



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I720984 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 03 月 11 日

(21)申請案號：105115893

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 05 月 20 日

(51)Int. Cl. : *A61K35/50 (2015.01)**A61P27/02 (2006.01)*

(30)優先權：2015/05/20 美國

62/164,281

(71)申請人：美商帝聖工業公司 (美國) TISSUETECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：曾 薛佛 TSENG, SCHEFFER (US) ; 譚 伊克 奇亞 TAN, EK KIA (US) ; 何 華 HE, HUA (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN 104619352A

審查人員：蔡明秀

申請專利範圍項數：6 項 圖式數：22 共 122 頁

(54)名稱

用於防止上皮細胞增生及上皮-間質轉移之組合物及方法

(57)摘要

本發明提供防止或減少上皮細胞增生及上皮-間質轉移(EMT)之組合物及胎兒支持組織製劑，其中該等上皮細胞可為人類上皮細胞且該等人類上皮細胞可為結膜、視網膜、角膜、角膜緣或腎上皮細胞。本發明提供防止或減少有需要之個體中之上皮細胞增生、細胞遷移及 EMT 的方法，其中該等上皮細胞可為人類上皮細胞且該等人類上皮細胞可為結膜、視網膜、角膜、角膜緣或腎上皮細胞。本發明提供預防或治療有需要之個體中之增生性玻璃體視網膜病變的方法。

Compositions and preparations of fetal support tissue that prevent or reduce the proliferation and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of epithelial cells, wherein the epithelial cells may be human epithelial cells and the human epithelial cells may be conjunctival, retinal, corneal, limbal, or renal epithelial cells. Methods of preventing or reducing the proliferation, cell migration, and EMT of epithelial cells in an individual in need thereof, wherein the epithelial cells may be human epithelial cells and the human epithelial cells may be conjunctival, retinal, corneal, limbal, or renal epithelial cells. Methods of preventing or treating proliferative vitreoretinopathy in an individual in need thereof.

指定代表圖：

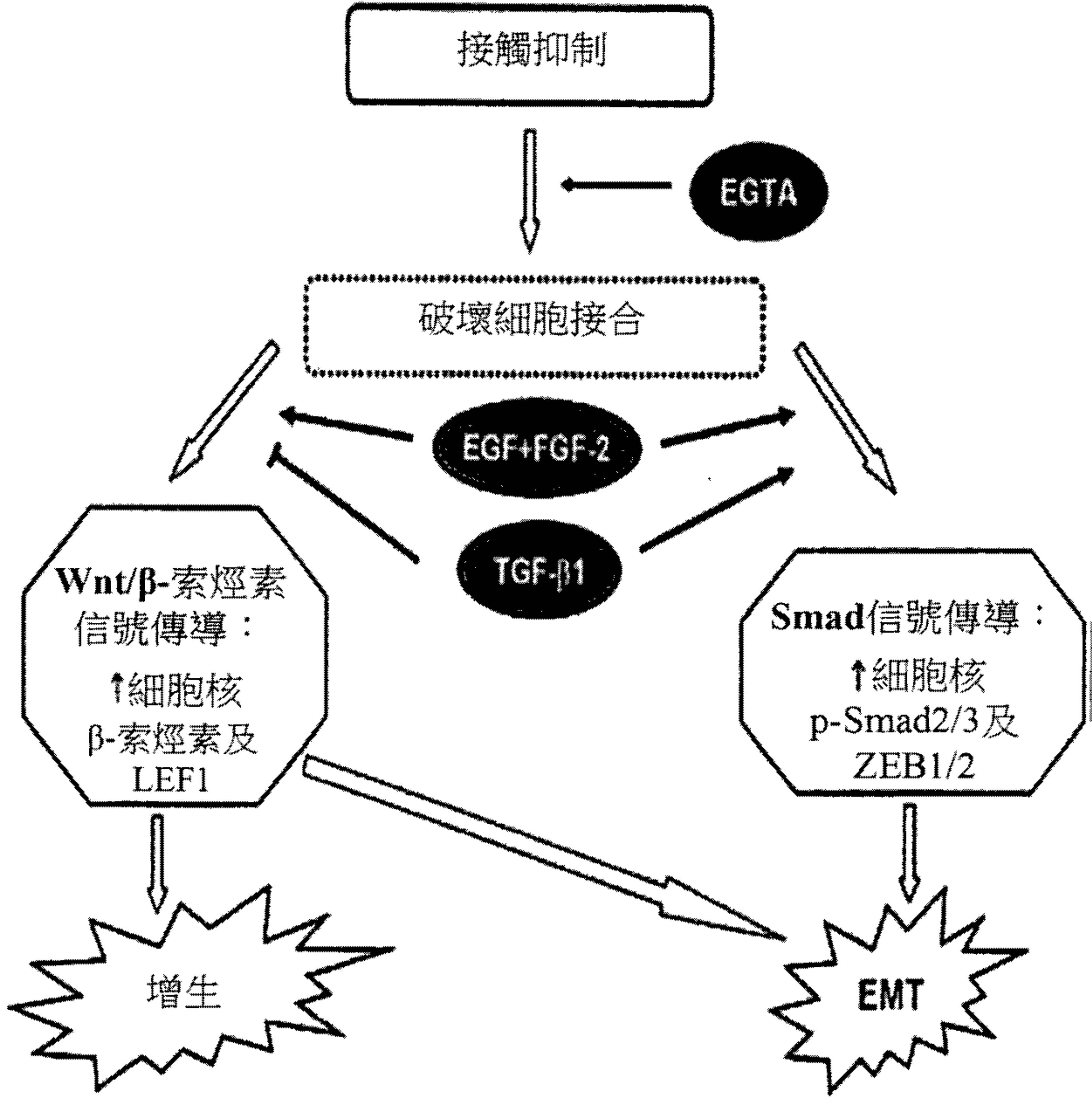


圖 1

I720984

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】

用於防止上皮細胞增生及上皮-間質轉移之組合物及方法
COMPOSITIONS AND METHODS FOR PREVENTING THE
PROLIFERATION AND EPITHELIAL-MESENCHYMAL
TRANSITION OF EPITHELIAL CELLS

【中文】

本發明提供防止或減少上皮細胞增生及上皮-間質轉移(EMT)之組合物及胎兒支持組織製劑，其中該等上皮細胞可為人類上皮細胞且該等人類上皮細胞可為結膜、視網膜、角膜、角膜緣或腎上皮細胞。本發明提供防止或減少有需要之個體中之上皮細胞增生、細胞遷移及EMT的方法，其中該等上皮細胞可為人類上皮細胞且該等人類上皮細胞可為結膜、視網膜、角膜、角膜緣或腎上皮細胞。本發明提供預防或治療有需要之個體中之增生性玻璃體視網膜病變的方法。

【英文】

Compositions and preparations of fetal support tissue that prevent or reduce the proliferation and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of epithelial cells, wherein the epithelial cells may be human epithelial cells and the human epithelial cells may be conjunctival, retinal, corneal, limbal, or renal epithelial cells. Methods of preventing or reducing the proliferation, cell migration, and EMT of epithelial cells in an individual in need thereof, wherein the epithelial cells may be human epithelial cells and the human epithelial cells may be conjunctival, retinal, corneal, limbal, or renal epithelial cells. Methods of preventing or treating proliferative vitreoretinopathy in an individual in need thereof.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

用於防止上皮細胞增生及上皮-間質轉移之組合物及方法
COMPOSITIONS AND METHODS FOR PREVENTING THE
PROLIFERATION AND EPITHELIAL-MESENCHYMAL
TRANSITION OF EPITHELIAL CELLS

交叉參考

本申請案主張2015年5月20日申請之美國臨時申請案第62/164,281號之權益及優先權，該案以全文引用之方式併入本文中。

【發明內容】

在某些實施例中，本文揭示用於防止或減少有需要之個體中之上皮細胞增生、細胞遷移或上皮-間質轉移(EMT)的方法，其包含：向該個體投與治療有效量之組合物，該組合物包含：(a)胎兒支持組織製劑；及(b)醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑，藉此防止或減少上皮細胞增生、細胞遷移或EMT，其中上皮細胞不為視網膜色素上皮細胞。在一些實施例中，EMT係與除增生性玻璃體視網膜病變(PVR)以外之疾病或病症相關。在一些實施例中，EMT係與選自以下之疾病或病症相關：癌症、增生性糖尿病性視網膜病變、纖維性病變及角膜後膜。在一些實施例中，胎兒支持組織係選自由以下組成之群：胎盤、胎盤羊膜、臍帶、臍帶羊膜、絨毛膜、羊膜-絨毛膜、羊膜基質、羊膜膠凍、羊水及其組合。在一些實施例中，將胎兒支持組織冷凍或事先冷凍。在一些實施例中，上皮細胞係選自結膜上皮細胞、角膜上皮細胞、角膜緣上皮細胞及腎上皮細胞。在一些實施例中，上皮細胞為人類上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為視

網膜色素上皮細胞(RPE)。在一些實施例中，人類上皮細胞為結膜上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為角膜上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為角膜緣上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為腎上皮細胞。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑為胎兒支持組織之萃取物、均質物、粉末、切碎(morselized)之胎兒支持組織、粉碎之胎兒支持組織、經研磨胎兒支持組織、經純化HC-HA/PTX3或其組合。在一些實施例中，組合物為凝膠、溶液或懸浮液。在一些實施例中，組合物呈可注射形式。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含基本上經分離之HC-HA/PTX3。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑由基本上經分離之HC-HA/PTX3組成。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含復原HC-HA/PTX3。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含高分子量透明質酸(HA)，其藉由共價鍵與間 α -胰蛋白酶抑制劑(I α I)之重鏈交聯，高分子量HA之分子量大於1000 kDa。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含正五聚素蛋白3 (PTX-3)。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含腫瘤壞死因子刺激基因6蛋白(TSG-6)。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含凝血栓蛋白-1 (TSP-1)。在一些實施例中，組合物中之總蛋白質與HA之比在500份蛋白質:1份HA及500份HA:1份蛋白質之間。在一些實施例中，組合物藉由抵消生長因子及細胞因子之作用來防止上皮細胞增生及EMT。在一些實施例中，生長因子及細胞因子係選自由以下組成之群：EGF、FGF-2、PDGF-A、PDGF-AB、PDGF-B、PDGF-C、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、CTGF、HGF、IGF-1、G-CSF、IL-6、MCP-1、TNF- α 、VEGF及IFN- γ 。在一些實施例中，組合物進一步包含水性佐劑。在一些實施例中，組合物用於局部投與。在一些實施例中，組合物經調配用於注射。在一些實施例中，組合物經調配用於眼內注射、視網膜下注射、玻璃體內注射、眼周注射、結膜下注射、眼球後注

射、前房內注射或眼球筋膜下注射(sub-Tenon's injection)。

在某些實施例中，本文揭示治療或預防有需要之個體中之增生性玻璃體視網膜病變(PVR)之方法，其包含向該個體投與治療有效量之主要由以下組成之可注射組合物：(a)基本上經分離之HC-HA/PTX3、復原HC-HA/PTX3或其組合；及(b)醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑，藉此治療或預防PVR。在一些實施例中，組合物由以下組成：(a)基本上經分離之HC-HA/PTX3、復原HC-HA/PTX3或其組合；及(b)醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑。在一些實施例中，組合物由復原HC-HA/PTX3及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑組成。在一些實施例中，組合物由基本上經分離之HC-HA/PTX3及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑組成。在一些實施例中，基本上經分離之HC-HA/PTX3自選自由以下組成之群的胎兒支持組織分離：胎盤、胎盤羊膜、臍帶、臍帶羊膜、絨毛膜、羊膜-絨毛膜、羊膜基質、羊膜膠凍、羊水及其組合。在一些實施例中，將胎兒支持組織冷凍或事先冷凍。在一些實施例中，胎兒支持組織為人類、非人類靈長類動物、牛或豬。在一些實施例中，胎兒支持組織為人類。在一些實施例中，基本上經分離之HC-HA/PTX3藉由超速離心自胎兒支持組織分離。在一些實施例中，治療有效量對於防止或減少上皮細胞增生、細胞遷移或EMT有效。在一些實施例中，上皮細胞為視網膜色素上皮細胞(RPE)。在一些實施例中，上皮細胞為人類上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為視網膜上皮細胞。在一些實施例中，可注射組合物為凝膠、溶液或懸浮液。在一些實施例中，組合物包含高分子量透明質酸(HA)，其藉由共價鍵與間 α -胰蛋白酶抑制劑(I α I)之重鏈交聯，高分子量HA之分子量大於1000 kDa。在一些實施例中，組合物包含正五聚素蛋白3 (PTX-3)。在一些實施例中，組合物包含腫瘤壞死因

子刺激基因6蛋白(TSG-6)。在一些實施例中，可注射組合物中之總蛋白質與HA之比在500份蛋白質:1份HA及500份HA:1份蛋白質之間。在一些實施例中，可注射組合物藉由抑制或遏制一或多種生長因子或細胞因子之活性來防止上皮細胞增生及EMT。在一些實施例中，生長因子及細胞因子係選自由以下組成之群：EGF、FGF-2、PDGF-A、PDGF-AB、PDGF-B、PDGF-C、TGF β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、CTGF、HGF、IGF-1、G-CSF、IL-6、MCP-1、TNF- α 、VEGF及IFN- γ 。在一些實施例中，可注射組合物進一步包含水性佐劑。在一些實施例中，可注射組合物用於局部投與。在一些實施例中，可注射組合物經調配用於眼內注射、視網膜下注射、玻璃體內注射、眼周注射、結膜下注射、眼球後注射、前房內注射或眼球筋膜下注射。在一些實施例中，組合物經調配用於玻璃體內注射。

在某些實施例中，本文揭示治療或預防有需要之個體中之增生性玻璃體視網膜病變(PVR)之方法，其包含向該個體投與治療有效量之主要由以下組成之可注射組合物：(a)基本上經分離之HC-HA/PTX3、復原HC-HA/PTX3或其組合；(b)額外治療劑；及(c)醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑，藉此治療或預防PVR。在一些實施例中，組合物由以下組成：(a)基本上經分離之HC-HA/PTX3、復原HC-HA/PTX3或其組合；(b)額外治療劑；及(c)醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑。在一些實施例中，額外治療劑為用於治療PVR之額外藥劑。在一些實施例中，額外治療劑係選自由以下組成之群：口服異維A酸、玻璃體內曲安奈德、蘭尼單抗、貝伐單抗、達沙替尼、派加替尼鈉、N-乙醯基-半胱胺酸(NAC)、吡格列酮、葡糖胺、染料木苷、格爾德黴素(geldanamycin)、福斯迪爾(fausdil)、白藜蘆醇、肝細胞生長因子(HGF)、BMP-7、LY-364947、薯蓣皂苷配基、大黃素、己酮可可鹼(pentoxifylline)、雙嘧

達莫、過氧化體增殖性活化受體 γ (PPAR γ)促效劑、雌性性激素及抗氧化劑。在一些實施例中，雌性性激素包含雌二醇或孕酮。在一些實施例中，抗氧化劑包含 β 胡蘿蔔素、維生素C、維生素E、葉黃素、玉米黃素及 ω -3脂肪酸。在一些實施例中，額外治療劑為用於治療發炎之額外藥劑。在一些實施例中，組合物由以下組成：(a)基本上經分離之HC-HA/PTX3、復原HC-HA/PTX3或其組合；(b)額外治療劑；及(c)醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑。在一些實施例中，組合物由復原HC-HA/PTX3、額外治療劑及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑組成。在一些實施例中，組合物由基本上經分離之HC-HA/PTX3、額外治療劑及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑組成。在一些實施例中，基本上經分離之HC-HA/PTX3自選自由以下組成之群的胎兒支持組織分離：胎盤、胎盤羊膜、臍帶、臍帶羊膜、絨毛膜、羊膜-絨毛膜、羊膜基質、羊膜膠凍、羊水及其組合。在一些實施例中，將胎兒支持組織冷凍或事先冷凍。在一些實施例中，胎兒支持組織為人類、非人類靈長類動物、牛或豬。在一些實施例中，胎兒支持組織為人類。在一些實施例中，基本上經分離之HC-HA/PTX3藉由超速離心自胎兒支持組織分離。在一些實施例中，組合物進一步包含額外治療劑。在一些實施例中，治療有效量對於防止或減少上皮細胞增生、細胞遷移或EMT有效。在一些實施例中，上皮細胞為視網膜色素上皮細胞(RPE)。在一些實施例中，上皮細胞為人類上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為視網膜上皮細胞。在一些實施例中，可注射組合物為凝膠、溶液或懸浮液。在一些實施例中，組合物包含高分子量透明質酸(HA)，其藉由共價鍵與間 α -胰蛋白酶抑制劑(I α I)-之重鏈交聯，高分子量HA之分子量大於1000 kDa。在一些實施例中，組合物包含正五聚素蛋白3 (PTX-3)。在一些實施例中，組合物包含腫瘤壞死因子刺激基因6蛋白(TSG-

6)。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含凝血栓蛋白-1 (TSP-1)。在一些實施例中，可注射組合物中之總蛋白質與HA之比在500份蛋白質:1份HA及500份HA:1份蛋白質之間。在一些實施例中，可注射組合物藉由抑制或遏制一或多種生長因子或細胞因子之活性來防止上皮細胞增生及EMT。在一些實施例中，生長因子及細胞因子係選自由以下組成之群：EGF、FGF-2、PDGF-A、PDGF-AB、PDGF-B、PDGF-C、TGF β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、CTGF、HGF、IGF-1、G-CSF、IL-6、MCP-1、TNF- α 、VEGF及IFN- γ 。在一些實施例中，可注射組合物進一步包含水性佐劑。在一些實施例中，可注射組合物用於局部投與。在一些實施例中，可注射組合物經調配用於眼內注射、視網膜下注射、玻璃體內注射、眼周注射、結膜下注射、眼球後注射、前房內注射或眼球筋膜下注射。在一些實施例中，組合物經調配用於玻璃體內注射。

在某些實施例中，本文揭示治療或預防有需要之個體中之增生性玻璃體視網膜病變(PVR)的方法，其包含向該個體投與治療有效量之包含以下之可注射組合物：胎兒支持組織製劑，其包含HC-HA/PTX3及胎兒支持組織之至少一種其他組分；及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑，藉此治療或預防PVR。在一些實施例中，胎兒支持組織為胎盤、胎盤羊膜、臍帶、臍帶羊膜、絨毛膜、羊膜-絨毛膜、羊膜基質、羊膜膠凍、羊水或其組合。在一些實施例中，將胎兒支持組織冷凍或事先冷凍。在一些實施例中，胎兒支持組織為人類、非人類靈長類動物、牛或豬。在一些實施例中，胎兒支持組織為人類。在一些實施例中，治療有效量為對於防止或減少上皮細胞增生、細胞遷移或EMT有效之量。在一些實施例中，上皮細胞為視網膜色素上皮(RPE)細胞。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑為胎兒支持組織之萃取物、微米尺寸化胎兒支持組織、均質物、粉末、切

碎之胎兒支持組織、粉碎之胎兒支持組織、經研磨胎兒支持組織、經純化HC-HA/PTX3或其組合。在一些實施例中，組合物為凝膠、溶液或懸浮液。在一些實施例中，組合物經調配用於眼內注射、視網膜下注射、玻璃體內注射、眼周注射、結膜下注射、眼球後注射、前房內注射或眼球筋膜下注射。

在某些實施例中，本文揭示用於防止或減少上皮細胞增生、細胞遷移及/或上皮-間質轉移(EMT)之組合物，其包含：(a)胎兒支持組織製劑；及(b)醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑，其中上皮細胞不為視網膜色素上皮細胞。在一些實施例中，EMT係與除增生性玻璃體視網膜病變以外之疾病或病症相關。在一些實施例中，EMT係與選自以下之疾病或病症相關：癌症、增生性糖尿病性視網膜病變、纖維性病變及角膜後膜。在一些實施例中，胎兒支持組織係選自由以下組成之群：胎盤、胎盤羊膜、臍帶、臍帶羊膜、絨毛膜、羊膜-絨毛膜、羊膜基質、羊膜膠凍、羊水及其組合。在一些實施例中，將胎兒支持組織冷凍或事先冷凍。在一些實施例中，胎兒支持組織為人類、非人類靈長類動物、牛或豬。在一些實施例中，胎兒支持組織為人類。在一些實施例中，組合物呈對於防止或減少上皮細胞增生、細胞遷移或EMT治療有效之量。在一些實施例中，上皮細胞係選自結膜上皮細胞、角膜上皮細胞、角膜緣上皮細胞及腎上皮細胞。在一些實施例中，上皮細胞為人類上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為視網膜色素上皮細胞(RPE)。在一些實施例中，人類上皮細胞為結膜上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為角膜上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為角膜緣上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為腎上皮細胞。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑為胎兒支持組織之萃取物、微米尺寸化胎兒支持組織、均質物、粉末、切碎之胎兒支持組織、粉碎之胎兒支持組織、經研磨胎兒支持

組織或經純化HC-HA/PTX3。在一些實施例中，組合物為凝膠、溶液或懸浮液。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含HC-HA/PTX3。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含基本上經分離之HC-HA/PTX3。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑由基本上經分離之HC-HA/PTX3組成。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含復原HC-HA/PTX3。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含高分子量透明質酸(HA)，其藉由共價鍵與間 α -胰蛋白酶抑制劑(I α I)-之重鏈交聯，高分子量HA之分子量大於1000 kDa。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含正五聚素蛋白3 (PTX-3)。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含腫瘤壞死因子刺激基因6蛋白(TSG-6)。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含凝血栓蛋白-1 (TSP-1)。在一些實施例中，可注射組合物中之總蛋白質與HA之比在500份蛋白質:1份HA及500份HA:1份蛋白質之間。在一些實施例中，可注射組合物藉由抑制生長因子及細胞因子之作用來防止上皮細胞增生及EMT。在一些實施例中，生長因子及細胞因子係選自由以下組成之群：EGF、FGF-2、PDGF-A、PDGF-AB、PDGF-B、PDGF-C、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、CTGF、HGF、IGF-1、G-CSF、IL-6、MCP-1、TNF- α 、VEGF及IFN- γ 。在一些實施例中，可注射組合物進一步包含水性佐劑。在一些實施例中，可注射組合物用於局部投與。在一些實施例中，組合物經調配用於注射。在一些實施例中，可注射組合物經調配用於眼內注射、視網膜下注射、玻璃體內注射、眼周注射、結膜下注射、眼球後注射、前房內注射或眼球筋膜下注射。

在某些實施例中，本文揭示用於治療或預防增生性玻璃體視網膜病變(PVR)之可注射組合物，其包含：(a)基本上經分離之HC-HA/PTX3、復原HC-HA/PTX3或其組合；及(b)醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑。在一些實施例中，組合物由以下組成：

(a)基本上經分離之HC-HA/PTX3、復原HC-HA/PTX3或其組合；及(b)醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑。在一些實施例中，組合物由復原HC-HA/PTX3及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑組成。在一些實施例中，組合物由基本上經分離之HC-HA/PTX3及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑組成。在一些實施例中，基本上經分離之HC-HA/PTX3自選自由以下組成之群的胎兒支持組織分離：胎盤、胎盤羊膜、臍帶、臍帶羊膜、絨毛膜、羊膜-絨毛膜、羊膜基質、羊膜膠凍、羊水及其組合。在一些實施例中，將胎兒支持組織冷凍或事先冷凍。在一些實施例中，胎兒支持組織為人類、非人類靈長類動物、牛或豬。在一些實施例中，胎兒支持組織為人類。在一些實施例中，基本上經分離之HC-HA/PTX3藉由超速離心自胎兒支持組織分離。在一些實施例中，可注射組合物呈對於防止或減少上皮細胞增生、細胞遷移或EMT治療有效之量。在一些實施例中，上皮細胞為視網膜色素上皮細胞(RPE)。在一些實施例中，上皮細胞為人類上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為視網膜上皮細胞。在一些實施例中，可注射組合物為凝膠、溶液或懸浮液。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含高分子量透明質酸(HA)，其藉由共價鍵與間 α -胰蛋白酶抑制劑(I α I)之重鏈交聯，高分子量HA之分子量大於1000 kDa。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含正五聚素蛋白3 (PTX-3)。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含腫瘤壞死因子刺激基因6蛋白(TSG-6)。在一些實施例中，可注射組合物中之總蛋白質與HA之比在500份蛋白質:1份HA及500份HA:1份蛋白質之間。在一些實施例中，可注射組合物藉由抑制或遏制生長因子及/或細胞因子之活性來防止上皮細胞增生及EMT。在一些實施例中，生長因子及細胞因子係選自由以下組成之群：EGF、FGF-2、PDGF-A、PDGF-AB、PDGF-B、PDGF-C、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、

CTGF、HGF、IGF-1、G-CSF、IL-6、MCP-1、TNF- α 、VEGF及IFN- γ 。在一些實施例中，可注射組合物進一步包含水性佐劑。在一些實施例中，可注射組合物用於局部投與。在一些實施例中，可注射組合物經調配用於眼內注射、視網膜下注射、玻璃體內注射、眼周注射、結膜下注射、眼球後注射、前房內注射或眼球筋膜下注射。

在某些實施例中，本文揭示用於治療或預防增生性玻璃體視網膜病變(PVR)之可注射組合物，其主要由以下組成：(a)基本上經分離之HC-HA/PTX3、復原HC-HA/PTX3或其組合；(b)額外治療劑；及(c)醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑。在一些實施例中，組合物由以下組成：(a)基本上經分離之HC-HA/PTX3、復原HC-HA/PTX3或其組合；(b)額外治療劑；及(c)醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑。在一些實施例中，組合物由復原HC-HA/PTX3、額外治療劑及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑組成。在一些實施例中，組合物由基本上經分離之HC-HA/PTX3、額外治療劑及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑組成。在一些實施例中，基本上經分離之HC-HA/PTX3自選自由以下組成之群的胎兒支持組織分離：胎盤、胎盤羊膜、臍帶、臍帶羊膜、絨毛膜、羊膜-絨毛膜、羊膜基質、羊膜膠凍、羊水及其組合。在一些實施例中，將胎兒支持組織冷凍或事先冷凍。在一些實施例中，胎兒支持組織為人類、非人類靈長類動物、牛或豬。在一些實施例中，胎兒支持組織為人類。在一些實施例中，基本上經分離之HC-HA/PTX3藉由超速離心自胎兒支持組織分離。在一些實施例中，額外治療劑係選自由以下組成之群：口服異維A酸、玻璃體內曲安奈德、蘭尼單抗、貝伐單抗、達沙替尼、派加替尼鈉、N-乙醯基-半胱胺酸(NAC)、吡格列酮、葡糖胺、染料木苷、格爾德黴素、福斯迪爾、白藜蘆醇、肝細胞生長因子(HGF)、BMP-7、LY-364947、薯蓣皂苷配

基、大黃素、己酮可可鹼、雙嘧達莫、過氧化體增殖性活化受體 γ (PPAR γ)促效劑、雌性性激素及抗氧化劑。在一些實施例中，雌性性激素包含雌二醇或孕酮。在一些實施例中，抗氧化劑包含 β 胡蘿蔔素、維生素C、維生素E、葉黃素、玉米黃素及 ω -3脂肪酸。在一些實施例中，可注射組合物呈對於防止或減少上皮細胞增生、細胞遷移或EMT治療有效之量。在一些實施例中，上皮細胞為視網膜色素上皮細胞(RPE)。在一些實施例中，上皮細胞為人類上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為視網膜上皮細胞。在一些實施例中，可注射組合物為凝膠、溶液或懸浮液。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含高分子量透明質酸(HA)，其藉由共價鍵與間 α -胰蛋白酶抑制劑(I α I)之重鏈交聯，高分子量HA之分子量大於1000 kDa。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含正五聚素蛋白3 (PTX-3)。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含腫瘤壞死因子刺激基因6蛋白(TSG-6)。在一些實施例中，可注射組合物中之總蛋白質與HA之比在500份蛋白質:1份HA及500份HA:1份蛋白質之間。在一些實施例中，可注射組合物藉由抑制或遏制生長因子及/或細胞因子之活性來防止上皮細胞增生及EMT。在一些實施例中，生長因子及細胞因子係選自由以下組成之群：EGF、FGF-2、PDGF-A、PDGF-AB、PDGF-B、PDGF-C、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、CTGF、HGF、IGF-1、G-CSF、IL-6、MCP-1、TNF- α 、VEGF及IFN- γ 。在一些實施例中，可注射組合物進一步包含水性佐劑。在一些實施例中，可注射組合物用於局部投與。在一些實施例中，可注射組合物經調配用於眼內注射、視網膜下注射、玻璃體內注射、眼周注射、結膜下注射、眼球後注射、前房內注射或眼球筋膜下注射。

在某些實施例中，本文揭示用於治療或預防增生性玻璃體視網膜病變(PVR)之可注射組合物，其包含：胎兒支持組織製劑，其包含

HC-HA/PTX3及胎兒支持組織之至少一種其他組分；及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑；其中組合物適用於注射。在一些實施例中，胎兒支持組織為胎盤、胎盤羊膜、臍帶、臍帶羊膜、絨毛膜、羊膜-絨毛膜、羊膜基質、羊膜膠凍、羊水或其組合。在一些實施例中，將胎兒支持組織冷凍或事先冷凍。在一些實施例中，胎兒支持組織為人類、非人類靈長類動物、牛或豬。在一些實施例中，胎兒支持組織為人類。在一些實施例中，組合物呈對於防止或減少上皮細胞增生、細胞遷移或EMT有效的量。在一些實施例中，上皮細胞為視網膜色素上皮(RPE)細胞。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑為胎兒支持組織之萃取物、微米尺寸化胎兒支持組織、均質物、粉末、切碎之胎兒支持組織、粉碎之胎兒支持組織、經研磨胎兒支持組織、經純化HC-HA/PTX3或其組合。在一些實施例中，組合物為凝膠、溶液或懸浮液。在一些實施例中，組合物經調配用於眼內注射、視網膜下注射、玻璃體內注射、眼周注射、結膜下注射、眼球後注射、前房內注射或眼球筋膜下注射。

【圖式簡單說明】

圖1說明在藉由生長因子之增生存在或不存在下在EMT之調節中之信號傳導路徑。

圖2A提供HC-HA/PTX3形成之示意性說明。圖2B說明自人類AME純化之HC-HA/PTX3。圖2C說明自AME純化之HC-HA/PTX3包含HC1。圖2D說明自AME純化之HC-HA/PTX3包含PTX3。

圖3A說明在人類角膜緣上皮祖細胞(LEPC)及龕細胞(LNC)中，HC-HA/PTX3下調典型Wnt信號傳導。圖3B說明接種於基質膠或固定HC-HA/PTX3上之 β -索脛素及C-JUN之免疫染色。

圖4A說明TGF- β 1在接種於塑膠、HA或HC-HA/PTX3（添加及不添加外源TGF- β 1）上之人類角膜纖維母細胞(HCF)中的表現。圖4B說

明TGF- β 2在接種於塑膠、HA或HC-HA/PTX3 (添加及不添加外源TGF- β 1)上之HCF中之表現。圖4C說明TGF- β 3在接種於塑膠、HA或HC-HA/PTX3 (添加及不添加外源TGF- β 1)上之HCF中的表現。圖4D例示北方墨點法，其顯示TGF- β RI、TGF- β RII及TGF- β III在接種於塑膠、HA或HC-HA/PTX3 (添加及不添加外源TGF- β 1)上之HCF中的表現。圖4E例示由添加外源TGF- β 1所引起之pSmad2/3之核轉位。圖4F例示由添加外源TGF-1所引起之 α -SMA之陽性細胞質表現。

圖5A說明HC-HA/PTX3不影響正常ARPE-19細胞之存活率。圖5B及5C說明當用EGF+FGF-2刺激時，HC-HA/PTX3抑制ARPE-19細胞中之增生。

圖6A及6B說明HC-HA/PTX3抑制APRE-19細胞中pSmad2/3之核轉位。

圖7A、7B、7C及7D說明PVR在兔中之發展。圖7A例示無PVR之正常兔眼之眼底照片。圖7B例示在氣體玻璃體切除術及玻璃體內注射RPE細胞之後四周具有牽引性PVR之兔。圖7C例示在摘出術之後無PVR之正常兔眼之截面。圖7D例示在摘出術之後具有視網膜脫落、具有牽引性PVR之兔眼之截面。

圖8說明添加膠原蛋白凝膠(Col)、AM萃取物AME或與AM萃取物混合之膠原蛋白凝膠(Col+AME)對TGF- β 啟動子活性之遏制之影響。BSA用作對照。

圖9說明與僅用BSA之對照分析相比，用AME、HA或HA+AME之處理對TGF- β 活性之遏制之影響。啟動子活性以相對螢光素酶單位(RLU)展示。

圖10說明藉由瓊脂糖凝膠電泳分離之AM萃取物中透明質酸之分子量範圍。將藉由緩衝液A、B、C萃取之羊膜用或不用玻尿酸酶處理且藉由0.5%瓊脂糖凝膠電泳分離。

圖11說明藉由瓊脂糖凝膠電泳分離之AM萃取物中透明質酸之分子量範圍。將藉由緩衝液PBS萃取之羊膜用或不用玻尿酸酶(於Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl中10單位/毫升)在37°C下處理2小時且穿過0.5%瓊脂糖凝膠。HA：陽性玻尿酸對照；L：低速離心之後的AM萃取物；H：高速離心之後的AM萃取物。

圖12說明西方墨點法，其展現間 α -胰蛋白酶抑制劑(I α I)存在於AM萃取物中。I α I存在於AM萃取物A及C中，儘管雙庫尼茨抑制劑(bikunin)之信號極弱(約39 kDa)。在轉移至西方墨點法之前，在4-15%變性丙烯醯胺凝膠上分離萃取物。

圖13說明免疫墨點，其展現甚至在低速(LS)或高速(HS)離心之後，間 α -胰蛋白酶抑制劑(I α I)存在於AM萃取物中。

圖14說明有(+)或無(-)玻尿酸酶處理之TSG-6 (腫瘤壞死因子刺激基因6)之免疫墨點。樣品包括無離心之總AM萃取物(T)、在於等張低鹽緩衝液(緩衝液A)、高鹽緩衝液(B)或4 M胍HCl (C)中萃取之後的AM萃取物；如實例2中詳述。TSG-6存在於總萃取物、緩衝液A萃取物及緩衝液C萃取物中。添加玻尿酸酶似乎未改變萃取物中之TSG-6含量。

圖15說明AM中TSG-6之去糖基化之免疫墨點分析。將AM萃取物A、B及C用(+)或不用20單位/毫升PNG酶F在37°C下處理3小時。隨後藉由西方墨點分析AM中TSG-6之糖基化。人類角膜纖維母細胞(HCF)之細胞溶解物用作陽性對照。

圖16說明藉由用軟骨素硫酸ABC解離酶消化來對AM中之潛在TSG-6複合物進行的免疫墨點分析。將AM萃取物A、B及C不用(-)或用(+) 1單位/毫升ABC解離酶在37°C下處理2小時。隨後藉由西方墨點法使用抗TSG-6抗體RAH-1:1:1000分析TSG-6複合物之可能的破壞。

圖17說明藉由用軟骨素硫酸ABC解離酶消化來對AM中之潛在

TSG-6複合物進行的免疫墨點。此為與圖16中所示相同之實驗，不同之處在於使用不同TSG-6抗體。此處，抗TSG-6抗體自R & D Systems獲得(目錄號MAB2104)。

圖18說明免疫墨點，其使用自Alexis Biochemicals獲得之大鼠單株抗PTX3抗體展現AM中存在正五聚素蛋白(PTX3)。HCF：人類角膜纖維母細胞，T、A、B、C：分別為總AM萃取物、AM萃取物A、B、C；HAse：玻尿酸酶。

圖19說明免疫墨點，其展現AM中存在TSP-1。指示單體TSP-1 (180 kDa)及推定的三聚TSP-1 (540 kDa)。陽性對照TSP-1自人類血小板(Calbiochem，目錄號605225)純化且以100奈克/泳道裝載。

圖20說明免疫墨點，其展現AM中存在Smad 7。用PBS或脲(於50 mM Tris-HCl，pH 7.5中2 M脲)萃取AM。對於各萃取物，裝載20 μ g總蛋白質。用山羊抗人類Smad 7 (AF2029，1:1000，R & D Systems)偵測Smad 7。Smad 7以約51 kDa之條帶遷移。

圖21說明自六個隨機顯微鏡區域計數之遷移細胞之數目(n=4，*指示當與PBS+EGF+FGF-2+ TGF- β 1相比時，p<0.05)。

圖22說明在各組(n=4，*指示與PBS+TGF- β 1相比，p<0.05)中比較之凝膠收縮百分比。

【實施方式】

本申請案描述用於防止或減少上皮細胞增生、細胞遷移及/或上皮-間質轉移(EMT)之組合物及方法，其中上皮細胞為人類上皮細胞且人類上皮細胞係選自：視網膜色素上皮、結膜、視網膜、角膜、角膜緣或腎上皮細胞。另外，本申請案描述用於預防及治療有需要之個體中之增生性玻璃體視網膜病變之組合物及方法。

已知當諸如視網膜色素上皮、人類結膜、視網膜、角膜、角膜緣或腎上皮細胞的上皮細胞活體外或活體內暴露於諸如EGF、FGF-

2、PDGF-A、PDGF-AB、PDGF-B、PDGF-C、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、CTGF、HGF、IGF-1、G-CSF、IL-6、MCP-1、TNF- α 、VEGF或IFN- γ 及乙二醇四乙酸(EGTA)的生長因子及細胞因子時，出現增生、細胞遷移及EMT。

此外，已知將冷凍保存之羊膜(AM)組織移植至眼表面上在角膜及角膜緣上皮細胞中提供抗增生、消炎、抗結疤及抗血管生成作用以促進傷口癒合。

需要防止或減少上皮細胞增生、細胞遷移及EMT，可在不需要手術移植的情況下投與且可另外向非表面上皮細胞(諸如視網膜及腎上皮細胞)投與之組合物。

某些實施例之描述如下。應瞭解本申請案之特定實施例藉助於說明顯示且不作為本申請案之限制。

特定術語

除非另有定義，否則本文所用之所有技術及科學術語均具有與熟習所主張之主題所屬技術者通常所瞭解相同之含義。除非另外提及，否則本文中整個揭示內容中所提及之所有專利、專利申請案、公開申請案及公開案、GENBANK序列、網站及其他公開材料均以全文引用之方式併入。在關於本文術語存在複數種定義之情況下，以此章節中之彼等定義為準。當參考URL或其他此類識別符或位址時，應瞭解，此類識別符可變化且網際網路上之特定資訊可變來變去，但等效資訊已知且可諸如藉由搜索網際網路及/或合適資料庫來容易地存取。對其之參考證實此類資訊之可獲得性及公眾傳播。

如本文所用，範圍及量可表示為「約」特定值或範圍。約亦包括準確量。因此，「約5 μ g」意謂「約5 μ g」以及「5 μ g」。一般而言，術語「約」包括將預期在實驗誤差內的量。

如本文所用，術語「受試者」、「個體」及「患者」可互換使

用。術語均不應解釋為需要醫學專業人員(例如醫生、護士、醫師助理、護理員、安護工作者)之監督。如本文所用，受試者為任何動物，包括哺乳動物(例如人類或非人類動物)及非哺乳動物。在本文提供之方法及組合物的一個實施例中，哺乳動物為人類。

如本文所用，術語「治療(treat/treating/treatment)」及其他語法等效物包括：緩解、減少或改善疾病或病狀之一或多種症狀。在一些實施例中，治療為緩解、減少或改善上皮-間質轉移之一或多種症狀。在一些實施例中，治療為緩解、減少或改善增生性玻璃體視網膜病變之一或多種症狀。在一些實施例中，治療為緩解、減少或改善發炎之一或多種症狀。在一些實施例中，治療為預防疾病或病狀之一或多種額外症狀或減少疾病或病狀之一或多種額外症狀之出現、嚴重性或頻率。在一些實施例中，方法包括預防上皮-間質轉移之一或多種額外症狀或減少上皮-間質轉移之一或多種額外症狀之出現、嚴重性或頻率。在一些實施例中，方法包括預防增生性玻璃體視網膜病變之一或多種額外症狀或減少增生性玻璃體視網膜病變之一或多種額外症狀之出現、嚴重性或頻率。在一些實施例中，方法包括預防發炎之一或多種額外症狀或減少發炎之一或多種額外症狀之出現、嚴重性或頻率。在一些實施例中，方法包括改善或預防疾病或病狀之一或多種症狀之潛在代謝病因；抑制疾病或病狀，諸如使疾病或病狀之發展停滯；緩解疾病或病狀；引起疾病或病狀消退；緩解由疾病或病狀所引起之病狀；或預防性及/或治療性抑制疾病或病狀之症狀。

如本文所用，「胎兒支持組織」意謂用於支持胎兒發育之組織。胎兒支持組織之實例包括(但不限於)：(i)胎盤羊膜(PAM)或基本上經分離之PAM，(ii)臍帶羊膜(UCAM)或基本上經分離之UCAM，(iii)絨毛膜或基本上經分離之絨毛膜，(iv)羊膜-絨毛膜或基本上經分離之羊膜-絨毛膜，(v)羊膜基質或基本上經分離之羊膜基質，(vi)胎盤或基本

上經分離之胎盤，(vii)臍帶或基本上經分離之臍帶，(viii)羊水，或(ix)其任何組合。胎兒支持組織亦可與「妊娠組織」互換使用。在一些實施例中，妊娠組織為「哺乳動物妊娠組織」或「人類妊娠組織(「HGT」)」。在一些實施例中，胎兒支持組織自哺乳動物獲得。在一些實施例中，胎兒支持組織來自人類、非人類靈長類動物、母牛或豬。在一些實施例中，胎兒支持組織來自人類。在一些實施例中，胎兒支持組織經研磨、粉碎、切碎，為移植物、粉末、凝膠、均質物或萃取物。在一些實施例中，胎兒支持組織經無菌處理。在一些實施例中，胎兒支持組織經最終滅菌。

如本文所用，「胎盤」意謂將發育胎兒與母體子宮壁連接以允許經由母體血液供應來進行營養物吸收、廢物排泄及氣體交換之器官。胎盤由三層構成。包圍胎兒之最內胎盤層稱作羊膜。尿膜為胎盤之中間層(來源於胚胎後腸)；源自臍部之血管跨越此膜。胎盤之最外層，絨毛膜，與子宮內膜接觸。絨毛膜及尿膜融合形成絨毛膜尿囊膜。

如本文所用，「絨毛膜」意謂由胚外中胚層及兩層滋胚層形成之膜。絨毛膜絨毛自絨毛膜顯現，侵入子宮內膜，且允許營養物自母體血液轉移至胎兒血液。絨毛膜由兩層組成：由滋胚層形成之外層，及由體壁中胚層形成之內層；羊膜與後者接觸。滋胚層由以下組成：立方或方形細胞之內層、細胞營養層或郎罕氏(Langhans)層及不含細胞邊界之充分成核原生質外層(融合細胞滋養層)。無血管羊膜黏附於絨毛膜之內層。

如本文所用，「羊膜-絨毛膜」意謂包含羊膜及絨毛膜之產物。在一些實施例中，羊膜及絨毛膜不分離(亦即羊膜天然黏附於絨毛膜之內層)。在一些實施例中，羊膜最初與絨毛膜分離且稍後在處理期間與絨毛膜合併。

如本文所用，「臍帶」意謂將發育胎兒與胎盤連接之器官。臍帶

由華頓氏膠(Wharton's jelly)構成，華頓氏膠為基本上由黏多醣製成之膠狀物質。其含有一個將含氧、富含營養物之血液攜帶至胎兒的靜脈及兩個帶走去氧、缺乏營養物之血液的動脈。在一些實施例中，已經基本上自臍帶組織移除血管。在一些實施例中，已移除一部分華頓氏膠。在一些實施例中，已移除血管及一部分華頓氏膠。

如本文所用，「胎盤羊膜」(PAM)意謂來源於胎盤之羊膜。在一些實施例中，PAM基本上經分離。

如本文所用，「臍帶羊膜」(UCAM)意謂來源於臍帶之羊膜。UCAM為半透明膜。UCAM具有多層：上皮層；基底膜；緻密層；纖維母細胞層；及海綿層。其缺乏血管或直接血液供應。在一些實施例中，UCAM基本上經分離。在一些實施例中，UCAM包含所有華頓氏膠。在一些實施例中，UCAM包含一部分華頓氏膠。在一些實施例中，UCAM包含血管及/或動脈。在一些實施例中，UCAM包含所有華頓氏膠及血管及/或動脈。在一些實施例中，UCAM包含一部分華頓氏膠及血管及/或動脈。

如本文所用，「基本上經分離」或「經分離」意謂胎兒支持組織產物已與來源於最初源生物體之非所需物質(例如紅血球、血管及動脈)分離。純度或「分離度」可藉由標準方法分析，且將通常為至少約10%純，更通常至少約20%純，一般至少約30%純，且更一般至少約40%純；在其他實施例中至少約50%純，或更通常至少約60%純；在其他實施例中，至少約95%純。

如本文所用，「生物活性」意謂多肽及多醣之活性。在一些實施例中，在臍帶(及基本上經分離之臍帶)、UCAM (及基本上經分離之UCAM)、胎盤(及基本上經分離之胎盤)、PAM (及基本上經分離之PAM)、絨毛膜(及基本上經分離之絨毛膜)或羊膜-絨毛膜(及基本上經分離之羊膜-絨毛膜)中發現多肽及多醣之活性。在一些實施例中，生

物活性為抗結疤活性、抗發炎活性、抗血管生成活性及傷口癒合。在一些實施例中，生物活性為抗發炎活性。在一些實施例中，生物活性包含胎兒支持組織製劑或組合物之生物活性。在一些實施例中，生物活性包含HC-HA/PTX3之生物活性。

如本文所用，生物活性或結構完整性之很大保存意謂當與未經處理組織之生物活性及結構完整性相比時，胎兒支持組織產物之生物活性及結構完整性僅降低約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約50%或約60%。

如本文所用，「冷凍」係指在低於約或處於0°C、-5°C、-10°C、-20°C、-40°C、-50°C、-60°C、-70°C、-80°C、-90°C或-100°C下曝露胎兒支持組織產物約1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、11小時、12小時、18小時、24小時或更久之時間段。

如本文所用，「粉末」意謂呈精細乾燥粒子或基質形式之物質。在一些實施例中，粒子尺寸不均勻。在一些實施例中，粒子尺寸基本上均勻。

如本文所用，「研磨」意謂將胎兒支持組織縮小成較小粒子或粉末之任何方法。術語研磨包括微米尺寸化、粉碎、均質化、銼削、研磨、磨碎、搗碎及壓碎。

如本文所用，術語「有效量」或「治療有效量」係指足以在一定程度上減輕所治療之疾病或病狀之一或多種症狀的所投與之藥劑或化合物之量。結果可為減輕及/或緩解疾病之病徵、症狀或病因，或生物系統之任何其他所需改變。舉例而言，用於治療用途之「有效量」為包括如本文中所揭示之化合物之組合物提供疾病症狀之臨床上顯著降低而無不當不良副作用所需的量。可使用諸如劑量遞增研究之技術確定任何個別情況下之適當「有效」量。術語「治療有效量」包

括例如預防有效量。本文所揭示之化合物之「有效量」為可有效實現所需作用或治療改善而無不當不良副作用之量。應瞭解「有效量」或「治療有效量」可因個體而不同，此係由於可注射組合物之代謝之變化、個體之年齡、體重、一般狀況、治療之病狀、治療之病狀之嚴重性及開處方之醫師之判斷。在一些實施例中，有效量為預防或減少PVR之症狀的量。在一些實施例中，有效量為減少、抑制或防止上皮細胞之細胞遷移、細胞增生及/或EMT的量。

上皮-間質轉移(EMT)為上皮細胞藉此失去其細胞極性及細胞-細胞黏附性且增加遷移及侵襲特性之過程。EMT出現在諸如中胚層形成、神經管形成、傷口癒合以及癌症進程之癌轉移起始的過程中。EMT可經由數種信號傳導路徑誘導，包括TGF- β 、FGF、EGF、HGF、Wnt/ β -索脛素及洛奇(Notch)。

增生性玻璃體視網膜病變(PVR)為作為孔源性視網膜脫落之併發症產生的疾病。當來自玻璃體液之流體進入視網膜中之孔且在視網膜下腔中積聚時，視網膜上玻璃體之牽引力導致孔源性視網膜脫落。在此過程期間，視網膜細胞層與玻璃體細胞因子接觸，其可觸發視網膜色素上皮(RPE)增生及遷移。RPE細胞經歷上皮-間質轉移(EMT)且產生遷出至玻璃體中之能力。在RPE遷移期間，此等細胞鋪設纖維膜，其在視網膜處收縮及牽拉，且在原發性視網膜脫落手術之後可導致繼發性視網膜脫落。

組合物

在某些實施例中，本文揭示用於防止或減少上皮細胞增生、細胞遷移及/或上皮-間質轉移(EMT)之組合物，其包含：胎兒支持組織製劑；及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑。在某些實施例中，本文進一步揭示用於防止或減少有需要之個體中之增生性靜脈視網膜病(PVR)的可注射組合物，其包含：胎兒支持組織製劑；及

醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑。在某些實施例中，本文進一步揭示用於防止或減少有需要之個體中之增生性靜脈視網膜病(PVR)的可注射組合物，其主要由以下組成：基本上經分離之HC-HA/PTX3、復原HC-HA/PTX3 (rcHC-HA/PTX3)；及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑。在某些實施例中，本文進一步揭示用於防止或減少有需要之個體中之增生性靜脈視網膜病(PVR)的可注射組合物，其主要由以下組成：基本上經分離之HC-HA/PTX3、復原HC-HA/PTX3 (rcHC-HA/PTX3)；額外治療劑；及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑。

在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含HC-HA/PTX3。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含：高分子量透明質酸(HA)，其藉由共價鍵與間 α -胰蛋白酶抑制劑(I α I)之重鏈交聯，高分子量HA之分子量大於1000 kDa。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含：正五聚素蛋白3 (PTX-3、PTX3)。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含：腫瘤壞死因子刺激基因6蛋白(TSG-6)。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含：凝血栓蛋白-1 (TSP-1)。在一些實施例中，組合物中總蛋白質與HA之比小於500份蛋白質:1份HA。在一些實施例中，組合物中HA與總蛋白質之比小於500份HA:1份蛋白質。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含HC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含基本上經純化之HC-HA/PTX3複合物。

在一些實施例中，上皮細胞為人類上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為視網膜色素上皮細胞(RPE)。在一些實施例中，人類上皮細胞為角膜上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為角膜緣上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為結膜上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為腎上皮細胞。

在一些實施例中，組合物藉由遏制生長因子及細胞因子之活性

來防止上皮細胞增生及EMT。在一些實施例中，生長因子及細胞因子係選自由以下組成之群：EGF、FGF-2、PDGF-A、PDGF-AB、PDGF-B、PDGF-C、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、CTGF、HGF、IGF-1、G-CSF、IL-6、MCP-1、TNF- α 、VEGF及IFN- γ 。在一些實施例中，組合物抑制上皮細胞中之信號傳導路徑以抑制增生及EMT。在一些實施例中，信號傳導路徑為典型Wnt信號傳導及TGF- β 誘導之Smad/ZEB信號傳導。

在一些實施例中，組合物包含胎兒支持組織製劑及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑或載劑。在一些實施例中，組合物進一步包含水性佐劑。在一些實施例中，組合物用於局部投與。在一些實施例中，組合物經調配用於注射。在一些實施例中，組合物經調配用於眼內注射、視網膜下注射、玻璃體內注射、眼周注射、結膜下注射、眼球後注射、前房內注射或眼球筋膜下注射。

胎兒支持組織製劑

在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含胎盤組織、臍帶組織、胎盤羊膜組織、絨毛膜組織、羊膜基質、羊膜-絨毛膜組織、UCAM組織、羊水或其組合。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑為胎兒支持組織之萃取物、微米尺寸化胎兒支持組織、胎兒支持組織之均質物、胎兒支持組織之粉末、切碎之胎兒支持組織、粉碎之胎兒支持組織、經研磨胎兒支持組織、經純化HC-HA/PTX3或其組合。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑由新鮮、冷凍或事先冷凍之胎兒支持組織製備。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑由冷凍或事先冷凍之胎兒支持組織製備。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含HA、I α I、TSG-6、PTX-3、TSP-1或其組合。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含HC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含經純化之HC-HA/PTX3。在一些實施例中，胎兒支持組織製

劑包含超速離心之HC-HA/PTX3。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑由經純化之HC-HA/PTX3組成。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含復原HC-HA/PTX3。

在一些實施例中，胎兒支持組織製劑遏制TGF- β 啟動子活性；增加巨噬細胞之細胞凋亡；減少人類血管內皮細胞之增生、減少人類血管內皮細胞之遷移及增加人類血管內皮細胞之細胞凋亡；降低人類纖維母細胞之存活率；減少發炎；及防止經受儲存及損傷之上皮細胞之細胞凋亡。在一些實施例中，本文中描述之胎兒支持組織製劑及可注射組合物用於治療與TGF- β 上調(諸如血管生成、傷口癒合及組織發炎)相關之疾病。

TGF- β 為除傷口癒合及疤痕形成以外，參與組織發炎之原型細胞因子。哺乳動物細胞表現三種不同TGF- β ：TGF- β 1、TGF- β 2及TGF β 3。TGF- β 為最有效的細胞因子，其在多種細胞類型(包括纖維母細胞)中藉由上調 α -SMA、整合素 α 5 β 1及含EDA結構域之纖維結合蛋白(Fn)之表現來促進肌纖維母細胞分化。TGF- β 亦上調諸如膠原蛋白及蛋白聚糖之基質組分之表現、下調蛋白酶及基質金屬蛋白酶及上調其抑制劑。共同地，此等作用引起細胞-基質相互作用及黏附性增加，以及疤痕組織沈積及形成。

TGF- β 經由在細胞膜上與TGF- β 受體(TGF- β R)結合來發揮其作用。在人類細胞中，存在三種TGF- β R，即TGF- β R I型(TGF- β RI)、II型(TGF- β RII)及III型(TGF- β RIII)。充當配位體之TGF- β 與由TGF- β RI及TGF- β RII製成之絲胺酸、蘇胺酸激酶受體複合物結合；此類結合藉由不為絲胺酸、蘇胺酸激酶受體之TGF- β RIII促進。與TGF- β RII結合活化TGF- β RI，TGF- β RI引起已知為Smad之效應蛋白質家族之直接磷酸化，Smad調節許多標靶基因之轉錄，該等標靶基因包括本文中描述之彼等基因，參與疤痕形成。

遏制TGF- β 可藉由針對TGF- β 之中和抗體及干預藉由TGF- β 介導之信號傳導之試劑(諸如核心蛋白聚糖)實現。大部分文獻顯示TGF- β 之遏制在調節TGF- β 活化、與其受體之結合、或其信號轉導之水準下實現。已顯示羊膜可在轉錄水準下實現此類抑制，即斷開TGF- β 1基因之轉錄。特定言之，已顯示羊膜遏制人類角膜及角膜緣纖維母細胞及人類結膜及翼狀胬肉體纖維母細胞中之TGF- β 信號傳導。

玻尿酸(HA)為在滑動關節流體、眼部玻璃體液、軟骨、血管、細胞外基質、皮膚及臍帶中發現之天然糖。在一些實施例中，HA之交聯係經由與另一分子(諸如蛋白質)之共價鍵。在一些實施例中，HA共價結合至間 α -胰蛋白酶抑制劑(I α I)之重鏈。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑中蛋白質與HA之比小於約500:1、小於約200:1、小於約100:1、小於約50:1或小於約10:1蛋白質:HA。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑中HA與蛋白質之比小於約500:1、小於約200:1、小於約100:1、小於約50:1或小於約10:1 HA:蛋白質。

TSG-6為在細胞外基質重塑、細胞增生及白血球遷移中發揮作用之透明質酸結合蛋白。TSG-6可與絲胺酸蛋白酶抑制劑間 α -抑制劑(I α I)形成複合物且催化重鏈自I α I轉移至HA。PTX-3為Ca²⁺依賴性配位體結合蛋白，其具有五聚體盤狀結構且存在於血漿中。TSP-1 (凝血栓蛋白1)為具有有效抗血管生成及其他生物活性之同源三聚糖蛋白。TSP-1藉由各種細胞類型分泌至細胞外基質中。

在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含選自以下之純化組分：HA、I α I、TSG-6、PTX-3、TSP-1、HC-HA/PTX3或其組合。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含復原HC-HA/PTX3。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含經純化之HC-HA/PTX3。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑由HC-HA/PTX3組成。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含高濃度之純化HC-HA/PTX3。在一些實施例中，

HC-HA/PTX3呈25至750 µg/ml、50 to 500 µg/ml、50至250 µg/ml或約250 ug/ml、約500 ug/ml或約750 ug/ml的濃度。在一些實施例中，純化組分自任何適合之來源獲得。在一些實施例中，純化組分自胎兒支持組織獲得。在一些實施例中，胎兒支持組織之純化組分自市售來源獲得。在一些實施例中，胎兒支持組織之純化組分自轉殖基因生物體分離。在一些實施例中，胎兒支持組織之純化組分之蛋白質序列與人類蛋白質序列具有至少90%、93%、95%、97%、99%或99.5 %之相似度。在一些實施例中，胎兒支持組織之純化組分經純化、基本上經純化、部分經純化或存在於粗萃取物中。在一些實施例中，胎兒支持組織之純化組分為HC-HA/PTX3。在一些實施例中，胎兒支持組織之純化組分在製程期間在任何時間自胎兒支持組織製劑分離。

在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含Smad7。在一些實施例中，Smad7自任何適合之來源獲得，諸如來自羊膜、來自市售來源或自轉殖基因生物體分離。在一些實施例中，Smad7經純化、基本上經純化、部分經純化或存在於粗萃取物中。

在一些實施例中，HA、IαI、TSG-6、PTX-3、TSP-1及視情況存在之Smad7自胎兒支持組織製劑獲得。在一些實施例中，製備含有HA、IαI、TSG-6、PTX-3、TSP-1及視情況存在之Smad7之組合的胎兒支持組織製劑。

在一些實施例中，在胎兒支持組織均質化之後，離心以移除不可溶物質。在一些實施例中，在胎兒支持組織均質化之後，不可溶物質留在胎兒支持組織製劑中。在一些實施例中，乾燥胎兒支持組織製劑。在一些實施例中，根據實例1中描述之方法製備胎兒支持組織製劑。

在一些實施例中，胎兒支持組織自諸如Bio-Tissue，Inc. (Miami，FL)及Baptist Hospital (Miami，FL) (經IRB批准)之來源獲

得。在一些實施例中，胎兒支持組織以新鮮、冷凍或事先冷凍狀態獲得。在一些實施例中，洗滌胎兒支持組織以移除過量儲存緩衝液、血液或污染物。在一些實施例中，使用短暫離心步驟或藉由其他方式移除過量液體。在一些實施例中，使用液氮或其他冷卻方式冷凍胎兒支持組織以促進隨後均質化。在一些實施例中，胎兒支持組織之來源為哺乳動物。在一些實施例中，胎兒支持組織之來源為人類。在一些實施例中，使用胎兒支持組織之其他來源，諸如非人類靈長類動物、牛或豬。

在一些實施例中，胎兒支持組織製劑自AM膠凍獲得。在一些實施例中，AM膠凍自新鮮AM組織獲得。在一些實施例中，在冷凍新鮮AM組織之前獲得AM膠凍。在一些實施例中，在冷凍新鮮AM組織之後獲得AM膠凍。在一些實施例中，AM膠凍自冷凍或事先冷凍之AM組織獲得。在一些實施例中，AM膠凍經冷凍。在一些實施例中，遵循如本文所描述之針對AM製劑之程序冷凍研磨AM膠凍。在一些實施例中，AM膠凍經離心。在一些實施例中，AM膠凍經凍乾。

在一些實施例中，胎兒支持組織製劑由AM基質製成。在一些實施例中，基質自新鮮、冷凍、解凍或以其他方式經處理之AM膜之層分離。在一些實施例中，基質移除藉由酶方法、機械方法或藉由任何其他適合之方式進行。在一些實施例中，基質為新鮮、冷凍或事先冷凍的。在一些實施例中，遵循如本文所描述用於自AM產生胎兒支持組織製劑的程序研磨或冷凍研磨基質。在一些實施例中，基質經離心。在一些實施例中，基質經凍乾。

在一些實施例中，製劑為經研磨胎兒支持組織。在一些實施例中，在研磨製程之前冷凍胎兒支持組織。在一些實施例中，冷凍步驟藉由任何適合之冷卻製程進行。在一些實施例中，使用液氮快速冷凍胎兒支持組織。在一些實施例中，將胎兒支持組織置於異丙醇/乾冰

浴中或在其他冷卻劑中快速冷凍。在一些實施例中，使用市售快速冷凍方法。在一些實施例中，將胎兒支持組織置於冰箱中且使其更緩慢地平衡至儲存溫度，而非快速冷凍。在一些實施例中，在任何所需溫度下儲存胎兒支持組織。在一些實施例中，在-20℃或-80℃下儲存胎兒支持組織。

在一些實施例中，製劑為粉碎之胎兒支持組織。在一些實施例中，胎兒支持組織經粉碎同時冷凍。在一些實施例中，在研磨步驟中使用新鮮、部分解凍或解凍之胎兒支持組織。在一些實施例中，用適合裝置(諸如刮刀)將胎兒支持組織(新鮮、冷凍或解凍)切成具有所需尺寸之碎片，隨後使用 BioPulverizer (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK)或其他合適之裝置研磨成精細粒子，且用均質化裝置(諸如 Tissue Tearor (Biospec Products, Inc., Dremel, WI))在適合溶液中均質化，形成均質物。溶液之非限制性實例包括(但不限於)磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)、DMEM、NaCl溶液及水。在一些實施例中，視需要調節溶液之pH。在一些實施例中，pH範圍為約5.5或6.0至約8.5。在一些實施例中，在pH在約6.3與約7.8之間的溶液中研磨冷凍組織。

在一些實施例中，製劑為胎兒支持組織之均質物。在一些實施例中，在任何適合之速度、溫度或其他參數下混合均質物。在一些實施例中，混合在約1℃或3℃至約6℃、10℃、15℃或20℃之溫度範圍下進行。在一些實施例中，混合在約4℃下進行。在一些實施例中，將均質物混合例如少於約1分鐘、10分鐘、或20分鐘至約1、2、3小時或3小時以上。

在一些實施例中，將均質物離心以移除任何剩餘不可溶物質及/或細胞碎片。在一些實施例中，使用任何適合範圍之時間、溫度、蛋白濃度、緩衝液及速度進行離心。在一些實施例中，離心在約

1,000、5,000或10,000 xg至約20,000 xg之範圍下進行。在一些實施例中，離心在約15,000 xg下進行。在一些實施例中，離心持續少於1分鐘、5分鐘、10分鐘、20分鐘至約40分鐘、60分鐘、1.5小時或更久之持續時間進行。在一些實施例中，收集上清液且在-80°C下以等分試樣形式儲存。在一些實施例中，使用任何適合之市售蛋白質分析套組(諸如BCA分析儀(Pierce, Rockford, IL))定量總蛋白質。實例2、表1及圖13描述在低度或高速離心之後對AM製劑進行之分析。

在一些實施例中，就生物化學表徵及純化而言，以上溶液補充有蛋白酶抑制劑。蛋白酶抑制劑之例示性混合物為以下：1 µg/ml抑肽酶、1 µg/ml亮肽素、1 µg/ml胃酶抑素A及1 mM PMSF。在一些實施例中，若胎兒支持組織製劑將添加至活細胞或組織中，則不向胎兒支持組織製劑中添加蛋白酶抑制劑。

在一些實施例中，製劑為胎兒支持組織之萃取物。在一些實施例中，使用任何適合之緩衝液或液體製備胎兒支持組織之萃取物。實例2在胎兒支持組織之萃取物中關於總蛋白質含量及HA檢查各種萃取緩衝液(高鹽、低鹽、PBS等)之使用(表1)。實例2使用數種萃取方法檢查特定蛋白TSG-6 (圖14)、PTX-3 (圖18)、TSP-1 (圖19)及Smad7 (圖20)之含量。

在一些實施例中，測試胎兒支持組織製劑以確認特定組分或蛋白質之存在。在一些實施例中，針對包括(但不限於)以下之分子之存在測試胎兒支持組織製劑：HA、IαI、TSG-6、PTX-3、TSP-1及Smad7。在一些實施例中，在製備製程期間在任何時刻測試胎兒支持組織製劑以確認不存在病原體。

在一些實施例中，胎兒支持組織製劑為乾粉。在一些實施例中，乾粉不需要在儲存期間冷藏或冷凍來防止乾粉隨時間降解。在一些實施例中，儲存乾粉且在使用之前復原。在一些實施例中，藉由製

備如本文所描述之冷凍研磨胎兒支持組織，隨後移除胎兒支持組織製劑中的至少一部分水來製備乾粉。在一些實施例中，藉由任何適合之方式自胎兒支持組織製劑移除過量水。在一些實施例中，藉由使用凍乾來移除過量水。在一些實施例中，凍乾胎兒支持組織製劑包含使用市售之凍乾器或冷凍乾燥器。在一些實施例中，例如經由 Virtis (Gardiner, NY)、FTS Systems (Stone Ridge, NY) 及 SpeedVac (Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY) 發現適合之裝備。在一些實施例中，移除之水的量為約 5%、10%、20%、30% 至約 60%、70%、80%、90%、95% 或 99% 或 99% 以上。在一些實施例中，自胎兒支持組織製劑移除基本上所有過量水。在一些實施例中，儲存乾粉。在一些實施例中，儲存溫度在低於約 -196°C、-80°C、-50°C 或 -20°C 至高於約 23°C 範圍內變化。在一些實施例中，在儲存之前將乾粉表徵(重量、蛋白質含量等)。

在一些實施例中，在使用之前在適合溶液或緩衝液中復原乾粉。溶液之非限制性實例包括(但不限於) PBS、DMEM 及 BSS。在一些實施例中，視需要調節溶液之 pH。在一些實施例中，用足夠體積之溶液復原乾粉以產生高濃度之胎兒支持組織復原組合物。在一些實施例中，用足夠體積之溶液復原乾粉以產生低濃度之胎兒支持組織復原組合物。

在一些實施例中，在乳霜、軟膏、凝膠、泡沫或洗劑中復原乾粉。

在一些實施例中，使用胎兒支持組織製劑來產生 AMSC 自肌纖維母細胞向纖維母細胞之表型反轉。在一些實施例中，使用胎兒支持組織製劑來防止或緩慢各種細胞類型之分化。在一些實施例中，用胎兒支持組織製劑處理許多類型之細胞。

經分離之 nHC-HA/PTX3 複合物

在一些實施例中，組合物包括經分離之天然HC-HA/PTX3複合物(nHC-HA/PTX3)。

在一些實施例中，自經分離之細胞分離nHC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，自培養細胞分離nHC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，自幹細胞分離nHC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，自由組織(諸如臍帶或羊膜)製備之萃取物之水溶性部分分離nHC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，用等張鹽溶液萃取水溶性部分。在一些實施例中，自由組織(諸如臍帶或羊膜)製備之萃取物之水不溶性部分分離nHC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，用GnHCl萃取不可溶部分。

在一些實施例中，自羊膜組織分離經分離之nHC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，自羊膜或臍帶分離經分離之nHC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，自新鮮、冷凍或事先冷凍之胎盤羊膜(PAM)、新鮮、冷凍或事先冷凍之臍帶羊膜(UCAM)、新鮮、冷凍或事先冷凍之胎盤、新鮮、冷凍或事先冷凍之臍帶、新鮮、冷凍或事先冷凍之絨毛膜、新鮮、冷凍或事先冷凍之羊膜-絨毛膜或其任何組合分離經分離之nHC-HA/PTX3複合物。此類組織可自任何哺乳動物獲得，諸如(但不限於)人類、非人類靈長類動物、母牛或豬。

在一些實施例中，藉由任何適合之方法純化nHC-HA/PTX3。在一些實施例中，藉由離心(例如超速離心、梯度離心)、層析(例如離子交換、親和、尺寸排阻及羥基磷灰石層析)、凝膠過濾或不同溶解性、乙醇沈澱或藉由用於蛋白質純化之任何其他可用技術(參見例如 Scopes, Protein Purification Principles and Practice第2版, Springer-Verlag, New York, 1987; Higgins, S. J.及Hames, B. D. (編), Protein Expression: A Practical Approach, Oxford Univ Press, 1999; 及 Deutscher, M. P., Simon, M. I., Abelson, J. N. (編), Guide to Protein

Purification: Methods in Enzymology (Methods in Enzymology Series, 第182卷), Academic Press, 1997, 所有均以引用的方式併入本文中)來純化nHC-HA/PTX3複合物。

在一些實施例中，自萃取物分離nHC-HA/PTX3。在一些實施例中，由羊膜萃取物製備該萃取物。在一些實施例中，由臍帶萃取物製備該萃取物。在一些實施例中，臍帶萃取物包含臍帶基質及/或華頓氏膠。在一些實施例中，nHC-HA/PTX3複合物含於藉由超速離心製備之萃取物中。在一些實施例中，nHC-HA/PTX3複合物含於藉由超速離心，使用CsCl/4-6M胍HCl梯度製備之萃取物中。在一些實施例中，藉由至少2輪超速離心製備萃取物。在一些實施例中，藉由多於2輪超速離心製備萃取物(亦即第2 nHC-HA/PTX3)。在一些實施例中，藉由至少4輪超速離心製備萃取物(亦即第4 nHC-HA/PTX3)。在一些實施例中，nHC-HA/PTX3複合物包含較小富含白胺酸之蛋白聚糖。在一些實施例中，nHC-HA/PTX3複合物包含HC1、HA、PTX3及/或較小富含白胺酸之蛋白聚糖。

在一些實施例中，在藉由在等張溶液中萃取來製備之萃取物上進行超速離心。在一些實施例中，等張溶液為PBS。舉例而言，在一些實施例中，組織在PBS中均質化以產生均質化樣品。均質化樣品隨後藉由離心分離成可溶部分及不可溶部分。在一些實施例中，在PBS萃取之組織之可溶部分上進行超速離心。在此類實施例中，藉由超速離心PBS萃取之組織來純化的nHC-HA/PTX3稱作nHC-HA/PTX3可溶複合物。在一些實施例中，nHC-HA可溶複合物包含較小富含白胺酸之蛋白聚糖。在一些實施例中，nHC-HA/PTX3可溶複合物包含HC1、HA、PTX3及/或較小富含白胺酸之蛋白聚糖。

在一些實施例中，在藉由羊膜及/或臍帶組織之直接胍HCl萃取(例如4-6 M GnHCl)製備之萃取物上進行超速離心。在一些實施例

中，GnHCl萃取組織隨後離心產生GnHCl可溶及GnHCl不可溶部分。在一些實施例中，在GnHCl可溶部分上進行超速離心。在此類實施例中，藉由超速離心胍HCl萃取之組織來純化的nHC-HA/PTX3稱作nHC-HA/PTX3不可溶複合物。在一些實施例中，nHC-HA不可溶複合物包含較小富含白胺酸之蛋白聚糖。在一些實施例中，nHC-HA/PTX3不可溶複合物包含HC1、HA、PTX3及/或較小富含白胺酸之蛋白聚糖。

在一些實施例中，在藉由對PBS萃取組織之不可溶部分進行進一步胍HCl萃取來製備的萃取物上進行超速離心。舉例而言，在一些實施例中，組織在PBS中均質化以產生均質化樣品。均質化樣品隨後藉由離心分離成可溶部分及不可溶部分。不可溶部分隨後在胍HCl（例如4-6 M GnHCl）中進一步萃取且離心以產生胍HCl可溶及不可溶部分。在一些實施例中，在胍HCl可溶部分上進行超速離心。在此類實施例中，藉由超速離心胍HCl萃取之組織來純化的nHC-HA/PTX3稱作nHC-HA/PTX3不可溶複合物。在一些實施例中，nHC-HA不可溶複合物包含較小富含白胺酸之蛋白聚糖。在一些實施例中，nHC-HA/PTX3不可溶複合物包含HC1、HA、PTX3及/或較小富含白胺酸之蛋白聚糖。

在一些實施例中，純化經分離nHC-HA/PTX3萃取物之方法包含：(a)以1.35 g/ml之初始密度將經分離萃取物（例如藉由本文中描述之可溶或不可溶方法製備）溶解在CsCl/4-6M胍HCl中，以產生CsCl混合物；(b)在15°C下在125,000 x g下將CsCl混合物離心48 h，以產生第一純化萃取物；(c)萃取第一純化萃取物且將其用蒸餾水透析以移除CsCl及胍HCl，以產生透折液。在一些實施例中，純化經分離萃取物之方法進一步包含：(d)在0°C下混合透折液與含有1.3% (w/v)乙酸鉀之3體積95% (v/v)乙醇1 h，以產生第一透折液/乙醇混合物；(e)在15,000 x g下將第一透折液/乙醇混合物離心，以產生第二純化萃取

物；及(f)萃取第二純化萃取物。在一些實施例中，純化經分離萃取物之方法進一步包含：(g)用乙醇(例如70%乙醇)洗滌第二純化萃取物，以產生第二純化萃取物/乙醇混合物；(h)將第二純化萃取物/乙醇混合物離心，以產生第三純化萃取物；及(i)萃取第三純化萃取物。在一些實施例中，純化經分離萃取物之方法進一步包含：(j)用乙醇(例如70%乙醇)洗滌第三純化萃取物，以產生第三純化萃取物/乙醇混合物；(k)將第三純化萃取物/乙醇混合物離心，以產生第四純化萃取物；及(l)萃取第四純化萃取物。在一些實施例中，經純化萃取物包含 nHC-HA/PTX3 複合物。

在一些實施例中，藉由免疫親和層析純化 nHC-HA/PTX3 複合物。在一些實施例中，產生抗HC1抗體、抗HC2抗體或兩者且附著於固定載體。在一些實施例中，使未純化HC-HA複合物(亦即移動相)越過載體。在某些情況下，HC-HA複合物結合至抗體(例如經由(a)抗HC1抗體與HC1，(b)抗HC2抗體與HC2，(c)抗PTX抗體與PTX3，(d)抗SLRP抗體與SLRP，或(e)其任何組合之相互作用)。在一些實施例中，洗滌(例如用PBS)載體以移除任何未結合或鬆散結合之分子。在一些實施例中，隨後用允許nHC-HA/PTX3複合物自載體溶離之溶液(例如1% SDS、6M胍-HCl或8M脲)洗滌載體。

在一些實施例中，藉由親和層析純化 nHC-HA/PTX3 複合物。在一些實施例中，產生HABP且附著於固定載體。在一些實施例中，使未純化nHC-HA/PTX3複合物(亦即移動相)越過載體。在某些情況下，nHC-HA/PTX3複合物結合至HABP。在一些實施例中，洗滌(例如用PBS)載體以移除任何未結合或鬆散結合之分子。在一些實施例中，隨後用允許HC-HA複合物自載體溶離之溶液洗滌載體。

在一些實施例中，藉由HABP親和層析及免疫親和層析之組合，使用抗HC1抗體、抗HC2抗體、抗PTX3抗體、針對SLRP或SLRP之組

合的抗體或其任何抗體組合純化nHC-HA/PTX3複合物。

在一些實施例中，使用一或多種抗體自如本文所描述之不可溶部分純化nHC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，使用抗SLRP抗體自如本文所描述之不可溶部分純化nHC-HA/PTX3複合物。

在一些實施例中，自如本文所描述之可溶部分純化nHC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，使用抗PTX3抗體自如本文所描述之可溶部分純化nHC-HA/PTX3複合物。

在一些實施例中，nHC-HA/PTX3複合物包含較小富含白胺酸之蛋白聚糖(SLRP)。在一些實施例中，nHC-HA/PTX3複合物包含I類、II類或II類SLRP。在一些實施例中，較小富含白胺酸之蛋白聚糖選自I類SLRP，諸如核心蛋白聚糖及雙糖鏈蛋白聚糖(biglycan)。在一些實施例中，較小富含白胺酸之蛋白聚糖選自II類SLRP，諸如纖調蛋白、光蛋白聚糖(lumican)、PRELP (脯胺酸精胺酸豐富端白胺酸豐富蛋白質)、角蛋白聚糖(keratocan)及骨黏附蛋白聚糖(osteoaderin)。在一些實施例中，較小富含白胺酸之蛋白聚糖選自III類SLRP，諸如骺蛋白聚糖(epipycan)及骨甘胺酸(osteoglycin)。在一些實施例中，較小富含白胺酸之蛋白聚糖選自雙庫尼茨抑制劑、核心蛋白聚糖、雙糖鏈蛋白聚糖及骨黏附蛋白聚糖。在一些實施例中，較小富含白胺酸之蛋白質包含葡糖胺聚糖。在一些實施例中，較小富含白胺酸之蛋白聚糖包含硫酸角質素。

rcHC-HA/PTX3 複合物

在一些實施例中，組合物包含有或無SLRP之復原HC-HA/PTX3複合物(rcHC-HA/PTX3)。

在一些實施例中，產生復原HC-HA/PTX3複合物之方法包含(a)使固定高分子量透明質酸(HMW HA)與正五聚素蛋白3 (PTX3)在適合條件下接觸以形成PTX3/HA複合物；及(b)使PTX3/HA複合物與IαI及腫

瘤壞死因子-刺激基因-6 (TSG-6)接觸。本文提供藉由此類方法產生之rcHC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，TSG-6催化間 α -抑制劑(I α I)之重鏈1 (HC1)向HA轉移。在一些實施例中，I α I之HC1與HA形成共價鍵。在一些實施例中，方法之步驟(a)及(b)依序按次序進行。

在一些實施例中，產生復原HC-HA/PTX3複合物之方法包含使PTX3/HA複合物與I α I及TSG-6接觸。在一些實施例中，TSG-6催化間 α -抑制劑(I α I)之重鏈1 (HC1)向HA轉移。本文提供藉由此類方法產生之rcHC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，I α I之HC1與HA形成共價鍵。

在一些實施例中，產生與PTX3結合之HA複合物之方法包含使固定高分子量透明質酸(HMW HA)與正五聚素蛋白3 (PTX3)在適合條件下接觸以形成PTX3/HA複合物。本文提供藉由此類方法產生之PTX3/HA複合物。

在一些實施例中，產生復原HC-HA/PTX3複合物之方法包含：(a)使固定高分子量透明質酸(HMW HA)與I α I及TSG-6接觸HA以形成與TSG-6預結合之HC-HA複合物；及(b)使HC-HA複合物與正五聚素蛋白3 (PTX3)在適合條件下接觸以形成rcHC-HA/PTX3複合物。本文提供藉由此類方法產生之rcHC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，I α I之HC1與HA形成共價鍵。在一些實施例中，方法之步驟(a)及(b)依序按次序進行。在一些實施例中，方法包含使與TSG-6預結合之HC-HA複合物與PTX3接觸。

在一些實施例中，方法包含首先使高分子量透明質酸(HMW HA)與正五聚素蛋白3 (PTX3)在適合條件下接觸以形成PTX3/HA複合物，隨後使PTX3/HA複合物與I α I及TSG-6接觸。

在一些實施例中，I α I蛋白質及TSG-6蛋白質以約1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、15:1或20:1 (I α I:TSG-6)之莫耳

比接觸複合物。在一些實施例中，I α I:TSG-6之比在約1:1至約20:1，諸如約1:1至約10:1，諸如約1:1至約5:1，諸如約1:1至約3:1範圍內。在一些實施例中，I α I:TSG-6之比為3:1或3:1以上。在一些實施例中，I α I:TSG-6之比為3:1。

在一些實施例中，方法之步驟(a)及(b)依序按次序進行。在一些實施例中，方法包含使PTX3/HA複合物與I α I及TSG-6接觸。

在某些情況下，TSG-6與I α I相互作用且與I α I之HC1及HC2形成共價複合物(亦即HC1•TSG-6及HC2•TSG-6)。在某些情況下，在HA存在下，HC轉移至HA形成rcHC-HA。在一些實施例中，將TSG-6•HC1複合物添加至預結合之PTX3/HA複合物中以催化HC1轉移至HA。在一些實施例中，方法包含首先使固定高分子量透明質酸(HMW HA)與正五聚素蛋白3 (PTX3)在適合條件下接觸以形成PTX3/HA複合物，隨後使PTX3/HA複合物與HC1•TSG-6複合物接觸。在一些實施例中，將HC1•TSG-6複合物與HC2•TSG-6複合物之組合添加至PTX3/HA複合物中。

在一些實施例中，使PTX3接觸固定HMW HA之步驟進行至少10分鐘、至少30分鐘、至少1小時、至少2小時、至少3小時、至少4小時、至少5小時、至少6小時、至少12小時或至少24小時或更久。在一些實施例中，使PTX3接觸固定HMW HA之步驟進行至少2小時或更久。在一些實施例中，使PTX3接觸固定HMW HA之步驟進行至少2小時。在一些實施例中，使PTX3接觸固定HMW HA之步驟在37°C下進行。在一些實施例中，使PTX3接觸固定HMW HA之步驟在於PBS中之5 mM MgCl₂中進行。

在一些實施例中，使PTX3/HA複合物與I α I及TSG-6接觸HA之步驟進行至少10分鐘、至少30分鐘、至少1小時、至少2小時、至少3小時、至少4小時、至少5小時、至少6小時、至少12小時或至少24小時

或更久。在一些實施例中，使PTX3/HA複合物與HC1•TSG-6複合物及/或HC2•TSG-6複合物接觸之步驟進行至少10分鐘、至少30分鐘、至少1小時、至少2小時、至少3小時、至少4小時、至少5小時、至少6小時、至少12小時或至少24小時或更久。在一些實施例中，使PTX3/HA複合物與HC1•TSG-6複合物及/或HC2•TSG-6複合物接觸之步驟進行至少2小時或更久。在一些實施例中，使PTX3/HA複合物與HC1•TSG-6複合物及/或HC2•TSG-6複合物接觸之步驟進行至少2小時。在一些實施例中，使PTX3/HA複合物與HC1•TSG-6複合物及/或HC2•TSG-6複合物接觸之步驟在37°C下進行。在一些實施例中，使PTX3/HA複合物與HC1•TSG-6複合物及/或HC2•TSG-6複合物接觸之步驟在於PBS中之5 mM MgCl₂中進行。

在一些實施例中，方法包含使高分子量透明質酸(HMW HA)與正五聚素蛋白3 (PTX3)蛋白質、包含重鏈1 (HC1)之間 α -抑制劑(I α I)蛋白質及腫瘤壞死因子 α -刺激基因6 (TSG-6)同時在適合條件下接觸以形成HC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，HMW HA與PTX3、I α I及TSG-6接觸進行至少10分鐘、至少30分鐘、至少1小時、至少2小時、至少3小時、至少4小時、至少5小時、至少6小時、至少12小時或至少24小時或更久。在一些實施例中，使HMW HA、PTX3、I α I及TSG-6接觸之步驟在37°C下進行。在一些實施例中，使HMW HA、PTX3、I α I及TSG-6接觸之步驟在於PBS中之5 mM MgCl₂中進行。

在一些實施例中，方法包含使高分子量透明質酸(HMW HA)與正五聚素蛋白3 (PTX3)蛋白質、包含重鏈1 (HC1)之間 α -抑制劑(I α I)蛋白質及腫瘤壞死因子 α -刺激基因6 (TSG-6)依序以任何順序在適合條件下接觸以形成HC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，HMW HA與PTX3、I α I及TSG-6接觸進行至少10分鐘、至少30分鐘、至少1小時、至少2小時、至少3小時、至少4小時、至少5小時、至少6小時、至少

12小時或至少24小時或更久。在一些實施例中，使HMW HA、PTX3、I α I及TSG-6接觸之步驟在37°C下進行。在一些實施例中，使HMW HA、PTX3、I α I及TSG-6接觸之步驟在於PBS中之5 mM MgCl₂中進行。

在一些實施例中，產生rcHC-HA/PTX3複合物之方法進一步包含添加一或多種較小富含白胺酸之蛋白聚糖(SLRP)。在一些實施例中，產生復原HC-HA/PTX3複合物之方法包含：(a)使固定高分子量透明質酸(HMW HA)與正五聚素蛋白3 (PTX3)在適合條件下接觸以形成PTX3/HA複合物；(b)使PTX3/HA複合物與I α I及腫瘤壞死因子-刺激基因-6 (TSG-6)接觸；及(c)使PTX3/HA複合物與一或多種SLRPS接觸。本文提供藉由此類方法產生之rcHC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，TSG-6催化間 α -抑制劑(I α I)之重鏈1 (HC1)向HA轉移。在一些實施例中，I α I之HC1與HA形成共價鍵。在一些實施例中，方法之步驟(a)、(b)及(c)依序按次序進行。在一些實施例中，方法之步驟(a)、(b)及(c)同時進行。在一些實施例中，進行方法之步驟(a)且隨後依序按次序進行方法之步驟(b)及(c)。在一些實施例中，進行方法之步驟(a)且隨後同時進行方法之步驟(b)及(c)。

在一些實施例中，產生復原HC-HA/PTX3複合物之方法包含：(a)使固定高分子量透明質酸(HMW HA)與I α I及TSG-6接觸HA以形成與TSG-6預結合之HC-HA複合物；(b)使HC-HA複合物與正五聚素蛋白3 (PTX3)接觸；及(c)使HC-HA複合物與一或多種SLRPS在適合條件下接觸以形成rcHC-HA/PTX3複合物。本文提供藉由此類方法產生之rcHC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，I α I之HC1與HA形成共價鍵。在一些實施例中，方法包含使與TSG-6預結合之HC-HA複合物與PTX3接觸。在一些實施例中，方法之步驟(a)、(b)及(c)依序按次序進行。在一些實施例中，方法之步驟(a)、(b)及(c)同時進行。在一些實

施例中，進行方法之步驟(a)且隨後依序按次序進行方法之步驟(b)及(c)。在一些實施例中，進行方法之步驟(a)且隨後同時進行方法之步驟(b)及(c)。

在一些實施例中，SLRP選自I類、II類或II類SLRP。在一些實施例中，SLRP選自I類SLRP，諸如核心蛋白聚糖及雙糖鏈蛋白聚糖。在一些實施例中，較小富含白胺酸之蛋白聚糖選自II類SLRP，諸如纖調蛋白、光蛋白聚糖、PRELP（脯胺酸精胺酸豐富端白胺酸豐富蛋白質）、角蛋白聚糖及骨黏附蛋白聚糖。在一些實施例中，較小富含白胺酸之蛋白聚糖選自III類SLRP，諸如骺蛋白聚糖及骨甘胺酸。在一些實施例中，較小富含白胺酸之蛋白聚糖選自雙庫尼茨抑制劑、核心蛋白聚糖、雙糖鏈蛋白聚糖及骨黏附蛋白聚糖。在一些實施例中，較小富含白胺酸之蛋白質包含葡萄糖胺聚糖。在一些實施例中，較小富含白胺酸之蛋白聚糖包含硫酸角質素。

PTX3

在一些實施例中，自細胞或複數個細胞(例如組織萃取物)分離用於方法中之PTX3。適用於表現PTX3之例示性細胞包括(但不限於)動物細胞，包括(但不限於)哺乳動物細胞、靈長類動物細胞、人類細胞、嚙齒動物細胞、昆蟲細胞、細菌及酵母；及植物細胞，包括(但不限於)藻類、被子植物、裸子植物、蕨類植物及蘚苔植物。在一些實施例中，自人類細胞分離用於方法中之PTX3。在一些實施例中，自用一或多種促炎性細胞因子刺激以上調PTX3表現之細胞分離用於方法中之PTX3。在一些實施例中，促炎性細胞因子為IL-1或TNF- α 。

在一些實施例中，自羊膜細胞分離用於方法中之PTX3。在一些實施例中，自來自臍帶之羊膜細胞分離用於方法中之PTX3。在一些實施例中，用一或多種促炎性細胞因子刺激羊膜細胞以上調PTX3表現。在一些實施例中，促炎性細胞因子為IL-1或TNF- α 。

在一些實施例中，自臍帶細胞分離用於方法中之PTX3。在一些實施例中，用一或多種促炎性細胞因子刺激臍帶細胞以上調PTX3表現。在一些實施例中，促炎性細胞因子為IL-1或TNF- α 。

在一些實施例中，自羊膜上皮細胞分離用於方法中之PTX3。在一些實施例中，自臍帶上皮細胞分離用於方法中之PTX3。在一些實施例中，用一或多種促炎性細胞因子刺激羊膜上皮細胞或臍帶上皮細胞以上調PTX3表現。在一些實施例中，促炎性細胞因子為IL-1或TNF- α 。

在一些實施例中，自羊膜基質細胞分離用於方法中之PTX3。在一些實施例中，自臍帶基質細胞分離用於方法中之PTX3。在一些實施例中，用一或多種促炎性細胞因子刺激羊膜基質細胞或臍帶基質細胞以上調PTX3表現。在一些實施例中，促炎性細胞因子為IL-1或TNF- α 。

在一些實施例中，用於方法中之PTX3為自細胞分離之天然PTX3蛋白質。在一些實施例中，用一或多種促炎性細胞因子刺激細胞以上調PTX3表現。在一些實施例中，促炎性細胞因子為IL-1或TNF- α 。

在一些實施例中，藉由重組技術製備PTX3。在一些實施例中，PTX3自重組表現載體表現。在一些實施例中，編碼PTX3之核酸可操作地連接於組成型啟動子。在一些實施例中，編碼PTX3之核酸可操作地連接於誘導型啟動子。在一些實施例中，PTX3在轉殖基因動物中表現。在一些實施例中，PTX3為重組蛋白。在一些實施例中，PTX3為自細胞分離之重組蛋白。在一些實施例中，PTX3為在無細胞萃取物中產生之重組蛋白。

在一些實施例中，PTX3自羊膜、臍帶、臍帶羊膜、絨毛膜、羊水或其組合純化。在一些實施例中，PTX3自羊膜細胞純化。在一些實施例中，羊膜細胞為羊膜上皮細胞。在一些實施例中，羊膜細胞為

臍帶上皮細胞。在一些實施例中，羊膜細胞為羊膜基質細胞。在一些實施例中，羊膜細胞為臍帶基質細胞。在一些實施例中，用一或多種促炎性細胞因子刺激羊膜細胞以上調PTX3表現。在一些實施例中，促炎性細胞因子為IL-1或TNF- α 。

在一些實施例中，不自細胞或複數個細胞(例如組織萃取物)分離PTX3。

在一些實施例中，PTX3包含具有SEQ ID NO: 33中闡述之序列的多肽或與具有SEQ ID NO: 33中闡述之序列的多肽具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列胺基酸一致性的其變異體。例示性變異體包括例如物種變異體、對偶基因變異體及含有保守性及非保守性胺基酸突變之變異體。在一些實施例中，PTX3包含足以結合至HA且促進rcHC-HA/PTX3複合物形成之PTX3片段。在一些實施例中，PTX3包含人類PTX3之Glu18至Ser277。用於所提供方法中之PTX3變異體包括具有胺基酸修飾之變異體，該胺基酸修飾為胺基酸置換(取代)、缺失或插入。在一些實施例中，此類修飾改良PTX3多肽之一或多種特性，諸如改良rcHC-HA/PTX3複合物之一或多種治療特性(例如消炎、抗免疫、抗血管生成、抗結疤、抗黏附、再生或如本文所描述之其他治療活性)。

在一些實施例中，自商業來源獲得PTX3蛋白質。PTX3之例示性商業來源為(但不限於)PTX3 (目錄號1826-TS；R&D Systems，Minneapolis，MN)。

在一些實施例中，在方法中使用之PTX3蛋白質為多聚蛋白質。在一些實施例中，在方法中使用之PTX3蛋白質為均多聚體。在一些實施例中，均多聚體為二聚體、三聚體、四聚體、六聚體、五聚體或八聚體。在一些實施例中，PTX3均多聚體為三聚體、四聚體或八聚體。在特定實施例中，PTX3均多聚體為八聚體。在一些實施例中，

多聚合結構域經修飾以改良PTX3蛋白質之多聚合。在一些實施例中，多聚合結構域經當融合至PTX3時改良PTX3之多聚合的非均質多聚合結構域(例如Fc多聚合結構域或白胺酸拉鏈)置換。

TSG-6

在一些實施例中，自細胞或複數個細胞(例如組織萃取物)分離用於方法中之TSG-6。適用於表現TSG-6之例示性細胞包括(但不限於)動物細胞，包括(但不限於)哺乳動物細胞、靈長類動物細胞、人類細胞、嚙齒動物細胞、昆蟲細胞、細菌及酵母；及植物細胞，包括(但不限於)藻類、被子植物、裸子植物、蕨類植物及蘚苔植物。在一些實施例中，自人類細胞分離用於方法中之TSG-6。在一些實施例中，自用一或多種促炎性細胞因子刺激以上調TSG-6表現之細胞分離用於方法中之TSG-6。在一些實施例中，促炎性細胞因子為IL-1或TNF- α 。

在一些實施例中，自羊膜細胞分離用於方法中之TSG-6。在一些實施例中，自來自臍帶之羊膜細胞分離用於方法中之TSG-6。在一些實施例中，自用一或多種促炎性細胞因子刺激以上調TSG-6表現之羊膜細胞分離用於方法中之TSG-6。在一些實施例中，促炎性細胞因子為IL-1或TNF- α 。

在一些實施例中，自臍帶細胞分離用於方法中之TSG-6。在一些實施例中，自用一或多種促炎性細胞因子刺激以上調TSG-6表現之臍帶細胞分離用於方法中之TSG-6。在一些實施例中，促炎性細胞因子為IL-1或TNF- α 。

在一些實施例中，自羊膜上皮細胞分離用於方法中之TSG-6。在一些實施例中，自臍帶上皮細胞分離用於方法中之TSG-6。在一些實施例中，自用一或多種促炎性細胞因子刺激以上調TSG-6表現之羊膜上皮細胞或臍帶上皮細胞分離用於方法中之TSG-6。在一些實施例

中，促炎性細胞因子為IL-1或TNF- α 。

在一些實施例中，自羊膜基質細胞分離用於方法中之TSG-6。在一些實施例中，自臍帶基質細胞分離用於方法中之TSG-6。在一些實施例中，自一或多種促炎性細胞因子刺激以上調TSG-6表現之羊膜基質細胞或臍帶基質細胞分離用於方法中之TSG-6。在一些實施例中，促炎性細胞因子為IL-1或TNF- α 。

在一些實施例中，用於方法中之TSG-6為自細胞分離之天然TSG-6蛋白質。在一些實施例中，用一或多種促炎性細胞因子刺激細胞以上調TSG-6表現。在一些實施例中，促炎性細胞因子為IL-1或TNF- α 。

在一些實施例中，藉由重組技術製備TSG-6。在一些實施例中，TSG-6自重組表現載體表現。在一些實施例中，編碼TSG-6之核酸可操作地連接於組成型啟動子。在一些實施例中，編碼TSG-6之核酸可操作地連接於誘導型啟動子。在一些實施例中，TSG-6在轉殖基因動物中表現。在一些實施例中，TSG-6為重組蛋白。在一些實施例中，TSG-6為自細胞分離之重組蛋白。在一些實施例中，TSG-6為在無細胞萃取物中產生之重組蛋白。

在一些實施例中，TSG-6自羊膜、羊膜、絨毛膜、羊水或其組合純化。在一些實施例中，TSG-6自羊膜細胞純化。在一些實施例中，羊膜細胞為羊膜上皮細胞。在一些實施例中，羊膜上皮細胞為臍帶上皮細胞。在一些實施例中，羊膜細胞為羊膜基質細胞。在一些實施例中，羊膜細胞為臍帶基質細胞。在一些實施例中，用一或多種促炎性細胞因子刺激羊膜細胞以上調TSG-6表現。在一些實施例中，促炎性細胞因子為IL-1或TNF- α 。

在一些實施例中，不自細胞或複數個細胞(例如組織萃取物)分離TSG-6。

在一些實施例中，TSG-6包含足以促進或催化I α I之HC1向HA轉移之TSG-6片段。在一些實施例中，TSG-6包含TSG-6之連接模組。在一些實施例中，TSG-6包含TSG-6之胺基酸Trp18至Leu277。在一些實施例中，TSG-6包含具有SEQ ID NO: 2中闡述之序列的多肽或與具有SEQ ID NO: 2中闡述之序列的多肽具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列胺基酸一致性的其變異體。例示性變異體包括例如物種變異體、對偶基因變異體及含有保守性及非保守性胺基酸突變之變異體。人類TSG-6之天然對偶基因變異體包括例如含有胺基酸置換Q144R之TSG-6。用於所提供方法中之TSG-6之變異體或其HA結合片段包括具有胺基酸修飾之變異體，該胺基酸修飾為胺基酸置換(取代)、缺失或插入。在一些實施例中，此類修飾改良TSG-6多肽之一或多種特性，諸如I α I之HC1向HA之轉移改良或在I α I之HC1轉移至HA之後TSG-6多肽自rcHC-HA/PTX3複合物之釋放改良。

在一些實施例中，TSG-6包含親和標籤。例示性親和標籤包括(但不限於)血球凝集素標籤、聚組胺酸標籤、myc標籤、FLAG標籤、麩胱甘肽-S-轉移酶(GST)標籤。此類親和標籤在此項技術中熟知用於純化。在一些實施例中，此類親和標籤作為融合蛋白或經由化學連接子併入TSG-6多肽中。在一些實施例中，TSG-6包含親和標籤且未結合TSG-6藉由親和純化自rcHC-HA/PTX3複合物移除。

在一些實施例中，自商業來源獲得TSG-6蛋白質。TSG-6之例示性商業來源為(但不限於) TSG-6 (目錄號2104-TS R&D Systems, Minneapolis, MN)。

I α I

在一些實施例中，I α I包含HC1鏈。在一些實施例中，I α I包含HC1及HC2鏈。在一些實施例中，I α I包含HC1及雙庫尼茨抑制劑。在

一些實施例中，I α I包含HC1及HC2鏈及雙庫尼茨抑制劑。在一些實施例中，I α I包含由硫酸軟骨素鏈連接之HC1及HC2鏈及雙庫尼茨抑制劑。

在一些實施例中，自生物樣品分離I α I。在一些實施例中，生物樣品為來自哺乳動物之生物樣品。在一些實施例中，哺乳動物為人類。在一些實施例中，生物樣品為血液、血清、血漿、肝臟、羊膜、絨毛膜或羊水樣品。在一些實施例中，生物樣品為血液、血清或血漿樣品。在一些實施例中，生物樣品為血液樣品。在一些實施例中，生物樣品為血清樣品。在一些實施例中，生物樣品為血漿樣品。在一些實施例中，I α I自人類血液、血漿或血清純化。在一些實施例中，自人類血清分離I α I。在一些實施例中，I α I不自血清分離。在一些實施例中，在羊膜細胞中產生用於方法中之I α I。在一些實施例中，在臍帶細胞中產生用於方法中之I α I。在一些實施例中，在來自臍帶之羊膜細胞中產生用於方法中之I α I。在一些實施例中，在羊膜上皮細胞中產生用於方法中之I α I。在一些實施例中，在臍帶上皮細胞中產生用於方法中之I α I。在一些實施例中，在羊膜基質細胞中產生用於方法中之I α I。在一些實施例中，在臍帶基質細胞中產生用於方法中之I α I。在一些實施例中，在肝細胞中產生用於方法中之I α I。在一些實施例中，藉由重組技術製備I α I。

在一些實施例中，自生物樣品分離I α I之HC1。在一些實施例中，生物樣品為來自哺乳動物之生物樣品。在一些實施例中，哺乳動物為人類。在一些實施例中，生物樣品為血液、血清、血漿、肝臟、羊膜、絨毛膜或羊水樣品。在一些實施例中，生物樣品為血液、血清或血漿樣品。在一些實施例中，生物樣品為血液樣品。在一些實施例中，生物樣品為血清樣品。在一些實施例中，生物樣品為血漿樣品。在一些實施例中，自人類血液、血漿或血清純化I α I之HC1。在一些實

施例中，自人類血清分離I α I。在一些實施例中，I α I之HC1不自血清純化。在一些實施例中，藉由重組技術製備I α I之HC1。在一些實施例中，自肝細胞純化I α I之HC1。在一些實施例中，自羊膜細胞純化I α I之HC1。在一些實施例中，自羊膜上皮細胞或臍帶上皮細胞純化I α I之HC1。在一些實施例中，自羊膜基質細胞或臍帶基質細胞純化I α I之HC1。

在一些實施例中，HC1包含具有SEQ ID NO:47中闡述之序列的多肽或與具有SEQ ID NO:47中闡述之序列的多肽具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列胺基酸一致性的多肽。

在一些實施例中，自生物樣品分離I α I之HC2。在一些實施例中，生物樣品為來自哺乳動物之生物樣品。在一些實施例中，哺乳動物為人類。在一些實施例中，生物樣品為血液、血清、血漿、肝臟、羊膜、絨毛膜或羊水樣品。在一些實施例中，生物樣品為血液、血清或血漿樣品。在一些實施例中，生物樣品為血液樣品。在一些實施例中，生物樣品為血清樣品。在一些實施例中，生物樣品為血漿樣品。在一些實施例中，自人類血液、血漿或血清純化I α I之HC2。在一些實施例中，自人類血清分離I α I之HC2。在一些實施例中，I α I之HC2不自血清分離。在一些實施例中，藉由重組技術製備I α I之HC2。在一些實施例中，自肝細胞純化I α I之HC2。在一些實施例中，自羊膜細胞純化I α I之HC2。在一些實施例中，自羊膜上皮細胞或臍帶上皮細胞純化I α I之HC2。在一些實施例中，自羊膜基質細胞或臍帶基質細胞純化I α I之HC2。

在一些實施例中，HC2包含具有SEQ ID NO:49中闡述之序列的多肽或與具有SEQ ID NO:49中闡述之序列的多肽具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列胺基酸一致性的多

肽。

在一些實施例中，IαI包含雙庫尼茨抑制劑。在一些實施例中，雙庫尼茨抑制劑包含具有SEQ ID NO:53中闡述之序列的多肽或與具有SEQ ID NO:53中闡述之序列的多肽具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列胺基酸一致性的多肽。在一些實施例中，IαI包含硫酸軟骨素鏈。

HA

在一些實施例中，自細胞、組織或流體樣品純化HA。在一些實施例中，HA自商業供應商(例如Sigma Aldrich或Advanced Medical Optics, Irvine, CA (例如Healon))獲得。在一些實施例中，HA自商業供應商以粉末形式獲得。在一些實施例中，HA在細胞中表現。適用於表現HA之例示性細胞包括(但不限於)動物細胞，包括(但不限於)哺乳動物細胞、靈長類動物細胞、人類細胞、嚙齒動物細胞、昆蟲細胞、細菌及酵母；及植物細胞，包括(但不限於)藻類、被子植物、裸子植物、蕨類植物及蘚苔植物。在一些實施例中，HA在人類細胞中表現。在一些實施例中，HA在轉殖基因動物中表現。在一些實施例中，HA自表現透明質酸合成酶(例如HAS1、HAS2及HAS3)之細胞獲得。在一些實施例中，細胞含有表現HA合成酶之重組表現載體。在某些情況下，HA合成酶藉由在擠壓通過細胞膜至細胞外空間中時反覆添加葡萄糖醛酸及N-乙酰基葡萄糖胺至新生多醣中來延長透明質酸。

用於方法中之HA通常為高分子量(HMW) HA。在一些實施例中，HMW HA之重量平均分子量大於約500千道爾頓(kDa)，諸如在約500 kDa與約10,000 kDa之間、約800 kDa與約8,500 kDa之間、約1100 kDa與約5,000 kDa之間或約1400 kDa與約3,500 kDa之間。在一些實施例中，HMW HA之重量平均分子量為約3000 kDa。

其他組分

在一些實施例中，添加一或多種其他組分以產生rcHC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，添加較小富含白胺酸之蛋白聚糖(SLRP)以產生rcHC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，SLRP為I類、II類或II類SLRP。在一些實施例中，SLRP選自I類SLRP，諸如核心蛋白聚糖及雙糖鏈蛋白聚糖。在一些實施例中，SLRP選自II類SLRP，諸如纖調蛋白、光蛋白聚糖、PRELP（脯胺酸精胺酸豐富端白胺酸豐富蛋白質）、角蛋白聚糖及骨黏附蛋白聚糖。在一些實施例中，SLRP選自III類別SLRP，諸如骺蛋白聚糖及骨甘胺酸。在一些實施例中，SLRP選自雙庫尼茨抑制劑、核心蛋白聚糖、雙糖鏈蛋白聚糖及骨黏附蛋白聚糖。在一些實施例中，SLRP包含葡糖胺聚糖。在一些實施例中，SLRP包含硫酸角質素。

HA固定

在一些實施例中，藉由任何適合之方法固定HMW HA。在一些實施例中，將HMW HA固定至固體載體，諸如培養盤、珠粒、管柱或其他適合之表面，諸如可植入醫學裝置之表面或其一部分或固定在隨後與如本文所描述之可植入醫學裝置連接或組合的表面上。在一些實施例中，HMW HA直接固定至固體載體，諸如藉由化學鍵聯。在一些實施例中，HMW HA經由連接子或中間蛋白質間接連接至固體載體。熟習此項技術者已知用於形成胺基與硫醇基之間的共價鍵且將硫醇基引入至蛋白質中的許多異雙官能交聯試劑。在一些實施例中，HMW HA經由與固體載體交聯直接固定至固體載體。在一些實施例中，HMW HA在不交聯至固體載體的情況下直接固定至固體載體。在一些實施例中，HMW HA以塗層形式直接固定至固體載體。在一些實施例中，HMW HA固定至Covalink™-NH表面。在一些實施例中，HMW HA以塗層形式直接固定至固體載體。在一些實施例中，HMW HA在4℃下固定至Covalink™-NH表面持續約16 h。

在一些實施例中，方法包含經由與固體載體直接鍵聯(亦即無中間蛋白質)將HMW HA固定至固體表面。在一些實施例中，在使固定HA與PTX3接觸之前洗滌固體載體以移除未結合HMW HA。在一些實施例中，在使固定HA與PTX3接觸之前用8 M GnHCl及PBS之洗液洗滌固體載體以移除未結合HMW HA。

在一些實施例中，方法包含經由中間蛋白質或連接子將HA固定至固體表面。在一些實施例中，連接子為肽連接子。在一些實施例中，中間蛋白質為HA結合蛋白(HABP)。在一些實施例中，HABP首先連接至固體載體(例如藉由交聯、化學鍵聯或經由化學連接子)。在一些實施例中，隨後使包含HABP之固體載體與HA (例如HMW HA)接觸以經由HABP與HA之結合將HA固定至固體載體。在一些實施例中，在使固定HMW HA與PTX3接觸之前洗滌固體載體以移除未結合HMW HA。在一些實施例中，在使固定HA與PTX3接觸之前用8 M GnHCl及PBS之洗液洗滌固體載體以移除未結合HMW HA。

在一些實施例中，方法包含經由肽連接子與固體載體之連接及HA與肽連接子之連接將HA固定至固體表面。在一些實施例中，肽連接子包含蛋白酶裂解位點。

在一些實施例中，方法包含經由可裂解化學連接子(諸如(但不限於)二硫化物化學連接子)之連接將HA固定至固體表面。

在一些實施例中，經選擇用於方法中之HABP為在形成rcHC-HA/PTX3複合物之後自HA解離之HABP。在一些實施例中，HABP非共價結合至HA。在一些實施例中，方法進一步包含使用一或多種解離劑自HABP解離rcHC-HA/PTX3複合物。此項技術中已知用於破壞非共價相互作用之解離劑(例如胍鹽酸鹽、脲及各種清潔劑，例如SDS)。在一些實施例中，解離劑為脲。在一些實施例中，解離劑為胍鹽酸鹽。在一些實施例中，解離劑為約4M至約8M胍-HCl。在一些

實施例中，解離劑為約4M、約5M、約6M、約7M、約8M胍-HCl。在一些實施例中，解離劑為含約4M至約8M胍-HCl之PBS，pH 7.5。

在一些實施例中，使用此類解離劑將rcHC-HA/PTX3複合物自中間HABP解離。用於方法中之HABP通常經選擇以使得對HA之結合親和力足夠強以准許rcHC-HA/PTX3複合物組裝但用適解離劑自rcHC-HA/PTX3複合物解離。在一些實施例中，解離劑為胍鹽酸鹽。

用於本文所提供之方法之例示性HABP包括(但不限於)HAPLN1、HAPLN2、HAPLN3、HAPLN4、聚集蛋白聚糖、多功能蛋白聚糖、神經蛋白聚糖、短蛋白聚糖、磷酸蛋白聚糖、TSG-6、CD44、穩定素-1、穩定素-2或其足以結合HA之部分(例如其連接模組)。在一些實施例中，HABP包含具有SEQ ID NO:54-99中之任一者中闡述之序列的多肽或與具有SEQ ID NO:54-99中之任一者中闡述之序列的多肽具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列胺基酸一致性的多肽。在一些實施例中，HABP為多功能蛋白聚糖。在一些實施例中，HABP為重組蛋白。在一些實施例中，HABP為重組哺乳動物蛋白。在一些實施例中，HABP為重組人類蛋白。在一些實施例中，HABP為重組多功能蛋白聚糖蛋白或其足以結合至HA之部分。在一些實施例中，HABP為重組聚集蛋白聚糖蛋白或其足以結合至HA之部分。在一些實施例中，HABP為天然HABP或其足以結合至HA之部分。在一些實施例中，自哺乳動物組織或細胞分離天然HABP。在一些實施例中，自牛鼻軟骨分離HABP (例如來自含有聚集蛋白聚糖及連接蛋白之HA結合結構域的Seikagaku的HABP)。

在一些實施例中，HABP包含HAPLN1、HAPLN2、HAPLN3、HAPLN4、聚集蛋白聚糖、多功能蛋白聚糖、神經蛋白聚糖、短蛋白聚糖、磷酸蛋白聚糖、TSG-6、CD44、穩定素-1或穩定素-2之連接模

組。在一些實施例中，HABP包含連接模組，其包含具有SEQ ID NO:54-99之連接結構域中的任一者中闡述之序列的多肽或與具有SEQ ID NO:54-99之連接結構域中的任一者中闡述之序列的多肽具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列胺基酸一致性的多肽。在一些實施例中，HABP包含多功能蛋白聚糖之連接模組。在一些實施例中，包含連接模組之HABP為重組蛋白。在一些實施例中，包含多功能蛋白聚糖之連接模組之HABP為重組蛋白。

在一些實施例中，中間蛋白質(諸如HABP)含有藉由位點特異性蛋白酶(諸如弗林蛋白酶(furin)、3C蛋白酶、卡斯蛋白酶、基質金屬蛋白酶或TEV蛋白酶)識別及水解之蛋白質裂解序列。在此類實施例中，經組裝rcHC-HA/PTX3複合物藉由使固定複合物與裂解特定裂解序列之蛋白酶接觸而自固體載體釋放。

在一些實施例中，rcHC-HA/PTX3複合物經純化。在一些實施例中，rcHC-HA/PTX3複合物藉由任何適合之方法或方法之組合純化。下文描述之實施例不意欲為排他性的，僅為例示性的。

在一些實施例中，rcHC-HA/PTX3複合物藉由層析(例如離子交換、親和力、尺排阻及羥基磷灰石層析)、凝膠過濾、離心(例如梯度離心)或不同溶解性、乙醇沈澱或藉由用於蛋白質純化之任何其他可用技術純化。

在一些實施例中，rcHC-HA/PTX3複合物藉由免疫親和層析純化。在一些實施例中，產生針對rcHC-HA/PTX3複合物之組分的抗體(例如抗HC1、抗PTX、針對rcHC-HA/PTX3複合物之一或多種SLRP之抗體，例如抗雙庫尼茨抑制劑、抗核心蛋白聚糖、抗雙糖鏈蛋白聚糖或抗骨黏附蛋白聚糖)且其附著至固體載體。在一些實施例中，使未純化rcHC-HA/PTX3複合物(亦即移動相)越過載體。在某些情況下，rcHC-HA/PTX3複合物結合至抗體。在一些實施例中，洗滌(例如用

PBS)載體以移除任何未結合或鬆散結合之分子。在一些實施例中，隨後用允許rcHC-HA/PTX3複合物自載體溶離之溶液(例如1% SDS、6M 胍-HCl或8M 脲)洗滌載體。在一些實施例中，自解離之rcHC-HA/PTX3複合物移除解離劑。在一些實施例中，藉由包括(但不限於)以下之方法自解離之rcHC-HA/PTX3複合物移除解離劑：離子交換層析、透析、凝膠過濾層析、超過濾或透濾作用。

在一些實施例中，藉由親和層析純化rcHC-HA/PTX3複合物。在一些實施例中，HABP用於結合至rcHC-HA/PTX3複合物以便純化複合物且附著至固定載體。在一些實施例中，使未純化rcHC-HA/PTX3複合物(亦即移動相)越過載體。在某些情況下，rcHC-HA/PTX3複合物結合至HABP。在一些實施例中，洗滌(例如用PBS)載體以移除任何未結合或鬆散結合之分子。在一些實施例中，隨後用允許rcHC-HA/PTX3複合物自載體溶離之溶液(例如解離劑)洗滌載體。在一些實施例中，藉由包括(但不限於)以下之方法自解離之rcHC-HA/PTX3複合物移除解離劑：離子交換層析、透析、凝膠過濾層析、超過濾或透濾作用。

在一些實施例中，藉由HABP親和層析及使用針對rcHC-HA/PTX3複合物之一或多種組分之抗體的免疫親和層析之組合純化rcHC-HA/PTX3複合物。

在一些實施例中，本文所揭示之rcHC-HA/PTX3複合物之一或多種組分包含親和標籤(例如具有親和標籤之PTX3或HC1之融合蛋白)。在一些實施例中，併入rcHC-HA/PTX3複合物之一或多種組分中之例示性親和標籤包括(但不限於)血球凝集素標籤、聚組胺酸、myc標籤、FLAG標籤或麩胱甘肽-S-轉移酶序列。在一些實施例中，親和標籤之配位體附著至固體載體。在一些實施例中，使未純化rcHC-HA/PTX3複合物越過載體。在某些情況下，rcHC-HA/PTX3複合物結

合至配位體。在一些實施例中，洗滌(例如用PBS)載體以移除任何未結合或鬆散結合之分子。在一些實施例中，隨後用允許本文所揭示之rcHC-HA/PTX3複合物自載體溶離之溶液洗滌載體。在一些實施例中，藉由包括(但不限於)以下之方法自解離之rcHC-HA/PTX3複合物移除溶離劑：離子交換層析、透析、凝膠過濾層析、超過濾或透濾作用。

在一些實施例中，PTX3、TSG-6及/或HC1結合至標籤。「標籤」係指直接或間接結合至多肽以便產生標記多肽之可偵測化合物或組合物。在一些實施例中，標籤本身可偵測(例如放射性同位素標籤或螢光標籤)，或在酶標籤之情況下，催化可偵測受質化合物或組合物的化學改變。標籤之非限制性實例包括螢光部分、染料、螢光標籤、綠色螢光蛋白或螢光素酶。

賦形劑

在一些實施例中，組合物包含賦形劑。在一些實施例中，賦形劑選自包含以下之群：pH調節劑、緩衝劑、膠原蛋白、HA、抗生素、界面活性劑、穩定劑、蛋白質及其組合。在一些實施例中，賦形劑包含細胞外基質(ECM)組分。在一些實施例中，ECM組分包含膠原蛋白、纖維蛋白、HA或其組合。

膠原蛋白為在體內發現之主要結構蛋白。其為組織提供支持，將組織連接至骨骼且提供身體結構。當身體處於癒合過程中時，膠原蛋白起幫助構建細胞結構之作用。玻尿酸為在滑動關節流體、眼部玻璃體液、軟骨、血管、細胞外基質、皮膚及臍帶中發現之天然糖。纖維蛋白為參與血液凝結之蛋白質。

在一些實施例中，將胎兒支持組織製劑與膠原蛋白、纖維蛋白或HA混合。膠原蛋白、纖維蛋白及HA可為適合遞送媒劑，因為與膠原蛋白或HA混合之AM製劑顯示對TGF 13啟動子活性發揮遏制作用。

儘管在本文中描述之實驗中將胎兒支持組織製劑與膠原蛋白凝膠及HA凝膠混合，在一些實施例中，使用任何可溶形式(例如液體)之膠原蛋白及HA或其他ECM組分(例如纖維蛋白)。在一些實施例中，膠原蛋白、纖維蛋白或HA來源於任何適合之來源。在一些實施例中，改變AM與膠原蛋白、纖維蛋白或HA之比。在一些實施例中，AM與膠原蛋白、纖維蛋白或HA之比為小於約0.001:1、0.01:1、0.05:1或0.1:1至約1:1、1.5:1、2:1、5:1、10:1、100:1或1000:1，或使用1000:1以上。

在一些實施例中，如實例1中所描述，藉由用0.1 N乙酸稀釋儲備溶液(4 mg/ml)且藉由將其與合適體積比率之20× DMEM或適合緩衝液及1 N NaOH混合來製備膠原蛋白凝膠。在一些實施例中，組合物中之膠原蛋白以小於約2 mg/ml至大於約4 mg/ml之範圍存在。

在一些實施例中，HA為高分子量(MW) HA。在一些實施例中，藉由在DMEM或適合緩衝液中稀釋商業上製備之HA (Healon™ (10 mg HA/ml) (Pharmacia, LaJolla, CA)來製備各種稀釋度之高MW HA。在一些實施例中，將乾粉及水可溶形式之胎兒支持組織製劑在諸如PBS、DMEM或其他溶液之溶液中稀釋至所需膠原蛋白濃度。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑中之HA以小於約2 µg/ml至大於約129 µg/ml之範圍存在。

說明性製備

實例8至15代表製備本文所描述及使用之胎兒支持組織製劑之說明性方法。

組合物

在一些實施例中，包含胎兒支持組織製劑的組合物以非固體劑型調配用於投與目的。在一些實施例中，非固體劑型包含組合製劑與遞送媒劑以產生組合物，諸如溶液、滴劑、懸浮液、糊劑、噴霧、軟

膏、油、乳液、氣溶膠、塗佈繃帶、貼片、乳霜、洗劑、凝膠及其類似物。所用調配物將視特定應用而定。凝膠適用於投與組合物，因為其允許在引入部位較好保留活性成分，使得在清除活性成分之前活性成分持續較長時間段發揮其作用。在一些實施例中，以延長釋放固體劑型(包括口服劑型)調配組合物。

在一些實施例中，以習知方式使用一或多種生理上可接受之載劑調配組合物，該等載劑包括賦形劑及助劑，其促進胎兒支持組織製劑處理成醫藥學上使用之組合物。適當調配物視所選投與途徑而定。適當時且如此項技術中所理解，可使用熟知技術、載劑及賦形劑中之任一者。

在一些實施例中，胎兒支持組織之組合物呈液體、懸浮液、凝膠或凍乾粉末或其他形式。在一些實施例中，組合物可注射。在一些實施例中，胎兒支持組織之組合物包含抗微生物劑。在一些實施例中，抗微生物劑為抗生素或抗真菌劑。在一些實施例中，胎兒支持組織之組合物包含額外物質以穩定及/或保存胎兒支持組織之組合物。在一些實施例中，在使用之前在室溫、-20°C 或-80°C 下封裝及儲存胎兒支持組織之組合物。

在某些實施例中，組合物包含醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑或載劑。在一些實施例中，組合物進一步包含其他活性成分，如在組合療法中。在一些實施例中，組合物包含其他藥物或醫藥試劑、載劑、佐劑，諸如防腐劑、穩定劑、濕潤劑或乳化劑、溶解促進劑及調節滲透壓之鹽、緩衝劑或其組合。在一些實施例中，組合物包含額外治療劑。

在一些實施例中，組合物進一步包含化學組分，諸如載劑、穩定劑、稀釋劑、分散劑、懸浮劑、增稠劑、賦形劑或其組合。在一些實施例中，組合物促進製劑投與至個體。在一些實施例中，治療有效

量之胎兒支持組織組合物以可注射組合物形式向患有待治療之疾病、病症或病狀之個體投與。在一些實施例中，個體為哺乳動物。在一些實施例中，哺乳動物為人類。在一些實施例中，治療有效量視疾病之嚴重性、個體之年齡及相對健康狀況、使用之組合物之效能及其他因素而變化。在一些實施例中，組合物單獨或與一或多種作為混合物之組分的治療劑組合使用。

眼用組合物：

在一些實施例中，眼用組合物包含胎兒支持組織製劑；及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑。在一些實施例中，眼用組合物主要由以下組成：基本上經分離之HC-HA/PTX3、復原HC-HA/PTX3或其組合；及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑。在一些實施例中，製備用於局部遞送至眼部之組合物。在一些實施例中，組合物全身性(諸如靜脈內)投與。在一些實施例中，組合物局部投與至眼部。在一些實施例中，將組合物調配成各種可局部投與之眼用組合物。在一些實施例中，可局部投與之眼用組合物包含溶液、懸浮液、凝膠或軟膏。在一些實施例中，組合物經調配用於注射至眼部。在一些實施例中，組合物藉由玻璃體內注射投與至眼部。在一些實施例中，組合物藉由眼內注射、視網膜下注射、玻璃體內注射、眼周投與、結膜下注射、眼球後注射、前房內注射(包括至前腔或玻璃體腔中)或眼球筋膜下注射來投與。在一些實施例中，藉由植入物、眼用溶液、眼用懸浮液、眼用軟膏、眼部植入物及眼部插入物、眼內溶液、使用離子導入療法、併入在手術灌洗溶液中及封裝(僅藉助於實例，插入在穹窿中之飽和棉花拭子)來投與組合物。

在一些實施例中，組合物為液體組合物，其中胎兒支持組織製劑以溶液形式、以懸浮液形式存在或兩者。在一些實施例中，組合物包括凝膠調配物。在其他實施例中，液體組合物為水溶液。在一些實

施例中，組合物為軟膏。

在一些實施例中，組合物為水性組合物。在一些實施例中，水性組合物為水性溶液、懸浮液或溶液/懸浮液。在一些實施例中，水性組合物以滴眼劑形式呈現。在一些實施例中，所需劑量經由已知數目之滴劑投與至眼部。舉例而言，對於25 μ l之滴劑體積，投與1至6滴將遞送25-150 μ l組合物。在一些實施例中，水性組合物包含約0.01%至約50%重量/體積胎兒支持組織製劑或純化組分。在一些實施例中，水性組合物包含約0.1%至約20%重量/體積胎兒支持組織製劑或純化組分。在一些實施例中，水性組合物包含約0.2%至約10%重量/體積胎兒支持組織製劑或純化組分。在一些實施例中，水性組合物包含約0.5%至約5%重量/體積胎兒支持組織製劑或純化組分。在一些實施例中，水性組合物具有眼部可接受之pH及滲透重量莫耳濃度。關於調配物、組合物或成分之「眼部可接受」通常意謂對治療之眼部或其功能或對治療之受試者之一般健康不具有持久有害影響。諸如微小刺激或「刺痛」感覺之短暫效果在藥劑之局部眼用投與之情況下為常見的且與所討論之調配物、組合物或成分為「眼部可接受」一致。

在一些實施例中，組合物為水性組合物且包含聚合物作為懸浮劑。在一些實施例中，水性組合物包含一種以上聚合物作為懸浮劑。在一些實施例中，聚合物包含水溶性聚合物、水不溶性聚合物或其組合。在一些實施例中，水溶性聚合物包含纖維素聚合物。在一些實施例中，纖維素聚合物包含羥丙基甲基纖維素。在一些實施例中，水不溶性聚合物包含交聯含羧基聚合物。在一些實施例中，水性組合物包含眼部可接受之黏膜黏附聚合物。在一些實施例中，黏膜黏附聚合物包含羧甲基纖維素、卡波姆(丙烯酸聚合物)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚丙烯醯胺、聚卡波非、丙烯酸/丙烯酸丁酯共聚物、海藻酸鈉、葡萄糖或其組合。

在一些實施例中，組合物包含眼部可接受之增溶劑以幫助胎兒支持組織製劑在組合物中之溶解。在一些實施例中，組合物包含眼部可接受之增溶劑以幫助純化HC-HA/PTX3在組合物中之溶解。術語「增溶劑」一般包括使得形成微胞溶液或試劑之真溶液的試劑。在一些實施例中，眼部可接受之增溶劑為非離子界面活性劑。在一些實施例中，非離子界面活性劑包含聚山梨醇酯80、二醇、聚二醇、聚乙二醇400、二醇醚、其衍生物或其任何組合。

在一些實施例中，組合物包含一或多種眼部可接受之pH調節劑或緩衝劑。在一些實施例中，pH調節劑包含酸。在一些實施例中，酸係選自包含以下之清單：乙酸、硼酸、檸檬酸、乳酸、磷酸及鹽酸。在一些實施例中，pH調節劑包含鹼。在一些實施例中，鹼係選自包含以下之清單：氫氧化鈉、磷酸鈉、硼酸鈉、檸檬酸鈉、乙酸鈉、乳酸鈉及參羥基甲胺基甲烷。在一些實施例中，緩衝劑係選自包含以下之清單：檸檬酸鹽/右旋糖、碳酸氫鈉及氯化銨。在一些實施例中，以將組合物之pH維持在眼部可接受之範圍內所需要之量包括酸、鹼或緩衝劑。

在一些實施例中，組合物包含呈使組合物之滲透重量莫耳濃度達到眼部可接受之範圍所需要的量的眼部可接受之鹽。在一些實施例中，鹽包含鈉、鉀或銨陽離子及氯、檸檬酸根、抗壞血酸根、硼酸根、磷酸根、碳酸氫根、硫酸根、硫代硫酸根或亞硫酸氫根陰離子。在一些實施例中，鹽選自包含以下之清單：氯化鈉、氯化鉀、硫代硫酸鈉、亞硫酸氫鈉、硫酸銨或其組合。

在一些實施例中，組合物包含眼部可接受之防腐劑以抑制微生物活性。在一些實施例中，防腐劑包含含汞物質、穩定二氧化氯、四級銨化合物或其組合。在一些實施例中，含汞物質包含硼酸苯汞(merfen)、硫柳汞或其組合。在一些實施例中，四級銨化合物包含氯

化苯甲烴銨、溴化十六烷基三甲基銨、氯化十六烷基吡啶或其組合。

在一些實施例中，組合物包含一或多種眼部可接受之界面活性劑以增強物理穩定性或用於其他目的。在一些實施例中，界面活性劑包含非離子界面活性劑。在一些實施例中，非離子界面活性劑係選自包含以下之清單：聚氧化乙烯脂肪酸甘油酯及植物油，例如聚氧化乙烯(60)氫化蓖麻油；及聚氧化乙烯烷基醚及烷基苯基醚，例如辛苯聚醇10、辛苯聚醇40。

在一些實施例中，需要時組合物包含一或多種抗氧化劑以增強化學穩定性。在一些實施例中，抗氧化劑包含抗壞血酸、偏亞硫酸氫鈉或其組合。

在一些實施例中，組合物封裝在單劑量不可再封閉容器中。在一些實施例中，組合物封裝在多劑量可再封閉容器中。在一些實施例中，當封裝在多劑量可再封閉容器中時組合物進一步包含防腐劑。

在一些實施例中，組合物呈插入在眼睛與眼瞼之間或結膜囊中(其中其釋放製劑)的固體物品形式。在一些實施例中，製劑釋放至浸洗角膜表面之淚液中或直接釋放至角膜本身，固體物品一般與其緊密接觸。在一些實施例中，適用於植入在眼睛中之固體物品包含聚合物。在一些實施例中，適用於植入在眼睛中之固體物品為可生物降解或不可生物降解的。

可注射組合物：

在一些實施例中，組合物為可注射組合物。在一些實施例中，可注射組合物包含胎兒支持組織製劑；及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑。在一些實施例中，可注射組合物主要由以下組成：基本上經分離之HC-HA/PTX3、復原HC-HA/PTX3或其組合；及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑。在一些實施例中，可注射組合物適用於眼內、肌肉內、皮下或靜脈內注射。在一些實施

例中，可注射組合物包含生理上可接受之無菌水溶液或非水溶液、分散液、懸浮液或乳液及用於復原成無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末。適合之水性及非水性載劑、稀釋劑、溶劑或媒劑之非限制性實例包括水、乙醇、多元醇(丙二醇、聚乙二醇、甘油、十六醇聚氧乙烯醚及其類似物)、其適合之混合物、植物油(諸如橄欖油)及可注射有機酯，諸如油酸乙酯。在一些實施例中，藉由使用包衣、界面活性劑或其組合來維持適當流動性。在一些實施例中，包衣為卵磷脂。在一些實施例中，可注射組合物包含添加劑。在一些實施例中，添加劑係選自包含以下之清單：防腐劑、濕潤劑、乳化劑、分配劑或其組合。在一些實施例中，可注射組合物包含抗細菌劑或抗真菌劑。在一些實施例中，抗細菌劑或抗真菌劑包含對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸或其組合。在一些實施例中，可注射組合物包含等張劑。在一些實施例中，等張劑包含糖、氯化鈉或其組合。在一些實施例中，可注射組合物包含吸收延遲劑。在一些實施例中，吸收延遲劑包含單硬脂酸鋁、明膠或其組合。

在一些實施例中，靜脈內投與可注射組合物。在一些實施例中，在水溶液中、在生理上相容之緩衝液，諸如漢克氏溶液(Hank's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)、生理鹽水緩衝液或另一適合溶液中調配可注射組合物。在一些實施例中，對於經黏膜投與，在調配物中使用適於將滲透之障壁的滲透劑。此類滲透劑一般在此項技術中已知。在一些實施例中，對於非經腸注射，合適調配物包括水性或非水性溶液，較佳具有生理上相容之緩衝劑或賦形劑。此類賦形劑一般在此項技術中已知。

在一些實施例中，非經腸注射涉及快速注射或連續輸注。在一些實施例中，組合物以單位劑型呈現，例如安瓿，或多劑量容器，其中添加防腐劑。在一些實施例中，可注射組合物呈適用於作為於油性

或水性媒劑中之無菌懸浮液、溶液或乳液來非經腸注射的調配物。在一些實施例中，可注射組合物包含處方劑。在一些實施例中，處方劑為懸浮劑、穩定劑、分散劑或其組合。在一些實施例中，用於非經腸投與之可注射組合物包含呈水溶性形式之胎兒支持組織製劑之水溶液。在一些實施例中，將活性化合物之懸浮液製備為油性注射懸浮液。在一些實施例中，可注射組合物包含親脂性溶劑或媒劑。親脂性溶劑或媒劑之非限制性實例包括(但不限於)脂肪油，諸如芝麻油；或合成脂肪酸酯，諸如油酸乙酯或三酸甘油酯，或脂質體。在一些實施例中，可注射組合物含有增加懸浮液之黏度的物質，諸如羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇或聚葡萄糖。在一些實施例中，可注射組合物含有適合之穩定劑或增加化合物之溶解性的試劑以允許製備高度濃縮溶液。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑呈粉末形式以便在使用之前用適合之媒劑(例如無菌無熱原質水)復原。

給藥方法及治療方案：

在一些實施例中，藉由任何適合之技術投與組合物。在一些實施例中，組合物直接投與至目標部位(例如眼表面、玻璃體等)。在一些實施例中，局部投與組合物。在一些實施例中，非經腸(例如皮下)投與組合物。在一些實施例中，眼內投與組合物。

在一些實施例中，投與組合物以用於預防性及/或治療性應用。在一些實施例中，組合物以足以治癒或至少部分抑制疾病或病狀之症狀的量向已罹患疾病或病狀之個體投與。在一些實施例中，對於此用途有效之量視疾病或病狀之嚴重性及病程、先前療法、個體之健康狀態、體重及對藥物之反應及治療醫師之判斷而定。

在一些實施例中，向易罹患特定疾病、病症或病狀或另外處於特定疾病、病症或病狀風險下之個體投與組合物。此類量定義為「預防有效量或劑量」。在此使用中，精確量亦視個體之健康狀況、體重

及其類似因素而定。在一些實施例中，使用劑量遞增試驗來確定預防有效量。在一些實施例中，使用任何適合之方法確定預防有效量。在一些實施例中，預防有效量視疾病、病症或病狀之嚴重性及病程、先前療法、個體之健康狀態及對藥物之反應及治療醫師之判斷而定。

在個體之病狀未改善之情況下，在醫生之判斷後，長期，亦即持續延長時間段，包括在個體生命之整個持續時間內投與組合物以便改善或以其他方式控制或限制個體之疾病或病狀之症狀。

在個體之狀態改善之情況下，在醫生之判斷後，持續給與組合物或投與之藥物之劑量暫時減少或暫時暫停某一時間長度(亦即「休藥期」)。在一些實施例中，休藥期之長度在2天與1年之間變化，包括僅例如2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天、15天、20天、28天、35天、50天、70天、100天、120天、150天、180天、200天、250天、280天、300天、320天、350天或365天。在一些實施例中，在休藥期期間劑量減少為10%-100%，包括僅例如10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

一旦個體之病狀出現改善，則在必要時投與維持劑量。隨後，根據症狀將投與劑量或頻率或兩者降低至維持改善之疾病、病症或病狀的程度。在一些實施例中，在症狀之任何復發後個體需要長期間歇治療。

在一些實施例中，向個體投與之組合物的量視諸如疾病或病狀及其嚴重性、需要治療之個體之身分(例如體重、性別、年齡及總體健康狀況)之因素而變化。在一些實施例中，以此項技術中已知之方式根據圍繞情況之特定情形確定所投與組合物的量，包括例如投與之特定製劑、組合物或調配物、投與途徑、治療之病狀及治療之個體。在一些實施例中，成人治療所採用之量或劑量在每日0.02-5000 mg，

較佳每日1-1500 mg範圍內。在一些實施例中，所需劑量以單一劑量或以同時投與(或歷經較短時間段)或以合適間隔，例如以每日兩次、三次、四次或四次以上之子劑量投與之分次劑量形式呈現。

在一些實施例中，組合物呈適用於單次投與精確量或劑量的單位劑型。在單位劑型中，組合物分成含有合適量或劑量之組合物的單位劑量。在一些實施例中，單位劑量呈含有各別量之組合物的封裝形式。非限制性實例為封裝在小瓶或安瓿中之粉末。在一些實施例中，組合物封裝在單劑量不可再封閉容器中。在一些實施例中，使用多劑量可再封閉容器，在此情況下，通常在組合物中包括防腐劑。在一些實施例中，用於非經腸注射之組合物以單位劑型呈現，其包括(但不限於)安瓿；或以多劑量容器，其中添加防腐劑。

在一些實施例中，適合於組合物之日劑量為約0.01至2.5 mg/kg/體重。指示日劑量在約0.5 mg至約100 mg範圍內，適宜地以分次劑量投與，包括(但不限於)一天至多四次或以延長釋放形式。前述範圍僅為例示，因為關於個別治療方案之變數數目巨大，且此等推薦值之重要偏差不常見。在一些實施例中，劑量視許多變數而改變，該等變數不限於組合物之活性、待治療之疾病或病狀、投與模式、個體之需求、所治療疾病或病狀之嚴重性及醫師之判斷。

在一些實施例中，此類治療方案之毒性及治療功效在細胞培養物或實驗動物中藉由標準醫藥程序來確定，包括(但不限於)測定LD₅₀ (群體之50%致死的劑量)及ED₅₀ (群體之50%治療有效的劑量)。在一些實施例中，毒性與治療效應之間的劑量比為治療指數且表示為LD₅₀與ED₅₀之間的比率。展示較高治療指數之組合物較佳。在一些實施例中，在調配一系列用於個體之劑量中使用自細胞培養分析或動物研究獲得的資料。在一些實施例中，組合物之劑量處於循環濃度之範圍內，其包括具有最小毒性之ED₅₀。在一些實施例中，劑量視所用劑型

及所用投與途徑而定在此範圍內變化。

組合治療：

在一些實施例中，組合物與額外治療化合物共同投與。在一些實施例中，額外治療劑不以相同組合物形式投與。在一些實施例中，藉由與組合物不同之途徑投與額外治療劑。投與模式之確定及(可能時)以相同組合物形式投與之合理性完全在熟練臨床醫師之知識範圍內。在一些實施例中，根據此項技術中已知之現有方案進行初始投與，且隨後由熟練臨床醫師基於觀測效果、劑量、投與模式及投與時間來修改。

在一些實施例中，所用額外治療化合物之特定選擇視主治醫師之診斷及其對個體病狀之判斷及合適治療方案而定。在一些實施例中，視疾病、病症或病狀之性質、個體之病狀及所用化合物之實際選擇而定，同時(例如同時、基本上同時或在同一治療方案內)或依序投與額外治療化合物。投與次序及各治療劑在治療方案期間之投與重複次數的確定在評估治療中之疾病及個體之病狀之後完全在熟練醫師之知識內。

在一些實施例中，當在組合治療中使用組合物時治療有效劑量變化。在一些實施例中，使用任何適合之方法確定用於組合治療方案之藥物及其他藥劑之治療有效劑量。在一些實施例中，使用節拍式給藥(亦即提供較頻繁、較少劑量以便使有毒副作用最小化)來確定用於組合治療之藥物及其他藥劑之治療有效劑量。在一些實施例中，組合治療包含在各種時間起始及終止以幫助臨床管理個體之週期性治療。

在一些實施例中，額外治療劑之劑量視所用共藥物之類型、所用特定藥物、所治療之疾病或病狀等等而變化。在一些實施例中，當與一或多種額外治療劑共同投與時，組合物與額外治療劑同時或依序投與。若依序投與，則主治醫師將決定投與組合物與額外治療劑組合

的適當次序。

在一些實施例中，多種額外治療劑與組合物組合投與。在一些實施例中，多種額外治療劑以任何次序或甚至同時投與。若同時，則多種額外治療劑以單一統一形式或以多種形式(僅舉例而言，以單一丸劑形式或以兩種獨立丸劑形式)提供。在一些實施例中，額外治療劑中之一者以多次劑量給與，或均可以多次劑量給與。在一些實施例中，若投與不同時，則多次劑量之間的時序在大於零週至小於四週範圍內改變。

在一些實施例中，根據各種因素修改用以治療、預防或改善尋求緩解之病狀的給藥方案。在一些實施例中，該等因素包含：個體所遭受之病症以及個體之年齡、體重、性別、飲食及醫學病狀或其組合。在一些實施例中，給藥方案廣泛變化且自本文所闡述之劑量方案偏離。

在一些實施例中，構成組合療法之組合物及額外治療劑為組合劑型或呈意欲用於基本上同時投與之單獨劑型。在一些實施例中，構成組合療法之組合物及額外治療劑依序投與，其中組合物或額外治療劑藉由需要兩步投與之療程投與。在一些實施例中，兩步投與療程需要依序投與組合物及額外治療劑或分開投與組合物及額外治療劑。在一些實施例中，視各藥劑之特性，諸如組合物或額外治療劑之效能、溶解性、生物可用性、血漿半衰期及動力學概況而定，多個投與步驟之間的時段在幾分鐘至數小時範圍內。在一些實施例中，組合物或治療劑濃度之晝夜變化決定最佳劑量間隔。

在一些實施例中，組合物與可向個體提供額外或協同益處之程序組合使用。僅舉例而言，個體預期在本文所描述之方法中發現治療及/或預防益處，其中將組合物或組合物與額外治療劑之組合與基因測試組合以判定個體是否為已知與某些疾病或病狀相關的突變基因之

攜帶者。

在一些實施例中，在疾病或病狀出現之前、期間或之後投與組合物及組合療法，且投與含有化合物之組合物的時序不同。在一些實施例中，組合物用作預防劑且持續向有罹患病狀或疾病之傾向的個體投與以便預防疾病或病狀之出現。在一些實施例中，在症狀發作期間或在症狀發作之後儘可能快地向個體投與組合物。在一些實施例中，在症狀發作之最初48小時內，較佳在症狀發作之最初48小時內，更佳在症狀發作之最初6小時內，且最佳在症狀發作之3小時內開始投與組合物。在一些實施例中，初始投與係經由任何切實可行的途徑，諸如靜脈內注射、快速注射、歷經5分鐘至約5小時輸注及其類似途徑或其組合。在一些實施例中，化合物一在偵測或懷疑疾病或病狀發作之後切實可行即投與，且持續治療疾病所需之時間長度，諸如約1個月至約3個月。在一些實施例中，對於各個體，治療時長不同，且使用已知準則確定時長。在一些實施例中，投與組合物至少2週，較佳約1個月至約5年，且更佳約1個月至約3年。

治療方法：

在某些實施例中，本文揭示防止或減少有需要之個體中之上皮細胞增生、細胞遷移及/或EMT之方法，其包含向個體投與治療有效量之包含以下之可注射組合物：(a)胎兒支持組織製劑；及(b)醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑，藉此防止或減少上皮細胞增生、細胞遷移及/或EMT。在一些實施例中，EMT係與除PVR以外之疾病相關。

在某些實施例中，本文揭示治療或預防有需要之個體中之增生性玻璃體視網膜病變(PVR)之方法，其包含向個體投與治療有效量之包含以下之可注射組合物：(a)胎兒支持組織製劑；及(b)醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑，藉此治療或預防PVR。

在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含HC-HA/PTX3。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含經純化之HC-HA/PTX3。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含超速離心之HC-HA/PTX3。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑由經純化之HC-HA/PTX3組成。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含復原HC-HA/PTX3。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含：高分子量透明質酸(HA)，其藉由共價鍵與間 α -胰蛋白酶抑制劑(I α I)之重鏈交聯，高分子量HA之分子量大於1000 kDa。在一些實施例中，製劑包含：正五聚素蛋白3 (PTX-3)。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含：腫瘤壞死因子刺激基因6蛋白(TSG-6)。在一些實施例中，胎兒支持組織製劑包含：凝血栓蛋白-1 (TSP-1)。在一些實施例中，組合物中總蛋白質與HA之比小於500份蛋白質:1份HA。在一些實施例中，組合物中HA與總蛋白質之比小於500份HA:1份蛋白質。

在一些實施例中，上皮細胞為人類上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為視網膜色素上皮細胞(RPE)。在一些實施例中，人類上皮細胞為腎上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為角膜上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為角膜緣上皮細胞。在一些實施例中，人類上皮細胞為結膜上皮細胞。

在一些實施例中，組合物藉由抑制或遏制生長因子或細胞因子之活性來防止上皮細胞增生及EMT。在一些實施例中，生長因子及細胞因子係選自由以下組成之群：EGF、FGF-2、PDGF-A、PDGF-AB、PDGF-B、PDGF-C、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、CTGF、HGF、IGF-1、G-CSF、IL-6、MCP-1、TNF- α 、VEGF及IFN- γ 。在一些實施例中，組合物抑制上皮細胞中之信號傳導路徑以抑制增生及EMT。在一些實施例中，信號傳導路徑為典型Wnt信號傳導及TGF- β 誘導之Smad/ZEB信號傳導。

在一些實施例中，組合物包含由以下製備之胎兒支持組織製劑：胎盤組織、臍帶組織、臍帶羊膜組織、胎盤羊膜組織、羊膜基質組織、羊膜-絨毛膜組織、絨毛膜組織、羊水或其組合。在一些實施例中，將胎盤組織、臍帶組織、羊膜組織、絨毛膜組織或其組合均質化、粉碎或研磨。在一些實施例中，胎盤組織、臍帶組織、羊膜組織、絨毛膜組織或其組合為新鮮、冷凍或已經事先冷凍的。在一些實施例中，組合物包含胎兒支持組織製劑及醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑或載劑。在一些實施例中，組合物進一步包含水性佐劑。在一些實施例中，組合物用於局部投與。在一些實施例中，組合物用於注射。在一些實施例中，組合物經調配用於眼內注射、視網膜下注射、玻璃體內注射、眼周注射、結膜下注射、眼球後注射、前房內注射或眼球筋膜下注射。

本文所揭示之方法具有許多用途，包括研究及臨床應用。在一些實施例中，方法應用於組織或細胞以達成所需生理調節。在一些實施例中，方法在細胞培養物或組織培養物上使用以達成所需效果。

在一些實施例中，方法用於預防、減少或治療組織之細胞凋亡。在一些實施例中，方法用於減少或預防已經受傷之組織的細胞凋亡。在一些實施例中，方法用於延長在移植之前儲存之器官之壽命。在一些實施例中，方法用於治療或預防在手術程序期間及之後的損傷。

在一些實施例中，方法適用於在移植之前保存組織(例如角膜)。在一些實施例中，方法減少歸因於儲存過程之細胞損傷。在一些實施例中，方法用於減少在移植或手術程序之前在儲存之組織中發生的降解的量。在一些實施例中，將製劑或組合物添加至有或無膠原蛋白及/或HA之儲存介質中。儲存之組織諸如眼睛、器官、皮膚及可受益於在添加組合物時發生之細胞凋亡減少的其類似物。

在一些實施例中，方法進一步包含在收集供體組織之後將供體組織儲存在儲存介質中直至移植。在一些實施例中，將組合物添加至儲存介質中以防止細胞凋亡。在一些實施例中，將組合物添加至儲存介質中以保存角膜緣上皮幹細胞。在一些實施例中，將組合物添加至細胞培養基或消化培養基中以防止細胞(例如角膜細胞)的細胞凋亡。因為本文中描述之研究顯示在分散酶消化(分別模擬手術及病理學損害之處理，諸如PRK中之準分子切除及復發性角膜糜爛)期間培育組合物顯著減少上皮細胞及角膜細胞之細胞凋亡。在一些實施例中，向接受機械刮削或準分子雷射光切除之眼睛投與組合物以嘗試減少角膜細胞之細胞凋亡，且因此減少角膜混濁。在一些實施例中，方法在手術病狀或疾病中使用，諸如復發性角膜糜爛或圓錐形角膜，其中溶解基底膜以減少角膜細胞之細胞凋亡。

在一些實施例中，方法用於產生AMSC自肌纖維母細胞向纖維母細胞之表型反轉。在一些實施例中，方法用於防止或減緩各種細胞類型之分化。在一些實施例中，用方法處理許多類型之細胞。此方法尤其適用於擴增細胞培養物而不促使培養物分化成非所需細胞類型。

套組/製品：

本文中亦描述用於本文所描述之方法的套組及製品。在一些實施例中，套組包含載體、封裝或容器，其經分隔以容納一或多個容器(諸如小瓶、管及其類似物)，容器中之每一者包括將在本文中描述之方法中使用的單獨元件中之一者。在一些實施例中，容器為瓶子、小瓶、注射器或試管。在一些實施例中，容器由各種材料(諸如玻璃或塑膠)形成。在一些實施例中，套組包含一或多個包含本文所揭示之組合物的預填充注射器。

在一些實施例中，製品含有封裝材料。用於封裝醫藥產品之封裝材料為熟習此項技術者所熟知。醫藥封裝材料之非限制性實例包括

(但不限於)泡殼包裝、瓶子、管、吸入器、泵、袋、小瓶、容器、注射器、瓶子及適用於所選調配物及預期投與及治療模式之任何封裝材料。本文提供之製劑及組合物之一批廣泛調配物預期作為任何疾病、病症或病狀之各種治療劑。

在一些實施例中，容器包括一或多種胎兒支持組織製劑，其視情況呈組合物形式或與如本文中所揭示的另一藥劑組合。在一些實施例中，容器包含無菌接取口。在一些實施例中，容器為靜脈內溶液袋或小瓶。在一些實施例中，無菌接取口為可藉由皮下注射針刺穿之塞子。在一些實施例中，套組包含組合物及識別描述或標籤或與其在本文所描述之方法中之使用相關的說明書。

在一些實施例中，套組包含一或多種額外容器，各具有自商業及使用者觀點來看對於包含胎兒支持組織之組合物之使用理想的各種物質中之一或多者(諸如試劑，視情況呈濃縮形式，及/或裝置)。此類物質之非限制性實例包括(但不限於)緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針、注射器；載劑、封裝、容器、小瓶及/或列舉內含物之管標籤及/或使用說明書及具有使用說明書之封裝插頁。在一些實施例中，包括一組說明書。

在一些實施例中，標籤位於容器上或與容器相連。在一些實施例中，當形成標記之字母、數字或其他字符附接、模製或蝕刻至容器自身中時標籤在容器上。在一些實施例中，當標籤存在於容器或亦固持容器之載體內時，標籤例如呈封裝插頁形式與容器相連。在一些實施例中，標籤用於指示內容物用於特定治療應用。在一些實施例中，標籤指示內含物諸如在本文所描述之方法中之使用指南。

在某些實施例中，可注射組合物以封裝或分配器裝置呈遞，其含有一或多個含有本文提供之可注射組合物的單位劑型。在一些實施例中，封裝含有金屬或塑膠箔，諸如泡殼包裝。在一些實施例中，封

裝或分配器裝置附有投與說明書。在一些實施例中，封裝或分配器裝置附有與容器相關之注意事項，其呈管制醫藥品之製造、使用或銷售之政府機構指定的形式，該注意事項反映該機構批准該藥物形式用於人類或獸醫學投與。在一些實施例中，注意事項為經美國食品及藥物管理局(U.S. Food and Drug Administration)核准用於處方藥物的標籤，或核准之藥品說明書。在一些實施例中，製備可注射組合物，置於合適容器中，且標記用於治療指示病狀。

在以下實例中進一步詳細提供本文中描述之組合物及方法。此等實例藉助於說明來提供且不意欲以任何方式限制本發明。

實例

實例1：實例製備

藉由將10 mg以下各者中之每一者與100 mg製劑混合來製備可注射組合物：HA、TSG-6、PTX-3及TSP-1，其中之每一者自商業來源獲得，製劑包含：胎盤組織、臍帶組織、羊膜組織、絨毛膜組織或其組合；且隨後與10 mL 0.9%無菌鹽水混合。將混合物併入適用於注射投與之單位劑型中。

實例2：羊膜組分之表徵

材料及方法

藉由BCA蛋白質分析套組(Pierce, Rockford, IL.)將各萃取物中之蛋白質濃度定量。用玻尿酸(HA)定量測試套組(Corgenix, Westminster, CO.)基於ELISA使用由製造商提供之藉由HA之連續稀釋製備的標準曲線分析各萃取物中之玻尿酸(HA)濃度。

藉由玻尿酸酶消化進行之HA分子量範圍分析

藉由瓊脂糖凝膠電泳根據由Lee及Cowman (Lee H. G.及Cowman, M. K. An Agarose Gel Electrophoretic Method for Analysis of Hyaluronan Molecular Weight Distribution. Analytical Biochemistry,

1994, 219, 278-287)描述之方法分析萃取物之HA分子量範圍。使樣品經受0.5%瓊脂糖凝膠電泳，接著使用0.005% Stains-All (Sigma, 目錄號23096-0)在50%乙醇中染色。凝膠在遮光罩蓋下在室溫下染色隔夜(3-4小時之較短染色時段亦可得到可接受之結果)。在藉由將凝膠轉移至H₂O中來去染之後HA觀測為藍色條帶且曝露於室內光大約6小時。分子量標準物包括 λ DNA-BstE II消化限制片段(目錄號D9793, Sigma), 其MW在0.9至 5.7×10^6 範圍內。藉由用或不用10單位/毫升玻尿酸酶(Sigma編號H1136)在反應緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 1% TritonX-100, 補充有以上蛋白酶及磷酸酶抑制劑之0.1% BSA)中在37°C下培育萃取物2 h, 使用自人類臍帶純化之高MW HA (目錄號H1876, Sigma)之陽性對照來進一步檢驗HA之真實性。

西方墨點分析

以上萃取物在4-15%變性丙烯醯胺凝膠上電泳且轉移至硝化纖維素膜，且隨後用兔抗人類間 α -胰蛋白酶抑制劑(兔多株抗體(目錄號A0301, DAKO, 在1:1000下)、兔抗人類TSG-6多株抗體(由Dr. Tony Day提供, 在1:1000稀釋度下)、大鼠單株抗PTX3抗體(Alexis Biochemicals, ALX-804-464, 1 μ g/ml)、自Calbiochem獲得之抗凝血栓蛋白-1抗體(目錄號BA24)及山羊抗人類Smad 7抗體(AF2029, 1:1000, R & D Systems)進行免疫墨點。藉由Western LightingTM化學發光試劑(PerkinElmer)偵測免疫反應性蛋白質條帶。

結果

實驗顯示當水溶性AM萃取物在90°C下預加熱10分鐘時觀測到之對TGF β 1啟動子活性之遏制效果消除，表明負責組分最可能含有構形重要之蛋白質。

AM萃取物中之HA及蛋白質之定量

表1中概述之結果顯示所有AM及膠凍萃取物均含有HA及蛋白質

兩者。一般而言，對於AM，與離心之後的上清液(例如對於PBS，L及H；且對於緩衝液A，A)相比，在總萃取物中蛋白質與HA之間的重量比較高，表明藉由離心消除大部分含蛋白質物質。然而，在AM膠凍中未注意到此趨勢，表明AM萃取物含有比膠凍多的蛋白質(參見PBS下之T及A/B/C下之T)。對於AM及AM膠凍兩者，蛋白質與HA之間的比率亦自萃取物A至萃取物B及C增加，進一步證實HA大多以可溶形式存在，且反之亦然，更多地在水不溶性組分中發現蛋白質。此外，在A/B/C中離心之後基本上自AM膠凍移除HA。

表1

組織 緩衝液 部分	AM							膠凍						
	PBS			A/B/C				PBS			A/B/C			
	T	L	H	T	A	B	C	T	L	H	T	A	B	C
蛋白質 ($\mu\text{g/ml}$)	8645	1370	1467	8645	2731	930	2698	3836	3645	3589	3836	3893	527	1364
HA ($\mu\text{g/ml}$)	75	62	44	60	74	7	35	80	90	96	129	94	2	7
蛋白質 /HA	115	22	33	144	37	133	77	48	41	37	30	41	264	195

[註釋]：T：總萃取物；L：在總萃取物低速離心之後的上清液；H：在總萃取物低速離心之後的上清液；A、B、C：萃取物，參見本文。

不同AM萃取物中之HA具有大於一百萬道爾頓的分子量

高分子量($>10^6$ 道爾頓) HA存在於總萃取物及萃取物A中(圖10)。然而，甚至更高MW之HA存在於萃取物B中，同時在萃取物C中在窄條帶中發現具有甚至更高MW的HA(圖10)。在玻尿酸酶消化之後所有含HA之組分消失，確認其實際上含有HA。與自Sigma獲得之HA(目錄號H1136)之陽性對照相比，亦在低速及高速離心之後獲得的兩種上清液中發現類似高分子量($>10^6$ 道爾頓) HA(圖11)。同樣在玻尿酸酶消化之後，此等含HA條帶消失。對於AM膠凍，獲得類似結果。

間 α -胰蛋白酶抑制劑(I α I)存在於不同AM萃取物中且其重鏈(HC)與HA

共價連接

圖12顯示在用玻尿酸酶消化之前，游離重鏈存在於不同複合物中，且亦存在少量輕鏈(UTI或雙庫尼茨抑制劑)。然而，在所有萃取物，即總萃取物及萃取物A、B及C中，在HA與I α I之重鏈之間亦存在共價連接複合物，因為後者僅僅在玻尿酸酶消化之後釋放。在藉由兩種不同速度之離心獲得的萃取物H及L中獲得相同結果(圖13)。

腫瘤壞死因子刺激基因6 (TSG-6)亦存在於AM萃取物中

圖14顯示TSG-6 (約38 kDa)存在於總萃取物、萃取物A及萃取物C中。在萃取物A中，存在接近純化TSG-6 (35kD)之條帶遷移的約38 kDa之條帶。約45及55 kDa之其他條帶之身分未知。總AM萃取物(無離心)「T」顯示兩個條帶(均35 kD以上)，且較高者(55 kD)在萃取物A中(在離心之後)發現，而較低者(45 kD)在萃取物C中發現。當用玻尿酸酶(圖14)或F-糖苷酶(圖15)處理樣品時所有此等條帶未顯著變化。然而，用硫酸軟骨素ABC解離酶消化產生使用抗體RAH-1 (圖16)但不使用抗體MAB2104 (圖17)的更多可辨38 kD條帶。

正五聚素蛋白-3 (PTX-3)僅僅存在於水溶性AM萃取物中且與HA形成複合物

圖18顯示PTX3亦存在於AM萃取物中且僅僅與水溶性萃取物A中之HA複合。

凝血栓蛋白-1 (TSP-1)存在於不同AM萃取物中

圖19顯示所有AM萃取物均具有TSP-1之高分子量條帶，同時總萃取物(T)及萃取物C亦具有35-120 kDa之間的一些條帶。除一些條帶變得稍微較強或較弱外，玻尿酸酶消化未改變反應模式。

Smad7大多存在於水不溶性AM萃取物中

發現Smad 7在AM之PBS萃取物及脲萃取物中(圖20)。

實例3：信號傳導路徑控制上皮細胞增生及EMT

功能異常上皮細胞之增生及EMT為兩個主要病理學過程。在孔源性視網膜脫落(RRD)期間，視網膜色素上皮(RPE)細胞分散至玻璃體中，其含有如最近鑑定之為增生性玻璃體視網膜病變(PVR)之生物活性所必需的許多生長因子及細胞因子(例如EGF、FGF、PDGF、TGF- β 、VEGF及IFN- γ)。為了理解生長因子可如何促成分散RPE細胞之增生及EMT，使用ARPE-19細胞之活體外培養模型，在匯合後七天之後此等細胞展示接觸抑制。

在藉由EGTA之接觸抑制擾動之後，僅僅在EGF及/或FGF-2存在下誘導細胞增生(BrdU標記)及EMT (損失N-鈣黏素、ZO-1、Na、K-ATP酶及RPE65之正常RPE表型標記物及表現波形蛋白、S100A4及 α -SMA之間質表型標記物)。此病理學過程需要活化典型Wnt信號傳導，如由增加之細胞核水準及 β -索烇素與LEF之相互作用，以及TCF/LEF轉錄活化之上調證明。藉由使用Wnt抑制劑XAV939及組成型活性 β -索烇素(S33Y)在阻斷或挽救實驗中之過度表現來確認典型Wnt信號傳導之活化。添加TGF- β 1亦藉由活化Smad/ZEB1/2信號傳導導致EMT，其遏制增生及典型Wnt信號傳導之活化。此外，由EGF+FGF-2觸發之典型Wnt信號傳導足夠且與TGF- β 1協同作用以導致EMT (圖1)。此等發現為吾人提供機械洞見以靶向此兩個信號傳導路徑以便預防PVR。代替藉由添加EGTA至匯合細胞，基於低細胞密度將使用ARPE-19細胞株之活體外模型進一步優化以引發增生以較好地模擬PVR。結果顯示HC-HA/PTX3未損害未刺激ARPE-19細胞(圖5A)，但在分別用EGF+FGF-2及EGF+FGF-2+TGF- β 1刺激之後，顯著遏制增生(圖5B及5C)及磷酸化Smad2/3之核定位(圖6A及6B)。此類活體外模型之建立允許在本文提供之兔PVR動物模型中，確定用於活體內測試之HC-HA/PTX3之最佳給藥(圖7A-D)。

實例4：發展PVR動物模型

藉由經由氣體壓縮玻璃體切除術進行玻璃體脫落接著玻璃體內注射兔RPE細胞來在兔中成功地再現PVR (參見圖7A至7D)以模擬人類PVR。選擇兔係因為其可產生模擬人類視網膜脫落之髓翼脫落且顯示類似PVR之特徵。

在為了降低眼內壓及減少由壓力急劇增加所引起之眼部損傷可能性而進行的前房放液穿刺術之後，在角膜鞏膜角膜緣後部3 mm在使用間接檢眼鏡檢查直接觀測下藉由經由使用32規格½"針將0.3 ml 100% C3F8氣體注射至玻璃體腔中來進行玻璃體內氣體注射來使NZW兔(雌性，年齡為3-7個月，體重在1.5與5.0 kg之間)經受玻璃體切除術。進行間接檢眼鏡檢查以確保在視網膜中存在正常血管流量。使用Perkins血壓計檢查眼內壓直至眼內壓低於20 mmHg。藉由以下來產生PVR：經由32規格½"針，在斜角朝上下玻璃體內注射由組織培養同源初級兔RPE細胞製備之呈總共0.1 ml體積之 2.0×10^5 個兔RPE細胞，且其恰好在視神經頭的前方注入至玻璃體腔中(緩慢，以防止視網膜損傷)。若HC-HA/PTX3之處理與RPE細胞同時，則類似地分別注射PBS或兩種不同劑量之HC-HA/PTX3至對照兔或經處理兔之玻璃體腔中。若HC-HA/PTX3之處理在RPE細胞之後，則一週後注射PBS及HC-HA/PTX3至玻璃體腔中。在各情況中，兔立即仰臥置放1 h以允許細胞及試劑沈降在視網膜之血管翼上方。

在注射玻璃體內HC-HA/PTX3或鹽水之後四週，藉由經由用Euthasol (390 mg/mL/kg，靜脈內)進行麻醉劑過度給藥來安樂死來殺死兔。將眼球去除所有結膜組織，且固定在10%福馬林中。眼睛經歷外部檢查且隨後移除上蓋以允許內部檢查。使用Nikon D600攝影機將去核眼睛之總體解剖檢查拍照(圖7C及圖7D)。

實例5：HC-HA/PTX3為引起AM之治療作用的獨特基質組分

首先在排卵卵母細胞周圍之卵丘-卵母細胞複合物中發現的HC-

HA/PTX3複合物在受精中發揮重要作用。HC-HA/PTX3大量存在於人類AM中且此發現引起數個激動人心的發現：(1) AM上皮及基質細胞表現為HC-HA/PTX3生物合成所必需之所有組分(HA、HC1、HC2、雙庫尼茨抑制劑、TSG-6及PTX3) (圖2A)；(2)自AM萃取物(AME)純化之HC-HA/PTX3由具有I α I之共價連接HC1的HMW HA (>3000 kDa)及緊密結合之PTX3 組成(圖2B-2D)，但不由HC2、雙庫尼茨抑制劑或TSG-6組成；及(3) HC-HA/PTX3引起以下簡要概述之AM之治療作用。

為了確保由各批AM供體製備之HC-HA/PTX3在生物化學及功能上一致，確立在GMP設施下使用優化SOP的製造製程。儘管HC-HA/PTX3自不同AM供體之產率不同，在效能分析中未觀測到顯著差異，該等差異係基於破骨細胞中耐酒石酸鹽之酸性磷酸酶活性之抑制及巨噬細胞M2極化在IFN- γ /LPS刺激之巨噬細胞中的促進產生。因此，確立用於驗證將在活體外及活體內研究中使用之各批HC-HA/PTX3之釋放的參考物質。

涉及嗜中性白血球及巨噬細胞的發炎在PVR發展中發揮重要作用。注射巨噬細胞至兔玻璃體中誘導視網膜前膜、後部玻璃體分離及視網膜脫落。巨噬細胞可轉分化成纖維母細胞樣細胞且分泌生長因子(例如PDGF)，其促成RPE細胞之增生及EMT，增生及EMT為PVR發病機制中之兩個重要事件。可溶HC-HA/PTX3而非HA顯著促進活化(藉由fMLP或LPS)而非靜止嗜中性白血球之細胞凋亡。類似地，可溶HC-HA/PTX3而非HA劑量依賴性地促進活化(藉由IFN- γ 、LPS或IFN- γ /LPS)而非靜止巨噬細胞之細胞凋亡。此外，可溶及固定HC-HA/PTX3而非HA促進凋亡嗜中性白血球藉由巨噬細胞之吞噬作用。固定HC-HA/PTX3促進LPS或IFN- γ /LPS活化巨噬細胞之消炎M2極化。此外，此類M2極化與由活化巨噬細胞及樹突狀細胞產生以活化

Th17細胞的IL-23之顯著下調結合。因此，結膜下注射HC-HA/PTX3延長同種異體角膜移植物在小鼠中之存活期。此等資料支持HC-HA/PTX3為可遏制由嗜中性白血球及巨噬細胞兩者介導之發炎的新穎複合物的觀點。

實例6：在人類角膜緣上皮祖細胞及龕細胞中HC-HA/PTX3下調典型Wnt信號傳導

AM藉由下調 β -索脛素之表現、磷酸化及核轉位來抑制人類結膜上皮之鱗狀化生。此外，在人類角膜緣上皮祖細胞(LEPC)及龕細胞(LNC)中，HC-HA/PTX3下調典型Wnt信號傳導。特定言之，固定HC-HA/PTX3上調非典型而非典型Wnt配位體(例如Wnt 2B、Wnt 3A、Wnt 5A、Wnt 5B、Wnt7A)、Wnt負調節因子及平面細胞極性(PCP)因子在LEPC/LNC中之轉錄表現，如藉由Wnt信號傳導路徑RT²分析器PCR陣列板所量測(圖3A)。免疫染色資料進一步確認固定HC-HA/PTX3防止如在接種於3D基質膠中之陽性對照細胞中所示的 β -索脛素之核轉位。相比之下，當接種於固定HC-HA/PTX3而非3D基質膠上時(圖3A)，在LNC中注意到非典型Wnt (PCP)信號傳導之重要參與者C-JUN之轉錄表現(圖3A)及核轉位(圖3B)。注意非典型Wnt (PCP)信號傳導之活化已知遏制典型Wnt信號傳導之活化。

實例7：在人類角膜纖維母細胞(HCF)中HC-HA/PTX3下調典型TGF- β 1/Smad信號傳導

已經報導TGF- β 1、2、3及TGF- β RII轉錄物之表現(使用北方墨點)在於AM基質上培養之HCF及人類角膜緣及結膜纖維母細胞中下調。AME誘導細胞聚集且防止 α -SMA藉由肌纖維母細胞表現。即使曝露於血清或TGF- β 1，在AM基質上接種之人類及小鼠角膜細胞仍維持其正常表型而不引發pSmad2/3之核轉位。可溶HC-HA/PTX3遏制HCF之TGF- β 1啟動子活性(圖4A)。已知在於塑膠及固定HA兩者上接種之

HCF中，外源TGF- β 1預期地上調TGF- β 1，但不上調TGF- β 2 (圖4B)。然而，在固定HC-HA/PTX3上未觀測到TGF- β 1上調。出人意料地，在有或無TGF- β 1下，TGF- β 3 (抗結疤同功異型物)僅由HC-HA/PTX3上調(圖4C)。在TGF- β 1挑戰之後，在HC-HA/PTX3上TGF- β RII之表現減少至幾乎零(圖4D)。正如所料，在塑膠及HA上HCF中外源TGF- β 1引起pSmad2/3之核轉位(圖4E)及 α -SMA之陽性細胞質表現(圖4F)。然而，HC-HA/PTX3有效阻斷HCF中此等TGF- β 1誘導之變化。總體而言，在HCF中HC-HA/PTX3下調典型TGF- β 1信號傳導且防止由外源TGF- β 1觸發之肌纖維母細胞分化。

實例8：製備保存之人類胎兒支持組織

在任選破腹產時收集人類胎盤。將胎盤展平至硝化纖維素紙(Hybond N+, Amersham, England)上，其中上皮表面向上。在-80°C下在DMEM/甘油1:2 (v/v)中儲存胎兒支持組織樣品直至使用。

實例9：羊膜萃取物製備

自Bio-tissue, Inc. (Miami, FL)獲得新鮮及冷凍人類胎盤。無菌進行用於製備總人類AM萃取物(AME)之整個程序以便用於隨後基於細胞培養之實驗。將AM切成較小碎片以適應BioPulverizer (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK)之筒管，在液氮中冷凍，粉碎成精細粉末，且稱重。在1:1 (ml /g)下向粉末中添加含有蛋白酶抑制劑(蛋白酶抑制劑混合物，P8340, Sigma，且補充有1 mM PMSF)及磷酸酶抑制劑(50 mM氟化鈉及0.2 mM鈳酸鈉)之冷1×PBS緩衝液，pH 7.4。混合物保持在冰上且用Tissue Tearor (Biospec Products, Inc., Dremel, WI)均質化5次，各1分鐘，伴隨2分鐘冷卻間隔。此等水溶性萃取物稱為「總」AM萃取物(AME)。

將總AM萃取物分至兩個50 ml圓錐形離心管中。在4°C下一個在高速(HS, 48,000xg)下離心且另一個在低速(LS, 15,000xg)下離心。

將HS及LS上清液之等分試樣轉移至無菌1.5 ml Eppendorf管中且分別稱為AM/HS及AM/LS。在凍乾之前在-20℃下冷凍所需AM/HS樣品1 h。隨後將樣品置於蓋上有孔之FreeZone (Labconco, Kansas City, MO)之腔室中。在-50℃下在0.85毫巴之真空下凍乾樣品5小時。在使用之前，樣品用無菌蒸餾H₂O復原至相同體積。相同方法亦用於自AM膠凍製備萃取物，AM膠凍容易地自AM基質上之黏著物質刮下。

實例10：總可溶人類羊膜及羊膜膠凍萃取物製備

自Bio-Tissue, Bio-tissue, Inc. (Miami, FL)獲得冷凍人類胎盤物質。無菌進行用於製備總人類AM萃取物(AME)之整個程序以便用於隨後基於細胞培養之實驗。將AM切成較小碎片以適應BioPulverizer (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK)之筒管，在液氮中冷凍，粉碎成精細粉末，且稱重。在1:1 (ml /g)下向粉末中添加含有蛋白酶抑制劑(蛋白酶抑制劑混合物，P8340, Sigma, 且補充有1 mM PMSF)及磷酸酶抑制劑(50 mM氟化鈉及0.2 mM鈣酸鈉)之冷1×PBS緩衝液，pH 7.4。混合物保持在冰上且用Tissue Tearor (Biospec Products, Inc., Dremel, WI)均質化5次，各1分鐘，伴隨2分鐘冷卻間隔。此等水溶性萃取物稱為「總」AM萃取物(AME)。

在4℃下混合總水溶性萃取物1小時，隨後藉由兩種不同離心速度(即15000xg及48000xg)在4℃下分離30分鐘，且所得上清液分別稱為L及H。將各上清液分成等分試樣且在-80℃下儲存。此方法亦用於自AM膠凍製備萃取物，AM膠凍容易地自AM基質上之黏著物質刮下。

實例11：藉由不同緩衝液及分離方法獲得之總可溶人類羊膜及羊膜膠凍萃取物

在於不同萃取緩衝液中檢查製劑中，將如由以上製備之粉末稱重且藉由在4℃下攪拌1小時在AM與緩衝液(ml)之濕重(g)下在1:1比率

下與緩衝液A (等張低鹽)：100 mM Tris-HCl，pH 7.6，150 mM NaCl，4 mM EDTA，1% Triton X-100混合。在48000xg下離心之後，隨後藉由在4°C下攪拌1小時藉由緩衝液B (高鹽)：100 mM Tris-HCl，pH 7.6，1 M NaCl，4 mM EDTA，1% Triton X-100來萃取所得糰粒。同樣在48000xg下離心之後，藉由在4°C下攪拌24小時藉由緩衝液C (4 M胍鹽酸鹽)：100 mM乙酸鈉，pH 5.8，4 M胍鹽酸鹽，4 mM EDTA，1% Triton X-100最終萃取糰粒。所有以上三種緩衝液補充有以下蛋白酶及磷酸酶抑制劑：1 µg/ml抑肽酶、1 µg/ml亮肽素、1 µg/ml胃酶抑素A、0.5 mM PMSF、50 µM氟化鈉及0.2 µM釩酸鈉。將分別稱為萃取物A、B及C之所得上清液用補充有0.5 mM PMSF之透析緩衝液(50 mM Tris-HCl，pH 7.5，0.15 M NaCl)在4°C下透析6小時且改變透析緩衝液兩次，各在500x (透析緩衝液:樣品之體積比)下。在透析之後，量測各樣品之體積且用透析緩衝液調節至相同體積。相同方法亦用於自AM膠凍製備萃取物，AM膠凍為AM基質上之可容易刮下的黏著物質。

實例12：在PBS中製備總可溶人類羊膜萃取物

無菌進行用於製備總可溶人類AM萃取物(T)之整個程序以便用於隨後基於細胞培養之實驗。自Bio-Tissue，Inc. (Miami，FL)獲得冷凍人類胎盤，自胎盤中獲取AM。將AM切成較小碎片以適應BioPulverizer (Biospec Products，Inc.，Bartlesville，OK)之筒管，在液氮中冷凍，且隨後粉碎成精細粉末。將粉末稱重且在1:1 (ml/g)下與具有蛋白酶抑制劑(蛋白酶抑制劑混合物，P8340，Sigma，且補充有1 mM PMSF)及磷酸酶抑制劑(50 mM氟化鈉及0.2 mM釩酸鈉)之冷PBS緩衝液(藉由添加蒸餾H₂O至來自10×PBS之1×PBS，pH 7.4中製備，目錄號70011-044，Invitrogen，Carlsbad，CA)混合。混合物保持在冰上且用Tissue Tearor (Biospec Products，Inc.，Dremel，WI)均質

化5次，各1分鐘，伴隨2分鐘間隔的冷卻。此水溶性萃取物稱為「總萃取物」(T)。在4℃下混合總水溶性萃取物1小時，在4℃下在48000xg下離心30分鐘。將上清液分成等分試樣且在-80℃下儲存。

實例13：製備水溶性AM基質萃取物

使用無菌技術，用HBSS簡單洗滌自Bio-Tissue，Inc. (Miami，FL)獲得之冷凍人類AM 2-3次以移除最初儲存介質。藉由刮勺刮下AM基質，冷凍在液氮之氣相中且藉由BioPulverizer (Biospec Products，Inc.，Bartlesville，OK)研磨成精細粒子，接著在PBS，pH 7.4中在冰上用Tissue Tearor (Biospec Products，Inc.，Dremel，WI)均質化1分鐘。藉由旋轉來混合均質物1 h且在4℃下在14,000xg下離心30分鐘。隨後收集PBS中之上清液，且在-80℃下以等分試樣形式儲存。藉由BCA分析測定蛋白質濃度。稱為羊膜基質萃取物(ASE)之此水溶性蛋白質萃取物用於本文中描述之實驗。

實例14：AM基質萃取物製備

無菌進行用於製備蛋白質萃取物之完整程序。用HBSS (Invitrogen，Carlsbad，CA)簡單洗滌自Bio-Tissue (Miami，FL)獲得之冷凍人類AM 2-3次以移除儲存介質。藉由刮勺自AM之基質側刮下AM基質以用於AM基質萃取物製備。用HBSS沖洗自Baptist Hospital (Miami，FL)獲得之人類胎盤以及絨毛膜3次以移除血。為了製備水溶性蛋白質萃取物，將總AM、刮下之AM基質、基質移除的AM、胎盤及絨毛膜各在液氮之氣相中冷凍且各使用BioPulverizer (Biospec Products，Inc.，Bartlesville，OK)研磨成精細粒子，接著在PBS (pH 7.4)中在冰上用Tissue Tearor (Biospec Products，Inc.，Dremel，WI)均質化1分鐘。混合各均質物1 h且在4℃下在14,000 g下離心30分鐘。隨後收集各上清液(於PBS中)且在-80℃下以等分試樣(0.5 ml)形式儲存。使用BCA分析(Pierce，Rockford，IL)來將不同萃取物中之總蛋白

質定量。

實例15：製備水溶性及凍乾粉末形式之人類AM萃取物

為了製備人類AM萃取物，無菌進行整個程序。除非另外說明，否則在程序之步驟期間在室溫下處理AM萃取物。首先，獲得新鮮或冷凍人類AM，較佳自Bio-Tissue，Inc. (Miami，FL)獲得。用HBSS (Invitrogen，Carlsbad，CA)簡單洗滌冷凍AM 2-3次以移除儲存介質。用HBSS沖洗新鮮人類胎盤或絨毛膜3次以移除血。

為了製備水溶性形式之AM萃取物，將AM (例如AM基質、基質移除的AM、胎盤、絨毛膜)轉移至無菌50 ml離心管中且在4°C下在5000xg下離心5分鐘以移除過量流體。將AM稱重，轉移至100 mm或150 mm無菌皮氏培養皿(Petri dish)中，且在液氮容器之氣相中冷凍20分鐘以促進隨後均質化。隨後用拋棄式刮刀將冷凍AM切成較小碎片或使用BioPulverizer (Biospec Products，Inc.，Bartlesville，OK)或其他適合之裝置研磨成精細粒子，且用Tissue Tearor (Biospec Products，Inc.，Dremel，WI)或其他適合之裝置在中性pH下之磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)或無酚紅之DMEM (Invitrogen，Carlsbad，CA)中均質化。為了生物化學表徵及純化，以上溶液補充有以下蛋白酶抑制劑：1 µg/ml抑肽酶、1 µg/ml亮肽素、1 µg/ml胃酶抑素A及1 mM PMSF。然而，若萃取物直接添加至細胞培養物中，則不添加蛋白酶抑制劑。在4°C下混合均質物30分鐘且在15,000x.g下離心30分鐘。收集上清液(亦即AM萃取物)且在-80°C下以等分試樣(0.5 ml)形式儲存。使用BCA分析(Pierce，Rockford，IL)來將各AM萃取物中之總蛋白質定量。

為了製備凍乾粉末形式之AM萃取物，使用BioPulverizer (Biospec Products，Inc.，Bartlesville，OK)或其他適合之裝置將冷凍AM研磨成精細粒子，且如本文所描述進一步均質化。在4°C下藉由SpeedVac (Savant Instruments Inc.，Farmingdale，NY)將大約0.5 ml之

等分試樣凍乾4 h以將重量自280 mg減少至32 mg (約89%減少)。將凍乾粉末稱重且在-80℃下儲存。在使用之前，凍乾粉末在適合之緩衝液中復原。

為了製備AM基質萃取物，自完整總AM之基質表面刮下AM基質，保持基底膜及羊膜上皮完整，且使用如本文所描述之BioPulverizer研磨冷凍AM基質。在4℃下用中性pH下之PBS萃取基質30分鐘且在15,000xg下離心30分鐘。收集上清液且在-80℃下以等分試樣(0.5 ml)形式儲存。使用BCA分析(Pierce, Rockford, IL)來將AM基質萃取物中之總蛋白質定量。

實例16：遏制TGF- β 1啟動子活性

本文中描述之胎兒支持製劑及組合物遏制TGF- β 1啟動子活性，如本文所示；因此本文中描述之胎兒支持製劑及組合物可用於抗結疤、消炎及抗血管生成療法。冷凍羊膜之胎兒部分具有比新鮮羊膜顯著高的抗結疤效果；冷凍羊膜之胎盤部分亦具有比新鮮羊膜顯著高的抗結疤效果。因此，在TGF- β 中冷凍胎兒支持組織(胎盤或胎兒部分)顯示比新鮮胎兒支持組織更有效的遏制效果。由自冷凍胎兒支持組織獲得之總胎兒支持組織萃取物介導的此遏制效果在0.4至125 μ g/ml之範圍上為劑量依賴性的(圖8)。此外，此類遏制效果無法僅由高MW HA (超過100 $\times$ 之等效AM萃取物)代替，且在用玻尿酸酶消化之後損失(圖9)，表明其由HA-I α I之間的複合物介導。在低速或高速下離心未顯著影響遏制效果。然而，隨後凍乾及復原產生更有效的遏制效果。另外，AM之總體遏制效果比AM膠凍更有效。

實例17：用於培養細胞之胎兒支持組織製劑及純化組合物

為了檢驗胎兒支持組織對細胞分化過程之影響，將自第2代AMSC分化之肌纖維母細胞繼代培養至AM之基質性基質上，且與在膠原蛋白I塗佈盤上繼代培養作為對照的彼等者相比。在具有10%

FBS之DMEM中培養7天之後，膠原蛋白I上之AMSC仍維持肌纖維母細胞形狀。相反，接種於胎兒支持組織基質性基質上之細胞展示圓形、軸形、細長形及樹枝形之混合。因此，在一些實施例中，胎兒支持組織製劑具有反分化能力，且用於減緩細胞分化。

實例18：HC-HA/PTX3對細胞遷移及膠原蛋白凝膠收縮之影響

細胞培養及處理

在具有5% CO₂之潮濕空氣中在37°C下在補充有10% FBS、50單位/毫升青黴素及50 µg/ml鏈黴素之HEPES緩衝DMEM及Ham's F-12 (1:1)中培養人類二倍體RPE細胞株ARPE-19。對於匯合後實驗，在100%匯合後在測試之前持續培養細胞7天。對於低細胞密度分析，以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 或其他密度接種細胞隔夜(20-24 h)，接著用生長因子及細胞因子處理24-120 h或48 h (在最優化之後)。在血清饑餓(*serum starvation*)的情況下，在無血清(SF)培養基中培育細胞24 h，接著用生長因子及細胞因子處理24-120 h。在終止生長因子/細胞因子處理之前，進行BrdU (10 µM)標記4 h。

自人類AM純化HC-HA/PTX3

由Bio-Tissue, Inc. (Miami, FL)提供之冷凍保存的人類胎盤製備HC-HA/PTX3。如所報導，藉由PBS (pH 7.4)萃取來自同一供體之AM以產生PBS萃取物。隨後藉由在15°C下在35,000 rpm下在4 M GnHCl中在1.35 g/ml之初始密度下在CsCl梯度中超速離心48 h來分離萃取物(LM8型，SW41轉子，Beckman Coulter, Indianapolis, IN)。自各超速離心機管收集總共12個部分(1 ml/部分)。量測各部分之重量以計算密度。在生物化學分析(HA ELISA、BCA蛋白質分析及西方墨點法，參見以下)之後，合併含有HA但含有極少或不含蛋白質之部分且在CsCl梯度中在1.40 g/ml之初始密度下經受第二超速離心操作。合併選擇性部分(含有HA但不可偵測蛋白質(藉由BCA分析量測)且稱為HC-

HA/PTX3)且用蒸餾水透析，凍乾，且在-80℃下儲存。因此，基於複合物中存在之HA量表示HC-HA/PTX3的量。

細胞遷移

當在下部隔室中添加無或有EGF (10 ng/ml)、FGF-2 (20 ng/ml)及TGF- β 1 (10 ng/ml)之0.5 ml DMEM/F12 (1:1)，同時向上部隔室中添加再懸浮於DMEM/F12 (2×10^6 /ml)中，用PBS (媒劑對照)、HA (25 μ g/ml)或HC-HA/PTX3 (25 μ g/ml)處理之0.1 ml ARPE-19細胞時，在24孔transwell板(8 μ m微孔尺寸，Costar，Kennebunk，ME)中進行遷移分析。在37℃下培育4 h之後，藉由棉簽移除未遷移通過孔之細胞，而將朝向下部隔室之在過濾器上之細胞用5%戊二醛固定，用1%結晶紫染色，且對於各對照或處理組，自六個隨機顯微鏡區域計數。

膠原蛋白凝膠收縮

將於冷DMEM/F12 (2.5 mg/ml)中之0.25 ml膠原蛋白I型溶液(Corning，Bedford，MA)添加至24孔板之各孔中，接著在37℃下培育1 h，隨後在膠原蛋白凝膠之頂部上添加無或有TGF- β 1 (10 ng/ml)及PBS (媒劑對照)、HA (25 μ g/ml)或HC-HA/PTX3 (25 μ g/ml)之處理的0.5 ml ARPE-19細胞或初級人類RPE細胞(各在 5×10^5 /ml)下。在24 h之後，用小刮勺使凝膠自培養孔壁脫離。將膠原蛋白凝膠之照片影像數位化且用NIH ImageJ 1.45軟體量測面積。藉由當與初始尺寸(在0 h)相比且在群組間比較時，量測在72 h之凝膠尺寸來測定凝膠收縮百分比。

結果

在EGF (10 ng/ml)、FGF-2 (20 ng/ml)及TGF- β 1 (10 ng/ml)之刺激下，HC-HA/PTX3 (25 μ g/ml)以及HA (25 μ g/ml)徹底遏制ARPE-19細胞之遷移(圖21)。相比之下，在ARPE-19細胞及初級人類RPE細胞兩者中，HC-HA/PTX3而非HA顯著減少TGF- β 1誘導之膠原蛋白凝膠收

縮(圖22)。

雖然本文中已經顯示及描述較佳實施例，熟習此項技術者將顯而易知此等實施例僅藉助於實例提供。現在可出現許多變化形式、改變及替代。應理解本文中描述之實施例的各種替代方案可用於實踐所描述之方法。預期以下申請專利範圍界定實施例之範疇，且藉此涵蓋此等申請專利範圍及其等效物之範疇內的方法及結構。

【符號說明】

無

申請專利範圍

1. 一種可注射組合物之用途，其用於製備治療患有增生性玻璃體視網膜病變(PVR)個體之PVR，或預防曾經歷視網膜脫落個體之PVR之藥物，其中該可注射組合物包含：
 - (a) 復原 (reconstituted) 重鏈 - 玻尿酸 / 正五聚素蛋白 3(HC-HA/PTX3)複合物；及
 - (b) 醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、媒劑或載劑；其中該組合物適用於注射。
2. 如請求項1之用途，其中該組合物呈對於防止或減少上皮細胞增生、細胞遷移或上皮-間質轉移(EMT)有效的量。
3. 如請求項2之用途，其中該等上皮細胞係視網膜色素上皮細胞(RPE)。
4. 如請求項3之用途，其中該等上皮細胞為人類上皮細胞。
5. 如請求項1之用途，其中該組合物為凝膠、溶液或懸浮液。
6. 如請求項1之用途，其中該組合物經調配用於眼內注射、視網膜下注射、玻璃體內注射、眼周注射、結膜下注射、眼球後注射、前房內注射或眼球筋膜下注射(sub-Tenon's injection)。

圖式

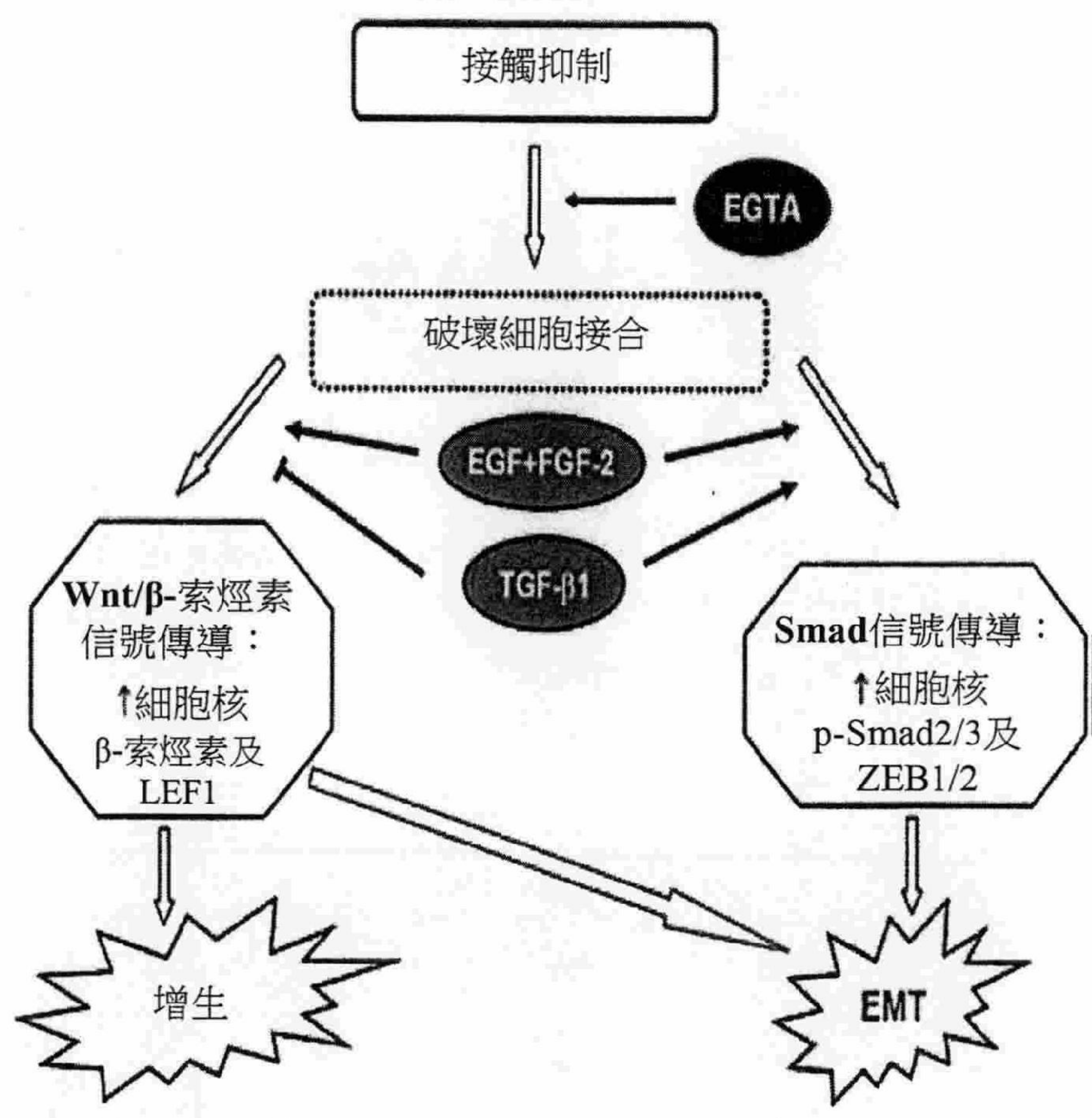


圖1

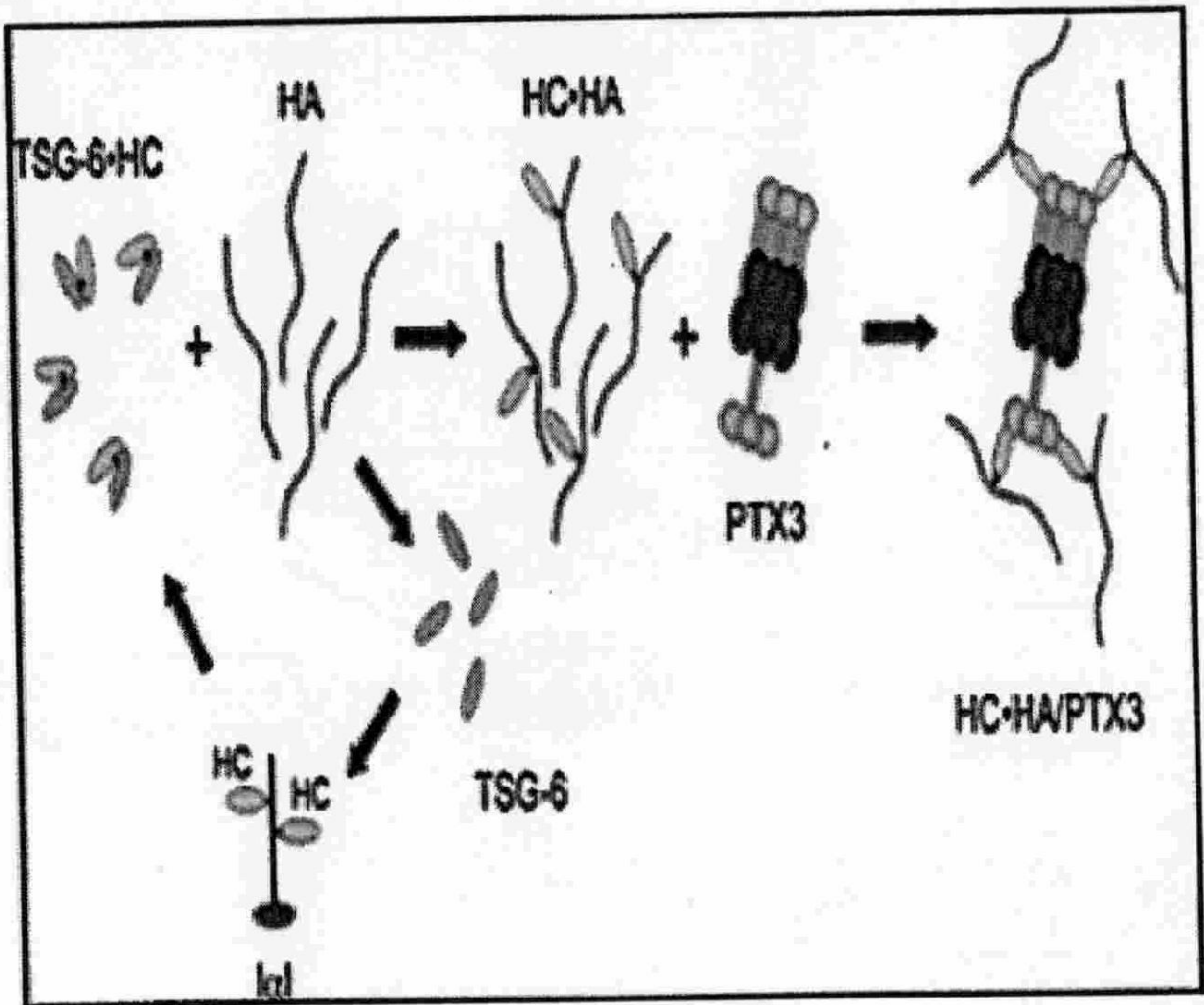


圖2A

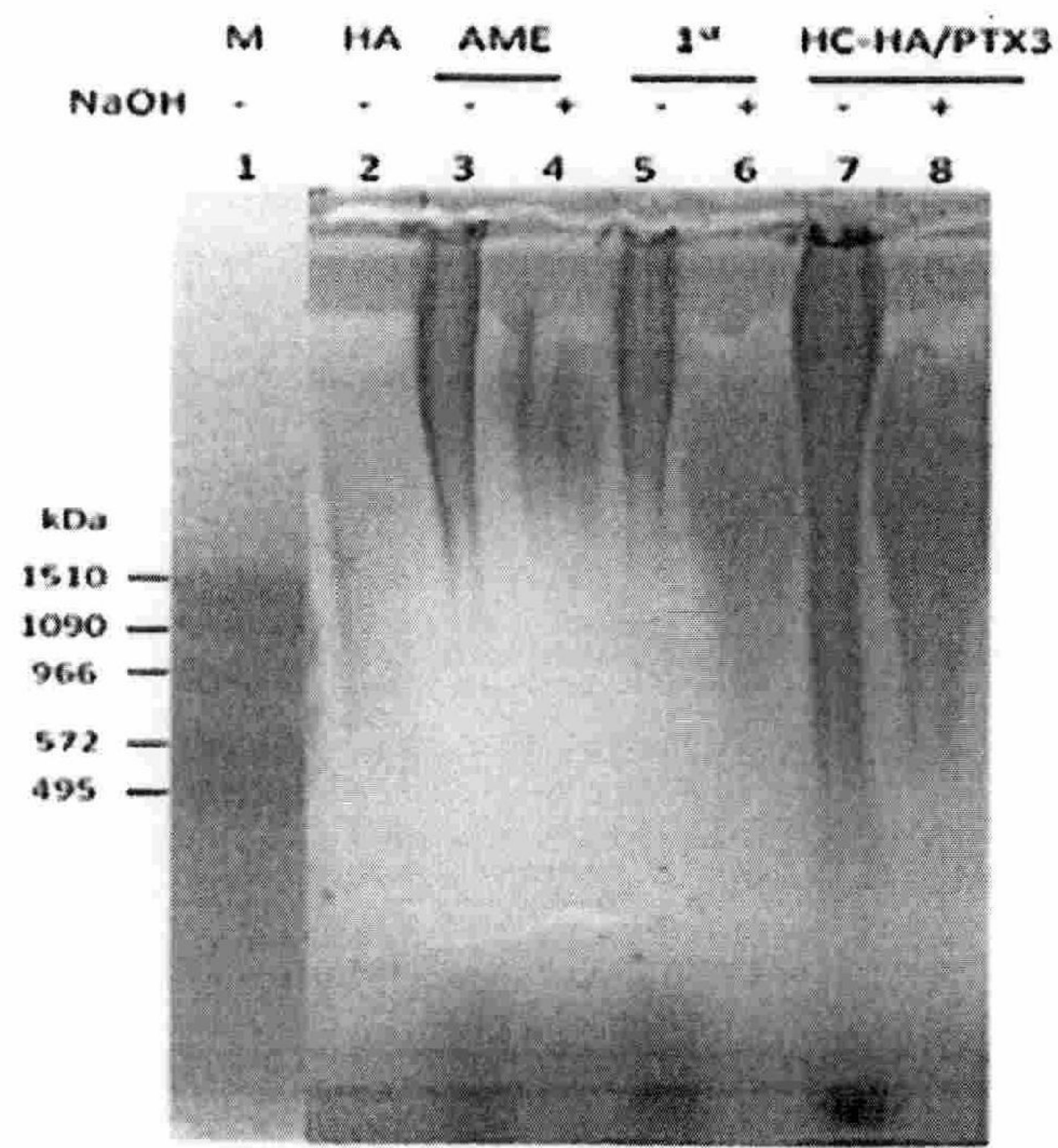


圖2B

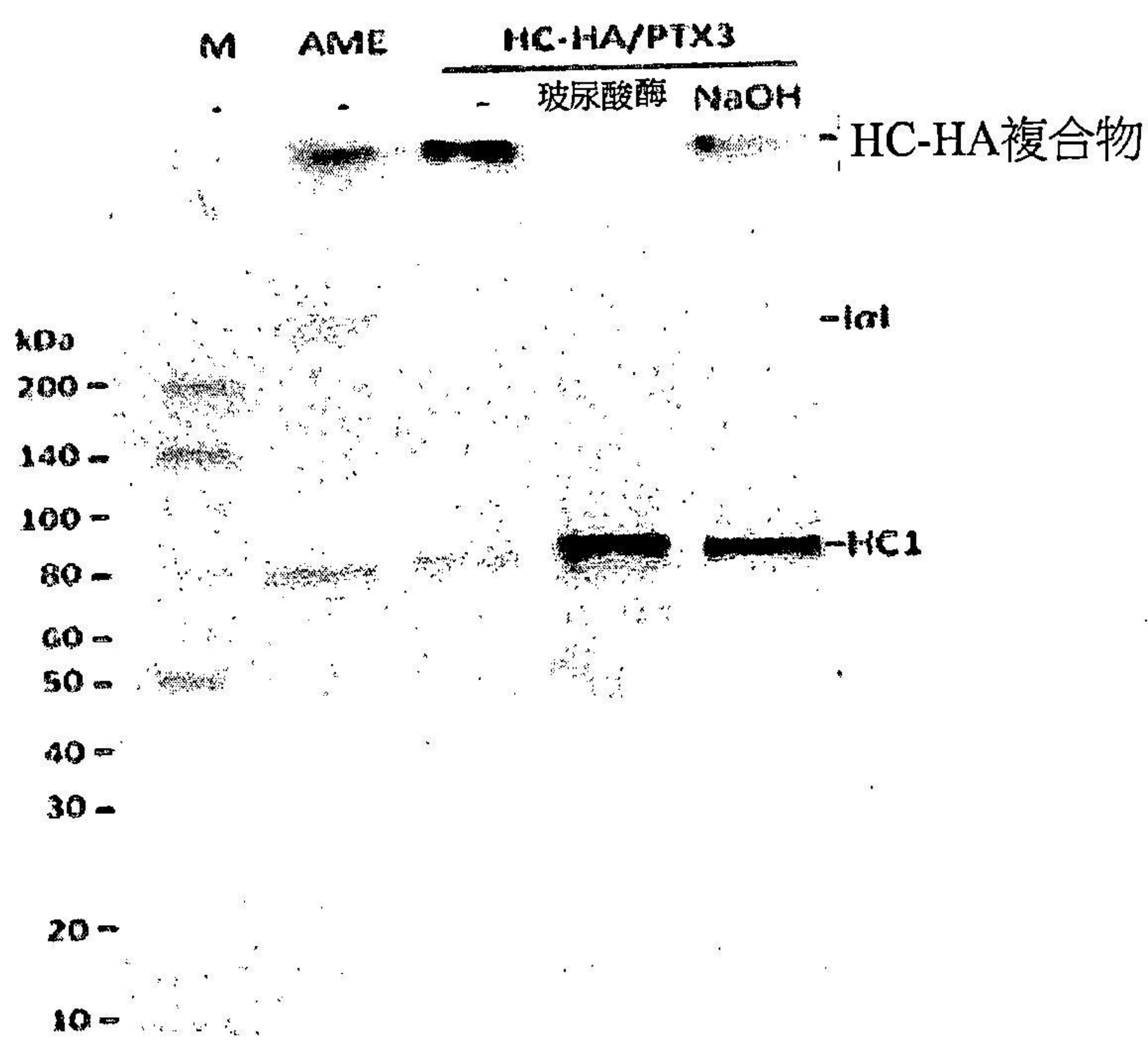


圖2C

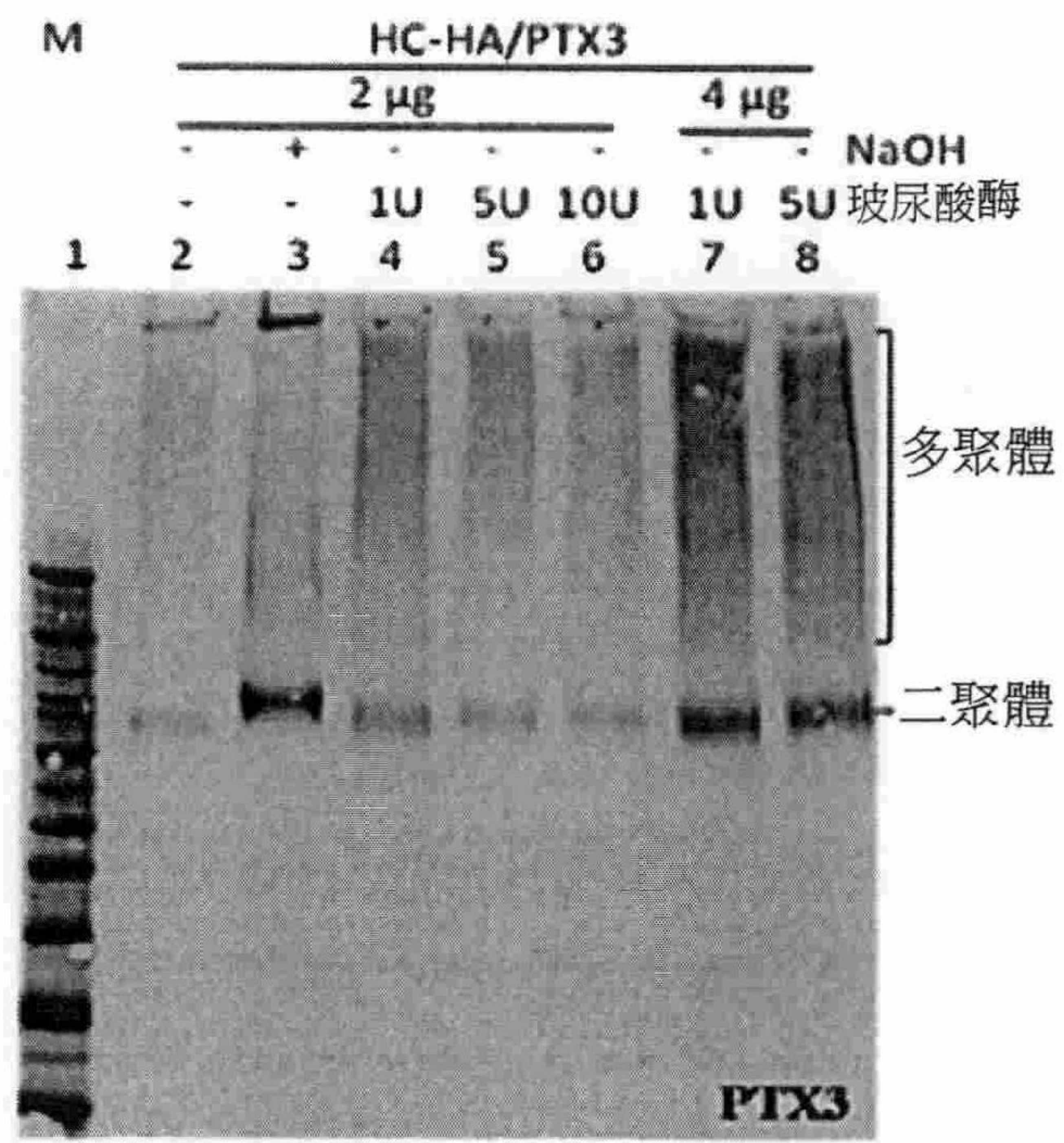


圖2D

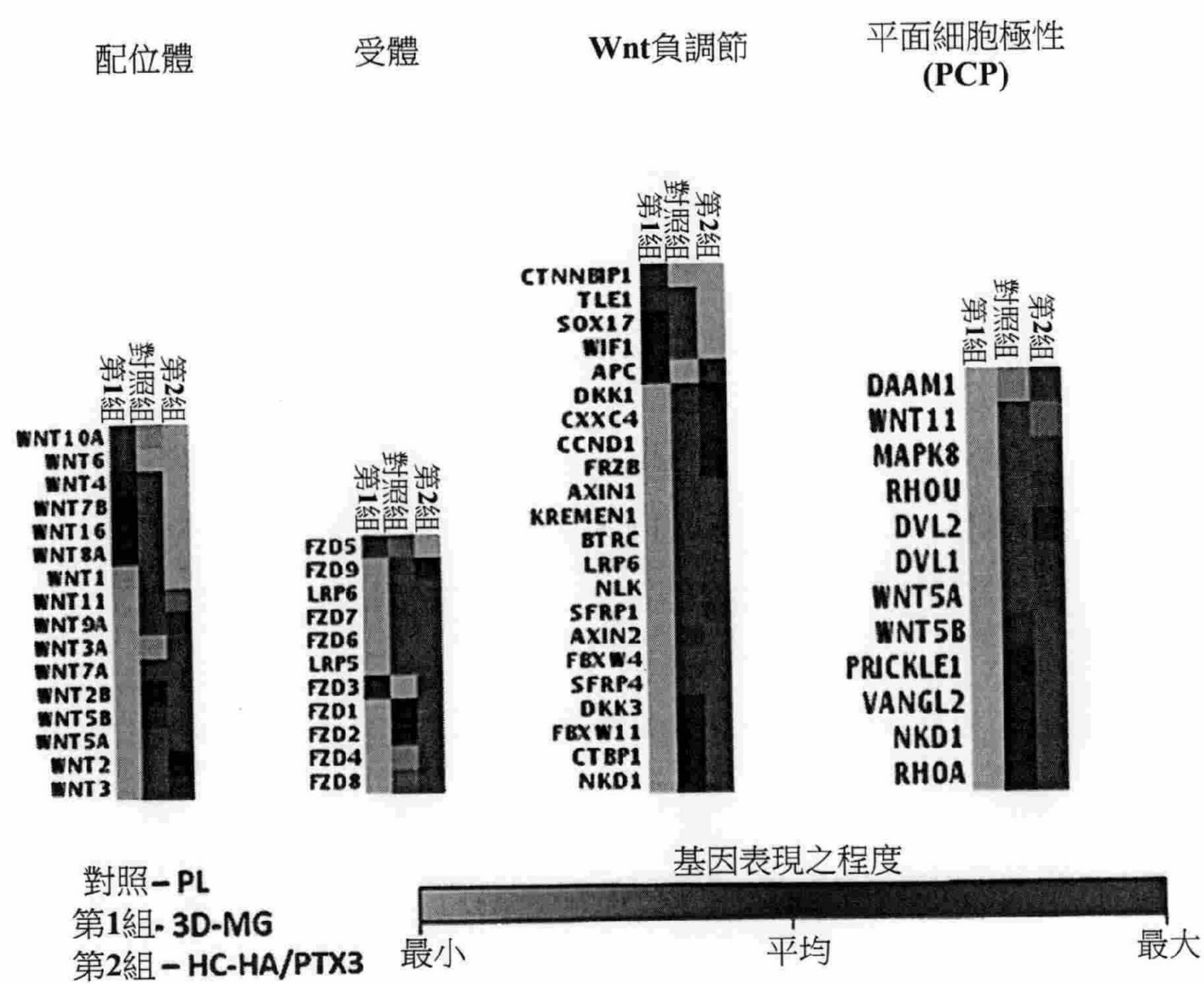


圖3A

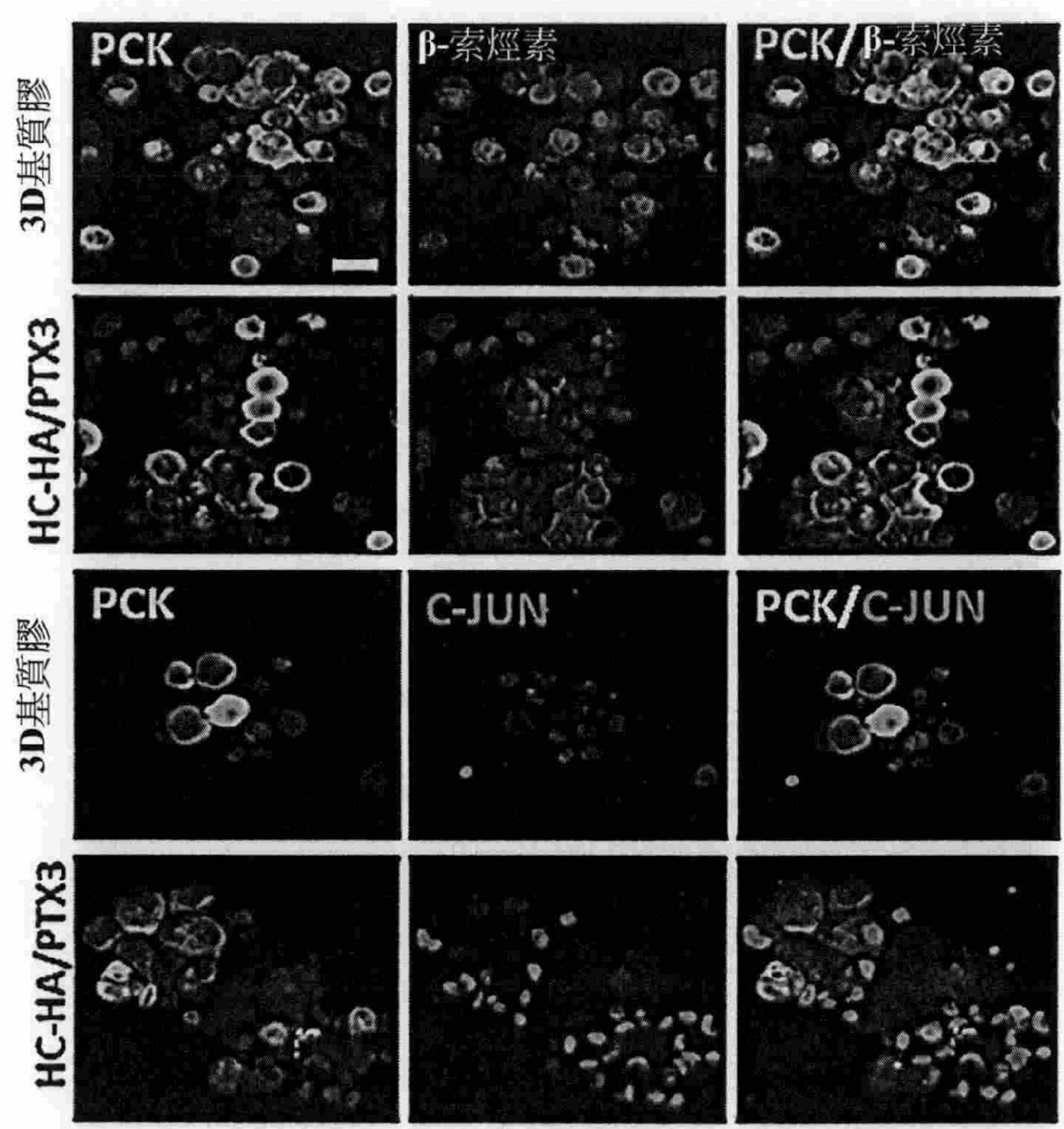


圖3B

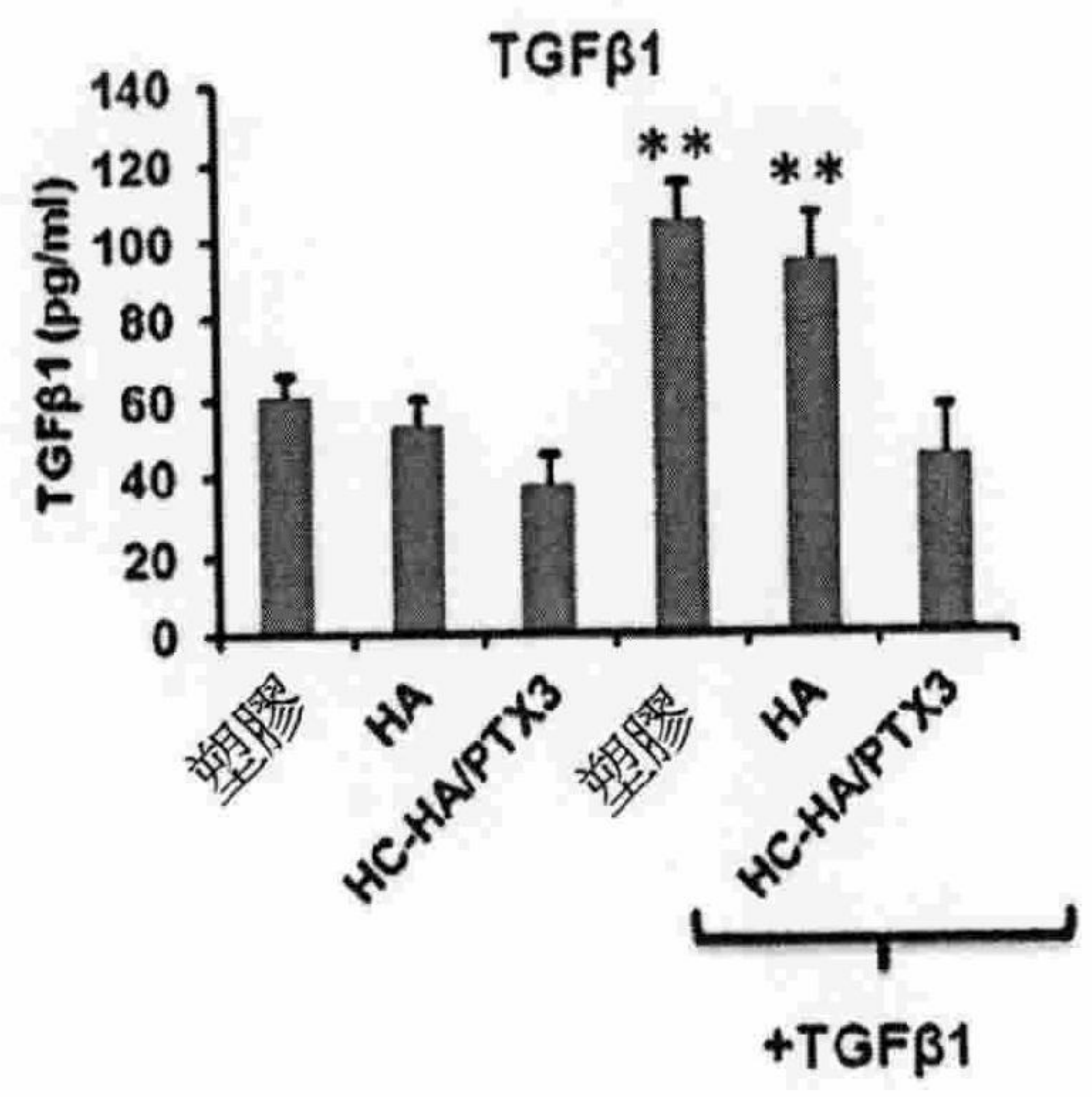


圖4A

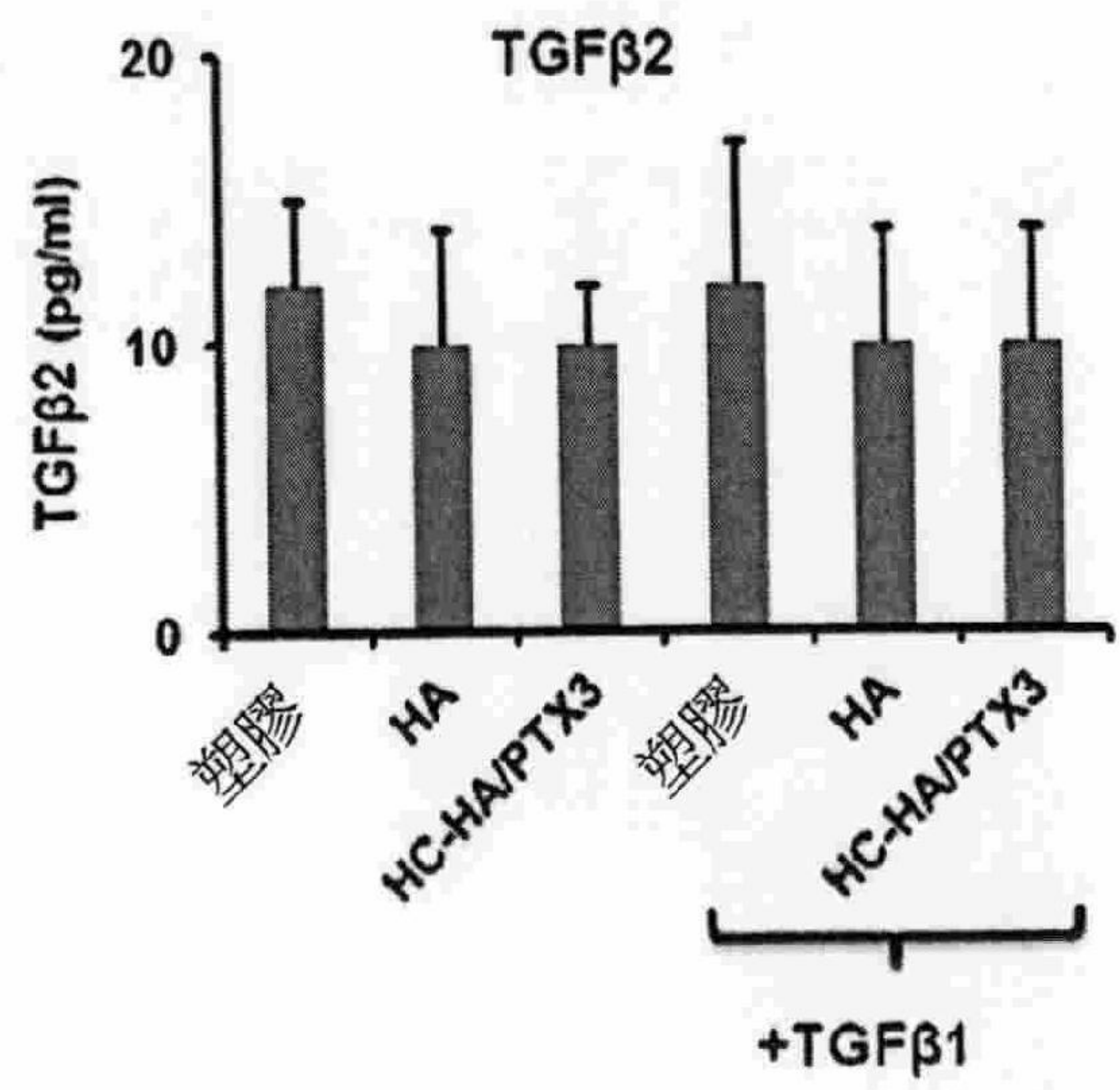


圖4B

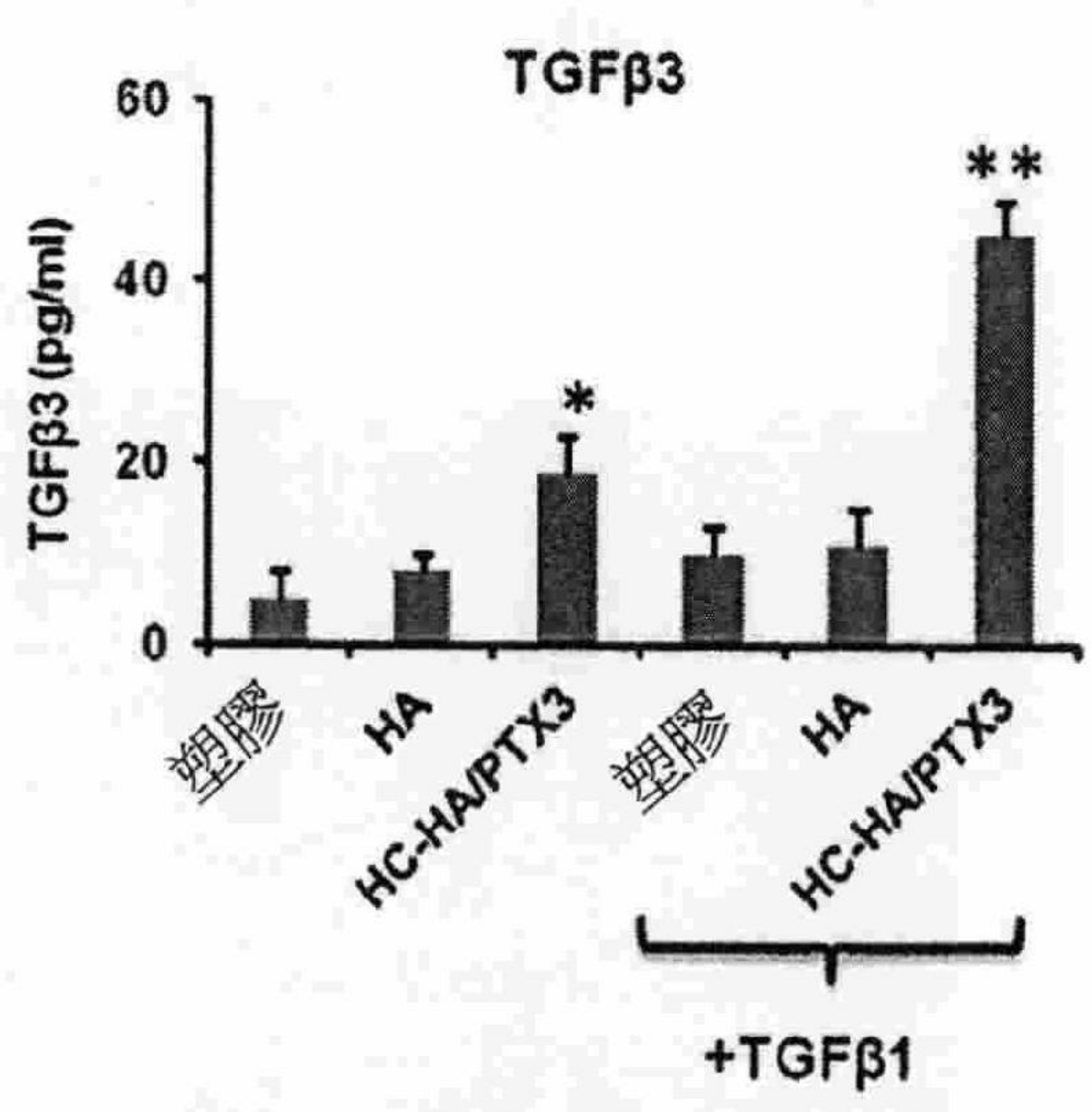


圖4C

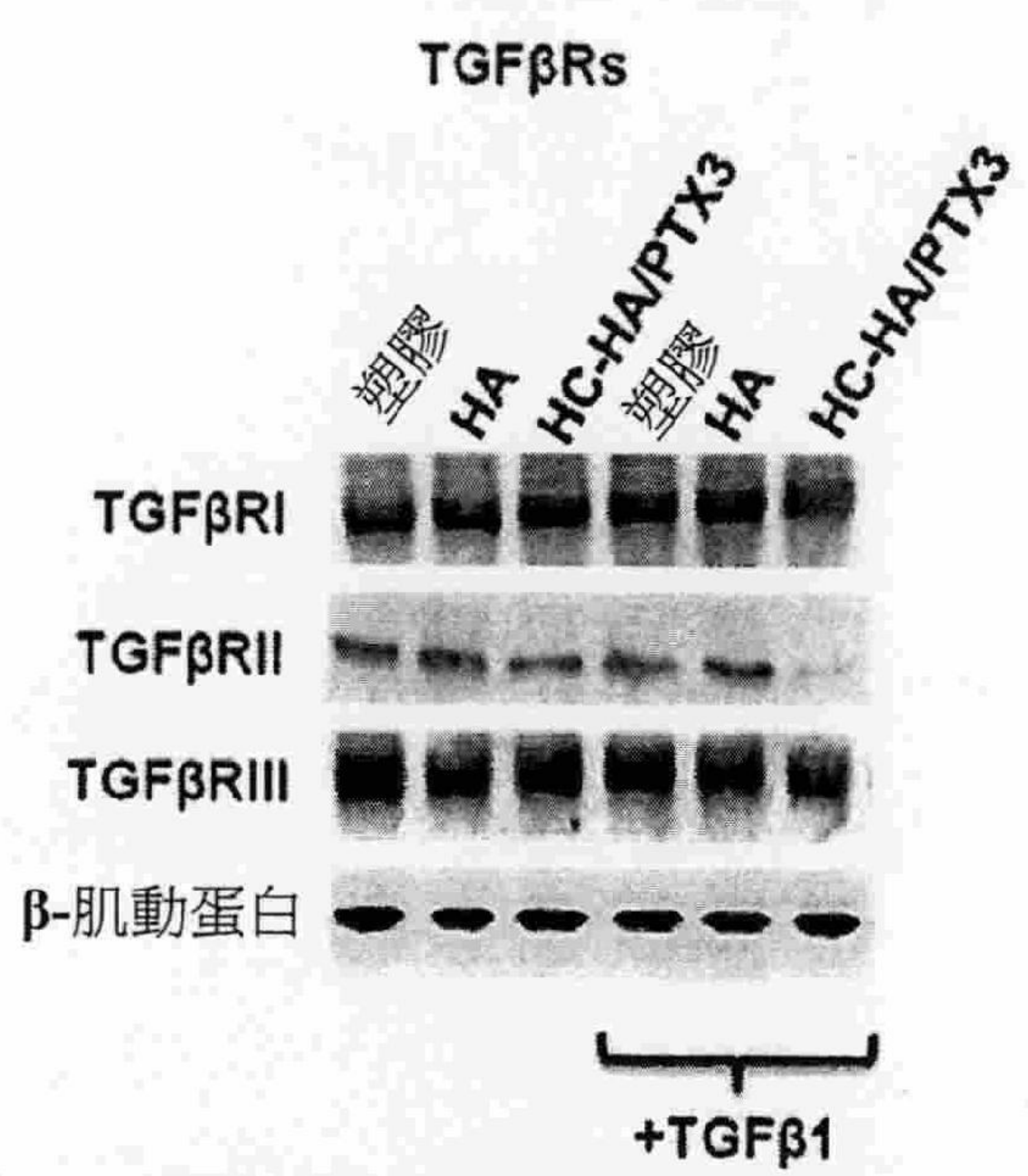


圖4D

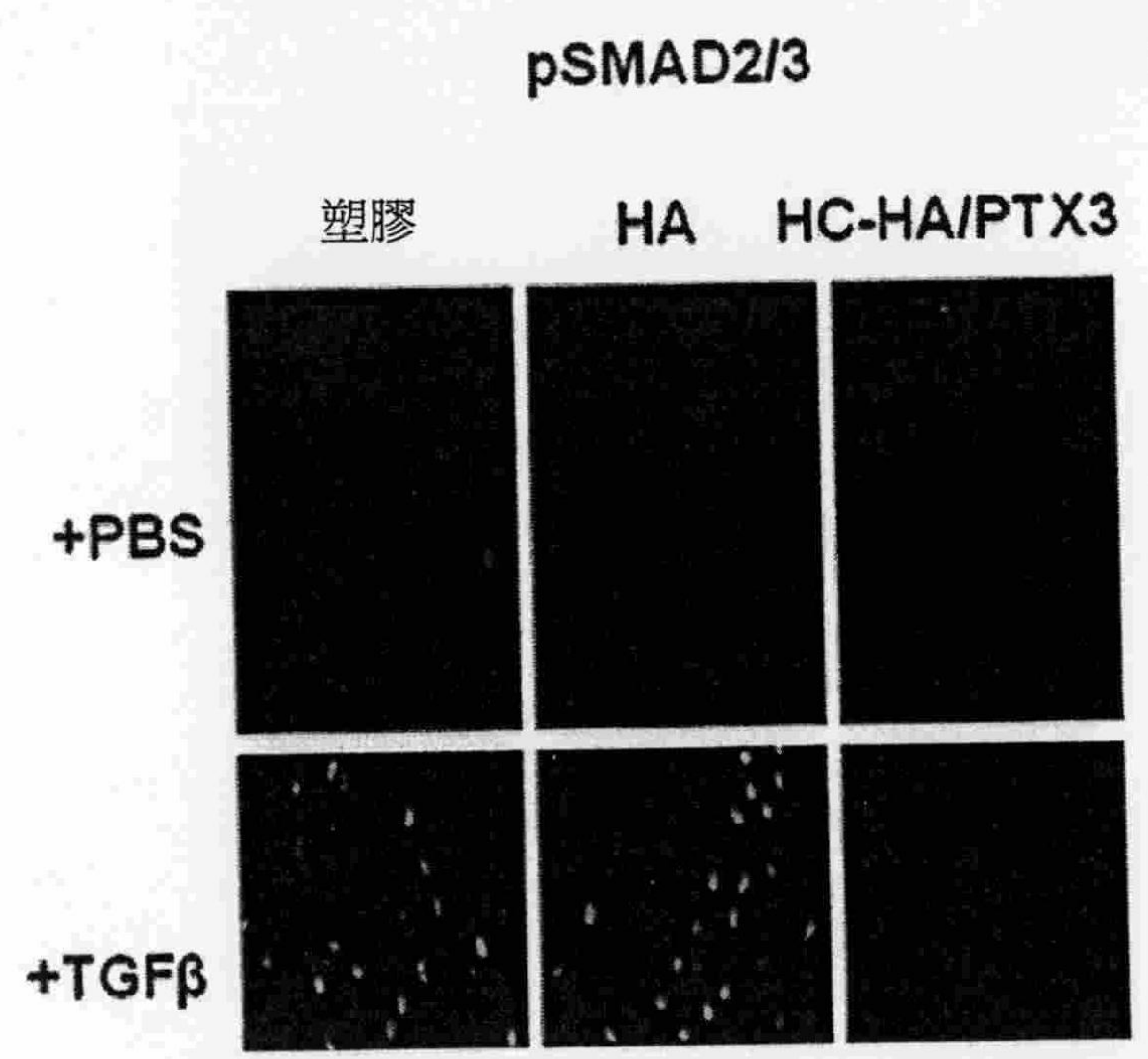


圖4E

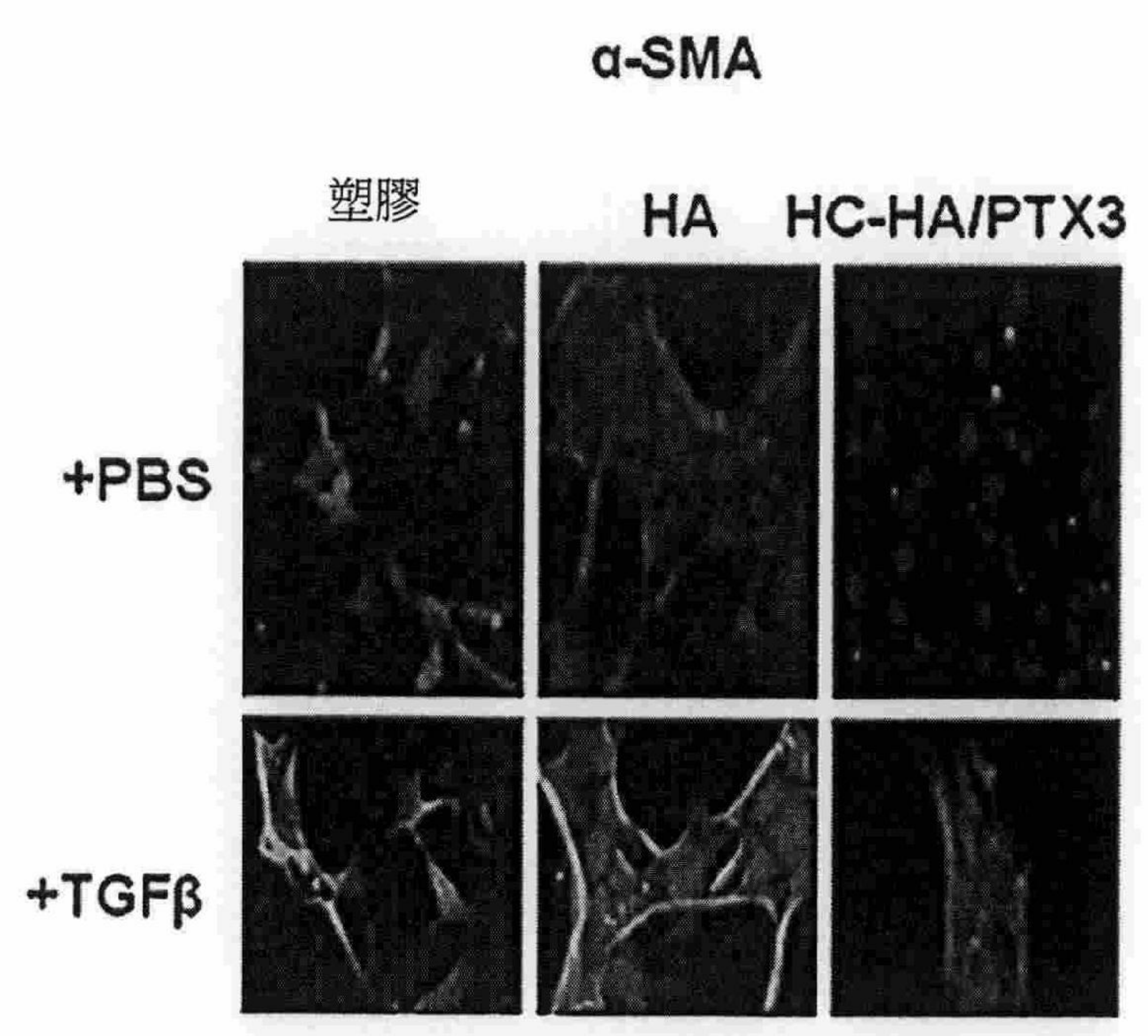


圖4F

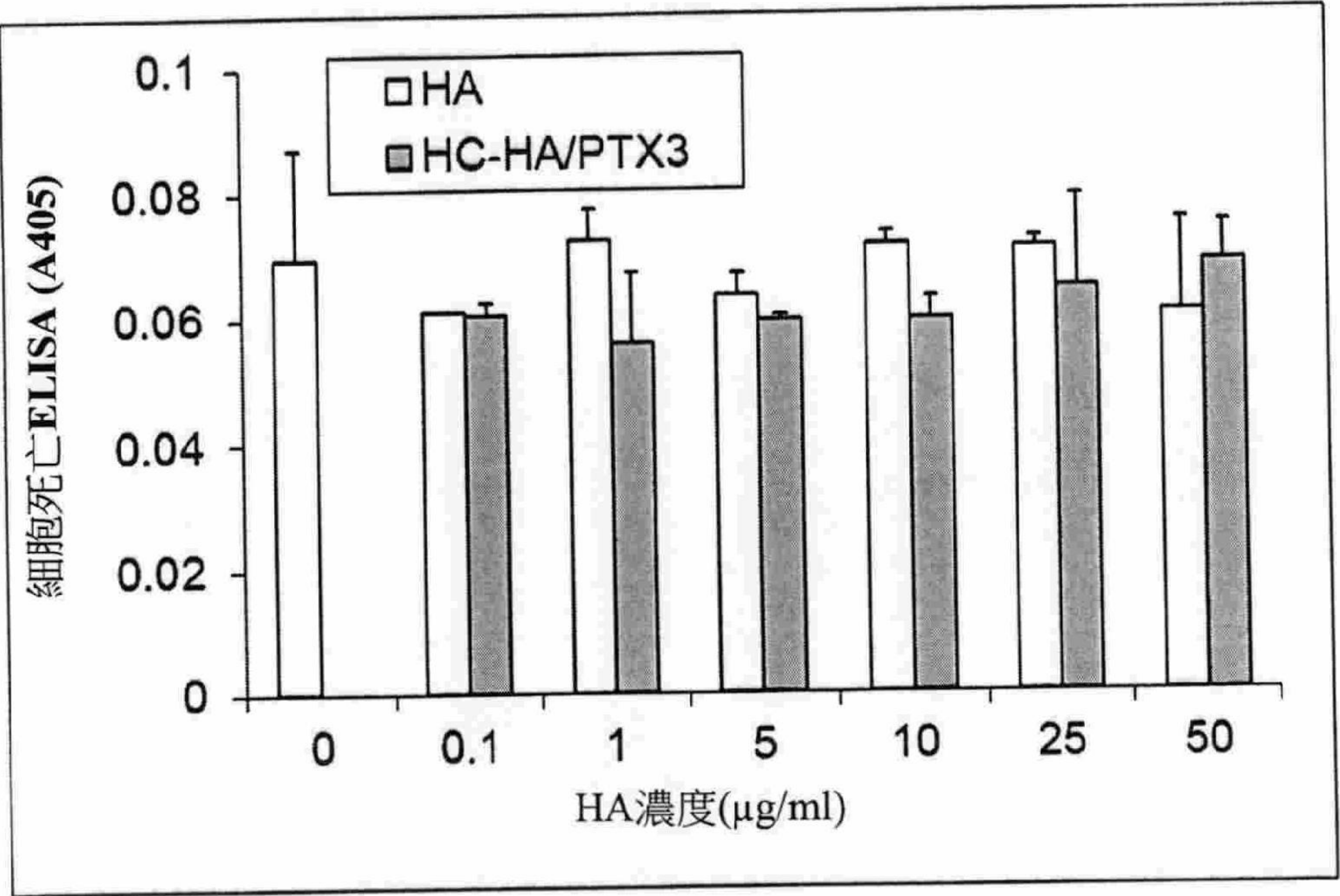


圖5A

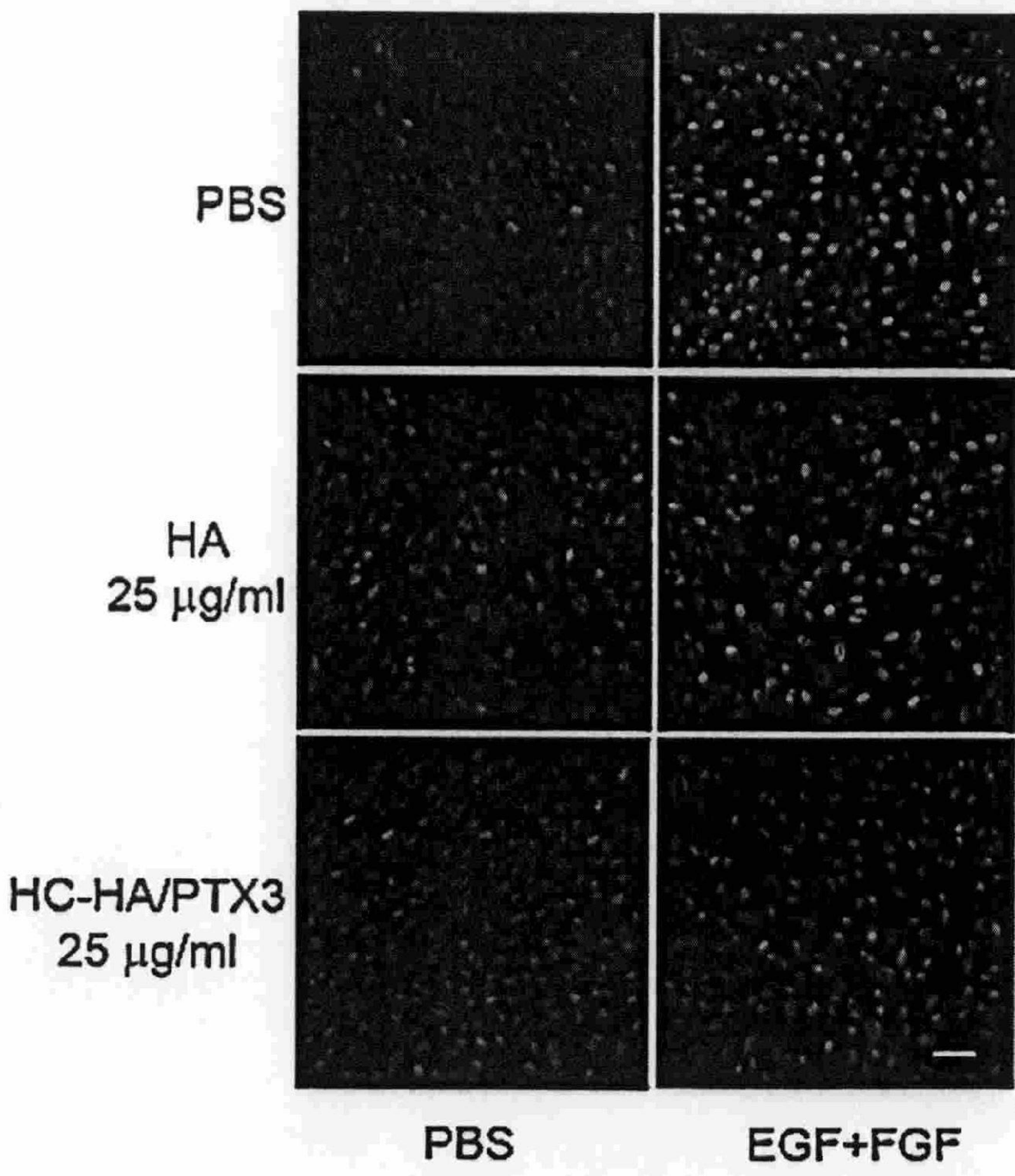


圖5B

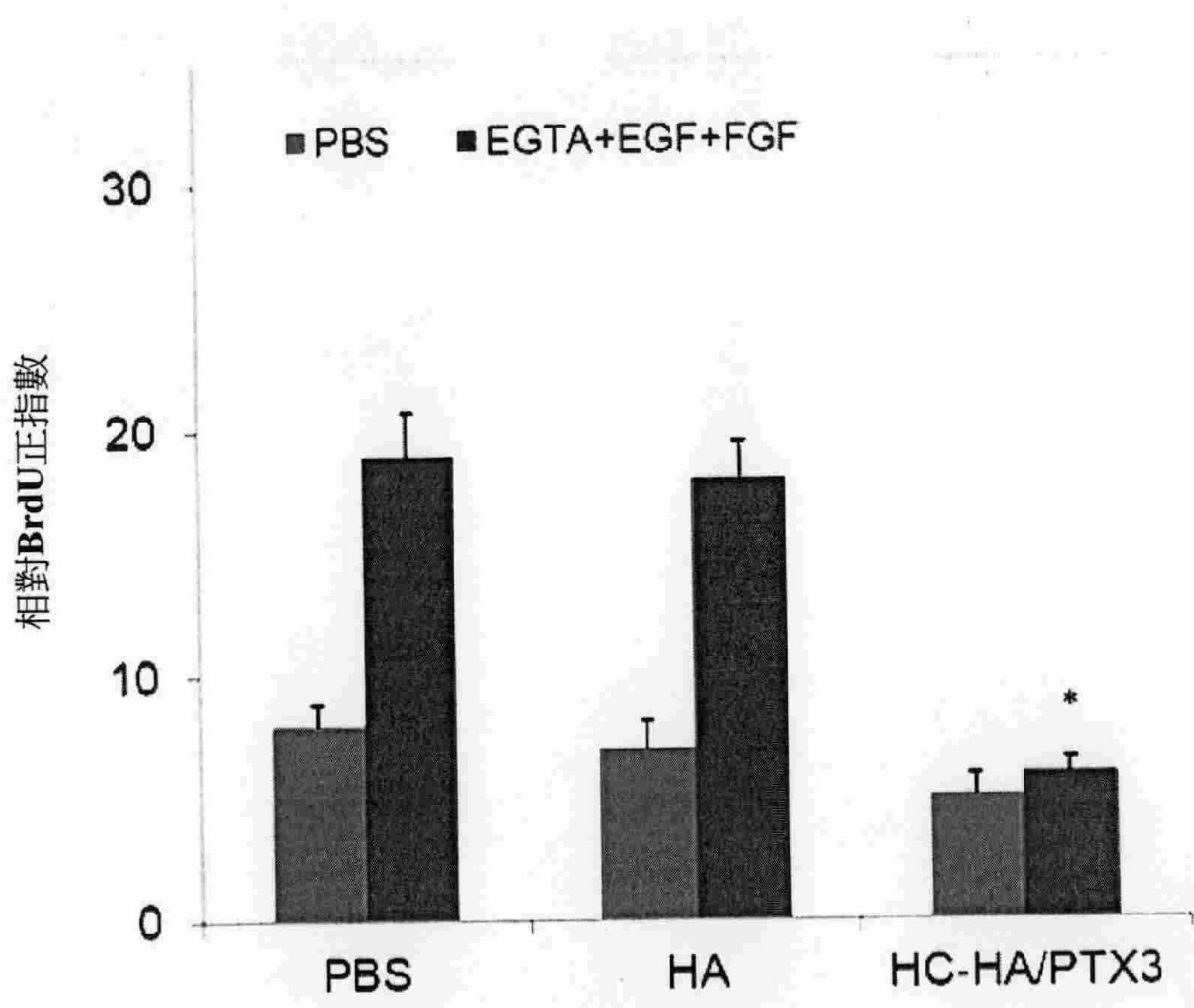


圖5C

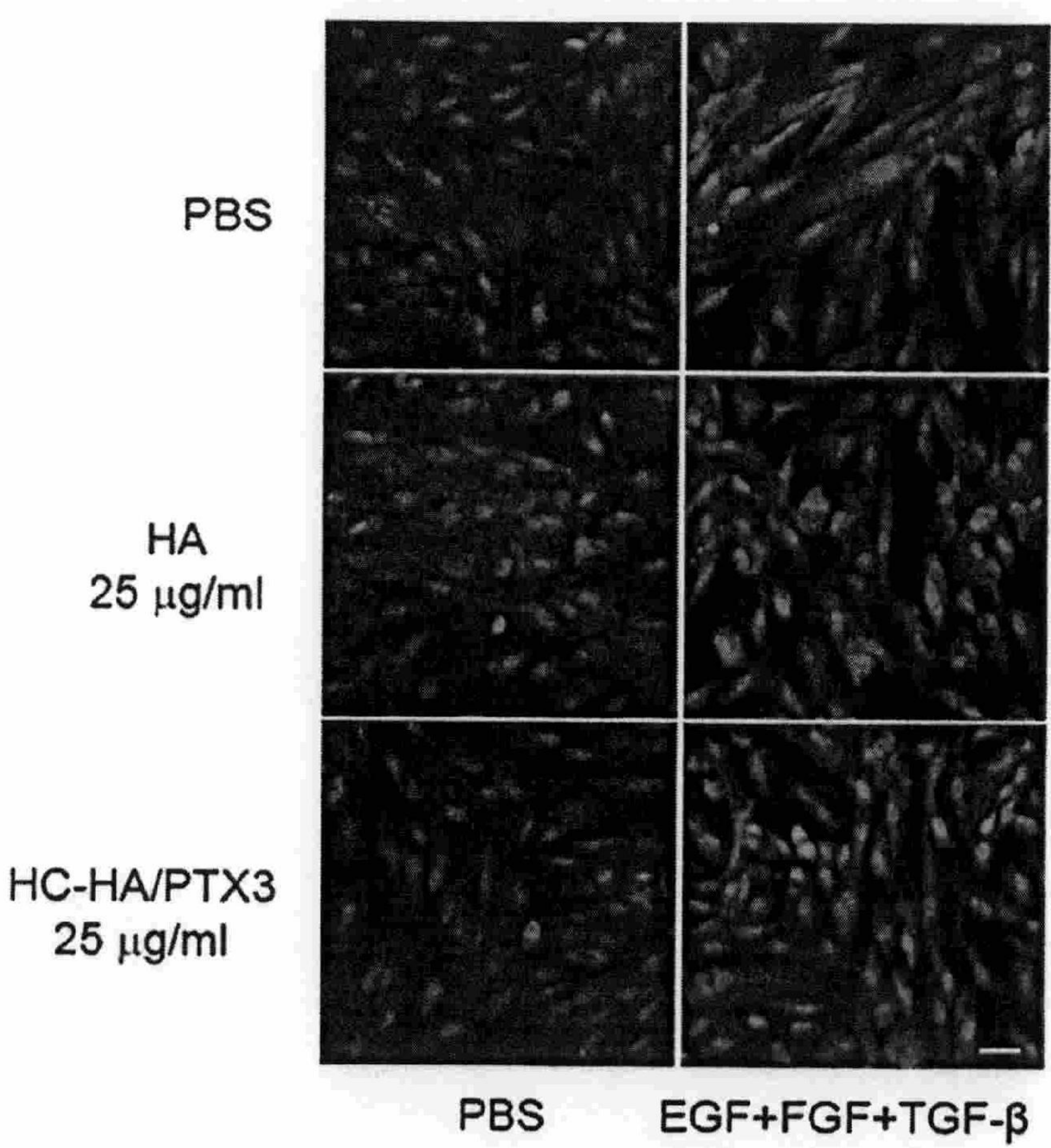


圖6A

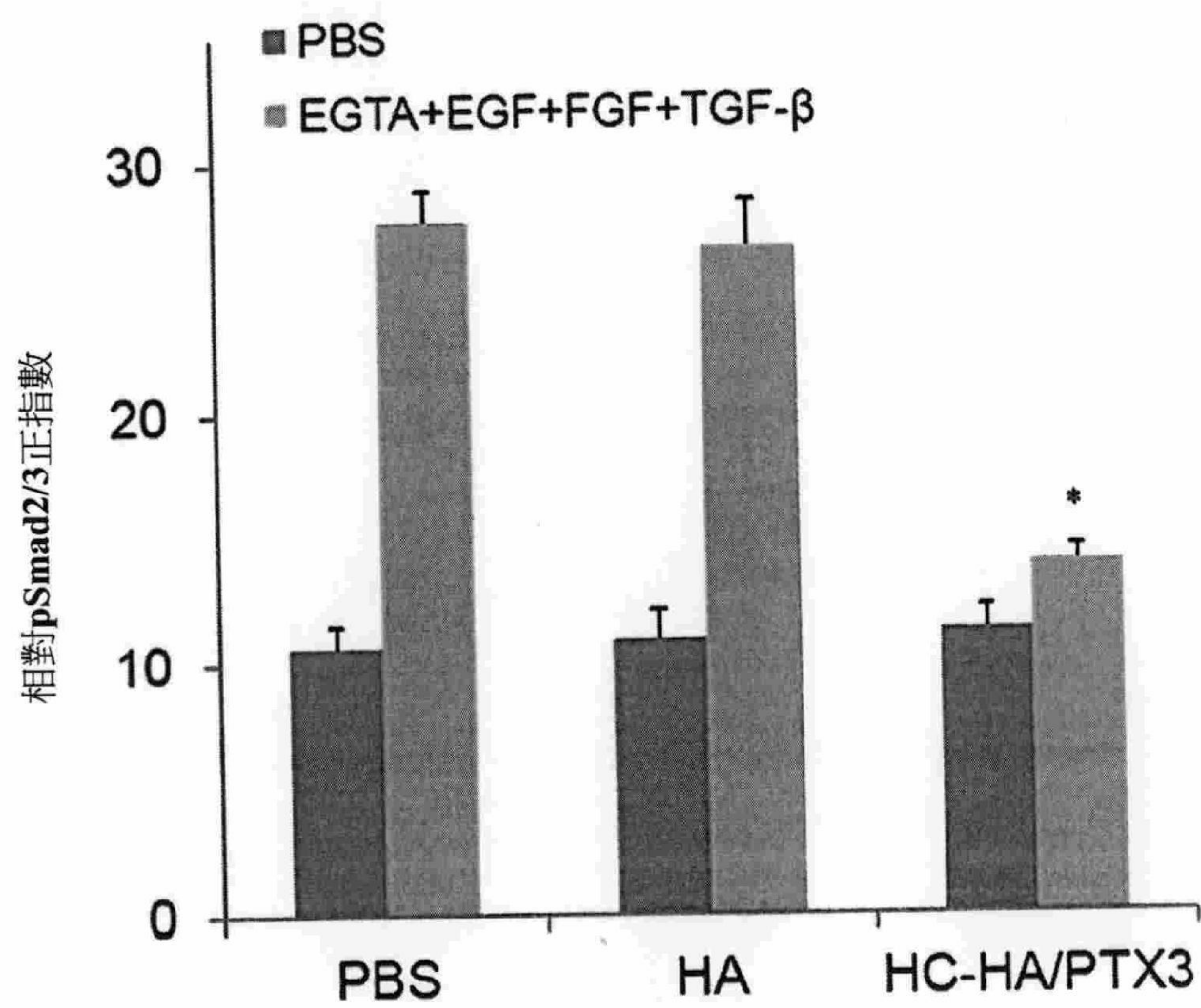


圖6B



圖7A



圖7B

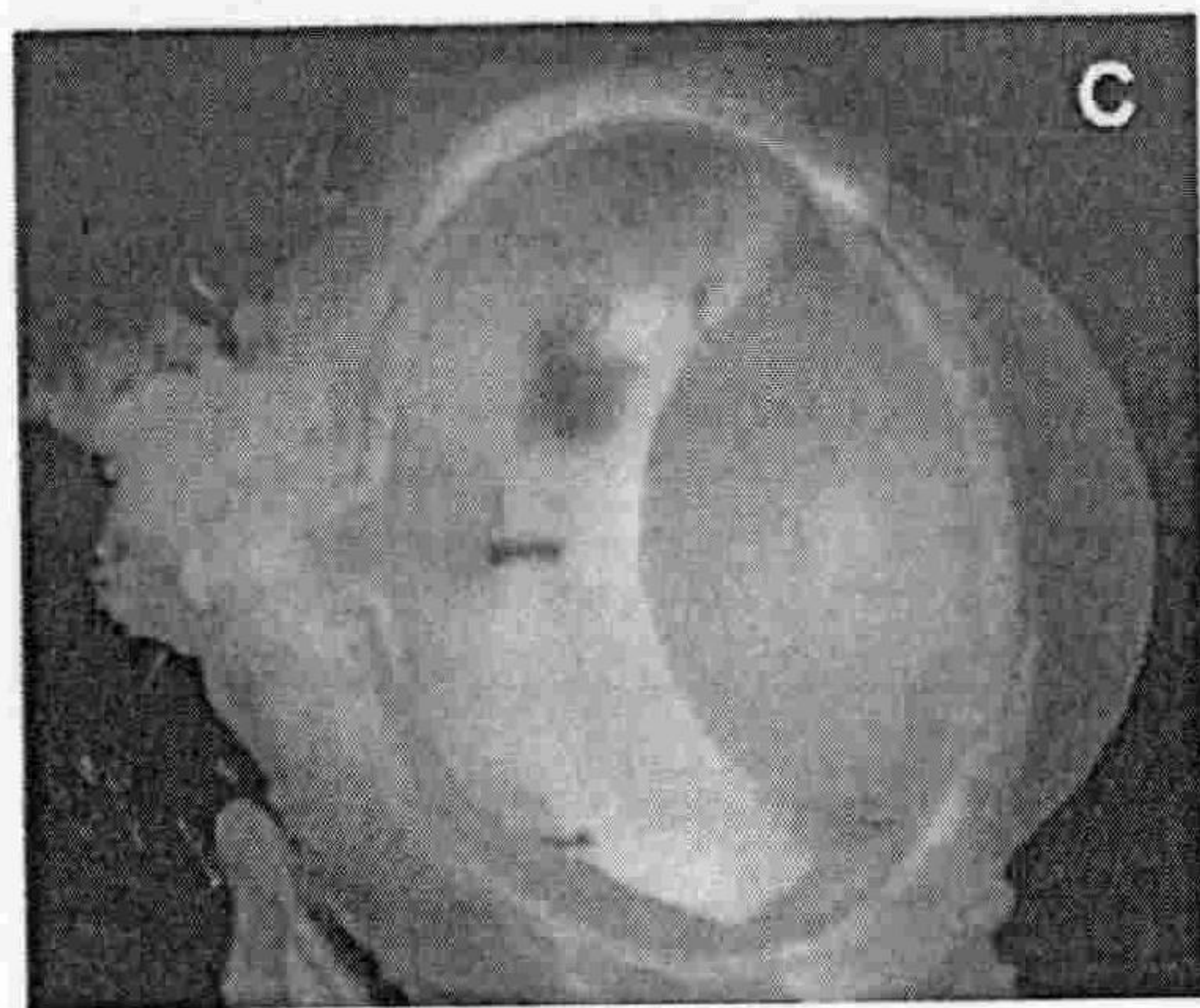


圖7C

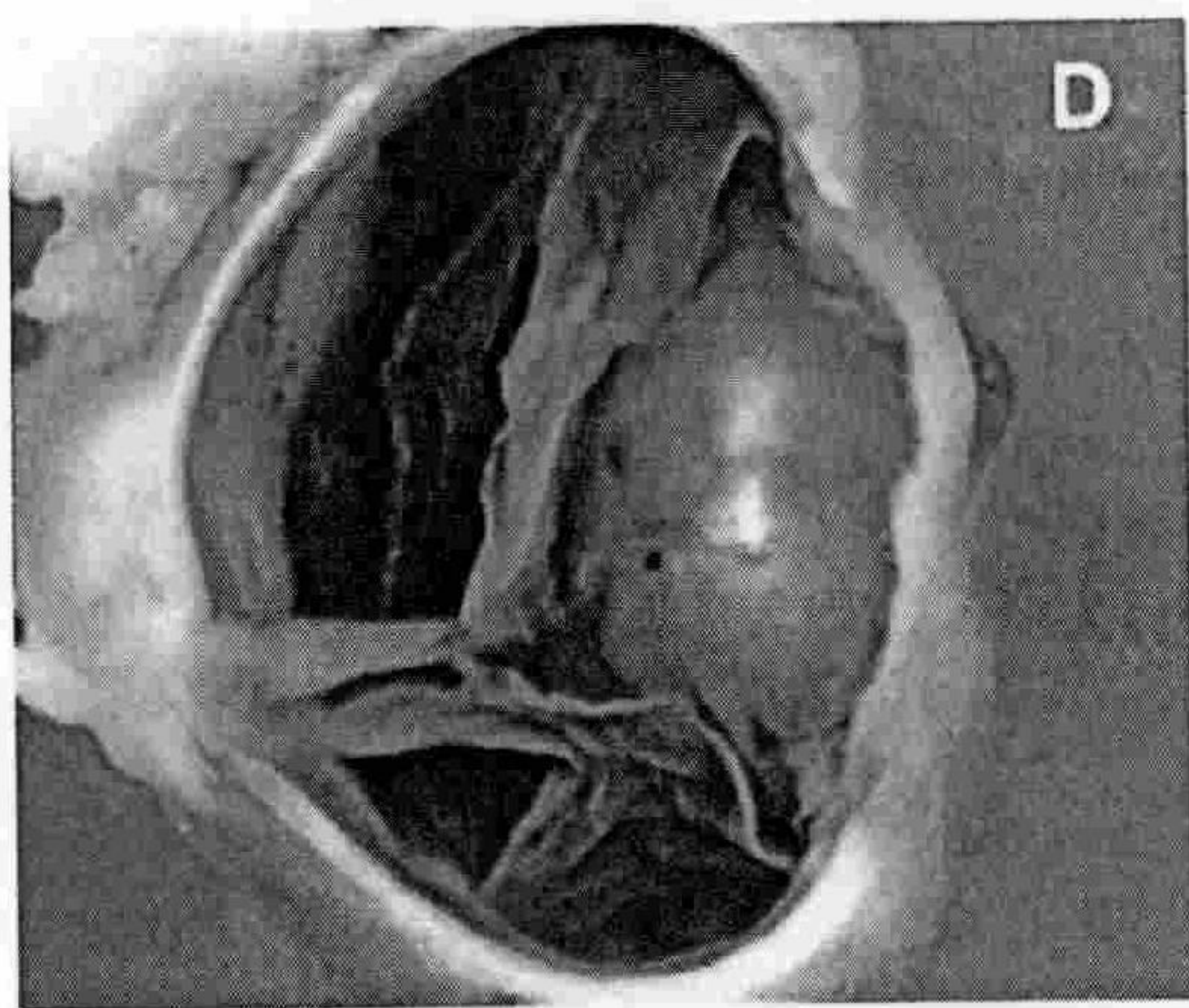


圖7D

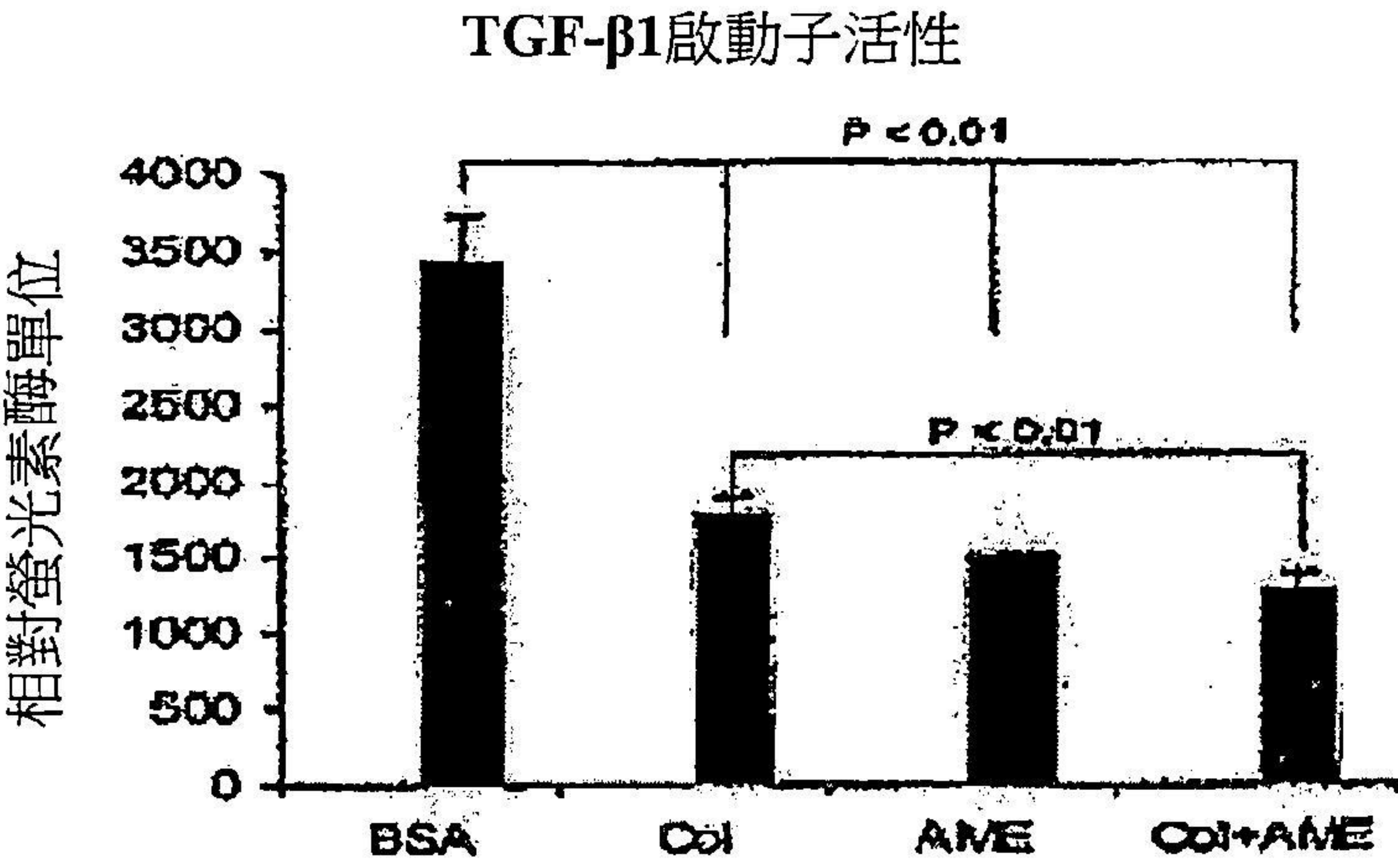


圖8

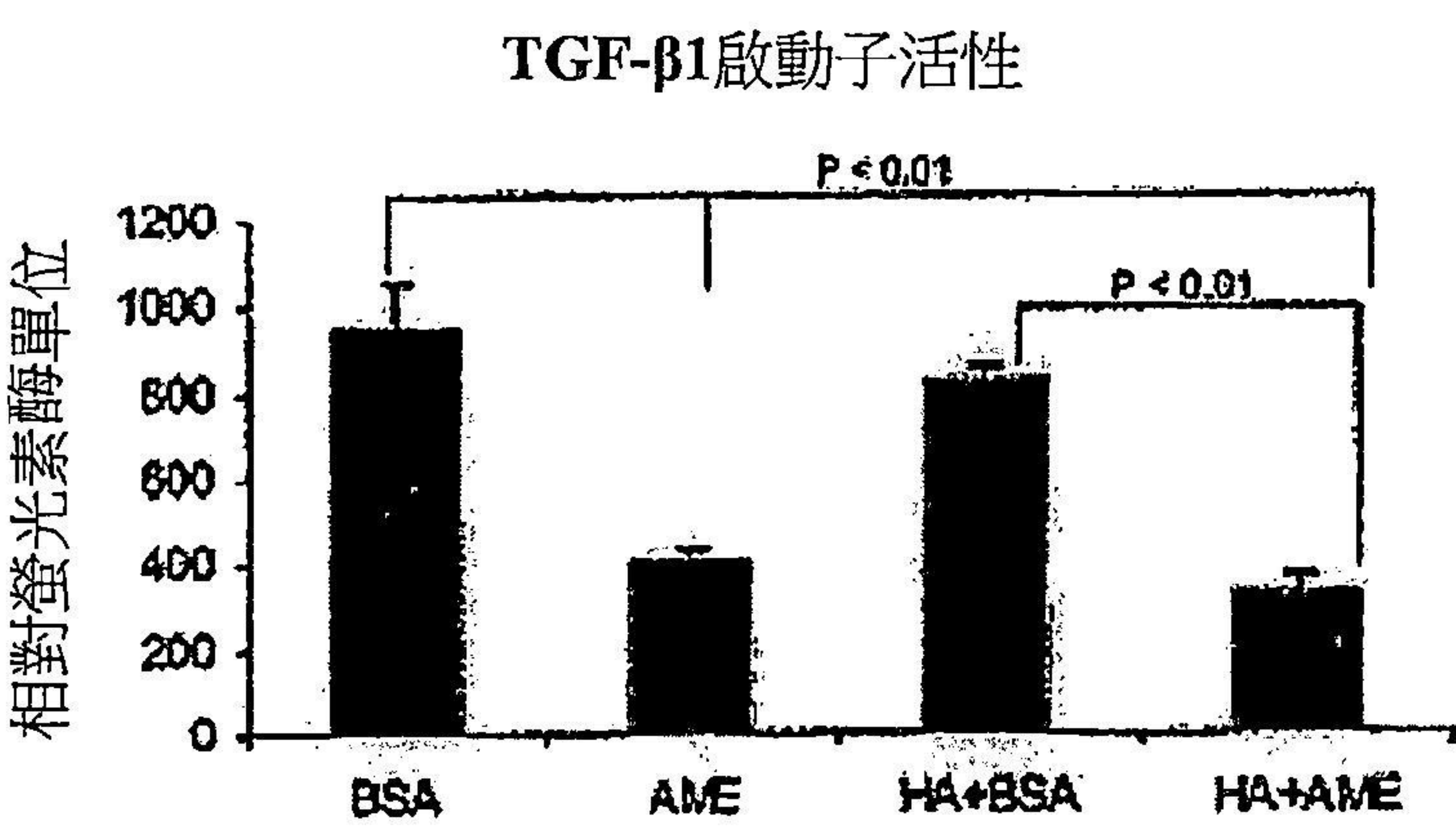


圖9

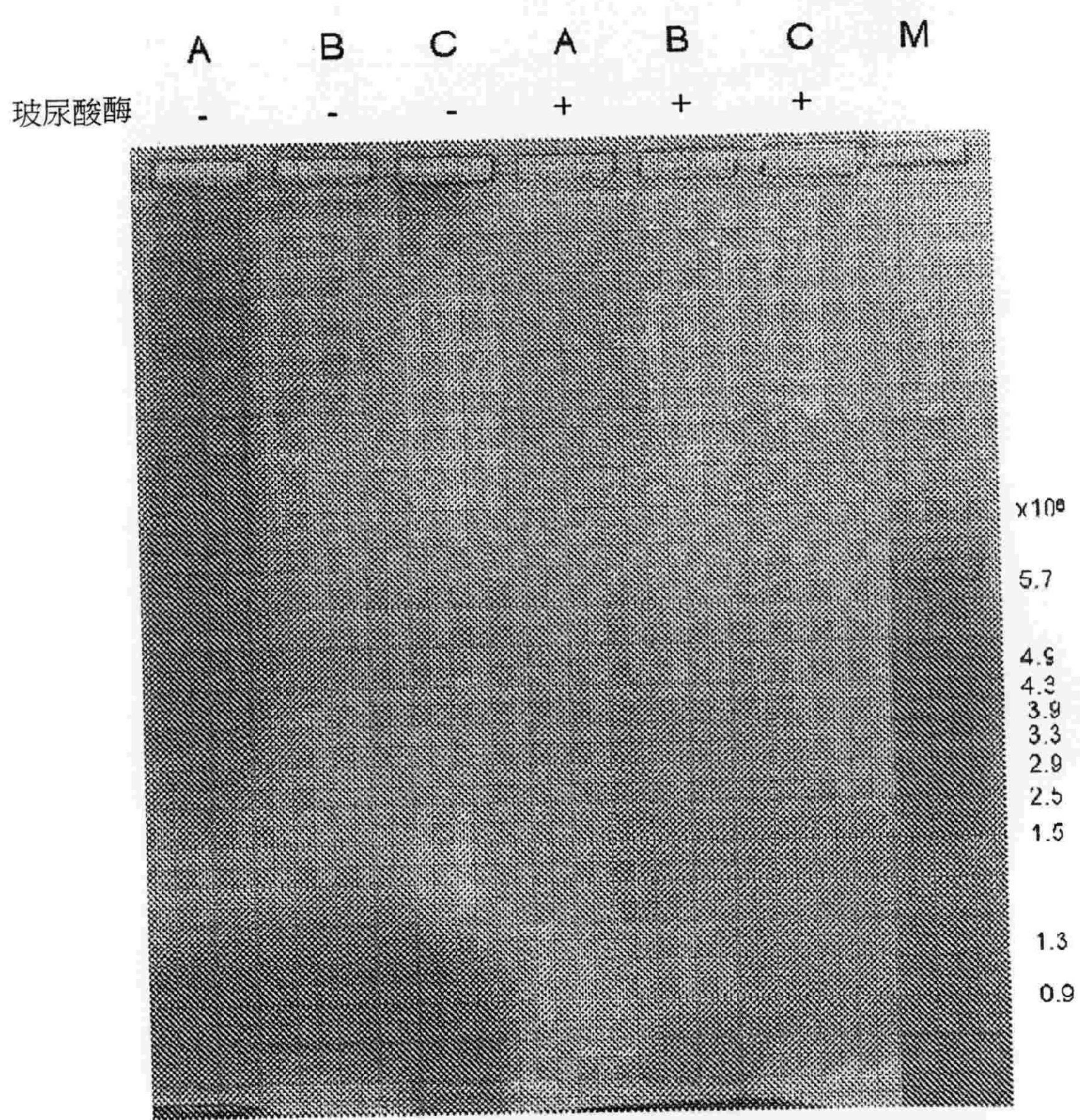


圖10

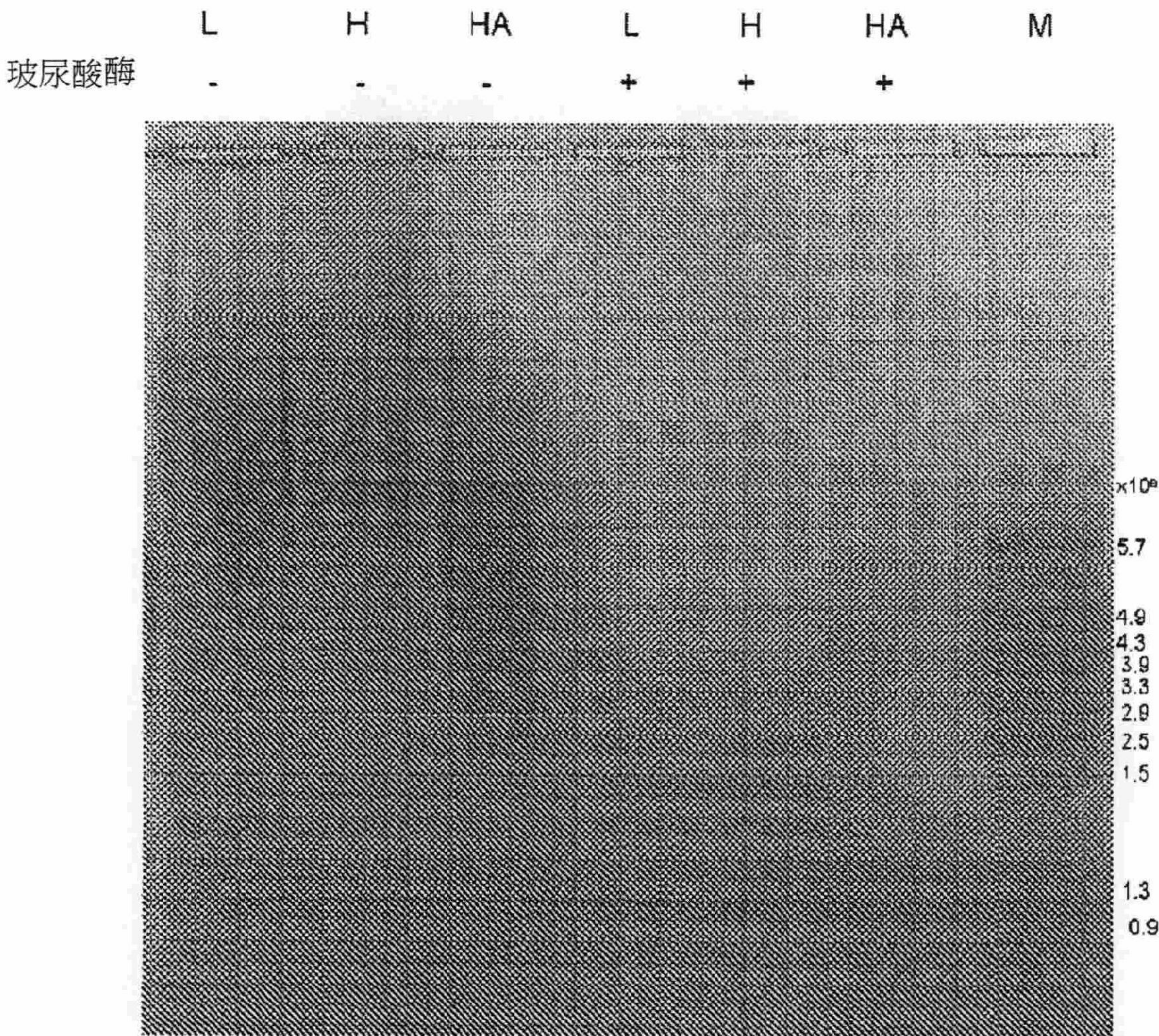


圖11

玻尿酸酶

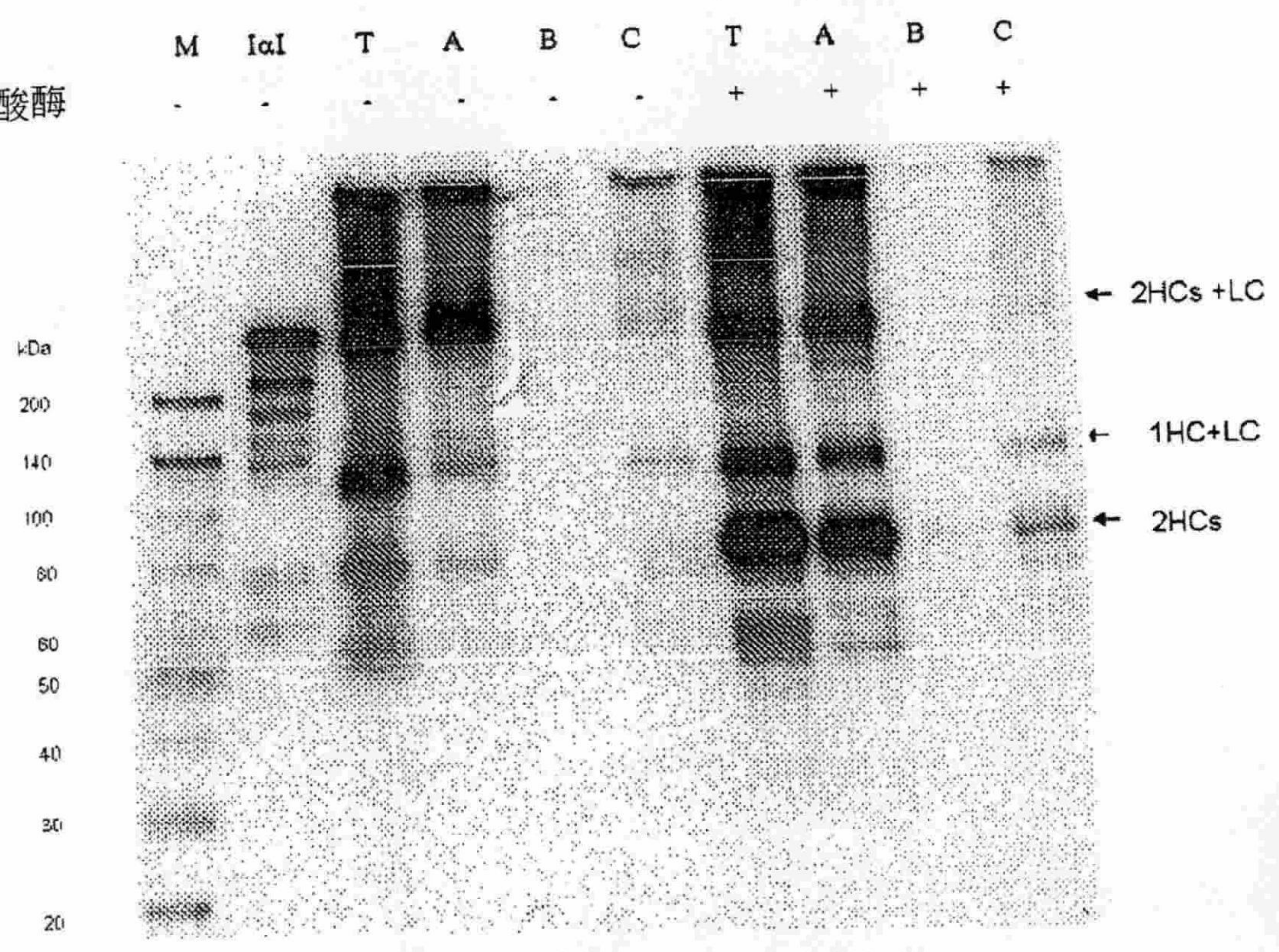


圖12

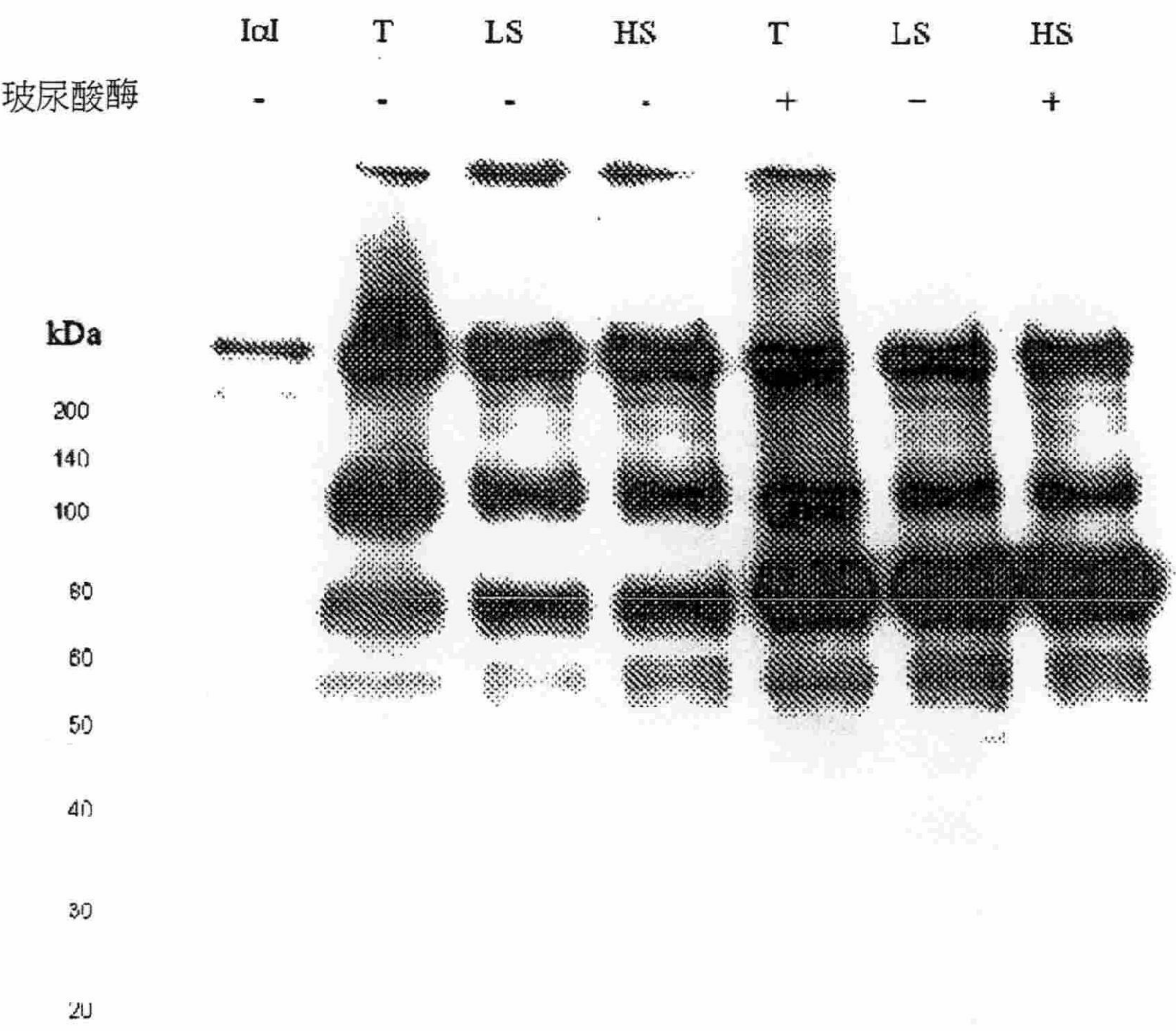


圖13

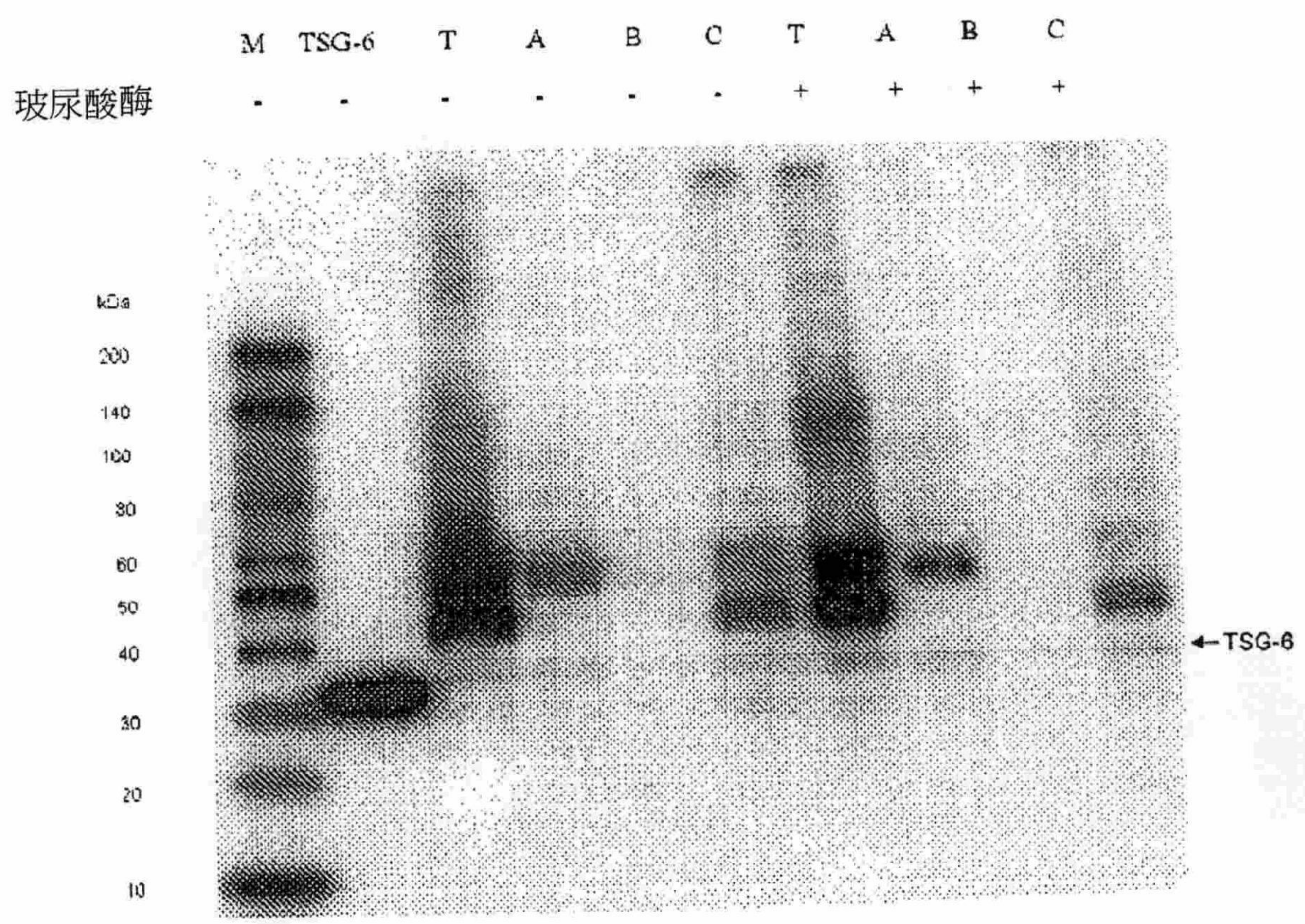


圖14

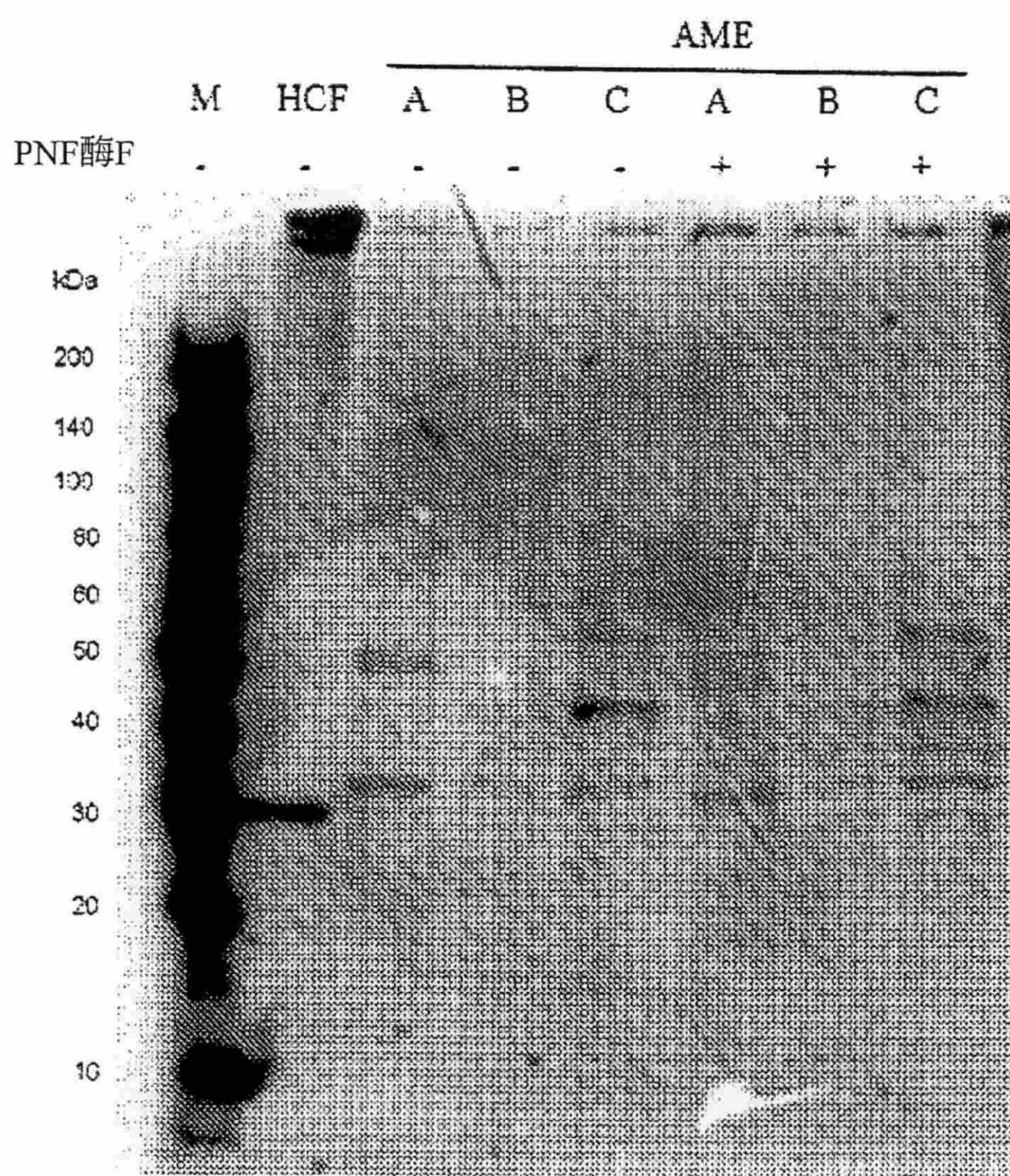


圖15

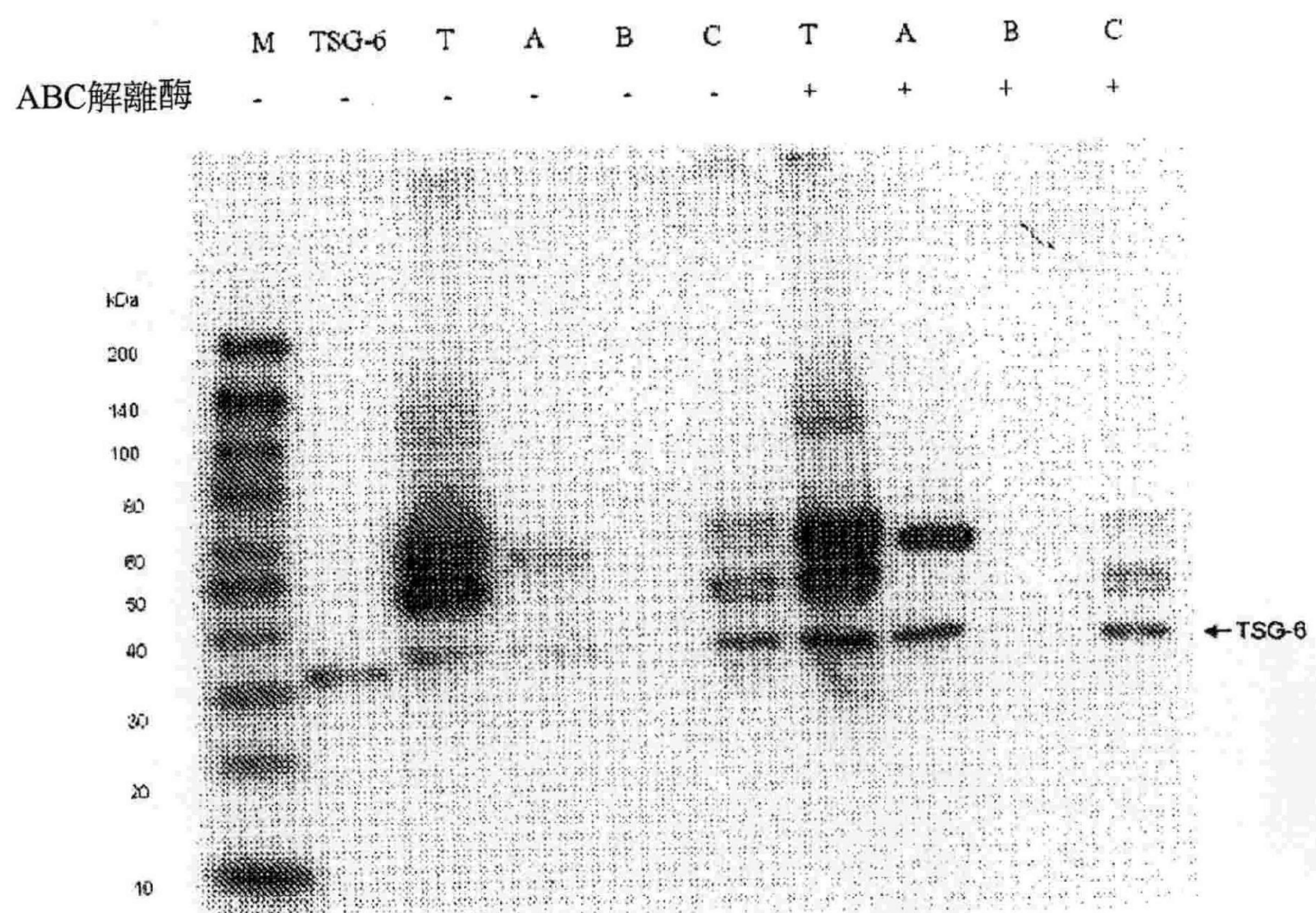


圖16

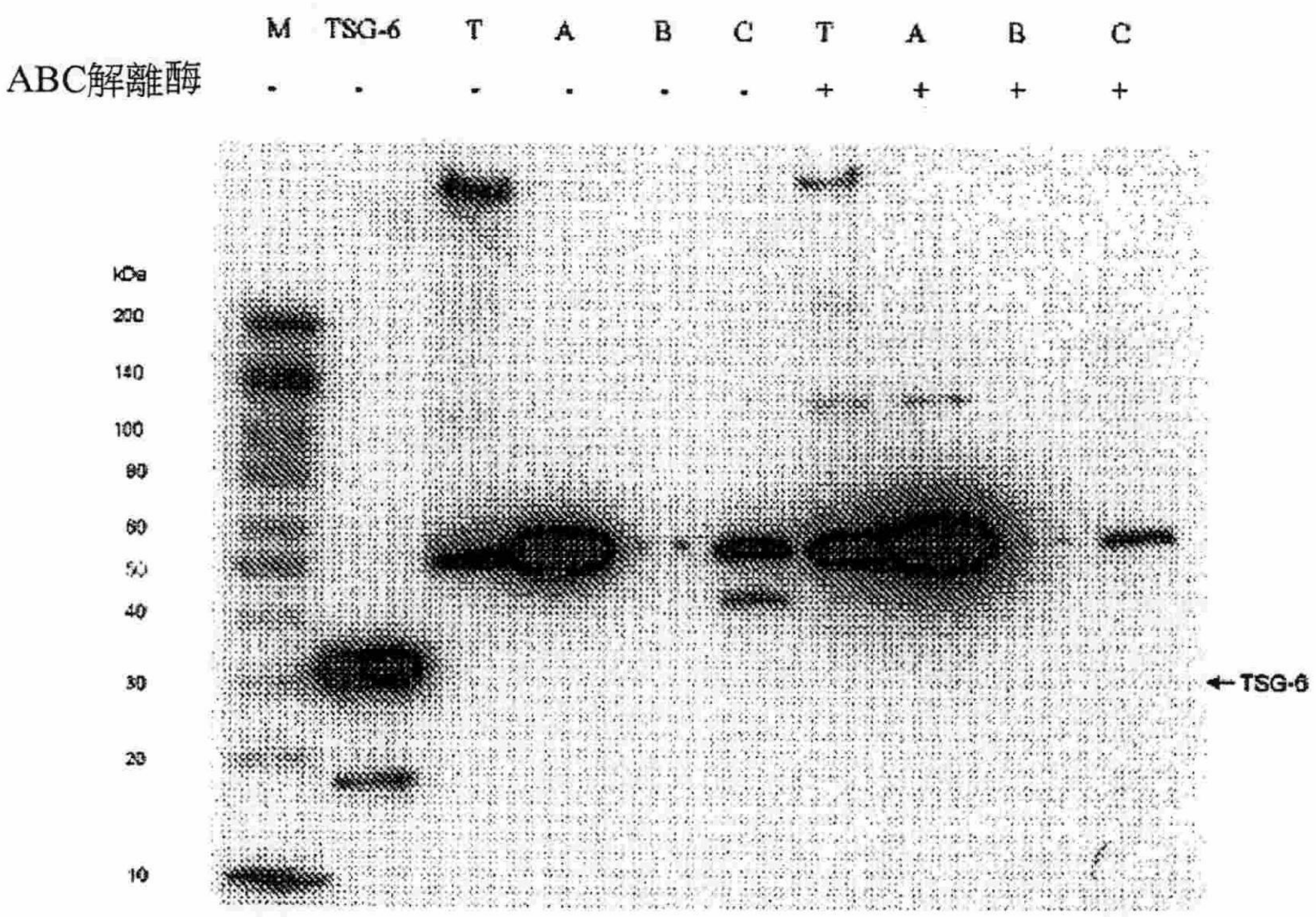


圖17

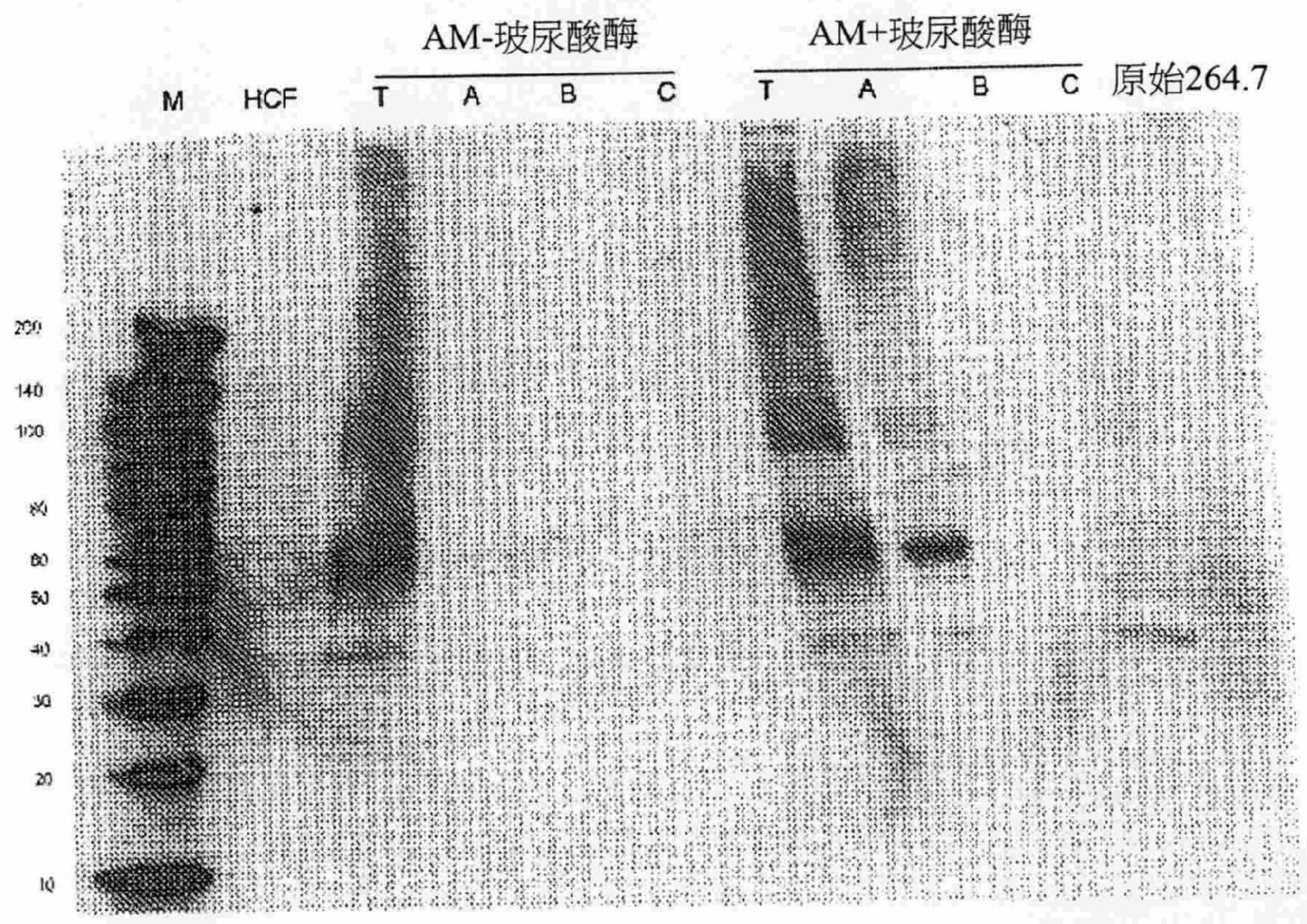


圖18

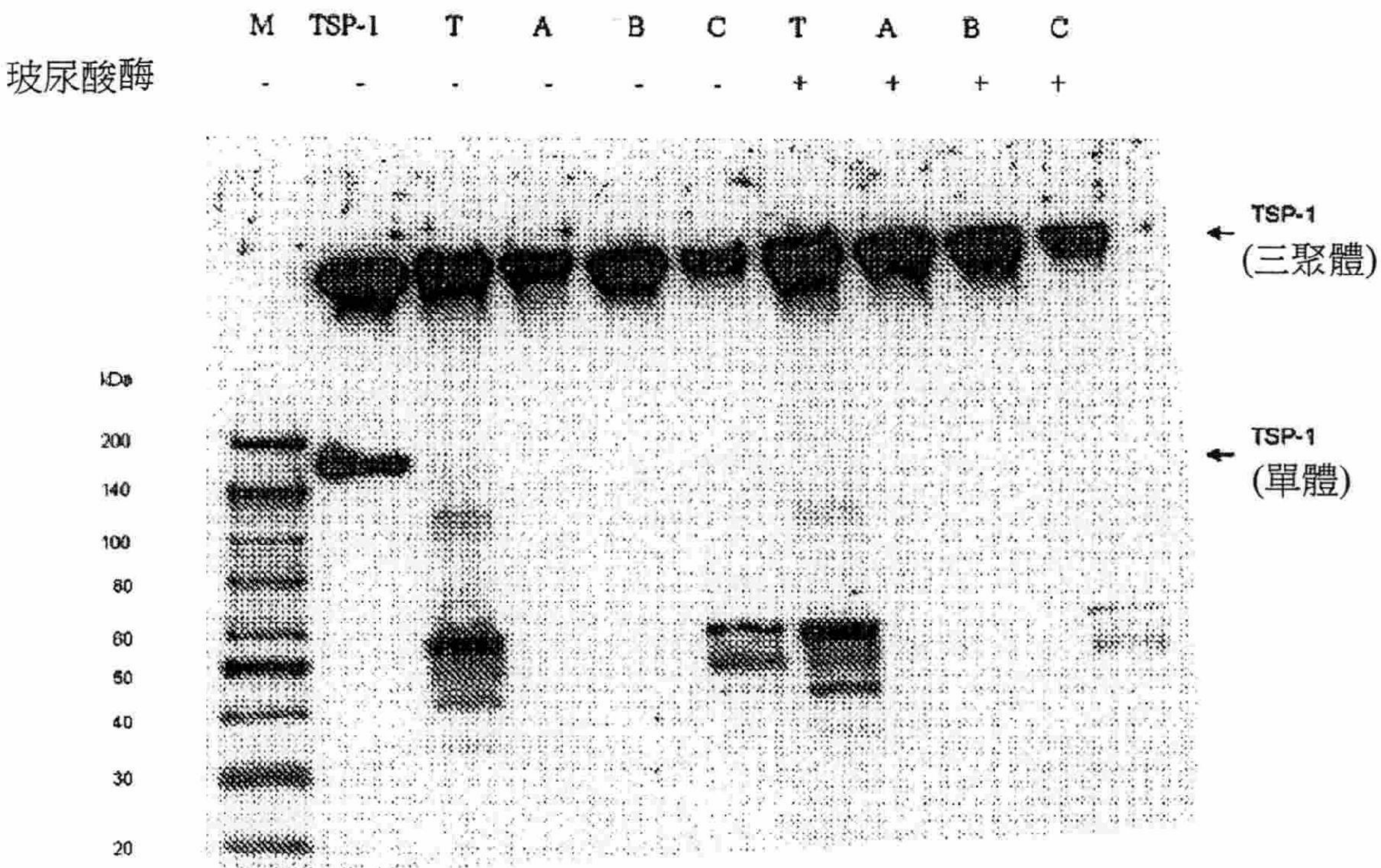


圖19

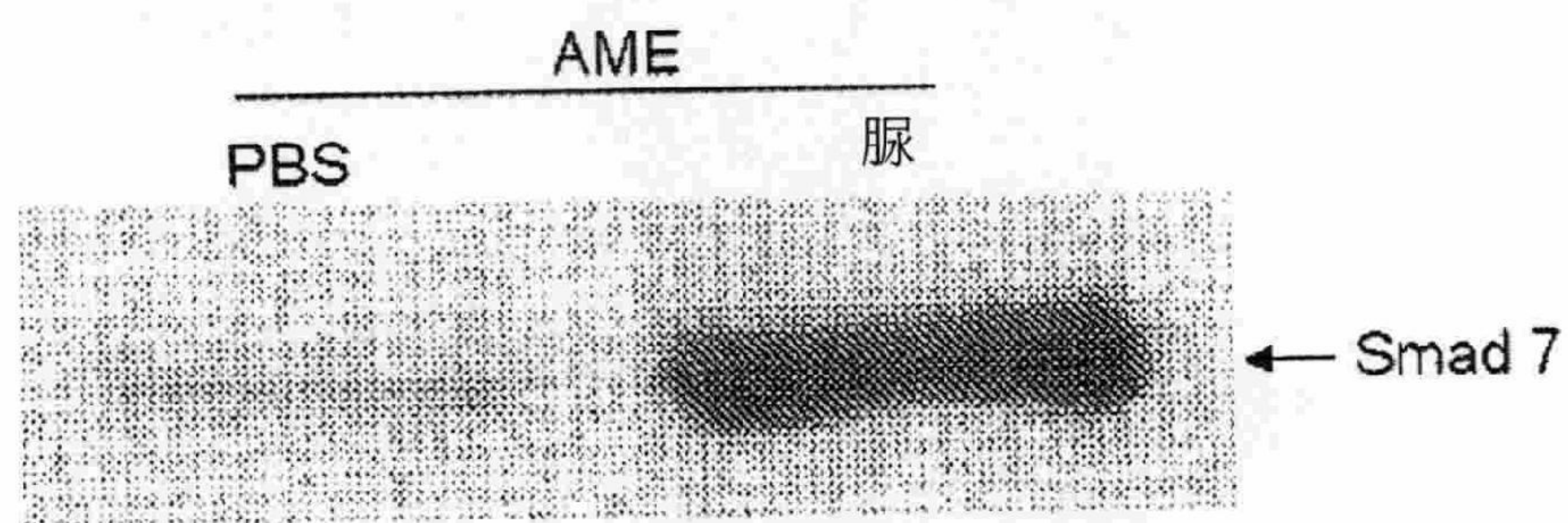


圖20

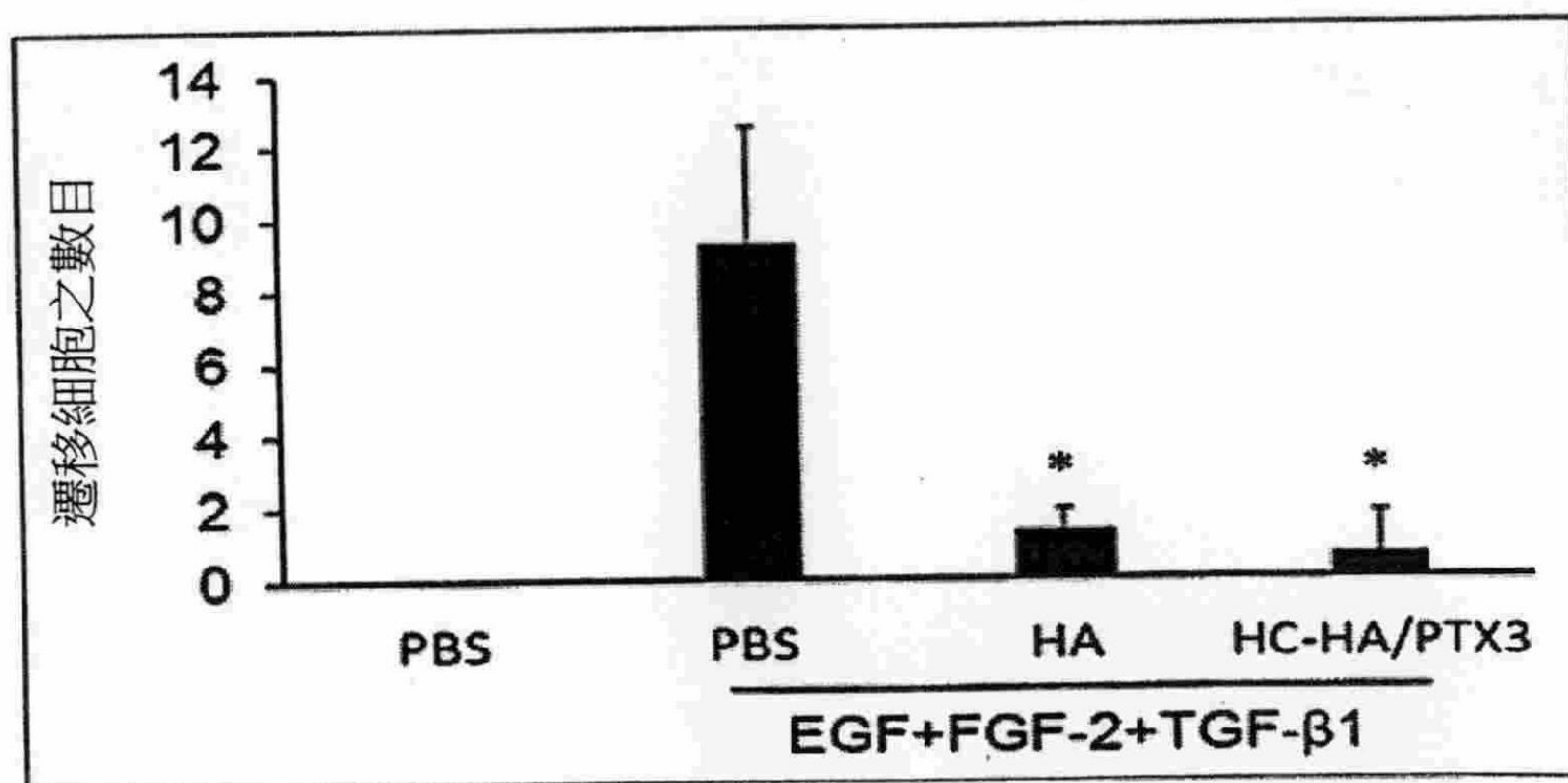


圖21

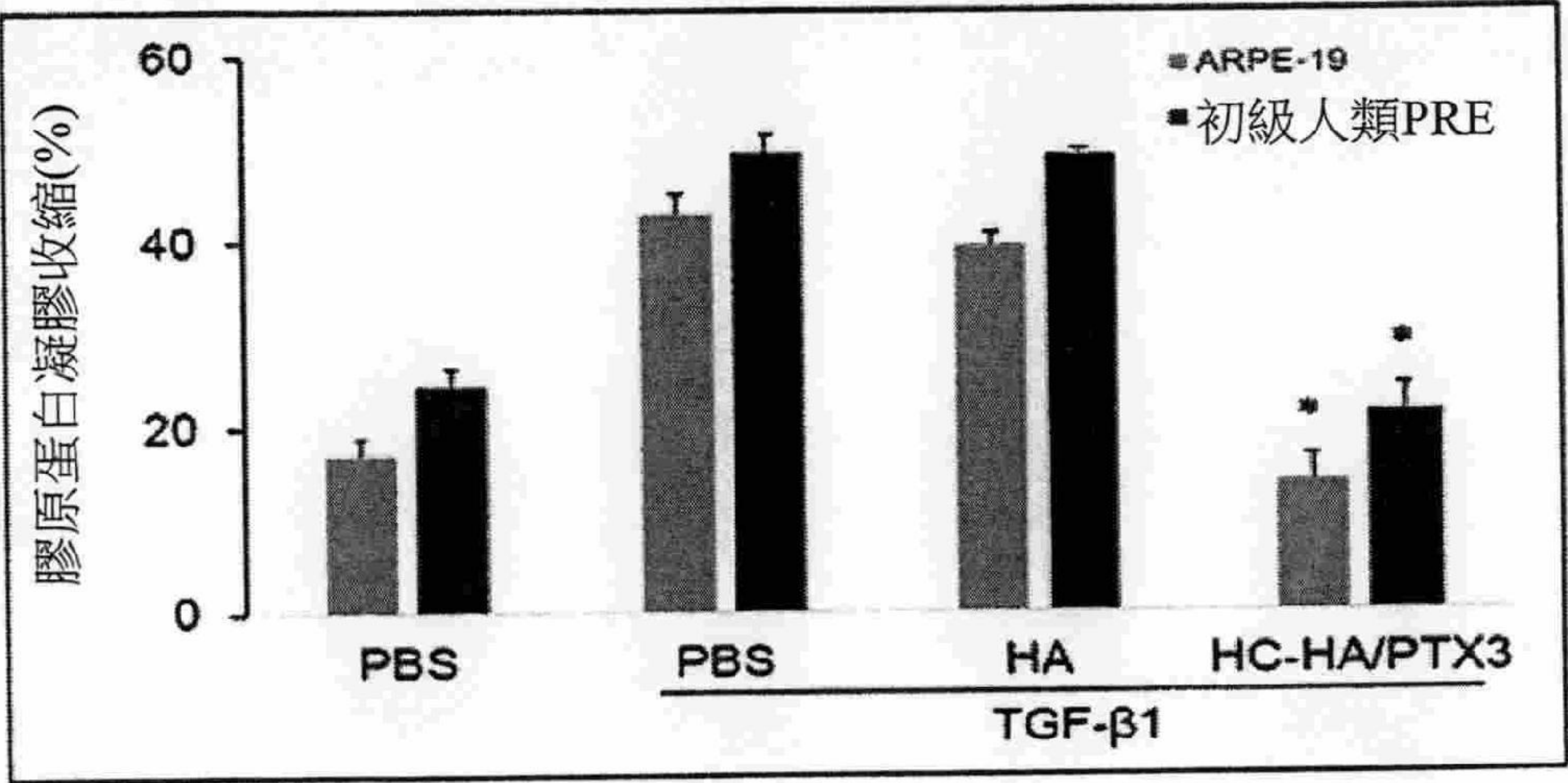


圖22