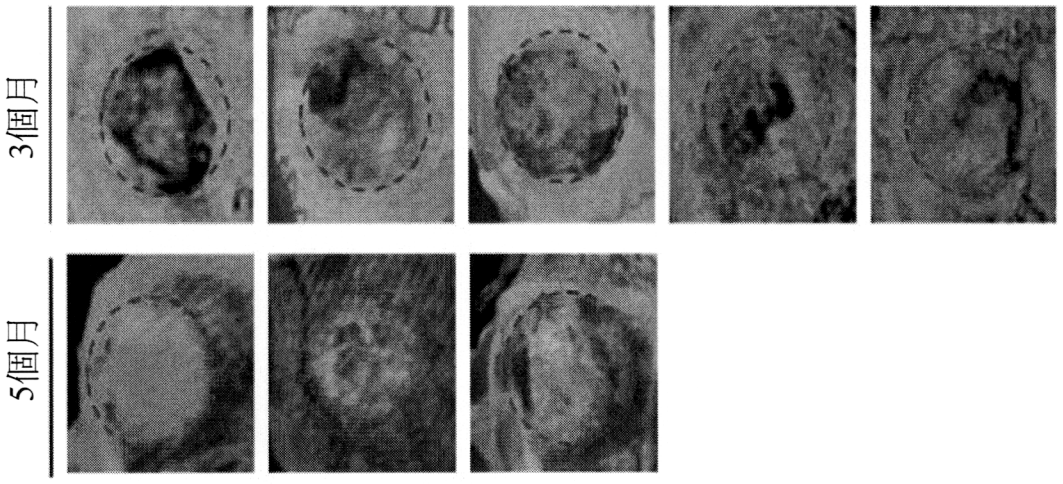
14. 如請求項1-13中任一項之方法，其中該體幹細胞係植入於一支架內。

15. 一種經單離的體幹細胞，其是用於治療一個體內的骨骼缺損，其中該體幹細胞大小爲2至8.0 μm且爲Lgr5+或CD349+。

圖式

圖 1

A.



B.