



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102802686 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 28

(21) 申请号 201080026718. 8

A61P 7/06 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 06. 18

(30) 优先权数据

61/218, 182 2009. 06. 18 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 12. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2010/058675 2010. 06. 18

(87) PCT申请的公布数据

W02010/146177 EN 2010. 12. 23

(71) 申请人 MC2 细胞有限责任公司

地址 丹麦赫斯霍尔姆

(72) 发明人 M·埃尔-萨班

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

(51) Int. Cl.

A61L 27/36 (2006. 01)

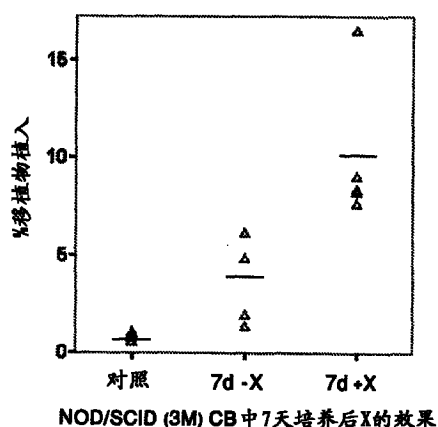
权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 2 页

(54) 发明名称

骨髓胞外基质提取物及其治疗用途

(57) 摘要

提供了造血干细胞用于治疗各种疾病的方法和用途。为了重建防御和长期植入,除了未分化的干细胞外,也利用自体造血干细胞向髓细胞系的分化向患者重新导入。



1. 通过包含以下步骤的方法可获得的人骨髓胞外基质提取物和可溶性因子：

- 将人造血干细胞植于含有类似人骨髓胞外基质的胞外基质的环境中，
- 培养这些细胞以将其分化为人骨髓细胞，由此刺激细胞合成、分泌和组织胞外基质和可溶性因子；

- 继续培养细胞直到细胞已分化为人骨髓细胞并已合成胞外基质和可溶性因子，和
- 去除细胞以得到骨髓的胞外基质提取物和可溶性因子；

其中含有类似人骨髓胞外基质的胞外基质的环境通过从哺乳动物，优选猪、牛或人，分离骨髓可获得。

2. 一种向患者自体移植造血细胞的方法，包括：i) 从患者取得造血干细胞；ii) 可选地用选自 GM-CSF, SF, IL-3, IL-1, GM-CSF/IL-3 融合蛋白及其组合的生长因子离体扩增造血干细胞，以提供含有扩增群体的造血祖细胞的细胞制品；iii) 将造血干细胞级分与权利要求 1 的提取物和可溶性因子或类似于权利要求 1 的人骨髓胞外基质的胞外基质的去细胞形式接触，以使这些细胞分化为髓细胞系；iv) 将造血干细胞与髓细胞系组合形成细胞制品；v) 为重建防御和长期移入而向患者施用该细胞制品。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述患者接受或已经接受细胞减少剂治疗。

4. 权利要求 2 的方法，其中所述哺乳动物患有造血细胞恶性肿瘤。

5. 权利要求 2 的方法，其中所述哺乳动物患有贫血。

6. 权利要求 2 的方法，其中所述细胞组合物经静脉内施用。

7. 权利要求 1 的提取物和可溶性因子或类似于权利要求 1 的人骨髓胞外基质的胞外基质的去细胞形式用于制备用于治疗患有血液癌症的患者的髓性细胞系的用途，所述血液癌症包括淋巴母细胞白血病、急性粒细胞白血病、慢性髓性白血病 (CML)、何杰金氏病、多发性骨髓瘤以及非何杰金氏淋巴瘤和 B- 细胞淋巴瘤，所述用途包括：i) 从患者取得造血干细胞；ii) 可选地用选自 GM-CSF, SF, IL-3, IL-1, GM-CSF/IL-3 融合蛋白及其组合的生长因子离体扩增造血干细胞，以提供含有扩增群体的造血祖细胞的细胞制品；iii) 将造血干细胞级分与权利要求 1 的提取物和可溶性因子或类似于权利要求 1 的人骨髓胞外基质的胞外基质的去细胞形式接触，以使这些细胞分化为髓细胞系；iv) 将造血干细胞与髓细胞系组合形成细胞制品；v) 为重建防御和长期移入而向患者施用该细胞制品。

8. 权利要求 7 的用途，其中所述患者接受或已经接受细胞减少剂治疗。

9. 权利要求 7 的方法，其中所述哺乳动物患有造血细胞恶性肿瘤。

10. 权利要求 7 的方法，其中所述哺乳动物患有贫血。

11. 权利要求 7 的方法，其中所述细胞组合物经静脉内施用。

骨髓胞外基质提取物及其治疗用途

背景技术

[0001] 本发明涉及造血干细胞 (HSC) 的鉴定及用途。更确切地,本发明涉及自体造血干细胞向髓细胞系的分化,所述髓细胞系用于与未分化干细胞共同引入患者以重建防御和长期移入。

[0002] 骨髓 (BM) 移植作为越来越多疾病的有效疗法被越来越多地应用于人类,所述疾病包括例如白血病、淋巴瘤、骨髓瘤和选择性实体瘤这样的恶性肿瘤,以及例如重度再生障碍性贫血、免疫缺陷和先天性代谢紊乱这样的非恶性状况。BM 移植的目的是为宿主提供能够分化为代替缺陷或病理性细胞系的成熟血细胞的健康干细胞群。用于移植的 BM 来源可以是自体的、同种或异种的。优选的是自体 BM 或来自 HLA- 匹配的兄弟姐妹的 BM,但来自 HLA- 不相匹配供体的 BM 目前也被用于移植。

[0003] 发生完全系统性供体特异性移植耐受的唯一已知临床情况是通过骨髓移植形成了嵌合体 (chimerism)。通过对受体进行全淋巴或全身照射、然后用供体细胞进行骨髓移植后,这已经在新生和成年动物模型以及人体中实现。异种骨髓移植的成功率在很大程度上依赖于供体细胞与受体细胞间“主要组织相容性复合物”(MHC) 紧密匹配以使得供体与受体间抗原差异最小化,由此降低宿主抗移植物反应和“移植物抗宿主病”(GVHD) 发生频率的能力。事实上,MHC 匹配是重要的,只能接受一或两种抗原不匹配,因为对于差异更大的情况,GVHD 是非常严重的。

[0004] 造血干细胞是已在胎儿骨髓、脐带血、成人骨髓和外周血中鉴定到的稀有细胞,它能够分化成髓红祖细胞(血红细胞、粒细胞、单核细胞)、巨核细胞(血小板)和淋巴细胞(T细胞、B细胞和天然杀伤细胞)系。这些细胞不仅长寿命,而且能够产生其他的干细胞,称作自我更新过程。干细胞最初定型为谱系限制性祖细胞,这可通过它们在半固体培养基上形成集落的能力来分析。祖细胞进行多谱系分化的能力受到限制,并且已经失去了自我更新的能力。祖细胞最终分化并成熟成为血液中的各功能性元件。成熟血细胞的终生维持来自少数多能造血干细胞的增殖活性,这些多能造血干细胞具有高的、但可能有限的自我更新能力。在培养条件下,造血干细胞迅速定型为已分化的细胞类型,这在培养条件下大多是不可逆的。该特性,以及它们在血液中的相对缺乏,向产生长期稳定的多能造血干细胞培养物提出了挑战。

[0005] 越来越多的证据表明,干细胞归巢骨髓是一个多步骤过程。该过程所涉及的机制和特定粘附分子还未被充分了解。已有显示,P1 整联蛋白、极迟抗原 4 (VLA-4) 和 VLA-5、以及 P2 整联蛋白淋巴细胞功能相关 1 (LFA-1) 都涉及了小鼠和人祖细胞与骨髓胞外基质 (ECM) 间的,以及与骨髓基质细胞间的粘附相互作用 (Levesque 等人,1995)。VLA-4 在大鼠干细胞迁移和体内血细胞生成中发挥了尤其重要的作用。缺失 P1 整联蛋白的大鼠干细胞不能在胎肝中定居 (Hirsh 等人,1996)。

[0006] 从用造血干细胞疗法来治疗许多严重疾病的扩展方法来看,为获得具有更高成功率和长期移入的干细胞,更好地理解干细胞归巢至骨髓以及被移植宿主再生背后的机制,是非常可取的。

[0007] 与骨髓移植 (BMT) 有关的两个障碍限制了其在临床移植上的应用：

[0008] (1) 移植物抗宿主病 (GVHD) 和 (2) 移植物移入失败。BMT 具备治疗多种疾病的潜力,包括癌症 (淋巴瘤)、血红蛋白病 (镰刀状细胞病、地中海贫血)、可溶性酶缺陷和自体免疫疾病。未改性骨髓移植的发病率和死亡率阻碍了该方法的广泛应用。传统的 T 细胞去除可以预防移植物抗宿主疾病,但涉及所不希望的高移植失败率。因此,需要优化移植物移入程序。

[0009] 发明概述

[0010] 因此,本发明的一个目的是提供一种调理受体用于骨髓移植的方法,该方法可减少非特异性免疫抑制剂和 / 或致死照射的需求。本发明的又一目的是提供以最小发病率治疗多种疾病和病症的方法。

[0011] 本发明的其他目的、优势和新颖之处将在以下说明书和实施例中分部叙述,基于对下文的阅读,这些部分对于本领域技术人员而言是显而易见的,也可以通过实施本发明来学习这些部分。通过尤其是所附权利要求书中所指出的组合物和方法可实现和获得本发明的目的和优势。为实现前述以及其他与本发明目的一致性的其他目标,如同具体表述的,本发明的方法包括向受体中组合导入自体造血干细胞和通过分化自体造血干细胞获得的髓系细胞。

[0012] 本发明还涉及对将接受细胞减少性疗法的患者进行自体干细胞移植的方法,包括:(1) 在进行细胞减少性疗法之前从患者获得造血干细胞 (或造血祖细胞);(2) 用本发明的胞外基质提取物离体增殖造血干细胞 (或造血祖细胞),以提供含有数量增加的造血干细胞 (或造血祖细胞) 以及分化的血细胞系 (比如髓细胞系) 的细胞制品;和 (3) 联合细胞减少性疗法或者在其之后将该细胞制品施用于患者。已显示该方法对于重建防御和长期移植物移入之目的都是优越的。

[0013] 干细胞可获自外周血采集物或骨髓外植物。

[0014] 这一创造性的方法可选地包含一个包括向患者施用募集生长因子以在采集外周血之前将造血祖细胞募集进外周血的初步体内步骤,其中的募集生长因子选自 GM-CSF、SF、GCSF、IL-3、GM-CSF/IL-3 融合蛋白,及其组合。

[0015] 这一创造性的方法可选地包含一个随后的体内步骤,其包括在自体移植该细胞制品后向患者施用植入生长因子以促进所移植的来自细胞制品的造血祖细胞植入和增加增殖。所述植入生长因子选自 GM-CSF、IL-3、SF、GM-CSF/IL-3 融合蛋白,及其组合。

[0016] 本发明还包括祖细胞扩增培养基,其中含有细胞生长培养基、自体血清和选自 SF、IIL-1、IL-3、GM-CSF、GM-CSF/IL-3 融合蛋白的生长因子,及其组合,条件是 IL-1 必须与至少一种另外的生长因子组合使用。

[0017] 另一方面,本发明包括治疗哺乳动物的方法。首先对哺乳动物进行鉴定,其具有特征为造血细胞不足的失调;从该哺乳动物获得造血干细胞样品以进行自体移植,该样品还包括一个亚群的未分化造血干细胞;在含有本发明的胞外基质提取物的培养基中以及适于引起未分化造血细胞增殖的条件下培养该造血细胞样品;将已分化造血细胞与未分化造血细胞分开;以及进一步培养该分离的未分化造血细胞,由此使得分离的未分化造血细胞进一步增殖。向该哺乳动物提供适量的培养的未分化造血细胞,该培养的未分化造血细胞在哺乳动物中提高造血细胞的数量,由此治疗所述失调。

[0018] 本发明的实施方式包括开放和封闭系统。适于治疗的失调包括,例如但不限于细胞减少症或者贫血比如那些由癌症治疗引起的,或者导致血细胞水平异常的遗传缺陷,或者癌症,例如移植物抗肿瘤法。在一种实施方式中,在移植入哺乳动物之前,扩增具有长期再群体化潜能的未分化造血干细胞培养物。在一种实施方式中,本发明包括提供未分化人造血细胞群体的方法。

[0019] 根据本发明,提供了通过包含以下步骤的方法可获得的人骨髓胞外基质提取物和可溶性因子:

[0020] - 将人造血干细胞接种于含有类似人骨髓胞外基质的胞外基质的环境中,

[0021] - 培养这些细胞以将其分化为骨髓,由此刺激所述细胞合成、分泌和组织胞外基质和可溶性因子;

[0022] - 继续培养所述细胞直到细胞已分化为骨髓细胞并已合成胞外基质和可溶性因子,和

[0023] - 去除所述细胞以得到骨髓的胞外基质提取物和可溶性因子;

[0024] 其中含有类似人骨髓胞外基质的胞外基质的环境可通过从哺乳动物(优选猪、牛或人)分离骨髓获得。

[0025] 该骨髓胞外基质提取物随后可用于分化新的骨髓干细胞,或者作为替代方案,可使用类似于骨髓胞外基质提取物的胞外基质提取物。相应地,提供了向患者自体移植造血细胞的方法,包括:i) 从患者取得造血干细胞;ii) 可选地用选自 GM-CSF, SF, IL-3, IL-1, GM-CSF/IL-3 融合蛋白及其组合的生长因子离体扩增造血干细胞,以提供含有扩增群体的造血祖细胞的细胞制品;iii) 将造血干细胞的级分与本发明的人源提取物和可溶性因子或类似于人骨髓的胞外基质的胞外基质的去细胞形式接触,以使这些细胞分化为髓细胞系;iv) 将所述造血干细胞与髓细胞系组合形成细胞制品;v) 为重建防御和长期移植物植入,向患者施用该细胞制品。

[0026] 依据上文,本发明还提供离体生产哺乳动物(优选人)骨髓胞外基质和可溶性因子的方法,其中所述提取物的组成类似于哺乳动物(优选人)骨髓的体内组成。这样的提取物非常适于造血干细胞向造血祖细胞的上述分化。

[0027] 类似于骨髓组织胞外基质的胞外基质可以是人或动物来源的,比如马、犬、猪、牛和羊来源的;或啮齿类物种,比如小鼠或大鼠。尽管本发明的目的是体外制备胞外基质和可溶性因子,其组成反映了人的组成,因此主要由人细胞分泌的生长因子、矿物质组成,但是,动物胞外基质提取物可用于诱导分化并由此刺激人干细胞分泌人源胞外基质。随着人干细胞分化,它们将产生胞外基质层或体,其主要包含分化的人细胞以及它们自身产生的胞外基质;因此,如果干细胞已在动物源的提取物中被刺激分化,则在所产生的胞外基质层中将没有非人材料级分留存。由于当干细胞完全分化为目的组织的细胞时可以得到胞外基质的体内组成,因此常需要培养干细胞大约至少 14 天。在任何情形下,在收集胞外基质之前都对细胞进行评估;一个通则是至少 90% 的细胞应在制备胞外基质之前完全分化。

[0028] 如果出于某些原因,需要生产不含任何动物成分的骨髓胞外基质,可以采取以下替代方案:i) 最初只用动物来源的骨髓胞外基质刺激干细胞,此后在置于普通生长培养基中培养之前仔细清洗被刺激的细胞;ii) 用人骨髓胞外基质刺激干细胞,和 iii) 用含有已知(至少部分)负责干细胞分化为给定组织细胞类型的生长和分化因子的“合成型”胞外

基质刺激干细胞。

[0029] 发明详述

[0030] 骨髓组织胞外基质和可溶性因子可用于体内诱导骨髓中的造血祖细胞增殖和使这些造血祖细胞迁移到外周血中。从外周血收集的造血祖细胞可用于对接受细胞减少剂治疗的患者进行造血挽救治疗。

[0031] 本发明涉及在输注或移植前用生长因子对来自外周血或骨髓的造血祖细胞进行离体处理以提高其数量。此外,生长因子可用于在移植后促进所移植的造血祖细胞的植入和增殖。对经历细胞减少性疗法的患者的造血重建可降低经高剂量细胞减少性疗法(比如骨髓抑制性癌症化疗剂,或高剂量的放射疗法)的患者的感染和出血并发症的发生率。

[0032] 促进造血干细胞(HSCs)分化和增殖的离体培养条件的进展将大大促进包括细胞移植、基因疗法和组织工程在内的下一代疗法的临床实施。事实上,最近几年已经显示这些细胞在移植疗法中的临床效用。不幸的是,能够在体外持续有效生长HSC的培养条件的建立是难以捉摸的。当前用于扩增HSC的策略,主要是通过生长因子的补充或者基质细胞支持,通常导致成熟祖细胞的扩增,但是在短期培养后伴随更多原发细胞的丢失或适度扩增。

[0033] 由于HSC在体内显示出具有广泛的增殖潜力,因此这些结果有些令人意外。证明单个鼠或人细胞的后代可实现在小鼠中长期植入,以及单克隆的后代能够在多个次级受体中再次建群的实验,为它们的潜力提供了证据。此外,在小鼠中的一系列移植研究(其中在各代监控和定量再次建群的干细胞的输入和输出数量)已经有力地显示再次建群的干细胞能够持续体内扩增,已计算出理论扩增150-8400倍。因此,简单补充培养基是不足以克服在大多数体外系统中所见到的生长抑制效果。

[0034] 如本文所使用的,术语“未分化的造血细胞”、“未分化细胞”、“造血干细胞(HSC)”和“原始细胞”可替换使用,用于描述在移植入哺乳动物中后能够长期体内扩增和重建群的多能造血干细胞。已经确定是,大多数原始细胞类型表达表面抗原CD34,它被认为是BM内干细胞和祖细胞粘附中起重要作用的跨膜糖磷蛋白。表达CD34和缺少CD38抗原(即,CD34+CD38-细胞)的细胞群已显示出表现原始细胞潜能。例如,大多数SRC可在CD34+CD38-细胞级分中找到,但是不能在CD34+CD38+群中发现,其被认为包含更为分化的细胞类型。CD34+CD38-表型还与具有LTC-IC特征的细胞的富集有关。能够长期多系重建群的鼠和人CD34-HSC的存在清楚地显示了,CD34抗原本身可不依赖于HSC潜力而被调控,以及CD34自身的表达不是必需的HSC标记。还基于Thy-1(一种T细胞相关标记)的表达鉴定了原始细胞。Thy-1表达允许从UCB、BM和人胎肝单个核细胞(MNC)回收LTC-IC,并负责存在于小鼠BM中的全部重建群细胞(Thy-1.110)。

[0035] 另一个标记,CD133(AC133),一种跨膜受体糖蛋白,也已被显示与早期造血祖细胞的富集一致。

[0036] 从UCB分离的CD34+CD133+细胞级分在原始祖细胞和还具有植入二级受体中的能力的SRC中高度富集。近来,血管生长因子受体2(KDR)已被显示作为原始细胞类型的分子标记。研究显示,BM来源的CD34+KDR+的分离导致人LTC-IC和SRC的富集。

[0037] 特定抗原的缺失可用于表征和分离原始造血干细胞群。例如,缺失HLA-DR 36或CD45RA/CD71的人CD34+细胞可鉴定能够自我更新和分化为多能造血细胞系的原始多能造血细胞。此外,缺失与成熟髓细胞和淋巴细胞有关的标记的分离细胞可代表一种富集原始

细胞类型的方法。

[0038] 如本文所使用的,术语“分化的造血细胞”、“分化细胞”或“祖细胞”指定型为造血细胞的系。这些细胞通常表达 CD2、CD3、CD14、CD16、CD19、CD24、CD56、CD66b 和血型糖蛋白 A 中的一种或多种抗原,且它们被称作谱系标记物 (lin⁺)。检测到 lin⁺ 抗原表明多能特性的丧失以及该细胞已经分化或者发生了谱系定型。相应地,这些 fin⁺ 抗原还为靶向分离本文所述的已分化细胞提供了适当抗原,而且这些抗原的抗体已被广泛用于免疫分离方法。

[0039] 如所述,迄今调查的大多数培养条件都导致分化细胞类型占主导,并伴随着原始细胞出现频率和数量的减少,最终导致培养物灭失。

[0040] 这种不期望的终结果是能够影响培养动力学的几个竞争因子的结果。一个这样的参数是培养过程中造血细胞的不同亚群内源性分泌可刺激或抑制 HSC 增殖的调控分子的效力。利用基因表达或蛋白分泌分析,已显示祖细胞和成熟细胞类型 -3 都表达和分泌多种已知抑制 HSC 扩增的因子。例如,已知单核细胞分泌转化生长因子 (TGF)-I 和巨噬细胞炎症性蛋白质 (MIP)。

[0041] 中性粒细胞与 TGF-、B1、MIP 和肿瘤坏死因子 (TNF) 有关,而巨核细胞分泌白细胞介素 (IL)。文献也报道了关于红色巨核祖细胞的类似发现,该细胞已显示分泌 TGF-Q。此外,研究已显示,许多这些分泌因子可刺激其他细胞类型二次分泌抑制因子。例如,单核细胞分泌的 IL-12、TNF-a、IL-1 或 IL 可刺激淋巴细胞产生 MIP。已知这些抑制因子通过使 HSC 保持休眠、经历细胞凋亡和 / 或分化为成熟细胞类型而阻碍 HSC 体外扩增。

[0042] 显示已分化细胞可抑制干细胞生长的进一步证据来自小鼠移植研究,其中已显示小鼠重建群干细胞的体内扩增潜能确实会受到移植增加数目的干细胞的限制。这些报道暗示,受体小鼠中由所注射进入的重建群细胞引起的成熟血细胞的恢复和产生,可能负责激活抑制机制,其最终限制干细胞增殖。相应地,为减少培养基中生长因子的局部浓度,将未分化细胞与培养物中的这些生长因子分离,这可通过例如但不限于培养基稀释、培养基更换、灌注等来完成。

[0043] 内源分泌因子可负面影响培养结果的一项实证来源于这样一些研究,在这些研究中对特异性针对单个抑制因子的封闭性抗体或拮抗剂 (即寡核苷酸或竞争性受体阻断剂) 在体内及体外模型中均已成功逆转或阻止了比如 TGF-、B1、MIP-1 α 、(MCP)-1 和 SDF-1 这样的已知抑制剂的效果。不幸的是,这样的阻断方案的应用并没有延续到重建群 HSC 的更大规模扩增,这可能是因为多种分泌因子负责抑制该群体。干细胞扩增的一个模型涉及负反馈控制机制,由此在补充了细胞因子的培养物中产生的分化血细胞生产直接或间接阻止 HSC 扩增的可溶性因子。

[0044] 该机制暗示,去除这些细胞或由这些细胞产生的内源因子将会通过将向干细胞呈递的信号 (即来自补充的细胞因子和分泌的细胞因子) 的平衡从阻碍扩增转变为利于扩增来去除对 HSC 扩增的阻断。

[0045] 这些细胞的去除可能还提供了富集可分泌刺激因子的细胞的方法。调控刺激性和抑制性因子的内源性生产的有用方法由此可克服目前的 HSC 扩增系统的限制。

[0046] 从培养物中去除特定靶细胞,结合培养基更换,可导致存在于培养物中的抑制因子的内源产生及整体浓度的伴随减少,这反过来引起 HSC 群的更大增殖。

[0047] 如本文所述产生的 HSC 可用于多种临床应用。例如,为了在加强治疗后增强或加

速免疫和造血恢复,扩增的 HSC 可用于移植以改善由放射疗法或用抗癌药物进行的化疗引起的细胞减少和贫血。作为一种选择,本发明可用于预防和治疗与淋巴细胞减少有关的感染性疾病,比如慢性 HIV 感染中所见的 CD4+T 细胞耗竭。HSC 可与分化因子一起培养以产生特定的血细胞类型。例如,用本发明产生的 HSC 可被诱导分化成目的群的细胞并作为已知生物试剂发挥功能。以这种方式,本发明可产生具有多种被建立以提供最大病人医疗护理的功能的“设计者移植物”。利用他们减少的免疫原性和多能特性,HSC 还可用于基因疗法,以在受体中表达转基因。

[0048] 本发明提供特别是造血细胞系的扩增干细胞或祖细胞。该过程大致包括获得富集有造血干细胞和祖细胞的造血细胞,并将其导入适宜的生长培养基中。将细胞维持培养并使其增殖。在培养过程中连续地或者间歇性地除去已分化细胞和内源性的生长因子,例如,通过对维持在培养物中的细胞进行培养基更换,以及靶向分离和除去分化细胞。进一步培养剩余的未分化干细胞并允许其进一步增殖。进行多个循环的培养和选择/培养基更换以扩增细胞。作为替代方案,可以进一步根据本发明选择并增殖处于谱系定型各不同阶段的分化细胞。同样,向培养物中添加一种或多种促红细胞生成素以迫使分化或谱系定型。优选依照 FDA 和其他管理血液制品的操作和制备的规章,在完全可控的环境封闭系统中进行细胞扩增和选择,并且维持无菌。

[0049] 本文公开的生物工艺可以作为开放或封闭系统实施。封闭系统通常与环境隔绝,并为培养物提供一个更可控的无菌微环境。封闭系统的其他好处包括为研究者和医药专业人员在操作生物液体过程中提供更高的安全性。目前的 FDA 和其他行政规定要求用封闭系统操作和处理血液细胞和设计用于人类的血液制品,因此是优选的。然而,存在用于扩增造血干细胞的开放系统,例如本文所公开的,以及例如 US 专利 5,674,750 和 5,925,567(各自全文整合入本文作为参考),并可根据本文提供的教导改进其他已知系统以制造适宜开放系统生物工艺。

[0050] 本发明包括一或多个能够接受和包含细胞样品的细胞培养室。细胞培养室基本是刚性的(例如就细胞培养瓶或皿而言),或者是半刚性的(例如就细胞培养袋而言)。有许多类型和种类的细胞培养容器(室)可商业获得,比如由 Corning Costar 生产的那些。适宜的材料是可以承受包括高压灭菌和伽马照射在内的各种无菌技术,对于其中直接接触细胞的元件,其应当是生物学惰性的。根据这些和比如目的容量、透明度、透气性、开放或封闭设计这样的其他因素来选择适宜细胞培养室,而且根据本文的教导,培养室类型和种类的特定选择对于本领域技术人员而言是显而易见的。目前优选的实施方案采用半透氧和二氧化碳但是基本上不透水蒸汽或液体比如细胞培养基的细胞培养袋,由此确保在培养过程中不损失或少损失生长培养基。氟化乙烯聚合物是适于该目的的一种示例材料。其他不透气但符合适当要求的材料包括聚丙烯、不锈钢和其他医药级材料,尤其是聚合物。

[0051] 细胞培养室可包括一或多个端口,可替换的帽子或盖子,比如橡皮塞、阀这样的自封隔件,或者类似的允许使用者向培养室中添加或取出材料而基本上不将生物工艺暴露于外部环境的手段。例如,这些机制允许向培养室中导入细胞、培养基和其他成分,比如抗体和生长因子,并允许从培养室中除去培养基、细胞、内源可溶性生长因子等,而同时维持其环境封闭系统。还可以提供通风孔、调节阀或用于附接外部气体(例如氧气或空气)或液体(例如培养基)来源的其他端口,或用于附接泵或压力装置的端口。

[0052] 许多情况下,离体 HSC 培养试图包括造血程序并由此最终形成一个含有造血成分的异质细胞群。透彻了解这些细胞的整体发展潜力和原始性将提供有关特定培养方法学扩增原始细胞类型的能力的信息。

[0053] 开发该知识需要对处于不同分化阶段的细胞进行稳健的定量监控。已经开发出各种不同的根据显著功能特性鉴定这些细胞的检测方法。利用已建立的基于可从形态上区分的集落的形成来检测已定型和多潜能祖细胞存在情况的检测方法可以在体外获知细胞功能。集落形成细胞 (CFC) 是可通过在半固体培养基 (甲基纤维素) 上培养 2-3 周后形成含有红细胞系的、髓系的或混合 (即红细胞系和髓系都有) 细胞的集落来检测的祖细胞。长期培养物起始细胞 (LTC-IC) 是比 CFC 更原始的细胞,它们可以通过与基质细胞共培养超过 5 周后产生 CFC 的能力来计数。由包括在内的间质细胞成纤维细胞、内皮细胞、脂肪细胞和成骨细胞在内的间充质细胞组成的基质细胞元件产生各种支持 LTC-IC 长期增殖和维持的可溶性因子。该检测方法的灵敏度可通过使用分泌已知增强 LTC-IC 检测和维持的因子的遗传工程化鼠成纤维细胞 (M2-1 OB4) 细胞系来提高。

[0054] 体内功能检测方法为造血细胞群的发育潜能提供最佳指示。这是因为它们直接测试干细胞群在静脉内注射后对特定器官、组织或系统的发育或再发育所作贡献的潜力。例如,根据其在移植入免疫受损及造血受损宿主后重建造血功能的能力鉴定了鼠 HSC。Ti11 和 McCulloch 最先报道了这样的细胞类型的存在,他们将同系 BM 细胞注射入经照射的小鼠受体并在脾脏中观察到了多谱系集落的形成。

[0055] 促红细胞生成素是为造血生长因子 (HGF) 或造血细胞因子设定的通用名,其作用于造血系统细胞。这些因子活跃于各发育阶段,因此在生物工艺中将除去这些促红细胞生成素以防止 HSC 分化。

[0056] 造血生长因子由不属于造血系统的许多不同细胞类型产生。这些因子要么被分泌,要么以膜结合或基质结合的形式存在。它们也可以具有不同的作用模式,比如自分泌、旁分泌或邻分泌生长控制。造血因子的产生受到严格调控,也就是说,它们在特定条件下由被活化的细胞合成,而不是时时组成型产生。许多观察指出了造血系统发育中所涉因子的有序层级和协调作用的存在。这些因子是造血干细胞的维持、其增殖、其分化为不同的造血谱系以及增殖与分化间的稳定平衡所需的。这些因子允许机体根据需要,例如在压力条件下,将平衡从一个方向改变至另一方向。许多这些因子的生物学活性是相互重叠的。从目的上来说,这保证了高效且允许功能受损 (例如在病理情况下) 的成分间的替代和 / 或互补。此外,由这些因子所引起的应答通常是前后关联的,也就是说,这些应答依赖于应答细胞环境中的其他细胞因子和 / 或因子的存在和浓度。目的是刺激 HSC 体外增殖的大多数研究的焦点集中于使用外源添加细胞因子的策略。细胞因子通过三类别的跨膜受体与 HSC 相互作用: 1) 固有酪氨酸激酶活性的跨膜受体, 2) 与 gp130 亚单元相互作用的跨膜受体, 和 3) 与 Janus 激酶 (JAK) 相互作用的跨膜受体。这些年来,利用表型和功能性检测方法已经鉴定了许多对原始造血细胞具有显著刺激作用的细胞因子。这些包括 flk2/flt3 配体 (FL)、干细胞因子 (SCF)、白细胞介素 (IL)-6、IL-6/ 可溶性 IL-6- 受体 (SIL-6R)、IL-11、血小板生成素 (TPO)、IL-3、IL-1、IL-12、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 和粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 90-0。无基质的添加细胞因子的培养物 (其中含有 IL-1、IL-3、IL-6、G-CSF、GM-CSF 和 SCF) 的首次报道使用支持集落形成单元 - 粒细胞 - 巨噬细胞 (CFU-GM) 祖

细胞的显著扩增 (66 倍)。

[0057] 实施例中给出了示范性的 HSC 生长条件,但是根据本发明,通常首先获得含有一个亚组 HSC 的细胞样品,然后再培养。培养的细胞然后维持一段适于允许发生增殖的时期,其中可能包括更换培养基以除去可溶性生长因子,之后将 HSC 与其他分化细胞中分离开。之后如所述再次允许 HSC 增殖。如果需要的话,可以再次分离分化的细胞。培养阶段末期,扩增的 HSC 可在添加甘油、DMSO 或适宜的冷冻保存剂后冷冻保存,或直接用于治疗方法中。重要的是要注意,上述步骤可在组装或分离的完整生物工艺装置中完成,其中细胞培养独立于细胞分离进行。

[0058] HSC 的临床用途包括例如血液癌症的治疗、贫血治疗、遗传性血液疾病的治疗、在癌症治疗中高剂量照射和化疗后补充血液细胞、癌症的移植物抗肿瘤治疗、自体免疫失调的治疗和基因疗法中。

[0059] 对于血液癌症、包括淋巴母细胞白血病、急性粒细胞白血病、慢性髓性白血病 (CML)、何杰金氏病、多发性骨髓瘤以及非何杰金氏淋巴瘤和 B- 细胞淋巴瘤的治疗性用途,患者自身的癌性造血细胞首先被高剂量照射和化疗毁坏。患者提供可移植的 HSC 来源,其根据本发明的方法得到分离和扩增。未分化细胞的移植提供长期的受体血液重建。可接受 HSC 治疗的非癌性血液疾病包括再生障碍性或其他类型的贫血。未分化细胞的移植提供长期的受体血液重建。利用 UCB,多项研究已经证实:细胞剂量是干细胞移植方案中患者存活的决定性因素。

[0060] 本发明现通过以下实施例作更具体的描述,这些实施例仅为给出示例,而非限制性的具体实施方式,本发明的保护范围应当仅由权利要求书确定。

实施例

[0061] 实施例 1

[0062] X(人骨髓胞外基质提取物)对培养 7 天后的 3M CB MNC 在 NOD-SCID 小鼠中的植入效果

[0063] 由 5 只小鼠组成的对照组用 Busilvex 处理,但是不接受任何 CBMNC 的 IV 注射。两个各由 5 只小鼠组成的组各接受在有或无 X 的条件下培养了 7 天的 3M CB MNC。移植物植入 % 从无 X 组小鼠中的 3% 提高到有 X 小鼠组中的超过 10%。如附图 1 所示,两组小鼠间的差异达到了统计学上的显著性 ($P < 0.05$)。人白细胞 (CD45)、B 淋巴细胞 (CD19) 和骨髓细胞 (CD33) 标记也显示了移植物植入增加。

[0064] 实施例 2

[0065] X(人骨髓胞外基质提取物)对培养 7 天后的 CB MNC 在 NOG 小鼠中的植入的效果

[0066] 由 4 只小鼠组成的对照组用 Busilvex 处理,但是不接受任何 CBMNC 的 IV 注射。两个各由 4 只小鼠组成的组各接受在有或无 X 的条件下培养了 7 天的 1.5M CB MNC。移植物植入 % 从无 X 组小鼠中的 5% 提高到有 X 小鼠组的超过 20%。如附图 2 所示,两组小鼠间的差异达到了统计学上的显著性 ($P < 0.05$)。使用基于负二项式分布的线性模型在两个组间产生了甚至更高统计学显著的差异。人白细胞 (CD45)、B 淋巴细胞 (CD19) 和骨髓细胞 (CD33) 标记也显示了移植物植入增加。

[0067] 实施例 3

[0068] 3 周后评估处理 7 天的 4M CB MNCs+/-X(人骨髓胞外基质提取物)对 NOG 小鼠的植入

[0069] 由 3 只小鼠组成的对照组用 Busilvex 处理 (ablated), 但是不接受任何 CB MNC 的 IV 注射。两个各由 3 只小鼠组成的组各接受在有或无 X 的条件下培养了 7 天的 4M CB MNC。三周而非六周后评估移植物植入%, 以评估未成熟幼红细胞和红细胞的分化。如附图 3 所示, 移植物植入%从无 X 组小鼠中的 5%提高到有 X 小鼠组的超过 18%。移植物植入的提高主要是由于不成熟幼红细胞 (CD45-CD36+, 深灰色) 数量的增加所致。

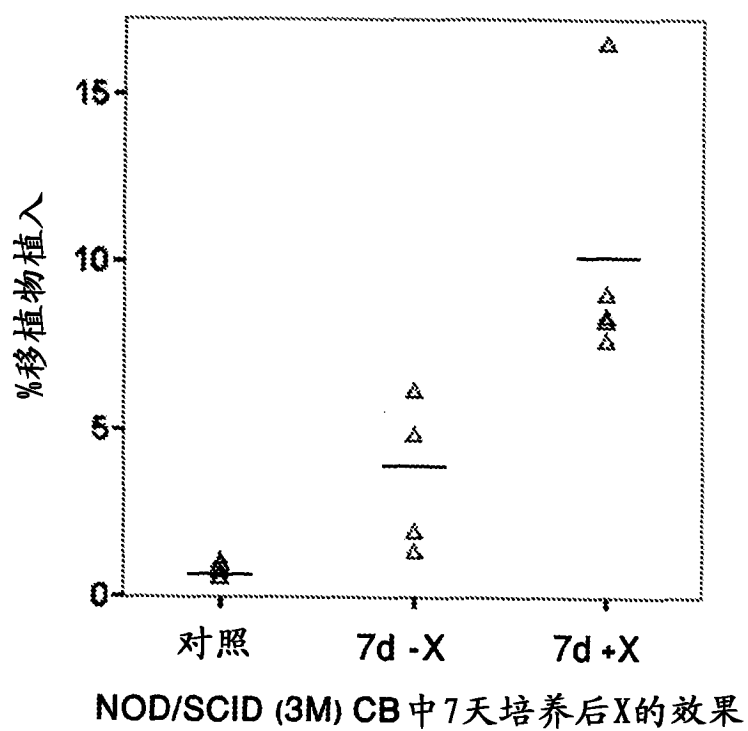


图 1

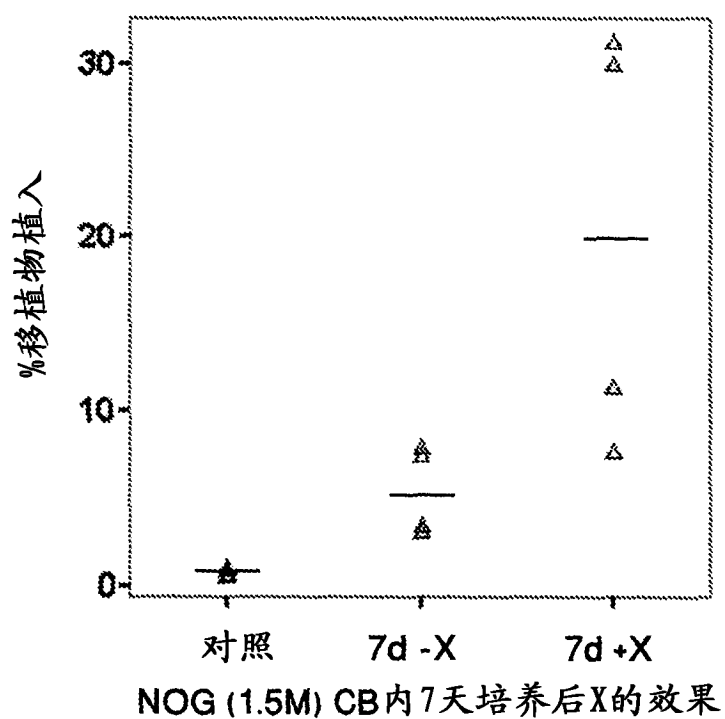


图 2

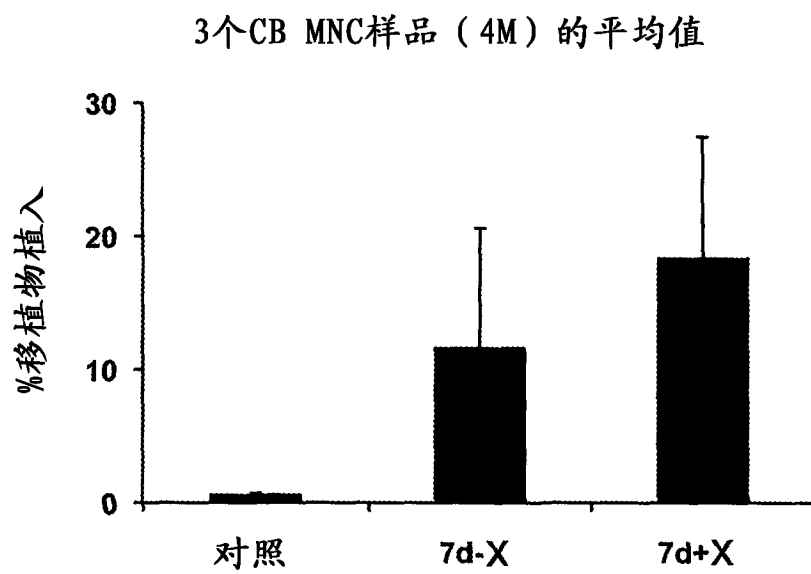


图 3