



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104546912 B

(45)授权公告日 2019.11.08

(21)申请号 201410727242.0

(22)申请日 2009.11.19

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104546912 A

(43)申请公布日 2015.04.29

(30)优先权数据

61/199,796 2008.11.20 US

(62)分案原申请数据

200980155054.2 2009.11.19

(83)生物保藏信息

PTA-7282 2005.12.19

(73)专利权人 中胚有限公司

地址 美国纽约

(72)发明人 S·伊泰斯库 R·克里希南

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

代理人 过晓东

(51)Int.Cl.

A61K 35/12(2015.01)

C12N 5/077(2010.01)

A61P 1/18(2006.01)

A61P 5/48(2006.01)

(56)对比文件

WO 2006/032092 A1,2006.03.30,

审查员 皇甫洁琼

权利要求书1页 说明书30页 附图7页

(54)发明名称

用于治疗胰功能异常的方法

(57)摘要

用于在有需要的对象中改善胰功能的方法，该方法包括给所述对象施用STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或衍生自其的可溶因子。本发明的方法可用于治疗和/或预防和/或延缓由胰功能异常引起的或与其相关的疾病的发作，例如，由胰不正常的内分泌或外分泌功能引起的疾病。

1. STRO-1⁺细胞在制备用于改善有此需要的对象的胰功能异常的药物中的用途,其中所述STRO-1⁺细胞的施用:

- (i) 促进胰β细胞和/或胰岛的再生;和/或
- (ii) 在所述对象中降低血液葡萄糖水平和/或提高血液/血清胰岛素水平;和/或
- (iii) 在所述对象的胰中诱导或促进动脉发生或血管发生。

2. 权利要求1的用途,其中所述STRO-1⁺细胞的施用在所述对象的胰中

- (i) 提高胰β细胞的数目;和/或
- (ii) 相对于胰α细胞,提高胰β细胞的数目;和/或
- (iii) 降低胰α细胞的数目;和/或
- (iv) 提高胰岛的数目;和/或
- (v) 提高胰和十二指肠同源异型框因子-1的表达;和/或
- (vi) 提高表达胰和十二指肠同源异型框因子-1的细胞的数目。

3. 权利要求1的用途,其中所述胰功能异常

- (i) 关联或引起异常水平的胰岛素、胰高血糖素、促生长素抑制素、胰多肽;和/或
- (ii) 关联或引起营养的吸收障碍;
- (iii) 导致高血糖或蛋白尿;和/或
- (iv) 关联或引起碳水化合物代谢病。

4. 权利要求3的用途,其中所述异常水平的胰高血糖素是由分泌胰高血糖素的肿瘤所引起的。

5. 权利要求3的用途,其中所述碳水化合物代谢病通过由胰所产生的胰岛素的降低所引起或者通过由胰所产生的淀粉酶的降低所引起。

6. 权利要求3的用途,其中所述碳水化合物代谢病选自先天性I型糖尿病、早发性II型糖尿病、青年发作性非典型糖尿病、青年的成年发作性糖尿病、营养不良相关性糖尿病、妊娠糖尿病、葡萄糖耐受受损的病症、禁食血浆葡萄糖受损的病症、代谢性酸中毒、酮病、高血糖、低胰岛素血症、胰岛素抗性、α甘露糖苷病、β甘露糖苷病、果糖不耐受、岩藻糖苷累积病、半乳糖血症、Leigh病、粘脂质累积和粘多糖累积病。

7. 权利要求1的用途,其中所述STRO-1⁺细胞直接施用至对象的血流中。

8. 权利要求7的用途,其中动脉内施用所述STRO-1⁺细胞。

9. 权利要求1的用途,其中施用于所述对象的STRO-1⁺细胞是STRO-1^{bri},和/或表达组织非特异性碱性磷酸酶(TNAP)。

10. 权利要求1的用途,其中所述STRO-1⁺细胞用于治疗或者延缓胰功能异常的进展。

11. 权利要求1的用途,其中所述STRO-1⁺细胞以组合物的形式施用,所述组合物包含所述STRO-1⁺细胞以及载体和/或赋形剂。

12. 权利要求11的用途,其中所述组合物另外包含诱导或增强先祖细胞分化成血管细胞的因子,或者所述组合物包含组织特异性定型细胞。

用于治疗胰功能异常的方法

[0001] 本申请是2009年11月19日提交的名称为“用于治疗胰功能异常的方法”的第200980155054.2号中国专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及在有需要的对象中改善胰功能的方法。是方法可用于治疗和/或预防和/或延缓病症的发病或进展,其中所述病症由胰功能异常导致或与胰功能异常相关联,例如,由不正常的胰内分泌或外分泌功能所导致。

[0003] 发明背景

[0004] 胰是脊椎动物的消化和内分泌系统中的多功能的腺体器官。其既是内分泌腺体(产生若干激素胰岛素、胰高血糖素、和促生长素抑制素),也是外分泌腺体(分泌胰液,其含有传递至小肠的消化酶)。胰液中的酶帮助进一步分解食糜(chyme)中的碳水化合物、蛋白、和脂肪。

[0005] 胰具有内分泌功能的部分由众多的细胞簇构成称作朗格汉斯胰岛。根据其分泌在胰岛中主要由四类细胞类型: α 细胞分泌胰高血糖素、 β 细胞分泌胰岛素、 δ 细胞分泌促生长素抑制素、以及PP细胞分泌胰多肽。胰岛是内分泌细胞的紧凑集合,其排列成簇和线状(cord)并且还含有毛细血管网。胰岛的毛细血管以直接与血管接触的内分泌细胞的层进行排列,并且大部分内分泌细胞直接与血管接触,这是通过细胞质的过程或者通过直接的并置(apposition)。

[0006] 与分泌激素至血液的内分泌胰相反,外分泌胰产生消化酶(例如,胰蛋白酶原、胰凝乳蛋白酶原、弹性蛋白酶、羧肽酶、胰脂肪酶、和淀粉酶)以及碱性液体,并响应小肠激素而通过外分泌管道系统分泌苏和胆囊收缩素将这些分泌至小肠。消化酶是由外分泌胰的腺泡细胞产生和分泌的。沿胰排列的特定细胞,称作泡心细胞,将碳酸氢盐-和盐-富集的溶液分泌至小肠内。

[0007] 胰功能异常可导致胰所产生的激素和/或酶过量生产或生产不足。与胰功能异常相关或由其引起的病症包括糖尿病、极性或慢性胰炎、胰酶缺乏或胰肿瘤。

[0008] 糖尿病(DM)是一种最常见的慢性内分泌疾病,遍及所有的年龄组和人群,并且由胰功能异常所引起。DM在全世界影响超过一亿人。单单在美国,就有超过一千二百万对象被诊断为患有DM,每年新增诊断600,000例。

[0009] DM是一组疾病的诊断术语,该组疾病特征在于不正常的碳水化合物(例如,葡萄糖)内稳态或代谢,导致血糖升高。这些疾病包括互相关联的代谢、血管、和神经病性组分。DM的各种组分由胰的内分泌和/或外分泌功能所引起。例如,代谢组分,通常特征是高血糖,包括由激素(特别是胰岛素)分泌的缺失或显著降低引起的碳水化合物、脂肪和蛋白代谢的改造(即,内分泌功能)和/或胰岛素作用无效。在外分泌水平,胰产生各种涉及食物消化的酶。例如,胰产生淀粉酶,而在DM中可能分泌不足量的此种酶来消化碳水化合物,导致外分泌胰机能不全、营养不良和体重减轻。因此,胰的内分泌和外分泌功能都对DM的代谢组分有贡献。DM的血管组分包括血管畸形,导致心血管、视网膜、和肾脏的并发症。外周和自主神经

系统的畸形也是DM的组分。

[0010] DM在遗传上由循环胰岛素的量的减少和/或对象中对胰岛素相应的细胞的减少而引起。胰岛素在碳水化合物、脂肪、和蛋白质的代谢中是必须的。胰岛素通过使葡萄糖进入肌肉细胞和脂肪细胞以及通过刺激葡萄糖转化成糖原(糖原生成)作为碳水化合物的储存,从而降低血液葡萄糖水平。胰岛素还抑制所储存的葡萄糖从肝糖原释放(糖原分解),并减缓了脂肪降解成甘油三酸酯、游离脂肪酸、和酮。此外,胰岛素减缓了蛋白分解产生葡萄糖(糖原异生)。胰岛素是由胰的胰岛中的 β 细胞生成和分泌的。

[0011] 有若干种类型的糖尿病,包括I型(也称作胰岛素-依赖型糖尿病或IDDM)和II型(也称作非胰岛素-依赖型糖尿病或NIDDM)、妊娠糖尿病和糖尿病前期(或者受损的葡萄糖代谢)。当然,糖尿病最常见的两种形式是I型和II型糖尿病。I型糖尿病(或胰岛素-依赖型糖尿病;IDDM)是由胰 β 细胞的缺失、破坏或损失所引起的,导致胰岛素的绝对缺乏。II型糖尿病(非胰岛素-依赖型糖尿病;NIDDM)是特征在于胰岛素抗性的异型的疾病。

[0012] I型糖尿病

[0013] I型糖尿病的总发病率单单在美国大约是每100,000人15例。在美国大约所有糖尿病病例中5-15%是I型糖尿病病例,医师诊断每年新增病例约10,000new例。国际上来说,I型糖尿病的分辨率从中国的每100,000人约0.61例至撒丁岛的每100,000人约34.5例,而在芬兰每100,000人超过40例。许多国家也报道在过去20年I型糖尿病的分辨率已经翻番。

[0014] I型糖尿病的急性临床发作的特征在于一些症状如高血糖、多尿症、烦渴、体重降低、或视力模糊,单独的或组合的症状,随后几天或几周有酮酸中毒。通常,该疾病的急性发作被认为之前是长期的无症状潜伏期,期间分泌胰岛素的 β -cells日益被对象的免疫系统所破坏。

[0015] 在健康个体中,胰通常含有1-1.5百万个胰岛;并且大约80%的胰岛细胞是产胰岛素的 β -细胞。当少于10%的这些 β -细胞残存时,糖尿病的临床症状开始显现。

[0016] 由胰 β -细胞的损失所导致的胰岛素供应和需求之间的失谐会引起不正常的葡萄糖、脂质、和蛋白质的代谢。胰岛素缺乏可以引起高血糖和血糖过多性脱水(hyperglycemic dehydration)、游离脂肪酸的水平升高、血清酮的水平升高、甘油三酸酯的水平升高、极低密度脂蛋白(VLDL)的水平升高、支链氨基酸水平的升高、蛋白合成的降低、以及酮酸中毒。具有I型糖尿病的对象可能会患有任何的一或多种不同的血管和神经性的并发症。例如,I型糖尿病患者心脏病发作的几率是非糖尿病患者的两倍;他们患坏疽的几率是5倍;患有完全肾衰竭的几率是17倍,失去视力的几率是25倍。

[0017] I型糖尿病的治疗/预防

[0018] 目前,通过施用外源胰岛素、锻炼和饮食控制来治疗I型糖尿病。这些形式的治疗并不纠正对胰的损害(即,替换被破坏的 β -胰岛细胞),而是替换 β -胰岛细胞所产生的生长因子或者尝试避免对这些因子的需求。

[0019] 大部分患有I型糖尿病的患者需要某种形式的胰岛素治疗。那时,此种治疗通常需要监测对象的血液葡萄糖和/或胰岛素水平,并在需要的时候注射重组的或纯化的胰岛素。新形式的胰岛素也在开发中以使得能够鼻部或口服施用。然而,此种形式的治疗需要对象连续不断地监测以及需要在对象的一生中每天至少施用一次胰岛素。如果对象忘记施用胰岛素或者施用了过多的胰岛素,就会有发展出例如,高血糖、低血糖或酮酸症的风险。

[0020] 目前用于治疗I型糖尿病的另外的化合物包括例如,磺酰脲、双胍,α-葡萄糖苷酶抑制剂或噻唑烷二酮。然而,每个这些化合物也具有明显的缺陷。例如,磺酰脲引起低血糖和超高胰岛素血症;双胍引起乳酸性酸中毒;α-葡萄糖苷酶抑制剂引起肠胃副作用;而噻唑烷二酮具有长期存在的作用,与体重之间相关联并且需要频繁地测试肝功能。

[0021] 胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 也被鉴定为糖尿病可能的治疗剂。此种肽诱导胰和十二指肠同源异型框因子-1 (PDX-1) 的表达,PDX-1是在胰发育、β-细胞分化、和β-细胞功能保持中发挥重要作用的转录因子(Babu et al.,Mol Endocrinol.20:3133-3145,2006)。PDX-1涉及诱导葡萄糖感受和代谢的表达,如GLUT2,葡萄糖激酶和胰岛素。GLP-1被建议为潜在的治疗剂是因为其可以诱导胰β细胞在对象中扩展,以及刺激胰岛素表达(Buteau,Diabetes and Metabolism,34:S73-S77,2008)。然而,使用临床可用的能够提高GLP-1细胞内可用性的物质,如口服的活性二肽基肽酶-4 (DPP-IV) 抑制剂或可注射的GLP-1类似物,已被局限于治疗轻度的II型糖尿病。这些物质相对较短的半衰期、需要频繁地施用、以及在严重的β细胞损失的病例中相对缺乏效力,已经排除了他们被用作胰岛素节约剂用于I型糖尿病或其它胰岛素依赖性患者的可能。即使是可口服的GLP-1类似物也具有短的半衰期并需要每日高剂量施用。

[0022] 其它治疗选择包括胰岛移植,其已显示可降低胰岛素依赖性(Shapiro et al.,New Eng.J.Med.,343:230-238,2000)。然而,此种治疗的应用受到了来自捐献者的原代人胰岛非常有限的可用性的局限,在移植过程中必须具有心跳以确保细胞存活(Burns et al.,J.Endocrinology,103:437-443,2004)。

[0023] 干细胞,例如,胚胎干细胞(ES)已被建议作为适宜的来源用于产生治疗相应量的产胰岛素细胞。然而,分泌胰岛素的β-细胞还未从干细胞中产生,更不要说所需的水平了,估计每次移植需要 $2-4 \times 10^9$ 个β-细胞。此种基于细胞的疗法必须克服这样的困难,即替代细胞的增殖能力必须受到严格控制以确保它们不会扩展至某种水平会引起超高胰岛素血症或低血糖,而移植的细胞也必须避免受体免疫系统的破坏。此外,在基于ES细胞的疗法中,必须去除任何残留的ES细胞以避免形成畸胎瘤的风险。

[0024] II型糖尿病

[0025] II型糖尿病占糖尿病病例的约90-95%,并且仅在美国每年就导致约193,000人死亡。II型糖尿病在所有死亡原因中排名第7位。在西方社会,II型糖尿病目前影响成年人群的6%并且全世界的分辨率预计每年增加6%。尽管存在某些遗传性特点可能使得某些特定个体偏向于发展出II型糖尿病,但是该疾病发病率目前增长的主要原因是日益增加的久坐的生活方式、饮食以及目前在发达国际中普遍存在的肥胖症等。II型糖尿病目前在国际上被认为是人类健康的主要威胁之一。

[0026] II型糖尿病,在肌肉、脂肪、肝细胞不能正常响应胰岛素的时候发展出来。此种不能响应(称作胰岛素抗性)可能是由于这些细胞上胰岛素受体的减少,或者这些细胞内信号通路的功能异常,或者二者兼而有之。β-细胞起初通过提高其胰岛素输出来弥补此种胰岛素抗性。随着时间的推移,这些细胞变得不能够产生足够的胰岛素以维持正常的葡萄糖水平,表明进展至II型糖尿病(Kahn et al.,Am.J.Med.108:2S-8S),2000)。

[0027] II型糖尿病的治疗

[0028] 对于II型糖尿病的常规治疗是非常有限的,并集中于尝试控制血液葡萄糖水平以

使并发症最小化或者延迟。目前的治疗目标是胰岛素抗性(二甲双胍,噻唑烷二酮("TZD")),或者 β -细胞释放胰岛素(磺脲,依泽那太(exenatide))。磺脲,以及其它通过使 β -细胞去极化的化合物,具有低血糖的副作用,因为它们引起不依赖于循环葡萄糖水平的胰岛素分泌。目前疗法的其它副作用包括体重增加、随时间推移对治疗无反应、胃肠问题、以及水肿。

[0029] 一种目前经许可的药物,Januvia(sitagliptin)提高了肠降血糖素激素的血液水平,其可以增加胰岛素分泌,降低胰高血糖素分泌并且具有其它未经有效表征的作。然而,Januvia和其它二肽基肽酶-IV抑制剂也可以影响其它激素和肽的组织水平,并且此类广泛的效果的长期结果还未经完整的研究。此外,此化合物不解决与胰岛素抗性相关的问题。

[0030] 与I型糖尿病类似,GLP-1已被建议作为潜在的治疗剂用于II型糖尿病,这是由于其诱导胰岛素分泌、诱导 β -细胞扩展和恢复葡萄糖抗性细胞中的葡萄糖耐受的能力。然而,如上所述,GLP-1及其类似物由于其非常短的半衰期而具有有限的治疗潜力。

[0031] 由前文可知,现有技术中需要用于对与胰功能相关的疾病的发作或进展进行治疗或预防或延缓的方法和/或用于改善胰功能的方法。

[0032] 发明概述

[0033] 在导致本发明的工作中,发明人想要确定间充质前体细胞(MPC)的特定亚集对胰功能异常的发展和/或进展的作用。本发明人使用了已知的模型,其中通过对小鼠施用链脲菌素(STZ)来诱导胰功能异常。此化合物诱导胰岛的炎症和免疫细胞渗入,最终导致细胞死亡和胰功能异常。STZ在胰的内分泌功能(例如,降低胰岛素产生)和胰的外分泌功能(例如,降低淀粉酶产生)均引起功能异常。此模型也是葡萄糖代谢病的被接受的模型,例如,I型糖尿病和II型糖尿病。

[0034] 如本文所示例的,本发明人证明了向经过STZ处理的小鼠施用STRO-1⁺细胞提高了血清胰岛素水平以及减低了血液葡萄糖水平(与经过STZ处理的但未接受STRO-1⁺细胞的小鼠相比)。本发明人也证明了STRO-1⁺细胞在胰中诱导或增加表达PDX-1的细胞的数目,和/或增加对象中胰 β 细胞和/或胰岛的数目(例如,促进胰 β 细胞再生)。本发明人也发现STRO-1⁺细胞通过提高 β 细胞数目和/或降低 α 细胞从而恢复了胰 β 细胞对胰 α 细胞的比率。本发明人此外还发现用STRO-1⁺细胞治疗可在对象的胰中诱导血管形成。这些数据一起,表明了STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或由其所分泌的因子诱导或促进胰再生和/或改善胰功能。因此,所述STRO-1⁺细胞或其后代细胞或源自其的因子能够治疗和/或预防和/或降低胰的STZ毒性作用。因此这些数据表明所述STRO-1⁺细胞或其后代细胞或源自其的一或多种因子能够治疗或预防或延缓胰功能异常的发作或者降低胰功能异常的严重性和/或改善胰功能和/或诱导胰或其细胞的再生和/或醋精葡萄糖代谢(例如,通过提高循环胰岛素水平)。

[0035] 本发明人的发现为用于治疗和/或预防和/或延缓胰功能异常的发作和/或延缓胰功能异常的进展的方法提供了基础,所述胰功能异常如糖尿病。

[0036] 因此,本发明提供了用于在有需要的对象中改善胰功能的方法,该方法包括给所述对象施用STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或衍生自其的可溶因子。

[0037] 本发明另外或者作为选择还提供用于促进或者诱导对象中胰再生的方法(例如,在患有胰功能异常的对象中),所述方法包括给所述对象施用STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或衍生自其的可溶因子。例如,该方法诱导或促进新的 β 细胞和/或胰中微血管的产

生。

[0038] 本发明另外或者作为选择还提供用于诱导或促进胰 β 细胞和/或胰岛的再生的方法,该方法包括给所述对象施用STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或衍生自其的可溶因子。

[0039] 本发明另外或者作为选择还提供用于在对象中降低的血液葡萄糖水平和/或增加血液/血清胰岛素水平的方法,该方法包括给所述对象施用STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或衍生自其的可溶因子。

[0040] 本发明另外或者作为选择还提供用于在对象中增加胰 β 细胞的数量和/或用于增加胰 β 细胞相对于胰 α 细胞的数量和/或用于降低胰 α 细胞的数量和/或用于增加胰岛的数量的方法,该方法包括给所述对象施用STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或衍生自其的可溶因子。

[0041] 本发明另外或者作为选择还提供用于在对象的胰中增加胰和十二指肠同源异型框因子-1 (PDX-1) 的表达和/或用于增加表达的PDX-1的细胞的数量方法,该方法包括给所述对象施用STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或衍生自其的可溶因子。

[0042] 本发明另外或者作为选择还提供用于在对象的胰中诱导或促进动脉发生或血管发生的方法,该方法包括给所述对象施用STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或衍生自其的可溶因子。

[0043] 本发明另外或者作为选择还提供用于在对象中增加胰 β 细胞前体的数量或者诱导或促进胰 β 细胞前体的增殖的方法,该方法包括给所述对象施用STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或衍生自其的可溶因子。

[0044] 在一个实例中,对象患有胰功能异常。

[0045] 在一个实例中,所述胰功能异常与胰的内分泌功能和/或胰的外分泌功能的功能异常相关或由其所引起。优选地,所述胰功能异常导致胰功能降低或与胰功能降低相关,例如,胰的内分泌功能减低或胰的外分泌功能降低。

[0046] 在本发明的一个实例中,胰功能异常关联或引起碳水化合物代谢病。此种碳水化合物代谢病可由胰的内分泌和/或外分泌功能异常所引起。在一个实例中,所述碳水化合物代谢病由胰的胰岛素生产降低所引起。在另一个实例中,所述碳水化合物代谢病是由胰高血糖素水平升高所引起(例如, α 细胞的数量增加和/或胰高血糖素的表达和/或产生和/或分泌增加)。在另一个实例中,所述碳水化合物代谢病是由胰的淀粉酶生产降低所引起。技术人员根据本文的说明会意识到,碳水化合物代谢病(或胰功能异常)未必仅由胰的功能来表征。例如,碳水化合物代谢病也可以由胰岛素抗性和/或由血管组分和/或由神经病变的组分来进行表征。在本发明的一个实例中,所述胰功能异常是糖尿病,例如,I型糖尿病或II型糖尿病。

[0047] 优选地,本发明的方法包括施用有效量的或者治疗有效量的或者预防有效量的STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或衍生自其的可溶因子。在一个实例中,该方法包括施用STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或衍生自其的可溶因子的量足以诱导对象中胰岛素生产,优选诱导胰岛素的生产至少约1周或2周或3周或4周。

[0048] 在一个实例中,将所述STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或衍生自其的可溶因子直接施用至对象的血流中,然而并不排除其它的施用部位。优选地,将所述STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或衍生自其的可溶因子全身性地施用。例如,将所述STRO-1⁺细胞和/或其

后代细胞和/或衍生自其的可溶因子静脉内、动脉内、施用至大动脉内、至心脏的心房或心室内或者至与胰相连的血管内,例如,腹部大动脉、上肠系膜动脉、胰十二指肠动脉或脾动脉。在优选的实例中,将所述STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或衍生自其的可溶因子经动脉内施用,例如,施用至股动脉内或腹腔动脉内,例如,施用导管。

[0049] 作为选择,或者此外,将所述STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或衍生自其的可溶因子施用至对象的胰或其部分。

[0050] 在一个实例中,施用于对象的STRO-1⁺细胞是STRO-1^{bri}、和/或表达组织非特异性碱性磷酸酶(TNAP)。本文描述了另外的STRO-1⁺细胞群体,其特征在于特定的细胞表面标记物或其组合。根据此实例,后代细胞和/或可溶因子也可以源自表达STRO-1的细胞或STRO-1^{bri}细胞和/或表达TNAP的细胞。此类后代细胞也可以表达STRO-1或者是STRO-1^{bri}细胞和/或表达TNAP。

[0051] 根据本发明用于治疗或延缓胰功能异常的进展的实例,优选在对病症进行诊断之后再施用STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或衍生自其的可溶因子,例如,使用本领域已知的标准技术。对于那些用于预防或延缓胰功能异常的发作的实例,优选在病症的临床诊断前施用STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子,例如,当对象患有受损葡萄糖耐受和/或受损的禁食糖血时,和/或在自身免应答之前的或伴有自身免应答的I型糖尿病的情况,如由T细胞群体和/或B细胞群体的扩展所指示出的和/或由自身抗体的产生所指示出的(例如,在I型糖尿病的发作或进展中针对胰β-胰岛细胞的细胞毒T细胞的扩展和/或针对一或多种胰β-胰岛细胞标记物的自身抗体的扩展)。

[0052] 优选地,本文根据任何实例所描述的方法另外包括监测或探测胰功能异常的发病和/或进展、和/或血液葡萄糖水平、和/或血液/血清胰岛素水平、和/或β细胞的数目、和/或α细胞的数目、和/或胰岛的数目、和/或PDX-1表达细胞的数目、和/或PDX-1表达的量、和/或血管的数目。例如,该方法另外包括葡萄糖耐受测试和/或禁食糖血测试和/或测量由胰所产生的激素或酶的水平、和/或获得胰的样品以确定β-细胞的数目和/或α细胞的数目和/或胰岛的数目和/或表达PDX-1的细胞的数目和/或PDX-1表达的量、和/或血管的数目。此类监测可以指示出随后施用STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子是必须的或期望的。

[0053] 技术人员从前面的段落会了解到,本文根据任何实例所描述的方法不应被认为是将STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子限制为单次施用。本发明清楚地涵盖了多次施用,施用于相同的或不同的部位或通过相同的或不同的途径施用。本发明也涉及了STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子的单次施用。

[0054] 在一个实例中,将STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子以组合物的形式施用,例如,包含所述STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子以及载体和/或赋形剂的组合物。适宜的载体和/或赋形剂对技术人员而言将是显见的和/或在本文中有描述。

[0055] 此种组合物可以包含另外的可用于治疗或预防碳水化合物代谢病的因子,例如,胰岛素或淀粉酶和/或与正常胰功能相关的肽或多肽,例如,胆囊收缩素辛肽(cholecystokinin octapeptide)或促生长素抑制素或胰高血糖素或胰蛋白酶原或胰凝乳蛋白酶原或弹性蛋白酶或羧肽酶或胰脂肪酶。作为选择,或者此外,STRO-1⁺细胞或其后代

细胞可以经遗传改造以表达(以及优选分泌),此种另外的因子,例如,胰岛素或淀粉酶和/或与正常胰功能相关的肽或多肽例如,胆囊收缩素辛肽或促生长素抑制素或胰高血糖素或胰蛋白酶原或胰凝乳蛋白酶原或弹性蛋白酶或羧肽酶或胰脂肪酶。

[0056] 本发明还提供了对STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或衍生自其的可溶因子的使用,或者含有上述的组合物的使用:

[0057] (i) 治疗胰功能异常;和/或

[0058] (ii) 改善胰功能;和/或

[0059] (iii) 诱导或促进胰β细胞和/或胰岛的再生;和/或

[0060] (iv) 降低血液葡萄糖水平和/或提高血液/血清胰岛素水平;和/或

[0061] (v) 提高胰β细胞的数目和/或用于相对于胰α细胞提高胰β细胞的数目和/或用于减少胰α细胞的数目和/或用于提高胰岛的数目;和/或

[0062] (vi) 提高胰和十二指肠同源异型框因子-1 (PDX-1) 表达和/或用于提高胰中的PDX-1表达细胞的数目;和/或

[0063] (vii) 诱导或促进胰中的动脉发生或血管发生。

[0064] 本发明还提供了STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或衍生自其的可溶因子在制备药物中的用途,所述药物用于:

[0065] (i) 治疗胰功能异常;和/或

[0066] (ii) 改善胰功能;和/或

[0067] (iii) 诱导或促进胰β细胞和/或胰岛的再生;和/或

[0068] (iv) 降低血液葡萄糖水平和/或提高血液/血清胰岛素水平;和/或

[0069] (v) 提高胰β细胞的数目和/或用于相对于胰α细胞提高胰β细胞的数目和/或用于减少胰α细胞的数目和/或用于提高胰岛的数目;和/或

[0070] (vi) 提高胰和十二指肠同源异型框因子-1 (PDX-1) 表达和/或用于提高胰中的PDX-1表达细胞的数目;和/或

[0071] (vii) 诱导或促进胰中的动脉发生或血管发生。

[0072] 本发明适用于广阔范围的动物。例如,所述对象是哺乳动物如人、狗、猫、马、牛、或绵羊,优选所述对象是人。在一个实施例中,所述对象是人。在另一个实施例中,所述对象是非人哺乳动物。

[0073] 附图简述

[0074] 图1描述了天后在STZ诱导的糖尿病NOD/scid小鼠中STRO-1⁺细胞对血液葡萄糖水平(BGL)的影响。血液葡萄糖水平在左心室注射了媒介物(CV)或STRO-1⁺细胞(CM)的糖尿病小鼠中确定,所述小鼠在STZ-疗法后第10天被注射。血液葡萄糖值为平均葡萄糖(mM) ± SE。斯氏t检验(Student's t-test)以显著性p<0.05来进行。

[0075] 图2显示了处理后的第7天、14天和21天后在STZ诱导的糖尿病NOD/scid小鼠中STRO-1⁺细胞对血液葡萄糖水平(BGL)的影响,与STZ-处理后第10天的基准相比较。血液葡萄糖水平在左心室注射了媒介物(CV)或STRO-1⁺细胞(CM)的糖尿病小鼠中确定。结果表示为BGL相对于第10天细胞治疗起始的%变化。斯氏T检验以显著性p<0.05来进行。

[0076] 图3显示了细胞治疗剂量21天后在STZ诱导的糖尿病NOD/scid小鼠中STRO-1⁺细胞对胰岛素水平的影响。血清小鼠胰岛素水平在左心室注射了媒介物(CV)或STRO-1⁺细胞

(CM)的糖尿病小鼠中确定。小鼠胰岛素值为 $\mu\text{g/L} \pm \text{SE}$ 。斯氏T检验以显著性 $p < 0.05$ 来进行。

[0077] 图4A显示了细胞治疗剂量21天后在STZ诱导的糖尿病NOD/scid小鼠中动脉内STRO-1⁺细胞对胰微血管密度的影响。由抗-平滑肌肌动蛋白(SMA)抗体染色的微血管的总数目是基于胰切片的大小分布/横切面面积来确定的。数据表示为平均 $\pm \text{sem}$;且媒介物组N=8、以及STRO-1治疗组N=6只动物。斯氏T检验以显著性 $p < 0.05$ 来进行。

[0078] 图4B是显微照片(200x)的复印,显示了经STRO-1细胞处理的小鼠的胰组织中由小鼠抗-平滑肌肌动蛋白IgG2a-FITC染色的不同直径的微血管。

[0079] 图5A显示了细胞治疗剂量21天后在STZ诱导的糖尿病NOD/scid小鼠中动脉内STRO-1⁺细胞对胰mRNA谱的影响。从媒介物组(CV)和STRO-1治疗组(CM)的胰组织提取RNA,反转录并PCR扩增与 β 细胞再生相关的转录因子:Mafa、Ngn3、Pdx-1。将总RNA含量针对持家基因 β -肌动蛋白来进行归一化。数据表示为平均 $\pm \text{sem}$;且媒介物组N=8、以及STRO-1治疗组N=6只动物。斯氏T检验以显著性 $p < 0.05$ 来进行。

[0080] 图5B显示了细胞治疗剂量21天后在STZ诱导的糖尿病NOD/scid小鼠中动脉内STRO-1⁺细胞对PDX-1阳性细胞的作用。对由抗-PDX-1抗体染色的胰组织分析每 mm^2 胰岛面积的PDX-1阳性细胞。数据表示为平均 $\pm \text{sem}$;且媒介物组N=8、STRO-1治疗组N=6以及未处理对照组(无STZ)N=3只动物。斯氏T检验以显著性 $p < 0.05$ 来进行。

[0081] 图5C是一系列显微照片(400x)的复印件,显示了经抗原恢复、福尔马林固定和石蜡包埋的切片,其由小鼠抗-PDX-1(IgG2b)染色并由山羊抗-小鼠IgG2b-Alexa 555缀合物检测。

[0082] 图6A显示了细胞治疗21天后在STZ诱导的糖尿病NOD/scid小鼠中动脉内STRO-1⁺细胞对胰岛特性的作用。对由H&E染色的胰组织分析胰岛密度,其被针对所检验的切片面积而进行归一化。数据表示为平均 $\pm \text{sem}$;且媒介物组N=8、以及STRO-1治疗组N=6只动物。斯氏T检验以显著性 $p < 0.05$ 来进行。

[0083] 图6B显示了细胞治疗21天后在STZ诱导的糖尿病NOD/scid小鼠中动脉内STRO-1⁺细胞对胰岛特性的作用。对由H&E染色的胰组织分析平均胰岛直径,其被针对所检验的切片面积而进行归一化。数据表示为平均 $\pm \text{sem}$;且媒介物组N=8、以及STRO-1治疗组N=6只动物。

[0084] 图6C显示了细胞治疗21天后在STZ诱导的糖尿病NOD/scid小鼠中动脉内STRO-1⁺细胞对胰岛特性的作用。对由H&E染色的胰组织分析平均胰岛面积,其被针对所检验的切片面积而进行归一化。数据表示为平均 $\pm \text{sem}$;且媒介物组N=8、以及STRO-1治疗组N=6只动物。

[0085] 图7A显示了细胞治疗21天后在STZ诱导的糖尿病NOD/scid小鼠中动脉内STRO-1⁺细胞对胰岛特性的作用。对由抗胰岛素抗体染色的胰组织分析每 mm^2 胰岛面积的胰岛素阳性细胞。数据表示为平均 $\pm \text{sem}$;且媒介物组N=8、STRO-1治疗组N=6以及未处理对照组(无STZ)N=3只动物。斯氏T检验以显著性 $p < 0.05$ 来进行。

[0086] 图7B是一系列显微照片(200x)的复印件,显示了经抗原恢复、福尔马林固定和石蜡包埋的切片,其由豚鼠抗-胰岛素抗体染色并由抗豚鼠IgG-罗丹明缀合物检测。处理组在每张显微照片的底部标出。

[0087] 图7C显示了细胞治疗21天后在STZ诱导的糖尿病NOD/scid小鼠中动脉内STRO-1⁺

细胞对胰岛特性的作用。对由抗胰高血糖素抗体染色的胰组织分析每 mm^2 胰岛面积的胰高血糖素阳性细胞。数据表示为平均 \pm sem;且媒介物组 $N=8$ 、STRO-1治疗组 $N=6$ 以及未处理对照组(无STZ) $N=3$ 只动物。斯氏T检验以显著性 $p<0.05$ 来进行。

[0088] 图7D是一系列显微照片(200x)的复印件,显示了经抗原恢复、福尔马林固定和石蜡包埋的切片,其由小鼠抗-胰高血糖素抗体染色并由山羊抗-小鼠IgG-FITC缀合物检测。处理组在每张显微照片的底部标出。

[0089] 图7E显示了胰岛内 β 细胞的数目作为总 $\alpha+\beta$ 细胞的比例。所示出的数据是从胰岛素阳性细胞数目/ mm^2 胰岛面积以及胰高血糖素阳性细胞数目/ mm^2 胰岛面积而计算的。该数据表示平均 \pm sem;且媒介物组 $N=8$ 、STRO-1治疗组 $N=6$ 以及未处理的对照组(无STZ) $N=3$ 只动物。斯氏T检验以显著性 $p<0.05$ 来进行。

[0090] 优选实施方案详述

[0091] 一般技术和经选择的定义

[0092] 在整个本说明书中,除非另有具体说明或者背景另有要求,涉及的单一步骤、物质的组合物,成组的步骤或成组的物质组合物,应当被理解为涵盖了一个以及多个(即一或多个)的那些步骤、物质的组合物、成组的步骤或成组的物质组合物。

[0093] 本文所描述的每个实施方案或者实施例经必要的修改后会适用于每个其它的实施方案,除非另有具体说明。例如,本文所述的专注于治疗和/或预防和/或延缓对象中胰功能异常的发作和/或延缓对象中胰功能异常的进展的每个实施方案或实施例经必要的修改后会适用于改善胰功能的方法和/或诱导或促进胰再生的方法,就好像那些实施方案已明确地记载于本文中。

[0094] 本文所述的关于治疗胰功能异常的每个实施例应被理解为经必要的修改后会适用于碳水化合物代谢病的治疗,就好像那些实施方案已明确地记载于本文中。

[0095] 本文所述的关于治疗胰功能异常的每个实施例应被理解为经必要的修改后会适用于糖尿病的治疗,例如I型糖尿病或II型糖尿病,就好像那些实施方案已明确地记载于本文中。

[0096] 本领域技术人员会理解,本文所述的发明可接受本文所具体描述的之外的变化和修改。应理解为本发明包括所有此类的变化和修改。本发明也单独地或共同地包括本说明书中所提及和指出的所有的步骤、特征、组合物和化合物,以及任意的和所有的组合,或者任意的二或更多个所述的步骤或特征。

[0097] 本发明在范围上不受本文所述的具体实施方案的限制,所述实施方案仅仅是用于例证的目的。功能上等价的产品、组合物和方法如本文所述也清楚地在本发明的范围之内。

[0098] 本发明的施行中无过度的实验,除非另有明示,其中使用常规技术分子生物学、微生物学、病毒学、重组DNA技术、溶液中的肽合成、固相肽合成、以及免疫学。此类过程例如在如下中有描述Sambrook, Fritsch&Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Second Edition (1989), 整个Vols I、II、和DI; DNA Cloning: A Practical Approach, Vols. I和II (D.N. Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, 全文; Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (M.J. Gait, ed, 1984) IRL Press, Oxford, 全文, 以及特别是其中的文章Gait, pp1-22; Atkinson et al, pp35-81; Sproat et al, pp 83-115; 和Wu et al, pp 135-151; 4. Nucleic Acid

Hybridization: A Practical Approach (B.D.Hames & S.J.Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, 全文; Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach (1986) IRL Press, Oxford, 全文; Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Methods In Enzymology (S.Colowick and N.Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), 全系列; J.F.Ramalho Ortigao, "The Chemistry of Peptide Synthesis" In: Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website (Interactiva, Germany); Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. and Fenichel, R.L. (1976) . Biochem. Biophys. Res. Commun. 73 336-342; Merrifield, R.B. (1963) . J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154; Barany, G. and Merrifield, R.B. (1979) in The Peptides (Gross, E. and Meienhofer, J. eds.), vol. 2, pp. 1-284, Academic Press, New York. 12. Wunsch, E., ed. (1974) Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie (Müller, E., ed.), vol. 15, 4th edn., 第1和第2部分, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 25, 449-474; Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); 以及 Animal Cell Culture: Practical Approach, Third Edition (John R.W. Masters, ed., 2000), ISBN 0199637970, 全文。

[0099] 在整个说明书中, 除非前背景中另有要求, 措辞“包含”或其变体如“包括”或“含有”等, 将被认为是表示包括了所述的步骤或元件或整体或者步骤或元件或整体的组, 但却并不排除包括任何其它的步骤或元件或整体或者步骤或元件或整体的组。

[0100] 如本文所用, 术语“源自”应被认为是表示具体的整体可以得自特定的来源但却未必是直接来自该来源。对于源自STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞的可溶因子的情况, 此术语应被认为是 指一或多种因子例如蛋白质、肽、碳水化合物等, 是在STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞的体外培养期间所产生的。

[0101] 如本文所用, 术语“改善胰功能”应被认为是 指对象中胰的一或多种功能与未经本发明所述那样处理的对象中的同一功能相比得到了增强 (优选是与处理前的对象相比)。此术语涵盖了, 例如在患有或者未患有葡萄糖代谢病的对象中提高胰岛素分泌的水平或改善胰岛素分泌的调节。该术语还涵盖了在具有升高的水平的胰高血糖素 (例如, 由于分泌胰高血糖素的肿瘤) 的对象中和/或在患有低血糖的对象中降低例如胰高血糖素的分泌。

[0102] 如本文所用, 术语“胰功能异常”应被认为是 指任何这样的状况, 其中对象中胰的一或多种功能与正常和/健康个体中同一功能不同。例如, 术语“胰功能异常”涵盖了其中对象中胰的内分泌功能和/或外分泌功能与正常和/健康个体相比增强了或降低了。例如, “胰功能异常”的特征可以在于, 与异常 (即, 增加了或减少了) 水平的胰岛素、胰高血糖素、促生长素抑制素、胰多肽、胰蛋白酶原、胰凝乳蛋白酶原、弹性蛋白酶、羧肽酶、胰脂肪酶或淀粉酶相关或由其所引起。根据前文对于技术人员而言显见的是, 术语“治疗胰功能异常”涵盖了使胰的功能正常化 (例如, 治疗对象以使胰的一或多种不正常的功能减弱或增强, 从而使它们更类似于正常和/健康个体的同一功能)。例如, 此种治疗可以在具有异常降低

水平的胰岛素和/或胰β细胞和/或胰岛的对象中导致胰岛素水平升高和/或胰β细胞和/或胰岛的数目增加。此种治疗可以同样地降低异常升高的胰高血糖素水平,例如,分泌胰高血糖素的胰肿瘤的情况,例如通过降低分泌胰高血糖素的α细胞的数目和/或通过降低胰高血糖素的表达、产生和/或分泌。在前文的基础上,术语“预防或延缓胰功能异常”的含义对于技术人员来说是显见的。

[0103] 胰功能异常可以与导致营养(例如,碳水化合物、脂质或蛋白质)吸收障碍的病症相关或引起该病症,例如是因为由胰所产生的消化酶的水平降低,如脂肪酶或淀粉酶,和/或通过降低胰液的产生。此类病症包括胰炎、胰机能不全、获得性自身免疫缺陷综合征、癌症、囊性纤维化或Zollinger-Ellison综合征。在优选的实例中,所述病症是由胰所产生的淀粉酶或脂肪酶的降低而引起的或者与其相关。

[0104] 胰功能异常还可以关联或引起与对象对营养的异常使用或代谢相关的病症,例如,导致高血糖或低血糖、降低的血清氨基酸水平、蛋白尿、坏死松解性游走性红斑(necrolytic migratory erythema)。此类病症包括碳水化合物代谢病如糖尿病。其它病症包括,例如肿瘤(如分泌胰高血糖素的肿瘤,其可引起高血糖)。示例性的肿瘤包括胰高血糖素瘤。

[0105] 如本文所用,术语“碳水化合物代谢病”应被理解是指对象不能够(或者能力降低)降解或代谢或者吸收或使用一或多种形式的碳水化合物的病症,通常导致该对象的血流中所述碳水化合物的水平升高。优选所述碳水化合物代谢病与涉及碳水化合物降解的激素在胰中生产的降低相关或者由其所引起,例如淀粉酶的生产。更优选地,所述碳水化合物代谢病与涉及碳水化合物摄取的激素在胰中生产的降低相关或者由其所引起,例如胰岛素的生产。示例性的碳水化合物代谢病包括I型糖尿病、II型糖尿病、先天性I型糖尿病(Ib型)、早发性II型糖尿病(EOD)、青年发作性非典型糖尿病(YOAD)、青年的成年发作性糖尿病(MODY)、营养不良相关性糖尿病、妊娠糖尿病、葡萄糖耐受受损(IGT)的病症、禁食血浆葡萄糖受损的病症、代谢性酸中毒、酮病、X综合征、高血糖、低胰岛素血症、胰岛素抗性、α甘露糖苷病、β甘露糖苷病、果糖不耐受、岩藻糖苷累积病、半乳糖血症、Leigh病、粘脂质累积、粘多糖累积病、或者任何一或多种前述病症的并发症。优选所述碳水化合物代谢病是糖尿病,例如I型糖尿病或II型糖尿病。

[0106] 优选患有糖尿病的对象具有临床可接受的糖尿病标记,如:

[0107] ●禁食血浆葡萄糖高于或等于7nmol/L或126mg/dl;

[0108] ●临时血浆葡萄糖(在一天的任何时间获取)高于或等于11.1nmol/L或200mg/dl并具有糖尿病的症状。

[0109] ●以;2小时的时间间隔测量的口服糖尿病耐受测试(OGTT)值高于或等于11.1nmol/L或200mg/dl。OGTT以2或3小时的时间跨度给出。

[0110] 如本文所用,术语“有效量”应被理解是指STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子的量足以改善其所施用的对象的胰功能(与施用前相比和/或与未施用其的对象相比)。例如,有效量的STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子可以降低基础或休眠葡萄糖水平(糖血)和/或改善葡萄糖耐受和/或提高血液胰岛素水平和/或提高血清中或胰中或消化系统中胰高血糖素、促生长素抑制素、胰多肽、胰蛋白酶原、胰凝乳蛋白酶原、弹性蛋白酶、羧肽酶、胰脂肪酶或淀粉酶的水平。有效量的STRO-1⁺细胞和/

或其后代细胞和/或源自其的可溶因子还可以增加胰或其区域的血液供应,例如通过增加胰或其区域内或周围的脉管系统。技术人员会意识到此种量会根据一些因素而变化,例如STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子、和/或特定的对象、和/或胰功能异常的类型或严重性。因此,此术语不应理解为是将本发明限制为具体的量,例如细胞或可溶因子的重量或数目,而本发明涵盖了足以改善对象中胰功能的任何量的所述STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子。用于确定胰功能的方法和/或用于确定STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子足以改善胰功能的量的方法的技术人员是显见的和/或在本文中有描述。有效量未必治疗或防止胰功能异常。

[0111] 如本文所用,术语“治疗有效量”应被理解是指STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子的量足以减少或抑制与胰功能异常相关或由其引起的临床病症的一或多种症状,达到低于所观测的水平或者接受为该病症的临床诊断的水平。例如,治疗有效量的STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子可以将对象的葡萄糖耐受从糖尿病对象中所观测的水平降低到症状发生前的对象(例如患受损的葡萄糖耐受或受损的休眠糖血)中或者正常或健康对象中所观测到的水平。

[0112] 如本文所用,术语“预防有效量”应被理解是指STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子的量足以防止或抑制与胰功能异常相关或由其引起的临床病症的一或多种可探测症状的发作。例如,预防有效量STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子可以防止对象的葡萄糖耐受变为受损至该对象被临床诊断为糖尿病的程度。

[0113] 如本文所用,术语“治疗”应被理解是指施用治疗有效量的可溶因子和/或细胞,并且减少或抑制与胰功能异常相关或由其引起的临床病症的至少一种症状。

[0114] 如本文所用,术语“预防”或“防止”应被理解是指施用预防有效量的可溶因子和/或细胞,并且停止或阻碍与胰功能异常相关或由其引起的临床病症的至少一种症状的发展。

[0115] “延缓胰功能异常的进展”是指治疗降低了对对象中胰功能异常的严重性。此种严重性的降低可以是,例如防止胰功能异常的一或多种并发症,如营养吸收障碍、低血糖、高血糖、酮酸症、视网膜病变、白内障、高血压、肾衰竭、冠状动脉病、外周血管病、神经病(如外周神经病或自主神经病)或者感染的风险增加。作为选择,或者此外,胰功能异常严重性降低的特征在于,对象对治疗性处理(如胰岛素施用)的需求降低,或者对治疗性处理规律性的需求降低(与未使用本发明的方法接受治疗的对象相比)。作为选择,或者此外,“降低胰功能异常进展”是指,与未使用降低胰功能异常的进展的化合物进行治疗的糖尿病对象相比,延迟了胰功能异常的一或多种可检测症状的发作。

[0116] 如本文所用,术语“可溶因子”应被理解是指由STRO-1⁺细胞和/或其后代所产生的任何可溶于水的分子,例如蛋白质、肽、糖蛋白、糖肽、脂蛋白、脂肽、碳水化合物等。此类可溶因子可以是细胞内的和/或由细胞所分泌的。此类可溶因子可以是复杂的混合物(如上清液)和/或其部分、和/或可以是纯化的因子。在本发明的一个实例中,可溶因子是上清液或包含在上清液内。因此,本文中要施用一或多种可溶因子的任何实例应被理解为,经必要修改后将会适用于施用上清液。

[0117] 如本文所用,术语“上清液”是指在适宜的培养基(优选液体培养基)中体外培养间充质前体细胞和/或其后代细胞后,所产生的非细胞材料。通常,所述上清液的产生是通过

在适宜的条件和时间于培养基中培养细胞,随后由离心等方法去除细胞材料。所述上清液在施用前可以经过或者未经过进一步的纯化步骤。在游戏的实例中,所述上清液含有少于 10^5 个活细胞、更优选少于 10^4 、更优选少于 10^3 以及更优选没有活细胞。

[0118] 如本文所用,术语“正常或健康个体”应被理解为是指,经任何本领域已知的方法和/或本文所述的方法评估,未患有胰功能异常的个体。

[0119] STRO-1⁺细胞或后代细胞,以及源自其的上清液或一或多种可溶因子

[0120] STRO-1⁺细胞是在骨髓、血液、齿髓细胞、脂肪组织、皮肤、脾、胰、脑、肾、肝、心脏、视网膜、脑、毛囊、肠、肺、淋巴结、胸腺、骨骼、韧带、腱、骨骼肌、真皮、和骨膜中发现的细胞;并且能够分化成种系如中胚层和/或内胚层和/或外胚层。

[0121] 在一个实施方案中,STRO-1⁺细胞是多能细胞,其能够分化成很多细胞类型,包括但不限于,脂肪组织、骨组织、软骨组织、弹性组织、肌肉组织、和纤维结缔组织。这些细胞所进入的具体的谱系定型以及分化途径取决于来自以下的各种影响,机械影响和/或内源生物活性因子如生长因子、细胞因子和/或宿主组织所确立的局部微环境条件。STRO-1⁺多能细胞是非造血先祖细胞,其分化以产生子细胞,所述子细胞是会不可逆地分化以产生表型细胞的干细胞或者前体细胞。

[0122] 在优选的实例中,STRO-1⁺细胞在得自对象的样品中富集,例如要治疗的对象或相关的对象或不相关的对象(相同或不同的物种)。术语“富集”或其变体在本文用于描述细胞群体中一种特定的细胞类型的比例或者多种特定细胞类型的比例与未经处理的群体相比是增加了的。

[0123] 在优选的实例中,用于本发明的细胞表达一或多种标记物,其单独地或共同地选自由以下组成的组:TNAP⁺、VCAM-1⁺、THY-1⁺、STRO-2⁺、CD45⁺、CD146⁺、3G5⁺、或其任意组合。

[0124] “单独地”是指本发明个别地涵盖所述的标记物或标记物的组,而且,尽管单独的标记物或标记物的组在本文中可能不是个别列出的,所附的权利要求可以分别限定此类标记物或标记物组并使其彼此可以分开。

[0125] “共同地”是指本发明涵盖了任何数目或组合的所述标记物或标记物组,而且,尽管此类数目或组合的标记物或标记物组可能未在本文中具体列出,所附的权利要求可以分别限定此类组合或亚-组合并且使其与其它组合的标记物或标记物组可以分开。

[0126] 优选所述STRO-1⁺细胞是STRO-1^{bright} (syn. STRO-1^{bri})。优选所述STRO-1^{bright}细胞又是TNAP⁺、VCAM-1⁺、THY-1⁺、STRO-2⁺和/或CD146⁺的一或多种。

[0127] 在一个实例中,所述间充质前体细胞是如WO 2004/85630中所定义的血管周间充质前体细胞(perivascular mesenchymal precursor cell)。

[0128] 细胞对于给定的标记物被称作是“阳性”,其可以表达低水平(lo或dim)或高(bright,bri)的该标记物,这取决于该标记物出现在细胞表面的程度,其中所述术语涉及荧光的强度或者用于细胞分选过程的其它标记物。lo(或dim或dull)与bri的区别可以根据正在分选的细胞上所使用的标记物来理解。细胞对于给定的标记物被称作是“阴性”,其未必在该细胞中缺失。此术语是指该标记物由该细胞以相对非常低的水平表达,并且当其经可探测地标记时产生非常低的信号或者在背景水平上不可探测。

[0129] 术语“bright”在用于本文时是指,细胞表面上的标记物,当其经可探测地标记时产生相对高的信号。虽然并非要用理论来进行限制,但是据提议来说“bright”细胞比样品

中的其它细胞表达更多的靶标记物蛋白(例如由STRO-1识别的抗原)。例如,当用FITC-缀合的STRO-1抗体标记由荧光激活细胞分选术(FACS)分析时,STRO-1^{bri}细胞比非-bright细胞(STRO-1^{dull/dim})产生更高的荧光信号。优选“bright”细胞构成起始样品中所含有的最明亮标记的骨髓单核细胞的至少约0.1%。在其它的实例中,“bright”细胞构成起始样品中所含有的最明亮标记的骨髓单核细胞的至少约0.1%、至少约0.5%、至少约1%、至少约1.5%、或至少约2%。在优选的实例中,STRO-1^{bright}细胞相对于“背景”(即STRO-1⁻细胞)具有STRO-1表面表达的2log幅度的更高的表达。经比较,STRO-1^{dim}和/或STRO-1^{intermediate}细胞与“背景”相比具有STRO-1表面表达的少于2log幅度的更高的表达,通常约1log或更低。

[0130] 如本文所用的术语“TNAP”是要涵盖组织非特异性碱性磷酸酶的所有同种型。例如,该术语涵盖了肝同种型(LAP)、骨骼同种型(BAP)和肾同种型(KAP)。在优选的实例中,所述TNAP是BAP。在特别优选的实例中,本文所用的TNAP是指可以结合STRO-3抗体的分子,其中所述抗体是由如下杂交瘤细胞系所产生的,即2005年12月19日根据布达佩斯条约的规定保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, Virginia, U.S.A.)的鼠杂交瘤细胞系,其保藏号为PTA-7282。

[0131] 此外,在优选的实例中,所述STRO-1⁺细胞能够引起产克隆CFU-F。

[0132] 优选所述STRO-1⁺多能细胞的很大一部分能够分化成至少2种不同的种系。所述多能细胞可以定型的世系的非限制性的例子包括骨前体细胞;多能的用于胆管上皮细胞和肝细胞的肝细胞先祖;神经受限细胞(neural restricted cell),其可产生神经胶质细胞前体(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,分泌葡萄糖应答胰岛素的胰β细胞系。其它世系包括但不限于,成牙质细胞、产牙本质细胞和软骨细胞、以及如下细胞的前体:视网膜色素上皮细胞、成纤维细胞、皮肤细胞如角质形成细胞、树突状细胞、毛囊细胞、输尿管上皮细胞、平滑肌和骨骼肌细胞、睾丸先祖、血管内皮细胞、腱、韧带、软骨、脂肪细胞、成纤维细胞、髓基、心肌、平滑肌、骨骼肌、周细胞、血管、上皮、神经胶质、神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。

[0133] 在另一个实例中,所述STRO-1⁺细胞不能在培养后产生造血细胞。

[0134] 在一个实例中,细胞取自要治疗的对象,用标准技术体外培养并用于获得上清液或可溶因子或扩展的细胞,用于作为自体同源的或同种异源的组合物施用于所述对象。在另外的实例中,施用已建立的一或多种人细胞系的细胞。在本发明另一个有用的实例中,使用非人动物的细胞(或者如果患者不是人类,则所用细胞来自另外的物种)。

[0135] 本发明还涉及得自或源自从体外培养产生的STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞(后者也被称为扩展的细胞)的所述上清液或可溶因子的用途。本发明的扩展的细胞可以具有广泛的不同表型,这取决于培养条件(包括培养基中刺激因子的数目和/或类型)、传代次数等。在某些实例中,所述后代细胞从亲代群体的约2次、约3次、约4次、约5次、约6次、约7次、约8次、约9次、或约10次传代后所获得。然而,所述后代细胞可以从从亲代群体的任何次数的传代后所获得。

[0136] 所述后代细胞可以通过在适宜的培养基中培养而获得术语“培养基”,在用于指细胞培养时,包括细胞周围环境的组分。培养基可以是固体、液体、气体、或相和材料的混合。培养基包括液体生长培养基以及不维持细胞生长的液体培养基。培养基还包括胶凝状培养基如琼脂、琼脂糖、明胶和胶原基质。示例性的气态培养基包括细胞在皮氏培养皿上或其它

固体或半固体支持物上生长时所暴露于其中的气相。术语“培养基”也是指要用于细胞培养的材料,即使其还未与细胞接触。换言之,制备用于细菌培养的营养富集液是培养基。当与水或其它液体混合时就成为适宜于细胞培养的粉末混合物可以被称作“粉末培养基”。

[0137] 在实例中,可用于本发明方法的后代细胞是通过如下方法获得的:使用标记有STRO-3抗体的磁珠将TNAP⁺STRO-1⁺细胞从骨髓中分离,然后培养扩展此分离的细胞(对于适宜培养条件的实例,参见Gronthos et al. Blood 85:929-940,1995)。

[0138] 在一个实例中,此类扩展的细胞(后代)(优选至少5次传代后)可以是TNAP⁻、CC9⁺、HLA I⁺类、HLA II⁻类、CD14⁻、CD19⁻、CD3⁻、CD11a⁻c⁻、CD31⁻、CD86⁻、CD34⁻和/或CD80⁻。然而,可能在本文所述的不同培养条件下不同标记物的表达会发生变化。而且,虽然这些表型的细胞可以在所述扩展的细胞中占支配地位,但这并不意味着存在少数比例的细胞不具有此表型(例如,少数百分比的所述扩展的细胞可以是CC9⁻)。在一个优选的实例中,扩展的细胞仍具有分化成不同细胞类型的能力。

[0139] 在一个实例中,用于获得所述上清液或可溶因子、或者细胞本身的扩展细胞群体,包含的细胞其中至少25%、更优选至少50%的细胞是CC9⁺。

[0140] 在另一个实例中,用于获得所述上清液或可溶因子、或者细胞本身的扩展细胞群体,包含的细胞其中至少40%、更优选至少45%的细胞是STRO-1⁺。

[0141] 在另外的实例中,所述扩展的细胞可以表达一或多种标记物,所述标记物单独地或共同地选自由如下组成的组:LFA-3、THY-1、VCAM-1、ICAM-1、PECAM-1、P-选择素、L-选择素、3G5、CD49a/CD49b/CD29、CD49c/CD29、CD49d/CD29、CD 90、CD29、CD18、CD61、整联蛋白β6-19、血栓调节蛋白、CD10、CD13、SCF、PDGF-R、EGF-R、IGF1-R、NGF-R、FGF-R、瘦素-R (STRO-2=瘦素-R)、RANKL、STRO-1^{bright}和CD146或这些标记物的任意组合。

[0142] 在一个实例中,所述后代细胞是如WO 2006/032092中所定义和/或描述的多潜能扩展的STRO-1⁺多能细胞后代(MEMP)。用于制STRO-1⁺多能细胞的富集体(从其中可以衍生出后代细胞)的方法在WO 01/04268和WO 2004/085630中有描述。在体外的背景下,STRO-1⁺多能细胞将很少作为纯的制备物存在并且通常将与其它细胞(组织特异性定型细胞(TSCC))一起存在。WO 01/04268提及了从骨髓中以大约0.1%至90%的纯度水平收获此类细胞。包含MPC的群体(从其中可以衍生出后代细胞)可以直接地从组织来源收获,或者其可以是已经被离体扩展的群体。

[0143] 例如,所述后代可以得自收获的、未扩展的基本纯化的STRO-1⁺多能细胞群体,包含其所存在的群体中的至少约0.1、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、95%的总细胞。此水平可以例如通过如下方式达到,即选择对至少一种标记物为阳性的细胞,所述标记物单独地或共同地选自由如下组成的组:TNAP、STRO-1^{bright}、3G5⁺、VCAM-1、THY-1、CD146和STRO-2。

[0144] MEMPS可以与新鲜收获的STRO-1⁺多能细胞区分,这是在于它们对标记物STRO-1^{bri}是阳性而对标记物碱性磷酸酶(ALP)是阴性。相反,新鲜分离的STRO-1⁺多能细胞对于STRO-1^{bri}和ALP均为阳性。在本发明优选的实例中,至少15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%的所施用的细胞具有表型STRO-1^{bri}、ALP⁻。在另外的优选实例中,MEMP对一或多种的标记物Ki67、CD44和/或CD49c/CD29、VLA-3、α3β1是阳性的。在另外的优选实例中,MEMP不展示TERT活性和/或对标记物CD18是阴性的。

[0145] STRO-1⁺细胞起始群体可以源自WO 01/04268或WO 2004/085630中所述的任意一

或多种组织类型,即骨髓、牙髓细胞、脂肪组织和皮肤、或者或许是更广泛地来自脂肪组织、牙齿、牙髓、皮肤、肝、肾、心脏、视网膜、脑、毛囊、肠、肺、脾、淋巴结、胸腺、胰、骨骼、韧带、骨髓、腱、和骨骼肌。

[0146] 应理解在实施本发明时,对携带有任何给定的细胞表面标记物的细胞所进行的分离,可以通过多种不同的方法实现,然而,优选的方法依赖于结合剂(例如,抗体或其抗原结合片段)对所关注的标记物的结合,随后分离那些展现出结合的(为高水平结合的、或低水平结合的或未结合的)。最方便的结合剂是抗体或基于抗体的分子,优选是单克隆抗体或者基于单克隆抗体,这是由于后面这些物质的特异性。两个步骤中都可以使用抗体,然而也可使用其它物质,因而也可使用这些标记物的配体以使携带(或缺乏)它们的细胞富集。

[0147] 抗体或配体可以附着于固体支持物以允许进行粗分离。分离技术优选将最大化的保持所要收集级分的活力。可以使用具有不同效率的各种技术以获得相对粗糙的分离。所使用的具体即使将取决于分离的效率、相关的细胞毒性、操作的简便和速度、以及成熟装置和/或专门的技能的必要性。用于分离的程序可以包括,但不限于磁分离、使用抗体包被的磁珠、亲和层析以及用附着至固体基质的抗体“装盘(panning)”。提供精确分离的技术包括但不限于FACS。用于进行FACS的方法对技术人员是显见的。

[0148] 针对每个本文所述标记物的抗体是商业可购的(例如,针对STRO-1的单克隆抗体可以购自R&D Systems,USA)、可得自ATCC或其它保藏机构和/或可以用本领域已知的方法产生。

[0149] 优选地,用于分离STRO-1⁺细胞的方法包括,例如,第一步即使用如磁激活细胞分选(MACS)的固相分选步骤识别STRO-1高水平的表达。如果需要的话,随后可以是第二个分选步骤,以产生高水平的前体细胞表达,如专利说明书WO 01/14268中所述。此第二分选步骤可能涉及使用一或多种标记物。

[0150] 获得STRO-1⁺细胞的方法还可以在第一个富集步骤前包括使用已知技术收集细胞的来源。从而可以如外科手术般地去组织。含有来源组织的细胞将会被分离至所谓的单一细胞悬液。可以通过物理的或者酶的手段来实现此分离。

[0151] 一旦获得了适宜的STRO-1⁺细胞群体,可以用适宜的手段将其培养或扩展以获得MEMO。

[0152] 在一个实例中,细胞取自要治疗的对象,用标准技术体外培养并用于获得所述上清液或可溶因子或扩展的细胞,用于作为自体同源的或同种异源的组合物施用于所述对象。在另外的实例中,使用已建立的一或多种人细胞系的细胞来获得所述上清液或可溶因子。在本发明另一个有用的实例中,使用非人动物的细胞(或者如果患者不是人类,则所用细胞来自另外的物种)以获得所述上清液或可溶因子。

[0153] 本发明的施行可以使用来自任何非人动物物种的细胞,包括但不限于非人灵长类细胞、有蹄动物、犬类、猫类、兔类、啮齿类、禽类、和鱼类细胞。可用来实行本发明的灵长类细胞包括但不限于黑猩猩、狒狒、食蟹猴、和任何其它新旧大陆的猴类的细胞。可用来实行本发明的有蹄类细胞包括但不限于牛类、猪类、绵羊类、山羊类、马类、水牛和野牛的细胞。可用来实行本发明的啮齿类细胞包括但不限于小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、和沙鼠细胞。可用来实行本发明的兔类物种的实例包括但不限于家兔、长腿野兔(jack rabbit)、野兔、棉尾兔、雪鞋兔(snowshoe rabbit)、和鼠兔(pika)。鸡(Gallus gallus)是可用来实行本发明的禽

类物种的实例。

[0154] 可用于本发明的方法的细胞可以在使用前进行储存,或者在获得所述上清液或可溶因子前进行储存。用于保存和储藏真核细胞(特别是哺乳动物细胞)的方法和方案,是本领域已知的(参见例如,Pollard,J.W.and Walker,J.M.(1997) Basic Cell Culture Protocols, Second Edition, Humana Press, Totowa, N.J.; Freshney, R.I. (2000) Culture of Animal Cells, Fourth Edition, Wiley-Liss, Hoboken, N.J.)。保持分离的干细胞如间充质干细胞/先祖细胞、或其后代的生物学活性的任何方法,都可以与本发明联用。在优选的实例中,使用冷冻保存来维持和储藏细胞。

[0155] 经遗传改造的细胞

[0156] 在一个实例中,STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞是经过遗传改造的,例如改造为表达和/或分泌感兴趣的蛋白质,例如提供治疗和/或预防益处的蛋白,如胰岛素、胰高血糖素、促生长素抑制素、胰蛋白酶原、胰凝乳蛋白酶原、弹性蛋白酶、羧肽酶、胰脂肪酶或淀粉酶,或者关联或引起增强的血管发生的多肽,或者与细胞分化成胰细胞或血管细胞相关联的多肽。

[0157] 用于遗传改造细胞的方法对技术人员是显见的。例如,把要在细胞中表达的核酸可操纵地连接至用于诱导在细胞中的表达启动子。例如,将核酸连接至可在对象的多种细胞中操作的启动子,如例如,病毒启动子如CMV启动子(例如CMV-IE启动子)或SV-40启动子。另外的适宜启动子是本领域已知的,并且应该认为其经必要的修改可适用于本发明的实例。

[0158] 优选以表达构建体的形式提供核酸。如本文所用,术语“表达构建体”是指核酸,其具有在细胞中表达其所可操纵地连接的核酸(例如报道基因和/或反选择性报道基因)的能力。在本发明的背景中,应理解表达构建体可以含有或者本身就是质粒、噬菌体、噬菌粒、粘粒、病毒亚基因组-或基因组-片段、或者其它能够以可表达的形式保持和/或复制异源DNA的核酸。

[0159] 构建用于实行本发明的适宜表达构建体的方法对本领域技术人员是显见的,并且在例如Ausubel et al (In: Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987) 或 Sambrook et al (In: Molecular Cloning: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Third Edition 2001) 中有描述。例如,使用如PCR从适宜的模板核酸扩增表达构建体的每个组分,并随后将其克隆至适宜的表达构建体内,如例如质粒或噬菌粒。

[0160] 适宜于此种表达构建体的载体是本领域已知的和/或在本文有描述。例如,在哺乳动物细胞中适用于本发明方法的表达载体为,例如,由Invitrogen供应的pcDNA载体套件的载体、pCI载体套件的载体(Promega)、pCMV载体套件的载体(Clontech)、pM载体(Clontech)、pSI载体(Promega)、VP 16载体(Clontech)或pcDNA载体套件的载体(Invitrogen)。

[0161] 技术人员会知道另外的载体和此类载体的来源,如例如Invitrogen Corporation、Clontech或Promega。

[0162] 用于将分离的核酸或者含有其的基因构建体引入到细胞内以表达的方法是本领域技术人员所熟知的。用于给定生物体的技术取决于已知的成功技术。用于将重组DNA引入

细胞的方法包括显微注射、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质体介导的转染如微粒轰击脂质转染胺(Gibco,MD,USA)和/或cellfectin(Gibco,MD,USA),PEG-介导的DNA摄取、电穿孔和微粒轰击如微粒轰击DNA-包被的钨或金颗粒(Agracetus Inc.,WI,USA)等。

[0163] 或者,本发明的表达构建体是病毒载体。适宜的病毒载体是本领域已知的和商业可购的。常规的用于递送核酸以及将该核酸整合至宿主细胞基因组内的基于病毒的系统包括,例如反转录病毒载体、慢病毒载体,或者腺伴随病毒载体。或者,腺病毒载体可用于将保持游离的核酸引入到宿主细胞内。表达载体是将基因转移至靶细胞和组织的有效且通用的方法。此外,已经在许多种不同细胞类型和靶组织中观测到高转导效率。

[0164] 例如,反转录病毒载体通常包含顺式作用长末端重复序列(LTR),具有对外源序列高达6-10kb的组装容量。最小的顺式作用LTR就足以复制和组装载体,其被用于将表达构建体整合至靶细胞内以提供长期的表达。广泛使用的反转录病毒载体包括那些基于小鼠白血病病毒(MuLV)、长臂猿(gibbon ape)白血病病毒(GaLV)、猿免疫缺陷病毒(SrV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、以及其组合的载体(参见例如,Buchscher et al.,J Virol.56:2731-2739(1992);Johann et al,J.Virol.65:1635-1640(1992);Sommerfelt et al,Virol.76:58-59(1990);Wilson et al,J.Virol.63:274-2318(1989);Miller et al.,J.Virol.65:2220-2224(1991);PCT/US94/05700;Miller and Rosman BioTechniques 7:980-990,1989;Miller,A.D.Human Gene Therapy 7:5-14,1990;Scarpa et al Virology 75:849-852,1991;Burns et al.Proc.Natl.Acad.Sci USA 90:8033-8037,1993)。

[0165] 各种腺伴随病毒(AAV)载体系统也被开发用于核酸递送。AAV载体可以使用本领域已知的技术轻易地构建。参见例如,U.S.Pat.No.5,173,414和5,139,941;International Publication No.WO 92/01070和WO 93/03769;Lebkowski et al.Molec.Cell.Biol.5:3988-3996,1988;Vincent et al.(1990)Vaccines 90(Cold Spring Harbor Laboratory Press);Carter Current Opinion in Biotechnology 5:533-539,1992;Muzyczka.Current Topics in Microbiol,and Immunol.158:97-129,1992;Kotin,Human Gene Therapy 5:793-801,1994;Shelling and Smith Gene Therapy 7:165-169,1994;以及Zhou et al.J Exp.Med.179:1867-1875,1994。

[0166] 可用于递送本发明的表达构建体的另外的病毒载体包括,例如,源自痘家族病毒的那些,如牛痘病毒和禽痘病毒或者甲病毒或缀合病毒载体(例如Fisher-Hoch et al.,Proc.Natl Acad.Sci.USA 56:317-321,1989中所述的)。

[0167] 测定细胞和可溶因子的治疗/预防潜力

[0168] 用于确定细胞或可溶因子治疗或防止或延缓胰功能异常的发作或进展的能力的方法对于技术人员将是显见的。

[0169] 例如,将细胞或可溶因子(例如,因子的混合物或单一的因子或因子的部分(例如,源自亲和性纯化或层析的))施用于测试对象(例如测试动物)一段时间并且是在某些条件下,从而足以提供治疗性/预防性的益处,并且评估休眠或基础或禁食的葡萄糖水平和/或进行葡萄糖耐受测试。使用商业可购的试剂盒和/或设备来进行此类测试。基础或禁食葡萄糖水平在禁食后进行评估,例如,进行大约8至大约14小时。对于葡萄糖耐受测试,将对象禁食大约8至大约14小时然后消耗葡萄糖(例如,每千克体重大约1.75克的葡萄糖)并在大约2至3小时后评估葡萄糖的血液水平。根据世界卫生组织(World Health Organization),禁

食血浆葡萄糖应该是低于6.1mmol/l (100mg/dl)。介于6.1和7.0mmol/l (100和126mg/dl) 之间的禁食水平是临界(“受损禁食糖血”),而反复处于或高于7.0mmol/l (126mg/dl) 的禁食水平是糖尿病的诊断。2小时葡萄糖水平应该低于7.8mmol/l (140mg/dl)。介于此水平和11.1mmol/l (200mg/dl) 之间的水平表明受损的葡萄糖耐受。在2小时的葡萄糖水平高于11.1mmol/l (200mg/dl) 确认了糖尿病的诊断。

[0170] 优选所述测试对象患有胰功能异常。例如,所述测试对象是非肥胖糖尿病(NOD) 小鼠(I型糖尿病模型)或者施用了链脲菌素的小鼠或大鼠(I型和/或II型糖尿病模型;参见Lúkcic et al.,*Developmental Immunol.*6:119-128,1998和Arulmozhi et al.,*Indian J.Pharmacol.*,36:217-221,2004),Goto Kakizaki (GK) 大鼠(II型糖尿病模型),New Zealand Obese (NZO) 小鼠(II型糖尿病模型)。其它I型和/或II型糖尿病模型在例如,Rees and Alcolado,*Diabet.Med.*22:359-70,2005中有描述。

[0171] 在此种胰功能异常模型中与未经治疗的动物或治疗前的测试对象相比降低基础葡萄糖水平和/或改善葡萄糖耐受的细胞和/或可溶因子被认为可能治疗或防止或延缓胰功能异常的发作或进展。

[0172] 作为选择,或者此外,对测试对象的循环中的胰岛素水平进行评估,例如,使用酶联-或荧光联-免疫吸附测定。在测试对象的循环中提高胰岛素水平的细胞和/或可溶因子被认为可能治疗或防止或延缓胰功能异常的发作或进展。

[0173] 用于确定血清胰高血糖素和促生长素抑制素水平的试剂盒和测定法是本领域已知的和/或商业可购,例如,来自Immuno-Biological Laboratories,Inc或Millipore Corporation的。

[0174] 作为选择,或者此外,淀粉酶的血清水平是用色度测定法确定的,例如,如Caraway,*Am.J.Clin.Pathol.*,32:97-99,1959中所述,或者用荧光测定来确定,例如,如Rinderknecht and Marbach,*Clin.Chem.Acta.*,29:107-110,1972中所述的。将血清淀粉酶水平维持在正常水平(例如,21-101U/L)的因子或细胞被认为可能治疗或防止或延缓胰功能异常的发作或进展。

[0175] 淀粉酶水平还可以在胰切片中或在胰液中确定,例如,由经口十二指肠插管获得的。这些样品还提供了用于测量胰蛋白酶原、胰凝乳蛋白酶原、弹性蛋白酶、羧肽酶、胰脂肪酶水平的样品。例如,Connon et al.,*Digestive Diseases and Sciences*,23:472-475,1978描述了用于确定胰液中胰脂肪酶水平的测定法。

[0176] 前段中所描述的测定法还适于对接受本文中根据任何实例所述治疗的对象实行进行中的监测。

[0177] 根据前文,对于技术人员显见的是,本发明还提供了对用于治疗胰功能异常的细胞或可溶因子进行鉴定或分离的方法,所述方法包括:

[0178] (i) 向患有胰功能异常的测试对象施用细胞或可溶因子并评估该对象的胰功能;

[0179] (ii) 将(i)中所述对象的胰功能,与患有胰功能异常但并未施用所述细胞或可溶因子的对照对象的胰功能进行比较,

[0180] 其中所述测试对象中与对照对象相比改善了胰功能表明该细胞或可溶因子治疗缓胰功能异常。

[0181] 本发明还提供了对用于防止或延缓胰功能异常的细胞或可溶因子进行鉴定或分

离的方法,所述方法包括:

[0182] (i) 向测试对象施用细胞或可溶因子并继而在该测试对象中诱导胰功能异常;

[0183] (ii) 将(i)中所述对象的胰功能,与患有胰功能异常但并未施用所述细胞或可溶因子的对照对象的胰功能进行比较,

[0184] 其中所述测试对象中与对照对象相比改善了胰功能表明该细胞或可溶因子防止或延缓胰功能异常的发作。

[0185] 所述细胞可以是本文中根据任何实例所描述的任何细胞。

[0186] 细胞组合物

[0187] 在本发明的一个实例中,STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞以组合物的形式施。优选此种组合物包含药物可接受载体和/或赋形剂。

[0188] 术语“载体”和“赋形剂”是指物质的组合物,其在本领域中被常规用于促进活性化合物的储存、施用、和/或生物活性(参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mac Publishing Company (1980)。载体还可以降低所述活性化合物的任何不期望的副作用。适宜的载体例如是稳定的,如不能与载体中的其它成分反应。在一个实例中,所述载体在用于治疗的剂量和浓度不会再接受者中产生显著的局部或全身性副作用。

[0189] 适于本发明的载体包括常规使用的那些,例如,水、盐水、水成葡聚糖、乳糖、Ringer溶液、缓冲溶液、透明质酸和乙二醇是优选的液体载体,特别是对于溶液而言(当等渗时)。适宜的药物载体和赋形剂包括淀粉、纤维素、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸镁、硬脂酸那、单硬脂酸甘油盐/酯、氯化钠、甘油、丙二醇、水、乙醇等。

[0190] 在另一个实例中,载体是介质组合物,例如,细胞在其中生长或悬浮。优选此种介质组合物不会在其所施用的对象中诱导任何副作用。

[0191] 优选的载体和赋形剂不会对细胞的活力和/或细胞降低、防止或延缓胰功能异常的能力带来不利的影响。

[0192] 在一个实例中,所述载体或赋形剂提供缓冲活性以将所述细胞和/或可溶因子维持在适宜的pH,由此发挥生物学活性,例如,所述载体或赋形剂是磷酸缓冲盐水(PBS)。PBS是有吸引力的载体或赋形剂,因为其最低限度的与细胞和因子相互作用并且允许细胞和因子的快速释放,在此种情况中,本发明的组合物可以被生产为液体以直接应用于血流或者进入组织或环绕或邻近组织的区域,例如通过注射。

[0193] 还可以将STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞掺入或插入支架内,所述支架是接受者相容性的并且降解成对接受者无害的产物。这些支架向要移植入接受者对象中的细胞提供支持和保护。此类支架的实例有天然的和/或合成的生物可降解支架。

[0194] 多种不同的支架可以成功的用于本发明的实践。优选的支架包括但不限于生物的、可降解的支架。天然生物可降解支架包括,胶原、纤连蛋白、和层粘连蛋白支架。用于细胞移植支架的适宜的合成材料应该能够支持广泛的细胞生长和细胞功能。此种支架还可以是可吸收的。适宜的支架包括聚乙醇酸支架,例如Vacanti, et al. J. Ped. Surg. 23:3-9 1988; Cima, et al. Biotechnol. Bioeng. 38:145 1991; Vacanti, et al. Plast. Reconstr. Surg. 88:753-91991中所描述的;或者合成聚合物如聚酐、多正酯类、和聚乳酸。

[0195] 在另一个实例中,所述细胞可以在凝胶支架中施用(如来自Upjohn Company的Gelfoam)。

[0196] 可用于本发明的细胞组合物可以单独施用或者作为与其它细胞的掺合物来施用。可以与本发明的组合物协同施用的细胞包括但不限于,其它多能或多潜能细胞或干细胞、或者骨髓细胞。不同类型的细胞可以在施用前才即时与本发明的组合物掺和,或者可以在施用前将它们一起共培养一段时间。

[0197] 优选所述组合物包含有效量的或者治疗或预防有效量的细胞。例如,所述组合物包含大约 1×10^5 个STRO-1⁺细胞/kg至大约 1×10^7 个STRO-1⁺细胞/kg或者大约 1×10^6 个STRO-1⁺细胞/kg至大约 5×10^6 个STRO-1⁺细胞/kg。要施用的细胞的确切量取决于多种因素,包括患者的年龄、重量、和性别,以及胰功能异常的程度和严重性。

[0198] 在一些实例中,将细胞包含在室内使得该细胞不能进入对象的循环,然而该室却允许所述细胞分泌的因子进入循环。以此方式,可以通过允许细胞将因子分泌至对象的循环内从而将可溶因子施用于该对象。此种室同样可以被植入对象中的部位以提高所述可溶因子的局部水平,例如植入胰内或其附近。

[0199] 在本发明的一些实例中,可能无须或者不期望在开始用细胞组合物治疗前对患者进行药理学的免疫阻抑。因此,在某些情况中移植同种异源或者甚至是异种异源的STRO-1⁺细胞或其后代是可以耐受的。

[0200] 然而,其它情况中,在开始细胞治疗前对患者进行药理学的免疫阻抑是期望的或者适当的。这可以通过使用全身性的或局部的免疫阻抑剂来完成,或者可以通过在包囊化的装置里递送细胞来完成。可将所述细胞包囊在胶囊中,所述胶囊对于细胞所需的营养和氧气以及治疗因子是可渗的而该细胞对于免疫体液因子和细胞是不可渗的。优选包囊材料是低变应原性的、容易且稳定地位于靶标组织中、并且对植入的结构提供增加的保护。用于降低或消除对移植细胞的免疫应答的这些以及其它方法是本领域已知的。作为选择,可以将细胞遗传改造以降低其免疫原性。

[0201] 可溶因子的组合物

[0202] 在本发明的一个实例中,源自STRO-1⁺细胞和/或后代细胞的上清液或可溶因子以组合物的形式施用,例如,包含适宜的载体和/或赋形剂。优选所述载体或赋形剂不会对所述可溶因子或上清液的生物学作用带来不利影响。

[0203] 在一个实例中,所述组合物包含物质的组合以使可溶因子或上清液的成分稳定,例如,蛋白酶抑制剂。优选所包含的蛋白酶抑制剂的量不足以给对象带来不利影响。

[0204] 含有源自STRO-1⁺细胞和/或后代细胞的上清液或可溶因子的组合物可以被制成适当的液体悬浊液,例如,在培养基中或者在稳定的载体或缓冲溶液中,例如,磷酸缓冲盐水。适宜的载体在本文上文中有所描述。在另一个实例中,含有源自STRO-1⁺细胞和/或后代细胞的上清液或可溶因子的悬浊液是用于注射的油悬浊液。适宜的亲酯溶剂或媒介物(vehicle)包括脂肪油如芝麻油;或合成脂肪酸酯如油酸乙酯或甘油三酯类;或脂质体。用于注射的悬浊液还可以含有提高该悬浊液粘性的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨醇、或葡聚糖。任选地,悬浊液还可以含有适宜的稳定剂或提高混合物溶解度的物质以使得可以制备高浓度溶液。

[0205] 可以通过将所需量的上清液或可溶因子掺入到适当的溶剂(根据需要具有一种或

一组上述的成分)中,从而制备无菌的可注射溶液,随后进行过滤消毒。

[0206] 通常,通过将所述上清液或可溶因子掺入到无菌的媒介物中而制备分散体,所述媒介物含有碱性分散介质以及所需的其它成分(如上所列举的)。在用无菌粉末制备无菌可注射溶液的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冻干,其从先前经过滤消毒的溶液产生所述活性成分加上另外所期望成分的粉末。根据本发明的作为选择的方面,所述上清液或可溶因子可以与一或多种增强其可溶性的额外的化合物一起配制。

[0207] 其它示例性的载体或赋形剂在如下中有描述,例如Hardman,et al.(2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,McGraw-Hill, New York,N.Y.;Gennaro(2000)Remington:The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott,Williams,and Wilkins,New York,N.Y.;Avis,et al.(eds.)(1993) Pharmaceutical Dosage Forms:Parenteral Medications,Marcel Dekker,NY; Lieberman,et al.(eds.)(1990)Pharmaceutical Dosage Forms:Tablets,Marcel Dekker,NY;Lieberman,et al.(eds.)(1990)Pharmaceutical Dosage Forms:Disperse Systems,Marcel Dekker,NY;Weiner and Kotkoskie(2000)Excipient Toxicity and Safety,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.

[0208] 治疗性组合物通常应该是无菌的以及在生产和储存条件下稳定的。组合物可被配制成溶液、微乳剂、脂质体、或其它有序的结构。所述载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如,水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇、和液体聚乙二醇等)、以及其适宜的混合物。可以通过如下来保持适当的流动性,例如通过使用包被如卵磷脂、在分散体的情况中通过保持所需的颗粒大小、以及通过使用表面活性剂。在很多情况中,会优选在之外中包括等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇、或氯化钠。可以通过在组合物中包含延缓吸收的物质如单硬脂酸盐和明胶从而使可注射组合物的吸收延长。此外,可以在缓释配制物中施用所述可溶因子,例如在包含缓释聚合物的组合物中。活性化合物可以与保护该化合物以免快速释放的载体一起制备,如控释配制物,包括植入和微囊化的递送系统。可以使用生物可降解的生物相容聚合物,如乙烯醋酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、多正酯类、聚乳酸和聚乳酸、聚乙醇酸共聚物(PLG)。用于制备此类配制物的许多方法已获得专利或者通常是本领域技术人员已知的。

[0209] 所述上清液或可溶因子可以与适当的基质组合施用,例如用于使所述可溶因子的缓释。

[0210] 组合物的另外的成分

[0211] 所述源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶因子、STRO-1⁺细胞或其后代可与其它有益的药物或生物分子(生长因子、营养因子)一起施用。当与其它物质一起施用时,它们可以与所述其它物质在单一的药物组合物中一起施用、或者在分别的药物组合物中施用、同时或者顺序施用(在施用所述其它物质之前或之后)。可以共施用的生物活性因子包括抗凋亡剂(例如,EPO、EPO模拟抗体(mimetibody)、TPO、IGF-I和IGF-II、HGF、胱天蛋白酶抑制剂);抗炎剂(例如,p38MAPK抑制、TGF- β 抑制剂、抑制素、IL-6和IL-1抑制剂、PEMIROLAST、TRANILAST、REMICADE、SIROLIMUS、和NSAID(非甾体抗炎药物;例如,TEPOXALIN、TOLMETIN、SUPROFEN);免疫抑制/免疫调节剂(例如,钙神经素抑制剂如环孢菌素、他罗利姆;mTOR抑制剂(例如,SIROLIMUS、EVEROLIMUS);抗增殖剂(例如,硫唑嘌呤、吗替麦考酚酯);皮质类固醇

类(例如,泼尼松龙、氢化可的松);抗体如单克隆抗-IL-2R α 受体抗体(例如,巴利昔单抗、达克珠单抗)、多克隆抗-T-细胞抗体(例如,抗-胸腺细胞球蛋白(ATG);抗-淋巴细胞球蛋白(ALG);单克隆抗-T细胞抗体OKT3));抗-血栓形成剂(例如,肝素、肝素衍生物、尿激酶、PPack(右旋苯丙氨酸脯氨酸精氨酸氯甲基酮)、抗凝血酶化合物、血小板受体拮抗剂、抗-凝血酶抗体、抗血小板受体抗体、阿司匹林、双嘧达莫、鱼精蛋白、水蛭素、前列腺素抑制剂、以及血小板抑制剂);和抗-氧化剂例如,普罗布可、维生素A、抗坏血酸、生育酚、辅酶Q-10、谷胱甘肽、L-半胱氨酸、N-乙酰半胱氨酸)以及局部麻醉剂。

[0212] 在一个实例中,如本文根据任何实例所描述的组合物包含用于治疗或预防胰功能异常的额外的因子。例如,该组合物包含双缩脲、噻唑烷二酮、磺酰脲、苯甲酸衍生物、 α -葡萄糖苷酶抑制剂、SGLT2抑制剂、和INGAP肽、二肽肽酶-IV抑制剂、胰岛素致敏物(例如,PPAR激动剂或双缩脲)、胰岛素、胰岛素模拟物、胰高血糖素受体拮抗剂、GLP-I、GLP-I模拟物、GLP-I受体激动剂;GIP、GIP模拟物、GIP受体激动剂、PACAP、PACAP模拟物、PACAP受体3激动剂;胆固醇降低剂(例如,HMG-CoA还原酶抑制剂、多价螯合剂、烟醇、烟酸)、PPAR α / γ 双重激动剂或抗-肥胖化合物。

[0213] 在另一个实例中,如本文根据任何实例所描述的组合物另外包含诱导或增强先祖细胞分裂成胰细胞的因子。示例性的因子包括,Wnt、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子或TGF β 。

[0214] 在另一个实例中,如本文根据任何实例所描述的组合物另外包含诱导或增强先祖细胞分裂成血管细胞的因子。示例性的因子包括,血管内皮生长因子(VEGF)、源自血小板的生长因子(PDGF;例如,PDGF-BB)、以及FGF。

[0215] 在另一个实例中,如本文根据任何实例所描述的组合物另外包含组织特异性定型细胞(TSCC)。对于这个,International Patent Application No.PCT/AU2005/001445证明了施用TSCC和STRO-1⁺细胞可以导致TSCC的增殖增强。在一个实例中,TSCC是胰细胞,例如 β 细胞或胰细的混合物,例如朗格汉斯胰岛。向对象施用此组合物可以导致例如 β 细胞胰岛的产生增加。在另一个实例中,TSC是血管细胞。向对象施用此组合物可以导致脉管系统的产生增加,例如,在胰中增加,例如,导致递送到胰的营养增加。

[0216] 医疗设备

[0217] 本发明还提供了用于本文根据任何实例所描述的方法(或在所述方法中使用)的医疗设备。例如,本发明提供了注射器或导管或其它适宜的递送设备,其中包含STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子和/或本发明的组合物。任选地,所述注射器或导管包装有使用说明书用本文根据任何实例所描述的方法。

[0218] 在另一个实例中,本发明提供了植入物,其包含STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子和/或本发明的组合物。任选地,所述植入物包装有使用说明书用本文根据任何实例所描述的方法。适宜的植入物可以由支架(例如,如本文上文中所描述的)以及STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子所形成。

[0219] 施用的方式

[0220] 源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶因子、STRO-1⁺细胞或其后代可经手术植入、注射、递送(例如,通过导管或注射器的方式)、或者另外可以直接或间接地施用于需要修复或加强的部位如胰、或者进入对象的血液系统。

[0221] 优选所述的源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶因子、STRO-1⁺细胞或其后代被递送至对象的血液系统。例如,所述的源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶因子、STRO-1⁺细胞或其后代被肠胃外递送。示例性的肠胃外施用途包括,但不限于腹膜内、心室内、脑室内、鞘内。优选所述的源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶因子、STRO-1⁺细胞或其后代经动脉内递送至大动脉内、递送至心脏的心房或心室内、或者递送至与胰连接的血管,例如腹部大动脉、上肠系膜动脉、胰十二指肠动脉或脾动脉。在另外的实例中,将源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶因子、STRO-1⁺细胞或其后代施用于股动脉腹腔动脉。

[0222] 在细胞递送至心脏的心房或心室的情况下,优选将细胞施用于左心房或心室以避免由细胞快速递送至肺部所带来的并发症。

[0223] 优选所述的源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶因子、STRO-1⁺细胞或其后代被注射至递送部位,例如使用注射器或者通过导管或中心静脉导线。

[0224] 选择用于治疗配制物的施用方案取决于几个因素,包括该实体的血清或组织周转率、症状的水平、以及该实体的免疫原性。优选地,施用方案将递送至患者的治疗化合物的量最大化并与可接受的水平的作用相协调。因此,所递送的配制物的量部分取决于特定的实体以及要治疗的病症的严重性。

[0225] 在一个实例中,源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶因子、STRO-1⁺细胞或其后代被作为单一的丸剂递送。或者,源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶因子、STRO-1⁺细胞或其后代通过连续的灌输而施用,或者通过例如1天、1周、或每周1-7次的间隔来给药。优选的给药方案涉及避免了显著的不期望副作用的最大剂量或给药频率。每周的总剂量取决于所使用化合物的类型和活性。适当的剂量由临床医师确定,例如,使用本领域中已知或者怀疑会影响治疗或者预计会影响治疗的参数。通常,以稍低于最佳剂量的剂量开始,之后以小的增量增加直至达到期望的效果或者相对于任何负面的副作用的最佳效果。重要的诊断量度包括糖尿病症状的那些。

[0226] 根据本发明用于治疗或延缓胰功能异常的进展的实例,优选在对病症的诊断后施用STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子,例如使用本领域已知的标准方法和/或本文所述的方法来诊断,例如葡萄糖耐受。

[0227] 对于那些用于预防或延缓胰功能异常的发作的实例,优选在病症的临床诊断前施用STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自其的可溶因子,例如,当对象患有受损葡萄糖耐受和/或受损的禁食糖血时,和/或在自身免疫应答之前的或伴有自身免疫应答的I型糖尿病的情况,如由T细胞群体和/或B细胞群体的扩展所指示出的和/或由自身抗体的产生所指示出的(例如,在I型糖尿病的发作或进展中针对胰β-胰岛细胞的细胞毒T细胞的扩展和/或针对一或多种胰β-胰岛细胞标记物的自身抗体的扩展)。用于对自身免疫应答的发作进行确定或预测的方法对技术人员来说是显见的和/或在本文中有描述。例如,检测到针对源自胰β-细胞或在胰β-细胞表面的抗原自身抗体,表明了对象针对所述细胞的免疫应答。一种此类测定检测对象血清中的胰岛细胞抗体。此测定包括使含有胰岛细胞的胰的切片接触来自测试对象的血清。继而用结合人免疫球蛋白的经标记的二抗来检测来自对象的血清中的免疫球蛋白(其能够结合胰β-胰岛细胞)。用于检测胰岛细胞抗体的适宜的方法(其中使用荧光标记物)在例如Bottazzo et al, Lancet 2:1279-83, 1974中有描述。作为选择,或者此外,使用测定法来检测结合对象中特定抗原的自身抗体。举例来说,Brooking et al. (Clin

Chim Acta 331:55-59,2003) 描述了基于ELISA的测定法,用于检测针对GAD65的自身抗体。所描述的测定法在微量滴定平板上使用低浓度的GAD抗原以捕获样品中的自身抗体。加入液态的生物素化GAD并且其被自身抗体的第二结合位点所捕获,而且被检测到产生非同位素的可探测信号的是经生物素化的GAD65。Nagata et al,Ann.New York Acad.Sci 1037:10-15,2004描述了ELISPOT测定法,其可用于检测针对胰岛素、IA-2和GAD65的自身抗体的存在。

[0228] 用于监测治疗/预防的方法

[0229] 用于监测治疗/预防的方法在本说明书的基础上对于技术人员来说将会是很显然的。例如,血液葡萄糖水平和/或胰岛素水平和/或淀粉酶水平用本领域公知的方法和/或本文所述的方法进行评估。

[0230] 在另一个实施例中,在处理之后获得胰的样品(例如,活组织检查),以及β细胞(例如,表达胰岛素的细胞)和/或α细胞(例如,表达胰高血糖素的细胞)和/或胰岛和/或PDX-1表达细胞的数目,例如使用免疫组织化学、免疫荧光、或核酸扩增测定法如聚合酶链反应(PCR)。此类测定法在本文中有描述。

[0231] 本发明将在下述非限制性的实施例中进行进一步的描述。

[0232] 实施例1

[0233] 用STRO-1⁺细胞治疗糖尿病小鼠

[0234] 1.1材料和方法

[0235] 小鼠中链脲菌素(STZ)-诱导的糖尿病

[0236] 在第1-4天于4-h的午前禁食后,每天用35mg/kg的β-细胞毒素,链脲菌素(STZ;Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)经腹膜内(i.p.)注射7-8周龄的雄性免疫缺陷NOD/scid小鼠(NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J;Animal Research Centre,Perth,Australia)。将STZ溶解于pH 4.5的柠檬酸钠缓冲液中,并在制备好后的15min之内注射。将小鼠保持在无菌条件下。

[0237] 细胞的灌输和治疗组

[0238] 将经免疫磁性选择的来自积累的骨髓细胞的人STRO-1⁺基质细胞基本上按照Gronthos和Zannettino(Methods Mol Biol.449:45-57,2008)所述的那样进行培养扩展,并且得自Angioblast Systems,USA。将传代4,在ProFreezeTM-CDM(Lonza,USA)中低温保存的STRO-1⁺基质细胞解冻,并对每个小鼠将2.5x 10⁶的细胞配制到200μl的媒介物中用于立即注射。在第10天,STZ处理后,将每个NOD/scid小鼠,用单一剂量的细胞经胸壁注射入经麻醉小鼠的左心室(动脉途径)。对照小鼠则通过动脉或静脉途径注射200μl的媒介物(含有7.5%DMSO和α-MEM的ProFreezeTM-CDM)。

[0239] 对血液葡萄糖和胰岛素的测定

[0240] 在4-h的午前禁食后,用葡萄糖计(Optimum XceedTM Diabetes Monitoring System;Abbott Diagnostics,Victoria,Australia)测定尾静脉血液中的血液葡萄糖。通过使用小鼠特异的ELISA试剂盒(Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA Mercodia,Uppsala,Sweden),在第32天处死小鼠前通过对麻醉的小鼠进行心脏内穿刺(puncture)而获得的血液中测定血液胰岛素。

[0241] 组织样品的制备

[0242] 通过断颈法对小鼠实施安乐死,将胰摘除并对称地切开,将一半在10%的中性福

尔马林中固定,而将另一半包埋入Tissue-Tek OCT Compound (Sakura Finetek, Torrance, CA) 并在干冰上冷冻且储存于-70℃。胰被特定地用于本研究中大部分的分析,而其它组织如肺、肝、心脏、脾、胃、肠/盲肠、膀胱、睾丸和脑则被收集用于组织病理学。

[0243] 胰组织的组织学和免疫荧光染色

[0244] 对于胰的组织学,将经福尔马林固定的石蜡包埋的 (FFPE) 切片用苏木精和曙红 (H&E) 染色。将装载至显微镜载玻片上的FFPE组织切片 (5μm) 去石蜡化,并通过在高压锅中的柠檬酸盐缓冲液中加热而进行抗原恢复 (antigen retrieval)。在抗原恢复后用10%的正常山羊血清将该切片封闭2h并用于使用如下抗体 (先前经测试和验证可检测经抗原恢复的组织中的小鼠特异性分子) 的免疫荧光检测:豚鼠抗-胰岛素抗体 (1:100; Millipore, USA)、小鼠抗-胰高血糖素抗体 (10μg/ml; 克隆K79bB10; AbCAM)、小鼠抗-PDX-1抗体 (10μg/ml; 克隆267712; R&D Systems)。在2h的初抗温育步骤之后,用1%的正常山羊血清/PBS将载玻片洗涤3次5min并在室温与物种特异性二抗 (1:400; 山羊抗-小鼠Alexa Fluor 555; Molecular Probe或山羊-抗-豚鼠罗丹明; Jackson Laboratories或山羊-抗-小鼠IgG1-FITC; AbCAM) 进一步温育90min。对照省略掉初抗。胰组织中平滑肌肌动蛋白 (SMA) 的染色通过使用小鼠抗-SMA-FITC mAb (2mg/ml; 克隆1A4; AbCAM) 的直接荧光染色来进行。

[0245] 免疫染色的评估

[0246] 在Zeiss Observer Z1显微镜 (Germany) 中观察载玻片并用AxioCam MRm拍摄图片。用Axio Vision Rel 4.7软件分析所拍摄的胰组织 (经H&E或者针对胰岛素、胰高血糖素、PDX-1和SMA的抗体染色并且经荧光探针检测) 的图片。来自每个实验动物的每个5mm的H&E切片被用于计数胰岛的总数目以及分析胰岛的大小 (面积和直径量度) 并且针对每个相应的经图像分析所测量的总切片面积进行归一化 (normalize)。此外,每个经抗原恢复的5μm FFPE切片 (由抗-胰岛素、胰高血糖素或PDX-1抗体染色) 被计数阳性染色的细胞的总数目并且针对相应的经测量的总切片面积或总胰岛面积来进行归一化。通过图像分析对不同直径的胰微血管的分布进行计数以及测量,并且针对其相应的经检验的切片面积进行归一化。所有的图像均在20-40x的物镜放大倍数下进行分析。

[0247] 通过半-定量RT-PCR的RNA分析

[0248] 来自实验组胰的RNA样品是在Trizol试剂中从来自每个冷冻组织的总共100mm的切片中提取的。用illustra RNAspin Mini RNA Isolation试剂盒 (GE Healthcare, UK) 从该Trizol组织提取物中纯化RNA。用分光光度计对总RNA进行定量并将1μg用oligo-dT (pdT₁₂₋₁₈) 和MLV反转录酶进行反转录。在表1所给出的扩增条件下用Tth Plus DNA聚合酶 (Roche Applied Science) 以及用针对鼠基因MafA、Ngn3、和Pdx-1的引物来将cDNA样品进行PCR扩增。β-肌动蛋白基因被用于对靶基因的表达进行归一化。用Kodak ID 3.5软件通过对UV-照射下可见条带的光密度测定分析来对PCR产物进行定量。

[0249] 表1. PCR条件

[0250]

基因	产物bp	循环条件	循环
肌动蛋白	238	94℃1min/55℃30sec/72℃30sec	28

NGN3	347	94°C1min/55°C30sec/72°C30sec	45
MafA	393	94°C1min/58°C30sec/72°C30sec	45
PDX-1	243	94°C1min/55°C30sec/72°C30sec	30

[0251] 统计学分析

[0252] 斯氏t检验被用于P值。

[0253] 1.2结果

[0254] NOD/scid小鼠中链脲菌素-诱导的高血糖

[0255] 通过4次的每天用STZ 35mg/kg/天腹腔内注射而在NOD/scid小鼠中诱导出高血糖。在该研究的第1天,即在第一次注射STZ之前,整组动物(N=80)的平均禁食血液葡萄糖水平(BGL)是7mM+/-1.5标准差(SD)。如果动物在此研究的第10天(即完成所述STZ疗程的5天后)所具有的BGL高于未处理小鼠中平均葡萄糖水平3SD,则认为他们发展出了高血糖。按照此条件未达到高血糖的小鼠随后被从所有分析中排除。在第10天有29只小鼠满足上述高血糖的条件及。在这些小鼠中,在第10天的平均是15.2mM+/-0.6,比基准线提高了217%。

[0256] 动脉内注射STRO-1⁺基质细胞对糖尿病NOD/scid小鼠中血液葡萄糖水平的影响

[0257] 如图1所示,经动脉内途径注射进高血糖小鼠的单次剂量的 2.5×10^6 STRO-1⁺细胞导致在细胞治疗之后整个3星期期间的BGL降低。

[0258] 图1显示,与仅动脉内注射媒介物相比,STRO-1⁺细胞的单次动脉内注射诱导糖尿病小鼠中BGL的早期降低。BGL的降低早在第17天即已明显,在第24天最大(35%的平均降低,平均BGL 12.7mM+/-1.2对比19.6mM+/-2.1;p=0.012),并且在整个三星期的随诊(follow-up)期间得以持续。

[0259] STRO-1⁺细胞的单次动脉内注射导致血液葡萄糖水平相对于基准线及早且持续的降低

[0260] 接受STRO-1⁺细胞单次动脉内注射的经STZ处理的小鼠,被证明在整个三星期的随诊(follow-up)期间,其平均BGL相对于第10天的基准线水平持续的降低。如图2所示,此组动物在整个研究期间具有低于处理前水平的平均BGL,而介质处理的对照则显示出逐渐增加的BGL水平。在STZ处理后第10天接受STRO-1⁺细胞动脉内注射的组在第7、14、和21天分别显示出平均BGL相对于基准BGL-11%、-14%、和-4%的降低。相反,仅接受动脉内注射介质的对照组在第7、14、和21天分别显示出平均BGL相对于基准BGL+8%、+20%、和+17%的增加。

[0261] 人STRO-1⁺细胞在糖尿病NOD/scid小鼠中的单次动脉内注射三周后导致小鼠胰岛素循环水平的显著提高

[0262] 如图3所示,处理后第21天通过小鼠特异性胰岛素ELISA测量的循环血清胰岛素水平显示出三周前动脉内注射了STRO-1⁺细胞的糖尿病小鼠与经媒介物处理的糖尿病小鼠相比具有显著较高的循环内源胰岛素水平(0.79mg/L+/-0.11对比0.57mg/L+/-0.02;p=0.009)。

[0263] 单次动脉内注射STRO-1⁺细胞导致糖尿病NOD/scid小鼠的胰微血管密度增加

[0264] 用直接缀合的针对平滑肌肌动蛋白的单克隆抗体(mAb)对胰组织进行染色以确定STRO-1⁺细胞治疗是否在受损的胰中诱导动脉发生。在免疫染色后,仔细检查整个切片以及计数微血管的总数目,并针对总切片面积进行归一化。计数血管的数目并基于大小将其分为3类不同的血管直径<20 μ m、20-100 μ m和>100 μ m。图4显示,STRO-1⁺细胞治疗组中平滑肌肌动蛋白直径<20 μ m的阳性血管数目与媒介物组相比有176%的增加(299.8 \pm 52对比169.1 \pm 18.5;p=0.01)。因此,用STRO-1⁺细胞治疗在受损的胰内诱导了小口径小动脉的应答。

[0265] 单次动脉内注射STRO-1⁺细胞在糖尿病NOD/scid小鼠中导致PDX-1转录因子表达的提升

[0266] 为了评价人STRO-1⁺细胞治疗是否能够在糖尿病NOD/scid小鼠的内源 β 细胞中诱导再生应答,检验了与胰发育和 β 细胞的产生相关联的PDX-1、MafA、和Ngn3转录因子的mRNA表达水平(Zhou et al., Nature 455:627-632, 2008)。如图5A所示,STRO-1⁺细胞治疗组中转录因子PDX-1的平均胰mRNA水平与媒介物组相比有2.5倍的增加(p=0.01)。转录因子MafA和Ngn3的胰mRNA水平也发现有增加,但却未达到显著的程度。

[0267] 为了确认PDX转录因子增加的蛋白水平是由暴露于STRO-1⁺细胞治疗的胰岛所表达的,用抗-PDX-1 mAb对胰岛切片进行免疫组织化学检验,所检验的胰岛切片来自健康的非-糖尿病NOD/scid小鼠、经对照介质处理的糖尿病NOD/scid小鼠、经动脉内STRO-1⁺细胞处理的糖尿病NOD/scid小鼠。如图5B所示,链脲菌素处理导致PDX-1蛋白阳性的胰岛细胞平均数目与健康非-糖尿病小鼠相比有59%的降低(37.1 \pm 12平均阳性细胞/胰岛对比15.1 \pm 4.8平均阳性细胞/胰岛,p=0.03)。与接受对照介质的经链脲菌素-处理的动物相比,动脉内注射STRO-1⁺细胞使PDX-1蛋白阳性胰岛细胞的数目平均增加了71%(25.7 \pm 2.2平均阳性细胞/胰岛,p=0.049),导致了与非-糖尿病动物相比PDX-1蛋白阳性胰岛细胞平均降低了仅31%(p=NS)。图5C中的荧光显微照片显示,来自代表性NOD/scid动物(非糖尿病的或者是有糖尿病且经STRO-1⁺细胞处理的)的胰岛显示出类似数目的PDX-1阳性细胞。相反,来自代表性NOD/scid动物(有糖尿病且接受了对照介质)的胰岛显示出PDX-1蛋白阳性细胞数目的显著降低。

[0268] 单次动脉内注射STRO-1⁺细胞导致胰岛数目的增加

[0269] 也评估了用STRO-1⁺细胞处理对总胰岛数目的影响。如图6A所示,三周前接受STRO-1⁺细胞单次动脉内注射的动物在处死时显示出与仅注射了介质的对照相比超过2倍的胰岛数目(0.78 \pm 0.07对比0.38 \pm 0.07胰岛/mm²,p=0.0012)。在总胰岛数目的增加之外,在处理组之间未发现平均胰岛直径或胰岛面积的显著变化,图6B和6C。

[0270] 单次动脉内注射STRO-1⁺细胞在糖尿病NOD/scid小鼠的胰岛内导致内源 β 细胞数目增加、 α 细胞减少、以及正常 β/α 细胞比率的重新确立

[0271] 抗-小鼠胰岛素mAb染色被用于对胰切片中胰岛内的 β 细胞的数目进行定量,所述胰切片来自健康非-糖尿病NOD/scid小鼠、经对照介质处理的糖尿病NOD/scid小鼠、和经STRO-1⁺细胞动脉内处理的糖尿病NOD/scid小鼠。如图7A所示,链脲菌素处理导致胰岛内 β 细胞的数目与健康非糖尿病小鼠相比降低了21%(6726 \pm 450/mm²胰岛面积对比5289 \pm 387/mm²,p=0.04)。与接受了对照的经链脲菌素-处理的动物相比,动脉内注射STRO-1⁺细胞使 β 细胞的数目平均增加了8%(5709 \pm 690/mm²),导致 β 细胞与非糖尿病动物相比平均降低仅15%(p=NS)。在图B的荧光显微照片中,代表性非糖尿病对照动物的胰岛内的 β 细胞显

示出在胰岛中心区域典型浓密地群集的胰岛素-阳性荧光细胞的定位。然而,在代表性的经STZ-处理的小鼠中 β 细胞丰度较低并且在胰岛中展示出散乱的(disrupted)模式。在代表性的经STRO-1⁺细胞处理的小鼠中的 β 细胞显示出荧光的中等模式,其丰度更高且散乱程度较低。

[0272] 抗-胰高血糖素mAb染色被用于对胰切片的胰岛内 α 细胞的数目进行定量,所述胰切片来自健康非糖尿病的NOD/scid小鼠、经对照介质处理的糖尿病NOD/scid小鼠、和经STRO-1⁺细胞动脉内处理的糖尿病NOD/scid小鼠。如图7C所示,链脲菌素处理导致胰岛内 α 细胞的数目与健康非糖尿病小鼠相比增加470% ($1046 \pm 46/\text{mm}^2$ 胰岛面积对比 $4954 \pm 632/\text{mm}^2$, $p=0.003$)。与接受了对照介质的经链脲菌素-处理的动物相比,动脉内注射STRO-1⁺细胞使 α 细胞的数目平均降低44% ($2764 \pm 274/\text{mm}^2$, $p=0.008$),导致 α 细胞与非糖尿病动物相比平均增加仅164% ($p=0.002$)。在图7D所示的荧光显微照片中,代表性的非糖尿病对照动物的正常胰岛内的 α 细胞可以被鉴定为整齐地沿圆周排列的经胰高血糖素-染色的细胞。然而,在代表性的经STZ-处理的小鼠中 α 细胞丰度较高并且展示出分散在整个胰岛的模式。经STRO-1⁺细胞处理的代表性小鼠胰岛内的 α 细胞显示出比较外围的荧光模式并且在胰岛的整个中心丰度较低。

[0273] 图7E描述了胰切片的胰岛内 β 细胞相对于 α 细胞的比例,所述胰切片来自健康非糖尿病NOD/scid小鼠、经对照介质处理的糖尿病NOD/scid小鼠、和经STRO-1⁺细胞动脉内处理的NOD/scid小鼠。链脲菌素处理导致胰岛内 β 细胞相对于总 α 和 β 细胞的百分比与健康非糖尿病小鼠相比降低了40% ($86 \pm 0.9\%$ 对比 $52 \pm 2.6\%$, $p=0.00002$)。与接受对照介质的经链脲菌素-处理的动物相比,动脉内注射STRO-1⁺细胞使 β 细胞相对于 α 细胞的比例平均提高29% ($52 \pm 2.6\%$ 对比 $67 \pm 3.9\%$, $p=0.005$)。因此,用STRO-1⁺细胞处理由链脲菌素而导致糖尿病的NOD/scid小鼠,会导致胰岛内重新确立 β 细胞对 α 细胞较正常的比率。

[0274] 讨论

[0275] 本研究首次提供了证据表明单次剂量的人STRO-1⁺细胞对于在由链脲菌素而导致糖尿病的NOD/scid小鼠中诱导持续的 β 细胞再生以及逆转高血糖是有效的。链脲菌素(STZ)-诱导的糖尿病实验模型导致了类似于PDX-1基因敲低(knockdown)后所见到的糖尿病表型,产胰岛素 β 细胞的数目降低、产胰高血糖素的 α 细胞增加、以及GLUT2 mRNA和蛋白表达降低(Liu et al., Mol Ther 15:86-93, 2007;和Wang et al., Diabetes 47:50-6, 1998)。单次剂量的STRO-1⁺细胞导致持续的PDX-1激活、内源 β 细胞数目增加、表达胰高血糖素的 α 细胞减少、以及增强的胰岛素生产。

[0276] 在单次剂量的STRO-1⁺细胞之后,经STZ处理的NOD/scid糖尿病小鼠中PDX-1表达的持续降低以及胰 β 细胞和 α 细胞之间内稳态的重新确立令人瞩目地类似于曾经报导的那些特征,所述报导是在同样的鼠模型中施用基因疗法以降低胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)的长期过表达(Liu et al., Mol Ther 15:86-93, 2007)。GLP-1是源于肠并迁移至胰的肽,其激活PDX-1和GLUT2,并导致胰岛素分泌的增加。其发现导致了两类新的引起 β 细胞中GLP-1活性提高的药剂的开发:(a) GLP-1类似物,其是长效的受体激动剂或者对GLP-1的天然拮抗剂二肽基肽酶IV (DPPIV)所引起的降解有抗性,以及(2)口服活性DPPIV拮抗剂,其导致内源的GLP-1活性增加。

[0277] 然而,这些药剂的临床用途被局限于治疗轻度形式的II型糖尿病。它们的半衰期

相对较短、需要频繁施用、以及在严重 β 细胞缺失的情况中相对缺乏效力,这使其不能作为胰岛素节约药剂用于I型糖尿病或其它依赖胰岛素的患者。实际上,尽管DPPIV拮抗剂提高内源GLP-1的水平,但其不能够逆转经STZ-处理的小鼠中已经确立的糖尿病(Kim et al., Diabetes 50:1562-1570,2001),并且仅仅在持续施用并伴随低剂量STZ和部分 β 细胞缺失的情况下才能改善高血糖(Mu et al.,Diabetes 55:1695-1704,2006)。类似地,GLP-1激动剂只有在用STZ之前给予或者伴随STZ给予时才有效,并且需要持续施用(Tourrell et al.,Diabetes 50:1562-1570,2001;Li et al.,J Biol Chem 278:471-478,2003;Gezginci-Oktayoglu and Bolkent,Biochem Cell Biol 87:641-651,2009)。总而言之,这些数据表明DPPIV抑制剂和GLP-1类似物仅仅在依旧存在大量 β 细胞时才能有效的促进 β 细胞再生。

[0278] 相反,本研究表明,只是单次注射STRO-1⁺细胞也可以诱导持续的 β 细胞再生,即使还存在很少量的 β 细胞。这由该细胞逆转已经确立的高血糖的能力所证明,其中所述细胞在完成高剂量的STZ疗程(β 细胞完全缺失的模型)5天之后施用。类似的结果只有在使用基因疗法持续过表达GLP-1时才能实现(Liu et al.,Mol Ther 15:86-93,2007)。STRO-1⁺疗法的长效性和强效力表明这种类型的细胞疗法可以在依赖胰岛素的糖尿病中提供持续的葡萄糖控制和节约胰岛素的效应,这是DPPIV抑制剂或GLP-1类似物无法做到的。

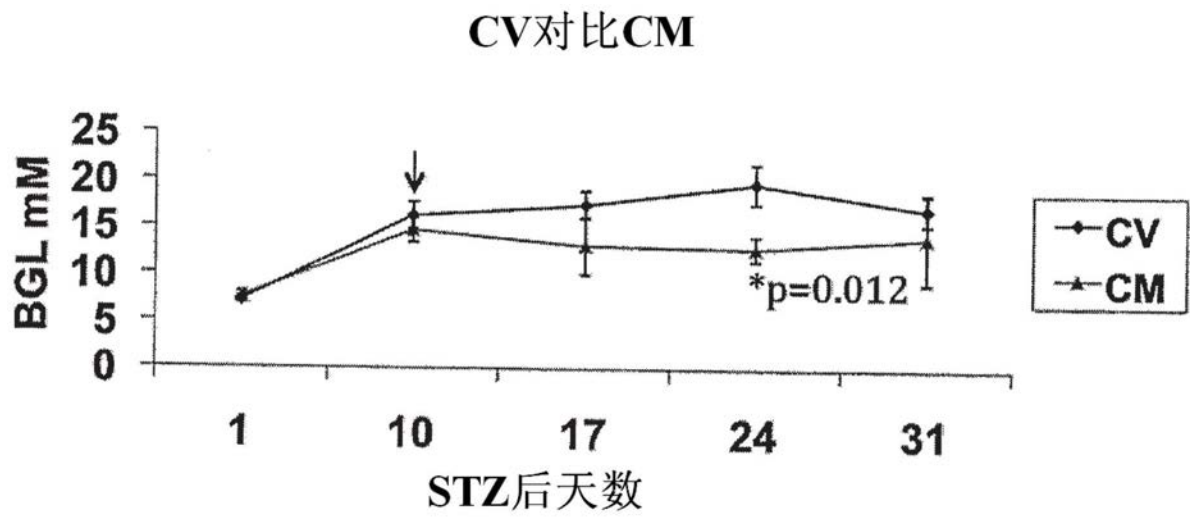


图1

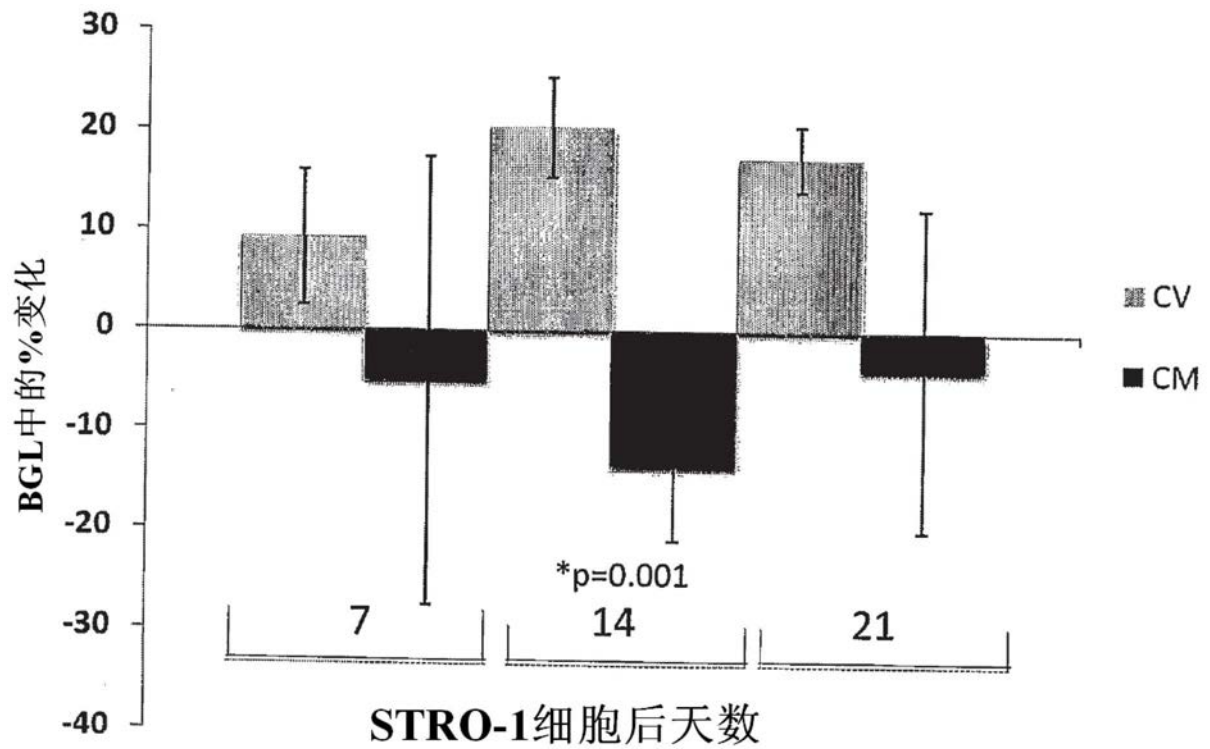


图2

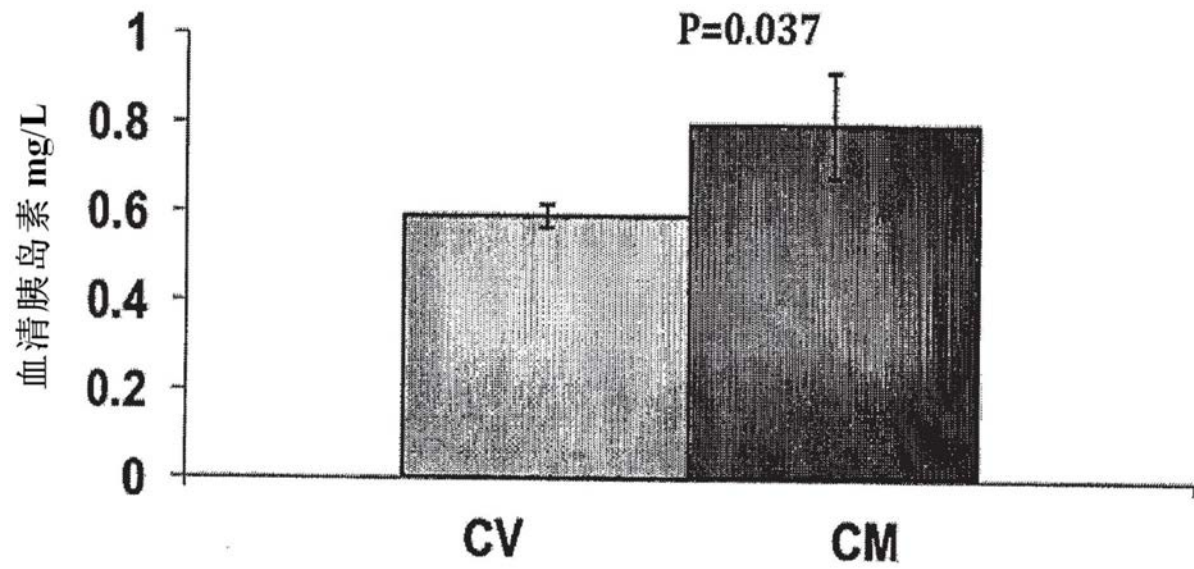


图3

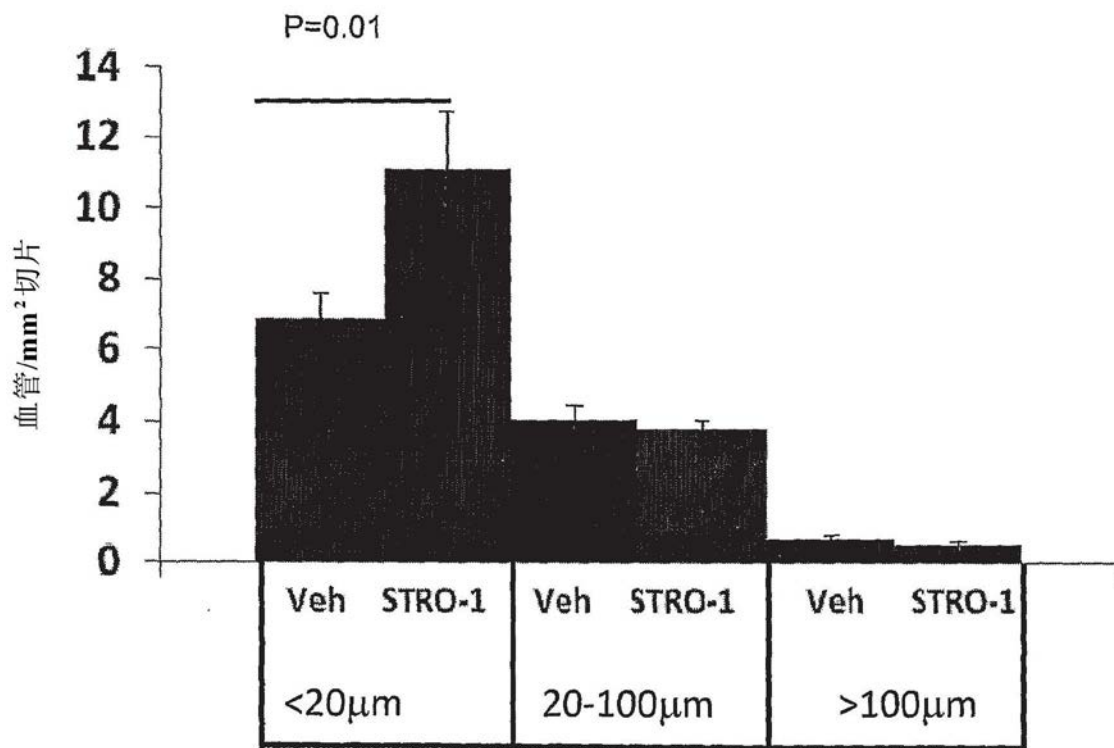


图4A

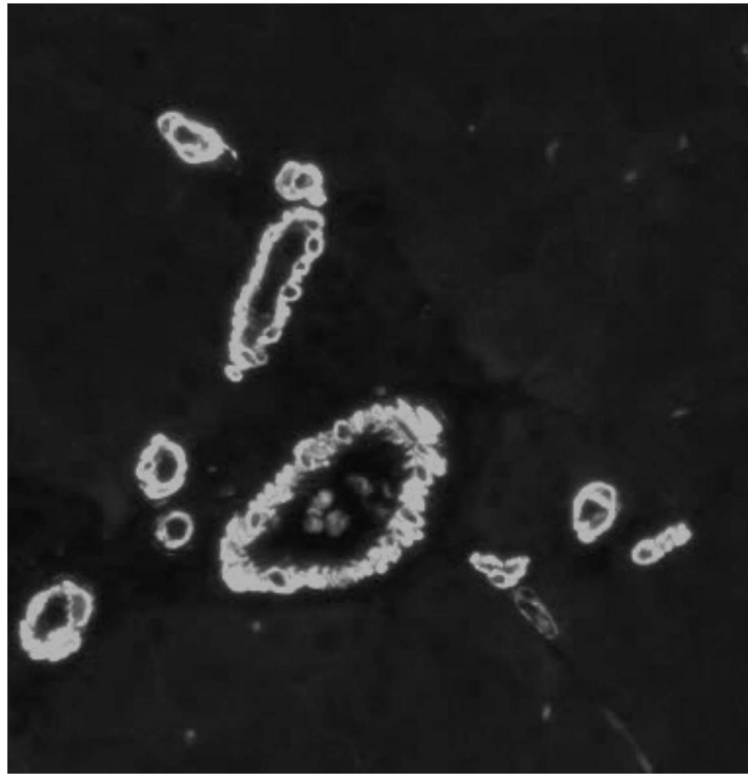


图4B

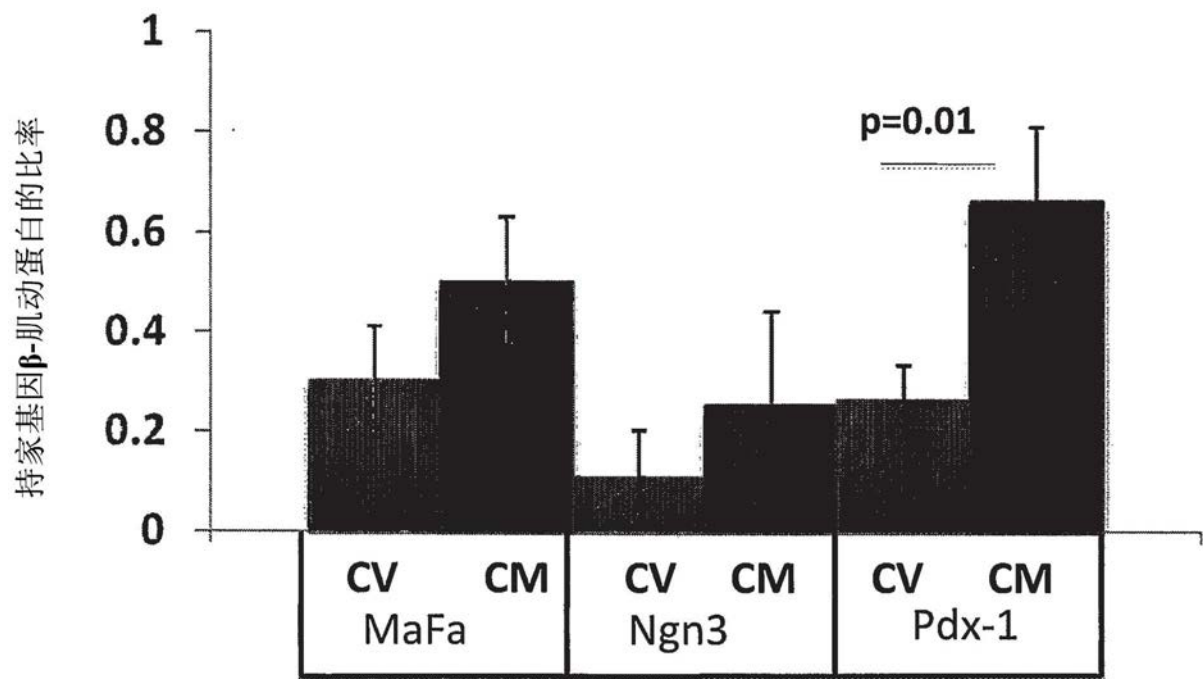


图5A

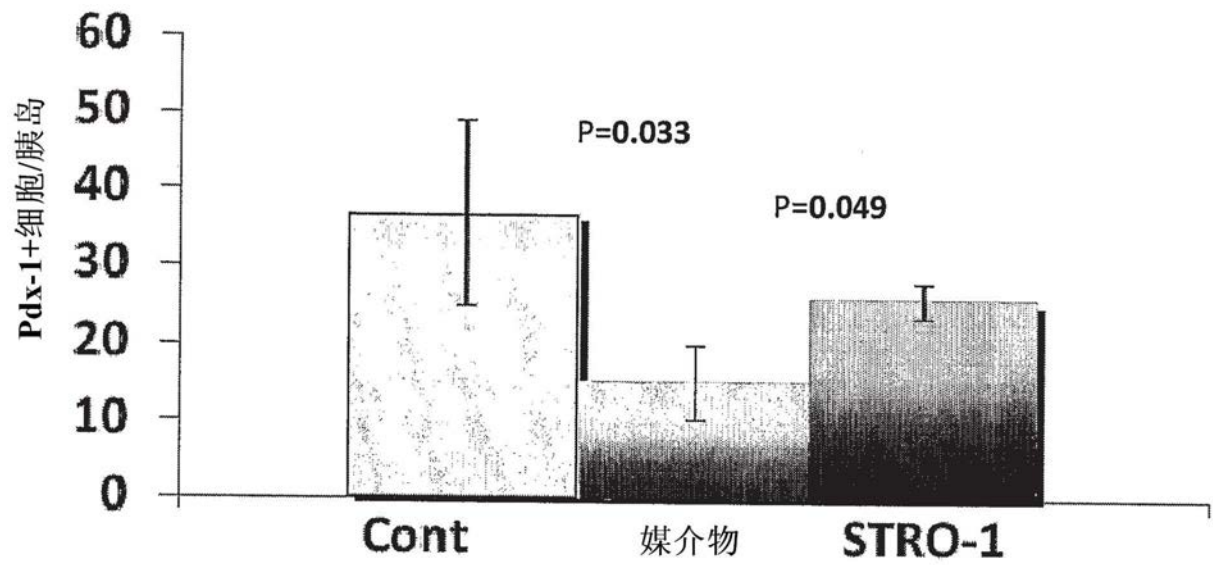
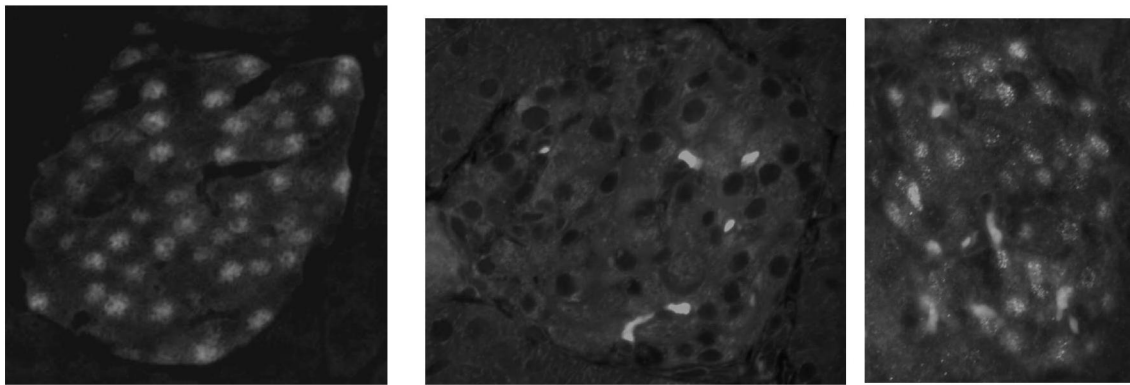


图5B



对照

媒介物

STRO-1

图5C

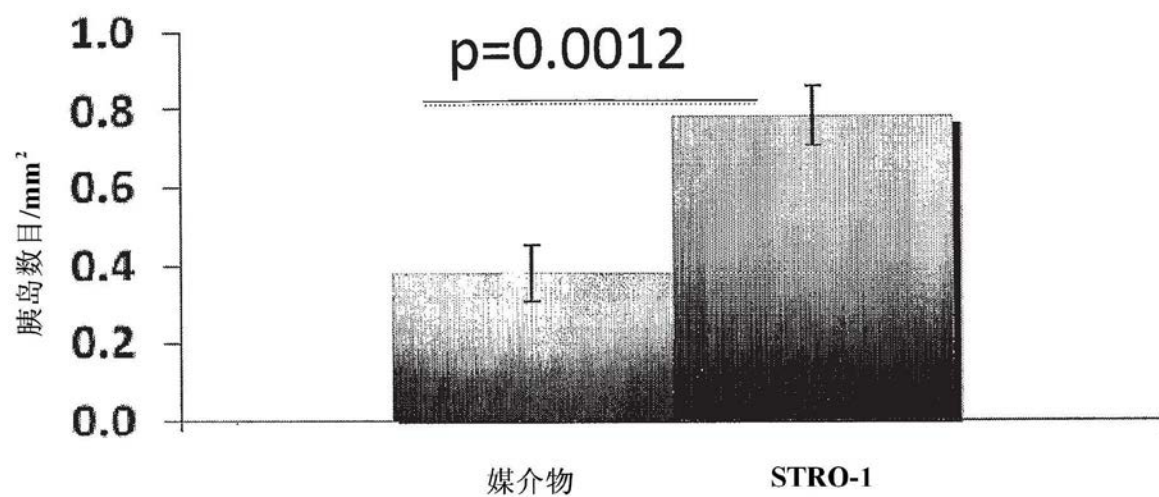


图6A

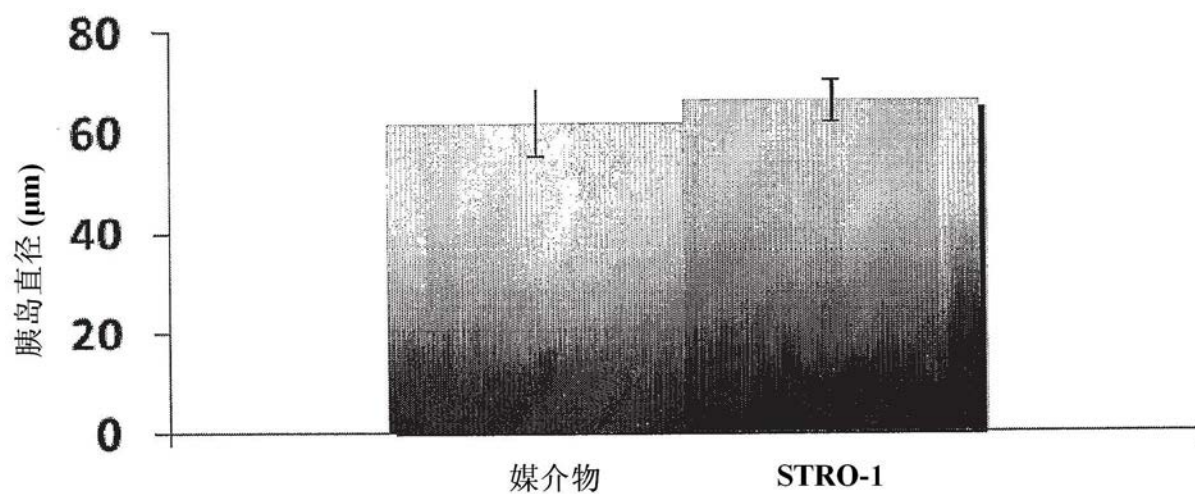


图6B

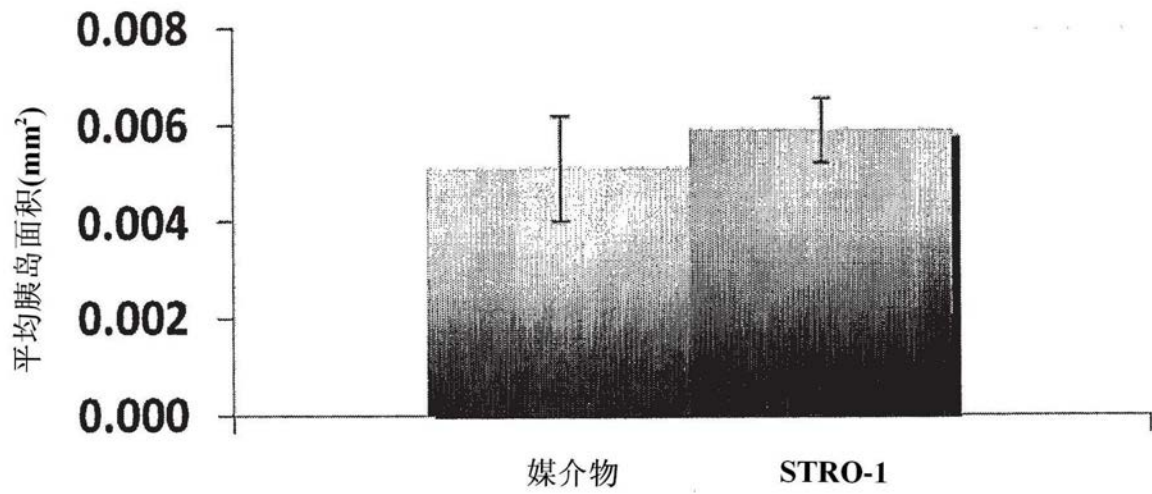


图6C

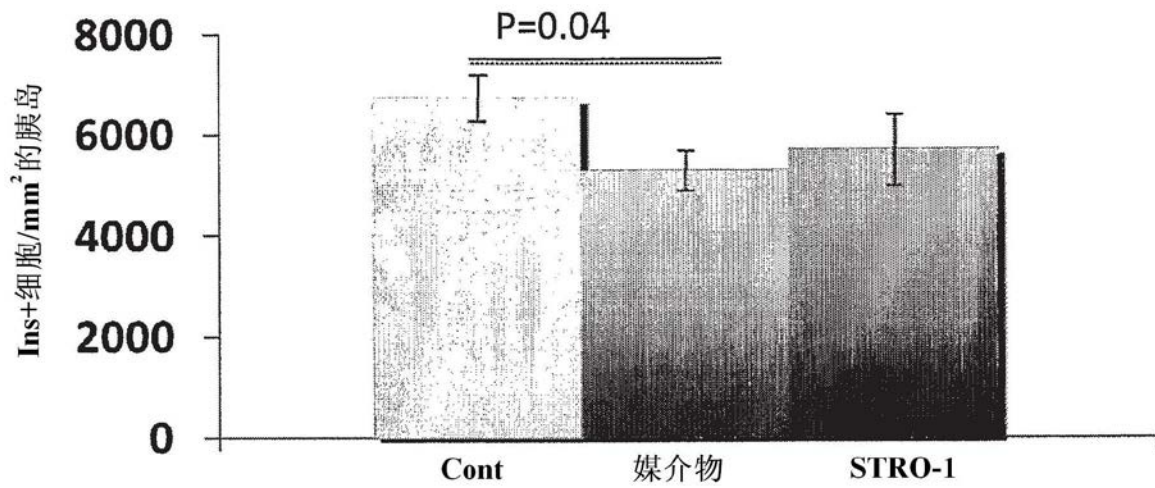


图7A

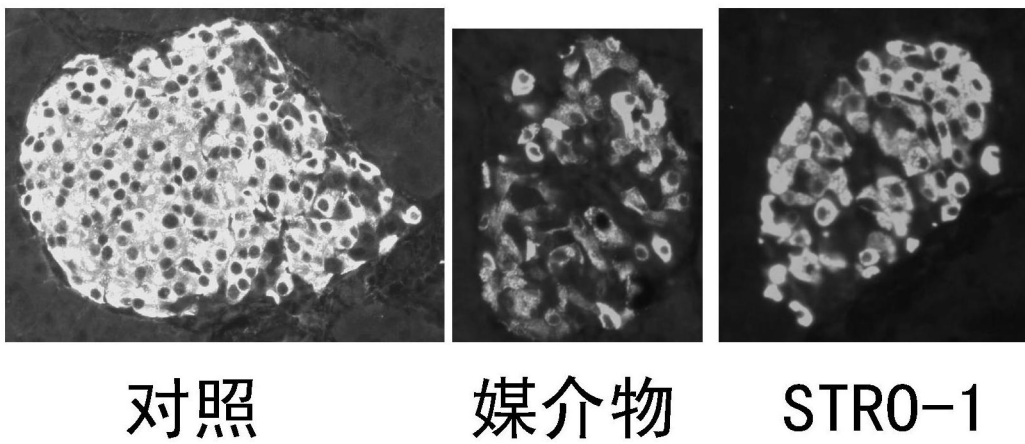


图7B

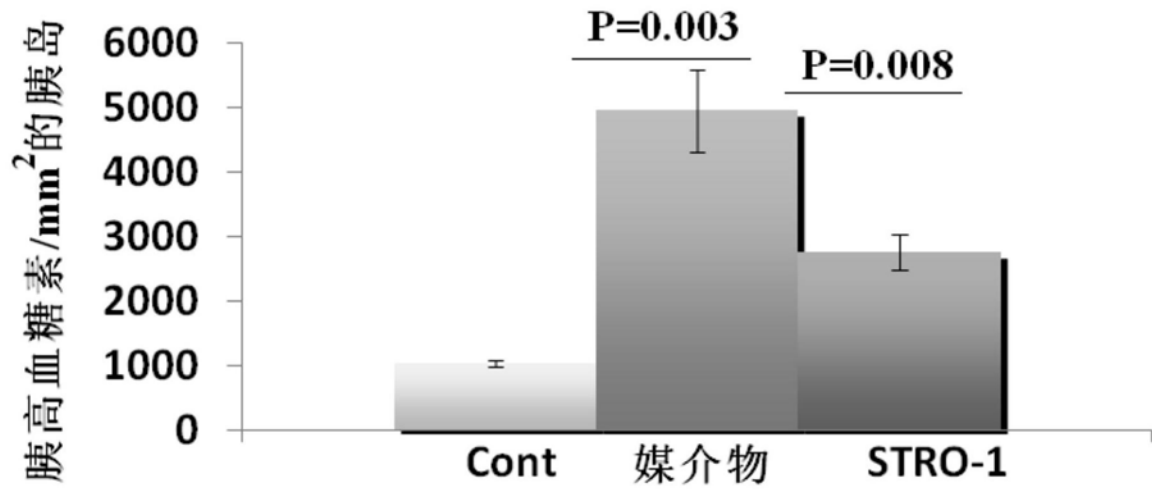


图7C

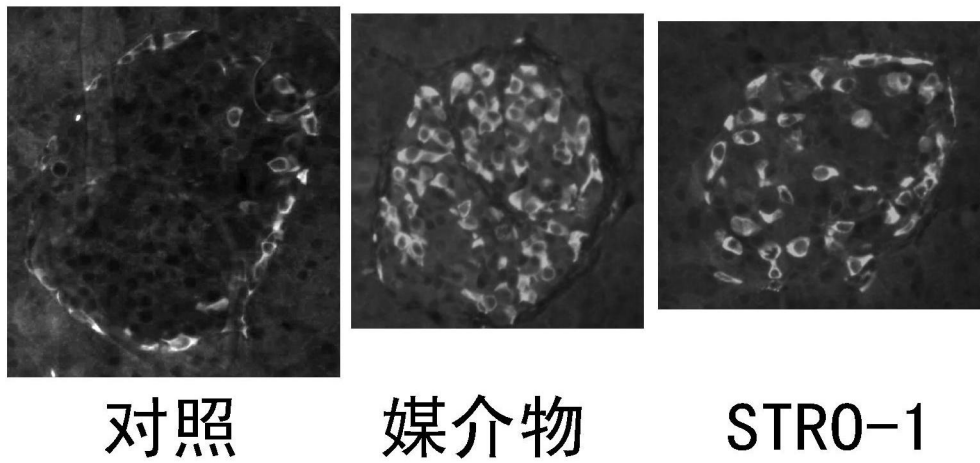


图7D

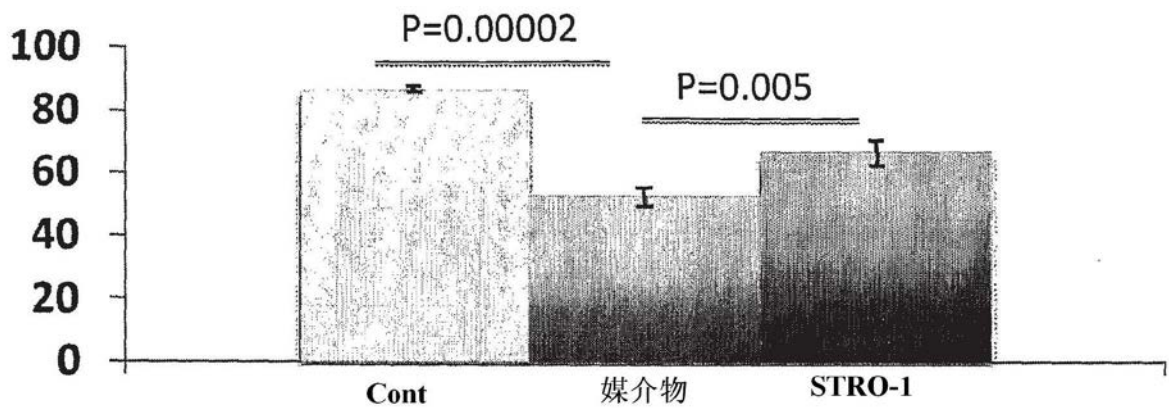


图7E