



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103298927 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 09

(21) 申请号 201280004911. 0

C12N 5/02(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 01. 07

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

61/460, 913 2011. 01. 10 US

US 2010080779 A1, 2010. 04. 01,

US 2005261617 A1, 2005. 11. 24,

WO 2008088738 A2, 2008. 07. 24,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 07. 09

审查员 王子晔

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/000017 2012. 01. 07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/096796 EN 2012. 07. 19

(73) 专利权人 斯丹姆涅恩有限公司

地址 美国宾夕法尼亚州匹兹堡市技术大街
100号200室

(72) 发明人 G·L·辛 D·L·斯蒂德

(74) 专利代理机构 北京华科联合专利事务所
(普通合伙) 11130

代理人 王为

(51) Int. Cl.

C12N 5/071(2006. 01)

C12N 5/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书15页

(54) 发明名称

使结缔组织的损伤和毛病加速痊愈的方法

(57) 摘要

本发明提供方法使结缔组织的损伤和毛病加速痊愈,特别是肌腱和韧带损伤和毛病。本发明利用新颖的组合物,包括但不限于胚外细胞因子分泌细胞(包括但不限于源自羊膜的多能祖细胞)、由这些细胞获得的条件培养基(简称为源自羊膜的细胞因子溶液或 ACCS, 并包括合并 ACCS)、以及生理性细胞因子溶液。

1. 用一种组合物制备一种使患者有损伤或毛病的肌腱或韧带加速痊愈的药物的应用, 其中组合物包含由源自羊膜的多能祖 (AMP) 细胞获得的条件培养基、或生理性细胞因子溶液 (PCS), 所述培养基或溶液包含 5-16ng/mL 的 VEGF、3.5-4.5ng/mL 的血管生成素、100-165pg/mL 的 PDGF、2.5-2.7ng/mL 的 TGF β 2、0.68 μ g/mL 的 TIMP-1 和 1.04 μ g/mL 的 TIMP-2。

2. 权利要求 1 所述的应用, 其中肌腱或韧带的损伤或毛病选自: 撕裂、破裂、扭伤、拉伤、挫伤、肌腱炎 / 肌腱退化、撕脱、滑囊炎、腱鞘炎或手术。

3. 权利要求 1 所述的应用, 其中条件培养基或生理性细胞因子溶液 (PCS) 被配制用于持续释放。

4. 权利要求 1 所述的应用, 其中组合物可结合其它治疗方式施予。

5. 权利要求 4 所述的应用, 其中其它治疗方式是物理治疗。

6. 权利要求 4 所述的应用, 其中其它治疗方式选自: 休息、冰敷、按压、抬高或运动。

使结缔组织的损伤和毛病加速痊愈的方法

[0001] 本申请要求以 2011 年 1 月 10 日提交的美国临时专利申请号 61/460,913 为优先权基础,该专利申请的所有内容都以引用方式被纳入本申请中。

技術領域

[0002] 本发明的技术领域涉及使结缔组织损伤和毛病加速痊愈的方法。本发明的领域特别针对加速肌腱和韧带的损伤和毛病的痊愈。本发明利用新颖的组合物,包括但不限于胚外细胞因子分泌细胞(extraembryonic cytokine-secreting cells, 以下简称为 ECS 细胞,包括但不限于源自羊膜的多能祖细胞, amnion-derived multipotent progenitor cells, 以下简称为 AMP 细胞), 和由这些细胞获得的条件培养基(amnion-derived cellular cytokine solution, 以下简称为源自羊膜的细胞因子溶液或 ACCS, 并包括合并 ACCS), 以及生理性细胞因子溶液(physiologic cytokine solution, 以下简称为 PCS), 每项组合物能单独或共同使用, 或单独或共同结合其它试剂使用。

背景技术

[0003] Sharma, P. 和 Maffulli, N. 讨论治疗肌腱炎和肌腱损伤的新方法 (Disability and Rehabilitation, 2008;30(20 - 22):1733 - 1745)。

發明內容

[0004] 本发明的一个目的是提供新的方法使结缔组织的损伤和毛病加速痊愈,特别是肌腱和韧带损伤和毛病。使结缔组织的损伤和毛病加速痊愈的方法利用新颖的组合物,包括胚外细胞因子分泌细胞(以下简称为 ECS 细胞,包括源自羊膜的多能祖细胞(AMP)),由这些细胞获得的条件培养基和 / 或细胞产物(以下简称为源自羊膜的细胞因子溶液或 ACCS, 并包括合并 ACCS),以及生理性细胞因子溶液(以下简称为 PCS)。各项组合物能单独或共同使用, 或单独或共同结合其它有活性或无活性的试剂使用。

[0005] 在一实施例中,本发明提供一种使患者结缔组织的损伤和毛病加速痊愈的方法,包括给予患者一个或多个治疗有效量的组合物,其中组合物选自:胚外细胞因子分泌(ECS)细胞,由这些细胞获得的条件培养基、细胞裂解产物、细胞产物,或生理性细胞因子溶液(PSC)。

[0006] 在一个实施例中,结缔组织的损伤和毛病选自:扭伤、拉伤、挫伤、肌腱炎 / 肌腱退化、撕脱、滑囊炎、腱鞘炎、应力性骨折或手术。

[0007] 在另一个实施例中,ECS 细胞为源自羊膜的多能祖(AMP)细胞。

[0008] 在一个具体实施例中,条件培养基为源自羊膜的细胞因子溶液(ACCS),包括合并 ACCS。在另一实施例中,ACCS、合并 ACCS 及 PCS 被配制用于持续释放。

[0009] 在另一个实施例中,ECS 细胞、由这些细胞获得的条件培养基、细胞裂解产物或细胞产物是结合其它试剂或治疗方式施予。

[0010] 在一实施例中,其它试剂为有活性的试剂。在一实施例中,有活性的试剂选自:生

长因子、细胞因子、酶抑制剂、免疫抑制剂、类固醇、趋化因子、抗体、抗生素、抗真菌剂、抗病毒剂、丝裂霉素 C 或其他类型的细胞。

[0011] 在另一个实施例中,其它治疗方式选自:休息、冰敷、按压、抬高、物理治疗或运动。

[0012] 本发明的其它特征和优点,将显示在随后的描述、实施例和权利要求中。本申请把所有被引用的参考文献,审查中的专利申请和已授权的专利的全部内容纳入本申请内。在有矛盾的情况下,以本说明书和当中的定义为准。

[0013] 定义

[0014] 本文所定义的“分离的”是指将物质从其原来的环境中提取出来,因此是“人为地”从其天然状态改变而来的。

[0015] 本文所定义的“基因”为参与生产多肽链的 DNA 段,包括编码区前面和后面的区域,以及在各个编码区段(外显子)之间的间隔序列(内含子)。

[0016] 本文所用的术语“蛋白质标志”,是指细胞或细胞群的任何蛋白质分子特征。蛋白标记可以位于细胞的质膜上,或在某些情况下为一个分泌蛋白。

[0017] 本文所用的“富集的”,是指通过从混合物中消除不需要的物质或选择并分离所需的物质,选择性地浓缩或增加一种或多种物质的量,例如从一异质细胞群中分离出具有特定细胞标记的细胞。

[0018] 本文所用的术语“基本上纯化的”是指就一个特定的标记或标记组合而言,细胞群是基本上同质的。基本上同质是指该特定的标记或标记组合为至少 90%,或 95%的细胞所表达。

[0019] 本文所用的术语“胎盘”是指早产胎盘或足月胎盘。

[0020] 本文所用的术语“全能细胞”(totipotent cell)具有下列含义:在哺乳动物中,全能细胞具有在成人体内变成任何类型细胞的潜能;具有变成胚外膜(如胎盘)的任何类型的细胞的潜能。全能细胞为受精卵及经其分裂产生的大约首四个细胞。

[0021] 本文所用的术语“多潜能干细胞”(pluripotent stem cell)具有下列含义:全能干细胞是真正的干细胞,具有可变成体内任何分化细胞的潜能,但不能形成源自滋养层的胚外膜的部份。羊膜发育自上胚层而非滋养层。现知的三种多能干细胞为:胚胎干细胞(ES)(在灵长类动物中可能为全能细胞)、胚胎生殖细胞(EG)和胚胎癌(EC)细胞。这些 EC 细胞分离自畸胎瘤,畸胎瘤为一种偶尔发生在胎儿生殖腺的肿瘤。与其他两种多能干细胞不同,EC 细胞通常非整倍体。

[0022] 本文所用的术语“多能干细胞”(multipotent stem cell)是真正的干细胞,但只能分化成有限数量的细胞类型。例如,骨髓中的多能干细胞,可变成血液中所有的血细胞,但未必能分化成其他的细胞类型。

[0023] 本文所用的术语“胚外组织”是指位于胚体外涉及胚胎的保护、营养、清除废物等的组织。胚外组织为在胚胎出生时被丢弃的组织。胚外组织包括但不限于羊膜、绒毛膜(包含脐带和血管的滋养层和胚外中胚层)、卵黄囊、尿囊和羊水(包括其中含有的所有物质)。胚外组织和由此得的细胞与发育中的胚胎具有相同基因型。

[0024] 本文所用的术语“胚外细胞”或“EE 细胞”是指来自胚外组织的细胞群。

[0025] 本文所用的术语“胚外细胞因子分泌细胞”或“ECS 细胞”(extraembryonic

cytokine-secreting cell) 是指来自胚外组织的细胞群, 该细胞群具有以下特征: 能向细胞外空间或周围培养基按生理相关的时段分泌达致生理水平的 VEGF、血管生成素、PDGF 和 TGF β 2 及 MMP 抑制剂 TIMP-1 和 TIMP-2。所述 ECS 细胞未曾在存有源自动物的物质的情况下培养, 因此这些细胞及其产物并没有被非人物质污染, 适合于人的临床应用。ECS 细胞可选自本申请及以下专利文献中所描述的细胞群和组合物: US2003/0235563、US2004/0161419、US2005/0124003、美国临时专利申请 60/666,949、60/699,257、60/742,067、60/813,759、美国专利申请 11/333,849、美国专利申请 11/392,892、PCTUS06/011392、US2006/0078993、PCT/US00/40052、美国专利号 7,045,148、US2004/0048372 及 US2003/0032179。上述提及的专利申请的所有内容都以引用方式被纳入本申请中。ECS 细胞以往被称为营养因子分泌(TSE)细胞。

[0026] 本文所用的术语“源自羊膜的多能祖细胞”或“AMP 细胞”(amnion-derived multipotent progenitor cell) 是指一群从羊膜获得的上皮细胞。AMP 的细胞具有以下特征: 它们并未曾在存有源自动物的物质下的情况下被培养, 因此这些细胞及其产物并没有被非人物质污染, 适合于人的临床应用。AMP 细胞在添有人血清蛋白的基础培养基中培养。在一实施例中, AMP 细胞分泌细胞因子 VEGF、血管生成素、PDGF 和 TGF β 2 及 MMP 抑制剂 TIMP-1 和 TIMP-2。这些细胞因子或其组合具有以下生理浓度范围: VEGF 为约 5-16ng/mL, 血管生成素为约 3.5-4.5ng/mL, PDGF 为约 100-165pg/mL, TGF β 2 为约 2.5-2.7ng/mL, TIMP-1 为约 0.68 μ g/mL 和 TIMP-2 为约 1.04 μ g/mL。AMP 细胞不需要饲养层细胞亦可生长, 不表达蛋白端粒酶和非致瘤性。AMP 细胞不表达造血干细胞的蛋白标记 CD34。一个细胞群缺乏 CD34 阳性细胞, 表示该分离的细胞群并没有受造血干细胞如脐带血或胚胎成纤维细胞的污染。几乎 100% 的细胞都与低分子量角蛋白抗体产生反应, 确认其上皮性质。从羊膜新鲜分离的细胞不会与干细胞或祖细胞标记 C-kit (CD117) 和 Thy-1 (CD90) 的抗体发生反应, 并可从这些细胞分离出 AMP 细胞。从足月或早产胎盘获取细胞的多种方法在本领域中是已知的(参见, 如 US2004/0110287; Anker et al., 2005, Stem Cells 22:1338-1345; Ramkumar et al., 1995, Am. J. Ob. Gyn. 172:493-500)。然而, 本文中所采用的方法可提供改良的组合物和细胞群。

[0027] 本文就某些组合物、生长条件、培养基等所用的术语“无动物的”, 是指在制备、生长、培养、增殖、储存或配方这些组合物或方法时, 没有使用来自非人类动物的物质, 如牛的血清、蛋白质、脂质、碳水化合物、核酸、维生素等。“无非人类动物的物质”所指物质从未置于或接触非人类动物的身体或物质, 因此并没有被非人类物质污染。当制备、生长、培养、增殖、储存或配方这些组合物或方法时, 只使用达至临床标准的物质, 如重组产生的人类蛋白质。

[0028] 本文就细胞组合物所用的术语“增殖的”, 是指与按照以前的方法获得的细胞群相比, 本发明的细胞群具有显著更高的浓度。例如, 细胞经第 5 次传代后, AMP 细胞的扩增组合物中每克羊膜组织的细胞水平比原来培养物中的羊膜上皮细胞的数量高出至少 50 倍和上至 150 倍, 相比之下, 使用以前方法获得的细胞群约增加 20 倍。在另一个例子中, 细胞经第 3 次传代后, AMP 细胞的扩增组合物中每克羊膜组织的细胞水平比原来培养物中的羊膜上皮细胞的数量高出至少 30 倍和上至 100 倍。因此, 相比以前的方法, “增殖的”细胞群中每克羊膜组织的细胞数量增加至少 2 倍和上至 10 倍。“增殖的”情况只涵盖经人介入以提

高细胞数量的情况。

[0029] 本文所用的术语“传代”是具有以下步骤的细胞培养技术：把在组织培养容器中生长达到汇合或将达到汇合的细胞从培养容器中取出，用新鲜的培养基稀释（即以 1:5 稀释），并放置到一个新的组织培养容器使其继续生长和存活。例如，从羊膜分离的细胞为原代细胞。这些细胞通过在本文所描述的生长培养基中培养而被扩增。当将这样的原代细胞作传代培养时，每一轮的传代培养被称为一个世代。本文所用的“原代培养物”是指新鲜分离的细胞群。

[0030] 本文所用的术语“分化”是指细胞逐渐变得更特化的一个过程。

[0031] 本文所用的术语“分化效率”是指一个细胞群中正在分化的或能分化的细胞百分比。

[0032] 本文所用的术语“条件培养基”是指特定细胞或细胞群已在其中培养、随后被除去的培养基。将细胞培养在培养基中时，它们可分泌对其他细胞提供支持或者影响其他细胞行为的细胞因子。这种因子包括但不限于激素、细胞因子、胞外基质 (ECM)、蛋白质、小泡、抗体、趋化因子、受体、抑制剂和颗粒。条件培养基为含细胞因子的培养基。制备条件培养基的方法记载于美国专利 6,372,494，其所有内容都以引用方式被纳入本申请中。

[0033] 本文所用的术语“源自羊膜的细胞因子溶液”或“ACCS” (amnion-derived cellular cytokine solution)，并包括合并 ACCS，是指源自 AMP 细胞的条件培养基。这些 AMP 细胞曾在添加了人血清蛋白的基础培养基中培养。ACCS 以前被称为“源自羊膜的细胞因子悬液”。

[0034] 本文所用的术语“生理水平”是指物质在生命体系中存在的、并且与正确发挥生化过程和 / 或生物过程的功能有关的水平。

[0035] 本文所用的术语“生理性细胞因子溶液”或“PCS” (physiologic cytokine solution) 组合物是一种非来自细胞并具有一种或多种因子的组合物，所述因子的浓度达生理水平，所述因子选自：VEGF、血管生成素、PDGF 和 TGF β 2 以及至少一种 MMP 抑制剂。合适的 MMP 抑制剂的例子包括但不限于 TIMP-1 和 TIMP-2。PCS 的详细内容记载于美国公开专利 US-2009-0054339-A1，其所有内容都以引用方式被纳入本申请中。

[0036] 本文所用的术语“合并的”是指已被合并的多种组合物，这些组合物已被合并以形成一种具有比非合并的组合物更加恒定或更加一致的特征的新组合物。

[0037] 本文所用的术语“治疗有效量”是指达到所需生理效应（即治疗结缔组织损伤和毛病）需要的治疗剂量。

[0038] 本文所用的术语“裂解产物”是指裂解细胞如 AMP 细胞并可选择地除去细胞碎片（如细胞膜）时得到的组合物。裂解细胞可通过机械方式、冻融、超声、使用洗涤剂例如 EDTA、或者使用例如透明质酸酶、分散酶、蛋白酶和核酸酶的酶消化。在某些情况下，裂解细胞需保留细胞碎片并除去剩馀部份。在其他情况下，则需要保留细胞碎片和剩馀部份。

[0039] 本文所用的术语“可药用的”是指除治疗剂外构成制剂的组分适合给予本发明的待治疗患者。

[0040] 本文所用的术语“组织”是指一个由相似地分化的细胞组成的聚集体，这些细胞联合行使特定的功能。

[0041] 本文所用的术语“治疗性蛋白”包括多种生物活性蛋白，包括但不限于生长因子、

酶、激素、细胞因子、细胞因子抑制剂、凝血因子、肽生长因子和肽分化因子。

[0042] 本文所用的术语“移植”是指给予人或其它动物一种由细胞组成的组合物，该组合物包括细胞悬液或处于基质或组织中的细胞，这些细胞可以是未分化、部分地分化或已完全分化。

[0043] 本文所用的术语“一 (a)”或“一种 (an)”是指一种或多种；至少一种。

[0044] 本文所用的术语“附加的”是指共同地、一起、另外地、相结合地等。

[0045] 本文使用的术语“共同给予”可包括同时或按次序给予两种或多种药剂。

[0046] 本文所用的术语“疗法”、“治疗”或“进行治疗”涵盖对哺乳动物（特别是人）的疾病或病征的任何治疗，包括：(a) 防止易患所述疾病或病征但尚未确诊的受试者罹患所述疾病或病症；(b) 抑制所述疾病或病征，即阻止其发展；(c) 减轻和 / 或改善所述疾病或病征，即消退所述疾病或病征；或者 (d) 治愈所述疾病或病征，即终止其发展或进展。本发明方法所治疗的受试群包括患病的受试者，以及有罹患所述病征或疾病的风险的受试者。

[0047] 本文所用的术语“加速痊愈”是指损伤或伤口痊愈的速度在经处理的受试者比未经处理的受试者为快。

具体实施方式

[0048] 根据本发明，本领域技术人员可能采用常规分子生物学、微生物学和重组 DNA 技术。这些技术在文献中有完整解释。参见，例如 Sambrook et al, 2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; Ausubel, ed., 1994, "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III; Celis, ed., 1994, "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III; Coligan, ed., 1994, "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III; Gait ed., 1984, "Oligonucleotide Synthesis"; Hames & Higgins eds., 1985, "Nucleic Acid Hybridization"; Hames & Higgins, eds., 1984, "Transcription And Translation"; Freshney, ed., 1986, "Animal Cell Culture"; IRL Press, 1986, "Immobilized Cells And Enzymes"; Perbal, 1984, "A Practical Guide To Molecular Cloning."

[0049] 本文提供的数值范围应理解为在所述范围的上限和下限之间的每个中间值（除非文中另外明确指出，这些中间值的间隔为下限单位的十分之一），以及所述范围中任何其他另作说明的值或中间值，都包括在本发明中。这些较小范围的上下限可以独立地被包含于所述较小范围中，并涵盖在本发明中，这些上下限受制于所述范围内任何特定的排除限值。如果所述范围包含一个或两个限值，则排除任何一个限值的范围都包括在本发明中。

[0050] 除非另外定义，本文使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域普通技术人员普遍理解的含义相同。儘管任何与本文所描述的方法和材料相似或等同的方法和材料都可用于实施或检验本发明，以下描述的为优选的方法和材料。

[0051] 应注意，在本文中和随附的权利要求中，除非文中明示，否则单数形式“一种 (a)”、“一个 (an)”和“这个 (the)”包括复形式的指定对象。

[0052] 治疗用途 - 本发明的组合物对用于治疗结缔组织损伤和毛病的方法是有用的，所述损伤和毛病包括但不限于：

[0053] 撕裂和破裂 - 肌腱和韧带可遭受撕裂和破裂。以下为容易引起肌腱和韧带撕裂和

破裂的情况：向肌腱和韧带注射类固醇，某些疾病（如痛风或甲状旁腺功能亢进症），及具有 O 型血。撕裂或破裂可以是一个严重的问题，如不及时治疗，有可能导致难以忍受的疼痛和永久性残疾。取决于损伤的严重程度，撕裂或破裂通常会以手术或药物治疗。

[0054] 扭伤 - 身体的关节以韧带维持。韧带是把骨头互相连接、如带子的强力结缔组织。扭伤是指韧带的轻度伸展或撕裂。最容易扭伤的部位为脚踝、膝盖和手腕。大多数轻度扭伤经休息、冰敷、按压、抬高、运动或物理治疗后可痊愈。中度扭伤或需要利用支撑一段时间。严重扭伤则可能需要以手术修复撕裂的韧带。

[0055] 拉伤 - 骨头由肌肉和肌腱形成的组合支持。肌腱将肌肉连接至骨骼。拉伤是肌肉或肌腱损伤的结果。拉伤可以是肌肉或肌腱的轻度伸展，或是部分或整条肌肉和肌腱组合的撕裂。拉伤跟扭伤的建议治疗相同：休息、冰敷、按压和抬高，然后通过简单的运动和 / 或物理治疗以减轻疼痛和恢复流动性。对于严重撕裂，组织可能需要手术修复。

[0056] 挫伤 - 挫伤是一个因打击肌肉、肌腱或韧带所造成的瘀伤。大多数挫伤为轻度的，并于受伤部位经休息、冰敷、按压和抬高后有改善。假如症状持续，应寻求医疗照顾以防止软组织永久性损坏。

[0057] 肌腱炎 / 肌腱退化 - 肌腱炎为肌腱或其表面的炎症。肌腱炎是由一连串反覆加重肌腱的细小压力引起。肌腱炎可以透过休息以消除压力、消炎药、注射类固醇、夹板固定来治疗，及以运动和 / 或物理治疗以纠正肌肉不平衡和提高灵活性。持续的炎症反应可能会导致肌腱损坏，或需要以手术矫正。

[0058] 滑囊炎 - 滑囊是一个充满液体、位于骨和肌腱或肌肉之间的囊。滑囊容许肌腱在骨表面顺畅地滑动。持续的细小压力和过度使用滑囊可能会导致滑囊肿胀。这种肿胀和刺激称为滑囊炎。许多人同时患有肌腱和滑囊炎。滑囊炎通常可以透过休息和消炎药缓解。医生也可能于滑囊注入额外药物以减少发炎。

[0059] 应力性骨折 - 当一骨头被过度使用，骨头可能产生微小的断裂。这些损伤被称为应力性骨折。早期症状可以是于应力性骨折部位的疼痛和肿胀。小腿和足部的骨头特别容易发生应力性骨折。这些断裂未必可以透过平常的 X 射线侦察到，而需要透过骨扫描以被诊断。这些损伤可透过休息、活动调节、石膏固定或在罕有情况下利用手术来治疗。

[0060] 腱鞘炎 - 另一种因长期过度使用肌腱引致的问题是腱鞘炎，这是肌腱和其周围的滑膜鞘（腱鞘）之间的炎症和 / 或刺激。滑膜鞘减少肌腱和使腱紧密连接关节的支持带（或在很少情况下为韧带）之间的摩擦。肌腱必须能够在滑膜鞘内自由滑动。

[0061] 撕脱 - 撕脱是由拉力大的负载导致肌腱被强行从其附在骨上的位置撕掉，而引起的一种急性肌腱损伤。大多数肌腱单元的拉伸应力损伤中，纤维撕裂在肌腱的接合点发生并引起拉伤。在某些情况下，这些纤维仍然完整，肌腱从其附在骨上的位置被拉开。撕脱损伤发生在一块大肌肉连接骨的部位相对较小的地方。

[0062] 手术 - 肌腱和韧带的修复可在使用局部麻醉、区域性麻醉或全身麻醉下进行。外科医生切开在损伤的肌腱或韧带上方的皮肤，把肌腱或韧带损坏或撕裂的两端缝在一起。如果肌腱或韧带已严重受损，可能需要移植。这种情况下通常会使用身体另一部分的一块肌腱或韧带。必需时，肌腱和韧带会被重新连接到周围组织。修复的目标为使关节或其周围组织在损伤后恢复正常的功能。潜在的风险包括形成防止关节顺畅移动的疤痕组织，损失部分相关关节的运用和关节僵硬。

[0063] 获取和培养细胞

[0064] ECS 细胞 - 本领域记载了从胚外组织分离细胞的多种方法, 所述细胞随后可用于产生本发明的 ECS 细胞 (参见, 例如 US2003/0235563 ;US2004/0161419 ;US2005/0124003 ; 美国临时专利申请 60/666, 949、60/699, 257、60/742, 067、60/813, 759 ; 美国专利申请 11/333, 849 ; 美国专利申请 11/392, 892 ;PCTUS06/011392 ;US2006/0078993 ;PCT/US00/40052 ;美国专利 7, 045, 148 ;US2004/0048372 和 US2003/0032179)。

[0065] 鉴定 ECS 细胞 - 一旦分离了胚外组织, 就需要鉴定所述组织中哪些细胞具有 ECS 细胞相关特征 (见上文的定义)。例如, 对细胞向胞外空间或周围培养基分泌 VEGF、血管生成素、PDGF 和 TGF β 2 及 MMP 抑制剂 TIMP-1 和 / 或 TIMP-2 的能力进行测定。在某些情况下, 标准测定方法可能难以或不可能检测到若干因子。这可能是由于细胞分泌这些因子的生理水平低于标准测定方法可检测的水平。这亦可能基于因子被 ECS 细胞和 / 或其他局部细胞使用, 从而令因子不能被累积至可使用标准测定方法检测的水平。这亦可能是由于分泌因子跟抽样的时间不一致而造成的暂时情况。

[0066] AMP 细胞的组合物使用以下步骤进行制备 :a) 从胎盘收集羊膜, b) 使用蛋白酶从所述羊膜离解羊膜上皮细胞, c) 在添加有天然来源的或重组产生的人蛋白 (人血清蛋白) 并不含有非人类动物蛋白的基础培养基中培养所述上皮细胞 ;d) 从上述上皮细胞培养物中选取 AMP 细胞, 以及可选择地 e) 使用另外的添加剂和 / 或生长因子进一步增殖所述细胞。详情描述于美国公开专利申请 2006-0222634-A1 中, 该公开文本通过引用的方式纳入本文。

[0067] AMP 细胞的培养-AMP 细胞培养于基础培养基中。这种培养基包括但不限于 **Epilife®** 上皮细胞培养基 (Cascade Biologicals)、OPTI-PRO™ 不含血清培养基、VP-SFM 不含血清培养基、IMDM 高度富集基础培养基、KNOCKOUT™ DMEM 低渗透压培养基、293SFM II 设定并不含血清培养基 (均由 Gibco; Invitrogen 生产)、HPGM 造血细胞生长培养基、Pro293S-CDM 不含血清培养基、Pro293A-CDM 不含血清培养基、UltraMDCK™ 不含血清培养基 (均由 Cambrex 生产)、**STEMLINE®** T- 细胞增殖培养基和 **Stemline®** II 造血细胞增殖培养基 (均由 Sigma-Aldrich 生产)、DMEM 培养基、DMEM/F-12 营养混合物培养基 (均由 Gibco 生产)、Ham' s F-12 营养混合物培养基、M199 基础培养基 (均由 Sigma-Aldrich 生产) 和其他等同的基础培养基。这种培养基可选择地包含或者添加有人蛋白。本文使用的“人蛋白”是天然产生的蛋白或使用重组技术产生的蛋白, 例如人血清蛋白。在一些具体实施例中, 所述基础培养基为 IMDM 高度富集基础培养基 **STEMLINE®** T- 细胞增殖培养基或 **Stemline®** II 造血细胞增殖培养基、OPTI-PRO™ 不含血清培养基或由以上所组合的培养基, 当中的人蛋白为至少添加 0.5% 及最多 10% 的人血清蛋白。在一些特定的实施例中, 人血清蛋白约 0.5%-2%。在一具体实施例中, 人血清蛋白为 0.5%。人血清蛋白可以从液体或固体 (粉末) 而来, 包括但不限于重组人血清蛋白、**PLASBUMIN®** 正常人血清蛋白及 **PLASBUMIN®** 人血分离成分 (均由 Talecris Biotherapeutics 生产)。

[0068] 在一个实施例中, 细胞在无动物产物的体系中培养以避免被非人物质污染。在该实施方案中, 培养基为 IMDM 高度富集基础培养基、T- 细胞增殖培养基或 **Stemline®** II 造血细胞增殖培养基、OPTI-PRO™ 不含血清培养基、或 DMEM 培养基, 当中可添加最多 10% 人血清

蛋白(PLASBUMIN®正常人血清蛋白)。

[0069] 本发明还考虑使用任何上述的基础培养基,当中来自动物的蛋白以重组人蛋白替代,来自动物的血清以人血清蛋白替代,例如以人血清蛋白替代牛血清蛋白。在一实施例中,所述培养基除了是无动物的之外,还是无血清的。

[0070] 可选择地使用其他因子。在一个实施例中,表皮生长因子(EGF)的浓度为0-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在一个实施例中,所述EGF浓度为大约10ng/mL。可使用的其他生长因子包括但不限于TGF α 或TGF β (5ng/mL;范围为0.1-100ng/mL)、激活素A、霍乱毒素(优选水平为约0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$;范围为0-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、转铁蛋白(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$;范围为0.1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、成纤维细胞生长因子(bFGF40ng/mL(范围为0-200ng/mL)、aFGF、FGF-4、FGF-8(范围均为0-200ng/mL))、骨形态生成蛋白(即BMP-4)或其他已知可增强细胞增殖的生长因子。所有添加物都是符合临床标准的。

[0071] 生产条件培养基

[0072] 生产ECS条件培养基-按照下文中针对ACCS的描述进行,不同之处是使用ECS细胞。

[0073] 生产ACCS-本发明的AMP细胞可用于生产ACCS。在一个实施例中,如本文所述分离AMP细胞以 1×10^6 个细胞/mL接种至装有5-30mL培养基、优选10-25mL培养基并且最优选约10mL培养基的T75培养瓶中。将所述细胞培养至汇合,更换培养基。在一个实施例中,在汇合后1天收集ACCS。在另一个实施例中,更换培养基并且在汇合后2天收集ACCS。在另一个实施例中,更换培养基并且在汇合后3天收集ACCS。在另一个实施例中,更换培养基并且在汇合后4天收集ACCS。在另一个实施例中,更换培养基并且在汇合后5天收集ACCS。在另一个实施例中,更换培养基并且在汇合后3、4、5、6或更多天收集ACCS。本领域技术人员应理解,本发明还包括从AMP细胞培养物收集ACCS的其他方法,例如使用其他组织培养容器包括但不限于细胞工厂、烧瓶、中空纤维或悬浮培养容器,或者从将近汇合的和/或活跃增殖的培养物收集ACCS。本发明还包括在收集所述ACCS后将其冷藏保存。本发明还包括在收集所述ACCS后将其冻干。本发明还包括在收集所述ACCS后将其配制用于持续释放。

[0074] 本发明的组合物可根据其拟定用途以不同方式制备。例如,可以实现本发明的组合物可以是包含本发明的药剂即ESC细胞(包括AMP细胞的和/或ACCS、合并的ACCS或PCS)的液体,所述液体为溶液、悬液或两者兼有(溶液/悬液)。术语“溶液/悬液”是指液体组合物中的活性药剂,第一部分存在于溶液中,而第二部分以颗粒形式存在于具有液体基质的悬浮物中。液体组合物还包括凝胶。所述液体组合物可以是水性的,或者是软膏、油膏、乳膏或类似的形式。

[0075] 可以实现本发明的水性悬液或溶液/悬液可包含一种或多种作为助悬剂的聚合物。有用的聚合物包括水溶性聚合物如纤维素聚合物以及不溶于水的聚合物如交联的含羧基聚合物。本发明的水性悬液或溶液/悬液优选地是粘稠的或粘附性的,甚至更优选地是粘稠的和粘附性的。

[0076] 药物组合物-本发明提供了ESC细胞(包括AMP细胞和/或ACCS、合并的ACCS或PCS)及可药用载体的药物组合物。术语“可药用”是指由美国联邦政府或州政府的管理机构批准或者在美国药典(U. S. Pharmacopeia)或其他普遍公认的药典中列出可用于动物、

尤其是用于人。术语“载体”是指与所述组合物一同给药的稀释剂、佐剂、赋形剂或运载体。这种药物载体可以是无菌液体，例如水和油，包括石油、动物油、植物油或合成来源的油，例如花生油、大豆油、矿物油、麻油等。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、麵粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、乾脱脂牛奶、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。根据需要，所述组合物还可含有少量的湿润剂或乳化剂，或者 pH 缓冲剂。这些组合物可采取溶液、悬液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、粉末剂、持续释放制剂等的形式。合适的药物载体的实例记载于 E. W. Martin 的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中，有些则是本领域技术人员所熟悉的。

[0077] 本发明的药物组合物可配制为中性形式或盐形式。可药用的盐包括那些用游离氨基形成的盐，例如盐酸盐、磷酸盐、醋酸盐、草酸盐、酒石酸盐等，以及那些用游离羧基形成的盐，例如钠盐、钾盐、铵盐、钙盐、氢氧化铁盐、异丙胺盐、三乙胺盐、2-乙氨基乙醇的盐、组氨酸盐、普鲁卡因盐等。

[0078] 治疗试剂盒 - 本发明还提供了一种生产制品，包括包装材料和包含在所述包装材料中的本发明的药物组合物，其中所述药物组合物包含包括 AMP 细胞和 / 或 ACCS、合并的 ACCS 或 PCS 的 ECS 细胞。所述包装材料包含一个标签或药物说明书，以说明内含的包括 AMP 细胞和 / 或 ACCS、合并的 ACCS 或 PCS 的 ECS 细胞可用于治疗结缔组织的损伤和毛病。

[0079] 制剂、剂量和给药

[0080] 可将包含 ESC 细胞（包括 AMP 细胞和 / 或 ACCS、合并的 ACCS 或 PCS）的组合物给予一名受试者以提供多种细胞或组织功能，例如疗结缔组织的损伤和毛病。本文使用的“受试者”可以指人或非人动物。

[0081] 这样的组合物可使用一种或多种生理上可接受的载体（任选地包含赋形剂和辅剂）以任何常规的方式配制。合适的配制取决于所选择的给药途径。所述组合物可以与说明其治疗结缔组织的损伤和毛病的用途的书面使用说明一同包装。所述组合物还可在一种或多种生理上可接受的载体中给予接受者。用于细胞的载体可包括但不限于磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 或含生理浓度的盐混合物的乳酸盐林格溶液。

[0082] 可以实现本发明某些实施例的药物组合物包括有疗效量的活性剂和药学上可接受的载体。这种药物组合物可以是液体、凝胶、软膏、油膏、缓释制剂或其他适用在结缔组织，包括肌腱和韧带给药的其它制剂。所述组合物包含本发明（即 ECS 细胞，包括 AMP 细胞和 / 或 ACCS、合并的 ACCS 或 PCS）和可选地至少一种药学上可接受的赋形剂的组合物。

[0083] 在各种实施例中，本发明的组合物可包括含有活性剂、可为溶液、悬液，或两者兼有的液体。本文的术语“悬液”包括一液体组合物，其中活性剂的第一部分存在于溶液中，而第二部分以颗粒形式存在于具有液体基质的悬浮物中。。本文所用的液体组合物包括凝胶。

[0084] 在一个实施例中，液体组合物为水性的。或者，该组合物可采取软膏的形式。在一个实施例中，该组合物为原位可凝胶化的水性组合物，更优选为原位可凝胶化的水性溶液。所述组合物可以包括一浓度的胶凝剂，该胶凝剂能在与身体接触时有效地促进胶凝作用。合适的胶凝剂非限制性地包括热固性聚合物如以四取代乙烯二胺的环氧乙烷 - 环氧丙烷嵌段共聚物（如泊洛沙胺 poloxamine1307）；聚卡波非；以及多醣如结兰胶，角菜胶（如 kappa- 角菜胶和 iota- 角菜胶）、壳聚醣和褐藻胶。词语“原位可凝胶化”不仅包括具低

粘度并可以形成凝胶的液体,还包括具更高粘度、在给药时能显著增加粘度或凝胶硬度的液体如半流质和摇变性凝胶。

[0085] 本发明的水性组合物具有生理性的 pH 和渗透压。优选地这些组合物运用方法如 在无菌条件下进行制备和包装和 / 或包含抗微生物的防腐剂以抑制微生物的生长。合适的 防腐剂非限制性地包括含汞的物质如苯汞盐(例如醋酸苯汞,硼酸苯汞和硝酸苯汞)和硫柳 汞;稳定化二氧化氯;四级氮化合物例如苯扎氯铵、十六烷基三甲基溴化铵和西吡氯铵; 咪唑烷基脲;苯甲酸酯类如对羟基苯甲酸甲酯,对羟基苯甲酸乙酯,对羟基苯甲酸丙酯和 对羟基苯甲酸丁酯,以及它们的盐;苯氧基乙醇;氨苯氧基乙醇;苯氧基丙醇;氯丁醇;氯甲 酚;苯乙醇;乙二胺四乙酸二钠;山梨酸及它们的盐。

[0086] 所述组合物可包括一个包含活性剂的贮藏式制剂以供给药。该贮藏式制剂包含本 发明的组合物(即包括 AMP 细胞和 / 或 ACCS、合并的 ACCS 或 PCS 的 ECS 细胞)。包含所述 组合物的微粒可以嵌入在生物相容、药学上可接受的聚合物或脂质。贮藏式制剂可设计成 在一段较长的时间内释放全部或几乎全部的活性物质。聚合物或脂质基质可在释放全部或 几乎全部的活性物质后被充分降解以便从给药部位运走。贮藏式制剂可以是包含药学上可 接受的聚合物和一已溶解或已分散活性剂的液体制剂。注射后,聚合物透过方法如凝胶化 或沉淀在注射部位形成一个贮藏体。

[0087] 所述组合物可包含植入在毛病或损伤部位中合适的位置中的,并在该位置释放活 性剂的固体物品。释放位置优选为通常与所述固体物品紧密接触的肌腱和 / 或韧带。适合 植入的固体物品通常包含可生物侵蚀的或非生物可侵蚀的聚合物。用于制备载有本发明组 合物的植入体、可生物侵蚀的聚合物非限制性地包括脂族聚酯如聚乙交酯、聚丙交酯、 聚 ϵ -己内酯、聚羟基丁酸酯和聚羟基戊酸酯、聚氨基酸、聚原酸酯、聚酞、脂族聚碳 酸酯和聚醚乳糖。硅弹性体为合适的非生物可侵蚀聚合物的例子。

[0088] 本领域技术人员可容易地确定用于一目的的 ECS 细胞(包括 AMP 细胞和 / 或 ACCS、 合并的 ACCS 或 PCS) 的合适浓度或剂量。本领域技术人员应了解,优选的剂量为对有需要 患者产生治疗效果(如治疗结缔组织损伤和毛病)的剂量。当然,所述 ECS 细胞的合适剂 量需要在使用时根据经验并基于多个可变因素确定,所述可变因素包括但不限于被治疗的 毛病、损伤、失调或病症的严重度和类型;患者的年龄、体重、性别、健康状态;正给予所述 患者的其他药剂和治疗等等。本领域技术人员还应了解,给药的剂量数目(剂量方按)还 需要根据经验基于例如被治疗的毛病、损伤、失调或病症的严重度和类型来确定。在一实施 例中,给予一个剂量是充分的。另一些实施例则考虑 2 个、3 个、4 个或更多个剂量。

[0089] 本发明提供一个透过给予治疗有效量的 ECS 细胞(包括 AMP 细胞和 / 或 ACCS、合 并的 ACCS 或 PCS) 以治疗结缔组织的损伤和毛病的方法。“治疗有效量”指一个能充分引发 一治疗效果的 ECS 细胞(包括 AMP 细胞和 / 或 ACCS、合并的 ACCS 或 PCS) 剂量。因此,在跟 本发明相符的给药剂量单位中,ECS 细胞(包括 AMP 细胞和 / 或 ACCS、合并的 ACCS 或 PCS) 的浓度对治疗如结缔组织的损伤和毛病是有效的

[0090] 在一实施例中,可共同给予 ECS 细胞(包括 AMP 细胞和 / 或 ACCS、合并的 ACCS 或 PCS) 和其他试剂(包括活性或无活性的试剂)以治疗结缔组织的损伤和毛病。活性试剂包 括,但不限于细胞因子、趋化因子、抗体、酶抑制剂、抗生素、抗真菌剂、抗病毒剂、免疫抑制剂, 以及其他的细胞类型等。无活性试剂包括载体、稀释剂、稳定剂、胶凝剂、运载工具、ECM(天

然和合成的)、支架等。当共同给予 ECS 细胞 (包括 AMP 细胞和 / 或 ACCS、合并的 ACCS 或 PCS) 和其他有药理学活性的试剂时,或需要较少的 ECS 细胞 (包括 AMP 细胞和 / 或 ACCS、合并的 ACCS 或 PCS) 以对治疗有效。

[0091] ECS 细胞 (包括 AMP 细胞和 / 或 ACCS、合并的 ACCS 或 PCS) 可以以注射至受试者的目标位置的方式来给药,如透过一递送装置如管 (例如导管) 注射。在一个实施例中,所述管另外包含针头,例如针筒,通过该针头可将所述细胞和 / 或 ACCS 导入至受试者中的所需位置。

[0092] 给予 ECS 细胞 (包括 AMP 细胞和 / 或 ACCS、合并的 ACCS 或 PCS) 的时间取决于被治疗的结缔组织的损伤或毛病的类型和严重程度。在一个实施例中,在产生结缔组织损伤或诊断结缔组织毛病后尽快地给予所述 ECS 细胞 (包括 AMP 细胞和 / 或 ACCS、合并的 ACCS 或 PCS)。在另一些实施例中,在损伤或诊断后不止一次给予所述 ECS 细胞 (包括 AMP 细胞和 / 或 ACCS、合并的 ACCS 或 PCS)。

[0093] 本发明的方法亦涵盖包含从 ECS 细胞部分或完全地分化的细胞 (包括 AMP 细胞) 的组合物。所述部分或完全分化的细胞组合物可从在适当试剂和条件下处理的 ECS 细胞 (包括 AMP 细胞) 获得,所述细胞会部分或完全分化成为细胞如结缔组织细胞。本领域技术人员应当熟知能影响所述部分或完全分化的条件。细胞可在使用前或在使用期间 (即移植、给药等步骤前) 以不同分化条件处理。在某些实施例中,细胞在使用前和在使用期间以分化条件下处理。

[0094] 持续释放组合物

[0095] 所述 ACCS、合并的 ACCS 和 PCS 可配制为持续释放的组合物。本领域技术人员应当熟知制备治疗剂 (包括以蛋白为基础的治疗剂如 ACCS、合并的 ACCS 或 PCS) 的持续释放组合物的方法。

[0096] 持续释放组合物可由本文中所述的任一方法制备。例如,多泡脂质体制剂技术可用于蛋白和肽治疗剂的持续释放。Qui, J. 等人 (ACTA Pharmacol Sin, 2005, 26(11) : 1395-401) 描述了以上述方法配制持续释放的干扰素 α -2b。Vyas, S. P. 等人 (Drug Dev Ind Pharm, 2006, 32(6) : 699-707) 描述了在多泡脂质体中包封聚乙二醇化干扰素 α 。ACCS (包括合并的 ACCS) 和 PCS 适合用于多泡脂质体持续释放的制剂中。

[0097] 纳米颗粒技术也可用于制备持续释放组合物。例如, Packhaeuser, CB. 等人 (J Control Release, 2007, 123(2) : 131-40) 描述了以装载了胰岛素的二烷基氨基烷基-胺-聚乙烯醇-g-聚(丙交酯共乙交酯) 纳米颗粒为基础的可生物降解、肠胃外贮藏系统,并结论出以纳米颗粒为基础的贮藏体适合用于设计针对生物活性大分子 (即蛋白) 的控制释放装置。Dailey, L. A. 等人 (Pharm Res 2003, 20(12) : 2011-20) 描述了以支化聚合物 DEAPA-PVAL-g-PLGA 为基础的无表面活性剂并可生物降解、用于气溶胶疗法的纳米颗粒,并结论出 DEAPA-PVAL-g-PLGA 为多功能性的药物递送系统。ACCS (包括合并的 ACCS) 和 PCS 适合用于基于纳米颗粒的持续释放制剂。

[0098] 基于聚合物的持续释放制剂也是非常有用的。Chan, Y. P. 等人 (Expert Opin Drug Deliv, 2007, 4(4) : 441-51) 提供了 Medusa 系统 (Flamel Technologies) 的综述,所述 Medusa 系统用于持续释放的蛋白和肽疗法。迄今为止, Medusa 系统已在动物模型 (大鼠、狗、猴子) 中以及在肾癌 (IL-2) 和丙型肝炎 (IFN- α (2b)) 患者的临床试验中被应用以皮

下注射 IL-2 和 IFN- α (2b)。Chavanpatil, M. D. 等人 (PharmRes, 2007, 24(4) :803-10) 描述了表面活性剂聚合物纳米颗粒, 作为用于水溶性分子的持续且增强细胞递送的新平台。Takeuchi, H. 等人 (AdvDrug Deliv Res, 2001, 47(1) :39-54) 描述了用于递送肽药物的粘附性纳米颗粒系统, 该系统包含脂质体和聚合物纳米颗粒。Wong, H. L. 等人 (Pharm Res, 2006, 23(7) :1574-85) 描述了一个新的聚合物-脂质杂合系统, 该系统已被证明可提高阿霉素对多抗药性乳癌细胞的细胞毒性。ACCS(包括合并的 ACCS) 和 PCS 适合用于上述持续释放的制剂方法中。

[0099] 另外, 本领域技术人员熟悉的但未在本文中具体地描述的其他持续释放方法, 也适合使用于本发明。

[0100] 本领域技术人员应当理解任何和所有目前在临床实践和临床发展中治疗结缔组织损伤和毛病的标准方法和方式均适合于实践本发明的方法。给药途径、制剂、与其它药剂共同给予等等在本文其它地方有详细的讨论。

[0101] 实施例

[0102] 给出下列实施例是为了为本领域的普通技术人员提供关于如何制备和使用本发明的方法和组合物的完整公开和描述, 非旨在限制本发明人所认为的本发明的范围。本发明已努力确保所使用的数字(如份量、温度等)的精确度, 但是还是应该考虑到某些实验错误和误差。除非另外指明, 否则份数为重量份, 分子量为平均分子量, 温度为摄氏度, 压力为大气压或约为大气压。

[0103] 实施例 1: 制备源自羊膜的多能祖细胞 (AMP)

[0104] 使用离解剂 PXXIII 从羊膜离解羊膜上皮细胞。羊膜的平均重量为 18-27g。以 PXXIII 为离解剂, 从每克羊膜回收细胞数目约为 $10-15 \times 10^6$ 个。

[0105] 选择 AMP 细胞的方法: 将从羊膜分离的细胞立即铺板。在培养基中培养约 2 天后, 除去非附着细胞并保留附着细胞。利用细胞是否附着塑料组织培养容器为挑选方法以获得所需 AMP 细胞群。附着和非附着 AMP 细胞似乎具有相似的细胞表面标记表达图谱, 但附着细胞具有更大的存活力, 为所需的细胞群。在添加人血清蛋白的基础培养液培养附着的 AMP 细胞, 直至它们达到约 120000-150000 细胞/cm²。在这时, 细胞培养物是汇合的。合适的细胞培养物将在约 5-14 天达到该细胞数目。符合该标准是 AMP 细胞具有增殖能力的指示, 不符合该标准的细胞不会被选择作进一步的分析和使用。一旦 AMP 细胞达到约 120000-150000 细胞/cm², 它们将被收集并冷藏保存。该收集时间点被称为 p0。

[0106] 实施例 2: 制备源自羊膜的细胞因子溶液 (ACCS)

[0107] 本发明的 AMP 细胞可用于制备 ACCS, 包括合并的 ACCS。将上述分离的 AMP 细胞以约 1×10^6 细胞/mL 接种至装有约 10mL 培养基的 T75 培养瓶中。将细胞培养至汇合, 更换培养基并在汇合后 3 天收集 ACCS。可选择在 3 天后再收集 ACCS, 并可选择在此 3 天后再收集。本领域技术人员应了解, 本发明的方法还包括其他从汇合培养物收集 ACCS 的方法, 如使用其他组织培养容器包括但不限于细胞工厂、烧瓶、中空纤维或悬浮培养装置等(参见上文详述)。本发明还包括在收集所述 ACCS 后将其冷藏保存, 冻干或者配制用于持续释放。本发明还包括在不同时间点收集 ACCS(参见上文详述)。

[0108] 实施例 3: 制备生理性细胞因子溶液 (PCS) 组合物

[0109] 如下的 PCS 组合物是通过将标明的细胞因子或因子以生理水平结合于一种载体

中而产生的：

[0110] 组合物 A :VEGF 和 TIMP-1 ;组合物 B :VEGF、血管生成素和 TIMP-1 ;组合物 C :VEGF、血管生成素、PDGF-BB 和 TIMP-1 ;组合物 D :VEGF、血管生成素、PDGF-BB、TGF β 2 和 TIMP-1 ;组合物 E :VEGF 和 TIMP-2 ;组合物 F :VEGF、血管生成素和 TIMP-2 ;组合物 G :VEGF、血管生成素、PDGF-BB 和 TIMP-2 ;组合物 H :VEGF、血管生成素、PDGF-BB、TGF β 2 和 TIMP-2 ;组合物 I :VEGF、TIMP-1 和 TIMP-2 ;组合物 J :VEGF、血管生成素、TIMP-1 和 TIMP-2 ;组合物 K :VEGF、血管生成素、PDGF-BB、TIMP-1 和 TIMP-2 ;组合物 L :VEGF、血管生成素、PDGF-BB、TGF β 2、TIMP-1 和 TIMP-2 ;组合物 M :血管生成素和 TIMP-1 ;组合物 N :血管生成素、PDGF-BB 和 TIMP-1 ;组合物 O :血管生成素、PDGF-BB、TGF β 2 和 TIMP-1 ;组合物 P :血管生成素和 TIMP-2 ;组合物 Q :血管生成素、PDGF-BB 和 TIMP-2 ;组合物 R :血管生成素、PDGF-BB、TGF β 2 和 TIMP-2 ;组合物 S :血管生成素、PDGF-BB、TGF β 2、TIMP-1 和 TIMP-2 ;组合物 T :PDGF-BB 和 TIMP-1 ;组合物 U :PDGF-BB、TGF β 2 和 TIMP-1 ;组合物 V :PDGF-BB 和 TIMP-2 ;组合物 W :PDGF-BB、TGF β 2 和 TIMP-2 ;组合物 X :PDGF-BB、TIMP-1 和 TIMP-2 ;组合物 Y :PDGF-BB、TGF β 2、TIMP-1 和 TIMP-2。一优选的组合物为组合物 L。

[0111] 组合物 A-Y 可选择地包含胸腺素 β 4。本领域技术人员应了解,在一些实施例中,其他 MMP 抑制剂可包括 TIMP-3、TIMP-4 或合成的 MMP 抑制剂 (J.Frederick Woessner, Jr., J. Clin. Invest. 108(6) :799-800(2001) ;Brew, K., et al, Biochim Biophys Acta. 2000Mar7 ;1477(1-2) :267-83)。

[0112] 将 VEGF、血管生成素、PDGF-BB、TGF β 2、TIMP-1 和 TIMP-2 以如下的生理水平加入 :VEGF 约 5.0-16ng/mL、血管生成素约 3.5-4.5ng/mL、PDGF 约 100-165pg/mL、TGF β 2 约 2.5-2.7ng/mL、TIMP-1 约 0.68 μ g/mL、TIMP-2 约 1.04 μ g/mL。VEGF 可购自 Invitrogen, 货号 #PHG0144、PHG0145、PHG0146、PHG0141 或 PHG0143 ;血管生成素可购自 R&D Systems, 货号 #265-AN-050 或 265-AN-250 ;PDGF-BB 可购自 Invitrogen, 货号 #PHG0044、#PHG0045、#PHG0046、#PHG0041、#PHG0043 ;TGF β 2 可购自 Invitrogen, 货号 #PHG9114 ;TIMP-1 可购自 R&D Systems, 货号 #970-TM-010 ;TIMP-2 可购自 R&D Systems, 货号 #971-TM-010。将 VEGF、血管生成素、PDGF-BB、TGF β 2、TIMP-1 和 TIMP-2 加入至一种载体中,所述载体例如生理盐水、PBS、乳酸盐林格溶液、细胞培养基、水或本领域技术人员已知的其他合适水性溶液。

[0113] 实施例 4 :制备持续释放的组合物

[0114] ACCS(包括合并的 ACCS)或 PCS 的持续释放组合物是通过以下方式产生 :将 ACCS(包括合并的 ACCS)或 PCS 组合物与本文所述的(参见以上)或本领域技术人员熟知的任何持续释放制剂技术相结合。

[0115] 实施例 5 :AMP 细胞和 ACCS 在结缔组织损伤的动物模型中的效用

[0116] 本实施例的目标为评估在大鼠模型中 AMP 细胞和 ACCS 对跟腱愈合的效果。

[0117] 材料和方法

[0118] 动物 :这个实验使用了 126 隻雌性、重量约 300 克和 10 週大的 SD 大鼠(Charles River, Cambridge, MA)。这些动物以两隻一组关在笼中,并可任意地给予食物和水。每笼(n=63)被随机分配到三个不同的组别 :A 组 - 生理盐水, B 组 -ACCs 和 C 组 -AMP 细胞。这项研究是获得 HMA 动物常务委员会批准并遵循所有机构有关实验动物的护理和处理指引。

[0119] 手术步骤 :使用氯胺酮(以腹腔内注射 60 毫克 / 千克)和甲苯噻嗪(以腹腔

内注射 10 毫克 / 公斤) 麻醉大鼠, 并通过鼻锥给予异氟醚气体(1-2%) 以使大鼠保持麻醉。然后用剃鬚器剃光右后脚的毛髮, 并依次用 70% 的酒精、聚乙烯酮碘和 70% 的酒精消毒。透过锐性分离, 暴露跟腱及于其中间点横切。于该跟腱的两个悬空端注射 100 微升生理盐水、ACCS 或稀释于 100 微升 PBS 的 100000 个 AMP 的细胞。使用 6-0 乙烯编织缝线 (Ethicon, Somerville, NJ) 以经修改的凯斯勒技术把肌腱缝合在一起。使用 6-0 尼龙缝线 (Ethicon) 缝合皮肤。然后用石油纱布包裹双腿并使用覆盖脚趾至腹部的固定敷料以固定双腿, 以达至三点稳定性(踝膝、髌、关节) (SCOTCHCAST, 3M)。把大鼠放回他们的笼中并给予 1 週、2 週, 或 4 週的时间以愈合。每天观察大鼠食欲、疼痛、感染、肿胀, 和肌肉瘫痪的迹象。于 1 週后拆除全部的固定敷料。以过量的异氟醚(10%) 杀死动物, 把跟腱从无关的软组织分割开并与跟骨和部分的腓肠肌和比目鱼肌复合体同时收集。立即把机械测试样本冻结在 -70°C 。以类似的方法解剖没有跟骨的样本作研究组织之用。收集每隻动物对侧未受伤的肌腱作为对照组。

[0120] 机械测试: 在评估当日, 解冻样本至室温并准备样本作拉伸测试。以钝性分离从肌腱近端仔细刮掉肌肉, 以获得扇形的肌腱纤维, 并使用边宁顿钳 (Pennington clamp) (Johnson&Johnson, New Brunswick, NJ) 和 1200 砂砾湿润砂纸 (Home Depot, Boston, MA) 夹紧所述肌腱纤维。使用另一个边宁顿钳把肌腱的末端夹紧在脚跟插入位置的近端。使用具有齿颚面的气动夹具相继把这两个边宁顿钳垂直地固定在材料测试仪器 (Instron 5565, Norwood, MA)。用游标卡尺量度肌腱的宽度、厚度和长度 (即边宁顿钳两端的距离)。基于几何形状为长方形的假设以计算横截面积。在制备组织和把组织装上材料测试仪器时, 以沾有生理盐水的纱布保持肌腱湿润。肌腱首先进行 3 个测试前循环步骤, 使之延伸 2%, 以消除任何滞后现象。仪器立即以均速 2mm/s 拉扯样本直至无法继续。使用 100N 的测力传感器 (Instron) 测量施加在样本的力和使用 Blue-Hill2 软件 (Instron) 收集所有数据。把数据传送至 Excel 工作表并作以下分析: 断裂强度 (定义为引致破裂的力, N)、最大拉伸强度 (定义为每单位面积的最大应力或力, MPa)、拉扯百分比 (定义为相比初始长度的长度变化 (mm/mm)) 和杨氏系数 (对材料的弹性的量度, MPa)。机械测试后, 重新把标本冻结在 -70°C 作进一步的评估。

[0121] 组织检视: 肌腱在福尔马林中浸渍 24 小时, 然后在 PBS 中漂洗。切开肌腱的矢状面以检视其组织。固定石蜡包裹的组织切片在试片上, 并使用标准方法以 H & E 和 Masson Trichrome 染色。

[0122] 统计分析: 假设数据为参数, 使用双因子变异数分析 (ANOVA) 并以治疗组和时间作为独立因素分析数据。以邦费罗尼事后检定 (Bonferroni post-test) 修正 p 值和减少 I 型错误。p 值小于 0.05 将被认为具有统计显著性。所有的分析都以 GraphPad Prism5 (适用于 Windows) 完成。

[0123] 结果

[0124] 统计分析: 杨氏系数为对材料的相对刚度 / 弹性的一个量度。愈合肌腱的杨氏系数越接近正常、未受伤的肌腱的杨氏系数, 代表该愈合肌腱在机械应力下的表现越接近正常、未受伤的肌腱。相比正常过多的刚度 (两个或更多个量值) 是不理想的, 因为这些肌腱耗散能量的能力会减弱, 亦可能变脆和撕裂。在这个实验中, 肌腱以 AMP 细胞治疗并给予 4 週的时间愈合, 对比在同一时间点以生理盐水和 ACCS 治疗的肌腱, 以 AMP 细胞的肌腱展示

了具有统计学显著性(p 值 = 0.1%) 的改善。事实上,在这个实验中,以 AMP 治疗的肌腱非常接近未经处理的肌腱。这个趋势即使在 2 週的时间点亦可观察到。1 个星期的时间点则并未显示任何趋势。

[0125] 最大拉伸强度为材料在被伸展或拉扯时可承受的最大应力的一个量度。在这个实验中,从接受了 2 週 AMP 细胞治疗的肌腱可以看出肌腱的强度在改善的明确趋势,所述改善并在第 4 週持续。但是,这个正面的趋势不具有统计学显著性。

[0126] 横截面积量度愈合期间的肌腱的横切面面积。肌腱面积越大,代表产生的新组织的量就越大。这是一种正面的发现,尤其是在愈合过程中的早期阶段,因为早期阶段的愈合质量较好,并给予肌腱更大的强度。肌腱的 H & E 和 Trichrome 的组织检视显示,对比以生理盐水和 ACCS 治疗的肌腱,接受了 4 週 AMP 细胞治疗的肌腱具有一个相对地大的横截面积。

[0127] 断裂强度量度材料抵抗由张力引起的断裂或破裂的能力。在这些实验中,断裂强度并没有表现出任何明显的差异。然而,分别以 ACCS 和 AMP 细胞治疗了 2 週的肌腱,当中越来越多组织愈合至可以进行张力分析,表示经 ACCS 和 AMP 细胞治疗的肌腱对比以生理盐水治疗的肌腱,其愈合有较早的改善。

[0128] 初步结论为:1) 1 週的时间点似乎太快并且不足以产生足以采用任何已使用方法中有意义的测量方法去量度的愈合;2) 以 ACCS 和 AMP 治疗的组织在 2 週均具有更好的愈合;3) AMP 的细胞看来提供最大的效果,尤其在 4 週的时间点。经推测,这是因为 AMP 细胞能持续分泌所需的因子,而 ACCS 本质上为单一剂量。日后的实验将测试持续释放的 ACCS 的递送。3) 日后的实验应包括稍后的时间点,如 6 週或 8 週,以确定在 4 週后是否仍然持续改善;4) 以 AMP 细胞治疗的肌腱展示了更快速的愈合和正常材料特性的恢复,特别是有关杨氏係数的特性。

[0129] 在不背离本发明的主旨和基本属性的前提下,本发明可以由其他具体方式实施。任何同等或类似的实施例均被涵盖于本发明的范围内。基于本文的显示和描述,本领域的技术人员可显而易见的对本发明作多样的修改。这些修改也落在随附权利要求的范围内。

[0130] 在说明书全文中引用了多篇出版物。每篇出版物均以引用的方式全文纳入本说明书。