



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112501118 A

(43) 申请公布日 2021.03.16

(21) 申请号 202011443538.1

(22) 申请日 2011.08.12

(30) 优先权数据

61/373,212 2010.08.12 US

(62) 分案原申请数据

201180049420.3 2011.08.12

(71) 申请人 菲特治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 丹尼尔·肖马克

普拉蒂克·穆尔塔尼

卡罗琳·德斯邦特斯

大卫·L·罗宾斯 保罗·格雷森

约翰·门德雷恩

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.

G12N 5/0789 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 13/02 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

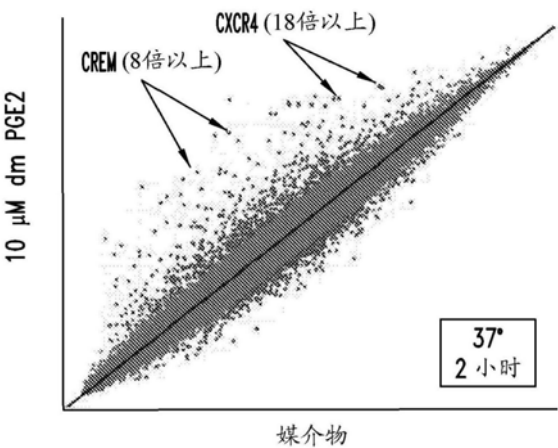
权利要求书2页 说明书58页 附图31页

(54) 发明名称

改进的造血干细胞和祖细胞疗法

(57) 摘要

本发明提供了改进的用于细胞治疗的方法。特别地,本发明提供具有改进的植入和归巢性质的经改变的造血干细胞和/或祖细胞的治疗组合物,以及制备所述治疗组合物的方法。本发明进一步提供了改善造血干细胞和祖细胞移植的功效的方法,包括向需要造血系统重建的个体中植入所述治疗组合物。



1. 含有细胞群体的治疗组合物,所述细胞群体包含至少约一百万个人造血干细胞或祖细胞,其中:

a) 所述造血干细胞或祖细胞已在约37℃的温度下与增加细胞中CXCR4基因表达的试剂离体接触;

b) 与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,所述造血干细胞或祖细胞中CXCR4的基因表达增加至少约2倍;并且

c) 其中所述治疗组合物包括准备好给予患者的造血干细胞或祖细胞的治疗上可接受的无菌悬浮液。

2. 含有细胞群体的治疗组合物,所述细胞群体包含至少约一百万个人造血干细胞或祖细胞,其中:

a) 所述造血干细胞或祖细胞已在约37℃的温度下与16,16-dmPGE₂离体接触约2小时的时间;

b) 所述造血干细胞或祖细胞包含CD34⁺细胞集合,其中与非接触的CD34⁺细胞中CXCR4的表达相比,所述CD34⁺细胞集合中CXCR4的基因表达增加至少约3倍;并且

c) 其中所述治疗组合物包括准备好给予患者的造血干细胞或祖细胞的治疗上可接受的无菌悬浮液。

3. 含有单体分型的细胞群体的治疗组合物,所述细胞群体包含至少约一百万个人造血干细胞或祖细胞,其中:

a) 所述造血干细胞或祖细胞已在约37℃的温度下与增加细胞中CXCR4基因表达的试剂离体接触;

b) 与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,所述造血干细胞或祖细胞中CXCR4的基因表达增加至少约2倍;并且

c) 其中所述治疗组合物包括准备好给予患者的造血干细胞或祖细胞的治疗上可接受的无菌悬浮液。

4. 制备治疗组合物的方法,其包括:在足以改变造血干细胞或祖细胞的基因表达的条件下,使包含造血干细胞或祖细胞的细胞群体在约37℃的温度下与一种或多种试剂离体接触,以得到包含基因表达标签的造血干细胞或祖细胞,所述基因表达标签包括与非接触的造血干细胞或祖细胞相比表达增加的一个或多个以下基因:透明质酸合成酶1 (HAS1), GTP-结合蛋白GEM (GEM), 双特异性蛋白磷酸酶4 (DUSP4), 双调蛋白 (AREG), 核受体相关蛋白1 (NR4A2), 肾素 (REN), cAMP反应元件调节因子 (CREM), 胶原蛋白I型α1 (COL1A1), Fos相关抗原2 (FOSL2) 或CXC趋化因子4 (CXCR4)。

5. 增加造血干细胞和祖细胞在个体中植入的方法,包括:

(a) 在约37℃的温度下,使包含造血干细胞和祖细胞的细胞群体与选自以下的一种或多种试剂离体接触:前列腺素E₂ (PGE₂) 和具有dmPGE₂活性的试剂;

(b) 洗涤所述细胞群体,以基本上除去所述试剂;和

(c) 将所述细胞群体给予个体;

其中与非接触的造血干细胞和祖细胞相比,在足以增加所述接触过的造血干细胞和祖细胞在所述个体中的植入的条件下,使所述细胞群体与所述试剂接触。

6. 治疗需要造血系统重建的个体的方法,包括:

(a) 选择需要造血系统重建的个体;

(b) 在约37℃的温度下,使包含造血干细胞和祖细胞的细胞群体与选自以下的一种或多种试剂离体接触:前列腺素E₂ (PGE₂) 和具有dmPGE₂活性的试剂;

(c) 洗涤所述细胞群体,以基本上除去所述试剂;和

(d) 将所述细胞群体给予所述个体;

其中与非接触的造血干细胞和祖细胞相比,在足以增加所述接触过的造血干细胞和祖细胞在所述个体中的植入的条件下,使所述细胞群体与所述试剂接触,从而治疗所述需要造血系统重建的个体。

7. 制备用于增加造血干细胞和祖细胞体内增殖的细胞群体的方法,包括:在约37℃的温度下,使包含造血干细胞和祖细胞的细胞群体与选自以下的一种或多种试剂离体接触:前列腺素E₂ (PGE₂) 和具有dmPGE₂活性的试剂;其中与非接触的造血干细胞和祖细胞相比,在足以增加所述接触过的造血干细胞和祖细胞体内增殖的条件下,使所述细胞群体与所述试剂接触。

8. 增加造血干细胞和祖细胞在个体体内增殖的方法,包括:

(a) 在约37℃的温度下,使包含造血干细胞和祖细胞的细胞群体与选自以下的一种或多种试剂离体接触:前列腺素E₂ (PGE₂) 和具有dmPGE₂活性的试剂;和

(b) 将所述细胞群体给予个体;

其中与非接触的造血干细胞和祖细胞相比,在足以增加所述接触过的造血干细胞和祖细胞在所述个体体内增殖的条件下,使所述细胞群体与所述试剂接触。

9. 如权利要求1所述的治疗组合物,其中与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,所述造血干细胞或祖细胞中CXCR4的基因表达增加至少约3倍。

10. 如权利要求1所述的治疗组合物,其中所述增加造血干细胞或祖细胞中CXCR4基因表达的试剂选自:cAMP类似物或增强剂,Gα-s激活剂,和选择性地结合PGE₂ EP₄受体的化合物。

改进的造血干细胞和祖细胞疗法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e),要求2010年8月12日提交的美国临时专利申请第61/373,212号的权益,通过引用将其整体并入本文。

[0003] 发明背景

技术领域

[0004] 本发明大体涉及细胞疗法。具体地,本发明涉及改进的用于造血系统的细胞疗法。更具体地说,本发明涉及改进的用于重建个体的造血系统的方法。

[0005] 相关领域描述

[0006] 再生医学是开发治疗以修复或恢复体内特定的细胞,组织和器官的医学研究领域。再生疗法所追求的一个方面是使用造血干细胞移植治疗越来越多的癌症和退行性疾病。根据全国骨髓捐献计划®(NMDP),估计全球每年进行45,000至50,000例造血干细胞移植(骨髓、外周血干细胞(PBSC),或脐带血移植),其中包括约20,000例异体造血干细胞移植,以治疗患有危及生命的恶性及非恶性疾病的患者(Horowitz MM.Uses and Growth of Hematopoietic Cell Transplantation.In:Blume KG,Forman SJ,Appelbaum FR, eds.Thomas'Hematopoietic Cell Transplantation.3rd ed.Malden,Mass:Blackwell; 2004:9-15)。此外,每年约4,800名患者通过NMDP使用无关系的捐献者或脐带血单元进行移植。

[0007] 因为开始运营于1987年,NMDP已协助超过38,000例骨髓和脐带血移植,给予患者第二次生命的机会。传统上,来自骨髓的造血干细胞移植用于治疗患有不同类型的白血病,贫血,淋巴瘤,骨髓瘤,免疫缺陷性疾病和实体瘤(如乳腺癌和卵巢癌)的患者。然而,骨髓移植对于捐献者是痛苦的,而且,找到必要程度的HLA捐献者匹配组织,尤其是在特定的民族群体中,通常是困难和耗费时间的。此外,异体骨髓移植往往伴随显著的移植物抗宿主病(GVHD)发病率。

[0008] 在许多情况下,接受造血干细胞移植的患者患有危及生命的晚期癌症或其他代谢性疾病。因此,寻找具有适当匹配的HLA组织类型的捐献者的任何延误都可能危及患者的结果,往往造成死亡。因此,最近NMDP无关系的捐献者移植的数量显著增长,仅2009年有4800多例,相比之下2008年有4,300例。此外,使用无关系的捐献者或脐带血单元的异体移植的比例稳步提高。在2006年,全球范围内进行的超过三分之一的异体移植使用的是无关系的捐献者。2009年,75%的成年捐献者——超过2,800人——通过NMDP向患者捐献外周血干细胞。2009年,NMDP促成了1,056例脐带血移植,这占2009年NMDP移植总数的22%。这与2008年相比增长18%,2008年NMDP促成898例脐血移植。

[0009] 已经使用脐带血进行了异体造血干细胞移植,因为血液更容易得到,接受者患移植物抗宿主病的风险较低,对于捐献者是无痛的,并且捐献者和接受者之间的HLA组织类型匹配要求更低。

[0010] 然而,发现利用人类脐带血移植存在几个缺点,包括脐带血移植的造血干细胞和

祖细胞可能不能植入的风险。

[0011] 使用脐带血移植的另一个缺点是,脐带血细胞植入患者需要更长的时间,将患者置于感染的高风险中。此外,脐带血移植是较新的治疗方法。因此,临床医生不倾向于使用它们,因为他们不能获得与做骨髓移植一样多的关于脐血移植后患者的长期结果的信息。此外,脐带血移植也具有与骨髓和外周血移植全部相同的风险。

[0012] 此外,使用脐带血作为细胞源用于人血移植的重大障碍是,在单个单位的脐带血中常常没有对于患者的个头而言足够的或足以治疗特定适应症的造血细胞。因为单个脐带的大小(即,单个脐带中造血细胞的数目)往往不足以血液移植,可能需要两个脐带,这增加了GVHD和植入失败的风险。因此,已经尝试许多方法以在离体环境中扩增分离的移植植物中脐带血中的人造血干细胞和祖细胞的数量,这允许使用单个脐带移植,但这些努力鲜有成功。

[0013] 因此,没有实现修复或再生的造血干细胞治疗的承诺,在某种程度上是由于有前途的动物模型方案向人临床实践转换的困难,现有的临床治疗方案的低功效,并发症(如移植植物抗宿主病)的高发生率,和相对较少的充分匹配的捐献者。

[0014] 因此,现有技术需要可以提高造血干细胞和祖细胞向骨髓中植入的功效的方法,从而扩大造血干细胞移植的适用性和增加造血干细胞移植的成功。本发明提供了这些问题的解决方案,并进一步提供对于本领域技术人员而言将是显而易见的其他的用途和优点。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明提供了改进的造血干细胞和祖细胞移植方法。此外,本发明提供了具有增加的植入/植入潜力和/或增加的增殖的造血干细胞或祖细胞的优良制剂。在多个实施方案中,细胞在体内增殖或扩增。在多个其它实施方案中,将细胞离体处理,给予个体并在体内增殖或扩增。

[0017] 在一方面,本发明提供了含有细胞群体的治疗组合物,所述细胞群体包含至少约一百万个人造血干细胞或祖细胞,其中:a)所述造血干细胞或祖细胞已经在约37℃的温度下与增加细胞中CXCR4基因表达的试剂离体接触;b)与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,所述造血干细胞或祖细胞中CXCR4的基因表达增加至少约2倍;并且c)其中所述治疗组合物包括准备好向患者给药的造血干细胞或祖细胞的治疗上可接受的无菌悬浮液。

[0018] 在具体实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,所述治疗组合物的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的基因表达增加至少约3倍。

[0019] 在一实施方案中,所述细胞群体包含CD34⁺细胞集合,其中与非接触的CD34⁺细胞集合相比,所述CD34⁺细胞集合中CXCR4的基因表达增加至少约3倍。

[0020] 在另一实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加约3倍至约8倍。

[0021] 在治疗组合物的另一实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加至少约4倍。

[0022] 在治疗组合物的另一实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加至少约6倍。在治疗组合物的另一实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加至少约7倍。

[0023] 在治疗组合物的另一实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加至少约8倍。在治疗组合物的另一实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加至少约10倍。

[0024] 在本发明的另一实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加至少约12倍。

[0025] 在本发明的其他实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加至少约16倍。

[0026] 在一些实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,构成治疗组合物的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的基因表达增加约8倍至约18倍。

[0027] 在本发明的多个实施方案中,增加造血干细胞或祖细胞中CXCR4基因表达的试剂选自:cAMP增强剂,Gα-s激活剂,和选择性地结合PGE₂EP₄受体的化合物。

[0028] 在具体实施方案中,所述增加造血干细胞或祖细胞中CXCR4基因表达的试剂为PGE₂,或者PGE₂类似物或衍生物。在更具体的实施方案中,所述增加造血干细胞或祖细胞中CXCR4基因表达的试剂为16,16-二甲基PGE₂。

[0029] 在本发明的治疗组合物的一实施方案中,所述造血干细胞或祖细胞已与所述试剂接触至少约1小时的时间。在多个实施方案中,所述造血干细胞或祖细胞已与所述试剂接触约1小时至约6小时的时间。在具体实施方案中,所述造血干细胞或祖细胞已与所述试剂接触约2小时至约6小时的时间。在更具体的实施方案中,构成治疗组合物的造血干细胞或祖细胞已与所述试剂接触约2小时的时间。

[0030] 在本发明的具体实施方案中,构成治疗组合物的造血干细胞或祖细胞包含基因表达标签,其中一个或多个标签基因的表达比非接触的造血干细胞或祖细胞中的所述一个或多个标签基因的表达增加至少约2倍,其中所述标签基因选自:透明质酸合成酶1 (HAS1), GTP-结合蛋白GEM (GEM), 双特异性蛋白磷酸酶4 (DUSP4), 双调蛋白 (AREG), 核受体相关蛋白1 (NR4A2), 肾素 (REN), cAMP反应元件调节因子 (CREM), 胶原蛋白I型α1 (COL1A1), 和Fos相关抗原2 (FOSL2)。

[0031] 在更具体的实施方案中,至少两个所述标签基因的表达比非接触的造血干细胞或祖细胞中的所述两个标签基因的表达增加至少5,10,15,或20倍。在更具体的实施方案中,每个所述标签基因的表达比非接触的造血干细胞或祖细胞中的所述标签基因的表达增加至少约2倍。

[0032] 在多个实施方案中,构成治疗组合物的细胞群体包含少于约0.10%,0.50%,1.0%,3%,5%,10%,15%,20%,或30%的CD34⁺细胞。在一些实施方案中,所述细胞群体包含至少约0.01%并且不超过约50%的CD34⁺细胞。

[0033] 在一些实施方案中,所述细胞群体不被离体增殖。

[0034] 在多个实施方案中,在护理点产生所述治疗化合物并将其给予患者而无需培养所述细胞群体。在一些实施方案中,在将治疗组合物给予患者的24小时内产生所述组合物。在一些实施方案中,在将治疗组合物给予患者的12小时内产生所述组合物。在一些实施方案中,在将组合物给予患者的6小时内产生所述组合物。在一些实施方案中,在输注治疗组合物当天产生所述组合物。

[0035] 在一些实施方案中,所述治疗组合物基本上不含所述试剂。在多个实施方案中,所

述治疗组合物包含悬浮于5%人血清白蛋白和葡聚糖溶液中的造血干细胞或祖细胞。

[0036] 在一些实施方案中,所述治疗组合物包含少于约30%,25%,20%,15%,10%或5%的间充质干细胞。在具体实施方案中,所述治疗组合物包含不超过约10%的间充质干细胞。

[0037] 在一些实施方案中,所述治疗组合物包含少于约30%,25%,20%,15%,10%或5%的内皮祖细胞。在具体实施方案中,所述治疗组合物包含不超过约10%的内皮祖细胞。

[0038] 在本发明的具体实施方案中,所述细胞群体包含细胞表面标志物CD34阳性的细胞并且包含少于约30%,25%,20%,15%,10%或5%的选自以下的细胞表面标志物阳性的细胞:CD73,CD140B,CD14和VWF。

[0039] 在具体实施方案中,构成本发明的治疗组合物的细胞群体包含CD34⁺细胞并且包含少于约30%,25%,20%,15%,10%,或5%的CD14⁺/CD45⁻细胞。在本发明的其他实施方案中,所述细胞群体包含CD34⁺细胞并且包含少于约30%,25%,20%,15%,10%,或5%的VWF⁺细胞。在本发明的其他实施方案中,所述细胞群体包含CD34⁺细胞并且包含少于约30%,25%,20%,15%,10%,或5%的CD140B⁺细胞。

[0040] 在更具体的实施方案中,所述细胞群体包含CD34⁺造血干细胞或祖细胞并且包含少于约30%,25%,20%,15%,10%,或5%的CD14⁺/CD45⁻细胞,VWF⁺细胞,CD73⁺细胞和CD140B⁺细胞。在一些实施方案中,所述细胞群体是细胞表面标志物CD34阳性的并且是选自以下的至少一种细胞表面标志物阴性的:CD14,VWF,CD73和CD140B。在其他实施方案中,所述细胞群体是细胞表面标志物CD34阳性的并且是细胞表面标志物CD14,VWF,CD73和CD140B阴性的。

[0041] 在本发明的多个实施方案中,所述细胞群体中至少约15%的细胞表达CXCR4蛋白。

[0042] 在一些实施方案中,所述细胞群体获自骨髓,脐带血,或动员的外周血。

[0043] 在具体实施方案中,所述细胞群体是HLA单体分型的。在更具体的实施方案中,所述细胞群体是基于由HLA-A,HLA-B,HLA-C,和HLA-DRB1组成的组进行HLA单体分型的。在一些实施方案中,所述HLA单体分型的细胞群体与特定的人类个体匹配。在一些实施方案中,所述HLA单体分型的细胞群体与特定的人类个体具有4/6个HLA匹配。

[0044] 在另一实施方案中,本发明提供了含有细胞群体的治疗组合物,所述细胞群体包含至少约一百万个人造血干细胞或祖细胞,其中:a)所述造血干细胞或祖细胞已经在约37℃的温度下与16,16-dmPGE₂离体接触约2小时的时间;b)所述造血干细胞或祖细胞包含CD34⁺细胞集合,其中与非接触的CD34⁺细胞中CXCR4的表达相比,所述CD34⁺细胞集合中CXCR4的基因表达增加至少约3倍;并且c)其中所述治疗组合物包括准备好向患者给药的造血干细胞或祖细胞的治疗上可接受的无菌悬浮液。

[0045] 在一些实施方案中,所述细胞群体包含CD34⁺细胞集合,其中与非接触的CD34⁺细胞集合相比,所述CD34⁺细胞集合中CXCR4的基因表达增加至少约3倍。

[0046] 在多个实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加约3倍至约8倍。在更具体的实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加至少约4倍。

[0047] 在其他具体的实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加至少约6倍。在其他具体的实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖

细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加至少约7倍。在其他实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加至少约8倍。在其他实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加至少约10倍。在其他实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加至少约12倍。在其他实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加至少约16倍。在其他实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加约8倍至约18倍。

[0048] 在一些实施方案中,所述造血干细胞或祖细胞包含基因表达标签,其中一个或多个标签基因的表达比非接触的造血干细胞或祖细胞中的所述一个或多个标签基因的表达增加至少约2倍,其中所述标签基因选自:透明质酸合成酶1(HAS1),GTP-结合蛋白GEM(GEM),双特异性蛋白磷酸酶4(DUSP4),双调蛋白(AREG),核受体相关蛋白1(NR4A2),肾素(REN),cAMP反应元件调节因子(CREM),胶原蛋白I型 $\alpha 1$ (COL1A1),和Fos相关抗原2(FOSL2)。

[0049] 在其他实施方案中,至少两个所述标签基因的表达比非接触的造血干细胞或祖细胞中的所述两个标签基因的表达相比增加至少5,10,15,或20倍。

[0050] 在具体的实施方案中,每个所述标签基因的表达比非接触的造血干细胞或祖细胞中的所述标签基因的表达增加至少约2倍。

[0051] 在其他实施方案,所述细胞群体不包含多于约0.10%,0.50%,1.0%,3%,5%,10%,15%,20%,或30%的CD34⁺细胞。在更具体的实施方案中,所述细胞群体包含至少约0.01%并且不超过约50%的CD34⁺细胞。

[0052] 在多个实施方案中,所述细胞群体不被离体增殖。

[0053] 在具体实施方案中,所述细胞群体获自骨髓,脐带血,或动员的外周血。

[0054] 在一些实施方案中,所述细胞群体是HLA单体分型的。

[0055] 在其他实施方案中,本发明提供了含有单体分型的细胞群体的治疗组合物,所述细胞群体包含至少约一百万个人造血干细胞或祖细胞,其中:a)所述造血干细胞或祖细胞已经在约37℃的温度下与增加细胞中CXCR4基因表达的试剂离体接触;b)与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,所述造血干细胞或祖细胞中CXCR4的基因表达增加至少约2倍;并且c)其中所述治疗组合物包括准备好向患者给药的造血干细胞或祖细胞的治疗上可接受的无菌悬浮液。

[0056] 在具体的实施方案中,所述单体分型的细胞群体是基于由HLA-A,HLA-B,HLA-C,和HLA-DRB1组成的组进行单体分型的。在更具体的实施方案中,所述单体分型的细胞群体是基于由HLA-DRB3/4/5,HLA-DQB1,和DPB1组成的组进行单体分型的。在一些实施方案中,所述单体分型的细胞群体与特定的人类个体匹配。在多个实施方案中,所述HLA单体分型的细胞群体与特定的人类个体具有4/6个HLA匹配。

[0057] 在一些实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,所述造血干细胞或祖细胞中CXCR4的基因表达增加至少约3倍。在具体实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加约3倍至约8倍。在其他具体的实施方案中,与非接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4的表达相比,CXCR4的基因表达增加至少约4倍。

[0058] 在具体实施方案中,所述增加造血干细胞或祖细胞中CXCR4基因表达的试剂选自:

cAMP类似物或增强剂, $G\alpha$ -s激活剂, 和选择性地结合 PGE_2EP_4 受体的化合物。在更具体的实施方案中, 所述增加造血干细胞或祖细胞中 CXCR4 基因表达的试剂为 16, 16-二甲基 PGE_2 。

[0059] 在多个实施方案中, 所述造血干细胞或祖细胞已与所述试剂接触约 1 小时至约 6 小时的时间。

[0060] 在一些实施方案中, 所述造血干细胞或祖细胞包含基因表达标签, 其中一个或多个标签基因的表达比非接触的造血干细胞或祖细胞中的所述一个或多个标签基因的表达增加至少约 2 倍, 其中所述标签基因选自: 透明质酸合成酶 1 (HAS1), GTP-结合蛋白 GEM (GEM), 双特异性蛋白磷酸酶 4 (DUSP4), 双调蛋白 (AREG), 核受体相关蛋白 1 (NR4A2), 肾素 (REN), cAMP 反应元件调节因子 (CREM), 胶原蛋白 I 型 $\alpha 1$ (COL1A1), 和 Fos 相关抗原 2 (FOSL2)。

[0061] 在具体实施方案中, 至少两个所述标签基因的表达比非接触的造血干细胞或祖细胞中的所述两个标签基因的表达增加至少 5, 10, 15, 或 20 倍。

[0062] 在其他实施方案中, 每个所述标签基因的表达比非接触的造血干细胞或祖细胞中的所述标签基因的表达增加至少约 2 倍。在其他实施方案中, 每个所述标签基因的表达比非接触的造血干细胞或祖细胞中的所述标签基因的表达增加至少约 4 倍。在其他实施方案中, 每个所述标签基因的表达比非接触的造血干细胞或祖细胞中的所述标签基因的表达增加至少约 6 倍。

[0063] 在其他实施方案, 所述细胞群体包含少于约 0.10%, 0.50%, 1.0%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 或 30% 的 $CD34^+$ 细胞。

[0064] 在更具体的实施方案中, 所述细胞群体包含至少约 0.01% 并且不超过约 50% 的 $CD34^+$ 细胞。

[0065] 在一些实施方案中, 细胞群体不被离体增殖。

[0066] 在其他实施方案中, 在护理点产生所述治疗化合物并将其给予患者而无需培养所述细胞群体。在一些实施方案中, 在将治疗组合物给予患者之前少于约 24 小时内产生所述组合物。在一些实施方案中, 在将治疗组合物给予患者之前少于约 12 小时内产生所述组合物。在一些实施方案中, 在将治疗组合物给予患者之前少于约 6 小时内产生所述组合物。在一些实施方案中, 在输注治疗组合物当天产生所述组合物。

[0067] 在其他实施方案中, 构成所述治疗组合物的细胞群体获自骨髓, 脐带血, 或动员的外周血。

[0068] 在其他实施方案中, 本发明部分地考虑到制备用于造血干细胞或祖细胞移植的治疗组合物的方法, 其包括: 在足以改变造血干细胞或祖细胞的基因表达的条件下, 在约 37°C 的温度下离体或体外接触包含造血干细胞或祖细胞的细胞群体, 以得到包含基因表达标签的造血干细胞或祖细胞, 所述基因表达标签包括与非接触的造血干细胞或祖细胞相比表达增加的一个或多个以下基因: 透明质酸合成酶 1 (HAS1), GTP-结合蛋白 GEM (GEM), 双特异性蛋白磷酸酶 4 (DUSP4), 双调蛋白 (AREG), 核受体相关蛋白 1 (NR4A2), 肾素 (REN), cAMP 反应元件调节因子 (CREM), 胶原蛋白 I 型 $\alpha 1$ (COL1A1), Fos 相关抗原 2 (FOSL2), 或 CXC 趋化因子受体 4 (CXCR4)。

[0069] 在其他实施方案中, 本发明部分地考虑到增加造血干细胞或祖细胞在个体中植入的方法, 其包括: 在约 37°C 的温度下使包含造血干细胞或祖细胞的细胞群体与选自以下的一种或多种试剂离体接触: PGE_2 和具有 $dmPGE_2$ 活性的试剂; 洗涤所述细胞群体, 以基本上除

去所述试剂;和将所述接触的细胞群体给予个体;其中与非接触的造血干细胞或祖细胞相比,在足以增加所述接触过的造血干细胞或祖细胞在所述个体中的植入的条件下,使所述细胞群体与所述试剂接触。

[0070] 在一实施方案中,本发明部分地考虑到治疗需要造血系统重建的个体的方法,其包括:选择需要造血重建的个体;在约37°C的温度下,使包含造血干细胞或祖细胞的细胞群体与选自以下的一种或多种试剂离体接触:PGE₂和具有dmPGE₂活性的试剂;洗涤所述细胞群体以基本上除去试剂;和将所述接触的细胞群体给予所述个体;其中与非接触的造血干细胞或祖细胞相比,在足以增加所述接触过的造血干细胞或祖细胞在所述个体中植入的条件下,使所述细胞群体与所述试剂接触,从而治疗所述需要造血系统重建的个体。

[0071] 在其他实施方案中,本发明部分地考虑到治疗需要造血系统重建的个体的方法,其包括:选择需要造血重建的个体;在约37°C的温度下,使包含造血干细胞或祖细胞的细胞群体与选自以下的一种或多种试剂接触:前列腺素E₂ (PGE₂) 或具有dmPGE₂活性的试剂;洗涤所述细胞群体以基本上除去试剂;和将所述接触的细胞群体给予所述个体;其中与非接触的造血干细胞或祖细胞相比,在足以增加所述接触过的造血干细胞或祖细胞在所述个体中植入的条件下,使所述细胞群体与所述试剂接触,从而治疗所述需要造血系统重建的个体。

[0072] 在其他实施方案中,本发明部分地考虑到制备用于增加造血干细胞和祖细胞体内增殖的细胞群体的方法,包括:在约37°C的温度下,使包含造血干细胞或祖细胞的细胞群体与选自以下的一种或多种试剂离体或体外接触:前列腺素E₂ (PGE₂) 或具有dmPGE₂活性的试剂;其中与非接触的造血干细胞或祖细胞相比,在足以增加所述接触过的造血干细胞或祖细胞体内增殖的条件下,使所述细胞群体与所述试剂接触。

[0073] 在本发明的方法的具体实施方案中,所述细胞群体获自骨髓,脐带血,或动员的外周血。

[0074] 在本发明的其他具体实施方案中,具有dmPGE₂活性的试剂为dmPGE₂,cAMP类似物或增强剂或者Gα-s激活剂。

[0075] 在某些实施方案中,所述试剂为PGE₂或其类似物。

[0076] 在某些具体实施方案中,PGE₂类似物为16,16-二甲基PGE₂。

[0077] 在其他具体实施方案中,所述试剂是cAMP增强剂。

[0078] 在本发明的某些实施方案中,足以改变所述接触过的造血干细胞或祖细胞群体的基因表达,增加所述接触过的造血干细胞或祖细胞群体的植入或植入潜力,或者增加所述接触过的造血干细胞或祖细胞群体的增殖的条件包括:使所述细胞群体与所述一种或多种试剂接触约1小时至约6小时的时间,其中至少一种所述试剂包括增强造血干细胞或祖细胞中PGE₂R₂或PGE₂R₄信号转导的试剂。在某些实施方案中,使所述造血干细胞或祖细胞与浓度为约10μM的所述增加所述造血干细胞或祖细胞中PGE₂R₂或PGE₂R₄信号转导的试剂在约37°C的温度下接触约2小时的时间。

[0079] 在其他实施方案中,使所述造血干细胞或祖细胞群体与约10μM或更高浓度的16,16-二甲基PGE₂接触,并持续约1小时至约6小时的时间。

[0080] 在其他实施方案中,使所述细胞群体与浓度为约10μM的16,16-二甲基PGE₂接触,并持续约2小时的时间。

[0081] 在具体实施方案中,所述细胞群体中的所述接触的造血干细胞或祖细胞的植入潜

力的增加包括:与非接触的造血干细胞或祖细胞相比,一个或多个以下基因的基因表达的增加:透明质酸合成酶1 (HAS1),GTP-结合蛋白GEM (GEM),双特异性蛋白磷酸酶4 (DUSP4),双调蛋白 (AREG),核受体相关蛋白1 (NR4A2),肾素 (REN),cAMP反应元件调节因子 (CREM),胶原蛋白I型 α -1 (COL1A1),Fos相关抗原2 (FOSL2),或CXC趋化因子受体4 (CXCR4);与非接触的造血干细胞或祖细胞相比,自我更新能力的增加;以及与非接触的造血干细胞或祖细胞相比,细胞活力没有显著的下降。

[0082] 在本发明的一些实施方案中,在不含内毒素的容器中制备所述包含造血干细胞或祖细胞的细胞群体,所述容器包括温度指示装置和经过时间指示装置,所述温度指示装置包括至少一个产生指示容器温度的信号的的温度指示器,所述经过时间指示装置包括至少一个经过时间指示器;并且其中所述容器适于细胞贮存,细胞处理,细胞洗涤,和细胞输注。

[0083] 在本发明的某些实施方案中,包括本发明的制备用于造血干细胞或祖细胞移植的细胞群体、和制备用于增加造血干细胞或祖细胞增殖的细胞群体的那些方法在内,将所述接触的细胞群体给予有需要的个体,例如需要细胞治疗的个体;并且本发明的方法还包括将所述接触的细胞群体给予有需要的个体。

[0084] 在某些具体实施方案中,所述个体患有急性髓性白血病 (AML),急性淋巴细胞性白血病 (ALL),慢性髓性白血病 (CML),慢性淋巴细胞性白血病 (CLL),青少年髓单核细胞白血病,霍奇金 (Hodgkin's) 淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,多发性骨髓瘤,重度再生障碍性贫血,范可尼 (Fanconi's) 贫血,阵发性睡眠性血红蛋白尿 (PNH),纯红细胞再生障碍,巨核细胞缺乏/先天性血小板减少症,严重联合免疫缺陷综合征 (SCID),维斯科特-奥尔德里奇 (Wiskott-Aldrich) 综合征,重度 β -地中海贫血,镰状细胞病,赫尔勒 (Hurler's) 综合征,肾上腺脑白质营养不良,异染性脑白质营养不良,脊髓发育不良,难治性贫血,慢性髓单核细胞白血病,病因不明的髓样化生,家族性噬红细胞性淋巴组织细胞增多症,实体瘤,慢性肉芽肿病,黏多糖症,或戴-布二氏贫血。

[0085] 在某些其他具体实施方案中,所述个体患有乳腺癌,卵巢癌,脑癌,前列腺癌,肺癌,结肠癌,皮肤癌,肝癌,胰腺癌,或肉瘤。

[0086] 在其他某些实施方案中,所述个体经历了骨髓清除性或非清髓性化疗或放射治疗。

[0087] 在其他实施方案中,所述个体是骨髓捐献者。

[0088] 在具体实施方案中,所述细胞群体包括一个或多个脐带血单位。在某些实施方案中,给予所述个体一个或多个脐带血单位。在其他实施方案中,给予所述个体部分脐带血单位。在其他具体实施方案中,给予所述个体一个脐带血单位。

[0089] 在其他实施方案中,所述包含造血干细胞或祖细胞的细胞群体是所述个体自体的。

[0090] 在某些实施方案中,所述细胞群体是从所述个体的外周血或骨髓动员的。

[0091] 在其他实施方案中,所述包含造血干细胞或祖细胞的细胞群体是所述个体异体的。

[0092] 附图简述

[0093] 附图简述

[0094] 图1示出了造血干细胞和祖细胞中存在的前列腺素 E_2 受体 2 /受体4G蛋白偶联受体

细胞信号转导通路的图示。

[0095] 图2示出了分析在不同的实验条件设定下,用16,16-二甲基PGE₂处理的纯化的CD34⁺细胞群或人脐带血的实验流程图。

[0096] 图3示出了在不同的实验条件设定下,用16,16-二甲基PGE₂处理的CD34⁺细胞的cAMP测定结果。

[0097] 图4示出了用媒介物处理的CD34⁺细胞的基因表达数据作为x轴对用10μM的16,16-二甲基PGE₂处理的CD34⁺细胞的基因表达数据作为y-轴的散点图。注意的是,与媒介物处理的细胞相比,10μM 16,16-二甲基PGE₂处理的CD34⁺细胞中CREM表达增加8倍,并且CXCR4表达增加18倍。

[0098] 图5示出了对用10μM的16,16-二甲基PGE₂处理的CD34⁺细胞的基因表达的处理时间的分析流程图。

[0099] 图6示出了处理时间为5,15,30,60和120分钟的用10μM的16,16-二甲基PGE₂处理的CD34⁺细胞(y-轴)对媒介物处理的细胞(x-轴)的基因表达谱。在120分钟的孵育期后获得基因表达谱。

[0100] 图7示出了在37℃用100nM,1μM,10μM或100μM的16,16-二甲基PGE₂处理120分钟的CD34⁺细胞(y-轴)对媒介物处理的细胞(x-轴)的基因表达谱。

[0101] 图8示出了在37℃用100nM,1μM,10μM,25μM或50μM的16,16-二甲基PGE₂处理120分钟的从脐带血纯化的CD34⁺细胞(y-轴)对媒介物处理的细胞(x-轴)的基因表达谱。

[0102] 图9示出在37℃(左图)或4℃(右上图)或25℃(右下图)用10μM的16,16-二甲基PGE₂处理60分钟(上图)或120分钟(下图)的CD34⁺细胞(y-轴)对媒介物处理的细胞(x-轴)的基因表达谱。

[0103] 图10示出与用媒介物处理的细胞或用10μM的16,16-二甲基PGE₂在4℃处理120分钟的细胞相比,用10μM的16,16-二甲基PGE₂在37℃孵育120分钟的CD34⁺细胞并未降低细胞活力。

[0104] 图11示出与用媒介物处理的细胞或用10μM的16,16-二甲基PGE₂在4℃处理120分钟的细胞相比,用10μM的16,16-二甲基PGE₂在37℃孵育120分钟的CD34⁺细胞并未降低形成集落形成单位的能力。粒细胞-单核细胞集落形成单位(CFU-GM),红系集落形成单位(CFU-E);爆式红系集落形成单位(BFU-E),多系混合集落形成单位(CFU-GM/M/Eosi)。

[0105] 图12示出了使用用16,16-二甲基PGE₂处理的的人脐带血的临床试验的示意图。

[0106] 图13显示了16,16-二甲基PGE₂处理方案的全基因组表达分析。图13A示出在4℃处理1小时的细胞中的基因表达。用10μM的16,16-二甲基PGE₂处理的细胞(y轴;N=3)与DMSO对照(N=3)相比。图13B表示在37℃处理2小时的细胞中的基因表达。用10μM的16,16-二甲基PGE₂处理的细胞(y轴;N=3)与DMSO对照(N=3)相比。

[0107] 图14示出了使用Fluidigm基因表达平台对用10μM的16,16-二甲基PGE₂在37℃下孵育处理的细胞进行的基因表达分析验证研究。图14A示出了与媒介物处理的对照相比,用10μM的16,16-二甲基PGE₂在37℃处理0,20,40,60,80,120,180和240分钟的CD34⁺细胞中一组选择的基因的基因表达。图14B示出了与媒介物处理的对照相比,用10μM的16,16-二甲基PGE₂在37℃处理0,20,40,60,80,120,180和240分钟的CD34⁺细胞中表3中列出的标签基因的平均基因表达。以下基因表现不佳且在确定图14B所示的平均基因表达中被排除:ARPC2,

CXCL5, CXCL6, FGF9, GNAL, GULP1, LRIG2, PDE4D, PLAT (1), PLAT (2), SSTR1, SYT4 和 TMCC3。以下管家基因用于标准化确定图B中所示的平均基因表达: ACTB, GAPDH, HPTR1 和 QARS。图14示出了与媒介物处理的对照相比, 用10 μ M的16, 16-二甲基PGE₂在37 $^{\circ}$ C处理0, 20, 40, 60, 80, 120, 180和240分钟的CD34⁺细胞中CXCR4的平均基因表达。图14的所有基因表达谱是在处理细胞特定的时间并且在处理后不再孵育细胞后获得。

[0108] 图15示出了用10 μ M的16, 16-二甲基PGE₂足以驱动完整的生物效应的脉冲处理进行处理的细胞或DMSO处理的细胞。用10 μ M的16, 16-二甲基PGE₂的孵育CD34⁺细胞所示的不同时间(0, 20, 40, 80和120分钟), 然后是在37 $^{\circ}$ C无16, 16-二甲基PGE₂的恢复期, 使得总孵育期为120分钟。使用Fluidigm基因表达平台进行数据分析。图15A和15B示出了与媒介物处理的对照相比, 用10 μ M的16, 16-二甲基PGE₂或DMSO在37 $^{\circ}$ C处理5, 15, 30, 60和120分钟的CD34⁺细胞中表3中列出的标签基因的平均基因表达。以下基因表现不佳, 且在确定图15B中所示的平均基因表达中被排除: ACDY7, CCND1, CREB5, GULP1, MPPE1, PDE3B, PTGER2, RGS2 和 YPEL4。以下管家基因用于标准化确定图15B中所示的平均基因表达: ACTB, ARPC2, GAPDH, HPRT1, LRIG2 和 QARS。基因表达谱是在120分钟的孵育期后获得。

[0109] 图16使用Fluidigm基因表达平台示出了16, 16-二甲基PGE₂浓度或用DMSO处理对基因表达的影响。图16A和16B示出了与媒介物处理的对照相比, 用0, 0.1, 1, 10, 50和100 μ M的16, 16-二甲基PGE₂或DMSO在37 $^{\circ}$ C处理120分钟的CD34⁺细胞中表3中列出的标签基因的平均基因表达。以下基因表现不佳, 且在确定图16B中所示的平均基因表达中被排除: ACDY7, CCND1, CREB5, GULP1, FGFR1, FLJ27352, MPPE1, PDE4D, PTGER2, PDG3B 和 YPEL4。以下管家基因用于标准化确定图16B中所示的平均基因表达: ACTB, ARPC2, GAPDH, HPRT1, LRIG2 和 QARS。

[0110] 图17示出了与DMSO处理的细胞相比, 在37 $^{\circ}$ C下用10 μ M的16, 16-二甲基PGE₂处理2小时的细胞的基因表达分析。图17A显示了与DMSO处理的脐带血细胞相比, 在37 $^{\circ}$ C下用10 μ M的16, 16-二甲基PGE₂处理2小时的全脐带血细胞的全基因组表达分析。图17B显示了与DMSO处理的Lin(+) CD34⁺细胞相比, 在37 $^{\circ}$ C下用10 μ M的16, 16-二甲基PGE₂处理2小时的Lin+CD34⁺细胞的全基因组表达分析。图17C显示了与DMSO处理的Lin(-) CD34⁺CD38⁺细胞相比, 在37 $^{\circ}$ C下用10 μ M的16, 16-二甲基PGE₂处理2小时的Lin(-) CD34⁺CD38⁺细胞的全基因组表达分析。图17D显示了与DMSO处理的Lin(-) CD34⁺CD38⁻CD90⁺细胞相比, 在37 $^{\circ}$ C下用10 μ M的16, 16-二甲基PGE₂处理2小时的Lin(-) CD34⁺CD38⁻CD90⁺细胞的全基因组表达分析。

[0111] 图18示出了在不同的温度下用10 μ M的16, 16-二甲基PGE₂处理不同时间长度的细胞中CXCR4表达。图18A显示了在该系列实验中比较的实验条件。图18B显示了在4 $^{\circ}$ C下用10 μ M的16, 16-二甲基PGE₂或DMSO处理1小时的细胞和在37 $^{\circ}$ C下用10 μ M的16, 16-二甲基PGE₂或DMSO处理2小时的细胞, 在处理1、6和24小时时CXCR4细胞表面表达。图18C显示了在4 $^{\circ}$ C下用10 μ M的16, 16-二甲基PGE₂或DMSO处理1小时的细胞和在37 $^{\circ}$ C下用10 μ M的16, 16-二甲基PGE₂或DMSO处理2小时的细胞, 在处理1、6和24小时时在细胞表面表达CXCR4的细胞的百分比。

[0112] 图19示出了在指定的时间和温度下用10 μ M的16, 16-二甲基PGE₂处理的CD34⁺细胞的活力和增殖分析。然后使用体内CFU-S测定分析处理的细胞。图19A显示了37 $^{\circ}$ C孵育增加造血祖细胞的数目。图19B显示了在4 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C下用不同浓度的16, 16-二甲基PGE₂孵育120分钟的人全脐带血细胞的细胞活力数据。图19C显示了在4 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C下用不同浓度的

16,16-二甲基PGE₂孵育120分钟的人CD34⁺细胞的细胞活力数据。图19D显示了与在4℃用DMSO或用dmPGE₂处理的CD34⁺细胞相比,在37℃下用dmPGE₂孵育120分钟的CD34⁺细胞中增加CFU-C集落形成。

[0113] 图20示出了体外趋化功能测定的实验流程图。用10μM的16,16-二甲基PGE₂或DMSO对照处理CD34⁺细胞4小时,然后转移到迁移孔,在0-50ng/ml SDF1α存在下测定4小时。

[0114] 图21示出了体外趋化功能测定的代表性数据。用10μM的16,16-二甲基PGE₂或DMSO对照处理CD34⁺细胞4小时,然后转移到迁移孔,在0-50ng/ml SDF1α存在下测定4小时。

[0115] 图22A显示了在4℃、25℃或37℃下用10μM的16,16-二甲基PGE₂处理120分钟的CD34⁺细胞(y-轴)对媒介物处理的细胞(x-轴)的全基因组表达分析。图22B提供了来自图22A所示的表达分析的细胞中标签基因亚组的平均倍数变化。

[0116] 图23A示出了在37℃下用10μM的dmPGE₂或毛喉素处理120分钟的CD34⁺细胞(y-轴)对媒介物处理的细胞(x-轴)的全基因组表达分析。图23B(上图)显示了图23A所示用dmPGE₂或毛喉素处理的细胞中标签基因亚组的平均倍数变化。图23B(下图)显示了通过Fluidigm qPCR测定在37℃用1mM dbcAMP处理120分钟或用dmPGE₂处理120分钟的CD34⁺细胞中标签基因亚组的平均倍数变化。

[0117] 图24示出了使用本发明的治疗组合物在小鼠中进行造血细胞移植的示例性策略。

[0118] 发明详述

[0119] A. 引言

[0120] 本发明提供治疗组合物和方法以改进造血干细胞或祖细胞植入的功效,并解决了在再生细胞疗法这一领域中医疗行业所面临的多层面挑战。本发明人分析了用改变造血干细胞和祖细胞的基因表达的试剂(包括刺激前列腺素通路和上调CXCR4的基因及细胞表面表达的试剂)处理的所述细胞群体的几个生物参数,从而开发提高用于干细胞移植的造血干细胞和祖细胞的功效的方法。细胞群体在植入后重建个体的造血系统中的有效性取决于诸如细胞群体归巢并植入骨髓的能力,自我更新的能力,和体内增殖的能力等性质。本发明提供了调节细胞群体的方法,以改进这样的细胞特性,并在造血重建中提供所产生的治疗改进。

[0121] 具体而言,本发明提供了包含增强的人造血干细胞或祖细胞群体的治疗组合物,以及制备所述增强的治疗组合物的方法和在干细胞移植中使用该增强的治疗组合物的方法。本发明的治疗组合物包含人造造血干细胞或祖细胞群体,所述细胞群体已被离体改变,以在移植疗法中使用所述细胞群体之前增强所述细胞群体的治疗性质。治疗组合物经改变的细胞表现出增强的归巢并植入骨髓的能力,并且还具有改进的细胞活力和自我更新能力。

[0122] 治疗组合物的造血干细胞和祖细胞的治疗性质包括细胞的植入和归巢能力,该性质由用改变细胞中被认为与细胞归巢和植入有关的基因(包括CXCR4)的表达的试剂离体处理所述细胞群体的方法所增加。因此,本发明的方法准备了包含所述细胞的治疗组合物,以实现所述细胞移植后的最佳有益治疗效果。在本发明的方法中,在生理相关温度下用所述试剂离体处理所述治疗组合物中的造血干细胞或祖细胞,使得与细胞的有益生物特性(如细胞群体的归巢,植入和体内扩增)相关基因的表达增加。包含增强的造血干细胞或祖细胞的治疗组合物在下面描述的实施例中证明在归巢,植入,和增殖中具有优势。

[0123] 因此,所述治疗组合物提供了改进包括收获的血细胞和(为清楚起见)脐带血在内

的血细胞的植入潜力的方法,以及增加移植的造血干细胞的归巢,活力和自我更新的方法。此外,本发明提供体内扩增造血干细胞和祖细胞的方法。在本发明中所述的治疗组合物和方法可以允许在脐带血移植中使用部分或单个脐带血单位。

[0124] 目前的移植前操作造血干细胞的护理标准需要将温度严格地控制在4℃,以最大化细胞活力和移植后的成功植入。本发明证明,在被认为与降低细胞活力和减少试剂半衰期的条件(如在37℃下操作细胞两小时)下,刺激造血干细胞和祖细胞的前列腺素细胞信号转导通路,意外地导致细胞归巢至骨髓的能力增加,自我更新增加,和干细胞/祖细胞的植入潜力增加,而不会对细胞活力产生不利影响。更具体地说,本发明人发现,需要将造血干细胞和祖细胞在生理相关温度(如体温)下长时间暴露(至少一小时)于发挥PGE₂活性的处理试剂,以实现完整的生物效应。值得注意的是,在生理相关温度下短时间处理造血干细胞或祖细胞导致cAMP产生增加,但意外地,不会导致被认为与细胞归巢和植入有关的基因的表达增加。需要在生理相关温度下较长的细胞处理时间以实现增加的基因表达,并且本发明证明,这对于实现所期望的增加细胞归巢和植入的生物效应是必要的。不希望受任何具体的理论限制,本文所述的方法导致增加造血干细胞和祖细胞在被给予个体后的增殖和植入潜力。

[0125] 前列腺素E₂(PGE₂)通过作用于不同细胞类型上的多种不同的前列腺素受体,激活各种信号转导通路,包括但不限于,PI3激酶(PI3-K或PI3K)通路,从而发挥其功能。这些前列腺素受体代表被称为G-蛋白-偶联受体(GPCR)的细胞表面七跨膜受体的亚家族。有四种亚型的前列腺素E₂受体:PGE₂R₁,PGE₂R₂,PGE₂R₃和PGE₂R₄。当被适当的配体或激动剂(如前列腺素或其类似物,例如,PGE₂R₂或PGE₂R₄激动剂)激活时,这些前列腺素受体会启动多种下游生物学功能。例如,对造血干细胞和祖细胞中PGE₂R₂和/或PGE₂R₄细胞信号转导的刺激/激活,部分地与腺苷酸环化酶的G蛋白α-s(Gα-s或Gα-s)的激活和刺激相偶联。

[0126] 腺苷酸环化酶的激活催化ATP向cAMP转化。第二信使cAMP的浓度增加,会导致激活环核苷酸门控离子通道,由cAMP激活的诸如RAPGEF3的交换蛋白。GPCR与其最终的分子靶标之间通过cAMP依赖通路的信号转导的特异性,可以通过包括GPCR,腺苷酸环化酶,和效应蛋白的多蛋白复合物的形成而实现。

[0127] 如上所述,环AMP激活蛋白激酶A(PKA,也称为cAMP依赖性蛋白激酶)。PKA通常没有活性,为四聚体全酶形式,由2个催化单元和2个调节单元(C₂R₂)组成,调节单元封闭催化单元的催化中心。环AMP结合PKA的调节单元的特定位置,使调节亚基和催化亚基解离,从而激活催化单元,使得它们能够磷酸化底物蛋白。不是所有蛋白磷酸酶都应答cAMP,因为有几类类型的蛋白激酶不是cAMP依赖性的,包括例如蛋白激酶C。

[0128] PKA活性亚基可以催化磷酸从ATP转移到蛋白质底物的特定丝氨酸或苏氨酸残基。磷酸化的蛋白激酶可以直接对细胞中的离子通道起作用,或可以激活或抑制其它酶。PKA还磷酸化结合DNA的启动子区域的特定蛋白,导致特定基因的表达增加。更下游的效应依赖于PKA的各种作用,这可能根据细胞类型而不同。比如,激活的PKA可以磷酸化许多其它的蛋白质,包括,例如,将糖原转化成葡萄糖的蛋白质,促进心脏中肌肉收缩导致心率增加的蛋白,和调节基因表达的转录因子。

[0129] 因此,对PGE₂R₂和PGE₂R₄细胞信号转导通路的刺激可能会导致增加转录因子激活,所述转录因子如cAMP反应元件结合蛋白(CREB)和CREB靶基因,例如,cAMP反应元件调节因

子(CREM)(见图1)。给予具有增加的cAMP的造血干细胞和祖细胞可以维持造血干细胞/祖细胞活力,增加归巢,提高自我更新,并提供移植的细胞群体增加的体内植入和增加的体内增殖。

[0130] 对PGE₂ R₂和PGE₂ R₄细胞信号转导的刺激/激活也与糖原合成酶激酶-3(GSK-3)的磷酸化增加和β-连环蛋白信号转导增加相关(Hull et al.,2004;Regan,2003),这二者均指示Wnt通路的激活。Wnt通路的PGE₂刺激可以通过来自干细胞小生境(niche)的信号转导以及细胞本身内的信号转导积极地增强造血干细胞/祖细胞扩增和自我更新(North et al.,447(7147)Nature 1007-11(2007))。造血干细胞和祖细胞中Wnt通路的激活也可以导致细胞群体体内增殖的增加。

[0131] PGE₂R₄刺激也已经被证明会激活PI3K通路,并且对于实现所期望的增加干细胞归巢、扩增、存活和植入的生物效应也是重要的。对PGE₂R₂的和PGE₂R₄细胞信号转导通路(如PI3K通路)的刺激/激活也可能增加对干细胞归巢和植入重要的基因的表达,所述基因例如CXC趋化因子受体4(CXCR4),选择素,整合素。

[0132] 在本发现之前,在最大化细胞活力和处理化合物稳定性的条件下,可以用被测化合物完全饱和EP受体的认识下,用化合物处理造血干细胞和祖细胞。根据造血干细胞移植的现行护理标准,与更高的温度(例如25℃或37℃)和更长的孵育期(例如2小时、3小时、4小时或更多小时)相比,在4℃处理被认为会提供改进的经处理细胞的细胞活力,并且预期增加被测化合物在该温度下的半衰期。

[0133] 不希望被任何具体理论限制,本发明部分地考虑到通过在增加的温度下用增加与归巢和植入相关的基因的表达的试剂在延长的孵育期处理造血干细胞和祖细胞,可以增加所述细胞的植入,细胞归巢至骨髓的能力和细胞的自我更新,并保持细胞活力。

[0134] 相关试剂包括,例如前列腺素E₂和具有dmPGE₂活性的试剂(包括cAMP类似物和增强剂,和/或Gα-s激活剂)的改进的组合。此外,本发明证明了给予在生理相关温度(例如体温或37℃)下用包括前列腺素E₂和具有dmPGE₂活性的试剂在内的这类试剂在延长的孵育期(即至少1小时)处理的细胞,不仅导致增加的细胞植入,还导致造血干细胞和祖细胞群体的体内增殖。

[0135] 因此,在多个实施方案中,本发明提供了包含人造造血干细胞或祖细胞的治疗组合物,所述人造造血干细胞或祖细胞已与能够增加细胞中CXCR4基因表达的试剂在约37℃的温度下离体接触。本发明还提供了制备作用于造血重建的治疗组合物的造血干细胞和祖细胞的方法,其包括在最优化造血干细胞或祖细胞群体的植入和增殖的条件下,使人造造血干细胞和/或祖细胞群体与能够增加细胞中CXCR4基因表达的试剂接触,所述试剂例如刺激前列腺素通路的试剂。

[0136] 本文使用的冠词“a”和“an”和“所述”指该冠词的一个或多个(即至少一个)语法对象。例如,“an element”指一个元件或多个元件。

[0137] 替代选择(例如,“或/或者”)的使用应被理解为替代选择的一个、两个或其任意组合。如本文所述的,术语“包括”和“包含”同义地使用。

[0138] 如本文所用,术语“约”或“大约”指与参考的量、水平、值、数、频率、百分比、尺度、尺寸、数额、重量或长度相差多达15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或1%的量、水平、值、数、频率、百分比、尺度、尺寸、数额、重量或长度。在一实施方案中,术语“约”或

“大约”指在一参考的量、水平、值、数、频率、百分比、尺度、尺寸、数额、重量或长度上下±15%、±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、或±1%的量、水平、值、数、频率、百分比、尺度、尺寸、数额、重量或长度的范围。

[0139] 在整个说明书中,除非上下文另外要求,否则词语“包含(comprise)”、“包含(comprises)”、“包含(comprising)”将被理解为意指包括陈述的步骤或元素,或者步骤或元素的组,但不排除任何其他步骤或元素,或者步骤或元素的组。所用“由……组成”指包括且限于在词组“由…组成”间列出的任何内容。因此,词组“由……组成”表明所列出的元素是必需的或强制的,并且不可以存在其他元素。所用“基本上由……组成”指包括在该词组间列出的任何元素,并限于不妨碍或不促进在所列元素的公开内容中指明的活性或作用的其他元素。因此,词组“基本上由……组成”表明所列元素是必需的或强制的,但其他元素是任选的,其他元素可以存在,也可以不存在,这取决于它们是否影响所列元素的活性或作用。

[0140] 整个本说明书中,在述及“一实施方案”或“实施方案”时,是指与该实施方案有关的所描述的具体特征、结构或特性包括在本发明的至少一个实施方案中。因此,在整个本说明书的多处中出现的措辞“在一实施方案中”或“在实施方案中”不必全部指同一实施方案。此外,在一个或多个实施方案中,具体特征、结构或特性可以以任何合适的方式组合。

[0141] B. 本发明的治疗组合物

[0142] 本发明提供了包含悬浮于无菌的适合用于给予患者的治疗可接受溶液中的人造血干细胞或祖细胞群体的治疗组合物。本发明的治疗组合物包含人造造血干细胞或祖细胞群体,其中所述造血干细胞或祖细胞已与能够增加细胞中CXCR4基因表达的一种或多种试剂离体接触,并且其中所述细胞通过基因表达标签表征,所述基因表达标签包括相对于非接触的干细胞或祖细胞表达增加的CXCR4。造血干细胞或祖细胞可以根据增加的基因和细胞表面CXCR4表达水平而被表征。

[0143] 在本发明的治疗组合物中,与非接触的细胞中的CXCR4表达相比,造血干细胞或祖细胞中的CXCR4的基因表达增加至少2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍或20倍。

[0144] 本发明的治疗组合物还可以通过基因表达标签表征,其中与非接触的细胞相比,选自以下的一个或多个标签基因的表达增加:透明质酸合成酶1(HAS1),GTP结合蛋白GEM(GEM),双特异性蛋白磷酸酶4(DUSP4),双调蛋白(AREG),核受体相关蛋白1(NR4A2),肾素(REN),cAMP反应元件调节因子(CREM),胶原蛋白I型α1(COL1A1),和Fos相关抗原2(FOSL2)。

[0145] 如本文所用,“非接触的”细胞是未用除了对照试剂之外的试剂处理(例如培养、接触或孵育)的细胞。与DMSO(对照试剂)接触、或与其他媒介物(vehicle)接触的细胞是非接触的细胞。

[0146] 如本文所用的“标签基因”是指在表3中提供的标签基因集合中的任何基因。例如,标签基因包括透明质酸合成酶1(HAS1),GTP结合蛋白GEM(GEM),双特异性蛋白磷酸酶4(DUSP4),双调蛋白(AREG),核受体相关蛋白1(NR4A2),肾素(REN),cAMP反应元件调节因子(CREM),胶原蛋白I型α1(COL1A1),和Fos相关抗原2(FOSL2)。为清晰起见,标签基因不包括管家基因。

[0147] 与非接触的细胞相比,标签基因的表达可以增加2倍或更多倍,在具体实施方案中,增加至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、10倍、15倍或20倍。在一些实施方案中,构成本发明的

治疗组合物的细胞中的一个或多个标签基因的表达增加。在具体实施方案中,与非接触的细胞相比,至少2个、3个、4个或更多个标签基因的表达增加至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、10倍、15倍或20倍。在多个实施方案中,与非接触的细胞相比,标签基因的表达可以增加至少6倍。

[0148] 在本发明的具体实施方案中,CXCR4的基因表达增加至少约4倍,并且CREM的基因表达增加至少约10倍。

[0149] 构成治疗组合物的人造血干细胞或祖细胞也可以通过基因表达谱表征,其中所有标签基因的平均倍数变化为至少约2倍、4倍或6倍。在一些实施方案中,所有标签基因的平均倍数变化为至少约4。在一些实施方案中,所有标签基因的平均倍数变化为至少约6。在一些实施方案中,至少40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%或90%的标签基因的平均倍数变化为至少6倍。在一些实施方案中,至少40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%或90%的标签基因的平均倍数变化为至少3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在具体实施方案中,治疗组合物可以通过基因表达谱表征,所述基因表达谱具有图14(B)、图15(B)或图16(B)所示的所有标签基因的平均倍数变化。

[0150] 在用试剂处理构成治疗组合物的人造血干细胞或祖细胞之后,可以分析(即获得)细胞的基因表达标签;或者可以在处理后将细胞孵育一段时间,然后分析细胞的基因表达标签。例如,可以用试剂离体处理细胞,洗涤细胞以除去试剂,并分析基因表达而无需进一步孵育细胞。或者,在一些实施方案中,用试剂处理细胞,洗涤细胞以从细胞群体除去试剂,然后将细胞离体孵育一段时间,再分析细胞的基因表达标签。

[0151] 在一些实施方案中,洗涤细胞以除去试剂,然后孵育1至6小时,再分析细胞的基因表达标签。在一些实施方案中,洗涤细胞,然后孵育至少约1小时,再分析细胞的基因表达标签。在一些实施方案中,洗涤细胞,然后孵育约2小时,再分析细胞的基因表达标签。

[0152] 本文所用的“基因表达”是指生物样品(例如本发明的治疗组合物中的造血干细胞和祖细胞或者造血干细胞或祖细胞群体)中的基因的相对表达水平和/或表达模式。可以在cDNA、RNA、mRNA或其组合的水平上测量基因的表达。“基因表达谱”或“基因表达标签”是指对同一样品(即细胞群体)测量的多个不同基因的表达水平。

[0153] 本领域内可用的用于检测表征构成本发明的治疗组合物的细胞的基因表达的任何方法均包括在本文中。如本文所用,术语“检测(……)表达”是指确定基因的RNA转录本或其表达产物的量或存在。用于检测基因表达的方法,即基因表达绘图,包括根据多核苷酸的杂交分析的方法,根据多核苷酸测序的方法,免疫组织化学方法和基于蛋白质组学的方法。这些方法通常检测目的基因的表达产物(例如,mRNA)。在一些实施方案中,使用基于PCR的方法,例如逆转录PCR(RT-PCR)(Weis et al.,TIG 8:263-64,1992);和基于阵列的方法,例如微阵列(Schena et al.,Science 270:467-70,1995)。“微阵列”是指在基板上有序排列的可杂交的阵列元件,例如多核苷酸探针。术语“探针”是指能够与专门针对的靶生物分子选择性结合的任何分子,所述生物分子例如内源基因编码的或与之对应的核苷酸转录本或蛋白。探针可以由本领域技术人员合成或来自于合适的生物制剂。探针可以被专门设计为被标记的。可以用作探针的分子的实例包括,但不限于RNA、DNA、适体、蛋白、抗体和有机分子。

[0154] RNA提取的常用方法是领域内公知的,并公开于分子生物学标准教科书中,包括

Ausubel等人编辑的Current Protocols in Molecular Biology(现代分子生物学实验技术), John Wiley&Sons, New York 1987-1999。例如,在Rupp and Locker(Lab Invest.56:A67,1987)和De Andres et al.(Biotechniques 18:42-44,1995)中公开了从石蜡包被的组织提取RNA的方法。具体而言,可以使用来自商业制造商如Qiagen(Valencia, Calif.)的纯化试剂盒、缓冲液系列和蛋白酶,根据制造商的说明书进行RNA分离。例如,可以使用Qiagen RNeasy微型柱从培养物中的细胞分离总RNA。其他可商购的RNA分离试剂盒包括MASTERPURE总DNA和RNA纯化试剂盒(Epicentre, Madison, Wis.)和石蜡包埋RNA分离试剂盒(Ambion, Austin, Tex.)。例如,可以使用RNA Stat-60(Tel-Test, Friendswood, Tex.)从组织样品分离总RNA。此外,可以使用本领域技术人员公知的方法容易地处理大量组织样品,所述技术例如Chomczynski的单步RNA分离方法(美国专利No.4,843,155)。

[0155] 分离的RNA可以用在杂交或扩增测定中,包括但不限于PCR分析和探针阵列。用于检测RNA水平的一种方法涉及使分离的RNA与可以与由待检测的基因编码的mRNA杂交的核酸分子(探针)接触。核酸探针可以是,例如全长cDNA或其部分,例如长度为至少7、15、30、60、100、250或500个核苷酸并且在严格条件下足以与本发明的内源基因特异性杂交的寡核苷酸,或任何衍生DNA或RNA。mRNA与探针的杂交表明探测的内源基因被表达。

[0156] 在一实施方案中,mRNA被固定在固体表面上并与探针接触,例如通过将分离的mRNA在琼脂糖凝胶上电泳并将该mRNA从凝胶转移到膜例如硝酸纤维素上。在其他实施方案中,探针被固定在固体表面上并且mRNA与探针接触,例如在Agilent基因芯片阵列中。本领域技术人员可以容易地改变已知的mRNA检测方法,用于检测本发明的内源基因的表达水平。

[0157] 确定样品中的基因表达水平的其他方法涉及核酸扩增的方法,例如通过RT-PCR(美国专利No.4,683,202),连接酶链式反应(Barany, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:189-93,1991),自主序列复制(Guatelli et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:1874-78,1990),转录扩增系统(Kwoh et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173-77,1989),Q-β复制酶(Lizardi et al., Bio/Technology 6:1197,1988),滚环复制(美国专利No.5,854,033)或任何其他核酸扩增方法;然后使用本领域技术人员公知的技术检测扩增的分子。如果核酸分子以非常低的数目存在,那么这些检测方案特别有助于检测这类分子。

[0158] 在本发明的具体方面,通过定量RT-PCR评估基因表达。多种不同的PCR或QPCR方案是本领域内已知的并在下文列出,并且可以使用本申请描述的组合物直接应用于或加以改变用于检测和/或定量表3中列出的基因。通常,在PCR中,通过与至少一个寡核苷酸引物或一对寡核苷酸引物反应扩增靶多核苷酸序列。引物与靶核酸的互补区域杂交,并且DNA聚合酶延伸引物以扩增靶序列。在足以提供基于聚合酶的核酸扩增产物的条件下,一个大小的核酸片段占反应产物(作为扩增产物的靶多核苷酸序列)的支配地位。重复扩增循环以增加单个靶多核苷酸序列的浓度。可以在通常用于PCR的任何热循环仪上进行反应。然而,优选的是具有实时荧光测量能力的循环仪,例如SMARTCYCLER(Cepheid, Sunnyvale, Calif.), ABI PRISM 7700.(Applied Biosystems, Foster City, Calif.), ROTOR-GENE(Corbett Research, Sydney, Australia), LIGHTCYCLER(Roche Diagnostics Corp, Indianapolis, Ind.), ICYCLER(Biorad Laboratories, Hercules, Calif.)和MX4000(Stratagene, La Jolla, Calif.)。

[0159] 在某些环境下定量PCR (QPCR) (也被称为实时PCR) 是优选的,因为它不仅提供定量测量,还缩短时间,减少污染。在某些实例中,全基因表达绘图技术的可用性是受限的,因为需要新鲜冷冻的组织 and 特殊的实验室设备,这使得难以在临床环境中常规地使用这类技术。如本文所用,“定量PCR (或“实时QPCR”)”是指在出现PCR扩增时直接监测其进展,而不需要对反应产物重复取样。在定量PCR中,反应产物可以在其产生时通过信号传递机制(例如荧光)被监测,并在信号超过背景水平之后、但在反应达到平台之前被追踪。达到荧光的可检测或“阈值”水平所需的循环数直接根据PCR过程开始时可扩增靶的浓度而变化,使得信号强度的测定能够实时地提供样品中靶核酸量的测定。

[0160] 在本发明的另一实施方案中,将微阵列用于表达绘图。由于在不同实验之间的再现性,微阵列特别适合于本目的。DNA微阵列提供了用于同时测量大量基因的表达水平的一种方法。每个阵列由连接到固体支持物的可再现的捕获探针图案组成。标记的RNA或DNA与阵列上互补的探针杂交,然后通过激光扫描被检测。阵列上每个探针的杂交强度被确定并被转换成表示为相对基因表达水平的定量值。参见,例如美国专利号6,040,138,5,800,992和6,020,135,6,033,860,和6,344,316。高强度寡核苷酸阵列在确定样品中大量RNA的基因表达谱中是特别有用的。

[0161] 可以通过商购设备根据制造商的说明进行微阵列分析,例如通过使用Affymetrix基因芯片技术,Illumina微珠阵列技术或Agilent喷墨打印微阵列技术。

[0162] “标准化”可用于除去样品之间的差异。对于微阵列数据,标准化处理意在通过平衡两种标记染料的荧光强度而除去系统性误差。染料偏好可以来自多种来源,包括染料标记效率的差异,热和光敏感性以及用于扫描两个通道的扫描仪设置。计算标准化因子的一些常用的方法包括:(i) 使用阵列上所有基因的全局标准化,例如通过多阵列对数健壮算法(log scale robust multi-array analysis,RMA);(ii) 使用恒定表达的管家/恒定基因的管家基因标准化;和(iii) 使用在杂交期间添加的已知量的外源对照基因的内参标准化(Quackenbush (2002) Nat. Genet. 32 (Suppl.), 496-501)。在一实施方案中,本文公开的基因的表达可以通过对照管家基因或通过多阵列对数健壮算法(RMA) 标准化。

[0163] 在多个示例性的实施方案中,本发明部分地提供了用于移植例如骨髓移植的包含细胞群体的治疗组合物。如本文所用,术语“细胞群体”是指包含造血干细胞和/或祖细胞的异源或同源细胞群体。包含造血干细胞和/或祖细胞的细胞群体可以是骨髓细胞,脐带血细胞或动员的外周血细胞,或从任何合适的来源获得的细胞群体,所述来源例如骨髓,动员的外周血和脐带血等。术语“细胞集合”也指细胞群体,在某些实施方案中,其与“细胞群体”同义。然而,细胞集合不必指任何特定的细胞群体。

[0164] 造血干细胞和/或祖细胞,无论获自脐带血、骨髓、外周血或其他来源,均可以在任何合适的、商购的或定制的培养基中生长、处理或增殖,根据需要,可以添加或不添加血清(参见,例如,Hartshorn et al,Cell Technology for Cell Products,第221-224页,R. Smith, Editor; Springer Netherlands, 2007,通过引用的方式将其整体并入本文)。例如,在某些实施方案中,无血清培养基可以利用白蛋白和/或转铁蛋白,所述蛋白已经被证明对于CD34⁺细胞在无血清培养基中的生长和增殖是有用的。此外,可以包括细胞因子,诸如Flt-3配体、干细胞因子(SCF)和促血小板生成素等。HSC还可以生长于诸如生物反应器的容器中(参见,例如,Liu et al., Journal of Biotechnology 124:592-601, 2006,通过引

用的方式将其整体并入本文)。用于离体增殖HSC的合适的培养基还可以包含HSC支持细胞,诸如基质细胞(例如,淋巴网状基质细胞),所述支持细胞可以源自,例如,淋巴组织的解聚物,并且已经被证实支持HSC以及它们的子代的体外、离体、和体内的维持、生长和分化。

[0165] 在具体实施方案中,细胞群体在被给予个体之前不被离体或体外增殖。在具体实施方案中,获得了未被增殖的细胞群体,该细胞群体根据本文提供的方案离体处理,可以洗涤该细胞群体以除去处理试剂,并且将其给予患者而不对所述细胞群体进行离体增殖。在一些实施方案中,细胞获自捐献者,包括脐带血,并且在细胞处理之前或之后,或在将治疗组合物给予患者之前的任何时间不被增殖。在一实施方案中,未被增殖的细胞群体被处理,并在群体中的细胞发生任何明显的离体细胞分裂之前,或在任何明显的离体细胞分裂所需时间之前被给予患者。在其他实施方案中,未被增殖的细胞群体被处理,并在群体中的细胞发生任何明显的离体有丝分裂之前,或在任何明显的离体有丝分裂所需时间之前被给予患者。在一些实施方案中,未被增殖的细胞群体被处理,并在群体中细胞加倍的时间之前被给予患者。在一些实施方案中,未被增殖的细胞群体被处理,并在处理细胞的6、12或24小时之内被给予患者。在其他实施方案中,未被增殖的细胞群体被处理,并在处理细胞的2小时之内被给予患者。

[0166] 在多个实施方案中,细胞群体在用试剂离体处理之前或在被给予患者之前的任何时间不被培养。在一些实施方案中,细胞群体被培养少于约24小时。在其他实施方案中,细胞群体被培养少于约12小时、10小时、8小时、4小时或2小时。

[0167] 在多个实施方案中,用本文他处所述的试剂处理并随后被给予个体的细胞群体是异源细胞群体,包括全骨髓、脐带血、动员的外周血、造血干细胞、造血祖细胞以及造血干细胞和祖细胞的子代,包括粒细胞(例如,早幼粒细胞,髓细胞,晚幼粒细胞,嗜中性粒细胞,嗜酸性粒细胞,嗜碱性粒细胞),红细胞(例如,网织红细胞,红细胞等),凝血细胞(例如,原巨核细胞,血小板产生的巨核细胞,血小板),和单核细胞(例如,单核细胞,巨噬细胞)。

[0168] 在一实施方案中,治疗组合物包含为约100%的造血干细胞和祖细胞的细胞群体。在一些实施方案中,治疗组合物中的细胞群体是少于约0.1%,0.5%,1%,2%,5%,10%,15%,20%,25%或30%的造血干细胞和祖细胞。在一些实施方案中,所述细胞群体是少于约0.1%,0.5%,1%,2%,5%,10%,15%,20%,25%或30%的CD34⁺细胞。在其它实施方案中,所述细胞群体为约0.1%至约1%,约1%至约3%,约3%至约5%,约10%-约15%,约15%-20%,约20%-25%,约25%-30%,约30%-35%,约35%-40%,约40%-45%,约45%-50%,约60%-70%,约70%-约80%,约80%-90%,约90%-95%或约95%至约100%的造血干细胞和祖细胞。在具体实施方案中,所述细胞群体为约0.1%至约1%,约1%至约3%,约3%至约5%,约10%-约15%,约15%-20%,约20%-25%,约25%-30%,约30%-35%,约35%-40%,约40%-45%,约45%-50%,约60%-70%,约70%-80%,约80%-90%,约90%-95%或约95%至约100%的CD34⁺细胞。

[0169] 本发明的治疗组合物中的细胞可以是自体 (autologous) / 自体 (autogeneic) (“自体 (self)”) 的或非自体的 (non-autologous) (“非自体 (non-self)”, 例如, 同种异体的, 同系基因的或异种的)。如本文所用“自体”, 是指来自同一个体的细胞。如本文所用“异体”, 是指同一物种的与相比较的细胞在基因上不同的细胞。如本文所用“同系基因”, 是指不同个体的与相比较的细胞在基因上相同的细胞。如本文所用“异种”, 是指与相比较的细胞不同

物种的细胞。在具体实施方案中,本发明的细胞是异体的。

[0170] “干细胞”是指这样的细胞:该细胞是未分化的细胞,其能够(1)长期自我更新,或能够产生原始细胞的至少一个相同的拷贝,(2)在单细胞水平上分化成多种,并在某些情况下,仅一种特化的细胞类型,以及(3)在体内功能性再生组织。干细胞根据其发育潜能被细分为全能性(totipotent)、多能性(pluripotent)、专能性(multipotent)和寡能性/单能性(oligo/unipotent)。“祖细胞”也具有自我更新和分化成更多成熟细胞的能力,但定向于某个谱系(例如,造血祖细胞定向于血液谱系;髓样祖细胞定向于骨髓谱系;淋巴样祖细胞定向于淋巴谱系),而干细胞不必有这样的限制。“自我更新”是指细胞具有产生没有改变的子细胞并因此补充和维持其群体数目、以及产生特化的细胞类型的独特能力(潜能)。自我更新可以通过两种方式实现。非对称细胞分裂产生一个与亲本细胞相同的子细胞和一个不同于亲代细胞并且是更加定向的祖细胞或分化的细胞的子代细胞。对称细胞分裂产生两个相同的子细胞。细胞的“增殖”或“扩增”是指对称地分裂细胞。

[0171] 造血干细胞(HSC)产生能在生物体的整个生命期间形成成熟血细胞库的定向造血祖细胞(committed hematopoietic progenitor cell,HPC)。术语“造血干细胞”或“HSC”是指产生生物体的所有血细胞类型的专能干细胞,所述血细胞类型包括骨髓谱系(例如,单核细胞和巨噬细胞,嗜中性粒细胞,嗜碱性粒细胞,嗜酸性粒细胞,红细胞,巨核细胞/血小板,树突细胞),和淋巴谱系(例如,T-细胞,B-细胞,NK-细胞),以及本领域中已知的其他谱系(参见Fei,R.等人的美国专利号5,635,387;McGlave等人的美国专利号5,460,964;Simmons,P.等人的美国专利号5,677,136;Tsukamoto等人的美国专利号5,750,397;Schwartz等人的美国专利号5,759,793;DiGuisto等人的美国专利号5,681,599;Tsukamoto等人的美国专利号5,716,827)。当被移植进致死辐射的动物或人体中时,造血干细胞可以再建类红细胞,中性粒细胞-巨噬细胞,巨核细胞和淋巴样造血细胞库。

[0172] HSC可以根据某些表型或基因型标志物来鉴定。例如,可以通过以下来鉴定HSC:其小体积、缺乏谱系(lin)标志物、诸如罗丹明123(罗丹明^{DULL},也称为rho¹⁰)或Hoechst 33342活体染料的浅染(边缘细胞群(side population))、以及多种抗原性标志物在其表面的存在,其中许多属于分化抗原簇系列(例如,CD34,CD38,CD90,CD133,CD105,CD45和c-kit,干细胞因子的受体)。HSC大都是通常对于检测谱系定向(lineage commitment)的标志物是阴性的,并因此经常被称为Lin(-)细胞。大多数的人HSC可以被表征为CD34⁺,CD59⁺,Thy1/CD90⁺,CD38^{lo/-},C-kit/CD117⁺和Lin(-)。然而,不是所有干细胞都被这些组合所涵盖,因为某些HSC是CD34⁻/CD38⁻。一些研究也表明,最早期的干细胞可能在细胞表面缺乏c-kit。对于人HSC,CD133可以代表早期标志物,因为CD34⁺和CD34⁻HSC都显示为CD133⁺。本领域已知CD34⁺和Lin(-)细胞也包括造血祖细胞。

[0173] 用于本发明的方法的造血干细胞和祖细胞的合适的来源包括,但不限于,从包含造血来源细胞的生物体分离或获得的细胞。“分离的”是指从其原始环境取出的物质。例如,如果细胞与在其天然状态通常伴随它的一些或所有组分分开时,则它是分离的。例如,本文所用的“分离的细胞群体”、“分离的细胞源”或“分离的造血干细胞和祖细胞”等是指一种或多种细胞与其天然细胞环境和与同组织或器官的其他组分的关联的体外或离体分开,即其与体内物质没有显著关联。

[0174] 可以去除用于本发明的方法的造血干细胞和祖细胞的成熟造血细胞,例如T细胞,

B细胞, NK细胞, 树突细胞, 单核细胞, 粒细胞, 类红细胞, 和其来自骨髓抽吸物, 脐带血, 或动员的外周血(动员的白细胞清除产品)的定向前体。成熟的谱系定向细胞通过免疫去除, 例如通过用结合一组所谓的“谱系”抗原的抗体标记固体基质, 所述抗原为CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123和CD235a。可以进行随后的步骤以进一步纯化细胞群体, 其中用结合CD34⁺抗原的抗体标记的基质被用于分离原始造血干细胞和祖细胞。用于从多种细胞来源纯化造血干细胞和祖细胞的试剂盒是商业可获得的, 并且在具体实施方案中, 这些试剂盒适合与本发明的方法一起使用。示例性纯化造血干细胞和祖细胞的市售试剂盒包括, 但不限于, 系别(Lin)去除试剂盒(Miltenyi Biotec); CD34⁺富集试剂盒(Miltenyi Biotec); RosettaSep(Stem Cell Technologies)。

[0175] 在一些实施方案中, 构成本发明的治疗组合物的细胞群体包含少于约30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 或5%的间充质干细胞。在具体实施方案中, 所述细胞群体包含不超过约10%的间充质干细胞。间充质干细胞(MSC)是可以容易地分化成包括成骨细胞、肌细胞、软骨细胞和脂肪细胞的谱系的多潜能干细胞(Pittenger, et al., Science, Vol. 284, pg. 143 (1999); Haynesworth, et al., Bone, Vol. 13, pg. 69 (1992); Prockop, Science, Vol. 276, pg. 71 (1997))。

[0176] 在其他实施方案中, 构成本发明的治疗组合物的细胞群体包含少于约30%, 25%, 20%, 15%, 10%或5%的内皮祖细胞。在其他实施方案中, 所述细胞群体包含少于约10%的内皮祖细胞。如本文所用, “内皮祖细胞”是指具有分化成血管内皮细胞的潜能的多潜能或单能细胞。

[0177] 在更具体的实施方案中, 所述细胞群体包含不超过约10%的间充质干细胞或内皮祖细胞。

[0178] 从捐献者获得的或其他方法提供的细胞群体可以基本上没有间充质干细胞和/或内皮祖细胞, 并且在具体实施方案中, 包含少于约10%的间充质干细胞和少于约10%的内皮祖细胞。或者, 可以使用本领域内已知的方法, 例如使用免疫磁选技术, 荧光激活的细胞分选或其组合, 去除所述细胞群体中的间充质干细胞和/或内皮祖细胞。去除方法还可以包括使用对本文所述的至少一种细胞表面标志物特异的至少一种抗体。

[0179] 在一些实施方案中, 去除所述细胞群体中的内皮祖细胞, 包括CD14细胞表面标志物阳性和CD45阴性(CD14⁺/CD45⁻)细胞和/或VWF(血管假性血友病因子, Von Willebrand Factor)阳性(VWF⁺)细胞。在其他实施方案中, 去除所述细胞群体中的CD73和/或CD140B细胞表面标志物阳性细胞。在本发明的具体实施方案中, 所述细胞群体包含细胞表面标志物CD34阳性细胞并且包含少于约30%, 25%, 20%, 15%, 10%或5%的选自以下的细胞表面标志物阳性的细胞: CD73, CD140B, CD14和VWF。

[0180] 在具体实施方案中, 构成本发明的治疗组合物的细胞群体包含CD34⁺细胞并且包含少于约30%, 25%, 20%, 15%, 10%或5%的CD14⁺/CD45⁻细胞。在其他实施方案中, 所述细胞群体包含CD34⁺细胞并且包含少于约30%, 25%, 20%, 15%, 10%或5%的VWF⁺细胞。在本发明的其他实施方案中, 所述细胞群体包含CD34⁺细胞并且包含少于约30%, 25%, 20%, 15%, 10%或5%的CD140B⁺细胞。

[0181] 在更具体的实施方案中, 所述细胞群体包含CD34⁺造血干细胞或祖细胞并且包含少于约30%, 25%, 20%, 15%, 10%或5%的CD14⁺/CD45⁻细胞, VWF⁺细胞, CD73⁺细胞和

CD140B⁺细胞。在一些实施方案中,所述细胞群体为细胞表面标志物CD34阳性并且为选自以下的至少一种细胞表面标志物阴性:CD14,VWF,CD73和CD140B。在其他实施方案中,所述细胞群体为细胞表面标志物CD34阳性并且为细胞表面标志物CD14,VWF,CD73和CD140B阴性。

[0182] 造血干细胞和祖细胞可以从成人的未分级分离或分级分离的骨髓获得或分离,包括股骨,髌骨,肋骨,胸骨和其他骨骼。造血干细胞和祖细胞可以利用针和注射器从髌骨取出直接获得或分离,或者从血液中获得,通常是在用诱导细胞从骨髓区室释放的或动员的诸如G-CSF(粒细胞集落刺激因子)的细胞因子预处理后从血液中获得。造血干细胞和祖细胞的其他来源包括脐带血、胎盘血和动员的外周血。对于实验目的,胎儿肝脏、胎儿脾脏、骨髓(kidney marrow)和动物的AGM(主动脉-性腺-中肾)也是造血干细胞和祖细胞的有用来源。

[0183] 在具体实施方案中,从造血来源(例如骨髓细胞、脐带血或动员的外周血细胞)收获造血干细胞或祖细胞。“收获”造血干细胞和祖细胞被定义为从基质取出或分离细胞。这可以通过使用多种方法实现,如酶法,非酶法,离心法,电法,或基于大小的方法,或优选的是,使用培养基(例如,其中孵育细胞的培养基)冲洗细胞。在具体实施方案中,收获用于移植的足够量的细胞可能需要动员捐献者的干细胞和祖细胞。

[0184] “造血干细胞动员”是指在干细胞移植之前,为了白细胞清除目的,从骨髓释放干细胞进入外周血液循环。造血生长因子,如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或化疗剂经常被用来激活动员。存在商业干细胞动员药物并可与G-CSF一起使用,以动员足够量的造血干细胞和祖细胞用于向个体移植。例如,可以给予捐献者G-CSF和MozobilTM(Genzyme公司),从而收获足够数量的用于移植的造血细胞。

[0185] 通过增加从捐献者收获的干细胞的数目,可用于移植回个体的干细胞的数目,个体的结果可以显著改善,从而有可能减少植入时间,并因此导致个体具有不足的中性粒细胞和血小板的时间减少,从而防止感染,出血或其他并发症。动员造血干细胞和祖细胞的其它方法是本技术领域技术人员显而易见的。

[0186] 在具体实施方案中,从脐带血得到造血干细胞或祖细胞。可根据本领域中已知的技术收获脐带血(参见,例如,美国专利号7,147,626和7,131,958,通过引用将该方法并入本文)。

[0187] 在一实施方案中,在本发明的治疗组合物和方法中使用的造血干细胞和祖细胞可以获自专能干细胞来源,例如,诱导的专能干细胞(iPSC)和胚胎干细胞(ESC)。如本文所用,术语“诱导的专能干细胞”或“iPSC”是指已被重编程为专能状态的非专能细胞。一旦个体的细胞已被重编程到专能状态,则该细胞可以被编程为所需的细胞类型,如造血干细胞或祖细胞。如本文所用,术语“重编程”是指增加细胞至较低分化状态的潜能的方法。如本文所用,术语“编程”是指降低细胞至较高分化状态的潜能或者使细胞分化至较高分化状态的方法。

[0188] 在多个实施方案中,本发明涉及将治疗组合物给予病人或需要治疗的个体。治疗组合物中包含的和给予患者的造血干细胞或祖细胞的量将随细胞来源,个体的疾病状态,年龄、性别和重量,以及造血干细胞和祖细胞在个体中引发所需应答的能力而变化。

[0189] 在一实施方案中,给予个体的治疗组合物中的造血干细胞或祖细胞(例如,CD34⁺, Lin(-)细胞)的量是部分或单个脐带血中的造血干细胞或祖细胞的量,或者至少为0.1 ×

10^5 个细胞,至少为 0.5×10^5 个细胞,至少为 1×10^5 个细胞,至少为 5×10^5 个细胞,至少为 10×10^5 个细胞,至少为 0.5×10^6 个细胞,至少为 0.75×10^6 个细胞,至少为 1×10^6 个细胞,至少为 1.25×10^6 个细胞,至少为 1.5×10^6 个细胞,至少为 1.75×10^6 个细胞,至少为 2×10^6 个细胞,至少为 2.5×10^6 个细胞,至少为 3×10^6 个细胞,至少为 4×10^6 个细胞,至少为 5×10^6 个细胞,至少为 10×10^6 个细胞,至少为 15×10^6 个细胞,至少为 20×10^6 个细胞,至少为 25×10^6 个细胞,或至少为 30×10^6 个细胞。

[0190] 在具体实施方案中,所述治疗组合物中的造血干细胞或祖细胞(例如,CD34⁺,Lin(-)细胞)的量是部分或单个脐带血中的造血干细胞或祖细胞的量,或者为约 0.1×10^5 个细胞至约 10×10^5 个细胞,约 0.5×10^6 个细胞至约 5×10^6 个细胞;约 1×10^6 个细胞至约 3×10^6 个细胞,约 1.5×10^6 个细胞至约 2.5×10^6 个细胞,或约 2×10^6 至 2.5×10^6 个细胞。

[0191] 在具体实施方案中,所述治疗组合物中的造血干细胞或祖细胞的量是部分或单个脐带血中的造血干细胞或祖细胞的量,或者为约 1×10^6 个细胞至约 3×10^6 个细胞;约 1.0×10^6 个细胞至约 5×10^6 个细胞;约 1.0×10^6 个细胞至约 10×10^6 个细胞,约 10×10^6 个细胞至约 20×10^6 个细胞,约 10×10^6 个细胞至约 30×10^6 个细胞,或约 20×10^6 个细胞至约 30×10^6 个细胞。

[0192] 在其他实施方案中,所述治疗组合物中的造血干细胞或祖细胞的量是部分或单个脐带血中的造血干细胞或祖细胞的量,或者为约 1×10^6 个细胞至约 30×10^6 个细胞;约 1.0×10^6 个细胞至约 20×10^6 个细胞;约 1.0×10^6 个细胞至约 10×10^6 个细胞,约 2.0×10^6 个细胞至约 30×10^6 个细胞,约 2.0×10^6 个细胞至约 20×10^6 个细胞,或约 2.0×10^6 个细胞至约 10×10^6 个细胞。

[0193] 在具体实施方案中,所述治疗组合物中的造血干细胞或祖细胞的量为约 1×10^6 个造血干细胞或祖细胞,约 2×10^6 个细胞,约 5×10^6 个细胞,约 7×10^6 个细胞,约 10×10^6 个细胞,约 15×10^6 个细胞,约 17×10^6 个细胞,约 20×10^6 个细胞,约 25×10^6 个细胞,或约 30×10^6 个细胞。

[0194] 在一实施方案中,给予个体的治疗组合物中的造血干细胞或祖细胞的量是部分或单个脐带血中的造血干细胞或祖细胞的量,或者至少为 0.1×10^5 个细胞/kg体重,至少为 0.5×10^5 个细胞/kg体重,至少为 1×10^5 个细胞/kg体重,至少为 5×10^5 个细胞/kg体重,至少为 10×10^5 个细胞/kg体重,至少为 0.5×10^6 个细胞/kg体重,至少为 0.75×10^6 个细胞/kg体重,至少为 1×10^6 个细胞/kg体重,至少为 1.25×10^6 个细胞/kg体重,至少为 1.5×10^6 个细胞/kg体重,至少为 1.75×10^6 个细胞/kg体重,至少为 2×10^6 个细胞/kg体重,至少为 2.5×10^6 个细胞/kg体重,至少为 3×10^6 个细胞/kg体重,至少为 4×10^6 个细胞/kg体重,至少为 5×10^6 个细胞/kg体重,至少为 10×10^6 个细胞/kg体重,至少有 15×10^6 个细胞/kg体重,至少为 20×10^6 个细胞/kg体重,至少为 25×10^6 个细胞/kg体重,或至少为 30×10^6 个细胞/kg体重。

[0195] 不希望受任何具体的理论限制,本发明部分地预期,本方法的优点之一是较少的造血干细胞和祖细胞可用于移植,因为与对照处理的细胞和用试剂例如在4℃处理的细胞相比,本发明的治疗组合物中增强的造血干细胞和祖细胞具有增加的植入潜力,改进的归巢,和增加体内增殖能力。

[0196] C. 本发明的方法

[0197] 本发明人分析了用改变细胞基因表达的试剂(包括刺激前列腺素通路和上调

CXCR4的基因及细胞表面表达的试剂)处理的造血干细胞和祖细胞群体的几个生物参数,从而提高用于干细胞移植的造血干细胞和祖细胞的功效。细胞群体在植入后重建个体的造血系统的有效性取决于诸如细胞群体归巢并植入骨髓的能力,自我更新的能力,和体内增殖的能力等性质。本发明提供了调节细胞群体的方法,以改进这样的细胞特性,并在造血重建中提供所产生的治疗改进。

[0198] “植入潜力”是指细胞植入的能力。在具体实施方案中,诸如CD34⁺, Lin(-)细胞的造血干细胞或祖细胞的植入潜力可以通过测定以下来确定,例如,PGE₂R₂/R₄细胞信号转导通路的活性,细胞中与归巢或植入相关的基因的表达,细胞活力和细胞自我更新的能力。当然,本领域技术人员理解,其他合适的测定也可以指示造血干细胞或祖细胞的增加的植入潜力。如本文所用,术语“植入”是指细胞整合到某个位置(例如某个组织),并随时间推移坚守在该具体位置的能力,例如,造血干细胞或祖细胞整合到骨髓中并坚守在骨髓中的能力。“归巢”是指造血干细胞或祖细胞集中(即移动)至某个具体区域或组织的能力,如移植的干细胞集中至骨髓。

[0199] 在多个实施方案中,本发明提供了包含人造造血干细胞或祖细胞的治疗组合物,所述造血干细胞或祖细胞与能够增加细胞中CXCR4基因表达的一种或多种试剂接触过,所述试剂包括刺激前列腺素通路,例如PGE₂R₂/R₄细胞信号转导通路的试剂。处理的细胞的治疗组合物提供了优于之前在干细胞移植中使用的细胞的多个优点,例如细胞群体体内归巢、植入和增殖的增加。如本文所用,“试剂”是指能够增加细胞中CXCR4基因表达的试剂。这类试剂包括,例如但不限于PGE₂或具有dmPGE₂活性的试剂(包括但不限于本文他处所述的PGE₂类似物,cAMP类似物或激活剂和/或Gα-s激活剂)。在具体实施方案中,包含造血干细胞或祖细胞的细胞群体可以与1、2、3、4、5或更多种试剂以任意组合同时或依次接触。

[0200] 在足以增加植入和/或植入潜力和/或增殖的条件下,与能够增加细胞中CXCR4基因表达的试剂,例如PGE₂或具有dmPGE₂活性的试剂,接触过的人造血干细胞或祖细胞可以以多种不同方式表征,例如通过:由生物化学测定所确定的增加的细胞内cAMP信号转导水平,例如CREB磷酸化;由诸如微阵列的基因表达测定所确定的指示参与PGE₂R₂/R₄细胞信号转导通路中的基因(如CREM)和增加造血干细胞和祖细胞归巢和植入的基因(如CXCR4)上调的基因表达标签;由诸如7-氨基放线菌素D(7-AAD)染色的细胞活力测定所确定的造血干细胞和祖细胞活力没有可测量的下降;和/或由诸如离体集落形成单位(CFU-C)测定所确定的增加的造血干细胞自我更新能力。

[0201] 在一实施方案中,在足以增加植入和/或植入潜力和/或增殖的条件下,与能够增加细胞中CXCR4基因表达的试剂(例如PGE₂或具有dmPGE₂活性的试剂)接触过的人造血干细胞或祖细胞可以通过检查接触的(处理的)细胞与用媒介物处理的细胞或用试剂在4℃处理的细胞相比的基因表达标签而鉴定。

[0202] 在具体实施方案中,与用媒介物处理的细胞或用试剂在4℃处理的细胞相比,具有增加的植入和/或植入潜力和/或增加的体内增殖的处理的造血干细胞或祖细胞具有表达增加的1、2、3、4、5种或所有的以下基因:透明质酸合成酶1(HAS1),GTP结合蛋白GEM(GEM),双特异性蛋白磷酸酶4(DUSP4),双调蛋白(AREG),核受体相关蛋白1(NR4A2),肾素(REN),cAMP反应元件调节因子(CREM),胶原蛋白I型α1(COL1A1),Fos相关抗原2(FOSL2),或CXC趋化因子受体4(CXCR4)。在本发明的具体实施方案中,与非处理的细胞中的CXCR4表达水平相

比,治疗组合物中的造血干细胞或祖细胞中的CXCR4上调至少4倍。

[0203] 与从临床前研究得到的观察结果相反,本发明人发现,与刺激前列腺素通路的试剂接触过的造血干细胞和祖细胞增加了所述细胞在本文所述的具体条件下的增殖和植入潜力。这些条件优化了用刺激前列腺素通路的试剂处理的期望生物应答,包括干细胞归巢、存活、扩增和植入。

[0204] 因此,本发明人已经发现,被认为降低造血干细胞和祖细胞活力和降低dmPGE₂半衰期的条件意外地导致造血干细胞或祖细胞表现出增加的植入和/或体内增殖潜力,因为它们保留细胞活力,增加向骨髓的归巢和植入(例如,增加的CXCR4表达)和增加的细胞自我更新能力。

[0205] 因此,本发明部分地考虑到进行骨髓、外周血和脐带血移植的新方法,这通过在预期对增加造血干细胞和祖细胞植入或造血干细胞和祖细胞体内增殖不利的条件下,用本文所述的上调细胞中的CXCR4表达的试剂(包括刺激PGE₂R₂/R₄信号转导通路的试剂)处理造血干细胞或祖细胞群体。

[0206] 如本文所用,术语“足以……的条件”或“在足以……的条件下”是指用增加细胞中的CXCR4基因表达的试剂处理移植材料来源的孵育条件,所述移植材料来源例如骨髓细胞,外周血细胞,或脐带血细胞,和/或其他包含造血干细胞和/或祖细胞的细胞群体,和/或富集的或选择的造血干细胞和祖细胞群体。在一实施方案中,该条件足以增加给予个体的造血干细胞和祖细胞的植入。在一实施方案中,该条件足以增加给予个体的造血干细胞或祖细胞的增殖。在另一实施方案中,该条件足以增加给予个体的造血干细胞或祖细胞群体的植入和增殖。孵育条件包括,但不限于细胞的来源、试剂浓度、孵育细胞和试剂的持续时间,以及孵育的温度。在具体实施方案中,所述试剂为PGE₂或具有dmPGE₂活性的试剂。在一实施方案中,所述试剂为16,16-二甲基PGE₂。

[0207] 在多个实施方案中,足以增加造血干细胞或祖细胞植入和/或增殖的条件包括,在生理相关温度下孵育,例如约39℃的温度范围(约室温至约体温),包括但不限于约22℃,23℃,24℃,25℃,26℃,27℃,28℃,29℃,30℃,31℃,32℃,33℃,34℃,35℃,36℃,37℃,38℃和39℃的温度;以约10nM至约120μM终浓度的16,16-二甲基PGE₂,包括但不限于约100nM,约500nM,约1μM,约10μM,约20μM,约30μM,约40μM,约50μM,约60μM,约70μM,约80μM,约90μM,约100μM,约110μM,或约120μM,或任何其他中间浓度的16,16-二甲基PGE₂(例如,0.1μM,1μM,5μM,10μM,20μM,50μM,100μM);以及孵育约60分钟至约4小时,包括但不限于孵育时间持续约60分钟,约70分钟,约80分钟,约90分钟,约100分钟,约110分钟,约2小时,约2.5小时,约3小时,约3.5小时,或约4小时,或任何其他中间的孵育持续时间(例如,111分钟,112分钟,113分钟,114分钟,115分钟,116分钟,117分钟,118分钟,119分钟)。

[0208] 如本文所用“约”或“大约”指与参考的浓度、温度、持续时间、量、水平、值、数、频率、百分比、尺度、尺寸、数额、重量或长度相差多达30%,25%,20%,25%,10%,9%,8%,7%,6%,5%,4%,3%,2%或1%的浓度、温度、持续时间、量、水平、值、数、频率、百分比、尺度、尺寸、数额、重量或长度。例如,在优选实施方案中,术语“约”是指以特定的量为中心加或减10%的量的范围,例如约37℃的温度是指33℃至41℃的温度范围。在另一优选实施方案中,术语“约”是指以特定的量为中心加或减5%的量的范围。在另一优选实施方案中,术语约是指以特定的量为中心加或减1%的量的范围。

[0209] 在具体实施方案中,足以增加造血干细胞和祖细胞植入和/或体内增殖的条件包括在约35℃至约39℃的温度范围孵育;以约10μM至约25μM终浓度的16,16-二甲基PGE₂;和孵育约1小时至约4小时,约2小时至约3小时,约2小时至约4小时,或约3小时至约4小时。

[0210] 在另一实施方案中,足以增加造血干细胞和祖细胞植入和/或体内增殖的条件包括在约37℃的温度(约体温)孵育;以约10μM或更高终浓度的16,16-二甲基PGE₂;以及孵育约2小时。

[0211] 在另一实施方案中,使包含造血干细胞或祖细胞的人脐带血、骨髓细胞或动员的外周血,或纯化的Lin(-)CD34⁺造血干细胞或祖细胞群体在37℃的温度与10μM终浓度的16,16-dmPGE₂(dmPGE₂)接触120分钟或更长时间,增加了造血干细胞或祖细胞植入个体的骨髓中的潜力。接触过的细胞没有表现出细胞活力的统计学上显著的下降,而表现出与造血干细胞或祖细胞归巢和植入以及自我更新能力相关的基因表达的统计学上显著的增加。

[0212] 在另一实施方案中,使包含造血干细胞或祖细胞的人脐带血、骨髓细胞或动员的外周血,或纯化的Lin(-)CD34⁺造血干细胞或祖细胞群体在37℃的温度与10μM终浓度的16,16-dmPGE₂(dmPGE₂)接触120分钟或更长时间,增加了给予个体的造血干细胞或祖细胞群体的体内增殖。

[0213] 在多个实施方案中,本发明部分地提供了获得和制备用于造血干细胞和祖细胞移植的细胞群体的方法,包括:在足以增加细胞的植入潜力和/或植入的条件下,使细胞群体与增加细胞中的CXCR4基因表达的一种或多种试剂接触,所述试剂包括刺激PGE₂R₂和/或PGE₂R₄细胞信号转导通路的试剂。

[0214] 在具体实施方案中,本发明部分地提供了获得和制备用于增加造血干细胞和祖细胞在个体中的量的细胞群体的方法,包括:在足以增加细胞群体体内增殖的条件下,使细胞群体与增加细胞中的CXCR4基因表达的一种或多种试剂接触,所述试剂包括刺激PGE₂R₂和/或PGE₂R₄细胞信号转导通路的试剂。

[0215] 在多个其他实施方案中,本发明部分地提供了增加造血干细胞和祖细胞在个体中植入的方法,包括:使包含表达CD34但缺乏Lin表达的造血细胞(例如,Lin(-)CD34⁺细胞)的细胞群体与一种或多种试剂接触,所述试剂选自:前列腺素E₂(PGE₂)或具有dmPGE₂活性的试剂;并将所述细胞群体给予个体。所述细胞在本文他处所述的足以增加接触过的造血干细胞和祖细胞在该个体中的植入的条件下与所述试剂接触。

[0216] 在某些实施方案中,本发明部分地提供了在个体中体内增殖造血干细胞和祖细胞群体的方法,包括:使包含表达CD34但缺乏Lin表达的造血细胞(例如,Lin(-)CD34⁺细胞)的细胞群体与一种或多种试剂接触,所述试剂选自:前列腺素E₂(PGE₂)或具有dmPGE₂活性的试剂;并将所述细胞群体给予个体。所述细胞在本文他处所述的足以在个体中增殖接触过的造血干细胞和祖细胞的条件下与所述试剂接触。

[0217] 本发明部分地考虑到增加干细胞在有需要的个体(例如,人)中植入的方法,包括:使包含造血干细胞和/或祖细胞的细胞群体(例如,骨髓细胞,外周血细胞和/或脐带血细胞)与PGE₂或其类似物(例如16,16-二甲基PGE₂(dmPGE₂)或具有dmPGE₂活性的试剂)接触;并将所述细胞给予所述个体。在一实施方案中,使包含造血干细胞和/或祖细胞的细胞源与诸如dmPGE₂的PGE₂类似物接触。在多个实施方案中,使包含造血干细胞和/或祖细胞的细胞源与具有dmPGE₂活性的试剂接触,所述试剂例如dmPGE₂,cAMP类似物或增强剂,或Gα-s激活剂。

[0218] 在某一实施方案中,使包含造血干细胞和/或祖细胞的细胞源与诸如dmPGE₂的PGE₂类似物和具有dmPGE₂活性的试剂接触,所述具有dmPGE₂活性的试剂例如cAMP类似物或增强剂,或Ga-s激活剂。在另一实施方案中,使包含造血干细胞和/或祖细胞的细胞源与一种或多种PGE₂类似物、一种或多种cAMP类似物或增强剂,和/或一种或多种Ga-s激活剂接触。

[0219] 在多个其他实施方案中,本发明提供了治疗有需要的个体的方法,包括:鉴定有需要的个体,并将包含造血干细胞和/或祖细胞的细胞群体给予所述个体,从而治疗所述有需要的个体,所述造血干细胞和/或祖细胞在足以增加接触过的造血干细胞或祖细胞在所述个体中的植入或体内增殖的条件下,与选自以下的一种或多种试剂接触:前列腺素E₂(PGE₂),具有dmPGE₂活性的试剂,例如cAMP类似物或增强剂和Ga-s激活剂。

[0220] “增强”或“促进”或“增加”或“激活”,一般是指与由媒介物或对照分子/组合物引起的应答相比,PGE₂或具有dmPGE₂活性的试剂在细胞中产生或导致更大的生理应答(即下游的效应)的能力,例如,增加的干细胞和/或祖细胞的植入/植入潜力和增加的干细胞体内增殖。可测量的生理应答可以包括造血干细胞和/或祖细胞植入、活力、归巢、自我更新和/或增殖以及根据本领域的理解和本文的描述显而易见的其他生理应答的增加。在一实施方案中,所述增加可以通过PGE₂R₂和/或PGE₂R₄细胞信号转导通路而增加信号转导所致的基因表达增加,包括但不限于,CREB磷酸化增加,CREM表达增加和CXCR4增加。造血干细胞和/或祖细胞植入、活力、归巢、自我更新和/或体内增殖的增加也可以使用本领域内已知的方法确定,例如基因表达,CFU-C测定,CFU-S测定,CAFC测定以及细胞表面蛋白表达等。“增加的”或“增强的”量通常是“统计学上显著的”量,并可以包括为由媒介物(缺乏试剂)或对照组合物所产生应答的1.1,1.2,1.5,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15,20,30倍或更多倍(例如,500倍,1000倍)(包括两者之间和大于1的所有整数和小数点,例如1.5,1.6,1.7,1.8等)的增加。例如,在具体实施方案中,本发明的方法包括使包含造血干细胞或祖细胞的细胞群体在约37℃与dmPGE₂接触。与在约4℃接触的细胞相比,这些细胞具有增加的植入潜力和增殖。

[0221] “减少”或“减低”,或“减轻”或“降低”或“减弱”通常是指与由媒介物或对照分子/组合物引起的应答相比,PGE₂或具有dmPGE₂活性的试剂在细胞中产生或导致更小的生理应答(即下游的效应)的能力,例如减少细胞凋亡。在一实施方案中,减少可以是通常与细胞活力降低相关的细胞信号转导的减少或基因表达的降低。“减少的”或“降低的”量通常是“统计学上显著的”量,并可以包括为由媒介物(缺乏试剂)或对照组合物产生的应答的1.1,1.2,1.5,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15,20,30倍或更多倍(例如,500倍,1000倍)(包括两者之间和大于1的所有整数和小数点,例如1.5,1.6,1.7,1.8等)的降低。例如,在具体实施方案中,本发明的方法包括使包含造血干细胞或祖细胞的细胞群体在约37℃与dmPGE₂接触。与在约4℃接触dmPGE₂的细胞相比,接触的细胞没有表现出细胞活力在统计学上显著的降低。

[0222] “维持”或“保留”,或“保持”或“没有改变”或“没有显著改变”或“没有显著降低”通常是指与由媒介物或对照分子/组合物引起的应答(参照应答)相比,PGE₂或具有dmPGE₂活性的试剂在细胞中产生或导致相当的生理应答(即下游的效应)的能力。相当的应答是与参照应答没有显著不同或可测量的不同的应答(参见图13A)。在一实施方案中,使包含造血干细胞和祖细胞的细胞群体与刺激PGE₂R₂和/或PGE₂R₄细胞信号转导通路的试剂在约37℃接触约2小时,所述试剂例如具有dmPGE₂活性的试剂,例如dmPGE₂,cAMP类似物或增强剂,和Ga-s激活剂。与在4℃接触的细胞相比,处理的细胞没有表现出细胞活力在统计学上显著的降

低。换言之，与在约4℃接触的细胞相比，本文所述的方法维持了造血干细胞和祖细胞的活力，没有显著降低该活力，没有导致该活力在统计学上显著的降低，没有引起该活力的损失和/或没有显著改变该活力。

[0223] 在具体实施方案中，用诸如dmPGE₂的试剂处理细胞一段时间。在相关实施方案中，处理后在细胞培养基中洗涤细胞使得它们基本上没有所述试剂。例如，在一实施方案中，使包含人造造血干细胞或祖细胞的细胞群体在约37℃下与16,16-二甲基PGE₂接触120分钟的一段时间，所述细胞群体例如骨髓细胞，动员的外周血细胞或脐带血细胞。在孵育后，但在输注或随后的处理或存储之前，用细胞培养基洗涤细胞，所述培养基例如低分子量葡聚糖和5%人血清白蛋白培养基(LMD/5%HSA)或Stem Span培养基(Stem Cells Technology Inc.)。

[0224] 在多个示例性的实施方案中，本发明部分地提供体外或离体处理方法，包括使包含造血干细胞或祖细胞的细胞群体与维持干细胞/祖细胞活力并增加植入、归巢、自我更新和体内增殖的PGE₂或具有dmPGE₂活性的试剂接触。

[0225] 术语“离体(ex vivo)”一般指发生在生物体外的活动，诸如在生物体外的人工环境中的活体组织之中或之上进行的实验或测量，优选对天然条件的改变最小。在具体实施方案中，“离体”方法涉及从生物体获取活体细胞或组织，并将其在实验室设备中培养，通常在无菌条件下，一般培养几小时或最长达约24小时，但也包括最长达48或72小时，这取决于环境。在某些实施方案中，这种组织或细胞可以被收集和冷冻，并在以后解冻用于离体处理。利用活体细胞或组织的持续超过几天的组织培养实验或方案通常被视为是“体外(in vitro)”的，尽管在某些实施方案中，该术语能够与离体互换使用。

[0226] 术语“离体给药”、“离体处理”或“离体治疗用途”一般指这样的医疗操作，其中一种或多种器官、细胞或组织从活的或最近死亡的个体获得，任选将其纯化/富集，暴露于处理或操作(例如，离体给药步骤，其包括用本发明的组合物或试剂孵育细胞以增强所需细胞诸如造血干细胞或祖细胞的增殖)。经离体处理的细胞可以被给予相同的或不同的活个体。

[0227] 这类离体医疗应用还可以包括任选的体内处理或操作步骤，例如将本发明的接触过的细胞1次或多次给予活个体。按照本领域已知和本文他处所述的技术，这些实施方案包括局部和全身给药。给予个体的细胞的量取决于该个体的特征，诸如一般健康状况、年龄、性别、体重和药物的耐受，以及对药物和/或细胞移植反应的严重程度和类型。

[0228] 术语“体内(in vivo)”通常是指在生物体内部发生的活动，例如细胞植入、细胞归巢、细胞自我更新和细胞增殖。在一实施方案中，术语“体内增殖”是指细胞群体在体内增加数目的能力。在具体实施方案中，体内增殖包括干细胞的自我更新和/或扩增。

[0229] 在一实施方案中，本发明部分地提供了制备用于诸如骨髓移植的移植的细胞群体的方法，所述细胞群体例如骨髓细胞，动员的外周血细胞，脐带血细胞，所述方法包括：在足以增加所述接触过的细胞被给予个体时植入和/或体内增殖的温度和时间下，使所述细胞与dmPGE₂或具有dmPGE₂活性的试剂离体接触。

[0230] 在具体实施方案中，本发明提供了治疗需要造血重建或造血系统重建的个体的方法，包括：鉴定需要造血重建的个体，并给予所述个体一个量的造血干细胞和/或祖细胞，从而治疗所述需要造血重建的个体，其中所述造血干细胞和/或祖细胞已在足以增加所述接触过的造血干细胞和祖细胞在所述个体中植入的条件下，与诸如dmPGE₂的能够增加CXCR4

基因表达的试剂接触过。

[0231] 在另一具体实施方案中,本发明提供了治疗需要造血重建、造血系统重建、增加造血干细胞或祖细胞数目和/或体内增殖造血干细胞或祖细胞的个体的方法,包括:鉴定需要造血重建的个体,并给予所述个体一个量的造血干细胞或祖细胞,从而治疗所述需要造血重建的个体,其中所述造血干细胞和/或祖细胞已在足以增加所述接触过的造血干细胞和祖细胞在所述个体中体内增殖的条件下,与诸如dmPGE₂的能够增加CXCR4基因表达的试剂接触过。

[0232] 本文所用的“个体”包括表现这样的症状的任何动物,所述症状可以被本发明的试剂或组合物或装置治疗,或可以被已经用本发明的试剂或组合物离体处理的HSC或脐带血治疗。“需要造血重建、造血系统重建、增加造血干细胞或祖细胞数目和/或造血干细胞或祖细胞体内增殖的个体”包括但不限于:患有或已被诊断有不同类型的本文他处所述的白血病、贫血、淋巴瘤、骨髓瘤、免疫缺陷症和实体瘤的个体。“个体”还包括干细胞移植或骨髓移植(例如在恶性疾病的治疗过程期间或作为基因治疗的组成部分)的备选者。个体还可以包括捐献用于异体移植的干细胞或骨髓的个体或动物。在某些实施方案中,个体可能已经经历照射治疗或化疗,例如在各种癌症治疗期间。合适的个体(例如,患者)包括实验室动物(诸如小鼠、大鼠、兔或豚鼠)、农场动物、和家养动物或宠物(诸如猫或狗)。包括非人灵长类,并优选包括人类患者。典型的个体包括表现出异常水平(比“正常”或“健康”个体低或高的水平)的一种或多种生理活动的动物,所述生理活动可以被试剂或干细胞或骨髓移植调节。

[0233] 用于本文所述方法的给予细胞群体的合适的方法包括非肠道给药,包括但不限于血管内给药,如静脉内和动脉内给药。用于给予本发明的细胞的其他示例性方法包括肌内,鞘内,囊内,眼窝内,心脏内,皮内,腹膜内,经气管,皮下,表皮下,关节内,囊下,蛛网膜下,椎管内和胸骨内注射和输注。

[0234] 向个体给予的造血干细胞和祖细胞的“量”是指给予“有效的量”以实现所需治疗或预防结果,包括但不限于对个体的治疗。因此,对于本文目的,“治疗有效量”的造血干细胞或祖细胞通过本领域内已知的考虑因素确定,并且可以随着诸如以下的因素而改变:个体的疾病状态,年龄、性别和重量,以及造血干细胞和祖细胞在个体中引发所需应答的能力。术语“治疗有效量”包括有效“治疗”个体(例如患者)的量。治疗有效量还是其中造血干细胞或祖细胞的任何有毒或有害效果被治疗有益效果超过的量。

[0235] “预防有效量”是指有效地实现所需预防结果的造血干细胞或祖细胞的量。由于预防剂量在发病之前或疾病的早期阶段在个体中使用,因此预防有效量通常少于治疗有效量,但并非必然如此。

[0236] 在另一具体实施方案中,本发明涉及治疗需要造血干细胞/祖细胞移植的个体的方法,包括:选择需要造血干细胞/祖细胞移植的个体,并将细胞群体给予个体,与非接触的细胞相比,所述细胞群体已在足以增加接触过的细胞在个体中植入和/或体内增殖的温度和时间下,与dmPGE₂或具有dmPGE₂活性的试剂离体接触过。在具体实施方案中,所述个体需要造血重建。

[0237] 如本文所用的,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等是指获得所需的药理学和/或生理效果,包括但不限于,实现疾病症状的改善或消除。效果可以是预防性的,表

现为完全地或部分地预防疾病或其症状;和/或效果可以是治疗性的,表现为实现症状的改善或消除,或提供对疾病和/或归因于疾病的不利影响的部分或完全治愈。如本文所用,“治疗”包括对哺乳动物特别是人的疾病的任何治疗,包括:(a)阻止可能倾向于患有疾病但还未被诊断患有该疾病的个体发病;(b)抑制疾病,即阻止其发展;(c)缓解疾病,例如,导致疾病的消退,例如,以完全或部分消除疾病的症状;及(d)使个体恢复至疾病前状态,例如,重建造血系统。

[0238] 如本文所用的“治疗”,包括对疾病的症状或病理或病理状态的任何所需效果,并且可包括在被治疗的疾病或疾病状况的一个或多个可测量标记的甚至最小的减少。“治疗”并不必然表示疾病或疾病状态或其相关症状的彻底根除或治愈。在本发明的具体方法中,治疗提供了细胞群体在个体中改善的植入,在个体中改善的造血重建或在个体中改善的存活。

[0239] 需要这种类型治疗的个体包括遭受(例如患有)非恶性血液病症的个体,所述非恶性血液病症特别是免疫缺陷(例如SCID,范可尼贫血,重度再生障碍性贫血,或先天性血红蛋白病,或代谢蓄积疾病,如胡尔勒病,亨特氏病,甘露糖苷贮积症等)或癌症,特别是血液恶性肿瘤,如急性白血病,慢性白血病(髓系或淋巴系),淋巴瘤(霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤),多发性骨髓瘤,骨髓增生异常综合征,或非血液癌症如乳腺癌,结肠癌,成神经细胞瘤或肾细胞癌。

[0240] 本发明的方法可以用于治疗其中需要增加骨髓中造血干细胞或祖细胞的量或需要向骨髓动员造血干细胞或祖细胞的任何疾病或病症。例如,本发明的方法可用于治疗需要骨髓移植或造血干细胞或祖细胞移植的患者,如接受化疗和/或放射疗法的癌症患者。本发明的方法对于治疗接受癌症化疗或放射治疗的患者是特别有用的,包括患有骨髓瘤,非霍奇金淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤,白血病,和实体瘤(乳房癌,卵巢癌,脑癌,前列腺癌,肺癌,结肠癌,皮肤癌,肝癌,或胰腺癌)的患者。本发明的方法也可用于治疗患有再生障碍性贫血、免疫失调(严重的联合免疫缺陷综合征或狼疮),骨髓增生异常,地中海贫血,镰状细胞病或维斯科特-奥尔德里奇综合征的患者。通过本发明的方法治疗的病症可以是,另一种主要治疗的不希望的副作用或并发症的结果,所述另一种主要治疗如放疗,化疗,或用骨髓抑制药物如齐多夫定(zidovadine),氯霉素或更昔洛韦(ganciclovir)治疗。这些病症包括中性白细胞减少症,贫血,血小板减少和免疫功能失调。此外,本发明的方法可用于治疗由无意暴露于毒剂或辐射引起的骨髓损伤。

[0241] 待治疗的病症也可以是造成骨髓干细胞或祖细胞损坏的感染(例如,病毒感染,细菌感染或真菌感染)的结果。

[0242] 除了上述疾病状态,可以受益于使用本发明的方法治疗的其他疾病状况包括但不限于,淋巴细胞减少症,淋巴溢,淋巴瘀滞,红细胞减少症,红细胞变性病症,成红细胞减少症,幼白成红细胞增多症;红细胞破碎,地中海贫血,骨髓纤维化,血小板减少症,弥散性血管内凝血(DIC),免疫(自身免疫性)血小板减少性紫癜(ITP),HIV诱导的ITP,脊髓发育不良;血小板性疾病,血小板增多症,先天性中性白细胞减少症(如科斯特曼(Kostmann's)综合征和舒-戴二氏(Schwachman-Diamond)综合征),肿瘤相关的中性粒细胞减少症,儿童和成人的循环中性粒细胞减少症,感染后中性粒细胞减少症,脊髓发育不良综合征,与化疗和放疗相关的中性粒细胞减少症,慢性肉芽肿病,黏多糖症,戴-布二氏(Diamond Blackfan)

贫血,镰状细胞病或重型 β 地中海贫血。

[0243] 在具体实施方案,需要移植的患者是已经捐献骨髓的骨髓捐献者,还未捐献骨髓的骨髓捐献者,骨髓捐献者移植接受者,具有环境压力下的造血祖细胞,患有贫血,与正常个体相比具有降低水平的免疫细胞功能,或具有免疫系统缺乏。

[0244] 在某些实施方案中,需要移植的患者患有骨髓瘤,非霍奇金淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤,慢性髓细胞性白血病,慢性骨髓性白血病,慢性粒细胞白血病,急性成淋巴细胞白血病,急性非成淋巴细胞白血病,或白血病前期。

[0245] D. 本发明的方法中使用的试剂

[0246] 在多个实施方案中,本发明涉及包含造血干细胞或祖细胞的细胞群体的治疗组合物,所述造血干细胞或祖细胞已与增加细胞中CXCR4基因表达的一种或多种试剂接触过,所述试剂如刺激PGE₂R₂和/或PGE₂R₄细胞信号转导通路的试剂。

[0247] 使用cGMP规范,可用于制备本发明的治疗组合物的试剂可以配制在有机溶剂如乙酸甲酯中,用于接触本发明的细胞,并可以在不含内毒素的容器中供给。如本文所述,本发明涉及的试剂适用于离体给予至哺乳动物细胞。在某些实施方案中,所述溶剂通常是本文所述的合适的有机溶剂(例如DMSO、DMF、DME等,包括其组合或混合物)。一种或多种溶剂可以按一定比例组合。例如,两种溶剂的混合物可以按9.5:0.5,9:1,8:2,7:3,6:4,5:5等比例组合,包括所有整数和小数点。

[0248] 术语“有机溶剂”或“合适的有机溶剂”一般涉及溶解固体,液体,或气体溶质从而得到溶液的含碳液体或气体。“合适的”有机溶剂是适合离体给予哺乳动物细胞或与其一起孵育的有机溶剂,并且也可能适合体内给予个体,例如在选择的浓度孵育或给药一段时间的离体条件(例如,细胞培养)下或体内具有最小的毒性或其他抑制作用。合适的有机溶剂还应该对贮存稳定性和处理本文所述的试剂是合适的。合适的有机溶剂的例子包括,但不限于二甲基亚砜(DMSO),N,N-二甲基甲酰胺(DMF),二甲氧基乙烷(DME),和二甲基乙酰胺,包括它们的混合物或组合。在某些实施方案中,组合物或有机溶剂“基本上不含”乙酸甲酯,这意味着在所述组合物或溶剂中不应该有多于痕量的乙酸甲酯,并优选检测不到的量(例如,通过高压液相色谱法(HPLC),气相色谱(GC)等测量)。

[0249] 如本文所用,术语“不含内毒素”是指容器和/或组合物包含至多痕量(即,对个体不具有不利的生理效应的量)的内毒素,优选检不出量的内毒素。“基本上不含内毒素”是指比FDA允许的生物制剂的内毒素(总内毒素为每天5EU/kg体重,对于平均70kg的人为350EU/总剂量的细胞)更少的内毒素/剂细胞。在一实施方案中,术语“不含内毒素”是指容器和/或组合物至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%,或100%不含内毒素。内毒素是与某些细菌(通常是革兰氏阴性菌)相关的毒素,但是内毒素也可能存在于革兰氏阳性细菌如单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogene*)中。最普遍的内毒素是存在于各种革兰氏阴性菌外膜的脂多糖(LPS)或脂寡糖(LOS),并且其代表这些细菌引起疾病的能力的核心致病特征。少量内毒素在人体中可以产生发热,降低血压以及激活发炎和凝血等不利生理效应。因此,通常希望从药品容器中除去大部分或全部痕量内毒素,因为即使少量也可能在人体造成不良影响。可以使用在本领域中已知的方法从容器除去内毒素,例如,容器可以在HEPA过滤的洗涤设备中用不含内毒素的水清洗,在250℃去除热原,并在100/10级洁净室(例如,100级洁净室,在每立方英尺的空气中包含不超过100个大于半微米的颗粒)中的

HEPA过滤工作站中清洁包装。

[0250] 如本文所用,术语“优质生产规范(GMP)”是指食品,医药产品和医疗设备的生产控制和管理以及质量控制检验。GMP不必然依赖于采样,而是依赖于药品和医疗器械制造涉及的工艺,活动和操作的每一个环节的文件记载。如果文件记载表明制造和测试产品的方式(这使得有可追溯性,并在将来出现问题的情况下,可以从市场召回)是不正确和不妥当的,那么该产品不符合所要求的规格,并被认为是被污染的(即,在美国是掺假的)。此外,GMP通常要求所有的生产和检测设备已经被认定为适合使用,并且在药品生产过程中使用的所有操作方法和程序(如制造,清洁和分析测试)已经根据预先确定的规格验证,以证明它们能够履行其声称的功能。在美国,措辞“现行的优质生产规范”出现在1938年的《食品、药品和化妆品法》501(B)中(21USC§351)。

[0251] 可以用于制备本发明的治疗组合物的试剂是能够增强人造血干细胞或祖细胞群体的归巢和植入潜力的试剂。这些试剂包括增加细胞中CXCR4基因表达的试剂,包括刺激PGE₂R₂和/或PGE₂R₄细胞信号转导通路的试剂。有用的试剂包括,但不限于PGE₂和具有dmPGE₂活性的试剂,例如PGE₂类似物,cAMP的类似物或增强剂,和Gα-S激活剂。在某些实施方案中,PGE₂R₄特异的类似物是特别感兴趣的,并且在一些实施方案中,试剂优先结合并激活PGE₂E₄受体。

[0252] 如本文所用,术语“前列腺素E₂”或“PGE₂”包括但不限于,任何天然存在的或化学合成的PGE₂分子,以及它们的“类似物”。如本文所用,术语“类似物”涉及这样的化学分子,其结构和功能与另一化学物质例如PGE₂类似,通常在结构上有单一的元素或基团的不同,但也可以通过修饰多于一个基团(例如,2,3,或4个基团)而不同,前提是其保留与亲本化学品相同的功能。这样的修饰对本领域技术人员而言是常规的,并包括,例如,另外的或取代的化学部分,如酸的酯或酰胺,保护基团,如对于醇或硫醇为苄基,对于胺为叔丁氧羰基。还包括的是对烷基侧链的修饰,如烷基取代(例如,甲基,二甲基,乙基等),对侧链的饱和或不饱和和水平的修饰,和添加修饰基团,如取代的苯基和苯氧基。类似物也包括偶联物,如生物素或抗生物素蛋白部分,酶如辣根过氧化物酶等,并且包括放射性标记部分,生物发光部分,化学发光部分或荧光部分。此外,部分可以被添加至本文所述的试剂,以改变它们的药代动力学性质,如增加体内或离体半衰期,或增加他们的细胞渗透性能等其他所需性质。还包括的是前药,已知它们增强药物的许多所需品质(例如,溶解度,生物利用度,制造等)(参见,例如,WO/2006/047476的示例性的EP激动剂前药,将对这类激动剂的披露通过引用并入本文)。

[0253] PGE₂“类似物”和具有dmPGE₂活性的试剂的示例性例子包括,但不限于,16,16-二甲基PGE₂(dmPGE₂),16,16-二甲基PGE₂对(对乙酰胺苯甲酰胺)苯基酯,11-脱氧-16,16-二甲基PGE₂,9-脱氧-9-亚甲基-16,16-二甲基PGE₂,9-脱氧-9-亚甲基PGE₂,9-酮氟前列醇,5-反式PGE₂,17-苯基-ω-拉坦(trinor)PGE₂,PGE₂丝氨酸酰胺,PGE₂甲基酯,16-苯基tetranor PGE₂,15(S)-15-甲基PGE₂,15(R)-15-甲基PGE₂,8-异-15-酮PGE₂,8-异PGE₂异丙酯,20-羟基PGE₂,11-脱氧PGE₁,诺氯前列素,硫前列酮,布他前列素,15-酮PGE₂,和19(R)羟基PGE₂。还包括与PGE₂具有类似结构的用卤素在9-位上取代的PG类似物或衍生物(参见,例如,WO2001/12596,其全部内容通过引用并入本文),以及2-脱羧-2-磷酸亚基前列腺素衍生物,如在美国专利公开第2006/0247214号中描述的那些,其全部内容通过引用并入本文)。

[0254] PGE₁类似物,包括但不限于前列地尔(alprostadil),也可以被用来激活PGE₂R₂(EP₂)和PGE₂R₄(EP₄)细胞信号传导通路,并考虑作为可用于本发明方法的试剂。

[0255] 对PGE₂R₂(EP₂)和PGE₂R₄(EP₄)细胞信号转导通路的刺激/激活被认为是增加细胞植入,维持细胞活力及增加细胞的归巢和增殖的造血干细胞和祖细胞的生理反应基础。因此,在一实施方案中,结合并刺激PGE₂R₂和PGE₂R₄受体的“非PGE₂基配体”(即,PGE₂R₂/PGE₂R₄激动剂)被考虑用于本发明的方法中。

[0256] 非PGE₂基EP₂受体激动剂的示例性的实例包括WO 2007/071456中所公开的CAY10399,ONO_8815Ly,ONO-AE1-259,CP-533,536和唑啉和茚。

[0257] 非PGE₂基EP₄激动剂的示例性实例包括WO/2000/038663;美国专利号6747037;和美国专利号6610719中公开的ONO-4819,APS-999Na,AH23848,ONO-AE1-329,和其他非PGE₂基EP₄激动剂。

[0258] 选择用于PGE₂ EP₄受体的试剂优先结合PGE₂ EP₄受体。这类试剂对EP₄受体比对任何其他三个EP受体(即EP₁,EP₂和EP₃)有更高的亲和力。选择性结合PGE EP₄受体的试剂,包括但不限于选自以下的试剂:5-[(1E,3R)-4,4-二氟-3-羟基-4-苯基-1-丁烯-1-基]-1-[6-(2H-四唑基-5R-基)己基]-2-吡咯烷酮,2-[3-[(1R,2S,3R)-3-羟基-2-[(E,3S)-3-羟基-5-[2-(甲氧基甲基)苯基]戊-1-烯基]-5-氧代环戊基磺酰基丙基磺酰基]乙酸,4-[2-[(1R,2R,3R)-3-羟基-2-[(E,3S)-3-羟基-4-[3-(甲氧基甲基)苯基]-1-烯基]-5-氧代环戊基]乙基磺酰基]丁酸甲酯,16-(3-甲氧基甲基)苯基-*p*-tetranor-5-thiaPGE;5-{3-[(2S)-2-{(3R)-3-羟基-4-[3-(三氟甲基)苯基]丁基}-5-氧代吡咯烷-1-基]丙基}噻吩-2-羧酸酯;[4'-(3-丁基-5-氧代-1-(2-三氟甲基苯基)-1,5-二氢-[1,2,4]三唑-4-基甲基]-联苯基-2-磺酸(3-甲基-噻吩-2-羰基)-酰胺];和((Z)-7-{(1R,4S,5R)-5-[(E)-5-(3-氯-苯并[b]噻吩-2-基)-3-羟基-戊-1-烯基]-4-羟基-3,3-二甲基-2-氧代-环戊基}-庚-5-烯酸),以及任何这些试剂的药学上可接受的盐。

[0259] “环AMP(cAMP)增强剂”是指这样的分子:与没有试剂或对照分子/组合物相比,其在细胞中产生或导致更大量的cAMP,或在细胞中产生或导致更大量的cAMP活性,或产生或导致cAMP相关信号转导通路的任何其他相关组分,或产生或导致cAMP信号转导通路的可测量的下游生理应答或效应。在具体实施方案中,具有dmPGE₂活性的试剂是cAMP类似物或增强剂。

[0260] 本发明的cAMP增强剂通常会增加或维持cAMP的细胞内水平和/或活性。最普遍的是,环腺苷单磷酸(cAMP,环AMP或3'-5'-环腺苷单磷酸)在许多生物过程中作为重要的第二信使。第二信使系统涉及细胞信号转导的方法,可扩散的信号转导分子在某些激活信号下迅速产生/分泌,该分子然后可以激活细胞内的效应蛋白以发挥细胞应答。比如,除了其他应答外,cAMP信号转导还会传递前列腺素的效应,该效应原本不能穿越过细胞膜。cAMP还调节Ca²⁺通过离子通道。

[0261] 可测量的下游效应可以包括更强的干细胞活力,增殖或扩增,自我更新和植入,以及根据本领域内的理解和本文的描述而显而易见的其他效应。cAMP增强剂可包括“激动剂”和“拮抗剂”,激动剂通常结合细胞的受体或其他分子,并触发该细胞的应答,拮抗剂通常对抗和阻止/抑制某个作用,如通过阻止cAMP的降解(例如阻止磷酸二酯酶)。也考虑cAMP类似物。

[0262] cAMP活性也可以通过多种机制被负调控。比如, $G_{\alpha-s}$ 亚基慢慢催化GTP水解为GDP, GDP反过来又使 G_s 蛋白失活, 从而切断cAMP通路。也可通过直接抑制腺苷酸环化酶或通过使由PKA磷酸化的蛋白去磷酸化, 而使cAMP通路在下游失活。可以由腺苷酸环化酶的抑制性 G_i 蛋白偶联受体的激动剂抑制腺苷酸环化酶, 并由此抑制cAMP产生。cAMP被磷酸二酯酶催化分解成AMP, 磷酸二酯酶也作为cAMP信号转导的负调节剂。

[0263] 抑制cAMP通路的分子的示例性实例包括, 例如cAMP磷酸二酯酶, 其将cAMP去磷酸化为AMP, 从而降低cAMP水平; G_i 蛋白, 其抑制腺苷酸环化酶, 从而降低cAMP水平; 和百日咳毒素, 其降低cAMP水平。

[0264] 本发明的cAMP增强剂通常能够在cAMP通路的任何阶段激活该通路, 或者可以防止cAMP的负调节(例如, 降解), 并包括化学品, 多肽, 抗体, 和其他具有这样作用效果的分子。激活cAMP通路的示例性的分子或试剂可包括, 例如, 霍乱毒素, 其增加cAMP的水平; 毛喉素(forskolin), 其为激活腺苷酸环化酶的双萜天然产物; 以及咖啡因和茶碱, 其抑制cAMP磷酸二酯酶, 导致随后激活cAMP通路的G蛋白被激活。

[0265] cAMP增强剂的示例性的实例包括, 但不限于佛波酯, 毛喉素, sclareline, 8-溴-cAMP, 霍乱毒素(CTx), 氨茶碱, 2,4-二硝基苯酚(DNP), 去甲肾上腺素, 肾上腺素, 异丙肾上腺素, 异丁基甲基黄嘌呤(IBMx), 咖啡因, 茶碱(二甲基黄嘌呤), 多巴胺, 咯利普兰, 伊洛前列素, 前列腺素 E_1 , 前列腺素 E_2 , 垂体腺苷酸环化酶激活肽(PACAP), 和血管活性肠多肽(VIP), 以及现有技术中已知的其他cAMP增强剂。如上面所列举的, cAMP增强剂的实例还包括cAMP和cAMP的类似物, 例如sp-5,6-DC1-BIMPS(BIMPS)和二丁酰cAMP(dbcAMP)等。

[0266] cAMP参与培养物中造血干细胞的生长和/或存活(参见, 例如, Negrotto et al., Experimental Hematology 34:1420-1428, 2006, 其全部内容通过引用并入本文)。例如, 观察到两种不同的cAMP类似物, 如二丁酰-cAMP和BIMPS, 通过抑制由一氧化氮(NO)或血清剥夺诱导的细胞凋亡而促进人脐带来源的CD34⁺细胞的存活。PKA和PI3K通路的参已通过他们各自的特异性抑制剂RP-cAMP和渥曼青霉素或LY294002逆转BIMPS的抗凋亡作用的能力而被证实。虽然血小板生成素(TPO), 粒细胞集落刺激因子(G-CSF), 或干细胞因子(SCF)并不会增加cAMP的水平, 但是这些生长因子所施加的抗凋亡活性被对腺苷酸环化酶的抑制所阻断并与BIMPS协同作用。因此, 环AMP类似物抑制暴露于NO或血清剥夺的细胞中降低的集落形成, 表明cAMP似乎不仅是控制CD34⁺存活的关键途径, 还是TPO, G-CSF和SCF-介导的细胞保护作用的介质。

[0267] 同样地, cAMP的激活, 如通过骨髓细胞移植后不久注射异丙肾上腺素(刺激腺苷酸环化酶)或二丁酰环腺苷-3',5'-单磷酸, 会几乎立即通过诱导DNA合成触发移植的干细胞进入S期(参见, 例如, Necas et al., Cell Proliferation, 9:223-230, 2008, 其全部内容通过引用并入本文)。

[0268] “ $G_{\alpha-s}$ 激活剂或激活试剂”或“G-蛋白 $\alpha-s$ 激活剂或激活试剂”包括能够激活刺激性G蛋白(“ $G_{\alpha-s}$ ”)或 $G_{\alpha-s}$ 变体的 α 亚基的任何分子。 $G_{\alpha-s}$ 激活剂的示例性实例包括PGE₂及其激动剂和衍生物, 和霍乱毒素。在具体实施方案中, 具有dmPGE₂活性的试剂是 $G_{\alpha-s}$ 激活剂。

[0269] 因此, 包含PGE₂和具有dmPGE₂活性的试剂(例如, dmPGE类似物, cAMP类似物或增强剂, 和/或 $G_{\alpha-s}$ 激活剂)的本发明的组合物, 可以用于保持或维持细胞活力, 并增加造血干细胞的植入, 归巢, 自我更新和/或体内增殖。

[0270] 因此,在具体实施方案中,通过使造血干细胞/祖细胞离体或体外接触没有限制的任意具体组合形式的PGE₂及其类似物(例如,dmPGE₂)和具有dmPGE₂活性的试剂,增加了该细胞的植入/植入潜力和/或体内增殖。

[0271] 在具体实施方案中,用一种或多种试剂处理(例如,接触)细胞群体,每种试剂的最终浓度为约1 μ M至约100 μ M。在某些实施方案中,用一种或多种药剂处理细胞群体,每种药剂的最终浓度为约1 $\times 10^{-14}$ M至约1 $\times 10^{-3}$ M,约1 $\times 10^{-13}$ M至约1 $\times 10^{-4}$ M,约1 $\times 10^{-12}$ M至约1 $\times 10^{-5}$ M,约1 $\times 10^{-11}$ M至约1 $\times 10^{-4}$ M,约1 $\times 10^{-11}$ M至约1 $\times 10^{-5}$ M,约1 $\times 10^{-10}$ M至约1 $\times 10^{-4}$ M,约1 $\times 10^{-10}$ M至约1 $\times 10^{-5}$ M,约1 $\times 10^{-9}$ M至约1 $\times 10^{-4}$ M,约1 $\times 10^{-9}$ M至约1 $\times 10^{-5}$ M,约1 $\times 10^{-8}$ M到约1 $\times 10^{-4}$ M,约1 $\times 10^{-7}$ M至约1 $\times 10^{-4}$ M,约1 $\times 10^{-6}$ M至约1 $\times 10^{-4}$ M,或任何中间范围的最终浓度。

[0272] 在另一具体实施方案中,用一种或多种试剂处理细胞群体,每种试剂的最终浓度为约1 $\times 10^{-14}$ M,约1 $\times 10^{-13}$ M,约1 $\times 10^{-12}$ M,约1 $\times 10^{-10}$ M,约1 $\times 10^{-9}$ M,约1 $\times 10^{-8}$ M,约1 $\times 10^{-7}$ M至约1 $\times 10^{-6}$ M,约1 $\times 10^{-5}$ M,约1 $\times 10^{-4}$ M,约1 $\times 10^{-3}$ M,或任何中间的最终浓度。在包括一种或多种试剂的治疗中,激动剂可以彼此为不同的浓度,或为相同的浓度。

[0273] 在具体实施方案中,细胞群体被处理(例如,与一种或多种试剂接触)1,2,3,4,5,6,7,8,9或10或更多次。细胞群体可以与一种或多种试剂在同一容器内间歇地,不连贯地或依次地接触(例如,使细胞群体与一种药物接触一段时间,更换培养基和/或洗涤细胞群体,然后用相同或不同的药剂组合将此循环重复相同的预定时间段或不同的预定时间段)。

[0274] 在优选的实施方案中,用终浓度约10 μ M的PGE₂R₂或PGE₂R₄激动剂(例如,16,16-二甲基PGE₂) 在约37 $^{\circ}$ C处理细胞群体2小时。

[0275] 示例性的处理时长一般包括约1小时,约2小时,或约3小时的处理时间。

[0276] 在具体实施方案中,可以将在本发明中有用的试剂从第一容器转移至第二容器,其中所述第二容器是具有特氟龙(teflon)盖的2mL小瓶,该小瓶不含内毒素并适用于试剂的存储或离体给药,其中所述试剂是在基本上不含乙酸甲酯的二甲亚砜(DMSO)中提供的约10mM存储浓度的16,16-二甲基PGE₂,并且其中在该小瓶中有空气覆盖。优选地,整个组合物,包括容器和溶剂在内,均是无菌和不含内毒素的。

[0277] 在某些实施方案中,所述第二或另一容器可以装有包括造血干细胞或祖细胞的细胞,如骨髓细胞,外周血细胞,或脐带血细胞。因此,这些和其它实施方案可能涉及将所述组合物从第一或初始容器转移至第二容器,所述第二容器适用于离体处理条件并装有在合适的培养基中的造血干细胞或祖细胞。或者,可以将人细胞群体转移到已经包含所述组合物并已经适合离体处理或孵育条件的第一或第二容器中,如PE袋或管。

[0278] E. 本发明的给药就绪组合物

[0279] 本发明的治疗组合物是无菌的,并且适合和准备好向病人给药(即没有任何进一步处理的情况下可以给予)。在一些实施方案中,治疗组合物准备好输注到患者体内。如本文所用,术语“给药就绪”,“准备好给药”或“准备好输注”是指本发明的基于细胞的组合物在移植或给予个体之前不需要任何进一步的处理或操作。

[0280] 适合向患者给药的无菌的治疗学上可接受的组合物可以包含一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂(例如,药学上可接受的介质,例如,细胞培养基),或其他药学上可接受的成分。药学上可接受的载体和/或稀释剂部分地取决于被给予的具体组合物,以及用于给予治疗组合物的具体方法。因此,存在本发明的治疗组合物的各种各样的

合适的制剂(例如,参见Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿制药科学),第17版,1985))。

[0281] 在具体的实施方案中,包含造血干细胞和/或祖细胞的治疗性细胞组合物包含药学上可接受的细胞培养基。本发明的包含基于细胞的组合物的治疗组合物可通过肠内或非肠道给药方法另行给药,或与其它合适的化合物联合给药,以实现所需的治疗目标。

[0282] 药学上可接受的载体和/或稀释剂必须有足够高的纯度和足够低的毒性,以使其适合给予被治疗的人类个体。它还应该维持或增加治疗组合物的稳定性。当与本发明的治疗组合物的其它组分组合时,药学上可接受的载体可以是液体或固体,并根据考虑的计划给药方式选择,以提供所希望的体积,稠度等。例如,药学上可接受的载体可以是,但不限于,结合剂(例如,预胶化玉米淀粉,聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素等),填充剂(例如,乳糖和其它糖,微晶纤维素,果胶,明胶,钙硫酸酯,乙基纤维素,聚丙烯酸酯,磷酸氢钙等),润滑剂(例如,硬脂酸镁,滑石,二氧化硅,胶体二氧化硅,硬脂酸,硬脂酸金属盐,氢化植物油,玉米淀粉,聚乙二醇,苯甲酸钠,醋酸钠等),崩解剂(例如,淀粉,淀粉羧乙酸钠等),或润湿剂(例如,月桂基硫酸钠等)。本发明的组合物的其它合适的药学上可接受的载体包括但不限于,水,盐溶液,醇,聚乙二醇,明胶,直链淀粉,硬脂酸镁,滑石,硅酸,粘性石蜡,羟甲基纤维素,聚乙烷基吡咯烷酮等。

[0283] 这样的载体溶液也可以含有缓冲液,稀释剂和其它合适的添加剂。本文所用的术语“缓冲液”指的是其化学组成会中和酸或碱而没有显著pH值变化的溶液或液体。本发明所考虑到的缓冲液的实例包括但不限于,杜尔贝科氏磷酸盐缓冲盐水(PBS),林格氏溶液,5%葡萄糖水(D5W),正常/生理盐水(0.9%NaCl)。

[0284] 这些药学上可接受的载体和/或稀释剂可以以足以将治疗组合物的pH值维持在约3至约10之间的量存在。因此,缓冲剂可以是高达基于总组合物约5%的重量比。电解质,例如但不限于,氯化钠和氯化钾,也可以包含在治疗组合物中。

[0285] 在一方面中,治疗组合物的pH值范围是约4至约10。或者,治疗组合物的pH值范围是约5至约9,约6至约9,或约6.5至约8。在另一实施方案中,治疗组合物包含具有在一个所述pH值范围中的pH值的缓冲液。在另一实施方案中,治疗组合物的pH值为约7。或者,治疗组合物的pH范围是约6.8至约7.4。在又一实施方案中,治疗组合物的pH值为约7.4。

[0286] 本发明的无菌组合物,可以是无毒的药学上可接受的介质中的无菌溶液或悬浮液。本文所用的术语“悬浮”可指在其中细胞不附着到固体支持物的非粘附状态。例如,保持悬浮的细胞可被搅拌并不粘附到支持物,如培养皿。

[0287] 悬浮液是其中细小的物质与另一物质结合的分散系(混合物),同时细小的物质是如此细小并被充分混合,因此它不会快速沉降。可以使用媒介物,如液体介质(包括溶液)来制备悬浮液。在具体的实施方案中,本发明的治疗组合物是悬浮液,其中造血干细胞和/或祖细胞分散在可接受的液体介质或溶液例如盐水或无血清培养基中,并没有附着到固体支持物。在日常生活中,最常见的悬浮液是液态水中的固体悬浮液。在可接受的稀释剂中,例如,媒介物及溶剂,可以采用的是水,林格氏溶液,等渗氯化钠(盐水)溶液及无血清细胞培养基。在一些实施方案中,采用高渗溶液来制备悬浮液。此外,无菌的固定油通常用作溶剂或悬浮介质。对于非肠道应用,特别合适的媒介物包括溶液,优选油性或水性溶液,以及悬浮液,乳液或植入物。水性悬浮液可以含有增加悬浮液粘度的物质,包括如羧甲基纤维素

钠、山梨醇或葡聚糖。在一些实施方案中,输注溶液对个体组织是等渗的。在一些实施方案中,输注溶液对个体组织是高渗的。

[0288] 构成本发明的给药就绪的治疗组合物的药学上可接受的载体,稀释剂和其它组分,来自使治疗组合物可用于临床治疗方案的美国药品级试剂。通常情况下,在使用之前,将这些成品试剂(包括任何介质,溶液,或其他药学上可接受的载体和/或稀释剂)通过本领域中常用的方式灭菌,如过滤灭菌,并测试各种不希望的污染物,如支原体,内毒素,或病毒的污染。在一实施方案中,药学上可接受的载体基本上不含人或动物来源的天然蛋白质,并且适合存储治疗组合物的包含造血干细胞和祖细胞的细胞群体。拟将治疗组合物给予病人,因而该治疗组合物基本上不含如牛血清白蛋白,马血清和胎牛血清的细胞培养基组分。

[0289] 本发明还部分地考虑到,本发明的具体组合物和/或培养物中的药学上可接受的细胞培养基的应用。这样的组合物适合向人类个体给药。一般来说,支持本发明的所需重编程和/或编程的细胞的维持,生长和/或健康的任何介质均适合用作药物的细胞培养基。在具体的实施方案中,药学上可接受的细胞培养基是无血清培养基。

[0290] 治疗组合物可以包含适于保存构成该组合物的细胞群体的无血清培养基。与含血清培养基相比,无血清培养基具有几个优点,包括:组成简单且成分更清楚,污染物数量减少,传染源的潜在来源被消除,并且成本更低。在多个实施方案中,无血清培养基是无动物成分的,并任选地不含蛋白质。任选地,培养基可以包含生物药学上可接受的重组蛋白质。“无动物成分的”培养基是指其中组分来自非动物来源的培养基。在无动物成分的培养基中,用重组蛋白取代天然动物蛋白,并且营养素获自合成,植物或微生物来源。相比之下,无蛋白培养基被定义为基本上不含蛋白质。

[0291] 在本发明中采用的无血清培养基是适合用于人类治疗程序和产品的制剂。一种无血清培养基是QBSF-60(Quality Biological, Inc.),如美国专利号5945337中描述的。QBSF-60用美国药品级组分优化,并由以下组成:基础培养基IMDM加2mM的L-谷氨酰胺,100U/mL青霉素,100µg/mL链霉素,人注射级血清白蛋白(4mg/mL)(Alpha Therapeutic Corporation),部分铁饱和人转铁蛋白(300µg/mL)(Sigma Chemical Corporation or Bayer Corporation)和重组人胰岛素钠(0.48U/mL)(Sigma)。本领域中已知的其他无血清培养基包括但不限于:Life Technologies公司编号StemPro-34的无血清培养基;Capmany, et al., Short-term, serum-free, static culture of cord blood-derived CD34⁺ cells: effects of FLT3-L and MIP-1α on in vitro expansion of hematopoietic progenitor cells, Haematologica 84:675-682(1999); Daley, J P, et al., Ex vivo expansion of human hematopoietic progenitor cells in serum-free StemPro™-34 Medium, Focus 18(3):62-67; Life Technologies有关AIM V无血清培养基的目录信息; BioWhittaker有关X-VIVO 10无血清培养基的目录信息; 5,397,706,标题为Serum-free basal and culture medium for hematopoietic and leukemia cells; 没有细胞扩增; Kurtzberg et al., 18:153-4(2000); Kurtzberg et al., Exp Hematol 26(4):288-98 (April 1998)。

[0292] 本领域普通技术人员将理解,上面的培养基实例是示例性的,而不以任何方式限制适合于在本发明中使用的培养基的制剂,并有很多在本领域中公知的和可用的这类培养基。

[0293] 在多个实施方案中,本发明的治疗组合物包含人血清白蛋白(HSA)(如5% HSA)和低分子量(LMW)葡聚糖的无菌溶液。

[0294] 所述治疗组合物基本上没有支原体,内毒素和微生物污染。在具体的实施方案中,治疗组合物包含少于约10,5,4,3,2,1,0.1,0.05 μ g/mL的牛血清白蛋白。

[0295] 对于内毒素,“基本上不含”是指比FDA允许的生物制剂的内毒素(总内毒素为每天5EU/kg体重,对于平均70kg的人为350EU/总剂量的细胞)更少的内毒素/剂细胞。

[0296] 对于支原体和微生物污染,本文所用的“基本上没有”是指本领域技术人员已知的普遍接受的测试的阴性读值。例如,通过将治疗组合物样品在肉汤培养基中传代培养,并在37°C下在第1,3,7,和14天与合适的阳性和阴性对照涂布在琼脂平板上来确定支原体污染。在100倍显微镜下将样品的外观与阳性和阴性对照的外观进行比较。此外,将指示细胞培养物的接种物孵育3和5天,并使用结合DNA的荧光染料,通过荧光显微镜在600倍下检查支原体的存在。如果琼脂和/或肉汤培养基方法和指示细胞培养方法均未显示支原体污染的证据,则样品被认为是令人满意的。

[0297] 本发明的治疗组合物是HLA分型的,并且可以匹配或部分匹配移植的特定患者。HLA类型是指被称为人白细胞抗原的独特蛋白质集。这些蛋白存在于每个独立的细胞上,并允许免疫系统识别“自我的”和“外来的”。给予被识别为外来的细胞或组织可能导致相容性问题,如免疫排斥反应或移植物抗宿主病(GVHD)。因此,HLA类型和匹配在器官和组织移植中特别重要。

[0298] 有六种主要的HLA(HLA-A,HLA-B,HLA-C,HLA-DR,HLA-DP,和HLA-DQ)。在人群中,每种HLA抗原有多种亚型,并且由于我们的基因组的二倍体性质,对每种HLA,每个个体可以有两个不同亚型。因此,完全匹配将匹配12/12个亚型。从预期接受者的同一个体或同卵双生个体捐献的细胞或组织将有完美的HLA类型,被称为同系基因的或自体的。还可以理解,包括但不限于民族背景和种族的某些因素与某些HLA类型相关。

[0299] 存在许多主要和次要HLA亚型,并且应当理解,合适的匹配可以包括一小组主要HLA,所有主要HLA,一些或所有的主要和次要HLA或本领域公知的缓解免疫排斥或GVHD的任何组合之间的匹配。还应当理解,什么构成良好的HLA类型匹配的具体指导方针取决于很多因素。因此,必须由本领域的技术人员做出判断以评估给定的细胞或组织样品移植到给定的个体中的适用性。

[0300] 可以使用所谓的低分辨率方法(例如,通过血清分型)或使用基于抗体的方法来确定HLA类型。血清分型是基于HLA类型的抗体识别。血清分型可以区分28种不同的HLA-A基因,59种HLA-B基因和21种HLA-C基因。血清分型方法的完美匹配是所谓的6/6个匹配,指存在于每个个体中的每种HLA(A,B,和C)的两个等位基因。在某些情况下,5/6个匹配或更少的匹配可以被本领域技术人员确定认为是良好匹配。

[0301] 确定HLA类型的其他低或中分辨率方法检查个体的HLA亚型,但不依赖于确定个体的HLA等位基因的实际序列。通常情况下,捐献者与接受样品的个体有关,在这种情况下仅血清分型或与其他低或中分辨率方法组合,可能足以确定样品是否适合移植。在其他情况下,5/6个匹配或更低的匹配容易找到,但完美的匹配不容易找到。在这种情况下,可能有利的是,使用低匹配的细胞或组织,而不是花费时间和努力寻找更好的HLA类型匹配。

[0302] 高分辨率方法涉及检查HLA基因或基因的表达产物(蛋白质或RNA)的具体序列。高

分辨率方法可以区分成千上万种不同的亚型。

[0303] 在最低限度,对治疗组合物的HLA分型在例如低分辨率/分割抗原水平对6种HLA基因座HLA-A,-B,和-DR进行。

[0304] 基于DNA的检测方法可用于HLA-DR分型。基于DNA的检测可用于HLA-A和-B。对患者,家庭分型及确认潜在的无关系的捐献者的HLA类型的移植核心指导方针包括:主要利用基于DNA的检测方法对HLA-A,B,和-DR基因座进行分型,对于DRB1,以等位基因水平分辨率进行,对于HLA-A和-B,以低分辨率/分割抗原水平进行。对患者和选定的捐献者的分型可以使用同一系列的试剂,方法和解释标准,利用新鲜组织样品进行,以确保HLA的一致性。遵守HLA检测的质量保证和质量控制。

[0305] 在多个实施方案中,细胞群体包含单体分型的造血干细胞或祖细胞。在一些的实施方案中,构成治疗组合物的细胞群体是基于HLA-A,HLA-B,HLA-C和HLA-DRB1进行HLA分型的。在具体的实施方案中,细胞群体是基于由HLA-DRB3/4/5,HLA-DQB1和DPB1组成的组进行HLA分型的。在一些实施方案中,构成治疗组合物的细胞群体与特定的人患者匹配。在一些实施方案中,HLA单体分型的细胞群体与特定的人类个体具有4/6个HLA匹配。HLA匹配可以基于等位基因或抗原或其组合。在一些实施方案中,HLA单体分型的细胞群体与特定的人类个体部分错配,所述个体是例如给予治疗组合物的个体。

[0306] 本发明的治疗组合物能够从FDA(即,FDA批准)及其他国家和监管地区的其他卫生当局获得生产许可,以及表征关于产品适应症,产品功效,安全性和纯度的信息的产品标签。FDA许可可能是基于细胞剂量和HLA错配。在一些实施方案中,根据认可的标准,对本发明的治疗组合物进行处理、冷冻保存,灭菌并作出标记,例如,RH和ABO分型,HLA分型和A,B和DR- β -1基因座,以及处理后计数,CD34⁺计数,CFU-GM计数,传染病筛查,家族病史以及家属同意捐献的证据。待用于移植的治疗组合物将包含最少4/6个抗原或3/6个等位基因匹配的细胞和本文所述的细胞剂量。

[0307] F. 智能生物容器

[0308] 在多个实施方案中,本发明部分地考虑到细胞例如造血干细胞/祖细胞移植疗法,所述方法包括:在足以增加接触过的细胞在个体中植入和/或体内增殖的条件下,使细胞群体与一种或者多种药剂在本文所述的不含内毒素的容器中接触,并将所述接触过的细胞给予所述个体。

[0309] 本发明部分地进一步考虑到,增加干细胞在个体中(例如,人)植入的方法,包括:在足以增加接触过的细胞在个体中的植入的条件下,在本文所述的不含内毒素的容器中,使包含造血干细胞和/或祖细胞的细胞群体(例如,骨髓细胞,外周血细胞和/或脐带血细胞)与增加造血干细胞和/或祖细胞中的CXCR4表达的试剂接触,所述试剂如PGE₂,dmPGE₂,或具有dmPGE₂活性的试剂。

[0310] 本发明部分地进一步考虑到,增加个体中(例如,人)造血干细胞或祖细胞数目的方法,包括:在足以增加接触过的细胞在个体中体内增殖的条件下,在本文所述的不含内毒素的容器中,使包含造血干细胞和/或祖细胞的细胞群体(例如,骨髓细胞,外周血细胞和/或脐带血细胞)与增加造血干细胞和/或祖细胞中的CXCR4表达的试剂接触,所述试剂如PGE₂或其类似物,例如16,16-二甲基PGE₂(dmPGE₂),或具有dmPGE₂活性的试剂。

[0311] 在多个示例性的实施方案中,本发明部分地提供了在足以维持干细胞/祖细胞活

力和增加植入、归巢和体内增殖的条件下,在本文所述的不含内毒素的容器中,使造血干细胞或祖细胞与PGE₂或其类似物接触的方法,所述试剂例如16,16-二甲基PGE₂(dmPGE₂)或具有dmPGE₂活性的试剂。

[0312] 在一实施方案中,本发明部分地提供了制备用于诸如骨髓移植的移植的细胞群体的方法,所述细胞群体例如骨髓细胞,动员的外周血细胞,脐带血细胞,所述方法包括:在与非接触的细胞相比,在足以增加接触过的细胞在个体中植入和/或体内增殖的条件下,在本文所述的不含内毒素的容器中,使该细胞与dmPGE₂或具有dmPGE₂活性的试剂接触。

[0313] 在具体实施方案中,本发明涉及了增加造血干细胞或祖细胞在个体中植入的方法,包括:给予所述个体细胞来源或群体,与非接触的细胞相比,所述细胞来源或群体已在足以增加接触过的细胞在个体中植入的条件下,在本文所述的不含内毒素的容器中,与dmPGE₂或具有dmPGE₂活性的试剂接触过。

[0314] 在另一具体实施方案中,本发明涉及治疗需要造血干细胞/祖细胞移植的个体的方法,包括:选择所述需要造血干细胞/祖细胞移植的个体,并给予所述个体细胞群体,与非接触的细胞相比,所述细胞群体已在足以增加接触过的细胞在个体中的植入和/或体内增殖的条件下,在本文所述的不含内毒素的容器中,与dmPGE₂或具有dmPGE₂活性的试剂接触过。

[0315] 如本文所用,术语“容器”一般涉及能够为了以下目的而被使用的任何物品:离体地或体外地培养,处理,操作,保存,分析,孵育,给予,以及以其他方式建立、支持、收获包含造血干细胞或祖细胞的细胞群体及其副产物,或者本文所列举和考虑的各种各样的目的。

[0316] 容器的示例性实施方案包括但不限于:袋(例如,静脉内注射(IV)袋;细胞培养袋,例如,VueLife™,KryoSure™,KryoVue™,PermaLife™,Lifecell®,X-Fold™,Si-Culture™,VectraCell™),生物反应器,细胞或组织培养装置,口袋,胶囊,培养小瓶,装置,细胞工厂,容器,培养管(例如,微量离心管,EPPENDORF TUBES®,FALCON®圆锥形管等),培养皿(例如,Petri培养皿),培养瓶,转瓶,滚瓶,多孔板(例如,2孔,4孔,6孔,12孔,24孔,48孔,96孔,以及384孔板),微型孵育器,微载体,微板,显微镜载玻片和腔室玻片,以及植入设备(例如,胶原蛋白海绵)。容器可以被多次使用,或者可以是单次使用的容器。

[0317] 优选地,本发明的容器不含内毒素,并根据本文他处讨论的GMP规范制造。

[0318] 在具体实施方案中,容器可以由具有一个或多个以下特点的材料制造:透气性(材料具有合适的氧气,二氧化碳和氮气的气体传输率),可以忽略不计的水损失率(材料实际上不透水),化学和生物惰性的(材料不与容器内容物发生反应),以及在各种条件下保持柔软性和强度(材料使得容器可以被微波处理,用紫外线照射处理,离心,或在广泛范围的温度例如-100℃至+100℃下使用)。

[0319] 本领域技术人员可以选择具有所需的透气性,生物反应性和生物相容性,耐温性,柔韧性,热传导性以及强度的适当的聚合物材料。

[0320] 适合用于制造本发明的容器的示例性材料包括但不限于:玻璃,陶瓷,金属,热固性和弹性体单体和聚合物,单体和聚合的热塑性塑料。适合用于制造本发明的容器的示例性的热塑性材料包括但不限于:缩醛类树脂,聚甲醛树脂(delrin),碳氟化物,聚酯,聚酯弹性体,金属茂,聚酰胺,尼龙,聚氯乙烯,聚丁二烯,有机硅树脂,ABS(“丙烯腈,丁二烯,苯乙烯”的首字母缩写),聚碳酸酯(在塑料工业中也简称为“PC”),聚丙烯,聚乙烯,聚苯乙烯,液

晶聚合物,合金,以及它们的组合和混合物和复合体,以及强化合金及其它们的组合和混合物和复合体。

[0321] 在具体实施方案中,容器可以由选自以下的一种或多种材料来制造:二乙基己基邻苯二甲酸酯,聚氯乙烯,聚乙烯,聚丙烯和氟化乙烯-丙烯。

[0322] 在多个示例性的实施方案中,可以将容器制造成具有这样的横截面壁厚度,所述横截面壁厚度以所选择的材料和预期的应用为基础,并且完全受其制约。示例性的横截面壁厚度包括但不限于,约0.25mm至约2.0mm,约0.5mm至约1.5mm,及约0.75mm至约1.25mm的厚度。在具体实施方案中,容器的横截面壁厚度为至少0.2mm,0.3mm,0.4mm,0.5mm,0.6mm,0.7mm,0.8mm,0.9mm,1.0mm,1.1mm,1.2mm,1.3mm,1.4mm,1.5mm,1.6mm,1.7mm,1.8mm,1.9mm或2.0mm,或任何中间的厚度。

[0323] 在具体示例性实施方案中,本发明的容器被设计为容纳特定的体积。本发明的容器的示例性体积包括但不限于,约10mL,约25mL,约50mL,约75mL,约100mL,约150mL,约250mL,约500mL,约750mL,约1000mL,约1250mL,约1500mL,约1750mL,约2000mL,或更大的体积,包括任何中间体积。例如,10mL和25mL之间的中间体积,包括11mL,12mL,13mL,14mL,15mL,16mL,17mL,18mL,19mL,20mL,21mL,22mL,23mL和24mL。

[0324] 在某些实施方案中,本文涉及的容器包括1,2,3,4或5个隔室。隔室可以是相同的尺寸或不同的尺寸,并且可以具有相同的或不同的孔隙度。在一实施方案中,相邻的隔室的孔隙率使得小分子,营养物,多肽和/或生长因子可以在隔室之间自由地交换,但其中每个隔室的细胞被限制在各自的隔室中。

[0325] 相关领域技术人员能够基于制造材料的知识和容器的预定用途制造具有所需的厚度,体积和隔室数量的容器。

[0326] 在具体实施方案中,可以由容纳特定涂层,薄膜,或其它试剂(例如,PGE₂或具有dmPGE₂活性的试剂或其适当的组合)的材料来制造容器。

[0327] 使用相关领域技术人员已知的方法,可以将容器的内表面设计为容纳有具有不同疏水性,亲水性或两亲分子的涂层。例如,常用的疏水性材料,例如,本文所公开的热固性材料,弹性体,橡胶和热塑性塑料,如聚苯乙烯,聚碳酸酯,ABS,以及其它聚合物材料,接受疏水性分子的结合(例如,具有一个或多个疏水性区域的蛋白质)。此外,具体的实验,工业,或临床应用可能需要,排除,或不关心不同类型分子的结合,所述分子例如,核酸,蛋白质,碳水化合物等。同样希望的是防止,最小化和/或最大化分子与基底的结合,这取决于具体应用的目标。

[0328] 在具体示例性实施方案中,本文涉及的容器包括一个或多个输入和/或输出端口,用于引入,交换或除去化合物,细胞,细胞培养基等。视情况而定,端口可提供无针接入或可以包括适当的针式接入点。每个端口都可以含有一个或多个适配器(例如鲁尔适配器),阀和/或过滤器。

[0329] 本发明部分地考虑到包括任何合适的组合和构造的一个或多个装置的容器,所述装置指示例如容器内容物温度,容器已经处于任何指定温度的时间及多种环境条件(例如,pH值,氧浓度,二氧化碳浓度,葡萄糖浓度)。本发明涉及卡,带,磁盘,贴纸,标签,探测器,传感器,和小型电子装置等形式的装置。涉及的设备可以被集成到容器的材料中,或可替换地,可以与容器分开制造,随后永久或非永久地固定或附着在容器的外表面。

[0330] 在一实施方案中,容器包括温度指示装置。在优选的实施方案中,容器包括温度指示装置和经过时间指示装置,所述装置要么分开作为单独的装置,要么结合为单个装置。在其他的实施方案中,容器包括温度指示装置,经过时间指示装置和一个或多个指示环境条件的装置。多个装置可以作为单独的装置分开制造,或作为单个装置制造。

[0331] 如本文所用,术语“温度指示装置”是指感应,测量,和/或指示容器和/或容器内容物的温度,并包括一个或多个“温度指示器”的装置。如本文所用,术语“温度指示器”是指产生指示温度的信号的指示器。温度指示器可以产生对应于实时温度或暴露于具体温度任何预定时长的信号。在具体实施方案中,温度指示器是双向的。在其它实施方案中,所述一个或多个温度指示器单向地指示容器和/或容器内容物已达到预定的温度,或已经历预定温度达具体时长。在进一步的实施方案中,温度指示装置包括任何数量或组合的一个或多个双向和单向温度指示器。

[0332] 温度指示装置可以被用户激活,或通过暴露于预定温度而被激活。如本文所用,术语“预定温度”是指由用户选择来进行监测的温度或温度范围。在多个实施方案中,所述预定温度是指示预计使用容器所需温度或温度范围的“目标温度”。在多个实施方案中,温度指示装置提供指示一个或多个预定温度的温度指示器,即容器和/或容器内容物的温度处于、高于或低于目标温度,或者高于、低于或在目标温度范围内。本发明涉及多个目标温度和温度范围,而没有限制。

[0333] 考虑在本发明的温度指示器中使用多种类型的信号。例如,温度指示器可以通过以下方式指示温度:产生可视信号(例如,数字显示,颜色变化,曲线图),声音信号,红外信号,无线电信号,模拟信号,数字信号,或其组合。例如,温度指示装置可以包括一个或多个:指示温度的液晶显示器(LCD);指示温度或指明物体低于或超过预定目标温度的声音或语音合成器;通过声波,超声波或其他波指示温度的模拟,红外或无线电信号;和/或电子地指示温度的数字信号。

[0334] 产生温度的可视指示的温度指示器,可以产生包括颜色在内的信号,所述颜色对应于处于、高于或低于目标温度,或者高于、低于或在目标温度范围内的容器和/或容器内容物温度。本发明考虑到,任何颜色组合均可以与任何数量和组合的温度指示器一起使用,而不受限制。本领域技术人员可以采用任何数量的在某些温度下反映某些颜色的化学品,并可以选择这样的化学物质,以反映对应于具体温度的所希望的颜色。

[0335] 在其他示例性的实施方案中,温度指示装置可以包括一种或多种的温度刻度(temperature scale),每个温度刻度都包括一个或多个指示预定温度或温度范围的温度指示器。某个温度刻度内的每个温度指示器均可以产生信号(例如,可视信号,数字信号)。

[0336] 示例性的温度刻度包括在5℃,10℃,15℃,20℃,25℃,30℃,35℃,40℃,45℃,50℃,55℃,60℃,65℃,70℃,75℃,80℃,85℃,90℃,95℃,100℃,110℃,125℃,130℃,140℃,150℃,160℃,170℃,180℃,190℃或200℃或更高的范围内增幅为1℃,2℃,3℃,4℃,5℃,6℃,7℃,8℃,9℃,10℃的温度指示器。

[0337] 示例性的温度范围,包括但不限于,约4℃至约65℃,约4℃至约50℃,约4℃至42℃,约4℃到37℃的温度范围,或任何中间的温度范围。

[0338] 本发明考虑到,但不限于,温度指示装置可以包括一种或多种在任何温度范围内的任何增幅的温度刻度,每种刻度包括任意数量和组合的温度指示器,以指示预定温度或

温度范围。

[0339] 在一实施方案中,温度指示装置包括多个双向温度指示器和一个或者多个单向温度指示器,每个所述双向温度指示器都与特定的温度范围相关联,所述单向温度指示器指示一个或多个预定温度已经达到或经历任何预定的时长。双向指示器单独实时地提供温度的可视指示。温度的可视指示对应于处于、高于或低于目标温度,或者高于、低于或在目标温度范围内的容器和/或容器内容物温度。一旦已经达到预定温度,单向指示器维持可视指示。

[0340] 本发明还考虑到包括一个或多个温度指示装置和一个或多个经过时间指示装置,或指示多种环境条件的装置的容器。

[0341] 如本文所用,术语“经过时间指示装置”是指包括一个或多个“经过时间指示器”的装置。如本文所用,术语“经过时间指示器”是指测量、监测和指示已经经过预定的时长的指示器。每个经过时间指示器可以单独地被用户激活,或通过暴露于具体的预定温度或温度范围而被激活。

[0342] 一旦被激活,经过时间指示器指示自激活起的时间。在一实施方案中,给定的经过时间指示器测量预定时长,然后产生一个信号,指示已经经过预定时长的时间。在多个示例性的实施方案中,经过时间指示装置包括1,2,3,4,5,或更多个经过时间指示器,每个能够单独地被用户单独地激活,或通过暴露于相同的或不同的预定温度或温度范围而被激活。

[0343] 在多个实施方案中,本发明部分地考虑到包括经过时间指示器的容器,所述经过时间指示器指示容器和/或内容物已经暴露于,经历或维持在一个或多个预定的温度或温度范围。在相关的实施方案中,经过时间指示器指示容器和/或内容物已经暴露于,经历或维持在一个或多个预定的温度或温度范围的预定时长。经过时间指示器可以产生连续的信号,或在已经过总预定时间的预定百分比的时间点产生一个或多个信号,例如在待测定的总经过时间的定期间隔产生信号。

[0344] 在一实施方案中,经过时间指示器在待测定的总经过时间的定期间隔产生信号。例如,如果经过时间指示器被设计来测量和指示1个小时的总经过时间,则该指示器可以产生信号以指示已经经过15分钟,30分钟,45分钟,和1个小时的时间点。示例性的定期间隔包括1分钟的间隔,2分钟的间隔,5分钟的间隔,10分钟的间隔,15分钟的间隔,20分钟的间隔,30分钟的间隔,45分钟的间隔,60分钟的间隔,90分钟的间隔,120分钟的间隔或更长的间隔。任何总的经过时间段中的定期间隔的示例性数目包括1,2,3,4,5,6,7,8,9,10个或更多个间隔。

[0345] 在另一实施方案中,经过时间指示器产生连续信号,指示已经经过的时长,或尚未经过的时长(即,剩余时间)。例如,被设计来测量和指示1个小时的总的经过时间的经过时间指示器可以是进度条,饼图,或时钟的形式,其中信号在被激活后产生,并相对于已经经过的总经过时间的分数而线性增加。在一实施方案中,一旦已经经过总时间,则经过时间指示器可以终止产生信号或产生不同的信号来指示已经经过总时间。

[0346] 在具体示例性的实施方案中,经过时间显示装置包括一个或多个任意组合的经过时间指示器。每个经过时间指示器可以由用户单独地激活或通过暴露于不同的预定温度而被激活。此外,每个经过时间指示器可以测量不同的预定时长并产生信号。

[0347] 仅仅是为了说明的目的,单个经过时间指示装置可以包括:用户激活的测量并指

示1小时的经过时间的经过时间指示器;用户激活的测量并指示2小时的经过时间的经过时间指示器;用户激活的测量并指示10分钟的经过时间的经过时间指示器;通过暴露于4℃的预定温度而被激活的测量并指示自激活起1小时,2小时,或更长时间的经过时间的经过时间指示器;和/或通过暴露于30℃至40℃范围中的预定温度(优选地37℃)而被激活的经过时间指示器,其测量并指示自激活起1小时,2小时,或更长的经过时间。

[0348] 经过时间指示器所产生的信号的示例性类型包括但不限于,可视信号,声音信号,红外信号,无线电信号,数字信号,模拟信号,和它们的组合。

[0349] 本发明部分地还考虑到包括指示装置的容器,所述指示装置包括一个或多个测量,监测和指示容器内容物的例如pH值,二氧化碳浓度,氧浓度,摩尔渗透压浓度或葡萄糖浓度的环境指示器。在一实施方案中,环境指示器连续监测并产生指示环境条件的信号。在另一实施方案中,环境指示器在一个或多个预定的时间和/或在定期间隔监测和产生信号。信号优选地为可视信号,更优选地为在LED,OLED或LCD上产生的字母数字信号。

[0350] 在多个实施方案中,环境指示器包括测量,监测和指示容器内环境条件的数字传感器。此外,可以考虑到,可以校正传感器来测量任何范围的环境条件,而不受限制。因此,每个环境条件的正常范围可被预编程进每个环境指示装置。范围可以包括一个或多个最小阈值,最佳条件或最大阈值。在具体实施方案中,当被测量或监测的环境条件超出最小或最大阈值时,环境指示器将产生声音信号以指示环境条件不在可接受的范围内。

[0351] 其他示例性的环境指示器包括但不限于, Ca^{++} 、钾、钠、镁、锰、硫酸盐、磷酸盐和氯化物浓度。

[0352] 本发明部分地考虑到包括指示装置组合的容器,所述装置指示例如,容器内容物温度,容器已经在任何指定温度的时间,和任选地一种或多种不同的实验条件(例如,pH值,氧浓度,葡萄糖浓度)。在优选实施方案中,组合装置可以包括本文所述的单独的装置和指示器并具有其特征。本领域技术人员将理解,环境指示装置优选地与容器的内容物接触。可以将涉及的装置整合进容器的材料中,在整合处,容器的通透性是这样的,使得具体的环境感应装置与容器内腔或容器内容物接触。在另一实施方案中,环境指示装置可以与容器分开制造,并随后永久地或非永久地固定或附着在容器的外表面。在一个相关的实施方案中,所述固定或附着的装置穿过容器,使得具体环境感应装置与容器内腔或容器内容物接触。在另一个相关的实施方案中,所述固定或附着的装置被应用到装置的可通透部分,使得具体环境感应装置与容器内腔或容器内容物接触。

[0353] 在优选的实施方案中,容器包括温度指示装置和经过时间指示装置的组合,所述装置要么分开作为单独的装置,要么作为单个的装置。在其他实施方案中,容器包括温度指示装置,经过时间指示装置和一个或多个环境条件指示装置的组合,所述装置要么分开作为单独的装置,要么作为单个的装置。

[0354] 组合指示装置可以与容器一体化制造,可以永久或非永久地附着到容器的外表面,可以层压到容器的外表面,或者可以被容器包到容器衬里中。装置可以是小型电子设备,探测器,传感器或它们的组合。

[0355] 组合指示装置可以是任何大小或形状的。组合指示装置的示例性形状,包括但不限于:卡,带,磁盘,贴纸,标签,探测器,或它们的组合。例如,卡装或带状的温度指示装置可以包括一个或多个温度指示磁盘,反之亦然。

[0356] 对于本领域技术人员明显的是,各种类型的图形设计可被用于可视化容器的经过时间和温度,包括但不限于,各种线,曲线,椭圆形,矩形或点。同样,还可以使用显示液体向前迁移进展的标记,包括,但并不限于各种不同大小的箭头,曲线,线和点。例如,,信号可以作为进度条上的进度在连续窗口中,或在多个可视窗口针对具体温度或温度范围在特定经过时间间隔时被观察。此外,每个实施方案可以被修改以包括许多附加标记,以显示容器的时间指示器或温度的状态。这类标记包括显示向总经过时间相比温度逐步推进的图形符号。

[0357] 在更优选的实施方案中,容器包括温度指示装置和经过时间指示装置的组合。

[0358] 如本文所用的,单数形式“a”、“an”和“the”包括复数指代物,除非上下文中另有明确指出。

[0359] 整个说明书中,除非上下文另外要求,词语“包含(comprise)”、“包含(comprises)”、“包含(comprising)”将被理解为意指包括陈述的步骤或元素或者步骤或元素的组,但不排除任何其他的步骤或元素或者步骤或元素的组。所用“由……组成”指包括且限于在词组“由……组成”间列出的任何内容。因此,词组“由……组成”表明所列出的元素是必需的或强制的,并且不可以存在其他元素。所用“基本上由……组成”指包括在该词组间列出的任何元素,并限于不妨碍或不促进在所列元素的公开内容中指明的活性或作用的其他元素。因此,词组“基本上由……组成”表明所列元素是必需的或强制的,但其他元素是任选的,其他元素可以存在,也可以不存在,这取决于它们是否影响所列元素的活性或作用。

[0360] 整个本说明书中,在述及“一实施方案”或“实施方案”时,是指与该实施方案有关的所描述的具体特征、结构或特性包括在本发明的至少一个实施方案中。因此,在整个本说明书的多处中出现的措辞“在一实施方案中”或“在实施方案中”不必全部指同一实施方案。此外,在一个或多个实施方案中,具体特征、结构或特性可以以任何合适的方式组合。

实施例

[0361] 对用刺激前列腺素通路的试剂处理的造血干细胞和祖细胞的数个生物参数进行了分析,从而开发增加细胞的植入潜力和增殖的临床方法(参见图2)。这些实验的结果和1b期临床试验的结果描述如下。

[0362] 实施例

[0363] 对用刺激前列腺素通路的试剂处理的造血干细胞和祖细胞的数个生物参数进行分析,从而开发临床方法以增加细胞的植入潜力和扩增(参见图2)。这些实验的结果和1b期临床试验的结果描述如下。

[0364] 实施例1

[0365] 竞争性cAMP测定

[0366] 使用**LANCE®**cAMP检测试剂盒(PeRkin Elmer inc.,Waltham,Ma),根据制造商的说明书,对CD34⁺细胞进行cAMP测定。简要地说,将3000个CD34⁺细胞(Stem Cell Technologies,Vancouver,Canada)等分在384-孔不透明白色板的各孔中的推荐的刺激缓冲液中。在所有条件下一式三份进行测定。

[0367] 将CD34⁺细胞放置在冰上,然后用DMSO或16,16-二甲基PGE₂在4℃刺激。对于在其他

的温度,例如25℃或37℃进行的测定,在室温下将DMSO或16,16-二甲基PGE₂添加到CD34⁺细胞,然后将板与DMSO或16,16-dmPGE₂在实验温度(25℃或37℃)下孵育。

[0368] 将CD34⁺细胞孵育5,15,30,60或120分钟的时间。孵育期之后,向刺激的细胞添加检测缓冲液,细胞在检测缓冲液中于室温下再孵育1小时,不考虑刺激温度。使用En Vision®2104Multilabel Reader(Perkin Elmer),按照制造商的说明书来分析测定板。

[0369] 使用CD34⁺细胞进行竞争性cAMP测定,以确定时间(孵育15,30,60,或120分钟),温度(在4℃,25℃,或37℃孵育),和最终16,16-二甲基PGE₂浓度(1μM,10μM,50μM,或100μM)对细胞中cAMP产量的影响。

[0370] 结果表明,最大cAMP反应发生在孵育约30-60分钟;孵育温度越高,导致cAMP活性越强;在10μM的浓度阈值之上,cAMP反应为剂量相对不敏感的(参见图3)。与DMSO对照相比,当用16,16-二甲基PGE₂在短至5分钟至长达2个小时的持续时间,以测试的所有16,16-二甲基PGE₂浓度(1,10,50和100μM),在37℃和25℃孵育CD34⁺细胞时,观察到cAMP活性在统计上显著增加($p < 0.001$)。与DMSO对照相比,当用16,16-二甲基PGE₂在类似的时间条件和在测试的所有浓度(1,10,50和100μM)下,在4℃孵育CD34⁺细胞时,没有观察到cAMP产量在统计上显著增加(对于所有样品, $p > 0.05$)。

[0371] 在更高的温度孵育更长的持续时间(这种条件之前被认为与CD34⁺细胞活力和16,16-二甲基PGE₂半衰期的降低有关),显示出更强的cAMP刺激,而不负面影响细胞活力。此外,如本文所述,用16,16-二甲基PGE₂在4℃处理细胞更短的时间,导致cAMP产量增加,但不导致被认为在调节干细胞归巢、存活、增殖和植入中是重要的基因的表达增加。这类基因的上调并由此实现最强的生物应答,需要用16,16-二甲基PGE₂在诸如37℃的生理相关温度下处理细胞至少约1小时增加的持续时间。

[0372] 实施例2

[0373] 基因表达

[0374] 全基因组表达阵列

[0375] 从Stem Cell Technologies Inc. (Vancouver, BC, Canada) 购买人脐带血和来自人脐带血的预分离的CD34⁺细胞。在含低分子量葡聚糖和5%人血清白蛋白的培养基(LMD/5%HSA)或Stem Span培养基(Stem Cells Technology Inc.)中孵育细胞,用于用16,16-二甲基PGE₂离体处理。使用Pico Pure RNA分离试剂盒(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)从孵育的细胞分离总RNA。

[0376] 根据制造商的说明书,使用MessageAmp II aRNA扩增试剂盒(Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX)的标准操作程序制备生物素化的扩增的RNA(aRNA)并任选地第二轮扩增;使用MessageAmp II增强型生物素试剂盒(Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX)将拷贝RNA转录成生物素标记的aRNA。根据Applied Biosystems操作程序纯化并破碎生物素标记的aRNA。将20μg破碎的aRNA与人基因组U133 Plus 2.0基因芯片(Affymetrix Inc., Santa Clara, CA)于45℃杂交16小时。

[0377] 洗涤基因芯片并在Affymetrix洗涤工作站450中染色,使用Affymetrix基因芯片扫描仪3000 7G扫描。使用Affymetrix表达控制台软件和默认分析设置来分析图像数据。通过多阵列对数健壮算法标准化基因芯片表达数据,并在用于基因组学的Spotfire 3.1(Tibco Spotfire, Palo Alto, CA)中可视化。在MetaCore. (GeneGo, St. Joseph, MI) 上进行

通路分析。

[0378] 使用基因芯片技术以确定时间(孵育5,15,20,30,40,60,80,100,120,180,或240分钟)、温度(在4℃,25℃,或37℃孵育)和最终16,16-二甲基PGE₂浓度(0.1μM,1μM,10μM,50μM或100μM)对细胞基因表达的影响。

[0379] 使用Fluidigm平台的微流控qPCR

[0380] 使用BioMark动态阵列微流控系统(Fluidigm Corporation, South San Francisco, CA, USA)对用16,16-二甲基PGE₂离体处理的CD34⁺细胞样品进行实时PCR转录本定量。使用Pico Pure RNA分离试剂盒(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)从处理的细胞中分离总RNA。使用大容量cDNA反转录试剂盒(Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)从50ng分离的总RNA中逆转录互补DNA(cDNA)。

[0381] 使用TaqMan预扩增混合试剂盒(Life Technologies)操作程序,利用200nM的96个基因(包括6个参照对照基因)特异性引物对(参见表1)的混合物预扩增特定靶基因(96)的cDNA。根据制造商的操作程序,在标准循环条件下使用14个循环的扩增,从cDNA进行特异性靶扩增(STA)。根据Fluidigm's EvaGreen操作程序,添加EvaGreen染料(Biotium, Inc. Hayward, CA, USA)以检测扩增产物。例如,反应混合物包含3.0μL基因表达Master Mix (Life Tech.), 0.3μL上样缓冲液(Fluidigm), 0.3μL 20倍EvaGreen染料(Biotium, Inc.), 1.5μL稀释的(1:5无菌nH₂O) STA cDNA和0.9μL无菌diH₂O,用于向96.96动态阵列(Fluidigm)的样品入口上样。

[0382] 从第5孔至第9孔重复运行样品。对于引物对,反应混合物包含2.5μL基因特异行引物对(20μM)和2.5μL测定上样缓冲液(Fluidigm),用于向96.96动态阵列(Fluidigm)的样品入口上样。使用NanoFlex IFC Controller HX(Fluidigm)上样96.96动态阵列,并使用BioMark实时PCR系统(Fluidigm)进行实时反应。

[0383] 使用BioMark实时PCR分析软件分析结果。从样品重复计算平均Ct,使用6个参照基因(ACTB, GAPDH, HPRT1, QARS, ARPC2和LRIG2)的平均值对仅媒介物的样品计算 δ - δ Ct($\Delta \Delta$ Ct)。将超过28的Ct或具有不合适的解链曲线特性的扩增产物从计算中排除。结果以热图形式显示在用于基因组的Spotfire 3.1(Tibco Spotfire, Palo Alto, CA, USA)中,或作为Excel图表(Microsoft Corp., Redmond, WA, USA)显示。

[0384] 表1: 引物对

[0385]

孔位置	名称	序列	名称	序列
A1	AREG-F	CGGCTCAGGCCATTA TGC	AREG-R	GGTCCCCAGAAAAT GGTTCA
A2	AREGB-F	TCTCCACTCGCTCTT CCAACAC	AREGB-R	ATCAAGAGCGACAG CACCACCTG
A3	ATP6V0A4 -F	TGGACGACCATGGA GAAGAGTTC	ATP6V0A4-R	ACTCGATGGTGTGG ATGGCTTG
A4	AKAP12-F	CAGAAACAAGAGAG AGAATCTGCAA	AKAP12-R	TGTCTTCACATTCTG GTCTTCCA
A5	ADCY7-F	GCACTGGAGAACTT GGGAAAAT	ADCY7-R	GCATTCAACAAGAGT ACCCGAGG
A6	CCND1-F	CTTCCTGTCCTACTA CCGCCTC	CCND1-R	CTTGACTCCAGCAG GGCTTC
A7	C6orf176-F	TCGGACACACACAC ACACACAC	C6orf176-R	AGCAACTTCGGACT CAGACCTC
A8	CA2-F	GATGACTCTCAGGA CAAAGCAGTG	CA2-R	AACCTTGTCATCAA GTGAACCC
A9	CA4-F	AAGGTCGTCTGGAC TGTGTTCC	CA4-R	CTGAGAGAATGCCA GGATCTGTTC
A10	CREB5-F	AAGACTGCCCAATA ACAGCCAT	CREB5-R	GACAGGACTAGCAG GAGGGCTA
A11	COL1A1-F	TGCGATGACGTGATC TGTGACG	COL1A1-R	TTTCTTGGTGCGGTGG GTGACTCTG
A12	CREM-F	AAGAAGCAACACGC AAACGA	CREM-R	TTCTTTCTTCTTCCT GCGACACT
B1	CXCL1-F	CGGAAAGCTTGCCT CAATCCTG	CXCL1-R	CAGTTGGATTTGTCA CTGTTTCAGC
B2	CXCL2-F	AAACCGAAGTCATA GCCACACTC	CXCL2-R	AGCCACCAATAAGC TTCCTCCTTC
B3	CXCL5-F	AGACCACGCAAGGA GTTCATCC	CXCL5-R	TCTTCAGGGAGGCT ACCACTTC
B4	CXCL6-F	AGCTTGAGTTTCCTG CCAGTCG	CXCL6-R	TTTCCTCGTGCCTTC TGCACTC
B5	CXCR4-F	TCCTGGCTTTCTTCG CCTGTTG	CXCR4-R	TGAAGGAGTCGATG CTGATCCC
B6	DUSP2-F	AACCAGATGGTGGA GATCAGTGC	DUSP2-R	CCGCTGTTCTTCACC CAGTCAATG
B7	DUSP4-F	TGCATCCCAGTGGA AGATAACCAC	DUSP4-R	GCATCGATGTACTCT ATGGCTTCC
B8	ECEL1-F	GACTTCCTGCTGAA ACCCGATG	ECEL1-R	GGTCTTCTCATGGAC CTCAAACCTC

[0386]

孔位置	名称	序列	名称	序列
B9	EDN1-F	ATTTGGGTCAACACT CCCGAGCAC	EDN1-R	TCACGGTCTGTTGCC TTTGTGG
B10	ETV3-F	ATGAAAGCCGGCTG TAGCATCG	ETV3-R	CAGGAAACTGATAC CCTCCACCTC
B11	GULP1-F	GCAGCAGATTTCCT CCAGATA	GULP1-R	TGTCTAACGGGTCG AGACAAAA
B12	FGF9-F	TCGGTGTGGGCATT GTCTCTTG	FGF9-R	ACTGGATGCAAACC CATGAGCTG
C1	FGFR1-F	ATACCAGCTGGATGT CGTGGAG	FGFR1-R	ACATGAACTCCACG TTGCTACCC
C2	FLJ27352-F	TCACCGGCTTTCTTG CCATCTG	FLJ27352-R	TTCTTATCCCGGTTG CGGTCTG
C3	FOS-F	TACACTCCAAGCGG AGACAGAC	FOS-R	GTTGGCAATCTCGGT CTGCAAAG
C4	FOSL2-F	GCAGTTGGGTTTCT GGCTTGAG	FOSL2-R	TCCTGCTACTCCTGG CTCATTC
C5	FOXA1-F	TCCTCAGGAATTGCC CTCAAGAAC	FOXA1-R	ATGACATGACCATGG CACTCTGC
C6	GEM-F	GCCGAGAAGTGTCT GTATCAGAAG	GEM-R	CTGTCGCACAATGC CCTCAAAC
C7	GNAL-F	AGAATCGACAGCGT CAGCTTGG	GNAL-R	TGGCCACCAACATC AAACATGTGG
C8	HAS1-F	GCCTGGTACAACCA GAAGTTCC	HAS1-R	ACCTGGAGGTGTAC TTGGTAGC
C9	HOMER1-F	AGAAGCTGCTCGAC TAGCAAAGG	HOMER1-R	GCGGATTCTGTGA AGGTGTACTG
C10	HR-F	AGGACCAAGAGCAT CAAAGAGGAG	HR-R	TGTATTCGCTCATGG CCCAAGC
C11	IL11-F	AGCGGACAGGGAAG GGTTAAAG	IL11-R	GGCGGCAAACACAG TTCATGTC
C12	INHBA-F	TCACGTTTGCCGAG TCAGGAAC	INHBA-R	TGACAGGTCACGTC CTTCCTTG
D1	JAG1-F	TGGGCCCCGACTGCA GAATAAAC	JAG1-R	ATCCACACAGGTCG CTCCAAAG
D2	JOSD1-F	TCCAGGACAGCAAT GCCTTCAC	JOSD1-R	CATGGTGTGTTGGAG ACAACCTCTG
D3	KCTD20-F	TCTAGGTCCCAGGA ATGAAGACC	KCTD20-R	GGAAGTGAAGATTT GCTGGCTGAG
D4	KIAA1199-F	TTGGCCTCCTTGTC AGTCTGG	KIAA1199-R	ATCCAGAAGGTGGA CACAGCATTG
D5	LGALS12-F	CGGGAATGAGGAAG TGAAGGTGAG	LGALS12-R	AGCGTGTCCACATG AGACAGTG
D6	LIF-F	TGCTTCATCCGGCTT AGCTTGG	LIF-R	AGTTTGTCTTTCTCG AAGCCCATC
D7	LONRF2-F	AGGGTCACAGCCAC ATGAATGC	LONRF2-R	AATTCTCCGAGCTCC CTGCATC
D8	LXN-F	ACAAGTTAAGGTGA ACTGCACAGC	LXN-R	TGCAGTTTCTTGTC CGTTGAAGG
D9	MALT1-F	TGGTCACAGCTGGA TGTTTGCG	MALT1-R	TCAGAGACGCCATC AACACTTCTC
D10	MPPE1-F	TGGCTGACACCCATT TGCTTGG	MPPE1-R	TCTCCATCTGCCATT CCCTTCG
D11	MYOM2-F	TGACCATCATGGAA GGGAAGACC	MYOM2-R	CTGGATGTCCTGGTC GTTCTTG
D12	NPTX1-F	ATCAGCGAGCTCGA GAAAGGTC	NPTX1-R	TAGTTGGTCCGCAG TGGAATG

[0387]

孔位置	名称	序列	名称	序列
E1	NR4A2-F	GCTGTTGGGATGGT CAAAGAAGTG	NR4A2-R	TCTTCGGTTTCGAGG GCAAACG
E2	NR4A3-F	TGCGTCCAAGCCCA ATATAGCC	NR4A3-R	TGTATGTCTGCGCCG CATAACTG
E3	PLAT(2)-F	GTGTGCTGGAGACA CTCGGA	PLAT(2)-R	CATCGTTCAGACAC ACCAGGG
E4	NTRK1-F	AGCACCGACTATTAC CGTGTGG	NTRK1-R	TCGGTGGTGAACCT ACGGTACAGG
E5	OSM-F	TGCCTGTCGGTTGCT TGGATTC	OSM-R	TGCACCACCTGTCCT GATTACAG
E6	PCDH8-F	TCATCAACCACATGC AGAGTGGAC	PCDH8-R	AAGGTTGACATCTG GGCTGGTG
E7	PDE4A-F	TCCACAACATTCCTG GACAAACAG	PDE4A-R	TTCCTTCATCGTGGG TGATGGG
E8	PDE4B-F	ACAAGTTCAGGCGT TCTTCTCC	PDE4B-R	CCATGTTGCGAAGG ACCTGAATG
E9	PDE4D-F	TTGTGACTCCATTTG CTCAGGTC	PDE4D-R	GATGGATGGTTGGTT GCACATGG
E10	PDLIM3-F	ACAAATGTGGGAGT GGCATAGTCG	PDLIM3-R	ACTCAGGGTGCCGG TACTTATC
E11	PLAT-F	TCTCAGATTTCTGTG GCCAGTGC	PLAT-R	GCACGTGGCCCTGG TATCTATTTT
E12	PLAUR-F	ATCGTGCGCTTGTGG GAAGAAG	PLAUR-R	ACCCACACACAACC TCGGTAAG
F1	PLK2-F	TGGAGGAGAACCTC ATGGATGG	PLK2-R	TTAGCCACTGAAGG AGGTAGAGC
F2	PPARD-F	TCCTTCCAGCAGCTA CACAGAC	PPARD-R	ATCTGCAGTTGGTCC AGCAGTG
F3	RASD1-F	AGGCTTCAAGAAAC CGTCATGC	RASD1-R	ACAGCAACCCGGAA TCACAGAC
F4	PTGER2-F	TCCTGGCTATCATGA CCATCAC	PTGER2-R	TTCGGGAAGAGGTT TCATTCAT
F5	REN-F	TGTACCTTTGGTCTC CCGACAG	REN-R	GGGCATTCTCTTGAG GAAGATCCG
F6	RGS1-F	TGCTGCTGAAGTAAT GCAATGGTC	RGS1-R	TGACCAGTTTGGTT GGCAAGAAG
F7	RGS2-F	CAAACAGCAAGCTT TCATCAAGCC	RGS2-R	AAGCCCTGAATGCA GCAAGACC
F8	SIPRI-F	ACGTAGGCTGTGGG AAGATGAAG	SIPRI-R	TGGAAACTTTGGCC TCAGCGAAG
F9	SC5DL-F	AAGCGCCTACATAA ACCTCACC	SC5DL-R	AGCATGACTTGCAA ATGGAGTAGG
F10	SGIP1-F	AAGGAGCAGACCCA AGCAAATG	SGIP1-R	GCCAGCAGGAAATG ACAACACC
F11	SGK1-F	AGGAGCCTGAGCTT ATGAATGCC	SGK1-R	TGATTTGCTGAGAA GGACTTGGTG
F12	SHISA2-F	ACTATCACCCGCTGC TTCTCTG	SHISA2-R	CGCCAAACCATAAC CACAAGGC
G1	SIK1-F	ACTCACCGCGCCAT GTATAGTC	SIK1-R	ACAAGTGTGAGAGC TGGTTCCC
G2	SSTR1-F	ATGGTGACAGGTGT GAGTCTGG	SSTR1-R	TTGAGTGCTGCTTGC ACTCCTG
G3	SV2C-F	TGTCTGCTCTGCTGA TGGACAG	SV2C-R	AAGCACCATAGAGC CACCTAGC
G4	SYT4-F	CACCAGCCGGGAAG AATTTGATG	SYT4-R	GTGAAGACCAGGCC AAATGCAC

[0388]

孔位置	名称	序列	名称	序列
G5	SYTL3-F	GAATGAACGACCGC TTGCTTGG	SYTL3-R	CCAACAGCTGTGTC TCCCTTTG
G6	TAC1-F	TACGACAGCGACCA GATCAAGGAG	TAC1-R	TCCAAAGAACTGCT GAGGCTTGG
G7	THBS1-F	GGCAGACACAGACA ACAATGGG	THBS1-R	TGTCCCGTTTCATTGA GGATACCG
G8	PTGER4-F	TCTTACTCATTGCCA CCTCCCT	PTGER4-R	TGGCTGATATAACTG GTTGACGA
G9	TMCC3-F	TTCAGCCGGTGAGG CTGTTATC	TMCC3-R	GGCAAGGCAATAAA CACAGAGTGG
G10	TNFRSF1B -F	TGTCCACACGATCCC AACACAC	TNFRSF1B-R	TGTCACACCCACAA TCAGTCCAAC
G11	ULBP2-F	GCTCTCCTTCCATCA AGTCTCTCC	ULBP2-R	GCACAGAAGGATCT TGGTAGCG
G12	VPS37B-F	ATGGTGCAGAAGAT GGAGGAGAC	VPS37B-R	GGTCAAGCGTGCTT TCAACGTG
H1	WT1-F	TGTCCCACTTACAGA TGCACAGC	WT1-R	ACACTGGAATGGTT TCACACCTG
H2	YPEL4-F	TCACCGCACTTACA GCTGTGTC	YPEL4-R	ATGGCTCCCTTGGA AGGACTTG
H3	PDE3B-F	TGATGAAGACGGTG AAGAATTAGA	PDE3B-R	AGGTGGTGCATTAG CTGACAAA
H4	ZNF331-F	AACAATGGCCCAGG GTTTGGTG	ZNF331-R	TACAGGTCCCTCTG AGCAGAGTTC
H5	TGFB2-F	AGCATGCCCGTATTT ATGGAGT	TGFB2-R	GCAGATGCTTCTGGA TTTATGG
H6	TCF4-F	ATCGAATCACATGGG ACAGATG	TCF4-R	GCTGTTAAGGAAGT GGTCTCTTG
H7	ACTB-F	TGGCCGAGGACTTT GATTGCAC	ACTB-R	GGACTTCCTGTAAC AACGCATCTC
H8	ARPC2-F	AGGTGAACAACCGC ATCATCGAG	ARPC2-R	TACTGCTTCCGGTTT GTTTCCG
H9	GAPDH-F	AGCTCATTTCTGGT ATGACAACG	GAPDH-R	CTCTTCCTCTTGTGC TCTTGCTG
H10	HPRT1-F	TGCAGACTTTGCTTT CCTTGGTC	HPRT1-R	CAAGCTTGCGACCT TGACCATC
H11	LRIG2-F	TGGCAACAGCTGAC AGAAATGGG	LRIG2-R	ACAAGCAGATGCAC ACCAGAGC
H12	QARS-F	AGGTTCCCTTTGCAC CCATTGTC	QARS-R	TTAAATCCTGGCTCT GGCTCCTC

[0389] 16,16-二甲基PGE₂基因表达标签

[0390] 获得与用媒介物处理的CD34⁺细胞相比的在37℃用10μM 16,16-二甲基PGE₂处理的CD34⁺细胞的基线基因表达标签(参见图4)。在这些条件下处理的CD34⁺细胞中,共有608个基因在统计学上显著的水平调节(365个上调或243个下调)。CXCR4——已知通过其与SDF-1α的相互作用将HSC归巢至骨髓微环境(niche)的介质,相对于DMSO处理的对照上调18倍。同样上调的是CREM——多种已知的cAMP反应基因中的一个。还观察到与PGE₂信号转导通路、细胞粘附和趋化因子信号转导相关的基因表达的调节。然而,没有观察到与细胞凋亡或细胞死亡相关的基因表达的增加。

[0391] 与DMO对照相比,在37℃用10μM 16,16-二甲基PGE₂处理的CD34⁺细胞的基因表达谱使本发明的细胞与其他已知的细胞相区别。本发明的方法产生了与未处理的对照或在4℃处理的细胞相比,显示提高或增强植入潜力/植入以及增加体内扩增的细胞。本发明细胞的基因表达标签中显示出大幅度上调的基因列表在下文示出。

[0392] 表2:dmPGE₂基因表达标签中高度上调的基因

[0393]	基因符号	描述	倍数变化(增加)
	HAS1	透明质酸合成酶1	55.83
	GEM	GTP结合蛋白GEM	28.18
	DUSP4	双特异性蛋白磷酸酶4	25.75
	AREG	双调蛋白 (Amphiregulin)	23.32
	NR4A2	核受体相关蛋白1	22.30
	REN	肾素	19.50
	CREM	cAMP反应元件调节因子	12.90
	COL1A1	胶原蛋白, I型, $\alpha 1$	10.50
	FOSL2	Fos相关抗原2	8.11
	CXCR4	CXC趋化因子受体4	7.33

[0394] 因此,与之前被认为与CD34⁺细胞活力和16,16-二甲基PGE₂半衰期下降相关的临床前操作程序(在37℃孵育)相反,意外地表明与PGE₂R₂/R₄细胞信号转导通路、细胞归巢和增殖相关的基因表达的增加。此外,没有观察到指示细胞活力下降的基因表达变化。

[0395] 进行进一步的实验以确定当在全脐带血临床治疗操作程序中处理细胞时,CD34⁺细胞是否应答16,16-二甲基PGE₂。在37℃用媒介物或10 μ M 16,16-二甲基PGE₂孵育人脐带血细胞120分钟(参见图17)。孵育后,使用Miltenyi磁珠分选分离Lin(-)CD34⁺细胞。从细胞制备生物素标记的aRNA并分析基因表达谱。与用不同浓度的16,16-二甲基PGE₂孵育的CD34⁺脐带血细胞的结果一致,从人脐带血分离的Lin(-)CD34⁺细胞再现了16,16-二甲基PGE₂基因表达标签。还从处理的全脐带血、Lin(+)CD34⁺细胞、Lin(-)CD34⁺CD38⁺细胞和Lin(-)CD34⁺CD38⁻CD90⁺细胞制备了aRNA。图17显示了全脐带血(超过99%的谱系+细胞)不以与从全脐带血或Lin(+)CD34⁺细胞分离的Lin(-)CD34⁺细胞相似的方式应答16,16二甲基PGE₂。

[0396] 时间参数

[0397] 分析在37℃用10 μ M 16,16-二甲基PGE₂孵育5,15,30,60,或120分钟的CD34⁺细胞的基因表达谱。对于少于120分钟的孵育(例如处理)期,在培养基中洗涤细胞以除去16,16-二甲基PGE₂,然后在培养基中孵育细胞剩余的时间段,以给予基因表达变化发生的时间(参见图5)。

[0398] 结果表明,更长地暴露于16,16-二甲基PGE₂在16,16-二甲基PGE₂表达标签中产生更高量级的基因表达(参见图6)。相比之下,非常短的孵育时间(5-15分钟)导致与16,16-二甲基PGE₂表达标签相关的基因中最低基因表达变化。在用16,16-二甲基PGE₂孵育30分钟之后出现基因表达变化,在长达120分钟的孵育中持续增加,尽管在120分钟的总经过时间后评估所有实验。

[0399] 这与之前的观察相反,之前的观察表明在移植之前短的孵育时间足以用药物负载EP₂/4受体,其中认为将发生下游生物学现象。目前的结果证明,在诸如37℃的生理相关温度时需要较长的孵育时间(大于30分钟),以实现生物学利益。

[0400] 还使用微流控qPCR平台以测量不同的孵育时间时人CD34⁺细胞中表3所列出的基因的16,16-二甲基PGE₂基因表达标签的表达变化。基因表达分析包括96孔形式以检测表3中列出的基因。

[0401] 表3:Fluidigm测定的标签基因

[0402]	ADCY7	CXCL1	FGFR1	INHBA	MYOM2	PLAT (1)	SC5DL	THBS1
	AKAP12	COL1A1	FLJ27352	JAG1	NPTX1	PLAT (2)	SGIP1	TMCC3
	AREG	CXCL2	FOS	JOSD1	NR4A2	PLAUR	SGK1	TNFRSF1B
	AREGB	CXCL5	FOSL2	KCTD20	NR4A3	PLK2	SHISA2	ULBP2
	ARPC2	CXCL6	FOXA1	KIAA1199	NTRK1	PPARD	SIK1	VPS37B
	ATB6V0A4	CXCR4	GEM	LGALS12	OSM	PTGER2	SSTR1	WT1
	C6orf176	DUSP2	GNAL	LIF	PCDH8	PTGER4	SV2C	YPEL4
	CA2	DUSP4	GULP1	LONRF2	PDE3B	RASD1	SYT4	ZNF331
	CA4	ECEL1	HAS1	LRIG2	PDE4A	REN	SYTL3	ACTB
	CCND1	EDN1	HOMER1	LXN	PDE4B	RGS1	TAC1	GAPDH
	CREB5	ETV3	HR	MALT1	PDE4D	RGS2	TCF4	HPRT1
	CREM	FGF9	IL11	MPPE1	PDLIM3	S1PR1	TGFB2	QARS

[0403] 图14A显示了在37℃连续暴露于16,16-二甲基PGE₂至少约60分钟至在37℃连续暴露于16,16-二甲基PGE₂多达至少约4小时之后,可检测合适的基因表达标签。然而,在37℃连续暴露于16,16-二甲基PGE₂至少约2小时之后,观察到最大基因表达应答。图14B显示了表3中列出的标签基因的平均基因表达,以及在37℃至少约2小时之后观察到的最大基因表达变化。图14C显示CXCR4的表达数据,CXCR4负责向归巢至骨髓小生境。有趣的是,注意到基因表达应答的动力学与cAMP应答相比慢很多,cAMP应答在37℃仅15分钟便达到最大水平。对于图14中示出的数据,以下基因组的基因表达检测反应失败并从该分析中排除:ARPC2、SSTR1、CXCL5、SYT4、CXCL6、TMCC3、FGF9、GNAL、GULP1、LRIG2、PDE4D、PLAT (1) 和PLAT (2)。对于图14中示出的数据,使用以下对照管家基因:ACTB、GAPDH、HPRT1和QARS。

[0405] 此外,对接受用16,16-二甲基PGE₂短时脉冲处理之后经历无药物存在下的恢复期的细胞进行基因表达标签测量。人CD34⁺细胞在16,16-二甲基PGE₂的存在下孵育不同时间,之后在被设计为反映体内环境的培养基中洗涤并经历恢复期。实验设计匹配离体处理范例,其中细胞被处理,洗涤以除去药物,然后给予患者。在37℃下用16,16-二甲基PGE₂孵育CD34⁺细胞5、15、30、60或120分钟,分析基因表达标签。对于少于120分钟的孵育期,在培养基中洗涤细胞以除去16,16-二甲基PGE₂,然后在培养基中孵育细胞剩余的时间段,以给予基因表达发生的时间。

[0406] 图15显示了用16,16-二甲基PGE₂短时脉冲处理(5-15分钟)不足以产生“完全的”基因表达应答。基因表达变化和可识别的基因表达标签仅在用16,16-二甲基PGE₂孵育约30分钟之后观察到,并且在约2小时之后最大,这与快速cAMP应答相反(参见图3)。因此,在具体临床实施方案中,用16,16-二甲基PGE₂在生理条件下(例如,37℃)处理120分钟的脐带血达到“强”的基因表达标签,指示改善被处理的细胞的临床功效。

[0407] 对于图15中示出的数据,下列基因组的基因表达检测反应失败并从该分析中排除:ADCY7、CCND1、CREB5、GULP1、MPPE1、PDE3B、PTGER2、RGS2和YPEL4。对于图15中示出的数

据,使用以下对照管家基因:ACTB、ARPC2、GAPDH、HPRT1、LRIG2和QARS。

[0408] 16,16-二甲基PGE₂浓度

[0409] 分析了在37℃下用不同浓度的16,16-二甲基PGE₂(媒介物,100nM、1μM、10μM或100μM,参见图7)孵育120分钟的CD34⁺细胞的基因表达谱。结果表明完整的16,16-二甲基PGE₂基因表达标签在10μM时重现,但在超过10μM 16,16-二甲基PGE₂时没有出现基因表达标签的进一步实质变化,表明10μM是最优处理剂量。

[0410] 使用人全脐带血重复这些实验,以确定CD34⁺表达结果是否可以转化到临床环境。处理全脐带考虑(1)全脐带血中存在的增加的细胞复杂性,(2)由于药物的蛋白结合而降低的药物水平,和(3)可能的旁泌性效应。在37℃用媒介物,100nM、1μM、10μM、25μM或50μM 16,16-二甲基PGE₂孵育人脐带血细胞120分钟(参见图8)。孵育后,分离Lin(-)CD34⁺细胞,从该细胞制备标记的aRNA并分析基因表达谱。与从用不同浓度的16,16-二甲基PGE₂孵育的CD34⁺细胞获得的结果一致,从人脐带血分离的LIN(-)CD34⁺细胞在10μM时重现了16,16-二甲基PGE₂基因表达标签,在10μM给出最大标签,在浓度增加时没有观察到实质性提高。

[0411] 还使用微流控qPCR平台,以在37℃用不同浓度的16,16二甲基PGE₂(媒介物,100nM、1μM、10μM或100μM)处理2小时的人CD34⁺细胞中测量16,16-二甲基PGE₂基因表达标签(基因参见图3)的表达变化。图16显示了16,16-二甲基PGE₂基因表达标签在10μM时最大,但在超过10μM的16,16-二甲基PGE₂时没有出现基因表达标签的进一步实质性变化。

[0412] 对于图16中示出的数据,下列基因组的基因表达检测反应失败并从该分析中排除:ADCY7、CCND1、CREB5、GULP1、FGFR1、FLJ27352、MPPE1、PDE4D、PTGER2、PDE3B和YPEL4。对于图16中示出的数据,使用以下对照管家基因:ACTB、ARPC2、GAPDH、HPRT1、LRIG2和QARS。

[0413] 孵育温度

[0414] 分析在4℃、25℃或37℃,用16,16-二甲基PGE₂孵育的CD34⁺细胞的基因表达谱(参见图9和22)。这些结果表明,在37℃孵育60至120分钟出现与16,16-二甲基PGE₂基因表达标签相关的基因表达变化,且基因表达变化在120分钟时最强。此外,浓度和温度共变,确定了较低的温度和较高浓度的16,16-二甲基PGE₂不能用于重现较高温度的效果(数据未显示)。因此,在4℃和25℃用100μM 16,16-二甲基PGE₂处理,产生比在37℃用10μM 16,16-二甲基PGE₂更小的基因表达变化。

[0415] 因此,结果表明,在分离的CD34⁺细胞或人脐带血的Lin(-)CD34⁺细胞中的基因表达导致参与HSC归巢和植入的基因上调,例如CXCR4;cAMP应答基因,如CREM;以及与PGE₂信号转导通路、细胞粘附和趋化因子信号转导相关的基因表达的调节。与在25℃或4℃孵育相比,在37℃用10μM 16,16-二甲基PGE₂孵育后,显著更多的基因具有至少2倍增加或降低的基因表达(对于每个基因/探针而言,t-检验p<0.05)。具体地,与在25℃或4℃孵育相比,在37℃有以下基因的基因表达在统计学上显著变化:与造血干细胞和祖细胞归巢相关的基因,例如CXCR4(p=0.00014),和与PGE₂R₂/R₄细胞信号转导通路增加相关的基因,例如CREM(p=0.0012)。

[0416] 此外,与临床前预期相反,在37℃孵育的细胞中没有观察到与细胞凋亡或细胞死亡相关的基因的基因表达增加,其之前被认为与降低的CD34⁺细胞活力和16,16-二甲基PGE₂半衰期有关。

[0417] 实施例3

[0418] 细胞活力测定

[0419] 从Stem Cell Technologies (Vancouver, Canada) 获得的全脐带血细胞或CD34⁺细胞被等分在Eppendorf管中, 在温度(4℃、22℃或37℃) 下用一系列浓度的16, 16-二甲基PGE₂ (10μM至100μM) 或DMSO对照在LMD/5%HSA培养基中离体处理60或120分钟。处理后, 使用7-氨基放线菌素D (7-AAD) 染色作为细胞死亡的指示剂来测定等分试样的孵育细胞。用5μL的7AAD染色溶液 (BD Bioscience, San Jose, CA) 染色1百万个全脐带血或用1μL 7-AAD溶液染色200,000个CD34⁺脐带血细胞。在Guava EasyCyte 8HT系统 (Millipore) 上, 利用FlowJo软件包 (Tree Star Inc., Ashland, OR) 来分析细胞。相同细胞的单独的等分试样还用于通过CFU-C测定来评估增殖潜力(在下文实施例4中讨论)。

[0420] 结果表明, 与在其他条件下孵育的细胞相比, 用16, 16-二甲基PGE₂在高温下相对长的孵育时间孵育的全脐带血细胞或CD34⁺细胞不降低细胞活力, 与之前的临床前实验预期的相反。因此, 7-AAD评估的活细胞从4℃至37℃没有统计学上显著的下降(参见图10和19B-C)。

[0421] 实施例4

[0422] 细胞增殖测定

[0423] 使用甲基纤维素测定试剂盒MethoCult® GF H4034 (Stem Cell Technologies, Vancouver, CA) 进行集落形成单位细胞测定 (CFU-C)。从Stem Cell Technologies (Vancouver, Canada) 获得的全脐带血细胞或CD34⁺细胞被平均等分在Eppendorf管中, 在温度(4℃、22℃或37℃) 下用一系列浓度的16, 16-二甲基PGE₂ (10μM至100μM) 或DMSO对照在LMD/5%HSA培养基中离体处理120分钟。处理后, 在LMC/5%HSA培养基中洗涤细胞, 并重悬在含有2%胎牛血清 (FBS) 的Iscove培养基中 (Stem Cell Technologies)。然后根据制造商的说明书, 将细胞上样在MethoCult®测定管中, 混合并接种在35mm组织培养板上。除非另外指明, 向每个板上样相等的10,000个WCB细胞和250个CD34⁺细胞。

[0424] 结果表明, 与在其他条件下孵育的细胞相比, 用16, 16-二甲基PGE₂在高温下相对长的孵育时间孵育的全脐带血细胞或CD34⁺细胞具有更高的增殖潜力(例如, 自我更新的能力), 与基于之前的临床前实验预期的相反。因此, 细胞增殖潜力从4℃至37℃有统计学上显著的增加(参见图11)。

[0425] 实施例5

[0426] 16, 16-二甲基PGE₂处理的细胞中CXCR4细胞表面表达

[0427] 流式细胞术

[0428] 在LMC/5%HSA中, 在37℃用10μM的16, 16-二甲基PGE₂或作为对照的DMSO处理CD34⁺脐带血细胞 (Stem Cell Technologies或All Cells) 2小时。处理后, 用LMD/5%HSA洗涤细胞并在650×g离心10分钟。然后根据他处公开的操作程序 (Park et al., 2008) 分选细胞以分离长期、短期和专能祖细胞。然后将细胞重悬在染色培养基 (如上所述) 中, 并加入抗体染色剂。除非另外指明, 所有抗体来自BD Biosciences。系别细胞去除抗体板包括CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD14、CD19、CD20、CD56、CD235, 并且全部直接偶联到FITC。使用的其他抗体是CD34 (8G12) -APC、CD38-PerCPCy5.5、CD45RA-V450和CD90-PE。在冰上用推荐量的抗体将细胞染色20分钟, 然后用染色培养基洗涤两次。然后以2百万个细胞/ml重悬细胞, 并在FACS Aria II上使用DiVa (BD Biosciences) 软件分选。将细胞收集在StemSpan培

培养基中,进行RNA提取之前在4℃保存。

[0429] CXCR4表面表达分析

[0430] 用10μM的16,16-二甲基PGE₂或DMSO在StemSpan培养基中在37℃处理CD34⁺脐带血细胞2小时或在4℃处理1小时。处理后,在StemSpan培养基中洗涤细胞,在300×g离心10分钟,重悬在含有细胞因子(例如,CC100)的StemSpan培养基中,以促进CD34⁺细胞存活,并在37℃孵育1、6和24小时。1、6或24小时孵育后,离心细胞并重悬在含有谱系混合物1-FITC、CD34⁺APC、CXCR4 (CD184) -PE的染色培养基中,在冰上孵育15分钟。然后向细胞添加新鲜染色培养基,细胞在300g离心10分钟,离心两次。在Guava EasyCyte上获得染色的细胞并使用FloJo软件包(Treestar)进行分析。

[0431] 与DMSO处理的细胞或在4℃用10μM处理1小时的细胞相比,在37℃用10μM的16,16-二甲基PGE₂处理2小时的全脐带血(WCB)或CD34⁺细胞中观察到CXCR4 RNA表达增加。CXCR4细胞表面表达对于干细胞向骨髓造血小生境归巢是重要的。图18显示了在某些条件下,在16,16-二甲基PGE₂的存在下CXCR4蛋白表面表达增加。在StemSpan培养基中,用10μM的16,16-二甲基PGE₂或DMSO对照在37℃处理细胞2小时或在4℃处理细胞1小时。在处理结束后1、6和24小时,通过流式细胞术评估CXCR4细胞表面蛋白表达。

[0432] 处理后1小时,与3.5%的DMSO处理的细胞相比,48%的用10μM的16,16-二甲基PGE₂处理的CD34⁺脐带血细胞可检测到CXCR4表达。处理后6小时,与1.7%的DMSO处理的细胞相比,34.7%的用10μM的16,16-二甲基PGE₂处理的CD34⁺脐带血细胞表达可检测水平的CXCR4。处理后24小时,与DMSO处理的细胞相比,用10μM的16,16-二甲基PGE₂处理的CD34⁺脐带血细胞存在的CXCR4水平基本上相同。

[0433] 相比之下,在4℃用10μM的16,16-二甲基PGE₂处理的CD34⁺脐带血细胞不导致CXCR4表达增加。因此,用10μM的16,16-二甲基PGE₂处理的细胞中的CXCR4 mRNA表达如实地代表了细胞中的CXCR4细胞表面蛋白表达。因此,在特定的临床实施方案中,为获得HSC的最大激活以影响HSC归巢和功能,用16,16-二甲基PGE₂在37℃处理细胞比在4℃处理更优选。

[0434] 实施例6

[0435] 脾脏集落形成单位测定

[0436] 第12天的脾脏集落形成单位(CFU-S12)测定如North等(Nature.2007 Jun 21;447(7147):1007-11)所述进行。分离来自8周龄C57B1/6供体小鼠的全骨髓,并用10μM的16,16-二甲基PGE₂或DMSO在4℃处理1小时,或在37℃处理2小时或在PBS中处理。处理后,通过离心洗涤细胞并重悬在PBS中,用于向C57B1/6受体(2×5/处理)尾静脉注射,所述受体之前已经在10.5Gy下致死辐射。每只受体注射50,000个细胞。

[0437] 在CFU-S测定中进一步证实,与用16,16-二甲基PGE₂在4℃处理1小时相比,用16,16-二甲基PGE₂在37℃处理2小时后观察到16,16-二甲基PGE₂基因表达标签的增加。

[0438] 小鼠骨髓暴露于用10μM的16,16-二甲基PGE₂或DMSO在4℃处理1小时或在37℃处理2小时,并给予辐射的小鼠。14天后,切除脾脏并计数集落。结果显示,4℃处理不引起cAMP应答或基因表达信号增加,但与DMSO处理的细胞相比,导致CFU-S数目的小幅增加。然而,这种增加在统计学上显著低于在37℃用10μM的16,16-二甲基PGE₂孵育的细胞。

[0439] 小鼠全骨髓(WBM)细胞在4℃或37℃暴露于10μM的16,16-二甲基PGE₂或DMSO 1小时或2小时。与DMSO处理的细胞相比,用10μM的16,16-二甲基PGE₂处理细胞时(无论温度),

观察到CFU-S12数目在统计学上显著增加(图19A)。在37℃暴露于10 μ M的16,16-二甲基PGE₂ 2小时,导致11.5 $\pm$ 1.4个集落的形成,其显著高于在4℃暴露于10 μ M的16,16-二甲基PGE₂处理1小时的WBM,8.5 $\pm$ 1.3个集落(p<0.005),或显著高于在37℃暴露于DMSO 2小时的WBM,4.0 $\pm$ 0.8个集落(p<0.001)。此外,用10 μ M的16,16-二甲基PGE₂在37℃处理1小时(11.2 $\pm$ 1.5)或2小时(11.5 $\pm$ 1.4)的WBM得出类似的结果。在4℃用16,16-二甲基PGE₂处理WBM观察到相同结果,其中1小时或2小时暴露得出类似的结果,分别为8.5 $\pm$ 1.3和8.4 $\pm$ 1.0个集落。

[0440] 实施例7

[0441] 增强16,16-二甲基PGE₂处理的细胞的趋化性

[0442] 根据制造商的说明书,使用96孔趋化小室,5 μ M孔径聚碳酸酯膜(Corning Inc., Corning, NY)进行趋化性测定。简而言之,从All Cells获得人CD34⁺脐带血(hCD34⁺CB)细胞并根据制造商的说明书解冻。然后用StemSpan培养基(Stem Cell Technology, Vancouver, Canada)中10 μ M浓度的16,16-二甲基PGE₂或DMSO对照在37℃处理细胞4小时。然后通过离心(300g, 10分钟)洗涤细胞,并以40,000-60,000个细胞/75 μ l的浓度重悬于跨孔测定缓冲液(无酚红RPMI培养基(Mediatech), 0.5%无脂质BSA(Sigma-Aldrich))。将75 μ l的细胞悬浮液添加到板的上部室,而将235 μ l的含有0或50ng/ml SDF1 α (R&D system, Minneapolis, MN)的跨室测定缓冲液添加到下部孔。在37℃, 5%CO₂孵育4小时后,通过流式细胞术得到下部孔中的总细胞数目,利用7AAD(BD Biosciences)来排除死细胞。图20显示了在这些试验中使用的趋化性体外功能测定的流程图。通过将下部孔中细胞的数目除以输入的总细胞再乘以100,计算百分比迁移率。样品一式三份进行分析,然后平均数据用于统计学分析。

[0443] 图21显示了与用DMSO或阴性对照(0ng/ml SDF1 α)孵育的CD34⁺细胞的迁移数目相比,用16,16-二甲基PGE₂孵育的CD34⁺细胞暴露于50ng/ml SDF1 α 时,迁移数目显著增加。因此,与DMSO或未处理的对照细胞相比,用16,16-二甲基PGE₂处理的CD34⁺细胞具有增加的干细胞归巢特性。

[0444] 实施例8

[0445] 1b期临床研究

[0446] 概述

[0447] 由本发明人获得的临床前数据支持了16,16-二甲基PGE₂用作HSC归巢、增殖、存活和分化的促进剂的用途。根据临床前数据,在降低强度预处理方案后经历双(脐带血)CB移植的患有恶性血液病的成年人中开始1b期临床试验。该研究的一个主要目的是根据到第42天具有>5%的16,16-二甲基PGE₂处理的UCB单位嵌合体的植入来确定16,16-二甲基PGE₂处理的UCB的安全性。第二目的包括植入时间,非造血毒性速率,植入失败,急性和慢性GVHD,复发,治疗相关死亡率(TRM),部分嵌合体以及无复发和总的存活率。双UCB移植的竞争性植入动态允许确定dmPGE₂修饰的HSC是否能够胜过未调节的HSC。

[0448] 方法

[0449] 脐带血选择的标准由以下组成:每个脐带血单位与个体以及与其他脐带血单位最小4/6的HLC匹配。用氟达拉滨(fludarabine, 30mg/m²/天IV第8天至第3天),美法仑(melphalan, 100mg/m²/天IV第2天),和兔ATG(1mg/kg/天,第7、5、3和1天)调节没有兄弟姐妹或不相关匹配供体的患者。免疫抑制方案包括西罗莫司(sirolimus, 目标3-12ng/mL)和他克莫司(tacrolimus, 目标5-10ng/mL)。在第0天,患者接受两个脐带血(UCB)单位,第一个

UCB单位(16,16-二甲基PGE₂处理的UCB)在温水浴中解冻并使用5%人血清白蛋白(HSA)和低分子量(LMW)葡聚糖的溶液洗涤。用16,16-二甲基PGE₂在37℃孵育细胞2小时。最终洗涤以除去残余的16,16-二甲基PGE₂之后,不再操作细胞,通过输注将16,16-二甲基PGE₂处理的UCB给予患者。在2-6小时后,不再调节或操作细胞,解冻、洗涤并输注第二个未处理的UCB单位而。

[0450] 结果

[0451] 总共登记12名个体并接受16,16-二甲基PGE₂处理的UCB单位,其中11名个体是可评估的。中位数年龄为57.5岁(范围为19-66岁)并且67%为男性。诊断包括:AML(5)、MDS(4)和NHL/CLL(3)。所有16,16-二甲基PGE₂处理的UCB被处理并在第0天输注。中位数预冷冻保存UCB大小,16,16-二甲基PGE₂处理的UCB: 2.7×10^7 TNC/kg (范围为2.0-5.1) 和 1.3×10^5 CD34/kg (范围为0.3-6.3); 未处理的UCB: 2.0×10^7 TNC/kg (范围为1.8-5) 和 1.1×10^5 CD34/kg (范围为0.5-3.4), 具有中位数组细胞剂量为 4.7×10^7 TNC/kg (范围为3.9-10.1) 和 2.1×10^5 CD34/kg 范围为(1.4-9.7)。

[0452] 用16,16-二甲基PGE₂处理UCB不导致显著的细胞损失,具有90%的平均存活CD34⁺细胞回收率。归因于16,16-二甲基PGE₂处理过的UCB的不良事件包括4名个体中,5次1级输注相关的事件,包括畏寒,面色潮红,腹痛或咳嗽。已知患有冠状动脉疾病的一名额外的个体经历了随着输注的短暂4级ST段抬高和通过心肌肌钙蛋白测定的心肌缺血证据。

[0453] 嗜中性粒细胞恢复(>500个细胞/μL)的中位数时间为17天(范围为15-27天),这可媲美在同一机构类似处理的历史性对照组21天的中位数(n=53, p=0.025)。这些数据也可媲美之前的群体的9位患者,他们同样接受未处理的UCB单位与16,16-二甲基PGE₂处理的UCB的组合,所述16,16-二甲基PGE₂处理的UCB使用以下替代孵育方案制备:在冰上(4℃的温度)用16,16-二甲基PGE₂处理60分钟。这些患者具有22天的嗜中性粒细胞恢复的中位数时间。

[0454] 无支持的血小板计数20,000/μL的中位数时间为42天(可评估n=9)。没有原发性或继发性植入失败实例。在11名可评估个体中的9名中,16,16-二甲基PGE₂处理的UCB是造血作用的主要来源,在第14天16,16-二甲基PGE₂处理的UCB的总嵌合体的中位数为90%,具有再次通过16,16-二甲基PGE₂处理的UCB单位的长期优势。相比之下,在接受未处理的UCB和使用4℃/60分钟孵育方案制备的16,16-二甲基PGE₂处理的UCB的9例患者的以往经验中,16,16-二甲基PGE₂处理的UCB只是9例中2例的造血作用的主要来源。

[0455] 至目前为止,只观察到两例2级急性GvHD,没有观察到慢性GvHD案例。此外,没有记录到EBV-淋巴增殖性疾病案例。TRM为9%(1例个体),1例患者复发,9名个体在5.0个月的随访中位数保持存活而不复发(范围为1.6-9.4个月)。

[0456] 结论

[0457] 这些结论支持了新的离体调节方法改善经历UCB移植的患者中植入的益处。此外,来自这些实验的结果明显证明,将孵育温度从4℃增加至37℃和将孵育时间从60分钟增加至120分钟,导致16,16-二甲基PGE₂处理的细胞的生物活性的显著提高。这部分工作提供了分子表达谱如何直接影响临床医疗的重要实例,并证明了用小分子短期离体处理可以改善细胞疗法。

[0458] 实施例9

[0459] 在4℃对比37℃,用dmPGE₂离体处理的小鼠骨髓细胞的再移植活性的点对点分析

[0460] 本发明证明了dmPGE₂对WBC恢复的影响,包括与对照相比细胞在37℃脉冲时,提高红细胞、血小板和嗜中性粒细胞计数的恢复。本研究是在4℃对比37℃,对用dmPGE₂离体处理的细胞的植入的点对点比较。来自同品系CD45.1和45.2小鼠的骨髓细胞用10μM的16,16-dmPGE₂离体处理2小时并共移植至致死辐射的CD45.1/CD45.2杂交受体小鼠。10只杂交小鼠组接受100,000个用16,16-dmPGE₂在4℃处理的CD45.1骨髓细胞和100,000个用16,16-dmPGE₂在37℃处理的CD45.2骨髓细胞。第二组10只小鼠接受100,000个用16,16-dmPGE₂在4℃处理的CD45.2骨髓细胞和100,000个用16,16-dmPGE₂在37℃处理的CD45.1骨髓细胞,以补偿染色偏好。移植后1、2、3和4个月,从小鼠取血并确定CD45.1和CD45.2阳性外周血细胞。在第4个月,评估三系重建以确定任何一种谱系重建偏好或差异。在移植后4个月,使小鼠无痛致死并进行骨髓嵌合体。来自50%/50%嵌合体的偏差反映了由处理程序导致的植入能力。该研究的图形概要在图24中示出。

[0461] 实施例10

[0462] 方法

[0463] 从处理的全脐带血分离Lin(-)CD34⁺细胞

[0464] 从Stem Cell Technologies (Vancouver, Canada) 获得人全脐带血单核细胞。解冻后,用16,16-二甲基PGE₂或合适的对照如DMSO在LMD/5%HAS培养基中处理细胞。

[0465] 处理后,细胞用LMD/5%HAS培养基洗涤,在室温下650×g离心10分钟,并重悬于冷的选择缓冲液(没有Ca⁺或Mg⁺的磷酸盐缓冲液(PBS);2mM EDTA;和0.5%HSA)。使用系别细胞(Lin)去除试剂盒(Miltenyi Biotec, aBrun, CA)之后是CD34⁺富集试剂盒(Miltenyi Biotec)进行磁性选择。根据制造商的说明书,使用QuadroMACSTM分离器进行系别细胞去除和CD34⁺细胞富集。在该过程中,细胞保持在4℃。一旦从处理的全脐带血中分离Lin-CD34⁺细胞,通过流式细胞术分析等分试样以评估纯度。细胞的纯度大于90%。大部分细胞通过利用Pico Pure RNA分离试剂盒(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)进行RNA提取以用于Affymetrix分析。

[0466] 可将上述各种实施方案进行组合以提供其它实施方案。将本说明书中引用和/或申请信息单中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、国外专利、国外专利申请和非专利出版物以其整体通过引用方式并入本文。若必要,则实施方案的方面可以修改以采用各种专利、申请和出版物的概念来提供其它实施方案。

[0467] 根据上述详细描述,可对实施方案进行这些和其它的改变。一般而言,在下述权利要求中,使用的术语不应解释为将权利要求限制在本说明书和权利要求中公开的具体实施方案,而应解释为包括所有可能的实施方案连同这类权利要求所给予的等同物的所有范围。因此,权利要求不受本公开的限制。

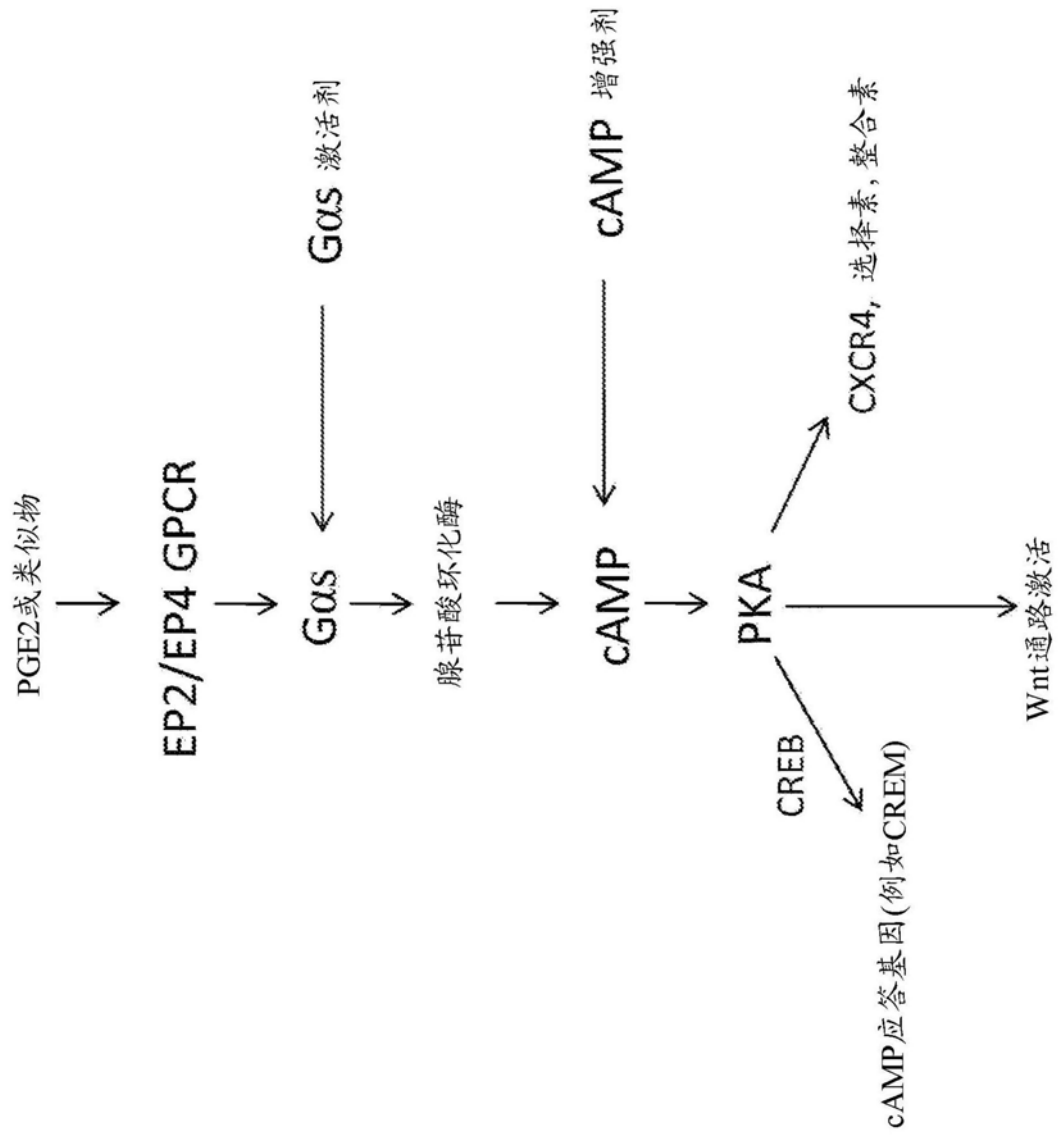


图1

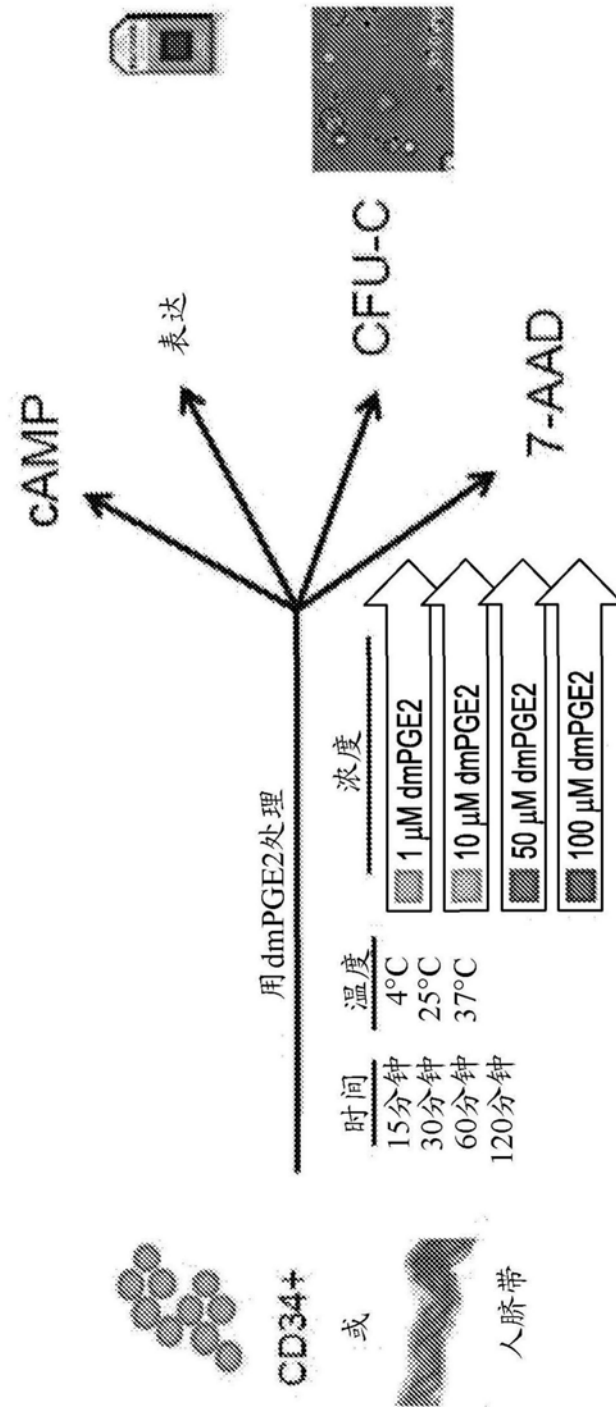


图2

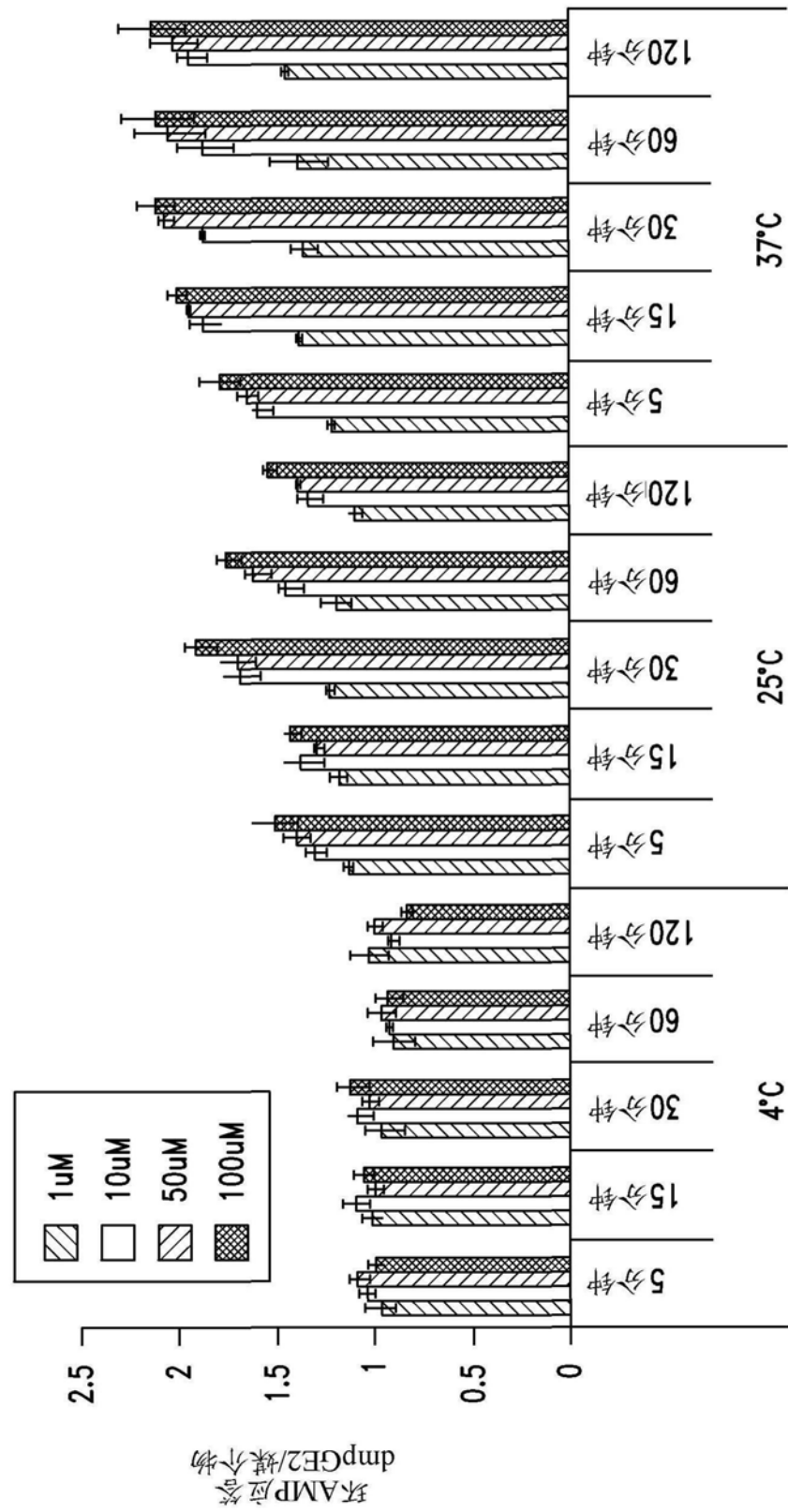


图3

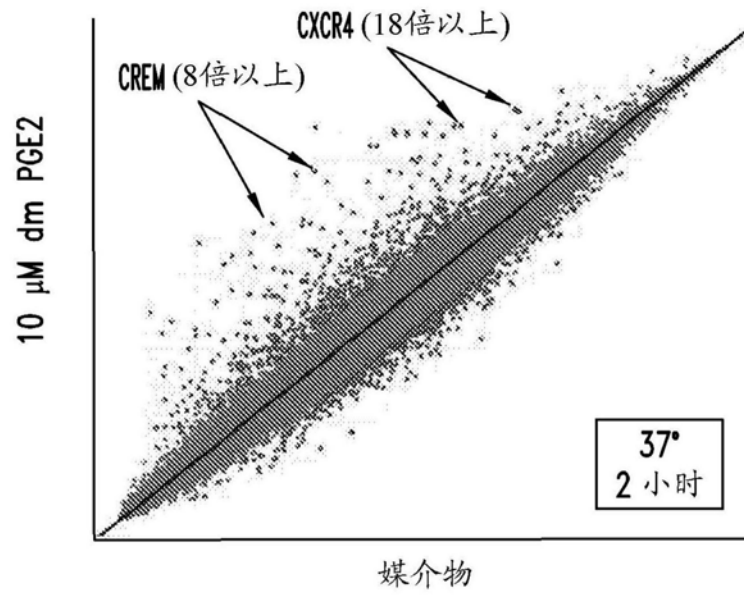


图4

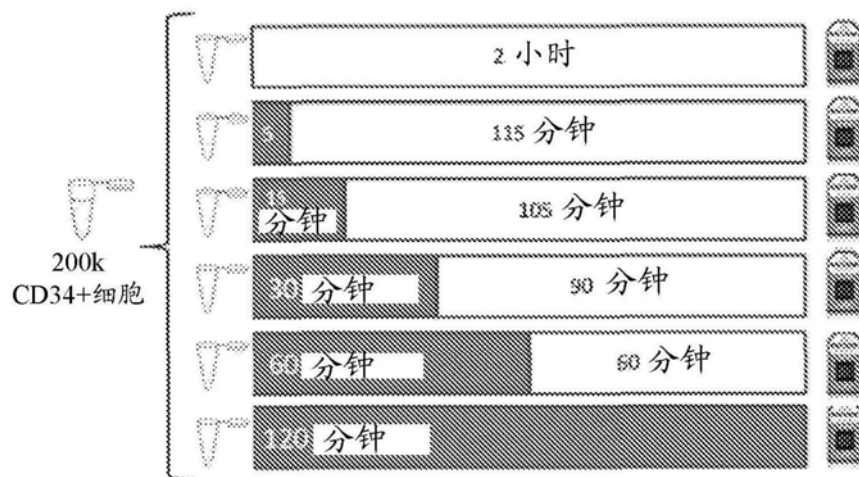


图5

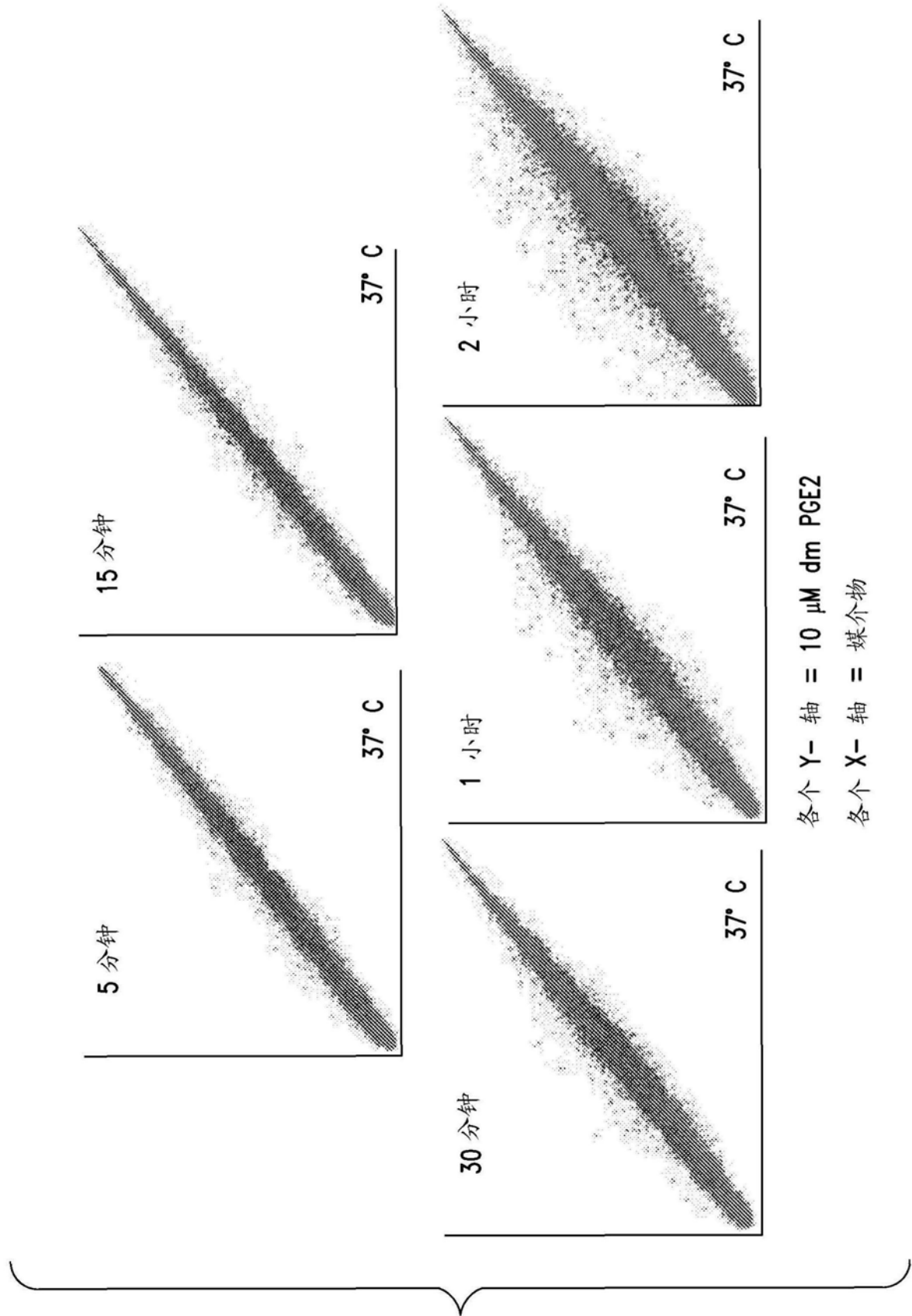


图6

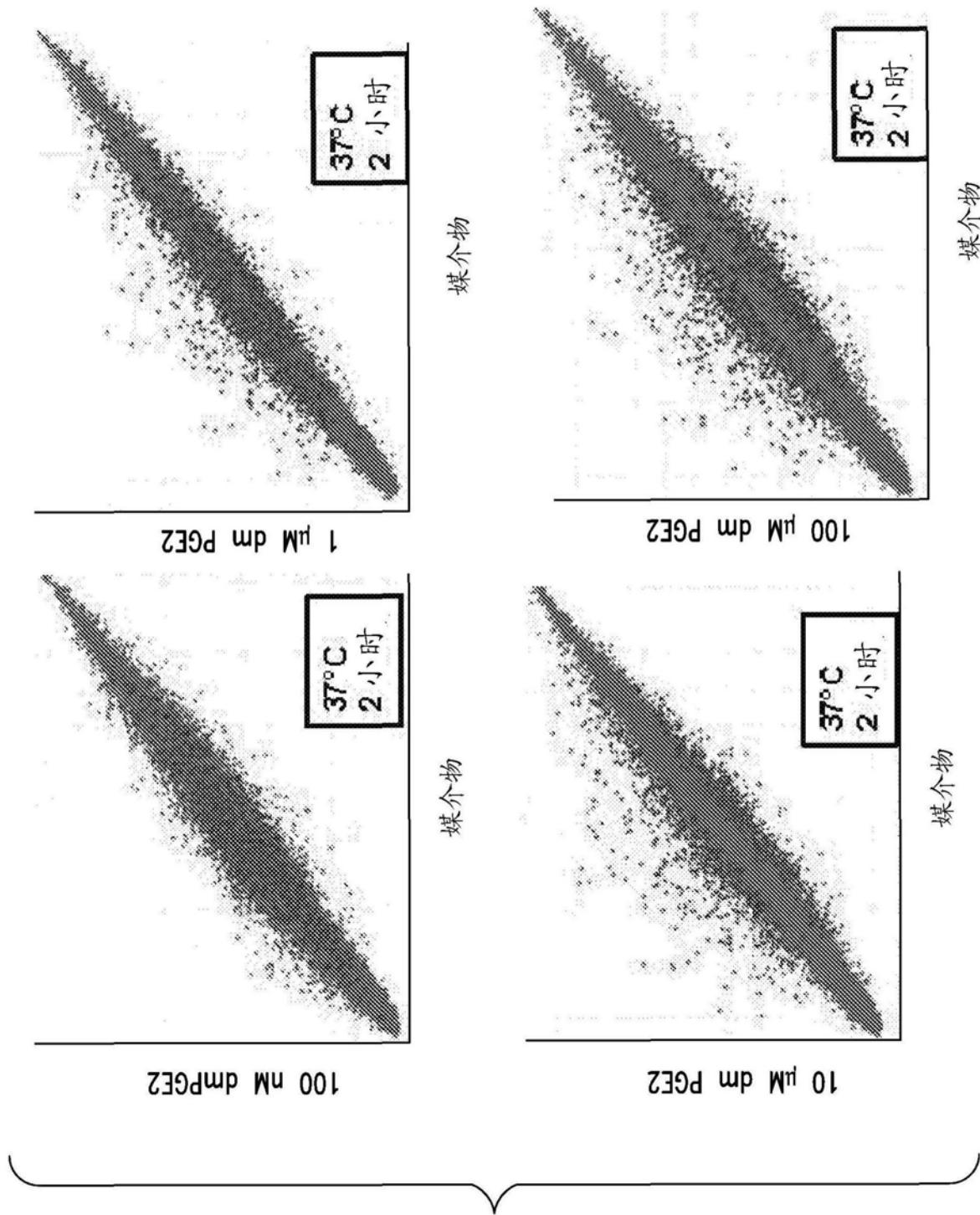


图7

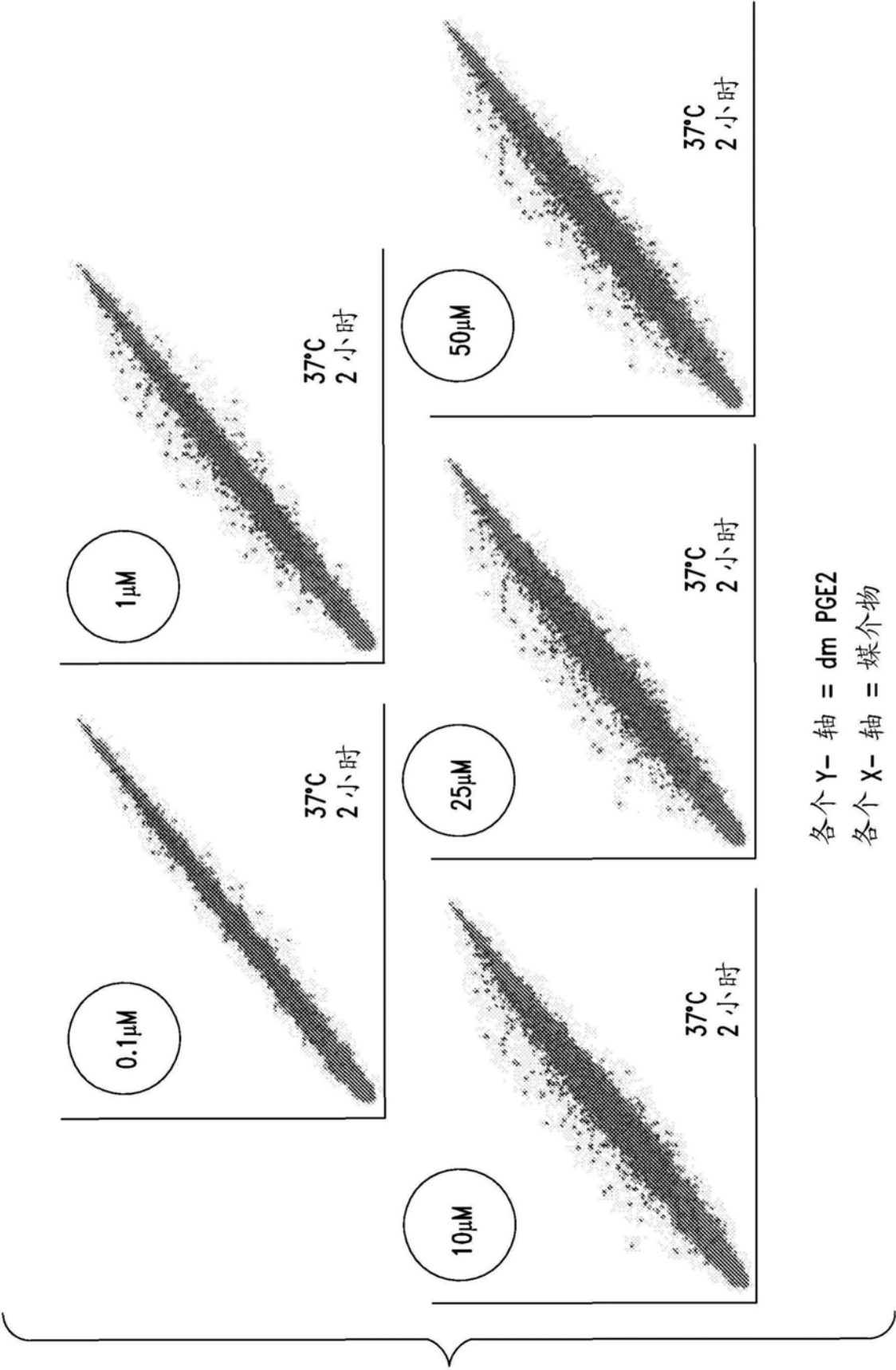


图8

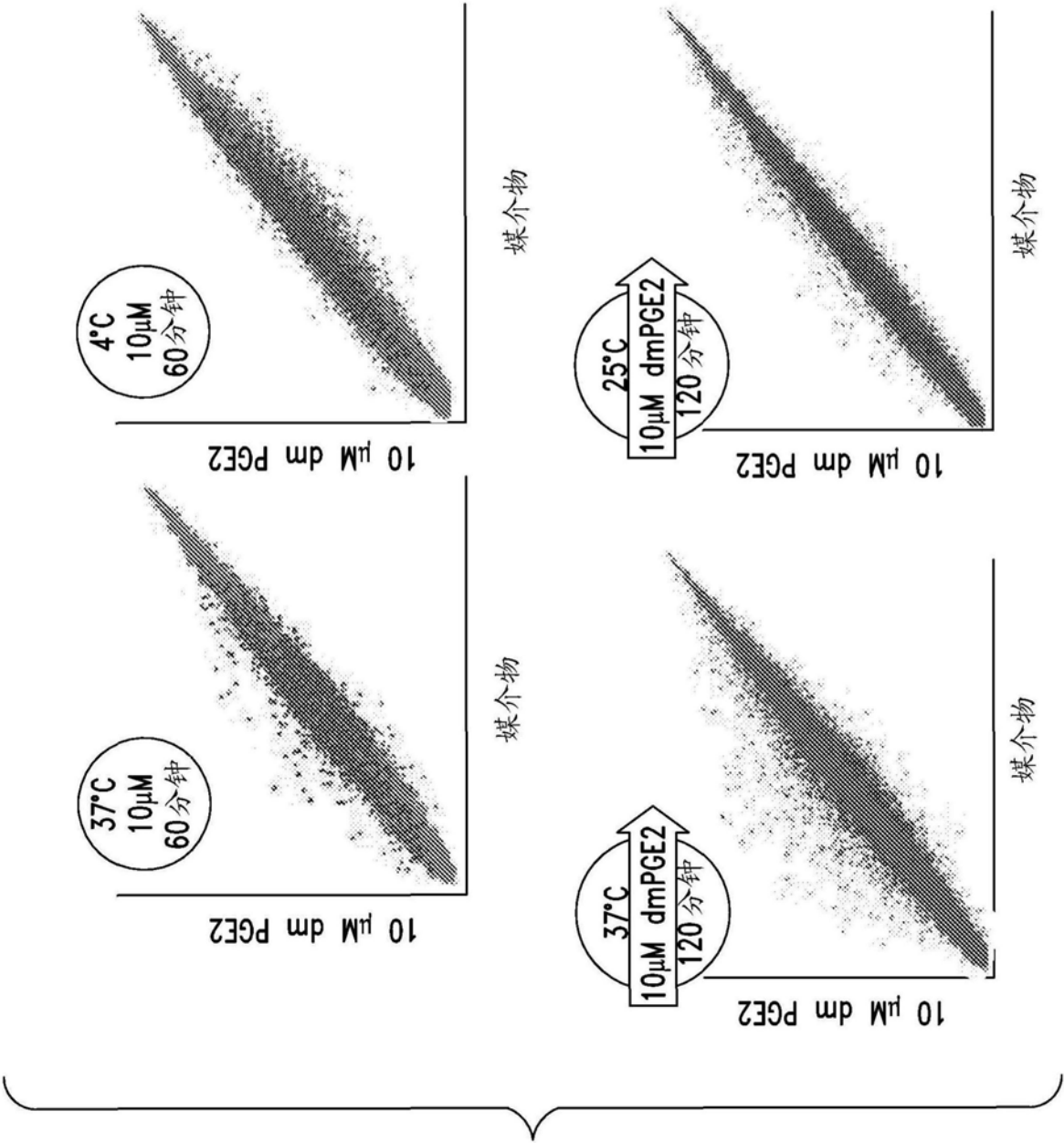


图9

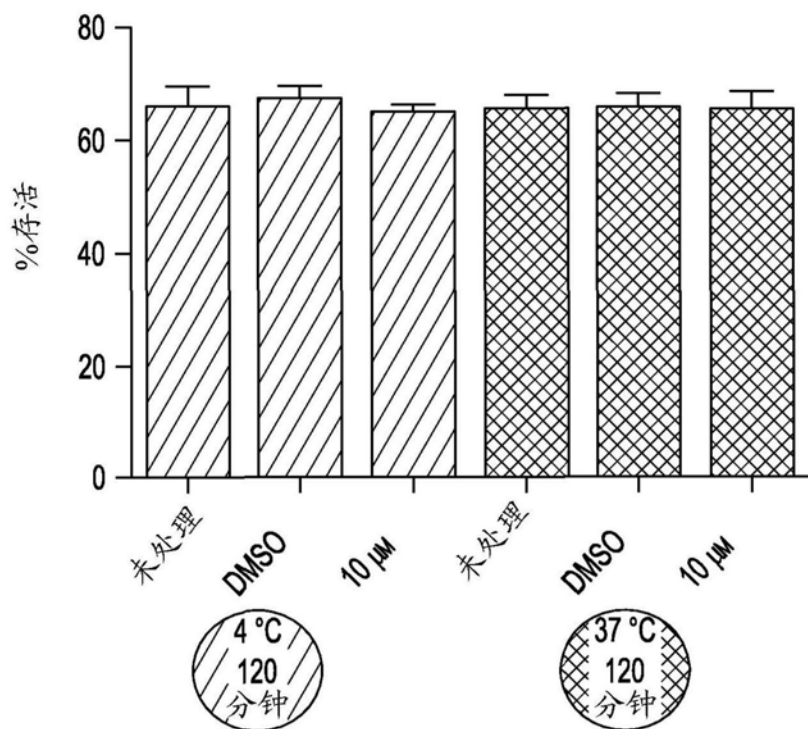


图10

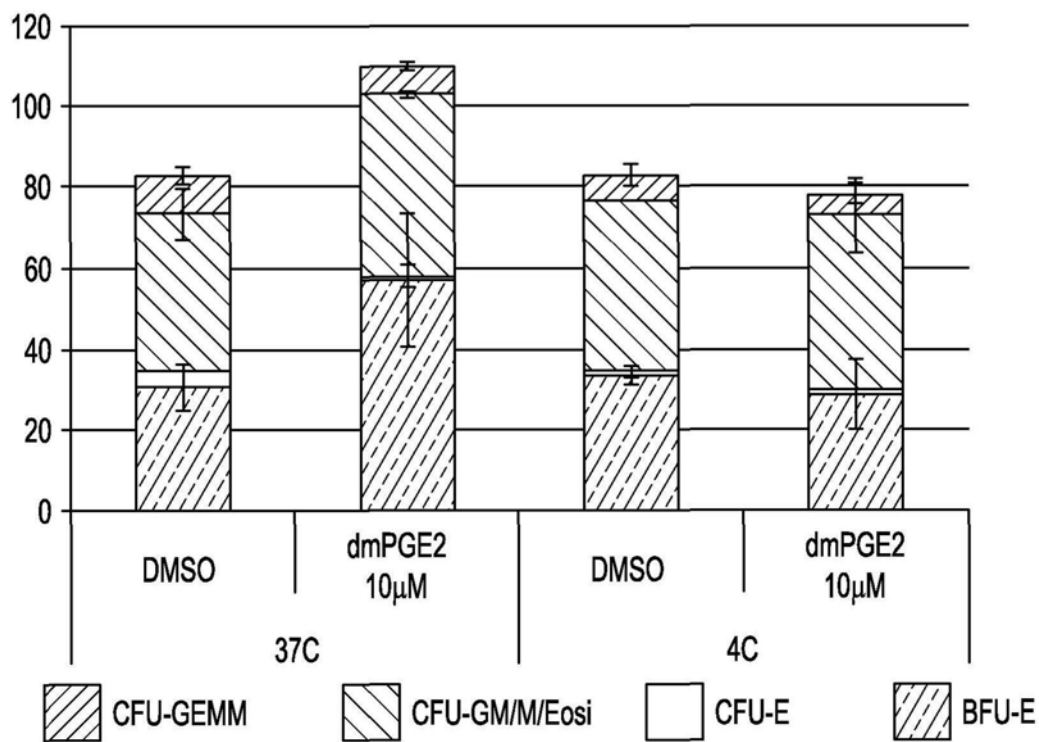


图11

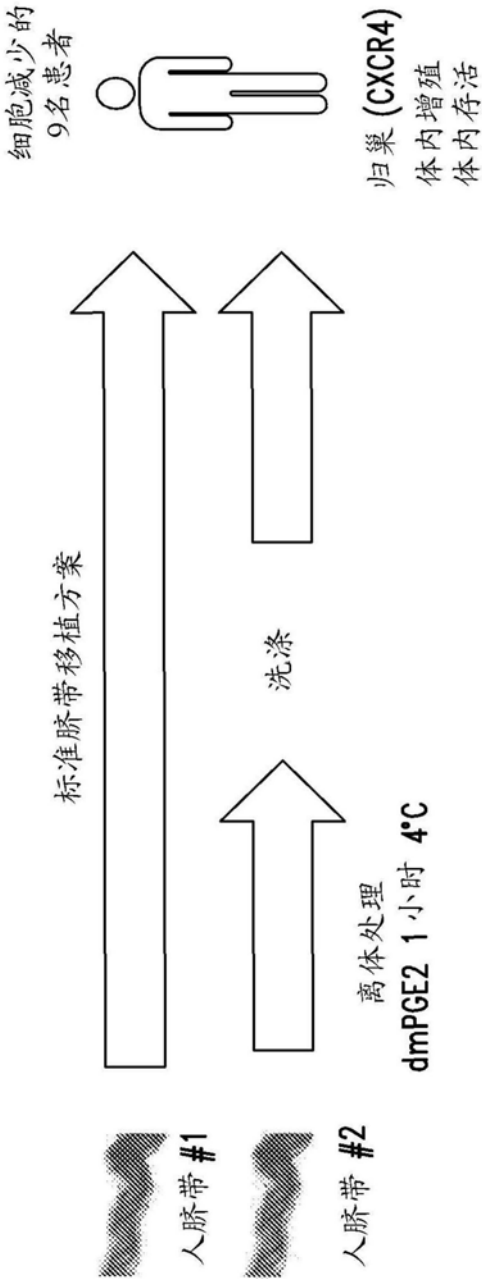


图12

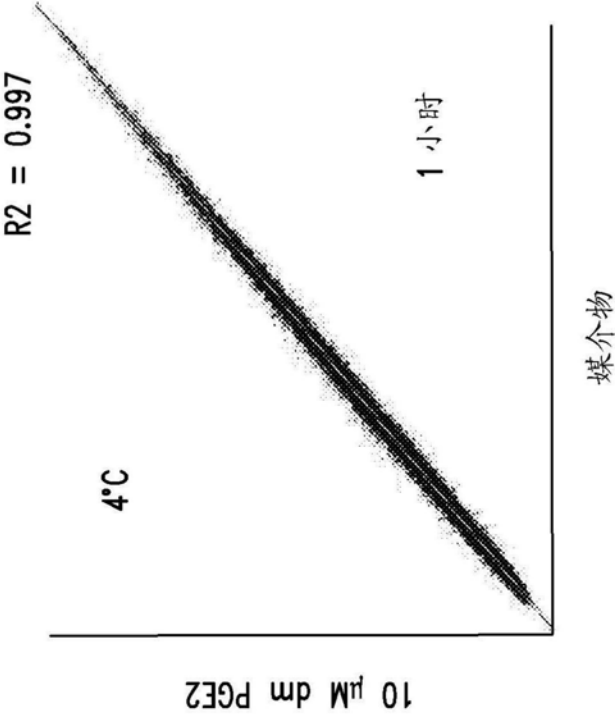


图13A

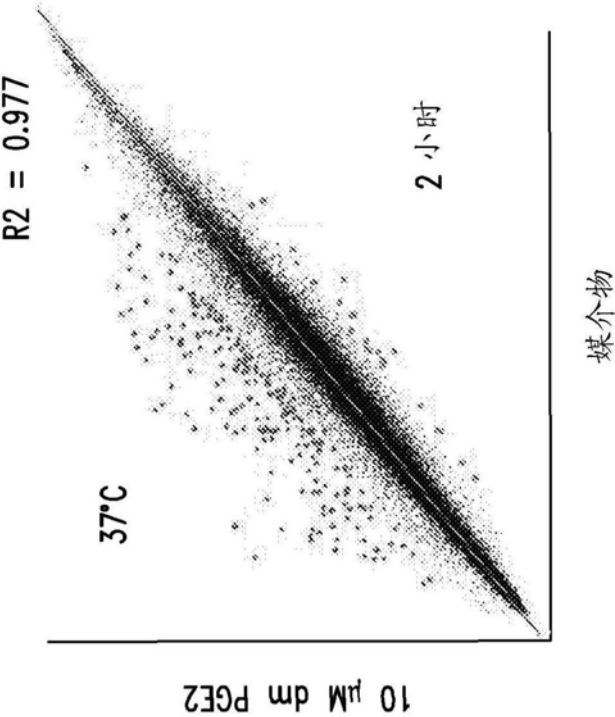


图13B

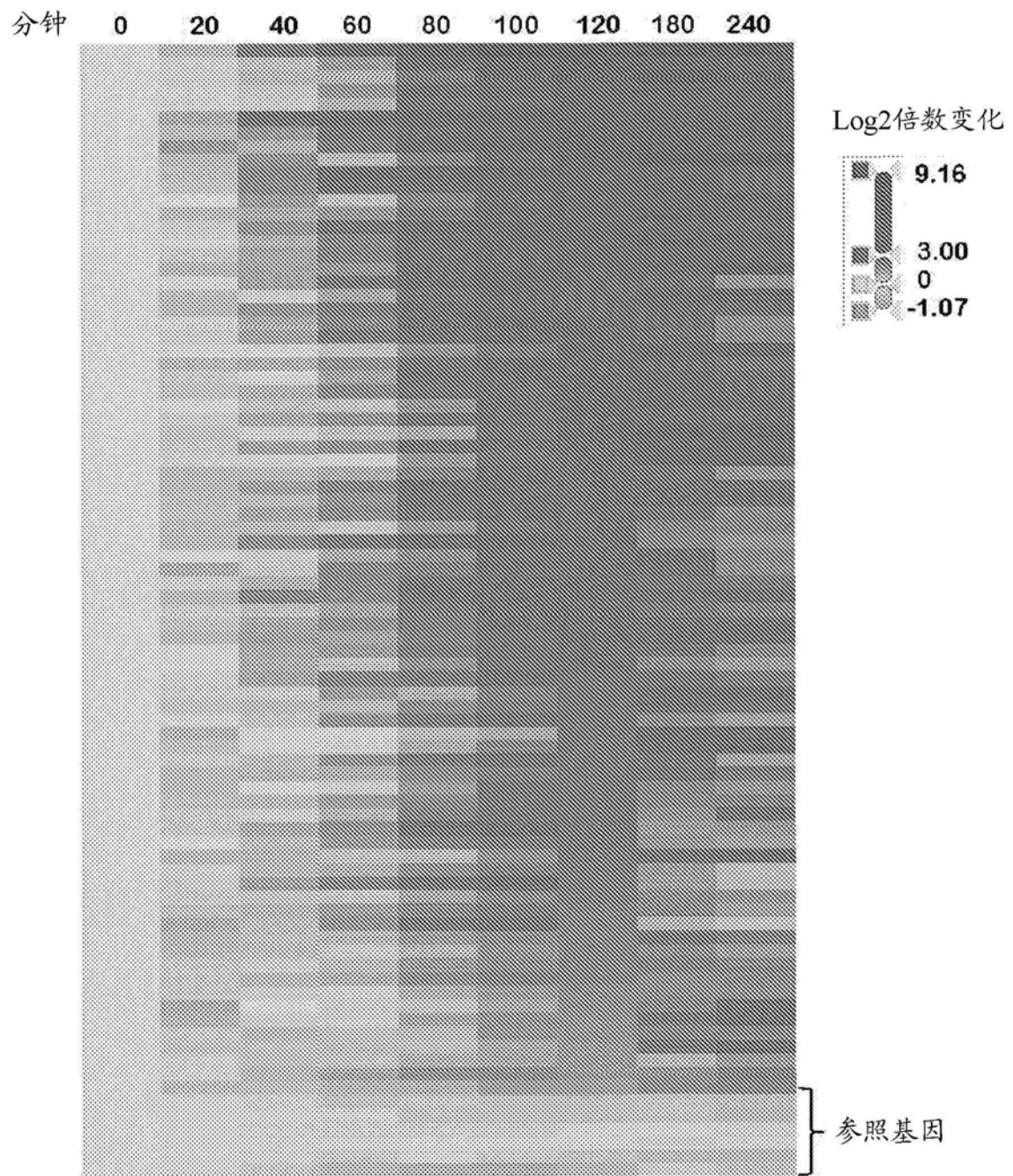


图14A

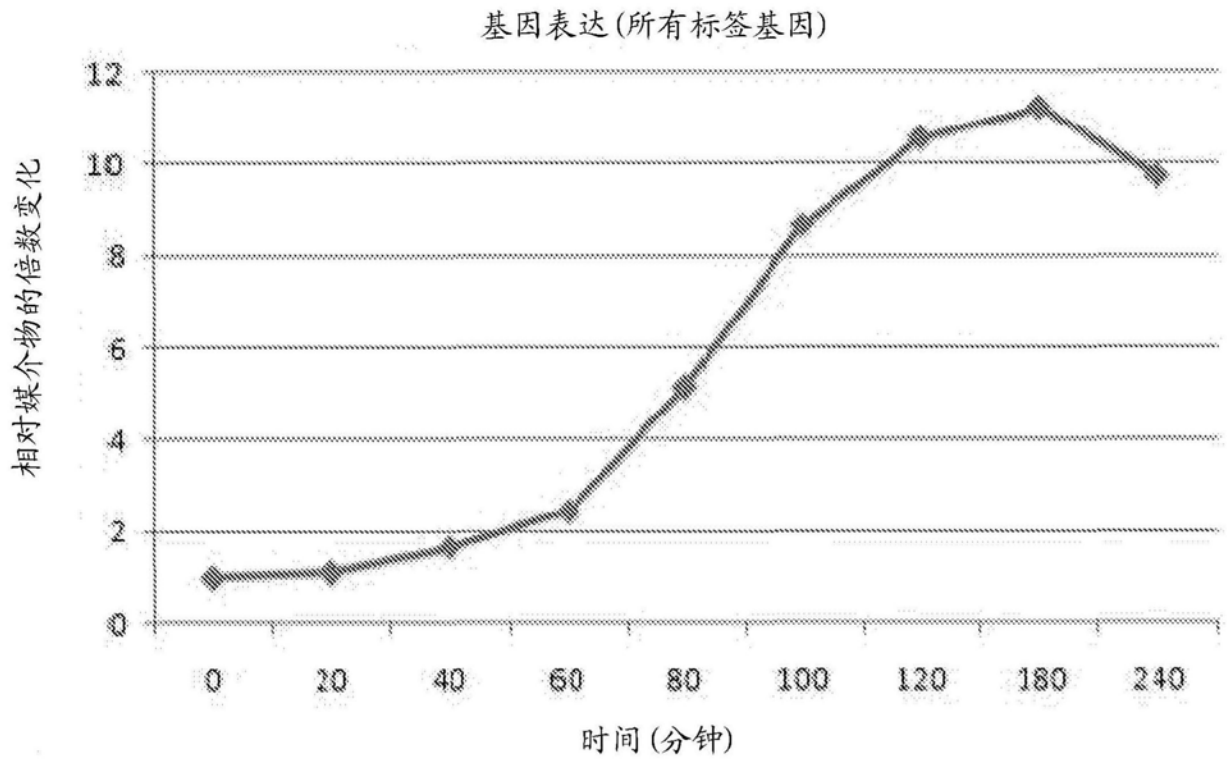


图14B

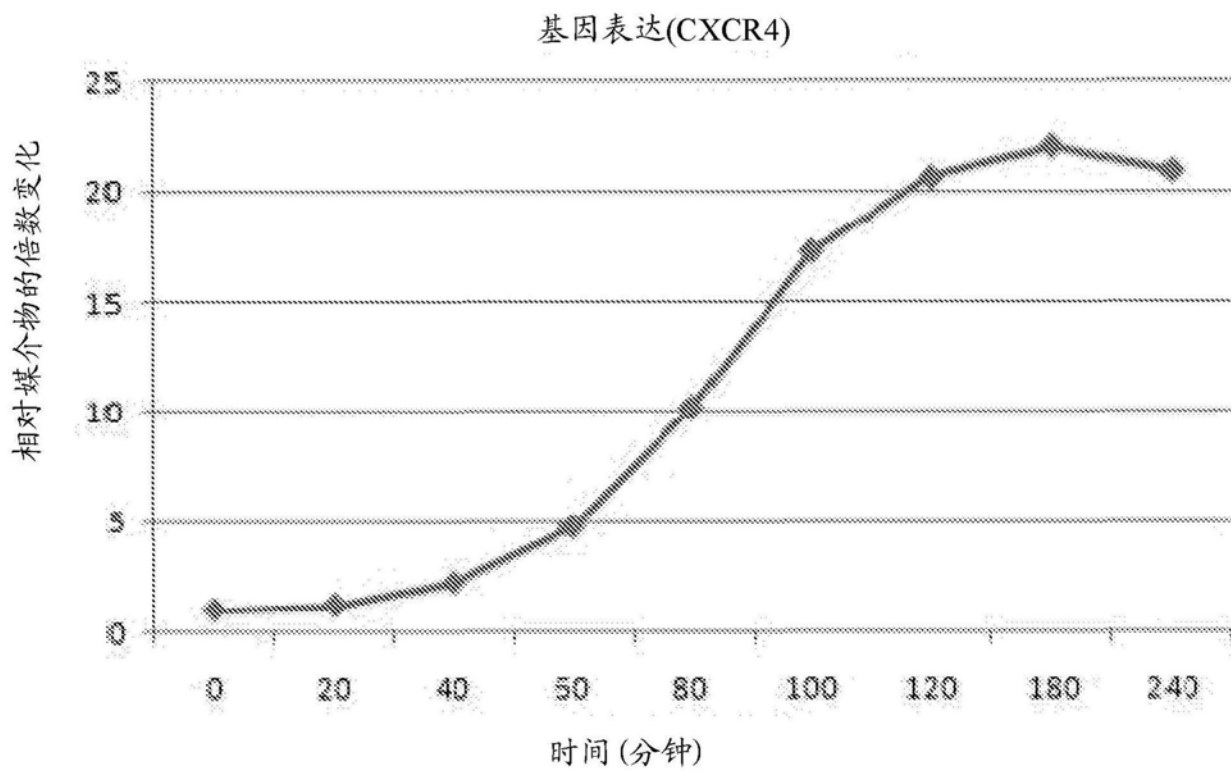


图14C

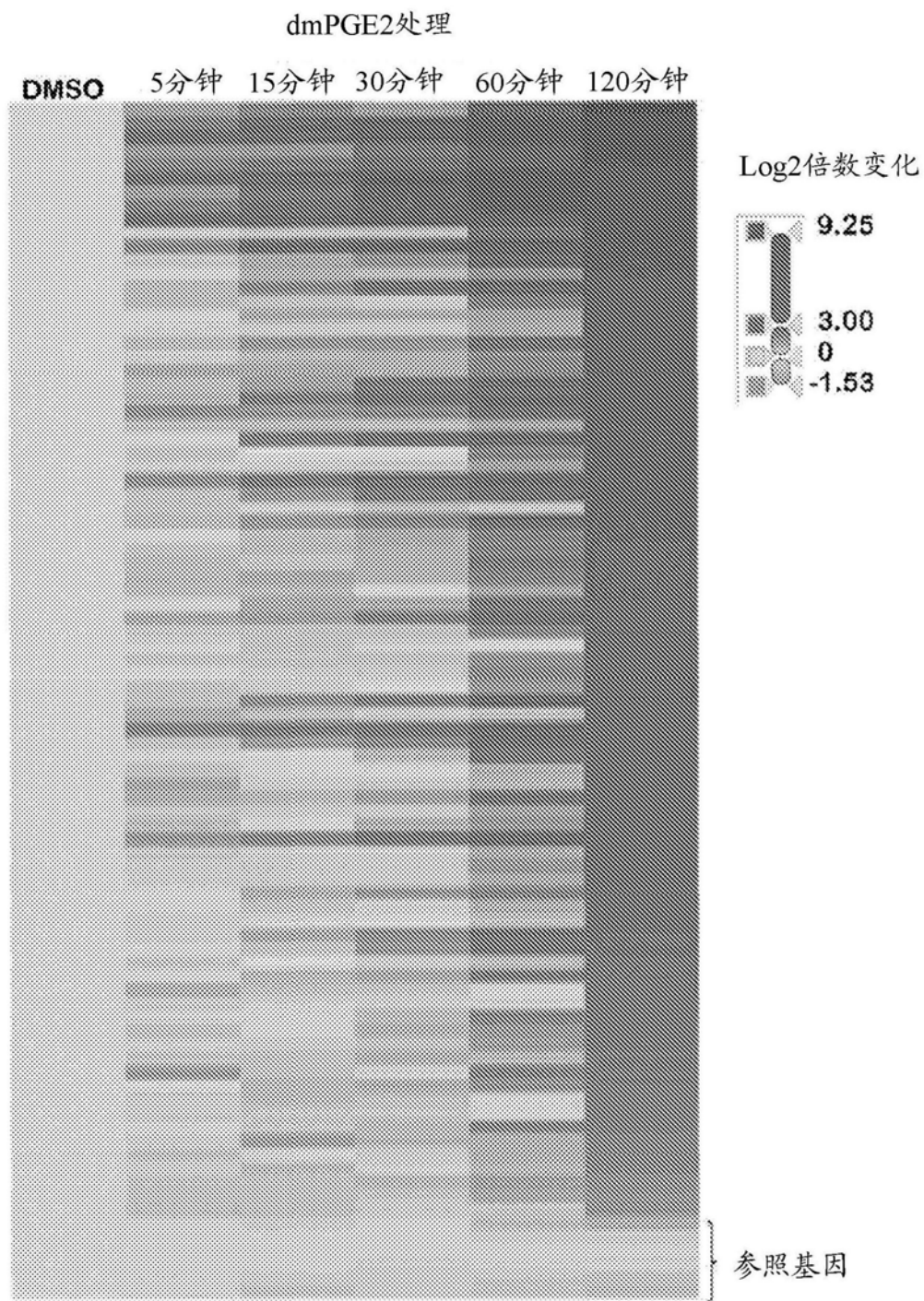


图15A

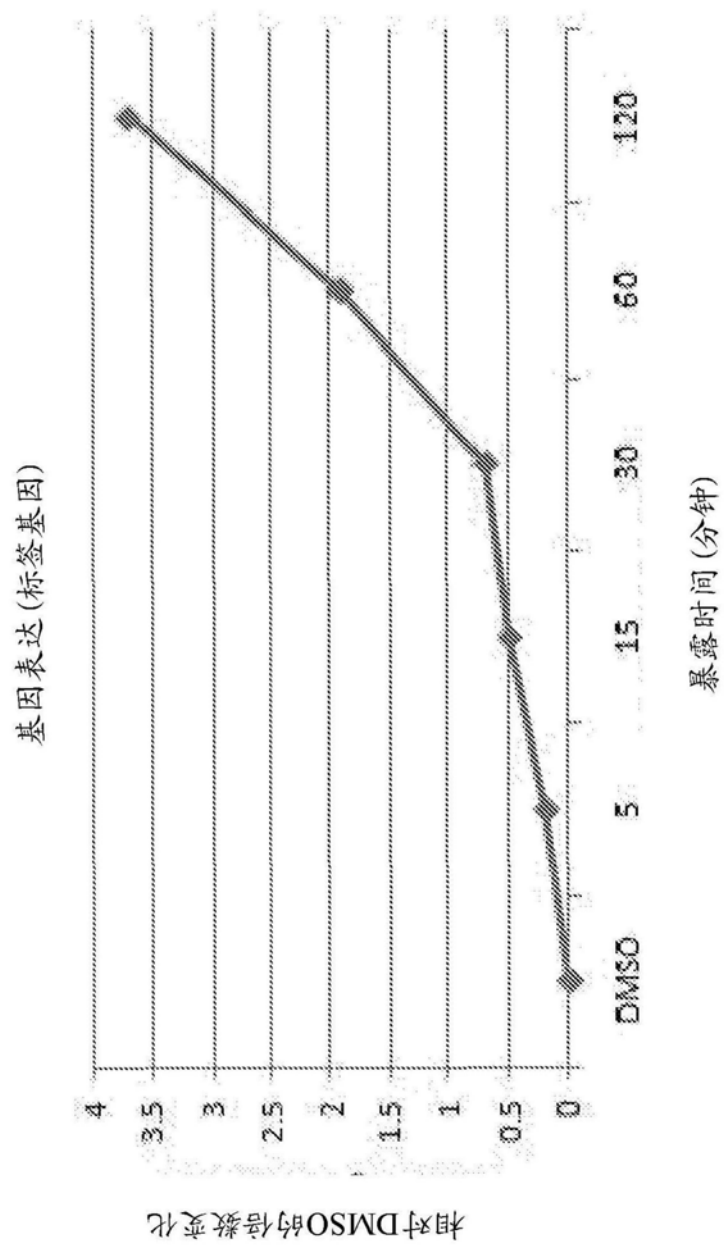


图15B

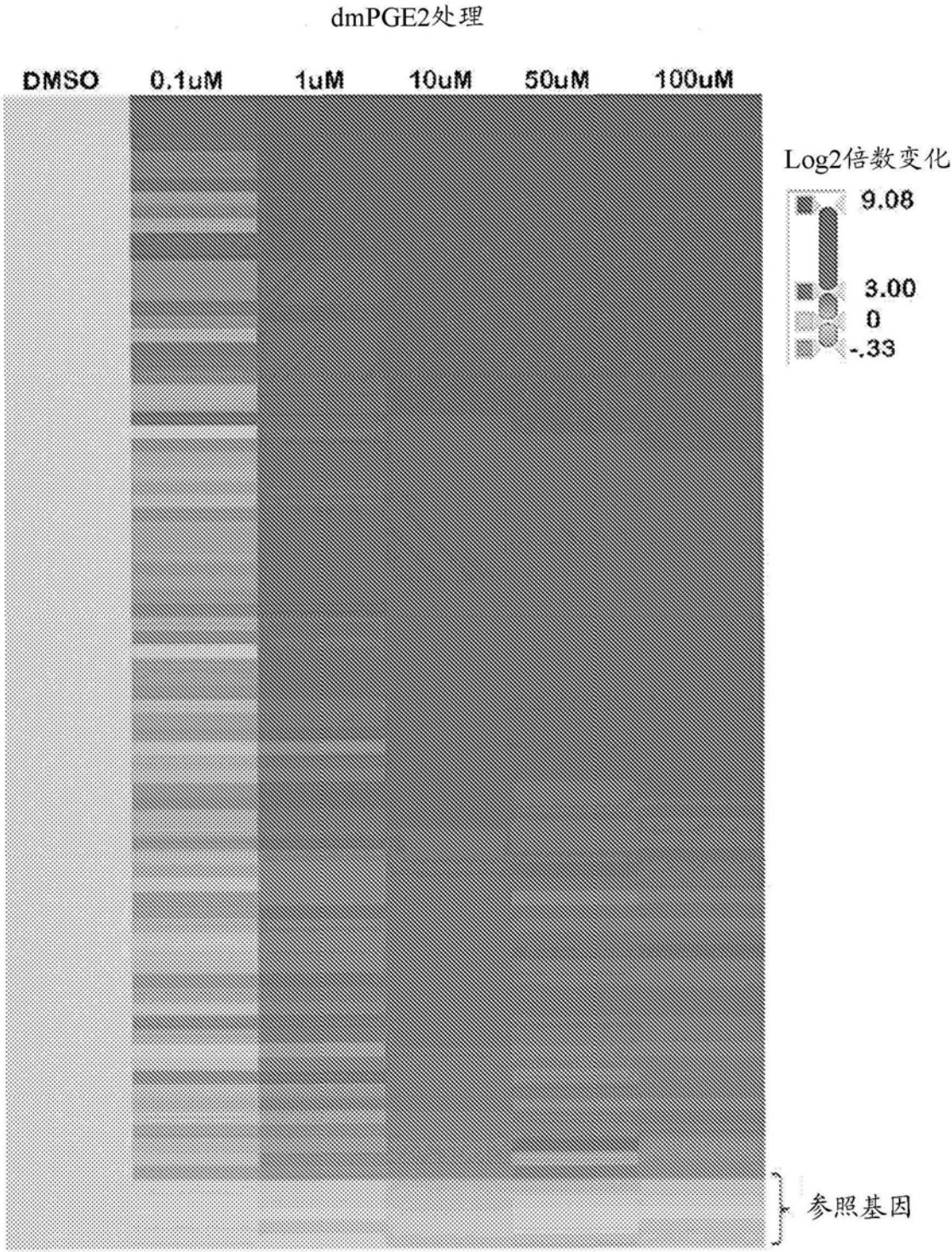


图16A

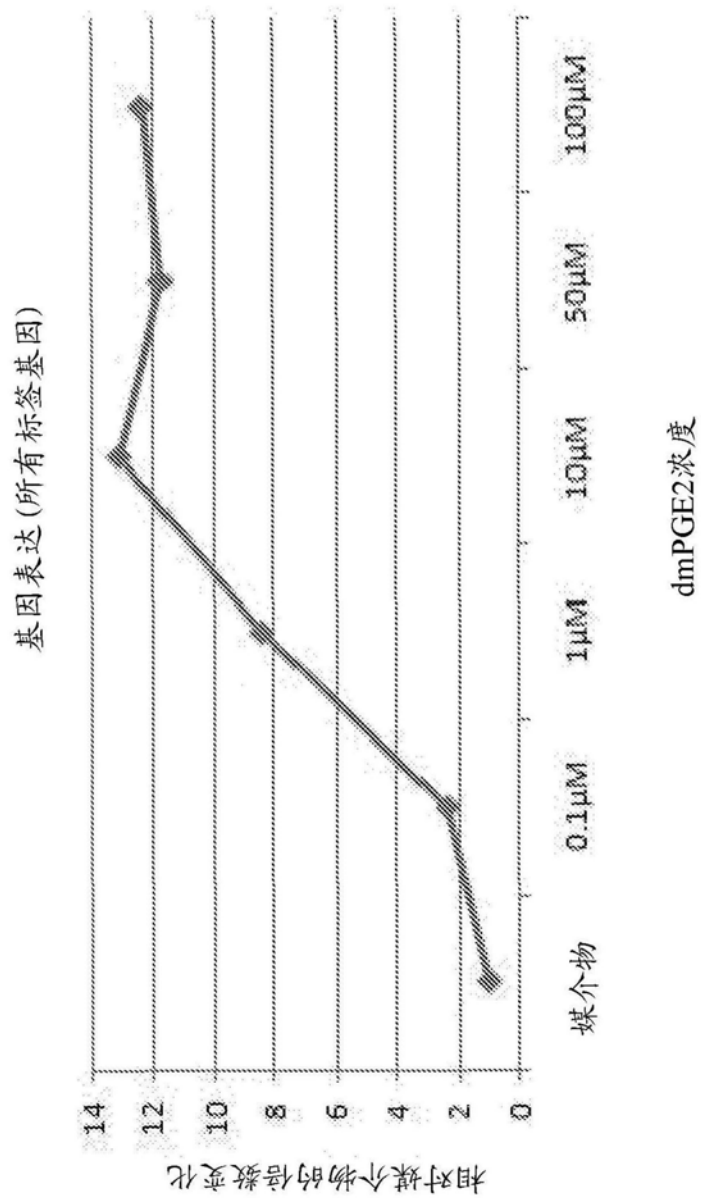


图16B

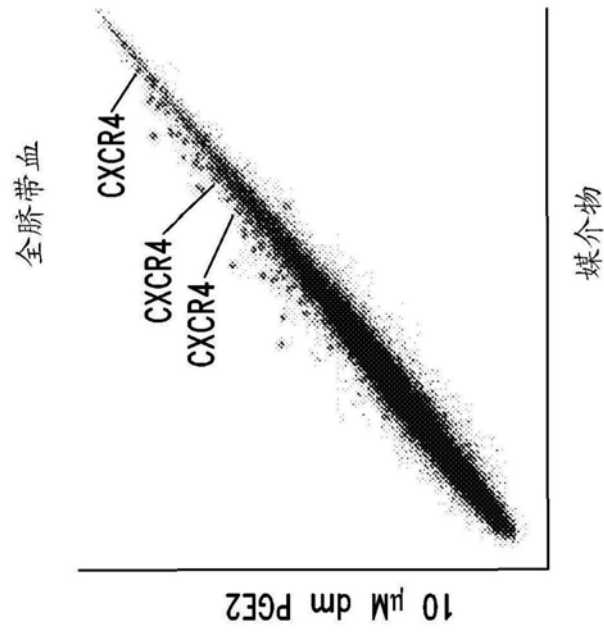


图17A

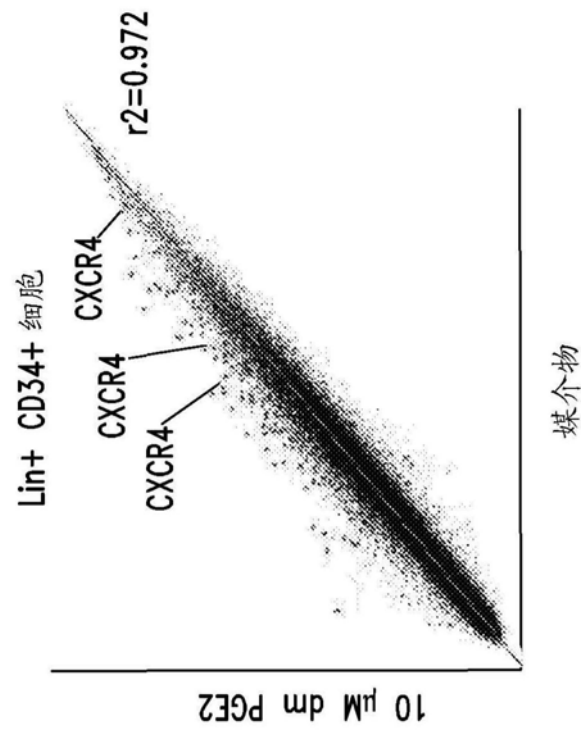


图17B

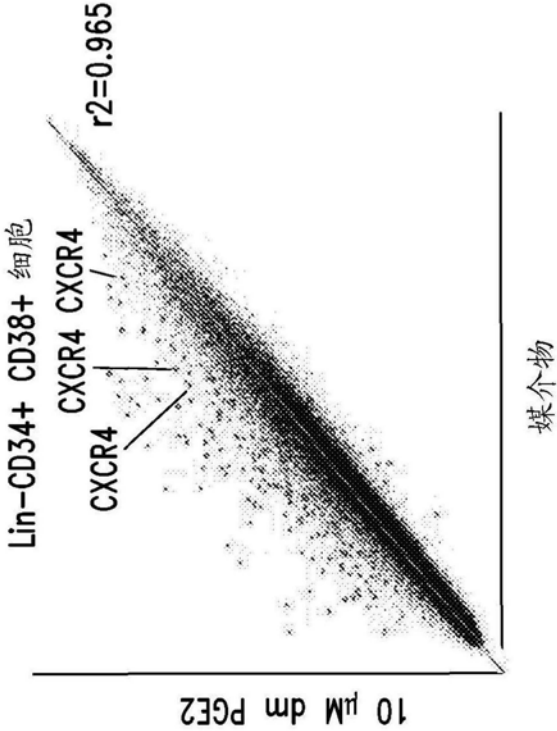


图17C

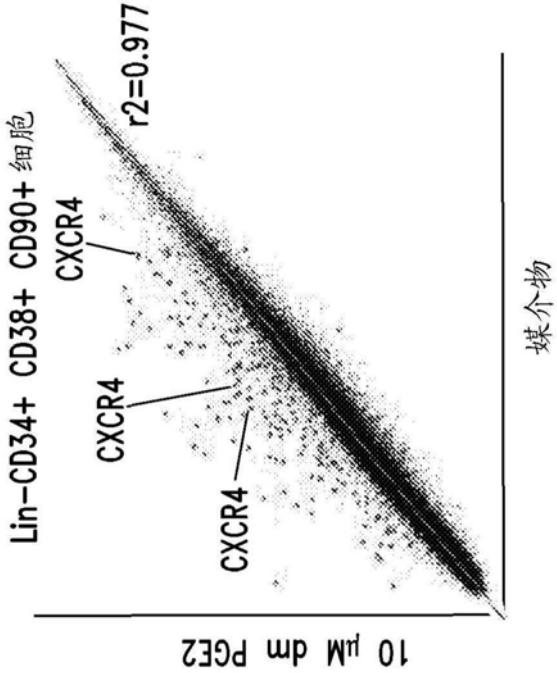


图17D

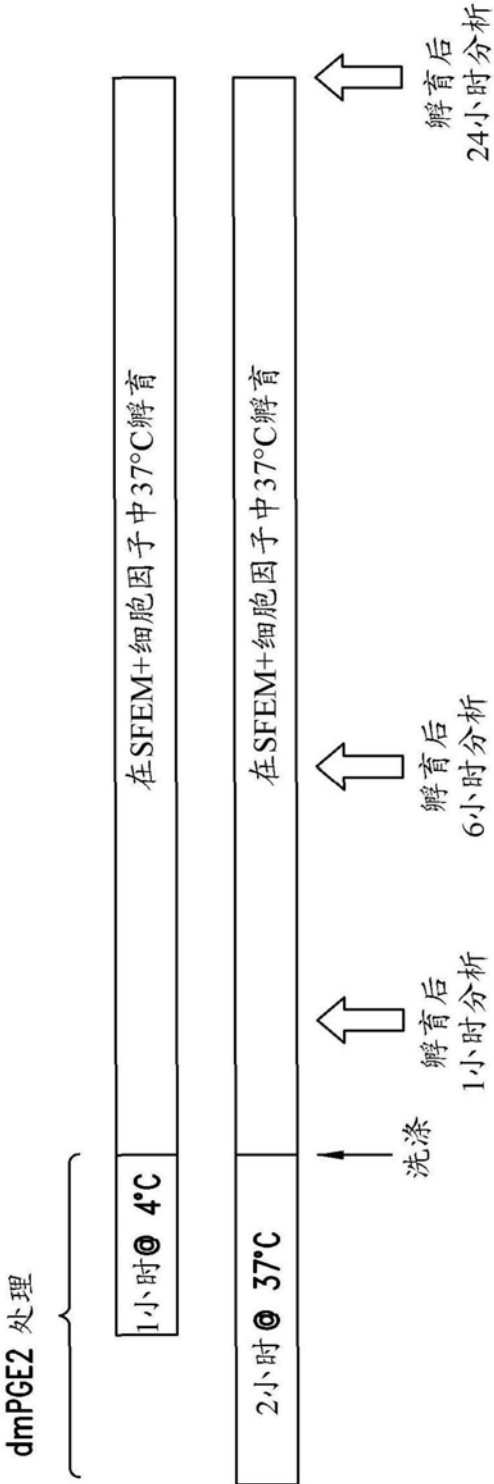


图18A

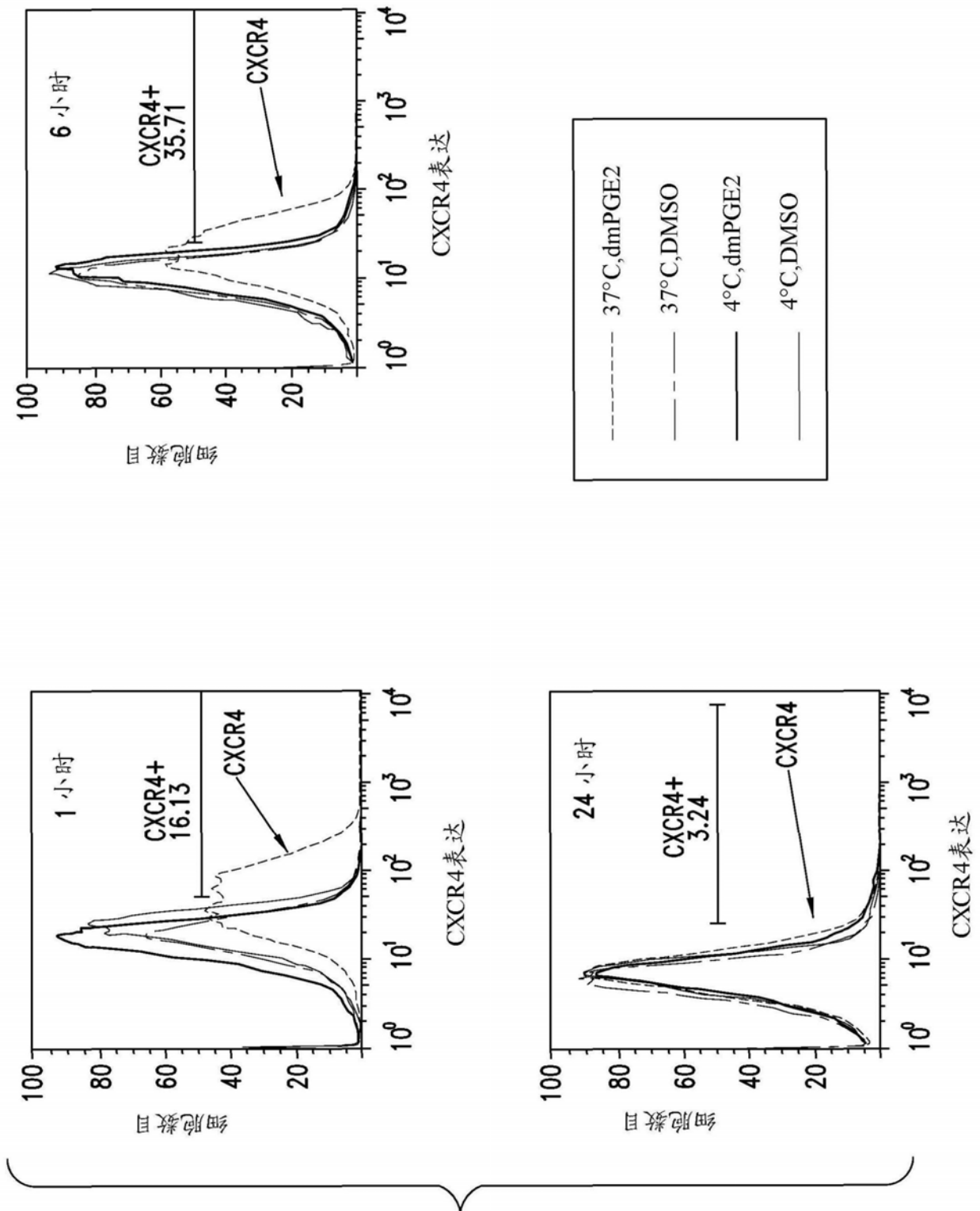


图18B

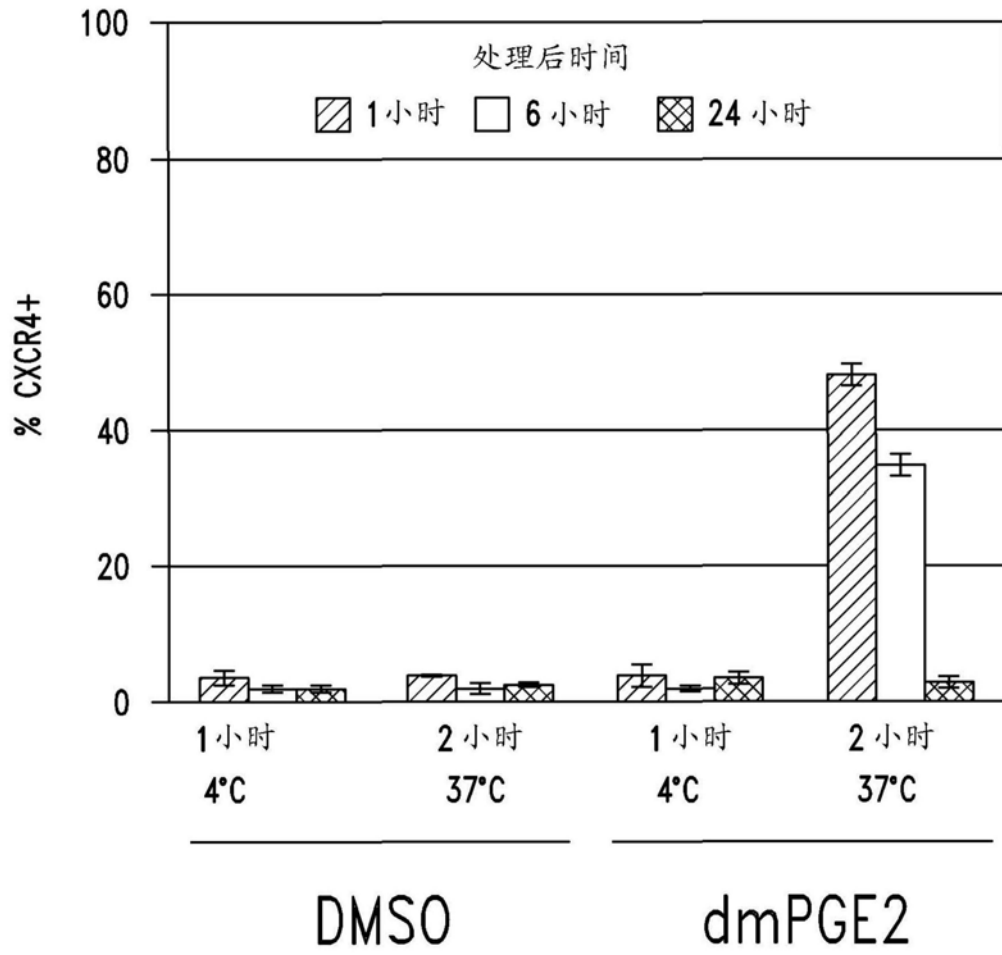


图18C

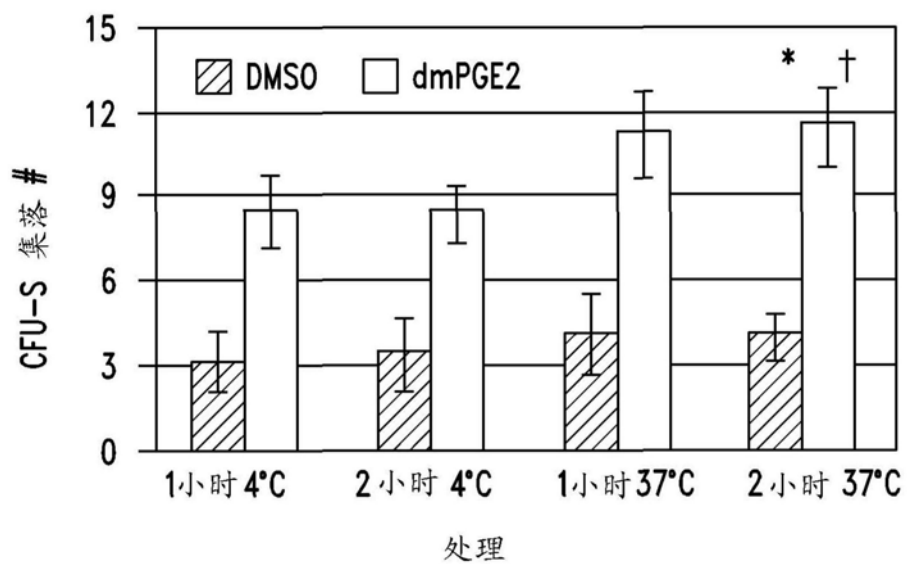


图19A

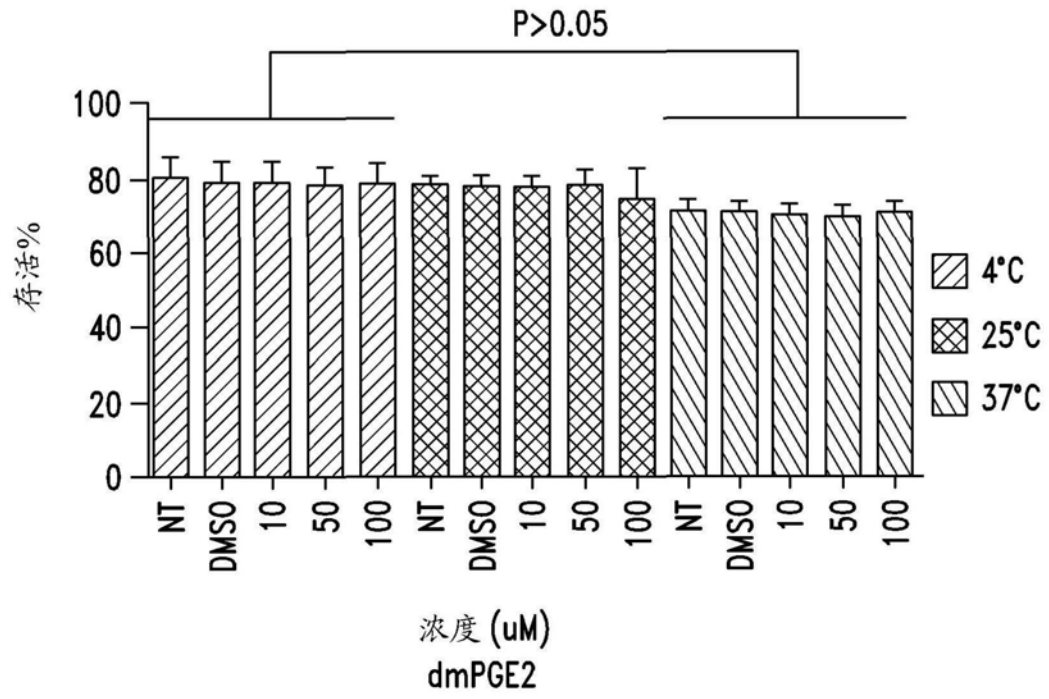


图19B

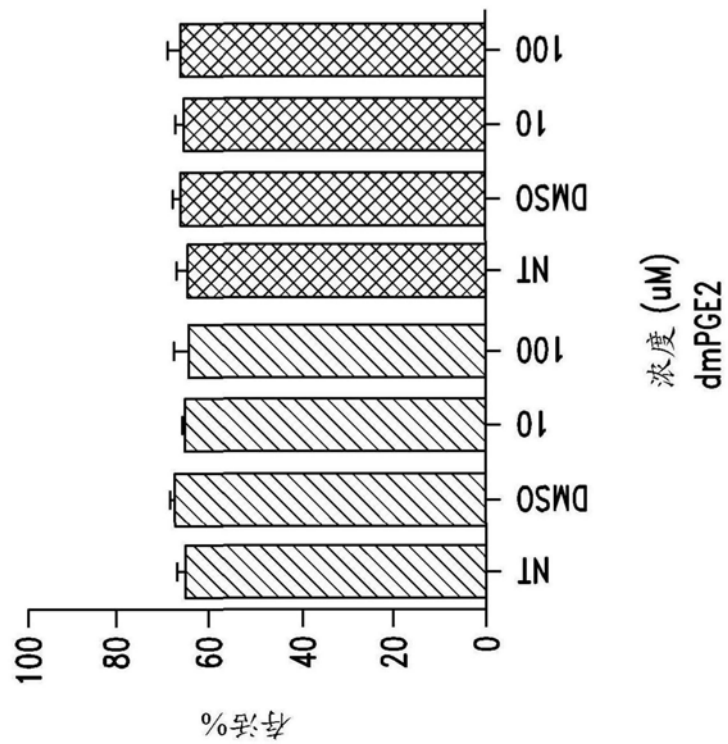


图19C

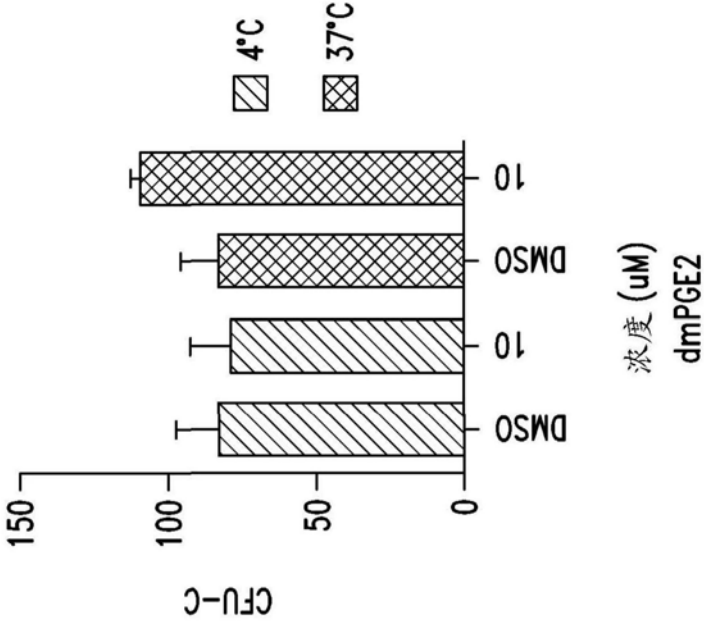


图19D

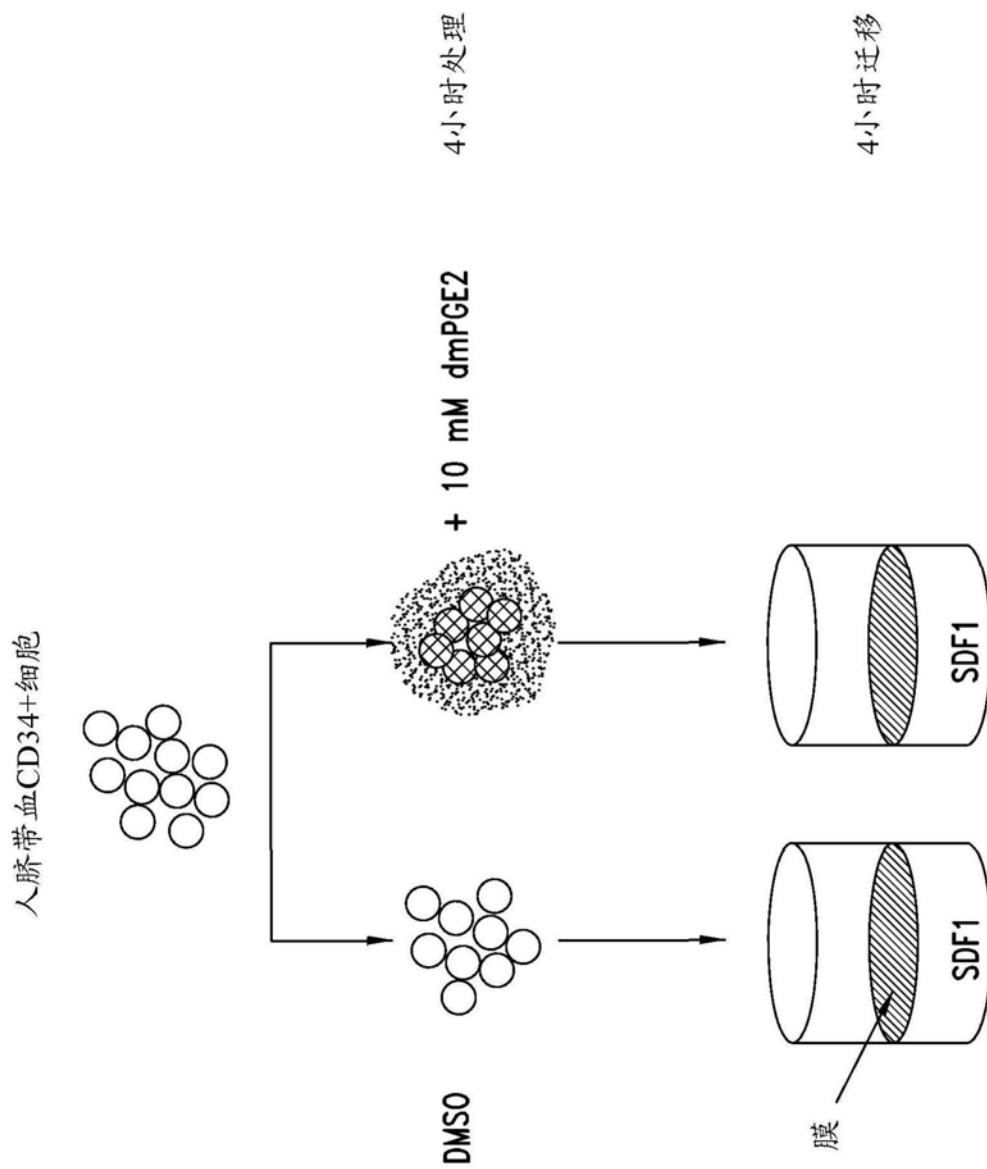


图20

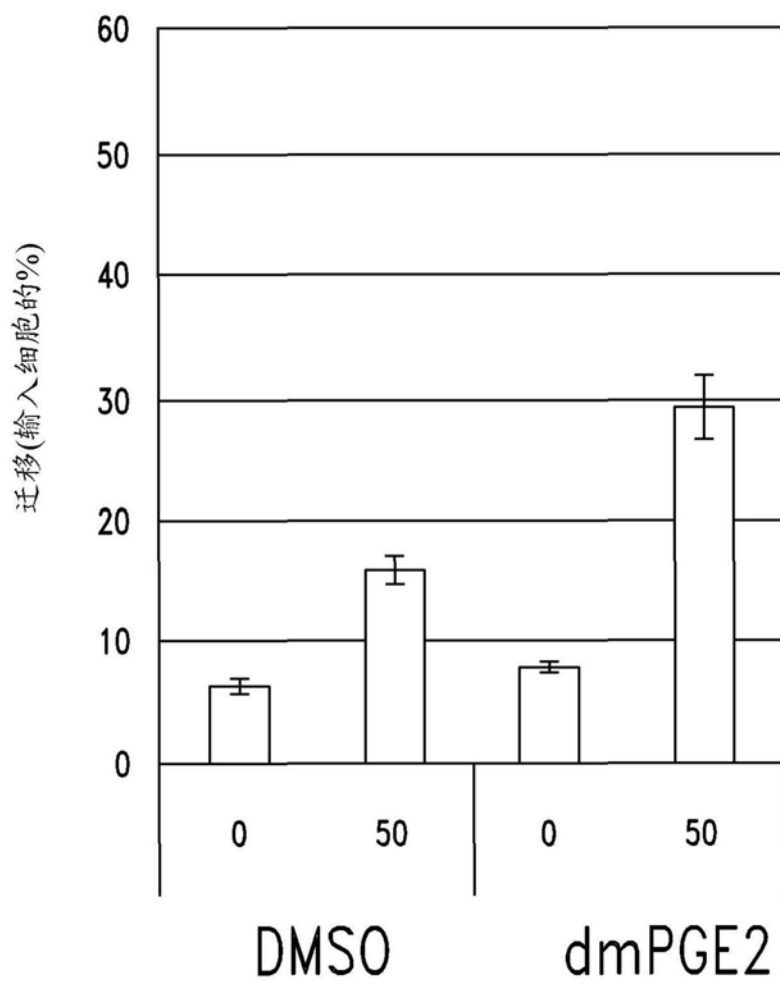


图21

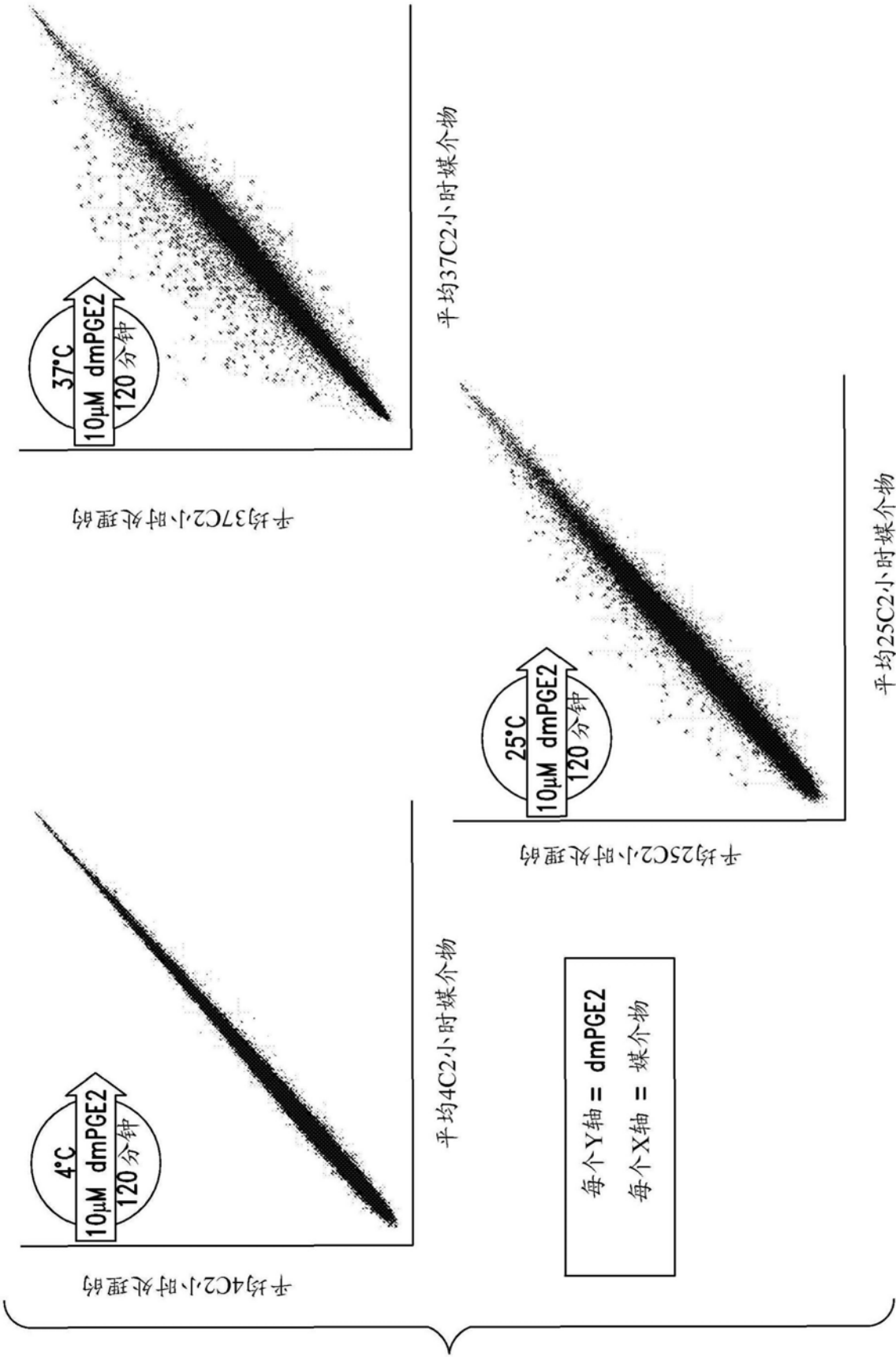


图22A

基因符号	描述	平均倍数 变化, 4°2小时	平均倍数 变化, 25°2小时	平均倍数 变化, 37°2小时
TAC1	肽激肽	1.01	4.51	60.96
HAS1	透明质酸合成酶1	0.98	12.45	43.13
DUSP4	双特异性蛋白磷酸酶4	1.04	1.34	24.16
AREG	双调蛋白	1.06	1.78	22.74
GEM	GTP-结合蛋白 GEM	1.20	1.32	22.17
NR4A2	核受体相关蛋白1	0.90	3.85	18.33
REN	肾素	1.17	1.36	16.60
CXCL6	CXC趋化因子配体6(粒细胞趋化蛋白: cAMP-反应元件调节因子	1.14	1.03	15.87
CREM	胶原蛋白, I型, $\alpha 1$	1.01	1.98	12.97
COL1A1	CXC趋化因子配体5	1.06	4.15	12.83
CXCL5	碳酸酐酶 II	1.05	4.64	11.61
CA2	血小板反应蛋白1	0.96	4.15	10.63
THBS1	FOS-样抗原2	1.04	2.31	8.70
FOSL2	CXC趋化因子受体4	1.03	1.79	7.92
CXCR4		1.05	2.79	7.76

图22B

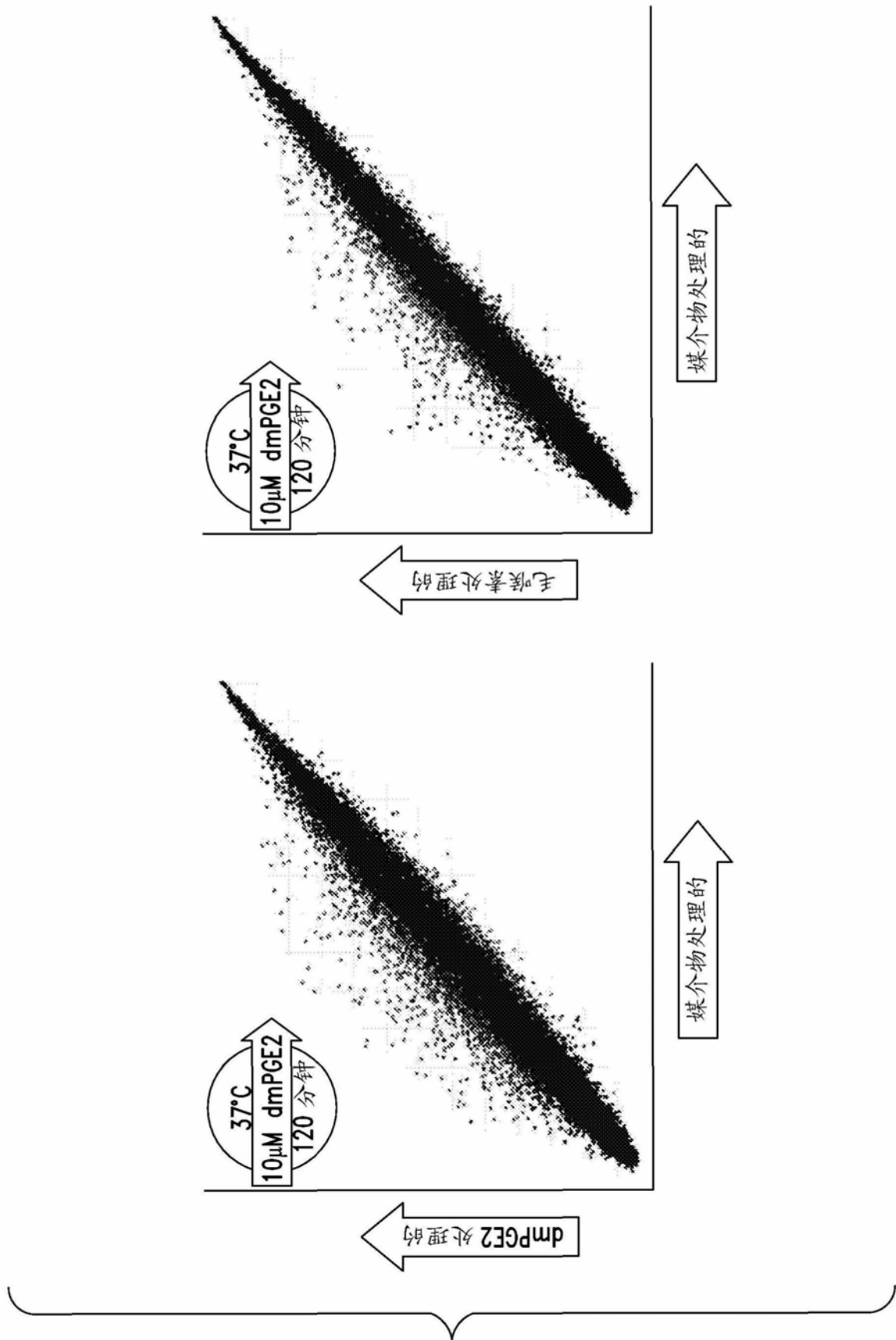


图23A

基因符号	描述	dmPEG2处理的 倍数变化	毛喉素处理的 倍数变化
TAC1	趋激肽	157.83	38.99
AREG	双调蛋白	41.18	16.39
GEM	GTP-结合蛋白GEM	37.30	11.21
DUSP4	双特异性蛋白磷酸酶4	19.66	14.49
NR4A2	核受体相关蛋白1	16.26	6.99
CXCL6	CXC趋化因子配体6(粒细胞趋化蛋白2)	19.20	9.25
CREM	cAMP-反应元件调节因子	12.09	9.34
FOSL2	FOS-样抗原2	7.41	5.30
CXCL5	CXC趋化因子配体5	12.09	6.84
THBS1	血小板反应蛋白1	5.53	3.95
HAS1	透明质酸合成酶I	11.32	7.37
CA2	碳酸酐酶II	6.46	3.14
CXCR4	CXC趋化因子受体4	4.84	3.97
REN	肾素	3.38	8.53
VEGFA	血管内皮生长因子A	2.31	3.16

基因符号	描述	10μM dmPEG2 处理的倍数变化	1mM dbcAMP 处理的倍数变化
GEM	GTP-结合蛋白GEM	93.06	57.09
NR4A2	核受体相关蛋白1	73.70	36.25
DUSP4	双特异性蛋白磷酸酶4	40.30	19.28
AREG	双调蛋白	29.68	17.04
CREM	cAMP-反应元件调节因子	15.50	7.88
CXCR4	CXC趋化因子受体4	14.83	7.94
VEGFA	血管内皮生长因子A	14.70	14.18
FOSL2	FOS-样抗原2	11.05	7.23
THBS1	血小板反应蛋白1	9.72	6.91

图23B

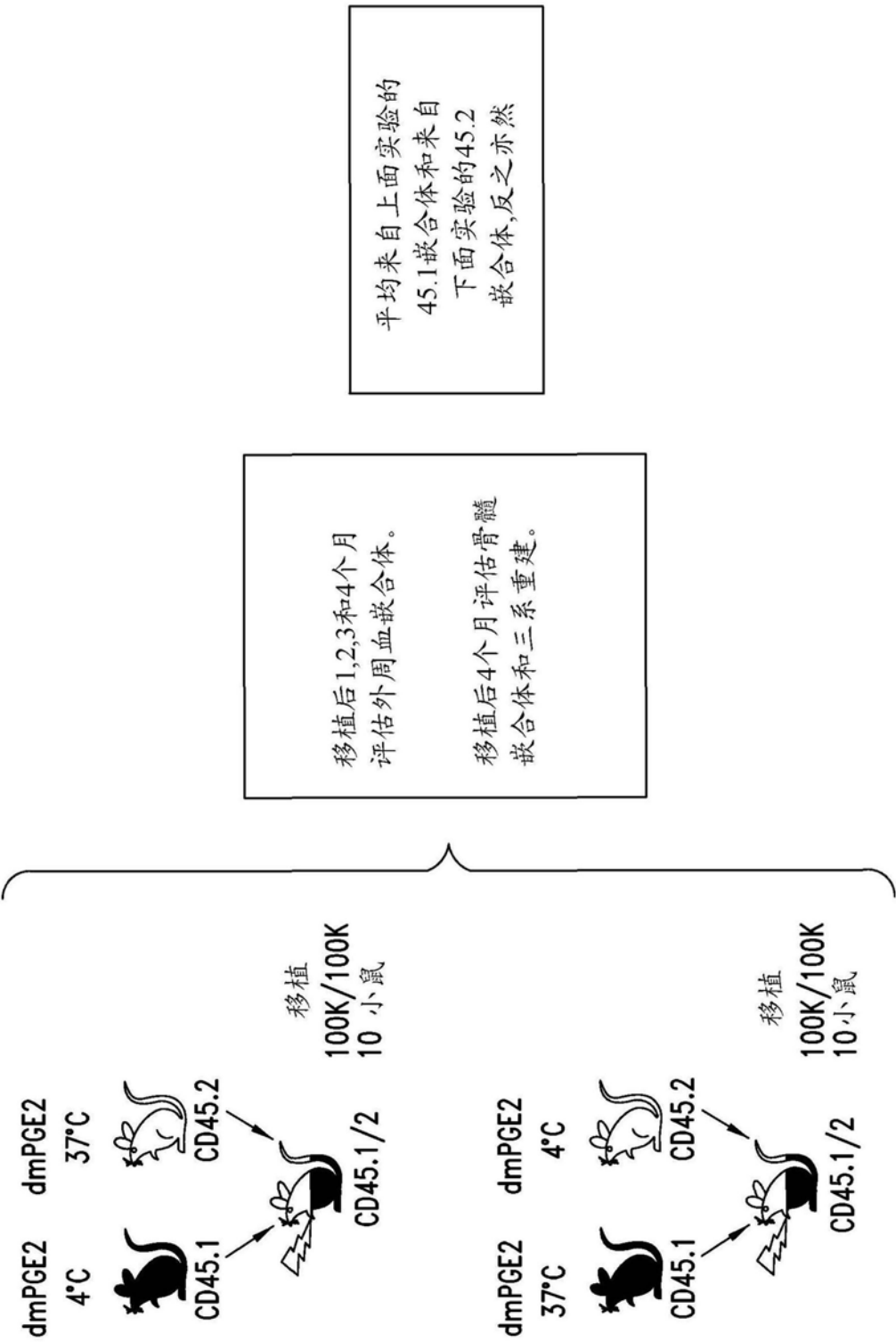


图24