



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115919901 A

(43) 申请公布日 2023.04.07

(21) 申请号 202310100395.1

A61P 11/00 (2006.01)

(22) 申请日 2013.12.12

A61P 37/08 (2006.01)

(30) 优先权数据

61/736,352 2012.12.12 US

A61P 11/06 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201380072492.9 2013.12.12

(71) 申请人 麦瑟布莱斯特公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 西尔维乌·伊泰斯库

拉维·克里希南 皮特·高希

(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

专利代理人 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.

A61K 35/28 (2015.01)

权利要求书1页 说明书34页 附图8页

(54) 发明名称

治疗或预防呼吸病症的方法

(57) 摘要

本公开提供用于治疗或预防呼吸病症和/或用于治疗IgE-介导的呼吸过敏症和/或用于降低对呼吸过敏原的过敏反应和/或用于诱导个体对呼吸过敏原无反应性和/或用于改善患有过敏症的个体肺功能的方法，其包括给予个体富集STRO-1⁺细胞的细胞群体和/或其后代和/或源自它们的可溶性因子。

1. 富集 $\text{STRO-1}^+\text{TNAP}^+$ 多能细胞的人细胞群和/或其培养扩增的细胞和/或源自它们的可溶性因子在制备用于治疗或预防呼吸病症的药物中的用途。
2. 如权利要求1所述的用途,其中所述呼吸病症为急性呼吸病症或慢性呼吸病症。
3. 如权利要求1或2所述的用途,其中所述呼吸病症为炎症性呼吸病症、阻塞性呼吸病症或限制性呼吸病症。
4. 如权利要求3所述的用途,其中所述呼吸病症为炎症性呼吸病症。
5. 如权利要求3所述的用途,其中所述呼吸病症为限制性呼吸病症。
6. 如权利要求5所述的用途,其中所述限制性呼吸病症为特发性肺纤维化。
7. 富集 $\text{STRO-1}^+\text{TNAP}^+$ 多能细胞的人细胞群和/或其培养扩增的细胞和/或源自它们的可溶性因子在制备用于治疗对过敏原的过敏反应的药物中的用途。
8. 如权利要求7所述的用途,其中所述过敏反应为针对屋尘螨过敏原(HDM)的过敏反应。
9. 富集 $\text{STRO-1}^+\text{TNAP}^+$ 多能细胞的人细胞群和/或其培养扩增的细胞和/或源自它们的可溶性因子在制备用于治疗哮喘的药物中的用途。
10. 如权利要求9所述的用途,其中所述哮喘为急性哮喘、慢性哮喘、重度哮喘和/或难治性哮喘。
11. 如权利要求9或10所述的用途,其中所述哮喘为长效β激动剂(LABA)难治性哮喘或类固醇难治性哮喘。
12. 富集 $\text{STRO-1}^+\text{TNAP}^+$ 多能细胞的人细胞群和/或其培养扩增的细胞和/或源自它们的可溶性因子在制备用于降低有需要的个体中血清过敏原特异性IgE水平的药物中的用途。
13. 如权利要求1至12中任一项所述的用途,其中所述群富集 STRO-1^+ 亮细胞和/或其后代和/或源自它们的可溶性因子。
14. 如权利要求1至13中任一项所述的用途,其中所述药物被配制用于全身施用。
15. 如权利要求1至14中任一项所述的用途,其中所述药物被多次施用。
16. 如权利要求1至15中任一项所述的用途,其中所述药物包括足以实现以下的一项或多项的剂量的所述细胞群和/或所述后代和/或所述可溶性因子:
 - (i) 改善支气管高反应性;
 - (ii) 减少肺或支气管肺泡灌洗液的嗜酸性粒细胞浸润;
 - (iii) 减少肺或支气管肺泡灌洗液的嗜中性粒细胞浸润;
 - (iv) 降低晚期哮喘反应;
 - (v) 降低早期哮喘反应;和/或
 - (vi) 减少肺重塑/纤维化。
17. 如权利要求1至16中任一项所述的用途,其中所述药物包括 1×10^6 个至 150×10^6 个 STRO-1^+ 细胞和/或其后代。
18. 如权利要求1至17中任一项所述的用途,其中所述群为同种异体的群。

治疗或预防呼吸病症的方法

[0001] 相关申请信息

[0002] 本申请要求于2012年12月12日提交的名称为“治疗或预防呼吸病症的方法”的第61/736352号美国专利申请的优先权。该申请的全部内容通过引用并入本文。

发明领域

[0003] 本公开涉及用于治疗或预防呼吸病症的方法,如IgE-介导的过敏性呼吸病症。

[0004] 引言

[0005] 呼吸病症被公认为涵盖侵袭参与气体交换的器官和组织的病理状态,并且包括上呼吸道、气管、支气管、细支气管、肺泡、胸膜和胸膜腔、及呼吸的神经和肌肉的病症。慢性呼吸病症在世界范围内引起大约全部死亡的7%,并且代表约4%的全球疾病负担。仅在美国,估计慢性呼吸病症的花费每年约1540亿美元,包括直接和间接的费用。可将呼吸病症分成几组,包括:

[0006] • 炎症性肺部病症,如哮喘、囊肿性纤维化、肺气肿、慢性阻塞性肺疾病或急性呼吸窘迫综合征,其以个体肺中的中性粒细胞和/或炎症性细胞因子水平增加为特征;

[0007] • 阻塞性肺部病症,如慢性阻塞性肺病和哮喘,其以气道容量减少或自由气流阻塞为特征;以及

[0008] • 限制性肺部病症(又被称为间质性肺病),如婴儿呼吸窘迫综合征,其以肺顺应性损失导致肺膨胀不完全和/或增加肺硬度为特征。

[0009] 哮喘是以可变且复发的症状,可逆的气道阻塞,气道(如支气管)高反应性和潜在的炎症为特征的常见慢性呼吸病症。哮喘的急性症状包括咳嗽、喘息、呼吸短促和夜间觉醒。这些症状通常由支气管痉挛引起,需要且响应于支气管扩张剂治疗。对哮喘的病理生理学关键的是存在由招募和激活多种细胞类型介导的潜在气道炎症存在,所述多种细胞类型包括肥大细胞、嗜酸性粒细胞、T淋巴细胞、巨噬细胞、树突细胞和中性粒细胞。影响气道高反应性的机制是多样的且包括炎症、神经调节功能失调和气道重塑。气道重塑涉及结构变化,包括基膜下增厚,上皮下纤维化,气道平滑肌肥大和增生,血管增生以及扩张,随之发生气道阻塞增加且通过当前疗法无法预防或完全逆转的气道永久变化。

[0010] 哮喘的当前标准疗法是组合皮质类固醇和 β 2-激动剂(抗炎症和支气管扩张药物)。这些药物对许多哮喘症状提供了可接受的控制。然而,据估计,尽管用皮质类固醇和 β 2-激动剂的这种组合治疗,仍有5至10%的哮喘患者患有有症状的病症(Chanez et al, J Allergy Clin Immunol 119:1337-1348 (2007))。

[0011] 慢性阻塞性肺病(COPD)是与显著发病率和死亡率相关的最常见的慢性肺部病症。在美国,COPD是第四大死亡原因,且每年医疗保健费用超过300亿美元。估计1600万成人受COPD影响,并且每年约120,000美国人死于该病症。COPD被定义为以气道/肺泡/全身炎症为特征的慢性疾病,有测量的气道阻塞(预测FEV1/FVC<70%和FEVi<80%),所述气道阻塞用支气管扩张剂疗法部分改善。通过肺部细胞局部和全身释放炎症性介质导致气道疾病(慢性阻塞性支气管炎),并且在少数患者中导致破坏实质组织(肺气肿),此二者都会导致具有

COPD特征的气流限制。通过肺细胞释放这些炎症介质还可使其他器官系统中的炎症加剧，如在冠状动脉、脑血管和周围血管病症中所观测到的。

[0012] 治疗COPD的当前疗法包括支气管扩张剂，特别是有助于在某种程度上减少高度膨胀从而增加吸气容量并缓解呼吸困难的抗胆碱能类药物。虽然皮质类固醇对于大部分哮喘病例是有效的治疗，但是COPD中的炎症性细胞和介质对用全身或吸入的皮质类固醇的治疗不敏感，使得用这些药物的治疗在COPD中的有效性受限制。

[0013] 特发性肺纤维化(IPF)是下呼吸道的慢性渐进性纤维化病症，一般影响40岁以上的成人。IPF被认为是通过环境因素如吸烟烟雾最初损伤肺部从而导致将中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞招募至肺泡而造成的。通过肺泡上皮细胞释放诸如TGF- β 的纤维发生细胞因子导致成纤维细胞增殖、迁移和纤维化。这些成纤维细胞不仅填充呼吸腔，还应答许多细胞因子分泌胶原和基质蛋白，导致实质组织重塑(Shimizu et al., Am J Respir Crit Care Med 163:210-217 (2001))。成纤维细胞的这种分化很可能是IPF慢性性质的关键。这些事件导致咳嗽和渐进的呼吸短促。IPF患者具有受损的肺功能并且显示限制性肺容积和容量。虽然已提出将皮质类固醇、免疫抑制剂、中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂、肝细胞生长因子以及干扰素 γ -Ib用作IPF的治疗剂，除了肺移植术之外，已知尚未有其他治疗来延长存活，而IPF仍然是具有3至6年中值存活范围的致命疾病。尚未建立IPF的第一线治疗。

[0014] 其他呼吸病症包括但不限于，肺动脉高压(PAH)、肺血管收缩，淋巴管肌瘤病(LAM)、结节性硬化症(TSC)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)和呼吸机所致肺损伤(VILI)。

[0015] 由前述公开内容，对本领域技术人员显而易见的是，呼吸病症是治疗选择有限的、流行且使人衰弱的一类病症。因而，对这些病症的新疗法是期望的。

[0016] 发明简述

[0017] 本发明人现已证明利用STRO-1⁺细胞制剂，其能够以剂量依赖的方式在人呼吸病症(如哮喘，例如过敏性哮喘)的公认动物模型中降低T_H2介导的过敏反应(如，减少嗜酸性粒细胞和/或IL-4水平和/或IgE水平)，例如IgE-介导的过敏反应，以及支气管高反应性。本发明人发现它们能抑制早期过敏反应和/或晚期过敏反应任一(或二者)。该剂量反应表明提供疗效的是STRO-1⁺细胞制剂。

[0018] 另外，STRO-1⁺细胞制剂减少嗜酸性粒细胞在气道腔和支气管肺泡灌洗液中的细胞浸润以及支气管肺泡灌洗液中嗜中性粒细胞的数量，表明这些制剂抑制个体肺部炎症的能力，例如患有炎症性呼吸病症如哮喘的个体。

[0019] 另外，STRO-1⁺细胞制剂降低受治疗动物中过敏原特异性IgE的水平。

[0020] 本发明人还观测到在接受STRO-1⁺细胞制剂的个体中，改善延迟相哮喘反应，例如由嗜中性粒细胞和嗜碱性粒细胞迁移至呼吸系统导致的。这些观测结果表明STRO-1⁺细胞制剂对于减少或预防对呼吸系统的损伤(如由嗜中性粒细胞和嗜碱性粒细胞导致的炎症和/或重塑)是有用的。

[0021] 本发明人的发现为治疗或预防个体呼吸病症的方法提供了基础，所述方法包括给予个体富集STRO-1⁺细胞的细胞群和/或其后代和/或源自它们的可溶性因子。

[0022] 本公开另外提供了治疗或预防个体中IgE-介导的过敏症(或T_H2-介导的过敏症)的方法，所述方法包括给予个体富集STRO-1⁺细胞的细胞群和/或其后代和/或源自它们的可溶性因子。

[0023] 本公开另外提供了用于减轻对过敏原的过敏反应和/或用于诱导对过敏原的无反应性的方法,所述方法包括给予个体富集STRO-1⁺细胞的细胞群和/或其后代和/或源自它们的可溶性因子。

[0024] 本公开另外提供了用于预防或治疗对屋尘螨过敏原(HDM)的过敏反应或者用于减轻对HDM的过敏反应和/或用于诱导对HDM的无反应性的方法,所述方法包括给予个体富集STRO-1⁺细胞的细胞群和/或其后代和/或源自它们的可溶性因子。

[0025] 本公开另外提供了用于改善个体肺功能的方法,所述方法包括给予个体富集STRO-1⁺细胞的细胞群和/或其后代和/或源自它们的可溶性因子,其中所述个体患有过敏症、IgE-介导的过敏症或对HDM的过敏反应。

[0026] 在一实例中,呼吸病症与过度的细胞增殖、重塑、炎症、血管收缩、支气管狭窄、气道高反应性和/或水肿相关。例如,本公开提供了用于治疗或预防病症的方法,所述病症如哮喘、慢性阻塞性肺病、肺动脉高压、急性呼吸窘迫综合征、呼吸机诱导的肺损伤、囊性纤维化、支气管扩张、α-1-抗胰蛋白酶缺乏症、鼻炎、鼻窦炎、原发性纤毛运动障碍、肺炎、支气管炎、间质性肺疾病包括淋巴管肌瘤病、特发性肺纤维化、闭塞性细支气管炎或闭塞性细支气管炎、非特异性间质性肺炎、隐源性机化性肺炎、急性间质性肺炎、呼吸性细支气管炎相关性间质性肺病或肺结节病。

[0027] 在一实例中,肺部病症为急性肺损伤。例如,急性肺损伤为一种或多种物理性创伤、化学性损伤如化学性灼伤、烟尘吸入、或暴露于有毒物质。在另一具体实施方案中,所述肺部疾病、障碍或病症为由肿瘤或副肿瘤性疾病引起的损伤。

[0028] 在一实例中,呼吸病症为慢性的。在此方面,可将本公开的方法用于治疗早期阶段或晚期阶段或二者的慢性呼吸病症。

[0029] 在一实例中,呼吸病症为炎症性呼吸病症、阻塞性呼吸病症或限制性呼吸病症。

[0030] 在一实例中,呼吸病症或过敏症为可逆性气道阻塞。

[0031] 在一实例中,呼吸病症或过敏症为阻塞性呼吸病症,如COPD、哮喘、闭塞性细支气管炎或囊肿性纤维症。在一实例中,呼吸病症为哮喘。

[0032] 在一实例中,呼吸病症为限制性呼吸病症,如限制性肺部病症(如外源性过敏性肺泡炎、纤维化性肺泡炎、石棉肺或嗜酸细胞性肺炎)或限制性胸膜病症(例如,胸腔积液、气胸或支气管扩张)。

[0033] 在一实例中,呼吸病症并非由于感染或癌症。

[0034] 在一实例中,呼吸病症为炎症性病症。例如,病症与气道高敏性和/或支气管高敏性和/或气道腔和支气管肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞浸润有关。在这方面,在一实例中,本公开的方法包括给予富集STRO-1⁺细胞的细胞群和/或其后代和/或源自它们的可溶性因子,使得气道高敏性和/或支气管高敏性和/或气道腔和/或支气管肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞浸润和/或嗜中性粒细胞降低。

[0035] 在一实例中,病症为哮喘,如慢性哮喘或急性哮喘或过敏性哮喘。例如,病症为慢性哮喘或过敏性哮喘。

[0036] 在一实例中,病症与肺重塑有关,如哮喘或肺纤维化,如特发性肺纤维化。

[0037] 在一实例中,哮喘为重度哮喘和/或难治性哮喘。

[0038] 在一实例中,病症为类固醇难治性哮喘。例如,患有哮喘的个体为用类固醇难治

的，例如，皮质类固醇，如氟尼缩松，糠酸莫米松，曲安西龙，氟替卡松，布地奈德，二丙酸倍氯米松或前述两种或更多种的任意组合。

[0039] 在另一实例中，病症为长效β激动剂(LABA)难治性哮喘。例如，患有哮喘的个体为用长效β激动剂难治的，例如，如沙美特罗，福莫特罗，班布特罗或双氯醇胺。

[0040] 在另一实例中，病症为LABA和类固醇难治性哮喘。

[0041] 在一实例中，所述方法减缓或预防早期阶段的过敏反应或哮喘反应。

[0042] 在另一实例中，所述方法减缓或预防晚期阶段的过敏反应或哮喘反应。

[0043] 在一实例中，病症为纤维化病症。肺部的纤维化疾病可为间质性肺病(弥漫性肺实质疾病)。在另一实例中，间质性肺病是矽肺，石棉肺，铍中毒，全身性硬化症，多肌炎或皮肌炎。在其它实例中，间质性肺疾病是由抗生素、化疗药物、抗心律失常药物或感染而引起的。

[0044] 在另外的实例中，病症为特发性肺纤维化。

[0045] 在一实例中，本文在任一实例中所描述的方法包括给予富集STRO-1^亮细胞的细胞群和/或其后代和/或源自它们的可溶性因子。

[0046] 在一实例中，本文在任一实例中所描述的方法包括给予富集STRO-1⁺和组织非特异性碱性磷酸酶⁺(TNAP)⁺细胞的细胞群和/或其后代和/或源自它们的可溶性因子。

[0047] 在一实例中，本文在任一实例中所描述的方法包括给予富集组织非特异性碱性磷酸酶⁺(TNAP)⁺细胞的细胞群和/或其后代和/或源自它们的可溶性因子。如本文所示，这样的细胞为STRO-1⁺，例如STRO-1^亮。在一实例中，细胞为富集STRO-3⁺的细胞。

[0048] 在一实例中，富集STRO-1⁺细胞的细胞群和/或其后代和/或源自它们的可溶性因子被全身性给予。

[0049] 例如，所述细胞群和/或后代和/或可溶性因子通过静脉注射给予。

[0050] 在另一实例中，所述细胞群和/或后代和/或可溶性因子通过鼻内或吸入给予。

[0051] 在一实例中，所述细胞群和/或后代和/或可溶性因子被多次给予。在这方面，本发明人已表明本文所述的细胞群能够提供多达四周或至少四周的治疗益处。因此，在一实例中，每三周或更多周给予一次所述细胞群和/或后代和/或可溶性因子。例如，每四周或更多周给予一次所述细胞群和/或后代和/或可溶性因子。例如，每五周或更多周给予一次所述细胞群和/或后代和/或可溶性因子。例如，每十周或更多周给予一次所述细胞群和/或后代和/或可溶性因子。例如，每十二周或更多周给予一次所述细胞群和/或后代和/或可溶性因子。

[0052] 在一实例中，所述方法包括监测个体并在以下一种或多种状况出现时给予另外剂量的所述细胞群和/或后代和/或可溶性因子：

[0053] (i) 个体开始持续喘息和/或咳嗽和/或具有胸闷和/或呼吸困难；

[0054] (ii) 通过肺活量计评估时个体显示以下中的一种或多种：

[0055] a) 持续至少2周，每周至少三天20%差异；

[0056] b) 治疗之后最大流量提高≥20%，例如：

[0057] 吸入β-激动剂(如，沙丁胺醇)10分钟；

[0058] 吸入皮质类固醇(如，倍氯米松)6周；

[0059] 30mg氢化泼尼松14天；

[0060] c) 暴露于触发剂(如，运动)之后最大流量降低≥20%

- [0061] (iii) 支气管镜检显示个体呼吸道中异常细胞和/或外源物质和/或阻塞;或者
- [0062] (iv) 胸部CT扫描显示肺部血管畸形,肺部血液或流体聚集,支气管扩张,胸腔积液或肺炎。
- [0063] 在一实例中,根据任一实例,本文所描述的方法包括给予剂量足以实现以下的一种或多种的所述细胞群和/或后代和/或可溶性因子:
- [0064] (i) 改善支气管高反应性,如利用支气管激发测试来评估;
- [0065] (ii) 改善气道高反应性;
- [0066] (iii) 减少肺或支气管肺泡灌洗液的嗜酸性粒细胞浸润;
- [0067] (iv) 减少肺或支气管肺泡灌洗液的嗜中性粒细胞浸润;
- [0068] (v) 减少晚期哮喘反应,如通过肺活量计来评估;
- [0069] (vi) 减少早期哮喘反应,如通过肺活量计来评估;和/或
- [0070] (vii) 减少肺重塑/纤维化,如通过胸部CT扫描来评估。
- [0071] 在一实例中,所述剂量足以实现前述至少两种、三种、四种、五种或全部效应。
- [0072] 在一实例中,根据任一实例,本文所描述的方法包括给予 1×10^6 至 150×10^6 个STRO-1⁺细胞和/或其后代。
- [0073] 在一实例中,根据任一实例,本文所描述的方法包括给予 25×10^6 至 150×10^6 个STRO-1⁺细胞和/或其后代。例如,所述方法包括给予约 25×10^6 或 75×10^6 或 150×10^6 个STRO-1⁺细胞和/或其后代。
- [0074] 在一实例中,根据任一实例,本文所描述的方法包括每千克给予约 2.5×10^4 细胞至 4.5×10^6 个STRO-1⁺细胞和/或其后代。
- [0075] 在一实例中,根据任一实例,本文所述的方法包括每千克给予约 4.5×10^5 至 4.5×10^6 个STRO-1⁺细胞和/或其后代。例如,所述方法包括每千克给予约 4.5×10^5 或约 5.5×10^6 或约 1.7×10^6 或约 1.9×10^6 或约 3.5×10^6 或约 4.5×10^6 个STRO-1⁺细胞和/或其后代。
- [0076] 在一实例中,根据任一实例,本文所述的方法包括给予全身剂量的STRO-1⁺细胞和/或其后代和/或源自它们的可溶性因子。例如,当多次给予细胞或可溶性因子时,全身剂量保持不变。
- [0077] 例如,所述方法包括给予个体在10mL中的 150×10^6 个STRO-1⁺细胞和/或其后代,即每毫升 1.5×10^6 个STRO-1⁺细胞和/或其后代。
- [0078] 在一实例中,根据任一实例,本文所描述的方法包括给予患有类固醇难治性哮喘或LABA难治性哮喘或者类固醇和LABA难治性哮喘的个体 150×10^6 个STRO-1⁺细胞和/或其后代,例如在10mL中给予个体,即每毫升 1.5×10^6 个STRO-1⁺细胞和/或其后代。
- [0079] 在一实例中,根据任一实例,本文所描述的方法包括给予患有特发性肺纤维化的个体 150×10^6 个STRO-1⁺细胞和/或其后代,例如在10mL中给予个体,即每毫升 1.5×10^6 个STRO-1⁺细胞和/或其后代。
- [0080] 在一实例中,所述细胞群和/或后代细胞为自体的或同种异体的,和/或所述可溶性因子可源自自体或同种异体细胞。在一实例中,所述细胞群和/或后代细胞为同种异体的,和/或所述可溶性因子来自同种异体细胞。
- [0081] 根据以上实例,所述方法可另外包括获得细胞群和/或后代细胞和/或可溶性因子,或者可另外包括分离所述细胞群和/或后代细胞和/或可溶性因子。在一实例中,所述细

胞群和/或后代细胞是基于STRO-1和/或TNAP的表达。

[0082] 在一实例中,所述细胞群和/或后代细胞和/或可溶性因子获自受治疗的个体。在另一实例中,所述细胞群和/或后代细胞和/或可溶性因子获自同一物种的不同个体。

[0083] 在一实例中,所述富集STRO-1⁺细胞的细胞群和/或后代细胞在给予之前和/或获得可溶性因子之前经培养扩增。

[0084] 根据以上实例,本文所述根据任一实例的方法可另外包括培养所述细胞群和/或后代细胞。

[0085] 在一实例中,以组合物的形式给予所述STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自它们的可溶性因子,所述组合物包含所述STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自它们的可溶性因子以及载体和/或赋形剂。

[0086] 根据以上实例,本文所述根据任一实例的方法可另外包括将所述细胞群和/或后代和/或可溶性因子配制成组合物。

[0087] 在一实例中,所述个体在治疗时正在遭受呼吸病症或其恶化(如,哮喘发作),例如,所述个体需要治疗。

[0088] 在一实例中,所述个体患有呼吸病症,然而在治疗时未遭受活跃的呼吸病症或其恶化(如,哮喘发作),即,所述方法是预防病症或其恶化的方法。

[0089] 本公开还提供了在治疗或预防呼吸病症中应用的富集STRO-1⁺细胞的细胞群和/或其后代和/或源自它们的可溶性因子。

[0090] 本公开还提供了富集STRO-1⁺细胞的细胞群和/或其后代和/或源自它们的可溶性因子在制备用于治疗或预防个体的呼吸病症的药物中的应用。

[0091] 本公开还提供了在本文按照任一实例所描述的方法中应用的试剂盒,所述试剂盒包括富集STRO-1⁺细胞的细胞群和/或其后代和/或源自它们的可溶性因子,并包装有说明书。

[0092] 例如,本公开提供了包装有产品信息的试剂盒,所述试剂盒包括包含所述细胞群体和/或后代和/或可溶性因子的组合物,所述产品信息指示所述组合物在本文按照任一实例所描述的方法中的应用。

附图说明

[0093] 图1.由成人骨髓单个核细胞(BMMNC)共表达TNAP(STRO-3)和间充质前体细胞标志物STRO-1^亮。双色免疫荧光和流式细胞术通过孵育STRO-1MACS-选择的BMMNC来进行,用与FITC结合的山羊抗-鼠IgM抗体间接标记(x轴),以及STRO-3mAb(鼠IgG1)用与PE结合的山羊抗-鼠IgG间接标记(y轴)。点状直方图代表以列表型(listmode)数据收集的 5×10^4 个事件。将垂直线和水平线设定为反应水平<利用在相同条件下处理的同种型匹配对照抗体-1B5(IgG)和1A6.12(IgM)获得的1.0%平均荧光。结果证明,STRO-1^亮细胞的较小群体共表达TNAP(右上象限),而剩余的STRO-1⁺细胞不能与STRO-3mAb反应。

[0094] 图2.图示显示了代表性流式细胞直方图,其利用培养扩增的源自骨髓的猕猴MPCs的单细胞悬液产生,相对于利用山羊抗-鼠IgM或偶联IgG的FITC二抗检测的同种型(IgM、IgG2a和IgG1)阴性对照(虚线),所述细胞具有间充质干细胞标志物-STRO-1、STRO-4和CD146的阳性细胞表面表达(实线)。代表性直方图还表明,猕猴MPCs缺少单核细胞/巨噬细

胞(CD14)、造血干/祖细胞(CD34)和成熟白细胞(CD45)标志物的细胞表面表达。相比同种型对照,大于1%荧光的水平表示阳性。

[0095] 图3为评估MPC在治疗绵羊哮喘模型中的安全性和功效的研究时间轴图示。

[0096] 图4为显示生理盐水组和MPC处理组随着研究进程的早期哮喘反应(EAR)的一系列图示。对照组及三个处理组(2500万,7500万和15000万oMPC)的总结EAR数据示于(A)中。数据代表从对照生理盐水雾化激发后获取的基线阻力读数至过敏原激发后第一个小时获取的最大阻力读数的阻力百分比变化。在整个试验的三个时机获取EAR读数:oMPC/生理盐水处理前2周(处理前);oMPC/生理盐水处理后1周(处理后1周);以及oMPC/生理盐水处理后4周(处理后4周)。(B)和(C)中的数据显示对照组与处理组之间从处理前分别至处理后1周和处理后4周的EAR百分比变化。数据表示为平均值±SEM。对照组和7500万oMPC组的N=11;2500万和15000万oMPC组的N=10。**p<0.01*p<0.05。

[0097] 图5为显示生理盐水组和MPC处理组随着研究进程的晚期哮喘反应(LAR)的一系列图示。对照组及三个处理组(2500万,7500万和15000万oMPC)的总结LAR数据示于(A)中。数据代表从雾化过敏原激发前获取的基线阻力读数至过敏原激发后6小时获取的阻力读数的阻力百分比变化。在整个实验的三个时机获取LAR读数:oMPC/生理盐水处理前2周(处理前);oMPC/生理盐水处理后1周(处理后1周);以及oMPC/生理盐水处理后4周(处理后4周)。(B)和(C)中的数据显示对照组与处理组之间从处理前分别至处理后1周和处理后4周的LAR百分比变化的比较。数据表示为平均值±SEM。对照组和7500万oMPC组的N=11;2500万和15000万oMPC组的N=10。**p<0.01*p<0.05。

[0098] 图6为显示生理盐水组和MPC处理组随着研究进程的支气管高反应性(BHR)的一系列图示。对照组及三个处理组(2500万,7500万和15000万oMPC)的总结BHR数据示于(A)中。y轴上的BHR数据代表诱导100%阻力变化所需的卡巴胆碱的呼吸单位平均数目。在整个实验的三个时机获取BHR读数:oMPC/生理盐水处理前2周(处理前);oMPC/生理盐水处理后1周(处理后1周);以及oMPC/生理盐水处理后4周(处理后4周)。(B)和(C)中的数据显示对照组与处理组之间从处理前分别至处理后1周和处理后4周的BHR百分比变化的比较。(D)中的数据显示对照组与合并的处理组之间的BHR数据比较。数据表示为平均值±SEM。对照组和7500万oMPC组的N=11;2500万和15000万oMPC组的N=10。*p<0.05**p<0.01。

[0099] 图7为显示生理盐水组和MPC处理组随着研究进程的支气管肺泡灌洗(BAL)液中嗜酸性粒细胞的一系列图示。数据表示为嗜酸性粒细胞百分比的总结(A),处理后1周(C)和4周(D)时,以及对照组相比合并的处理组(E)的嗜酸性粒细胞从处理前的百分比变化。嗜酸性粒细胞/mL示于(B)中。数据表示为平均值±SEM。对照组和7500万oMPC组的N=11;2500万和15000万oMPC组的N=10。*p<0.05,**p<0.01。

[0100] 图8为显示生理盐水组和MPC处理组随着研究进程的支气管肺泡灌洗(BAL)液中嗜中性粒细胞的一系列图示。数据表示为嗜中性粒细胞百分比的汇总(A)和嗜中性粒细胞/mL(B)。数据表示为平均值±SEM。对照组和7500万oMPC组的N=11;2500万和15000万oMPC组的N=10。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.005。

[0101] 图9为显示生理盐水组和MPC处理组随着研究进程的支气管肺泡灌洗(BAL)液中巨噬细胞的一系列图示。数据表示为巨噬细胞百分比的汇总(A)和巨噬细胞/mL(B)。数据表示为平均值±SEM。对照组和7500万oMPC组的N=11;2500万和15000万oMPC组的N=10。

[0102] 图10为显示生理盐水组和MPC处理组随着研究进程的支气管肺泡灌洗(BAL)液中淋巴细胞的一系列图示。数据表示为淋巴细胞百分比的汇总(A)和淋巴细胞/mL(B)。数据表示为平均值±SEM。对照组和7500万oMPC组的N=11;2500万和15000万oMPC组的N=10。

[0103] 图11为显示哮喘绵羊血清中IgE水平的一系列图示。ELISA数据显示试验绵羊血清中HDM-特异性IgE的平均吸光度(Abs)水平。数据表示为平均值±SEM,并且显示oMPC处理之前和之后的HDM-IgE水平比较(A),在1周(B)和4周(C)时IgE水平从处理前的百分比变化。分别在实验第51天、72天和93天从所有绵羊采集处理前、处理后1周和处理后4周的血清。对照组和7500万oMPC组的N=11;2500万和15000万oMPC组的N=10.*p<0.05,**p<0.01。

[0104] 发明详述

[0105] 一般技术和所选定义

[0106] 在本说明书中,除非另有明确说明或者上下文另有要求,提及单一步骤、物质组合物、步骤组或物质组合物的组应当理解为包括一个和多个(即一个或多个)此类步骤、物质组合物、步骤组或物质组合物的组。

[0107] 除非另有明确说明,本文描述的各个实例加以适当的修改可适用于本申请其他的每一个实例。

[0108] 除了具体描述的那些外,本领域技术人员应当理解,可对本公开及其单个实例进行变型和修改。应当理解本公开包括所有这类变型和修改。本公开还单独或整体地包括本说明书提及的或说明的所有步骤、特征、组合物和化合物,以及所述步骤或特征的任何和所有组合,或任何两个或更多个所述步骤或特征。

[0109] 本公开不限于本文包括的本公开的具体实例的范围,其仅试图用于例证目的。功能等同的产品、组合物和方法明显在本文所述的本公开及其实例的范围内。

[0110] 除非另有说明,利用分子生物学、微生物学、病毒学、重组DNA技术、溶液中的肽合成、固相肽合成和免疫学的常规技术实施本公开,不需要过多的实验过程。此类操作描述于,例如,Sambrook,Fritsch&Maniatis,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratories,New York,Second Edition(1989),整个I、II和III卷;DNA Cloning:A Practical Approach,Vols.I and II(D.N.Glover,ed.,1985),IRL Press,Oxford,全文;Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach(M.J.Gait,ed,1984)IRL Press,Oxford,全文,尤其是其中Gait的文章,pp1-22;Atkinson et al,pp35-81;Sproat et al,pp 83-115;和Wu et al,pp 135-151;4.Nucleic Acid Hybridization:A Practical Approach(B.D.Hames&S.J.Higgins编,1985)IRL Press,Oxford,全文;Immobilized Cells and Enzymes:A Practical Approach(1986)IRL Press,Oxford,全文;Perbal,B.,A Practical Guide to Molecular Cloning(1984);Methods In Enzymology(S.Colowick and N.Kaplan编,Academic Press,Inc.),整个系列;J.F.Ramalho Ortigao,"The Chemistry of Peptide Synthesis"Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website(Interactiva,Germany);Sakakibara,D.,Teichman,J.,Lien,E.Land Fenichel,R.L.(1976).Biochem.Biophys.Res.Commun.73336-342;Merrifield,R.B.(1963).J.Am.Chem.Soc.85,2149-2154;Barany,G.and Merrifield,R.B.(1979),The Peptides(Gross,E.and Meienhofer,J.编),vol.2,pp.1-284,Academic Press,New York.12.Wünsch,E.编(1974)Synthese von Peptiden in Houben-Weyls

Metoden der Organischen Chemie (Müller, E. 编), vol.15, 第4版, 第1和2部分, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 25, 449-474; Handbook of Experimental Immunology, Vols. I- IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell 编, 1986, Blackwell Scientific Publications); 以及 Animal Cell Culture: Practical Approach, 第3版 (John R. W. Masters 编, 2000), ISBN 0199637970, 全文。

[0111] 在本说明书中,除非上下文另有要求,单词“包括 (comprise)”或变型如“包括 (comprises)”或“包括 (comprising)”,应当理解为意指包括所述的步骤或元素或整体 (integer),或者步骤或元素或整体的组,而不排除任何其他步骤或元素或整体,或者元素或整体的组。

[0112] 如本文所用,术语“源自”应当理解为表示指明的整体 (integer) 可以获自特定来源,虽然不一定直接来自该来源。在源自 STRO⁺ 细胞和/或其后代细胞的可溶性因子的情况下,该术语应当理解为指 STRO⁺ 细胞和/或其后代细胞的体外培养期间产生的一种或多种因子,例如蛋白、肽、糖类等。

[0113] 术语“呼吸病症”应当理解为包括降低个体肺功能的任何疾病或病症,包括,例如哮喘、慢性支气管炎、肺气肿、囊性纤维化、呼吸衰竭、肺水肿、肺栓塞、肺高压(高血压)、肺炎和结核病(TB)、肺癌、肺硬化和疤痕(例如,由药物、毒物、感染或辐射引起)、来自非正常大气压(例如,由机械通气装置导致)的肺部疾病。在一实例中,呼吸病症是一种慢性肺部病症和/或与肺部炎症有关的肺部病症,例如,肺部病症是哮喘、COPD 或囊性纤维化或肺纤维化或细支气管炎或肺泡炎或血管炎或结节病。在另一实例中,病症与个体的肺重塑或纤维化有关,例如所述病症是肺纤维化(例如,特发性肺纤维化)或哮喘。

[0114] 如本文所用,术语“哮喘”应被理解为意指特征为阵发性或持续性呼吸困难、胸闷、喘息、咳痰和咳嗽的疾病,与可变气流受限和对内源性或外源性刺激的气道高反应性有关(加拿大哮喘指南),和/或特征为导致喘息、呼吸急促、胸闷和咳嗽反复发作(特别是在夜间或清晨)的气道高反应性、伴随有可变气流阻塞的病症,,其经常自发地或通过治疗是可逆的(全球哮喘防治倡议(The Global Initiative for Asthma))。

[0115] 如本文所用,术语“重度哮喘”将被理解为意指吸入高至极高剂量的皮质类固醇且使用或不使用口服皮质类固醇而良好控制的哮喘症状;“极重度哮喘”将被理解为意指尽管吸入和摄入极高剂量的皮质类固醇且需要或不需要其他治疗而良好控制或未良好控制的哮喘症状。对于这些限定,每日吸入高和极高剂量的皮质类固醇(近似等效剂量)如下定义:高剂量为二丙酸倍氯米松,1000至2000μg;氟替卡松,500至1000μg;以及布地奈德,800至1600μg,而极高剂量为氟替卡松,1000至2000μg;以及布地奈德,1600至3200μg。

[0116] 如本文所用,术语“难治性哮喘”包括具有“致命”或“接近致命”性哮喘的患者,以及之前被描述为“重度哮喘”和“类固醇-依赖性和/或抗性哮喘”、“难控制性哮喘”、“控制不佳的哮喘”、“脆性(brittle)哮喘”或“不可逆的哮喘”的哮喘亚组。根据美国胸科协会指南,满足以下描述的一种或两种主要标准和两种次要标准时可定义为难治性哮喘。主要标准是:为了实现控制轻中度持续性哮喘的水平:(1)用连续或接近连续(每年≥50%)口服皮质

类固醇治疗；(2)需要用高剂量吸入皮质类固醇治疗。次要条件是：(1)除了吸入皮质类固醇外，需要每天用控制药物治疗，如LABA，茶碱或白三烯拮抗剂；(2)需要每天或接近每天使用短效β激动剂的哮喘症状；(3)持续气道阻塞($FEV_1 < 80\%$ 预计；日呼气峰流量(PEF)变异率 $> 20\%$)；(4)每年一次或多次因哮喘急诊就诊；(5)每年三次或更多次口服类固醇“爆发”；(6)口服或吸入皮质类固醇剂量减少 $\leq 25\%$ ，迅速恶化；(7)过去接近致命的哮喘事件。为了定义难治性哮喘的目的，药物($\mu g/d$)和剂量(puffs/d)的定义如下：(a)二丙酸倍氯米松 $> 1,260 > 40$ puffs(42 μg /吸入) $>$ puffs(84 μg /吸入)；(b)布地奈德 $> 1,200 > 6$ puffs；(c)氟尼缩松 $2,000 > 8$ puffs；(d)丙酸氟替卡松 $> 880 > 8$ puffs(110 μg)， > 4 puffs(220 μg)；(e)醋酸曲安奈德 $> 2,000 > 20$ puffs。

[0117] 如本文所用，术语“急性哮喘”或“过敏性哮喘”涉及由过敏原(如尘螨粪便或花粉)激活位于呼吸道的下游气道粘膜下方的肥大细胞引起的哮喘。肥大细胞的活化引起刺激鼻腔上皮以产生粘液的颗粒释放，并随后收缩气道内的平滑肌。这种平滑肌收缩使气道收缩，导致哮喘特征的喘息。

[0118] “慢性哮喘”并非由过敏原引起，而是由急性哮喘获得的炎症导致。急性哮喘的整体效应引起慢性炎症，其导致粘膜上皮对环境反应变得过敏。因而简单的环境因子，如烟雾，可刺激过敏的上皮产生大量的粘液和收缩。

[0119] 如本文所用，术语“特发性肺纤维化”应被理解为意指以肺部的支撑框架(间质)纤维化为特征的未知起源的慢性进行性肺病。常见症状是进行性呼吸困难(难呼吸)，还包括干咳、杵状指(手指损毁)以及啰音(吸入期间用听诊器听到肺部的爆裂音)。关于特发性间质性肺炎的2002ATS/ERS多学科共识声明提出以下无需肺活检确诊IPF的标准：

[0120] • 主要标准(满足全部4种)：

[0121] o排除其他已知原因的间质性肺疾病(药物，暴露，结缔组织病)；

[0122] o具有限制(降低的肺活量)和气体交换受损(P_{O_2} ，

[0123] $P(A-a)O_2, DLCO$)证据的异常肺功能检查；

[0124] o高分辨率CT扫描具有极小磨玻璃样的双侧基底(Bibasilar)网状结构异常；以及

[0125] o经支气管肺活检或支气管肺泡灌洗(BAL)显示没有特征来支持另一诊断。

[0126] • 次要标准(4种中满足3种)：

[0127] o年龄 > 50 ；

[0128] o另外无法解释的活动性呼吸困难起病隐匿；

[0129] o患病持续 > 3 个月；以及

[0130] o双侧基底吸气性爆裂音。

[0131] 术语“恶化”应被理解为意指呼吸病症的呼吸症状扩大，如哮喘发作。

[0132] “早期过敏反应”(或哮喘反应)通常在接触过敏原后2小时或1小时或30分钟或10分钟或1分钟内发生，并且通常又被称作速发型过敏反应或I型过敏反应。反应由以下引起：结合至肥大细胞FcεRI受体的过敏原特异性IgE分子交联之后，由肥大细胞通过称为脱颗粒的过程释放组胺和肥大细胞颗粒蛋白以及产生白细胞三烯、前列腺素和细胞因子。这些介质影响导致发痒的神经细胞，导致收缩的平滑肌细胞(引起过敏性哮喘中观察到的气道狭窄)，导致粘液产生的杯状细胞，以及导致血管舒张和水肿的内皮细胞。

[0133] “晚期过敏反应”(或哮喘反应)通常在接触过敏原之后6-12小时或8-12小时出现，

并且由例如肥大细胞介导。早期反应的产物包括趋化因子和作用于内皮细胞的分子，并引起它们表达细胞间粘附分子(如血管细胞粘附分子和选择素)，这一起导致白细胞从血液招募至过敏反应的位置并被激活。通常，在过敏反应中所观测到的浸润细胞包含高比例的淋巴细胞，特别是嗜酸性粒细胞。所招募的嗜酸性粒细胞脱颗粒，释放大量细胞毒性分子(包括主要碱性蛋白和嗜酸性粒细胞过氧化物酶)，以及产生大量细胞因子如IL-5。所招募的T-细胞通常为Th2种类，它们产生的细胞因子导致进一步招募肥大细胞和嗜酸性粒细胞，并且在浆细胞同种型转换为IgE，其将结合至肥大细胞Fc ϵ RI受体并引发个体进一步的过敏反应。

[0134] 如本文所用，术语“有效量”应当被理解为指足够量的STRO-1 $^{+}$ 细胞和/或其后代细胞和/或源自它们的可溶性因子，其足以减缓本文所述的呼吸病症的一种或多种症状。

[0135] 如本文所用，术语“治疗有效量”应当被理解为足够量的STRO-1 $^{+}$ 细胞和/或其后代细胞和/或源自它们的可溶性因子，其足以治疗呼吸病症，即，使得个体不再满足呼吸病症或其恶化的临床标准。

[0136] 如本文所用，术语“预防有效量”应当被理解为指足够量的STRO-1 $^{+}$ 细胞和/或其后代细胞和/或源自它们的可溶性因子，其足以预防或抑制或延迟呼吸病症的发作或其恶化或其复发。

[0137] 如本文所用，术语“全身剂量”应当被理解为意指给予个体指定剂量的细胞和/或可溶性因子，不考虑其体重或体表面积。

[0138] 如本文所用，术语“治疗(treat/treatment/treating)”应当理解为意指给予治疗有效量的可溶性因子和/或细胞，减缓或抑制与呼吸病症的症状，以使得个体不再被临床诊断为患有该病症或其恶化。

[0139] 如本文所用，术语“预防(prevent/preventing/prevention)”应当理解为意指给予预防有效量的可溶性因子和/或细胞，阻止或妨碍或延迟呼吸病症或其恶化的发生或进程。预防呼吸病症还包括给予预防有效量的可溶性因子和/或细胞，预防或减缓病症恶化的频率。

[0140] 如本文所用，术语“可溶性因子”应当理解为意指由STRO-1 $^{+}$ 细胞和/或其后代产生的水溶性的任何分子，例如，蛋白、肽、糖蛋白、糖肽、脂蛋白、脂肽、糖类等。此类可溶性因子可以为细胞内的，和/或由细胞分泌的。此类可溶性因子可以为复合混合物(例如，上清液)和/或其部分，和/或可以为纯化的因子。在一实例中，可溶性因子位于上清液中，或包含于上清液中。因此，本文中涉及给予一种或多种可溶性因子的任何实例加以必要的修改后适用于给予上清液。

[0141] 如本文所用，术语“上清液”是指在适当的培养基例如液体培养基中，体外培养STRO-1 $^{+}$ 细胞和/或其后代后产生的非细胞物质。通常，上清液通过以下方式产生：于适当的条件和时间下在培养基中培养细胞，然后通过诸如离心的步骤去除细胞物质。在给予前，上清液可以进行或不进行进一步的纯化步骤。在一实例中，上清液包含少于10 5 ，例如少于10 4 ，如少于10 3 ，例如，无活细胞。

[0142] 如本文所用，术语“正常或健康个体”应当理解为意指未患有通过本领域已知的和/或本文描述的任何方法所评估的呼吸病症的个体。在一实例中，“正常或健康个体”未患有呼吸病症的任何症状。

[0143] 过敏原

[0144] 在一实例中,本公开提供了用于减少或预防对过敏原的反应(如,过敏反应)的方法。如本文所用的,术语“过敏原”应被理解为意指包括能够诱导特异性IgE形成(即,过敏反应)的一种或多种抗原的物质。IgE产生之后,IgE与肥大细胞或嗜碱性粒细胞表面的Fc受体结合。随后接触过敏原之后,结合到过敏原至少两种表位的至少两种IgE抗体引起IgE分子的Fab'区的交联,导致肥大细胞或碱性粒细胞释放多种血管活性胺,如,例如组胺,由此诱导过敏症状。术语过敏原包括所有类型的过敏原,例如多肽过敏原、磷脂过敏原、脂肪酸或碳水化合物。常见过敏原的实例列于表1中。

[0145] 表1:由生物体分离的常见过敏原

	过敏原来源		MW
	系统命名	曾用名	
[0146]		菊目	
	Amb a 1	抗原 E	38
	Amb a 2	抗原 K	38
	Amb a 3	Ra3	11
	Amb a 5	Ra5	5
	Amb a 6	Ra6	10
	Amb a 7	Ra7	12
	Amb a ?		11
	三裂叶豚草(<i>Ambrosia trifida</i>) (巨豚草)		
	Amb t 5	Ra5G	4.4
禾本目		北艾(<i>Artemisia vulgaris</i>) (艾草)	
	Art v 2		35
		百慕达草(<i>Cynodon dactylon</i>) (狗牙草)	
	Cyn d 1		32
		鸭茅(<i>Dactylis glomerata</i>) (果园草)	
	Dac g 1	AgDg1	32
	Dac g 2		11
	Dac g 5		31
		多年生黑麦草(<i>Lolium perenne</i>) (黑麦草)	
	Lol p 1	组 I	27
	Lol p 2	组 II	11
	Lol p 3	组 III	11
	Lol p 5		31
	Lol p 9	Lol p Ib	31/35
		梯牧草(<i>Phleum pratense</i>) (猫尾草)	
	Phl p 1		27
	Phl p 5	Ag25	32

	过敏原来源		MW
	系统命名	曾用名	
	草地早熟禾(<i>Poa pratensis</i>)(肯塔基蓝草)		
	Poa p 1	组 I	33
	Poa p 5		31
	Poa p 9		32/34
	石茅(<i>Sorghum halepense</i>)(约翰逊草)		
	Sor h 1		
壳斗目	普通赤杨 (<i>Alnus glutinosa</i>)(桤木)		
	Aln g 1		17
	银桦树(<i>Betula verrucosa</i>)(桦木)		
	Bet v 1		17
	Bet v 2	抑丝蛋白 (profilin)	15
[0147]	欧洲鹅耳枥(<i>Carpinus betulus</i>)(角木)		
	Car b 1		17
	欧洲榛(<i>Corylus avellana</i>)(榛木)		
	Cor a 1		17
	白栎(<i>Quercus alba</i>)(白橡木)		
	Que a 1		17
松目	日本柳杉(<i>Cryptomeria japonica</i>)(杉木)		
	Cry j 1		41-45
	Cry j 2		
	<i>Juniper sabinaoides</i> (刺柏)		
	Jun s 1		50
	北美圆柏(<i>Juniper virginiana</i>)(东方红柏)		
	Jun v 1		45-50
木樨目	齐墩果树(<i>Olea europea</i>)(橄榄)		
	Ole e 1		16
	屋尘螨(<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>)(螨)		

	过敏原来源		MW
	系统命名	曾用名	
	Der p 1	抗原 P1	25
	Der p 2		14
	Der p 3	胰蛋白酶	28/30
	Der p 4	淀粉酶	60
	Der p 5		14
	Der p 6	糜蛋白酶	25
	Der p 7		22-28
微角尘螨 (<i>Dermatophagoides microceras</i>)(螨)			
	Der m 1		25
粉尘螨 (<i>Dermatophagoides farinae</i>)(螨)			
	Der f 1		25
	Der f 2		14
	Der f 3		30
害鳞嗜螨 (<i>Lepidoglyphus destructor</i>)(仓储螨)			
	Lep d ?		15
家犬(<i>Canis familiaris</i>)(狗)			
	Can f 1		25
	Can f 2		27
家猫(<i>Felis domesticus</i>)(猫唾液)			
	Fel d 1	cat-1	38
小家鼠(<i>Mus musculus</i>)			
	Mus m 1	MUP	19
褐家鼠(<i>Rattus norvegicus</i>)			
	Rat n 1		17
烟曲霉(<i>Aspergillus fumigatus</i>)			
	Asp f 1		18
	Asp f ?		90
	Asp f ?		55

[0148]

	过敏原来源		MW
	系统命名	曾用名	
[0149]	白色念珠菌(<i>Candida albicans</i>)		
	Cand a		40
	链格孢菌(<i>Alternaria alternata</i>)		
	Alt a 1		28
	断发毛癣菌(<i>Trichophyton tonsurans</i>)		
	Tri t 1		30
	德国小蠊(<i>Blattaria germanica</i>)(蟑螂)		
	Bla g 2		20

- [0150] 在一实例中,过敏原来自动物,如哺乳动物,例如狗或猫或大鼠或小鼠。
- [0151] 在一实例中,过敏原来自植物,如植物花粉。
- [0152] 在一实例中,过敏原来自昆虫,如螨。
- [0153] 在一实例中,过敏原为HDM。
- [0154] STRO-1⁺细胞或后代细胞以及源自它们的上清液或者一种或多种可溶性因子
- [0155] STRO-1⁺细胞为发现于骨髓、血液、乳牙(如脱落的乳牙)、牙髓细胞、脂肪组织、皮肤、脾脏、胰腺、脑、肾脏、肝、心脏、视网膜、脑、毛囊、肠、肺、淋巴结、胸腺、骨、韧带、腱、骨骼肌、真皮和骨膜中的细胞。
- [0156] 在一实例中,STRO-1⁺细胞能够分化为一种或多种或两种或更多种和/或三种胚系,如中胚层和/或内胚层和/或外胚层。
- [0157] 在一个实例中,STRO-1⁺细胞是能够分化为许多细胞类型的专能性细胞(multipotential cells),包括但不限于:脂肪组织、骨组织、软骨组织、弹性组织、肌肉组织和纤维结缔组织。这些细胞进入的具体定型谱系和分化途径,取决于来自机械影响和/或内源性生物活性因子如生长因子、细胞因子和/或宿主组织确立的局部微环境条件的多种影响。因此,STRO-1⁺专能性细胞为非造血祖细胞,其分裂产生的子代细胞为干细胞或前体细胞,它们会适时地不可逆分化而产生表型细胞。
- [0158] 在一个实例中,STRO-1⁺细胞从获自个体的样品富集而来,例如,待治疗的个体或相关的个体或不相关的个体(相同物种或不同物种的个体)。本文所用术语“富含”、“富集”或其变型用来描述,当相比未处理的细胞群(例如,处于它们天然环境中的细胞)时,细胞群中一种特定细胞类型的比例或多种特定细胞类型的比例增加。在一个实例中,富集STRO-1⁺的细胞群包含至少约0.1%,或0.5%,或1%,或2%,或5%,或10%,或15%,或20%,或25%,或30%,或50%,或75%的STRO-1⁺细胞。在这个方面,术语“富集STRO-1⁺细胞的细胞群”应当理解为给术语“包含X%的STRO-1⁺细胞的细胞群”提供了明确的支持,其中X%为本文所述的百分比。
- [0159] 在一些实例中,STRO-1⁺细胞可以形成克隆性集落,例如CFU-F(成纤维细胞)或其子集(例如,50%,或60%,或70%,或70%,或90%,或95%)可以具有该活性。

[0160] 在一个实例中,以可选形式从包含STRO-1⁺细胞的细胞制剂富集细胞群。在这个方面,术语“可选形式”应当理解为指细胞表达允许选择STRO-1⁺细胞的标志物(例如,细胞表面标志物)。所述标志物可以但并非必须为STRO-1。例如,如本文所述和/或示例的,表达STRO-2和/或STRO-3(TNAP)和/或STRO-4和/或VCAM-1和/或CD146和/或3G5的细胞(例如,MPCs)还表达STRO-1(且可以为STRO-1^亮)。因此,细胞为STRO-1⁺的说明并不意味着该细胞是通过STRO-1表达而选择的。在一个实例中,基于至少STRO-3表达来选择所述细胞,例如,它们为STRO-3⁺(TNAP⁺)。

[0161] 提及挑选细胞或其群体不要求从特定组织来源挑选。如本文所述,可以从大量不同来源来挑选或分离或富集STRO-1⁺细胞。即,在一些实例中,这些术语为从包含STRO-1⁺细胞(例如,MPCs)的任何组织或血管化组织或包含周细胞(例如,STRO-1⁺周细胞)的组织或任何一种或多种本文所述的组织进行挑选提供支持。

[0162] 在一个实例中,用于本公开的方法的细胞表达一种或多种标志物,其单独地或共同地选自:TNAP⁺、VCAM-1⁺、THY-1⁺、STRO-2⁺、STRO-4⁺(HSP-90 β)、CD45⁺、CD146⁺、3G5⁺或它们的任何组合。

[0163] 所用“单独地(individually)”是指本公开分别包括所述标志物或标志物的组,并且,虽然本文可能没有分别列出单个标志物或标志物的组,所附的权利要求可以分别地和彼此分开地定义此类标志物或标志物的组。

[0164] 通过“共同地(collectively)”是指本公开包括任何数目或组合的所述标志物或肽的组,并且,虽然本文可能没有明确列出此类数目或组合的标志物或标志物的组,所附的权利要求可以分别地和与任何其他标志物或标志物组的组合分开地定义此类组合或亚组合。

[0165] 例如,所述STRO-1⁺细胞为STRO-1^亮(同义词为STRO-1^{bri})。在一个实例中,所述Stro-1^{bri}细胞相对于STRO-1^{暗淡}或STRO-1^{中间}细胞优先被富集。

[0166] 在一个实例中,另外地,所述STRO-1^亮细胞为TNAP⁺、VCAM-1⁺、THY-1⁺、STRO-2⁺、STRO-4⁺(HSP-90 β)和/或CD146⁺的一种或多种(或全部)。例如,所述细胞针对一种或多种前述标志物进行挑选,和/或被证明表达一种或多种前述标志物。在这方面,显示表达了标志物的细胞不需要被特别测试,但先前富集的或分离的细胞可以被测试,并且随后被使用,分离或富集的细胞可以被合理地假定为也表达相同标志物。

[0167] 在一个实例中,间充质前体细胞为WO 2004/85630中定义的血管周间充质前体细胞。

[0168] 对于给定标志物被称为“阳性”的细胞,其可以表达低(1o或暗淡)或高(亮,bri)水平的该标志物,这取决于标志物在细胞表面上存在的程度,其中该术语与用于所述细胞的分选过程中的荧光或其他标志物的强度有关。在将标志物用于被分选的特定细胞群的情形下,1o(或者,暗或暗淡)和bri的区别容易理解。对于给定标志物被称为“阴性”的细胞,不一定完全不存在于该细胞。该术语是指细胞以相对非常低的水平表达标志物,并且其在当可检测地标记时产生非常低的信号,或在背景水平例如利用同种型对照抗体检测的水平上不可检测。

[0169] 当用于本文时,术语“亮”是指当被可检测地标记时,产生相对高的信号的细胞表面上的标志物。不希望受理论的束缚,认为相比样品中的其他细胞,“亮”细胞表达更多的靶

标标志物蛋白(例如被STRO-1识别的抗原)。例如,当用FITC-偶联的STRO-1抗体标记时,如通过荧光活化的细胞分选(FACS)分析所测定的,相比非亮细胞(STRO-1^{暗淡/暗}),STRO-1^{bri}细胞产生更强的荧光信号。在一个实例中,“亮”细胞构成起始样品中所包含的最亮标记的细胞(例如骨髓单个核细胞)的至少约0.1%。在其它实例中,“亮”细胞构成起始样品中所包含的最亮标记的细胞,例如骨髓单个核细胞的至少约0.1%、至少约0.5%、至少约1%、至少约1.5%或至少约2%。在一个实例中,相对于“背景”即STRO-1⁻细胞,STRO-1^亮细胞的STRO-1表面表达具有2个对数量级的较高表达。通过比较,相比“背景”,STRO-1^{暗淡}和/或STRO-1^{中间}细胞的STRO-1表面表达具有小于2个对数量级的较高表达,通常约为1个对数量级或小于背景。

[0170] 如本文所用,术语“TNAP”旨在包括组织非特异性碱性磷酸酶的所有同种型。例如,该术语包括肝同种型(LAP)、骨同种型(BAP)和肾同种型(KAP)。在一个实例中,所述TNAP为BAP。在一个实例中,如本文所用,TNAP是指能结合由杂交瘤细胞系产生的STRO-3抗体的分子,所述杂交瘤细胞系根据布达佩斯条约的条款于2005年12月19日保藏在ATCC,保藏登录号为PTA-7282。

[0171] 此外,在优选的实例中,所述STRO-1⁺细胞能产生克隆性CFU-F。

[0172] 在一个实例中,显著比例的STRO-1⁺专能性细胞能分化为至少两种不同的胚系。专能性细胞可以发展成的的谱系的非限制性实例包括:骨前体细胞;肝细胞祖细胞,其能专能分化为胆管上皮细胞和肝细胞;神经受限细胞,其能产生能发展为少突胶质细胞和星形胶质细胞的神经胶质细胞前体;神经元前体,其发展为神经元;心肌和心肌细胞、葡萄糖响应性胰岛素分泌性胰β细胞系的前体。其他谱系包括但不限于,成牙本质细胞、牙质生成细胞(denti-producing cells)和软骨细胞,以及以下细胞的前体细胞:视网膜色素上皮细胞、成纤维细胞、皮肤细胞如角质细胞、树状细胞、毛囊细胞、肾管上皮细胞、平滑肌和骨骼肌肉细胞、睾丸祖细胞、血管内皮细胞、腱细胞、韧带细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、骨髓基质、心肌细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、周细胞、血管细胞、上皮细胞、神经胶质细胞、神经元细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞。

[0173] 在另一个实例中,所述STRO-1⁺细胞培养后不能产生造血细胞。

[0174] 在一个实例中,所述细胞采集自待治疗的个体,并利用标准技术体外培养,以及被用来获得上清液或可溶性因子或扩增的细胞,以作为自体型或同种异体型组合物用于给予至所述个体。在可选的实例中,使用了一种或多种已建立的人细胞系的细胞。在本公开另一个有用的实例中,使用了非人的动物(或者如果患者不为人,则来自另一物种)的细胞。

[0175] 本公开还包括获自或来源于经体外培养产生的STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞(后者也被称为扩增的细胞)的上清液或可溶性因子的用途。根据培养条件(包括培养基中刺激因子的数目和/或类型)、传代次数等,本公开的扩增的细胞可以具有多种表型。在某些实例中,所述后代细胞由亲本细胞群经过约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9或约10次传代后获得。然而,所述后代细胞可以由亲本细胞群经过任何次传代后获得。

[0176] 所述后代细胞可以通过在任何合适的培养基中培养获得。在提及细胞培养物时所用的术语“培养基”包括细胞周围环境的组分。培养基可以为固体、液体、气体或相和物质的混合物。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。示例性气体培养基包括生长在培养皿(petri dish)或其他固体或半固体支持物上的细胞所暴露于其中的气相。术语“培养基”还指旨在

用于细胞培养的物质,即使其还未与细胞接触。换句话说,制备的用于细菌培养的富营养液体为培养基。与水或其他液体混合时变得适于细胞培养的粉末状混合物可以称为“粉末状培养基”。

[0177] 在一个实例中,通过利用标记有STRO-3抗体的磁珠从骨髓中分离TNAP⁺STRO-1⁺细胞可以得到用于本公开所述方法的后代细胞,然后培养扩增所述分离的细胞(合适培养条件的实例,参见Gronthos et al.Blood85:929-940,1995)。

[0178] 在一个实例中,此类扩增的细胞(后代)(例如,至少5次传代后)可以为TNAP⁻、CC9⁺、HLA I⁺类、HLA II⁻类、CD14⁻、CD19⁻、CD3⁻、CD11a⁻c⁻、CD31⁻、CD86⁻、CD34⁻和/或CD80⁻。然而,可能在与本文描述的那些不同的培养条件下,不同标志物的表达可能存在差异。另外,虽然这些表型的细胞可能在扩增的细胞群中占优势,但这不意味着小比例的所述细胞不具有该表型(例如,小百分比的扩增细胞可以为CC9⁻)。在一个实例中,扩增的细胞仍然具有分化为不同细胞类型的能力。

[0179] 在一个实例中,用来得到上清液或可溶性因子或细胞本身的扩增的细胞群,包含其中至少25%(例如至少50%)的细胞为CC9⁺的细胞。

[0180] 在另一个实例中,用来得到上清液或可溶性因子或细胞本身的扩增的细胞群,包含其中至少40%(例如至少45%)的细胞为STRO-1⁺的细胞。

[0181] 在其他的实例中,扩增的细胞可以表达一种或多种共同地或单独地选自以下的标志物:LFA-3、THY-1、VCAM-1、ICAM-1、PECAM-1、P-选择素、L-选择素、3G5、CD49a/CD49b/CD29、CD49c/CD29、CD49d/CD29、CD 90、CD29、CD18、CD61、整合素β6-19、血栓调节蛋白、CD10、CD13、SCF、PDGF-R、EGF-R、IGF1-R、NGF-R、FGF-R、瘦素-R(STRO-2=瘦素-R)、RANKL、STRO-4(HSP-90β)、STRO-1^亮和CD146或这些标记的任何组合。

[0182] 在一个实例中,所述后代细胞为专能性扩增的STRO-1⁺专能性细胞后代(MEMPs),如WO 2006/032092中所定义和/或描述。制备可衍生后代细胞的STRO-1⁺专能性细胞的富集细胞群的方法描述于WO 01/04268和WO 2004/085630。在体外情形下,STRO-1⁺专能细胞很少作为完全纯的制剂提供,并且通常与其他细胞即组织特异性定型细胞(TSCCs)一起提供。WO 01/04268涉及以约0.1%至90%的纯度水平从骨髓收获此类细胞。包含可衍生后代的MPCs的细胞群可以直接从组织源收获,或可选地,其可以为已体外扩增的群体。

[0183] 例如,所述后代可以获自收获的、未扩增的基本上纯化的STRO-1⁺专能性细胞群体,其包含所存在的群体总细胞的至少约0.1%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或95%。例如,可以通过选择对于至少一种单独地或共同地选自以下的标志物为阳性的细胞来达到该水平:TNAP、STRO-4(HSP-90β)、STRO-1^亮、3G5⁺、VCAM-1、THY-1、CD146和STRO-2。

[0184] MEMPS与新鲜收获的STRO-1⁺专能细胞的区别可以在乎,它们对标志物STRO-1^{bri}为阳性,而对标志物碱性磷酸酶(ALP)为阴性。相反,新鲜分离的STRO-1⁺专能性细胞对STRO-1^{bri}和ALP均为阳性。在本公开的一个实例中,施用的细胞中至少15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%具有STRO-1^{bri}、ALP⁻表型。在其他的实例中,MEMPS对标志物Ki67、CD44和/或CD49c/CD29、VLA-3、α3β1中的一种或多种为阳性。在又一个实例中,MEMPs不展示TERT活性,和/或对标志物CD18为阴性。

[0185] STRO-1⁺细胞起始群体可以源自WO 01/04268或WO 2004/085630中所列的任何一

种或多种组织类型,即骨髓、牙髓细胞、脂肪组织和皮肤,或者可能更广义地来自:脂肪组织、牙、牙髓、皮肤、肝、肾、心脏、视网膜、脑、毛囊、肠、肺、脾脏、淋巴结、胸腺、胰腺、骨、韧带、骨髓、腱和骨骼肌。

[0186] 应当理解,在实施本公开所述方法时,对携带任何给定细胞表面标志物的细胞进行分离可受到多种不同方法的影响,然而,一些示例性方法依赖于,将结合剂(例如,抗体或其抗原结合片段)结合至所关注的标志物,然后分离展现出结合的那些,其为高水平结合,或低水平结合或无结合。最方便的结合剂为抗体或基于抗体的分子,例如单克隆抗体或基于单克隆抗体的(例如,包含其抗原结合片段的蛋白)分子,这是由于这些后述试剂的特异性。抗体可以用于这两个步骤,然而也可以使用其他试剂,因此还可以利用这些标志物的配体来富集携带它们或缺少它们的细胞。

[0187] 可以将抗体或配体结合到固相支持物上,以允许粗分离。例如,分离技术将待收集部分的活力保留最大化。可以利用各种不同效率的技术来获得相对的粗分离。采用的具体技术取决于分离效率、相关的细胞毒性、进行的容易度和速度,以及所需的尖端设备和/或专业技术。分离方案可以包括但不限于:利用包被有抗体的磁珠的磁力分离、亲和层析和用结合至固相基质的抗体“淘选”。提供精确分离的技术包括但不限于FACS。进行FACS的方法对本领域技术人员显而易见。

[0188] 针对每种本文所述标志物的抗体可商购(例如,针对STRO-1的单克隆抗体可从R&D Systems, USA商购),可从ATCC或其他保藏机构获得,和/或可以利用本领域公认的技术制备。

[0189] 在一个实例中,用于分离STRO-1⁺细胞的方法包括的第一步骤为固相分选步骤,其利用例如磁力活化的细胞分选(MACS)来识别STRO-1的高水平表达。随后可以进行的第二分选步骤(如需要)导致如专利说明书WO 01/14268所描述的更高水平的前体细胞表达。该第二分选步骤可涉及使用两种或更多种标志物。

[0190] 获得STRO-1⁺细胞的方法还可以包括利用已知的技术在第一富集步骤前收获细胞来源。因此,可手术去除组织。然后,将包含细胞的所述来源组织分离为所称的单细胞悬液。可以通过物理和/或酶促方式实现这一分离。

[0191] 一旦得到合适的STRO-1⁺细胞群,其可以通过任何合适的方式培养或扩增,以获得MEMPs。

[0192] 在一个实例中,所述细胞采自待治疗的个体,利用标准技术体外培养,以及用以获得作为自体型或同种异体型组合物的上清液或可溶性因子或扩增的细胞,用于给予至所述个体。在可选的实例中,使用一种或多种已建立的人细胞系细胞来获得上清液或可溶性因子。在本公开另一有用的实例中,非人动物(或如果患者不为人,则来自另一物种)的细胞被用来获得上清液或可溶性因子。

[0193] 可以利用来自任何非人的动物物种的细胞实施本公开的方法和用途,包括但不限于:非人灵长类细胞、有蹄类、犬科动物、猫科动物、兔类、啮齿动物、鸟类和鱼类的细胞。可以用以实施本公开的方法的灵长类细胞包括但不限于:黑猩猩、狒狒、猕猴和任何其他新世界或旧世界猴的细胞。可以用以实施本公开的有蹄类动物细胞包括但不限于:牛、猪、绵羊、山羊、马、水牛和野牛的细胞。可以用以实施本公开的啮齿类动物细胞包括但不限于:小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠和沙鼠的细胞。可以用以实施本公开的兔类动物物种实例包括家兔、长

腿大野兔、野兔、白尾灰兔、雪鞋兔和鼠兔。鸡(原鸡)为可以用以实施本公开的鸟类物种的一个实例。

[0194] 在一个实例中,所述细胞为人细胞。

[0195] 在使用前,或在得到上清液或可溶性因子前,可以将用于本公开方法的细胞储存备用。用于保存和储存真核细胞尤其是哺乳动物细胞的方法和方案为本领域已知(参见,例如Pollard,J.W.and Walker,J.M.(1997)Basic Cell Culture Protocols,Second Edition,Human Press,Totowa,N.J.;Freshney,R.I.(2000)Culture of Animal Cells,Fourth Edition,Wiley-Liss,Hoboken,N.J.)。任何保持所分离的干细胞如间充质干/祖细胞或其后代的生物活性的方法都可用于本公开。在一个实例中,所述细胞通过利用冷冻保存维持和储存。

[0196] 遗传修饰的细胞

[0197] 在一个实例中,STR0-1⁺细胞和/或其后代细胞被遗传修饰,例如,以表达和/或分泌目标蛋白。例如,所述细胞被改造以表达在治疗呼吸病症中有用的蛋白,例如,蛋白酶、DNase或表面活性蛋白如表面活性蛋白C。

[0198] 遗传修饰细胞的方法对本领域技术人员显而易见。例如,要在细胞中表达的核酸被可操作地连接至启动子,以诱导在细胞中的表达。例如,将核酸连接至在个体的多种细胞中可操作的启动子,诸如例如,病毒启动子,例如,CMV启动子(例如,CMV-IE启动子)或SV-40启动子。其他合适的启动子为本领域已知,且应当理解为加以必要的修改适用于本公开的当前实例。

[0199] 在一个实例中,核酸以表达构建体的形式提供。如本文所用,术语“表达构建体”是指能够使得与其可操作地连接的核酸(例如报告基因和/或反选择性报告基因)在细胞内进行表达的核酸。在本公开的情形中应当理解,表达构建体可以包括或为质粒、噬菌体、噬菌粒、粘粒、病毒亚基因组或基因组片段,或能够以可表达形式维持和/或复制异源DNA的其他核酸。

[0200] 用于完成本公开的合适表达构建体的构建方法对本领域技术人员显而易见,并且描述于,例如,Ausubel et al (In:Current Protocols in Molecular Biology.Wiley Interscience,ISBN 047 150338,1987)或Sambrook et al (In:Molecular Cloning: Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratories,New York,Third Edition 2001)。例如,利用例如PCR从合适的模板核酸扩增表达构建体的每个组分,随后克隆至合适的表达构建体,例如,质粒或噬菌粒。

[0201] 适合于此类表达构建体的载体为本领域已知,和/或在本文有描述。例如,哺乳动物细胞中适合于本公开方法的表达载体为,例如,Invitrogen公司提供的pcDNA载体组的载体、pCI载体组(Promega)的载体、pCMV载体组(Clontech)的载体、pM载体(Clontech)、pSI载体(Promega)、VP 16载体(Clontech)或pcDNA载体组(Invitrogen)的载体。

[0202] 本领域的技术人员知道其他载体和此类载体的来源,例如,Life Technologies Corporation、Clontech或Promega公司。

[0203] 将分离的核酸分子或包含其的基因构建体引入至细胞进行表达的方法为本领域技术人员所已知。用于给定生物体的技术取决于已知的成功技术。将重组DNA引入至细胞的方法包括显微注射、DEAE-葡萄糖介导的转染、脂质体(诸如使用lipofectamine(Gibco,MD,

USA) 和/或cellfectin (Gibco, MD, USA)) 介导的转染、PEG-介导的DNA摄取、电穿孔和微粒轰击,如通过利用包覆有DNA的钨或金颗粒 (Agracetus Inc., WI, USA) 等。

[0204] 可选择地,本公开的表达构建体为病毒载体。合适的病毒载体为本领域已知,且可商购。用于递送核酸以及将该核酸整合到宿主细胞基因组的常规基于病毒的系统包括,例如,逆转录病毒载体、慢病毒载体或腺病毒相关的病毒载体。可选地,腺病毒载体可用于将保持附加体形式的核酸引入至宿主细胞。病毒载体为在靶细胞和组织中进行基因转移的有效和通用的方法。另外,在许多不同细胞类型和靶组织中观察到高转导效率。

[0205] 例如,逆转录病毒载体通常包含顺式作用长末端重复 (LTRs),其具有多达6-10kb的外源序列的包装能力。最小的顺式作用LTRs足以用于载体的复制和包装,其随后被用于将表达构建体整合至靶细胞,以提供长期表达。广泛使用的逆转录病毒载体包括基于鼠白血病病毒 (MuLV)、长臂猿白血病病毒 (GaLV)、猿猴免疫缺陷病毒 (SrV)、人免疫缺陷病毒 (HIV) 和它们的组合的那些(参见,例如,Buchscher et al., J Virol. 56:2731-2739 (1992); Johann et al., J. Virol. 65:1635-1640 (1992); Sommerfelt et al., Virol. 76:58-59 (1990); Wilson et al., J. Virol. 63:274-2318 (1989); Miller et al., J. Virol. 65: 2220-2224 (1991); PCT/US94/05700; Miller and Rosman BioTechniques 7:980-990, 1989; Miller, A.D. Human Gene Therapy 7:5-14, 1990; Scarpa et al. Virology 75:849-852, 1991; Burns et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037, 1993)。

[0206] 已开发出多种腺相关病毒 (AAV) 载体系统用于核酸递送。可以利用本领域已知技术容易地构建AAV载体。参见,例如,美国专利第5,173,414号和第5,139,941号;国际公开第 WO 92/01070号和第WO 93/03769号;Lebkowski et al. Molec. Cell. Biol. 5:3988-3996, 1988; Vincent et al. (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter Current Opinion in Biotechnology 5:533-539, 1992; Muzyczka. Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158:97-129, 1992; Kotin, Human Gene Therapy 5: 793-801, 1994; Shelling and Smith Gene Therapy 7:165-169, 1994; 以及 Zhou et al. J Exp. Med. 179:1867-1875, 1994。

[0207] 用于递送本公开的表达构建体的其他病毒载体包括,例如源自痘病毒家族的那些载体,如牛痘病毒和鸟痘病毒,或甲病毒属,或缀合的病毒载体(例如Fisher-Hoch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56:317-321, 1989中所描述的)。

[0208] 分析细胞和可溶性因子的治疗性/预防性潜能

[0209] 确定细胞或可溶性因子治疗或预防或延缓呼吸病症的发作或进程的能力的方法对本领域技术人员而言是显而易见的。

[0210] 例如,将细胞或可溶性因子(例如,因子混合物或单个因子或因子的一部分(如通过亲和纯化或层析得到的))施用于呼吸病症模型,并且评估对一种或多种症状的影响。

[0211] 呼吸病症的示例性模型包括过敏症如过敏性哮喘的动物模型,如WO2002/098216 中所描述的模型,如通过宿主尘螨蛋白诱导的过敏性哮喘小鼠模型(Fattouh et al., Am J Respir Crit Care Med 172:314-321, 2005),其中IL-5和嗜酸性粒细胞趋化因子 (eotaxin) 过度表达的重度哮喘小鼠模型,对作为气溶胶递送的乙酰甲胆碱高度过敏的接受气管内滴注聚-L-赖氨酸的小鼠(Homma et al., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 289:L413-L418, 2005),博来霉素(bleomycin) 或FITC或二氧化硅诱导的肺纤维化模型

(Muggia et al., Cancer Treat Rev 10:221-243, 1983; Roberts et al., J Pathol 176: 309-318, 1995; Oberdorster Inhal Toxicol 8:73-89, 1996)。

[0212] 从前述内容对本领域技术人员显而易见的是,本公开还提供了识别或分离用于治疗、预防或延缓呼吸病症的细胞或可溶性因子的方法,所述方法包括:

[0213] (i) 将细胞或可溶性因子给予患有呼吸病症的测试个体,并评估呼吸病症的症状;

[0214] (ii) 将(i)所述个体的呼吸病症症状水平与对照个体的呼吸病症症状进行比较,所述对照个体患有该呼吸病症且未给予所述细胞或可溶性因子,

[0215] 其中相比对照个体,测试个体症状的改善表明该细胞或可溶性因子可治疗呼吸病症。

[0216] 所述细胞可以为本文根据任一实例描述的任何细胞。

[0217] 本文描述了示例性症状。

[0218] 细胞组合物

[0219] 在本公开的一个实例中,STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞以组合物的形式给予。在一个实例中,此类组合物包含药学可接受的载体和/或赋形剂。

[0220] 术语“载体”和“赋形剂”是指本领域常规使用的以促进活性化合物的储存、给药和/或生物活性的物质组合物(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mac Publishing Company (1980)。载体还可以减少活性化合物任何不需要的副作用。合适的载体为,例如,稳定的,例如,不能与载体内的其他成分反应。在一个实例中,所述载体在治疗采用的剂量和浓度下对接受者不产生明显的局部或全身性不利影响。

[0221] 本公开的合适载体包括常规使用的那些载体,例如,水、盐水、葡萄糖水溶液、乳糖、林格氏溶液、缓冲溶液、透明质酸和乙二醇为示例性液体载体,尤其是对于溶液(等渗时)。合适的药物载体和赋形剂包括淀粉、纤维素、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸镁、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、氯化钠、甘油、丙二醇、水、乙醇等。

[0222] 在另一个实例中,载体为培养基组合物,例如,其中生长或悬浮有细胞。例如,此类培养基组合物对于给予个体不诱发任何不利的影响。

[0223] 示例性载体和赋形剂不对细胞存活力和/或细胞减少、预防或延缓呼吸病症的能力产生不利影响。

[0224] 在一个实例中,载体或赋形剂提供了缓冲活性,以维持细胞和/或可溶性因子处于合适的pH,从而发挥生物活性,例如,所述载体或赋形剂为磷酸盐缓冲盐水(PBS)。PBS代表了有吸引力的载体或赋形剂,因为其与细胞和因子最小相互作用,并允许细胞和因子的快速释放,在这种情形下,本公开的组合物可以作为液体制备,以直接应用于血流或组织或组织周围或邻近区域,例如,通过注射。

[0225] 还可以将STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞并入或植入到支架内,所述支架与接受者相容且降解为对接受者无害的产物。这些支架为要移植到接受个体中的细胞提供了支持和保护。天然和/或合成的可生物降解支架即为此类支架的实例。

[0226] 多种不同的支架可以成功用于实施本公开的方法。示例性支架包括但不限于生物可降解的支架。天然的生物可降解支架包括胶原、纤连蛋白和层粘连蛋白支架。用于细胞移植支架的合适合成材料应当能够支持大量的细胞生长和细胞功能。此类支架还可以为可吸收的。合适的支架包括聚乙醇酸支架,例如,如Vacanti, et al. J. Ped. Surg. 23:3-9 1988;

Cima, et al. Biotechnol. Bioeng. 38:145 1991; Vacanti, et al. Plast. Reconstr. Surg. 88:753-9 1991所描述的;或合成聚合物如聚酸酐、聚原酸酯(polyorthoesters)和聚乳酸。

[0227] 在另一个实例中,细胞可以在凝胶支架(如来自Upjohn公司的Gelfoam)内给药。

[0228] 可将细胞作为药物组合物的组分给药,特别是配制为用于鼻内给药。在某些实例中,细胞与酶抑制剂或吸收增强剂同时给药。在其他实例中,配制成鼻内给药的药物组合物包含酶抑制剂和/或吸收增强剂。在其他实例中,药物组合物包含合成的表面活性剂、胆盐、磷脂和环糊精。细胞还可通过乳剂或脂质体鼻内给药。在某些实例中,鼻内给药通过使用聚合物微球来实现。细胞可在甘氨胆酸钠(NaGC)和亚油酸存在下给药。

[0229] 用于鼻内给药的药物组合物可作为喷雾剂、气溶胶、凝胶、溶液、乳剂或悬浮剂给药。可选择地,药物组合物直接给药至上呼吸道,如鼻旁窦。在一个实例中,细胞或药物组合物通过微导管给药。

[0230] 可用于本文所述方法的细胞组合物可以单独或作为与其他细胞的混合物一起给予。可以与本公开的组合物共同给药的细胞包括但不限于其他专能或多能细胞或干细胞,或骨髓细胞。不同类型的细胞可以在给药前即刻或不久与本公开的组合物混合,或者可以将它们在给药前一起共培养一段时间。

[0231] 在一个实例中,所述组合物包含有效量或者治疗或预防有效量的细胞。本文描述了示例性剂量。待给予的细胞的精确量取决于多种因素,包括患者年龄、体重和性别,以及呼吸病症的程度和严重性。

[0232] 在一些实例中,细胞被包含于腔室内,所述腔室不允许细胞逸出进入个体的循环却允许由该细胞分泌的因子进入循环。以这种方式,通过允许细胞分泌因子进入个体的循环中,可将可溶性因子给予个体。这种腔室可以同样地植入个体的部位,以增加可溶性因子的局部水平,例如,植入胰腺内或胰腺附近。

[0233] 在本公开的一些实例中,在启动细胞组合物治疗前抑制患者的免疫反应可能是不需要的或不合适的。因此,用同种异体型甚或异种型STRO-1⁺细胞或其后代移植在一些情形下可能是可耐受的。

[0234] 然而,在其他情形下,在启动细胞治疗前通过药理学方式抑制患者的免疫反应和/或减少个体针对细胞组合物的免疫反应可以是可取的或合适的。这可以通过应用全身性或局部性免疫抑制剂来完成,或其可以通过在密封装置内递送细胞完成。所述细胞可以封装在胶囊内,所述胶囊对细胞所需的营养物和氧以及治疗因子具有通透性,然而所述细胞对免疫体液因子和细胞不具有通透性。例如,胶囊密封材料为低过敏性的,容易并稳定地置入靶组织,并为植入的结构提供额外防护。减少或消除对被移植的细胞的免疫反应的这些和其他方式为本领域已知。作为一种选择,可以对所述细胞进行遗传修饰,以减少它们的免疫原性。

[0235] 可溶性因子组合物

[0236] 在一个实例中,源自STRO-1⁺细胞和/或源自后代细胞的上清液或可溶性因子以组合物形式给予,例如,包含合适的载体和/或赋形剂。在一个实例中,所述载体或赋形剂不对可溶性因子或上清液的生物效应产生不利影响。

[0237] 在一个实例中,所述组合物包含稳定可溶性因子或上清液成分例如蛋白酶抑制剂

的物质组合物。在一个实例中,包含的蛋白酶抑制剂的量不足以对个体带来不利影响。

[0238] 可以将包含源自STRO-1⁺细胞和/或源自后代细胞的上清液或可溶性因子的组合物制备为合适的液体悬液,例如,在培养基或稳定的载体或缓冲溶液中,例如,磷酸盐缓冲盐。合适的载体在上文有描述。在另一个实例中,包含源自STRO-1⁺细胞和/或源自后代细胞的上清液或可溶性因子的悬液为用于注射的油性悬液。合适的亲脂性溶剂或载体包括:脂肪油如芝麻油;或合成的脂肪酸酯如油酸乙酯或甘油三酯;或脂质体。用于注射的悬液还可以含有增加悬液粘性的物质如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。任选地,所述悬液还可以含有合适的稳定剂或增加化合物溶解性的试剂,以允许制备高浓缩的溶液。

[0239] 根据需要,无菌注射液可通过将在合适的溶剂中的所需量的上清液或可溶性因子与上述成分的一种或组合合并,然后过滤灭菌来制备。

[0240] 通常,通过将上清液或可溶性因子合并至含有基础分散介质和来自以上所列举那些的所需其他成分的无菌载体中来制备分散液。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末情形下,示例性制备方法为真空干燥和冷冻干燥,其产生活性成分加上来自其先前无菌过滤的溶液的任何其他所需成分的粉末。根据本公开的可选实例,可以将所述上清液或可溶性因子与一种或多种增加其溶解性的其他化合物一起配制。

[0241] 其他示例性载体或赋形剂描述于例如Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

[0242] 治疗性组合物在生产和存储条件下通常应当为无菌且稳定的。可以将组合物配制为溶液、微乳剂、脂质体或其他有序结构。载体可以为溶剂或分散介质,其含有例如,水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和聚乙二醇液体等),以及它们的合适混合物。例如,通过使用包衣层如卵磷脂、通过维持分散情形下所需粒径,以及通过使用表面活性剂,可以维持合适的流动性。在一些情形下,所述组合物中含有等渗剂,例如,糖类、多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。可以通过将延迟吸收的试剂例如单硬脂酸盐和明胶包含在组合物中,达到可注射组合物的延长吸收。此外,可以在时间释放制剂中给予可溶性因子,例如在含有缓释性聚合物的组合物中。可以将活性化合物与防止化合物快速释放的载体一起制备,如控释制剂,包括埋植剂和微胶囊化的递送系统。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物,如乙烯醋酸乙烯酯、聚碳酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、聚乳酸和聚乳酸-聚乙醇酸共聚物(PLG)。用于制备此类制剂的许多方法已获得专利,或为本领域技术人员熟知。

[0243] 上清液或可溶性因子可以与合适的基质相组合给药,例如,以提供可溶性因子的缓慢释放。

[0244] 组合物的其他组分

[0245] 源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶性因子、STRO-1⁺细胞或其后代可以与其他有利

的药物或生物分子(生长因子、营养因子)一起给药。当与其他试剂一起给药时,它们可以按单一药物组合物或分别的药物组合物,与其他药剂同时或依次(在给予其他试剂之前或之后)一起给药。可以共给药的生物活性因子包括抗凋亡剂(例如,EPO、EPO模拟体(mimetibody)、TPO、IGF-I和IGF-II、HGF、半胱天冬酶抑制剂);抗炎剂(例如,p38 MAPK抑制剂、TGF- β 抑制剂、他汀类、IL-6和IL-1抑制剂、PEMIROLAST、TRANILAST、REMICADE、SIROLIMUS和NSAIDs(非甾族抗炎药;例如,TEPOXALIN、TOLMETIN、SUPROFEN);免疫抑制剂/免疫调节剂(例如,钙调神经磷酸酶抑制剂如环孢霉素、他克莫司;mTOR抑制剂(例如,SIROLIMUS、EVEROLIMUS);抗-增殖剂(例如,咪唑硫嘌呤(azathioprine)、霉酚酸酯(mycophenolate mofetil));皮质类固醇(例如,氢化泼尼松(prednisolone)、氢化可的松(hydrocortisone));抗体如单克隆抗-IL-2R α 受体抗体(例如,巴利昔单抗、达利珠单抗(daclizumab))、多克隆抗-T-细胞抗体(例如,抗-胸腺细胞球蛋白(ATG);抗-淋巴细胞球蛋白(ALG);单克隆抗-T细胞抗体OKT3));抗-血栓形成剂(例如,肝素、肝素衍生物、尿激酶、PPack(右旋苯丙氨酸脯氨酸精氨酸氯甲基酮)、抗凝血酶化合物、血小板受体拮抗剂、抗-凝血酶抗体、抗-血小板受体抗体、阿司匹林、双嘧达莫、鱼精蛋白、水蛭素、前列腺素抑制剂和血小板抑制剂);以及抗-氧化剂(例如,普罗布考、维生素A、抗坏血酸、生育酚、辅酶Q-10、谷胱甘肽、L-半胱氨酸、N-乙酰半胱氨酸)以及局部麻醉剂。

[0246] 在一个实例中,本文根据任一实例所述的组合物包含抗炎剂、免疫调节剂、免疫抑制剂、止痛药或抗生素。在一个实例中,第二治疗剂是免疫调节剂。在另一实例中,第二治疗剂是抗-CD3抗体(如,OKT3,鼠源单克隆抗体(muronomab)),抗-IL-2受体抗体(如,巴利普单抗和达利珠单抗),抗T细胞受体抗体(如鼠源CD3单克隆抗体),硫唑嘌呤,神经钙调蛋白抑制剂,皮质类固醇,环孢霉素,甲氨蝶呤,巯嘌呤,霉酚酸酯,他克莫西或雷帕霉素。

[0247] 可选择地或另外地,本文根据任一实例所述的细胞、分泌的因子和/或组合物与呼吸病症的已知治疗如类固醇或LABA相组合。

[0248] 在一实例中,本文根据任一实例所述的药物组合物包含用于治疗呼吸病症的化合物。可选地,本文根据任一实例所述的治疗/预防方法还包括给予用于治疗呼吸病症的化合物。示例性化合物在本文中有描述,并且应当理解为加以必要的修改适用于本公开的这些实例。

[0249] 在另一实例中,本文根据任一实例所述的组合物还包含诱导或促进祖细胞分化为血管细胞的因子。示例性因子包括血管内皮生长因子(VEGF)、源自血小板的生长因子(PDGF;例如,PDGF-BB)和FGF。

[0250] 在另一实例中,本文根据任一实例所述的组合物还包含组织特异性定型细胞(TSCC)。在这方面,国际专利申请第PCT/AU2005/001445号表明,给予TSCC和STR0-1 $^+$ 细胞可导致TSCC增殖的增加。在一个实例中,TSCC为血管细胞。将此类组合物给予个体可以使血管生成增加,例如,引起被递送至受影响组织的营养物增加。

[0251] 医疗设备

[0252] 本公开还提供了用于或当被使用于本文根据任一实例所述的方法的医疗设备。例如,本公开提供了注射器或导管或吸入器或其他合适的递送装置,其包含STR0-1 $^+$ 细胞和/或其后代细胞和/或源自它们的可溶性因子和/或本文根据任一实例所述的组合物。任选地,所述注射器或导管或吸入器包装有用于本文根据任一实例所述方法的使用说明书。

[0253] 在另一个实例中,本公开提供了植入物,其包含STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自它们的可溶性因子和/或本文根据任一实例所述的组合物。任选地,所述植入物包装有用于本文根据任一实例所述方法的使用说明书。合适的植入物可以由例如,如上文所述的支架以及STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自它们的可溶性因子组成。

[0254] 给药方式

[0255] 可将源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶性因子、STRO-1⁺细胞或其后代手术植入、注射、吸入、递送(如通过导管或注射器),或以其他方式直接或间接地给予至需要修复或增加的部位,如肺中。

[0256] 在一实例中,可将源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶性因子、STRO-1⁺细胞或其后代递送至个体的血流。例如,源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶性因子、STRO-1⁺细胞或其后代经肠胃外递送。示例性肠胃外给药途径包括但不限于腹膜内、心室内、脑室内、囊内或静脉内。在一实例中,所述源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶性因子、STRO-1⁺细胞或其后代经动脉内递送至主动脉、心脏心房或心室中,或例如经静脉内至血管中。在这方面,已显示STRO-1⁺细胞迁移至受伤部位和/或肺。

[0257] 在递送细胞至心脏的心房或心室情形下,可将细胞给予至左心房或左心室,以避免可能由快速递送细胞至肺引起的并发症。

[0258] 在一个实例中,源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶性因子、STRO-1⁺细胞或其后代经静脉内递送。

[0259] 在一个实例中,源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶性因子、STRO-1⁺细胞或其后代被注射入递送部位,例如,利用注射器或通过导管或中心线。

[0260] 在一实例中,源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶性因子、STRO-1⁺细胞或其后代经鼻内或通过吸入递送。

[0261] 治疗制剂给药方案的选择取决于几种因素,包括实体的血清或组织更新率、症状水平和实体的免疫原性。在一实例中,给药方案将递送至个体的细胞和/或因子的量最大化,并符合可接受的副作用水平。因此,所递送细胞和/或因子的量部分取决于特定实体和所治疗病症的严重度。

[0262] 在一实例中,源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶性因子、STRO-1⁺细胞或其后代作为单次快速灌注剂量递送。可选择地,源自STRO-1⁺细胞的上清液或可溶性因子、STRO-1⁺细胞或其后代通过连续输注给予,或通过以例如每隔一天、一周或每周1-7次的剂量给予。示例性剂量方案涉及避免明显的不良副作用的最大剂量或剂量频率。总的每周剂量取决于所用化合物/细胞的类型和活性。合适剂量的确定由临床医生进行,例如,利用本领域已知的或者怀疑影响治疗或预期影响治疗的参数或因素。通常,剂量以稍微低于最佳剂量的量开始,并在其后以小的增量增加,直到相对于任何不利副作用达到所需的或最佳的效应。

[0263] 本发明的发明人已显示,由STRO-1⁺细胞和/或其后代和/或源自它们的可溶性因子提供的疗效在个体内观察至少可到4周。因此,在一些实例中,将所述细胞每周、每两周、每三周一次或每四周一次给药。

[0264] 根据本公开的涉及治疗或延缓呼吸病症进程的实例,在病症诊断后,给予STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自它们的可溶性因子,例如,利用本领域已知的和/或本文描述的标准方法。

[0265] 对于涉及预防或延缓呼吸病症发作的那些实例,可在该病症的临床诊断前,给予STRO-1⁺细胞和/或其后代细胞和/或源自它们的可溶性因子。

[0266] 在一实例中,本公开的治疗方法包括评估受治疗的个体在给药之后(如7天至30天之后)一种或多种肺功能参数的改善,其中所述肺功能参数为一秒钟用力呼气量(FEV₁) ;用力肺活量(FVC) ;FEV₁/FVC;呼气峰流量(PEF);用力呼气流量的25%-50%或25%75%(呼气中段空气流出肺的平均流量);用力呼气时间(FET);肺总容量(TLC);一氧化碳弥散量(DLCO);最大随意通气量;在胸部X射线、CT扫描、MRI、支气管镜检查或类似扫描中的一种或多种可检测的改善(如,肺外观的可见改善);或者血液中可检测的二氧化碳水平的可检测的改善(如,CO₂水平变动至正常范围内)。在一实例中,给药导致一种或多种肺功能参数(1)提高至预期的80%或以上;或者(2)提高了至少2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、50%。在一个实例中,所述方法包括在给药之前,鉴定小于相同身高和体重的个体预期值80%的任何参数,以及在治疗之后评估所述参数,其中治疗导致所述肺功能参数的一种或多种(1)提高至预期的80%或以上;或者(2)提高了至少2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、50%。

[0267] 本公开包括以下非限制性实施例。

实施例

[0268] 实施例1:通过选择STRO-3⁺细胞对MPC进行免疫选择

[0269] 骨髓(BM)获自健康正常成人志愿者(20-35岁)。简单地说,从臀部髂后嵴吸取40ml BM至含肝素锂抗凝剂的管中。

[0270] 如先前所述(Zannettino,A.C. et al. (1998) Blood 92:2613-2628),利用LymphoprepTM(Nycomed Pharma,Oslo,Norway)通过密度梯度分离来制备BMMNC。4℃下以400×g离心30分钟后,用移液管去除棕黄层(buffy layer),并在“HHF”中洗涤3次,所述“HHF”由Hank's平衡盐溶液(HBSS;Life Technologies,Gaithersburg,MD)组成,含有5%的胎牛血清(FCS,CSL Limited,Victoria,Australia)。

[0271] 随后按照先前所述(Gronthos et al. (2003) Journal of Cell Science 116: 1827-1835;Gronthos,S.and Simmons,P.J. (1995) Blood 85:929-940),通过磁力活化的细胞分选分离STRO-3⁺(或TNAP⁺)细胞。简单地说,将约1-3×10⁸个BMMNC在封闭缓冲液中于冰上孵育20分钟,所述缓冲液由HHF中的10% (v/v) 正常兔血清组成。将细胞与200μl的10μg/ml STRO-3mAb溶液一起在封闭缓冲液中于冰上孵育1小时。随后通过400×g离心,将细胞在HHF中洗涤两次。加入HHF缓冲液中以1/50稀释的山羊抗-小鼠γ-生物素(Southern Biotechnology Associates,Birmingham,UK),并将细胞在冰上孵育1小时。按如上所述将细胞在MACS缓冲液(无Ca²⁺和Mn²⁺的PBS,补充有1% BSA、5mM EDTA和0.01%叠氮化钠)中洗涤两次,并重悬在0.9ml终体积的MACS缓冲液中。

[0272] 将100μl链霉亲和素微珠(Miltenyi Biotec;Bergisch Gladbach,Germany)加入细胞悬液中,并在冰上孵育15分钟。将细胞悬液洗涤两次,并重悬在0.5ml MACS缓冲液中,然后上样至小型MACS柱(MS Columns,Miltenyi Biotec),并用0.5ml MACS缓冲液洗涤3次,以回收未结合STRO-3mAb的细胞(于2005年12月19日保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC),登录号为PTA-7282-参见国际公开第WO 2006/108229号)。加入另外的1ml MACS缓冲液后,从磁体移走柱子,并通过正压分离TNAP⁺细胞。来自每个级分的细胞等分试样可用

链霉亲和素-FITC进行染色，并通过流式细胞术评估纯度。

[0273] 实施例2:通过STRO-3mAb选择的细胞为STRO-1^亮细胞

[0274] 设计了实验以验证利用STRO-3mAb作为单一试剂分离细胞STRO-1^亮细胞的可能性。

[0275] 考虑到STRO-3 (IgG1) 与STRO-1 (IgM) 是不同的同种型，基于其与利用MACS程序分离的STRO-1⁺细胞共表达，通过双色FACS分析评估了STRO-3鉴定克隆性CFU-F的能力(图1)。点状直方图代表了以列表型数据收集的 5×10^4 个事件。垂直线和水平线设定为小于利用在相同条件下处理的同种型匹配的对照抗体1B5 (IgG) 和1A6.12 (IgM) 获得的平均荧光的1.0%的反应性水平。结果证明，STRO-1^亮细胞的较小群体共表达TNAP (右上象限)，而其余STRO-1⁺细胞与STRO-3mAb不反应。随后分析来自所有4个象限通过FACS分离的细胞的CFU-F发生率(表1)。

[0276] 表1:基于细胞表面标志物STRO-1和TNAP的共表达，通过双色FACS分析人骨髓细胞的富集(参见图1)。将FACS分选的细胞于标准的克隆形成条件下于补充有20% FCS的αMEM中培养。数据表示第14天时每接种 10^5 细胞的集落形成细胞(CFU-F)的平均数±SE ($n=3$ 个不同骨髓抽吸物)。这些数据表明，人MPC仅局限于鲜明地共表达STRO-1抗原的BM的TNAP阳性部分。

[0277]	骨髓部分	CFU-F频数/ 10^5 个细胞	富集(倍增)
	未分级分离的BMMNC	11.0 ± 2.2	1.0
	TNAP ⁺ /STRO-1 ^亮	$4,511 \pm 185$	410
	TNAP ⁺ /STRO-1 ^暗	0.0	0.0

[0278] 实施例3:在绵羊哮喘的绵羊模型中绵羊MPC的治疗应用

[0279] 3.1方法

[0280] 由于其使用与人临床相关的过敏原，过敏性哮喘的屋尘螨(HDM)绵羊模型被选择用来研究MPCs对哮喘的影响。哮喘的其他模型存在不足。例如，小鼠OVA激发模型使用的是与人临床不相关的过敏原，肺部炎症的模式和分布与在人体观测到的不一样，肺和实质组织炎症/重塑都被观测，并且与人慢性哮喘相反，未观测到气道平滑肌大幅增加。类似地，蛔虫(Ascaris)绵羊哮喘模型未利用临床相关抗原，且对与人通常不接触的过敏原(猪蛔虫(ascaris suum))具有较强的中性粒细胞应答和相对弱的嗜酸性粒细胞应答。

[0281] 在绵羊中通过相距两周三次皮下注射屋尘螨抗原(50 μ g)和明矾的给药来启动哮喘。然后选择通过ELISA检测显示高IgE应答的绵羊，给予抗原之后IgE水平增加1.5倍被认为是“高IgE应答”。

[0282] 第7、28和49天，利用与机械呼吸机相连接的喷雾器，绵羊接受含屋尘螨抗原的气溶胶(5mL包含200 μ g/mL抗原)激发。机械呼吸机辅助绵羊以每分钟呼吸20次呼吸10分钟，使得每只绵羊每次激发接受200次呼吸剂量的雾化抗原。之前已表明这种激发足以在绵羊中诱发哮喘和炎症反应。

[0283] 第7、28和49天，通过计算对浓度渐增的支气管收缩剂卡巴胆碱(carbachol)的剂量-反应来定量支气管高反应性。该检测的预期剂量范围是1mg/ml雾化卡巴胆碱5至300次呼吸以产生100%增加的阻力。

[0284] 还测定了早期哮喘反应，与基线(抗原给予前)值相比，预期的反应范围为给予抗原之后阻力变化50%至900%。

[0285] 然后将绵羊随机分成如表2所示的四组,这样所有组都包含具有生理反应范围相似的绵羊。将ProFreeze™/DMSO/αMEM中的绵羊MPCs(第5代)稀释于生理盐水中,然后于第63天(给予第三次雾化抗原激发之后两周)给予相关组。处理方案的总结示于图3中。

[0286] 表2:处理组

组	动物数目	处理	
		类型	剂量
[0287]	A	10 屋尘螨过敏原和 MPCs	2500 万 MPCs
	B	11 屋尘螨过敏原和 MPCs	7500 万 MPCs
	C	10 屋尘螨过敏原和 MPCs	15000 万 MPCs
	D	11 屋尘螨过敏原和生理盐水 (对照)	N/A

[0288] 绵羊MPC通过静脉输注(100mL/30分钟)至颈静脉给药。然后用屋尘螨过敏原于第一周和第四周(分别为第70天和第91天)再次激发绵羊。

[0289] 如Koumoundouros等(Exp.Lung Res.,32:321-330,2006)所述,通过评估食管和气管压力以及肺气流以计算气道阻力来进行基线肺功能的测量(早期哮喘反应[EAR])。在本方案中,将气囊导管经鼻插入至食管下端来测量食管压力(即外部压力)。为测量内部气道压力,将气管导管置于经鼻插入的气管内管中。通过附着于气管内管近端的呼吸速度描计器(pneumotachograph)(Hans Rudolph,Kansas City,USA)来测量气流。将食管和气管导管以及呼吸速度描计器连接至差动传感器,这样可测量跨肺压和气流。在定制的Labview Pty Ltd软件程序中分析来自这些记录的数字资料,以呼吸-呼吸为基础记录气道阻力。通过分析用HDM气溶胶激发之后特定时间的气道阻力变化来测定绵羊中过敏原诱导的支气管收缩。该激发之后立即记录阻力值1小时来评估早期哮喘反应(EAR),然后在激发之后记录6小时来评估6小时哮喘反应。EAR的结果表示为从雾化生理盐水激发之后的基线阻力值至HDM激发之后第1个小时的最大阻力值的气道阻力百分比变化。LAR数据表示为从基线阻力值至HDM激发之后六小时测量的平均阻力值的气道阻力百分比变化。

[0290] 支气管高反应性(BHR),又被称为气道高反应性(AHR),是测量应答非特异性兴奋剂的气道闭合的反应性。众所周知,哮喘气道为痉挛的,并且对相对低剂量的支气管收缩剂如胆碱能激动剂卡巴胆碱和乙酰甲胆碱作出反应。在绵羊中,在HDM激发期开始之前和HDM激发几周之后评估BHR。这通过以下来实现:给予加倍气溶胶剂量范围(0.25%-4%w/v卡巴胆碱)的支气管收缩剂卡巴胆碱,以及每次给予卡巴胆碱之后立即测量气道阻力变化。结果表示为由基线增加气道阻力100%所需的卡巴胆碱气溶胶浓度或者卡巴胆碱已达到的最大剂量。所给予卡巴胆碱剂量的浓度以呼吸单位(BUs)来测定;一个BU为1%w/v卡巴胆碱一次呼吸。肺部已对HDM敏感的绵羊通常用相对低剂量卡巴胆碱引起支气管收缩。

[0291] 第7天(研究进入基线)和BHR检测之后24小时(第2,51,72,93天)采集约20-30mL血液,并进行以下测试:

[0292] • 血液学和凝结:红血细胞计数(RBC),白血细胞计数(WBC),血红蛋白(Hb),血细胞比容,血小板,嗜中性粒细胞,单核细胞,嗜酸性粒细胞,嗜碱性粒细胞,纤维蛋白原。

[0293] • 生化: 钠, 钾, 氯, 碳酸氢盐, 葡萄糖, 肌酸酐, 钙, 镁, 磷酸盐, 总蛋白, 白蛋白, 总胆红素, 天冬氨酸转氨酶 (AST), 丙氨酸转氨酶 (ALT), γ -谷氨酰转肽酶 (GGT)。

[0294] • 细胞因子检测: 细胞因子 (TNF- α 和 IFN- γ)。

[0295] 通过标准酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测第49天, 第63天和第91天采集的血清样品中 IgE 的存在

[0296] 通过利用光学纤维支气管镜输注 10mL 生理盐水至左肺并回收 BAL 细胞和液体来采集支气管 - 肺泡灌洗 (BAL) 细胞。用 Haem Kwik (HD Scientific Pty Ltd.) 染色剂差异染色 BAL 细胞, 以确定不同白细胞存在的百分比。第7天 (研究进入基线) 和 BHR 检测之后 24 小时 (第 2, 51, 72, 93 天) 进行 BAL。.

[0297] 使用过量戊巴比妥钠 (至少 200mg/kg; 即每 40kg 绵羊 20mL 400mg/mL 溶液) 使动物无痛致死。

[0298] 对死亡或无痛致死的所有动物都进行尸体剖检和组织采集。

[0299] 组织样品在尸体剖检时 (第 93 天) 采集自左侧近后部的肺区域, 并冷冻于浮于液氮的铝盘上的模具中的 OCT 包埋介质中, 用于免疫组织化学。每个绵羊的肺冷冻两份组织块。使用抗绵羊细胞表面分子 CD4、CD8、CD45R、 $\gamma\delta$ 和 IgE 的 mAbs 染色冷冻切片 (5 μ m)。嗜酸性粒细胞用内源性过氧化物酶进行组织染色后鉴定, 并用苏木精和伊红-y 复染。在每只绵羊的实质、气道固有层 (lamina propria) 和外气道壁中检测并计数单独的细胞, 并表示为每平方毫米 (mm^2) 所检测的组织的细胞数目。对于高密度的细胞类型, 以 200 倍放大率在各自区域内计数至少一百个细胞来确定细胞密度。对于低密度细胞类型, 由取自完整切片全部相关区域内的非重叠视野来计算密度。所有细胞鉴定、计数和密度计算都由对处理组不了解的观察者进行。

[0300] 3.2 结果

[0301] 在处理前、单次静脉输注 oMPC 或生理盐水后 1 周和 4 周时 HDM- 致敏的哮喘绵羊早期哮喘反应 (EAR)

[0302] 在 oMPC 处理后 4 周的时间点过敏原激发后那小时期间, 接受 15000 万 oMPCs 的绵羊具有显著改善的肺功能 (图 4A, B 和 C)。oMPC 处理后 4 周的时间点, 肺功能的改善显示为与 oMPC 处理前的 EAR 相比时, 过敏原激发后 EAR 降低 57.1% ($p < 0.05$ (图 4A 和 C))。

[0303] 在处理前、单次静脉输注 oMPC 或生理盐水后 1 周和 4 周时 HDM- 致敏的哮喘绵羊的晚期过敏反应 (LAR)

[0304] 与处理前数值相比时, 当在 1 周和 4 周的时间点进行评估时, 过敏原激发后 6 小时时, 生理盐水对照组显示 LAR 增加的倾向 (图 5A)。与处理前数值相比, 2500 万 oMPC 处理组与 1 周时的 6 小时 LAR 的显著下降有关 (图 5A)。与处理前数值相比, 在处理后 1 周和 4 周的时间点, 7500 万和 15000 万 oMPC 处理组全部都经历 6 小时 LAR 下降的倾向。显示处理组之间 6 小时 LAR 的比较变化的总结图显示于图 5B 中。通过从处理前到后续处理的百分比变化评估 LAR 的相对变化时, 与 1 周的时间点时的对照相比, 2500 万 oMPC 剂量组中的 LAR 的百分比变化显著改善 ($p < 0.05$, 图 5B)。oMPC 处理后 4 周的时间点时的 6 小时 LAR 显示相似的趋势 (图 5C)。

[0305] 在处理前、单次静脉输注 oMPC 或生理盐水后 1 周和 4 周时 哮喘绵羊的支气管高反应性 (BHR)

[0306] 在 1 周和 4 周的时间点时, 接受代替 oMPCs 的生理盐水介质处理的对照组未经历显

著的BHR变化(图6A,B,C和D)。与oMPC处理之前所测量的BHR相比,在oMPC处理后1周和4周的时间点时,接受7500万oMPCs的绵羊组都具有显著改善的BHR指数(图6A)。将所有处理组合并在一起的事后分析中,处理前与1周和4周的时间点之间的差异是统计上显著的(图6D)。

[0307] 支气管肺泡灌洗(BAL)液分析:在处理前、单次静脉输注oMPC或生理盐水后1周和4周时哮喘绵羊的BAL液中的炎症细胞谱

[0308] oMPC或生理盐水对照处理后1周和4周时过敏原激发之后2天,进行支气管肺泡灌洗(BAL)取样。在本试验使用的所有绵羊中,过敏原激发和干细胞治疗之前,所取样的总BAL细胞中嗜酸性粒细胞的平均基线百分比为4.5%。过敏原激发后2天且干细胞或生理盐水处理之前,所取样的所有绵羊BAL中的嗜酸性粒细胞的平均百分比(即BAL嗜酸性粒细胞的处理前平均百分比)为15.0%。过敏原激发之后2天且oMPC处理后,由试验绵羊回收的BAL液中的嗜酸性粒细胞分析显示,治疗前与用2500万oMPCs输注的绵羊1周的时间点之间有显著差异(图7A和B)。对于7500万和15000万oMPC处理的组,处理前与1周和4周的时间点之间的BAL液中嗜酸性粒细胞的差异未达到统计显著性。然而,在事后分析中将全部三组处理值合并在一起时,处理前与处理后BAL嗜酸性粒细胞在1周和4周的时间点的差异都是统计上显著的(图7E)。

[0309] 在本试验使用的所有绵羊中,过敏原激发之后2天且干细胞或生理盐水处理前取样的总BAL细胞中的嗜中性粒细胞的平均百分比相对低,为0.89%。与处理前数值相比,对于2500万和15000万oMPC处理的绵羊,oMPC后1周的时间点时BAL液中的嗜中性粒细胞的百分比显著更低(图8A)。对于7500万oMPC组,与处理前的值相比,oMPC后4周的时间点时BAL液中的嗜中性粒细胞的百分比显著更低(图8A)。

[0310] 过敏原激发之后2天,从所有试验绵羊回收的BAL液中的淋巴细胞和巨噬细胞的Cytospot分析显示,BAL液中的这些细胞类型中的任何一种在各组之间没有显著差异(图9-10)。

[0311] 在处理前、单次静脉输注oMPC或生理盐水后1周和4周时哮喘绵羊血清中的HDM-特异性IgE

[0312] 由于过敏原诱发的哮喘与过敏原特异性IgE有关,在oMPC给予之前以及oMPC处理后1周和4周的两个时间点时,评估所有绵羊血清中循环的HDM-特异性IgE水平(图11A)。结果显示,与处理前HDM-特异性IgE水平相比,oMPC处理后1周时,15000万oMPC剂量对于显著降低HDM-特异性IgE是有效的(图11A)。与处理前HDM-特异性IgE水平相比,oMPC处理后4周时,2500万和7500万oMPC处理显著减少HDM-特异性IgE水平。与处理前数值相比,1周和4周的时间点时,生理盐水处理的对照组绵羊中的HDM-特异性IgE水平轻微下降;然而,该差异并不显著(图11A)。对照绵羊与输注不同剂量oMPCs的绵羊之间的比较示于图11B和C中,该比较评估了处理前和处理后1周和4周的血清中的IgE水平的百分比变化。

[0313] 肺组织的免疫组织学分析:单次静脉输注oMPC或生理盐水之后4周时哮喘绵羊肺部的炎症细胞谱

[0314] 对来自试验绵羊左侧肺后叶的尸体剖检取样的肺组织进行免疫组织化学分析。将一组细胞表面抗体标志物用于组织切片来鉴定CD4,CD8和 $\gamma\delta$ -阳性T细胞亚群,CD45R-阳性细胞,和IgE-阳性细胞(鉴定肥大细胞)。嗜酸性粒细胞被鉴定为过氧化物酶阳性染色的细胞。这些细胞类型的相对密度在三个单独的肺部位评估,包括:肺实质,包括诸如肺泡腔和

肺泡壁的非气道组织;气道壁固有层,其将细胞密度分析限制于腔上皮与气道平滑肌束的内边界之间的气道壁区域;以及整个气道壁,其包括气道腔上皮与毗邻肺泡的外部外膜之间的密度计数。

[0315] 对取样自哮喘绵羊的肺组织切片的过氧化物酶阳性嗜酸性粒细胞的分析表明,用15000万oMPC处理的绵羊气道壁中的嗜酸性粒细胞密度显著低于生理盐水处理的对照绵羊气道壁中的嗜酸性粒细胞密度($p<0.05$)。总之,这些数据表明,在尸检前4周给予15000万oMPC剂量处理与暴露于过敏原的气道中过氧化物酶阳性嗜酸性粒细胞的较低密度有关。

[0316] 组织病理学分析:单次静脉输注oMPC或生理盐水后4周以及用HDM再次激发后24小时嗜酸性粒细胞在哮喘绵羊肺部中的浸润

[0317] 用Luna组织学法染色肺部组织,其中在染蓝色的背景组织中,通过将嗜酸性粒细胞颗粒染成明显的红色来鉴定嗜酸性粒细胞。

[0318] 对在肺前部和后部中发现的细支气管腔碎片/嗜酸性粒细胞和具有嗜酸性粒细胞的肺不张的分析没有在对照和处理动物之间揭示任何显著差异。对在肺前叶和肺后叶中的发现进行分析显示,在组C的动物(即用15000万oMPC处理的绵羊)中Luna-阳性的嗜酸性粒细胞呈现降低趋势。在左侧肺前叶中,显示Luna-阳性的嗜酸性粒细胞的绵羊出现数目由对照组中的5只降低至15000万oMPC组中的3只。在右侧肺前叶中,显示Luna-阳性的嗜酸性粒细胞的绵羊出现数目由对照组中的5只降低至15000万oMPC处理组中的4只。在左侧肺后叶中,具有Luna-阳性的嗜酸性粒细胞的绵羊出现数目由对照组中的5只降低至15000万oMPC处理组中的3只。在右侧肺后叶中,具有Luna-阳性的嗜酸性粒细胞的绵羊出现数目由对照组中的4只降低至15000万oMPC处理组中的2只。2500万和7500万oMPC剂量组与对照组之间显示Luna-阳性嗜酸性粒细胞的绵羊发生率没有差异。

[0319] 进行事后(Post-hoc)分析评估相比对照绵羊,15000万oMPC剂量对于减少阳性嗜酸性粒细胞的存在是否整体上更为有效。该分析通过增加绵羊数目来进行,所述绵羊对所检查的四个肺叶中的每一个都显示显著的Luna-阳性嗜酸性粒细胞染色。该分析表明,与生理盐水处理的对照组相比,在15000万oMPC组中显示Luna-阳性嗜酸性粒细胞病理学的绵羊数目较少。

[0320] 3.3讨论

[0321] 本研究评估了oMPC疗法在哮喘绵羊模型中的安全性和功效。相比免疫前水平,在其血清中具有高水平HDM-特异性IgE抗体的绵羊在6-周的时间被给予三次整个肺部HDM气溶胶激发,以使它们的气道对HDM敏感。将绵羊随机分配成四组并通过静脉输注给予生理盐水(对照),或三种剂量的oMPC处理(2500万、7500万或15000万oMPC)中的一种。然后在各自oMPC或生理盐水处理之后7天和28天时,用HDM再次激发绵羊。在之前显示的时间点时HDM再次激发之后不久评估肺功能和BAL细胞分析。2500万、7500万或15000万oMPC的IV输注被良好耐受而没有与给予这些细胞有关的不良反应。

[0322] 在当前的研究中,相比对照绵羊,经静脉输注单剂量的oMPC通常与对过敏原激发较不严重的生理应答有关。例如,用15000万oMPC处理之后四周时,EAR肺功能应答出现统计学上显著的减弱。有趣的是,EAR的显著减弱在MPC处理后4周时在15000万oMPC处理组中被延迟并被观测到。不受任何理论和作用方式的限制,该延迟效应可能是由于结合膜的肥大细胞过敏原特异性IgE的长半衰期导致的。这可表明,过敏原特异性IgE最终由肥大细胞脱

落之后, MPC能够减少肥大细胞脱颗粒, 这最终导致oMPC处理后4周时EAR减少。

[0323] 相比对照, 全部三个oMPC处理组在oMPC处理后1周时普遍使LAR肺功能指数变弱。对来自三个不同oMPC剂量的数据合并分析显示, 相比输注生理盐水的对照绵羊, 在处理后1周和4周的时间点, oMPC处理在统计学上显著改善BHR肺功能指数。因而, 看起来, oMPC-处理绵羊的BHR肺功能指数的改善在oMPC输注之后持续4周。这与来自15000万剂量组的EAR数据的解释相一致, 所述EAR数据表明在4周时间点时oMPC输注的显著治疗效应是明显的。

[0324] 不受任何理论或作用方式的限制, oMPC改善具有实验性哮喘的绵羊肺功能的效应可能至少部分与在这些oMPC处理的动物的气道壁中嗜酸性粒细胞的稍微较低的密度相关。气道壁中的嗜酸性粒细胞组织密度的盲式形态测定分析显示, 与生理盐水处理的对照绵羊相比, 15000万oMPC处理组具有显著更低的组织嗜酸性粒细胞密度。此外, 在4周的研究期间, 最高剂量的oMPC有效减少气道嗜酸性粒细胞密度, 考虑到在单次给予oMPC后四周尸检时收集用于分析的所有形态测定数据。

[0325] 该结果表明, oMPC处理与BAL液中较低水平的嗜中性粒细胞有关。过敏原激发之后两天, 在处理前的所有测试绵羊中, 总BAL细胞中的嗜中性粒细胞平均百分比为0.89%。从该相对低的百分比, 在oMPC后1周的时间点, 2500万和15000万oMPC处理组有效减少BAL中的嗜中性粒细胞百分比超过50%。在给予oMPC之后随后4周的时间点, 用7500万oMPCs处理显著减少BAL中的嗜中性粒细胞。BAL液和气道壁中的嗜中性粒细胞的存在与哮喘某些表型的病理学有关。

[0326] 本研究中所使用的全部绵羊基于用HDM外周免疫接种完成之后7天在其血浆中高水平的HDM-特异性抗体而选入试验, 因而在本研究中仅使用被致敏的绵羊。值得注意的是, 结果表明, oMPC处理使过敏原-特异性IgE抗体变弱, 并且该效应在单次输注2500万或7500万oMPC之后持续四周。在15000万oMPC组中, IgE的抑制在oMPC后1周显著, 在四周取样时间点时减弱。与处理之前的值相比, 生理盐水处理的对照绵羊在1周或4周的时间点时未显示血清HDM-特异性IgE水平的显著降低。

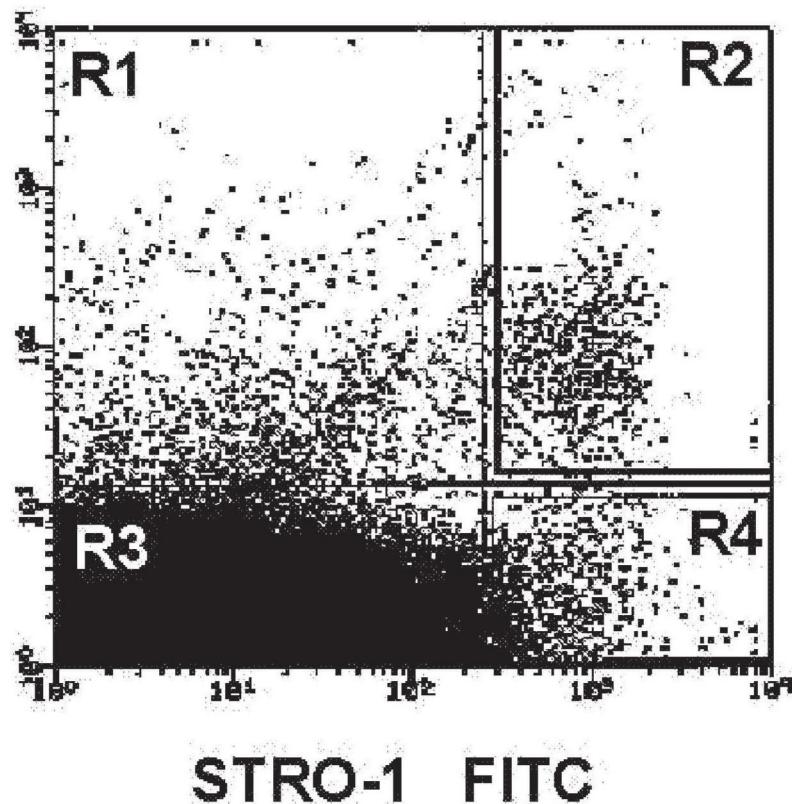


图1

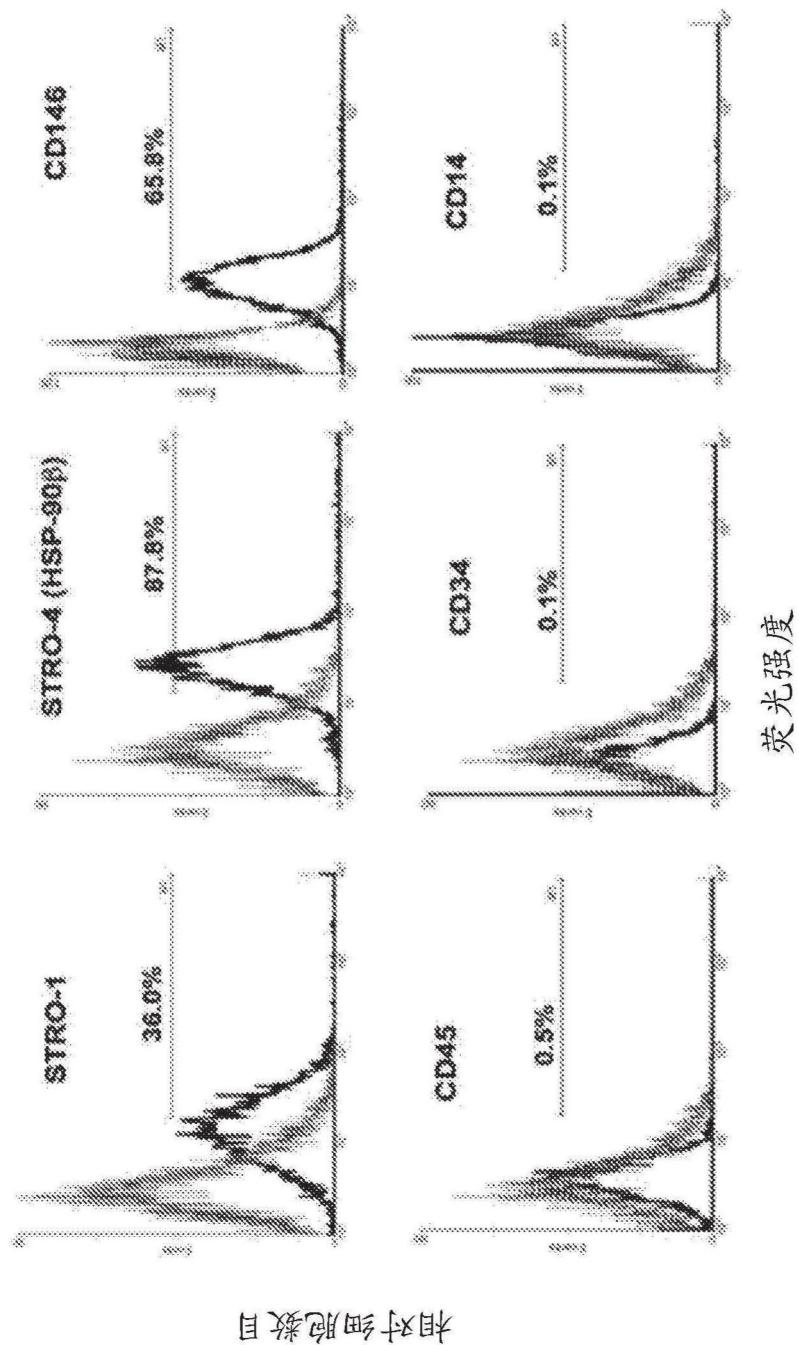


图2

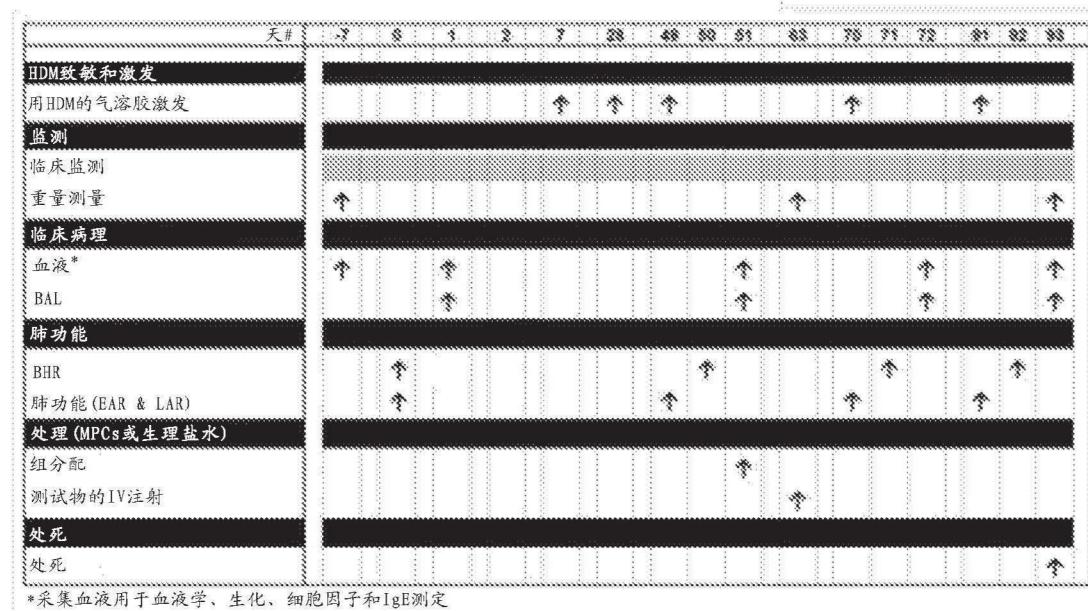


图3

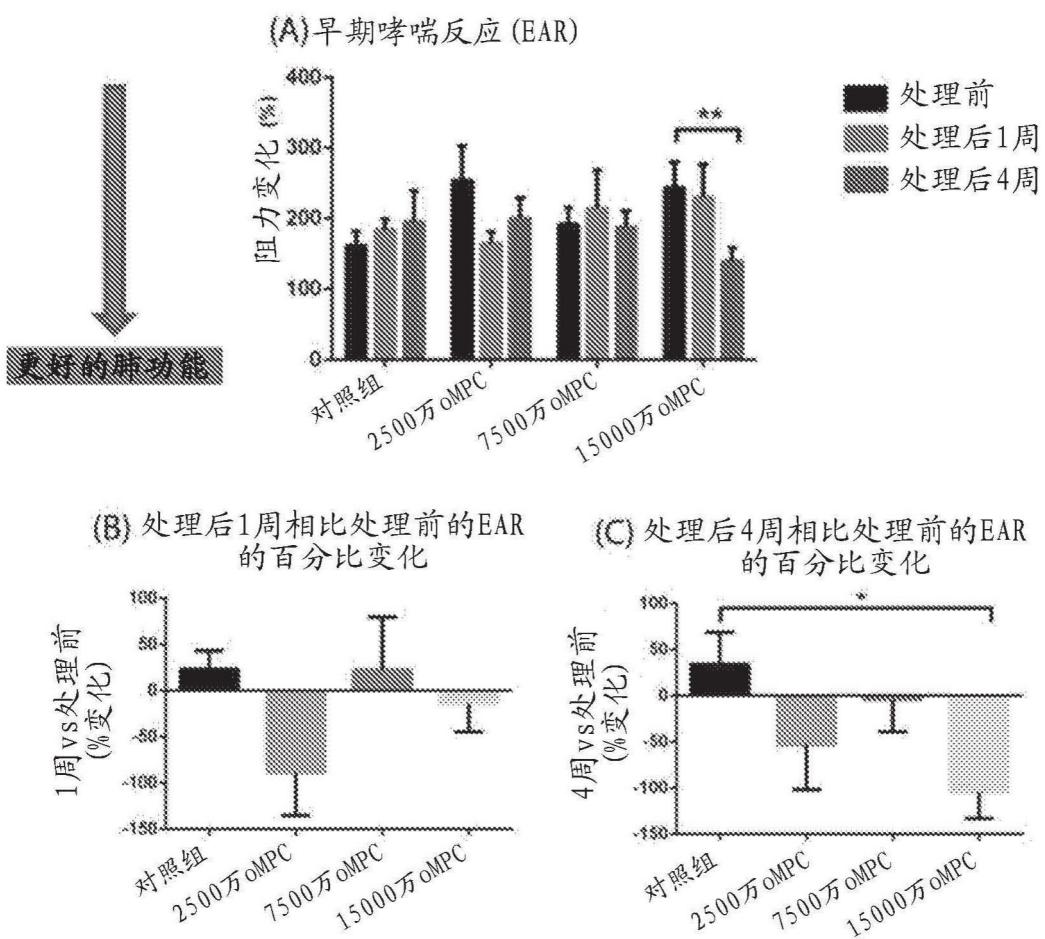


图4

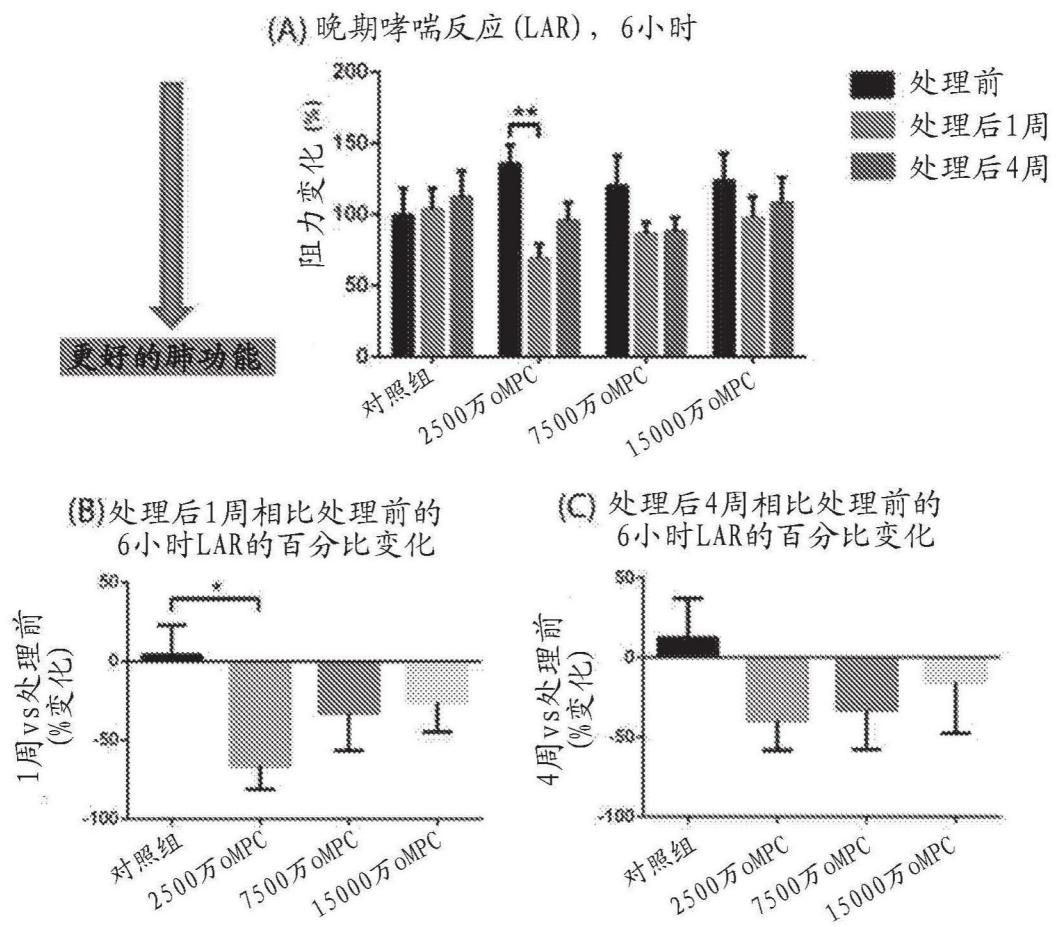


图5

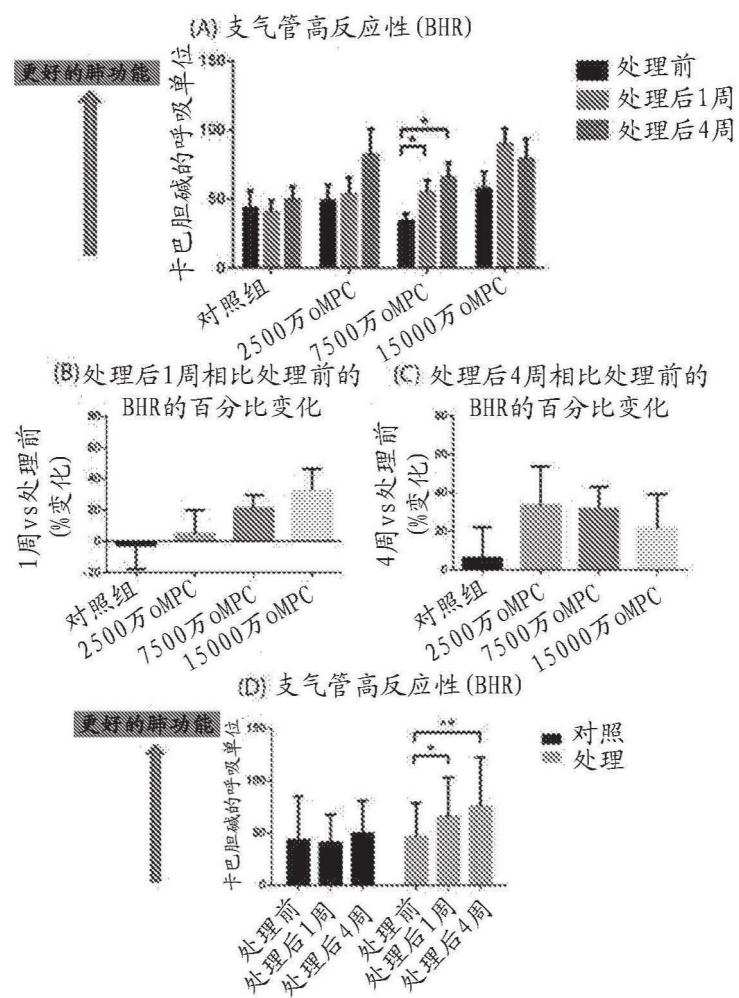


图6

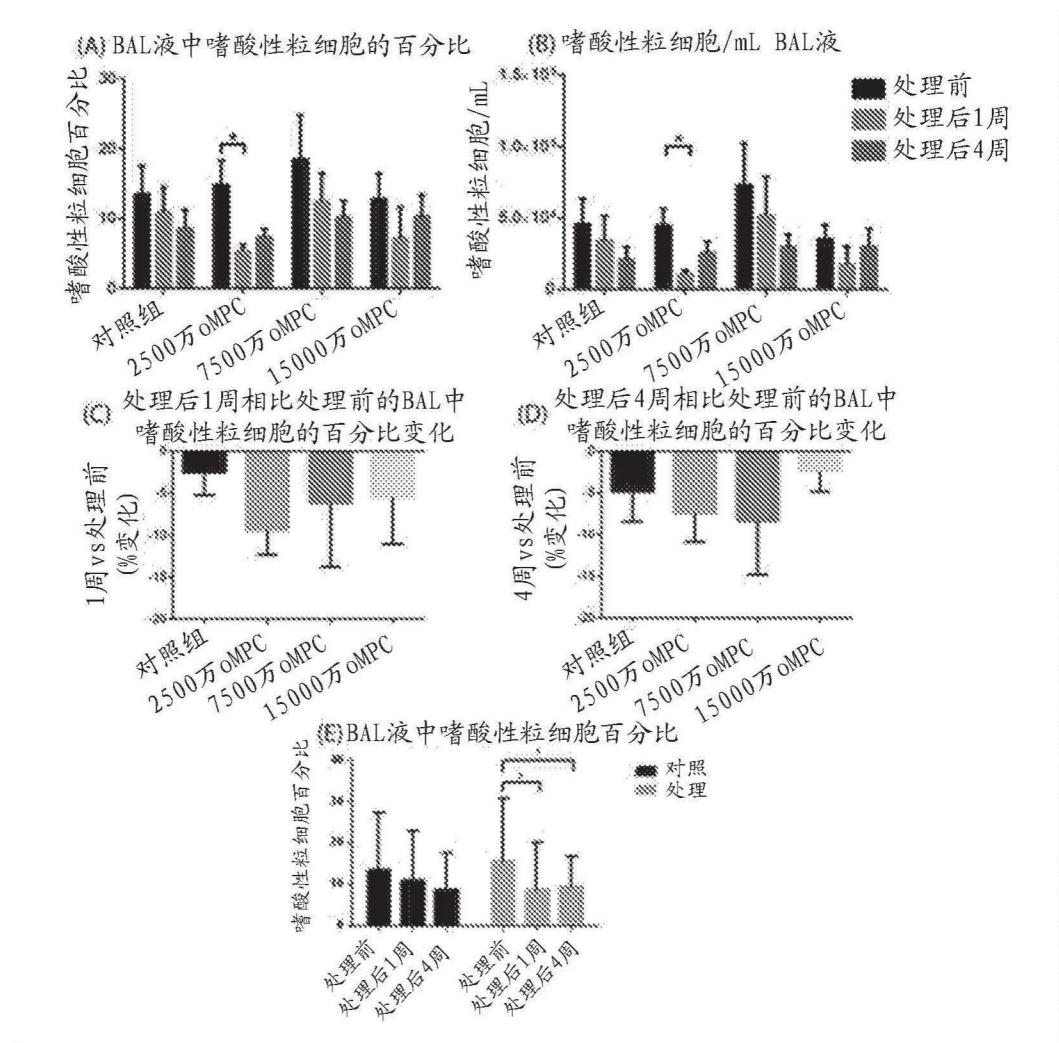


图7

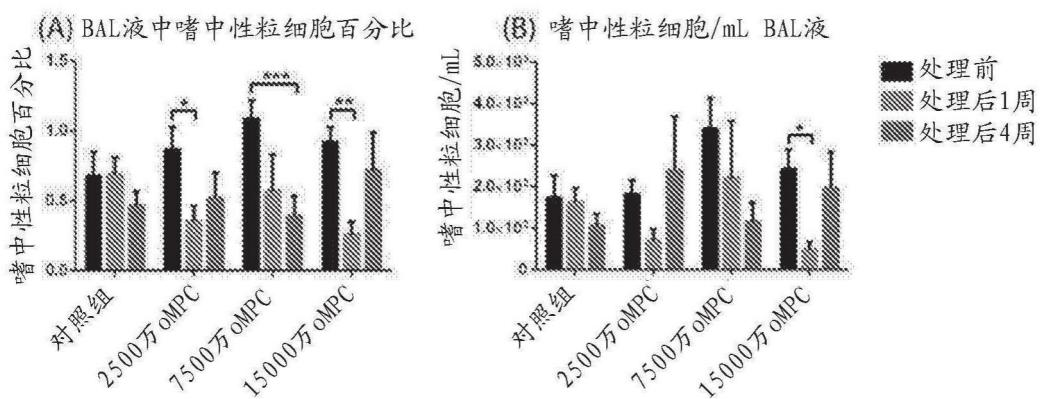


图8

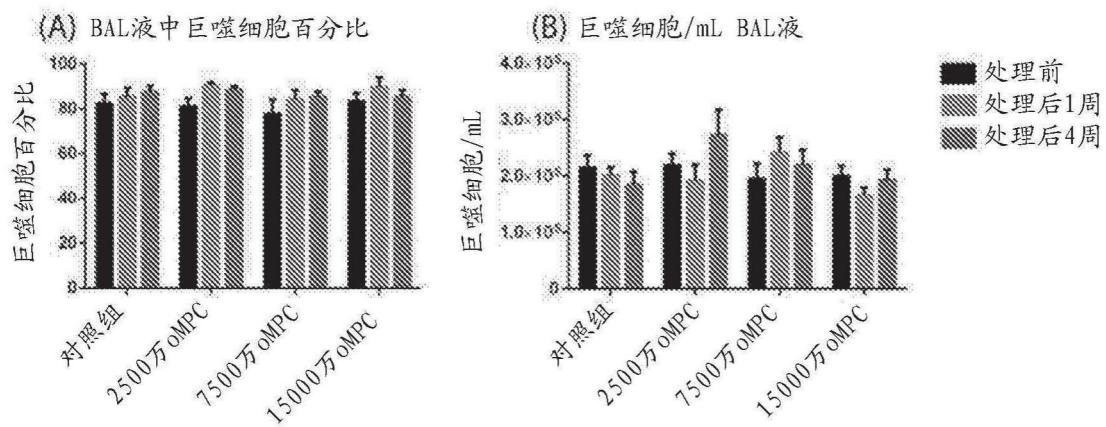


图9

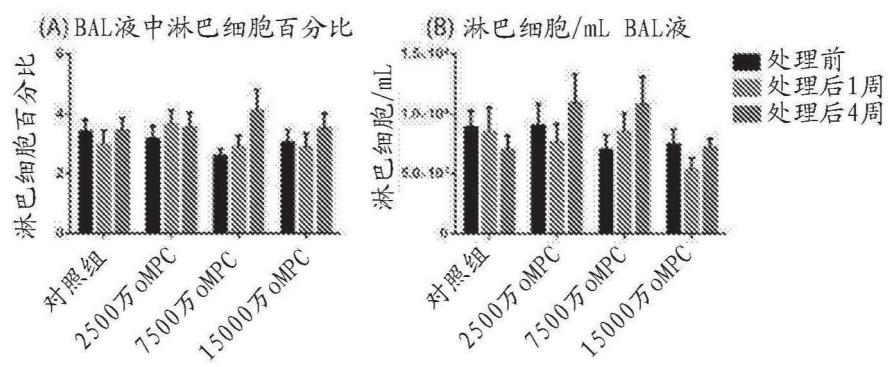


图10

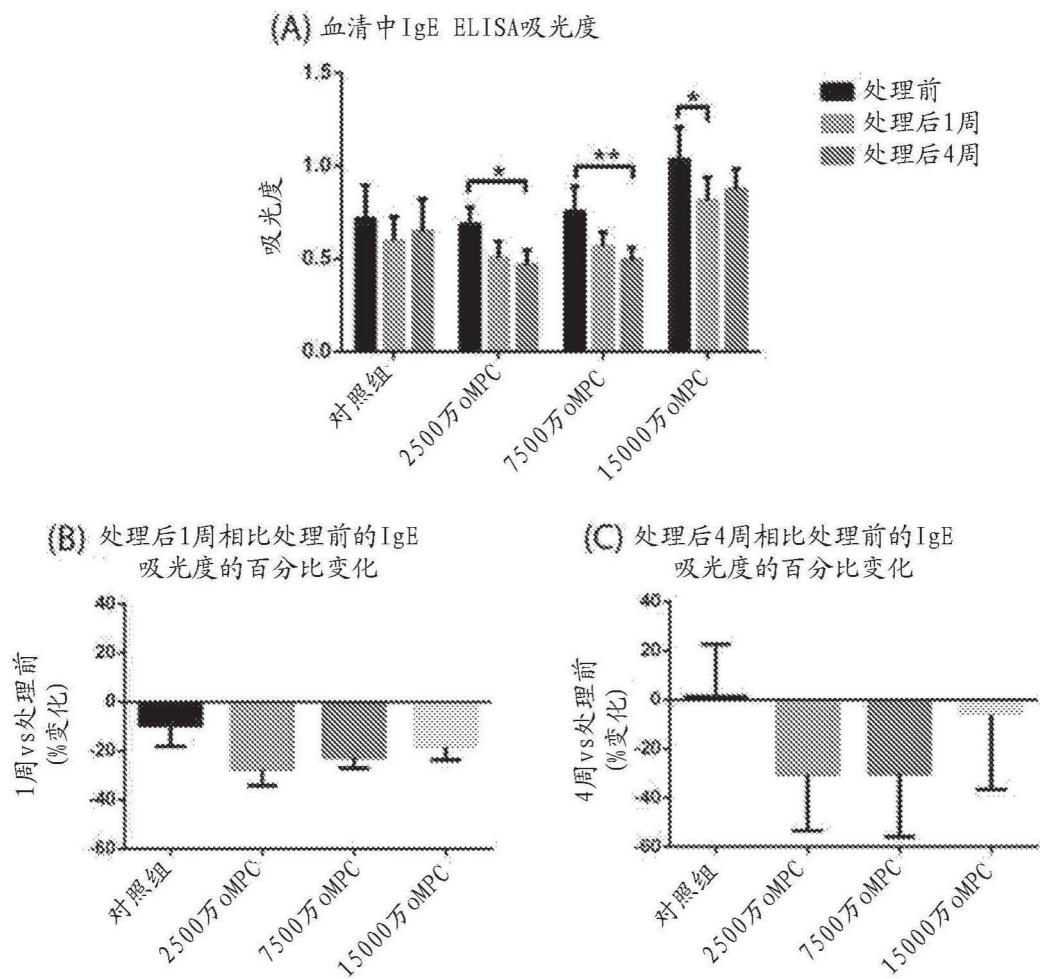


图11