(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106574247 A
(43)申请公布日 2017.04.19

(21)申请号 201580037505.8

(22)申请日 2015.05.08

(30)优先权数据
UD2014A000075 2014.05.09 IT

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.01.09

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2015/053379 2015.05.08

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/170291 EN 2015.11.12

(71)申请人 善克思腾(股份)责任有限公司
地址 意大利乌迪内曼兹尼路21号

(72)发明人 马科·波力提尼

(74)专利代理机构 上海翼胜专利商标事务所(普通合伙) 31218
代理人 翟羽

(51)Int.Cl.
C12N 5/0789(2010.01)

权利要求书1页 说明书12页 附图9页

(54)发明名称

从全血中扩增成体干细胞的方法

(57)摘要

本发明公开一种用以从血液中扩增成体干细胞的方法,包括通过使用MCSF对一已经采集的血液样品进行体外处理和对所述血液样品进行臭氧处理,而对所述血液样品的成体血液干细胞进行生长和去编程。

CN 106574247 A

1.一种用以从血液中扩增成体干细胞的方法,其特征在于:所述方法包含:

-使用MCSF对一已经采集的血液样品进行体外处理,以对所述血液样品的成体血液干细胞进行生长与去编程;

-对所述血液样品进行臭氧处理。

2.如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述方法是在所述MCSF处理之前进行所述血液样品的所述臭氧处理。

3.如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述方法是在所述MCSF处理期间进行所述血液样品的所述臭氧处理。

4.如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述方法是在所述MCSF处理之后进行所述血液样品的所述臭氧处理。

5.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于:所述方法提供所述臭氧处理是通过向所述血液样品供应一氧-臭氧混合物。

6.如权利要求5所述的方法,其特征在于:所述方法提供所述血液及所述氧-臭氧混合物的一化学计量比为1:1。

7.如权利要求5或6所述的方法,其特征在于:所述方法提供一份量为大于或等于约1微克/升的氧-臭氧混合物至所述血液样品中。

8.如权利要求7所述的方法,其特征在于:所述方法提供至所述血液样品中的所述氧-臭氧混合物的所述份量被选择为约1微克/毫升至约42微克/毫升的一区间内。

9.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于:所述方法提供用以向所述血液样品中加入一抗凝血剂。

10.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于:所述方法提供用以使用一试剂盒收集血液,所述试剂盒包括一容器用以容纳所采集的血液,并至少含有所述MCSF物质。

11.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于:所述方法提供用以使被采集并被进行所述MCSF处理和所述臭氧处理以进行生长和去编程的所述血液样品的量介于0.2毫升至100毫升之间。

12.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于:所述方法提供用以使被采集并被进行所述MCSF处理和所述臭氧处理以进行生长和去编程的所述血液样品的量介于2毫升至10毫升之间。

13.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于:所述方法提供用以使被采集并被进行所述MCSF处理和所述臭氧处理以进行生长和去编程的所述血液样品的量介于3毫升至5毫升之间。

14.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于:所述方法提供用以所述MCSF的一浓度被包含在约1纳莫耳至约55纳莫耳的一区间内。

15.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于:所述方法提供用以使通过所述MCSF体外处理的一生长和去编程的时间介于4小时至96小时之间。

从全血中扩增成体干细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明所述实施例的形式是有关于一种从成体哺乳动物的全血，特别但不限于是从外周血中扩增成体干细胞的方法，及在医疗领域的相对应用，特别是在人类或兽医学中用于治疗性处理外部和内部损伤、肌腱损伤、韧带和软骨、骨折以及慢性及/或急性发炎病变的治疗及/或预防性治疗、神经和神经病变病理学、心脏病理学、肿瘤病理学、自体免疫病理学、眼科病理学和遗传源的病理学。

[0002] 在本文和以下的描述中，以及如文献中已知的术语“扩增”指的是通过细胞分裂或如本文所描述和要求保护的特定情况下通过“去分化”或“去编程”来增加细胞数目的过程，也就是说，存在于血液中的一些细胞在适当的体外处理后被重新转化成干细胞的过程，将如后所述。

背景技术

[0003] 近年来，干细胞在医疗中的使用已经获得广泛的共识，但是除了从血液获得的干细胞，治疗所获得的效果远低于预期。

[0004] 事实上，许多已知的用于获得干细胞的方法已证明是耗时的、费力的和昂贵的，具有相对的结果和偶尔的附带效应。

[0005] 对于胚胎干细胞和成体干细胞：从外周血和脐带等获得，前者来自8天囊胚，而成体干细胞主要从骨髓、脂肪或肌肉组织获得。

[0006] 干细胞的定义是不断进化的。对于所有这些细胞，胚胎(ES)细胞和成体细胞、造血(HSC)细胞和间质(MSC)细胞(库瓦讷等人，2003年)，已经鉴定了多种遗传标记，其中一些是共同的许多细胞类型(康朵麦斯等人，2006年；康等人，2006年；赵等人，2003年；拉比诺维奇等人，1976年)。

[0007] 为了鉴定多能干细胞(PSCs)、胚胎细胞和成体细胞，一些细胞内转录因子的表现是被考虑的(Sox2、Oct3/4和Nanog)。

[0008] 最初，针对胚胎源的干细胞的研究，因为它们是多能分化的，并且也是可计量和可量化的，因此适合于实验过程。然而，伦理问题，尤其是由于肿瘤的产生的反指标，意味着它们必须被搁置。因此，如今成体干细胞是优选的。而另一个体的成体干细胞(同种异体)非常频繁地引起严重的排斥问题，因为它们不被认为是“本身”。这特别影响了几乎限定用于同种异体干细胞且来自脐带的干细胞。

[0009] 使用一过程诱导，并通过病毒将多能因子从胚胎干细胞转移到成体干细胞的的多能干细胞是不适合用于治疗的细胞，这是由于与具有与胚胎干细胞相似的反指标，以及极高的成本。

[0010] 就人类而言，目前接受通过称为“外围血液干细胞分离术”或“白血球分离术”的过程从外围血液获得的干细胞的使用。干细胞从血液中提取、收集，然后在化疗或放射治疗后立即接种到受一些白血病病理影响的患者中。干细胞是造血的，因此它们仅与血液的病理相互反应。

[0011] 在持续6至8小时的外围血液干细胞分离术中，血液从手臂、颈部或胸部的静脉中取出，并通过去除干细胞的机器。血液因此纯化并返回到患者，而收集的细胞则通过在液氮中冷藏来保存(康朵麦斯等人，2006年；康等人，2006年)。这种技术不仅痛苦，而且对患者也非常有压力。它提供了体内接种生长因子以刺激干细胞从骨髓释放到血液中，并且无法使干细胞在循环中的真正区别及/或纯化。

[0012] 根据立法，现在允许这些细胞用于治疗专门的血液病理疗程。

[0013] 目前被引入市面上以治疗不同病理的干细胞是从骨髓和脂肪获得的成体干细胞，主要是间质干细胞。然而，这些有一定的限制：

[0014] -它们需要侵入性方法来收集它们，钻入一骨骼取骨髓干细胞或从脂肪手术中取得干细胞；

[0015] -由于它们的间质性衍生，它们仅能够与一些组织相互反应；

[0016] -当它们被培养以获得足够数量用于治疗时，它们开始分化成其他细胞类型，总是呈现不同的细胞膜膜受体，因此它们不能被计量和定量，这是人体试验不可或缺的特征。

[0017] 赵等人在“人体周边血液单核细胞衍生的子集作为多能干细胞”，申请号WO-A-2004/043990一案中描述了另一种已知的方法。这是一种用于制备源自单核细胞的干细胞的方法，其包括以下步骤：从周边血液中分离单核细胞，使其与促有丝分裂成分接触，随后在适于繁殖细胞的条件下培养来自周边血液的单核细胞。

[0018] 所述方法一开始需要分离单核细胞的步骤，然后在培养基中的扩增步骤是非常冗长的，大约15-20天，以获得大量的干细胞，并且无法获得多能干细胞。

[0019] 再次于从单核细胞制备干细胞的框架中，文献WO-A-2005/046570，WO-A-2007/131200和WO-A-03/083092是已知的。然而，由于它们必须进行血液的初步纯化而仅能分离一种细胞类型，即单核细胞，并且随后扩增以获得所需的干细胞，所以这些文献中描述的方法还是需要非常冗长的时间，大约仍需15-40天，以获得可接受数量的干细胞。

[0020] 以本申请发明人的名义申请的文献WO-A-2008/034370也是已知的，其全文以引用方式并入本文，并且涉及使用一巨噬细胞群落刺激因子(MCSF)从血液中取得的成体干细胞的扩增方法。所述已知的方法为提供了通过使用浓度介于8纳莫耳和15纳莫耳之间的MCSF体外处理并接着纯化-优选在Ficoll梯度上分级分离-以获得血液之后，使成体血液干细胞生长。所述方法还可以提供从通过使用浓度为35纳莫耳至55纳莫耳的MCSF体外处理纯化的周边血液使干细胞生长。

[0021] 所述方法的功效通过干细胞标记CD90，CD90/34，CD34和CD117的存在和识别以及干细胞在分裂或扩增后不失去其“本身”识别因子的事实来证实。当干细胞被施用给患者时，干细胞不产生附带效应，例如排斥、感染或畸胎瘤的发生，并且能够“体内”分化并表现为多能干细胞。

[0022] 发明人已经发现，当局部或静脉注射时，细胞通过分裂或扩增，因此细胞在“体内”生长(而非如本领域已知方法在现有技术中通过合适的生长因子及/或化学刺激的“体外”生长(古拉提等人，2003年；卡提兹等人，2002年；冈崎等人，2005年))，获得关于所治疗生物体的需求和病理所有巨噬细胞、淋巴细胞、上皮细胞、内皮细胞、神经元和肝细胞的形态和化学特征。所述方法相较于以前用于收集干细胞的其它方法侵入性更小，其为无痛的(与外围血液干细胞分离术不同)且经济的。

[0023] 最后，可轻易地获得这些细胞，然后能够长时间保存(例如在液氮中冷冻)的可能性使得使用所述已知方法获得的细胞适合于自体移植和治疗许多病理(各种类型病变、代谢性疾病、神经病症、急性和慢性炎病症)。

[0024] 以本申请人的名义申请的文献WO-A-2009/115522也是已知的，所述申请整体通过引用并入本文，并且涉及用于收集血液(优选周边血液)用于生产多能干细胞的试剂盒，包括能够容纳所采集血液的容器，其含有抗凝血剂和MCSF物质。试剂盒可以在WO-A-2008/034370中描述的方法中使用。

[0025] 然而，申请人已经发现，干细胞在执行WO-A-2008/034370中描述的方法时所经历的各种工序和处理步骤，例如红血球的消除、干细胞相对于血液其它成分的纯化，能够获得更大量的多能干细胞，相较于造血和间质干细胞经培养分化成其它类型细胞，可以促使成体干细胞的获取，使它们存活但效力较低，降低了能量和信息的潜在需求。

[0026] 在兽医领域中，各种技术和装置用于产生干细胞，特别是用于纯化来自脂肪和骨髓的干细胞并获得生长因子。

[0027] 然而，对于干细胞，第一个障碍是它们难以收集：如本文所述，为了从骨髓取得它们，必须钻骨头或穿透骨架，并且为了从脂肪获取它们，需要缝针的外科手术。

[0028] 还有后勤的复杂性：调度样品和接收干细胞，保持它们的活性和稳定性。

[0029] 其他障碍可能是所需的手动操作的数量，准备时间和所有成体干细胞使用到现在的成本。

[0030] 这些困难以及不良的临床结果使得干细胞几乎完全从兽医临床实践中消失，并且只有少数兽医继续使用它们，尤其是用于实验目的。

[0031] 在WO-A-2008/034370中所描述和在各种科学出版物中报导的细胞制备物能够鉴定和定量所获得的干细胞，证实它们的多功能分化性特征。它也比迄今为止所使用的技术容易得多，因为取样简单-几毫升的血液，也因为细胞不需要培养。

[0032] 然而，上述系统也可以被改进，即在人类临床实验中使用干细胞，以克服与样品到实验室的调度相关的障碍，随后用MCSF去编程并返回到治疗处理的受体。另一个限制可以使用WO-A-2008/034370中描述的方法从血液中完全纯化获得的干细胞，其允许对于同种异体接种(其安全性仍然需要被证明)可能具有更大的安全性。事实上，用于消除红血球和细胞在分选器(计量)中通过的纯化和过程对所获得的干细胞产生相当大的压力，使得它们丧失其一部分的治愈能力。因此，强烈需要将血液的处理减至最小以获得有效的干细胞，从而获得更好的结果。

[0033] 现有方法(包括WO-A-2008/034370)获得的所有干细胞疗法的另一个限制是，它们需要专门的实验设备。

[0034] 文献WO-A-2008/036374也是已知的，其描述了没有被预先免疫抑制的患者中干细胞移植的方法和组合物。

[0035] 以下科学文献也是已知的：

[0036] -撒帕斯J.H.、甘博柯瑞塔A.、波列特提尼M.、布罗克斯S.等人，“马周边血液干细胞扩增纯化及与临床应用》，80卷，2号，页面129-135，从网路上检索到的网址：http://hdl.handle.net/1854/lu-1215157；

[0037] -加伯等人，“臭氧治疗人类免疫缺陷病毒感染和免疫性疾病的治疗及血液的使

用:安全性和有效性的研究“,艾滋病期刊,1991年1月,页981-984,取自网址:http://graphics.tx.ovid.com/ovftpdfs/fpddncfbhadjcp00/fs047/ovft/live/gv039/00002030/00002030-199108000-00009.pdf;

[0038] -拉瑞尼等人,“臭氧作用分离周边血液单核细胞“,体外毒理学,Elsevier Science,GB,19卷,1号,2005年二月,页55-61。

[0039] 因此,需要完善从全血中扩增成体干细胞的方法,其可以克服现有技术至少一个的缺点。

[0040] 申请人已设计、测试和实施本发明以克服现有技术的缺点并获得上述和其它目的和优点。

[0041] 除非另有定义,本文和以下所使用的所有技术和科学术语具有与本申请所属技术领域的通常知识者所理解的相同的含义。即使与本申请所述方法和材料类似或等同的方法和材料可用于实施于本发明的试验中,但是下文中作为实例描述了方法和材料。在发生冲突时,以本申请为准,包括其定义。材料、法和实施例具有纯粹说明性的目的,并且不应被理解为具有限制性的。

发明内容

[0042] 本发明被阐述和表征在独立权利要求中,而从属权利要求描述本发明的其它特征或主要发明思想的变型。

[0043] 根据上述目的,一种克服现有技术的局限性并消除其中的缺陷的从血液中扩增成体干细胞的方法提供:

[0044] -使用MCSF对已经采集的一血液样品进行体外处理,以对所述血液样品的成体血液干细胞进行生长与去编程;

[0045] -对所述血液样品进行臭氧处理。

[0046] 因此,本发明得以从血液样品获得多能分化性成体干细胞。

[0047] 根据实施例的可能形式,所述方法是在所述MCSF处理之前进行所述血液样品的所述臭氧处理。特别地,所述MCSF处理可以在已进行所述臭氧处理的所述血液样品。

[0048] 根据实施例的其它可能形式,所述方法是在所述MCSF处理期间进行所述血液样品的所述臭氧处理。特别地,可以在所述MCSF处理期间进行所述血液样品的所述臭氧处理。

[0049] 根据实施例的其它可能形式,所述方法是在所述MCSF处理之后进行所述血液样品的所述臭氧处理。特别地,可以在所述臭氧处理之前对血液样品进行所述MCSF处理。

[0050] 根据实施例的其它可能形式与此处描述的所有形式的实施例组合,所述方法提供所述臭氧处理是通过向所述血液样品供应一氧-臭氧混合物。

[0051] 根据实施例的其它可能形式与此处描述的所有形式的实施例组合,所述方法提供所述血液及所述氧-臭氧混合物的一化学计量比为1:1。

[0052] 根据实施例的其它可能形式与此处描述的所有形式的实施例组合,所述方法提供一份量为大于或等于约1微克/升的氧-臭氧混合物至所述血液样品中。

[0053] 根据实施例的其它可能形式与此处描述的所有形式的实施例组合,所述方法提供至所述血液样品中的所述氧-臭氧混合物的所述份量被选择为约1微克/毫升至约42微克/毫升的一区间内。

[0054] 根据实施例的其它可能形式与此处描述的所有形式的实施例组合，所述方法提供用以向所述血液样品中加入一抗凝血剂。

[0055] 根据实施例的其它可能形式与此处描述的所有形式的实施例组合，所述方法提供用以使用一试剂盒收集血液，所述试剂盒包括一容器用以容纳所采集的血液，并至少含有所述MCSF物质。

[0056] 根据实施例的其它可能形式与此处描述的所有形式的实施例组合，所述方法提供被采集并被处理的所述血液样品的量介于0.2毫升至100毫升之间。特别地介于0.5毫升和50毫升之间，更特别地介于1毫升和25毫升之间，还更特别地介于2毫升和10毫升之间，更特别地介于2毫升和8毫升之间，更特别地介于3毫升和8毫升之间，更特别地介于3毫升和5毫升之间。

[0057] 根据实施例的其它可能形式与此处描述的所有形式的实施例组合，所述方法提供用以所述MCSF的一浓度被包含在约1纳莫耳至约55纳莫耳的一区间内。

[0058] 根据实施例的其它可能形式与此处描述的所有形式的实施例组合，所述方法提供用以使通过所述MCSF体外处理的一生长和去编程的时间介于4小时至96小时之间。

[0059] 此外，本文所述的其他形式的实施例有关于从血液中扩增成体干细胞的方法，其仅由以下步骤组成：

[0060] -使用MCSF对已经采集的一血液样品进行体外处理，以对所述血液样品的成体血液干细胞进行生长与去编程。

[0061] 本文所述实施例的形式进一步关于可通过根据本文的方法获得的含有成体干细胞的血液样品。

[0062] 根据实施例的可能形式，所述血液样品被提供用于治疗性处理及/或预防病症。

[0063] 根据实施例的可能形式，所述血液样品被提供用于治疗性处理，包括治疗性处理外部和内部损伤、肌腱损伤、韧带和软骨、骨折以及慢性及/或急性发炎病变的治疗及/或预防性治疗、神经和神经病变病理学、心脏病理学、肿瘤病理学、自体免疫病理学、眼科病理学和遗传源的病理学。

[0064] 根据实施例的可能形式，一血液样品被提供于一疗程中，所述疗程提供静脉内、动脉内或局部施用(例如皮下、肌内或组织内)经过MCSF处理和臭氧处理的所述血液样品。

[0065] 根据实施例的可能形式，一血液样品被提供于一疗程中，所述疗程提供静脉内或动脉内或局部施用(例如皮下、肌内或组织内)经过MCSF处理和臭氧处理的所述血液样品和患者全身的臭氧处理。

[0066] 本发明所述实施例的形式还关于一试剂盒，其包括至少一个容器，其含有根据本文的方法获得的含有成体干细胞的血液样品。

[0067] 参考以下描述，附图和所附权利要求将更好地解释本申请上述和其它方面的特征和优点。所述附图被整合并形成本发明的一部份，示出了本发明实施例的部分形式，并且用于共同描述本发明的原理。

[0068] 本说明书中描述的各种特征和特性可以在可能的情况下单独应用。在单独的特征，例如在所附从属权利要求中描述的特征和特性，目的是可以分案申请。

[0069] 应理解的是，在专利申请期间发现的已知任何特征或特性皆不应被要求保护，并且应该是声明放弃的客体。

具体实施方式

[0070] 现在将详细地参阅本发明实施例的各种形式。各实施例是为了说明本发明而提供的，并且不应理解为限制本发明。例如，所示出或描述的特征，因为它们是一实施例的一部分形式，可以在其他形式的实施例上采用或与产生关联，以产生另一种形式的实施例。应理解的是，本发明将包括所有这样的修改和变型。

[0071] 在描述这些形式的实施例之前，还必须说明，本说明书在其应用中不限于如附图和在以下描述中所描述的组件构造和设置细节。本说明书可以提供其他形式的实施例，并且可以以各种其他方式获得或执行。还必须说明，这里使用的措辞和术语仅用于描述的目的，不能被认为是限制性的。

[0072] 诸如“约”，“一般”，“基本上”等术语应被理解为修饰一组件或数值的功能性用语，而不是绝对的，并且不会出现在现有技术中。这些术语主要用于修饰，应由特定情况和用语定义，根据这些术语在特定领域中的共同用法来使用。它们应至少考虑到预期的实验误差、用于测量值的给定技术与预期的实验误差的程度。除非另有说明，否则在本说明书中，除非上下文另有所指，否则诸如“一”，“一个”和“一个”的单数形式应被理解为包括复数形式。

[0073] 除非另有说明，本说明书呈现的所有间隔值应理解为包括极值，包括介于两个间隔的数值之间的那些数值。

[0074] 除非另有说明，本说明书还包括从所描述的两个或更多个间隔的联合或重迭得到的间隔。

[0075] 除非另有说明，本说明书还包括可以从不同点获取的两个或更多个值的组合导出的间隔。

[0076] 除非另有定义，本文和以下所使用的所有技术和科学术语具有与本申请所属技术领域的通常知识者所理解的相同的含义。

[0077] 即使与本申请所述方法和材料类似或等同的方法和材料可用于实施于本发明的试验中，但是下文中作为实例描述了方法和材料。在发生冲突时，以本申请为准，包括其定义。材料、法和实施例具有纯粹说明性的目的，并且不应被理解为具有限制性的。

[0078] 本文所述实施例的形式涉及从血液中扩增成体干细胞的方法，其提供：

[0079] -使用MCSF对已经采集的一血液样品进行体外处理，以对所述血液样品的

[0080] 成体血液干细胞进行生长与去编程；

[0081] -对所述血液样品进行臭氧处理。

[0082] 特别地，血液可以是全血，更特别是周边全血。

[0083] 因此，本发明可从所采集的血液样品获得多能性成体干细胞。

[0084] 事实上，如WO-A-2008/034370和WO-A-2009/115522中所述，所获得的干细胞具有干细胞标记物CD90、CD90/34、CD34和CD117，它们还表现一些细胞内转录因子的特性，其与多能性特征(Sox2，Oct3/4和Nanog)强烈相关，并且在分裂或扩增后不失去其“本身”识别因子。干细胞施用于患者不会引起附带效应，例如排斥、感染、畸胎瘤的发生，它们能够在“体内”自行分化，因此表现得像多能性干细胞。

[0085] 所述“使用MCSF对已经采集的一血液样品进行体外处理，以对所述血液样品的成体血液干细胞进行生长与去编程”是指从患者取得的所述血液样品已经包含一定量的成体

干细胞，体外用MCSF处理，并通过对血液中白血球的细胞株进行去编程，以获得最初存在于血液样品中的成体干细胞的生长。

[0086] 此外，此处强调的是所述“臭氧处理”在这里是指用臭氧处理所述血液样品，即向血液样品中添加、输送、施用或混合臭氧或氧和臭氧混合物至/于所述血液样品中。

[0087] 臭氧(符号O_3)是氧的同素异形体，具有三原子分子和分子量为48。在正常条件下，臭氧显示为蓝色气体，具有刺鼻的气味，并且具有强的氧化能力。臭氧可以作为许多有机合成中的消毒剂，除臭剂，杀菌剂，杀菌剂或氧化剂。

[0088] 根据实施例的可能形式，在所述MCSF处理之前进行所述血液样品的所述臭氧处理。

[0089] 根据实施例的可能形式，在所述MCSF处理期间进行所述血液样品的所述臭氧处理。

[0090] 根据实施例的可能形式，在所述MCSF处理之后进行所述血液样品的所述臭氧处理。

[0091] 根据实施例的可能形式，所述方法提供用以向所述血液样品中加入一抗凝血剂。。肝素、EDTA或柠檬酸钠是可能的抗凝血剂的实施例。

[0092] 在一些形式的实施例中，根据本说明书的所述方法提供使用一试剂盒来收集血液，用以根据上述方法来产生多能性干细胞，所述试剂盒包括一容器，如试管，用以容纳所采集的血液样品，其可能含有所述MCSF物质，如果提供的话，包含所述的抗凝血剂。

[0093] 使用这种类型的试剂盒，可以收集全血，优选周边血，以便根据本说明书的上述方法快速开始干细胞的生长和生产，并因此使生产更快速。

[0094] 这里所述实施例的形式可以提供，根据本文所述方法采集和处理的所述血液样品的量，即，使用MCSF进行生长与去编程以及臭氧处理的血液样品的量，仅仅是数毫升，例如包括介于0.2毫升至100毫升之间，特别是介于0.5毫升和50毫升之间，更特别是介于1毫升和25毫升之间，更特别是介于2毫升和10毫升之间，更特别是介于2毫升和8毫升之间，更特别是介于3毫升和8毫升之间，仍更特别地介于3毫升和5毫升之间。

[0095] 其它变体被提供，采集和使用MCSF进行生长与去编程的血液样品的量为数百毫升，例如100毫升至1000毫升，特别是200毫升至600毫升，更特别是400毫升至600毫升，例如500毫升。血液样品可以被注射以在患者中循环(静脉内或动脉内)，其随后可以进行一全身臭氧处理。

[0096] 根据实施例的某些形式与此处描述的所有形式的实施例组合，所述方法提供可以使用任何类型的容器，所述全血和臭氧可以被引入其中，以及任何类型的可能的抗凝血剂和具有任何浓度的MCSF，例如在约1纳莫耳至约55纳莫耳的区间。例如2纳莫耳至50纳莫耳的子区间，或从5纳莫耳至45纳莫耳。其他实施例为例如2纳莫耳至20纳莫耳的子区间，或从8纳莫耳至15纳莫耳，或从8纳莫耳至10纳莫耳，或从10纳莫耳至12纳莫耳，或从12纳莫耳至35纳莫耳，或从15纳莫耳至30纳莫耳，或从20纳莫耳至25纳莫耳，或从35纳莫耳至55纳莫耳，或从40纳莫耳至50纳莫耳，或所有这些区间或子区间的组合，还包括未于此处明确指出的存在于区间或子区间中的所有整数或分数。

[0097] 根据实施例的某些形式与此处描述的所有形式的实施例组合，所述方法提供所述臭氧处理是通过向所述血液样品供应一氧-臭氧混合物。

[0098] 在可能的实施例中，发明人已经发现，供所述血液及所述氧-臭氧混合物的一化学计量比优选为1:1。

[0099] 在可能的实施例中，所述血液样品中所述氧-臭氧混合物的量可以大于或等于约1微克/升，特别是在约1微克/毫升至约42微克/毫升，更特别是在约5微克/毫升至约30微克/毫升，还更特别是在约10微克/毫升至约20微克/毫升。

[0100] 这里所述一些形式的实施例，提供了血液在这些条件下，优选在室温下，在一定时间后，优选在4小时和96小时之间，特别是在4小时和72小时之间，更特别地是在4小时和48小时之间，由此获得具有干细胞成分的所述全血，所述干细胞则由去编程获得，所述全血可以被全身性(静脉内或动脉内)或局部性地再次注入到或接近一患病组织。

[0101] 在可能的实施例中，所述方法提供用以使通过所述MCSF体外处理的一生长和去编程的时间介于4小时至96小时之间，特别是在12小时和72小时之间，更特别地是在12小时和36小时之间。

[0102] 在可能的实施例中，所述方法提供用以使通过所述MCSF体外处理的一生长和去编程的时间介于24小时至96小时之间，特别是在24小时和72小时之间，更特别地是在24小时和36小时之间。

[0103] 在可能的实施例中，所述方法提供用以使通过所述MCSF体外处理的一生长和去编程的时间介于48小时至96小时之间，特别是在48小时和72小时之间，更特别地是在48小时和60小时之间。

[0104] 发明人已假设，使用通过所述MCSF体外处理的生长和去编程的血液样品经过臭氧处理后会刺激成体干细胞的扩增和去编程的过程，使得几个小时后存在大量有用的成体干细胞。

[0105] 发明人已经发现，使用所述MCSF体外处理的持续时间包括在约4至96小时之间，可以通过鉴定干细胞标记物CD90、CD90/34、CD34和CD117来使干细胞的生长稳定化。这被认为是最理想条件。

[0106] 发明人还发现，当所述MCSF的浓度为约1纳莫耳至约55纳莫耳时，细胞维持多能性成体干细胞的表现型。已经观察到，使用浓度大于55纳莫耳(例如70纳莫耳)的所述MCSF，在24小时后已经不再维持多能性成体干细胞的表现型。

[0107] 本文所述方法的所述实施例的形式不仅可以提供所述容器使所述MCSF存在于其中并且使的成体干细胞产生扩增，而且可以使用一第二容器来容纳如上所述所获得的干细胞，例如在静脉内或动脉内使用的情况下，以及可能包括不同尺寸的一第三容器，用于局部使用。被产生和被保存在所述容器中的所述干细胞可以立即使用，或者可以保存，例如在液氮中，以根据后续需要使用。

[0108] 根据本文，所述臭氧处理可以在任何一个所述容器中并在所述MCSF处理使干细胞扩增和去编程之前、期间或之后进行所述血液样品的所述臭氧处理。

[0109] 根据可能形式的实施例，刚刚从患者取得的血液可以立即注入具有所述抗凝血剂和所述MCSF的试管中。所述抗凝血剂可以停止凝血的发生，而同时存在的所述MCSF可以使扩增过程快速开始并保证使治疗患者的起始时间最小化。此外，所述样品已根据本文进行臭氧处理。

[0110] 根据其它可能形式的实施例，可以将所述抗凝血剂加入取自于患者的血液中，以

停止血液的凝结，而所述血液被用于进行不改变其产生干细胞的能力的一保存过程。当需要时，从保存的地方取得所述血液，并如上所述进行干细胞的扩增步骤，即向其中加入所述MCSF物质，快速获得必要数量的干细胞。此外，在这种情况下，所述样品也根据本文进行臭氧处理。

[0111] 根据本文的方法可以克服现有技术的缺点并且带来许多优点。

[0112] 例如，本发明可以制备和处理全血，尽可能的简化了治疗，避免了实验室中对任何类型的细胞所需要进行的处理。事实上，本发明排除了进行处理的必要性或可能性，例如消除红血球，或相较于另外两种干细胞的组成-造血细胞和间质细胞-并相对于血液的所有其它成分纯化干细胞以获得更大量的多能性干细胞，或将其培养或分化成其他类型细胞。这些额外的处理会压缩干细胞的取得，使的干细胞虽然存活，但是具有减少的表现和分化潜力。相反的，本发明避免了所有对所述血液样品进一步工序和处理的需要，使得存在于全血中的成体干细胞能更佳地保持其特性，因为它们不受压力，并且因为在血液中，他们可以受益于其他元素的存在而有助于再生过程。

[0113] 发明人已经发现，对于无法治愈的病症，例如心肌的退化，以通过从血液获得的去编程的干细胞治疗，会具有良好的结果，如WO-A-2008/034370中描述的，已得知在全血中具有去编程的干细胞的会产生决定性地更良好的演变，而不需要如上所述的附加操作和处理，因此采取一仅由以MCSF进行体外处理以进行生长与去编程的方法，而不包括纯化、后续扩增的额外工序步骤，或其可包括以MCSF进行生长与去编程以及臭氧处理。

[0114] 根据本文所述的方法制备干细胞可以避免复杂的实验室设备的需要，使得任何医院、诊所或医生可以使用具有含有优选最小量MCSF的简单试管制备干细胞。换句话说，使用一单一试管，其中放入几毫升具有MCSF的血液样品，可以治疗和甚至改善严重的病症，例如心脏病发作的后遗症或帕金森氏症。因此，这些结果支持这样的事实，即根据实施例的可能形式，从血液中扩增成体干细胞的方法也可以仅仅包括以对一血液样品的成体血液干细胞进行生长与去编程，并使用MCSF进行体外处理所述血液样品。

[0115] 此外，在一些形式的实施例中，臭氧对所述血液样品是额外或有帮助的，源自于对所述血液样品进行臭氧处理，可以对成体干细胞的去编程和所获得的干细胞的质量及其表现和分化潜力具有催化效应，使得其积极地影响受损组织的细胞再生，并且还进一步确保产品是无菌的。事实上，正如前所述，臭氧可以作为消毒剂或杀菌剂。

[0116] 实验例

[0117] 发明人构思了用MCSF和臭氧处理的想法，即，通过在体内进行一些体内实验证明臭氧在催化剂的催化作用下，添加臭氧或氧和臭氧混合物以共同与MCSF进行扩展和“去编程”，一些体内的实验证明臭氧对于从根据本文的生长步骤所获得的去编程干细胞在进行的治疗中具有催化作用。

[0118] 系统性臭氧化

[0119] 一匹15岁的马由于前右表面屈肌腱的慢性近端病变，导致其跛行18个月(如图1)而由竞赛中退出。它在6个月前已经被“炙烧”了，如同在几年前的常见做法(如图2)。这无法产生任何积极的治疗效果，并且实际上引起了疤痕性硬化。这匹马处于一整体较差的状况，并且炙烧在较年长的马其难以治愈的敏感区域中导致近端损伤(如图3)。炙烧产生了疤痕，甚至连每6周以由具有MCSF去编程处理而得到扩增的干细胞施予局部注射进行三次皆无法

获得任何改善。即，在超音波治疗或跛行复健中甚至没有最小的改善。在注射扩增的干细胞5个月后，这匹马可以开始工作，但，但病变开始恶化(参见图4和5)。

[0120] 因此，由于炙烧引起的肌腱硬化的情况下，局部和全身接种取自血液使用具有MCSF来扩增获得的去编程处理的干细胞，以指定的频率进行了三次接种后并没有帮助。

[0121] 在第三次接种后15天，用含有120cc，10微克/毫升的氧-臭氧混合物的半升血液通过自动输血加上臭氧进行全身治疗。

[0122] 令人惊奇的是，发明人在实验中发现，通过系统性引入臭氧，即通过用富含臭氧的自体血液输血，给患者的血液充氧，仅在十天/十五天内就可以观察到臭氧的催化作用，因为超音波显示病变消退，马不再跛脚(如图6)。其病理组织，其先前已经接受接种干细胞的治疗，所述干细胞来自血液由MCSF扩增，所述干细胞激活损伤表面屈肌腱的组成，通过臭氧对再生过程的催化作用而治愈。

[0123] 臭氧治疗三个月后，心脏超音波分析清楚地显示病变已治愈(如图7和图8)。

[0124] 作为实际治愈的证据，在积极和长期的影响下，马工作了15天并被派去竞赛。超音波显示的改善是真实的，而马持续定期的在每月平均有6次比赛，其职业生涯的跳高竞赛达一米六十，直到18岁。事实上，马持续竞赛了额外三年且没有任何复发，参与跳高竞赛在16岁(如图9)、17岁(如图10)和18岁以下(如图11)。

[0125] 臭氧对通过用MCSF扩增和去编程从成体血液获得的干细胞的催化作用通过上述实验描述如上。

[0126] 在这种情况下，臭氧疗法作为催化剂被引入许多用从血液扩增和使用MCSF去编程而获得的干细胞所治疗的患者。

[0127] 对从血液获得的干细胞在体内的作用可以在体外假设有相同的催化效果，即在用MCSF处理之前、之后或期间在试管中的血液中可以假设有相同的催化效应。

[0128] 体外臭氧化

[0129] 获得结果之后，然后发明人还设想了将臭氧直接引入含有血液和MCSF的容器中的新的和创新的想法，以便催化所述去编程过程并给予通过以下方式获得的干细胞更大的能量-分化潜力：通过使用MCSF进行生长和去编程。

[0130] 发明人在体外和体内研究了臭氧对血液的影响(参见上文)。

[0131] 当它在血液中起泡时，氧-臭氧混合物在几秒钟内与细胞膜的磷脂层的脂肪酸反应。

[0132] 由于臭氧O_3与不饱和脂肪酸的双键的这种反应结果，磷脂链断裂并以过氧化物的形式进入红血球内，影响红血球内的反应，但不超过细胞膜。但是，由于过氧化物的高细胞毒性力，红血球立即反应，通过谷胱甘肽系统激活解毒机制。这样消耗的谷胱甘肽通过糖酵解路径，即磷酸戊糖路径重建。

[0133] 因此，血红蛋白(Hb)被保护免于氧化成变性血红蛋白，保持氧合血红素的功能，使的氧O_2得以传输。

[0134] 关于红血球的功能，也必须考虑2,3-脱氧甘油酸(2,3-DPG)发挥的特殊作用。2,3-DPG存在于红血球中，其功能是调节血红蛋白对氧的亲和力。特别是对于臭氧，通过周边区域的红血球产生氧释放作用。

[0135] 另一个有趣的作用是由诱导干扰素引起的臭氧免疫刺激效应。在免疫活性细胞

中，T4淋巴细胞或辅助细胞具有关键作用，因为由巨噬细胞活化，它们产生特定物质、白血球介素、生长因子等，其作为细胞间信使并促进细胞之间的通信。

[0136] 在被白血球介素活化后，巨噬细胞产生肿瘤坏死因子(TNF)，其用作测量免疫活性细胞的活性的标准。

[0137] 因此，臭氧直接作用于白血球细胞株]，并间接地通过在红细胞上产生的反应而起作用，作为对血液细胞株的功能的催化剂，并因此也对由以下活化的去编程过程产生作用：在白血球细胞株上的MCSF。

[0138] 关于血液与氧-臭氧混合物的比例，发明人发现所述比例优选为一化学计量比为1:1。

[0139] 此外，发明人发现，血液样品中氧-臭氧混合物的量可以大于或等于约1微克/升，特别是在约1微克/毫升至约42微克/毫升，更特别为约5微克/毫升至约30微克/毫升，还更特别为约10微克/毫升1至约20微克/毫升。一实例可提供约12微克/毫升的氧-臭氧混合物的量。另一个实例可以提供约15微克/毫升的氧-臭氧混合物的量。另一个实例可以提供约18微克/毫升的氧-臭氧混合物的量。

[0140] 心肌退化性病变的病理治疗实例

[0141] 发明人进行实验以显示从在心肌退化性病变中施用的通过臭氧处理全血中去编程所获得的干细胞的临床功效。

[0142] 图12和图13是包含收缩功能的重要参数的两个表，用于相较于使用如WO-A-2008/034370中所述获得的干细胞在11只狗的心脏功能不全的治疗上的结果和使用方法，即使用MCSF和臭氧处理(臭氧处理的全血)进行生长和去编程。通过比较参数，相较于WO-A-2008/034370，使用本文所述的方法可以清楚地看出增加收缩能力的改善，特别是这种改善已经发生在短期内(控制在45天)。

[0143] 特别地，发明人治疗了三只类似年龄(6-7岁)的狗(1只雄性大丹犬，1只雄性纽芬兰犬，一只雌性杜宾犬)，其受原发性扩张型心肌病变的影响(其病理为导致收缩功能逐步丧失，目前没有任何类型的治疗使其恢复的可能性)，并严重抑制收缩功能(FS 15-20％)。上述狗被施予扩增的干细胞治疗，所述干细胞用MCSF去编程，来自臭氧处理后的全血，并且在心脏区域的静脉内和皮下未施用任何纯化手段。心脏超音波图像显示在图14及图16，其显示了在治疗之前两个不同的患者(雌性杜宾犬-Chanel和雄性纽芬兰犬Leonardo，如图13中的表所示)的情况，其中可以看到收缩功能参数：DsVSx的极端负值(收缩期直径左心室)-FS％和FE％。

[0144] 相反，从图15和17中的心脏超音波图像可以看出，对于相同的两个患者，治疗后发明人发现通过线性和容积评估(Teicholz&Simpson方法)测量收缩功能参数DsVSx(左心室的收缩直径)的FS％和FE％增加，此效应在短期内更明显(相对于在先前用从血液获得的纯化干细胞治疗的患者类型中，在相同时间区段获得的结果，控制在45天，如WO-A-2008/034370)。

[0145] 另外关于由心肌病变病症对ISACHS类心脏衰竭的一般状况和临床评价所引起的影响，申请人发现其改善快速许多，并伴随着食欲的恢复、显著的体重增加和1个月后的物理表现和抗压能力相当大的改善。

[0146] 因此，发明人得出结论，从血液中扩增成体干细胞的方法，包括通过根据本发明的

MCSF进行的生长和臭氧处理，使的由于病变而产生缺陷的心肌其收缩性能够恢复。目前，使用现有技术疗法不具有恢复的可能性。事实上，在兽医领域，通过再生医学已经尝试了其他决议，但是甚至将不同来源(骨髓、脂肪)的间质干细胞接种到心肌本身也无法得到显著的治疗结果。

[0147] 通过从血液获得的干细胞，其具有多能性成分使得它们能够与肌肉和其支配的神经相互反应，随着时间逐渐改善，结果是正面的。然而，最令人惊讶的效果在于将来自全血且被臭氧处理和并未被纯化的成体干细胞施用于心脏区域中的静脉内和皮下中发现，相较于纯化的细胞，改善了治疗结果，并在更短的时间内获得了更好的结果。

[0148] 心脏超音波图像在图14、图15、图16和图17，证明了所获得的改进有多么显著。

[0149] 显然，在不脱离本发明的领域和范围的情况下，可以对如上所述的从全血中扩增成体干细胞的方法进行修饰和/或增加内容。

[0150] 同样清楚的是，尽管本发明已通过一些具体的实施例描述说明，本领域的技术人员一定能实现其他等效形式的从全血中扩增成体干细胞的方法，所具有的特征如在权利要求中阐述，并均包括于本发明的范围内。

图1

图2

图3

图4

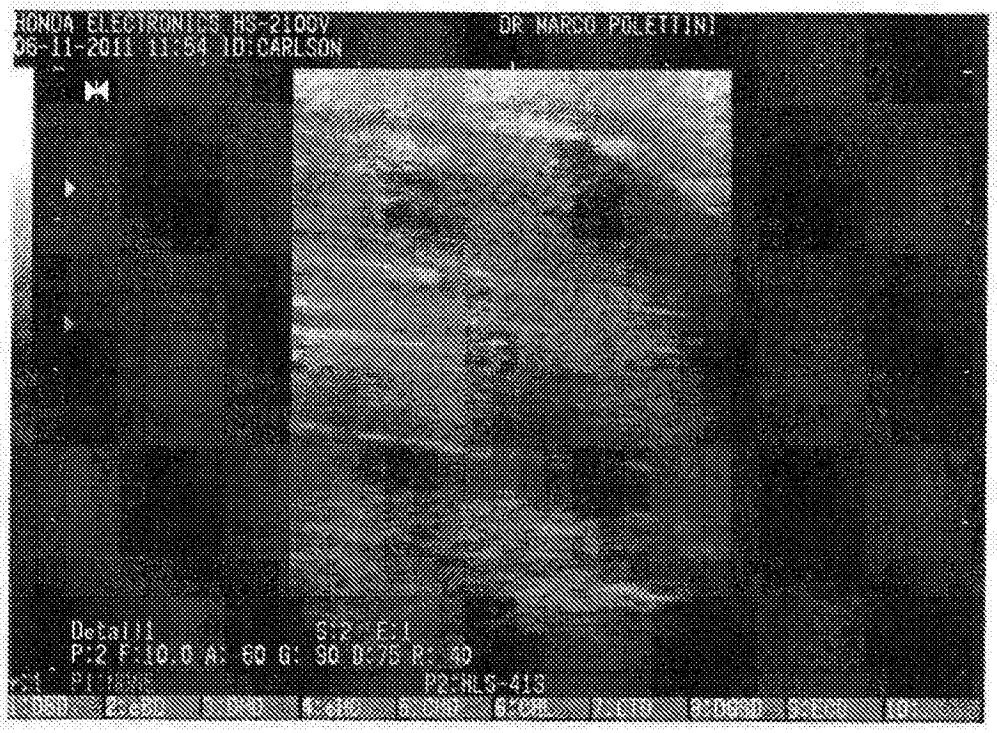

图5

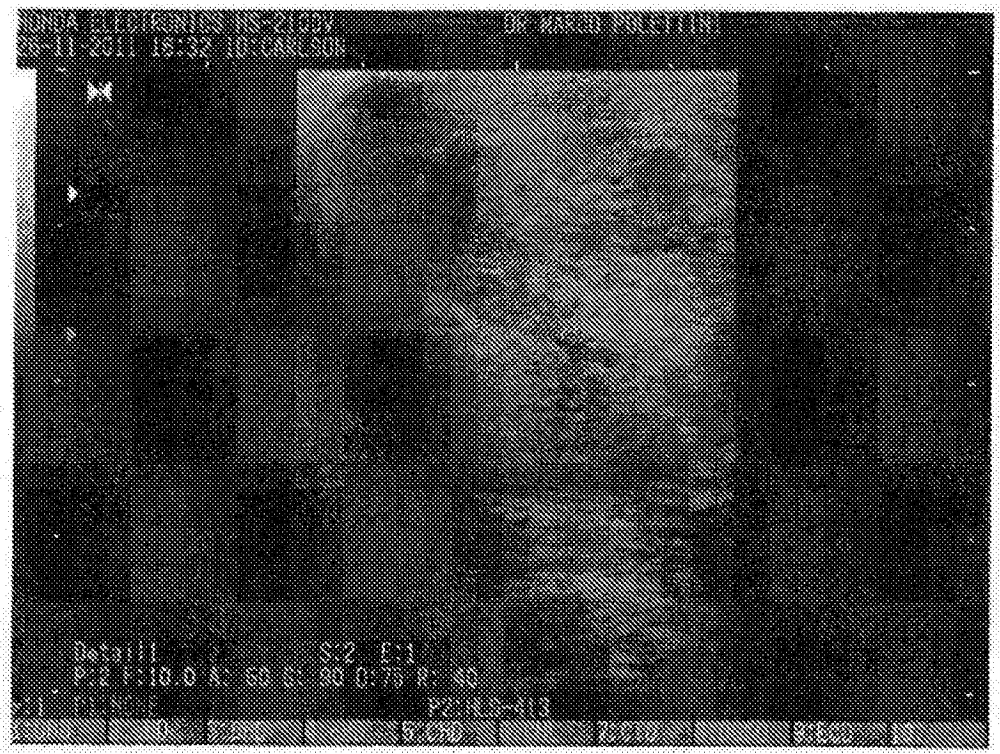

图6

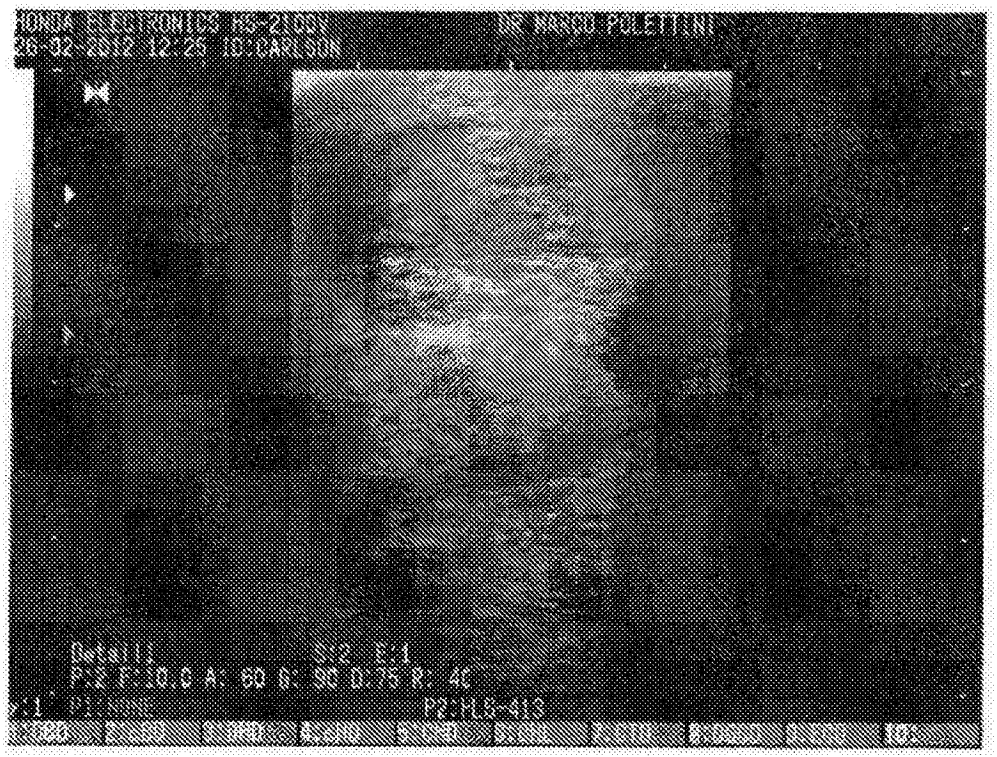

图7

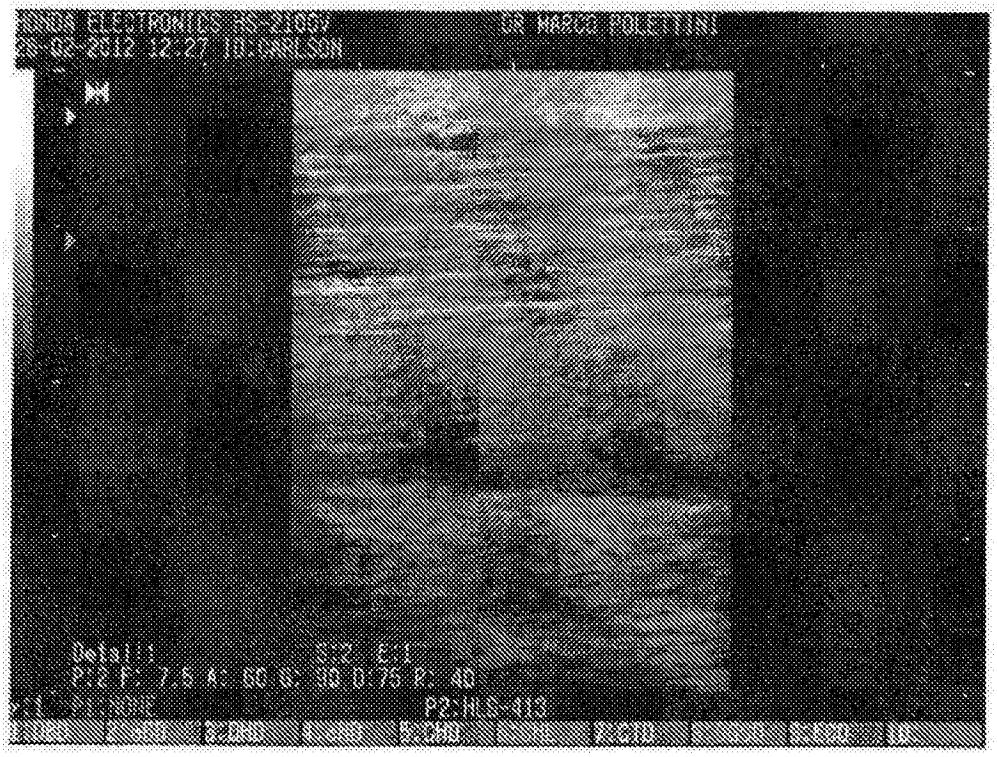

图8

图9

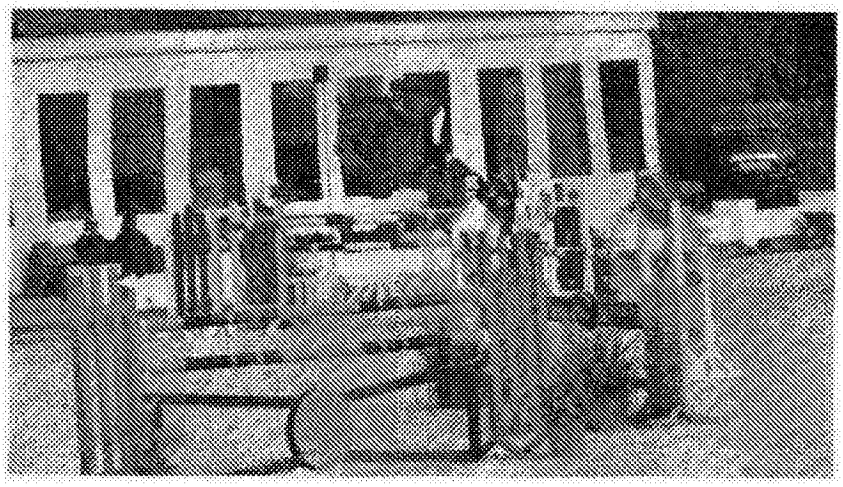

图10

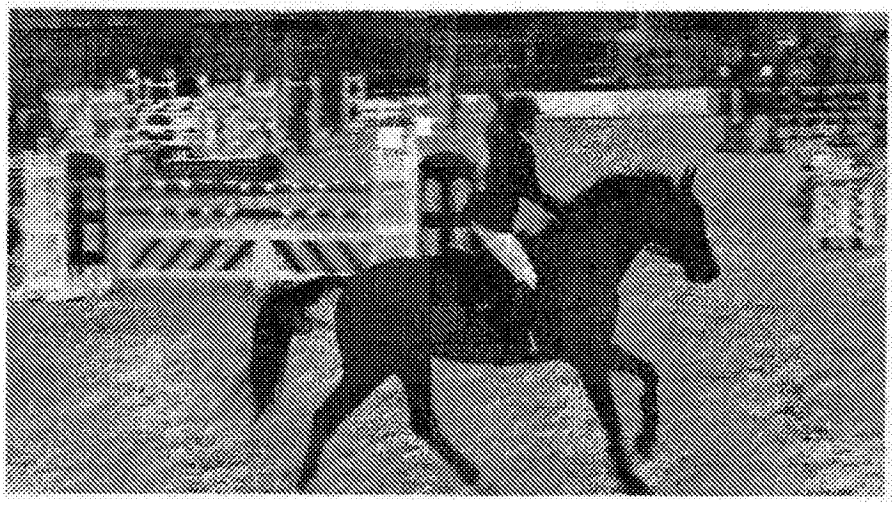

图11

	现况			120天			1年后		
病患	FS FE %	心功能不全类型	体重	FS FE %	心功能不全类型	体重	FS FE %	心功能不全类型	体重
米罗	16 29	IV	54公斤	18 34	II/III	59公斤	20 40	II	67公斤
史科比	23 44	III	56公斤	24 46	II	62公斤	28 54	II	66公斤
索尔	20 42	III/IV	60公斤	24 47	II/III	63公斤	26 51	II	69公斤
葛瑞夫	17 33	IV	61公斤	21 41	III	65公斤		死亡	
伊格尔	18 38	III	56公斤	18 39	III	58公斤		未进行	
维琴察	16 31	IV	44公斤	18 36	III	47公斤		死亡	
锡利瑞	23 45	I	53公斤	24 46	I	53公斤		未进行	
杜宾		III			II			死亡	
杜宾	25 52	II	34公斤	25 52	I	36公斤	26 52	I	36公斤
史特富		IV			III			未进行	
达尔马提雅	19 39	IV	23公斤	22 45	III	26公斤	28 53	II	28公斤

图12

	现况				45天			
	FS FE	左心室收缩直径	心功能不全类型	体重	FS FE	左心室收缩直径	心功能不全类型	体重
杜宾香奈儿	30% 15%	52毫米	III	33公斤	58% 29%	39毫米	I	38公斤
大丹 史科比	50% 24%	66毫米	I	59公斤	60% 30%	61毫米	0	64公斤
纽芬兰 李察纳多	27% 13%	72毫米	IV	60公斤	50% 25%	62毫米	II	68公斤

图13

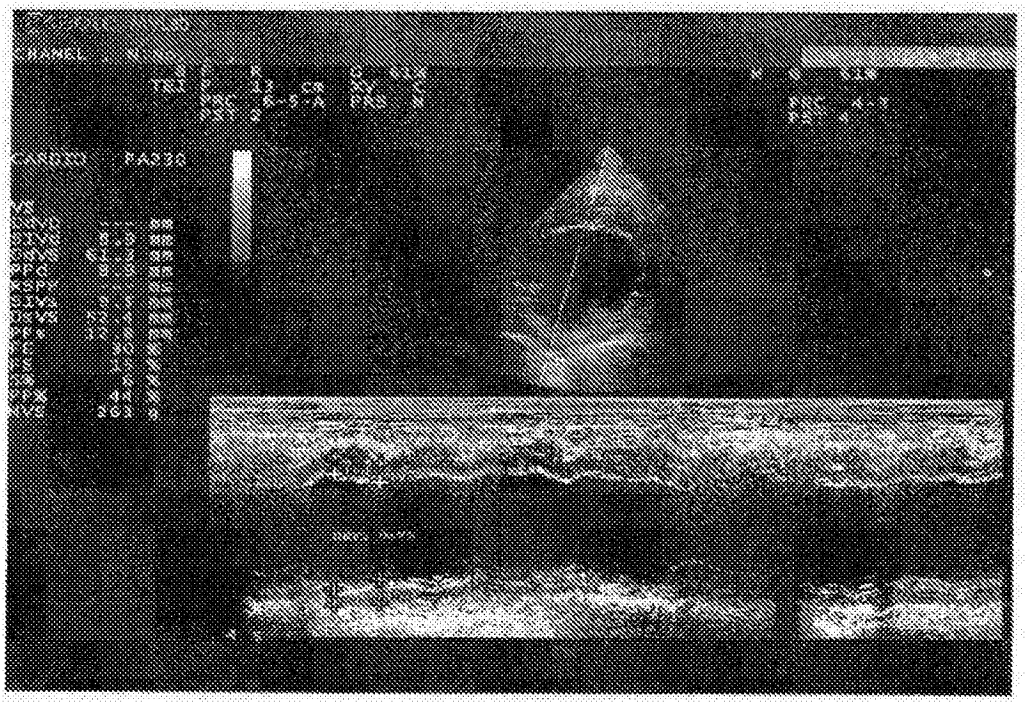

图14

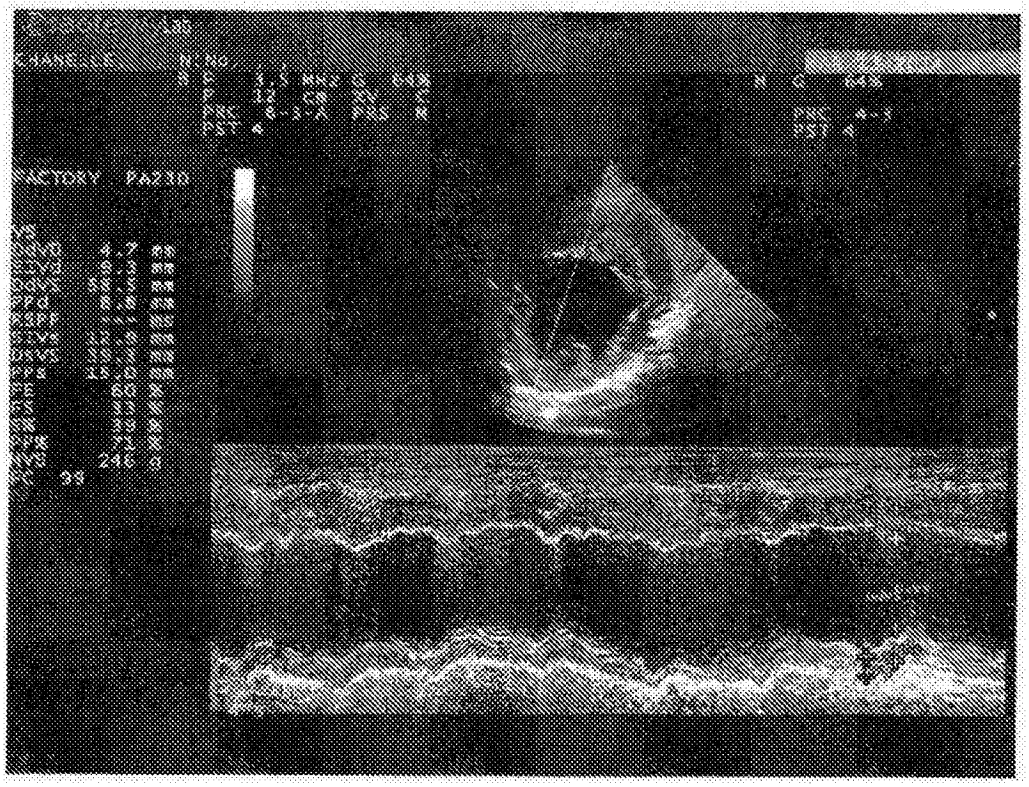

图15

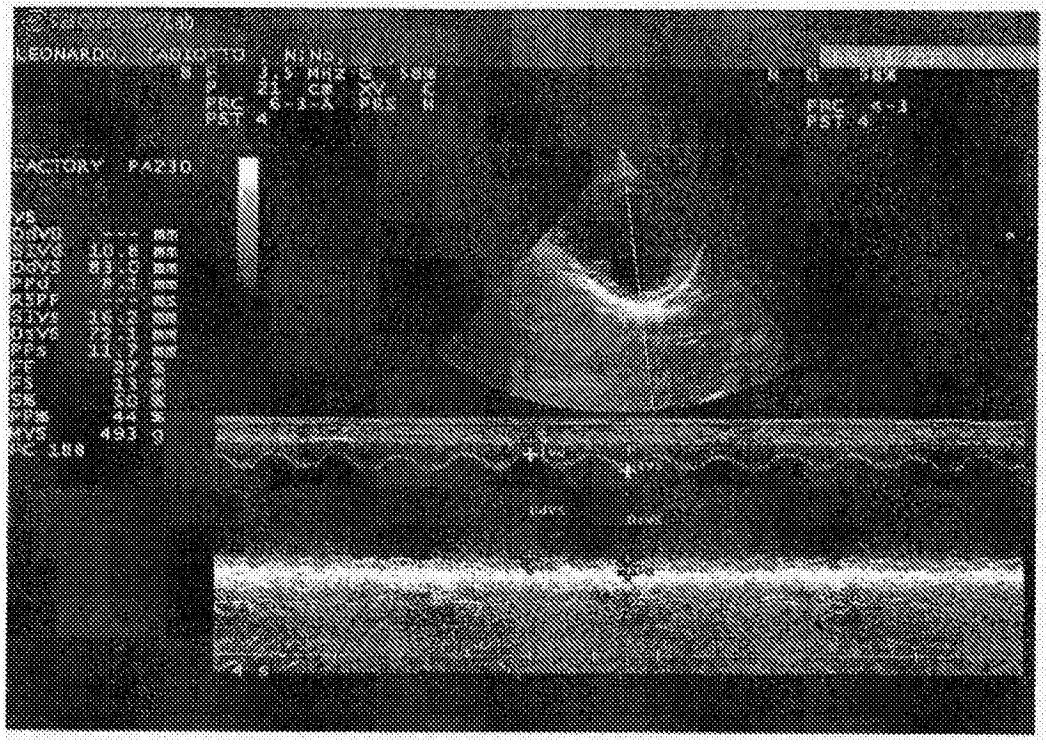

图16

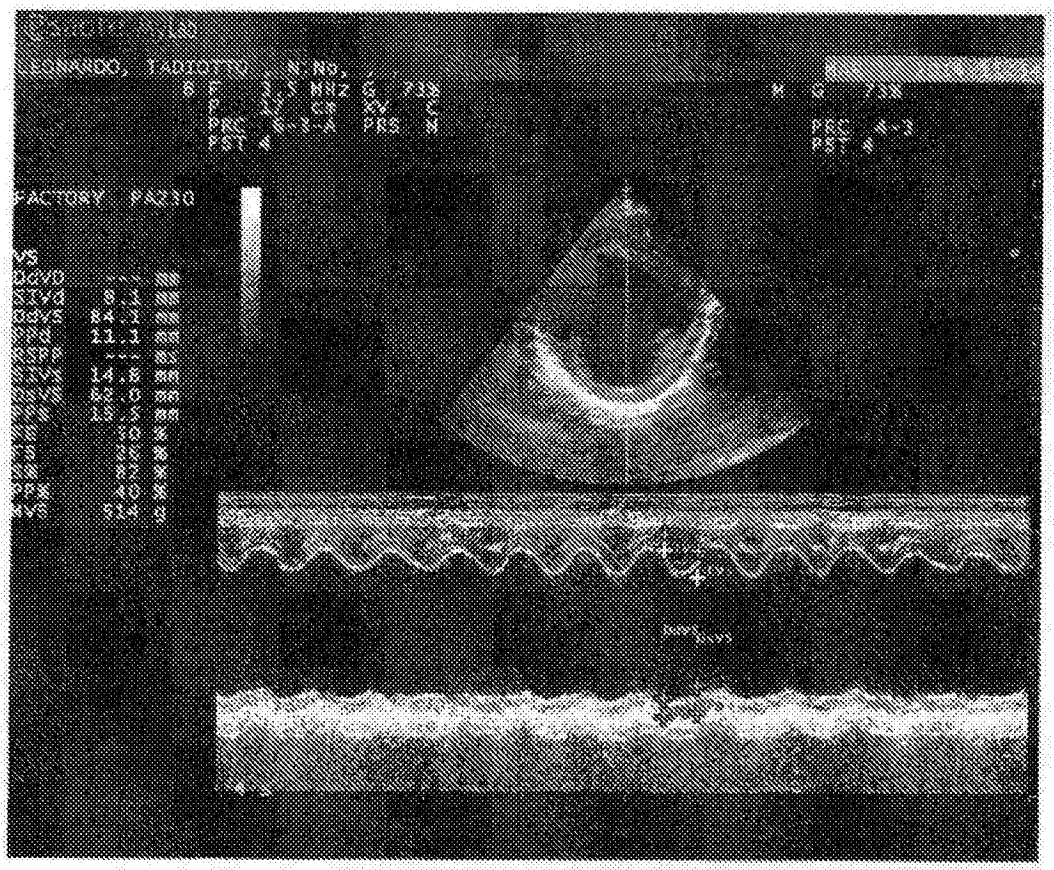

图17