



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108883135 B

(45) 授权公告日 2022.11.04

(21) 申请号 201780017154.3

(72) 发明人 爱德华多·布拉沃

(22) 申请日 2017.03.14

玛丽亚·帕斯夸尔

(65) 同一申请的已公布的文献号

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理  
有限责任公司 11204

申请公布号 CN 108883135 A

专利代理人 王达佐 洪欣

(43) 申请公布日 2018.11.23

(51) Int.CI.

(30) 优先权数据

A61K 35/28 (2015.01)

1604304.4 2016.03.14 GB

C12N 5/0775 (2010.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 1/00 (2006.01)

2018.09.13

(56) 对比文件

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 101263224 A, 2008.09.10

PCT/IB2017/051468 2017.03.14

CN 101313062 A, 2008.11.26

(87) PCT国际申请的公布数据

CN 102421444 A, 2012.04.18

W02017/158509 EN 2017.09.21

ES 2345867 A1, 2010.10.04

(73) 专利权人 武田药品工业株式会社

CN 101056974 A, 2007.10.17

地址 日本大阪

审查员 陈小燕

权利要求书1页 说明书34页 附图4页

(54) 发明名称

用于治疗克罗恩病的难治性、复杂性肛周瘘  
的脂肪组织来源的基质干细胞

(57) 摘要

本文中提供了扩增的同种异体的脂肪组织  
来源的基质干细胞，其用于治疗克罗恩病的复杂  
性肛周瘘。

1. 扩增的同种异体的脂肪组织来源的基质干细胞在制备呈试剂盒形式的用于治疗患有克罗恩病的患者的多个管道的复杂性肛周瘘的药物中的用途,其中所述试剂盒含有用于单次施用方案的总量为1.2亿个的所述扩增的同种异体的脂肪组织来源的基质干细胞,并且所述细胞总量的一半用于注射至内部的一个或多个开口周围的组织,以及另一半用于注射至全部沿着瘘管道的瘘壁,其中

所述多个管道的复杂性肛周瘘显示对抗生素和免疫抑制剂中的一种或多种响应不足;

所述药物中至少90%的所述扩增的同种异体的脂肪组织来源的基质干细胞表达以下表面标志物:HLA I、CD29、CD44、CD59、CD73、CD90和CD105;以及

所述药物在24周内诱导联合缓解。

2. 如权利要求1所述的用途,其中所述多个管道的复杂性肛周瘘显示对抗TNF疗法响应不足。

3. 如权利要求1所述的用途,其中所述多个管道的复杂性肛周瘘包含2个内部开口和/或3个外部开口。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述患者:

(a) 患有非活动性或轻度活动性克罗恩病;和/或

(b) 腔克罗恩病。

5. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述细胞经病灶内注射。

6. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述药物在18周内或在12周内诱导临床缓解。

7. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述药物在8周内或在6周内诱导临床缓解。

8. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中通过MRI监测所述多个管道的复杂性肛周瘘。

9. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述扩增的同种异体的脂肪组织来源的基质干细胞不表达以下中的四种或更多种:HLA II、CD11b、CD11c、CD14、CD45、CD31、CD34、CD80和CD86。

## 用于治疗克罗恩病的难治性、复杂性肛周瘘的脂肪组织来源的基质干细胞

### 发明领域

[0001] 本发明涉及用于治疗患有克罗恩病的患者的难治性、复杂性肛周瘘的脂肪组织来源的干细胞。

[0002] 发明背景

[0003] 通常,瘘是通常不连接的器官或管之间的异常连接或通道。瘘可以在身体的不同部位发展。例如,瘘的类型(以其中它们发生的身体区域命名)包括肛门直肠瘘或肛瘘(fistula-in-ano)或粪瘘(在直肠或其他肛门直肠区域与皮肤表面之间)、动静脉瘘或A-V瘘(在动脉与静脉之间)、胆瘘(在胆管至皮肤表面之间,经常由胆囊手术引起)、子宫颈瘘(子宫颈中的异常开口)、颅窦瘘(在颅内空间与副鼻窦之间)、肠肠瘘(enteroenteral fistula)(在肠的两部分之间)、肠皮瘘(enterocutaneous fistula)(在肠与皮肤表面之间,即从十二指肠或空肠或回肠)、肠阴道瘘(在肠与阴道之间)、胃瘘(在胃至皮肤表面之间)、子宫腹膜瘘(在子宫与腹膜腔之间)、外淋巴瘘(在中耳与内耳间的膜之间的撕裂)、肺动静脉瘘(在肺的动脉与肺静脉之间,导致血液分流)、直肠阴道瘘(在直肠与阴道之间)、脐瘘(在脐与肠之间)、气管食管瘘(在呼吸管与饲管之间),以及膀胱阴道瘘(在膀胱与阴道之间)。瘘的原因包括创伤,来自医学治疗和疾病的并发症。

[0004] 瘘的治疗根据瘘的原因和程度而改变,但通常涉及手术干预。通常使用各种手术方案,最常用的是瘘管切开术、放置挂线(穿过瘘的通道以保持其打开用于引流的线),或者直肠内皮瓣方案(其中健康组织被拉过瘘的内侧以防止排泄物或其他物质再次感染通道)。肛门直肠瘘手术并非没有副作用,包括复发、再感染和失禁。

[0005] 炎症性肠病(诸如克罗恩病和溃疡性结肠炎)是导致肛门直肠瘘、肠肠瘘和肠皮瘘的主要原因。报道的克罗恩病中瘘的发生率为17%至50%。患有克罗恩病的患者的瘘的治疗仍然是一个极具挑战性的问题,因为许多这样的瘘对可用的治疗没有响应。此类瘘及其复发是一种非常令人痛苦的并发症,其会显著降低受影响患者的生活质量。最近在医学治疗(例如,用英夫利昔单抗®(Infliximab®)治疗)和专家手术治疗方面的改进已经减少了对复杂手术的需求。然而,许多患者并未被治愈。瘘不能痊愈很可能是由于已经受克罗恩病影响的组织质量欠佳。确实,克罗恩瘘提供在一些最不可能条件下的伤口愈合的模型系统。

[0006] 肛周瘘是克罗恩病的常见并发症<sup>A1</sup>,估计其在诊断后的头二十年中影响多达28%的患者<sup>A2,A3</sup>,特别是患有结肠疾病和直肠损害的那些患者<sup>A4</sup>。它们严重损害患者的生活质量并引起相当大的发病率<sup>A5,A6</sup>。大约70-80%的肛周瘘为复杂的<sup>A3,A7</sup>,并且对这些的治疗存在挑战性,因为它们对于常规治疗策略(抗生素、免疫抑制剂)和抗肿瘤坏死因子(抗TNF)疗法来说特别难治<sup>A8-A12</sup>。此外,60-70%的患者在停止治疗后会复发<sup>A13-A17</sup>,并且仅少数患者得到长期缓解<sup>A18</sup>。

[0007] 医学疗法的失败或不耐受性最终会导致使用使人衰弱的手术方法,例如转移造口(diverting stoma)或直肠切除术<sup>A19</sup>。因此,存在对可替代性医学治疗的巨大的未满足的需

求。

[0008] 间充质基质细胞 (MSC) 是非造血基质细胞, 其能够分化成间充质组织 (诸如骨、软骨、肌肉、韧带、肌腱和脂肪)。可以容易地从组织中 (诸如骨髓或脂肪组织) 分离MSC并在培养中快速扩增。WO-A-2006/136244描述了使用含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物来治疗瘘。脂肪组织来源的间充质基质细胞是一种很有前景的新的治疗方法, 其可用于治疗复杂性肛周瘘, 这是因为它们具有抗炎症和再生组织的潜能<sup>A20-A22</sup>。最初的概念验证于先前在同种异体的、扩增的脂肪组织来源的干细胞 (eASC、Cx601) 的开放标签第1/2a期的临床研究中获得, 该研究在患有复杂性肛周瘘的24名克罗恩病患者中进行, 其中在治疗后24周, 56.3%的患者显示外部开口的完全闭合, 且不存在通过MRI测量的经治疗的瘘的集合物A23

[0009] 克罗恩病中的复杂性肛周瘘的治疗特别具挑战性, 且仍然需要建立用于治疗克罗恩病中的复杂性肛周瘘的经临床证明的疗法。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明涉及提供用于治疗克罗恩病中的难治性、复杂性肛周瘘的经临床证明的疗法, 其基于评估eASC在患有克罗恩病和治疗难治的、引流复杂的肛周瘘的212名成人中的功效和安全性的多中心、双盲、以安慰剂为对照的研究的结果。本文中的实施例描述了首个以安慰剂为对照的第3期研究, 其评估了单独的或加入至现有医学疗法的扩增的同种异体的脂肪来源的干细胞用于克罗恩病患者的治疗难治的、复杂的肛周瘘的功效和安全性。本文中报道的结果为第24周主要和次要终点。

[0012] 新的临床试验数据出人意料地揭示出脂肪来源的干细胞特别有效地治疗多个管道的复杂性肛周瘘。数据还显示, 在瘘前处理时未接受或者接受了抗TNF和免疫抑制剂疗法的患者中观察到细胞的数量上的最大的影响。另外, 出人意料地, 在治疗后不久即实现了临床缓解, 其中治疗组中的临床缓解的中值时间为6.7周。类似地, 响应的中值时间为6.3周。在第6周、第12周和第18周, 肛周疾病活动指数 (PDAI) 的提高明显更大。总之, 数据揭示了同种异体的eASC是用于克罗恩病患者的复杂性肛周瘘的一种出人意料的有效疗法, 即使是先前的药物疗法已经失败的最难治疗的、非常复杂的瘘, 通过单次施用能够提供快速和持久的治疗效果。

[0013] 本发明的第一个方面提供了扩增的同种异体的脂肪组织来源的基质干细胞, 其用于治疗患有克罗恩病的患者的难治性、复杂性肛周瘘的方法中的用途。

[0014] 本发明的第二个方面提供了扩增的同种异体的脂肪组织来源的基质干细胞在制备用于治疗患有克罗恩病的患者的难治性、复杂性肛周瘘的药物中的用途。

[0015] 本发明的第三个方面提供了治疗患有克罗恩病的患者、需要此类治疗的患者的难治性、复杂性肛周瘘的方法, 所述方法包括向所述瘘施用扩增的同种异体的脂肪组织来源的基质干细胞的步骤。

[0016] 除了其他方面, 本文中还公开了含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物。本文中描述的含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物具有独特的表型, 且展示有利的表型同质性, 因此使得它们更适合用于治疗瘘。可以将含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物可与溶液或其他物质一起配制以用作药物或医学装置, 例如, 作为缝合线或粘合剂。此外, 提供了使用脂肪组织来源的基质干细胞治疗复杂性肛周瘘的新的方法, 以及用于实施该方法的试剂盒。

[0017] 附图的简要说明

[0018] 图1描绘了第III期临床研究设计。Cx601,同种异体的、扩增的脂肪来源的干细胞;ICF,知情同意书;MRI,磁共振成像。

[0019] 图2概述了患者的处置方式。Cx601,同种异体的、扩增的脂肪来源的干细胞;ITT,意向治疗;mITT,改良的意向治疗;\*深静脉血栓形成、克罗恩病恶化(Crohn's flare)、肠梗阻、克罗恩病、肛周脓肿(n=3);†瘘、肛部痛、肛周脓肿(n=4);‡症状未痊愈或恶化;抗生素的新疗程;肛周区域的新的手术;§需要改变疗法的克罗恩病的恶化。

[0020] 图3显示了主要终点:第24周时ITT群体(A组)中联合的临床和放射学缓解\*。第24周时mITT群体(B组)中联合的临床和放射学缓解\*。至第24周根据随机分层因子(即在随机化时接受的克罗恩病治疗),mITT群体(C组)中联合的缓解\*。Cx601,同种异体的、扩增的脂肪来源的干细胞;IS,免疫抑制剂;ITT,意向治疗;mITT,改良的意向治疗;TNF,肿瘤坏死因子。\*所有经治疗的外部开口闭合的临床评估,所述外部开口在基线时是溢液的,且至第24周关于中心盲化的MRI评估在3维的≥2个中不存在>2cm的经治疗的肛周瘘的集合物。闭合的临床评估被限定为尽管轻微的手指压迫仍无溢液。

[0021] 发明详述

[0022] 1. 定义

[0023] 如本文中所用,以下术语和短语应当具有下文所述的含义。除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0024] 冠词“一个/种(a/an)”是指一个/种或多于一个/种(即,至少一个/种)该冠词的语法对象。例如,“一个/种元素”是指一个/种元素或多于一个/种元素。

[0025] “脂肪组织”是指任何脂肪组织。脂肪组织可以为来源于皮下、网膜/内脏、乳腺、性腺或其他脂肪组织部位的棕色或白色脂肪组织。通常,脂肪组织是皮下白色脂肪组织。此类细胞可以包含原代细胞培养物或永生化的细胞系。脂肪组织可以来自具有脂肪组织的任何生物体。通常,脂肪组织是哺乳动物,最通常脂肪组织是人。脂肪组织的方便的来源为来自吸脂手术,然而,脂肪组织的来源或脂肪组织的分离方法对于本发明并非至关重要。

[0026] “脂肪组织来源的基质干细胞”或“ASC”是指起源于脂肪组织通常起源于人脂肪组织(hASC)的基质部分的间充质干细胞。

[0027] 术语“粘合剂”是指将表面结合或粘合在一起的任何物质;例如,胶。

[0028] 术语“生物医药产品”应理解为是指只是用于治疗用途的基于蛋白质或核酸的药物物质,其通常通过除从天然(非工程的)生物来源直接提取以外的方法产生。

[0029] 术语“细胞组合物”是指细胞制剂,除细胞外,该制剂可以包括非细胞组分,诸如细胞培养基,例如蛋白质、氨基酸、核酸、核苷酸、辅酶、抗氧化剂、金属等。此外,细胞组合物可以具有这样的组分,其不影响细胞组分的生长或活力,但被用于以特定形式(例如作为用于包封的聚合物基质或药物制剂)提供细胞。

[0030] “复杂性肛周瘘”为具有以下中的一种或多种的肛周瘘:

[0031] (i) 高的括约肌间、跨括约肌、括约肌外或括约肌上来源;

[0032] (ii) ≥2个外部开口;或

[0033] (iii) 相关的集合物。

[0034] 复杂性肛周瘘可以任选地具有最多2个内部开口和3个外部开口。此外,根据本发

明,在治疗之前,复杂性肛周瘘可能已溢液至少6周。

[0035] 术语“培养 (culture)”是指培养基中细胞、生物体、多细胞实体或组织的任何生长。术语“培养 (culturing)”是指实现此类生长的任何方法,并且可以包括多个步骤。术语“进一步培养”是指培养细胞、生物体、多细胞实体或组织至某个生长阶段,然后使用另一种培养方法将所述细胞、生物体、多细胞实体或组织引入另一生长阶段。“细胞培养”是指细胞的体外生长。在此类培养中,细胞增殖,但它们自身不组织成组织。“组织培养”是指组织(例如器官原基或成体器官的外植体)的体外维持或生长,以便保持其结构和功能。“单层培养”是指这样的培养,其中细胞在合适的培养基中繁殖,同时主要彼此连接并与基质连接。此外,“悬浮培养”是指这样的培养,其中细胞繁殖,同时悬浮于合适的培养基中。同样地,“连续流动培养”是指在连续流动的新鲜培养基中培养细胞或外植体以维持细胞生长(例如存活活力)。术语“条件培养基”是指在与培养的细胞接触一段时间后产生的上清液(例如,无培养的细胞/组织),使得培养基已被改变为包括由细胞产生并分泌至培养物中的某些旁分泌因子和/或自分泌因子。“铺满培养”是这样的细胞培养,其中所有细胞均接触,并因此培养器皿的整个表面被覆盖,以及意味着细胞也已达到它们的最大密度,尽管汇合并不一定意味着分裂将停止或者群体大小将不会增加。

[0036] 术语“培养基 (culture medium/medium)”在本领域是公认的,并且通常是指被用于培养活细胞的任何物质或制剂。如关于细胞培养所用的术语“培养基”,包括所述细胞周围环境的组分。培养基可以为固体、液体、气体或者相和物质的混合物。培养基包括液体生长培养基以及不维持细胞生长的液体培养基。培养基还包括凝胶状培养基,如琼脂、琼脂糖、明胶和胶原基质。示例性的气体培养基包括在有盖培养皿或者其他固体或半固体支持体上生长的细胞所被暴露于其中的气相。术语“培养基”还指打算被用于细胞培养的物质,即使其还未与细胞接触。换言之,制备的用于细菌培养的富含营养物的液体即为培养基。类似地,当与水或其他液体混合时变得适合细胞培养的粉末混合物,可以被称为“粉末状培养基”。“确定成分的培养基”是指由化学上确定的(通常为纯的)组分制成的培养基。“确定成分的培养基”不含有表征不充分的生物提取物(诸如酵母提取物和牛肉汤)。“丰富培养基”包括被设计为支持大多数或全部特定物种的存活形式的生长的培养基。丰富培养基通常包括复杂的生物提取物。“适合高密度培养物生长的培养基”为当其他条件(诸如温度和氧传递速率)允许此类生长时,允许细胞培养物达到3或更大的OD600值的任何培养基。术语“基础培养基”是指促进许多类型微生物生长的培养基,所述微生物不需要任何特别的营养补充物。大多数基础培养基通常包含4种基本的化学组:氨基酸、碳水化合物、无机盐和维生素。基础培养基通常用作更复杂培养基的基础,以向其中加入补充物(诸如血清、缓冲剂、生长因子、脂类等)。基础培养基的实例包括但不限于:伊格尔基础培养基(Eagles Basal Medium)、最小必需培养基、达尔伯克改良的伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、培养基199、营养混合物Ham's F-10和Ham's F-12、Mc Coy's 5A、达尔伯克MEM/F-I 2(Dulbecco's MEM/F-I 2)、RPMI 1640和伊思考夫改良的达尔伯克培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium,IMDM)。

[0037] 术语“包含 (comprise/comprising)”用于包括性、开放性含义,是指可以包括另外的元素。

[0038] 术语“Cx601”是指含有同种异体来源的人扩增的脂肪来源的干细胞(eASC)的无菌

缓冲盐溶液中的细胞悬浮液。在不含保存剂的一次性小管中提供这些细胞。以1.2亿个细胞(500万个细胞/mL)的剂量给予细胞,以用于病灶内注射。

[0039] 术语“分化”是指细胞表达标志物的形成,所述标志物已知与更特化和更接近成为不够进一步分裂或分化的终末分化细胞的细胞相关。例如,在胰腺情境下,可以在岛样细胞簇的产生中看到分化,所述岛样细胞簇含有增加比例的产生增加量的胰岛素的 $\beta$ -上皮细胞。术语“进一步的”或“更大的”分化是指这样的细胞,其相比它们被培养的细胞来源,更为特化和更接近成为不能够进一步分裂或分化的终末分化细胞。术语“最终分化”是指已成为不能进一步分裂或分化的终末分化细胞的细胞。

[0040] 如本文所用的术语“扩增的”,当提及细胞时,应理解为具有其在本领域的通常的含义,即已在体外增殖的细胞。制备eASC的方法为本领域已知,例如如W02007/039150中所描述的。可以扩增ASC以提供保留ASC的至少一种生物学功能(通常是在标准培养条件下贴附至塑料表面的能力)的细胞群。扩增的细胞群可以保留分化为一种或多种细胞类型的能力。

[0041] 术语“瘘”是指任何异常通道或联系或连接,通常位于两个内部器官之间,或者从内部器官引入至身体表面。瘘的实例包括但不限于:肛门直肠瘘或肛瘘或粪瘘、动静脉瘘或A-V瘘、胆瘘、子宫颈瘘、颅窦瘘、肠肠瘘、肠皮瘘、肠阴道瘘、胃瘘、子宫腹膜瘘、外淋巴瘘、肺动静脉瘘、直肠阴道瘘、脐瘘、气管食管瘘和膀胱阴道瘘。本发明涉及肛周瘘。

[0042] 本文所用的术语“包括”是指“包括但不限于”。“包括”和“包括但不限于”可互换使用。

[0043] “标志物”是指其存在、浓度、活性或磷酸化状态可以被检测并被用于鉴定细胞表型生物分子。

[0044] “间充质基质细胞”(在本文中也被称为“MSC”)为多能基质细胞(即,它们是能够产生多种不同类型的细胞的细胞),通常来源于结缔组织,并且为非造血细胞。MSC具有分化为体细胞(诸如中胚层细胞(例如,脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞))或向体细胞(诸如中胚层细胞(例如,脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞))分化,并且任选地分化为内胚层和/或外胚层细胞类型或谱系或向内胚层和/或外胚层细胞类型或谱系分化的能力。通常,所述细胞具有分化为选自脂肪细胞、成软骨细胞和成骨细胞谱系中的至少两种或全部细胞类型或向选自脂肪细胞、成软骨细胞和成骨细胞谱系中的至少两种或全部细胞类型分化的能力。ASC是MSC的一种类型,其获自脂肪组织的基质部分。MSC和ASC在标准培养条件下贴附至塑料。

[0045] “贴片”(patch)为被应用以覆盖或保护伤口或其他溃疡的敷料或覆盖物。

[0046] 通过本发明方法治疗的“患者”、“对象”或“宿主”可以指人或非人的动物。

[0047] 本文中采用的短语“药学上可接受的”是指那些化合物、物质、组合物和/或剂量形式,其在合理的医学判断的范围内,适合用于与人类和动物的组织接触而无过度的毒性、刺激性、过敏反应或者其他问题或并发症,与合理的益处/风险比相称。

[0048] 如本文所用的短语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的物质、组合物或媒介物(诸如液态或固态填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂),其包封物质,参与将主题化合物从身体的一个器官或一部分运载或运输至身体的另一个器官或另一部分。每种载体必须为“可接受的”,其含义为与制剂的其他组成部分相容,并且对患者无害。术语“表型”是指细胞的可观察特征,诸如大小、形态、蛋白表达等。

[0049] 术语“祖细胞”是指具有产生比其自身更为分化的子代的能力的细胞。例如,所述术语可以指未分化的细胞或分化为程度低于最终分化程度的细胞,其能够增殖并产生更多的祖细胞,所述祖细胞具有产生大量的可以继而产生分化的或可分化的子细胞的母细胞的能力。在优选的实施方案中,术语祖细胞是指广义的母细胞,其后代(子代)通常通过分化(例如通过获得完整的个体特征)在不同的方向特化,如胚胎细胞和组织的进行性多样化中发生的那样。细胞分化是一个复杂的过程,通常通过许多次的细胞分裂发生。分化的细胞可以来源于其自身即来源于多能细胞的多能细胞等。虽然这些多能细胞中的每个均可被认为是干细胞,但每个可以产生的细胞类型的范围可以变化很大。一些分化的细胞还具有产生更大发育潜能的细胞的能力。此类能力可以是天然的或者可以在经各种因素处理后被人为地诱导。通过这一定义,干细胞也可以为祖细胞,以及终末分化细胞的更直接的前体。

[0050] “增殖”是指细胞数目的增加。“增殖”(proliferating/proliferation)是指经历有丝分裂的细胞。

[0051] “难治的”应理解为是指当用于治疗疾病时无显著的临床获益,例如,无症状的显著改善(improvement)或改善(amelioration)。

[0052] 术语“缓解”是指瘘的成功治疗。“临床缓解”为尽管轻微的手指压迫,在基线时溢液的所有经治疗的外部开口的闭合。临床缓解的时间被限定为从治疗开始至具有临床缓解的首次患者评估的时间。“联合缓解”为该临床缓解加上通过MRI(磁共振成像)确认在经治疗的肛周瘘中,在3维的至少2维中不存在大于2cm的集合物。这通常通过盲化的中心MRI读取来确认。不存在集合物或脓肿是很重要的,因为如果未治愈,这些将导致新的瘘。

[0053] 术语“响应”是指尽管轻微的手指压迫(即,如临幊上评估的),在基线时溢液的所有经治疗的外部开口中的至少50%的闭合。因此,如果在基线时E0的数目为1或2,当1个E0闭合时即满足响应,并且如果在基线时存在3个E0,当2个E0闭合时即满足响应。响应的时间被限定为从治疗开始至响应的首次评估的时间。

[0054] 术语“复发”是指在先前评估时具有临床缓解的患者,其任何经治疗的外部开口的重新打开,根据临幊评估具有活跃的溢液,或者经MRI确认发展出经治疗的肛周瘘的大于2cm的肛周集合物。

[0055] 如本文中所用的,术语“溶液”包括药学上可接受的载体或稀释剂,其中本发明的细胞保持存活。

[0056] 术语“基本上纯的”,关于脂肪组织来源的干细胞群,是指脂肪组织来源的干细胞细胞群,其相对于构成总细胞群的脂肪组织来源的基质干细胞,为至少约75%,通常至少约85%,更通常至少约90%,且最通常至少约95%纯的。重新定义(Recast),术语“基本上纯的”是指在随后的培养和扩增之前,含有在原始的未扩增和分离的群体中的少于约20%,更通常少于约10%,最通常少于约5%的谱系定型的细胞的本发明的脂肪组织来源的基质干细胞群。

[0057] 如本文中所用的,“支持体”是指可以作为用于脂肪组织来源的基质干细胞生长的基础或基质的任何装置或材料。

[0058] 术语“缝合线”是指可以被用于将伤口缝合在一起的线或纤维或其他紧固材料。

[0059] 单个“管道”的瘘具有1个内部开口和1个外部开口。具有“多个管道”的瘘具有多于1个外部开口和/或多于1个内部开口。因此,多管道的瘘具有不同的分支。每个外部开口通

常代表一个管道。

[0060] 如本文所用的术语“治疗”是指修复瘘或伤口,以及防止瘘或伤口恶化或复发。

[0061] “治疗剂(Therapeutic agent/therapeutic)”是指能够对宿主具有所期望的生物学作用的试剂。化学治疗剂和遗传毒性剂是治疗剂的实例,其通常已知分别是与生物来源的相反化学来源的,或分别通过特定的作用机制引起治疗效果。生物来源的治疗剂的实例包括生长因子、激素和细胞因子。多种治疗剂是本领域已知的,并且可以通过它们的效果进行鉴定。某些治疗剂能够调节细胞增殖和分化。实例包括化学治疗性核苷酸、药物、激素、非特异性(非抗体)蛋白、寡核苷酸(例如,与靶核酸序列(例如mRNA序列)结合的反义寡核苷酸)、肽和模拟肽。

[0062] 2.含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物

[0063] 本发明涉及具有某些特征(诸如特定表型)的含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物。例如,可以通过细胞表面标志物的表达、大小、葡萄糖消耗、乳酸产生和细胞产量/存活力表征本发明的细胞组合物中的脂肪组织来源的基质干细胞。本发明的另一个方面涉及这样的含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物,其包括作为细胞组分的、具有特定表型的脂肪组织来源的基质干细胞或其子代的基本上纯的制剂。本发明的含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物不仅包括基本上纯的祖细胞群,还可以包括细胞培养物组分,例如培养基,其包括氨基酸、金属、辅酶因子,以及其他基质细胞的小群体,例如,其中一些可以由本发明的细胞随后分化产生。此外,其他非细胞组分可以包括使细胞组分适于在特定环境下支持例如植入,例如连续培养的那些非细胞组分,或适合用作生物材料或药物组合物的那些非细胞组分。

[0064] 在某些实施方案中,通过第3节中描述的培养方法产生含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物。

[0065] 优选的ASC是Cx601细胞。这些细胞的所推荐的(但未被确认的)国际非专有名称是“Adalextemcel”。

[0066] 在标准培养条件下,ASC贴附至塑料。

[0067] 扩增的ASC(eASC)在培养中展示出成纤维细胞样形态。具体地说,这些细胞大并且其形态特征在于具有很少的长而细的细胞凸起的浅的细胞体。细胞核大而圆,具有突出的核仁,使核具有清晰的外观。大多数eASC显示出这种纺锤形的形态,但通常情况是一些细胞获得了多边形形态(Zuk等人,2002)。

[0068] Cx601eASC对表面标志物HLAI、CD29、CD44、CD59、CD73、CD90和CD105呈阳性。因此,一个实施方案提供了含有eASC的组合物,其中至少约80%、至少约90%或至少约95%,或通常至少约96%、97%、98%或99%的eASC表达表面标志物HLA I、CD29、CD44、CD59、CD73、CD90和CD105。通常,至少约90%的eASC表达表面标志物HLAI、CD29、CD44、CD59、CD73、CD90和CD105。更通常,至少约95%的eASC表达表面标志物HLA I、CD29、CD44、CD59、CD73、CD90和CD105。

[0069] CX601eASC对HLAII、CD11b、CD11c、CD14、CD45、CD31、CD34、CD80和CD86呈阴性。因此,一个实施方案提供了含有eASC的组合物,其中少于约5%的eASC表达表面标志物HLAII、CD11b、CD11c、CD14、CD45、CD31、CD34、CD80和CD86。更通常,少于约4%、3%或2%的eASC表达表面标志物HLAII、CD11b、CD11c、CD14、CD45、CD31、CD34、CD80和CD86。在一个实施方案

中,少于约1%的eASC表达表面标志物HLA II、CD11b、CD11c、CD14、CD45、CD31、CD34、CD80和CD86。

[0070] 在一些实施方案中,eASC可能表达HLA I、CD29、CD44、CD59、CD73、CD90和CD105中的一种或多种(例如,两种或更多种、3种或更多种、4种或更多种、5种或更多种、6种或7种)。在一些实施方案中,eASC可能不表达HLA II、CD11b、CD11c、CD14、CD45、CD31、CD34、CD80中的一种或多种(例如,两种或更多种、3种或更多种、4种或更多种、5种或更多种、6种或更多种、7种或8种)。在一些实施方案中,eASC表达HLA I、CD29、CD44、CD59、CD73、CD90和CD105中的4种或更多种,并且不表达HLA II、CD11b、CD11c、CD14、CD45、CD31、CD34、CD80中的4种或更多种。

[0071] 根据本发明的某些实施方案扩增的人ASC被描述于DelaRosa等人(“Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells.”; *Tissue Eng Part A*.2009年10月;15(10):2795-806.doi:10.1089/ten.TEA.2008.0630),和Lopez-Santalla等人2015(“Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Experimental Autoimmune Arthritis by Modifying Early Adaptive T Cell Responses.” *STEM CELLS*,33:3493-3503.doi:10.1002/stem.2113)中。

[0072] 在一个实施方案中(如Lopez-Santalla等人2015中所描述的),将来自健康供体的人脂肪组织抽出物用磷酸盐缓冲盐水洗涤两次,并用0.075%的胶原酶(I型;Invitrogen)消化。将经消化的样品用10%胎牛血清(FBS)洗涤,用160mM NH<sub>4</sub>Cl处理消除去剩余的红细胞,并悬浮于含有10%FBS的培养基[达尔伯克改良的伊格尔培养基(DMEM)]中。将细胞接种(2-3·10<sup>4</sup>个细胞/cm<sup>2</sup>)在组织培养瓶中并扩增(37°C,5%CO<sub>2</sub>),每3-4天更换一次培养基。在它们达到90%汇合时,将细胞转移到新的细颈瓶中(10<sup>3</sup>个细胞/cm<sup>2</sup>)。将细胞扩增直至12-14次复制并冷冻。用来自两名男性和两名女性成年供体的细胞进行实验,群体倍增12-14次。在每次实验前,从相同的冷库中解冻ASC并接种。根据国际细胞治疗协会(International Society for Cellular Therapy)的标准来定义ASC,即:对HLA-I、CD73、CD90和CD105呈阳性,且对CD11b、CD14、CD31、CD34和CD45呈阴性。

[0073] 在另一个实施方案中(如DelaRosa等人2009所述的),用PBS将来自健康成年供体的人脂肪组织获得的脂肪抽出物洗涤两次,并在PBS中用18U/mL的I型胶原酶在37°C下消化30min。一个单位的胶原酶在37°C,pH 7.5(Invitrogen,Carlsbad,CA)下,在5小时内从胶原中释放出1mM的L-亮氨酸等同物。将经消化的样品用10%的胎牛血清(FBS)洗涤,用160mM NH<sub>4</sub>Cl处理,悬浮于培养基(含有10%FBS的DMEM)中,并通过40-mm尼龙网过滤。将细胞接种(2-3·10<sup>4</sup>个细胞/cm<sup>2</sup>)于组织培养瓶上,并在37°C和5%CO<sub>2</sub>下扩增,每7天更换培养基。在培养物达到90%的汇合时,将细胞传递至新的培养瓶(10008个细胞/cm<sup>2</sup>)。通过它们分化成软骨、成骨和成脂肪谱系的能力,对细胞进行表型表征。另外,通过用特定表面标志物染色来验证hASC。hASC对HLA-1、CD90和CD105呈阳性,且对HLA-II、CD40、CD80、CD86和CD34呈阴性。将来自六名健康供体(三名男性和三名女性,年龄为35至47岁)的汇集物用于所述研究中。使用的细胞为第4-6代。

[0074] 在一些实施方案中,ASC:(i)不表达特异性来自APC的标志物;(ii)不组成性地表达IDO;(iii)不显著地组成性地表达MHC II。通常,可以通过用IFN-γ刺激诱导IDO或MHC

II的表达。

[0075] 在一些实施方案中,所述ASC可能表达以下标志物中的一种或多种(例如两种或更多种、3种或更多种、4种或更多种、5种或更多种、6种或更多种、7种或更多种、8种或更多种、9种或更多种,或者10种或更多种(例如,多达13种)):CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49A、CD51、CD54、CD55、CD58、CD59、CD90和CD105。例如,ASC可能表达标志物CD29、CD59、CD90和CD105中的一种或多种(例如,两种、3种或全部),例如CD59和/或CD90。

[0076] 在一些实施方案中,MSC可能不表达以下标志物中的一种或多种(例如两种或更多种、3种或更多种、4种或更多种、5种或更多种、6种或更多种、7种或更多种、8种或更多种、9种或更多种,或者10种或更多种(例如,多达15种)):因子VIII、 $\alpha$ -肌动蛋白、肌间线蛋白、S-100、角蛋白、CD11b、CD11c、CD14、CD45、HLAII、CD31、CD34、CD45、STRO-1和CD133,例如,MSC不表达标志物CD34、CD45、CD31和CD14中的一种或多种(例如,两种、3中或全部),例如CD31和/或CD34。

[0077] 在一个实施方案中,提供了含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物,其中至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%,或者通常至少约96%、97%、98%或99%的干细胞表达CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49A、CD51、CD54、CD55、CD58、CD59、CD90和/或CD105标志物。在含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物的某些实施方案中,少于约15%、约10%、约5%,且通常约4%、3%、2%或1%的干细胞表达CD34、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD31、CD34、CD45、CD49f、CD102、CD104、CD106和/或CD133标志物。

[0078] 在另一个实施方案中,提供了含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物,其中至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%,或者通常至少约96%、97%、98%或99%的干细胞表达c-Kit、波形蛋白和/或CD90标志物。在含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物的某些实施方案中,少于约15%、约10%、约5%,且通常约4%、3%、2%或1%的干细胞表达CD34、因子VIII、 $\alpha$ -肌动蛋白、肌间线蛋白、S-100和/或角蛋白标志物。还提供了这样的脂肪组织来源的基质干细胞群,其表达c-Kit、波形蛋白和CD90标志物,且不表达CD34、因子VIII、 $\alpha$ -肌动蛋白、肌间线蛋白、S-100和角蛋白标志物。

[0079] 可以通过细胞的单独染色(流式细胞术),或者通过原位制作所述群体的组织切片进行通过表面标志物对细胞群的表型表征,其根据标准方法进行。通过抗体、免疫表型表征的表面标志物的表达谱的确定可以是直接的使用标记的抗体,或者是间接的使用针对细胞标志物的一级特异性抗体的二级标记的抗体,从而实现信号放大。另一方面,可以通过不同的方法确定与抗体结合的存在或不存在,所述不同的方法包括但不限于免疫荧光显微术和放射线照相术。类似地,可以通过流式细胞术进行抗体结合水平的监测,流式细胞术是允许将荧光染料的水平和与标记的抗体特异性结合的细胞表面上存在的抗原量进行关联的技术。细胞群上的一系列表面标志物的差异表达提供了用于鉴定和分离所述群体的方法。因此,通常可以使用FACS(荧光激活细胞分选)。

[0080] 在某些实施方案中,如下文中更详细描述的,含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物是在各种溶液或材料(例如,用作药物或生物材料)中的脂肪组织来源的基质干细胞的悬浮液。在一个实施方案中,细胞组合物包含在林格氏溶液和HSA中的主题脂肪组织来源

的基质干细胞的悬浮液。在另一个实施方案中,细胞组合物包含在材料(诸如聚合物、胶、凝胶等)中的主题脂肪组织来源的基质干细胞的悬浮液。可以例如通过以下方式制备此类悬浮液:从培养基中沉淀出主题脂肪组织来源的基质干细胞,并将它们重悬于所期望的溶液或材料中。可以例如通过离心、过滤、超滤等将细胞沉淀和/或更换出培养基。

[0081] 在含有脂肪组织来源的基质干细胞的主题组合物中的主题脂肪组织来源的基质干细胞的浓度可以为至少约 $5 \times 10^6$ 个细胞/mL、至少约 $10 \times 10^6$ 个细胞/mL、至少约 $20 \times 10^6$ 个细胞/mL、至少约 $30 \times 10^6$ 个细胞/mL,或者至少约 $40 \times 10^6$ 个细胞/mL。通常,所述浓度为约 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL至 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL,例如约 $5 \times 10^6$ 个细胞/mL至 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL。在实施例中报道的临床试验中,以500万个细胞/mL的浓度施用eASC。

[0082] 因此,本发明的另一个方面涉及主题脂肪组织来源的基质干细胞的子代,例如,已经来源于脂肪组织来源的基质干细胞的那些细胞。此类后代细胞可以包括随后几代的脂肪组织来源的基质干细胞,以及通过在将它们从外植体分离后诱导(例如,体外诱导)主题脂肪组织来源的基质干细胞的分化而产生的谱系定型的细胞。在某些实施方案中,在来自亲本群体的约2次、约3次、约4次、约5次、约6次、约7次、约8次、约9次或约10次传代后获得子代细胞。然而,可以在来自亲本群体的任何数目的传代后获得子代细胞。

[0083] 在某些实施方案中,将提供本发明的含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物作为药物制剂(例如无菌的,不存在不想要的病毒、细菌和其他病原体,以及无热原制剂)的一部分。也就是说,对于人类施用,主题组合物应满足FDA生物制剂标准办公室(FDA Office of Biologics standards)要求的无菌、致热原性以及一般安全性和纯度标准。

[0084] 关于移植宿主,扩增的脂肪组织来源的基质干细胞是同种异体的。由于难以获得足够的自体干细胞,来自同种异体的供体的脂肪组织来源的基质干细胞构成了用于治疗用途的干细胞的有价值的可替代的来源。本领域已知骨髓基质干细胞和脂肪组织来源的基质细胞在体外不引起同种异体的淋巴细胞的响应,并因此,可以将来源于供体的同种异体的脂肪组织来源的基质干细胞用于任何患者,而不考虑MHC的不相容。

[0085] 在本文中有详细描述向对象(特别是人类对象)施用含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物的方法,包括将细胞注射或植入至对象的靶位点,可以将细胞嵌入有助于通过注射或植入将细胞引入至对象中的递送装置中。此类递送装置包括用于将细胞和流体注射到受体对象体内管(例如导管)。在优选的实施方案中,管另外具有针(例如注射器),通过其可以在所期望位置将含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物引入至对象。可以将含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物以不同的形式嵌入至此类递送装置(例如注射器)中。例如,含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物包括这样的脂肪组织来源的基质干细胞的组合物,当被包含在此类递送装置中时,所述脂肪组织来源的基质干细胞的组合物悬浮于溶液中或被嵌入支持基质中。

[0086] 药学上可接受的载体和稀释剂包括盐水、水性缓冲溶液、溶剂和/或分散介质。此类载体和稀释剂的使用是本领域众所周知的。溶液通常是无菌的,并且存在易于注射程度的流动。通常,溶液在制备和储存条件下是稳定的,并且通过使用例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等保持不受微生物(诸如细菌和真菌)的污染作用。可以通过以下方式制备是本发明的脂肪组织来源的基质干细胞组合物的溶液:将如本文中所述的脂肪组织来源的基质干细胞掺入药学上可接受的载体或稀释剂,以及根据需要,上面列举

的其他组成部分中,然后过滤灭菌。

[0087] 可以用作药学上可接受的载体的材料和溶液的一些实例包括: (1) 糖类,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖; (2) 淀粉类,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉; (3) 纤维素及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素; (4) 粉末状黄蓍胶; (5) 麦芽; (6) 明胶; (7) 滑石粉; (8) 赋形剂,诸如可可油和栓剂蜡类; (9) 油,诸如花生油、棉花籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油; (10) 二醇类,诸如丙二醇; (11) 多元醇类,诸如甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇; (12) 酯类,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯; (13) 琼脂; (14) 缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝; (15) 海藻酸; (16) 无热原水; (17) 等渗盐水; (18) 林格氏溶液; (19) 乙醇; (20) pH缓冲溶液; (21) 聚酯类、聚碳酸酯类和/或聚酸酐类; 以及 (22) 药物制剂中采用的其他无毒相容的物质。

[0088] 在某些实施方案中,含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物还包含粘合剂。在某些实施方案中,所述粘合剂是基于纤维蛋白的粘合剂,诸如纤维蛋白凝胶或纤维蛋白胶,或者基于纤维蛋白的聚合物或粘合剂,或者其他组织粘合剂或外科胶,诸如例如氨基丙烯酸酯粘合剂、胶原、凝血酶和聚乙二醇。可以使用的其他材料包括但不限于: 藻酸钙、琼脂糖, I型、II型、IV型或其他胶原同种型, 聚乳酸/聚乙醇酸、透明质酸盐衍生物或其他材料 (Perka C. 等人 (2000) *J. Biomed. Mater. Res.* 49: 305-311; Sechriest VF. 等人 (2000) *J. Biomed. Mater. Res.* 49: 534-541; Chu CR 等人 (1995) *J. Biomed. Mater. Res.* 29: 1147-1154; Hendrickson DA 等人 (1994) *Orthop. Res.* 12: 485-497)。在其他实施方案中,所述粘合剂是液体绷带,其中将该方法的含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物与液体绷带材料混合。“液体绷带”是包含化合物(诸如聚合物材料)的溶液,其利用喷雾或刷子被应用于伤口上,然后通过蒸除去溶剂以在伤口上提供保护膜。

[0089] 还可以将本发明的含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物用于包被支持体(例如,医疗设备)。例如,支持物可以是缝合线或线。

[0090] 可以以本领域技术人员已知的任何方式(例如,通过浸泡、喷涂、涂抹、压印等)用细胞包被支持体。

[0091] 在一个实施方案中,支持体是缝合线、U形钉、可吸收的线、不可吸收的线、天然的线、合成的线、单丝线或复丝线(也被称为编织物)。制备包被有脂肪组织来源的基质干细胞的,用于闭合伤口的缝合线和其它支持体的优选方法公开于2005年2月14日递交的美国专利申请第11/056,241号“Biomaterial for Suturing”,,该申请通过引用整体并入。本文中公开的含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物代表了可以与美国专利申请第11/056,241号中公开的方法一起使用的新型组合物。

[0092] 此外,在任何含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物中,可以将至少一种治疗剂掺入所述组合物中(尽管不是必需的并且可以任选地被排除)。例如,组合物可以含有止痛剂以帮助治疗在瘘部位的炎症或疼痛,或者含有抗感染剂以防止用所述组合物治疗的部位的感染。

[0093] 更具体地,有用的治疗剂的非限制性实例包括以下治疗剂类别: 镇痛药,诸如非甾体类抗炎药、阿片类激动剂和水杨酸盐类; 抗感染剂,诸如驱虫药、抗厌氧菌药(antianaerobics)、抗生素、氨基糖苷类抗生素、抗真菌抗生素、头孢菌素抗生素、大环内酯类抗生素、杂β-内酰胺抗生素、青霉素类抗生素、喹诺酮类抗生素、磺胺类抗生素、四环素类

抗生素、抗分枝杆菌药、抗结核抗分支杆菌药、抗原虫药、抗疟抗原虫药、抗病毒剂、抗逆转录病毒剂、抗疥螨剂、抗炎剂、皮质类固醇抗炎剂、止痒剂/局部麻醉剂、局部抗感染剂、抗真菌局部抗感染剂、抗病毒局部抗感染剂；电解质和肾脏制剂，诸如酸化剂、碱化剂、利尿剂、碳酸酐酶抑制剂利尿剂、髓袢利尿剂、渗透性利尿剂、保钾利尿剂、噻嗪类利尿剂、电解质替代品和促尿酸尿剂；酶，诸如胰酶和溶栓酶；胃肠道制剂，诸如止泻剂、止吐药、胃肠道抗炎剂、水杨酸盐类胃肠道抗炎剂、抗酸抗溃疡剂、胃酸泵抑制剂抗溃疡剂、胃粘膜抗溃疡剂、H2阻断剂抗溃疡剂、胆石溶解剂、消化剂、催吐剂、轻泻剂和大便软化剂，以及促动力剂；全身麻醉剂，诸如吸入麻醉剂、卤代吸入麻醉剂、静脉内麻醉剂、巴比妥酸盐静脉内麻醉剂、苯二氮卓类静脉内麻醉剂，和阿片类激动剂静脉内麻醉剂；激素和激素调节剂，诸如堕胎药、肾上腺制剂、皮质类固醇肾上腺制剂、雄激素、抗雄激素，免疫生物制剂，诸如免疫球蛋白、免疫抑制剂、类毒素和疫苗；局部麻醉剂，诸如酰胺类局部麻醉剂和酯类局部麻醉剂；肌肉骨骼制剂，诸如抗痛风抗炎剂、皮质类固醇抗炎剂、金化合物抗炎剂、免疫抑制抗炎剂、非甾体类抗炎药 (NSAID)、水杨酸盐抗炎剂、矿物质；以及维生素，诸如维生素A、维生素B、维生素C、维生素D、维生素E和维生素K。

[0094] 优选的来自上述类别的有用的治疗剂类型包括：(1) 一般的镇痛药，诸如利多卡因或其衍生物，和非甾体类抗炎药 (NSAID) 镇痛药 (包括双氯芬酸、布洛芬、酮洛芬和萘普生)；(2) 阿片类激动剂镇痛药，诸如可待因、芬太尼、氢化吗啡酮和吗啡；(3) 水杨酸盐类镇痛药，诸如阿司匹林 (ASA) (肠溶包衣ASA)；(4) H1阻断剂抗组胺药，诸如克里马丁和特非那定；(5) 抗感染剂，诸如莫匹罗星；(6) 抗厌氧菌抗感染剂，诸如氯霉素和克林霉素；(7) 抗真菌抗生素抗感染剂，诸如两性霉素b、克霉唑、氟康唑和酮康唑；(8) 大环内酯类抗生素抗感染剂，诸如阿奇霉素和红霉素；(9) 杂β-内酰胺类抗生素抗感染剂，诸如氨曲南和亚胺培南；(10) 青霉素类抗生素抗感染剂，诸如萘夫西林、苯唑西林、青霉素G和青霉素V；(11) 喹诺酮类抗生素抗感染剂，诸如环丙沙星和诺氟沙星；(12) 四环素类抗生素抗感染剂，诸如强力霉素、米诺环素和四环素；(13) 抗结核抗分枝杆菌抗感染剂，诸如异烟肼 (INH) 和利福平；(14) 抗原虫抗感染剂，诸如阿托伐醌和氨苯砜；(15) 抗疟疾抗原虫抗感染剂，诸如氯喹和乙胺嘧啶；(16) 抗逆转录病毒抗感染剂，诸如利托那韦和齐多夫定；(17) 抗病毒抗感染剂，诸如阿昔洛韦、更昔洛韦、干扰素α和金刚烷乙胺；(18) 抗真菌局部抗感染剂，诸如两性霉素B、克霉唑、咪康唑和制霉菌素；(19) 抗病毒局部抗感染剂，诸如阿昔洛韦；(20) 电解质和肾脏制剂，诸如乳果糖；(21) 髓袢利尿剂，诸如呋塞米；(22) 保钾利尿剂，诸如氨苯蝶啶；(23) 噻嗪类利尿剂，诸如氢氯噻嗪 (HCTZ)；(24) 促尿酸尿剂，诸如丙磺舒；(25) 酶，诸如RNA酶和DNA酶；(26) 止吐药，诸如丙氯拉嗪；(27) 水杨酸盐类胃肠道抗炎剂，诸如柳氮磺胺吡啶；(28) 胃酸泵抑制剂抗溃疡剂，诸如奥美拉唑；(29) H<sub>2</sub>-阻断剂抗溃疡剂，诸如西咪替丁、法莫替丁、尼扎替丁和雷尼替丁；(30) 消化剂，诸如胰脂肪酶；(31) 促动力剂，诸如红霉素；(32) 酯类局部麻醉剂，诸如苯佐卡因和普鲁卡因；(33) 肌肉骨骼皮质类固醇抗炎剂，诸如倍氯米松、倍他米松、可的松、地塞米松、氢化可的松和强的松；(34) 肌肉骨骼抗炎症免疫抑制剂，诸如咪唑硫嘌呤、环磷酰胺和甲氨蝶呤；(35) 肌肉骨骼非甾体类抗炎药 (NSAID)，诸如双氯芬酸、布洛芬、酮洛芬、酮咯酸和萘普生；(36) 矿物质，诸如铁、钙和镁；(37) 维生素B化合物，诸如氰钴维生素 (维生素B12) 和烟酸 (维生素B3)；(38) 维生素C化合物，诸如抗坏血酸；和(39) 维生素D化合物，诸如骨化三醇。

[0095] 在某些实施方案中,治疗剂可以是生长因子或影响细胞分化和/或增殖的其他分子。诱导最终分化状态的生长因子在本领域是众所周知的,并且可以被选自己已经被显示诱导最终分化状态的任何此类因子。在某些实施方案中,用于本文中描述的方法的生长因子可以是天然存在的生长因子的变体或片段。例如,可以通过进行保守氨基酸改变,并在上文描述的功能测定的一种中或者在本领域已知的另一种功能测定中测试所产生的变体来产生变体。保守氨基酸取代是指具有相似侧链的残基的可互换性。例如,具有脂肪族侧链的一组氨基酸是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;具有脂肪族-羟基侧链的一组氨基酸是丝氨酸和苏氨酸;具有含酰胺侧链的一组氨基酸是天冬酰胺和谷氨酰胺;具有芳香族侧链的一组氨基酸是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;具有碱性侧链的一组氨基酸是赖氨酸、精氨酸和组氨酸;以及具有含硫侧链的一组氨基酸是半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代基团是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0096] 如本领域技术人员所理解的,可以使用常规技术,诸如诱变(包括产生离散点突变)或通过截短产生多肽生长因子的变体或片段。例如,突变可以产生变体,其保留与其所来源的多肽生长因子的生物活性基本上相同的或仅仅子集的生物活性。

[0097] 3.制备含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物的方法

[0098] 用于分离和培养ASC以提供本发明的eASC和细胞群,以及包含本发明的细胞群的组合物的方法是本领域已知的。通常,用于制备包含细胞群的组合物的方法包括以下步骤:

[0099] (i) 从脂肪组织的基质部分分离ASC,并通过贴附至合适的表面(例如塑料)来进行挑选;

[0100] (ii) 扩增ASC以提供包含eASC的本发明的细胞群。

[0101] 任选地,可以在扩增步骤(ii)期间和/或之后冷冻保存本发明的细胞群。任选地,可以在扩增步骤(ii)期间和/或之后评估本发明的细胞群的表型。任选地,可以在扩增步骤(ii)之后分离本发明的细胞群,并将其重悬于药学上可接受的载体和/或稀释剂中。

[0102] 可以通过本领域的任何标准方法获得ASC。通常,从来源组织(例如脂肪抽出物或脂肪组织)分离细胞(通常通过用消化酶如胶原酶处理组织)而获得所述细胞。然后,通常将经消化的组织物质通过约20 $\mu$ m至1mm的过滤器过滤。然后分离细胞(通常通过离心)并将其在贴附表面(通常为组织培养板或细颈瓶)上培养。此类方法是本领域已知的,并且例如,如美国专利第6777231号中所公开的。根据该方法,从脂肪组织和源自脂肪组织的细胞获得了脂肪抽出物。在该方法的过程中,可以洗涤细胞以去除污染的碎片和红细胞,优选地用PBS洗涤。用在PBS中的胶原酶消化细胞(例如在37℃下30分钟,0.075%胶原酶;I型,Invitrogen,Carlsbad,CA)。为了消除剩余的红细胞,可以洗涤(例如用10%胎牛血清)经消化的样品,用160mmol/L的C1NH4处理,最后悬浮于DMEM完全培养基(含有10%FBS、2mmol/L谷氨酰胺和1%青霉素/链霉素的DMEM)中。可以通过40- $\mu$ m尼龙网过滤细胞。

[0103] 在包含适于ASC贴附的表面(例如,塑料)的合适的组织培养容器中培养细胞。例如通过在合适的缓冲剂中洗涤来去除未贴附的细胞,以提供贴附的基质细胞(例如ASC)的分离群。可以将以这种方式分离的细胞接种(优选2-3x10<sup>4</sup>个细胞/cm<sup>2</sup>)至组织培养瓶上,并在37℃和5%CO<sub>2</sub>下扩增,每3-4天更换培养基。优选地从贴附表面分离(deattached)细胞(例如借助胰蛋白酶),并且当培养物达到约90%的汇合时,传递(“传代”)至新的培养瓶(1,000个

细胞/cm<sup>2</sup>）。

[0104] 优选地在无菌或GMP条件下进行细胞分离。

[0105] 在一个实施方案中,方法包括: (a) 从对象采集脂肪组织; (b) 通过酶消化获得细胞悬浮液; (c) 沉淀细胞悬浮液并将细胞重新悬浮于培养基中; (d) 将细胞培养至少约10天; 和 (g) 将细胞扩增至少两个培养传代。

[0106] 脂肪组织来源的基质干细胞是同种异体的,即,并非分离自最终的含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物将被引入的对象的脂肪组织。

[0107] 在某些实施方案中,将细胞培养至少约15天、至少约20天、至少约25天,或至少约30天。通常,培养中细胞的扩增提高了细胞群中细胞表型的同质性,从而获得了基本上纯的或同质的群体。

[0108] 在某些实施方案中,在培养中将细胞扩增至少3个培养传代或“传代至少3次”。在其他实施方案中,所述细胞被传代至少4次、至少5次、至少6次、至少7次、至少8次、至少9次或至10次。优选地,细胞被传代多于3次,以提高细胞群中细胞表型的同质性。确实,可以在培养中无限期地扩增细胞,只要细胞表型的同质性得到提高且分化能力得到维持。

[0109] 在某些实施方案中,细胞在培养中繁殖至少三次群体倍增。在某些实施方案中,将细胞在培养中扩增至少4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、15次或20次群体倍增。在某些实施方案中,将细胞在培养中扩增少于7次、8次、9次、10次、15次或20次群体倍增。在某些实施方案中,将细胞在培养中扩增约5次至10次群体倍增。在某些实施方案中,将细胞在培养中扩增约10次至15次群体倍增。

[0110] 在某些实施方案中,将细胞在培养中扩增约15次至20次群体倍增,例如约16次群体倍增。

[0111] 可以通过本领域已知的用于培养干细胞的任何技术培养细胞。关于各种培养技术以及它们的扩充的讨论可以在Freshney, R. I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 第4版, Wiley-Liss 2000中找到。可以使用培养瓶或适合大规模扩增的生物反应器对细胞进行扩增。适合间充质基质细胞大规模扩增的生物反应器可以商购,并且可以包括2D(即基本上为平面的)和3D扩增生物反应器。此类生物反应器的实例包括但不限于:活塞流生物反应器、灌注生物反应器、连续搅拌罐生物反应器、固定床生物反应器。在某些实施方案中,通过单层培养培养所述细胞。在一个实施方案中,按下面实施例A中所述的对细胞进行培养和传代。

[0112] 可以在组织培养中使用能够支持基质细胞的任何培养基。将支持成纤维细胞的生长的培养基配方包括但不限于:达尔伯克改良的伊格尔培养基(DMEM)、α改良的最小必需培养基(α.MEM),和洛斯维·帕克纪念研究所培养基1640(Roswell Park Memorial Institute Media 1640)(RPMI培养基1640)等。通常,将0至20%的胎牛血清(FBS)或1% - 20%的马血清加入上述培养基中,以支持基质细胞和/或软骨细胞的生长。然而,如果确定了用于基质细胞和软骨细胞的FBS中必需的生长因子、细胞因子和激素,并且在生长培养基中以适当的浓度提供,则可以使用确定成分培养基。可用于本发明方法的培养基可以含有一种或多种目标化合物,包括但不限于用于基质细胞的抗生素促有丝分裂或分化化合物。细胞将在湿润保温箱中,于31°C至37°C的温度下生长。将二氧化碳含量维持在2%至10%,且将氧含量维持在1%至22%。细胞可以在这种环境中维持长达4周的时间段。

[0113] 可以补充至培养基中的抗生素包括但不限于青霉素和链霉素。在化学成分确定的培养基中青霉素的浓度为约10至约200单位/ml。在化学成分确定的培养基中链霉素的浓度为约10至约200ug/ml。

[0114] 可以使用质粒、病毒或可替代的载体策略,用目标核酸稳定或瞬时转染或转导脂肪组织来源的基质干细胞。目标核酸包括但不限于编码基因产物的那些目标核酸,所述基因产物增强在待修复的组织类型(例如肠壁或阴道壁)中发现的胞外基质组分的产生。

[0115] 可以用通过氯化铯条带或其他方法纯化的病毒载体(腺病毒、逆转录病毒、腺相关病毒或其他载体),以10:1至2000:1的感染复数(病毒单元:细胞)进行携带调节基因的病毒载体至基质干细胞的转导。在阳离子去污剂(诸如聚乙烯亚胺或Lipofectamine.TM.)不存在或存在下,在无血清或含有血清的培养基中将细胞暴露至病毒1h至24h的时间段(Byk T.等人(1998)Human Gene Therapy 9:2493-2502; Sommer B.等人(1999)Calcif.Tissue Int.64:45-49)。

[0116] 用于将载体或质粒转移至干细胞的其他适合的方法包括脂质/DNA复合物,诸如描述于美国专利第5,578,475号、第5,627,175号、第5,705,308号、第5,744,335号、第5,976,567号、第6,020,202号和第6,051,429号中那些脂质/DNA复合物。适合的试剂包括脂转染胺,其为一种在膜过滤水中的聚阳离子脂质2,3-二油酰氧-N-[2(精胺羧基-酰胺)乙基]-N,N-二甲基-1-丙铵三氟乙酸(DOSPA)(化学文摘登记名称:N-[2-(2,5-双[(3-氨基丙基)氨基]-1--氧戊基]氨基]乙基]-N,N-二甲基-2,3-双(9-十八烯基氧基)-1-丙铵三氟乙酸)与中性脂质二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)的3:1(w/w)的脂质体制剂。示例性的为制剂Lipofectamine 2000TM(可从Gibco/LifeTechnologies购买,#11668019)。其他试剂包括:FuGENETM 6转染试剂(在80%乙醇中的非脂质体形式的脂质与其他化合物的混合物,可从Roche Diagnostics获得,#1814443);和LipoTAXITM转染试剂(脂质制剂,来自Invitrogen Corp.,#204110)。可以通过电穿孔进行干细胞的转染,例如,如M.L.Roach和J.D.McNeish(2002)Methods in Mol.Biol.185:1中描述的。用于产生具有稳定遗传改变的干细胞的合适的病毒载体系统可以是基于腺病毒和逆转录病毒的,并且可以使用可商购的病毒组分制备。

[0117] 可以将携带调节基因的质粒载体至干基质细胞的转染通过以下方式引入至细胞:在单层培养物中,通过使用磷酸钙DNA沉淀或阳离子去污剂方法(Lipofectamine.TM., DOTAP),或者在三维培养物中,通过将质粒DNA载体直接掺入至生物相容性聚合物中(Bonadio J.等人(1999)Nat.Med.5:753-759)。

[0118] 为了追踪和检测由这些基因编码的功能性蛋白质,病毒或质粒DNA载体将含有易于检测的标志基因,诸如绿色荧光蛋白或β-半乳糖苷酶,二者都可以通过组织化学方法进行追踪。

[0119] 4.治疗复杂性肛周瘘

[0120] 本发明涉及使用扩增的同种异体的脂肪组织来源的基质干细胞治疗克罗恩病患者的复杂性肛周瘘。脂肪组织来源的基质干细胞通常包含如本文所述的含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物,有时被称为“Cx601”。然而,可以将脂肪组织来源的基质干细胞的其他制剂用于本文描述的方法中,例如,诸如被描述于美国专利第6,777,231号和第6,555,374号,以及2005年2月25日提交的美国专利申请第11/065,461号“Identification and

Isolation of Multipotent Cells From Non-Osteochondral Mesenchymal Tissue”中的那些方法。

[0121] 实施例显示同种异体的eASC是用于克罗恩病患者的复杂性肛周瘘的一种出人意料地有效疗法,即使是对先前的治疗无响应的最难治的、非常复杂的瘘,通过单次给药能够提供快速和持久的治疗效果。例如,通常至约6周看到益处,并且所述益处通常从治疗持续至24周。

[0122] 在一个实施方案中,治疗克罗恩病患者的复杂性、难治性肛周瘘的方法包括病灶内将约1.2亿个扩增的同种异体的脂肪组织来源的基质干细胞注射至瘘的所有管道。为了避免怀疑,在本实施方案中,在单次过程中,向患者施用1.2亿个细胞,其中每个瘘管道接受至少一部分的该剂量。将大约一半的剂量注射至内部的一个或多个开口周围的组织。将另一半注射入全部沿着瘘管道的瘘壁(不深于2mm),制造出几个微泡。实施例中的数据显示这种单次给药能够在24周内或更少周内,甚至在约6周内或在约8周内提供联合缓解。因此,在一个实施方案中,治疗由1.2亿个eASC的这种单次的病灶内的施用组成。

[0123] 通常按例示临床试验中的进行病灶内注射,借此通过内部开口(用注射器通过肛门进入)和通过瘘管道壁(用注射器通过瘘的外部开口进入)注射细胞悬浮液。

[0124] 患者可以为男性或女性。患者通常为成年人。

[0125] 在一个实施方案中,首先去除可能存在的任何挂线。通常,在施用eASC之前刮除瘘。可以任选地缝合内部开口。然后用细长的针施用eASC。如上文所示的,将大约一半的剂量注射至缝合的内部开口周围的组织。将另一半注射至全部沿着瘘管道的瘘壁(不深于2mm),制造出几个微泡。

[0126] 在根据本发明治疗前,可以在筛选时进行骨盆MRI扫描来指导手术过程。患者也可在研究产品施用前 $\geq 2$ 周,按临床指示的进行瘘刮除术和挂线放置(图1)。如果放置了挂线,在研究产品施用前立即将其取出。

[0127] 待治疗的患者患有克罗恩病,通常为腔克罗恩病。通常,患者已经患有非活动性或轻度活动性腔克罗恩病,例如如通过 $\leq 220$ 的克罗恩病活动指数(CDAI)<sup>A24</sup>所限定的。患者可能已经患有克罗恩病至少6个月。

[0128] 患者患有至少一种复杂性肛周瘘。在一个实施方案中,患者不具有不能通过手术准备方案解决的直肠阴道瘘、直肠狭窄、肛门狭窄、活动性严重直肠炎(通过存在的表浅溃疡或深部溃疡来限定)、转移造口或者脓肿或 $>2$ cm的集合物。

[0129] 患者对于至少一种先前的药物疗法为难治性的。先前的疗法可能为小分子药物或生物学医药产品。通常,患者已接受所述治疗至少约4、6、12、18、24或36周,且仍然存在活动性疾病症状。换言之,即使在治疗至少约4、6、12、18、24或36周后,瘘的严重性未得到改善。先前的疗法可以为抗生素疗法,诸如环丙沙星或甲硝哒唑、免疫抑制剂疗法(例如,诸如咪唑硫嘌呤或6-巯基嘌呤的嘌呤类似物、诸如氟尿嘧啶的嘧啶类似物(pyrminidine analogue),或者诸如甲氨蝶呤的叶酸类似物);或者抗TNF疗法,诸如阿达木单抗(修美乐(Humira))、赛妥珠单抗(Cimzia)、依那西普(恩利(Enbrel))、高利单抗(欣普尼(Simponi))或英夫利昔单抗(类克(Remicade))。符合条件的患者通常对于以下治疗中的至少一种为难治性(无响应):在1个月的抗生素(例如,环丙沙星、甲硝哒唑)后;和/或在3个月的免疫抑制剂(例如,咪唑硫嘌呤、6-巯基嘌呤)后;和/或以稳定剂量引入或维持的抗TNF疗法(例如,英

夫利昔单抗、依那西普、阿达木单抗、赛妥珠单抗、高利单抗)。

[0130] 在一个实施方案中,患者为免疫抑制剂(例如,咪唑硫嘌呤、6-巯基嘌呤)和TNF- $\alpha$ 抑制剂(例如,英夫利昔单抗或阿达木单抗)难以治疗的。

[0131] 因此,典型的患者患有已诊断的非活动性腔克罗恩病(CDAI $\leqslant$ 220)至少6个月,具有含有1个或2个内部开口以及2个或3个外部开口的复杂性肛周瘘,其显示对抗生素、免疫抑制剂或抗TNF疗法中的一种或多种的响应不足。具有1个或2个内部开口以及3个外部开口的瘘为高度复杂的,且直至目前仍很难治疗。在另一个实施方案中,在根据本发明治疗时,患者正接受:(a)无抗TNF疗法且无免疫抑制剂疗法,或者(b)抗TNF疗法和免疫抑制剂疗法。特别出人意料的是eASC能够显著改善接受抗TNF和免疫抑制剂疗法的患者的联合缓解(在第24周),其为目前可用的最佳疗法(参见图3C)。

[0132] 复杂性肛周瘘具有至少两个外部开口,例如3个或更多个外部开口。一些瘘可能具有4个或5个外部开口。

[0133] 复杂性肛周瘘通常具有多个管道、至少两个内部开口或3个外部开口。瘘可以任选地包含这些特征中的两种或3种,例如:多个管道和至少两个内部开口;多个管道和3个外部开口;至少两个内部开口和3个外部开口;或者多个管道、至少两个内部开口和3个外部开口。在一个实施方案中,复杂性肛周瘘含有不多于两个内部开口和3个外部开口,例如,瘘由1个或2个内部开口以及2个或3个外部开口(例如,1I0/2E0、1I0/3E0、2I0/2E0或2I0/3E0)组成。

[0134] 在eASC施用后,可以任选地用抗生素治疗患者不多于4周。在整个治疗(例如,直至响应、临床缓解或联合缓解)中,可以将免疫抑制剂和抗TNF维持在稳定的剂量。

[0135] 通常排除没有接受过用于肛周瘘管性克罗恩病的先前治疗(包括抗生素)的患者,以及除了引流和挂线放置之外,接受过用于活动性瘘的先前手术的那些患者。如果患者在即将进行eASC治疗前4周内已经接受过糖皮质类固醇,则他们通常不符合治疗条件。在随访期间可以允许类固醇过程来治疗腔疾病恶化,采用40mg的初始剂量,经最多12周记录。

[0136] 在某些实施方案中,例如,其中首次递送的细胞是不足的,方法还可以包括进一步施用eASC。这种进一步施用可以包括:(c)向(任选地闭合的、缝合的)内部孔和瘘壁递送第二剂量的至少约 $20 \times 10^6$ 个细胞、至少约 $30 \times 10^6$ 个,或至少约 $40 \times 10^6$ 个脂肪组织来源的基质干细胞,例如约1.2亿个细胞,例如,在本发明的含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物中。

[0137] 在一些实施方案中,治疗对象的难治性、复杂性肛周瘘的方法包括:(a)用包含同种异体的eASC的缝合线闭合内部孔。用在含有脂肪组织来源的基质干细胞的主题组合物中的细胞包被的此类缝合线被详细描述于在2005年2月14日提交的美国专利申请第11/056,241号中,其通过引用并入本文。

[0138] 在一些实施方案中,方法还可以包括:深刮至少一个瘘管道;和/或用材料填充所述瘘管道。在某些实施方案中,方法还可以包括将例如来自主题细胞组合物的至少约 $10 \times 10^6$ 个脂肪组织来源的基质干细胞递送至材料。通常,材料为基于纤维蛋白的聚合物或粘合剂,诸如纤维蛋白胶或凝胶。在某些实施方案中,至少约 $10 \times 10^6$ 个脂肪组织来源的基质干细胞的剂量已被包含在材料中,例如,使得材料包含含有脂肪组织来源的干细胞的组合物。

[0139] 在另一个实施方案中,治疗对象的瘘的方法包括:

- [0140] (i) 深刮至少一个瘘管道
- [0141] (ii) 利用缝合线闭合经刮的管道的内部孔
- [0142] (iii) 将约1.2亿个同种异体的扩增的脂肪组织来源的基质干细胞递送至(任选地闭合的、缝合的)内部开口和瘘壁
- [0143] 例如,在本发明的含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物中。
- [0144] 不需要并且可以任选地排除细胞的进一步施用。然而,在某些实施方案中,方法还可以包括:
- [0145] (iv) 递送第二剂量的至少约 $20 \times 10^6$ 个细胞、至少约 $30 \times 10^6$ 个或至少约 $40 \times 10^6$ 个脂肪组织来源的基质干细胞,例如约1.2亿个eASC,通常至闭合的、缝合的内部开口,
- [0146] 例如,在本发明的含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物中。
- [0147] 通常,通过深刮所有待治疗的瘘管道来进行步骤(i),例如,将刮除术针引入至瘘管道中,并且通过刮瘘壁来产生诱导的出血,以便获得天然的纤维蛋白,其将填充瘘管道。发明人先前的临床研究表明,与使用人造纤维蛋白密封剂相比,通过这种刮的方法产生的天然纤维蛋白是优选的选择,因此,在本发明的方法的优选实施方案中,待治疗的瘘管道未用此类材料填充。
- [0148] 通过局部递送细胞(例如通过沿着瘘管道将含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物注射至瘘壁)来进行步骤(iv)。例如,沿3cm的瘘管道多次注射1千万个细胞。
- [0149] 可以通过本领域已知的任何方法(例如,通过切开、导管等)进入手术修复的瘘。
- [0150] 上述方法还可以包括向治疗的对象施用治疗剂,例如系统性地或在缝合位点局部地施用。在某些实施方案中,将脂肪组织来源的基质干细胞配制在含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物中,所述组合物含有如上所述的治疗剂。在其他实施方案中,单独施用治疗剂,例如,与所述方法同时施用、在进行所述方法之前施用,或者在进行所述方法之后施用。在一些实施方案中,在对对象进行所述方法之前、期间和之后将治疗剂施用至对象。示例性的治疗剂是上文描述的。在优选的实施方案中,向对象施用用于治疗克罗恩病的治疗剂。示例性的克罗恩病治疗剂为抗炎剂(诸如包含美沙拉嗪的试剂)、免疫抑制剂(诸如6-巯基嘌呤和咪唑硫嘌呤);生物试剂(诸如英夫利昔单抗(类克®)、抗生素)和止泻剂(诸如地芬诺酯、洛哌丁胺和可待因)。
- [0151] 可能需要支持性治疗。例如,可以根据本领域已知的方法,在治疗之前、期间和/或之后施用免疫抑制剂来防止GVHD。在施用前,也可以根据本领域已知的方法,将细胞修饰以抑制对象对细胞的免疫反应,或者反之亦然。
- [0152] 任何治疗剂的剂量将根据患者的症状、年龄和体重、待治疗或预防的病症的性质和严重程度、施用途径和试剂的形式而变化。可以以单次剂量或以分次剂量施用任何主题制剂。可以通过本领域技术人员已知的或本文中教导的技术容易地确定治疗剂的剂量。而且,可以施用多于一种治疗剂的混合物,或者在单独的组合物中施用多种治疗剂。
- [0153] 在给定患者中将产生最有效治疗的任何特定试剂的精确施用时间和量将取决于特定化合物的活性、药代动力学和生物利用度、患者的生理条件(包括年龄、性别、疾病类型和阶段、一般身体状况、对药物的给定剂量和类型的响应能力)、施用途径等。可以将本文提供的指南用于优化治疗,例如,确定施用的最佳时间和/或量,这将仅需要由监测对象和调整剂量和/或时间组成的常规实验。

[0154] 在治疗对象的同时,可以通过在24小时时间段期间的预定时间测量一个或多个相关指数来监测患者的健康状况。可以根据此类监测的结果优化治疗(包括施用的补充、量、时间和制剂)。可以通过测量相同的参数定期重新评估患者以确定改善的程度,首次此类的重新评估通常发生在治疗开始后的第4周末,并且在治疗期间的随后的重新评估每4至8周进行一次,然后治疗后每三个月进行一次。治疗可以持续数月或者甚至数年,其中最少一个月是人类治疗的典型长度。可以基于这些重新评估来进行对施用的试剂的量的调整和可能的对施用的时间的调整。

[0155] 本文中例示的瘘的联合缓解包括临床和放射学缓解。通常通过MRI(其为一种众所周知的技术)进行缓解的放射学评估。可替代地,可以使用其他成像技术(例如直肠内超声波检查)。这些成像技术评估脓肿或集合物的存在。

[0156] 可以用小于化合物的最佳剂量的较小剂量开始治疗。此后,可以通过小增量增加剂量,直到实现最佳治疗效果。

[0157] 几种治疗剂的联合使用可以减少任何单独组分的所需剂量,因为不同组分的起效和效果持续可能是互补的。在此类联合疗法中,不同的活性剂可以被一起或单独地,以及同时或在一天内的不同时间递送。

[0158] 可以通过标准药学程序在细胞培养物或实验动物(例如,用于测定LD<sub>50</sub>和ED<sub>50</sub>)中测定主题化合物的毒性和治疗功效,。展示大治疗指数的组合物是优选的。虽然可以使用展示毒性副作用的化合物,但应注意设计一种将试剂靶向至所期望的部位的递送系统以减少副作用。

[0159] 可以在配制一系列用于人的剂量中,使用从细胞培养物测定和动物研究中获得的数据。任何治疗剂或者可替代地其中任何组分的剂量通常位于具有很少毒性或无毒性的包括ED<sub>50</sub>一系列循环浓度内。剂量可以在该范围内变化,这取决于采用的剂量形式和所利用的施用途径。对于本发明的试剂,最初可以从细胞培养测定估计治疗有效剂量。可以在动物模型中配制剂量以达到如在细胞培养中确定的包括IC<sub>50</sub>(即,实现症状的半数最大抑制的测试化合物的浓度)的循环血浆浓度范围。可以将此类信息用于更准确地确定人的有用剂量。例如,可以通过高效液相色谱法测量血浆中的水平。

#### [0160] 5.临床响应和缓解

[0161] 本发明的同种异体的eASC在治疗克罗恩病患者的难治性、复杂性肛周瘘时出人意料地有效。在统计学上满足了主要终点,第24时的联合缓解;Cx601统计学上优于安慰剂。又一个关键的次要终点,第24周时的临床缓解和响应,满足了临界统计学显著性(分别为在ITT群体中,p=0.064&p=0.054;在mITT群体中,p=0.057&0.045)。

[0162] 数据表明接受单次施用的eASC的患者具有的比接受安慰剂的患者高出30%的实现临床缓解的可能性。数据还表明接受eASC的患者具有比接受安慰剂的患者高出约35%的实现临床响应的可能性。

[0163] 在某些实施方案中,在24周内(通常在18周内)实现临床缓解。可以在12周内或更少周内(例如在10周内或在8周内)实现临床缓解。可以任选地在6周后实现临床缓解。数据显示用Cx601的临床缓解的中值时间比用安慰剂的临床缓解的中值时间短约2倍(6.7周对14.6周)。因此,在一个实施方案中,在14周内实现临床缓解。

[0164] 在一些实施方案中,在24周内(通常在18周内)实现联合缓解。可以任选地在12周

内或更少周内(例如在10周内或在8周内)实现联合缓解。可以任选地在6周后实现联合缓解。

[0165] 在某些实施方案中,在11周或更少周内实现临床响应。数据显示临床响应的中值时间比用安慰剂的临床响应的中值时间也要短约2倍(6.3周对11.7周)。在某些实施方案中,临床响应的时间可以为10周或更少周、9周或更少周、8周或更少周。临床响应的时间可以任选地为7周或更少周(例如约6周)。

[0166] 当注意到是在单次施用eASC后观察到这些改善时,这些结果是特别出人意料的。

[0167] 肛周疾病活动指数“PDAI”包括5项类别:溢液、疼痛、性活动受限、肛周疾病的类型和硬化程度。每项类别基于5分制(five-point scale)分级,范围从无症状(评分0)至严重的症状(评分4)。在第6周、第12周和第18周,观察到eASC的肛周疾病活动指数评分的提高显著高于安慰剂的肛周疾病活动指数评分。因此,在某些实施方案中,在6周内、在12周内或在18周内实现PDAI的提高。PDAI的提高可以任选地为高于1.5个PDAI点,任选地至少2个PDAI点的提高。PDAI的提高可以任选地为指数的5个组分中的每一个的降低(提高)。

[0168] 6. 试剂盒

[0169] 在其他实施方案中,本发明涉及试剂盒,其包括含有脂肪组织来源的基质干细胞的组合物和任选地用于它们使用的说明书。包含本发明的药物组合物和生物材料的试剂盒也在本发明的范围内。试剂盒组分可以是经包装用于手动或者部分或完全自动化地实施上述方法。此类试剂盒可以具有多种用途,包括,例如治疗、修复、生物材料制备和其他应用。

## 实施例

[0170] 现在已整体上对本发明进行了描述,通过参考以下实施例将更容易地理解本发明,以下实施例被包括仅是为了说明本发明的某些方面和实施方案的目的,且不意指限制本发明。

[0171] III期临床试验

[0172] 本研究是首项以安慰剂为对照的3期研究,其评估了用于治疗克罗恩病患者的难治性、复杂性肛周瘘的单独或加入至现有医学疗法的Cx601的功效和安全性。

[0173] 总之,结果证明了同种异体的eASC适用于当瘘已经显示出对至少一种常规的或生物学疗法的响应不足时,治疗患有非活动性/轻度活动性腔克罗恩病的成年患者的复杂性肛周瘘。

[0174] 方法

[0175] 研究监督

[0176] 于2012年7月至2015年7月,在7个欧洲国家和以色列的49个医学中心进行这项3期随机化、双盲、平行组、以安慰剂为对照的研究(NCT01541579; EUDRACT 2011-006064-43)。方案得到了中心或当地伦理委员会的批准。所有患者均签署了知情同意书。

[0177] 本研究由ADMIRE指导委员会设计和实施(参见补充附录)。主办者(sponsor)收集了数据,由奇尔特恩国际生物统计局(Department of Biostatistics of Chiltern International)分析所述数据,并且由主办者和指导委员会一起解释数据。所有作者对数据都有完全使用权,同意提交用于出版的最终原稿的决定,并担保所报道数据的准确性和完整性。原稿由第一作者起草,且所有作者对后来的草稿均有贡献。

[0178] 患者

[0179] 符合条件的患者为18岁或更大年龄的成年人,其患有通过≤220的克罗恩病活动指数(CDAI)<sup>A24</sup>限定的≥6个月的非活动性或轻度活动性腔克罗恩病,并且患有在纳入前已经溢液≥6周的、具有最多2个内部开口和3个外部开口的复杂性肛周瘘(限定为以下中的一种或多种:高的括约肌间、跨括约肌、括约肌外或括约肌上来源;≥2个外部开口;或相关的集合物)。如果患者具有以下情形时被排除:不能通过手术准备方案解决的直肠阴道瘘、直肠和/或肛门狭窄和/或活动性严重直肠炎(通过存在的表浅溃疡或深部溃疡来限定)、转移造口,或者脓肿或>2cm集合物。符合条件的患者必须对被记录为无响应的以下治疗中的至少一种为难治性的:在1个月的抗生素(环丙沙星、甲硝唑)后和/或在3个月的免疫抑制剂(咪唑硫嘌呤、6-巯基嘌呤)和/或以稳定剂量引入或维持的抗TNF疗法后。仅对抗生素为难治性的患者占总群体的<25%。

[0180] 在研究产品施用后,可以用抗生素治疗患者不超过4周。在整个研究中将免疫抑制剂和抗TNF维持在稳定剂量。不允许这些试剂的起始反应或剂量增加。

[0181] 也排除没有接受过用于肛周瘘管性克罗恩病的先前治疗(包括抗生素)的患者,以及除了引流和挂线放置之外,接受过用于活动性瘘的先前手术的那些患者。如果患者在先前的4周内接受了糖皮质类固醇,则他们是不符合条件的。在随访期间允许类固醇过程来治疗腔病恶化,采用40mg的起始剂量,经最多12周记录。

[0182] 随机化和治疗

[0183] 在筛查时进行了骨盆MRI扫描以指导手术过程和中心盲化读取评估的集合物。另外,在研究产品施用前≥2周,患者按照临床指示接受了麻醉下检查、瘘刮除术和挂线放置(图1)。如果放置了挂线,必须在研究产品施用前立即将其取出。

[0184] 在研究产品施用前≥2周,在瘘前处理访问后,将患者以1:1比率随机分至Cx601或安慰剂组(图1)。基于随机化时的伴随性用药将患者分层(抗TNF和/或免疫抑制剂或二者均无)。使用由Linical生物统计局生成的预先建立的随机化表来分配治疗。

[0185] 在Cx601组中的患者接受了病灶内分配至瘘管道的单次注射的1.2亿个Cx601。如先前所述进行Cx601的分离和表达<sup>A23</sup>。在安慰剂组中的患者接受了相同体积的盐溶液。在去除挂线(如果存在)和刮瘘后,用细长的针施用研究治疗。一半的剂量被注射入缝合的内部开口周围的组织。另一半被注射入全部沿着瘘管道的瘘壁(不深于2mm),制造出几个微泡。

[0186] 治疗的盲化是不可能的,因为细胞悬液明显不同于盐溶液。通过由评估响应的未盲化的外科医生和盲化的胃肠病医生及放射科医生施用的治疗来维持双盲的研究设计。

[0187] 研究过程和随访

[0188] 在第6周、第12周、第18周和第24周,通过由研究者在经治疗的外部开口处检查自发溢液的存在及轻微手指压迫后的溢液来临床评估瘘闭合<sup>A12</sup>,并在第24周时通过盲化的、中心读取的骨盆MRI扫描来进行放射学评估瘘闭合;向中心读取人提供图来鉴定经治疗的瘘,但其对患者数据、检查顺序和所接受的治疗是盲化的。在所有研究访问时均评估了治疗突发不良事件(TEAE)。用肛周疾病活动指数(PDAI)<sup>A25</sup>评估了在基线和所有研究访问时的肛周克罗恩病的严重性。用炎性肠病调查表(IBDQ)<sup>A26</sup>和CDAI<sup>A24</sup>评估了在基线和第24周的生活质量。

[0189] 功效和安全终点

[0190] 主要终点为第24周时的联合缓解,其被限定为通过盲化的中心MRI读取(Bioclinica GmbH, Munich, 德国)确认的在基线时溢液的所有经治疗的外部开口的闭合的临床评估,和在3维的 $\geq 2$ 维中不存在经治疗的肛周瘘的 $>2$ cm的集合物。闭合的临床评估被限定为尽管轻微手指压迫仍不存在溢液<sup>A12</sup>。

[0191] 有2个关键的次要功效终点:至第24周时的临床缓解(即,基线时尽管轻微手指压迫仍溢液的所有经治疗的外部开口的闭合)和响应(即,基线时溢液的所有经治疗的外部开口的 $\geq 50\%$ 的闭合)。其他次要功效终点包括至第24周时的临床缓解时间、响应时间、PDAI、CDAI和IBDQ评分。

[0192] 根据监管活动医学词典(Medical Dictionary for Regulatory Activities)第17.0版进行编码TEAE。

#### [0193] 统计学分析

[0194] 待筛选的计划样本大小为278名患者,以便将 $\geq 208$ 名患者随机化(每组104名)。样本大小足够检测Cx601与安慰剂之间的具有联合缓解的患者百分比中最小25%的差异(预期的最小联合缓解比率为:Cx601的50%和安慰剂的25%<sup>A8, A12, A23, A27</sup>),其中 $\alpha$ 误差为0.025,且检测功效为80%,并且允许20%的患者中止本研究。

[0195] 对以下群体进行了功效分析:包括所有随机化的患者的意向治疗(ITT)群体、包括接受了研究治疗且具有 $\geq 1$ 次的基线后功效评估的所有随机化的患者的改良的ITT(mITT)群体,以及包括无大的方案偏差的所有经治疗的患者的符合方案集(PP)群体。在被限定为接受了研究治疗的所有患者的安全群体中分析TEAE。

[0196] 使用针对随机化层次(即,随机化时的克罗恩病治疗)调整的分层Cochran-Mantel-Haenszel检验分析主要终点。使用ITT群体进行主要分析。我们也提供了mITT群体的结果,因为它的定义更为类似在其他随机临床试验中的ITT群体并且提供了更可靠的治疗效果评估。使用末次观察值结转(LOCF)法估算缺失数据。如果至第24周末进行基线后MRI扫描或临床评估,则估算无响应/无缓解。如果在第24周前发生了抢救事件,也会估算无响应/无缓解。在主要终点的敏感性分析中探讨了抢救事件和缺失数据惯例(convention)对功效的影响。

[0197] 为了解决多重性的问题,用使用Hochberg测试程序<sup>A28</sup>来控制总体I型误差的以主要功效终点作为守门者(gatekeeper)的守门(gatekeeping)方法,将两个关键次要终点(至第24周时的临床缓解和响应)分组至短期家庭。用0.05的双侧I型误差水平评估统计学显著性。对于非关键的次要终点,未进行多重性的统计学调整。用利用Wald's渐进法计算的95%置信区间(CI)表示百分比和治疗差异。利用Kaplan-Meier估计分析临床缓解和响应的时间。用描述性统计提供安全性结果。

[0198] 使用SAS系统9.1.3版本或更新版本进行统计学分析(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)。

#### [0199] 结果

[0200] 筛选了总共289名患者,且在这些患者中,将212名随机分至Cx601组或安慰剂组(图2)。这2个组的基线特征相似(表1)。大多数的患者在过去的6个月已经接受过 $\geq 1$ 次的克罗恩病治疗。与安慰剂组的患者相比,Cx601组中较高比例的患者具有多管道瘘(分别为30.4%和46.6%)。总共有171名患者(80.7%)完成了24周的随访。在研究期间,Cx601组中

的1名患者和安慰剂组中的4名患者由于克罗恩病恶化而接受了类固醇。

[0201] 功效

[0202] 与安慰剂组的患者相比,显著更大比例的Cx601经治疗组的患者在第24周达到了联合缓解的主要终点,包括在ITT群体(分别为34.3%和49.5%;差异[97.5%CI]:15.2%[0.2-30.3];p=0.024])和mITT群体(35.6%和51.5%;15.8%[0.5-31.2];p=0.021;图3A和3B)中。在PP群体和在另外的敏感性分析中确认了这些结果(表S1)。在4个随机化层中Cx601的效果大于安慰剂,其中在随机化时未接受或接受了抗TNF和免疫抑制剂疗法的患者中观察到Cx601的数字上最大的效果(治疗差异分别为33.1%和20.0%;图3C)。

[0203] 在mITT群体中,至第24周,与安慰剂组相比,Cx601组中数字上更大比例的患者实现了临床缓解(分别为42.6%和55.3%;差异[95%CI]:12.8%[-0.8-26.4];p=0.057),并具有响应(分别为55.4%和68.9%;13.5%[0.3-26.7];p=0.045)。

[0204] 与安慰剂组相比,Cx601组的临床缓解的中值时间短约2倍(14.6[11.9-22.9]周,和6.7[95%CI,6.4-11.9]周),响应的中值时间也是如此(11.7[6.7-12.9]周,和6.3[6.0-6.6]周)。

[0205] 在mITT群体中,用Cx601的PDAI的提高显著大于用安慰剂的PDAI,包括在第6周(从基线治疗差异的改变[95%CI]:-1.0[-1.7至-0.3])、在第12周(-1.2[-2.0至-0.4]),和在第18周(-1.2[-2.0至-0.3]),但不包括在第24周(-0.8[-1.8至0.2])。对于总的和子区域IBDQ和CDAI评分,处理组之间没有显著性差异(表S2)。

[0206] 安全性

[0207] Cx601组和安慰剂组中经历TEAE的患者的百分比相似(分别为66.0%和64.7%;表2)。最常报告的TEAE为肛部痛、肛周脓肿和鼻咽炎。与Cx601组相比,安慰剂组中较高比例的患者经历了治疗相关的TEAE(分别为17.5%和29.4%),其中最常见到的为肛周脓肿和肛部痛。大多数的TEAE为轻度强度或中度强度的。很少的患者由于TEAE而退出本研究(4.9%和5.9%),然而Cx601组中稍高比例的患者经历了严重的TEAE(17.5%和13.7%)。最常见的严重TEAE为肛周脓肿(Cx601:8.7%;安慰剂:6.9%)。无死亡出现。

[0208] 讨论和综述

[0209] 这是治疗患有克罗恩病的患者的复杂性、治疗难治的肛周瘘的首项大规模的、随机的、以安慰剂为对照的临床研究。在患有复杂性肛周瘘且常规或生物学疗法失败的患者的治疗困难的研究群体中,用单独Cx601或加入至现有医学疗法中的Cx601治疗的1/2的患者在第24周时实现了联合的临床和放射学缓解。这一结果在所有统计学群体中均保持一致,尽管在Cx601组中的患者具有更多的多管道瘘。因此,本研究结果显示Cx601为治疗难治的患者的复杂性肛周瘘提供了替代激进的手术方法的首个真正闭合的方法。

[0210] 联合的临床和放射学缓解的主要终点比用于治疗克罗恩病的肛周瘘的治疗的其他随机化临床研究使用的联合的临床和放射学缓解的主要终点更为严格,所述用于治疗克罗恩病的肛瘘肛周瘘的治疗的其他随机化临床研究通常评估临床响应(即,溢液瘘数目的 $\geq 50\%$ 减少)或临床缓解<sup>A8, A12</sup>。这是使用了如欧洲克罗恩病和结肠炎组织指南(European Crohn's and Colitis Organisation guidelines)<sup>A29</sup>中建议的临床评估瘘闭合和MRI评估无脓肿的首项大规模的、随机的临床试验。

[0211] 次要的功效分析强化了Cx601的临床益处。用Cx601,临床缓解和响应的时间快,发

生的时间为安慰剂组中发生时间的一半。Cx601组和安慰剂组之间的临床缓解速度的差异未达到统计学显著性,这是由于“安慰剂”效应(42.6%)显著高于比先前研究中预期和观察到的“安慰剂”效应(13-19%)<sup>A8,A12,A27</sup>。根据随机化层次的安慰剂效应(即,用伴随性的抗TNF和免疫抑制剂最高[46.7%]且二者均无的治疗最低[21.1%])表明本研究中的较高的安慰剂效应可能是由于伴随性用药驱使的。手术引流和内部孔口闭合也可能具有增加的安慰剂响应。虽然在Cx601组中见到PDAI评分的有利提高,但处理组之间的IBDQ和CDAI评分没有差异。这可能是由于基线时低的CDAI(纳入标准)和高的IBDQ。

[0212] 安全性数据表明Cx601在研究群体中耐受良好,这与先前的1/2a期研究的结果<sup>A23</sup>一致。处理相关的TEAE在安慰剂组中发生更为频繁,并因此可能涉及疾病的自然过程或手术研究过程。有利的安全特性可提供相比抗TNF疗法的优势,所述抗TNF疗法与几个严重的安全性问题相关,这源自对药物的免疫原性和增加的感染风险(包括结核病)<sup>A30,A31</sup>。

[0213] 本研究的结果令人鼓舞,考虑了患有克罗恩病和复杂性肛周瘘的患者需要有效和耐受良好的新的治疗选择。本研究对于患有治疗难治的、复杂性肛周瘘的克罗恩病患者的护理也具有重要的影响,因为他们中的许多目前必须反复接受手术,这存在损害括约肌,引起大便失禁的风险。结果是,12-38%的患有肛周瘘管性疾病的患者需要直肠切除术<sup>A32</sup>。相反,Cx601的施用为微创性的,且可以在门诊患者环境中进行。

[0214] 本试验的局限性为排除具有多于2个内部开口和3个外部开口的患者,以及除引流和挂线放置外进行了先前手术的那些患者。此外,未确定TEAE是否与手术过程有关。

[0215] 总之,Cx601是用于对常规和/或生物学治疗响应失败的克罗恩病的复杂性肛周瘘的有效和安全疗法。

[0216] 表1.患者特征(安全性群体)。

变量	Cx601 (N=103)	安慰剂 (N=102)
年龄-岁	38.9 (13.1)	37.6 (13.2)
男性-数量(%)	57 (55.3)	54 (52.9)
种族-数量(%)		
白种人	96 (93.2)	93 (91.2)
黑种人	4 (3.9)	1 (1.0)
其他	0	1 (1.0)
缺失的	3 (2.9)	7 (6.9)
体重-kg	73.3 (14.4)	71.4 (15.0)
CD 持续时间-年	11.8 (9.8)	11.4 (9.0)
过去 6 个月的先前 CD 用药-数量(%)		
抗生素	78 (75.7)	72 (70.6)
免疫抑制剂	87 (84.5)	74 (72.5)
[0217]    抗 TNF	80 (77.7)	82 (80.4)
伴随性的 CD 用药(层化因子)-数量(%)		
抗 TNF	36 (35.0)	32 (31.4)
免疫抑制剂	16 (15.5)	21 (20.6)
抗 TNF + 免疫抑制剂	27 (26.2)	30 (29.4)
均无	24 (23.3)	19 (18.6)
肛周克罗恩病活动指数*	6.7 (2.5)	6.5 (2.9)
瘘开口-数量(%)		
0 个内部+1 个外部	0	1 (1.0)
1 个内部+1 个外部	55 (53.4)	70 (68.6)
1 个内部+2 个外部	23 (22.3)	17 (16.7)
1 个内部+3 个外部	4 (3.9)	3 (2.9)
2 个内部+1 个外部	3 (2.9)	2 (2.0)
2 个内部+2 个外部	14 (13.6)	8 (7.8)
2 个内部+3 个外部	4 (3.9)	1 (1.0)

	克罗恩病活动指数†	87.8 (48.3)	92.5 (55.3)
[0218]	炎性肠病调查表‡	173.5 (31.6)	169.8 (36.2)
	C 反应蛋白- mg/L	7.9 (11.5)	6.3 (9.5)
	血红蛋白- mmol/L	8.3 (0.8)	8.3 (0.8)

[0219] CD, 克罗恩病; Cx601, 同种异体的、扩增的脂肪组织来源的干细胞; TNF, 肿瘤坏死因子。

[0220] 数据为均值(标准偏差), 除非另有说明。

[0221] \*肛周克罗恩病活动指数的评分范围可以为0至20; 较高的评分指示更严重的疾病。

[0222] †克罗恩病活动指数的评分范围可以为0-600; 较高的评分指示更严重的疾病。

[0223] ‡炎性肠病调查表的评分范围可以为32至224; 较高的评分指示较好的生活质量。

[0224] 表2. 直到第24周的治疗突发不良事件(安全性群体)。

TEAE-数量(%)	Cx601 (N=103)	安慰剂(N=102)
总共	68 (66.0)	66 (64.7)
引起研究取消的 TEAE	5 (4.9)	6 (5.9)
严重的 TEAE	18 (17.5)	14 (13.7)
在≥5.0%的患者中的 TEAE*		
肛部痛	13 (12.6)	11 (10.8)
肛周脓肿	12 (11.7)	13 (12.7)
[0225]    鼻咽炎	10 (9.7)	5 (4.9)
腹泻	7 (6.8)	3 (2.9)
腹痛	4 (3.9)	6 (5.9)
瘘	3 (2.9)	6 (5.9)
治疗相关的 TEAE	18 (17.5)	30 (29.4)
在≥2.0%的患者中的治疗相关的 TEAE*		
肛周脓肿	6 (5.8)	9 (8.8)
肛部痛	5 (4.9)	9 (8.8)
[0226]    操作痛	1 (1.0)	2 (2.0)
瘘溢液	1 (1.0)	2 (2.0)
硬化	0	2 (2.0)

[0227] TEAE, 治疗突发不良事件; Cx601, 同种异体的、扩增的脂肪组织来源的干细胞; \*在任何一个处理组中。

[0228] 表S1. 主要终点的支持性和敏感性分析:联合缓解。\*

分析类型	分析组	处理缺失数据的细节	Cx601 (%)	安慰剂 (%)	差异(%)		p 值
					(97.5% CI)		
支持性	ITT	估算所有缺失数据且在抢救治疗后(无 LOCF)的无响应/无缓解	48.6	32.4	16.2	(1.3–31.1)	0.014
支持性	PP1†	在抢救治疗后估算应用 LOCF 无响应/无缓解	57.0	36.9	20.1	(3.3–36.9)	0.010
[0229]	支持性	PP2‡ 在抢救治疗后估算无响应/无缓解	63.2	39.7	23.4	(5.6–41.3)	0.005
	敏感性	ITT 缺失的=应用 LOCF 后的无响应/无缓解。急救用药不认为是失败	49.5	34.3	15.2	(0.2–30.3)	0.024
	敏感性	ITT 缺失的=应用 LOCF 后的无响应/无缓解。包括层化因子的 Logistic 分析且基线外部开口的数量作为因子	49.5	34.3	NA		0.017

[0230] CI, 置信区间; Cx601, 同种异体的、扩增的脂肪组织来源的干细胞; ITT, 意向治疗; LOCF, 末次观察值结转; NA, 不适用的; PP, 符合方案集; TNF, 肿瘤坏死因子。

[0231] 抢救治疗被限定为40mg强的松等同物的肾上腺皮质类脂醇, 维持≥12周; 与基线疗法相比的新的抗TNF疗法, 维持≥8周; 与基线疗法相比的新的免疫抑制剂疗法, 为期≥12周; 或者对经治疗的瘘进行手术干预。

[0232] \*至第24周基于中心盲化的MRI评估, 在基线时溢液的所有经治疗的外部开口的闭合的临床评估, 和在3维中的≥2维中的不存在经治疗的肛周瘘的>2cm的集合物。闭合的临床评估被限定为尽管轻微手指压迫仍不存在溢液。

[0233] †PP1群体包括无大的方案偏差的那些患者 (Cx601, n=86; 安慰剂, n=84)。

[0234] ‡PP2群体包括完成了24周访问的PP1患者 (Cx601, n=76; 安慰剂, n=73)。

[0235] 表S2. 直到第24周的来自克罗恩病活动指数 (CDAI) \*和炎性肠病调查表 (IBDQ) †评

分的患者报告的结果 (mITT群体)。

CDAI	Cx601	安慰剂	治疗差异(95% CI)
	(N=103)	(N=101)	
<b>总共</b>			
基线	87.8 (48.3)	93.3 (55.0)	
第 24 周	92.5 (66.5)	94.1 (76.1)	
自基线的改变	5.7 (62.2)	2.2 (65.5)	1.8 (-16.0 至 19.7)
<b>液状粪便数量</b>			
[0236]			
基线	9.8 (12.3)	9.3 (9.4)	
第 24 周	9.5 (12.6)	10.0 (12.6)	
自基线的改变	-0.0 (9.5)	0.9 (10.7)	-0.7 (-3.4 至 2.1)
<b>腹痛</b>			
基线	1.6 (2.9)	2.0 (3.1)	
第 24 周	2.7 (4.5)	3.0 (4.1)	
自基线的改变	1.1 (4.4)	0.9 (4.0)	-0.1 (-1.2 至 1.1)
<b>总体健康</b>			

基线	2.7 (3.7)	3.2 (4.1)	
第 24 周	3.1 (4.6)	3.3 (4.7)	
自基线的改变	0.6 (4.5)	0.3 (4.5)	0.1(-1.1 至 1.3)
<b>IBDQ</b>	<b>Cx601</b>	<b>安慰剂</b>	<b>治疗差异(95% CI)</b>
	(N=103)	(N=101)	
<b>总共</b>			
基线	173.5 (31.6)	169.4 (36.1)	
第 24 周	178.3 (34.6)	174.7 (36.2)	
自基线的改变	3.8 (25.5)	4.0 (25.6)	0.3 (-6.6 至 7.3)
<b>肠功能</b>			
基线	57.1 (9.2)	56.6 (9.9)	
第 24 周	57.2 (10.2)	56.4 (9.8)	
[0237] 自基线的改变	0.0 (7.6)	-0.6 (8.2)	0.5 (-1.6 至 2.7)
<b>情绪状态</b>			
基线	62.9 (14.5)	61.4 (15.2)	
第 24 周	64.7 (15.6)	63.9 (15.3)	
自基线的改变	1.7 (11.3)	2.1 (11.2)	-0.3 (-3.3 至 2.7)
<b>系统性症状</b>			
基线	25.8 (5.2)	24.9 (6.5)	
第 24 周	26.2 (5.9)	25.6 (6.3)	
自基线的改变	0.3 (4.7)	0.6 (5.1)	-0.1 (-1.4 至 1.2)
<b>社会功能</b>			
基线	27.7 (6.9)	26.5 (8.4)	
第 24 周	29.5 (7.3)	28.4 (8.0)	
自基线的改变	1.6 (6.4)	1.7 (6.0)	0.3 (-1.3 至 2.0)

[0238] CI,置信区间;Cx601,同种异体的、扩增的脂肪组织来源的干细胞;mITT,改良的意向治疗。

[0239] 数据为均值(标准偏差)。

[0240] \*克罗恩病活动指数(CDAI)的评分范围可以为0至600;较高的评分指示较严重的疾病。

[0241] †炎性肠病调查表(IBDQ)的评分范围可以为32至224;较高的评分指示较好的生活质量。

[0242] 参考文献

[0243] 除非另有指示,本发明的实施将采用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术,其属于本领域的技术范围内。此类技术在文献中有完整的解释。参见,例如Molecular Cloning A Laboratory Manual,第二版,由Sambrook,Fritsch和Maniatis编辑(Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989);DNA Cloning,第I卷和第II卷(D.N.Glover编辑,1985);Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编辑,1984);Mullis等人,美国专利第4,683,195号;Nucleic Acid Hybridization(B.D.Hames&S.J.Higgins编辑,1984);Transcription And Translation(B.D.Hames&S.J.Higgins编辑,1984);Culture Of Animal cells(R.I.Freshney,Alan R.Liss,Inc.,1987);Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press,1986);B.Perbal,A Practical Guide To Molecular Cloning(1984);the treatise,Methods In Enzymology(Academic Press,Inc.,N.Y.);Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(J.H.Miller和M.P.Calos编辑,1987,Cold Spring Harbor Laboratory);Methods In Enzymology,第154卷和第155卷(Wu等人编辑),Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(Mayer和Walker编辑,Academic Press,伦敦,1987);Handbook Of Experimental Immunology,卷I-IV(D.M.Weir和C.C.Blackwell编辑,1986);Manipulating the Mouse Embryo,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1986)。

[0244] 本文中提及的所有出版物和专利,包括下面列出的那些项,在此通用引用完整并入本文中,就像每个单独的出版物或专利被特别地且单独地指示通过引用并入。在存在冲突的情况下,将以本申请(包括本文中的任何定义)为准。

[0245] 1. American Gastroenterological Association Medical Position Statement:Perianal Crohn's Disease.Gastroenterology (2003) 125:1503-1507.

[0246] 2. Levy C, Tremaine WJ. Inflamm Bowel Dis (2002) 8 (2) :106-11.

[0247] 3. Pennincke F, D'Hoore A, Filez L. Acta Gastroenterol Belg (2001) 64 (2) :223-226.

[0248] 4. Rius J, Nessim A, Nogueras JJ, Wexner SD. Eur J Surg (2000) 166 (3) :218-222.

[0249] 5. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Plastic Reconstr Surg (2002) 109 (1) :199-209.

[0250] 6. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Tissue Eng (2001) 7 (2) :211-228.

[0251] 7. Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Gomez-Garcia L et al. Int J Colorectal Dis (2003) 18:451-454.

[0252] 8. Abkowitz JL. New Engl J Med (2002) 346 (10) :770-772.

[0253] 9. Matsubara H. Lancet (2004) 363:746-747.

[0254] 10. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, et al. Nat Biotechnol. (2004) 22 (5) :560-7

[0255] 11. Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo MA. New Eng J Med (2003) 349:1480-1481.

[0256] 12. Osawa M., Hanada K., Hanada H. and Nakauchi H. (1996) Science 273, 242-245.

[0257] 13. Morrison S.J., Uchida N. and Weissman I.L. (1995) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 11, 35-71.

- [0258] 14. Ivanova N.B., Dimos J.T., Schaniel C., Hackney J.A., Moore K.A., Lemischka\*I.R. (2002) *Science* 298, 601-604.
- [0259] 15. Phillips RL. (2000) *Curr Top Microbiol Immunol.* 251, 13-19.
- [0260] 16. Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. (2002) *Science* 298, 597-600.
- [0261] 17. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. (2003) *Cells Tissues Organs* 174 (3), 101-109.
- [0262] 18. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN, *Exp Hematol.* (1976) Sep; 4 (5) :267-74.
- [0263] 19. Caplan AI *J Orthop Res.* (1991) Sep; 9 (5) :641-50
- [0264] 20. Pittenger, M.F. et al. (1999) *Science* 284: 143-147
- [0265] 21. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME, *J Cell Sci.* (1992) Jun; 102 (Pt 2) :341-51
- [0266] 22. Yoo JU, Johnstone B, *Clin Orthop.* (1998) Oct; (355 Suppl) :S73-81
- [0267] 23. Wakitani S. et al. (1995) *Muscle Nerve* 18: 1417-1426.
- [0268] 24. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI, *Bone*. 1992; 13 (1) :81-8.
- [0269] 25. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR, *Exp Neurol.* (2000) Aug; 164 (2) :247-56.
- [0270] 26. Rogers JJ, Young HE, Adkison LR, Lucas PA, Black AC Jr, *Am Surg.* (1995) Mar; 61 (3) :231-6.
- [0271] 27. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM, *Exp Hematol.* (2002) Aug; 30 (8) :896-904.
- [0272] 28. Caplan AI, Bruder SP, *Trends Mol Med.* (2001) Jun; 7 (6) :259-64.
- [0273] 29. Stanford, C.M. et al. (1995) *J Biol Chem* 270: 9420-9428.
- [0274] “A”参考文献
- [0275] A1. Baumgart DC, Sandborn WJ. *Crohn's disease.* *Lancet* 2012; 380: 1590-605.
- [0276] A2. Schwartz DA, Loftus EV, Jr., Tremaine WJ, et al. *The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota.* *Gastroenterology* 2002; 122: 875-80.
- [0277] A3. Eglinton TW, Barclay ML, Gearry RB, Frizelle FA. *The spectrum of perianal Crohn's disease in a population-based cohort.* *Dis Colon Rectum* 2012; 55: 773-7.
- [0278] A4. Hellers G, Bergstrand O, Ewerth S, Holmstrom B. *Occurrence and outcome after primary treatment of anal fistulae in Crohn's disease.* *Gut* 1980; 21: 525-7.
- [0279] A5. Scharl M, Rogler G. *Pathophysiology of fistula formation in Crohn's*

disease. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014;5:205-12.

[0280] A6. Nielsen OH, Rogler G, Hahnloser D, Thomsen OO. Diagnosis and management of fistulizing Crohn's disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2009;6:92-106.

[0281] A7. Bell SJ, Williams AB, Wiesel P, Wilkinson K, Cohen RC, Kamm MA. The clinical course of fistulating Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17:1145-51.

[0282] A8. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, et al. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004;350:876-85.

[0283] A9. Thia KT, Mahadevan U, Feagan BG, et al. Ciprofloxacin or metronidazole for the treatment of perianal fistulas in patients with Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:17-24.

[0284] A10. Present DH, Korelitz BI, Wisch N, Glass JL, Sachar DB, Pasternack BS. Treatment of Crohn's disease with 6-mercaptopurine. A long-term, randomized, double-blind study. *N Engl J Med* 1980;302:981-7.

[0285] A11. Pearson DC, May GR, Fick GH, Sutherland LR. Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 1995;123:132-42.

[0286] A12. Present DH, Rutgeerts P, Targan S, et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999;340: 1398-405.

[0287] A13. Domenech E, Hinojosa J, Nos P, et al. Clinical evolution of luminal and perianal Crohn's disease after inducing remission with infliximab: how long should patients be treated? *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:1107-13.

[0288] A14. Goldstein ES, Marion JF, Present DH. 6-Mercaptopurine is effective in Crohn's disease without concomitant steroids. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:79-84.

[0289] A15. Korelitz BI, Present DH. Favorable effect of 6-mercaptopurine on fistulae of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1985;30:58-64.

[0290] A16. Brandt LJ, Bernstein LH, Boley SJ, Frank MS. Metronidazole therapy for perineal Crohn's disease: a follow-up study. *Gastroenterology* 1982;83:383-7.

[0291] A17. Solomon MJ, McLeod RS, O'Connor BI, Steinhart AJ, et al. Combination ciprofloxacin and metronidazole in severe perianal Crohn's disease. *Can J Gastroenterol* 1993;7:571-3.

[0292] A18. Molendijk I, Nuij VJ, van der Meulen-de Jong AE, van der Woude CJ. Disappointing durable remission rates in complex Crohn's disease fistula. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20:2022-8.

- [0293] A19.Gecse K,Khanna R,Stoker J,et al.Fistulizing Crohn's disease: Diagnosis and management.United European Gastroenterol J 2013;1:206-13.
- [0294] A20.Singer NG,Caplan AI.Mesenchymal stem cells:mechanisms of inflammation.Annu Rev Pathol 2011;6:457-78.
- [0295] A21.DelaRosa O,Dalemans W,Lombardo E.Mesenchymal stem cells as therapeutic agents of inflammatory and autoimmune diseases.Curr Opin Biotechnol 2012;23:978-83.
- [0296] A22.Garcia-Olmo D,Guadalajara H,Rubio-Perez I,Herreros MD,De La Quintana P,Garcia-Arranz M.Recurrent anal fistulae:limited surgery supported by stem cells.World J Gastroenterol 2015;21:3330-6.
- [0297] A23.de la Portilla F,Alba F,Garcia-Olmo D,Herrerias JM,Gonzalez FX, Galindo A.Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn's disease:results from a multicenter phase I/IIa clinical trial.Int J Colorectal Dis 2013;28:313-23.
- [0298] A24.Best WR,Becktel JM,Singleton JW,Kern F,Jr.Development of a Crohn's disease activity index.National Cooperative Crohn's Disease Study.Gastroenterology 1976;70:439-44.
- [0299] A25.Irvine EJ.Usual therapy improves perianal Crohn's disease as measured by a new disease activity index.McMaster IBD Study Group.J Clin Gastroenterol 1995;20:27-32.
- [0300] A26.Guyatt G,Mitchell A,Irvine EJ,et al.A new measure of health status for clinical trials in inflammatory bowel disease.Gastroenterology 1989;96:804-10.
- [0301] A27.Colombel JF,Schwartz DA,Sandborn WJ,et al.Adalimumab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease.Gut 2009;58:940-8.
- [0302] A28.Hochberg Y.A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance.Biometrika 1988;75:800-2.
- [0303] A29.Van Assche G,Dignass A,Reinisch W,et al.The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Special situations.J Crohns Colitis 2010;4:63-101.
- [0304] A30.Schwartz DA,Herdman CR.Review article:The medical treatment of Crohn's perianal fistulas.Aliment Pharmacol Ther 2004;19:953-67.
- [0305] A31.American Gastroenterological Association medical position statement:perianal Crohn's disease.Gastroenterology 2003;125:1503-7.
- [0306] A32.Geltzeiler CB,Wieghard N,Tsikitis VL.Recent developments in the surgical management of perianal fistula for Crohn's disease.Ann Gastroenterol 2014;27:320-30.
- [0307] 等同物
- [0308] 除了其他方面外,本发明还提供了用于治疗和预防瘘的方法和组合物。虽然已经

讨论了主题发明的具体实施方案,以上说明书为说明性的,且并非限制性的。在本领域技术人员回顾本说明书后,本发明的许多变形将会变得显而易见。所附的权利要求并不旨在要求保护所有此类的实施方案和变形,并且本发明的完整范围应当通过参考权利要求及其等同物的完整范围,和本说明书及此类变形来确定。

## 研究设计

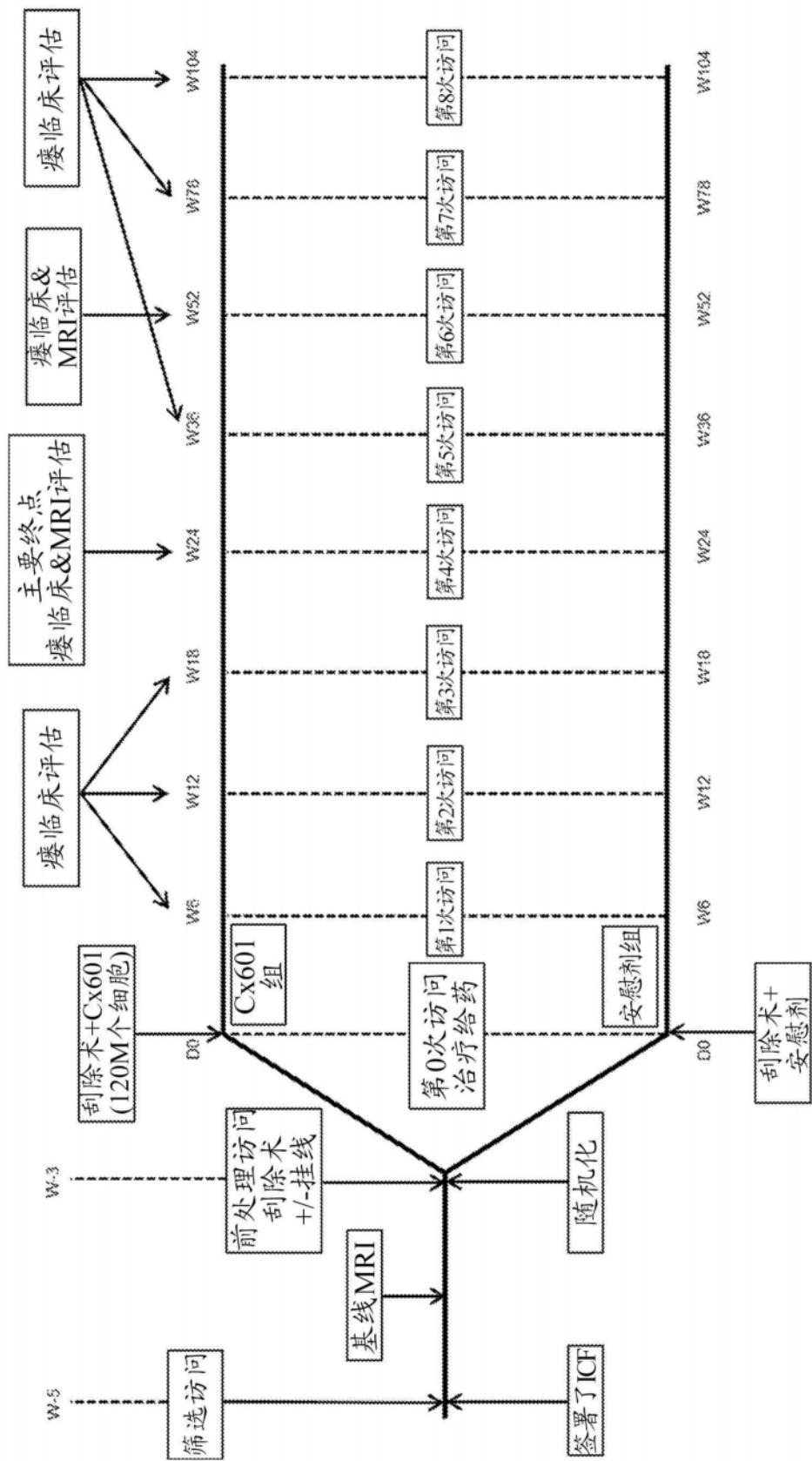


图1

## 患者处置

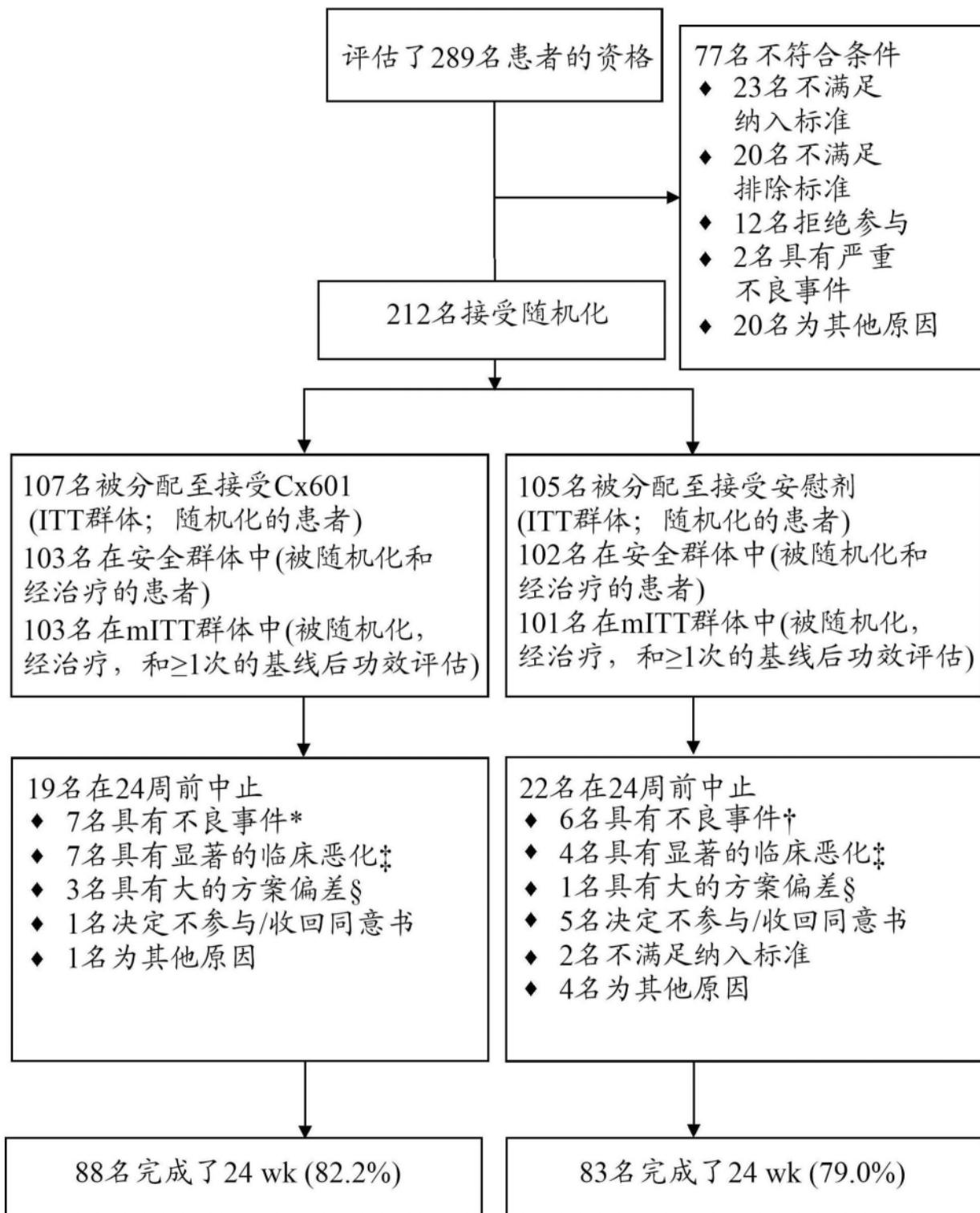


图2

## 主要终点

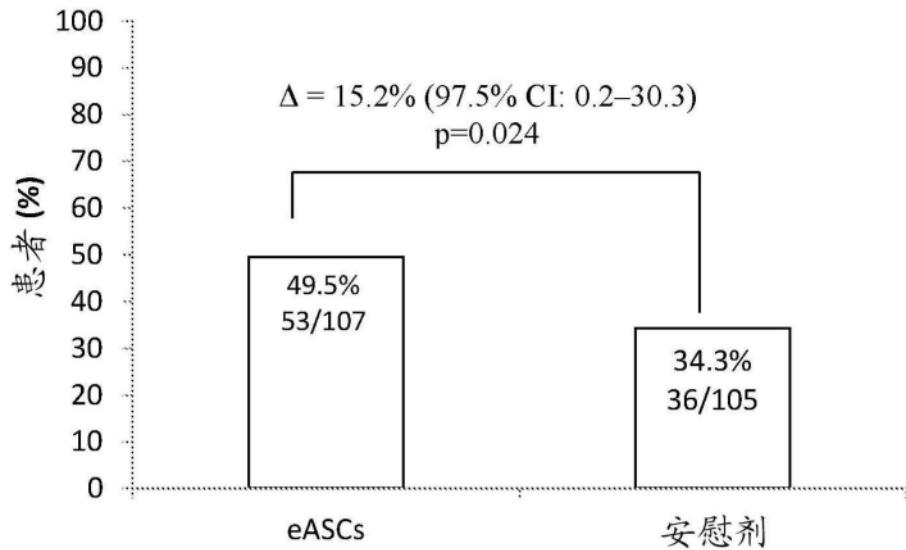


图3A

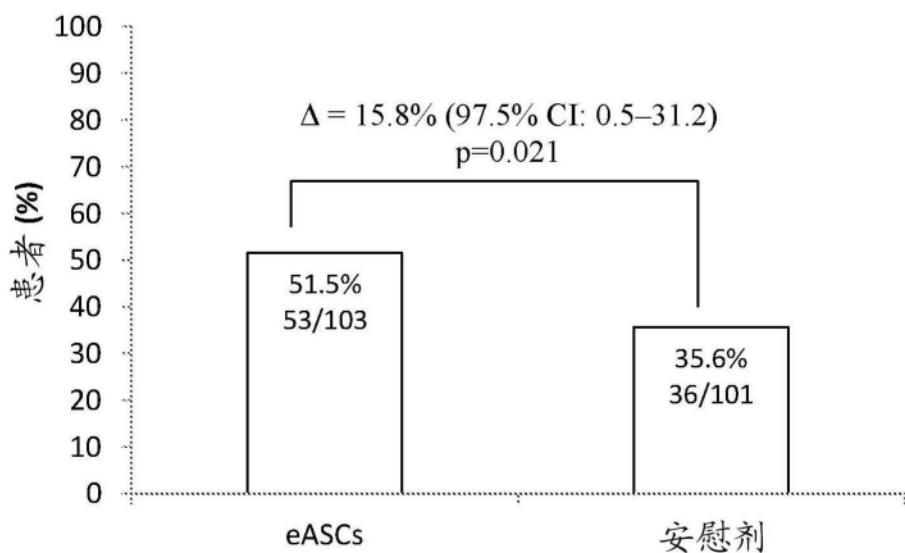


图3B

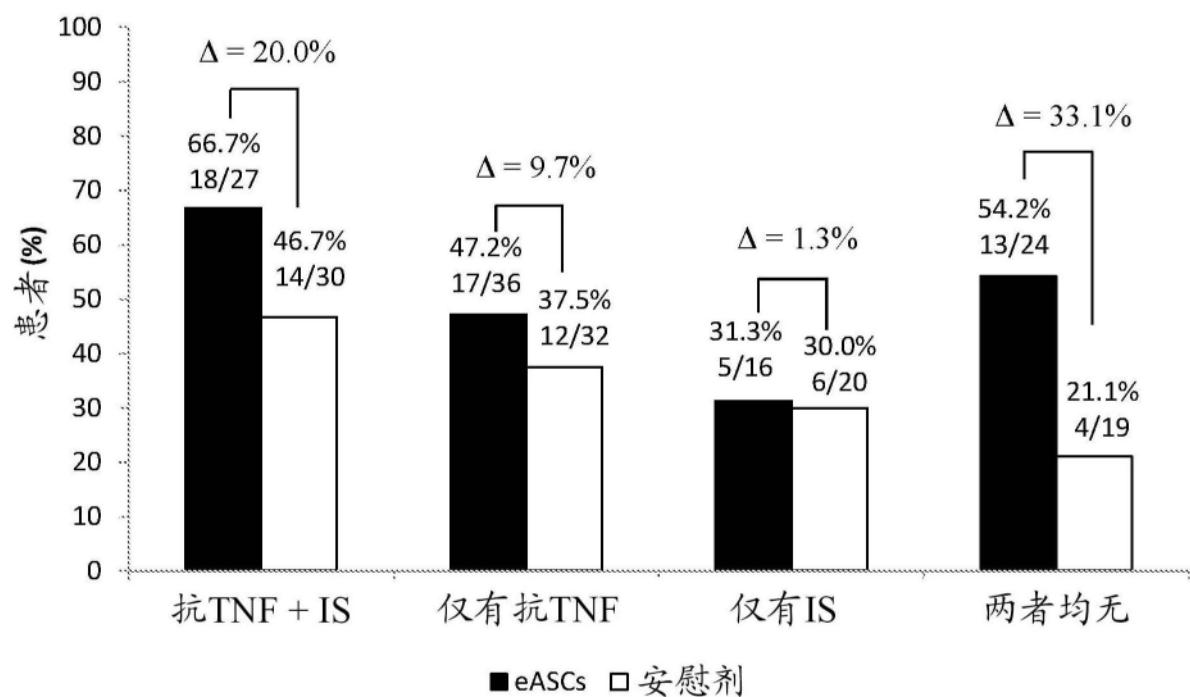


图3C