



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104968298 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 07

(21) 申请号 201380033833. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 04. 30

A61F 2/10(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61L 27/38(2006. 01)

61/640, 041 2012. 04. 30 US

A61K 35/33(2015. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 12. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/038914 2013. 04. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/166045 EN 2013. 11. 07

(71) 申请人 约翰霍普金斯大学

地址 美国马里兰州

申请人 由陆军部部长为代表的美国政府

(72) 发明人 路易斯·安德烈斯-加尔萨

赛旺·康 乔恩·H·迈耶勒

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 王思琪 郑霞

权利要求书2页 说明书20页 附图15页

(54) 发明名称

使用自体成纤维细胞改变皮肤身份的方法

(57) 摘要

本发明涉及自体成纤维细胞领域。更具体地说, 本发明提供了包含自体成纤维细胞的方法和组合物及其用来改变皮肤身份的用途。在某些实施方案中, 掌跖成纤维细胞可因在截肢者残肢部位诱导掌跖皮肤的能力而被扩增。在其他实施方案中, 来自长着毛发的头皮的成纤维细胞可被扩增以改善脱发。

1. 一种用于改变患者皮肤身份的方法,包括移植自体成纤维细胞到患者的靶皮肤部位中的步骤,其中经来自期望的皮肤类型部位的皮肤活检获得所述自体成纤维细胞。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述靶皮肤部位是截肢者的残肢部位皮肤且所述期望的皮肤类型部位是所述截肢者的掌跖皮肤。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述靶皮肤部位是所述患者的脱发部位且所述期望的皮肤类型部位是长着毛发的头皮。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述靶皮肤部位是伤疤且所述期望的皮肤类型部位来自所述伤疤相邻或周围的区域。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述靶皮肤部位是变色皮肤且所述期望的皮肤类型部位来自所述变色皮肤相邻或周围的区域。

6. 如权利要求 5 所述的方法,其中所述变色皮肤是鲜红斑痣。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述靶皮肤部位是不匹配的刃厚皮肤移植物或其他自体皮肤移植物且所述期望的皮肤类型来自具有期望身份的对侧皮肤。

8. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述靶皮肤部位是好发疹或溃疡的部位且所述期望的皮肤类型正常情况下对该疹或溃疡有抵抗力。

9. 如权利要求 8 所述的方法,其中所述好发疹或溃疡的部位是骶骨的压迫性溃疡且正常情况下对该疹或溃疡有抵抗力的所述期望的皮肤类型是掌跖皮肤。

10. 一种用于改变患者皮肤身份的方法,包括以下步骤:

- a. 从所述患者的期望的皮肤类型部位获得组织样品;
- b. 培养所述组织以扩增成纤维细胞;和
- c. 将所扩增的自体成纤维细胞移植到所述患者的靶皮肤部位中。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述靶皮肤部位是截肢者的残肢部位皮肤且所述期望的皮肤类型部位是所述截肢者的掌跖皮肤。

12. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述靶皮肤部位是所述患者的脱发部位且所述期望的皮肤类型部位是长着毛发的头皮。

13. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述靶皮肤部位是伤疤且所述期望的皮肤类型部位来自所述伤疤相邻或周围的区域。

14. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述靶皮肤部位是变色皮肤且所述期望的皮肤类型部位来自所述变色皮肤相邻或周围的区域。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述变色皮肤是鲜红斑痣。

16. 一种用于在截肢者的残肢部位诱导掌跖皮肤的方法,包括移植自体掌跖成纤维细胞到所述截肢者的非掌跖残肢部位的步骤。

17. 如权利要求 16 所述的方法,其中所述移植步骤包括注射所述自体掌跖成纤维细胞。

18. 一种用于在截肢者的残肢部位诱导掌跖皮肤的方法,包括以下步骤:

- a. 从所述截肢者获得掌跖皮肤活检;
- b. 培养所述活检以扩增成纤维细胞;和
- c. 将所扩增的自体成纤维细胞移植到所述截肢者的残肢部位中。

19. 一种用于治疗患者脱发的方法,包括移植自体成纤维细胞到所述患者的脱发部位

中的步骤,其中经来自所述患者的长有毛发的头皮的皮肤活检获得所述自体成纤维细胞。

20. 一种用于治疗患者脱发的方法,包括以下步骤:

- a. 从所述患者的长有毛发的头皮获得组织样品;
- b. 培养所述组织以扩增成纤维细胞;和
- c. 将所扩增的自体成纤维细胞移植到所述患者的脱发部位中。

21. 一种用于改变患者疤痕的皮肤身份的方法,包括移植自体成纤维细胞到所述患者的疤痕部位中的步骤,其中经来自所述患者疤痕部位相邻或周围的皮肤部位的皮肤活检获得所述自体成纤维细胞。

22. 一种用于改变患者疤痕的皮肤身份的方法,包括以下步骤:

- a. 从所述患者的疤痕部位相邻或周围的皮肤部位获得组织样品;
- b. 培养所述组织以扩增成纤维细胞;和
- c. 将所扩增的自体成纤维细胞移植到所述患者的疤痕部位中。

23. 一种药物组合物,包括用于移植的自体成纤维细胞。

24. 用于在改变患者皮肤身份的方法中使用的自体成纤维细胞,其中所述自体成纤维细胞经来自期望的皮肤类型部位的皮肤活检获得且被移植到所述患者的靶皮肤部位中。

25. 根据权利要求 24 所述的用于使用的自体成纤维细胞,其中:

- a. 所述靶皮肤部位是截肢者的残肢部位皮肤且所述期望的皮肤类型部位是所述截肢者的掌跖皮肤;
- b. 所述靶皮肤部位是所述患者的脱发部位且所述期望的皮肤类型部位是长有毛发的头皮;
- c. 所述靶皮肤部位是疤痕且所述期望的皮肤类型部位来自所述疤痕相邻或周围的区域;或
- d. 所述靶皮肤部位是变色皮肤且所述期望的皮肤类型来自所述变色皮肤相邻或周围的区域。

使用自体成纤维细胞改变皮肤身份的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2012 年 4 月 30 日递交的美国临时申请第 61/640,041 号的权益,该申请通过引用整体并入本文。

[0003] 政府利益声明

[0004] 本发明是在美国政府支持下在基金号 1K08AR05566601 A1 之下做出的。美国政府拥有本发明的某些权利。

发明领域

[0005] 本发明涉及自体成纤维细胞领域。更具体地说,本发明提供了包含自体成纤维细胞的方法和组合物及其用来改变皮肤身份 (identity) 的用途。

[0006] 发明背景

[0007] 再生医学的主要努力是改变组织身份。在皮肤病学,改变皮肤身份的应用是宽广的,且包括使疤痕回复到其原来的组织类型。这些努力将可能涉及细胞疗法,正如已经在例如同种异体成纤维细胞的注射以治疗遗传性大疱病中所做的。尽管同种异体细胞已在伤口治疗中被常规使用,最佳结果因缺乏有关有效递送干细胞和将干细胞植入皮肤的知识而受到阻碍。而且,考虑到临床差异性和这些状况的罕见,用于慢性伤口或大疱病的细胞疗法的优化是困难的。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明至少部分基于部位特定的自体成纤维细胞可被用于改变皮肤身份的发现。在某些实施方案中,掌跖 (volar) 成纤维细胞可因在截肢者残肢部位诱导掌跖皮肤的能力而被扩增。在其他实施方案中,来自长着毛发的头皮的成纤维细胞可被扩增以改善脱发。

[0010] 因此,在一方面,本发明提供了对于改变皮肤身份有用的方法和组合物。在一个实施方案中,用于改变患者皮肤身份的方法包括移植自体成纤维细胞到患者的靶皮肤部位中的步骤,其中经来自期望的皮肤类型部位的皮肤活检获得自体成纤维细胞。在特定实施方案中,靶皮肤部位是截肢者的残肢部位皮肤且期望的皮肤类型部位是截肢者的掌跖皮肤。在另一个实施方案中,靶皮肤部位是患者的脱发部位且期望的皮肤类型部位是长着毛发的头皮。在替代实施方案中,靶皮肤部位是伤疤且期望的皮肤类型部位来自伤疤相邻或周围的区域。在又一实施方案中,靶皮肤部位是变色皮肤且期望的皮肤类型部位来自变色皮肤相邻或周围的区域。在特定实施方案中,变色皮肤是鲜红斑痣 (port wine stain)。

[0011] 在另一实施方案中,靶皮肤部位是不匹配的刃厚皮肤移植 (mismatched split thickness skin graft) 或其他自体皮肤移植,且期望的皮肤类型来自具有期望身份的对侧皮肤。可替代地,靶皮肤部位是好发疹或溃疡的部位且期望的皮肤类型正常情况下对疹或溃疡有抵抗力。更具体地说,好发疹或溃疡的部位是骶骨的压迫性溃疡 (pressure ulcer) 且正常情况下对疹或溃疡有抵抗力的期望的皮肤类型是掌跖皮肤。

[0012] 本发明还提供了用于改变患者皮肤身份的方法,包括以下步骤:(a) 从该患者的期望的皮肤类型部位获得组织样品;(b) 培养该组织以扩增成纤维细胞;和 (c) 将所扩增的

自体成纤维细胞移植到该患者的靶皮肤部位中。在特定实施方案中,靶皮肤部位是截肢者的残肢部位皮肤且期望的皮肤类型部位是截肢者的掌跖皮肤。在另一个实施方案中,靶皮肤部位是患者的脱发部位且期望的皮肤类型部位是长着毛发的头皮。可替代地,靶皮肤部位是伤疤且期望的皮肤类型部位来自伤疤相邻或周围的区域。在又一实施方案中,靶皮肤部位是变色皮肤且期望的皮肤类型部位来自变色皮肤相邻或周围的区域。更具体地说,在另一实施方案中,变色皮肤是鲜红斑痣。

[0013] 在本发明的另一具体实施方案中,用于在截肢者的残肢部位诱导掌跖皮肤的方法包括移植自体掌跖成纤维细胞到截肢者的非掌跖残肢部位的步骤。在某些实施方案中,该移植步骤包括注射自体掌跖成纤维细胞。

[0014] 本发明还提供了用于在截肢者的残肢部位诱导掌跖皮肤的方法,包括以下步骤:(a) 从该截肢者获得掌跖皮肤活检;(b) 培养该活检以扩增成纤维细胞;和(c) 将所扩增的自体成纤维细胞移植到该截肢者的残肢部位中。在另一实施方案中,用于治疗患者脱发的方法包括移植自体成纤维细胞到患者的脱发部位中的步骤,其中经来自该患者的长有毛发的头皮的皮肤活检获得自体成纤维细胞。在另一实施方案中,用于治疗患者脱发的方法包括以下步骤:(a) 从该患者的长有毛发的头皮获得组织样品;(b) 培养该组织以扩增成纤维细胞;和(c) 将所扩增的自体成纤维细胞移植到该患者的脱发部位中。

[0015] 本发明还提供了用于改变患者疤痕的皮肤身份的方法,包括移植自体成纤维细胞到患者的疤痕部位中的步骤,其中经来自该患者疤痕部位相邻或周围的皮肤部位的皮肤活检获得自体成纤维细胞。在另一实施方案中,用于改变患者疤痕的皮肤身份的方法包括以下步骤:(a) 从该患者的疤痕部位相邻或周围的皮肤部位获得组织样品;(b) 培养该组织以扩增成纤维细胞;和(c) 将所扩增的自体成纤维细胞移植到该患者的疤痕部位中。

[0016] 在另一方面,本发明提供了对于改变皮肤身份有用的药物组合物。在某些实施方案中,药物组合物包括用于移植的自体成纤维细胞。本发明还提供了用于在改变患者皮肤身份的方法中使用的自体成纤维细胞,其中该自体成纤维细胞经来自期望的皮肤类型部位的皮肤活检获得且被移植到该患者的靶皮肤部位中。在供此类使用的自体成纤维细胞中,(a) 靶皮肤部位是截肢者的残肢部位皮肤且期望的皮肤类型部位是截肢者的掌跖皮肤;(b) 靶皮肤部位是患者的脱发部位且期望的皮肤类型部位是长有毛发的头皮;(c) 靶皮肤部位是疤痕且期望的皮肤类型部位来自疤痕相邻或周围的区域;或(d) 靶皮肤部位是变色皮肤且期望的皮肤类型来自变色皮肤相邻或周围的区域。

[0017] 更具体地说,药物组合物包括约 0.1 至约 9.9×10^{10} 个细胞/ml,约 0.5 至约 9×10^{10} 个细胞/ml,约 1 至约 9×10^9 个细胞/ml,约 1 至约 8×10^8 个细胞/ml,约 1 至约 7×10^7 个细胞/ml,约 1 至约 6×10^6 个细胞/ml,约 1 至约 5×10^5 个细胞/ml。在更特别的实施方案中,细胞的适当数目包括约 1 至约 9×10^7 个细胞/ml,约 1 至约 8×10^7 个细胞/ml,约 1 至约 7×10^7 个细胞/ml,约 1 至约 6×10^7 个细胞/ml,约 1 至约 5×10^7 个细胞/ml,约 1 至约 4×10^7 个细胞/ml,约 1 至约 3×10^7 个细胞/ml,以及约 1 至约 2×10^7 个细胞/ml。可替代地,靶量可在配制范围内进行调整以适应不同的适应症剂量(indication dose)。

[0018] 自体成纤维细胞组合物可包括至少约80%、至少约85%、至少约88%、至少约89%、和至少约90%的成纤维细胞。更具体地说,该组合物可包含至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至

少约 99% 的成纤维细胞。

[0019] 本发明的药物组合物可通过任何有效的施用途径施用。在具体实施方案中,施用途径是通过注射。在某些实施方案中,通过非常靠近表皮/真皮会合处的表皮下注射(真皮内)施用组合物。

[0020] 附图简述

[0021] 图 1:示意性概括异位掌跖皮肤在截肢者的残肢部位的建立。

[0022] 图 2:描绘具有 KRT9 突变的患者的掌跖角化病(palmoplantar keratodermas)的图像。

[0023] 图 3:KRT9 的正常表达($n = 3, p < 0.05$)。

[0024] 图 4:掌跖解冻的成纤维细胞(1 百万)在 10cm 板共培养 3 天后诱导包皮角质形成细胞(25 万)中的异位 KRT9 表达($n = 3, p < 0.05$;体外 2-D 共培养测定)。

[0025] 图 5:体外 3-D 测定显示以在 4.2cm²插入物中在空气界面 3 周的解冻的掌跖成纤维细胞(脚底对脚背;大鼠尾部 I 型胶原中 1 百万)对包皮角质形成细胞(1 百万)的表皮和角质层增厚(20 $\times$)。

[0026] 图 6:HoxA13 是解冻的成纤维细胞中 KRT9 诱导所必需的($n = 3, p < 0.05$)。在共培养前用 12 皮摩 siRNA(Dharmacon#3209)核转染成纤维细胞(Lonza 4D);验证 >50%敲低。

[0027] 图 7:如通过 taqman ABI qRT-PCR 所测量的,LMX1b 表达相反地反映在传代的成纤维细胞中的 KRT9 诱导能力($n = 3, p < 0.05$)。

[0028] 图 8:LMX1b 敲低在敲低后第三天增加 DKK-1($n = 3, p < 0.05$)。

[0029] 图 9:LMX1b 敲低赋予脚背解冻的成纤维细胞新的诱导 KRT9 的能力($n = 3, p < 0.05$)。

[0030] 图 10:不同的成纤维细胞获得诱导 KRT9 的能力,比较错义(scrambled)与 LMX1b 敲低($n = 3, p < 0.05$)。

[0031] 图 11:阵列的证实:PAX9 是成纤维细胞中的掌跖同源盒基因($n = 3, p < 0.05$)。

[0032] 图 12:LMX1b 敲低在单独的成纤维细胞中诱导 PAX9($n = 3, p < 0.05$)。

[0033] 图 13:hSHOX 小鼠同源物在 LMX1b 敲除小鼠肢芽组织中被抑制。

[0034] 图 14:EMX2 在 LMX1b 敲除小鼠肢芽组织中被抑制。

[0035] 图 15:用 2 μ g 的 pMAX 质粒通过 Lonza 4-D 核转染对 1 百万非掌跖成纤维细胞进行 GFP 质粒瞬时转染后 24 小时。

[0036] 图 16:皮肤重建的“HAT”测定反映了加入的成纤维细胞的身份。将单独的 1 千万新生小鼠角质形成细胞(顶部)或与 1 千万新生小鼠真皮成纤维细胞一起(底部)的浆液注入裸鼠后背的 1cm 直径硅“HAT”室中并在 4 周后当形态发生完成时收获。

[0037] 图 17:脚底成纤维细胞在随后传代增殖更慢($n = 3, p < 0.01$)。将脚底和脚成纤维细胞以 50 万个细胞接种在 60cm 皿中并在细胞计数前使其扩增 7 天。

[0038] 图 18:人类志愿者的体内光学相干断层扫描(Optical Coherence Tomography, OCT;VivoSight)显示在掌跖皮肤中更厚的(0.11 对 0.31mm)表皮。

[0039] 发明详述

[0040] 应理解,本发明不限于本文所描述的具体方法和组分等,因为它们可能会有所不同。还应理解,本文所用的术语仅为了描述具体的实施方案,并非意图限制本发明的范围。

必须注意,除非文中明确地另有说明,本文和所附权利要求书中使用的单数形式“一 (a)”、“一 (an)”和“该 (the)”包括复数指代对象。因此,例如,提及“蛋白”是提及一种或更多种蛋白,并包括本领域技术人员已知的其等同物等。

[0041] 除非另有限定,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员所通常理解的相同含义。描述了具体的方法、装置和材料,尽管与本文所述的这些材料和方法类似或等同的任何材料和方法可用于实施或测试本发明。

[0042] 本文引用的所有出版物,包括所有期刊文献、书、手册、公开的专利申请和授权的专利,均以引用的方式并入本文。此外,提供了说明书、实施例和所附权利要求书中使用的一些术语和短语的含义。所述定义在本质上并不意味着进行限制,而是用于提供对本发明某些方面更清晰的理解。

[0043] 在某些实施方案中,本发明适用于促进截肢者中的假体使用。在美国,据估计到 2050 年,360 万人将失去肢体 (limb)。尽管在假体设计上取得大大进步,这些进步都受限在于残肢部位的皮肤破坏。在我们引入的最近的综述中,例如 48% 的越南退伍军人,在其截肢技术后超过 40 年仍具有皮肤问题。如本文所述,在某些实施方案中,本发明的方法将在残肢部位皮肤的身份转换为增强摩擦和刺激抵抗力的掌跖 (palmo (掌)-plantar (跖)) 皮肤 (图 1)。以人们在其脚底不显现皮肤破坏的相同方式,在残肢部位的掌跖皮肤将增强假体使用。

[0044] 在其他实施方案中,本发明利用部位特定的自体成纤维细胞改变组织身份。例如,来自长着毛发的头皮的成纤维细胞可被利用以治疗脱发。在其他实施方案中,可利用部位特定的成纤维细胞来治疗疤痕组织,改变疤痕组织身份以更好匹配相邻和周围皮肤。此外,可利用部位特定的成纤维细胞来改变烧伤疤痕组织身份。

[0045] 本发明基于发育生物学中的概念,即上皮 (角质形成细胞) 功能的间充质 (表皮成纤维细胞) 控制。对换的鸡和鸭上皮和间充质的早期实验确立,间充质控制表皮身份。本发明转换该基本概念以帮助改善截肢受害者的生活质量。

[0046] 掌跖角质形成细胞表达 KRT9,一种负责结构弹性的角蛋白。在表皮松解性掌跖角化症 (EPK ; OMIM 144200) 的选取病例中 KRT9 是被突变的。这些患者仅有掌 / 跖症状,这证实了 KRT9 的局限表达。KRT9 是掌跖功能的理想读出物 (read-out),还因为它提供了对掌跖皮肤的整体结构支持,如通过 EPK 患者的代偿性增厚的手掌和脚底的症状所证明的 (图 2)。KRT9 的结构功能的证据还是其在健康个体中的正常表达模式。KRT9 在皮肤最高的压应力点、乳突纹线 (papillary ridge) 顶端被特异性上调。公认没有其他基因局限于掌跖皮肤。

[0047] 掌跖皮肤具有增厚的角质层和表皮。使用人细胞的早期实验证实,真皮成纤维细胞控制 KRT9 表达。显示人跖成纤维细胞当被移植到 SCID 小鼠时可将成人躯干角质形成细胞 (trunk keratinocyte) 转化成增厚的 KRT9 阳性表皮。同样,当成人非掌跖表皮被移植到手掌真皮时,表皮增厚并表达 KRT9,显示掌真皮指导表皮身份。本发明确立了如下相互的概念:成纤维细胞能够诱导 KRT9 且能够在人体中诱导异位成人掌跖皮肤。

[0048] 进一步的早期工作显示,DKK-1 在掌跖成纤维细胞中升高且本身具有提高掌跖表皮的表皮厚度和减少色素沉着的能力。类似地,远端同源框 A13 (HOXA13) 显示是 KRT9 诱导所必需的且诱导 Wnt5a, Wnt5a 本身还能刺激 KRT9 表达。此外,显示成纤维细胞同源框基因

表达标志被保留在培养物中。然而, HOXA13 指定近端 - 远端命运, 且不是控制掌跖皮肤身份的特异性同源框。因此, 本发明目的还在于鉴定手掌和脚底的重叠基因。实际上, 本发明人发现, 同源框基因 LMX1b 特异性调控掌跖皮肤身份, 因为其在不同的成纤维细胞阵列中的抑制允许诱导 KRT9 的新能力。

[0049] 如本文所述, 本发明人在寻找诱导异位掌跖皮肤的疗法中, 聚焦在成纤维细胞本身 - 它们在培养中保持其身份。成纤维细胞是皮肤中产生胶原和其他细胞外基质组分的专门化细胞。它们是结缔组织自其发育的细胞, 且因此在人组织发育中起关键作用, 包括合成有助于皮肤纹理和包括胶原的基质纤维的分泌的细胞外基质组分的能力。

[0050] 在某些实施方案中, 提供了自体成纤维细胞产物。细胞疗法产物包括使用标准组织培养程序生长自每个个体自身皮肤的活检的自体成纤维细胞的悬浮液。经酶消化分离自组织的成纤维细胞被扩增至足够注射到患者的靶治疗区域的数量。

[0051] 自体成纤维细胞获取自接受者自身皮肤的活检, 接着使用标准细胞培养技术在培养物中扩增。从受试者相关区域对皮肤组织 (真皮和表皮层) 进行活检。在一个实施方案中, 起始材料包括使用标准无菌操作采集的三 3-mm 或四 4-mm 打孔皮肤活检。这些活检由治疗医师采集, 置于包含无菌磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 或其他运输介质的小瓶中。这些活检被培养和扩增以用于本文描述的方法中。可替代地, 这些活检可在 2-8°C 冷藏运输装置中被运输到用于培养、扩增和 / 或储藏的设施。

[0052] 在特别的实施方案中, 这种疗法的活性组分是自体培养的成纤维细胞。作为另一个实例, 使用标准方法由包括采自掌跖 (手掌或脚底) 或非掌跖皮肤部位的表皮和真皮层的 4-mm 打孔活检培养成纤维细胞。在体外扩增期间和之后, 收获成纤维细胞并进行质量控制测试。大于约 95% 的最终悬浮液包括成纤维细胞, 因为大多数角质形成细胞在最初加工阶段被除去。最终悬浮液达到至少约 3750 万个成纤维细胞后, 将细胞悬浮液以限定的成纤维细胞细胞浓度冷藏保存在包含例如人血清白蛋白、羟乙基淀粉和二甲基亚砷 (DMSO) (在无菌盐水中的 2.5% 人血清白蛋白、5% DMSO、6% 羟乙基淀粉) 的冷冻介质中。在临床使用之前, 将细胞解冻, 然后在 24 小时内经真皮内途径注射到自体移植部位。在一个具体实施方案中, 移植物体积包括在 0.75mL 的冷冻介质中的约 3750 万个细胞。

[0053] 在一个实施方案中, 自体成纤维细胞可按如下制备:

[0054] 活检处理。在活检后, 检查组织样品并在酶消化之前洗涤。洗涤后, 在某些实施方案中, 可在不切碎的条件下添加 Liberase 消化酶溶液 (Liberase Digestive Enzyme Solution), 并将活检组织在 $37.0 \pm 2^\circ\text{C}$ 孵育约一小时。活检组织消化时间是能够影响培养物中细胞的活力和生长速率的关键工艺参数。Liberase 是一种胶原酶 / 中性蛋白酶的酶混合物, 配制的从 Lonza Walkersville, Inc. (Walkersville, Md.) 获得, 未配制的从 Roche Diagnostics Corp. (Indianapolis, Ind.) 获得。可选择地, 可使用其他市售胶原酶, 如 Serva Collagenase NB6 (Helidelburg, Germany)。在消化后, 加入生长培养基 (例如 IMDM, GA, 10% 胎牛血清 (FBS)) 以中和该酶, 通过离心沉淀细胞并将细胞重悬在 5.0mL 生长培养基中。可使用任何适合的生长培养基。可替代地, 不进行离心, 通过仅加入生长培养基使存在的酶完全失活。

[0055] 成纤维细胞接种。加入生长培养基, 然后将细胞悬浮液接种到 T-175 细胞培养烧瓶中开始细胞生长和扩增。可使用 T-75、T-150、T-185 或 T-225 烧瓶代替 T-75 烧瓶。将

细胞在 $37 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 与 $5.0 \pm 1.0\%$ CO_2 下孵育并每约三到五天用新鲜生长培养基加料。在该过程中的所有加料通过除去一半生长培养基并用新鲜培养基替换相同体积来进行。可替代地,可进行完全加料。在传代前细胞不应保留在 T-175 烧瓶中大于 30 天。在整个过程监测汇合以确保在培养物分裂期间充足的接种密度。

[0056] 成纤维细胞扩增。当细胞在 T-175 烧瓶中汇合大于或等于 40%,它们通过移除用过的培养基、洗涤细胞和用胰蛋白酶-EDTA 处理以释放烧瓶中的贴壁细胞到溶液中来传代。然后细胞被胰蛋白酶化并接种到 T-500 烧瓶中用于持续的细胞扩增。可替代地,可使用一个或两个 T-300 烧瓶、单层细胞培养器 (One Layer Cell Stack, 1CS)、单层细胞工厂 (One Layer Cell Factory, 1CF) 或两层细胞培养器 (Two Layer Cell Stack, 2CS) 代替 T-500 烧瓶。

[0057] 每次传代时评估形态,并在整个过程监测培养物纯度,然后收获。通过比较观察的样品与用于细胞培养物的形态检查的可视标准品评估形态。细胞在以培养单层生长时展示典型成纤维细胞形态。细胞可展示狭长的纺锤形或具有细延长物的纺锤体外观,或表现为可具有细胞质前缘 (cytoplasmic leading edge) 的更大的扁平星形细胞。还可能观察到这些形态的混合物。在较少汇合区域的成纤维细胞可以是类似形状,但取向随机。还评价了细胞培养物中角质形成细胞的存在。角质形成细胞表现为圆形和不规则形状,且在较高汇合时,它们表现为以圆石队形被组织。在较低汇合时,角质形成细胞在小集落中可观察到。

[0058] 在某些实施方案中,将细胞在 $37 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 与 $5.0 \pm 1.0\%$ CO_2 下孵育并每三到五天在 T-500 烧瓶中和每五到七天在十层细胞培养器 (ten layer cell stack, 10CS) 中加料。在传代前细胞不应保留在 T-500 烧瓶中大于 10 天。安全性质量控制 (QC) 释放测试包括无菌度和内毒素测试。当 T-500 烧瓶中的细胞汇合 $\geq 95\%$ 时,细胞被传代到 10CS 培养瓶中。可替代地,可使用两个五层细胞培养器 (Five Layer Cell Stacks, 5CS) 或 10 层细胞工厂 (10 Layer Cell Factory, 10CF) 代替 10CS。传代到 10CS 通过移除用过的培养基、洗涤细胞和用胰蛋白酶-EDTA 处理以释放烧瓶中的贴壁细胞到溶液中进行。然后将细胞转移到 10CS。加入另外的生长培养基来中和胰蛋白酶并且将来自 T-500 培养瓶的细胞移液到包含新鲜生长培养基的 2L 瓶中。将 2L 瓶中的内容物转移到 10CS 中并遍及所有层接种。然后将细胞在 $37 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 与 $5.0 \pm 1.0\%$ CO_2 下孵育并用新鲜生长培养基每五到七天加料。在传代前细胞不应保留在 10CS 中大于 20 天。

[0059] 细胞收获。当细胞在 10CS 中汇合为 95% 或更多时,收获细胞。收获通过移除用过的培养基、洗涤细胞、用胰蛋白酶-EDTA 处理以释放贴壁细胞到溶液中、和加入另外的生长培养基来中和胰蛋白酶来进行。通过离心收集细胞,重悬,并进行过程中 QC 测试 (in-process QC testing) 来确定总的活细胞计数和细胞活力。

[0060] 如果在收到来自原代 10CS 收获物的细胞计数结果后需要另外的细胞,可进行另外的传代到多个细胞培养器中 (达四个 10CS)。对于另外的传代,将来自原代收获物的细胞加至包含新鲜生长培养基的 2L 培养基瓶。将重悬细胞加至多个细胞培养器并且在 $37 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 与 $5.0 \pm 1.0\%$ CO_2 下孵育。如以上所述对细胞培养器加料并收获,除外的是在细胞收获前细胞汇合必须达到 80% 或更高。收获程序与以上对原代收获物所述程序相同。采集来自细胞和用过的培养基的支原体样品,如以上对原代收获物所述进行细胞计数和活力。

[0061] 在特别的实施方案中,通过将扩增的成纤维细胞在不含蛋白的培养基中培养一段时间使传代的真皮成纤维细胞基本上不含培养基中存在的免疫原性蛋白。该方法降低或消除免疫原性蛋白,避免其从动物来源的试剂引入。为了减少工艺残留,可将细胞冷藏保存在不含蛋白的冷冻介质中,然后解冻并且在制备最终注射物之前洗涤以进一步减少剩下的残留物。

[0062] 细胞的冷冻保存。因此,在某些实施方案中,组合物包括悬浮在包含 Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM) 和 Profreeze-CDM™(Lonza, Walkerville, Md.) 加 7.5% 二甲基亚砜 (DMSO) 的冷冻保存介质中的有活力的自体人成纤维细胞群体。可替代地,可使用更低的 DMSO 浓度代替 7.5% 或可使用 CryoStor™ CS5 或 CryoStor™ CS10(BioLife Solutions, Bothell, Wash.) 代替 IMDM/Profreeze/DMSO。

[0063] 在另一个实施方案中,自体成纤维细胞可按如下制备:

[0064] 活检处理。使用所有无菌(高压灭菌的或个别包装的)仪器以生物安全柜(BSC)级别制备处理的活检用于组织培养。通过浸入包含补充 ABX Antibiotic Antimycotic Solution(100×), Stabilized(Sigma A5955) 的杜氏磷酸盐缓冲液(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) 或 PBS(Sigma D8537) 的 25mL 以 1× 终浓度的无菌漂洗缓冲液将活检漂洗两次。每毫升 100× 抗生素/抗真菌溶液包含 10,000 单位青霉素、10mg 链霉素和 25 μg 两性霉素 B。在抗生素/抗真菌溶液中漂洗活检皮肤之后,将其放置在包含 25mL PBS(具有 1×ABX) 洗涤缓冲液的 50-mL 圆锥形管(Becton Dickinson) 中并进行两次洗涤。在第一次洗涤中,剧烈摇动管并使皮肤浸透几分钟。利用以 70%乙醇灭菌的一对镊子,将皮肤转移到另一个包含 PBS/ABX 洗涤缓冲液的 50-mL 圆锥形管。在第二次洗涤中,再次剧烈摇动管。皮肤可以开始漂浮。在最后一次洗涤中使皮肤浸透几分钟。

[0065] 洗涤后,将皮肤小片从圆锥形管中移出并转移到无菌 10cm 培养皿中。标准操作程序要求操作者看得见顶层表皮和由真皮和皮下脂肪组成的底层。使用无菌手术刀片除去皮下脂肪并将每个分离的小片一分为二。

[0066] 然后使用一对无菌镊子将每个皮肤活检小片转移到包含 10mL 成纤维细胞介质的无菌 15-mL 圆锥形管(Becton Dickinson) 中。该成纤维细胞介质由以下组成:补充高质量限定的胎牛血清(Invitrogen 16000-044) 到 2% 终浓度的 Chemically Defined FGM-CD 成纤维细胞生长培养基(Lonza CC-3132, 包括 CC-4126 和 CC-3131)、以及 200 μL 分散酶(Dispase)I(BD Biosciences 目录号 #354235) 和 1× 终浓度的 ABX 抗生素/抗真菌溶液。

[0067] 将管密闭并在冰箱(4℃) 中过夜孵育不摇动。12 小时后轻轻摇动管并放回冰箱。表皮将在分散酶 I 处理约 18 小时内分离出来。在 4℃ 孵育 18 小时后,将管从冰箱中取出并转移至生物安全柜。在旋开盖子前用 70%乙醇给管消毒。使用高压灭菌镊子将每小片活检从成纤维细胞介质中移出并放置在无菌、干燥的 10-cm 培养皿(Fisher Scientific) 上。在任何后续步骤中分散酶不得接触组织或细胞。将每小片布置在培养皿上并在无菌安全柜内充气 2-5 分钟以使真皮贴在皿上。在充气后使用两对无菌镊子通过用一对镊子夹住真皮且用另一对镊子夹住表皮将层仔细剥离开(从边缘开始)。

[0068] 分离后,将每个真皮小片放置在无菌无包被的 6 孔组织培养板(Fisher Scientific) 的一个孔中,“表皮”侧面向下并展成单层。每个培养板应包含仅一个真皮。将培养板的盖复位并将板转移到无菌 37℃ 培养箱中。将盖移开并容许真皮在培养箱中充气约

15-20 分钟使得真皮贴合到孔底部。所有来自分离真皮的成纤维细胞扩增在不含分散酶的成纤维细胞介质中完成。

[0069] 成纤维细胞接种。在皮肤小片充气后,将 2mL 成纤维细胞介质仔细加入包含真皮小片的孔中,确保不搅乱真皮。这通过轻微地倾斜皿这样从边缘缓慢加入介质而不是直接加到真皮上而完成。使培养板缓慢回到水平位置并转移到无菌 37℃、CO₂培养箱。将板安稳孵育 2-3 天。例如,如果真皮在周五处理,加入 2mL 新鲜成纤维细胞培养基并将板留在培养箱中直到周一下午。每周三次更换培养基,每次更换时标注培养基颜色。如果培养物变黄,培养基应该更频繁更换,例如,每隔一天。在每次培养更换时,在倒置显微镜下目测检查细胞感染的存在,即丝状的存在、浊度升高、或颗粒物质或能动生物。还观察培养物的成纤维细胞扩增状态。成纤维细胞应该在大约八天内开始从真皮长出。使用无菌移液管和自动移液器吸取培养上清。

[0070] 成纤维细胞扩增。例行检查成纤维细胞培养物汇合并基于孔上自由空间的量估计。为了保持汇合,将 30-80%培养物按需拆分到新容器中。如果汇合大于 80%,将培养物拆分并将成纤维细胞按需继代培养以扩增培养物。对于继代培养,在细胞从板剥离前将细胞在补充 Trypsin LE-express (Invitrogen 12605-010) 的培养基中孵育最小分钟量(通常少于 5 分钟)。

[0071] 对于第一次传代,用各自 4mL 的无菌 PBS 将每个孔中的细胞洗涤两次。将 2mL 胰蛋白酶加到皿中并孵育五分钟或直到细胞剥离皿。向孔加入 1mL 无菌 FBS 以中和胰蛋白酶。在胰蛋白酶化之后接种未洗的细胞。10 μL 胰蛋白酶失活溶液加至 5 μL 的 4%台盼蓝并在 Countess 筒上上样。使用 Countess 自动细胞计数器确定细胞总数。将 40mL 无菌 PBS(补充抗生素/抗真菌溶液)加至 50mL 圆锥形管中的细胞。将细胞以 200×g 离心 5 分钟,然后重悬在 12mL 成纤维细胞介质中。如以上所述以生产对数 (production log) 记录细胞数目。将两百万细胞加至标记的 75cm²(T-75) 组织培养烧瓶 (Fisher Scientific) 中。

[0072] 对于后续传代,用两等份各自 20mL 的无菌 PBS 洗涤细胞,接着将培养物在 5mL 胰蛋白酶中孵育 5 分钟或直到细胞从烧瓶剥离。将 1 毫升无菌 FBS 加至烧瓶以中和胰蛋白酶。将细胞转移至 50mL 圆锥形组织培养管,接着加入 40mL 的无菌 PBS(补充抗生素/抗真菌溶液)。如以上所述将细胞在 Countess 自动细胞计数器上计数。将细胞以 200×g 离心 5 分钟,并将沉淀物重悬在 12mL 成纤维细胞介质中。最后,将细胞加至新的标记的 T-75 组织培养瓶。接种密度将是每 T-75 两百万细胞。

[0073] 对于最后两次传代,当总细胞数目达到 5 百万细胞时,我们随后将细胞保持在前述介质中但该介质将不含任何抗生素或抗真菌剂。因此该介质将是补充高质量限定胎牛血清 (Invitrogen 16000-044) 到 2%终浓度的化学限定的 FGM-CD 成纤维细胞生长培养基 (Lonza CC-3132)。

[0074] 细胞收获。当细胞密度达到用于注射的靶细胞数目的 120%时收获培养的成纤维细胞。例如,对于注射 37.5×10^6 个细胞,收获 45×10^6 个细胞。在最后洗涤细胞前,保存过剩介质用于支原体测试。使用 Countess 自动细胞计数器给细胞计数。分离 45×10^6 个细胞后,然后冷冻等份。将每份含约 1×10^6 个细胞的三小等份包装用于无菌度、内毒素、效力和稳定性测试。

[0075] 首先粗略并在组织培养显微镜下目测检查培养上清以确保没有污染迹象。然后,

使用无菌移液管和自动移液器吸取培养上清。除如下述处理细胞用于冷冻保存以外,按以上所述用于传代培养物的程序用胰蛋白酶将培养的成纤维细胞从正生长的表面移出。

[0076] 细胞的冷冻保存。在胰蛋白酶化之后,用 PBS 稀释细胞悬浮液并在 Beckman Coulter 离心机(型号 #392187)中以 $200\times g$ 离心 5 分钟。将细胞重悬在 PBS 中并再次沉淀。将最终洗涤物吸出并将沉淀重悬在由 65mL Hespan(6%羟乙基淀粉)(B. Braun Medical, Inc.)和 6.5mL 的 25%人血清白蛋白(HSA)(Gemini Bio-Products, 目录号 #800-126P)组成的 95%冷冻保存介质(冷冻保护剂)中。

[0077] 将细胞以每 2-mL 冷冻小瓶(Nalgene Cryovial, 目录号 #5012-0020)每 0.75mL 冷冻保护剂 $3-4\times 10^7$ 个细胞的密度重悬。在特殊室温异丙醇容器 Mr. Frosty-Nalgene(Sigma, 目录号 #C1562)中在 -80°C 对小瓶进行缓慢冷冻至少 24 小时。在这个简单过程中,将小瓶简单地放在 Mr. Frosty 内并通过将室温 Mr. Frosty 容器放在 -80°C 冰箱中使小瓶缓慢冷却。完成缓慢冷冻后将小瓶转移到液氮冷库并以气相存储(-150°C)。

[0078] 自体成纤维细胞制品和施用。完成培养物扩增时,收获细胞并洗涤,然后配制以包含适当的细胞数目。此类包含自体成纤维细胞的药物组合物包括但不限于约 0.1 至约 9.9×10^{10} 个细胞 /ml, 约 0.5 至约 9×10^{10} 个细胞 /ml, 约 1 至约 9×10^9 个细胞 /ml, 约 1 至约 8×10^8 个细胞 /ml, 约 1 至约 7×10^7 个细胞 /ml, 约 1 至约 6×10^6 个细胞 /ml, 约 1 至约 5×10^5 个细胞 /ml。在更特别的实施方案中,细胞的适当数目包括约 1 至约 9×10^7 个细胞 /ml, 约 1 至约 8×10^7 个细胞 /ml, 约 1 至约 7×10^7 个细胞 /ml, 约 1 至约 6×10^7 个细胞 /ml, 约 1 至约 5×10^7 个细胞 /ml, 约 1 至约 4×10^7 个细胞 /ml, 约 1 至约 3×10^7 个细胞 /ml, 以及约 1 至约 2×10^7 个细胞 /ml。可替代地,靶量可在配制范围内进行调整以适应不同的适应症剂量。

[0079] 自体成纤维细胞组合物可包括至少约 80%、至少约 85%、至少约 88%、至少约 89%、和至少约 90% 成纤维细胞。更具体地说,该组合物可包含至少约 91%、至少约 92%、至少约 93%、至少约 94%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、或至少约 99% 成纤维细胞。

[0080] 本发明的药物组合物可通过任何有效的施用途径施用。在具体实施方案中,施用途径是通过注射。在某些实施方案中,通过非常靠近表皮/真皮会合处的表皮下注射(真皮内)施用组合物。

[0081] 在没有进一步阐述的情况下,应认为,本领域技术人员使用先前的描述可最大程度地利用本发明。下面的实施例仅是说明性的,而不以任何方式限制本公开内容的其余部分。

实施例

[0082] 提出下面的实施例是为了向本领域普通技术人员提供如何制备和评估本文所描述和要求保护的化合物、组合物、物品、装置和/或方法的完整披露和说明,旨在纯粹地进行说明,而并非旨在限制本发明人认为的发明范围。已努力确保数值(例如,数量、温度等)的准确性,但本文也可能存在一些错误和偏差。除非另有说明,份是重量份,温度是摄氏度或在环境温度下,压力为在大气压下或接近大气压。有反应条件的众多改变和组合,例如组分浓度、所需溶剂、溶剂混合物、温度、压力和其他反应范围和条件,这些范围和条件可被用

于优化从所述方法得到的产物纯度和收率。仅需要合理的和常规的实验方法来优化这些方法条件。

[0083] 用于测试 KRT9 诱导的稳健系统。本发明人能够有效和快速地测试成纤维细胞诱导 KRT9 在角质形成细胞中表达的能力。在正常组织中, KRT9 被唯一表达在掌跖皮肤中(图 3)。有趣的是, 我们发现在掌跖部位中, 脚底具有更高的 KRT9 水平, 可能因为在该部位的更大压力。为了尝试重复这些发现, 我们着手稳健的体外系统。

[0084] 我们首先从手和脚(Hopkins IRB 批准的 NA_00033375)的掌跖和非掌跖部位获得人活检并使用传统方法扩增成纤维细胞。冷冻等份的成纤维细胞(P2)供将来使用, 然后解冻并扩增。我们从包皮切除物扩增角质形成细胞。然后使用理想比率(1 角质形成细胞(kers):4 成纤维细胞(fibros))和时间(3 天)的优化方案, 我们将这些细胞一起培养在传统的 2-D 板中并收获用于 qRT-PCR。

[0085] 我们发现, 掌跖成纤维细胞具有诱导 KRT9 的能力(图 4)。我们发现, 它们这样做是通过传代 16(they did so through passage 16), 且非掌跖细胞从来不自发这样做。正常情况下 KRT9 被表达在体内 KRT11+ 上基部细胞。因为 2D 系统由基底类型角蛋白表达(K4+、K15+、KRT11-)组成, KRT9 诱导水平比体内低。体外模型系统中 KRT9 低水平的另一个原因是被假定促进 KRT9 表达的压力缺乏。在掌跖表皮中, KRT9 大部分表达在乳突纹线中央, 乳突纹线被认为具有最高水平的压应力。尽管如此, 我们的体外结果还表明脚底成纤维细胞比手掌成纤维细胞诱导通常更高量的 KRT9($p = 0.1$)的重演。

[0086] 我们实验室还着手使用 3-D 培养物来评估掌跖成纤维细胞如何不仅影响 KRT9 表达, 还影响更广泛的掌跖表皮特征。该结果表明, 表皮使用掌跖成纤维细胞更厚(图 5), 与体内类似(图 1)。同样, 通过 RT-PCR 诱导 KRT9(17 倍)。

[0087] 作为对我们系统另外的验证, 我们已证实远端活性同源盒基因 HoxA13 对于诱导 KRT9 的必要性。扩增的掌跖成纤维细胞在与包皮角质形成细胞共培养之前用 siRNA 敲低(knockdown)处理。尽管模拟敲低细胞保留诱导 KRT9 的能力, HOXA13 缺陷的成纤维细胞失去该能力(图 6)。尽管该实验暗示, HOXA13 是 KRT9 诱导必需的, HOXA13 不可能特定参与掌跖表型。因为 HOXA13 对于远端身份是重要的, 其可能仅对于掌跖表型是允许的。它在背-腹图式发育(dorsal-ventral patterning)中没有起所述作用且没有与掌跖皮肤基因标志强烈相关(见以下)。

[0088] 保守掌跖基因标志的微阵列表征。尽管有为数不多的关于掌跖皮肤组织学的公开报道, 据我们所知没有报道描述这种独特的基因表达模式。我们因此执行了关于人完整组织(24)、表皮(24)/真皮(24)和培养的成纤维细胞(24)的详尽的微阵列以寻找保守的掌跖基因标志。对于统计学分析, 我们利用两种掌跖组织(手掌, 脚底)的存在以寻找共同基因。

[0089] 我们首先证实, KRT9 是掌跖表皮(44726 种转录本, $p = 0.0001$)中的最高表达基因。因为培养的掌跖成纤维细胞具有忠实地异位诱导 KRT9 的能力(图 4), 我们聚焦在这些细胞的基因表达。有趣的是, 同源盒基因 mRNA-在胚胎图式发育中是中心重要的-在成人掌跖成纤维细胞中仍高度丰富以大概保持其组织身份(PAX9、SHOX、LMX1b、EMX2;与表 1 中的非掌跖比较)。在比较中, 被公布促进 KRT9 表达的信号传导分子被相当低地表达(Wnt5a、DKK1;表 1)。我们因此假设, 成人皮肤组织身份被积极保持且对这些转录因子的操纵可允

许皮肤身份的转换。

[0090] 表 1:正常掌跖成纤维细胞基因标志的基因芯片结果。

[0091]

掌跖成纤维细胞中基因上升			
名称	46,878 种的排序	倍	p值
PAX9	19	2	0.004
WNT5a	168	1.5	0.058
DKK1	8396	1.2	0.744
掌跖成纤维细胞中基因下降			
名称	46,878 种的排序	倍	p值
SHOX	1	-4	0.005
LMX1b	162	-3.7	0.004
EMX2	9	-2.3	0.017

[0092] 对手和脚的人掌跖 / 非掌跖成纤维细胞 (P2) 的一式三份样品的 RNA Affymetrix Exon 芯片转录本丰度值进行 ANOVA 分析。

[0093] 基于我们的微阵列分析,我们聚焦在 LMX1b。杂合突变 (Heterozygous mutation) 导致甲髌综合征,在指甲背侧和髌骨具有缺陷 (OMIM 161200)。人类中没有公布纯合突变。然而,纯合敲除小鼠发展了腹侧结构重复。LMX1b 的胚后期功能是未知的。我们的假设是, LMX1b 可能是掌跖表型的主抑制物 - 甚至在成人期是活跃的。我们证实 LMX1b 在人掌跖完整真皮中几乎完全被抑制 (数据未显示)。然后我们证实, LMX1b 在掌跖成纤维细胞中被抑制 - 且注意到, LMX1b 不仅在掌跖 / 非掌跖而且较高 / 较低极点方面与 KRT9 水平负相关 (图 7)。

[0094] 作为确定 LMX1b 功能的第一步,我们下一步使用 siRNA 处理敲低 LMX1b (80% 减少) 以测试 LMX1b 是否诱导信号传导分子下降来促进掌跖表型 - DKK-1。我们发现, LMX1b 敲低的确增加 DKK-1 (图 8) 水平,表明 LMX1b 可能充当成纤维细胞中掌跖表型的抑制物。

[0095] LMX1b 是掌跖表型的主抑制物。为了探求 LMX1b 功能,然后我们测试在 LMX1b 敲低之下,成纤维细胞是否获取诱导 KRT9 的能力。实际上,如图 9 所示, LMX1b 的敲低允许来自脚背的非掌跖成纤维细胞在包皮角质形成细胞中诱导 KRT9。我们接下来测试 LMX1b 敲低是是否能够诱导非四肢成纤维细胞刺激 KRT9 表达。我们发现,来自包皮、耳、颊、唇和腹部的不同成纤维细胞阵列全都因 LMX1b 敲低而获取诱导 KRT9 的能力 (图 10)。这些结果清楚地显示 LMX1b 在不同成人成纤维细胞集合中抑制掌跖表型。

[0096] 在成纤维细胞中 LMX1b 敲低诱导非掌跖角质形成细胞中 KRT9 的能力给出了仔细分析通往掌跖表型的必要和充分途径的独特机会。为了这样做,我们询问哪些基因遵循以下三个标准: 1) 在手掌成纤维细胞中相对手背中高度丰富的基因, 2) 在脚底成纤维细胞中相对脚背中高度丰富的基因, 和 3) LMX1b 敲低后在不同的非四肢成纤维细胞中高度丰富的基因。

[0097] LMX1b 的候选下游基因。满足这些标准的主要候选基因之一是同源盒基因 PAX9。PAX9 是在掌跖组织中最丰富的转录因子 (表 1)。我们通过 RT-PCR 证实微阵列以验证 PAX9

是掌跖同源盒基因（图 11）。此外，LMX1b 在非掌跖成纤维细胞中的敲低导致显著增加的 PAX9 基因表达（图 12），与 LMX1b 敲除小鼠的结果一致。最后，PAX9 缺失小鼠（PAX9 null mice）本身显示四肢缺陷。这些数据表明，PAX9 诱导是在 LMX1b 抑制的下游。

[0098] 尽管 PAX9 在掌跖组织中被上调，可能其他基因在负责掌跖表型诱导的 LMX1b 敲低后被下调。除 LMX1b 以外在掌跖成纤维细胞中被抑制的顶部基因是 SHOX 和 EMX2（表 1）。我们在掌跖完整真皮阵列和掌跖完整组织甲基化阵列上发现类似模式。同样公布的关于 LMX1b 敲低四肢肢芽皮肤的阵列也显示 SHOX（图 13；小鼠同源物）和 EMX2（图 14）的抑制。从我们自己的 LMX1b 敲低的成纤维细胞在 24 小时的微阵列分析，我们还发现 EMX2（40%）和 SHOX（30%）的早期抑制均排序在大多数受抑制的转录本的顶部 5% 左右。因此在总计 3 种不同的体内微阵列研究和 2 种不同的敲低阵列研究中我们发现在掌跖组织或敲低 LMX1b 的条件下 SHOX/EMX2 的匹配抑制。这些结果再次强烈表明 SHOX/EMX2 抑制可能介导 LMX1b 敲低作用（图 1）。

[0099] 允许成纤维细胞在非掌跖角质形成细胞中诱导异位 KRT9 的转录因子和细胞信号传导剂的预示研究。多重证据线支持 PAX9 促进掌跖表型的作用。然而，还没有测试在成人四肢成纤维细胞中的功能获得或出生后作用。PAX9 被过表达和敲低以测试其对于在正常掌跖成纤维细胞和 LMX1b 敲低的成纤维细胞背景下 KRT9 诱导的充分性和必要性。

[0100] 确定了 PAX9 上调赋予非掌跖成纤维细胞在非掌跖角质形成细胞中诱导 KRT9 的能力是否是必要和 / 或充分的。我们首先集中注意力于 PAX9 敲低，使用在实验室建立的常规技术（图 6-10）。如在图 4、6 和 9 中，从 5 个人类捐赠者的广泛现有冷冻储存物中扩增掌跖和非掌跖成纤维细胞。使用错义 siRNA（Dharmacon D-001910-10-05）或 PAX9 siRNA（L-012242-00-0005）的敲低用 100 万成纤维细胞的核转染（nucleofection）（Lonza 4-D）进行。在 10cm²培养皿中铺板一天后，添加 250,000 个包皮角质形成细胞。3 天后，收获细胞并测试 KRT9 诱导。重复该实验，用敲低 LMX1b 的非掌跖成纤维细胞（对于 PAX9/LMX1b 双重敲低）代替掌跖成纤维细胞。

[0101] 在测试成纤维细胞 PAX9 在 KRT9 诱导上的必要性以后，测试其充分性。如图 15 中所见的，我们的实验室已经进行了瞬时转染用于过表达 GFP。我们已经购买 PAX9 cDNA（Gene ID#5083）并开始克隆到 pcDNA3.1 载体中。将 PAX9 或 GFP 核转染到非掌跖成纤维细胞中，然后与包皮角质形成细胞一起孵育并测试 KRT9。

[0102] 平行地，利用 RT-PCR 和蛋白质印迹来定量被操纵基因的过表达或表达不足的程度。用几个不同的 siRNA 种类证实了成功结果并与错义对照进行比较。最终，尝试援救研究，其中更大的被转染的转录本将克服限制 siRNA 的作用。

[0103] 基于我们显示在掌跖成纤维细胞中升高的 PAX9 和在非掌跖成纤维细胞中 LMX1b 敲低 / KRT9 诱导后增加的 PAX9 的广泛微阵列，我们预期 PAX9 在非掌跖成纤维细胞中过表达将赋予其诱导 KRT9 的能力。可能 PAX9 对于诱导也是必需的且 PAX9 的敲低将消除掌跖成纤维细胞或 LMX1b 敲低的非掌跖成纤维细胞诱导 KRT9 的能力。如果不是这种情况，这提高了其他同源盒转录因子可能补偿的局限。例如，关于几个体内阵列，我们还观察到同源盒 LHX2 和 LHX9 在掌跖成纤维细胞中的提高 - 尽管这些在具有诱导 KRT9 的能力的 LMX1b 敲低的成纤维细胞中没有被提高。这强调掌跖成纤维细胞和非掌跖 LMX1b 敲低的成纤维细胞诱导 KRT9 的机制不可能相同。尽管我们聚焦作为功能提示的重叠特征，冗余机制可能存在于

天然掌跖成纤维细胞中,其在 LMX1b 敲低的成纤维细胞中不存在。LHX2/9 可能是实例。因此,可能的是, PAX9 可能是在 LMX1b 敲低的非掌跖成纤维细胞中 KRT9 诱导所必需的,但由于冗余通路像 LHX2/9, PAX9 或许不是在掌跖成纤维细胞中必需的。因此替代方案将会测试 LHX2 或 LHX9 和 PAX9 的双重敲低。另一替代假设可能是,同时被 LMX1b (PAX9) 上调的转录本和被下调的那些 (SHOX/EMX2) 必须被协调修改来刺激 KRT9。另一替代努力会同时进行 PAX9 的敲入 (knock-in) 和 SHOX/EMX2 的敲低。

[0104] 确定了 SHOX/EMX2 下调赋予非掌跖成纤维细胞在非掌跖角质形成细胞中诱导 KRT9 的能力是否是必要和 / 或充分的。在这些实施方案中,研究了在掌跖成纤维细胞中被大部分下调的转录因子。两种转录因子在一起且在掌跖成纤维细胞中被最高抑制: SHOX 和 EMX2。我们发现, SHOX/EMX2 在掌跖成纤维细胞的保守 mRNA 标志中被下调 (表 1)。SHOX/EMX2 在四肢皮肤或在获得诱导异位 KRT9 能力的非掌跖成纤维细胞中被 LMX1b 敲低下调 (在 24 小时 30-40%; 数据未显示)。二者在 LMX1b 敲除小鼠中都被下调 (图 13 和 14)。而且, SHOX 和 EMX2 分别在发育中的四肢和脑中具有背侧局限的表达 (dorsum-limited expression)。这表明它们可能在多种组织中指定背侧与腹侧命运。而且,在改变的四肢发育 (兰格肢中骨发育不良 (Langer Mesomelic Dysplasia (OMIM#249700))) 的某些状况下, SHOX 是被突变的。EMX2 没有已知的四肢缺陷,但是对于两种基因来说,它们的出生后功能 - 在皮肤或其他部位 - 还未被检查。我们假设对于 LMX1b 来说,其在掌跖结构中持续抑制保持其不间断的身份。因此我们预测, SHOX/EMX2 下调可介导 KRT9 诱导并且在 LMX1b 抑制的下游。

[0105] 首先测试了 SHOX (Dharmacon L-011107-00-0005) 或 EMX2 (Dharmacon L-017904-00-0005) 敲低是否能够赋予非掌跖成纤维细胞诱导 KRT9 的能力 - 就像 LMX1b 敲低所做那样。接下来,然后测试了 EMX2 和 SHOX 的双重敲低对于 KRT9 诱导是否是叠加的 (相比于各自单独) 或必要的。在测试敲低赋予 KRT9 诱导的充分性之后, EMX2 (加 GFP 标签的 cDNA Origene RG228105)、SHOX (加 GFP 标签的 cDNA Origene RG218605) 和 GFP 质粒 (pCMV6-AC-GFP Origene PS100010) 以瞬时转染被过表达来确定是否下调是正常掌跖成纤维细胞诱导 KRT9 表达所必需的。EMX2、SHOX 或 GFP 质粒与 LMX1b siRNA 然后被过表达在非掌跖成纤维细胞中来确定是否这些细胞对 LMX1b 敲低的作用变得有抵抗力。

[0106] 我们预期腹侧命运的指定将同时需要 EMX2 和 SHOX 的抑制。尽管 LMX1b 敲除小鼠显示腹侧结构的完全复制,这在 EMX2 或 SHOX 敲除小鼠中并没有被观察到。因为 EMX2 和 SHOX 在 LMX1b 下游,且在腹侧组织中都被抑制,我们假设一个可能补偿另一个。我们因此还预期,两者中任一个的过表达将阻止 LMX1b 敲低赋予在非掌跖成纤维细胞中的 KRT9 诱导。类似地,两者中任一个的过表达将阻止掌跖成纤维细胞的正常诱导 KRT9 的能力。这些结果将帮助限定调控掌跖皮肤身份的遗传网络,并且增加了这是保持皮肤身份的活动进程的证据。

[0107] EMX2 和 SHOX 仍然仅代表一小组 LMX1b 下游转录因子。尽管可能 EMX2 和 SHOX 是优势下游因子,因为它们是仅有的同时出现在保守非掌跖基因列表 (手掌 & 足底) 和 LMX1b 敲低基因列表中的因子,但其他优势因子可能存在。替代方式可能就必须要以 LMX1b 进行 CHIP 阵列来确定第四阵列以限定下游基因。这会提供甚至更稳健的生物信息学平台来相互参照生物学相关基因。该目的的较小局限是 EMX2 或 SHOX 的 GFP 标签可能干扰功能的可能

性。替代方案将是使用可用的没有标签的 EMX2 和 SHOX cDNA。可替代地,我们将集中注意力于 Lmx1b 对释放的因子如 Dkk-1 的直接信号传导控制。其他考虑的替代领域包括掌跖诱导如掌跖结缔组织的完全非基因组机制且可能涉及评估去生机的掌跖真皮在接种非掌跖成纤维细胞后促进 KRT9 诱导的能力。

[0108] DKK-1 释放对于角质形成细胞与掌跖成纤维细胞、Lmx1b 敲低的非掌跖成纤维细胞和突变体的共同培养物中异位 KRT9 诱导的充分性和必要性。如以上所述,限定了控制成纤维细胞的掌跖身份和诱导 KRT9 的能力的转录因子。然而,对于完全的机械学洞察成纤维细胞对角质形成细胞的表型控制过程,我们还必须限定下游信号传导剂。这些剂甚至可能最终可用作除诱导异位掌跖皮肤的掌跖成纤维细胞之外的辅助疗法。这些实验聚焦于 DKK-1,其已经被提出抑制掌跖表皮中的黑素细胞功能。DKK-1 加至皮肤培养物还引起表皮增厚;其必要性没有被测试。而且,DKK-1 导致诱导 KRT9 的充分性和必要性还没有被测试。最后,DKK-1 介导 LMX1b 敲低的成纤维细胞诱导 KRT9 的能力的必要性也没有被测试。支持 DKK-1 可能的作用,我们发现 DKK-1 在 LMX1b 敲低后的确增加了,与诱导 KRT9 的能力一致(图 8)。因此 DKK-1 在 KRT9 诱导场景中的充分性和必要性被测试-首次在正常掌跖成纤维细胞中,且如果成功的话然后在突变体中测试。

[0109] 首先,通过添加 $0.03 \mu\text{g/ml}$ rDkk-1 (R&D 5439-DK) 到包皮角质形成细胞培养物中 24 小时(基于共培养条件)然后测量 KRT9 诱导来测试充分性。为了测试必要性,如上述开始共培养。与角质形成细胞的加入一致,添加 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 中和 Dkk-1 抗体 (R&D AF1096),其显示降低 Dkk-1 活性 50%,更高浓度阻断 >90%。在共培养后,如以上对 KRT9 所述进行定量 RT-PCR。测试掌跖成纤维细胞,并且如果成功的话,测试 LMX1b 敲低的成纤维细胞。如果 PAX9 敲入或 EMX2/SHOX 敲低成功诱导 KRT9,那么也测试这些突变体的 DKK-1 必要性。

[0110] 我们预期 DKK-1 对于 KRT9 诱导将是充分的,如 wnt5a 已经显示的那样。我们还预期对于掌跖成纤维细胞、LMX1b 敲低的成纤维细胞和可能的 PAX9/SHOX/EMX2 突变体,诱导 KRT9 将部分需要 DKK-1。如果我们以上假设得不到实验证据支持,那么必须考虑其他信号传导剂。已经公布 wnt5a 对于 KRT9 诱导是充分的,且 wnt5a 在我们的掌跖成纤维细胞阵列上被升高(表 1)。尽管我们发现它在 Lmx1b 敲低后仅被略微升高,这是要考虑的替代方案。为了鉴定其他候选物,我们对我们的基因列表进行生物信息学来鉴定那些在掌跖成纤维细胞中被正常升高且在 LMX1b 敲低中也被升高的信号传导剂。这些候选物可被作为替代方法追随且包括:IL-24(顶部 98.8th百分位)、IL-12A(98.6th)以及较少被研究的细胞外信号物(signalers)如 SEMA3a(99.2th)和 TFPI2(99.2th)。

[0111] 尽管 LMX1b 敲低和可能的 PAX9/SHOX/EMX2 调节可能刺激 KRT9-且可能甚至需要 DKK1-仍可能的是完全掌跖表型可能不被单基因/蛋白操作诱导,甚至 LMX1b 敲低的成纤维细胞的掌跖诱导手段可能代表一小组正常掌跖诱导的体内机制。有多个证据线支持单因素像 LMX1b 敲低确实能够完全概括正常掌跖诱导的可能性。首先,我们发现正常掌跖成纤维细胞和 LMX1b 敲低的成纤维细胞在相同程度上诱导 KRT9-约 3-4 倍(图 4&10)。第二,KRT9 是上基部的角蛋白并因此是掌跖身份的晚期标志物。第三,可能一组有限的细胞外信号传导提示将限定掌跖身份,并且如果在掌跖和 LMX1b 敲低的非掌跖成纤维细胞中不相同的话这些将是高度重叠的。最后,LMX1b 敲除的小鼠显示腹侧结构的完全复制,这是所有证据中最让人信服的。然而,因为 DKK-1/PAX9 上调和 SHOX/EMX2 下调在 LMX1b 下游,用这些操作

的剂没有能关于成纤维细胞做出相当的论证。因此,替代目的将是限定暴露于这些细胞的“掌跖化 (volarized)”角质形成细胞的转录特征并将它们与天然掌跖角质形成细胞进行比较。类似地,以 3-D 培养物比较 (图 5) 能够限定任何表型区别。这种替代目的的结果将限定在操作这些掌跖因子后部分“掌跖化”是否出现并支持对其他信号的进一步寻找。

[0112] 如果我们的结果没有匹配这些预料,那么另一局限是体内信号可能与提出的体外测试表现不同。因此,另一替代将是使用小鼠模型如使可用的 Col1^{1a2-cre-er} 小鼠 (JAX#016237)) 与 floxed LMX1b 杂交来观察有多少成人组织身份可被完全转换。我们已经获取了 floxed LMX1b 小鼠 (Randy Johnson, MD Anderson ;见支持信) 来准备这种可能性。如果这些小鼠例如具有背部皮肤掌跖化,那么我们将拥有使用外源蛋白或抑制抗体限定负责的信号传导剂的体内系统。

[0113] 使用体外和体内模型对保持非掌跖皮肤身份的组织稳态机制的预言研究。确定在非掌跖成纤维细胞的存在下掌跖成纤维细胞诱导 KRT9 是否被抑制。为了克服任何抑制,在体外和体内测定中限定加入的掌跖成纤维细胞与确立的非掌跖成纤维细胞 / 角质形成细胞用于 KRT9 诱导的理想比例。

[0114] 组织身份是相当静止的。尽管有持久的细胞更新,即使相邻皮肤区域如在掌跖到非掌跖的过渡区域都保持其身份。因此,冗余机制保持组织身份的情况是可能的。这些已在基因水平例如以表观遗传机制被研究。然而,根据我们知识,还没有进行关于如何保持多细胞组织身份的研究。随着细胞疗法的使用,这些问题在再生医学中将变得日益重要。本发明人致力于如下假设:在掌跖组织转换的情况下,非掌跖成纤维细胞抑制掌跖成纤维细胞在角质形成细胞中诱导异位 KRT9 的能力。在该过程中,限定了用于优化人临床试验的参数。尽管 2-D 细胞培养系统具有速度和再现性的优势,考虑到对我们最终人类使用目标的更大应用性,平行进行体内小鼠 HAT 测定 (图 16) 实验。

[0115] 我们已经确立,当 1 百万掌跖成纤维细胞被加至 250,000 个非掌跖角质形成细胞时 KRT9 被诱导大致 3-4 倍。这里,首先确立增加量的非掌跖成纤维细胞与 250,000 个非掌跖角质形成细胞的共培养。然后添加一百万掌跖成纤维细胞来确定 KRT9 诱导被抑制的程度 (平均 3-4 倍)。然后我们确定在哪个掌跖:非掌跖成纤维细胞比例 KRT9 抑制最小化。还测试了是否来自非掌跖成纤维细胞的的条件培养基介导这种抑制作用,因为成纤维细胞具有很少的细胞对细胞接触。对于体内研究,进行了在 HAT 测定中的类似研究 (图 16)。本发明人已经历在皮下注射和在 Lichti hat 模型中从细胞浆液 (cell slurry) 重建完整毛囊 (图 16)。这里,将人非掌跖成纤维细胞 (1 千万) 和角质形成细胞 (1 千万) 组合在 SCID 小鼠的 1cm 直径硅“hat”室中重建非掌跖皮肤。在移植物成活后 (4 周),执行表皮下注射 10 万、100 万和 1 千万掌跖成纤维细胞,然后按我们对小鼠常规所做的那样使用无创共聚焦扫描激光显微镜测量表皮厚度。鉴于典型的重建时间线,我们估计增厚发生在第 3-4 周 (图 5)。然后将移植物切除并通过组织学测量表皮厚度以及通过 qRT-PCR 测量 KRT9 水平来限定哪个比例最佳“掌跖化”皮肤。

[0116] 我们预期,非掌跖成纤维细胞将抑制掌跖成纤维细胞的 KRT9 诱导。成功的证据是与诱导掌跖表型及其功能相关的配体。例如, wnt5a 被公布诱导 KRT9。wnt5a 激活不依赖于 β -连环蛋白的通路。类似地,我们已经证实, wnt 抑制性蛋白 DKK-1 在掌跖组织中被升高 (图 8) 且其显示降低掌跖皮肤中的黑素细胞功能。考虑到标准 wnt 在促进毛囊形态发

生和周期变化中的作用,毛囊在掌跖皮肤中不存在,以及 wnt5a/Dkk-1 的上调,掌跖皮肤可能是标准 wnt 不足环境的产物。因此, wnt 在非掌跖成纤维细胞中的存在将可能抑制 KRT9 诱导。确定这种抑制的精确程度对于测量克服这种抑制所必需的掌跖成纤维细胞的理想升高比例是重要的。然后可直接使用这个比例基于已知的非掌跖成纤维细胞的密度确定掌跖成纤维细胞注射的数量。

[0117] 我们预期,非掌跖成纤维细胞的这种负面效应可能存在于来自非掌跖成纤维细胞的条件培养基。这种预期的证据是考虑到广泛的基底膜,在皮肤上皮间质相互作用中成纤维细胞和角质形成细胞存在很少物理接触。因此 KRT9 表达的调节可能唯一通过旁分泌信号传导分子发生。

[0118] 局限是如下的可能性:KRT9 诱导的抑制将不会从非掌跖成纤维细胞发生。如果是这样的情况,那么这对于这种疗法预兆良好。另一局限是体内动物实验的相对困难;替代方案将是使用 3-D 系统(图 5)。最后的局限是同时我们将不限定抑制 KRT9 诱导性的特定因素。一种替代方案将是使用蛋白尺寸排阻柱对介质分级,接着是质谱筛选负责的级分,但这在基金的范围之外。

[0119] 然后确定少数掌跖成纤维细胞在多数非掌跖成纤维细胞培养物中是否具有降低的存活、增殖或基因表达。限定以掌跖成纤维细胞连续注射到非掌跖成纤维细胞/角质形成细胞分次给药是否可能在体外和体内测定中克服这种间接效应并增强 KRT9 诱导。

[0120] 如以上所提到的,多种机制可能保持组织身份。例如,在创伤期间循环的成纤维细胞或迁移成纤维细胞可能死亡或以其目的采用其周围细胞的表型。然而,真皮成纤维细胞默认是保持其身份,甚至在从身体移出后。之前的研究显示,真皮成纤维细胞在培养物中保持其 hox 标志。我们的结果显示保守的掌跖表型,确证该组的发现(表 1)。这是一个反论:如果成纤维细胞按默认保持其位置记忆,在异位成纤维细胞的情况诸如在创伤期间的迁移异位成纤维细胞或血源性接种的异位成纤维细胞将发生的情况中的这种记忆丢失是怎样的?克服这些机制对于异位注射成纤维细胞以诱导 KRT9 将是重要的。我们假设,细胞信号传导发生在多数成纤维细胞群体中以保持其身份;少数群体将显示减少的增殖、存活或天然基因表达。该原理将在体外和体内测试这种假设。

[0121] 我们的第一个努力将是在成纤维细胞共培养实验中定量少数位点不匹配的成纤维细胞相比于多数群体中的存活、增殖和基因表达。在放置在共培养物中之前使用已建立的用于细胞标记的市售技术。具体地说,利用 Cell Trace CFSE(绿色)和 Cell Trace Violet 细胞标记,其直到 10 个细胞代是稳定的,没有转移到相邻细胞,且能通过流式细胞术区分。这些方法已经被验证和公布,多数用于 T 细胞激活研究,但也用于粘附细胞。增殖和坏死通过每个不同群体的流式细胞术解析来定量。还利用细胞分选通过 RT-PCR 分析基因表达。

[0122] 我们将首先在同质群体中使用绿色和紫色染料执行阳性对照。具体地说,我们将用绿色标记一小组掌跖细胞,以及用紫色标记更大的掌跖细胞群体。我们将证实,这些在均质群体中不同标记的组具有相同的增殖、细胞死亡和基因表达速率。我们将对非掌跖细胞执行相同实验。对于二者我们将使用血清饥饿和血清加入的成纤维细胞作为阳性对照来显示增殖上的差异。在证实这些对照后,我们将分别在多数非掌跖和掌跖群体中标记少数掌跖和非掌跖群体。我们将使用解析流来确定高达 10 群体倍增,并在少数群体中测量增殖或

坏死上的差异 (DAPI 排除, 具有 UV 激光器的 LSRIIb)。我们将分选少数和多数群体的 RNA 提取和 qRT-PCR 来观察例如是否在少数掌跖群体中 PAX9 表达减少和 LMX1b 表达增加 – 所以它们随时间匹配周围的成纤维细胞。

[0123] 我们将确定非掌跖成纤维细胞抑制掌跖成纤维细胞活性的作用所需的时间长度。然后我们将测试在掌跖成纤维细胞到非掌跖成纤维细胞 / 角质形成细胞共培养物中的这种逝去的间隔之前连续注射是否将增加 KRT9 诱导。

[0124] 我们将用动物模型平行测试。我们将订购近交性别和品种 (HLA 匹配的 ;FVB) 小鼠, 带有组成性萤光素酶作为转基因的小鼠 (JAX#008450)。成纤维细胞将从转基因小鼠的不同区域 (后肢、背、爪 & 腹部) 培养, 被扩增到 1 百万成纤维细胞并以相同数目同局部地 (同位置) 或异局部地 (不匹配的部位) 在 HLA 匹配的转基因宿主中注射。移植存活将通过整个小鼠无创 IVIS 萤光素酶成像 (在我们的动物设施中可用) 经 4 周过程来测量。我们将定量是否异位移植植物相比同位移植植物具有减少的存活。

[0125] 预期结果、局限和替代方案: 鉴于每种组织固定的身份, 尽管有损伤和持续的细胞更新, 我们预测组织水平的稳态机制保持组织身份。(如果不是这种情况, 见以下局限)。我们清楚地证明, 掌跖和非掌跖成纤维细胞在培养物中保持非常不同的 mRNA 表达标志 (表 1)。这些导致我们也已经注意到的表型差异, 例如脚底成纤维细胞在晚期传代时增殖更慢 (图 17)。然而, 我们没有测试混合群体的效应。我们预期, 以培养细胞释放未经鉴定的自分泌因子 (其需要细胞以最小密度接种) 相同的方式, 体内部位特异性成纤维细胞将是同位的 (homotrophic)。

[0126] 除了用于抑制异位成纤维细胞的这种理论证据以外, 在使用自体成纤维细胞治疗皱纹中的实践经验也支持这些机制。这些试验全包括不匹配的成纤维细胞的连续注射且连续注射也被推荐用于临床使用。如果异位成纤维细胞同等存活, 将不需要重复注射 – 但需要重复注射。我们假设天然成纤维细胞将压制异位的部位不匹配的成纤维细胞。这种目的的重要性是创建展示这种效应的体外系统作为仔细分析其机制的序曲。

[0127] 我们预期在多数非掌跖成纤维细胞的存在下, 少数掌跖成纤维细胞 – 相比于其在同质单独培养物中的状态 – 将展示减少的增殖、增加的细胞死亡、减少的 PAX9 和增加的 LMX1b、SHOX 或 EMX2 的某种组合。鉴于 KRT9 诱导的 3 天时间范围, 我们预期这种效应发生在 48 小时后, 且分开的每 48 小时连续注射将优于一次给予相等总量。

[0128] 这种目的的主要局限是如下可能性: 在多数非掌跖成纤维细胞共培养物中不存在少数掌跖成纤维细胞群体的抑制。尽管这似乎不可能, 这种阴性结果本身将是启蒙性的且对于目的 3 预兆良好。另一局限 (也适用于目的 2c) 是体内动物实验的相对困难; 替代方案将是使用 3-D 系统 (图 5)。体外努力的局限是如下可能性: 其他组织组分如细胞外基质、角质形成细胞或在这些成纤维细胞共培养物中不存在的某种其他元件可能保持非掌跖组织身份; 因此我们还将平行测试体内模型。

[0129] 2c: 使用体外和体内模型确定创伤是否在具有掌跖与非掌跖成纤维细胞的可变比例的非掌跖角质形成细胞培养物中增大 KRT9 诱导。测试是否成熟角质形成细胞相比新生角质形成细胞具有相似的 KRT9 诱导潜力。

[0130] 原理: 组织转换方法存在于小鼠中。如图 16 所示, 将适当的细胞浆液加至室容许毛囊的重建。创伤转换静止的生长终期毛囊进入生长初期。同样在小鼠中, 大的切除性创伤

允许完全重编程和用于伤疤中央新毛囊器官发生的胚胎发生的从头重演。在人类,治疗光老化的激光疗法也被假设凭借创伤“复原”组织功能。实际上,烧蚀性更强的激光是更成功的疗法。所有这些现象利用创伤环境。因此我们假设,创伤可能容许身份转换的窗户且事实上缓和和对天然非掌跖成纤维细胞在加入掌跖成纤维细胞时的 KRT9 诱导的任何直接(目的 2a)或间接(目的 2b)抑制。

[0131] 这个目的的另一原理是测试成熟角质形成细胞相比新生角质形成细胞 KRT9 诱导的潜力。尽管对于这份基金中的初步数据来说我们已经证明包皮角质形成细胞的 KRT9 诱导的多个实例(图 4、6、9&10),我们本身没有测试成熟角质形成细胞。存在许多证据预测成熟角质形成细胞将具有与新生角质形成细胞等同的诱导。Yamaguchi 等人显示当被移植到掌跖真皮时,成熟非掌跖表达丰富的 KRT9(见重新提交的引言(Introduction to Resubmission);图 0),他的小组在单独研究中重复了该结论。我们的研究和其他的研究已显示成熟角质形成细胞甚至以毛发诱导性成纤维细胞转换为皮质腺细胞(sebocytes)的能力。尽管如此,这将是测试的重要变量。

[0132] 方法:在目的 2a 中我们将优化添加的掌跖成纤维细胞与现有的非掌跖成纤维细胞/角质形成细胞共培养物的理想比例。在这个目的中,我们将建立非掌跖成纤维细胞/角质形成细胞共培养物。我们将然后对选定的板进行抓伤,然后添加在目的 2a 中被发现仅部分诱导 KRT9 的次优量的掌跖成纤维细胞。我们将测试是否 KRT9 诱导被增大。

[0133] 在目的 2b 中我们将限定异位掌跖成纤维细胞连续应用到现有的非掌跖/角质形成细胞共培养物的理想份用量。与以上类似,我们将测试在异位掌跖成纤维细胞的次优份用量之前的连续搔抓是否将增强 KRT9 诱导。

[0134] 而且,如在目的 2a 中那样,我们将使用 HAT 测定(图 16)来创建非掌跖人表皮。与那些已提出的实验的仅有的差别将是,在表皮下注射次优数目的掌跖成纤维细胞之前,我们在皮肤中进行针穿刺(needle puncture)以测试增强的 KRT9。

[0135] 最后,我们添加掌跖成纤维细胞到成熟或新生包皮以测试 KRT9 诱导。

[0136] 预期的结果、局限和替代方案:我们期望,在培养物或 HAT 体内测定中创伤将增强 KRT9 诱导。如果不是这样,我们就考虑交替的创伤方法。例如,我们组具有创伤诱导的毛发新生模型的大量经验。不是毛发新生,如果掌跖成纤维细胞被注入伤口,掌跖皮肤重建会发生吗?这个目的的主要局限是如下可能性:创伤将不增强植入。其他增强植入的替代方法可能是用生长因子预先处理掌跖成纤维细胞,但这会使用于在人受试者中测试的调控途径相当复杂。测试的其他因子将是掌跖 ECM 蛋白。

[0137] 我们预测,成熟和新生角质形成细胞将具有相等的体外诱导 KRT9 潜力。如果情况不是这样,鉴于成熟异位 KRT9 表达的体内证据,这可能是体外系统的伪象。替代方案将是如以上 HAT 测定那样的体内测试。如果实际情况是成熟角质形成细胞具有抑制的 KRT9 诱导能力,那么我们可以测试方法如以上的创伤来增强那种能力。

[0138] 自体人掌跖成纤维细胞诱导掌跖表皮基因表达的能力的预示临床试验。细胞疗法在再生医学里前景广阔但以非常不发达的形式存在。同种异体产物如活的角质形成细胞/成纤维细胞双层移植体(Apligraf)或仅有活的成纤维细胞的移植体(Dermagraft)被用作创伤疗法。近来自体成纤维细胞已被 FDA 批准并作为可注射的填料(Fibrocell)被市售用于治疗皱纹。尽管有这种相当大的临床努力,根据我们的知识,人类细胞植入的优化还没有

实现。部分上这是因为这些指征都没有用于优化的清晰的量化分子终点。

[0139] 这个实施例的中心意义是, KRT9 和转换成掌跖皮肤呈现了理想的测试实例来开始回答有关细胞治疗效力的基础临床问题。本发明人将活检掌跖和非掌跖皮肤, 在临床验证的霍普金斯细胞治疗中心 (Hopkins Cellular Therapy Core) 扩增成纤维细胞并体外验证异位诱导 KRT9 的能力以用于 FDA 试验性新药应用 (Investigational New Drug Application, IND) 的目的。

[0140] 所有的细胞临床工作将在霍普金斯细胞治疗中心完成, 该中心具有被管理组织的完备监管批准 (CLIA、FACT、AABB&CAP)。关于临床使用自体细胞的实际问题包括限定关于细胞扩增的精确变量: 在 4 周内扩增的成纤维细胞总数、纯度验证和在标准临床生产中的效力验证。对于扩增, 以下将是更好的: 避免我们正在使用的 10% FBS 制剂以降低未来成本和具有来自扩增间质干细胞产业努力的市场需求的 FBS 市场的可能缺乏。因此我们将测试 0% 或 2% 补充的“无血清”成纤维细胞介质如 Millipore FibroGRO (SCMF001) 和 Lonza FBM/FGM-2 (CC03132)。FDA 已经评论, 鉴于细胞在扩增过程中的最小操作, 致癌性测试不是必需的。纯度验证将通过用波形蛋白染色完成。我们还将比较非掌跖与掌跖成纤维细胞中 CD24 的存在。CD24 是掌跖成纤维细胞中丰富的第 87 高转录本 (46, 878 种中; 表 1)。这可能是用于定量掌跖成纤维细胞纯度的另一候选。对于最后的临床使用, 掌跖细胞将在霍普金斯细胞治疗中心扩增。在某些实施方案中, 为最终临床使用容易, 测试 GMP 扩增后的冷冻细胞的效力。我们已经测试, 解冻的细胞在我们的研究实验室有效 (图 4、6&9), 但在 GMP 背景下还没有这样做。因此我们将评定最近解冻的掌跖成纤维细胞是否也具有诱导 KRT9 的能力。

[0141] 我们预测, Millipore 和 Lonza 介质将容许等同的 KRT9 诱导。鉴于我们的培养条件, 我们期望对于波形蛋白阳性的细胞来说纯度是在 90% 以上。我们预测 CD24 在掌跖组织中略微升高但不是唯一升高。

[0142] 在 FDA 和 IRB 批准后, 本发明人在成对的臀部区域注射自体掌跖和非掌跖成纤维细胞。在无创成像显示增厚的表皮/角质层之后将所注射的细胞和其上的表皮通过皮肤活检除去。出于安全性原因, 在鉴定表型的改变后除去整个注射区域是理想的。

[0143] 跖 (脚底) 和非跖 (脚) 3mm 打孔活检将从知情同意的受试者取得。成纤维细胞将如我们所做的那样从这些组织扩增 (图 4-13), 但利用低 FBS 介质制剂。如果发现冷冻细胞诱导 KRT9 表达仍有效, 那么将细胞等份冷冻在标准临床细胞冷冻介质中 (在无菌盐水中的 2.5% 人血清白蛋白、5% DMSO、6% 羟乙基淀粉)。每等份冷冻物将等于单剂量。在特殊实施方案中, 总体积将是 700 μ l - 细胞没有从以下逃跑的表皮下注射限度: 在常规临床利多卡因注射期间在 PI 经历中皮肤中的浓缩的 5mm 直径“水泡 (bleb)”和在几乎 10 个活细胞表皮下癌症疫苗免疫试验中的细胞治疗核。细胞总数可以变化。在一些实施方案中, 细胞的绝对上限将是 3 千万掌跖细胞。在某些实施方案中, 我们基于我们角质形成细胞与成纤维细胞的体外比例预测该数目将是 1 千万。

[0144] 冷冻细胞将用 PBS 洗涤。我们将进行臀部的在左侧的 3 个注射区域 (掌跖) 和在右侧的 3 个区域 (非掌跖)。注射部位将被仔细标记、测量和摄影, 用和不用用来标记界标 (即臀部的痣、血管瘤、骶髂关节、沟) 和注射部位的透明纸。2 周后, 我们将用光学相干断层扫描 (OCT) 执行每周然后每月监测表皮厚度, OCT 我们已经对人受试者测试验证其可行

性（图 18）。我们将定量表皮厚度。一旦厚度显示增加我们将进行 6mm 打孔来移除 1/2 受试者中的整个注射区域。其余受试者将被监测 6 个月时间以在 6 个月时间结束时用活检确定增加的表皮厚度的效应的寿命。

[0145] 我们想象在注射过程中将发生成纤维细胞的某种渗漏，但因为我们将注射比认为必需的量多 20% 的细胞，这本身不应该是问题。鉴于我们在霍普金斯皮肤病学临床转化单位 (Hopkins Dermatology Clinical Translational Unit) 的多次类似和成功的临床研究，我们预测容易鉴定注射部位。替代方案将是较高浓度和较低浓度尝试剂量逐渐升高研究，以及分开给药研究。另外的替代方案将是测试损伤如表面皮肤磨削术或烧蚀激光是否增强注射细胞的效应。完全替代假设是，来自掌跖真皮的结缔组织材料可能增强掌跖诱导；对去生机的掌跖真皮与非掌跖真皮接种非掌跖成纤维细胞和角质形成细胞是测试这种假设的一种手段。

[0146] 通过组织学和 RT-PCR 分析表皮的掌跖表型特征 (KRT9、表皮厚度、角质层厚度、PAX9^高、LMX1b^低、EMX2^低、SHOX^低 成纤维细胞的存在。尽管掌跖注射区域的表型分型可能显示总的改变如比非掌跖注射区域更大的表皮厚度，更精细的分子变化可能发生，其将需要仔细测试。我们利用这些转录因子的重要性的验证来使用它们作为标志物以追踪异位成纤维细胞的存在和持久性。

[0147] 6mm 打孔物被一分为二。一半被送去石蜡包埋并染色 H&E 以及 KRT9。另一半被均质处理用于 qRT-PCR。测定了 KRT9、PAX9、LMX1b、EMX2、SHOX 和如在表皮微阵列中限定的其他标志物。

[0148] 我们预期如我们在体外所见，掌跖细胞增加 KRT9 mRNA 和表皮厚度，但没有到体内水平。我们期望如下阳性结果：PAX9 在掌跖注射部位增加，且同样 EMX2、SHOX 和 LMX1b 更低。我们怀疑，掌跖表型的完全转换需要更大的压力和摩擦，如在手掌和脚底中所见那样。

[0149] 这个目的的局限是如下可能性：6 个月时间点后显示更大改变。替代方案将是迟的时间过程研究。另一局限是压力 - 用掌跖成纤维细胞 - 可能是完全诱导 KRT9 的重要因素；截肢者测试（见以下）可能实际显示比这些初始试验更好的结果，纵然这是一个易受伤群体。

[0150] 对截肢者应用：本文描述了在截肢者的残肢部位创建异位掌跖皮肤。用体外和动物模型限定最佳剂量和频率，并在健康个体的概念验证研究中测试将非掌跖转换为掌跖皮肤的能力。来自以上的结果将验证标志物来测试掌跖成纤维细胞在截肢者中的持久性。同样来自以上的结果将告知在未来试验中测试的精确剂量和频率。以上的这些结果还鉴定响应的程度和寿命，这将直接告知未来试验的设计。我们提出在这份基金完成后将在更正式的 1/2 期人试验中在健康受试者中再次优化细胞递送的理想剂量和频率（这里仅在动物和体外模型中优化）。仅在完成这项第二健康受试者研究后我们将尝试对易受伤的截肢群体试验。在该试验中（2/3 期）我们将根据增加的残肢区域按比例放大要注射的细胞的数目和体积。鉴于以下我们预测这将是可行的：在成纤维细胞培养物后期加倍时细胞数目大增加和环块 (ring-block) 用于门诊环境中的麻醉。重要的是我们将在后续试验聚焦假体增加的可用性的测量。

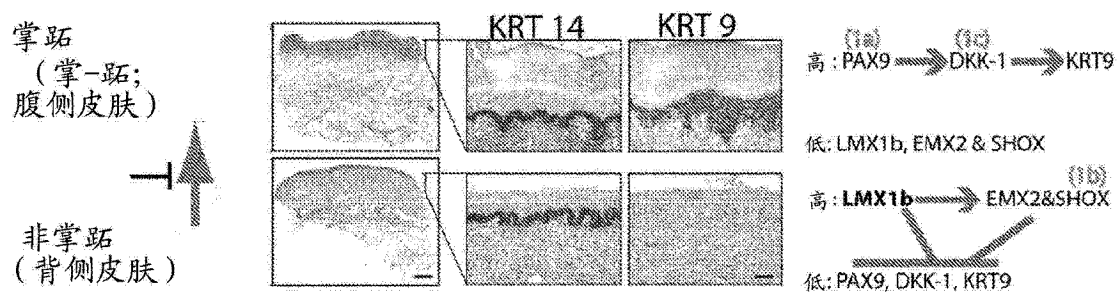


图 1

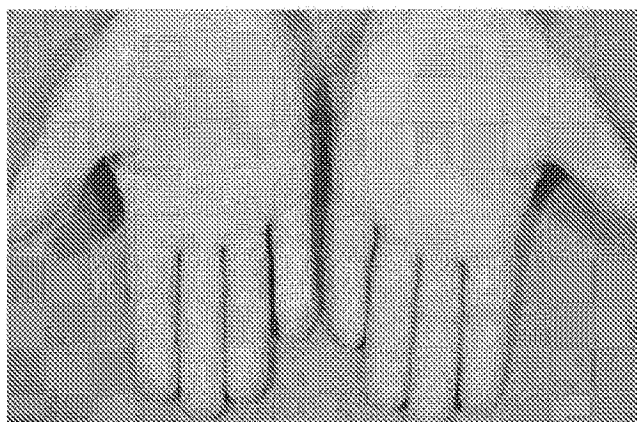


图 2A

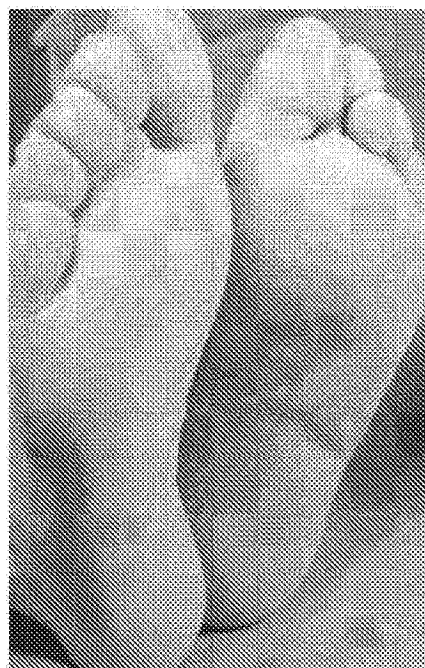


图 2B

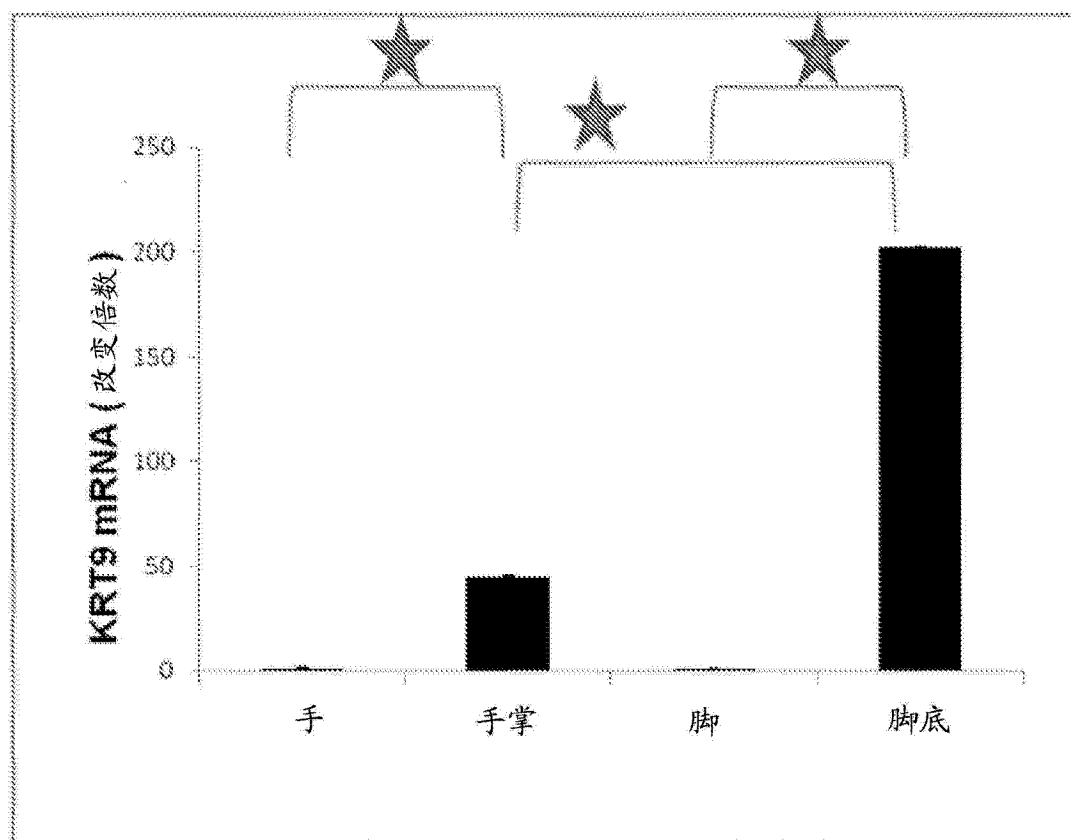


图 3

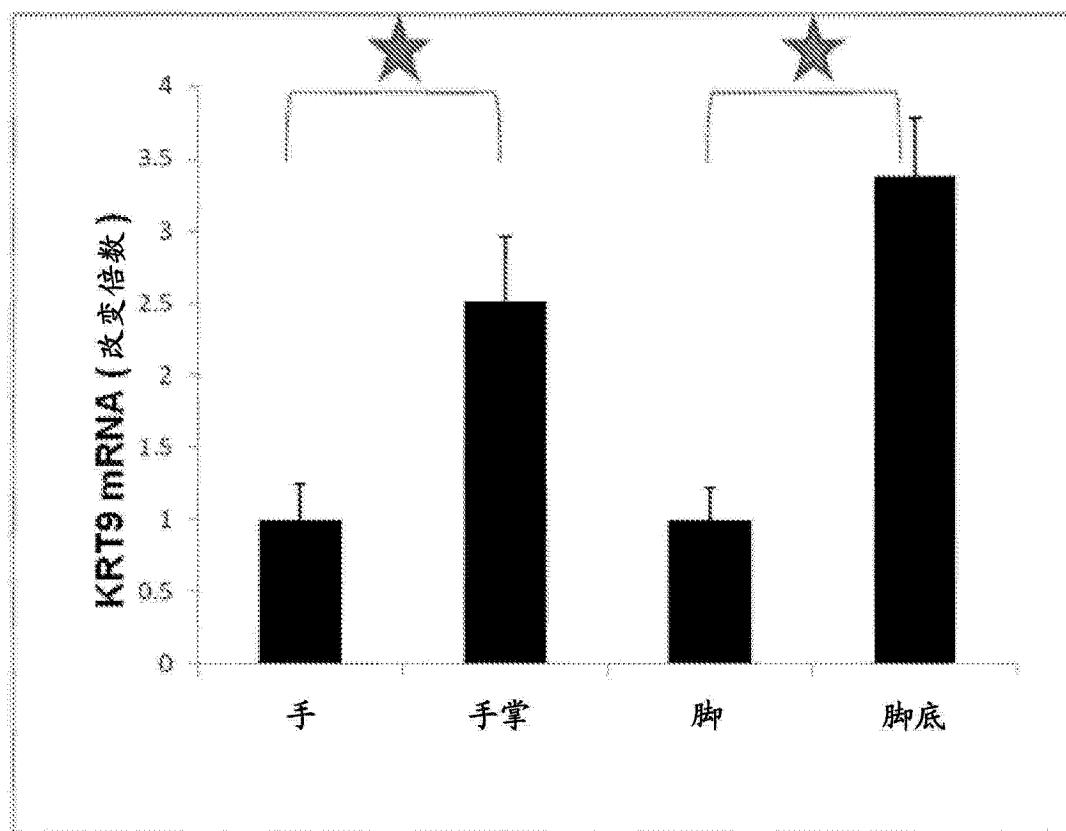


图 4

非掌跖成
纤维细胞

掌跖成
纤维细胞

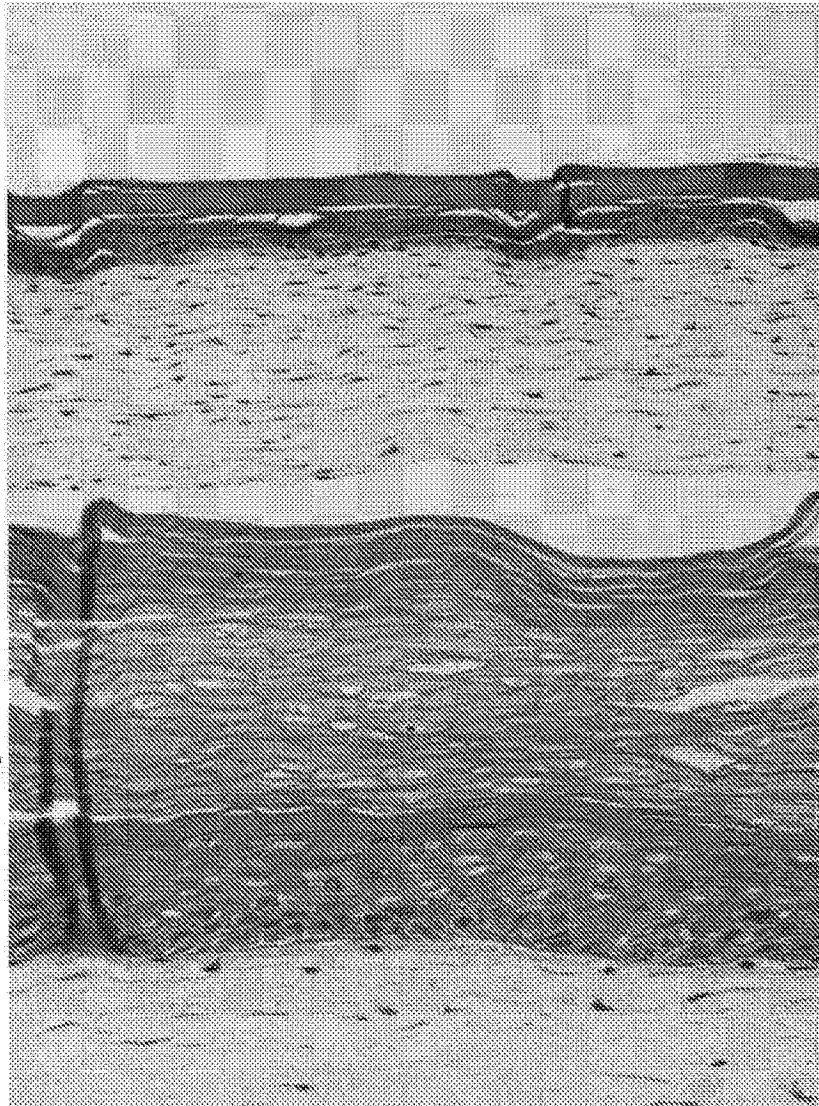


图 5

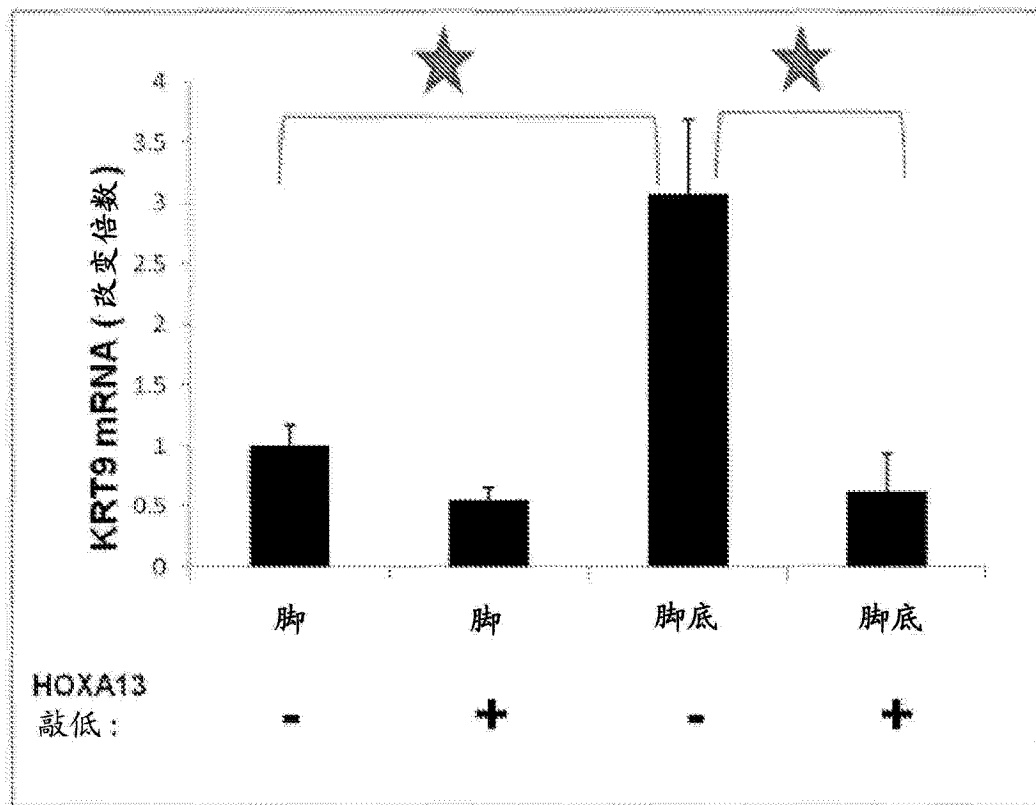


图 6

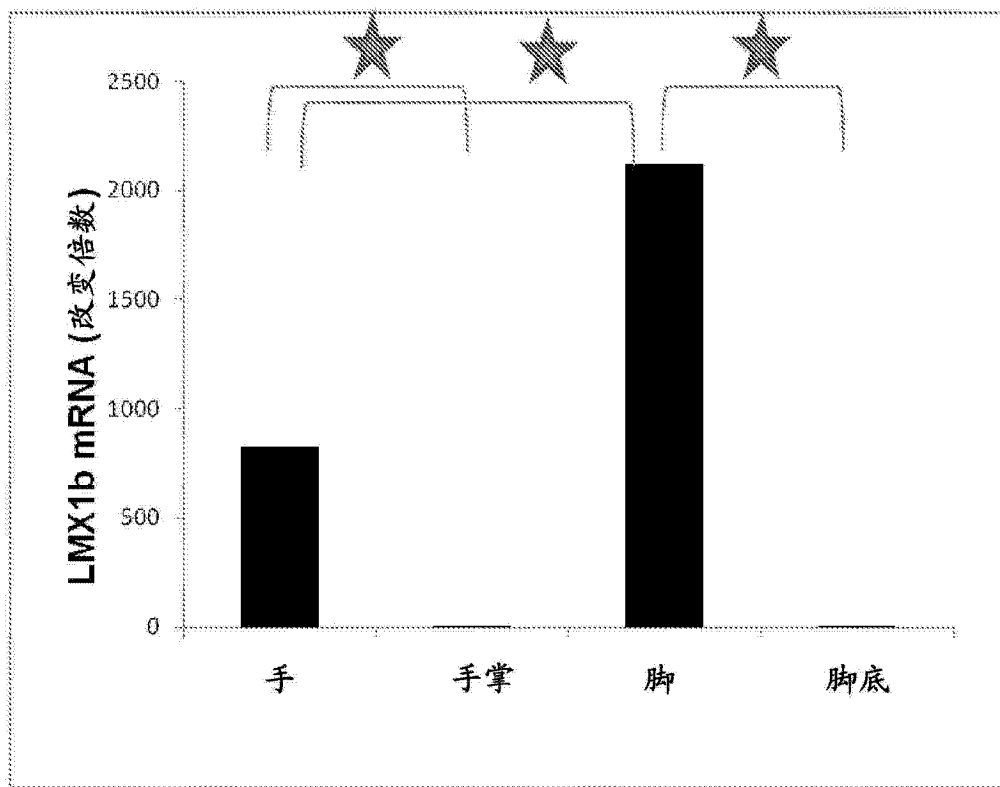


图 7

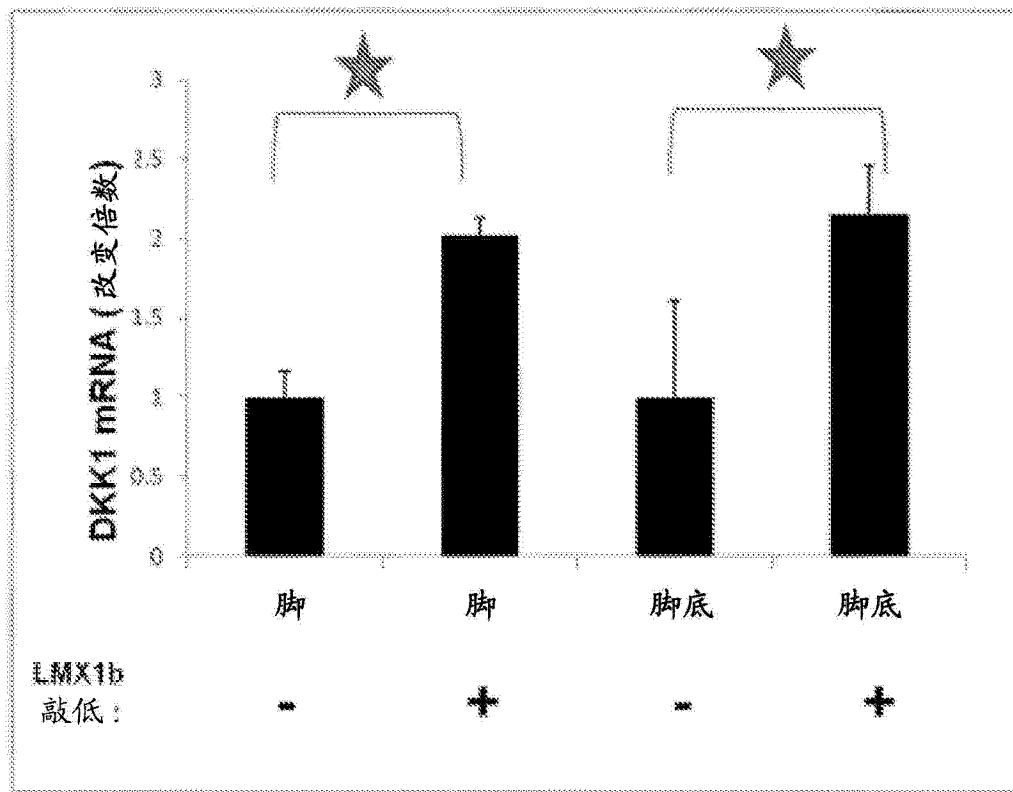


图 8

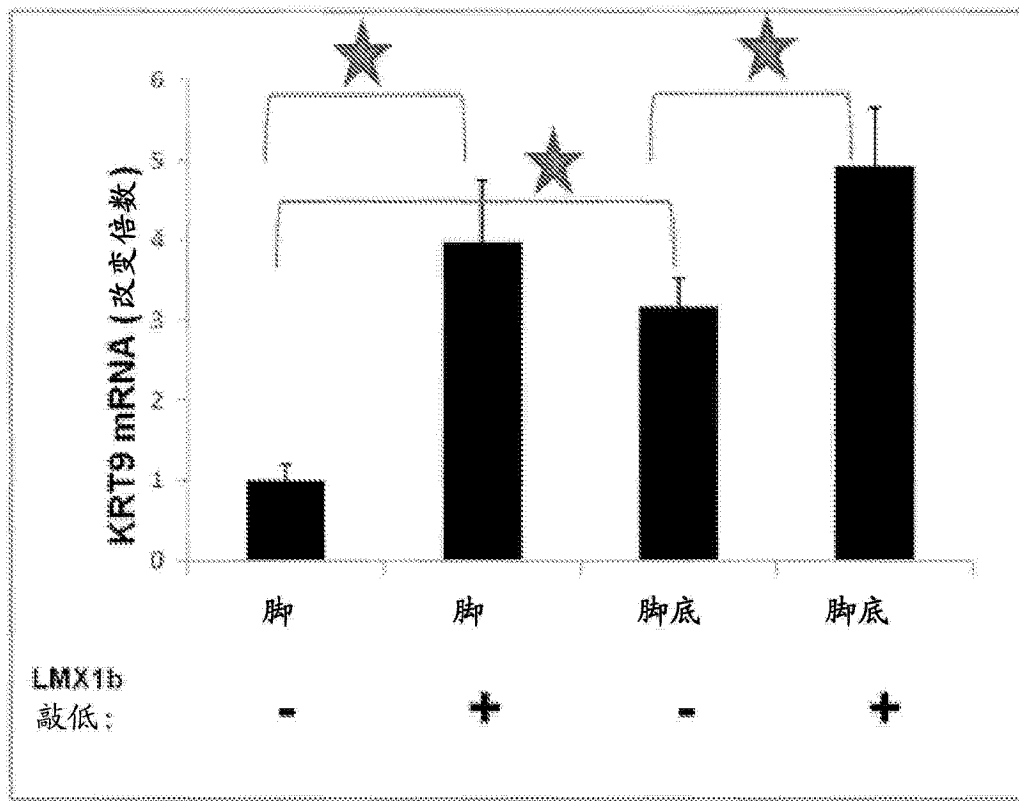


图 9

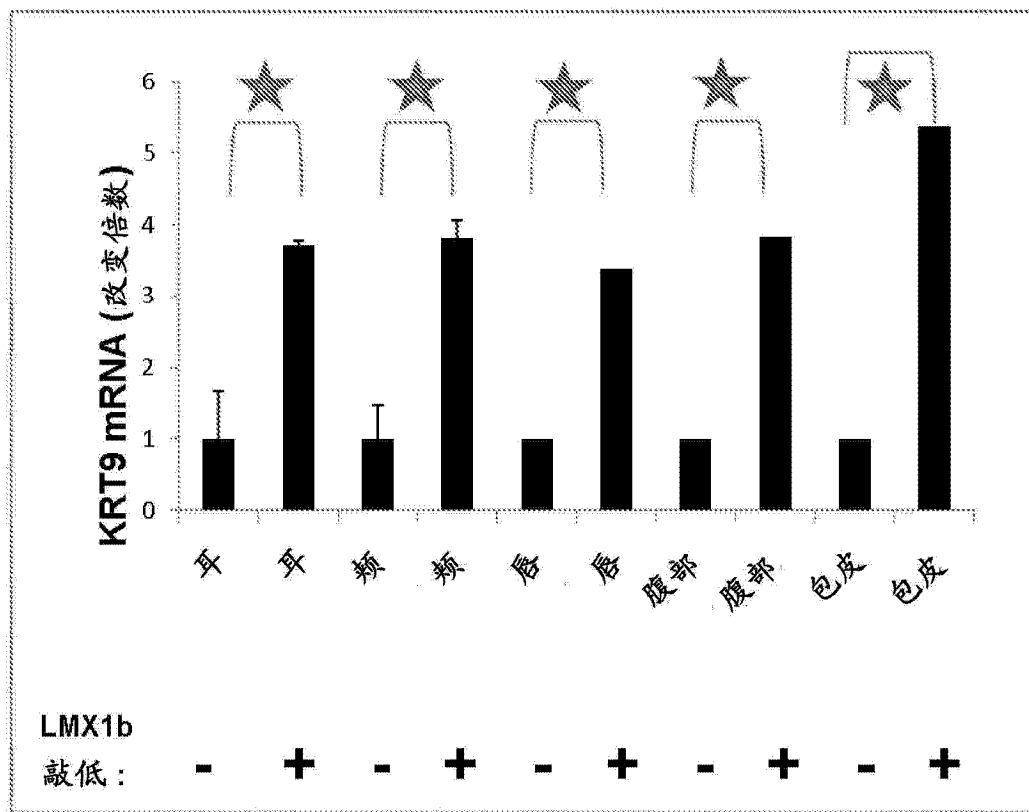


图 10

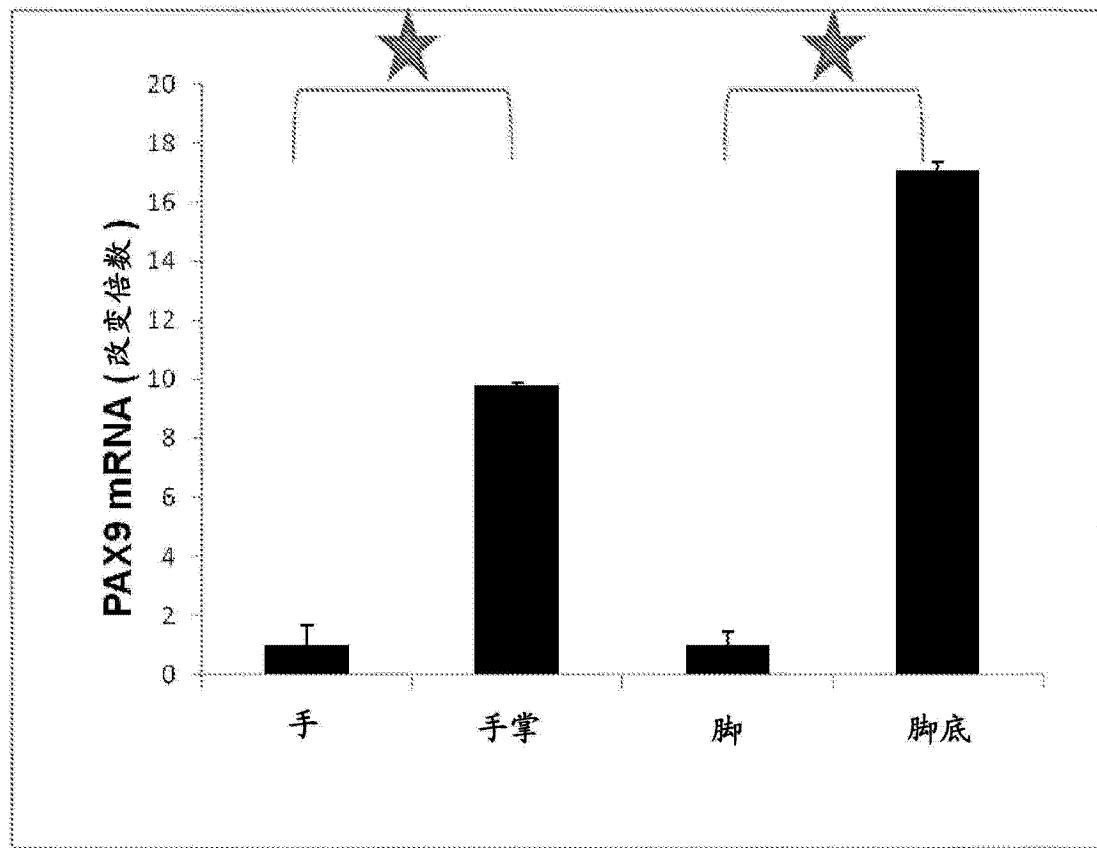


图 11

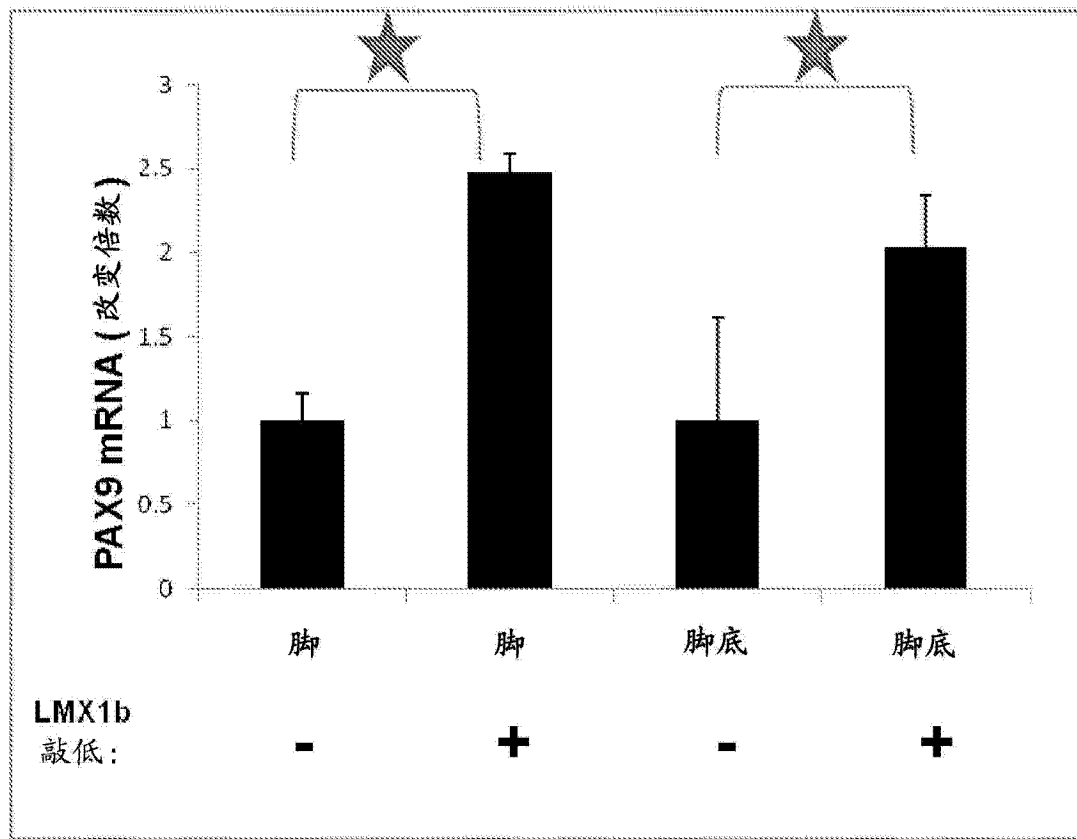


图 12

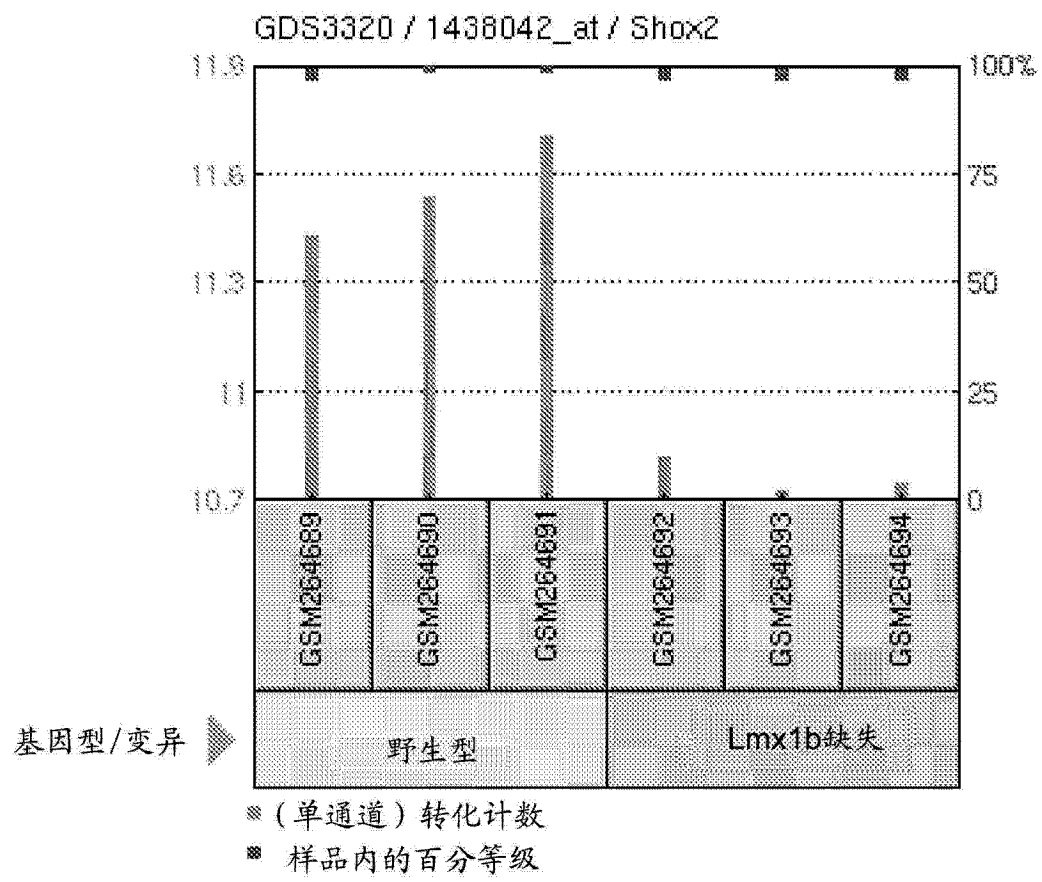


图 13

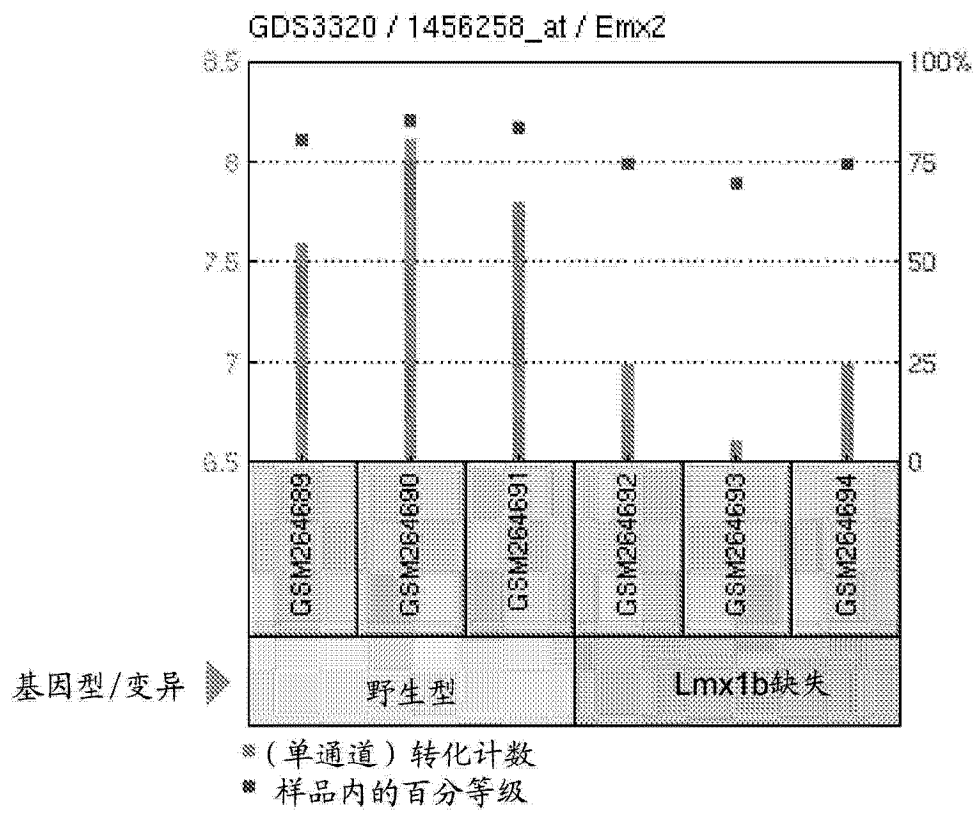


图 14

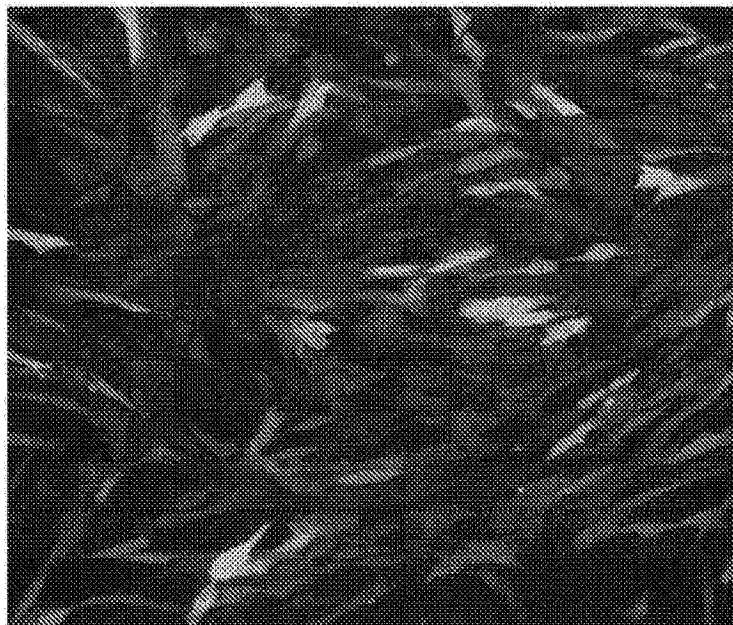


图 15

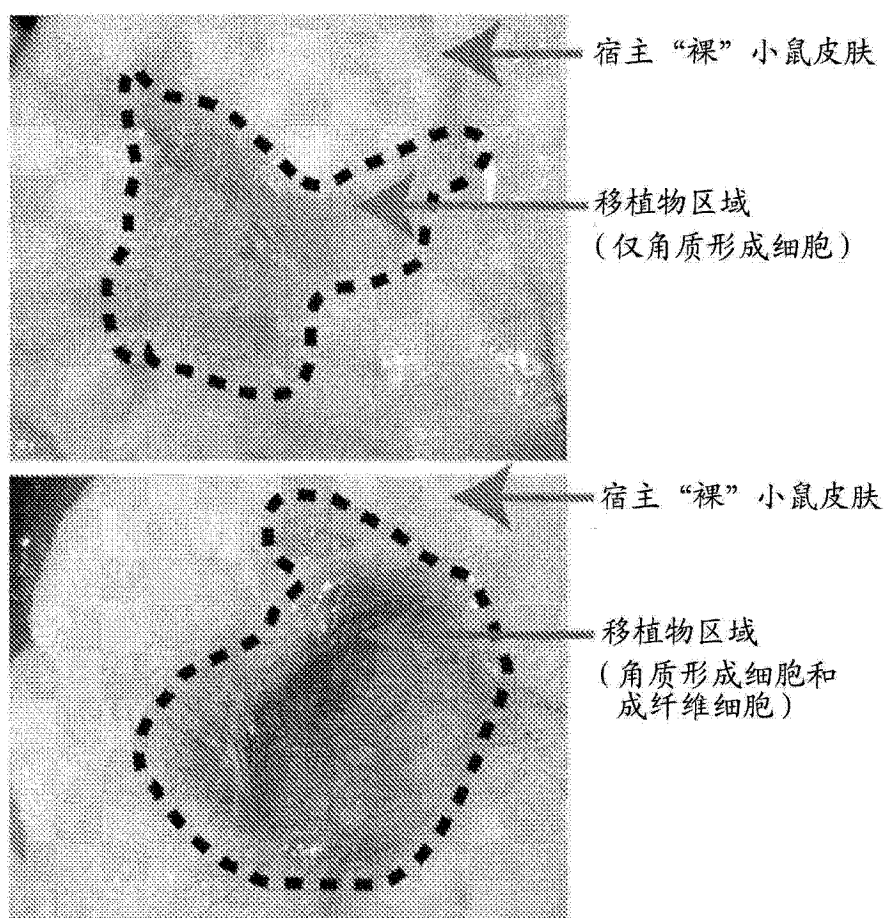


图 16

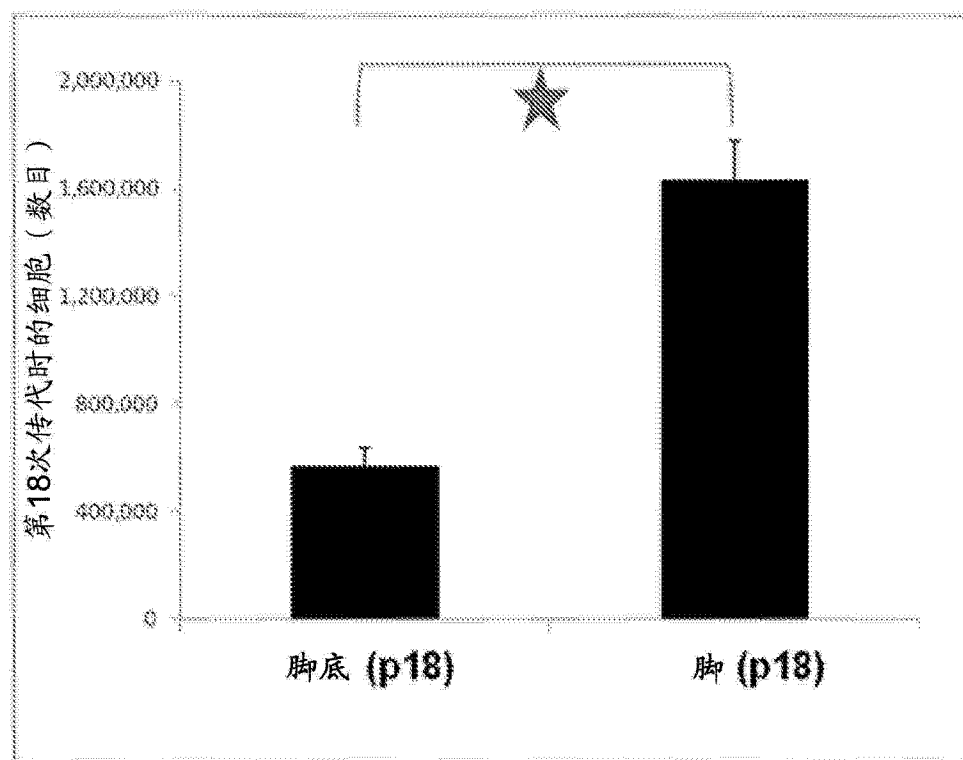
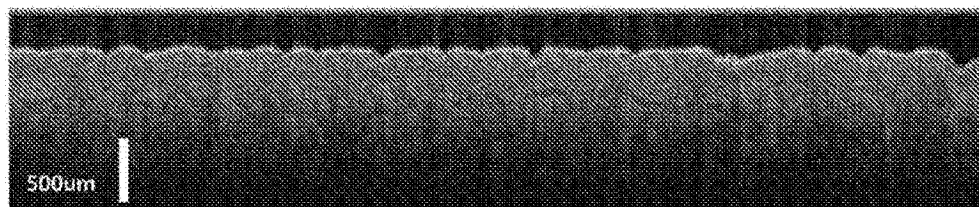


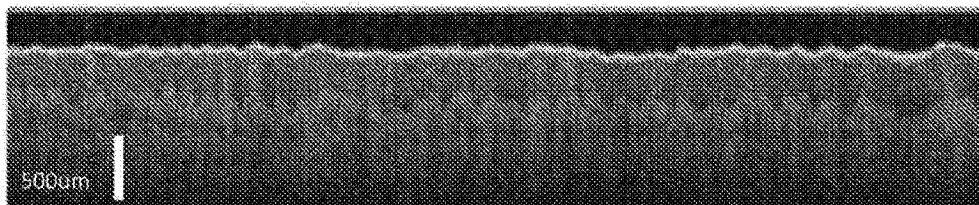
图 17

手背



表皮厚度

手掌



表皮厚度

图 18