



(21)申請案號：113102969 (22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 08 月 18 日

(51)Int. Cl. : A61K35/28 (2015.01) A61K35/12 (2015.01)
A61K47/02 (2006.01) A61K47/26 (2006.01)
A61K47/36 (2006.01) A61K9/08 (2006.01)
A61P27/02 (2006.01)

(30)優先權：2015/08/18 美國 62/206,821

(71)申請人：美商安斯泰來再生醫藥協會 (美國) ASTELLAS INSTITUTE FOR REGENERATIVE MEDICINE (US)
美國

(72)發明人：蓋 羅傑 GAY, ROGER (US)；萊利夫 朱德森 RATLIFF, JUDSON (US)；索思維克 洛瑪 E SOUTHWICK, ROMMA E. (US)

(74)代理人：陳長文；張哲倫；劉君怡

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：11 共 101 頁

(54)名稱

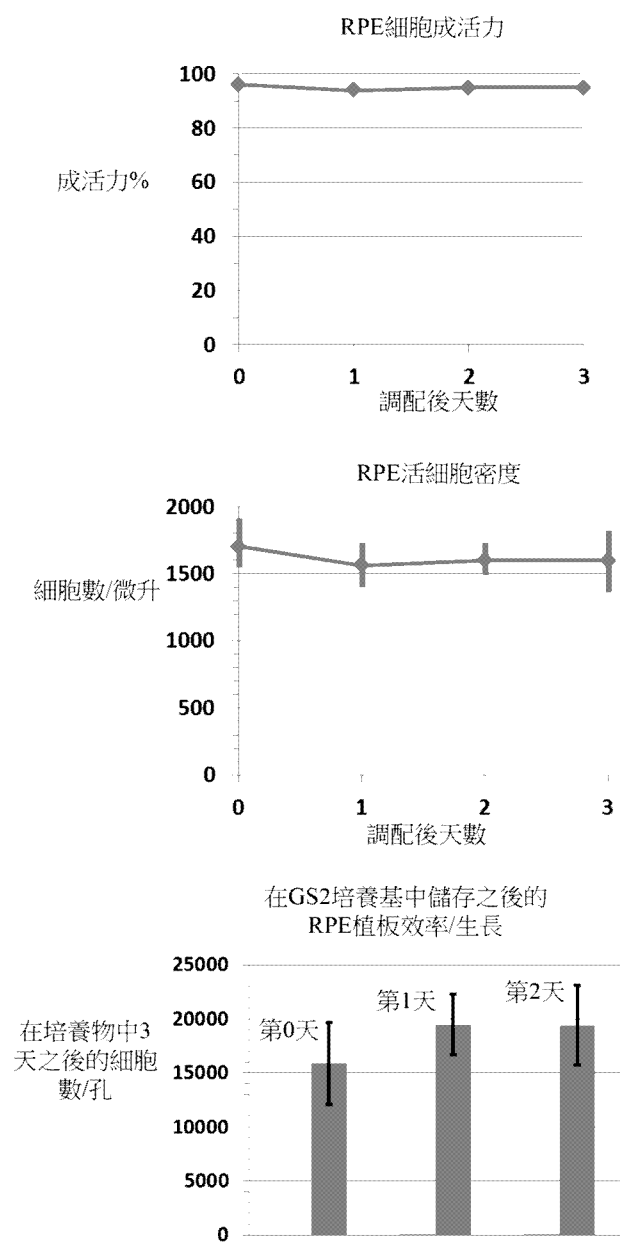
臨床調配物

(57)摘要

本發明之一些態樣提供臨床培養基，其在儲存至多 48 小時或更長時間期間支持細胞及組織之成活力、再植板效率及再生能力。本文所提供之臨床培養基亦適用於臨床沖洗。亦提供包含如本文所提供之細胞群或組織及臨床培養基的細胞或組織製劑，同樣提供用於產生該等製劑之方法。亦揭示將本文所提供之臨床培養基和細胞及組織製劑例如用於向有需要之個體投與有效量之細胞或組織的方法。

Some aspects of this disclosure provide clinical media that support viability, re-plating efficiency, and repopulation capacity of cells and tissues during storage for up to 48 hours or longer. The clinical media provided herein are also useful for clinical irrigation. Cell or tissue preparations comprising a cell population or tissue and a clinical medium as provided herein are also provided, as are methods for generating such preparations. Methods for using the clinical media and cell and tissue preparations provided herein, for example, for administering an effective amount of cells or tissue to a subject in need thereof, are also disclosed.

指定代表圖：



【圖2】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

臨床調配物

【英文發明名稱】

CLINICAL FORMULATIONS

【中文】

本發明之一些態樣提供臨床培養基，其在儲存至多48小時或更長時間期間支持細胞及組織之成活力、再植板效率及再生能力。本文所提供之臨床培養基亦適用於臨床沖洗。亦提供包含如本文所提供之細胞群或組織及臨床培養基的細胞或組織製劑，同樣提供用於產生該等製劑之方法。亦揭示將本文所提供之臨床培養基和細胞及組織製劑例如用於向有需要之個體投與有效量之細胞或組織的方法。

【英文】

Some aspects of this disclosure provide clinical media that support viability, replating efficiency, and repopulation capacity of cells and tissues during storage for up to 48 hours or longer. The clinical media provided herein are also useful for clinical irrigation. Cell or tissue preparations comprising a cell population or tissue and a clinical medium as provided herein are also provided, as are methods for generating such preparations. Methods for using the clinical media and cell and tissue preparations provided herein, for example, for administering an effective amount of cells or tissue to a subject in need thereof, are also disclosed.

【指定代表圖】

圖2

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

臨床調配物

【英文發明名稱】

CLINICAL FORMULATIONS

【技術領域】

本發明係關於用於儲存及輸送移植用細胞及組織之臨床培養基及細胞製劑。

【先前技術】

用於儲存及輸送移植用細胞及組織之當前可利用的臨床培養基超過相對較短時段(例如最多4-6小時)且甚至在彼等較短儲存時間期間不支持細胞成活力及功能，通常觀測到細胞及細胞功能顯著損失。另外，包含碳酸氫根陰離子之當前臨床培養基無法耐受熱滅菌且甚至在環境溫度下儲存期間常常形成碳酸鹽沈澱，由此導致了較短的存放期。

【發明內容】

相關申請案

本申請案主張2015年8月18日申請之名為「CLINICAL FORMULATIONS」之美國臨時申請案第62/206,821號之35 U.S.C. § 119(e)的權益，其全部內容以引用之方式併入本文中。

各種醫療程序依賴於使用臨床溶液，例如用於手術區域之沖洗、傷口清潔、手術後黏著預防及自手術區域之碎屑移除。在細胞或組織植入或移植之情形下，臨床溶液係用於調配細胞或組織，在調配之後儲存細胞或組織直至向個體投與且在投與期間，例如在注射細胞或組織期間作為承載

細胞或組織結構之培養基。在臨床情形中，例如在沖洗、傷口清潔、注射等期間，與細胞或組織接觸之溶液通常為無菌、無熱原質的，在生理學pH下經緩衝，且展現生理滲透壓。

與用於在手術期間防止損傷敏感性細胞或組織之當前可利用的手術沖洗溶液相關的一個問題為使用碳酸氫根陰離子與鹽一起作為緩衝劑，該等鹽(諸如通常用作醫藥賦形劑之幾乎所有鈣及鎂之離子鹽)可與碳酸氫根陰離子形成沈澱物。當含有碳酸氫鹽及鈣及/或鎂之溶液經熱滅菌時，碳酸鹽之形成及後續沈澱可快速發生，且亦常常隨時間推移在環境儲存條件下發生。

針對沈澱問題之一種可能的溶液為提供呈兩部分套組形式之手術沖洗溶液，其中一個部分含有碳酸氫鹽緩衝劑且另一部分含有鈣鹽及/或鎂鹽。在即將使用之前，該等部分通常混合在一起以形成單一溶液。該等兩部分溶液之用途係與以下數個缺點相關，包括需要製造兩種各別溶液、代表混合錯誤風險之不便的混合步驟及通常較短半衰期之混合溶液。因此，一部分沖洗溶液將為有利的且為所極其期望的。

已嘗試製造一部分沖洗溶液。參見例如歐洲專利申請案EP 1067907 B1 (Armitage)。該等嘗試通常依賴於使用兩性離子有機緩衝劑，諸如N-(2-羥基乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)，通常稱為HEPES，以防止如上文所述之碳酸鹽沈澱問題。然而，用於該等一部分沖洗溶液之兩性離子有機緩衝劑通常不與細胞或組織培養基相容，且因此不提供針對細胞儲存期間沈澱物形成問題的可廣泛適用之溶液。

除了如上所述形成沈澱物及與常用細胞培養組分不相容之問題以外，常用手術沖洗溶液亦通常包含無法耐受蒸汽滅菌之組分組合，例如某

些碳水化合物或二硫化羧胱甘肽(GSSG)。

與先前研發之一部分沖洗溶液相比，本發明提供不需要使用兩性離子有機緩衝劑之一部分溶液。本發明之穩定沖洗溶液解決當前沖洗溶液之沈澱及相關的較短存放期問題。與當前可利用的溶液之存放期相比，本文所提供之溶液具有經極大改良之存放期。

本文所提供之溶液適用於沖洗、(例如低溫保存或粒狀細胞)細胞復原、細胞儲存(例如在用於運送或移植之調配之後)、輸送及/或向個體投與細胞(例如在細胞植入或移植之情形下)。本文所提供之溶液可結合不同細胞類型及不同投與位點使用。儘管眼科應用為較佳的，但本發明亦涵蓋且包涵其他應用。

本發明之一些態樣提供用於細胞復原、儲存、輸送及/或向個體投與之溶液。在一些實施例中，該溶液包含(a)緩衝劑，其將溶液維持在生理學pH下；及(b)至少2 mM葡萄糖；及(c)滲透活性劑，其將溶液維持在生理滲透壓下。在一些實施例中，該溶液包含2-150 mM葡萄糖，例如5-150 mM、10-150 mM、15-150 mM、2-100 mM、2-50 mM、5-30 mM、10-100 mM、10-50 mM、10-30 mM、10-20 mM、12-18 mM、14-17 mM、15-17或16-17 mM。在一些實施例中，該溶液包含至少2.5 mM、至少3 mM、至少5 mM、至少7.5 mM、至少10 mM、至少15 mM、至少20 mM、至少25 mM或至少30 mM葡萄糖。在一些實施例中，該葡萄糖由右旋糖組成或包含右旋糖。在一些實施例中，該溶液包含至少2.5 mM、至少3 mM、至少5 mM、至少6 mM、至少7.5 mM、至少10 mM、至少15 mM、至少20 mM、至少25 mM或至少30 mM右旋糖。在一些實施例中，該溶液包含至少0.03% (w/v)、至少0.05% (w/v)、至少0.1% (w/v)、至少

0.125% (w/v)、至少0.15% (w/v)、至少0.175% (w/v)、至少0.2% (w/v)、至少0.225% (w/v)、至少0.25% (w/v)、至少0.275% (w/v)、至少0.28% (w/v)、至少0.29% (w/v)、至少0.3% (w/v)、至少0.35% (w/v)、至少0.4% (w/v)、至少0.45% (w/v)、至少0.5% (w/v)、至少0.55% (w/v)、至少0.6% (w/v)、至少0.65% (w/v)、至少0.7% (w/v)、至少0.75% (w/v)、至少0.8% (w/v)、至少0.9% (w/v)、至少1% (w/v)、至少1.25% (w/v)、至少1.5% (w/v)、至少1.75% (w/v)、至少2% (w/v)、至少2.125% (w/v)、至少2.5% (w/v)、至少2.75% (w/v)或至少3% (w/v)葡萄糖。在一些實施例中，該溶液進一步包含二價陽離子源。在一些實施例中，該等二價陽離子包含鈣及/或鎂陽離子。在一些實施例中，二價陽離子源包含鈣源及/或鎂源。在一些實施例中，該溶液包含鈣源。在一些實施例中，該溶液包含鎂源。在一些實施例中，該緩衝劑包含乙酸鹽緩衝劑及/或檸檬酸鹽緩衝劑。

本發明之一些態樣提供用於細胞復原、儲存、輸送及/或向個體投與之溶液，其中該溶液包含(a)緩衝劑，其將溶液維持在生理學pH下；及(b)葡萄糖；及(c)滲透活性劑，其將溶液維持在生理滲透壓下；及(d)二價陽離子源。在一些實施例中，二價陽離子源包含鈣源及/或鎂源。在一些實施例中，該緩衝劑包含乙酸鹽緩衝劑及/或檸檬酸鹽緩衝劑。

在本文所提供之溶液之一些實施例中，該葡萄糖為D-葡萄糖(右旋糖)。在一些實施例中，該葡萄糖濃度為5-50 mM。在一些實施例中，該葡萄糖濃度為10-25 mM。在一些實施例中，該葡萄糖濃度為10-20 mM。在一些實施例中，該葡萄糖濃度為約10 mM、約11 mM、約12 mM、約13 mM、約14 mM、約15 mM、約16 mM、約17 mM、約18 mM、約19 mM或約20 mM。在本文所提供之溶液之一些實施例中，二價陽離子源包含二

價陽離子之醫藥學上可接受之鹽。在一些實施例中，二價陽離子源包含醫藥學上可接受之鈣鹽。在一些實施例中，二價陽離子源包含醫藥學上可接受之鎂鹽。在一些實施例中，二價陽離子源包含醫藥學上可接受之鈣鹽及/或醫藥學上可接受之鎂鹽，其係選自由用酸形成之鈣鹽及/或鎂鹽之群，該酸選自包含以下之群：乙酸、抗壞血酸、檸檬酸、鹽酸、順丁烯二酸、草酸、磷酸、硬脂酸、丁二酸及硫酸。在一些實施例中，二價陽離子源包含鈣源。在一些實施例中，該鈣源包含氯化鈣。在一些實施例中，該鈣源包含二水合氯化鈣。在一些實施例中，二價陽離子源包含鎂源。在一些實施例中，該鎂源包含氯化鎂。在一些實施例中，該鎂源包含六水合氯化鎂。在本文所提供之溶液之一些實施例中，該鈣源濃度為0.25-0.75 mM。在一些實施例中，該鈣源濃度為0.4-0.65 mM。在一些實施例中，該鈣源濃度為0.5-0.6 mM。在一些實施例中，該鈣源濃度為約0.6 mM。在一些實施例中，該鈣源濃度為0.5-0.9 mM。在一些實施例中，該鈣源濃度為0.6-0.8 mM。在一些實施例中，該鈣源濃度為約0.7 mM。

在本文所提供之溶液之一些實施例中，該鎂源濃度為0.05-5 mM。在一些實施例中，該鎂源濃度為0.1-0.3 mM。在一些實施例中，該鎂源濃度為約0.3 mM。

在本文所提供之溶液之一些實施例中，該檸檬酸鹽或乙酸鹽緩衝劑以檸檬酸鹽或乙酸鹽形式提供。在本文所提供之溶液之一些實施例中，該檸檬酸鹽緩衝劑呈檸檬酸鈉形式提供。在一些實施例中，檸檬酸鹽或乙酸鹽濃度為0.1-5 mM。在一些實施例中，檸檬酸鹽或乙酸鹽濃度為0.5-2 mM。在一些實施例中，檸檬酸鹽或乙酸鹽濃度為約1 mM。

在本文所提供之溶液之一些實施例中，該溶液之pH為6.8-7.8。在本

文所提供之溶液之一些實施例中，該溶液之pH為7.2-7.6。在一些實施例中，該溶液之pH為7.4-7.5。在一些實施例中，該溶液之pH為約7.5。

在本文所提供之溶液之一些實施例中，該滲透活性劑為鹽。在一些實施例中，該滲透活性劑為鈉鹽。在一些實施例中，該滲透活性劑為氯化鈉。在一些實施例中，滲透活性劑濃度為約100-250 mM。在一些實施例中，滲透活性劑濃度為約125-175 mM。在一些實施例中，滲透活性劑濃度為約150 mM。

在本文所提供之溶液之一些實施例中，該溶液為等張性。在一些實施例中，該溶液為高張性。在一些實施例中，該溶液展現約270-345 mOsm/l之滲透壓。在一些實施例中，該溶液展現約300-330 mOsm/l之滲透壓。在一些實施例中，該溶液之滲透壓為約315 mOsm/l。

在一些實施例中，該溶液進一步包含鉀鹽。在一些實施例中，該鉀鹽為氯化鉀。在一些實施例中，KCl濃度為0.2-5 mM。在一些實施例中，KCl濃度為1-2.5 mM。在一些實施例中，KCl濃度為約2 mM。

在一些實施例中，該溶液進一步包含黏彈性聚合物。在一些實施例中，該聚合物為合成聚合物。在一些實施例中，該聚合物以可有效減少溶液中之細胞暴露於剪應力的濃度存在。在一些實施例中，聚合物濃度為0.001-5% w/v。在一些實施例中，聚合物濃度為約0.05% w/v。在一些實施例中，該聚合物為玻尿酸或其鹽或溶劑合物。在一些實施例中，該聚合物為玻尿酸鈉。在一些實施例中，該玻尿酸或其鹽或溶劑合物為Healon Endocoat® (Abbott)、Hyasis® (Novozymes)或Pro-Visc® (Alcon)。在一些實施例中，該玻尿酸或其鹽或溶劑合物之濃度為約0.001%-0.05% w/v，例如為0.01%-0.05%w/v、約0.02%-0.05%w/v、約0.01% w/v、約

0.02% w/v、約0.03% w/v、約0.04% w/v或約0.05% w/v。

在本文所提供之溶液之一些實施例中，該溶液包含或基本上由氯化鈣、氯化鎂、檸檬酸鈉、氯化鈉及葡萄糖(例如D-葡萄糖)於水溶液中組成。在一些實施例中，該溶液包含或基本上由氯化鈣、氯化鎂、檸檬酸鈉、氯化鈉、葡萄糖(例如D-葡萄糖)及氯化鉀於水溶液中組成。在一些實施例中，該溶液包含或基本上由約0.7 mM CaCl_2 、約0.3 mM MgCl_2 、約1 mM檸檬酸鈉、約16 mM右旋糖及約145 mM NaCl 於水溶液中組成。在一些實施例中，該溶液包含或基本上由約0.5-0.9 mM CaCl_2 、約0.2-0.4 mM MgCl_2 、約0.8-1.2 mM檸檬酸鈉、約13-19 mM右旋糖及約116-174 mM NaCl 於水溶液中組成。

在一些實施例中，該溶液進一步包含約2 mM KCl 。在一些實施例中，該溶液包含或基本上由約0.7 mM CaCl_2 、約0.3 mM MgCl_2 、約1 mM檸檬酸鈉、約16 mM右旋糖及約145 mM NaCl 及約2 mM KCl 於水溶液中組成。在一些實施例中，該溶液包含或基本上由約0.5-0.9 mM CaCl_2 、約0.2-0.4 mM MgCl_2 、約0.8-1.2 mM檸檬酸鈉、約13-19 mM右旋糖、約116-174 mM NaCl 及約1.6-2.4 mM KCl 於水溶液中組成。

在本文所提供之溶液之一些實施例中，該溶液包含或基本上由氯化鈣、氯化鎂、檸檬酸鈉、氯化鈉、葡萄糖(例如D-葡萄糖)及黏彈性聚合物(例如玻尿酸或其鹽或溶劑合物)於水溶液中組成。在一些實施例中，該溶液包含或基本上由氯化鈣、氯化鎂、檸檬酸鈉、氯化鈉、葡萄糖(例如D-葡萄糖)、氯化鉀及黏彈性聚合物(例如玻尿酸或其鹽或溶劑合物)於水溶液中組成。在一些實施例中，該溶液包含或基本上由約0.7 mM CaCl_2 、約0.3 mM MgCl_2 、約1 mM檸檬酸鈉、約16 mM右旋糖、約145 mM NaCl 及

約1-5% w/v黏彈性聚合物(例如玻尿酸或其鹽或溶劑合物)於水溶液中組成。在一些實施例中，該溶液包含或基本上由約0.7 mM CaCl_2 、約0.3 mM MgCl_2 、約1 mM檸檬酸鈉、約16 mM右旋糖、約145 mM NaCl 、約2 mM KCl 及約0.01-5% w/v黏彈性聚合物(例如約0.01-0.05%w/v玻尿酸或其鹽或溶劑合物)於水溶液中組成。在一些實施例中，該溶液包含或基本上由約0.7 mM CaCl_2 、約0.3 mM MgCl_2 、約2 mM KCl 、約1 mM檸檬酸鈉、約16 mM右旋糖、約145 mM NaCl 及約0.05%玻尿酸組成。在一些實施例中，該溶液包含或基本上由約0.5-0.8 mM CaCl_2 、約0.2-0.4 mM MgCl_2 、約1.6-2.4 mM KCl 、約0.8-1.2 mM檸檬酸鈉、約13-19 mM右旋糖、約116-174 mM NaCl 及約0.04-0.06%玻尿酸組成。

在一些實施例中，該溶液為無菌的。在一些實施例中，該溶液為基本上無熱原質的。

在一些實施例中，該溶液不包含碳酸鹽緩衝劑。在一些實施例中，該溶液不包含麩胱甘肽或二硫化麩胱甘肽(GSSG)。在一些實施例中，該溶液不包含兩性離子有機緩衝劑。

在一些實施例中，本文所提供之溶液在25°C下可儲存至少4小時、至少6小時、至少8小時、至少12小時、至少18小時、至少24小時、至少36小時、至少48小時、至少72小時、至少96小時、至少120小時、至少144小時、至少一週、至少兩週、至少三週或至少一個月而不會出現可量測的溶質沈澱及/或可量測的溶液支持儲存於溶液中的細胞之存活及成活力的能力損失。在一些實施例中，本文所提供之溶液在2°C-8°C下可儲存至少4小時、至少6小時、至少8小時、至少12小時、至少18小時、至少24小時、至少36小時、至少48小時、至少72小時、至少96小時、至少120小

時、至少144小時、至少一週、至少兩週、至少三週或至少一個月而不會出現可量測的溶質沈澱及/或可量測的溶液支持儲存於溶液中的細胞之存活及成活力的能力損失。

本發明之一些態樣提供包含細胞群於如本文所提供之溶液中的製劑。在一些實施例中，該細胞群適用於移植至個體中。在一些實施例中，該細胞群適用於移植至個體眼睛中。在一些實施例中，該細胞群包含RPE細胞。在一些實施例中，該細胞群包含感光細胞。在一些實施例中，該細胞群包含間葉細胞。在一些實施例中，該細胞群包含視網膜神經節細胞。在一些實施例中，該細胞群包含視網膜祖細胞。在一些實施例中，該細胞群包含造血幹或祖細胞、神經幹或祖細胞、神經細胞、星形膠質細胞或星形膠質細胞祖細胞、膠細胞或膠細胞祖細胞及/或胰臟細胞。在一些實施例中，製劑經冷藏。在一些實施例中，該製劑在約2°C-8°C下冷藏。在一些實施例中，該製劑支持在製劑儲存期間細胞群中之細胞存活。在一些實施例中，該細胞群中至少70%細胞在2°C-8°C下儲存製劑24小時、48小時、72小時、96小時、120小時之後或144小時之後仍有活力。在一些實施例中，該細胞群中至少80%細胞在2°C-8°C下儲存製劑24小時、48小時、72小時、96小時、120小時之後或144小時之後仍有活力。在一些實施例中，該細胞群中至少90%細胞在2°C-8°C下儲存製劑24小時、48小時、72小時、96小時、120小時之後或144小時之後仍有活力。在一些實施例中，該製劑支持在儲存製劑期間維持細胞群之植板效率。在一些實施例中，在2°C-8°C下儲存製劑24小時、48小時、72小時、96小時、120小時之後或在144小時之後，細胞群展現其初始植板效率之至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%

或至少99%，其中該初始植板效率係指細胞群在儲存時段開始時的植板效率。在一些實施例中，該製劑在儲存容器內。在一些實施例中，該製劑在注射器內。

本發明之一些態樣提供製備本文所提供之製劑(例如包含細胞群於如本文所提供之溶液中的製劑)之方法，其中該方法包含使該細胞群與該溶液接觸。在一些實施例中，該方法包含使低溫保存或集結成粒之細胞與該溶液接觸，由此復原該等細胞。

本發明之一些態樣提供適用於向個體投與之醫藥組合物，其中醫藥製劑包含如本文所提供之溶液或包含細胞群於如本文所提供之溶液中的製劑。

本發明之一些態樣提供方法，其包含向有需要之個體投與如本文所提供之溶液或製劑。在一些實施例中，該方法包含向該個體眼睛投與該溶液或該製劑。在一些實施例中，該方法包含在儲存製劑至少4小時、至少6小時、至少12小時、至少24小時、至少36小時、至少24小時、至少48小時、至少60小時、至少72小時、至少96小時、至少120小時或至少144小時之後，向該個體投與該製劑。在一些實施例中，該個體患有或診斷患有視網膜疾病。在一些實施例中，該視網膜疾病為視桿或視錐營養不良、視網膜變性、色素性視網膜炎、糖尿病性視網膜病變、黃斑變性、雷伯氏先天性黑矇(Leber congenital amaurosis)、視網膜神經節細胞相關疾病、青光眼或斯特格氏疾病(Stargardt disease)。在一些實施例中，該製劑包含可有效改善個體中視網膜疾病之至少一種症狀的一定大小之細胞群。在一些實施例中，該細胞群包含RPE細胞、感光細胞或間葉幹細胞。在一些實施例中，該方法進一步包含監測個體中視網膜疾病之至少一種症狀。

本發明之一些態樣提供方法，其包含(a)使細胞群與如本文所提供之溶液接觸，由此產生細胞製劑。在一些實施例中，該方法進一步包含(b)儲存(a)之細胞製劑至少4小時、至少6小時、至少12小時、至少18小時、至少24小時、至少36小時、至少48小時、至少60小時、至少72小時、至少96小時、至少120小時或至少144小時。在一些實施例中，該方法進一步包含(c)在(b)之儲存時段之後向個體投與(a)之細胞製劑。在一些實施例中，(c)之投與包含將細胞注入個體眼睛中。在一些實施例中，其中該方法進一步包含在(b)之儲存時段之後，測定(a)之細胞製劑中之細胞成活力。在一些實施例中，該方法包含在步驟(b)之儲存時段期間冷藏(a)之細胞製劑。在一些實施例中，該冷藏法包括在2°C -8°C 之溫度下儲存該細胞製劑。在一些實施例中，該方法進一步包含在(b)之儲存時段內將(a)中所生成之製劑輸送至與生成製劑之位置不同的位置。在一些實施例中，該輸送包含將該製劑輸送至臨床或操作空間，其中進行(c)之投與。

本發明之一些態樣提供治療視網膜疾病之方法，其中該等方法包含向患有視網膜疾病之個體眼睛投與有效量之本文所提供之細胞製劑。在一些實施例中，該個體患有或診斷患有視網膜疾病。在一些實施例中，該視網膜疾病為視桿或視錐營養不良、視網膜變性、色素性視網膜炎、糖尿病性視網膜病變、黃斑變性、病理性近視、雷伯氏先天性黑矇、青光眼或斯特格氏疾病。在一些實施例中，該製劑包含可有效改善個體中視網膜疾病之至少一種症狀的一定大小之細胞群。在一些實施例中，該細胞群包含RPE細胞、感光細胞、視網膜神經節或間葉幹細胞。在一些實施例中，該方法進一步包含監測個體中視網膜疾病之至少一種症狀。

本發明之一些態樣提供套組，其包含(a)如本文所提供之溶液；及(b)

說明書，用於使細胞群與(a)之溶液接觸以產生細胞製劑；及(c)容器，用於(b)之接觸及/或儲存(b)之細胞製劑。在一些實施例中，(a)之溶液及(c)之容器適用於將(b)之細胞製劑移植給個體。

以上發明內容意欲以非限制性方式說明本文揭示之技術之一些實施例、優點、特徵及用途。本文揭示之技術之其他實施例、優點、特徵及用途將自實施方式、附圖、實例及申請專利範圍顯而易見。

【圖式簡單說明】

圖1. RPE細胞可在HypoThermosol中維持24 (但不為48小時)而在培養物中接種及生長之後續能力無顯而易見損失。

圖2. 在GS2 (2°C -8°C)中之RPE穩定性。RPE細胞可在GS2中維持至少48小時而活細胞數目或在培養物中接種及生長之後續能力無顯而易見損失。

圖3. 在GS2 (2°C -8°C)中之RPE穩定性。RPE細胞可在GS2中維持4-5天而細胞成活力僅有很小損失且活細胞密度無顯著降低。

圖4. 在GS2 (2°C -8°C)中之RPE穩定性。RPE細胞在培養物中接種及生長之能力在GS2冷儲存5天之後開始降低。

圖5. 在GS2 (2°C -8°C)中之RPE穩定性。GS2與當前注射系統相容。

圖6. 展示來自三個重複管之平均活細胞密度±標準差。人類RPE細胞密度使用血球計測定。細胞成活力藉由錐蟲藍排除(Trypan Blue exclusion)獲取。平均值自針對各條件製造之細胞之三個重複管計算，其中各管之活細胞濃度自三個重複計數測定。以上各組值展示針對各條件經由MedOne編號3233套管在細胞擠出之後所觀測到的細胞數目之%改變(δ)。

圖7. 展示來自針對所測試各條件之六個孔的人類RPE細胞/孔之平均數及標準差($\pm$ SD)。針對各條件，約20,000個細胞/孔接種至明膠塗佈之96孔板上，且在RPE生長培養基(具有EGM2 Single Quots之EBM-2，Stem Cell, Inc.)中在5% CO₂、37攝氏度、濕度可控恆溫箱中培養3天。為了測定3天生長之後的細胞數目，利用胰蛋白酶(Sigma)及基於HEPES分解培養基(Gibco)之1:1混合物使細胞上升。當細胞上升時，胰蛋白酶用含有10%胚胎牛血清之培養基中和且使用血球計計數細胞。

圖8. 用於儲存MSC之不同培養基之比較。使人類胚胎幹細胞衍生之MSC生長至70%融合度，利用0.05%胰蛋白酶收集，再懸浮於aMEM+15%FCS (MSC培養基)中且以200 x g快速離心5 min。細胞集結粒再懸浮於小體積之MSC培養基中，且使用錐蟲藍排除計算成活力。接著，5百萬個MSC置放於4個Eppendorf管中之每一者中，快速離心且再懸浮於1 ml所指示緩衝劑中之每一者中。將管置放於設定在4°C下之冷空間中持續所指示時間量。CS：犬血清；FBS：胎牛血清。

圖9. 當以更高密度儲存於GS2中時，MSC成活力增強，同時FBS之存在幾乎不促進在GS2中24小時之成活力。

圖10. 當儲存時，MSC成活力得以保存且經由26G針/注射器(在GS2中在4°C下)排出。

圖11. 與利用BSS-Plus或僅GS2輸送之培養基(無細胞)處理或經受偽處理或無處理之動物眼睛相比，針對用懸浮於BSS-Plus或GS2輸送之培養基中之RPE細胞處理的一組16隻大鼠眼睛在60天處理後下的視網膜電流圖(ERG)。

【實施方式】

前言

儘管與早期的技術相比，許多先進的手術程序最小化對細胞及組織之損壞，但某些精細程序仍對所用技術及材料極其敏感。舉例而言，眼科手術程序，諸如白內障手術及玻璃體切除術涉及極其易損壞的細胞及組織(諸如角膜內皮層)，且因此幾乎不能有誤差且極有可能傷害該等眼部組織及患者視覺。另外，例如在再生藥品方法之情形下，細胞移植常常需要調配、儲存、輸送及/或注射精細或易損壞的細胞，其在不當操作或暴露於非生理學條件時可受到損害或失去再生能力。

本發明提供用於沖洗、細胞復原、細胞儲存、細胞輸送及/或向個體之細胞投與的溶液。本文所提供之溶液具有數個優點，其優於當前可利用的用於沖洗、細胞復原、調配、儲存及/或移植之溶液。舉例而言，與當前可利用的培養基相比，本文所提供之溶液甚至在長期儲存時段期間仍支持各種細胞及組織類型(包括易損壞的細胞及組織)之存活，且維持細胞及組織成活力、再植板效率及再生能力之經改良水準。如本文中其他處更加詳細地解釋，當前可利用的用於手術前沖洗或細胞調配之培養基具有較短半衰期(例如基於碳酸鹽之沈澱)，及/或不支持長時段(例如大於4-6小時)儲存細胞之存活、再植板效率及再生能力。由於較短半衰期及超過相對較短時段缺乏支持細胞成活力及功能，使用當前可利用的培養基使培養基及/或細胞及組織之調配物於各別培養基中非常接近於臨床位點(其中使用(例如移植)培養基或細胞製劑)成為必要，例如在診所自產或在非常接近之實驗室。因此，當前可利用的溶液限制調配細胞或組織臨床用於彼等應用中，該等應用允許在較短時間間隔內在此期間細胞成活力、再植板效率及/或再生能力可接受之投與。對非常接近於臨床位點之調配物的需要產生

額外費用、風險及對位點外處理之額外限制。

對比而言，與當前可利用的溶液相比，本文所提供之溶液具有長期儲存期限，且甚至在長儲存時段(例如至多24小時、至多48小時或更長儲存時段)期間亦支持各種細胞類型(包括易損壞細胞，諸如RPE及感光細胞及間葉幹細胞)之細胞功能、成活力、再植板效率及再生能力。本文所提供之溶液進一步具有生物相容性且因此適用於向個體投與。在本文所提供之溶液中調配之細胞或組織可因此直接向個體投與而不需要培養基替換。

本文所提供之溶液之增強特性允許調配溶液、細胞及組織輸送至遠離調配位點的臨床位點，其使得能夠進行中心處理及最終產物調配，且消除了對非常接近於臨床位點之調配物的需要。本文所提供之溶液之經改良儲存及輸送能力進一步允許使用更加遠離最終產物之調配位點的臨床位點，且亦增加了排程臨床應用，例如投與在本文所提供之溶液中調配之細胞或組織的時程手術之彈性。儲存之經擴增時間窗口在臨床操作開始之前，例如在手術小組開始手術準備之前或在個體準備進行手術之前進一步提供了用於品質控制調配產物之額外機會，例如測試最終調配產物中病原污染物之存在。

臨床溶液

本發明之一些態樣提供用於沖洗且用於調配、儲存、輸送、且投與細胞及組織之臨床溶液。

與用於沖洗及細胞調配之當前可利用的培養基，例如平衡鹽溶液或鹽水相比，當前所描述臨床溶液支持敏感性細胞或組織之長期存活及功能，易於製備且滅菌，且具有長期儲存期限。

簡單的鹽溶液，諸如磷酸鹽緩衝鹽水或0.9%氯化鈉溶液可用於短期

儲存細胞，但此等溶液不足以支持細胞成活力或細胞功能持續更長期儲存，其甚至在僅較短時段之儲存之後仍導致細胞成活力、再植板效率及再生能力顯著且常常不可接受的降低。

更加複雜的平衡鹽溶液可供用於臨床目的，諸如臨床沖洗或細胞及組織儲存，其通常包含維持滲透壓之藥劑、鈣源、鎂源及緩衝劑。

氯化鈉常用於維持溶液之滲透壓。鈣離子在維持例如角膜內皮中之細胞間界面中起一定作用。鎂離子，如鈣離子在水狀液中發現，且對多種細胞方法必不可少。

由於碳酸氫根陰離子代表用於許多組織之生理學緩衝劑且與其他溶質廣泛相容，所以其通常用作緩衝劑。然而，某些形式之鈣及鎂可與碳酸氫鹽反應，形成碳酸鈣或碳酸鎂，其在某些環境下可自溶液沈澱出。當含有碳酸氫鹽及鈣及/或鎂之溶液經熱滅菌時，反應及沈澱可快速發生，且隨時間推移在環境儲存條件下可發生。在鈣或鎂與碳酸氫鹽之間的反應似乎在通常用作醫藥賦形劑之幾乎所有鈣及鎂之離子鹽的情況下發生。

一種避免沈澱之方法為提供使用碳酸氫鹽緩衝劑作為應用之前不久混合之兩種各別儲備溶液的臨床溶液。舉例而言，一種廣泛使用之臨床培養基為、BSS PLUS[®]無菌眼內沖洗溶液(Alcon Laboratories, Inc.)。BSS PLUS[®]無菌眼內沖洗溶液為兩部分溶液。在即將手術之前，該等部分混合在一起以形成單一溶液。此混合步驟可為不便的且代表在忙碌的操作空間中之混合錯誤風險。另外，與製造一部分調配物相比，製造兩種各別溶液更加複雜且昂貴。因此，一部分臨床溶液將為有利的且為所極其期望的。

BSS PLUS[®]無菌眼內沖洗溶液之部分I含有溶解於注射用水中之氯化鈉、氯化鉀、碳酸氫鈉及磷酸氫二鈉。部分I之pH接近中性，且其具有相

對於生理學流體幾乎等張性重量莫耳滲透濃度。BSS PLUS[®]無菌眼內沖洗溶液之部分II含有溶解於注射用水中之氯化鈣、氯化鎂、右旋糖及二硫化麩胱甘肽(GSSG)。部分II之pH調節至3與5之間，且溶液具有低張重量莫耳滲透濃度。

經復原BSS PLUS[®]無菌眼內沖洗溶液具有中性pH及等張性重量莫耳滲透濃度。若BSS PLUS[®]無菌眼內沖洗溶液之兩個部分合併，則部分II中之二價陽離子，諸如鈣及鎂將與部分I中之碳酸氫鹽及磷酸鹽反應，形成沈澱物。若合併溶液經蒸氣滅菌，則此反應幾乎立刻進行，且在室溫下通常在數小時至數天之時間段內進行較緩慢。為了防止此沈澱，經復原BSS PLUS[®]無菌眼內沖洗溶液之標記儲存期限為六小時，在此期間必須使用溶液。

先前已嘗試製造與兩部分BSS PLUS[®]無菌眼內沖洗溶液效能相當的一部分臨床溶液。歐洲專利申請案EP 1067907 B1 (Armitage)教示使用兩性離子有機緩衝劑，諸如通常稱為HEPES之N-(2-羥基乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)以防止如上文所論述之沈澱。由Armitage揭示之調配物不含有諸如右旋糖及GSSG之組分，其經高壓處理或併入於生理學pH溶液中時，已知為不穩定的。由Armitage揭示之調配物亦不含有通常存在於諸如胺基酸之組織培養基中的類型組分。Armitage之教示內容因此不提供針對沈澱物形成之問題的溶液。

與先前研發之一部分溶液相比，本發明之一些態樣提供一部分臨床溶液，其不需要使用兩性離子有機緩衝劑，諸如HEPES、BES、MOPS、TES、EPPS及TRICINE以維持溶液在生理學pH範圍內。本發明之臨床溶液解決短存放期問題。與當前可利用的臨床培養基相比，本文所提供之臨

床溶液具有經極大改良之存放期，且甚至在長期儲存24小時、48小時、60小時、72小時、96小時、120小時、144小時或168小時或更長之後支持細胞之成活力、再植板效率及再生能力。

如本文所用，術語「溶液」係指水性介質，其包含水作為主要溶劑及一或多種溶解於溶液中之溶質，例如緩衝劑、滲透活性劑、葡萄糖、鹽、聚合物等。在一些實施例中，本文所提供之溶液供臨床使用，且因此為無毒、基本上無熱原質且無菌的。

在一些實施例中，本文所提供之溶液展現生理學pH及亦稱為生理滲透壓之生理學滲透壓。生理學pH係指pH不為細胞毒性的且類似於溶液投與之細胞或組織pH或溶液中調配之細胞或組織在其自然環境中所遇到之細胞或組織pH。對於大多數細胞及組織，生理學pH為約6.8-7.8之pH，例如為7-7.7之pH、7.2-7.6之pH、7.2-7.4之pH或7.4-7.5之pH。因此，在一些實施例中，本文所提供之溶液展現pH為約7.0、約7.1、約7.2、約7.3、約7.4、約7.5、約7.6、約7.7或約7.8。生理學滲透壓係指滲透壓不為細胞毒性的且類似於溶液投與之細胞或組織之滲透壓或溶液中調配之細胞或組織在其自然環境中所遇到之細胞或組織之滲透壓。對於大多數細胞及組織，生理學滲透壓為約270-345 mOsm/l，例如280-330 mOsm/l、290-325 mOsm/l、300-315 mOsm/l。在一些實施例中，生理學滲透壓為約300 mOsm/l、約305 mOsm/l、約310 mOsm/l、約315 mOsm/l、約320 mOsm/l或約325 mOsm/l。

術語溶液之「滲透壓」或「滲透壓」為阻止溶劑跨越半透膜流動至溶液中所要的壓力，由此將純溶劑分隔在一側上且溶液分隔在另一側上，其中該半透膜對於溶劑分子為可滲透的但對於溶質分子為不可滲透的。溶

液之滲透壓與溶液中溶質粒子之莫耳濃度成正比，且以mOsm/l或mOsm/kg為單位量測。在一些實施例中，本文所提供之溶液展現滲透壓在約290 mOsm/l與約320 mOsm/l之間或在約300 mOsm/l與310 mOsm/l之間或為約305 mOsm/l。在一些實施例中，溶液展現約300-330 mOsm/l之滲透壓。在一些實施例中，溶液之滲透壓為約300、約305、約310、約315、約320或約325 mOsm/l。

在一些實施例中，本文所提供之溶液之滲透壓係就其張力而言，其中高張溶液為使細胞收縮之溶液，低張溶液為使細胞膨脹之溶液且等張溶液不改變細胞體積。術語「高張性」、「低張性」及「等張性」通常關於使溶液接觸之細胞、細胞群或組織使用。舉例而言，在提供沖洗溶液之實施例中，等張性係指在沖洗期間不引起與溶液接觸之細胞或組織體積變化的滲透壓。類似地，在溶液用於調配供臨床使用(例如用於移植個體)之細胞、細胞群或組織之實施例中，等張性係指當在溶液中調配細胞、細胞群之細胞或組織之細胞時不引起其體積變化的滲透壓。在本文所提供之溶液之一些實施例中，溶液為等張性。在一些實施例中，溶液為高張性。

在本文所提供之溶液之一些實施例中，滲透活性劑為鹽。在一些實施例中，該鹽為醫藥學上可接受之鹽。在一些實施例中，滲透活性劑為鈉鹽。在一些實施例中，滲透活性劑為氯化鈉。在一些實施例中，滲透活性劑之濃度為約100-200 mM、125-175 mM或140-160 mM。在一些實施例中，滲透活性劑之濃度為約100、約105、約110、約115、約120、約125、約130、約135、約140、約145、約150、約155、約160、約165、約170、約175、約180、約185、約190、約195或約200 mM。

如本文所用，術語「生理滲透壓」係指滲透壓不為細胞毒性的(例如

不導致給定細胞或細胞類型破裂或以其他方式對細胞造成損壞)，且類似於溶液投與之組織之滲透壓或溶液中調配之細胞或組織在其自然環境中所遇到之組織之滲透壓。用於大多數應用之生理滲透壓範圍在約280 mOsm/l與約325 mOsm/l之間、在約290 mOsm/l與約320 mOsm/l之間或在約300 mOsm/l與310 mOsm/l之間或為約305 mOsm/l。

在一些實施例中，用於細胞復原、儲存、輸送及/或向個體投與之本文所提供之溶液包含(a)緩衝劑，其將溶液維持在生理學pH下；及(b)至少2 mM葡萄糖；及(c)滲透活性劑，其將溶液維持在生理滲透壓下。在一些實施例中，溶液進一步包含二價陽離子源。在一些實施例中，二價陽離子源包含鈣源及/或鎂源。在一些實施例中，該溶液包含鈣源。在一些實施例中，溶液進一步包含鎂源。在一些實施例中，該緩衝劑包含乙酸鹽緩衝劑及/或檸檬酸鹽緩衝劑。在一些實施例中，溶液包含至少4 mM、至少5 mM、至少6 mM、至少7 mM、至少7.5 mM、至少8 mM、至少9 mM、至少10 mM、至少15 mM、至少20 mM、至少25 mM、至少30 mM、至少40 mM或至少50 mM葡萄糖。在一些實施例中，溶液包含至少0.5 mM、至少1 mM、至少2 mM、至少2.5 mM、至少3 mM、至少5 mM、至少6 mM、至少7 mM、至少7.5 mM、至少8 mM、至少9 mM、至少10 mM、至少15 mM、至少16 mM、至少20 mM、至少25 mM、至少30 mM、至少40 mM或至少50 mM右旋糖。在一些實施例中，溶液包含不超過3 mM、不超過4 mM、不超過5 mM、不超過6 mM、不超過7 mM、不超過7.5 mM、不超過8 mM、不超過9 mM、不超過10 mM、不超過15 mM、不超過17 mM、不超過20 mM、不超過25 mM、不超過30 mM、不超過40 mM或不超過50 mM葡萄糖。在一些實施例中，溶液包含不超過0.5 mM、不超過1 mM、

不超過2 mM、不超過2.5 mM、不超過3 mM、不超過4 mM、不超過5 mM、不超過6 mM、不超過7 mM、不超過7.5 mM、不超過8 mM、不超過9 mM、不超過10 mM、不超過15 mM、不超過20 mM、不超過25 mM、不超過30 mM、不超過40 mM或不超過50 mM右旋糖。

在一些實施例中，用於細胞復原、儲存、輸送及/或向個體投與之本文所提供之溶液包含(a)緩衝劑，其將溶液維持在生理學pH下；及(b)葡萄糖；及(c)滲透活性劑，其將溶液維持在生理滲透壓下；及(d)鈣源；及(e)鎂源。在一些實施例中，該緩衝劑包含乙酸鹽緩衝劑及/或檸檬酸鹽緩衝劑。在一些實施例中，溶液包含至少0.5 mM、至少1 mM、至少2 mM、至少2.5 mM、至少3 mM、至少4 mM、至少5 mM、至少6 mM、至少7 mM、至少7.5 mM、至少8 mM、至少9 mM、至少10 mM、至少15 mM、至少16 mM、至少20 mM、至少25 mM、至少30 mM、至少40 mM或至少50 mM葡萄糖。在一些實施例中，溶液包含至少0.5 mM、至少1 mM、至少2 mM、至少2.5 mM、至少3 mM、至少5 mM、至少6 mM、至少7 mM、至少7.5 mM、至少8 mM、至少9 mM、至少10 mM、至少15 mM、至少16 mM、至少20 mM、至少25 mM、至少30 mM、至少40 mM或至少50 mM右旋糖。在一些實施例中，溶液包含不超過0.5 mM、不超過1 mM、不超過2 mM、不超過2.5 mM、不超過3 mM、不超過4 mM、不超過5 mM、不超過6 mM、不超過7 mM、不超過7.5 mM、不超過8 mM、不超過9 mM、不超過10 mM、不超過15 mM、不超過17 mM、不超過20 mM、不超過25 mM、不超過30 mM、不超過40 mM或不超過50 mM葡萄糖。在一些實施例中，溶液包含不超過0.5 mM、不超過1 mM、不超過2 mM、不超過2.5 mM、不超過3 mM、不超過4 mM、不超過5 mM、不超

過6 mM、不超過7 mM、不超過7.5 mM、不超過8 mM、不超過9 mM、不超過10 mM、不超過15 mM、不超過17 mM、不超過20 mM、不超過25 mM、不超過30 mM、不超過40 mM或不超過50 mM右旋糖。

在本文所提供之溶液之一些實施例中，葡萄糖或右旋糖之濃度為0.5-150 mM、0.5-50 mM、2.5-50 mM、5-50 mM、10-50 mM、0.5-25 mM、2.5-25 mM、5-25 mM、10-25 mM或10-20 mM。在本文所提供之溶液之一些實施例中，葡萄糖或右旋糖之濃度為約0.5 mM、約1 mM、約2 mM、約2.5 mM、約3 mM、約4 mM、約5 mM、約6 mM、約7 mM、約7.5 mM、約8 mM、約9 mM、約10 mM、約11 mM、約12 mM、約12.5 mM、約13 mM、約14 mM、約15 mM、約16 mM、約17 mM、約18 mM、約19 mM、約20 mM、約22.5 mM、約25 mM、約30 mM、約35 mM、約40 mM、約45 mM或約50 mM。

在一些實施例中，本文所提供之溶液包含二價陽離子源。適合之二價陽離子包括(但不限於)例如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cr^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ba^{2+} 及 Sr^{2+} 。在一些實施例中，二價陽離子源包含鈣源。在一些實施例中，二價陽離子源包含鎂源。在一些實施例中，二價陽離子源包含兩種或更多種不同二價陽離子源，例如鈣源及鎂源。

在本文所提供之溶液之一些實施例中，溶液包含鈣源，例如鈣離子源。在一些實施例中，鈣源包含醫藥學上可接受之鈣鹽。在本文所提供之溶液之一些實施例中，溶液包含鎂源，例如鎂離子源。在一些實施例中，鎂源包含醫藥學上可接受之鎂鹽。

如本文所用，術語「醫藥學上可接受之鹽」係指認為適用於向人類個體投與之鹽。在一些實施例中，醫藥學上可接受之鹽為由選自包含以下

之群的酸形成之鹽：乙酸、抗壞血酸、檸檬酸、鹽酸、順丁烯二酸、草酸、磷酸、硬脂酸、丁二酸及硫酸。在一些實施例中，醫藥學上可接受之二價陽離子源係選自由酸形成之鈣及/或鎂鹽之群，該酸係選自包含以下之群：乙酸、抗壞血酸、檸檬酸、鹽酸、順丁烯二酸、草酸、磷酸、硬脂酸、丁二酸及硫酸。舉例而言，實施例之此群之醫藥學上可接受之鈣鹽將包括乙酸鈣、抗壞血酸鈣、檸檬酸鈣、氯化鈣、順丁烯二酸鈣、草酸鈣、磷酸鈣、硬脂酸鈣、丁二酸鈣及硫酸鈣。對熟習此項技術者將顯而易見，在溶液包含兩種或更多種醫藥學上可接受之鹽(例如鈣鹽、鎂鹽及鉀鹽)之實施例中，一些或所有鹽可由同一酸形成(例如氯化鈣、氯化鎂及氯化鉀)，或兩種或更多種鹽可由不同酸形成(例如氯化鈣、氯化鎂及乙酸鉀；氯化鈣、檸檬酸鎂及順丁烯二酸鉀等)。

在一些實施例中，醫藥學上可接受之鹽，例如醫藥學上可接受之鈣鹽或鎂鹽，為選自由以下組成之群的酸之鹽：1-羥基-2-萘甲酸、2,2-二氯乙酸、2-羥基乙磺酸、2-氧代戊二酸、4-乙醯胺基苯甲酸、4-胺基水楊酸、乙酸、己二酸、抗壞血酸(L)、天冬胺酸(L)、苯磺酸、苯甲酸、樟腦酸(+)、樟腦-10-磺酸(+)、癸酸(capric acid/decanoic acid)、己酸(caproic acid/hexanoic acid)、辛酸(caprylic acid/octanoic acid)、碳酸、肉桂酸、檸檬酸、環己胺磺酸、十二基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙磺酸、甲酸、反丁烯二酸、半乳糖二酸、龍膽酸、葡庚糖酸(D)、葡萄糖酸、(D)、葡糖醛酸(D)、麩胺酸、戊二酸、甘油磷酸、乙醇酸、馬尿酸、氫溴酸、鹽酸、異丁酸、乳酸(DL)、乳糖酸、月桂酸、順丁烯二酸、蘋果酸(-L)、丙二酸、杏仁酸(DL)、甲磺酸、萘-1,5-二磺酸、萘-2-磺酸、菸鹼酸、硝酸、油酸、草酸、棕櫚酸、雙羥萘酸、磷酸、丙酸、焦麩胺酸(-L)、柳酸、癸

二酸、硬脂酸、丁二酸、硫酸、酒石酸(+L)、硫氰酸、甲苯磺酸(p)及十一碳烯酸。另外適合的醫藥學上可接受之鹽將對熟習此項技術者顯而易見，且應瞭解本發明在此方面不受限制。

在一些實施例中，二價陽離子源包含0.1-20 mM，例如約0.5-10 mM、0.5-5 mM、1-10 mM或2-10 mM之二價陽離子總濃度。在一些實施例中，二價陽離子源之濃度為約0.2 mM、約0.3 mM、約0.4 mM、約0.5 mM、約0.6 mM、約0.7 mM、約0.8 mM、約0.9 mM、約1 mM、約2 mM、約3 mM、約4 mM或約5 mM。在一些實施例中，二價陽離子源包含鈣源及/或鎂源。

在本文所提供之溶液之一些實施例中，鈣源包含氯化鈣。在一些實施例中，鈣源包含二水合氯化鈣。在一些實施例中，鎂源包含氯化鎂。在一些實施例中，鎂源包含六水合氯化鎂。在本文所提供之溶液之一些實施例中，鈣源之濃度為0.1-1.2 mM、0.25-0.75 mM、0.4-0.65 mM或0.5-0.7 mM。在一些實施例中，鈣源之濃度為約0.2 mM、約0.3 mM、約0.4 mM、約0.5 mM、約0.6 mM、約0.7 mM、約0.8 mM、約0.9 mM、約1 mM、約1.1 mM或約1.2 mM。在本文所提供之溶液之一些實施例中，鎂源之濃度為0.05-5 mM、0.1-0.5 mM、0.25-2.5 mM、0.1-1 mM或0.1-0.3 mM。在一些實施例中，鎂源之濃度為約0.05 mM、約0.1 mM、約0.2 mM、約0.3 mM、約0.4 mM、約0.5 mM、約0.6 mM、約0.7 mM、約0.8 mM、約0.9 mM、約1 mM、約2 mM、約3 mM、約4 mM或約5 mM。

在本文所提供之溶液之一些實施例中，溶液包含緩衝劑。可與本文中術語「緩衝劑(buffer)」互換使用之術語「緩衝劑(buffering agent)」係指可藉由中和所添加酸或鹼而維持溶液之pH相對穩定的藥劑。通常，緩

衝劑包含弱共軛酸鹼對，亦即弱酸及其共軛鹼，或弱鹼及其共軛酸。

在一些實施例中，包含於本文所提供溶液中之緩衝劑A檸檬酸鹽或乙酸鹽緩衝劑，例如呈檸檬酸鹽或乙酸鹽形式提供。在本文所提供之溶液之一些實施例中，檸檬酸鹽緩衝劑呈檸檬酸鈉形式提供。在一些實施例中，檸檬酸鹽或乙酸鹽之濃度為0.1-5 mM。在一些實施例中，檸檬酸鹽或乙酸鹽濃度為0.5-2 mM。在一些實施例中，檸檬酸鹽或乙酸鹽之濃度為約0.05 mM、0.06 mM、0.07 mM、0.09 mM、0.1 mM、0.2 mM、0.3 mM、0.4 mM、0.5 mM、0.6 mM、0.7 mM、0.9 mM、1 mM、2 mM、3 mM、4 mM、5 mM、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM、或10 mM。

在一些實施例中，溶液進一步包含鉀鹽，較佳為醫藥學上可接受之鉀鹽。在一些實施例中，鉀鹽為氯化鉀。在一些實施例中，KCl之濃度為0.2-5 mM或1-2.5 mM。在一些實施例中，KCl之濃度為約0.2 mM、0.3 mM、0.4 mM、0.5 mM、0.6 mM、0.7 mM、0.9 mM、1 mM、1.5 mM、2 mM、2.5 mM、3 mM、4 mM或5 mM。

在一些實施例中，溶液進一步包含黏彈性聚合物。在不希望受理論束縛的情況下，相信在本文所提供之溶液中儲存之後及/或在向個體投與之後，例如經由包含套管插入法之投與途徑添加黏彈性聚合物藉由保護細胞及組織免受剪應力而促進了細胞及組織成活力、再植板效率及再生能力。黏彈性聚合物對熟習此項技術者已熟知，且例示性適合的黏彈性聚合物包括(但不限於)玻尿酸(例如Healon Endocoat[®] (Abbott)、Hyasis[®] (Novozymes)及Pro-Visc[®] (Alcon))、海藻酸鹽(包括海藻酸鈉)、亦稱為聚(環氧乙烷) (PEO)之聚(乙二醇) (PEG)、聚丙烯醯胺、聚(乙烯醇) (PVA)、羥乙基纖維素(HEC)、聚(N-羥基乙基丙烯醯胺) (PHEA)、羥丙基甲基纖

維素(HPMC)、羥基乙基纖維素、羧基甲基纖維素、聚(2-甲基丙烯酸羥基乙酯) (pHEMA)、聚甲基丙烯酸(卡波姆(carbomer))、聚(乙烯基吡咯烷酮) (PVP)、聚(丙烯酸) (PAA)、聚葡萄糖、硫酸軟骨素、聚(2-甲基丙烯醯氧基乙基磷酸膽鹼) (PMPC)及三嵌段共聚物(例如泊洛沙姆(poloxamer) 188 (PLURONIC® F68)、泊洛沙姆P108 (PLURONIC® F38)、泊洛沙姆P184 (PLURONIC® L64)、泊洛沙姆P401、泊洛沙姆P402、泊洛沙姆P407 (PLURONIC® F127)及泊洛沙姆P408 (PLURONIC® F108))、羥丙基瓜爾豆聚乙烯吡咯啉酮、聚氧乙烯聚氧丙烯共聚物(泊洛沙姆)或其鹽或混合物，包括(但不限於)玻尿酸及海藻酸鹽之混合物或其鹽。在一些實施例中，聚合物為非離子聚合物。在某些實施例中，聚合物為聚醚。在某些實施例中，聚合物為聚烷基醚。在某些實施例中，聚合物為聚烷基醚與另一聚合物(例如聚烷基醚)之共聚物。在一些實施例中，聚合物為泊洛沙姆(亦稱為泊洛昔姆(poloxymers))。泊洛昔姆為非離子三嵌段共聚物，其由聚氧丙烯(POP) (亦稱為聚丙二醇)之中心疏水性鏈側接有兩個聚氧乙烯(POE) (亦稱為聚乙二醇(PEG))之親水性鏈構成。熟習此項技術者將意識到用於本文基於本發明所提供之溶液的另外適合的黏彈性聚合物，且應理解本發明在此方面不受限制。熟習此項技術者應理解適用於本文所提供之溶液及製劑的黏彈性聚合物之量將取決於聚合物之黏彈性，例如尤其取決於所用聚合物之分子量。在一些實施例中，黏彈性聚合物在本文所提供之溶液及製劑中以0.001% w/v-5% w/v之濃度使用。在一些實施例中，黏彈性聚合物以一定濃度使用，其提供本文所提供溶液或製劑之黏度對應於包含0.01%-0.05%玻尿酸之相同溶液或製劑之黏度，例如對應於包含0.01%-0.05% Healon Endocoat®之相同溶液或製劑所展現的黏度。

在某些實施例中，含有輸送培養基之黏彈性聚合物之零剪切黏度大於1,000、10,000、50,000或甚至100,000 Pas，且較佳零剪切黏度在1,000至200,000 Pas範圍內且更佳在1,000至20,000 Pas範圍內。在某些實施例中，相對於無黏彈性聚合物之輸送培養基，黏彈性聚合物將所得輸送培養基之零剪切黏度增加5%、10%、15%、25%或甚至40%。

在實施例中，其中溶液例如呈包含細胞或組織於溶液中之製劑形式向個體投與，在本發明中所利用之聚合物為生物相容的及/或可生物降解。

在一些實施例中，聚合物為玻尿酸或其鹽或溶劑合物。在一些實施例中，聚合物為玻尿酸鈉。在一些實施例中，聚合物以可有效減少溶液中之細胞暴露於剪應力的濃度存在。在一些實施例中，聚合物濃度為0.01-5% w/v。在一些實施例中，聚合物濃度為約0.01%-0.05% w/v。在一些實施例中，聚合物為Healon Endocoat[®]。

在一些實施例中，溶液不包含碳酸鹽緩衝劑。在一些實施例中，溶液不包含麩胱甘肽或二硫化麩胱甘肽(GSSG)。在一些實施例中，溶液不包含兩性離子有機緩衝劑。

本發明涵蓋與兩個或更多個或任何數目之準則(例如pH、滲透壓、溶質(緩衝劑、葡萄糖、滲透活性劑、鎂、鈣、鉀、聚合物)、濃度等)組合之溶液。舉例而言，本發明涵蓋在存在或不存在添加聚合物之情況下包含緩衝劑、葡萄糖及滲透活性劑之溶液；包含鉀之溶液；及不包含鉀之溶液；以及包含溶質之任何組合之溶液，該等溶質係以針對各別溶質提供之任何濃度。將亦理解，本發明涵蓋包含所列舉溶質之溶液以及基本上由或由所列舉溶質及溶劑(例如水)組成之溶液。此等替代物出於簡潔之目的在

此處不拼寫出。

舉例而言，在本文所提供之溶液之一些實施例中，溶液包含或基本上由氯化鈣、氯化鎂、檸檬酸鈉、氯化鈉及葡萄糖(例如D-葡萄糖)於水中組成。在一些實施例中，溶液包含或基本上由氯化鈣、氯化鎂、檸檬酸鈉、氯化鈉、葡萄糖(例如D-葡萄糖)及氯化鉀於水中組成。在一些實施例中，溶液包含或基本上由約0.7 mM CaCl_2 、約0.03 mM MgCl_2 、約1 mM 檸檬酸鈉、約16 mM 右旋糖及約145 mM NaCl 於水中組成。在一些實施例中，溶液進一步包含約2 mM KCl 。在一些實施例中，溶液包含或基本上由約0.7 mM CaCl_2 、約0.03 mM MgCl_2 、約1 mM 檸檬酸鈉、約16 mM 右旋糖、約145 mM NaCl 及約2 mM KCl 於水中組成。在一些實施例中，溶液包含或基本上由約0.7 mM CaCl_2 、約0.3 mM MgCl_2 、約1 mM 檸檬酸鈉、約16 mM 右旋糖、約145 mM NaCl 及約2 mM KCl 於水中組成。在一些實施例中，溶液進一步包含黏彈性聚合物。在一些實施例中，聚合物為玻尿酸或其鹽或溶劑合物。在一些實施例中，聚合物為玻尿酸鈉。在一些實施例中，聚合物以可有效減少溶液中之細胞暴露於剪應力的濃度存在。在一些實施例中，聚合物濃度為0.01-5% w/v。在一些實施例中，聚合物濃度為約0.01-0.05% w/v。在本文所提供之溶液之一些實施例中，溶液包含或基本上由氯化鈣、氯化鎂、檸檬酸鈉、氯化鈉、葡萄糖(例如D-葡萄糖)及黏彈性聚合物(例如玻尿酸)或其鹽或溶劑合物於水中組成。在一些實施例中，溶液包含或基本上由氯化鈣、氯化鎂、檸檬酸鈉、氯化鈉、葡萄糖(例如D-葡萄糖)、氯化鉀及黏彈性聚合物(例如玻尿酸)或其鹽或溶劑合物於水中組成。在一些實施例中，溶液包含或基本上由約0.7 mM CaCl_2 、約0.03 mM MgCl_2 、約1 mM 檸檬酸鈉、約16 mM 右旋糖、約145

mM NaCl及約0.005-5% w/v黏彈性聚合物(例如玻尿酸)或其鹽或溶劑合物於水中組成。在一些實施例中，溶液包含或基本上由約0.7 mM CaCl_2 、約0.03 mM MgCl_2 、約1 mM檸檬酸鈉、約16 mM右旋糖、約145 mM NaCl、約2 mM KCl及約0.005-5% w/v黏彈性聚合物(例如玻尿酸)或其鹽或溶劑合物於水中組成。在一些實施例中，溶液包含或基本上由約0.85% NaCl、約0.015% KCl、約0.01% CaCl_2 二水合物、約0.006% MgCl_2 六水合物、約0.035%二水合檸檬酸鈉及約0.29%右旋糖於水中組成，及視情況包含約0.01-5% w/v黏彈性聚合物，例如玻尿酸或其鹽或溶劑合物，諸如0.01-0.05% Healon Endocoat[®]。在一些實施例中，溶液包含或基本上由約0.68-1.02% NaCl、約0.008-0.012% CaCl_2 二水合物、約0.0048-0.0072% MgCl_2 六水合物、約0.028-0.042%二水合檸檬酸鈉及約0.23-0.35%右旋糖於水中組成，及視情況包含約0.01-5% w/v黏彈性聚合物，例如玻尿酸或其鹽或溶劑合物，諸如0.01-0.05% Healon Endocoat[®]。在一些實施例中，溶液包含或基本上由約0.68-1.02% NaCl、約0.012-0.018% KCl、約0.008-0.012% CaCl_2 二水合物、約0.0048-0.0072% MgCl_2 六水合物、約0.028-0.042%二水合檸檬酸鈉及約0.23-0.35%右旋糖於水中組成，及視情況包含約0.01-5% w/v黏彈性聚合物，例如玻尿酸或其鹽或溶劑合物，諸如0.01-0.05% Healon Endocoat[®]。

細胞及組織製劑

本發明之一些態樣提供包含細胞群或組織於如本文所提供之溶液中的製劑。在一些實施例中，細胞群適用於移植至個體中。在一些實施例中，調配本文所提供之製劑用於例如向個體投與，經由注射或沖洗投與。本文所提供之製劑可包含細胞群或組織於本文所描述之溶液(例如GS2)

中，其單獨或與一或多種另外化合物或藥劑組合，例如與抗氧化劑、抑菌劑或醫藥活性劑組合。例示性醫藥製劑包含細胞或組織於如本發明之實例1中所描述之GS2中。

可調配適用於治療人類患者的例示性細胞或組織製劑於本文所提供之溶液中，例如無熱原質或基本上無熱原質、無病原體、無菌且以生理學pH及滲透壓。在一些實施例中，調配本文所提供之製劑用於注射至特定位點中，例如在用於治療視網膜疾病或病症之眼科製劑之情況下，注射至玻璃體液中以遞送至視網膜或脈絡膜損壞位點。

由本發明提供之製劑可包括另外治療劑，例如免疫抑制劑、促血管生成劑或支持製劑中細胞之存活及/或植入的養分或生長因子。

製劑中製劑體積及細胞數目將取決於特定應用。通常，對於細胞移植應用，期望儘可能地減少投與之體積。因此，可調配製劑使得可遞送最小體積。注射之細胞濃度可以有效且無毒之任何量。舉例而言，在一些實施例中，提供用於移植之細胞製劑在本文所提供之溶液中(例如在GS2中)包含至少約 10^4 個細胞/毫升。在一些實施例中，用於移植之細胞製劑以至少約 10^3 、至少約 10^4 、至少約 10^5 、至少約 10^6 、至少約 10^7 、至少約 10^8 、至少約 10^9 或至少約 10^{10} 個細胞/毫升之劑量調配。

在一些實施例中，在本文所提供之製劑中細胞數目及/或細胞濃度可藉由計數活細胞且不包含非活細胞測定。舉例而言，非活細胞可藉由未能排除至關重要染料(諸如錐蟲藍)或使用功能分析(諸如黏附至培養基質之能力、吞噬作用等)偵測。另外，所需細胞類型之細胞數目或細胞濃度可藉由以下方法測定：計數表現可表徵彼細胞類型之一或多個細胞標記物的細胞及/或不包含表現指示除所需細胞類型以外之細胞類型之一或多個標

記物的細胞。

在一些實施例中，本文所提供之細胞製劑包含至少約1,000個、2,000個、3,000個、4,000個、5,000個、6,000個、7,000個、8,000個或9,000個細胞。在一些實施例中，細胞製劑可包含至少約 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 或 9×10^{10} 個細胞。在一些實施例中，細胞製劑可包含至少約 1×10^2 - 1×10^3 、 1×10^2 - 1×10^4 、 1×10^4 - 1×10^5 或 1×10^3 - 1×10^6 個細胞。在一些實施例中，細胞製劑可包含至少約10,000、20,000、25,000、50,000、75,000、100,000、125,000、150,000、175,000、180,000、185,000、190,000或200,000個細胞，例如細胞製劑可於約50-200 μ l體積之本文所提供之溶液(例如GS2)中包含至少約20,000-200,000個細胞。

在一些實施例中，細胞群適用於移植至個體眼睛中。在一些實施例中，適用於移植至個體眼睛之細胞群包含RPE細胞、RPE祖細胞、虹膜色素上皮(IPE)細胞及其他視覺相關神經細胞(諸如聯絡神經元(例如內核層(INL)之「傳達」神經元)及無軸突神經細胞)、視網膜細胞、視桿細胞、視錐細胞及角膜細胞、神經細胞、感光細胞及間葉細胞(諸如間葉幹細胞(MSC))。

在一些實施例中，所提供製劑包括含於本文所提供之溶液中之RPE細胞群，例如含於實例1中所描述GS2培養基中。適合的RPE細胞可由多能幹細胞(諸如人類胚胎幹細胞或iPS細胞)分化，且可在分子上不同於胚胎幹細胞、成體衍生之RPE細胞及胚胎衍生之RPE細胞。在一些實施例中，使用成體衍生之RPE細胞、及胚胎衍生之RPE細胞。

當使用ES細胞衍生之RPE細胞時，在一些實施例中，製劑不包含可偵測量之殘餘ES細胞，使得本文所提供之製劑在RPE細胞培養物及製劑中不會造成不可接受之污染風險。

在一些實施例中，包含適用於移植至個體眼睛中之細胞群的製劑適用於注射至該個體眼睛中。在一些實施例中，此類製劑可用於治療視網膜變性疾病或病症，包括(但不限於)視網膜脫離、視網膜發育不良、血管樣條痕、近視黃斑變性或視網膜萎縮或與導致感光器官損壞及失明之多種視覺改變疾病相關，諸如無脈絡膜、糖尿病性視網膜病變、黃斑變性(例如老年性黃斑變性)、色素性視網膜炎及斯特格氏疾病(眼底黃色斑點症(fundus flavimaculatus))。

RPE細胞可為穩定的、終末分化RPE細胞，其不去分化為非RPE細胞類型。本文所描述之RPE細胞可為功能RPE細胞，其特徵為整合至角膜上之視網膜、視網膜下中的能力或另外投與至人類或非人類動物中。

RPE細胞可表現RPE細胞標記物。舉例而言，諸如RPE65、PAX2、PAX6、酪胺酸酶、斑萎蛋白、PEDF、CRALBP、Otx2及/或MITF之標記物之表現水準可等效於天然存在之RPE細胞中的表現量。RPE細胞之成熟水準可藉由量測PAX2、PAX6及酪胺酸酶中之至少一者之表現，或其各別表現水準評定。

在一些實施例中，本文所描述之本文所提供之製劑中所包含的RPE細胞可基於細胞之色素沉著程度加以識別及表徵。色素改變可藉由培養及維持RPE細胞之密度及RPE在培養物中維持之持續時間控制。快速分裂之分化RPE細胞經較輕微地著色。對比而言，較緩慢分裂或未分裂RPE具有特徵性的多邊形或六邊形形狀且隨著黑色素及脂褐質積累而增加了色素沉著水準。舉例而言，靜態RPE培養物(例如由於會合)隨時間推移通常增加其色素沉著水準。因此，色素沉著積累充當RPE分化準則且與細胞密度相關之增加的色素沉著充當RPE成熟準則。舉例而言，成熟的RPE細胞可以較低密度繼代培養，使得色素沉著減少。在此情形下，可培養成熟的RPE細胞以產生較不成熟的RPE細胞。該等RPE細胞仍為表現RPE分化之標記物的分化RPE細胞。

舉例而言，在一些實施例中，提供包含RPE細胞之製劑，該等RPE細胞之平均黑色素含量為小於8皮克/細胞、小於7皮克/細胞、小於6皮克/細胞或小於5皮克/細胞，例如在0.1-8皮克/細胞之間、在0.1-7皮克/細胞之間、在0.1-6皮克/細胞之間、在0.1-5皮克/細胞之間、在0.1-4皮克/細胞之間、在0.1-3皮克/細胞之間、在0.1-2皮克/細胞之間、在0.1-1皮克/細胞之間、在1-8皮克/細胞之間、在1-7皮克/細胞之間、在1-6皮克/細胞之間、在1-5皮克/細胞之間、在1-4皮克/細胞之間、在1-3皮克/細胞之間、在1-2皮克/細胞之間、在2-6皮克/細胞之間、在3-5皮克/細胞之間或在4-5皮克/細胞之間，諸如在4.2-4.8皮克/細胞之間或在0.1-5皮克/細胞之間。在另一實例中平均黑色素含量可小於5皮克/細胞，例如在0.1-5皮克/細胞之間、在0.2-5皮克/細胞之間、在0.5-5皮克/細胞之間、在1-5皮克/細胞之間、在2-5皮克/細胞之間、在3-5皮克/細胞之間、在4-5皮克/細胞之間或在4.5-5

皮克/細胞之間。

在一些實施例中，提供包含RPE細胞於本文所描述之溶液(例如GS2)中的製劑，其中在RPE細胞移植至個體中之後，例如在製劑注射至個體眼睛中之後，RPE細胞維持其表現型。RPE細胞在移植之後可維持其表現型持續接受者之生命期。舉例而言，RPE細胞在移植之後可維持其表現型持續至少約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。另外，RPE細胞在移植之後可維持其表現型持續至少約1、2、3、4、5、6、7、8、9或10週。RPE細胞在移植之後可維持其表現型持續至少約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12個月。RPE細胞在移植之後可維持其表現型持續至少約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多年。

在一些實施例中，本發明提供RPE細胞於本文所提供之溶液中的製劑用於注射至個體眼睛中。在該等實施例中，製劑為用於眼內注射之醫藥學上可接受之眼用調配物。當藉由玻璃體內注射投與製劑時，例如可調配製劑使得可遞送最小體積。注射濃度可以有效且無毒之任何量。可以本文所提供之溶液之至少約 10^4 個細胞/毫升劑量調配用於治療患者之RPE細胞製劑。用於治療患者之RPE細胞製劑以至少約 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 或 10^{10} 個RPE細胞/毫升之劑量調配。

本文所描述之RPE細胞製劑可包含至少約1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000或9,000個RPE細胞於本文所描述之溶液中，例如於如實例1中所描述之GS2中。RPE細胞之醫藥製劑可包含至少約 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、

9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、
 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、
 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、
 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、
 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、
 8×10^{10} 或 9×10^{10} 個RPE細胞。RPE細胞之醫藥製劑可包含至少約 1×10^2 -
 1×10^3 、 1×10^2 - 1×10^4 、 1×10^4 - 1×10^5 或 1×10^3 - 1×10^6 個RPE細胞。RPE細胞
 之醫藥製劑可包含至少約10,000、20,000、25,000、50,000、75,000、
 100,000、125,000、150,000、175,000、180,000、185,000、190,000或
 200,000個RPE細胞。舉例而言，RPE細胞之醫藥製劑可包含以體積至少
 約50-200 μL 之至少約20,000-200,000個RPE細胞。另外，RPE細胞之醫
 藥製劑可包含以體積150 μL 之約50,000個RPE細胞、以體積150 μL 之約
 200,000個RPE細胞或以體積至少約150 μl 之至少約180,000個RPE細胞。

RPE細胞可呈如本文所提供之製劑形式調配以在醫藥學上可接受之
 眼用媒劑中遞送，使得維持該製劑與眼部表面接觸足夠時間段以允許細胞
 穿透眼睛之受影響區域，例如前房、後房、玻璃體、水狀液、玻璃體液、
 角膜、虹膜/睫狀體、晶體、脈絡膜、視網膜、鞏膜、脈絡膜上腔、結
 膜、結膜下腔、鞏膜上腔、角膜內腔、角膜上皮腔(epicorneal space)、平
 坦部、手術誘導之無血管區域或黃斑。

在一些實施例中，本文提供細胞製劑，其中RPE細胞含於細胞薄層
 中。舉例而言，包含RPE細胞之細胞薄層可藉由在可釋放細胞之完整薄層
 的基質上培養RPE細胞製備，例如熱回應聚合物，諸如熱回應聚(N-異丙
 基丙烯醯胺) (PNIPAAm)接枝之表面，在其上細胞在培養溫度下黏附且增

殖，且隨後在溫度改變時，表面特性改變，促使釋放所培養之細胞薄層(例如藉由冷卻至低於較低的至關重要溶液溫度(LCST)) (參看da Silva等人, Trends Biotechnol. 2007年12月; 25(12):577-83; Hsiue等人, Transplantation. 2006年2月15日; 81(3):473-6; Ide, T.等人(2006); Biomaterials 27, 607-614, Sumide, T.等人(2005), FASEB J. 20, 392-394; Nishida, K.等人(2004), Transplantation 77, 379-385; 及Nishida, K.等人(2004), N. Engl. J. Med. 351, 1187-1196, 其中之每一者以全文引用的方式併入本文中)。細胞薄層可附著至適用於移植之基質，諸如當薄層移植至宿主生物體中時可在活體內溶解之基質，例如藉由在適用於移植之基質上培養細胞製備，或自另一基質(諸如熱回應聚合物)釋放細胞至適用於移植之基質上製備。潛在地適用於移植之例示性基質可包含明膠(參見Hsiue等人, 前述)。可適用於移植之替代性基質包括基於纖維蛋白之基質及其他基質。細胞薄層可用於製造供預防或治療視網膜變性疾病用之藥劑。RPE細胞薄層可藉由使其與本文所描述之溶液(例如GS2溶液)接觸而調配成用於引入有需要之個體眼睛中的細胞或組織製劑。在一些實施例中，細胞薄層可藉由視網膜中央凹下膜切除術(subfoveal membranectomy)利用移植RPE細胞薄層而引入有需要之個體眼睛中，或在視網膜中央凹下膜切除術之後可用於製造供移植用之藥劑。

由本發明之一些實施例提供之製劑體積取決於諸如以下因素：投與模式、待遞送細胞數目、患者年齡及體重及所治療疾病之類型及嚴重性。舉例而言，若藉由注射投與，則本發明之RPE細胞之醫藥製劑體積可為約1、1.5、2、2.5、3、4或5 ml。體積可為約1-2 mL。舉例而言，若藉由注射投與，則本發明之RPE細胞之醫藥製劑體積可為約1、2、3、4、5、6、

7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、
23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、
38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、
53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、
68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、
83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、
98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、
100、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、
122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、
134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、
146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、
158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、
170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、
182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、
194、195、196、197、198、199或200 μL (微升)。舉例而言，本發明之
製劑體積可為約10-50、20-50、25-50或1-200 μL 。本發明之製劑體積可
為 約10、20、30、40、50、100、110、120、130、140、150、160、
170、180、190或200 μL 或更高。

在一些實施例中，本文所提供之製劑可包含約 1×10^3 、 2×10^3 、
 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、 1×10^4 、 2×10^4 、
 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 或 9×10^4 個RPE細胞/微
升。舉例而言，在一些實施例中，製劑可包含2000個RPE細胞/微升，例
如100,000個RPE細胞/50微升或180,000個RPE細胞/90微升。

在一些實施例中，冷藏製劑。在一些實施例中，製劑在約2°C -8°C 下冷藏。

在一些實施例中，製劑支持在製劑儲存期間細胞群中之細胞存活。在一些實施例中，細胞群中之至少70%細胞在2°C -8°C 下48小時製劑儲存之後仍有活力。在一些實施例中，細胞群中之至少80%細胞在2°C -8°C 下48小時製劑儲存之後仍有活力。在一些實施例中，細胞群中之至少90%細胞在2°C -8°C 下48小時製劑儲存之後仍有活力。在一些實施例中，製劑支持在儲存製劑期間維持細胞群之植板效率。在一些實施例中，在2°C -8°C 下48小時製劑儲存之後，細胞群展現其初始植板效率之至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%，其中初始植板效率係指細胞群在儲存時段開始時的植板效率。在一些實施例中，製劑在儲存容器內。在一些實施例中，製劑在注射器內。

本發明之一些態樣提供細胞及組織於本文所提供之溶液中的醫藥製劑。該等製劑適用於向個體投與。在一些實施例中，醫藥製劑基本上由細胞、細胞群或組織及如本文所提供之溶液組成。在一些實施例中，醫藥製劑包含一或多種醫藥學上活性之成分，例如防腐劑、抗氧化劑、自由基清除劑、免疫抑制劑、促血管生成因子、抗血管生成因子、生長激素或支持細胞生長、存活及植入之細胞養分或基質。

本發明亦包涵醫藥包裝及/或套組。所提供之醫藥包裝及/或套組可包含本文所提供之細胞或組織製劑及容器(例如小瓶、安瓿、瓶、注射器及/或冷卻器封裝或其他適合之容器)。在一些實施例中，所提供套組可視情況進一步包括第二容器，其包含用於調配供稀釋、洗滌及/或復原細胞或

組織製劑用之製劑的溶液。在一些實施例中，所提供調配容器之內含物及溶劑容器組合而形成至少一種單位劑型。

本發明之一些態樣提供製備本文所提供之製劑(例如包含細胞群於如本文所提供之溶液中的製劑)之方法，其中該方法包含使該細胞群與該溶液接觸。在一些實施例中，該方法包含使低溫保存或集結成粒之細胞與該溶液接觸，由此復原該等細胞。

舉例而言，本發明之一些態樣提供方法，其包含(a)使細胞群與如本文所提供之溶液接觸，因此產生細胞製劑。在一些實施例中，該方法進一步包含(b)儲存(a)之細胞製劑至少4小時、至少6小時、至少12小時、至少18小時、至少24小時、至少36小時、至少48小時、至少60小時、至少72小時或至少96小時。在一些實施例中，該方法進一步包含(c)在(b)之儲存時段之後向個體投與(a)之細胞製劑。在一些實施例中，(c)之投與包含將細胞注入個體眼睛中。在一些實施例中，其中該方法進一步包含在(b)之儲存時段之後，測定(a)之細胞製劑中之細胞成活力。在一些實施例中，該方法包含在步驟(b)之儲存時段期間冷藏(a)之細胞製劑。在一些實施例中，該冷藏法包括在2°C-8°C之溫度下儲存該細胞製劑。在一些實施例中，該方法進一步包含在(b)之儲存時段內將(a)中所生成之製劑輸送至與生成製劑之位置不同的位置。在一些實施例中，該輸送包含將該製劑輸送至臨床或操作空間，其中進行(c)之投與。

例示性用途及方法

本發明之溶液可用於各種臨床應用。該等應用包括臨床沖洗、細胞之復原或調配，例如在粒化或低溫保存以及細胞調配之後，例如用於臨床應用，包括(但不限於)向個體投與之前細胞儲存及輸送及/或作為載體培養

基用於向個體投與細胞、細胞單層或組織。

舉例而言，本發明之溶液在一些實施例中可作為溶液用於細胞復原。如本文所用，術語「細胞復原」係指以下方法，其使細胞群與溶液(例如本文所提供之溶液)接觸，以便生成包含細胞群之溶液。在一些實施例中，復原細胞群包含產生溶液，其包含來自細胞集結粒(例如在離心步驟之後接著丟棄上清液獲得之細胞集結粒)之細胞群。在一些實施例中，復原具有本文所提供之溶液的細胞群包含稀釋或替換最初懸浮細胞之任何培養基，以獲得細胞群於基本上由或由本文所提供之溶液組成之培養基中。在一些該等實施例中，懸浮於除本文所提供之溶液以外之培養基中的細胞群可利用本文所提供之溶液洗滌一次或更多次。洗滌步驟可在一些實施例中包含使細胞與本文所提供之溶液接觸，例如藉由離心粒化細胞，丟棄上清液且利用溶液復原細胞集結粒。取決於所用溶液之體積及細胞集結粒之體積，在單一洗滌復原循環之後或在2、3、4、5、6、7、8、9或10次該等週期之後，初始培養基可基本上經溶液替換。

在一些實施例中，本文所提供之溶液可用於細胞及組織調配物。如本文所用，術語「調配物」在細胞及組織之情形下係指使細胞、細胞群或組織與一定體積之本文所提供之溶液接觸，獲得適用於臨床用途，例如用於向個體投與之細胞或組織製劑。本文所提供之溶液與各種細胞類型、細胞群及組織廣泛相容，包括(但不限於)成體幹細胞及祖細胞、分化細胞及包含該等細胞之群及組織。在一些實施例中，在本文所提供之溶液中如此調配之細胞、細胞群或組織為再生藥品方法中例如用於臨床用途之治療細胞、細胞群或組織。舉例而言，在一些實施例中，在本文所提供之溶液中調配之細胞、細胞群或組織可包含以下細胞群，其可替換個體中損失或退

化之細胞，或修復或替換個體中已損壞或功能異常之組織。舉例而言，在一些實施例中，在本文所提供之溶液中調配之細胞、細胞群或組織可包含多能幹細胞或母細胞、或功能分化細胞、或包含該等細胞之群或組織、或該等細胞之組合。在一些實施例中，本文所提供之溶液係用於調配RPE細胞、感光細胞、間葉幹細胞、造血幹細胞、神經或神經元幹細胞或母細胞、膠幹細胞或母細胞、胰臟幹細胞或母細胞、 β 細胞、角質細胞、軟骨細胞、成骨細胞、破骨細胞、或包含或基本上由該等細胞組成之群體或組織，例如RPE細胞之單層、胰臟胰島或皮移植片。在一些實施例中，細胞調配物於本文所提供之溶液中可加以儲存直至臨床使用(例如直至向個體投與)，及/或輸送至臨床位點，及如所提供或僅經最小處理，諸如稀釋調配物至所需體積或至細胞之所需濃度而向個體投與。

在一些實施例中，本文所提供之溶液適用於細胞或組織儲存。如本文所用，術語「儲存」在細胞及組織之情形下係指在細胞或組織之調配物於本文所提供之溶液中與細胞或組織之另一處理步驟或臨床用途之間的一段時間。與先前可利用的溶液相比，本文所提供之溶液支持儲存各種細胞及組織類型，包括敏感性細胞及組織，諸如RPE細胞、感光器官及MSC繼續長期時段，例如持續至少4小時、至少6小時、至少8小時、至少12小時、至少18小時、至少24小時、至少30小時、至少36小時、至少48小時、至少60小時或至少72小時，其中細胞成活力、再植板效率或再生能力僅最低程度地降低。舉例而言，在一些實施例中，細胞、細胞群或組織(例如RPE細胞、感光細胞或MSC)在本文所提供之溶液中儲存持續至少4小時、至少6小時、至少8小時、至少12小時、至少18小時、至少24小時、至少30小時、至少36小時、至少48小時、至少60小時或至少72小時

之時段導致細胞成活力、再植板效率及/或再生能力為在儲存時段開始時之成活力、再植板效率及/或再生能力的至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%。在一些實施例中，儲存時間段，例如在細胞或組織之調配物與其臨床使用之間的時間段將不超過4小時、6小時、8小時、12小時、18小時、24小時、30小時、36小時、48小時、60小時或72小時。通常，在本文所提供之溶液中調配之細胞或組織經冷藏至例如2°C-8°C之間之溫度以供儲存。因此，在一些實施例中，細胞及組織儲存於低於環境溫度之溫度下，例如在2°C-8°C之間之溫度下的本文所提供之溶液中。在一些實施例中，然而，在更高溫度下儲存涵蓋例如在8°C與16°C之間之溫度下、在16-22°C下或在環境溫度(通常約25°C)下。

本文所提供之溶液在其調配之後亦適用於輸送細胞、細胞群及組織至臨床位點。本文所提供之溶液支持細胞存活且最小化在輸送期間之代謝及物理應力，包括剪應力。細胞或組織輸送將通常在細胞或組織之儲存時段內且因此在如上文所描述之用於儲存的適合條件下進行。在實施例中，其中在本文所提供之溶液中調配之細胞或組織在冷藏條件下，例如在低於環境溫度之溫度下輸送，較佳使用移動製冷設備用於輸送。該設備包括(不限於)絕緣輸送或運送容器、濕冰包裝、冷卻凝膠、冷卻容器及移動製冷單元。用於冷藏輸送之一些例示性適合的輸送方法、容器及器件在本文中其他處更詳細地描述，且熟習此項技術者鑒於本發明意識到另外適合的方法、容器及器件。

本發明之一些態樣提供用於治療有需要之個體的方法，其藉由向該個體投與有效量之如本文所述之臨床溶液或細胞或組織製劑。在一些實施

例中，個體患有或診斷患有可藉由投與例如呈本文所描述之細胞或組織製劑形式的細胞、細胞群或組織進行治療的疾病或病症。在一些實施例中，向個體投與之製劑包含可有效改善個體中疾病或病症之至少一種症狀的一定大小之細胞群。在一些實施例中，個體進行手術且投與本文所描述之溶液或製劑以沖洗手術位點。在一些實施例中，該方法進一步包含監測個體中疾病之至少一種症狀。

術語「治療(treatment/treat/treating)」係指旨在逆轉、減輕、延緩如本文所述疾病或病症或一或多種其症狀之發作或抑制其進展的臨床干預。在一些實施例中，治療可在一或多種症狀已發展之後在已診斷出疾病之後投與。在其他實施例中，治療可在不存在症狀之情況下投與，例如以預防或延緩症狀發作或抑制疾病發作或進展。舉例而言，治療可在症狀發作之前向敏感個人投與(例如根據症狀病史及/或根據遺傳性或其他敏感性因素)。亦可在已消退症狀之後繼續治療，例如以預防或延緩其復發。

如本文所用，術語「個體」係指個別生物體，例如個別哺乳動物。在一些實施例中，個體為人類。在一些實施例中，個體為非人類哺乳動物。在一些實施例中，個體為非人類靈長類。在一些實施例中，個體為嚙齒動物。在一些實施例中，個體為綿羊、山羊、牛、貓或狗。在一些實施例中，個體為研究動物。在一些實施例中，個體經基因工程改造，例如經基因工程改造之非人類個體。個體可為任一性別且在發展之任何階段下。

如本文所用，術語「有效量」係指足以誘發所需生物反應的生物活性劑之量。舉例而言，在一些實施例中，有效量之如本文所述細胞或組織製劑可指包含多種細胞或組織之量的製劑之量，其足以改良與疾病或病症相關之症狀，例如足以改良患有視網膜疾病或病症之個體的視覺。如熟習

此項技術者將瞭解，有效量之本文所提供之溶液或製劑可取決於各種因素而變化，例如取決於所需生物反應，例如取決於待治療之特定疾病、待緩解之特定症狀，取決於待靶向之細胞或組織及個體年齡、性別及整體健康狀況。

本發明之一些態樣提供方法，其包含向有需要之個體投與如本文所提供之溶液或製劑。在一些實施例中，該方法包含向該個體之眼睛投與該溶液或該製劑。在一些實施例中，該方法包含在製劑儲存至少4小時、至少6小時、至少12小時、至少24小時、至少36小時或至少48小時之後向個體投與製劑。在一些實施例中，該個體患有或診斷患有視網膜疾病。在一些實施例中，視網膜疾病為視桿或視錐營養不良、視網膜變性、色素性視網膜炎、糖尿病性視網膜病變、黃斑變性、雷伯氏先天性黑矇或斯特格氏疾病。在一些實施例中，該製劑包含可有效改善個體中視網膜疾病之至少一種症狀的一定大小之細胞群。在一些實施例中，該細胞群包含RPE細胞、感光細胞或間葉幹細胞。在一些實施例中，該方法進一步包含監測個體中視網膜疾病之至少一種症狀。

本發明之一些態樣提供治療視網膜疾病之方法，其中該等方法包含向患有視網膜疾病之個體眼睛投與有效量之本文所提供之細胞製劑。在一些實施例中，該個體患有或診斷患有視網膜疾病。在一些實施例中，視網膜疾病為視桿或視錐營養不良、視網膜變性、色素性視網膜炎、糖尿病性視網膜病變、黃斑變性、雷伯氏先天性黑矇或斯特格氏疾病。在一些實施例中，該製劑包含可有效改善個體中視網膜疾病之至少一種症狀的一定大小之細胞群。在一些實施例中，該細胞群包含RPE細胞、感光細胞或間葉幹細胞。在一些實施例中，該方法進一步包含監測個體中視網膜疾病之至

少一種症狀。

如本文所用，術語「監測疾病之症狀」係指評定在時間段內的複數個時間點下疾病之症狀之嚴重性。舉例而言，症狀之嚴重性可在個體治療開始之前在個體中評定且接著治療後一段時間之後再次評定。在一些實施例中，監測可包括在已知或預期足夠用於治療以在類似個體(例如具有相同種類、性別、年齡、整體健康狀況等之個體)中引起症狀之可量測改良的時間之後評定症狀之嚴重性。在一些實施例中，監測可包括在規律的時間間隔下評定症狀之嚴重性。舉例而言，待治療視網膜視網膜之個體中，可進行個體視覺之初始評定。熟習此項技術者應理解此評定為例示性的且取而代之或除了個體視覺之評價以外，亦可進行其他評定。該等評定可包括視網膜變性、視網膜脫落、黃斑變性等之水準。當個體藉由投與本文所提供之細胞製劑(例如包含有效數目之RPE細胞於如本文所提供之GS2培養基中的製劑)治療時，理想地在使得所投與細胞植入且執行其功能的手術後時間段已過去之後，例如在約一週、約兩週、約三週、約一個月、約兩個月、約三個月、約四個月、約五個月、約六個月之後或在約一年之後，可再次評定個體視覺。可記錄手術後評定之結果且將其與手術前評定進行比較，以測定個體中症狀是否已改良，例如視覺水準是否已恢復。評定可重複一次或多次以測定症狀改善是否仍在進展中或是否已達到終點。取決於手術後監測之結果，可排程另外的手術程序以(進一步)改良所評定之症狀。若在初始手術之後，未觀測到改良，則可增加細胞或組織製劑之劑量以便促進症狀改善。

視網膜疾病之治療方法可包含投與單次劑量之有效量之如本文所提供RPE細胞製劑，例如包含有效量之RPE細胞於本文所描述之GS2培養基

中的製劑。另外，本文所描述之治療方法可包含療程，其中在一段時段內多次投與RPE細胞，且其中各劑量之細胞有效緩解疾病之症狀，或其中複數個劑量累積傳遞有效量。例示性治療過程可包含每週、每週兩次、每月、每季、每半年或每年治療。替代地，治療可按階段進行，由此起初投與多個劑量(例如第一週之日劑量)，且隨後需要愈來愈不頻繁的劑量。

若如本文所述之RPE細胞製劑，例如包含RPE細胞於GS2溶液中之製劑係藉由眼內注射投與，則RPE細胞製劑可在患者壽命期間週期性地一或多次遞送。舉例而言，RPE細胞製劑可遞送一次每年、一次每6-12個月、一次每3-6個月、一次每1-3個月或一次每1-4週。替代地，某些條件或病症可期望更加頻繁的投與。若藉由植入物或器件投與，則視特定患者及待治療之病症或病況需要，RPE細胞可在患者壽命期間一次或一或多次週期性地投與。類似涵蓋的為隨時間推移而改變之治療方案。舉例而言，在開始時(例如每天或每週治療)，可需要更加頻繁的治療。隨時間推移，隨著患者病況改良，可需要較不頻繁的治療或甚至無進一步治療。

本文所描述之方法可進一步包含藉由量測個體中視網膜電流圖反應、視動清晰度臨限值或亮度臨限值來監測治療或預防之功效的步驟。該方法亦可包含藉由監測眼睛中細胞之免疫原性或細胞之移動來監測治療或預防之功效。

RPE細胞或包含RPE細胞及本文所提供之臨床溶液(例如GS2溶液)的製劑可用於製造治療視網膜變性之藥劑。本發明亦涵蓋包含本文揭示之RPE細胞的製劑在治療失明中之用途。舉例而言，包含人類RPE細胞之製劑可用於治療與多種導致感光器官損壞及失明之視覺改變疾病相關的視網膜變性，諸如糖尿病性視網膜病變、黃斑變性(包括老年性黃斑變性，例

如濕性老年性黃斑變性及乾性老年性黃斑變性)、色素性視網膜炎及斯特格氏疾病(眼底黃色斑點症)。製劑可包含至少約5,000-500,000個RPE細胞(例如100,00個RPE細胞)，其可向視網膜投與以治療與多種導致感光器官損壞及失明之視覺改變疾病相關的視網膜變性，諸如糖尿病性視網膜病變、黃斑變性(包括老年性黃斑變性)、色素性視網膜炎及斯特格氏疾病(眼底黃色斑點症)。

用於供治療個體用之製劑的細胞，例如用於本文所提供之RPE細胞製劑的RPE細胞可為人類細胞。人類細胞可用於人類患者以及動物模型或動物患者。舉例而言，人類細胞可在視網膜變性之小鼠、大鼠、貓、狗或非人類靈長類模型中進行測試。另外，人類細胞可在治療上用於治療對其有需要之動物，諸如用於獸醫學。

在一些實施例中，治療視網膜疾病之方法可進一步包含投與免疫抑制劑，其在時間上接近投與本文所提供之臨床製劑。可使用之免疫抵製劑包括(但不限於)抗淋巴細胞球蛋白(ALG)多株抗體、抗胸腺細胞球蛋白(ATG)多株抗體、硫唑嘌呤(azathioprine)、BASILIXIMAB® (抗IL-2R α 受體抗體)、環孢素(cyclosporin) (環孢素A)、DACLIZUMAB® (抗IL-2R α 受體抗體)、依維莫司(everolimus)、黴酚酸、RITUXIMAB® (抗CD20抗體)、西羅莫司(sirolimus)及他克莫司(tacrolimus)。免疫抵製劑可以至少約1、2、4、5、6、7、8、9或10 mg/kg給藥。當使用免疫抵製劑時，其可全身性或局部投與，且其可在RPE細胞投與之前、與RPE細胞投與同時或在RPE細胞投與之後投與。在投與RPE細胞後，免疫抑制性療法可繼續數週、數月、數年或無限期地。舉例而言，在投與RPE細胞後，患者可投與5 mg/kg環孢素持續6週。

在一些態樣中，本文所提供之溶液可用作臨床沖洗溶液。該等溶液適用於臨床沖洗，例如適用於沖洗創傷或手術位點。可與本文中術語「沖洗」互換使用之術語「臨床沖洗」一般係指將溶液，通常為水溶液投與至傷口或手術位點。如本文所提供之沖洗溶液可出於各種目的投與，例如出於組織水合、清潔、移除碎屑或表面病原體、潤滑、避免組織黏著或輔助視覺檢查之目的。在一些實施例中，沖洗包含投與沖洗溶液之穩定流跨越開放傷口或手術位點。在一些實施例中，間歇地投與沖洗溶液。投與方式以及所投與沖洗溶液之體積及流速將取決於特定環境，例如傷口大小、待沖洗組織及傷口或手術位點之狀態(例如碎屑存在、暴露於表面病原體)。熟習此項技術者將能夠確定適用於投與之合適的方法及器件以及適合的體積及流速。

同時在一些環境下，簡單的沖洗溶液可足以達成一些沖洗目的，習知沖洗溶液，諸如鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)、防腐劑或抗生素在一些手術環境中可不支持敏感性細胞或組織之存活或對其為細胞毒性的，且因此負面影響手術結果。

一種常用的臨床沖洗劑生理鹽水(0.9% NaCl於水中)為等張性，且由於其低毒性、生理學特性(pH及滲透壓)、易於製備及滅菌(包括蒸汽滅菌)及在環境溫度下較長的儲存期限而常常用於傷口沖洗。生理鹽水之一個缺點為其不支持敏感性細胞或組織之長期存活，且與其他沖洗溶液相比，在利用生理鹽水沖洗之後已報導相對較高的傷口感染率。

為了例如在眼部手術期間沖洗敏感性手術位點或創傷，例如可受到利用生理鹽水或其他簡單的沖洗溶液進行沖洗不利影響的位點或創傷，已研發多種市售之手術沖洗溶液。在手術期間，例如在眼部手術期間供使用

之當前可利用的手術沖洗溶液中通常存在四種關鍵成分用於預防損傷敏感性細胞或組織：維持滲透壓之藥劑、鈣源、鎂源及緩衝劑。

本發明之一些實施例提供利用本文所提供之溶液，例如利用GS2溶液沖洗手術位點之方法。在一些實施例中，手術位點為個體眼睛。

用於沖洗手術位點之方法及器件為一般熟習此項技術者已熟知。熟習此項技術者應理解所用遞送方法、體積及壓力將取決於手術位點之性質及條件。用於臨床沖洗之適合器件包括(但不限於)球注射器、活塞注射器、壓力罐、漩渦攪拌器、漩渦軟管噴灑器、具有傾倒蓋或噴嘴之塑膠容器中的沖洗流體及脈衝式灌洗器件(例如噴射灌洗、機械灌洗、脈衝式灌洗、機械沖洗、高壓沖洗器件)。

在一些實施例中，沖洗為連續的，其中不間斷流之沖洗劑向手術位點投與。在其他實施例中，採用脈衝式或間歇性沖洗，其中進行間歇性或間斷遞送沖洗劑。沖洗體積將取決於手術位點特徵及沖洗目的(傷口清潔、水合等)。

套組

本發明之一些態樣提供套組，其包含(a)如本文所提供之溶液；及(b)說明書，用於使細胞群與(a)之溶液接觸以產生細胞製劑；及(c)容器，用於(b)之接觸及/或儲存(b)之細胞製劑。在一些實施例中，(a)之溶液及(c)之容器適用於將(b)之細胞製劑移植給個體。

本發明因此提供尤其以下：

條項1. 一種溶液，其包含

(a) 將該溶液維持在生理學pH下之緩衝劑；及

(b) 至少2 mM或至少0.05% (w/v)葡萄糖；及

(c) 將該溶液維持在生理滲透壓下之滲透活性劑。

條項2. 如條項1之溶液，其中該溶液包含至少5 mM或至少0.1% (w/v)葡萄糖。

條項3. 如條項1之溶液，其中該溶液包含至少7.5 mM或至少0.14% (w/v)葡萄糖。

條項4. 如條項1之溶液，其中該溶液包含至少10 mM或至少0.2% (w/v)葡萄糖。

條項5. 如條項1之溶液，其中該溶液包含至少15 mM或至少0.25% (w/v)葡萄糖。

條項6. 如條項1之溶液，其中該溶液包含至少20 mM或至少0.4% (w/v)葡萄糖。

條項7. 如條項1之溶液，其中該溶液包含至少25 mM或至少0.5% (w/v)葡萄糖。

條項8. 如條項1至7中任一項之溶液，其中該溶液進一步包含二價陽離子源。

條項9. 如條項8之溶液，其中該二價陽離子源包含鈣源及/或鎂源。

條項10. 如條項1至9中任一項之溶液，其中該緩衝劑包含乙酸鹽緩衝劑及/或檸檬酸鹽緩衝劑。

條項11. 一種溶液，其包含

(a) 將該溶液維持在生理學pH下之緩衝劑，其中該緩衝劑不為二碳酸鹽緩衝劑；及

(b) 葡萄糖；及

(c) 將該溶液維持在生理滲透壓下之滲透活性劑；及

(d) 二價陽離子源。

條項12. 如條項11之溶液，其中(d)之該二價陽離子源包含鈣源及/或鎂源。

條項13. 如條項11至12中任一項之溶液，其中該緩衝劑包含乙酸鹽緩衝劑及/或檸檬酸鹽緩衝劑。

條項14. 如條項9至10或12至13中任一項之溶液，其中該鈣源包含醫藥學上可接受之鈣鹽。

條項15. 如條項9至10或12至14中任一項之溶液，其中該鎂源包含醫藥學上可接受之鎂鹽。

條項16. 如條項14至15中任一項之溶液，其中該醫藥學上可接受之鈣鹽及/或該醫藥學上可接受之鎂鹽係選自由用酸形成之鈣及/或鎂鹽之群，該酸係選自包含以下之群：乙酸、抗壞血酸、檸檬酸、鹽酸、順丁烯二酸、草酸、磷酸、硬脂酸、丁二酸及硫酸。

條項17. 如條項9至10或12至16中任一項之溶液，其中該鈣源包含氯化鈣。

條項18. 如條項9至10或12至17中任一項之溶液，其中該鈣源包含二水合氯化鈣。

條項19. 如條項9至10或12至18中任一項之溶液，其中該鎂源包含氯化鎂。

條項20. 如條項9至10或12至18中任一項之溶液，其中該鎂源包含六水合氯化鎂。

條項21. 如條項10或13至20中任一項之溶液，其中該檸檬酸鹽緩衝

劑呈檸檬酸鈉形式提供。

條項22. 如條項1至21中任一項之溶液，其中該葡萄糖為D-葡萄糖(右旋糖)。

條項23. 如條項1至22中任一項之溶液，其中該滲透活性劑為鹽。

條項24. 如條項1至23中任一項之溶液，其中該滲透活性劑為鈉鹽。

條項25. 如條項1至24中任一項之溶液，其中該滲透活性劑為氯化鈉。

條項26. 如條項1至25中任一項之溶液，其中該溶液包含氯化鈣、氯化鎂、檸檬酸鈉、氯化鈉及葡萄糖。

條項27. 如條項1至26中任一項之溶液，其中該溶液之pH為6.8-7.8。

條項28. 如條項1至27中任一項之溶液，其中該溶液之pH為7.4-7.5。

條項29. 如條項1至28中任一項之溶液，其中該溶液之pH為約7.5。

條項30. 如條項1至29中任一項之溶液，其中該溶液為等張性。

條項31. 如條項1至29中任一項之溶液，其中該溶液為高張性。

條項32. 如條項1至31中任一項之溶液，其中該溶液展現約270-345 mOsm/l之滲透壓。

條項33. 如條項1至32中任一項之溶液，其中該溶液之滲透壓為約315 mOsm/l。

條項34. 如條項9至10或12至33中任一項之溶液，其中該鈣源之濃度為0.25-0.75 mM。

條項35. 如條項9至10或12至34中任一項之溶液，其中該鈣源之濃

度為0.4-0.65 mM。

條項36. 如條項9至10或12至35中任一項之溶液，其中該鈣源之濃度為0.5-0.6 mM，或如條項9至10或12至35中任一項之溶液，其中該鈣源之濃度為0.5-0.9 mM，或其中該鈣源之濃度為0.6-0.8 mM。

條項37. 如條項9至10或12至36中任一項之溶液，其中該鈣源之濃度為約0.6 mM，或如條項9至10或12至36中任一項之溶液，其中該鈣源之濃度為約0.7 mM。

條項38. 如條項9至10或12至37中任一項之溶液，其中該鎂源之濃度為0.05-5 mM。

條項39. 如條項9至10或12至38中任一項之溶液，其中該鎂源之濃度為0.1-0.3 mM。

條項40. 如條項9至10或12至39中任一項之溶液，其中該鎂源之濃度為約0.3 mM。

條項41. 如條項1至40中任一項之溶液，其中該葡萄糖之濃度為5-50 mM。

條項42. 如條項1至41中任一項之溶液，其中該葡萄糖之濃度為10-25 mM。

條項43. 如條項1至42中任一項之溶液，其中該葡萄糖之濃度為10-20 mM。

條項44. 如條項1至43中任一項之溶液，其中該葡萄糖之濃度為約16 mM。

條項45. 如條項1至44中任一項之溶液，其中該滲透活性劑之濃度為約100-200 mM。

條項46. 如條項1至45中任一項之溶液，其中該滲透活性劑之濃度為約125-175 mM。

條項47. 如條項1至46中任一項之溶液，其中該滲透活性劑之濃度為約150 mM。

條項48. 如條項10或13至47中任一項之溶液，其中該檸檬酸鹽或乙酸鹽之濃度為0.1-5 mM。

條項49. 如條項10或13至48中任一項之溶液，其中該檸檬酸鹽或乙酸鹽之濃度為0.5-2 mM。

條項50. 如條項10或13至39中任一項之溶液，其中該檸檬酸鹽或乙酸鹽之濃度為約1 mM。

條項51. 如條項1至51中任一項之溶液，其中該溶液進一步包含鉀鹽。

條項52. 如條項51之溶液，其中該鉀鹽為氯化鉀。

條項53. 如條項51或52之溶液，其中該KCl之濃度為0.2-5 mM。

條項54. 如條項53之溶液，其中該KCl之濃度為1-2.5 mM。

條項55. 如條項54之溶液，其中該KCl之濃度為約2 mM。

條項56. 如條項1至55中任一項之溶液，其中該溶液包含約0.7 mM CaCl_2 、約0.03 mM MgCl_2 、約1 mM檸檬酸鈉、約16 mM右旋糖及約145 mM NaCl，或如條項1至55中任一項之溶液，其中該溶液包含約0.7 mM CaCl_2 、約0.3 mM MgCl_2 、約1 mM檸檬酸鈉、約16 mM右旋糖及約145 mM NaCl，或如條項1至55中任一項之溶液，其中該溶液包含約0.5-0.9 mM CaCl_2 、約0.2-0.4 mM MgCl_2 、約0.8-1.2 mM檸檬酸鈉、約13-19 mM右旋糖及約116-174 mM NaCl。

條項57. 如條項1-55中任一項之溶液，其中該溶液包含約0.85% NaCl、約0.01% CaCl_2 二水合物、約0.006% MgCl_2 六水合物、約0.035% 二水合檸檬酸鈉及約0.29%右旋糖，或如條項1至55中任一項之溶液，其中該溶液包含約0.68-1.02% NaCl、約0.008-0.012% CaCl_2 二水合物、約0.0048-0.0072% MgCl_2 六水合物、約0.028-0.042%二水合檸檬酸鈉及約0.23-0.35%右旋糖。

條項58. 如條項1至57中任一項之溶液，其中該溶液進一步包含約2 mM KCl。

條項59. 如條項1至58中任一項之溶液，其中該溶液進一步包含黏彈性聚合物。

條項60. 如條項59之溶液，其中該聚合物為玻尿酸或其鹽或溶劑合物。

條項61. 如條項59或60之溶液，其中該聚合物為玻尿酸鈉。

條項62. 如條項59至61中任一項之溶液，其中該聚合物以可有效減少該溶液中之細胞暴露於剪應力的濃度存在。

條項63. 如條項59至62中任一項之溶液，其中該聚合物之濃度為0.005-5% w/v。

條項64. 如條項63之溶液，其中該聚合物之濃度為約0.05% w/v。

條項65. 如條項1至64中任一項之溶液，其中該溶液包含約0.7 mM CaCl_2 、約0.03 mM MgCl_2 、約2 mM KCl、約1 mM檸檬酸鈉、約16 mM右旋糖、約145 mM NaCl及約0.05%玻尿酸，或如條項1至64中任一項之溶液，其中該溶液包含約0.7 mM CaCl_2 、約0.3 mM MgCl_2 、約2 mM KCl、約1 mM檸檬酸鈉、約16 mM右旋糖、約145 mM NaCl及約0.05%玻

尿酸，或如條項1-64中任一項之溶液，其中該溶液包含約0.5-0.8 mM CaCl_2 、約0.2-0.4 mM MgCl_2 、約1.6-2.4 mM KCl 、約0.8-1.2 mM檸檬酸鈉、約13-19 mM右旋糖、約116-174 mM NaCl 及約0.04-0.06%玻尿酸。

條項66. 如條項1至65中任一項之溶液，其中該溶液不包含碳酸鹽緩衝劑。

條項67. 如條項1至66中任一項之溶液，其中該溶液不包含麩胱甘肽或二硫化麩胱甘肽(GSSG)。

條項68. 如條項1至67中任一項之溶液，其中該溶液不包含兩性離子有機緩衝劑。

條項69. 如條項1至68中任一項之溶液，其中該溶液可在25°C下儲存至少48小時、至少72小時、至少96小時、至少120小時、至少144小時、至少一週、至少兩週、至少三週或至少一個月而不會出現可量測的溶質沈澱及/或可量測的溶液支持儲存於該溶液中的細胞之存活及成活力的能力損失。

條項70. 如條項1至69中任一項之溶液，其中該溶液在2°C-8°C下可儲存至少48小時、至少72小時、至少96小時、至少120小時、至少144小時、至少一週、至少兩週、至少三週或至少一個月而不會出現可量測的溶質沈澱及/或可量測的溶液支持儲存於該溶液中的細胞之存活及成活力的能力損失。

條項71. 如條項1-70中任一項之溶液，其中該溶液適用於向個體投與、適用於向個體眼睛投與及/或適用於將細胞移植至個體眼睛中。

條項72. 如條項1至71中任一項之溶液，其中該溶液為基本上無熱原質的。

條項73. 如條項1至72中任一項之溶液，其中該溶液為無菌的。

條項74. 如條項1至73中任一項之溶液，其中該溶液係用於沖洗、細胞復原、細胞儲存、細胞輸送及/或向個體投與。

條項75. 一種製劑，其包含細胞群於如條項1至74中任一項之溶液中。

條項76. 如條項75之製劑，其中該細胞群適用於移植至個體中。

條項77. 如條項76之製劑，其中該細胞群適用於移植至個體眼睛中。

條項78. 如條項75至77中任一項之製劑，其中該細胞群包含RPE細胞。

條項79. 如條項75至78中任一項之製劑，其中該細胞群包含感光細胞。

條項80. 如條項75至79中任一項之製劑，其中該細胞群包含間葉細胞。

條項81. 如條項75至80中任一項之製劑，其中該製劑經冷藏。

條項82. 如條項81之製劑，其中該製劑在約2°C -8°C 下冷藏。

條項83. 如條項75至82中任一項之製劑，其中該製劑在其儲存期間支持該細胞群中之細胞存活，且其中該細胞群中至少70%細胞在該製劑在2°C -8°C 下儲存48小時之後仍有活力。

條項84. 如條項83之製劑，其中該細胞群中至少80%細胞在該製劑在2°C -8°C 下儲存48小時之後仍有活力。

條項85. 如條項83之製劑，其中該細胞群中至少90%細胞在該製劑在2°C -8°C 下儲存48小時之後仍有活力。

條項86. 如條項75至85中任一項之製劑，其中該製劑在其儲存期間支持維持該細胞群之植板效率，且其中在該製劑在2°C -8°C 下儲存48小時之後，該細胞群展現其初始植板效率之至少70%，其中該初始植板效率為該細胞群在儲存時段開始時的植板效率。

條項87. 如條項86之製劑，其中在該製劑在2°C -8°C 下儲存48小時之後，該細胞群展現其初始植板效率之至少80%。

條項88. 如條項86之製劑，其中該細胞群展現其初始植板效率之至少90%。

條項89. 如條項75至88中任一項之製劑，其中該製劑係在儲存容器內。

條項90. 如條項75至89中之任一項之製劑，其中該製劑係在注射器內。

條項91. 一種用於製備如條項75至90中任一項之製劑的方法，其中該方法包含使細胞群與如條項1至74中任一項之溶液接觸。

條項92. 如條項91之方法，其中該方法包含使經低溫保存或集結成粒之細胞與如條項1至74中任一項之溶液接觸，由此復原該等細胞。

條項93. 一種醫藥組合物，其包含如條項1至74中任一項之溶液或如條項75至90中任一項之製劑，其中該醫藥組合物適用於向個體投與。

條項94. 一種方法，其包含向有需要之個體投與如條項1至74中任一項之溶液或如條項75至90中任一項之製劑或如條項88之醫藥組合物。

條項95. 如條項94之方法，其中該方法包含向該個體之眼睛投與該溶液或該製劑。

條項96. 如條項94或95之方法，其中該方法包含在該製劑儲存至少4

小時、至少6小時、至少12小時、至少24小時、至少36小時或至少48小時之後向該個體投與該製劑。

條項97. 如條項96之方法，其中該個體患有或診斷患有視網膜疾病。

條項98. 如條項97之方法，其中該視網膜疾病為視桿或視錐營養不良、視網膜變性、色素性視網膜炎、糖尿病性視網膜病變、黃斑變性、雷伯氏先天性黑矇或斯特格氏疾病。

條項99. 如條項97或98之方法，其中該製劑包含可有效改善該個體中該視網膜疾病之至少一種症狀的一定大小之細胞群。

條項100. 如條項97至99中任一項之方法，其中該方法進一步包含監測該個體中該視網膜疾病之至少一種症狀。

條項101. 一種方法，其包含

(a) 使細胞群與如條項1至74中任一項之溶液接觸，由此產生細胞製劑。

條項102. 如條項101之方法，其進一步包含

(b) 儲存(a)之該細胞製劑至少4小時、至少6小時、至少12小時、至少18小時、至少24小時、至少36小時、至少48小時、至少60小時或至少72小時。

條項103. 如條項102之方法，其中該方法進一步包含

(c) 在(b)之該儲存時段之後，向個體投與(a)之該細胞製劑。

條項104. 如條項103之方法，其中(c)之該投與包含將該等細胞注射至個體眼睛中。

條項105. 如條項101至104中任一項之方法，其中該方法進一步包含

在(b)之該儲存時段之後，測定(a)之該細胞製劑中之細胞成活力。

條項106. 如條項101至105中任一項之方法，其中該方法包含在步驟(b)之該儲存時段期間冷凍(a)之該細胞製劑。

條項107. 如條項106之方法，其中冷凍包含在2°C -8°C 之溫度下儲存該細胞製劑。

條項108. 一種用於治療視網膜疾病之方法，該方法包含

向患有視網膜疾病之個體眼睛投與有效量之如條項75至90中任一項之製劑或如條項93之醫藥組合物。

條項109. 如條項108之方法，其中該視網膜疾病為視桿或視錐營養不良、視網膜變性、色素性視網膜炎、糖尿病性視網膜病變、黃斑變性、雷伯氏先天性黑矇或斯特格氏疾病。

條項110. 一種套組，其包含

(a) 如條項1至74中任一項之溶液；

(b) 用於使細胞群與(a)之該溶液接觸以產生細胞製劑的說明書；及

(c) 用於(b)之該接觸及/或用於儲存(b)之該細胞製劑的容器。

條項111. 如條項110之套組，其中(a)之該溶液及(c)之該容器適用於將(b)之該細胞製劑移植給個體。

實例

前言

向罹患SMD及AMD之個體眼睛投與RPE細胞之第1期臨床試驗係使用Alcon BSS PLUS[®]作為RPE細胞調配、儲存及移植培養基進行。BSS PLUS[®]為已批准用於眼內手術之生理上可相容(滲透壓約310 mOs，pH約7.4)溶液。在臨床投與(注射)之前，當在2°C -8°C 下儲存時，在BSS PLUS[®]

中調配之RPE細胞的儲存期限限於約四小時。由於此受限的產物儲存期限，必須建立非常接近參與試驗之各臨床位點的衛星細胞處理實驗室。

研發顯著延長最終產物儲存期限(例如至48小時或更長)之培養基將帶來諸多優點。增強之儲存期限將允許最終產物調配物在單一位置處合併，最終產物可自該單一位置運送至位於美國的所有臨床位點。以此方式，可擴增當前限於緊密接近於cGMP處理位點之診所位點的診所位點數目。延長的產物儲存期限亦消除了與維持多種材料清單、培訓人員及監管多個衛星處理位點相關的邏輯複雜性。延長的儲存期限促進了移植的排程彈性，目前的移植必須在嚴格的四小時窗口內進行。

延長最終產物儲存期限將允許患者在準備手術或進入手術室(OR)之前，擁有充足的時間從容地通知任何延緩或取消。另外，若最終產物未通過品質放行測試，則有可能在同一天另外製備最終產物之調配物，而不用延遲或取消手術。延長儲存期限允許額外的時間用於補充最終產物放行測試(諸如使用泛引子之DNA qPCR)以偵測以下所提出之微生物污染物的存在。

於BSS Plus[®]中調配之RPE最終產物經由MedOne REF 3233 PolyTip[®]套管23/38遞送。使用當前BSS PLUS[®]調配物，觀測到活細胞密度平均損失約23%。此損失在所有細胞密度測試上均一致，且對經由套管擠出之剩餘77%細胞在成活力或在培養物中接種、增殖及分化之後續能力等方面無明顯影響。雖然可預期因黏著所造成的一些細胞損失，但後續實驗仍一致出現細胞損失，且推測細胞裂解歸因於在套管擠出期間所產生之剪切力。為了補償預期損失，因此增加套管裝載密度以確保遞送所要劑量。除了增強儲存期限以外，具有適合黏彈性之最終調配物培養基亦在套管遞送期間

使細胞損失減到最少。最小化細胞損失減少了細胞碎屑遞送，由此減輕對胞內組分的潛在免疫反應。

實例1：培養基組合物

GS2培養基

製備用於細胞復原、儲存、輸送及/或向個體投與之培養基。如下製備命名為「GS2」之培養基：

48.75 ml 0.9% NaCl於水中；

13.10 ml Alcon平衡鹽溶液(BSS®)，300 mOsm於水中；及

3.75 ml 5%右旋糖於0.9% NaCl (於水中)中(560 mOsm)

合併，獲得具有0.29%右旋糖之最終濃度及315 mOsm之滲透壓的65.6 mL培養基。

基礎GS2培養基因此包含

約145 mM NaCl (約0.85% NaCl)，

約2 mM KCl (約0.015% KCl)，

約0.7 mM CaCl₂ (約0.01% CaCl₂二水合物)，

約0.3 mM MgCl₂ (約0.006% MgCl₂六水合物)，

約1 mM檸檬酸鈉(約0.035%二水合檸檬酸鈉)及

約16 mM葡萄糖(約0.29%右旋糖)，

於水中。

視情況，GS2培養基可進一步包含黏彈性聚合物，其以可有效減少細胞上之剪應力，例如以約0.005-5% w/v最終濃度之量。在一些實施例中，黏彈性聚合物為玻尿酸或其鹽或溶劑合物。

Alcon平衡鹽溶液(BSS®)

Alcon平衡鹽溶液(BSS[®]無菌沖洗溶液)為無菌平衡鹽溶液，其含有
0.64%氯化鈉(NaCl)，
0.075%氯化鉀(KCl)，
0.048%二水合氯化鈣($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)，
0.03%六水合氯化鎂($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)，
0.39%三水合乙酸钠($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)，
0.17%二水合檸檬酸鈉($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)，
氫氧化鈉及/或鹽酸(以調整pH)，
及注射用水。

BSS[®]之pH為約7.5且重量莫耳滲透濃度為約300 mOsm/Kg。

Alcon BSS因此包含

約109 mM NaCl，

約10 mM KCl

約3 mM CaCl_2

約0.1 mM MgCl_2

約5 mM檸檬酸鈉

Alcon平衡鹽溶液PLUS (BSS[®] PLUS)

Alcon平衡鹽溶液PLUS (BSS PLUS[®])為在眼內手術程序期間使用之無菌眼內沖洗溶液。其在自兩個部分，命名為「部分I」及「部分II」使用之前復原。

部分I為無菌480 mL溶液於500 mL單次劑量瓶中，向其添加部分II濃縮物。BSS PLUS[®]之部分I含有

7.440 mg/ml氯化鈉，

0.395 mg/ml氯化鉀，
0.433 mg/ml磷酸氫二鈉，
2.190 mg/ml碳酸氫鈉，
鹽酸及/或氫氧化鈉(以調整pH)，及
注射用水。

部分II為無菌濃縮物於20 ml單次劑量小瓶中用於添加至部分I。BSS PLUS[®]之部分II含有：

3.85 mg/ml二水合氯化鈣，
5 mg/ml六水合氯化鎂，
23 mg/ml右旋糖，
4.6 mg/ml二硫化麩胱甘肽(氧化麩胱甘肽)，及
注射用水。

在添加BSS PLUS[®]部分II至部分I瓶之後，經復原產物含有：

7.14 mg/ml氯化鈉，
0.38 mg/ml氯化鉀，
0.154 mg/ml二水合氯化鈣，
0.2 mg/ml六水合氯化鎂，
0.42 mg/ml磷酸氫二鈉，
2.1 mg/ml碳酸氫鈉，
0.92 mg/ml右旋糖，
二硫化麩胱甘肽(氧化麩胱甘肽)0.184 mg/ml，
鹽酸及/或氫氧化鈉(以調整pH)，
於注射用水中。

經復原產物具有約7.4之pH及約305 mOsm之重量莫耳滲透濃度。

實例2：BSS-Plus®中調配之RPE最終產物之儲存期限

BSS Plus®中調配之RPE最終產物在冷儲存(2°C -8°C)中維持其成活力4小時。已完成最終產物儲存期限之更加全面的評價。在此研究中，RPE散裝產物經解凍，且以兩種活細胞密度調配，其歸類最終儲存密度為2,000個活細胞/微升。此儲存密度對所有製備劑量均為恆定的。在即將裝載注射器之前，在OR中進行具有預量測體積之BSS Plus®的細胞之最終稀釋。此稀釋步驟決定150 µL注射體積(對所有劑量亦為恆定的)中遞送之最終細胞密度。

在調配(0小時)時及在冷儲存(2°C -8°C)中4及6小時之後評定儲存於冷環境中之最終BSS-Plus®調配RPE細胞產物之細胞成活力、活細胞密度、純度及效能。活細胞密度及細胞成活力在冷儲存中六小時後展示為恆定的。另外，接種且培養儲存0、4及6小時的所調配RPE細胞以進行後續純度及效能評定。對於接種之各時間點(0、4及6小時)，藉由MITF及PAX6免疫染色評定純度，且藉由量測所吞噬粒子之FACS分析評定效能。資料展示所有測試之產物屬性在所評價之6小時時段內保持恆定。

儲存於BSS Plus®中12小時之RPE細胞一般展現小於70%存活力，且在BSS-Plus中24小時之後，RPE細胞成活力通常小於20%。

實例3：經改良細胞復原、儲存、輸送及/或移植培養基之研發

研發用於細胞復原(例如自低溫保存狀態)、細胞儲存(例如在自細胞培養物復原或採集與輸送至移植設施或向個體投與之間的冷儲存)、細胞輸送及細胞移植的經改良培養基。所得培養基(GS2)之組分列舉於以下表1中。提供例示性供應商。熟習此項技術者應理解存在所列舉組分之另外

來源，且將能夠確定此等試劑之適合來源：

表1 GS2組合物			
組分	供應商	NDC編號	目的/基本原理
右旋糖5%/NaCl 0.9% 或 右旋糖5%/NaCl 0.9%	Braun 或 Baxter	00264-7610-00 或 0338-0089-04	生理學pH及等滲的以維持細胞完整性
無菌沖洗溶液	Alcon 9008625-0113	0065-0795-15viso	乙酸鈉/檸檬酸鹽緩衝劑之生理學pH約7.5以維持pH及 約300 mOsm/Kg之等滲透壓以維持細胞完整性
0.9%氯化鈉	Baxter Healthcare	0338-0049-11	等滲的以維持細胞完整性
0.1N NaOH	J.T.Baker® VWR編 號 JT5636-2	適用於ACS、 USP及NF藥典方法 及一般實驗室 應用的體積及分析	調整GS2 pH至7.4
3%玻尿酸鈉 (例 如Healon® EndoCoat (Abbott)、Hysis® (Novozymes)、Pro-Visc® (Alcon) (視情況存在之組分)	Abbott、 Novozymes、 Alcon	05047-4547-06	在套管擠出期間抗剪切力之保護作用，由此減少細胞損失。

GS2最終調配物在pH (7.2-7.6)及滲透壓(所計算滲透壓315)方面為生理學的。

調配GS2培養基，且將其分配於Iso-5 BSC內之專用RPE細胞最終產物Iso-7潔淨室中。將表1中之無菌組分添加至無菌貯存器且置放於旋轉振盪器(30-40 RPM)上。在最少三小時之後，自貯存器移除樣品，且量測pH，且在遞增添加0.1N NaOH下將其調節至7.4 +/- 0.2 pH。用於填充之GS2不與pH探針形成接觸。溶液為經膜濾器除菌，且再檢查pH。

3 ml等分試樣之GS2分配至由符合USP VI級(USP Class VI)限制之原生聚丙烯樹脂構成的γ輻射冷凍小瓶中。自各填充小瓶移除樣品，且封蓋小瓶。QC測試在如下所述之彙集樣品上進行。各小瓶在可見光及UV光下

經受目視檢查以確認缺少顆粒。小瓶返回至無菌條件以進行標記且在2℃-8℃下儲存。在冷儲存中最少一天之後，移除數個小瓶，且使用經2℃-8℃ pH標準物校準之pH測定計再測試pH以確認在使用溫度(2℃-8℃)下之接受性。

實例4：RPE細胞最終產物在GS2中之品質控制及合格規格

由自所有填充小瓶移除之樣品組成的彙集GS2之等分試樣經受14天 USP無菌性、pH、滲透壓及內毒素測試。在經由注射套管調配及擠出之後，亦評定各批次GS2維持RPE細胞成活力及生長之效能。例示性品質控制測試及合格規格提供於以下表2中：

4

表2		
例示性GS2品質放行測試準則I		
測試	方法	規格
無菌性	USP/21 C.F.R. 610.12浸漬方法	負
內毒素	內毒素特異性濁度方法	< 0.50 EU/mL
在2℃-8℃下之pH	pH電極	7.2-7.6
滲透壓	滲透計	295-335 mOsm
目視檢查	視覺/UV光箱觀察	無顆粒存在於通過小瓶中
RPE細胞成活力及生長之維持	確認GS2中調配之RPE可接受的成活力及生長	在48小時儲存後調配物(套管擠出前及套管擠出後)之後，>= 80% GS2標準批次之細胞密度及成活力
例示性GS2品質放行測試準則II		
測試	方法	規格
無菌性	USP/21 C.F.R. 610.12浸漬方法	負
內毒素	內毒素特異性濁度方法	< 0.20 EU/mL
在2℃-8℃下之 pH	pH電極	6.8-7.8
滲透壓	滲透計	270-345 mOsm
RPE細胞生長	在GS2培養基中儲存2天之後的細胞生長	在培養2-3天之後，細胞數目增加>=25% (例如開始於20,000個細胞/孔，在培養2天之後，>=25,000個細胞/孔)
RPE細胞成活力	在GS2培養基中儲存2天之後的錐蟲藍排除	>=79%

表2		
例示性GS2品質放行測試準則I		
測試	方法	規格
RPE活細胞密度	在GS2中儲存2天之後的活細胞數	≥ 0.7 所調配之細胞密度

應理解表2中所列舉之放行準則為例示性的，且表2中所列舉之任何準則之任何組合可合併且單獨或與另外準則組合使用以進行放行測試及品質控制。

在RPE細胞生長分析之一例示性實施例中，在GS2儲存時段之後，細胞以初始密度，例如以20,000個細胞/孔之密度於RPE GM或EGM2/EBM2培養基(Lonza，例如目錄號：CC-3156、CC-4176)中接種於明膠塗佈之96孔板中。細胞在適合條件下，例如在5% CO₂中，在37°C下且在濕度可控恆溫箱中生長2-3天。例如藉由胰蛋白酶消化使細胞自孔上升，且隨後計數。若在培養時段結束時，滿足關於此測試之GS2品質放行測試準則，則每孔細胞數為初始細胞密度之125%或更大，例如對於20,000個細胞/孔之初始密度， $\geq 25,000$ 個細胞/孔。

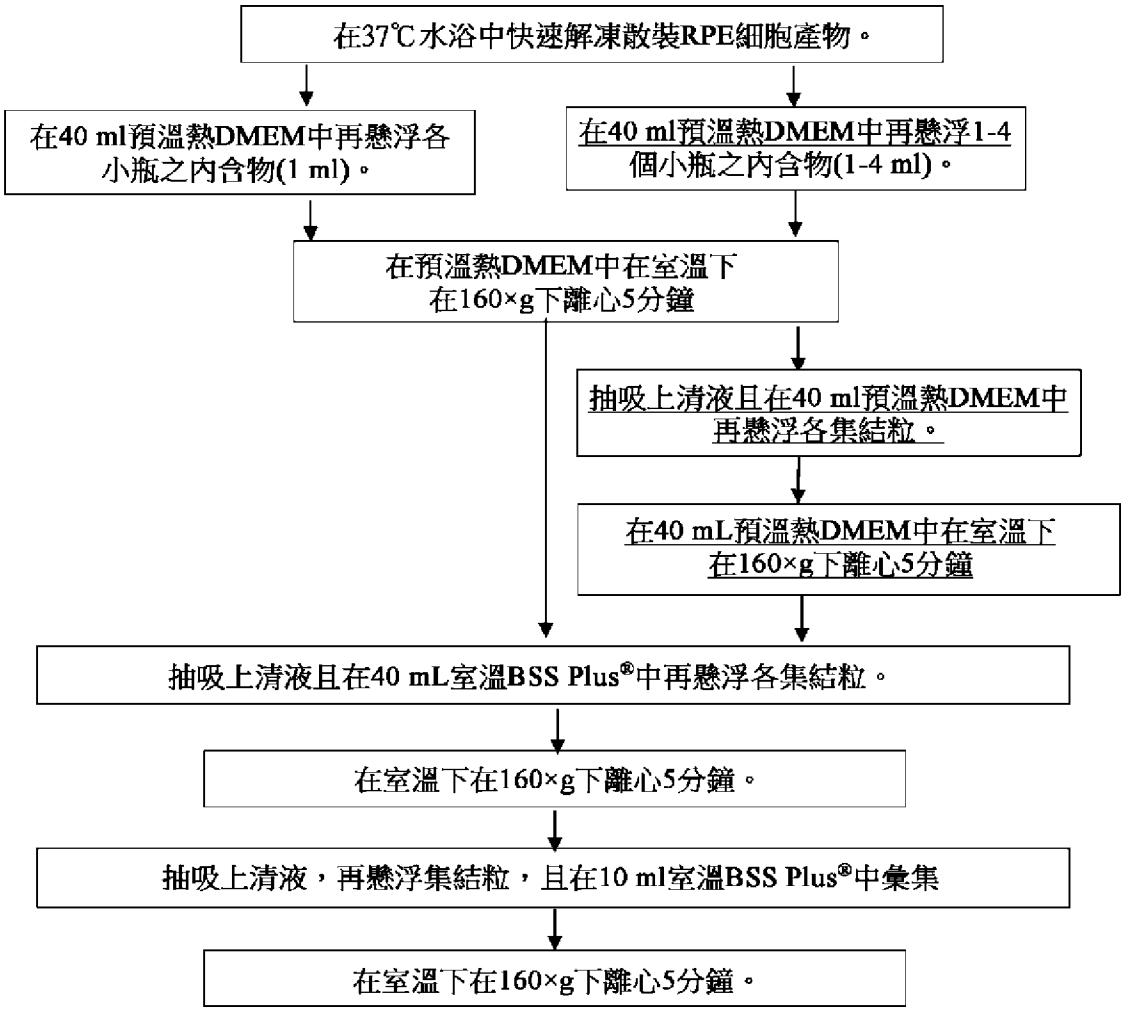
實例5：RPE最終產物調配、封裝及運送

在以下概述之方法中，BSS Plus[®]用於GS2處理之初始洗滌步驟。本發明之實施例亦涵蓋且包涵在GS2而非BSS Plus[®]中洗滌。自液氮儲存取回供臨床使用之所釋放低溫保存MA09-hRPE細胞之小瓶。取決於劑量，需要2-4小瓶細胞。冷凍小瓶輸送至潔淨室且在37°C水浴中快速解凍。將各小瓶之解凍內含物(在低溫保存時含有2百萬細胞之1 ml低溫保存培養基(90% FCS + 10% DMSO))輕緩地再懸浮於溫熱的DMEM中，轉移至50 ml錐形管中且在另外溫熱的DMEM下達到40 ml之最終體積。離心各管之再懸浮細胞(在室溫下160×g 5分鐘)且各集結粒再懸浮於40 ml室溫BSS Plus[®]中。再次離心各細胞懸浮液，彙集集結粒，且將其再懸浮於10 ml室

溫BSS Plus®中。第三次離心再懸浮、彙集細胞(在室溫下160×g 5分鐘)，且抽吸上清液。

以下為說明以上概述之產物調配步驟的流程圖(GS2處理步驟藉由加底線表示)：

RPE產物調配-I



在移除儘可能多的上清液之後，將集結粒再懸浮於以每一百萬解凍細胞之50 µl最終體積為目標的體積之冷BSS Plus® (當前處理)或冷GS2 (GS2處理)中。自此時刻起，在預先冷卻之管擱架中保存細胞以保持細胞在2°C -8°C 下以用於剩餘程序步驟。15-25%目標體積之典型回收將產生約4,000個活RPE細胞/微升之細胞懸浮液。

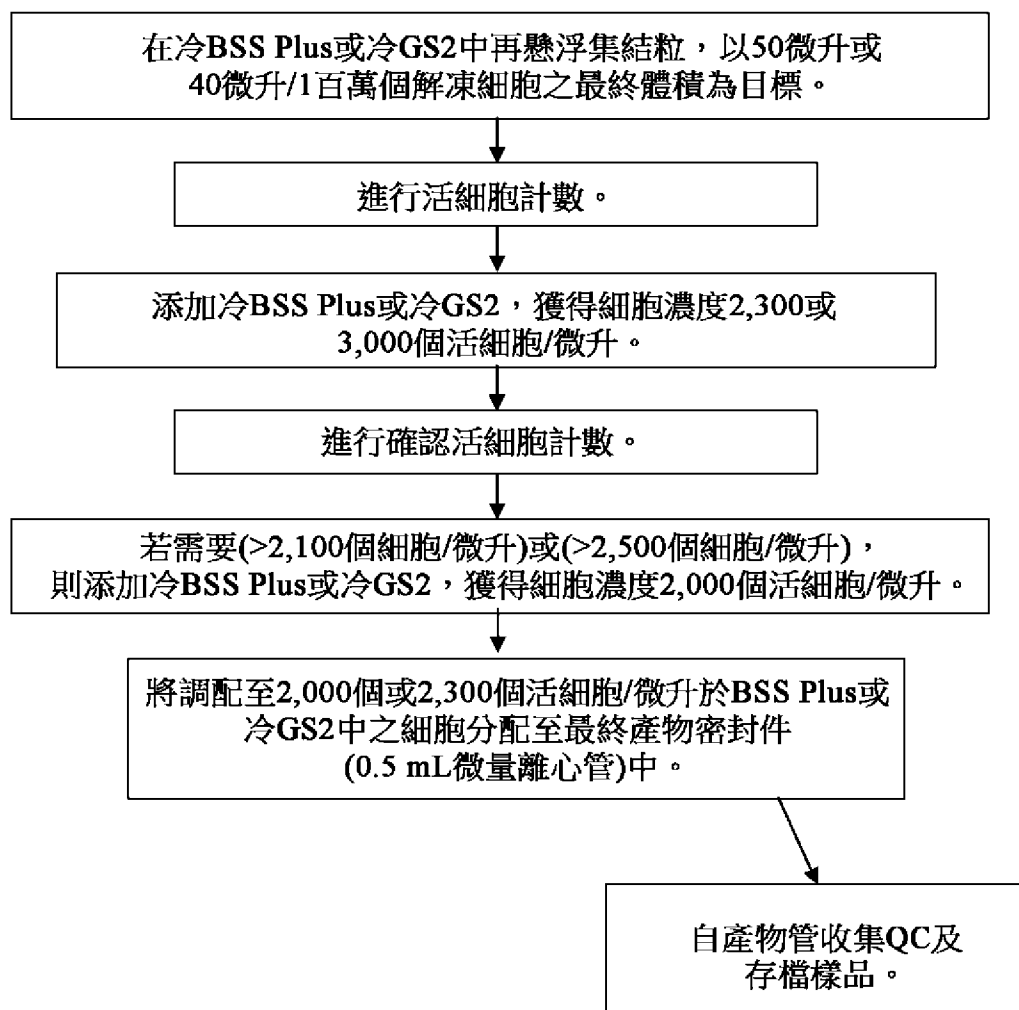
移除樣品，進行活細胞計數，且測定所回收細胞之活細胞密度及總

數。添加另外的冷BSS Plus[®]或冷GS2至細胞懸浮液以使最終細胞濃度為2,300個活RPE細胞/微升(比2,000個活RPE細胞/微升之目標最終調配物濃度高300個細胞)。進行確認細胞計數，且添加另外的冷BSS Plus[®]或冷GS2以使最終濃度為2,000個活RPE細胞/微升。所要體積之細胞分配至最終產物密封件(0.5 ml無菌微量離心管；Fisher，目錄號02-707-351)中。產物標記黏附至用於BSS Plus[®]處理之各管或黏附至含有用於GS2處理之產物管的Whirl-Pak袋，指明BSS Plus[®] RPE為4小時過期或GS2 RPE為48小時過期。自各產物管移除樣品且彙集此等樣品進行存檔及QC測試。

另外，研發用於調配培養細胞之方案。在此方案中，在GS2移植培養基中進行細胞調配之前，解凍低溫保存RPE細胞，且預培養3-7天。使培養細胞自培養盤上升且在DMEM中第一次洗滌，接著在BSS-Plus中洗滌，且最終在與GS2培養基1:1混合之BSS-Plus中洗滌。在最終洗滌步驟之後，細胞轉移至冷(2°C-8°C) GS2培養基中。樣品移除、測試及調節最終細胞密度之體積係如上文所描述。

以下為說明以上概述之產物調配步驟的流程圖(GS2處理步驟藉由加底線表示)：

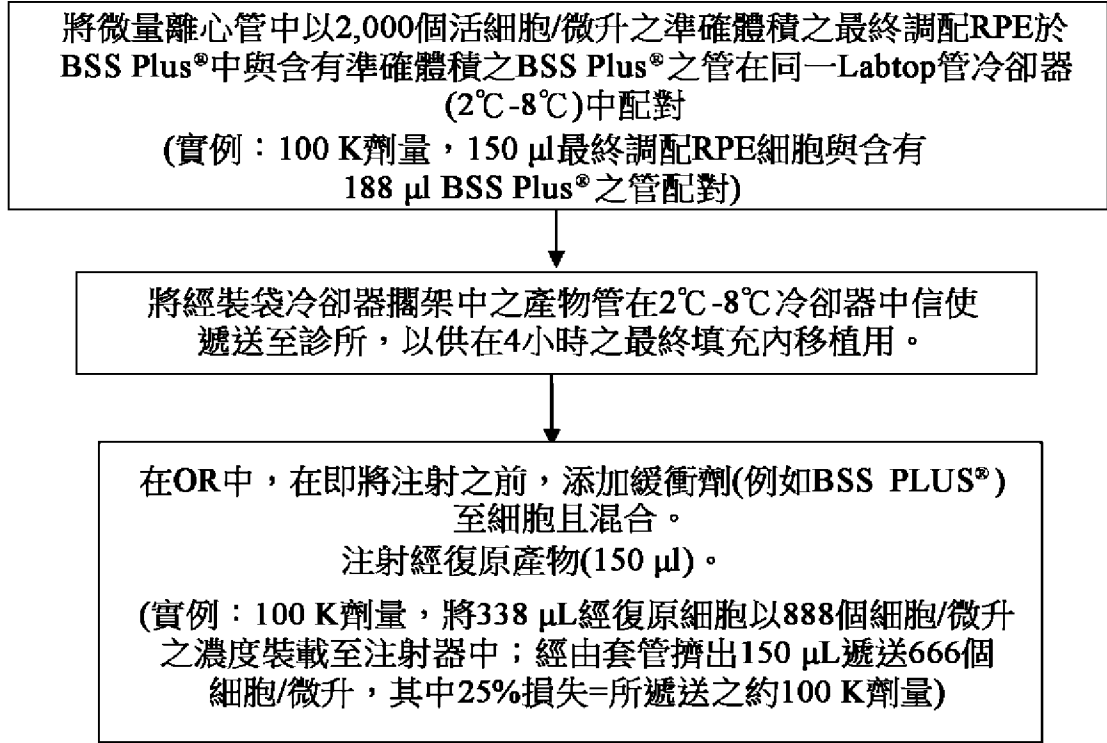
RPE產物調配-II



RPE於BSS PLUS[®]中之封裝及運送。對於臨床試驗移植(SMD及AMD)，各劑量由一對管組成：一個管含有預量測體積之以2,000個活RPE細胞/微升調配之RPE細胞及另一管含有預量測體積之BSS Plus[®]。將各對管置放於2°C-8°C下之Labtop管冷卻器擱架中。冷卻器擱架經裝袋，置放於含有約16磅預冷卻Insul-Ice之Coleman冷卻器中，且由信使人工遞送至診所。

在OR中，在即將移植之前，使用鈍填充針添加BSS Plus[®]至細胞。細胞混合且裝載至1 ml注射器中。經由注射套管將產物(所有劑量均為150 µl)擠入視網膜下腔中。注射器中之裝載細胞密度設定為1.33×遞送密度以補償套管擠出期間之25%預期損失。

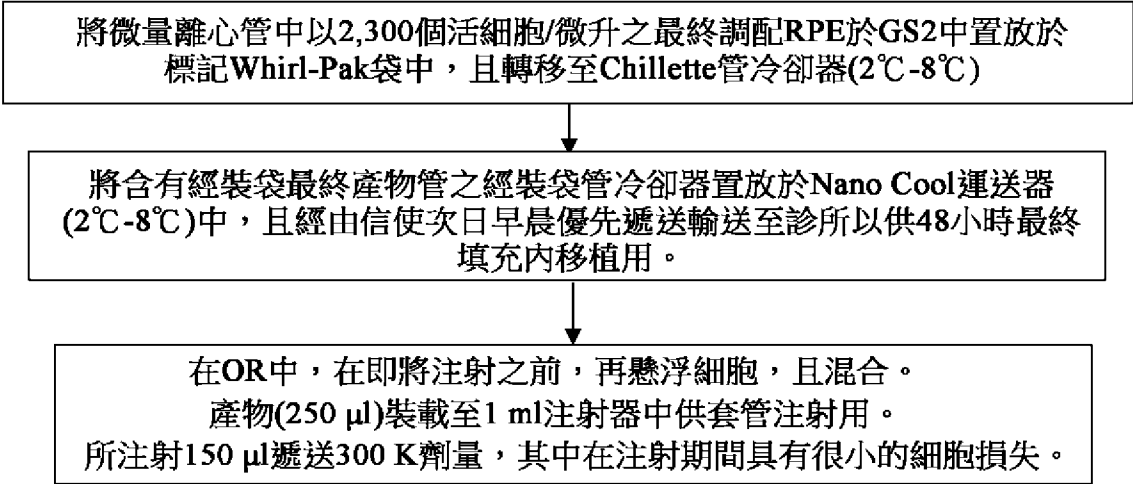
以下為說明BSS PLUS[®]中封裝及運送步驟的流程圖：



RPE於GS2中之封裝及運送。 各劑量由含有以2,300個活RPE細胞/微升調配之250µl RPE細胞的微量離心管組成。含有一個劑量之最終調配RPE產物的單一管置放於2盎司無菌Whirl-Pak袋中，最終產物標記黏附至該Whirl-Pak袋。裝袋管置放於經清潔、預冷卻(2°C-8°C)、經獨特編號的攜帶型管冷卻器中。除了標記產物管以外，含有30 µl RPE產物細胞之標記衛星管(未裝袋)及含有100 µl 0.4%錐蟲藍之另一管亦置放於各Chillette冷卻器中。最終產物標記亦黏附至各Chillette冷卻器。具有產物之各冷卻器置放於無菌條件下之無菌Whirl-Pak袋中。具有產物之裝袋冷卻器、伴隨的臨床次序表格及兩個產物標記置放於潔淨室通道中，由此獲得最終封裝及運送區域。為了避免混亂，各Chillette冷卻器裝載有無菌條件下之產物管且置放於潔淨室通道中，一次一個。

封裝人員自潔淨室通道取回各Chillette冷卻器及伴隨的文書工作及最終產物標記，且將裝袋Chillette冷卻器、氣泡包裹物、鈍填充針、注射

器、注射套管及血球計放入預先冷卻之Nano Cool冷卻單元之運送隔室中。固持冷卻單元之蓋子，且外部運送器包裝有供接收、觀察、儲存及運送後成活力測試用的文件。封裝產物置放在隔離下直至已進行所有產物釋放測試且已頒佈「供移植用之放行RPE細胞最終產物憑證(RPE Cell Final Product Certificate of Release for Transplantation)」為止。具有產物及文件之NanoCool運送器隔夜發送至診所。在接收時，運送器可儲存在室溫下或在2°C -8°C下直至自最終填充時間起的48小時內使用產物為止具有過期日期及時間之最終產物標記黏附至外部運送器、Chillette管冷卻器及含有最終產物管之袋。



RPE最終產物品質放行測試。在移植之前進行的當前最終產物(在BSS PLUS®中)品質放行測試包括細胞成活力檢查及革蘭氏染色(Gram staining)。發送樣品以進行USP 14天無菌性測試，結果在移植後報導。

移植前RPE最終產物放行		
測試	方法	規格
成活力	錐蟲藍排除	>= 70%
革蘭氏染色	顯微鏡觀察	負
移植後RPE最終產物放行		
無菌性	USP/21 CFR 610.12浸漬	負

用於偵測污染物之qPCR。由於RPE最終產物儲存期限自BSS-Plus®中4小時延長至GS2中至少48小時，可在產物放行之前進行具有更長週轉

時間之分析。舉例而言，目前有可能使RPE最終產物經受PCR分析，且接收品質控制結果，且在放行及使用產物之前放行目的。可進行的一種適合分析為泛引子DNA qPCR分析。此類分析可在兩個小時內完成。qPCR分析極其敏感且可用於偵測多種病原污染物，例如環境、微生物及病毒性污染物以及常見皮膚共生菌。qPCR分析可用作除了革蘭氏染色及USP無菌性測試以外的輔助最終產物放行分析用於偵測微生物污染物。qPCR結果將在產物運送之前得知，由此預防離開設施時潛在經污染產物。應理解本文所描述之qPCR分析為例示性的，且取而代之或另外可進行其他適合之分析，包括(但不限於)可在最終RPE產物之經延長儲存期限內進行的其他PCR分析及其他類型之分析。

運送後最終產物觀察及成活力檢查。在接收時在臨床位點處，經過訓練的人員將取回外部運送器，確認正確批量及批次資訊且檢查運送器損壞跡象。若臨床位點具有進行細胞成活力檢查之能力，則此時自Chillette冷卻器移除含有細胞之衛星管及含有錐蟲藍之管。將管轉移至測試實驗室進行運送後細胞成活力檢查。若細胞成活力低於70%，則將丟棄產物。

用於裝載注射套管之說明書。在即將在OR中移植之前，使用鈍填充針混合細胞，且將其裝載至1 ml注射器中。產物(150 µl)經由注射套管擠入視網膜下腔中。由於在套管擠出期間GS2中僅存在很小的細胞損失，注射器中之裝載細胞密度(2,000個活RPE細胞/微升)為利用150 µL注射300K劑量遞送的密度。

實例6：GS2中之細胞穩定性

圖1說明RPE細胞可在HypoThermosol (BioLife Solutions, Inc., Bothell, WA, USA)中維持24小時(但不為48小時)而在培養物中接種及

生長的後續能力無明顯損失。

圖2至圖5說明在GS2中在2°C-8°C下之RPE穩定性。圖2展示RPE細胞可在GS2中維持至少48小時而在培養物中之活細胞數目或接種及生長的後續能力無明顯損失。圖3展示RPE細胞可在GS2中維持4-5天而細胞成活力僅有很小的損失且活細胞密度無顯著降低。圖4展示在GS2冷儲存5天之後，RPE細胞在培養物中接種及生長的能力開始降低。圖5展示GS2與當前注射系統相容。

實例7：GS2移植培養基-黏彈性聚合物之效應

評定在套管插入法之後，各種濃度之黏彈性聚合物對細胞成活力的效應。根據cGMP程序製造人類視網膜色素上皮細胞(RPE)散裝批次NRPE-313 5C P2，且將其低溫保存。在實驗當天，解凍且調配小瓶。細胞解凍至預溫熱(37°C) DMEM (Gibco)中。接著離心細胞(在160×g下5分鐘)。各集結粒再懸浮於40 ml室溫BSS Plus® (Alcon)中，且再次離心。集結粒接著彙集至單一離心管中，再懸浮於室溫BSS Plus®中，且隨後分成多個(4個)管，隨後為以10 ml體積/管之最終旋轉步驟。將細胞集結粒放入命名為GS2 TM之不同移植培養基調配物中。

移植培養基GS2 TM藉由以下步驟製造：在無菌貯存器中合併5%右旋糖於鹽水(0.9% NaOH)中，Braun NDC編號00264-7610-00或Baxter NDC編號0338-0089-04；鹽水(0.9% NaOH)，Baxter NDC編號0338-0049-11；Alcon BSS沖洗溶液、NDC編號0065-0795-15；及玻尿酸或玻尿酸鈉(HA)，諸如Abbott Healon EndoCoat，NDC編號05047-4547-06；且在定軌振盪器上混合組分。量測pH，且將其在遞增添加0.1 N NaOH下調節至pH 7.4+/-0.2，隨後無菌過濾。在此實驗中，製造含有最終濃度

0.15%、0.1%、0.05%或0%之來自Healon EndoCoat (Abbott)之玻尿酸(HA)的GS2 TM。

逐漸地稀釋細胞，得到約2,000個細胞/微升之最終儲存細胞密度。在不同移植培養基中經復原且稀釋之後，針對各條件製造三個重複小瓶之細胞。細胞之小瓶在冷凍機中在2°C -8°C下儲存2天，使用血球計測定細胞數目。藉由錐蟲藍排除獲取細胞生存力。平均值自針對各條件製造之細胞之三個重複管計算，其中各管之活細胞濃度自三個重複計數測定。計算經由MedOne編號3233套管擠出前後的細胞數目差值或 δ 。

此實驗結果展示於圖6中。展示來自三個重複管之平均活細胞密度 $\pm$ 標準差。使用血球計測定人類RPE細胞密度。藉由錐蟲藍排除獲取細胞生存力。平均值自針對各條件製造之細胞之三個重複管計算，其中各管之活細胞濃度自三個重複計數測定。以上各組值展示針對各條件經由MedOne編號3233套管在細胞擠出之後所觀測到的細胞數目之%改變(δ)。

儘管所測試的所有濃度之HA展示在套管插入法之後經改良之細胞成活力值，但測定添加0.05% HA對移植培養基調配物為較佳的。與在無HA或具有0.1%或0.15% HA的情況下製造之GS2 TM相比，觀測到含有0.05% HA之GS2 TM在經由MedOne編號3233套管擠出RPE細胞之後細胞損失較少。最值得注意的是，與未添加HA之GS2 TM相比，包含0.05% HA觀測到10%較少損失。

實例8：GS2培養基-葡萄糖濃度對細胞成活力之效應

評定在套管插入法之後，各種濃度之黏彈性聚合物對細胞成活力的效應。為此目的，根據cGMP程序製造人類視網膜色素上皮細胞(RPE)散裝批次NRPE-313 5C P2，且將其低溫保存。在實驗當天，解凍小瓶，細

胞在預溫熱(37℃) DMEM (Gibco)中經復原。接著離心細胞(在160×g下5分鐘)。各集結粒再懸浮於40 ml室溫BSS Plus® (Alcon)中，且再次離心。集結粒接著彙集至單一離心管中，再懸浮於室溫BSS Plus®中，且隨後分成多個(6個)管，隨後為以10 ml BSS Plus®/管之最終旋轉步驟。將細胞集結粒放入不同移植培養基GS2 TM中。

移植培養基GS2 TM藉由以下步驟製造：在無菌貯存器中合併5%右旋糖於鹽水(0.9% NaOH)中；鹽水(0.9% NaOH)；及Alcon BSS沖洗溶液、NDC編號0065-0795-15；且在定軌振盪器上混合。量測pH，且將其在遞增添加0.1 N NaOH下調節至pH 7.4±0.2，隨後無菌過濾。如以下表3中展示，以各種濃度之葡萄糖製造關於此實驗之GS2 TM培養基。所提及之體積以毫升為單位：

	無葡萄糖	1/3X葡萄糖	1X葡萄糖	2X葡萄糖	3X葡萄糖	4X葡萄糖
0.9%氯化鈉	52.50	51.25	48.75	45.00	41.25	37.50
5%右旋糖及0.9%氯化鈉	0.00	1.25	3.75	7.50	11.25	15.00
BSS (Alcon)	13.13	13.13	13.13	13.13	13.13	13.13
所計算之滲透壓	300.0	305.0	314.9	329.7	344.6	359.4

表3：

當在各種GS2移植培養基中調配時，逐漸地稀釋細胞，得到約2,000個細胞/微升之最終儲存細胞密度。細胞接著在冷凍機中在2℃-8℃下儲存於無菌小瓶(Fischer)中3天。隨後，使用血球計測定活細胞數目，且將約20,000個活細胞/孔接種於明膠塗佈(Stem Cell, Inc.)之96孔組織培養板(COSTAR)中。細胞在RPE生長培養基(具有EGM2 Single Quots之EBM-2，Stem Cell, Inc.，例如Lonza|| 錄號：CC-3156, CC-4176)中在5% CO₂，37℃，濕度可控恆溫箱中培養3天。隨後使用40微升/孔之1:1胰蛋白酶(Sigma)及基於分解培養基(Gibco)之HEPES使細胞上升。含血清培養

基(40微升/孔)用於中和胰蛋白酶作用，且細胞利用吸管滴定以上升且使用血球計計數。圖7展示針對所測試之各條件來自六個孔的人類RPE細胞/孔之平均數目±SD。與未含有葡萄糖之對照物相比，各濃度之葡萄糖產生經增強結果。

實例9：間葉幹細胞在GS2培養基中之增強成活力

圖8說明間葉幹細胞(MSC)在不同調配物培養基中之細胞成活力。使人類胚胎幹細胞衍生之MSC生長至70%融合度，利用0.05%胰蛋白酶收集，再懸浮於aMEM+15%FCS (MSC培養基)中且以200×g快速離心5 min。細胞集結粒再懸浮於小體積之MSC培養基中，且使用錐蟲藍排除計算成活力。五百萬個MSC置放於4個Eppendorf管中之每一者中，快速離心且再懸浮於1 ml所指示培養基中之每一者中。將管置放於4°C下之冷空間中持續指示時間段。CS：犬血清；FBS：胎牛血清。圖8說明GS2中有或無血清之調配物促進MSC細胞成活力且延長MSC儲存時間。

圖9說明當儲存於GS2中時更高的細胞密度(以百萬細胞/毫升為單位展示)促進MSC成活力。在GS2中儲存24小時(箭頭)之後，發現血清(此處為FBS)之存在對細胞成活力具有極少效應。

圖10說明在GS2中在4°C下儲存且經由26G針/注射器後續排出之後，MSC成活力得以保存。

實例10：關於GS2輸送培養基之分析的例示性憑證

作為品質控制之部分，意欲用於人類及/或獸醫患者之個體輸送培養基經受一連串測試，其意欲最大化培養基作為醫藥或手術方法之部分的效用，且最小化不利反應或事件的可能性。舉例而言，內毒素為極其強力、熱穩定的且通過大多數滅菌膜濾器，且為無處不在的細菌或已存在。內毒

素最令人關注，其中當用於調配供注射用之RPE細胞時，輸送培養基用於定位遞送，諸如於如所意欲之視網膜下腔中。因此，GS2輸送調配物已經受一連串測試，且已展現滿足以下準則：

測試	方法	規格
無菌性	USP/21 CFR 610.12浸漬方法	負
內毒素	內毒素特異性濁度方法	< 0.20 EU/mL
在25 ± 2°C下之 pH	pH電極	6.8 - 7.8
重量莫耳滲透濃度	滲透計	270 - 345 mOm
RPE細胞生長	細胞生長 (在GS2中儲存之後)	≥ 25,000個細胞/孔
RPE細胞成活力	錐蟲藍排除 (在GS2中儲存之後)	≥ 79%
RPE活細胞密度	活細胞數(在GS2中儲存之後)	≥ 0.7所調配細胞密度

實例11：藉由光阻法測試輸送培養基

亦作為品質控制之部分，特別地對於將所調配細胞用於人類患者，本發明之輸送培養基將一般不含不可接受量之顆粒物質。特定物質由移動未溶解粒子(亦即其不為氣泡)組成，由於其所代表之材料較小及其非均質組成，該等移動未溶解粒子通常無法由化學分析定量。當使用光阻法(USP 788測試方法)測試，亦即其使用電子粒子計數器計數顆粒物質時，本發明之輸送培養基調配物已展現每毫升之輸送培養基具有不超過25個粒子在大小上≥10微米且每毫升輸送培養基具有不超過3個粒子在大小上≥25微米。

USP 788向程序提供方法1 (光阻計數測試)及方法2 (顯微鏡粒子計數測試)用於測定顆粒物質。當檢查輸送培養基之低於可見粒子時，較佳應用方法1。然而，在個體調配物之一些情況下，可必需藉由光阻粒子計數測試接著顯微鏡粒子計數測試來測試製劑，以最終符合要求。

並非所有非經腸製劑可利用此等方法中之一者或兩者檢測低於可見粒子。當方法1不適用時，例如在製劑具有減少之透明度或增加之黏度的

情況下，應根據方法2進行測試。其中輸送培養基包括膠體或脂質體作為組分，其為後者之實例。類似地，對於當吸入感測器時可產生空氣或氣泡的輸送培養基之彼等實施例亦可需要顯微鏡粒子計數測試。儘管當前個體輸送之較佳實施例不為過度黏性的，但若待測試製劑之黏度足夠高使得妨礙利用任一測試方法進行檢查，則視需要可製造具有合適稀釋劑之定量稀釋液以減少黏度，由此允許分析進行。

USP方法1。光阻粒子計數測試。具有或無玻尿酸組分之GS2輸送培養基樣品在基於光阻原理之適合裝置中進行測試，該裝置允許自動測定粒子大小及與大小對應之粒子數目。使用在10 μm 與25 μm 之間已知大小之球形顆粒分散液、USP粒子計數參考標準校準裝置。此等標準粒子分散於無粒子水中。注意避免在分散期間粒子聚集。顆粒物質測試在限制顆粒物質之條件下，亦即在層流櫃中進行。極其謹慎地洗滌且沖洗玻璃器皿及過濾設備。緊接著在使用之前，自上而下、外部及內部利用無粒子水沖洗設備。使用多種測試樣本足以提供對所分析輸送培養基之統計上合理的評定，分析樣品等於或大於10微米及25微米之粒子數目。對於所測試GS2輸送培養基樣品中之每一者，樣品包括大小 ≥ 10 微米之 ≤ 25 個粒子/毫升輸送培養基及大小 ≥ 25 微米之 ≤ 3 個粒子/毫升輸送培養基。

實例12：確認GS2培養基中之RPE細胞活體內成活力及功效

此實例之目標為評價及比較以下之安全性、移植及功能性：1)衍生自在BSS PLUS®中調配且在4小時內移植之胚胎幹細胞(ES)株MA09的人類視網膜色素上皮(hRPE)細胞；2)衍生自在BSS PLUS®中調配之ES細胞株J1的hRPE細胞；及3)衍生自在GS2輸送培養基中調配且(a)在22-28小時內及(b)在44-52小時內移植之J1細胞株的hRPE細胞。此研究確定與當前所用臨床調配物培養基(BSS-PLUS)相比，GS2培養基延長了最終產物之

儲存期限。

總計32隻RCS (皇家外科醫學院(Royal College of Surgeon))幼年大鼠 (16隻雄性及16隻雌性)接受研究。大鼠在給藥開始時年齡為21-25天。

環境適應時段：最少7天。第1天對應於視網膜下注射這天。

實驗設計：八隻RCS大鼠(4隻/性別)隨機分為四個劑量組MA09-hRPE (第1組)及J1-hRPE (第2組、第3組、第4組)，各組由三個子組(以下表1)組成。所有大鼠經由穿虹膜途徑投與在麻醉下接受右眼(OD)視網膜下注射hRPE細胞。第1組利用MA-09 hRPE於BSS PLUS®中(在4小時內)給藥，第2組利用J1 hRPE細胞於BSS Plus®中(在4小時內)注射，第3組利用J1 hRPE細胞於GS2中(在22-28小時內)注射且第4組利用J1 hRPE細胞於GS2中(在44-52小時內)注射。子組係由左眼給藥界定；偽子組(1隻/性別)僅接受針穿刺至左眼之視網膜下腔；無注射(NI或未經處理)子組(1隻/性別)在左眼中未接受注射；及兩個媒劑子組(2隻/性別)接受視網膜下注射GS2或BSS Plus媒劑。大鼠在注射後70-80天時進行安樂死。

表1 實驗研究設計

		給藥 (視網膜下注射)		
組	子組	大鼠編號	左眼(OS)(對照物)	右眼(OD)(hRPE細胞)
1 (MA-09 hRPE於BSS PLUS®中(在4小時內))	a	1M/1F	NI	MA-09 hRPE
	b	1M/1F	偽	MA-09 hRPE
	c	2M/2F	媒劑(BSS Plus)	MA-09 hRPE
2 (J1 hRPE於BSS PLUS®中(在4小時內))	d	1M/1F	NI	J1 hRPE
	e	1M/1F	偽	J1 hRPE
	f	2M/2F	媒劑(BSS Plus)	J1 hRPE
3 (J1 hRPE於GS2中(在22-28小時內))	g	1M/1F	NI	J1 hRPE
	h	1M/1F	偽	J1 hRPE
	i	2M/2F	媒劑(GS2)	J1 hRPE
4 (J1 hRPE於GS2中(44-52小時))	j	1M/1F	NI	J1 hRPE
	k	1M/1F	偽	J1 hRPE
	l	2M/2F	媒劑(GS2)	J1 hRPE

NI =無注射 偽=利用空移液管穿刺視網膜下腔。

BSS PLUS® = 2 µL 媒劑(無細胞) GS2 = 2 µL 媒劑(無細胞)

hRPE = 100,000個細胞於2 µL BSS PLUS®或GS2媒劑中。

所進行的用於評價之生命量測、屍體剖檢及組織病理學終點的概述在以下表2中呈現。

表2 評價參數及時間間隔

參數	大致時間間隔(天數為注射後)
臨床觀測	每天至少一次
體重/餵料消耗	每週
眼睛檢查	給藥前及在手術後第40±3天及第70±3天(均為眼睛)
視動(頭部跟蹤)	在手術後第40±3天及第70±3天
ERG (視網膜電圖描記)	在手術後第40±3天及第70±3天
光學相干斷層攝影術	在手術後第70±4天
亮度臨限值記錄	在手術後第70天至多第80天
完全屍體剖檢	在終止時，包括記錄剖檢病變
組織收集	出於存檔目的保存組織大腦、下頷淋巴結、心臟、肝、腎、脾及肺。
器官重量	大腦、心臟、肝、腎、脾及肺
組織病理學	眼睛及視神經及任何剖檢病變
免疫染色	眼睛及視神經

BSS-PLUS®在按照標記給藥這天復原且冷藏儲存(2℃-8℃)以供在調配期間稀釋RPE細胞用，以及由外科醫生用於填充注射裝置及用作媒劑參考物。簡言之，將BSS PLUS®部分II之內含物轉移至BSS PLUS®部分I且在6小時復原內用於再懸浮RPE細胞。在研究記錄中記錄且維持復原及注射時間。

調配用於此研究之GS2培養基批次，且在2℃-8℃下儲存。GS2在室溫下用於在調配期間洗滌細胞，且在2℃-8℃下用於RPE細胞最終調配物，以及由外科醫生用於填充注射裝置及用作待注射之媒劑參考物。

BBS-Plus製劑：低溫保存之MA09-hRPE及J1-hRPE細胞儲存於液氮(LN2)中可以在≤135℃溫度下維持細胞處於氣相。細胞維持在LN2儲存中直

至處理及移植這天為止。在移植這天，低溫保存之hRPE經解凍且以約50,000個活細胞/微升在BSS-PLUS®中調配。將LabTop冷卻器中置放於濕冰上之最終填充管中的濃縮hRPE細胞遞送至外科醫生以在調配物之4小時內使用(圖11，參見「MA-09 RPE <4 h」及「J1 RPE < 4 h」)。在研究記錄中記錄且維持復原及注射時間。

GS2製劑：低溫保存之J1-hRPE以氣相儲存於 $\leq 135^{\circ}\text{C}$ 溫度下乾式液氮(LN2)中。細胞維持在LN2儲存中直至處理這天為止。在移植之前一天或兩天，J1-hRPE細胞經解凍且在GS2中以約1,500個活細胞/微升調配。經調配之RPE接著在 2°C - 8°C 下儲存且在調配後2-6小時之後評定活細胞數目。在調配後約20小時或42小時時，RPE細胞在GS2中濃縮至約50,000個活細胞/微升。將LabTop冷卻器中置放於濕冰上之最終填充管中的濃縮hRPE細胞遞送至外科醫生。RPE細胞在調配後約22小時或44小時之後移植於GS2中(圖11，分別參見「J1 RPE <22」及「J1 RPE < 44」)。

劑量投與：視網膜下注射

動物用氯胺酮(75 mg/kg)及右美托咪啉(dexmedetomidine) (0.25 mg/kg)之混合物麻醉，接著用卡洛芬(Carprofen) (5 mg/kg)經由SQ進行劑量投與。在給藥之前，眼睛利用0.9%氯化鈉沖洗以進行注射(無菌NaCl) USP。眼睛接著利用2滴0.3% Ocuflux眼用溶液USP進行清潔，且利用散瞳滴劑(1%托品醯胺(tropicamide))接著2.5%鹽酸苯腎上腺素眼科溶液USP進行擴張。測試項目，MA09及J1 hRPE細胞於BSS PLUS®中在調配物(第1組及第2組，表1)之0.25至4小時內進行注射。測試項目J1 hRPE細胞於GS2中係在調配物(第3組及第4組，表1)之22或44小時內。如以上實驗設計(及表1)所指示，針對各組之測試項目(接受MA09-hRPE細胞或J1-

hRPE細胞)藉由視網膜下注射投與至8隻動物之右眼/組。在第1組及第2組中之每一者中四隻動物之左眼投與參考項目BSSP LUS®。第3組及第4組中之每一者中四隻動物之左眼投與參考項目GS2。四組中之每一者中2隻動物之左眼經受注射程序，但將不注射材料(偽注射)。四組中之每一者中剩餘兩隻動物之左眼不接受注射(未經處理)。

簡言之，視網膜下注射使用手術顯微鏡進行。眼睛使用縫合線(Ethicon 4-0 Perma-Hand Silk)在眼球赤道後方使用環繞眼球之荷包口線圈穩定。羥丙甲纖維素(或類似物)溶液施加到眼睛且利用環在適當位置固持。剪刀用於切割掉結膜之較小區域，且施加30 G x ½"金屬針以在眼球之上部背側顳區域處進行虹膜切開術。將由以下組成之給藥裝置用如研究設計(表1)中所描述之合適媒劑預填充：經校準無菌玻璃移液管(World Precision Instruments，項目號1B150-4)，其連接至約0.8 mm內徑Tygon™塑膠導管(Saint-Gobain Performance Plastics編號R-3603)，其連接至18G鈍針(Becton-Dickenson, Inc.參考號305196)，其連接至25 µL Hamilton注射器(模型號702 LT目錄號804010)。將少量空氣引入至管線中以自給藥裝置中之媒劑分離注射液，其後將測試或參考項目吸入玻璃移液管至2 µL體積。將新的無菌玻璃移液管用於各注射/眼睛。

虹膜切開術用不可吸收性手術縫合線(Ethicon Prolene 10-0)縫合。移除環繞眼球之縫合線(Ethicon 4-0 Perma-Hand Silk®)，且眼瞼最終恢復至正常位置。局部抗生素(5 mg/g紅黴素(erythromycin)眼用軟膏)施加到所處理之眼睛，接著完成注射程序。

在手術期間，仔細的手術中眼底圖式記錄氣泡大小及位置以及任何其他眼部改變。

動物維持在溫熱板上或在加熱毛毯(約37°C)下直至完全恢復，其後返回其飼養籠中。0.5%紅黴素眼用軟膏之另外投與將在眼睛表面需要時塗覆以預防乾燥，直至動物完全蘇醒且可正常眨眼為止。

所有動物維持飲用水中投與經口環孢靈A (CsA) (210 g/L，導致約300 g/L目標血液濃度)。術後亦每天一次腹膜內注射地塞米松(dexamethasone)持續14天(1.6毫克/公斤/天)。

每天至少一次進行籠側觀測死亡/瀕死及臨床觀測。不存在要處理的疾病之臨床症狀或反應。動物在環境適應期間至少稱量一次及在研究期間約每週稱量及緊接著在屍體剖檢(最終體重)之前稱量。觀測到研究動物體重無例外的改變。眼睛檢查在給藥前、在給藥後約40天及在屍體剖檢之前再次進行。動物眼睛使用1%托品醯胺以1滴/眼睛形式滴注進行擴張以進行檢查。在各個RPE調配物組之間的眼科檢查未揭示明顯差異。同樣地，視動反應(OKR)使用移動的不同空間頻率之條帶進行，將按照表2中所描述時間量測所有動物之視動反應。視力藉由OKR在所有眼睛(實驗及對照)中量測。待使用之方法驗光測試裝置(Prusky等人，2000)由垂直正弦波光柵遮蓋之旋轉圓筒組成，其在以正方形配置之四個電腦監視器上的虛擬三維(3-D)位置中呈現。大鼠不受約束地置放於正方形中心平台上，其中其以反射性頭部動作跟蹤光柵。光柵之空間頻率藉由反覆地再中心調整測試個體之頭部上的『圓筒』來夾持在觀察位置處。視力藉由增加光柵之空間頻率使用心理物理學階梯進展定量直至視動反射損耗，由此獲得最大臨限值。量測以c/d (循環/程度)獲取。在各個RPE調配物組之間的OKR實驗未揭示明顯差異。亦如上進行頻域光學相干斷層攝影術(SD-OCT)，在各個RPE調配物組之間的眼科檢查未揭示明顯差異。大鼠經由IP注射麻醉劑麻

醉。托品醯胺施加到兩個眼睛以擴張瞳孔進行更好的視網膜成像。大鼠置放於成像系統中，施加Genteal及Systane之滴眼劑到角膜以保持角膜濕潤。

圖11展示處理後60天時一組16隻大鼠的視網膜電流圖(ERG)結果。如上，在各個RPE調配物組之間的ERG檢查未揭示明顯差異。簡言之，動物保持在完全的黑暗中隔夜(至少12小時)以達成適應黑暗狀態之視網膜。為了記錄ERG，動物用IP注射麻醉劑麻醉且置放於立體定位的頭部固持器中。在昏暗紅色照明下，記錄電極(兩個同軸電線環圈，金屬絲直徑50 μm ，附接至中性隱形眼鏡)置放於利用利多卡因(Lidocaine)預處理之動物眼睛上。一個後肢利用電動剪毛機剪除毛髮，且皮膚利用碘伏(betadyne)準備好，隨後插入套管(套管將嵌入後肢肌肉中持續程序之持續時間)。瞳孔利用托品醯胺擴張。開始記錄之前，另外1小時時段之暗適應用於在動物準備之後恢復適應。針對兩個眼睛(眼睛將按順序測試，左眼至右眼或右眼至左眼)的整個ERG記錄持續約20分鐘。眼睛利用全場燈光閃爍進行刺激。利用連接至電極之放大器記錄角膜電位。閃爍呈現利用電腦程式控制。以5-100刺激呈現對反應進行平均，取決於ERG強度，其可在患有進行性視網膜變性之動物中極低。

概言之，此等研究之結果指示當與懸浮小於4小時之BSS Plus培養基相比時，該4小時為將BSS-Plus用於RPE細胞注射的當前FDA及EMA批准之儲存期限，GS2輸送培養基提供約同樣有效劑量之有活力且功能性RPE細胞，甚至其在GS2輸送培養基中懸浮至多44小時之後。在各情況下，與BSS-Plus及GS2輸送培養基組中RPE細胞處理之眼睛相比，對照物動物之偽及未經處理之眼睛確實不展示任何改良。

等效物及範疇，其以引用之方式併入

熟習此項技術者最多使用常規實驗將識別或能夠確定本文中所述實施例之許多等效物。本發明之範疇不意欲限於以上描述，而是如所附申請專利範圍中所闡述。

除非上下文以其他方式清楚地指示，否則諸如「一(a/an)」及「該(the)」之冠詞包括單數及複數個參考物。因此，例如參考「藥劑」包括單一藥劑及複數個該等藥劑。

除非有相反指示，或以其他方式自上下文顯而易見，否則若存在一個、超過一個或所有組成員，則包括一組之兩個或更多個成員之間之「或」的申請專利範圍或描述視為符合的。包括兩個或更多個組成員之間之「或」的一組本發明提供其中存在該組之精確地一個成員的實施例、其中存在超過一個該組之成員的實施例及其中存在所有該組成員的實施例。出於簡潔之目的，彼等實施例在本文中尚未個別地拼寫出，但應理解此等實施例中之每一者均在本文中提供且可特定地主張或宣佈棄權。

應理解本發明涵蓋所有變化、組合及排列，其中來自申請專利範圍中之一或多者或來自描述之一或多個相關部分的一或多個限制、要素、條項或描述性項目引入至另一申請專利範圍中。舉例而言，依附於另一申請專利範圍之申請專利範圍可經修改以包括在依附於同一基本申請專利範圍之任何其他申請專利範圍中可見的一或多個限制。另外，當申請專利範圍列舉組合物時，應理解除非另有指示或除非對一般熟習此項技術者顯而易見將出現矛盾或不一致性，否則包括對應於本文揭示之製造或使用之任一方法或對應於此項技術中已知之方法(若存在)的製造或使用該組合物之方法。

當要素呈現為清單時，例如以馬庫西組格式(Markush group format)，應理解亦揭示要素之每一可能的子組，且要素之任何要素或子組可自該組移除。亦注意術語「包含」意欲為開放性的且准許包括另外的要素或步驟。應理解一般而言當實施例、產物或方法稱為包含特定要素、特徵或步驟時，同樣提供由或基本上由該等要素、特徵或步驟組成之實施例、產物或方法。出於簡潔之目的，彼等實施例在本文中尚未個別地拼寫出，但應理解此等實施例中之每一者均在本文中提供且可特定地主張或宣佈棄權。

當給出範圍時，包括端點。另外，應理解除非另外指示或另外自上下文及/或一般熟習此項技術者的理解顯而易見，否則表示為範圍之值可在一些實施例中採用所陳述範圍內之任何特定值，除非上下文另外明確規定，否則達到該範圍下限之單位的十分之一。出於簡潔之目的，在各範圍中之值在本文中尚未個別地拼寫出，但應理解此等值中之每一者本文提供且可特定地主張或宣佈棄權。應理解除非另外指示或另外自上下文及/或一般熟習此項技術者的理解顯而易見，否則表示為範圍之值可採用給定範圍內之任何子範圍，其中子範圍之端點表達至與該範圍下限之單位的十分之一相同的精確性程度。

另外，應理解本發明之任何特定實施例可明確自申請專利範圍中之任何一或多者排除。當範圍給定時，在範圍內之任何值可明確自申請專利範圍中之任何一或多者排除。組合物之任何實施例、要素、特徵、應用或態樣及/或本發明之方法可自任一個或更多個申請專利範圍排除。出於簡潔之目的，排除一或多個要素、特徵、目的或態樣之所有實施例不在本文中明確闡述。

在本文中例如在先前技術、發明內容、實施方式、實例及/或參考文獻部分中提及之所有公開案、專利、專利申請案、公開案及資料庫條目(例如序列資料庫條目)在此以全文引用之方式併入如同各個別公開案、專利、專利申請案、公開案及資料庫條目特定地且個別地以引用之方式併入本文中一般。在有衝突的情況下，以本申請案(包括本文中之任何定義)為準。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種用於細胞復原、儲存、輸送及/或向個體投與之溶液，該溶液包含：

- (a) 將該溶液維持在生理學pH下之緩衝劑，其中該緩衝劑係乙酸鹽緩衝劑及/或檸檬酸鹽緩衝劑；
- (b) 至少2 mM葡萄糖；
- (c) 將該溶液維持在生理滲透壓下之滲透活性劑；及
- (d) 二價陽離子源，其包含鈣源及/或鎂源；

其中，該溶液不包含二碳酸鹽緩衝劑或兩性離子有機緩衝劑，且進一步不包含麩胱甘肽或二硫化麩胱甘肽。

【請求項2】

一種用於細胞復原、儲存、輸送及/或向個體投與之溶液，其中該溶液包含氯化鈣、氯化鎂、檸檬酸鈉、氯化鈉、葡萄糖、氯化鉀及黏彈性聚合物於水溶液中，

其中，該溶液不包含二碳酸鹽緩衝劑或兩性離子有機緩衝劑，且進一步不包含麩胱甘肽或二硫化麩胱甘肽。

【請求項3】

如請求項1或2之溶液，其中該葡萄糖係以13-19 mM之濃度存在。

【請求項4】

如請求項1或2之溶液，其中該葡萄糖係以15-17 mM之濃度存在。

【請求項5】

如請求項1或2之溶液，其中該葡萄糖係右旋糖。

【請求項6】

如請求項1或2之溶液，其中該溶液係經熱滅菌。

【請求項7】

如請求項1或2之溶液，其中該溶液包含：

- (a) 0.5-0.9 mM CaCl_2 (氯化鈣)、0.2-0.4 mM MgCl_2 (氯化鎂)、1.6-2.4 mM KCl (氯化鉀)、0.8-1.2 mM 檸檬酸鈉、13-19 mM 右旋糖及116-174 mM NaCl ；或
- (b) 0.68-1.02% (w/v) NaCl (氯化鈉)、0.008-0.012% CaCl_2 二水合物(二水合氯化鈣)、0.012-0.018% (w/v) KCl (氯化鉀)、0.0048-0.0072% MgCl_2 六水合物(六水合氯化鎂)、0.028-0.042%二水合檸檬酸鈉及0.23-0.35%右旋糖；或
- (c) 0.1-1.2 mM CaCl_2 (氯化鈣)、0.05-5 mM MgCl_2 (氯化鎂)、1-2.5 mM KCl (氯化鉀)、0.5-2 mM 檸檬酸鈉、15-17 mM 右旋糖及約125-175 mM NaCl (氯化鈉)。

【請求項8】

一種製劑，其包含如請求項1至7中任一項之溶液以及視網膜色素上皮(RPE)細胞。

【請求項9】

一種製劑，其包含如請求項1至7中任一項之溶液以及感光細胞。

【請求項10】

一種製劑，其包含如請求項1至7中任一項之溶液以及間葉細胞。

【請求項11】

一種用於對復原細胞產物執行品質控制評定之方法，其包含：

將低溫保存之細胞群與如請求項1至7中任一項之溶液接觸，以形成復原細胞產物；以及

在向個體投與之前，對該復原細胞產物執行品質控制評定。

【請求項12】

一種用於對復原細胞產物執行品質控制評定之方法，其包含：

將低溫保存之細胞群與溶液接觸以形成復原細胞產物，其中該溶液包含：

- (a) 0.5-0.9 mM CaCl_2 (氯化鈣)、0.2-0.4 mM MgCl_2 (氯化鎂)、1.6-2.4 mM KCl (氯化鉀)、0.8-1.2 mM 檸檬酸鈉、13-19 mM 右旋糖及約116-174 mM NaCl (氯化鈉)；或
- (b) 0.68-1.02% (w/v) NaCl (氯化鈉)、0.008-0.012% CaCl_2 二水合物(二水合氯化鈣)、0.012-0.018% (w/v) KCl (氯化鉀)、0.0048-0.0072% MgCl_2 六水合物(六水合氯化鎂)、0.028-0.042%二水合檸檬酸鈉及0.23-0.35%右旋糖；或
- (c) 0.1-1.2 mM CaCl_2 (氯化鈣)、0.05-5 mM MgCl_2 (氯化鎂)、1-2.5 mM KCl (氯化鉀)、0.5-2 mM 檸檬酸鈉、15-17 mM 右旋糖及125-175 mM NaCl (氯化鈉)；以及

在向個體投與之前，對該復原細胞產物執行品質控制評定。

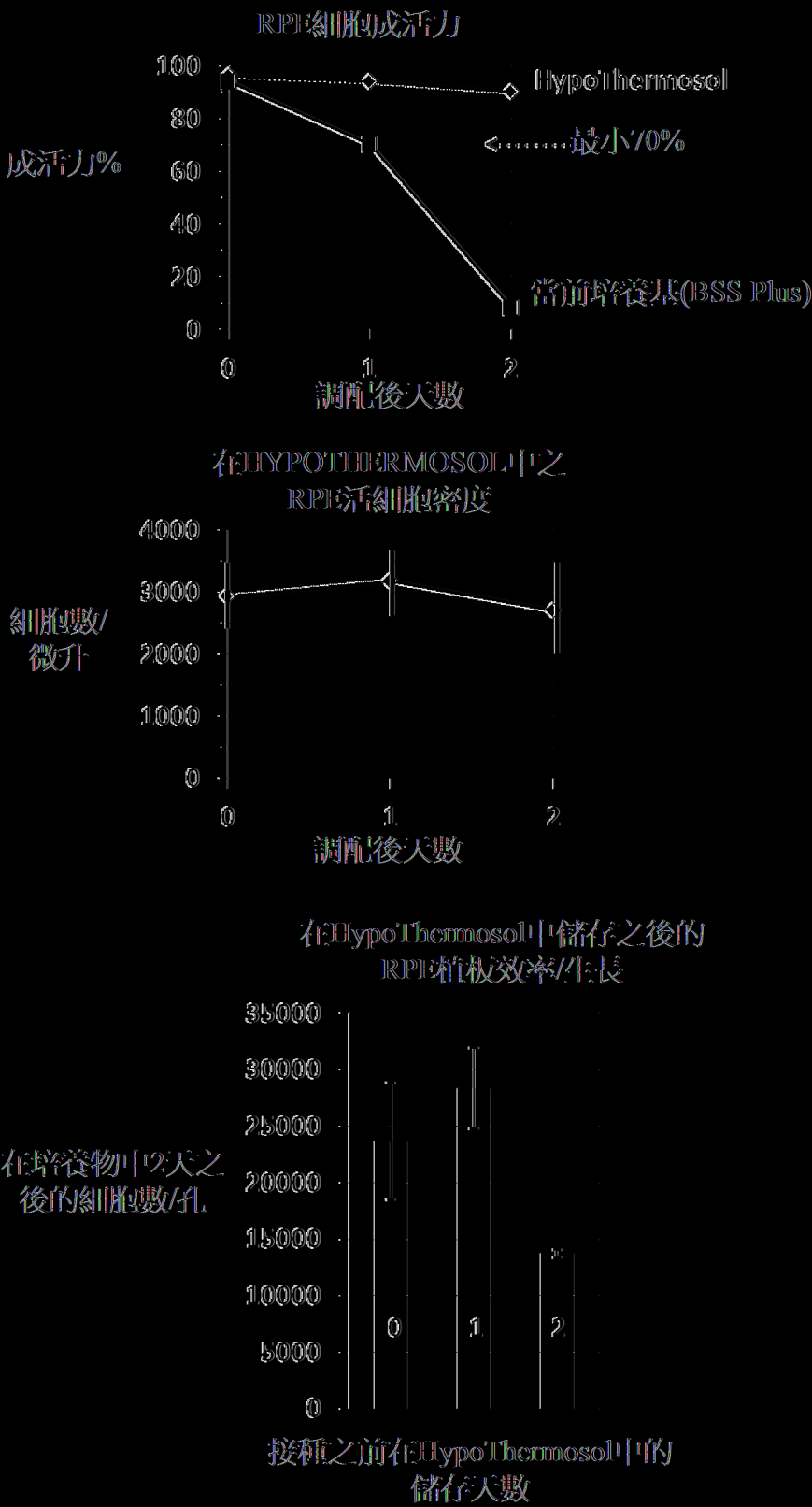
【請求項13】

如請求項11或12之方法，其中該品質控制評定包含測試病原污染物之存在。

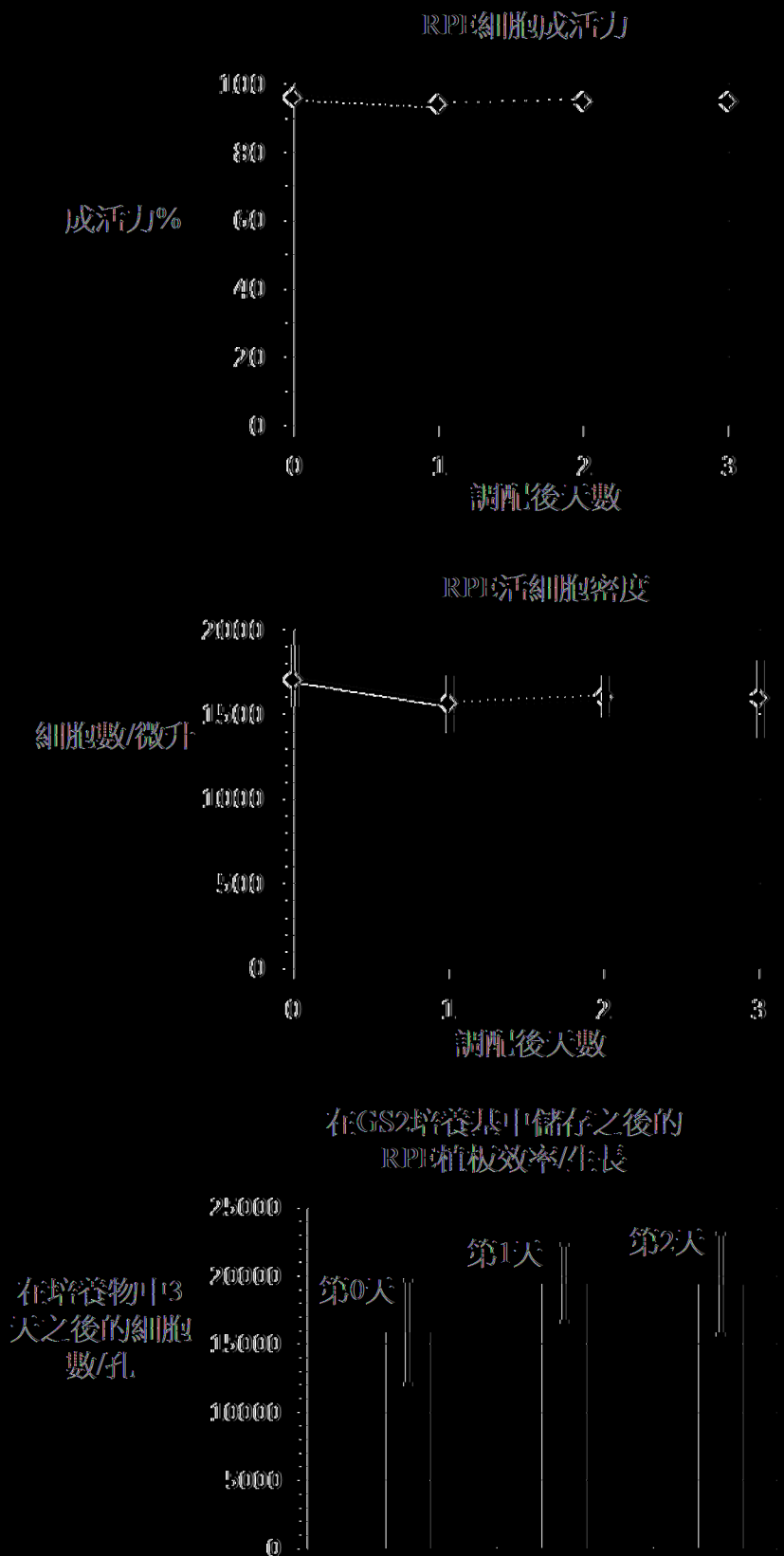
【請求項14】

如請求項11或12之方法，其中該細胞群係RPE細胞群。

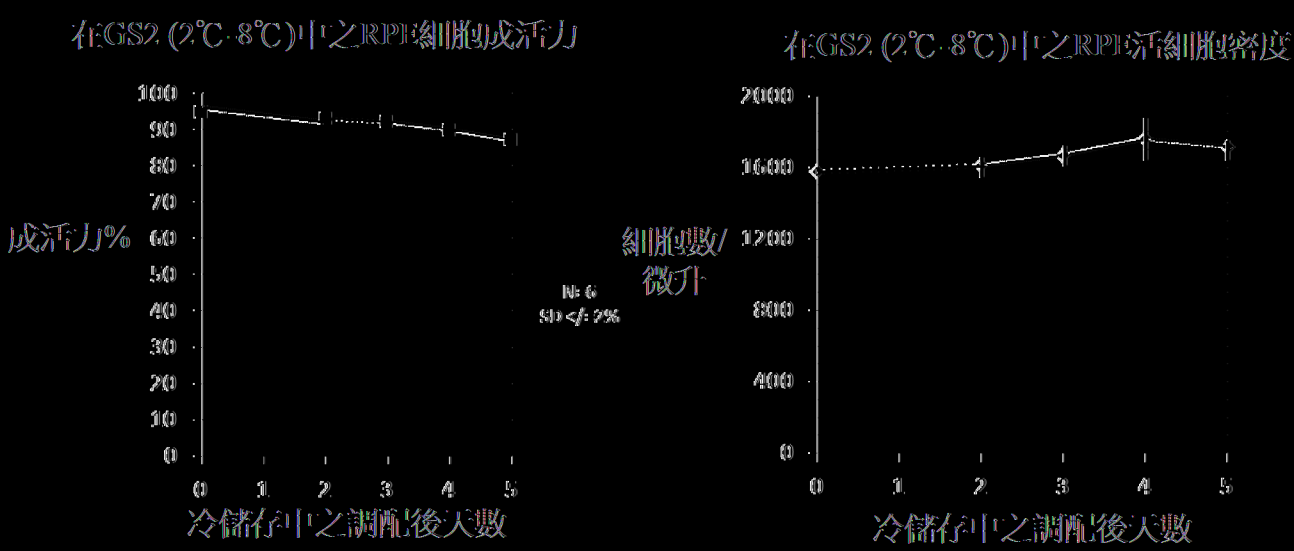
[(發明圖式)]



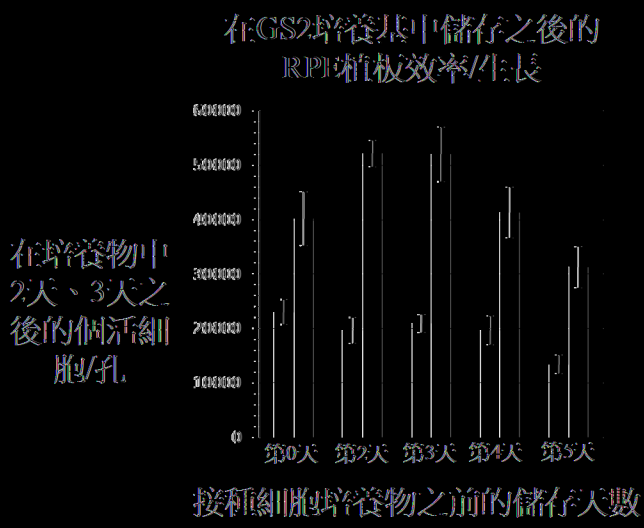
[(圖1)]



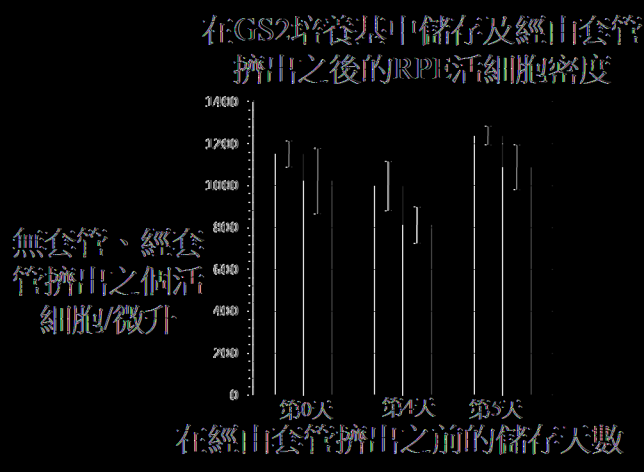
[(圖2)]



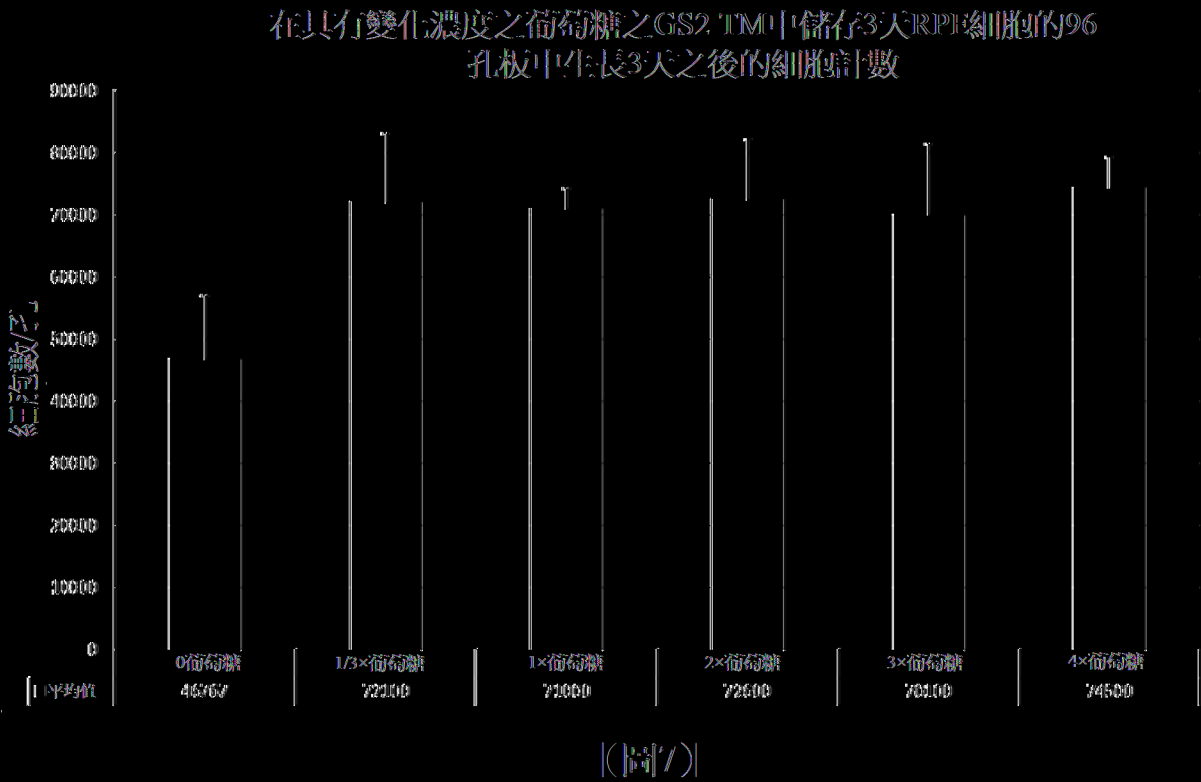
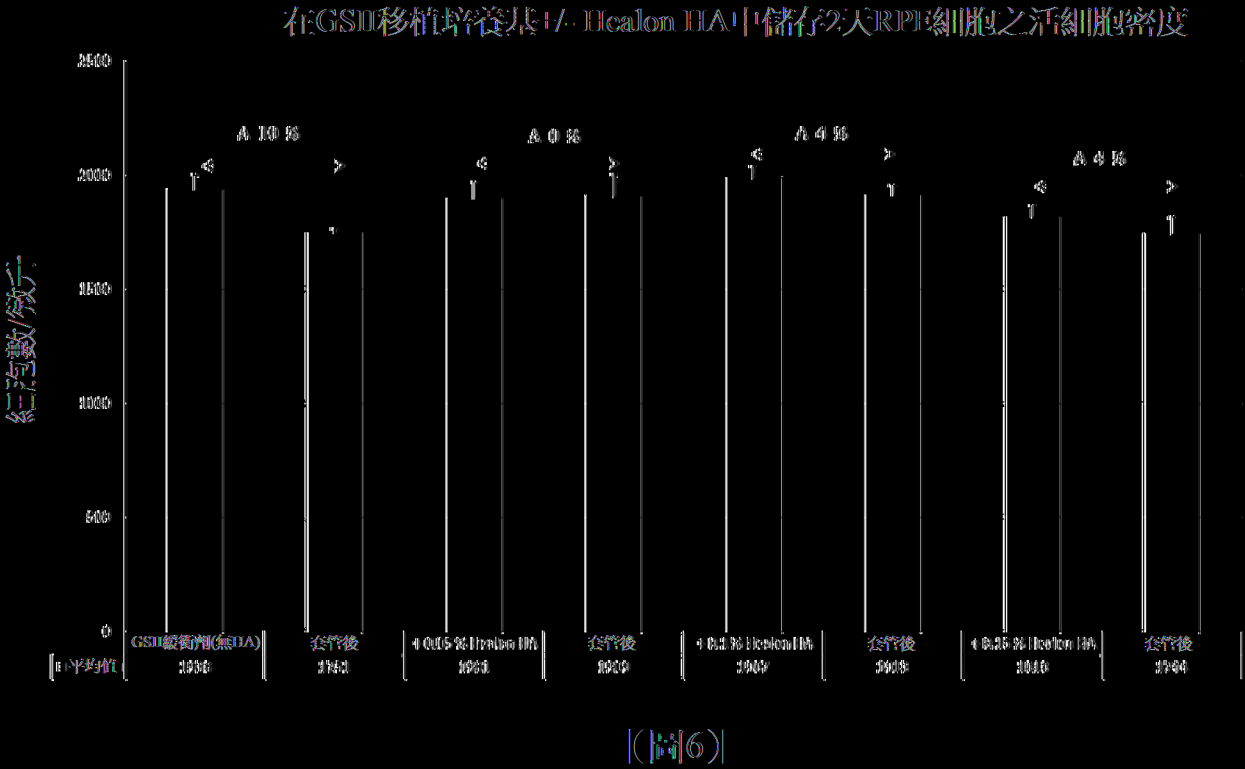
[(圖3)]

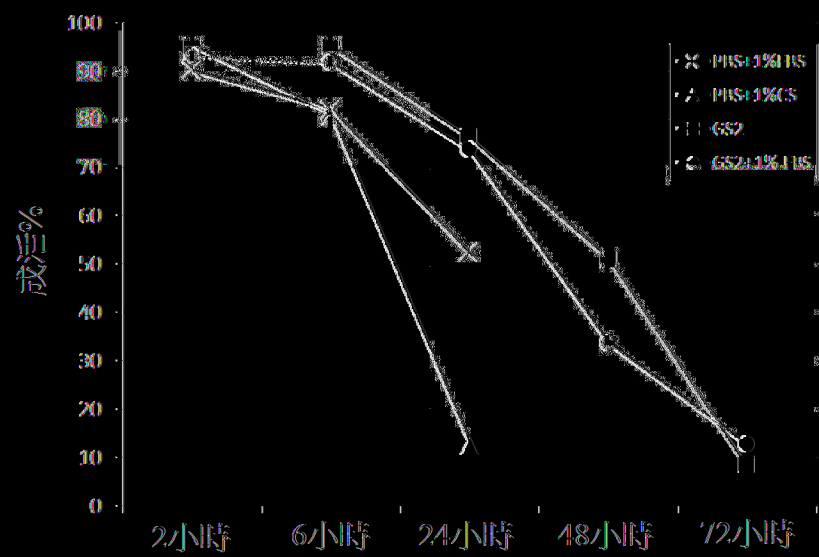


[(圖4)]

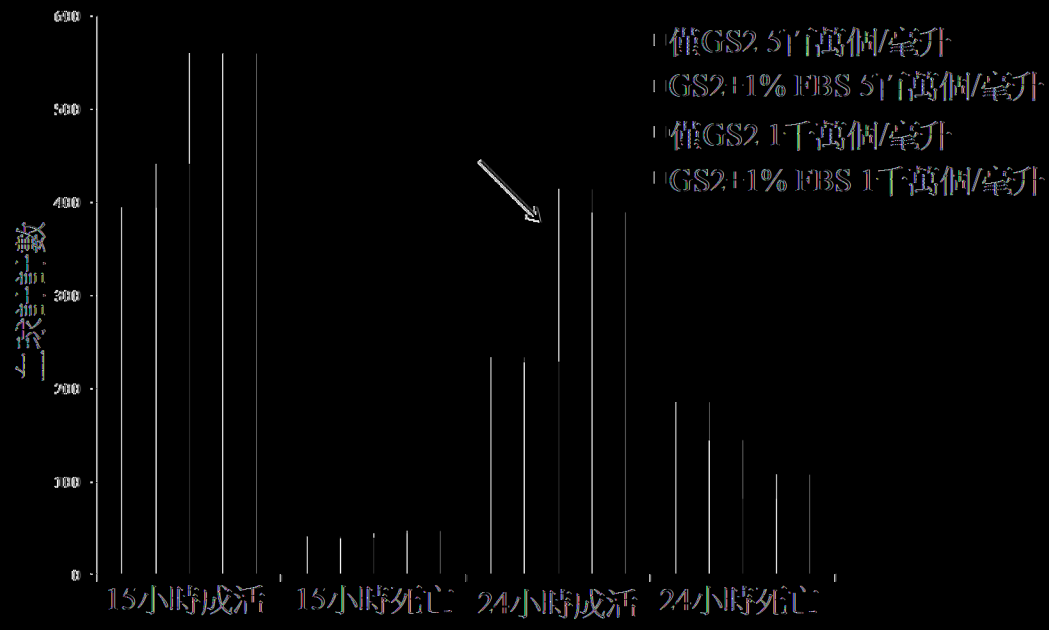


[(圖5)]

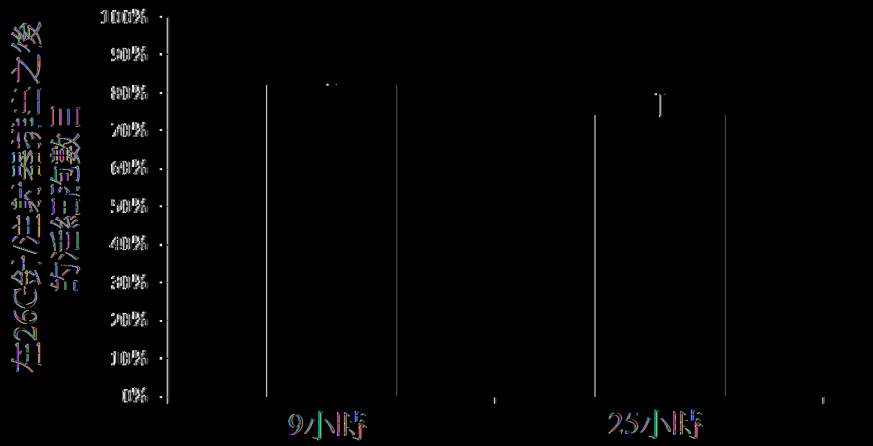




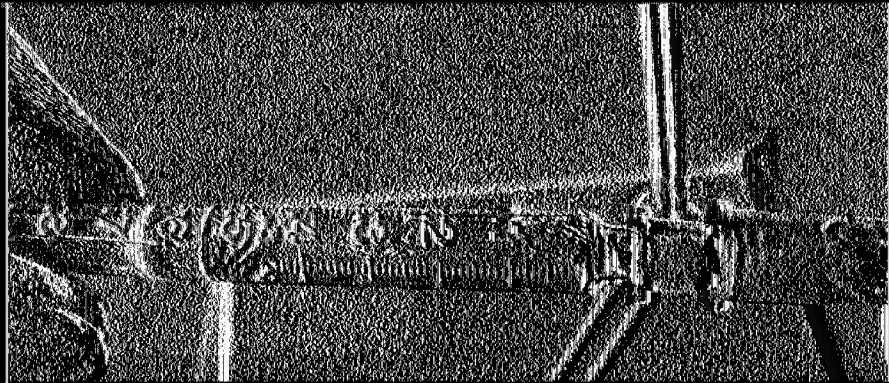
[(圖8)]



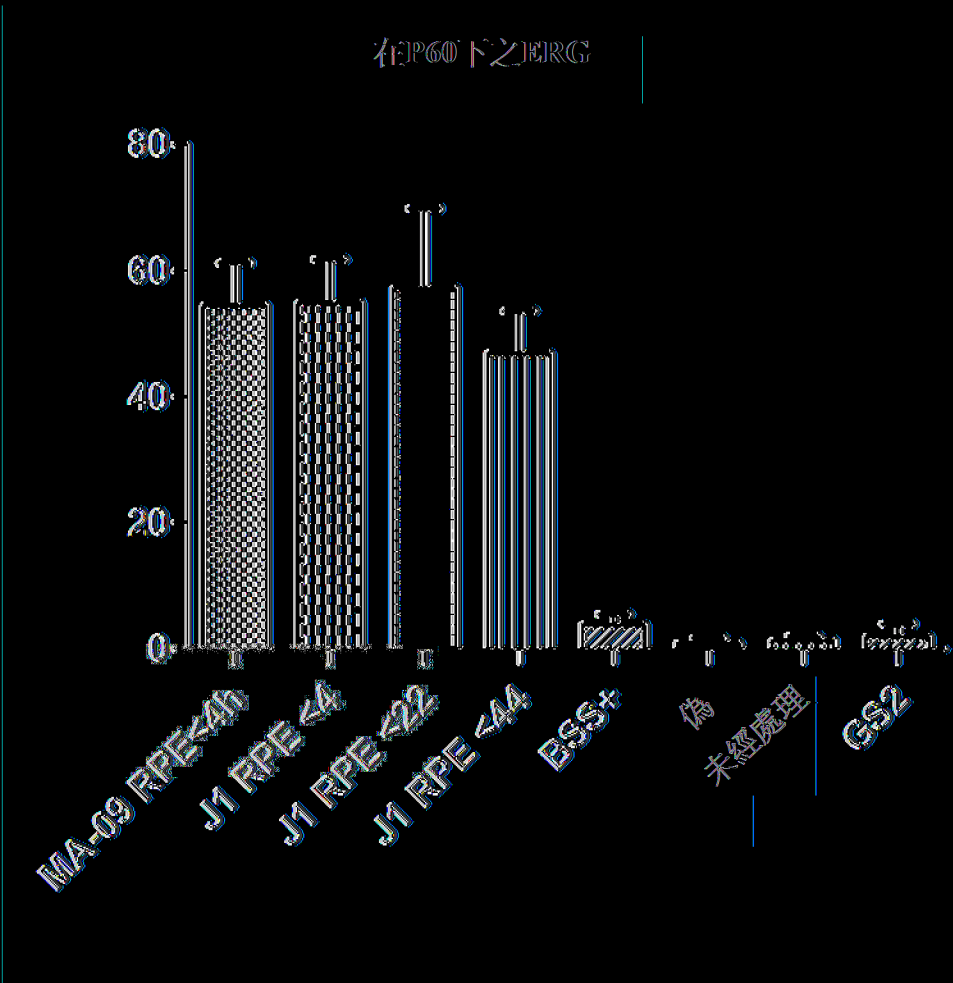
[(圖9)]



在0及25小時(25小時經針)之後注射器中殘留之MSC



[(圖10)]



(圖11)