(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119097642 A
(43)申请公布日 2024.12.10

(21)申请号 202411079982.8

(22)申请日 2018.02.20

(30)优先权数据
62/460,267 2017.02.17 US
62/574,119 2017.10.18 US

(62)分案原申请数据
201880025487.5 2018.02.20

(71)申请人 匹兹堡大学联邦系统高等教育
地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 E·拉加西

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
专利代理师 陶家蓉 钱文宇

(51)Int.Cl.
A61K 35/26(2015.01)
A61K 35/407(2015.01)
A61K 35/22(2015.01)
A61P 1/16(2006.01)
A61P 13/12(2006.01)

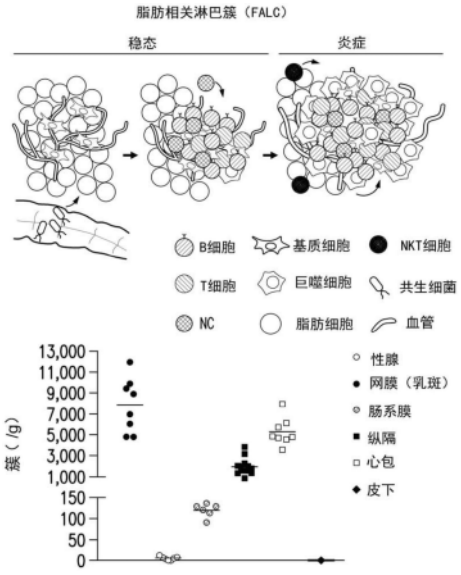
权利要求书1页 说明书25页 附图39页

(54)发明名称

脂肪相关淋巴簇作为多种组织的移植、组织再生、器官发生和功能的位点

(57)摘要

本公开涉及脂肪相关淋巴簇(“FALC”或“乳斑”)中细胞的植入或增殖,其可以用于生成功能性异位组织。本公开还提供了用于通过激活淋巴毒素β受体(LTβR)和/或NF-κB诱导激酶(NIK)信号转导途径在FALC中移植细胞和使细胞增殖的方法和组合物。本公开还提供了在FALC(乳斑)中建立异位肝脏组织并将这类异位肝脏组织用于获得治疗益处的方法和组合物,并且提供了在FALC中生成异位肾组织的方法和组合物,其可以用于在对象中获得治疗益处。



CN 119097642 A

1.一种在对象中生成异位组织的方法,该方法包括将一种细胞或组织片段导入所述对象的脂肪相关淋巴簇,从而促进脂肪相关淋巴簇中异位组织的形成。

2.如权利要求1所述的方法,其中,所述细胞或组织片段包含肝细胞,且所述异位组织是异位肝脏组织。

3.如权利要求1所述的方法,其中所述对象肝功能下降。

4.如权利要求1所述的方法,其中所述对象具有Crigler-Najjar综合征I型,急性肝脏功能衰竭,肝硬化,血色素沉着症,高草酸尿症,草酸病,Wilson病,α-1抗胰蛋白酶缺乏症,肝癌,肝炎,酒精肝炎,自身免疫肝炎,脂肪肝疾病和非酒精性脂肪肝疾病。

5.如权利要求1所述的方法,其中所述细胞或组织片段包含肾脏细胞,且所述异位组织是异位肾脏组织。

6.如权利要求1所述的方法,其中所述细胞或组织片段包括分离自胚肾、后肾的细胞,分离自体外形成的肾脏类器官的细胞或其任何组合。

7.如权利要求1所述的方法,其中对象是人。

8.如权利要求1所述的方法,其中脂肪相关淋巴簇位于对象的胸膜腔中。

9.如权利要求1所述的方法,其中细胞或组织片段是对象同种异体的。

10.如权利要求1所述的方法,其中细胞或组织片段是对象自体同源的。

11.如权利要求1所述的方法,其中脂肪相关淋巴簇位于对象的心包腔中。

12.如权利要求1所述的方法,其中脂肪相关淋巴簇位于对象的腹膜腔中。

13.如权利要求1所述的方法,其中脂肪相关淋巴簇位于对象的网膜、肠系膜、脾脏、肝门和/或性腺脂肪中。

14.如权利要求1所述的方法,其中脂肪相关淋巴簇位于对象的网膜中。

15.权利要求1所述的方法,其中细胞或组织片段通过腹腔注射给予对象。

16.权利要求1所述的方法,其中细胞或组织片段局部给予对象。

17.权利要求1所述的方法,其中该方法能够将对象的生存期延长至少20%。

18.一种在受试者体内生成异位组织的方法,该方法包括将细胞引入对象的淋巴结,并向对象给予促进异位组织形成的试剂。

脂肪相关淋巴簇作为多种组织的移植、组织再生、器官发生和功能的位点

[0001] 优先权信息

[0002] 本申请要求2017年2月17日提交的美国临时专利申请序列号62/460,267和2017年10月18日提交的美国临时专利申请序列号62/574,119的优先权,其各自内容通过引用其全文纳入本文并要求其各自的优先权。

[0003] 资助信息

[0004] 无。

[0005] 引言

[0006] 本公开涉及脂肪相关淋巴簇(Fat-Associated Lymphoid Cluster)("FALC",也称之为"乳斑(milky spot)")中器官细胞的植入和增殖以生成可以用于补充或替代对象中器官功能的异位组织。

背景技术

[0007] 对于患有肝病的患者缺乏有效的治疗。肝脏疾病导致每年美国超过31,000人死亡。原位肝移植(OLT)基本是最后的手段,并且目前是严重疾病的唯一治疗方法(1、2)。此外,虽然据估计有100,000名患者需要新的肝脏,但每年只有6,000多名患者接受肝移植手术。可用供体短缺是受终末期肝脏疾病影响的患者所面临的主要挑战之一。患有合并症和高龄的患者要么不被认为是OLT的候选者,要么预计移植后存活率低(3-5)。另外,移植操作在花费以健康护理资源方面都是高成本的。由于这些原因,已有人提出在患者等待可用的器官时将基于细胞的移植作为OLT的治疗替代方案或桥梁(6)。

[0008] 迄今为止,已经证明肝细胞移植在动物模型中的功能效用。从转基因尿激酶(7-9)到诱导型酪氨酸血症(tyrosinemic)小鼠(10-15),肝细胞移植已经成功地建立了其完全再生肝脏的治疗潜力。尽管存在这些令人鼓舞的结果,但是人肝细胞移植仍处于临床探索的实验阶段(6、16),以寄希望于能将动物研究的积极结果转化为用于人类疾病的治疗应用。

[0009] 然而,对于患有晚期肝病的患者,还存在其它的挑战:大多数设想的细胞疗法针对患病肝脏本身中的细胞植入。通常通过脾脏(例如,通过人患者的脾动脉或通过啮齿类动物中的脾实质)或通过门静脉注射移植的肝细胞。肝细胞主动或被动地快速迁移至患病肝脏,其中预期将出现通过移植肝细胞的肝再生。由于存在肝硬化和纤维化(17)(患病肝脏中的常见病理特征),这种方法限制并且可能排除了绝大多数患有严重肝病的患者的细胞疗法的功效。因此,这些患者(最需要治疗的患者)的天然肝脏再生是一项重大挑战。

[0010] 因此,患有晚期肝病的患者需要新的疗法。已经开发的一种选项是工程改造辅助肝(18-20)。通常,这由植入异位或原位放置的健康肝脏移植物,同时保留全部或部分原始天然肝脏完整构成。该方法不仅有可能避免特定类型患者的OLT,而且还包括自发再生天然肝脏和最终回避免疫抑制药物的可能性(21-24)。尽管在早期试验(18-20、25-27)中出现了问题,但是报道了最近有利的结果,其在急性肝功能衰竭(25)、代谢紊乱(28-31)甚至肝硬化的情况下是令人鼓舞的(26、27)。迄今为止,还没有了解保持肝细胞和辅助肝脏长期稳定

和活力所必需的细胞和分子机制。

[0011] 许多研究人员已经在多种肝外位点移植肝细胞(34-40)。大多数肝外位点的肝细胞植入与多变的结果相关。先前已经证明,移植到淋巴结中的肝细胞产生能够在小鼠中产生能够长期(超过6个月)恢复肝功能的功能性辅助肝(参见,例如,美国专利号9,125,891)。这些结果为通过使用淋巴位点作为体内生物反应器进行组织或器官替代物生长的组织再生的新范例奠定了基础(32-36)。

[0012] 除了肝病,肾病在人群中普遍存在并且在美国每年导致超过47,000人死亡。用于治疗肾病的已知治疗方法包括休息,饮食改变,药物疗法,血液透析疗法和肾移植,并且取决于疾病的严重程度。达到肾衰竭时,需要透析治疗如血液透析或腹膜透析或肾移植。虽然血液透析疗法可以消除体内累积的废物,但受损肾脏的功能无法恢复。在肾衰竭的情况中,除非患者接受肾移植,否则患者必须在其一生中持续进行透析治疗。然而,存在与肾移植相关的许多困难,包括供体短缺,组织相容性困难和避免排斥反应。因此,需要用于低肾功能患者的新疗法。

[0013] 淋巴结和脂肪相关淋巴簇(“FALC”,在本文中也称为“乳斑”)是淋巴系统的次级淋巴器官,并且是良好脉管化的。FALC出现在许多解剖位置,包括网膜(参见图1)。它们在免疫系统中起重要作用,允许在各种条件下诸如细菌或病毒感染期间大量扩增白细胞。有趣的是,淋巴结和乳斑在癌症中也具有临床意义,因为它们是早期转移事件(即肿瘤侵袭和初始转移性生长)的部位。通常利用淋巴结中的肿瘤转移进行癌症的分期和预后。

发明概述

[0015] 本公开涉及脂肪相关淋巴簇(“FALC”或“乳斑”)中细胞的植入和增殖,其可以用于生成功能性异位组织,用于移植到宿主对象中。这是(至少部分)基于这样的发现,即腹膜内移植到肝功能不全的小鼠体内的肝细胞会在网膜的FALC(乳斑)以及肠系膜、脾脏、肝门(portal)和/或性腺脂肪的FALC中定位和增殖,以产生能够有利地增强小鼠中肝脏功能的异位肝脏组织。这还(部分)基于这样的发现,即胎肾细胞在网膜FALC中增殖以产生异位肾脏组织。这进一步(部分)基于这样的发现,即基质细胞中的LTβR信号转导促进移植的细胞的成功血管形成/血管新生。

[0016] 在某些实施方式中,本公开提供了用于在网膜的FALC(乳斑)以及肠系膜、脾脏、肝门和/或性腺脂肪的FALC中建立异位肝脏组织并将这类异位肝脏组织用于获得治疗益处的方法和组合物。在某些实施方式中,本公开还提供了在FALC中生成异位肾脏组织的方法和组合物,其可以用于在对象中获得治疗益处。

[0017] 在某些实施方式中,本公开还提供了用于通过激活淋巴毒素β受体(LTβR)和/或NF-κB诱导激酶(NIK)信号转导途径在FALC或淋巴结中移植细胞(例如,肝细胞或肾脏细胞)并使所述细胞增殖的方法和组合物。

[0018] 本公开提供了用于在对象中发育异位组织的方法。在某些实施方式中,该方法包括将一种或多种细胞导入对象的脂肪相关淋巴簇或淋巴结并提供促进所述一种或多种细胞增殖和/或血管形成的一种或多种试剂以形成异位组织。在某些实施方式中,一种或多种细胞是肝细胞,而异位组织是异位肝脏组织。在某些实施方式中,一种或多种细胞是肾脏细胞和/或肾脏组织片段,而异位组织是异位肾脏组织。在某些实施方式中,脂肪相关淋巴簇

位于胸膜和/或心包和/或腹膜腔的脂肪组织。在腹膜腔中,FALC可以位于对象的网膜和/或肠系膜和/或脾脏和/或肝门和/或性腺脂肪。

[0019] 在某些实施方式中,促进异位组织形成的试剂包含一种或多种骨髓源性细胞和/或基质细胞。在某些实施方式中,一种或多种试剂包含基质细胞,例如,成纤维细胞。在某些实施方式中,基质细胞表达平足蛋白、NIK和/或LTβR中的一种或多种。在某些实施方式中,基质细胞用LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂处理。

[0020] 在某些实施方式中,促进异位组织形成的试剂包含LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂,例如,LTβR和/或NIK的激活剂。在某些实施方式中,促进异位组织形成的试剂包含非经典NF-κB信号转导途径的激活剂。在某些实施方式中,LTβR和/或NIK的激活和/或非经典NF-κB信号转导途径的活化促进一种或多种细胞的增殖和/或血管形成以形成异位组织。

[0021] 在某些实施方式中,促进异位组织形成的试剂包含促进炎症的试剂。在某些实施方式中,在将一种或多种细胞导入对象的脂肪相关淋巴簇或淋巴结之前诱导炎症。

[0022] 本公开进一步提供了治疗需要增强肝脏功能的对象的方法。在某些实施方式中,该方法包括向对象给予治疗有效量的肝细胞,并促进对象的脂肪相关淋巴簇或淋巴结中肝细胞的增殖以形成异位肝脏组织。在某些实施方式中,脂肪相关淋巴簇中异位肝脏组织的形成通过向脂肪相关淋巴簇的解剖区域局部给予肝细胞来促进。在某些实施方式中,脂肪相关淋巴簇位于网膜和/或肠系膜和/或脾脏和/或肝门和/或性腺脂肪。

[0023] 在某些实施方式中,脂肪相关淋巴簇或淋巴结中异位肝脏组织的形成通过共同给予一种或多种骨髓源性细胞或基质细胞来促进。例如但不限于,共同给予基质细胞。在某些实施方式中,基质细胞是成纤维细胞。在某些实施方式中,基质细胞表达平足蛋白、NIK和/或LTβR中的一种或多种。

[0024] 在某些实施方式中,脂肪相关淋巴簇或淋巴结中异位肝脏组织的形成通过共同给予LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂来促进。在某些实施方式中,脂肪相关淋巴簇或淋巴结中异位肝脏组织的形成通过共同给予非经典NF-κB信号转导途径的激活剂来促进。

[0025] 在某些实施方式中,脂肪相关淋巴簇或淋巴结中异位肝脏组织的形成通过诱导对象中的炎症来促进。在某些实施方式中,通过向对象给予促进炎症的试剂来诱导炎症。在某些实施方式中,在将一种或多种细胞导入对象的脂肪相关淋巴簇或淋巴结之前诱导炎症。

[0026] 本公开进一步提供了用于生成异位肝脏的方法,其中该方法包括将一种或多种肝细胞导入脂肪相关淋巴簇或淋巴结,并提供促进异位肝脏组织形成的至少一种试剂。在某些实施方式中,该方法在体内或在体外实施。在某些实施方式中,促进异位肝脏组织形成的试剂包含一种或多种骨髓源性细胞和/或基质细胞。在某些实施方式中,基质细胞是成纤维细胞。在某些实施方式中,基质细胞表达平足蛋白、NIK和/或LTβR中的一种或多种。在某些实施方式中,基质细胞用LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂处理。在某些实施方式中,促进异位组织形成的试剂包含LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂。在某些实施方式中,促进异位组织形成的试剂包含促进炎症的试剂。

[0027] 在某些实施方式中,用于在对象中生成异位肝脏组织的方法包括将包含一种或多种肝细胞和一种或多种基质细胞的细胞导入对象的脂肪相关淋巴簇或淋巴结,并提供LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂,其中一种或多种基质细胞中LTβR和/或NIK信号转导途径的激活促进一种或多种肝细胞的增殖和/或血管形成以形成异位肝脏细胞。

[0028] 在某些实施方式中,用于在对象中生成异位肝脏组织的方法包括将包含一种或多种肝细胞和一种或多种基质细胞的细胞导入对象的脂肪相关淋巴簇或淋巴结,并提供LTβR和/或NIK的激活剂,其中一种或多种基质细胞中LTβR和/或NIK的激活促进一种或多种肝细胞的增殖和/或血管形成以形成异位肝脏细胞。在某些实施方式中,肾脏细胞包含分离自胚肾、后肾(metanephroi)的细胞,分离自体外形成的肾脏类器官(organoid)的细胞或其任何组合。

[0029] 本公开进一步提供了治疗需要肾脏功能增强的对象的方法。在某些实施方式中,该方法包括向对象给予治疗有效量的肾脏细胞(或肾脏组织片段),并促进对象的脂肪相关淋巴簇或淋巴结中肾脏细胞的增殖以形成异位肾脏组织。在某些实施方式中,脂肪相关淋巴簇中异位肾脏组织的形成通过向脂肪相关淋巴簇的解剖区域局部给予肝细胞来促进。在某些实施方式中,脂肪相关淋巴簇位于网膜和/或肠系膜和/或脾脏和/或肝门和/或性腺脂肪。

[0030] 在某些实施方式中,脂肪相关淋巴簇或淋巴结中异位肾脏组织的形成通过共同给予一种或多种骨髓源性细胞或基质细胞来促进。例如但不限于,共同给予基质细胞。在某些实施方式中,基质细胞是成纤维细胞。在某些实施方式中,基质细胞表达平足蛋白、NIK和/或LTβR中的一种或多种。

[0031] 在某些实施方式中,脂肪相关淋巴簇或淋巴结中异位肾脏组织的形成通过共同给予LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂来促进。在某些实施方式中,脂肪相关淋巴簇或淋巴结中异位肾脏组织的形成通过共同给予非经典NF-κB信号转导途径的激活剂来促进。

[0032] 在某些实施方式中,脂肪相关淋巴簇或淋巴结中异位肾脏组织的形成通过诱导对象中的炎症来促进。在某些实施方式中,通过向对象给予促进炎症的试剂来诱导炎症。在某些实施方式中,在将一种或多种细胞肾脏细胞导入对象的脂肪相关淋巴簇或淋巴结之前诱导炎症。

[0033] 本公开进一步提供了用于生成异位肾脏的方法,其中该方法包括将一种或多种肾脏细胞(或一种或多种肾脏组织片段)导入脂肪相关淋巴簇或淋巴结,并提供促进异位肾脏组织形成的至少一种试剂。在某些实施方式中,该方法在体内或在体外实施。在某些实施方式中,促进异位肾脏组织形成的试剂包含一种或多种骨髓源性细胞和/或基质细胞。在某些实施方式中,基质细胞是成纤维细胞。在某些实施方式中,基质细胞表达平足蛋白、NIK和/或LTβR中的一种或多种。在某些实施方式中,基质细胞用LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂处理。在某些实施方式中,促进异位肾脏组织形成的试剂包含LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂。在某些实施方式中,促进肾脏异位组织形成的试剂包含促进炎症的试剂。

[0034] 在某些实施方式中,用于在对象中生成异位肾脏组织的方法包括将包含一种或多种肾脏细胞和一种或多种基质细胞的细胞导入对象的脂肪相关淋巴簇或淋巴结,并提供LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂,其中一种或多种基质细胞中LTβR和/或NIK信号转导途径的激活促进一种或多种肾脏细胞的增殖和/或血管形成以形成异位肾脏细胞。

[0035] 在某些实施方式中,用于在对象中生成异位肾脏组织的方法包括将包含一种或多种肾脏细胞和一种或多种基质细胞的细胞导入对象的脂肪相关淋巴簇或淋巴结,并提供LTβR和/或NIK的激活剂,其中一种或多种基质细胞中LTβR和/或NIK的激活促进一种或多种肾脏细胞的增殖和/或血管形成以形成异位肝脏细胞。

[0036] 本公开进一步包括用于生成异位组织的组合物。在某些实施方式中,组合物包含多个细胞以及促进异位组织形成的一种或多种试剂。在某些实施方式中,用于生成异位肝脏组织的组合物包含多个肝细胞以及促进异位肝脏形成的一种或多种试剂。在某些实施方式中,用于生成异位肾脏组织的组合物包含多个肾脏细胞以及促进异位肾脏形成的一种或多种试剂。

[0037] 在某些实施方式中,本公开主题的组合物中包括一种或多种试剂,所述一种或多种试剂包含多个骨髓源性细胞和/或多个基质细胞。在某些实施方式中,基质细胞表达平足蛋白、NIK和/或LTβR中的一种或多种。在某些实施方式中,一种或多种试剂是LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂。在某些实施方式中,一种或多种试剂是促进炎症的试剂。在某些实施方式中,一种或多种试剂包含下述两种或更多种:(a)多个骨髓源性细胞和/或多个基质细胞;(b)LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂;和(c)促进炎症的试剂。在某些实施方式中,组合物进一步包含合成的培养基。

[0038] 在某些实施方式中,治疗需要增强肝脏功能的对象的方法包括向对象给予治疗有效量的肝细胞,并提供促进对象淋巴结中异位肝脏组织形成的一种或多种试剂,其中所述一种或多种试剂包含下述两种或更多种:(a)多个骨髓源性细胞,多个基质细胞或其组合;(b)LTβR信号转导途径的激活剂,NIK信号转导途径的激活剂或其组合;或(c)促进炎症的试剂。

[0039] 在某些实施方式中,本公开进一步提供了治疗需要增强肾脏功能的对象的方法,该方法包括向对象给予治疗有效量的肾脏细胞、肾脏组织片段或其组合,并提供促进对象淋巴结中异位肾脏组织形成的一种或多种试剂,其中所述一种或多种试剂包含下述两种或更多种:(a)多个骨髓源性细胞,多个基质细胞或其组合;(b)LTβR信号转导途径的激活剂,NIK信号转导途径的激活剂或其组合;或(c)促进炎症的试剂。

[0040] 本公开进一步提供了包含本文公开的一种或多种组合物的试剂盒。

附图简要说明

[0042] 图1:脂肪相关淋巴簇;示意图(上分图)和分布(下分图)。

[0043] 图2A-D:次级淋巴组织中异位肝脏的生成。(A)IP移植肝细胞后12周,$Fah^{-/-}$小鼠的宏观图像。黄色圆圈强调了淋巴组织中生成的多个异位肝结节(乳斑和淋巴结(LN))。(B)门静脉分流术,部分肝切除术和肝细胞移植后2个月的肠系膜猪淋巴结。左图,OCT区块以及来自该区块经针对肝细胞的CK18和针对高内皮细胞的PNAd染色的冷冻切片。51.5%的LN质量被鉴定为CK18+肝细胞。右图,经CK18(肝细胞)和ER-TR7(成纤维细胞)染色的对照肝脏和异位肝脏的冷冻切片。H&E显示了猪异位肝中存在的正常微血管生成(C)顶图,显示覆盖胃(S)和肠(I)、邻近肝脏(L)并位于胰腺(未示出)上的较大网膜(O)的小鼠腹膜空间的宏观视图。中图,解剖显微镜下的小鼠网膜,显示大量的血管。下图,显示供给乳斑的血管树的网膜示意图。(D)IP移植GFP+肝细胞。肝细胞植入后12周Fah-/-小鼠乳斑中生成异位结节。

[0044] 图3:IP移植肝细胞后3-4周后的$Fah^{-/-}$小鼠;毛细管间隙的扩张和乳斑中血管的萌生。

[0045] 图4:小鼠中的网膜乳斑。

[0046] 图5:网膜乳斑中移植肝细胞的植入。肝细胞经GFP标记并以绿色荧光的明亮区存

在。ER-TR7是存在于淋巴组织胞外基质的抗原,该成像中为荧光蓝色(通过箭头指示)。

[0047] 图6:FRGN(Fah$^{-/-}$Rag2/γc$^{-/-}$Nod)小鼠中缺少网膜乳斑。免疫荧光染色野生型(左)和FRGN网膜,乳斑("MS")标记的。

[0048] 图7:FRGN小鼠网膜中肝细胞的植入。

[0049] 图8:在12周期间并未在FRGN小鼠中观测到网膜中植入的肝细胞生长。

[0050] 图9:通过骨髓移植恢复FRGN小鼠网膜中的乳斑。

[0051] 图10:通过骨髓移植恢复FRGN小鼠网膜中的乳斑。右图中的指示箭头显示乳斑中植入的肝细胞。

[0052] 图11:骨髓移植后FRGN小鼠中的异位肝脏形成。

[0053] 图12:骨髓移植后FRGN小鼠中的异位肝脏形成。左图显示了在没有骨髓移植-肝细胞聚集情况下的结果,但是并未看到异位肝脏形成。右图显示了以骨髓移植的结果,生成异位肝脏。

[0054] 图13:基质细胞/淋巴组织诱导物相互作用(左)和NIK信号途径(右)。

[0055] 图14:通过腹膜内(IP)相对脾脏(SP)注射NIK缺陷型(aly/aly)和对照Fah$^{-/-}$小鼠测试NIK功能对挽救肝脏功能的影响的研究的示意图。通过脾脏(SP)注射(左)或IP注射(右)移植了10^6个肝细胞的Fah-/-小鼠和aly/aly Fah-/-小鼠的卡普兰迈耶(Kaplan Meier)生存曲线。

[0056] 图15:NIK功能是通过IP注射挽救Fah$^{-/-}$小鼠所需的。将10^6个GFP+肝细胞通过IP注射分别接种到Fah$^{-/-}$小鼠中和淋巴组织发育不全(alymphoplasia)Fah$^{-/-}$小鼠(aly/aly Fah$^{-/-}$)中。在各个时间点对网膜乳斑进行整装(Whole-mount)成像。显示的是与供体肝细胞的荧光(绿色)合并的亮场图像。顶图,Fah$^{-/-}$小鼠;底图,aly/aly Fah$^{-/-}$小鼠。

[0057] 图16:IP肝细胞移植后观测的结果的示意图。

[0058] 图17A-D:(A)成纤维网状细胞("FRC")、淋巴内皮细胞(LEC)和脑内皮细胞(BEC)中平足蛋白(PDPLN)和CD31的分布,以及对于淋巴结中的这些标志物进行的流式细胞术分析,与乳斑中的情况做比较。(B)在乳斑中,肝细胞自身建立于ER-TR7基质细胞附近。(C)分离的基质细胞,移植的IP,将迁移回网膜乳斑。(D)具有移植的肝细胞的乳斑。

[0059] 图18:免疫荧光研究证明,肝细胞是淋巴毒素α和β阳性,而基质细胞是NIK和淋巴毒素β受体阳性。

[0060] 图19:2、4和6周后将野生型GFP+(绿色荧光蛋白)肝细胞腹膜内移植到Fah$^{-/-}$或Fah/LTbR$^{-/-}$小鼠中。该图片显示了这些动物的网膜中的植入。

[0061] 图20A-G:(A)顶图,从左到右的图像是人胎肾,空肠LN(肾脏片段移植后),和LN(移植后3周)。中间左侧,石蜡包埋的供体人胎肾的H&E染色切片。中间右侧,肾脏移植后3周的LN的苏木精染色冷冻切片。橘黄色虚线围绕的区域指示非植入的LN的区域。底图,这些插图显示了非成熟的(左侧)或成熟的(右侧)肾小球。(B)针对NCAM、WT-1、PDPLN、α-SMA、Megalin、AQ1、LTL、NKCC2、BRN1/DBA、LTL/DBA、K8/AQ2或EPO的3周移植物切片的代表性免疫荧光染色。(C)8周移植物的代表性3D重建。左侧,LN内植入的肾小球及小管的图像。右侧,仅肾小球及小管的图像。(D)具有移植物的11周龄小鼠的10,000kDa MW德克萨斯红葡聚糖累积。(E)小鼠和人CD31的1、3和8周移植物切片的代表性荧光免疫染色。(F)左侧,移植前针对小鼠NP类器官中NCAM、SIX2、WT-1或E-CADH的代表性免疫荧光染色。右侧,针对PDPLN/CD31、

PDPLN/CD105或PDPLN/Ly-76的代表性免疫荧光染色显示了NP类器官移植后8周LN中血管形成的肾小球样结构。(G)左侧,针对DBA/BRN1和E-CADH/LTL的iPSC源性肾脏类器官的代表性整装免疫荧光成像。底图,显示了类器官移植到LN中后6周,LTL/Megalin反应性近端样小管(proximal-like tubule)附近的两种不同肾单位样结构的系列切片,其各自包括肾小球样结构,所述肾小球样结构包含推定足细胞(PDPLN、SYNPO、PODXL)、系肾小球系膜细胞(CIV)和内皮细胞(CD31)。使用赫斯特(Hoechst)(蓝色)复染细胞核。

[0062] 图21:经典和非经典NF-κB信号转导途径的示意图。

[0063] 图22A-G:(A)左侧,实验方案的示意图。小鼠在接受移植胚胎GFP+肾脏片段到其LN(第1天)之前的2天IP注射100μg LTβR-Fc或对照Ig。在第8天和第15天再次处理小鼠。在第22天收集LN。右侧,分离自处理的或未处理的小鼠的带肾脏整装(whole mount)LN。(B)如A中所述的肾脏移植物的系列切片针对PDPLN、LTL、CD31、CD105、Ly-76的代表性免疫荧光染色。(C)LN或网膜基质细胞群(CD45-)中成纤维网状细胞(FRC)、淋巴内皮细胞(LEC)和血液内皮细胞(BEC)的流式细胞术概况。(D)针对网膜基质细胞的PDPLN和LTβR的代表性免疫荧光染色。(E)来自移植胚GFP+肾脏后的野生型和/或LTβR-/-小鼠的整装带肾网膜,移植后6周(左侧为合并的荧光/明场图像,而右侧为解剖范围图像)。相较于成体小鼠肾脏,显示新肾(Neo-kidney)。(F)如E中所述网膜内(intraomental)肾脏移植物的系列切片针对CD31、CD105和Ly-76的代表性免疫荧光染色。(G)针对胚GFP+(左侧和中间)或野生型(右侧)肾脏LN移植物的切片上ERTR-7、LTα、LTβ、LTβR、NIK、NIK/CD34的代表性免疫荧光染色。使用赫斯特(蓝色)复染细胞核。

[0064] 图23:腹膜炎症诱导网膜中剧烈的变化。顶图:实验的示意图。在第0天腹膜内(IP)注射酵母聚糖。3天后,IP注射1百万肝细胞。肝细胞注射7天后,收集样品。下左图:来自酵母聚糖诱导的和对照动物的网膜的宏观图。下右图:当与对照相比,酵母聚糖诱导的炎症后,网膜的重量显著增加。

[0065] 图24:FALC和肝生长。GFP+肝细胞移植后一周,酵母聚糖或PBS注射后,C57bl/6小鼠的网膜和肠系膜脂肪。酵母聚糖炎症诱导了允许GFP+肝细胞植入显著增加的FALC数量和大小。网膜和肠系膜脂肪与荧光显微镜下鉴定的GFP+肝细胞比较。

[0066] 图25:腹膜炎症增加肝细胞移植后酪氨酸血症小鼠的存活。具有或不具有之前诱导的炎症的$Fah^{-/-}$C57bl/6小鼠经IP移植野生型肝细胞,然后进行两轮选择(脱NTBC)。不具有炎症的动物(左图)在第2选择后体重持续减少,动物H146和H148在移植后8周左右/时死亡。具有之前诱导的炎症的动物(右图)在第二选择期间体重增加,表明具有恢复功能性肝脏质量的对于肝脏疾病的拯救。

[0067] 图26:腹膜炎症增加含脂FALC中存在的肝脏质量。包含来自不具有(H146)和具有(H150)之前诱导的炎症的Fah-/-C57bl/6小鼠的肝脏组织的腹膜脂肪的宏观图。炎症支持FALC中异位肝脏生长。

发明详述

[0069] 为了清楚而非限制,本文所公开主体的详细描述分为以下小节:

[0070] (i)定义;

[0071] (ii)治疗方法;

[0072] a.肝脏疾病和病症的治疗;

[0073] b.肾脏疾病和病症的治疗;和

[0074] (iii)组合物。

[0075] 5.1定义

[0076] 除非另外定义,否则本申请中使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0077] 本文所用术语“约”或“大约”表示在本领域普遍技术人员确定的特定数值的可接受误差范围内,这将取决于该数值的测量或确定方式,即测量体系的极限。例如,“约”可按本领域实践表示在3个标准偏差之内或大于3个标准偏差。或者,“约”可表示给定值的多至20%,优选多至10%,更优选多至5%,和更优选直到多至1%的范围。或者,尤其对于生物系统或过程而言,该术语可表示某值的一定数量级内,优选5倍内,更优选2倍内。

[0078] 本文所用脂肪相关淋巴簇(“FALC”,在本文中也称为“乳斑”)是非淋巴结的淋巴系统的结构。FALC存在于许多解剖位置中,包括但不限于肠系膜,纵隔,心包和皮下组织(参见图1)。FALC位于胸膜、心包和腹膜腔的脂肪组织中。在腹膜腔中,FALC位于对象的网膜和肠系膜、或脾脏、肝门和性腺脂肪中。在某些非限制性实施方式中,用于异位组织生长例如肝脏或肾脏组织生长的FALC位于网膜中。在某些非限制性实施方式中,FALC位于纵膈或心包中。

[0079] 本文所用“淋巴结”或“LN”指任何淋巴结,例如但不限于,腹部淋巴结,腹腔淋巴结,腹主动脉旁淋巴结,脾门淋巴结,肝门淋巴结,胃淋巴结(左和右),胃网膜(胃大网膜)淋巴结(左和右),腹膜后淋巴结,幽门淋巴结(幽门上(suprapyloric),幽门下(subpyloric),幽门后(retropyloric)),胰腺淋巴结(上胰,下胰,脾线淋巴结),肝淋巴结(囊性,含孔Winslow孔),胰十二指肠淋巴结(上胰十二指肠,下胰十二指肠),上肠系膜淋巴结,回肠结肠淋巴结,盲肠前淋巴结,盲肠后淋巴结,阑尾淋巴结,结肠系膜淋巴结(结肠周围,左结肠动脉,中结肠动脉,右结肠动脉,肠系膜下淋巴结,乙状结肠,上直肠动脉),常见髂总淋巴结(内侧常见髂骨,中间常见髂骨,外侧常见髂骨,主动脉下常见髂骨,岬前常见髂骨节)和外髂骨淋巴结(内侧外髂骨,中间外髂骨,外侧外髂骨,内侧腔隙-股骨,中间腔隙-股骨,外侧腔隙-股骨,髂间外髂骨,闭孔肌-外髂骨闭孔),空肠,腘和腋窝淋巴结。

[0080] 器官的细胞可以包含一种或多种细胞类型。在某些实施方式中,细胞包含原始器官中存在的多种细胞类型,但是不一定需要包含器官中存在的所有细胞类型。一个非限制示例,用于根据本公开的植入(engraftment)的“肝脏细胞”包含肝细胞并且还可包含肝脏的祖细胞、胆道细胞、内皮细胞和干细胞中的一种或多种。另一非限制示例,用于根据本公开的植入的“肾脏细胞”包含肾实质细胞并且还可包含肾脏的祖细胞、肾小球细胞、内皮细胞和干细胞中的一种或多种。在某些实施方式中,在用于植入的导入之前将细胞解离。在某些实施方式中,在导入之前细胞包含在聚集物中。在某些实施方式中,细胞包含体外扩增的类器官。在某些实施方式中,细胞包含iPS或体外扩增的其它干细胞。在某些实施方式中,细胞包含获自完整器官的组织片段,但是所述片段组成不超过所述器官的约5%,或不超过约10%,或不超过约25%或不超过约50%。

[0081] 本文所用“激活剂”指激活(例如,增加、促进或增强)蛋白质或途径的活性、功能、表达和/或生成的化合物或分子(例如,小分子、肽、肽模拟物、天合化合物或抗体)。激活剂

可以是这样的任何化合物或分子,其促进指定蛋白质(分子,涉及指定分子或指定的相关分子的任何分子)如LTβR或NIK的任何活性,或者促进指定蛋白质(例如LTβR或NIK)与信号转导伴侣或结合伴侣相互作用。激活剂可以还包括通过截获上游信号转导分子间接调节指定蛋白质(例如LTβR或NIK)生物活性的分子。在某些实施方式中,激活剂可以包括通过增加生成和/或产生LTβR或NIK的酶的活性和/或功能促进、增加和/或增强指定蛋白质诸如LTβR或NIK生成和/或产生的分子。

[0082] 本文中所用的"治疗"(及其语法变化形式)指试图改变受治疗的个体的自然病程,并且可供预防或在临床病理学的病程中采用的临床介入。所需的治疗效果包括但不限于,预防疾病的发生或复发、缓减症状、减少疾病的任何直接或间接病理学结果、降低疾病进展速度、缓解或缓和疾病状态和减轻或改善预后。在某些实施方式中,"治疗"可以指降低并发症、症状和/或恶化的严重程度。例如但不限于,降低可以是例如相对于未接受治疗的类似对照对象,并发症、症状和/或恶化的严重程度降低10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%。在某些实施方式中,"治疗"还可表示相对于未接受治疗的预期存活期而言的存活期延长。

[0083] 本文所用的"治疗有效量"或"有效量"指能够实现下述一种或多种情况的量:减缓症状,降低疾病进展的速率,延长存活期,减缓或减轻疾病状态和/或改善预后。

[0084] "对象"或"个体"在本文中可互换使用,可以指人或非人对象。非人对象的非限制示例包括非人灵长类动物,狗,猫,马,小鼠,大鼠,仓鼠,兔,猪等。

[0085] 术语或短语"移植"、"细胞替换"或"植入"在本文中可互换使用,指代向靶组织例如FALC或包含FALC的组织导入细胞。

[0086] 本文所用"与……组合"可以表示一种或多种待植入的细胞或其组合物和试剂(例如,LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂)可以作为治疗方案或计划的部分给予对象。在某些实施方式中,组合使用并不要求一种或多种细胞和一种或多种试剂在给药前经物理合并或者在相同的时间范围内给药。例如但不限于,一种或多种待植入的细胞和一种或多种试剂可以同期给予接受治疗的对象,或者可以在同一时刻给药或以任意顺序或在不同时间点依序给药。在某些实施方式中,本公开的方法可以包括在给予一种或多种待植入的细胞例如肝细胞或肾脏细胞之前给予一种或多种试剂。

[0087] 5.2治疗方法

[0088] 在某些实施方式中,本公开涉及脂肪相关淋巴簇("FALC"或"乳斑")中细胞的移植或增殖以生成异位组织。

[0089] 本公开提供了在FALC中或周围生成异位组织的方法。在某些实施方式中,用于生成异位组织的方法可以包括将细胞例如肝细胞或肾脏细胞导入对象的FALC以形成异位组织,例如,异位肝脏组织或异位肾脏组织。在某些实施方式中,用于生成异位组织的方法可以包括在对象的淋巴结中导入细胞。在某些实施方式中,本公开的方法可以用于治疗可以受益于异位组织生成的医学状态和/或病症(例如,病理、疾病综合症)。例如但不限于,对象可以患有疾病或病症,诸如但不限于,肝病和/或衰竭或肾病和/或衰竭。

[0090] 在某些非限制性实施方式中,对象可以是人或非人。非人的非限制示例包括非人灵长类动物,狗,猫,马,小鼠,大鼠,仓鼠,兔,猪等。在某些实施方案中,所述对象是人。

[0091] 在某些实施方式中,待植入对象FALC的细胞可以是人细胞,非人细胞或两者。在一

些实施方式中,细胞是人细胞。在某些实施方式中,人细胞可以植入非人对象(例如小鼠)的FALC,或包含FALC的区域。

[0092] 用于移植的细胞可以获自正在经历移植的对象。在某些实施方式中,细胞可以获自除了在经历移植的对象以外的来源。在某些实施方式中,细胞可以获自新鲜或冷冻的细胞群。在某些实施方式中,细胞可以分离自组织并在移植前在各种培养条件下体外生长。在某些实施方式中,细胞可以获自胚胎、胎儿、儿童或成人组织。在某些实施方式中,细胞可以是祖细胞或前体细胞。在某些实施方式中,祖细胞或前体细胞可以分化成待转移的细胞类型。

[0093] 用于根据本公开使用的细胞可以通过本领域已知的任何方法制备。在某些实施方式中,细胞溶液,例如本文所公开的组合物,用于注射。用于所公开方法的组合物的非限制性示例示例下述于5.3节。在某些实施方式中,可以根据Li等J Tissue Culture Methods 14:139-146(1992)的方法制备细胞。简言之,分离包括胶原酶灌注仅有一个切口表面的限定尺寸(<50g)的样品。在某些实施方式中,可以使用特异性富集的细胞群,如美国专利号7,211,404中所公开的那些。

[0094] 可以通过本领域已知的任何方法给予对象细胞。在某些实施方式中,细胞可被注入,包括但不限于,腹膜内、静脉或动脉内注射或通过局部灌注注入。在某些实施方式中,可以手术移植细胞,例如,通过常规或内窥镜手术技术。在某些实施方式中,可以局部给予细胞。例如但不限于,可以将细胞导入包含FALC的解剖位置附近,诸如但不限于,性腺,网膜,肠系膜,纵隔膜,心包和皮下组织。在某些实施方式中,解剖区域是网膜。在某些实施方式中,例如,肝细胞或肾脏细胞(或肾脏组织的片段)可以导入网膜(此处驻留FALC)的附近,例如,通过靶向腹膜内注射或通过常规或内窥镜手术技术。在某些实施方式中,待移植的细胞可以最初在培养基中扩增,然后导入体内FALC或淋巴结。

[0095] 在某些实施方式中,细胞可以悬浮于任何合适的注射用缓冲液。这类缓冲液的非限制示例包括盐水、磷酸盐缓冲盐水、汉克斯盐(Hank's salt)和林格溶液(Ringer's solution)等。

[0096] 在某些实施方式中,用于在FALC或淋巴结中或附近生成异位组织的方法包括提供促进异位组织形成的试剂。例如但不限于,该方法可以包括给予待植入的一种或多种细胞和促进异位组织形成的一种或多种试剂的组合。在某些实施方式中,一种或多种试剂可以包含于含有待植入的一种或多种细胞的组合物中。或者和/或另外,植入一种或多种细胞之前、之后或同一时刻可以给予一种或多种试剂。在某些实施方式中,试剂促进一种或多种细胞的增殖和/或血管形成以形成异位组织。类似的方法可以用于在淋巴节中生成异位组织。

[0097] 在某些实施方式中,促进异位组织形成的试剂可以是与形成异位组织的细胞(例如,肾脏细胞或肝细胞)不同的细胞类型。在某些实施方式中,试剂包括一种多种骨髓源性细胞和/或基质。在某些实施方式中,试剂包括基质细胞,例如,成纤维细胞,成纤维细胞网状细胞(FRC),叶状树突细胞(FDC),淋巴内皮细胞(LEC),血液内皮细胞(BEC),α-7整合素周皮细胞(AIP)和双阴性细胞(DNC)。在某些实施方式中,成纤维细胞可以是人包皮成纤维细胞,人胚胎成纤维细胞,小鼠胚胎成纤维细胞,皮肤成纤维细胞,血管成纤维细胞,肌成纤维细胞,平滑肌细胞,间充质干细胞(MSC)源性成纤维细胞或其组合。例如但不限于,用于生成异位组织的方法可以包括(a)将一种或多种细胞例如肝细胞或肾脏细胞导入对象的FALC

(或包含FALC的解剖区域)或淋巴结(或包含淋巴结的解剖区域)以形成异位组织,例如,异位肝脏组织或异位肾脏组织,和(b)导入一种或多种骨髓源性细胞和/或基质细胞以促进异位组织的形成,例如,通过促进一种或多种细胞的增殖和/或血管洗功能层以形成异位组织。在某些实施方式中,一种或多种待植入的细胞和一种或多种骨髓源性细胞和/或基质细胞可以包含在相同的组合物中。

[0098] 在某些非限制性的实施方式中,促进异位组织形成的基质细胞例如基质内皮细胞或成纤维细胞可以表达可检测水平的平足蛋白、淋巴毒素β受体("LTβR")、NIK或其组合中的一种或多种。或者和/或另外,在给予对象之前、期间或之后,可以用LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂处理基质细胞,例如,LTβR或NIK或其下游靶标的激活剂。在某些实施方式中,基质细胞例如基质内皮细胞或成纤维细胞可以用NIK的激活剂处理。在某些实施方式中,基质细胞可以经遗传修饰以外源性表达LTβR和/或NIK和/或过表达LTβR和/或NIK。

[0099] 在某些实施方式中,促进异位组织形成的试剂,例如,通过促进一种或多种细胞的增殖和/或血管形成以形成异位组织可以是LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂。例如但不限于,在FALC或淋巴结中或附近生成异位组织的方法可以包括将细胞例如肝细胞或肾脏细胞导入对象的FALC(或包含FALC的解剖区域)或淋巴结并提供LTβR和/或NIK信号转导途径的至少一种激活剂,其中LTβR和/或NIK或其下游靶标的激活促进异位组织的形成,例如,异位肝脏组织或异位肾脏组织。在某些实施方式中,LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂是LTβR和/或NIK的激活剂或非经典NF-κB信号转导途径的激活剂。在某些实施方式中,一种或多种待植入的细胞和LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂可以包含在相同的组合物中。或者,将一种或多种待植入的细胞导入对象之前、期间或之后,可以给予激活剂。

[0100] 在某些实施方式中,LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂可以增加经历植入的对象中存在的细胞(例如基质细胞或基质内皮细胞)中LTβR或NIK的表达。例如但不限于,LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂激活对象FALC中存在的基质细胞中的信号转导途径。

[0101] 或者和/或另外,待植入的细胞可以是异质细胞群,例如,包含异质细胞群的组合物,其包含基质细胞或基质内皮细胞,并且LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂可以增加待植入的组合物中存在的基质细胞或基质内皮细胞中LTβR或NIK的表达。例如但不限于,用于生成异位组织的方法可以包括(a)将一种或多种细胞例如肝细胞或肾脏细胞导入对象的FALC或淋巴结以形成异位组织,例如,异位肝脏组织或异位肾脏组织,(b)导入一种或多种骨髓源性细胞和/或基质细胞以促进一种或多种细胞的增殖和/或血管形成以形成异位组织,和(c)给予LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂。在某些实施方式中,LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂存在于包含一种或多种待植入的细胞和一种或多种骨髓源性细胞和/或基质细胞的组合物中,或者LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂存在于包含一种或多种骨髓源性细胞和/或基质细胞的组合物中。

[0102] 在某些实施方式中,LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂可以是LTβR的激活剂或LTβR的下游靶标。在某些实施方式中,激活剂可以是NIK的激活剂或NIK的下游靶标,例如,非经典NF-κB信号转导途径的激活剂。在某些实施方式中,LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂可以是激动剂抗体(或其抗体片段)或特异性结合LTβR或NIK的单链抗体。抗-LTβR激动剂抗体的非限制性示例包括:通过Adipogen生物科学公司(Adipogen Life Sciences)目录号AG-20B-0008的产生的单克隆抗体,抗-LTβR激动剂抗体CBE11(参见例如,Lukashev等,

Cancer Res.66(19):9617-9624(2006)),抗-LTβR激动剂抗体BS-1(参见例如,Hu等,Carcinogenesis 34(5):1105-1114(2013))和抗-LTβR激动剂抗体4H8(参见例如,Scarzello等,Gut 65:1765-1775(2016))。抗-LTβR激动剂抗体的其它非限制示例公开于美国专利申请号2002/0090366中,其内容通过引用其全文纳入本文。在某些实施方式中,LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂可以增强LTβR或NIK或其下游靶标的功能和/或活性。

[0103] 在某些实施方式中,本公开提供了用于在对象中生成异位肝脏组织的方法,其包括将一种或多种细胞导入对象的FALC或淋巴结,并提供LTβR和/或NIK的激活剂,其中LTβR和/或NIK的激活促进一种或多种细胞的增殖和/或血管形成以生成异位细胞。在某些实施方式中,一种或多种细胞包含肝细胞,并且异位组织包含异位肝脏组织。在某些实施方式中,一种或多种细胞包含肾脏细胞,并且异位组织包含异位肾脏组织。在某些实施方式中,一种或多种细胞还包含一种或多种基质细胞,并且,LTβR和/或NIK的激活导致基质细胞中LTβR和/或NIK信号转导途径的激活。

[0104] 在某些实施方式中,促进异位组织形成的试剂可以是促进对象中炎症的试剂。例如但不限于,用于在FALC或淋巴结中或附近生成异位组织的方法可以还包括诱导对象中的炎症,例如,通过给予促进对象中炎症的的试剂。此类试剂的非限制性示例包括细胞因子,血管扩张剂,组胺,血清素,缓激肽和酵母聚糖。细胞因子的非限制示例包括:IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、IL-23、IL-24、IL-27、IFN-α、IFN-α2、IFN-β或IFN-γ、TNF-α和TNF-β、TGF-α和TGF-β、淋巴毒素-α和淋巴毒素-β。趋化因子的非限制示例包括:CCL18、CCL19、CCL21、CXCL8、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CXCL12和CXCL13。在某些实施方式中,试剂包含激活补体系统的化合物和/或分子。在某些实施方式中,试剂包含酵母聚糖。在某些实施方式中,将试剂给予在已经植入细胞或将植入细胞的FALC中和/或附近。在某些实施方式中,局部诱导炎症,例如,在包含已经移植细胞或将移植细胞的FALC或淋巴结的解剖区域中或附近。此外和/或或者,全身性地诱导炎症。

[0105] 在某些实施方式中,炎症是临时的。例如但不限于,炎症持续不超过约10周、不超过约9周、不超过约8周、不超过约7周、不超过约6周、不超过约5周、不超过约4周、不超过约3周、不超过约2周、不超过约1周、不超过约6天、不超过约5天、不超过约4天或不超过约3天。

[0106] 在某些实施方式中,在将一种或多种待移植的细胞导入之前诱导炎症。例如但不限于,在导入一种或多种待植入的细胞之前至少2小时、至少4小时、至少6小时、至少8小时、至少10小时、至少12小时、至少14小时、至少16小时、至少18小时、至少20小时、至少22小时、1天前、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天或至少10天诱导炎症。

[0107] 此外和/或或者,在将一种或多种待移植的细胞导入之后诱导炎症。例如但不限于,在导入一种或多种待植入的细胞之后至少10分钟、至少30分钟、至少1小时、至少2小时、至少4小时、至少6小时、至少8小时、至少10小时、至少12小时、至少14小时、至少16小时、至少18小时、至少20小时、至少22小时、1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天或至少10天诱导炎症。

[0108] 在某些非限制性的实施方式中,细胞例如肝细胞或肾脏细胞移植受体可以另接受免疫抑制剂的给药,从而使植入的细胞(例如,肝细胞或肾脏细胞)的免疫排斥最小化。通过

抑制或阻抑任何先天免疫系统活性,包括但不限于T细胞和/或B细胞活性,免疫抑制剂可以降低或预防受体哺乳动物中对外来或移植的组织的不良免疫应答。免疫抑制剂的给药可以包括但不限于,给予放疗和/或给予免疫抑制药物。合适的免疫抑制药物的示例包括但不限于,类固醇(如皮质激素、地塞米松和泼尼松),Cox-1和Cox-2抑制剂,大环内酯类抗生素(如雷帕霉素和他克莫司)以及限制、减少或抑制B细胞、T细胞和/或其它先天免疫活性的其它物质。在某些实施方式中,特别适合用于本公开的免疫抑制剂包括已知用于肝脏和/或肾脏移植的那些免疫抑制剂,包括但不限于,类固醇、环孢菌素、雷帕霉素、硫唑嘌呤、泼尼松和OKT3。在某些实施方式中,肝细胞移植受体被给予免疫抑制剂他克莫司,也称为FK506,一种反过来可能抑制IL-2产生和下游B淋巴细胞激活的钙调神经磷酸酶抑制剂。

[0109] 在某些非限制实施方式中,对象未被给予免疫抑制剂,例如,上述段落中所列出的试剂(例如但不限于,其中转移了自体肝细胞或肾脏细胞)。

[0110] 5.2.1肝脏疾病和病症的治疗;本公开提供了治疗需要增强肝脏功能的对象的方法。在某些实施方式中,本公开提供了在FALC或淋巴结中繁殖肝细胞从而产生异位肝脏组织的方法,所述异位肝脏组织可以用于在对象中获得治疗益处,例如,在肝脏功能降低的对象中。在某些实施方式中,FALC位于网膜中。

[0111] 需要增强肝脏功能的对象是缺乏足够的功能性肝脏以维持健康状态的对象,包括但不限于这样的对象,所述对象具有纤维化和/或硬化的肝脏,或因疾病、创伤或毒性作用而受损的肝脏。例如,通过一个或多个肝脏功能参数落入对象正常范围内证明健康状态。肝脏功能参数的非限制示例包括白蛋白水平,丙氨酸转氨酶(“ALT”)水平,天冬氨酸转氨酶(“AST”)水平,肌酸酐水平,总胆红素水平,直接胆红素水平,苯丙氨酸水平,丙氨酸水平,甘氨酸水平,缬氨酸水平,谷氨酸水平,凝血酶原时间,乳酸脱氢酶和碱性磷酸酶;本领域中已知针对各种对象包括人对象这些水平的正常范围。在某些非限制实施方式中,一个或多个、或两个或更多个、或三个或更多个所述参数相对于正常水平升高至少约25%或至少约50%表明需要增强肝脏功能。实现对象中肝脏功能增强表示使至少一个肝脏功能参数向正常范围移动,例如但非限制,改善至少约10%或至少约20%或至少约30%或至少约40%或至少约50%。

[0112] 在某些非限制性实施方式中,通过对象生存期延长表示肝脏功能增强,例如至少约20%或至少约30%。

[0113] 在某些实施方式中,需要增强肝脏功能的对象可以患有肝脏疾病,肝脏病症,肝脏衰竭和/或肝脏功能降低。可以通过本公开方法治疗的肝脏疾病和/或病症的非限制示例包括:代谢紊乱,Crigler-Najjar综合征I型,急性肝脏功能衰竭,肝硬化,血色素沉着症,高草酸尿症,草酸病,Wilson病,α-1抗胰蛋白酶缺乏症,肝癌,肝炎(酒精和自身免疫),脂肪肝疾病和非酒精性脂肪肝疾病。与可以通过本公开的方法治疗的胆汁系统相关(并与肝脏间接相关)的疾病和/或病症的非限制性示例包括原发性胆汁性肝硬化和原发性硬化性胆管炎。

[0114] 在某些非限制性实施方式中,本公开提供了治疗需要增强肝脏功能的对象的方法,其包括向对象给予治疗有效量的肝细胞,其中至少一种给予的肝细胞在FALC或淋巴结中或附近增殖并生成异位肝脏组织,从而增强对象的肝脏功能。

[0115] 在某些实施方式中,移植到对象中的肝细胞可以是人肝细胞、非人肝细胞或两者。肝细胞对于预期的受体可以是同系的或者同种异体的。在非限制性实施方式中,肝细胞对

于预期的受体是自体同源的(例如,在移植之前于培养基中收获和扩增,或者由预期的受体的干细胞或前体细胞生成)。在某些非限制性实施方式中,一个物种的肝细胞可以移植到另一物种中,例如但不限于,将人肝细胞移植到非人(例如,小鼠)宿主中。例如但不限于,非人肝细胞可以被植入人受体的FALC。

[0116] 有效量或治疗有效量的待植入的肝细胞包含约10^4 -10^{11}个肝细胞或者约10^5-10^{10}个肝细胞或者经发现将在FALC或淋巴结中异位肝脏组织的至少一个位点有效的量。在某些实施方式中,有效量的肝细胞可以包含一种或多种肝细胞。在某些实施方式中,可以给予对象约10^5至约10^{11}、10^5至约10^9、10^5至约10^8、10^5至约10^7、10^5至约10^6、10^6至约10^{11}、10^6至约10^{10}、10^6至约10^9、10^6至约10^8、10^6至约10^7、10^7至约10^{11}、10^7至约10^{10}、10^7至约10^9个的量的肝细胞。

[0117] 在某些实施方式中,肝细胞可以给予对象超过一次以实现所需的异位肝脏组织。例如但不限于,肝细胞可以给予对象至少两次、至少三次或至少四次。或者或此外,肝细胞可以植入两个或更多个不同的解剖区域,其包含FALC或淋巴结以获得两种或多种异位肝脏组织。

[0118] 在某些非限制性实施方式中,本公开提供了治疗需要增强肝脏功能的对象的方法,其包括向对象给予治疗有效量的肝细胞,并且促进对象的FALC中至少一种肝细胞增殖。在某些实施方式中,可以促进这类增殖,例如但非限制,通过向这样的解剖区域局部给予肝细胞,所述解剖区域包含以异位肝脏组织形成为目标的FALC,和/或通过提供促进异位肝脏组织形成的至少一种试剂,如上所述。在某些实施方式中,试剂可以是例如但不限于多种骨髓源性细胞和/或多种基质细胞。在某些实施方式中,试剂可以是LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂,例如,LTβR或NIK或其下游靶标的激活剂。在某些实施方式中,试剂可以是骨髓源性细胞,基质细胞,LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂或其组合。类似的方法可以用于在淋巴节中生成异位组织以增强肝脏功能。

[0119] 在某些非限制性实施方式中,本公开提供了生成异位肝脏组织的方法,其包括向FALC导入肝细胞,并提供促进异位肝脏组织形成的至少一种试剂,例如,如上所述。例如但不限于,用于治疗需要增强肝脏功能的对象的方法,其包括(a)向对象给予治疗有效量的肝细胞到对象的FALC中以形成异位肝脏组织,和(b)向对象给予一种或多种骨髓源性细胞和/或基质细胞以促进异位肝脏的形成,例如,通过促进一种或多种细胞的增殖和/或血管形成以形成异位肝脏组织。类似的方法可以用于在淋巴节中生成异位组织。

[0120] 在某些非限制性实施方式中,用于治疗需要增强肝脏功能的对象的方法可以包括(a)向对象给予治疗有效量的肝细胞到对象的FALC以形成异位肝脏细胞,(b)向对象提供LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂以促进异位肝脏组织的形成。类似的方法可以用于在淋巴节中生成异位组织以增强肝脏功能。

[0121] 在某些非限制性实施方式中,用于治疗需要增强肝脏功能的对象的方法可以包括(a)向对象给予治疗有效量的肝细胞到对象的FALC中以形成异位肝脏组织,(b)向对象给予一种或多种骨髓源性细胞和/或基质细胞以促进异位肝脏的形成,例如,通过促进一种或多种细胞的增殖和/或血管形成以形成异位肝脏组织,和(c)给予LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂。类似的方法可以用于在淋巴节中生成异位组织以增强肝脏功能。

[0122] 在某些实施方式中,用于治疗需要增强肝脏功能的对象的方法可以包括诱导对象

中的炎症。例如但不限于,可以通过向对象给予促进炎症的试剂诱导炎症,如上所公开。在某些实施方式中,在将一种或多种待移植的肝细胞导入之前诱导炎症,如上所述。

[0123] 在某些实施方式中,公开的方法在体内进行,如上所述。在某些实施方式中,其在体外/离体进行,例如,如培养的组织外植体。在某些非限制性实施方式中,本公开的主题提供了以这类体外/离体方法产生的肝脏组织,例如,用于后续移植到需要增强肝脏功能的对象中。

[0124] 5.2.2肾脏疾病和病症的治疗;

[0125] 本公开提供了治疗需要增强肾脏功能的对象的方法。在某些实施方式中,本公开提供了在FALC或淋巴结中繁殖肾脏细胞或肾脏组织的片段从而产生异位肾脏组织的方法,所述异位肾脏组织可以用于在对象中获得治疗益处,例如,在具有肾脏功能降低的对象中。在某些实施方式中,FALC位于网膜中。

[0126] 需要增强肾脏功能的对象是缺乏足够的功能性肾脏以维持健康状态的对象,包括但不限于这样的对象,所述对象具有肾脏衰竭,或因疾病、创伤或毒性作用而受损的肾脏。例如但不限于,通过一个或多个肾脏功能参数落入对象正常范围内证明健康状态。肾脏功能产生的非限制示例包括肌酸酐水平,蛋白质水平和白蛋白水平;这些水平对于各种对象包括人对象的正常范围为本领域所知。在某些非限制实施方式中,一个或多个、或两个或更多个、或三个或更多个所述参数相对于正常水平升高至少约25%或至少约50%表明需要增强肾脏功能。实现对象中肾脏功能增强表示使至少一个肾脏功能参数向正常范围移动,例如但非限制,改善至少约10%或至少约20%或至少约30%或至少约40%或至少约50%。在某些实施方式中,对象的肾小球滤过率(GFR)降低指示肾脏功能降低。例如但不限于,对象的GFR降低约10%、约20%、约30%、约40%或约40%指示肾脏功能降低。在某些实施方式中,植入的细胞能够产生浓缩尿。

[0127] 在某些非限制性实施方式中,通过对象生存期延长表示肾脏功能增强,例如至少约20%或至少约30%。

[0128] 在某些实施方式中,需要增强肾脏功能的对象可患有肾脏疾病,肾脏病症,肾脏衰竭和/或肾脏功能降低。可以通过本公开的方法治疗的肾脏疾病和/或病症的非限制性示例包括急性肾脏衰竭,慢性肾脏疾病,肾小球肾炎,狼疮,多囊肾脏疾病,肾病,肾变病,肾脏畸形和肾癌。与肾脏疾病相关的其它非限制示例减少红细胞生成,缺乏激活的维生素D和非典型非甲状腺病。

[0129] 在某些非限制性实施方式中,本公开提供了治疗需要增强肾脏功能的对象的方法,其包括向对象给予治疗有效量的肾脏细胞,其中至少一种给予的肾脏细胞在FALC或淋巴结中或附近增殖并生成异位肝脏组织,从而增强对象的肾脏功能。

[0130] 在某些实施方式中,肾脏细胞或肾脏组织的片段被植入FALC或淋巴结中或附近以生成异位肾脏组织。在某些实施方式中,移植到对象中的肾脏细胞或肾脏组织的片段可以是人或非人细胞。非人肾脏细胞的非限制示例包括非人灵长类动物肾脏细胞以及来自各种非人动物如狗,猫,马,小鼠,大鼠,仓鼠,兔,猪等的肾脏细胞。在某些实施方式中,肾脏细胞或肾脏组织的片段对于预期的受体可以是同系的或者同种异体的。在非限制性实施方式中,肾脏细胞和/或肾脏组织片段对于预期的受体是自体同源的(例如,在移植之前于培养基中收获和扩增,或者由预期的受体的干细胞或前体细胞生成)。在某些实施方式中,肾脏

细胞可以获自胚胎肾脏细胞或组织,例如,后肾(metanephroi)。在某些实施方式中,肾脏细胞不是后肾,例如,完整的后肾。在某些实施方式中,肾脏细胞可以是肾祖细胞。在某些非限制性实施方式中,一个物种的肾脏细胞和/或肾脏组织片段可以移植到另一物种中,例如但不限于,将人肾脏细胞移植到小鼠宿主中。例如但不限于,非人肾脏细胞和/或肾脏组织片段可以被植入人受体的FALC。

[0131] 在某些实施方式中,有效量的肾脏细胞包含约10^4 -10^{11}个肾脏细胞或者约10^5-10^{10}个肾脏细胞或者经发现将在FALC中异位肾脏组织的至少一个位点有效的量。在某些实施方式中,有效量的肾脏细胞可以包含一个或多个肾脏细胞。在某些实施方式中,可以给予对象约10^5至约10^{11}、10^5至约10^9、10^5至约10^8、10^5至约10^7、10^5至约10^6、10^6至约10^{11}、10^6至约10^{10}、10^6至约10^9、10^6至约10^8、10^6至约10^7、10^7至约10^{11}、10^7至约10^{10}、10^7至约10^9个的量的肾脏细胞。

[0132] 在某些实施方式中,肾脏细胞和/或肾脏组织片段可以给予对象超过一次以实现所需的异位肾脏组织。例如但不限于,肾脏细胞和/或肾脏组织片段可以给予对象至少两次、至少三次或至少四次。或者或此外,肾脏细胞和/或肾脏组织片段可以植入两个或更多个不同的解剖区域,其包含FALC或淋巴结以获得两种或多种异位肾脏组织。

[0133] 在某些实施方式中,本公开还提供了治疗需要增强肾脏功能的对象的方法,其包括向对象给予治疗有效量的肾脏细胞(或肾脏组织的片段),并促进对象的脂肪相关淋巴簇或淋巴结中肾脏细胞的增殖。在某些实施方式中,可以促进这类增殖,例如但非限制,通过向这样的解剖区域局部给予肾脏细胞,所述解剖区域包含以异位肾脏组织形成为目标的FALC,和/或通过提供促进异位肾脏组织形成的至少一种试剂,如上所述。

[0134] 在某些实施方式中,试剂可以是例如但不限于多种骨髓源性细胞和/或多种基质细胞或基质内皮细胞。此外和/或或者,试剂可以是LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂,例如,LTβR或NIK或其下游靶标的激活剂。在某些实施方式中,试剂可以是非经典NF-κB信号转导途径的激活剂。在某些实施方式中,试剂可以是骨髓源性细胞,基质细胞,LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂,非经典NF-κB信号转导途径的激活剂或其组合。

[0135] 在某些非限制性实施方式中,本公开提供了生成异位肾脏组织的方法,其包括向FALC导包含肾脏细胞的组合物,并提供至少一种促进异位肾脏组织形成的试剂,例如,如上所述。例如但不限于,用于治疗需要增强肾脏功能的对象的方法,其包括(a)向对象给予治疗有效量的肾脏细胞或肾脏组织片段到对象的FALC中以形成异位肾脏组织,和(b)向对象给予一种或多种骨髓源性细胞和/或基质细胞以促进异位肾脏的形成,例如,通过促进一种或多种细胞的增殖和/或血管形成以形成异位肾脏组织。类似的方法可以用于在淋巴节中生成异位组织。

[0136] 在某些非限制性实施方式中,用于治疗需要增强肾脏功能的对象的方法,其包括(a)向对象给予治疗有效量的肾脏细胞或肾脏组织片段到对象的FALC或淋巴结中以形成异位肾脏组织,和(b)向对象给予一种或多种骨髓源性细胞和/或基质细胞以促进异位肾脏的形成,例如,通过促进一种或多种细胞的增殖和/或血管形成以形成异位肾脏组织。类似的方法可以用于在淋巴节中生成异位组织以增强肾脏功能。

[0137] 在某些非限制性实施方式中,用于治疗需要增强肾脏功能的对象的方法可以包括(a)向对象给予治疗有效量的肾脏细胞或肾脏组织细胞到对象的FALC或淋巴结以形成异位

肾脏细胞,(b)向对象提供LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂以促进异位肾脏组织的形成。类似的方法可以用于在淋巴节中生成异位组织以增强肾脏功能。

[0138] 在某些实施方式中,用于治疗需要增强肾脏功能的对象的方法可以包括诱导对象中的炎症。例如但不限于,可以通过向对象给予促进炎症的试剂诱导炎症,如上所公开。在某些实施方式中,在将一种或多种待移植的肝细胞导入之前诱导炎症,如上所述。

[0139] 在某些实施方式中,公开的方法在体内进行,如上所述。在某些实施方式中,其在体外/离体进行,例如,如培养的组织外植体。在某些非限制性实施方式中,本公开的主题提供了以这类体外/离体方法产生的肾脏组织,例如,用于后续移植到需要增强肾脏功能的对象中。

[0140] 5.3组合物和试剂盒

[0141] 本公开主题提供了用于生成异位组织的组合物。本公开提供了用于生成异位组织的组合物,其包含一种或多周姑娘细胞和一种或多种可以用于促进异位组织由一种或多种细胞形成的试剂。

[0142] 在某些实施方式中,存在于组合物中的一种或多种细胞包括肝细胞。在某些实施方式中,存在于组合物中的一种或多种细胞包括肾脏细胞。在某些实施方式中,可以由移植制备肝细胞或肾脏细胞,和/或移植过程可以使用美国专利号9,125,891中所述方法进行,通过引用纳入本文。

[0143] 适合用于本公开的细胞可以源自任何合适的来源。例如但不限于,细胞可以源自自体同源来源。在某些实施方式中,细胞可以源自待植入细胞的对象。在某些实施方式中,细胞可以源自异源来源。在某些实施方式中,细胞可以源自与待植入细胞的对象不同的个体。在某些实施方式中,还可以由源自然后将分化成相关细胞类型的各种来源的干细胞生成细胞,例如,肝细胞或肾脏细胞。在某些实施方式中,可以在各种条件下培养细胞一段时间以在用于本公开的组合物和/或方法之前诱导某些表型。

[0144] 在某些实施方式中,本文所公开的组合物内包含的细胞的数量可以不同。在某些实施方式中,组合物可以包括至少约1、约2、约3、约4、约5、约10、约15、约20、约25、约30、约35、约50、约100、约150、约200、约300、约400、约500、约1000、约10,000、约100,000或约1,000,000个细胞,例如,肝细胞或肾脏细胞。在某些实施方式中,组合物可以包括约10^4-约10^{11}细胞,例如,肝细胞或肾脏细胞。

[0145] 在某些实施方式中,本公开提供了组合物,用于生成异位肝脏或治疗需要增强肝脏功能的对象。在某些实施方式中,组合物包含多种肝细胞以及一种或多种促进异位肝脏形成的下述试剂。在某些实施方式中,试剂可以是不是肝细胞的一种或多种细胞。例如但不限于,一种或多种试剂可以包括多种骨髓源性细胞和/或多种基质细胞。在某些实施方式中,骨髓源性细胞可以是造血干细胞。在某些实施方式中,基质细胞可以是成纤维细胞或成纤维细胞样细胞,如成纤维细胞网状细胞(FRC),叶状树突细胞(FDC),淋巴内皮细胞(LEC),血液内皮细胞(BEC),α-7整合素周皮细胞(AIP)和双阴性细胞(DNC)。

[0146] 在某些实施方式中,本公开提供了组合物,用于生成异位肾脏或治疗需要增强肾脏功能的对象。在某些非限制性实施方式中,本公开提供了用于生成异位肾脏组织的组合物,其包含多种肾脏细胞(或肾脏组织的片段)以及一种或多种促进异位肾脏形成的试剂。在某些实施方式中,试剂可以是不是肾脏细胞的一种或多种细胞。例如但不限于,一种或多

种试剂可以包括多种骨髓源性细胞和多种基质细胞。在某些实施方式中,骨髓源性细胞可以是造血干细胞。在某些实施方式中,基质细胞可以是成纤维细胞或成纤维细胞样细胞,如成纤维细胞网状细胞(FRC),叶状树突细胞(FDC),淋巴内皮细胞(LEC),血液内皮细胞(BEC),α-7整合素周皮细胞(AIP)和双阴性细胞(DNC)。

[0147] 在某些实施方式中,组合物可以进一步包含LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂。LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂的非限制示例如上所述。在某些实施方式中,组合物可以进一步包含非经典NF-κB信号转导途径的激活剂。例如但不限于,本公开的组合物可以包含多种细胞,例如,肾脏细胞(或肾脏组织的片段)或肝细胞,和治疗有效量的LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂。

[0148] 在某些实施方式中,本公开提供了组合物,其可以包含(a)多种细胞,例如,肾脏细胞(或肾脏组织的片段)或肝细胞,(b)多种骨髓源性细胞和多种基质细胞和(c)治疗有效量的LTβR和/或NIK信号转导途径的激活剂。

[0149] 在某些实施方式中,组合物可以任选地包含合成的培养基和/或支架。在某些实施方式中,培养基和/或支架可以包括但不限于,肽,蛋白质,碳水化合物,基质胶,透明质酸,胶原蛋白,纤维蛋白,纤维蛋白原,纤连蛋白,聚原酸酯,聚乙烯醇,聚酰胺,聚碳酸酯,琼脂糖,藻酸盐,聚(乙烯)乙二醇,聚乳酸,聚乙醇酸,聚己内酯,聚乙烯吡咯烷酮,海洋粘附蛋白,氰基丙烯酸酯,聚合物水凝胶,其类似物或组合。

[0150] 在某些实施方式中,组合物可以任选地包含抗生素。抗生素的非限制示例包括但不限于,青霉素,例如,青霉素和阿莫西林;头孢菌素,例如,头孢氨苄;磺胺类,例如,复方新诺明和甲氧苄啶;大环内酯,例如,红霉素,克拉霉素和阿奇霉素;氟喹诺酮,例如,环丙沙星,左氧氟沙星和氧氟沙星;四环素,例如,四环素和多西环素;和氨基糖苷,例如,庆大霉素和妥布霉素。

[0151] 本公开还进一步提供了包含通过本文所公开的方法产生的异位组织的组合物。例如但不限于,本公开的组合物可以包含非人宿主中产生的人肝脏组织,如上所公开。在某些实施方式中,组合物可以任选地包含合成的培养基和/或支架。在某些实施方式中,组合物可以任选地包含抗生素。

[0152] 本公开进一步提供了包含本文公开的一种或多种组合物的试剂盒。在某些实施方式中,如果试剂盒包含一种或多种组合物,各种组合物可以在试剂盒中自己的容器中提供。在某些实施方式中,本公开的试剂盒进一步提供了使用试剂盒的说明,例如,给予试剂盒中存在的组合物的说明书。某些实施方式中,本文试剂盒还可以包括一种或多种例如以下所述组分:如使用说明书、装置和其它试剂及组分,如用于实施前述方法的管、容器或注射器。

[0153] 提供以下实施例以更全面地说明本公开,但不应解释为限制其范围。

[0154] 6.实施例1:在次级淋巴组织中生物工程改造肝脏

[0155] 6.1.在淋巴结(LN)和乳斑(FALC)中生成辅助肝脏

[0156] 为了寻找肝细胞移植的新位点作为全器官移植的替代方案,发现了不寻常的观察结果:肝细胞在被腹膜内注射(IP)到Fah$^{-/-}$小鼠(酪氨酸分解代谢酶延胡索酰乙酰乙酸盐水解酶(fumarylacetoacetate hydrolase(Fah))缺陷型小鼠)(诱导型肝脏衰竭模型)中然后从饮用水去除2-(2-硝基-4-三氟甲基苯甲酰基)-1,3-环己二酮(“NTBC”)后(32),这些肝细胞可以从头(de novo)形成异位结节。最初,观察到正常的肝细胞迁移到淋巴系统,以定

殖$Fah^{-/-}$小鼠的淋巴结(图2A),并异位生成超过70%的天然肝脏质量。这是一个令人吃惊的结果,特别是考虑到淋巴结是多种癌症初始转移的常见部位。图3描述了IP移植肝细胞后3-4周后的$Fah^{-/-}$小鼠;毛细管间隙的扩张和乳斑中血管的萌生。

[0157] 这引出了一种假设,即淋巴结可被直接靶向以作为多种细胞类型异位移植的位点以恢复组织和器官功能。已经确定,将肝细胞直接注射到单个$Fah^{-/-}$小鼠淋巴结(腋窝,腘或肠系膜)中产生足够的功能性异位肝脏质量以拯救受致死代谢疾病影响的这些突变小鼠的存活(33)。

[0158] 最近,证实了这种生成异位肝脏的概念可以转化到诱导肝脏疾病后的大型动物中(图2B)。此处,通过进行门静脉分流术,然后在肠系膜淋巴结中移植肝细胞,产生了肝脏疾病的猪模型和淋巴结中的异位肝组织生长。6只猪被移植,伴随增多的附加肝损伤,使用部分肝切除术。该实验的结果是证明了淋巴结中的肝细胞植入以及所有移植动物中肝组织的生成(图2B),伴随增多的异位肝脏质量。门静脉分流术是患有严重肝脏疾病的患者的主要外科手术,但现在不太常用。它通过在血管(门静脉到腔静脉)之间建立新的连接来减少75%流向肝脏的血流,从而缓解衰弱性门静脉高压症。此外,已知向肝脏的血流的这种显著减少会诱导肝营养因子和肝细胞增殖(41)。

[0159] 当前,类似但优选的微创手术是经颈静脉肝内门体分流术(TIPS),以开启患有临界门静脉高压症(critical portal hypertension)的肝硬化患者中的门静脉与肝静脉之间的新联系。鉴于在猪模型中这些有前景的结果及对于TIPS后患者的潜在转化结果,待确定淋巴微环境对于移植的细胞如何且为何是如此良好的宿主。

[0160] 肝细胞也植入到乳斑中。当仔细分析IP注射后$Fah^{-/-}$小鼠中肝细胞植入位点时,发现除了淋巴结外,肝细胞也迁移到网膜乳斑,产生肝结节(图2C-D,图3-5)。注意,如图3所示,毛细血管空间的扩张以及乳斑中血管的萌生(例如,右下图)。乳斑是主要存在于较大网膜中的淋巴组织(脂肪相关淋巴簇或"FALC")的小"乳色"区域(图2C)。造血细胞(淋巴细胞和巨噬细胞)和基质细胞的这些聚集体被称为次级淋巴器官(42、43),类似于淋巴结。不足为奇的是,乳斑还被鉴定为腹膜癌病中的早期靶点,尤其是转移性卵巢癌。

[0161] 为了确认异位肝脏形成需要淋巴组织环境,在进一步携带重组酶激活基因-2(RAG2)和常见细胞因子受体γ链(γc)中突变的$Fah^{-/-}$NOD小鼠("FRGN"小鼠)中进行IP移植,;这样的小鼠是完全淋巴发育不全的(alymphoid)(44)如图6所示,FRGN小鼠中缺乏网膜乳斑和FALC。相对于野生型对照,肝细胞的IP移植导致FRGN小鼠网膜中的植入性差(图7),并且未观察到植入细胞的生长(图8)。有趣的是,通过骨髓移植,FRGN小鼠中恢复形成乳斑和FALC的能力(图9和10),并且那些乳斑和FALC可以支持异位肝脏形成(图11和12)。

[0162] 6.2.异位肝脏发育的分子机制

[0163] 然后研究了肝细胞植入和$Fah^{-/-}$存活是否需要淋巴结。有理由认为肝细胞正在定植乳斑和淋巴结,并且希望知道缺乏功能性淋巴结的$Fah^{-/-}$小鼠是否能在乳斑中生成足够的异位肝脏质量以存活。为了验证这一假设,将成淋巴细胞(lymphoblastic)小鼠(aly/aly)与经历诱导性肝衰竭($Fah^{-/-}$)的小鼠杂交。由于NF-κB诱导激酶(NIK)中的点突变破坏了细胞中的非经典NF-κB信号传导,aly/aly小鼠缺乏淋巴结,派尔集合淋巴结(Peyer's patche)并具有紊乱的脾脏(图13)没有非经典NF-κB信号传导的情况下,淋巴结器官发生在发育过程中没有正常出现(无淋巴结),虽然淋巴管以及重要的乳斑在这些小鼠中存在并具

功能性(43)。

[0164] 首先测试了IP移植的肝细胞是否会植入aly/aly-Fah$^{-/-}$小鼠中(图14)。结果发现,大部分肝细胞迁移到网膜中的乳斑,并证实肝细胞植入aly/aly-Fah$^{-/-}$小鼠,与Fah$^{-/-}$小鼠的情况相似(图15),但是在6周的过程中未能形成大的结节,并且在12周(拯救对照Fah-/-小鼠所需的时间)后,移植的小鼠无一被拯救(n=28),不论最初的网膜中植入(图14,最右边为卡普兰-迈耶存活图)。在尸检时,相较于Fah$^{-/-}$小鼠中产生的异位结节,观察到有限的血管形成。还将肝细胞移植到aly/aly-Fah$^{-/-}$小鼠的肝脏(通过脾注射),并发现将小鼠从肝衰竭中被拯救(图14,最左侧为卡普兰迈耶存活图)。这个结果很重要,因为它表明aly/aly-Fah$^{-/-}$小鼠中缺乏肝细胞腹膜生长是该位点所特有的,并且是由于aly(NIK)突变导致的NIK途径破坏的后果(图16)。注射到肝脏中的肝细胞(脾注射)可能替代正常肝脏结构内的濒死肝细胞,而不需要NIK途径。

[0165] 接下来,进行了研究以表征可以起到异位肝脏形成宿主作用的淋巴环境。图17A显示了相较于乳斑,淋巴结中淋巴标志物平足蛋白和内皮标志物CD31的分布。如图17B所示,移植的肝细胞与携带ER-TR7的基质细胞形成紧密关联。有趣的是,当通过腹膜内注射移植网膜基质细胞而不是肝细胞时,它们也迁移回网膜中的乳斑(图17C)。如图18所示,发现基质细胞表达NIK和淋巴毒素β受体;进而,肝细胞呈淋巴毒素α(也称为肿瘤坏死因子β)和β(也称为肿瘤坏死因子C)阳性。

[0166] 鉴于观察到肝细胞表达淋巴毒素β(“LTb”)并且基质细胞表达淋巴毒素β受体(“LTbR”),有兴趣观察肝细胞是否会在缺乏LTbR的Fah$^{-/-}$小鼠的乳斑中植入和生长。结果示于图19,其中观察到Fah/LTbR$^{-/-}$小鼠中肝细胞的生长小于Fah$^{-/-}$、LTbR^{+}小鼠中的肝细胞的生长。

[0167] 总而言之,IP注射的肝细胞经历器官发生,完成新血管形成以支持Fah$^{-/-}$小鼠中的异位肝脏质量,并且NIK途径是该过程完成所必需的独特途径。

[0168] 在Stephen Paget博士(1889)经典的癌症种子和土壤理论中,种子(转移性癌症)需要土壤(肥沃的环境)才能成功。本文所述结果证明种子(肝细胞)需要土壤(次级淋巴器官)以在异位位点移植并生成肝组织。不受任何具体理论限制,该数据支持这样的机制,即伴有基质细胞的肝细胞激活淋巴毒素/NIK途径以在乳斑中生成辅助肝脏。该数据进一步表明,通过将肝细胞移植到肝脏(脾脏途径)或乳斑(IP途径),肝脏组织的再生在机理上是不同的。NF-κB诱导激酶(NIK)中的aly/aly点突变破坏异位肝脏发育,但不破坏天然肝脏修复。NIK在非经典NF-κB信号传导中对次级淋巴器官发展具有中央功能。NIK是分裂原活化蛋白3(MAP3)激酶的成员,其在受体连接后累积至可检测水平。这使得NIK能够磷酸化并激活κB激酶α(IKKα)的抑制剂,从而启动IKKα介导的p100磷酸化(参见图13)。

[0169] 6.3.参考文献

[0170] 1.Starzl,T.E.等原位同种移植人肝脏(Orthotopic homotransplantation of the human liver).Ann Surg 168,392-415(1968).

[0171] 2.Reuben,A.酒精和肝脏(Alcohol and the liver).Curr Opin Gastroenterol23,283-291(2007).

[0172] 3.Perkins,J.D.等应当避免对终末期肝病模型评分<或=14的患者进行肝移植吗?决策分析方法(Should liver transplantation in patients with model for end-

stage liver disease scores<or＝14be avoided?A decision analysis approach).Liver Transpl 15,242-254(2009).

[0173] 4.Volk,M.L.,Hernandez,J.C.,Lok,A.S.和Marrero,J.A.改良Charlson合并症指数用于预测肝移植术后存活率(Modified Charlson comorbidity index for predicting survival after liver transplantation).Liver Transpl 13,1515-1520(2007).

[0174] 5.Lipshutz,G.S.和Busuttil,R.W.在那些上了年纪的人中的肝移植:移植的情况(Liver transplantation in those of advancing age:the case for transplantation).Liver Transpl 13,1355-1357(2007).

[0175] 6.Strom,S.C.,Chowdhury,J.R.和Fox,I.J.肝细胞移植用于治疗人类疾病(Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease).Semin Liver Dis19,39-48(1999).

[0176] 7.Rhim,J.A.,Sandgren,E.P.,Degen,J.L.,Palmiter,R.D.和Brinster,R.L.通过肝细胞移植替代患病的小鼠肝脏(Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation).Science(纽约州纽约市)263,1149-1152(1994).

[0177] 8.Weglarz,T.C.,Degen,J.L.和Sandgren,E.P.肝细胞移移植到患病小鼠肝脏。实质再生的动力学和四倍体和八倍体肝细胞增殖能力的鉴定(Hepatocyte transplantation into diseased mouse liver.Kinetics of parenchymal repopulation and identification of the proliferative capacity of tetraploid and octaploid hepatocytes).Am J Pathol 157,1963-1974(2000).

[0178] 9.Braun,K.M.和Sandgren,E.P.重症肝损伤小鼠模型再生实质的细胞来源(Cellular origin of regenerating parenchyma in a mouse model of severe hepatic injury).Am J Pathol 157,561-569(2000).

[0179] 10.Grompe,M.等遗传性酪氨酸血症I型小鼠模型中新生致死性肝功能障碍的药理学校正(Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I).Nat Genet 10,453-460(1995).

[0180] 11.Overturf,K.,al-Dhalimy,M.,Ou,C.N.,Finegold,M.和Grompe,M.连续移植揭示了成体小鼠肝细胞的干细胞样再生潜能(Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes).The American journal of pathology 151,1273-1280(1997).

[0181] 12.Lagasse,E.等纯化的造血干细胞可在体内分化成肝细胞(Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo).Nat Med 6,1229-1234(2000).

[0182] 13.Grompe,M.治疗性肝脏再增殖的原理(Principles of therapeutic liver repopulation).J Inherit Metab Dis 29,421-425(2006).

[0183] 14.Grompe,M.,Overturf,K.,al-Dhalimy,M.和Finegold,M.I型遗传性酪氨酸血症小鼠模型的治疗试验的进展报告(Therapeutic trials in the murine model of hereditary tyrosinaemia type I:a progress report).J Inherit Metab Dis 21,518-531(1998).

[0184] 15.Overturf,K.等通过基因治疗校正的肝细胞在遗传性酪氨酸血症I型的鼠模型

中体内选择(Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I).Nat Genet 12,266-273(1996).

[0185] 16.Fox,I.J.等肝细胞移植治疗Crigler-Najjar综合征I型(Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation).N Engl J Med 338,1422-1426(1998).

[0186] 17.Nishikawa,T.等重置转录因子网络可逆转终末期慢性肝功能衰竭(Resetting the transcription factor network reverses terminal chronic hepatic failure).The Journal of clinical investigation 125,1533-1544(2015).

[0187] 18.Tretbar,L.L.,Beven,E.G.和Hermann,R.E.将辅助犬肝同种异体移植到骨盆中;门静脉分流术在预防肝萎缩中的作用(Homotransplantation of an auxiliary dog liver into the pelvis;effect of protacaval shunt in the prevention of liver atrophy).Surgical forum 16,219-221(1965).

[0188] 19.Marchioro,T.L.,Porter,K.A.,Dickinson,T.C.,Faris,T.D.和Starzi,T.E.辅助肝同种异体移植的生理要求(Physiologic Requirements For Auxiliary Liver Homotransplantation).Surgery,gynecology and obstetrics 121,17-31(1965).

[0189] 20.Van Thiel,D.H.,Makowka,L.和Starzl,T.E.肝移植的过去及未来(Liver transplantation:where it's been and where it's going).Gastroenterology clinics of North America 17,1-18(1988).

[0190] 21.Moritz,M.J.等异位肝移植治疗暴发性肝衰竭-恢复的桥梁(Heterotopic liver transplantation for fulminant hepatic failure--a bridge to recovery).Transplantation 50,524-526(1990).

[0191] 22.Boudjema,K.等临时辅助肝脏移植治疗儿童亚急性肝功能衰竭(Temporary auxiliary liver transplantation for subacute liver failure in a child).Lancet(London,England)342,778-779(1993).

[0192] 23.Terpstra,O.T.,Reuvers,C.B.和Schalm,S.W.辅助异位肝移植(Auxiliary heterotopic liver transplantation).Transplantation 45,1003-1007(1988).

[0193] 24.Metselaar,H.J.等在辅助异位移植后恢复失败的肝脏(Recovery of failing liver after auxiliary heterotopic transplantation).Lancet(英国伦敦)335,1156-1157(1990).

[0194] 25.Faraj,W.等儿童急性肝功能衰竭的辅助肝移植(Auxiliary liver transplantation for acute liver failure in children).Annals of surgery 251,351-356(2010).

[0195] 26.Dokmak,S.,Elkrief,L.和Belghiti,J.用小死亡肝脏移植物的辅助肝移植用于肝硬化合并肝细胞癌(Auxiliary liver transplantation with a small deceased liver graft for cirrhotic liver complicated by hepatocellular carcinoma).Transplant international:official journal of the European Society for Organ Transplantation 26,e102-104(2013).

[0196] 27.Ren,W.,Zhang,A.和Dong,J.整合辅助移植的小肝移植物的再生和再生:器官短缺和免疫抑制的解决方案(Integrating repopulation and regeneration of the

auxiliarily transplanted small liver graft:the solution for organ shortage and immunosuppression).Medical hypotheses 79,241-245(2012).

[0197] 28.McKiernan,P.肝脏移植和先天性代谢缺陷的细胞疗法(Liver transplantation and cell therapies for inborn errors of metabolism).Journal of inherited metabolic disease 36,675-680(2013).

[0198] 29.Shanmugam,N.P.等辅助肝移植:一种选择性代谢紊乱的基因治疗方法(Auxiliary liver transplantation:a form of gene therapy in selective metabolic disorders).Journal of clinical and experimental hepatology 1,118-120(2011).

[0199] 30.Rela,M.等用于Crigler-Najjar综合征I型的辅助部分原位肝移植I(Auxiliary partial orthotopic liver transplantation for Crigler-Najjar syndrome type I).Annals of surgery 229,565-569(1999).

[0200] 31.Burdelski,M.和Rogiers,X.代谢病症中的肝移植(Liver transplantation in metabolic disorders).Acta gastro-enterologica Belgica 62,300-305(1999).

[0201] 32.Hoppo,T.,Komori,J.,Manohar,R.,Stolz,D.B.和Lagasse,E.通过小鼠中的疱疹淋巴结来挽救致死性肝衰竭(Rescue of lethal hepatic failure by hepatized lymph nodes in mice).Gastroenterology 140,656-666e652(2011).

[0202] 33.Komori,J.,Boone,L.,DeWard,A.,Hoppo,T.和Lagasse,E.小鼠淋巴结作为多种组织的异位移植位点(The mouse lymph node as an ectopic transplantation site for multiple tissues).Nat Biotechnol 30,976-983(2012).

[0203] 34.DeWard,A.D.,Komori,J.和Lagasse,E.用于基于细胞的治疗的异位移植位点(Ectopic transplantation sites for cell-based therapy).Current opinion in organ transplantation 19,169-174(2014).

[0204] 35.Francipane,M.G.和Lagasse,E.淋巴结中胚胎组织的成熟:生物工程复杂器官的新方法(Maturation of embryonic tissues in a lymph node:a new approach for bioengineering complex organs).Organogenesis,1-9(2014).

[0205] 36.Francipane,M.G.和Lagasse,E.in Stem Cells Translational Medicine In press(2015).

[0206] 37.Gupta,S.等与腹膜腔或背脂肪垫相比,肝细胞移植到肝脏和脾脏后表现出优异的转基因表达:对肝脏基因治疗的影响(Hepatocytes exhibit superior transgene expression after transplantation into liver and spleen compared with peritoneal cavity or dorsal fat pad:implications for hepatic gene therapy).Hum Gene Ther 5,959-967(1994).

[0207] 38.Jirtle,R.L.和Michalopoulos,G.部分肝切除术对移植肝细胞的影响(Effects of partial hepatectomy on transplanted hepatocytes).Cancer Res 42,3000-3004(1982).

[0208] 39.Ohashi,K.等小鼠中人肝细胞的持续存活:体内感染人乙型肝炎和丁型肝炎病毒的模型(Sustained survival of human hepatocytes in mice:A model for in vivo infection with human hepatitis B and hepatitis delta viruses).Nat Med 6,327-

331(2000).

[0209] 40.Ohashi,K.等小鼠肝外位点的肝脏组织工程改造作为遗传性肝病的潜在新疗法(Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver diseases).Hepatology(Baltimore,Md.)41,132-140(2005).

[0210] 41.Nordlinger,B.等肝细胞移植到脾脏后会增殖吗?通过自体造影在大鼠中进行演示(Can hepatocytes proliferate when transplanted into the spleen?

[0211] Demonstration by autohistoradiography in the rat).European surgical research.Europaische chirurgische Forschung.Recherches chirurgicales europeennes 19,381-387(1987).

[0212] 42.Shah,S.等网膜组织再生的细胞基础(Cellular basis of tissue regeneration by omentum).PloS one 7,e38368(2012).

[0213] 43.Rangel-Moreno,J.等网膜乳白色斑点在没有淋巴组织诱导细胞的情况下发展并支持B和T细胞对腹膜抗原的反应(Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens).Immunity 30,731-743(2009).

[0214] 44.Mazurier F1,Fontanellas A,Salesse S,Taine L,Landriau S,Moreau-Gaudry F,Reiffers J,Peault B,Di Santo JP,de Verneuil H.,新型免疫缺陷型小鼠模型——RAG2 x常规细胞因子受体γ链双突变体——需要给予外源性细胞因子用于人造血干细胞移植(A novel immunodeficient mouse model--RAG2 x common cytokine receptor gamma chain double mutants--requiring exogenous cytokine administration for human hematopoietic stem cell engraftment).J Interferon Cytokine Res.1999May;19(5):533-41.

[0215] 45.Fabregat I,Moreno-Càceres J,Sánchez A,Dooley S,Dewidar B,Giannelli G,Ten Dijke P;IT-LIVER Consortium.,TGF-β信号传导和肝脏疾病(TGF-βsignalling and liver disease).FEBS J.2016Jun;283(12):2219-32.

[0216] 46.Rogers S.,Lowell J.,Hammerman N.和Hammerman M.,移植发展中的后肾到成年大鼠(Transplantation of developing metanephroiinto adult rats).Kidney International 1998;54:27-37.

[0217] 7.实施例2:在次级淋巴组织中生物工程改造肾脏

[0218] 小鼠淋巴结(LN)(一种次级淋巴器官(SLO))可以支持小鼠后肾成熟为具有肾小球和肾小管功能的肾单位,并且LN还可以促成移植的人胎肾以及由小鼠肾单位祖细胞(NP)或人诱导型多能干细胞(hiPSC)生成的肾脏类器官的成熟。为了测试LTβR信号传导(LN发生中关键的信号传导介质)是否支持异位器官发生,用LTβR-Fc融合蛋白处理携带LN肾脏移植物的小鼠。LTβR-Fc融合蛋白通过接合LTβR配体(LTα和LTβ)来拮抗LTβR介导的作用(参见图21)。如图22A-B所示,LTβR-Fc处理显著地减小了移植物的大小及其血管形成。

[0219] 除了接合LTβR配体外,LTβR-Fc还接合非TNF家族成员LIGHT,其不仅与LTβR相互作用,而且还可与HVEM和Dcr3受体相互作用(参见图21)。为了排除由于LTβR-Fc导致的移植物血管形成/血管新生受损干扰除了LTβR介导的信号途径之外的信号转导的可能性,研究了

LTβR缺陷环境中肾脏移植的结果,如LTβR-/-小鼠所提供的结果(见图22)。该方法还允许排除观察到的作用可能是由于LTβR/HVEM/Dcr3对供体肾细胞或移植时存在于供体组织中的其它细胞类型(包括基质细胞和造血细胞)的抑制的可能性。

[0220] 因为LTβR-/-小鼠没有LN,因此较大的网膜被用作用于移植的替代SLO。网膜含有淋巴聚集物,称为乳斑,其促进对腹膜抗原的免疫力(见图1)。与LN一样,成纤维细胞网状细胞(FRC)的网状网络支持乳斑中的白细胞。相较于LN,当研究网膜的稳态基质组成时,发现了相似的基质细胞流式细胞概况(图22C)。此外,在网膜细胞悬浮液中鉴定了PDPLN+/LTβR+和PDPLN-/LTβR+细胞亚群,这表明在网膜中存在稀有的LT-响应性FRC和脑内皮细胞(BEC)群体(图22D)。胚胎肾脏碎片的生长在LTβR-/-网膜中受到显著影响;不仅移植物变小,而且血管化程度也较低,并当与其对照物比较时表现出异常的形态,确定LTβR信号转导在宿主基质细胞中对于异位肾脏移植物成功的血管形成/血管新生的重要性(图22E-F)。在未处理的LN肾移植物中,NIK(LTβR下游靶标和非经典NF-κB途径的中心组分)限于肾小球内皮细胞(图22G)。相反,LTβR-Fc处理消除了这些细胞中的NIK表达。相似地,在LTβR-/-网膜中生长的移植物中无法检测到NIK表达。不受任何具体理论或机理限制,LTβR可能使用NIK来使非经典NF-κB信号传导增殖并促进移植的组织的血管形成/血管生成。此外,不受任何具体理论的束缚,驻留在次级淋巴器官内的基质细胞似乎使用LTβR信号传导来支持器官发生,并且基质内皮细胞限制的NIK激活可促进形态血管生成(graph angiogenesis)。

[0221] 8.实施例3:炎症增强移植的肝细胞的生长

[0222] 腹膜炎症诱导脂肪相关淋巴簇(FALC)数量和大小的增加(Benezech,C.等炎症诱导的脂肪相关淋巴簇的形成(Inflammation-induced formation of fat-associated lymphoid clusters).Nature immunology 16,819-828(2015))。该作用依赖于骨髓细胞的TNF表达和基质细胞上的TNFR信号传导(Benezech等(2015))。为了确定炎症是否也导致肝细胞移植增强,在野生型C57bl/6和对照动物(用PBS注射野生型C57bl/6)中启动了由酵母聚糖(酵母衍生的Toll样受体2配体)驱动的无菌腹膜炎症(参见图23)。3天后将GFP+肝细胞移植到两组动物中,并在1周后处死。

[0223] 如图24所示,酵母聚糖诱导的炎症显著增加GFP+细胞的存在,如在组织中可以看见的以及通过网膜和肠系膜脂肪中GFP+肝细胞的定量。重要的是,在野生型小鼠中观察到IP注射后FALC中肝细胞的植入表明FALC中的植入并不依赖于肝脏损伤。仍有待研究FALC形成与炎症的引发或消退的时间关系如何且肝细胞植入是否将在消退阶段持续。

[0224] 接下来,在$Fah^{-/-}$C57bl/6小鼠中测试该预条件化方案以确定它是否会在诱导肝脏疾病(脱NTBC)后影响酪氨酸血症小鼠的存活。使用与图23中所述相同的方法,具有或不具有诱导的炎症的$Fah^{-/-}$C57bl/6小鼠被移植野生型肝细胞,然后诱导肝脏疾病(脱NTBC)。如图25所示,左图上没有炎症的动物在两次选择后没有被拯救(体重下降=肝脏疾病),而在具有炎症的动物在8周后被拯救。

[0225] 没有诱导的炎症的动物的尸检揭示了网膜、脾脏、肝门、性腺和肠系膜脂肪中存在的FALC中的低/有限的肝植入和肝脏质量(图26)。相反,具有诱导的炎症的动物在这些位置具有大量肝组织。

[0226] 本文引用的各种文献、专利和专利申请其内容通过引用整体纳入本文。

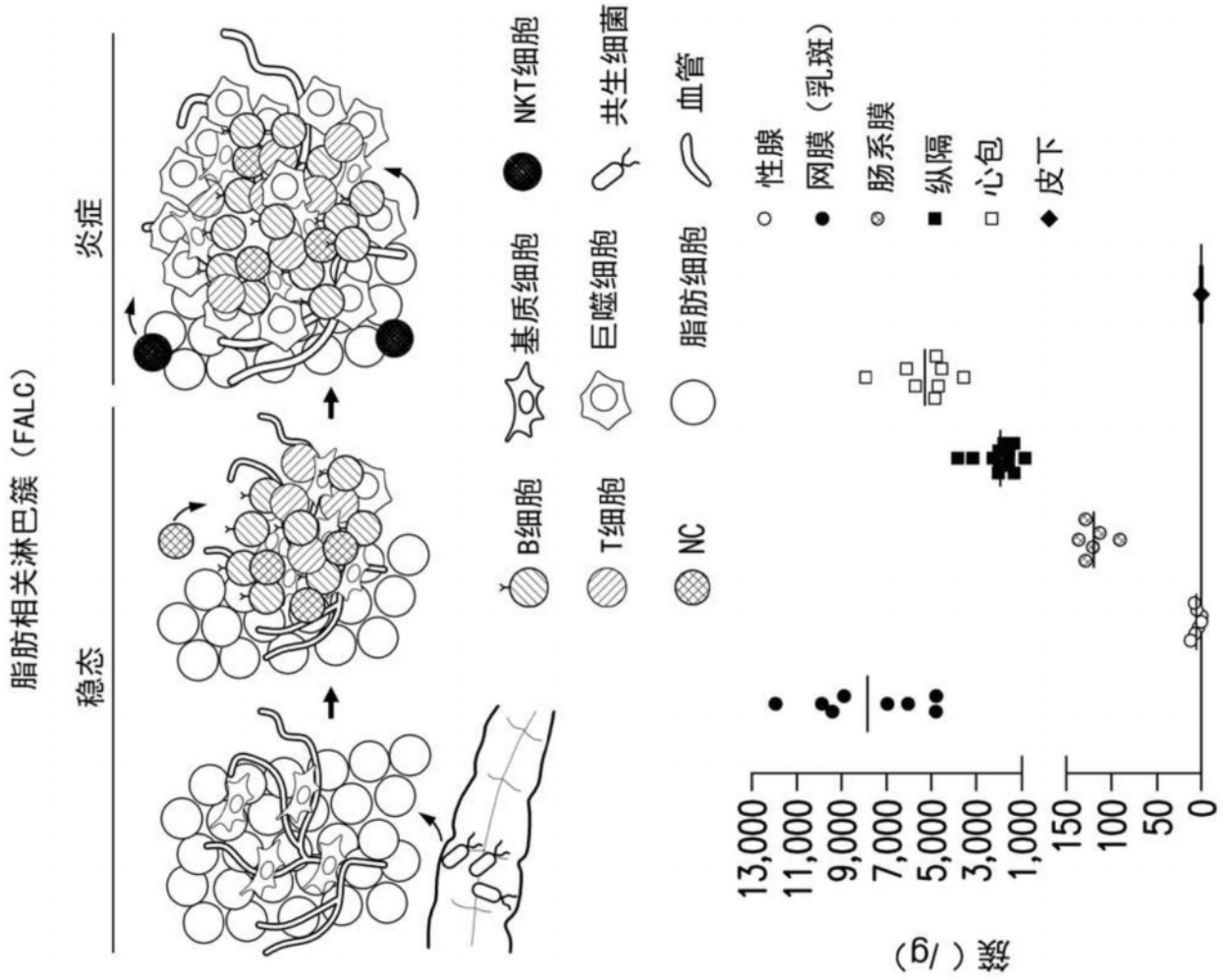

脂肪相关淋巴簇（FALC）
稳态
炎症
B细胞
基质细胞
NKT细胞
T细胞
巨噬细胞
共生细菌
NC
脂肪细胞
血管
性腺
网膜（乳斑）
肠系膜
纵隔
心包
皮下
13,000
11,000
9,000
7,000
5,000
3,000
1,000
150
100
50
0

图1

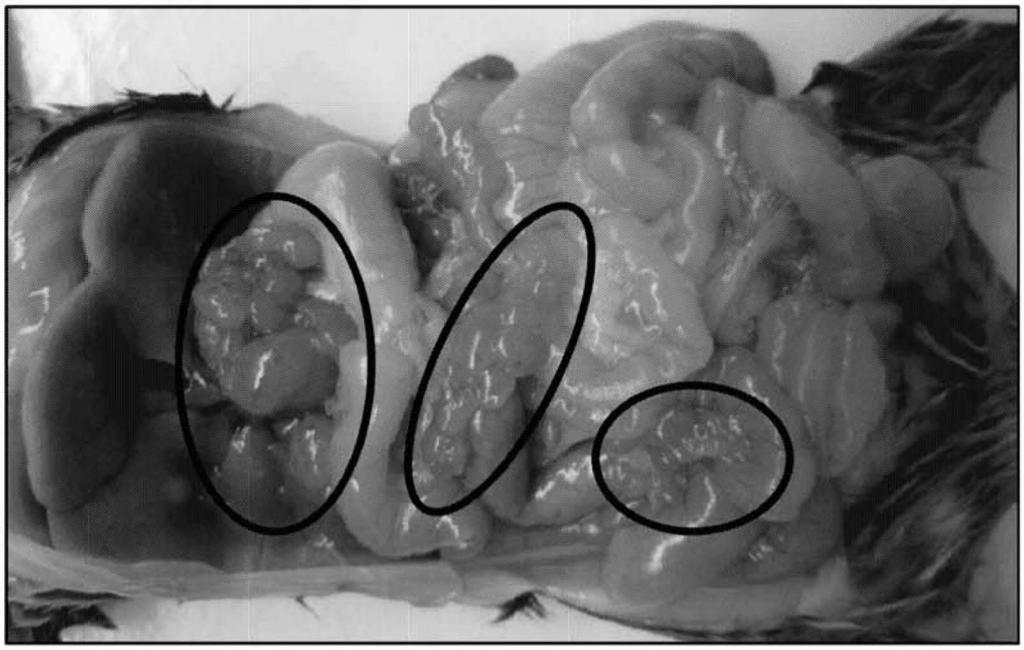


图2A

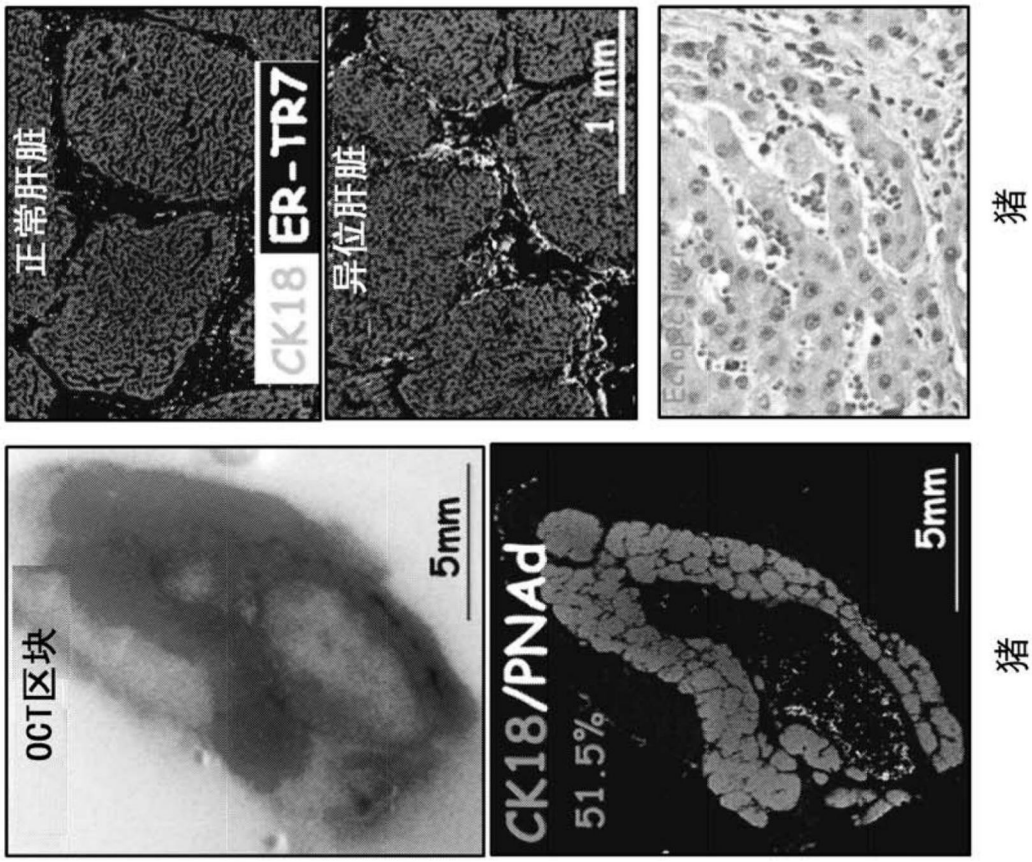


图2B

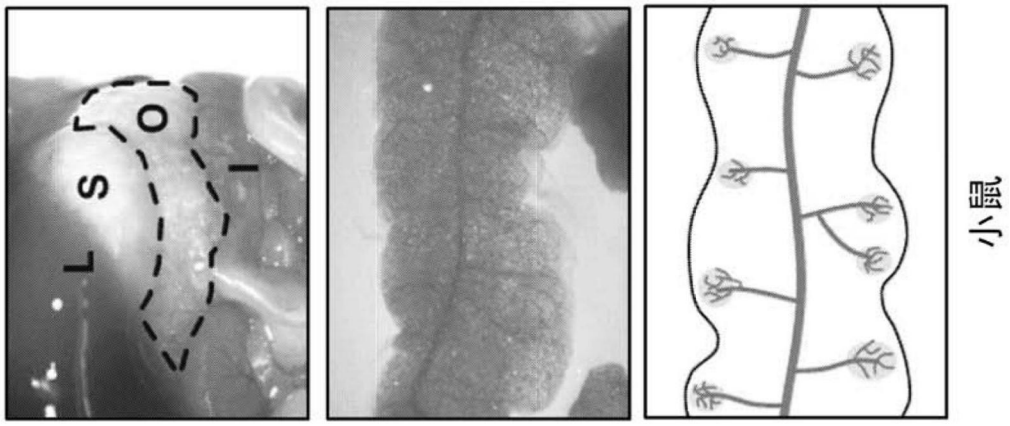


图2C

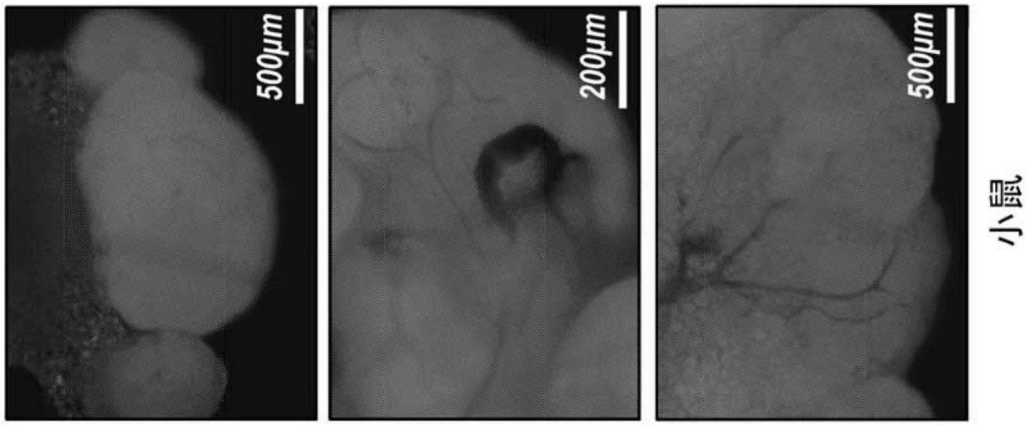


图2D

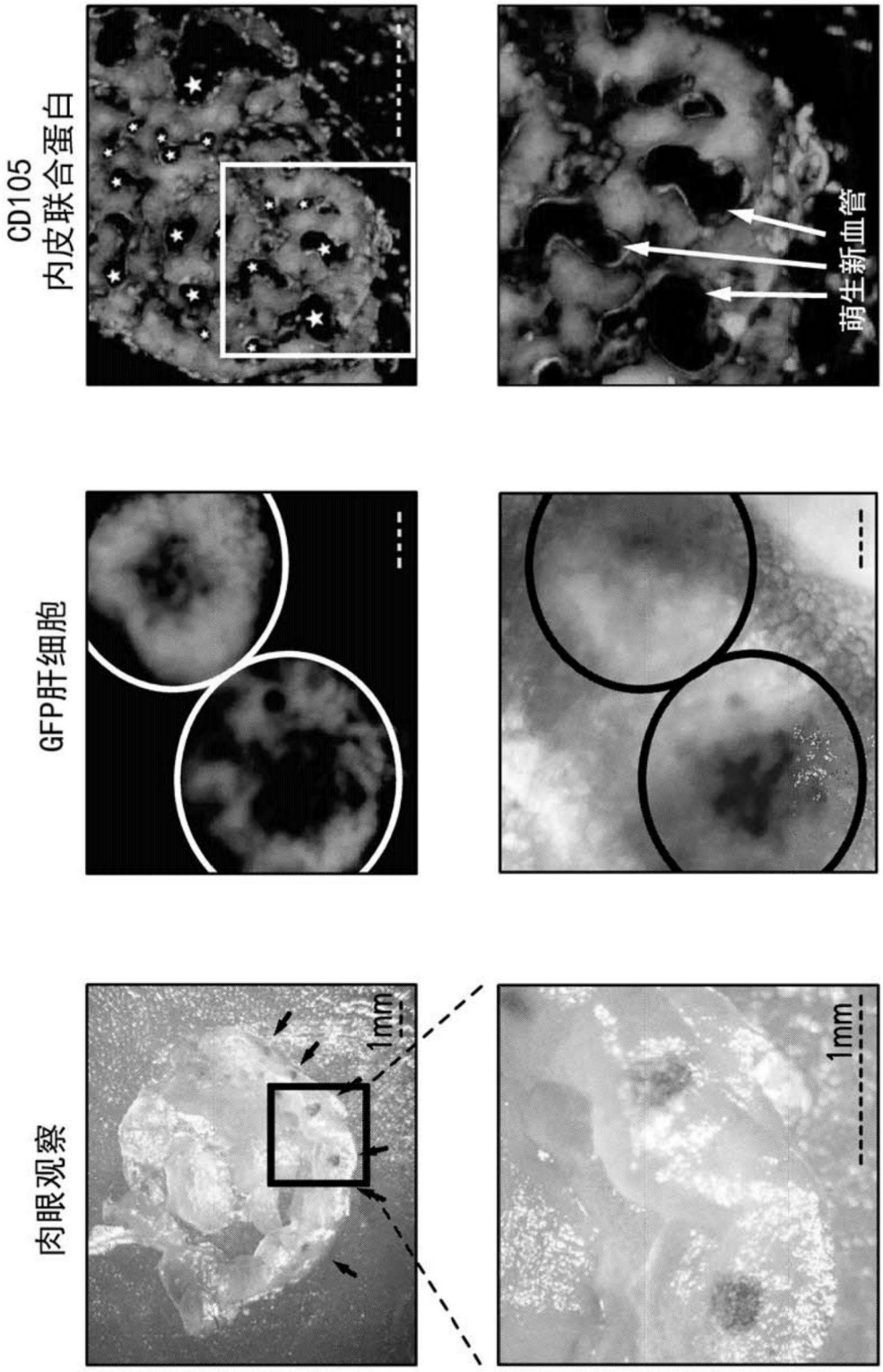


图3

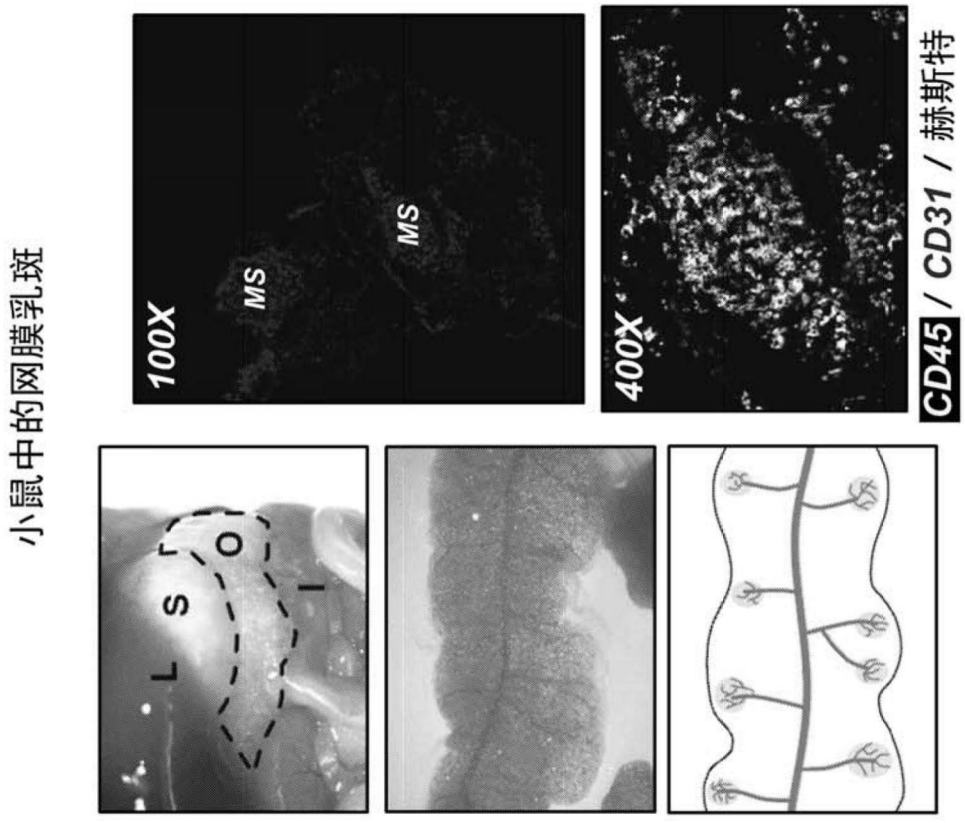


图4

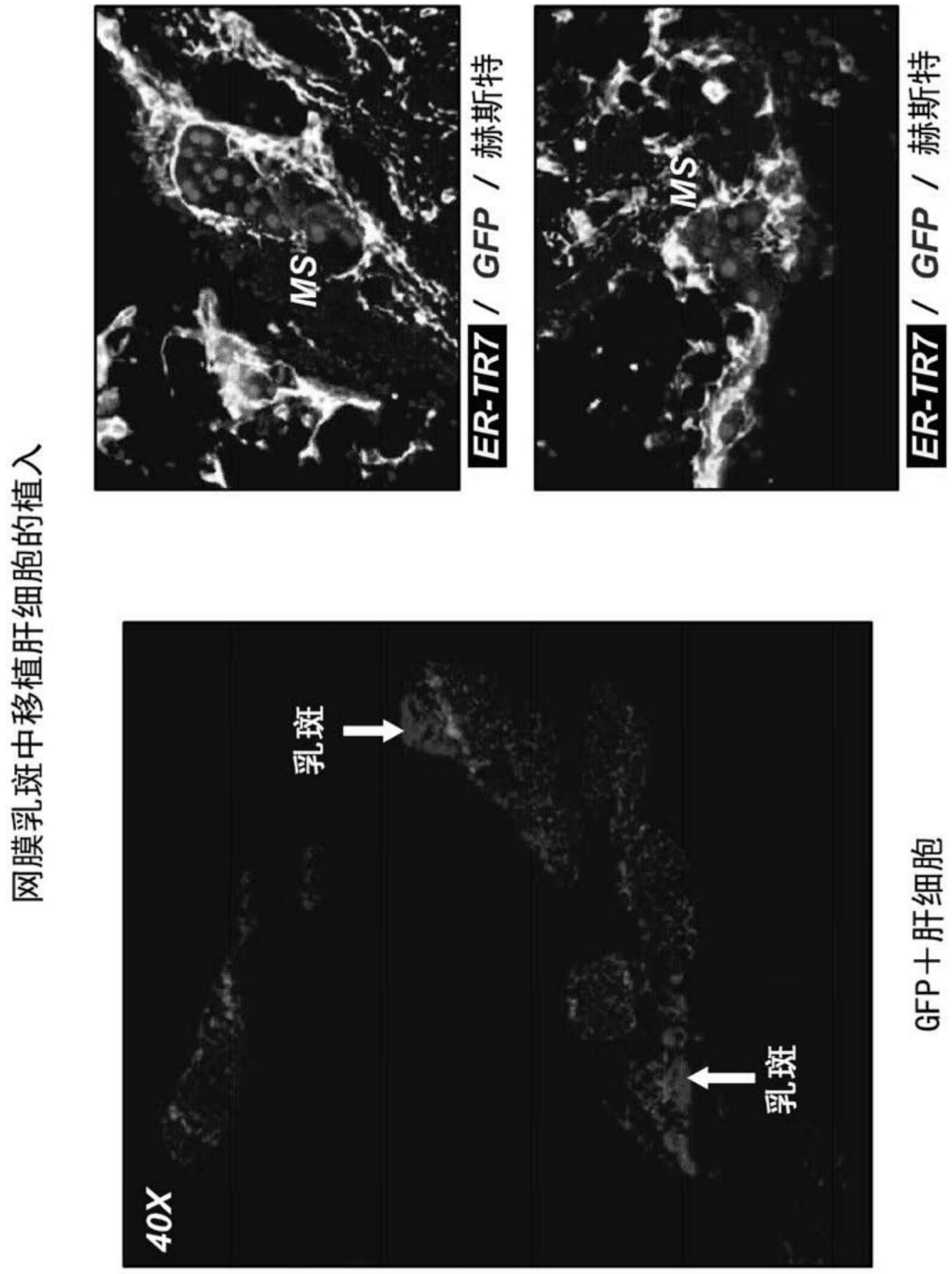

网膜乳斑中移植肝细胞的植入
MS
ER-TR7 / GFP / 赫斯特
MS
ER-TR7 / GFP / 赫斯特
40X
乳斑
乳斑
GFP＋肝细胞

图5

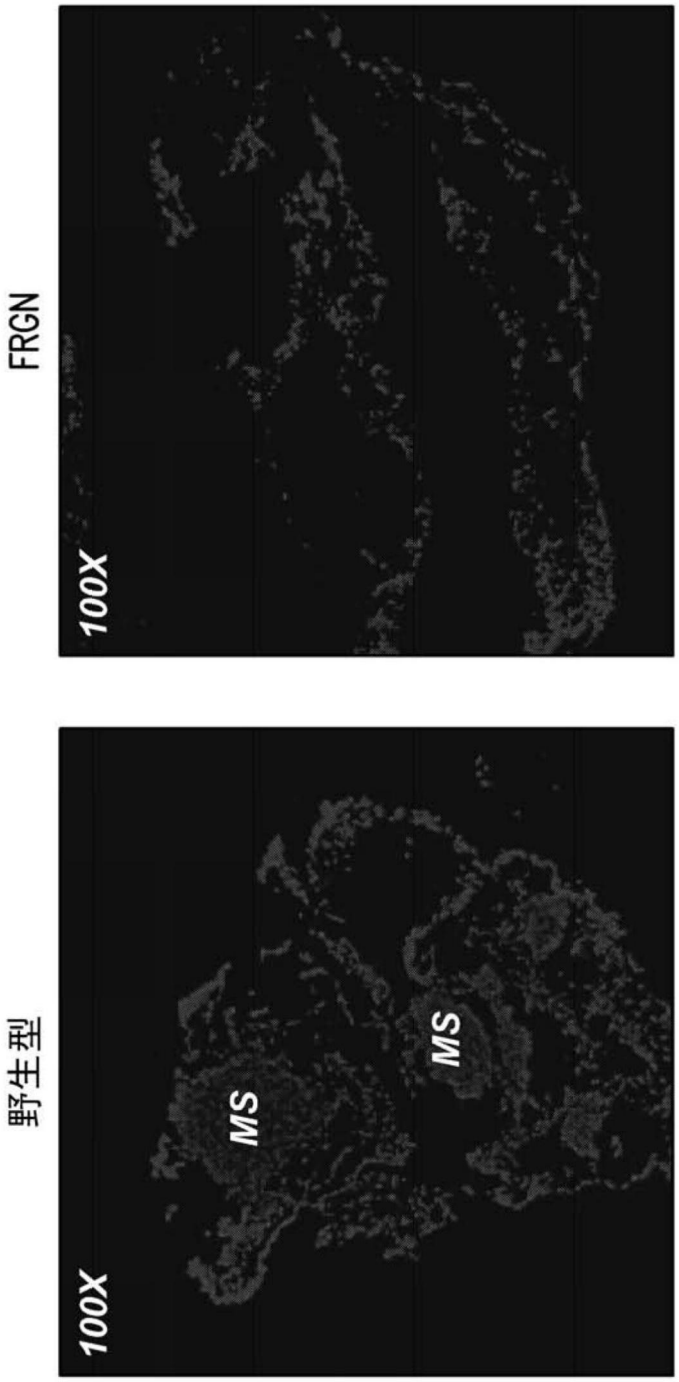


图6

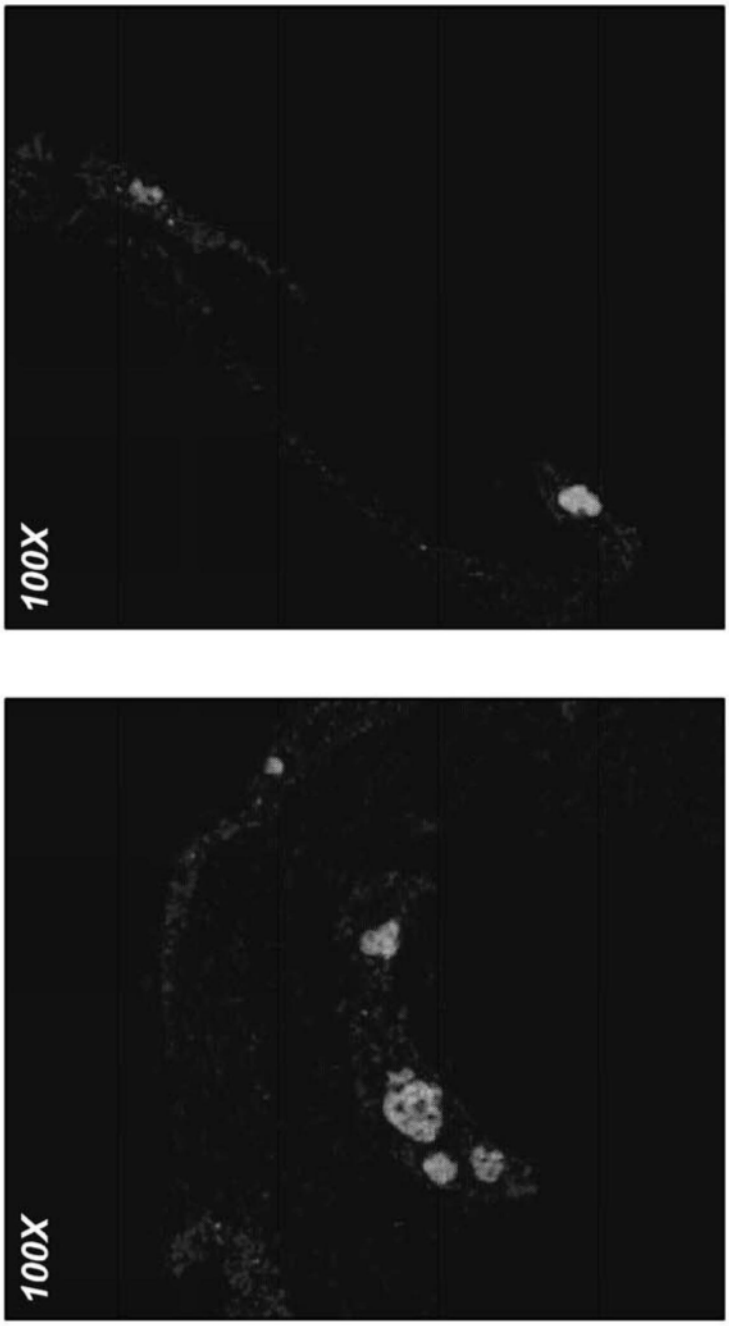


图7

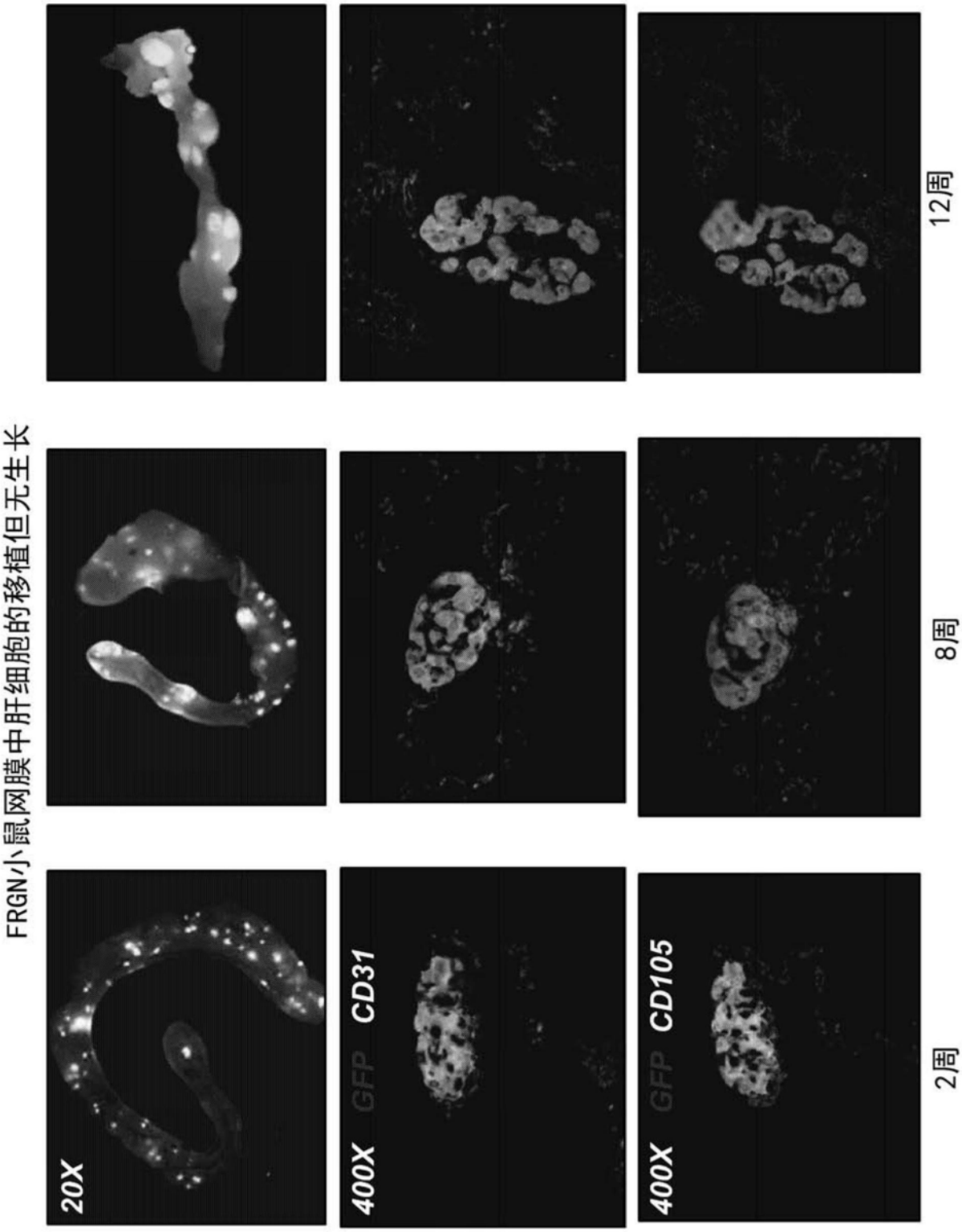

FRGN小鼠网膜中肝细胞的移植但无生长
20X
400X GFP CD31
400X GFP CD105
2周
8周
12周

图8

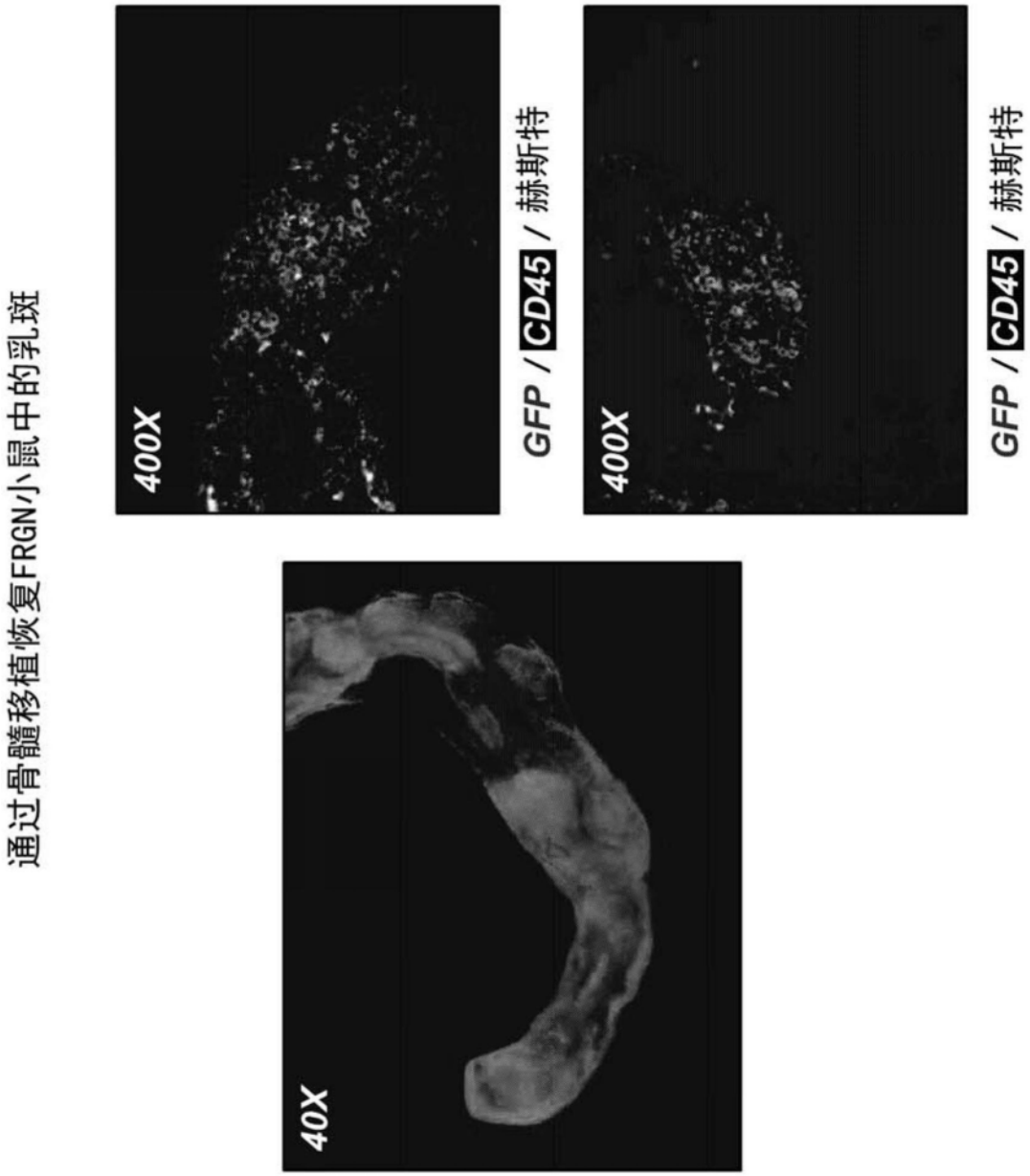


图9

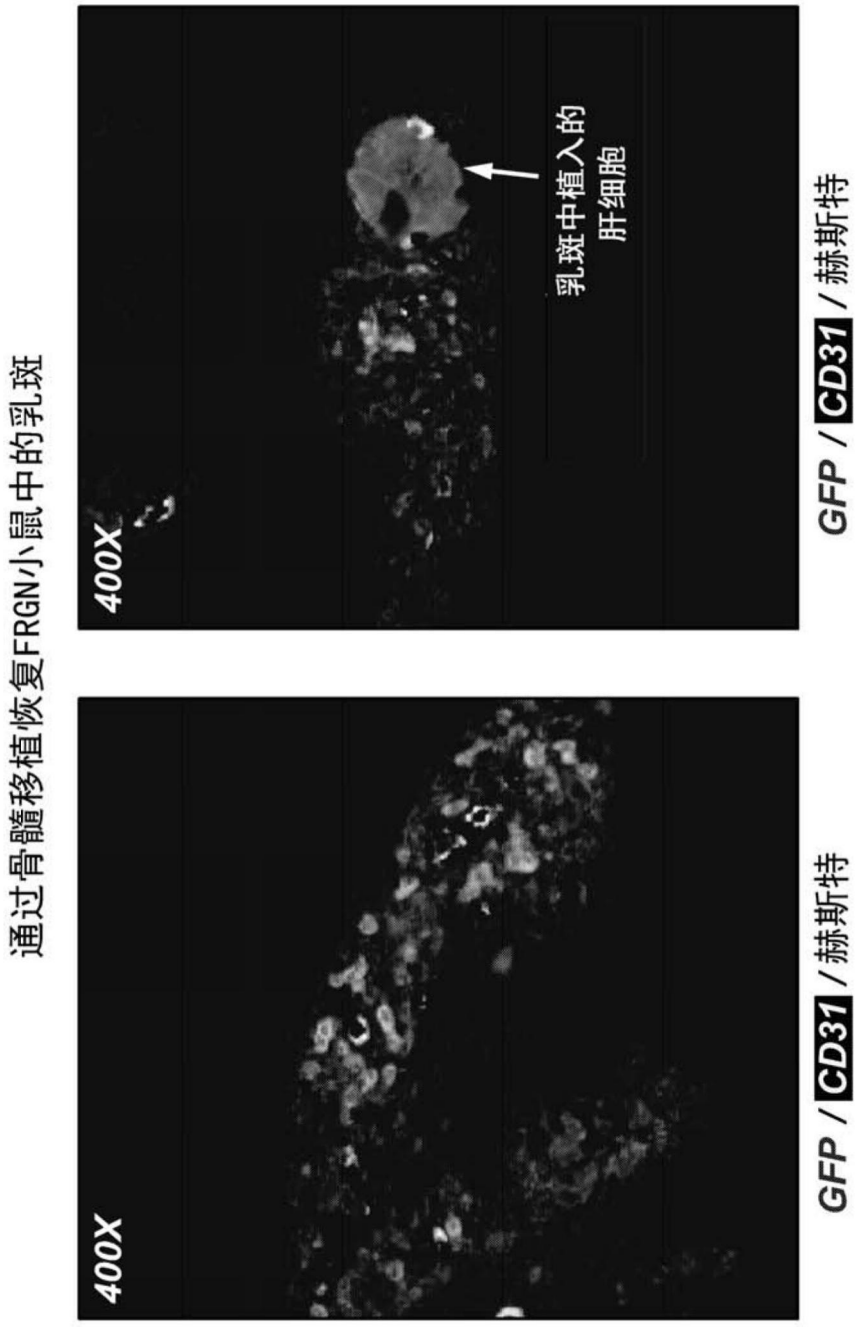

通过骨髓移植恢复FRGN小鼠中的乳斑
400X
GFP / CD31 / 赫斯特
400X
乳斑中植入的
肝细胞
GFP / CD31 / 赫斯特

图10

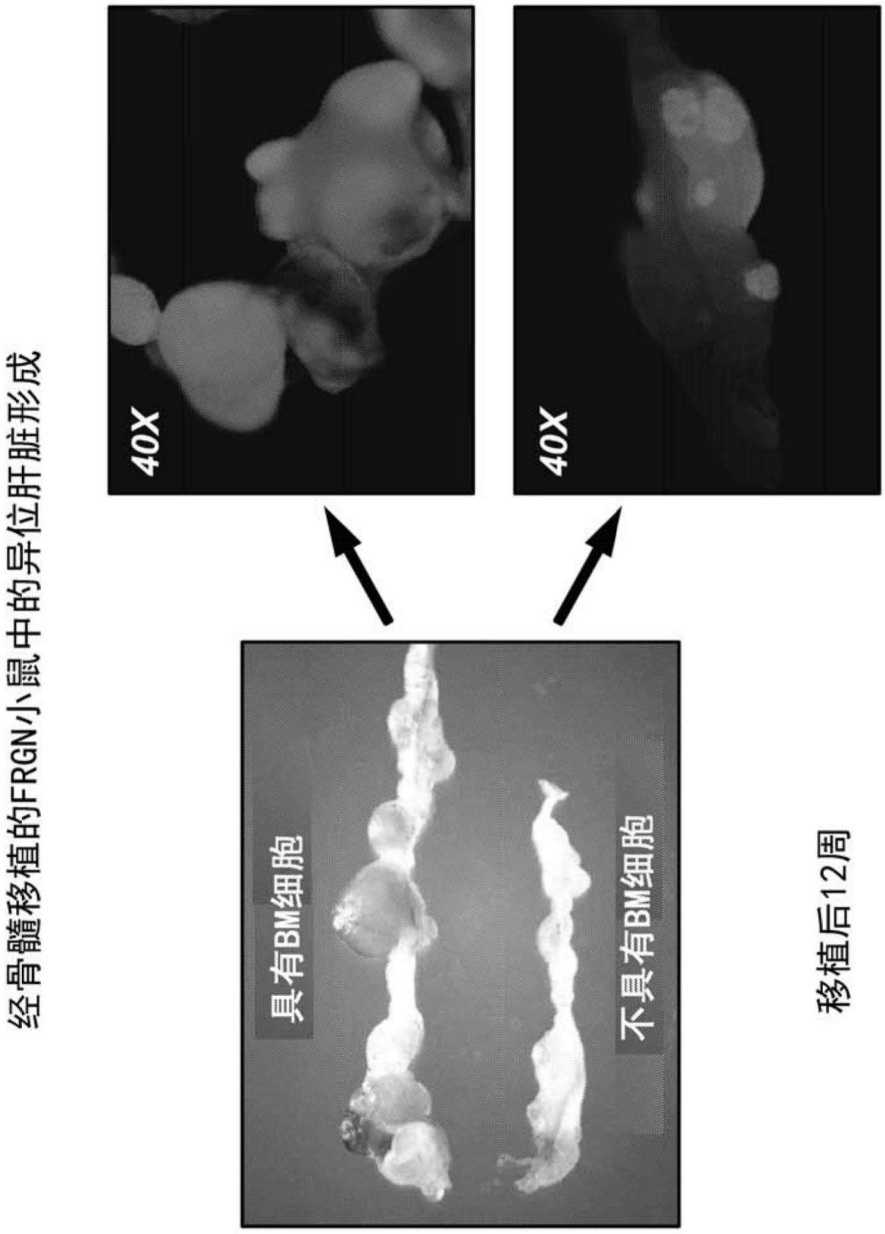


图11

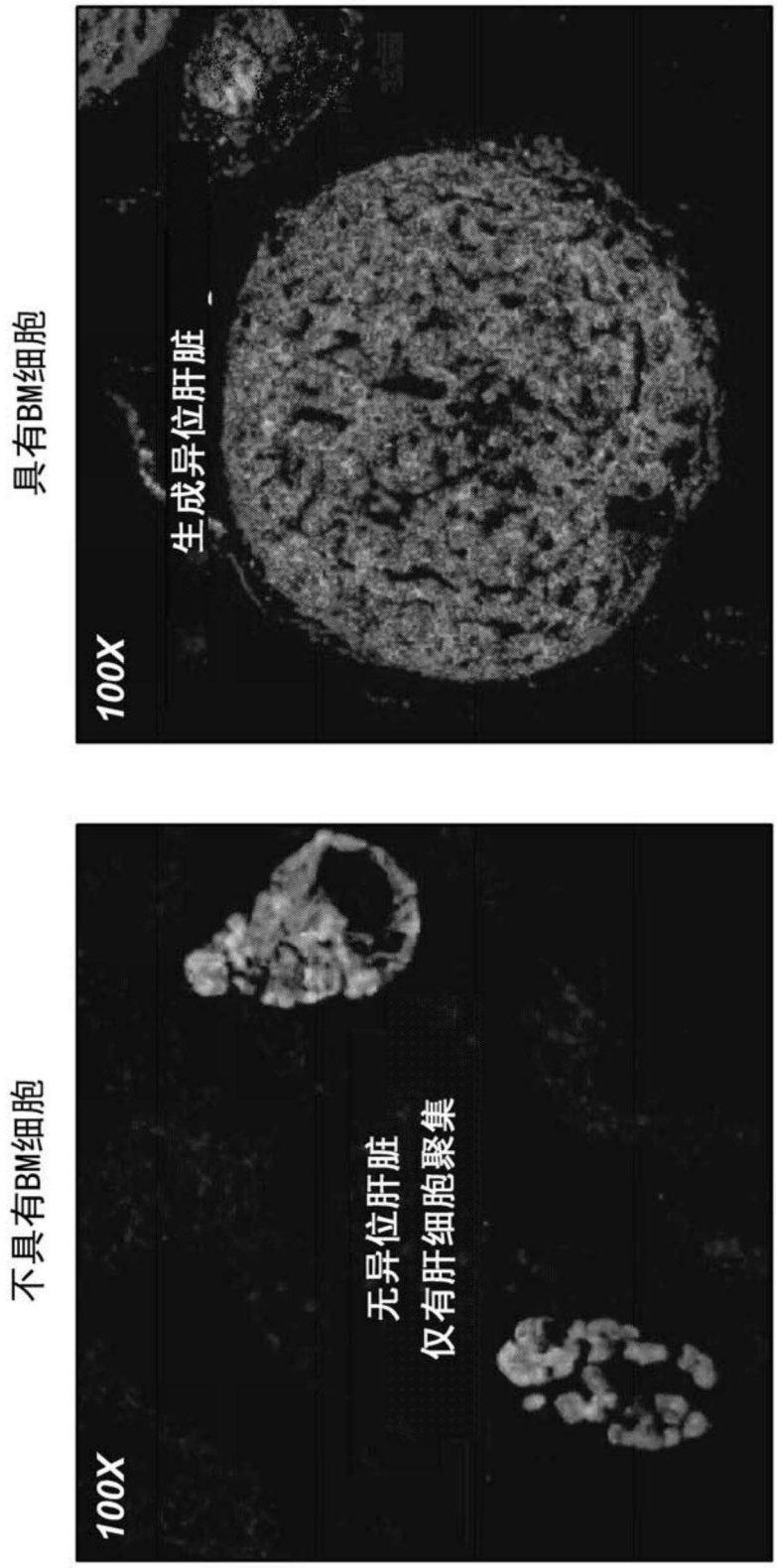


图12

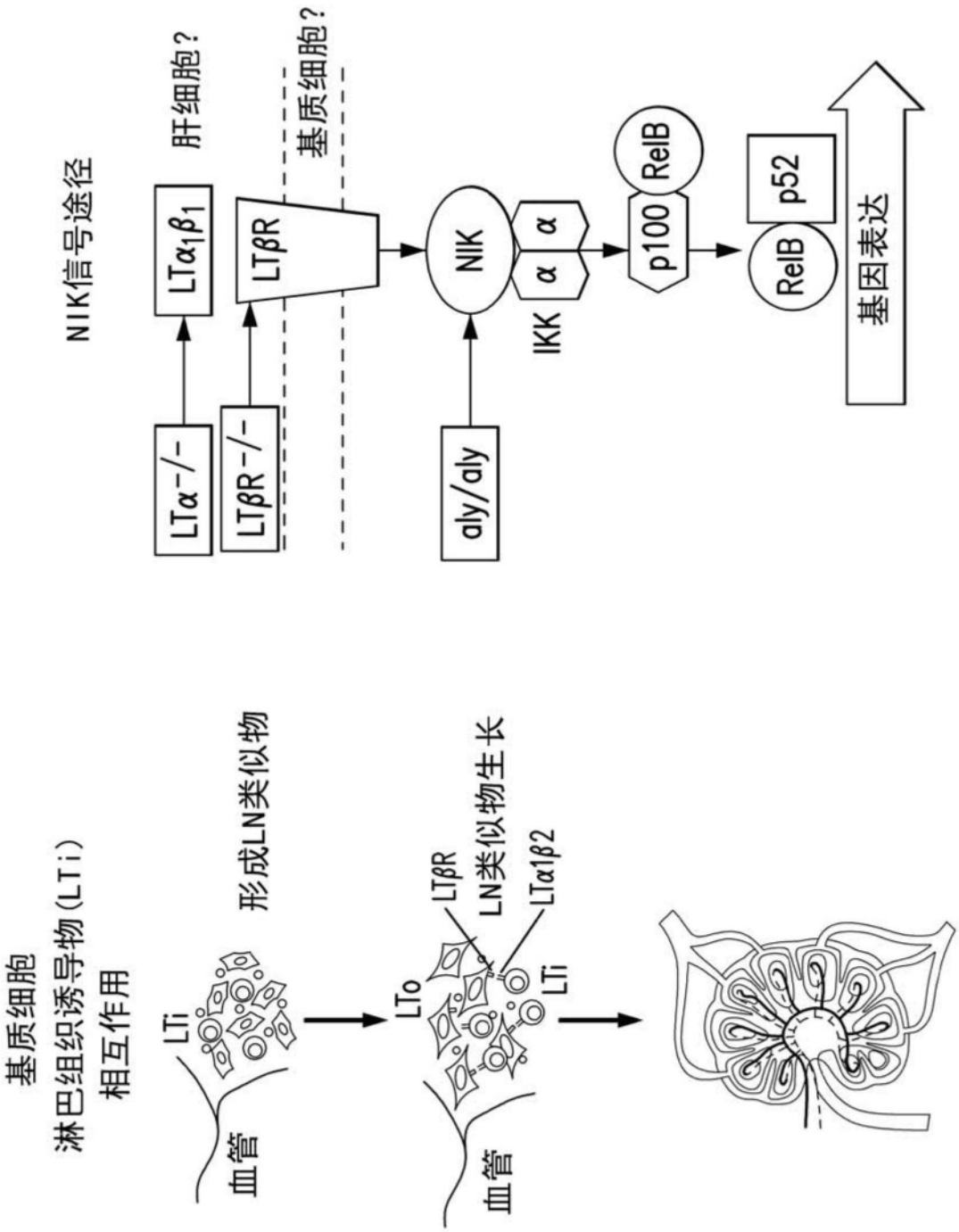

NIK信号途径
肝细胞?
基质细胞?
LTα1β1
LTβR
NIK
α
α
IKK
p100
RelB
RelB
p52
基因表达
LTα-/-
LTβR-/-
aly/aly
基质细胞
淋巴组织诱导物(LTi)
相互作用
形成LN类似物
LTi
血管
LTo
LTβR
LN类似物生长
LTα1β2
LTi
血管

图13

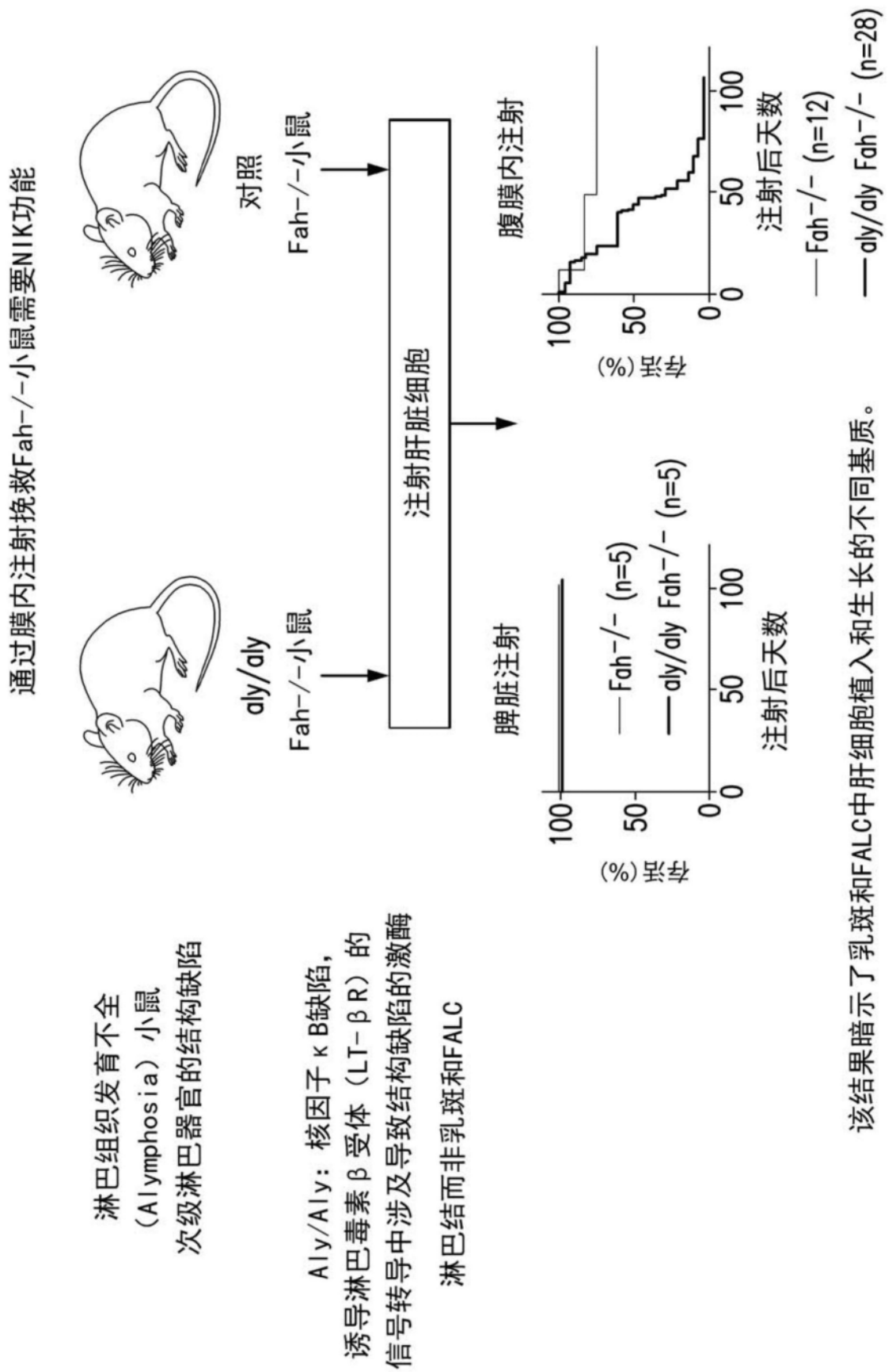

通过膜内注射挽救Fah−/−小鼠需要NIK功能
对照
Fah−/−小鼠
aly/aly
Fah−/−小鼠
注射肝脏细胞
脾脏注射
腹膜内注射
存活(%)
Fah−/− (n=5)
aly/aly Fah−/− (n=5)
注射后天数
存活(%)
Fah−/− (n=12)
aly/aly Fah−/− (n=28)
注射后天数
该结果暗示了乳斑和FALC中肝细胞植入和生长的不同基质。
淋巴组织发育不全
(Alymphosia) 小鼠
次级淋巴器官的结构缺陷
Aly/Aly：核因子κB缺陷，
诱导淋巴毒素β受体（LT-βR）的
信号转导中涉及导致结构缺陷的激酶
淋巴结而非乳斑和FALC

图14

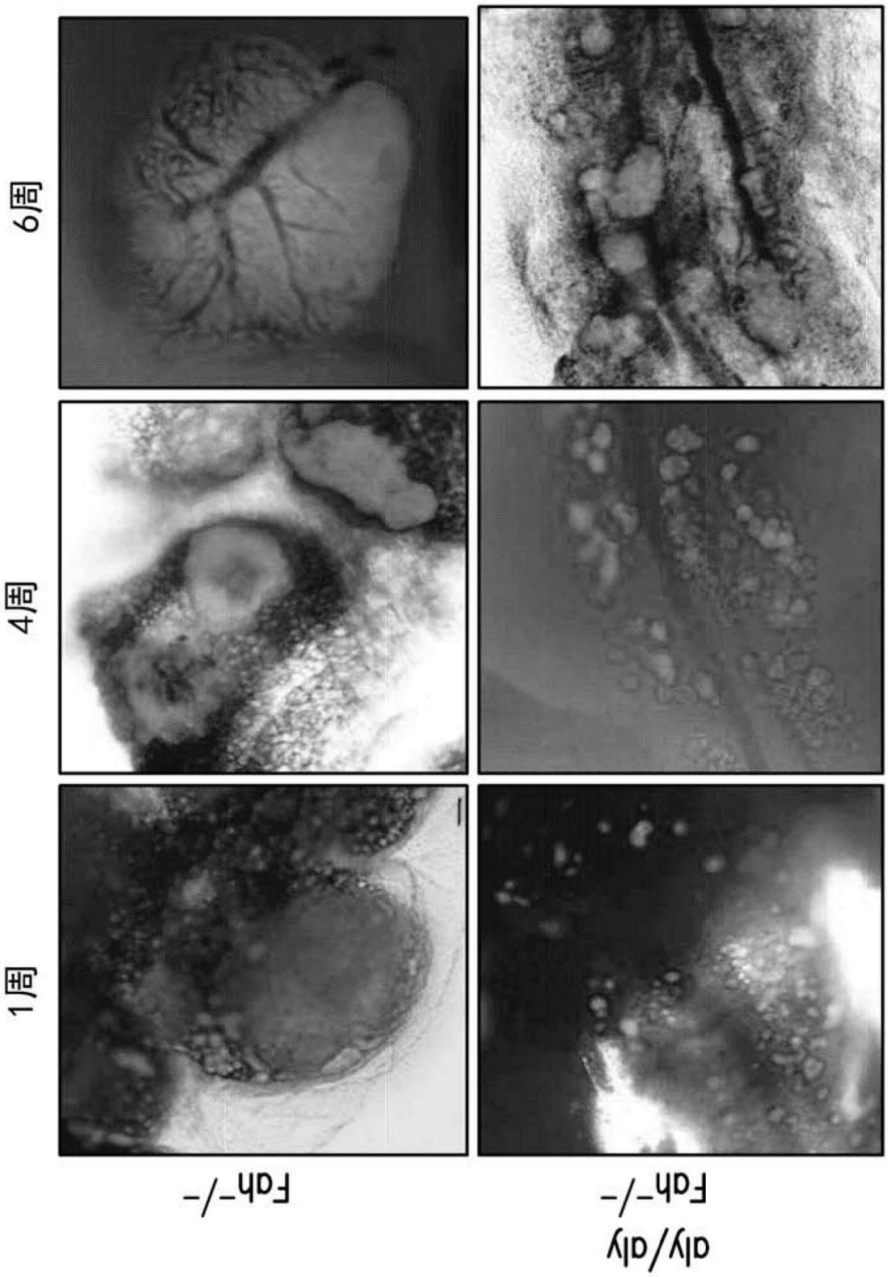


图15

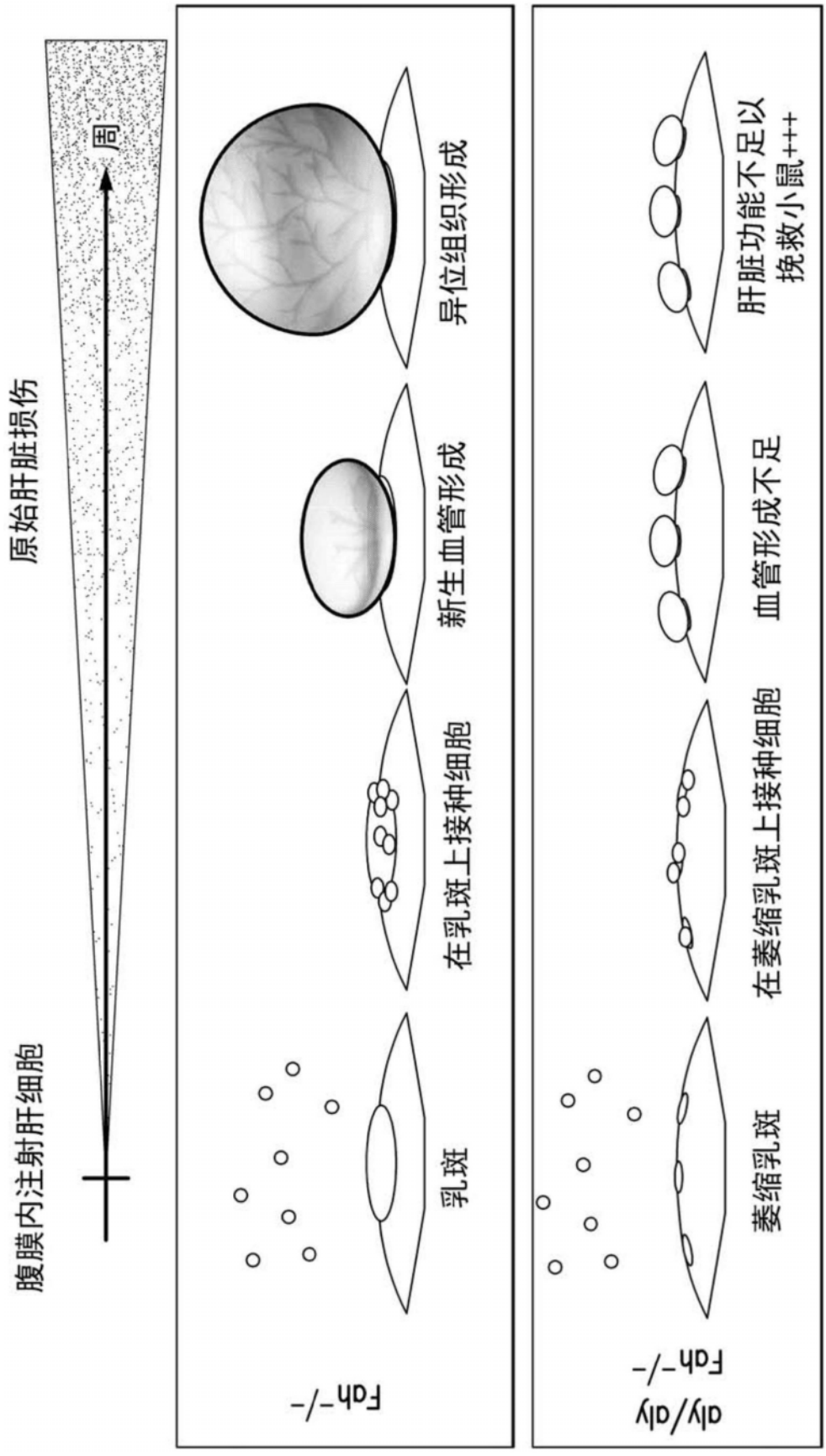

腹膜内注射肝细胞
原始肝脏损伤
周
Fah-/-
乳斑
在乳斑上接种细胞
新生血管形成
异位组织形成
Oly/Oly
Fah-/-
萎缩乳斑
在萎缩乳斑上接种细胞
血管形成不足
肝脏功能不足以
挽救小鼠+++

图16

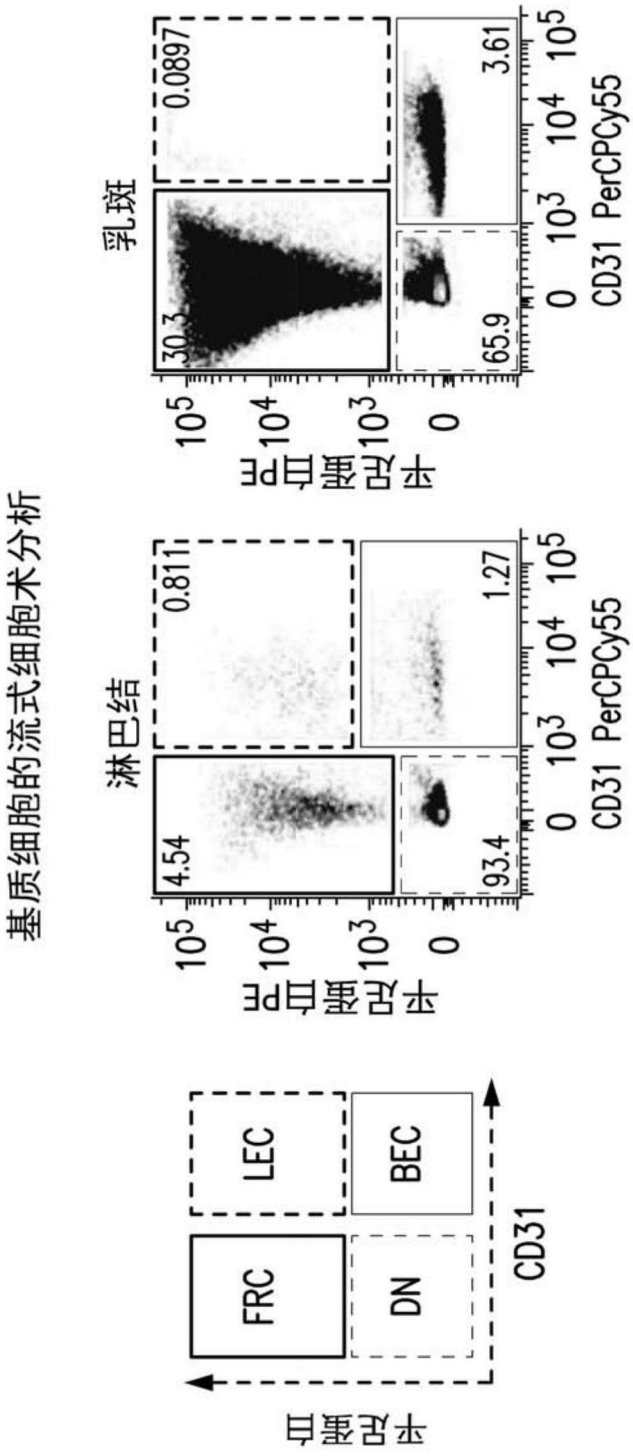

基质细胞的流式细胞术分析
淋巴结
乳斑
平足蛋白PE
CD31 PerCPCy55
4.54
0.811
93.4
1.27
30.3
0.0897
65.9
3.61
平足蛋白
CD31
FRC
LEC
DN
BEC

图17A

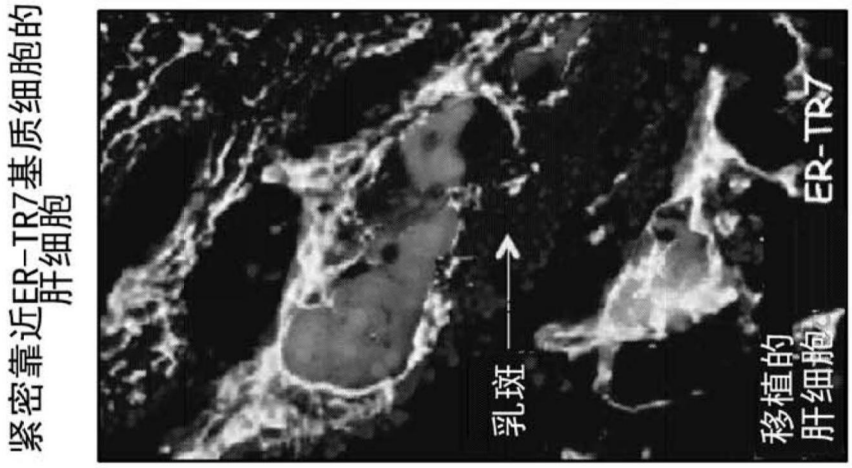


图17B

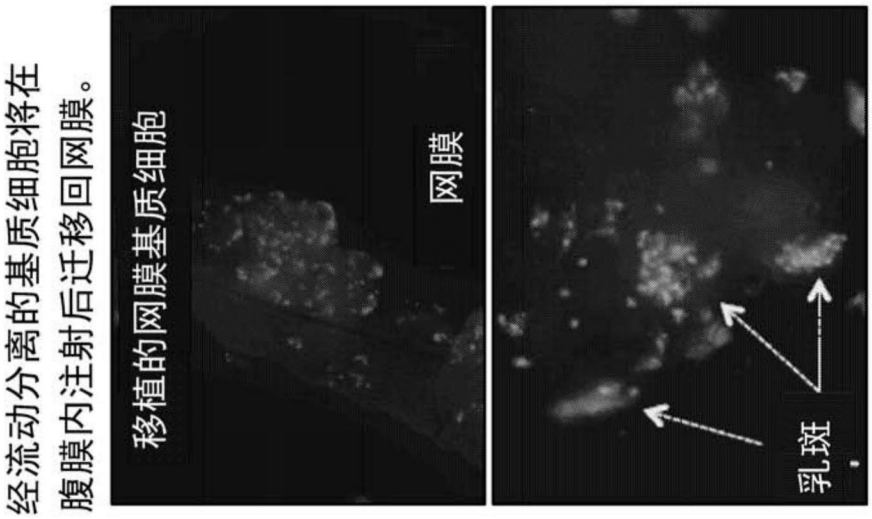


图17C

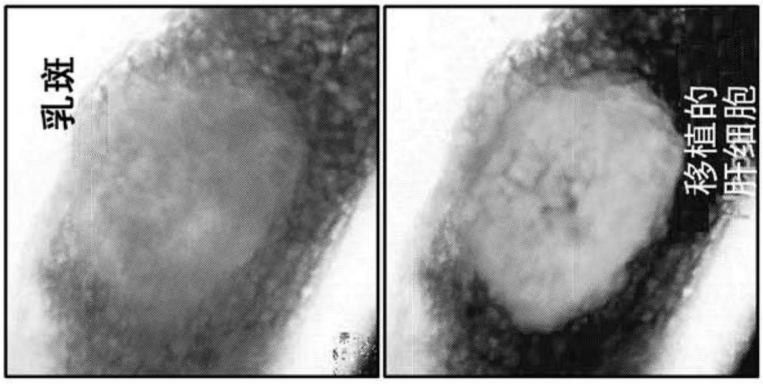


图17D

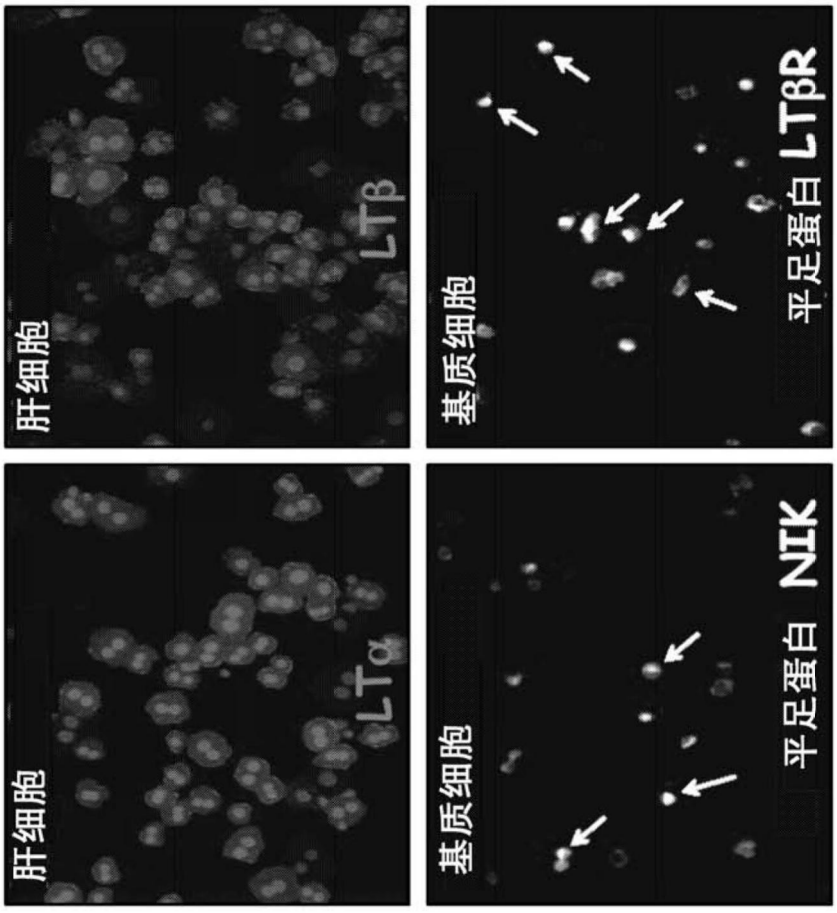


图18

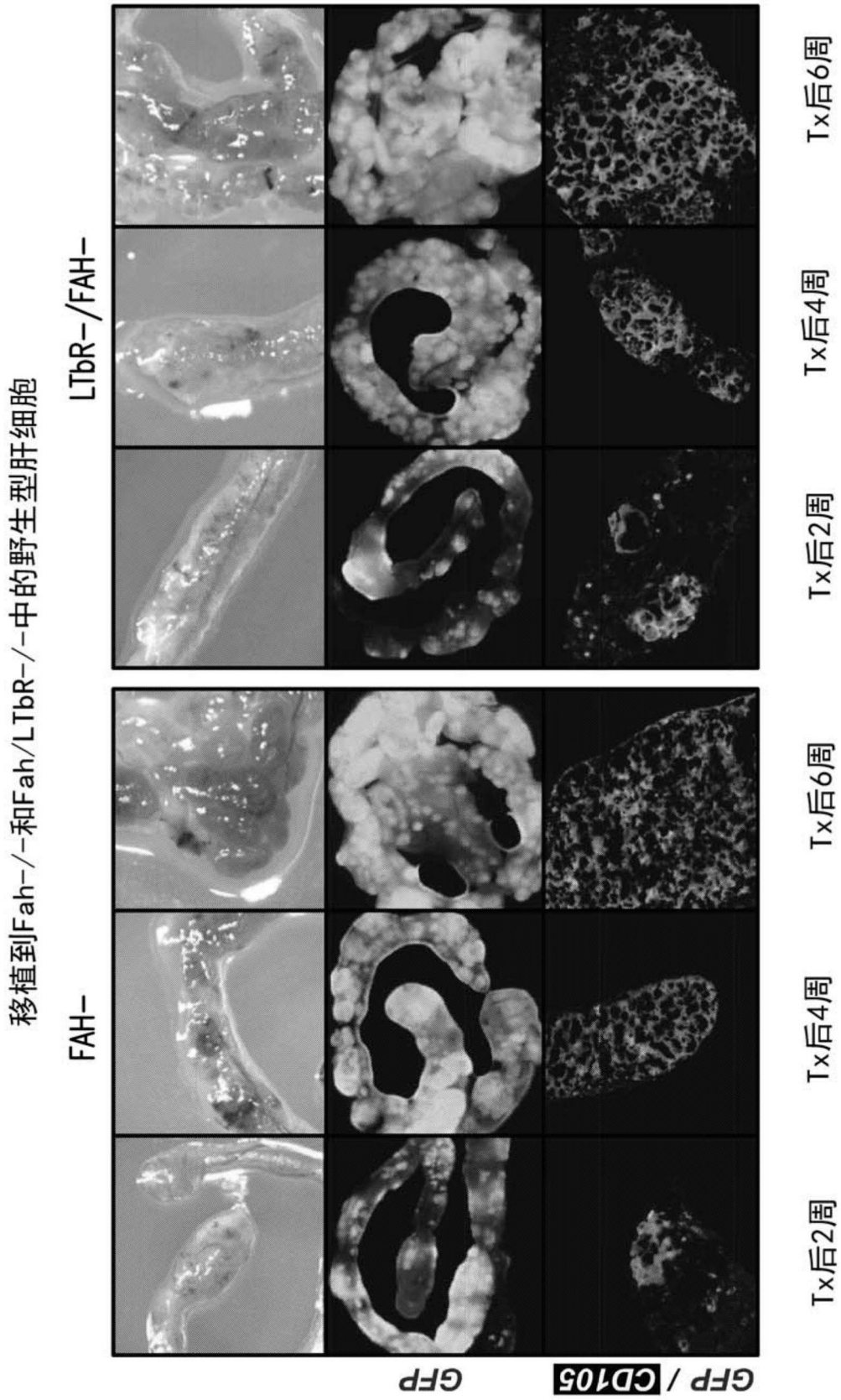

移植到Fah-/-和Fah/LTbR-/-中的野生型肝细胞
FAH-
LTbR-/FAH-
Tx后2周
Tx后4周
Tx后6周
Tx后2周
Tx后4周
Tx后6周
GFP
GFP / CD105

图19

图20A

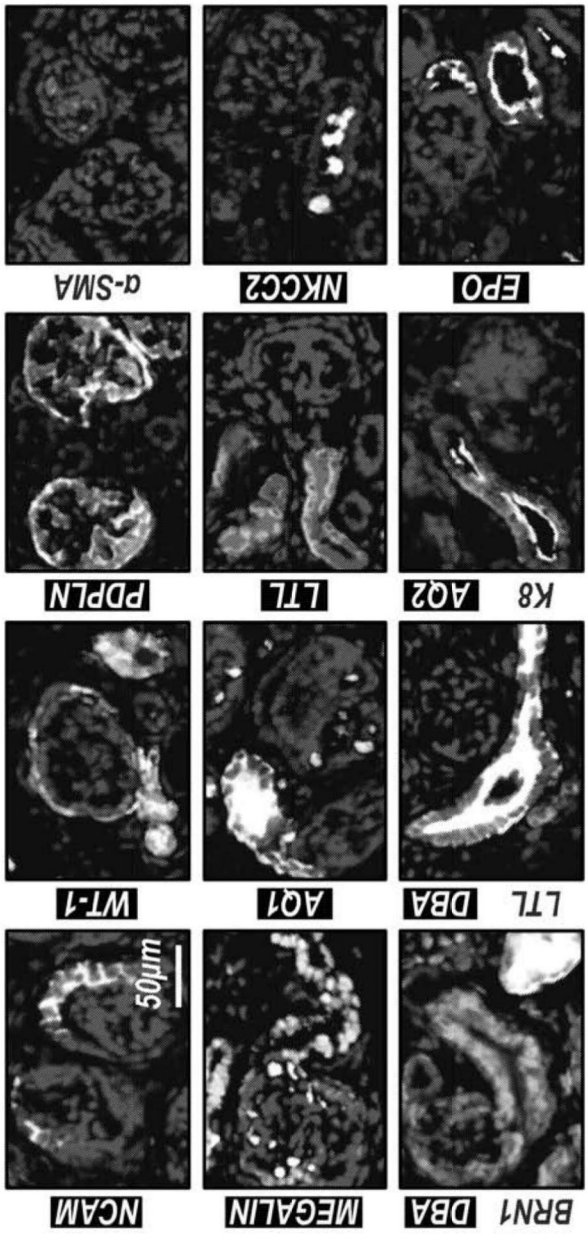

α-SMA
NKCC2
EPO
PDPLN
LTL
AQ2
K8
WT-1
AQ1
DBA
LTL
50μm
NCAM
MEGALIN
DBA
BRN1

图20B

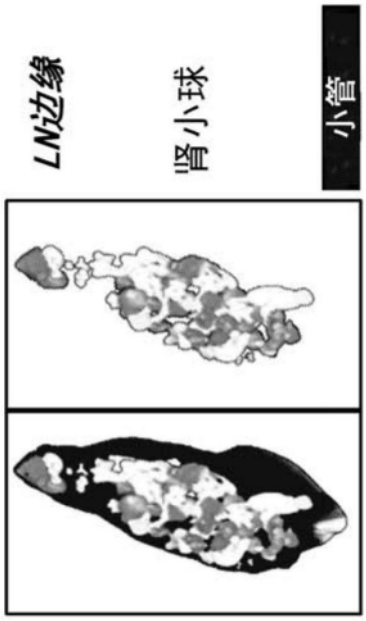


图20C

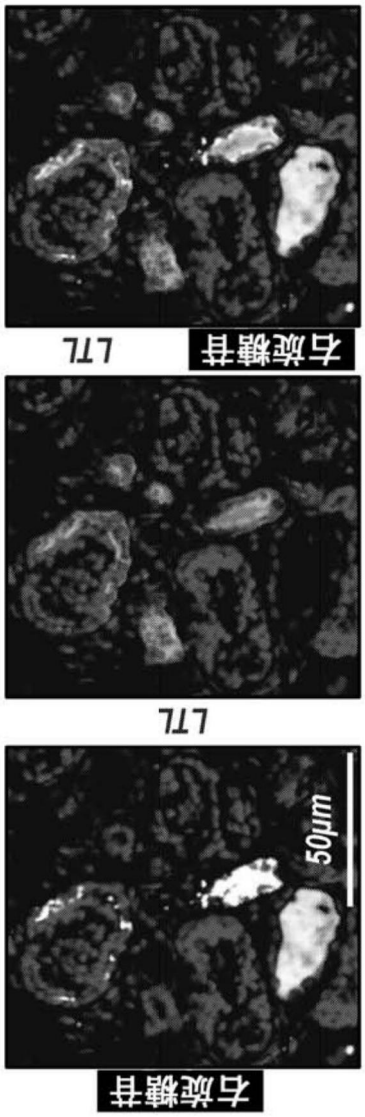


图20D

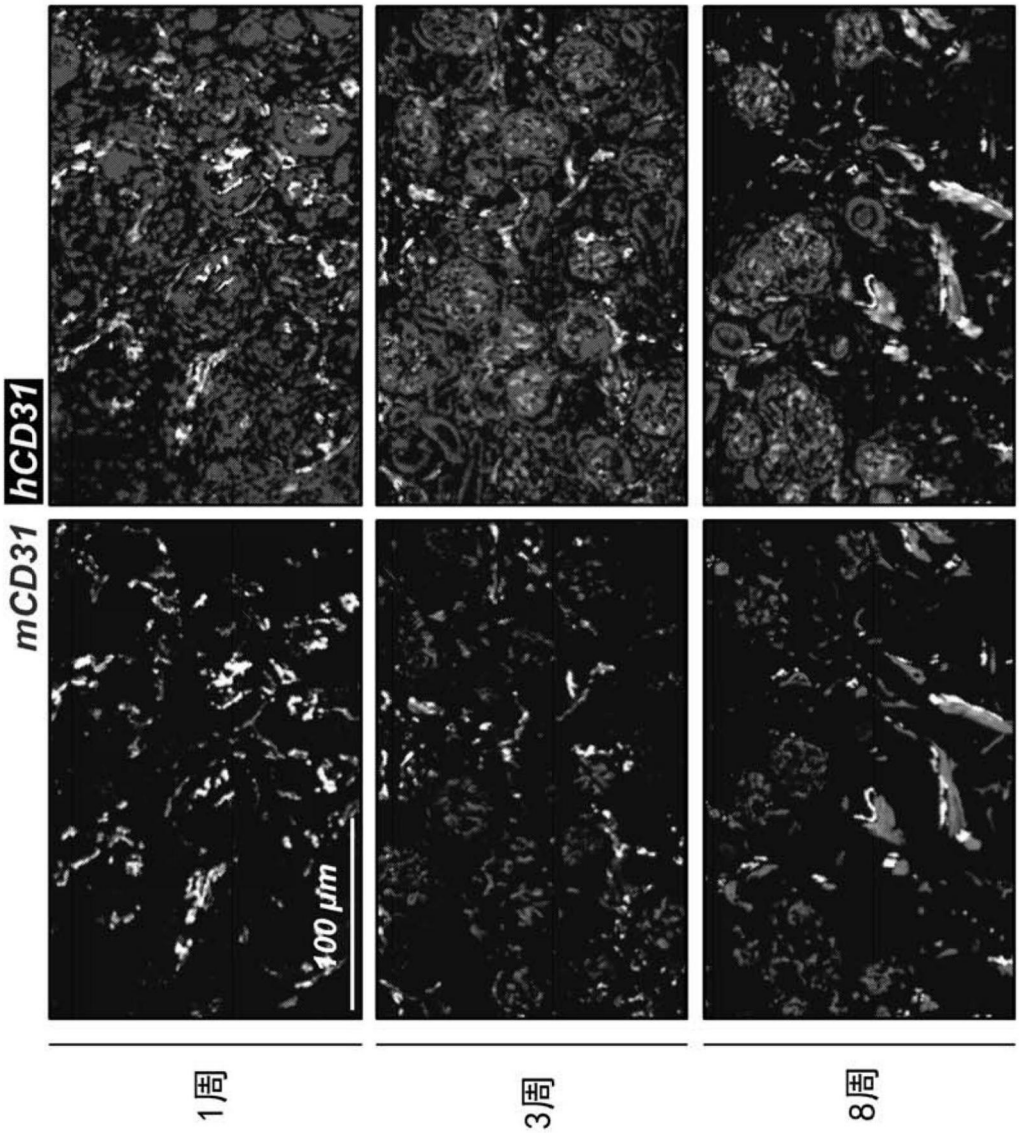


图20E

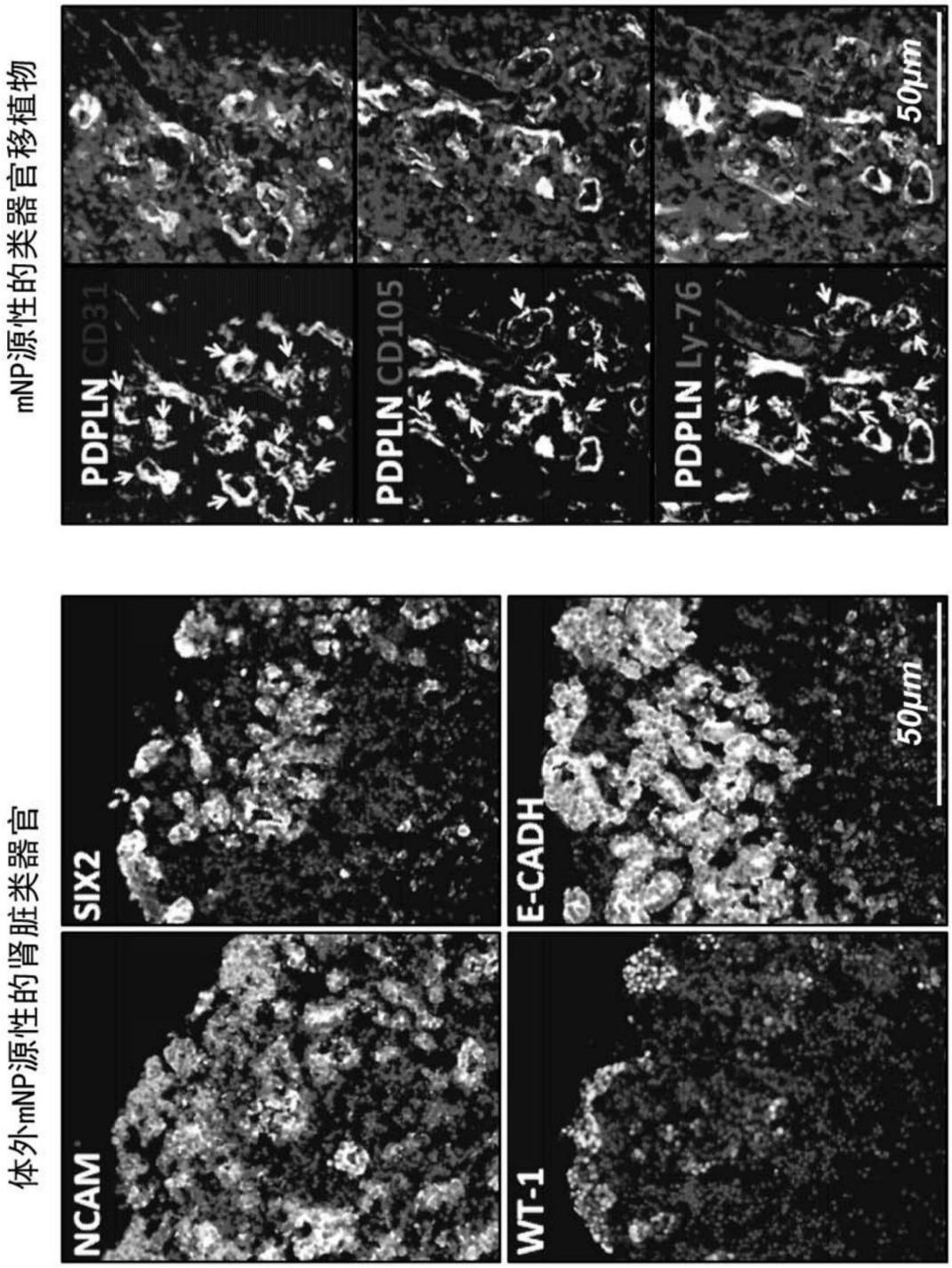

体外mNP源性的肾脏类器官
NCAM
SIX2
WT-1
E-CADH
50μm
mNP源性的类器官移植物
PDPLN CD31
PDPLN CD105
PDPLN Ly-76
50μm

图20F

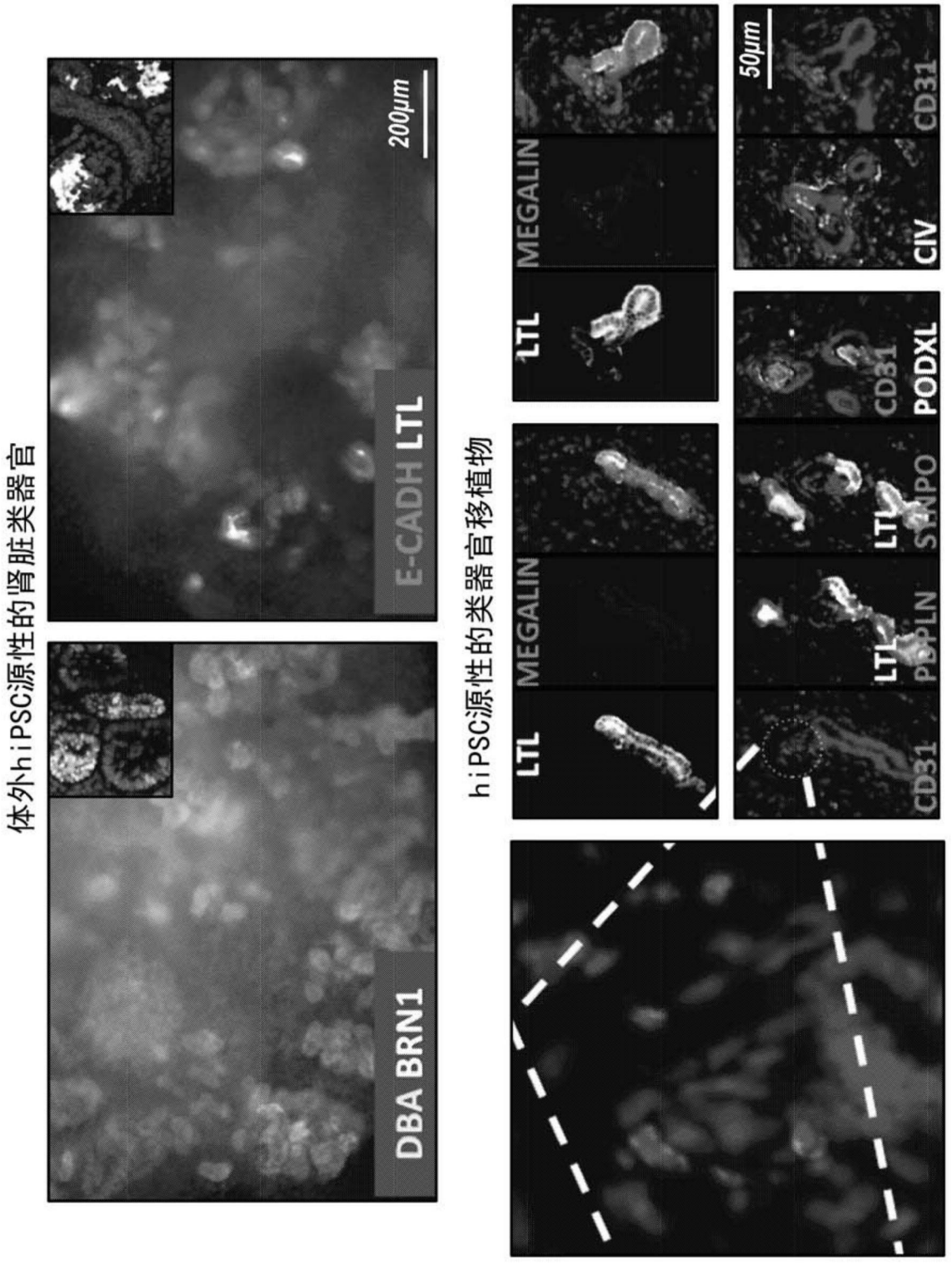

体外hiPSC源性的肾脏类器官
DBA BRN1
E-CADH LTL
200μm
hiPSC源性的类器官移植物
LTL
MEGALIN
CD31
PODPLN
LTL
SYNPO
CD31
PODXL
LTL
MEGALIN
50μm
CIV
CD31

图20G

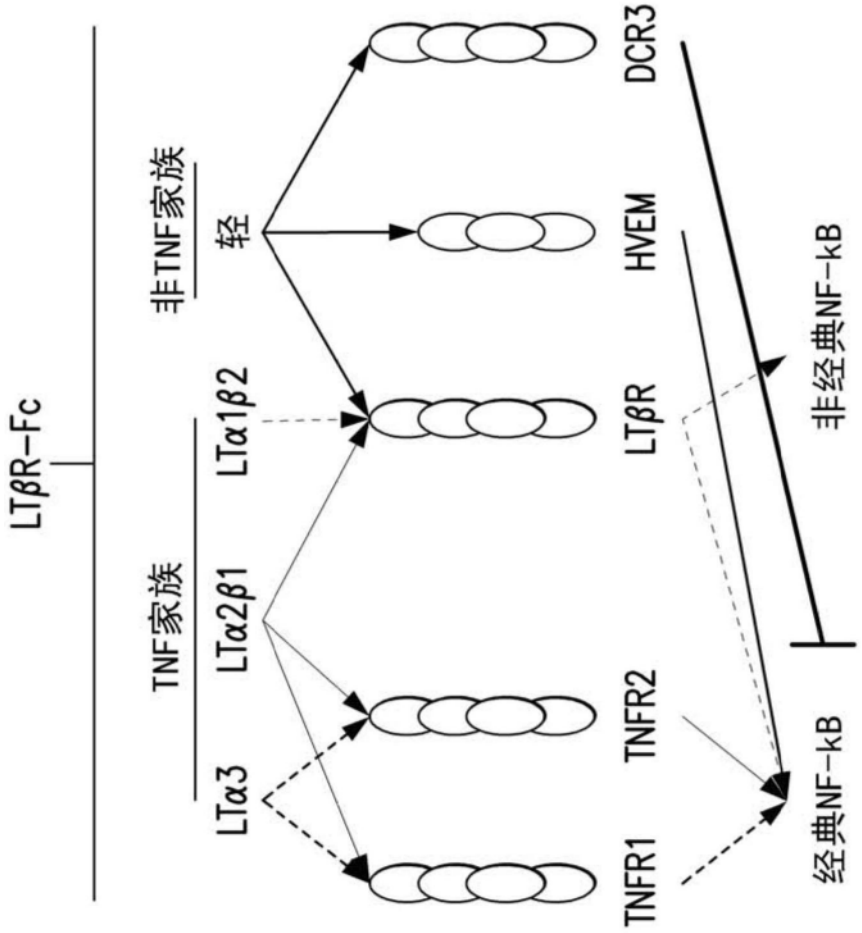

LTβR-Fc
TNF家族
LTα3
LTα2β1
LTα1β2
非TNF家族
轻
TNFR1
TNFR2
LTβR
HVEM
DCR3
经典NF-kB
非经典NF-kB

图21

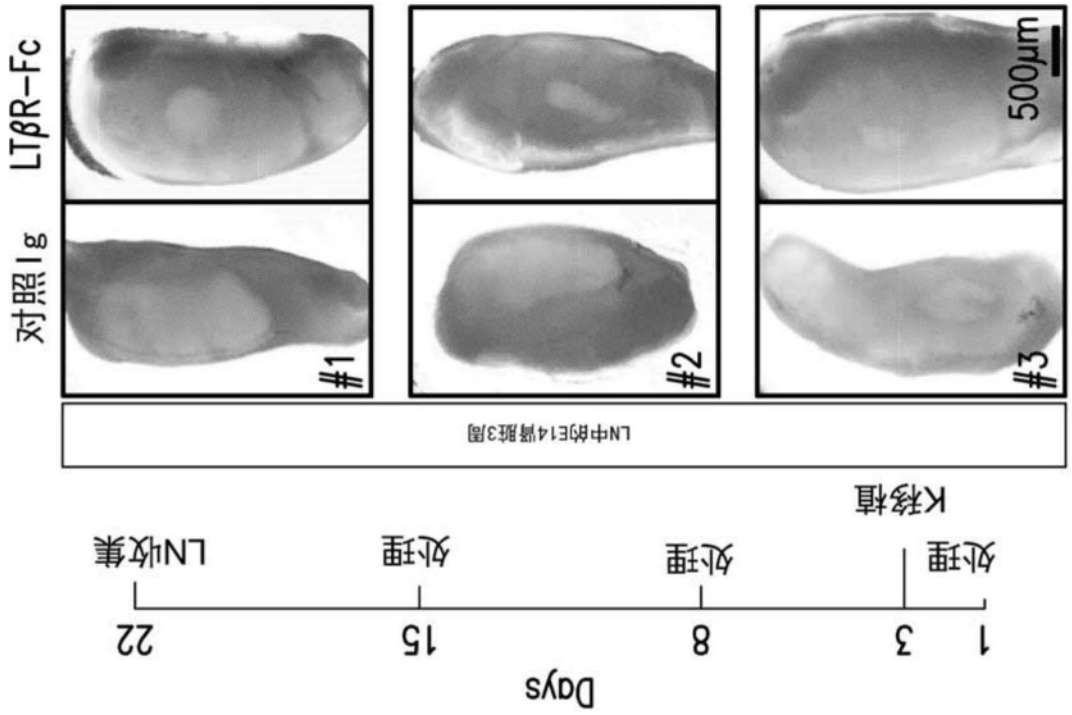

LTβR-Fc
对照Ig
#1
#2
#3
500μm
LN中的E14将胚3周
K移植
处理
处理
处理
LN收集
1
3
8
15
22
Days

图22A

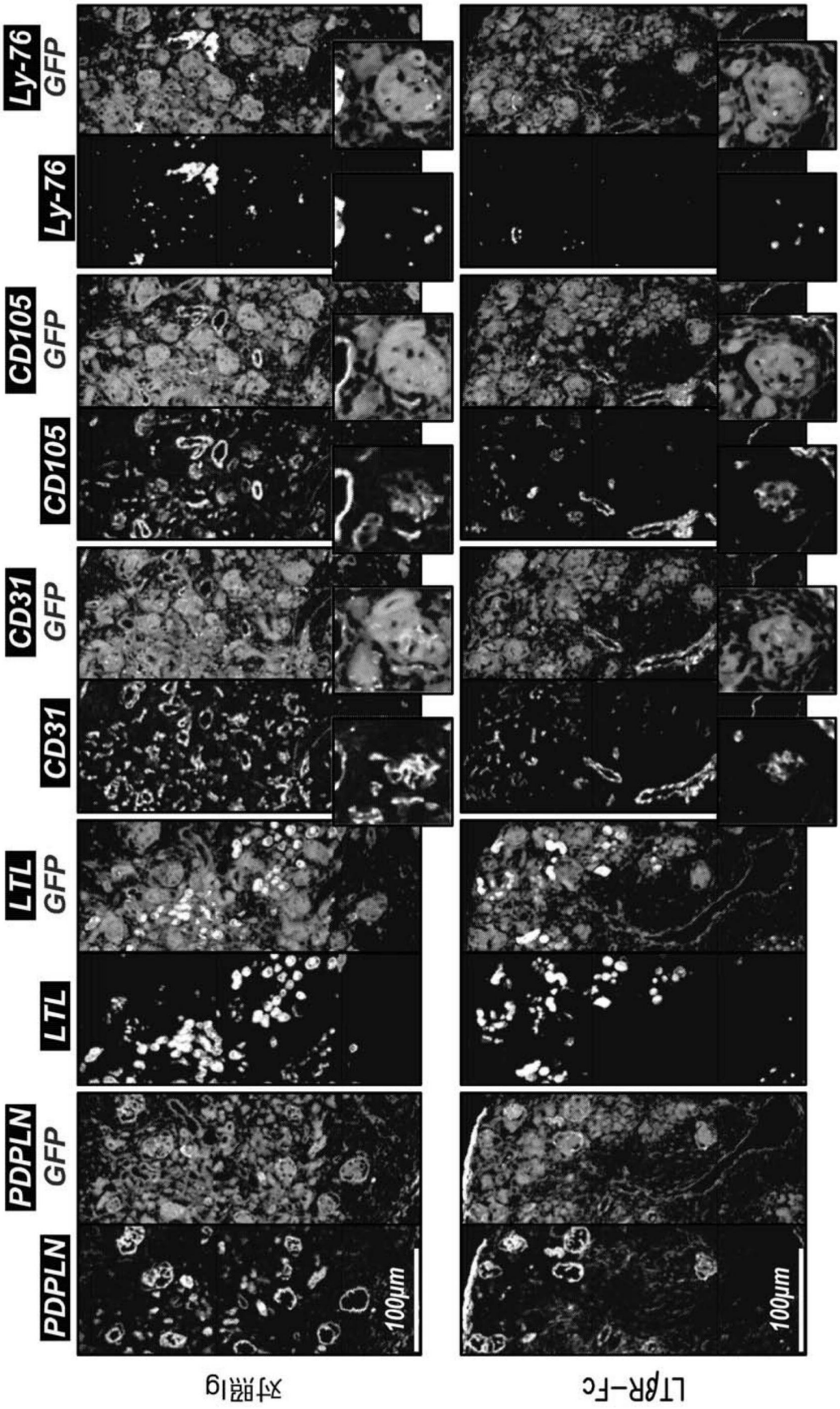

PDPLN
PDPLN GFP
LTL
LTL GFP
CD31
CD31 GFP
CD105
CD105 GFP
Ly-76
Ly-76 GFP
100μm
对照Ig
LTβR-Fc

图22B

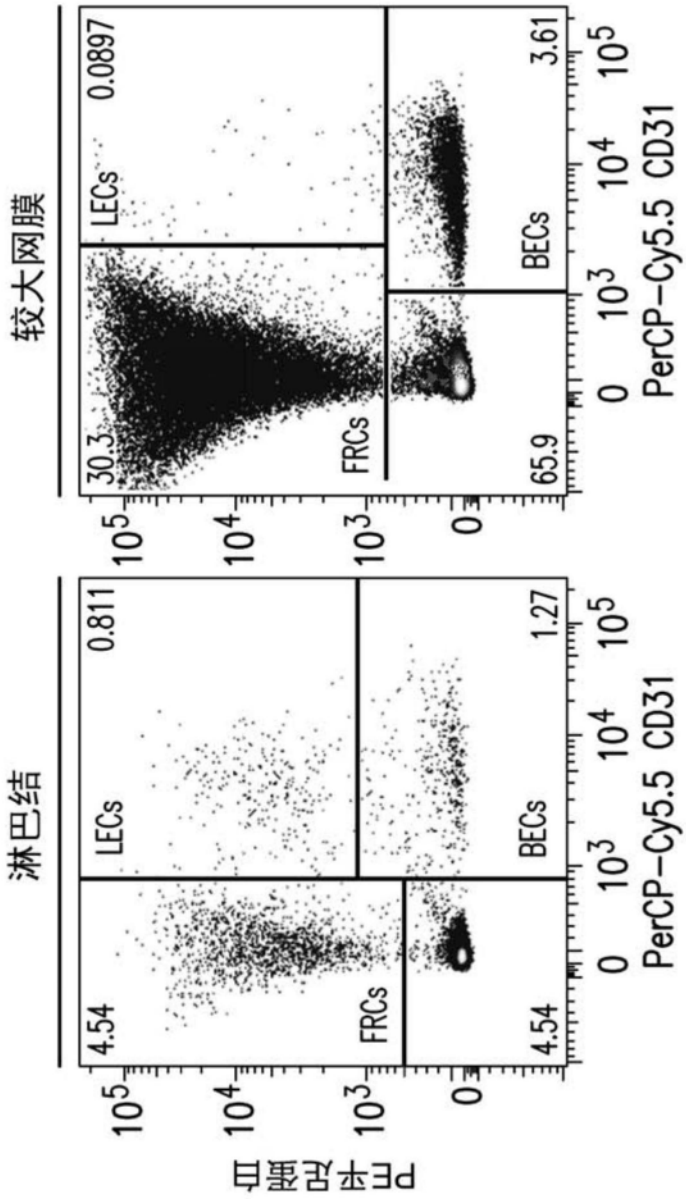

较大网膜
淋巴结
LECs
FRCs
BECs
30.3
0.0897
65.9
3.61
4.54
0.811
1.27
PE平足蛋白
PerCP-Cy5.5 CD31

图22C

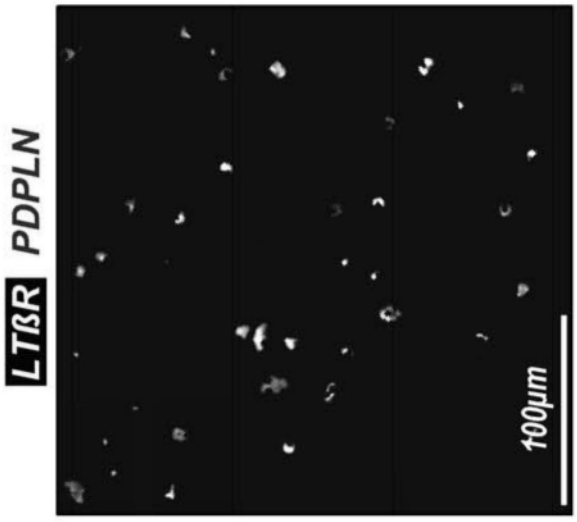

LTβR PDPLN
100μm

图22D

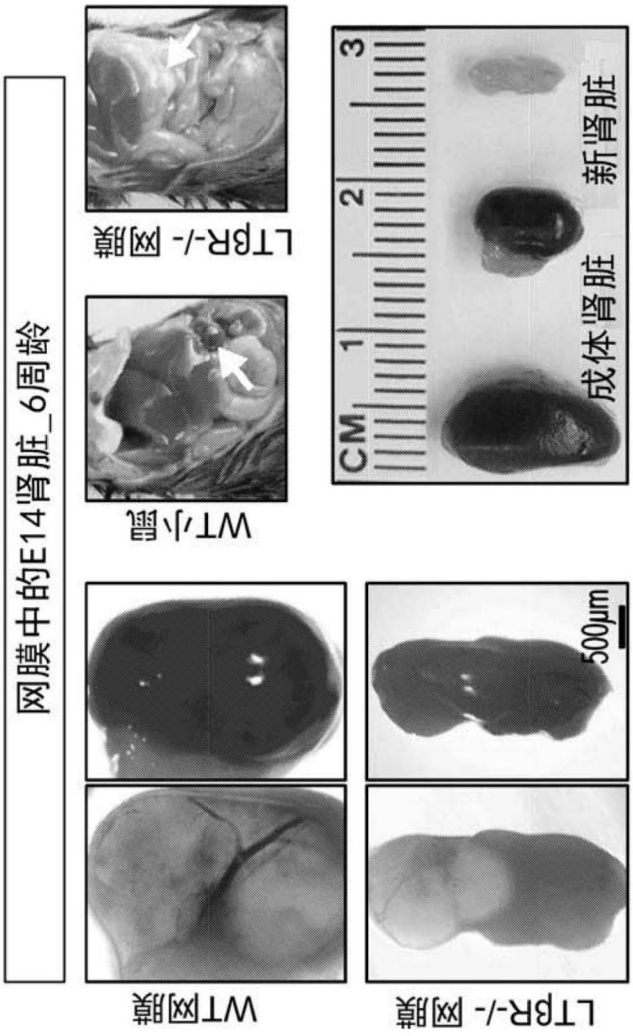

网膜中的E14肾脏_6周龄
WT小鼠
LTβR-/- 网膜
CM
1
2
3
成体肾脏
新肾脏
500μm
WT网膜
LTβR-/- 网膜

图22E

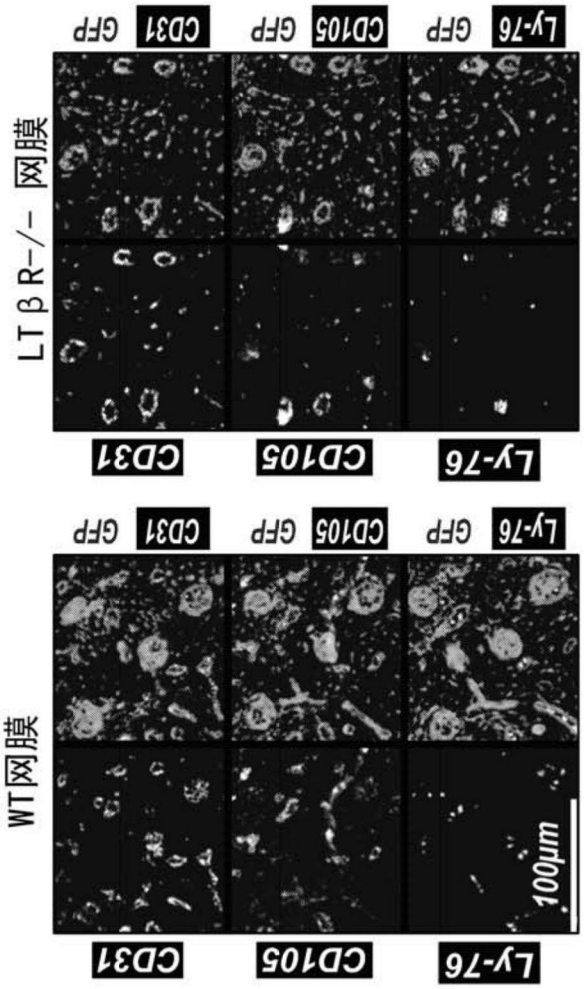

LT β R−/− 网膜
WT网膜
CD31 GFP
CD105 GFP
Ly-76 GFP
CD31
CD105
Ly-76
100μm

图22F

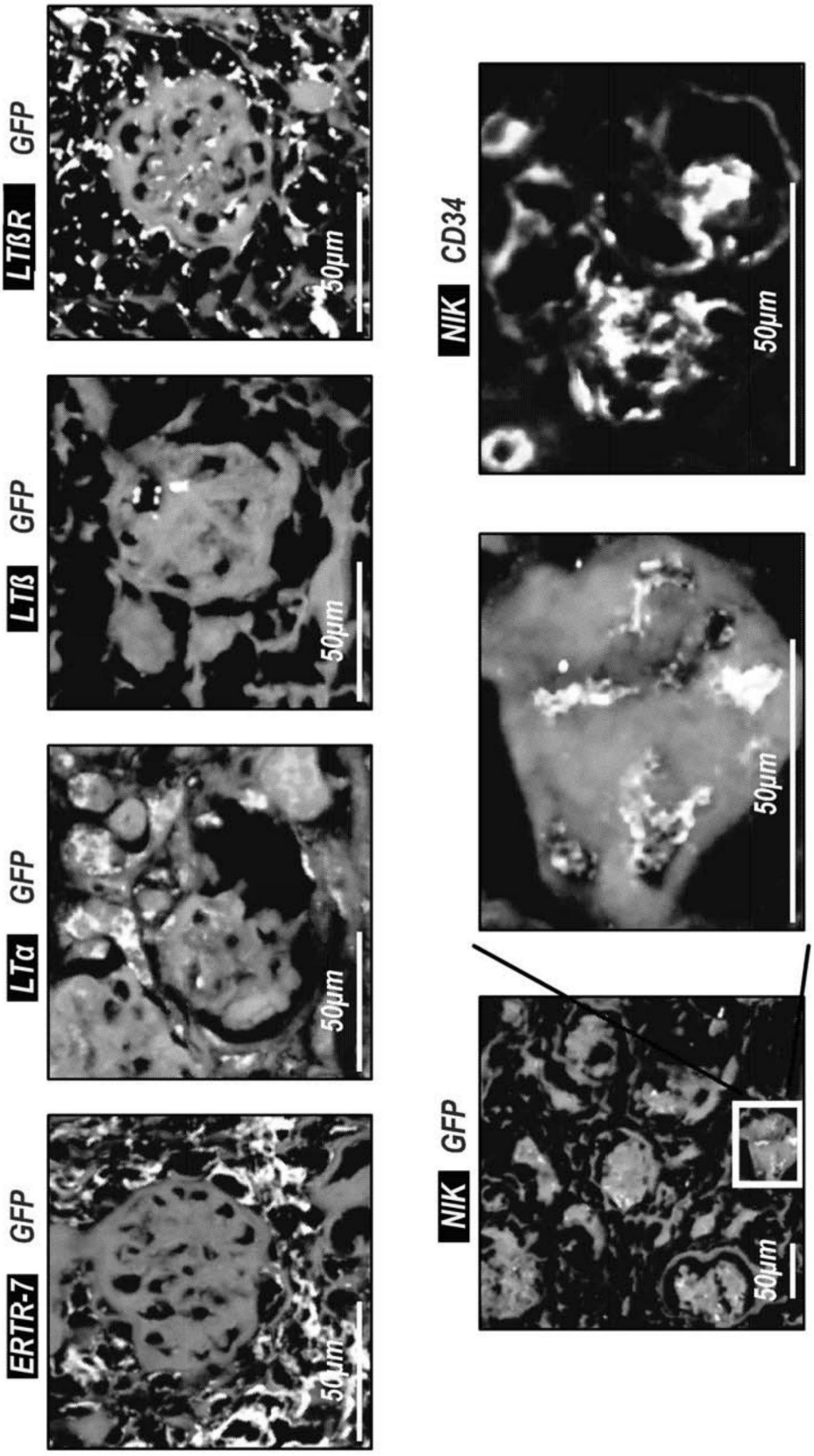

ERTR-7 GFP
50μm
LTα GFP
50μm
LTß GFP
50μm
LTßR GFP
50μm
NIK GFP
50μm
NIK CD34
50μm

图22G

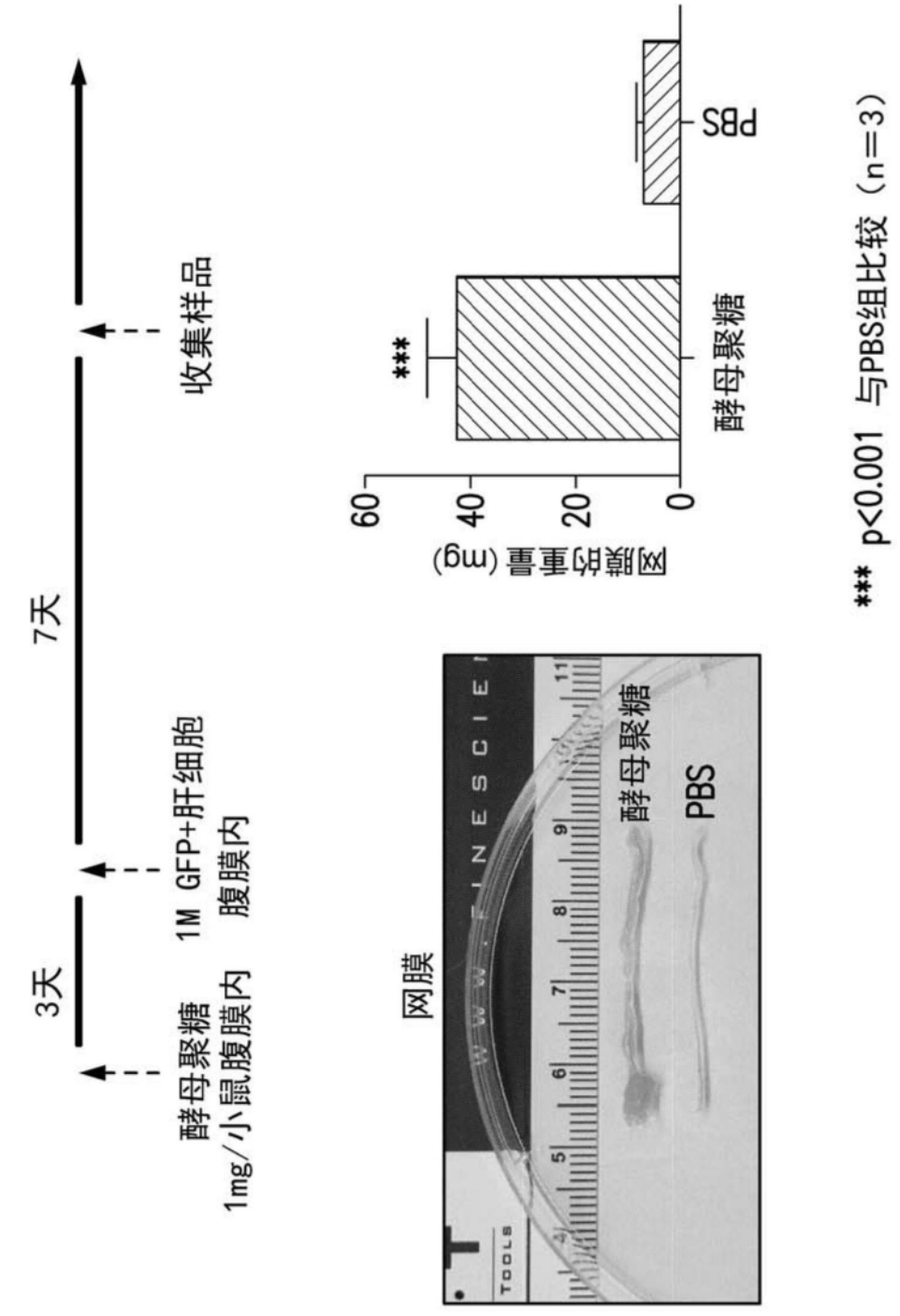

3天
7天
酵母聚糖
1mg/小鼠腹膜内
1M GFP+肝细胞
腹膜内
收集样品
网膜
酵母聚糖
PBS
***
60
40
20
0
酵母聚糖
PBS
*** p<0.001 与PBS组比较（n=3）

图23

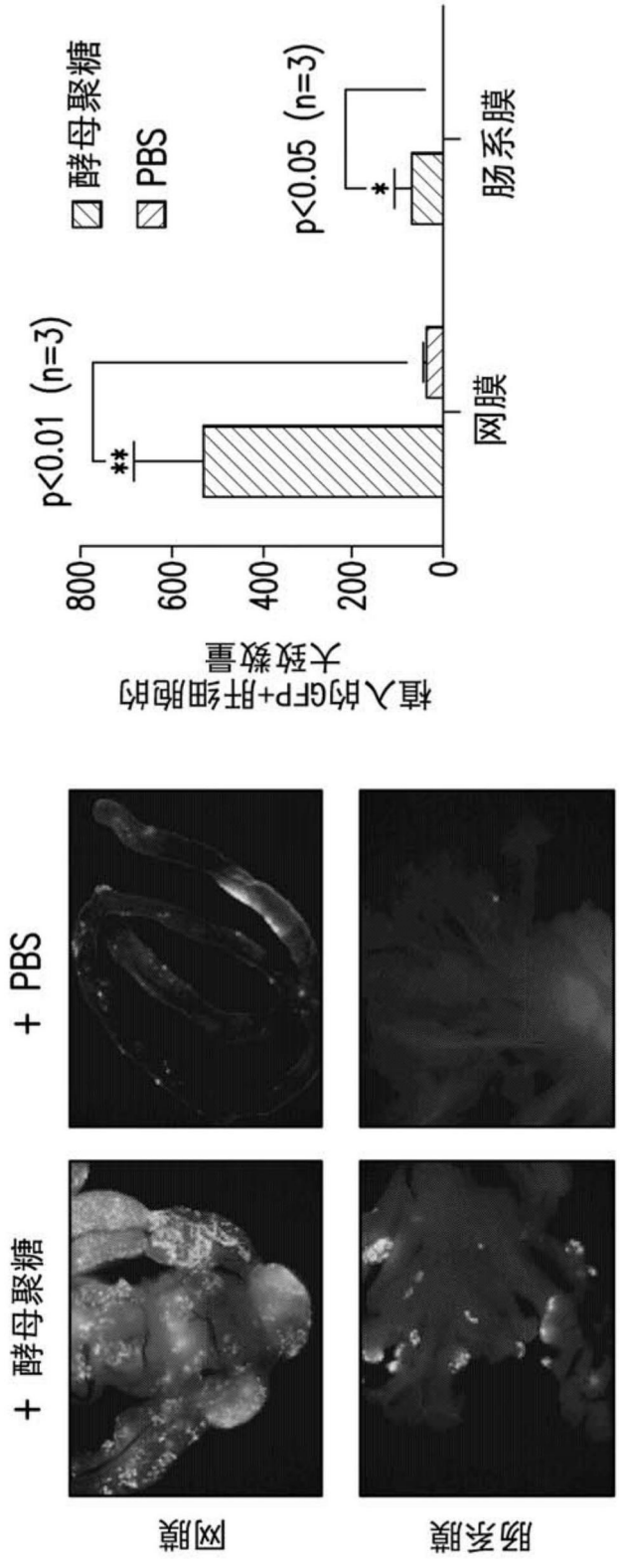

植入的GFP+肝细胞的
大致数量
800
600
400
200
0
p<0.01 (n=3)
**
p<0.05 (n=3)
*
酵母聚糖
PBS
网膜
肠系膜
+ 酵母聚糖
+ PBS
网膜
肠系膜

图24

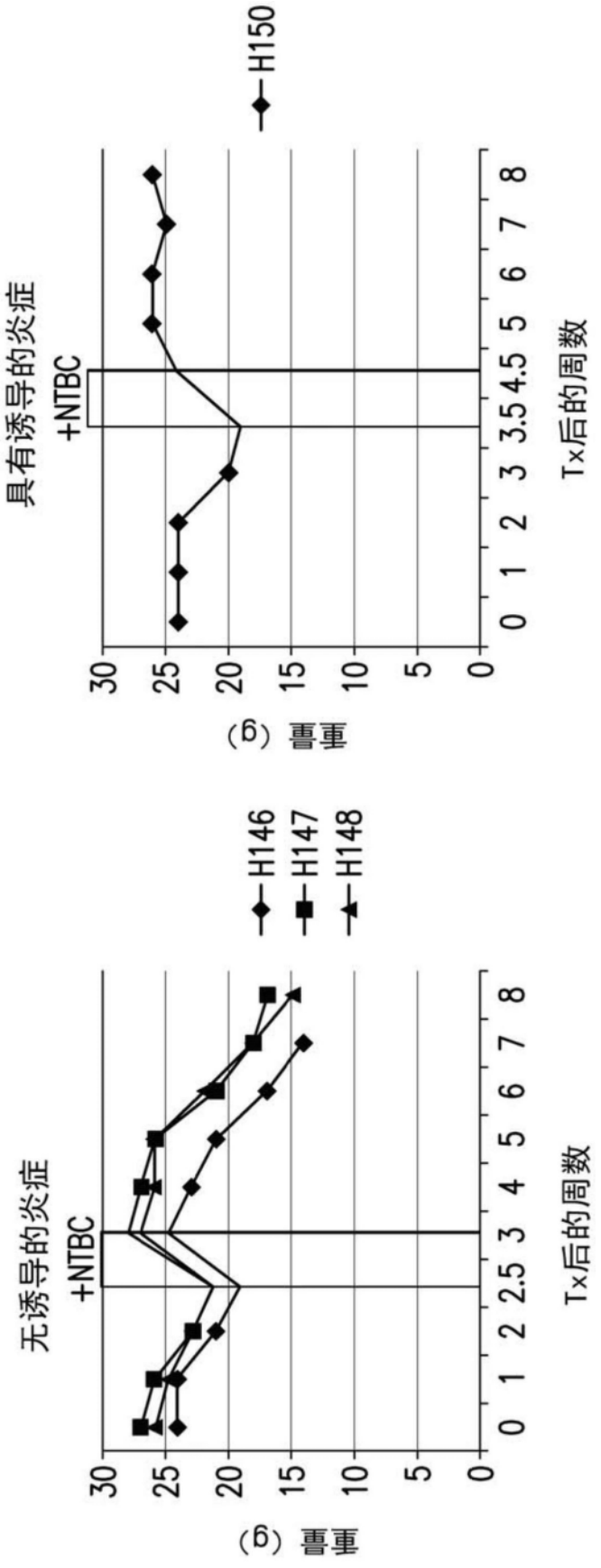

具有诱导的炎症
+NTBC
H150
重量（g）
Tx后的周数
0 1 2 3 3.5 4.5 5 6 7 8
30 25 20 15 10 5 0
无诱导的炎症
+NTBC
H146
H147
H148
重量（g）
Tx后的周数
0 1 2 2.5 3 4 5 6 7 8
30 25 20 15 10 5 0

图25

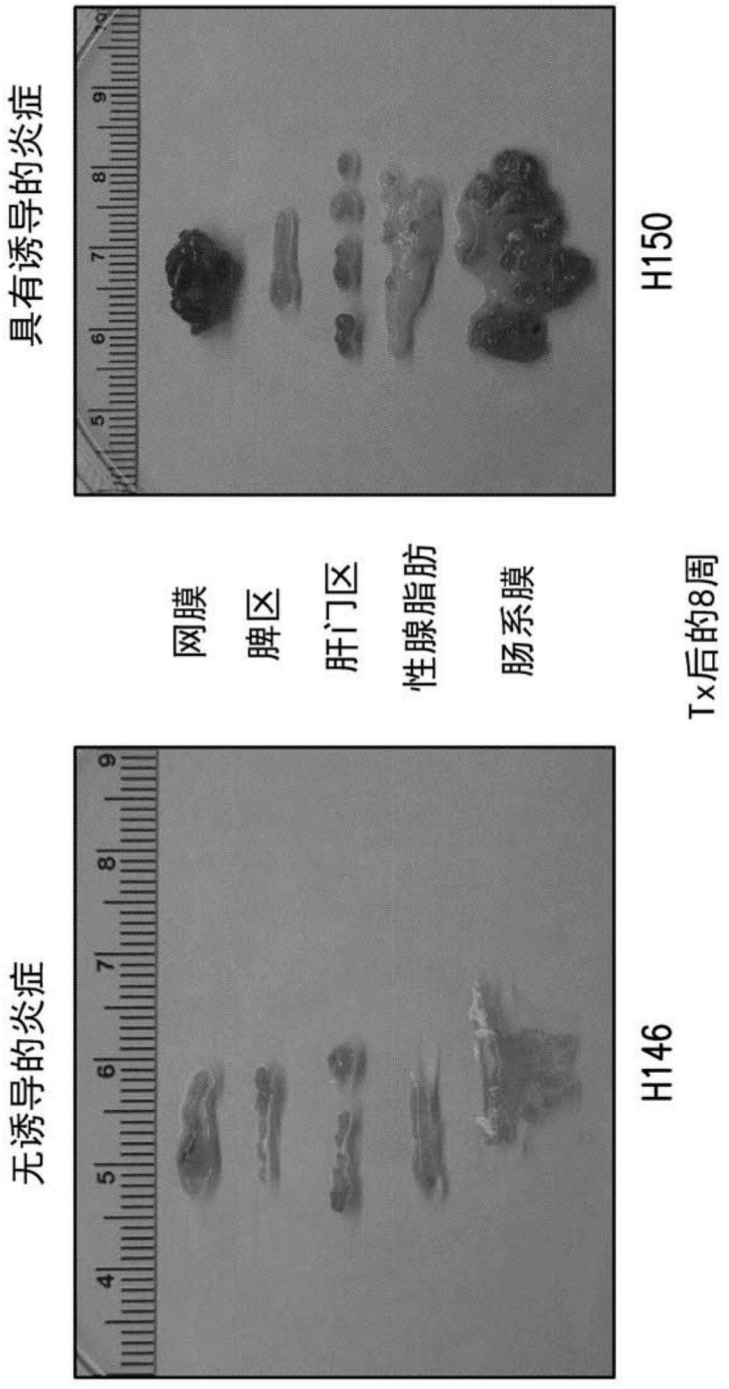


图26