



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106573018 A

(43)申请公布日 2017. 04. 19

(21)申请号 201580043614.0

(22)申请日 2015.11.18

(30)优先权数据

62/081,880 2014.11.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.02.14

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/061257 2015.11.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/081553 EN 2016.05.26

(71)申请人 干细胞生物科技公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 詹姆斯·王

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 穆彬

(51)Int.Cl.

A61K 35/28(2015.01)

A61P 19/08(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

用于治疗骨骼缺损的体干细胞

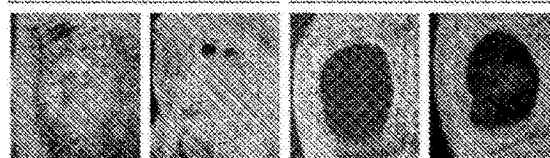
(57)摘要

一种治疗个体内的骨骼缺损的方法,其包含施用有效量的分离的体干细胞至需要其的个体内的骨骼缺损处,其中所述体干细胞大小为大约2至8.0 μ m且为Lgr5⁺或CD349⁺。

A.

阳性对照

阴性对照



1. 一种治疗个体内的骨骼缺损的方法,其包含施用有效量的分离的体干细胞至需要其的个体内的骨骼缺损处,其中所述体干细胞大小为2至8.0 μm 且为Lgr5+或CD349+。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述体干细胞为CD133-、CD34-、CD90-、CD66e-、CD31-、Lin1-、CD61-、Oct4+、Nanog+,以及Sox2-。
3. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述体干细胞为Lgr5+。
4. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述体干细胞通过下列的程序来获得:
于容器中以EDTA或肝素培养源自供体个体的样本直到所述样本分离成上层和下层,收集所述上层,以及
从所述上层分离体干细胞群,其大小为2至8.0 μm 且为Lgr5+或CD349+。
5. 如权利要求4所述的方法,其中所述样本为血液或骨髓样本。
6. 如权利要求5所述的方法,其中,在从所述供体个体获得所述样本之前,所述供体个体被施用粒细胞集落刺激因子或褐藻糖胶(fucoidan)。
7. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述体干细胞对所述个体为自体的或异源性的。
8. 如权利要求1或2所述的方法,在所述施用步骤之前,所述方法进一步包含:
于容器中以EDTA或肝素来培养源自供体个体的样本直到所述样本分离成上层和下层,收集所述上层,以及
从所述上层分离体干细胞群,其大小为大约2至8.0 μm 且为Lgr5+或CD349+。
9. 如权利要求8所述的方法,其中所述样本为血液或骨髓样本。
10. 如权利要求9所述的方法,其进一步包含从所述上层移除Lin+细胞及CD61+细胞。
11. 如权利要求9或10所述的方法,其中,在从所述供体个体获得所述样本之前,所述供体个体被施用颗粒球群落刺激因子或褐藻糖胶。
12. 如权利要求11所述的方法,其中所述供体个体为具有骨骼缺损的供体或是另一个个体。
13. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其进一步包含施用骨骼移植物或骨骼移植物代用品至所述骨骼缺损处。
14. 如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述体干细胞植入于支架内。
15. 一种分离的体干细胞,其用于治疗个体内的骨骼缺损,其中所述体干细胞大小为2至8.0 μm 且为Lgr5+或CD349+。

用于治疗骨骼缺损的体干细胞

[0001] 相关申请案的交叉引述

[0002] 本申请案主张2014年11月19日提交的美国专利临时申请案第62/081,880的优先权,其整体内容并入本文以作为参考数据。

发明领域

[0003] 本发明有关于用于治疗骨骼缺损的体干细胞。

[0004] 发明背景

[0005] 干细胞为多潜能的或全能的干细胞,其能于活体内或活体外分化成许多的或者全部的细胞谱系。由于其多能性,胚胎干(ES)细胞保有治疗各种各样的疾病的巨大潜力。然而,道德的考虑已妨碍了人类ES细胞的用途。非胚胎起源的干细胞能规避此障碍。这些成体干细胞具有如同ES细胞一样的分化能力。

[0006] 已分离源自骨髓的多潜能的成体祖细胞,其能分化成外胚层、中胚层以及内胚层。其他类型的细胞,包括骨髓分离的成体多谱系可诱导的细胞以及衍生自骨髓的单细胞克隆,也具有相同多潜能的分化能力。这些多潜能的体细胞不易获得、培养,及扩增。

发明概要

[0007] 本文所描述的是一种治疗个体内的骨骼缺损的方法。该方法包括施用有效量的分离的体干细胞至需要其的个体内的骨骼缺损处。该体干细胞大小为大约2至8.0 μ m且为Lgr5⁺或CD349⁺。

[0008] 该分离的体干细胞可以通过下列的程序来获得:于容器中以EDTA或肝素来培养源自供体个体的样本直到该样本分离成上层和下层;收集该上层;以及从该上层单离体干细胞群,其大小为大约2至8.0 μ m且为Lgr5⁺或CD349⁺。

[0009] 以下的附图及说明中列举一个或更多个实施方案的细节。从本说明及图示,以及从权利要求将更明了该实施方案的其他特征、目的及优点。

[0010] 附图简述

[0011] 图1为一组影像,其展现出利用SB细胞进行的颅缺损的修复。(A):阳性和阴性对照。(B):SB细胞。

[0012] 较佳实施例的详细说明

[0013] 意外地发现小成体干细胞(small adult stem cells),也即SB细胞,可以从来自个体的样本分离。SB细胞为多潜能的或全能的干细胞,其能分化成与三种胚胎胚层,即外胚层、内胚层及中胚层,有关联的细胞类型。参见,US2012/0034194。

[0014] 从生物样本(例如,骨髓样本)分离的SB细胞大小为大约2至6.0 μ m,CD133⁻、CD34⁻、CD90⁻、CD66e⁻、CD31⁻、Lin1⁻、CD61⁻、Oct4⁺、Nanog⁺,以及Sox2⁻。在SB细胞群中,有一种独特的细胞亚群,其为CD9⁻及Lgr5⁺(“Lgr5+SB细胞”)。有另一种SB细胞亚群,其为CD9⁺及CD349⁺(“CD349+SB细胞”)。

[0015] SB细胞可以使用下列的程序从样本分离。该样本用EDTA或肝素于容器中(例如,于

EDTA管中)培养,直到该样本分离成上层和下层。培养可以在4℃下执行历时6至48小时。由以上的培养步骤生产的上层含有SB细胞(例如,Lgr5+SB细胞及CD349+SB细胞),其分离可以使用根据细胞大小的方法(例如,离心和过滤),或者根据细胞表面标志的那些方法(例如,流式细胞术、抗体,以及磁分选)。

[0016] 为了富集(enrich)SB细胞,可以从上层中的该细胞群移除Lin+细胞及CD61+细胞。备选地,可以从该细胞群选择Lin-细胞及CD61-细胞。Lin+及CD61+细胞可以使用本领域已知的方法予以移除或选择,例如,EasySep Biotin Selection Kit及EasySep PE Selection Kit。

[0017] 为了进一步富集SB细胞,在从该个体获得样本之前,可以施用粒细胞集落刺激因子(GCSF)或褐藻糖胶(fucoidan)至该个体。举例而言,在获得样本以前,该个体可以注射以5μg/kg/每天的GCSF历时1至5天。以下所描述的数据显示GCSF可以动员SB细胞。GCSF-动员的SB细胞的大小稍微大一些,也即,大约4至8μm。

[0018] SB细胞可以从样本分离,例如血液、骨髓、骨骼肌,或者脂肪的组织样本。在样本为一种骨骼肌或者脂肪组织样本的一个实施方案中,在培养步骤以前,组织样本首先可以用胶原蛋白酶来消化以从细胞外的基质释放个别的细胞。该样本可以获得自人类个体。

[0019] 分离的SB细胞,Lgr5+SB细胞,或者CD349+SB细胞可以于非分化培养基中进一步增殖超过10、20、50,或者100群倍增,而没有显示自发性的分化、衰老、形态变异、增高的生长速率,或者分化能力改变的情况。这些干细胞在使用前可以用标准的方法予以储存。

[0020] 术语“干细胞”系是指一种细胞,其为全能或多潜能的,电即能够分化成一些最终的、分化细胞类型。全能干细胞典型地具有发展成任一种细胞类型的能力。全能的干细胞的起源可以为胚胎或者非胚胎。多潜能的细胞典型为细胞,其能够分化成数种的不同的、最终分化的细胞类型。单潜能干细胞仅可以生产一种细胞类型,但是其具有能与非干细胞区分的自我更新的性质。这些干细胞可以发源自各种各样的组织或者器官系统,包括血液、神经、肌肉、皮肤、肠、骨骼、肾脏、肝脏、胰脏、胸腺,以及类似物。

[0021] 本文中所公开的干细胞为实质纯的。术语“实质纯的”,当参照干细胞或者干细胞衍生的细胞(例如,分化的细胞)来使用时,意指该特定的细胞组成制备物中多数的细胞(也即,超过20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%,或者95%)。一般说来,一种实质纯化的细胞群组成制备物中至少大约70%的细胞,通常为制备物中大约80%的细胞,以及特别地为制备物中至少大约90%的细胞(例如,95%、97%、99%或者100%)。

[0022] 当在本文中可交换地使用时,有关于细胞的术语“增生(proliferation)”和“扩增(expansion)”,意指相同类型的细胞数目通过分裂而增加。术语“分化”是指一种发展过程,通过此发展过程细胞变成特化成一种特定的功能,举例而言,细胞获得与最初的细胞类型相异的一种或多种形态特征及/或功能。术语“分化”包括谱系确定(lineage commitment)及终末分化(terminal differentiation)过程二者。分化的评估可以,举例而言,通过使用免疫组织化学法或者本领域技术人员已知的其他程序,来监测存在或者缺少谱系标志。衍生自祖细胞的分化的后代细胞可以,但是非必需,相关于干细胞的来源组织相同的胚层或者组织。举例而言,神经祖细胞及肌肉祖细胞可以分化成造血细胞谱系。

[0023] 当在本文中可交换地使用时,术语“谱系确定(lineage commitment)”及“规格(specification)”,涉及干细胞经历的过程,其中所述干细胞产生祖细胞确定会形成一种

特定的限定范围的分化细胞类型。确定的祖细胞通常能够自我更新或者细胞分裂。

[0024] 术语“终末分化”是指一种细胞成为成熟、完全分化的细胞的最终的分化。举例而言,神经祖细胞及肌肉的祖细胞可以分化成造血细胞谱系,其终末分化导致一种特定的细胞类型的成熟的血液细胞。通常,终末分化与退出细胞周期及增生中断有关联。当使用于本文中,术语“祖细胞”是指一种细胞,其确定会成一种特定的细胞谱系,其通过一系列的细胞分裂来产生此谱系的细胞。祖细胞的实例会是一种成肌细胞(myoblast),其仅仅能够分化成一种细胞类型,但是其自身不是完全成熟或者完全分化的。

[0025] Lgr5+或者CD349+SB细胞可以用来治疗或修复病人体内的骨骼缺损。为了治疗病人体内的骨骼缺损,Lgr5+或者CD349+SB细胞可以单独地施用至该个体缺损处。该细胞也可以连同骨骼移植物(例如,自体移植物或同种异体移植物)或骨骼移植物代用品(例如,去矿物质骨骼基质、基于胶原蛋白的基质、羟磷石灰、磷酸钙,以及硫酸钙)一起施用。

[0026] Lgr5+或者CD349+SB细胞也可以先植入于支架或基质内。该支架或基质继而植入缺损处。组成干细胞支架的一种或多种材料(例如,胶原蛋白、琼脂糖、藻酸盐、透明质酸(hyaluronan)、壳聚糖、PLGA,以及PEG)为本领域已知的。

[0027] “骨骼缺损”是指于骨骼中的一个区域缺少或者缺乏骨骼组织(也即,矿化的骨骼基质)。骨骼缺损可以起因于各种各样的原因,例如创伤、癌症,或者先天性疾病。

[0028] 异源性及自体的Lgr5+或者CD349+SB细胞二者均可以用来治疗病人。如果使用异源性细胞,应该要进行HLA-配型(HLA-matching)以避免宿主反应或者使宿主反应减到最少。自体的细胞可以从个体富集及纯化以及储存以备后用。该细胞可以在活体外(ex vivo)宿主或者移植物T细胞存在下予以培养,以及再导入至宿主内。此可能有的优点为宿主将细胞识别为自我的以及对T细胞活性提供更佳缩减。

[0029] 遗传工程改造的组织相容性万能供血者(histocompatible universal donor)Lgr5+或者CD349+SB细胞,也可以使用本领域已知的方法来制备。更特别地,本文所描述的干细胞可以予以遗传工程改造成不表达其表面II型MHC分子。该细胞也可以予以工程改造成基本上不表达全部的细胞表面I型和II型MHC分子。当使用于本文中时,术语“不表达”意指不足以引起反应的量表达在细胞表面上,或者表达的蛋白质是有缺陷的并且且因而不会引起反应。

[0030] “治疗(Treating)”是指施用一种组合物(例如,一种细胞组合物)至个体,该个体患有该病症或者处于发展该病症的风险,目的是为了治愈、缓和、缓解、医治(remedy)、延迟发作、预防,或者减轻该病症,病症的症状,病症继发的疾病状态,或者损伤/病症的素因。“有效量”是指组合物的量能够在治疗的个体内产生医学上所需的结果。治疗的方法可以单独地执行或者结合其他的药物或者疗法来执行。

[0031] 以下特定的实施例要解读为仅仅作例证的,以及无论以任何方式不限制本公开的其余部分。在没有进一步详细阐述的情况下,据信技术人员根据本文的说明、能够最大程度地使用本公开。本文中列举的全部出版物以其整体并入以作为参考数据。

实施例

[0032] 从人类个体取出骨髓样本以及放置于抗凝血的EDTA管中。在4℃下培养历时6至48小时之后,该样本分离成两层。顶层含有体干细胞群(SB细胞),其经由C6accuri流式细胞

术、免疫细胞化学法,以及RT-PCR予以进一步的分析。底层含有红及白血液细胞,其不小于6.0 μ m。

[0033] 使用分级小珠来进行流式细胞术,决定SB细胞的大小。SB细胞的大小系介于2和6微米之间。SB细胞不是Lgr5+就是CD349+。P2闸 (gate) 中的细胞群的32%表达Lgr5。

[0034] 我们发现SB细胞可以经由注射GCSF予以动员。相同的人类个体注射以5 μ g/kg/每天的GCSF历时5天。最后的注射大约3.5小时之后,收集周边的血液样本。SB细胞系如以上所述从血液样本分离以及经由流式细胞术来分析。当与GCSF注射以前从该个体分离的SB细胞比较,细胞的大小增加至4~8微米以及Lgr5+细胞的百分比也增加。

[0035] 将正常的人类血液(购自于A11Cell)放置于抗凝血的EDTA管中,添加HetaStarch(购自于StemCell)。血液样本分离成两层。CD61+血小板和Lin+细胞,其包括红及白血液细胞,分别依照制造商的说明来使用EasySep Biotin Selection Kit和EasySep PE Selection Kit而从顶层移开。之后,移动Lin+和CD61+细胞,获得一种经纯化的Lgr5+或者CD349+SB细胞群。

[0036] 一百万个以上经纯化的SB细胞连同胶原蛋白海绵一起植入至SCID小鼠于颅缺损处,该处通过从颅骨移除一块骨骼所产生。在SB细胞植入于缺损处3或5个月之后,通过微型计算机断层摄影影像来分析小鼠。如同图1中所显示的,SB细胞能够形成骨骼结构以修复缺损处。一种以人类骨髓细胞来治疗的小鼠,该人类骨髓细胞过度表达一种人类骨成形性蛋白质7(hBMP7),用作阳性对照。用只有胶原蛋白海绵的及PBS来治疗的小鼠用作阴性对照。

[0037] 其他实施方案

[0038] 本说明书所公开的全部特征可以以任何组合进行组合。本说明书所公开的各个特征可以用提供相同的、均等的,或者相似的目的的替代的特征来代替。因而,除非另有明确陈述,否则所公开的各个特征仅仅为一种通用系列的均等物或者相似的特征的实例。

[0039] 从以上的说明,本领域技术人员可以容易地确定所描述实施方案的必须的特征,以及在没有背离其精神和范畴的情况下,可以做出实施方案各种各样的改变和修饰以适应各种各样的用法和条件。因而,其他的实施方案也落在权利要求的范围内。

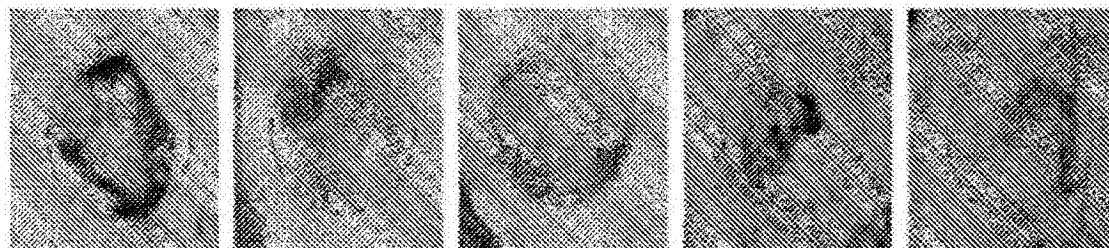
A.

阳性对照

阴性对照

**B.**

3个月



5个月

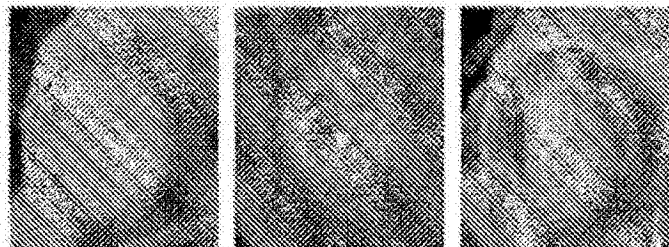


图1