



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102920734 A

(43) 申请公布日 2013.02.13

(21) 申请号 201210457047.1

C12N 5/0775 (2010.01)

(22) 申请日 2012.11.14

A61P 1/04 (2006.01)

(71) 申请人 青岛奥克生物开发有限公司

地址 266003 山东省青岛市市南区江苏路
16号

(72) 发明人 魏斯漂 高宏 王丽 胡建霞
张学峰

(74) 专利代理机构 青岛联智专利商标事务所有
限公司 37101

代理人 杨秉利

(51) Int. Cl.

A61K 35/44 (2006.01)

A61K 35/50 (2006.01)

A61K 47/42 (2006.01)

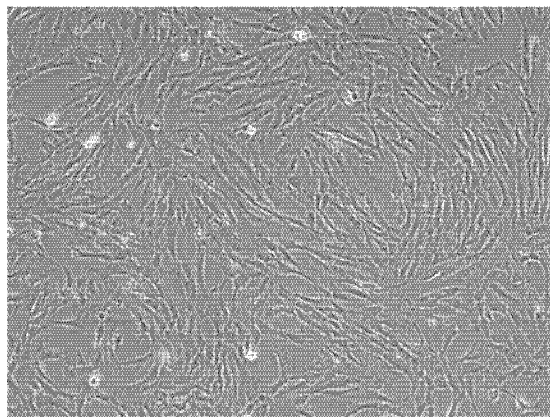
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种间充质干细胞注射液及其制备方法和在制备治疗溃疡性结肠炎药物中的应用

(57) 摘要

本发明提供了一种间充质干细胞注射液及其制备方法和在制备治疗溃疡性结肠炎药物中的应用,所述间充质干细胞注射液它包括以下组分:含量为 2×10^5 - 1×10^7 个 /ml 的间充质干细胞;体积比为 5-10% 的 DMSO;质量体积比为 1-6% 的人血白蛋白;1% 的低分子右旋糖酐和复方电解质溶液。本发明利用人间充质干细胞注射液来纠正溃疡性结肠炎患者体内的免疫紊乱,阻止自身免疫紊乱对肠道的继续破坏;同时分泌很多细胞生长因子及修复因子,促进病变肠段溃疡的愈合,从而达到从根本上治疗溃疡性结肠炎的目的。本发明可以逆转溃疡性结肠炎病程,帮助患者摆脱腹痛腹泻对生活的影响以及药物带来的毒副作用,彻底治疗溃疡性结肠炎。



1. 一种间充质干细胞注射液,其特征在于它包括以下组分:
含量为 2×10^5 - 1×10^7 个 /ml 的间充质干细胞;
体积比为 5-10% 的临床级 DMSO;
质量体积比为 1-6% 的人血白蛋白;
质量体积比为 1% 的低分子右旋糖酐;
余量为复方电解质溶液。
2. 根据权利要求 1 所述的间充质干细胞注射液,其特征在于:所述间充质干细胞来源于人脐带和 / 或胎盘。
3. 根据权利要求 1 所述的间充质干细胞注射液,其特征在于:所述间充质干细胞活力保持在 85% 以上。
4. 根据权利要求 1 所述的间充质干细胞注射液的制备方法,其特征在于配制体积比为 5-10% 的 DMSO、质量体积比为 1-6% 的人血白蛋白、质量体积比为 1% 低分子右旋糖酐和复方电解质溶液,将间充质干细胞重悬于上述溶液中制成单细胞悬液,使干细胞数量为 2×10^5 - 1×10^7 个 /ml。
5. 根据权利要求 4 所述的间充质干细胞注射液的制备方法,其特征在于所述脐带间充质干细胞的制备包括以下步骤:
 - (1). 取新鲜足月健康胎儿脐带,用含 100kU/L 青霉素及 100mg/L 链霉素的 PBS 缓冲液冲洗;
 - (2). 剪取 5-10cm 长脐带,将脐带剪成 2cm 长的小段,用所述 PBS 缓冲液反复冲洗;
 - (3). 将脐带组织块剪碎成 $2-5\text{mm}^3$ 小块;加入 L-DMEM 培养基洗涤,在 500-800g 条件下离心 5 分钟,弃上清;
 - (4). 将组织块和培养基按体积比 2.5-3:1 比例加入培养基,混匀组织块,接种至细胞培养皿中培养,所述的培养基为含 1-10ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子的 MSC 专用无血清培养基;
 - (5). 每 3 天换一次培养基,至 8-9 天细胞达 80% 左右融合时传代,传代培养基为 MSC 专用无血清培养基。
6. 根据权利要求 4 所述的间充质干细胞注射液的制备方法,其特征在于所述胎盘间充质干细胞的制备包括以下步骤:
 - (1). 用含 100kU/L 青霉素、100mg/L 链霉素和 50u/ml 肝素钠的 PBS 缓冲液冲洗胎盘,沿胎盘边缘将胎儿面羊膜慢慢剥离;
 - (2). 再次冲洗胎盘源羊膜,将羊膜剪成 $1-5\text{mm}^3$ 小块;
 - (3). 将羊膜组织块用含青霉素和链霉素的 DMEM 培养基混匀,在 700-950g 条件下离心 10min;
 - (4). 弃上清,每管加含体积比 0.25% 胰蛋白酶的 DMEM 培养基于 37°C 消化 10min,在 700-950g 条件下离心 10min;
 - (5). 弃上清,每管加完全培养基后,在 2200rpm 条件下离心 10min;所述完全培养基为含 100kU/L 青霉素 +100mg/L 链霉素的 MSC 无血清培养基;
 - (6). 弃上清,羊膜组织块接种于培养皿中,加完全培养基,在培养箱培养;每 3 天进行半量换液;

(7). 至 10-12 天有细胞贴壁生长, 细胞克隆形成后, 弃掉组织块, 加完全培养基进行培养;

(8). 至 15-17 天细胞克隆融合至 80-90%, 进行细胞传代。

7. 根据权利要求 1 所述的间充质干细胞注射液在制备治疗溃疡性结肠炎药物中的应用。

8. 根据权利要求 7 所述的间充质干细胞注射液在制备治疗溃疡性结肠炎药物中的应用, 其特征在于: 所述间充质干细胞注射液的用量为含有 1×10^6 - 1×10^8 个 /ml 的间充质干细胞。

一种间充质干细胞注射液及其制备方法和在制备治疗溃疡性结肠炎药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及一种间充质干细胞注射液及其制备方法和在制备治疗溃疡性结肠炎药物中的应用。

背景技术

[0002] 溃疡性结肠炎可以发生于任何年龄阶段,但多见于 20-40 岁。发达国家及城市多于农村。发病原因尚不清楚,目前认为是免疫紊乱,遗传与环境因素共同作用导致发病。研究发现溃疡性结肠炎易发生于某些特定家族,大约 20% 左右溃疡性结肠炎患者的一级亲戚(即堂/表兄弟/姐妹或更亲近)也患有溃疡性结肠炎,因此遗传因素起了一定作用。除胃肠道的症状,有些患者会出现机体其他部位的症状,包括:眼睛红和痒胀;口腔溃疡;关节肿痛;皮肤肿块及其他损伤;骨质疏松;肾结石等。有溃疡性结肠炎 8-10 年病史的患者患结肠癌风险较高。

[0003] 溃疡性结肠炎不同于一般的炎症疾病,患者的肠道粘膜损伤严重,只有对其进行根本上的修复患者才能康复,传统上的手术、药物等手段缓解的只是表面炎症反应,治标不治本,所以治疗效果不理想,病情还是会复发,无法让患者和家属满意。

[0004] 间充质干细胞(MSCs)是干细胞家族的重要成员,因其具有多向分化潜能、造血支持和促进干细胞植入和自我复制等特点而日益受到人们的关注。MSCs 具有低免疫原性和独特的免疫调节作用,能调节体内过激或较弱的免疫反应,减少自身异常免疫反应对自身组织的破坏。而且 MSCs 在体内或体外特定的诱导条件下,可分化为脂肪、骨、软骨、肌肉、肌腱、韧带、神经、肝、心肌、内皮等多种组织细胞,连续传代培养和冷冻保存后仍具有多向分化潜能。胎盘、脐带来源的 MSCs 具有分化潜力大、增殖能力强、免疫原性低、取材方便、无道德伦理问题的限制、易于工业化制备等特征,使其有可能成为用于组织修复、免疫紊乱的调节和代谢性疾病细胞治疗最具临床应用前景的多能干细胞。

[0005] 目前溃疡性结肠炎的治疗主要解决的是消除症状和维持无症状的状态,不能从根本上治疗疾病,患者需终生严格控制饮食,在此情况下仍然容易复发,腹痛、腹泻及粘液脓血便严重影响患者的生活质量,且激素及柳氮磺吡啶等药物副作用很大。随着病程的进展,溃疡性结肠炎的并发症逐渐出现且加重,病史较长的患者易出现结肠癌。目前的药物与手术治疗并不能很好的避免这些情况的发生,调整溃疡性结肠炎患者体内的免疫紊乱,修复病变的肠段才是治疗溃疡性结肠炎的根本。

[0006] 溃疡性结肠炎病程长难治愈,通过药物可促使结肠病变愈合,缓解腹泻、直肠便血和腹痛等症状,达到消除症状和维持无症状的状态,但不能从病因上治疗疾病,而且部分患者由于病变肠段广泛,药物治疗不能缓解病情,须通过手术切除病变肠段进行治疗,手术效果尚可,但手术的并发症较多,包括溃疡导致的严重出血、肠穿孔、中毒性巨结肠、溃疡癌变等,风险较大。鉴于目前溃疡性结肠炎发病率逐年增高且无特效简便的治疗方法,本发明拟从根本上解决患者长期服药和病情反复发作的困境,治疗溃疡性结肠炎。

[0007] 现有技术的缺点：目前溃疡性结肠炎的治疗主要依赖于饮食控制、柳氮磺吡啶及激素、中药灌肠等药物治疗，病情严重时需手术治疗。这些疗法的综合运用可以暂时控制腹痛、腹泻及脓血便等症状，不能有效纠正患者体内免疫紊乱，不能从根本上治疗溃疡性结肠炎及阻止病情的进展与复发。而且柳氮磺吡啶及激素等药物有很严重的毒副作用，比如：过敏反应，中性粒细胞减少或缺乏症、血小板减少症及再生障碍性贫血，溶血性贫血及血红蛋白尿，肝脏损害等。手术可以部分治愈此疾病，但术后并发症较多且较严重，如：粘连性肠梗阻，吻合口出血、瘘等，严重影响患者的生活质量。

发明内容

[0008] 针对现有技术中溃疡性结肠炎存在的上述缺陷，本发明提供了一种间充质干细胞注射液及其制备方法和在制备治疗溃疡性结肠炎药物中的应用。所述注射液可以从根本上调节溃疡性结肠炎患者的免疫紊乱，阻止自身免疫紊乱对肠道组织的破坏；促进病变肠道的修复与溃疡的愈合，从而使患者摆脱腹痛腹泻的困扰、激素等药物带来的毒副反应以及病情控制不佳导致的严重并发症。

[0009] 为实现上述发明目的，本发明采用下述技术方案予以实现：

一种间充质干细胞注射液，它包括以下组分：

含量为 $2 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ /ml 的间充质干细胞；

体积比为 5-10% 的临床级 DMSO；

质量体积比为 1-6% 的人血白蛋白；

质量体积比为 1% 的低分子右旋糖酐；

余量为复方电解质溶液。

[0010] 对上述技术方案的进一步改进：所述间充质干细胞来源于人脐带和 / 或胎盘。

[0011] 对上述技术方案的进一步改进：所述间充质干细胞活力保持在 85% 以上。

[0012] 本发明还提供了所述的间充质干细胞注射液的制备方法，包括脐带间充质干细胞的制备和胎盘间充质干细胞的制备。

[0013] 本发明还提供了所述的间充质干细胞注射液在制备治疗溃疡性结肠炎药物中的应用。

[0014] 对上述技术方案的进一步改进：所述间充质干细胞注射液的用量为含有 $1 \times 10^6 - 1 \times 10^8$ 个 /ml 间充质干细胞。

[0015] 与现有技术相比，本发明的优点和积极效果是：

1. 本发明选择用来源于人脐带和胎盘的间充质干细胞来制备间充质干细胞注射液，所述间充质干细胞产量较大，制备体系易于质控，易于产业化。

[0016] 2. 间充质干细胞注射液成分由人间充质干细胞、临床级 DMSO、人血白蛋白、低分子右旋糖酐、和勃脉力（复方电解质溶液）组成。本注射液可以直接经程控降温冻存，复苏后可直接用于临床注射。

[0017] 3. 本发明利用人间充质干细胞注射液来纠正溃疡性结肠炎患者体内的免疫紊乱，从病因上治疗疾病，阻止自身免疫紊乱对肠道的继续破坏；同时分泌很多细胞生长因子及修复因子，促进病变肠段溃疡的愈合，从而达到从根本上治疗溃疡性结肠炎的目的。本发明可以逆转溃疡性结肠炎病程，阻止并发症的出现，帮助患者摆脱腹痛腹泻对生活的影响。

以及药物带来的毒副作用,彻底治疗溃疡性结肠炎。

[0018] 结合附图阅读本发明的具体实施方式后,本发明的其他特点和优点将变得更加清楚。

附图说明

[0019] 图 1 是本发明中所述人脐带间充质干细胞的显微镜照片。

[0020] 图 2 是本发明中大鼠结肠组织治疗后变化比较图。

[0021] 图 3 是本发明中大鼠结肠组织治疗后病理变化比较图。

[0022] 图 4 是本发明中治疗后大鼠血清 TNF- α 含量变化比较图。

具体实施方式

[0023] 下面结合附图和具体实施方式对本发明的技术方案作进一步详细的说明。

[0024] 实施例 1

一、脐带间充质干细胞的制备

1. 新鲜足月健康胎儿脐带,用 PBS 缓冲液冲洗,所述 PBS 缓冲液含 100 kU/ L 青霉素及 100 mg/ L 链霉素;

2. 剪取 5-10cm 长脐带,将脐带剪成 2cm 长的小段,用 PBS 缓冲液反复冲洗;所述 PBS 缓冲液含 100 kU/ L 青霉素及 100 mg/ L 链霉素;

3. 将脐带组织块剪碎成 2-5mm³ 小块;加入 L-DMEM 培养基洗涤,在 500-800g 条件下离心 5 分钟,弃上清;

4. 将组织块和培养基按体积比 2.5-3:1 比例加入培养基,混匀组织块,接种至细胞培养皿中,置培养箱培养;所述的培养基为含 1-10ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 及 MSC 专用无血清培养基;

5. 每 3 天换一次培养基,至 8-9 天细胞达 80% 左右融合时传代;传代培养基为 MSC 专用无血清培养基。

[0025] 二、胎盘间充质干细胞的制备

1. 用含 100 kU/ L 青霉素、100 mg/ L 链霉素和 50u/ml 肝素钠的 PBS 缓冲液冲洗胎盘,沿胎盘边缘将胎儿面羊膜慢慢剥离;

2. 再次冲洗胎盘源羊膜,将羊膜剪成 1-5mm³ 小块;

3. 将羊膜组织块用含青霉素和链霉素的 DMEM 培养基混匀,在 700-950g 条件下离心 10min;

4. 弃上清,每管加含体积比 0.25% 胰蛋白酶的 DMEM 培养基于 37℃ 消化 10min,在 700-950g 条件下离心 10min;

5. 弃上清,每管加完全培养基后,在 2200rpm 条件下离心 10min;所述完全培养基为含 100 kU/ L 青霉素+100 mg/ L 链霉素的 MSC 无血清培养基;

6. 弃上清,羊膜组织块接种于培养皿中,加完全培养基,在培养箱培养;每 3 天进行半量换液;

7. 至 10-12 天有细胞贴壁生长,细胞克隆形成后,弃掉组织块,加完全培养基进行培养;

8. 至 15-17 天细胞克隆融合至 80-90%, 进行细胞传代。

[0026] 三、间充质干细胞注射液的制备

该注射液是由以下成分按比例配制而成：

1、来源于人脐带和 / 或胎盘间充质干细胞, 每毫升注射液中中间充质干细胞的数量为 $2 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ 个；

2、体积比为 5-10% 的 DMSO (临床级)；

3、质量体积比为 1-6% 的人血白蛋白；

4、质量体积比为 1% 低分子右旋糖酐

5、余量为勃脉力 (复方电解质溶液)。

[0027] 临床级 DMSO 对细胞无毒, 可以更好地起到保护细胞的作用, 在细胞复苏后无需漂洗, 可直接用于临床注射, 对患者安全无毒。

[0028] 人血白蛋白为临床常用注射液, 可为细胞提供营养, 利于细胞的新陈代谢。

[0029] 1% 低分子右旋糖酐的添加保证细胞在保存过程中维持良好的细胞分散状态, 减少了细胞间的黏附成团及细胞黏附容器壁的现象, 降低了临床细胞输注时可能发生的血管内细胞成团栓塞的危险, 同时也降低了细胞聚集而被输液滤器过滤导致的细胞损失。

[0030] 勃脉力 (复方电解质溶液), 可以保持细胞的渗透压, 利于细胞的存活。该注射液组份为临床常用电解质溶液, 可方便临床输注。

[0031] 该注射液可在 -196°C 温度中稳定保存。使用时解冻复苏后可直接输注到患者体内, 细胞保持为单细胞悬液状态, 细胞活力保持在 85% 以上, 且不会引起患者不适反应。

[0032] 这种注射液非常利于间充质干细胞的保存、运输及存活, 且临床输注安全, 细胞可在此注射液中长时间保持较高的活力, 便于运输而不受使用时间的苛刻限制, 解决了异地患者使用时细胞长时间运输影响细胞活力的问题。

[0033] 间充质干细胞注射液的具体配制过程为: 如配制 100ml 干细胞注射液, 该注射液由人间充质干细胞、临床级 DMSO 5ml、人血白蛋白原液 (原液质量体积比浓度为 20%) 10ml、低分子右旋糖酐 1ml (原液浓度 100%) 及勃脉力 (复方电解质溶液) 84ml 组成。本发明所述质量体积比均代表质量 (g) 与体积 (ml) 的比例。每毫升注射液中中间充质干细胞的数量为 $2 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ 。间充质干细胞注射液在 -196°C 环境温度中, 仍可保持单细胞悬液状态, 复苏后细胞活力保持在 85% 以上, 可直接用于临床注射。

[0034] 四、间充质干细胞注射液对溃疡性结肠炎大鼠治疗的安全性和有效性实验

健康清洁级 SD 大鼠 45 只, 6-8 周龄, 随机分为 3 组, 每组 15 只。采用免疫复合法制备溃疡性结肠炎模型。A、B 两组大鼠均于实验 1 天、14 天在其腹股沟、足趾处注射乳化液 0.4ml。免疫后禁食 (不禁水) 24h, 3% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 经肛门推入 0.6ml 液体 (100mg/kg TNBS+50% 乙醇)。造模 24h 后 A 组大鼠经尾静脉注入 1ml 人间充质干细胞注射液 (含 5×10^6 细胞, 电镜照片如图 1 所示), B 组大鼠经尾静脉注射 1ml PBS。C 组为正常 SD 大鼠。

[0035] 实验开始后每天定时观察大鼠活动及体征。3 组均于间充质干细胞治疗后 3 天、7 天、14 天麻醉处死 5 只大鼠, 剖取结肠, 观察结肠损伤, 并在显微镜下观察结肠病理变化。

[0036] 结果: 整个实验过程未见大鼠出现急性休克或死亡。

[0037] 1. 大鼠生活状态观察: 造模后 1 天, A、B 组大鼠即开始出现厌食、懒动、大便次数

增多、软便或稀便等。3天后症状达高峰,之后症状开始缓解,A组缓解速度快于B组,实验结束时A组已无腹泻,活动正常。C组未见任何异常症状。

[0038] 2. 结肠组织变化:治疗后3天,A、B组均见结肠肠壁明显增厚、充血水肿、部分区域可见范围较大的溃疡;治疗后7天,A组充血水肿稍减轻,溃疡范围亦减少,B组病变无明显改观;治疗后14天,A组结肠仅见轻度充血水肿,未见溃疡,B组病变略有减轻,实验结果如图2所示,左图为:A组大鼠间充质干细胞治疗后3天结肠组织,结肠肠壁明显增厚、充血水肿、部分区域可见范围较大的溃疡;中图为:A组大鼠间充质干细胞治疗后14天结肠组织,病变明显减轻,溃疡愈合;右图为:B组大鼠治疗后14天结肠组织,仍有明显充血水肿及肉眼可见的溃疡。

[0039] 3. 结肠组织病理变化:细胞治疗后3天,A组结肠病理切片HE染色显微镜下见较大范围的上皮缺损,粘膜及粘膜下层有炎症细胞浸润,B组病理改变类似于A组;治疗后7天,A组上皮缺损范围有所减少,粘膜及粘膜下层见大量炎症细胞浸润,B组病变无明显改观;至14天,A组粘膜结构基本完整,仅有少量炎症细胞浸润,实验结果如图3所示,左图为:A组大鼠间充质干细胞治疗后3天结肠组织病理,镜下可见较大范围的上皮缺损,粘膜及粘膜下层有炎症细胞浸润;中图为:A组大鼠间充质干细胞治疗后14天结肠组织病理,镜下可见粘膜结构基本完整,仅有少量炎症细胞浸润;右图为:B组大鼠治疗后14天结肠组织病理,镜下仍有大范围的上皮缺损,粘膜及粘膜下层有炎症细胞浸润。

[0040] 4. 大鼠体内免疫指标变化:细胞治疗后3天,A组大鼠血清TNF- α 含量较对照组明显升高,B组改变类似于A组;治疗后7天,A组大鼠血清TNF- α 含量有所减少,B组病变无明显改观;至14天,A组大鼠血清TNF- α 含量较B组明显减少,实验结果如图4所示,治疗后14天,A组大鼠血清TNF- α 含量较B组明显减少($P < 0.05$)。

[0041] 结论:人间充质干细胞注射液治疗溃疡性结肠炎大鼠安全可行,经间充质干细胞治疗后患病大鼠的生活状态、症状及体征、结肠病理及免疫紊乱状态均有明显好转,治疗明显有效。

[0042] 实施例2

如配制100ml干细胞注射液,该注射液由人间充质干细胞、临床级DMSO 10ml、人血白蛋白原液(原液浓度为20%)10ml、低分子右旋糖酐1ml及勃脉力(复方电解质溶液)79ml组成。每毫升注射液中充质干细胞的数量为 $2 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ 。间充质干细胞注射液在 -196°C 环境温度中,仍可保持单细胞悬液状态,复苏后细胞活力保持在85%以上,可直接用于临床注射。

[0043] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其进行限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的普通技术人员来说,依然可以对前述实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明所要求保护的技术方案的精神和范围。

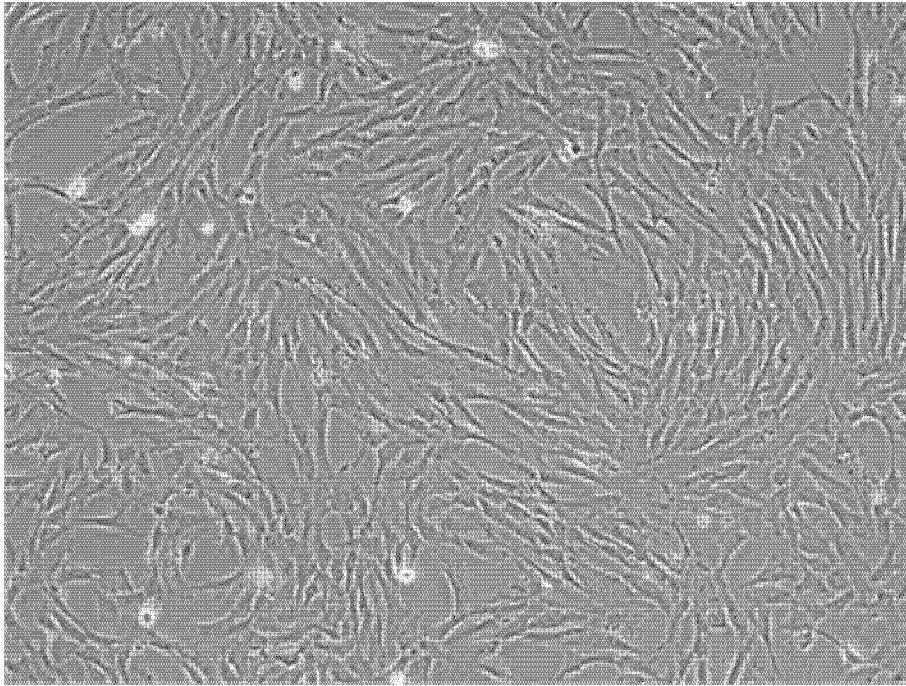


图 1

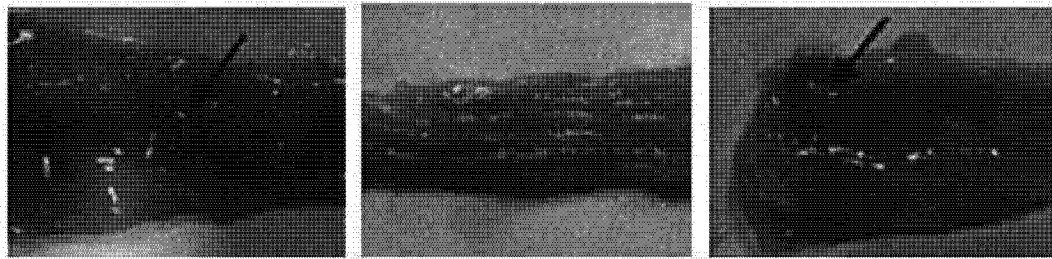


图 2



图 3

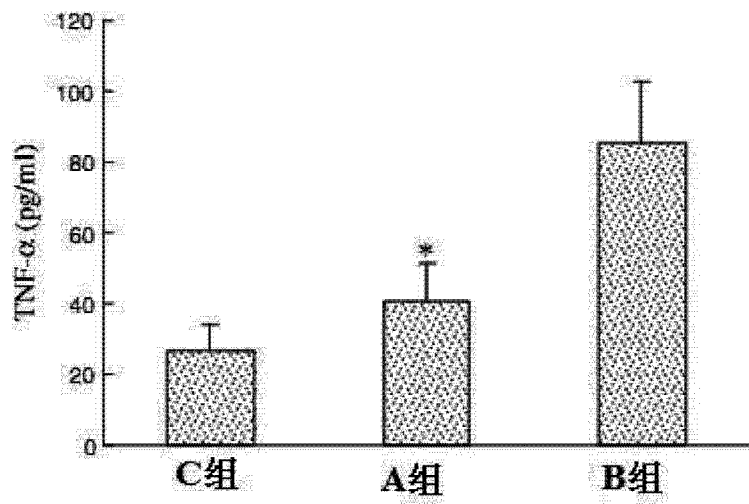


图 4