



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102292092 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 21

(21) 申请号 200980155331. X *A61K 48/00* (2006. 01)
(22) 申请日 2009. 11. 25 *A61P 19/02* (2006. 01)
(30) 优先权数据 *A01N 1/02* (2006. 01)
61/117, 881 2008. 11. 25 US *C12N 5/071* (2010. 01)
(85) PCT申请进入国家阶段日 *C12N 5/077* (2010. 01)
2011. 07. 25 *C12N 5/10* (2006. 01)
(86) PCT申请的申请数据 *C12N 15/85* (2006. 01)
PCT/US2009/065996 2009. 11. 25
(87) PCT申请的公布数据
W02010/068510 EN 2010. 06. 17
(71) 申请人 组织基因公司
地址 美国马里兰州
(72) 发明人 卢文钟 李泳锡 李宽熙
(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240
代理人 李丙林 张英
(51) Int. Cl.
A61K 35/12 (2006. 01)
A61K 35/32 (2006. 01)
A61K 38/19 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 16 页
序列表 4 页 附图 6 页

(54) 发明名称

致敏细胞疗法

(57) 摘要

本发明涉及一种包含致敏的结缔组织细胞的组合物及其药学上可接受的载体的组合物。

1. 一种组合物,包含致敏的结缔组织细胞及其药学上可接受的载体。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述细胞为成纤维细胞、软骨细胞或成纤维软骨细胞。
3. 根据权利要求2所述的组合物,其中,所述细胞为人类细胞。
4. 根据权利要求1所述的组合物,所述组合物是可注射的。
5. 一种用于在约 -70°C 至约 -196°C 的温度下储存细胞的储存容器,其中包含如权利要求1所述的组合物。
6. 一种刺激哺乳动物中靶部位处软骨再生的方法,包括:(i)用包含细胞因子的组合物孵育结缔组织细胞以产生致敏细胞;(ii)可选地从所述结缔组织细胞中分离所述细胞因子;和(iii)将治疗有效量的所述致敏细胞注射到希望生成软骨的靶关节部位中,其中所述靶部位处的所述结缔组织细胞的内源性存在形式减少,并且其中所述靶部位处的所述致敏细胞的存在刺激软骨的再生。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述结缔组织细胞为成纤维细胞、软骨细胞或成纤维软骨细胞。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中,所述软骨细胞为原代人软骨细胞。
9. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述细胞因子是属于TGF- β 超家族的成员。
10. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述结缔组织细胞孵育约1小时至约40小时。
11. 根据权利要求9所述的方法,其中,所述细胞因子为TGF- β 。
12. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述细胞因子的存在量为至少 1ng/ml 。
13. 根据权利要求1所述的组合物,进一步包含由希望被表达的基因转染或转导的第二群哺乳动物细胞。
14. 一种混合的细胞组合物,包含产生透明软骨的有效量的:
 - (a) 第一群致敏的软骨细胞或成纤维细胞;
 - (b) 第二群成纤维细胞或软骨细胞,其已被编码所述TGF- β 超家族成员的基因转染或转导;和
 - (c) 其药学上可接受的载体。
15. 根据权利要求14所述的组合物,其中,所述基因为TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7或BMP-9。
16. 根据权利要求14所述的组合物,其中,所述第一群致敏细胞和已被编码TGF- β 超家族成员的基因转染或转导的所述第二群成纤维细胞或软骨细胞的比例为约1-20:1。
17. 根据权利要求16所述的组合物,其中,所述比例约为1-10:1。
18. 根据权利要求16所述的组合物,其中,所述比例约为1-3:1。
19. 根据权利要求14所述的组合物,其中,对由基因转染或转导的所述第二细胞群进行辐照。
20. 根据权利要求14所述的组合物,其中,所述第一细胞群和所述第二细胞群来自相同来源的生物体。
21. 根据权利要求14所述的组合物,其中,所述第一细胞群和所述第二细胞群来自不同来源的生物体。
22. 一种产生混合细胞组合物的方法,包括:

- (A) 产生第一细胞群,包括以下步骤:
- (i) 用包含细胞因子的组合物孵育结缔组织细胞以产生第一群致敏细胞;和
 - (ii) 可选地从所述结缔组织细胞中分离所述细胞因子;
- (B) 产生第二细胞群,包括以下步骤:
- (i) 产生重组载体,其包含可操作地连接于启动子的编码治疗蛋白的 DNA 序列;
 - (ii) 用所述重组载体对细胞群进行体外转染或转导以产生所述第二细胞群;和
- (C) 将所述第一细胞群和所述第二细胞群混合在一起以产生混合细胞组合物。
23. 一种刺激哺乳动物中靶部位处的软骨再生的方法,包括:
- (A) 产生第一细胞群,包括以下步骤:
- (i) 用包含细胞因子的组合物孵育结缔组织细胞以产生第一群致敏细胞;和
 - (ii) 可选地从所述结缔组织细胞中分离所述细胞因子;
- (B) 产生第二细胞群,包括以下步骤:
- (i) 产生重组载体,其包含可操作地连接于启动子的编码治疗蛋白的 DNA 序列;
 - (ii) 用所述重组载体对细胞群进行体外转染或转导以产生所述第二细胞群;和
- (C) 将治疗有效量的所述第一细胞群和所述第二细胞群的混合物注射到希望生成软骨的靶关节部位中,其中所述靶部位处的所述结缔组织细胞的内源性存在形式减少,并且其中所述靶部位处的细胞混合物的存在刺激软骨的再生。
24. 根据权利要求 23 所述的方法,其中,所述基因为 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6 或 BMP-7。
25. 根据权利要求 23 所述的方法,其中,所述第一细胞群和所述第二细胞群与所述宿主受体同源。
26. 根据权利要求 23 所述的方法,其中,所述第一细胞群和所述第二细胞群与所述宿主受体异源。
27. 根据权利要求 23 所述的方法,其中,所述第一细胞群和所述第二细胞群与所述宿主受体异种。
28. 根据权利要求 23 所述的方法,其中,所述重组载体为病毒载体。
29. 根据权利要求 23 所述的方法,其中,所述重组载体为质粒载体。
30. 根据权利要求 23 所述的方法,其中,所述细胞在移植前被储存起来。
31. 根据权利要求 30 所述的方法,其中,所述细胞在移植前冷冻储存。
32. 一种治疗骨关节炎的方法,包括:
- (A) 产生第一细胞群,包括以下步骤:
- (i) 用包括细胞因子的组合物孵育结缔组织细胞以产生第一群致敏细胞;和
 - (ii) 可选地从所述结缔组织细胞中分离所述细胞因子;
- (B) 产生第二细胞群,包括以下步骤:
- (i) 生成重组载体,其包括可操作地连接于启动子的编码治疗蛋白的 DNA 序列;
 - (ii) 用所述重组载体对细胞群进行体外转染或转导以产生所述第二细胞群;和
- (C) 将治疗有效量的所述第一细胞群和所述第二细胞群的混合物及其药学上可接受的、不是无生命的三维结构的载体注射到哺乳动物的关节间隙中以进入希望生成软骨的靶关节部位,其中所述靶部位处的所述结缔组织细胞的内源性存在形式减少,并且其中所述

靶部位处的细胞混合物的存在刺激软骨的再生以治疗骨关节炎。

33. 一种用于在约 -70°C 至约 -196°C 的温度下储存细胞的储存容器, 其中包含如权利要求 14 所述的混合细胞组合物。

34. 一种缩短结缔组织细胞倍增时间的方法, 包括用包含细胞因子的组合物孵育结缔组织细胞以产生致敏细胞。

35. 根据权利要求 34 所述的方法, 其中, 所述结缔组织细胞为成纤维细胞、软骨细胞或成纤维软骨细胞。

36. 根据权利要求 35 所述的方法, 其中, 所述软骨细胞为原代人软骨细胞。

37. 根据权利要求 34 所述的方法, 其中, 所述细胞因子是属于 TGF- β 超家族的成员。

38. 根据权利要求 34 所述的方法, 其中, 用所述细胞因子孵育所述细胞约 1 小时至约 40 小时。

39. 根据权利要求 34 所述的方法, 其中, 所述倍增时间约为未孵育对照细胞的一半。

40. 根据权利要求 34 所述的方法, 其中, 所述细胞因子是 FGF 和 TGF- β 1 的组合。

41. 根据权利要求 40 所述的方法, 其中, 所述组合物进一步包含 3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸。

42. 根据权利要求 6 所述的方法, 其中, 所述受试者患有退行性关节炎。

43. 根据权利要求 6 所述的方法, 其中, 所述靶部位是脊髓。

致敏细胞疗法

技术领域

[0001] 本发明涉及将利用通过使用细胞因子孵育而致敏的细胞以用于体细胞治疗。

背景技术

[0002] 在骨科领域,退行性关节炎或骨关节炎是最常遇到的与软骨损伤相关的疾病。体内的几乎每个关节,如膝关节、髋关节、肩关节,甚至是腕关节,都会受到影响。该病的发病机制是透明关节软骨的变性 (Mankin 等人, *J Bone Joint Surg*, 52A :460-466, 1982)。关节的透明软骨发生变形,原纤维化,并最终凹陷。如果退化的软骨能够以某种方式再生,那么大部分患者将能够在没有令人虚弱的疼痛的情况下享受生活。

[0003] 传统的药物递送途径,如口服、静脉或肌肉注射给予,将药物递送至关节的效率较低。关节内注射的药物的半衰期通常很短。关节内注射药物的另一个缺点是在治疗诸如关节炎的慢性疾病时需要在关节间隙处频繁重复注射以达到可接受的药物水平。由于迄今为止的治疗药物不能选择性靶向于关节,因此有必要将哺乳动物宿主暴露于全身性的高浓度药物中,以实现持续的关节内治疗剂量。以这种方式的非靶器官的暴露会加剧抗关节炎药物产生严重副作用的趋势,例如哺乳动物宿主的胃肠不适以及血液、心血管、肝脏和肾脏系统的变化。

[0004] 在骨科领域,某些细胞因子已被认为是用于治疗骨科疾病的候选物。骨形态发生蛋白已被认为是骨形成的一种有效刺激物 (Ozkaynak 等人, *EMBO J*, 9 :2085-2093, 1990 ; Sampath 和 Rueger, *Complications in Ortho*, 101-107, 1994), 并且已报导了 TGF- β 作为骨形成和软骨形成的刺激物 (Joyce 等人, *J Cell Biology*, 110 :2195-2207, 1990)。

[0005] 转化生长因子- β (TGF- β) 被认为是一种多功能的细胞因子 (Sporn 和 Roberts, *Nature (London)*, 332 :217-219, 1988), 并且在细胞生长、分化和细胞外基质蛋白合成中起调节作用 (Madri 等人, *J Cell Biology*, 106 :1375-1384, 1988)。TGF- β 在体外抑制上皮细胞和破骨细胞样细胞的生长 (Chenu 等人, *Proc Natl Acad Sci*, 85 :5683-5687, 1988), 但其在体内刺激软骨内成骨并最终刺激骨形成 (Critchlow 等人, *Bone*, 521-527, 1995 ; Lind 等人, *A Orthop Scand*, 64(5) :553-556, 1993 ; 和 Matsumoto 等人, *In vivo*, 8 :215-220, 1994)。TGF- β 诱导的骨形成由其刺激的骨膜下多能细胞介导, 该骨膜下多能细胞最终分化成软骨形成细胞 (Joyce 等人, *J Cell Biology*, 110 :2195-2207, 1990 ; 和 Miettinen 等人, *J Cell Biology*, 127-6 :2021-2036, 1994)。

[0006] 已经报导了 TGF- β 在骨科中的生物学作用 (Andrew 等人, *CalcifTissue In*. 52 :74-78, 1993 ; Borque 等人, *Int J Dev Biol.*, 37 :573-579, 1993 ; Carrington 等人, *J Cell Biology*, 107 :1969-1975, 1988 ; Lind 等人, *A OrthopScand*. 64(5) :553-556, 1993 ; Matsumoto 等人, *In vivo*, 8 :215-220, 1994)。在小鼠胚胎中, 染色法显示出 TGF- β 与来自间叶细胞的组织 (例如结缔组织)、软骨组织和骨组织密切相关。除了胚胎学的发现, TGF- β 存在于骨形成和软骨形成的部位。其也能够提高兔胫骨骨折的愈合。最近, 报导了 TGF- β 的治疗价值 (Critchlow 等人, *Bone*, 521-527, 1995 ; 和 Lind 等人, *AOrthop Scand*,

64(5):553-556,1993),但其短期效果和高治疗费用限制了其广泛临床应用。

[0007] 在培养时通过重复传代而增殖的过程中,软骨细胞不可避免地丧失其产生软骨基质如氨基葡聚糖(GAG)和II型胶原(COL2)的能力,并开始产生I型胶原(COL1),这被称为脱分化(dedifferentiation)。一直以来人们就知道人类关节软骨细胞在体外仅能够经历有限次的细胞分裂,并且其增殖能力会随着年龄的增长而降低。

[0008] 申请人已证明扩充人类关节软骨细胞的条件能够在体外调节细胞重新进入分化程序并增加生长潜能的能力。

[0009] 美国专利5,858,355和5,766,585公开了制备IRAP(白细胞介素-1受体拮抗剂蛋白)基因的病毒或质粒构建体;用该构建体转染滑膜细胞(5,858,355)和骨髓细胞(5,766,585);并将转染的细胞注射到兔关节中,但未公开利用致敏的软骨细胞使结缔组织再生。

[0010] 美国专利5,846,931和5,700,774公开了将包括属于TGF β “超家族”的骨形态发生蛋白(BMP)与截短的甲状旁腺素相关蛋白的组合物一起注射以影响软骨组织形成的维持,和软骨组织的诱导。然而,其并未公开使用BMP基因的基因疗法,也未公开使用致敏的软骨细胞。

[0011] 美国专利5,842,477公开了将支架、骨膜/软骨膜组织和包括软骨细胞的基质细胞的组合植入到软骨缺损的区域。由于该专利公开内容要求所植入的系统中存在全部三个元素,而参考资料并未公开或暗示无需植入支架或骨膜/软骨膜组织的本发明的简单细胞疗法。

[0012] 尽管存在这些现有技术的公开内容,然而仍然非常现实和实质性地需要更加有效和强效的治疗方法,其不仅在哺乳动物宿主中使结缔组织再生,而且也是更好和更有效的体细胞基因治疗方法。

发明内容

[0013] 本发明已满足此前所述的需要。

[0014] 在一个方面中,本发明涉及细胞因子或细胞因子的组合,其诱导已丧失产生软骨基质的软骨细胞的再分化。本发明涉及能够在体外促进原代软骨细胞的细胞生长的细胞因子。此外,可利用再分化的软骨细胞形成软骨组织,而无需利用三维基质。申请人还发现使用具有促进生长和再分化的细胞因子的细胞进行序贯治疗可使软骨组织再生最大化。

[0015] 在一个方面中,本发明涉及一种包含致敏的(primed)结缔组织细胞及其药学上可接受的载体的组合物。细胞可以是成纤维细胞、软骨细胞或成纤维软骨细胞。细胞可以是人类细胞。细胞可以是可注射的。细胞可被容纳在用于在约-70 $^{\circ}$ C至约-196 $^{\circ}$ C的温度下储存细胞的储存容器中。

[0016] 在另一个方面中,本发明涉及一种刺激哺乳动物中靶部位处软骨再生的方法,包括:(i)用包含细胞因子的组合物孵育结缔组织细胞以产生致敏细胞;(ii)可选地从结缔组织细胞中分离细胞因子;和(iii)将治疗有效量的致敏细胞注射到希望生成软骨的靶关节部位中,其中该靶部位处的结缔组织细胞的内源性存在形式减少,并且其中该靶部位处致敏细胞的存在刺激软骨的再生。结缔组织细胞可以是成纤维细胞、软骨细胞或成纤维软骨细胞。软骨细胞可以是原代人软骨细胞。细胞因子可以是属于TGF- β 超家族的成员。可

将该结缔组织细胞孵育约 1 小时至约 2 周以产生致敏细胞。细胞因子可以是 TGF- β 。细胞因子的存在量可以为至少 1ng/ml。

[0017] 在另一个方面中,本发明涉及除致敏细胞以外的由希望被表达的基因转染或转导的第二群哺乳动物细胞。

[0018] 在又一个方面中,本发明涉及一种混合细胞组合物,包含产生透明软骨的有效量的:(a) 第一群致敏的软骨细胞或成纤维细胞;(b) 第二群成纤维细胞或软骨细胞,其已被编码 TGF- β 超家族成员的基因转染或转导;和(c) 它们的药学上可接受的载体。该基因可以是 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7 或 BMP-9。在该组合物中,第一群致敏细胞和已被编码 TGF- β 超家族成员的基因转染或转导的第二群成纤维细胞或软骨细胞的比例为约 1-20 : 1;约 1-10 : 1;或约 1-3 : 1。可对基因转染或转导的第二群细胞进行辐照。在本发明的组合物中,第一细胞群和第二细胞群可来自相同来源的生物体或不同来源的生物体。

[0019] 在再一个方面中,本发明涉及一种产生混合细胞组合物的方法,包括:(A) 产生第一细胞群,包括以下步骤:(i) 用包含细胞因子的组合物孵育结缔组织细胞以产生第一群致敏细胞;和(ii) 可选地从结缔组织细胞中分离细胞因子;(B) 产生第二细胞群,包括以下步骤:(i) 产生包含可操作地连接于启动子的编码治疗蛋白的 DNA 序列的重组载体;(ii) 用所述重组载体对细胞群进行体外转染或转导以产生第二细胞群;和(C) 将第一细胞群和第二细胞群混合在一起以产生混合细胞组合物。

[0020] 在再一个方面,本发明涉及一种刺激哺乳动物中靶部位处软骨再生的方法,包括:(A) 产生第一细胞群,包括以下步骤:(i) 用包含细胞因子的组合物孵育结缔组织细胞以产生第一群致敏细胞;和(ii) 可选地从结缔组织细胞中分离细胞因子;(B) 产生第二细胞群,包括以下步骤:(i) 产生包含可操作地连接于启动子的编码治疗蛋白的 DNA 序列的重组载体;(ii) 用所述重组载体对细胞群进行体外转染或转导以产生第二细胞群;和(C) 将治疗有效量的第一细胞群和第二细胞群的混合物注射入希望生成软骨的靶关节部位中,其中该靶部位处的结缔组织细胞的内源性存在形式减少,并且其中该靶部位处的细胞混合物的存在刺激软骨的再生。在该方法中,基因可以是 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6 或 BMP-7。在该方法中,第一和第二细胞群与宿主受体可以是同源、异源(同种异体)或异种的。重组载体可以是病毒载体或质粒。细胞可在注射前可选地冷冻储存。

[0021] 在再一个方面中,本发明涉及一种治疗骨关节炎的方法,包括:(A) 产生第一细胞群,包括以下步骤:(i) 用包含细胞因子的组合物孵育结缔组织细胞以产生第一群致敏细胞;和(ii) 可选地从结缔组织细胞中分离细胞因子;(B) 产生第二细胞群,包括以下步骤:(i) 产生包含可操作地连接于启动子的编码治疗蛋白的 DNA 序列的重组载体;(ii) 用所述重组载体对细胞群进行体外转染或转导以产生第二细胞群;和(C) 将治疗有效量的第一和第二细胞群的混合物及其药学上可接受的、不是无生命的三维结构的载体注射到哺乳动物的关节间隙中以进入希望生成软骨的靶关节部位中,其中该靶部位处的结缔组织细胞的内源性存在形式减少,并且其中该靶部位处的细胞混合物的存在刺激软骨的再生以治疗骨关节炎。

[0022] 在又一种实施方式中,本发明涉及一种缩短结缔组织细胞倍增时间的方法,包括

用包含细胞因子的组合物孵育结缔组织细胞以产生致敏细胞。该结缔组织细胞可以是成纤维细胞、软骨细胞或成纤维软骨细胞。软骨细胞可以是原代人软骨细胞。细胞因子可以是属于 TGF- β 超家族的成员。可用细胞因子孵育细胞约 1 小时至约 2 周以产生致敏细胞。倍增时间可以是未孵育的对照细胞的大约一半。细胞因子可以是 FGF 和 TGF- β 1 的组合。组合物可包括 3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸 (3,3',5-Triiodo-L-thyronine)。

[0023] 通过对本发明的以下描述、附图和所附权利要求,将更加充分地了解本发明的这些和其他目的。

附图说明

[0024] 通过对本发明的以下详细描述,以及仅以图示说明的方式提供而不是意在限制本发明的附图,将更加充分地了解本发明,其中:

[0025] 图 1 示出了在用 TGF β 1 孵育成纤维软骨细胞后的不同时间(周),细胞阿尔新蓝染色 (Alcian blue staining) 的结果。1. 用 10ng/mL TGF β 1 孵育 18hr ;2. 用 50ng/mL TGF β 1 孵育 18hr ;3. 用 10ng/mL TGF β 1 孵育 6hr ;4. 用 50ng/mL TGF β 1 孵育 6hr ;5. 用 1ng/mL TGF β 1 孵育 ;6. 用 10ng/mL TGF β 1 孵育,不分离细胞因子 ;7. 未经处理的对照成纤维软骨细胞。

[0026] 图 2 示出了经细胞因子处理的二维培养物中的细胞生长速率。在 T-75 烧瓶中培养的来自每个细胞因子处理组的细胞在汇合时收获并计数,以根据最初的细胞接种数量来确定细胞的生长速率。

[0027] 图 3 示出了微团的形成。在不存在培养基的情况下,将微团以 1.5×10^5 细胞 / 20μ l / 团直接接种于培养皿的表面上。将细胞孵育 1.5 小时以产生足够的细胞附着,并加入 0.5mL / 孔的完全培养基。培养细胞 7 天,在 3-4 天时完全更换生长培养基。在 7 天孵育期末,用 1mL dPBS / 孔洗涤微团两次并用 10%福尔马林溶液固定 30 分钟。除去固定液并用 1N HCl 中的 1.0%阿尔新蓝 8GX 以 500μ L / 孔在 4°C 下将微团染色过夜。阿尔新蓝染色示出了暴露于不同细胞因子条件下的软骨细胞的微团培养中的氨基葡聚糖 (GAG) 分布。

[0028] 图 4 示出了微团的 GAG 定量分析。氨基葡聚糖的定量分析可通过加入盐酸胍 (Gu-HCl) 来进行,其使得与阿尔新蓝结合的蛋白聚糖分子的 GAG 链形成沉淀。用 250μ l / 孔的 4M Gu-HCl 对经阿尔新蓝染色的微团进行孵育。当大部分染色剂从微团中提取出来时,除去溶液并在 560nm 下测量光密度。

[0029] 图 5 示出了经细胞因子处理的二维培养物中的细胞形态。在显示约 30-50%细胞汇合的时间点(接种后 3 天)采集软骨细胞生长的数字图像。观察到的细胞因子处理组之间细胞分布、细胞大小和形态有所不同。以 100x 的放大倍率采集图像。

[0030] 图 6 示出了经细胞因子处理的二维培养物中的细胞形态。在显示约 80-100%细胞汇合的时间点(接种后 8 天)采集软骨细胞生长的数字图像,之后立即收获细胞以用于制备 RNA、提取蛋白和进行微团培养。以 100x 的放大倍率采集图像。

具体实施方式

[0031] 如本文中所使用的,关于核酸、蛋白、蛋白片段或其衍生物的术语“生物活性”被定义为核酸或氨基酸序列模拟由该核酸或蛋白的野生型形式所引起的已知生物功能的能力。

[0032] 如本文中所使用的,术语“结缔组织”是连接和支持其他组织或器官的任何组织,并且包括但不限于哺乳动物宿主的韧带、软骨、肌腱、骨和滑膜。

[0033] 如本文中所使用的,术语“结缔组织细胞”和“结缔组织的细胞”包括在结缔组织中发现的分泌胶原细胞外基质的细胞,例如成纤维细胞、软骨细胞(软骨性细胞)和骨细胞(成骨细胞/骨细胞),以及脂肪细胞(脂细胞)和平滑肌细胞。优选地,结缔组织细胞为成纤维细胞、软骨细胞和骨细胞。应认识到本发明能够通过结缔组织细胞的混合培养物以及单一类型的细胞来实施。还应认识到在将组织细胞注射到关节间隙中之前,可利用化合物或辐照对组织细胞进行预处理,以使得细胞在宿主生物体内稳定表达所关注的基因。优选地,当注射到受体生物体内时,结缔组织细胞不会引起负免疫应答。应该理解,出于这方面的考虑可使用异源细胞,以及同源细胞以进行细胞介导的基因治疗或体细胞治疗。

[0034] 如在本文中所使用的,“结缔组织细胞系”包括来自共同亲代细胞的多种结缔组织细胞。

[0035] 如在本文中所使用的,细胞的“减少”是指与在该部位发现的正常数量相比,细胞群减少。这意味着与该部位的正常细胞群相比,细胞群下降的百分比为例如至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,或意味着该部位细胞的损伤或损耗。

[0036] 如在本文中所使用的,供体细胞和受体宿主的“组织相容性”是指它们共享足够数量的组织相容性因子,以便于在宿主哺乳动物中接受移植并保持功能。尤其是,对于人类白细胞抗原(HLA),例如A型、B型和C型HLA(I类)和DR型HLA(II类)而言,供体和受体应匹配。

[0037] 如在本文中所使用的,“透明软骨”是指覆盖关节表面的结缔组织。仅通过举例方式,透明软骨包括但不限于关节软骨、肋软骨和鼻软骨。

[0038] 特别是已知透明软骨能够自我更新、顺应变化、并提供具有较小摩擦的稳定运动。发现即使透明软骨在相同的关节内或在厚度、细胞密度、基质组成和力学性质不同的关节之间,也能保持相同的一般结构和功能。透明软骨的一些功能包括对压缩的惊人刚度、回弹性、和独特的分配重量负荷的能力、使得对软骨下骨的峰值应力最小的能力、以及优异的耐久性。

[0039] 总体上和组织学上,透明软骨呈抗变形的光滑坚固表面。软骨的细胞外基质包含软骨细胞,但缺少血管、淋巴管或神经。保持软骨细胞和基质间相互作用的复杂的、高度有序的结构在保持低水平代谢活动的同时,起到保持透明软骨的结构和功能的作用。参考文献O' Driscoll, J. Bone Joint Surg., 80A:1795-1812, 1998 详细描述了透明软骨的结构和功能,其全部内容以引用方式结合于本文作为参考。

[0040] 如在本文中所使用的,“可注射的”组合物是指不包括各种三维支架、框架、网格或毡结构(felt structure)的组合物,该三维支架、框架、网格或毡结构可由任意材料制得或为允许细胞附着并允许细胞以多于一层生长的形状,并且该结构通常被植入而非注射。在一种实施方式中,本发明的注射方法通常通过注射器来实施。然而,可使用任意方式注射所关注的组合物。例如,也可以使用导管、喷雾器或温度依赖性聚合物凝胶。

[0041] 如在本文中所使用的,术语“哺乳动物宿主”包括动物界的成员,包括但不限于人类。

[0042] 如在本文中所使用的,“混合的细胞”或“细胞的混合物”或“细胞混合物”是指多

个细胞的组合,包括被所关注的被表达的基因转染或转导的细胞群和包括致敏细胞的至少一个其他细胞群。

[0043] 在本发明的一种实施方式中,混合的细胞可以是指多种结缔组织细胞的组合,包括被编码转化生长因子 β 超家族成员的基因或 DNA 转染或转导的细胞,和未被编码转化生长因子 β 超家族成员的基因转染或转导的致敏细胞。通常,未被编码转化生长因子 β 超家族成员的基因转染或转导的致敏细胞与被 TGF 超家族基因转染或转导的细胞之比在约 3-20 : 1 的范围内。该范围可包括约 3-10 : 1。特别地,根据细胞的数量,该范围可为约 10 : 1。然而,应该理解,不必将这些细胞的比例固定在任意特定范围,只要这些细胞的组合在部分或完全缺损的关节中有效地产生透明软骨即可。

[0044] 如在本文中所使用的,术语“患者”包括动物界的成员,包括但不限于人类。

[0045] 如在本文中所使用的,“药学上可接受的载体”是指现有技术中已知的促进本发明的组合物的转运效率并延长组合物的功效的任何载体。

[0046] 如在本文中所使用的,术语“致敏的”细胞是指已被活化或改变以表达特定基因的细胞。

[0047] 如在本文中所使用的,“体细胞”或“细胞”通常是指除卵细胞和精子以外的体内细胞。

[0048] 如在本文中所使用的,“储存的”细胞是指混合细胞群的致敏细胞的组合物,包括给予至关节间隙之前单独或共同储存的致敏细胞。细胞可储存于冷藏设备中。可替代地,可在约 -70°C 至约 -196°C 将细胞冷冻在液氮罐或等同的储存设备中,以便保存细胞以供随后给予至关节间隙。可利用已知方案对细胞进行解冻。可通过任意方式实施冷冻和解冻过程,只要细胞的活力和效能能够得到优化即可。

[0049] 如在本文中所使用的,术语“转染”和“转导”作为将 DNA 转移至宿主细胞并随后整合入受体细胞的染色体 DNA 中的特定方法被提及。实施本发明时,可使用任何方法将外源 DNA 转移至宿主细胞中,包括非病毒或病毒基因转移方法,只要将外源基因引入到宿主细胞中并且该外源基因在宿主细胞中稳定表达即可。因此,如本文中所使用的,术语“转染的或转导的”包括将基因递送至细胞的任何方法,如磷酸钙沉淀、DEAE 葡聚糖、电穿孔、脂质体、病毒介导等。

[0050] 如在本文中所使用的,“转化生长因子 $-\beta$ (TGF- β) 超家族”包括一组结构相关的蛋白质,其广泛影响胚胎发育过程中的分化过程。该家族包括正常雄性发育所需的血清苗勒抑制物 (Müllerian inhibiting substance, MIS) (Behringer 等人, Nature, 345 :167, 1990)、背腹轴形成和成虫盘的形态发生所需的果蝇生存因子 (drosophila decapentaplegic, DPP) 基因产物 (Padgett 等人, Nature, 325 :81-84, 1987)、位于卵 (母细胞) 的植物极的爪蟾 Vg-I 基因产物 (Weeks 等人, Cell, 51 :861-867, 1987)、能够在爪蟾胚胎中诱导中胚层和早期结构形成 (Thomsen 等人, Cell, 63 :485, 1990) 的活化素 (Mason 等人, Biochem, Biophys. Res. Commun. , 135 :957-964, 1986)、以及能够诱导软骨和骨重新形成 (Sampath 等人, J. Biol. Chem. , 265 :13198, 1990) 的骨形态发生蛋白 (BMP, 如 BMP-2、3、4、5、6 和 7, 成骨素, OP-1)。TGF- β 基因产物能够影响多种分化过程,包括脂肪生成、肌生成、软骨生成、血细胞生成和上皮细胞分化。综述请参见 Massague, Cell 49 :437, 1987, 其全部内容以引用方式结合于本文作为参考。

[0051] TGF- β 家族的蛋白最初作为大的前体蛋白合成,随后在距 C 末端约 110-140 个氨基酸的一组残基经历了蛋白酶切。蛋白的 C 末端区域均为结构上相关的,并且基于它们的同源性程度,可将不同的家族成员分类为不同的亚组。虽然在特定的亚组中同源性的范围为 70%至 90%的氨基酸序列同一性,但亚组之间的同源性显著较低,范围通常仅为 20%至 50%。在每种情况下,活性物质似乎都是 C 末端片段的二硫键连接的二聚体。对于大部分已研究过的家族成员,发现同源二聚体物质具有生物活性,但对于其他家族成员,如抑制素(Ung 等人, *Nature*, 321 :779, 1986) 和 TGF- β ' s(Cheifetz 等人, *Cell*, 48 :409, 1987), 也检测到异源二聚体,并且这些似乎具有与各自的同源二聚体不同的生物学性质。

[0052] TGF- β 基因超家族的成员包括 TGF- β 3、TGF- β 2、TGF- β 4(鸡)、TGF- β 1、TGF- β 5(爪蟾)、BMP-2、BMP-4、果蝇 DPP、BMP-5、BMP-6、Vgr1、OP-1/BMP-7、果蝇 60A、GDF-1、爪蟾 Vgf、BMP-3、抑制素- β A、抑制素- β B、抑制素- α 和 MIS。在 Massague, *Ann. Rev. Biochem.* 67 :753-791, 1998 中讨论了这些基因,其全部内容以引用方式结合于本文作为参考。

[0053] 优选地, TGF- β 基因超家族的成员为 TGF- β 或 BMP。更优选地, 该成员为 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6 或 BMP-7。最优选地, 该成员为人或猪 TGF- β 1 或 BMP-2。

[0054] 致敏细胞疗法

[0055] 本发明包括将致敏的细胞给予至哺乳动物所需的部位,以产生胶原或透明软骨。致敏的细胞通常为结缔组织细胞,包括软骨细胞或成纤维细胞。

[0056] 举例来说,当原代软骨细胞群传代约 3 或 4 次时,其形态学通常变为成纤维软骨细胞。随着原代软骨细胞的传代,它们开始丧失其某些软骨细胞的性质并开始出现成纤维软骨细胞的性质。发明人已发现当使用细胞因子例如来自 TGF- β 超家族的蛋白来孵育或“致敏”这些成纤维软骨细胞时,细胞重新获得其软骨细胞的性质,包括产生胶原。

[0057] 这样的致敏细胞包括成纤维软骨细胞,已用 TGF β 1 对其进行孵育,结果回复为 II 型胶原生成软骨细胞。在治疗骨关节炎或软骨再生时使用致敏细胞的一个优点是容易产生可用的软骨细胞以引入到需要生成软骨的关节中或体内的其他部位,例如在脊柱的椎间盘中以产生胶原并另外维持软骨基质。

[0058] 细胞可包括但不限于原代细胞或经历了约一至二十次传代的细胞。细胞可以是结缔组织细胞。细胞可包括经历了形态发生变化的细胞,其中致敏导致其恢复为原来细胞的性质。细胞可包括但不限于软骨细胞、成纤维细胞或成纤维软骨细胞。通过用细胞因子孵育细胞至少 1hr 可发生致敏,优选 1hr 至两周;1 天至 10 天,5 天至 10 天或 5 天至 7 天,然后可选地将细胞因子从细胞中分离,并将致敏的细胞注射到所关注的软骨缺损部位这以再生软骨,优选透明软骨。在一个方面,该细胞因子可以是 TGF- β 超家族的成员。尤其是,该细胞因子可以是 TGF- β , 并且尤其是 TGF- β 1。

[0059] 存在于孵育混合物中的细胞因子的量可以为至少约 1ng/ml,约 1 至 1000ng/ml,约 1 至 750ng/ml,约 1 至 500ng/ml,约 1 至 400ng/ml,约 1 至 300ng/ml,约 1 至 250ng/ml,约 1 至 200ng/ml,约 1 至 150ng/ml,约 1 至 100ng/ml,约 1 至 75ng/ml,约 1 至 50ng/ml,约 10 至 500ng/ml,约 10 至 400ng/ml,约 10 至 300ng/ml,约 10 至 250ng/ml,约 10 至 200ng/ml,约 10 至 150ng/ml,约 10 至 100ng/ml,约 10 至 75ng/ml,约 10 至 50ng/ml,约 15 至 500ng/

ml, 约 15 至 400ng/ml, 约 15 至 300ng/ml, 约 15 至 250ng/ml, 约 15 至 200ng/ml, 约 15 至 150ng/ml, 约 15 至 100ng/ml, 约 15 至 75ng/ml, 约 15 至 50ng/ml, 约 20 至 500ng/ml, 约 20 至 400ng/ml, 约 20 至 300ng/ml, 约 20 至 250ng/ml, 约 20 至 200ng/ml, 约 20 至 150ng/ml, 约 20 至 100ng/ml, 约 20 至 75ng/ml, 约 20 至 50ng/ml, 约 25 至 500ng/ml, 约 25 至 400ng/ml, 约 25 至 300ng/ml, 约 25 至 250ng/ml, 约 25 至 200ng/ml, 约 25 至 150ng/ml, 约 25 至 100ng/ml, 约 25 至 75ng/ml, 约 25 至 50ng/ml, 约 30 至 500ng/ml, 约 30 至 400ng/ml, 约 30 至 300ng/ml, 约 30 至 250ng/ml, 约 30 至 200ng/ml, 约 30 至 150ng/ml, 约 30 至 100ng/ml, 约 30 至 75ng/ml, 约 30 至 50ng/ml, 约 35 至 500ng/ml, 约 35 至 400ng/ml, 约 35 至 300ng/ml, 约 35 至 250ng/ml, 约 35 至 200ng/ml, 约 35 至 150ng/ml, 约 35 至 100ng/ml, 约 35 至 75ng/ml, 约 35 至 50ng/ml, 约 40 至 500ng/ml, 约 40 至 400ng/ml, 约 40 至 300ng/ml, 约 40 至 250ng/ml, 约 40 至 200ng/ml, 约 40 至 150ng/ml, 约 40 至 100ng/ml, 约 40 至 75ng/ml, 或约 40 至 50ng/ml。

[0060] 实施本发明的一种方法可包括用细胞因子孵育细胞特定的一段时间以产生致敏细胞并可选地将细胞因子从细胞中分离, 并且将致敏的细胞注射到所关注的结缔组织缺损部位中。可替代地, 可使用所关注的细胞因子孵育细胞一段时间, 并将该组合给予至结缔组织缺损部位而无需分离出细胞因子。

[0061] 应当理解, 虽然在本发明的致敏细胞治疗方案中, 例如可将支架或框架以及各种外来组织的物质一起植入, 但在本发明的注射系统中也可以不包括这些支架或组织。在一种优选的实施方式中, 在本发明的体细胞疗法中, 本发明涉及一种将致敏的结缔组织细胞群注射到关节间隙中的简单方法。

[0062] 本领域普通技术人员应当理解, 用于治疗人类患者的细胞来源可以是患者自身的结缔组织细胞, 如同源的成纤维细胞或软骨细胞, 但也可以使用异源细胞以及异种细胞而不考虑细胞的组织相容性。可替代地, 在本发明的一种实施方式中, 可利用与哺乳动物宿主进行了组织相容性匹配的异源细胞。为了进一步详细描述, 确定供体和患者的组织相容性, 以便于将组织相容的细胞给予哺乳动物宿主。

[0063] 出乎意料的是, 与未经处理的细胞相比, 细胞因子处理的细胞的倍增时间有所降低。参见图 2。经过处理的细胞的生命也有所增加。经过处理的细胞比未经处理的细胞存活时间更长, 倍增时间更快。经处理的细胞在包被和未包被胶原的烧瓶中增殖超过 8 代; 然而在无胶原包被的烧瓶中, 未经处理的细胞的生长在第 7 代 (p7) 停止。无论如何, 容纳经 FGF-TGF β 1 处理的细胞的胶原包被的烧瓶显示出最强的生长。即使在 8 代之后, 也没有迹象表明细胞的生长减缓。

[0064] 从包被和未包被胶原的烧瓶中收获细胞后, 将这些细胞转移至多孔板以制备微团, 直接用阿尔新蓝对其进行染色。

[0065] 致敏细胞的倍增时间可减少约 0.8 至约 0.2 倍; 约 0.7 至约 0.3 倍; 约 0.6 至约 0.4 倍; 或约 0.5 倍。当减少 0.5 倍时, 意味着经细胞因子处理的细胞的倍增时间是未孵育的对照细胞的一半。

[0066] 在这方面, 细胞因子如仅仅 TGF- β 1、仅 TGF- β 3、BMP2 以及胰岛素或 BMP2-胰岛素和 T3 一起或 FGF-TGF- β 1 组合导致致敏细胞的倍增时间显著减少。对于某些细胞因子孵育, 包被和未包被胶原的烧瓶也提供了明显不同的结果。参见图 2。

[0067] 混合细胞的替代疗法

[0068] 本发明还包括将细胞混合物给予哺乳动物的对其有需要的部位,以产生胶原或透明软骨,其中第一细胞群用所关注的基因进行转染或转导,该基因在哺乳动物中所关注的部位进行表达。由于尝试了体细胞基因治疗,本发明提供包括第二细胞群,其为未经所关注基因转染或转导的致敏细胞,并且该细胞在受伤或患病或其他所关注的虚弱的部位发生内源性减少。

[0069] 尤其是,在使用致敏细胞的混合细胞治疗方法中,本发明公开了用于将所关注的 DNA 序列递送至哺乳动物宿主的结缔组织细胞的体外和体内技术。体外技术涉及靶结缔组织细胞的培养,将所关注的 DNA 序列、DNA 载体或其他递送载体的体外转染或转导到结缔组织细胞中,随后将修饰的结缔组织细胞移植入哺乳动物宿主的靶关节中,从而影响所关注的基因产物的体内表达。

[0070] 应当理解,虽然在本发明的基因治疗方案中,例如可将支架或框架以及各种外来组织的物质共同植入,但本发明的注射系统中也可以不包括这些支架或组织。在一种优选的实施方式中,在细胞介导的基因疗法或体细胞疗法中,本发明涉及一种将转染或转导的结缔组织细胞群注射至关节间隙中,以使外源性 TGF 超家族蛋白在关节间隙中表达的简单方法。

[0071] 在说明书全文中所公开的使用致敏细胞的混合细胞方法治疗结缔组织病的体外方法包括最初产生含有编码蛋白或其生物活性的片段的重组病毒或质粒载体。然后使用该重组载体来感染或转染体外培养的结缔组织细胞群,导致产生包含该载体的结缔组织细胞群。然后以与致敏结缔组织细胞的混合物一起或单独将这些结缔组织细胞移植到哺乳动物宿主的靶关节间隙中以在关节内形成混合物,从而影响关节间隙内蛋白或蛋白片段的随后表达。所关注的 DNA 序列的表达对于大幅降低与结缔组织病相关的至少一种有害关节病变是有用的。

[0072] 在混合细胞方法中,在使用基因转染的细胞的情况下,本发明的方法包括采用能够编码转化生长因子 β 超家族成员的基因,或其生物学活性衍生物或片段以及可选择的标记,或其生物学活性衍生物或片段作为基因。

[0073] 本发明的又一种实施方式包括采用能够编码至少一种转化生长因子 β 超家族成员的基因或其生物学活性衍生物或片段作为基因,并采用本领域技术人员已知的、递送后能够在靶细胞或组织中稳定保持的任何 DNA 质粒载体作为载体,而与所使用的递送方法无关。

[0074] 本发明的另一种实施方式提供了一种将编码产物的至少一个基因引入到至少一种结缔组织细胞中以用于对哺乳动物宿主进行治疗的方法。该方法包括采用非病毒方式将编码该产物的基因引入结缔组织细胞。更具体地,该方法包括脂质体包封、磷酸钙共沉淀、电穿孔、或 DEAE-葡聚糖介导,并且包括采用能够编码转化生长因子超家族成员的基因或其生物学活性衍生物或片段,以及可选的标记或其生物学活性衍生物或片段作为基因。

[0075] 本发明的另一种实施方式提供了另一种将编码产物的至少一个基因引入到至少一种结缔组织细胞中以用于对哺乳动物宿主进行治疗的方法。该另一种方法包括采用利用病毒将 DNA 载体分子递送至靶细胞或组织的生物学方法。优选地,病毒是假病毒,已对基因组进行改变以使假病毒仅能够递送和在靶细胞中稳定保持,但不保留其在靶细胞或组织中复

制的能力。该改变的病毒基因组进一步通过重组 DNA 技术来操纵,以使得该病毒基因组起到包含将在靶细胞或组织中表达的所关注的异源基因的 DNA 载体分子的作用。

[0076] 本发明的另一种优选方法涉及在体内将 TGF- β 超家族基因直接递送与通过使用逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒 (AAV) 载体或单纯疱疹病毒 (HSV) 载体而致敏的细胞共同递送至哺乳动物宿主的结缔组织。换言之,所关注的编码功能性 TGF- β 或 BMP 蛋白或蛋白片段的 DNA 序列亚被克隆到各病毒载体中。然后,使含有 TGF- β 或 BMP 的重组病毒生长至足够的效价并将其引入到关节间隙中,优选通过关节内注射引入。

[0077] 将 DNA 分子呈递至关节的靶结缔组织细胞的方法包括但不限于,将 DNA 分子包封在阳离子脂质体中、在逆转录病毒或质粒载体中对所关注的 DNA 序列进行亚克隆、或将 DNA 分子本身直接注射至关节中。DNA 分子,无论以何种形式呈递至膝关节,优选作为 DNA 载体分子,或作为重组病毒 DNA 载体分子或重组 DNA 质粒载体分子进行呈递。所关注的异源基因的表达通过直接在异源基因的编码区域的上游插入在真核细胞中具有活性的启动子片段来确保。本领域普通技术人员可利用已知的载体构建策略和技术来确保 DNA 分子进入结缔组织后进行适当水平的表达。

[0078] 在一种优选实施方式中,将未致敏的成纤维细胞和软骨细胞在体外培养,以便随后利用其与致敏细胞一起作为基因治疗的递送系统。本申请不限于使用所公开的具体结缔组织是显而易见的。可以利用其他体外培养技术的组织来源。可在预防性和治疗性处理骨关节炎和创伤愈合中采用本发明的使用基因或细胞因子的方法。本发明不限于仅用于治疗膝关节的预防性和治疗性应用是显而易见的。可利用本发明的预防性和治疗性的处理在由软骨的撕裂或退化引起的损伤而导致的任何易患病的关节或任何损伤中的骨关节炎。

[0079] 在本发明的又一种实施方式中,在给予至关节间隙之前需要储存致敏的细胞。此外,转染或转导的细胞可单独储存,或以混合物形式储存,但不必同时进行。此外,储存的持续时间不必为相同时间段。因此,单独储存的细胞可在注射之前进行混合。可替代地,细胞可单独储存和注射以在关节间隙中形成混合物。本领域技术人员应知晓,这些细胞可冷冻储存于冷冻剂中,例如但不限于液氮中约百分之十的 DMSO 或等同的储存介质。

[0080] 结缔组织是难以进行靶向治疗的器官。本领域中已知静脉及口服途径给药提供的进入这些结缔组织的效果较差,并且具有将哺乳动物宿主全身性的暴露在治疗药物中的缺点。更具体而言,已知的将蛋白通过关节内注射至关节提供了直接进入关节的效果。然而,大部分以包封蛋白形式存在的所注射药物在关节内具有较短的半衰期。本发明通过将致敏细胞引入哺乳动物宿主的结缔组织而解决了这些问题,该致敏细胞可包括软骨细胞或成纤维细胞和/或编码用于治疗哺乳动物宿主的蛋白的基因。可使用具有抗关节炎特性的编码蛋白的基因。

[0081] 致敏的细胞可用于治疗骨关节炎,骨关节炎是一种由损坏并最终失去一个或多个关节的软骨所导致的一种关节炎类型。如果仅通过将致敏细胞而不包括各种物理装置例如支架或任意其他三维结构注射至关节就能够治愈退化性关节炎或骨关节炎或任意软骨损伤,那么就可以对患者进行便利的治疗而无需接受大手术。

[0082] 椎间盘

[0083] 致敏细胞也可用于再生椎间盘。椎间盘组成脊柱长度的四分之一。在寰椎 (C1)、枢椎 (C2) 和尾骨间没有椎间盘。椎间盘没有血管,因此其依赖终板来扩散所需的营养。终

板的软骨层将椎间盘固定在适当的位置上。

[0084] 椎间盘是纤维软骨的缓冲,作为脊柱的减震系统,其可起到保护椎骨、大脑和其他结构(即神经)的作用。椎间盘允许某些脊椎的运动:伸展和弯曲。单个椎间盘的运动十分有限-然而当若干椎间盘产生合力时,可产生相当大的运动。

[0085] 椎间盘由纤维环和髓核组成。纤维环是一种坚固的由薄板(lamellae)组成的辐射状轮状结构;同心的薄层胶原纤维与脊椎终板相连。薄层的取向具有不同的角度。纤维环包围着髓核。

[0086] 虽然纤维环和髓核均由水、胶原和蛋白聚糖(PG)组成,但髓核中液体(水和PG)的量是最大的。PG分子是很重要的,因为其吸引并保持水分。髓核含有水合凝胶样物质,能抵抗压缩。一天中髓核中水的含量取决于活动情况。随着人们年龄的增长,髓核开始脱水,这限制了它的减震能力。纤维环随年龄增大而变弱并损伤。虽然在一些人中这可能不会引起疼痛,但是在其他人中这些原因中的一种或两种会引起慢性疼痛。

[0087] 由于脱水的髓核不能起到减震作用而造成的疼痛称为轴向疼痛或椎间盘间隙疼痛。它一般是指由于退行性椎间盘疾病而导致的髓核逐渐脱水。当纤维环由于受伤或老化过程而损伤时,髓核就开始从纤维环的损伤部位被挤压出去。这称为椎间盘突出。在每个椎间盘的背面,主要脊神经沿着脊柱延伸至不同器官、组织、四肢等。通常椎间盘脱出会挤压这些神经(神经挟捏),引起放射性痛、麻木、刺痛和力量和/或运动范围的减小。此外,包含炎性蛋白的内核凝胶与神经接触也会引起明显疼痛。神经相关的疼痛称为神经根痛。

[0088] 椎间盘脱出有许多名称,并且这些名称对于不同医学专业人员而言意味着不同的事件。椎间盘脱出、椎间盘破裂或椎间盘膨出都可以指相同的疾病。椎间盘突出至相邻椎骨被称为施莫耳(氏)结(schmorl's node)。

[0089] 以下实施例以对本发明说明的方式而并非以限制的方式提供。

[0090] 实施例

[0091] 实施例 1- 致敏软骨细胞的制备

[0092] 实施例 1.1- 细胞培养和处理

[0093] 本研究中所使用的细胞来自在体外长时间培养的原代人软骨细胞。不管它们的来源而假定这些细胞具有成纤维细胞的形态和表型。在培养至大约第七次传代时进行实验。细胞以两种不同的培养形式接种:单层和微团。培养基由含 4.5g/L 葡萄糖,并辅以 10% 胎牛血清(Lonza)和 1% L-谷氨酰胺的 DMED(Lonza)组成。在 37°C, 5% CO₂ 的环境下孵育以持续处理。对于几种孵育时间的长度,在培养过程的不同时间点将细胞暴露于多个浓度的 TGF-β 1 中(R&D Systems)。

[0094] 实施例 1.2- 单层培养

[0095] 将软骨细胞以 5×10⁴ 细胞/孔接种至 6-孔胶原包被板中(BioCoat, BDBiosciences)。在接种前用浓度为 100ng/mL 的 TGF-β 1 对细胞致敏 6 小时或者在研究过程中用浓度为 1ng/mL 的 TGF-β 1 进行孵育。除了这两种处理,以 1:3 的比例制备 TGF-β 1 产生细胞和人软骨细胞的共培养物,以 5×10⁴ 细胞/孔接种并在三周的研究过程中进行类似的检查。可每周收获细胞以制备 RNA 及染色。

[0096] 还进行了一个更短的为期一周研究。以 3×10³ 细胞/cm² 将软骨细胞接种至胶原包被的 6-孔板的每个孔中。四个处理组代表在不同时间点添加 TGF-β 1:24 小时、48 小时、

72 小时,以及在为期一周的研究末期收获细胞之前的两个 36 小时的间隔。

[0097] 实施例 1.3- 微团培养

[0098] 制备细胞悬液以使接种密度为 3×10^5 细胞 / $15 \mu\text{L}$ 液滴。细胞液滴置于 24-孔胶原包被板的孔中心 (BioCoat)。一旦确定微团,将细胞团在 37°C 孵育 1.5 小时并补充 1mL 完全培养基。在接种微团之前,通过用 10ng/mL 或 50ng/mL 的 TGF- β 1 持续处理 6 小时或 18 小时来致敏细胞。除了这四个处理组,在研究持续过程中,将两组软骨细胞暴露于浓度为 1ng/mL 或 10ng/mL 的 TGF- β 1 中。最后的实验组由比例为 3 : 1 的 TGF- β 1 产生细胞与未处理的软骨细胞组成。培养微团达四周。

[0099] 实施例 1.4- 阿尔新蓝染色

[0100] 阿尔新蓝 (AB),也称为阿尔新蓝 8GX (Alcian blue 8GX)、国固蓝 1 (Ingrain blue 1) 和 C. I. 74240,是一种含铜的酞菁染料。该染料可将酸性粘多糖和氨基葡聚糖染色,因此是最广泛使用的阳离子染料之一;染色的部分为蓝色至蓝绿色。它能够与 H&E 染色法和 van Gieson 染色法结合。它通过静电引力与负电荷的大分子结合。用于洗涤结合染料的电解质浓度的逐渐增加可选择性的鉴定中性、硫酸化和磷酸化粘多糖。

[0101] 阿尔新蓝染色与每周细胞收获相结合,以确定在培养过程中 GAG 聚集的水平。将所有培养基从孔中吸出,然后以 4mL PBS/孔 (Cellgro, Mediatech) 洗涤两次。然后用 10% 的福尔马林 (Sigma) 对培养物固定 15 分钟,24-孔板为 $500 \mu\text{L}$ /孔,6-孔板为 $800 \mu\text{L}$ /孔。 1mL - 2mL 过滤的阿尔新蓝 8-GX (Sigma, 1.0%, 在 3% 乙酸中, pH 1.0) 加入每个孔中,室温下染色过夜。染色之后用 3% 的乙酸 2 - 4mL /孔对每个孔漂洗两次,用 PBS 2 - 4mL /孔对每个孔漂洗两次,每次洗涤之间均将漂洗液完全抽出。观察细胞染色强度和细胞形态。结果如图 1 所示。

[0102] 实施例 1.5-RT-PCR

[0103] 利用 TRIzol (Invitrogen) 的苯酚氯仿萃取程序从每周收获的细胞中分离 RNA。使用 SuperscriptTM 逆转录酶 (Invitrogen) 对分离出的 RNA 进行逆转录,以获得每个细胞样品的 cDNA 结构。使用由 IDT 合成的下列引物进行聚合酶链反应:

[0104] 胶原 II α 1 正向引物 5' -GACCTCGTGGCAGAGATGGAG-3' (SEQ ID NO :1),

[0105] 胶原 II α 1 反向引物 5' -AACCTCTGTGACCTTTGACACCAG-3' (SEQ ID NO :2),

[0106] 胶原 I α 1 正向引物 5' -TGTGGCCCAAGAAGACTGGTACAT-3' (SEQ ID NO :3),

[0107] 胶原 I α 1 反向引物 5' -AAAGGAGCAGAAAGGGCAGCATTG-3' (SEQ ID NO :4),

[0108] 聚集蛋白聚糖正向引物 5' -TTCAGTGGCCTACCAAGTGGCATA-3' (SEQ ID NO :5),

[0109] 聚集蛋白聚糖反向引物 5' -ACATCACTGGTGGTGGATTCT-3' (SEQ ID NO :6),

[0110] β -钙粘蛋白正向引物 5' -TGGCCATCTTTAAGTCTGGAGGCA-3' (SEQ ID NO :7),

[0111] β -钙粘蛋白反向引物 5' -GATTTGCGGGACAAAGGGCAAGAT-3' (SEQ ID NO :8)。

[0112] 以下条件用于在温度循环器中进行 PCR:在 95°C 下预变性 2 分钟,接着在 95°C 下进行为期 45 秒的 35 个循环,在 62.5°C 下退火 1 分钟,在 72°C 下延伸 1 分钟。在结束所有循环时将最终延伸期设定为在 72°C 下进行 5 分钟。最终 PCR 产物的凝胶电泳以 β -肌动蛋白为对照进行,以确定 TGF- β 1 处理的软骨细胞的相对表型基因水平。

[0113] 实施例 2- 致敏细胞的进一步制备

[0114] 实施例 2.1- 单层细胞培养

[0115] 将两瓶hChonJ第五代(p5)软骨细胞(2×10^6 细胞/瓶)解冻并以细胞接种密度为 5×10^3 细胞/cm²接种于偶数个胶原包被和无胶原包被的T-75烧瓶中。最初用完全培养基DMEM(Lonza cat. no.), 辅以10% FBS(Lonza, cat. no. 14-507F)和1% L-谷氨酰胺(Lonza, cat. no. 17-605E)进行细胞培养。

[0116] 实施例 2.2- 细胞因子处理

[0117] 在本研究中使用七个不同的细胞因子处理组。细胞接种后24小时,用12mL添加了细胞因子的培养基替换所有烧瓶中的培养基。细胞因子处理组(表1)如下: 50ng/mL TGF β 1(eBioscience 或 Promogen), 200ng/mL BMP-2(eBioscience) 和 15 μ g/mL 胰岛素(Sigma Aldrich), 200ng/mL BMP-2(eBioscience), 15 μ g/mL 胰岛素(Sigma Aldrich), 和 100nM 3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸(T3)(Sigma Aldrich), 10ng/mL FGF(eBioscience) 和 TGF β 1(eBioscience 或 Promogen), 和 20ng/mL TGF β 3(Sigma Aldrich)。两个胶原包被细胞的T-75烧瓶和两个未包被的T-75烧瓶用作阴性处理对照, 12mL的完全DMEM。每个处理组的细胞培养基每3-4天进行更换。图2也示出了经细胞因子处理的二维培养基的细胞生长率。在汇合时收获来自每个细胞因子处理组的T-75烧瓶中培养的细胞并计数, 以根据最初接种数量确定细胞生长速率。

[0118] 表 1

[0119] 细胞因子研究的处理条件比较

[0120]

细胞因子组	缩写	成分	浓度
TGF β 1	TGF-b1_e	TGF β 1	50 ng/mL
TGF β 1	TGF-b1_p	TGF β 1	50 ng/mL
BMP2&胰岛素	BI	BMP2	200 ng/mL
		胰岛素	15 μ g/mL
BMP2、胰岛素&T3	BIT	BMP2	200 ng/mL
		胰岛素	15 μ g/mL
		T3	100 nM
FGF&TGF β 1	FGF-TGF-b1_e	FGF	10 ng/mL
		TGF β 1	50 ng/mL
FGF&TGF β 1	FGF-TGF-b1_p	FGF	10 ng/mL
		TGF β 1	50 ng/mL
TGF β 3	TGF-b3	TGF β 3	20 ng/mL
阴性对照	\emptyset	----	----

[0121] 图5示出了经细胞因子处理的二维培养基中的细胞形态。在显示约30-50%细胞汇合的时间点(接种后3天),采集软骨细胞生长的数字图像。对细胞分布、细胞大小和形态学的观察数据在细胞因子处理的组间有所不同。在100x放大倍率下采集图像。

[0122] 图6示出了经细胞因子处理的二维培养基中的细胞形态。收获细胞以制备RNA、提取蛋白和进行微团培养之前,在显示约80-100%细胞汇合的时间点(接种后8天),采集软骨细胞生长的数字图像。在100x放大倍率下采集图像。

[0123] 实施例 2.3- 第二单层扩增培养的亚培养

[0124] 当达到汇合后,由实施例 2.2 获得的一部分细胞用2mL/烧瓶的1x胰蛋白酶-维尔烯(EDTA)在37°C下处理3-4分钟。在100x的显微镜下检查细胞以确定完全附着。每

个烧瓶中加入 8mL 完全培养基以使胰蛋白酶失活。从总细胞悬液中除去 30 μ L 的细胞并加入 30 μ L 台盼蓝以用于细胞计数。计算细胞浓度后,将 2.25×10^5 个细胞加入至每个烧瓶以使第二次扩培的最终细胞接种密度为 3×10^3 个细胞 / cm^2 。亚培养的细胞经历与在实施例 2.2 中相同的细胞因子处理,以确定在从实施例 2.2 获得的单层培养物中,细胞因子对结缔组织细胞的影响(数据未示出)。

[0125] 实施例 2.4- 以微团培养形式的细胞接种

[0126] 根据之前在实施例 2.2 中提出的细胞因子处理方案,从实施例 2.2 获得的一部分细胞接种至 24 孔胶原包被或无胶原包被的培养板。允许每个细胞悬液中有一定数量的微团,并且确定为 10 到 24 个微团。当计算出每个微团为 1.5×10^5 个细胞时,将该体积从细胞悬液中移至新离心管中。细胞在 1500rpm, 10°C 下离心 7 分钟。抽出上清液,以允许 20 μ L/微团的体积将剩下的细胞沉淀重悬浮在完全培养基中。以 20 μ L 体积($\sim 1.5 \times 10^5$ 个细胞)直接将微团移至孔的裸露表面,并在 37°C , 5% CO_2 下孵育约 1 小时。在 1 小时孵育期后,向每个孔中加入 500 μ L 的培养基、细胞因子条件化培养基或阴性对照完全培养基。将微团培养 7 天后,收获以得到 RNA 和蛋白含量及阿尔新蓝染色并随后进行 GAG 定量分析。

[0127] 图 3 示出了微团的形成。在无培养基存在下,将微团以 1.5×10^5 细胞 / 20 μ L / 微团直接接种于培养皿的表面。细胞孵育 1.5 小时以发生足够的细胞附着,并以 0.5mL/孔加入完全培养基。培养细胞 7 天,在 3-4 天时完全培养基替换生长培养基。在 7 天孵育期末,用 1mL dPBS/孔将微团洗涤两次并用 10%福尔马林溶液固定 30 分钟。除去固定液并用 1N HCl 中的 1.0%阿尔新蓝 8GX 以 500 μ L/孔在 4°C 下将微团染色过夜。阿尔新蓝染色表明当暴露于不同细胞因子条件下,软骨细胞的微团培养中氨基葡聚糖(GAG)的分布。

[0128] 实施例 2.5- 细胞悬液的 RNA 制备和蛋白提取

[0129] 将在实施例 2.2 中获得的细胞的剩余细胞悬液等分,使用所测量的体积,可计算每份预备体积中的细胞数。细胞预备悬液在 1500rpm, 10°C 下离心 7 分钟。用 4mL PBS 介质洗涤沉淀并再次离心。抽出最终洗涤的液体,用于 RNA 和蛋白提取细胞沉淀。对于 RNA 制备,采用标准的苯酚-氯仿提取技术。对于蛋白提取,使用 RIPA 缓冲液(Sigma Aldrich)使细胞溶解,并在液氮中迅速冷冻。使用来自实施例 2.3 所述的亚培养的细胞,重复进行 RNA 的制备以及蛋白的提取和分析。

[0130] 实施例 2.6- 微团 RNA 的制备和蛋白的提取

[0131] 在一周的培养期后,将微团培养皿从孵育器中取出,并同时进行 RNA、蛋白和阿尔新蓝染色处理。用 1mL dPBS 将每个孔温和洗涤两次。使用标准苯酚氯仿提取法对留下的一半微团进行 RNA 制备。其余的微团用于利用 RIPA 裂解缓冲液以进行蛋白提取并将样品在液氮中迅速冷冻并长期储存于 -80°C 。也可使用实施例 2.3 的亚培养细胞进行微团接种。也使用这些微团重复进行 RNA 和蛋白的提取和分析,并且结果证实了与从实施例 2.2 中获得的单层细胞接种的微团的结果。

[0132] 实施例 2.7- 阿尔新蓝染色

[0133] 在 1N HCl 溶液中制备 1.0%的阿尔新蓝 -8GX 染色剂并过滤以除去颗粒碎片。仅保留 3-4 个微团用于染色。以 1mL dPBS 对每个孔的微团温和洗涤两次。将最终洗涤溶液从每个孔中完全除去。以 250 μ L/孔加入 10%的福尔马林以固定每个微团,将板在室温下孵育 15-30 分钟。将固定液从每个孔中完全吸出,并以 500 μ L/孔加入 1%阿尔新蓝 -8GX

染色剂,4℃下孵育过夜。孵育期后除去染色溶液并以 1mL dPBS/孔洗涤微团两次。采集微团的数字图像。以记录每个孔中染色的分布。

[0134] 实施例 2.8-GAG 定量分析

[0135] 以 250 μL/孔加入 4M 盐酸胍 (Gu-HCl) 并在 4℃下孵育最短 1hr 至 18hr 过夜,以确保完全提取出染色剂。从每个孔中将 100 μL 的溶液移出并转移至 96 孔测定板以在 560nm 下观察。用 100 μL 的 4M Gu-HCl 作为空白。图 4 示出了微团的 GAG 定量分析。氨基葡聚糖的定量分析可通过加入盐酸胍 (Gu-HCl) 进行,其与阿尔新蓝结合的蛋白聚糖分子的 GAG 链形成沉淀。用 250 μL/孔的 4M Gu-HCl 对阿尔新蓝染色的微团进行孵育。当大部分染色剂从微团中提取出来时,移去溶液并在 560nm 下测量光密度。

[0136] 实施例 2.9- 基因表达分析

[0137] 通过寡核苷酸 dT 作为引物的 mRNA (0.5-1 μg, 根据 RNA 浓度) 的逆转录获得互补 DNA (cDNA)。在温度循环器中以 20 μL 的体积进行逆转录反应。对若干软骨型基因的表达水平 (表 2) 进行分析。对单层细胞和微团以及亚培养的单层细胞和来自亚培养细胞的微团均进行基因表达分析,结果彼此印证。

[0138] 表 2

[0139] 所关注基因的引物

[0140]

GOI	产物长度 bp	引物 ID	序列 (5'→3')	长度	Tm	GC%
β肌动蛋白	838	β肌动蛋白 5'	ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG (SEQ ID NO:9)	32	76.78	53.12
		β肌动蛋白 3'	CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC (SEQ ID NO:10)	32	76.02	53.12
Col1a1	845	Col1a1 正向引物	TGT GGC CCA GAA GAA CTG GTA CAT (SEQ ID NO:3)	24	66.06	50.00
		Col1a1 反向引物	AAA GGA GCA GAA AGG GCA GCA TTG (SEQ ID NO:4)	24	68.61	50.00
Col2a1	511	A- Col2a1 F	CCC TGA GTG GAA GAG TGG AG (SEQ ID NO:11)	20	59.83	60.00
		A- Col2a1 R	GAG GCG TGA GGT CTT CTG TG (SEQ ID NO:12)	20	61.01	60.00
Sox-9	310	SOX9 正向引物	CCC TTC AAC CTC CCA CAC TA (SEQ ID NO:13)	20	59.96	55.00
		SOX9 反向引物	TTA GGA TCA TCT CGG CCA TC (SEQ ID NO:14)	20	60.00	50.00
ColXa1	288	ColXa1 正向引物	GAA AAT GAC CAG GTG TGG CT (SEQ ID NO:15)	20	59.97	50.00
		ColXa1 反向引物	CGT TTT TAC GTT GCT GCT CA (SEQ ID NO:16)	20	60.05	45.00
聚集 蛋白聚糖	998	Agg 正向引物	TGC CTC GAA ACA TCA CTG AG (SEQ ID NO:17)	20	59.98	50.00
		Agg 反向引物	CTC TTC TAC GGG GAC AGC AG (SEQ ID NO:18)	20	60.01	60.00

[0141] 聚合酶链反应在下列条件中进行。在 95°C 下预变性 2 分钟后 ; 变性 : 在 95°C 下进行 45 秒 ; 退火 : 在 62.5°C 下进行 1 分钟 ; 和延伸 : 在 72°C 下进行 1 分零 5 秒。这些步骤重复进行的 35 个循环。在第 35 个循环末, 在 72°C 下进行 5 分钟的最终延伸期。凝胶电泳是用 4 μ L 每种反应样品, 与 1 μ L 凝胶加样缓冲液在 1.5% 琼脂糖凝胶上在 100V 下进行 30 分钟进行的。凝胶在 UV 光下显影, 以确定阳性条带的存在。

[0142] 此处将所有参考文献的全部内容以引用方式并入本文。

[0143] *****

[0144] 尽管出于说明目的对本发明的特定实施方式进行了如上描述, 但在不背离所附权利要求所限定的发明的前提下, 对本发明的细节进行多种变化对于本领域技术人员而言是显而易见的。

[0001]

P46579_序列表

SEQUENCE LISTING

<110> 组织基因公司
 <120> 致敏细胞疗法
 <130> P46579JHKL
 <150> US 61/117, 881
 <151> 2008-11-25
 <160> 18
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 胶原II α 1正向引物
 <400> 1
 gacctcgtgg cagagatgga g 21
 <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 胶原II α 1反向引物
 <400> 2
 aacctctgtg acctttgaca ccag 24
 <210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 胶原I α 1正向引物
 <400> 3
 tgtggcccag aagaactggt acat 24
 <210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 胶原I α 1反向引物
 <400> 4
 aaaggagcag aaaggcagc attg 24
 <210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 聚集蛋白聚糖正向引物
 <400> 5
 ttcagtggcc taccaagtgg cata 24

[0002]

<210> 6	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 聚集蛋白聚糖反向引物	
<400> 6	
acatcactgg tgggtggtgga ttct	24
<210> 7	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> β -连环蛋白正向引物	
<400> 7	
tggccatctt taagtctgga ggca	24
<210> 8	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> β -连环蛋白反向引物	
<400> 8	
gatttgcggg acaaaggga agat	24
<210> 9	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> β 肌动蛋白5'	
<400> 9	
atctggcacc acacctteta caatgagctg cg	32
<210> 10	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> β 肌动蛋白3'	
<400> 10	
cgtcatactc ctgcttgctg atccacatct gc	32
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> A-Co12a1 F	
<400> 11	
ccctgagtgg aagagtggag	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	

[0003]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> A-Col2a1 R	
<400> 12	
gaggcgtgag gtcttctgtg	20
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SOX9正向引物	
<400> 13	
cccttcaacc tcccacacta	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SOX9反向引物	
<400> 14	
ttaggatcat ctcgccatc	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ColXa1正向引物	
<400> 15	
gaaaatgacc aggtgtggt	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ColXa1反向引物	
<400> 16	
cgtttttacg ttgctgctca	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Agg正向引物	
<400> 17	
tgccctgaaa catcactgag	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

[0004]

<223> Agg反向引物

<400> 18

ctcttctacg gggacagcag

20

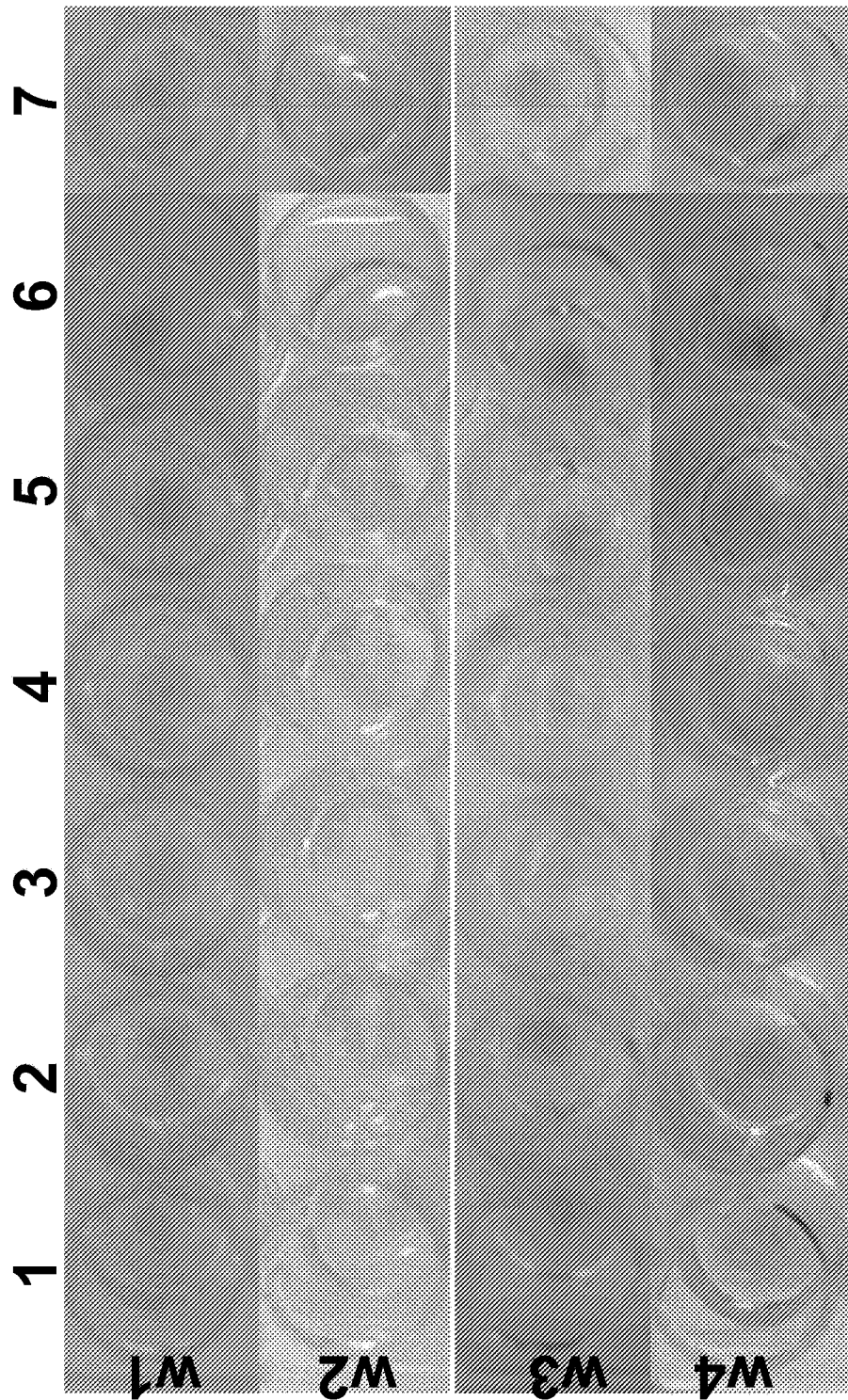


图 1

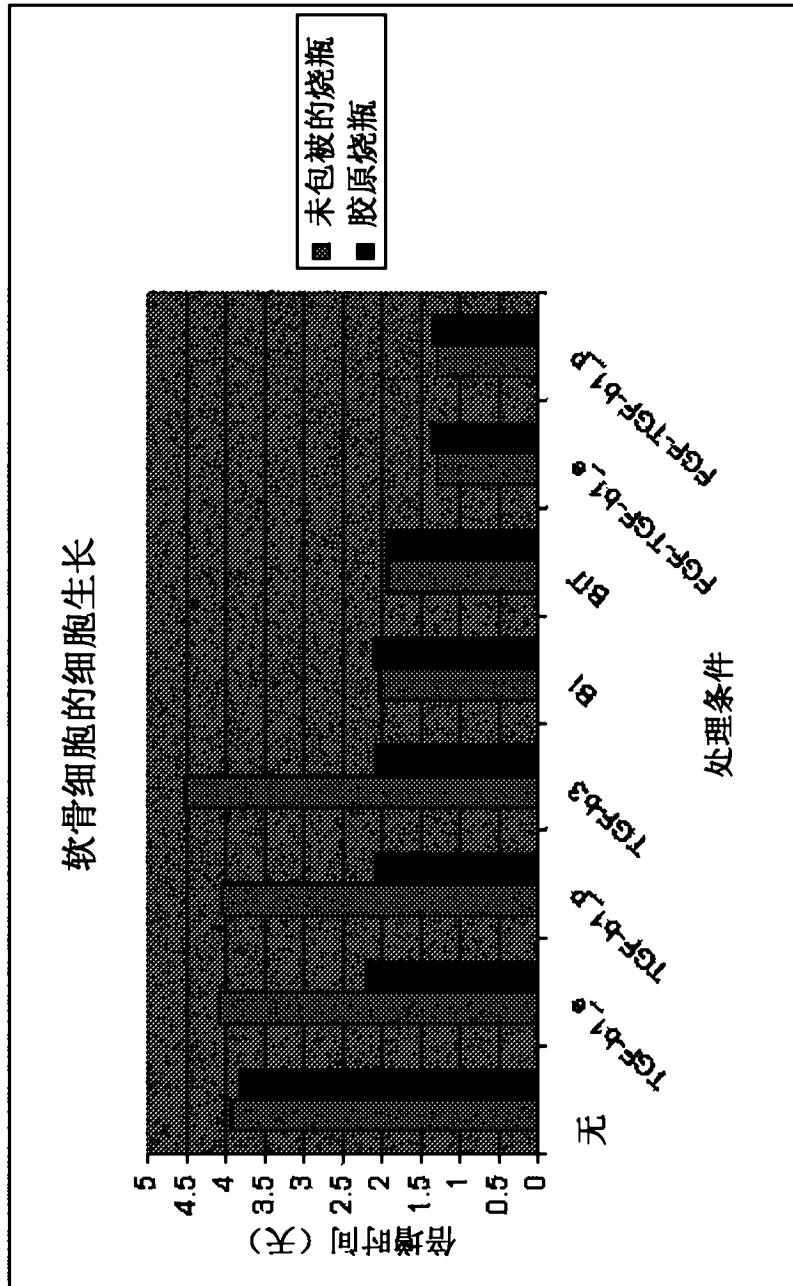


图 2

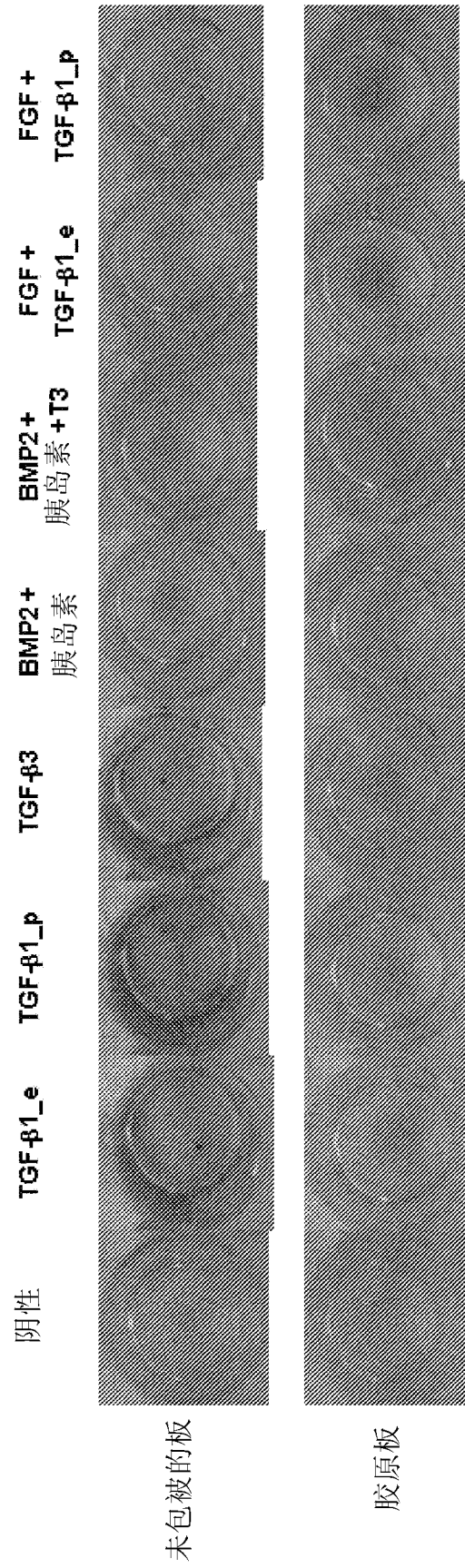


图 3

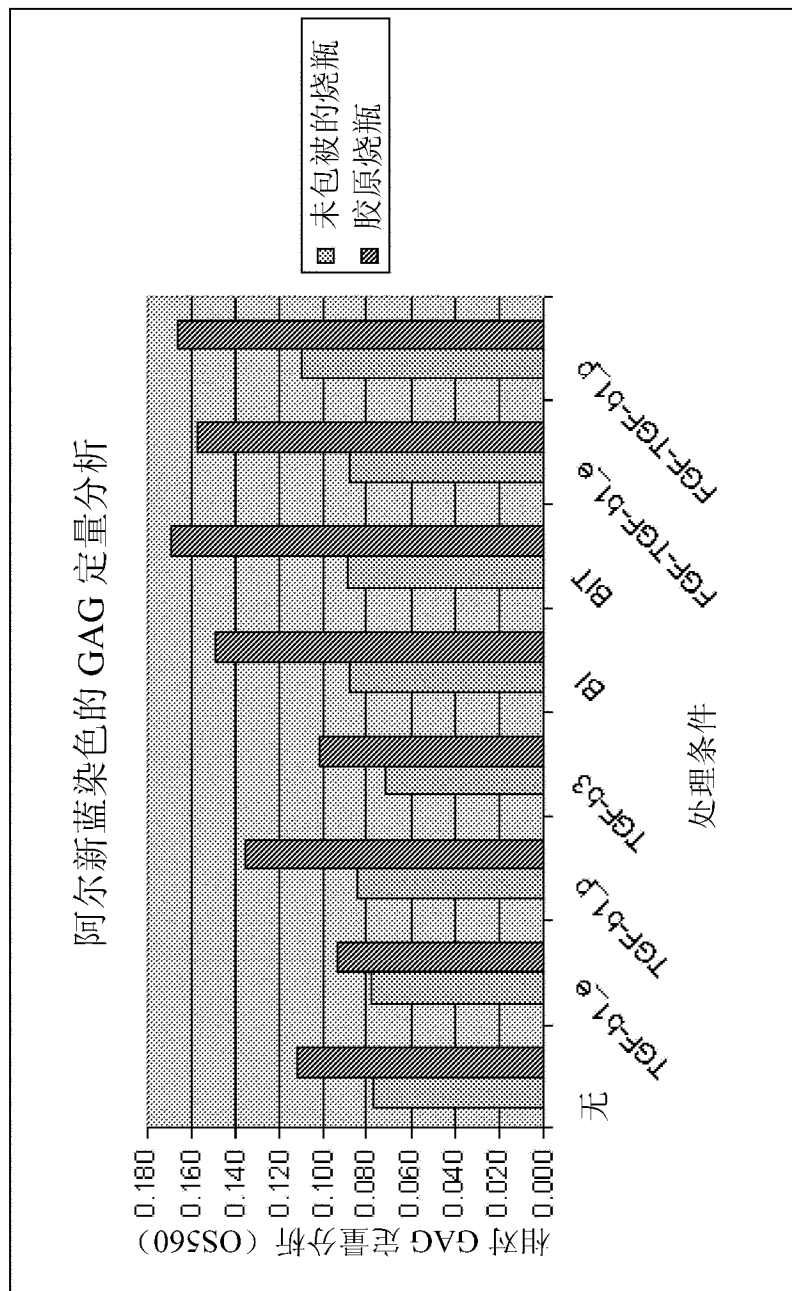


图 4

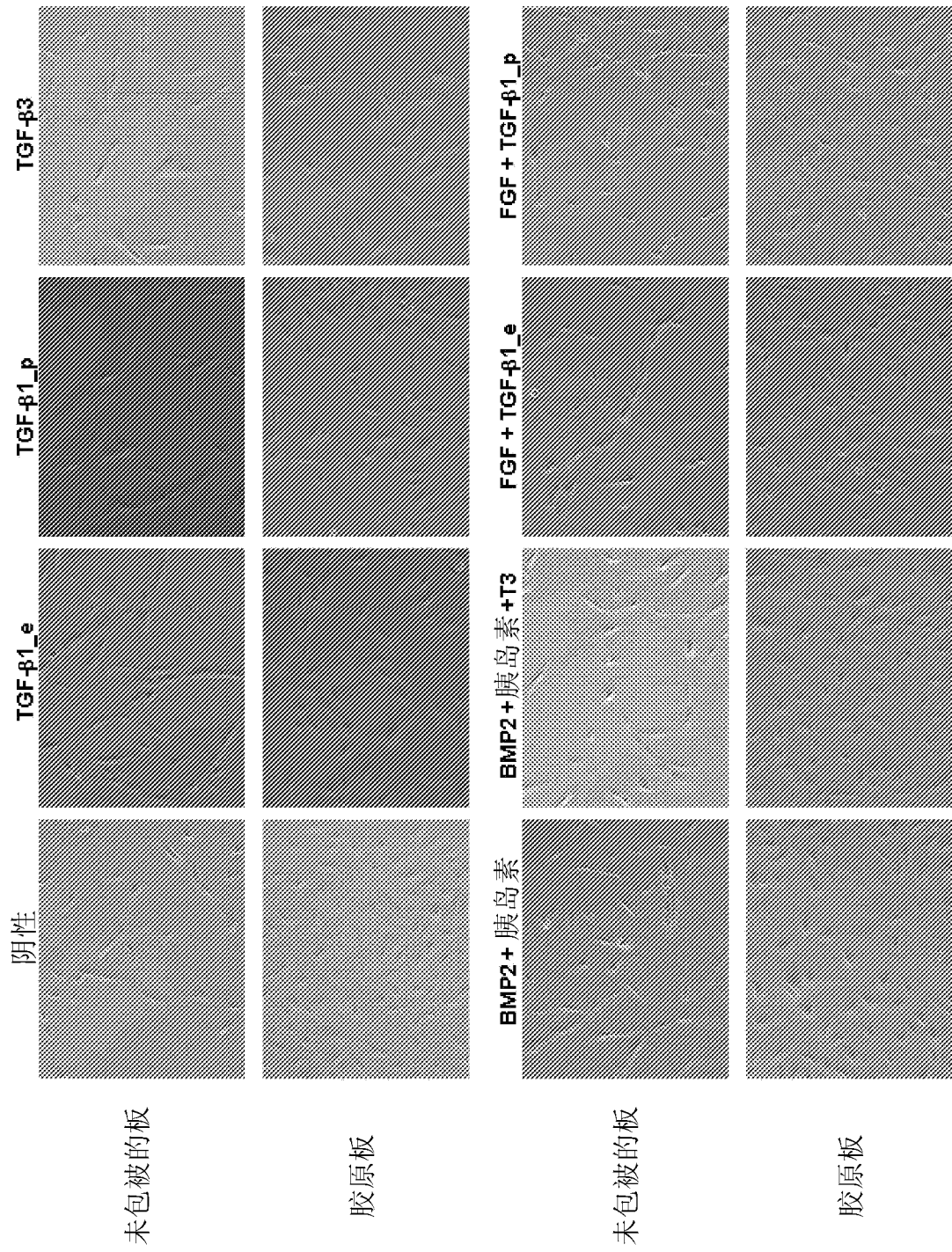


图 5

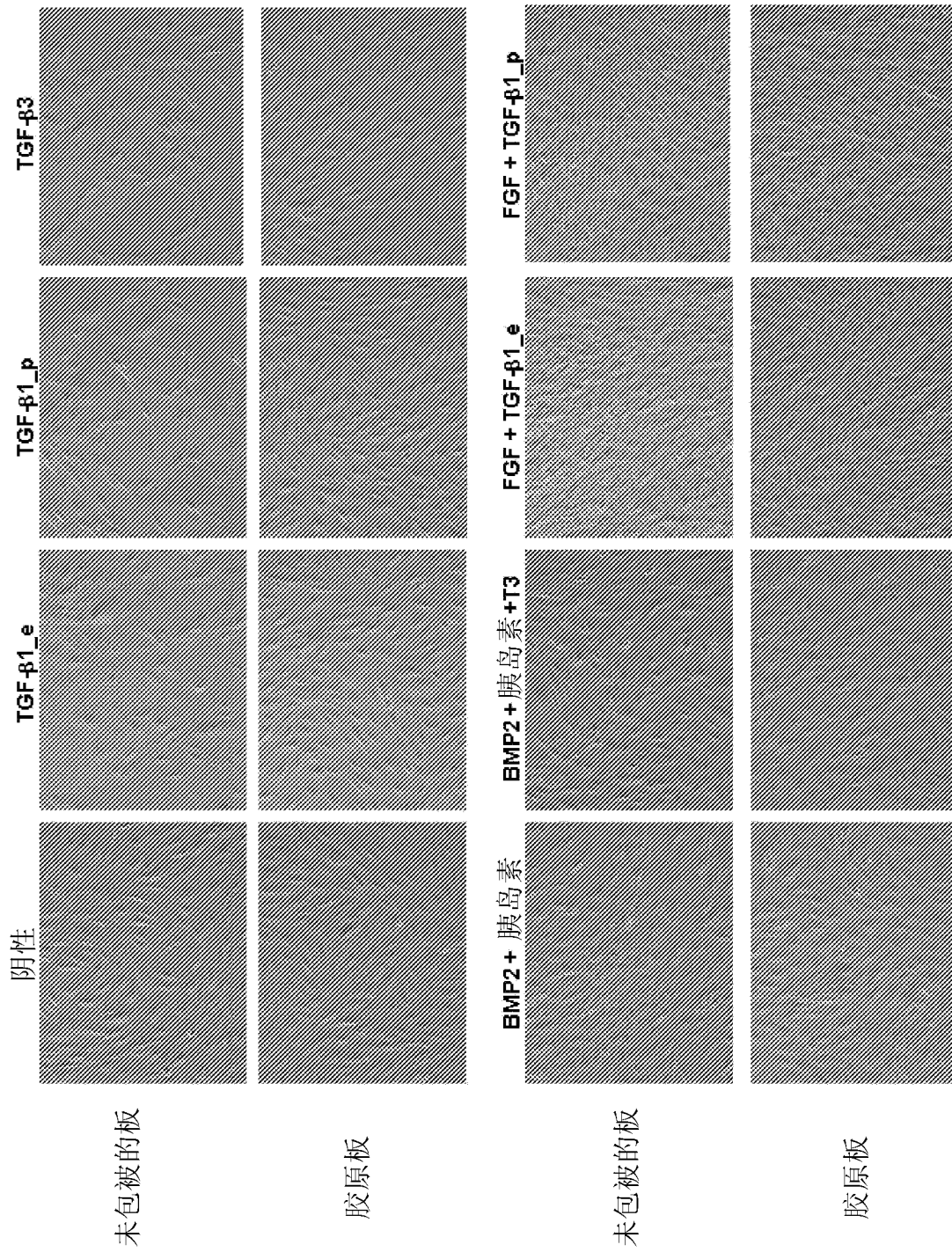


图 6