



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110573170 A

(43)申请公布日 2019.12.13

(21)申请号 201880028213.1

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

(22)申请日 2018.05.14

责任公司 11240

(30)优先权数据

代理人 杜升

62/506,006 2017.05.15 US

(51)Int.Cl.

A61K 35/28(2015.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 21/00(2006.01)

2019.10.28

C12N 5/0775(2010.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2018/050523 2018.05.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/211498 EN 2018.11.22

(71)申请人 干细胞医药有限公司

地址 以色列耶路撒冷

(72)发明人 埃胡德·马罗姆

弗里达·格里恩斯潘 迪马·尤金

权利要求书3页 说明书26页 附图9页

(54)发明名称

使用脂肪来源的干细胞治疗多发性硬化症

(57)摘要

提供了治疗进展型多发性硬化症形式的方法,包括将脂肪来源干细胞给予至中枢神经系统(CNS)中。还提供了用于获得ADSC的改进方法,与当前使用的方法相比,该方法更具成本效益并且提供更高的产率。

1. 一种治疗原发性进展型多发性硬化症的方法,包括将非基因修饰的人脂肪来源干细胞(hADSC)给予对其有需要的受试者的中枢神经系统(CNS)中。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述hADSC是通过以下获得自人皮下脂肪的hADSC:

(a) 冷冻脂肪抽吸物;

(b) 解冻所述脂肪抽吸物并用组织解离酶或通过机械破碎解离;

(c) 通过离心粒化包含所述hADSC的细胞部分,并可选地用能够支持细胞活力的悬浮介质洗涤颗粒,并使悬浮液经受至少一次另外的离心;

(d) 将步骤(c)中获得的颗粒重悬于能够支持细胞活力的悬浮介质中并从重悬的颗粒中的细胞群体中选择hADSC;

(e) 可选地在hADSC选择之前进行至少一次过滤;和

(f) 可选地将所述hADSC培养至少3代。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述hADSC是通过以下获自人皮下脂肪的hADSC:

(i) 冷冻脂肪抽吸物;(ii) 解冻所述脂肪抽吸物并使用组织解离酶或通过机械破碎解离;

(iii) 通过离心粒化包含所述hADSC的细胞部分;(iv) 用等渗缓冲液或培养基洗涤颗粒并进行另外的离心;(v) 将步骤(iv)中获得的所述颗粒重悬于等渗缓冲液或培养基中并至少进行一次过滤;(vi) 从重悬的颗粒中的细胞群体中选择hADSC;以及(vii) 将所述hADSC培养至少3代。

4. 根据权利要求2或权利要求3所述的方法,其中,在离心后获得的包含所述hADSC的细胞部分不暴露于红细胞裂解缓冲液。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述hADSC通过粘附至细胞培养容器来选择。

6. 一种将人脂肪来源干细胞(hADSC)注射到对其有需要的受试者的中枢神经系统(CNS)中的方法,所述方法包括通过以下从人皮下脂肪获得hADSC:

(a) 冷冻脂肪抽吸物;

(b) 解冻所述脂肪抽吸物并用组织解离酶或通过机械破碎解离;

(c) 通过离心粒化包含所述hADSC的细胞部分,并可选地用能够支持细胞活力的悬浮介质洗涤颗粒,并使悬浮液经受至少一次另外的离心;

(d) 将步骤(c)中获得的颗粒重悬于能够支持细胞活力的悬浮介质中并进行至少一次过滤;

(e) 从重悬的颗粒中的细胞群体中选择所述hADSC;

(f) 可选地将所述hADSC培养至少3代;和

(g) 将所述hADSC注射到所述受试者的CNS中。

7. 一种用于由人皮下脂肪获得人脂肪来源干细胞(hADSC)以给予至对其有需要的受试者的方法,所述方法由以下组成:

(a) 冷冻脂肪抽吸物;

(b) 解冻所述脂肪抽吸物并用组织解离酶或通过机械破碎解离;

(c) 通过离心粒化包含所述hADSC的细胞部分,并可选地用能够支持细胞活力的悬浮介质洗涤颗粒,并使悬浮液经受至少一次另外的离心;

(d) 将步骤(c)中获得的颗粒重悬于能够支持细胞活力的悬浮介质中并进行至少一次过滤；

(e) 从重悬的颗粒中的细胞群体中选择hADSC；和

(f) 可选地在将所述hADSC给予所述受试者之前，将其培养至少3代。

8. 根据权利要求6或权利要求7所述的方法，其中，所述hADSC通过粘附至组织培养容器来选择。

9. 根据权利要求6或权利要求7所述的方法，其中，所述受试者患有多发性硬化症(MS)。

10. 根据权利要求9所述的方法，其中，所述多发性硬化是进展型MS。

11. 根据权利要求10所述的方法，其中，所述进展型MS是继发性进展型MS。

12. 根据权利要求10所述的方法，其中，所述进展型MS是原发性进展型MS。

13. 根据权利要求2-12中任一项所述的方法，其中，所述冷冻在-80°C下进行，然后在气相液氮中进行。

14. 根据权利要求2-13中任一项所述的方法，其中，所述组织解离酶选自胶原酶、分散酶或它们的组合。

15. 根据权利要求14所述的方法，其中，所述组织解离酶是胶原酶。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中，所述hADSC特征在于CD44、CD73和CD90被至少95%的细胞阳性表达、CD105被至少90%的细胞阳性表达，且CD45、CD19、CD11b和HLA-DR被至少95%的细胞阴性表达。

17. 根据权利要求16所述的方法，其中，所述hADSC特征在于CD44、CD73和CD90被至少98%的细胞阳性表达、CD105被至少90%的细胞阳性表达，且CD45、CD19、CD11b和HLA-DR被至少98%的细胞阴性表达。

18. 根据权利要求16所述的方法，其中，所述hADSC进一步特征在于CD34被1-10%的细胞阳性表达。

19. 根据权利要求16所述的方法，其中，至少50%的细胞对CD105、CD73、CD44和CD90为阳性，并且对CD45、CD19、CD11b和HLA-DR为阴性。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中，所述hADSC是在其给予前培养至3-10的传代数的hADSC。

21. 根据权利要求20所述的方法，其中，所述hADSC是在其给予前培养至3-5的传代数的hADSC。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中，所述hADSC给予一次。

23. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法，其中，所述hADSC给予多于一次。

24. 根据权利要求23所述的方法，其中，所述hADSC每2-8个月给予一次。

25. 根据权利要求23所述的方法，其中，所述hADSC每3-12个月给予一次。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中，通过鞘内给予来给予所述hADSC。

27. 根据权利要求1-25中任一项所述的方法，其中，通过室内或脑室内(ICV)给予来给予所述hADSC。

28. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中，所述hADSC是自体的。

29. 根据权利要求1-27中任一项所述的方法，其中，所述hADSC是同种异体的。

30. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中，给予所述hADSC包括每给予一次给

予约 10^5 - 3×10^8 个细胞。

31.一种药物组合物,包含非基因修饰的人脂肪来源干细胞(hADSC),用于通过给予至中枢神经系统(CNS)中来治疗原发性进展型多发性硬化症。

使用脂肪来源的干细胞治疗多发性硬化症

技术领域

[0001] 本发明涉及多发性硬化症的治疗方案,包括给予脂肪来源的干细胞。特别地,本发明涉及使用脑室内或鞘内给予脂肪来源干细胞来治疗进展型多发性硬化症。

背景技术

[0002] 多发性硬化症(MS)是中枢神经系统(CNS)的慢性炎性疾病,其通常发生于年轻人,女性比男性更普遍。MS影响大脑和脊髓中的神经细胞相互沟通和控制身体功能的能力。临床上的残疾与髓磷脂的炎症有关,髓磷脂是CNS的轴突周围的保护鞘,由于自身免疫攻击和神经退行性过程而受损。结果,大脑和脊髓的白质因局部病变(斑块)而变得瘢痕化,从而导致神经功能障碍。MS的症状有几种模式。大多数患者在初始阶段经历复发缓解型(RRMS)病程,其特征是不可预测的复发,随后是部分或完全恢复(缓解)期,在某些时候变成进展型(PMS)。这种进展型MS被分类为继发性进展型MS(SPMS)。一些患者从症状发作就经历进展型病程,并且这种疾病模式被分类为原发性进展型MS(PPMS)。

[0003] 患有复发缓解型MS的患者通常在急性发作(复发)期间接受糖皮质激素治疗,并使用免疫调节或免疫抑制药物治疗以防止新的复发和残疾进展。这些包括干扰素β(Avonex®、Rebif®、Betaseron®),醋酸格拉替雷(Copaxone®)、富马酸二甲酯(Tecfidera®)、芬戈莫德(Gilenya®)、那他珠单抗(Tysabri®)和在更严重病情下的化学治疗剂米托蒽醌。

[0004] 有时使用相似的药物来治疗进展型MS,但是治疗主要集中在控制症状和康复方面。MS的所有治疗选择仅部分有效。

[0005] 最近的评论强调,进展型MS是目前缺乏可用的疾病改善疗法的领域(Clinical Medicine, 2016, 第16 (6) 卷, 第s53-s59页)。Ocrelizumab (OCREVUS™) 是一种人源化抗CD20单克隆抗体,其已于2016年被美国食品和药物管理局(FDA)授予PPMS的突破性疗法认定(Investor Update by Roche, Basel, 2016年2月17日)。

[0006] 用于治疗自身免疫和/或神经退行性疾病的间充质干细胞(MSC) :

[0007] MSC是多能自我更新细胞的来源,最初在成人骨髓中被确定。自然地,它们分化产生骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞。MSC为胚胎干细胞(ES)的替代提供了多能干细胞的可获取来源。MSC潜在地避开了细胞疗法中对免疫抑制的需求,因为它们可以源自自体来源,并且还因为它们的特点是免疫豁免性质,有利于同种异体使用。

[0008] 已证实基于MSC的疗法在临床前研究中针对多种适应症(包括移植植物抗宿主病、中风、心肌梗死、肺纤维化和自身免疫疾病)有效。MSC也被广泛研究作为抗神经退行性疾病的治疗工具。在神经退行性疾病的背景下,已经从两个方面讨论了MSC:它们在特定条件下转分化为神经细胞的能力及其神经保护和免疫调节作用。当移植到大脑中时,MSC产生神经营养和生长因子,其保护受损组织和诱导受损组织的再生。另外,还已经探索了MSC作为基因递送载体,例如,经过基因工程化以在脑中过表达神经胶质来源或脑来源的神经营养因子。目前正在从事有关MSC的MS、ALS、创伤性脑外伤、脊髓损伤和中风的临床试验。

[0009] 脂肪来源干细胞 (ADSC) :

[0010] 在过去的几十年中,已经证明脂肪组织除了主要功能是作为能量储存外,还是多能基质细胞的丰富资源 (Zuk et al., Mol Biol Cell 2002; 13:4279-4295)。

[0011] WO2010/045645公开了从脂肪组织回收脂肪干细胞的方法。

[0012] US 8,021,882公开了用于通过提供脂肪干细胞培养物并收集其上清液来生产用于治疗神经损伤的干细胞条件培养基的方法。

[0013] Constantin et al., (2009) Stem Cells., 27 (10) :2624-35研究了在慢性实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 中向小鼠静脉注射脂肪来源的间充质干细胞。

[0014] Stepien et al., (2016) Mediators of Inflammation, vol. 2016报道了使用鞘内注射自体脂肪干细胞治疗的具有RRMS或SPMS的MS患者的一年随访。

[0015] WO2006/057003尤其公开了使用骨髓来源干细胞结合格拉替雷的干细胞治疗方法。

[0016] Aharoni et al., (2009) J Neuroimmunol., 215 (1-2) :73-83报道了关于使用脑室或腹膜内移植的肌肉祖细胞 (MPC) 和醋酸格拉替雷联合治疗EAE诱导的小鼠。

[0017] 本领域需要用于治疗多发性硬化症的改进方法,特别是对于具有进展型疾病形式的患者。

发明内容

[0018] 根据一些方面,本发明提供了使用给予到中枢神经系统 (CNS) 中的脂肪来源干细胞 (ADSC) 的多发性硬化症 (MS) 的疗法,包括进展型MS,特别是原发性进展型MS。本发明进一步提供了用于获得ADSC的改进方法,与当前使用的方法相比,该方法更具成本效益并且提供更高的产率。

[0019] 本发明部分地基于在慢性多发性硬化症动物模型中给予到CNS中的人ADSC对临床评分的出乎意料的效果。发现这些细胞在降低最大疾病得分上尤其有效,重要地,在减慢疾病的进展方面有效。有利地,使用如下文举例说明的改良方法分离细胞。本文首次公开的改进方法涉及在进一步加工之前冷冻和解冻通过脂肪抽吸术获得的脂肪组织样品,即脂肪抽吸物。改进的方法还避免了如目前使用的方法要求的施加缓冲液以破坏脂肪抽吸物中存在的血细胞的需要。因此,改进的方法还消除了随后将ADSC与细胞碎片分离。出乎意料地发现,即使不施加红细胞裂解缓冲液,所得ADSC样品的生长也与根据标准方法分离的样品一样有效。

[0020] 根据一个方面,本发明提供了治疗原发性进展型多发性硬化症的方法,其包括将非基因修饰的人脂肪来源干细胞 (hADSC) 给予于需要其的受试者的中枢神经系统 (CNS) 中。

[0021] 在一些实施方式中,hADSC是通过以下由人皮下脂肪获得的hADSC:

[0022] (a) 冷冻脂肪抽吸物;

[0023] (b) 解冻脂肪抽吸物并用组织解离酶或通过机械破碎解离;

[0024] (c) 通过离心粒化包含hADSC的细胞部分,并可选地用能够支持细胞活力的悬浮介质洗涤颗粒,并使悬浮液经受至少一次另外的离心;

[0025] (d) 将步骤 (c) 中获得的颗粒重悬于能够支持细胞活力的悬浮介质中并从重悬的颗粒中的细胞群体中选择hADSC;

[0026] (e) 可选地在hADSC选择之前进行至少一次过滤；和

[0027] (f) 可选地将hADSC培养至少3代。

[0028] 在一些实施方式中，hADSC是通过以下由人皮下脂肪获得的hADSC：(i) 冷冻脂肪抽吸物；(ii) 解冻脂肪抽吸物并使用组织解离酶或通过机械破碎解离；(iii) 通过离心粒化包含hADSC的细胞部分；(iv) 用等渗缓冲液或培养基洗涤颗粒并进行进一步离心；(v) 将步骤(iv)中获得的颗粒重悬于等渗缓冲液或培养基中并至少进行一次过滤；(vi) 从重悬的颗粒中的细胞群体中选择hADSC；以及(vii) 将hADSC培养至少3代。

[0029] 如本文所公开的，获得ADSC的方法避免了施加缓冲剂以引起最初存在于脂肪抽吸物中红细胞的裂解的需要。因此，在一些实施方式中，在不施加红细胞裂解缓冲液的情况下，处理脂肪抽吸物以分离脂肪来源干细胞。根据这些实施方式，离心后获得的包含hADSC的细胞部分不暴露于红细胞裂解缓冲液。

[0030] 根据另一方面，本发明提供了将人脂肪来源干细胞(hADSC)注射到有需要的受试者的中枢神经系统(CNS)中的方法，该方法包括通过以下从人皮下脂肪获得hADSC：

[0031] (a) 冷冻脂肪抽吸物；

[0032] (b) 解冻脂肪抽吸物并用组织解离酶或通过机械破碎解离；

[0033] (c) 通过离心粒化包含hADSC的细胞部分，并可选地用能够支持细胞活力的悬浮介质洗涤颗粒，并进行至少另外一次离心；

[0034] (d) 将步骤(c)中获得的颗粒重新悬浮在缓冲液或培养基中并进行至少一次过滤；

[0035] (e) 从重悬的颗粒中的细胞群体中选择hADSC；

[0036] (f) 可选地将hADSC培养至少3代；且

[0037] (g) 将hADSC注射入受试者的CNS中。

[0038] 根据另一方面，本发明提供了用于从人皮下脂肪中获得人脂肪来源干细胞(hADSC)用于给予至需要其的受试者的方法，该方法由以下组成：

[0039] (a) 冷冻脂肪抽吸物；

[0040] (b) 解冻脂肪抽吸物并用组织解离酶或通过机械破碎解离；

[0041] (c) 通过离心粒化包含hADSC的细胞部分，并可选地用能够支持细胞活力的悬浮介质洗涤颗粒，并使悬浮液经受至少一次另外的离心；

[0042] (d) 将步骤(c)中获得的颗粒重悬于能够支持细胞活力的悬浮介质中并进行至少一次过滤；

[0043] (e) 从重悬的颗粒中的细胞群体中选择hADSC；和

[0044] (f) 可选地在将hADSC给予给受试者之前，将其培养至少3代。

[0045] 如本文公开的，离心后获得的包含hADSC的细胞部分不暴露于红细胞裂解缓冲液。

[0046] 在一些实施方式中，通过粘附至细胞培养容器来选择hADSC。在一些实施方式中，细胞粘附至塑料组织培养容器。

[0047] 在一些实施方式中，在-80°C下进行冷冻，随后通过气相液氮冷冻。

[0048] 在一些实施方式中，组织解离酶选自胶原酶、分散酶或其组合。在一些具体的实施方式中，组织解离酶是胶原酶。

[0049] 在一些实施方式中，hADSC的特征在于CD44、CD73和CD90被至少95%的细胞阳性表达、CD105被至少90%的细胞阳性表达，且CD45、CD19、CD11b和HLA-DR被至少95%的细胞阴

性表达。根据一些实施方式, hADSC进一步特征在于CD34被1-10%的细胞阳性表达。

[0050] 在一些实施方式中, hADSC的特征在于CD44、CD73和CD90被至少98%的细胞阳性表达、CD105被至少90%的细胞阳性表达,且CD45、CD19、CD11b和HLA-DR被至少98%的细胞阴性表达。

[0051] 在一些实施方式中,至少50%的细胞对CD105、CD73、CD44和CD90为阳性,并且对CD45、CD19、CD11b和HLA-DR为阴性。

[0052] 在一些实施方式中, hADSC是在其给予前培养至3-10的传代数的hADSC。在另外的实施方式中, hADSC是在其给予前培养至3-5的传代数的hADSC。

[0053] 在一些实施方式中, hADSC是在其给予前在无异源培养基中培养的hADSC。

[0054] 根据一些实施方式, hADSC给予一次。

[0055] 根据其他实施方式, hADSC给予一次以上,例如两次、三次、四次等。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。根据一些实施方式, hADSC每2-8个月给予一次。根据另外的实施方式, hADSC每3-12个月给予一次。

[0056] 根据一些实施方式,通过鞘内给予来给予hADSC。

[0057] 根据其他实施方式,通过室内或脑室内 (ICV) 给予,即进入脑室中,给予hADSC。

[0058] 根据一些实施方式, hADSC衍生自通过抽脂抽吸获得的人皮下脂肪。

[0059] 根据一些实施方式, hADSC是自体的。

[0060] 根据其他实施方式, hADSC是异体的。

[0061] 根据一些实施方式,给予hADSC包括每一次给予给予约 10^5 - 3×10^8 个细胞。

[0062] 如本文描述的待治疗的受试者通常是人类。根据一些实施方式,本发明的方法和组合物可用于治疗多发性硬化症,特别是进展型多发性硬化症 (MS)。因此,根据一些实施方式,该受试者患有MS。在一些实施方式中,受试者是患有进展型MS的受试者。在一些特定的实施方式中,进展型MS是继发性进展型MS。在另外的特定实施方式中,进展型MS是原发性进展型MS。

[0063] 通过下面的详细描述、实施例和权利要求,本发明的这些和其他方面和特征将变得显而易见。

附图说明

[0064] 图1:EAE的ADSC剂量反应-平均临床评分分析至第28天。所有组 (n=10/组,+/-标准误差)。

[0065] 图2:EAE的ADSC剂量反应-平均临床评分分析至第28天。介质与 2×10^5 个细胞/动物相比较。(n=10/组,+/-标准误差)。

[0066] 图3:EAE的ADSC剂量反应-平均临床评分分析至第28天。 1×10^5 个细胞、 2×10^5 个细胞和 4×10^5 个细胞/动物的比较。(n=10/组,+/-标准误差)。

[0067] 图4:EAE的ADSC剂量反应-体重分析至第29天。(n=10/组,+/-标准误差)。

[0068] 图5:ADSC细胞剂量对EAE的影响-平均临床评分(疾病负担)的平均AUC至第28天。*P<0.05 (n=10/组,+/-标准误差)

[0069] 图6:ADSC剂量对EAE的影响-平均最高得分分析到第28天。*P<0.05 (n=10/组,+/-标准误差)。

[0070] 图7:作为传代数的函数的ADSC的细胞表面标记物表达。如实施例部分中描述的从脂肪组织分离细胞并培养,并分析指示的标记物的表达。结果是九(9)个样本的平均+/-标准偏差。

[0071] 图8:分离后有或没有红细胞裂解的SVF细胞计数数据。(A) 细胞/毫升;(B) %活力。

[0072] 图9:分离后有或没有红细胞裂解的第0代的细胞计数数据。(A) 细胞/毫升;(B) %活力。

[0073] 图10:SVF和ADSC产率作为脂肪抽吸组织样品(第一批)的初始体积的函数。在P#0(B)下和在P#1(C)下,SVF分离后(A)立即的活细胞总数。

[0074] 图11:SVF和ADSC产率作为脂肪抽吸组织样品(第二批)的初始体积的函数。在P#0(B)下和在P#1(C)下,SVF分离后(A)立即的活细胞总数。

[0075] 图12:SVF和ADSC产率作为脂肪抽吸组织样品(第三批)的初始体积的函数。在P#0(B)下和在P#1(C)下,SVF分离后(A)立即的活细胞总数。

具体实施方式

[0076] 根据一些方面,本发明提供了使用脂肪来源干细胞(ADSC)的多发性硬化症(MS)包括进展型MS的疗法。

[0077] 在一些实施方式中,提供了一种治疗原发性进展型多发性硬化症的方法,其包括将人脂肪来源干细胞(hADSC)给予至需要其的受试者的中枢神经系统(CNS)中。

[0078] 本发明的发明人已经利用MOG诱导的EAE模型来评估脂肪来源间充质干细胞对疾病结果的影响。MOG是一种糖蛋白,被认为在中枢神经系统(CNS)的神经的髓鞘化的过程中是重要的。使用MOG 35-55肽的免疫通常用于诱导C57BL/6小鼠中的慢性EAE。将ADSC注射到其中已经使用MOG诱导EAE的小鼠的脑室(ICV)中。用不同剂量的干细胞治疗小鼠。

[0079] 本文首次公开的出乎意料的观察结果证明了人类ADSC对慢性EAE的明显作用,包括临床评分、最大平均疾病评分和疾病进展。

[0080] 因此,本发明提供了治疗方法和方案,包括向患有进展型多发性硬化形式的受试者给予人间充质脂肪来源的干细胞。与使用干细胞的静脉内治疗相比,这些治疗对多发性硬化症提供优越的治疗功效。如通过各种临床评分确定的,当前治疗产生改善和延长的疗效。

[0081] 目前,尚未证明包括给予脂肪来源干细胞的多发性硬化症的治疗方法和方案是有效和安全的,也没有任何治疗是商业上可获得的。这种疗法对许多患者,特别是患有神经疾病或身体残疾的晚期疾病患者将是有益的。具体地,这种治疗将使患有进展型多发性硬化症的患者受益。

[0082] 如本文所用,术语“治疗”是指在原发性进展型或继发性进展型多发性硬化症发作后预防、抑制或减轻症状或多种症状。在某些实施方式中,症状选自由协调受损、行走能力受损、平衡受损、腿无力、腿僵硬、记忆力受损、认知功能受损、吞咽困难、视力受损、全身疲劳、疼痛、膀胱功能受损、肠功能受损及其任何组合的组。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0083] 在一些特定的实施方式中,根据本发明治疗多发性硬化症包括减慢疾病进展,即减慢残疾进展。

[0084] 给予细胞的“受试者”是哺乳动物，通常是人类。根据一些实施方式的受试者患有进展型多发性硬化症形式，即被诊断为进展型多发性硬化症形式。

[0085] 如本文所用，术语“多发性硬化症”是指中枢神经系统的自身免疫疾病，其伴有上文描述的一种或多种症状。在一些实施方式中，进展型MS是继发性进展型MS。在其他实施方式中，进展型MS是原发性进展型MS。在另外的实施方式中，进展型MS是进展型复发性MS。

[0086] 根据一些实施方式，ADSC被给予一次。根据一些实施方式，多次给予ADSC，例如每2-8个月、每3-12个月或低频率给予。

[0087] 根据一些实施方式，每3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个月给予一次ADSC。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0088] 脂肪来源干细胞

[0089] 本发明利用脂肪来源的间充质干细胞。如本文所用，术语“脂肪来源的间充质干细胞”或“脂肪来源干细胞”，缩写为“ADSC”或“hADSC”（即，人脂肪来源干细胞），是指从脂肪组织收获的塑料粘附的多能细胞群体。细胞群体的特征在于CD44、CD73和CD90被至少95%的细胞阳性表达、CD105被至少90%的细胞阳性表达，且CD45、CD19、CD11b和HLA-DR被至少95%的细胞阴性表达。

[0090] 在一些实施方式中，细胞群体的特征在于CD44、CD73和CD90被至少98%的细胞阳性表达、CD105被至少90%的细胞阳性表达，且CD45、CD19、CD11b和HLA-DR被至少98%的细胞阴性表达。

[0091] 细胞群体进一步特征在于CD34被高达至多达10%-20%的细胞阳性表达。在一些实施方式中，细胞群体特征在于CD34被至多达5%的细胞阳性表达。

[0092] 在一些实施方式中，至少50%的细胞对CD105、CD73、CD44和CD90为阳性，并且对CD45、CD19、CD11b和HLA-DR为阴性。

[0093] 根据一些实施方式，90-100%的人ADSC对标记物：CD44、CD73和CD90为阳性。根据另外的实施方式，至少95%的人ADSC对标记物：CD44、CD73和CD90为阳性。根据另外的实施方式，至少98%的人ADSC对标记物：CD44、CD73和CD90为阳性。

[0094] 根据一些实施方式，65-100%的人ADSC对CD105为阳性。根据另外的实施方式，80-100%的hADSC对CD105为阳性。根据另外的实施方式，90-100%的hADSC对CD105为阳性。根据另外的实施方式，80-95%的hADSC对CD105为阳性。

[0095] 根据一些实施方式，0.1-20%的人ADSC表达标记物CD34。根据另外的实施方式，0.1-10%的人ADSC表达标记物CD34。

[0096] 根据其他实施方式，1-10%的hADSC对标记物CD34为阳性。根据其他实施方式，1-5%的hADSC对标记物CD34为阳性。根据一些实施方式，至少90%的细胞，例如至少95%的细胞对标记物CD34为阴性。

[0097] 根据一些实施方式，至少90%的给予的人ADSC对标记物：CD45、CD19、CD11b和HLA-DR为阴性。根据另外的实施方式，至少95%的给予的人ADSC对标记物：CD45、CD19、CD11b和HLA-DR为阴性。根据另外的实施方式，至少98%的给予的人ADSC对标记物：CD45、CD19、CD11b和HLA-DR为阴性。

[0098] 根据一些实施方式中，至少50%的注射的人ADSC对CD105、CD73、CD44和CD90为阳性，并且对CD45、CD19、CD11b和HLA-DR为阴性。根据另外的实施方式中，至少60%、70%、

80%或90%的注射的人ADSC对CD105、CD73、CD44和CD90为阳性，并且对CD45、CD19、CD11b和HLA-DR为阴性。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0099] 细胞表面标记物表达的表征可以通过本领域已知的方法进行，例如使用荧光激活细胞分选术(FACS)。对于FACS的FACS流程在例如：Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology Volume 699 2011, Editors: Teresa S. Hawley, Robert G. Hawley Humana Press中综述。示例性程序在下面描述。

[0100] 脂肪组织作为多能基质/干细胞的来源比其他来源具有多个优势(Baer PC, Geiger H. Stem Cells Int 2012; 2012:812693)。例如，皮下脂肪在人类中普遍存在，并且通过抽脂术抽吸容易大量获得。抽脂术是耐受性良好的程序，得到大量组织抽吸物。脂肪抽吸物通常作为医疗废物丢弃，有资格作为脂肪来源基质/干细胞(ASC)分离的良好起始材料。该组织包含大量的多能细胞，这些细胞可以在培养物中分离和增殖。

[0101] 根据一些实施方式，ADSC来源于人皮下脂肪。根据特定的实施方式，细胞来源于通过抽脂术抽吸获得的人皮下脂肪。可以通过抽脂程序在身体的各个区域(包括胃、臀部、大腿、手臂、颈部和臀部)获得ADSC。根据本发明，可以使用任何抽脂程序来获得ADSC，包括但不限于激光、超声和通过腹部整形术去除脂肪，如本领域中已知的。

[0102] 处理脂肪组织以分离脂肪来源干细胞。制备方法通常包括用例如PBS和盐水的缓冲液和/或用生长培养基(通常没有任何添加剂如外部细胞因子或生长因子)如DMEM、StemMACSTM或血浆-Lyte洗涤组织的步骤，并使用组织解离酶(如胶原酶)处理组织和/或使用如Tulip Nano TransferTM的装置对组织进行非酶促机械破碎。样品的酶促消化也可以使用分散酶和胶原酶的组合进行。通常聚集的脂质体可以通过离心与包括干细胞和其他细胞如红细胞、内皮细胞和成纤维细胞的游离基质细胞分离。可以使用合适的裂解缓冲液从悬浮的颗粒中裂解红细胞，然后将剩余的细胞过滤或离心。

[0103] 如本文所公开的，用于分离脂肪来源干细胞的改进方法包括在进一步处理之前冷冻和解冻脂肪组织。有利地，在解冻后，可以将组织处理以分离干细胞，而无需使用裂解缓冲液破坏红细胞。标准的裂解缓冲液通常为氯化铵(NH₄Cl)、碳酸氢钾(KHCO₃)和pH值为7.3的EDTA的溶液。这种缓冲液组合物通过利用这些细胞的特定特征及其承受渗透压的有限能力来选择性地裂解红细胞。

[0104] 根据一些实施方式的冷冻如下进行：将脂肪抽吸物置于冷冻袋中，并以10%的最终浓度添加DMSO。将冷冻袋放置在冷冻罐中，并将样品在-80℃下保持过夜(~24小时)。然后，将冷冻的样品转移到气相液氮罐中。在储存期间可以进行稳定性测试。

[0105] 为了解冻，根据一些实施方式，将样品取出并在室温下放置几分钟，通常为5-10分钟。然后，将样品在37℃的水浴中解冻几分钟，通常5-10分钟，或者直到大部分样品解冻。然后，在37℃下用能够支持细胞活力的悬浮介质洗涤，在本文中定义为适用于间充质干细胞的等渗缓冲液或培养基，例如缓冲液，例如PBS。通常将样品洗涤两次。

[0106] 在一些实施方式中，该方法包括进行至少一次过滤。在一些实施方式中，过滤通过100微米筛，然后通过40微米筛进行，以进一步分离组织并有助于SVF部分的收集。

[0107] 为了从SVF部分的细胞群体中分离ADSC，通常应用如通过粘附至细胞培养容器(例如，通过塑料粘附)和/或经由珠/抗体的选择的过程。可选地，可以通过细胞分选分离细胞或免疫组织化学分离细胞。Bunnell et al., (2008) Methods., 45 (2) :115-120综述了用于

分离ADSC的方法。

[0108] 通过粘附在培养容器上的选择通常通过以下进行：将SVF细胞接种在具有合适培养基的培养烧瓶（例如塑料烧瓶）中；将接种的细胞温育过夜（在一些实施方式中，温育至少12小时，或24-48小时）；洗涤烧瓶以除去非粘附细胞和组织碎片；和将新鲜的培养基加入到烧瓶中。可以将粘附细胞（ADSC）培养到期望的融合水平，然后可以收集和储存它们或将其传代培养至其他传代。

[0109] 在一些实施方式中，hADSC是通过以下方式获自人皮下脂肪的hADSC：(a)冷冻脂肪抽吸物；(b)解冻脂肪抽吸物并通过组织解离酶解离或通过机械破碎；(c)通过离心粒化包含hADSC的细胞部分，并可选地用能够支持细胞活力的悬浮介质洗涤颗粒，并使悬浮液经受至少一次另外的离心；(d)在能够支持细胞活力的悬浮介质中重悬在步骤(c)中获得的颗粒并通过在塑料烧瓶中过夜温育来选择塑料粘附hADSC；(e)可选地在塑料粘附选择之前进行至少一次过滤以分离hADSC；和(f)可选地将hADSC培养至少3代。

[0110] 在一些实施方式中，hADSC是通过以下方式获自人皮下脂肪的hADSC：(a)冷冻脂肪抽吸物；(b)解冻脂肪抽吸物并用胶原酶消化；(c)通过离心粒化包含hADSC的细胞部分，并可选地用缓冲液或培养基洗涤颗粒，并进行进一步离心；(d)将步骤(c)中获得的颗粒重新悬浮在合适的培养基中；并通过粘附于细胞培养容器来选择hADSC。

[0111] 在一些实施方式中，用于从人皮下脂肪获得hADSC以给予需要其的受试者的方法主要包括：

[0112] (a)冷冻脂肪抽吸物；

[0113] (b)解冻脂肪抽吸物并用组织解离酶或通过机械破碎解离；

[0114] (c)通过离心粒化包含hADSC的细胞部分，并可选地用能够支持细胞活力的悬浮介质洗涤颗粒，并使悬浮液经受至少一次另外的离心；

[0115] (d)将步骤(c)中获得的颗粒重悬于能够支持细胞活力的悬浮介质中并进行至少一次过滤；

[0116] (e)通过粘附于细胞培养容器来选择hADSC；和

[0117] (f)可选地在将hADSC给予给受试者之前，将其培养至少3代。

[0118] 在下面的实施例1中描述了用于分离ADSC的示例性程序。

[0119] 在一些优选的实施方式中，在将ADSC提供给有需要的受试者之前（和/或在保存以备以后使用之前）培养。优选地，将细胞在无异源培养基中培养。在一些实施方式中，在给予给受试者之前，将ADSC生长至约80%-100%融合，例如约80%融合，并传代培养至3-10的传代数，优选3-5或3-4的传代数。因此，在一些实施方式中，给予的细胞的传代数为3至10。在另外的实施方式中，给予的细胞的传代数为3至5。在一些实施方式中，将ADSC传代培养至传代数为3。在一些实施方式中，将ADSC传代培养至传代数为4。在一些实施方式中，将ADSC传代培养至传代数为5。

[0120] 在给予前，对细胞计数，并准备在药用稀释剂/载体中注射。通常，在给予于受试者之前将细胞浓缩。浓度范围通常为 $1.5 \times 10^4/\text{ml}$ 至 $100 \times 10^6/\text{ml}$ 。

[0121] 在一些实施方式中，根据本发明的方法，用于单次给予的干细胞组合物包含 $10^5\text{-}3 \times 10^8$ 个人ADSC。根据一些实施方式，组合物包含 $10^5\text{-}10^8$ 个人ADSC。根据另外的实施方式，在一次给予中注射 $10^6\text{-}10^7$ 个人ADSC。根据另外的实施方式，在一次给予中注射 $200 \times 10^6\text{-}300$

$\times 10^6$ 个人ADSC。根据另外的实施方式,在一次给予中注射 $10^7\text{--}2\times 10^8$ 个人ADSC。

[0122] 根据一些实施方式,本发明的ADSC组合物用于通过全身给予使用。通常,给予是进入受试者的中枢神经系统(CNS)中。这种给予可能旨在绕过血脑屏障。根据其他实施方式,将ADSC直接给予至脑的特定区域。

[0123] 根据一些实施方式,例如通过椎管内给予将组合物给予至CNS。根据一些实施方式,将组合物鞘内给予。根据其他实施方式,组合物通过室内或脑室内(ICV)途径给予,即进入脑室中。

[0124] 脑室内药物递送是在脑池(C1-2椎骨)和颅内室的脑脊液内的药物递送。通过直接给予药物,与口服给予的药物相比,需要的药物更少,并且副作用更少。如本领域中已知的,药物通常通过连接到泵的植入导管来递送。泵可以是可编程的,并且可以是植入的或外部的。

[0125] 鞘内给予是通过注射到椎管内,更具体地注射到蛛网膜下腔,使其到达脑脊髓液(CSF)的药物给予途径,并且可用于脊髓麻醉、化学疗法或疼痛管理应用。该途径还用于引入抗某些感染的药物,尤其是神经外科手术后。需要以这种方式给予药物以避免血脑屏障。鞘内和硬膜外药物递送包括椎管内药物给予途径。每种途径都将药物递送到脑脊液(CSF)。鞘内递送涉及将药物直接注射到脊柱鞘内空间内的CSF中,而在硬膜外腔中注射的药物必须穿过硬脑膜以到达CSF。这样,硬膜外给予的药物也可以到达全身循环,而鞘内给予的药物则局限于在脊柱和脑室中循环的CSF内。

[0126] 本发明还包括脂肪来源干细胞与可选的至少一种其他活性剂的组合疗法。

[0127] 本发明范围内的活性剂包括但不限于干扰素,例如聚乙二醇化或非聚乙二醇化的 α -干扰素或 β -干扰素,例如干扰素 β -1a或干扰素 β -1b或 τ -干扰素;具有可选的抗增殖/抗肿瘤活性的免疫抑制剂,例如米托蒽醌、甲氨蝶呤、硫唑嘌呤、环磷酰胺或类固醇,例如甲基泼尼松龙、泼尼松或地塞米松,或类固醇分泌剂,例如ACTH;腺苷脱氨酶抑制剂,例如克拉屈滨;针对各种T细胞表面标记物的IV免疫球蛋白G(例如,Neurology,1998,May 50 (5):1273-81中公开的)单克隆抗体,例如那他珠单抗(ANTEGREN®)或阿仑单抗;TH2促进细胞因子,例如IL-4、IL-10或抑制TH1促进细胞因子表达的化合物,例如磷酸二酯酶抑制剂,例如己酮可可碱;抗痉挛剂,包括巴氯芬、地西洋、吡拉西坦、丹曲洛林、拉莫三嗪、利鲁唑、替扎尼定、可乐定、 β 受体阻滞剂、赛庚啶、奥芬那君或大麻素;AMPA谷氨酸受体拮抗剂,例如2,3-二羟基-6-硝基-7-氨基磺酰基苯并(f)喹喔啉,[1,2,3,4,-四氢-7-吗啉-基-2,3-二氧-6-(三氟甲基)喹喔啉-i-基]甲基膦酸酯、1-(4-氨基苯基)-4-甲基-7,8-亚甲基-二氧基-5H-2,3-苯并二氮杂卓或(-)1-(4-氨基苯基)-4-甲基-7,8-亚甲基-二氧基-4,5-二氢-3-甲基氨基甲酰基-2,3-苯并二吖庚因;VCAM-1表达的抑制剂或其配体的拮抗剂,例如 α 4 β 1整合素VLA-4和/或 α -4- β -7整合素的拮抗剂,例如那他珠单抗(ANTEGREN®);巨噬细胞迁移抑制因子(抗MIF);xi i)组织蛋白酶S抑制剂;xi i i)mTor抑制剂。每种可能性代表本发明的单独实施方式。当前优选的一种其他活性剂是属于免疫抑制剂类别的FTY720(2-氨基-2-[2-(4-辛基苯基)乙基]丙烷-1,3-二醇;芬戈莫德)。

[0128] 本发明包括ADSC与至少一种另外的药物,优选地免疫抑制剂,特别是芬戈莫德的组合。

[0129] 本发明还提供了在治疗人ADSC的多发性硬化症中的用途,可选地与适合于治疗多

发性硬化症的另外的药物一起使用。

[0130] 提出以下实施例以更充分地说明本发明的某些实施方式。然而，它们决不应被解释为限制本发明的广泛范围。在不脱离本发明的范围的情况下，本领域的技术人员可以容易地设计出本文公开的原理的许多变型和修改。

[0131] 实施例

[0132] 实施例1-人脂肪来源的干细胞(hADSC)对C57BL/6小鼠中的MOG诱导的慢性EAE的效果

[0133] 材料和方法

[0134] ADSC分离：

[0135] 将从人类健康供体获得的脂肪抽吸物在-80℃下冷冻，然后在气相液氮中冷冻(一周以上)。然后，将脂肪抽吸物解冻，并在37℃下用等体积的PBS洗涤两次。然后，伴随摇动，在37℃下用胶原酶(NB4, Serva)将脂肪抽吸物消化35分钟。加入等体积的DMEM，并将样品在室温下以300-500g旋转下沉(span down)一次10分钟。沉淀的部分用DMEM洗涤，再次旋转下沉一次，并将颗粒重悬在培养基(StemMACS™, Miltenyi)中，不施加红细胞裂解缓冲液。计算的培养基的量如下：每150ml的初始脂肪抽吸物组织为50ml。然后，将样品通过100μm过滤器过滤，然后添加另外5ml的培养基，并在室温下以500g离心10分钟。用40μm过滤器重复该程序，并计数细胞。所得的细胞称为基质血管部分(SVF)。

[0136] 细胞培养：

[0137] 将SVF部分以每75cm²为约 2×10^6 个细胞的密度铺板，无需任何涂覆，并温育过夜以选择塑料粘附细胞(ADSC)。第二天，洗涤烧瓶以除去非粘附细胞和组织碎片，加入新鲜培养基，并使细胞生长至80-100%融合，胰蛋白酶消化并传代培养至第3-5代。

[0138] 然后，收集细胞并分析标记物：CD105、CD73、CD90、CD45、CD44、CD19、CD11b、HLA-DR和CD34。将细胞冷冻保存在液氮中直至使用。为了使用，将冷冻细胞解冻并以5000细胞/cm²的浓度铺板并温育过夜。

[0139] 在细胞ICV注射之前，将细胞胰蛋白酶化，计数并准备用于在下表2中详述的选定浓度下进行注射，并保持在冰上不超过30分钟的时间直至使用。使用立体定向系统进行ICV注射，并注意不要伤害小鼠大脑。

[0140] 动物：所有动物研究均由当地伦理委员会批准。将7-9周龄的C57BL/6雌性小鼠随机分为平均重量相似的对照组或治疗组。在整个实验过程中，随意给予动物食物和水。

[0141] 实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的诱导：为了诱导EAE，在改良的完全弗氏佐剂(CFA)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)中制备髓磷脂-少突胶质细胞-糖蛋白(MOG)35-55(GL Biochem co. Ltd, Shanghai, China)的乳剂如下：将热灭活的结核分枝杆菌(M. tuberculosis)菌株H37RA(Sigma)添加到CFA中，使最终浓度达到4mg/mL。随后，将2mg/mL的MOG 35-55用等量的改性CFA乳化。通过在一个部位的小鼠剃毛背部皮下注射该乳液(SC)，然后在第0天和MOG免疫后48小时，腹膜内注射百日咳杆菌毒素(Sigma)的PBS溶液诱导EAE。

[0142] 测量：

[0143] 从第0天到第29天每天测量体重。通过从免疫后第0天到第29天每天一次对小鼠进行临床评分来评估EAE(表1)。死动物(如果发生)的临床得分为5，且动物死亡前的最后体重

测量记录为最终体重。

[0144] 表1:EAE临床得分

得分	临床症状
0	正常小鼠;没有明显的疾病迹象
1	尾部无力
2	后肢瘫痪
3	后肢和前肢瘫痪
4	完全瘫痪:出于人道原因致死
5	垂死状态;EAE死亡

[0146] 以下计算是根据临床评分原始数据得出的:

[0147] 平均最高得分:

[0148] 是直到指定的分析日,特定组中对每只小鼠注意到的最高分数的平均值。

[0149] 平均病程:

[0150] (分析日-每只小鼠的发病日)的总和

[0151] (每组小鼠的数量)

[0152] 平均发病日:

[0153] 每只小鼠发病日的总和

[0154] 每组小鼠的数量

[0155] 临床评分的曲线下面积(AUC):

[0156] 使用Microsoft Excel计算得出并代表疾病负担。

[0157] 实验设计:

[0158] 表2中详细列出了EAE模型的实验设计(每组n=10)。

[0159] 表2:实验设计

组(测试物)	途径	细胞剂量(细胞数)	给予天数	介质,注射体积
对照/介质(PBS)	ICV	0	0	PBS 4 ul
ADSC 100K	ICV	1×10^5	0	PBS 4 ul
ADSC 200K	ICV	2×10^5	0	PBS 4 ul
ADSC 400K	ICV	4×10^5	0	PBS 4 ul

[0162] 统计分析:假设方差不等,n=10/组,+/-标准误差,使用单因素方差分析(ANOVA),然后双尾双样本学生t检验,分析每个数据集。

[0163] 结果:

[0164] 在表3和图1-6中描述了从首次注射测试物起至多达28天计算的试验结果。

[0165] 细胞表型:

标记物(染料)	%表达

CD73 (PE*)	100
CD90 (PE)	100
CD105 (PE)	100
CD44 (FITC**)	100
HLA-DR (PE)	0.1
CD34 (PE)	1.5
CD45 (PE)	0.5
CD11b (PE)	0.2
CD19 (PE)	0.1
IgG1 (PE)	0.2
IgG2a (PE)	0.1
IgG1 (FITC)	0

[0167] 表3:ADSC对EAE的影响

组	AUC 临床评分	最大平均得分	平均发病日	第28天的生存率
对照/介质 (PBS)	36.05±3.33	2.90±0.19	11.30±0.42	100%
ADSCs 100K	33.45±2.78	3.00±0.20	12.40±0.54	100%
ADSCs 200K	26.95±3.13	2.35±0.18	12.70±0.80	100%
ADSCs 400K	29.38±1.12	2.6±0.10	12.50±0.43	100%

[0169] 在所有三种研究剂量下,EAE MOG模型中ADSC的ICV移植显示出疾病症状出现率降低(图1)。最有效的剂量是 2×10^5 个细胞/动物,其显示出疾病严重程度的明显降低,与介质组的 2.75 ± 0.25 相比,达到平均临床评分为 2 ± 0.11 的平台(图2)。每只小鼠十万(1×10^5)个细胞似乎不足以引起疾病进展的变化,并且动物的行为与介质对照组相似。如图3观察到的,最高剂量(4×10^5 个细胞/动物)虽然可以有效减轻症状,但其效果不如 2×10^5 个细胞/动物的中间剂量有效,这可能是由于在小鼠的很小ICV空间中的高密度的细胞所致。

[0170] 对动物体重的分析证实了在对动物临床评分的分析中注意到的观察结果。两种较高剂量的细胞(2×10^5 和 4×10^5 细胞/动物)导致较高的平均体重,在整个实验过程中都保留了该体重(图4)。

[0171] 与介质和 1×10^5 个ADSC相比,对于 2×10^5 个ADSC和 4×10^5 个ADSC动物组,在免疫后第28天,作为细胞剂量的函数计算的平均临床评分曲线下面积(AUC)明显更低(图5)。此外,在免疫后第28天, 2×10^5 个ADSC组的平均最大疾病评分显着低于 1×10^5 个ADSC和对照组的平均最大疾病评分(图6)。

[0172] 实验数据显示了ADSC的ICSC移植的明显优势,每只小鼠 2×10^5 个细胞的效果最大。该ADSC剂量对EAE症状的减轻产生长期影响,从而导致疾病负担的显着降低。

[0173] 实施例2-ADSC的细胞表面标记物的分析

[0174] 表4-12总结了在1-5次传代后如以上实施例1描述的制备的九(9)个ADSC样品的FACS分析。表13-14和图7显示了平均值和标准偏差("StDev")值。如从表格和图中可以看出,标记物在P3之后保持稳定。传代数P3-P4等于不大于约14的群体倍增数。

[0175] 表4

	标记物 (染料)	传代						
		0	1	2	3	4	5	
[0176]	CD73 (PE*)	99.1	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	阳性
	CD90 (PE)	97	99.9	99.9	99.9	99.9	100	
	CD105 (PE)	90.4	78.3	97.8	89	82.1	99.7	
	CD44 (FITC**)	99.6	99.8	99.9	99.9	99.7	99.8	
	HLA-DR (PE)	1.2	0.2	0.1	0.1	0.4	0.1	阴性
	CD34 (PE)	14.6	0.3	0.2	0.2	1.2	10.8	
	CD45 (PE)	1.5	0.1	0.1	0	0.1	0.4	
	CD11b (PE)	1.6	0.1	0	0	0	0	
	CD19 (PE)	0.3	0.1	0	0	0	0.2	对照
	IgG1 (PE)	0.3	0	0.1	0	0.1	0	
	IgG2a (PE)	0.3	0.1	0.1	0	0	0	
	IgG1 (FITC)	0.3	0	0	0	0	0.1	

[0177] *PE-藻红蛋白

[0178] **FITC-异硫氰酸荧光素

[0179] 表5

	标记物 (染料)	传代						
		0	1	2	3	4	5	
[0180]	CD73 (PE)	99.9	100	100	100	100	100	阳性
	CD90 (PE)	无数据	100	99.9	100	99.9	100	
	CD105 (PE)	79.5	76.3	98.8	98.1	99.6	97.3	
	CD44 (FITC)	99.2	99.2	99.9	99.4	99.7	99.4	
	HLA-DR (PE)	0.3	0.1	0.1	0	0.1	0.2	阴性
	CD34 (PE)	0.4	0.3	0.4	1.4	3.1	5	
	CD45 (PE)	0.2	0	0.1	0.1	0.1	0.4	
	CD11b (PE)	0.1	0	0	0	0	0.1	
	CD19 (PE)	0.1	0	0	0	0.1	0.4	对照
	IgG1 (PE)	0.1	0.1	0	0	0	0.1	
	IgG2a (PE)	0.1	0.1	0	0.1	0	0	
	IgG1 (FITC)	1	0	0	0	0	0	

[0181] 表6

	标记物 (染料)	传代						
		0	1	2	3	4	5	
[0182]	CD73 (PE)	99.8	100	100	100	100	100	阳性
	CD90 (PE)	99.9	100	99.9	99.9	100	100	
	CD105-PE	90.8	99.9	98.3	99.4	99.3	86.9	
	CD44 (FITC)	99.4	99.9	99.8	99.5	99.6	95.9	
	HLA-DR (PE)	0.7	0.1	0	0	0.1	0.1	
	CD34 (PE)	21.4	5	1.4	6.8	7	2.3	
	CD45 (PE)	0.5	20.4	0.1	0.1	2.2	1.2	
	CD11b (PE)	0.2	0.2	0	0	0.2	0	
	CD19 (PE)	0.2	0.3	0	0	0.1	0.1	
	IgG1 (PE)	0.2	0.1	0	0	0.1	0	
[0183]	IgG2a (PE)	0.2	0.1	0	0	0.1	0	对照
	IgG1 (FITC)	0.1	0	0	0.1	0	0	

表7

	标记物 (染料)	传代						
		0	1	2	3	4	5	
[0184]	CD73 (PE)	99.9	99.9	99.9	100	99.9	99.9	阳性
	CD90 (PE)	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	
	CD105 (PE)	99.4	96.9	99.1	99.6	99.9	99.9	
	CD44 (FITC)	99.3	98	99.5	99.5	99.4	99.8	
	HLA-DR (PE)	0.2	0	0.2	0	0.1	0.4	
	CD34 (PE)	13.6	4.8	3.3	23.1	4	1.9	
	CD45 (PE)	0.7	0.1	0.2	9.7	0.3	0.2	
	CD11b (PE)	0.2	0	0	0.1	0.4	0.2	
	CD19 (PE)	0.8	0	0.1	5.7	0.5	3.5	
	IgG1 (PE)	0.1	0	0	0.1	0.1	0	
[0185]	IgG2a (PE)	0.2	0	0.1	0	0	0	对照
	IgG1 (FITC)	0.1	0	0.1	0	0	0	

表8

	标记物 (染料)	传代						
		0	1	2	3	4	5	
[0186]	CD73 (PE)	99.9	100	99.8	99.9	99.9	100	阳性
	CD90 (PE)	99.9	100	100	99.9	99.9	100	
	CD105 (PE)	98.7	99.9	91.3	99.9	99.9	99.7	
	CD44 (FITC)	98.8	99.9	97.4	99.8	100	99.9	
	HLA-DR (PE)	0.4	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	阴性
	CD34 (PE)	16.7	0.2	1.1	1.4	3.7	17.6	
	CD45 (PE)	3.4	0	0.2	1.6	0.8	0.3	
	CD11b (PE)	0.4	0.1	0.6	0	0	0.1	
	CD19 (PE)	0.3	0.1	0.1	0.2	0	0.5	对照
	IgG1 (PE)	0.3	0	0	0	0	0	
	IgG2a (PE)	0.4	0	0.1	0	0	0.1	
	IgG1 (FITC)	0.2	0	0	0	0	0	

[0187] 表9

	标记物 (染料)	传代						
		0	1	2	3	4	5	
[0188]	CD73 (PE)	无数据	99.3	99.9	99.9	99.9	100	阳性
	CD90 (PE)	无数据	100	100	100	99.9	100	
	CD105 (PE)	无数据	61.7	29.7	75.1	74.4	96.2	
	CD44 (FITC)	无数据	94.5	98.4	98.9	99.7	99.8	
	HLA-DR (PE)	无数据	0.1	0	0.1	0.1	0.1	阴性
	CD34 (PE)	无数据	9.5	1	2.4	5.5	9.7	
	CD45 (PE)	无数据	1.7	0.5	0.9	0.8	2.4	
	CD11b (PE)	无数据	0	0.1	0	0	0.7	
	CD19 (PE)	无数据	0.1	0	0.4	0.3	2.3	对照
	IgG1 (PE)	无数据	0.1	0	0.1	0.1	0.3	
	IgG2a (PE)	无数据	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	
	IgG1 (FITC)	无数据	0	0	0	0	0	

[0189] 表10

	标记物 (染色)	传代						
		0	1	2	3	4	5	
[0190]	CD73 (PE)	99.9	100	100	99.9	100	99.9	阳性
	CD90 (PE)	99.9	100	100	99.9	99.1	100	
	CD105 (PE)	99.7	99.9	99.5	99.9	99.1	100	
	CD44 (FITC)	99.9	100	99.8	99.7	99.8	99.9	
	HLA-DR (PE)	0.3	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	
	CD34 (PE)	12	0.9	10.1	0.4	3.6	0.7	阴性
	CD45 (PE)	0.9	0.5	2.1	0.2	0.2	0.3	
	CD11b (PE)	0.1	0.1	0.6	0.1	0.1	0.1	
	CD19 (PE)	0.7	0.2	0.2	0.2	0.4	0.1	
	IgG1 (PE)	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	对照
	IgG2a (PE)	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	
	IgG1 (FITC)	0.2	0	0.1	0	0.1	0.1	

[0191] 表11

	标记物 (染料)	传代						
		0	1	2	3	4	5	
[0192]	CD73 (PE)	99.7	100	99.7	99.8	99.7	99.9	阳性
	CD90 (PE)	99.5	99.8	99.8	99.8	99.7	99.9	
	CD105 (PE)	94	99.9	99.7	92.9	95.9	89.7	
	CD44 (FITC)	99.9	100	100	100	100	99.9	
	HLA-DR (PE)	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	阴性
	CD34 (PE)	73	0.7	0.2	0.4	0.3	4.9	
	CD45 (PE)	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
	CD11b (PE)	0.3	0	0	0	0	0	
	CD19 (PE)	0.3	0	0	0	0	0.1	
	IgG1 (PE)	0.2	0.2	0	0.2	0.1	0	对照
	IgG2a (PE)	0.3	0.1	0	0.1	0.1	0.1	
	IgG1 (FITC)	0.2	0	0	0.1	0.1	0	

[0193] 表12

	标记物 (染料)	传代						
		0	1	2	3	4	5	
[0194]	CD73 (PE)	99.9	100	99.9	100	99.9	100	阳性
	CD90 (PE)	99.9	99.9	99.9	99.5	99.9	100	
	CD105 (PE)	99.7	100	99.7	99.7	99.9	99.8	
	CD44 (FITC)	99.8	99.8	99.8	99.9	99.8	99.9	
	HLA-DR (PE)	0.1	0	0.2	0.1	0.1	0.1	阴性
	CD34 (PE)	4.1	2.3	0.1	3.2	1.2	2.1	
	CD45 (PE)	0.1	0.2	0	0.1	0.4	0.3	
	CD11b (PE)	0.1	0	0	0.1	0.1	0.1	
[0195]	CD19 (PE)	0.2	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	对照
	IgG1 (PE)	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	
	IgG2a (PE)	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	
	IgG1 (FITC)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	

[0195] 表13-平均值

	标记物 (染色)	传代						
		0	1	2	3	4	5	
[0196]	CD73 (PE)	99.8	99.9	99.9	99.9	99.9	100.0	阳性
	CD90 (PE)	99.4	99.9	99.9	99.9	99.8	100.0	
	CD105 (PE)	94.0	90.3	90.4	94.8	94.5	96.6	
	CD44 (FITC)	99.5	99.0	99.4	99.6	99.7	99.4	
	HLA-DR (PE)	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	阴性
	CD34 (PE)	19.5	2.7	2.0	4.4	3.3	6.1	
	CD45 (PE)	1.0	2.6	0.4	1.4	0.6	0.6	
	CD11b (PE)	0.4	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	
[0197]	CD19 (PE)	0.4	0.1	0.1	0.8	0.2	0.8	对照
	IgG1 (PE)	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
	IgG2a (PE)	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
	IgG1 (FITC)	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

[0197] 表14-StDev

StDev	标记物 (染色)	传代						阳性
		0	1	2	3	4	5	
[0198]	CD73 (PE)	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	阳性
	CD90 (PE)	1.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.0	
	CD105 (PE)	7.1	14.4	22.9	8.3	9.5	4.9	
	CD44 (FITC)	0.4	1.8	0.9	0.3	0.2	1.3	
	HLA-DR (PE)	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
	CD34 (PE)	22.6	3.2	3.2	7.3	2.2	5.6	
	CD45 (PE)	1.1	6.7	0.7	3.1	0.7	0.7	
	CD11b (PE)	0.5	0.1	0.3	0.1	0.1	0.2	
	CD19 (PE)	0.3	0.1	0.1	1.9	0.2	1.2	
	IgG1 (PE)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
[0199]	IgG2a (PE)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	阴性
	IgG1 (FITC)	0.3	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	

[0199] 实施例3-有与没有红细胞裂解的SVF分离

[0200] 研究设计

[0201] 从储存在气相氮中的两个不同批次中取出两个150ml的冷冻保存的脂肪抽吸组织样品(共四个脂肪抽吸组织样品)。解冻组织样品，并从每个样品中分离出SVF，如下详细描述的。在红细胞裂解缓冲液步骤之前，以相同的方式处理每个组织样品。此时，使用ACK裂解缓冲液(Lonza)对两个样品(每批中的一个)进行红细胞裂解步骤(指定为“A”的样品)，而其他两个样品(每批中的一个)不进行此步骤(指定为“B”的样品)。在裂解步骤后，对所有样品均以相同的方式进行SVF分离过程。

[0202] 对以下SVF分离细胞计数并测量以下参数：

[0203] • 活细胞数/ml

[0204] • 死细胞数/ml

[0205] • 每个样品的活细胞总数

[0206] • 活力百分比

[0207] • 平均细胞尺寸(μm)

[0208] 然后，将每个样品的细胞接种并扩增至第0代(P0)。对于每个批次，当其中一个样品达到70-80%融合时，收获所有烧瓶。在P0下，测量以下参数：

[0209] • 活细胞数/ml

[0210] • 死细胞数/ml

[0211] • 每个样品的活细胞总数

[0212] • 活力百分比

[0213] • 平均细胞大小(μm)

[0214] • MSC形态

[0215] • 免疫表型(FACS分析:CD90、CD73、CD45和CD31)

[0216] • 收获时间(天数)

[0217] 程序

[0218] 脂肪抽吸组织解冻和SVF分离

[0219] 将来自两个不同批次的两个150ml的脂肪抽吸物组织样品(分别标记为EF137和EF144)解冻(总共四个脂肪抽吸物组织样品)。将每个解冻的组织样品转移到500ml离心管中。对于每个批次,将一个试管标记为“A”,并将另一个试管标记为“B”。向每个试管中加入150ml的胶原酶溶液(142ml的PBS,7.5ml的5%胶原酶母液,0.6ml的CaCl₂ 1M),并伴随摇动(130rpm)将试管在37°C下在水浴中温育约半小时。接下来,在室温下将200ml的DMEM低葡萄糖(DMEM LG,Gibco)添加到每个试管中,并将试管在21±2°C下以500x g离心10分钟。离心结束时,除去大部分上清液,剩下约5ml。将每个试管中的颗粒重悬在剩余的上清液中,并转移到50ml锥形试管中。接下来,将45ml的DMEM LG加入到每个50ml试管中,并在21±2°C下以500x g将试管离心10分钟。在该第二次离心之后,除去上清液,并将命名为“B”的试管中的颗粒重悬于5ml的DMEM LG中。

[0220] 对于命名为“A”的试管,将颗粒重悬于10ml的ACK红细胞裂解缓冲液中,并在15–25°C下温育约10分钟。接下来,将20ml的PBS(15–25°C)添加到试管中,并将试管在21±2°C下以500x g离心10分钟。离心后,除去上清液,并将颗粒重悬于5ml的DMEM LG中。

[0221] 然后以相似的方式对命名为A的试管和命名为B的试管进行两个过滤步骤:将100μm的网格过滤器放置在新的预先标记的50ml试管(标记为“A”或“B”)的顶部上,并过滤悬浮液。每个过滤器用另外的5ml的DMEM LG洗涤,然后将滤液在21±2°C下以500x g离心10分钟。将颗粒重悬于5ml的DMEM LG中。接下来,将40μm的过滤器置于另一组新的预先标记的50ml试管(标记为“A”或“B”)的顶部,并过滤悬浮液。每个过滤器用另外的5ml的DMEM LG洗涤,然后将滤液在21±2°C下以500x g离心10分钟。将每个颗粒重悬于5ml的StemMACS™完全生长培养基(Miltenyi)中。

[0222] SVF细胞计数和SVF接种

[0223] 使用NC-200Nucleo-计数器计数每个试管中的细胞数。记录以下参数:活细胞/ml,死细胞/ml,活力(%),平均细胞大小(μm)和活细胞总数。每个试管计数两次,并计算两次计数的平均值。

[0224] 接下来,将来自每个试管的 2.6×10^6 个细胞一式两份地接种在75cm²烧瓶中,并将15ml的StemMACS™完全生长培养基加入到每个烧瓶中。将烧瓶温育过夜以选择塑料粘附细胞(ADSC)。第二天,洗涤烧瓶以除去非粘附细胞和组织碎片,加入新鲜培养基并使细胞生长。当各组中的一个达到约80%融合时,收获细胞。

[0225] P0的收获

[0226] 收获细胞并计数。记录以下参数:活细胞/ml,死细胞/ml,活力(%),平均细胞大小(μm),活细胞总数,以及从接种到收获的时间(天)。每个试管计数两次,并计算两次计数的平均值。

[0227] 免疫表型-P0

[0228] 通过FACS分析来自每个试管的细胞的以下标记物:CD73、CD90、CD45、CD31和IgG1作为对照。

[0229] 结果:

[0230] 下表15和17以及图8A–8B、9A–9B显示了SVF分离之后立即和在传代0(P0)时的细胞计数数据(每个样品的两次计数的平均值)。表16、18总结了标准差(SD)数据。

[0231] 表15-在SVF分离后的细胞计数

批次	EF137		EF144	
样品	A	B	A	B
活细胞/ml	8.56E+06	8.51E+06	2.59E+06	5.63E+06
死细胞/ml	2.72E+06	2.93E+06	5.64E+05	1.33E+06
活力%	75.9	74.4	82.3	80.9
平均细胞大小 (微米)	9.85	9.7	10.4	10.15
活细胞总数	4.28E+07	4.25E+07	1.30E+07	2.82E+07

[0233] 表16-SVF分离后的细胞计数的SD

批次	EF137		EF144	
样品	A	B	A	B
活细胞/ml	2.47E+05	1.63E+05	2.55E+05	7.07E+04
死细胞/ml	6.36E+04	1.20E+05	1.47E+05	1.77E+05
活力%	0.14	1.13	2.40	1.84
平均细胞大小 (微米)	0.070711	0	0	0.070711
活细胞总数	1.24E+06	8.13E+05	1.27E+06	3.54E+05

[0235] 表17-P0时的细胞计数

批次	EF137		EF144	
样品	A	B	A	B
活细胞/ml	4.81E+05	9.04E+05	1.30E+06	2.07E+06
死细胞/ml	1.32E+04	3.08E+04	7.79E+04	1.42E+05
活力%	97.325	96.7	94.325	93.475
平均细胞大小 (微米)	13.75	13.425	13.475	13.425
活细胞总数	2.41E+06	4.52E+06	6.50E+06	1.03E+07

[0237] 表18-P0时的细胞计数的SD

批次	EF137		EF144		
样品	A	B	A	B	
[0238]	活细胞/ml	2.08E+04	1.18E+05	8.60E+04	3.23E+05
	死细胞/ml	8.49E+03	7.16E+03	5.09E+04	4.55E+04
	活力%	1.763283	0.374166	3.757104	2.478407
	平均细胞大小(微米)	0.208167	0.095743	0.170783	0.15
	活细胞总数	1.04E+05	5.90E+05	4.30E+05	1.61E+06

[0239] 从表和图中可以看出,对于未进行红细胞裂解的样品(命名为“B”的样品)和进行裂解步骤的样品(命名为“A”的样品),细胞计数数据基本相同,并且某些参数甚至更好,表明省略裂解步骤不会对细胞的生长产生负面影响。

[0240] 有利地,在P0,未进行红细胞裂解的样品比进行裂解步骤的样品更快地达到70-80%的融合。

[0241] 表19总结了传代P0时的免疫表型数据(标记物表达)

[0242] 从表中可以看出,标记物表达对于未进行红细胞裂解的样品和进行裂解步骤的样品基本相同,这表明省略该步骤不会对所得细胞的表型产生负面影响。

[0243] 表19-P0时的标记物表达(%)

批次	EF137		EF144		
样品	A	B	A	B	
[0244]	CD73	99.9	99.85	99.9	99.9
	CD90	99.65	99.9	99.95	99.85
	CD45	0.25	0.3	0.3	0.25
	CD31	5.85	1.9	3.75	4.15

[0245] 总而言之,发现即使不施加红细胞裂解缓冲液,得到的ADSC样品的生长也与根据采用红细胞裂解的标准方法分离的样品一样有效。

[0246] 实施例4-初始组织体积对基质血管部分(SVF)和脂肪来源干细胞(ADSC)产量的影响

[0247] 可以从脂肪抽吸组织样品中获得的ADSC的量尤其取决于脂肪抽吸组织样品的初始体积。对于诸本文所述的治疗多发性硬化症的治疗应用,建议获得至少 10^5 个ADSC,或甚至至少 10^6 个ADSC。

[0248] 以下研究旨在确定可用于获得足以用于治疗目的(如根据本发明治疗多发性硬化症)的ADSC的量的脂肪组织(脂肪抽吸组织)的最小体积,并旨在评估在小于100ml的体积可用于处理的情况下可提高产率的生产过程的可能改变。

[0249] 研究设计

[0250] 获得三种不同批次的人脂肪抽吸组织。从每批中,用PBS洗涤5、10、20、50和150ml的样品,并将其置于冷冻袋中。加入终浓度为10%的DMSO,并将样品储存在液氮中直至使

用。

[0251] SVF生产

[0252] 如上文实施例1和3中所述,将所有样品解冻并处理以获得SVF而不进行红细胞裂解。处理5、10、20和50ml的样品而不施加过滤(即,除了省略了红细胞裂解外,省略了通过100 μm 过滤器然后通过40 μm 过滤器过滤的步骤)。

[0253] 细胞培养

[0254] 将从20、50和150ml样品中获得的SVF部分以 $35 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的浓度接种。将从5ml和10ml样品中获得的SVF部分以 $\sim 4 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的浓度接种。过夜温育以选择塑料粘附细胞(ADSC)后,洗涤烧瓶,添加新鲜培养基,并将细胞在StemMACS™完全培养基中生长至 $\sim 80\%$ 融合。在此阶段,将细胞传代定义为P#0。然后,将细胞胰蛋白酶化,收获,以 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的浓度接种到新鲜的烧瓶中,并再次生长至 $\sim 80\%$ 的融合至下一次传代,定义为P#1。然后,将细胞胰蛋白酶化,收获,并在1ml冷冻管中以约 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 的浓度保持冷冻,直至使用。

[0255] 另外,在处理50ml样品期间,在组织消化和离心后观察到大量组织聚集体,因此决定检查这些聚集体在单独处理时是否可以产生间充质干细胞。收集聚集体并接种在单独的烧瓶中,并温育过夜以选择塑料粘附细胞。洗涤非粘附细胞,并以与其他样品相同的方式进一步处理剩余的样品。

[0256] 分析:

[0257] 将细胞解冻,在解冻后立即测定细胞数、细胞活力和细胞直径。对于FACS分析,在分析之前,将细胞回收过夜(将1个冷冻小瓶接种到 175cm^2 烧瓶中)。

[0258] 结果:

[0259] 下表20-22和图10A-C、11A-C、12A-C显示了SVF分离后立即以及在第0和1代(P#0, P#1)的每个样品的细胞计数数据。

[0260] 表20

第1批						
活细胞总数 ($\times 10^6$)						
	5ml	10ml	20ml	50ml	50ml 聚集体	150ml
SVF	3.34	1.97	3.27	3.27	NA	11.00
P#0	1.81	0.49	9.51	0.75	6.00	11.50
P#1	36.80	5.90	152.68	12.54	114.73	124.80

[0262] 表21

第2批						
活细胞总数 ($\times 10^6$)						
	5ml	10ml	20ml	50ml	50ml 聚集体	150ml
SVF	0.99	2.53	2.71	6.70	NA	30.28
P#0	0.89	2.43	1.97	9.77	10.90	19.70
P#1	13.06	30.50	21.50	100.25	156.56	98.00

[0264] 表22

第3批						
	活细胞总数 ($\times 10^6$)					
	5ml	10ml	20ml	50ml	50ml 聚集体	150ml
SVF	0.61	0.53	7.13	9.03	NA	8.70
P#0	0.82	0.72	7.65	10.30	4.10	9.30
P#1	4.43	4.78	102.40	99.00	72.78	68.60

[0266] 在三个不同批次之间,观察到SVF产率的差异很大。另外,SVF部分中的细胞数并不总是与在P#0获得的细胞数相关。然而,一旦收获了选定的MSC群体(P#0),向P#1的进一步扩展与P#0时的MSC细胞数量相关,并且在P#1,给定批次的细胞数量与该批次在P#0的细胞数量相关。

[0267] 如上所述,未过滤50ml的样品,观察到大的聚集体。收集聚集体并单独接种(而不是像通常那样丢弃)。聚集体产生大量的MSC,因此得出结论,保持和培养聚集体对于增加产率是有利的。

[0268] FACS分析:

[0269] 收获三批的P#1样品,并以 $\sim 5 \times 10^6$ 细胞/ml的浓度冷冻保存。然后将细胞解冻,用StemMACS™完全培养基接种过夜,收获并通过FACS分析。分析的标记物列于表23中。分析结果在表24-27中列出。

[0270] 表23-用于FACS分析的标记物

标记物	
CD73-PE	阳性
CD90-PE	
CD105-PE	
CD44-FITC	
HLA-DR-PE	阴性
CD34-PE	
CD45-PE	
CD11b-PE	
CD19-PE	1. 对照
IgG1-PE	
IgG2a-PE	
IgG1-FITC	

[0272] 表24-FACS分析-阳性标记物

	体积	批次	CD73-PE	CD90-PE	CD105-PE	CD44-FITC
[0273]	5ml	第 1	99.9	99.9	96.9	99.7
		第 2	99.8	99.8	95.0	98.8
		第 3	99.9	99.9	99.8	99.8
[0274]	10ml	平均值	99.9	99.9	97.2	99.4
		第 1	99.9	99.6	98.5	98.7
		第 2	99.9	99.8	99.4	99.5
		第 3	99.9	99.9	99.8	99.6
		平均值	99.9	99.8	99.2	99.3
[0275]	20ml	第 1	99.9	99.9	98.5	99.3
		第 2	99.6	99.5	98.4	98.5
		第 3	99.9	99.9	99.8	99.7
		平均值	99.8	99.8	98.9	99.2
	50ml	第 1	99.9	99.9	99.4	99.2
		第 2	99.9	99.9	99.9	99.0
		第 3	99.7	99.8	99.4	99.5
		平均值	99.8	99.9	99.6	99.2
[0276]	50ml 聚集体	第 1	99.9	99.9	99.5	99.1
		第 2	100.0	99.9	99.9	99.7
		第 3	99.8	99.6	95.9	98.9
		平均值	99.9	99.8	98.4	99.2
	150ml	第 1	99.9	99.9	99.9	99.7
		第 2	100.0	99.9	99.9	99.9
		第 3	99.9	99.8	99.5	99.9
		平均值	99.9	99.9	99.8	99.8

[0275] 表25-阳性标记物-平均值和SD

	CD73-PE	CD90-PE	CD105-PE	CD44-FITC
平均值				
5ml	99.9	99.9	97.2	99.4
10ml	99.9	99.8	99.2	99.3
20ml	99.8	99.8	98.9	99.2
50ml	99.8	99.9	99.6	99.2
50ml 聚集体	99.9	99.8	98.4	99.2
150ml	99.9	99.9	99.8	99.8
SD (n=3)				
5ml	0.1	0.1	2.4	0.6
10ml	0.0	0.2	0.7	0.5
20ml	0.2	0.2	0.8	0.6
50ml	0.1	0.1	0.3	0.3
50ml 聚集体	0.1	0.2	2.2	0.4
150ml	0.1	0.1	0.2	0.1

[0277] 表26-FACS分析-阴性标记物

体积	批次	HLA-DR-PE	CD34-PE	CD45-PE	CD11b-PE	CD19-PE
5ml	第 1	0.0	0.2	0.1	0.0	0.1
	第 2	0.2	7.1	2.4	0.4	0.8
	第 3	0.3	0.3	0.1	0.0	0.1
	平均值	0.2	2.5	0.9	0.1	0.3
10ml	第 1	0.2	0.6	0.2	0.1	0.1
	第 2	0.1	35.6	6.5	1.0	4.8
	第 3	0.3	9.3	6.9	0.1	8.6
	平均值	0.2	15.2	4.5	0.4	4.5
20ml	第 1	0.2	0.6	0.2	0.1	0.0
	第 2	0.3	68.8	5.0	0.4	1.3
	第 3	0.1	2.1	0.8	0.2	1.3
	平均值	0.2	23.8	2.0	0.2	0.9
50ml	第 1	0.1	19.7	0.8	0.2	1.8
	第 2	0.2	41.7	12.8	0.2	12.4
	第 3	0.1	9.4	0.3	0.2	0.9
	平均值	0.1	23.6	4.6	0.2	5.0
50ml 聚集的	第 1	0.2	28.4	7.0	0.2	9.4
	第 2	0.2	78.4	33.6	2.1	12.9
	第 3	0.1	18.8	0.8	0.6	0.1
	平均值	0.2	41.9	13.8	1.0	7.5
150ml	第 1	0.0	7.0	4.2	0.0	0.6
	第 2	0.1	23.2	4.9	0.1	4.2
	第 3	0.2	4.6	1.1	0.5	0.3
	平均值	0.1	11.6	3.4	0.2	1.7

[0279] 表27-阴性标记物-平均值和SD

	HLA-DR-PE	CD34-PE	CD45-PE	CD11b-PE	CD19-PE
平均值					
5ml	0.2	2.5	0.9	0.1	0.3
10ml	0.2	15.2	4.5	0.4	4.5
20ml	0.2	23.8	2.0	0.2	0.9
50ml	0.1	23.6	4.6	0.2	5.0
50ml 聚集体	0.2	41.9	13.8	1.0	7.5
150ml	0.1	11.6	3.4	0.2	1.7
SD (n=3)					
5ml	0.2	4.0	1.3	0.2	0.4
10ml	0.1	18.2	3.8	0.5	4.3
20ml	0.1	38.9	2.6	0.2	0.8
50ml	0.1	16.5	7.1	0.0	6.4
50ml 聚集体	0.1	32.0	17.4	1.0	6.6
150ml	0.1	10.1	2.0	0.3	2.2

[0282] 阳性标记物显示在来自所有三个测试的批次(阳性CD73、CD105、CD90、CD44)的所有处理的体积中,间充质干细胞的高百分比(如ISCT指南定义的)。

[0283] 阴性标记物显示出比一般对于来自脂肪来源间充质干细胞观察到的更高的百分

比,表明存在作为杂质的造血祖细胞。在单独的一系列实验中,将细胞培养五(5)代,结果表明阴性标记物作为传代数的函数而降低。

[0284] 在未过滤的样品中,组织聚集体可能捕获更多的造血祖细胞,这导致CD34的更高表达以及更高的CD45和CD19表达细胞。这种假设得到了50ml聚集体培养物的支持,其显示出最高的CD34表达。

[0285] 总而言之,尽管差异很大,但结果表明,即使从非常低的初始组织体积中也可以获得足够量的ADSC用于治疗应用,如本文公开的MS的治疗。为了利用低的初始体积,可以应用对生产过程的某些调整,如省略过滤和培养至少4代,以减少细胞损失并获得具有足够纯度的ADSC群体。

[0286] 如果可能,建议使用至少50ml的初始组织体积。进一步建议尤其包括通过一组过滤器过滤(但是,如本文所公开的,没有红细胞裂解)的生产方法,以提高在早期传代时的ADSC的纯度。

[0287] 然而,如果从患者处收集的脂肪抽吸组织的体积小于50ml,并且不可能收集更多,则可以应用适应性方法。

[0288] 尽管已经具体描述了本发明,但是本领域技术人员将理解,可以做出许多变化和修改。因此,本发明不应被解释为限于特别描述的实施方式,并且通过参考所附权利要求书将更容易理解本发明的范围和概念。

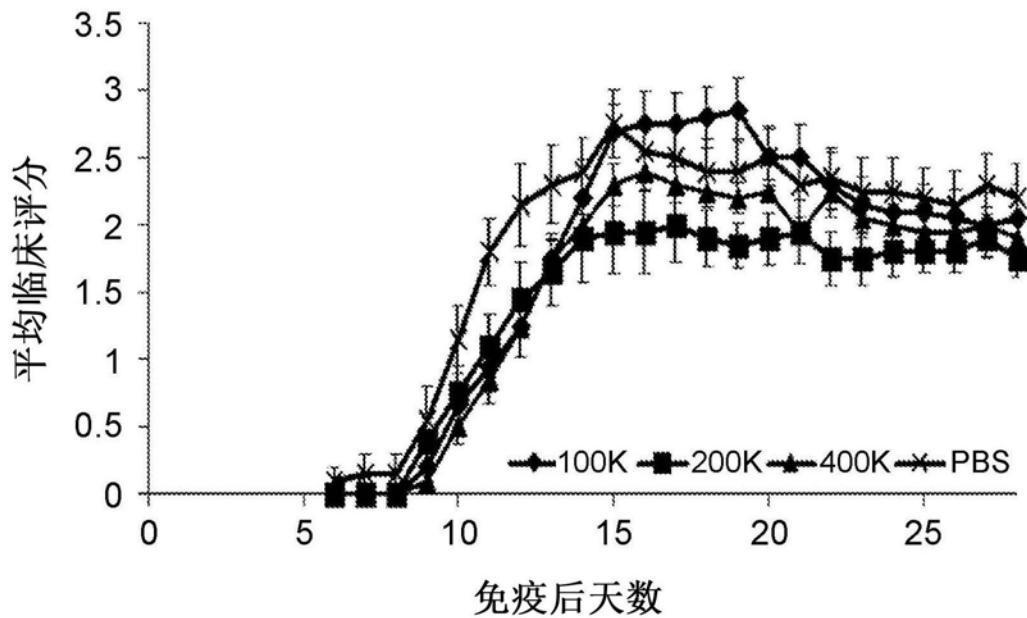


图1

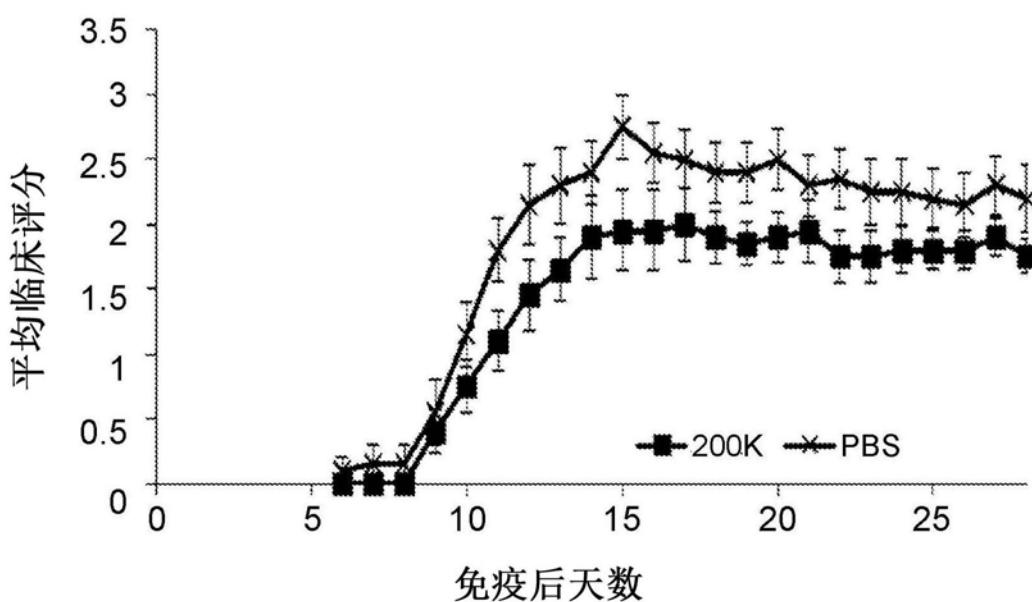


图2

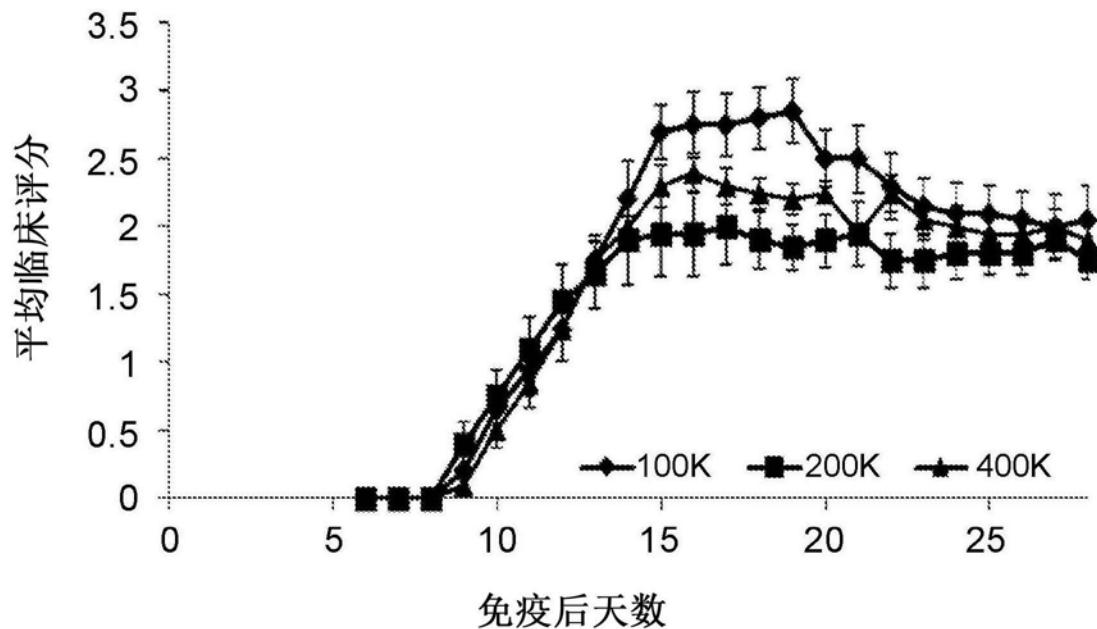


图3

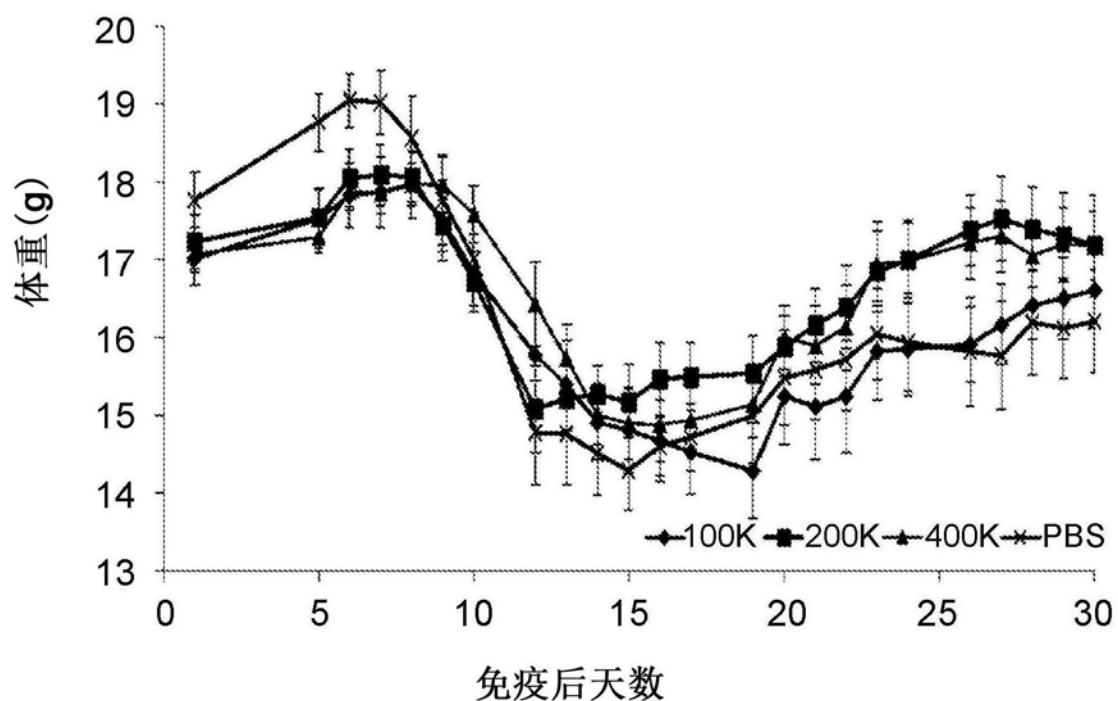


图4

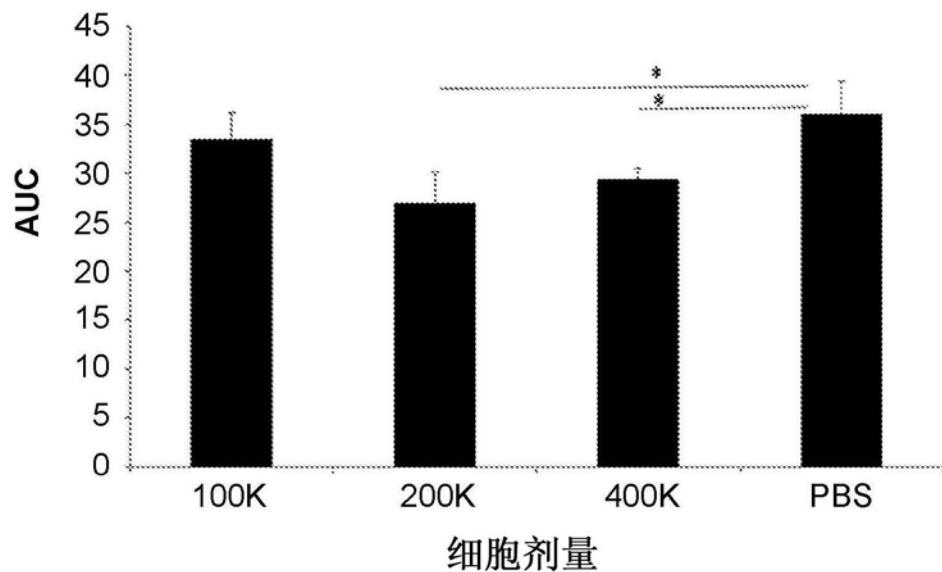


图5

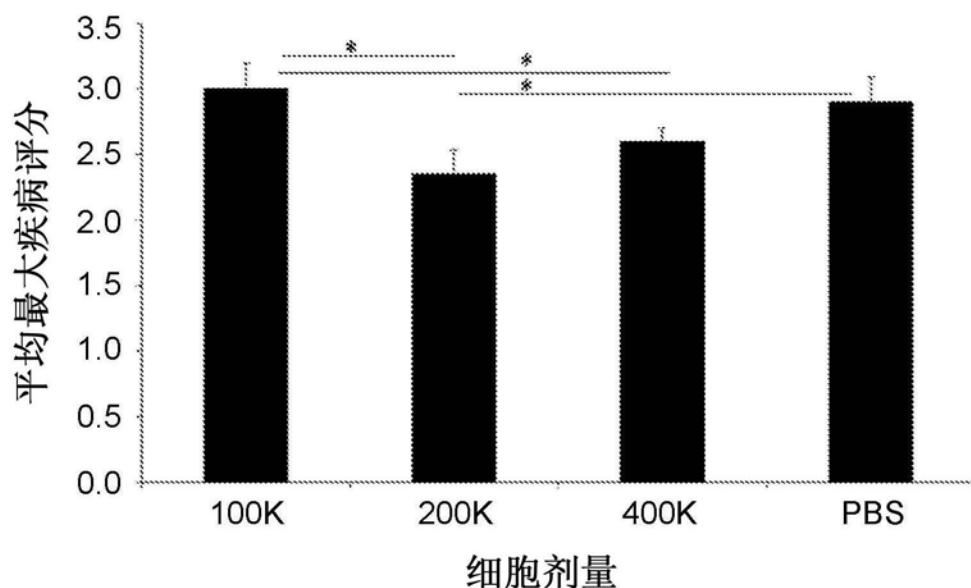


图6

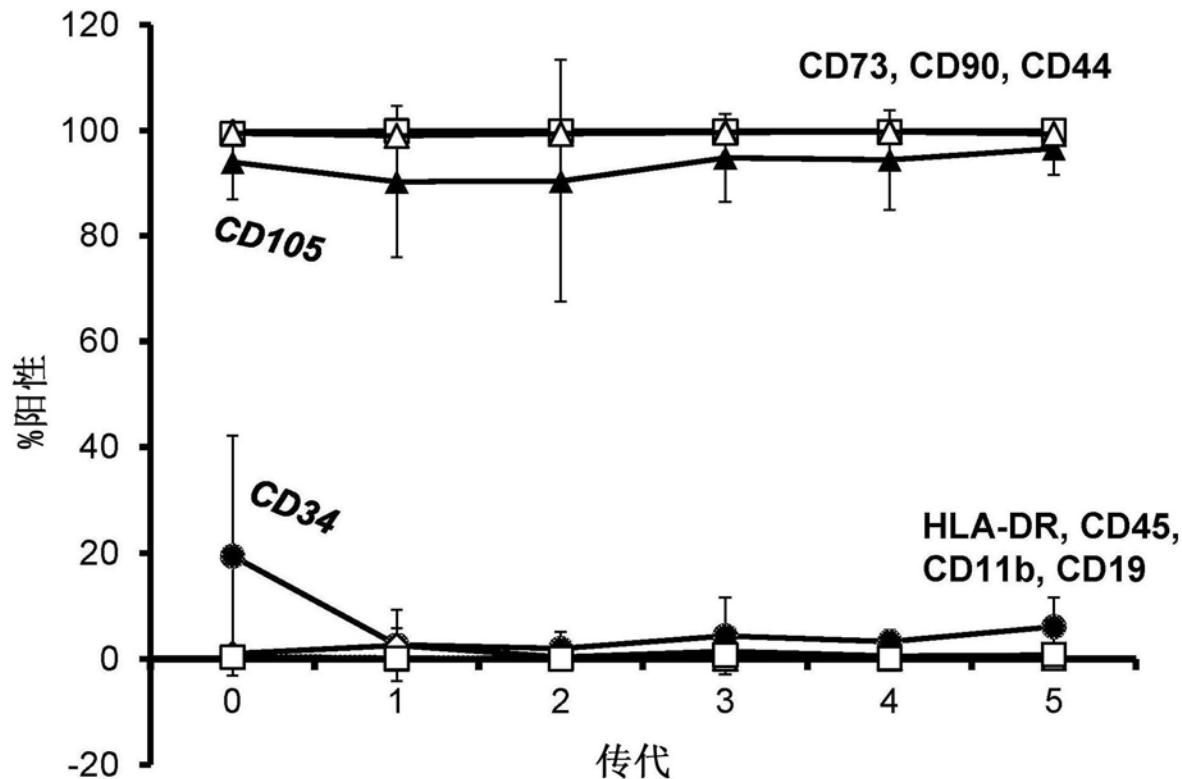


图7

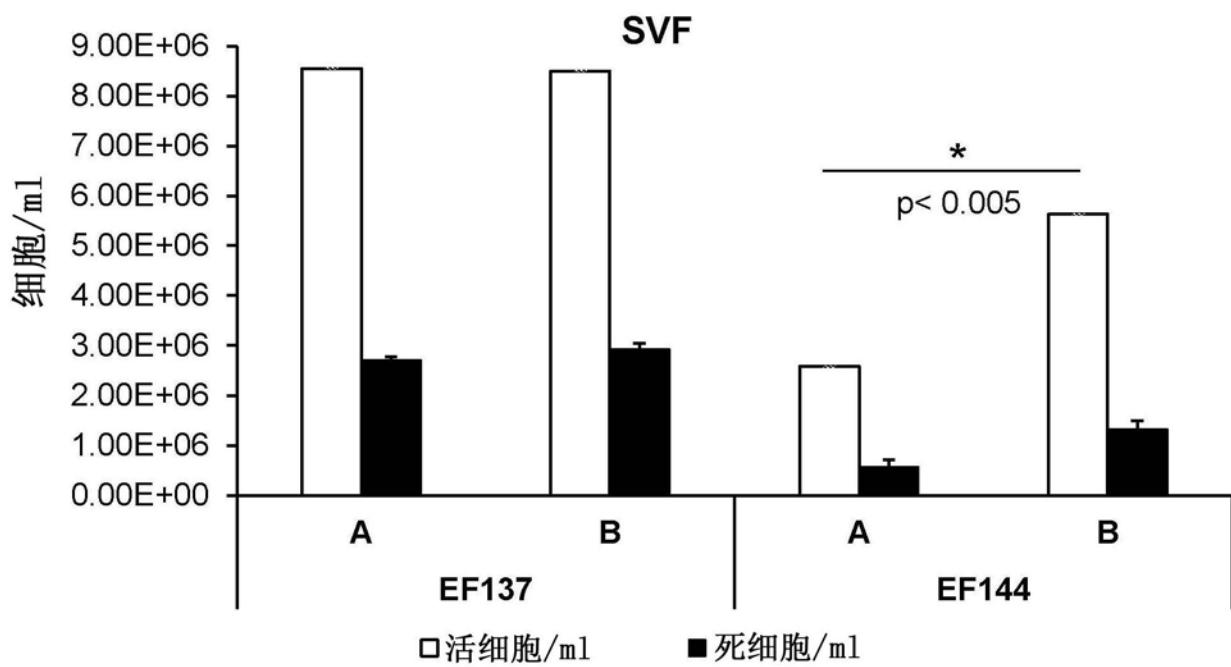


图8A

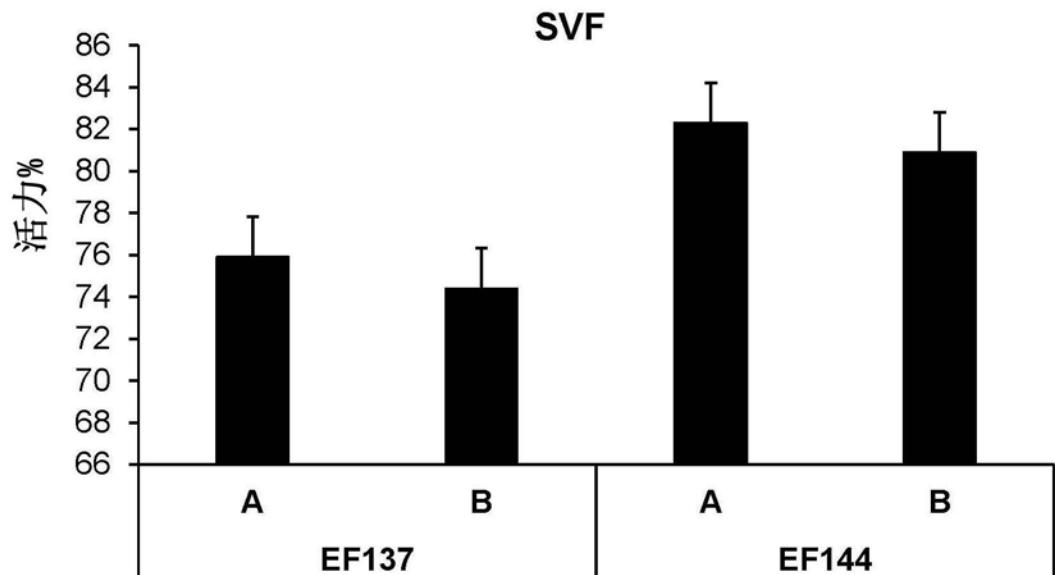


图8B

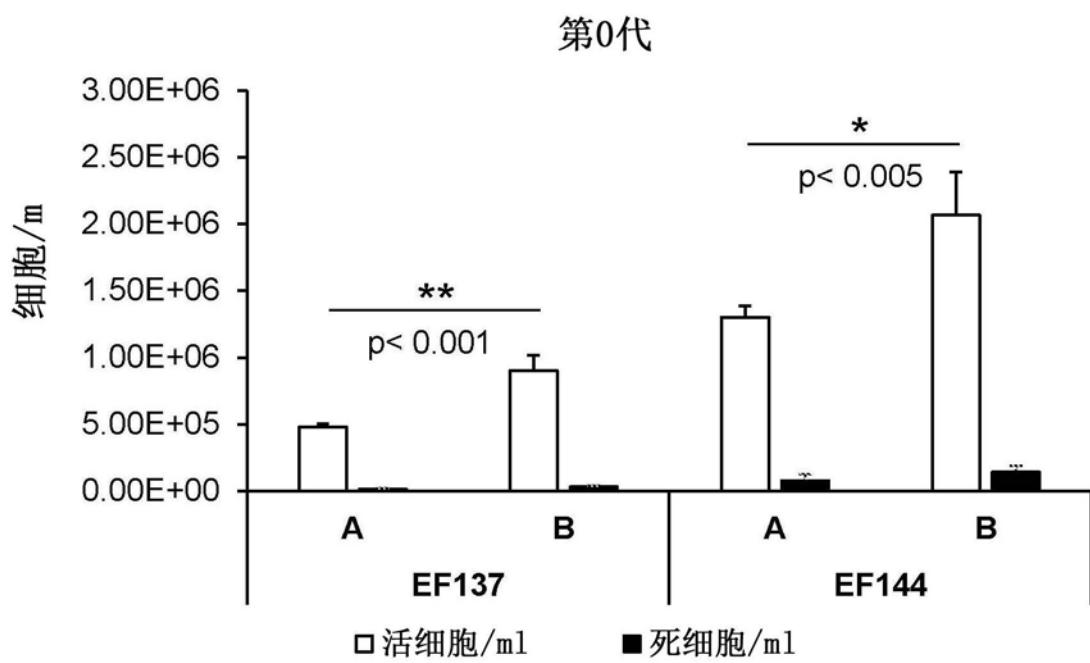


图9A

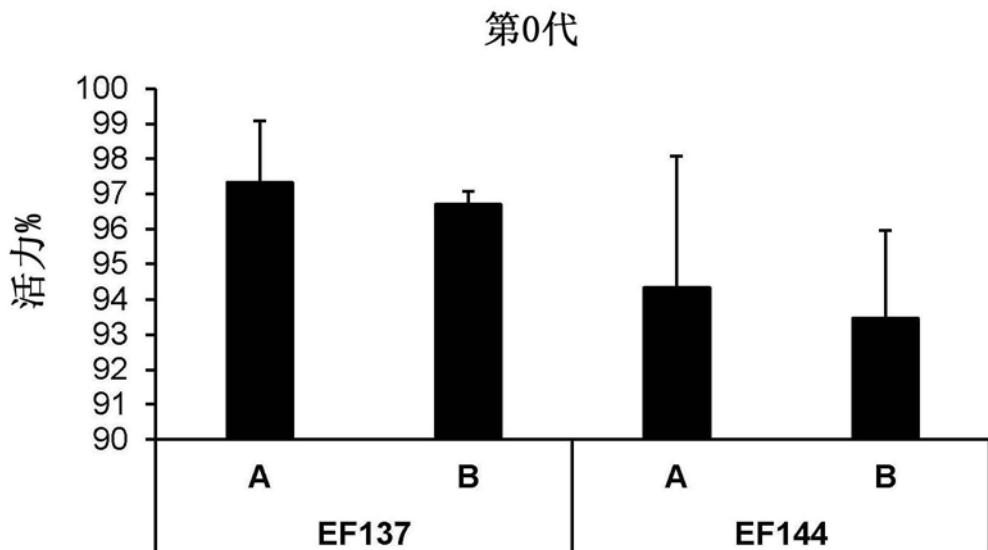


图9B

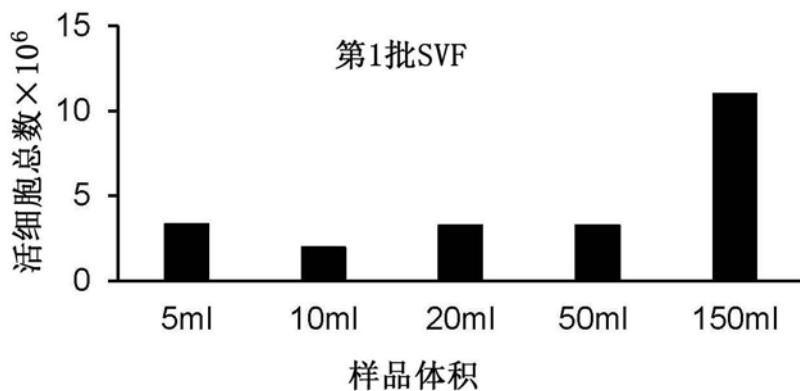


图10A

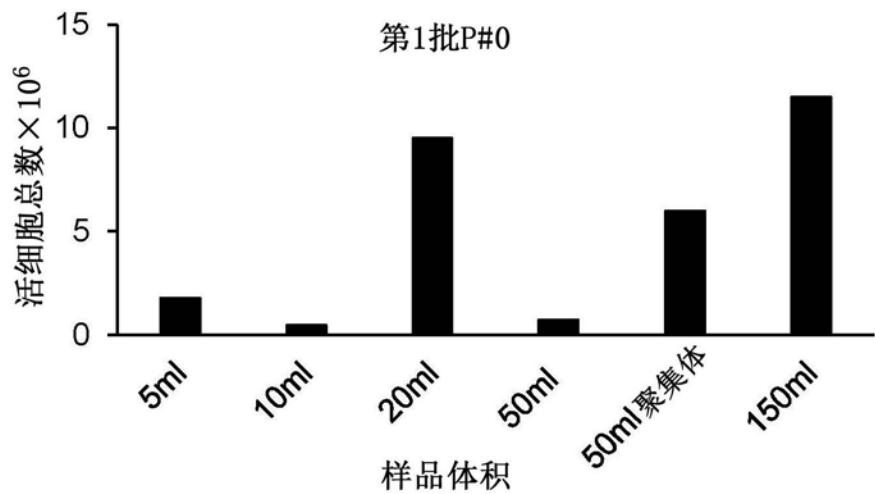


图10B

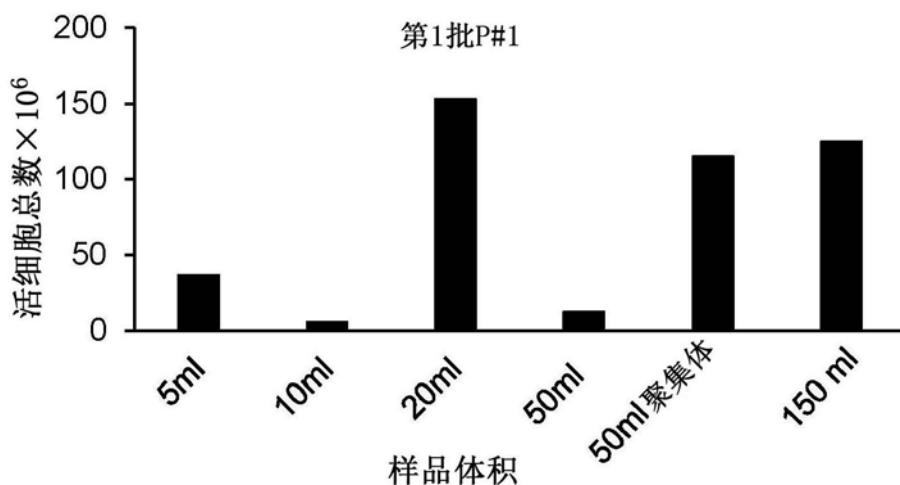


图10C

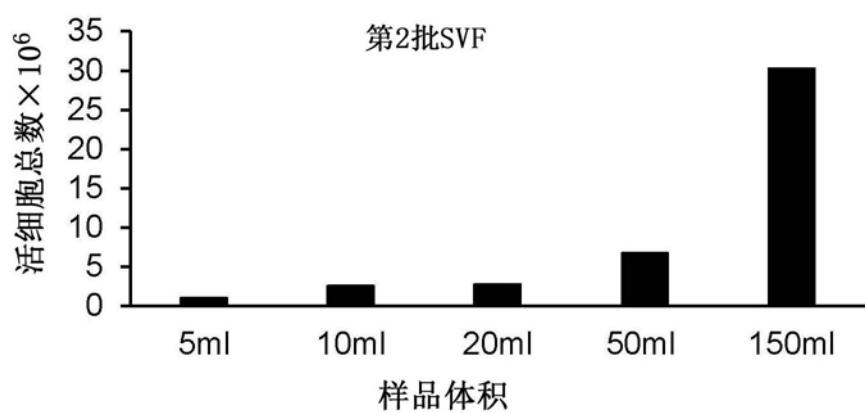


图11A

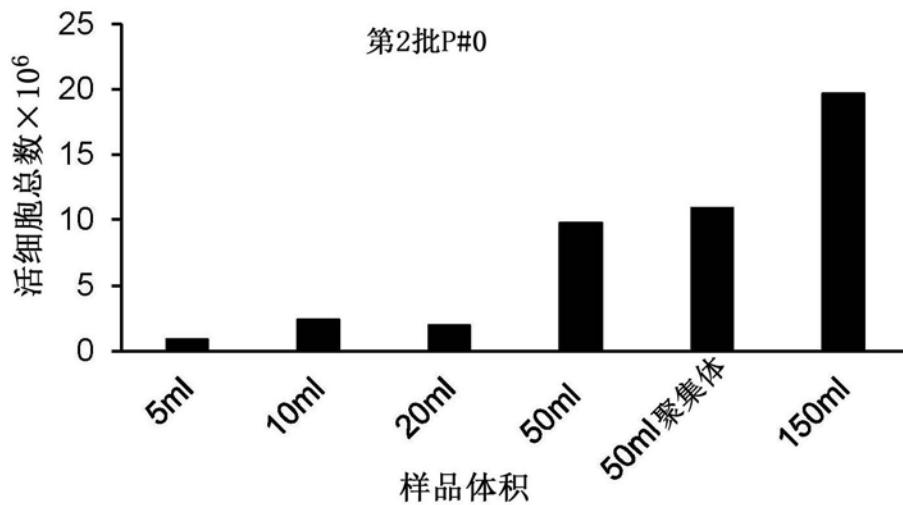


图11B

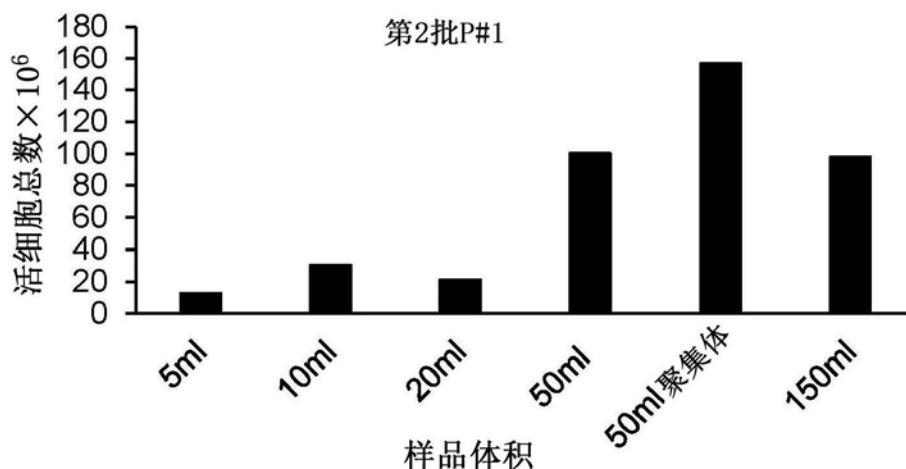


图11C

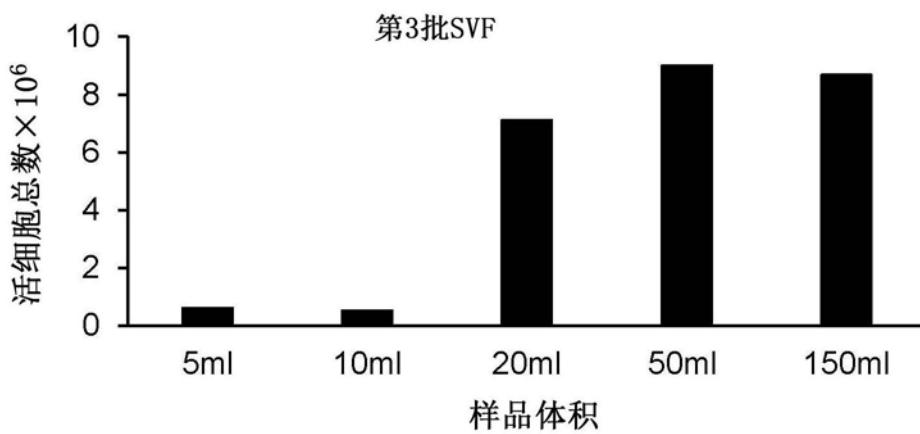


图12A

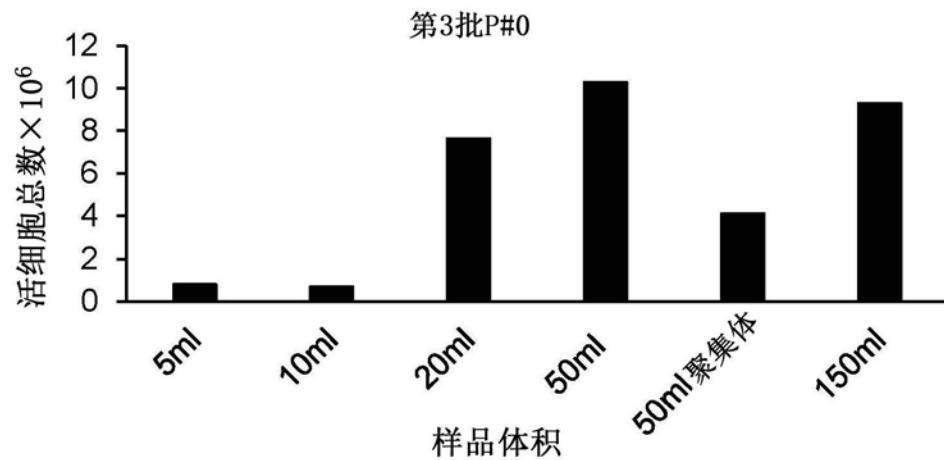


图12B

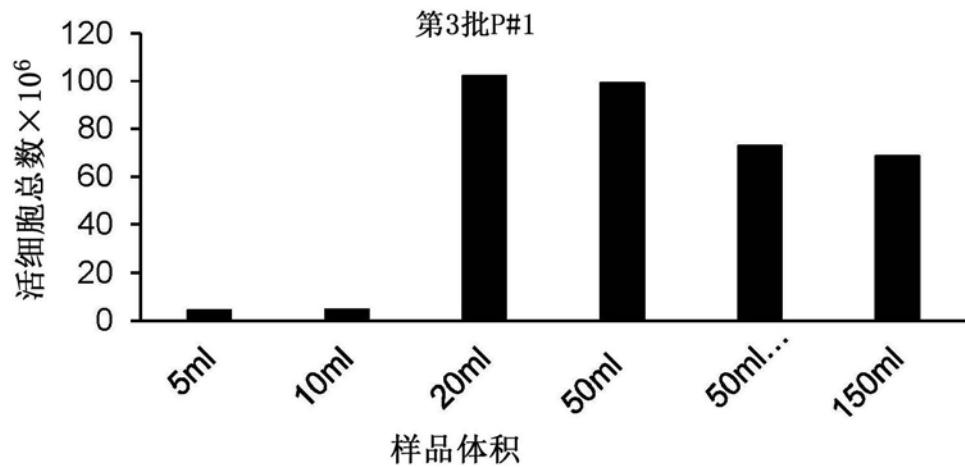


图12C