



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115210361 B

(45) 授权公告日 2024. 12. 10

(21) 申请号 202180017794.0

(22) 申请日 2021.03.04

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 115210361 A

(43) 申请公布日 2022.10.18

(30) 优先权数据  
2020-036421 2020.03.04 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2022.08.30

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/JP2021/008325 2021.03.04

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02021/177387 JA 2021.09.10

(73) 专利权人 淋巴奥格尼克斯有限公司  
地址 英国伦敦

(72) 发明人 岩宫贵紘

(74) 专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理有限公司 51258

专利代理师 王佳媛

(51) Int.Cl.  
C12N 5/071 (2006.01)  
A61K 35/33 (2006.01)  
A61K 38/22 (2006.01)  
A61P 7/06 (2006.01)  
A61P 13/12 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 109890398 A, 2019.06.14  
JP 2003174897 A, 2003.06.24  
Naoko Okada et al..The Implications of the Upregulation of ICAM-1/VCAM-1 Expression of Corneal Fibroblasts on the Pathogenesis of Allergic Keratopathy. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2005, 46卷(12期), 第 4512页 第 1栏摘要部分、Figure 2.

审查员 吴丹阳

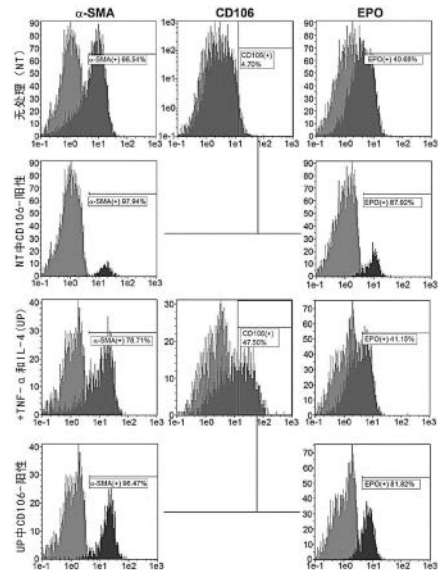
权利要求书1页 说明书13页 附图3页

(54) 发明名称

促红细胞生成素产生能力增强的成纤维细胞、制造方法以及医药组合物

(57) 摘要

发现通过使用添加了TNF- $\alpha$ 和IL-4的培养基培养人成纤维细胞,使该成纤维细胞中的EPO产生能力得到提高,其结果是,发现了一种EPO产生能力增强的成纤维细胞,还发现了一种使用该细胞改善EPO产生能力下降的状态的方法、治疗肾损伤或肾性贫血的方法。



1. 一种促红细胞生成素产生能力增强的成纤维细胞的制造方法,所述成纤维细胞为CD106阳性的来自肾脏的成纤维细胞,其中,

以细胞数为基准,相对于成纤维细胞群中所含的全部成纤维细胞,所述CD106阳性的成纤维细胞的比例为4.7%以上,

所述制造方法包括:

使50ng/mL以上且100ng/mL以下的浓度的TNF- $\alpha$ 及2ng/mL以上且5ng/mL以下的浓度的IL-4与成纤维细胞接触;以及

对所述接触后的成纤维细胞在促红细胞生成素产生能力能够被增强的条件下培养3天或4天。

2. 根据权利要求1所述的制造方法,其中,还包括使用抗CD106抗体,对CD106阳性的成纤维细胞进行选择或者浓缩。

3. 一种促红细胞生成素产生能力增强的成纤维细胞,其中,能通过权利要求1或2所述的制造方法得到。

4. 一种医药组合物,其中,含有权利要求3所述的成纤维细胞。

5. 权利要求3所述的成纤维细胞在制造用于治疗肾损伤或肾性贫血的医药组合物中的应用。

6. 根据权利要求5所述的制造中的应用,其中,所述医药组合物是用于注射的组合物。

## 促红细胞生成素产生能力增强的成纤维细胞、制造方法以及医药组合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种促红细胞生成素(以下,也称为EPO)产生能力增强的成纤维细胞。还涉及一种该细胞的制造方法、含有该细胞的医药组合物。

### 背景技术

[0002] EPO是一种有助于促进红细胞的产生的激素。大部分的EPO在肾脏产生,之后作用于骨髓中的成红血细胞祖细胞上,具有促进红细胞的产生(分化及增殖)的作用。

[0003] 近年来,EPO所具有的促进红细胞产生的能力受到关注,发现其对肾性贫血等肾脏疾病有效(非专利文献1),实际上,在医疗现场,EPO制剂作为肾性贫血的治疗剂被广泛使用。

[0004] 还已知EPO在各种组织中具有抗炎症、抗氧化、抗凋亡、促进血管再生的作用,也有报告称,EPO通过对患有肾损伤(急性肾损伤(AKI)、慢性肾脏病(CKD)、糖尿病性肾病等)的对象进行给药,可带来保护肾脏免受肾损伤引起的肾功能下降的肾脏保护功能(非专利文献2及非专利文献3)。

[0005] 另外,发明人过去曾发现表达Vascular cell adhesion molecule-1(血管细胞粘附分子1)(VCAM-1,CD106)的成纤维细胞作为心脏细胞培养材料是有用的(专利文献1),表达VCAM-1的心脏成纤维细胞作为用于治疗心脏疾病的注射用组合物是有用的(专利文献2)。但是,还不清楚关于表达VCAM-1的成纤维细胞的除心脏细胞培养材料以外的有用性、或含有表达VCAM-1的成纤维细胞的注射用组合物的对除心脏疾病以外的疾病的有用性。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:国际公开2016/006262号公报。

[0009] 专利文献2:国际公开2018/155651号公报。

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献1:Nephron,1997;77(2):176-185。

[0012] 非专利文献2:Proc Natl Acad Sci.,2004;101(41):14907-14912。

[0013] 非专利文献3:J Renal Inj Prev.,2013;2(1):29-30。

### 发明内容

[0014] 发明要解决的问题

[0015] 本发明的课题在于,提供一种EPO产生能力增强的成纤维细胞,以及提供一种使用该细胞改善EPO产生能力下降的状态的方法。

[0016] 用于解决问题的手段

[0017] 本发明人等为了解决上述课题而进行研究,发现通过使用添加了TNF- $\alpha$ 和IL-4的培养基培养人成纤维细胞,可以得到EPO产生能力增强的成纤维细胞,从而完成了本发明。

- [0018] 即,本发明包括以下的第一方面(发明A)。
- [0019] (A1) 一种EPO产生能力增强的成纤维细胞。
- [0020] (A2) 根据(A1)所述的成纤维细胞,其中,其为CD106阳性的成纤维细胞。
- [0021] (A3) 根据(A1)或者(A2)所述的细胞,其中,所述成纤维细胞为肾脏成纤维细胞。
- [0022] (A4) 根据(A1)~(A3)中任一项所述的细胞,其中,EPO的产生量比作为对照的成纤维细胞高1.65倍以上。
- [0023] (A5) 一种成纤维细胞群,其中,含有(A1)~(A4)中任一项所述的细胞。
- [0024] (A6) 根据(A5)所述的细胞群,其中,相对于所述细胞群中所含的全部成纤维细胞,所述CD106阳性的成纤维细胞的比例(细胞数基准)为4.7%以上。
- [0025] 另外,本发明包括以下的第二方面(发明B)。
- [0026] (B1) 一种EPO产生能力增强的成纤维细胞的制造方法,包括:
- [0027] 使成纤维细胞接触TNF- $\alpha$ 及IL-4;以及对所述接触后的成纤维细胞在EPO产生能力能够被增强的条件下进行培养。
- [0028] (B2) 根据(B1)所述的方法,其中,所述EPO产生能力增强的成纤维细胞为CD106阳性的成纤维细胞。
- [0029] (B3) 根据(B2)所述的方法,其中,还包括使用抗CD106抗体对CD106阳性的成纤维细胞进行选择或者浓缩。
- [0030] (B4) 根据(B1)~(B3)中任一项所述的方法,其中,所述成纤维细胞为肾脏成纤维细胞。
- [0031] (B5) 一种EPO产生能力增强的成纤维细胞,其中,能通过(B1)~(B4)中任一项所述的制造方法得到。
- [0032] (B6) 一种成纤维细胞群,其中,含有(B5)所述的细胞。
- [0033] 另外,本发明包括以下的第三方面(发明C)。
- [0034] (C1) 一种医药组合物,其中,含有(A1)~(A4)、(B5)中任一项所述的细胞或者(A5)、(A6)、(B6)中任一项所述的细胞群。
- [0035] (C2) 根据(C1)所述的医药组合物,其中,用于改善EPO产生能力下降的状态。
- [0036] (C3) 根据(C1)所述的医药组合物,其中,用于对患有肾损伤的患者进行给药。
- [0037] (C4) 根据(C3)所述的医药组合物,其中,所述肾损伤为慢性肾脏病(CKD)。
- [0038] (C5) 根据(C1)所述的医药组合物,其中,用于对患有肾性贫血的患者进行给药。
- [0039] (C6) 根据(C1)~(C5)中任一项所述的医药组合物,其中,其是用于注射的组合物。
- [0040] (C7) 根据(C1)~(C5)中任一项所述的医药组合物,其中,所述细胞群被构建为平面状或者立体状的细胞组织。
- [0041] 另外,本发明包括以下的第四方面(发明D)。
- [0042] (D1) 一种改善对象的促红细胞生成素产生能力下降的状态的方法,其中,包括:将(A1)~(A4)、(B5)中任一项所述的细胞、(A5)、(A6)、(B6)中任一项所述的细胞群或者(C1)所述的组合物向该对象进行给药或者移植。
- [0043] (D2) 一种治疗对象的肾损伤的方法,其中,包括:将(A1)~(A4)、(B5)中任一项所述的细胞、(A5)、(A6)、(B6)中任一项所述的细胞群或者(C1)所述的组合物向该对象进行给药或者移植。

[0044] (D3) 一种治疗对象的慢性肾脏病 (CKD) 的方法, 其中, 包括: 将 (A1) ~ (A4)、(B5) 中任一项所述的细胞、(A5)、(A6)、(B6) 中任一项所述的细胞群或者 (C1) 所述的组合物向该对象进行给药或者移植。

[0045] (D4) 一种治疗对象的肾性贫血的方法, 其中, 包括: 将 (A1) ~ (A4)、(B5) 中任一项所述的细胞、(A5)、(A6)、(B6) 中任一项所述的细胞群或者 (C1) 所述的组合物向该对象进行给药或者移植。

[0046] (D5) 一种将 EPO 向对象进行给药的方法, 其中, 包括: 将 EPO 产生能力增强的成纤维细胞向该对象进行给药或者移植。

[0047] 另外, 本发明包括以下的第五方面 (发明 E)。

[0048] (E1) 将 (A1) ~ (A4)、(B5) 中任一项所述的细胞、(A5)、(A6) 及 (B6) 中任一项所述的细胞群或者 (C1) 所述的组合物作为用于向肾脏组织或者其周围区域进行给药的注射剂来使用。

[0049] (E2) 将 (A1) ~ (A4)、(B5) 中任一项所述的细胞、(A5)、(A6) 及 (B6) 中任一项所述的细胞群或者 (C1) 所述的组合物作为用于向肾脏组织或者其周围区域进行移植的移植材料来使用。

[0050] 发明的效果

[0051] 根据本发明, 能够提供一种 EPO 产生能力增强的成纤维细胞, 还能够提供一种使用该细胞改善 EPO 产生能力下降的状态的方法、治疗肾损伤或肾性贫血的方法。

## 附图说明

[0052] 图1A是表示肾脏成纤维细胞的特征的图。A是培养的肾脏成纤维细胞的显微镜照片 (比例尺: 500 $\mu$ m)。

[0053] 图1B是表示肾脏成纤维细胞的特征的图。B是示出 actin alpha 2、smooth muscle ( $\alpha$ -SMA)、CD106 及 EPO 的表达的流式细胞术 (flow cytometry) 的解析图。分别对无处理 (Non Treatment (NT): 无处理 (NT)) 细胞或者添加 TNF- $\alpha$  及 IL-4 (+TNF- $\alpha$  and IL-4 (UP): +TNF- $\alpha$  和 IL-4 (UP)) 的细胞中的 CD106 阳性区域进行设门 (gating), 将设门后的细胞分别作为 CD106 阳性 NT (CD106-positive in NT: NT 中 CD106-阳性) 细胞或者 CD106 阳性 UP (CD106-positive in UP: UP 中 CD106-阳性) 细胞。灰色的直方图示出作为阴性对照的同型对照抗体的荧光强度, 黑色的直方图示出对于  $\alpha$ -SMA、CD106 或者 EPO 的标记抗体的荧光强度。

[0054] 图2是在无处理 (无处理 (NT)) 细胞或者添加 TNF- $\alpha$  及 IL-4 (+TNF- $\alpha$  和 IL-4 (UP)) 的细胞中, 对 EPO 阳性区域进行设门, 调查设门后的细胞中的 CD106 阳性率的流式细胞术的解析图。灰色的直方图示出作为阴性对照的同型对照抗体的荧光强度, 黑色的直方图示出对于 CD106 或者 EPO 的标记抗体的荧光强度。

[0055] 图3是示出各种成纤维细胞培养上清液中的 EPO 含有量的相对比较的图。A 将无处理 (无处理 (NT)) 细胞中的 EPO 产生量设为 1, 将 TNF- $\alpha$  及 IL-4 添加 (UP) 细胞中的 EPO 产生量用相对值表示。B 示出各种成纤维细胞培养上清液中的 EPO 含有量 (平均光密度 Average OD)。C 示出校准曲线 (calibration curve)。D 示出各种成纤维细胞培养上清液中的 EPO 含有量 (mIU/mL)。

## 具体实施方式

[0056] 以下,使用具体的实施方式详细说明本发明,但本发明不仅仅限定于所示的具体实施方式。

[0057] 本发明的一实施方式是EPO产生能力增强的成纤维细胞。

[0058] 本实施方式的成纤维细胞优选CD106阳性。CD106也被称为VCAM-1,是作为在血管内皮细胞等中表达的细胞粘附分子而已知的蛋白质。

[0059] 成纤维细胞的来源没有限制,可以将胚胎干细胞(ES细胞)、人工多能干细胞(iPS细胞)及Muse细胞等多能干细胞或间叶干细胞等成体干细胞分化使用。另外,可以使用从动物(包括人)采集的原代细胞,也可以使用株化细胞。成纤维细胞优选来自肾脏。

[0060] 在来自人的成纤维细胞中,CD106阳性成纤维细胞的比例低,在天然状态下,在来自肾脏的成纤维细胞的情况下,最多也只是4.7%(细胞数基准)左右。

[0061] 因此,对于通过后述的制造方法使来自人的CD106阳性成纤维细胞的比例提高的来自人的成纤维细胞群,也可以包含在本实施方式中。例如,作为本发明的其他的方式,可以是如下的来自人的成纤维细胞群,即,在全部来自人的成纤维细胞中来自人的CD106阳性成纤维细胞的占比(细胞数基准)为4.7%以上。另外,在本实施方式的来自人的成纤维细胞群中,CD106阳性成纤维细胞占全部成纤维细胞的比例(细胞数基准)可以是5%以上,可以是10%以上,可以是15%以上,可以是20%以上,可以是25%以上,可以是30%以上,可以是40%以上,可以是50%以上,可以是60%以上,可以是70%以上,可以是80%以上,可以是90%以上,可以是100%。此外,通过选择已知为CD106阳性的细胞,能够省略细胞筛选的处理。

[0062] 另外,来自人的成纤维细胞在天然状态下,EPO阳性(以下,也称为EPO+)细胞的比例低,在来自肾脏的成纤维细胞的情况下,最多也只是40.7%(细胞数基准)左右。另外,由于EPO是造血激素,不是细胞膜表达型蛋白质,因此难以将EPO作为指标选择或者浓缩细胞。

[0063] 因此,例如,能够按照后述的成纤维细胞的制造方法通过选择或者浓缩来自人的CD106阳性成纤维细胞,来增加成纤维细胞群中的EPO+成纤维细胞的比例。或者,可以通过其他方法增加成纤维细胞群中的EPO+成纤维细胞的比例。本实施方式的来自人的成纤维细胞群中,EPO+成纤维细胞占全部成纤维细胞的比例(细胞数基准)可以是40.7%以上,可以是45%以上,可以是50%以上,可以是60%以上,可以是70%以上,可以是80%以上,可以是90%以上,可以是100%。

[0064] EPO产生能力的增强是指,例如,与作为对照的成纤维细胞中的EPO产生量相比较,EPO产生量增加。作为对照的成纤维细胞没有特别限定,可以是天然的肾脏成纤维细胞。用于比较EPO产生量的测定方法没有特别限定,例如,可以通过作为本领域技术人员已知的方法的流式细胞术测定EPO阳性细胞比例,也可通过ELISA法(酶联免疫吸附测定法)测定产生的EPO的浓度。

[0065] 在使用流式细胞术的情况下,例如,当本实施方式的来自人的成纤维细胞群中的EPO+成纤维细胞占全部成纤维细胞的比例(细胞数基准)为40.7%以上、45%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、或者100%时,能够判断为EPO产生能力增强了。

[0066] 在使用ELISA法的情况下,例如,本实施方式的来自人的成纤维细胞群的培养上清

液所含的EPO的量与同条件下培养的作为对照的成纤维细胞相比较,当增加了1.65倍以上、2.0倍以上、3.0倍以上、5.0倍以上或者10.0倍以上时,能够判断为EPO产生能力增强了。

[0067] 另外,例如,将成纤维细胞 $9.2 \times 10^5$  cells进行5天培养,回收3mL培养上清后,当通过Amicon-Ultra-2(离心式过滤器)等浓缩了100倍的培养上清浓缩液中的EPO的浓度超过5.08mIU/mL时,可以判断为EPO产生能力增强了,当为5.10mIU/mL以上、6.00mIU/mL以上、7.00mIU/mL以上、8.00mIU/mL以上、8.39mIU/mL以上、10.0mIU/mL以上、20.0mIU/mL以上、50.0mIU/mL以上、100.0mIU/mL以上时,也可以判断为EPO产生能力增强了。

[0068] 另外,例如,将成纤维细胞 $9.2 \times 10^5$  cells进行5天培养,当回收3mL培养上清后的未浓缩的培养上清中的EPO的浓度超过 $5.08E-02$  mIU/mL时,可以判断为EPO产生能力增强了,当为 $5.10E-02$  mIU/mL以上、 $6.00E-02$  mIU/mL以上、 $7.00E-02$  mIU/mL以上、 $8.00E-02$  mIU/mL以上、 $8.39E-02$  mIU/mL以上、 $10.0E-02$  mIU/mL以上、 $20.0E-02$  mIU/mL以上、 $50.0E-02$  mIU/mL以上、 $100.0E-02$  mIU/mL以上时,也可以判断为EPO产生能力增强了。

[0069] 另外,例如,将成纤维细胞 $9.2 \times 10^5$  cells进行5天培养,当回收3mL培养上清后的未浓缩的培养上清中的EPO量超过每1dish(3mL)  $1.52E-01$  mIU时,可以判断为EPO产生能力增强了,当为 $1.60E-01$  mIU以上、 $2.00E-01$  mIU以上、 $2.52E-01$  mIU以上、 $3.00E-01$  mIU以上、 $4.00E-01$  mIU以上、 $5.00E-01$  mIU以上、 $10.0E-01$  mIU以上、 $20.0E-01$  mIU以上、 $50.0E-01$  mIU以上时,也可以判断为EPO产生能力增强了。

[0070] 另外,例如,将成纤维细胞 $9.2 \times 10^5$  cells进行5天培养,当回收3mL培养上清后的未浓缩的培养上清中的每个细胞的EPO产生量超过 $1.66E-07$  mIU时,可以判断为EPO产生能力增强了,当为 $1.70E-07$  mIU以上、 $1.80E-07$  mIU以上、 $1.90E-07$  mIU以上、 $2.00E-07$  mIU以上、 $2.74E-07$  mIU以上、 $3.00E-07$  mIU以上、 $5.00E-07$  mIU以上、 $10.0E-07$  mIU以上、 $20.0E-07$  mIU以上时,也可以判断为EPO产生能力增强了。

[0071] 本实施方式也可以是含有EPO产生能力增强的成纤维细胞的成纤维细胞群。该成纤维细胞优选CD106阳性。

[0072] 本实施方式的细胞群除了CD106阳性成纤维细胞以外,还可以含有其他的成纤维细胞或其他成分,在含有其他的成纤维细胞的情况下,相对于细胞群中的细胞总量,CD106阳性成纤维细胞的比例以细胞数基准可以是0.03%以上,可以是0.1%以上,可以是1%以上,可以是2%以上,可以是4%以上,可以是5%以上,可以是10%以上,可以是20%以上,可以是30%以上,可以是40%以上,可以是50%以上,可以是60%以上,可以是70%以上,可以是80%以上,可以是90%以上,可以是95%以上,可以是98%以上,可以是99%以上。

[0073] 对成纤维细胞的制造方法进行说明。关于成纤维细胞的制造,可以参照并按照本发明人等的以往的报告(专利文献1)进行制造。

[0074] (成纤维细胞的准备)

[0075] 在成纤维细胞的准备中,成纤维细胞的来源没有特别限制,按照已经叙述的即可。另一方面,可以是来自自身的细胞,例如准备如下的成纤维细胞,即,从患有肾脏疾病的患者的肾脏组织分离的肾脏成纤维细胞或将患者的成体(体)干细胞分化并分离的肾脏成纤维细胞。另外,还可以是将来自身细胞的iPS细胞等多能干细胞进行分化并回收的成纤维细胞。此外,可以是除自身以外的细胞,例如准备如下的成纤维细胞,即,从来自提供肾脏细胞的提供者的肾脏组织或利用动物等制作的肾脏组织分离的肾脏成纤维细胞、将提供者的

成体(体)干细胞分化并分离的肾脏成纤维细胞。另外,还可以是将来自提供者的iPS细胞或ES细胞等多能干细胞分化并回收的成纤维细胞。

[0076] (成纤维细胞的分离)

[0077] 准备的成纤维细胞典型地可以通过利用中性蛋白酶(Dispase)、胶原蛋白酶(collagenase)这样的酶来处理从而进行分离。分离除了利用中性蛋白酶、胶原蛋白酶这样的酶来进行之外,如果可以进行所需的分离,也可以是其他的处理,例如机械式处理。

[0078] (CD106阳性成纤维细胞的选择或者浓缩)

[0079] 在成纤维细胞为CD106阳性的情况下,成纤维细胞可以供于CD106阳性成纤维细胞的选择或者浓缩。在不经过选择或者浓缩也能得到CD106阳性成纤维细胞的情况下,可以省略选择或者浓缩。对于CD106阳性成纤维细胞的选择或者浓缩,可例示使用了抗CD106抗体(抗VCAM-1抗体)的流式细胞术法、磁珠法、亲和层析柱法(affinity column method)或者淘选法(Panning method)等方法。具体来说,能够使用磁珠细胞分选法(MACS)或荧光激活细胞分选法(FACS)等。抗CD106抗体可以使用市售的抗体,还可以使用利用已知的方法制作的抗体。另外,可以使用单克隆抗体或者多克隆抗体,但从特异性的角度出发,优选使用单克隆抗体。此外,还可以通过导入耐药基因来除去CD106阴性成纤维细胞,从而得到CD106阳性成纤维细胞。另外,也可以导入荧光蛋白质编码基因,将荧光蛋白质阳性细胞用FACS等进行分离。另外,也可以使用实时PCR、下一代测序仪及原位杂交(in situ hybridization)等方法,来确认细胞中的CD106基因的表达,并分离CD106基因的表达群。

[0080] (成纤维细胞的培养)

[0081] 成纤维细胞可以以如下目的被供于培养,即,直到达到希望的细胞数为止,及/或者直到具有希望的功能为止等。培养的条件没有限制,可通过已知的细胞培养方法进行。

[0082] 培养所用的培养基可根据要培养的细胞的种类等进行适当设定,例如,可以使用DMEM、 $\alpha$ -MEM、RPMI-1640、HFDM-1(+)等。可以向该培养基中添加FCS或FBS等营养物质或增殖因子、细胞因子、抗生物质等。此外,也可以用含有TNF- $\alpha$ 及/或者IL-4的培养基进行培养。

[0083] 培养周期可以根据如下目的适当设定天数,即,直到培养的细胞达到希望的细胞数为止,及/或者直到培养的细胞具有希望的功能为止等。例如,可举出1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、2周、1个月、2个月、3个月、6个月等周期。

[0084] 培养温度可以按照要培养的细胞的种类进行适当设定,例如,可以是10°C以上、15°C以上、20°C以上、25°C以上、30°C以上,还可以是60°C以下、55°C以下、50°C以下、45°C以下、40°C以下。

[0085] 培养可以进行多次。例如,能够通过选择或者浓缩来提高希望的成纤维细胞的纯度,并每次都进行培养。

[0086] (成纤维细胞的回收)

[0087] 培养的成纤维细胞的回收可通过胰蛋白酶等蛋白酶来剥离细胞并回收,可使用温度响应性培养皿,通过温度变化来剥离细胞并回收,也可使用细胞刮取器(Cell Scraper)等器具来剥离细胞并进行回收。

[0088] 本发明的其他方式是一种EPO产生能力增强的成纤维细胞的制造方法,该方法包括使成纤维细胞接触TNF- $\alpha$ 及IL-4,以及对上述接触后的成纤维细胞在EPO产生能力可以被增强的条件下进行培养。

[0089] 该成纤维细胞优选CD106阳性,在该情况下,本实施方式的制造方法可以包括使用抗CD106抗体对CD106阳性成纤维细胞进行选择或者浓缩。

[0090] 成纤维细胞与TNF- $\alpha$ 及IL-4相接触的方法只要不使EPO产生能力增强的成纤维细胞的诱导、或者EPO产生增强的CD106阳性成纤维细胞的诱导被显著损害,就没有特别限制,典型的做法是向含有成纤维细胞的培养基中添加TNF- $\alpha$ 及IL-4,但不限于此。TNF- $\alpha$ 及IL-4既可以各自分开地与成纤维细胞接触,也可以同时接触。使TNF- $\alpha$ 及IL-4同时接触的方法可以是将TNF- $\alpha$ 及IL-4混合后再添加到成纤维细胞中。例如,可以是将TNF- $\alpha$ 及IL-4溶解于水、培养基、血清或者二甲基亚砜(DMSO)后,再添加至培养基中。

[0091] 在本实施方式中,由于可以在添加了TNF- $\alpha$ 及IL-4的培养基中培养成纤维细胞,所以可以直接在维持成纤维细胞中的CD106的表达水平的情况下培养成纤维细胞。因此,能够制造具有高CD106表达水平的成纤维细胞。

[0092] 在添加TNF- $\alpha$ 及IL-4至培养基(mL)的情况下,TNF- $\alpha$ 的添加量没有特别限制,通常是0.1ng/mL以上,可以是0.5ng/mL以上,可以是1ng/mL以上,可以是10ng/mL以上,可以是50ng/mL以上。上限没有特别限制,通常是500ng/mL以下,可以是100ng/mL以下。

[0093] 另外,IL-4的添加量没有特别限制,通常是0.1ng/mL以上,可以是0.5ng/mL以上,可以是1ng/mL以上,可以是2ng/mL以上。上限没有特别限制,通常是10ng/mL以下,可以是5ng/mL以下,可以是1ng/mL以下。

[0094] 添加的TNF- $\alpha$ 和IL-4的比(重量比)为,即TNF- $\alpha$ :IL-4通常为10000:1~1:1,也可以是50000:1~10:1。另外,可以是1:1~1:10000,也可以是1:10~1:50000。

[0095] 通过进一步培养与TNF- $\alpha$ 及IL-4接触的成纤维细胞,能够制造EPO产生能力增强的成纤维细胞。

[0096] 对于成纤维细胞的培养,只要是在可以使成纤维细胞的EPO产生能力被增强的条件下就没有特别限制,可通过已知的细胞培养方法进行。此外,优选在可以成为CD106阳性的条件下进行培养。可例示出上述成纤维细胞的制造方法中的(成纤维细胞的培养)的项中所记载的方法。

[0097] 对于培养的成纤维细胞的回收,可例示出上述成纤维细胞的制造方法中的(成纤维细胞的回收)的项中所记载的方法。

[0098] 在成纤维细胞为CD106阳性的情况下,对于CD106阳性成纤维细胞的选择或者浓缩能够通过使用抗CD106抗体的方法进行。选择或者浓缩可以在任何时机进行。可以在与TNF- $\alpha$ 及IL-4接触前,可以在与TNF- $\alpha$ 及IL-4接触后、培养前,也可以在培养后。

[0099] 可例示出上述成纤维细胞的制造方法中的(CD106阳性成纤维细胞的选择及浓缩)的项中所记载的方法。

[0100] 通过使用抗CD106抗体进行选择或者浓缩,能够使成纤维细胞中的CD106阳性成纤维细胞的比例增加,从而得到含有高疾病治疗效果的EPO产生能力增强的CD106阳性成纤维细胞的细胞群。

[0101] 通过本实施方式的EPO产生能力增强的成纤维细胞的制造方法,可以得到EPO产生能力增强的成纤维细胞,该成纤维细胞或含有该细胞的成纤维细胞群为本发明的其他的实施方式。由于成纤维细胞,特别是肾脏成纤维细胞通过被TNF- $\alpha$ 及IL-4刺激,CD106表达细胞的比例(细胞数基准)升高,EPO表达细胞的比例(细胞数基准)升高,因此EPO产生能力增强

的成纤维细胞能够适合用作治疗EPO产生量下降的疾病的组合物。

[0102] 本发明的其他方式为一种医药组合物,该医药组合物含有上述EPO产生能力增强的成纤维细胞或者其细胞群。该成纤维细胞优选CD106阳性。

[0103] 通过给药或移植本实施方式的医药组合物至生物体内,能够在生物体内高效地产生EPO。因此,虽然没有特别的限制,但能够改善例如由肾脏组织的损伤、缺损、功能障碍引起的EPO产生能力下降的状态。另外,可以是以能够对患有肾损伤或肾性贫血的患者给药的方式,也可以是以能够由此来治疗肾损伤或肾性贫血的方式。作为肾损伤,没有特别限制,例如能够举出急性肾损伤(AKI)、慢性肾脏病(CKD)、糖尿病肾病、急性肾小球肾炎(急性肾炎)、慢性肾小球肾炎(慢性肾炎)、急进性肾小球肾炎、肾病综合征、急性肾衰竭、慢性肾衰竭。优选肾损伤是慢性肾脏病(CKD)。更优选肾损伤是慢性肾衰竭。此外,肾衰竭是指,与正常时相比肾脏功能下降的状态,在本实施方式中特指与正常时相比肾脏功能下降至30%以下的状态。

[0104] 给药或者移植本实施方式的医药组合物至生物体的方法没有特别限制,例如能够通过注射给药。医药组合物的给药部位没有特别限制,例如,通过将医药组合物直接给药或者移植至肾脏组织及/或者其周围区域(例如,肾被膜下等),能够改善上述疾病状态或治疗肾性贫血。另外,也可以将医药组合物向静脉、动脉、淋巴结、淋巴管、骨髓、皮下、阴茎海绵体、腹腔内给药。向静脉、动脉、淋巴管的给药可以通过向脉管内注射,也可以通过导管而注入,还可以使用其他已知的方法。

[0105] 注射的方法没有特别限制,能够适用有针注射、无针注射等已知的注射方法,用于注入的导管的方法也能够适用已知的方法,没有特别限制。

[0106] 另外,本实施方式的医药组合物虽没有特别限制,但也可作为人工器官材料适用于生物体,例如,该人工器官材料可以是细胞群被构建为平面状或者立体状的细胞组织而成的。该平面状或者立体状的细胞组织可以是成纤维细胞群单独培养而成的,或者也可以是将成纤维细胞群和其他的细胞例如肾细胞共同培养后作为平面状或者立体状的细胞组织而成的。作为平面状或者立体状的细胞组织,没有特别限制,例如,可例示出细胞片、细胞纤维、利用3D打印机形成的组织等。

[0107] 在本实施方式中,平面状或者立体状的细胞组织的大小或形状只要能适用于坏死的肾组织及/或者其周围区域,则没有特别限制。另外,所谓平面状,单层或者多层都可以。

[0108] 此外,细胞培养中的培养基组成、温度、湿度等这些条件只要能够培养EPO产生能力增强的成纤维细胞,且能够构建平面状或者立体状的细胞组织,则没有特别限制。例如,可例示出按照上述成纤维细胞的制造方法中的(成纤维细胞的培养)及/或者(成纤维细胞的回收)的项中所记载的培养条件的条件。

[0109] 通过将这样的平面状或者立体状的细胞组织适用于坏死的肾组织及/或者其周围区域,或者通过作为人工器官与坏死的肾组织及/或者其周围区域进行交换,能够治疗肾损伤或肾性贫血。

[0110] 医药组合物所含的EPO产生能力增强的成纤维细胞的比例可以基于向患者给药或者移植的方式等来适当设定,只要作为有效成分含有在治疗上有效的量的EPO产生能力增强的成纤维细胞即可。

[0111] 在医药组合物中含有其他的成纤维细胞的情况下,相对于医药组合物中所含的成

纤维细胞总量, EPO产生能力增强的成纤维细胞的比例以细胞数基准可以是0.03%以上, 可以是0.1%以上, 可以是1%以上, 可以是2%以上, 可以是4%以上, 可以是5%以上, 可以是10%以上, 可以是20%以上, 可以是30%以上, 可以是40%以上, 可以是50%以上, 可以是60%以上, 可以是70%以上, 可以是80%以上, 可以是90%以上, 可以是95%以上, 可以是98%以上, 可以是99%以上。

[0112] 另外, 医药组合物中所含的EPO产生能力增强的成纤维细胞的数量例如能够为 $1.0 \times 10^2$  cells/mL以上、 $1.0 \times 10^3$  cells/mL以上、 $1.0 \times 10^4$  cells/mL以上、 $1.0 \times 10^5$  cells/mL以上、 $1.0 \times 10^6$  cells/mL以上、 $5.0 \times 10^6$  cells/mL以上、 $1.0 \times 10^7$  cells/mL以上。注射用组合物中所含的EPO产生能力增强的成纤维细胞的数量可以根据疾病的程度进一步进行增减。

[0113] 医药组合物的上述治疗及/或者上述改善的效果的确认方法没有特别限制, 例如, 可例示出与给药或者移植组合物前相比较, 给药或者移植组合物后的血中EPO浓度增加, 或者与给药或者移植组合物前相比较, 给药或者移植组合物后的红细胞数量增加。

[0114] 医药组合物的上述治疗及/或者上述改善的效果的确认方法没有特别限制, 例如, 可例示出与给药或者移植组合物前相比较, 给药或者移植组合物后的血肌酐(Cr)值减少, 或者与给药或者移植组合物前相比较, 给药或者移植组合物后的血尿素氮(BUN)值减少。

[0115] 医药组合物的上述治疗及/或者上述改善的效果的确认方法没有特别限制, 例如, 可例示出与给药或者移植组合物前相比较, 给药或者移植组合物后的内生肌酐清除率(CCr)值上升, 或者与给药或者移植组合物前相比较, 肾小球滤过率(GFR)值上升。

[0116] 医药组合物的上述治疗及/或者上述改善的效果的确认方法没有特别限制, 例如, 可例示出与给药或者移植组合物前相比较, 给药或者移植组合物后的尿中的尿蛋白减少, 或者与给药或者移植组合物前相比较, 尿潜血减少。

[0117] 医药组合物还可以含有生理学上容许的作为医药组合物的其他的成分。作为这样的其他的成分, 可举出生理盐水、细胞保存液、细胞培养液、水凝胶、细胞外基质、冻存液等。

[0118] 作为本发明的其他的实施方式, 还可以是一种通过如下方式改善EPO产生能力下降的状态的方法, 即, 通过将上述EPO产生能力增强的成纤维细胞、其细胞群、或者含有该成纤维细胞或其细胞群的医药组合物对患有EPO产生能力下降的状态的对象进行给药或者移植, 来改善EPO产生能力下降的状态。本实施方式的成纤维细胞优选CD106阳性。

[0119] 另外, 作为本发明的其他的实施方式, 还可以是一种通过如下方式治疗肾损伤或者保护肾脏的方法, 即, 通过将上述EPO产生能力增强的成纤维细胞、其细胞群、或者含有该成纤维细胞或其细胞群的医药组合物对患有肾损伤的对象进行给药或者移植, 来治疗肾损伤或者保护肾脏。本实施方式的成纤维细胞优选CD106阳性。

[0120] 另外, 作为本发明的其他的实施方式, 还可以是一种通过如下方式治疗肾性贫血的方法, 即, 通过将上述EPO产生能力增强的成纤维细胞、其细胞群、或者含有该成纤维细胞或其细胞群的医药组合物对患有肾性贫血的对象进行给药或者移植来治疗肾性贫血。本实施方式的成纤维细胞优选CD106阳性。

[0121] 另外, 作为本发明的其他的实施方式, 还可以进行如下使用, 即, 将上述EPO产生能力增强的成纤维细胞、其细胞群、或者含有该成纤维细胞或其细胞群的组合物作为注射剂或者移植材料, 用于给药或者移植至肾脏组织及/或者其周围区域。本实施方式的成纤维细胞优选CD106阳性。

[0122] 【实施例】

[0123] 通过以下实施例,对本发明进行更详细的说明,但是当然,本发明的范围不只限于实施例。

[0124] <人类成人肾脏成纤维细胞的培养>

[0125] 人类成人肾脏成纤维细胞购自Innoprot公司。用添加了1%新生胎牛血清(newborn calf serum(NBCS,Hyclone公司)的含有重组人表皮细胞生长因子(rh-EGF)的成纤维细胞用无血清培养液(HFDM-1(+),Cell Science&Technology)对该细胞进行了培养。经过3~5次的继代后,用50ng/mL的TNF- $\alpha$ (Pepro tech公司)及2ng/mL的IL-4(Wako公司)对成纤维细胞进行了处理。

[0126] <流式细胞术解析>

[0127] 在表1中示出流式细胞术解析中使用的抗体及试剂。用4%多聚甲醛(Wako公司)固定细胞,并在PBS(Phosphate buffer saline:缓冲溶液)(Wako公司)中静置。用0.1%皂苷进行渗透处理,并与各种抗体各进行30分钟反应。流式细胞术解析是按照制造公司的指示书,用MACSQuant Analyzer10进行了解析(Miltenyi Biotec公司)。

[0128] 【表1】流式细胞术解析中使用的抗体及试剂

产品	供应商	参考
人 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 APC 标记抗体 ( Human alpha-Smooth Muscle Actin APC-conjugated Antibody)	R&D Systems	IC1420A
Alexa Fluor 647 小鼠 IgG2,k 同型对照 (Alexa Fluor 647 Mouse IgG2, k Isotype Control)	BD Biosciences	557715
BV421 小鼠抗人 CD106 (BV421 Mouse Anti-human CD106)	BD Biosciences	744309

[0130]	BV421 小鼠 IgG1,k 同型对照 (BV421 Mouse IgG1, k Isotype Control)	BD Biosciences	562438
	APC 人促红细胞生成素 Ab (APC Human Erythropoietin Ab)	Assaypro	33312-05161
	Alexa Fluor 647 标记驴抗兔 IgG (Alexa Fluor 647 Donkey anti-rabbit IgG)	Biolegend	406414
	皂苷 EP 25G (Saponin EP 25G)	Nacalai tesque	30502-42
	4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液 (4% Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution)	Wako	163-20145

[0131] <促红细胞生成素产生能力的评价>

[0132] 将未处理的人肾脏成纤维细胞 (NT) 及用TNF- $\alpha$  (50ng/mL) 和IL-4 (2ng/mL) 进行3天处理的人肾脏成纤维细胞 (UP) 以  $9.2 \times 10^5$  cells/dish 的浓度接种至  $60\text{mm}\phi$  培养皿 (Corning, Corning, NY), 用无血清DMEM培养基培养5天后, 分别回收了3mL成纤维细胞的培养上清液。使用Amicon-Ultra-2 (离心式过滤器) (Merck, Darmstadt, 德国) 和Human Erythropoietin ELISAKit (人促红细胞生成素ELISA试剂盒) (Proteintech, Rosemont, IL), 按照制造商推荐方案对上清液进行了样品调制。用SpectraMax M2 (多功能酶标仪) (San Jose, CA) 实施了测定。通过Amicon-Ultra-2浓缩前的EPO产生量 (mIU) 以产品的数据表中记载的浓缩最小容量 (15 $\mu$ L) 为基准进行了计算。具体来说, 通过用浓缩后的EPO产生量 (mIU/mL) 除以从上述最小容量计算出的浓缩率 (100倍, 假设相对填充容量1.5mL浓缩至15 $\mu$ L时的浓缩率), 再乘以每Dish的培养基总量 (3mL), 来计算EPO产生量 (mIU)。每1细胞的EPO产生量 (mIU/cell) 是通过用EPO产生量 (mIU) 除以接种细胞数 ( $9.2 \times 10^5$  cells) 来计算的。

[0133] <实施例1: 通过组合使用TNF- $\alpha$ 及IL-4, CD106 (VCAM-1) 阳性肾脏成纤维细胞中EPO表达增强>

[0134] 用细胞培养皿培养了人类成人肾脏成纤维细胞。人类成人肾脏成纤维细胞呈扁平且纺锤形形状, 是典型的成纤维细胞的形状 (图1A)。

[0135] 将肾脏成纤维细胞用50ng/mL的TNF- $\alpha$ 及2ng/mL的IL-4进行3天处理后, 使用FACS解析了其细胞特征。使用的抗体是针对 $\alpha$ -SMA、CD106或者EPO的抗体。在用0.1%的Saponin (皂苷) 进行细胞膜渗透处理后, 实施了对在细胞质中局部存在的蛋白质的染色。

[0136] 在无处理的肾脏成纤维细胞中, 作为成纤维细胞标志物的 $\alpha$ -SMA在66.54%的细胞中表达。另一方面, 在肾脏成纤维细胞中, CD106阳性细胞的比例少 (以细胞数基准为4.70%), EPO+细胞的比例也少 (以细胞数基准为40.68%) (图1B)。若对CD106阳性细胞进行设门并解析, 则表达 $\alpha$ -SMA和EPO的细胞的比例 (细胞数基准) 分别是97.94%和87.92%。也就是说, 示出了CD106阳性肾脏成纤维细胞中 $\alpha$ -SMA及EPO的表达比例 (细胞数基准) 高。从该结果表明, 在天然状态下, 对于EPO+细胞, 难以通过使用了抗CD106抗体的已知的方法来高

效地进行选择或者浓缩(图1B)。

[0137] 此外,通过对肾脏成纤维细胞用TNF- $\alpha$ 及IL-4进行3天处理,CD106阳性细胞的比例增加至47.50% (细胞数基准), $\alpha$ -SMA+细胞的比例增加至78.71% (细胞数基准)。虽然处理后的肾脏成纤维细胞中的EPO+细胞的比例为41.15% (细胞数基准),但在CD106阳性细胞中,EPO+细胞的比例为81.82% (图1B)。也就是说,示出了CD106阳性肾脏成纤维细胞即使在通过利用TNF- $\alpha$ 及IL-4的处理而引起了CD106的表达后, $\alpha$ -SMA及EPO的表达比例(细胞数基准)也会变高。

[0138] <实施例2:通过组合使用TNF- $\alpha$ 及IL-4,表达EPO的肾脏成纤维细胞中的CD106阳性率增加>

[0139] 用细胞培养皿培养了人类成人肾脏成纤维细胞。将肾脏成纤维细胞用50ng/mL的TNF- $\alpha$ 及2ng/mL的IL-4进行3天处理后,使用FACS解析了其细胞特征。使用的抗体是针对CD106或者EPO的抗体。

[0140] 在无处理的肾脏成纤维细胞中,EPO+细胞的比例以细胞数基准为37.24%,其中,CD106阳性细胞率为47.78%。另一方面,用TNF- $\alpha$ 及IL-4进行3天处理的肾脏成纤维细胞中,EPO+细胞的比例以细胞数基准为35.13%,其中,CD106阳性细胞率为82.86%,这是非常高的CD106阳性细胞率。

[0141] 即,示出了通过使用了抗CD106抗体的已知方法对肾脏成纤维细胞进行纯化,由此,可以高效地得到高纯度的EPO产生能力增强的CD106阳性成纤维细胞。根据这些结果,启示了通过使用TNF- $\alpha$ 及IL-4来选择性地使产生EPO的肾脏成纤维细胞对CD106为阳性,由此,能够高效地实施对EPO产生能力增强的CD106阳性成纤维细胞的选择或者浓缩。

[0142] <实施例3:各种成纤维细胞的促红细胞生成素产生能力的评价>

[0143] 为了评价未处理的人肾脏成纤维细胞(NT)以及用TNF- $\alpha$  (50ng/mL)和IL-4 (2ng/mL)进行3天处理的人肾脏成纤维细胞(UP)的促红细胞生成素产生能力,用ELISA评价了各种成纤维细胞的培养上清液中所含的促红细胞生成素含有量(图3)。其结果,示出了与NT的培养上清液相比,UP的培养上清液中更多地含有1.65倍的EPO(图3中的A)。另外,示出了UP的培养上清液的平均光密度(Average.OD)是0.21,含有8.39mIU/mL浓度的EPO,另一方面,NT的培养上清液的Average.OD为0.14,含有5.08mIU/mL的EPO(浓缩后)(图3中的B及D)。另外,在浓缩前的UP的培养上清液中,含有8.39E-02mIU/mL、2.52E-01mIU、2.74E-07mIU/cell1的浓度的EPO,另一方面,在浓缩前的NT的培养上清液中,含有5.08E-02mIU/mL、1.52E-01mIU、1.66E-07mIU/cell1的浓度的EPO。

[0144] 根据本结果,发现了用TNF- $\alpha$ 和IL-4处理并制作的肾脏成纤维细胞不仅EPO的表达被增强,产生能力也被提高,启示了通过使用TNF- $\alpha$ 和IL-4来选择性地使产生EPO的肾脏成纤维细胞为CD106阳性,由此,能够高效地实施对EPO产生能力增强的CD106阳性成纤维细胞的选择或者浓缩。

[0145] 已知EPO是一种有助于促进红细胞的产生的激素。大部分的EPO在肾脏产生,之后作用于骨髓中的成红血细胞祖细胞上,具有促进红细胞的产生(分化及增殖)的作用,并且近年来,EPO所具有的促进红细胞产生能力受到关注,发现其对肾性贫血等肾脏疾病有效(非专利文献1)。实际上,在医疗现场,EPO制剂作为肾性贫血的治疗剂被广泛使用。另外,公知EPO在各种组织中具有抗炎症、抗氧化、抗凋亡、促进血管再生的作用,也有报告称,EPO通

过对患有肾损伤(急性肾损伤(AKI)、慢性肾脏病(CKD)、糖尿病肾病等)的对象进行给药,能带来保护肾脏免受肾损伤引起的肾功能下降的肾脏保护功能(非专利文献2及非专利文献3)。即,若鉴于通过这些既有研究而已知的EPO的作用,则启示了根据本发明而人工制作的EPO产生能力增强的CD106阳性成纤维细胞的给药对于肾损伤是有效的。

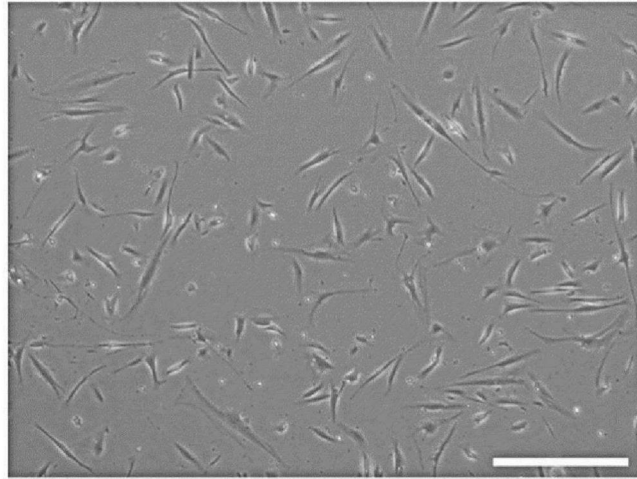


图1A

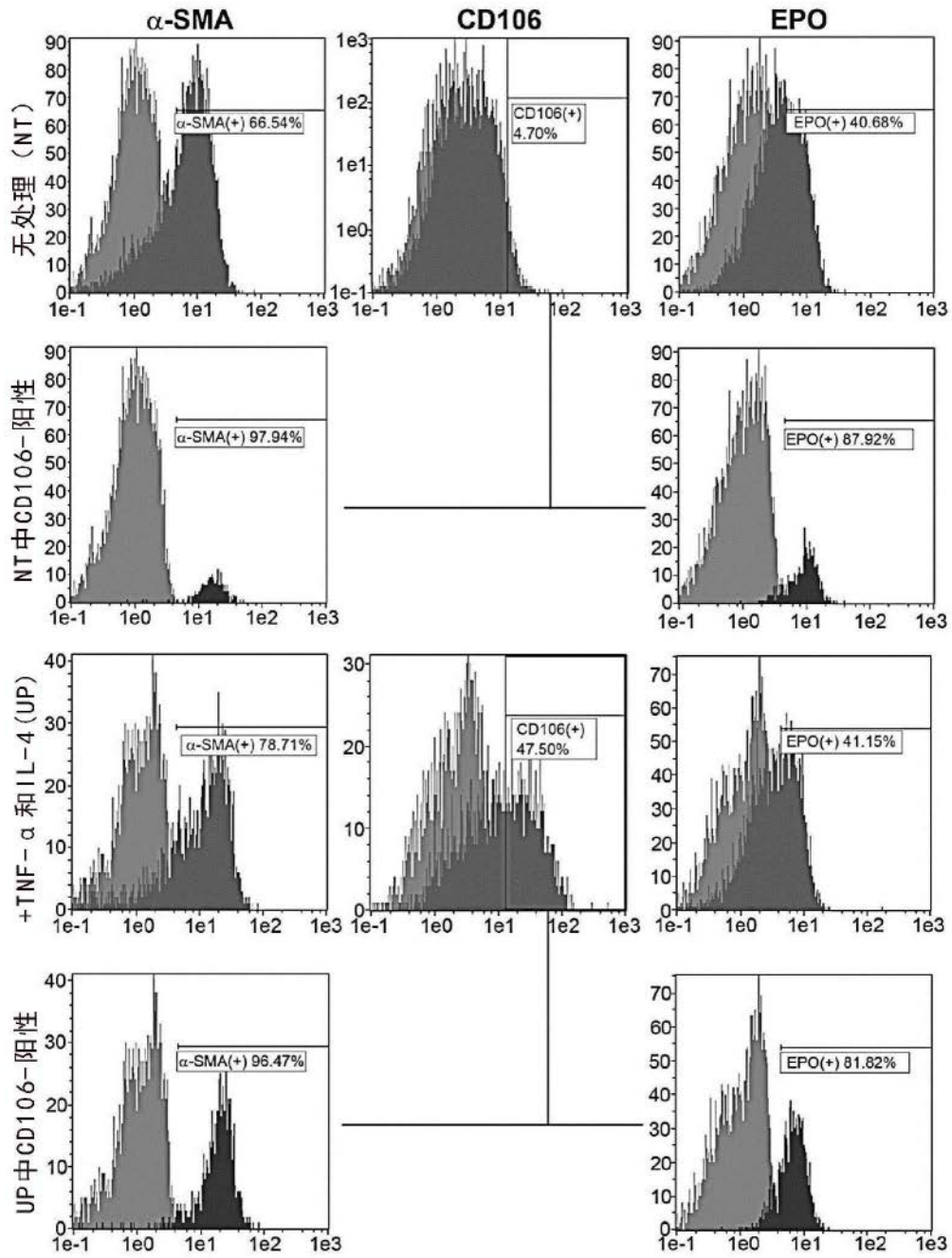


图1B

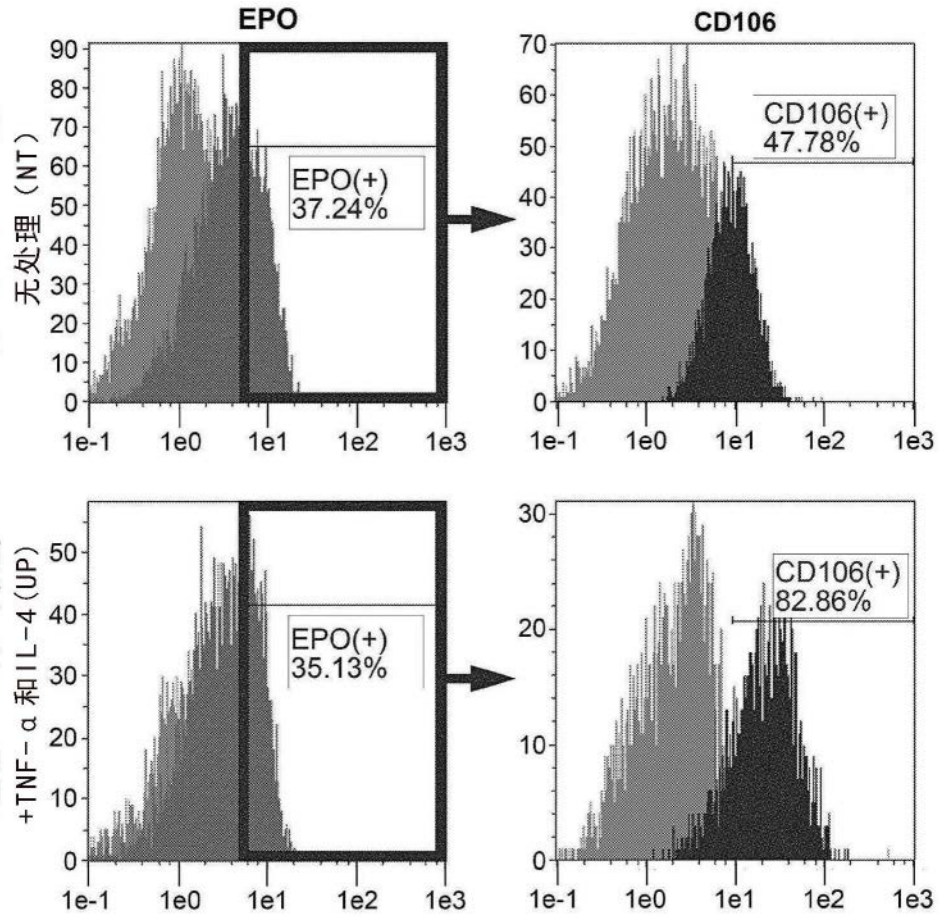


图2

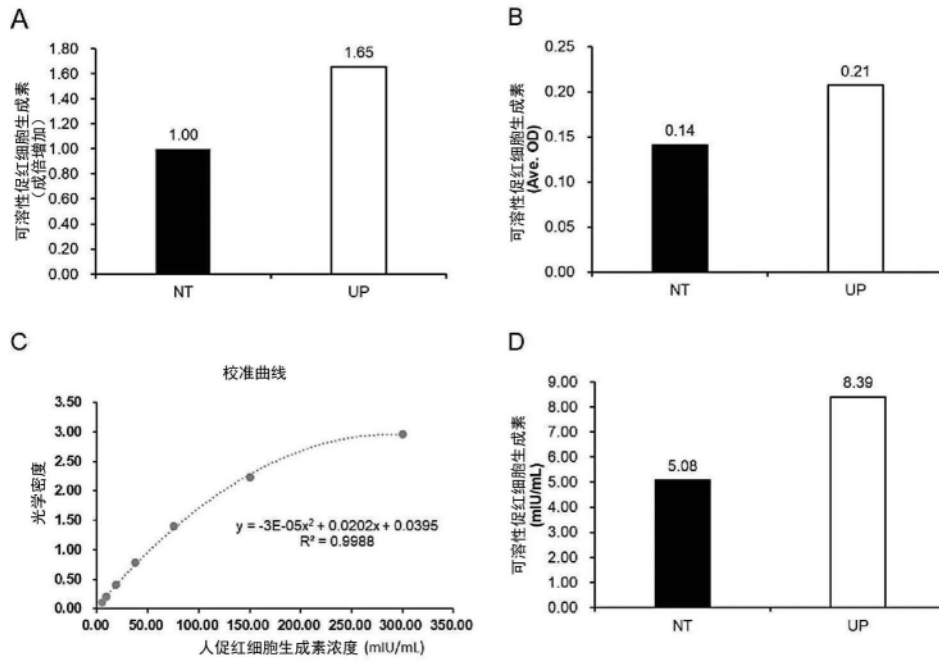


图3