(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109718250 B
(45)授权公告日 2022.08.30

(21)申请号 201910165600.6
(22)申请日 2013.03.13
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109718250 A
(43)申请公布日 2019.05.07
(30)优先权数据
61/647,893 2012.05.16 US
(62)分案原申请数据
201380025599.8 2013.03.13
(73)专利权人 桑比欧公司
地址 美国加利福尼亚
专利权人 南佛罗里达大学
(72)发明人 C·V·博兰干 C·C·凯斯
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 傅宇昌
(51)Int.Cl.
C12N 5/10(2006.01)
C12N 5/079(2010.01)
A61K 35/28(2015.01)
A61K 9/00(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
(56)对比文件
CN 101801396 A,2010.08.11
CN 101584869 A,2009.11.25
CN 1639335 A,2005.07.13
Ciara C Tate等.Human mesenchymal stromal cells and their derivative, SB623 cells, rescue neural cells via trophic support following in vitro ischemia.《Cell Transplant》.2010,第19卷(第8期),
审查员 陈彦闯

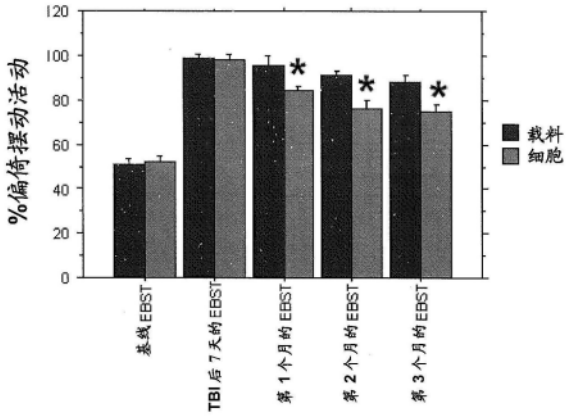
权利要求书1页 说明书17页 附图7页

(54)发明名称

用于治疗创伤性脑损伤和用于调节神经原性细胞迁移的方法和组合物

(57)摘要

本文公开了通过移植细胞来治疗创伤性脑损伤的方法,所述细胞源于表达外源Notch细胞内结构域的骨髓粘附干细胞。经移植的细胞形成通路,内源神经原性细胞沿所述通路进行增殖并且从脑室下区迁移至损伤位点。



CN 109718250 B

1.细胞在制备用于在受试者中诱导神经原性细胞进行增殖的试剂中的用途,其中所述细胞通过包括下列步骤的过程来获得:

(a)提供骨髓粘附干细胞(MSCs)的培养物,

(b)将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸相接触,其中所述多核苷酸不编码全长Notch蛋白,

(c)选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞,和

(d)在不进行选择的情况下进一步培养步骤(c)的所选择出的细胞。

2.权利要求1的用途,其中所述受试者为人。

3.权利要求1的用途,其中所述MSCs从人获得。

4.权利要求1的用途,其中所述试剂用于治疗脑损伤。

5.权利要求4的用途,其中所述脑损伤在皮层中。

6.权利要求4的用途,其中所述脑损伤为创伤性脑损伤。

用于治疗创伤性脑损伤和用于调节神经原性细胞迁移的方法和组合物

[0001] 本申请是申请日为2013年3月13日、申请号为201380025599.8、发明名称为“用于治疗创伤性脑损伤和用于调节神经原性细胞迁移的方法和组合物”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2012年5月16日提交的美国临时专利申请号61/647,893(其说明书和附图通过提及而以其整体合并入本文以用于所有目的)的权益。

[0004] 关于联邦政府资助的声明

[0005] 本文中所描述的研究中的一些得到来自国家神经学病症和中风研究所(National Institute of Neurological Disorders and Stroke)的拨款的资助。美国政府可能享有在本文所公开的发明中的某些权利。

发明领域

[0006] 本公开内容为用于神经学病症的细胞疗法的领域。

[0007] 发明背景

[0008] 最初用于深入检验细胞发育[1],干细胞已经成为再生医学(包括用于治疗神经学病症的基于细胞的疗法)的基石[2,3]。干细胞甚至存在于成年期中[8],并且具有自我更新和分化成多种谱系[9],促进正常的内环境稳定[10],和内源地[11-14]或者在移植入受损伤的器官(即脑)中之后[15-21]发挥治疗益处的能力。侧脑室的脑室下区(SVZ)和海马齿状回的颗粒细胞下区是成人脑中两个主要的干细胞小生境(niche)[22,23],尽管在其他脑区域中已经检测到静息神经干细胞(NSCs)[24]。在损伤后诱导内源干细胞将会在再生医学中提供新的机会[2,3,11-21]。

[0009] 除了多能干细胞外的细胞也已经用于治疗中枢神经系统的病症。作为一个例子,通过移植在缺血性损伤位点处或者在缺血性损伤位点附近,将SB623细胞(其为源自其中已经表达了外源Notch细胞内结构域的骨髓粘附干细胞的细胞)用于治疗中风。参见例如,美国专利号8,092,792,和Yasuhara等人,(2009)Stem Cells Devel.18:1501-1513。美国专利号7,682,825描述了SB623细胞在许多中枢和周围神经系统病症的治疗之中的另外用途。

[0010] 尽管有这些科学进展和一些初步的临床研究[25-27],但是在我们对于细胞疗法的了解中的根本缺口是关于经移植的细胞促进受损的神经组织修复的机制的知识。迄今为止,在血液学和非血液学病症中提供治疗益处方面,增加的移植物存活和移植物持久存在已经被认为是成功的细胞移植疗法的关键。因此,许多努力指向延长经移植的细胞的存活和持久存在。因此,不要求持久存在大量经移植的细胞的用于有效细胞疗法的方法将会是有利的。

[0011] 创伤性脑损伤(TBI)是指由于外部机械力而引起的对脑的损害。除了其他原因外,TBI尤其可以由于跌倒、火器伤、运动事故、建筑事故和交通事故而引起。TBI的受害者可能会遭受到许多身体、认知、社交、情感和/或行为的紊乱。

[0012] 对于逆转TBI的初始物理损害,几乎没有什么可以做的。因此,治疗选项主要在于

用于在急性期中防止进一步损害的稳定化，和之后的康复。由于这些有限的选项，因而需要另外的用于治疗TBI的方法和组合物。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明人已发现，SB623细胞(即源自其中已经表达了外源Notch细胞内结构域的骨髓粘附干细胞的细胞)的移植可以用于治疗创伤性脑损伤(TBI)。相比于仅接受载料注射的因创伤而受损伤的动物而言，在TBI后接受SB623移植体的动物展示出显著经改善的运动和神经学功能，以及与之相关联的显著降低的对于皮层核心和损伤周围皮层区域的损害。

[0015] 发明人还已经发现，与预期相反，SB623细胞移植的治疗益处并不需要大量经移植的细胞的存活和持久存在。令人惊异地，可以通过最小和短期的移植物存活(其足以引发强大且稳定的功能恢复)来获得治疗益处。这解决了两个主要问题：对于充足供应可移植的细胞的需要和对于长期移植物存活的需要。

[0016] 发明人还已经发现，SB623细胞移植在TBI治疗中的有益效应是由于在脑室下区(SVZ)中的神经原性小生境和受损伤的脑位点之间形成生物学桥(“生物桥”(biobridge))而引起的。已经通过免疫组织化学方式可视化并经激光捕获的这种生物桥最初表达高水平的细胞外基质金属蛋白酶，并且其特征在于经移植的细胞流。在移植后的时间里，经移植的细胞被新形成的宿主细胞替代，并且几乎没有经移植的细胞保留在生物桥中。因此，经移植的SB623细胞最初在神经原性SVZ和受损伤的皮层之间形成通路，所述通路促进宿主神经原性细胞稍后从神经原性小生境向脑损伤位点迁移。

[0017] 该连续的事件揭示了用于治疗TBI的新方法，即移植SB623细胞，其形成用于引导宿主神经原性细胞迁移的瞬时通路。也就是说，经移植的SB623细胞最初在神经原性小生境和损伤位点之间形成生物桥；但一旦该生物桥形成，经移植的细胞被迁移至损伤位点的宿主神经原性细胞所替代。这些发现揭示，宿主细胞从神经原性小生境向受损伤的脑位点的长距离迁移可以通过经移植的SB623细胞来实现，所述经移植的SB623细胞用作用于引发内源修复机制的生物桥。

[0018] 因此，本公开内容尤其提供了下列实施方案：

[0019] 1.用于在受试者中治疗创伤性脑损伤的方法，所述方法包括向所述受试者的脑施用治疗有效量的SB623细胞，其中所述SB623细胞通过下述方式来获得：(a)提供骨髓粘附干细胞(MSCs)的培养物；(b)将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸相接触，其中所述多核苷酸不编码全长Notch蛋白；(c)选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞；和(d)在不进行选择的情况下进一步培养步骤(c)的所选择出的细胞。

[0020] 2.实施方案1的方法，其中所述受试者为人。

[0021] 3.实施方案1或2的方法，其中所述MSCs从人获得。

[0022] 4.用于移植到受试者中以治疗创伤性脑损伤的细胞，其中所述细胞通过包括下列步骤的过程来获得：(a)提供MSCs的培养物；(b)将步骤(a)的细胞培养物与包含编码NICD的序列的多核苷酸相接触，其中所述多核苷酸不编码全长Notch蛋白；(c)选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞；和(d)在不进行选择的情况下进一步培养步骤(c)的所选择出的细胞。

[0023] 5.实施方案4的细胞，其中所述受试者为人。

[0024] 6.实施方案4或5的细胞，其中所述MSCs从人获得。

[0025] 7.用于诱导内源神经原性细胞从神经原性小生境向脑损伤位点迁移的方法，所述

方法包括向受试者的脑施用治疗有效量的SB623细胞，其中所述SB623细胞通过下述方式来获得：(a)提供MSCs的培养物；(b)将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸相接触，其中所述多核苷酸不编码全长Notch蛋白；(c)选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞；和(d)在不进行选择的情况下进一步培养步骤(c)的所选择出的细胞。

[0026] 8.实施方案7的方法，其中所述神经原性小生境为脑室下区。

[0027] 9.实施方案7或8的方法，其中所述脑损伤为创伤性脑损伤。

[0028] 10.实施方案7-9中任一项的方法，其中所述受试者为人。

[0029] 11.实施方案7-10中任一项的方法，其中所述MSCs从人获得。

[0030] 12.用于在受试者中刺激神经原性细胞增殖的方法，所述方法包括向受试者的脑施用治疗有效量的SB623细胞，其中所述SB623细胞通过下述方式来获得：(a)提供MSCs的培养物；(b)将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸相接触，其中所述多核苷酸不编码全长Notch蛋白；(c)选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞；和(d)在不进行选择的情况下进一步培养步骤(c)的所选择出的细胞。

[0031] 13.实施方案12的方法，其中所述脑损伤为创伤性脑损伤。

[0032] 14.实施方案12或13的方法，其中所述受试者为人。

[0033] 15.实施方案12-14中任一项的方法，其中所述MSCs从人获得。

[0034] 16.用于在受试者中诱导神经原性细胞进行增殖并向脑损伤位点迁移的方法，所述方法包括向受试者的脑施用治疗有效量的SB623细胞，其中所述SB623细胞通过下述方式来获得：(a)提供MSCs的培养物；(b)将步骤(a)的细胞培养物与包含编码Notch细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸相接触，其中所述多核苷酸不编码全长Notch蛋白；(c)选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞；和(d)在不进行选择的情况下进一步培养步骤(c)的所选择出的细胞。

[0035] 17.实施方案16的方法，其中所述脑损伤为创伤性脑损伤。

[0036] 18.实施方案16或17的方法，其中所述受试者为人。

[0037] 19.实施方案16-18中任一项的方法，其中所述MSCs从人获得。

[0038] 附图简述

[0039] 图1显示了在大鼠中“抬高身体摆动测试”(elevated body swing test，EBST)的结果。提供了基线(在TBI前)以及在TBI后7天、1个月、2个月和3个月的值。大鼠接受SB623细胞移植体(“细胞”，每对中最右边的柱)或者载料输注(“载料”，每对中最左边的柱)。“*”表明了统计学显著性，$p<0.05$。

[0040] 图2显示了在经历了TBI并随后接受SB623细胞移植体(“细胞”)或者载料输注(“载料”)的大鼠中的改进的Bederson神经学检查的平均得分。提供了基线(在TBI前)以及在TBI后7天、1个月、2个月和3个月的值。每对中最左边的柱表示在输注了载料的大鼠中的得分；每对中最右边的柱表示在接受了SB623细胞移植体的大鼠中的得分。“*”表明了统计学显著性，$p<0.05$。

[0041] 图3显示了大鼠能够保持在Rotorod装置上的秒数的平均值。大鼠经历了实验性TBI，并随后接受SB623细胞移植体(“细胞”)或者载料输注(“载料”)。提供了基线(在TBI前)以及在TBI后7天、1个月、2个月和3个月的值。每对中最左边的柱表示在输注了载料的大鼠

中的得分;每对中最右边的柱表示在接受了SB623细胞移植体的大鼠中的得分。“*”表明了统计学显著性,$p<0.05$。

[0042] 图4A和4B显示了在经历了TBI的大鼠中对于皮层核心(“核心”)以及对于在冲击位点中和周围的皮层区域(“损伤周围”)的损害的检验的结果。图4A显示了来自接受SB623细胞移植体的大鼠(图版a-d)的脑的H&E切片,相比于接受载料输注的大鼠(图版a1-d1)而言。在图4B中,将结果表示为相对于经历了TBI并接受载料输注的动物而言的损伤区域的百分比(参见实施例8)。每对中最左边的柱显示了核心区域的值;每对中最右边的柱显示了损伤周围区域的值。

[0043] 图5显示了在TBI后1个月和3个月时,相比于经历了TBI并接受载料输注的动物而言,在经历了TBI并接受SB623细胞移植体的动物的脑室下区(“SVZ”)和皮层(“CTX”)中经Ki67标记的细胞的水平。“*”表明了每高倍视野中所观察到的经标记的细胞的数目的在统计学上显著的增加($p<0.05$)。

[0044] 图6显示了在TBI后1个月和3个月时,相比于经历了TBI并接受载料输注的动物而言,在经历了TBI并接受SB623细胞移植体的动物的脑室下区(“SVZ”)和皮层(“CTX”)中经巢蛋白标记的细胞的水平。“*”表明了每高倍视野中所观察到的经标记的细胞的数目的在统计学上显著的增加($p<0.05$)。

[0045] 图7显示了在TBI后1个月和3个月时,相比于经历了TBI并接受载料输注的动物而言,在经历了TBI并接受SB623细胞移植体的动物的胼胝体(“CC”)和皮层(“CTX”)中经双皮质素标记的细胞的水平。“*”表明了每高倍视野中所观察到的经标记的细胞的数目的在统计学上显著的增加($p<0.05$)。

[0046] 图8显示了在TBI后1个月和3个月时,在来自经历了实验性TBI的大鼠脑的经激光捕获的生物桥的匀浆物中的分解活性。将活性表示为相对于0.5ng重组MMP-9而言的光密度单位,其通过扫描酶谱法凝胶来获得。在所述2组的各具有3条柱的每一组中,最左边的柱表示在来自在TBI后输注载料的大鼠的生物桥中的相对活性,中间的柱表示在来自在TBI后移植SB623细胞的大鼠的生物桥中的相对活性,和最右边的柱表示在来自对照即进行假手术的大鼠的生物桥中的相对活性。

[0047] 发明详述

[0048] 本文公开了用于治疗创伤性脑损伤(TBI)的方法和组合物。本文还公开了用于调节在脑中干细胞(例如,神经干细胞,神经元干细胞)的迁移的方法和组合物。

[0049] 发明人已经得到了令人惊讶的发现:在TBI后由于细胞移植而引起的行为和组织学改善不要求大规模的移植物存活或长期的移植物持久存在。实际上,对于产生这些治疗益处来说仅需要适度的、短期的移植物存活。因此,发明人揭示了需要阈值剂量的经移植的细胞的用于神经修复的新方法,所述经移植的细胞不需要在脑中持久存在,并且能够诱导SVZ产生新细胞和将新细胞推动至受冲击的皮层区域。因此,移植最小有效剂量和经移植的细胞的短期存活足以引发用于消除大量脑损伤的错综复杂的内源修复机制。

[0050] 除非另有指明,本公开内容的实践使用了在细胞生物学、毒理学、分子生物学、生物化学、细胞培养、免疫学、神经学、手术和重组DNA的领域以及相关领域中的标准方法和常规技术,其在本领域的技能之内。这样的技术描述在文献中,并由此对于本领域技术人员来说是可获得的。参见例如Alberts,B.等人,“Molecular Biology of the Cell”,第5版,

Garland Science,New York,NY,2008;Voet,D.等人,“Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level”,第3版,John Wiley&Sons,Hoboken,NJ,2008;Sambrook,J.等人,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001;Ausubel,F.等人,“Current Protocols in Molecular Biology”,John Wiley&Sons,New York,1987,及定期更新;Freshney,R.I.,“Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique”,第4版,John Wiley&Sons,Somerset,NJ,2000;和“Methods in Enzymology”丛书,Academic Press,San Diego,CA。

[0051] 骨髓粘附干细胞(MSCs)

[0052] 本公开内容提供了用于在受试者中通过向脑损伤位点移植SB623细胞来治疗TBI和调节干细胞迁移的方法。通过在MSCs中表达Notch蛋白的细胞内结构域而从骨髓粘附干细胞(MSCs)(也称为骨髓粘附基质细胞和间充质干细胞)获得SB623细胞。通过从骨髓中选择粘附细胞(即,粘附至组织培养塑料制品的细胞)而获得MSCs。

[0053] MSCs的示例性公开内容提供在美国专利申请公开号2003/0003090;Prockop(1997)Science 276:71-74;和Jiang(2002)Nature 418:41-49中。用于分离和纯化MSCs的方法可以在例如美国专利号5,486,359;Pittenger等人,(1999)Science 284:143-147;和Dezawa等人,(2001)Eur.J.Neurosci.14:1771-1776中找到。人MSCs是商购可得的(例如,BioWhittaker,Walkersville,MD),或者可以通过例如骨髓吸取和随后选择粘附骨髓细胞而从供体获得。参见例如WO 2005/100552。

[0054] MSCs还可以从脐带血中分离。参见例如Campagnoli等人,(2001)Blood 98:2396-2402;Erices等人,(2000)Br.J.Haematol.109:235-242;和Hou等人,(2003)Int.J.Hematol.78:256-261。MSCs的另外来源包括例如月经血和胎盘。

[0055] Notch细胞内结构域

[0056] Notch蛋白是在所有后生动物中发现的跨膜受体,其通过细胞内信号传导来影响细胞分化。Notch细胞外结构域与Notch配体(例如,Delta、Serrate、Jagged)的接触导致Notch蛋白的两次蛋白水解切割,其中第二次由γ-分泌酶催化并向细胞质中释放Notch细胞内结构域(NICD)。在小鼠Notch蛋白中,该切割发生在氨基酸gly1743和val1744之间。NICD移位至细胞核,在那里它充当转录因子,其中招募另外的转录调控蛋白(例如,MAM,组蛋白乙酰基转移酶)以解除各种靶基因(例如,Hes 1)的转录阻抑。

[0057] 关于Notch信号传导的其他细节和信息可以在例如Artavanis-Tsakonas等人,(1995)Science 268:225-232;Mumm和Kopan(2000)Develop.Biol.228:151-165;和Ehebauer等人,(2006)Sci.STKE 2006(364),cm7.[DOI:10.1126/stke.3642006cm7]中找到。

[0058] 细胞培养和转染

[0059] 用于细胞培养的标准方法是本领域中已知的。参见例如R.I.Freshney“Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique”,第5版,Wiley,New York,2005。

[0060] 用于将外源DNA引入细胞(即转染)的方法,以及用于选择包含外源DNA的细胞的方法,也是本领域中熟知的。参见例如Sambrook等人,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001;Ausubel等人,“Current Protocols in Molecular Biology”,John Wiley&Sons,New York,1987,及定期更新。

[0061] SB623细胞

[0062] 在一个用于制备SB623细胞的实施方案中,将MSCs的培养物与包含编码Notch细胞内结构域(NICD)的序列的多核苷酸相接触,例如通过转染;随后通过药物选择和进一步培养来富集经转染的细胞。参见例如美国专利号7,682,825(2010年3月23日);美国专利申请公开号2010/0266554(2010年10月21日);和WO2009/023251(2009年2月19日);它们的所有公开内容通过提及而以其整体合并入本文,为了描述骨髓粘附干细胞的分离和骨髓粘附干细胞向SB623细胞(在那些文献中称为"神经前体细胞"和"神经再生细胞")的转化的目的。

[0063] 在这些方法中,可以使用任何编码Notch细胞内结构域的多核苷酸(例如,载体),并且可以使用任何用于选择和富集经转染的细胞的方法。例如,在某些实施方案中,用包含编码Notch细胞内结构域的序列并且还包含编码药物抗性标记(例如,对于G418的抗性)的序列的载体来转染MSCs。在另外的实施方案中,使用两种载体(一种包含编码Notch细胞内结构域的序列,和另一种包含编码药物抗性标记的序列)来转染MSCs。在这些实施方案中,在用所述载体转染细胞培养物之后,通过以足以杀死不包含载体的细胞但不杀死包含载体的细胞的量向所述细胞培养物添加选择试剂(例如,G418)来实现选择。不进行选择需要去除所述选择试剂或者将其浓度降低至不杀死不包含载体的细胞的水平。在选择(例如,进行7天)之后,去除选择试剂并进一步培养细胞(例如,2次传代)。

[0064] 因此,SB623细胞的制备涉及在MSC中外源Notch细胞内结构域的瞬时表达。为此,可以用包含编码Notch细胞内结构域的序列的载体来转染MSCs,其中所述序列不编码全长Notch蛋白。所有此类序列对于本领域技术人员来说是熟知的并且容易可得的。例如,Del Amo等人,(1993)Genomics 15:259-264呈现了小鼠Notch蛋白的完整氨基酸序列;而Mumm和Kopan(2000)Devel.Biol.228:151-165提供了来自小鼠Notch蛋白的围绕所谓的S3切割位点的氨基酸序列,所述S3切割位点释放细胞内结构域。总之,这些参考文献为熟练技术人员提供了包含Notch细胞内结构域但并非全长Notch蛋白的每种肽;由此也为熟练技术人员提供了包含编码Notch细胞内结构域的序列但不编码全长Notch蛋白的每种多核苷酸。前述文献(Del Amo和Mumm)通过提及而以其整体合并入本文,为了分别公开全长Notch蛋白的氨基酸序列和Notch细胞内结构域的氨基酸序列的目的。

[0065] 关于来自另外物种(包括大鼠、爪蟾(Xenopus)、果蝇(Drosophila)和人)的Notch蛋白和核酸,类似的信息是可得的。参见例如Weinmaster等人,(1991)Development 113:199-205;Schroeter等人,(1998)Nature 393:382-386;NCBI参考序列编号NM_017167(及其中所引用的参考文献);SwissProt P46531(及其中所引用的参考文献);SwissProt Q01705(及其中所引用的参考文献);和GenBank CAB40733(及其中所引用的参考文献)。前述参考文献通过提及而以其整体合并入本文,为了公开在许多不同物种中的全长Notch蛋白的氨基酸序列和Notch细胞内结构域的氨基酸序列的目的。

[0066] 在另外的实施方案中,通过下述方式来制备SB623细胞:将包含编码Notch细胞内结构域的序列的核酸引入MSCs中,从而使得所述MSCs不表达外源Notch细胞外结构域。这可以例如通过用包含编码Notch细胞内结构域的序列的载体转染MSCs来完成,其中所述序列不编码全长Notch蛋白。

[0067] 关于制备SB623细胞的另外的细节以及用于制备可以在本文所公开的方法中使用的具有与SB623细胞类似的特性的细胞的方法,可在美国专利号7,682,825;美国专利号8,

133,725;以及美国专利申请公开号2010/0266554和2011/0229442中找到;它们的公开内容通过提及而合并入本文,为了提供关于制备SB623细胞的另外细节和备选方法的目的以及为了提供用于制备具有与SB623细胞类似的特性的细胞的方法。还可参见Dezawa等人,(2004)J Clin.Invest.113:1701-1710。

[0068] 通过移植SB623细胞来逆转TBI的症状

[0069] 在大鼠模型系统中测试了SB623细胞移植作为用于TBI的治疗的功效。在测试之前,在运动和神经学测试中对成年雄性Sprague-Dawley大鼠(8周龄)进行评价(在整个研究中全由不知道处理条件的两位研究者来实施),以确认所有动物展示出正常的在基线处的行为(即在脑损伤之前)。然后,将动物暴露于实验性创伤性脑损伤(TBI),并在7天后经历相同的行为测试以确认典型的由TBI诱导的运动和神经学损害。在这些测试之后(在TBI后7天),将动物随机分配入两个组之一,以便接受向皮层中的经Notch诱导的骨髓衍生干细胞(SB623细胞)的立体定位移植体[26,29]或者载料输注(参见实施例3)。

[0070] 发明人已发现,在TBI后1个月和3个月时,相比于仅接受载料的因创伤而受损伤的动物而言,接受SB623细胞移植体的因创伤而受损伤的动物均展示出显著经改善的运动和神经学功能,以及与之相关联的显著降低的对于皮层核心和损伤周围皮层区域的损害(参见实施例)。这些行为和身体的改善是以在TBI后1个月和3个月时分别为0.60%和0.16%的适度移植物存活来实现的。在脑中受TBI影响的其他位点包括纹状体和海马;因此向纹状体和海马移植SB623细胞也可用于治疗影响这些区域的TBI。总之,将SB623细胞移植入脑受损伤的动物中提供了强有力的功能恢复,尽管缺乏移植物持久存在。

[0071] 通过移植SB623细胞来建立生物桥

[0072] 在TBI后1个月时,对在接受了SB623细胞移植体的脑受损伤的动物中的宿主组织进行的检查揭示出在损伤周围皮层区域和脑室下区(SVZ)中内源细胞增殖(通过Ki67表达来检测)和神经原性细胞的分化(通过巢蛋白的表达来检测)的急剧增加。还检测到沿着这些动物的胼胝体(CC)进行迁移的细胞流(其表达双皮质素)。相反地,经历了实验性TBI并仅接受载料的动物展示出有限的细胞增殖,很少的神经分化,和仅散布的向损伤周围皮层区域中的迁移。另外,在这些对照动物的脑室下区中仅可见非常少的新形成的细胞(参见实施例)。

[0073] 在TBI后3个月时,来自接受SB623细胞移植体的动物的脑显现出高得多的水平的包围损伤周围皮层区域的细胞增殖和神经分化,以及不仅沿着而是穿过CC从SVZ向受冲击的皮层进行迁移的稳固的神经元细胞(其表达巢蛋白和双皮质素两者)流。来自仅接受载料的受损伤的动物的脑在TBI后3个月时显现出比在TBI后1个月时大大升高的细胞增殖水平,但新形成的细胞似乎“困陷”于SVZ和胼胝体中;仅少数细胞能够到达受冲击的皮层。在SVZ、CC和受损伤的皮层区域中的Ki67、巢蛋白和双皮质素免疫反应性的定量分析表明,在接受SB623细胞移植体的动物和仅接受载料的动物之间这些标志物表达的差异是在统计学上显著的。

[0074] 在一个分开的实验中,通过激光捕获显微解剖(Espina等人,(2006)Nature Protoc.1:586-603)来分离由从SVZ向损伤位点迁移的内源细胞所形成的生物桥,并且分析其产酶特性。在该实验中,分析了3组动物:(1)经历了TBI并随后在TBI后7天时移植SB623细胞的动物;(2)经历了TBI并随后在TBI后7天时输注载料的动物;和(3)对照即进行假手术的

年龄相近的成年Sprague-Dawley大鼠(n＝3/组)。来自经历了TBI的动物的经激光捕获的生物桥的酶谱法检验揭示,在移植后1个月和3个月时,相比于输注了载料的动物或进行假手术的动物而言,在接受了SB623细胞移植体的动物中基质金属蛋白酶9(MMP-9)表达/活性分别具有2倍和9倍的上调(实施例11)。

[0075] MMPs已牵涉于在慢性脑损伤中的恢复之中[29],而且已经显示MMP活性的抑制消除神经原性细胞从SVZ向受损组织的迁移并延缓神经血管重塑[30]。因此,MMPs可能在促进宿主细胞向受损伤的脑区域迁移方面起作用,作为SB623细胞经由此而提供从TBI中的功能恢复的过程的一部分。

[0076] 总之,发明人已发现,SB623细胞的移植通过在SVZ和损伤周围皮层之间建立生物桥而重塑了因创伤而受损伤的脑。该细胞疗法方法现在可以用于在神经原性位点和非神经原性位点之间建立类似的生物桥以促进细胞穿过组织的损伤特异性迁移,否则所述组织可能造成对于细胞运动的屏障。

[0077] 制剂、试剂盒和施用途径

[0078] 还提供了包含本文所公开的SB623细胞的治疗组合物。这样的组合物通常包含SB623细胞和药学上可接受的承载体。额外的活性化合物也可以掺入到SB623细胞组合物中。

[0079] 本文所公开的治疗组合物尤其可用于治疗TBI和调节在脑中的干细胞迁移。因此,包含SB623细胞的组合物的“治疗有效量”是减小TBI的症状或者刺激在脑中的干细胞迁移的任何量。例如,剂量数量可以从大约100、500、1,000、2,500、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、300,000、500,000、1,000,000、5,000,000至10,000,000个细胞或更多(或者其间的任何整数值)变化;施用频率为例如每天1次、每周2次、每周1次、每月2次、每月1次,这取决于例如体重、施用途径、疾病严重程度等。因此,治疗有效量可以包括相同量或不同量的SB623细胞的多次施用。在某些实施方案中,SB623细胞的单次施用是治疗有效量。

[0080] 鉴于本公开内容,各种药学组合物以及其制备和使用的技术是本领域技术人员已知的。关于合适的药理学组合物以及其施用的技术的详细列表,可以参考教科书,例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版,1985;Brunton等人,“Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics”,McGraw-Hill,2005;University of the Sciences in Philadelphia(eds.),“Remington:The Science and Practice of Pharmacy”,Lippincott Williams&Wilkins,2005;和University of the Sciences in Philadelphia(eds.),“Remington:The Principles of Pharmacy Practice”,Lippincott Williams&Wilkins,2008。

[0081] 可以将本文所描述的细胞悬浮在生理学上相容的承载体中以用于移植。本文中所使用的术语“生理上相容的承载体”是指与SB623细胞且与制剂的任何其他成分相容并且对于其接受者来说无害的承载体。本领域技术人员熟悉生理上相容的承载体。合适的承载体的例子包括细胞培养基(例如,Eagle极限必需培养基),磷酸缓冲盐水,Hank's平衡盐溶液+/-葡萄糖(HBSS),和多种电解质溶液,例如Plasma-Lyte™ A(Baxter)。

[0082] 向受试者施用的SB623细胞悬浮液的体积将会根据移植位点、治疗目标和溶液中的细胞数目而变化。通常,所施用的细胞的量将会是治疗有效量。本文中所使用的“治疗有效量”或“有效量”是指对于实现特定病症的治疗(即使得与该病症相关的症状的量和/或严

重程度降低)来说所需的经移植的细胞的数目。例如,在TBI的情况下,治疗有效量的SB623细胞的移植导致TBI的症状的减小和/或逆转,例如运动活动和神经学性能的恢复,以及宿主神经原性细胞迁移的刺激。治疗有效量随脑损害的类型和程度而变化,并且还可以根据受试者的整体情况而变化。

[0083] 所公开的治疗组合物还可以包含药学上可接受的材料、组合物或载料,例如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、溶剂或包囊材料,即承载体。这些承载体可以例如稳定SB623细胞和/或促进SB623细胞在身体内的存活。每种承载体应当在与制剂的其他成分相容并且对于受试者来说无害的意义上是"可接受的"。可以用作药学上可接受的承载体的材料的一些例子包括:糖类,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;黄蓍胶粉;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;油,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,例如丙二醇;多元醇,例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯类,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;藻酸;无致热原的水;等渗盐水;林格溶液;乙醇;磷酸盐缓冲溶液;以及其他在药学制剂中所使用的无毒的相容物质。润湿剂、乳化剂和润滑剂(例如,十二烷基硫酸酯钠和硬脂酸镁),以及着色剂、释放剂、包覆剂、甜味剂、矫味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可以存在于所述组合物中。

[0084] 示例性的制剂包括但不限于,适合于肠胃外施用(例如,肺内、静脉内、动脉内、眼内、颅内、脑膜下或皮下施用)的那些,包括包囊在胶束、脂质体或药物释放胶囊(活性试剂被掺入到设计用于缓释的生物相容的包衣中)中的制剂;可摄食的制剂;用于局部使用的制剂,例如滴眼剂、霜剂、软膏和凝胶;以及其他制剂,例如吸入剂、气雾剂和喷雾剂。本公开内容的组合物的剂量将会根据治疗需求的程度和严重度、所施用的组合物的活性、受试者的总体健康情况和本领域技术人员熟知的其他考虑因素而变化。

[0085] 在另外的实施方案中,本文所描述的组合物以颅内方式递送至创伤性脑损伤位点处或附近。这样的局部性递送允许所述组合物的非全身的递送,由此相比于全身递送而言降低所述组合物的身体负荷。局部递送可以例如通过颅内注射或通过使用各种医学上可植入的设备(包括但不限于支架和导管)来实现,或者可以通过吸入、静脉切开术或外科手术来实现。用于包覆、植入、包埋以及还有将所需试剂附着至医疗设备(例如,支架和导管)的方法是本领域中已建立的并且在本文中得到考虑。

[0086] 本公开内容的另一个方面涉及用于实施向受试者施用SB623细胞(可选地与另一种治疗剂相组合)的试剂盒。在一个实施方案中,试剂盒包含在适合于进行移植的药学承载体中配制的SB623细胞的组合物。

实施例

[0087] 在本文所公开的研究中,使大鼠经历实验性创伤性脑损伤(TBI),并且在7天后,具有充分的运动和神经学缺陷的那些大鼠接受向受损伤的区域的SB623细胞或载料的移植体。在TBI前(基线值)、在TBI后7天再次(在移植前)和此后每月(在TBI后持续3个月),评价运动和神经学性能的值。

[0088] 在TBI后1个月和3个月时的行为测试完成之后,通过经心脏灌注4%低聚甲醛来对随机选择的动物进行安乐死(n=10/组)。取出它们的脑,并进行切片以评价经移植的细胞

的持久存在，在受损伤的区域中和周围的脑组织的组织学外观，在受损伤的区域中和周围各种神经标志物的表达，和在受损伤的区域中和周围的产酶活性。

[0089] 使用下列标准来评价移植结果：1)运动行为，通过“抬高身体摆动测试”(EBST)和Rotorod；2)神经学性能，通过Bederson改进的神经学检查；3)损伤体积，通过组织学(经H&E染色的切片)；4)移植物存活，通过使用特异地检测人细胞的抗体(HuNu)的免疫组织化学；和5)使用针对经移植的人细胞和宿主细胞的抗体来进行神经保护和/或再生的基于机制的免疫组织化学分析。

[0090] 实施例1：MSCs和SB623细胞的制备

[0091] 从Lonza Walkersville,Inc.(Walkersville,MD)获得来自成人供体的骨髓吸取物，并且铺板在补充有10％胎牛血清(Hyclone,Logan,UT)、2mM L-谷氨酰胺(Invitrogen,Carlsbad,CA)和青霉素/链霉素(Invitrogen)的α-MEM(Mediatech,Herndon,VA)中。将细胞在37℃和5％CO_2下培养3天，以获得单层粘附细胞，在去除非粘附细胞之后，在相同条件下继续培养2周。在该时间期间，通过使用0.25％胰蛋白酶/EDTA来将细胞传代2次。将来自第二次传代的部分细胞进行冷冻以作为MSCs。

[0092] 将来自第二次传代的其余细胞进行铺板，并且通过使用Fugene6(Roche Diagnostics,Indianapolis,IN)，用包含与巨细胞病毒启动子可操作地连接的编码Notch细胞内结构域的序列的质粒(pCMV-hNICD1-SV40-Neo^R)进行转染。该质粒还包含处于SV40启动子的转录控制之下的编码对于新霉素和G418的抗性的序列。将经转染的细胞在37℃和5％CO_2下在补充有100μg/ml G418(Invitrogen,Carlsbad,CA)的于前面段落中所描述的生长培养基中进行培养。在7天后，扩展抗G418的集落，并且将培养物传代2次。在第2次传代后，收集细胞并进行冷冻以作为SB623细胞。

[0093] 将如本文所描述的那样制备的MSCs和SB623细胞按需要进行解冻并用于进一步研究。

[0094] 实施例2：在大鼠模型中诱导TBI

[0095] 总共40只在基线处(在TBI手术前)被鉴定为展示出正常行为(在EBST中50-60％的偏倚摆动活动；在Rotorod上60秒的停留时间；和最多0-0.5的平均Bederson得分)的动物接受下面所描述的TBI手术。

[0096] 所有手术操作程序在无菌条件下进行。将成年雄性Sprague-Dawley大鼠用1.5％异氟烷进行麻醉，并且就疼痛反射进行检查。在深度麻醉下，动物如下经历中度TBI模型。将每只动物放置在立体定位架中，其中用经由气体面罩进行施用的1-2％异氟烷来保持麻醉。在暴露出头骨之后，在左侧额顶皮层上进行4-mm颅骨切除术，其中心在相对于前囟点而言-2.0mm AP和+2.0mm ML。使用直径为3mm的气动式金属冲击器以6.0m/s的速度来冲击脑，达到硬脑膜层下1.0mm的深度并在脑中保持150毫秒。冲击器棒与垂直面成15°的夹角，以便与在冲击位点处的脑表面的切面垂直。使用与冲击器相连接的线性可变位移换能器(Macrosensors,Pennsauken,NJ)来测量速度和持续时间，以验证一致性。

[0097] 在受控的皮层冲击损伤之后，在出血停止后缝合切口。带有反馈控制的集成式加热垫和直肠温度计单元允许将体温维持在正常限度。监测所有动物直至从麻醉中恢复。另外，动物在诱导TBI后连续3天期间每天进行称重和观察，此后每周称重2次，并且在整个研究期间每天就健康状态和任何指示出问题或并发症的征候进行监测。

[0098] 实施例3:SB623细胞的移植

[0099] 在经历了TBI的动物之中,仅选择在TBI后第7天时具有下列程度的行为损害的那些动物用于进行移植研究:在EBST中至少75%的偏倚摆动活动;在Rotorod上30秒或更短的停留时间;和至少2.5的平均Bederson得分。将所选择出的那些动物随机分配到接受SB623移植体的组(n=20)或者接受载料输注的组(n=20)。移植的目标区域是内侧皮层,其相应于损伤周围皮层区域,基于先前建立的关于类似立体定位植入物的目标位点。

[0100] 所有手术操作程序在无菌条件下进行。将动物用1.5%异氟烷进行麻醉,并且就疼痛反射进行检查。一旦实现深度麻醉(通过疼痛反射的丧失来确定),在手术切口区域(头骨区域)周围剃除毛发,其中留出足够的边界以防止手术部位的污染。这之后为该部位的2次手术消毒擦洗,并且用无菌盖布进行遮盖。

[0101] 然后,将动物固定至立体定位装置(Kopf Instruments,Tujunga,CA),并且用钻孔锥在头骨中制造小开口。开口的坐标是相对于前囟点而言前面0.5mm和侧面1.0mm,以及在硬脑膜表面下2.0mm;这些是基于Paxinos和Watson(1998)的图集而选择出来的,以相应于临近核心损伤位点的皮层区域。然后,将包含测试材料的26-号Hamilton注射器放低入开口中。采用单次针穿过,制造3个存积物(各3ul)。每个存积物由在3ul Plasmalyte A中的100,000个活细胞组成,其在3分钟的时间段内输注。在额外的2-分钟吸收时间之后,撤回针,并且用不锈钢伤口夹来封闭伤口。加热垫和直肠温度计允许在整个手术和随后从麻醉中恢复期间将体温维持在大约37℃。对照注射仅包含Plasmalyte A。

[0102] 在基线处(在TBI前)、在TBI后7天(正好在移植前)和此后每月(直至TBI后3个月),使经治疗的动物和对照动物经历“抬高身体摆动测试”(EBST,实施例4)、神经学检查(实施例5)和Rotorod测试(实施例6)。

[0103] 另外,在TBI后1个月和3个月时,对经治疗的动物和对照动物的脑在组织学上进行表征,以确定损害程度(实施例8和9);宿主细胞增殖、迁移和神经分化的程度(实施例10);和产酶活性的存在(实施例11)。

[0104] 实施例4:“抬高身体摆动测试”(EBST)

[0105] 所有对动物进行测试的研究者均不知道处理条件。通过由其尾部提起动物并记录动物摆动其头部的方向来进行EBST。测试装置包括透明的Plexiglas箱(40×40×35.5cm)。在尾基部轻轻提起动物,并且通过尾部将动物提高直至动物鼻子处于表面上方2英寸(5厘米)的高度。一旦动物头部从身体的中线位置向一侧移动大约10度,就记录下摆动方向(左或右)。在单次摆动之后,将动物放置回Plexiglas箱中,并且在再次测试之前允许动物自由移动30秒。重复这些步骤,对于每只动物总共20次检验。未受损伤的大鼠展示出50%的摆动偏倚,即向左和向右摆动的次数相同。75%的摆动偏倚表明在20次试验期间15次摆动在一个方向上而5次在另一个方向上。先前的使用EBST的结果已经表明,在黑质纹状体损伤或单侧半球损伤后1个月时,单侧受损伤的动物展示出>75%的偏倚摆动活动;并且这样的不对称性处于稳定状态直至6个月[3,26]。

[0106] EBST的结果显示在图1中。在TBI后,基本上所有的动物均显现出偏倚摆动活动。在移植了SB623细胞的动物中,偏倚摆动活动在TBI和移植后3个月的时间段内稳定地降低。相反地,在移植了载料的动物中,在TBI后显现出偏倚摆动活动的动物百分比保持基本上不变。

[0107] 实施例5:改进的Bederson神经学检查

[0108] 在EBST结束后大约1小时,施行改进的Bederson神经学检查,按照先前所描述的程序[3,26],其中稍作改动。使用3个测试来获得每只大鼠的神经学得分,所述测试包括:(1)前肢收缩,其测量动物在前肢被侧向移置2至3cm后将前肢复位的能力,等级分为0(立即复位)至3(在数秒后复位或不复位);(2)横杆行走能力,等级分为0(大鼠容易地经过2.4cm宽、80cm长的横杆)至3(大鼠不能在横杆上停留10秒);和(3)双侧前爪抓握,其测量在直径为2mm的钢棒上保持住的能力,等级分为0(大鼠具有正常的前爪抓握行为)至3(大鼠不能用前爪进行抓握)。将来自所有3个测试(其在每个评估日在大约15分钟的时间段内进行)的得分相加,从而得到平均神经学缺陷得分(最大可能得分,9点除以3个测试=3)。

[0109] 这些神经学检查的结果显示在图2中。在TBI后,在所有动物中的平均神经学得分为2.5(最高为3)。在移植了SB623细胞的动物中,该得分在TBI和移植后3个月的时间段内稳定地降低(表明了经改善的神经学功能)。相比于输注了载料的动物而言,在移植了SB623细胞的动物中神经学功能的改善是统计学上显著的($p<0.05$)。

[0110] 实施例6:Rotorod®测试

[0111] 在神经学检查完成后1小时,使动物经历Rotorod®测试。该测试包括将动物置于旋转式跑台上,所述跑台在60秒的时间段内从4rpm加速至40rpm(Rotorod®,Accuscan,Inc.,Columbus,OH)。记录动物能够保持在跑台上的总秒数,并将其用作运动协调的指数。先前的使用TBI模型系统的结果已经显示,相比于进行假手术的或正常的对照而言,受损伤的动物能够在Rotorod上保持显著更短的时间。

[0112] 该检验的结果显示在图3中。未受损伤的动物能够在跑台上保持平均60秒。在TBI后7天,在跑台上的平均时间降至低于20秒。在TBI后移植了SB623细胞的动物中,在跑台上的平均时间加倍至大约40秒。相比于经历了TBI并输注了载料的动物而言,这些改善是统计学上显著的。

[0113] 实施例7:灌注和切片

[0114] 在TBI后1个月和3个月时,在实施例4-6中所描述的行为测试完成之后,通过经心脏灌注4%低聚甲醛来对随机选择的动物进行安乐死(n=10/组)。解剖出脑,在4%低聚甲醛中后固定过夜,然后浸没在30%蔗糖中。从前面在前囟点-5.2mm处开始,通过向后移动直至前囟点-8.8mm,将每个前脑切成40um冠状切片。对切片进行加工处理,以用于测定脑损害和分析在损伤周围区域中的细胞存活,如在实施例8和9中所描述的。

[0115] 实施例8:脑损害的测量

[0116] 进行脑切片的制备和检查以鉴定脑损害的程度和宿主细胞存活。加工处理至少4个片冠状组织切片/脑,以用于苏木精和伊红(H&E)染色或Nissl染色。通过测定间接损伤面积来对脑损害进行定量,所述间接损伤面积是通过从对侧半球的面积中减去同侧半球的完好面积来计算的。将损伤体积表示为相比于对侧半球而言的损伤的体积百分数,通过将来自系列切片的损伤面积相加总计。

[0117] 定量地显示在图4B中的结果表明,相比于经历了TBI并接受载料输注的动物而言,经历了TBI并接受SB623细胞移植体的动物经受了显著更小的对于皮层核心和损伤周围皮层区域的损害。

[0118] 实施例9:在TBI损伤周围区域中的细胞存活的分析

[0119] 检查了随机选择的相应于损伤周围皮层区域的高倍视野,以对在该区域中的存活宿主细胞进行计数。结果显示在图4A中。

[0120] 实施例10:免疫组织化学

[0121] 加工处理漂浮切片以用于免疫荧光显微术。简而言之,将40μm的经恒冷切片的组织在4×放大倍数下进行检查,并且使用基于PC的图像工具计算机程序来进行数字化。使用不与啮齿动物蛋白质交叉反应的单克隆人特异性抗体HuNu来评估经移植的SB623细胞的移植物移入。加工处理另外的脑切片以用于脑组织样品的基于机制的免疫组织化学分析,其关注于细胞增殖(Ki67)、迁移(双皮质素或DCX)和神经分化(巢蛋白)。对脑切片进行盲编号,并且使用Abercrombie公式来计算免疫阳性细胞的总数目[3,26]。

[0122] 这些分析的结果显示,SB623细胞的移植诱导了在SVZ和受冲击的皮层之间形成生物桥,所述生物桥由高度增殖性的、专用于神经的和迁移的细胞组成。在TBI后1个月时,免疫荧光和共聚焦显微术揭示出在损伤周围皮层区域和脑室下区(SVZ)中内源细胞增殖(通过表达Ki67的细胞来证明)和未成熟神经分化(表达巢蛋白的细胞)的急剧增加,其中具有沿着接受了SB623细胞移植体的动物的胼胝体(CC)的迁移细胞(表达双皮质素的细胞)流。来自仅接受了载料的动物的脑展示出有限的细胞增殖和神经分化,以及散布的向损伤周围皮层区域中的迁移,其中在SVZ中几乎没有新形成的细胞存在。在TBI后3个月时,来自移植了SB623的动物的脑显现出量大得多的包围损伤周围皮层区域的细胞增殖和神经分化,伴随有不仅沿着而是穿过CC从SVZ向受冲击的皮层进行迁移的稳固的带有神经元标记的细胞(其表达巢蛋白和双皮质素两者)流。相反地,在来自输注了载料的动物的脑中,细胞增殖增强了,但新形成的细胞“困陷”于SVZ和CC中,并且仅很少的细胞能够到达受冲击的皮层。在SVZ、CC和CTX中的经Ki67、巢蛋白和DCX免疫标记的细胞的定量分析揭示出在经移植的动物和输注了载料的动物之间的统计学上显著的差异(图5-7)。

[0123] 实施例11:酶谱法

[0124] 将与其分析描述在实施例4-10中的动物群分开的动物群用于测试在将SB623细胞移植到受损伤的脑中之后蛋白水解酶的存在和/或活性。使大鼠经历TBI,然后对其移植SB623细胞或载料。使年龄相近的进行假手术的成年Sprague-Dawley大鼠的对照组经历相同的实验程序(n=3只大鼠/组)。在TBI后1个月和3个月时,通过激光解剖来获得相应于由从SVZ向受冲击的皮层进行迁移的细胞所形成的生物桥的组织。在提取出之后,将组织放置在低温管中并在液氮中快速冷冻。将管贮存于-80℃冰箱中直至进行匀浆。

[0125] 将样品在450μL的包含50mM Tris-HCl(pH 7.5)、75mM NaCl和1mM PMSF的冷的工作缓冲液中进行匀浆。将组织用匀浆器加工处理10分钟并在4℃以13000rpm离心20分钟。将上清液分离、冷冻,并且保存于-80℃直至使用。通过Bradford方法来评估在上清液中的总蛋白质浓度。

[0126] 在施行酶谱法的那一天,将等价于50μg总蛋白质的体积加载到新鲜制备的明胶酶谱法凝胶中。所有凝胶包含加载了0.5ng重组MMP-9的对照泳道,其用作酶量(ng)和明胶分解活性(表示为相对光密度单位,见下面)的标准。于100V在非还原条件下在凝胶中以电泳方式将蛋白质分开。在电泳后,将凝胶在125ml 2.5%Triton中洗涤两次,进行20分钟。然后,将凝胶在激活缓冲液(Zymogram Development Buffer,Bio-Rad,Hercules,CA)中于37

℃温育20小时。第二天,将凝胶用考马斯蓝R-250染色溶液(Bio-Rad)染色3小时,并用脱色溶液(Bio-Rad)脱色25分钟。通过条带的光密度测定法分析(Gel-Prov 3.1,Media Cybernetics,Carlsbad,CA)来评估样品的明胶分解活性。通过与在相同凝胶上走样的预染色的标准蛋白质参照物(Bio-Rad)相比较来测定在显现出分解活性的凝胶区域中的蛋白质的分子量。将活性表示为相对于0.5ng重组MMP-9(其在凝胶中作为标准进行走样)的光密度而言的光密度。

[0127] 结果显示在图8中。在TBI后1个月和3个月时,来自在TBI后移植了SB623细胞的动物的经激光捕获的生物桥(相应于在SVZ和受冲击的皮层之间的脑组织)表达高水平的MMP-9明胶分解活性。在所述两个时间点处,在经SB623处理的动物中的水平均显著高于在来自输注了载料和进行假手术的动物的生物桥中的水平($p<0.05$)。尽管在TBI后1个月时,相比于进行假手术的动物而言,来自输注了载料的动物的生物桥显示出MMP-9活性的显著增加,但是这些水平在TBI后3个月时回复至对照水平(即与进行假手术的动物的水平没有显著不同)。

[0128] 为了在印迹上进行检测,用印迹级脱脂奶粉(Bio-Rad)对膜进行封闭。在用0.1%tween 20-tris缓冲盐水(TTBS)进行洗涤后,将膜与1ug/ml抗MMP-9单克隆小鼠抗体一起在4℃温育过夜。将膜再次在TTBS中进行清洗,与二抗(缀合有辣根过氧化物酶的山羊抗小鼠IgG的1:1,000稀释物,Calbiochem)一起温育1小时,并且最后用辣根过氧化物酶显色溶液(ECL高级检测试剂盒,Amersham)进行显色。将膜暴露于放射自显影胶片(Hyblot CL,Denville Scientific Inc.)。将酶谱的样品条带的密度表示为相对于标准条带(0.5ng重组MMP-9)而言的最大光密度。

[0129] 本发明的一些实施方案如下:

[0130] 1.用于移植到受试者中以治疗创伤性脑损伤的细胞,其中所述细胞通过包括下列步骤的过程来获得:

[0131] (a)提供MSCs的培养物,

[0132] (b)将步骤(a)的细胞培养物与包含编码NICD的序列的多核苷酸相接触,其中所述多核苷酸不编码全长Notch蛋白,

[0133] (c)选择包含步骤(b)的多核苷酸的细胞,和

[0134] (d)在不进行选择的情况下进一步培养步骤(c)的所选择出的细胞。

[0135] 2.实施方案1的细胞,其中所述受试者为人。

[0136] 3.实施方案1或实施方案2的细胞,其中所述MSCs从人获得。

[0137] 4.用于在受试者中治疗创伤性脑损伤的方法,所述方法包括向所述受试者的脑施用治疗有效量的根据实施方案1至3中任一项的细胞。

[0138] 5.用于诱导内源神经原性细胞从神经原性小生境向脑损伤位点迁移的方法,所述方法包括向受试者的脑施用治疗有效量的根据实施方案1-3中任一项的细胞。

[0139] 6.实施方案5的方法,其中所述神经原性小生境为脑室下区。

[0140] 7.实施方案5的方法,其中所述脑损伤为创伤性脑损伤。

[0141] 8.用于在受试者中刺激神经原性细胞增殖的方法,所述方法包括向受试者的脑施用治疗有效量的根据实施方案1至3中任一项的SB623细胞。

[0142] 9.用于在受试者中诱导神经原性细胞进行增殖并向脑损伤位点迁移的方法,所述

方法包括向受试者的脑施用治疗有效量的根据实施方案1至3中任一项的SB623细胞。

[0143] 10.实施方案9的方法,其中所述脑损伤为创伤性脑损伤。

[0144] 参考文献

[0145] 1.Joyner,A.L.等人,Production of a mutation in mouse En-2gene by homologous recombination in embryonic stem cells.Nature 338,153-156(1989)

[0146] 2.Yasuhara,T.等人,Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease.J.Neurosci.26,12497-12511(2006)

[0147] 3.Yasuhara,T.等人,Intravenous grafts recapitulate the neurorestoration afforded by intracerebrally delivered multipotent adult progenitor cells in neonatal hypoxic-ischemic rats.J.Cereb.Blood Flow Metab.28,1804-1810(2008)

[0148] 4.Borlongan,C.V.等人,Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke.Stroke 35,2385-2389(2004)

[0149] 5.Pastori,C.等人,Arterially perfused neurosphere-derived cells distribute outside the ischemic core in a model of transient focal ischemia and reperfusion in vitro.PLoS One 3,e2754(2008)

[0150] 6.Redmond,D.E.Jr.等人,Behavioral improvement in a primate Parkinson's model is associated with multiple homeostatic effects of human neural stem cells.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.104,12175-12180(2007)

[0151] 7.Lee,J.P.等人,Stem cells act through multiple mechanisms to benefit mice with neurodegenerative metabolic disease.Nat.Med.13,439-447(2007)

[0152] 8.Ma,D.K.等人,Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain.Nat.Neurosci.13,1338-1344(2010)

[0153] 9.Hong,S.H.等人,Cell fate potential of human pluripotent stem cells is encoded by histone modifications.Cell Stem Cell.9,24-36(2011)

[0154] 10.Kim,Y.等人,Mouse B-type lamins are required for proper organogenesis but not by embryonic stem cells.Science.334,1706-1710(2011)

[0155] 11.Borlongan,C.V.Bone marrow stem cell mobilization in stroke:a 'bonehead'may be good after all!Leukemia 25,1674-1686(2011)

[0156] 12.Barha,C.K.等人,Progesterone treatment normalizes the levels of cell proliferation and cell death in the dentate gyrus of the hippocampus after traumatic brain injury.Exp.Neurol.231,72-81(2011)

[0157] 13.Jaskelioff,M.等人,Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice.Nature 469,102-106(2011)

[0158] 14.Wang,L.等人,Tumor necrosis factorαprimes cerebral endothelial cells for erythropoietin-induced angiogenesis.J.Cereb.Blood Flow Metab.31,640-647(2011)

[0159] 15.Andres,R.H.等人,Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain.Brain.134,1777-1789(2011)

[0160] 16.Liu,Z.等人,Bone marrow stromal cells promote skilled motor recovery and enhance contralesional axonal connections after ischemic stroke in adult mice.Stroke 42,740-744(2011)

[0161] 17.Mazzocchi-Jones,D.等人,Embryonic striatal grafts restore bi-directional synaptic plasticity in a rodent model of Huntington's disease.Eur.J.Neurosci.30,2134-2142(2009)

[0162] 18.Lee,H.S.等人,Foxa2and Nurr1synergistically yield A9 nigral dopamine neurons exhibiting improved differentiation,function,and cell survival.Stem Cells 28,501-512(2010)

[0163] 19.Hargus,G.等人,Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.107,15921-15926(2010)

[0164] 20.Yasuda,A.等人,Significance of remyelination by neural stem/progenitor cells transplanted into the injured spinal cord.Stem Cells.29,1983-1994(2011)

[0165] 21.Mezey,E.The therapeutic potential of bone marrow-derived stem cells.J.Cell.Biochem.112,2683-2687(2011)

[0166] 22.Sanai,N.等人,Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy.Nature 478,382-386(2011)

[0167] 23.Carlén,M.等人,Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke.Nat.Neurosci.12,259-267(2009)

[0168] 24.Robel,S.等人,The stem cell potential of glia:lessons from reactive gliosis.Nat.Rev.Neurosci.12,88-104(2011)

[0169] 25.Seol,H.J.等人,Genetically engineered human neural stem cells with rabbit carboxyl esterase can target brain metastasis from breast cancer.Cancer Lett.311,152-159(2011)

[0170] 26.Yasuhara,T.等人,Notch-induced rat and human bone marrow stromal cell grafts reduce ischemic cell loss and ameliorate behavioral deficits in chronic stroke animals.Stem Cells Dev.18,1501-1514(2009)

[0171] 27.Pollock,K.等人,A conditionally immortal clonal stem cell line form human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke.Exp.Neurol.199,143-155(2006)

[0172] 28.Dezawa,M.等人,Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation.J Clin Invest.113,1701-10(2004)

[0173] 29.Zhao,B.Q.,Tejima,E.,Lo,E.H.Neurovascular proteases in brain injury,hemorrhage and remodeling after stroke.Stroke.38,748-752(2007)

[0174] 30.Zhao,B.Q.等人,Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke.Nat Med.12,441-445(2006)

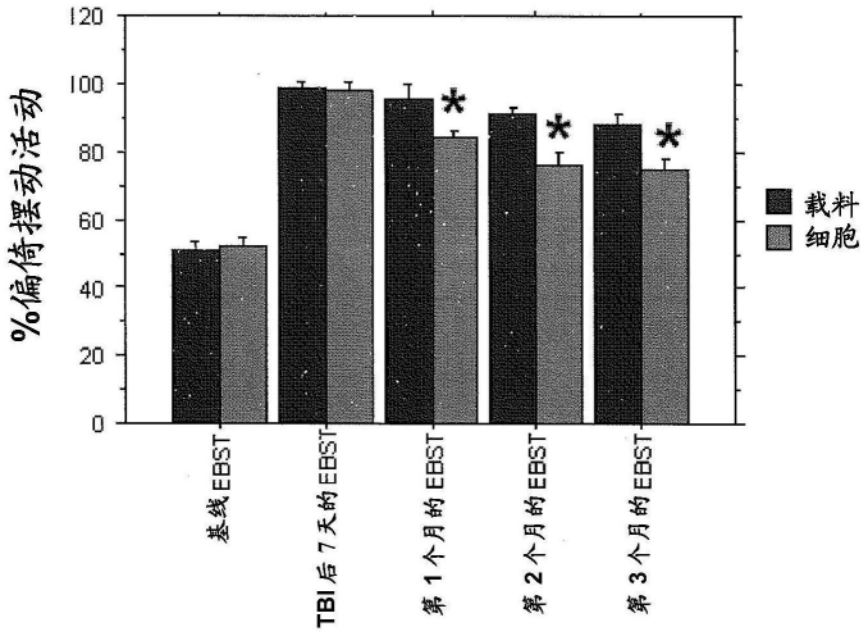

%偏倚摆动活动
120
100
80
60
40
20
0
*
*
*
载料
细胞
基线EBST
TBI后7天的EBST
第1个月的EBST
第2个月的EBST
第3个月的EBST

图1

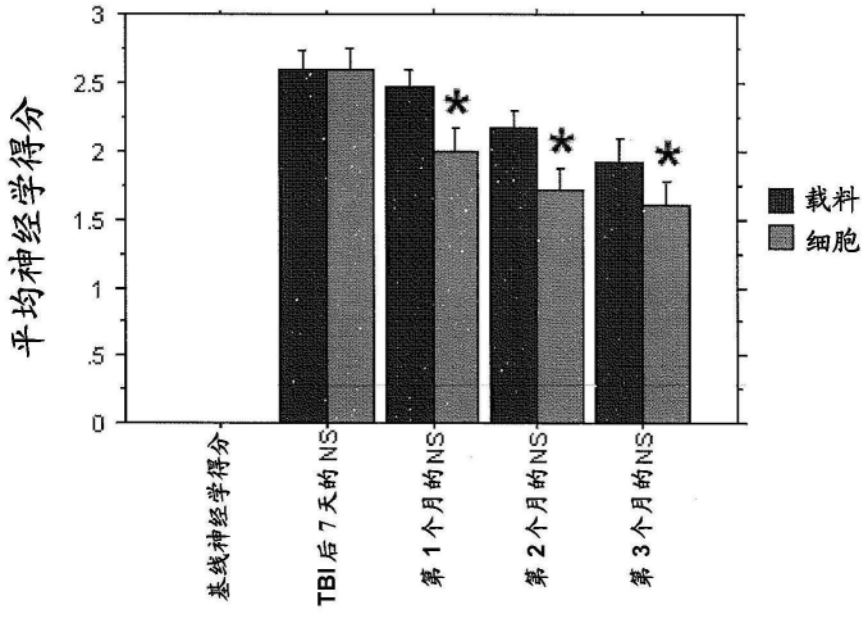

平均神经学得分
3
2.5
2
1.5
1
.5
0
*
*
*
载料
细胞
基线神经学得分
TBI后7天的NS
第1个月的NS
第2个月的NS
第3个月的NS

图2

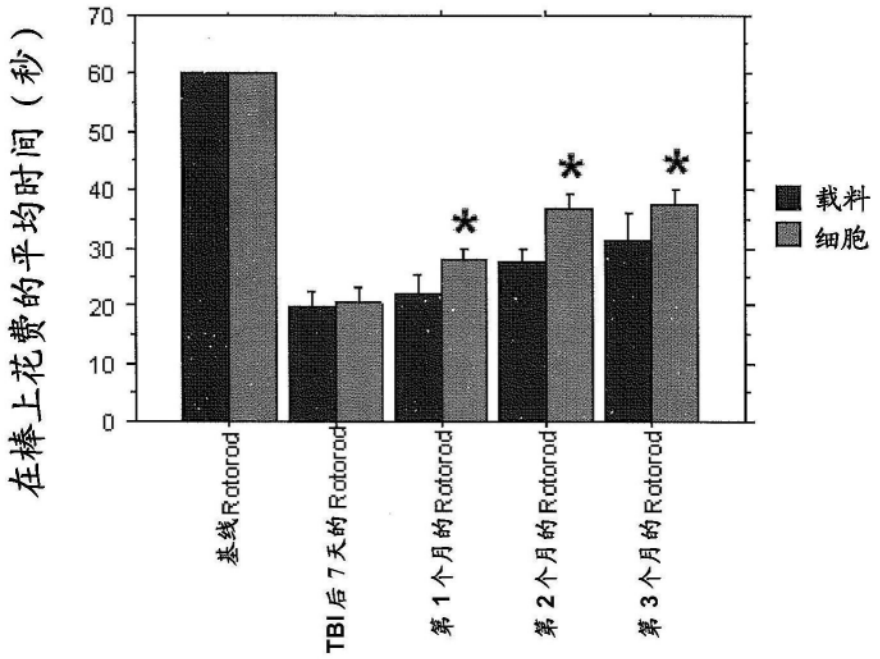
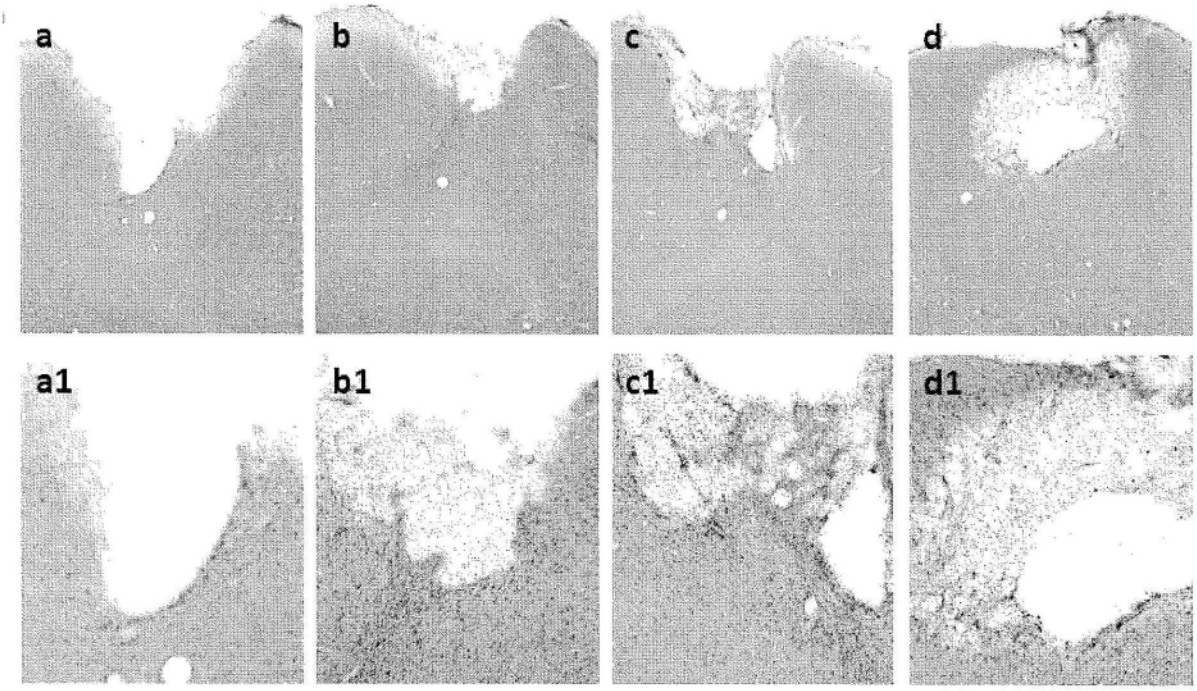

在棒上花费的平均时间（秒）
70
60
50
40
30
20
10
0
*
*
*
载料
细胞
基线Rotorod
TBI后7天的Rotorod
第1个月的Rotorod
第2个月的Rotorod
第3个月的Rotorod

图3

A


a
b
c
d
a1
b1
c1
d1

B

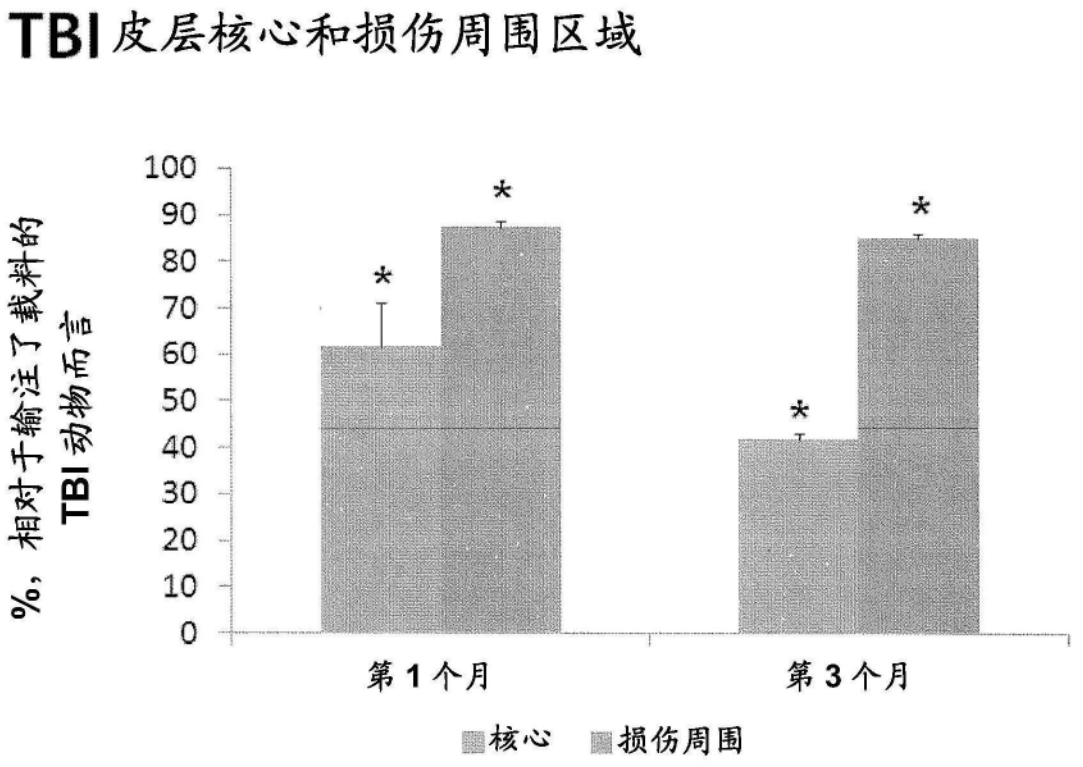

TBI皮层核心和损伤周围区域
%，相对于输注了载料的TBI动物而言
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
*
*
*
第1个月
第3个月
核心
损伤周围

图4

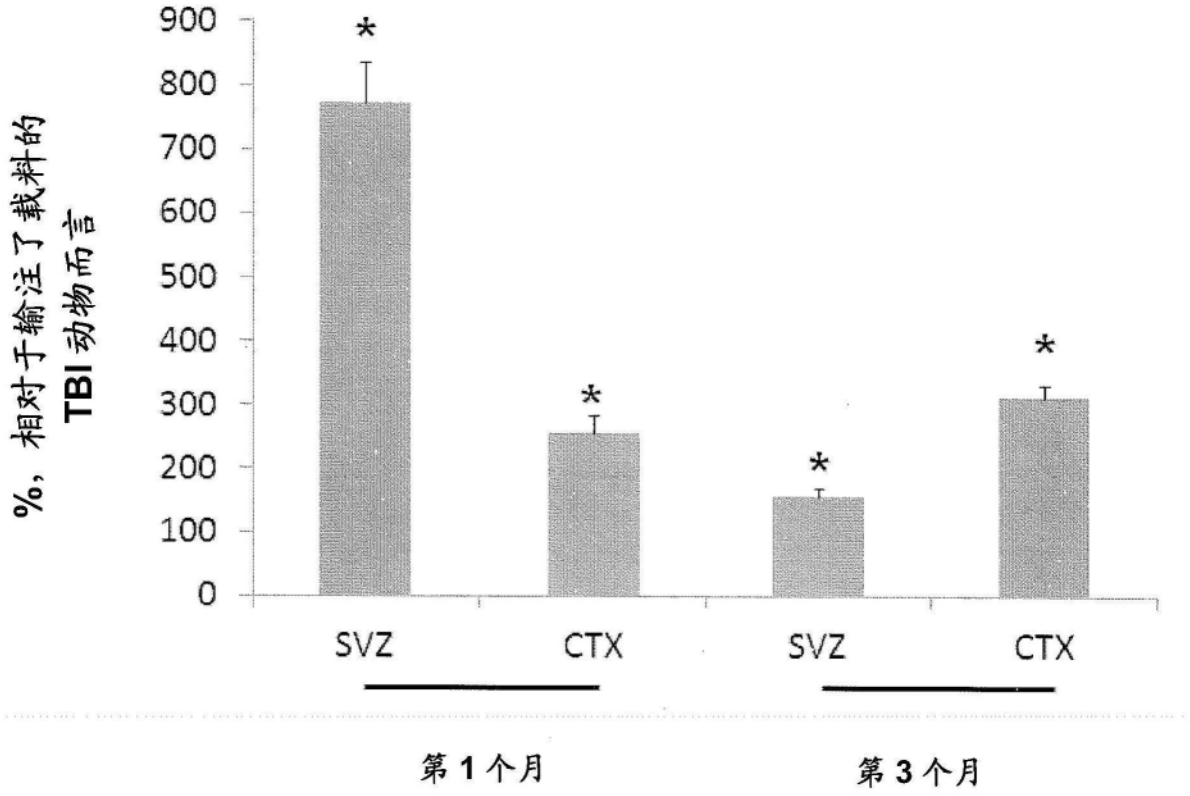

%，相对于输注了载料的
TBI 动物而言
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
*
*
*
*
SVZ
CTX
SVZ
CTX
第 1 个月
第 3 个月

图5

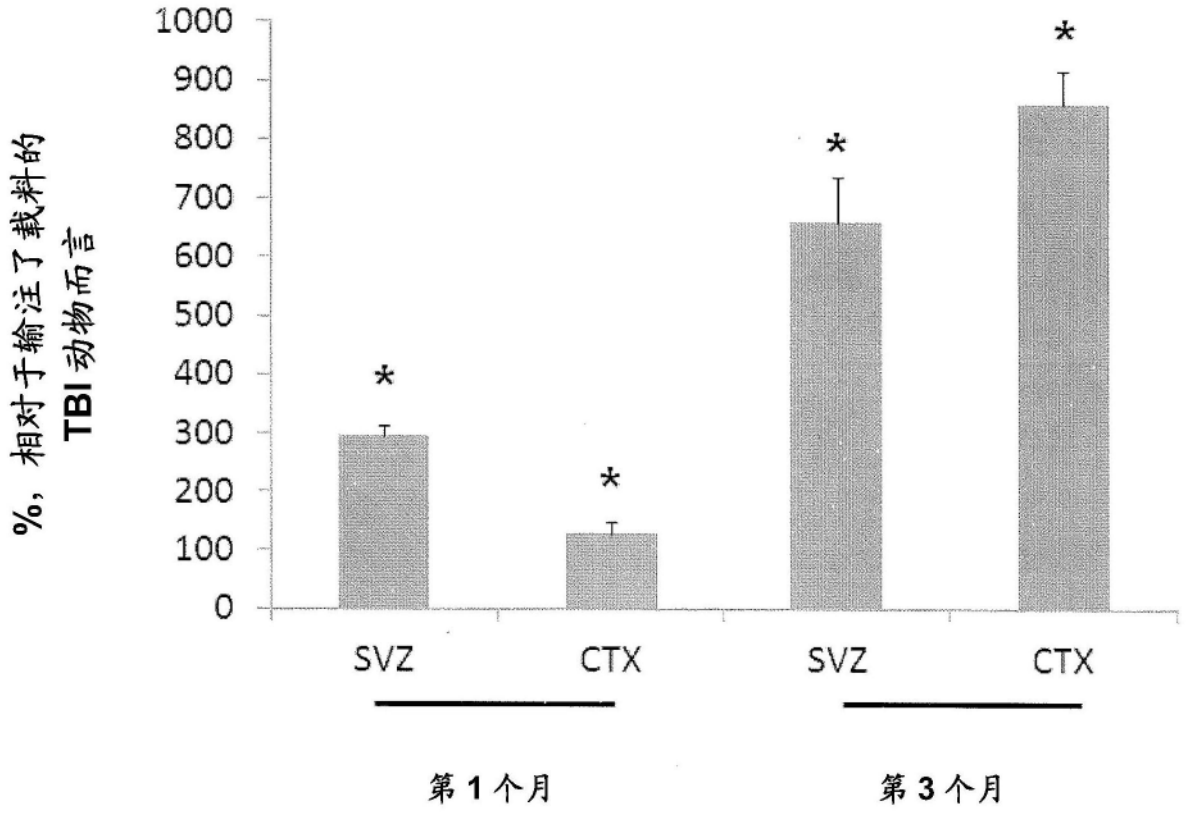

%，相对于输注了载料的TBI动物而言
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
*
*
*
*
SVZ
CTX
SVZ
CTX
第 1 个月
第 3 个月

图6

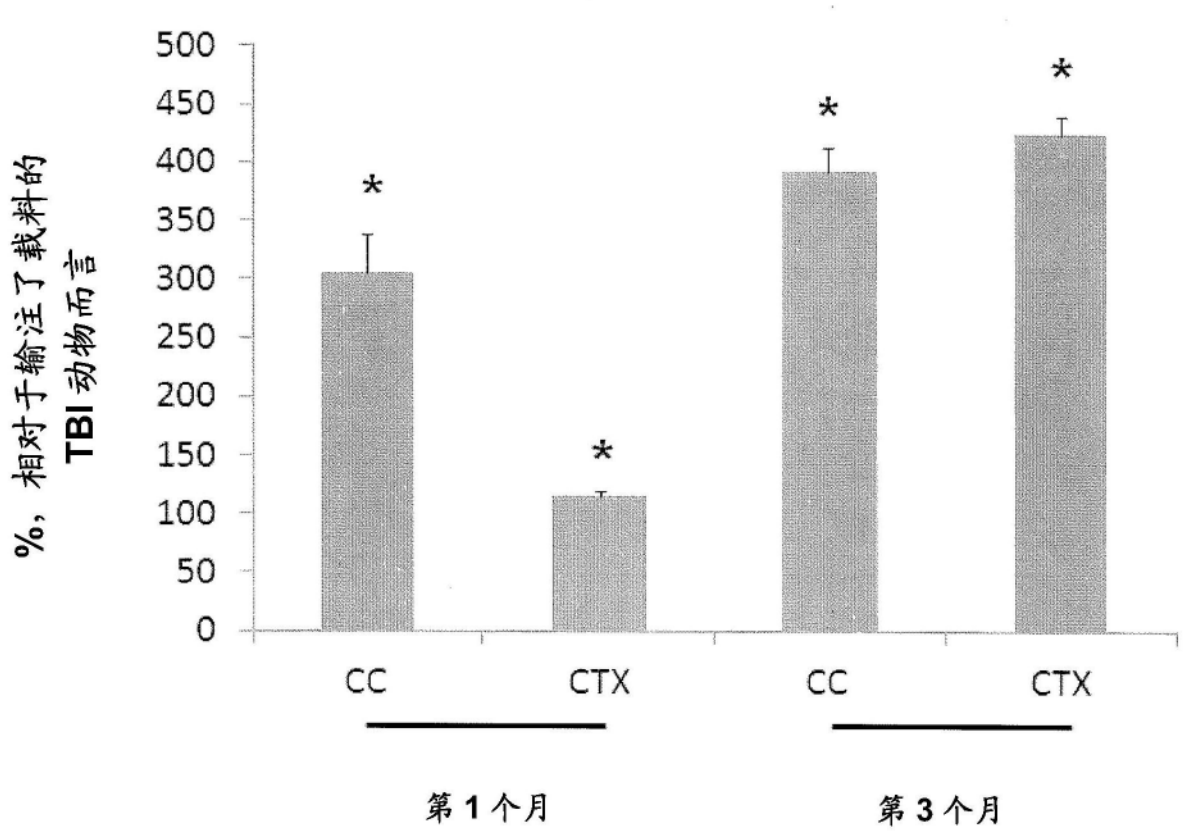

%，相对于输注了载料的TBI动物而言
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
*
*
*
*
CC
CTX
CC
CTX
第 1 个月
第 3 个月

图7

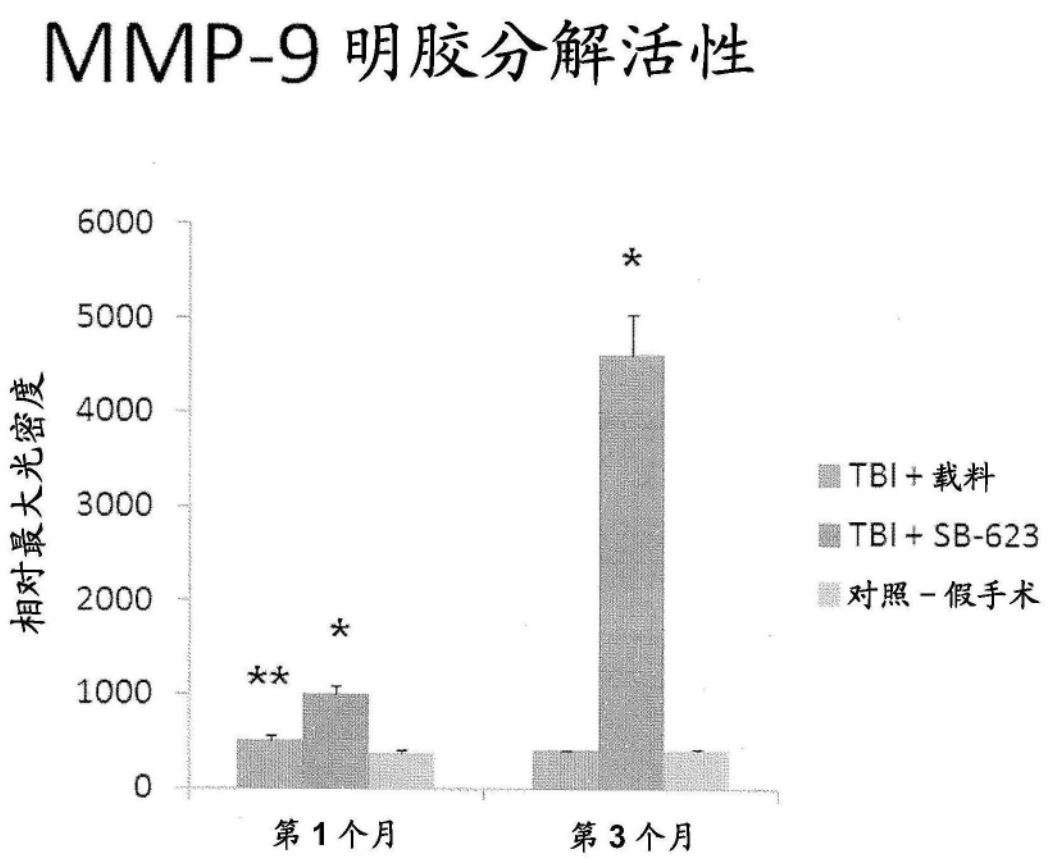

MMP-9 明胶分解活性
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
相对最大光密度
**
*
*
第 1 个月
第 3 个月
TBI + 载料
TBI + SB-623
对照 – 假手术

图8