



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101273123 B

(45) 授权公告日 2013.06.26

(21) 申请号 200680035886.7

A61P 9/10(2006.01)

(22) 申请日 2006.07.27

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

0508029 2005.07.27 FR

Wang H U 等. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-82 and its receptor Eph-B4. 《CELL》. 1998, 第 93 卷 (第 5 期), 741-753.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2008.03.27

DZAU V. J. 等. Angiogenesis in health and disease. 《NATURE MEDICINE》. 2003, 第 9 卷 (第 6 期), 653-660.

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/FR2006/001837 2006.07.27

MAEKAWA HIROMITSU 等. Ephrin-B2 induces migration of endothelial cells through the phosphatidylinositol-3 kinase pathway and promotes angiogenesis in adult vasculature. 《ARTERIOSCLEROSIS THROMBOSIS AND VASCULATURE BIOLOGY》. 2003, 第 23 卷 (第 11 期), 2008-2014.

(87) PCT 申请的公布数据

W02007/012764 FR 2007.02.01

LE RICOUSSE-ROUSSANNE SOPHIE 等. Ex vivo differentiated endothelial and smooth muscle cells from human cord blood progenitors home to the angiogenic tumor vasculature. 《CARIDOVASCULAR RESEARCH》. 2004, 第 62 卷 (第 1 期), 176-184.

(73) 专利权人 血管与血液研究院

地址 法国巴黎

专利权人 巴黎第七大学丹尼斯狄德罗学院

(72) 发明人 菲利普·福伯特

让-塞巴斯蒂安·西尔韦斯特里

索菲·勒里库西-鲁桑尼

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴 巫肖南

(51) Int. Cl.

C12N 5/078(2010.01)

A61K 35/44(2006.01)

A61P 43/00(2006.01)

A61P 9/00(2006.01)

审查员 张颖慧

权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

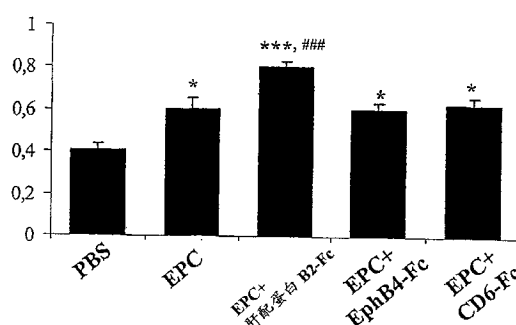
标记物是 Eph 型标记物的细胞 / 配体标记系统, 包含所述系统的细胞材料, 其制备方法, 和促血管生成的用途

料、其制备方法和其治疗用途, 尤其用于血管机能不全方面。

(57) 摘要

本发明涉及细胞 / 配体特异性标记系统, 所述系统的特征在于, 它包含: (a) 内皮前体细胞 (EPC), 其含选自 Eph (尤其是 EphB4 或 EphB1) 组成的组的细胞标记物, 和 (b) L-K 结构的蛋白材料, 其由特异针对所述标记物、并与结合蛋白 (K) 相连或融合的配体 (L) 组成, 所述系统能提供 EPC-Eph-L-K 结构的促血管生成的细胞材料。本发明还涉及作为能刺激血管生成的产品的细胞材

血管造影得分
(缺血肢体/未缺血肢体)



1. 细胞标记物 / 特异性配体型的促血管生成组合物, 在所述组合物中, 细胞标记物存在于细胞外膜上, 其特征在于所述组合物包含:

(a) 内皮前体细胞 (EPC), 其含细胞标记物 EphB4, 和

(b) 以下结构的蛋白材料:

肝配蛋白 -B2-Fc 结构 I

其由与抗体 Fc 片段相连或融合的肝配蛋白 -B2 组成,

所述组合物能提供具有如下结构的刺激血管生成的细胞材料:

EPC-EphB4- 肝配蛋白 -B2-Fc 结构 II。

2. 权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于, EPC 得自单核细胞或表达 CD34 或 CD133 的细胞, 所述单核细胞或表达 CD34 或 CD133 的细胞源于骨髓、外周血或源于脐带血。

3. 权利要求 1 或 2 所述的组合物, 其特征在于, EPC 得自外周血或脐带血。

4. 能刺激血管生成的细胞材料, 其特征在于, 它具有如下结构:

EPC-EphB4- 肝配蛋白 -B2-Fc 结构 II

其中肝配蛋白 -B2 与抗体 Fc 片段相连或融合, 所述细胞材料能够: (i) 是基本上纯的细胞培养物的形式的, 或是与其他前体细胞组合的细胞培养物的形式的, 而且 (ii) 在适当时, 是冰冻的。

5. 权利要求 4 所述的细胞材料, 其特征在于, 所述其他前体细胞是单核细胞。

6. 权利要求 4 或 5 所述的细胞材料, 其特征在于, 它在施用于施用位点之前通过温育下列成分而获得:

(a) 含细胞标记物 EphB4 的内皮前体细胞 (EPC), 和

(b) 如下结构的蛋白材料:

肝配蛋白 -B2-Fc 结构 I

其由与抗体 Fc 片段相连或融合的肝配蛋白 -B2 组成。

7. 制备权利要求 4 至 6 之任一所述的细胞材料的方法, 所述方法的特征在于它包括如下步骤:

利用在外膜上表达 EphB4 标记物的 EPC, 而且

将所述 EPC 在体外与蛋白质材料肝配蛋白 -B2-Fc 接触, 其中 Fc 是与肝配蛋白 -B2 相连或融合的抗体 Fc 片段。

8. 权利要求 7 所述的方法, 其特征在于, 它包括以下步骤:

(1°) 利用源自骨髓、外周血或脐带血的单核细胞,

(2°) 使前述步骤 (1°) 中的所述细胞分化, 由此获得带有 EphB4 标记物的 EPC, 和

(3°) 通过使肝配蛋白 -B2 与 EphB4 结合, 体外活化步骤 (2°) 中获得的 EPC。

9. 权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 它在步骤 (1°) 和 (2°) 之间包括如下的额外步骤:

(1a°) 分离 CD34⁺ 和 / 或 CD133⁺ 单核细胞。

10. 权利要求 9 所述的方法, 其特征在于, 在步骤 (1°) 中, 单核细胞源自外周血或脐带血。

11. 可用于重建受损脉管的药物, 其特征在于, 它包含治疗可接受量的权利要求 4 至 6 之任一所述的细胞材料, 以及生理上可接受的赋形剂。

12. 用于重建受损脉管的药物组合物,其特征在于,它包含治疗可接受量的权利要求 1 至 3 之任一所述的促血管生成组合物的两种成分,它们分开包装,每种都混合有生理上可接受的赋形剂,所述两种成分在施用前温育从而产生结构 II 的细胞材料。

13. 细胞材料的用途,其特征在于,将用作促血管生成活性成分的、权利要求 4 至 6 之任一所述的细胞材料以及生理上可接受的赋形剂用于制备用于治疗血管机能不全的治疗用途的组合物的用途。

14. 权利要求 13 所述的用途,其特征在于,所述组合物用于缺血性心脏、脑或外周组织的再血管化治疗。

15. 权利要求 14 所述的用途,其特征在于,所述组合物用于治疗动脉炎、冠状机能不全、心脏机能不全或脑机能不全。

标记物是 Eph 型标记物的细胞 / 配体标记系统, 包含所述系统的细胞材料, 其制备方法, 和促血管生成的用途

发明领域

[0001] 本发明涉及新的技术解决方案, 其利用包含细胞标记物和特异于所述标记物的配体的系统, 其中所述标记物选自由 Eph 组成的组, 尤其是 Eph4 标记物。它也涉及包含该系统的细胞材料和制备它的方法, 以及其用作促血管生成剂的治疗用途。

现有技术

[0002] 已知最初在神经系统中证明用于神经元引导的肝配蛋白 (ephrin) 家族成员和它们的 Eph 受体酪氨酸激酶是涉及血管生成的因子。Eph 受体和它们的肝配蛋白配体的许多同种型被描述成具有组织表达特异性。在脊椎动物中, 首先, 至少有 16 种 Eph 受体是已知的, 即: 10 种 EphA 受体 (EphA1 至 EphA10) 和 6 种 EphB 受体 (EphB1 至 EphB6); 其次, 至少有 9 种肝配蛋白配体是已知的, 即: 肝配蛋白 -A1 至肝配蛋白 -A6, 和肝配蛋白 -B1 至肝配蛋白 -B3。起先分成 EphA 和 EphB 两类, 是基于它们胞外域序列的同源性, 但该分类也与它们配体的优先结合一致, 肝配蛋白 -A 配体一般通过糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 与膜结合, 而肝配蛋白 -B 配体是穿膜的, 其带有具有 PDZ 结合结构域的胞质内结构域。

[0003] 如下文图 1 所示:

[0004] Eph 受体包含胞外域、III 型纤连蛋白重复区、富含半胱氨酸的区域和特异性配体结合结构域; 它在胞内域中也有延伸, 包含有酪氨酸激酶活性的结合域、不育性 α 模组 (SAM) 和 PDZ 结合模组;

[0005] 肝配蛋白 -A 配体通过 GPI (GPI 锚) 附着于膜; 而且

[0006] 肝配蛋白 -B 穿膜配体具有胞内延伸物, 包含细胞质尾巴和 PDZ 结合模组。

[0007] 在 Eph 受体酪氨酸激酶 (尤其是 EphB4) 和其配体 (尤其是肝配蛋白 -B2) (其为穿膜蛋白) 间相互作用方面, 发生双向信号传递, 其包括在其表面表达 Eph 的细胞的 Eph 受体所诱导的信号传递 (正向信号传递), 和在其表面表达肝配蛋白的细胞的肝配蛋白配体所诱导的反向信号传递。该双向信号传递在细胞 / 细胞接触、迁移和细胞粘附中起作用。

[0008] 由 H. U. Wang 等的文章 (“Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor EphB4”, Cell, 1998 ; 93 : 741-753) 可知动静脉表达 EphB4 / 肝配蛋白 -B2 偶联物的特异性, EphB4 仅由静脉表达, 而肝配蛋白 -B2 仅由动脉表达。

[0009] EphB 受体和它们的肝配蛋白 -B 配体特别会在胚胎发育期间表达。根据 Z. Wang 等的 “Ephrin receptor, EphB4, regulates ES cell differentiation of primitive mammalian hemangioblasts, blood, cardiomyocytes and blood vessels”, Blood, 2004 ; 103 : 100-109, EphB4 似乎涉及小鼠胚胎细胞 (ES) 分化成内皮细胞。

[0010] 也已知某些 Eph 受体 (尤其是 EphB4) 在肿瘤中过表达。该观察结果提示, 这些 Eph 受体在肿瘤发展中起作用。N. K. Noren 等的文章 “Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

101:5583-5588,证明了通过 EphB4 活化肝配蛋白 -B2(反向信号传递)能刺激肿瘤生长。

[0011] 在另一方面,现有文献中观察到的有:(i)在肿瘤发生期间肝配蛋白 -B2 的表达增加,而且其次(ii)由于有这样的增加,因而担心肝配蛋白 -B2 可能能够诱导肿瘤。这解释了为什么几篇公开出版物建议:一方面检测作为肿瘤标记物的肝配蛋白 -B2,另一方面抑制肝配蛋白 -B2;尤其参见(i)W002/058538A,其推荐检测肝配蛋白 -B2 配体作为肿瘤维管结构标记物,并描述了显现这种肿瘤维管结构的技术,(ii)US2003/0207447A,其建议使用 Eph(尤其是 EphB4)抑制剂或肝配蛋白(尤其是肝配蛋白 -B2)抑制剂,通过阻止受体和配体间相互作用来限制血管生成,和(iii)US6864227A 和 W003/102144A,其推荐使用抗 Eph 抗体(尤其是抗 EphB4 抗体)或抗肝配蛋白抗体(尤其是抗肝配蛋白 -B2 抗体)来减少或调节血管生成。

[0012] 简而言之,涉及 Eph/肝配蛋白结合对的公开的专利文件尤其关注特别涉及如下的方法:

[0013] 通过与 PDZ 结构域结合的蛋白质引起肝配蛋白 -B 信号传递(反向信号传递),参见 W002/079382A 和 W000/031124;

[0014] 调节肝配蛋白 -B2 或 EphB4 的表达,尤其参见 US2004/0110150A、W004/006846A 和 W004/080418;

[0015] 抑制肝配蛋白 -B2/EphB4 相互作用来治疗癌症和与血管生成相关的疾病,尤其参见上述 W004/080418A 文件和 W004/069264A;和

[0016] 将肝配蛋白 -B2 用作肿瘤维管系统的标记物,尤其可参见上述 W002/058538A 文件。

[0017] 另外,Maekawa Hiromitsu 等的文章“Ephrin-B2 induces migration of endothelial cells through the phosphatidylinositol-3 kinase pathway and promotes angiogenesis in adult vasculature”,Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology,2003,23:2008-2014,表明与 Fc 蛋白(即抗体的 Fc 片段)偶联的肝配蛋白 -B2 配体诱导内皮细胞(HUVEC)迁移。

[0018] 最后,由 US6610534B 可知带有鞘氨醇激酶编码序列和血管生成蛋白编码序列的腺病毒。该专利的目的是在局部注射所述腺病毒后,表达鞘氨醇激酶和血管生成蛋白,其可以是肝配蛋白 -B2。另外,由公开出版的 US2005/0049194A 可知用于减少造血干细胞异常增殖的方法,其包括通过注射肝配蛋白 -B2 的水溶性抑制剂来施用。

[0019] 发明目的

[0020] 根据本发明,计划提供上述现有技术中既没有描述也没有提示过的新的解决方案来解决刺激血管生成的技术问题。更具体地,本文计划提供使用“细胞标记物/特异针对所述标记物的配体”系统的新的技术解决方案,所述系统用于特定细胞,即内皮前体细胞,来解决刺激血管生成的问题。所追求的目的是通过在细胞被注射前活化细胞,来改良以前已知的细胞疗法,从而取得更好的再血管化过程(尤其是缺血后再血管化)的效果。

[0021] 发明主题

[0022] 本发明所述的新的解决方案使用细胞标记物/配体系统,其中所述标记物与内皮细胞前体细胞相连(associated)。在该系统中,标记物是 Eph 受体,而且 Eph 特异性配体是肝配蛋白配体。

[0023] 根据本发明的第一个方面,提供了新的细胞标记物 / 特异性配体促血管生成系统,在所述系统中,细胞标记物存在于细胞外膜上,所述系统的特征在于,它包含:

[0024] (a) 内皮前体细胞 (EPC),其含选自 Eph (尤其是 EphB4 或 EphB1) 组成的组的细胞标记物,和

[0025] (b) 以下结构的蛋白材料:

[0026] L-K (I)

[0027] 其由特异针对所述标记物、并与结合蛋白 (K) 相连或融合的配体 (L) 组成,所述结合蛋白 (K) 尤其是抗体 Fc 片段,

[0028] 所述系统能提供刺激血管生成的具有如下结构的细胞材料:

[0029] EPC-Eph-L-K (II)。

[0030] 换句话说,为了刺激血管生成,含 Eph 标记物的 EPC 细胞用属于肝配蛋白家族的特异性配体 L 活化。配体 L 也可由肝配蛋白 (如肝配蛋白 -B2) 的肽片段组成,其具有相同的生物活性。

[0031] 根据本发明的第二个方面,提供了能刺激血管生成的细胞材料,所述细胞材料的特征在于,它具有如下结构:

[0032] EPC-Eph-L-K (II)

[0033] 其中所述配体 L 与结合蛋白 K 相连或融合。

[0034] 该细胞材料能够 (i) 是基本纯的细胞培养物的形式的,或与其他前体细胞 (尤其是单核细胞) 组合的细胞培养物的形式的,而且 (ii) 在适当时,是冰冻的。

[0035] 根据本发明的第三个方面,提供了制备所述细胞材料的方法,所述方法的特征在于它包括如下步骤:

[0036] 利用在其外膜上表达 Eph 家族 (尤其是 EphB4 或 EphB1) 标记物的 EPC,而且

[0037] 将所述 EPC 在体外与蛋白质材料 L-K 接触,其中 L 是特异于所述标记物的配体,而 K 是与 L 相连或融合的结合蛋白。

[0038] 还推荐了可用于重建受损脉管的药物,其特征在于,它包含特别作为促血管生成活性成分的、治疗可接受量的本发明所述的细胞材料,以及生理上可接受的赋形剂。

[0039] 最后,根据本发明的另一个方面,提供了所述细胞材料的新用途,所述用途的特征在于,利用作为促血管生成活性成分的所述细胞材料,并组合以生理上可接受的赋形剂,用于制备用于治疗血管机能不全的治疗用途的组合物,所述治疗用途特别是缺血性心脏、脑或外周组织的再血管化。

[0040] 附图简述

[0041] 在附图中,

[0042] - 图 1,如以上详细所述的,解释了现有知识状态并示意性表示 Eph 受体酪氨酸激酶及其肝配蛋白 -A 型或肝配蛋白 -B 型配体;而且

[0043] - 图 2 至 4 图示了在所进行的测试方面,本发明所述的细胞材料的促血管生成性质。

[0044] 发明详述

[0045] E. B. Pasquale 的文章 (Curr. Opin. Cell Biol., 1997 ;9(5) :608) 特别描述了 Eph 受体 / 肝配蛋白配体系统成分的特异性。为了方便起见,根据该文章 (如 US6579683A 所

示)整理出并给出以下表 I,该表给出某些结合对的特异性,配体置于第二栏,它们的受体在第一栏报道,配体按与其受体亲和性的降序排列。

[0046] 在本发明所述的细胞标记物/特异性配体系统中,人们能想象,结合对的两个成分各自呈氨基酸序列的形式,或在合适时,呈核酸序列形式。可是,很清楚在一开始优选有呈氨基酸序列形式的、在 EPC 膜上表达的 Eph 受体。相似地,肝配蛋白配体以氨基酸序列或肝配蛋白肽片段的形式使用,将是非常有益的。这是因为 Eph 和肝配蛋白是以氨基酸形式结合的,蛋白/蛋白相互作用对于观察到促血管生成活性是必需的。因此,在下文中,Eph 和肝配蛋白仅以氨基酸序列的蛋白质形式出现。

[0047] 作为 Eph 标记物,这里可使用 EphA 或 EphB。可是,根据本发明,优选 EphB 作为 Eph 标记物,这是因为 EphB 标记物主要涉及血管生成,而(根据现有知识水平的了解)EphA 似乎主要涉及神经系统。

[0048] 根据本发明,EphB 标记物有利的是 EphB4 或 EphB1;在 EphB 标记物中,EphB4 优于 EphB1。

[0049] 根据本发明,在肝配蛋白配体中,将优选肝配蛋白-B 配体,尤其是肝配蛋白-B2 或肝配蛋白-B1。另外,肝配蛋白-B2 变体,例如相应于具有相同生物活性的肝配蛋白-B2 肽片段的变体,也是合适的。

[0050] 因此,在本发明所述的系统中,有利的是一方面利用标记物 EphB4 或 EphB1,另一方面利用配体肝配蛋白-B2 或肝配蛋白-B1,本发明特别优选的 Eph/肝配蛋白结合对是 EphB4/肝配蛋白-B2。

[0051] 为了使配体 L 能活化 EPC-Eph,重要的是在多数情况下使配体 L 与具有如下结构的蛋白材料形式的结合蛋白 K 相连或融合:

[0052] L-K (I)

[0053] 根据申请人的知识,重组肝配蛋白-B2 蛋白是无需借助于结合蛋白 K 就能单独活化 EPC-Eph 的物质。

[0054] 在适合本发明的结合蛋白 K 中,特别可提及众多抗体 Fc 片段(例如,通过用胃蛋白酶、木瓜蛋白酶或任何其他合适物质裂解抗体所得的那些)。为了方便起见,本文推荐市场上可买到的、作为抗体制剂(如 Fab' 和 F(ab)2)的副产品的 Fc 片段。

[0055] 作为以上给出的变体,所述蛋白材料 L-K 能用重组的、优选是人的肝配蛋白-B2 蛋白代替。

[0056] 适合本发明的 EPC 是包含在细胞外膜上表达的 Eph 细胞标记物(尤其是 EphB,优选 EphB1 或更佳的是 EphB4)的细胞。该 EPC 细胞得自单核细胞或表达 CD34 或 CD133 的细胞,其源自骨髓、外周血或更优选源自脐带血。

[0057] 单核细胞在骨髓中产生(在其中发现它们以高浓度存在),进入血流,并在脐带血和外周血中被发现。鉴于在它们的组成中有数量可观的细胞拥有(i)表达 Eph 标记物(更特别的是 EphB4 标记物)或(ii)在其外膜上包括所述已经表达的标记物所需的遗传材料,它们构成了可选择材料。本发明优选的单核细胞是 CD34⁺ 或 CD133⁺ 细胞,这是因为在分化后,它们提供了相对大量的基本表达 EphB4 标记物或包括 EphB4 标记物的 EPC。

[0058] 包含于单核细胞群中的、分化产生的 EPC 的浓度根据细胞来源而变化。所述浓度在骨髓和脐带血中或多或少是等量的。在另一方面,在外周血中较低。

[0059] 根据本发明的细胞材料（其由以上结构 II 所代表，其中蛋白材料 L-K 能用重组肝配蛋白 -B2 蛋白代替）由一个或多个细胞组成，每个细胞在其外膜上带有与其特异性配体结合的 Eph 标记物（尤其是 EphB4 或 EphB1）。作为变体形式，所述细胞材料可由培养物组成，所述培养物含几种具有结构 II 的细胞，并在合适的时候还组合有其他不由所述蛋白材料活化的细胞；因此，该培养物可以是活化的 EPC、未活化的 EPC 和单核细胞的细胞混合物。

[0060] 根据本发明的具体实施方式，所述细胞材料的获得是通过温育以下成分获得的，然后将其施用于施用位点：

[0061] (a) 含细胞标记物的内皮前体细胞 (EPC)，所述细胞标记物选自由 Eph、特别是 EphB4 或 EphB1 组成的组，和

[0062] (b) 如下结构的蛋白材料：

[0063] L-K (I)

[0064] 其由特异针对所述标记物的配体 (L) 组成，并与结合蛋白 (K)（尤其是抗体 Fc 片段）相连或融合。

[0065] 根据有益的实施方式，温育在体外进行 10 至 60 分钟，尤其进行 30 分钟，该温育期正好在施用细胞材料之前。

[0066] 作为变体形式，所述细胞材料可以是细胞培养物形式的，所述细胞培养物是纯化的或是细胞的混合物，其包含 (i) 用 L-K 或重组肝配蛋白 -B2 蛋白活化的 EPC 细胞，和 (ii) 未活化的前体，例如未用 L-K 或所述重组肝配蛋白 -B2 蛋白活化的单核细胞和 / 或 EPC。另外，细胞材料可保存在冷冻状态下。

[0067] 从上述视点来看，本发明优选的细胞材料为结构 II 的材料，其中所述标记物是 EphB4 或 EphB1，而且其中所述配体是肝配蛋白 -B2 或肝配蛋白 -B1。

[0068] 根据优选的实施方式，本发明制备所述细胞材料的方法包括以下步骤：

[0069] (1°) 利用源自骨髓、外周血或脐带血的单核细胞，

[0070] (2°) 分化前述步骤中的所述细胞，由此获得带有 Eph 标记物的 EPC，和

[0071] (3°) 通过使肝配蛋白与 Eph 结合，在体外活化步骤 (2°) 所得的 EPC。

[0072] 所述方法在合适时在步骤 (1°) 和 (2°) 之间包括额外的步骤，即：

[0073] (1a°) 分离 CD34⁺ 和 / 或 CD133⁺ 单核细胞。

[0074] 步骤 (1a°) 意味着有 (1°)+(1a°)+(2°) 三步过程。可是，相对于 (1°)+(2°) 两步过程，实施所述步骤 (1a°) 增加了生产成本。在实践中，由于未活化的 EPC 细胞用来稀释包含它们的细胞培养物中的活化的 EPC 细胞，而不损害它们的活性，因此目前两步过程显然比三步过程更有效益。

[0075] 根据本发明的方法，所述配体 L 与结合蛋白 K 相连或融合，由此提供如下结构的细胞材料：

[0076] EPC-Eph-L-K (II)

[0077] 其中所述 Eph 标记物有利的是 EphB4 或 EphB1，而且所述配体 L 是肝配蛋白 -B2 或肝配蛋白 -B1。

[0078] 作为药物，本发明所述的细胞材料尤其能用于治疗血管机能不全，特别是用于缺血的心脏、脑或外周组织的再血管化。

[0079] 本发明所述的细胞材料能以单位剂量形式包装，每剂含结构 II 的材料。作为变体

形式,可以预见一种包装,其中所述材料 II 的成分,即 EPC-Eph 和蛋白材料 L-K,并不接触;根据如下反应机理温育:

[0080]
$$\text{EPC-Eph} + \text{K-L} \rightarrow \text{EPC-Eph-K-L}$$

[0081] 所述温育在施用前进行,尤其在在进行该施用前 10 至 60 分钟(优选 20 至 30 分钟)进行。

[0082] 在这种情况下,推荐一种药物组合物,其特征在于,它包含治疗可接受量的本发明所述的促血管生成系统的两种成分,其分开包装,每种都混合有生理上可接受的赋形剂,所述两种成分在施用前温育,以产生结构 II 的细胞材料。

[0083] 如上所述,本发明所述的细胞材料用于再生血管组织,所述组织尤其在心脏或脑的水平上或在外周水平上受损。尤其适于制备用于治疗动脉炎、冠状或心脏血管机能不全和脑血管机能不全的组合物。在动物模型上,首先在治疗下肢“危急”缺血上,其次在确保恢复而使其能避免截肢上,它取得了好的结果。

[0084] 根据已知的方法本身,本发明所述的细胞材料能施用给哺乳动物,尤其是人。例如,所述材料能 (i) 被注射入血管损伤处或其附近, (ii) 通过静脉途径被注射入血液中,或者另外 (iii) 通过合适的载体方式被带入损伤位点。作为变体形式,通过注射(尤其是静脉注射)首先是 EPC-Eph 细胞,其次是与基因治疗领域已知的载体相结合的蛋白材料,能将其分开施用。

[0085] 在成人中,通过静脉注射能施用结构 II 的细胞,这种细胞在合适时被包含在未活化的 EPC 的细胞混合物中。该细胞混合物在每次注射时可含总共约 10^5 至 10^9 个细胞。

[0086] 阅读以下制备和药理学试验的例子将会更清晰地理解本发明的其他优点和特征。当然,该组例子不是限制性的,而是通过示例的方式给出的,所用的细胞材料为 EPC-EphB4-肝配蛋白-B2-Fc。

[0087] 实施例 1

[0088] 获取 EPC-EphB4

[0089] (A) 取人脐带血样品(分别取 30 至 50ml)并置于含抗凝的肝素钠溶液的无菌试管中。用 Pancoll (1.077g/ml, Dominique Dutscher S. A. 公司(Brumath, 法国)销售的产品)进行密度梯度离心,分离脐带血单核细胞。然后通过于 37°C 在塑料平皿上培养 24 小时,将单核细胞与粘附的细胞分开。获取含表达 EphB4 标记物的单核细胞和不表达所述标记物的单核细胞的细胞混合物。

[0090] (B) 将实施例 1(A) 最后获得的细胞混合物置于 6 孔板的孔中,所述孔用溶于培养基中的 I 型胶原蛋白(Sigma-Aldrich 公司(Saint-Quentin, 法国)销售的产品)包被,所述培养基含 hVEGF 用于分化(由 LeRicousse-Roussanne S. 等, Cardiovasc. Res., 2004; 62:176-184 的文章确定)。培养 15 天后,收集富集 EPC-EphB4 的细胞混合物。

[0091] 实施例 2

[0092] 获取 EPC-EphB4

[0093] (A) 利用实施例 1(A) 最后获得的细胞混合物,通过标准的免疫磁分离技术,尤其通过包含抗 CD34 单克隆抗体的“CD34 分离试剂盒”(由 Miltenyi Biotech 公司(巴黎, 法国)销售),将 CD34^+ 细胞从非粘附的细胞中分离并纯化出来。用流式细胞计并利用与 FITC 偶联的抗 CD34 单克隆抗体(优选不同于前一种)分析所获得的细胞,表明它们中的 75%

($\pm 5.6\%$) 带有 CD34 标记物。

[0094] (B) 所获得的细胞混合物含 1.5×10^6 至 3.5×10^6 个 CD34+ 细胞, 将它们置于 6 孔板的孔中, 所述孔用含纤连蛋白、层粘连蛋白、肝素硫酸钠和 I 和 IV 型胶原蛋白 (上述 Sigma-Aldrich 公司销售的产品) 包被, 在含 hVEGF、bFGF 和 IGF1 (R&D 系统有限公司 (牛津, 英国) 销售的产品) 的培养基中培养。培养 15 天后, 回收富含 EPC-EphB4 的细胞混合物。

[0095] 实施例 3

[0096] 获取 EPC-EphB4- 肝配蛋白 -B2-Fc

[0097] 获取实施例 1(B) 所述的细胞混合物之后 (所述细胞混合物含带有 EphB4 标记物的 EPC 细胞), 该细胞混合物用 3ug/ml 如下融合蛋白处理: 肝配蛋白 -B2-Fc、EphB4-Fc 或 CD6-Fc (CD6-Fc 作为阴性对照, 用于证明用肝配蛋白 -B2 活化 EPC 所观察到的效应), 于 37°C 温育 30 分钟。通过冲洗去除每种未结合的融合蛋白 (此处至少进行 2 次冲洗)。

[0098] 得到三种细胞混合物, 其中一种含本发明所述的结构为 EPC-EphB4- 肝配蛋白 -B2-Fc 的细胞材料, 第二种含用 EphB4-Fc 融合蛋白活化 EPC 而产生的细胞材料, 而第三种含用 CD6-Fc 融合蛋白活化 EPC 而产生的细胞材料。

[0099] 实施例 4

[0100] 获取 EPC-EphB4- 肝配蛋白 -B2-Fc

[0101] 进行如实施例 3 所示的过程, 以获取结构为 EPC-EphB4- 肝配蛋白 -B2-Fc 的细胞, 其中区别在于起始细胞混合物是在实施例 2(B) 最后所获得的。获取所述的活化的细胞。

[0102] 试验规程

[0103] 在时间 $T = 0$ 时, 结扎 7 周大的雄性裸鼠 (每次试验和每种测试产品 (包括 PBS、未活化的 EPC 和 HUVEC 对照) 使用一组 6 只动物) 的右股动脉, 从而诱导缺血。在时间 $T = +4.5$ 小时时, 进行实施例 3 所述的温育, 从而获得本发明所述的结构为 EPC-EphB4- 肝配蛋白 -B2-Fc 的细胞材料和其他两种用于比较的细胞材料。接着在时间 $T = +5$ 小时时, 将实施例 3 中所得的三种细胞混合物之每一种静脉注射入眶后窦中 (10^6 个细胞 / 小鼠)。在时间 $T = +12$ 天时, 处死鼠, 并去掉有缺血的肢体和未缺血肢体的腓肠肌。确定以下事项:

[0104] - 血管造影得分;

[0105] - 毛细血管密度 (即毛细血管数 / mm^2); 和

[0106] - 皮肤血流。

[0107] 在图 2-4 中, 所得数值以平均值 $\pm$ SEM 的形式给出。

[0108] 试验 1

[0109] 血管造影得分

[0110] 血管造影得分 (即, 脉管密度) 通过显微血管造影术来确定。更具体的, 与未缺血肢体相比的缺血肢体脉管密度, 通过高分辨显微血管造影术来确定 (参见 Silvestre J. S. 等, *Cir. Res.*, 2001 ;89 :259-264 的文章中的操作方法)。所得的结果以比率 (缺血肢体 / 未缺血肢体) 的形式给出, 其在图 2 中以图表形式给出。

[0111] 观察到, 相对于接受 PBS 的对照组, 注射未活化的 EPC、或用 EphB4-Fc 或 CD6-Fc 融合蛋白活化的 EPC 以相当的水平轻微增加脉管密度。当 EPC 细胞用肝配蛋白 -B2-Fc 融合蛋白活化时, 注意到脉管密度较注射未活化的 EPC 后所观察到的增加 25.5%, 即血管造影

得分增加 1.34 倍。

[0112] 试验 2

[0113] 毛细血管密度 (毛细血管数 /mm²)

[0114] 通过用特异针对内皮细胞的抗 CD31 标记物的抗体标记腓肠肌切片,并与未缺血肢体的腓肠肌切片比较,来研究缺血肌肉的毛细血管密度。所得的结果以比率 (缺血肢体 / 未缺血肢体) 的形式提供,其在图 3 中以图的形式给出。

[0115] 观察到,当通过用本发明所述的肝配蛋白 -B2-Fc 融合蛋白活化的 EPC 注射来处理小鼠时,毛细血管密度与注射未活化的 EPC 相比增大 36.7%,即毛细血管密度增加 1.57 倍。

[0116] 试验 3

[0117] 皮肤血流

[0118] 还对血流进行定量评估,其用缺血肢体 / 未缺血肢体的比率表示,以验证脉管数量变化对应于功能适应,因此对应于缺血肢体的灌注变化。所得的结果在图 4 中以图的形式给出。

[0119] 观察到,用本发明所述的肝配蛋白 -B2-Fc 融合蛋白活化的 EPC 注射,使缺血肢体血流与未缺血肢体血流的比率增加 1.37 倍 (增加 27.1%)。

[0120] 实施例 5

[0121] EphB4 标记物的作用

[0122] 在该最后一个实施例中,通过其中 EphB4 标记物蛋白的合成被抑制的细胞制品来证明 EphB4 标记物的作用。

[0123] 为此,利用“干扰 RNA”或“siRNA”,其尤其能特异降解编码给定基因的信使 RNA,特别是编码表达 EphB4 标记物的基因的信使 RNA。这些干扰 RNA 的特定作用被称为转染。

[0124] 根据与上述试验规程相似的试验规程向雄性裸鼠施用这些细胞制品。

[0125] 在第一步中,将内皮前体细胞或 EPC 培养至 80% 满板。EphB4 siRNA 溶液 (即含能抑制 EphB4 标记物蛋白合成的干扰 RNA 的溶液) 用不含抗生素、不含血清的 M199 培养基稀释,并在环境温度下温育 5 分钟。另外,不针对任何特定基因的“对照 siRNA”溶液在相同条件下被稀释。后一被稀释的溶液对 EphB4 标记物的表达不具生物学效应,其仅用来验证干扰 RNA 没有独立于它们抑制剂作用之外的固有活性。

[0126] 另外,转染剂 Dharmafect2 (Dharmacon, Perbio) 在与上述溶液相同的条件下制备,然后与这些溶液混合,然后接着进行温育。

[0127] 然后这些温育的溶液与内皮前体细胞 EPC 接触,从而在第一细胞制品中抑制 EphB4 标记物蛋白合成,而在其中编码 EphB4 标记物的基因表达不被抑制的第二细胞制品中形成对照。

[0128] 这两种细胞制品将接着分别被分成两份,其中之一用肝配蛋白 -B2-Fc 融合蛋白刺激,然后静脉注射入右股动脉已经被结扎的小鼠。以这种方式,向小鼠施用 4 种不同细胞制品。

[0129] 该实施例 5 的结果概要如以下表 I 所示。

[0130] 表 I

[0131]

编号	PBS	1	2	3	4
血管造影得分	100	161.5+/-10.7	218.8+/-12.8	153.5+/-2.9	158.9+/-12.5
血流	100	144.5+/-4.5	193.5+/-4.7	151.1+/-8	138.5+/-14.1
毛细血管密度	100	147.4+/-10.7	201.7+/-12.8	142.6+/-11	140.8+/-11.3

[0132] 1:用对照 siRNA 转染的并在注射前未刺激的 EPC;

[0133] 2:用对照 siRNA 转染的并在注射前用肝配蛋白 -B2-Fc 刺激的 EPC;

[0134] 3:用 EphB4siRNA 转染的并在注射前未刺激的 EPC;

[0135] 4:用 EphB4siRNA 转染的并在注射前用肝配蛋白 -B2-Fc 刺激的 EPC;

[0136] 在此再次注意到,对于所施用的 4 种细胞制剂,血管造影得分结果、血流结果和毛细血管密度结果基本上平行发展。

[0137] 而且,很显然的是,1、3 和 4 号细胞制品的测量结果基本上是相同的,而 2 号细胞制品的结果增加近 40%。

[0138] 由于显然假设将 EphB4 标记物和肝配蛋白 -B2-Fc 蛋白材料相连促进了促血管生成活性,因此在阅读表 I 后,通过比较 1 号和 4 号细胞制品的结果,注意到:掺入“对照 siRNA”、但不与肝配蛋白 -B2-Fc 蛋白材料相连的内皮前体细胞,其效应基本上等于 EphB4 标记物表达被抑制、但与肝配蛋白 -B2-Fc 蛋白材料相连的内皮前体细胞。因此表明干扰 RNA 没有独立于它们的抑制剂作用之外的固有活性;而且,与不表达标记物、并且与肝配蛋白 -B2-Fc 蛋白材料相连的内皮前体细胞 (EPC) 相比,表达 EphB4 标记物的内皮前体细胞 (EPC) 不具有更高活性。

[0139] 而且,通过比较 1 号和 3 号细胞制品的测量结果,显示内皮前体细胞 (EPC) 自身,其或者表达 EphB4 标记物或者不表达 EphB4 标记物,具有相当的活性。

[0140] 另外,同时也是最重要的方面,鉴于 2 号细胞制品的结果,并与任何其他制品进行比较,清楚地显示:将 EphB4 标记物和肝配蛋白 -B2-Fc 蛋白材料特异性相连显示出可观的促血管生成活性。

[0141] 表 II

[0142] 一些 Eph/ 肝配蛋白结合对的特异性

[0143]

Eph 受体	肝配蛋白配体（亲和性递减排列）
EphA1	肝配蛋白 -A1
EphA2	肝配蛋白 -A3, -A1, -A5, -A4
EphA3	肝配蛋白 -A5, -A2, -A3, -A1
EphA4	肝配蛋白 -A5, -A1, -A3, -A2, -B2, -B3
EphA5	肝配蛋白 -A5, -A1, -A2, -A3, -A4
EphA6	肝配蛋白 -A2, -A1, -A3, -A4, -A5
EphA7	肝配蛋白 -A2, -A3, -A1
EphA8	肝配蛋白 -A5, -A3, -A2
EphB1	肝配蛋白 -B2, -B1, -A3
EphB2	肝配蛋白 -B1, -B2, -B3
EphB3	肝配蛋白 -B1, -B2, -B3
EphB4	肝配蛋白 -B2, -B1

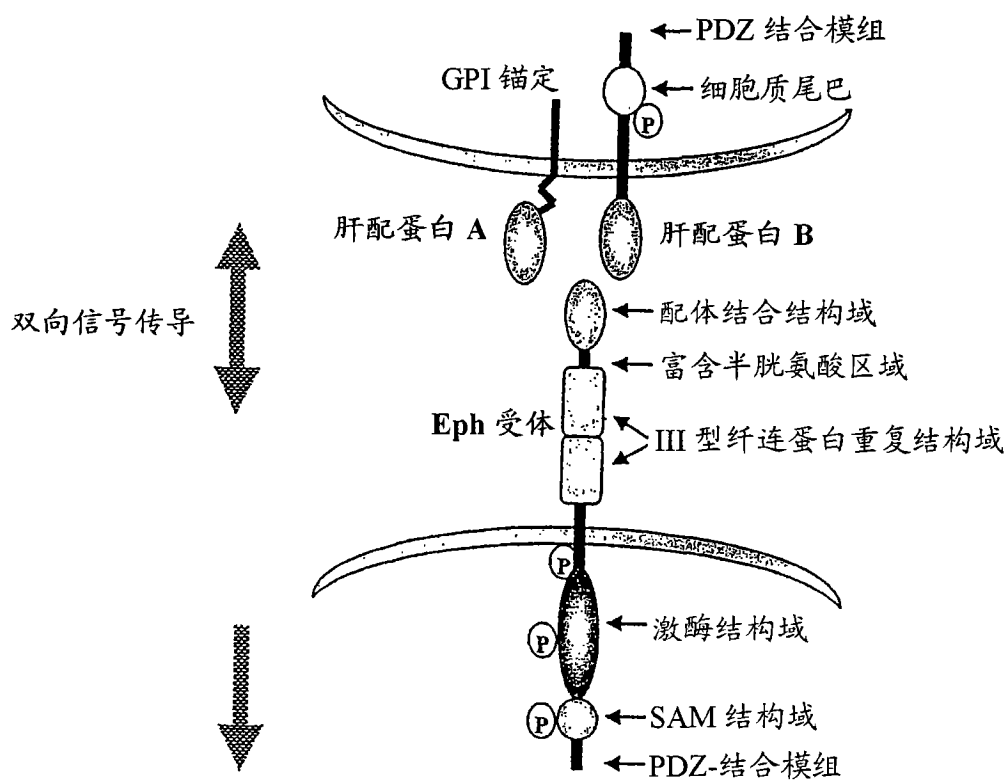


图 1

血管造影得分
(缺血肢体/未缺血肢体)

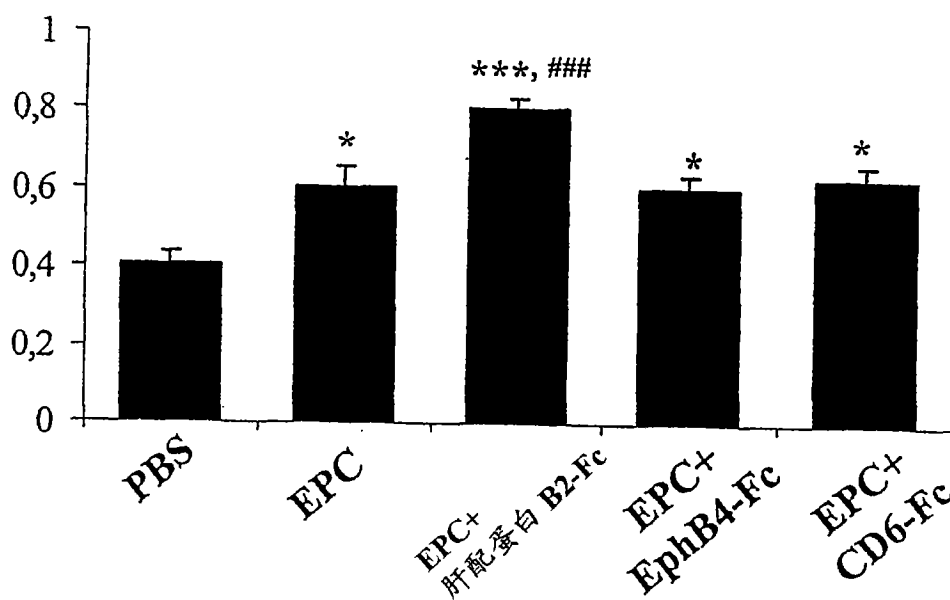


图 2

毛细血管数目(CD31 标记)/mm²
(缺血肢体/未缺血肢体)

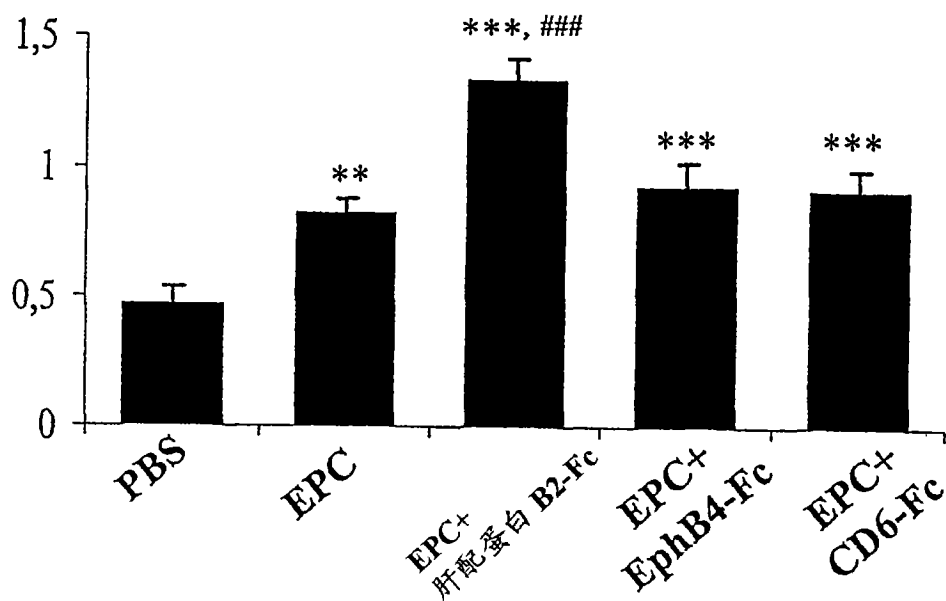


图 3

皮肤血流
(缺血肢体/未缺血肢体)

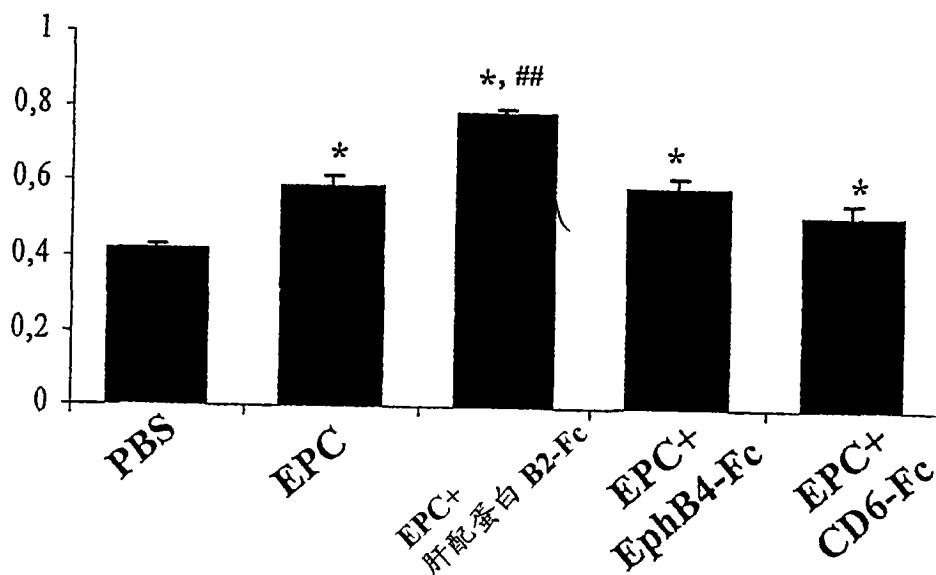


图 4