



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108671224 B

(45) 授权公告日 2022.12.13

(21) 申请号 201810498785.8

A61K 31/727 (2006.01)

(22) 申请日 2012.06.26

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

WO 2009152084 A2, 2009.12.17

申请公布号 CN 108671224 A

CN 111107857 A, 2020.05.05

(43) 申请公布日 2018.10.19

CN 105636599 A, 2016.06.01

(30) 优先权数据

WO 2019126494 A1, 2019.06.27

61/501,411 2011.06.27 US

JP 2011508771 A, 2011.03.17

61/547,897 2011.10.17 US

WO 2010064267 A1, 2010.06.10

(62) 分案原申请数据

US 2009305401 A1, 2009.12.10

201280036793.1 2012.06.26

胡晓琴 等.富血小板血浆 (PRP) 裂解液在苯扎溴铵诱导的小鼠干眼治疗中的作用.《眼科新进展》.2019, 第39卷 (第11期),

(73) 专利权人 爱默蕾大学

Ranzato 等. Platelet lysate promotes in vitro wound scratch closure of.《JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR MEDICINE》.2008, 第13卷 (第8b期), (续)

地址 美国佐治亚州

审查员 郝攀

专利权人 亚特兰大儿童医疗保健公司

(72) 发明人 伊恩·B·科普兰 雅克·加利波

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理人 牟静芳 郑霞

(51) Int.Cl.

权利要求书1页 说明书14页 附图5页

A61K 38/18 (2006.01)

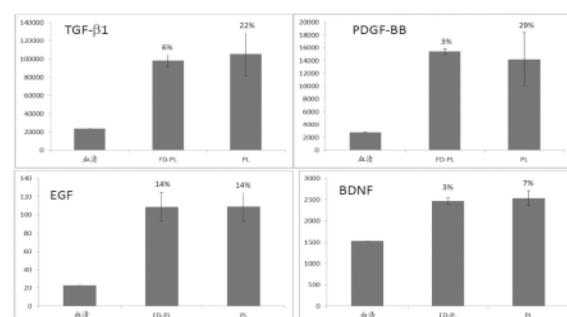
A61P 27/02 (2006.01)

A61K 35/19 (2015.01)

(54) 发明名称

物; (b) 去除细胞碎片; 以及 (c) 通过添加金属盐诸如氯化钙而形成可去除的团块来耗尽纤维蛋白原。另外, 本披露还描述了使用所述方法生产的产物。

血小板裂解物的组合物、用途和制备



B  
CN 108671224 B  
本申请涉及血小板裂解物的组合物、用途和制备。特别地, 本申请涉及组合物在制备用于治疗或预防干眼的药用组合物中的用途, 其中所述组合物包括肝素、肝素稳定化的生长因子和具有小于50 μg/mL的纤维蛋白原的浓度和大于10ng/mL的PDGF-BB的浓度的血小板裂解物组分。在某些实施例中, 本披露描述了包括耗尽了纤维蛋白原的血小板裂解物的组合物。在另外的实施例中, 该组合物进一步包括细胞培养基组分。本披露还提供一种用于制备该组合物的方法, 该方法包括以下步骤: (a) 对血小板进行裂解, 提供裂解

[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

Geremicca 等.Blood components for topical use in tissue regeneration: evaluation of corneal lesions treated

with platelet lysate and considerations on repair mechanisms.《Blood Transufs》.2010,第8卷(第2期),

1. 组合物在制备用于治疗干眼的药用组合物中的用途,其中所述组合物包括肝素、肝素稳定化的生长因子和具有小于50 $\mu$ g/mL的纤维蛋白原的浓度和大于10ng/mL的PDGF-BB的浓度的血小板裂解物组分,并且其中该组合物实质上耗尽了纤维蛋白原。
2. 如权利要求1所述的用途,其中这些血小板裂解物组分没有实质上耗尽PDGF。
3. 如权利要求1所述的用途,其中该组合物是水溶液。
4. 如权利要求3所述的用途,其中该纤维蛋白原的浓度小于4 $\mu$ g/mL。
5. 如权利要求1所述的用途,其中该纤维蛋白原的浓度小于10 $\mu$ g/mL。
6. 如权利要求1所述的用途,其中该纤维蛋白原的浓度小于2 $\mu$ g/mL。
7. 如权利要求1所述的用途,其中该组合物实质上不含有冷冻沉淀物。
8. 如权利要求1所述的用途,其中该组合物还包括细胞培养基组分。
9. 如权利要求1所述的用途,其中该组合物实质上不含有细胞碎片。
10. 如权利要求1所述的用途,其中该组合物还包括钙盐。
11. 如权利要求10所述的用途,其中该钙盐溶解于缓冲液或等渗的电解质溶液中。
12. 如权利要求10所述的用途,其中该钙盐是氯化钙。
13. 组合物在制备用于治疗干眼的药用组合物中的用途,其中该组合物通过从权利要求3中定义的组合物中去除水的工艺而制成。

## 血小板裂解物的组合物、用途和制备

[0001] 本申请是申请日为2012年06月26日,申请号为201280036793.1,发明名称为“血小板裂解物的组合物、用途和制备”的申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2011年6月27日提交的美国临时申请号61/501,411和2011年10月17日提交的美国临时申请号61/547,897的优先权,两者都通过引用以其全文特此结合。

[0004] 领域

[0005] 在某些实施例中,本披露描述了包括耗尽了纤维蛋白原的血小板裂解物和冷冻沉淀物的组合物。在一个进一步的实施例中,该组合物进一步包括一种细胞培养基组分。本披露还提供了一种用于制备该组合物的方法,该方法包括以下步骤: (a) 对血小板进行裂解, 提供一种裂解物; (b) 去除细胞碎片; 以及 (c) 通过添加一种金属盐诸如氯化钙而形成一种可去除的团块来耗尽纤维蛋白原。另外,本披露还描述了使用所述方法生产的产物。

[0006] 背景

[0007] 再生医学是一个广阔的领域,在该领域中运用了众多技术以增强机体的自愈能力。一种这样的技术是细胞疗法。若干细胞类型已经被用于细胞疗法,这些细胞类型包括但不限于胚胎细胞、新生儿细胞、体细胞、异种细胞和诱导性多功能细胞 (induced pluripotent cell)。间充质干细胞 (MSC) 通过使骨骼组织诸如骨、软骨和腱再生同时也治疗神经元变性和支持造血细胞植入而尤其具有经证实的治疗效果。见例如Doucet (杜塞) 等人, *J Cell Phys* (《细胞生理学杂志》), (2005), 205:228-236 和 Lange (兰格) 等人, *J Cell Physiol* (《细胞生理学杂志》), (2007), 213:18-26。

[0008] 以前的努力已经使用一种包含胎牛血清 (FBS) 的生长培养基来离体使供体细胞增殖。尽管在转移到该受体之前对这些供体细胞进行了清洗, FBS 在该培养基中的存在已经引起针对 FBS 的抗体的产生并且已经导致阿瑟氏样反应 (arthus-like reaction)。Selvaggi (塞尔瓦吉) 等人, *Blood* (《血液》), (1997), 89 (3): 776-9。关于动物朊病毒、病毒的和人畜共患病污染的转移的顾虑也围绕着对 FBS 的使用。与在生长培养基中使用 FBS 相关联的这些潜在的并发症已经造成了对于能够保持细胞功能性的非异种生长补充剂的一种特别关注。

[0009] 在使 MSC 离体增殖的努力中,自体的和同种异体的人血清都作为 FBS 的一种替代物进行了测试。同种异体血清导致了 MSC 的细胞生长停滞和死亡。Shahdadfar (斯哈德发) 等人, *Stem Cells* (《干细胞》), (2005) 23 (9): 1357-66。即使自体血清使 MSC 有效地增殖, 务实的顾虑诸如血清的成本和可获得性致使这种方法有些不切实际。见例如Kobayashi (小林) 等人, *J Bone Joint Surg Br* (《骨与关节外科杂志》), (2005), 87 (10): 1426-33。以前的研究表明, 从人血小板中释放的生长因子有效地增强若干细胞类型包括 MSC 的生长。于是, 最近的努力已经集中在使用血小板裂解物代替 FBS 作为一种细胞培养补充剂。

[0010] 血小板能够释放多种生长因子, 诸如多种血小板衍生生长因子 (PDGF)、胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 以及转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ )。Sanchez (桑切斯) 等人, *Int J Oral Maxillofac Implants* (《口腔与上颌面植入国际杂志》), (2003), 18 (1): 93-103。为了对细胞培养基补充这些生长因子的目的, 血小板裂解物显示出是优于血小板粘附和血小板凝集

两种方法的。Doucet (杜塞) 等人, J Cell Phys (《细胞生理学杂志》), (2005), 205:228-236。

[0011] 尽管增强细胞生长,对未经处理的血小板裂解物的使用造成了它自身的一组并发症。直到最近,对离体细胞疗法的临床使用已经使用FBS作为一种细胞培养生长补充剂,而关于在临床应用中使用血小板裂解物的考虑因素仍然有待解决。这些考虑因素包括细胞碎片、凝血因子和冷冻沉淀物的存在,连同在血小板裂解物的存在下所培养的细胞的这些免疫抑制特性。另外,在细胞培养物中对未经处理的血小板裂解物的使用导致了纤维蛋白原向纤维蛋白的转化。一般而言,直接将肝素添加至该细胞培养物以防止这种转化。见例如 Schallmoser (斯卡尔莫斯) 等人, Tissue Eng Part C Methods (《组织工程学部分C方法》), (2008), 14 (3) :185-96。尽管有对肝素的这种使用,大纤维束可以在这些培养基之内形成并且附着于MSC单层。这带有将这些纤维束注入患者的风险,潜在地导致微型闭塞或大型闭塞。因此,有需要去找到将纤维束的产生降低的改进的方法。

[0012] 酶原凝血素在肝中产生。它在两个位点被因子Xa酶促切割,产生凝血酶。凝血酶转而通过纤维蛋白原向纤维蛋白的转化介导凝血。纤维蛋白可以与转谷氨酰胺酶因子XIII交联,形成一种凝块。该纤维蛋白可以聚结为纤维束,这些纤维束如果被转移到患者体内是危险的,正如以上所说明的。肝素可以用于增加抗凝血酶对凝血酶和因子Xa两者的亲和性,潜在地扰乱凝血级联。

### [0013] 概述

[0014] 在某些实施例中,本披露描述了包括耗尽了纤维蛋白原的血小板裂解物和冷冻沉淀物的组合物。在一个进一步的实施例中,该组合物进一步包括一种细胞培养基组分。本披露还提供了一种用于制备该组合物的方法,该方法包括以下步骤: (a) 对血小板进行裂解,提供一种裂解物; (b) 去除细胞碎片; 以及 (c) 通过添加一种金属盐诸如氯化钙而形成一种可去除的团块来耗尽纤维蛋白原。另外,本披露还描述了使用所述方法生产的产物。

[0015] 在某些实施例中,该血小板裂解物组合物实质上耗尽了纤维蛋白原。在一些实施例中,该组合物所具有的纤维蛋白原的浓度为小于或大约2或4 $\mu$ g/mL。在一些实施例中,该组合物所具有的PDGF-BB的浓度为多于或大约15、30或40ng/mL。在一些实施例中,该组合物不包含酸性柠檬酸盐右旋糖(ACD)或不包含大量的钙螯合性抗凝剂诸如酸性柠檬酸盐。在一些实施例中,该组合物实质上不含有细胞碎片。在一些实施例中,该组合物实质上不含有冷冻沉淀物。在一些实施例中,该组合物实质上耗尽了凝血酶。

[0016] 在一些实施例中,本披露涉及一种使用包括所述组合物的一种细胞培养基培养细胞的方法。典型的细胞培养基包含氨基酸和可任选的胰岛素、激素、抗生素和糖类。在一些实施例中,这些经培养的细胞为体细胞、新生儿细胞、胚胎细胞、异种细胞或多功能细胞。在一些实施例中,这些经培养的细胞为MSC。

[0017] 在一些实施例中,本披露涉及从选自以下的物种中扩增细胞: 哺乳类动物、猪、灵长类动物、人类灵长类动物和非人类灵长类动物。

[0018] 在一些实施例中,本披露涉及一种制备该组合物的方法,该方法包括以下步骤: (a) 对血小板进行裂解,提供一种裂解物; (b) 去除细胞碎片; 以及 (c) 实质上耗尽纤维蛋白原。在某些实施例中,该方法进一步包括以下步骤: (d) 去除钙螯合性抗凝剂,例如ACD,并且对该组合物进行再钙化。在一些实施例中,在纤维蛋白原耗尽之前、在纤维蛋白原耗尽之后、或在纤维蛋白原耗尽之前和之后都将该细胞碎片去除。在一些实施例中,在去除细胞碎

片之前、在去除细胞碎片之后、当对细胞碎片的去除未完成时、在耗尽纤维蛋白原之前、在耗尽纤维蛋白原之后、或在对纤维蛋白原的耗尽完成之前对多种血小板裂解物进行合并。在一些实施例中,该合并发生在过滤之前或之后。在一些实施例中,通过一次或多次解冻对血小板进行裂解。在一些实施例中,一种金属盐,诸如二价金属盐,典型的是一种钙盐,被添加至单独的或经合并的裂解物中。在一些实施例中,肝素被添加至单独的或经合并的裂解物中。在一些实施例中,对经合并的裂解物进行观察,直至一种可见的凝块出现。在一些实施例中,将所述可见的凝块去除,例如通过离心。

[0019] 在一些实施例中,本披露涉及通过在本文中所披露的方法生产的产物。在一些实施例中,该产物是灭菌的或实质上是不含有细菌的,例如是支原体阴性的。在一些实施例中,该产物所具有的纤维蛋白原的浓度为小于2、3、4、5、10、20或50 $\mu$ g/mL。在一些实施例中,该产物所具有的PDGF-BB的浓度为大于1、5、10、15或40ng/mL。

[0020] 在某些实施例中,披露涉及治疗或预防在本文中所提供的疾病或病症的方法,这些方法包括将一个有效量的、包括经纤维蛋白原耗尽的血小板裂解物或组分的一种药用组合物给予一名需要其的受试者。

[0021] 在一些实施例中,本披露涉及作为一种局部试剂的用途和/或在眼科学中细胞产物的产生。在某些实施例中,本披露涉及治疗或预防一种眼部疾病或病症的方法,这些方法包括将一个有效量的、包括在本文中所披露的组合物的一种药用组合物给予一名需要其的受试者。在某些实施例中,该受试者对其有需要,因为该受试者被诊断为患有以下疾病、面临以下疾病的风险或表现出以下疾病的症状:巩膜炎,角膜炎,角膜溃疡或擦伤,角膜血管新生,Fuch营养不良,角膜结膜炎,虹膜炎,葡萄膜炎,白内障,脉络膜视网膜炎,后睫状体炎,脉络膜视网膜瘢痕,脉络膜视网膜变性,脉络膜营养不良,脉络膜出血或破裂,脉络膜脱离,视网膜脱离,视网膜劈裂症,高血压性视网膜病变,糖尿病性视网膜病变,与年龄相关的黄斑变性,黄斑变性,色素性视网膜炎,黄斑水肿,青光眼,飞蚊症,视神经病变,视神经乳头玻璃疣,弱视,暗点,夜盲症,红眼,眼干燥症,或失明。

[0022] 在某些实施例中,本披露涉及治疗或预防一种眼部疾病或病症的方法,这些方法包括将一个有效量的、包括在本文中所披露的血小板裂解物组分的一种组合物给予一名需要其的受试者。

[0023] 在某些实施例中,通过将一种包括在本文中所披露的一种组合物的溶液滴在该受试者的眼中来给予该组合物。在某些实施例中,向眼的内部给予该组合物,例如通过穿过外眼的细胞插入至水状液或玻璃状液中的注射器或其他输送装置诸如细导管或管。

[0024] 在某些实施例中,本披露想到使用经纤维蛋白原耗尽的血小板裂解物用于免疫抑制性单核细胞的繁殖。

[0025] 在某些实施例中,本披露想到使用在本文中所产生和披露的间充质干/基质细胞以在体内产生成骨细胞、脂肪细胞、和软骨细胞、肌细胞和神经元。

[0026] 在某些实施例中,本披露涉及组合物,这些组合物包括与通过一种冻融工艺产生的血小板裂解物相比较纤维蛋白原的量降低的血小板裂解物组分,例如其中该组合物实质上耗尽了纤维蛋白原并且这些血小板裂解物组分没有实质上耗尽PDGF。在某些实施例中,该组合物是一种具有小于2或4 $\mu$ g/mL的纤维蛋白原浓度的水溶液,其中PDGF-BB的浓度大于15ng/mL。在某些实施例中,本披露涉及多种组合物,这些组合物通过从在本文中所披露的

血小板裂解物组合物中通过冻干法去除水的工艺制成。

[0027] 在某些实施例中,本披露想到培养细胞的方法,其中细胞在一种培养基中进行培养,该培养基包括在本文中所披露的血小板裂解物组分。在某些实施例中,这些细胞为祖细胞或干细胞诸如多功能干细胞(pluripotent stem cell)、多潜能干细胞(multipotent stem cell)、体干细胞、间充质干/基质细胞、脂肪来源干/基质细胞、内皮干细胞、牙髓干细胞、胚胎干细胞、骨髓或造血干细胞、羊膜干细胞、淋巴样或髓样干细胞。

[0028] 在某些实施例中,本披露想到治疗一种创伤或创伤闭合的方法,这些方法包括向该创伤施用一种组合物,该组合物包括在本文中所披露的血小板裂解物组合物或组分。在某些实施例中,本披露想到创伤敷料,该创伤敷料包括在本文中所披露的血小板裂解物组合物或组分。创伤敷料的实例包括绷带、纱布、胶例如氰基丙烯酸酯胶、或缝合线。在某些实施例中,该创伤敷料进一步包括一种抗生素。

[0029] 本申请提供了以下内容:

[0030] 1).一种组合物,包括与通过一种冻融工艺生产的血小板裂解物相比较纤维蛋白原的量降低的血小板裂解物组分。

[0031] 2).如1)所述的组合物,其中该组合物实质上耗尽了纤维蛋白原。

[0032] 3).如1)所述的组合物,其中这些血小板裂解物组分没有实质上耗尽PDGF。

[0033] 4).如1)所述的组合物,其中该组合物是一种具有小于50 $\mu$ g/mL的纤维蛋白原浓度的水溶液。

[0034] 5).如4)所述的组合物,其中纤维蛋白原的浓度小于4 $\mu$ g/mL。

[0035] 6).如4)所述的组合物,其中PDGF-BB的浓度大于15ng/mL。

[0036] 7).一种组合物,该组合物通过从如4)所述的组合物中去除水的工艺而制成。

[0037] 8).一种培养细胞的方法,其中在包括如1)所述的组合物的培养基中对细胞进行培养。

[0038] 9).如8)所述的方法,其中这些细胞为祖细胞或干细胞。

[0039] 10).如9)所述的方法,其中这些干细胞为多功能干细胞(pluripotent stem cell)、多潜能干细胞(multipotent stem cell)、体干细胞、间充质干细胞、脂肪来源干细胞、内皮干细胞、牙髓干细胞、胚胎干细胞、骨髓或造血干细胞、羊膜干细胞、淋巴样或髓样干细胞。

[0040] 11).一种治疗或预防一种眼部疾病或病症的方法,该方法包括将一个有效量的、包括如1)所述的组合物的一种药用组合物给予一名需要其的受试者。

[0041] 12).一种治疗创伤或创伤闭合的方法,该方法包括向该创伤施用包括如1)所述的组合物的一种组合物。

[0042] 13).一种创伤敷料,包括如1)所述的组合物。

[0043] 14).如13)所述的创伤敷料,选自绷带、纱布、氰基丙烯酸酯胶或缝合线。

[0044] 15).如13)所述的创伤敷料,进一步包括一种抗生素。

[0045] 附图简要说明

[0046] 图1显示了图形数据,这些图形数据表明尽管有在纤维蛋白原上的降低,FD-PL和phPL包含相似水平的所希望的生长因子如PDGF、TGF- $\beta$ 、EGF和BDNF,正如通过ELISA所测量的。

[0047] 图2显示了在储存7天之后进行的显微镜分析,该显微镜分析表明FD-PL(顶部)基本上不含有碎片,而phPL(底部)包含不同大小的颗粒。

[0048] 图3显示了MSC在FBS、phPL和FD-PL中进行离体扩增的数据,这些数据证明与FBS和phPL两者相比较,在FD-PL中培养MSC能够显著缩短倍增时间。

[0049] 图4显示了关于当在从FD-PL(GMP)和phPL(RG)中培养时,基于IDO诱导的MSC的INF- $\gamma$ 响应能力的数据,这些数据表明经FD-PL扩增的MSC具有优良的免疫抑制潜能。

[0050] 图5显示了对FD-PL(顶部)、phPL(中间)和血清(底部)进行的显微镜分析(右侧为左侧的扩展视图),该显微镜分析表明FD-PL能够促进一种CD11b和CD33阳性单核细胞群的附着和扩增。

[0051] 图6显示了关于使用phPL(左侧)、FD-PL(中间)和血清(右侧)使人角膜上皮细胞(HCEC)生长的增殖(顶部)和生活力(底部)的数据。

[0052] 详细说明

[0053] 使用肝素和金属盐类将纤维蛋白原从血小板裂解物中耗尽

[0054] 血小板或凝血细胞是来源于前体巨核细胞破碎的不具有包含DNA的细胞核的细胞。血小板在哺乳动物的血液中循环,并且涉及止血,导致血液凝块的形成。血小板去除法指的是收集这些血小板的方法。可以从全血中或通过一种装置对血小板进行合并,该装置将这些血小板分离并且将血液的其他部分返回到供体。典型地,在被称为一种“软旋转(soft spin)”的事物中,血清被放入一种大离心机中。在这些设置下,这些血小板仍然悬浮于该血浆中。从这些RBC中将该富血小板的血浆(PRP)去除,并且然后在一种更快的设置下进行离心以从该血浆中收获这些血小板。典型地,对这些所收集的血小板进行冷藏,以减缓这些细胞的降解。

[0055] 如在本文中所使用的,术语“血小板裂解物”指的是血小板裂解的这些产物。该血小板裂解物还可以包括在其中包含这些经裂解的血小板的任何培养基。在本披露中,冻融是用于对细胞进行裂解的典型的但不是唯一的方法。机械裂解,典型地通过使用剪切力的使用,是所想到的用于产生一种裂解物的另一种方法。裂解缓冲液,典型地通过将这些细胞放置在一种低渗溶液中来起作用,是又另一种选项。该裂解工艺可以由这些方法的组合组成。

[0056] 在某些实施例中,本披露涉及多种方法,其中将肝素和钙盐直接添加至血小板裂解物中,以便耗尽纤维蛋白原,使该裂解物再钙化并中和柠檬酸盐。在另一个实施例中,该产生的裂解物与细胞培养基结合。以前,在补充血小板裂解物之前,肝素被直接添加至细胞培养基;使用这种现有方法没有呈现出纤维蛋白原耗尽的证据。见例如Schallmoser(斯卡尔莫斯)等人,Tissue Eng Part C Methods(《组织工程学部分C方法》),(2008),14(3):185-96。

[0057] 在一些实施例中,本披露涉及血小板裂解物的组合物,其中补体实质上耗尽。这种耗尽可以是通过多种手段获得的,如在本文中所说明的。这种耗尽的一种用途是,这些实施例可以对于非人类细胞使用,同时最小化由人血小板裂解物产生的针对这些非人类细胞的任何补体介导的免疫反应性的风险。

[0058] 典型地,酸性柠檬酸盐右旋糖(ACD)被用作一种抗凝剂。见例如美国已公布的专利申请号12/441,870(ACD被描述为“一种重要的血液抗凝剂”)。通过降低钙的可获得性,ACD

使该钙丧失了它所依赖的凝血机制。见例如Reich-Slotky (莱希-斯洛特克) 等人, J Clin Apher (《临床血浆分离交换术杂志》), (2009), 24 (6): 265-8。用于在正常细胞活动中使用的钙也被ACD降低, 从而呈现出潜在的毒性。在本披露中, 肝素被用作该抗凝剂, 从而避免了ACD的这些潜在毒性的、钙耗尽性的影响。添加一种盐诸如一种钙盐, 理想的是CaCl<sub>2</sub>, 进一步中和了柠檬酸盐毒性并且使该血小板裂解物再钙化。在一些实施例中, 该CaCl<sub>2</sub>溶解于一种缓冲液中, 例如勃脉力 (Plasmalyte) A。在一些实施例中, 该CaCl<sub>2</sub>溶解于一种在大约pH 7.4下的灭菌的、等渗的电解质溶液中。在某些实施例中, 去除ACD (一种钙螯合性抗凝剂) 是在本文中所披露的方法的一部分。钙螯合剂对细胞培养物是有害的, 并且对钙的充分提供导致了最佳的功能。另外, 对生长因子的肝素诱导性稳定化以及对该产物的净化是在本披露中所包含的结果。在某些实施例中, 在本文中所披露的方法不要求使用ACD。

[0059] 经纤维蛋白原耗尽的血小板裂解物 (FD-PL或Multiplate FD) 比未经处理的血小板裂解物有益。益处包括但不限于以下发现: Multiplate FD在对MSC进行扩增中优于未经处理的血小板裂解物和FBS, Multiplate FD是非异种的 (即它不造成人畜共患病或朊病毒传染的风险), Multiplate FD去除了对在培养基中额外的肝素的需要, Multiplate FD避免了纤维束形成于培养基中并且附着于MSC单层的风险 (即降低了微型闭塞或大型闭塞的风险), Multiplate FD在制造用于自体免疫和同种免疫疗法的MSC中在稳定性上优于未经处理的血小板裂解物, Multiplate FD保留了使用胎牛血清所见到的这些免疫抑制特性并且用于对来自多种谱系和物种的细胞进行扩增比未经处理的血小板裂解物更加通用。

[0060] 在本披露中所描述的这些实施例可以应用至用于再生医学、免疫疗法、释放生物活性因子、癌以及其他相关领域的临床治疗。

[0061] 对血小板裂解物中蛋白成分的分析

[0062] 使用RayBio®人细胞因子抗体阵列C系列4000, 对大约174种蛋白的相对表达水平进行了比较。在四种溶液 (人血清、贫血小板血浆、粗血小板裂解物 (phPL) 以及经纤维蛋白原耗尽的血小板裂解物 (FD-PL)) 中的至少一种中对蛋白进行了检测。在这116种蛋白中, 87种可以在FD-PL中检测到, 而在phPL中, 113种蛋白是可检测的。在血清中, 67种被检测到, 而在PPP中, 60种蛋白被检测到。典型地, 在所有样品中的这些最丰富的蛋白是MSP- $\alpha$ 、ACRP30、血管生成素和RANTES。巨噬细胞刺激蛋白 (MSP- $\alpha$ 链) 也被称为HGF样蛋白 (肝细胞生长因子样蛋白) 和MST1 (巨噬细胞刺激1)。它是一种70kDa的由二硫键连接的杂二聚物 (47和22kDa亚基) 并且当有活性时通过CD136进行信号传导。30kDa的脂肪细胞补体相关蛋白 (ACRP30) 在结构上与脂连蛋白相同并且是一种强有力的胰岛素增强剂。血管生成素也是一种由肝产生的丰富的血浆蛋白并且已经显示出具有血管生成和抗炎两种性质。Rantes或CCL5主要因它作为一种趋化细胞因子的活性而闻名, 但是可以在宿主防御中作为一种直接抗病毒剂而具有一种潜在的作用。既然每种或这些蛋白能够被认为是血浆的一种正常组分, 在所测试的各种溶液之间它们的水平无怪乎是相似的。于是在血清对PPP、FD-PL对PPP以及phPL对PPP之间进行了一种比例分析, 以确定由于血小板脱粒/凝血或裂解, 哪些因子被释放或耗尽。六种蛋白显示出了在FD-PL中提高的相对蛋白表达, 而37种蛋白是降低的。特别令人感兴趣的是与phPL相比较在FD-PL中在瘦蛋白、PDGF-AA和PDGF-AB水平上的提高, 以及在若干MMP和炎性趋化因子上的降低。

[0063] 在一项单独的分析中, 正常人血清、贫血小板血浆、粗血小板裂解物 (phPL) 和经纤

维蛋白原耗尽的血小板裂解物 (FD-PL) 经过了胰蛋白酶消化并且使用质谱分析法针对蛋白表达进行了分析。载脂蛋白类是所检测的蛋白的最高代表性的家族 (N=3) , 随后是补体级联的成员 (N=6)。证实了我们的ELISA数据, MS分析显示血小板裂解物的该制造方案耗尽了纤维蛋白原。与phPL相比较, 在FD-PL中纤维蛋白原水平降低了至少10倍, 相比于贫血小板血浆更类似于血清水平。该制造方案还选择性地耗尽了补体4、补体C1s亚组分以及补体因子B, 它们在phPL和PPP中被保留。与血清和PPP两者相比较, 血小板裂解物 (phPL和FD-PL) 包含可检测的水平的若干种细胞骨架蛋白和细胞骨架关联蛋白, 如肌动蛋白、细丝蛋白、踝蛋白和斑联蛋白。两种PL都包含可检测的水平的胸腺素β4, FD-PL具有大约两倍的phPL的ThB4的量。进一步, FD-PL耗尽了包括以下各项的因子: 血液结合素、载脂蛋白CIII、载脂蛋白AI、α-2-巨球蛋白和α-1B-糖蛋白, 但是针对α-2-HS-糖蛋白、载脂蛋白L1、丛生蛋白/载脂蛋白J 和血小板碱性蛋白是增加的。

[0064] 除了对补体和MMP的耗尽以外, 纤维蛋白原和纤维蛋白耗尽增强了FD-PL产物的安全性。纤维蛋白原被转化为纤维蛋白。纤维蛋白据报道会诱导炎症。见Rowland (罗兰) 等人, Curr Eye Res. (《当前眼科研究》) 1985, 4 (5) :537-53。纤维蛋白能够促使CEC产生IL-8。见Ramsby (拉姆斯拜) 等人, Invest Ophthalmol Vis Sci. (《眼科学及视觉科学研究》) 1994, 35 (12) :3980-90以及Drew (杜鲁) 等人, Invest Ophthalmol Vis Sci. (《眼科学及视觉科学研究》) 2000, 41 (1) :67-72.)。另外, 纤维蛋白原能够在单核细胞上通过TLR4直接进行信号传导, 以增加MCP-1MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ 和MIP-2。见Smiley (斯迈利) 等人, J Immunol. (《免疫学杂志》) 2001, 167 (5) :2887-94以及Sitrin (斯汀) 等人, J Immunol (《免疫学杂志》) 161: 1462-1470, 1998。它能够通过结合到在嗜中性粒细胞表面上的CD11b/CD18的 $\alpha$ 亚基上并且从而激活Erk信号传导途径来延长嗜中性粒细胞的炎症响应。见Rube1 (鲁贝尔) 等人J Immunol (《免疫学杂志》) 166:2002-2010, 2001。最后, 已经显示出的是, 被吸附的纤维蛋白原是造成对许多植入材料的急性炎症响应的主要血浆组分。见Tang (唐) 等人, J Exp Med (《实验医学杂志》) 178:2147-2156, 1993。因此, 将纤维蛋白原从我们的血小板裂解物中耗尽降低了这种产物在培养中不利地影响细胞 (如表达TLR4的MSC) 的机会, 并且创造了一种针对将这种产物向患者进行直接局部施用的更好的安全性属性。

[0065] 治疗适应证

[0066] 在某些实施例中, 本披露想到在本文中所包含的经纤维蛋白原耗尽的血小板裂解物组合物可以直接使用或通过工艺诸如冻干法, 即冷冻干燥法耗尽水分, 以提供脱水产物, 这些脱水产物可以被添加至细胞培养物和药学上可接受的赋形剂中并且用于在本文中所提供的治疗应用中。

[0067] 干眼是在造血干细胞移植之后与慢性移植物抗宿主病相关联的一种主要并发症。Pezzotta (皮札特) 等人, Bone Marrow Transplant (《骨髓移植》), 2012, doi:10.1038/bmt.2012.64, 报道了自体血小板裂解物可以用于对眼部GvHD的治疗。在某些实施例中, 本披露涉及对干眼的治疗, 该治疗包括向一名受试者的眼睛给予一个有效量的、在本文中所披露的一种经纤维蛋白原耗尽的血小板裂解物组合物。

[0068] Sandri (山德利) 等人, Int J Pharm (《国际药剂学杂志》), 2012, 426 (1-2) :1-6报道了包含血小板裂解物的滴眼液对角膜溃疡的治疗是有用的。在某些实施例中, 本披露涉及对角膜疾病或病症的治疗, 该治疗包括向一名受试者的眼睛给予一个有效量的、在本文

中所披露的一种经纤维蛋白原耗尽的血小板裂解物组合物。

[0069] FD-PL和phPL具有很多相似性,但是由于我们的制造步骤,存在对很多蛋白的一种选择性耗尽和积累,这使得FD-PL成为一种独特的产物。特别令人感兴趣的是以下事实:FD-PL具有增加的量的TB4,TB4是一种具有血管生成、促存活和抗炎性质的因子,并且目前正在针对眼部组织再生进行临床评价。

[0070] Ranzato(兰扎特)等人,J Cell Mol Med(《细胞和分子医学杂志》),2009,13 (8B): 2030-8,报道了血小板裂解物促进人成纤维细胞的创伤擦伤闭合。在某些实施例中,本披露涉及经纤维蛋白原耗尽的血小板裂解物组合物或组分用于创伤愈合应用的用途。在某些实施例中,本披露涉及治疗创伤的方法,这些方法包括向该受试者或在带有一种创伤的该受试者的一个区上给予或施用一种包括经纤维蛋白原耗尽的血小板裂解物组分的组合物。该药用组合物可以是处于一种洗剂或油或水溶液的形式,该洗剂或油或水溶液包含经纤维蛋白原耗尽的血小板裂解物组合物。

[0071] 术语

[0072] 如在本文中所使用的,术语“细胞培养基”指的是能够支持哺乳动物细胞的体外增殖的任何培养基。典型地,这将包括一种在大约pH 7.4下的等渗溶液,该等渗溶液包含氨基酸、一种或多种抗生素、维生素、盐和葡萄糖。包含这些标准中的一些或全部的培养基的实例包括但不限于DMEM和RPMI。

[0073] 如在本文中所使用的,术语“肝素”指的是具有抗凝剂性质的硫酸化多糖类、片段或衍生物中的任何种类。典型地,肝素类组合物是一种具有从大约3kDa至大约30kDa的一系列分子量的混合物。肝素结合至酶抑制剂抗凝血酶(AT)。当结合时,AT经受一种构象变化,并且被激活。该经激活的AT能够使凝血酶和其他蛋白酶失活。这防止凝血酶将纤维蛋白原转化为纤维蛋白,从而扰乱凝血过程。

[0074] 如在本文中所使用的,术语“MSC”指的是一种间充质干细胞,也称为一种间充质基质细胞。典型地,一种人MSC是通过表面标记物进行识别的,这些表面标记物包括CD29、CD44、CD45、CD51、CD71、CD73、CD90、CD105、CD106和CD166。MSC是多功能细胞,这些多功能细胞可以从机体内的多种位置获得,诸如从骨髓、脂肪组织或血液。MSC是使用在本披露中所描述的这些实施例进行增殖的典型的但不是唯一的细胞类型。

[0075] 如在本文中所使用的,术语“PDGF”指的是一种血小板衍生生长因子。在人血小板裂解物中,有多种类型的PDGF (Gen Bank登录号AAA60552.1),包括PDGF-AB、PDGF-AA和PDGF-BB (Gen Bank登录号CAA45383.1)。所有三种PDGF亚型都结合至PDGFR $\alpha$ ,而PDGF-AB和PDGF-BB结合至PDGFR $\beta$ 。两种PDGFR都是酪氨酸激酶受体。一旦被PDGF结合,PDGFR就被磷酸化。这转而刺激激酶催化活性连同针对包含SH2的下游信号传导分子的结合位点的形成。见Heldin(海尔丁)等人,Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor(血小板衍生生长因子的作用机制和在体内作用),Physiol Rev(《生理学评论》),(1999),Oct;79 (4):1283-316。PDGF向PDGFR的结合能够诱导许多生物效应。PDGF具有多种多样的生物功能。PDGF对胚胎发育是关键的,涉及中枢神经系统的发育,保持间质流体压力,对血管系统具有一种血管生成作用,并且已经显示出提高创伤愈合的速度。在体外,PDGF作为人血小板裂解物的一种组分,为了增殖细胞,尤其是MSC,已经显示出是FBS的一种可行的替代物。见例如Horn(霍恩)等人,Impact of individual platelet lysates on

isolation and growth of human mesenchymal stromal cells(单独血小板裂解物对人间充质基质细胞的分离和生长的影响), Cytotherapy(《细胞疗法》), (2010), 12 (7): 888-98。术语PDGF并非意在被限于任何特定序列,假定存在充分的序列同源性和功能属性的话。

[0076] 实验

[0077] 实例1:用于回收和纤维蛋白原耗尽的PL的制造。

[0078] 大约10%体积的作为一种钙螯合剂起作用的柠檬酸盐被添加至血小板去除法产物(phPL)中,以防止在患者输注之前该产物不慎凝结。对将一个再钙化步骤插入至该phPL制造工艺中进行了测试,以评价是否产生了一种更加稳定和均匀的产物。照此,对氯化钙的若干浓度和孵育时间进行了评价。

[0079] 在这些研究期间,对以下条件进行了评价。

[0080] 1.PL+5mM CaCl<sub>2</sub>, RT (1-12小时)

[0081] 2.PL+5mM CaCl<sub>2</sub>, 37°C (1-12小时)

[0082] 3.PL+10mM CaCl<sub>2</sub>, RT (1-12小时)

[0083] 4.PL+10mM CaCl<sub>2</sub>, 37°C (1-12小时)

[0084] 5.PL+16mM CaCl<sub>2</sub>, RT (1-12小时)

[0085] 6.PL+16mM CaCl<sub>2</sub>, 37°C (1-12小时)

[0086] 7.PL+20mM CaCl<sub>2</sub>, RT (1-12小时)

[0087] 8.PL+20mM CaCl<sub>2</sub>, 37°C (1-12小时)

[0088] 来自这些研究的数据证实了5mM CaCl<sub>2</sub>在两种温度中任一种下都不能够形成一种凝块。10mM CaCl<sub>2</sub>在37°C下12小时能够形成一种凝块,然而这种凝块几乎完全固化,允许对上清液进行非常少的回收。CaCl<sub>2</sub>的这些更高的浓度也普遍地形成了完全刚性的凝块,如果允许进行超过1小时的孵育的话。在随后的实验中,对在6-10mM之间的CaCl<sub>2</sub>浓度进行了评价。如果凝块出现,它普遍地快速出现并且是完全的。另外,在启动凝块形成所必要的CaCl<sub>2</sub>浓度下,在多个批次之间有着变异性。

[0089] 为了进一步改善这种工艺1)以2U/mL的浓度添加肝素,以控制该凝结步骤2)CaCl<sub>2</sub>溶解于勃脉力与水中,以提高稳定性3)进行一种双冻融,以提高血小板膜裂解,和4)允许该凝块在RT或37°C下形成持续1小时,然后在4°C过夜下。一旦将未经改性的phPL在细胞培养基中稀释,在这些基础培养基中存在的钙足够压倒柠檬酸盐螯合能力,这允许游离纤维蛋白原转化为纤维蛋白,该纤维蛋白然后能够合并以形成一种凝块。

[0090] 使用了来自我们的第一次实验的组5-8。所有的组都显示出一定程度的凝块形成,并且这些溶液在4度的过夜孵育允许该凝块的稳定化。与我们的第一次实验相比较,所实现的这些变化允许我们在第二天旋转该溶液,并且回收这些溶液的大部分(即70%-80%),而在更高CaCl<sub>2</sub>浓度下的这些第一次实验中,我们的回收率接近20%。通过将肝素添加至该溶液,存在一些残留的纤维蛋白原,然而这不足以导致随后的凝胶形成的发生。变得明显的是,使用一种双冻融导致了像PDGF-BB之类的生长因子的释放。基于这些实验,一种双冻融步骤之后是在2U/mL肝素的存在下用20mM CaCl<sub>2</sub>进行重新鉴定。其后在很多制造运行中进行这种工艺,以确立一致性。可以可靠地生产FD-PL产物,使得纤维蛋白原含量小于4ug/ml,在多个批次之间变异性大约为12%。未经处理的phPL典型地具有纤维蛋白原含量60μg/mL。特别令人感兴趣的是以下事实:尽管有在纤维蛋白原上的降低,FD-PL和phPL包含相似水平

的所希望的生长因子如PDGF、TGF- $\beta$ 、EGF和BDNF,正如通过ELISA所测量的。见图1。

[0091] 以下提供了一种从冷冻人血小板去除法产物中对FD-PL (Multiplate FD) 进行的典型GMP制备。将大约五种人供体经复检的过期的血小板去除法产物从冰箱中移出,并且在4°C过夜解冻。为了在-20°C重新冷冻,这些样品然后被转移到一种10,000级cGMP洁净室。从每个样品中取小等分试样用于微生物测试。具有无污染的等分试样的样品然后在4°C过夜解冻。然后将样品在4000rpm离心15分钟,以便使用一种COBE细胞处理器使细胞碎片成为丸形。然后将来自每个样品的上清液通过40 $\mu$ m过滤器,并且然后合并在一起。然后将这种经合并的样品滤液放置于250mL离心管中用于在3000g在4°C离心15min,以使任何剩下的碎片成为丸形。然后给予该产生的经合并的样品上清液一种基于日期的八位数字ID (例如2010年12月13日=13122011)。然后添加16-20mM CaCl<sub>2</sub> (溶解于勃脉力A中),以再钙化并中和该样品中的柠檬酸盐成分。然后将1.5-2.5单位/mL肝素 (1000单位/mL贮液) 添加至该样品,以调整这种工艺。该样品保持在37°C+/-2°C持续2-4小时,直至一种可见的凝块出现。然后将该样品放置于4°C持续16-24h,直至凝块大小稳定化。将该样品在3000g离心15min。然后通过0.2 $\mu$ m过滤对该样品进行净化。然后将该样品储存于4°C或低至-80°C±10°C冷冻。如果进行冷冻,取经合并的样品的一个小等分试样用于支原体无菌性测试以及纤维蛋白原/PDGF定量。如果支原体检测是阴性的,纤维蛋白原浓度小于2 $\mu$ g/mL,并且PDGF-BB浓度大于15ng/mL的话,该样品被认可。

[0092] 实例2:纤维蛋白原水平的最佳降低未显著地改变生化或生长因子、细胞因子或趋化因子。

[0093] 通过一种40 $\mu$ m PALL输血过滤器 (PALL BIOMEDICAL, INC Fajardo, PR) 对经解冻的血小板单位进行单独过滤,并且允许合并入一个收集袋中。经合并的、经过滤的裂解物被平均等分入经标记的250mL锥形管 (Corning® Lowell, MA USA) 中,并且在室温下在4600rpm旋转20分钟。对经旋转的裂解物进行再次过滤 (40 $\mu$ m),等分入新的经标记的250mL锥形管中,并且逐步过滤至0.2 $\mu$ m (未经改性的PL)。然后将未经改性的血小板裂解物的等分试样与各种浓度的CaCl<sub>2</sub>结合,并且在多个特定温度下进行持续各种时间的孵育。一种优选的配方被发现是这些血小板单位的一种双冻融,随后再钙化至20mM CaCl<sub>2</sub>并结合有2U/mL硫酸肝素,随后在37°C+/-2°C孵育2小时,以允许一种凝块形成。这随后是在4°C的16小时孵育,以允许凝块大小稳定化。这个步骤允许纤维蛋白原大于150倍的降低,批次间变异性大约10%。在生物化学上,添加CaCl<sub>2</sub>至Multiplate FD导致了渗透摩尔浓度以及钙和氯浓度高于未经处理的血小板裂解物的渗透摩尔浓度以及钙和氯浓度,然而许多其他因子即Na、K、葡萄糖、总蛋白和白蛋白水平在未经改性的PL和Multiplate FD之间是没有显著差异的。

[0094]

	血清	PPP	FD-PL	PL
渗透摩尔浓度	301	311	350	309
NA	140	141	154	160
K	4.1	>15	5	5
CL	105	100	123	85
Glu	92	101	217	247
Bun	11	12	12	14
Creat	0.94	1.04	1	1

CO	279	282	313	326
TPROT	7.1	7.1	5	5
ALB	4.6	4.5	3	3
CA	9.6	<2.0	>20	6
AP	45	<5	47	41
AST	30	30	36	42

[0095] 血小板裂解物与血清和血浆两者都不同,因为它不仅包含正常的血小板脱粒释放产物,而且还包含没有被正常释放的细胞内组分。另外,与正常血浆或血清相比较,血小板裂解物包含高得多的浓度的血小板,并且因此释放因子的浓度相当地更加高。为了获得普遍存在于贫血小板血浆 (PPP) 中的这些细胞因子和生长因子的广泛概述,在一种蛋白阵列筛选技术中采用了血清和血小板裂解物和Multiplate FD。该技术基于夹心免疫测定原理。在一种膜的表面上,在特定的点位置,对一个面板的抗体(捕获)进行固定化。对带有生物样品的阵列膜的孵育导致相应抗体对细胞因子的捕获。这些经结合的细胞因子用一种生物素化抗体混合物进行检测。然后使用化学发光对信号进行可视化。使用RayBio®人细胞因子抗体阵列C4000允许我们同时检测174种细胞因子。根据该制造商方案,对于在 $\alpha$ -MEM培养基中稀释的PPP、血清或血小板裂解物和Multiplate FD,用等量的总蛋白对膜进行孵育。

[0096] 使用这些阵列,一些蛋白的表达在这些组之间是相似的;然而,在某些情况下,血小板裂解物和Multiplate FD显示出针对若干蛋白的更高的表达。特别令人感兴趣的是,相对于血清和PPP,在PL中所发现的像所有三种PDGF亚型、EGF和BDNF之类的蛋白连同像TIMP-1和PAI-1之类的蛋白酶抑制剂的水平升高。证实了阵列数据,在PPP、血清、血小板裂解物和Multiplate FD中对PDGF-BB、EGF、BNDF、TGF-b1和VEGF水平进行了分析。与PPP和血清两者相比较,Multiplate FD和血小板裂解物phPL具有针对每一种细胞因子的增加的浓度。平均而言(N=3批次),在Multiplate FD和PL之间在EGF、PDGF-BB、TGF-b1或BDNF水平之间没有统计差异,然而在关于PDGF-BB和TGF-b1水平上的批次间变异性与PL相比较在Multiplate FD中更低。将纤维蛋白原从血小板裂解物中耗尽导致了一种关于一致性的更加可靠的产物。

[0097] 实例3:Multiplate FD比未经处理的血小板裂解物(phPL)更加稳定。

[0098] 用于把phPL用作一种用于MSC的生长补充剂的策略已有报道。然而,采用phPL作为一种生长补充剂的培养包括添加肝素(通常2U/ml)以防止纤维蛋白凝胶形成。在使用未经纤维蛋白原耗尽的血小板裂解物(phPL)的研究中,观察到的是,一旦被制造并且被过滤至0.2 $\mu$ m,该溶液在光学上是透明的并且不包含明显的碎片,然而一旦冷冻并再解冻或一旦在4°C储存,新的沉淀在这种phPL中形成。这随时间而积累,使得该溶液浑浊,这不能通过单用离心去除,典型地要求重新过滤。因此,为了获得FD-PL是否容易导致一种相似的沉淀积累的一种更好的认识,从相同的血小板去除法池中制造了phPL和FD-PL。这些产物冷冻于-30°C,直至使用。然后将phPL和FD-PL的等分试样在4°C过夜解冻,于3000xg离心10分以去除冷冻沉淀物并且过滤至0.2 $\mu$ m,并且立即进行或在4°C储存24小时或7天之后进行颗粒分析。

[0099] 使用一种Beckmann Coulter Canto II流式细胞仪,使用前向和侧向散射信号对phPL和FD-PL进行颗粒分析,以估算颗粒大小、丰度和粒度。将针对FSC和SSC的激光功率设置为对数刻度,并且设置为确保所有大小的颗粒都将会被记录。为了获得对颗粒的相对定

量,针对每个样品将数据采集收集设置为持续正好15秒。紧随过滤之后,phPL和FD-PL两者都具有少量的检测到的碎片,该少量的检测到的碎片随着时间在FD-PL中没有明显地变化。相反地,即使在过滤24小时之后,phPL显示出在颗粒数目和大小上的增加,其在7天时继续向外。显微镜分析可以证实一种相似的观察,使得在7天时FD-PL基本上不含有碎片,而phPL包含不同大小的颗粒。见图2。使用所披露的制造工艺,一个人能够生产一种血小板裂解物产物,该血小板裂解物产物包含显著更少的碎片并且更加稳定。

[0100] 从相同的血小板去除法的5供体池中制造未经处理的和Multiplate FD之后,将产物等分试样在-80°C冷冻1个月。随后,将等分试样在4°C过夜解冻,在3000xg旋转以去除冷冻沉淀物,并且然后逐步过滤至0.2mm。过滤之后,未经稀释的或经稀释的(20%,在勃脉力A中)血小板裂解物和Multiplate立即通过流式细胞仪针对碎片进行分析,然后储存于4°C,并且随后每天进行分析,持续4天。紧随过滤之后,血小板裂解物和Multiplate FD两者都在这些未经稀释的和经稀释的两种样品中具有了相似量的碎片,然而,截至24小时,与在Multiplate FD中相比较,在该血小板裂解物中有着显著的和渐进的碎片形成的积累。与我们的流式细胞仪分析一致,碎片积累的可视化证实了在Multiplate FD中,碎片的积累大幅少于血小板裂解物并且显著更小。在血小板裂解物中,碎片看起来随时间凝集,并且截至第3天,这些凝集体能够达到在5-10μm范围内的大小,而该碎片看起来不会凝集并且普遍地小于2μm。

[0101] 实例4:Multiplate FD实现了优于FBS和未经处理的血小板裂解物的MSC增殖速率,并且保持了免疫表型和免疫抑制性质。

[0102] 自体的和同种异体的MSC已经据报道用于治疗涉及缺血和免疫失调两者的病症。离体细胞操作的大部分已经依赖于胎牛血清(FBS)以使MSC在贴壁培养中繁殖。既然FBS是异种的,暴露于它的细胞具有变为具有免疫原性的潜力,并且据报道用FBS培养的细胞的反复给予能够在患者中引发不良反应。为此,已经在FBS的人源性替代物中对MSC进行培养,这些人源性替代物包括人血清和富血小板血浆。据报道用人血小板衍生生长因子(形式为人血小板裂解物,hPL)取代FBS能够促进MSC生长。

[0103] 为了评价在FD-PL中是否保留了作为一种生长补充剂的功能性,进行了一系列的体外实验,以将FD-PL产物与phPL进行比较。对来自间充质谱系、内皮和上皮谱系的原代细胞进行了测试。将间充质细胞从健康志愿者的骨髓中分离,并且进行扩增直至传代。在传代之后,两种间充质基质细胞制剂以1000个细胞/cm<sup>2</sup>接种于组织培养瓶中,这些组织培养瓶包含具有FBS、phPL或FD-PL的培养基。然后允许MSC生长3天,进行收获,并且对细胞数目进行计数。然后计算群体倍增时间。phPL和FD-PL两者都可以显著降低倍增时间。当彼此直接比较时,与在phPL中的MSC相比较,在FD-PL中扩增的MSC具有更低的倍增时间(图3)。在表型上,在FBS、phPL或FD-PL中所生长的MSC全都表达MSC的这些包括以下各项的典型标记物:CD44、CD90、CD73、HLA-I、CD105,并且没有显示出CD45、CD11b、CD34或CD19的表达。这些实验表明,与FBS和phPL两者相比较,在FD-PL中MSC生长得更快,并且它没有不利地影响它们的免疫表型。

[0104] MSC已经据报道会影响体外T细胞激活和增殖。所提出的MSC影响T-细胞增殖所通过的一种机制是通过吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)。IDO是一种免疫调节酶,它催化必需氨基酸L-色氨酸降解为N-甲酰犬尿氨酸。IDO是通过犬尿氨酸途径的色氨酸分解代谢的第一种

酶并且是限速酶。对局部色氨酸的耗尽已经显示出使T细胞的生长停止。未经刺激的MSC不表达IDO,然而IDO基因表达被像INF-  $\gamma$  之类的炎性细胞因子快速增加。MSC上调IDO表达的能力与它们的抑制T-细胞增殖的能力相关。

[0105] 为了评价在phPL或FD-PL中生长的MSC是否影响它们的上调IDO至炎性刺激的能力,将骨髓源性MSC群体在phPL或FD-PL中繁殖,持续2次传代(即2周)。以100,000个细胞/孔的密度将每个群体接种入6孔板中过夜。次日, MSC在它们各自的培养基中用5ng/ml INF-  $\gamma$  进行刺激,或仍处于未经刺激的状态,持续4小时。对细胞进行清洗,并且在带有b-巯基乙醇的RLT缓冲液中进行裂解,并且在-80°C储存,直至对RNA进行提取。对无DNA的总RNA进行提取,并且进行逆转录,正如所说明的。在ABI 7500快速实时PCR系统热循环仪和SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems) 上,使用针对IDO和b-肌动蛋白(管家基因)的人引物序列(5' 3' 正向,反向)以两次重复进行实时qPCR测定。实时PCR分析证实了在phPL或者FD-PL中生长的未经刺激的MSC不具有大量的IDO基因表达,然而使用INF-  $\gamma$  进行4小时的刺激足以增加在两种培养基中的MSC中IDO的表达。见图4。

[0106] 实例5:FD-PL抑制离体T-细胞增殖

[0107] ConA是一种凝集素,它结合至并且非特异性地激活T细胞。PHA和PMA是佛波酯化合物,它们能够激活在细胞中的多种增殖性信号传导途径。利用了一种CD3/CD28刺激方案,该刺激方案对T-细胞是特异性的。使用由荧光标记物CFSE标记的外周血单核细胞(PBMC)进行的CD3/CD28刺激,一个人能够基于使用流式细胞仪,基于在信号强度上的相对降低,对T-细胞的增殖进行跟踪,并且然后评估一种处理是否对经激活的T-细胞的增殖产生冲击。

[0108] 在进行用或不用MSC的这些PBMC增殖测定中,观察到的是,当PBMC单独在带有10% FBS的RPMI中进行培养并且用CD3/CD28珠粒进行刺激时,T-细胞强劲地增殖,然而当FBS被FD-PL取代时,经刺激的PBMC没有增殖。对三项单独实验的分析表明,与血清相比较,FD-PL在经刺激的PBMC中能够抑制一种T-细胞增殖性响应4.7倍,与FBS相比较。

[0109] 由于PBMC响应细胞代表淋巴骨髓(lymphomyeloid)细胞的一种非均匀混合物,该非均匀混合物包括淋巴细胞和单核细胞(典型地以4:1的比例),随后进行了一系列的实验,以确定FD-PL是否直接作用于T-细胞或单核细胞。使用免疫磁分离,我们进行了负选择,以取得经高度纯化的T-细胞和单核细胞的一个群体以与未经分离的PBMC相比较。当对PBMC单独在血清中进行刺激时,T-细胞经过了强健的增殖,而在phPL中增殖被减弱。令我们惊讶的是,当对T-细胞单独进行刺激时,在血清和phPL培养物两者中都发生了增殖。因此意味着,FD-PL不直接抑制T-细胞增殖。证实了这种假说,反加实验得到执行并且表明,对T-细胞补充特定浓度的单核细胞可以剂量依赖性地降低在这些phPL条件下的T-细胞增殖。随后,使用经在血清、phPL或FD-PL(10%浓度)中培养3天的未经标记的PBMC进行了一系列的实验,并且发现单独的FD-PL能够促进一种CD11b和CD33阳性的单核细胞群体的附着和扩增,该单核细胞群体是CD14阴性的,使用血清或phPL不能够容易地产生该单核细胞群体。见图5。因此,通过对单核细胞的独特作用,FD-PL在体外具有强健的抗炎性质。

[0110] 实例6:FD-PL对这些离体培养的多种细胞类型来说是更加通用的。

[0111] 对经冷冻的来自Life technologies的原代人角膜上皮细胞(HCEC)用它们的经优化的培养基和生长补充剂混合物进行扩增,持续一次传代。一旦进行继代培养,HCEC被放入各种条件中,以确定血清、phPL或FD-PL是否可以取代该经优化的生长补充剂混合物。在6孔

板中以50,000个细胞/孔对HCEC进行铺板,在培养基中包含:

- [0112] a) 最优培养基+最优生长因子混合物。
- [0113] b) 最优培养基+在1%、5%和10%浓度下的同种异体血清。
- [0114] c) 最优培养基+在1%、5%和10%浓度下的同种异体phPL。
- [0115] d) 最优培养基+在1%、5%和10%浓度下的同种异体FD-PL。
- [0116] 在培养基中三天之后,针对每种条件对这些HCEC进行收集,针对细胞数目和生活力进行分析。见图6。这些结果证实了越来越高浓度的FD-PL增强了HCEC的生活力,并且在越来越高的浓度下可以产生一种剂量依赖性的增殖性响应。该对HCEC的增殖性响应在5%浓度下是最大的,并且相当于该可商购的生长因子混合物。相反地,血清和粗PL两者随着越来越高的浓度降低了生活力,并且不管浓度如何,不能够产生一种比得上可商购的生长因子混合物的增殖性响应。因此,与血清或phPL相比较,在上皮细胞中FD-PL显示出了并且增强了毒理学属性和功能性使用。
- [0117] 在包含10% (v/v) FBS、未经改性的血小板裂解物或FD-PL的培养基中对MSC进行培养。将2单位/mL的肝素添加至这些包含未经处理的血小板裂解物的培养基中,以便防止纤维蛋白原转化为纤维蛋白。MSC在未经处理的血小板裂解物和FD-PL两个组中的增殖优于在该FBS组中的MSC增殖。随后的72小时
- [0118] 在包含FD-PL或phPL的培养基中对各种细胞类型进行培养。FD-PL和phPL两者都能够使来自人、猪和灵长类动物来源的MSC生长。在来自未经分离的外周血单核细胞的免疫抑制性单核细胞源性细胞的离体增殖中,FD-PL也优于血清和phPL。FD-PL还能够使4T1、NIH 3T3细胞、人角膜上皮细胞和人内皮细胞繁殖,而phPL没有促进这些细胞的扩增或存活。

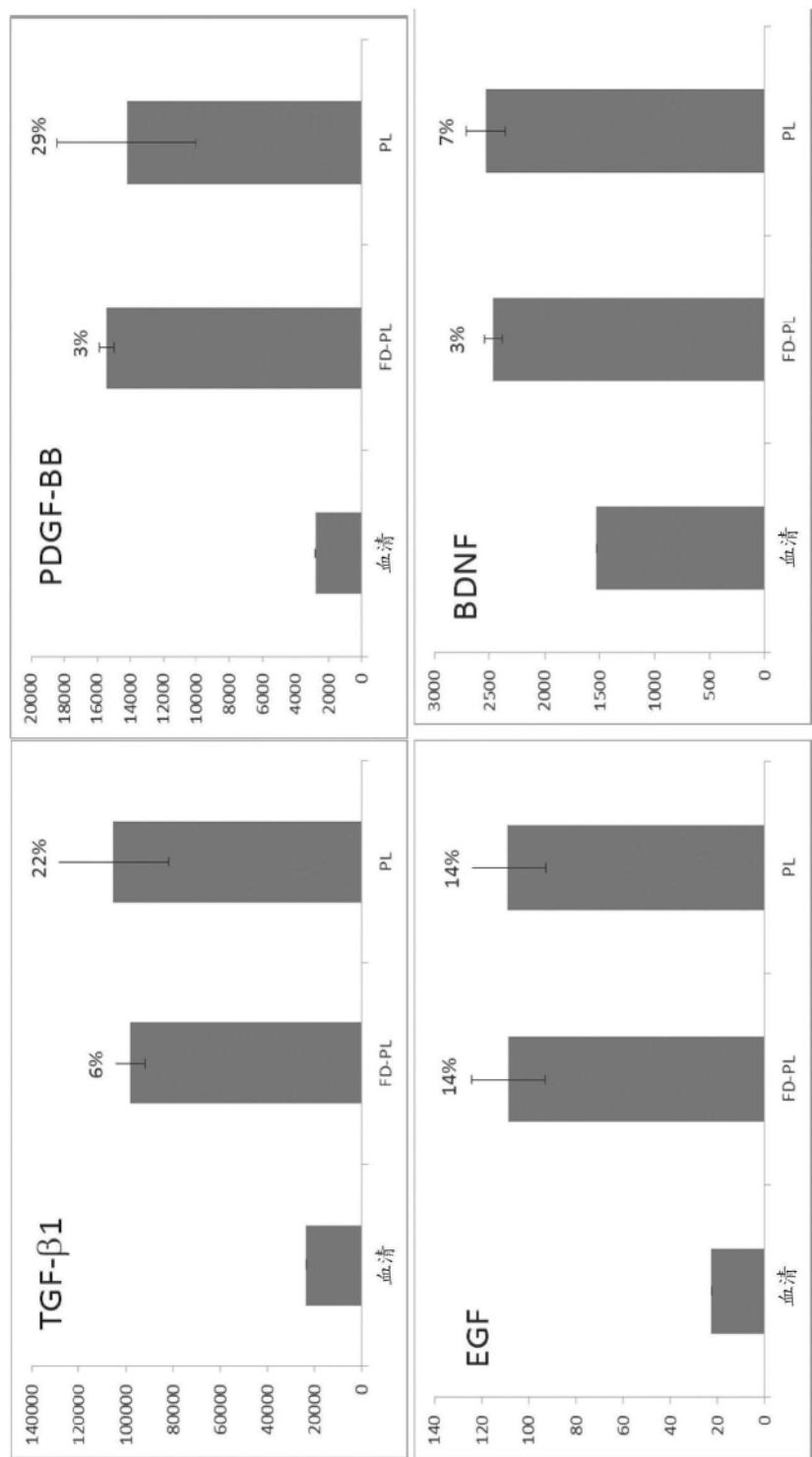


图1

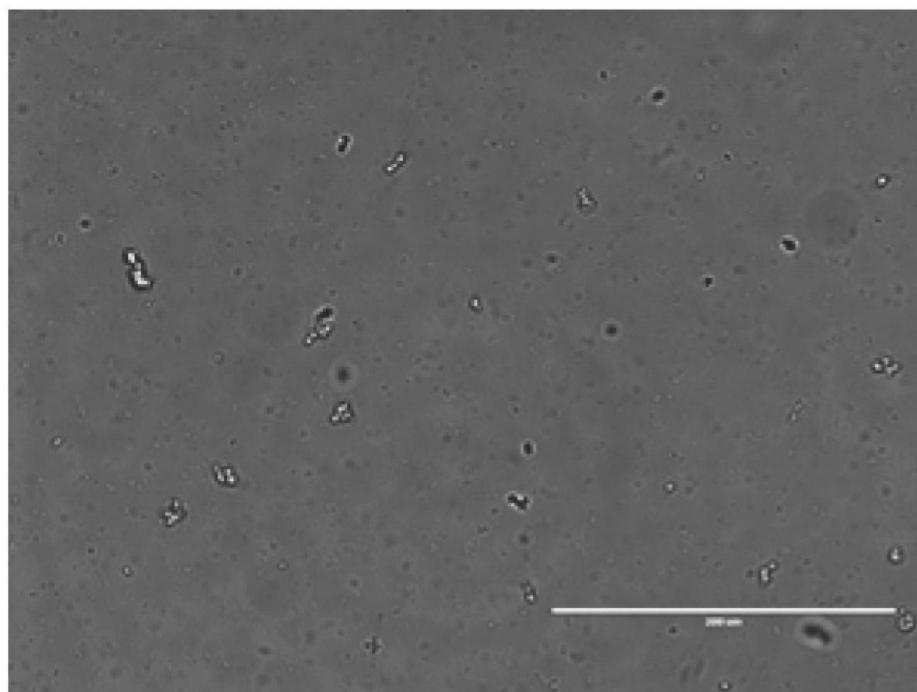
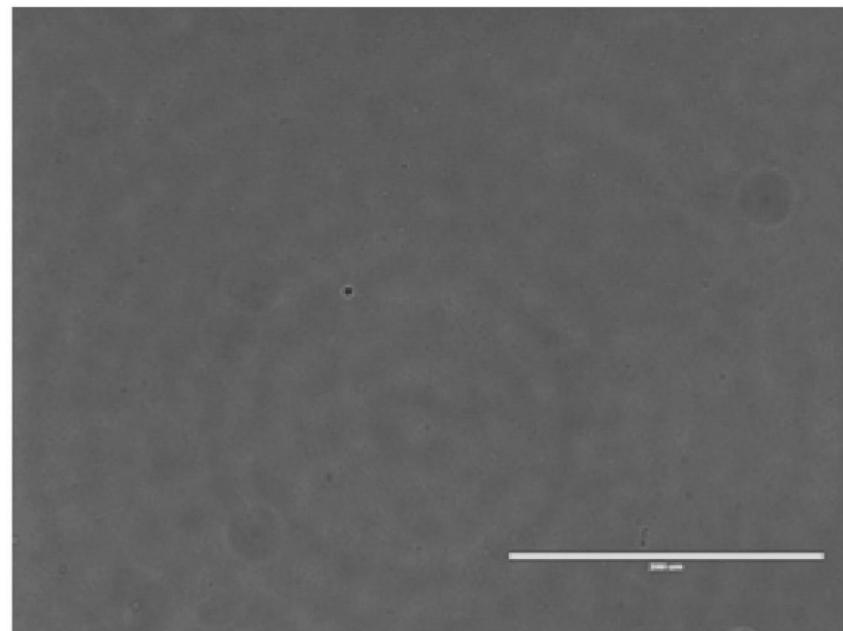


图2

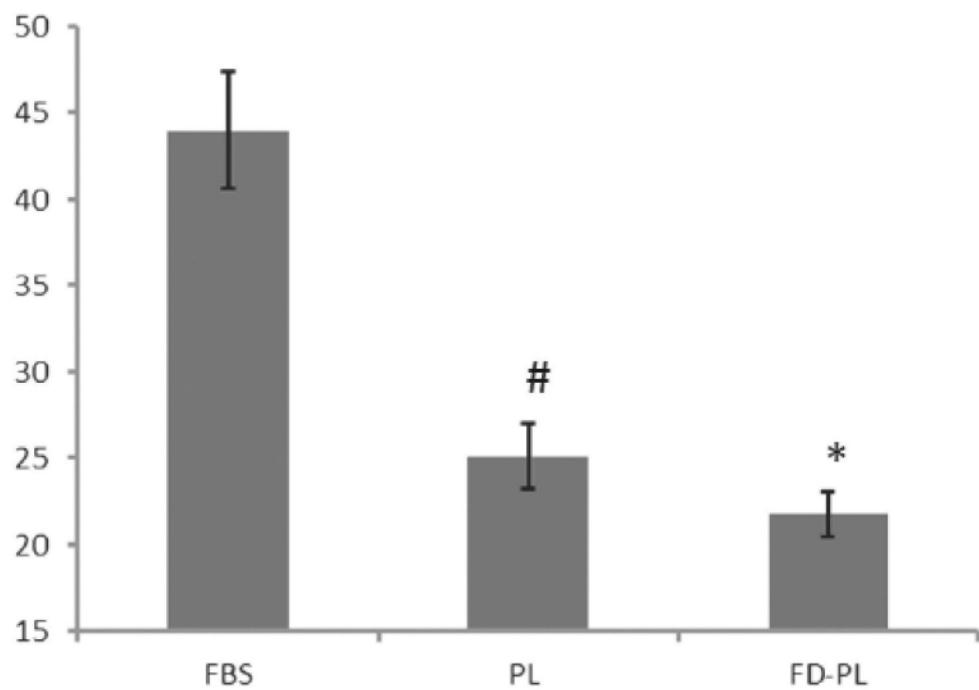


图3

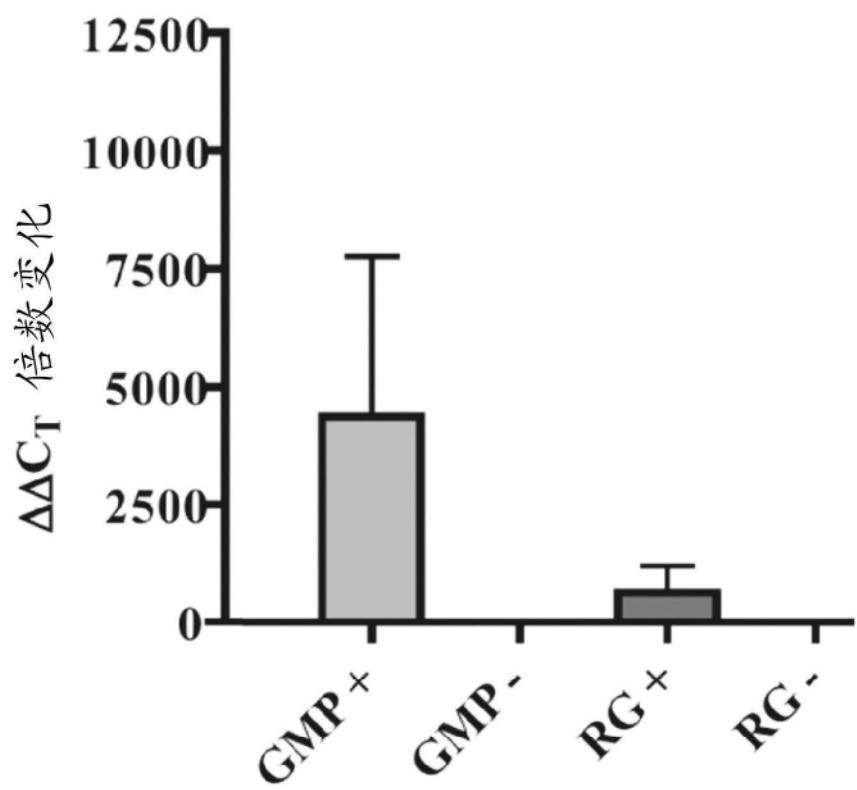


图4

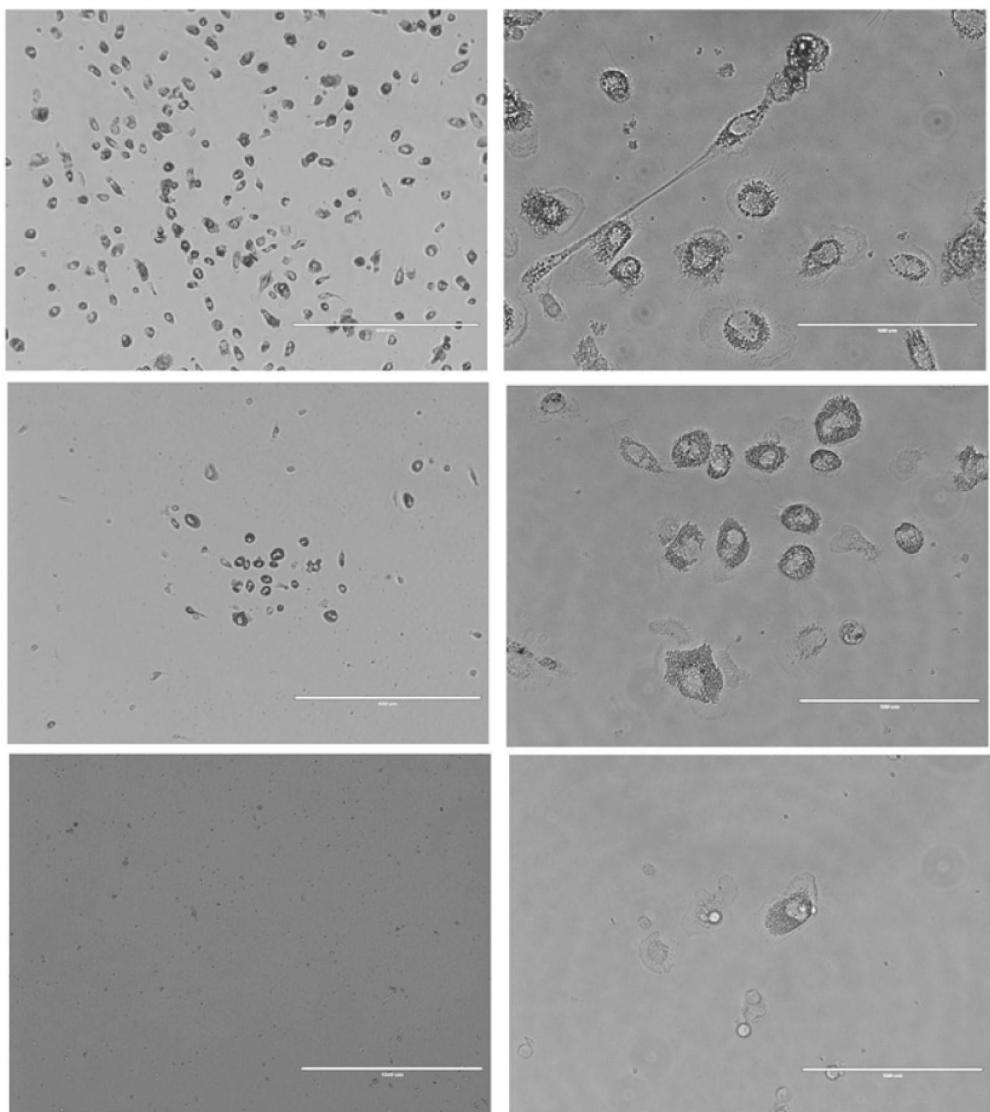


图5

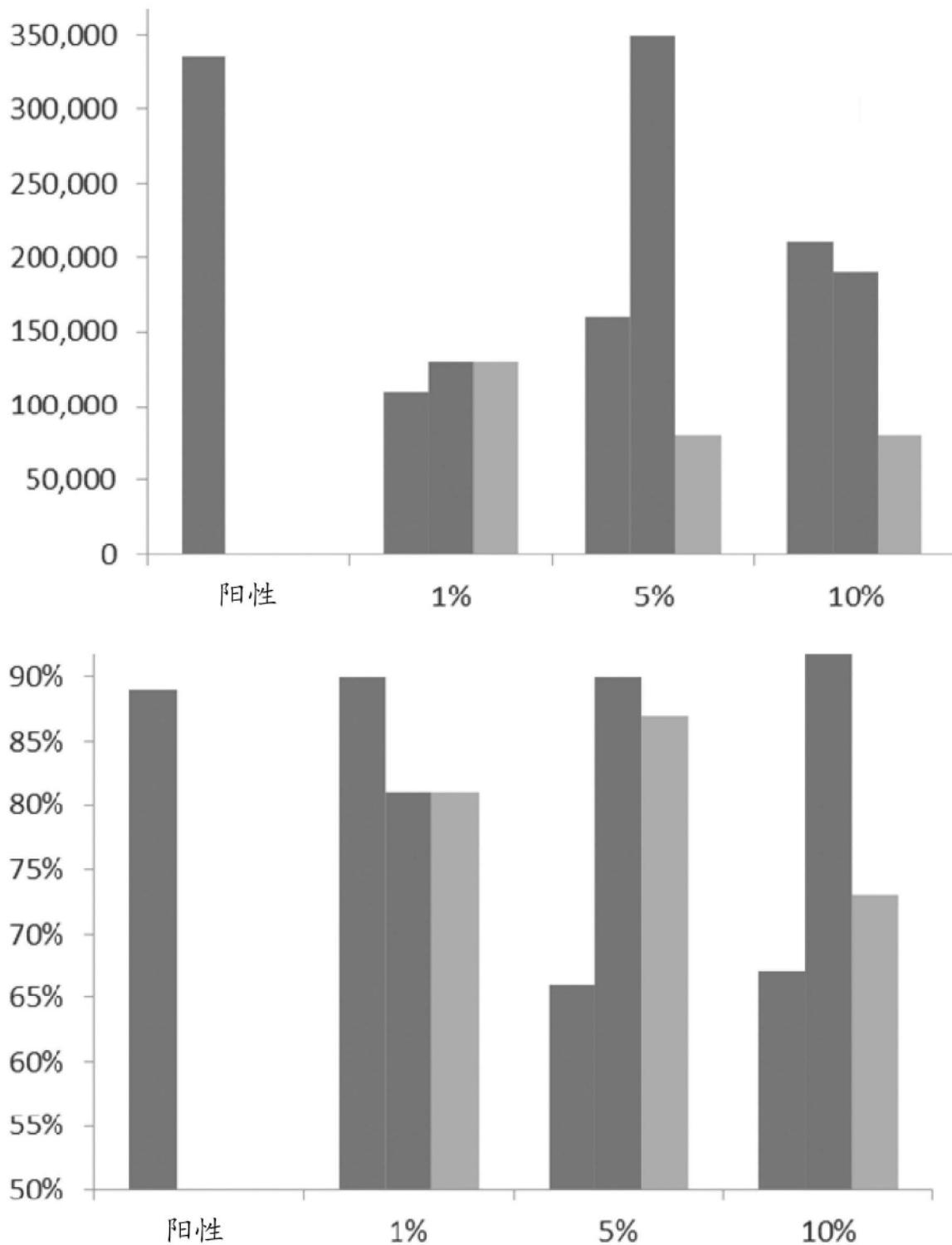


图6