



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104962512 B

(45) 授权公告日 2022.09.09

(21) 申请号 201510188056.9

(22) 申请日 2010.07.21

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104962512 A

(43) 申请公布日 2015.10.07

(30) 优先权数据
61/227,309 2009.07.21 US(62) 分案原申请数据
201080041878.X 2010.07.21(73) 专利权人 ABT控股公司
地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 J·M·沃达 W·范特霍夫

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285
专利代理师 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

C12N 5/074 (2010.01)

C40B 50/06 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 35/42 (2015.01)

A61K 35/44 (2015.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2006/0263337 A1, 2006.11.23

WO 2007/056578 A1, 2007.05.18

WO 02/064748 A2, 2002.08.22

US 2006/0121605 A1, 2006.06.08

US 2009/0130124 A1, 2009.05.21

CN 101336112 A, 2008.12.31

CN 101410125 A, 2009.04.15

M Kovacsovics-Bankowski et al.. "Pre-clinical safety testing supporting clinical use of allogeneic multipotent adult progenitor cells".《Cytotherapy》.2008,第10卷(第7期),第730-742页.

W Van't Hof et al.. "Direct delivery of syngeneic and allogeneic large-scale expanded multipotent adult progenitor cells improves cardiac function after myocardial infarct".《Cytotherapy》.2007,第9卷(第5期),第477-487页.

Magdalena Kovacsovics-Bankowski et al.. "Clinical scale expanded adult pluripotent stem cells prevent graft-versus-host disease".《Cellular Immunology》.2008,第255卷第55-60页. (续)

审查员 樊艳爽

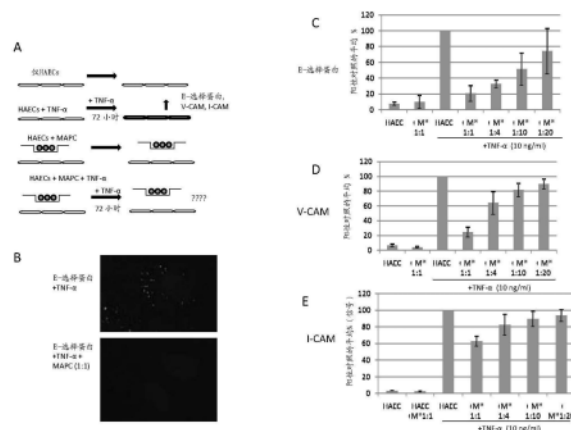
权利要求书5页 说明书32页 附图7页

(54) 发明名称

干细胞用于减少白细胞外渗的用途

(57) 摘要

本发明总体上涉及借助分泌可减少白细胞外渗的因子的细胞来减少炎症。具体地,本发明涉及使用分泌因子的细胞的方法,所述因子可下调在血管内皮细胞中细胞粘附分子的表达。下调细胞粘附分子的表达可减少白细胞对内皮细胞的粘附从而减少外渗。结果是减少了炎症。所述细胞是具有多能特性的非胚胎、非生殖细胞。这些可包括多能标记物的表达和广泛的分化潜能。



[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

Nan-ping Weng. "Interplay between telomere length and telomerase in human leukocyte differentiation and aging". 《Journal of Leukocyte Biology》.2001,第70卷第861-867页.

Georges Herbein et al.. "Tumor Necrosis Factor (TNF)- α and TNF Receptors in Viral Pathogenesis". 《Proc. Soc. Exp. Biol. Med.》.2000,第223卷第241-257页.

Yuehua Jiang et al.. "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow". 《Nature》.2002,第418卷第41-49页.

Yuehua Jiang et al.. "Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain". 《Experimental Hematology》.2002,第30卷第896-904页.

Fan Zhang et al.. "Inhibition of TNF- α induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium".

《Atherosclerosis》.2002,第161卷第381-386页.

Robert Korngold et al.. "Role of Tumor Necrosis Factor- α in Graft-versus-Host Disease and Graft-versus-Leukemia Responses". 《Biology of Blood and Marrow Transplantation》.2003,第9卷第292-303页.

BJ Herdrich et al.. "Multipotent adult progenitor cells: their role in wound healing and the treatment of dermal wounds". 《Cytotherapy》.2008,第10卷(第6期),第543-550页.

Steven L. Highfill et al.. "Multipotent adult progenitor cells can suppress graft-versus-host disease via prostaglandin E2 synthesis and only if localized to sites of allopriming". 《Blood》.2009,第114卷(第3期),第693-701页.

Andrei Kochegarov. "Small molecules for stem cells". 《Expert Opin. Ther. Patents》.2009,第19卷(第3期),第275-281页.

1. 具有用于以下一种或多种效应的所需效能的细胞 (I) 用于制备用于实现所需效应的药剂的用途, 其中所述效应为: (1) 减少白细胞外渗, (2) 减少白细胞至血管内皮或者分离的内皮细胞的粘附, (3) 减少细胞因子介导的内皮细胞的活化, (4) 减少一种或多种细胞粘附分子在内皮细胞上的表达, 其中所述细胞 (I) 是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞,

其中在制备所述药剂之前, 测定所述细胞 (I) 具有所需效能。

2. 一种体外方法, 包括评估细胞 (I) 具有至少一种对白细胞和对内皮细胞的效应的能力, 所述至少一种效应为: (1) 减少白细胞外渗, (2) 减少白细胞至血管内皮或者分离的内皮细胞的粘附, (3) 减少细胞因子介导的内皮细胞的活化, (4) 减少一种或多种细胞粘附分子在内皮细胞上的表达, 被测定具有所述能力的细胞 (I) 是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞。

3. 权利要求1-2中任一项的方法或用途, 其中所述细胞 (I) 表达端粒酶。

4. 权利要求1-2中任一项的方法或用途, 其中所述细胞 (I) 表达oct4。

5. 权利要求3的方法或用途, 其中所述细胞 (I) 表达oct4。

6. 权利要求1-2和5中任一项的方法或用途, 其中所述细胞 (I) 表达端粒酶和oct4。

7. 权利要求3的方法或用途, 其中所述细胞 (I) 表达端粒酶和oct4。

8. 权利要求4的方法或用途, 其中所述细胞 (I) 表达端粒酶和oct4。

9. 权利要求1-2、5和7-8中任一项的方法或用途, 其中所述细胞 (I) 能够在使用前在培养中经历至少40次细胞倍增。

10. 权利要求3的方法或用途, 其中所述细胞 (I) 能够在使用前在培养中经历至少40次细胞倍增。

11. 权利要求4的方法或用途, 其中所述细胞 (I) 能够在使用前在培养中经历至少40次细胞倍增。

12. 权利要求6的方法或用途, 其中所述细胞 (I) 能够在使用前在培养中经历至少40次细胞倍增。

13. 权利要求1-2、5、7-8和10-12中任一项的方法或用途, 其中所述细胞 (I) 能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种。

14. 权利要求3的方法或用途, 其中所述细胞 (I) 能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种。

15. 权利要求4的方法或用途, 其中所述细胞 (I) 能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种。

16. 权利要求6的方法或用途, 其中所述细胞 (I) 能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种。

17. 权利要求9的方法或用途, 其中所述细胞 (I) 能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种。

18. 权利要求1-2、5、7-8、10-12和14-17中任一项的方法或用途, 其中所述细胞 (I) 能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层。

19. 权利要求3的方法或用途,其中所述细胞(I)能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层。

20. 权利要求4的方法或用途,其中所述细胞(I)能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层。

21. 权利要求6的方法或用途,其中所述细胞(I)能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层。

22. 权利要求9的方法或用途,其中所述细胞(I)能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层。

23. 权利要求13的方法或用途,其中所述细胞(I)能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层。

24. 权利要求1-2、5、7-8、10-12、14-17和19-23中任一项的方法或用途,其中所述细胞(I)具有正常的核型且不是致瘤的。

25. 权利要求3的方法或用途,其中所述细胞(I)具有正常的核型且不是致瘤的。

26. 权利要求4的方法或用途,其中所述细胞(I)具有正常的核型且不是致瘤的。

27. 权利要求6的方法或用途,其中所述细胞(I)具有正常的核型且不是致瘤的。

28. 权利要求9的方法或用途,其中所述细胞(I)具有正常的核型且不是致瘤的。

29. 权利要求13的方法或用途,其中所述细胞(I)具有正常的核型且不是致瘤的。

30. 权利要求18的方法或用途,其中所述细胞(I)具有正常的核型且不是致瘤的。

31. 权利要求1-2、5、7-8、10-12、14-17、19-23和25-30中任一项的方法或用途,其中所述细胞(I)是来自人的多能成体祖细胞,并且特征在于其是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞。

32. 权利要求3的方法或用途,其中所述细胞(I)是来自人的多能成体祖细胞,并且特征在于其是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞。

33. 权利要求4的方法或用途,其中所述细胞(I)是来自人的多能成体祖细胞,并且特征在于其是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞。

34. 权利要求6的方法或用途,其中所述细胞(I)是来自人的多能成体祖细胞,并且特征在于其是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞。

35. 权利要求9的方法或用途,其中所述细胞(I)是来自人的多能成体祖细胞,并且特征在于其是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞。

36. 权利要求13的方法或用途,其中所述细胞(I)是来自人的多能成体祖细胞,并且特征在于其是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞。

37. 权利要求18的方法或用途,其中所述细胞(I)是来自人的多能成体祖细胞,并且特征在于其是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚

层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞。

38. 权利要求24的方法或用途,其中所述细胞(I)是来自人的多能成体祖细胞,并且特征在于其是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞。

39. 权利要求1-2、5、7-8、10-12、14-17、19-23、25-30和32-38中任一项的方法或用途,其中所述细胞(I)是来自人骨髓的多能成体祖细胞,并且特征在于其是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞。

40. 权利要求3的方法或用途,其中所述细胞(I)是来自人骨髓的多能成体祖细胞,并且特征在于其是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞。

41. 权利要求4的方法或用途,其中所述细胞(I)是来自人骨髓的多能成体祖细胞,并且特征在于其是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞。

42. 权利要求6的方法或用途,其中所述细胞(I)是来自人骨髓的多能成体祖细胞,并且特征在于其是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞。

43. 权利要求9的方法或用途,其中所述细胞(I)是来自人骨髓的多能成体祖细胞,并且特征在于其是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞。

44. 权利要求13的方法或用途,其中所述细胞(I)是来自人骨髓的多能成体祖细胞,并且特征在于其是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞。

45. 权利要求18的方法或用途,其中所述细胞(I)是来自人骨髓的多能成体祖细胞,并且特征在于其是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞。

46. 权利要求24的方法或用途,其中所述细胞(I)是来自人骨髓的多能成体祖细胞,并且特征在于其是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞。

47. 权利要求31的方法或用途,其中所述细胞(I)是来自人骨髓的多能成体祖细胞,并且特征在于其是表达oct4、端粒酶、rex-1或rox-1中的一种或多种并且/或者能够分化为内胚层、外胚层和中胚层胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎、非生殖细胞。

48. 权利要求1-2、5、7-8、10-12、14-17、19-23、25-30、32-38和40-47中任一项的方法或用途,其中所述细胞因子选自TNF- α 和IL-1。

49. 权利要求3的方法或用途,其中所述细胞因子选自TNF- α 和IL-1。

50. 权利要求4的方法或用途,其中所述细胞因子选自TNF- α 和IL-1。

51. 权利要求6的方法或用途,其中所述细胞因子选自TNF- α 和IL-1。

52. 权利要求9的方法或用途,其中所述细胞因子选自TNF- α 和IL-1。

53. 权利要求13的方法或用途,其中所述细胞因子选自TNF- α 和IL-1。

54. 权利要求18的方法或用途,其中所述细胞因子选自TNF- α 和IL-1。

55. 权利要求24的方法或用途,其中所述细胞因子选自TNF- α 和IL-1。

56. 权利要求31的方法或用途,其中所述细胞因子选自TNF- α 和IL-1。

57. 权利要求39的方法或用途,其中所述细胞因子选自TNF- α 和IL-1。

58. 权利要求1-2、5、7-8、10-12、14-17、19-23、25-30、32-38、40-47和49-57中任一项的方法或用途,其中细胞因子介导的活化使得内皮细胞中E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中一种或多种的表达增加。

59. 权利要求3的方法或用途,其中细胞因子介导的活化使得内皮细胞中E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中一种或多种的表达增加。

60. 权利要求4的方法或用途,其中细胞因子介导的活化使得内皮细胞中E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中一种或多种的表达增加。

61. 权利要求6的方法或用途,其中细胞因子介导的活化使得内皮细胞中E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中一种或多种的表达增加。

62. 权利要求9的方法或用途,其中细胞因子介导的活化使得内皮细胞中E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中一种或多种的表达增加。

63. 权利要求13的方法或用途,其中细胞因子介导的活化使得内皮细胞中E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中一种或多种的表达增加。

64. 权利要求18的方法或用途,其中细胞因子介导的活化使得内皮细胞中E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中一种或多种的表达增加。

65. 权利要求24的方法或用途,其中细胞因子介导的活化使得内皮细胞中E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中一种或多种的表达增加。

66. 权利要求31的方法或用途,其中细胞因子介导的活化使得内皮细胞中E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中一种或多种的表达增加。

67. 权利要求39的方法或用途,其中细胞因子介导的活化使得内皮细胞中E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中一种或多种的表达增加。

68. 权利要求48的方法或用途,其中细胞因子介导的活化使得内皮细胞中E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中一种或多种的表达增加。

69. 权利要求1-2、5、7-8、10-12、14-17、19-23、25-30、32-38、40-47、49-57和59-68中任一项的方法或用途,其中所述细胞粘附分子的表达在内皮细胞中被减少,并且所述细胞粘附分子是E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中的一种或多种。

70. 权利要求3的方法或用途,其中所述细胞粘附分子的表达在内皮细胞中被减少,并且所述细胞粘附分子是E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中的一种或多种。

71. 权利要求4的方法或用途,其中所述细胞粘附分子的表达在内皮细胞中被减少,并且所述细胞粘附分子是E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中的一种或多种。

72. 权利要求6的方法或用途,其中所述细胞粘附分子的表达在内皮细胞中被减少,并且所述细胞粘附分子是E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中的一种或多种。

73. 权利要求9的方法或用途,其中所述细胞粘附分子的表达在内皮细胞中被减少,并且所述细胞粘附分子是E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中的一种或多种。

74. 权利要求13的方法或用途,其中所述细胞粘附分子的表达在内皮细胞中被减少,并

且所述细胞粘附分子是E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中的一种或多种。

75. 权利要求18的方法或用途,其中所述细胞粘附分子的表达在内皮细胞中被减少,并且所述细胞粘附分子是E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中的一种或多种。

76. 权利要求24的方法或用途,其中所述细胞粘附分子的表达在内皮细胞中被减少,并且所述细胞粘附分子是E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中的一种或多种。

77. 权利要求31的方法或用途,其中所述细胞粘附分子的表达在内皮细胞中被减少,并且所述细胞粘附分子是E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中的一种或多种。

78. 权利要求39的方法或用途,其中所述细胞粘附分子的表达在内皮细胞中被减少,并且所述细胞粘附分子是E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中的一种或多种。

79. 权利要求48的方法或用途,其中所述细胞粘附分子的表达在内皮细胞中被减少,并且所述细胞粘附分子是E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中的一种或多种。

80. 权利要求58的方法或用途,其中所述细胞粘附分子的表达在内皮细胞中被减少,并且所述细胞粘附分子是E-选择蛋白、P-选择蛋白、VCAM-1、ICAM和VCAM-2中的一种或多种。

81. 权利要求1、5、7-8、10-12、14-17、19-23、25-30、32-38、40-47、49-57、59-68和70-80中任一项的用途,其中所述效能的水平高于亲代细胞群。

82. 权利要求3的用途,其中所述效能的水平高于亲代细胞群。

83. 权利要求4的用途,其中所述效能的水平高于亲代细胞群。

84. 权利要求6的用途,其中所述效能的水平高于亲代细胞群。

85. 权利要求9的用途,其中所述效能的水平高于亲代细胞群。

86. 权利要求13的用途,其中所述效能的水平高于亲代细胞群。

87. 权利要求18的用途,其中所述效能的水平高于亲代细胞群。

88. 权利要求24的用途,其中所述效能的水平高于亲代细胞群。

89. 权利要求31的用途,其中所述效能的水平高于亲代细胞群。

90. 权利要求39的用途,其中所述效能的水平高于亲代细胞群。

91. 权利要求48的用途,其中所述效能的水平高于亲代细胞群。

92. 权利要求58的用途,其中所述效能的水平高于亲代细胞群。

93. 权利要求69的用途,其中所述效能的水平高于亲代细胞群。

干细胞用于减少白细胞外渗的用途

[0001] 本申请为分案申请，其原申请的申请日为2010年7月21日，申请号为201080041878.X，名称为“干细胞用于减少白细胞外渗的用途”。

技术领域

[0002] 本发明总得来说涉及借助分泌可减少白细胞外渗的因子的细胞减少炎症的方法。具体地，本发明涉及使用分泌因子的细胞的方法，所述因子可下调细胞粘附分子在血管内皮细胞中的表达。下调细胞粘附分子的表达可减少白细胞黏着内皮细胞，从而减少外渗。结果是减少了炎症。因此，本发明提供用于治疗与不想要的炎症组分相关的病理学疾病（包括心血管疾病）的方法。本发明还涉及筛选调节细胞下调内皮细胞中细胞粘附分子表达的能力的试剂的药物发现方法。本发明还涉及细胞库，其可被用于提供用于给予受试者的细胞，所述库包含在下调内皮细胞中的细胞粘附分子的表达和减少白细胞黏附和/或外渗方面具有所需能力的细胞。本发明还涉及包含具有特定所需能力的细胞的组合物。本发明还涉及在给予所述细胞之前进行的诊断方法，包括评估待给予的细胞的所需能力的测定。本发明还涉及治疗后诊断测定以评估所述细胞对被治疗的受试者的作用。本发明还涉及药物组合物中具有需要能力的细胞。所述细胞是具有多能特性的非胚胎非生殖细胞。所述多能特性可包括多能标记物的表达和广泛分化潜能。

背景技术

[0003] 炎症

[0004] 急性炎症的过程由受伤组织局部的血管起始，所述血管改变以允许血浆蛋白质和白细胞渗入周围组织中。进入所述组织的流体流增加可导致与炎症相关的特征性肿胀。血管经受显著血管变化，包括血管舒张、渗透性增大和血流变缓，其由各种炎症介体的作用诱导。增加的血管渗透性可导致血浆进入所述组织，引起由于血液中的细胞浓度增加而产生的淤滞。淤滞使得白细胞沿着内皮边缘化，这是它们募集进入所述组织的关键步骤。正常血流可以防止上述过程的发生，因为沿着血管周边的剪切力将细胞移动到血管中部。因此，所述变化使得白细胞通过构成血管的内皮和基底膜外渗。一旦进入所述组织，所述细胞就沿着趋化梯度移动到损伤部位，在这里它们能够尝试除去刺激物并且修复所述组织。

[0005] 白细胞从血液通过血管移动至组织被称为外渗，并且可被分为多个大步骤：

[0006] (1) 白细胞局部化并且募集至炎症局部的内皮——包括边缘化和黏附至内皮细胞：白细胞的募集是受体介导的。炎症的产物，例如组胺，可促进P-选择蛋白在内皮细胞上立即表达。该受体微弱地结合至白细胞表面的碳水化合物配体，使得它们随着键的形成和断裂沿着内皮表面“滚动”。来自受损细胞的细胞因子可诱导E-选择蛋白在内皮细胞上表达，其与P-选择蛋白的功能类似。细胞因子也可诱导整合蛋白配体在内皮细胞上表达，这进一步使得白细胞慢下来。这些微弱结合的白细胞如果没有被受损组织产生的趋化因子激活就能自由分离。活化可增加结合的整合蛋白受体对内皮细胞表面的配体的亲和性，将白细胞牢固地结合至内皮。

[0007] (2) 通过血细胞渗出过程穿内皮的迁移,被称作变移:趋化因子梯度可刺激附着的白细胞在内皮细胞之间移动并且穿过基底膜进入组织。

[0008] (3) 白细胞通过趋化作用在组织中移动:达到组织间质的白细胞通过表达的整联蛋白和CD44结合至细胞外基质蛋白质以防止它们从位点上脱落。趋化物使得白细胞沿着趋化梯度朝向炎症源移动。

[0009] 白细胞外渗是白细胞从循环系统移出,朝向组织损伤或感染的部位的移动。该过程形成先天免疫应答的一部分,包括募集非特异性白细胞。单核细胞还可在不存在感染和组织损伤的情况下,在它们发育为巨噬细胞的过程中使用该过程。

[0010] 白细胞外渗主要出现在毛细血管后微静脉,其中血流动力学剪切力被最小化。可将该过程理解为多个步骤,下文概括为“趋化作用”“滚动黏着”“紧密黏附”和“(内皮)变移”。已经证明每当这些步骤中的任一步骤被抑制时,白细胞募集即停止。

[0011] 趋化作用

[0012] 识别病原体并被病原体活化后,感染组织中的定居巨噬细胞释放细胞因子,例如IL-1、TNF- α 和趋化因子。IL-1和TNF- α 可引起感染部位附近的血管内皮细胞表达细胞粘附分子,包括选择蛋白。循环白细胞由于趋化因子的存在而朝向损伤或感染部位集中。

[0013] 滚动黏着

[0014] 像尼龙搭链一样,循环白细胞上的碳水化合物配体通过边缘亲和力与血管内壁的选择蛋白分子结合。这使得白细胞慢下来并且开始沿着血管壁内表面滚动。在这种滚动中,在选择蛋白和它们的配体之间发生短暂的键形成和断裂。

[0015] 紧密黏着

[0016] 同时,由巨噬细胞释放的趋化因子可激活滚动的白细胞并且使得表面整联蛋白分子从默认的低亲和力状态转换为高亲和性状态。这是通过整联蛋白的近分泌活化促进的,其中所述整联蛋白的近分泌活化通过内皮细胞释放的趋化因子和可溶因子实现。整联蛋白在活化状态与内皮细胞上表达的互补受体以高亲和性紧密结合。这使得白细胞固定不动,尽管有流动的血流的剪切力。

[0017] 变移

[0018] 白细胞的细胞骨架以如下方式重组,即白细胞铺展在内皮细胞上。白细胞以这种形式伸出伪足并且通过内皮细胞间的空隙。白细胞变移随着出现在白细胞和内皮细胞表面上的PECAM蛋白与所述细胞相互作用并且有效地将所述细胞拉动通过内皮而出现。白细胞可分泌降解基底膜的蛋白酶,使得它们能够逸出血管——该过程被称为血细胞渗出。一旦白细胞处于间隙液中,即沿着趋化梯度朝向损伤或感染的部位移动。

[0019] 嗜中性粒细胞在炎症部位积聚是由特定类的细胞粘附分子介导的,所述细胞粘附分子包括白细胞上的CD18整联蛋白和选择蛋白(内皮上的P-和E-选择蛋白,以及白细胞上的L-选择蛋白)。这一点得到了对患有白细胞黏附缺陷综合征患者进行的研究的支持,所述患者的白细胞在CD18或选择蛋白碳水化合物配体表达方面有遗传缺陷(例如,II型白细胞黏附缺陷)。

[0020] 选择蛋白

[0021] 选择蛋白在内皮细胞(通过组织巨噬细胞)的细胞因子活化后很快表达。活化的内皮细胞最初表达P-选择蛋白分子,但是到活化后2小时内,倾向于表达E-选择蛋白。内皮选

择蛋白与白细胞跨膜糖蛋白(包括唾液酸化路易斯血型抗原X)上的碳水化合物结合。

[0022] P-选择蛋白:P-选择蛋白在活化的内皮细胞和血小板上表达。P-选择蛋白的合成可由凝血酶、白细胞三烯B₄、补体片段C5a、组胺、TNF- α 或LPS诱导。这些细胞因子诱导内皮细胞中的怀布尔-帕拉德体的外化,将预先形成的P-选择蛋白呈递于内皮细胞表面。P-选择蛋白可作为配体结合PSGL-1。

[0023] E-选择蛋白:内皮白细胞黏附因子-1由细胞因子刺激的内皮细胞表达。认为它通过介导细胞黏附至血管内壁而负责血液白细胞在炎症部位积聚。它表现出与LUAM1的结构特征一致的结构特征,包括存在凝集素-或EGF-样结构域,之后有含6个保守半胱氨酸残基的短共有重复序列(SCR)结构域。这些蛋白质是细胞粘附分子的选择蛋白家族的一部分(Watson et al.,__J.Exp.Med.172:263-272(1990);Collins et al.,_J.Biol.Chem.266:2466-2473(1991))。在P-选择蛋白合成后不久E-选择蛋白合成,其由例如IL-1和TNF- α 的细胞因子诱导。E-选择蛋白可结合PSGL-1和ESL-1。

[0024] L-选择蛋白:L-选择蛋白在一些白细胞上组成型表达,并且已知其作为配体与GlyCAM-1、MadCAM-1和CD34结合。

[0025] 一些选择蛋白的表达抑制可导致免疫应答减缓。如果L-选择蛋白没有产生,免疫应答可能会慢10倍,因为P-选择蛋白(其也可由白细胞产生)相互结合。P-选择蛋白可以以高亲和性相互结合,但是其出现的频率较低,因为受体位点密度比更小的E-选择蛋白分子低。这可增加初始的白细胞滚动速度,延长缓慢的滚动阶段。

[0026] 整联蛋白

[0027] 参与细胞黏附的整联蛋白主要在白细胞上表达。滚动的白细胞上的 β 2整联蛋白与内皮细胞黏附因子结合,阻止细胞运动。

[0028] LFA-见于循环白细胞,可与内皮细胞上的ICAM-1和ICAM-2结合。

[0029] Mac-1见于循环白细胞,可与内皮细胞上的ICAM-1结合。

[0030] VLA-4见于白细胞和内皮细胞,可促进趋化作用;它还可与VCAM-1结合。

[0031] 通过细胞外趋化因子的细胞活化可导致预先形成的 β 2整联蛋白从细胞库中释放出来。整联蛋白分子迁移至细胞表面并且以高亲和力斑块的形式聚集。细胞内整联蛋白结构域通过胞质因子介导与白细胞细胞骨架联结,所述胞质因子例如胞踝蛋白、 α -辅肌动蛋白和黏着斑蛋白。这种联结引起整联蛋白四级结构的构象变化,使得配体可以接近结合位点。二价阳离子(例如, Mg^{2+})也是整联蛋白-配体结合需要的。

[0032] 整联蛋白配体ICAM-1和VCAM-1由炎症细胞因子活化,而ICAM-2由一些内皮细胞组成型表达,但是会被炎症细胞因子下调。ICAM-1和ICAM-2共有两个同源N-末端结构域;两者可都与LFA-1结合。

[0033] 在趋化作用期间, β 1整联蛋白与细胞外基质组分结合促进细胞运动;VLA-3、VLA-4和VLA-5与纤连蛋白结合,VLA-2和VLA-3与胶原蛋白和其他细胞外基质组分结合。

[0034] 细胞因子

[0035] 外渗受到由炎症应答产生的背景细胞因子环境的调节,并且与具体的细胞抗原无关。最初免疫应答释放的细胞因子诱导血管舒张并且降低沿血管表面的电荷。血流被减缓,促进分子间结合。

[0036] IL-1活化定居淋巴细胞和血管内皮。

[0037] TNF- α 增加血管渗透性并且活化血管内皮。

[0038] CXCL8 (IL-8) 形成趋化梯度,其引导白细胞朝向组织损伤/感染部位移动(CCL2具有与CXCL8类似的功能,包括单核细胞外渗和发育为巨噬细胞);还活化白细胞整联蛋白。

[0039] 可以得到总结炎症中的外渗过程的综述文章。参见Steeber,D.and Tedder,T., Immunologic Research,22/2-3:299-317 (2000);Steeber et al.,FSAEB J,9:866-873 (1995);和Wagner,D.and Frenette,P.,Blood,111:5271-5281 (2008)。

[0040] CD15 (3-岩藻糖基-N-乙酰基-乳糖胺) 是一组分化抗原——一种免疫学上重要的分子。CD15是能够在糖蛋白、糖脂和蛋白聚糖上表达的碳水化合物黏着分子(不是蛋白质)。

[0041] CD15可介导吞噬作用和趋化作用,见于嗜中性粒细胞上;在患有何杰金病、B细胞慢性淋巴细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病和大部分非淋巴细胞性白血病的患者中表达。它还被称为路易斯x和SSEA-1 (阶段特异胚胎抗原1) 并且代表鼠多能干细胞的一种标记物,其中它在植入前胚胎中的细胞的黏附和迁移中起重要作用。它由FUT4 (岩藻糖基转移酶4) 和FUT9合成。

[0042] CD15s

[0043] 对于E-选择蛋白和P-选择蛋白介导的白细胞黏附,唾液酸化路易斯血型抗原X寡糖决定子是白细胞反受体的必要组分。该低聚糖分子分布在粒细胞、单核细胞和天然杀伤细胞的表面。在最终使得白细胞离开血管树(vascular tree)并且被募集至淋巴组织和炎症部位的过程中,白细胞黏附至这些选择蛋白的形成是在早期的且重要的步骤。Natsuka等人,J.Biol.Chem.269:16789-16794 (1994) 和Sasaki等人,J.Biol.Chem.269:14730-14737 (1994) 分离了编码人白细胞 α -1,3-岩藻糖基转移酶——FUT7,其能够合成唾液酸化路易斯血型抗原x决定子——的cDNA。

[0044] Natsuka等人发现,当FUT7在哺乳动物细胞中表达时,所述cDNA指导细胞表面唾液酸化路易斯血型抗原x部分的合成,而不是路易斯x、路易斯A、唾液酸化路易斯a或VIM-2决定子的合成。Sasaki等人证明了在体内FUT7合成与E-选择蛋白结合的唾液酸化路易斯x部分的能力,并且报道了FUT7在白细胞中受限的表达。

[0045] Chen等人,Proc.Nat.Acad.Sci.103:16894-16899 (2006) 指出,活化的T细胞,尤其是Th1细胞表达唾液酸化路易斯x,但是其他T细胞不表达。使用报告基因分析,他们表明了TBET促进了FUT7的转录,而GATA3抑制了FUT7的转录。TBET干扰GATA3与其靶DNA的结合,但是GATA3还干扰TBET与FUT7启动子的结合。GATA3通过以磷酸化依赖方式募集组蛋白脱乙酰酶-3和HDAC5,并且通过在与TBET的N端结合中与CBP/p300竞争,调节FUT7的转录。通过ROG介导的GATA3抑制获得了FUT7和唾液酸化路易斯x在T细胞中的最大表达。Chen等人(2006)得出以下结论:GATA3/TBET转录因子复合体可调节淋巴细胞归巢受体的细胞系特异表达;糖缀合物受到该复合体调节以在Th1和Th2淋巴细胞亚群中实现细胞系特异性表达。

[0046] 选择蛋白P配体或P-选择蛋白糖蛋白配体(PSGL1) 是髓细胞和受激的T淋巴细胞上的P-选择蛋白的高亲和性反受体。因此,它在将这些细胞束缚至活化的血小板或表达P-选择蛋白的内皮中起到关键作用。

[0047] 基于流式细胞术、免疫印迹和流动室分析(flow chamber analyse),Fuhlbrigge等人,Nature 389:978-981 (1997) 提出由岩藻糖基转移酶-7介导的不同的PSGL1翻译后修饰可调节皮肤淋巴细胞相关抗原(CLA) 的表达,所述抗原在T细胞中可结合P-选择蛋白和E-

选择蛋白。CLA-阳性T细胞是皮肤归巢记忆T细胞,其由它们与单克隆抗体HECA-452的反应性界定。CLA-阳性T细胞在很多炎性皮肤病(包括银屑病)中浸润皮肤受损处。

发明内容

[0048] 本发明总得来说涉及用于减少炎症的方法。

[0049] 本发明更具体地涉及减少白细胞(嗜中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞)外渗的方法。

[0050] 本发明更具体地涉及减少白细胞从循环系统渗入周围组织的方法。

[0051] 本发明还涉及减少白细胞黏附至血管的方法。

[0052] 本发明还涉及减少白细胞黏附至血管内皮的方法。

[0053] 本发明还涉及减少白细胞黏附至血管壁中的内皮细胞的方法。

[0054] 本发明还涉及用于下调内皮细胞中的黏着分子的表达的方法。

[0055] 本发明还涉及减少内皮细胞活化的方法。

[0056] 本发明还涉及减少血管内皮中的内皮细胞活化的方法。

[0057] 内皮细胞活化可由暴露于炎症细胞因子造成。细胞因子包括但不限于肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 (IL-1)、双调蛋白、LPS和其他Toll样受体配体(致病性肽,例如fMLP;来自损伤组织的肽,例如纤连蛋白片段)、凝血酶、组胺、氧自由基和IFN- γ 。在本发明的上下文中,活化包括血管内皮细胞中细胞粘附分子的上调。

[0058] 本发明还涉及降低血管壁中的内皮细胞与白细胞上的黏着配体或部分结合的能力的方法。所述黏着配体或部分包括但不限于PSGL-1、ESL-1、CD15s、 α 4-整联蛋白、CD44、 β 2-整联蛋白、L-选择蛋白、CD99和JAM。

[0059] 白细胞包括但不限于嗜中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞。淋巴细胞包括B细胞和T细胞。T细胞包括CD4⁺、CD8⁺、 γ δ T细胞和天然杀伤细胞。

[0060] 在内皮细胞中表达并被下调的细胞粘附分子包括但不限于E-选择蛋白VCAM、ICAM (1/2)、P-选择蛋白、CD99、PECAM-1、JAM、ESAM和骨桥蛋白(VCAM的共同受体)。

[0061] 在一个实施方案中,在具有外伤性脑损伤的受试者中,内皮细胞上的I-CAM和P-选择蛋白被上调。

[0062] 本发明涉及减少细胞粘附分子的表达。表达可以是细胞内和细胞外的,例如在内皮细胞表面。因此,可减少表达,使得当内皮细胞培养时这些分子分泌进入细胞培养基减少。细胞外和细胞表面表达包括在蛋白质水平上减少表达。细胞内表达包括减少细胞内的转录和翻译。

[0063] 根据本发明,全部上述效应(即,炎症、外渗、白细胞黏附至内皮细胞、黏着分子的表达等)的减少可通过以下方式实现:将所述白细胞和/或内皮细胞暴露于具有胚胎干细胞的一些多能特性但衍生自非胚胎组织的非胚胎非生殖细胞。

[0064] 根据本发明,全部上述效应可通过给予细胞或由所述细胞条件化的培养基(medium conditioned by the cell)实现。细胞包括但不限于具有胚胎干细胞特性但衍生自非胚胎组织的非胚胎非生殖细胞。这样的细胞可以是多能的并且表达多能标记物,例如oct4、端粒酶、rex-1、rox-1、sox-2、nanog、SSEA-1和SSEA-4的一种或多种。其他多能性特征可以包括分化为超过一个胚层,例如两个或三个的外胚层、内胚层和中胚层胚胎的胚层的

细胞类型的能力。这样的细胞可以永生化或在培养中转化,或者可以不永生化,也不在培养中转化。这样的细胞可以高度扩增,同时不转化并且维持正常的核型。例如,在一个实施方案中,所述非胚胎非生殖细胞可进行至少10-40次,例如30、40、50、60或更多次细胞倍增,其中所述细胞没有转化并且具有正常的核型。所述细胞可以表达端粒酶活性以便实现超过30次,例如35、40、45、50或更多次细胞群倍增(细胞倍增)。但是,如上所述,所述细胞还能够表达oct4、端粒酶、rex-1、rox-1、sox-2、nanog、SSEA1或SSEA4的一种或多种。这样的细胞可以分化为内胚层、外胚层和中胚层胚胎细胞系的两种的每种中的至少一种细胞类型,并且可以包括分化成为所有三种胚层。此外,它们可以是致瘤的,或者可以不是致瘤的,例如不产生畸胎瘤。如果细胞转化或者致瘤,并且需要将它们用于融合,这样的细胞可被致缺陷以使它们不能在体内形成肿瘤,例如通过防止细胞增殖成为肿瘤的处理。这样的处理在本领域是熟知的。这样的细胞可以自然地达到本文所述的效果(即,达到该效果没有经过遗传学或药物学修饰)。但是,天然表达子可以被遗传学或药物学修饰以增加效能。

[0065] 鉴于这些细胞实现以上效应的特性,所述细胞可被用于筛选调节所述细胞以实现以上所述效应的能力的试剂的药物发现方法。这样的试剂包括但不限于小的有机分子、反义核酸、siRNA DNA适体、肽、抗体、非抗体蛋白质、细胞因子、趋化因子和趋化物。然后,所述试剂可被用于增加所述细胞实现任意上述效应的效能。

[0066] 作为一个实例,该测定已经被用于鉴定用TNF- α 、IFN- γ 或IL-1 β 或它们的结合物对细胞进行的预处理,所述预处理用于产生抑制内皮细胞分子的上调或者下调这些分子的表达的细胞。一些细胞必须与活化的内皮细胞共同培养以产生下调黏附分子(或抑制上调)的因子。因此,对照细胞(没有暴露于活化的内皮细胞)可被暴露于需要的试剂,然后测定它们对内皮细胞活化、黏附部分的表达或上述任意效应的作用。

[0067] 由于本申请描述的所述效应可以由从所述细胞分泌的因子引起,因此不仅细胞,而且从培养所述细胞产生的条件化培养基(conditioned medium)也可用于实现所述效应。这样的培养基将包含所述分泌的因子,因此可被用于代替所述细胞或者添加至所述细胞。因此,当可以使用细胞时,应理解所述培养基也是有效的,并且可被代替或加入。

[0068] 考虑到这些细胞实现上述效应的特性,可以建立细胞库,其包含因具有实现上述效应所需的效能而被选出的细胞。因此,本发明包括测定这样的细胞实现上述任一效应的能力,选择具有所需效能的细胞并将其建库。所述库可提供用于制备用于给予所述受试者的药物组合物的源。可以从所述库中直接使用细胞,或者在使用前扩增。

[0069] 因此,本发明还涉及在将这些细胞给予受试者之前进行的诊断方法,所述预诊断方法包括评估所述细胞实现一种或多种上述效应的能力。所述细胞可从细胞库中取出并且直接使用,或者在给药前扩增。在两种情况下,都会对所述细胞评估所需要的效能。或者,所述细胞可以来自于所述受试者并且在给药之前扩增。在这种情况下,在给药之前对所述细胞评估所需效能。

[0070] 尽管对效性选择的细胞必然会在所述选择程序中进行测定,但是在给予所述受试者用于治疗之前再次测定所述细胞以确保所述细胞在所需水平是否仍然有效,这是更适当的并且是谨慎的。这在所述细胞已被储存——例如在细胞库中,其中细胞在储存期间很可能被冷冻——任意时长的情况下尤其是更适当的。

[0071] 关于用所述细胞处理的方法,所述细胞在最初被分离和给予受试者之间可以有多

个(即相继的)对于调节的测定。这是为了确保所述细胞在该时间范围内出现的操作之后仍然能够达到所需水平的所述效应。例如,可在每次扩增所述细胞之后进行测定。如果细胞储存于细胞库中,它们可在从所述库中释放之后进行测定。如果它们被冷冻,则可在解冻后进行测定。如果来自细胞库的细胞被扩增,它们可在扩增之后进行测定。优选地,可对最终细胞制品(即实际给予所述受试者的)的一部分进行测定。

[0072] 本发明还涉及用于通过评估这种细胞实现一种或多种上述效应的效能来确定所述细胞给药剂量的方法。

[0073] 本发明还包括给予所述细胞之后进行处理后诊断测定以评估效能。所述诊断测定包括但不限于本文描述的任何效应,所述效应容易进行受试者测定。

[0074] 本发明还涉及包含具有所需效能的细胞群的组合物。这样的细胞群被发现可作为适于给予受试者的和/或在细胞库中的药物组合物,来自所述细胞库的细胞可被直接用于给予受试者或者在给予之前扩增。

[0075] 本发明的方法和组合物可用于治疗涉及炎症的任意疾病,其中所述炎症的组分涉及白细胞通过细胞粘附分子黏附于血管内皮。这包括心血管中的极性和慢性病症,例如,急性心肌梗死;中枢神经系统损伤,例如中风、外伤性脑损伤、脊髓损伤;周围血管疾病;肺部疾病,例如哮喘、ARDS;自身免疫疾病,例如风湿性关节炎、多发性硬化、狼疮、硬皮病(scleroderma);银屑病;胃肠疾病,例如移植物抗宿主病、克罗恩病。

[0076] 但是,因理解,对于以上任何病症的治疗,使用这样的细胞可能是适当的;即,在给予用于治疗所述病症前已经评估了一种或多种本文描述的所述效应并且对所需水平的效果进行了选择的细胞。

附图说明

[0077] 图1:人大动脉内皮细胞(HAEC)中MultiStem通过TNF- α 调节E-选择蛋白、V-CAM和I-CAM的上调。(A)将细胞培养至接近铺满时,用TNF- α 将内皮细胞在两种情况下活化72小时,一种情况是仅内皮细胞,另一种情况是与MultiStem共培养。然后通过流式细胞术或PCR对细胞分析E-选择蛋白、V-CAM或I-CAM的表达。(B-E) TNF- α 诱导的内皮细胞粘附分子表面表达在MultiStem存在的情况下以细胞剂量依赖的方式减小。当与MultiStem在TNF- α (10ng/ml)存在下共培养72小时,HAEC显示出E-选择蛋白(B、C)、V-CAM(D)和I-CAM(E)表达的细胞表面下调。测定表达E-选择蛋白和V-CAM的细胞数量,表示为用TNF- α 诱导表达这些标记的细胞的总数的百分比。对于I-CAM,所有的细胞都有一些表达,即使是在活化前。因此,计算了每细胞的信号强度,并将所述数据表示为TNF- α 诱导信号的百分比。

[0078] 图2:MultiStem抑制人肺内皮细胞(HPMEC)中细胞表面黏附分子的上调或者由IL-1 β 导致的细胞表面黏附分子上调。(A)当与MultiStem在TNF- α (10ng/ml)存在下共培养72小时,HPMEC显示出E-选择蛋白、V-CAM和I-CAM表达的细胞表面下调,类似于HAEC。细胞表面表达通过FACS测量。(B) HAEC中另一种促炎因子,IL-1 β ,对细胞表面标记物的诱导在与MultiStem共培养的HAEC中也减少。

[0079] 图3:MultiStem在转录水平调节细胞粘附分子上调。(A)通过ELISA测量来自MultiStem和内皮细胞(HAEC或HPMEC)共培养物的培养基中的可溶性E-选择蛋白(sE-选择蛋白)的水平。(B)在TNF- α 存在或不存在的条件下与不同细胞剂量的MultiStem共培养72小

时之后从HAEC中分离mRNA。对E-选择蛋白、V-CAM、I-CAM和GAPDH进行定量RT-PCR。与未处理对照细胞相比,MultiStem减少了TNF- α 诱导的E-选择蛋白、V-CAM和I-CAM的mRNA表达。

[0080] 图4:与MultiStem不同,在用TNF- α 活化时,MSC不会抑制内皮细胞中黏着分子的细胞表面表达。(A-C) TNF- α 诱导的内皮细胞粘附分子表面表达在MSC存在下不会改变,而与MultiStem共培养可减少黏着分子表达。当在TNF- α (10ng/ml) 存在下与MSC共培养72小时时,HAEC显示E-选择蛋白、V-CAM和I-CAM表达的细胞表面上调没有变化。

[0081] 图5:与单独用TNF- α 诱导的内皮细胞的结合相比,黏附于在TNF- α 和MultiStem存在下共培养的内皮细胞的嗜中性粒细胞减少。(A) 在单独或者与MultiStem孵育72小时后,活化或未活化的内皮细胞与活化的嗜中性粒细胞孵育1分钟。然后洗涤细胞,拍照。通过在每种条件下重复拍照3次对结合的嗜中性粒细胞并且对在每个高倍视野(10 \times)中结合的嗜中性粒细胞计数来确定结合的嗜中性粒细胞的数目。(B) 与对照内皮细胞相比,结合至与MultiStem共培养的内皮细胞的嗜中性粒细胞的数目显著减少。(C) 显示结合至MultiStem共培养的内皮细胞的嗜中性粒细胞减少的代表性照片。

[0082] 图6:AMI三天后,与运载体处理的动物相比,MultiStem处理的动物中嗜中性粒细胞浸润显著减少。(A) 通过永久性LAD结扎诱导急性心肌梗死。在直接注射运载体对照(PBS)或者大鼠MultiStem(1千万个细胞)后所有大鼠都接受AMI。通过在来自处理或未处理动物的动物心脏切片中显示弹性蛋白酶染色的细胞测量嗜中性粒细胞浸润。表1显示来自每只动物的弹性蛋白酶阳性细胞的平均数目(每只动物检测了4个切片)。(B) 通过弹性蛋白酶染色测量嗜中性粒细胞浸润。在手术后3天,与MultiStem处理动物(12.185PMN/hpf)相比,对照组具有显著更高的弹性蛋白酶染色(35.25PMS/hpf) ($p=0.005823$)。(C) 在MultiStem处理动物和未处理动物中嗜中性粒细胞水平的代表性照片(由弹性蛋白酶染色测量的)。

[0083] 图7:在炎症过程中调节白细胞募集的多个连续步骤。白细胞被捕获并且开始在P-和-E-选择蛋白和它们的配体P-选择蛋白糖蛋白配体-1 (PSGL-1) 和E-选择蛋白配体-1 (ESL-1) 上滚动。一些白细胞例如淋巴细胞或者造血干细胞和祖细胞开始在 $\alpha 4$ 整联蛋白及其内皮受体血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 上滚动。L-选择蛋白对于淋巴细胞在淋巴组织中的HEV上滚动是关键的。随着炎症发展,白细胞滚动速度减慢,可使来自选择蛋白配体和G-蛋白偶联受体(GPCR)的活化信号整合。这些活化信号导致缓慢滚动的白细胞极化,并且使得L-选择蛋白和PSGL-1聚集在可使白细胞通过继发性束缚进一步募集的主要极处,所述继发性束缚是通过白细胞-白细胞相互作用进行的。白细胞活化增强整联蛋白亲和性和亲合力,导致牢固黏附于在内皮细胞表达的胞间黏着分子-1 (ICAM-1)。黏附的白细胞不断地从侧面迁移,以检查微血管系统并且寻找变移的可能位点。白细胞通常可以通过连接(细胞旁侧;paracellular)途径,或者通过内皮细胞途径(跨细胞途径)变移,所述连接途径是通过连接黏着分子(JAM)、CD99和血小板/内皮细胞粘附分子-1 (PECAM-1)、内皮细胞选择性黏着分子(ESAM)的相互作用进行。

具体实施方式

[0084] 应理解本发明不限于本文描述的方法、规程和试剂等,因为这些都可以变化。本文使用的术语目的仅是用于描述具体的实施方案,不意欲限制本发明的范围,其仅由权利要求界定。

[0085] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,并且不应以任意方式理解为限制所描述的主题。

[0086] 除非另有说明,本申请的方法和技术一般根据本领域熟知的和本说明书引用的和全文讨论的各种总体的和更具体的参考文献中描述的常规方法进行。参见,例如,Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y. (2001) 和Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates(1992),以及Harlow and Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y. (1990)。

[0087] 定义

[0088] “一”或“一种”在本文中是指一种或超过一种,至少一种。当本文使用复数形式时,一般包括单数形式。

[0089] 本文使用的术语“黏附、黏着”等,当在体内时是指足以导致外渗的白细胞与内皮细胞的联结。在本发明的上下文中,被本发明的试剂减少或防止的所述黏附是以这样的足量出现的。在体外应用中,黏附的程度(亲合力)可以不必为上述水平。例如,在药物发现的情形中,可能需要检测较低级别亲合力的黏附(结合)。

[0090] “细胞库”是已经培养并且存储用于将来使用的细胞的行业命名。细胞可以等分存储。它们可在从储库中直接取出使用或者可在存储后扩增。这样方便,有“成品”细胞可用于给药。所述细胞可以储存在可药用赋形剂中,这样它们可被直接给予,或者当它们从库中取出时可与合适赋形剂混合。细胞可被冷冻,或者以其他保持活性的方式储存。在本发明的一个实施方案中,可创造这样的细胞库,即其中所述细胞经过了针对实现一种或多种所述效应的效能的选择,所述效能例如减少一种或多种黏着分子的表达。从所述库中取出之后,在给予所述受试者之前,优选再次测定所述细胞的效能。这可以通过直接或者间接地使用本申请描述的或者本领域已知的测定法进行。然后,具有所需效能的细胞能够被给予所述受试者用于治疗。

[0091] “共给予”是指相互结合、一起、并列给药,包括同时或者顺序给予两种或多种试剂。

[0092] “包括(包含;comprising)”是指(没有其他限制地)必需包括(包含)指示物,对于其他可以包括的事项没有任何限制或排除。例如,“包含x和y的组合物”包括含有x和y的任意组合物,无论所述组合物中存在何种其他组分。类似地,“包括步骤x的方法”包括其中进行x的任意方法,无论x是所述方法中的唯一步骤还是x仅是步骤之一,无论其中由多少其他步骤,也无论与所述其他步骤相比x多么简单或者复杂。“包括(包含;Comprised of)”和使用相同词根“包括(包含;(comprise))”的类似短语在本文中用作“包括(包含;comprising)”的同义词,并且具有相同的含义。

[0093] “包括(包含;Comprised of)”是“包括(包含;comprising)”的同义词(见上文)。

[0094] “条件化的细胞培养基(Conditioned cell culture medium)”是本领域熟知的术语,是指细胞在其中生长的培养基。本文中,这是指所述细胞生长足够的时间以分泌可以有效达到本申请描述的任意效应的因子,所述效应包括减少细胞粘附分子的表达;减少白细胞黏附于内皮细胞;减少外渗等。

[0095] 条件化培养基是指培养细胞以分泌因子进入其中的培养基。为本发明的目的,细胞可以经历充分的细胞分裂以产生有效量的此类因子,这样所述培养基可以减少细胞粘附分子的表达,从而减少白细胞的黏附,进而减少外渗等。通过本领域已知的任意方法从所述培养基中除去细胞,所述方法包括但不限于离心、过滤、免疫耗竭(例如,经标记的抗体和磁化柱)和FACS分选。

[0096] “下降”或“减少”是指降低所述效应或者完全阻止所述效应,例如减少白细胞外渗、黏附、黏附部分的表达或者本文描述的任意效应。

[0097] “EC细胞”是从对被称为畸胎瘤的一类癌症的分析中发现的。1964年,研究人员指出畸胎瘤中的单个细胞可被分离并且在培养中保持未分化状态。这类型的干细胞逐渐被人们称为胚胎癌细胞(EC细胞)。

[0098] “有效量”一般是指提供所需的局部或全身效应的量,例如,通过影响导致外渗的黏附而有效地改善不需要的炎症效应的量。例如,有效量是足以实现有益或所需临床效应的量。所述有效量可以在单次给药中一次全部提供,或者以数次给药提供有效量的部分量提供。对于可被认为是有效量的准确确定可基于各个受试者的个体因素,包括其体重、年龄、损伤和/或待治疗的疾病和损伤,以及所述损伤出现或疾病开始以来的时间长。本领域技术人员能够根据这些本领域常规的考虑因素确定对于给定的受试者的有效量。本文使用的“有效剂量”与“有效量”的含义相同。

[0099] “有效途径”一般是指提供用于将试剂递送至需要的区域、系统或部位的途径。例如,有效途径是通过其可以给予试剂以在所需作用位点提供足以实现有益效应或所需临床效应的试剂量的途径。

[0100] “胚胎干细胞(ESC)”是本领域熟知的,并且已经从很多不同的哺乳动物种中制备得到。胚胎干细胞是衍生自被称为胚泡的早期胚胎的内细胞团的干细胞。它们能够分化成为三种原胚层:外胚层、内胚层和中间胚层的所有衍生细胞。这些包括成人体内超过220种细胞类型的每一种。ES细胞可以成为身体中的任何组织,但胚盘除外。仅桑葚胚细胞是全能的,能够变成所有组织和胚盘。类似于ESC的一些细胞可以通过将体细胞的核转移至去核受精卵中产生。

[0101] “外渗”是指液体从它的容纳处漏出。在炎症的情况下,它是指白细胞从毛细血管中移动至它们的周围组织中。这在背景技术部分也讨论过。

[0102] 使用术语“包括”并不意欲限制。

[0103] “增加”是指在完全没有预先存在的效应的情况下诱导,或者提高所述效应的程度,所述效应例如白细胞外渗、黏附、黏附部分的表达或者本文描述任意效应。

[0104] “诱导性多能干细胞(IPSC或IPS细胞)”是重编程的体细胞,例如,通过引入赋予体细胞较低程度分化表型的外源基因来重编程。然后这些细胞能够被诱导分化称为分化程度较低的子代。可以使用最初于2006年发现的方法的修饰来衍生IPS细胞(Yamanaka, S. et al., Cell Stem Cell, 1:39-49 (2007))。例如,在一种情况下,为了产生IPS细胞,科学家用皮肤细胞起始,然后通过使用反转录病毒将基因插入细胞DNA的常规实验室技术修饰所述皮肤细胞。在一种情况下,所述掺入的基因是Oct4、Sox2、Lif4和c-myc,已知它们可以作为天然调节子共同作用以保持细胞处于胚胎干细胞样状态。这些细胞记载于文献中。例如,参见Wernig et al., PNAS, 105:5856-5861 (2008); Jaenisch et al., Cell, 132:567-582

(2008);Hanna et al.,Cell,133:250-264(2008);和Brambrink et al.,Cell Stem Cell, 2:151-159(2008)。这些参考文献因其对IPSC和产生它们的方法教导以引用的方式纳入本文。通过特定的培养条件(暴露于特定的试剂)产生这样的细胞也是可能的。

[0105] 术语“分离的”是指不与以下成分联结的细胞:一种或多种细胞或者与所述一种或多种细胞在体内联结的一种或多种细胞组分。“富集的群”是指相对在体内或者在原代培养中一种或多种其他细胞类型,所需细胞在数目上相对增加。

[0106] 但是,本文使用的术语“分离的”并不表示仅有干细胞存在。相反,术语“分离的”是指细胞从它们的天然组织环境中分离出来并且以高于所述正常组织环境的浓度存在。因此,“分离的”细胞群可以进一步包含除干细胞之外的细胞类型,并且可以包含其他的组织组分。这还可以表述为,例如细胞倍增。细胞在体外或离体进行10、20、30、40或更多次倍增,这样与在体内或在所述细胞最初的组织环境中(例如骨髓、外周血、脂肪组织等)的初始数目相比,所述细胞被富集。

[0107] “MAPC”是“多能成体祖细胞(multipotent adult progenitor cell)”的首字母缩略词。在本申请中,该术语用于命名一类细胞,即具有胚胎干细胞特征的非胚胎干细胞。它可以在分化时衍生超过一种胚层的细胞系,例如两个或三个胚层(即,内胚层、中胚层和外胚层)。MAPC可以表达端粒酶、Oct 3/4(即Oct 3A)、rex-1、rox-1、sox-2以及SSEA-4中的一种或多种。MAPC中的术语“成体”是非限制性的。它是指非胚胎体细胞。MAPC核型正常并且在体内不形成畸胎瘤。该首字母缩略词在PCT/US2000/21387中首次使用以描述从骨髓分离的多能细胞。但是,这些细胞从骨髓中被分离之后,已经发现了具有多能标记物和/或分化潜能的其他细胞,为了本发明的目的,所述其他细胞可以在本文描述效应方面功能上等同于首次被命名为“MAPC”的细胞。

[0108] 术语“**MultiStem[®]**”是高度可扩增的、核型正常的且在体内不形成畸胎瘤的非胚胎非生殖细胞的商品名称。它可以分化为超过一个胚层的细胞系。所述细胞可以表达端粒酶、oct3/4、rex-1、rox-1、sox-2和SSEA4中的一种或多种。**MultiStem[®]**是根据本专利申请公开的细胞培养方法制备的,具体地,降低氧量和增加血清量。

[0109] “可药用载体”是用于本发明的细胞的任意可药用介质。这样的介质可保持等渗性、细胞代谢、pH等。它适合体内给予受试者,因此可用于细胞递送和治疗。

[0110] 术语“效能”是指细胞(或者来自所述细胞的条件化培养基)实现本申请描述的各种效应的能力。因此,效能是指各种水平的效能,包括但不限于(1)减少炎症;(2)减少白细胞浸润(嗜中性粒细胞、淋巴细胞或单核细胞);(3)减少黏附,例如选择蛋白与白细胞上的唾液酸化路易斯抗原x的黏附,所述白细胞包括但不限于CD4⁺和CD8⁺淋巴细胞;和(4)减少内皮细胞上细胞粘附分子的表达,所述黏着分子包括但不限于ICAM、VCAM、E-选择蛋白和P-选择蛋白。

[0111] 可培养并刺激“原始胚胎生殖细胞”(PG或EG细胞)产生很多分化程度较低的细胞类型。

[0112] “祖细胞”是在干细胞分化过程中产生的细胞,其具有一些但不是全部它们的最终分化子代的特性。确定的祖细胞,例如“心脏祖细胞”将限于一种细胞系,但不限于具体的或终末分化的细胞类型。首字母缩略词“MAPC”中使用的术语“祖”并不将这些细胞限制于具体

的细胞系。祖细胞可以形成比所述祖细胞分化程度更高的子代细胞。

[0113] 本文使用的术语“减少”是指降低,还指阻止。在处理的情形中,“减少”是阻止或改善一种或多种临床症状。临床症状是如果不予处理将对受试者的生活质量(健康)产生消极影响的一种(或多种)症状。这还适用于生物学效应,例如减少外渗、下调内皮细胞上的黏着分子、减少白细胞黏着至内皮细胞、减少白细胞浸润周围组织、减少白细胞结合等,其最终结果会是改善炎症的有害效应。

[0114] “选择”具有所需水平的效能(例如,减少一种或多种黏着分子的表达)的细胞可以指鉴别(如通过测定)、分离和扩增细胞。这将产生具有比其从中分离的亲代细胞群更高效能的细胞群。

[0115] 选择细胞将包括确定是否存在所需效应的测定,还将包括获得该细胞。所述细胞可能天然具有所述效应,因为所述细胞没有与诱导所述效应的试剂孵育,或者暴露于所述试剂。在进行所述测定前可能不知道所述细胞具有所述效应。由于所述效应可以依赖于基因表达和/或分泌,本领域技术人员还可以基于引起所述效应的一种或多种基因进行选择。

[0116] 选择可以来自组织中的细胞。例如,在这种情况下,细胞可从所需组织中分离,在培养物中扩增,对所需效应进行选择,并将选出的细胞进一步扩增。

[0117] 选择还可以来自离体的细胞,例如培养物中的细胞。在这种情况下,可对所述效应测定培养物中的一种或多种细胞,并且得到的具有所述效应的细胞可被进一步扩增。

[0118] 还可选择增强效应的细胞。在这种情况下,获得增强的细胞的细胞群已经具有所述效应。增强的有效性是指与所述亲代群体相比,每细胞的平均效应量更高。

[0119] 所述增强的细胞选自自的亲代群体可以是基本纯系的(相同的细胞类型)。从该群中获得此类增强的细胞的一种方法是制备单一细胞或细胞库,并且测定这些细胞或细胞库的所述效应,以获得天然具有所述效应的克隆(与用所述效应的调节子处理所述细胞相反),然后扩增这些天然增强的细胞。

[0120] 然而,可用增强内源细胞途径的效应的一种或多种试剂处理细胞。因此,可处理基本纯系的群体以增强调节。

[0121] 如果所述群体不是基本纯系的,那么,优选地,待处理的亲代细胞包含至少100个可获得增强的效应的有效细胞类型,更优选至少1000种这样的细胞,甚至更优选至少10000种这样的细胞。处理之后,该子群体可通过已知的细胞分选技术从所述异质群体中回收,如果需要可以进一步扩增。

[0122] 因此,所述效应的需要水平可以是比给定在先群体的水平高的水平。例如,从组织置于原代培养物中并且通过培养条件扩增并分离的细胞可提供亲代群体,所述培养条件没有特地设计为具有所述效应。这样的亲代群体可被处理以增强每细胞的平均效应,或者被筛选以得到所述群体中表达更高效应的一种或多种细胞。然后可将这样的细胞扩增以提供具有更高(需要的)效应的群体。

[0123] “自我更新”是指产生复制子代干细胞的能力,所述子代干细胞具有与自身来自的细胞相同的分化潜能。本文中使用的类似术语是“增殖”。

[0124] “干细胞”是指可以进行自我更新(即,子代具有相同的分化潜能)并且还可以产生分化潜能更有限的子代细胞的细胞。在本发明的上下文中,干细胞还可以包括分化程度更高的细胞,其已经通过例如以下方式去分化:通过核移植、通过与更原始的干细胞融合、通

过导入特定的转录因子或者通过在特定条件下培养。参见,例如,Wilmot et al.,Nature, 385:810-813 (1997); Ying et al.,Nature, 416:545-548 (2002); Guan et al.,Nature, 440:1199-1203 (2006); Takahashi et al.,Cell, 126:663-676 (2006); Okita et al., Nature, 448:313-317 (2007); 和Takahashi et al.,Cell, 131:861-872 (2007)。

[0125] 去分化还可以通过给予一些化合物或暴露于在体内或体外可以引起去分化的物理环境而引起。干细胞还可以来自异常组织,例如畸胎瘤和一些其他来源,例如胚状体(但是这些可被认为是胚胎干细胞,因为它们来自胚胎组织,尽管不是直接来自于内细胞团)。干细胞还可以通过将与干细胞功能相关的基因导入非干细胞中而产生,例如,诱导性多能干细胞。

[0126] “受试者”是指脊椎动物,例如哺乳动物,例如人。哺乳动物包括但不限于人、狗、猫、马、牛和猪。

[0127] 术语“治疗有效量”是指在哺乳动物中被确定产生任何治疗反应的试剂量。例如,有效的抗炎治疗剂可以延长患者的存活,并且/或者抑制明显的临床症状。在本文使用的所述术语含义内的治疗有效的治疗包括改善患者的生活质量的治疗,即使它们没有改善疾病结果本身。这样的治疗有效量很容易由本领域普通技术人员确定。因此,“治疗”是指送递这样的量。因此,治疗可以防止或改善炎症的任意病理症状。

[0128] 本发明中广泛使用术语“治疗(“Treat”、“treating”或“treatment”)”,其主要包括防止、改善、抑制或者治愈缺陷、机能障碍、疾病或其他有害的过程,包括治疗干扰的和/或产生于治疗的那些。

[0129] 干细胞

[0130] 本发明可以优选地使用脊椎动物的干细胞进行,所述脊椎动物例如人、非人灵长类、驯养动物、家畜和其他非人哺乳动物。这些包括但不限于下文描述的那些细胞。

[0131] 胚胎干细胞

[0132] 研究最透彻的干细胞是胚胎干细胞(ESC),因为它具有无限的自我更新能力和多能分化潜能。这些细胞可以源自胚泡的内细胞团,或者可以源自移植后胚胎的原始生殖细胞(胚胎生殖细胞或EG细胞)。ES和EG细胞首次从小鼠中得到,之后从很多不同的动物中得到,最近,还从非人灵长类和人中得到。当ESC被导入小鼠胚泡或者其他动物的胚泡中时,ESC可以成为所述动物的所有组织。ES和EG细胞可通过用抗SSEA1(小鼠)和SSEA4(人)的抗体阳性染色来鉴别。参见,例如,美国专利No. 5,453,357、5,656,479、5,670,372、5,843,780、5,874,301、5,914,268、6,110,739、6,190,910、6,200,806、6,432,711、6,436,701、6,500,668、6,703,279、6,875,607、7,029,913、7,112,437、7,145,057、7,153,684和7,294,508,各自因其胚胎干细胞的教导和制备和扩增所述胚胎干细胞的方法而通过引用的方式纳入本文。因此,ESC及其分离和制备方法是本领域熟知的。

[0133] 已经鉴定了许多影响胚胎干细胞在体内的效能状态的转录因子和外源性细胞因子。被描述参与干细胞多能性的首个转录因子是Oct4。Oct4属于POU(Pit-Oct-Unc)转录因子家族,是能够活化基因转录的DNA结合蛋白,包含被称为启动子或增强子区域内的“八聚体基序”的八聚序列。

[0134] Oct4在受精卵的分裂期表达,直到卵圆柱形成。Oct3/4的功能是抑制分化诱导基因(即,FoxaD3、hCG)并且活化促进多能性的基因(FGF4、Utf1、Rex1)。Sox2——高迁移率族

(HMG) 盒转录因子的一个成员——与Oct4协作活化内细胞团中表达的基因的转录。Oct3/4在胚胎干细胞中的表达维持在具体水平之间是必要的。Oct4表达水平>50%的过表达或者下调将改变胚胎干细胞命运,分别为形成原始内胚层/中胚层或滋养外胚层。在体内,Oct4缺陷胚胎可发育至胚泡期,但是内细胞团细胞不是多能的。相反,它们沿着胚胎外滋养层系分化。Sal14——哺乳动物Spalt转录因子——是Oct4的上调调节子,因此对于在胚胎早期维持合适的Oct4水平是重要的。当Sal14水平下降至低于某一阈值时,滋养外胚层细胞将异位扩增至内细胞团。多能性需要的另一个转录因子是Nanog,是以Celtic部族“Tir Nan Og”:永远年轻的土地,命名的。在体内,Nanog从致密桑葚胚期表达,之后被限制在内细胞团中,并且在植入期下调。Nanog的下调对于在原肠胚形成过程中避免多能细胞不受控的扩增和允许多细胞系分化可能是重要的。第5.5天分离的Nanog无效胚胎由无序胚泡构成,主要包含胚胎外内胚层和无法辨认的上胚层。

[0135] 非胚胎干细胞

[0136] 已在大部分组织中鉴别到干细胞。可能最清楚表征的是造血干细胞(HSC)。HSC是来自中胚层的细胞,可以使用细胞表面标记物和功能特性来纯化。它们已经被从骨髓、外周血、脐带血、胎肝和卵黄囊中分离。它们起始造血作用并且产生多种造血细胞系。当它们被移植进入致死量放射线照射的动物中时,它们能够再造红系嗜中性粒细胞-巨噬细胞、巨核细胞和淋巴造血细胞库。它们还能被诱导进行一些自我更新细胞分裂。参见,例如,美国专利No.5,635,387、5,460,964、5,677,136、5,750,397、5,681,599和5,716,827。美国专利No.5,192,553报道了分离人新生儿或胎儿造血干细胞或祖细胞的方法。美国专利No.5,716,827报道了作为Thy-1⁺祖细胞的人造血干细胞,以及在体外再生它们的合适生长培养基。美国专利No.5,635,38报道了用于培养人干细胞和它们的前体的方法和装置。美国专利No.6,015,554描述了重建人淋巴和树突细胞的方法。因此,HSC及其分离和扩增方法是本领域熟知的。

[0137] 本领域熟知的另一种干细胞是神经干细胞(NSC)。这些细胞可在体内增殖并且连续地再生至少一些神经细胞。当离体培养时,神经干细胞可被诱导增殖以及分化为不同类型的神经元和神经胶质细胞。当神经干细胞被移植至脑时,其能够植入并且产生神经细胞和神经胶质细胞。参见,例如Gage F.H.,*Science*,287:1433-1438(2000),Svendsen S.N.et al,*Brain Pathology*,9:499-513(1999),和Okabe S.et al.,*Mech Development*,59:89-102(1996)。美国专利No.5,851,832报道了从脑组织中得到的多能神经干细胞。美国专利No.5,766,948报道了从新生儿大脑半球中产生神经母细胞。美国专利No.5,564,183和5,849,553报道了哺乳动物神经嵴干细胞的用途。美国专利No.6,040,180报道了在体外从哺乳动物多能CNS干细胞的培养物中产生分化神经元。WO 98/50526和WO 99/01159报道了神经上皮干细胞、少突星型胶质细胞前体和细胞系受限神经元前体的再生和分离。美国专利No.5,968,829报道了从胚胎前脑得到的神经干细胞。因此,神经干细胞及其制备和扩增方法是本领域熟知的。

[0138] 本领域已经大量研究的另一种干细胞是间充质干细胞(MSC)。MSC来自于胚胎中胚层,可从多种来源分离,主要包括成体骨髓、外周血、脂肪、胎盘和脐带血。MSC能够分化成为很多中胚层组织,包括肌肉、骨、软骨、脂肪和腱。关于这些细胞有大量的文献。参见,例如,美国专利No.5,486,389、5,827,735、5,811,094、5,736,396、5,837,539、5,837,670和5,

827,740。还可见于Pittenger,M.et al,Science,284:143-147(1999)。

[0139] 成体干细胞的另一个实例是脂肪衍生的成体干细胞(ADSC),其已被从脂肪,常规地通过吸脂术,之后使用胶原酶释放ADSC而分离。ADSC在很多方面类似于源自骨髓的MSC,不同的是能够从脂肪中分离更多细胞。已经报道这些细胞可以分化成为骨、脂肪、肌肉、软骨和神经元。U.S.2005/0153442描述了一种分离方法。

[0140] 本领域已知的其他干细胞包括胃肠干细胞、表皮干细胞和肝脏干细胞,其也被称作“卵形细胞”(Potten,C.,et al.,Trans R Soc Lond B Biol Sci,353:821-830(1998),Watt,F.,Trans R Soc Lond B Biol Sci,353:831(1997);Alison et al.,Hepatology,29:678-683(1998))。

[0141] 报道的能够分化成为超过一种胚胎胚层的细胞类型的其他非胚胎细胞包括但不限于来自脐带血的细胞(参见美国公布No.2002/0164794)、来自胎盘的细胞(参见美国公布No.2003/0181269)、来自脐带血基质的细胞(Mitchell,K.E.et al.,Stem Cells,21:50-60(2003))、来自小胚胎样干细胞的细胞(Kucia,M.et al.,J Physiol Pharmacol,57Suppl 5:5-18(2006))、来自羊水干细胞的细胞(Atala,A.,J Tissue Regen Med,1:83-96(2007))、来自皮肤衍生的前体的细胞(Toma et al.,Nat Cell Biol,3:778-784(2001))和来自骨髓的细胞(参见美国公布No.2003/0059414和2006/0147246),其各自因对这些细胞的教导以引用的方式纳入本文。

[0142] 重编程体细胞的方法

[0143] 已经使用了一些不同的方法,例如核移植、细胞融合和培养诱导的重编程,来诱导分化的细胞转化为胚胎状态。核移植包括将体细胞核注射进去核卵母细胞,当起被移植进入代理母亲时,可以形成克隆(“生殖性克隆”),或者当在培养物中扩增时,可以形成遗传匹配的胚胎干(ES)细胞(“体细胞核移植”,SCNT)。体细胞与ES细胞的细胞融合致使产生显示多能ES细胞的全部特性的杂合体。培养物中的体细胞外植可选择用于可以是多能(pluripotent or multipotent)的无限繁殖细胞系。目前,精原细胞干细胞是可衍生自出生后动物的多能干细胞的唯一来源。用规定的因子转导体细胞可以起始重编程至多能状态。对这些试验方法有大量综述(Hochedlinger and Jaenisch,Nature,441:1061-1067(2006)and Yamanaka,S.,Cell Stem Cell,1:39-49(2007))。

[0144] 核移植

[0145] 核移植(NT),也被称作体细胞核移植(SCNT),是指将来自供体体细胞的核导入去核卵母细胞以产生克隆动物,例如多莉羊(Wilmut et al.,Nature,385:810-813(1997))。通过NT产生活的动物证明了体细胞的外遗状态,包括终末分化的细胞的外遗状态,尽管是稳定的,也不是不可逆地固定的,而是可以重编程至胚胎状态,其能够指导新生物体的发育。除了对阐释胚胎发育和疾病中涉及的外遗传机制提供令人兴奋的实验方法外,核克隆技术具有用于患者特异移植医学的潜在益处。

[0146] 体细胞和胚胎干细胞的融合

[0147] 将体细胞核外遗传重编程至未分化状态已经在通过胚胎细胞和体细胞融合产生的小鼠杂合体中被证明。多种体细胞和胚胎癌细胞的杂合体(Solter,D.,Nat Rev Genet,7:319-327(2006))、胚胎生殖细胞(EG)或ES细胞(Zwaka and Thomson,Development,132:227-233(2005))有很多与亲本胚胎细胞相同的特性,表明多能表型在这样的融合产物中是

主要的。对于小鼠 (Tada et al., Curr Biol, 11:1553-1558 (2001)), 人ES细胞具有在融合之后重编程体细胞核的潜能 (Cowan et al., Science, 309:1369-1373 (2005)); Yu et al., Science, 318:1917-1920 (2006))。沉默多能标记物例如Oct4的活化, 或者失活体细胞X染色体的再活化为体细胞基因组在杂合细胞中重编程的分子证据。已经提出DNA复制对于在融合后2天首次观察到的多能标记物的活化是必要的 (Do and Scholer, Stem Cells, 22:941-949 (2004)), 以及, 当与神经干细胞融合时, Nanog在ES细胞中的强制过表达可促进多能性 (Silva et al., Nature, 441:997-1001 (2006))。

[0148] 培养物诱导的重编程

[0149] 已经从胚胎源得到了多能细胞, 所述胚胎源例如卵裂球和胚泡的内细胞团 (ICM) (ES细胞)、上胚层 (EpiSC细胞)、原始生殖细胞 (EG细胞) 和出生后精原细胞干细胞 (“maGSCsm”, “ES-样”细胞)。以下的多能细胞, 与它们的供体细胞/组织一起, 描述如下: 单性生殖ES细胞 (parthenogenetic ES cell) 来自小鼠卵母细胞 (Narasimha et al., Curr Biol, 7:881-884 (1997)); 胚胎干细胞来自卵裂球 (Wakayama et al., Stem Cells, 25:986-993 (2007)); 内细胞团 (来源不适用) (Eggan et al., Nature, 428:44-49 (2004)); 胚胎生殖细胞和胚胎癌细胞来自原始生殖细胞 (Matsui et al., Cell, 70:841-847 (1992)); GMCS、maSSC和MASC来自精原细胞干细胞 (Guan et al., Nature, 440:1199-1203 (2006); Kanatsu-Shinohara et al., Cell, 119:1001-1012 (2004); 和Seandel et al., Nature, 449:346-350 (2007)); EpiSC细胞来自上胚层 (Brons et al., Nature, 448:191-195 (2007); Tesar et al., Nature, 448:196-199 (2007)); 单性生殖ES细胞来自人卵母细胞 (Cibelli et al., Science, 295L819 (2002); Revazova et al., Cloning Stem Cells, 9:432-449 (2007)); 人ES细胞来自人胚泡 (Thomson et al., Science, 282:1145-1147 (1998)); MAPC来自骨髓 (Jiang et al., Nature, 418:41-49 (2002); Phinney and Prockop, Stem Cells, 25:2896-2902 (2007)); 脐带血细胞 (来自脐带血) (an de Ven et al., Exp Hematol, 35:1753-1765 (2007)); 神经球 (neurosphere) 衍生的细胞来自神经细胞 (Clarke et al., Science, 288:1660-1663 (2000))。来自生殖细胞系的供体细胞, 例如PGC或精原细胞干细胞已知在体外是单能性的, 但是已证明多能ES样细胞 (Kanatsu-Shinohara et al., Cell, 119:1001-1012 (2004)) 或maGSC (Guan et al., Nature, 440:1199-1203 (2006)) 在体外长时间培养后可被分离。尽管大部分这些多能细胞类型能够在体外分化和形成畸胎瘤, 但依据更严格的标准, 仅ES、EG、EC和精原细胞干细胞衍生的maGCS或ES样细胞是多能的, 因为它们能够形成出生后嵌合体并且成为生殖细胞系。最近, 多能成体精原细胞干细胞 (MASC) 可从成体小鼠的睾丸精原细胞干细胞中得到, 并且这些细胞具有与ES细胞不同 (Seandel et al., Nature, 449:346-350 (2007)) 但是与EpiSC细胞类似的表达谱, 所述EpiSC细胞来自小鼠胚胎移植后的上胚层 (Brons et al., Nature, 448:191-195 (2007); Tesar et al., Nature, 448:196-199 (2007))。

[0150] 通过规定的转录因子重编程

[0151] Takahashi和Yamanaka已经报道了将体细胞重编程回ES样状态 (Takahashi and Yamanaka, Cell, 126:663-676 (2006))。在将4种转录因子Oct4、Sox2、c-myc和Klf4进行病毒介导的转导, 之后针对Oct4靶基因Fbx15的活化进行选择之后, 他们成功地将小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 和成体成纤维细胞重编程为多能ES样细胞 (图2A)。具有活化的Fbx15的细胞是

制造的iPS(诱导性多能干)细胞并且通过它们形成畸胎瘤的能力显示是多能的,但是它们不能产生生活的嵌合体。这种多能状态依赖于转导的Oct4和Sox2基因的连续病毒表达,而内源Oct4和Nanog基因或者不表达,或者以比ES细胞中低的水平表达,并且发现它们各自的启动子大量甲基化。这与以下结论一致,即Fbx15-iPS细胞与ES细胞并不一致,但是可能代表了重编程的不完全状态。尽管遗传实验已经确定了Oct4和Sox2对于多能性是必需的(Chambers and Smith, *Oncogene*, 23:7150-7160 (2004); Ivanona et al., *Nature*, 442:5330538 (2006); Masui et al., *Nat Cell Biol*, 9:625-635 (2007)),但是两种癌基因c-myc和Klf4在重编程中的作用仍不清晰。一些这些癌基因实际上对于重编程是可省去的,因为已经在不存在c-myc转导的情况下得到了小鼠和人iPS细胞,尽管效能较低(Nakagawa et al., *Nat Biotechnol*, 26:191-106 (2008); Werning et al., *Nature*, 448:318-324 (2008); Yu et al., *Science*, 318:1917-1920 (2007))。

[0152] MAPC

[0153] MAPC是“多能成体祖细胞”的首字母缩略词(非-ES,非-EG,非生殖细胞)。MAPC具有分化为至少两种,例如所有三种,原胚层(外胚层、中胚层和内胚层)的细胞类型的能力。见于ES细胞的基因也可见于MAPC(例如,端粒酶、Oct 3/4、rex-1、rox-1、sox-2)。Oct 3/4(人中Oct 3A)看起来是ES和生殖细胞特异的。MAPC代表比MSC更原始的祖细胞群(Verfaillie, C.M., *Trends Cell Biol* 12:502-8 (2002), Jahagirdar, B.N., et al., *Exp Hematol*, 29:543-56 (2001); Reyes, M. and CM. Verfaillie, *Ann N Y Acad Sci*, 938:231-233 (2001); Jiang, Y. et al., *Exp Hematol*, 30:896-904 (2002); 和(Jiang, Y. et al., *Nature*, 418:41-9. (2002))。

[0154] 人MAPC描述于美国专利7,015,037和美国申请No.10/467,963。已经在其他哺乳动物中鉴定了MAPC。例如,鼠MAPC描述于美国专利7,015,037和美国申请No.10/467,963。大鼠MAPC还描述于美国申请No.10/467,963。

[0155] 这些参考文献因描述MAPC由Catherine Verfaillie首次分离出来而以引用的方式纳入本文。

[0156] MAPC的分离和培养

[0157] MAPC分离方法是本领域已知的。参加,例如,美国专利7,015,037和美国申请No.10/467,963,这些方法连同MAPC的特征(表型)以引用的方法纳入本文。MAPC可从多个源分离,所述源包括但不限于骨髓、胎盘、脐带和脐带血、肌肉、脑、肝脏、脊髓、血液或皮肤。因此,可能获得骨髓抽吸物、脑或肝脏活检组织和其他器官,并且使用本领域技术人员知晓的阳性或阴性选择技术,依赖这些细胞表达(或者不表达)的基因(例如,通过功能性或形态学测定,例如上文参考的申请中公开的那些,所述申请以引用的方式纳入本文)分离所述细胞。

[0158] 美国专利7.015.037中描述的来自人骨髓的MAPC

[0159] MAPC不表达共有的白细胞抗原CD45或成红细胞特异血型糖蛋白-A(Gly-A)。将细胞的混合群进行Ficoll Hypaque分离。然后使用CD45抗体和Gly-A抗体对细胞进行阴性选择,去除CD45⁺和Gly-A⁺细胞的群,然后回收剩余的约0.1%的骨髓单核细胞。还可将细胞铺板于纤连蛋白包被的孔中,并且如下文所述培养2-4周以去除CD45⁺和Gly-A⁺细胞。在黏着骨髓细胞的培养物中,很多黏着基质细胞在约细胞倍增30次时发生复制性衰老,纯度更高的

细胞群继续扩增并且保持长的端粒。

[0160] 或者,可以使用阳性选择与细胞特异性标记物的结合分离细胞。阳性和阴性选择技术都是本领域技术人员可以得到的,并且本领域可得到很多适于阴性选择目的的单克隆和多克隆抗体(参见,例如,Leukocyte Typing V,Schlossman,et al.,Eds.(1995) Oxford University Press),其可从许多来源市购得到。

[0161] 从细胞群混合物中分离哺乳细胞的技术也已经由Schwartz等在美国专利No.5,759,793(磁性分离)中,Basch等,1983(免疫亲和层析)和Wysocki and Sato,1978(荧光激活细胞分选)描述。

[0162] U.S.7,015,037中描述的培养MAPC

[0163] 如本文描述分离的MAPC可以使用本文和美国专利7,015,037描述的方法培养,所述专利因这些方法而以引用的方式纳入本文。

[0164] 细胞可在低血清或无血清培养基中培养。用于培养MAPC的无血清培养基描述于美国专利7,015,037。已经在无血清和低血清培养基中培养了很多细胞。在这种情况下,所述培养基补充了一种或多种生长因子。通常使用的生长因子包括但不限于骨形态发生蛋白、碱性成纤维细胞生长因子、血小板衍生生长因子和表皮生长因子。参见,例如,美国专利No.7,169,610、7,109,032、7,037,721、6,617,161、6,617,159、6,372,210、6,224,860、6,037,174、5,908,782、5,766,951、5,397,706和4,657,866;全部都因对在无血清培养基中培养细胞的教导而以引用的方式纳入本文。

[0165] 另外的培养方法

[0166] 在另外的实验中,MAPC培养的密度可以是约100个细胞/cm²或约150个细胞/cm²至约10000个细胞/cm²,包括约200个细胞/cm²至约1500个细胞/cm²至约2000个细胞/cm²。所述密度可随种的不同而变化。此外,最佳密度可依赖于培养条件和细胞来源而变化。本领域技术人员能够确定给定培养条件和细胞的最佳密度。

[0167] 同样,在培养的MAPC的分离、生长和分化期间的任何时间都可以使用低于约10%,包括约1-5%,尤其是3-5%的有效大气氧浓度。

[0168] 可在多种血清浓度下,例如约2-20%,培养细胞。可以使用胎牛血清。更高的血清浓度可以与更低的氧压联合使用,例如,约15-20%。不必在黏附培养皿之前选择细胞。例如,在Ficoll梯度离心之后,将细胞以例如250,000-500,000/cm²直接铺板。可以挑出黏着集落,可以合并并且扩增。

[0169] 在一个实施方案中,在实施例实验方法中使用的高血清(约15-20%)和低氧(约3-5%)条件被用于细胞培养。具体地,将来自集落的黏着细胞以约1700-2300个细胞/cm²的密度在18%血清和3%氧下(具有PDGF和EGF)铺板并传代。

[0170] 在针对MAPC的一个实施方案中,补充物是细胞因子或使得MAPC保持分化为所有三个细胞系的组分。这可以通过未分化状态的特定标记物的表达来指示。MAPC,例如,组成型表达Oct 3/4 (Oct 3A) 并且维持高水平的端粒酶。

[0171] 细胞培养

[0172] 对于下文列出的全部组分,参见U.S.7,015,037,其因对这些组分的教导而以引用的方式纳入本文。

[0173] 总的来说,可以在本领域熟知并且可以得到的培养基中维持并且扩增可用于本发

明的细胞。还考虑含哺乳动物血清的细胞培养基的补充物。还可以有利地使用其他补充物来为细胞提供必需微量元素用于最优地生长和扩增。还可以有利地将激素用于细胞培养物。还可以依赖于细胞类型和分化细胞的命运来使用脂质和脂质载体以补充细胞培养基。还考虑使用饲养细胞层。

[0174] 还可在“3D”(聚集的)培养物中培养细胞。一个实例是2009年1月21日提交的PCT/US2009/31528。

[0175] 一旦在培养物中建立,细胞可被新鲜使用或者使用例如含40%FCS和10%DMSO的DMEM冷冻并储存为冻存物。对于培养的细胞制备冻存物的其他方法也是本领域技术人员可获得的。

[0176] 药物制剂

[0177] U.S.7,015,037因为对药物制剂的教导而以引用的方式纳入本文。在一些实施方案中,细胞群存在于组合物中,所述组合物被改造适合并且适于递送,即是生理学相容的。

[0178] 在一些实施方案中,用于给予受试者的细胞的纯度(或条件化培养基)是约100%(基本同质)。在另一些实施方案中,它是95%至100%。在一些实施方案中,它是85%至95%。具体地,在与其他细胞的混合物的情况下,所述百分比可以是约10%-15%、15%-20%、20%-25%、25%-30%、30%-35%、35%-40%、40%-45%、45%-50%、60%-70%、70%-80%、80%-90%或90%-95%。或者,分离/纯化可以细胞倍增的方式表达,其中所述细胞已经经历了例如10-20、20-30、30-40、40-50或更多次的细胞倍增。

[0179] 对于给定应用,用于给予所述细胞的制剂的选择将依赖于多种因素。其中主要的因素是受试者的种类;待治疗的病症的性质,它的状态和在所述受试者中的分布;给予的其他疗法和试剂的性质;给药的最佳路径;经所述路径的耐受性;给药方案和对于本领域技术人员明显的其他因素。例如,合适载体和其他添加剂的选择会依赖于给药的确切路径和具体给药形式的性质。

[0180] 细胞/培养基的水性悬浮液的最终配制一般包括将所述悬浮液的离子强度调节至等渗(即,约0.1至0.2)并且调节至生理pH(即,约pH6.8至7.5)。最终制剂一般还会包含流体润滑剂。

[0181] 在一些实施方案中,细胞/培养基被配制为单位给药剂量可注射形式,例如溶液剂、悬浮剂或乳剂。适于注射细胞/培养基的药物制剂一般是无菌的水性溶液和分散体。可注射制剂的载体可以是包含例如以下物质的溶剂或分散介质:水、盐水、磷酸缓冲的盐水、多元醇(例如甘油、丙二醇、液态聚乙二醇等)及其合适的混合物。

[0182] 本领域技术人员可以容易地确定本发明的方法中给予的组合物中的细胞和可选的添加剂、运载体和/或载体的量。一般地,任意添加剂(除所述细胞之外)存在的量为在溶液中(例如在磷酸缓冲的盐水中)0.001至50wt%。活性成分以毫克至微克的级别存在,例如为约0.001至约5wt%,优选约0.0001至约1wt%,最优选为约0.0001至约0.05wt%或者约0.001至约20wt%,优选约0.01至约10wt%,最优选为约0.05至5wt%。

[0183] 细胞的给药剂量可在很大范围内变化,并且在每种具体情况下会适合个体需求。一般地,肠胃外给药的情况下,常规地给予约1万个至约2千万个细胞/kg接受者体重。细胞的数量将随着以下因素变化:接受者的体重和病症、给药的次数或频率以及本领域技术人员已知的其他可变因素。可通过适于所述组织或器官的途径给予所述细胞。例如,它们可被

全身给予,即,通过静脉给予而肠胃外给予;或者可以被靶向具体的组织或器官;它们可被通过皮下给予或通过给予具体的所需组织而给药。

[0184] 所述细胞可以约 0.01×10^6 个至约 5×10^6 个细胞/ml的浓度悬浮于合适的赋形剂中。对于注射溶液适合的赋形剂是与细胞和接受者生物学和生理学相容的赋形剂,例如缓冲的盐水溶液或其他合适的赋形剂。用于给药的所述组合物可根据符合适当的无菌性和稳定性的标准方法而配制、生产和存储。

[0185] 对淋巴造血组织给药

[0186] 对这些组织给药的技术是本领域已知的。例如,骨髓内注射可以包括将细胞直接注射进入(一般为)髂后嵴的骨髓腔,但是还可以包括髂嵴的其他部位、股骨、胫骨、肱骨或尺骨的骨髓腔;脾脏注射可以包括在射线拍照指导下注射进入脾脏,或者通过腹腔镜或剖腹手术暴露脾脏;派尔淋巴集结、GALT或BALT注射可以要求剖腹术或腹腔镜注射过程。

[0187] 剂量

[0188] 对于人或其他哺乳动物的剂量可无需过度实验由本领域技术人员从本公开内容、本文引用的文献和本领域知识确定。适合用于本发明的各个实施方案的细胞/培养基的剂量会依赖于许多因素。确定主要和辅助疗法给予的最佳剂量的参数一般会包括以下一些和全部:待治疗的疾病及其阶段;受试者的种类、其健康情况、性别、年龄、体重和代谢速率;受试者的免疫活性;给予的其他治疗法;和从所述受试者的病史或基因型预测的潜在并发症。所述参数还包括:所述细胞是否是同基因、自体同源、同种异体或者异种;它们的能力(具体活性);所述细胞/培养基若要有效而必须靶向的位点和/或分布;以及所述位点的如下特性,例如细胞/培养基的可接近性和/或细胞的植入。其他参数包括与其他因子(例如生长因子和细胞因子)共给予。给定情况的最佳剂量还将考虑制备所述细胞/培养基的方式,给予所述细胞/培养基的方式,以及所述细胞/培养基在给药之后在所述靶部位的局部化的程度。

[0189] 细胞的最佳剂量可以在用于自体同源单核骨髓移植的剂量范围内。对于细胞的基本纯制品,多个实施方案中的最佳剂量的范围是每次给药 10^4 至 10^8 个细胞/kg的接受者体重。在一些实施方案中,每次给药的最佳剂量为 10^5 至 10^7 个细胞/kg。在很多实施方案中,每次给药的最佳剂量为 5×10^5 至 5×10^6 个细胞/kg。作为参考,前述的更高剂量类似于自体同源单核细胞骨髓移植中使用的有核细胞的剂量。一些更低的剂量类似于自体同源单核骨髓移植中使用的 $CD34^+$ 个细胞/kg的数目。

[0190] 在多个实施方案中,可以以初始剂量给予细胞/培养基,之后通过进一步给药维持。初始可用一种方法给予细胞/培养基,之后通过相同的方法或一种或多种不同的方法给予。可通过进行的所述细胞/培养基给药来维持所述水平。多个实施方案通过静脉注射初始给予所述细胞/培养基或者在所述受试者中维持其水平,或者初始给予所述细胞/培养基并且维持所述细胞/培养基水平。在多个实施方案中,依赖于患者的病症和其他因素(在本文他处描述)可使用其他形式的给药。

[0191] 细胞/培养基可以多种频率在很宽范围的时间段给予。一般地,治疗的时长会与所述疾病过程的时长、实行的治疗的有效性和接受治疗的受试者的病症和反应成比例。

[0192] 用途

[0193] 由于本发明的细胞分泌一种或多种因子,所述因子通过本申请描述的多种生物学

机制最终减少炎症,因此给予所述细胞可用于减少如上所列的任意数目的病理中不想要的炎症。

[0194] 此外,由本申请描述的生物学机制提供了其他用途。这些用途中的一种包括药物发现。该方面包括就调节所述细胞的抗炎效应的能力筛选一种或多种化合物。这将包括,首先,针对细胞减少以下任一情况的能力开发测定法:(1)炎症,(2)外渗,(3)内皮细胞-白细胞结合,(4)黏着分子在内皮细胞中的表达(RNA和/或蛋白质),(5)与所述黏着细胞分子结合的相关配体(位于白细胞上)的表达,前提是该配体的表达受到内皮细胞的调节,和(6)内皮细胞的细胞因子产生。因此,该测定法可被设计为在体内或在体外进行。调节测定可评估任意所需水平,例如形态学、基因表达、功能等,的活化状态。它可能包括分离的血管内皮。或者,它可能包括从内皮部分地或者完全地移除的血管内皮细胞,包括内皮细胞株(strain)和内皮细胞系(line),可以是天然的或重组的。但是,它还可以包括已知具有结合亲和性的分离的细胞组分,例如内皮上表达的黏着分子和见于白细胞上的它们的相应结合配体。因此,表达或分泌所述细胞粘附分子的重组细胞和相应的白细胞配体可被用于检测结合。或者,所述分离的淋巴细胞结合伴侣可与表达内皮黏着分子的细胞一起使用,例如P-选择蛋白或E-选择蛋白和CD15s;ICAM-1或ICAM-2和LFA-1;ICAM和Mac-1;VCAM-1和VLA-4。

[0195] 所述测定可以包含活性细胞因子,例如TNF- α 或IL-1 β 。仅所述细胞因子即可构成所述测定的基础。例如,可对所述细胞/培养基测定结合TNF- α 的能力,或者在基于细胞的受体测定或者可溶受体测定中作为TNF- α 受体的竞争抑制剂起作用的能力。非结合TNF- α 可被直接检测,或者非结合TNF- α 的测定可以包括针对TNF- α 的任意生物学效应的测定。这还可以适用于其他活性细胞因子,例如IL-1。

[0196] 或者,所述测定可以包括在基于受体的测定中所述细胞/培养基调节(增加、降低)NF κ B的能力,所述基于受体的测定具有与由NF κ B控制的启动子可操作地连接的报告基因。然后所述测定可被用于筛选增加或者降低所述细胞/培养基的效应的化合物/试剂。

[0197] 可以通过直接测定蛋白质或DNA来估计基因表达。这可以通过本领域熟知的任意技术进行,例如通过FACS和其他基于抗体的检测方法和PCR以及其他基于杂交的检测方法进行。间接检测也可以用于表达,例如结合至任意已知的结合伴侣。

[0198] 对表达/分泌的测定包括但不限于ELISA、Luminex、qRT-PCR、因子抗体蛋白质印迹和在组织样本和细胞上的因子免疫组织化学。

[0199] 细胞和条件化培养基中的调节因子的定量确定可以使用市售试剂盒(例如,依赖两步骤的基于消减抗体的测定(subtractive antibody-based assay)的R&D系统)来进行。

[0200] 本发明包括产生具有本文描述的增加效应的细胞的方法。因此,本发明包括鉴别化合物的方法,所述化合物增加所述细胞具有本文描述任意效应的能力,所述方法通过将所述细胞暴露于化合物并且检测所述细胞达到任意需要水平所述效应的能力来进行。在一个实施方案中,一些细胞可能需要在产生具有本文描述的效应的因子之前与活化的内皮细胞接触。这样的细胞可被指定为“对照”。因此,在一个实施方案中,可能通过使用适于本文描述的递送的化合物代替活化的内皮细胞的作用。在一个实施方案中,例如,发明人发现IL-1 β 、TNF- α 和IFN- γ 的结合物可以代替用于与活化的内皮细胞接触,这在实施例部分简要地描述。因此,可用任意数目的化合物对细胞进行筛选以鉴定允许该代替的化合物。然后,对于本申请描述的任何治疗用途,以及对于产生可用于临床、治疗和诊断应用和细胞库

的组合物和细胞建库,可将这些化合物用于预处理对照细胞。

[0201] 具体测定的实例

[0202] 1. 内皮细胞的FACS分析以在与MAPC共培养或者与来自MAPC的条件化培养基孵育之后检测黏着分子的存在情况。

[0203] 2. 对结合至与MAPC共培养或者与来自MAPC的条件化培养基孵育的内皮细胞的嗜中性粒细胞定量。

[0204] 3. 对使用基于启动子的系统在与MAPC共培养或者与来自MAPC的条件化培养基孵育之后对NF- κ B活性定量。

[0205] 4. 在内皮层与MAPC共培养或者与来自MAPC的条件化培养基孵育之后,使用基于ECIS的系统或类似系统对通过所述内皮层的白细胞外渗定量。

[0206] 还可以通过检测由所述细胞分泌的活性因子来进行效能测定。所述活性分子包括糖皮质激素、HB-EGF、IL-10、前列腺素A1、IL-13、IL-1R、IL-18R、IFN-R、TNF-R1、TNF-R2、IL-4、IL-11、IFN- β 、TGF- β 1、 β 2、 β 3、前列腺素E2、SPP1、CYLD、弹性蛋白酶、VEGF、IL-33、胸腺素B4和TGF- β 肾上腺髓质肽。检测可以是直接的,例如通过RNA或蛋白质测定;或者是间接的,例如,对这些因子的一种或多种生物学效应进行生物学测定。

[0207] 本发明的另一个用途是建立细胞库以提供用于临床给药的细胞。一般地,该方法的一个基本部分是提供用于在多种治疗临床情况下给药的具有所需效能的细胞。

[0208] 可用于药物发现的任意相同测定法还可被应用于为所述库选择细胞以及选择来自所述库的细胞用于给药。

[0209] 因此,在建库过程中,将对所述细胞(或培养基)检测实现任意上述效应的能力。然后,将选择具有任意上述效应能力的细胞,这些细胞将形成用于产生细胞库的基础。

[0210] 还考虑通过用外源化合物处理来增加效能,所述化合物例如通过用大的组合库筛选细胞发现的化合物。这些化合物库可以是试剂库,所述试剂包括但不限于小有机分子、反义核酸、siRNA DNA适体、肽、抗体、非抗体蛋白质、细胞因子、趋化因子和趋化物。例如,细胞可在培养和制备过程中的任意时间暴露于这样的试剂。唯一需要是有足够数目的所需测定可以进行以评估所述试剂是否增加效能。在上文描述的一般的药物发现方法中发现的此种试剂可以更有利地应用于建库前的最后传代过程中。

[0211] 从合格的骨髓供体分离细胞,所述合格的骨髓供体已经接受了特定的测试要求以确定从该供体得到的细胞产物可安全地在临床情况下使用。使用手工或自动化方法分离所述单核细胞。将这些单核细胞置于培养物中,使得这些细胞黏附至处理的细胞培养容器表面。可使MAPC细胞在处理的表面扩增,在第2天和第4天更换培养基。在第6天,通过机械方法或酶法将细胞从所述处理的基质中移除,并且重铺于另一个处理的细胞培养容器的表面。在第8天和第10天,如前将所述细胞从所述处理的表面移除并且进行重铺。在第13天,将所述细胞从所述处理的表面移除,洗涤并且与冷冻保护材料结合,并且最后在液氮中冷冻。在所述细胞冷冻至少1周之后,取出等份的细胞用于效能、类型、无菌性测试以及其他测试以确定所述细胞库的可用性。然后,该库中的这些细胞可通过解冻这些细胞、将它们置于培养物中来使用或者在解冻之后使用以治疗潜在的症状。

[0212] 另一个用途针对给予所述细胞之后的效能和有益临床效应的诊断测定。依赖于所述症状,可能有可用于评估的生物标记物。例如,高水平的C-反应蛋白与急性炎症应答有

关。可以监测CRP的水平来确定有益临床效果。

[0213] 另一个用途是评估细胞达到上述任意结果的效力,所述评估作为将所述细胞给予受试者之前的治疗前诊断。

[0214] 组合物

[0215] 本发明还涉及细胞群,其具有实现本文描述的任意效应的具体效能(即,炎症、外渗、黏附、减少内皮活化等)。如上所述,这些群是通过选择具有所需效能的细胞建立的。这些群被用于制备其他组合物,例如,包含具有具体所需效能的群的细胞库和包含具有具体所需效能的细胞的药物组合物。

[0216] 实施例

[0217] 实施例1

[0218] **MultiStem[®]**是在本文实施例中描述的实验方法中使用的MAPC细胞制品的商标名称。

[0219] 多能成体祖细胞在活化后调节内皮细胞粘附分子表面表达并且在AMI之后减少炎症

[0220] 依据/背景

[0221] 免疫细胞定位于炎症位点是对损伤和感染的免疫应答的重要部分。在对炎症的应答中,免疫细胞(包括白细胞、淋巴细胞和单核细胞)结合至并且变异通过内皮细胞层到达损伤位点^{1,2}。内皮细胞可被凝血酶、组胺和促炎细胞因子(例如,TNF- α 和白细胞介素1 β)以及氧自由基活化,这可导致黏着分子(包括E-选择蛋白、V-CAM和I-CAM-1)的上调³⁻⁵。内皮细胞表面细胞粘附分子的上调可使活化的免疫细胞黏附、滚动并且变移穿过内皮细胞屏障⁴。

[0222] 尽管免疫系统的动员是对感染和对伤口愈合的免疫应答的关键部分,缺血性损伤后的炎症可促使细胞毒性和死亡。例如,在急性心肌梗死之后,嗜中性粒细胞浸润的增加与用溶血栓疗法和初级血管形成术治疗的患者中有害事件的风险增加有关⁶⁻⁸。对心肌梗死的炎症应答程度对确定梗死大小以及之后的左心室(LV)重塑具有重要作用^{9,10}。嗜中性粒细胞定位至心脏通过释放蛋白酶和活性氧自由基(ROS)促进心肌损伤,所述蛋白酶和活性氧自由基可促进左心室重塑。此外,嗜中性粒细胞通过在被描述为“无再流(no reflow)”的现象中阻断毛细血管而促进微血管和毛细血管损伤¹¹。朝向T辅助1(Th1)细胞的促炎失衡可促进左心室膨胀、心脏收缩机能障碍和功能降低¹²。因此,AMI之后调节嗜中性粒细胞和炎性细胞应答会帮助减少对心肌的损伤。

[0223] **MultiStem[®]**是已证明在临床前模型中,现在在阶段I临床试验中,在AMI之后改善心肌功能的扩增的人临床级同种异体多能成体祖细胞¹³⁻¹⁵。在动物模型中通过直接左前降动脉结扎诱导心肌梗死之后将MultiStem递送至梗死附近位点致使心脏功能改善。与对照载体相比,这些研究中MultiStem处理的动物显示出左心室收缩性能改善,伤痕区域减小、血管密度增加和心肌能量特征改善^{14,16,17}。由于MultiStem植入水平低并且MultiStem最低程度地分化为心肌和内皮细胞,在AMI期间MultiStem的益处被认为来自旁分泌效应。

[0224] 先前的研究已经证明啮齿动物和人MultiStem显示出强效的免疫抑制特性,并且证明了MultiStem培养物在体外是非免疫原性的并且能够抑制抗体激活的T-细胞扩增^{13,15}。曾猜测MultiStem的免疫抑制或抗炎特性扩展至内皮细胞,并且MultiStem可在AMI期间部

分地通过内皮细胞活化和免疫细胞黏附的免疫调节而提供益处,所述内皮细胞活化和免疫细胞黏附的免疫调节导致嗜中性粒细胞浸润减少。

[0225] 在该研究中,通过检测细胞粘附分子在细胞表面上是否下调来检测MultiStem以确定它是否能够调节内皮细胞活化。发现将MultiStem与主动脉或肺部的上皮细胞共培养可以防止用TNF- α 活化后内皮细胞的细胞表面上E-选择蛋白、V-CAM和I-CAM的上调,其中对I-CAM上调的防止作用程度较低。E-选择蛋白的上调看起来并不是因为从细胞表面切割的增加。相反,MultiStem通过降低V-CAM、I-CAM和E-选择蛋白的转录而调节细胞表面上调。与未处理对照相比,在与MultiStem共培养时出现的细胞表面黏着分子表达的减少可导致结合至内皮细胞的嗜中性粒细胞减少。该活性并不是骨髓衍生的黏着干细胞所共有的,因为MSC不能够调节用TNF- α 活化后V-CAM、E-选择蛋白或I-CAM细胞表面上调。这些结果表明MSC和MultiStem响应炎性信号具有不同的分泌谱。为了确定降低的内皮细胞活化是否能够减少急性心肌梗死之后的炎症和嗜中性粒细胞浸润,在AMI大鼠模型中检测了MultiStem对减少由缺血事件诱导的炎性应答的作用。发现嗜中性粒细胞浸润水平降低,与以下现象一致:永久性LAD结扎之后,与运载体对照相比,在MultiStem处理的肝脏中嗜中性粒细胞组织弹性蛋白酶水平下降。

[0226] 材料和方法

[0227] 细胞培养

[0228] 从Lonza (Walkersville, MD, <http://www.lonza.com>) 购买了人主动脉内皮细胞(HAEC), 并且根据制造商的说明书培养以传代7次, 使用来自Lonza的内皮生长培养基-2 (EGM-2)。从ScienCell (Carlsbad, CA, www.sciencellonline.com) 购买了人肺微动脉内皮细胞(HPMEC) 并且根据制造商的说明书培养以传代4次, 使用来自ScienCell的内皮细胞培养基(ECM)。从Lonza购买了人间充质干细胞(MSC) 并且根据制造商的说明书培养以传代6次, 使用来自Lonza的间充质干细胞生长培养基(MSCGM)。如参考文献所述培养人MultiStem¹⁸。

[0229] 内皮共培养测定

[0230] 在加湿、5%CO₂和37℃的环境下, 将HAEC或HPMEC使用各自的培养基以 1×10^5 个细胞/cm²铺板于6孔0.4 μ m膜Transwell板(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, <http://www.fishersci.com>) 的底部, 孵育3天。吸去培养基, 用PBS清洗所述细胞。每孔加入2ml的**MultiStem®**培养基, 添加物包含1:1、1:4、1:10或1:20 (HAEC:MultiStem)。将1ml的MultiStem培养基中的MultiStem置于所述孔中。向每孔加入来自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, <http://www.sigmaaldrich.com>) 的10ng/ml重组人肿瘤坏死因子 α (rhTNF α)。还设置仅由内皮细胞(-rhTNF α)组成的对照、由单独的内皮细胞+10ng/ml rhTNF α 组成的对照和1:1共培养物(-rhTNF α)对照。对照是在3ml MultiStem培养基中制备的。然后在加湿、5%CO₂和37℃的环境中培养所述样本。或者, 对于对照研究, 可以使用MSC和MSCGM代替MultiStem和MultiStem培养基。还可以使用来自Sigma-Aldrich的10ng/ml的重组人白细胞介素1 β (rhIL-1 β) 代替rhTNF α 来进行所述测定。

[0231] 流式细胞术分析

[0232] 使用50/50PBS/Enzyme Free (Millipore, Billerica, MA, <http://www.millipore.com>) 将细胞从所述6孔板中分离出来, 在1600rpm旋转5分钟沉底, 重悬浮于

600 μ l的PBS。将每个样本等分至3管用于流式细胞术染色。在黑暗中将所述细胞与来自BD Pharmingen (San Jose, CA, <http://www.bdbiosciences.com>) 的20 μ l的针对CD 106FITC缀合的 (V-CAM1) 的抗体、针对CD54PE缀合的 (I-CAM1) 的抗体或针对CD62E PE缀合的 (E-选择蛋白) 的抗体在4 $^{\circ}$ C孵育40分钟。此外,使用FITC小鼠IgG1 κ 或PE小鼠IgG1 κ (BD Pharmingen) 进行同种型对照。将所述细胞用2ml的PBS清洗,在1600rpm旋转5分钟沉底。弃去上清液,将所述细胞重悬浮于200 μ l的PBS+1%多聚甲醛 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, <http://www.electronmicroscopysciences.com>) 中。在装配有488-nm氩激光的FACSVantage SE流式细胞仪 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, California) 上进行流式细胞术分析。使用585/42带通滤波器检测来自PE (FL2) 荧光的发射。使用CellQuestTM软件 (Becton Dickinson) 进行数据获取和分析。

[0233] 免疫荧光

[0234] 在为所述共培养测定对HAEC铺板之前,将12mm的显微镜盖玻片 (Fisher Scientific) 放置在6孔Transwell板的底部。在室温下用10%驴血清 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, <http://www.jacksonimmuno.com>) 封闭所述细胞1小时,之后在4 $^{\circ}$ C下用人E-选择蛋白的小鼠单克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, <http://www.scbt.com>) 的1:50稀释物孵育过夜,伴随着缓慢搅动。然后用PBS-T清洗所述细胞4次,每次5分钟,之后在室温下用小鼠AlexaFluor 488的驴抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA, <http://www.invitrogen.com>) 的1:400稀释物孵育1小时。然后用PBS-T将这些细胞洗涤4次,每次5分钟。使用Leica显微镜 (Leica, Microsystems, Bannockburn, IL, <http://www.leica-microsystems.com>)、Optronics相机和MagnaFire软件 (Optronics, Goleta, CA, <http://www.optronics.com>) 在100 \times 放大率下获取图像。

[0235] ELISA

[0236] 在所述共培养试验后收集所述培养基,并将2倍稀释的样本根据制造商的说明书用于可溶性E-选择蛋白的ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, <http://www.rndsystems.com>)。

[0237] RT-PCR

[0238] 使用0.25%胰蛋白酶-EDTA (Invitrogen) 将细胞从所述6孔Transwell板中分离出来,离心并重悬浮于1.8ml裂解缓冲液中。使用Absolutely RNA Miniprep试剂盒 (Stratagene, La Jolla, CA, <http://www.stratagene.com>) 根据制造商的说明书提取RNA。在65 μ l提供的洗提缓冲液中洗提所述RNA。使用100pmol Random Primers (Promega, Madison, WI, <http://www.promega.com>) 进行RT-PCR。在96孔板上检测RT阳性和RT阴性以及水。

[0239] 嗜中性粒细胞结合测定

[0240] 从健康志愿者的外周血中分离嗜中性粒细胞。分离之后,通过在37 $^{\circ}$ C加入LPS (0.1 μ g/ml) 10分钟使嗜中性粒细胞活化10分钟。在TNF- α 存在或不存在的条件下,如上文所述将HAEC与MultiStem或MSC孵育72小时。然后除去培养基,清洗所述细胞,然后将内皮细胞与活化的嗜中性粒细胞孵育1分钟。然后将所述内皮细胞用PBS清洗4次以除去所有未结合的嗜中性粒细胞。多次清洗之后,通过显微镜 (20 \times 物镜) 检查与内皮细胞结合的嗜中性粒细胞,

并且拍照。对每个视野中与内皮层结合嗜中性粒细胞计数。每种情况重复3次,每孔拍照3个视野。

[0241] 动物研究

[0242] 细胞制备——在细胞注射的每一天,将MultiStem解冻并测试生存力。将显示>90%生存力的细胞以5千万个细胞/mL重悬浮于PBS。先前的解冻实验表明MultiStem细胞在这些条件下保持>95%的活性最长达8小时。

[0243] 动物手术——本研究描述的所有实验动物方法都是根据Animal Research Committee of the Cleveland Clinic Foundation (Cleveland, Ohio, USA) 提供的方案进行的。体重为150-175g的雄性Lewis大鼠被通过腹膜内注射氯胺酮(ketamine) (100mg/kg) 和甲苯噻嗪(xylazine) (5mg/kg) 的混合物麻醉,并在80次呼吸/min下用室内气体换气(RSP 1002, Kent Scientific Corp, Torrington, CT)。在25只大鼠中通过胸骨切开术和手术结扎左前降动脉来诱导前壁心肌梗死。通过所述缝合远端的组织的漂白来确认LAD的结扎。LAD结扎之后,将1千万Lewis Rat MultiStem细胞(5千万个细胞/ml) 或单独的PBS在梗死区域周围的区域注射进入心脏。手术后3天处死动物。将来自10只动物(5只为运载体处理,5只为MultiStem处理)的心脏包埋在OCT中并且用于冷冻薄切片。随后将切片对弹性蛋白酶染色(以确定嗜中性粒细胞数目)。

[0244] 统计学

[0245] 使用Student T检验或ANOVA连同后续分析进行统计学分析,当合适时以 $p < 0.05$ 接受为统计学显著。误差线表示为标准差。

[0246] 结果

[0247] MultiStem防止活化后细胞粘着分子上调

[0248] 当暴露于促炎细胞因子,例如TNF- α 时,黏着分子在内皮细胞表面上的表达显著增加。为了测试MultiStem是否能够调节该应答,在TNF- α 存在或不存在的条件下,将MultiStem与人主动脉内皮细胞(HAEC)在transwell中共培养3天。之后,通过FAC分析或免疫染色测量E-选择蛋白、V-CAM和I-CAM的细胞表面表达(图1A)。72小时之后,与未活化对照相比,TNF- α 在MultiStem不存在的情况下诱导了高水平的所有3中标记物。然而,发明人发现在存在MultiStem的情况下,具有E-选择蛋白(图1B) ($p = 0.0149$) 和V-CAM ($p = 0.0037$) 表面表达的细胞数量显著下降(图1B)。此外,在最高剂量的MultiStem下,I-CAM的细胞表面表达水平($p = 0.001$) 下降(图1C)。MultiStem对细胞表面黏着分子上调的调节是细胞剂量依赖的,随着MultiStem浓度的下降而降低,并且用来自其他供体的MultiStem可以重复(未显示数据)。为了检查该效应是否是TNF- α 特异的,使用白细胞介素1 β (IL-1 β) 重复该实验。与使用TNF- α 的结果类似,当用IL-1 β 活化时,与对照相比,与MultiStem共培养抑制了黏着分子(E-选择蛋白、V-CAM和I-CAM)在细胞表面的上调(图2B)。

[0249] 接着,检测在MultiStem存在下细胞粘附分子的表面表达的下调是否是主动脉内皮特异的应答,或者其他内皮细胞系是否也以类似的方式响应MultiStem。测试了人肺微血管内皮细胞(HPMEC)以确定这些细胞对MultiStem响应是否以类似于HAEC的方式下调TNF- α 诱导的细胞粘附分子细胞表面表达(图2A)。在细胞表面表达TNF- α 诱导的E-选择蛋白($p < 0.0001$) 和V-CAM ($p < 0.0001$) 的HPMEC的数量在与MultiStem共培养之后下降。类似地,在与最高剂量MultiStem共培养的细胞中I-CAM细胞表面表达也显著下降($p = 0.028$) (图2A)。因

为这些实验是在transwell中进行的,MultiStem调节内皮细胞黏着标记物活化并不需要MultiStem和内皮细胞之间的直接相互作用。因此,这些数据表明,从MultiStem分泌的可溶因子是以旁分泌的方式来减少内皮细胞表面黏着分子表达。

[0250] MultiStem不增加黏着分子的脱落而是通过防止黏着分子RNA表达诱导来起作用

[0251] MultiStem能够降低黏着分子(例如E-选择蛋白)细胞表面表达的一种可能机制是增加这些分子从细胞表面切割。黏着分子从细胞表面切割是由不同的蛋白酶(包括金属蛋白酶,例如TACE/ADAM17)介导的。之前的研究表明,可溶黏着分子可能是病理性的并且可以促进嗜中性粒细胞活化^{19,20}。对用MultiStem的处理进行检查以确定它是否通过增加E-选择蛋白表面脱落而降低E-选择蛋白表面表达。在MultiStem存在或不存在的条件下,通过ELISA测量了由内皮细胞分泌到条件化培养基中的可溶E-选择蛋白的水平。在从MultiStem和HAEC或HPMECS共培养物中收集的条件化培养基中没有发现sE-选择蛋白浓度增加(图3A,未显示数据)。相反地,发现在以最高比例与MultiStem的共培养的TNF- α 活化的HAEC ($p < 0.001$)和HPMEC ($p < 0.001$)的培养基中可溶E-选择蛋白出现下降,表明E-选择蛋白的表面表达下降是表面表达的下降连同之后的可溶E-选择蛋白的脱落减少的结果(图3A)。因此,E-选择蛋白的表面表达降低不是因为该分子从细胞表面的切割增加,说明内皮细胞表面的细胞粘附分子的减少不是这些分子蛋白水解切割的结果。

[0252] 由于当用例如TNF- α 的促炎细胞因子处理内皮细胞时,其中的细胞表面黏着分子E-选择蛋白、V-CAM和I-CAM均转录活化,测定MultiStem是否能够在转录水平调节这些黏着分子的调节(图3)。内皮细胞(HAECs)在存在或不存在TNF- α 下与MultiStem孵育72小时。随后从所述内皮细胞分离RNA并反转录成cDNA。使用针对E-选择蛋白、V-CAM和I-CAM和GAPDH的引物进行定量PCR。mRNA的表达水平被相对GAPDH水平标准化(图3B)。这些结果表明E-选择蛋白、V-CAM和I-CAM mRNA水平在MultiStem存在下下降,表明MultiStem可抑制这些基因的TNF- α 上调。类似的结果可见于当MultiStem与肺内皮细胞(HPMEC,未显示数据)共培养时。由TNF- α 引起的V-CAM、I-CAM和E-选择蛋白转录活化是NF κ B依赖的,表明MultiStem在一定程度上调节NF κ B信号传递。

[0253] 不同于MultiStem,MSC不显著调节细胞粘附分子表达

[0254] 其他骨髓源干细胞也已被证明通过在动物模型中防止T细胞增殖、抑制天然杀伤细胞功能以及调节免疫疾病(例如克罗恩病和GVHD)而调节免疫功能。为了评估MultiStem对内皮细胞活化的免疫调节作用是否也可由其他干细胞系产生,在TNF- α 存在下将内皮细胞与MSC共培养72小时,之后检查细胞粘附分子的细胞表面表达。令人惊讶的是,与未处理对照相比,在MSC存在下TNF- α 诱导的内皮细胞粘附分子表面表达没有变化,而MultiStem显著减少黏着分子表达(图4A-C)。对于MSC在最高剂量观察到了E-选择蛋白表面表达的微弱减少,然而,该变化显著小于在MultiStem存在下可见的变化(图4A)。因此,MSC不调节TNF- α 引起的黏着分子上调。这些结果证明MultiStem具有与MSC在功能上不同的分泌谱,其表现在它们的生物学活性的差异上。

[0255] 活化的内皮细胞与MultiStem共培养防止嗜中性粒细胞结合

[0256] 已经证明内皮细胞细胞表面上细胞粘附分子的上调对于例如嗜中性粒细胞的免疫细胞的滚动和牢固黏着是关键的⁴。为了确定由MultiStem引起的对黏着分子在细胞表面的上调的调节是否足以影响嗜中性粒细胞结合至内皮细胞,比较了嗜中性粒细胞对

MultiStem处理的内皮细胞和未处理内皮细胞的结合。将内皮细胞培养至汇合单层,在MultiStem存在或不存在的条件下用TNF- α 处理72小时。从至少2个不同的供体分离嗜中性粒细胞,通过加入LPS (0.1 μ g/ml) 活化,并且与内皮细胞孵育1分钟。多次清洗之后,通过显微镜 (10 \times 物镜) 检查内皮细胞和嗜中性粒细胞的结合并拍照。对每个视野中与内皮细胞结合的嗜中性粒细胞计数 (图5A)。仅低水平的活化或未活化的嗜中性粒细胞结合至未活化的内皮细胞。然而,当用TNF- α 活化后,如所预期,在结合的嗜中性粒细胞中可见显著增加 (图5B)。当内皮细胞与MultiStem预孵育时,嗜中性粒细胞结合显著降低 ($p < 0.0001$)。这些结果证明内皮细胞上黏着分子表达的变化足以改变内皮细胞层对嗜中性粒细胞的结合特性。相反,在TNF- α 活化期间,将MSC与内皮细胞共培养不能改变嗜中性粒细胞结合。此外,当单独的或者与MSC共培养的TNF- α 活化的内皮细胞暴露于嗜中性粒细胞时,内皮细胞形态会发生显著改变,成为更长更细的细胞型,并且细胞-细胞接触减少 (图5C)。与MultiStem共培养的内皮细胞当用TNF- α 活化后,细胞形态的没有多大变化,并且保持着细胞-细胞接触。这些数据表明MultiStem从功能上改变活化的内皮细胞。因此,检测MultiStem以确定它是否能够在体内影响内皮细胞迁移。

[0257] 用MultiStem处理减少LAD-诱导的急性心肌梗死之后的嗜中性粒细胞浸润

[0258] 先前的动物研究已经证明在心肌梗死 (由直接左前降支结扎诱导) 之后将MultiStem直接注射进入梗死附近部位导致心脏功能改善^{14,16}。该报道中的所述结果证明MultiStem能够下调TNF- α 存在下黏着分子 (E-选择蛋白、V-CAM和I-CAM) 的细胞表面表达。这些分子对于嗜中性粒细胞黏着和通过内皮外渗是关键。由于缺血之后嗜中性粒细胞浸润进入心脏可能是有害的并且可导致缺血损伤之后心脏功能下降^{10,11}, 猜测MultiStem处理之后心脏功能的改善部分地是由于AMI之后炎症减少和嗜中性粒细胞浸润进入梗死区域附近。为了验证该假设,在大鼠中诱导心肌梗死之后检查存在于心脏中的嗜中性粒细胞水平。

[0259] 在大鼠中通过结扎左前降动脉 (LAD结扎) 诱导前壁心肌梗死。LAD结扎之后,将1千万Lewis大鼠MultiStem细胞或单独的PBS注射进入心脏的梗死区域周围区域。手术之后3天——炎症应答在峰值时——处死动物。将来自10只动物 (5只为运载体处理,5只为MultiStem处理) 的心脏切片并且对弹性蛋白酶染色以确定中性粒细胞浸润程度。对于处理和未处理的动物在梗死周围区域 (梗死组织的0.25-0.5cm之内) 检查嗜中性粒细胞浸润 (图6)。

[0260] AMI和细胞处理之后3天,与运载体处理的对照相比,MultiStem处理的动物表现出显著较少的白细胞浸润进入梗死周围区域 (每个高倍放大视野 (Hpf) 12.185个嗜中性粒细胞对35.25个嗜中性粒细胞/Hpf, $p = 0.005823$) (图6A-C)。在每个动物的4个高倍放大视野中计数弹性蛋白酶阳性细胞并取平均 (图6B、C)。这些结果证实了AMI之后MultiStem对心脏有抗炎症效应。这些数据表明在MultiStem存在下,在培养物中TNF- α 活化时内皮细胞粘附分子上调中观察到的下降可在体内转化为内皮细胞屏障的功能性变化。

[0261] 结论

[0262] 在该研究中,对MultiStem进行检查以确定它是否能够调节内皮细胞响应炎性刺激的活化。MultiStem是大规模扩增的临床级多能祖细胞 (MAPC)。所述结果证明,与未处理对照相比,当用TNF- α 或IL-1 β 活化并与MultiStem共培养时,主动脉和肺内皮细胞都发生黏

着分子E-选择蛋白、V-CAM和I-CAM细胞表面表达下降。此外,所述实验证明E-选择蛋白表达下降不是因为该分子从细胞表面脱落减少。相反,与TNF- α 处理的单独内皮细胞相比,V-CAM、E-选择蛋白和I-CAM mRNA表达下降,表明MultiStem调节这些蛋白质响应炎症信号而增加的转录。此外,观察到当在TNF- α 活化期间内皮细胞与MultiStem孵育时,黏附至活化的内皮细胞的嗜中性粒细胞也会减少。为了研究这些变化是适于体内,检查用MultiStem处理以确定它是否调节缺血损伤之后的炎症。确实,在大鼠中AMI之后3天,与运载体对照相比,MultiStem处理的动物中梗死周围区域中嗜中性粒细胞浸润减少。

[0263] 在MultiStem存在下活化的内皮细胞上细胞粘附分子下调的分子机制仍不清楚。但是,由于在transwell中进行了所述共培养研究,MultiStem必定将一种或多种可溶因子分泌进入培养基,所述可溶因子随后作用于内皮细胞以防止或下调这些整联蛋白和选择蛋白的转录。当例如TNF- α 或IL-1 β 的细胞因子结合至它们的受体后,内部信号传递的起始引起NF- κ B信号传递依赖的转录。E-选择蛋白、I-CAM和V-CAM的转录全部都是NF- κ B依赖的,表明MultiStem可能调节NF- κ B信号传递。

[0264] 尽管MSC已被证明在其他情况下具有免疫调节特性,MSC并不阻止活化的内皮细胞与这些细胞共培养时细胞粘附分子上调。当与任意剂量的MSC共培养时,V-CAM和I-CAM表达没有表现出任何下调。在最高的MSC剂量下,与未处理对照相比,E-选择蛋白从所述细胞表面适度下降。然而,E-选择蛋白表面表达比内皮细胞与MultiStem共培养时显著更高。此外,当活化的内皮细胞与较低剂量的MSC共培养时,没有发现对E-选择蛋白有影响。这些结果有些复杂。首先,MSC用于调节T细胞增殖的机制不同于MultiStem用于下调内皮细胞表面标记物的机制,表明所述干细胞能够通过多种途径调节免疫功能。其次,这些结果表明MultiStem和MSC具有不同的分泌谱,这由这两种细胞类型的功能性活性的差异表现。这些差异可以揭示哪种细胞类型在潜在治疗多种临床症状方面可能是最好的,每种细胞类型最适合用于不同类型的症状。对这些干细胞类型和它们的作用机制之间的差异的进一步研究将帮助澄清这些问题。

[0265] 尽管已经在AMI背景下研究了MultiStem对内皮细胞的作用,淋巴细胞和白细胞黏附至内皮细胞是炎症过程的关键部分,并因此在很多疾病中有害,所述疾病包括其他缺血损伤,例如中风;以及免疫疾病,例如GVHD、急性呼吸窘迫综合症(ARDS)和多发性硬化。所述结果显示MultiStem可调节至少两种内皮细胞类型——用两种不同细胞因子TNF- α 和IL-1 β 活化时的主动脉型和肺型——中的细胞粘附分子上调。该研究说明MultiStem的免疫调节活性可以扩展至多种内皮细胞类型和炎症信号。因此,用MultiStem处理可能对免疫细胞通过浸润内皮导致损伤和破坏增强的疾病有益。

[0266] 参考文献

[0267] 1.Wagner et al.The vessel wall and its interactions.Blood.Jun 12008; 111(11):5271-5281.

[0268] 2.Golias C,Tsoutsis E,Matziridis A,Makridis P,Batistatou A, Charalabopoulos K.Review.Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease.In vivo(Athens,Greece) .Sep-Oct 2007;21(5):757-769.

[0269] 3.Bullard et al.,Infectious susceptibility and severe deficiency of

leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *The Journal of experimental medicine*. May 1 1996;183(5):2329-2336.

[0270] 4. Rao et al., Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circulation research*. Aug 3 2007;101(3):234-247.

[0271] 5. Frenette et al., Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell*. Feb 23 1996;84(4):563-574.

[0272] 6. Furman et al., Effect of elevated leukocyte count on in-hospital mortality following acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology*. Oct 15 1996;78(8):945-948.

[0273] 7. Menon et al., Leukocytosis and adverse hospital outcomes after acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology*. Aug 15 2003;92(4):368-372.

[0274] 8. Takahashi et al., Relationship of admission neutrophil count to microvascular injury, left ventricular dilation, and long-term outcome in patients treated with primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circ J*. Jun 2008;72(6):867-872.

[0275] 9. Gonon et al., Limitation of infarct size and attenuation of myeloperoxidase activity by an endothelin A receptor antagonist following ischaemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol*. Sep 2001;96(5):454-462.

[0276] 10. Vasilyev et al., Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation*. Nov 1 2005;112(18):2812-2820.

[0277] 11. Vinten-Johansen J., Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. Feb 15 2004;61(3):481-497.

[0278] 12. Cheng et al., TH1/TH2 functional imbalance after acute myocardial infarction: coronary arterial inflammation or myocardial inflammation. *Journal of clinical immunology*. May 2005;25(3):246-253.

[0279] 13. Kovacsics-Bankowski et al., Clinical scale expanded adult pluripotent stem cells prevent graft-versus-host disease. *Cellular immunology*. 2009;255(1-2):55-60.

[0280] 14. Van't Hof et al., Direct delivery of syngeneic and allogeneic large-scale expanded multipotent adult progenitor cells improves cardiac function after myocardial infarct. *Cytotherapy*. 2007;9(5):477-487.

[0281] 15. Kovacsics-Bankowski et al., Pre-clinical safety testing supporting clinical use of allogeneic multipotent adult progenitor cells. *Cytotherapy*. 2008;10(7):730-742.

- [0282] 16.Pclacho et al.,Multipotent adult progenitor cell transplantation increases vascularity and improves left ventricular function after myocardial infarction.Journal of tissue engineering and regenerative medicine.Jan-Feb 2007;1(1):51-59.
- [0283] 17.Zeng et al.,Bioenergetic and functional consequences of bone marrow derived multipotent progenitor cell transplantation in hearts with postinfarction LV remodeling.Circulation.2007;In press.
- [0284] 18.Perry et al.,Clinical Scale Expansion of Human Pluripotent Stem Cells.ASH Annual Meeting Abstracts.November 16,2005 2005;106(11):1060-.
- [0285] 19.Vainerc et al.,Serum Concentration and Chemotactic Activity of E-selectin(CD62E) in Inflammatory Bowel Disease.Mediators of inflammation.1994;3(3):215-218.
- [0286] 20.Zeitler et al.,Elevated serum concentrations of soluble adhesion molecules in coronary artery disease and acute myocardial infarction.European journal of medical research.Sep 29 1997;2(9):389-394.
- [0287] 21.Lloyd-Jones et al.,Heart Disease and Stroke Statistics--2010Update.A Report From the American Heart Association.Circulation.Dec 17 2009.
- [0288] 22.Aranguren et al.,Multipotent adult progenitor cells sustain function of ischemic limbs by stimulating vessel and muscle regeneration.2007.
- [0289] 23.Wragg et al.,VEGFR1/CXCR4positive progenitor cells modulate local inflammation and augment tissue perfusion by a SDF1dependent mechanism.The Journal of clinical investigation.2006.
- [0290] 24.Hare et al.,A randomized,double-blind,placebo-controlled,dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells(prochymal) after acute myocardial infarction.Journal of the American College of Cardiology.Dec 8 2009;54(24):2277-2286.
- [0291] 25.Brenneman et al.,Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats.J Cereb Blood Flow Metab.J an;30(1):140-149.
- [0292] 26.Halkos et al.,Intravenous infusion of mesenchymal stem cells enhances regional perfusion and improves ventricular function in a porcine model of myocardial infarction.Basic Res Cardiol.Nov 2008;103(6):525-536.
- [0293] 27.Tang et al.,Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion.Eur J Cardiothorac Surg.Aug 2006;30(2):353-361.
- [0294] 28.Ringden et al.,Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease.Transplantation.May 27 2006;81(10):1390-

1397.

[0295] 29. Ringden et al., Mesenchymal stem cells combined with cyclosporine inhibits cytotoxic T cells. Biol Blood Marrow Transplant. Jun 2006;12(6):693-694.

[0296] 30. Highfill et al., Multipotent adult progenitor cells (MAPC) can suppress graft-versus-host disease via prostaglandin E2 synthesis and only if localized to sites of allopriming. Blood. May 20 2009.

[0297] 实施例2

[0298] 提高对下调效能

[0299] 所述内皮细胞测定已被用于鉴定 MultiStem 治疗方案, 所述方案模拟 MultiStem 与活化的内皮细胞或活化的 T 细胞共培养。发明人之前发现在所述内皮测定中, MultiStem 与活化的内皮细胞共培养是诱导 MultiStem 的抗炎活性 (E-选择蛋白、I-CAM 和 V-CAM 的下调) 所需要的。换言之, 从 MultiStem 在其正常培养条件下生长得到的条件化培养基不足以下调用 TNF- α 或 cytomix 活化后的内皮细胞粘附分子。然而, 发明人进行了一项试验, 他们在其中用 “cytomix” (10ng/ml 的 TNF- α 、干扰素- γ 和白细胞介素 1 β 的混合物) 处理 MultiStem 3 天。该处理之后他们收集了 MultiStem 的条件化培养基。然后该条件化培养基被用作所述内皮细胞测定中 MultiStem 的替代物 (它被加入用 TNF- α 或 cytomix 活化的内皮细胞中并培养 2 或 3 天)。他们发现不同于未条件化的基础培养基或从正常条件下培养的 MultiStem 收集的培养基, 该 “cytomix” 处理的培养基足以阻止内皮细胞粘附分子上调。该培养基可以代替 MultiStem 与所述活化的内皮细胞共培养。随后他们使用该培养基测试它是否足以在 T 细胞增殖测定中代替 MultiStem 与 T 细胞共培养, 发现与从未处理的 MultiStem 收集的条件化培养基不同, 该培养基足以阻止 CD3/CD28 诱导的 T 细胞增殖。

[0300] 因此, 他们得出这样的结论, 即用 cytomix 处理 MultiStem 足以诱导阻止 T 细胞活化和内皮细胞粘附分子上调所需要的 MultiStem 的抗炎活性。这是通过使用内皮细胞测定发现的。

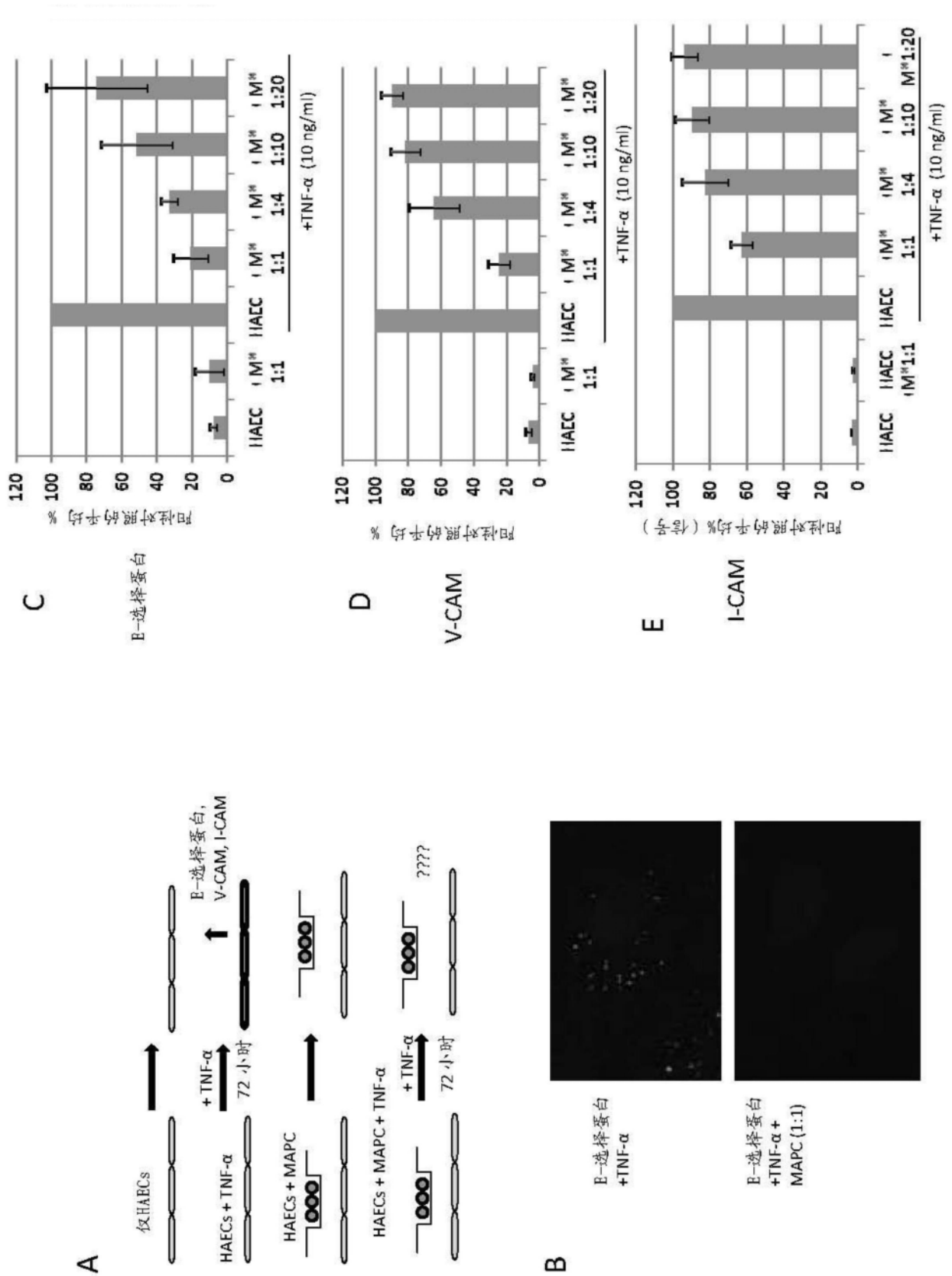


图1

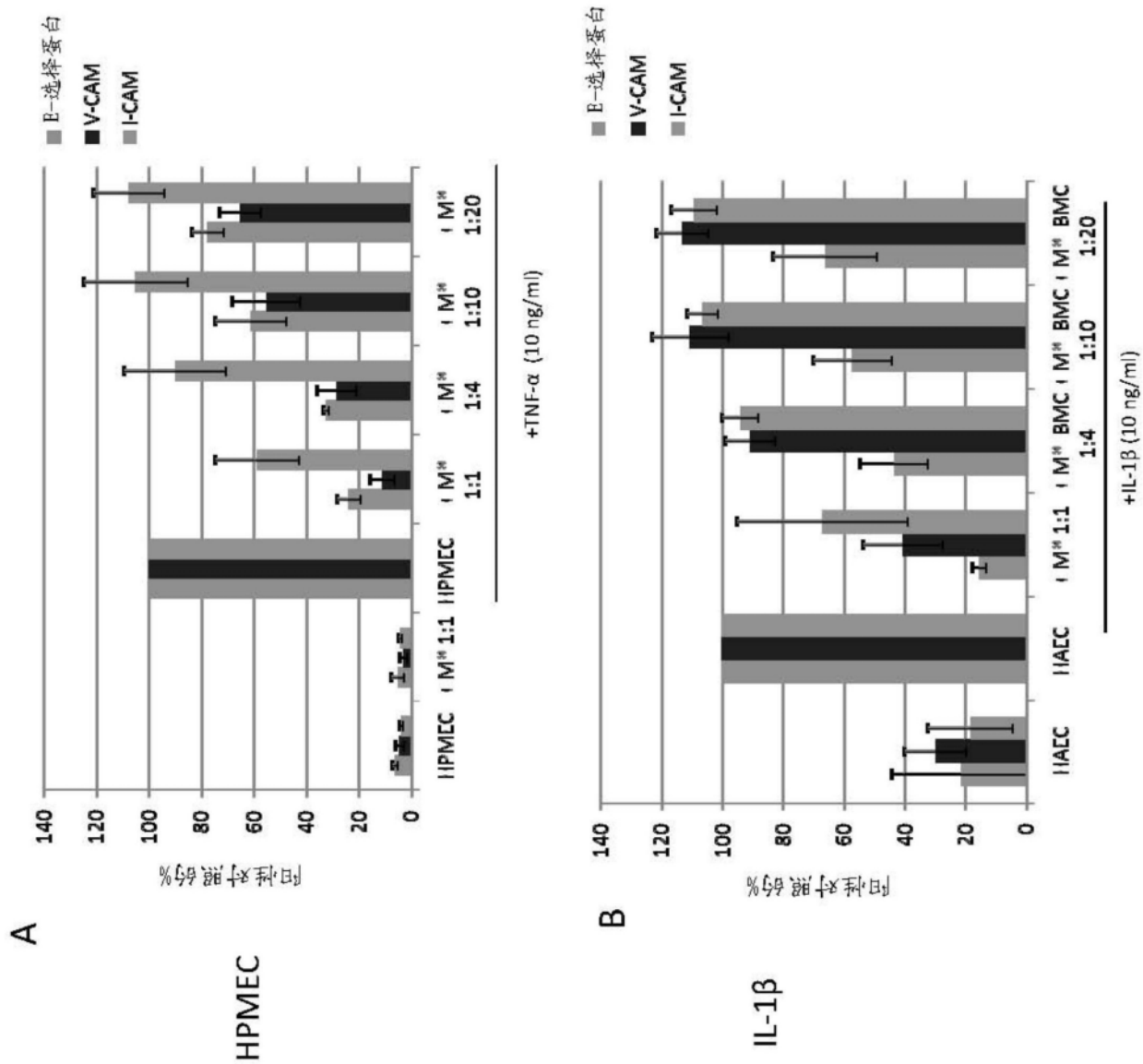


图2

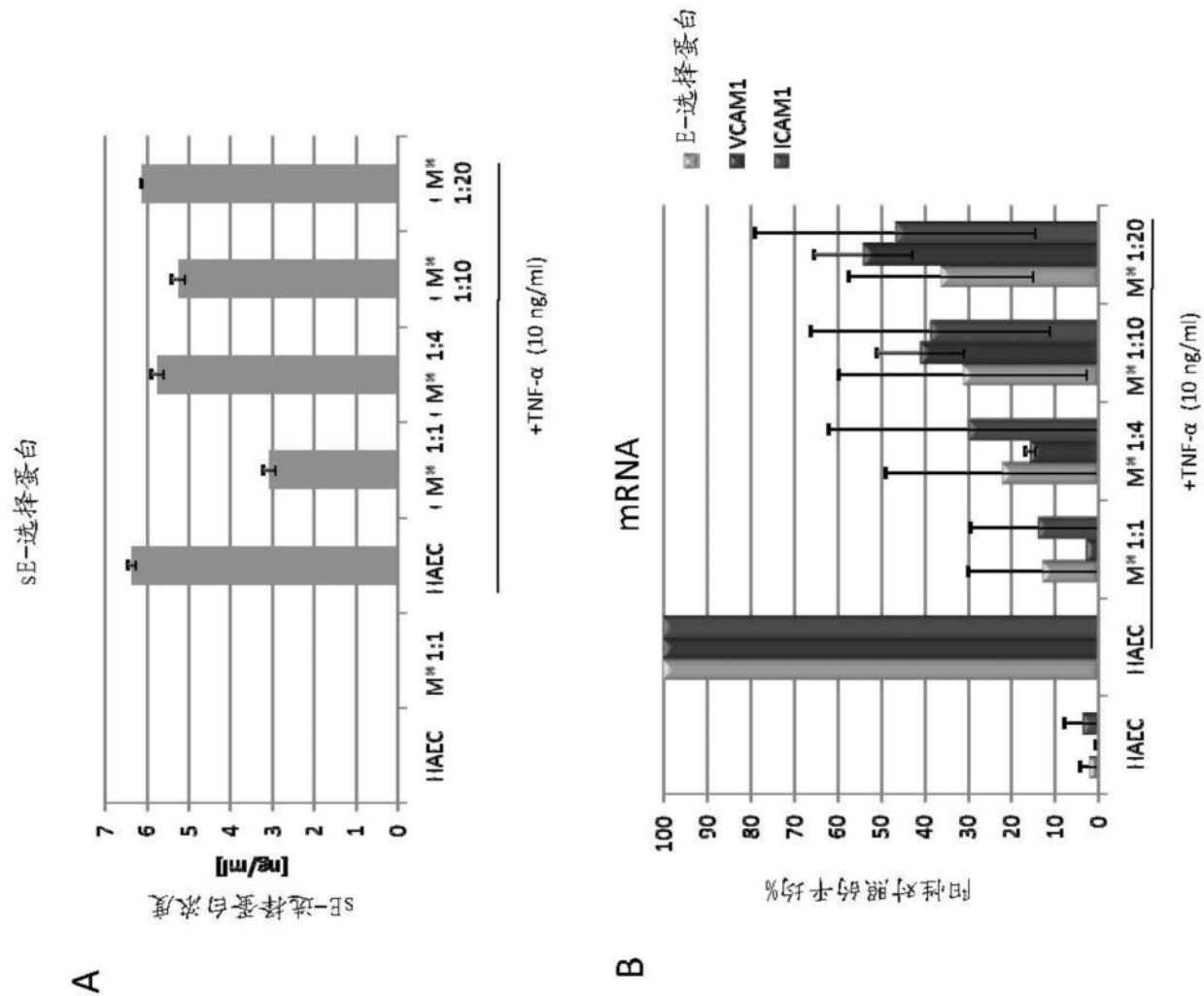


图3

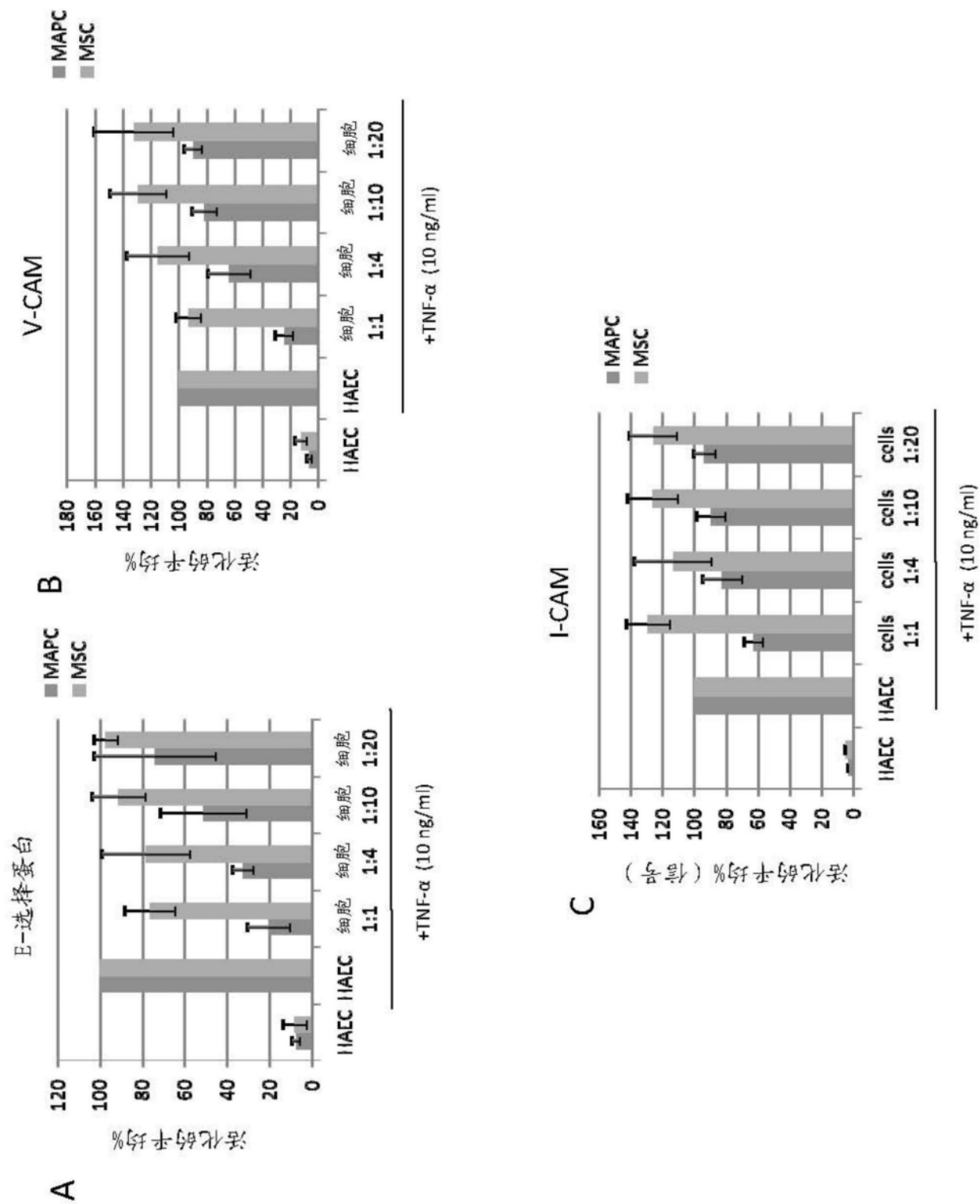
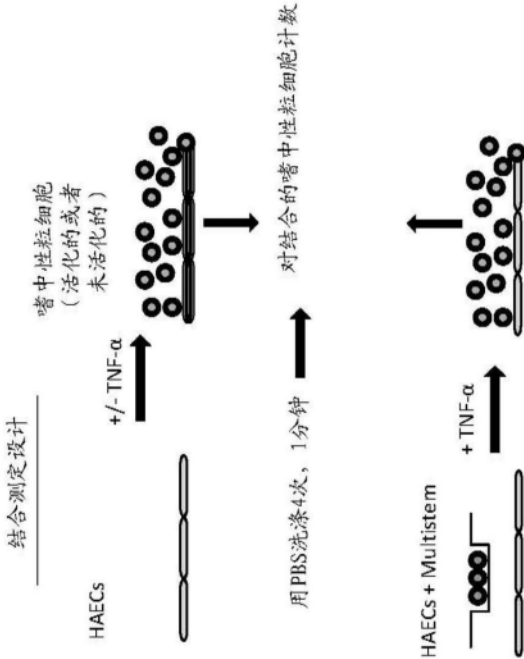
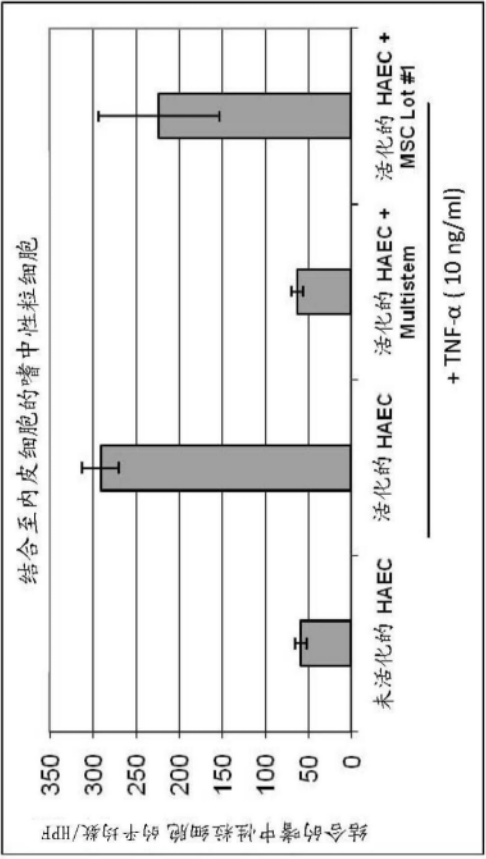


图4

A



B



C

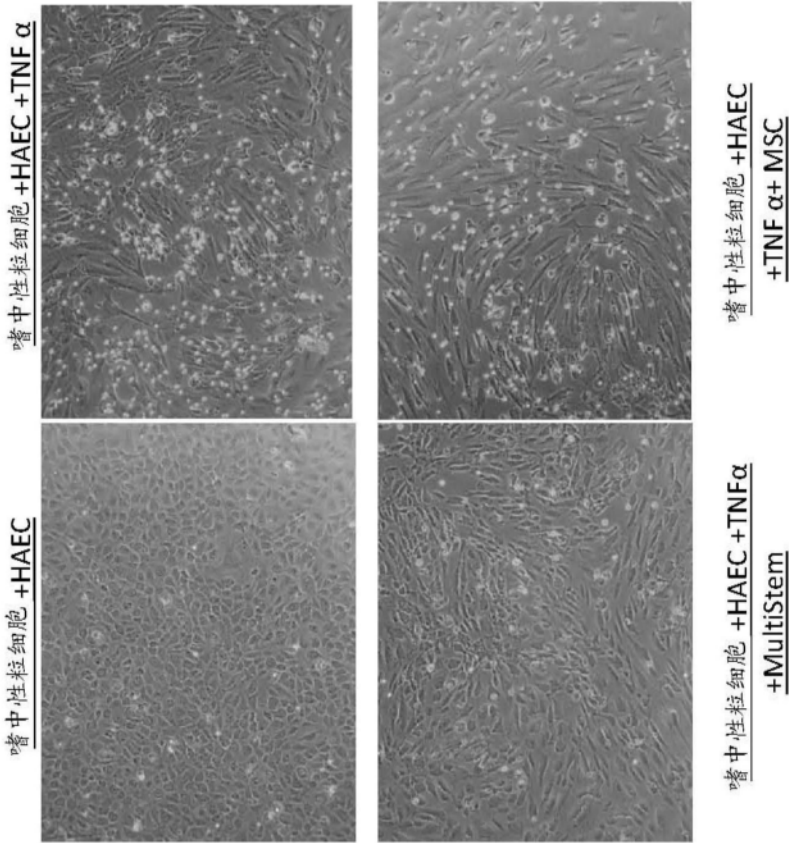
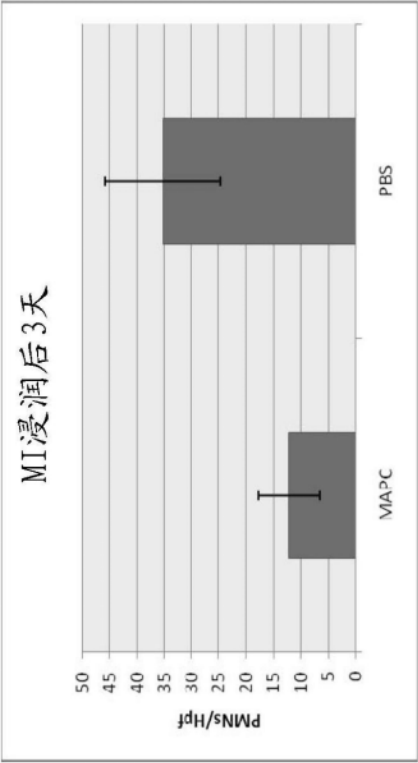


图5

A

Mulistem 处理的	平均PMN/部分	STD	总平均值
AI-1	9.25	6.849574	12.1875
AI-2	19.25	11.44188	
AI-3	13.75	1.707825	
AI-4	6.5	3	
PBS 处理的			
AI-6	25	8.717798	35.25
AI-7	36.25	8.770215	
AI-8	52.75	8.381527	
AI-9	30.25	11.29528	
AI-10	32	12.70171	

B



C

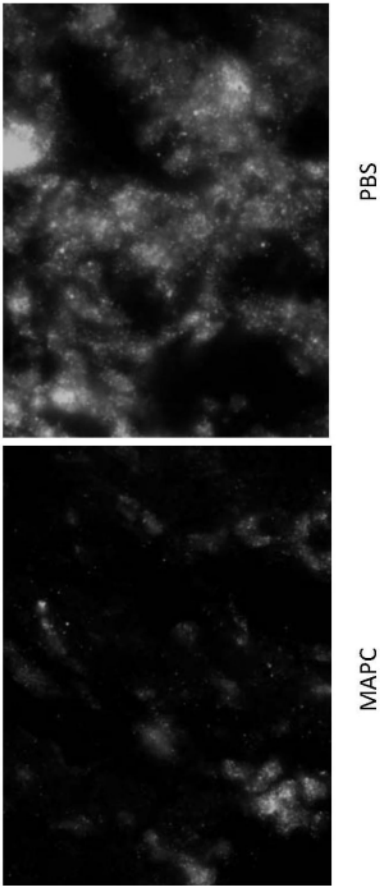


图6

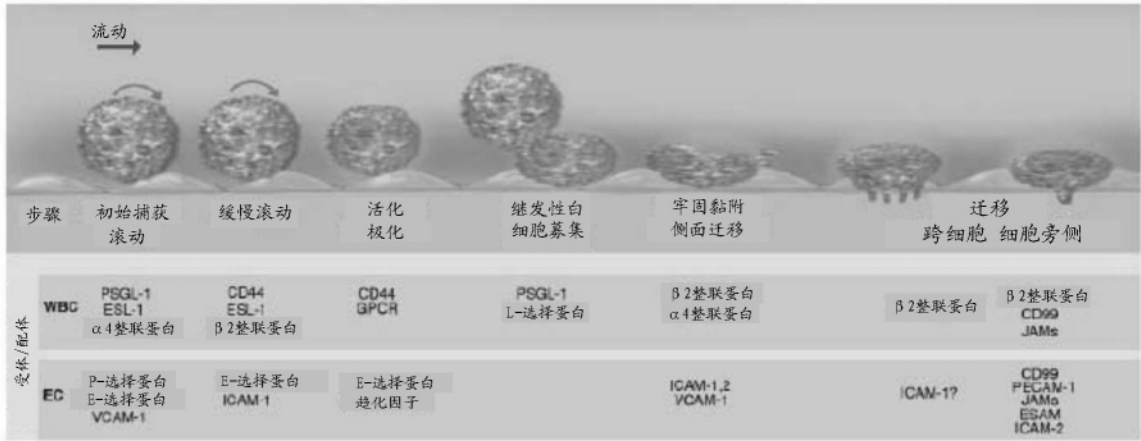


图7