(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115361960 A
(43)申请公布日 2022.11.18

(21)申请号 202180027192.3

(22)申请日 2021.02.18

(30)优先权数据
2020900472 2020.02.19 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.10.09

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/054066 2021.02.18

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/165420 EN 2021.08.26

(71)申请人 迈索布拉斯特国际有限公司
地址 瑞士梅兰

(72)发明人 S·伊茨库

(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 张小勇

(51)Int.Cl.
A61K 35/28(2015.01)
A61P 37/06(2006.01)
C12N 5/0775(2010.01)

权利要求书2页 说明书19页

(54)发明名称

用于治疗慢性移植物抗宿主病的方法

(57)摘要

本公开涉及治疗或预防有需要的受试者的慢性移植物抗宿主病的方法,所述方法包括向所述受试者施用包括培养扩增的间充质谱系前体或干细胞(MLPSC)的组合物。

CN 115361960 A

1.一种治疗或预防有需要的人类受试者的慢性移植物抗宿主病(cGvHD)的方法,所述方法包括向所述受试者施用包括培养扩增的间充质谱系前体或干细胞(MLPSC)的组合物。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述MLPSC已经被冷冻保存和解冻。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述MLPSC是从中间冷冻保存的MLPSC群体培养扩增的。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述MLPSC被培养扩增至少约5次传代。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述MLPSC每百万MLPSC表达至少13pg TNFR1。

6.根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述MLPSC每百万MLPSC表达约13pg至约44pg TNFR1。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述培养扩增包括至少20次群体倍增。

8.根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述培养扩增包括至少30次群体倍增。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述受试者对类固醇免疫抑制剂和/或生物疗法是难治的。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述受试者在治疗28天后具有至少部分应答。

11.根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述受试者在治疗后至少28天至90天具有至少部分应答。

12.根据权利要求10或11所述的方法,其中所述部分应答的特征在于以下一项或多项或全部:

-皮肤%BSA评分降低至少一点;

-口腔评分降低至少一点;

-眼评分降低至少一点;

-皮肤特征评分降低至少一点;

-胃肠道评分降低至少一点;

-肝脏评分降低至少一点;

-肺症状评分降低至少一点;

-肺FEV1评分降低至少一点;

-关节和筋膜评分降低至少一点;

-生殖道评分降低至少一点。

13.根据权利要求10或11所述的方法,其中所述部分应答的特征在于以下一项或多项或全部:

-皮肤%BSA评分降低至少一点;

-口腔评分降低至少一点;

-眼评分降低至少一点。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述MLPSC是静脉内施用的。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述MLPSC是间充质干细胞(MSC)。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述MLPSC是同种异体的。

17.根据权利要求1至16中任一项所述的方法,所述方法包括每剂量施用10×10^6个与2×10^8个之间的细胞。

18.根据权利要求1至16中任一项所述的方法,所述方法包括每剂量施用20×10^6个与1×10^7个之间的细胞。

19.根据权利要求17或18所述的方法,其中所述受试者接受至少两剂量。

20.根据权利要求17或18所述的方法,其中所述受试者接受至少2剂量、3剂量、4剂量、5剂量、6剂量、7剂量、8剂量、9剂量或10剂量。

21.根据权利要求19或20所述的方法,其中所述前两剂量每周施用,持续两周。

22.根据权利要求19或20所述的方法,其中所述前两剂量每周施用,每两周一次。

23.根据权利要求22所述的方法,其中第三剂量和随后的剂量每月施用。

24.根据权利要求1至23中任一项所述的方法,其中所述组合物进一步包括血浆-裂解物A、二甲亚砜(DMSO)、人血清白蛋白(HSA)。

25.根据权利要求1至23中任一项所述的方法,其中所述组合物进一步包括血浆-裂解物A(70%)、DMSO(10%)、HSA(25%)溶液,所述HSA溶液包括5%HSA和15%缓冲液。

26.根据权利要求1至25中任一项所述的方法,其中所述组合物包括大于6.68×10^6个活细胞/mL。

用于治疗慢性移植物抗宿主病的方法

技术领域

[0001] 本公开涉及治疗或预防有需要的受试者的慢性移植物抗宿主病的方法。

背景技术

[0002] 急性和慢性移植物抗宿主病(GvHD)是免疫病症,所述病症是限制同种异体干细胞移植的成功和可用性的主要因素。急性和慢性GvHD都与导致慢性疾病并可能导致宿主哺乳动物死亡的全身性炎性反应相关。然而,在过去若干年中,慢性GvHD(cGvHD)已成为同种异体骨髓或干细胞移植最麻烦的并发症。

[0003] cGvHD不同于急性GvHD(aGvHD)。众所周知,aGvHD和cGvHD涉及不同的病理过程,aGvHD被认为主要是Th1/Th17驱动的过程并具有强烈的炎性组分,而cGvHD表现出更多的自身免疫性和纤维化特征。

[0004] 近年来,B细胞越来越被认为是cGvHD中的主要因素。例如,干细胞移植后,cGvHD患者的CD5+B细胞重建明显受损。

[0005] 在难治性cGvHD患者中进行的间充质干细胞(MSC)试验观察到了可变的结果。因此,cGvHD和/或其相关症状的患者仍然存在未满足的治疗需求,需要新的治疗选择。

发明内容

[0006] 本发明人出乎意外地发现,通过施用已经被冷冻保存和解冻的培养扩增的间充质谱系前体或干细胞,可以在患有慢性移植物抗宿主病(cGvHD)的受试者中实现早期疾病应答(第28天)。这些间充质谱系前体或干细胞构成“现成”产物,不需要间充质谱系前体或干细胞供体和cGvHD患者的HLA匹配。

[0007] 因此,在第一实例中,本公开涉及治疗或预防有需要的人类受试者的慢性移植物抗宿主病(cGvHD)的方法,所述方法包括向所述受试者施用包括培养扩增的间充质谱系前体或干细胞(MLPSC)的组合物。

[0008] 在一实例中,所述培养扩增的MLPSC已经被冷冻保存和解冻。因此,在另一个实例中,本公开涉及治疗或预防有需要的人类受试者的慢性移植物抗宿主病(cGvHD)的方法,所述方法包括向所述受试者施用包括培养扩增的间充质谱系前体或干细胞(MLPSC)的组合物,其中所述培养扩增的MLPSC已经被冷冻保存和解冻。

[0009] 在一实例中,所述MLPSC是从中间冷冻保存的MLPSC群体培养扩增的。在另一个实例中,所述MLPSC被培养扩增至少约5次传代。

[0010] 在一实例中,所述MLPSC每百万MLPSC表达至少13pg TNFR1。在一实例中,所述MLPSC每百万MLPSC表达约13pg至约44pg TNFR1。

[0011] 在另一个实例中,培养扩增包括至少20次群体倍增。在另一个实例中,培养扩增包括至少30次群体倍增。

[0012] 在一实例中,所述受试者对类固醇免疫抑制剂和/或生物疗法是难治的。在另一个实例中,所述受试者在治疗28天后至少有部分应答。在另一个实例中,所述受试者在治疗后

至少28天至90天具有至少部分应答。在一实例中，部分应答的特征在于以下一项或多项或全部：

[0013] -皮肤%BSA评分降低至少一点；

[0014] -口腔评分降低至少一点；

[0015] -眼评分降低至少一点；

[0016] -皮肤特征评分降低至少一点；

[0017] -胃肠道评分降低至少一点；

[0018] -肝脏评分降低至少一点；

[0019] -肺症状评分降低至少一点；

[0020] -肺FEV1评分降低至少一点；

[0021] -关节和筋膜评分降低至少一点；

[0022] -生殖道评分降低至少一点。

[0023] 在另一个实例中，部分应答的特征在于以下一项或多项或全部：

[0024] -皮肤%BSA评分降低至少一点；

[0025] -口腔评分降低至少一点；

[0026] -眼评分降低至少一点。

[0027] 在另一个实例中，所述MLPSC是静脉内施用的。在一实例中，所述MLPSC是间充质干细胞(MSC)。在另一个实例中，所述MLPSC是同种异体的。

[0028] 在另一个实例中，本公开的方法包括每剂量施用10×10^6个与2×10^8个之间的细胞。在另一个实例中，本公开的方法包括每剂量施用20×10^6个与1×10^7个之间的细胞。在另一个实例中，所述受试者接受至少两剂量。在另一个实例中，所述受试者接受至少2剂量、3剂量、4剂量、5剂量、6剂量、7剂量、8剂量、9剂量或10剂量。在一实例中，前两剂量每周施用，持续两周。在另一个实例中，前两剂量每周施用，每两周一次。在另一个实例中，第三剂量和随后的剂量每月施用。

[0029] 在一实例中，所述组合物进一步包括血浆-裂解物A、二甲亚砜(DMSO)、人血清白蛋白(HSA)。在另一个实例中，所述组合物进一步包括血浆-裂解物A(70%)、DMSO(10%)、HSA(25%)溶液，所述HSA溶液包括5%HSA和15%缓冲液。

[0030] 在一实例中，所述组合物包括大于6.68×10^6个活细胞/mL。

具体实施方式

[0031] 贯穿本说明书，除非另有明确说明或上下文另有要求，否则对单个步骤、物质组合物、步骤组或物质组合物组的提及应被视为涵盖这些步骤、物质组合物、步骤组或物质组合物组中的一个和多个(即一种或多种)。

[0032] 本领域的技术人员将会了解，可对在此描述的本公开加以除具体所描述的那些之外的变化和修改。应当理解，本公开包含所有此类变化和修改。本公开还包含本说明书中个别或共同提及或指出的所有步骤、特征、组合物和化合物，以及任何两个或更多个所述步骤或特征的任何和所有组合。

[0033] 本公开的范围不受本文所述的具体实施例的限制，这仅出于例示的目的。如本文所描述的，功能等效的产物、组合物和方法显然在本公开的范围内。

[0034] 除非另有明确说明,否则本文公开的任何实例在进行必要的修改后应被视为适用于任何其它实例。

[0035] 除非另外特别说明,否则本文所使用的所有技术和科学术语应被视为具有与本领域(例如,在细胞培养、分子遗传学、干细胞分化、免疫学、免疫组织化学、蛋白质化学和生物化学)的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。

[0036] 除非另有说明,否则本公开中使用的外科手术技术是本领域技术人员熟知的标准程序。

[0037] 获得和富集间充质谱系干细胞或前体细胞群体的方法是本领域已知的。例如,间充质谱系干细胞或前体细胞的富集群体可以通过使用流式细胞术和基于使用在间充质谱系干细胞或前体细胞上表达的细胞表面标志物的细胞分选程序来获得。

[0038] 本文引用或参考的所有文件,以及本文引用的文件连同本文提及的任何产品的任何制造商说明书、说明、产品规范和产品表或通过引用并入本文的任何文件中引用或参考的所有文件都特此通过全文引用的方式并入本文。

[0039] 所选定义

[0040] 术语“和/或”,例如“X和/或Y”应理解为意指“X和Y”或“X或Y”,并且应被视为对两种含义或任一含义提供明确的支持。

[0041] 如本文所使用的,除非相反地说明,否则术语“约”是指指定值的+/-10%,更优选地+/-5%。

[0042] 贯穿本说明书,词语“包括(comprise)”或如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”等变体应当被理解为暗示包含所陈述要素、整数或步骤或要素组、整数组或步骤组,但不排除任何其它要素、整数或步骤或要素组、整数组或步骤组。

[0043] 如本文所使用的,除非上下文明确指出,否则单数形式“一个”、“一种”和“所述”包含单数和复数指示物。

[0044] “分离的”或“纯化的”意指已与其自然环境的至少一些组分分离的细胞。此术语包含细胞与其自然环境的总体物理分离(例如从供体去除)。术语“分离的”包含通过例如解离改变细胞与和其直接相关的相邻细胞的关系。术语“分离的”不是指组织切片中的细胞。当用于指细胞群体时,术语“分离的”包含由本公开的分离的细胞增殖产生的细胞群体。

[0045] 在本公开的上下文中使用的术语“传代(passage)”、“传代(passaging)”或“传代培养(sub-culture)”是指已知的细胞培养技术,所述技术用于使细胞在培养条件下长时间存活和生长,使得细胞数量可以持续增加。细胞系的传代培养程度通常表示为“传代数量”,一般用来指细胞被传代培养的次数。在一实例中,一次传代包括去除非粘附细胞并留下粘附间充质谱系前体或干细胞。然后可以将此类间充质谱系前体或干细胞从底物或烧瓶中解离(例如,通过使用如胰蛋白酶或胶原酶等蛋白酶),可以添加培养基,可以进行任选的洗涤(例如,通过离心),并且然后间充质谱系前体或干细胞可以重新铺板或重新接种到一个或多个总表面积更大的培养容器中。然后,间充质谱系前体或干细胞可以继续在培养物中扩增。在另一个实例中,去除非粘附细胞的方法包含非酶处理步骤(例如,用EDTA)。在一实例中,间充质谱系前体或干细胞在汇合处或附近传代(例如,约75%至约95%汇合)。在一实例中,以约10%、约15%或约20%细胞/ml培养基的浓度接种间充质谱系前体或干细胞。

[0046] 如在本公开的上下文中使用的术语“培养基”(“medium”或“media”)包含培养物中

的细胞周围环境的组分。设想培养基有助于和/或提供适合于允许细胞生长的条件。培养基可以是固体、液体、气体或相和材料的混合物。培养基可以包含液体生长培养基以及不维持细胞生长的液体培养基。示例性的气体培养基包含在培养皿或其它固相或半固相载体上生长的细胞所暴露的气相。

[0047] “移植物抗宿主病(GvHD)”是一种免疫病症,所述病症是限制同种异体骨髓或干细胞移植的成功和可用性的主要因素。GvHD以急性(aGvHD)或慢性(cGvHD)形式发生。急性GvHD通常在骨髓或干细胞移植后100天内出现。慢性GvHD通常比aGvHD出现晚(移植后>100天),并且具有自身免疫性疾病的一些特征。其可以在aGvHD解决后从头发展,也可以作为aGvHD的扩展。慢性GvHD可导致多种通常是衰弱性的症状,包含广泛的皮疹、疼痛的口腔溃疡、呼吸急促以及四肢和关节疼痛。例如,患有cGvHD的患者的CD5+B细胞的重建受损。在一实例中,cGvHD对类固醇疗法是难治的。在一实例中,cGvHD对生物疗法是难治的。在一实例中,cGvHD对类固醇疗法和生物疗法是难治的。

[0048] 如本文所使用的,术语“治疗”(“treating”、“treat”或“treatment”)包含施用间充质谱系干细胞或前体细胞和/或其后代和/或源自其的可溶性因子的群体,从而减少或消除cGvHD的至少一种症状。在一实例中,治疗包含施用培养扩增的间充质谱系前体或干细胞的群体。在一实例中,在治疗开始后治疗诱导部分应答。在一实例中,在治疗开始后28天诱导部分应答。在一实例中,在治疗开始后至少28天诱导部分应答。在一实例中,在治疗开始后至少30天诱导部分应答。在一实例中,在治疗开始后至少2个月诱导部分应答。在另一个实例中,在治疗开始后至少3个月诱导部分应答。在另一个实例中,在治疗开始后28天至56天诱导部分应答。在另一个实例中,在两剂量后诱导部分应答。在另一个实例中,在每周一次施用两剂量后诱导部分应答。在另一个实例中,在每两周每周一次施用两剂量后诱导部分应答。在另一个实例中,在三剂量或更多剂量之后诱导部分应答。

[0049] 在一实例中,部分应答的特征在于以下一项或多项或全部:

[0050] -皮肤%BSA评分降低至少一点;

[0051] -口腔评分降低至少一点;

[0052] -眼评分降低至少一点;

[0053] -皮肤特征评分降低至少一点;

[0054] -胃肠道评分降低至少一点;

[0055] -肝脏评分降低至少一点;

[0056] -肺症状评分降低至少一点;

[0057] -肺FEV1评分降低至少一点;

[0058] -关节和筋膜评分降低至少一点;

[0059] -生殖道评分降低至少一点。

[0060] 在一实例中,部分应答的特征在于皮肤%BSA评分降低至少一点。在另一个实例中,部分应答的特征在于口腔评分降低至少一点。在另一个实例中,部分应答的特征在于眼评分降低至少一点。在这些实例中,可以使用针对GvHD的NIH共识标准2014获得评分(参见例如下面的实例部分)。

[0061] 在另一个实例中,部分应答的特征在于以下一项或多项或全部:

[0062] -皮肤%BSA评分降低至少一点;

[0063] -口腔评分降低至少一点；

[0064] -眼评分降低至少一点。

[0065] 如本文所使用的，术语“预防”(“prevent”或“preventing”)包含施用间充质谱系干细胞或前体细胞和/或其后代和/或源自其的可溶性因子的群体，从而停止或抑制cGvHD的至少一种症状的发展。

[0066] 有多种分类系统用于表征GvHD(Lee,S.,(2017)《血液(Blood.)》,129(1):30-37)。在一实例中，NIH共识标准2014可用于对本文公开的结果进行评分(Jagasia等人,(2015)《血液与骨髓移植生物(Biol Blood Marrow Transplant.)》,21:389-401)。NIH共识标准2014的组分如下表所示：

[0067] cGvHD的器官评分

[0068]

器官	评分 0	评分 1	评分 2	评分 3
皮肤% BSA[1]	不涉及 BSA	1%至 18% BSA	19%至 50% BSA	> 50% BSA
皮肤特征	无硬化特征	不适用	表面硬化特征，但不是“顽固的”	深度硬化特征；“顽固的”；行动不便；溃疡
口腔	无症状	**有**疾病体征的轻微症状，但不显著限制口服摄入	有疾病体征的中度症状，口服摄入**有**部分限制	有疾病体征的严重症状，口服摄入**有**主要限制
眼	无症状	不影响 ADL 的轻微干眼症状（润滑剂滴剂需求 ≤ 3x/天）	部分影响 ADL 的中度干眼症状（需要润滑剂滴> 3x/天或泪点塞）**无**干燥性角膜结膜炎（KCS）引起的新视力障碍	显著影响 ADL（减轻疼痛的特殊护目镜）**或**因眼部症状而无法工作**或**因干燥性角膜结膜炎（KCS）导致视力丧失的严重干眼症状
GI 道	无症状	无明显体重减轻的症状（< 5%）	与 3 个月内轻微至中度体重减轻（5%至 15%）**或**中度腹泻相关的症状，对日常生活没有显著干扰	与 3 个月内显著体重减轻（> 15%）相关的症状，需要营养补充剂来满足大多数卡路里需求**或**食管扩张**或**严重腹泻，严重干扰日常生活

[0069]

肝脏	正常总胆红素并且 ALT 或 AP< 3 x ULN	正常总胆红素，ALT ≥3 x ULN 至 5 x ULN 或 AP ≥3 x ULN	总胆红素升高但≤3 mg/dL 或 ALT > 5 x ULN	总胆红素升高但> 3 mg/dL
肺症状评分	无症状	轻微症状（爬上一段台阶后 SOB）	中度症状（平地行走后 SOB）	严重症状（静息时 SOB；需要 O2）
肺肺评分	FEV1 ≥80%	FEV1 60%至 79%	FEV1 40%至 59%	FEV1 ≤39%
关节和筋膜	无症状	手臂和腿轻度紧绷，活动范围正常或轻微减少**且**不影响 ADL	手臂或腿紧绷**或**关节挛缩，被认为是筋膜炎引起的红斑，活动范围的中度减少**以及** ADL 的轻微至中度限制	**具有**活动范围显著减少的挛缩**以及** ADL 显著限制（无法系鞋带、纽扣衬衫、衣架等）
生殖道 [2]	无体征	轻微体征并且女性在检查时有或没有不适	中度体征并且检查时可能有不适体征	有或无症状的严重体征
其它特征 [3]	无 GVHD	轻微	中度	严重

[0070] 在一实例中，部分应答是上表中器官特异性NIH共识标准2014评分降低≥1点。因此，在一实例中，治疗诱导皮肤%BSA评分降低≥1点。在另一个实例中，治疗诱导口腔评分降低≥1点。在另一个实例中，治疗诱导眼评分降低≥1点。在另一个实例中，治疗诱导皮肤特征评分降低≥1点。在另一个实例中，治疗诱导胃肠道评分降低≥1点。在另一个实例中，治疗诱导肝脏评分降低≥1点。在另一个实例中，治疗诱导肺症状评分降低≥1点。在另一个实例中，治疗诱导肺FEV1评分降低≥1点。在另一个实例中，治疗诱导关节和筋膜评分降低≥1点。在另一个实例中，治疗诱导生殖道评分降低≥1点。

[0071] 在一实例中，在治疗开始后治疗诱导完全应答。在一实例中，在治疗开始后28天诱导完全应答。在一实例中，在治疗开始后至少28天诱导完全应答。在一实例中，在治疗开始后至少30天诱导完全应答。在一实例中，在治疗开始后至少2个月诱导完全应答。在另一个实例中，在治疗开始后至少3个月诱导完全应答。在另一个实例中，在治疗开始后28天至56天诱导完全应答。在另一个实例中，在两剂量后诱导完全应答。在另一个实例中，在每周一次施用两剂量后诱导完全应答。在另一个实例中，在每两周每周一次施用两剂量后诱导完全应答。在另一个实例中，在三剂量或更多剂量之后诱导完全应答。

[0072] 在一实例中，本公开的方法抑制受试者的cGvHD疾病进展或疾病并发症。“抑制”受试者的cGvHD疾病进展或疾病并发症是指预防或减少受试者的cGvHD进展和/或疾病并发症。

[0073] 如本文所使用的，术语“受试者”是指人类受试者。例如，受试者可以是成年人。在另一个实例中，受试者可以是儿童。在另一个实例中，受试者可以是青少年。如“受试者”、“患者”或“个体”等术语是可以在本公开的上下文中互换使用的术语。

[0074] 根据本公开治疗的受试者可能具有指示cGvHD的症状。例如，受试者可能患有中度或严重cGvHD。示例性症状包含干眼症、>19％BSA、>50％BSA、斑丘疹/红斑、丘疹鳞屑性病变/鱼鳞病、色素沉着过度、部分或主要的口服摄入限制、腹泻、总胆红素升高、FEV1降低和关节紧绷或疼痛。

[0075] 在一实例中，受试者先前已经在至少一种抗TNF疗法中失败。在一实例中，受试者具有生物疗法的禁忌症。在另一个实例中，受试者先前已经在至少一种类固醇疗法中失败。

[0076] 在另一个实例中，受试者已经患有GvHD>90天。在另一个实例中，受试者已经患有GvHD>100天。

[0077] 如本文所使用的，术语“未经基因修饰的”是指未通过用核酸转染修饰的细胞。为避免疑义，在本公开的上下文中，用编码Ang1的核酸转染的间充质谱系前体或干细胞将被认为是经基因修饰的。

[0078] 间充质谱系前体细胞

[0079] 如本文所使用的，术语“间充质谱系前体或干细胞(MLPSC)”是指未分化的多能细胞，所述多能细胞具有自我更新的能力同时保持多能性以及分化为许多间充质来源(例如，成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、基质细胞、成纤维细胞和肌腱)或非中胚层来源(例如，肝细胞、神经细胞和上皮细胞)的细胞类型的能力。为避免疑义，“间充质谱系前体细胞”是指可以分化为如骨、软骨、肌肉和脂肪细胞以及纤维结缔组织等间充质细胞的细胞。

[0080] 术语“间充质谱系前体或干细胞”包含亲本细胞以及其未分化的后代。所述术语还包含间充质前体细胞、多能基质细胞、间充质干细胞(MSC)、血管周围间充质前体细胞以及其未分化的后代。

[0081] 间充质谱系前体或干细胞可以是自体的、同种异体的、异种的、同源的(syngenic)或同基因的(isogenic)。自体细胞是从其将被重新植入的同一个体中分离的。同种异体细胞是从同一物种的供体中分离的。异种细胞是从另一物种的供体中分离的。同源或同基因细胞是从基因相同的生物体中分离的，如双胞胎、克隆或高度近交的研究动物模型。

[0082] 在一实例中，间充质谱系前体或干细胞是同种异体的。在一实例中，同种异体间充质谱系前体或干细胞被培养扩增并冷冻保存。

[0083] 间充质谱系前体或干细胞主要存在于骨髓中，但也显示存在于多种宿主组织中，包含例如脐带血和脐带、成人外周血、脂肪组织、小梁骨和牙髓。其也存在于皮肤、脾脏、胰腺、脑、肾、肝、心脏、视网膜、脑、毛囊、肠、肺、淋巴结、胸腺、韧带、肌腱、骨骼肌、真皮和骨膜中；并且能够分化成种系，如中胚层和/或内胚层和/或外胚层。因此，间充质谱系前体或干细胞能够分化成大量细胞类型，包含但不限于脂肪、骨、软骨、弹性组织、肌肉和纤维结缔组织。这些细胞进入的特定谱系定型和分化途径取决于来自机械影响和/或如生长因子、细胞因子和/或宿主组织建立的局部微环境条件等内源性生物活性因子的各种影响。

[0084] 术语“富集的”、“富集”或其变体在本文中用于描述与未处理的细胞群体(例如，在其自然环境中的细胞)相比，一种特定细胞类型的比例或多种特定细胞类型的比例增加的细胞群体。在一实例中，富集间充质谱系前体或干细胞的群体包括至少约0.1％或0.5％或1％或2％或5％或10％或15％或20％或25％或30％或50％或75％的间充质谱系前体或干细胞。在此方面，将采用术语“富集间充质谱系前体或干细胞的细胞群体”来明确支持术语“包括X％间充质谱系前体或干细胞的细胞群体”，其中X％是如本文叙述的百分比。在一些实例中，间充质谱系前体或干细胞可以形成克隆源性集落，例如CFU-F(成纤维细胞)或其子集(例如，50％或60％或70％或70％或90％或95％)可以具有此活性。

[0085] 在本公开的一实例中，间充质谱系前体或干细胞是间充质干细胞(MSC)。MSC可以是均质组合物或可以是在MSC中富集的混合细胞群体。可以通过培养粘附骨髓或骨膜细胞

获得均质MSC组合物，并且可以通过用独特的单克隆抗体鉴定的特定细胞表面标志物来鉴定MSC。例如，在美国专利第5,486,359号中描述了一种用于获得在MSC中富集的细胞群体的方法。MSC的替代性来源包含但不限于血液、皮肤、脐带血、肌肉、脂肪、骨和软骨膜。在一实例中，MSC是同种异体的。在一实例中，MSC是冷冻保存的。在一实例中，MSC是培养扩增且冷冻保存的。

[0086] 在另一个实例中，间充质谱系前体或干细胞是CD29+、CD54+、CD73+、CD90+、CD102+、CD105+、CD106+、CD166+、MHC1+MSC。

[0087] 分离的或富集的间充质谱系前体或干细胞可以通过培养在体外扩增。分离的或富集的间充质谱系前体或干细胞可以冷冻保存、解冻，然后通过培养在体外扩增。

[0088] 在一个实例中，分离的或富集的间充质谱系前体或干细胞以50,000个活细胞/cm^2接种于培养基(无血清或补充有血清)中，例如补充有5％胎牛血清(FBS)和谷氨酰胺的α最小必需培养基(αMEM)，并且使其在37℃、20％O_2下粘附在培养容器上过夜。随后根据需要更换和/或改变培养基，并且将细胞在37℃、5％O_2下进一步培养68小时至72小时。

[0089] 如本领域技术人员将理解的，培养的间充质谱系前体或干细胞在表型上不同于体内细胞。例如，在一个实施例中，其表达以下标志物中的一种或多种：CD44、NG2、DC146和CD140b。培养的间充质谱系前体或干细胞在生物学上也与体内细胞不同，与体内大部分非循环(静态)细胞相比，具有更高的增殖率。

[0090] 在一个实例中，细胞群体从包括可选择形式的STRO-1+细胞的细胞制剂富集。在此方面，术语“可选择形式”将被理解为意指细胞表达允许选择STRO-1+细胞的标志物(例如，细胞表面标志物)。标志物可以是STRO-1，但不一定是。例如，如本文所描述的和/或例示的，表达STRO-2和/或STRO-3(TNAP)和/或STRO-4和/或VCAM-1和/或CD146和/或3G5的细胞(例如，间充质前体细胞)也表达STRO-1(并且可以是STRO-1bright)。因此，细胞为STRO-1+的指示并不意味着细胞仅通过STRO-1表达来选择。在一个实例中，至少基于STRO-3表达来选择细胞，例如，其为STRO-3+(TNAP+)。

[0091] 提及细胞或其群体的选择不一定需要从特定组织来源中选择。如本文所描述的，STRO-1+细胞可以选自或分离自或富集自多种来源。也就是说，在一些实例中，这些术语为从包括STRO-1+细胞(例如，间充质前体细胞)的任何组织或血管化组织或包括周细胞(例如，STRO-1+周细胞)的组织或本文所述的组织中的任何一种或多种组织中选择提供了支持。

[0092] 在一个实例中，本公开中使用的细胞单独或共同表达一种或多种标志物，所述标志物选自由以下组成的组：TNAP+、VCAM-1+、THY-1+、STRO-2+、STRO-4+(HSP-90β)、CD45+、CD146+、3G5+或其任何组合。

[0093] “单独地”意指本公开单独涵盖所述标志物或标志物组，并且尽管本文中可能未单独列出单独的标志物或标志物组，但所附权利要求可以将此类标志物或标志物组彼此单独和分开定义。

[0094] “共同地”意指本公开涵盖所述标志物或标志物组的任何数量或组合，并且尽管标志物或标志物组的此类数量或组合可能未在本文中具体列出，但所附权利要求可以将此类组合或子组合与任何其它标志物组合或标志物组单独和分开定义。

[0095] 如本文所使用的，术语“TNAP”旨在涵盖组织非特异性碱性磷酸酶的所有同种型。

例如,所述术语涵盖肝脏同种型(LAP)、骨同种型(BAP)和肾脏同种型(KAP)。在一个实例中,TNAP是BAP。在一个实例中,如本文所使用的TNAP是指可以与由根据《布达佩斯条约(Budapest Treaty)》的规定以保藏登记号PTA-7282于2005年12月19日保藏在ATCC的杂交瘤细胞系产生的STRO-3抗体结合的分子。

[0096] 此外,在一个实例中,STRO-1+细胞能够产生克隆源性CFU-F。

[0097] 在一个实例中,显著比例的STRO-1+细胞能够分化成至少两个不同的种系。STRO-1+细胞可以定型为的谱系的非限制性实例包含骨前体细胞;肝细胞祖细胞,所述祖细胞对胆管上皮细胞和肝细胞具有多能性;神经受限细胞,所述神经受限细胞可以生成胶质细胞前体,所述胶质细胞前体进展为少突胶质细胞和星形胶质细胞;进展为神经元的神经元前体;心肌和心肌细胞的前体,葡萄糖反应性胰岛素分泌胰腺β细胞系。其它谱系包含但不限于成牙质细胞、产生牙质的细胞和软骨细胞,以及以下的前体细胞:视网膜色素上皮细胞、成纤维细胞、如角质形成细胞等皮肤细胞、树突细胞、毛囊细胞、肾导管上皮细胞、平滑肌和骨骼肌细胞、睾丸祖细胞、血管内皮细胞、肌腱、韧带、软骨、脂肪细胞、成纤维细胞、骨髓基质、心肌、平滑肌、骨骼肌、周细胞、血管、上皮细胞、胶质细胞、神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。

[0098] 在一实例中,间充质谱系前体或干细胞从单个供体或多个供体获得,其中供体样品或间充质谱系前体或干细胞随后被汇集,然后培养扩增。

[0099] 本公开所涵盖的间充质谱系前体或干细胞也可以在向受试者施用之前冷冻保存。在一实例中,间充质谱系前体或干细胞在向受试者施用之前进行培养扩增和冷冻保存。

[0100] 在一实例中,本公开涵盖间充质谱系前体或干细胞以及其后代、源自其的可溶性因子和/或从其分离的胞外囊泡。在另一个实例中,本公开涵盖间充质谱系前体或干细胞以及从其分离的胞外囊泡。例如,可以在适合将胞外囊泡分泌到细胞培养基中的条件下培养扩增本公开的间充质前体谱系或干细胞一段时间。随后可以从培养基中获得分泌的胞外囊泡用于疗法。

[0101] 如本文所使用的,术语“胞外囊泡”是指从细胞中自然释放的脂质颗粒,并且其大小范围从约30nm至大至10微米,尽管其大小通常小于200nm。其可以含有来自释放细胞(例如,间充质干细胞;STRO-1^+细胞)的蛋白质、核酸、脂质、代谢物或细胞器。

[0102] 如本文所使用的,术语“外泌体”是指一种类型的胞外囊泡,其大小通常在约30nm至约150nm的范围内,并且源自哺乳动物细胞的核内体区室,其从所述区室运输到细胞膜并且释放。其可以含有核酸(例如,RNA;microRNA)、蛋白质、脂质和代谢物,并且通过从一个细胞分泌并被其它细胞吸收以递送其货物而在细胞间通讯中发挥作用。

[0103] 细胞的培养扩增

[0104] 在一实例中,间充质谱系前体或干细胞被培养扩增。“培养扩增的”间充质谱系前体或干细胞培养基与新鲜分离的细胞的区别在于其已在细胞培养基中培养并传代(即传代培养)。在一实例中,培养扩增的间充质谱系前体或干细胞被培养扩增约4次传代至10次传代。在一实例中,间充质谱系前体或干细胞被培养扩增至少5次传代、至少6次传代、至少7次传代、至少8次传代、至少9次传代、至少10次传代。例如,间充质谱系前体或干细胞可以被培养扩增至少5次传代。在一实例中,间充质谱系前体或干细胞可以被培养扩增至少5次传代至10次传代。在一实例中,间充质谱系前体或干细胞可以被培养扩增至少5次传代至8次传

代。在一实例中，间充质谱系前体或干细胞可以被培养扩增至少5次传代至7次传代。在一实例中，间充质谱系前体或干细胞可以被培养扩增多于10次传代。在另一个实例中，间充质谱系前体或干细胞可以被培养扩增多于7次传代。在这些实例中，干细胞可在被冷冻保存之前进行培养扩增以提供中间冷冻保存的MLPSC群体。在一实例中，本公开的组合物由中间冷冻保存的MLPSC群体制备。例如，中间冷冻保存的MLPSC群体可以在施用之前进一步培养扩增，如下文进一步讨论的。因此，在一实例中，间充质谱系前体或干细胞被培养扩增并冷冻保存。在这些实例的一实施例中，间充质谱系前体或干细胞可以从单个供体或多个供体获得，其中供体样品或间充质谱系前体或干细胞随后被汇集，然后培养扩增。在一实例中，培养扩增过程包括：

[0105] -i.通过传代扩增来扩增多个活细胞以提供至少约10亿个活细胞的制剂，其中传代扩增包括建立分离的间充质谱系前体或干细胞的原代培养物，并且然后连续建立从先前培养物中分离的间充质谱系前体或干细胞的第一非原代(P1)培养物；

[0106] -ii.通过传代扩增将分离的间充质谱系前体或干细胞的P1培养物扩增至间充质谱系前体或干细胞的第二非原代(P2)培养物；以及，

[0107] -iii.制备和冷冻保存从间充质谱系前体或干细胞的P2培养物中获得的处理中的中间间充质谱系前体或干细胞制剂；以及，

[0108] -iv.将冷冻保存的处理中的中间间充质谱系前体或干细胞制剂解冻并通过传代扩增来扩增处理中的中间间充质谱系前体或干细胞制剂。

[0109] 在一实例中，扩增的间充质谱系前体或干细胞制剂具有抗原谱和活性谱，所述抗原谱和活性谱包括：

[0110] -i.少于约0.75％CD45+细胞；

[0111] -ii.至少约95％CD105+细胞；

[0112] -iii.至少约95％CD166+细胞。

[0113] 在一实例中，相对于对照，扩增的间充质谱系前体或干细胞制剂能够抑制CD3/CD28激活的PBMC的IL2Ra表达至少约30％。

[0114] 在一实例中，培养扩增的间充质谱系前体或干细胞被培养扩增约4次传代至10次传代，其中间充质谱系前体或干细胞在被进一步培养扩增之前在至少2次传代或3次传代后被冷冻保存。在一实例中，将间充质谱系前体或干细胞培养扩增至少1次传代、至少2次传代、至少3次传代、至少4次传代、至少5次传代，冷冻保存，然后在施用或进一步冷冻保存之前进一步培养扩增至少1次传代、至少2次传代、至少3次传代、至少4次传代、至少5次传代。

[0115] 在一实例中，本公开的组合物中的大多数间充质谱系前体或干细胞具有大约相同的传代数(即，其在彼此的约1次或约2次或约3次或约4次细胞倍增内)。在一实例中，本组合物中细胞倍增的平均次数为约20次倍增至约25次倍增。在一实例中，本组合物中的细胞倍增的平均次数为约9次至约13次(例如，约11次或约11.2次)来自原代培养物的倍增，加上每次传代约1次、约2次、约3次或约4次倍增(例如，每次传代约2.5次倍增)。当分别通过约1次、约2次、约3次、约4次、约5次、约6次、约7次、约8次、约9次和约10次传代产生时，本组合物中的示例性平均细胞倍增为约13.5次、约16次、约18.5次、约21次、约23.5次、约26次、约28.5次、约31次、约33.5次和约36次中的任何一者。

[0116] 可以使用本领域已知的任何设备和细胞处理方法进行间充质谱系前体或干细胞

分离和离体扩增的过程。本公开的各种培养扩增实施例采用需要对细胞进行操作的步骤，例如，接种、进料、解离粘附培养物或洗涤的步骤。任何操作细胞的步骤都有可能损伤细胞。尽管间充质谱系前体或干细胞在制备期间通常可以承受一定量的损伤，但细胞优选地通过充分执行给定步骤同时最小化对细胞的损伤的处理程序和/或设备进行操作。

[0117] 在一实例中，间充质谱系前体或干细胞在包含细胞来源袋、洗涤溶液袋、再循环洗涤袋、具有入口和出口端口的旋转膜过滤器、滤液袋、混合区、用于洗涤的细胞的最终产物袋和适当的管道的设备中洗涤，例如，如US 6251295中所描述的，所述文献特此通过引用并入。

[0118] 在一实例中，根据本公开的间充质谱系前体或干细胞组合物在CD105阳性和CD166阳性和CD45阴性方面是95％均质的。在一实例中，此均质性通过离体扩增持续存在；即虽然多次群体倍增。在一实例中，所述组合物包括至少一个治疗剂量的间充质谱系前体或干细胞，并且所述间充质谱系前体或干细胞包括少于约1.25％的CD45+细胞、至少约95％的CD105+细胞和至少约95％的CD166+细胞。在一实例中，此均质性在冷冻储存和解冻后持续存在，其中细胞通常也具有约70％或更高的活力。

[0119] 在一实例中，本公开的组合物包括间充质谱系前体或干细胞，所述间充质谱系前体或干细胞表达大量TNFR1，例如每百万间充质谱系前体或干细胞中大于13pg的TNFR1。在一实例中，此表型在离体扩增和冷冻储存过程中是稳定的。在一实例中，每百万间充质谱系前体或干细胞中约13pg至约179pg(例如约13pg至约44pg)范围内的TNFR1水平的表达与期望的治疗潜力相关，所述治疗潜力也通过离体扩增和冷冻保存而持续存在。

[0120] 在一实例中，培养扩增的间充质谱系前体或干细胞以至少110pg/ml的量表达肿瘤坏死因子受体1(TNFR1)。例如，间充质谱系前体或干细胞可以以至少150pg/ml、或至少200pg/ml、或至少250pg/ml、或至少300pg/ml、或至少320pg/ml，或至少330pg/ml，或至少340pg/ml或至少350pg/ml的量表达TNFR1。

[0121] 在一实例中，间充质谱系前体或干细胞以至少13pg/10^6个细胞的量表达TNFR1。例如，间充质谱系前体或干细胞以至少15pg/10^6个细胞，或至少20pg/10^6个细胞、或至少25pg/10^6个细胞、或至少30pg/10^6个细胞、或至少35pg/10^6个细胞、或至少40pg/10^6个细胞、或至少45pg/10^6个细胞或至少50pg/10^6个细胞的量表达TNFR1。

[0122] 在另一个实例中，本文公开的间充质谱系前体或干细胞抑制T细胞上的IL-2Rα表达。在一实例中，间充质谱系前体或干细胞可以抑制IL-2Rα表达至少约30％、可替代地至少约35％、可替代地至少约40％、可替代地至少约45％、可替代地至少约50％、可替代地至少约55％、可替代地至少约60％。

[0123] 在一实例中，本公开的组合物包括至少一个治疗剂量的间充质谱系前体或干细胞，所述间充质谱系前体或干细胞例如可以包括至少约1亿个细胞或约1.25亿个细胞。

[0124] 细胞的修饰

[0125] 本公开的间充质谱系前体或干细胞可以以此类方式改变，即在施用时，细胞的裂解被抑制。抗原的改变可以诱导免疫无应答或耐受性，从而预防诱导免疫应答的效应子阶段(例如，细胞毒性T细胞生成、抗体产生等)，所述效应子阶段最终导致正常免疫应答中外来细胞的排斥。可以改变以实现此目标的抗原包含例如MHC I类抗原、MHC II类抗原、LFA-3和ICAM-1。

[0126] 间充质谱系前体或干细胞也可以被基因修饰以表达对横纹骨骼肌细胞的分化和/或维持具有重要意义的蛋白质。示例性蛋白质包含生长因子(TGF-β、胰岛素样生长因子1(IGF-1)、FGF)、成肌因子(例如myoD、成肌素、成肌因子5(Myf5)、成肌调节因子(MRF))、转录因子(例如GATA-4)、细胞因子(例如嗜心素-1)、神经调节蛋白家族成员(例如神经调节蛋白1、2和3)和同源盒基因(例如Csx、tinman和NKx家族)。

[0127] 本公开的组合物

[0128] 在本公开的一个实例中,间充质谱系前体或干细胞和/或其后代和/或源自其的可溶性因子以组合物的形式施用。在一个实例中,此类组合物包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。因此,在一实例中,本公开的组合物可以包括培养扩增的间充质谱系前体或干细胞。

[0129] 术语“载体”和“赋形剂”是指本领域常规用于促进活性化合物的储存、施用和/或生物活性的物质组合物(参见例如,《雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第16版,马克出版公司(Mac Publishing Company)(1980))。载体还可以减少活性化合物的任何不期望的副作用。合适的载体是例如稳定的,例如不能与载体中的其它成分反应。在一个实例中,载体在用于治疗的剂量和浓度下不会在接受者中产生显著的局部或全身副作用。

[0130] 本公开的合适载体包含常规使用的那些,例如水、盐水、右旋糖水溶液、乳糖、林格氏溶液(Ringer's solution)、缓冲溶液、透明质酸和二醇是示例性的液体载体,特别是(当为等渗的时)对于溶液。合适的药物载体和赋形剂包含淀粉、纤维素、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸镁、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、氯化钠、甘油、丙二醇、水、乙醇等。

[0131] 在另一个实例中,载体是培养基组合物,例如细胞在其中生长或悬浮。例如,此类培养基组合物不会在将其施用到的受试者中引起任何副作用。

[0132] 示例性载体和赋形剂不会不利地影响细胞的活力和/或细胞减少、预防或延迟代谢综合征和/或肥胖症的能力。

[0133] 在一个实例中,载体或赋形剂提供缓冲活性以将细胞和/或可溶性因子维持在合适的pH,从而发挥生物活性,例如载体或赋形剂是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。PBS代表有吸引力的载体或赋形剂,因为其与细胞和因子的相互作用最小并且允许细胞和因子的快速释放,在此类情况下,本公开的组合物可以生产为用于直接应用到血流中或进入组织或组织周围或邻近组织的区域的液体,例如通过注射。

[0134] 间充质谱系前体或干细胞和/或其后代和/或源自其的可溶性因子也可以掺入或包埋在与接受者相容且降解成对接受者无害的产物的支架内。这些支架为要移植到接受者受试者中的细胞提供支持和保护。天然和/或合成的可生物降解的支架是此类支架的实例。

[0135] 在本公开的实践中可以成功地使用多种不同的支架。示例性支架包含但不限于生物、可降解支架。天然可生物降解的支架包含胶原蛋白、纤连蛋白和层粘连蛋白支架。用于细胞移植支架的合适的合成材料应该能够支持广泛的细胞生长和细胞功能。此类支架也可以是可再吸收的。合适的支架包含聚乙醇酸支架,(例如,如以下所描述的:Vacanti等人《儿童外科杂志(J.Ped.Surg.)》23:3-9 1988;Cima等人《生物技术与生物工程(Biotechnol.Bioeng.)》38:145 1991;Vacanti等人《整形和重建外科手术

(Plast.Reconstr.Surg.)》88:753-9 1991);或合成聚合物,如聚酸酐、聚原酸酯和聚乳酸。

[0136] 在另一个实例中,间充质谱系前体或干细胞和/或其后代和/或源自其的可溶性因子可以在凝胶支架(如来自普强公司(Upjohn Company)的Gelfoam)中施用。

[0137] 本文描述的组合物可以单独施用或作为与其它细胞的混合物施用。不同类型的细胞可以在施用前立即或不久与本公开的组合物混合,或者其可以在施用前一起共培养一段时间。

[0138] 在一个实例中,组合物包括有效量或治疗或预防有效量的间充质谱系前体或干细胞和/或其后代和/或源自其的可溶性因子。例如,组合物包括约1×10^5个间充质谱系前体或干细胞至约1×10^9个间充质谱系前体或干细胞或约1.25×10^3个间充质谱系前体或干细胞至约1.25×10^7个间充质谱系前体或干细胞/kg(80kg受试者)。在另一个实例中,组合物包括约1×10^6个间充质谱系前体或干细胞至约3×10^6个间充质谱系前体或干细胞/kg(80kg受试者)。

[0139] 待施用的细胞的确切量取决于多种因素,包含受试者的年龄、体重和性别,以及要治疗的病症的程度和严重性。

[0140] 在一实例中,施用50×10^6个至200×10^7个间充质谱系前体或干细胞。在其它实例中,施用60×10^6个至200×10^6个细胞或75×10^6个至150×10^6个间充质谱系前体或干细胞。在一实例中,施用75×10^6个间充质谱系前体或干细胞。在另一个实例中,施用150×10^6个间充质谱系前体或干细胞。

[0141] 在一实例中,所述组合物包括大于5.00×10^6个活细胞/mL。在另一个实例中,所述组合物包括大于5.50×10^6个活细胞/mL。在另一个实例中,所述组合物包括大于6.00×10^6个活细胞/mL。在另一个实例中,所述组合物包括大于6.50×10^6个活细胞/mL。在另一个实例中,所述组合物包括大于6.68×10^6个活细胞/mL。

[0142] 在一实例中,间充质谱系前体或干细胞包括组合物的细胞群体的至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%。

[0143] 本公开的组合物可以被冷冻保存。可以使用本领域已知的慢速冷却方法或'快速'冷冻方案进行间充质谱系前体或干细胞的冷冻保存。优选地,与未冷冻细胞相比,冷冻保存的方法保持冷冻保存的细胞的相似表型、细胞表面标志物和生长速率。

[0144] 冷冻保存的组合物可以包括冷冻保存溶液。冷冻保存溶液的pH通常为6.5至8,优选地7.4。

[0145] 冷冻保存溶液可以包括无菌、无热原等渗溶液,例如PlasmaLyte A™。100mL的PlasmaLyte A™含有526mg氯化钠,USP(NaCl);502mg葡萄糖酸钠($C_6H_{11}NaO_7$);368mg三水乙酸钠,USP($C_2H_3NaO_2\cdot3H_2O$);37mg氯化钾,USP(KCl);以及30mg氯化镁,USP($MgCl_2\cdot6H_2O$)。其不含抗微生物剂。用氢氧化钠调整pH。pH为7.4(6.5至8.0)。

[0146] 冷冻保存溶液可以包括Profreeze™。冷冻保存溶液可以另外或可替代地包括培养基,例如αMEM。

[0147] 为了促进冷冻,通常将冷冻保护剂,例如二甲亚砜(DMSO)添加到冷冻保存溶液中。理想地,冷冻保护剂应该对细胞和患者无毒、无抗原性、化学惰性,在解冻后提供高存活率

并允许移植而无需洗涤。然而，最常用的冷冻保护剂DMSO显示出一些细胞毒性。羟乙基淀粉(HES)可以用作替代品或与DMSO结合使用，以降低冷冻保存溶液的细胞毒性。

[0148] 冷冻保存溶液可以包括DMSO、羟乙基淀粉、人血清组分和其它蛋白质填充剂中的一种或多种。在一个实例中，冷冻保存的溶液包括约5％的人血清白蛋白(HSA)和约10％的DMSO。冷冻保存溶液可以进一步包括甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和海藻糖中的一种或多种。

[0149] 在一个实施例中，将细胞悬浮在42.5％Profreeze™/50％αMEM/7.5％DMSO中并在受控速率的冰箱中冷却。

[0150] 冷冻保存的组合物可以解冻并直接向受试者施用或添加到例如包括HA的另一种溶液中。可替代地，在施用前可以将冷冻保存的组合物解冻并将间充质谱系前体或干细胞重悬于替代载体中。

[0151] 在一实例中，本公开的细胞组合物可以包括血浆-裂解物A、二甲亚砜(DMSO)和人血清白蛋白(HSA)。例如，本公开的组合物可以包括血浆-裂解物A(70％)、DMSO(10％)、HSA(25％)溶液，所述HSA溶液包括5％HSA和15％缓冲液。

[0152] 在一实例中，本文描述的组合物可以作为单剂量施用。

[0153] 在一些实例中，本文描述的组合物可以通过多剂量施用。例如，至少2剂量、至少3剂量、至少4剂量、至少5剂量、至少6剂量、至少7剂量、至少8剂量、至少9剂量、至少10剂量。

[0154] 在一些实例中，细胞包含在不允许细胞进入受试者的循环但允许细胞分泌的因子进入循环的室中。以此方式，可以通过允许细胞将因子分泌到受试者的循环中来向受试者施用可溶性因子。此类室同样可以植入受试者体内的部位以增加可溶性因子的局部水平。

[0155] 在一实例中，间充质谱系前体或干细胞可以静脉内施用。在另一个实例中，间充质谱系前体或干细胞每周施用一次。例如，间充质谱系前体或干细胞可以每两周每周施用一次。在一实例中，间充质谱系前体或干细胞可以每月施用一次。在一实例中，每周一次施用两剂量的间充质谱系前体或干细胞。在另一个实例中，每两周每周一次施用两剂量的间充质谱系前体或干细胞。例如，可以每两周每周一次施用两剂量的间充质谱系前体或干细胞，然后再每月施用一次后续剂量。在此实例的一实施例中，每月施用剂量，持续在另外一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月或更多个月。

[0156] 本领域技术人员将理解，在不脱离本公开广泛的一般范围的情况下，可以对上述实施例进行多种变化和/或修改。因此，本实施例应当在所有方面都被视为是说明性的而非限制性的。

[0157] 以下具体实例应被解释为仅是说明性的，并且不以任何方式限制本公开的其余部分。无需进一步详细阐述，相信本领域的技术人员可以基于本文描述在最大程度上利用本发明。

[0158] 实例

[0159] 离体培养扩增的成人同种异体骨髓源性间充质干细胞(MSC)，用于治疗慢性移植物抗宿主病(cGvHD)

[0160] 组合物

[0161] 组合物由分离自健康成人供体的骨髓的培养扩增的间充质基质细胞(ceMSC)组成。最终组合物包括在血浆-裂解物A(70％)、二甲亚砜(DMSO，10％)和人血清白蛋白(HSA)

(25%)溶液(20%,包括5%HSA和15%缓冲液)中调配的ceMSC,浓度≥6.68×10^6个活细胞/mL。每个剂量小瓶含有3.8mL冷冻保存的细胞悬浮液(每小瓶的总细胞数≥25×10^6个)。

[0162] 目的

[0163] 主要目的

[0164] 评估上述组合物自首次施用日期起6个月内静脉内施用的重复剂量对先前用常规治疗治疗没有应答的患有cGvHD的受试者的功效。

[0165] 次要目的

[0166] 评估上述组合物对存活率的影响。

[0167] 评分和功效评估

[0168] 慢性GvHD器官评分。

[0169] 慢性GVHD的器官评分

[0170]

器官	评分 0	评分 1	评分 2	评分 3
皮肤% BSA[1]	不涉及 BSA	1%至 18% BSA	19%至 50% BSA	> 50% BSA
皮肤特征	无硬化特征	不适用	表面硬化特征，但不是“顽固的”	深度硬化特征；“顽固的”；行动不便；溃疡
口腔	无症状	**有**疾病体征的轻微症状，但不显著限制口服摄入	有疾病体征的中度症状，口服摄入**有**部分限制	有疾病体征的严重症状，口服摄入有主要限制
眼	无症状	不影响 ADL 的轻微干眼症状（润滑剂滴剂需求≤ 3x/天）	部分影响 ADL 的中度干眼症状（需要润滑剂滴> 3x/天或泪点塞）**无**干燥性角膜结膜炎（KCS）引起的新视力障碍	显著影响 ADL（减轻疼痛的特殊护目镜）或因眼部症状而无法工作**或**因干燥性角膜结膜炎（KCS）导致视力丧失的严重干眼症状
GI 道	无症状	无明显体重减轻的症状（< 5%）	与 3 个月内轻微至中度体重减轻（5%至 15%）**或**中度腹泻相关的症状，对日常生活没有显著干扰	与 3 个月内显著体重减轻（> 15%）相关的症状，需要营养补充剂来满足大多数卡路里需求或食管扩张或严重腹泻，严重干扰日常生活。
肝脏	正常总胆红素并且 ALT 或 AP< 3 x ULN	正常总胆红素，ALT > 3 x ULN 至 5 x ULN 或 AP > 3 x ULN	总胆红素升高但< 3 mg/dL 或 ALT > 5 x ULN	总胆红素升高> 3 mg/dL
肺症状评分：	无症状	轻微症状（爬上一段台阶后 SOB）	中度症状（平地行走后 SOB）	严重症状（静息时 SOB；需要 O_2）
肺肺评分：	FEV1 ≥80%	FEV1 60%至 79%	FEV1 40%至 59%	FEV1 <39%
关节和筋膜	无症状	手臂或腿轻度紧绷，活动范围正常或轻微减少且不影响 ADL	手臂或腿紧绷或关节挛缩，被认为是筋膜炎引起的红斑，活动范围的中度减少以及 ADL 的轻微至中度限制	**具有**活动范围显著减少的挛缩**以及** ADL 显著限制（无法系鞋带、纽扣衬衫、衣架等）
生殖道[2]	无体征	轻微体征并且女性在检查时有或没有不适	中度体征并且检查时可能有不适体征	有或无症状的严重体征
其它特征[3]	无 GVHD	轻微	中度	严重

[0171]

[0172] 慢性GvHD应答标准。

[0173]

缩写词	定义
CR	完全应答:cGVHD的完全消退，
PR	部分应答:器官特异性NIH cGVHD评分降低≥1点。

SD	疾病稳定:cGVHD无变化
PD	进行性疾病:在MSC治疗期间或至多8周后cGVHD进展。

[0174] 治疗成功定义为受试者在治疗开始后6个月存活并评估分级为CR或PR。

[0175] 受试者

[0176] 第一个月,每周一次(±1天)用干细胞组合物静脉内(IV)治疗受试者,剂量为2×10^6MSC/kg(筛查时的实际体重),持续2周。如果符合条件,将每月提供一次2×10^6MSC/kg的持续疗法,持续至多另外5个月。

[0177] 评估

[0178] GvHD评估将在筛查时进行,然后每月进行一次(第2个月至第6个月±2天,然后第7个月至第12个月±7天),直到初始干细胞输注后12个月。受试者是否可以继续接受持续细胞疗法的确定将由研究者基于在第1剂量组合物(第0天)后4周(第28天(±2天))进行的受试者的cGvHD评估/分级来确定。

[0179] 第一个月(第28天(±2天))疗法评估:

[0180] 将在第一次输注细胞组合物后第四周(第28天(±2天))进行疗法评估,以确定治疗应答并确定受试者是否将继续接受持续疗法。第28天疗法评估必须在最后剂量的细胞组合物后至少24小时进行。根据对治疗的应答,将允许受试者进行继续疗法,如下文所描述的。

[0181] 第2个月、第3个月、第4个月、第5个月、第6个月、第7个月、第8个月、第9个月、第10个月、第11个月和第12个月疗法评估:

[0182] 将每月进行一次疗法评估(第2个月至第6个月±2天,然后第7个月至第12个月±7天)以确定治疗应答。每个月度疗法评估必须在最后剂量的细胞组合物后至少24小时进行。

[0183] 持续疗法

[0184] 受试者可以在筛查时以2×10^6MSC/kg实际体重的相同初始剂量接受另外的每月一次的细胞组合物输注,这将在初始治疗后第4周(第28天(±2天))进行的初始疗法评估后的一周内开始。持续疗法输注将每月一次(±2天)给予,至多持续另外5个月。

[0185] 分析

[0186] 患者#1AO 030-02C:

[0187] -患者完成了4/7细胞组合物输注。

[0188] 基线评估:

[0189] -器官受累:皮肤、口腔、眼

[0190] -皮肤特征:斑丘疹/红斑、丘疹鳞屑性病变/鱼鳞病

[0191] -其它皮肤发现:色素沉着过度、毛发受累

[0192] -皮肤%BSA评分=3(大于50%BSA)

[0193] -眼评分=1(不影响ADL的轻微干眼症状(润滑剂滴剂需求少于或等于3x/天)

[0194] -口腔评分=1(有疾病体征的轻微症状,但不显著限制口服摄入)

[0195] -cGvHD的最高等级(根据最佳临床判断)=严重

[0196] 第28天应答评估为部分应答:

[0197] -器官受累:皮肤、眼(无口腔受累)

[0198] -皮肤特征:斑丘疹/红斑(基线发现)丘疹鳞屑性病变或鱼鳞病(第28天发现)

[0199] -其它皮肤发现:毛发受累(改善)、指甲受累(改善)

[0200] -皮肤%BSA评分=1(1%至18%BSA)

[0201] -眼评分=1(不影响ADL的轻微干眼症状(润滑剂滴剂需求少于或等于3x/天))

[0202] -严重程度的主观临床医生意见:轻微

[0203] 患者#2CL 054-001:

[0204] -完成了5/7细胞组合物输注。

[0205] 基线评估:

[0206] -器官受累:皮肤、口腔、眼

[0207] -皮肤特征:斑丘疹/红斑

[0208] -其它皮肤发现:严重/全身瘙痒、毛发受累、指甲受累

[0209] -皮肤%BSA评分=1(1%至18%BSA)

[0210] -眼评分=1(不影响ADL的轻微干眼症状(润滑剂滴剂需求少于或等于3x/天)

[0211] -口腔评分=1(有疾病体征的轻微症状,但不显著限制口服摄入)

[0212] -cGvHD的最高等级(根据最佳临床判断)=中度

[0213] 第28天应答评估为部分应答:

[0214] -器官受累:皮肤、眼(无口腔受累)

[0215] -皮肤特征:丘疹鳞屑性病变或鱼鳞病

[0216] -其它皮肤发现:毛发受累(改善)、指甲受累

[0217] -皮肤%BSA评分=1(1%至18%BSA)

[0218] -眼评分=1(不影响ADL的轻微干眼症状(润滑剂滴剂需求少于或等于3x/天)

[0219] -严重程度的主观临床医生意见:轻微

[0220] 第2个月:评估为部分应答:

[0221] -器官受累:皮肤、眼(无口腔受累)

[0222] -皮肤特征:手指上的红色区域很少,上背部和下背部慢性区域消退,具有2个至3个小圆形斑块,耳朵有些轻微发红,头皮上没有皮疹,头发更厚

[0223] -其它皮肤发现:毛发受累、指甲受累

[0224] -皮肤%BSA评分=1(1%至18%BSA)

[0225] -眼评分=1(不影响ADL的轻微干眼症状(润滑剂滴剂需求少于或等于3x/天)

[0226] -严重程度的主观临床医生意见:轻微

[0227] 患者#3PF 055-001:

[0228] -完成了2/7细胞组合物输注。

[0229] 基线评估:

[0230] -皮肤%BSA评分=2(19%至50%BSA)

[0231] -眼评分=2(部分影响ADL的中度干眼症状(需要润滑剂滴大于3x/天或泪点塞)无干燥性角膜结膜炎引起的新视力障碍)

[0232] -口腔评分=1(有疾病体征的轻微症状,但不显著限制口服摄入)

[0233] -cGvHD的最高等级(根据最佳临床判断)=中度

[0234] 第28天应答评估为部分应答:

[0235] -患者的皮肤(涉及的主要器官)显著改善。基线处的许多病变减少到2个。

[0236] 本领域技术人员将理解的是，在不脱离广泛描述的本公开的精神或范围的情况下，可以对如在特定实施例中示出的本公开进行多种变化和/或修改。因此，本实施例应当在所有方面都被视为是说明性的而非限制性的。

[0237] 上文所讨论的所有出版物均以其全文并入本文中。

[0238] 已包含在本说明书中的文件、法令、材料、装置、物品等的任何讨论仅仅是出于为本公开提供上下文的目的。不应因为所述讨论在本申请的每个权利要求的优先权日期之前就已经存在而将其视为承认任何或所有这些事项形成现有技术基础的一部分，或者是与本公开相关的领域中的公知常识。

[0239] 本申请要求于2020年2月19日提交的澳大利亚临时专利申请2020900472的优先权，所述澳大利亚临时专利申请的全部内容通过引用并入本文。