



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104873540 B

(45)授权公告日 2019.11.15

(21)申请号 201510185968.0

(22)申请日 2006.11.09

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104873540 A

(43)申请公布日 2015.09.02

(30)优先权数据

11/269736 2005.11.09 US

(62)分案原申请数据

200680050862.9 2006.11.09

(73)专利权人 ABT控股公司

地址 美国俄亥俄州

专利权人 俄勒冈健康与科学大学

(72)发明人 R.迪恩斯 W.范特 霍夫

R.马齐尔兹 M.科瓦索维克斯

(续)

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 杜艳玲 徐厚才

(51)Int.Cl.

C12N 5/0789(2010.01)

A61K 35/12(2015.01)

(续)

(56)对比文件

WO 0111011 A2, 2001.02.15,

CN 1314939 A, 2001.09.26,

US 6328960 B1, 2001.12.11,

WO 2005003320 A2, 2005.01.13,

Philippe Trope1等.Isolation and

(54)发明名称

多潜能成体祖细胞的免疫调节特性及其用途

B
CN 104873540 B
(57)摘要

描述了不是胚胎干细胞、不是胚胎生殖细胞和不是生殖细胞的分离细胞。这些细胞能分化成内胚层、外胚层和中胚层胚胎谱系中的至少两个谱系的每一个的至少一种细胞类型。这些细胞不

characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow.

《Experimental Cell Research》.2004, 第295卷第395-406页。

M Reyes等.Characterization of Multipotent Adult Progenitor Cells, a Subpopulation of Mesenchymal Stem Cells.《ANNALS NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES》.2001, 第938卷(第1期), 第231-233页。

Jiang Y et al..Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.《NATURE》.2002, 第418卷(第6893期), 第41-49页。

Tomohiro Okuda等.Oct-3/4 repression accelerates differentiation of neural progenitor cells in vitro and in vivo.《Molecular Brain Research》.2004, 第132卷第18-30页。

Amelia Bartholomew等.Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo.《Experimental Hematology》.2002, 第30卷第42-48页。

王晓等.人骨髓多能成体祖细胞的分离培养及向肝细胞样细胞分化的研究.《胃肠病学和肝病学杂志》.2003, 第12卷(第2期), 第148-151页.

审查员 朱兵

权利要求书1页 说明书37页 附图10页

会引起有害的免疫应答。这些细胞能调节免疫应答。举例说,这些细胞能抑制宿主中的由异基因细胞、组织和器官引起的免疫应答。描述了使用这些细胞本身或者辅助地治疗受试者的方法。例如,这些细胞可在移植疗法中辅助地用于免疫抑制。还描述了获得这些细胞的方法和使用它们的组合物。

[接上页]

(72)发明人 P.斯特里特
(51)Int.Cl.
A61K 35/14(2015.01)
A61K 35/26(2015.01)
A61K 35/28(2015.01)
A61K 35/48(2015.01)
A61K 35/44(2015.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)

1. 细胞在制备对有遭受免疫功能异常危险或者遭受了免疫功能异常的受试者进行辅助治疗的药物中的用途,其中所述细胞是多潜能成体祖细胞,其特征在于:所述细胞不是胚胎干细胞、胚胎生殖细胞或生殖细胞;能分化成内胚层、外胚层和中胚层胚胎谱系中的至少两个谱系的每一个的至少一种细胞类型;表达端粒酶;在培养中进行了至少40次细胞倍增;与受试者异基因或异种;不在受试者中引起有害免疫应答;并通过有效的途径和以有效量辅助于一种或多种其它的给予受试者的治疗法来进行给予。

2. 权利要求1的用途,其中所述细胞能分化成内胚层、外胚层和中胚层胚胎谱系中的每一个谱系的至少一种细胞类型。

3. 权利要求1的用途,其中所述细胞对oct-3/4阳性。

4. 权利要求2的用途,其中所述细胞对oct-3/4阳性。

5. 权利要求1至4中任一项的用途,其中所述细胞与受试者异基因。

6. 权利要求1至4中任一项的用途,其中所述细胞以一个或多个包含 $10^4\text{--}10^8$ 个所述细胞/公斤受试者质量的剂量给予受试者。

7. 权利要求1至4中任一项的用途,其中所述受试者将接受或已接受移植物,且将会有发展宿主抗移植物反应或移植物抗宿主病的危险或者已发展宿主抗移植物反应或移植物抗宿主病,且所述细胞是辅助于该移植物来给予。

8. 权利要求7的用途,其中所述移植物是器官、骨髓或血液移植物,所述受试者有发展宿主抗移植物反应的危险或者已经发展宿主抗移植物反应,且所述细胞是辅助于该移植物来给予治疗宿主抗移植物反应。

9. 权利要求7的用途,其中所述受试者正在接受或将要接受放射疗法或化学疗法或放射疗法和化学疗法的组合的治疗,使得受试者的免疫系统削弱,且用所述细胞进行的治疗是辅助于放射疗法、化学疗法或两者的组合。

10. 权利要求7的用途,其中所述细胞给予免疫系统缺损的受试者。

11. 权利要求1至4中任一项的用途,其中所述受试者有遭受肿瘤、贫血或其它血液疾病和免疫功能异常中的一种或多种的危险或者正在遭受这些疾病,其中用所述细胞的治疗是辅助于对这些疾病的治疗。

12. 权利要求1至4中任一项的用途,其中所述受试者有遭受骨髓增殖性疾病、骨髓增生异常综合征、白血病、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、血红蛋白病、地中海贫血、骨髓衰竭综合征、镰状细胞性贫血、再生障碍性贫血、范可尼贫血、免疫性溶血性贫血、先天性免疫缺陷或自身免疫功能异常中的一种或多种的危险或者正在遭受这些疾病,其中用所述细胞的治疗是辅助于对这些疾病的治疗。

13. 权利要求1至4中任一项的用途,其中所述细胞来自骨髓。

14. 权利要求1至4中任一项的用途,其中所述细胞来自人骨髓。

15. 权利要求1至4中任一项的用途,其中所述受试者是人受试者。

多潜能成体祖细胞的免疫调节特性及其用途

[0001] 本申请是国际申请日为2006年11月9日、国际申请号为PCT/US2006/043804、进入国家阶段的申请号为200680050862.9、发明名称为“多潜能成体祖细胞的免疫调节特性及其用途”的PCT申请的分案申请。

[0002] 相关申请的引用

[0003] 本申请是2005年11月9日提交的美国申请系列号11/269,736的部分继续申请；11/269,736是2005年6月13日提交的美国申请系列号11/151,689的部分继续申请；11/151,689是2004年10月11日提交的美国申请系列号10/963,444(放弃)的部分继续申请；10/963,444是2002年2月1日提交的美国申请系列号10/048,757的部分继续申请；10/048,757是2000年8月4日提交的、2001年2月15日用英语以WO 01/11011公布的PCT/US00/21387的美国国家阶段申请；PCT/US00/21387根据35U.S.C. §119(e)要求1999年8月5日提交的美国临时申请系列号60/147,324和1999年11月10日提交的美国临时申请系列号60/164,650的优先权，是2003年8月11日提交的美国申请系列号10/467,963的部分继续申请；10/467,963是2002年2月14日提交的、2002年8月22日用英语以WO 02/064748公布的PCT/US02/04652的美国国家阶段申请；PCT/US02/04652根据35U.S.C. §119(e)要求2001年2月14日提交的美国临时申请系列号60/268,786、2001年2月15日提交的美国临时申请系列号60/269,062、2001年8月7日提交的美国临时申请系列号60/310,625和2001年10月25日提交的美国临时申请系列号60/343,836的优先权，所有这些申请和公开说明书都通过引用整体结合到本文中，且本申请要求所有这些申请和公开说明书的全部优先权。

技术领域

[0004] 本发明的领域是多潜能成体祖细胞(“MAPCs”)的免疫调节和这些细胞在主要治疗和辅助治疗中用于调节免疫应答的用途。

背景技术

[0005] 包括骨髓移植在内的器官移植的治疗应用从一开始就在稳步增加。它已成为包括但不限于血液疾病、免疫疾病和恶性疾病等多种疾病的重要治疗选择。

[0006] 遗憾的是，移植的治疗用途往往会被移植所引起的不利免疫应答造成复杂化、致使无效或妨碍实施。移植疗法所碰到的最为突出的不良反应有(i)宿主抗移植物反应(“HVG”) (有免疫能力的宿主对移植的排斥) 和(ii) 移植物抗宿主病(“GVHD”) (主要出现在免疫受损的(immunocompromised)宿主中的过程，当该宿主被移植的免疫活性细胞识别为非己时出现)。

[0007] 当然，可通过完美地匹配供体和宿主避免宿主中的移植排斥。但是，除了自体同源组织外，只有完全相同的双胞胎可预期是真正同基因的。某个体供体(donor)和另一个体宿主/接受者(host/recipient)之间的完美匹配事实上是不存在的。因此，自体同源(autologous)组织的使用是获得完美匹配的唯一另外途径。遗憾的是，宿主组织通常不适合，或者没有在有需要前进行分离。对移植疗法的需求往往其实是替代宿主中的受损组织。

因此,同基因组织的使用虽然是解决宿主对移植组织的不利应答问题的有效办法,但在实际应用中通常没有用。

[0008] 如果不可能做到同基因(syngeneic)匹配,那么可通过使异基因的供体和宿主尽可能紧密地匹配来减轻移植疗法中出现的不利免疫作用。血液和/或组织分型被用来匹配供体和宿主,以提供最高的治疗成功可能性。但是,即使是异基因(allogeneic)组织的最紧密匹配也不能防止出现严重HVG,因此移植疗法涉及到免疫抑制和免疫抑制药物的使用,这在下文中有论述。

[0009] 另一已实行的避免移植疗法中的HVG并发症的方法,是使接受宿主的免疫系统失效。这已通过使用放射疗法和/或免疫抑制性化学疗法和/或抗体疗法来实现。所产生的对宿主免疫应答的抑制往往能很有效地帮助移植植物(如骨髓)在宿主中建系(establishment)。但是,免疫切除(immunoablation)或抑制会损及宿主的免疫防御。这会导致宿主在稍有暴露于传染原后就变得十分易受感染。所产生的感染是移植患者中致病率或死亡率的主要原因。

[0010] 损及宿主免疫系统还会产生或加剧移植疗法中碰到的另一严重问题——移植植物抗宿主病("GVHD")。当供体组织含有能将接受者的MHC蛋白识别为非己的免疫活性细胞时,会出现GVHD。这会激活T细胞,使T细胞分泌出细胞因子如IL-2(白介素2)、IFN((干扰素 γ)和TNF α (肿瘤坏死因子 α)。这些信号会引发对包括皮肤、胃肠道、肝脏和淋巴器官在内的接受者靶标的免疫攻击(Ferrara和Deeg,1991)。GVHD在骨髓移植中特别成问题,已证实它在骨髓移植中主要是由T淋巴细胞介导(Grebe和Streilein,1976)。实际上,大约有50%的骨髓移植患者会发展急性GVHD。这些患者中有许多人会死亡(15%-45%)。

[0011] 还存在着作为原发病变和作为其它病变和/或其治疗的继发作用而发生的其它免疫系统功能异常(dysfunction)、紊乱(disorder)和疾病(disease)。这些包括肿瘤、骨髓病变、血液病变、自身免疫疾病和一些炎性疾病,这在下文中进一步论述。这些紊乱和疾病的主要疗法和辅助疗法,如HVG和GVHD的主要疗法和辅助疗法,往往涉及到免疫抑制药物的使用。所有现行的疗法都有缺点和副作用。

[0012] 免疫抑制药物

[0013] 已作出大量的努力,来开发出治疗这些免疫系统功能异常从而改善或消除它们的有害作用,而又不引起另外的有害副作用的药物。在这个目标上已获得一定的进步,已有多种药物被开发出并用于预防和/或治疗这些功能异常。更为有效的这些药物的引入标志着移植疗法的医学实践的巨大进步;但是,这些药物没有一个是理想的。确实,目前可供在移植疗法中临床使用的免疫抑制药物没有一个是完全有效的。所有的药物都有严重的缺点和不利的副作用,这在下文中有概述。有关评论参见Farag(2004), "Chronic graft-versus-host disease: where do we go from here?", Bone Marrow Transplantation 33:569-577。

[0014] 主要用于治疗炎症和炎性疾病的皮质类固醇已知具有免疫抑制性,被许多人认为是HVG和GVHD的最佳主要治疗药。它们至少部分上通过抑制某些涉及T细胞激活和T细胞依赖性免疫应答的细胞因子基因的表达,来抑制T细胞增殖和T细胞依赖性免疫应答。

[0015] 环胞菌素是HVG和GVHD的免疫抑制和预防的最常用药物之一。它一般具有强烈免疫抑制性。虽然它能有效地减少移植患者中的不利免疫反应,但它也会极大地削弱免疫系

统,使得患者高度易受感染。因此,患者更容易受病原体暴露所感染,没有什么能力对感染作出有效的免疫应答。因而即使是温和的病原体也会威胁生命。环胞菌素还会引起多种其它不想要的副作用。

[0016] 甲氨喋呤单独或与其它药物组合在一起,也广泛用于HVG和GVHD的预防和治疗。研究已证实,就算它能有效,它显然也不比环胞菌素有效。和环胞菌素一样,甲氨喋呤也会引起多种副作用,其中一些副作用对患者健康可能有害。

[0017] FK-506是大环内酯样化合物。与环胞菌素相似,它也衍自真菌来源。环胞菌素和FK-506的免疫抑制作用相似。它们通过与它们各自的细胞质受体蛋白(即亲环蛋白和FK-结合蛋白)形成异型二聚复合物来阻断T细胞激活的早期事件。这然后会抑制钙调磷酸酶的磷酸酶活性,从而最终抑制核调节蛋白和T细胞激活基因的表达。

[0018] 已被用于免疫抑制的其它药物包括抗胸腺细胞球蛋白、硫唑嘌呤和环磷酰胺。它们被证明并不有利。雷帕霉素也被用于阻断T细胞激活的免疫应答,它是另一种能干扰T细胞对IL-2的应答的大环内酯样化合物。RS-61443这种霉酚酸衍生物已被发现能抑制实验动物中的同种异体移植排斥。咪唑立宾是一种咪唑核苷,能以类似于硫唑嘌呤和RS-61443的方式阻断嘌呤生物合成途径和抑制促细胞分裂原刺激的T细胞和B细胞增殖。脱氧精胍菌素是精胍菌素的合成类似物,已发现它能在临床前移植模型中发挥免疫抑制特性。抗代谢物布喹那钠是二氢乳清酸脱氢酶的抑制剂,能通过对嘧啶合成的抑制阻断尿苷和胞苷两种核苷的形成。黄连素及其药理上可耐受的(pharmacologically tolerable)盐已被用作免疫抑制剂,用来治疗诸如风湿病的自身免疫疾病,用来治疗过敏症和用来预防移植排斥。据报道,黄连素能抑制B细胞抗体产生和通常能抑制体液免疫应答,但不会影响T细胞繁殖。参见日本专利07-316051和美国专利6,245,781。

[0019] 这些免疫抑制药物无论是单独使用还是与其它药剂组合使用,没有一个是完全有效的。它们全部都通常会让患者仍易发生HVG和GVHD,削弱患者抵抗感染的能力。这使得他们更易受感染,在发生感染时更不能抗击感染。此外,所有这些药物都会引起严重副作用,包括例如胃肠毒性、肾脏毒性、高血压、骨髓抑制、肝脏毒性、高血压和牙龈肥大等等。它们没有一个证明是完全可接受或有效的治疗药。总之,鉴于这些缺点,对于不利免疫系统功能异常和/或应答如HVG和GVHD,目前还没有完全令人满意的基于药物的治疗。

[0020] 一直认为,可以开发出没有这些缺点的更具特异性的免疫抑制类型。例如,能特异性抑制或消除同种异体反应性(alloreactive)T细胞的药剂,将能有效抵抗HVG和GVHD(至少对于异基因移植),而又不会出现全身性攻击和损及免疫系统的药剂所会出现的不利副作用。但是,至今还没有开发出这种药剂。

[0021] 局限干细胞(restricted stem cell)在移植中的用途

[0022] 干细胞代替免疫抑制剂来使用或与免疫抑制剂一起来使用,最近受到了关注。在这个领域已有一些鼓舞人心的观察结果。近年来已分离和表征了多种干细胞。它们既有分化潜力高度局限、在培养物中生长的能力有限的干细胞,也有分化潜力明显不受局限、在培养物中生长的能力无限的干细胞。前者通常更容易衍生,可从多种成体组织获得。后者须衍自生殖细胞和胚胎,被称为胚胎干("ES")细胞、胚胎生殖("EG")细胞和生殖细胞。胚胎干("ES")细胞具有无限的自我更新能力,能分化成所有的组织类型。ES细胞衍自胚泡的内细胞团。胚胎生殖("EG")细胞衍自着床后胚胎(post-implantation embryo)的原始生殖细

胞。衍自成体组织的干细胞其价值有限,因为它们具有免疫原性,分化潜力有限和在培养中繁殖的能力有限。ES、EG和生殖细胞没有这些缺点,但它们有在异基因宿主中形成畸胎瘤的明显倾向,这引起了对它们在医学治疗中的用途的高度关注。因此,尽管它们的广泛分化潜力是有利的,但对它们在临床应用中的有用性存在着悲观看法。衍自胚胎的干细胞还遭到伦理争议,这些争议会妨碍它们在治疗疾病上的使用。

[0023] 一些试图寻找ES、EG和生殖细胞的替代物的努力,投向了衍自成体组织的细胞。虽然成体干细胞在哺乳动物的大多数组织中都已鉴定出,但它们的分化潜力有局限,比ES、EG和生殖细胞的分化潜力要窄得多。的确,许多这种细胞只能产生一种或少数几种分化细胞类型,且许多其它细胞局限于单一胚胎谱系。

[0024] 例如,造血干细胞只能分化形成造血谱系的细胞,神经干细胞只分化成神经外胚层起源的细胞,间充质干细胞(“MSCs”)则限于间充质起源的细胞。出于上述的与ES、EG和生殖细胞有关的限制、风险和争议的原因,很大一部分的涉及干细胞在移植疗法中的用途的工作都采用MSCs。最近几年的结果似乎表明,MSCs的同种异体移植物(allograft)并不产生HVG免疫反应,这种反应是当其它组织在异基因个体之间移植时总能看到的一种应答。此外,结果提示MSCs至少在一些情况下会削弱淋巴细胞免疫应答。

[0025] 虽然这些结果直接提示到,MSCs可能可用于减少通常会伴随异基因移植出现的HVG和/或GVHD,但所观察到的MSCs的免疫抑制作用是高度剂量依赖性的,且需要相对较高的剂量才观察到免疫抑制作用。事实上,在体外混合淋巴细胞测定中,淋巴细胞增殖的下降只有在MSCs与淋巴细胞之比为1:10或以上时才“明显”。此外,随着MSCs的剂量下降,所观察到的抑制作用也下降和变得不可观察,在低于1:100的比例下MSCs的存在实际上似乎刺激T细胞的增殖。在促细胞分裂原刺激的淋巴细胞增殖测定中也观察到相同的剂量效应。有关评论参见Ryan et al. (2005) "Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection (间充质干细胞能避免异基因排斥)," *J. Inflammation* 2:8; Le Blanc (2003) "Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells (胎儿和成体间充质干细胞的免疫调节作用)," *Cytotherapy* 5 (6) :485-489和Jorgensen et al. (2003) "Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy (工程化间充质干细胞用于免疫疗法)," *Gene Therapy* 10:928-931。另外的结果在下文中总结。

[0026] 例如,Bartholomew和他的同事发现,狒狒MSCs不刺激异基因淋巴细胞在体外增殖,且在体外混合淋巴细胞测定中MSCs减少了促细胞分裂原刺激的淋巴细胞的增殖超过50%。他们进一步证实,MSMCs的体内给予延长了皮肤移植物存活期(相对于对照)。体外结果和体内结果要求高剂量的MSCs:对于体外结果要求其与淋巴细胞之比为1:1。就实际而言,为在人体内接近这种比例所要求的MSCs的量可能高得难以达到。这会限制MSCs的应用。参见Bartholomew et al. (2002) :"Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo (间充质干细胞能在体外抑制淋巴细胞增殖和在体内延长皮肤移植物存活期)," *Experimental Hematology* 30:42-48。

[0027] Maitra和他的同事研究了人MSCs和异基因人脐带血细胞共输注到亚致死辐射的NOD-SCID小鼠后,前者对后者的移入(engraftment)的作用。他们发现,在体外增殖测定中,人MSCs促进了移入,不刺激异基因T细胞。他们还发现,人MSCs抑制了促细胞分裂原对异基

因人T细胞的体外激活。这些作用是剂量依赖性的,需要相对较高的比例才能抑制。(Maitra et al. (2004) *Bone Marrow Transplantation*33:597-604)。

[0028] 最近,Le Blanc他的同事报道说,通过给予“第三方单倍同一性(third party haploidentical)”MSCs,成功地治疗了一名患有通常致命的IV级急性GVHD的患者。该患者是患有处于第三好转期(third remission)的急性淋巴母细胞性白血病的9岁男孩。最初,该患者用放射和环磷酰胺进行治疗,然后给予在HLA-A、HLA-B和HLA-DRbeta1基因座处与他自己的细胞完全相同的血细胞。这些细胞获自不相关的雌性供体。尽管进行了积极的治疗,包括给予了多种免疫抑制剂,但到移植后70天时,患者还是发展了IV级急性GVHD。他常常遭受侵入性细菌、病毒和真菌感染的折磨。

[0029] 在这些明显可怕的情况下,尝试了别种血液干细胞移植。从患者的母亲分离了单倍同一性MSCs,在体外扩增(expand)三个星期。收获细胞,以 2×10^6 个细胞/公斤静脉内给予患者。没有与MSCs有关的毒性的迹象,也没有很大的副作用。在移植后几天内许多症状消退,但残余疾病仍明显。用相同的方法再静脉内注射几次MSCs后,患者的症状和GVHD完全消退。患者在摆脱疾病后一年仍保持无病。根据作者的经验,这个患者在患上这么严重的GVHD仍能存活方面是不平常的。Le Blanc等报道的结果既有希望又鼓舞人心,对开发出利用干细胞的有效疗法来说应该是个激励。Le Blanc et al. (2004) "Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells(用第三方单倍同一性间充质干细胞治疗严重急性移植物抗宿主病)," *Lancet*363:1439-41。

[0030] 尽管如此,这些结果,包括Le Blanc和他的同事的结果,揭示了MSCs的潜在缺点。细胞需要与传统的免疫抑制模式(modality)一起给予,而这会继续产生有害免疫应答。MSCs的剂量要求需要非常高才能有效,这会造成成本更高、给药更困难、毒性和其它副作用的风险更大以及其它缺点。

[0031] 鉴于目前的基于干细胞的移植相关疗法的这些限制,显然对这样的祖细胞有强烈的需求,这种祖细胞能用于所有的——或者至少大部分的——接受宿主,而又不需要宿主-接受者单倍型匹配。此外,还对这样的细胞有需求,这种细胞具有较大的“比活性”,使得它们在较低剂量下是治疗上有效的,且它们的给予不会造成在使用MSCs获得有利结果时要求的高剂量模式所伴随产生的问题。还有对这样的细胞也有需求,这种细胞具有几乎无限的分化潜力,能形成在目的生物中所出现的细胞。

[0032] 因此,一直对这样的细胞有需求,这种细胞具有ES、EG和生殖细胞的自我更新和分化能力,但没有免疫原性;当同种移植或异种移植到宿主时不会形成畸胎瘤;不会造成ES、EG和生殖细胞所伴随出现的其它安全问题;保持了ES、EG和生殖细胞的其它优点;容易从易得来源如胎盘、脐带、脐带血、血液和骨髓分离;能长时间安全储藏;能容易获得,对志愿者、供者或患者没有风险,无须其他人给予同意;不会带来涉及到其获取和与ES、EG和生殖细胞一起运用的技术上和运销上的困难。

[0033] 最近,有一类本文称之为多潜能成体祖细胞("MAPCs")的细胞得到了分离和表征(参见例如美国专利,该专利7,015,037通过引用整体结合到本文中)。("MAPCs"也可称为"MASCs")。这些细胞能提供ES、EG和生殖细胞的许多优点,又没有它们的许多缺点。例如,MAPCs能够进行无限期培养而又不失去它们的分化潜力。它们显示出随同NOD-SCID小鼠的

多个发育谱系的有效、长期的移入和分化，在移入和分化的同时没有畸胎瘤形成(在ES、EG和生殖细胞中常见)的迹象(Reyes, M. 和 C.M. Verfaillie (2001) *Ann N Y Acad Sci.* 938: 231-5)。

发明内容

[0034] 因此，在本发明的一些实施方案中，本发明提供这样的细胞，它们(i)不是胚胎干细胞、不是胚胎生殖细胞和不是生殖细胞；(ii)能分化成内胚层、外胚层和中胚层胚胎谱系中的至少两个谱系的每一个的至少一种细胞类型；(iii)在引入到非同基因受试者(subject)中时不会引起有害免疫应答；和(iv)在引入到受试者中时能调节免疫应答。在这个方面的某些实施方案中，本发明提供这样的细胞，它们除去如前所述外，还具有免疫抑制性。此外，本发明的各个实施方案提供这样的细胞，它们是具有免疫调节特性的前述细胞，该免疫调节特性可用于治疗如排除、防止、改善、减轻、降低、最小化、消除和/或整治宿主中的有害免疫应答和/或过程。在本发明的一些实施方案中，所述细胞为此作为主要治疗模式单独使用或者与其它治疗剂和模式一起使用。在本发明的一些实施方案中，所述细胞在辅助治疗模式中使用，在该模式中它们是作为唯一治疗剂使用或者与其它治疗剂一起使用。在本发明的一些实施方案中，所述细胞在一种或多种主要治疗模式中和在一种或多种辅助治疗模式中，都是单独地或者与其它治疗剂或模式一起使用。

[0035] 本发明的细胞在本文中将作更详细的描述，在本文中一般称为“多潜能成体祖细胞”，其英文首字母缩略词为“MAPC”(单数)和“MAPCs”(复数)。应认识到，这些细胞不是ES、不是EG，也不是生殖细胞，它们具有分化成三种原始胚层谱系(外胚层、中胚层和内胚层)中的至少两种的细胞类型、例如分化成所有三种原始谱系的细胞的能力。

[0036] 例如，MAPCs能形成以下细胞及其谱系的其它细胞：内脏(splanchnic)中胚层细胞、肌肉细胞、骨细胞、软骨细胞、内分泌细胞、外分泌细胞、内皮细胞、生发细胞、生齿细胞、内脏(visceral)中胚层细胞、造血细胞、基质细胞、骨髓基质细胞、神经元细胞、神经外胚层细胞、上皮细胞、眼细胞、胰细胞和肝细胞样细胞等等。由MAPCs形成的细胞有造骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、骨骼肌细胞(skeletal muscle cell)、骨骼肌细胞(skeletal myocyte)、胆上皮细胞、胰腺泡细胞、系膜细胞、平滑肌细胞、心肌细胞(cardiac muscle cell)、心肌细胞(cardiomyocyte)、骨细胞、血管形成细胞、少突神经胶质细胞、神经元(包括5-羟色胺能、GABA能、多巴胺能神经元)、神经胶质细胞、小胶质细胞、胰上皮细胞、肠上皮细胞、肝上皮细胞、皮肤上皮细胞、肾上皮细胞、胰岛细胞、成纤维细胞、肝细胞和与上述细胞同谱系的其它细胞，等等。

[0037] MAPCs具有自我更新所必需的和据认为维持未分化状态所必需的端粒酶活性。通常它们也表达oct-3/4。Oct-3/4(在人体中为Oct-3A)也是ES、EG和生殖细胞所特有。它被认为是具有广泛分化能力的未分化细胞的标志。Oct-3/4还通常被认为具有维持细胞处于未分化状态的作用。Oct-4(在人体中为Oct-3)是在原肠形成前期胚胎、早期分裂期胚胎、胚泡的内细胞团的细胞和胚胎癌(“EC”)细胞中的转录因子(Nichols, J. et al. (1998) *Cell* 95: 379-91)，当细胞被诱导分化时被下调。Oct-4基因(在人体中为Oct-3)在人体中被转录成至少两个剪接变体Oct-3A和Oct-3B。Oct-3B剪接变体见于许多分化细胞中，而Oct-3A剪接变体(之前也称为Oct-3/4)据报道对未分化胚胎干细胞具有特异性。参见Shimozaki et al.

(2003) Development 130: 2505-12。oct-3/4的表达在决定胚胎发生和分化中的早期步骤中起到重要的作用。Oct-3/4与rox-1一起引起锌指蛋白rex-1的转录激活,这个激活也是维持ES细胞处于未分化状态所需的 (Rosfjord, E. 和 Rizzino, A. (1997) Biochem Biophys Res Commun 203: 1795-802; Ben-Shushan, E. et al. (1998) Mol Cell Biol 18: 1866-78)。

[0038] MAPCs通常还表达其它据认为是原始干细胞所特有的标志。这些标志有rex-1、rox-1和sox-2。Rex-1受oct-3/4的控制,即oct-3/4激活rex-1的下游表达。Rox-1和sox-2在非ES细胞中表达。

[0039] 本发明的各个实施方案提供使用MAPCs来排除、防止、治疗、改善、减轻、降低、最小化、消除和/或整治宿主中的疾病和/或不利免疫应答和/或过程的方法。本发明的某些实施方案提供将所述细胞本身作为主要治疗模式使用的方法。在本发明的一些实施方案中,所述细胞与一种或多种其它药剂和/或治疗模式一起作为主要治疗模式使用。在本发明的一些实施方案中,所述细胞作为辅助治疗模式使用,也就是说作为另一主要治疗模式的辅助模式使用。在一些实施方案中,所述细胞作为辅助治疗模式的唯一活性药剂使用。在其它实施方案中,所述细胞与一种或多种其它药剂或治疗模式一起作为辅助治疗模式使用。在一些实施方案中,所述细胞同时作为主要和辅助治疗剂和/或模式使用。在这两方面,所述细胞都可在主要模式和/或在辅助模式中单独使用。它们也可在主要模式中或在辅助模式中或在两种模式中与其它治疗剂或模式一起使用。

[0040] 如上所述,主要治疗如治疗剂、疗法和/或治疗模式是要靶向(即意在作用于)待治疗的主要功能异常如疾病。辅助治疗如疗法和/或治疗模式可与主要治疗如治疗剂、疗法和/或治疗模式一起给予,以作用于主要功能异常如疾病和补充主要治疗的作用,从而增加治疗方案(regimen)的总体功效。辅助治疗如治疗剂、疗法和/或治疗模式,也可给予来作用于主要功能异常如疾病的并发症和/或副作用和/或某种治疗如治疗剂、疗法和/或治疗模式所引起的并发症和/或副作用。对于任何这些应用,可将一种、两种、三种或多种主要治疗与一种、两种、三种或多种辅助治疗一起使用。

[0041] 在一些实施方案中,将MAPCs在功能异常如疾病、副作用和/或有害免疫应答发生前给予受试者。在一些实施方案中,将所述细胞在功能异常正在发展时给予。在一些实施方案中,将所述细胞在功能异常已确立后给予。所述细胞可在功能异常的发展、持续和/或扩散中的任何阶段给予,或者在功能异常消退后给予。

[0042] 如前所述,本发明的实施方案提供用于主要或辅助疗法的细胞和方法。在本发明的某些实施方案中,将所述细胞给予异基因(allogenic)受试者。在一些实施方案中,它们与受试者自体同源(autologous)。在一些实施方案中,它们与受试者同基因(syngeneic)。在一些实施方案中,所述细胞与受试者异种(xenogeneic)。无论是异基因、自体同源、同基因还是异种,在本发明的各个实施方案中,MAPCs在受试者中具有弱免疫原性或者是非免疫原性的。在一些实施方案中,MAPCs具有充分低的免疫原性或者是非免疫原性的,且充分地没有一般的有害免疫应答,从而当被给予异基因受试者时它们能用作“通用”供体细胞而无需进行组织分型和匹配。根据本发明的各个实施方案,MAPCs也可储藏和维持在细胞库中,从而能在有需要时可供使用。

[0043] 在所有这些方面和其它方面,本发明的实施方案提供来自哺乳动物的MAPCs,所述哺乳动物在一个实施方案中是人,在其它实施方案中是非人灵长类动物、大鼠和小鼠及狗、

猪、山羊、绵羊、马和牛。从上述哺乳动物制备得到的MAPCs可用于所有本文所述的本发明方法和其它方面。

[0044] 根据本发明各个实施方案的MAPCs可从这种哺乳动物的多个区室 (compartment) 和组织分离得到,所述区室和组织包括但不限于骨髓、血液、脾脏、肝脏、肌肉、大脑及下文提到的其它区室和组织。在一些实施方案中,将MAPCs进行培养后再使用。

[0045] 在一些实施方案中,将MAPCs进行遗传工程改造,例如以改善它们的免疫调节特性。在一些实施方案中,遗传工程改造的MAPCs通过体外培养来产生。在一些实施方案中,遗传工程改造的MAPCs从转基因生物产生。

[0046] 在各个实施方案中,将MAPCs通过任何能有效递送细胞治疗剂的途径给予受试者。在一些实施方案中,所述细胞通过注射给予,包括局部注射和/或全身注射。在某些实施方案中,将所述细胞在它们意在治疗的功能异常的部位当中和/或接近该部位处给予。在一些实施方案中,所述细胞通过在不接近功能异常部位的位置处注射来给予。在一些实施方案中,所述细胞通过系统注射如静脉内注射来给予。

[0047] 在一些实施方案中,将MAPCs给予一次、两次、三次或三次以上,直到达到所需的治疗效果或者其给予似乎不再可能给受试者提供好处。在一些实施方案中,将MAPCs例如通过静脉滴注连续给予一段时间。MAPCs的给予可以是为期较短的时间、为期数天、为期数周、为期数月、为期数年或者为期更长的时间。

[0048] 以下各个带编号段落描述的是一些例示本发明一些方面和特征的本发明示例性实施方案。它们并没有穷尽说明本发明许多方面和实施方案,因此并不是以任何方式限制本发明。本发明的许多其它方面、特征和实施方案在本文中有描述。本领域技术人员在阅读本申请并根据本领域的现有技术和知识对本申请进行适当思考时,会容易想到许多其它方面和实施方案。

[0049] 以下的带编号段落是自身引用的(self-referential)。措辞“根据任何前述或后述的”是指所有前面编号的和所有后面编号的段落和它们的内容。“根据#”形式的所有措辞是对该编号段落的直接引用,例如“根据46”是指根据这里的带编号段落集合中的段落46。所有的交叉引用除了范围上的冗余和不一致外都是组合性的。交叉引用是明确用来提供简明的描述,表明包括了各主题相互间的各种组合。

[0050] 1.一种治疗受试者的免疫功能异常的方法,所述方法包括:

[0051] 通过有效的途径和以能治疗免疫功能异常的有效量,给予可能会遭受、正在遭受或已经遭受免疫功能异常的受试者这样的细胞(MAPCs):它们不是胚胎干细胞、胚胎生殖细胞或生殖细胞;能分化成内胚层、外胚层和中胚层胚胎谱系中的至少两个谱系的每一个的至少一种细胞类型;不会在受试者中引起有害免疫应答;和能有效治疗免疫功能异常。

[0052] 2.一种对受试者进行辅助治疗的方法,所述方法包括通过有效的途径和以能治疗免疫功能异常的有效量,给予可能会遭受、正在遭受或已经遭受免疫功能异常的受试者这样的细胞(MAPCs):它们不是胚胎干细胞、胚胎生殖细胞或生殖细胞;能分化成内胚层、外胚层和中胚层胚胎谱系中的至少两个谱系的每一个的至少一种细胞类型;不会在受试者中引起有害免疫应答;和能有效治疗免疫功能异常,其中所述细胞是辅助于一种或多种其它的给予受试者以治疗同样的事情、治疗别的事情或两种情况都治疗的治疗法来进行给予。

[0053] 3.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞能分化成内胚层、外胚层和中胚层

胚胎谱系中的每一个的至少一种细胞类型。

[0054] 4. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞能表达端粒酶。

[0055] 5. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞对oct-3/4阳性。

[0056] 6. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞在培养中进行了至少10-40次细胞倍增再给予受试者。

[0057] 7. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

[0058] 8. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞是人、马、牛、山羊、绵羊、猪、大鼠或小鼠细胞。

[0059] 9. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞是人、大鼠或小鼠细胞。

[0060] 10. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞是人细胞。

[0061] 11. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞衍自从以下任一者分离的细胞:胎盘组织、脐带组织、脐带血、骨髓、血液、脾组织、胸腺组织、脊髓组织、脂肪组织和肝组织。

[0062] 12. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞衍自从胎盘组织、脐带组织、脐带血、骨髓、血液和脾组织中的任何一个分离的细胞。

[0063] 13. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞衍自从胎盘组织、脐带组织、脐带血、骨髓或血液中的任何一个分离的细胞。

[0064] 14. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞衍自从骨髓或血液中的任何一个或多个分离的细胞。

[0065] 15. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞与受试者异基因。

[0066] 16. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞与受试者异种。

[0067] 17. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞与受试者自体同源。

[0068] 18. 根据任何前述或后述的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

[0069] 19. 根据任何前述或后述的方法,其中所述受试者是哺乳动物中的宠物动物、哺乳动物中的牲畜动物、哺乳动物中的研究用动物或非人灵长类动物。

[0070] 20. 根据任何前述或后述的方法,其中所述受试者是人。

[0071] 21. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞以一个或多个包含 10^4 - 10^8 个所述细胞/公斤受试者质量的剂量给予受试者。

[0072] 22. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞以一个或多个包含 10^5 - 10^7 个所述细胞/公斤受试者质量的剂量给予受试者。

[0073] 23. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞以一个或多个包含 5×10^6 - 5×10^7 个所述细胞/公斤受试者质量的剂量给予受试者。

[0074] 24. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞以一个或多个包含 2×10^7 - 4×10^7 个所述细胞/公斤受试者质量的剂量给予受试者。

[0075] 25. 根据任何前述或后述的方法,其中除了所述细胞外,还将一种或多种因子给予所述受试者。

[0076] 26. 根据任何前述或后述的方法,其中除了所述细胞外,还将一种或多种生长因子、分化因子、信号转导因子和/或能增加归巢(homing)的因子给予所述受试者。

[0077] 27. 根据任何前述或后述的方法,其中除了所述细胞外,还将一种或多种细胞因子给予所述受试者。

[0078] 28.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞是辅助于在给予所述细胞之前、同时或之后给予的另一治疗法来给予受试者。

[0079] 29.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞是辅助于一种或多种免疫抑制剂对受试者的给予来给予受试者。

[0080] 30.根据任何前述或后述的方法,其中除了用所述细胞治疗外,受试者还要接受或已经接受某种移植,其中所述细胞是辅助于该移植来给予。

[0081] 31.根据任何前述或后述的方法,其中除了用所述细胞治疗外,受试者还要接受或已经接受肾脏、心脏、肺、肝脏或其它器官的移植,其中所述细胞是辅助于该移植来给予。

[0082] 32.根据任何前述或后述的方法,其中除了用所述细胞治疗外,受试者还要接收或已经接受骨髓、静脉、动脉、肌肉或其它组织的移植,其中所述细胞是辅助于该移植来给予。

[0083] 33.根据任何前述或后述的方法,其中除了用所述细胞治疗外,受试者还要接收或已经接受血细胞、胰岛细胞或者其它组织或器官再生细胞的移植,其中所述细胞是辅助于该移植来给予。

[0084] 34.根据任何前述或后述的方法,其中除了用所述细胞治疗外,受试者还要接收或已经接受血细胞移植,其中所述细胞是辅助于该移植来给予。

[0085] 35.根据任何前述或后述的方法,其中除了用所述细胞治疗外,受试者还要接收或已经接受骨髓移植,其中所述细胞是辅助于该移植来给予。

[0086] 36.根据任何前述或后述的方法,其中除了用所述细胞治疗外,受试者已经用、将要用或正在用一种或多种免疫抑制剂进行治疗,其中所述细胞是辅助于该免疫抑制剂的治疗来给予。

[0087] 37.根据任何前述或后述的方法,其中除了用所述细胞治疗外,受试者已经用、将要周或正在用以下之一种或多种进行治疗:皮质类固醇、环胞菌素A、环胞菌素样免疫抑制剂、环磷酰胺、抗胸腺细胞球蛋白、硫唑嘌呤、雷帕霉素、FK-506和FK-506之外的大环内酯样免疫抑制剂、雷帕霉素和免疫抑制性的单克隆抗体药剂(即这样的免疫抑制剂,它是免疫抑制性的单克隆抗体或者包含单克隆抗体的全部或一个或多个部分的药剂,如包含单克隆抗体的Fc或Ag结合位点的嵌合蛋白),其中所述细胞是辅助于以上之一种或多种的治疗来给予。

[0088] 38.根据任何前述或后述的方法,其中除了用所述细胞治疗外,受试者已经用、将要用或正在用以下之一种或多种进行治疗:皮质类固醇、环胞菌素A、硫唑嘌呤、雷帕霉素、环磷酰胺、FK-506或免疫抑制性的单克隆抗体药剂,其中所述细胞是辅助于以上之一种或多种的治疗来给予。

[0089] 39.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞是辅助于一种或多种抗生素药剂对受试者的给予来给予受试者。

[0090] 40.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞是辅助于一种或多种抗真菌剂对受试者的给予来给予受试者。

[0091] 41.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞是辅助于一种或多种抗病毒剂对受试者的给予来给予受试者。

[0092] 42.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞是辅助于任何免疫抑制剂和/或抗生素药剂和/或抗真菌剂和/或抗病毒剂中的两种或多种的任何组合对受试者的给予来给

予受试者。

[0093] 43. 根据任何前述或后述的方法, 其中所述细胞是辅助于移植疗法来给予受试者, 以治疗受试者中的正在损害或可能损害移植的治疗功效和/或正在导致或可能导致移植排斥的宿主抗移植物反应。

[0094] 44. 根据任何前述或后述的方法, 其中所述细胞给予具有受削弱的免疫系统、如缺损免疫系统和/或被切除免疫系统中的一个或多个的受试者。

[0095] 45. 根据任何前述或后述的方法, 其中所述细胞是辅助于已给予、正给予或将要给予受试者的放射疗法或化学疗法或者放射疗法和化学疗法的组合来给予受试者。

[0096] 46. 根据任何前述或后述的方法, 其中所述细胞是辅助于放射疗法或化学疗法或者放射疗法和化学疗法的组合的正在进行中的方案来给予受试者。

[0097] 47. 根据任何前述或后述的方法, 其中所述受试者的免疫系统已被放射疗法、化学疗法或者放射疗法和化学疗法的组合所削弱、缺损和/或切除。

[0098] 48. 根据任何前述或后述的方法, 其中所述受试者是非同基因血细胞或骨髓移植植物的接受者, 所述受试者的免疫系统已被放射疗法、化学疗法或者放射疗法和化学疗法的组合所削弱或切除, 且所述受试者有发展移植物抗宿主病的危险或已经发展该疾病。

[0099] 49. 根据任何前述或后述的方法, 其中所述受试者是非同基因血细胞或骨髓移植植物的接受者, 所述受试者的免疫系统已被放射疗法、化学疗法或者放射疗法和化学疗法的组合以及给予受试者的免疫抑制药物所削弱或切除, 其中此外所述受试者有发展移植物抗宿主病的危险或已经发展该疾病, 所述细胞是辅助于一种或多种其它治疗法(即移植、放射疗法、化学疗法和/或免疫抑制药物)给予所述受试者以治疗移植物抗宿主病。

[0100] 50. 根据任何前述或后述的方法, 其中所述受试者将是或者现在是非同基因移植植物的接受者, 有发展宿主抗移植物反应的危险或者已经发展该反应, 其中所述细胞被给予来治疗宿主抗移植物反应。

[0101] 51. 根据任何前述或后述的方法, 其中所述受试者有遭受肿瘤的危险或正遭受肿瘤, 所述细胞是辅助于对肿瘤的治疗来给予。

[0102] 52. 根据任何前述或后述的方法, 其中所述受试者有遭受血细胞或骨髓细胞的肿瘤的危险或正遭受该肿瘤, 所述细胞是辅助于对该肿瘤的治疗来给予。

[0103] 53. 根据任何前述或后述的方法, 其中所述受试者有遭受骨髓细胞的良性肿瘤、骨髓增殖性疾病、骨髓增生异常综合征或急性白血病的危险或正遭受这些疾病, 所述细胞是辅助于对这些疾病的治疗来给予。

[0104] 54. 根据任何前述或后述的方法, 其中所述受试者有遭受骨髓细胞的良性肿瘤的危险或正遭受该肿瘤, 所述细胞是辅助于对该肿瘤的治疗来给予。

[0105] 55. 根据任何前述或后述的方法, 其中所述受试者有遭受骨髓增殖性疾病的危险或正遭受该疾病, 所述细胞是辅助于对该疾病的治疗来给予。

[0106] 56. 根据任何前述或后述的方法, 其中所述受试者有遭受以下一种或多种疾病的危险或正遭受这些疾病: 慢性髓细胞性白血病("CML") (也称慢性粒细胞性白血病("CGL"))、原因不明的骨髓纤维化(agnogenic myelofibrosis)、特发性血小板增多症、真性红细胞增多症或其它骨髓增殖性疾病, 所述细胞是辅助于对这些疾病的治疗来给予。

[0107] 57. 根据任何前述或后述的方法, 其中所述受试者有遭受骨髓增生异常综合征的

危险或正遭受该综合征,所述细胞是辅助于对该综合征的治疗来给予。

[0108] 58. 根据任何前述或后述的方法,其中所述受试者有遭受急性白血病的危险或正遭受该疾病,所述细胞是辅助于对该疾病的治疗来给予。

[0109] 59. 根据任何前述或后述的方法,其中所述受试者有遭受以下一种或多种疾病的危险或正遭受这些疾病:急性多发性骨髓瘤、髓母细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病("CML")、急性前髓细胞性白血病、前-B急性淋巴母细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病("CLL")、B细胞淋巴瘤、毛细胞白血病、骨髓瘤、T急性淋巴母细胞性白血病、外周型T细胞淋巴瘤、其它淋巴样白血病、其它淋巴瘤或其它急性白血病,所述细胞是辅助于对这些疾病的治疗来给予。

[0110] 60. 根据任何前述或后述的方法,其中所述受试者有遭受贫血或其它血液疾病的危险或正遭受这些疾病,所述细胞是辅助于对这些疾病的治疗来给予。

[0111] 61. 根据任何前述或后述的方法,其中所述受试者有遭受血红蛋白病、地中海贫血、骨髓衰竭综合征、镰状细胞性贫血、再生障碍性贫血、范可尼贫血或免疫性溶血性贫血的危险或正遭受这些疾病,所述细胞是辅助于对这些疾病的治疗来给予。

[0112] 62. 根据任何前述或后述的方法,其中所述受试者有遭受以下一种或多种疾病的危险或正遭受这些疾病:难治性贫血、环形铁粒幼细胞性难治性贫血 (refractory anemia with ringed sideroblasts)、伴过多原始细胞的难治性贫血 (refractory anemia with excess blasts)、伴过多转化中原始细胞的难治性贫血 (refractory anemia with excess blasts in transformation)、慢性骨髓单核细胞性白血病或其它骨髓增生异常综合征,所述细胞是辅助于对这些疾病的治疗来给予。

[0113] 63. 根据任何前述或后述的方法,其中所述受试者有遭受范可尼贫血的危险或正遭受该疾病,所述细胞是辅助于对该疾病的治疗来给予。

[0114] 64. 根据任何前述或后述的方法,其中所述受试者有遭受免疫功能异常的危险或正遭受免疫功能异常,所述细胞是辅助于对免疫功能异常的治疗来给予。

[0115] 65. 根据任何前述或后述的方法,其中所述受试者有遭受先天性免疫缺陷的危险或正遭受先天性免疫缺陷,所述细胞是辅助于对先天性免疫缺陷的治疗来给予。

[0116] 66. 根据任何前述或后述的方法,其中所述受试者有遭受自身免疫功能异常、紊乱或疾病的危险或正遭受该异常、病症或疾病,所述细胞是辅助于对该异常、病症或疾病的治疗来给予。

[0117] 67. 根据任何前述或后述的方法,其中所述受试者有遭受以下一种或多种自身免疫功能异常的危险或正遭受这些自身免疫功能异常:节段性回肠炎、格林-巴利综合征、红斑狼疮(也称"SLE"和系统性红斑狼疮)、多发性硬化、重症肌无力、视神经炎、牛皮癣、类风湿性关节炎、格雷夫斯氏病、桥本氏病、0rd甲状腺炎、糖尿病(I型)、莱特尔氏综合征、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、抗磷脂抗体综合征("APS")、眼阵挛-肌阵挛综合征("OMS")、颞动脉炎、急性播散性脑脊髓炎("ADEM"和"ADE")、吉德帕斯彻氏综合征、韦格纳肉芽肿、乳糜泻、天疱疮、多关节炎和温性自身免疫性溶血性贫血,所述细胞是辅助于对这些自身免疫功能异常的治疗来给予。

[0118] 68. 根据任何前述或后述的方法,其中所述受试者有遭受以下一种或多种自身免疫功能异常的危险或正遭受这些自身免疫功能异常:节段性回肠炎、红斑狼疮(也称"SLE"

和系统性红斑狼疮)、多发性硬化、重症肌无力、牛皮癣、类风湿性关节炎、格雷夫斯氏病、桥本氏病、糖尿病(I型)、莱特尔氏综合征、原发性胆汁性肝硬化、乳糜泻、多关节炎和温性自身免疫性溶血性贫血,所述细胞是辅助于对这些自身免疫功能异常的治疗来给予。

[0119] 69.根据任何前述或后述的方法,其中所述受试者有遭受以下一种或多种据认为具有自身免疫因素(component)的疾病的危险或正遭受这些疾病:子宫内膜异位、间质性膀胱炎、神经性肌强直、硬皮病、进行性系统性硬皮病、白癫风、外阴部触觉痛(vulvodynia)、恰加斯氏病、肉样瘤病、慢性疲劳综合症和自主神经机能异常,所述细胞是辅助于对这些疾病的治疗来给予。

[0120] 70.根据任何前述或后述的方法,其中所述受试者有遭受炎性疾病危险或正遭受炎性疾病,所述细胞是辅助于对炎性疾病的治疗来给予。

[0121] 71.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞以包含一种或多种其它药物活性剂的制剂形式给予。

[0122] 72.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞以包含一种或多种其它免疫抑制剂的制剂形式给予。

[0123] 73.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞以包含以下一种或多种药剂的制剂形式给予:皮质类固醇、环胞菌素A、环胞菌素样免疫抑制剂、环磷酰胺、抗胸腺细胞球蛋白、硫唑嘌呤、雷帕霉素、FK-506和FK-506之外的大环内酯样免疫抑制剂、雷帕霉素和免疫抑制性的单克隆抗体药剂。

[0124] 74.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞以包含以下一种或多种药剂的制剂形式给予:皮质类固醇、环胞菌素A、硫唑嘌呤、环磷酰胺、雷帕霉素、FK-506和免疫抑制性的单克隆抗体药剂。

[0125] 75.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞以包含一种或多种抗生素药剂的制剂形式给予。

[0126] 76.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞以包含一种或多种抗真菌剂的制剂形式给予。

[0127] 77.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞以包含一种或多种抗病毒剂的制剂形式给予。

[0128] 78.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞通过胃肠外途径给予受试者。

[0129] 79.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞通过以下胃肠外途径中的任何一种或多种给予受试者:静脉内、动脉内、心脏内、脊柱内、鞘内、骨内、关节内、滑液内、皮内、真皮内、皮下和肌肉内注射。

[0130] 80.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞通过以下胃肠外途径中的任何一种或多种给予受试者:静脉内、动脉内、皮内、真皮内、皮下和肌肉内注射。

[0131] 81.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞通过以下胃肠外途径中的任何一种或多种给予受试者:静脉内、动脉内、皮内、皮下和肌肉内注射。

[0132] 82.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞通过注射器经由皮下针头给予受试者。

[0133] 83.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞经由导管给予受试者。

[0134] 84.根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞通过外科植入给予受试者。

[0135] 85. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞通过用关节内窥镜程序进行植入来给予受试者。

[0136] 86. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞在载体(support)中或载体上给予受试者。

[0137] 87. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞以包囊形式给予受试者。

[0138] 88. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞进行适当配制以供通过以下途径中的任何一种或多种进行给予:口服、直肠给予、表皮给予、眼部给予、鼻内给予和肺部给予。

[0139] 89. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞以一个剂量给予受试者。

[0140] 90. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞以一系列的两个或多个剂量序贯给予受试者。

[0141] 91. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞以单剂量、以两个剂量或以两个以上剂量给予,其中各剂量相同或不同,且它们之间以相等或不相等的间隔时间给予。

[0142] 92. 根据任何前述或后述的方法,其中所述细胞在少于一天到一个星期、一个星期到一个月、一个月到一年、一年到两年或者两年以上的时间里给予。

[0143] 93. 一种治疗受试者的免疫功能异常的方法,所述方法包括通过某种途径和以能有效治疗受试者的免疫功能异常的量,给予遭受免疫功能异常的受试者这样的细胞:它们不是胚胎干细胞、胚胎生殖细胞或生殖细胞;能分化成内胚层、外胚层和中胚层胚胎谱系中的至少两个谱系的每一个的至少一种细胞类型;不会在受试者中引起有害免疫应答;和能有效治疗受试者的免疫功能异常。

[0144] 94. 一种治疗受试者的免疫功能异常的辅助治疗方法,所述方法包括通过某种途径和以能有效治疗受试者的免疫功能异常的量,给予遭受免疫功能异常的受试者这样的细胞:它们不是胚胎干细胞、胚胎生殖细胞或生殖细胞;能分化成内胚层、外胚层和中胚层胚胎谱系中的至少两个谱系的每一个的至少一种细胞类型;不会在受试者中引起有害免疫应答;和能有效治疗受试者的免疫功能异常,其中所述细胞是辅助于一种或多种其它的正给予受试者以治疗相同的免疫功能异常、治疗一种或多种其它功能异常或者这两种情况的治疗法来给予受试者。

[0145] 本发明的其它方面在以下公开内容中描述或者从以下公开内容显见,这些其它方面属本发明的范围内。

附图说明

[0146] 图1是转录序型分析(transcriptional profiling)研究的图示,进行该研究是为了产生(鉴别)基于基因和表面受体的、能区别本发明MAPCs与其它更为谱系定向的(more lineage committed)干细胞和祖细胞的标志。实验产生出一批75个在MSC培养物和MAPCs之间具有10倍差异表达的标志。

[0147] 图2这一组图形显示了GFP标记的大鼠MAPCs的三谱系分化。结果显示MAPCs能分化成所有三种胚胎谱系的细胞。如下文所进一步描述,对于内皮分化,将MAPCs在纤连蛋白包被的板上在血管内皮生长因子B(VEGF-B)存在下进行培养。对于肝细胞分化,将细胞在基质胶包被的板上生长并用成纤维细胞生长因子-4(FGF-4)和肝细胞生长因子(HGF)处理。神经

元分化是通过序贯用碱性FGF (bFGF)、用FGF-8和Sonic Hedgehog (SHH) 两者及用大脑衍生神经营养因子(BDNF) 进行处理来诱导。两个星期后,从细胞抽提出mRNA并应用于使用能特异性检测各种谱系标志的引物的qPCR分析。在所有测定中,在能诱导谱系的细胞因子不存在下培养的细胞充当为对照。将各个谱系标志的表达水平首先归一化到在分化过程中不受影响的内对照基因(GAPDH) 的表达水平。然后这样来评估分化成功:计算出分化细胞或对照细胞与亲本大鼠细胞系的水平相比而言的相对表达,以相对表达超过5倍的增加作为成功分化的截断水平。分化的大鼠MAPCs显示出内皮标志von Willebrand因子和PECAM-1(上小图);肝标志白蛋白、细胞角蛋白-18和HNF-1a(中小图) 和神经元/星形胶质细胞标志GFAP、干蛋白和NF-200(下小图) 的显著表达。

[0148] 图3这一对柱形图显示了MAPCs在下文进一步描述的混合淋巴细胞反应(MLR) 中的低免疫原性(上小图) 和免疫抑制性(下小图) 。上小图中:B+B=供体B+供体B;B+A=供体B+供体A;B+K=供体B+供体K;B+R=供体B+供体R;B+T=供体B+供体T;供体B+PHA;B+BMPC=供体B+MAPC。十二种不同的供体都获得相同的结果。下小图中:供体W+供体W;供体W+供体A;供体W+供体T;供体W+MSC;供体W+MAPC(17);供体W+PHA;供体W+供体A+MSC;供体W+供体A+MAPC(17);供体W+供体T+MSC;供体W+供体T+MAPC(17);供体W+供体P+MSC;供体W+供体P+MAPC(17)。PHA是植物凝集素(T细胞激活的阳性对照)。

[0149] 图4这个图形显示MAPCs如在实施例6中所述能抑制ConA刺激的T细胞的增殖。插图文字“仅LN”表示不加MAPCs的对照反应的结果。MAPCs后的数字表示有多少细胞被用于测定中。

[0150] 图5A这个图形显示Lewis MAPCs如在实施例7中所述在混合淋巴细胞反应中的免疫抑制作用。图5A中的插图列举了每个反应中MAPCs的数量。在插图中,R表示应答细胞(responder cell),S表示刺激细胞(stimulator cell)(来自DA大鼠的受辐射脾细胞)。

[0151] 图5B这个图形显示Sprague-Dawley MAPCs如在实施例7中所述在混合淋巴细胞反应中的免疫抑制作用。插图文字和缩写同图5A。

[0152] 图6这个图形显示,由接受者的呼吸频率测定出,MAPCs的输注并没有不利影响接受者的健康,这个图形在实施例8中作进一步的描述。

[0153] 图7这个柱形图描绘了证明MAPCs抑制正在进行的免疫应答的能力的实验的结果。该图形显示,MAPCs无论是与T细胞激活剂(刺激剂)同时加入(第0天,图形的左侧),还是在T细胞激活剂(刺激剂)加入3天后加入(第3天,图形的右侧),在MLRs中都有强烈免疫抑制性。实验的细节在实施例10中作进一步描述。

[0154] 图8这个柱形图显示MAPCs在MLRs中对T细胞增殖的抑制是可逆的。结果以三份重复培养的平均cpm+/-SD表示。这个图形在实施例11中作进一步的描述。

[0155] 图9这个图形显示MAPCs如实施例13中所述能抑制GVHD。

[0156] 定义

[0157] 本文用到的某些术语具有以下阐明的含义。

[0158] 单数名词意指一个或多个该名词所指事物;至少是一个。

[0159] “辅助于”是指共同地、一起地、另外地、联合地等。

[0160] “共给予”可包括两种或多种药剂的同时或序贯给予。

[0161] “细胞因子”指细胞的能诱导或增强细胞运动如MAPCs或其它干细胞、祖细胞或分

化细胞的归巢的因子。细胞因子还可刺激这种细胞发生分裂。

[0162] 本文所用的“有害”是指能造成损害。举例说，本文所用的“有害免疫应答”是指能造成损害的免疫应答，如缺乏的或太弱的免疫应答、太强的免疫应答和/或方向错误的免疫应答。有害免疫应答包括在免疫疾病中出现的能造成损害的免疫应答。实例包括免疫缺陷疾病中免疫应答的缺乏、自身免疫疾病中过大的和/或方向错误的免疫应答。有害免疫应答还包括会干扰医学治疗的免疫应答，这包括会干扰医学治疗的、在其它方面正常的免疫应答。实例包括涉及排斥移植物的免疫应答，和移植物中会引起移植物抗宿主病的免疫活性细胞的应答。

[0163] “分化因子”指细胞的能诱导谱系定向 (lineage commitment) 的因子，如生长因子。

[0164] 本文所用的“功能异常”是指本来正常的过程的紊乱、疾病或有害作用。举例说，免疫功能异常包括免疫疾病如自身免疫疾病和免疫缺陷。它还包括会干扰医学治疗的免疫应答，这包括会干扰医学治疗的、在其它方面正常的免疫应答。这种功能异常的实例包括涉及排斥移植物的免疫应答，和移植物中会引起移植物抗宿主病的免疫活性细胞的应答。

[0165] “EC细胞”指胚胎癌细胞。

[0166] “有效量”一般指能提供所需的局部性或全身性作用的量。例如，有效量是足以实现有利的或所需的临床结果的量。有效量可以在单次给药中全部一次提供，或者分几次给药以分次的量来提供有效量。例如，MAPCs的有效量可以以一次或多次给药来给予，可包括任何预先选择的细胞量。要准确确定出多少的量才被认为是有效量，这要取决于每个受试者个人的因素，包括他们的体重、年龄、损失情况和/或疾病或正在治疗的损伤情况以及自从出现损伤或患上疾病以来的时间长度。本领域技术人员会能够根据这些本领域常规的考虑因素确定出针对给定受试者的有效量。因此例如，本领域技术人员如医师根据本文和本领域所公开的MAPCs已知特性，同时考虑上述各个因素，会能够确定出针对给定受试者的MAPCs有效量。本文所用的“有效剂量”与“有效量”同义。

[0167] “EG细胞”指胚胎生殖细胞。

[0168] “移入”指细胞接触到现有的体内目的组织并掺入到其中的过程。

[0169] “富集集落”是指MAPCs的数量相对于起始集落中的其它细胞或成分的相对增加，如MAPCs的数量相对于培养物(如原代培养物)中或体内一种或多种非MAPC细胞类型的增加。

[0170] “ES细胞”指胚胎干细胞。

[0171] “扩增”指某一个细胞或多个细胞繁殖但没有分化。

[0172] 本文所用的“范可尼贫血”与范科尼贫血同义，是一种遗传性疾病。

[0173] “GVHD”指移植物抗宿主病，这是指主要出现在免疫缺损的宿主中的过程，当该宿主被移植物的免疫活性细胞识别为非己时出现。

[0174] “HVG”指宿主抗移植物反应，这是指当宿主排斥移植物时出现的过程。通常，当移植物被宿主的免疫活性细胞识别为外来(非己)时会引发HVG。

[0175] “分离”指某个细胞或多个细胞与在体内与其有关联的一个或多个细胞或者一个或多个细胞成分没有了关联。

[0176] “MAPC”是“多潜能成体祖细胞”的首字母缩略词。它指能产生超过一个胚层如所有

三个胚层(即内胚层、中胚层和外胚层)的细胞谱系的非ES、非EG、非生殖细胞。MAPCs还具有端粒酶活性。它们可以是oct-3/4(例如人oct-3A)阳性。它们还可表达rex-1和rox-1。此外,它们可表达sox-2、SSEA-4和/或nanog。在MAPC中的术语“成体”不带限制性。它仅仅表示这些细胞不是ES、EG或生殖细胞。通常,本文所用的MAPC是单数,MAPCs是复数。MAPCs还被称为多潜能成体干细胞(MASCs)。参见美国专利7,015,037,该专利中有关MAPC/MASC及其分离和生长方法的公开内容通过引用结合到本文中。

[0177] “MASC”参见MAPC。

[0178] “MNC”指单核细胞。

[0179] “模式”指类型、办法(approach)、途径(avenue)或方法,如治疗模式即疗法类型。

[0180] “MSC”是间充质干细胞的首字母缩略词。

[0181] MAPCs中的“多潜能”指在分化时产生超过一个胚层如所有三个原始胚层(即内胚层、中胚层和外胚层)的细胞谱系的能力。

[0182] “持续”指细胞在体内随时间推移(例如数天、数周、数月或数年)能抵抗排斥和保持和/或增加数量的能力。

[0183] 多潜能成体祖细胞(MAPCs)中所用的“祖细胞”表示这些细胞能产生其它细胞如进一步分化的细胞。该术语不带限制性,并不将这些细胞限制于特定的谱系。

[0184] “自我更新”指产生具有分化潜力的复制子干细胞的能力,该分化潜力与产生复制子干细胞的干细胞的分化潜力相同。在此情形下使用的类似术语是“增殖”。

[0185] “受试者”是脊椎动物如哺乳动物如人。哺乳动物包括但不限于人、饲养动物、竞技动物和宠物。需要用本发明方法进行治疗的受试者,包括遭受紊乱、功能异常或疾病(如免疫缺陷或功能异常,如HVG和GVHD),或者这些问题的副作用,或者这些问题的治疗法的那些受试者,这些问题可得益于给予MAPCs作为主要治疗或辅助治疗。

[0186] 本文所用的“移植物”是指引入到受试者中的细胞、组织或器官。移植物可衍自受试者,衍自培养物或衍自非受试者来源。

[0187] “治疗”包括治疗、防止、改善、抑制或整治缺陷、功能异常、疾病或其它会导致有害作用的过程,如免疫系统缺陷、功能异常、疾病或其它会有害影响免疫系统功能或特性或者会干扰疗法的过程。

具体实施方式

[0188] 引言

[0189] MAPCs无论是单独使用时还是与其它治疗法组合使用时,对于通过细胞移植技术治疗疾病,如对于组织和器官再生,都非常有希望。实现MAPCs对于治疗疾病和对于组织和器官再生的希望的潜在障碍,有通常会复杂化或阻碍移植疗法如血液和骨髓移植疗法和实体器官移植的成功的不利免疫反应。这些免疫并发症中显著的有宿主免疫系统的移植排斥(本文称宿主抗移植反应,“HVG”)和当移植物中的免疫活性细胞因与宿主的非己成分接触而被激活时所致的对免疫缺损宿主的系统性损害(本文称为移植抗宿主病,“GVHD”)。

[0190] 已发现(在本文别处作更详细的描述)MAPCs不会在异基因宿主中引起免疫应答。因此,MAPCs向异基因宿主的移植应该不会产生异基因移植排斥(即HVG)。

[0191] 此外还发现,异基因MAPCs能以高浓度给予宿主而没有对呼吸的不利影响,这

提示肺中没有出现不适当的聚集和/或沉积。

[0192] 另外发现(在本文别处作更详细的描述)MAPCs能调节免疫应答。在这点上具体的说,已发现MAPCs能抑制免疫应答,包括但不限于涉及例如HVG和GVHD(仅举此两例)的免疫应答。在这点上更具体的说,已发现MAPCs甚至在强效T细胞刺激剂如伴刀豆球蛋白A和异基因刺激细胞存在下,也能抑制T细胞的增殖。

[0193] 此外还发现,甚至相对较少量的MAPCs也能抑制这些应答。的确,在混合淋巴细胞反应中仅仅3%MAPCs就足以减少体外T细胞对强效刺激剂的应答达50%。

[0194] 因此,在这点上的本发明某些方面提供用于治疗、改善和/或整治或消除不利免疫反应(如在移植疗法中出现的那些不利免疫反应)的组合物和方法等。

[0195] 异基因MAPCs的低免疫原性、它们抑制不利免疫应答的能力和它们的高比活性,使得它们对于具有不利免疫因素(immune component)的疾病的治疗中的辅助疗法特别有价值。这种疾病包括自身免疫疾病,自身免疫疾病通常是受试者自身免疫系统的功能异常引起疾病。MAPCs还可用作免疫抑制性辅助治疗药剂用于治疗移植疗法中出现的不利免疫应答。实例包括免疫活性宿主中的HVG和免疫缺损宿主中的GVHD。MAPCs此外还可用于多种肿瘤、贫血和血液疾病的治疗中和某些炎性疾病治疗中的辅助性免疫抑制疗法。在这点上的疾病下文中将作详细论述。

[0196] 采用本文所述的MAPC分离、表征和扩增方法,并结合本文在MAPCs的免疫抑制特性方面的公开内容,可将MAPCs用于防止、抑制或减少免疫紊乱、功能异常或疾病,包括例如不利免疫反应,如由其它疗法引起的不利免疫反应,其中包括会使移植疗法复杂化的不利免疫反应如HVG和GVHD。这种紊乱、功能异常和疾病还包括先天性免疫疾病和自身免疫疾病等等。

[0197] MAPCs在这些方面和其它方面都可作为主要和辅助治疗剂和模式来使用。可将MAPCs单独地或与其它药剂一起进行治疗使用。可将MAPCs在给予这种其它药剂之前、过程中和/或之后给予。同样,无论是单独使用还是与其它药剂一起使用,MAPCs都可在移植进行之前、过程中和/或之后给予。如果是在移植过程中给予,可将MAPCs与移植材料一起给予,或者分开给予。如果是分开给予,可将MAPCs与移植植物序贯给予或同时给予。此外,可将MAPCs在移植之前和/或在移植之后给予。

[0198] 可以与MAPCs联用的其它药剂,具体的说是在移植疗法中联用,包括免疫调节剂。多种这样的药剂在本文别处有描述。在本发明的某些实施方案中,免疫调节剂是免疫抑制剂,如本文别处描述的免疫抑制剂。这种药剂包括皮质类固醇、环胞菌素A、环胞菌素样免疫抑制化合物、硫唑嘌呤、环磷酰胺和甲氨蝶呤。

[0199] MAPCs可通过本文别处论述的多种方法给予宿主。在某些实施方案中,MAPCs通过注射如通过静脉内注射给予。在一些实施方案中,将MAPCs进行包囊来给予。在一些实施方案中,将MAPCs原位给予。实例包括MAPCs在实体器官移植和在器官修复中的原位给予。这些和其他形式的给予在下文中进行论述。

[0200] 在本发明的一些实施方案中,将MAPCs以按MAPCs(细胞)与身体质量(体重)之比度量的剂量来给予。或者,可以以固定细胞数的剂量给予MAPCs。剂量、给药途径、制剂等在本文别处作更详细的论述。

[0201] 作用机制

[0202] 虽然不想受限于任何一种或多种关于MAPCs的免疫调节特性和其它特性、活性和作用的解释性机制,但还是值得一提的是它们能够通过多种模式调节免疫应答。例如,MAPCs能对移植植物或宿主具有直接的作用。这种直接作用主要是MAPCs与宿主或移植植物的细胞之间的直接接触的事情。这种接触可以是与细胞的结构成员的接触或者是与细胞邻近环境中的组分的接触。这种直接机制可涉及直接接触、扩散、吸收(uptake)或本领域技术人员公知的其它过程。MAPCs的直接活性和作用可能会在空间上被限制于例如局部沉积区域或者限制于注射所达到的身体区室。

[0203] MAPCs还可响应“归巢”信号而“归巢”,这种信号如受伤或疾病部位所释放的信号。由于归巢往往是由其自然功能在于将细胞募集到需要进行修复的部位的信号来介导,归巢行为可以是将MAPCs集中到治疗靶标的有力工具。这个作用可受特异性因子的刺激,这在下文中有论述。

[0204] MAPCs还可通过它们对各种因子的应答来调节免疫过程。这可以对直接调节而言另外地(additionally)或者替代地(alternatively)出现。这种因子可包括归巢因子、促细胞分裂原和其它刺激因子。它们还可包括分化因子和能引发特定细胞过程的因子。后者包括能促使细胞分泌其它特异性因子的因子,所述其它因子如涉及将细胞如干细胞(包括MAPCs)募集到受伤或疾病部位的因子。

[0205] 对前述情况而言另外地或者替代地,可将MAPCs分泌能作用于内生细胞如干细胞或祖细胞的因子。这些因子可以作用于其它细胞以引起、提高、降低或抑制它们的活性。MAPCs可分泌能作用于干细胞、祖细胞或分化细胞从而促使这些细胞分裂和/或分化的因子。归巢到需要进行修复的部位的MAPCs可分泌能吸引其它细胞到该部位的营养因子。这样,MAPCs可将干细胞、祖细胞或分化细胞吸引到需要进行修复的部位。MAPCs还可分泌能促使这些细胞分裂或分化的因子。

[0206] 包括营养因子在内的这种因子的分泌,能有助于MAPCs在例如限制炎性损害、限制血管通透性、改进细胞存活以及引起和/或增加修复细胞向损害部位的归巢方面的功效。这种因子还可直接影响T细胞增殖。这种因子还可通过降低树突细胞的吞噬和抗原呈递活性来影响树突细胞,这还可影响到T细胞活性。

[0207] 通过这些和其它的机制,MAPCs能提供有利的免疫调节作用,包括但不限于对不需要的和/或不利的免疫反应、应答、功能、疾病等的抑制。本发明各个实施方案中的MAPCs能提供有利的免疫调节特性和作用,这种特性和作用本身或者与在辅助疗法中可用于排除、防止、减轻、降低、改善、缓和、治疗、消除和/或整治不利的免疫过程和/或病况。这种过程和病况包括例如自身免疫疾病、贫血、肿瘤、HVG、GVHD和某些炎性疾病,这在本文别处作更详细描述。MAPCs尤其是在哺乳动物中可用于这些其它方面。在这点上的本发明各个实施方案中,MAPCs往往是辅助于其它疗法在人患者中进行治疗使用。

[0208] MAPC的给予

[0209] MAPC制品

[0210] MAPCs可从多个组织如骨髓细胞制备得到,这在本文别处作更详细描述。

[0211] 在许多实施方案中,MAPC制品(preparation)是克隆衍生得到的。原则上,这些制品中的MAPCs互相间在遗传上是相同的,且如果制备和保持得当的话,不会有其它的细胞。

[0212] 在一些实施方案中,可以使用纯度不如这些的MAPC制品。当初始克隆步骤需要超

过一个细胞时可能会出现纯度较低的集落,不过这种情况少见。如果这些细胞不全是MAPCs,则扩增会产生出混合集落,其中MAPCs仅是至少两种类型的细胞中的一种。更经常的是,当将MAPCs与一种或多种其它类型的细胞混合给予时,会产生混合集落。

[0213] 在许多实施方案中,给予受试者的MAPCs的纯度为约100%。在其它实施方案中,为95%-100%。在一些实施方案中,为85%-95%。特别是在与其它细胞混合的情况下,MAPCs的百分数可为25%-30%、30%-35%、35%-40%、40%-45%、45%-50%、60%-70%、70%-80%、80%-90%或90%-95%。

[0214] 给定体积中的MAPCs的数量可通过公知和常规的程序和仪器来测定。给定体积的细胞混合物中的MAPCs的百分数可通过几乎一样的程序来测定。可容易通过手工计数或使用自动细胞计数器对细胞进行计数。使用特异性的染色和肉眼检验法,和通过使用特异性结合试剂(通常是抗体、荧光标记物)和荧光激活细胞分选仪的自动方法,可测定给定体积中的特定细胞。

[0215] MAPC免疫调节可涉及未分化的MAPCs。它可涉及定向于某个分化途径的MAPCs。这种免疫调节还可涉及已分化成具有有限分化潜力的较不强效(potent)的干细胞的MAPCs。它还可涉及已分化成终末分化细胞类型(terminally differentiated cell type)的MAPCs。MAPCs的最佳类型和混合物要按其特定使用情况决定,这将是本领域技术人员确定MAPCs的有效类型或组合的日常设计问题。

[0216] 制剂

[0217] 用于为给定应用给予MAPCs的制剂(formulation)的选择,要取决于多种因素。这些因素中主要是受试者的物种,所治疗的紊乱、功能异常或疾病的性质及其在受试者中的状态和分布,所给予的其它疗法和药剂的性质,MAPCs的最佳给予途径,MAPCs通过该途径时的存活率,剂量方案以及本领域技术人员显见的其它因素。比如具体地说,合适的载体和其它添加剂的选择要取决于确切的给药途径和特定剂型如液体剂型(例如组合物是否要配制成溶液剂、混悬剂、凝胶剂或别的液体剂型,如延时释放剂型或液体填充剂型(liquid-filled form))的性质。

[0218] 例如,细胞存活可能是基于细胞的疗法的功效的重要决定因素。这对于主要疗法和辅助疗法都是如此。如靶标部位并不适合细胞种植和细胞生长,则这又是一个问题。这会妨碍治疗性MAPCs接近该部位和/或移入该部位。本发明的各个实施方案包括增加细胞存活和/或克服细胞种植和/或生长障碍所造成的问题的措施。

[0219] 包含MAPCs的组合物的实例包括液体制品,而液体制品包括肌肉内或静脉内给药(例如可注射给药)用混悬剂和制品,如无菌混悬剂或乳剂。这种组合物可包含MAPCs与合适的载体、稀释剂或赋形剂如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等的混合物。组合物还可进行冻干。组合物可含有辅助物质如湿润剂或乳化剂、pH缓冲剂、胶凝剂或粘度增强添加剂、防腐剂、矫味剂、着色剂等,这取决于给药途径和所需的制品。可参考权威性教科书如"REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE,"17th edition,1985(通过引用结合到本文中)来制备合适的制品,而无需做太多的实验。

[0220] 本发明的组合物往往便利地作为液体制品来提供,例如等渗水溶液剂、混悬剂、乳剂或粘稠组合物,它们可被缓冲到选定的pH。液体制品通常比凝胶剂、其它粘稠组合物和固体组合物更容易制备。另外,液体组合物的给药还稍微更方便些,特别是通过注射给药。另

一方面,可在适当的粘度范围内配制出粘稠组合物,以使与特定组织的接触时间更长。

[0221] 往往要包括各种添加剂以提高组合物的稳定性、无菌性和等渗性,如抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂等等。可通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山梨酸等,来确保防止微生物的作用。在许多情况下,宜包括等渗剂如糖类、氯化钠等。可通过使用能延迟吸收的物剂如单硬脂酸铝和明胶,来造成可注射药物形式的延长吸收。但是根据本发明,所使用的任何介质、稀释剂或添加剂都要与细胞相容。

[0222] MAPC溶液剂、混悬剂和凝胶剂除了细胞外,通常还含有大量的水(优选纯化的灭菌水)。还可存在少量的其它成分,如pH调节剂(例如碱如NaOH)、乳化剂或分散剂、缓冲剂、防腐剂、湿润剂和胶凝剂(例如甲基纤维素)。

[0223] 通常,组合物要等渗,也就是说它们当适当制备以供给药时会与血液和泪液具有相同的渗透压。

[0224] 本发明组合物的所需等渗性可用氯化钠或者其它药物可接受物剂如右旋糖、硼酸、酒石酸钠、丙二醇或其它无机或有机溶质来实现。优选氯化钠,特别是对于含有钠离子的缓冲剂。

[0225] 如果需要的话,可用药物可接受的增稠剂将组合物的粘度维持在选定的水平。优选甲基纤维素,因为它容易获得,经济且容易操作。其它合适的增稠剂包括例如黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、卡波姆等。增稠剂的优选浓度要取决于所选的物剂。重要一点是使用会实现所选粘度的量。粘稠组合物通常是通过加入这种增稠剂从溶液剂准备得到。

[0226] 可采用药物可接受的防腐剂或细胞稳定剂来提高MAPCs组合物的寿命。如果包括有这种防腐剂,则选择不会影响MAPCs的存活力或功效的组合物是完全在技术人员的能力范围内的事情。

[0227] 本领域技术人员会认识到,组合物的各成分应该是化学上惰性的。这对于熟知化学和药物原理的技术人员来说是不成问题的。可通过参考权威性教科书,或者通过用本公开说明书和本文引述的文献所提供的信息或本领域易获得的信息进行简单实验(不涉及太多的实验),容易地将问题避免。

[0228] 无菌可注射溶液剂可通过将用于实施本发明的细胞与按需而定的不同数量其它成分一起掺入到所需量的适当溶剂中来制备。

[0229] 在一些实施方案中,将MAPCs配制成单位剂量可注射形式,如溶液剂、混悬剂或乳剂。适合MAPCs注射用的药物制剂通常是无菌水溶液剂和分散剂。可注射制剂的载体可以是含有例如水、盐水、磷酸缓冲盐水、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)和它们的合适混合物的溶剂或分散介质。

[0230] 技术人员能容易确定出待按本发明方法给药的组合物中细胞和任选的添加剂、介质和/或载体的量。通常,任何添加剂(细胞除外)在溶液中如在磷酸缓冲盐水中的存在量为0.001-50wt%。活性成分的存在量为微克量至毫克量的范围,如约0.0001至约5wt%、优选约0.0001至约1wt%、最优选约0.0001至约0.05wt%或者约0.001至约20wt%、优选约0.01至约10wt%、最优选约0.05至约5wt%。

[0231] 对于任何要给予动物或人的组合物和对于任何特定的给药方法,优选的是为此确定:毒性,如通过在合适动物模型(例如啮齿动物如小鼠或大鼠)中确定致死剂量(LD)和LD₅₀;及组合物的剂量、其中各成分的浓度和能引起合适应答的组合物给予时机。这种确定

不需要做过多的实验,由技术人员的知识、本公开说明书和本文引述的文献就可确定。同样,序贯给药的时间也不用做过多实验就能确定。

[0232] 在一些实施方案中,将MAPCs进行包囊来给药,特别是在包囊能提高疗法的有效性或者提供操作和/或货架期方面的好处的情况下。在包囊能提高MAPC介导的免疫抑制的功效的一些实施方案中,包含还因此可以减少对免疫抑制药物疗法的需求。

[0233] 而且,在一些实施方案中,包囊能提供对受试者免疫系统的屏障,这个屏障可进一步减少受试者免疫系统对MAPCs的应答(MAPCs在异基因移植植物中通常没有免疫原性或者仅有弱免疫原性),从而减少在给予细胞时可能会出现的任何移植排斥或炎症。

[0234] 在多个其中MAPCs与别种类型的细胞(其通常在异基因或异种环境中更具免疫原性)混合给予的实施方案中,包囊可减少或消除宿主对非MAPC细胞的不利免疫应答和/或如果混合细胞具有免疫活性和将宿主识别为非己时可能会在免疫缺损宿主中出现的GVHD。

[0235] MAPCs可通过膜以及胶囊进行包囊后再进行植入。设想的是,许多现有的细胞包囊方法中的任何一种都可采用。在一些实施方案中,将细胞单个地进行包囊。在一些实施方案中,将许多细胞包囊在同一个膜中。在其中细胞植入后要进行去除的实施方案中,包囊着许多细胞的相对较大尺寸结构(如在单个膜当中)可提供进行回收的便利手段。

[0236] 有多种材料可用于各种实施方案中对MAPCs进行微包囊。这种材料包括例如聚合物胶囊、海藻酸盐-聚-L-赖氨酸-海藻酸盐微胶囊、聚-L-赖氨酸海藻酸钡胶囊、海藻酸钡胶囊、聚丙烯腈/聚氯乙烯(PAN/PVC)中空纤维和聚醚砜(PES)中空纤维。

[0237] 可用于给予MAPCs的细胞微包囊技术是本领域技术人员公知的,在例如Chang, P., et al., 1999; Matthew, H.W., et al., 1991; Yanagi, K., et al., 1989; Cai Z.H., et al., 1988; Chang, T.M., 1992和在美国专利5,639,275(该专利例如描述了用于长期保持能稳定表达生物活性分子的细胞的生物相容性胶囊)中有描述。另外的包囊方法描述于欧洲专利公开说明书301,777及美国专利4,353,888;4,744,933;4,749,620;4,814,274;5,084,350;5,089,272;5,578,442;5,639,275和5,676,943。所有前述文献和专利关于MAPCs的包囊的内容通过引用结合到本文中。

[0238] 某些实施方案是将MAPCs掺入到聚合物如生物聚合物或合成聚合物中。生物聚合物的实例包括但不限于纤连蛋白、血纤蛋白、纤维蛋白原、凝血酶、胶原和蛋白聚糖。其它因子如上述细胞因子也可掺入到聚合物。在本发明的其它实施方案中,可将MAPCs掺入到三维凝胶的空隙中。大的聚合物或凝胶通常要进行外科手术植入。能配制成足够小的颗粒或纤维的聚合物或凝胶,可通过其它普通的、更为方便的非外科手术途径给予。

[0239] 本发明的药用组合物可以以多种形式制备,这些形式包括片剂、硬明胶或软明胶胶囊、水溶液剂、混悬剂和脂质体以及其它缓释制剂如成型聚合物凝胶(shaped polymeric gel)。口服液体药物组合物可以为例如含水或含油混悬剂、溶液剂、乳剂、糖浆剂或酏剂的形式,或者可以以干燥产品形式呈现,在使用前用水或其它合适的介质复溶。这种液体药物组合物可含有常规添加剂如悬浮剂、乳化剂、非水介质(其可包括食用油)或防腐剂。可将口服剂型配制成使得细胞在通过胃部后释放到肠中。这种制剂描述于美国专利6,306,434及其中包含的参考文献。

[0240] 适合直肠给药的药物组合物可制备成单位剂量栓剂。合适的载体包括盐水溶液和本领域常用的其它材料。

[0241] 对于吸入给药,细胞可便利地从吹入器、喷雾器或加压容器 (pressurized pack) 或其它便利的喷雾剂递送工具进行递送。加压容器可包含合适的推进剂如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体。在加压气溶胶的情况下,可通过提供阀门以递送计量量 (metered amount) 来确定剂量单位。

[0242] 或者,对于吸入或吹入给药,给药方式可以采取干粉组合物的形式,例如调节剂和合适的粉末基料 (如乳糖或淀粉) 的粉末混合物。粉末组合物可以在例如胶囊或药筒 (cartridge) 或者例如明胶或水泡眼包装 (在吸入器或吹入器帮助下可从中给予粉末) 中以单位剂量形式提供。对于鼻内给药,细胞可通过液体喷雾来给予,如通过塑料瓶喷雾器给予。

[0243] 其它活性成分

[0244] MAPCs 可与其它药物活性剂一起给予。在一些实施方案中,将一种或多种这样的药剂与MAPCs配制在一起进行给药。在一些实施方案中,MAPCs 和该一种或多种药剂在分开的制剂中。在一些实施方案中,将包含MAPCs 和/或该一种或多种药剂的各组合物配制成相互间辅助使用。

[0245] MAPCs 可在包含免疫抑制剂的制剂中给予,所述免疫抑制剂例如是皮质类固醇、环胞菌素A、环胞菌素样免疫抑制剂、环磷酰胺、抗胸腺细胞球蛋白、硫唑嘌呤、雷帕霉素、FK-506 和FK-506之外的大环内酯样免疫抑制剂和雷帕霉素中的任何个的任何组合物。在某些实施方案中,这在药剂包括皮质类固醇、环胞菌素A、硫唑嘌呤、环磷酰胺、雷帕霉素和/或 FK-506。前述的免疫抑制剂可以仅仅是它们这种另外的药剂,或者可以与其它的药剂如本文提到的其它药剂进行组合。其它的免疫抑制剂包括他克莫司、麦考酚酸莫酯和西罗莫司。

[0246] 这种药剂还包括抗生素药剂、抗真菌剂和抗病毒剂,这是在仅列举少数几个按照本发明实施方案可以使用的其它药理活性物质和组合物。

[0247] 典型的抗生素或抗真菌化合物包括但不限于青霉素、链霉素、两性霉素、氨苄青霉素、庆大霉素、卡那霉素、霉酚酸、萘啶酸、新霉素、制霉菌素、巴龙霉素、多粘菌素、嘌呤霉素、利福平、大观霉素、四环素、泰乐菌素、zeocin 和头孢菌素、氨基糖苷和棘白菌素。

[0248] 更多的这类添加剂涉及到这样的事实,即MAPCs 和其它干细胞一样,在给予受试者后会“归巢”到有利于它们生长和发挥功能的环境。这种“归巢”往往将细胞集中在需要细胞的部位,如免疫紊乱、功能异常或疾病的部位。有多种物质已知能刺激归巢。它们包括生长因子和营养信号剂如细胞因子。它们可用来促进MAPCs 向治疗靶标部位的归巢。它们可以在用MAPCs 治疗前、与MAPCs 一起或者在给予MAPCs 之后给予受试者。

[0249] 某些细胞因子例如能改变或影响MAPCs 或它们的分化细胞向需要治疗的部位如免疫缺损部位的迁移。在这点上可以使用的细胞因子包括但不限于基质细胞衍生因子-1 (SDF-1)、干细胞因子 (SCF)、促血管生成素-1、胎盘衍生生长因子 (PIGF)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、能刺激内皮黏着分子如ICAMs 和VCAMs 的表达的细胞因子和能引起或促进归巢的细胞因子。

[0250] 它们可作为预治疗、与MAPCs 一起或者在给予了MAPCs 之后给予受试者,以促进向所需部位的归巢和通过改进的归巢或通过其它机制实现改进的治疗作用。这种因子可以与MAPCs 一起在适合于将它们一起给予的制剂中进行组合。或者,这种因子可以单独配制和给予。

[0251] 各因子(如上述细胞因子)和MAPCs的给予顺序、制剂、剂量、给予频率和给予途径,通常要依所治疗紊乱或疾病及其严重程度、受试者、正给予的其它疗法、紊乱或疾病的阶段及预后因子等等而变。已为其它治疗法确立的一般方案能给确定MAPC介导的直接或辅助疗法中的适当剂量提供框架。这些信息连同本文提供的另外信息,将使技术人员无需过多的实验就能按照本发明实施方案确定适当的给予程序。

[0252] 途径

[0253] MAPCs可通过多种本领域技术人员公知的可用来将细胞给予受试者的途径中的任何一种给予受试者。

[0254] 在这点上可在本发明各实施方案中使用的方法包括通过胃肠外途径给予MAPCs的方法。可用于本发明各个实施方案的胃肠外给予途径,包括通过静脉内、动脉内、心脏内、脊柱内、鞘内、骨内、关节内、滑液内、皮内、真皮内、皮下和/或肌肉内注射进行的给予。在一些实施方案中,使用静脉内、动脉内、皮内、真皮内、皮下和/或肌肉内注射。在一些实施方案中,使用静脉内、动脉内、皮内、皮下和/或肌肉内注射。

[0255] 在本发明的各个实施方案中,MAPCs通过全身注射给予。全身注射如静脉内注射提供了用以给予MAPCs的最简单和侵入最少的途径之一。在一些情况中,这些途径可能需要高MAPC剂量来达到最佳有效性和/或MAPCs向靶标部位的归巢。在多个实施方案中,MAPCs可通过靶向和/或局部注射来给予,以确保在靶标部位的最佳效果。

[0256] 在本发明的一些实施方案中,MAPCs可通过注射器经由皮下针头给予受试者。在各个实施方案中,MAPCs通过导管给予受试者。在多个实施方案中,MAPCs通过外科手术植入来给予。此外在这点上,在本发明的各个实施方案中,MAPCs通过用关节内窥镜程序进行植入来给予受试者。在一些实施方案中,将MAPCs在固体载体(如聚合物或凝胶)中或载体上给予受试者。在各个实施方案中,将MAPCs以包囊形式给予受试者。

[0257] 在本发明另外的实施方案中,将MAPCs适当配制以供口服、直肠、上表皮、眼部、鼻部和/或肺部递送并相应地进行给予。

[0258] 剂量

[0259] 组合物可以以医学和兽医领域技术人员公知的剂量和技术进行给予,其中考虑到诸如特定患者的年龄、性别、体重和身体状况以及将要给予的制剂(例如是固体制剂还是液体制剂)等因素。技术人员从本公开说明书、本文引述的文献和本领域的知识出发,无需过多的实验就能确定人用或其它哺乳动物用的剂量。

[0260] 适合按本发明各个实施方案进行使用的MAPCs剂量要取决于多个因素。对于不同的情况,这个剂量可能相差甚大。会决定为主要和辅助疗法而给予的MAPCs的最佳剂量的参数,通常要包括以下的一些或全部:所治疗的疾病及其阶段;受试者的物种;它们的健康、性别、年龄、体重和代谢速率;受试者的免疫活性;所给予的其它疗法;和从受试者的病史或基因型预期的潜在并发症。参数还可包括:MAPCs是同基因的、自体同源的、异基因的还是异种的;它们的功效(比活性);为使MAPCs能有效而必须靶向的部位和/或分布;和该部位的诸如以下的特性:对MAPCs的可达性和/或MAPCs的移入情况。另外的参数包括MAPCs与其它因子(如生长因子和细胞因子)的共给予。给定情况中的最佳剂量还要考虑到细胞的配制方式、细胞的给予方式和细胞在给予后会在靶标部位得到局部化的程度。最后,最佳剂量的确定必然要提供出这样的有效剂量,它既不低于最大有利效果的阈值,也不高于MAPCs的剂量所

伴随出现的不利效果超出所增加的剂量的好处时的阈值。

[0261] 对于一些实施方案,MAPCs的最佳剂量要在用于自体同源单核骨髓移植的剂量的范围内。对于相当纯的MAPCs制品,在各个实施方案中每次给予的最佳剂量要在 10^4 - 10^8 个MAPC细胞/kg接受者质量的范围。在一些实施方案中,每次给予的最佳剂量要在 10^5 - 10^7 个MAPC细胞/kg之间。在许多实施方案中,每次给予的最佳剂量要在 5×10^5 - 5×10^6 个MAPC细胞/kg之间。作为参考,前述剂量范围中的较高剂量类似于自体同源单核骨髓移植中所用的有核细胞的剂量。一些较低的剂量类似于自体同源单核骨髓移植中所用的CD34⁺细胞/kg的数量。

[0262] 应认识到,单剂量可以全部一次递送、分次递送或者在一段时间里连续递送。整个剂量还可递送到单个部位,或者分开散布在几个部位。

[0263] 在各个实施方案中,可将MAPCs以初始剂量进行给予,之后通过再给予MAPCs进行维持。可将MAPCs初始通过一种方法给予,之后通过相同的方法或者一种或多种不同的方法给予。受试者的MAPCs水平可通过持续给予该细胞来维持。各个实施方案都是通过静脉内注射来或者初始给予MAPCs,或者维持它们在受试者中的水平,或者同时这两种情况。在各个实施方案中,取决于患者身体状况和本文别处论述到其它因素,使用其它的给予方式。

[0264] 要指出的是,通常对人受试者的治疗时间比实验动物长,但是治疗的时间长度通常与疾病过程的时间长度和治疗的有效性相称。本领域技术人员在使用在人和/或在动物(如大鼠、小鼠、非人灵长类动物等)中进行的其它程序的结果来对人用适当剂量进行确定时,会将这一点加以考虑。基于这些考虑因素和在考虑了本公开说明书和现有技术所提供的指导下进行的这种确定,会使技术人员无需太多的实验就能这样做。

[0265] 初次给予和进一步剂量的合适方案或者序贯给药的合适方案,可以都相同或者可以不同。技术人员可根据本公开说明书、本文引述的文献和本领域的知识来确定适当的方案。

[0266] 治疗的剂量、频率和持续时间要取决于许多因素,包括疾病的性质、受试者和可能给予的其它疗法。因此,有多种方案可用来给予MAPCs。

[0267] 在一些实施方案中,将MAPCs以一个剂量给予受试者。在其它实施方案中,将MAPCs以一系列的两个或多个剂量序贯给予受试者。在其中MAPCs以单剂量、以两个剂量和/或以两个以上剂量给予的一些其它实施方案中,各剂量可以相同或不同,且它们之间以相等或不相等的间隔时间给予。

[0268] 可将MAPCs在多个时间范围里多次给予。在一些实施方案中,MAPCs在不到一天时间里给予。在其它实施方案中,它们在两天、三天、四天、五天或六天时间里给予。在一些实施方案中,MAPCs在几个星期的时间里每个星期给予一次或多次。在其它实施方案中,它们在几个星期时间里给予,持续一个月到几个月。在各个实施方案中,它们可在几个月时间里给予。在其它实施方案中,它们可在一年或多年的时间里给予。通常,治疗的时间长度要与疾病过程的时间长度、所应用的疗法的有效性以及所治疗的受试者的身体状况和反应相称。

[0269] 免疫调节性MAPCs的治疗用途

[0270] MAPCs的免疫调节特性可用于治疗多种紊乱、功能异常和疾病,如本质上作为继发作用或者作为治疗的副作用呈现有害免疫系统过程和作用的那些紊乱、功能异常和疾病。

下文会论述几个例子。

[0271] 在这点上许多实施方案涉及到将MAPCs作为唯一疗法或者作为与另一治疗的辅助疗法给予其免疫系统被削弱(或缺损)的受试者。在这点上在本发明多个实施方案中,将MAPCs辅助于已经给予、正在给予、将要给予受试者的放射疗法或化学疗法或者放射疗法和化学疗法的组合来给予受试者。在许多这种实施方案中,放射疗法、化学疗法或者放射疗法和化学疗法的组合是移植疗法的一部分。在多个实施方案中,给予MAPCs以治疗有害的免疫应答如HVG或GVHD。

[0272] 在这点上在多个实施方案中,受试者是非同基因(通常是异基因)血小板或骨髓细胞移植植物的接受者,受试者的免疫系统已被放射疗法、化学疗法或者放射疗法和化学疗法的组合所削弱或切除,正将免疫抑制药物给予受试者,受试者有发展移植物抗宿主病的危险或已经发展该疾病,将MAPCs辅助于移植、放射疗法和/或化学疗法和免疫抑制药物中的任何一个或多个来给予受试者,以治疗如改善、阻止或消除受试者的移植物抗宿主病。

[0273] 肿瘤

[0274] 术语“肿瘤”一般指涉及到细胞的克隆增殖的疾病。肿瘤可以是良性的,也就是说是非进行性的和非复发性的,因此如果这样的话,一般是不会威胁生命的。肿瘤还可以是恶性的,也就是说它们会进行性地恶化、扩散,因此通常会危及生命,且往往是致命的。

[0275] 在各个实施方案中,将MAPCs给予患上肿瘤的受试者以辅助于对肿瘤的治疗。例如,在这点上在本发明一些实施方案中,受试者有患上血细胞或骨髓细胞的肿瘤的风险或者正患上该肿瘤,并已进行或将进行血液或骨髓移植。采用本文所述的MAPC分离、表征和扩增方法,并结合本文在MAPCs的免疫抑制特性方面的公开内容,可给予MAPCs以治疗如防止、抑制或减少会使移植疗法复杂化的不利免疫反应如HVG和GVHD。

[0276] 在多个涉及到移植疗法的实施方案中,可将MAPCs单独地或者与其它药剂一起用于免疫抑制目的。可将MAPCs在进行一种或多种移植之前、过程中或之后给予。如果是在移植过程中给予,可将MAPCs与移植材料分开或一起给予。如果是分开给予,可将MAPCs与其它移植材料序贯给予或同时给予。此外,对在进行移植时给予的同时或大约同时进行的MAPCs给予而言另外地或者替代地,可将MAPCs远在移植之前和/或远在移植之后给予。

[0277] 可以与MAPCs联用的其它药剂,具体的说是在移植疗法中联用,包括免疫调节剂,如在本文别处有描述的免疫调节剂,具体的说是免疫抑制剂,更具体的说是本文别处描述的特别是为此描述的免疫抑制剂,即皮质类固醇、环胞菌素A、环胞菌素样免疫抑制化合物、硫唑嘌呤、环磷酰胺、甲氨蝶呤和免疫抑制性单克隆抗体药剂中的一种或多种。

[0278] 在这点上在本发明实施方案中用MAPCs进行治疗的骨髓肿瘤疾病,包括骨髓增殖性疾病("MPDs")、骨髓增生异常综合征(或状态) ("MDSs")、白血病及包括多发性骨髓瘤和淋巴瘤在内的淋巴增殖性疾病。

[0279] MPDs以血髓中的细胞的异常和自发增殖为显著特征。这种疾病可仅涉及一种细胞类型,或者涉及几种细胞类型。通常,MPDs涉及到三种细胞谱系,它们是红细胞谱系、粒细胞谱系和血小板谱系。三种谱系受涉及的情况随MPD的不同而不同,且随所出现的各个类型的不同而不同。通常,它们所受影响不同,在给定的肿瘤中主要影响一种细胞谱系。MPDs没有明显恶性;不过它们被归类为肿瘤,以血髓中的造血前体细胞的异常自我复制为特征。尽管如此,MPDs具有发展成急性白血病的潜力。

[0280] MDSs和MPDs一样是克隆疾病,它们以血髓中的造血前体细胞的异常自我复制为特征。和MPDs一样,它们能发展成急性白血病。大多数但不是所有的MDSs显示外周血血球减少(慢性骨髓单核细胞性白血病例外),而MPDs不显示。

[0281] 这些疾病的实验室和临床表现可随它们的进程而不同,且在各次发病之间也不同。各种表现可能重叠,可能难以作出可靠的诊断来将一种疾病与所有其它疾病区别开来。因此,对骨髓造血细胞的肿瘤的诊断需要特别小心,以免将事实上致命性恶性疾病误诊为良性疾病。

[0282] 以下疾病属在本发明各个实施方案中可主要地或辅助地用MAPCs进行治疗的骨髓增殖性疾病(MPDs):慢性髓细胞性白血病("CML")/慢性粒细胞性白血病("CGL")、原因不明的骨髓纤维化(agnogenic myelofibrosis)、特发性血小板增多症和真性红细胞增多症。

[0283] 以下疾病属在本发明各个实施方案中可主要地或辅助地用MAPCs进行治疗的骨髓增生异常综合征(MDSs):难治性贫血、环形铁粒幼细胞性难治性贫血、伴过多原始细胞的难治性贫血、伴过多转化中原始细胞的难治性贫血和慢性骨髓单核细胞性白血病。

[0284] 以下疾病属在本发明各个实施方案中可主要地或辅助地用MAPCs进行治疗的淋巴增殖性疾病(包括多发性骨髓瘤和淋巴瘤在内):前-B急性淋巴母细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病("CLL")、B细胞淋巴瘤、毛细胞白血病、骨髓瘤、多发性骨髓瘤、T急性淋巴母细胞性白血病、外周型T细胞淋巴瘤、其它淋巴样白血病和其它淋巴瘤。

[0285] 在本发明多个实施方案中可主要地或辅助地用MAPCs进行治疗的肿瘤还有:骨髓细胞的良性肿瘤、骨髓增殖性疾病、骨髓增生异常综合征或急性白血病;慢性髓细胞性白血病("CML") (也称慢性粒细胞性白血病("CGL"))、原因不明的骨髓纤维化、特发性血小板增多症、真性红细胞增多症、其它骨髓增殖性疾病、急性多发性骨髓瘤、髓母细胞性白血病、急性前髓细胞性白血病、前-B急性淋巴母细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病("CLL")、B细胞淋巴瘤、毛细胞白血病、骨髓瘤、T急性淋巴母细胞性白血病、外周型T细胞淋巴瘤、其它淋巴样白血病、其它淋巴瘤或其它急性白血病。

[0286] 可将MAPCs辅助于对任何前述疾病的治疗进行给予。

[0287] 涉及免疫切除或缺损的治疗

[0288] 急性白血病往往难以通过对其它恶性肿瘤来说已有效的方法来治疗。这部分上是因为细胞会从骨髓迁移,包括肿瘤的细胞。部分上是因为骨髓遍布骨骼分散分布。再部分上无疑是因为细胞本身的特性和它们的转化。

[0289] 目前,血液恶性肿瘤的标准治疗法涉及将患者中的所有造血细胞进行切除。要这样做同时又不切除掉患者的健康造血细胞,这是办不到的。通常,用化学放射疗法以足够高的剂量来治疗患者,以杀死几乎所有的骨髓细胞,包括正常细胞和肿瘤细胞。该治疗的副作用是严重的,它对患者的影响是不愉快的、痛苦的,在身体上和情绪上都会使人疲惫不堪。该治疗不仅切除了患病的组织和细胞,它还除去了患者的造血系统和免疫系统。该治疗使患者变得免疫缺损,要依赖输液,且如此高度易受感染,以至于即使是对传染原的本该轻微的暴露也是致命的。

[0290] 正常的造血能力之后通过自体同源的或异基因的外周血或骨髓移植植物得到恢复。遗憾的是,患者的免疫系统不但因切除治疗而受到严重缺损,而且在异基因移植的情况下还因有意的免疫抑制而受到严重缺损,该有意免疫抑制是为了防止移植植物被排斥,和确保

会在患者骨髓中再繁殖和使患者造血和免疫细胞再生的新造血干细胞的移入和增殖。

[0291] 在进行这种移植以使免疫缺损宿主中的造血和免疫系统再生时碰到了许多并发症。一种并发症是宿主中的残余免疫活性细胞和过程引起的排斥,在本文中称为HVG反应。另一种并发症由移植物中的免疫活性细胞引起,本文中称为GVHD。

[0292] 这些并发症可通过使用同基因的或自体同源的供体材料来避免。但是,同基因的供体通常是罕见的,而自体同源的移植具有很高的疾病复发风险。因此,移植通常是使用从HLA相容供体获得的异基因细胞和组织。遗憾的是,这个程序会导致GVHD,在接受这种形式的疗法的大部分患者当中或轻微或严重地出现。如果没有至少得到改善的话,这些免疫反应会导致移植疗法的失败,且其本身对患者可能是致命的。

[0293] 已开发出多种药剂来抑制免疫应答,从而改善移植并发症如上文所述的HVG和GVHD。在一些移植疗法如骨髓和外周血移植中,有一些药剂能足够有效地使不利免疫反应降低到可应付的水平。这些药剂在一定程度上改进了移植患者的预后,但是它们没有一个是完全有效的,而且它们全部都有相当大的缺点。

[0294] 已发现(这在本文别处更详细描述到),MAPCs不会在异基因宿主中引起免疫应答。因此,MAPCs相异基因宿主的移植不会产生异基因移植排斥(即HVG)。

[0295] 此外还发现,异基因MAPCs能以高浓度给予宿主而对呼吸无不利影响。

[0296] 另外已发现(这在本文别处更详细描述到),MAPCs能调节免疫应答。在这点上具体的说,已发现MAPCs能抑制免疫应答,包括但不限于涉及例如HVG反应和GVHD(仅举两例)的免疫应答。在这点上更具体的说,已发现MAPCs甚至在强效T细胞刺激剂如伴刀豆球蛋白A和异基因或异种的刺激细胞存在下,也能抑制T细胞的增殖。

[0297] 此外还发现,甚至相对较少量的MAPCs也能抑制这些应答。的确,在混合淋巴细胞反应中仅仅3% MAPCs就足以减少体外T细胞应答达50%。

[0298] 因此,本发明的实施方案提供用于治疗如用于改善和/或整治或消除肿瘤如造血细胞的肿瘤(特别是骨髓的肿瘤)的组合物和方法等。

[0299] 这些肿瘤有骨髓增殖性疾病(MPDs)如慢性髓细胞性白血病(也称“慢性粒细胞性白血病”和“CGL”)、原因不明的骨髓纤维化、特发性血小板增多症、真性红细胞增多症;骨髓增生异常综合征(MDSs)如难治性贫血、环形铁粒幼细胞性难治性贫血、伴过多原始细胞的难治性贫血、伴过多转化中原始细胞的难治性贫血、慢性骨髓单核细胞性白血病;和明显恶性的肿瘤——急性白血病如急性髓母细胞性白血病、慢性粒细胞性白血病(CML)、急性前髓细胞性白血病、B-急性淋巴母细胞性白血病、CLL、B细胞淋巴瘤、毛细胞性白血病、骨髓瘤、T-急性淋巴母细胞性白血病、外周型T细胞淋巴瘤和其它淋巴样白血病和淋巴瘤。

[0300] 可将MAPCs辅助于对任何前述疾病的治疗来给予。

[0301] 贫血和其它血液疾病

[0302] 在本发明的在各个实施方案中,可将MAPCs用于治疗贫血或其它血液疾病,往往是辅助性地治疗。在这点上的各个实施方案是其中MAPCs被用来单独地或主要地或辅助地治疗以下贫血和/或血液疾病的实施方案:血红蛋白病、地中海贫血、骨髓衰竭综合征、镰状细胞性贫血、再生障碍性贫血或免疫性溶血性贫血。同时疾病还包括难治性贫血、环形铁粒幼细胞性难治性贫血、伴过多原始细胞的难治性贫血、伴过多转化中原始细胞的难治性贫血、慢性骨髓单核细胞性白血病或其它骨髓增生异常综合征,和在一些实施方案中范可尼贫

血。

[0303] 可将MAPCs辅助于对任何前述疾病的治疗来给予。

[0304] 免疫疾病

[0305] 本发明的实施方案涉及使用MAPC免疫调节单独地或作为辅助疗法来治疗免疫功能异常、紊乱或疾病。在这点上的实施方案涉及先天性免疫缺陷和自身免疫功能异常、紊乱和疾病。在这点上的各个实施方案涉及使用MAPCs来单独地或辅助地治疗节段性回肠炎、格林-巴利综合征、红斑狼疮(也称“SLE”和系统性红斑狼疮)、多发性硬化、重症肌无力、视神经炎、牛皮癣、类风湿性关节炎、格雷夫斯氏病、桥本氏病、0rd甲状腺炎、糖尿病(I型)、莱特尔氏综合征、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、抗磷脂抗体综合征(“APS”)、眼阵挛-肌阵挛综合征(“OMS”)、颞动脉炎、急性播散性脑脊髓炎(“ADEM”和“ADE”)、古德帕斯彻氏综合征、韦格纳肉芽肿、乳糜泻、天疱疮、多关节炎和温性自身免疫性溶血性贫血。

[0306] 这些实施方案中的具体实施方案涉及节段性回肠炎、红斑狼疮(也称“SLE”和系统性红斑狼疮)、多发性硬化、重症肌无力、牛皮癣、类风湿性关节炎、格雷夫斯氏病、桥本氏病、糖尿病(I型)、莱特尔氏综合征、原发性胆汁性肝硬化、乳糜泻、多关节炎和温性自身免疫性溶血性贫血。

[0307] 另外,在这点上在多个实施方案中MAPCs可单独地、主要地、辅助地用于治疗多种据认为具有自身免疫因素的疾病,包括但不限于可用来治疗以下疾病的实施方案:子宫内膜异位、间质性膀胱炎、神经性肌强直、硬皮病、进行性系统性硬皮病、白癫风、外阴部触觉痛(vulvodynia)、恰加斯氏病、肉样瘤病、慢性疲劳综合症和自主神经机能异常。

[0308] 遗传性免疫系统疾病包括严重复合型免疫缺乏症(SCID),包括但不限于SCID伴腺苷脱氨酶缺乏症(ADA-SCID)、x联锁的SCID、无T细胞和B细胞的SCID、无T细胞的SCID、正常B细胞、Omenn综合征、嗜中性白细胞减少症,包括但不限于Kostmann综合征、Myelokathexis;共济失调毛细血管扩张、裸淋巴细胞综合征、普通变异型免疫缺陷病、DiGeorge综合征、白细胞粘附缺陷病;和吞噬细胞疾病(吞噬细胞是能吞没和杀灭外来生物体的免疫系统细胞),包括但不限于Chediak-Higashi综合征、慢性肉芽肿病、中性白血球肌动蛋白缺乏、网状组织发育不全。

[0309] 可将MAPCs辅助于对任何前述疾病的治疗来给予。

[0310] 炎性疾病

[0311] 另外,在本发明的多个实施方案中,可将MAPCs作为唯一药剂或者辅助地用于治疗炎性疾病。在许多这种实施方案中,可将MAPCs用于治疗严重的炎症状态,如因急性变态反应引起的或者从属于其它疾病或治疗的炎症状态。MAPCs在这点上的用途目前主要限于其中受试者有重大残疾或失去生命的危险的急性情况。

[0312] 可将MAPCs辅助于对任何前述疾病的治疗来给予。

[0313] 美国专利7,015,037中所述的MAPCs

[0314] 人MAPCs在本领域中有描述。人和小鼠的MAPC分离方法是本领域公知的。因此现在本领域技术人员可以获得骨髓吸出物、大脑或肝脏活组织切片及其它器官,并用本领域技术人员可得到的阳性或阴性选择技术,依靠在这些细胞中被表达(或不被表达)的基因(例如通过功能或形态测定,如以上引用的申请案中所公开的测定,这些申请案已通过引用结合到本文中),来分离到这些细胞。这种方法描述于例如美国专利7,015,037,该专利就其关

于MAPCs和制备方法的描述内容通过引用结合到本文中。

[0315] PCT/US00/21387中所描述的MAPCs的分离和生长

[0316] 人和小鼠的MAPC分离方法是本领域公知的。它们描述于例如美国专利7,015,037、PCT/US00/21387(以WO 01/11011公布)和PCT/US02/04652(以WO 02/064748公布),这些方法连同这些专利中所公开的MAPCs的表征通过引用结合到本文中。

[0317] MAPCs最初是从骨髓分离,但后来是从其它组织建系(established),包括大脑和肌肉(Jiang,Y.et al.,2002)。因此,MAPCs可从多个来源分离获得,包括骨髓、胎盘、脐带和脐带血、肌肉、大脑、肝脏、脊髓、血液或皮肤。例如,MAPCs可衍自骨髓吸出物,而骨髓吸出物是可通过本领域技术人员可得到的标准方法来获得的(参见例如Muschler,G.F.,et al.,1997;Batinic,D.,et al.,1990)。

[0318] 人MAPCs在美国专利7,015,037中所述的条件下的表型

[0319] 用FACS对经过22-25次细胞倍增获得的人MAPCs所作的免疫表型分析表明,细胞不能表达CD31、CD34、CD36、CD38、CD45、CD50、CD62E和-P、HLA-DR、Muc18、STR0-1、cKit、Tie/Tek;能表达低水平的CD44、I类HLA和β2-微球蛋白,但能表达CD10、CD13、CD49b、CD49e、CDw90、F1k1(N>10)。

[0320] 一旦细胞在以约 $2 \times 10^3/cm^2$ 再接种的培养物中进行了超过40次倍增,表型变得更加同质,没有细胞表达I类HLA或CD44(n=6)。当细胞以更高的铺满度(confluence)生长时,它们表达高水平的Muc18、CD44、I类HLA和β2-微球蛋白,这与对MSC(N=8)所述的表型(Pittenger,1999)相似。

[0321] 免疫组织化学显示,以约 $2 \times 10^3/cm^2$ 接种密度生长的人MAPCs表达EGF-R、TGF-R1和-2、BMP-R1A、PDGF-R1a和-B,且有一小群(1-10%)的MAPCs被抗SSEA4抗体染色(Kannagi,R,1983)。

[0322] 使用Clontech cDNA阵列,测定了以约 2×10^3 个细胞/cm²的接种密度培养22-26次细胞倍增的人MAPCs的基因表达谱:

[0323] A.MAPCs不表达CD31、CD36、CD62E、CD62P、CD44-H、cKit、Tie、IL1受体、IL3受体、IL6受体、IL11受体、G CSF、GM-CSF、Epo、F1t3-L或CNTF,表达低水平的I类HLA、CD44-E和Muc-18mRNA。

[0324] B.MAPCs表达细胞因子BMP1、BMP5、VEGF、HGF、KGF、MCP1的mRNA;细胞因子受体F1k1、EGF-R、PDGF-R1a、gp130、LIF-R、激活蛋白-R1和-R2、TGFR-2、BMP-R1A;粘附受体CD49c、CD49d、CD29和CD10。

[0325] MAPCs表达hTRT和TRF1的mRNA;POU结构域转录因子oct-4、sox-2(oct-4需要它来维持ES/Ec的未分化状态,Uwanogho D.,1995)、sox 11(神经发育)、sox 9(软骨发生)(Lefebvre V.,1998);同源异型域转录因子:Hox-a4和-a5(颈胸骨骼特化;呼吸道的器官发生)(Packer AI,2000)、Hox-a9(骨髓组织生成)(Lawrence H,1997)、Dlx4(头的前脑和周围结构的特化)(Akimenko MA,1994)、MSX1(胚胎中胚层、成体心脏和肌肉、软骨发生和骨发生)(Foerst-Potts L.1997)、PDX1(胰腺)(Offield MF,1996)。

[0326] D.RT-PCR确证了oct-4、LIF-R和hTRT mRNA的存在。

[0327] 另外,RT-PCR显示rex-1mRNA和rox-1mRNA在MAPCs中表达。

[0328] Oct-4、rex-1和rox-1在衍自人和鼠骨髓的MAPCs和衍自鼠肝脏和大脑的MAPCs中

表达。人MAPCs表达LIF-R且SSEA-4染色阳性。最后发现，被培养超过30次细胞倍增的人MAPCs中oct-4、LIF-R、rex-1和rox-1mRNA水平提高，这导致产生表型上更加同质的细胞。与此对比，在高密度下培养的MAPCs失去这些标志的表达。这与40次细胞倍增之前就发生衰老和失去分化为成软骨细胞、造骨细胞和脂肪细胞之外的细胞的能力有关。因此，oct-4与rex-1、rox-1和sox-2一起的存在，是与MAPCs培养物中的大多数原始细胞的存在有关联的。

[0329] 培养MAPCs的方法是本领域公知的。(参见例如美国专利7,015,037,其关于培养MAPCs的方法通过引用结合到本文中)。培养MAPCs的密度可在约100个细胞/cm²或约150个细胞/cm²至约10,000个细胞/cm²之间变动，包括约200个细胞/cm²至约1500个细胞/cm²至约2000个细胞/cm²。对于不同的物种，密度可不同。另外，最佳密度可随培养条件和细胞来源而变。为给定的一组培养条件和细胞确定最佳密度是技术人员技能所及的。

[0330] 还有，在培养中MAPCs的分离、生长和分化过程中的任何时间，都可使用小于约10%、包括约3-5%的有效大气氧浓度。

[0331] 本发明另外通过以下示例性非限制性实施例进行描述。

[0332] 实施例

[0333] 实施例1:人MAPCs(来自骨髓单核细胞)

[0334] 骨髓单核细胞获自80个以上的健康人志愿者后髂棘的骨髓吸出物。从每个受试者获得10-100立方厘米的骨髓。单核细胞(“MNCs”)是通过将骨髓以Ficoll-Paque密度梯度(Sigma Chemical Co., St Louis, MO)进行离心获得。将骨髓MNCs与CD45和血型糖蛋白A微珠(Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA)一起温育15分钟，将样品放在SuperMACS磁体前来除去CD45⁺GlyA⁺细胞。洗脱的细胞为99.5%CD45⁻GlyA⁻。

[0335] CD45⁺GlyA⁺细胞的耗减导致回收到CD45⁻GlyA⁻细胞，其占总骨髓单核细胞的大约0.05-0.10%。选出不表达共同白细胞抗原CD45或红细胞系前体标志血型糖蛋白A(GlyA)的细胞。CD45⁻GlyA⁻细胞占骨髓单核细胞的1/10³。将CD45⁻GlyA⁻细胞接种在包被有纤连蛋白的各孔中，该纤连蛋白是在2%FCS、EGF、PDGF-BB、地塞米松、胰岛素、亚油酸和抗坏血酸中。7-21天后，有小簇的黏附细胞发展。使用有限稀释测定得知，产生这些粘附细胞簇的细胞的频数是1/5x 10³个CD45⁻GlyA⁻细胞。当出现细胞集落时(约10³个细胞)，通过胰蛋白酶消化回收细胞，并每隔3-5天在相同的培养条件下以1:4稀释度再接种。细胞密度维持在2-8x 10³个细胞/cm²之间。

[0336] 实施例2:小鼠MAPCs

[0337] 所有组织均按照明尼苏达州大学IACUC的指导方针获得。BM单核细胞(BMMNC)通过Ficoll Hypaque分离来获得。BM获自5-6周龄ROSA26小鼠或C57/BL6小鼠。或者，肌肉和大脑组织获自3天龄129小鼠。将前后肢近端的肌肉切除并彻底切碎。将组织用0.2%胶原酶(Sigma Chemical Co., St Louis, MO)在37℃下处理1小时，然后用0.1%胰蛋白酶(Invitrogen, Grand Island, NY)处理45分钟。然后将细胞剧烈研磨，通过70μm滤器。收集细胞悬浮液，在1600rpm下离心10分钟。将大脑组织解剖并彻底切碎。将细胞通过在37℃下(与0.1%胰蛋白酶和0.1%DNA酶Sigma)温育30分钟使它们解离。然后将细胞剧烈研磨，通过70μm滤器。收集细胞悬浮液，在1600rpm下离心10分钟。

[0338] 将BMMNC或者肌肉或大脑悬浮液以1x 10⁵/cm²接种在扩增培养基中[2%FCS于低葡萄糖Dulbecco's极限必需培养基(LG-DMEM)中，血小板衍生生长因子(PDGF)、表皮生长因子

(EGF) 和白血病抑制因子 (LIF) 各10ng/ml], 并维持在 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 。3-4个星期后, 通过胰蛋白酶/EDTA回收细胞, 用微磁珠去掉CD45⁺GlyA⁺细胞。所得的CD45⁻GlyA⁻细胞以10个细胞/孔再接种在包被有FN的96孔板中, 扩增到 $0.5\text{--}1.5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的细胞密度。无论MAPCs衍自何种组织, 它们的扩增潜力都相似。

[0339] 实施例3: 大鼠MAPCs

[0340] 从Sprague Dawley、Lewis或Wistar大鼠获得BM和MNCs, 在与对mMAPCs所述的条件类似的条件下进行接种。

[0341] 实施例4: 小鼠和大鼠MAPCs的可克隆性

[0342] 为证明分化的细胞是单细胞衍生的且MAPCs的确是“克隆的”多潜能细胞, 制备出其中MAPCs已转导有反转录病毒载体的培养物。发现未分化的MAPCs和它们的后代在基因组中的相同位点有反转录病毒插入。

[0343] 用两种独立衍生的ROSA26MAPCs、两种C57BL/6MAPCs和一种扩增了40至大于90PD的rMAPC群, 以及用eGFP转导的“克隆”小鼠和“克隆”rMAPCs, 进行了研究。在eGFP转导和未转导细胞之间未见差异。值得注意的是, eGFP表达在分化的MAPCs中持续出现。

[0344] 具体的说, 与EGF、PDGF-BB和LIF一起在FN上培养三个星期的小鼠和大鼠BMMNCs, 在连续两天被转导上eGFP癌反转录病毒载体。然后去掉CD45⁺和GlyA⁺细胞, 将细胞以10个细胞/孔进行亚培养。将eGFP转导的大鼠BMMNCs扩增85PD。或者, 使用扩增了80PD的小鼠MAPCs。未分化MAPCs的亚培养物, 是通过将100个来自维持了75PD的培养物的MAPCs进行接种并将它们再扩增到大于 5×10^6 个细胞来产生。将扩增的MAPCs在体外诱导分化成内皮、神经外胚层和内胚层。用对这些细胞类型有特异性的抗体进行染色, 来证实谱系分化。

[0345] 实施例5: 人MAPCs没有免疫原性

[0346] 已证实间充质干细胞具有低体外免疫原性和能够在异基因接受者之间发生移入(Di Nicola, M. et al. (2002) *Blood* 99: 3838-3843; Jorgensen, C. et al. (2002) *Gene Therapy* 10: 928-931; Le Blanc, K. et al. (2003) *Scandinavian Journal of Immunology* 57: 11-20; McIntosh, K. et al. (2000) *Graft* 6: 324-328; Tse, W. et al. (2003) *Transplantation* 75: 389-397)。

[0347] 图3表明, 人MAPCs显示出低体外免疫原性, 当加入到强效的T细胞MLRs中时是免疫抑制性的(Tse, W. et al. (2003))。在所有试验过的供体细胞和应答细胞对(donor and responder pairs), 结果均一致。

[0348] 应答细胞和刺激细胞是为这些实验而制备, MLRs是按照Tse, W. et al. (2003) 描述的程序来进行。

[0349] 实施例6: MAPCs能调节T细胞应答

[0350] MAPCs调节(在这里的情况下是抑制)免疫应答性的能力通过T细胞增殖测定来证明, 该测定例如可如下来进行。

[0351] 应答T细胞的制备

[0352] 应答细胞从Lewis大鼠的淋巴结制备。从大鼠手术切除淋巴结, 立即放入60x 15mm平板中的3-5ml培养基(完全RPMI或完全DMEM)中。将淋巴结分散通过尼龙滤器(使用注射器的手动柱塞)。将分散液装入50ml试管中, 在1,250rpm下离心8分钟。将所得的上清液(培养基)弃去。将沉淀(含有细胞)重悬于新鲜培养基(完全RPMI或完全DMEM)中。将细胞洗涤三

次,然后重悬于新鲜培养基中。重悬细胞密度通过计数已知体积中的细胞数来确定。将细胞保持在冰上。使用前,将细胞以 1.25×10^6 个细胞/ml的密度重悬于培养基(完全RPMI或完全DMEM)中。

[0353] MAPCs的制备

[0354] 从Lewis或从Sprague-Dawley大鼠制备MAPCs,然后如上所述冰冻。将它们解冻,然后以3000rad进行辐射。将辐射过的细胞以 0.4×10^6 个细胞/ml、 0.8×10^6 个细胞/ml和 1.6×10^6 个细胞/ml的密度重悬于培养基(完全RPMI或完全DMEM)中。

[0355] 伴刀豆球蛋白A的制备

[0356] 伴刀豆球蛋白A("ConA")用来激活T细胞。将ConA溶于PBS(完全RPMI或完全DMEM)中至最终浓度为0(只含PBS)、10、30和 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0357] 测定程序

[0358] 每个数据点基于至少三个测定值。

[0359] 将 $20\mu\text{l}$ 的每种ConA溶液加到微量滴定板(96孔,平底)的各孔中,然后加入 $80\mu\text{l}/\text{孔}$ 的应答细胞和 $100\mu\text{l}/\text{孔}$ 的MAPCs。将各板在加湿培养箱中在 37°C 、5%CO₂下温育4-5天。在培养的最后14-18小时中,给各板脉冲输送 $1\mu\text{Ci}/\text{孔}$ 的³H-胸苷。之后,用Tomtec收获机将细胞自动收获在玻璃纤维滤器上。胸苷摄取是在微板闪烁计数器中进行定量。结果以每分钟平均计数(CPM) +/- SD表示。

[0360] 各孔中生长培养基中的ConA最终浓度为0、1、3.16和 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 。MAPCs在各孔中的存在量为0、 0.4 、 0.8 和 1.6×10^5 个细胞/孔。

[0361] 结果在图4中显示,以下进行讨论。

[0362] 结果

[0363] 递增量的ConA导致了T细胞增殖的剂量依赖性刺激(图4,仅LN)。Lewis MAPCs抑制了ConA刺激的T细胞的增殖。该抑制取决于MAPCs的剂量。最大抑制(50%)出现在这些实验中所用的最高MAPCs剂量下,此时ConA剂量为低到中等。这些结果图示于图4中,表明MAPCs能抑制被激活的T细胞的增殖。

[0364] 实施例7:MAPCs能抑制被刺激的T细胞的增殖

[0365] MAPCs抑制同基因的和非匹配的(异基因的)T细胞增殖应答的能力,通过混合淋巴细胞反应的结果进行证明。以下实施例证实MAPCs对来自Lewis大鼠的、受来自DA大鼠的被辐射脾细胞刺激的T细胞的抑制作用。来自同基因的Lewis大鼠和非匹配的(异基因的)Sprague-Dawley大鼠的MAPCs均以剂量依赖性方式抑制T细胞应答。实验如下进行。

[0366] 应答T细胞的制备

[0367] 应答细胞如上所述从Lewis大鼠的淋巴结制备。

[0368] 被辐射的脾脏刺激细胞

[0369] 从DA大鼠手术切除脾脏。然后基本上如以上关于从Lewis大鼠淋巴结分离应答细胞的描述,从脾脏分离脾细胞。将分离的脾细胞以1800rad进行辐照。然后将细胞重悬至 $4 \times 10^6/\text{ml}$,保持在冰上备用。MAPCs的制备

[0370] 如上所述从Lewis大鼠制备同基因的MAPCs。以同样方式从Sprague-Dawley大鼠制备非匹配的(异基因的)MAPCs。将Lewis MAPCs和Sprague-Dawley MAPCs均以3000rad进行辐射,然后以 $0.03 \times 10^6/\text{ml}$ 、 $0.06 \times 10^6/\text{ml}$ 、 $0.125 \times 10^6/\text{ml}$ 、 $0.25 \times 10^6/\text{ml}$ 、 $0.5 \times 10^6/\text{ml}$ 、 $1 \times$

$10^6/ml$ 和 $2 \times 10^6/ml$ 的密度重悬在完全 RPMI 培养基中。

[0371] 测定程序

[0372] 给 96 孔微量滴定板的各孔装入： $100\mu l$ 的 MAPCs (在上述各稀释度下) 或 $100\mu l$ 的培养基； $50\mu l$ 的刺激细胞原液或对照；各 $50\mu l$ 的应答细胞原夜或对照；和使总体积等于 $200\mu l$ /孔的最终体积所需的培养基 (完全 RPMI 或完全 DMEM)。所有测定都是使用 96 孔平底微量滴定板。

[0373] 每个数据点基于至少三个测定值。

[0374] 将各板在加湿培养箱中在 $37^\circ C$ 、 $5\% CO_2$ 下温育 4-5 天。在培养的最后 14-18 小时中，给各板脉冲输送 $1\mu Ci$ /孔的 ^{3}H -胸昔。之后，用 Tomtec 收获机将细胞自动收获在玻璃纤维滤器上。胸昔摄取是在微板闪烁计数器中进行定量。结果以每分钟平均计数 (CPM) +/- SD 表示。结果

[0375] 衍自 Lewis 大鼠淋巴结的 T 细胞 (应答细胞) 暴露于由来自 DA 大鼠的被辐射脾细胞组成的刺激细胞，导致了应答细胞的非常强烈的增殖应答，如图 5A 和 5B 中的“无 MAPC”所示。

[0376] 递增剂量的同基因 Lewis MAPCs (图 5A) 和非匹配 (异基因) 第三方 Sprague-Dawley MAPCs (图 5B) 的加入，导致了 T 细胞激活受到显著和剂量依赖性的抑制。最大抑制水平约为 80%。即使是在最低剂量的 MAPCs 下，也有 40-50% 抑制。

[0377] 如图 5A 和 5B 所示，对照中没有 ^{3}H -胸昔掺入，表明掺入只因为被激活的应答 T 细胞的增殖而发生。

[0378] 总之，结果表明，同基因的和第三方的 (异基因的) MAPCs 即使是在来自非匹配大鼠的强效活性脾细胞存在下，也能抑制 T 细胞增殖。在这些实验中，当反应中的刺激细胞、应答细胞和 MAPCs 各自数量相近 (200,000 个细胞) 时抑制达到最高值。在这些条件下，有大约 80% 抑制。在反应中 MAPCs 与其它细胞之比极低的情况下，也有很大的抑制。例如在 1.5% MAPCs 下有 50% 抑制 (MAPCs 3,000 个，而每种其它细胞 200,000 个)。结果不但证明 MAPCs 具有很强的免疫抑制作用，而且还证明相对较少量的 MAPCs 甚至在非常强效的 T 细胞激活剂存在下也足以抑制相对较大量的有活性的 T 细胞。

[0379] 实施例 8: MAPCs 是安全的

[0380] 静脉内注射大量细胞的主要直接危险是细胞团块在肺中的积累，这会导致呼吸窘迫和可能导致心搏停止。为在这点上证实 MAPCs 的安全性，我们测量了 MAPCs 的静脉内注射对 Buffalo 大鼠的呼吸频率的影响。

[0381] 如上所述从 Lewis 大鼠制备 MAPCs (“Lewis MAPCs”)。还如上所述从 Lewis 大鼠制备脾细胞用作对照 (“Lewis 脾细胞”)。

[0382] 每组有一只雌性 Lewis 大鼠充当脾细胞供体 (实验条件)。每种有两只 Buffalo 大鼠用作接受者 (实验条件)。

[0383] 将细胞如下所示给予大鼠。数据图示于图 6 中。各数据点与以下编号的各个大鼠的对应关系在图 6 右边的竖排图例中列举。所有大鼠均为 Buffalo 大鼠。

[0384] $1.1, 1.210 \times 10^6$ Lewis MAPC 每鼠

[0385] $2.1, 2.25 \times 10^6$ Lewis MAPC 每鼠

[0386] $3.1, 3.22.5 \times 10^6$ Lewis MAPC 每鼠

[0387] $4.1, 4.21.2 \times 10^6$ Lewis MAPC 每鼠

[0388] 5.1,5.210x 10⁶Lewis脾细胞每鼠

[0389] 6.1,6.25x 10⁶Lewis脾细胞每鼠

[0390] 7.1,7.22.5x 10⁶Lewis脾细胞每鼠

[0391] 8.1,8.21.2x 10⁶Lewis脾细胞每鼠

[0392] 如上所述,各大鼠注射以1.2、2.5、5或10*10⁶个MAPCs或者1.2、2.5、5或10*10⁶个脾细胞。这对应于5、10、25或50*10⁶个细胞/kg。呼吸频率在静脉内注射MAPCs或脾细胞前(0分钟)和1、5和10分钟后测量。呼吸频率是测量20秒钟,然后将计数乘以3得到每分钟呼吸频率。正常大鼠呼吸频率在每分钟60-140次之间。

[0393] 结果

[0394] 所有大鼠在静脉内细胞注射后均存活。没有观察到呼吸频率在不同条件下有显著差异或趋向。结果在图6中显示。初始呼吸速率(0分钟)稍低,因为各大鼠在注射细胞前进行了麻醉。在每个时间点,各测量值簇集在一起,没有任何明显趋向。

[0395] 总之,静脉内注射5-50*10⁶个MAPCs/kg在任何条件下在任何大鼠中都没有引起呼吸频率或死亡率的变化。结果证实MAPCs的静脉内注射即使在高剂量下也是安全的。

[0396] 实施例9:MAPC的免疫标志表达

[0397] 通过测定MAPCs中的免疫调节标志,如Barry et al. (2005)所描述的标志,来进一步表征MAPCs的免疫调节特性。这些标志用标志特异性抗体和FACS分析来测定。

[0398] 如上所述分离大鼠骨髓MAPCs并进行培养和收获。对于FACS分析,将细胞以1-2x 10⁸个细胞/ml悬浮于PBS中。将200μl的细胞悬浮液加到一系列的12x 75聚丙烯管中的每一个管。将标记特异性抗体或对照加到每个管中,然后将它们在室温下温育15-20分钟。温育结束时,向每个管加入2ml PBS,然后在400x g下离心5分钟。弃去上清液,将每个管中的细胞重悬于100μl PBS。将荧光标记的第二抗体以适当的量加到每个管中,将各管再次在室温下温育15-20分钟,这回是在暗处温育。然后向每个管加入2ml PBS,再次在400x g下离心5分钟。弃去上清液,将每个管中的细胞重悬于200μl PBS,然后保持在冰上以待FACS分析。

[0399] 结果在表1中列出。如表中所示,大鼠MAPCs: (a) 对I类MHC、CD11c、CD29和CD90阳性,(b) 对II类MHC、CD11b、CD31、CD40、CD45、CD54、CD80、CD86、CD 95和CD106阴性。由对照细胞(包括大鼠外周血细胞和内皮细胞)的阳性染色证实了每种抗体的阴性结果。这些标志表达模式(包括在MAPCs中检测到的标志和没有检测到的标志)完全符合MAPCs的低免疫调节截面图(cross-section)。

[0400] 表1-MAPCs中免疫细胞相关标志的检测

[0401]

标志	标志的名称/功能	市售的抗大鼠 志抗体	FACS 检测
I 类 MHC		是	阳性
II 类 MHC		是	阴性
CD11b	Mac-1	是	阴性
CD11c	整联蛋白 αX	是	阳性
CD29	整联蛋白 $\beta 1$	是	阳性
CD31	PECAM-1	是	阴性
CD40	TNFRSF	是	阴性
CD45	白细胞共同抗原	是	阴性
CD54	ICAM-1	是	阴性
CD80	B7-1	是	阴性
CD86	B7-2	是	阴性
CD90	Thy-1	是	阳性
CD95	Apo-1	是	阴性
CD106	VCAM-1	是	阴性

[0402] 实施例10: MAPCs在MLRs中能抑制之前被刺激过的T细胞

[0403] 细胞

[0404] 应答细胞如上所述从Lewis大鼠的淋巴结制备。从Buffalo或DA大鼠制备的脾细胞如上所述用作刺激细胞。MAPCs如上所述进行制备。

[0405] 程序

[0406] 将MAPCs与脾细胞同时加到第一组MLRs中(前面实施例的做法)。另外,将MAPCs加到与第一组相同配置的第二组MLRs中。但是,第二组中的MAPCs是在加入脾细胞(或对照)3天后加入。因此,在第一组,MAPCs是在T细胞开始响应脾细胞发生增殖之前加入。在第二组,MAPCs是当T细胞对脾细胞的应答进行了3天时加入。所有的板均总共温育4天,然后如前面实施例所述脉冲输送 ^{3}H -胸苷并收获。实验在其它方面按前面实施例中对MLRs的描述来进行。

[0407] 每个数据点基于至少三个测定值。

[0408] 结果

[0409] 从图7的右边可见,MAPCs在MLRs中当在用异基因脾细胞刺激T细胞三天后加入时,能强烈抑制T细胞增殖。比较图7的左边和右边得知,MAPCs能强烈抑制正在进行的增殖反应。定量地说,结果显示对于Buffalo细胞,在刺激3天后加入的MAPCs与对照相比抑制了T细

胞增殖达50% (图的右边),而当与刺激性脾细胞同时加入时达75% (图的左边)。同样对于DA细胞,在刺激3天后加入的MAPCs与对照相比抑制了T细胞增殖达33% (图的右边),而当与刺激性脾细胞同时加入时达70% (图的左边)。

[0410] 在所有情况中,MAPCs的免疫抑制程度一般取决于加入到反应的MAPCs数量。换句话说,免疫抑制取决于加入到MLRs的MAPCs剂量。

[0411] 上文引述的出版物就其被引述的特定主题整体通过引用结合到本文中。

[0412] 实施例11:MAPC对T淋巴细胞的抑制是可逆的

[0413] 将T细胞在被辐射MAPCs存在或不存在下与异基因的刺激性脾细胞一起培养。培养13天后,将T细胞回收,在MAPCs存在或不存在下与被辐照异基因脾细胞一起再接种并培养4天。

[0414] 在原代培养过程中因被辐射MAPCs的存在而被抑制的T细胞,其增殖在继代培养过程中在MAPCs不存在的情况下得到恢复。继代培养中MAPCs的存在对T细胞增殖的抑制与在原代培养中的抑制相当,在MAPCs与T细胞之比为1:2下最高达90%抑制。在图8中显示的结果清楚证明,在MLRs中MAPCs对T细胞增殖的抑制是可逆的,MAPCs能抑制原代和继代T细胞增殖应答。

[0415] 实施例12:MAPCs能防止GVHD

[0416] 在如下的大鼠模型中证明MAPCs抑制GVHD的能力。来自Buffalo大鼠供体的T细胞充当Lewis x Buffalo大鼠接受者中的“移植物”。Buffalo移植细胞被宿主中的“外源”Lewis细胞激活,导致模型中出现GVHD。

[0417] 在第0天以单一600rad剂量对F1接受者大鼠 (Lewis x Buffalo) 进行亚致死辐照。在同一天给它们静脉内注射来自供体Buffalo大鼠的 2×10^7 个骨髓细胞和 10×10^7 个T细胞(脾细胞)。对大鼠的GVHD迹象进行每星期3次监测,所述迹象由体态、活动性、软毛质地、皮肤和体重量减轻进行评估。

[0418] 组1未接受MAPCs。组2在第1天接受 2.5×10^6 个MAPCs。组3在第1天和第8天各接受 2.5×10^6 个MAPCs。每组有五只大鼠。结果在图9中显示。MAPC的给予明显改进存活率。组2中40%的大鼠和组3中60%的大鼠存活到实验结束(42天),而所有没有接受MAPCs的大鼠(组1)最迟至第21天就罹患GVHD。

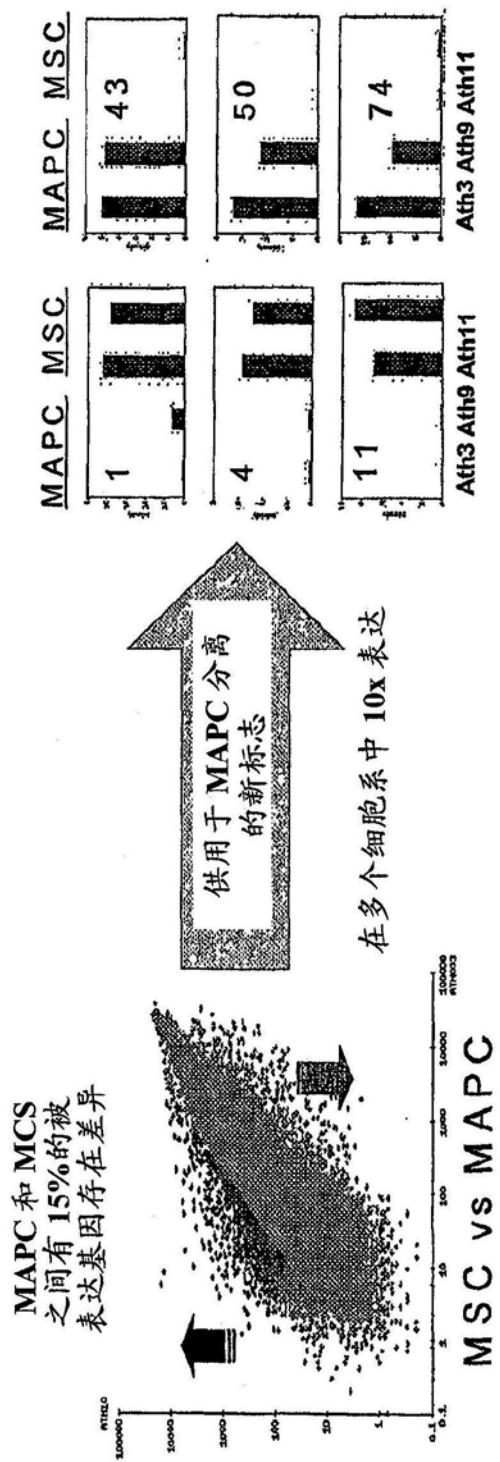


图 1

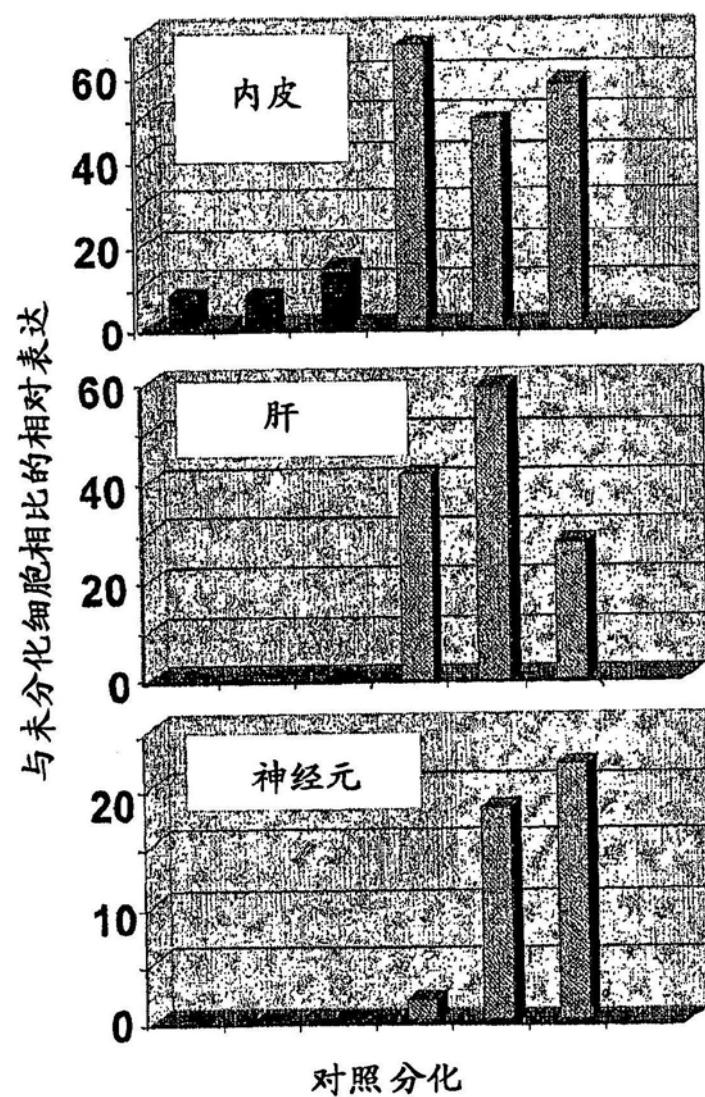


图2

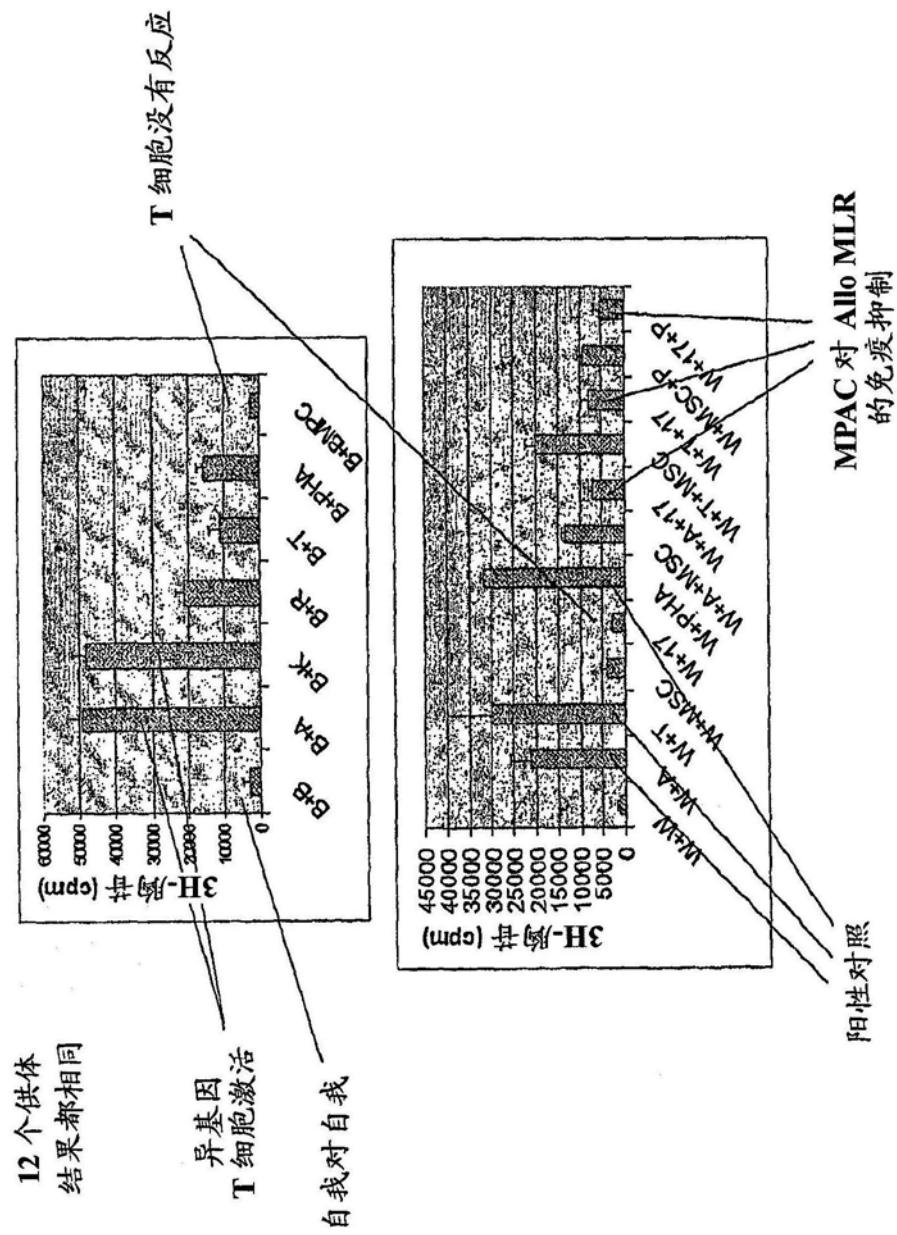


图3

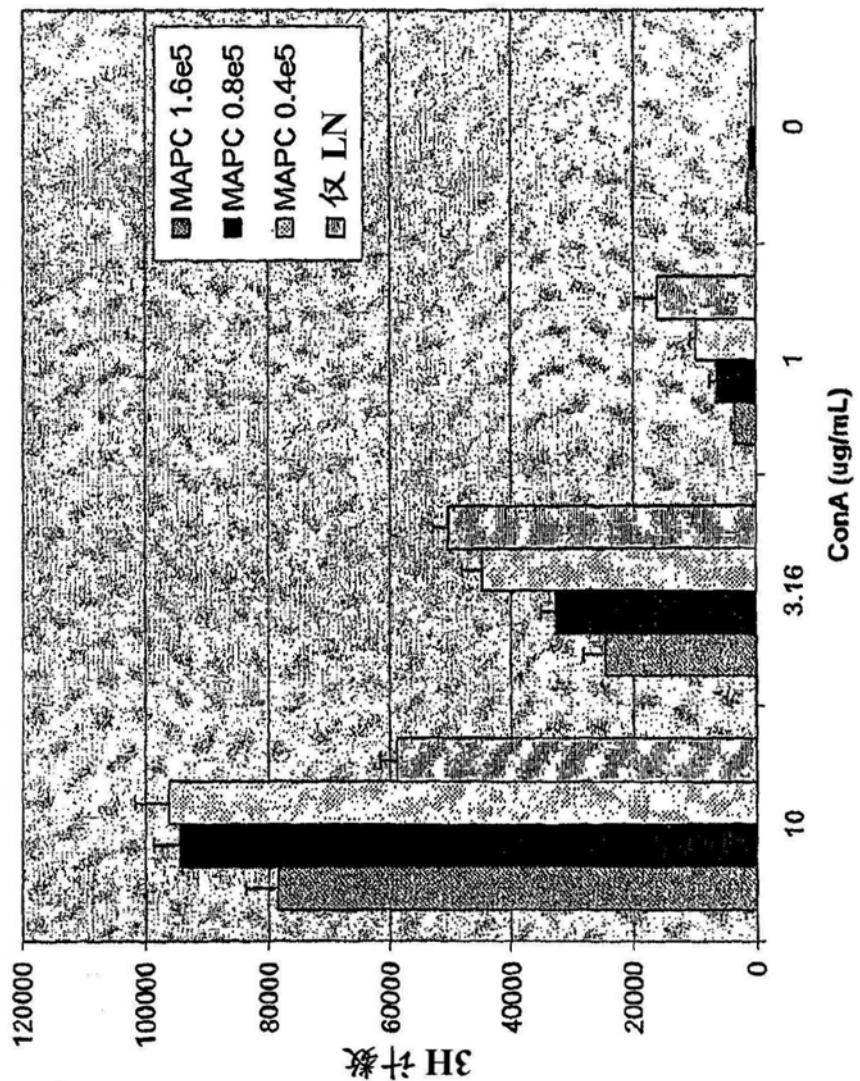


图4

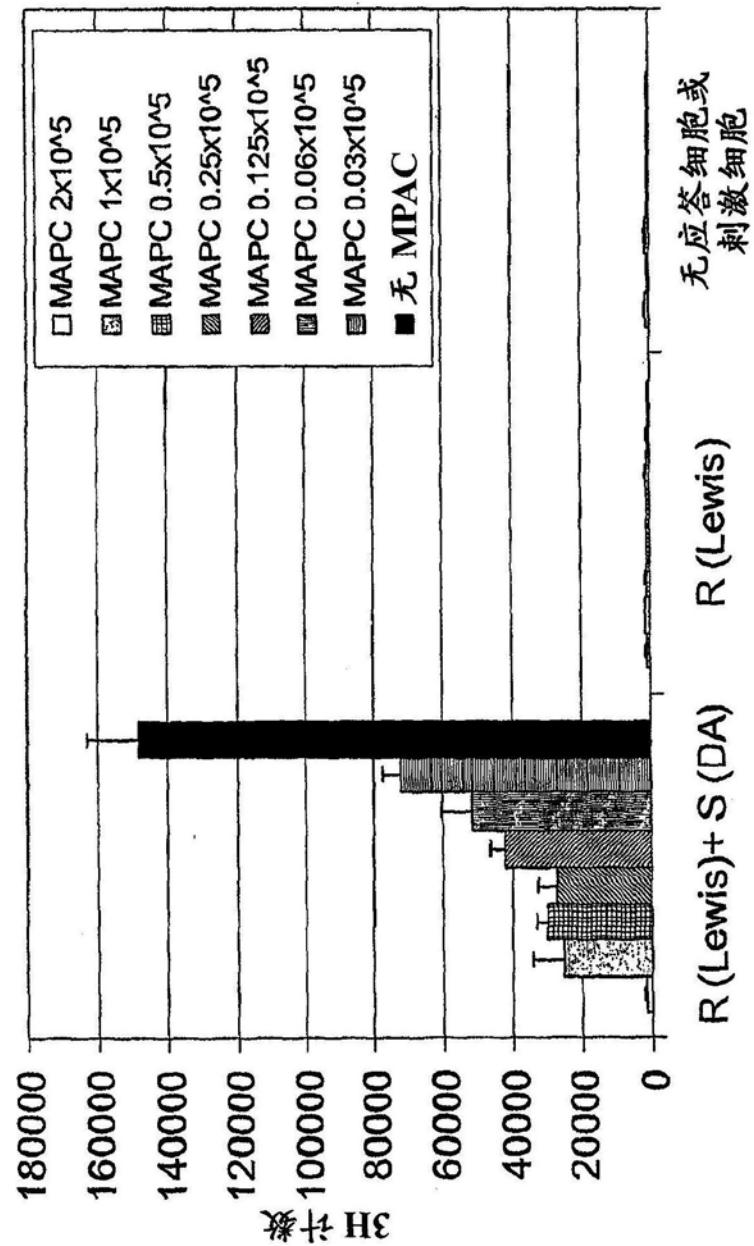


图5A

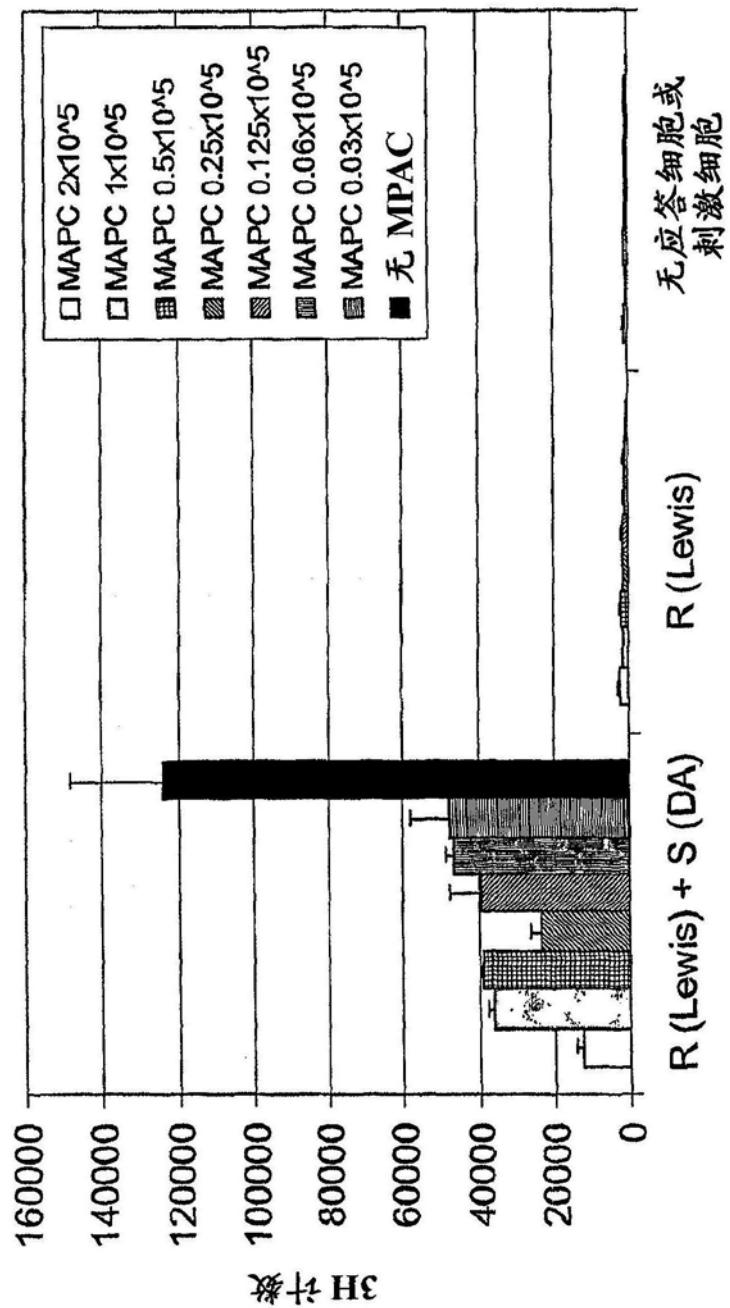


图5B

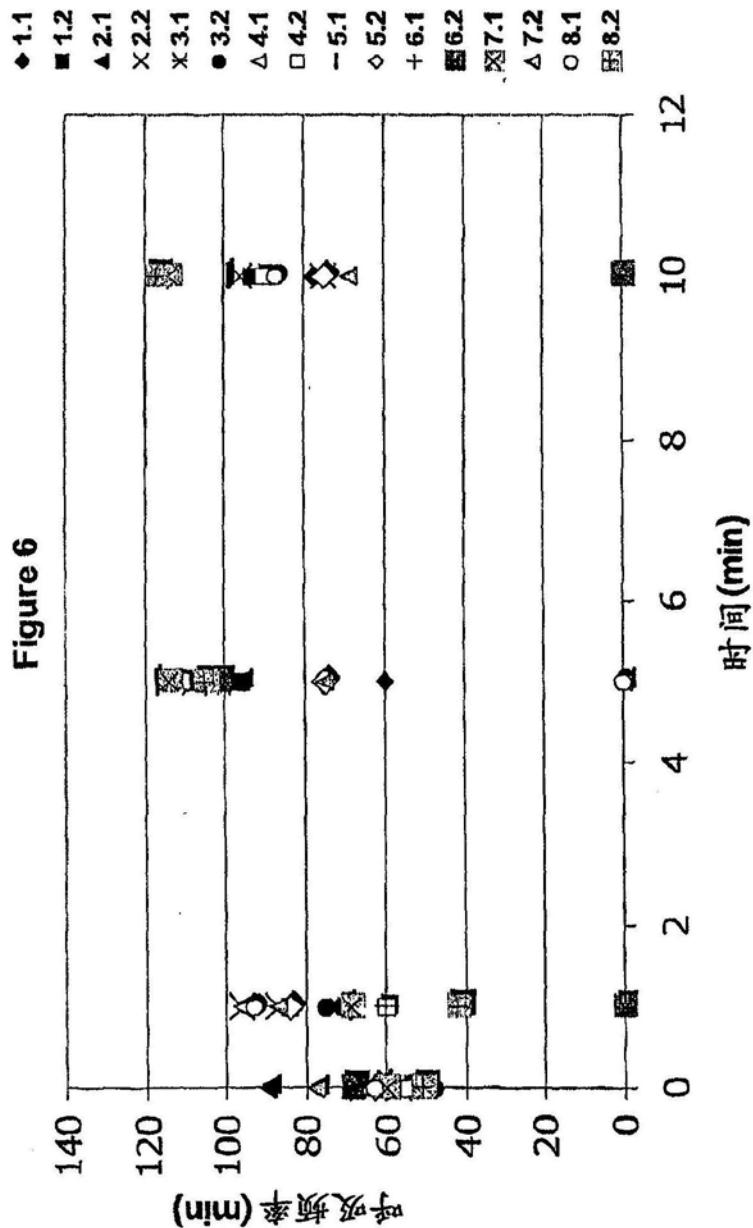


图6

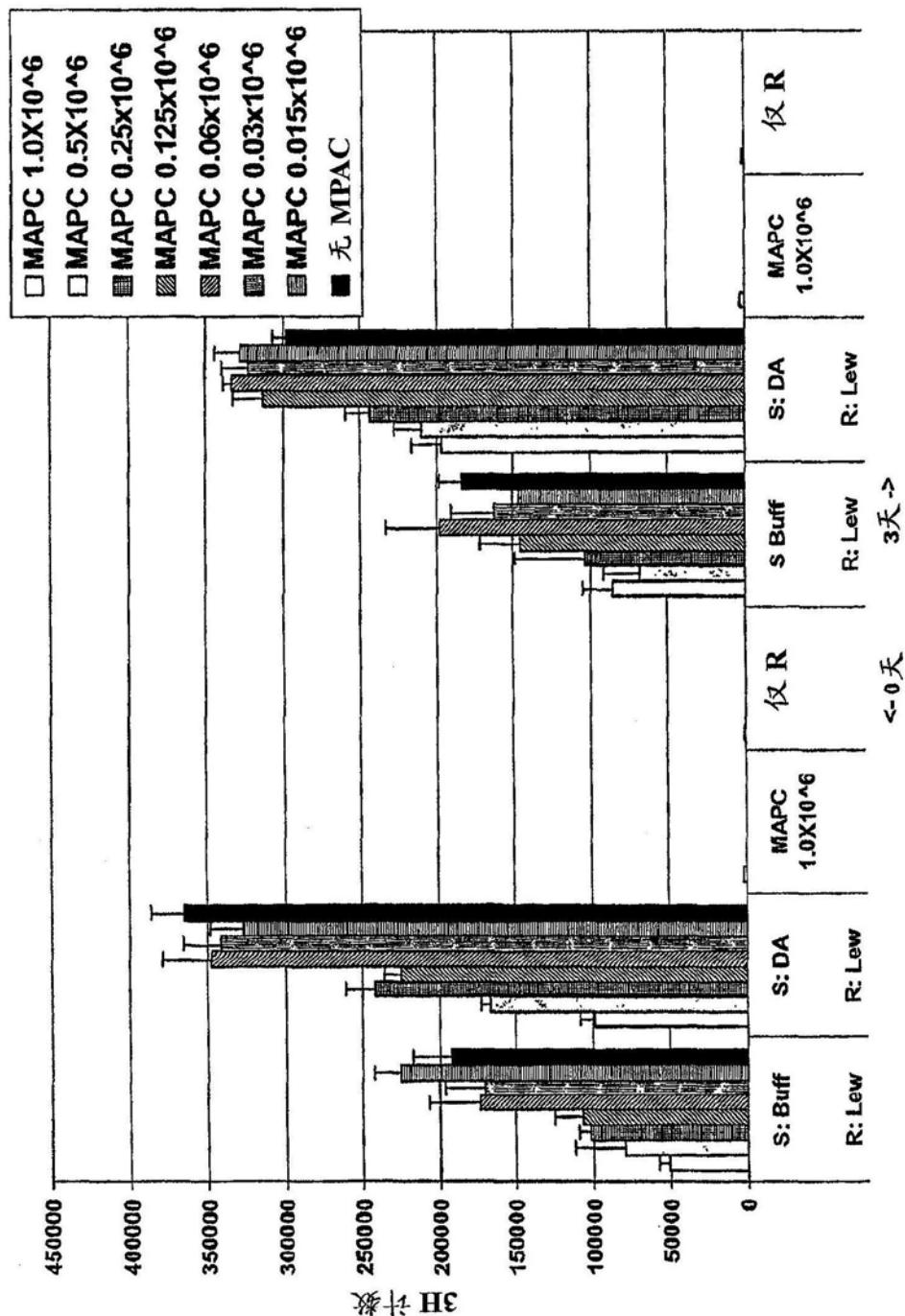


图7

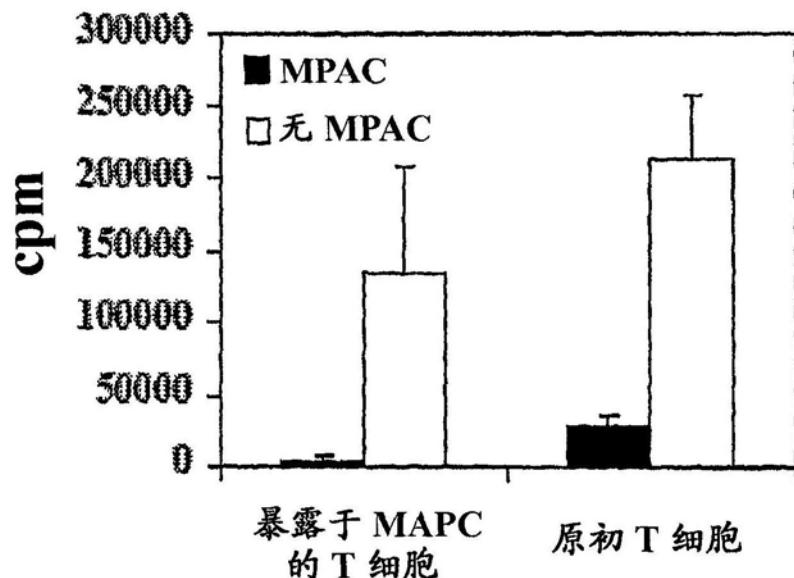


图8

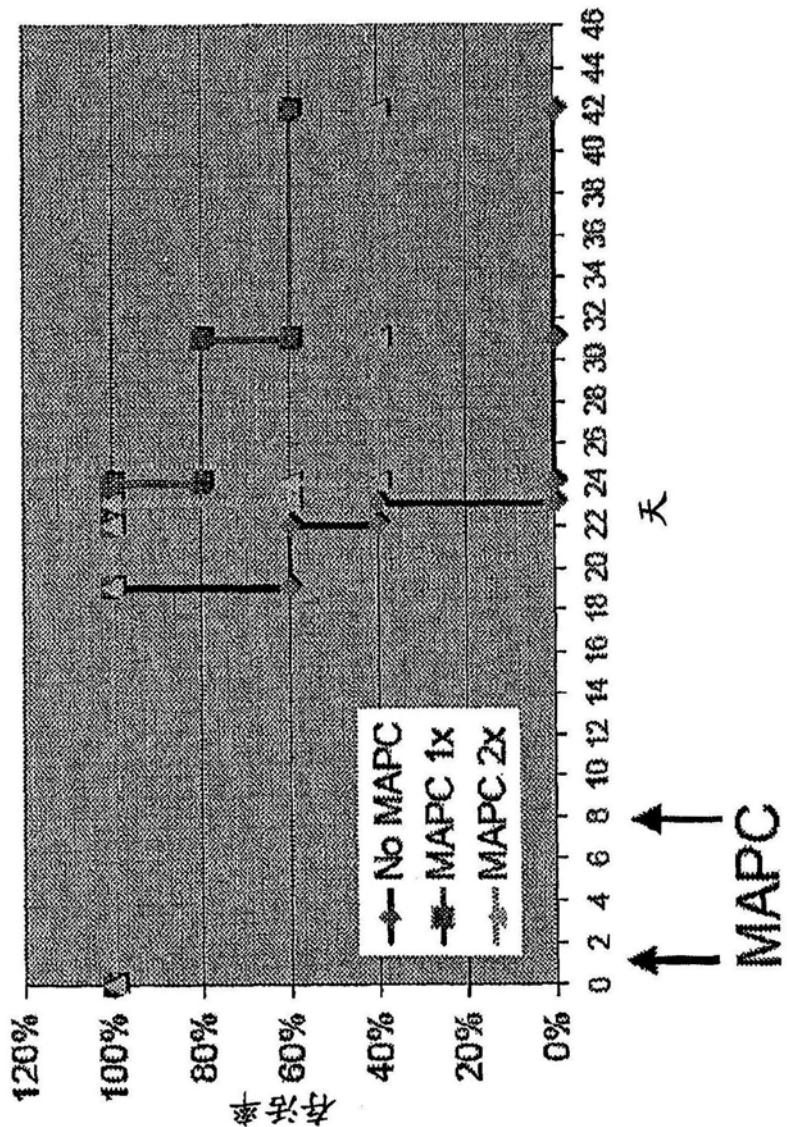


图9