

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380104179.5

[51] Int. Cl.

A01N 63/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

[43] 公开日 2006年1月4日

[11] 公开号 CN 1717177A

[22] 申请日 2003.11.25

[21] 申请号 200380104179.5

[30] 优先权

[32] 2002.11.26 [33] US [31] 60/429,702

[86] 国际申请 PCT/US2003/038143 2003.11.25

[87] 国际公布 WO2004/047770 英 2004.6.10

[85] 进入国家阶段日期 2005.5.26

[71] 申请人 人类起源公司

地址 美国纽约

[72] 发明人 罗伯特·J·哈里里

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任  
公司

代理人 杨青 樊卫民

权利要求书6页 说明书18页

[54] 发明名称

细胞治疗剂、细胞治疗单元及其用于治疗的方法

[57] 摘要

本发明提供了含有预定数量的所选择类型的潜能细胞的细胞治疗单元。通过分析以及所述数量和同一性的证明实现所述细胞特性和同一性的保证。本发明还提供了治疗模式。优选经分析并且优选经类群证明的细胞制剂文库，并且本发明还提供了适应于具体病人和疾病症状的细胞制剂的制备。

- 
- 5           1. 含有多种潜能细胞的细胞治疗单元；所述单元中至少一些所述多种细胞的同一性和数量是已知的；该单元经分析以确保所述同一性和数量的精确性。
2. 权利要求 1 的细胞治疗单元，其中分析的精确性由单元的提供者证明。
- 10           3. 权利要求 1 的细胞治疗单元，其中同一性和数量已知的潜能细胞是多能细胞。
4. 权利要求 1 的细胞治疗单元，其中所述同一性反映鉴定的细胞上至少一种抗原决定簇的存在与否。
- 15           5. 权利要求 1 的细胞治疗单元，其中所述的潜能细胞获自胎儿脐血或其他胎儿组织。
6. 权利要求 1 的细胞治疗单元，其中所述的潜能细胞获自胎儿脐血。
- 20           7. 权利要求 1 的细胞治疗单元，其中所述的潜能细胞获自胎盘。
8. 权利要求 1 的细胞治疗单元，其中所述的潜能细胞获自产后胎盘。
- 25           9. 权利要求 1 的细胞治疗单元，其中所述的潜能细胞获自产后胎盘灌流液。
- 30           10. 权利要求 1 的细胞治疗单元，其中所述同一性和数量已知的

潜能细胞包括至少一些呈现 CD34, CD8, CD10, OCT4 的细胞。

11. 权利要求 1 的细胞治疗单元, 其中的潜能细胞来自多种来源。

5           12. 权利要求 1 的细胞治疗单元, 其中的潜能细胞来自至少两个个体。

13. 权利要求 1 的细胞治疗单元, 其中的潜能细胞来自至少 5 个个体。

10

14. 权利要求 1 的细胞治疗单元, 其中的潜能细胞是经遗传修饰的潜能细胞。

15           15. 权利要求 1 的细胞治疗单元, 其中至少一种细胞型被从该单元中排除。

16. 权利要求 1 的细胞治疗单元, 其中选择多种潜能细胞以使细胞治疗单元适合于治疗指示的疾病状态或病症。

20           17. 权利要求 16 的细胞治疗单元, 其中至少一种细胞类型被从单元中排除。

18. 含有最低数量的预选类型的潜能细胞的细胞治疗单元。

25           19. 权利要求 18 的细胞治疗单元, 其经分析以确保其预选类型的潜能细胞含量的精确性。

20. 权利要求 18 的细胞治疗单元, 其中预选的潜能细胞的含量是经证明的。

30

21. 权利要求 18 的细胞治疗单元，其中至少一种细胞类型被从单元中排除。

5 22. 权利要求 21 的细胞治疗单元，其中预选的潜能细胞的含量和要排除的细胞类型的缺失是经证明的。

23. 权利要求 18 的细胞治疗单元，其中所述的证明是有关多种潜能细胞类型、所述的多种以及所述被选择的多种中每一种的数量可以使细胞治疗单元适合治疗特定的疾病状态或病症的证明。

10

24. 权利要求 23 的细胞治疗单元，其中所述的证明是有关多种潜能细胞类型、所述的多种以及所述被选择的多种中每一种的数量以及被排除细胞的类型可以使细胞治疗单元适合治疗特定的疾病状态或病症的证明。

15

25. 权利要求 18 的细胞治疗单元，至少一些潜能细胞是遗传修饰的细胞。

20

26. 用于治疗怀疑患有某种疾病状态或病症的试剂盒，包括含有多种潜能细胞的细胞治疗单元；所述单元中至少一些所述多种细胞的同一性和数量是已知的；所述单元经分析以确保所述同一性和数量的精确性；以及包括分析精确性的证明。

25

27. 权利要求 26 的试剂盒，其中至少一种细胞类型从细胞治疗单元中排除。

30

28. 用于治疗怀疑患有某种疾病状态或病症的试剂盒，包括含有最低量的鉴定的潜能细胞的细胞治疗单元和所述单元的潜能细胞组成的证明。

29. 权利要求 28 的试剂盒，其中至少一种细胞类型被从细胞治疗单元中排除。

30. 权利要求 28 的试剂盒，其中至少一些细胞是遗传修饰的细胞。

5

31. 含有来自脐血、胎盘或其混合物的细胞的细胞治疗单元，其中至少一种细胞类型已从细胞治疗单元中排除。

32. 权利要求 31 的细胞治疗单元，其中多种细胞类型已被从细胞治疗单元中排除。

10

33. 权利要求 31 的细胞治疗单元，其中所述单元的至少一些细胞是遗传修饰的细胞。

15

34. 含有来自脐血、胎盘或其混合物的细胞的细胞治疗单元，所述细胞包括多种不同类型，不同的类型中至少一些已经被分离成组分并重组到所述单元中。

20

35. 权利要求 34 的细胞治疗单元，其中所述分离的细胞类型已经分别冷冻。

36. 权利要求 34 的细胞治疗单元，处于冷冻状态。

25

37. 权利要求 34 的细胞治疗单元，其中所述分离的细胞型已经过特征鉴定。

38. 权利要求 34 的细胞治疗单元，其中所述分离的细胞类型已经被遗传修饰过。

30

39. 治疗哺乳动物疾病的方法，包括：

对所述哺乳动物施用治疗有效剂量的组合物，其包括：含有多种潜能细胞的细胞治疗单元；所述单元中至少一些多种所述多种潜能细胞的同一性和数量是已知的；所述单元经分析以确保所述同一性和数量的精确性。

5

40. 权利要求 39 的方法，其中细胞治疗单元包括最低量的预选类型的潜能细胞。

10

41. 权利要求 39 的方法，其中所述同一性和数量的精确性是经证明的。

42. 权利要求 39 的方法，其中所述细胞治疗单元来自产后胎盘。

15

43. 权利要求 39 的方法，其中所述细胞治疗单元来自产后胎盘灌流液。

44. 权利要求 39 的方法，其中所述单元包括至少一种自体细胞。

45. 权利要求 39 的方法，其中所述单元包括至少一种异体细胞。

20

46. 权利要求 39 的方法，其中所述单元被多次施用。

47. 权利要求 39 的方法，其中所述方法进一步包括多倍施用来自不同个体的所述单元。

25

48. 权利要求 39 的方法，其中所述方法进一步包括多次施用来自不同来源的所述单元。

30

49. 权利要求 39 的方法，其中所述方法进一步包括多次施用遗传修饰的所述单元。

50. 细胞治疗单元文库，所述文库的各个单元成员包括多种潜能细胞；每个所述单元中至少一些包括所述单元的多种潜能细胞的同一性和数量是已知的；每个所述单元经分析已确保所述同一性和数量的精确性。

5

51. 治疗需要细胞疗法治病的病人的方法，包括从细胞治疗单元文库中选择所述文库的至少两个单元成员；将来自所述单元成员的等分组合以形成治疗单元并将所述治疗单元施用于病人。

10

52. 权利要求 51 的方法，其中所述库的每个单元成员已经过分析测定了存在与所述单元成员中潜能细胞的同一性和数量。

15

53. 权利要求 51 的方法，其中所述文库的至少一种所述单元成员中至少一种选定的细胞群已减少。

## 细胞治疗剂、细胞治疗单元及其用于治疗的方法

## 5 发明领域

本发明涉及利用细胞治疗剂改进治疗法。细胞疗法包括向病人导入非成熟细胞，尤其是干细胞，以减轻、减缓或治疗疾病状态。本发明还涉及改进的细胞治疗剂、其生产方法、该试剂的单元剂型以及对需要治疗的病人施用细胞治疗单元的新方式。

10

## 技术背景

15

迄今为止，为了达到治疗目的已经采用对动物和人施用某些类型干细胞的方法。很多这样的工作是用从成人得到的干细胞进行的，诸如在成人骨髓中发现的干细胞，尤其是用于繁殖数量降低的骨间的细胞，所述细胞参与攻击性的化疗或放疗，例如用于治疗某些癌症。事实上，这样的细胞治疗尽管受到包括包括缺少细胞数目和类型的标准等方面的限制，已经相对广泛的应用并且获得了一定程度的成功。

20

许多这样的治疗方案利用相对成熟的细胞制剂，如骨髓。尽管这些制剂具有一定水平的治疗潜力，但这样的细胞具有相当大量的表面抗原并且伴随着给药需要进行免疫抑制。此外，绝大多数从成人骨髓提取的细胞受限于其能够分化的细胞类型。已有一些报道显示绝大多数从成人骨髓分离到的细胞只能分化成血细胞。尽管这对于血液相关的疾病是有用的，如白血病，但是这些细胞对于治疗其他定位于特定类型的组织或器官的疾病不是非常有用。骨髓制剂的其它问题是提取骨髓的过程非常痛苦，并且虽然能够找到可能的捐献者，但是很多人由于可能的痛苦和不适不同意接受这个过程。

25

30

最近，利用不太成熟的干细胞的细胞治疗获得一些成功，所述细胞为如在胎儿脐血中发现的干细胞。然而，绝大多数来源包括来自胎



儿脐血的干细胞制剂，包含具有不同有效治疗潜能的各种细胞类群，并且通常不含有用于最佳治疗剂量的充足细胞数目，尤其是例如对接受白血病移植的普通成年人而言。可以相信不同的科学和医疗小组可能得到具有不同特性的不同制剂，即使假定他们遵循相同或相似的方案。目前，大多数的独立制剂，即使是由同一个体制备的制剂，可能具有组合物的细节未明确的不同组合物。简言之，在用于移植的细胞单元中完全缺乏单元之间的可重复性并且几乎没有标准性。

之前的实践可以产生来自不同研究和医疗中心不一致的治疗结果，并且难以或无法获得对细胞治疗方法的精确、统计学的分析。因此，长久以来有着对改进的细胞治疗材料和方法的需要，使其能获得可重复的结果并且可用于科学分析。还需要改进细胞治疗的特异性以及影响改进的效率和结果。重要的是，还有对于单元之间可重复性的需要，可以促进收集充分的数据从而推动细胞治疗医学领域发展的能力。本发明提供了对上述问题和长久以来需求的解决方案。

#### 发明简述

这里使用的“细胞治疗单元”指包含多种潜能细胞的细胞制剂，所述细胞中至少一种类型的细胞可适应于特定的病人或特定的疾病状态。使其适应的过程可以包括具有最小数量的上述细胞型，或去除部分或所有上述的细胞型。

“潜能”细胞或细胞型，指该细胞或细胞型能分化成至少一种类型的细胞。

“多能”细胞或细胞型，指该细胞或细胞类能分化成至少两种不同类型的细胞。

“抗原决定簇”指细胞表面的抗原性区组。

“因子”指针对细胞的抗原决定簇的细胞型。

5 示例的因子包括 CD34, CD8, CD10 等。细胞或细胞制剂可以还根据特定细胞或细胞型是否表现特定因子的特征而被确定为针对该特定因子的阳性或者阴性型。

10 本发明提供了含有多种潜能细胞的细胞治疗单元, 其中至少一些潜能细胞的同一性和数目是已知的。为确保至少一些潜能细胞的同一性和数目的精确性, 进行至少一项检测。在一些优选实施方案中, 细胞单元的提供者确认该检测的精确性。在另外的实施方案中, 同一性和数目已知的潜能细胞是多能细胞。潜能细胞的同一性优选反映细胞表面至少一种抗原决定簇的存在或者缺失。在一些实施方案中, 细胞治疗单元含有至少一些呈现例如 CD34、CD8、CD10、OCT4、CD38、CXCR4 或 CD117 的潜能细胞。在一些优选实施方案中, 部分的这些细胞还呈现 CD33。在 15 一些优选的实施方案中, 细胞治疗单元含有缺少特异性抗原决定簇的细胞。在另外的实施方案中, 至少一种鉴定的某来源的潜能细胞被从细胞制剂中特异性排除或除去。

20 在本发明的一个实施方案中, 一些或全部细胞可以通过是否存在一种或多种下述细胞表面标记进行鉴定: CD10+, CD29+, CD34-, CD38-, CD44+, CD45-, CD54+, CD90+, SH2+, SH3+, SH4+, SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+和 ABC-p+。

25 所述潜能细胞可以从胎儿脐血或其他胎儿组织中获得。在一些实施方案中, 潜能细胞来自胎盘, 尤其是产后的胎盘, 其已由代谢支持和供给营养。潜能细胞优选从产后胎盘灌流液获得。本发明还提供其中潜能细胞来自多种来源的细胞治疗单元。在一些实施方案中, 潜能细胞来源于至少两个个体, 至少五个个体, 或至少十个个体。在一些实施方案中, 该单元包含至少一种自体细胞。在 30 一些实施方案中, 该单元包含至少一种外源细胞。一些实施方案中, 该单元包含自体细胞

和异体细胞的嵌合体。在另一些实施方案中，至少一些这样的细胞是遗传修饰的细胞。

5 在另外的实施方案中，选择多种潜能细胞以使所述单元适合于治疗特定疾病状态或病症和/或严重的病症。在一些优选的实施方案中，细胞治疗单元包括最小量的预选类型的潜能细胞并且可以基于例如特定病人的体重或病人的医疗状态来选择。在一些优选的实施方案中，分析细胞治疗单元以确保预选的潜能细胞含量的精确性。在一些优选的实施方案中，细胞治疗单元中预选潜能细胞的含量是经确认的。  
10 在一些优选的实施方案中，细胞治疗单元可以是一组基本相同的单元之一，其中另外的单元储存用于将来的移植，以使在需要的情况下病人可以接受与先前移植一致的单元。或者，可以改变另外的相似单元以优化对同一病人将来的移植。

15 在另外的实施方案中，至少一种细胞型被从含有预选潜能细胞的细胞治疗单元中排除。细胞治疗单元优选被确认为其预选潜能细胞的含量以及缺失要排除的细胞型。在其他的实施方案中，确认选择的多种潜能细胞的同一性和数量使细胞治疗单元适合于特定的疾病状态或病症的治疗。在一些实施方案中，确认的优选为多种潜能细胞型，其中  
20 中被选择以及排除的所述多种细胞中的每一种的多样性和数目使细胞治疗单元适合于治疗特定疾病状态或病症。

25 在一些实施方案中，本发明提供了治疗怀疑患有某种疾病状态或病症的人的试剂盒。该试剂盒优选包括含有多种潜能细胞的细胞治疗单元。在一些实施方案中，该试剂盒含有其中至少一种细胞类型已从细胞治疗单元中排除的细胞治疗单元。在一些优选的实施方案中，该试剂盒含有其中至少一些潜能细胞已被鉴定并计数的潜能细胞。在一些实施方案中，该试剂盒含有已经分析以确保潜能细胞的同一性和数量精确性的单元。在一些更优选的试剂盒的实施方案中，分析的精确性  
30 已经过证实。

5 本发明提供了用于治疗怀疑患有某种疾病状态或病症的人的试剂盒，其含有具有最少数目的鉴定的潜能细胞并且确认了潜能细胞组成的细胞治疗单元。该试剂盒还可以包括将所述单元施用于病人的设备或装置，监控施用的材料和其他附带物。

10 在一些实施方案中，本发明提供含有源自脐带血、胎盘或其混合物的细胞的细胞治疗单元，其中至少一种类型的细胞被从该单元中除去。在一些实施方案中，多种细胞型已从该单元中除去。

15 本发明提供了含有源自脐带血、胎盘或其混合物的细胞的细胞治疗单元，其中所述细胞含有多种不同类型。在一些实施方案中，至少一些不同类型的细胞分离成组分。在其他的实施方案中，该组分重组成单元。在本发明的一些方面优选使用组分以补充细胞治疗单元具有特定的潜能细胞类型。分离的组分可以单独冷冻或在重组之前储存。在一些其他的实施方案中，细胞治疗单元本身已经处于冷冻状态。在一些其它的实施方案中，分离的细胞型已经过鉴定和/或计数。

20 本发明提供了治疗哺乳动物疾病的方法，包括给哺乳动物施用治疗有效量的含有细胞治疗单元的组合物。用来治疗疾病状态或病症的单元含有多种潜能细胞，其中该单元的同性和数量而言是已知的。分析所述单元中的至少一些细胞以确保潜能细胞的同性和数量的精确性。在一些优选的实施方案中，多次施用细胞治疗单元。在其他的情况下，可以施用多剂量的源自不同个体或来源的细胞治疗单元。该方法还可以包括施用多剂量的源自一个个体的细胞治疗单元。

25 本发明提供了细胞治疗单元，其包括多种潜能细胞，细胞治疗单元种的至少一些潜能细胞的同性和数量是已知的。

30 细胞治疗单元中潜能细胞的同性和数量是对于本发明中使用的该单元

的可靠性和质量非常重要的方面。所述潜能细胞可以通过任意数量的方法并且基于本领域技术人员认为有用的任何标准进行鉴定。一种这样的方法是基于细胞表面抗原决定簇的存在来鉴定潜能细胞。抗原决定簇可以是能被抗体识别的任意分子。抗原决定簇的一些例子包括多肽、脂类、糖蛋白、糖等。另外，细胞还可以根据一种或多种下述细胞表面标记的存在与否进行鉴定：CD10+，CD29+，CD34-，CD38-，  
5 CD44+，CD45-，CD54+，CD90+，SH2+，SH3+，SH4+，SSEA3-，SSEA4-，OCT-4+和 ABC-p+。

10 尽管一些潜能细胞可以通过抗原决定簇的存在或通过特定表达的因子进行鉴定，基于该细胞缺少何种抗原决定簇来鉴定细胞是同等重要的。例如，已知某些决定簇的存在可以降低成功治疗的机会，因此使用细胞治疗单元的人希望知道使用的单元缺少某些抗原决定簇。此外，抗原性因子的存在与否能帮助确定特定细胞或细胞型的成熟水平。  
15 成熟度低的细胞具有较广泛范围的分化并且因此可能更为有用。根据细胞治疗单元的使用，需要不同分化水平的细胞。一些细胞的鉴定可以使在其使用时获得单元的人产生更好的临床结果。

判断细胞上或者细胞中抗原性因子存在与否的方法是本领域所公知的。这些方法包括荧光活化细胞分选(FACS)，酶联免疫吸附检测(ELISA)，Western 印迹，聚合酶链式反应(PCR)，逆转录 PCR(RT-PCR)等。用于鉴定潜能细胞的精确方法不是主要的。

其他鉴定细胞的标准可以基于细胞的遗传组成。基因在细胞内发生的事件中起着重要作用。因此，本领域的普通技术人员可以基于其基因鉴定潜能细胞。更具体的，本领域的普通技术人员可以基于基因是野生型、突变型、被表达、不被表达、含有多态性、或其组合来鉴定细胞。这里使用的术语“表达的”指该基因是否被转录为 RNA 或是  
25 否能由该基因最终产生蛋白。

30

确定细胞遗传图谱的方法是本领域的普通技术人员公知的。任何使用的方法都可行，但能用来确定细胞遗传组成的方法或技术的一些例子包括但不限于，PCR，RT-PCR，Northern 印迹、Southern 印迹，单核苷酸多态性(SNP)分析、基因芯片表达分析、基因表达系列分析(SAGE)、核苷酸测序、FACS、原位杂交等。

在本发明的一些实施方案中，细胞可以通过上述任意的标准进行鉴定：抗原决定簇，遗传组成，其组合，或者细胞可以基于另外的一组标准进行鉴定。在一些实施方案中，能够鉴定至少 0.1%，1%，至少 10%，至少 20%，至少 30%，至少 40%，至少 50%，至少 60%，至少 70%，至少 80%，至少 90%，至少 95%，或大约 100%的细胞。

鉴定细胞和测定细胞数量的方法是本领域公知的，其包括但不限于使用标准的细胞检测技术，如流式细胞仪、细胞分选、免疫细胞化学(如用组织特异性或细胞标记特异性的抗体染色)，FACS，磁活化细胞分选(MACS)，通过光学显微镜或共聚焦显微镜检查细胞形态，或利用本领域公知的技术测定基因表达的改变，所述技术诸如为 PCR 和基因表达谱。此外，还能够通过包括但不限于下述的技术进行相关检测：光学或电光学性质、形态成像方法、光晶体管([www.genoptix.com](http://www.genoptix.com))微波光谱学(Signature Bioscience [www.signaturebio.com](http://www.signaturebio.com))和光钳。其他的方法也可以使用。

已知具有特定抗原决定簇的特异性细胞型或细胞可以对细胞治疗的成功率产生不良影响。因此，本发明提供至少一种细胞类型被排除的细胞治疗单元。被排除的细胞类型不总是一样的。在一些实施方案中，排除所有 CD34 阳性的细胞。在其他一些实施方案中，排除所以 CD8 阳性的细胞。在一些实施方案中，排除多种细胞类型。在一些应用中，降低而不是消除选定的细胞类型以提高治疗成功率是可接受并且方便的。因此，本文中的术语“排除”或“消除”优选指在细胞制剂中减少某些细胞类型数量的至少约 75%。优选，达到减少至少

约 90%，更优选至少减少约 95%。基本完全清除当然是更为合适的，尽管在一些情况下也可以达到相同的效果。前述的减少百分比是指利用任何合适的分析检测的相对于这些细胞的原始数目的细胞数。

5            可以通过选择含细胞的单元，该单元并不天然含有该细胞(或很多该细胞)或通过利用特异性去除选定的细胞型的方法来排除或减少细胞型。优选排除具有不符合细胞治疗单元打算用于的治疗手段的抗原决定簇的细胞型。例如，但不是加以限制，可以排除 T-淋巴细胞和成熟树突细胞以降低移植物抗宿主疾病的可能性。在肾上腺白细胞发育异常 (leukodysplasia) 的治疗中，可能需要除去一些或全部 CD8 阳性的  
10            细胞。

“天然地”排除指某一来源的细胞制剂不需要进一步操作就不含有特异性细胞型或含有很小量的这种细胞型。或者细胞型可以通过在在  
15            细胞从某一来源提取之前或之后使用的过程排除。用于排除特异性细胞型的过程或方法是本领域技术人员公知的。所述的过程或方法的实例包括：FACS，离心，免疫层析等。

在一个实施方案中，细胞可以使用荧光活化细胞分选仪(FACS)进行分选。荧光活化细胞分选(FACS)是基于颗粒的荧光性质分离包括细胞的颗粒的公知方法(Kamrach,1987,Method Enzymol,151:150-65)。激光  
20            激发颗粒个体的荧光基团产生少电荷，从而使带正电和负电的颗粒从混合物中电磁性地分离出来。在一个实施方案中，细胞表面标记特异性的抗体和配体用不同的荧光标记物标记。通过细胞分选仪处理细胞，  
25            根据细胞结合所使用抗体的能力使其分离。FACS 分选仪分选的颗粒可以直接沉积到 96 孔板或 384 孔板的各个孔内以利于分离和克隆。用于细胞表面标记的试剂或决定簇指定(cluster designated)的试剂可以从各种途径得到，包括例如 Becton Dickinson 和 Cell Pro Inc。

30            可获得的试剂包括但不限于鉴定下列标记的试剂：CD1a；CD2；

CD3; CD4; CD4(多克隆); CD4 v4; CD5; CD7; CD8(Leu-2a);  
 CD8(Leu-2b); CD10(抗-CALIA); CD11a(抗-LFA-1 $\alpha$ ); CD11b; CD11c;  
 CD13; CD14; CD15; CD16(Leu-11a, 11b, 11c); CD18(抗-LFA-1 $\beta$ );  
 CD19 (Leu-12); CD19(SJ25C1); CD20; CD21(抗-CR2); CD22; CD23;  
 5 CD25(抗-IL-2R); CD26; CD27; CD28; CD31(抗-PECAM-1); CD33;  
 CD34(抗-HPCA-1 & 2); CD38; CD42a(抗-gpIX); CD44; CD45(抗-Hle-1);  
 CD45RA; CD45RO; CD49d (抗-VLA-a $\alpha$  4); CD54; CD56 (MY31);  
 CD56(NCAM16.2); CD57; CD58(抗-LFA-3); CD61; CD62P;  
 CD62L(Leu-8); CD69; CD71; CD80(抗-BBI/B7); CD95; CD117;  
 10 CD122(抗-IL-2Rp75); CD123(抗-IL-3R $\alpha$ ); CD134(Ox40); CD154  
 (CD40L); CD158a; CD161; 血系混合物 1(Lineage Cocktail 1)(linl) FITC  
 和其他现在已知或以后发现的标记。

非决定簇试剂包括: 抗-BrdU; 抗-细胞角蛋白(CAM 5.2); 抗  
 15 -HER-2/neu; 抗-HLA-DP; 抗-HLA-DQ; 抗-HLA-DR; 抗-Hu KIR  
 (NKB1); 抗-IgA<sub>2</sub>; 抗-IgD; 抗-IgG; 抗-IgM(Ig重链); 抗- $\kappa$  (Ig轻链);  
 抗- $\kappa$  F(ab')<sub>2</sub>; 抗- $\lambda$  (Ig轻链); 抗- $\lambda$  F(ab')<sub>2</sub>; 抗-P-糖蛋白(P-gp); 抗-TCR  
 $\alpha$  /  $\beta$  -1 (WT31); 抗-TCR- $\gamma$  /  $\delta$  -1; PAC-1; 血系混合物 1( Lineage  
 20 Cocktail 1)(linl)FITC。本领域技术人员可以使用这些试剂为其个别需要  
 所需的试剂从而优化所需的细胞治疗单元或使其适应特定的病人或应  
 用。

在另一个实施方案中, 磁珠被用来分离细胞。细胞可以通过磁化  
 的细胞分选(MACS)技术进行分离, 该分离颗粒的方法是基于其与磁珠  
 25 结合(直径 0.5-100  $\mu$  m)。可以在磁性微球上进行多种有用的修饰, 包括  
 共价结合能特异识别细胞固相表面分子或半抗原的抗体。然后施加磁  
 场从而物理性的操作所选择的珠子。然后将珠子与细胞混合使之结合。  
 然后将细胞通过磁场以分离出带有细胞表面标记的细胞。然后这些细  
 胞可被分离出并与偶联有针对其它细胞表面标记的抗体的磁珠再混  
 30 合。这些细胞再次通过磁场, 分离结合两种抗体的细胞。如果需要,



然后将这些细胞稀释到分开的盘中，诸如用于克隆分离的微量盘。

5 如果知道细胞治疗单元的组成将有助于实现长久以来对可靠的和确定的细胞治疗单元的需求。除了细胞治疗单元的组成，如果知道细胞治疗单元中至少一些细胞的数量也是有帮助的。在一些实施方案中，可以只知道细胞的数量而不知道任何细胞的特异性的同一性。在一些其他的实施方案中，不仅知道细胞的数量，而且知道所鉴定的细胞的数量。确定细胞总数是本领域技术人员所公知的。可以用来细胞计数的设备的例子是进行 FACS 或流式细胞技术的机器，或更简单的设备，  
10 血球计数板。通常在确定细胞同一性的同时确定细胞的数量，但也可以在确定一些潜能细胞的同一性之前或之后确定细胞数目。通过知道存在于细胞治疗单元中细胞的数量可以使利用该单元的人知道正在施用什么，及本细胞治疗中唯一缺乏的物质。

15 细胞治疗单元中总细胞数量和特异性细胞型的数量的知识可用于给所示单元补充其它的细胞或细胞型使得最低数量的细胞或最低数量的特异性细胞型存在于所述单元中。据认为细胞治疗中观察到的不同反应一部分是由于使用目前的细胞制备技术从某来源回收的不同细胞数目。

20

通过鉴定细胞和细胞计数可以对成功的治疗所需要的以及对特异性细胞型在细胞制剂中的重要性进行彻底和完整分析的能力进行更彻底的分析。

25

现在能够制备具有最低量的预选细胞的细胞治疗单元。还可以确保其他细胞型从该单元中排除。在一些实施方案中，细胞治疗单元包括至少约 100 个选定的潜能细胞。这样的单元优选具有至少大约 1000 个这样的细胞，更优选具有至少大约 10,000 个这样的细胞。选定的细胞数量越多越优选，尤其是该单元当将所述单元多次施用于同一或不  
30 同个体时。因此，选定的细胞群大于约 100,000 或甚至约 500,000 时是

有用的。优选所述单元中一些或全部的细胞通过检测鉴定，并且上述情况反映在确定了这些细胞存在的情况下。这种确定确保了治疗应用的一致性和有效性。

5           在本发明的一些实施方案中，细胞治疗单元具有最低数量的不同的特异性细胞类型。具有最低数量的特异性细胞型的有利之处在于其可以提高细胞治疗单元的疗效。例如，细胞治疗单元可被检测包括至少约 1,000 个 OCT4 阳性细胞，含有或不含有已知数量的其他合适的细胞型。在其他的实施方案中，所述单元可以包含通过相对制剂中的所有有核细胞测定的特定百分比的 CD34 阳性细胞。因此，这样的制剂可以包括至少 0.01%，0.1%，1%，10%，20%，30%，40%，50%，60%，  
10       70%，80%，90%，95%或其他百分比的 CD34 阳性细胞。相似地，可以制备已知百分比的具有其他抗原决定簇或特异性因子的细胞。

15           本发明的其他实施方案提供了含有来自至少一个来源的细胞的细胞治疗单元，其中所述来源的细胞已被分离成组分。这里使用的术语“组分”是细胞类型、鉴定的细胞等的同意词。将细胞制剂分离成组分的方法是本领域技术人员公知的，包括但不限于 FACS、离心、层析、HPLC、FPLC 等。

20           因此，细胞治疗单元能包括重新组合的组分。在一些实施方案中，细胞治疗单元中使用至少一个组分。在一些其他的实施方案中，至少两个，至少三个，至少四个，至少五个，至少十个，至少一百个组分重新组合形成细胞治疗单元。优选知道各个来源的组分的同一性和相对数量，一些细胞型优选从一些或所有的组分中排除。可以观察到不同的组分可以分开保藏，如冷冻，并且相同的组分可以形成已知同一性和数量的细胞“制剂”或“文库”用于配制成组合的细胞治疗单元。  
25           将各自的细胞制剂分离成组分可以制备具有细胞和排除细胞类型的特定组成的细胞治疗剂。此外，可以给现存的细胞治疗单元补充具有可以指定用于特定治疗手段的特定细胞型或组分。  
30

因此，本发明的细胞治疗单元可以包括从一个来源或多个来源得来的细胞。与之前的实践相反，据信提供来自多个来源的细胞是有利的，并能由此产生治疗益处和疗效。在一些实施方案中，细胞来自多个来源且可以来自这些来源的多种器官。这里使用的术语“来源”指可以从中得到或提取细胞的生物、组织或器官。在一些实施方案中，来源是胎儿脐血、胎儿组织、胎盘、产后胎盘、产后胎盘灌流液或其混合物。如何从不同组织或器官提取细胞是本领域技术人员公知的。从胎儿脐血提取细胞的方法可以从下述文献找到，例如，美国专利 5,372,581，名称为“收集胎盘血的方法和设备”("Method and apparatus for placental blood collection")，公开(issue)于 1994 年 12 月 13 日；Hessel 等的美国专利 5,415,665，名称为“脐带夹紧、切断和血液收集装置和方法”("Umbilical cord clamping, cutting, and blood collecting device and method")公开于 1995 年 5 月 16 日。针或套管通常置于脐静脉内而胎盘被轻柔按摩以帮助从胎盘中收集脐血。从胎盘、产后胎盘或产后胎盘灌流液提取细胞的方法能在下述文献找到，如国际专利申请 WO 02/46373 和 WO02/064755，这里引入两者全文引入作为参考。

在另外的实施方案中，通过施用例如下列物质而刺激细胞增殖：红细胞生成素、细胞因子、淋巴因子、干扰素、集落刺激因子(CSF's)、干扰素、趋化因子、白介素、包含配体的重组人造血生长因子、干细胞因子、血小板生成素(TPO)、白介素和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或其他生长因子。

在另外的实施方案中，细胞遗传工程化细胞，例如，利用诸如腺病毒或反转录病毒载体的病毒载体，或通过诸如脂质体或化学介导的 DNA 吸收的机械方法。

含有转基因的载体能够通过本领域公知的方法导入到目的细胞，例如转染、转化、转导、电穿孔、感染、微注射、细胞融合、DEAE

葡聚糖 (DEAE extran)、磷酸钙沉淀、脂质体、LIPOFECTIN<sup>TM</sup>、溶酶体融合、合成阳离子脂质、使用基因枪或 DNA 载体转运子, 使转基因转导入子细胞, 如胚胎样干细胞的子细胞或由胚胎样干细胞分裂产生的祖细胞。转化或转染哺乳动物细胞的各种方法参见 Keown 等, 1990, Methods Enzymol. 185: 527-37; Sambrook 等, 2001, 分子克隆-实验室指南(Molecular Cloning, A Laboratory Manual), 第三版, 冷泉港实验室出版, N. Y.

细胞治疗单元优选包含最低量的预选类型的潜能细胞并且经过鉴定。这里使用的“预选的”是指在施用细胞治疗单元之前选择将用于细胞治疗单元的潜能细胞类型的方法。对在细胞治疗单元中将具有最低量的潜能细胞的类型进行预选择可以使细胞治疗单元适合配制成在个体或一类个体中有望获得特定治疗结果的组合物。相似的, 出于相似的理由优选证明缺少其他的预选细胞类型。

选择本发明的细胞治疗单元中存在的潜能细胞和细胞类型的多样性使得所述单元适合治疗特定的疾病状态或病症。这里使用的术语“选择...使得”是指确定含有多种潜能细胞的细胞治疗单元是否适合用于治疗的方法。这种确定可以基于细胞治疗单元中存在的潜能细胞的数量。如上文讨论的, 细胞的数量似乎对用细胞疗法治疗个体或病人的成功率是非常重要的。因此, 不是所有的细胞治疗单元都可以适合用于特定的疾病状态或病症的治疗。此外, 潜能细胞类型也有助于确定细胞治疗单元是否适合用于治疗。某些类型的潜能细胞可以是对特定疾病状态或病症的治疗有害或有益的。因此, 单元中存在的细胞类型可以是用来选择适合用于治疗的单元的另一个因素。用于选择适合治疗的单元的标准对上述提到的不是特异的。任何标准都可用来确定是否选择细胞治疗单元中存在的多种潜能细胞使得所述单元适合用于特定的疾病状态或病症的治疗。

本发明提供了细胞治疗单元, 其中存在的至少一些潜能细胞被鉴

定和计数。然而，对在科研中可依赖并且可用于细胞治疗的单元而言，优选分析单元的含量以保证同一性和数量的精确性。可以由已经确定细胞治疗单元中至少一些潜能细胞的同一性和数量的相同小组，个体或者设备进行分析。然而，可以通过已经确定一些潜能细胞的同一性和数量的不同个体、小组或设备来进行分析。在一些实施方案中，只需要进行一个分析确保同一性和数量的精确性。在一些其他的实施方案中，需要进行至少 2 个，至少 5 个，或至少 10 个分析确保潜能细胞的同一性和数量的精确性。要进行的分析的类型可以是与前面用来确定数量和同一性的相同分析。在一些其他的实施方案中，使用不同的分析以确保一些潜能细胞的数量和同一性的精确性。一些用于确保精确性的分析包括但不限于 ELISA、FACS、Western 印迹等。

在一些其他的实施方案中，单元的提供者证明分析的精确性。这里使用的术语“提供者”指给使用所述单元的个体提供细胞治疗单元的个体，商户或机构。在一些实施方案中，证明包括表明已正确进行检验并且结果正确的书面陈述。在一些其他的实施方案中，证明包括显示该分析工作正常的对阳性对照进行检验的结果。在一些其他的实施方案中，证明包括阳性对照结果以及分析工作正常的书面陈述。在另外一些实施方案中，证明包括从细胞治疗单元中排除的潜能细胞类型的列表。在另外一些实施方案中，证明包括包含在细胞治疗单元中的至少一些潜能细胞类型的列表。在一些实施方案中，证明包括所有细胞的数目。在一些实施方案中，证明还包括至少一些特定细胞类型的数量。在一些其他的实施方案中，证明包括添加到单元中以补充潜能细胞以使该单元含有最低数量的潜能细胞的至少一些潜能细胞的类型的列表。

本发明还提供用于治疗怀疑患有某种疾病状态或病症的试剂盒，包括含有多种潜能细胞的细胞治疗单元，其中至少一些潜能细胞的同一性和数量是已知的。此外，分析细胞治疗单元以确保潜能细胞的同一性和数量的精确性。该试剂盒还包括分析精确性的证明。在一些实

实施方案中，试剂盒包括具有最低数量的鉴定的潜能细胞的细胞治疗单元和该单元的潜能细胞组合物的证明。在一些其他的实施方案中，该试剂盒包括至少一种细胞类型被排除的细胞治疗单元。

5            本发明还提供治疗哺乳动物疾病状态或病症的方法。所述方法包括给哺乳动物施用有效治疗量的包括含有潜能细胞的细胞治疗单元的组合物，其中一些潜能细胞已知其同一性和数量。该单元还经分析以确保同一性和数量的精确性。在一些其他的实施方案中，细胞治疗单元包括最低数量的预选的潜能细胞类型。

10

对哺乳动物的有效治疗剂量是不同的，但是例如可以是大约 0.01 细胞治疗单元/Kg 到 100 单元/Kg。细胞治疗单元可以快速或缓慢地施用于哺乳动物。在一些实施方案中，细胞治疗单元以大约 0.01  $\mu$  L/分钟的速度给药，在其他的实施方案中，该单元以大约 100,000mL/分钟的速度给药。该单元可以以下列方式给药，如静脉内、皮下、肌内、口腔或者直肠。在一些实施方案中，在不同时间给哺乳动物多次施用所述单元。在一些其他的实施方案中，将来自不同来源或不同个体的细胞治疗单元施用于哺乳动物。

15

20            细胞治疗单元的潜在使用是不受限制的，但能使用细胞治疗单元治疗的疾病状态或病症的一些例子包括癌症、急性白血病、慢性白血病及其他目前用骨髓或脐血移植进行治疗的癌症、脊髓发育不良综合症、干细胞障碍、脊髓细胞增殖障碍、淋巴细胞增殖障碍、吞噬细胞障碍、脂质体贮积障碍、组织细胞障碍、遗传性红细胞异常、先天(遗传)免疫系统障碍、遗传血小板异常、浆细胞障碍、Lesch-Nyhan 综合症、软骨-毛发发育不良、Glanzmann 血小板机能不全、骨质疏松症、乳腺癌、Ewing 肉瘤、神经母细胞瘤、肾细胞癌、肺癌、阿尔兹海默病、肝病、肝炎、帕金森病、视觉丧失、记忆丧失等。

25

30            细胞治疗单元可以进行优化用于酶替换疗法治疗特定的疾病或病

症，包括但不限于，溶酶体贮积疾病如 Tay-Sachs, Niemann-Pick, Fabry's, Gaucher's, Hunter's 和 Hurler's 综合症，及其他神经节苷脂病、粘多糖增多症和糖原贮积病。这种情况下细胞治疗单元可以被证明细胞经分析含有能产生必要酶的所需数量的细胞。所述的单元可以包括含有所需酶的功能性内源基因的异体细胞、含有所需基因的外源拷贝的自体细胞或两者的组合。

在其他的实施方案中，细胞可以用作基因治疗的自体或异体转基因载体，用于纠正先天的代谢失常，诸如肾上腺白质萎缩、囊性纤维化、糖原贮积病、甲状腺功能减退，镰刀形红细胞贫血病、Pearson 综合症、Pompe's 病、苯丙酮酸尿症(PKI)、Tay-Sachs 病、卟啉症、槭糖尿尿病、高胱氨酸尿病、粘多糖病、慢性肉芽肿病和酪氨酸血症或治疗癌症、肿瘤或其他病症。

引用任何公开物是用作本发明申请日之前的技术公开，且不应理解为本发明由于在先发明的存在而不能在时间上早于这些公开物。本发明不限于此处描述的具体实施方案的范围。实际上，除这里描述的之外，根据前面的描述多种对本发明的各种改变对本领域的技术人员是显而易见的。这些修改在权利要求书的范围内。这里引用的所有参考文献在此全文引入作为参考并与每个公开物、专利或专利申请具体和单独指定全文引入作为通用参考的程度相同。

### 实施例 1

患急性骨髓性白血病 (AML) 的成人需要通过细胞移植进行造血重建。病人进行传统化疗，然后接受由病人的健康护理提供者确定的用于移植的传统制剂，但包括杀伤患病的骨髓。测定病人的体重。用传统的方法进行 HLA 配型。基于这些参数，包括待治疗的疾病、病人的体重和 HLA 匹配情况，移植者要求并被提供了具有多种潜能有核细胞的细胞治疗单元；所述单元已知至少一些所述的多种细胞的同一性和数量；该单元经分析保证所述同一性和数量的精确性，并且是确认

的。尤其是言，该单元被确认每千克病人体重含有大约  $1.4 \times 10^7$  个有核细胞。此外，确认的信息包括 HLA 的信息。由于病人患有 AML，细胞治疗单元包括不少于总有核细胞 1% 的 CD34+，以及不少于 CD8+ 细胞的 2.5% 以使移植物抗肿瘤效应最小化。

5

在这种情况下，移植者需要待移植的细胞总数的两倍( $1.4 \times 10^7$  个有核细胞乘以病人体重公斤数乘以 2)。移植者在移植前需要  $1 \times$  的量以使这次移植具有合适的细胞数量。另一半量的细胞将在需要下一次移植时被使用(shipped)。因此，第二个细胞治疗单元与首次移植使用的是一样的。或者根据病人体重、疾病严重程度或建议治疗的改变，移植者可以要求第二个细胞治疗单元以适当的方式作改变(CD34 阳性的数量增加等) 并加以证明。移植以移植者通常使用的相同方式进行。

10

### 实施例 2

患镰刀形红细胞贫血病的儿童需要细胞移植。确定以患儿的每千克体重计需  $1.7 \times 10^7$  个有核细胞。通过常规的方法进行正确的 HLA 配型。确定细胞治疗单元必需具有不少于总有核细胞数 1% 的 CD34+ 细胞。所述 CD34+ 细胞进一步描述为 CD34+/CD33+；CD34+/CD33-A 的比例为 2：1。提供具有这些参数的细胞治疗单元。该单元包括从脐血得到的细胞和例如描述于 WO 02/064755 中的多能胎盘细胞，所述多能胎盘细胞以描述于 WO 02/064755 的方式获得。CD34+/CD33+ 细胞对 CD34+/CD33- 细胞的比例是 2：1，该事实通过分析确定并证明了其精确性。证明的细胞通过 FACS 基于颗粒的荧光性质、细胞表面标记特异性抗体或标记用不同荧光标记物标记的配体进行测定。通过细胞分选仪处理细胞，基于细胞与使用抗体的结合能力进行分离。细胞表面标记特异性抗体可以从任何出售这些试剂的公司获得，包括例如 Becton Dickinson。通过移植者常规使用的相同方式进行移植。

20

25

### 实施例 3

患有肾上腺白细胞发育异常的儿童。据确定适合进行细胞移植。

30



据确定没千克患儿体重需要  $2 \times 10^7$  个有核细胞(通过常规方法从脐血得到)。通过常规方法进行正确的 HLA 配型。提供具有上述参数的细胞治疗单元。尤其是，该单元被确认包含不少于有核细胞总数 0.25%的 CD34+/CD38-细胞以及不少于有核细胞总数 0.5%缺失的 CD8+细胞。

5

通过移植者常规使用的相同方式进行移植。