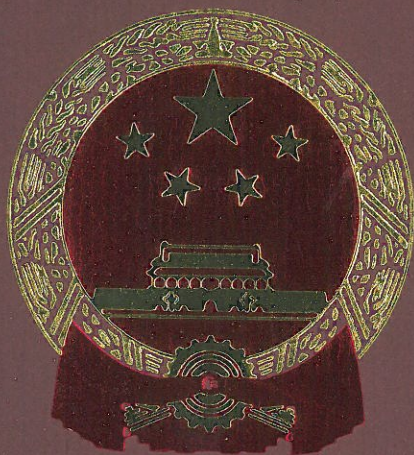




发明专利证书

Certificate of Invention Patent

中华人民共和国国家知识产权局

STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA

证书号第1618527号



发明专利证书

发明名称：充质干细胞及提取方法在制备多发性硬化症药物中的应用

发明人：王宏林

专利号：ZL 2012 1 0002750.3

专利申请日：2012年01月06日

专利权人：上海交通大学医学院

授权公告日：2015年04月01日

本发明经过本局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发本证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为二十年，自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则规定缴纳年费。本专利的年费应当在每年01月06日前缴纳。未按照规定缴纳年费的，专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长
申长雨

申长雨





(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103191155 B

(45) 授权公告日 2015.04.01

(21) 申请号 201210002750.3

(22) 申请日 2012.01.06

(73) 专利权人 上海交通大学医学院

地址 200025 上海市卢湾区重庆南路 280 号
5 号楼 1001 室

(72) 发明人 王宏林

(74) 专利代理机构 上海大邦律师事务所 31252
代理人 袁洋

(51) Int. Cl.

C12N 5/0775(2010.01)

A61K 35/36(2015.01)

A61P 25/00(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1597937 A, 2005.03.23, 全文.

王友臣等. 间充质干细胞应用的研究进展.《实用医学杂志》.2011, 第 27 卷(第 20 期), 第 3806 页右栏第 1-3 行, 第 3807 页中栏第 2-4 行.

王友臣等. 间充质干细胞应用的研究进展.《实用医学杂志》.2011, 第 27 卷(第 20 期), 第 3806 页右栏第 1-3 行, 第 3807 页中栏第 2-4 行.

杨立业等. 皮肤间充质干细胞的体外培养和分化.《生物医学工程学杂志》.2005, 第 22 卷(第 3 期), 第 515 页“2.2 细胞培养”.

审查员 胡嘉蕴

权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

充质干细胞及提取方法在制备多发性硬化症药物中的应用

(57) 摘要

本发明的目的在于提供充质干细胞在制备具有治疗治疗多发性硬化症的药物中的应用, 充质干细胞能够有效地抑制多发性硬化症患者在中枢神经系统内过度活化的效应 T 细胞免疫应答, 诱导具特异性功能的调节性 T 细胞发生, 分化成新的神经细胞, 从而修补受损的神经组织而治疗发性硬化症患。这种应用中涉及的皮肤间充质干细胞取得容易、不具免疫排斥性、疗效高、治疗后疾病不易复发而副作用小的有益效果。

1. 如下所述的充质干细胞在制备治疗具有免疫调节功能的药物中的应用,其中所述的充质干细胞来源于皮肤真皮层中,所述的充质干细胞通过下列方法提取:剪取背部皮肤置于 dispase 酶中,使用 PBS 液清洗,剥去表皮,将真皮置于胶原酶中消化,完成后再添加 DNase I 消化,再用 PBS 洗一遍,用滴管吹打成单细胞悬液并过滤,接种于培养皿中,弃去悬浮细胞,将贴壁细胞继续培养,待长满瓶底大部分后,胰酶消化,常规传代。

2. 如下所述的充质干细胞在制备治疗多发性硬化症的药物中的应用,其中所述的充质干细胞来源于皮肤真皮层中,所述的充质干细胞通过下列方法提取:剪取背部皮肤置于 dispase 酶中,使用 PBS 液清洗,剥去表皮,将真皮置于胶原酶中消化,完成后再添加 DNase I 消化,再用 PBS 洗一遍,用滴管吹打成单细胞悬液并过滤,接种于培养皿中,弃去悬浮细胞,将贴壁细胞继续培养,待长满瓶底大部分后,胰酶消化,常规传代。

充质干细胞及提取方法在制备多发性硬化症药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及充质干细胞在制备具有免疫调节功能的药物中的应用,特别是皮肤间充质干细胞(Skin-derived Mesenchymal Stem Cells)在制备多发性硬化症的药物中的应用。

背景技术

[0002] 多发性硬化症(multiple sclerosis)是一种发生于中枢神经系统(脑部以及脊髓)的慢性、炎症性、自体免疫疾病,其特征是在中枢神经系统中异常神经退行病变(neurodegeneration)引发以T细胞、B细胞、抗原提呈细胞为主的炎症细胞浸润,从而导致多处的神经出现脱髓鞘(demyelination)现象,并在髓鞘组织修复的过程中,沿着轴突受损硬化。多发性硬化症的确切发病原因还不清楚,环境因子(诸如感染、外伤等)和遗传因子等综合因素决定了个体的易感性,患者可能出现行动不便、视力受损、疼痛等神经功能残缺症状(Hauser and Oksenberg, 2006)。

[0003] 多发性硬化症目前尚无根治的药物,IFN- β 和 glatiramer acetate 为常见的治疗复发型多发性硬化症(relapsing-remitting multiple sclerosis)的第一线药物,一般认为此两种药物能抑制炎症T细胞免疫应答,然而其作用机理尚不明确,也仅能达到适度舒缓疾病复发的机率(Hauser and Oksenberg, 2006)。另一种用于治疗严重多发性硬化症患者的药物为 Natalizumab,它的作用机理是透过抑制致病性淋巴细胞表面所表达的细胞黏附分子 $\alpha 4$ 整合素,达到阻止淋巴细胞迁移至中枢神经系统的效果(Hauser and Oksenberg, 2006)。虽然 Natalizumab 有较好的疗效,由于淋巴细胞在机体正常免疫反应中不可缺少,没有选择性地阻挡淋巴细胞迁移至中枢神经系统导致极高比例的病患在接受治疗后产生脑部感染症状(Martin, 2010)。此外,抗体类药物生产成本高、价格昂贵、普通病人很难能承受。多发性硬化症为导致神经功能残缺的最主要的疾病之一,全球有上千万人患病,患者的日常生活往往受到严重牵连。基于这一点,自主研究开发高效且低副作用的新疗法势在必行。

[0004] 充质干细胞(mesenchymal stem cell)是一种未分化、能自我增生、且能分化成多种间充质组织细胞的多能性细胞(Pittenger et al., 1999)。早期,间充质干细胞多从骨髓中取得,骨髓间充质干细胞具有抑制免疫应答和诱导外周免疫耐受的特质(Xu et al., 2007),曾被应用于抑制骨髓移植时所导致的移植体对宿主排斥反应(graft-versus-host disease, GVHD)(Le Blanc et al., 2004)。除了骨髓以外,间充质干细胞也存在于其他成体组织中。不同于骨髓间充质干细胞,在皮肤真皮层中的间充质干细胞,除了能分化成中胚层(mesodermal)相关组织细胞(如脂肪细胞、平滑肌细胞),还具有分化成神经细胞、造血细胞、肝细胞等多种非中胚层组织细胞的特性,因此在临床上有极大的应用价值(Sellheyer and Krah1, 2010)。由于大量的皮肤样本较骨髓易于取得,从皮肤样本提取治疗用间充质干细胞实属可行性高、用途广、侵入性小、且具经济效益的选择。

[0005] 然而,皮肤间充质干细胞的免疫调节功能目前尚未被发现。本发明提供一种透过

皮肤间充质干细胞在炎症环境中选择性地抑制致病性效应 T 细胞应答,促使神经细胞再生而达到治疗效果的多发性硬化症细胞疗法,并根据此法制备具有免疫调节功能的药物的应用特别是制备治疗多发性硬化症的药物的应用。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供一种充质干细胞在制备具有免疫调节功能的药物中的应用,以及相关充质干细胞的提取方法:

[0007] 充质干细胞在制备治疗具有免疫调节功能的药物中的应用。

[0008] 充质干细胞在制备治疗多发性硬化症的药物中的应用。

[0009] 所述的充质干细胞在制备治疗具有免疫调节功能的药物中的应用,其中所述的充质干细胞来源于皮肤真皮层中。

[0010] 所述的充质干细胞在制备治疗多发性硬化症的药物中的应用,其中所述的充质干细胞来源于皮肤真皮层中。

[0011] 所述的应用中所述的充质干细胞通过下列方法提取:剪取背部皮肤置于 dispase 酶中,使用 PBS 液清洗,剥去表皮,将真皮置于胶原酶中消化,完成后再添加 DNase I 消化,再用 PBS 洗一遍,用滴管吹打成单细胞悬液并过滤,接种于培养皿中,弃去悬浮细胞,将贴壁细胞继续培养,待长满瓶底大部分后,胰酶消化,常规传代。

[0012] 从小鼠皮肤真皮中分离得到真皮间充质干细胞:取新生小鼠,处死后剪取背部皮肤置于 dispase 酶中,使用 PBS 液清洗,剥去表皮,将真皮置于胶原酶中消化,完成后再添加 DNase I 消化,再用 PBS 洗一遍,用滴管吹打成单细胞悬液并过滤,接种于培养皿中,弃去悬浮细胞,将贴壁细胞继续培养,待长满瓶底大部分后,胰酶消化,常规传代,取传至第三代的细胞进行研究。对其进行鉴定:将体外培养的真皮间充质干细胞胰酶消化后接种于不同的分化诱导体系中,培养后经行组织染色,鉴定分化情况。向成骨细胞分化通过茜素红染色;向脂肪细胞分化通过形态学观察和油红染色(图 1)。观察到从小鼠皮肤真皮层中提取的皮肤间充质干细胞具有免疫调节的特性,在体外培养时能有效抑制效应 T 细胞免疫应答(图 2);用细胞标记物标记免疫磁珠分离的小鼠 T 细胞,与皮肤间充质干细胞共培养;在共培养中用抗体刺激 T 细胞。标记过的细胞的分裂增殖情况可以被流式细胞仪检测,这个实验说明了和骨髓间充质干细胞一样自体皮肤间充质干细胞均可以在体外抑制抗体刺激下的 T 细胞分裂增殖。测试皮肤间充质干细胞对多发性硬化症的治疗效果实验中,将皮肤间充质干细胞注入一种在组织学、免疫学、多基因特性和治疗反应性上与人类多发性硬化症极为相似的 experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) 小鼠体内, EAE 小鼠在皮肤间充质干细胞治疗 30 天后被基本治愈(图 3)。

[0013] 本发明有益效果:充质干细胞在炎症环境中选择性地抑制致病性效应 T 细胞应答并诱导调节性 T 细胞发生而达到治疗效果。本发明公开的皮肤间充质干细胞取得容易、不具免疫排斥性、能够在炎症环境中特异抑制致病性效应 T 细胞应答、促使神经细胞再生、疗效好、治疗后疾病不易复发而副作用小。

附图说明

[0014] 图 1:小鼠真皮间充质干细胞的分离鉴定:

- [0015] A, 体外培养的真皮间充质干细胞 ;
- [0016] B, 真皮间充质干细胞的成骨诱导分化 ;
- [0017] C, 真皮间充质干细胞的成脂诱导分化。
- [0018] 图 2 : 小鼠的同体皮肤间充质干细胞抑制效应 T 细胞免疫应答 :
- [0019] A, 同体骨髓间充质干细胞 (autologous bone marrow mesenchymal stem cells) 与 T 细共培养 3 天, 有 11.5% T 细胞分裂增殖 ;
- [0020] B, 同体皮肤间充质干细胞 (autologous skin-derived mesenchymal stem cells) 与 T 细共培养 3 天, 有 19.6% T 细胞分裂增殖 ;
- [0021] D, T 细胞单独培养有 85.0% 的分裂增殖 ;
- [0022] E, 没有用 anti-CD3 和 anti-CD28 抗体刺激的 T 细胞几乎没有分裂增值。这个预备实验说明了和骨髓间充质干细胞一样同体皮肤间充质干细胞均可以在体外抑制抗体刺激下的 T 细胞分裂增殖。
- [0023] 图 3 : 小鼠同体皮肤间充质干细胞对小鼠的 EAE 的治疗效果明显 :
- [0024] 浅色点状线条: 同体皮肤间充质干细胞治疗小鼠 EAE30 天的评分 ;
- [0025] 深色点状线条: 只注射 PBS 的对照小鼠 EAE30 天的评分。采用 5 分评分法, EAE 评分标准如下 : 0 分为不发病 ; 1 分为尾巴无力 ; 2 分为轻微后肢无力 ; 3 分为严重后肢瘫痪 ; 4 分为四肢瘫痪 ; 5 分为濒临死亡或死亡。

具体实施方式

- [0026] 1. 小鼠真皮间充质干细胞的分离
- [0027] 取出生 3 天左右的新生小鼠, 引颈处死, 酒精消毒, 剪取背部皮肤置于 0.25% 的 dispase 酶中, 4℃ 消化过夜, PBS 液清洗 3 次, 剥去表皮, 将真皮置于 0.2% 的胶原酶中消化一个小时, 消化完成后再添加 DNase I 消化 10 到 15 分钟, 用 PBS 洗一遍, 用滴管吹打成单细胞悬液, 过滤除去大块组织和碎片, 接种于培养皿中, 培养条件为 DMEM (low glucose)+10% 胎牛血清, 37℃, 5%CO₂。培养 6 小时后, 轻轻弃去悬浮细胞, 将贴壁细胞继续培养, 待长满瓶底大部分后, 胰酶消化, 常规传代。取传至第三代的细胞进行研究。
- [0028] 2. 小鼠真皮间充质干细胞的鉴定
- [0029] 将体外培养的真皮间充质干细胞胰酶消化后接种于不同的分化诱导体系中, 培养 3 周 后经行组织染色, 鉴定分化情况。向成骨细胞分化通过茜素红染色 ; 向脂肪细胞分化通过形态学观察和油红染色。
- [0030] 3. 小鼠的皮肤间充质干细胞抑制效应 T 细胞免疫应答 ;
- [0031] 用细胞标记物 CFSE 来标记免疫磁珠分离的小鼠 CD4⁺CD25⁻ T 细胞, 与皮肤间充质干细胞共培养 (皮肤间充质干细胞 : T 细胞为 1 : 4); 在共培养中用 anti-CD3 和 anti-CD28 抗体刺激 T 细胞 3 天。CFSE 标记过的细胞的分裂增殖情况可以被流式细胞仪检测。
- [0032] 4. 小鼠皮肤间充质干细胞对小鼠 EAE 的治疗 ;
- [0033] 首先是建立 EAE 模型, 在不完全弗氏佐剂中加入热灭活结核分枝杆菌, 即为完全弗氏佐剂, MOG35-55 配成终浓度 10mg/ml。小鼠分别于背侧中线两侧 2 点皮下注射由 MOG35-55 与 CFA 按 1:1 混合乳化抗原。免疫当天及第二天给小鼠尾静脉注射百日咳毒素 200ng/ 只, 诱导小鼠产生 EAE。运用一定的方法分离从小鼠皮肤真皮中分离间充质干细胞,

培养至 P3 代。每只患病小鼠尾静脉注射 1×10^6 个皮肤间充质干细胞, 观察 30 天且每天评分。

[0034] 5. 皮肤间充质干细胞对人类多发性硬化症患者的治疗。

[0035] 从人的皮肤中分离出皮肤间充质干细胞, 无菌环境下培养至 P3 代。每位患者静脉注射 50×10^6 个皮肤间充质干细胞进行治疗。

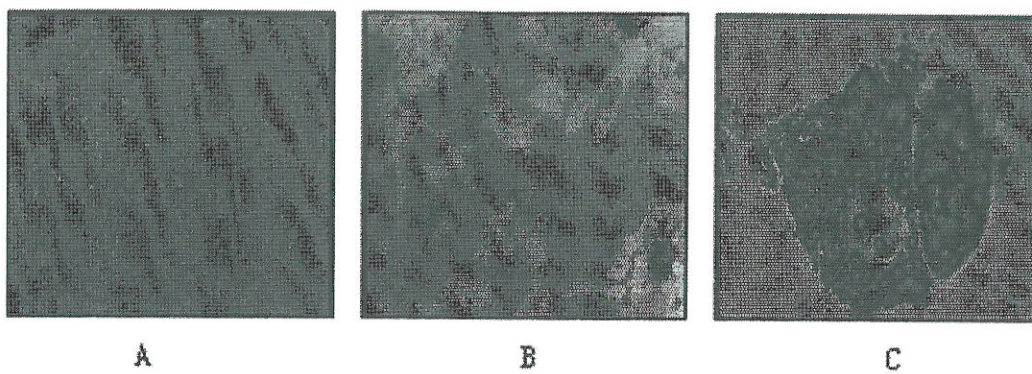


图 1

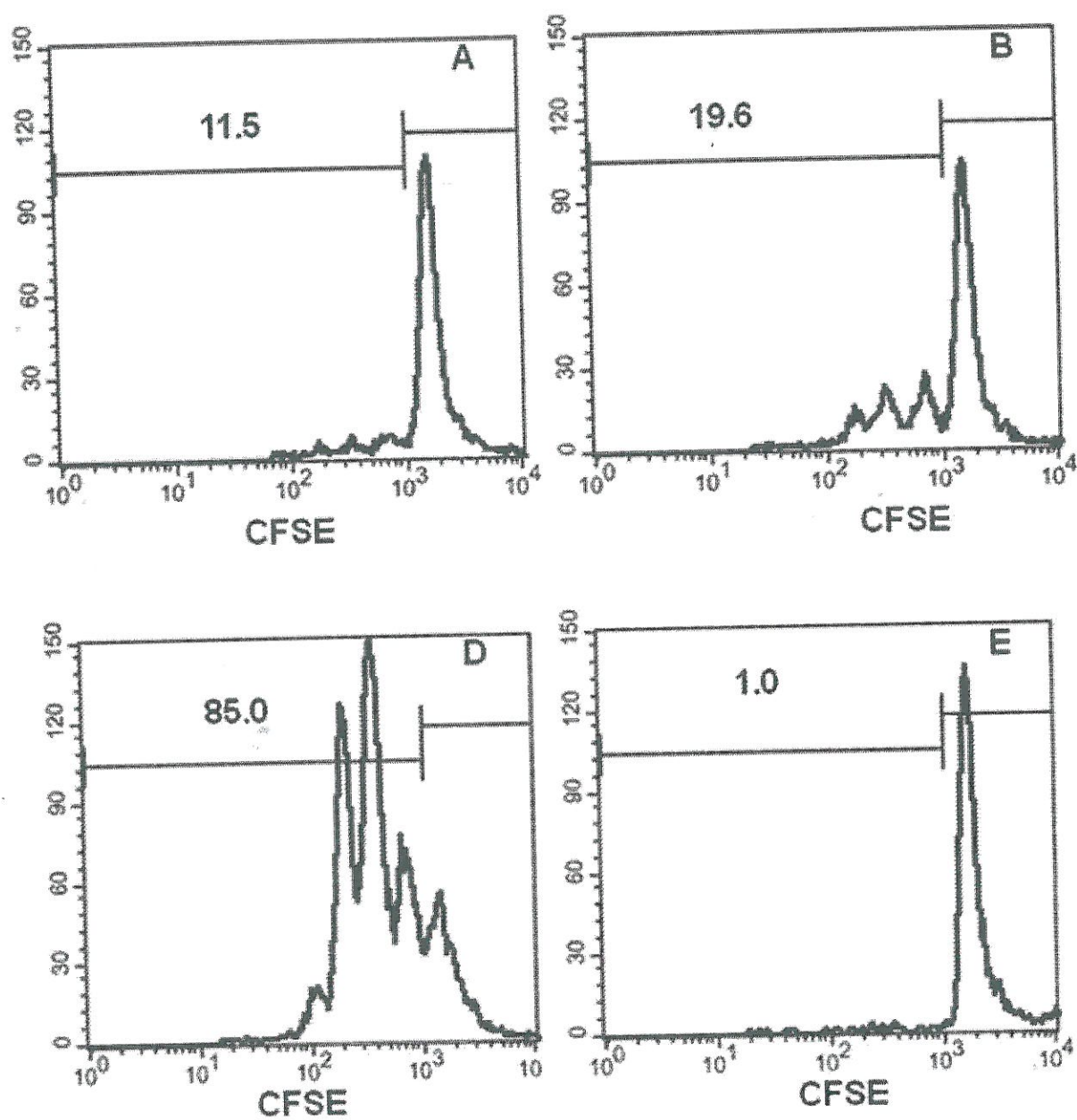


图 2

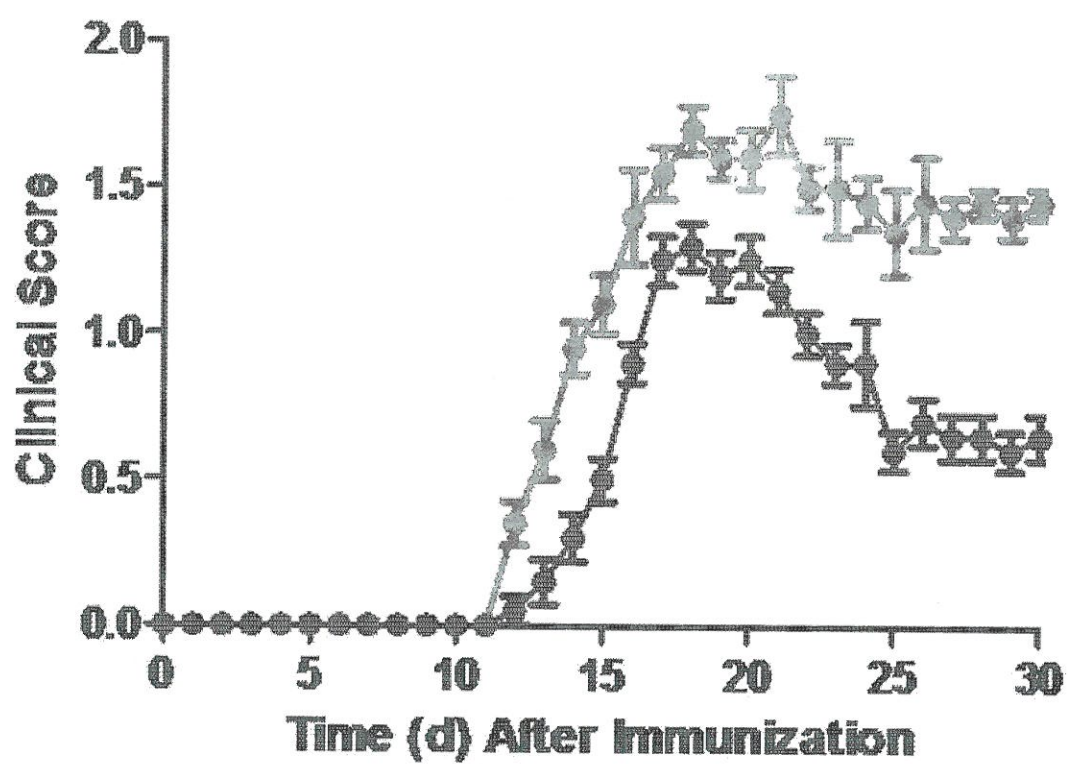


图 3