



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105209881 B

(45) 授权公告日 2021.01.22

(21) 申请号 201480026884.6

(22) 申请日 2014.03.12

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105209881 A

(43) 申请公布日 2015.12.30

(30) 优先权数据
61/778,591 2013.03.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2015.11.11

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/024629 2014.03.12

(87) PCT国际申请的公布数据
W02014/159662 EN 2014.10.02

(73) 专利权人 迈阿密大学
地址 美国佛罗里达州

(72) 发明人 E·V·巴迪亚瓦斯 A·Q·沙比尔
S·C·戴维斯

(74) 专利代理机构 北京市联德律师事务所
11361

代理人 刘永全 王屹东

(51) Int.Cl.

G01N 1/34 (2006.01)

G01N 1/40 (2006.01)

C12N 15/88 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2013022786 A2, 2013.02.14

WO 2012020307 A2, 2012.02.16

US 2012093885 A1, 2012.04.19

WO 2012002760 A2, 2012.01.05

CN 102007144 A, 2011.04.06

Daniel Grenier, et al. Functional Characterization of Extracellular Vesicles Produced by Bacteroides gingivalis.《Infection and Immunity》.1987, 第55卷(第1期),

审查员 詹晨希

权利要求书2页 说明书30页 附图45页

(54) 发明名称

从细胞培养上清液和生物流体分离并纯化微泡的方法

(57) 摘要

本发明涉及医学、细胞生物学、分子生物学和遗传学领域。具体地,本发明提供从细胞培养上清液和生物液体分离并纯化微泡的方法。本发明还提供微泡的药物组合物,其用于促进或增强伤口愈合、刺激组织再生、改造疤痕组织、调节免疫反应、改变肿瘤细胞的生长和/或可动性、或改变正常细胞的生长和/或可动性。本发明还提供欲用作诊断试剂的微泡的组合物以及制备所述微泡的组合物的方法。

1. 一种制备药物组合物的方法,其包含:
 - (a) 获得含有哺乳动物微泡的生物流体;
 - (b) 澄清所述生物流体以除去细胞碎片;
 - (c) 通过向经澄清的所述生物流体中加入沉淀剂以沉淀所述微泡,其中,所述沉淀剂是聚乙二醇;
 - (d) 通过不损伤所述沉淀的微泡的离心力或重力来收集所述沉淀的微泡;
 - (e) 洗涤所述沉淀的微泡以除去所述沉淀剂;和
 - (g) 提供沉淀的分离的所述微泡作为所述药物组合物。
2. 根据权利要求1所述的方法,还包含(f) 将所述微泡悬浮于溶液中以用于贮存。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述哺乳动物微泡来自间充质干细胞。
4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,进一步加工所述微泡,以分离具有选自以下特征中的至少一个特征的微泡:特定尺寸、特定尺寸范围、特定分子量、特定分子量范围、和具有具体的分子。
5. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述聚乙二醇具有200Da至10000Da范围的平均分子量和5%至25%重量/体积范围的浓度。
6. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述聚乙二醇的平均分子量为20000Da。
7. 如权利要求1或2所述的方法,其中,通过离心收集所述沉淀的微泡。
8. 如权利要求1或2所述的方法,其中,通过过滤收集所述沉淀的微泡。
9. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述生物流体选自于由以下物质组成的组,所述物质是外周血、血清、血浆、腹水、尿液、脑脊髓液(CSF)、痰、唾液、骨髓、关节液、羊水、羊水、耳垢、母乳、支气管肺泡灌洗液、精液、考珀液、射精前液、女性射精、汗液、粪便、毛发、眼泪、囊液、胸腔液、腹腔液、心包液、淋巴液、食糜、乳糜、胆汁、间质液、月经、脓、皮脂、呕吐物、阴道分泌物、粘膜分泌物、粪便水、胰液和灌洗流体。
10. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述生物流体是前列腺液。
11. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述沉淀的微泡具有2nm至5000nm范围的尺寸。
12. 如权利要求3所述的方法,其中,所述间充质干细胞来自骨髓。
13. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述生物流体是来源于细胞或组织样品的流体。
14. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述生物流体是细胞培养液。
15. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述生物流体是来源于经培养的细胞的流体。
16. 一种根据权利要求1或2所述的方法制备的药物组合物,其促进或增强血管生成。
17. 一种根据权利要求1或2所述的方法制备的药物组合物,其促进或增强神经元再生。
18. 一种根据权利要求1或2所述的方法制备的药物组合物,其促进或增强细胞增殖。
19. 一种根据权利要求1或2所述的方法制备的药物组合物,其促进或增强细胞迁移。
20. 一种根据权利要求1或2所述的方法制备的药物组合物,其促进或增强伤口愈合。
21. 一种根据权利要求1或2所述的方法制备的药物组合物,其减少疤痕形成。
22. 一种根据权利要求1或2所述的方法制备的药物组合物,其减少皱纹形成。
23. 一种根据权利要求1或2所述的方法制备的药物组合物,其能够在具有患病、被损伤

或缺失的皮肤的患者中再生至少一种选自如下组的组织,所述组由上皮组织、基质组织、神经组织、血管组织和附属结构组成。

从细胞培养上清液和生物流体分离并纯化微泡的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学、细胞生物学、分子生物学和遗传学领域。具体地，本发明提供从细胞培养上清液和生物液体分离并纯化微泡的方法。本发明还提供微泡的药物组合物，其用于促进或增强伤口愈合、刺激组织再生、改造疤痕组织、调节免疫反应、改变肿瘤细胞的生长和/或可动性、或改变正常细胞的生长和/或可动性。本发明还提供欲用作诊断试剂的微泡的组合物以及制备所述微泡的组合物的方法。

背景技术

[0002] 微泡是由许多(即使不是全部)体外和体内的细胞类型分泌的并且存在于诸如例如血液、间质液、尿液、唾液和眼泪等生物流体中。微泡是由细胞的原生质膜形成的包含脂质双层的囊泡并且在尺寸上是不均匀的，范围在约2nm至约5000nm。在本文中形成微泡的细胞称为“宿主细胞”。微泡是囊泡的异质群体并且包括例如外皮层、微粒、微泡、纳米囊泡、脱落囊泡和膜颗粒。

[0003] 微泡在它们的膜表面显示出来自于它们的宿主细胞的膜蛋白质，并且还可以在微泡中含有来自于所述宿主细胞的分子，诸如例如mRNA、miRNA、tRNA、RNA、DNA、脂质、蛋白质或感染性颗粒。这些分子可以起因于或者是导入到所述宿主细胞中的重组分子。微泡在细胞间通讯中发挥关键作用，并且可以在体内局部或远侧发挥作用，通过与靶细胞融合、将微泡上和/或中的分子运输到所述靶细胞中而诱导细胞的改变。例如，微泡已经牵连到抗肿瘤逆转、癌症、肿瘤免疫抑制、转移、肿瘤-基质相互作用、血管生成和组织再生。微泡还可以用来诊断疾病，因为已经证明它们携带了多种疾病的生物标志物，包括例如心脏病、HIV和白血病。

[0004] 尽管微泡较重要，但是以有用的量分离微泡并同时保存它们的结构和功能的完整性仍然是个问题。传统的工序采用超速离心以从样本中分离微泡。

[0005] 例如，美国专利7,807,438公开了一种用于分离丙型肝炎病毒的方法。该方法包含从感染了丙型肝炎病毒(HCV)的个体的血浆分离出称为外来体的颗粒并且从这些外来体颗粒提取RNA。

[0006] 在另一个例子中，美国专利申请US20030198642A1公开了来源于抗原呈递细胞中的富集了MHC II类的隔室的[外]来体……[以用于]……接种赋形剂。

[0007] 在另一个例子中，美国专利申请US20060116321A1公开了用于在介导免疫抑制反应中使用的方法和组合物。该组合物…包含具有免疫抑制活性的外来体。此种外来体可以来源于各种不同的细胞类型，包括抗原呈递细胞，诸如树突状细胞和巨噬细胞。在分离外来体之前，所述细胞可以经基因工程化以表达能够增强所述外来体的免疫抑制活性的分子和/或暴露于一种或多种试剂(诸如细胞因子或细胞因子抑制剂)，所述试剂也能够增强外来体的免疫抑制活性。本发明还涉及此种外来体用于治疗与免疫系统的不希望的活化有关的疾病和病症的用途。本发明还包括从血清中分离的已经证明具有免疫抑制性的外来体。

[0008] 超速离心可能损伤微泡，导致囊泡的裂解或破裂。如果将此种损伤的微泡导入到

体内的话,微泡的损伤可能在体内引发副反应。

[0009] 其他人已经尝试了替代方法以分离微泡。但是,所采用的所述替代方法经常分离出微泡的子级分(sub-fraction)或效率低下。例如,美国专利申请US2011003008A1公开了一种由骨髓间充质干细胞分泌的颗粒并且包含骨髓间充质干细胞的至少一种生物学性质。所述生物学性质可以包含骨髓间充质干细胞条件培养基(MSC-CM)的生物活性,诸如心脏保护或缩小梗死面积。所述颗粒可以包含囊泡或外来体。

[0010] 在另一个例子中,美国专利申请US20120070858A1公开了一种通过基于外来体的预先确定Zeta电位的电荷吸引机制使用氧化铁(Fe_3O_4)的超顺磁性纳米颗粒从血小板分离外来体的方法。该方法涉及氧化铁纳米颗粒的使用,该氧化铁纳米颗粒是预先合成的[sic(照抄原文)]、具有预先确定的正电荷并且结合到生物样品中含有的负电荷外来体。在培育的过程中,所述阳离子磁性纳米颗粒由于静电相互作用而被外来体膜的表面吸收。所述材料在磁场中的暴露使得能够分离结合至所述纳米颗粒的外来体。这种技术的成功已经通过流式细胞仪[sic]对所述外来体的表征[sic]而得到了证实。该方法由于能够分离并纯化外来体而不会改变它们的原始形态和结构特征,所以已经证明其适合于此目的。

[0011] 在另一个例子中,PCT专利申请W02012169970A1公开了连同对流层析、流化床或共沉淀的应用而在生物材料(如抗体、病毒、细胞和细胞器)的纯化中使用约束共水化剂的材料和方法。

[0012] 因此,仍然需要提供一种无损伤且以充足的量分离并纯化微泡的方法,所分离的微泡随后可以用于诊断疾病、治疗或研究。

[0013] 本发明提供了用于从生物流体分离微泡的方法,其不会损伤所述微泡的结构和/或功能的完整性。本发明还提供用于从生物流体分离外皮层、微粒、微泡、纳米囊泡、脱落囊泡、凋亡小体或膜颗粒的方法,其不会损伤它们的结构和/或功能的完整性。

发明内容

[0014] 在一个实施方式中,本发明提供一种从细胞培养上清液或生物流体分离和/或纯化微泡的方法,其利用沉淀剂通过置换溶剂化的水而从所述细胞培养上清液或生物流体中沉淀出所述微泡。

[0015] 在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂。在一个实施方式中,所述分离的微泡的制剂随后被纯化。在一个实施方式中,所述分离的微泡的制剂随后被纯化以产生外皮层的制剂。在一个实施方式中,所述分离的微泡的制剂随后被纯化以产生微粒的制剂。在一个实施方式中,所述分离的微泡的制剂随后被纯化以产生纳米囊泡的制剂。在一个实施方式中,所述分离的微泡的制剂随后被纯化以产生脱落囊泡的制剂。在一个实施方式中,所述分离的微泡的制剂随后被纯化以产生膜颗粒的制剂。在一个实施方式中,所述分离的微泡的制剂随后被纯化以产生凋亡小体的制剂。

[0016] 在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其促进或增强血管生成。在一个实施方式中,所述分离的微泡的制剂促进或增强患者中的血管生成。

[0017] 在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其促进或增强神经元再生。在一个实施方式中,所述分离的微泡的制剂促进或增强患者中的神经元再生。

[0018] 在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其促进或增强细胞增殖。

在一个实施方式中,所述分离的微泡的制剂促进或增强患者中的细胞增殖。

[0019] 在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其促进或增强细胞迁移。在一个实施方式中,所述分离的微泡的制剂促进或增强患者中的细胞迁移。

[0020] 在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其促进或增强伤口愈合。在一个实施方式中,所述伤口为三度烧伤。在一个实施方式中,所述伤口是二度烧伤。

[0021] 在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其减少患者中的疤痕形成。

[0022] 在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其减少患者皮肤中的皱纹形成。

[0023] 在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其用于在患者中诊断疾病的存在和/或进展。在一个实施方式中,所述疾病是转移性黑色素瘤。在替代的实施方式中,所述疾病是炎症/自身免疫性疾病,诸如类风湿性关节炎。在一个实施方式中,所述疾病是移植物抗宿主病。

[0024] 在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其可以促进复杂组织结构的功能再生与组织机化。在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其可以在患有再生障碍性贫血的患者中再生造血组织。在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其可以在具有患病、损伤或丢失的皮肤的患者中再生选自于由上皮组织、间质组织、神经组织、血管组织和附属结构组成的组中的至少一种组织。在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其可以再生来自于所有三种胚层的组织和/或细胞。

[0025] 在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其用于调节患者的免疫系统。

[0026] 在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其增强了移植到患者中的组织或细胞的成活率。在一个实施方式中,在患者接受移植的组织或细胞之前,使用所述分离的微泡的制剂治疗患者。在替代的实施方式中,在患者接受所述移植的组织或细胞之后,使用所述分离的微泡的制剂治疗患者。在替代的实施方式中,使用所述分离的微泡的制剂治疗所述组织或细胞。在一个实施方式中,在移植之前使用所述分离的微泡的制剂治疗所述组织或细胞。

[0027] 在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其含有选自于由来自于宿主细胞的RNA、DNA和蛋白质组成的组中的至少一种分子。在一个实施方式中,所述宿主细胞经工程化以表达选自于由RNA、DNA和蛋白质组成的组中的至少一种分子。在一个实施方式中,将含有选自于由来自宿主细胞的RNA、DNA和蛋白质组成的组中的至少一种分子的所述分离的微泡的制剂用作治疗剂。

附图说明

[0028] 并入到本文并且构成本说明书一部分的附图阐述了本发明的各种实施方式,并且与描述一起进一步用于解释本发明的原理并且使得本领域普通技术人员能够制造和使用本发明。在附图中,相同的参考数字指示相同或功能相似的元素。本发明的更完全的理解及其许多伴随的优点将容易获得,因为在连同考虑所述附图并参见以下说明说明时能够使它们变得更好理解,其中:

- [0029] 图1示出了用于通过超速离心分离微泡的试验记录示意图。
- [0030] 图2示出了本发明的微泡分离方法的一个实施方式。
- [0031] 图3示出了本发明的微泡分离方法的替代实施方式。
- [0032] 图4示出了通过过滤促进生物流体的澄清和析出的微泡的收集的装置的一个实施方式。
- [0033] 图5示出了通过实施例1中所描述的超速离心法分离的(图A和B)和根据本发明的方法分离的(图C和D)来源于使用人类骨髓来源的间充质干细胞条件培养的(conditioned)培养基的微泡的电子显微照片,放大倍数如图中所示。
- [0034] 图6示出了通过实施例1中所描述的超速离心法分离的(面板A和B)和根据本发明的方法分离的(图C和D)来源于使用猪骨髓来源的间充质干细胞条件培养的培养基的微泡的电子显微照片,放大倍数如图中所示。
- [0035] 图7示出了通过实施例1中所描述的超速离心法分离的(图A和B)和根据本发明的方法分离的(图C和D)来源于使用小鼠骨髓来源的间充质干细胞条件培养的培养基的微泡的电子显微照片,放大倍数如图中所示。
- [0036] 图8示出了根据本发明的方法从人类血浆分离的微泡的电子显微照片。图A至C示出了在增加放大倍数下的微泡,如图中的比例尺所示。
- [0037] 图9示出了根据本发明的方法从猪血浆分离的微泡的电子显微照片。图A至C示出了在增加放大倍数下的微泡,如图中的比例尺所示。
- [0038] 图10示出了根据本发明的方法从人尿液分离的微泡的电子显微照片。图A至C示出了在增加放大倍数下的微泡,如图中的比例尺所示的。
- [0039] 图11示出了免疫印迹,其报告了HSP70、CD63、STAT 3和磷酸化的STAT3在人类骨髓来源的间充质干细胞的裂解物中、通过超速离心(hMSC MV超速离心)或通过如实施例3中所描述的本发明的方法(hMSC PEG沉淀)制备的从使用人类骨髓来源的干细胞条件培养的培养基分离的微泡中的表达。还分析了来源于通过如实施例3中所述的本发明的方法制备的人血浆和人尿液的微泡。分别为(人血浆PEG沉淀)和(人尿液PEG沉淀)。
- [0040] 图12示出了从使用人类骨髓来源的间充质干细胞条件培养的培养基分离的微泡对正常人真皮成纤维细胞(A)、从糖尿病足溃疡获得的真皮成纤维细胞(B)和从压力足部溃疡获得的真皮成纤维细胞(C)的增殖的影响。还比较了通过超速离心分离的微泡(MV U/C)和通过本发明的方法分离的微泡(MV PEG)的影响。将使用PBS或微泡耗尽的培养基处理的成纤维细胞纳入作为对照。使用MTT测定法确定增殖。
- [0041] 图13示出了从使用人类骨髓来源的间充质干细胞条件培养的培养基分离的微泡对人真皮成纤维细胞的迁移的影响,其通过成纤维细胞迁移至已被刮掉的区域中的能力来确定。标记了“处理前”的图示出了在添加测试处理前的除去了细胞的细胞培养板的代表性区域。以所示的浓度使用根据本发明的方法分离的微泡(PEG沉淀)和通过超速离心分离的微泡(超速离心)测试成纤维细胞迁移的影响。将使用PBS或微泡耗尽的培养基处理的成纤维细胞纳入作为对照。
- [0042] 图14示出了从使用人类骨髓来源的间充质干细胞条件培养的培养基分离的微泡对从糖尿病足溃疡获得的人真皮成纤维细胞的迁移的影响,其通过成纤维细胞迁移至已被刮掉的区域中的能力来确定。标记了“处理前”的图示出了在添加测试处理前的除去了细胞

的细胞培养板的代表性区域。以所示的浓度使用根据本发明的方法分离的微泡(PEG沉淀)和通过超速离心分离的微泡(超速离心)测试成纤维细胞迁移的影响。将使用PBS或微泡耗尽的培养基处理的成纤维细胞纳入作为对照。

[0043] 图15示出了本发明的微泡向人真皮成纤维细胞中的摄入。在标记了“Hoechst33342”的图中示出了使用Hoechst 33342染料解析的细胞核。在标记了“Vybrant-Dio”的图中示出了使用vybrant染料解析的细胞。在标记了“PKH标记的MV”的图中示出了使用PKH染料解析的微泡。在标记了“复合”的图中可以看到其中重叠所有三种染料获得的图像的图。

[0044] 图16示出了本发明的微泡向人真皮成纤维细胞中的摄入。在标记了“Hoechst33342”的图中示出了使用Hoechst 33342染料解析的细胞核。在标记了“Vybrant-Dio”的图中示出了使用vybrant染料解析的细胞。在标记了“PKH标记的MV”的图中示出了使用PKH染料解析的微泡。在标记了“复合”的图中可以看到其中重叠所有三种染料获得的图像的图。

[0045] 图17示出了使用如下物质处理的人真皮成纤维细胞的裂解物的免疫印迹:根据本发明的方法从获自于患有类风湿性关节炎的患者的血浆分离的微泡(人血浆MV PEG沉淀);根据本发明的方法从使用骨髓来源的间充质干细胞条件培养的培养基分离的微泡(人类hMSC MV PEG沉淀);通过超速离心从使用骨髓来源的间充质干细胞分离的微泡(人hMSC MV 超速离心);PBS对照;和耗尽的培养基对照(耗尽了MV的hMSC条件培养的培养基)。

[0046] 图18示出了含有包含T1799A突变的BRAF的外显子15的地区的存在,其中:SK-MEL28细胞,使用引物1从RNA扩增(第3道);SK-MEL28细胞,使用引物2从RNA扩增(第4道);根据本发明的方法从使用SK-MEL28细胞条件培养的培养基分离的微泡,使用引物1从RNA扩增(第5道);根据本发明的方法从使用SK-MEL28细胞条件培养的培养基分离微泡,使用引物2从RNA扩增(第6道);SK-MEL28细胞,使用引物1从DNA扩增(第7道);SK-MEL28细胞,使用引物2从DNA扩增(第8道);根据本发明的方法从使用SK-MEL28细胞分离的微泡,使用引物1从DNA扩增(第9道);和根据本发明的方法从使用SK-MEL28细胞条件培养的培养基分离的微泡,使用引物2从DNA扩增(第10道)。

[0047] 图19示出了V600E BRAF在SK-MEL28细胞的裂解物和根据本发明的方法从使用SK-MEL28细胞条件培养的培养基分离的微泡的裂解物中的存在。

[0048] 图20示出了根据本发明的方法从使用获自于表达绿色荧光蛋白(GFP)的小鼠的骨髓来源的干细胞条件培养的培养基分离的微泡向人真皮成纤维细胞中的摄入。标记了“Hoechst33342”的图中示出了使用Hoechst 33342染料解析的细胞核。标记了“Vybrant-Dio”的图中示出了使用vybrant染料解析的细胞。标记了“GFP”的图中示出了GFP-标记的微泡。在标记了“复合”的图中可以看到其中重叠所有三种染料获得的图像的图。

[0049] 图21示出了根据本发明的方法从使用获自于表达GFP的小鼠的骨髓来源的干细胞条件培养的培养基分离的微泡向人真皮成纤维细胞中的摄入。标记了“Hoechst33342”的图中示出了使用Hoechst 33342染料解析的细胞核。标记了“Vybrant-Dio”的图中示出了使用vybrant染料解析的细胞。标记了“GFP”的图中示出了GFP-标记的微泡。在标记了“复合”的图中可以看到其中重叠所有三种染料获得的图像的图。

[0050] 图22示出了来自以下的伤后5天的全层伤口的组织切片:(A)未处理的动物;(B)根

据本发明的方法从使用自体骨髓来源的间充质干细胞条件培养的培养基分离的微泡；(C) 盐水；和 (D) 通过超速离心从自体骨髓来源的间充质干细胞分离的微泡。

[0051] 图23示出了伤后7天的用如下物质处理的动物上的二度烧伤的图片，所述物质是：(A) 通过超速离心从使用自体骨髓来源的间充质干细胞条件培养的培养基分离的微泡；(B) 根据本发明的方法从使用自体骨髓来源的间充质干细胞条件培养的培养基分离的微泡；和 (C) 未处理的动物。(D) 示出了受伤7天后的使用通过超速离心从使用自体骨髓来源的间充质干细胞条件培养的培养基分离的微泡处理的动物中的全层伤口。箭头指示使用通过超速离心分离的微泡处理的全层伤口在第7天的脓肿形成(40X)。这未在使用根据本发明的方法制备的微泡处理的全层伤口中观察到。

[0052] 图24示出了来自使用根据本发明的方法从使用自体骨髓来源的间充质干细胞条件培养的培养基分离的微泡处理的动物伤后28天的二度伤口的组织玻片。

[0053] 图25示出了来自使用盐水处理的动物伤后28天的二度伤口的组织玻片。

[0054] 图26示出了来自使用根据本发明的方法从使用自体骨髓来源的间充质干细胞条件培养的培养基分离的微泡处理的动物伤后28天的全层伤口的组织玻片。

[0055] 图27示出了来自使用根据本发明的方法从使用自体骨髓来源的间充质干细胞条件培养的培养基分离的微泡处理的动物伤后28天的全层伤口的组织玻片。A示出了新神经生长(箭头)和血管生成(圈)。B示出了新神经生长(箭头)。C示出了新血管生长(箭头)。

[0056] 图28示出了在使用来源于使用自体骨髓来源的间充质干细胞条件培养的培养基的微泡处理的动物中，伤后7天的全层伤口的组织玻片。

[0057] 图29示出了辐照的动物在给药GFP-标记的骨髓后嵌合状态存在或不存在。

[0058] 图30中图A和B示出了MSC治疗对 γ 照射后的头发生长的影响。图C示出了辐照的动物给药GFP-标记的骨髓后不存在嵌合状态。

[0059] 图31示出了使用本发明的方法获得的骨髓来源的微泡对血管形成的影响，其使用血管生成的体外测定。上面三幅图是使用落射荧光显微镜获取的使用由本发明的方法获得的骨髓来源的微泡处理的HUVEC细胞培养物的代表性物象(“骨髓穿刺MV”)。下三面板是使用落射荧光显微镜获取的使用赋形剂对照(“赋形剂对照”)处理的HUVEC细胞培养物的代表性物象。

[0060] 图32示出了使用本发明的方法获得的骨髓来源的微泡对细胞生长或增殖的影响，其使用细胞生长的体外测定。图A示出了使用落射荧光显微镜获取的使用由本发明的方法获得的骨髓来源的微泡(“骨髓MV”)或PBS(“PBS”)处理的正常成年成纤维细胞培养物在处理后的三天的代表性物象。图B示出了在使用由本发明的方法获得的骨髓来源的微泡(“骨髓MV”)或PBS(“PBS”)处理的正常成年成纤维细胞培养物在处理后的三天的平均细胞数。

具体实施方式

[0061] 为了公开清楚，而不是通过限制的方式，将本发明的详细描述拆分为描述或说明本发明的某些特征、实施方式或应用的下列小部分。

[0062] 用于分离本发明的微泡的方法

[0063] 在一个实施方式中，在一种方法中从含有微泡的生物流体分离微泡，该方法包含如下步骤：

[0064] a) 获得含有微泡的生物流体，

[0065] b) 澄清该生物流体以除去细胞碎片，

[0066] c) 通过向该澄清的生物流体中添加沉淀剂以沉淀微泡，

[0067] d) 收集该沉淀的微泡并且洗涤该物质以除去所述沉淀剂，和

[0068] e) 将所述经洗涤的微泡悬浮于溶液中用于存贮或随后使用。

[0069] 在一个实施方式中，通过离心来澄清所述生物流体。在替代的实施方式中，通过过滤来澄清所述生物流体。

[0070] 在一个实施方式中，通过离心来收集所述沉淀的微泡。在替代的实施方式中，通过过滤来收集所述沉淀的微泡。

[0071] 在一个实施方式中，在一个方法中从含有微泡的生物流体分离微泡，该方法包含如下步骤：

[0072] a) 获得含有微泡的生物流体，

[0073] b) 澄清所述生物流体以去除细胞碎片，

[0074] c) 通过向所述澄清的生物流体中添加沉淀剂以沉淀所述微泡，

[0075] d) 收集所述沉淀的微泡并且洗涤该物质以除去所述沉淀剂，

[0076] e) 将所述经洗涤的微泡悬浮于溶液中，和

[0077] f) 加工所述微泡以分析核酸、碳水化合物、脂质、小分子和/或蛋白质的含量。

[0078] 在一个实施方式中，通过离心来澄清所述生物流体。在替代的实施方式中，通过过滤来澄清所述生物流体。

[0079] 在一个实施方式中，通过离心来收集所述沉淀的微泡。在替代的实施方式中，通过过滤来收集所述沉淀的微泡。

[0080] 在一个实施方式中，本发明提供了用于根据本发明的方法从生物流体中分离微泡的试剂和试剂盒。

[0081] 所述生物流体可以是外周血、血清、血浆、腹水、尿液、脑脊髓液 (CSF)、痰、唾液、骨髓、关节液、房水、羊水、耳垢、母乳、支气管肺泡灌洗液、精液 (包括前列腺液)、考珀液或射精前液、女性射精、汗液、粪便、毛发、眼泪、囊液、胸腔和腹腔液、心包液、淋巴液、食糜、乳糜、胆汁、间质液、月经、脓、皮脂、呕吐物、阴道分泌物、粘膜分泌物、粪便水、胰液、来自窦腔的灌洗液、支气管肺吸出物或其他灌洗液。

[0082] 所述生物流体还可以来源于囊胚腔 (blastocyl cavity)、脐带血或母体血液循环，它们可以是来源于胎儿或母亲。所述生物流体还可以来源于组织样品或活体组织切片。

[0083] 所述生物流体可以来源于植物细胞培养物的植物细胞。所述生物流体可以来源于酵母细胞或酵母细胞培养物。

[0084] 在一个实施方式中，所述生物流体是细胞培养基。在一个实施方式中，在根据本发明的方法分离微泡之前，使用组织和/或细胞对所述细胞培养基进行条件培养。

[0085] 术语“条件培养的 (conditioned)”或“条件培养基 (conditioned medium)”是指其中生长有细胞或组织的群体或它们的组合的培养基，并且所述细胞或组织的群体或它们的组合向所述培养基贡献因子。在一种此类应用中，从所述培养基中除去所述细胞或组织的群体或它们的组合，同时保留由所述细胞产生的因子。在一个实施方式中，所产生的因子是微泡。

[0086] 培养基可以通过本领域普通技术人员所选择的任何适合的方法进行条件培养。例如培养基可以根据EP1780267A2中描述的方法进行培养。

[0087] 在一个实施方式中,微泡是从在分离所述微泡之前已经进行预处理的细胞或组织分离的。预处理可以包括例如在特定培养基、含有至少一种添加剂、生长因子的培养基、缺乏血清的培养基或它们的组合中培养。替代地,预处理可以包含将细胞或组织与添加剂(例如白细胞介素、VEGF、转录因子诱导剂、转录因子、激素、神经递质、药物化合物、microRNA)、转化剂(例如脂质体、病毒、转染剂等)接触。替代地,预处理可以包含使细胞或组织暴露于改变的物质条件(例如缺氧、冷冲击、热冲击)。

[0088] 在一个实施方式中,微泡是从使用在分离所述微泡之前已经预处理的细胞或组织条件培养的培养基分离的。预处理可以包括例如在特定培养基、含有至少一种添加剂(生长因子)的培养基、缺乏血清的培养基或它们的组合中培养。替代地,预处理可以包含将细胞或组织与添加剂(例如白细胞介素、VEGF、转录因子诱导剂、转录因子、激素、神经递质、药物化合物、microRNA)、转化剂(例如脂质体、病毒、转染剂等)接触。替代地,预处理可以包含使细胞或组织暴露于改变的物质条件(例如缺氧、冷冲击、热冲击)。

[0089] 在一个实施方式中,所述生物流体是来自植物的提取物。在替代的实施方式中,所述生物流体是来自植物细胞培养物的细胞培养基。在替代的实施方式中,所述生物流体是酵母提取物。在替代的实施方式中,所述生物流体是来自酵母细胞培养物的细胞培养基。

[0090] 虽然本发明的方法可以在任何温度下进行,但是本领域普通技术人员可以容易地理解,某此生物流体可能会降解,并且如果将样品保持在低于该生物液体降解温度的温度下,则可以减少此种降解。在一个实施方式中,本发明的方法在4°C下进行。在替代的实施方式中,本发明的方法的至少一步在4°C下进行。

[0091] 在某些实施方式中,在经受本发明的方法之前,可以将生物流体稀释。如果样品的粘度太大而难以获得可接受的微泡的产量,粘性生物流体可以要求稀释以降低样品的粘度。所述稀释可1:2稀释。替代地,所述稀释可1:3稀释。替代地,所述稀释可1:4稀释。替代地,所述稀释可1:5稀释。替代地,所述稀释可1:6稀释。替代地,所述稀释可1:7稀释。替代地,所述稀释可1:8稀释。替代地,所述稀释可1:9稀释。替代地,所述稀释可1:10稀释。替代地,所述稀释可1:20稀释。替代地,所述稀释可1:30稀释。替代地,所述稀释可1:40稀释。替代地,所述稀释可1:50稀释。替代地,所述稀释可1:60稀释。替代地,所述稀释可1:70稀释。替代地,所述稀释可1:80稀释。替代地,所述稀释可1:90稀释。替代地,所述稀释可1:100稀释。

[0092] 所述生物流体可以使用任何稀释剂进行稀释,前提条件是所述稀释剂不影响微泡的功能和/或结构的完整性。本领域普通技术人员可以容易地选择适合的稀释剂。稀释剂可以例如磷酸盐缓冲盐水、细胞培养基等。

[0093] 在一个实施方式中,通过施加离心力除去细胞碎片以澄清所述生物流体。施加至生物流体的离心力足以从生物流体中除去任何细胞、裂解细胞、组织碎片,但是所述离心力大小、持续时间或这两方面均不足以除去微泡。所述生物流体可以要求稀释以促进澄清。

[0094] 用于澄清生物流体的离心力的持续时间和大小可以根据本领域普通技术人员容易理解的多个因素而变化,所述因素包括例如生物流体、生物流体的pH、所分离的微泡的所需纯度、所分离的微泡的所需尺寸、微泡的所需分子量等。在一个实施方式中,对生物流体

施加30分钟的2000x g的离心力。

[0095] 使所澄清的生物流体与沉淀剂接触以沉淀微泡。在一个实施方式中,沉淀剂可以是围绕微泡并且置换溶剂化水的任何试剂。此种沉淀剂可以选自于由聚乙二醇、葡聚糖和多糖组成的组。

[0096] 在替代的实施方式中,所述沉淀剂可以导致微泡聚集。

[0097] 在替代的实施方式中,沉淀剂选自于由钙离子、镁离子、钠离子、铵离子、铁离子、有机溶剂(诸如硫酸铵)和絮凝剂(诸如藻酸盐)组成的组。

[0098] 使经澄清的生物流体与沉淀剂接触足以沉淀微泡的一段时间。所述足以沉淀微泡的一段时间可以根据本领域普通技术人员容易理解的多个因素而变化,所述因素包括例如生物流体、生物流体的pH、所分离的微泡的所需纯度、所分离的微泡的所需尺寸、微泡的所述分子量等。在一个实施方式中,所述足以沉淀微泡的一段时间为6小时。

[0099] 在一个实施方式中,在4℃下使经澄清的生物流体与沉淀剂接触足以沉淀微泡的一段时间。

[0100] 用于从生物流体中沉淀微泡的沉淀剂的浓度可以根据本领域普通技术人员容易理解的多个因素而变化,所述因素包括例如生物流体、生物流体的pH、所分离的微泡的所需纯度、所分离的微泡的所需尺寸、微泡的所需分子量等。

[0101] 在一个实施方式中,沉淀剂为聚乙二醇。在本发明的方法中使用的聚乙二醇的分子量可以为约200Da至约10,000Da。在一个实施方式中,在本发明的方法中使用的聚乙二醇的分子量可以大于10,000Da。分子量的选择可能受到包括例如生物流体的粘度、微泡的所需纯度、微泡的所需尺寸、所使用的生物流体等的多种因素的影响。

[0102] 在一个实施方式中,在本发明的方法中使用的聚乙二醇的分子量可以为约200Da至约8,000Da,或大约为200、300、400、600、1000、1500、4000、6000或8000中的任何一者。

[0103] 在一个实施方式中,在本发明的方法中使用的聚乙二醇的分子量为约6000Da。

[0104] 在一个实施方式中,在本发明的方法中使用的聚乙二醇的平均分子量为约8000Da。

[0105] 在本发明的方法中使用的聚乙二醇的浓度可以为约0.5%w/v至约100%w/v。在本发明的方法中使用的聚乙二醇的浓度可能受到包括例如生物流体的粘度、微泡的所需纯度、微泡的所需尺寸、所使用的生物流体等的多种因素的影响。

[0106] 在某些实施方式中,聚乙二醇以约5%~25%w/v的浓度用于本发明的浓度中。在某些实施方式中,所述浓度为约5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%或15%或这些数值的任何两个之间的范围。

[0107] 在一个实施方式中,在本发明的方法中使用的聚乙二醇的浓度为约8.5%w/v。

[0108] 在一个实施方式中,在本发明的方法中使用的聚乙二醇的浓度为约6%w/v。

[0109] 在一个实施方式中,具有6000Da的平均分子量的聚乙二醇以8.5%w/v的浓度使用。在一个实施方式中,聚乙二醇稀释于0.4M氯化钠中。

[0110] 在一个实施方式中,在本发明的方法中使用的聚乙二醇的浓度与该聚乙二醇的平均分子量成反比。例如,在一个实施方式中,具有4000Da平均分子量的聚乙二醇以20%w/v的浓度使用。在替代的实施方式中,具有8000Da平均分子量的聚乙二醇以10%w/v的浓度使用。在替代的实施方式中,具有20000Da平均分子量的聚乙二醇以4%w/v的浓度使用。

[0111] 在一个实施方式中,通过施加离心力收集沉淀的微泡。所述离心力以及施加的持续时间足以促使微泡形成丸粒,但不足以损伤微泡。

[0112] 用于从生物流体沉淀微泡的离心力的持续时间和大小可以根据本领域普通技术人员容易理解的多个因素而变化,所述因素包括例如生物流体、生物流体的pH、所分离的微泡的所需纯度、所分离的微泡的所需尺寸、微泡的所需分子量等。在一个实施方式中,通过施加60分钟10000x g的离心力以收集沉淀的微泡。

[0113] 可以使用任何液体洗涤沉淀的微泡,前提条件是所述液体不影响微泡的功能和/或结构的完整性。本领域普通技术人员可以容易地选择适合的液体。液体可以为例如磷酸盐缓冲盐水、细胞培养基等。

[0114] 在一个实施方式中,所述洗涤步骤去除沉淀剂。在一个实施方式中,使用具有100kDa分子量切割的过滤装置通过离心过滤洗涤微泡。

[0115] 可以使用任何液体来悬浮分离的微泡,前提条件是所述液体不影响微泡的功能和/或结构的完整性。本领域普通技术人员可以容易地选择适合的液体。液体可以为例如磷酸盐缓冲盐水、细胞培养基等。

[0116] 在一个实施方式中,可以进一步加工所分离的微泡。所述进一步加工可以是分离特定尺寸的微泡。替代地,所述进一步加工可以是分离特定尺寸范围的微泡。替代地,所述进一步加工可以是分离特定分子量的微泡。替代地,所述进一步加工可以是分离特定分子量范围的微泡。替代地,所述进一步加工可以是分离表现出或含有特定分子量的微泡。

[0117] 在一个实施方式中,本发明的微泡被进一步加工以分离一种微泡的制剂,所述微泡通过电子显微镜测定具有约2nm至约1000nm的尺寸。在替代的实施方式中,本发明的微泡被进一步加工以分离一种微泡的制剂,所述微泡通过电子显微镜测定具有约2nm至约500nm的尺寸。在替代的实施方式中,本发明的微泡被进一步加工以分离一种微泡的制剂,所述微泡通过电子显微镜测定具有约2nm至约400nm的尺寸。在替代的实施方式中,本发明的微泡被进一步加工以分离一种微泡的制剂,所述微泡通过电子显微镜测定具有约2nm至300nm的尺寸。在替代的实施方式中,本发明的微泡被进一步加工以分离一种微泡的制剂,所述微泡通过电子显微镜测定具有约2nm至200nm的尺寸。在替代的实施方式中,本发明的微泡被进一步加工以分离一种微泡的制剂,所述微泡通过电子显微镜测定具有约2nm至约100nm的尺寸。在替代的实施方式中,本发明的微泡被进一步加工以分离一种微泡的制剂,所述微泡通过电子显微镜测定具有约2nm至约50nm的尺寸。在替代的实施方式中,本发明的微泡被进一步加工以分离一种微泡的制剂,所述微泡通过电子显微镜测定具有约2nm至约20nm的尺寸。在替代的实施方式中,本发明的微泡被进一步加工以分离一种微泡的制剂,所述微泡通过电子显微镜测定具有约2nm至约10nm的尺寸。

[0118] 在一个实施方式中,使用选自于由免疫亲和、HPLC、切向流过滤、相分离/分配、和微流体组成的组中的方法进行随后的纯化。

[0119] 在一个实施方式中,所分离的微泡被进一步加工以分析存在于微泡上或包含于其中的分子。所分析的分子选自于由核酸、碳水化合物、脂质、小分子、离子、代谢物、蛋白质以及它们的组合所组成的组。

[0120] 包含使用培养细胞条件培养的细胞培养基的生物流体:在一个实施方式中,微泡获自于使用培养细胞条件培养的培养基。任何培养细胞或细胞的群体均可以在本发明的方

法中使用。所述细胞可以是干细胞、原代细胞、细胞系、组织或器官的外植体、或它们的任意组合。所述细胞在来源上可以是同种异体的、自体的或异种的。

[0121] 在一个实施方式中,所述细胞是来源于骨髓穿刺液的细胞。在一个实施方式中,所述来源于骨髓穿刺液的细胞是骨髓来源的间充质干细胞。在一个实施方式中,所述来源于骨髓穿刺液的细胞是单核细胞。在一个实施方式中,所述来源于骨髓穿刺液的细胞是单核细胞和骨髓来源的间充质干细胞的混合物。

[0122] 在一个实施方式中,骨髓来源的间充质干细胞是通过在塑料组织培养烧瓶中将骨髓穿刺液培养长达约4天的时间、随后通过洗涤以除去非贴壁细胞而从骨髓穿刺液分离的。

[0123] 在一个实施方式中,单核细胞是通过使用Ficoll梯度的低密度离心并且收集处于界面的单核细胞而从骨髓穿刺液分离的。

[0124] 在一个实施方式中,在根据本发明的方法分离微泡之前,在细胞培养箱中将细胞培养、生长或保持在适当的温度和气体混合物中(对于哺乳动物细胞,典型地为37°C,5% CO₂)。不同类型细胞的培养条件差别很大,并且本领域普通技术人员可以容易地确定。

[0125] 在一个实施方式中,一个或多个培养条件是变化的。在一个实施方式中,此变化产生不同的表型。

[0126] 在一个实施方式中,在细胞在它们的培养基中需要血清的情况下,为了开始微泡分离工序,使用不含微泡的血清补充所述细胞培养基,然后将其添加到欲条件培养的细胞中。从所述条件细胞培养基中收集微泡。血清可以用任何合适的方法耗尽,所述方法诸如例如超速离心、过滤、沉淀等。培养基的选择、血清浓度和培养条件受到本领域普通技术人员容易理解的各种因素的影响,所述因素包括例如被培养的细胞类型、微泡的所需纯度、培养细胞的所需表型等。在一个实施方式中,为微泡分离工序而条件培养的细胞培养基与在微泡分离工序之前生长所述细胞的细胞培养基是同一类型的。

[0127] 在一个实施方式中,为了开始微泡分离工序,将细胞培养基去除并且向待条件培养的细胞中加入不含血清的培养基。然后从条件培养的无血清培养基中收集微泡。培养基的选择和培养条件受到本领域普通技术人员容易理解的各种因素的影响,所述因素包括例如被培养的细胞类型、微泡的所需纯度、培养细胞的所需表型等。在一个实施方式中,所述无血清培养基补充有至少一种附加因子,其能够促进或增强细胞在该无血清培养基中的存活。此种因子可以例如为细胞提供营养支持、抑制或防止细胞的凋亡。

[0128] 将细胞在培养基中培养充足的一段时间以允许所述细胞向所述培养基中分泌微泡。所述足以允许细胞向培养基中分泌微泡的一段时间受到本领域普通技术人员容易理解的各种因素的影响,所述因素包括例如被培养的细胞类型、微泡的所需纯度、培养细胞的所需表型、微泡的所需产量等。

[0129] 然后通过本发明的方法从培养基中取出微泡。

[0130] 在一个实施方式中,在微泡分离工序之前,使用选自于由抗炎性化合物、抗细胞凋亡的化合物、纤维化抑制剂、能够增强血管生成的化合物、免疫抑制化合物、促进细胞存活的化合物、化学治疗剂、能增强细胞迁移的化合物、神经源性化合物和生长因子组成的组中的至少一种试剂处理所述细胞。

[0131] 在一个实施方式中,在将细胞培养于收集微泡的培养基中的同时,使用选自于由抗炎性化合物、抗细胞凋亡的化合物、纤维化抑制剂、能够增强血管生成的化合物、免疫抑

制化合物、促进细胞存活的化合物和生长因子组成的组中的至少一种试剂处理所述细胞。

[0132] 在一个实施方式中,所述抗炎性化合物可以选自于美国专利号6,509,369中公开的化合物。

[0133] 在一个实施方式中,所述抗细胞凋亡的化合物可以选自于美国专利号6,793,945中公开的化合物。

[0134] 在一个实施方式中,所述纤维化抑制剂可以选自于美国专利号6,331,298中公开的化合物。

[0135] 在一个实施方式中,所述能够增强血管生成的化合物可以选自于美国专利申请2004/0220393或美国专利申请2004/0209901中公开的化合物。

[0136] 在一个实施方式中,所述免疫抑制化合物可以选自于美国专利申请2004/0171623中公开的化合物。

[0137] 在一个实施方式中,所述促进细胞存活的化合物可以选自于美国专利申请2010/0104542中公开的化合物。

[0138] 在一个实施方式中,所述生长因子可以是选自于由下列物质组成的组中的至少一种分子:TGF- β 族的成员(包括TGF- β 1、2和3),骨形态发生蛋白(BMP-2、-3、-4、-5、-6、-7、-11、-12和-13),成纤维细胞生长因子-1和-2,血小板衍生的生长因子-AA、-AB和-BB,富血小板血浆,胰岛素生长因子(IGF-I, II),生长分化因子(GDF-5、-6、-8、-10、-15),血管内皮细胞来源的生长因子(VEGF),多效生长因子,内皮素等。其它药物化合物可以包括例如烟酰胺、缺氧诱导因子1- α 、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)、GLP-1和GLP-2模拟体、和II、艾塞那肽-4、nodal、头蛋白、NGF、视黄酸、甲状旁腺激素、肌腱蛋白-C、弹性蛋白原、凝血酶衍生的肽、抗菌肽、防卫素、层粘连蛋白、含有粘合剂细胞外基质蛋白的细胞-和肝素-结合域的生物肽(诸如纤维连接蛋白和玻连蛋白)、和MAPK抑制剂(诸如例如美国专利申请2004/0209901和美国专利申请2004/0132729中公开的化合物)。

[0139] 在一个实施方式中,从生物流体中分离微泡,所述生物流体包含使用骨髓来源的间充质干细胞的培养物条件培养的细胞培养基,其包含步骤:

[0140] a) 获得骨髓来源的间充质干细胞的群体并且以1:4的细胞稀释度接种于烧瓶中,

[0141] b) 在培养基中培养所述细胞直到细胞80~90%汇合,

[0142] c) 取出并澄清培养基以除去细胞碎片,

[0143] d) 通过向澄清的培养基中添加沉淀剂以沉淀微泡,

[0144] e) 收集沉淀的微泡并且洗涤该物质以除去沉淀剂,和

[0145] f) 将经洗涤的微泡悬浮于溶液中用于贮存或随后使用。

[0146] 在一个实施方式中,从生物流体中分离微泡,所述生物流体包含使用骨髓来源的单核细胞的培养物条件培养的细胞培养基,其包含步骤:

[0147] a) 获得骨髓来源的单核细胞的群体并且以1:4的细胞稀释度接种于烧瓶中,

[0148] b) 在培养基中培养所述细胞直到细胞80~90%汇合,

[0149] c) 取出并且澄清所述培养基以除去细胞碎片,

[0150] d) 通过向经澄清的培养基中添加沉淀剂以沉淀微泡,

[0151] e) 收集沉淀的微泡并且洗涤该物质以除去沉淀剂,和

[0152] f) 将经洗涤的微泡悬浮于溶液中用于贮存或随后使用。

[0153] 在一个实施方式中,在37℃下,在95%潮湿空气和5%CO₂中,将骨髓来源的间充质干细胞培养于补充有20%牛胎儿血清和1%青霉素/链霉素/谷氨酰胺的包含 α -MEM的培养基中。

[0154] 在一个实施方式中,在37℃下,在95%潮湿空气和5%CO₂中,将骨髓来源的单核细胞培养于补充有20%牛胎儿血清和1%青霉素/链霉素/谷氨酰胺的包含 α -MEM的培养基中。

[0155] 在一个实施方式中,通过离心澄清培养基。

[0156] 在一个实施方式中,所述沉淀剂为具有6000平均分子量的聚乙二醇。在一个实施方式中,以约8.5w/v%的浓度使用聚乙二醇。在一个实施方式中,将聚乙二醇稀释于具有0.4M最终浓度的氯化钠溶液中。

[0157] 在一个实施方式中,通过离心收集沉淀的微泡。

[0158] 在一个实施方式中,使用具有100kDa分子量切割的膜,使用磷酸盐缓冲盐水,通过离心过滤洗涤分离的微泡。

[0159] 包含血浆的生物流体:在一个实施方式中,微泡获片于血浆。所述血浆可以获自于健康个体或替代地获自于具有特定疾病表型的个体。

[0160] 在一个实施方式中,从包含血浆的生物流体分离微泡,包含步骤:

[0161] a) 获得血浆并且使用细胞培养基稀释该血浆,

[0162] b) 通过向稀释的血浆中添加沉淀剂以沉淀微泡,

[0163] c) 收集沉淀的微泡并且洗涤该物质以除去沉淀剂,和

[0164] d) 将经洗涤的微泡悬浮于溶液中用于贮存或随后使用。

[0165] 在一个实施方式中,使用培养基将所述血浆稀释1:10。

[0166] 在一个实施方式中,所述培养基是 α -MEM。

[0167] 在一个实施方式中,所述沉淀剂是具有6000的平均分子量的聚乙二醇。在一个实施方式中,聚乙二醇以约8.5w/v%的浓度使用。在一个实施方式中,将聚乙二醇稀释于具有0.4M最终浓度的氯化钠溶液中。

[0168] 在一个实施方式中,通过离心收集沉淀的微泡。

[0169] 在一个实施方式中,使用具有100kDa分子量切割的膜,使用磷酸盐缓冲盐水,通过离心过滤洗涤分离的微泡。

[0170] 包含骨髓穿刺液的生物流体:在一个实施方式中,微泡获自于骨髓穿刺液。在一个实施方式中,微泡获自于骨髓穿刺液的细胞部分。在一个实施方式中,微泡获自于骨髓穿刺液的非细胞部分。

[0171] 在一个实施方式中,从培养自骨髓穿刺液的细胞获得微泡。在一个实施方式中,将培养自骨髓穿刺液的细胞用于条件培养细胞培养基,从该细胞培养基分离微泡。

[0172] 在一个实施方式中,从包含骨髓穿刺液的生物流体分离微泡,其包含步骤:

[0173] a) 获得骨髓穿刺液并且将该骨髓穿刺液分离成非细胞部分和细胞部分,

[0174] b) 稀释所述非细胞部分,

[0175] c) 澄清经稀释的非细胞部分以去除细胞碎片,

[0176] d) 通过向经稀释的非细胞部分中添加沉淀剂以沉淀该非细胞部分中的微泡,

[0177] e) 收集沉淀的微泡并且洗涤该物质以除去沉淀剂,和

[0178] f) 将经洗涤的微泡悬浮于溶液中用于贮存或随后使用。

- [0179] 在一个实施方式中,使用培养基将所述非细胞部分稀释1:10。
- [0180] 在一个实施方式中,所述培养基为 α -MEM。
- [0181] 在一个实施方式中,所述经稀释的非细胞部分通过离心来澄清。
- [0182] 在一个实施方式中,所述沉淀剂是具有6000平均分子量的聚乙二醇。在一个实施方式中,聚乙二醇以约8.5w/v%的浓度使用。在一个实施方式中,将聚乙二醇稀释在具有0.4M最终浓度的氯化钠溶液中。
- [0183] 在一个实施方式中,通过离心收集沉淀的微泡。
- [0184] 在一个实施方式中,使用具有100kDa分子量切割的膜,使用磷酸盐缓冲盐水,通过离心过滤洗涤分离的微泡。
- [0185] 在一个实施方式中,将所述细胞部分进一步加工以分离并收集细胞。在一个实施方式中,将所述细胞部分进一步加工以分离并收集骨髓来源的间充质干细胞。在一个实施方式中,将所述细胞部分进一步加工以分离并收集骨髓来源的单核细胞。在一个实施方式中,将所述细胞部分用于条件培养基,随后可以从该培养基得到微泡。
- [0186] 在一个实施方式中,从所述细胞部分分离微泡。在分离微泡之前可以将所述细胞部分培养一段时间。替代地,在收集所述细胞部分之后可以立即从该细胞部分分离微泡。
- [0187] 在一个实施方式中,还使用从由抗炎性化合物、抗细胞凋亡的化合物、纤维化抑制剂、能够增强血管生成的化合物、免疫抑制化合物、促进细胞存活的化合物、化学治疗剂、能增强细胞迁移的化合物、神经源性化合物和生长因子组成的组中选择的至少一种试剂处理所述细胞部分。
- [0188] 在一个实施方式中,所述抗炎性化合物可以选自于美国专利号6,509,369中公开的化合物。
- [0189] 在一个实施方式中,所述抗细胞凋亡的化合物可以选自于美国专利号6,793,945中公开的化合物。
- [0190] 在一个实施方式中,所述纤维化抑制剂可以选自于美国专利号6,331,298中公开的化合物。
- [0191] 在一个实施方式中,所述能够增强血管生成的化合物可以选自于美国专利申请2004/0220393或美国专利申请2004/0209901中公开的化合物。
- [0192] 在一个实施方式中,所述免疫抑制化合物可以选自于美国专利申请2004/0171623中公开的化合物。
- [0193] 在一个实施方式中,所述促进细胞存活的化合物可以选自于美国专利申请2010/0104542中公开的化合物。
- [0194] 在一个实施方式中,所述生长因子可以是选自于由下列物质组成的组中的至少一种分子:TGF- β 族的成员(包括TGF- β 1、2和3),骨形态发生蛋白(BMP-2、-3、-4、-5、-6、-7、-11、-12和-13),成纤维细胞生长因子-1和-2,血小板衍生的生长因子-AA、-AB和-BB,富血小板血浆,胰岛素生长因子(IGF-I,II),生长分化因子(GDF-5、-6、-8、-10、-15),血管内皮细胞来源的生长因子(VEGF),多效生长因子,内皮素等。其它药物化合物可以包括例如烟酰胺、缺氧诱导因子1- α 、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)、GLP-1和GLP-2模拟体、和II、艾塞那肽-4、nodal、头蛋白、NGF、视黄酸、甲状旁腺激素、肌腱蛋白-C、弹性蛋白原、凝血酶衍生的肽、抗菌肽、防卫素、层粘连蛋白、含有粘合剂细胞外基质蛋白的细胞-和肝素-结合域的生物肽

(诸如纤维连接蛋白和玻连蛋白)、和MAPK抑制剂(诸如例如美国专利申请2004/0209901和美国专利申请2004/0132729中公开的化合物)。

[0195] 在一个实施方式中,在缺氧条件下培养所述细胞部分。

[0196] 在一个实施方式中,所述细胞部分是热冲击的。

[0197] 包含尿液的生物流体:在一个实施方式中,从尿液获得微泡。所述尿液可以获自健康个体或替代地获自具有特定疾病表型的个体。

[0198] 在一个实施方式中,从包含尿液的生物流体分离微泡,其包含步骤:

[0199] a) 获得尿液样品,

[0200] b) 澄清所述尿液以除去细胞碎片,

[0201] c) 通过向经澄清的尿液中添加沉淀剂以沉淀微泡,

[0202] d) 收集经沉淀的微泡并且洗涤该物质以除去沉淀剂,和

[0203] e) 将经洗涤的微泡悬浮于溶液中用于贮存或随后使用。

[0204] 在一个实施方式中,通过离心澄清尿液。

[0205] 在一个实施方式中,所述沉淀剂是具有6000平均分子量的聚乙二醇。在一个实施方式中,聚乙二醇以约8.5w/v%的浓度使用。在一个实施方式中,将聚乙二醇稀释于具有0.4M最终浓度的氯化钠溶液中。

[0206] 在一个实施方式中,通过离心收集沉淀的微泡。

[0207] 在一个实施方式中,使用具有100kDa分子量切割的膜,使用磷酸盐缓冲盐水,通过离心过滤洗涤经分离的微泡。

[0208] 在本发明的替代实施方式中,通过过滤澄清所述生物流体。在替代的实施方式中,通过过滤收集沉淀的微泡。在替代的实施方式中,通过过滤澄清所述生物流体并且收集沉淀的微泡。

[0209] 在某些实施方式中,所述生物流体和/或沉淀微泡的过滤需要施加外力。所述外力可以是重力,可以是正常重力或离心力。替代地,所述外力可以是抽吸。

[0210] 在一个实施方式中,本实施方式提供了一种用于促进通过过滤澄清生物流体的设备。在一个实施方式中,本发明提供了一种用于促进通过过滤收集沉淀的微泡的设备。在一个实施方式中,本发明提供了一种通过过滤促进生物流体的澄清和沉淀的微泡的收集的设备。在一个实施方式中,所述设备还洗涤所述微泡。

[0211] 在一个实施方式中,所述设备是图4中示出的设备。在这个实施方式中,将生物流体加入到内室中。该内室具有第一过滤器,该第一过滤器具有能够使得微泡通过但保留尺寸大于该内室中的微泡的任何颗粒的孔径。在一个实施方式中,内室的过滤器的孔径为1 μ m。在这个实施方式中,当生物流体从内室通过所述过滤器时,大于1 μ m的颗粒被保留在内室中,并且所有其它颗粒收集于内室的底部和第二过滤器之间的区域中。

[0212] 所述第二过滤器具有不允许微泡通过的孔径。在一个实施方式中,内室的第二过滤器的孔径为0.01 μ m。在这个实施方式中,当生物流体通过第二过滤器时,微泡被保留在内室的底部和第二过滤器之间的区域中,并且所有其它剩余颗粒和液体收集于设备的底部。

[0213] 本领域普通技术人员可以容易理解的是,例如,所述设备可以具有多于两个不同孔径的过滤器,以选择所需尺寸的微泡。

[0214] 在一个实施方式中,向内室中的生物流体中加入沉淀剂。在一个实施方式中,向通

过了第一过滤器的滤液中加入沉淀剂。

[0215] 本发明的设备利用的过滤膜可以由任何适合的材料制成,前提条件是该过滤膜不会与生物流体反应或结合生物流体中的组分。例如,所述过滤膜可以由低结合材料制成,诸如例如聚醚砜、尼龙6、聚四氟乙烯、聚丙烯、zeta改性的玻璃微纤维、硝酸纤维素、醋酸纤维素、聚偏二氟乙烯、再生的纤维素。

[0216] 本发明的微泡

[0217] 在一个实施方式中,通过电子显微镜测定,本发明的微泡具有约2nm至约5000nm的尺寸。在替代的实施方式中,通过电子显微镜测定,本发明的微泡具有约2nm至约1000nm的尺寸。在替代的实施方式中,通过电子显微镜测定,本发明的微泡具有约2nm至约500nm的尺寸。在替代的实施方式中,通过电子显微镜测定,本发明的微泡具有约2nm至约400nm的尺寸。在替代的实施方式中,通过电子显微镜测定,本发明的微泡具有约2nm至约300nm的尺寸。在替代的实施方式中,通过电子显微镜测定,本发明的微泡具有约2nm至约200nm的尺寸。在替代的实施方式中,通过电子显微镜测定,本发明的微泡具有约2nm至约100nm的尺寸。在替代的实施方式中,通过电子显微镜测定,本发明的微泡具有约2nm至约50nm的尺寸。在替代的实施方式中,通过电子显微镜测定,本发明的微泡具有约2nm至约20nm的尺寸。在替代的实施方式中,通过电子显微镜测定,本发明的微泡具有约2nm至约10nm的尺寸。

[0218] 在一个实施方式中,本发明的微泡具有至少100kDa的分子量。

[0219] 根据本发明的方法分离的微泡可以用于治疗。替代地,根据本发明的方法分离的微泡可以用于诊断试验。替代地,本发明的微泡可以用于改变或工程化细胞或组织。在将本发明的微泡用于改变或工程化细胞或组织的情况下,所述微泡可以装载、标记有可以改变或工程化细胞或组织的RNA、DNA、脂质、碳水化合物、蛋白质、药物、小分子、代谢物或它们的组合。替代地,所述微泡可以自表达和/或含有RNA、DNA、脂质、碳水化合物、蛋白质、药物、小分子、代谢物或它们的组合的细胞或组织中分离。

[0220] 本发明的微泡在诊断试验中的用途

[0221] 本发明的微泡可以在诊断试验中使用,该诊断试验检测识别特定表型(诸如例如病况或疾病、或疾病的阶段或进展)的生物标志物。来自细胞起源(cell-of-origin)特异性微泡的生物标志物或标志物可以用来确定疾病、病况、疾病阶段和病况阶段的治疗方案,并且也可以用来确定治疗效果。来自起源细胞特异性微泡的标志物还可以用来识别未明原因的疾病的病况。

[0222] 如本文中所使用的,术语“生物标志物”是指生物状态的指示器。其是一种作为正常的生物过程、致病过程、和对治疗干预的药理学反应的指示器而客观测量和评价的特征。可以评估微泡的一个或多个生物标志物用于表示表型的特征。所述生物标志物可以是代谢物、核酸、肽、蛋白质、脂质、抗原、碳水化合物或蛋白聚糖,诸如DNA或RNA。所述RNA可以为mRNA、miRNA、snoRNA、snRNA、rRNAs、tRNAs、siRNA、hnRNA或shRNA。

[0223] 受试者中的表型可以通过从该受试者获得生物样品并且分析来自该样品的一种或多种微泡来表征。例如,表征受试者或个体的表型可以包括:检测疾病或病况(包括症状前早期检测),确定疾病或病况的预后、诊断和治疗诊断,或确定疾病或病况的阶段或进展。表征一种表型还可以包括:鉴定用于特定疾病、病况、疾病阶段和病况阶段的适合治疗或治疗效果,疾病的进展(特别是疾病的复发\转移扩散或疾病再发)的预测和可能性分析。表型

还可以是病况或疾病(诸如癌症或肿瘤)的临床不同类型或亚型。表型确定也可以是生理性病况的确定、或者器官痛苦或器官排斥(诸如移植后)的评估。本文的产品和方法允许在个体的基础上评价受试者,这在治疗中可以提供更高效且经济决策的益处。

[0224] 所述表型可以是美国专利7,897,356中列举的任何表型。所述表型可以是肿瘤、瘤或癌症。通过本文所描述的产品或方法检测或评估的癌症包括但不限于乳腺癌、卵巢癌、肺癌、结肠癌、增生性息肉、瘤、结肠直肠癌、高度发育异常、低度发育异常、前列腺增生、前列腺癌、黑色素瘤、胰腺癌、脑癌(诸如成胶质细胞瘤)、恶性血液病、肝细胞癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、头颈部癌、食道癌、胃肠道间质瘤(GIST)、肾细胞癌(RCC)或胃癌。结肠直肠癌可以是CRC Dukes B或Dukes C-D。恶性血液病可以是B-细胞慢性淋巴细胞白血病、B-细胞淋巴瘤-DLBCL、B-细胞淋巴瘤-DLBCL-生发中心样、B-细胞淋巴瘤-DLBCL-活化的B-细胞样和伯基特氏肿瘤。所述表型还可以为癌前病况,如Barrett食管。

[0225] 所述表型还可以为炎症性疾病、免疫性疾病或自身免疫性疾病。例如,所述疾病可以是炎症性肠病(IBD)、克罗恩病(CD)、溃疡性结肠炎(UC)、盆腔炎、血管炎、牛皮癣、糖尿病、自免疫肝炎、多发性硬化、重症肌无力、I型糖尿病、类风湿性关节炎、牛皮癣、系统性红斑狼疮(SLE)、桥本氏甲状腺炎、格雷夫斯病、强直性脊柱炎干燥症、CREST综合症、硬皮病、风湿性疾病、器官排斥、移植物抗宿主病、原发性硬化性胆管炎或败血症。

[0226] 所述表型可以为心血管疾病,诸如动脉粥样硬化、充血性心脏衰竭、易损斑块、中风或缺血。心血管疾病或病况可以是血压升高、管腔狭窄、血管闭塞或血栓形成事件。

[0227] 所述表型还可以是神经疾病,诸如多发性硬化(MS)、帕金森病(PD)、阿耳茨海默氏病(AD)、精神分裂症、双相情感障碍、抑郁、自闭症、朊病毒疾病、皮克病、痴呆、亨廷顿病(HD)、唐氏综合症、脑血管病、拉斯姆森脑炎、病毒性脑膜炎、神经精神系统性红斑狼疮(NPSLE)、肌萎缩侧索硬化、克-雅各伯病、格斯特曼-施特劳斯纳病(Gerstmann-Straussler-Scheinker)、传染性海绵状脑病、缺血再灌注损伤(例如中风)、脑外伤、微生物感染、或慢性疲劳综合征。所述表型还可以是诸如纤维肌痛、慢性神经性疼痛、或外周神经性疼痛的病况。

[0228] 所述表型还可以是传染病,诸如细菌、病毒或酵母感染。例如,所述疾病或病况可以是惠普尔氏病、朊病毒疾病、肝硬化、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、HIV、肝炎、梅毒、脑膜炎、疟疾、结核病或流感。可以在外来体中评估病毒蛋白,诸如HIV或HCV样颗粒,以表征病毒情况。

[0229] 所述表型还可以是围产期或怀孕相关性病况(例如先兆子痫或早产)、代谢性疾病或病况(诸如与铁代谢相关的代谢性疾病或病况)。代谢性疾病或病况也可以是糖尿病、炎症或围产期病况。

[0230] 表型可以通过任何合适的测定方法检测,诸如例如蛋白质印迹、ELISA、PCR等。可以组合所述测定方法进行多于一种表型的多重分析。可以应用于本发明的微泡的测定方法的例子公开于PCT申请W02009092386A3和W02012108842A1中。

[0231] 在所述生物标志物为RNA的情况下,可以通过美国专利8,021,847中公开的方法从本发明的微泡中分离RNA。

[0232] 在一个实施方式中,在用于诊断美国专利7,897,356中公开的病症诊断试验中使用本发明的微泡。

[0233] 在一个实施方式中,根据美国专利8,211,653中公开的方法,将本发明的微泡用于癌症诊断试验中。

[0234] 在一个实施方式中,根据美国专利8,216,784中公开的方法,将本发明的微泡用于癌症诊断试验中。

[0235] 在一个实施方式中,根据美国专利8,278,059中公开的方法,将本发明的微泡用于前列腺癌诊断试验中。

[0236] 在一个实施方式中,根据美国专利8,343,725中公开的方法,将本发明的微泡用于癌症存活预后诊断试验中。

[0237] 在一个实施方式中,根据美国专利8,349,568中公开的方法,将本发明的微泡用于癌症存活预后诊断试验中。

[0238] 在一个实施方式中,根据美国专利8,349,560中公开的方法,将本发明的微泡用于急性淋巴细胞性白血病诊断试验中。

[0239] 在一个实施方式中,根据美国专利8,349,561中公开的方法,将本发明的微泡用于急性淋巴细胞性白血病诊断试验中。

[0240] 在一个实施方式中,在丙型肝炎病毒诊断试验中利用本发明的微泡。在一个实施方式中,根据美国专利7,807,438中描述的方法,从本发明的微泡中提取丙型肝炎病毒RNA以测试丙型肝炎病毒在患者中的存在。

[0241] 在一个实施方式中,根据美国专利8,349,574中公开的方法,在用于确定患者对癌症治疗的反应的诊断试验中利用本发明的微泡。

[0242] 在一个实施方式中,根据美国专利申请US20120058492A1中公开的方法,在用于诊断恶性肿瘤的诊断试验中利用本发明的微泡。

[0243] 在一个实施方式中,根据美国专利申请US20120238467A1中公开的方法,在用于诊断癌症或不良妊娠结果的诊断试验中利用本发明的微泡。

[0244] 在一个实施方式中,根据美国专利申请US20120214151A1中公开的方法,将本发明的微泡用于尿液中HIV的诊断试验中。

[0245] 在一个实施方式中,根据美国专利申请US20120309041A1中公开的方法,将本发明的微泡用于心血管事件诊断试验中。

[0246] 在一个实施方式中,根据PCT申请W02012110099A1中公开的方法,将本发明的微泡用于心血管事件诊断试验中。

[0247] 在一个实施方式中,根据PCT申请W02012126531A1中公开的方法,将本发明的微泡用于心血管事件诊断试验中。

[0248] 在一个实施方式中,根据PCT申请W02013110253A3中公开的方法,将本发明的微泡用于心血管事件诊断试验中。

[0249] 在一个实施方式中,根据PCT申请W02012135844A2中公开的方法,将本发明的微泡用于黑色素瘤诊断试验中。

[0250] 在一个实施方式中,在转移性黑色素瘤的诊断测试中利用本发明的微泡,其通过测试根据本发明的方法分离的微泡以观察生物标志物BRAF的存在。可以通过蛋白质印迹或替代地通过PCR来确定BRAF的存在。在一个实施方式中,转移性黑色素瘤试验能够检测野生型和恶性BRAF。在一个实施方式中,转移性黑色素瘤试验能够检测恶性BRAF的剪接变体。

[0251] 在一个实施方式中,在转移性黑色素瘤的诊断试验中利用的微泡是使用包含图3中概述的步骤的方法分离的。

[0252] 在一个实施方式中,微泡获自于希望诊断转移性黑色素瘤的存在患者。在一个实施方式中,微泡获自于患者的血浆。

[0253] 在一个实施方式中,使用下列两个引物组中的一个通过PCR确定转移性黑色素瘤的存在:

[0254] 序列1:

[0255] 正向:AGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA

[0256] 反向:CTGATGGGACCCACTCCATC

[0257] 扩增片段长度:70

[0258] 序列2:

[0259] 正向:GAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTG

[0260] 反向:CTGATGGGACCCACTCCATC

[0261] 扩增片段长度:82

[0262] 在另一个实施方式中,使用小鼠抗-BRAF V600E抗体(NewEast Biosciences, Malvern, PA),通过蛋白质印迹确定转移性黑色素瘤的存在。

[0263] 本发明的微泡在疗法中的用途

[0264] 本发明的微泡可以用作疗法以治疗疾病。

[0265] 在一个实施方式中,根据美国专利申请US20030198642A1中描述的方法,将本发明的微泡用作疫苗。

[0266] 在一个实施方式中,根据美国专利申请US20060116321A1中描述的方法,将本发明的微泡用于调节或抑制患者的免疫反应。

[0267] 在一个实施方式中,根据PCT专利申请W006007529A3中描述的方法,将本发明的微泡用于调节或抑制患者的免疫反应。

[0268] 在一个实施方式中,根据PCT专利申请W02007103572A3中描述的方法,将本发明的微泡用于调节或抑制患者的免疫反应。

[0269] 在一个实施方式中,根据美国专利8,288,172中描述的方法,将本发明的微泡用于调节或抑制患者的免疫反应。

[0270] 在一个实施方式中,根据PCT专利申请W02011000551A1中描述的方法,将本发明的微泡用作癌症的疗法。

[0271] 在一个实施方式中,根据美国专利申请US20120315324A1中描述的方法,将本发明的微泡用作癌症或炎症性疾病的疗法。

[0272] 在一个实施方式中,根据美国专利8,343,485中描述的方法,将本发明的微泡用作血管损伤的疗法。

[0273] 在一个实施方式中,将本发明的微泡用于向细胞递送分子。所述分子的递送可能有用于治疗或预防疾病。在一个实施方式中,根据PCT申请W004014954A1中描述的方法进行所述递送。在替代的实施方式中,根据PCT申请W02007126386A1中描述的方法进行所述递送。在替代的实施方式中,根据PCT申请W02009115561A1中描述的方法进行所述递送。在替代的实施方式中,根据PCT申请W02010119256A1中描述的方法进行所述递送。

[0274] 在一个实施方式中,将本发明的微泡用于促进或增强伤口愈合。在一个实施方式中,所述伤口是三度烧伤。在一个实施方式中,所述伤口是二度烧伤。

[0275] 在一个实施方式中,将本发明的微泡用于促进或增强患者中的血管生成。

[0276] 在一个实施方式中,将本发明的微泡用于促进或增强患者中的神经元再生。

[0277] 在一个实施方式中,将本发明的微泡用于减少患者中的疤痕形成。

[0278] 在一个实施方式中,将本发明的微泡用于减少患者皮肤中的皱纹形成。

[0279] 在一个实施方式中,将本发明的微泡用于协调患者中的复杂的组织再生。

[0280] 在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其能够促进复杂组织结构的功能再生和机化。在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其能够在患有再生障碍性贫血的患者中再生造血组织。在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其能够在具有患病、损伤或丢失的皮肤的患者中再生至少一种组织,所述组织选自自由上皮组织、基质组织、神经组织、血管组织和附属结构组成的组中。在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其能够再生来自所有三个胚层的组织和/或细胞。

[0281] 在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其用于调节患者的免疫系统。

[0282] 在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其增强移植到患者中的组织或细胞的存活。在一个实施方式中,在接受移植的组织或细胞之前,使用所述分离的微泡的制剂治疗所述患者。在替代的实施方式中,在接受移植的组织或细胞之后,使用所述分离的微泡的制剂治疗所述患者。在替代的实施方式中,使用所述分离的微泡的制剂处理所述组织或细胞。在一个实施方式中,在移植之前使用所述分离的微泡的制剂处理所述组织或细胞。

[0283] 在一个实施方式中,本发明提供一种分离的微泡的制剂,其含有从由来自宿主细胞的RNA、DNA、脂质、碳水化合物、代谢物、蛋白质和它们的组合组成的组中选择的至少一种分子。在一个实施方式中,所述宿主细胞被工程化以表达选自自由RNA、DNA、脂质、碳水化合物、代谢物、蛋白质和它们的组合组成的组中的至少一种分子。在一个实施方式中,将含有从由来自宿主细胞的RNA、DNA、脂质、碳水化合物、代谢物、蛋白质和它们的组合组成的组中的至少一种分子的所述分离的微泡的制剂用作治疗剂。

[0284] 下列实施例进一步阐明了本发明,但本发明不受它们的限制。

[0285] 实施例

[0286] 实施例1:通过超速离心从细胞培养基分离微泡

[0287] 本实施例阐明了从细胞培养基或任何生物流体分离微泡的典型方法。图1中示出了从细胞培养基分离微泡的方法的概要。总的来说,将细胞培养于补充有不含微泡的血清(所述血清可以通过超速离心、过滤、沉淀等耗尽微泡)的培养基中。在将细胞培养一段时间后,将培养基取出并且转移至锥形管中并且在4°C在400x g下离心10分钟以丸粒化所述细胞。随后,将上清液转移到新的锥形管中并且在4°C在2000x g下离心30分钟以进一步除去细胞和细胞碎片。其随后可以是另一个离心步骤(例如,10000x g,30分钟以进一步耗尽细胞碎片和/或去除较大的微泡)。将得到的上清液转移到超速离心管中,称量以确保重量相等并且在4°C在70000+x g下超速离心70分钟以丸粒化微泡。

[0288] 随后弃去这种上清液并且将所述丸粒再悬浮于冰冷的PBS中。在4°C在70000+x g

下将该溶液超速离心70分钟以丸粒化微泡。将富集了微泡的丸粒重悬浮于小体积(约50-100 μ l)的适合缓冲液(例如,PBS)中。

[0289] 实施例2:通过本发明的方法从细胞培养基分离微泡

[0290] 本实施例阐明了如何通过本发明的方法从细胞培养基分离微泡。图2和图3中示出了从具有培养细胞的培养基分离微泡的方法的概要。总的来说,将细胞培养于补充有不含微泡的血清(所述血清可以通过超速离心、过滤、沉淀等耗尽微泡)的培养基中。在将细胞培养一段时间后,取出培养基并且转移至锥形管中并且在4 $^{\circ}$ C在400x g下离心10分钟以丸粒化细胞。随后,将上清液转移到新的锥形管中并且在4 $^{\circ}$ C在2000x g下离心30分钟以进一步除去细胞和细胞碎片。其随后可以是另一个离心步骤(例如,10000x g,30分钟以进一步耗尽细胞碎片和除去较大的颗粒)。

[0291] 然后在4 $^{\circ}$ C使用8.5%w/v PEG 6000和0.4M NaCl沉淀微泡。将这种混合物在4 $^{\circ}$ C在10000x g下旋转30分钟。除去上清液并且将丸粒再悬浮于适合的缓冲液(例如PBS)中。其可以用于即刻的下游反应或进一步纯化。进一步纯化工序可以包括使用离心过滤器(例如100kDa的MWC0)、免疫亲和、HPLC、切向流过滤、相分离/分配、微流体等。

[0292] 实施例3:通过本发明的方法从使用骨髓来源的干细胞条件培养的培养基分离微泡

[0293] 正常供体的人骨髓获自AllCells LLC(Emeryville,CA,<http://www.allcells.com>)。通过标准的塑料贴壁法分离MSC。使用Ficoll-Paque Premium(密度:1.077g/ml)根据制造商的协议(GE Healthcare Life Sciences,Pittsburgh,PA)通过低密度离心分离骨髓单核细胞。在界面处收集单核细胞,在补充有2%FBS(Atlanta Biologies,Atlanta,GA)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中洗涤三次,并且再悬浮于由 α -最低必需培养基(α -MEM)(Mediatech Inc.,Manassas,VA)和20%FBS,1%青霉素/链霉素(Lonza,Allendale,NJ)和1%谷氨酰胺(Lonza)组成的MSC培养基中。

[0294] 将MSC细胞或单核细胞各自的初始培养物以2~3x 10⁵细胞/cm²接种于组织培养处理的培养皿(BD Biosciences,San Jose,CA)中并且置于37 $^{\circ}$ C、95%潮湿空气和5%CO₂的细胞培养器中。48~72小时之后,除去非贴壁细胞,使用PBS冲洗培养瓶一次,并且向瓶中加入新鲜培养基。使细胞生长直到实现80%汇合,然后通过胰蛋白酶-EDTA(Life technologies,Carlsbad,CA)传代。以1:4比例将细胞分开到5层的多层培养瓶(BD Biosciences)中。替代地,在37 $^{\circ}$ C下将冰冻的MSC解冻并且立即在37 $^{\circ}$ C、95%潮湿空气和5%CO₂中在补充有20%不含微泡的牛胎儿血清和1%青霉素/链霉素/谷氨酰胺的 α -MEM中培养。类似于上述对它们进行扩增。

[0295] 使细胞在多层培养瓶中生长直到达到80~90%汇合。使用PBS冲洗培养瓶两次并且加入补充有1%青霉素/链霉素/谷氨酰胺的 α -MEM。24小时之后,将所述条件培养基转移到50mL锥形离心管(Thermo Fisher Scientific Inc,Weston,FL)中并且立即在4 $^{\circ}$ C在400x g下离心10分钟以丸粒化任何非贴壁细胞。将上清液转移至新的50mL锥形离心管中并且在4 $^{\circ}$ C在2000x g下离心以进一步去除细胞和细胞碎片。

[0296] 收集上清液并且置于250ml无菌的聚丙烯一次性容器(Corning,Corning,NY)中。向所述上清液中,以8.5w/v%加入不含核糖核酸酶和蛋白酶的聚乙二醇(平均分子量6000)(Sigma Aldrich,Saint Louis,MO)以及氯化钠(最终浓度0.4M)。将该溶液置于4 $^{\circ}$ C的冷室

中摇动过夜。将溶液转移至50mL锥形离心管中并且在4℃在10000x g下离心30分钟。倾析出上清液并且将富集了微泡的丸粒再悬浮于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。将富集了微泡的溶液转移至amicon超-15离心过滤单元(标称分子量限制100kDa)(Millipore,Billerica,MA)中并且在5000x g下离心30分钟。使用磷酸盐缓冲盐水洗涤所述过滤单元并且再次在5000x g下离心30分钟。从过滤装置的底部回收浓缩的样品(约200 μ l)。通过微BAS蛋白质测定试剂盒(Pierce,Rockford,IL)确定蛋白质浓度并且将经富集的微泡溶液贮存在-70度下或加工用于下游使用(例如,蛋白质、RNA和DNA提取)。

[0297] 实施例4:通过本发明的方法从血浆分离微泡

[0298] 通过静脉穿刺采集约6~8ml血液(人和猪)并且置于BD真空采血管塑料EDTA淡紫色管(BD Biosciences,San Jose,CA)中。在室温下在400x g将静脉穿刺管离心30分钟。取出血浆(约3~4ml)并且置于新的50ml锥形离心管(Thermo Fisher Scientific Inc,Weston,FL)中。以1:10(血浆比培养基)的比率加入无菌的 α -最低必需培养基(α -MEM)(Mediatech Inc.,Manassas,VA)。

[0299] 向该溶液中,以8.5w/v%加入不含核糖核酸酶和蛋白酶的聚乙二醇(平均分子量6000)(Sigma Aldrich,Saint Louis,MO)以及氯化钠(最终浓度0.4M)。将该溶液置于4℃的冷室中摇动过夜。在4℃在10000x g下将溶液离心30分钟。倾析出上清液并且将富集了微泡的丸粒再悬浮于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。将富集了微泡的溶液转移至amicon超-15离心过滤单元(标称分子量100kDa)(Millipore,Billerica,MA)中并且在5000x g下离心30分钟。使用磷酸盐缓冲盐水洗涤过滤单元并且在5000x g再次离心30分钟。从过滤装置的底部回收浓缩的样品(约200~400 μ l)。通过微BSA蛋白质测定试剂盒(Pierce,Rockford,IL)确定蛋白质浓度并且将经富集的微泡溶液贮存在-70度或加工用于下游使用(例如,蛋白质、RNA和DNA的提取)。

[0300] 实施例5:通过本发明的方法从骨髓穿刺液分离微泡

[0301] 从髂嵴分离猪骨髓。使用聚维酮碘7.5%和异丙醇70%仔细清洁皮肤区。将11-规格的3mm套针(Ranafac,Avon,MA)插入到髂嵴中。使抽吸注射器装载有5000~1000单位的肝素以防止骨髓样品的凝固。抽吸约20~25ml骨髓并且将溶液转移至50ml锥形离心管中。替代地,从AllCells LLC(Emeryville,CA,<http://www.allcells.com>)获得正常供体人骨髓(约50ml)。

[0302] 在室温下在400x g下将所述50ml锥形管离心30分钟。收集上清液(非细胞部分)(每50ml约10~12ml)并且置于新的50ml锥形离心管(Thermo Fisher Scientific Inc,Weston,FL)。以1:10(骨髓上清液比培养基)的比率加入无菌的 α -最低必需培养基(α -MEM)(Mediatech Inc.,Manassas,VA)。将溶液转移至新的50ml锥形管中并且在4℃在2000x g下离心30分钟。将上清液转移到新的50ml锥形管中并且向这种溶液中以8.5w/v%加入不含核糖核酸酶和蛋白酶的聚乙二醇(平均分子量6000)(Sigma Aldrich,Saint Louis,MO)以及氯化钠(最终浓度0.4M)。

[0303] 将所述溶液置于4℃的冷室中摇动过夜。在4℃在10000x g下将溶液离心30分钟。倾出上清液并且将富集了微泡的丸粒再悬浮于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。将富集了微泡的溶液转移至amicon超-15离心过滤单元(标称分子量100kDa)(Millipore,Billerica,MA)中并且在5000x g下离心30分钟。使用磷酸盐缓冲盐水洗涤所述过滤单元并且再次在5000x g

下离心30分钟。从过滤装置的底部回收浓缩的样品(约200~400 μ l)。通过微BSA蛋白质测定试剂盒(Pierce, Rockford, IL)确定蛋白质浓度并且将经富集的微泡溶液贮存在-70度或加工用于下游使用(例如,蛋白质、RNA和DNA的提取)。

[0304] 收集细胞部分并且加工用于间充质干细胞分离或骨髓完全分离。

[0305] 实施例6:通过本发明的方法从尿液分离微泡

[0306] 分离约500ml清洁接取的人尿并且置于50ml锥形管(Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL)中。

[0307] 将所述50ml锥形管在4 $^{\circ}$ C在400x g下离心30分钟。取出上清液并且置于新的50ml锥形离心管(Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL)中。将溶液转移至新的50ml锥形管并且在4 $^{\circ}$ C在2000x g下离心30分钟。将上清液转移至新的50ml锥形管,并且向这种溶液中以8.5w/v%加入不含核糖核酸酶和蛋白酶的聚乙二醇(平均分子量6000)(Sigma Aldrich, Saint Louis, MO)以及氯化钠(最终浓度0.4M)。

[0308] 将溶液置于4 $^{\circ}$ C的冷室中摇动过夜。在4 $^{\circ}$ C在10000x g下将溶液离心30分钟。倾析出上清液并且将富集了微泡的丸粒再悬浮于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。将富集了微泡的溶液转移至amicon超-15离心过滤单元(标称分子量100kDa)(Millipore, Billerica, MA)中并且在5000x g下离心30分钟。使用磷酸盐缓冲盐水洗涤过滤单元并且再次在5000x g下离心30分钟。从过滤装置的底部回收浓缩的样品(约200~400 μ l)。通过微BSA蛋白质测定试剂盒(Pierce, Rockford, IL)确定蛋白质浓度并且将经富集的微泡溶液贮存在-70度或加工用于下游使用(例如,蛋白质、RNA和DNA的提取)。

[0309] 实施例7:通过本发明的方法从来自骨髓细胞长期培养的培养基分离微泡

[0310] 从穿刺液(参见实施例1)获得骨髓并且使用含有0.1mM EDTA(Stem Cell Technologies, Vancouver, BC)的0.8%氯化铵溶液裂解红血球。在400X g在牛胎儿血清(Atlanta Biologies, Atlanta, GA)垫层下丸粒化有核细胞5分钟。通过在400X g下丸粒化5分钟以在McCoys 5a培养基(Mediatech Inc., Manassas, VA)中洗涤有核细胞。以 1×10^6 细胞/ml的密度将所述细胞再悬浮于培养基中并且接种在25、75或225cm²培养瓶(Corning, Corning, NY)中。

[0311] 培养基由McCoy's 5a培养基、1%碳酸氢钠(Life technologies, Carlsbad, CA)、0.4% MEM非必需氨基酸(Life technologies)、0.8% MEM必需氨基酸(Life technologies)、1% L谷氨酰胺(Lonza, Allendale, NJ)、0.1 μ M氢化可的松(Life technologies)、1%青霉素/链霉素(Lonza)、12.5%胎牛血清(Atlanta Biologies)和12.5%马血清(Stem Cell Technology)组成。在33 $^{\circ}$ C和5%CO₂下培养所述培养物。在培养的前九周期间,每周通过在不除去任何培养基的情况下添加原始体积的一半的培养基以进行哺养。如果培养物生长超出九周,将培养基的体积减少至原始体积并且每周加入原始体积一半的新鲜培养基。

[0312] 在培养约九周之后,取出原始培养基并且贮存。使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)将细胞洗涤两次并且在由McCoy's 5a培养基、1%碳酸氢钠、0.4% MEM非必需氨基酸、0.8% MEM必需氨基酸(Life technologies)、1% L-谷氨酰胺(Lonza, Allendale, NJ)和1%青霉素/链霉素(Lonza)组成的培养基中培养24小时。

[0313] 24小时后,将上清液转移至50ml锥形离心管(Thermo Fisher Scientific Inc,

Weston,FL) 并且立即在4℃在400x g下离心10分钟以将任何非贴壁细胞丸粒化。将贮存的原始培养基加回到所述细胞中。将上清液转移至新的50mL锥形离心管中并且在4℃在2000x g下离心30分钟以进一步除去细胞和细胞碎片。

[0314] 收集上清液并且置于250ml无菌的丙烯一次性容器(Corning, Corning, NY)中。向所述上清液中,以8.5w/v%加入不含核糖核酸酶和蛋白酶的聚乙二醇(平均分子量6000)(Sigma Aldrich, Saint Louis, MO)以及氯化钠(最终浓度0.4M)。将溶液置于4℃的冷室中摇动过夜。将溶液转移到50mL锥形离心管中并且在4℃在10000x g下离心30分钟。倾析出上清液并且将富集了微泡的丸粒再悬浮于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。将富集了微泡的溶液转移至amicon超-15离心过滤单元(标称分子量100kDa)(Millipore, Billerica, MA)中并且在5000x g下离心30分钟。使用磷酸盐缓冲盐水洗涤过滤单元并且在5000x g下再次离心30分钟。从过滤装置的底部回收浓缩的样品(约200 μ l)。通过微BSA蛋白质测定试剂盒(Pierce, Rockford, IL)确定蛋白质浓度并且将富集的微泡溶液贮存在-70度或加工用于下游使用(例如,蛋白质、RNA和DNA的提取)。

[0315] 实施例8:本发明的微泡的分析

[0316] 通过电子显微镜分析微泡的样品。对于透射电子显微镜(TEM),将微泡的每个样本加载在formvar-涂布的150目铜格栅(Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA)上20分钟。使所述格栅排干并且漂浮在2%戊二醛滴上5分钟,然后在双蒸水(DDOH)中洗涤,随后在4%水性醋酸双氧铀的滴上染色并且在DDOH中洗涤多次。在Philips CM 10电子显微镜中在80kV检查所述格栅。

[0317] 图5示出了通过实施例1中所描述的超速离心法分离的(图A和B)和根据实施例3中描述的本发明的方法分离的(图C和D)来源于人类骨髓来源的间充质干细胞的微泡的电子显微照片。图6示出了通过实施例1中所描述的超速离心法分离的(图A和B)和根据实施例3中描述的本发明的方法分离的(图C和D)来源于猪骨髓来源的间充质干细胞的微泡的电子显微照片。图7示出了通过实施例1中所描述的超速离心法分离的(图A和B)和根据实施例3中描述的本发明的方法分离的(图C和D)来源于小鼠骨髓来源的间充质干细胞的微泡的电子显微照片。

[0318] 图5~7示出了通过本发明的方法分离的微泡相对于通过超速离心分离的微泡之间的差异。通过本发明的方法分离的微泡具有更加平滑、无波纹且看起来更“完整”的边缘。

[0319] 图8示出了根据本发明的方法从人类血浆分离的微泡的电子显微照片。使用PEG分离实现的形状和尺寸的不均匀性表明分离了所有类型的微泡。在根据本发明的方法从猪血浆(图9)和人尿液(图10)分离的微泡中观察到了类似的不均匀性。

[0320] 为了分析微泡的样品中的蛋白质表达,在RIPA缓冲液(Cell signaling technology, Danvers, MA)中裂解细胞和微泡并且通过微BSA测试试剂盒(Pierce, Rockford, IL)估算蛋白质浓度。将约20微克裂解物加载在各泳道中并且通过兔抗-63抗体(SBI Biosciences, Mountain View, CA)、兔抗-hsp70(SBI Biosciences)、兔STAT3(Cell signaling technology)和/或兔磷-STAT3(Cell signaling technology)过夜探测所述膜(1:1000)。

[0321] 外来体标志物(HSP 70和CD63)的存在证实了本发明的方法能够分离外来体。另外,所述外来体还含有转录因子STAT3和活化磷酸化形式磷酸-STAT3。参见图11。

[0322] 实施例9:本发明的微泡对成纤维细胞增殖与迁移的影响

[0323] 为了研究本发明的微泡促进或增强伤口愈合的能力,测试了微泡模拟真皮成纤维细胞的增殖的能力。从Life Technology (Carlsbad,CA)获得正常人成年真皮成纤维细胞。根据IRB批准的协议(IND#BB IND 13201),从虽然进行标准护理和高级伤口护理治疗但持续2年仍然没有愈合迹象的伤口采集慢性创伤患者成纤维细胞(压力足溃疡和糖尿病足溃疡)。将正常和慢性创伤成纤维细胞以 5×10^3 细胞/孔接种在24孔组织培养板(BD Biosciences, San Jose, CA)上。在第0天和第3天进行MTT细胞增殖测定。在第0天加入微泡。在3天后,PEG分离的和超速离心分离的微泡在提高正常和慢性创伤成纤维细胞两者的生长上近似等价。磷酸盐缓冲盐水(PBS)和耗尽了微泡的条件培养的MSC培养基显示出很少的生长。参见图12。

[0324] 在共培养实验中,将正常成年成纤维细胞和来自糖尿病足溃疡的成纤维细胞接种于24孔板中。每孔接种以达到100%汇合(约 1×10^5 细胞/孔)。为了避免细胞增殖的影响,在刮擦的2小时前,将培养基替换为新鲜的无血清含有 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 丝裂霉素的培养基。然后使用1ml的无菌移液器吸头在铺满的单层上划线以留下 $0.4 \sim 0.5 \text{mm}$ 宽的刮痕。然后立即除去培养基(以及任何脱落的细胞)。使用含有微泡(PEG或超速离心来源的)、PBS或耗尽了微泡的MSC条件培养基的新鲜培养基(10%FBS)替换所除去的培养基。在刮擦后即刻以及处理3天后通过采集数字化图像来监测被刮擦的区域。使用倒转IX81奥林巴斯显微镜(Olympus America, Center Valley, PA, <http://www.olympusamerica.com>)和ORCA-AG滨松数码相机(Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu City, Shizuoka Pref., Japan, <http://www.hamamatsu.com>)获取数字化图像。处理三天后,根据本发明的方法分离的微泡显示出最大的迁移(基本上关闭伤口),其次是来源于超速离心的微泡。对照(PBS)和耗尽了微泡的MSC条件培养基(耗尽的)显示出很少的迁移。参见图13。

[0325] 图14示出了微泡对来源于糖尿病足溃疡的成纤维细胞的细胞迁移的影响。类似于图13中的结果,根据本发明的方法分离的微泡唤起了最大的迁移,其次是使用实施例1中描述的超速离心法分离的微泡。对照(PBS)和耗尽了微泡的MSC条件培养基(耗尽的)显示出很少的迁移。

[0326] 实施例10:将本发明的微泡摄入到细胞中

[0327] 使用磷脂细胞接头染料PKH-26(红色)按照制造商的指示(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO)标记根据本发明的方法从条件培养基分离的人类MSC微泡。使用Vybrant-Dio(Life technology)按照制造商的指示标记正常皮肤成纤维细胞。将正常皮肤成纤维细胞接种在涂布有纤维结合蛋白(Sigma-Aldrich)的4-孔Nunc*Lab-Tek*II室玻片(Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL) (5×10^3 细胞/孔)上。根据制造商的指示使用核染料Hoechst 33342(Life technology)对细胞进行染色。使用PKH-26标记的微泡将Dio标记的成纤维细胞处理24小时。使用倒转IX81奥林巴斯显微镜和ORCA-AG滨松数码相机获得图像。正常皮肤成纤维细胞(使用绿色脂质膜染料Dio染色的)展示了将通过PEG沉淀分离的PKH-26标记的人类MSC MV摄入到了核周围位置。参见图15和图16。在图16中,在核周围位置看到了微泡。

[0328] 实施例11:本发明的微泡作为类风湿关节炎的诊断的用途

[0329] 将正常皮肤成纤维细胞以 1×10^5 细胞/孔的密度接种于6孔组织培养板(BD

Biosciences) 中。使成纤维细胞缺乏血清过夜并且使用下列物质进行处理:PBS (对照);10 微克根据本发明的方法从获自于患有类风湿性关节炎的患者的血浆分离的微泡(人血浆MV PEG沉淀);10微克根据本发明的方法从使用骨髓来源的间充质干细胞条件培养的培养基分离的微泡(人类hMSC MV PEG沉淀);10微克通过超速离心从使用骨髓来源的间充质干细胞条件培养的培养基分离的微泡(人类hMSC MV超速离心);PBS对照;和耗尽的培养基对照(耗尽了MV的hMSC条件培养基)。在成纤维细胞中STAT3磷酸化的量大于在根据本发明的方法分离的微泡中STAT3磷酸化的量。参见图17。

[0330] 实施例12:本发明的微泡作为转移性黑色素瘤的诊断的用途

[0331] BRAF是一种制造称为B-Raf的蛋白质的人类基因。已经鉴定出与人类癌症相关的超过30种BRAF基因的突变。我们已经设计了用于扩增与转移性黑色素瘤有联系的BRAF突变形式的pcr引物。所述突变为在BRAF中的外显子15中的T1799A突变。这导致在密码子600处的缬氨酸(V)被替换为谷氨酸(E)(现在称为V600E)。这种突变的存在对于通过BRAF抑制剂Vemurafenib的治疗是必需的。

[0332] 已经从ATCC(Washington DC, Maryland)获得的SK-Mel28细胞系在BRAF中的外显子15中具有T1799A突变。根据本发明的方法分离的微泡获自于通过在EMEM(ATCC)+10%血清(Atlanta biologics, Atlanta, Georgia)中培养3天的条件培养基。

[0333] 使用Qiagen's (Hilden, Germany) AUPrep DNA/RNA试剂盒对所分离的微泡加工以进行DNA和RNA的分离。使用iScript™反转录Supermix (Biorad, Hercules, CA) 反转录约50ng来自SK-MEL28细胞和微泡的RNA。利用Platinum® PCR SuperMix (Life technology) 根据制造商的指示,将2μl等份试样用于PCR。此外,利用Platinum® PCR SuperMix根据制造商的指示,将80ng来自SK-MEL28细胞和微泡的DNA用于PCR。在3%琼脂糖凝胶上运行PCR产物并且通过Biorad凝胶-doc系统可视化。结果示于图18中。

[0334] 所使用的引物为:

[0335] 序列1:

[0336] 正向:AGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA

[0337] 反向:CTGATGGGACCCACTCCATC

[0338] 扩增片段长度:70

[0339] 序列2:

[0340] 正向:GAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTG

[0341] 反向:CTGATGGGACCCACTCCATC

[0342] 扩增片段长度:82

[0343] 此外,在RIPA缓冲液中裂解微泡的样品并且通过微BSA测定试剂盒估算蛋白质浓度。底土约50微克加载在各泳道中并且通过小鼠抗-BRAF V600E抗体(NewEast Biosciences, Malvern, PA)对膜进行探测过夜(1:1000)。以1:10000稀释度将二次抗体山羊抗-小鼠(Pierce)施用1小时。蛋白质印迹显示了SKMEL28细胞和MV裂解物中的BRAF V600E检测。

[0344] 实施例13:通过本发明的方法从使用GFP-标记的骨髓来源的间充质干细胞的培养物条件培养的培养基分离微泡

[0345] 从Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine) 获得在人类泛素C启动子 (C57BL/6-Tg (UBC-GFP) 30Scha/J) 的指引下表达增强的绿色荧光蛋白 (GFP) 的纯合子转基因小鼠。已知这些小鼠在所有组织中均表达GFP。

[0346] 通过CO₂窒息对GFP-小鼠 (约3~4周龄) 实施安乐死。在髌关节上侧和踝关节下侧切断四肢。收获后肢并且除去皮肤、肌肉和所有结缔组织。然后将骨骼置于冰冷的无菌1X PBS的平皿中并且在PBS中洗涤数次。使用剪刀剪掉每一根骨头的端部。迫使具有温热培养基 (补充有20%牛胎儿血清和1%青霉素/链霉素/谷氨酰胺的 α -MEM) 的10cc注射器通过骨轴以将所有的骨髓提取到150mm盘中。将此重复数次以确保所有的骨髓被取出。将细胞混合物吸移数次以离解细胞并且将细胞悬浮液通过细胞过滤器 (70 μ m尺寸) (BD Biosciences, San Jose, CA) 以除去大细胞团块或骨颗粒。

[0347] 将初始培养物以 $2 \sim 3 \times 10^5$ 细胞/cm² 接种于组织培养处理的培养皿 (BD Biosciences, San Jose, CA) 中并且置于37 $^{\circ}$ C、95%潮湿空气和5%CO₂中的细胞培养器中。72~96小时之后, 除去非贴壁细胞, 使用PBS冲洗培养瓶一次, 并且向瓶中加入新的培养基。使细胞生长直至达到80%汇合, 然后通过胰蛋白酶-EDTA (Life technologies, Carlsbad, CA) 传代。以1:4的比分开细胞。

[0348] 替代地, 在37 $^{\circ}$ C将冰冻的GFP小鼠- MSC解冻并且立即在37 $^{\circ}$ C在95%潮湿空气和5%CO₂中在补充有20%牛胎儿血清和1%青霉素/链霉素/谷氨酰胺的 α -MEM中培养。与上述类似, 将它们扩增。

[0349] 在瓶中生长所述细胞直到达到100%汇合 (约1周)。将上清液转移到50mL锥形离心管 (Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL) 中并且立即在4 $^{\circ}$ C在400x g下离心10分钟以丸粒化任何非贴壁细胞。将上清液转移至新的50mL锥形离心管中并且在4 $^{\circ}$ C在2000x g下离心30分钟以进一步除去细胞和细胞碎片。

[0350] 收集上清液并且置于250ml无菌的聚丙烯一次性容器 (Corning, Corning, NY) 中。向该上清液中, 以8.5w/v%加入不含核糖核酸酶和蛋白酶的聚乙二醇 (平均分子量6000) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) 以及氯化钠 (最终浓度0.4M)。将溶液置于4 $^{\circ}$ C的冷室中摇动过夜。将所述溶液转移到50mL锥形离心管并且在4 $^{\circ}$ C在10000x g下离心30分钟。倾析出上清液并且将富集了微泡的丸粒再悬浮于磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。将富集了微泡的溶液转移至amicon超-15离心过滤单元 (标称分子量100kDa) (Millipore, Billerica, MA) 中并且在5000x g下离心30分钟。使用磷酸盐缓冲盐水洗涤所述过滤单元并且再次在5000x g下离心30分钟。从过滤装置的底部回收浓缩的样品 (约200~400 μ l)。通过微BSA蛋白质测定试剂盒 (Pierce, Rockford, IL) 确定蛋白质浓度并且将经富集的微泡溶液贮存在-70度或加工用于下游使用 (例如, 蛋白质、RNA和DNA的提取)。

[0351] 为了确定微泡的细胞摄入, 根据制造商的说明使用Vybrant-Dio (Life technology) 标记正常人皮肤成纤维细胞。将正常皮肤成纤维细胞接种在纤维结合蛋白 (Sigma-Aldrich) 涂布的4-孔Nunc*Lab-Tek*II室玻片 (Thermo Fisher Scientific Inc) (5×10^3 细胞/孔) 上。按照制造商的指示使用核染料Hoechst 33342 (Life technology) 将细胞染色。使用从表达GFP的小鼠MSC分离的微泡将DiI标记的成纤维细胞处理24小时。使用倒数IX81奥林巴斯显微镜和ORCA-AG滨松数码相机获取图像。参见图20和图21。重要的是, 这些图像示出了含有GFP的微泡被细胞吸收。

[0352] 实施例14:本发明的微泡作为用于促进或增强伤口愈合的用途

[0353] 使用10mm打孔活检仪在猪背上制造全层伤口。根据实施例1中描述的方法(“常规的”超速离心法)或通过实施例3中描述的方法从使用自体骨髓来源的间充质干细胞条件培养的培养基分离微泡。在受伤的时刻和在第1天和第2天通过局部注射将30微克微泡施用于所述伤口。对照使用盐水处理或使其暴露于空气中愈合。5天之后,使动物安乐死,并检查伤口。

[0354] 图22示出了受伤5天后的伤口的组织学。在第5天,使用根据本发明的方法(即根据实施例3中描述的方法)分离的微泡处理的伤口看起来比盐水对照、空气暴露对照和使用通过超速离心制备的微泡处理的伤口更小。与使用根据本发明的方法制备的微泡处理的伤口和两个对照相比,使用通过超速离心制备的微泡处理的伤口显示出增强的炎症反应。

[0355] 在另一个研究中,使用加热至100℃的黄铜棒在猪背上产生二度烧伤伤口。根据实施例1中描述的方法(“常规的”超速离心法)或通过实施例3中描述的方法从使用自体骨髓来源的间充质干细胞条件培养的培养基分离微泡。在受伤的时刻和在第1天及第2天通过局部注射将30微克微泡施用于所述伤口。对照使用盐水处理或使其暴露于空气中愈合。

[0356] 在实验的过程中(烧伤后长达28天),与使用根据本发明的方法(即,根据实施例3中描述的方法)制备的微泡处理的伤口相比,使用通过超速离心制备的微泡处理的伤口显著更加红肿。参见图23,类似地,使用通过超速离心制备的微泡处理的伤口比盐水对照和空气暴露对照显著更加红肿。使用根据本发明的对照制备的微泡处理的烧伤伤口没有表现出比对照显著更加红肿。

[0357] 图23示出了在受伤后的第7天,使用通过超速离心制备的微泡处理的伤口、根据本发明的方法制备的微泡处理的伤口和空气暴露对照之间的炎症的差异。在显微镜下,在使用通过超速离心制备的微泡处理的全层伤口和烧伤伤口两者中均看到了脓肿形成。使用通过超速离心制备的微泡所注意到的炎症被认为是由于受损的微泡引起的,其可以容易地刺激炎症级联反应。通过包括附加颗粒,本发明的微泡还可以赋予附加益处。

[0358] 图24示出了使用通过本发明的方法分离的微泡处理的烧伤28天后的二度猪烧伤伤口。存在胶原的显著重塑,具有基础物质的外观。这些发现象征着具有III型胶原形成的真皮重塑。还存在真皮表皮诱导,其产生了似乎良好锚定至真皮的加厚表皮。这些发现在疤痕形成中是未观察到的且更符合真皮再生。形成在疤痕上的表皮由于不能良好的锚定至疤痕真皮而容易再次受伤。

[0359] 图25示出了使用盐水处理的烧伤28天后的二度猪烧伤伤口。存在极微的真皮再生,具有扁平的表皮。重要的网脊形成的不足高度地暗示着不充分锚定的表皮。这些发现更加象征着具有持续伤害的风险的疤痕形成。

[0360] 图26示出了使用根据本发明的方法分离的微泡处理的受伤28天后的全层猪伤口。存在神经(由箭头示出)向重塑真皮中的生长,可能是由所施用的微泡所刺激的。神经生长伴随着血管生成反应(圆圈区域)。神经似乎是完善的组织结构,而不是归因于简单轴突出芽。这是一种独特的发现且从未被报道过,并且在对照伤口或使用通过超速离心制备的微泡处理的伤口也未观察到。这些观察高度象征着复杂组织再生,其具有从所有胚层(包括表皮、间质、血管及神经组织)生成成熟元素的能力。那么,这些方法似乎可以广泛适用于治疗许多病况,包括外胚层、内胚层和中胚层来源的组织的外伤、炎症、肿瘤及退化性病症。

[0361] 图27示出了受伤28天后使用通过本发明的方法分离的微泡处理的全层猪伤口。该图在更大的放大倍率下示出了图26中所描述的观察内容。在A)中,神经生长似乎跟随着与血管生成反应有关的路径。这一发现使人感兴趣,因为众所周知,神经生长在胚胎发育中追随血管生成。再次,这些发现象征着组织再生。B)示出了处于更高能力(higher power)下的神经。C)更好地示出了与神经生长邻近的血管生成。

[0362] 在猪全层伤口模型中的全部治疗组(对照和微泡治疗的)中均看到了骨形成。参见图28。动物接受总计1.44mg微泡(一半根据本发明的方法制备的和一半通过超速离心制备的)。此后,似乎存在刺激骨在所有伤口中形成的全身效果。骨形成倾向于更多地发生在更多的炎症伤口中,表明了局部炎症介质的协同效应和微泡的全身效应。

[0363] 实施例15:本发明的微泡作为用于重新填充骨髓和重新生成复杂结构的疗法的用途

[0364] 使用两个循环的400cGy γ 射线对C57/CJ6(GFP⁻)进行致死剂量照射以消融其宿主骨髓祖细胞。在照射之后,使用烧蚀分数钬:YAG激光器在约2cm²面积中处理所述小鼠。在激光处理之后,将一塑料室附着于皮肤,并且向室中加入获自于同系基因GFP⁺转基因小鼠的骨骼来源的细胞。所述GFP⁺骨髓细胞包括新收获的全骨髓细胞、沿袭阴性选定的骨髓细胞、间充质干细胞和骨髓完全培养细胞(如本申请中所描述的)。在施用细胞后的4~6周,通过循环GFP⁺细胞检测,仅有少数动物能够实现嵌合状态。参见图29。惊奇地,许多动物都存活了,没有供体骨髓移植的迹象。总共30%的接收细胞的动物存活了下来(在所有给予细胞的组中)。在不同的组之间,接受沿袭阴性选择的细胞(45%)以及新骨髓细胞(30%)的动物的存活率最高。没有接受细胞的对照照射动物具有100%的死亡率。细胞因子都没有类似地营救类似致死剂量照射的动物并且在这些存活的动物中均不能展示功能供体骨髓的植入。由递送的细胞分泌的微泡可能担负着宿主骨髓的恢复,从而导致了这些动物的存活。我们已经证明,新鲜骨髓(其包括沿袭阴性细胞)和间充质干细胞产生了可以实现这种效果的充足量的微泡。

[0365] 在另一个研究中,使用两个循环的400cGy γ 射线对C57/CJ6(GFP⁻)进行致死剂量照射以抑制它们的毛发生长和部分消融它们的骨髓。在照射之后,剃光小鼠的背部并且使用烧蚀分数钬:YAG激光器在约2cm²面积中处理所述小鼠。在激光处理之后,将一塑料室附着于皮肤,并且向室中加入获自于同系基因GFP⁺转基因小鼠的骨髓来源的细胞。所述GFP⁺骨髓细胞包括新收获的全骨髓细胞、沿袭阴性选定的骨髓细胞、间充质干细胞和骨髓完全培养细胞(如本申请中所描述的)。在施用细胞后的4~6周,通过循环GFP⁺细胞检测,在动物中不能够实现嵌合状态。参见图30。接受单独的激光处理的动物从不具有到具有非常微少的短粗硬的毛发生长。图30(A)。在给予骨髓细胞的动物中,存在显著、长期持续的毛发生长。图30(A和B)。这些发现在使用GFP⁺沿袭阴性选定的细胞和全新GFP⁺骨髓细胞处理的小鼠中是最惊人的。在2周内可以检测到毛发生长并且持续生长数月。在新毛发生长区域中进行皮肤切片检查,但未检测到GFP⁺细胞。通过FACS分析在任何动物中也均不能检测到骨髓细胞的功能植入。图30(C)。如同图29中的例子,已经证明,细胞因子在恢复毛发生长中没有这种效果。由所递送的细胞分泌的微泡可能是刺激毛发生长的原因。

[0366] 实施例16:本发明的微泡用于促进或刺激血管生成以及用于促进或刺激成纤维细胞增殖的用途

[0367] 骨髓穿刺液微泡的分离:从Allcells, Inc. (Alameda, CA) 获得约25ml新鲜全骨髓。将骨髓小心地置于新的50ml锥形离心管中并且在室温下在400x g下离心30分钟。小心地取出上清液(约15ml)并且置于新的50ml锥形离心管(Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL)中并且在4℃下在2000x g下离心30分钟。再次小心地取出上清液并且置于新的50ml锥形离心管中,向其中以1:10(骨髓上清液比培养基)的比率加入无菌的 α -最低必需培养基(α -MEM) (Mediatech Inc., Manassas, VA)。向这种溶液中,以8.5w/v%加入无核糖核酸酶和蛋白酶的聚乙二醇(平均分子量6000) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) 以及氯化钠(最终浓度0.4M)。将所述溶液置于4℃的冷室中摇动过夜。将所述溶液在4℃在10000x g下离心30分钟。倾析出上清液并且将富集了微泡的丸粒再悬浮于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。将所述富集了微泡的溶液转移至amicon超-15离心过滤单元(标称分子量100kDa) (Millipore, Billerica, MA)中并且在5000x g下离心30分钟。使用磷酸盐缓冲盐水洗涤所述过滤单元并且再次在5000x g下离心30分钟。从过滤装置的底部回收经浓缩的样品(约200-400 μ l)。

[0368] 血管生成测定:使用内皮管道形成测定法(Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY) 测量血管生成。在75-cm²组织培养瓶中,将冻存的原代人脐静脉内皮细胞(HUVEC) (Invitrogen Life Technologies) 在补充有2%低血清生长补充的培养基200PRF(Invitrogen Life Technologies) 中生长6天。然后以 3×10^4 的密度将细胞接种于含有不存在补充的培养基的24孔组织培养板中。随后使用骨髓微泡(约100 μ g) 处理HUVEC细胞。将PBS用作赋形剂对照。在37℃和5%CO₂下将经处理的细胞培养6小时。将2 μ g/ml浓度的Calcein AM荧光染料用于可视化表示管形成。使用倒转IX81奥林巴斯显微镜(Olympus America, Center Valley, PA) 获得荧光图像。与赋形剂(PBS) 对照相比,骨髓MV显示出显著的管形成能力(参见图31)。

[0369] 生长测定:将正常成年成纤维细胞接种于24-孔板(10000细胞/孔)的生长培养基(5%FBS、1%谷氨酰胺、1%青霉素/链霉素)中以用于测定。在过夜培养之后,随机选定三孔并且使用NucBlue Live ReadyProbes Reagent(Invitrogen Life technologies) 进行染色(第0天)。使用EVOS FL自动细胞成像系统(Invitrogen Life technologies) 获取荧光图像。使用含有骨髓来源的微泡(约100 μ g) 或PBS(赋形剂对照) 再喂养成纤维细胞并且在三天后(第3天) 染色和成像。骨髓来源的微泡处理的成纤维细胞在数量上增加了约三倍(与第0天相比) 并且比率显著大于对照(图32, 面板A和图32, 面板B)。

[0370] 尽管上文通过参照实施例和优选的实施方式阐明了本发明的各个方面,但可以理解的是,本发明的范围不受前述说明的界定,而是由根据专利法原则适当解释的下列权利要求来界定。

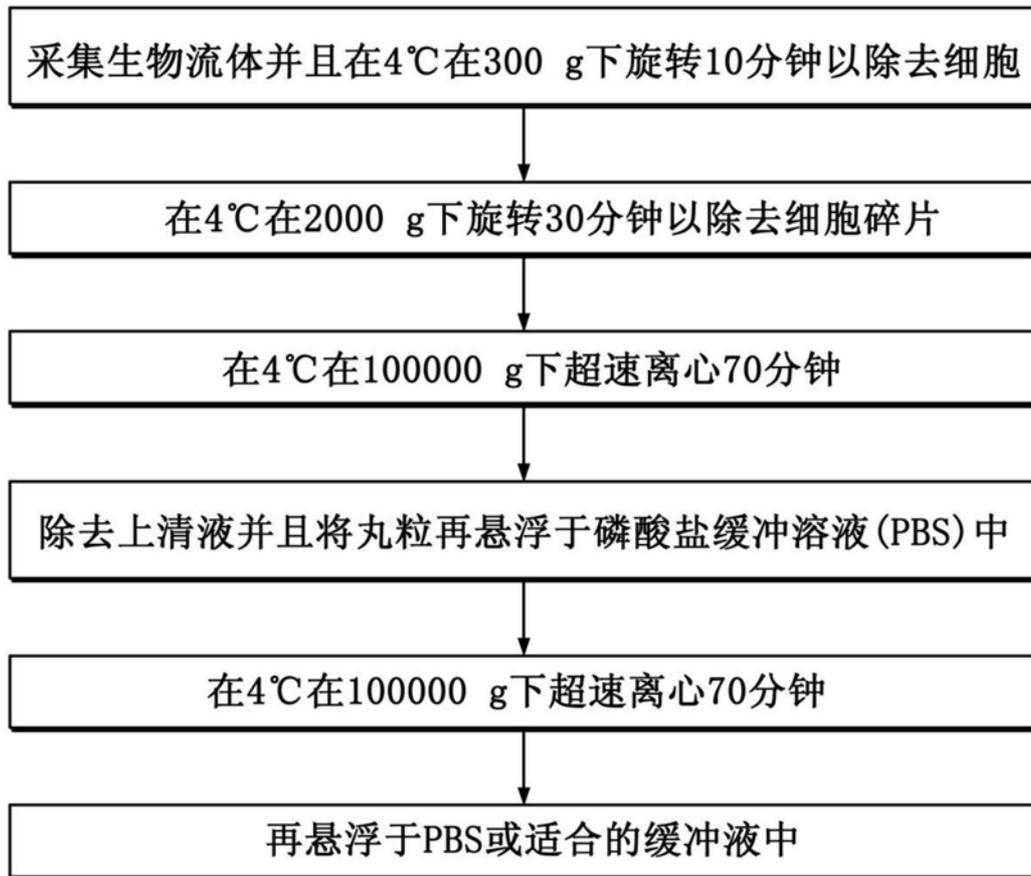


图1

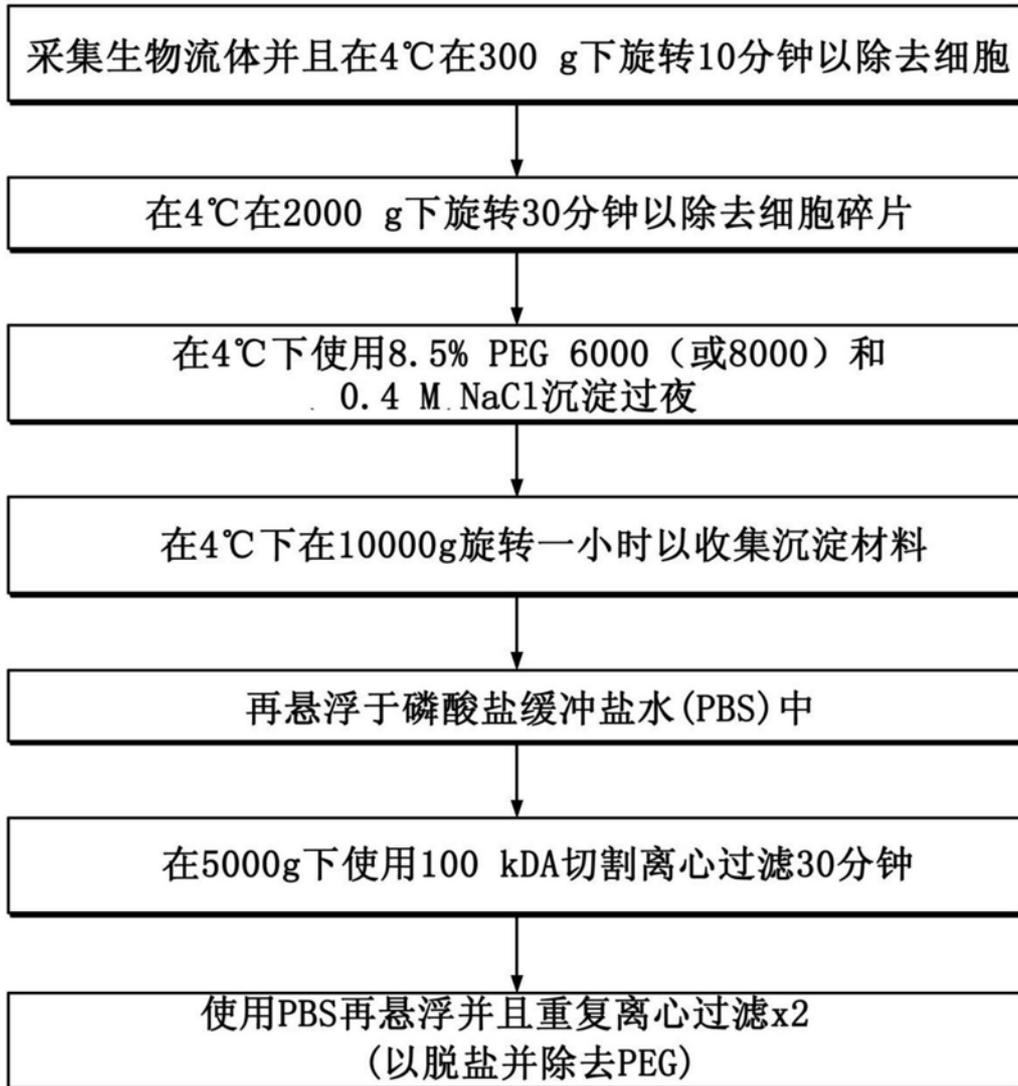


图2

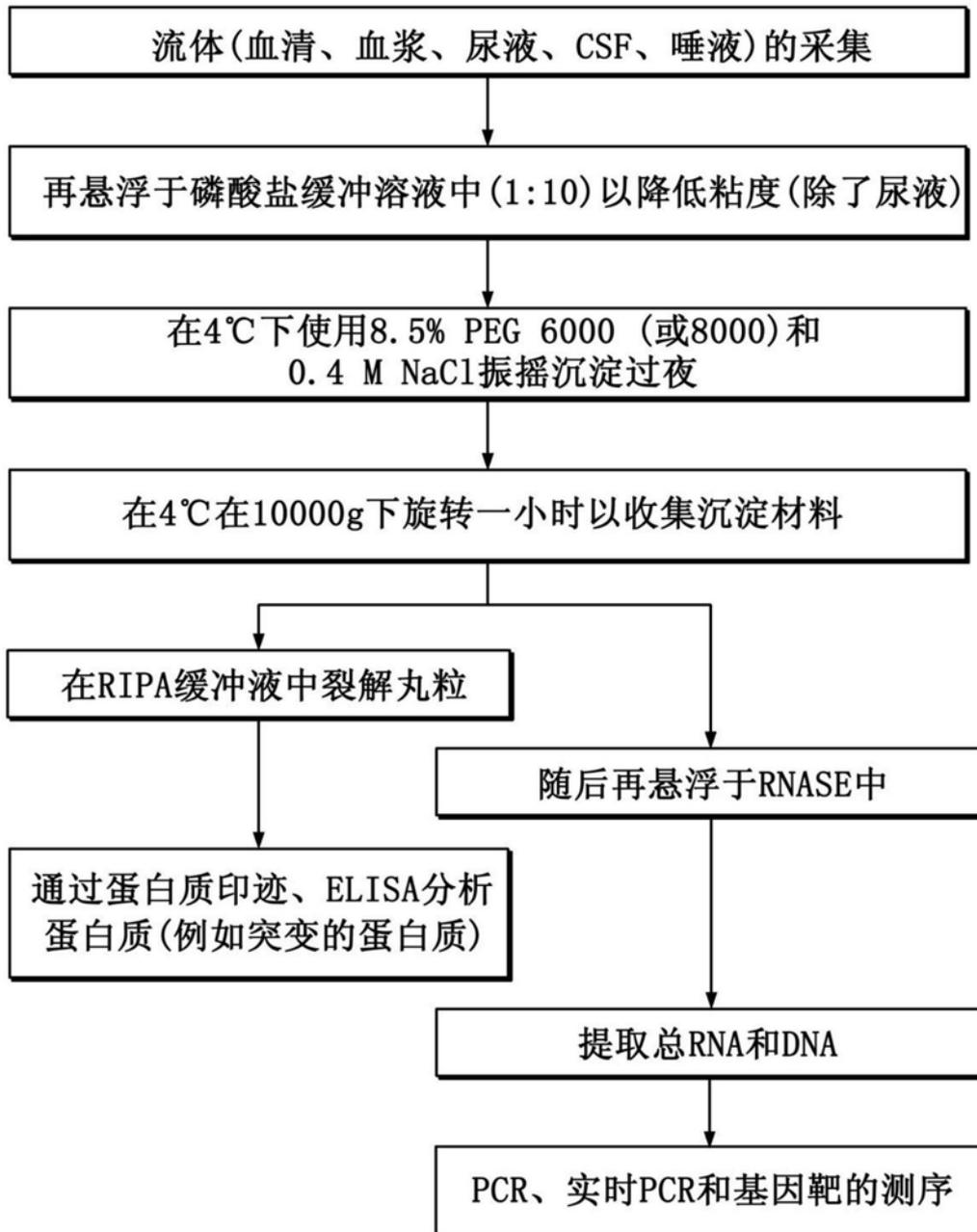


图3

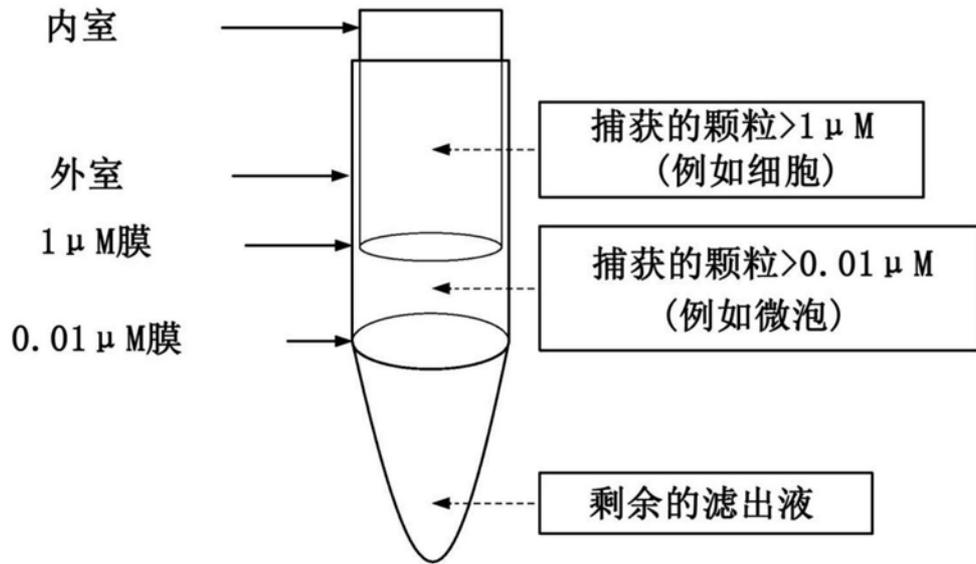


图4

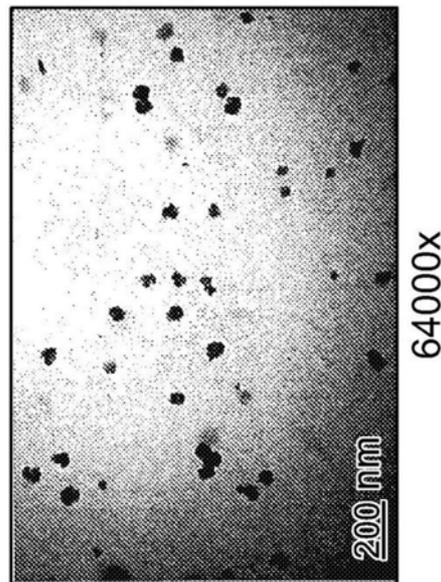


图5A

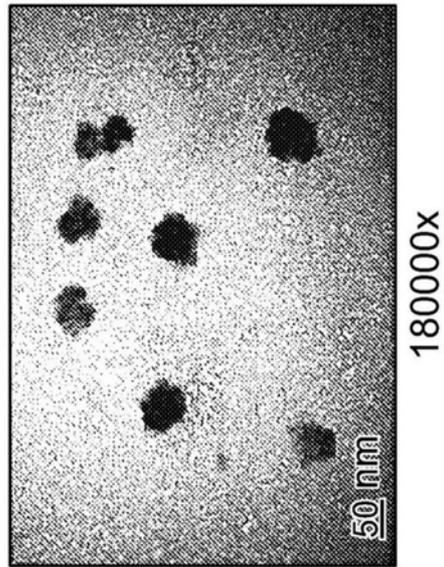


图5B

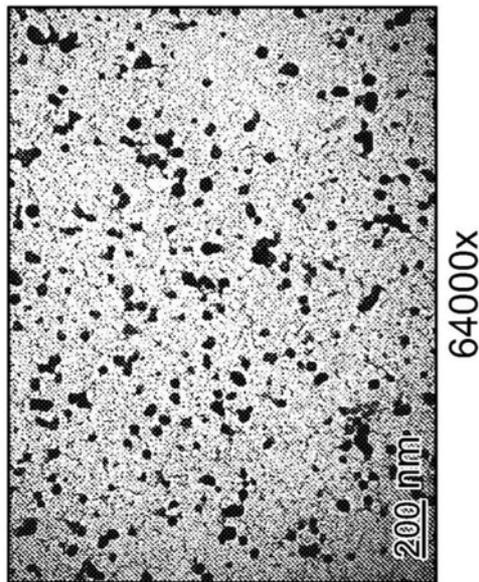


图5C

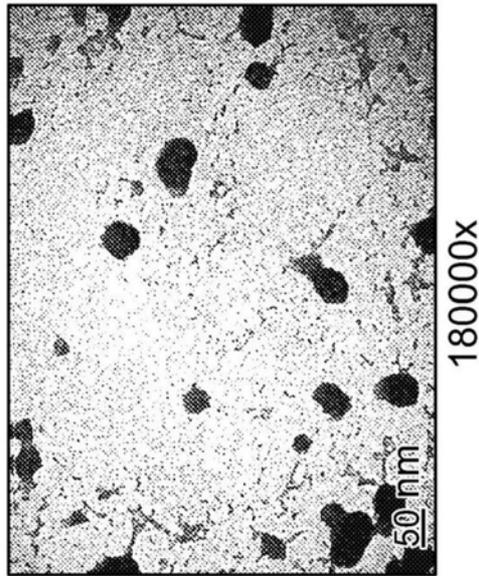


图5D

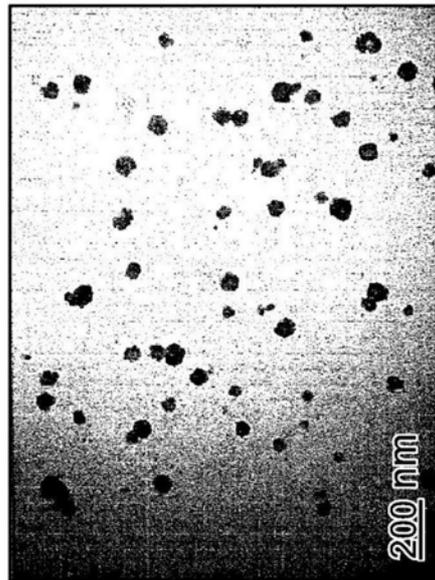


图6A

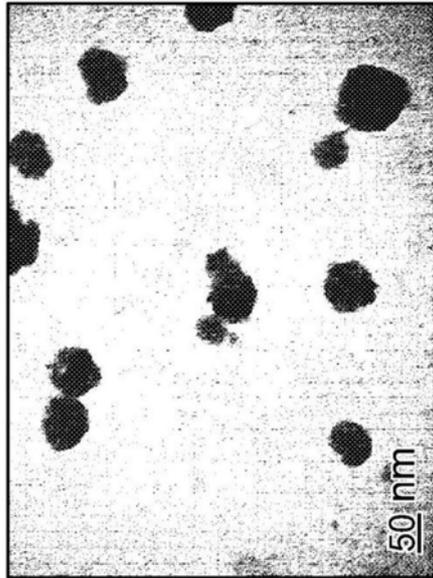


图6B

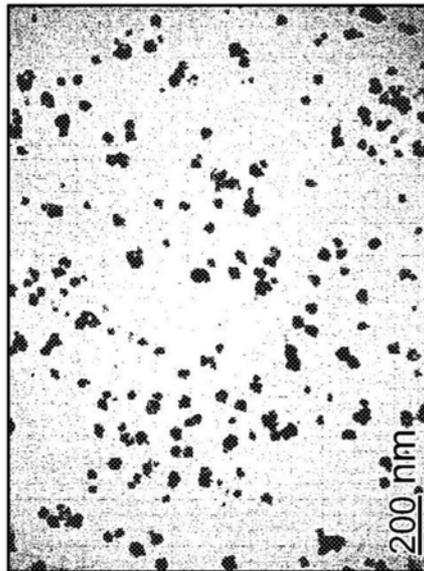


图6C

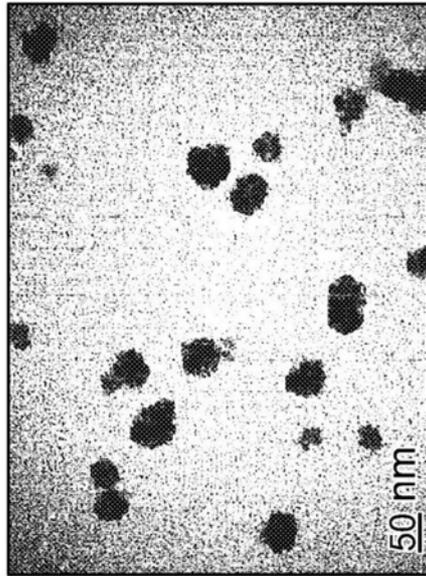


图6D

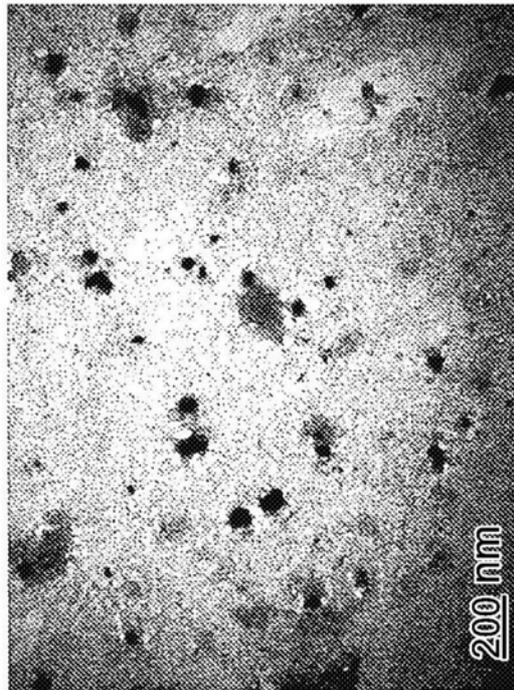


图7A

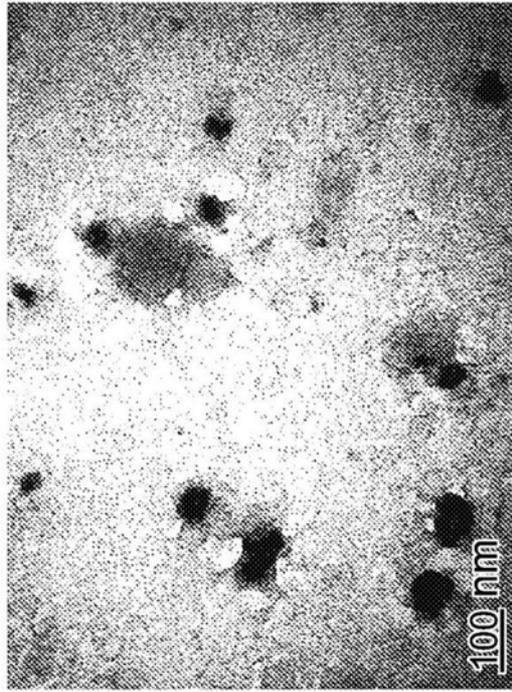


图7B

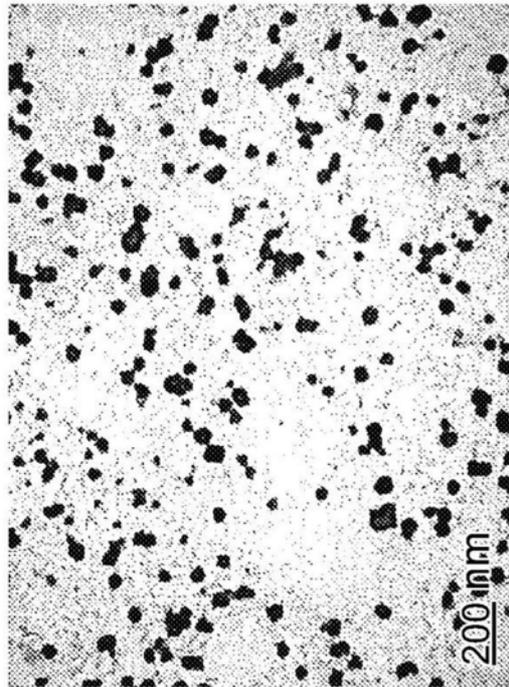


图7C

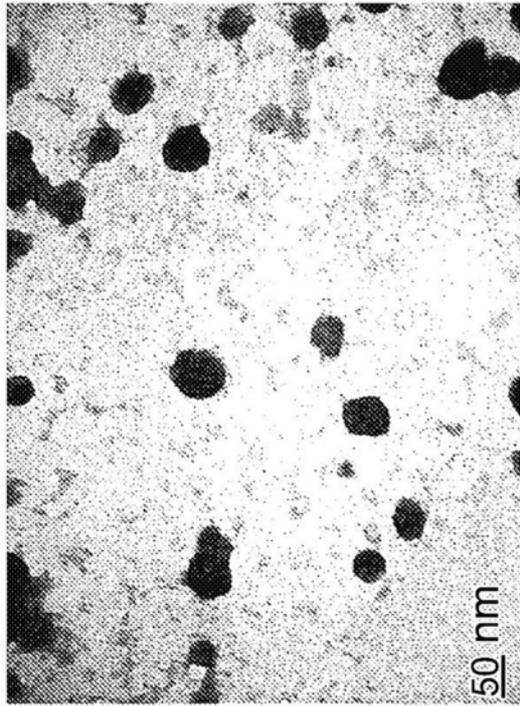


图7D

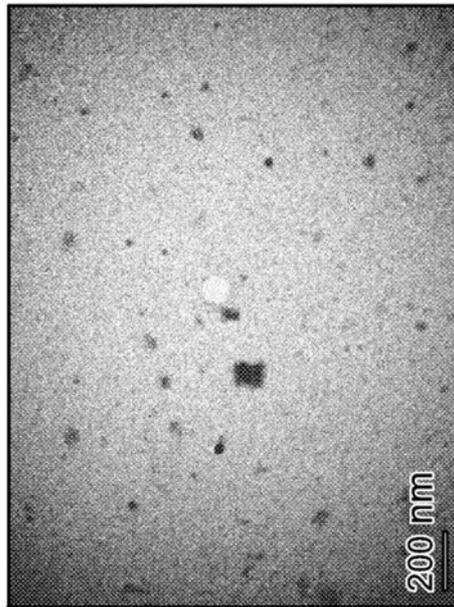


图8A

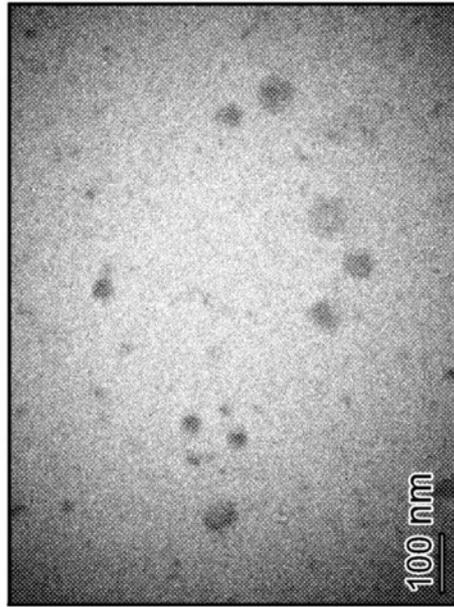


图8B

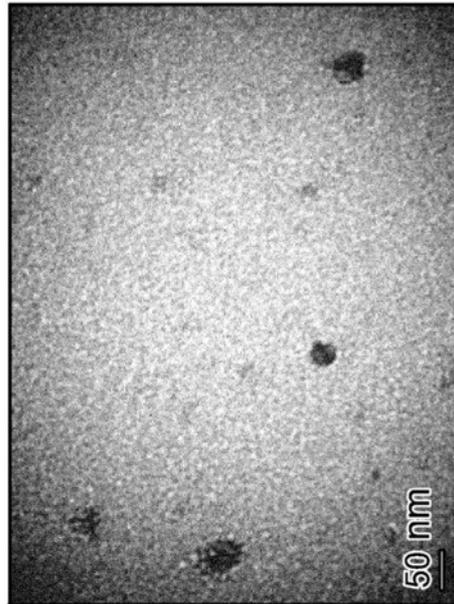


图8C

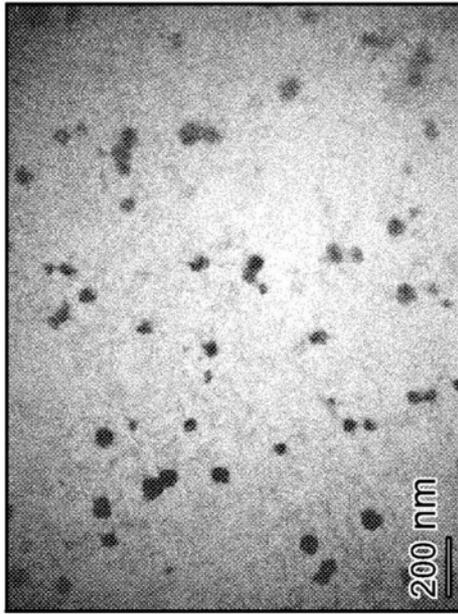


图9A

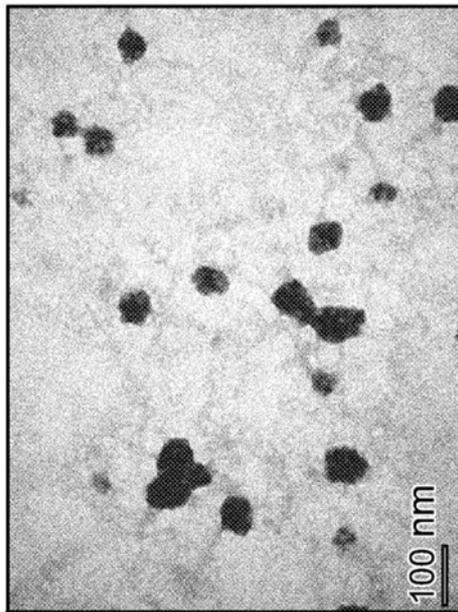


图9B

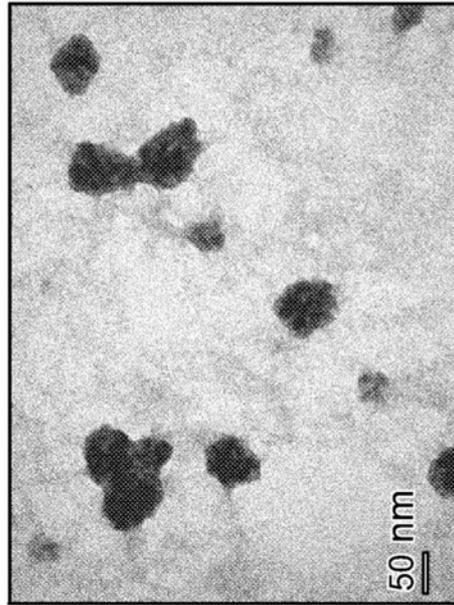


图9C

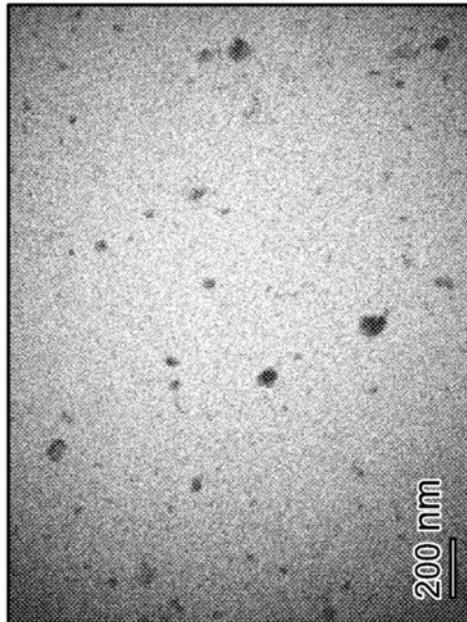


图10A

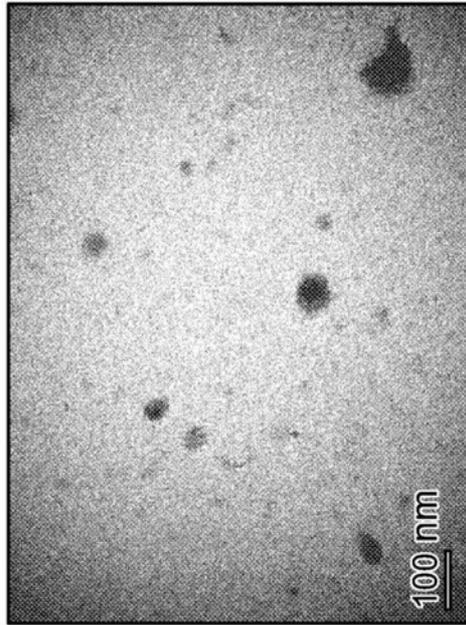


图10B

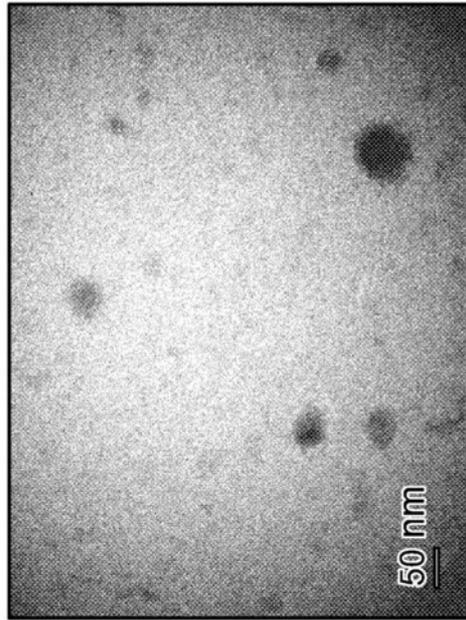


图10C

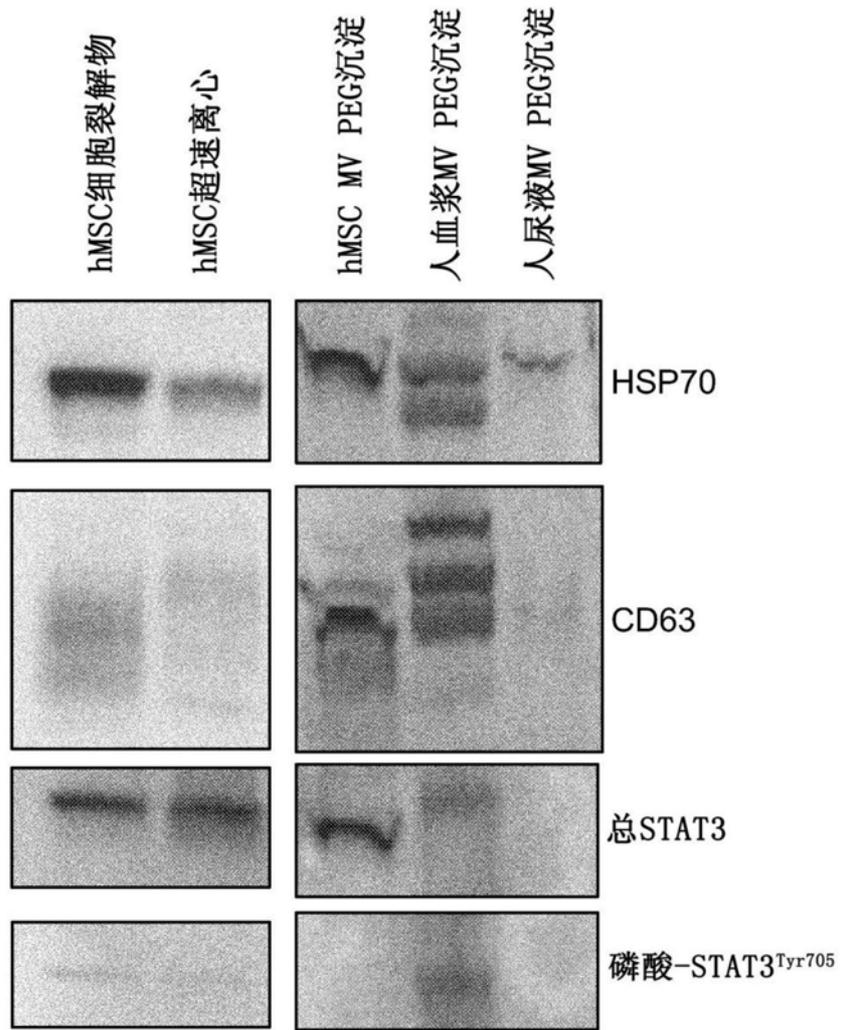


图11

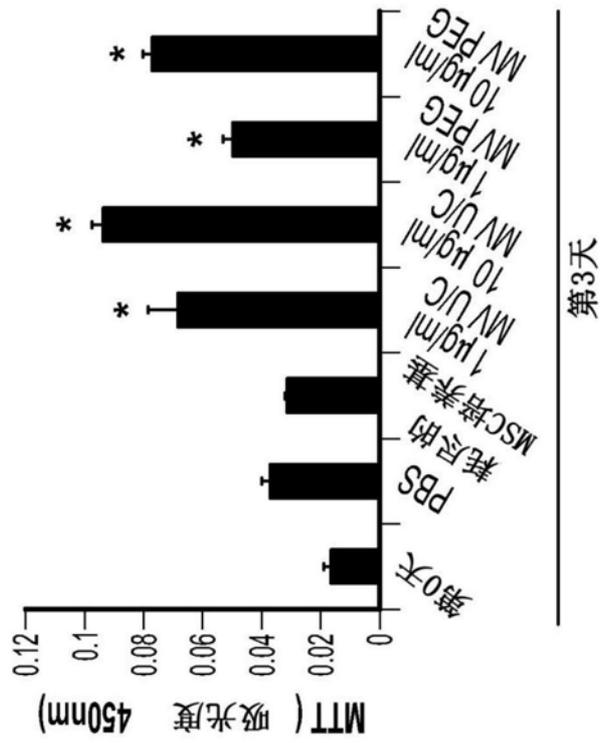


图12A

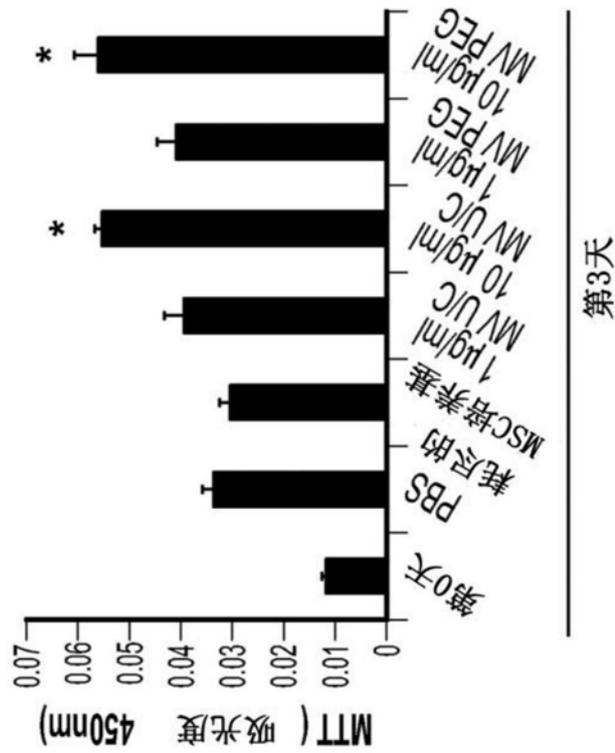


图12B

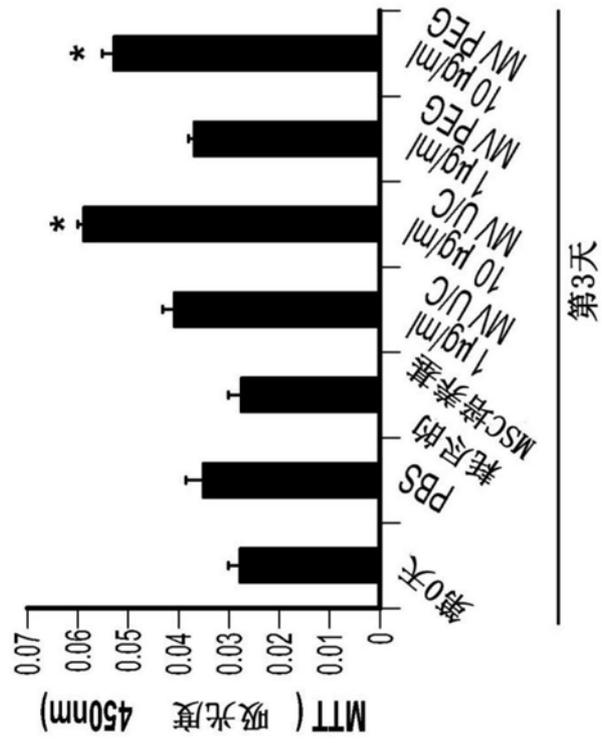
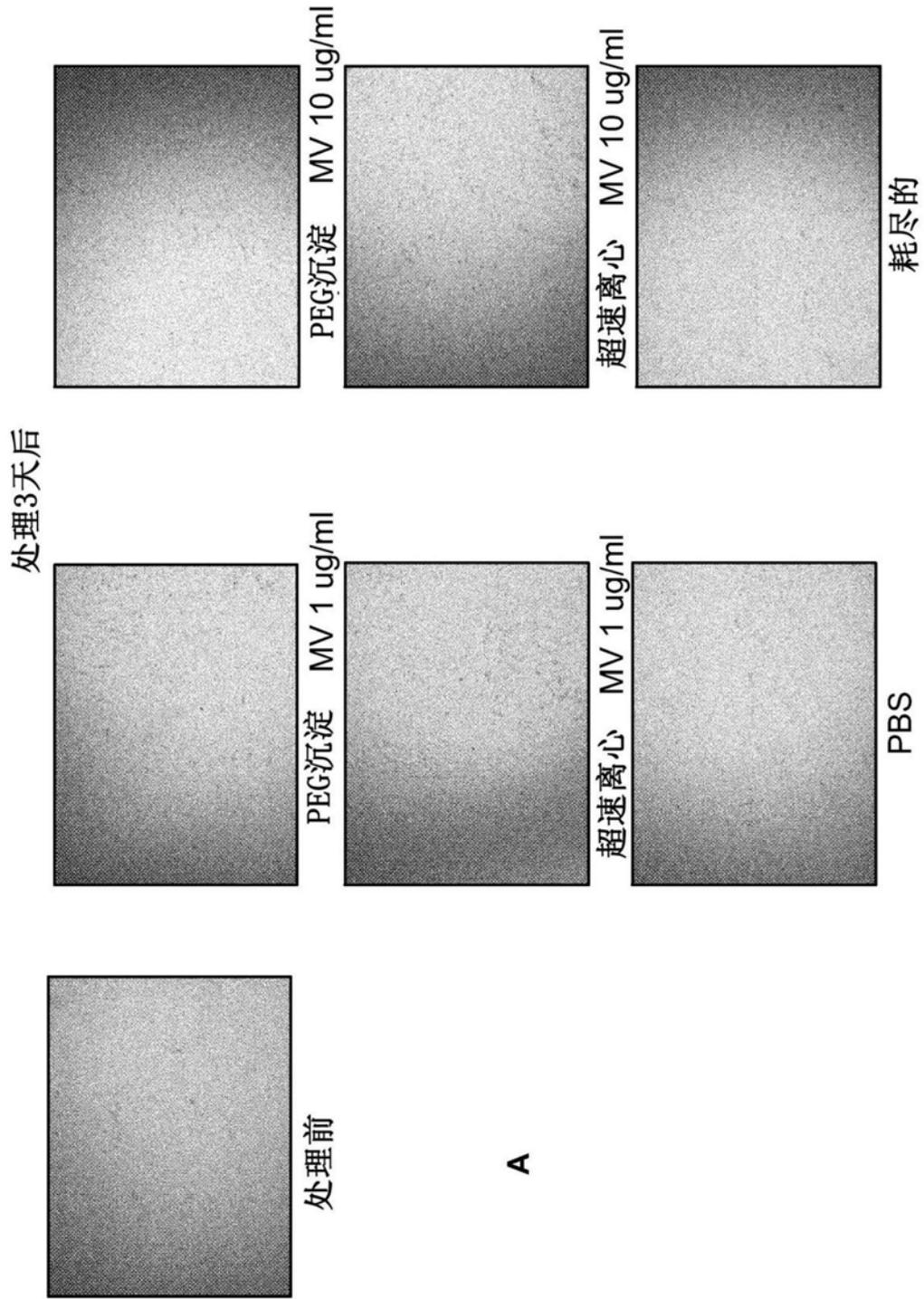


图12C



A

图13

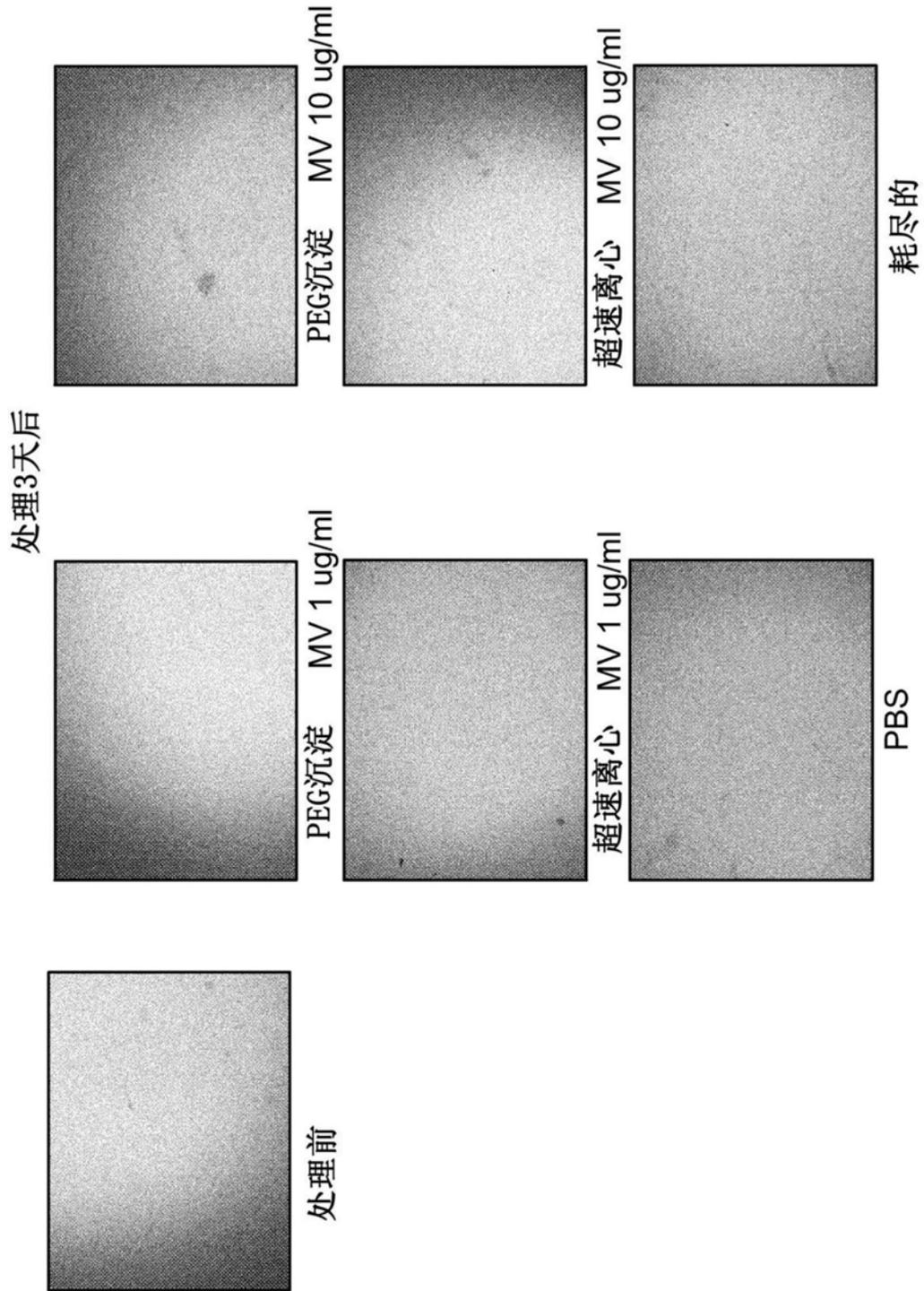


图14

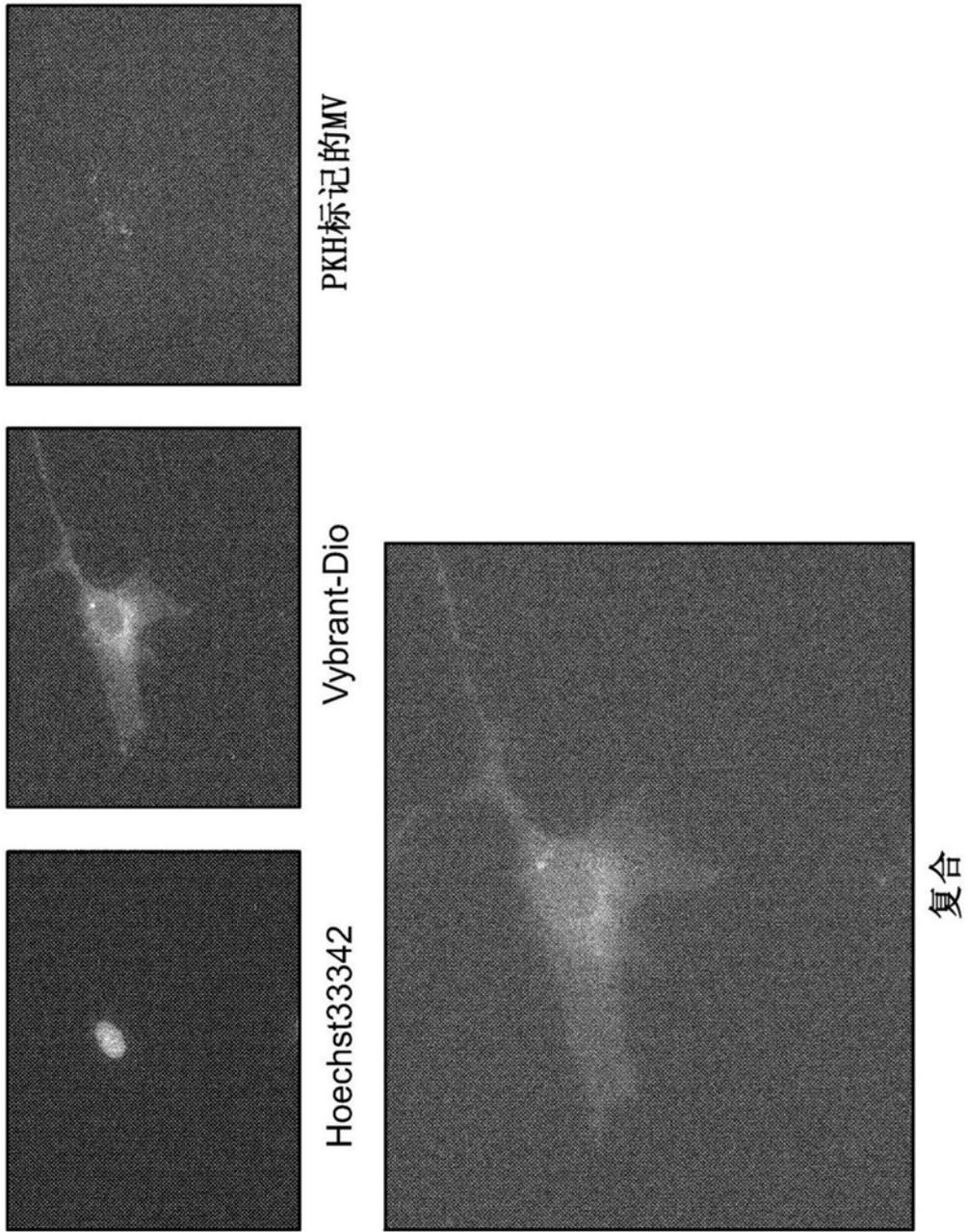


图15

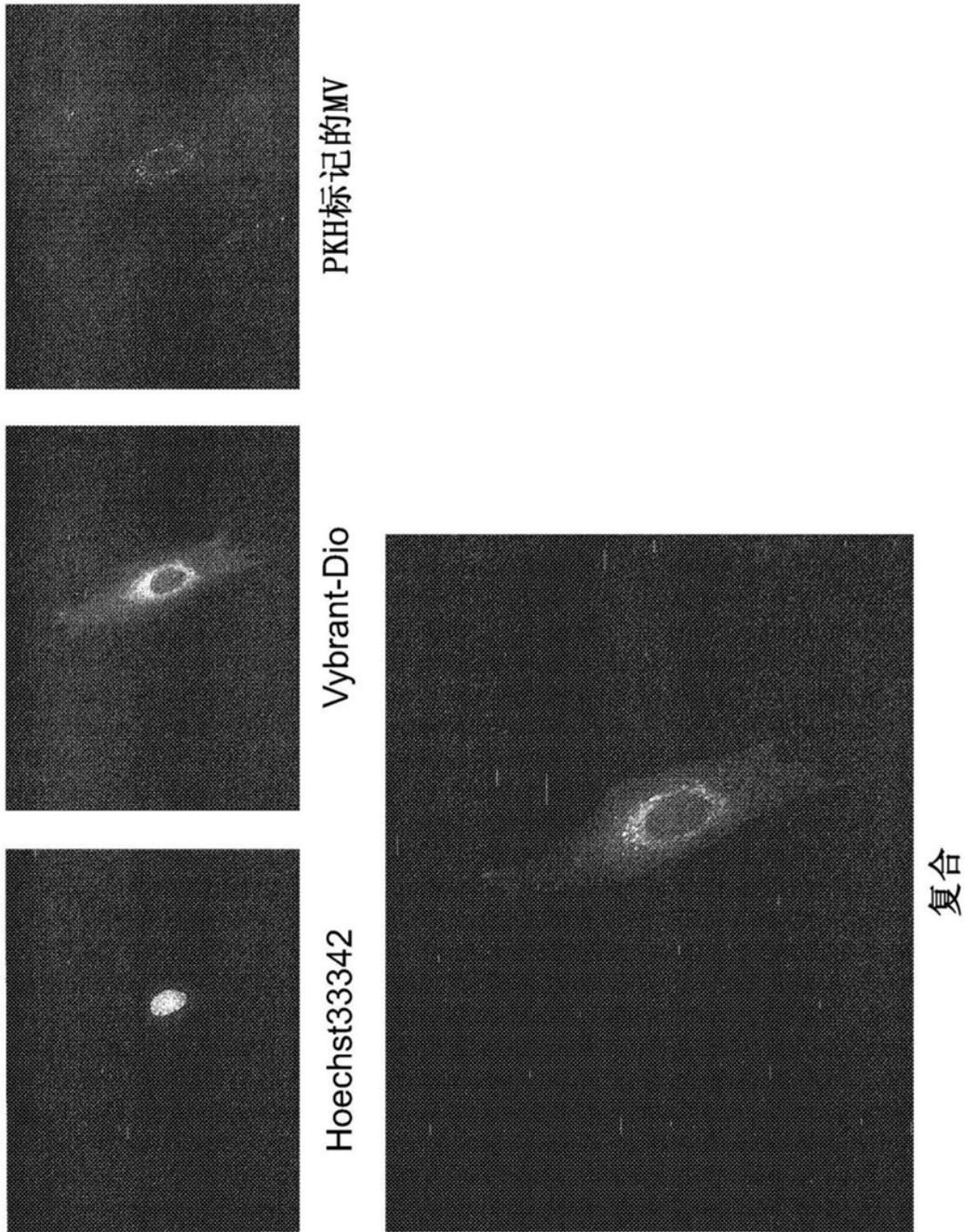


图16

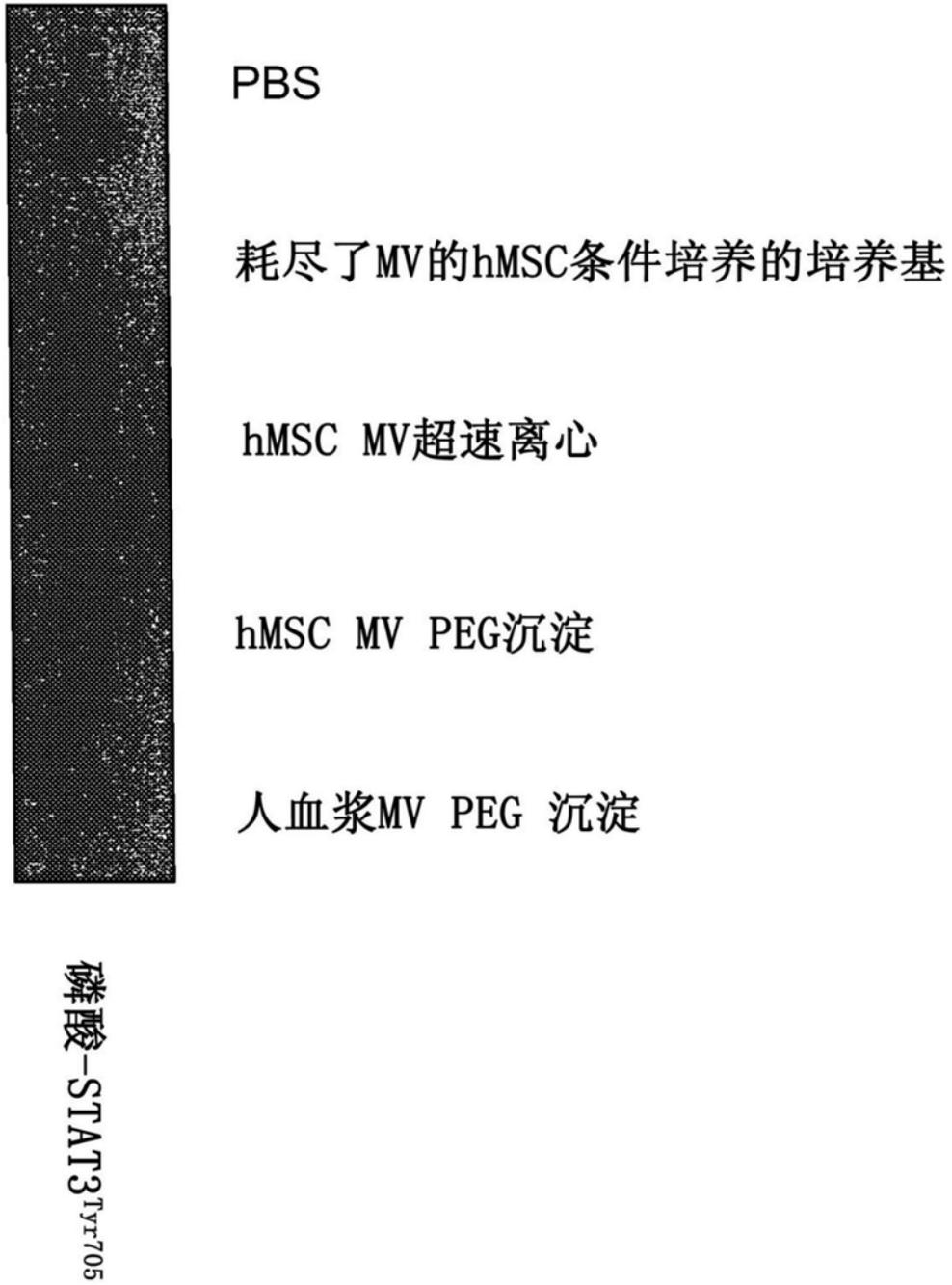


图17

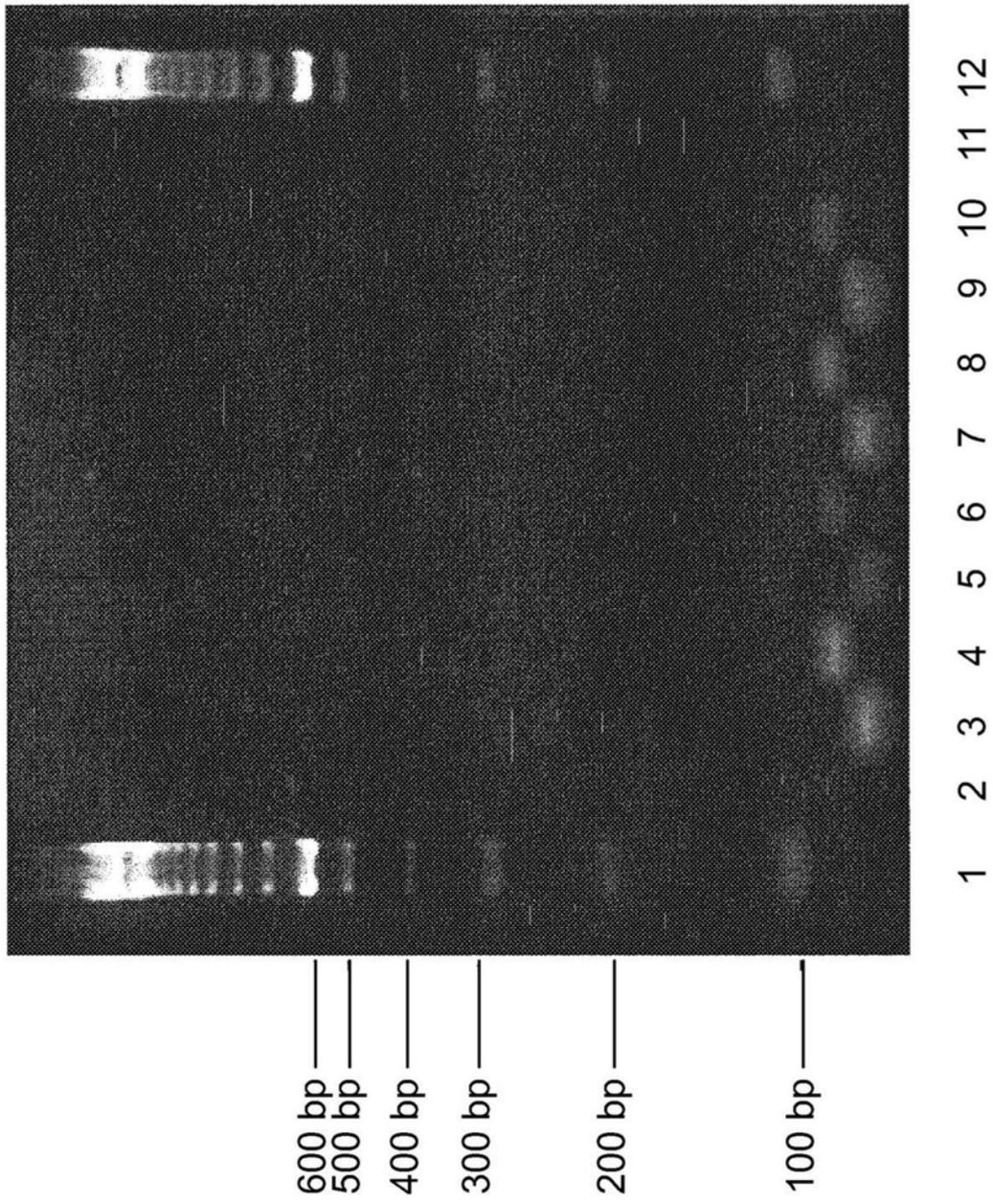
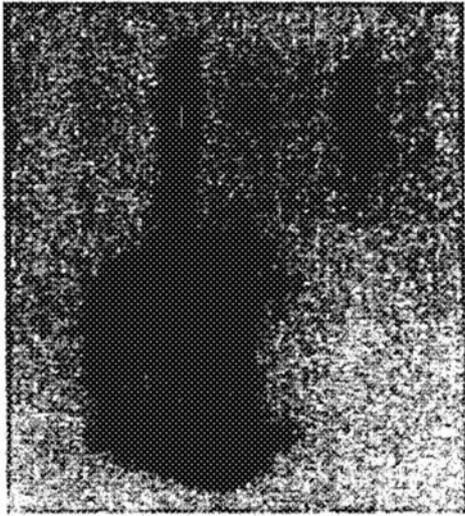


图18



SK-MEL28细胞裂解物

SK-MEL28 MV裂解物

BRAF V600E

图19

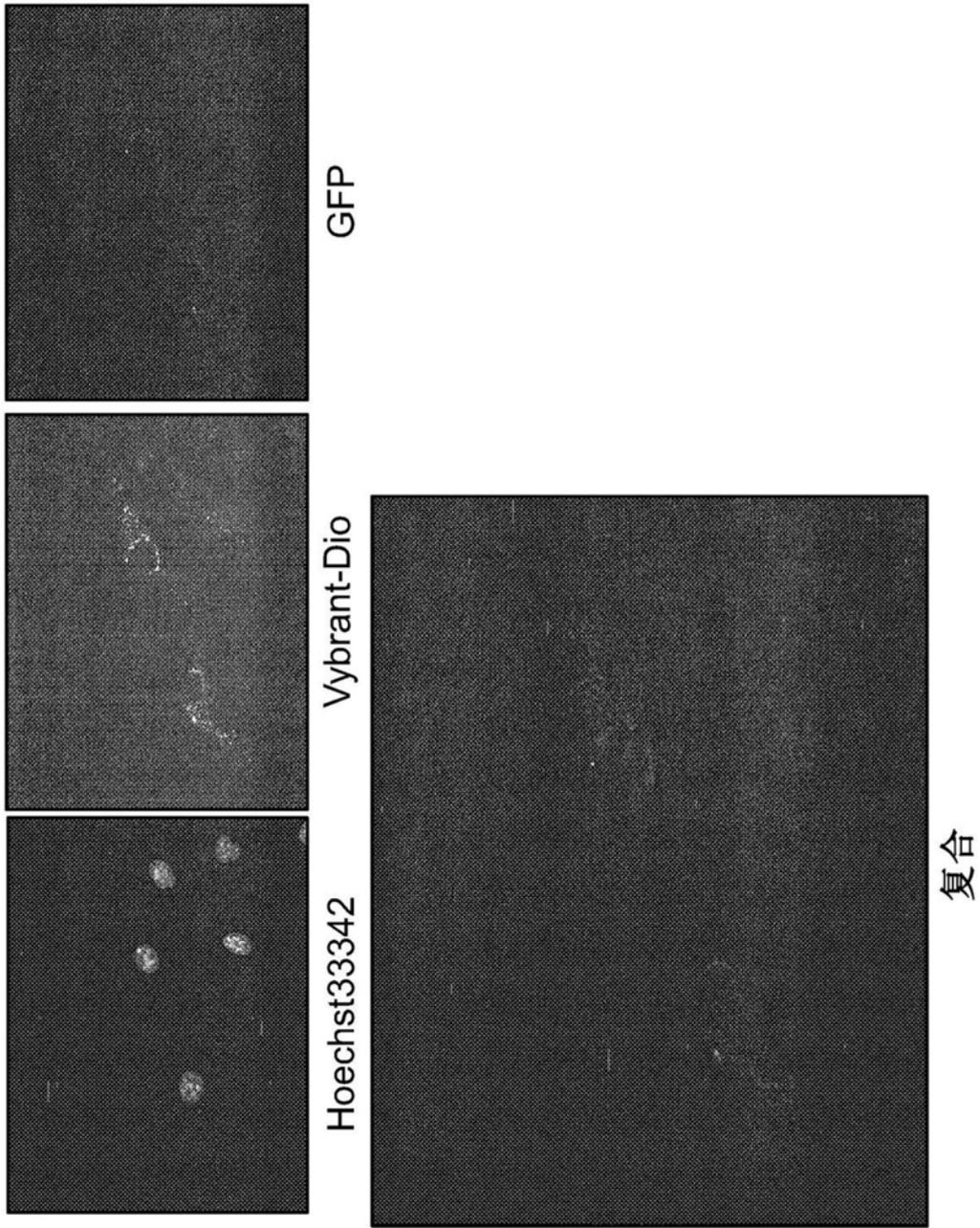


图20

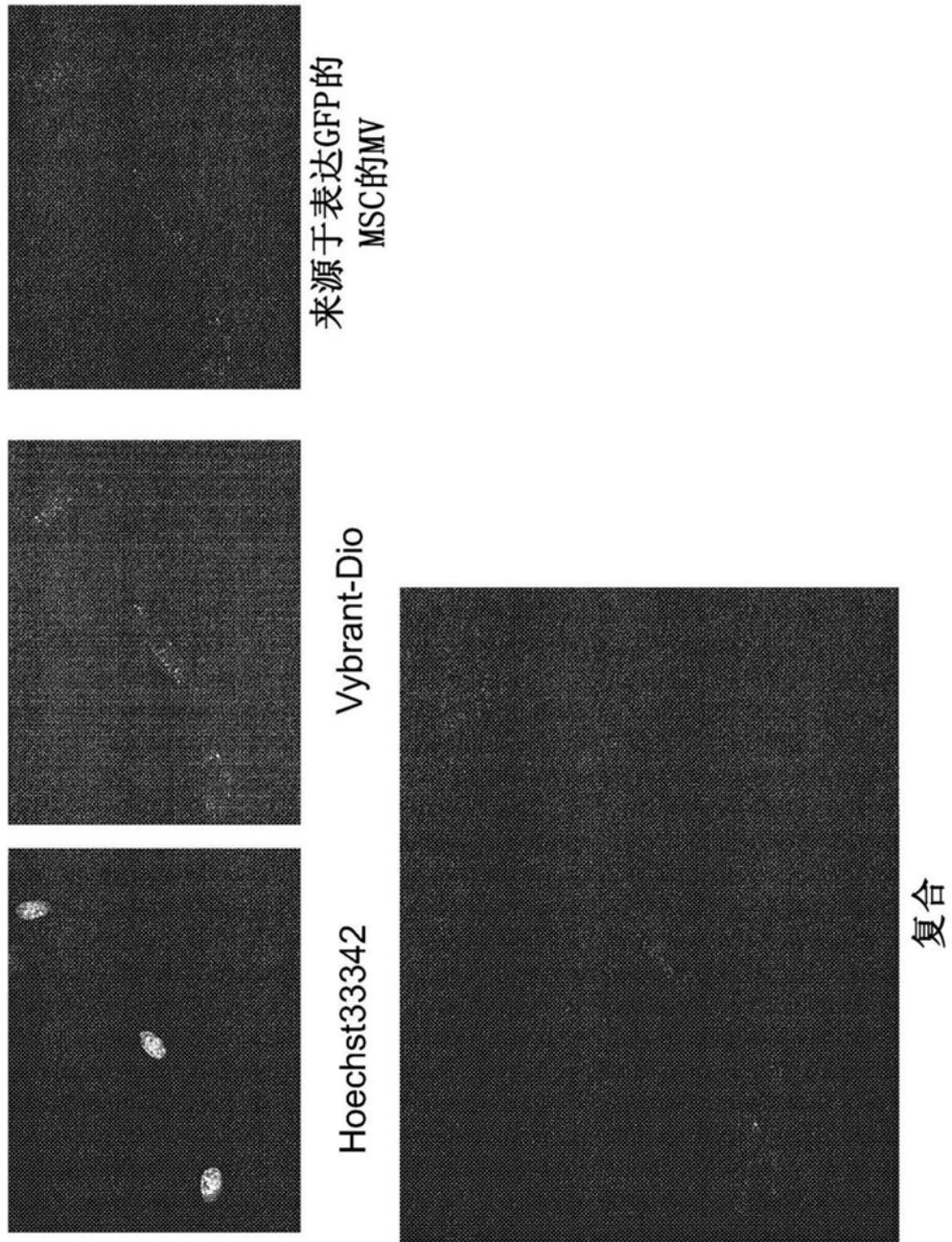


图21



图22A



图22B

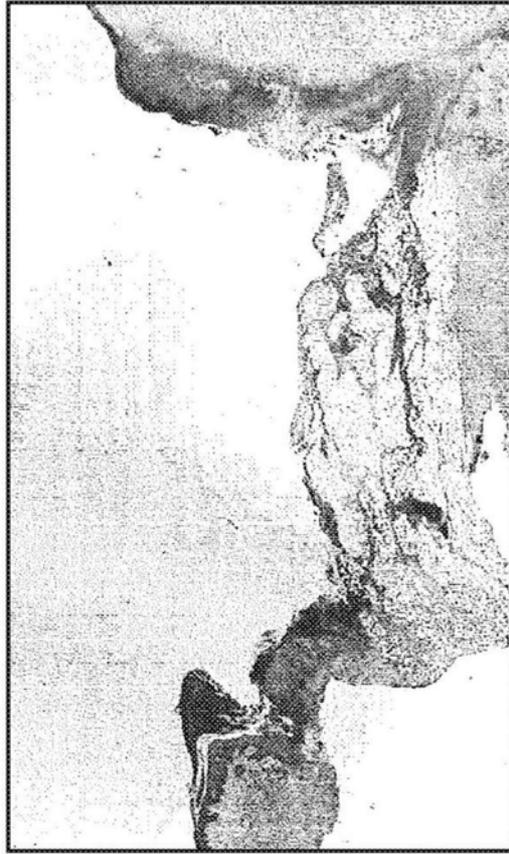


图22C



图22D

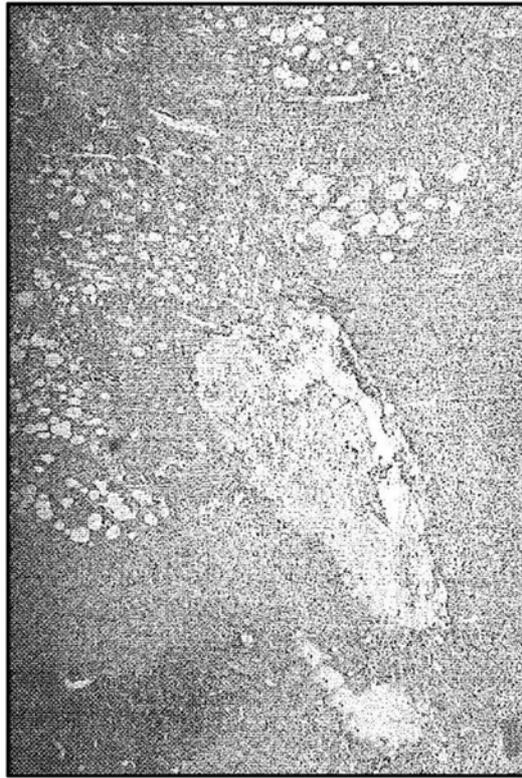


图23A

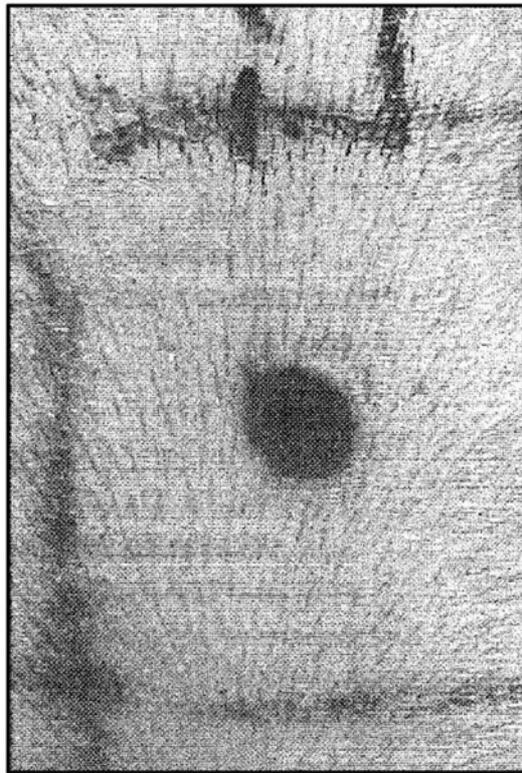


图23B

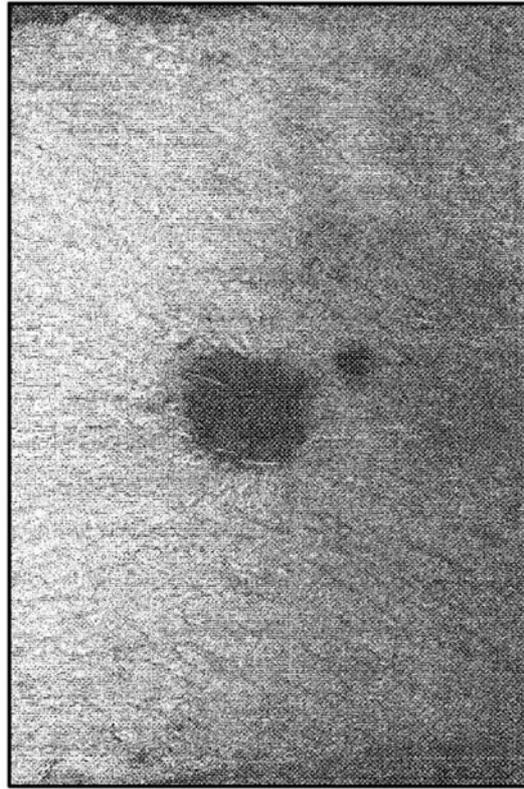


图23C

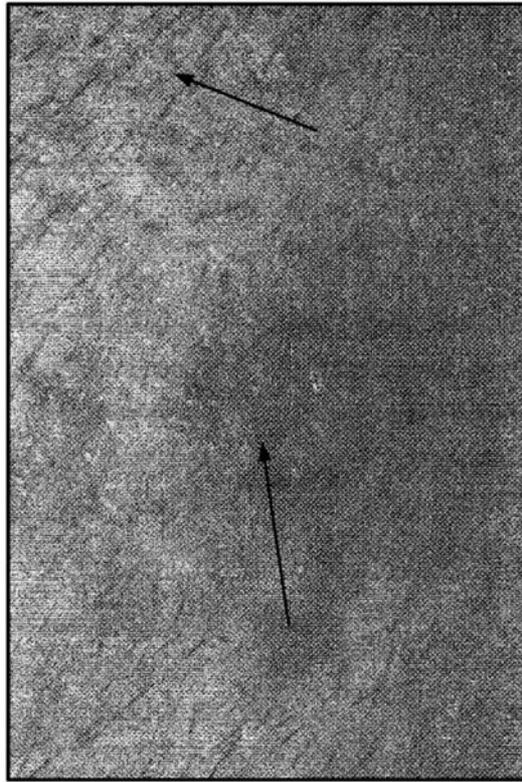


图23D

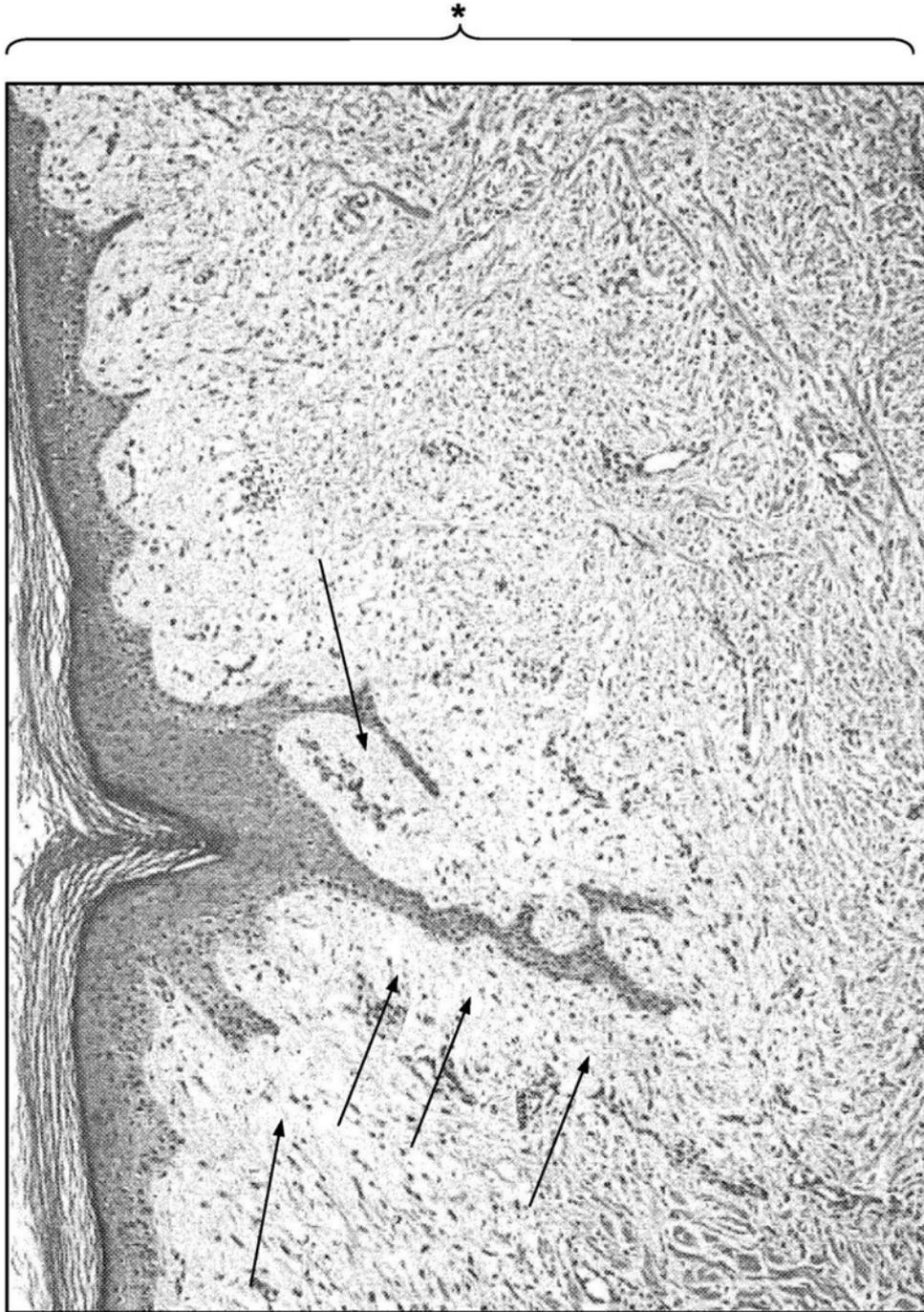


图24

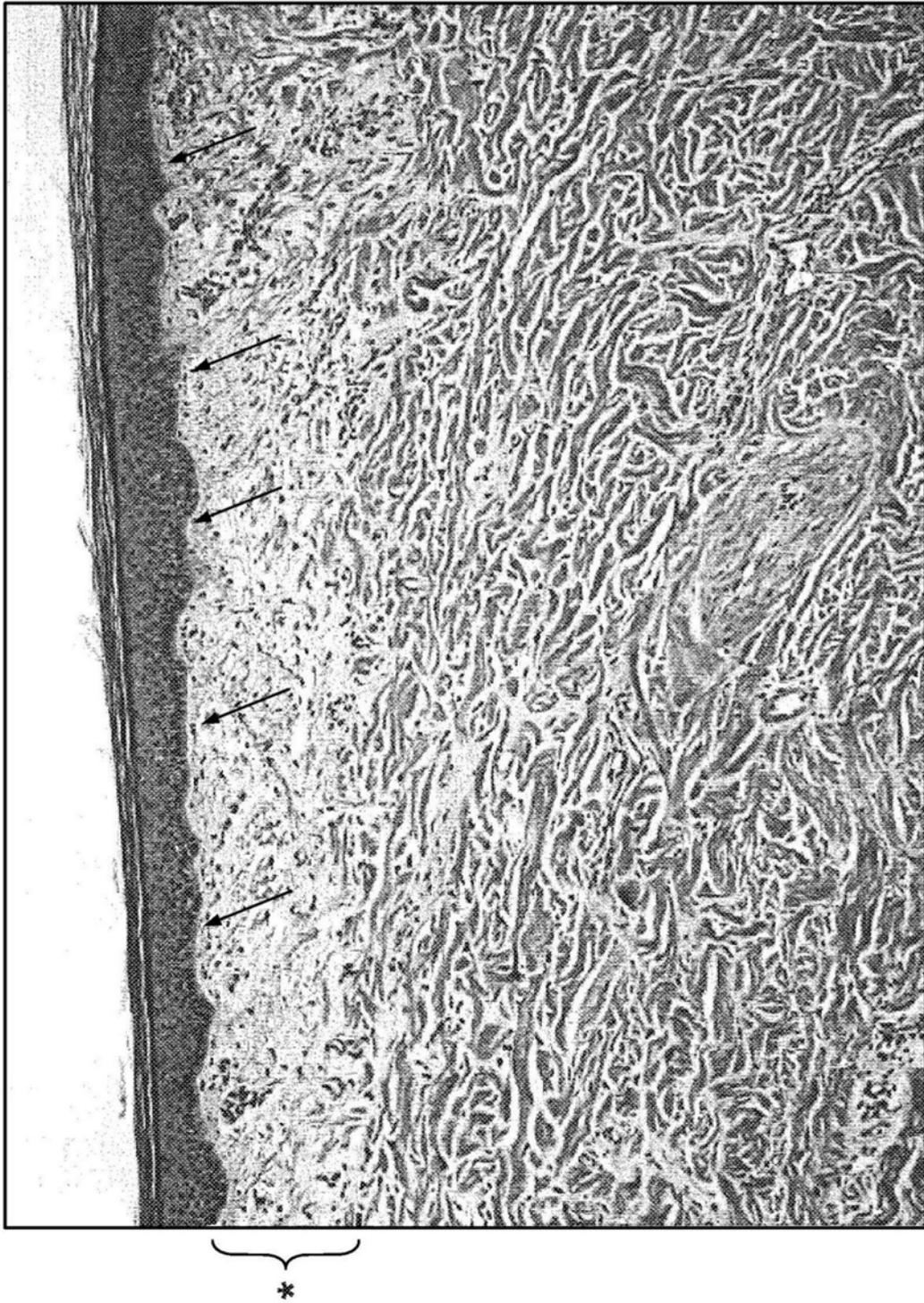


图25



图5：使用由我们的方法制备的MV处理的在第28天的全层伤口 (12.5X)
箭头示出了新神经向重塑伤口中的生长。
神经生长与血管生成相关—突出显示在画圈的区域中
这些发现高度象征着组织再生
这从未被观察到
在对照或超速离心的MV处理的伤口中未观察到

图26

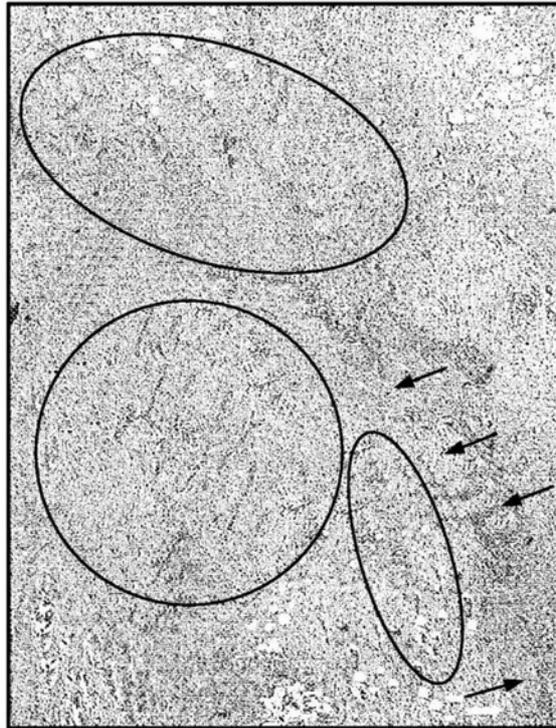


图27A

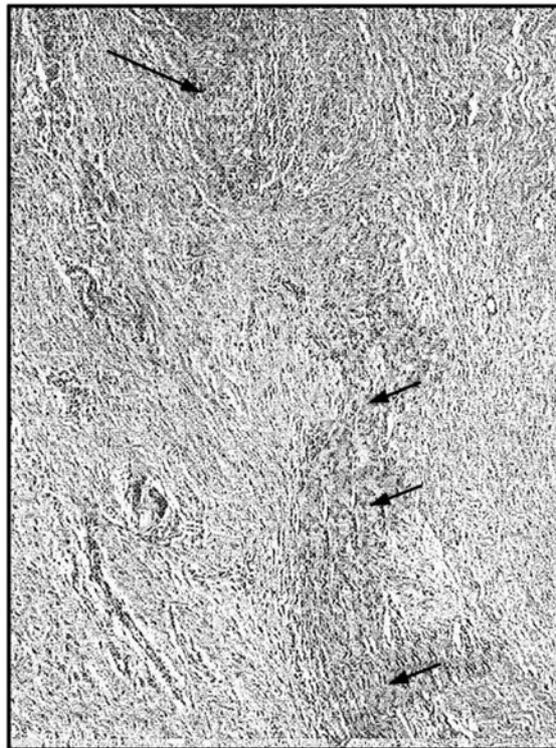


图27B

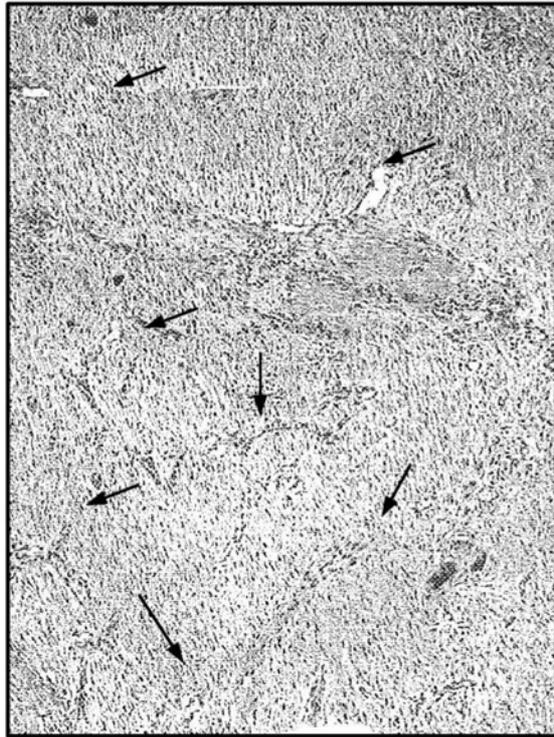


图27C

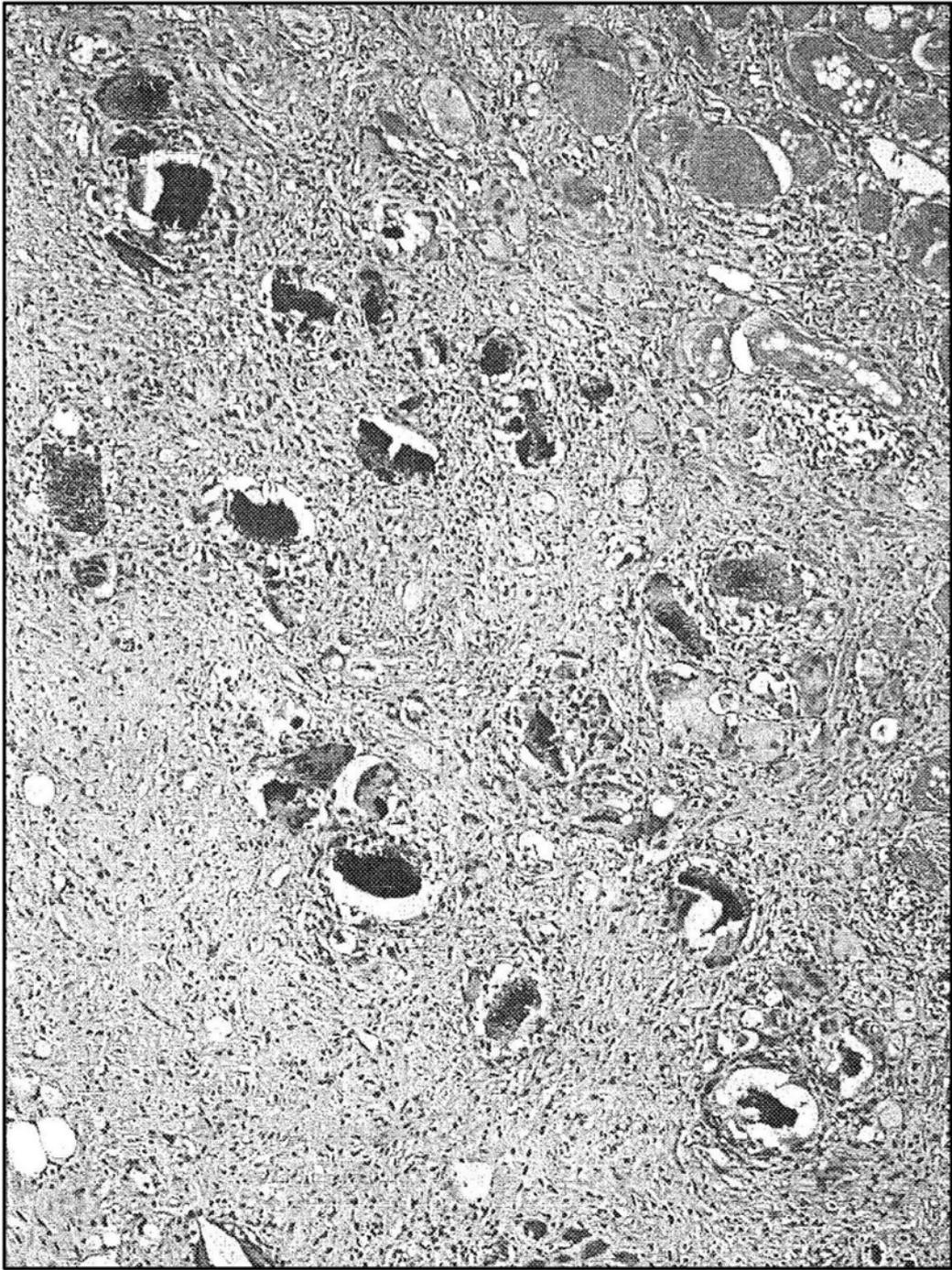


图28

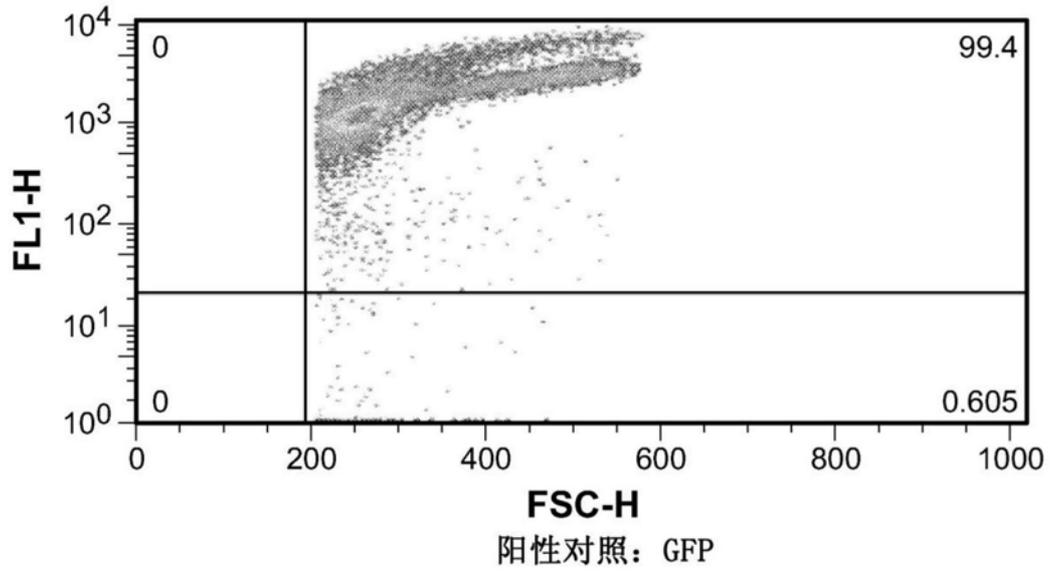


图29A

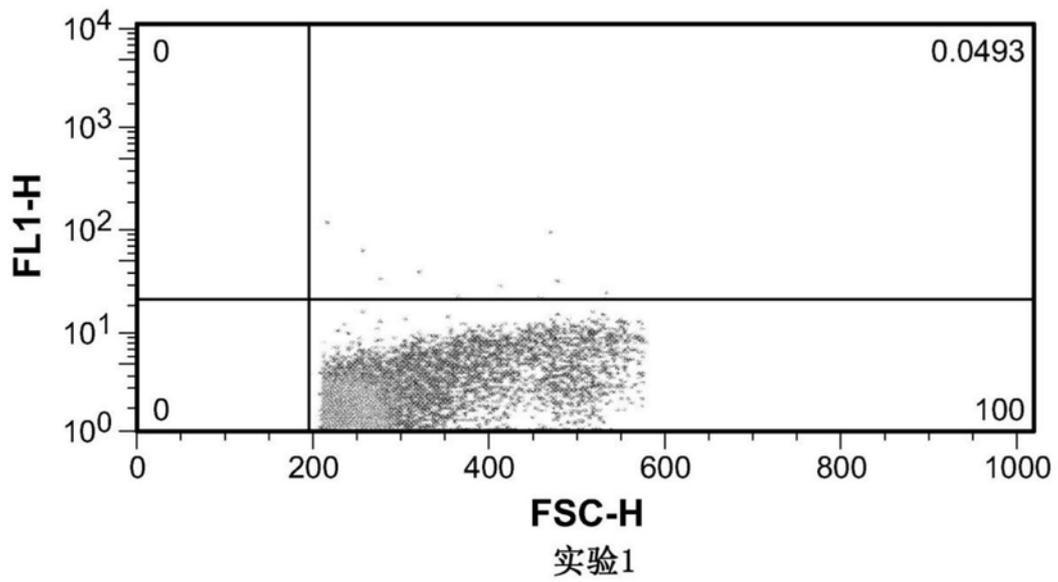


图29B



图30A

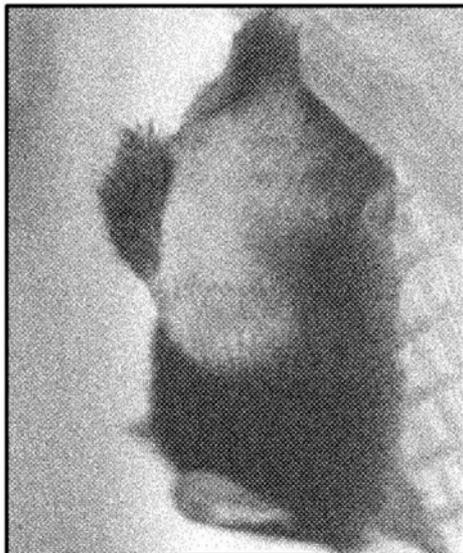


图30B

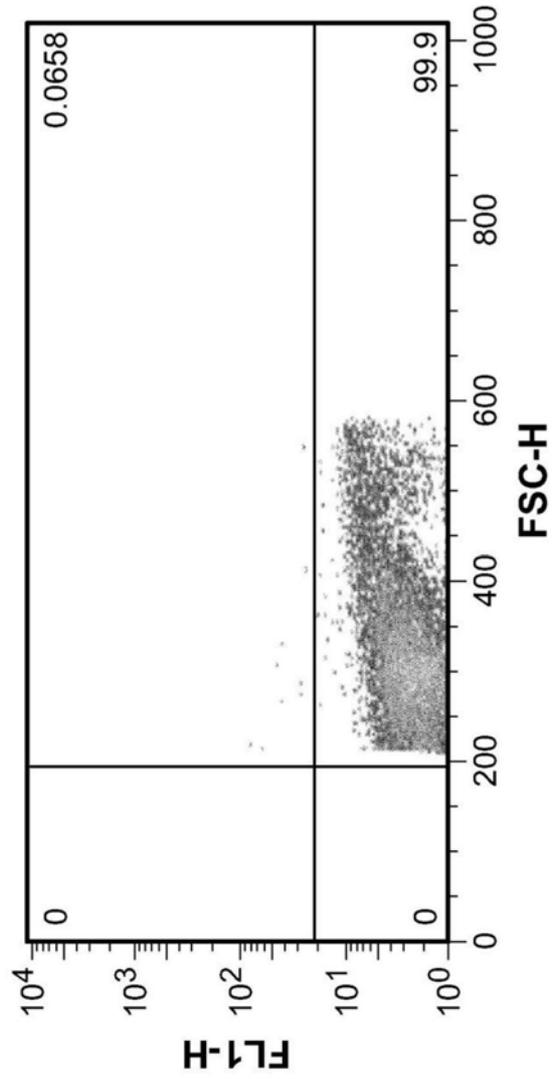


图30C

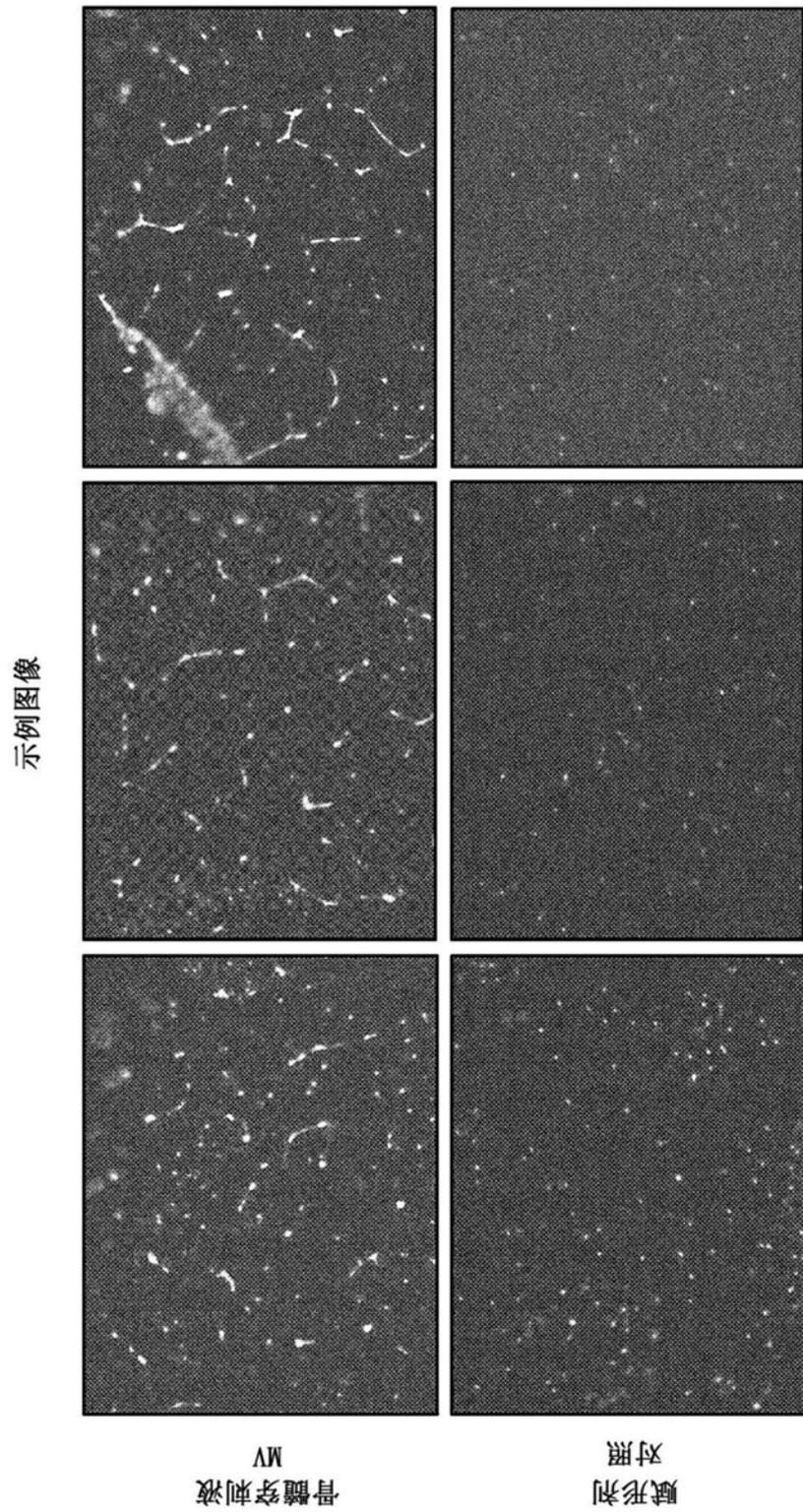


图31

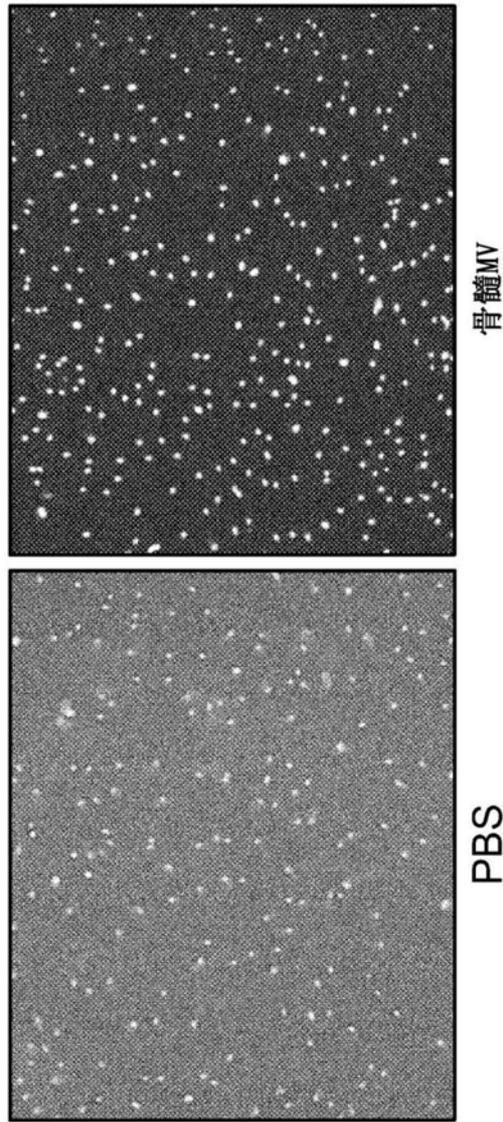


图32A

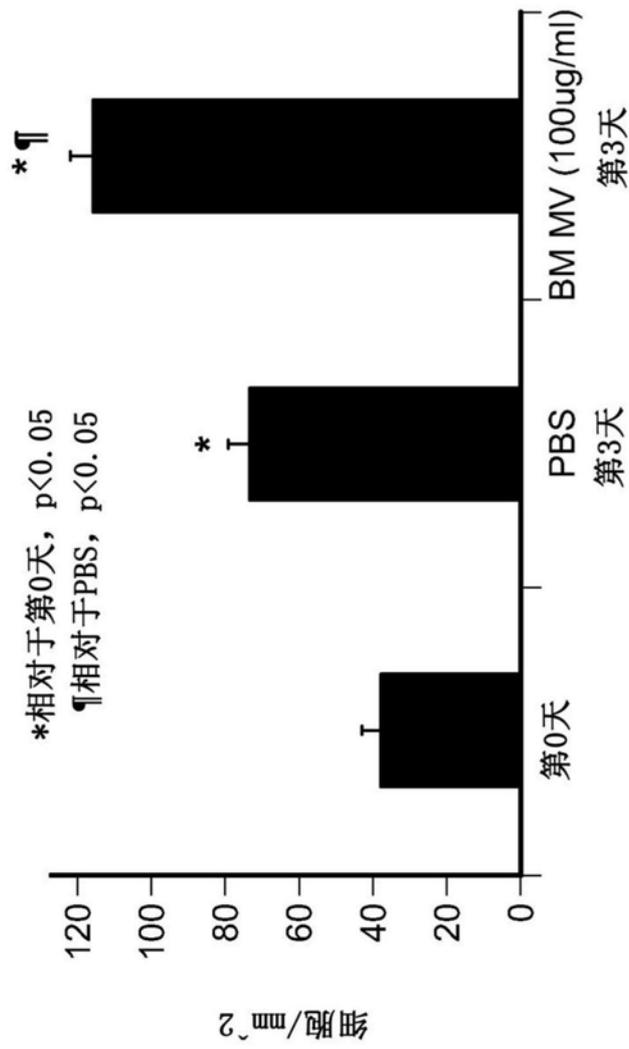


图32B