



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101754767 A

(43) 申请公布日 2010.06.23

(21) 申请号 200880100116.5

A61P 37/06 (2006.01)

(22) 申请日 2008.05.27

C12N 5/0775 (2010.01)

(30) 优先权数据

10-2007-0053298 2007.05.31 KR

60/940,349 2007.05.25 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.01.22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2008/003005 2008.05.27

(87) PCT申请的公布数据

W02009/040666 EN 2009.04.02

(71) 申请人 同种疗法有限公司

地址 韩国仁川

(72) 发明人 宋淳旭 李文熙 金喆守

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 吴贵明 张英

(51) Int. Cl.

A61K 35/28 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 4 页

(54) 发明名称

移植物抗宿主疾病的治疗

(57) 摘要

本申请涉及一种利用克隆性骨髓干细胞
(cMSCs) 作为活性成分来治疗急性或慢性移植物
抗宿主疾病的治疗剂。

1. 一种抑制已确认患有移植物抗宿主疾病的受治疗者体内的供者骨髓 T 细胞活性的方法,包括给予需要该治疗的受治疗者治疗有效剂量的同种克隆性骨髓干细胞群。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,每次给药的干细胞剂量在 1×10^4 细胞 /kg 体重至 1×10^8 细胞 /kg 体重之间。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述干细胞利用亚组分分离培养法进行分离。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述干细胞表达 CD29、CD44、和 CD105 细胞表面抗原,但不表达 HLA-DR 细胞表面抗原。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述干细胞表达 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105 和 CD166 细胞表面抗原,但不表达 CD106、CD119 或 HLA-DR 细胞表面抗原。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述同种克隆性骨髓干细胞分泌至少约 5ng/ml 浓度的白细胞介素 -10。

7. 一种治疗已确认患有移植物抗宿主疾病的受治疗者体内移植物抗宿主疾病症状的方法,包括给予需要该治疗的受治疗者治疗有效剂量的同种克隆性骨髓干细胞群。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中,所述移植物抗宿主疾病的症状为胃肠道症状、皮肤硬化、经口进食受限、眼干、肝症状、呼吸短促,或者上肢或下肢紧缩感。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中,所述胃肠道症状为增加的每日排便量。

10. 根据权利要求 8 所述的方法,其中,所述胃肠道症状为结肠发炎。

11. 根据权利要求 8 所述的方法,其中,所述肝症状为血清中碱性磷酸酶水平升高。

12. 一种抑制已确认患有移植物抗宿主疾病的受治疗者体内的供者骨髓 T 细胞活性的方法,包含:

(A) 处理骨髓细胞的生物学样品,包括:

(i) 将所述细胞样品接种于容器中;

(ii) 将上清液从所述容器转移至另一容器;以及

(iii) 从所述上清液中分离该样品中具有相对较低密度的细胞,以获得同种克隆性骨髓干细胞群;以及

(B) 给予需要该治疗的受治疗者治疗有效剂量的从 (A) 中获得的同种克隆性骨髓干细胞群。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中,所述容器用涂层进行处理。

14. 根据权利要求 13 所述的方法,其中,所述涂层为胶原、多聚赖氨酸、纤维蛋白原或明胶。

15. 一种在已确认患有移植物抗宿主疾病的受治疗者体内治疗移植物抗宿主疾病症状的方法,包含:

(A) 处理骨髓细胞的生物学样品,包括:

(i) 将所述细胞样品接种于容器中;

(ii) 将上清液从所述容器转移至另一容器;以及

(iii) 从所述上清液中分离该样品中具有相对较低密度的细胞,以获得同种克隆性骨髓干细胞群;以及

(B) 给予需要该治疗的受治疗者治疗有效剂量的从 (A) 中获得的同种克隆性骨髓干细胞群。

16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中,所述细胞的剂量在 1×10^4 细胞 /kg 至 1×10^8 细胞 /kg 之间。

17. 根据权利要求 15 所述的方法,其中,所述细胞表达 CD29、CD44 和 CD105 细胞表面抗原,但不表达 HLA-DR 细胞表面抗原。

18. 根据权利要求 15 所述的方法,其中,所述细胞表达 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105 和 CD166 细胞表面抗原,但不表达 CD106、CD119 或 HLA-DR 细胞表面抗原。

19. 根据权利要求 15 所述的方法,其中,所述细胞群分泌至少约 5ng/ml 浓度的白细胞介素 -10。

20. 一种用于治疗急性或慢性移植物抗宿主疾病的治疗剂,包含作为活性成分的同种克隆性骨髓干细胞群。

21. 根据权利要求 20 所述的治疗剂,其是利用亚组分分离培养法来分离的。

22. 根据权利要求 20 所述的治疗剂,其中,所述细胞表达 CD29、CD44 和 CD105 细胞表面抗原,但不表达 HLA-DR 细胞表面抗原。

23. 根据权利要求 20 所述的治疗剂,其中,所述细胞表达 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105 和 CD166 细胞表面抗原,但不表达 CD106、CD119 或 HLA-DR 细胞表面抗原。

24. 根据权利要求 20 所述的治疗剂,其中,所述细胞分泌至少约 5ng/ml 浓度的白细胞介素 -10 (IL-10)。

25. 根据权利要求 20 所述的治疗剂,其中,所述细胞比利用密度梯度离心法分离的细胞分泌大至少约 5 倍量的 IL-10。

26. 一种同种克隆性骨髓干细胞群,其比利用密度梯度离心法分离的细胞表达大至少约 5 倍量的 IL-10。

27. 一种同种克隆性骨髓干细胞群,其比利用密度梯度离心法分离的细胞表达大至少约 5 倍量的 IL-10,其中所述同种克隆性骨髓干细胞群是通过下述方法获得的:

(i) 将骨髓细胞样品接种于容器中;

(ii) 将上清液从所述容器转移至另一容器;以及

(iii) 从所述上清液中分离所述样品中具有相对较低密度的细胞。

28. 根据权利要求 27 所述的同种克隆性骨髓干细胞群,其中,所述骨髓细胞在 37°C 培养约 1 到 3 小时,然后在 37°C 重复培养 2 到 3 次,约 12 到 36 小时,接着在 37°C 培养约 24 到 72 小时,且每次培养将上部的培养上清液转移入一个新的培养容器中。

29. 根据权利要求 27 所述的同种克隆性骨髓干细胞群,其中,所述容器用涂层进行处理。

30. 根据权利要求 29 所述的同种克隆性骨髓干细胞群,其中,所述涂层为胶原、多聚赖氨酸、纤维蛋白原或明胶。

31. 根据权利要求 28 所述的治疗剂,其中,所述重复孵育进行约 4 到 5 次。

移植物抗宿主疾病的治疗

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本申请要求于 2007 年 5 月 25 日提交的美国临时专利申请第 60/940,349 号的优先权,其全部内容结合于本文以供参考。

技术领域

[0003] 本发明涉及一种用于治疗急性或慢性移植物抗宿主疾病的治疗剂。本发明还涉及一种包含间质干细胞作为活性成分的用于治疗急性或慢性移植物抗宿主疾病的治疗剂。

背景技术

[0004] 移植物抗宿主疾病 (GVHD) 是由于患者机体对同源移植时注入的捐献者外周血液或骨髓中的 T 淋巴细胞的免疫反应而引起的疾病。即,它是一种由移植入的活的淋巴细胞引起免疫反应,从而导致肝功能障碍、皮肤损伤、黄疸、腹泻、发热、全血细胞减少等,严重致死的疾病。

[0005] 移植物抗宿主疾病可大致分为急性移植物抗宿主疾病 (aGVHD) 和慢性移植物抗宿主疾病 (cGVHD)。cGVHD 是最主要且最常见的副作用,在血液和骨髓祖细胞移植后存活超过 100 天的患者中占 20% -70%,并且是移植后死亡的主要原因。因为 cGVHD 和 aGVHD 不是连续性的疾病,由于血液和骨髓祖细胞移植治疗方法的发展,aGVHD 需要不同的途径而 cGVHD 则正在成为一个更加重要的问题。

[0006] 在同种移植的情况下,cGVHD 通常发生在移植后 4-6 个月,而发生在 80 天内或 1 年后的并不常见。因此,可以理解同源反应是引起 cGVHD 的一个主要的必要条件,并且 cGVHD 的发病会经历一个较长的潜伏期或者对靶器官的效应缓慢显现。cGVHD 中发现了多种胸腺功能障碍,并且认为如果正常胸腺在移植前治疗或通过外周机制产生的同源抗原 / 自身抗原所引起的损伤中未被切除,病理性的移植 T 细胞会反应性增加,这种类型的病理性 CD 阳性的 T 细胞,作为 Th2 免疫反应,会引起与自身免疫疾病相似的免疫缺陷,包括细胞溶解攻击、分泌炎性纤维细胞因子、B 细胞激活、以及通过形成自身抗体引起靶器官损伤。

[0007] cGVHD 的临床症状包括皮肤的变化,如红斑、干燥、瘙痒、色素沉着变化、以及斑丘疹;毛发的变化,如毛发变细和脱发,以及口腔病变如牙龈炎、粘膜炎、及唇萎缩。除此之外,还包括发生在眼睛、生殖器官、肝、肺、胃肠道、筋膜、骨骼系统、浆膜 (serousmembrane) 等的各种损伤。

[0008] 尽管 cGVHD 通常被定义为骨髓移植 100 天后发生的 GVHD,但对于诊断而言表现出的病症比出现的时间更为重要。依照症状出现的时间,可将其分为进行性发病 (progressive onset),即 aGVHD 尚未治愈即转变成为 cGVHD;静止性发病 (quiescent onset),即在 aGVHD 完全治愈后发生的 cGVHD;以及初发 (DE novo),即在之前未出现 aGVHD 的情况下发生的 cGVHD。在进行性发病期间的发病率和死亡率最高,其次为静止性发病期间,而在初发时最低。至于所表现出的症状,在许多病例中以皮肤和口腔粘膜上的青苔样疹为最初症状,而损伤也可能出现在与 aGVHD 相同的部位,损伤是丘疹样的,侵袭性的,且覆

盖有白色鳞屑。当从病理组织学角度与 aGVHD 进行比较时,尽管仍能发现卫星细胞坏死性损伤,但其淋巴细胞浸润呈现为一条超固结带 (over consolidated band)。除此之外,胆囊肿管缩窄,并且可观察到胆汁的蓄积,但由于有的病例中可能混有与药物治疗或病毒性肝炎相关的损伤,因此存在难以与 cGVHD 相区分的情况。

[0009] 发生 cGVHD 时,由于免疫功能已经下降,因此在治疗期间可能出现严重感染,这就迫切需要一种新的有效的且副作用很小的治疗方法。关于这一点,已有多项研究报道了间质干细胞具有分化为多种器官细胞的能力,且可通过抑制 T 细胞来改善移植物抗宿主反应。

[0010] 尽管间质干细胞可作为原始中胚层的原始细胞以未分化状态进行增殖,并且可从多种器官中分离得到,如骨髓、脂肪组织、肝、肌腱、滑膜、脐带,但尚不存在可以用来精确定义间质干细胞的单一标记物。然而,CD14、CD34 和 CD45 是众所周知的骨髓标记物,而 SH-2 (CD105)、SH-3 (CD73)、SH-4 及 Th7-1 是众所周知的间质标记物。间质干细胞或间质基质细胞 (MSC) 表达第 1 类主要组织相容性复合物 (MHC),而 MHC 类可以通过干扰素- γ (IFN- γ) 诱发临床表现,并且由于其不显示 FAS 或 FAS L (CD40) 型共刺激分子,所以不会诱发免疫反应,也不会发生由细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 和自然杀伤 (NK) 细胞引起的细胞溶解。此外,尽管间质干细胞在混合淋巴细胞反应 (MLR) 时通过密度依赖抑制 T 细胞增殖,并且抑制 B 细胞增殖以及免疫球蛋白的形成,但现在已知 MHC 相容性对于 MSC 免疫抑制并不是必需的。此外,还已知 MSC 的核型或端粒酶的活性在分裂 50 次时并不发生改变。

[0011] 然而,由于机体中存在的 MSC 非常稀少,开发分离 MSC 的技术非常重要。目前,密度梯度离心分离法、利用 Sca-1 或 STRO-1 特异性单克隆抗体的方法,以及依据细胞大小的分离方法是用于分离 MSC 的已知方法。本发明的发明人之前已开发了一种不需要特定机械设备或试剂的有效 MSC 分离方法 (韩国专利公开第 10-0802011 号),上述方法的特征在于:培养从个体取出的骨髓,并通过将上层培养液重复移入新容器而进一步培养。

[0012] 关于 cGVHD 的治疗方法,美国专利第 6,544,506 号提供了一种 GVHD 的预防和治疗方法,其显著特征为,通过在器官移植患者体内注射非同种异体反应性抗细胞毒性淋巴细胞来除去细胞毒性 T 淋巴细胞。美国专利第 6,936,281 号披露了一种利用间质干细胞的 GVHD 治疗方法。美国专利第 7,173,016 号披露了一种包含注射腺苷脱氨酶抑制剂步骤的 GVHD 治疗方法。美国专利第 6,328,960 号披露了一种 GVHD 的治疗方法,其显著特征为通过在靶器官移植患者体内以能够减轻效应细胞针对抗原的免疫反应的量注射间质干细胞,以减轻靶器官移植患者体内效应细胞针对异体抗原的免疫反应。美国专利第 6,386,636 号披露了一种减少由效应细胞引起的免疫反应的方法,包括以能够减轻针对异体抗原的免疫反应的注射剂量使效应细胞与间质干细胞上层培养液相接触的步骤。

[0013] 迄今为止,还没有任何利用间质干细胞或骨髓干细胞成功治疗 cGVHD 的案例报道。据此,本专利发明人通过在临床上验证了利用亚组分分离培养法分离的间质干细胞或骨髓干细胞可有效治疗 cGVHD,试图治疗 cGVHD 完成了本发明。

发明内容

[0014] 本发明的一个目标是提供用于急性或慢性移植物抗宿主疾病的治疗剂。

[0015] 本发明的另一个目标是提供用于急性或慢性移植物抗宿主疾病的治疗方法。

[0016] 为实现上述目标,本发明提供了一种含有间质干细胞或骨髓干细胞的用于治疗急性或慢性移植物抗宿主疾病的治疗剂。

[0017] 此外,本发明还包括一种用于治疗移植物抗宿主疾病的方法,其包括一个在患急性或慢性移植物抗宿主疾病的患者体内注射有效剂量的间质干细胞或骨髓干细胞的步骤。

[0018] 一方面,本发明涉及一种在已确认患有移植物抗宿主疾病的受治疗者体内抑制供者骨髓中 T 细胞活性的方法,包含对需要该治疗的受治疗者给予治疗有效量的同种克隆性骨髓干细胞群。每次给药的干细胞剂量在 1×10^4 细胞/kg 体重至 1×10^8 细胞/kg 体重之间。这些干细胞可以利用亚组分分离培养法而分离。所述干细胞可以表达 CD29、CD44 及 CD105 细胞表面抗原,但不表达 HLA-DR 细胞表面抗原。所述干细胞可以表达 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、及 CD166 细胞表面抗原,但不表达 CD106、CD119 或 HLA-DR 细胞表面抗原。同种克隆性骨髓干细胞可以分泌浓度至少约 5ng/ml 的白细胞介素 -10。

[0019] 另一方面,本发明涉及一种在已确认患有移植物抗宿主疾病的受治疗者体内治疗移植物抗宿主疾病症状的方法,包含对需要该治疗的受治疗者给予治疗有效量的同种克隆性骨髓干细胞群。移植物抗宿主疾病的症状可以表现为胃肠道症状、皮肤硬化、经口进食受限、眼干、肝症状、呼吸短促或者上肢或下肢紧缩感。胃肠道症状可能是每日粪便量的增加或炎性结肠。肝症状可能为血清中碱性磷酸酶水平的升高。

[0020] 另一方面,本发明涉及一种在已确认患有移植物抗宿主疾病的受治疗者体内抑制供者骨髓中 T 细胞活性的方法,包含:

[0021] (A) 处理骨髓细胞的生物学样品,包括:

[0022] (i) 将细胞样品接种于一个容器中;

[0023] (ii) 将上清液从该容器转移至另一个容器;以及

[0024] (iii) 从上清液中分离该样品中具有相对较低密度的细胞,以获得同种克隆性骨髓干细胞群;以及

[0025] (B) 对需要该治疗的受治者给予治疗有效量的从 (A) 中获得的同种克隆性骨髓干细胞群。

[0026] 在上述方法中,该容器可用涂层加以处理。涂层可以是胶原、多聚赖氨酸、纤维蛋白原或明胶。

[0027] 另外一方面,本发明涉及一种在已确认患有移植物抗宿主疾病的受治疗者体内治疗移植物抗宿主疾病症状的方法,包括:

[0028] (A) 处理骨髓细胞的生物学样品,包括:

[0029] i) 将细胞样品接种于一个容器中;

[0030] ii) 将上清液从该容器转移至另一个容器;以及

[0031] iii) 从上清液中分离该样品中具有相对较低密度的细胞,以获得同种克隆性骨髓干细胞群;以及

[0032] (B) 对需要该治疗的受治疗者给予治疗有效剂量的从 (A) 中获得的同种克隆性骨髓干细胞。

[0033] 该细胞的剂量可以在 1×10^4 细胞/kg 体重至 1×10^8 细胞/kg 体重之间。这些细胞可以表达 CD29、CD44 及 CD105 细胞表面抗原,但不表达 HLA-DR 细胞表面抗原。所述细胞可以表达 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105 及 CD166 细胞表面抗原,但不表达 CD106、CD119、

或 HLA-DR 细胞表面抗原。该细胞群可以分泌浓度至少约在 5ng/ml 的白细胞介素 -10。

[0034] 从本发明的下列描述,参考附图以及附属的权利要求,可以更充分地理解本发明的这些以及其他目的。

附图说明

[0035] 根据下文给出的详细说明,将更加充分的理解本发明,所示附图仅为了举例示出,而并不是限制本发明,其中:

[0036] 图 1 显示的是利用在本发明中所使用的亚组分分离培养法分离克隆性骨髓干细胞或间质干细胞过程的图解。

[0037] 图 2 显示的是在通过亚组分分离培养法分离且用于 GVHD 患者治疗的克隆性骨髓干细胞上细胞表面抗原表位的 FACS 表型分析结果。

[0038] 图 3A-图 3B 显示的是在 GVHD 患者的治疗中所使用的克隆性骨髓干细胞(cMSC-15)以及通过常规的密度梯度离心法分离的对照间质干细胞所分泌的(A)TGF- β 和(B)IL-10 量的图表。

[0039] 图 4 显示的是在 GVHD 患者体内给予克隆性骨髓干细胞后每日排便量体积及碱性磷酸酶活性的变化图表。

[0040] 图 5A-图 5D 显示的是注射了克隆性骨髓干细胞的 GVHD 患者的结肠镜检照片。(A)是治疗前的照片,(B)是治疗 10 天后所拍的照片,(C)是治疗 1 个月后所拍的照片,以及(D)是治疗 3 个月后所拍的照片。

具体实施方式

[0041] 在本申请中,“一个”和“一种”既用来指单个也用来指多个对象。

[0042] 如本文中所使用的,“身体样品”指的是从期望从中分离出单一类型细胞的哺乳动物获得的任何样品。这样的身体样品包括骨髓样品、外周血、脐带血、脂肪组织样品、及细胞因子激活的外周血。

[0043] 如本文中所使用的,“克隆性骨髓干细胞”指的是来源于单个干细胞的细胞。该短语可与“多谱系干细胞”互换,后者是通过亚组分分离培养法获得的。

[0044] 如本文中所使用的,“同种”细胞群通常指在该种群内存在相同类型的细胞。基本上同种可指约 80%的同种性,或者约 85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,99.1%,99.2%,99.3%,99.4%,99.5%,99.6%,99.7%,99.8%,或 99.9%的同种性。特别地,细胞的同种性可归因于单一细胞起源的细胞扩大培养。目前没有可用的 MSC 特异性抗原,因此也没有可用的 MSC 特异性抗体。理论上,获得 100%同种的 MSC 群的唯一方法是对后期通过表征分化和增殖潜能而鉴定为 MSC 的单个细胞进行扩大培养。“同种干细胞群”指的是来源于后期通过这些特征研究鉴定为干细胞的单个细胞的干细胞(群)。

[0045] 如本文中所使用的,“较低密度细胞”指的是那些较样品中的其他细胞具有较低密度的细胞。较低密度细胞包括,但不限于,多谱系干细胞、祖细胞、其他骨髓基质细胞。

[0046] 如本文中所使用的,用于讨论细胞来源和治疗目的的“哺乳动物”指任何归类为哺乳动物的动物,包括人类、家养及农场动物,以及动物园动物、竞赛动物、或宠物,如狗、猫、牛、马、绵羊、猪、大鼠、小鼠、兔等等。优选地,哺乳动物指的是人类。

[0047] 如本文中所使用的,“MLSC”指的是多谱系干细胞。

[0048] 如本文中所使用的,“MLSC/PC”指的是多谱系干细胞或祖细胞。

[0049] 如本文中所使用的,“MSC”指的是骨髓基质细胞或间质干细胞,或骨髓干细胞,这些术语可以互换。

[0050] 如本文中所使用的,“细胞样品”指的是含有不同类型细胞的混合物的任何样品,包括骨髓样品、外周血、脐带血、脂肪组织样品、和细胞因子激活的外周血。

[0051] 亚组分分离培养技术

[0052] 尽管不限于任何分离 MSC、MLSC 或 MLSC/PC 的特定方法,获取用来治疗移植物抗宿主疾病的细胞的优选方法是“亚组分分离培养法”,该方法被用来从身体样品或诸如人类骨髓的来源中分离高度同种的克隆性骨髓干细胞群或多谱系干细胞群 (MLSCs)。美国专利申请公开文件 US2006/0286669 (序列号 11/471,684,2006 年 6 月 19 日提交)“多谱系干细胞的分离 (Isolation of Multi-Lineage Stem Cells)”中阐述了操作步骤,其全部内容结合于此以供参考。

[0053] 已知很难分离得到未受造血细胞污染的骨髓 MSC。为了应用于临床机构,获得同种 MSC 群以避免由免疫原带来的问题并正确评价临床效果都是很重要的。传统地,同种 MSC 群的分离是通过 MSC 特异性抗体柱纯化实现的。然而,由于还是无法获得完美的 MSC 特异性抗体,即使是这种方法也并不适用。

[0054] 在亚组分分离培养法的操作中,不需要采用任何形式的离心以预先去除任何类型的细胞,例如从样品中除去红细胞或白细胞,因为大多数较重或密度较大的细胞会在最初两个 2 小时的培养步骤中被除去。因此,本发明系统的优点之一即:可以避免传统采用的,可能将诸如吡啶甲基、聚蔗糖、聚蔗糖-泛影葡胺等污染引入细胞培养的密度梯度离心法及单核细胞分离步骤。因此,所发明的亚组分分离培养法是一种简单、有效,且经济的从身体样品(优选骨髓样品)中分离出高度同种 MLSC 的方案。

[0055] 可替代地,也可以将通过 MSC 分离的常规密度梯度离心法分离/分级分离得到的单核细胞接种入 D1 培养皿以获得单一细胞来源的克隆,然后分离得到同种干细胞群或祖细胞群(图 1)。因此,该亚组分分离培养法可以与通过常规密度梯度离心法分离的单核细胞一起使用。

[0056] 本申请描述了所分离的单细胞源性干细胞系的细胞表面蛋白表达特征的多样性,表明在生物样品中存在若干种不同类型的多谱系干细胞或祖细胞,尤其是在所例示的骨髓样品中。所分离的 MLSC 通常表现为 CD34、HLA-DR、CD31、CD166、第 I 类 HLA 阴性或弱阳性,而 CD44、CD29、CD105 强阳性。然而,一些来自培养皿 D4 和 D5 的细胞系表现出独特的表面蛋白水平,表明骨髓中可能存在若干种不同类型的多谱系干细胞或祖细胞(图 1)。这些带有不同表面标记物的 MSC 可能代表该细胞的不同分化潜能。因此,通过亚组分分离培养法分离单细胞来源的同种干细胞使得分离组织特异性干细胞或定向祖细胞成为可能,只要在骨髓或其他专门分离的身体样品中存在这些细胞群,且在细胞扩大培养期间培养条件不改变其潜能。如在本申请中所显示的,由于能够通过特定的特性来表征细胞亚群,从而使 MSC 治疗的安全性和有效性以及细胞移入过程得到了改进。

[0057] 由于省去了密度梯度离心法和单核细胞分离步骤,并且不需要使用抗体以分离干细胞或特定的酶,因此亚组分分离培养法通过简单、有效且经济的操作步骤在样品中生产

出更多的同种 MSC 或 MLSC 群,且更安全地应用于治疗机构中。

[0058] 在实现本发明的过程中,优选但不限于利用上述亚组分分离培养法获得骨髓干细胞。此外,优选所获得的 MSC's 表达 CD29、CD44、CD105 细胞表面抗原中的任一种或全部,且优选 MSC's 中不表达 HLA-DR 细胞表面抗原中的任一种或全部。更优选地,在 MSC's 上表达 CD29、CD44、CD90、CD105 及 CD166 细胞表面抗原中的任一种或全部,而在 MSC's 上不表达 CD106、CD119、及 HLA-DR 细胞表面抗原中的任一种或全部。

[0059] 优选地,本发明采用的 MSC's 表达白细胞介素 -10 (IL-10)。优选地,在治疗时,培养后 IL-10 表达可超过 5ng/ml 或 10ng/ml。

[0060] 一方面,本发明涉及利用通过亚组分分离培养法获得的细胞,包括:1) 从个体获得骨髓的步骤;2) 培养骨髓的步骤;3) 仅将 2) 中的上层液体转移至一个新的容器并进行培养的步骤;4) 仅分离 3) 中的上层液体并在培养容器中重复培养的步骤,该培养容器可选地用涂层进行处理。

[0061] 关于上述亚组分分离培养法,尽管并不限于任何特定的时间,上述步骤 4) 中的重复培养可按如下操作,37℃培养 1 到 4 小时,然后 37℃重复培养 2 到 3 次,约 12 到 36 小时,接着 37℃培养 24 到 72 小时,并且每次均需将上层液体转移到一个新的培养容器。

[0062] 另一方面,为了获得更具粘附性的干细胞,使用了涂覆有胶原、明胶、纤维蛋白原、或多聚赖氨酸的培养皿。申请人发现,与未涂覆的培养皿表面相比,任何带电荷的培养表面,无论是带正电还是负电,都利于干细胞附着到它上。在涂覆有胶原或多聚赖氨酸的培养皿中,比未涂覆的培养皿有更多的细胞附着,分别达到约 2 到 3 倍(数据未示出)。

[0063] 因此,在一种实施方式中,培养皿的底部可以涂覆有带正电的氨基酸例如多聚赖氨酸、多聚精氨酸,或用带负电的氨基酸例如多聚天冬氨酸、多聚谷氨酸、或它们的组合物,以协助干细胞或祖细胞更好地附着在培养皿底部。

[0064] 优选该培养容器用涂层进行处理,尽管任何能够改善细胞附着的材料均可采用,但特别优选的是利用胶原、多聚赖氨酸、纤维蛋白原、或明胶。更优选地,可以使用胶原和多聚赖氨酸。甚至更优选地,可以使用胶原。此外,在用胶原处理过的培养容器中将细胞重复培养约 3 到 6 次是理想的(期望的),更加理想的是将细胞重复培养 4 到 5 次。

[0065] 所述治疗剂的药物制剂可以利用该行业中的常规知识来制备。例如,它可以药用的非口服的水或灭菌液体溶液形式以及混悬注射液的形式使用。例如,可考虑将药制剂与药用载体或介质结合,尤其是无菌水或生理盐水溶液、植物油、乳化剂、混悬剂、表面活性剂、稳定剂、赋形剂、载体、防腐剂、粘合剂等等,并将其混合于通常认为药学应用所需的单位容量形式(unit capacity format)中。此外,根据已知利用支持液体(如注射用蒸馏水)的药学应用,可以开具灭菌的注射用混合物的处方。

[0066] 可以共同使用的注射用水性溶液的实例可以是生理盐水溶液、葡萄糖、或等渗溶液(包括支持性药物如 D- 山梨醇、D- 甘露糖、D- 甘露醇、或氯化钠)。至于恰当的液化支持剂,一个实例可以是醇,特别是乙醇或诸如丙二醇的多元醇,或非离子表面活性剂,如多山梨醇酯 80™ 或 HCO-50。

[0067] 对于油剂,可以考虑芝麻油或大豆油,且可以与苯甲酸苄酯或苯甲醇共同使用。此外,其还可以与缓冲剂如磷酸缓冲液、醋酸钠缓冲液、或止痛溶液如奴佛卡因,或稳定剂如苯甲醇、苯酚、或抗氧化剂等联合使用。制备好的注射液分装入普遍认可的合适的安瓿中。

[0068] 通过非口服方式对患者机体给药是合乎需要的,更具体地,尽管静脉给药 1 或 3 次是基本的,但更大的注射量也是允许的。此外,给药时段可长可短。更具体地,可考虑注射类型或经皮给药的类型。作为注射类型的实例,可以通过静脉内注射、动脉注射,可选择性动脉注射、肌肉注射、腹膜内注射、皮下注射、脑内注射、颅脑注射、或骨髓注射进行给药,静脉内注射是最理想的。在静脉内注射的情况中,由于利用常规输血的移植方法已经成为可能,患者不需要进行手术,而且由于不需局部麻醉,患者和医生的负担都会较轻。考虑到急诊医学的未来发展,在紧急运送过程中或在关键部位进行给药也是可以考虑的。

[0069] 此外,本发明提供了一种用于治疗患移植抗宿主疾病患者的方法,包括对上述患有移植抗宿主疾病的患者给予有效治疗剂量的间质干细胞或骨髓干细胞的步骤。

[0070] 在哺乳动物尤其是人类中,治疗 GVHD 或 GVHD 症状的克隆性骨髓细胞每次注射的有效剂量,可以为 1×10^4 细胞/kg 体重至 1×10^8 细胞/kg 体重之间;在 1×10^4 细胞/kg 体重至 1×10^8 细胞/kg 体重之间;在 2×10^4 细胞/kg 体重至 1×10^8 细胞/kg 体重之间;在 2.5×10^4 细胞/kg 体重至 1×10^8 细胞/kg 体重之间;在 2×10^4 细胞/kg 体重至 1×10^7 细胞/kg 体重之间;在 2.5×10^4 细胞/kg 体重至 1×10^7 细胞/kg 体重之间;在 2×10^4 细胞/kg 体重至 3×10^6 细胞/kg 体重之间;在 2.5×10^4 细胞/kg 体重至 3×10^6 细胞/kg 体重之间;在 2×10^4 细胞/kg 体重至 2×10^6 细胞/kg 体重之间;在 2.5×10^4 细胞/kg 体重至 2×10^6 细胞/kg 体重之间;在 2×10^4 细胞/kg 体重至 1×10^6 细胞/kg 体重之间;在 2.5×10^4 细胞/kg 体重至 1×10^6 细胞/kg 体重之间;在 2×10^4 细胞/kg 体重至 1×10^5 细胞/kg 体重之间;或在 2.5×10^4 细胞/kg 体重至 1×10^5 细胞/kg 体重之间。

[0071] 尽管不限于任何特定的给药方法,但优选的是非口服给药法。尽管全身或局部给药都是可以的,但优选全身给药,而最为优选的是静脉内给药。

[0072] 移植抗宿主疾病的治疗

[0073] 本专利的发明人能够改善急性或慢性移植抗宿主疾病患者的状况,这些患者表现为对通过给予利用 2006 年 6 月 19 日提交的美国专利申请公开第 US2006/0286669 号“多谱系干细胞的分离 (Isolation of Multi-Lineage Stem Cells)”中所披露的方法 (图 1) 分离得到的间质干细胞或骨髓干细胞进行治疗无应答,该申请的全部内容结合于此以供参考。

[0074] GVHD 表现或症状包括皮肤硬化、经口进食受限、眼干、胃肠道 (GI) 症状如吞咽困难、食欲减退、恶心、呕吐、腹痛、或腹泻,肝症状如表现为胆红素升高、碱性磷酸酶升高、丙氨酸转氨酶 (ALT)/ 天冬氨酸转氨酶 (AST) 之比 (ALT/AST) 升高、呼吸短促、和 / 或上肢或下肢紧缩感。

[0075] 受治疗者可能会表现出多种症状,这取决于被移植抗宿主疾病所影响的组织。一些患者会出现 4-5 种症状而其他的可能为 1-2 种症状。因此,本发明旨在治疗与 GVHD 相关的,表现在受治疗者任何组织中的任何和全部症状。当这些表现或症状被治愈,就可以认为 GVHD 疾病本身也同样被治愈。

[0076] 下文的说明提供了本申请中涉及的亚组分分离培养技术的应用以及利用由此获得的同种克隆性骨髓干细胞治疗经鉴定出现 GVHD 症状个体的详细内容。虽然没有理论的支持,但可以认为所给予的干细胞在受治疗者体内会分泌 IL-10,其可以抵消或抑制供者 T 细胞的有害作用,从而治疗 GVHD 及 GVHD 的症状。

[0077] 在利用亚组分分离培养法从上述患有移植物抗宿主疾病患者的母亲分离得到间质干细胞或骨髓干细胞,并证实为单克隆细胞起源的细胞系后,将其命名为 cMSC-15。通过实质细胞分析来实施细胞表面抗原分析以确定上述细胞系是否是真正的间质干细胞或骨髓干细胞(图 2)。结果显示,由于其显示出 CD29、CD44、CD90、CD105 及 CD166 细胞表面抗原表达,而 CD106、CD119、及 HLA-DR 细胞表面抗原没有表达,因此确认其为间质干细胞或骨髓干细胞而并非造血干细胞。CD133 和 STRO-1 的表达呈弱阳性。相应地,为了更具体地验证上述细胞系的特征,利用 ELISA 的方法验证了 TGF- β 和 IL-10 的表达程度(图 3)。TGF- β 的表达与作为对照的通过常规的密度梯度离心法获得的间质干细胞不存在较大差异。然而,与对照相比,IL-10 的表达却至少增加了 5 倍。

[0078] 因此,本专利发明人在将上述已确定的间质干细胞或骨髓干细胞培养至足够用于治疗量后,将其用在了一名由于慢性移植物抗宿主疾病的发作而处于生命危急状况的患者的治疗。特别指出,上述患者是一名诊断为患有急性髓细胞白血病的 18 岁女性,在通过诱导治疗达到缓解后,接受了同种异体骨髓移植。在六个月的免疫抑制剂给药中断后一个月,出现了慢性移植物抗宿主疾病,尽管利用环孢霉素 A(CsA)、麦考酚酸吗乙酯(MMF)、和甾类化合物进行了治疗,但由于持续的便血、胆红素增加,及皮肤、口和眼睛干燥,患者的情况恶化,并且由于治疗的副作用和在尿液及血液中均检测到的 BK 病毒(由于 BK 病毒的感染),巨细胞病毒活化,因此开始使用西多福韦(Cideforvir)进行治疗。

[0079] 本专利发明人在收到韩国食品药品监督管理局发出的紧急临床许可后,通过静脉内注射给予一次上述间质干细胞或骨髓干细胞。在给药期间及之后均没有观察到不良/负面反应,且患者的症状在第 1 次给药后出现缓慢改善,3 周后进行了第 2 次给药。后来,患者症状得到了改善,并且在第 2 次给药 34 天后,在停止服用甾类化合物而仅服用免疫抑制剂的情况下,患者出院。

[0080] 为了验证该治疗的病理学效应,本专利发明人检测了移植物抗宿主疾病的主要指征,即排便量及血液中的碱性磷酸酶活性(图 4)。排便量显著减少,而作为血清学指标的血液碱性磷酸酶活性也回落到了正常水平(60-220ng/ml)。此外,还进行了结肠镜检查以验证症状是否得到改善(图 5)。从图 5 中可以看出,在给予本发明的间质干细胞或骨髓干细胞后,结肠镜数据显示溃疡随时间得到了显著改善。

[0081] 从以上看出,本专利发明人通过临床试验证实了利用本发明所述亚组分分离培养法分离的间质干细胞或骨髓干细胞对治疗慢性移植物抗宿主疾病是有效的。

[0082] 本发明并不限于本文所描述的特定实施例所限定的范围,实际上,除本文所描述的实施例之外,本领域的普通技术人员将能够根据前面的说明和附图对本发明进行多种改进是显而易见的。这些改进也将归为附属权利要求的范围内。下面提供的实施例是用来说明而非限制本发明的。

[0083] 实施例

[0084] 实施例 1- 利用亚组分分离培养法分离间质干细胞或骨髓干细胞

[0085] 在对骨髓捐献者(慢性移植物抗宿主疾病患者治疗对象的母亲)臀部的一个区域实施局部麻醉后,通过在髌骨中插入注射针抽取骨髓。将 15ml 含有 20% FBS(胎牛血清)和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM(达尔伯克氏改良伊格尔培养基, GIBCO-BRL, Life-technologies, MD, USA) 和 2ml 来自上述骨髓供者的骨髓提取物加入 100mm 的培养容

器中,并在 37℃,5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 2 小时。培养之后,将培养容器轻微倾斜,以使得附着在底部的细胞不会脱落,并将培养容器中最大量的上层培养液移至一个新的容器中。

[0086] 再次重复相同操作后,将取出的培养液移入一个培养容器中 (Becton Dickinson) 并在 37℃ 培养 2 小时。再次将培养液移入一个新的容器,24 小时后移入另一个新的容器,并在 24 小时后再移入一个新的容器。最后,48 小时后,目测判定移入新容器后被保留下来的细胞在培养容器底部附着并生长。可以推断,能够经历多次分层分离进入这一阶段的细胞是那些比其他细胞小的细胞。再经过大约 3 到 5 个小时,这些细胞会形成单克隆。用胰蛋白酶处理单克隆,分离,然后以每孔 10² 至 6×10² 的细胞数将细胞转移到一个 6 孔培养容器中。在 37℃,5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 4 到 5 天后,当其生长至 80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶 /1mM EDTA (GIBCO-BRL) 进行处理,收集细胞后,移入一个 75cm² 的培养容器中继代培养。至此获得了上述单克隆起源的细胞系并将其命名为 cMSC-15。

[0087] 通过显微镜观察上述细胞的形状的结果是,可以看到起始阶段的细胞形状与成纤维细胞类似,直至继代培养的第 5 代 (stage) 细胞均未发现形状的显著改变。观察发现细胞倍增所需的时间为 24-36 小时,与成纤维细胞无明显差异。

[0088] 实施例 2- 分离的间质干细胞或骨髓干细胞的鉴定

[0089] 实施例 2.1- 利用流式细胞仪分析间质干细胞或骨髓干细胞特征

[0090] 为了验证利用上述实施例 1 中的方法从骨髓中分离的 cMSC-15 是否是间质干细胞或骨髓干细胞,利用流式细胞仪 (BDBiosciences) 观察是否存在具有干细胞特征的细胞表面抗原。

[0091] 将干细胞在 75cm² 培养容器中继代培养 6 到 7 天后,用 0.25% 胰蛋白酶处理,并收集细胞。细胞用 1×PBS/0.4% BSA 洗涤 2 次,以除去胰蛋白酶和培养液。用离心分离法收集细胞并测量细胞数后,将 1×10⁶ 细胞收集在一个 1.5ml 管中,并用山羊血清 (Vector) 在室温下封闭 1 小时。封闭完成后,用 1×PBS/0.4% BSA 将细胞洗涤 2 次,并用分别连接抗 CD14、CD29、CD31、CD34、CD44、CD73、CD90、CD105、CD106、CD119、CD133、CD166、HLA-DR、第 1 类 HLA 和 STRO-1 抗体 (Serotec Ltd, Kidlington, OX, UK) 的藻红蛋白 (PE) 进行处理,4℃ 反应 40 分钟。细胞用 1×PBS/0.4% BSA 洗涤 2 次后,悬浮于 0.5ml 1×PBS/0.4% BSA 中,置于流式细胞仪中并进行分析。

[0092] CD29 (其作为一种间质干细胞的特异性整合素抗原),以及 CD44 和 CD105 (它们为间质干细胞的特异性基质受体抗原) 均显示为阳性反应。CD90、CD166、和第 1 类 HLA 细胞表面抗原均表达,而 CD106、CD119、以及 HLA-DR 细胞表面抗原均不表达。除此之外,CD31、CD133、和 STRO-1 的表达水平显示为弱阳性 (图 2)。这些细胞表面抗原在经历了 6 次继代培养的细胞中仍能维持表达。这表明所分离的细胞,即使经过继代培养,其间质干细胞的特异性抗原也将会持续表达。

[0093] 实施例 2.2- 与间质干细胞免疫抑制相关的细胞因子分泌情况的分析

[0094] 为了寻找更多利用本发明中所述亚组分分离培养法分离的间质干细胞的特征,本专利发明人分析了与免疫抑制相关的细胞因子的表达水平。

[0095] 特别地,在对取自同一骨髓捐献者并利用现有的密度梯度离心法分离的间质干细胞或骨髓干细胞 (对照组) 以及本发明中利用上述实施例 1 中描述的方法分离的 cMSC-15

进行培养后,利用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 分析了培养液中分泌的 TGF- β 和 IL-10 的表达量。为了进行精确的分析,对上述两种细胞系进行无血清培养,且上述两个 ELISA 检测均采用 R&D 系统 (USA) 的试剂盒,并按照制造商的说明书操作。

[0096] 分析结果显示,尽管 TGF- β (的表达) 与对照组差异极小,但对于 IL-10,利用亚组分分离培养法获得的 cMSC-15 与对照组相比,显示出 5 倍以上的增加表达量 (图 3)。这表明,在移植物抗宿主疾病的治疗功效与间质干细胞或骨髓干细胞的 IL-10 表达水平之间存在关联。

[0097] 实施例 3- 所分离的间质干细胞或骨髓干细胞的临床应用

[0098] 实施例 3.1- 间质干细胞或骨髓干细胞的给药

[0099] 患者是一名被诊断为患有急性髓细胞白血病的 18 岁女性,在通过诱导治疗达到缓解后,接受了同种异体的骨髓移植。在六个月的免疫抑制剂给药中断后一个月,出现了慢性移植物抗宿主疾病,尽管利用环孢霉素 A (CsA)、麦考酚酸吗乙酯 (MMF)、和甾类化合物进行了治疗,但由于持续的便血、胆红素增加、及皮肤、口和眼睛干燥,患者的情况恶化,并且由于治疗副作用和 BK 病毒 (由于 BK 病毒的感染,在尿液及血液中均检测到了 BK 病毒) 引起的巨细胞病毒活化,因此开始使用西多福韦进行治疗。在收到韩国食品药品监督管理局发出的紧急临床许可后,将按照实施例 1 中描述的方法分离得到的患者母亲的间质干细胞或骨髓干细胞在 GMP 装置中培养,并采用静脉内注射给予患者。在给药期间及之后没有观察到不良 / 负面反应,且患者的症状在第 1 次给药后出现缓慢改善,3 周后以与第 1 次相同的剂量进行第 2 次给药。后来,患者症状得到了显著改善,并且,在第 2 次给药的 34 天后,在停止服用甾类化合物而仅服用 1.5g/ 天的作为免疫抑制剂的 MMF 的情况下,患者出院。

[0100] 实施例 3.2- 治疗后疾病指征的改变

[0101] 为了验证利用本发明中的亚组分分离培养法分离的间质干细胞或骨髓干细胞是否具有疗效,本专利发明人检测了排便量及作为主要指征的血液中碱性磷酸酶活性 (图 4)。血液中碱性磷酸酶的活化利用商品化试剂盒 (Sigma Chemical Company, USA) 来实现。

[0102] 结果显示,作为慢性移植物抗宿主疾病的一个主要指征的排便量显著减少,且作为血清学指标的血液碱性磷酸酶活性也回落到了正常水平 (60-220ng/ml)。此外,还进行了结肠镜检查以验证症状是否得到改善 (图 5)。结果显示,在给予间质干细胞或骨髓干细胞后三个月后,结肠镜检查认为溃疡得到了显著改善。正如所描述的,本专利发明人已通过临床试验证实了利用本发明的亚组分分离培养法分离的间质干细胞或骨髓干细胞对治疗慢性移植物抗宿主疾病是有效的。

[0103] 本发明涉及包括作为活性成分的间质干细胞或骨髓干细胞的用于治疗急性或慢性移植物抗宿主疾病的治疗剂,本发明的治疗剂可以非常有效的治疗那些极难治疗的移植物抗宿主疾病,尤其是作为骨髓移植术后作为副作用的频繁发生的致死性急性或慢性移植物抗宿主疾病。

[0104] 本文所引用的参考资料的全部内容均结合于此供参考。

[0105] *****

[0106] 本领域的普通技术人员仅利用常规实验即能够识别或者能够确定多种本发明中特别阐述的特定实施方式的等同替代方式。这些等同替代方式也将包含在权利要求的范围内。

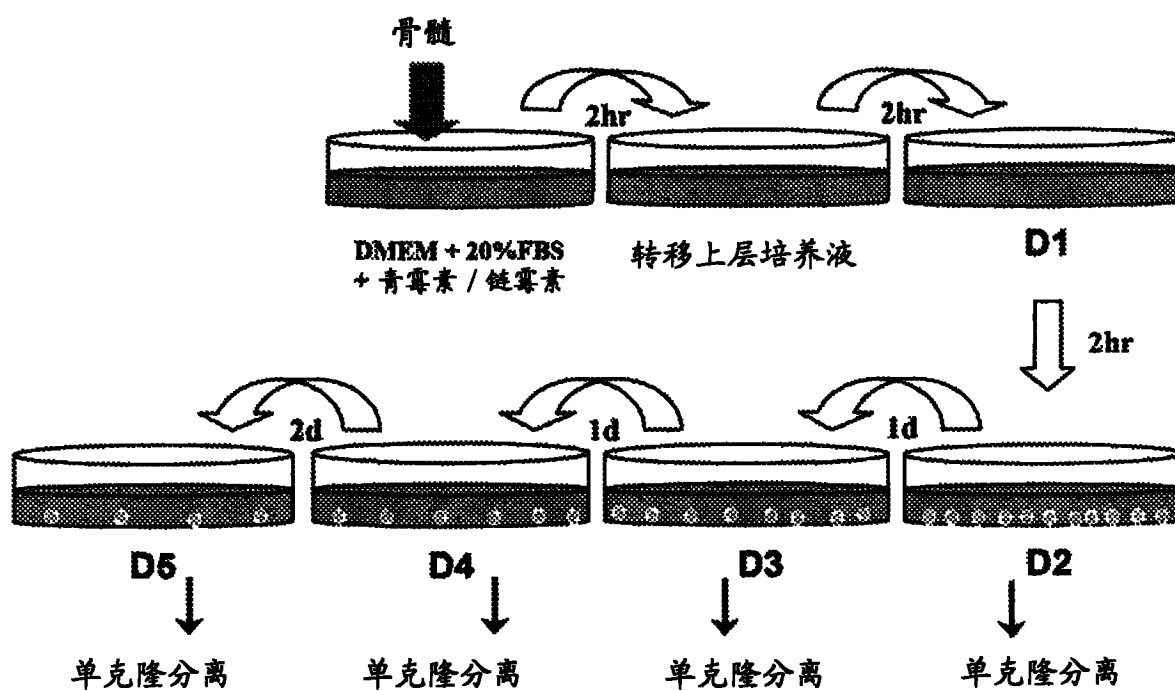


图 1

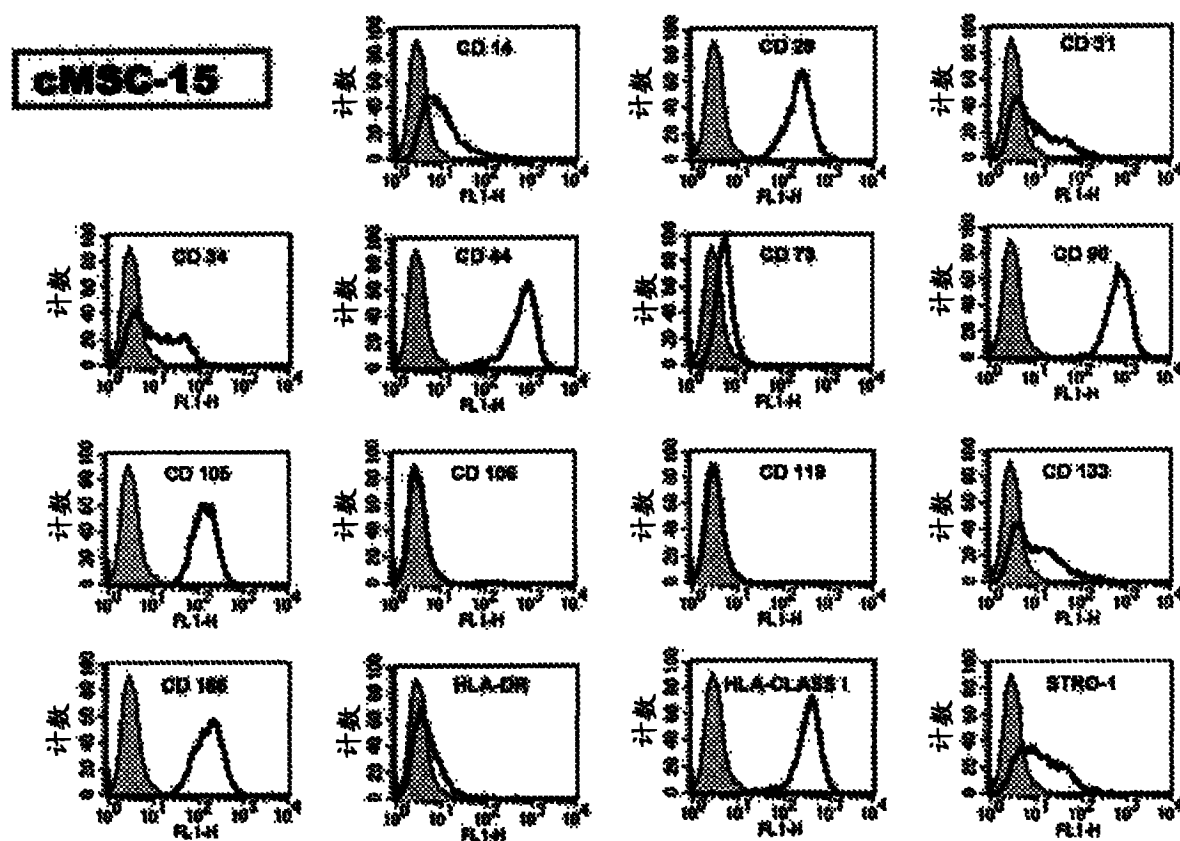


图 2

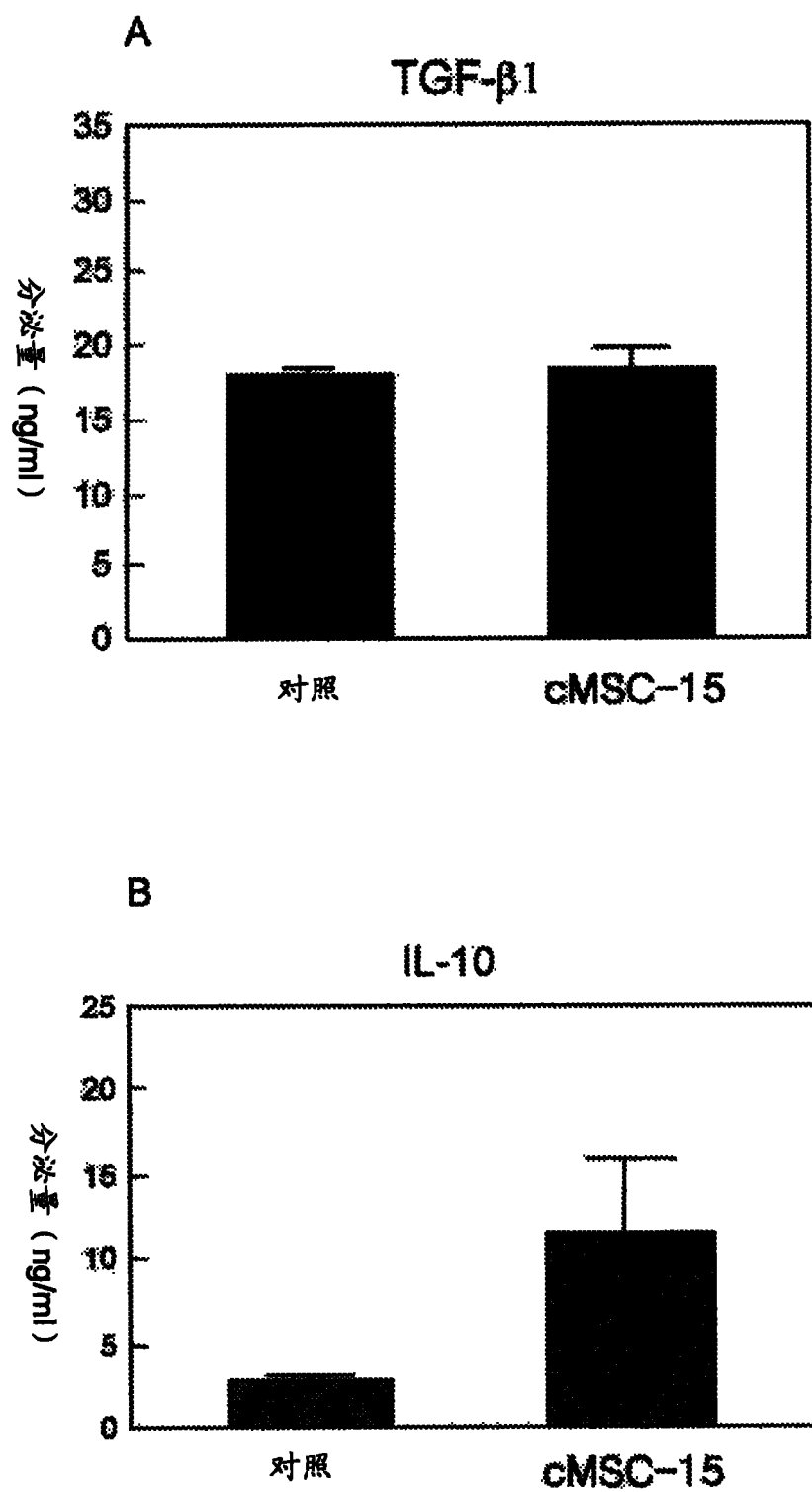


图 3

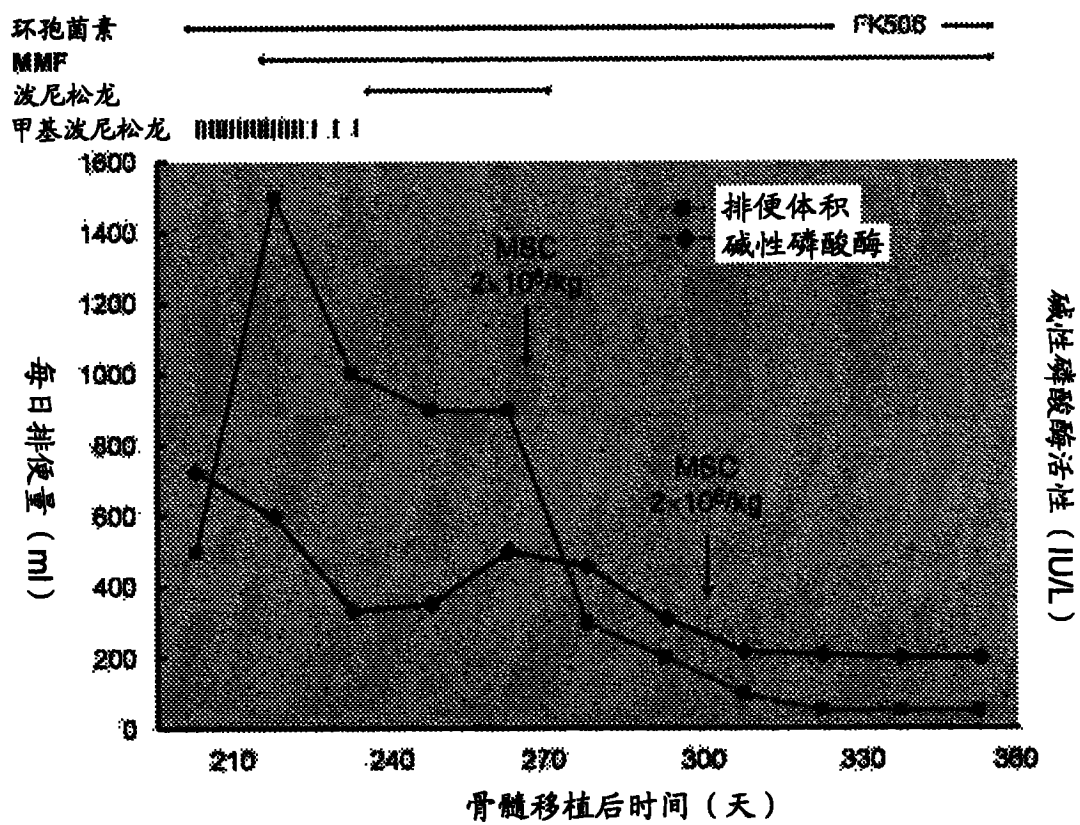


图 4

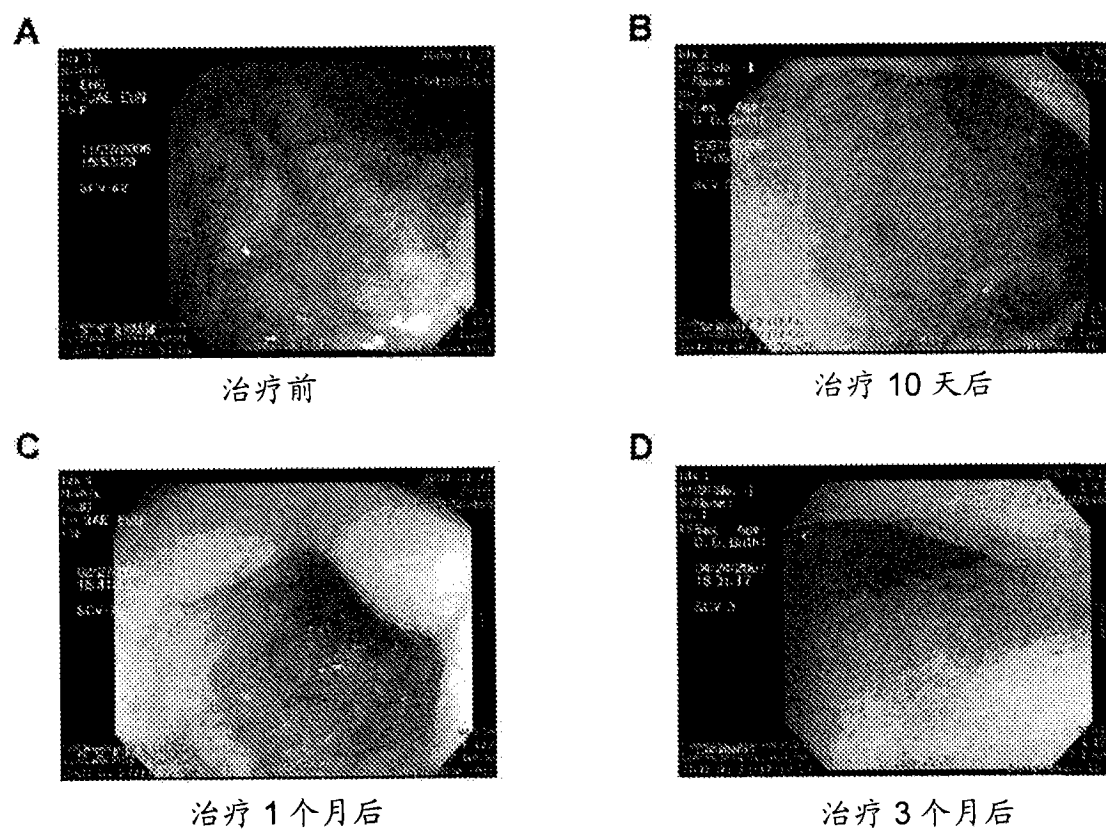


图 5