



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108348555 B

(45) 授权公告日 2022.07.08

(21) 申请号 201680065321.7

A61P 19/02 (2006.01)

(22) 申请日 2016.09.08

(56) 对比文件

US 2014219972 A1, 2014.08.07

US 2014219972 A1, 2014.08.07

WO 2005085421 A2, 2005.09.15

Julia P Vogel等. Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics.《Platelets》.2009, 第17卷(第7期), 第462-469页.

Sandra Mjoll Jonsdottir-Buch等

.Expired and Pathogen-Inactivated Platelet Concentrates Support Differentiation and Immunomodulation of Mesenchymal Stromal Cells in Culture.《Cell Transplant》.2014, 第24卷(第8期), 第1545-1554页.

G M van Buul等. Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture.《Osteoarthritis Cartilage》.2012, 第20卷(第10期), 第1186-1196页.

审查员 赵秋歌

权利要求书2页 说明书29页 附图2页

(51) Int.Cl.

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(54) 发明名称

细胞扩增方法和治疗组合物

(57) 摘要

本发明涉及用于生产间充质干细胞(MSC)的方法, 特别涉及用于大规模生产用于治疗人和其他动物的各种疾病的MSC(例如同种异体MSC)的方法。本发明还涉及允许选择适于大规模生产MSC的优选供体细胞的方法。本发明还涉及通过本发明的方法制备的纯化MSC。本发明还涉及血小板溶解产物在用于制备MSC培养物的方法中的用途以及富集细胞外基质的分泌物的制备。本发

明还涉及用于制备包含一种或更多种从培养的MSC中分泌的组分的组合物的方法, 所述组分具有改进的稳定性特征。本发明还涉及通过施用富集高分子量糖缀合物的条件培养基来治疗炎性病况(包括减轻其疼痛)的方法, 并且涉及通过施用富集高分子量糖缀合物的条件培养基来治疗神经性疼痛的方法。

1. 包含细胞外基质(ECM)组分的条件培养基在制备用于受试者中炎性病况的治疗的药物中的用途,其中所述包含细胞外基质(ECM)组分的条件培养基包含硫酸软骨素,并通过在包含血小板溶解产物的培养基中将间充质干细胞(MSC)培养到大于80%汇合的细胞密度而制备,其中所述炎性病况选自骨关节炎、滑囊炎、腱炎、高尔夫球员腕、网球肘、腓肠撕裂和冻疮。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述药物进一步包括治疗有效量的培养扩增的MSC。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述药物包括培养扩增的MSC和包含细胞外基质(ECM)组分的条件培养基。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中通过在包含血小板溶解产物的培养基中培养MSC来制备所述包含细胞外基质(ECM)组分的条件培养基。

5. 根据权利要求2到4中任一项所述的用途,其中,对于人受试者的治疗,所述培养扩增的MSC的治疗有效量为200万到1000万个细胞的剂量。

6. 根据权利要求2到4中任一项所述的用途,其中,对于人受试者的治疗,所述培养扩增的MSC的治疗有效量为500万个细胞的剂量。

7. 血小板溶解产物用于制备包含细胞外基质(ECM)组分的条件培养基的用途,其中所述包含细胞外基质(ECM)组分的条件培养基包含硫酸软骨素,并通过在包含血小板溶解产物的培养基中将间充质干细胞(MSC)培养到大于80%汇合的细胞密度而制备。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中所述血小板溶解产物是人血小板溶解产物。

9. 一种用于制备包含细胞外基质(ECM)组分的条件培养基的方法,所述方法包括在包含血小板溶解产物的培养基中将间充质干细胞(MSC)培养到大于80%汇合的细胞密度。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述MSC是脂肪组织来源的MSC。

11. 根据权利要求9所述的方法,其中所述血小板溶解产物是人血小板溶解产物。

12. 根据权利要求9所述的方法,其中所述培养基包含5%到10% v/v的血小板溶解产物。

13. 根据权利要求9所述的方法,其中所述条件培养基包含蛋白聚糖、糖胺聚糖和粘蛋白中的一种或更多种。

14. 根据权利要求9所述的方法,其中所述条件培养基包含硫酸角质素、硫酸皮肤素、硫酸肝素、光蛋白聚糖、多能蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、硫酸软骨素或聚集蛋白聚糖中的一种或更多种。

15. 根据权利要求9所述的方法,其进一步包括从所述培养基中去除所述细胞的步骤。

16. 一种组合物,其包含包含细胞外基质(ECM)组分的条件培养基,其中所述包含细胞外基质(ECM)组分的条件培养基包含硫酸软骨素,并通过在包含血小板溶解产物的培养基中将间充质干细胞(MSC)培养到大于80%汇合的细胞密度而制备。

17. 一种组合物,其包含培养扩增的间充质干细胞(MSC)和包含细胞外基质(ECM)组分的条件培养基,其中所述包含细胞外基质(ECM)组分的条件培养基包含硫酸软骨素,并通过在包含血小板溶解产物的培养基中将MSC培养到大于80%汇合的细胞密度而制备。

18. 根据权利要求16或17所述的组合物,其中所述组合物是药物组合物。

19. 根据权利要求17所述的组合物,其中所述细胞在装有所述组合物的容器中不粘附。

20. 一种药物组合物,其包含根据权利要求16到19中任一项所述的包含细胞外基质

(ECM)组分的条件培养基和药学上可接受的载体、赋形剂或佐剂。

21. 包含来自间充质干细胞(MSC)的体外培养物的包含细胞外基质(ECM)组分的条件培养基的组合物在制备用于治疗受试者的炎性病况的药物中的用途,其中所述药物被配制用于局部施用至所述受试者,其中所述条件培养基通过在包含血小板溶解产物的培养基中将MSC培养到大于80%汇合的细胞密度而制备,其中所述炎性病况选自骨关节炎、滑囊炎、腱炎、高尔夫球员腕、网球肘、腓肠撕裂和冻疮。

22. 根据权利要求21所述的用途,其中所述MSC是人脂肪来源的MSC。

23. 根据权利要求21所述的用途,其中所述炎性病况为跟腱炎。

24. 根据权利要求21所述的用途,其中所述包含条件培养基的组合物进一步包含培养扩增的MSC。

25. 根据权利要求24所述的用途,其中所述培养扩增的MSC是多次传代的MSC。

26. 一种用于制备包含稳定分泌蛋白质组的治疗组合物的方法,其中所述稳定性包括在室温一个月后保留至少60%的活性,所述方法包括将间充质干细胞(MSC)在包含血小板溶解产物的培养基中培养足以允许分泌蛋白质组分泌到所述培养基中的时间,培养到大于80%汇合的细胞密度,收获所述培养物的上清液,并且其中所述方法不包括过滤所述上清液。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述稳定分泌蛋白质组包含一种或更多种选自由以下组成的组的因子:IFN- γ 、IL-8、IL-9、IL-12、IL-15、TNF- α 、IL-10、MCP-1、RANTES、GM-CSF、IP-10、PDGF-bb、VEGF、IL-6和VEGF。

细胞扩增方法和治疗组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于生产间充质干细胞 (MSC) 的方法,特别涉及用于大规模生产用于治疗人和其他动物的各种疾病的MSC的方法。在具体实施方案中,所述方法允许有效大规模生产用于疗法的同种异体MSC。本发明还涉及允许选择适于大规模生产MSC的优选供体细胞的方法。本发明还涉及通过本发明方法制备的纯化的MSC。本发明还涉及血小板溶解产物在用于制备MSC培养物的方法中的用途以及富集细胞外基质的分泌物的制备。本发明还涉及用于制备包含一种或更多种从培养的MSC中分泌的组分(例如血管内皮生长因子(VEGF))的组合物的方法,所述组分具有改进的稳定性特征。本发明还涉及通过施用富集高分子量糖缀合物的条件培养基来治疗炎性病况(包括减轻其疼痛)的方法。本发明还涉及通过施用富集高分子量糖缀合物的条件培养基来治疗神经性疼痛的方法。

背景技术

[0002] 使用同种异体间充质干细胞 (MSC) 治疗人和动物的各种疾病是许多群体感兴趣的快速扩展的领域。目前,有大量的临床试验探索使用MSC用于治疗各种疾病,包括骨关节炎、心肌梗塞、中风和明显有免疫系统参与的其他疾病,例如移植植物抗宿主病、克罗恩氏病(Crohn's disease)、类风湿性关节炎和糖尿病。MSC正被用作细胞疗法,以治疗骨和软骨中的缺陷并帮助伤口愈合,或者与生物材料组合用于组织工程开发。

[0003] 对于同种异体间充质干细胞的商业生产,重要的是来自单个供体的细胞可被充分扩增以产生大量剂量。尽管存在用于生产适用于疗法的MSC的已知方法,但在将此类方法应用于大规模生产MSC方面存在限制。例如,一种限制在于用于建立培养物的不同组织样品或细胞样品之间存在增殖能力的不一致性,以致一个供体样品可能具有更多细胞倍增的能力由此适于细胞的大规模制备,而另一供体样品可能具有有限的能力且不适合。目前没有可靠的手段,使用者通过该手段能够在早期阶段区分此类样品,结果是在已实现可接受数目的剂量之前,来源于一个样品的细胞可能变得衰老,从而导致浪费精力和资源。

[0004] 除了使用同种异体间充质干细胞 (MSC) 治疗人和动物的各种疾病之外,使用来自MSC的分泌物来治疗各种疾病的兴趣也在扩大。分泌物可呈各种形式,例如申请人的共同未决申请PCT国际公开号W02013/040649中所描述的,该申请名称为“治疗方法和组合物(Therapeutic methods and compositions)”,其内容以引用方式并入本文。

[0005] 在本文所描述的实施方案中,本发明解决了对生产MSC和基于MSC的产品的改进方法的需要,特别是改善当已知方法应用于大规模生产MSC(例如用于生产大量剂量的同种异体细胞)时的一种或更多种限制的方法。在实施方案中,本发明解决了对生产包含MSC分泌的细胞因子和生长因子的组合物的改进的方法以及对此类组合物的需要,所述改进的方法或组合物可减轻已知方法和组合物的一种或更多种限制,例如易用性、组合物在储存时的稳定性或治疗能力。

[0006] 在实施方案中,本发明解决了对用于治疗炎性病况(包括减轻其疼痛)的改进的或替代的方法和药剂的需要。在实施方案中,本发明解决了对用于治疗神经性疼痛的改进的

或替代的方法和药剂的需要。

发明内容

[0007] 本发明人已开发出使得能够从单个供体生产非常大量剂量的MSC的方法。所述方法涉及首先从供体收获大量脂肪组织。然后消化脂肪抽吸物(lipoaspirate)以分离基质血管级分(SVF)，然后将其置于组织培养物中并扩增。

[0008] 如本文所描述的，本发明人还已开发出用于在包含血小板溶解产物的培养基中生产MSC的创新方法。本发明人已鉴别出，在包含血小板溶解产物的培养基中，例如在本文所描述的条件下，MSC的生长具有令人惊讶的优点，即细胞向组织培养基中分泌高水平的高分子量糖缀合物。这允许生产富集高分子量糖缀合物的条件培养基，其为治疗或减轻炎性病况(包括骨关节炎)的疼痛或为减轻神经性疼痛提供另外的治疗优点。以这种方式产生的条件培养基具有比在不存在血小板溶解产物的情况下通过MSC生长产生的条件培养基更高的粘度。因此，粘度可充当从培养物中收获细胞和/或条件培养基的适当时间的指标。如本文所证实的，在含有成纤维细胞生长因子(FGF)和表皮生长因子(EGF)的培养基中培养的MSC也产生粘性的条件培养基。

[0009] 如本文所描述的，本发明人还已开发了用于筛选来自不同供体的细胞或组织样品或来自单个供体的细胞或组织样品以选择适于大规模制造的细胞的方法。

[0010] 在本发明的一个方面，提供用于治疗受试者的炎性病况的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的富集高分子量糖缀合物的条件培养基。

[0011] 在一个实施方案中，炎性病况是骨关节炎。在一个实施方案中，所述方法进一步包括施用治疗有效量的培养扩增的MSC。在一个实施方案中，所述方法包括施用包含培养扩增的MSC和富集高分子量糖缀合物的条件培养基的组合物。在一个实施方案中，通过在包含血小板溶解产物的培养基中培养MSC来制备富集高分子量糖缀合物的条件培养基。

[0012] 在又一方面，本发明提供血小板溶解产物用于制备富集高分子量糖缀合物的条件培养基的用途。

[0013] 在一个实施方案中，血小板溶解产物是人血小板溶解产物。

[0014] 在又一方面，本发明提供用于制备富集高分子量糖缀合物的条件培养基的方法，所述方法包括在包含血小板溶解产物的培养基中培养间充质干细胞(MSC)。在又一方面，本发明提供用于制备富集高分子量糖缀合物的条件培养基的方法，所述方法包括在包含FGF和或EGF的培养基中培养间充质干细胞(MSC)。在一个实施方案中，将细胞培养到大于约80%汇合(confluence)。在一个实施方案中，将细胞培养达汇合后1到10天。在一个实施方案中，将细胞培养达汇合后1到6天。在一个实施方案中，将细胞培养达约汇合后1天、或达约汇合后2天、或达约汇合后3天、或达约汇合后4天、或达约汇合后5天、或达约汇合后6天、或达约汇合后7天、或达约汇合后8天。在一个实施方案中，条件培养基具有至少约1.5厘泡的粘度。在一个实施方案中，条件培养基具有至少约1.6厘泡的粘度。在一个实施方案中，条件培养基具有至少约1.7厘泡的粘度。在一个实施方案中，条件培养基具有至少约1.8厘泡的粘度。在一个实施方案中，条件培养基具有至少约1.9厘泡的粘度。在一个实施方案中，条件培养基具有至少约2厘泡的粘度。在一个实施方案中，条件培养基具有至少约2.1厘泡的粘度。在一个实施方案中，条件培养基具有至少约2.2厘泡的粘度。在一个实施方案中，条件培

养基具有至少约2.3厘泡的粘度。在一个实施方案中,条件培养基具有大于1.5厘泡的粘度。在一个实施方案中,条件培养基具有大于1.7厘泡的粘度。在一个实施方案中,条件培养基具有大于2厘泡的粘度。在一个实施方案中,条件培养基具有大于2.5厘泡的粘度。

[0015] 在一个实施方案中,MSC是脂肪组织来源的MSC。在一个实施方案中,血小板溶解产物是人血小板溶解产物。在一个实施方案中,培养基包含约5%到约10% v/v的血小板溶解产物。在一个实施方案中,富集培养基包含蛋白聚糖、糖胺聚糖和粘蛋白中的一种或更多种。在一个实施方案中,富集培养基包含硫酸角质素、硫酸软骨素或聚集蛋白聚糖(aggrecan)。在一个实施方案中,所述方法进一步包括从培养基中去除细胞的步骤。

[0016] 在一个实施方案中,包含来自培养细胞的分泌物的条件培养基包含与通过在不存在血小板溶解产物的情况下培养MSC所制备的MSC分泌的生长因子或细胞因子相比具有改进的稳定性的一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子。在一个实施方案中,包含来自培养细胞的分泌物的条件培养基包含与通过在不存在FGF和EGF的情况下培养MSC所制备的经MSC分泌的生长因子或细胞因子相比具有改进的稳定性的一种或更多种经MSC分泌的生长因子或细胞因子。在一个实施方案中,该一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子选自由以下组成的组:IFN- γ 、IL-8、IL-9、IL-12、IL-15、TNF- α 、IL-10、MCP-1、RANTES、GM-CSF、IP-10、PDGF-bb、VEGF、IL-6。在一个实施方案中,该一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子是VEGF。

[0017] 在一个实施方案中,改进的稳定性包括在室温一个月后保留至少60%活性。在一个实施方案中,改进的稳定性包括在室温一个月后保留至少70%活性。在一个实施方案中,改进的稳定性包括在室温一个月后保留至少80%活性。在一个实施方案中,改进的稳定性包括在室温一个月后保留至少90%活性。

[0018] 在一个实施方案中,改进的稳定性包括在室温三个月后保留至少60%活性。在一个实施方案中,改进的稳定性包括在室温三个月后保留至少70%活性。在一个实施方案中,改进的稳定性包括在室温三个月后保留至少80%活性。在一个实施方案中,改进的稳定性包括在室温三个月后保留至少90%活性。

[0019] 在一个实施方案中,改进的稳定性包括在室温六个月后保留至少60%活性。在一个实施方案中,改进的稳定性包括在室温六个月后保留至少70%活性。在一个实施方案中,改进的稳定性包括在室温六个月后保留至少80%活性。在一个实施方案中,改进的稳定性包括在室温六个月后保留至少90%活性。

[0020] 在又一方面,本发明提供包含富集高分子量糖缀合物的条件培养基的组合物。在一个实施方案中,包含富集高分子量糖缀合物的条件培养基的组合物包含这样的一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子,其与通过在不存在血小板溶解产物或不存在FGF和EGF的情况下培养MSC所制备的MSC分泌的生长因子或细胞因子相比具有改进的稳定性。在一个实施方案中,该一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子选自由以下组成的组:IFN- γ 、IL-8、IL-9、IL-12、IL-15、TNF- α 、IL-10、MCP-1、RANTES、GM-CSF、IP-10、PDGF-bb、VEGF、IL-6。在一个实施方案中,该一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子是VEGF。在一个实施方案中,所述组合物中的一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子与包含所述一种或更多种MSC分泌生长因子或细胞因子、缺乏所述富集高分子量糖缀合物的条件培养基的组合物相比具有改进的稳定性。

[0021] 在一个实施方案中,通过在包含血小板溶解产物的培养基中培养MSC来制备所述组合物。在一个实施方案中,通过在包含FGF和/或EGF的培养基中培养MSC来制备所述组合物。

[0022] 在又一方面,本发明提供用于制备包含稳定的一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子的组合物的方法,其中所述稳定性包括在室温一个月后保留至少60%的活性,所述方法包括将间充质干细胞(MSC)在包含血小板溶解产物的培养基中培养足以允许一种或更多种经MSC分泌的生长因子或细胞因子分泌到所述培养基中的时间。在一个实施方案中,血小板溶解产物的浓度为5% v/v到10% v/v。在一个实施方案中,血小板溶解产物的浓度为10% v/v。在又一方面,本发明提供用于制备包含稳定的一种或更多种经MSC分泌的生长因子或细胞因子的组合物的方法,其中所述稳定性包括在室温一个月后保留至少60%的活性,所述方法包括将间充质干细胞(MSC)在包含FGF和/或EGF的培养基中培养足以允许一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子分泌到所述培养基中的时间。在一个实施方案中,FGF和/或EGF的浓度为10ng/ml到30ng/ml。在一个实施方案中,FGF的浓度为20ng/ml。在一个实施方案中,EGF的浓度为20ng/ml。在一个实施方案中,一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子选自由以下组成的组:IFN- γ 、IL-8、IL-9、IL-12、IL-15、TNF- α 、IL-10、MCP-1、RANTES、GM-CSF、IP-10、PDGF-bb、VEGF、IL-6。在一个实施方案中,一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子是VEGF。在一个实施方案中,MSK是人脂肪来源的MSC。

[0023] 在一个实施方案中,所述方法包括将MSC在包含血小板溶解产物的培养基中培养到大于约80%汇合的细胞密度。在一个实施方案中,所述方法包括将MSC在包含血小板溶解产物的培养基中培养到大于约85%汇合的细胞密度。在一个实施方案中,所述方法包括将MSC在包含血小板溶解产物的培养基中培养到大于约90%汇合的细胞密度。在一个实施方案中,所述方法包括将MSC在包含血小板溶解产物的培养基中培养到大于约95%汇合的细胞密度。在一个实施方案中,所述方法包括将MSC在包含血小板溶解产物的培养基中培养到大于约100%汇合的细胞密度。在一个实施方案中,所述培养持续足以允许制备具有至少约1.5厘泡(cSt)的粘度的条件培养基的时间。在一个实施方案中,所述培养持续足以允许制备具有至少约1.6厘泡的粘度的条件培养基的时间。在一个实施方案中,所述培养持续足以允许制备具有至少约1.7厘泡的粘度的条件培养基的时间。

[0024] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括从所述培养物中收集条件培养基。在一个实施方案中,该方法进一步包括从所述培养物中收集条件培养基和培养扩增的MSC。

[0025] 在实施方案中,所述稳定性包括任选地在室温一个月后保留所述一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子的至少70%活性、在室温一个月后保留所述一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子的至少80%活性、在室温一个月后保留所述一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子的至少90%活性、在室温三个月后保留所述一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子的至少70%活性、在室温三个月后保留所述一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子的至少80%活性、在室温三个月后保留所述一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子的至少90%活性、在室温六个月后保留所述一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子的至少60%活性、在室温六个月后保留所述一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子的至少70%活性、在室温六个月后保留所述一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子的至少80%活性、或在室温六个月后保留所述一种或更多种MSC分泌的生长因子或细胞因子活性的至少90%。

[0026] 在又一方面,本发明提供包含培养扩增的MSC和富集高分子量糖缀合物的条件培养基的组合物。

[0027] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物是药物组合物。在一个实施方案中,该药物组合物是可注射组合物。在一个实施方案中,该药物组合物是用于局部敷用(例如敷用到受试者的皮肤、牙龈或粘膜)的组合物。在一个实施方案中,该药物组合物是乳膏、凝胶、液体或洗剂。在一个实施方案中,该药物组合物包含配制在用于局部敷用的凝胶或乳膏中的富集高分子量糖缀合物的条件培养基。在一个实施方案中,所述组合物不包含表面活性剂。

[0028] 在包含培养扩增的MSC和富集高分子量糖缀合物的条件培养基的组合物的一个实施方案中,细胞在装有所述组合物的容器中不粘附。

[0029] 在又一方面,本发明提供药物组合物,其包含(i)富集高分子量糖缀合物的条件培养基、或(ii)培养扩增的MSC和富集高分子量糖缀合物的条件培养基、以及药学上可接受的载体、赋形剂或佐剂。

[0030] 在又一方面,本发明提供筛选适用于大规模生产培养的MSC的MSC样品的方法,所述方法包括以下步骤:(i)在包含血小板溶解产物或FCS的培养基中将所述样品的细胞培养1次传代、2次传代或3次传代,和(ii)在包含同种异体血清的培养基中培养步骤(i)之后的所述细胞或其等分试样,其中细胞在包含同种异体血清的所述培养基中的继续增殖指示适用于生产大规模数目的培养MSC的样品。

[0031] 在一个实施方案中,用于大规模生产培养的MSC的适合性包括在衰老之前至少25次群体倍增的能力。在一个实施方案中,用于大规模生产培养的MSC的适合性包括在衰老之前至少30次群体倍增的能力。在一个实施方案中,用于大规模生产培养的MSC的适合性包括在衰老之前至少35次群体倍增的能力。在一个实施方案中,用于大规模生产培养的MSC的适合性包括在衰老之前至少40次群体倍增的能力。在一个实施方案中,用于大规模生产培养的MSC的适合性包括在衰老之前至少45次群体倍增的能力。

[0032] 在一个实施方案中,MSC样品是脂肪组织来源的MSC样品。在一个实施方案中,MSC样品选自人MSC、犬MSC、马MSC和猫MSC。

[0033] 在又一方面,本发明提供筛选不适用于大规模生产培养的MSC的MSC样品的方法,所述方法包括以下步骤:(i)在包含血小板溶解产物或FCS的培养基中将所述样品的细胞培养1次传代、2次传代或3次传代,和(ii)在包含同种异体血清的培养基中培养来自步骤(i)的所述细胞或其一部分,其中所述细胞未能在包含同种异体血清的所述培养基中增殖指示不适用于生产大规模数目的培养MSC的样品。

[0034] 在一个实施方案中,细胞未能达到汇合指示细胞未能增殖。

[0035] 在又一方面,本发明提供用于大规模生产培养的MSC的方法,所述方法包括以下步骤:(i)获得包含MSC的细胞样品或组织样品,(ii)在包含血小板溶解产物或FCS的培养基中将所述样品的至少一部分培养1次传代、2次传代或3次传代以提供培养的细胞群体,(iii)在包含同种异体血清的培养基中培养来自步骤(ii)的所述培养的细胞群体的一部分,其中细胞在包含同种异体血清的所述培养基中继续增殖时,(iv)在包含血小板溶解产物或FCS的培养基中将来自步骤(i)或步骤(ii)的所述培养的细胞群体的至少一部分培养另外的传代以提供培养的MSC的大规模制备。

[0036] 在一个实施方案中,细胞样品是包含脂肪组织的基质血管级分的细胞悬浮液。在

一个实施方案中,细胞样品包括分离的MSC。在一个实施方案中,细胞样品包括培养扩增的MSC。在一个实施方案中,步骤(i)到(iv)中的至少一个的细胞是已被冷冻的细胞。在一个实施方案中,步骤(iv)包括将所述细胞群体培养10次或更多次另外的群体倍增;或15次或更多次另外的群体倍增;或20次或更多次另外的群体倍增;或25次或更多次另外的群体倍增;或30次或更多次另外的群体倍增;或35次或更多次另外的群体倍增。在一个实施方案中,所述方法进一步包括在所述另外的传代之后收获培养扩增的MSC,以及任选地,将所述收获的细胞等分到构成治疗剂量的MSC的单个容器中。在一个实施方案中, MSC的治疗剂量包括约200万到约1000万个MSC。在一个实施方案中, MSC的治疗剂量包括约500万个MSC。

[0037] 在本发明的又一方面,提供用于制备培养扩增的脂肪组织来源的间充质干细胞的纯化的群体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0038] (i) 从受试者获得脂肪组织样品,

[0039] (ii) 在适合的条件下孵育所述脂肪组织以至少部分地消化所述脂肪组织,其中所述条件包括在包含浓度为50mg/L到500mg/L的钙的缓冲液中以及在浓度为0.2%wt/vol到0.02%wt/vol的胶原酶存在下孵育,

[0040] (iii) 离心所述孵育的脂肪组织以获得基质血管级分(SVF)细胞,

[0041] (iv) 以期望的接种密度将所述SVF细胞接种到组织培养物中,

[0042] (v) 将所述培养物在补充血清的培养基中在适当条件下孵育到至少85%的烧瓶汇合(flask confluence),

[0043] (vi) 从所述培养物中收获MSC,

[0044] (vii) 将所述收获的MSC或其后代传代至少10次群体倍增以获得培养扩增的MSC。

[0045] 在一个实施方案中,胶原酶浓度为0.05%wt/vol。在一个实施方案中,钙的浓度为300mg/L到400mg/L。在一个实施方案中,钙的浓度为330mg/L。在一个实施方案中,所述条件包括在轨道旋转器(orbital rotor)上混合。在一个实施方案中,接种密度为每cm²组织培养烧瓶约5,000到约15,000个细胞。在一个实施方案中,组织培养包括在微载体珠粒或盘上培养所述细胞。在一个实施方案中,补充血清的培养基包含FCS或血小板溶解产物。在一个实施方案中,FCS的浓度为约5%到10%。在一个实施方案中,血小板溶解产物的浓度为约5%到10%。在一个实施方案中,血小板溶解产物的浓度为10%v/v。在一个实施方案中,所述方法进一步包括在细胞已经历超过三次传代之前,在包含同种异体血清的培养基中培养所述细胞的等分试样,以鉴别适于继续用于生产大规模数目的培养MSC的细胞。在一个实施方案中,所述方法进一步包括在包含FCS或血小板溶解产物的培养基中对鉴别为适于继续用于生产大规模数目的培养MSC的细胞继续传代。在一个实施方案中,所述方法包括将收获的MSC或其后代传代至少25次群体倍增;或至少30次群体倍增;或至少35次群体倍增;或至少40次群体倍增;或至少45次群体倍增,以获得培养扩增的MSC。

[0046] 缩略语

[0047] DMEM 达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)。

[0048] SVC 基质血管细胞。

[0049] SVF 基质血管级分。

[0050] MSC 间充质干细胞。

[0051] FCS 胎牛血清(本文还可缩写为FBS,是胎牛血清)。

[0052]	ABC	碳酸氢铵缓冲液。
[0053]	wt/vol	重量/体积。
[0054]	(v/v) 或 v/v	体积/体积。
[0055]	VEGF	血管内皮生长因子。
[0056]	(cSt)	厘泡

附图说明

[0057] 图1. 在胎牛血清和血小板溶解产物中生长的MSC的培养基粘度的比较。在补充有10%FCS(正方形)或10%血小板溶解产物(圆圈)的DMEM中培养MSC，并且在汇合后0天、1天、3天和6天后确定各自培养基的粘度。如实施例中5所描述的确定运动粘度，并以厘泡(cSt)表述。

[0058] 图2. VEGF的稳定性。使用ELISA测量从在加5%血小板溶解产物的DMEM中培养10天的人脂肪来源的MSC的培养物收获的上清液中VEGF的量，其中于室温(大约23°C)在上清液组合物的6个月储存期间的不同时间进行测定。

[0059] 图3. 在22°C储存5个月后的粘性(浅色阴影)和非粘性(深色阴影)条件培养基中14种不同细胞因子的百分比变化的比较。数值被表述为相对于储存在-80°C的起始材料的百分比变化。

[0060] 图4. 来自小于或大于80%汇合的培养物的条件培养基的粘度的比较。

具体实施方式

[0061] 在整个说明书中，除非上下文另有规定，否则对“一个/一种(a)”或“一个/一种(one)”要素的提及不排除复数。类似地，除非上下文另有规定，否则对“一个实施方案”的提及并不排除所述实施方案的特征与所描述的一个或更多个其他实施方案组合应用。

[0062] 在本说明书的上下文中，术语“包括(comprising)”意味着包含但不一定仅仅包含。此外，词语“包括(comprising)”的变化形式(例如“包括(comprise)”和“包括(comprises)”)具有相应变化的含义。因此，术语“包括”和其变型以包含性而非排他性的含义使用，使得另外的整数或特征可任选地存在于被描述为包括整数A或包括整数A和B等的组合物、方法等中。

[0063] 在本说明书的上下文中，术语“约”和“大约”将被理解为指示技术人员会与给定值相关联的通常容差。

[0064] 在本说明书的上下文中，在对参数陈述范围的情况下，应当理解，所述参数包含所述范围内的所有值，包括所述范围的所述端点。例如，“5到10”的范围将被理解为包括值5、6、7、8、9和10以及所述范围内的任何子范围，例如包括6到10、7到10、6到9、7到9等的子范围。并且包括在所述范围内合理的整数之间的任何值和范围，例如5.5、6.5、7.5、5.5到8.5和6.5到9等。

[0065] 已包括在本说明书中的对文献、法条、材料、装置、物品等的任何讨论仅仅是为了提供本发明的背景的目的。不应认为是承认，这些事项中的任何或全部构成现有技术基础的一部分，或者是在本申请的优先权日之前与本发明相关的领域中的一般常识。

[0066] 在本说明书的上下文中，术语“多个(plurality)”和“多个(multiple)”意指大于1

的任何数目。

[0067] 应当注意,本文中对本发明方法和组合物在治疗或疗法中或在从供体获得组织或细胞中的用途的提及将被理解为适用于人和非人(例如兽医)的应用。因此,应当理解,除非另有说明,否则对供体、患者、受试者或个体的提及是指人或非人,例如具有任何社会、经济、农业或研究重要性的物种的个体,包括但不限于绵羊、牛、马、猪、猫、犬、灵长类、啮齿类的分类成员,尤其是那些分类的驯养或养殖成员,例如绵羊、牛、马、猪、猫和狗的。

[0068] 当在本文中描述本发明的各种实施方案或方面的实施例时,它们通常将在前面加有适当的术语,包括“诸如”或“例如”或“包括”。应当理解,所述实施例被描述为包含性的可能性,例如为了说明或理解的目的,并且除非上下文另有指示,否则不被提供为限制性的。

[0069] 本文所提到的药物组合物还可被称为药物,例如当意欲用于治疗用途时。因此,应当理解,当本发明被描述为包括所述组分的组合物用于制备用于预期治疗目的的药物组合物的用途时,除非上下文另有指示,否则该描述同样意味着用于制备用于该预期治疗目的的药物的用途。

[0070] 在本说明书的上下文中,且特别是在将培养扩增的MSC用于治疗用途的背景下,“剂量”是足够数目的培养扩增的MSC的等分试样,其可出于向个体提供治疗益处的目的而被施用给个体。取决于上下文,本文中对“剂量”的提及可包括或不包括另外的治疗组分,例如富集高分子量糖缀合物的条件培养基。“剂量”中细胞的实际数目通常在约200万到约2000万个细胞的范围、优选例如约400万到约1000万个细胞、或优选约500万个细胞。应当理解,“剂量”可以一次或更多次注射施用。“剂量”也可被看作是培养扩增的MSC的适合储存单位。

[0071] 在本说明书的上下文中,术语“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”、“疗法(therapy)”等是指病况或疾病(例如炎性病症)的症状和/或根本原因的减轻。在某些实施方案中,治疗将至少暂时减缓、延迟或停止病症、或病症或损伤的症状的进展,或逆转病症或损伤的进展。因此,在本发明的上下文中,当关于治疗应用使用时,“治疗(treatment)”或其派生词(例如“治疗(treating)”)包括疗法的所有方面,例如与所治疗的病况相关的疼痛的减轻、所治疗病况的严重程度的减轻、所治疗病况的一种或更多种症状的改善等。词语“治疗”或其派生词的使用将被理解为意指被“治疗”的受试者可经历任何一种或更多种上述益处。

[0072] 在疾病的“预防(prevention)”的背景下,术语“预防(preventing)”等是指阻碍疾病的症状或根本原因的进展。应当理解,可能发生的疾病的完全预防,使得疾病不在被治疗的动物或受试者中发生。同样,应当理解,该术语包括部分预防,例如疾病未能进展到在未予治疗的动物或受试者中观察到的典型状态。

[0073] 应当理解,当本文中的描述指示本发明的实施方案所提供的潜在优点或潜在改进时,并非所有实施方案都需要满足该优点或改善。

[0074] 在允许的范围内,本文中所引用的所有参考文献均以引用方式整体并入。

[0075] 在本文所述的实施方案中,本发明涉及用于大规模制备培养的扩增间充质干细胞(MSC)的改进的方法,所述细胞例如用于治疗方法中。所述方法允许从脂肪组织的单个供体制剂生产数百万治疗剂量的MSC。

[0076] 间充质干细胞(MSC)是出生后、多能、成体干细胞。间充质干细胞(MSC)存在于机体

的许多组织中并且在组织修复和再生中起重要作用。为了治疗目的,通常从骨髓、胎盘、脐带血和脂肪组织收获MSC。在许多情况下,将细胞在使用前通过组织培养扩增。本发明提供用于大规模生产培养扩增的细胞的改进的方法,其包括用于选择具有用于此类大规模生产的优选能力的供体细胞的方法。

[0077] 脂肪组织

[0078] 在本发明的上下文中,间充质干细胞(MSC)优选来源于脂肪组织。“来源”意指从中分离出用于本发明的方法或组合物中的MSC的组织类型。可特别是出于本发明的方法和组合物的目的,从组织分离MSC,或可在与本发明的方法或组合物无关的程序中,已从组织来源分离MSC。

[0079] 脂肪组织可以是人脂肪组织或哺乳动物脂肪组织,例如犬、马或猫。通常,脂肪组织的来源将与MSC的预期受体具有相同的物种。脂肪组织可包括“白色”脂肪组织或“棕色”脂肪组织。

[0080] 除了大量的MSC外,脂肪组织还包括免疫细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞和周细胞,它们与MSC一起统称为基质血管级分(SVF)。

[0081] 脂肪组织的收集和处理

[0082] 通过脂肪抽吸或通过切除从供体收集脂肪组织。在涉及大规模制造培养的MSC的本发明方法中,大量(大约200克到2000克)脂肪抽吸物被收集或可获得作为起始材料,因为这会影响可制造的细胞的数目。

[0083] 为了从狗产生细胞,通常通过从镰状部(falciform)、腹股沟脂肪垫或肩部切除来收集脂肪组织。为了从马产生细胞,通常通过从尾基部、胸部或腹部切除来收集脂肪组织。为了从人产生细胞,从腹部、大腿或臀部收集脂肪组织。

[0084] 脂肪组织最初可通过使用本领域容易获得的技术机械解离脂肪组织来处理。可使用用于机械解离脂肪组织的任何适合方法,例如通过用刀片或剪刀切碎脂肪组织,或通过迫使脂肪组织通过孔径足以将组织破碎成脂肪组织的分离的细胞或小块的筛网或网,或这些技术的组合。在使用机械解离的优选方法中,在消化之前用剪刀将脂肪组织精细切碎。

[0085] 已惊讶地发现,如以下段落中所描述的,通过使用最佳的脂肪组织消化,可将从脂肪组织提取的细胞的数目最大化,同时保持细胞活力,从而使SVF细胞产量和存活力最大化。在最大化SVF细胞产量和存活力对操作者重要的情况下,此类方法将是优选的。

[0086] 通过在适当的缓冲液存在下与胶原酶孵育来消化脂肪组织。在消化中,将胶原酶添加到约0.2%重量/体积(wt/vol)到约0.02%wt/vol(例如约0.2%wt/vol、或约0.15%wt/vol、或约0.1%wt/vol、或约0.9%wt/vol、或约0.08%wt/vol、或约0.07%wt/vol、或约0.06%wt/vol、或约0.05%wt/vol、或约0.04%wt/vol、或约0.03%wt/vol或约0.02%wt/vol)的最终浓度。在一个优选的实施方案中,将消化步骤中的胶原酶添加到约0.05%wt/vol的最终浓度。

[0087] 本发明人已鉴别出通过在消化期间使用含钙缓冲液也有助于改进细胞产量和存活力。消化步骤期间钙的浓度在约50mg/L到约500mg/L范围,例如约50mg/L、100mg/L、125mg/L、150mg/L、175mg/L、200mg/L、225mg/L、250mg/L、300mg/L、325mg/L、330mg/L、350mg/L、375mg/L、400mg/L、425mg/L、450mg/L、475mg/L或500mg/L。在一个优选的实施方案中,消化中的钙浓度为约330mg/L。在一个优选的实施方案中,缓冲液是含钙的林格氏缓冲

液(Ringers buffer)或含钙的磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0088] 将脂肪组织在胶原酶存在下在适当的温度(例如约37℃)下孵育适当的时间,例如约30到约120分钟。在一个优选的实施方案中,孵育约90分钟。本发明人已鉴别出,通过消化步骤期间的小心混合以释放细胞也有助于改进细胞产量和存活力,因为过多的混合或过于剧烈的混合将影响细胞存活力。混合可用手进行,例如通过在孵育期间每隔一段时间轻轻倒置材料,例如约每15分钟进行。混合可通过机械手段进行,例如在轨道旋转器上,例如在约50rpm到约200rpm范围,进行混合。在一个优选的实施方案中,用手或在轨道旋转器上以约100rpm进行混合。

[0089] 脂肪组织来源的细胞悬浮液的制备可包括离心步骤。悬浮在液体(例如培养基)中的脂肪组织的分离细胞或小聚集体或小块的离心是以大约500g持续10分钟,或持续足够的时间并且以足够的g-力以产生细胞沉淀,所述细胞沉淀包含脂肪来源的非脂肪细胞的细胞,其上面是一层培养基,在所述培养基上面漂浮的进而是包含有活力的脂肪细胞的层,并且在顶部漂浮的是来源于破裂的脂肪细胞的脂质层。在离心后,将优选丢弃脂质层、脂肪细胞和培养基层,并保留称为SVF且包含MSC的沉淀材料。沉淀的细胞还可被称为脂肪来源的非脂肪细胞的细胞或SVF细胞。

[0090] 组织培养

[0091] 将SVF细胞置于组织培养物中。SVF含有混合的细胞类型的群体,包括MSC。红细胞(RBC)通常也存在于SVF中,也可以作为细胞簇。RBC通常以低数目的污染物形式存在,大多数RBC已通过在用胶原酶消化之前洗涤脂肪组织块而被去除。其他研究人员通常在进行组织培养之前例如通过以下方式从其他细胞类型纯化MSC:荧光激活细胞分选(FACS)或免疫-磁性细胞分离(IMS)、或通过密度梯度离心进行部分纯化、或溶解或去除红细胞、或去除细胞簇。在本发明的方法中,不需要在组织培养之前从SVF进一步纯化MSC。本发明人已惊讶地发现,不需要预先纯化MSC,并且事实上,当MSC未在培养之前进一步从SVF纯化时,获得了培养时改进的MSC产量和存活力。不希望受理论束缚,关于如在一些已知方法中进行的通过溶解去除红细胞的步骤,本发明人怀疑溶解红细胞负面影响MSC产量和存活力。

[0092] 以每cm²组织培养烧瓶约5,000到约15,000个细胞的水平接种SVF细胞。MSC是存在于SVF中的生长最快的细胞,并且生长速度超过其他细胞类型,从而产生纯的MSC群体。令人惊讶的是,尽管存在竞争性污染物或非MSC细胞,但这种扩增方法比组织培养之前纯化MSC的起始群体得到更高的细胞产量。

[0093] 用于培养MSC的方法是本领域已知的,并且包括例如培养细胞以形成贴壁细胞培养物,例如汇合贴壁细胞培养物。在细胞培养期间或之后的任何适当时间,例如从可以是汇合贴壁细胞培养物的贴壁细胞培养物中收获上清液,并且任选地从所述上清液中去除细胞以形成包含脂肪组织来源的分泌物的组合物。任何适当的培养基均可用于培养所述细胞。适当的培养基包括例如DMEM、RPMI和最低必需培养基。在一个实施方案中,在DMEM中培养细胞。

[0094] 优选在无菌血清存在下进行细胞培养。培养物中血清的浓度可以是有助于培养脂肪组织来源细胞的任何适合浓度,例如在约1%体积/体积(v/v)到约30%v/v的范围,例如约10%v/v、或约15%v/v或约20%v/v。血清可以是用于培养脂肪组织来源细胞的任何适当的血清,例如商业胎牛血清,或例如通过本领域已知的方法在室内制备的血清。在本发明的

实施方案中,血清是自体的,已从获得脂肪组织的同一个体制备,或是同种异体的。通常,在37°C和5%CO₂培养细胞。

[0095] 在本发明的实施方案中,血清来自不同物种。例如,细胞可以是犬、马或人,并且可分别在含有除犬、马或人以外的血清的培养基中培养。在本发明的实施方案中,在补充有胎牛血清的培养基中培养细胞。在本发明的实施方案中,培养基包含10%FCS。细胞可在较后期传代(例如最终传代)时从FCS转换为同种异体血清,以最终产物中去除FCS。

[0096] 在用于大规模制备培养的MSC的方法中,通常使细胞在CO₂孵育箱中在37°C在培养基和血清中经4-21天生长到至少85%的烧瓶汇合(汇合确定方法是通过显微镜)。

[0097] 本发明还提供在微载体上,例如在搅拌生物反应器中培养的MSC。MSC可在微载体珠粒(90-400μm)上培养,所述微载体珠粒可以是未涂覆的,或者涂覆有特定的蛋白质,例如胶原,并且可被处理以在表面上具有特定的电荷分布。微载体可用于多种容器例如旋转烧瓶、微生物反应器、搅拌槽、摇动平台或微重力中的细胞生长。还可在 Fibra-Cel® 盘 (New Brunswick Scientific, EdisoN, NJ) 上培养细胞,所述盘可作为悬浮搅拌系统或作为静态填充床维持在生物反应器中。

[0098] 培养中的细胞,例如MSC,将组分分泌到培养基中,使得从培养物中获得的液相将含有从细胞中分泌的组分。这些分泌组分在本文中可统称为分泌蛋白质组 (secretome)。在细胞培养期间产生的液相在本文中可被称为分泌物,或者当培养中的细胞是来源于脂肪组织的非脂肪细胞的细胞时,被称为来自脂肪组织来源的非脂肪细胞的细胞的分泌物。或者,在培养期间产生且任选从培养获得的液相在本文中还可被称为条件培养基。

[0099] 在血小板溶解产物中培养的MSC和富集高分子量糖缀合物的培养基的生产

[0100] 在本发明的实施方案中,在血小板溶解产物中培养细胞。在本文所述的方法中,血小板溶解产物优选作为人细胞组织培养的血清来源。血小板溶解产物以约1%体积/体积(v/v)到约20%v/v(例如约1%、或约2%、或约3%、或约4%、或约5%、或约6%、或约7%、或约8%、或约9%、或约10%、或约11%、或约12%、或约13%、或约14%、或约15%、或约16%、或约17%、或约18%、或约19%、或约20%)的浓度使用,优选以约2%到约7.5%(例如约5%v/v)范围的浓度使用,或更优选以约7.5%到15%(例如约10%)范围的浓度使用。

[0101] 血小板溶解产物提供细胞的高细胞产量,并且通过细胞在补充血小板溶解产物的培养基中的生长,本发明人令人惊讶地使得能够生产含有高水平细胞外基质(ECM)组分的条件培养基。如本文所证实的,在血小板溶解产物中生长的细胞分泌高浓度的细胞外基质(ECM)组分,所述组分可包括蛋白聚糖、糖胺聚糖和粘蛋白。

[0102] 如本文实施例中所述,本发明人还示出,可通过使细胞在含有表皮生长因子(EGF)和/或碱性成纤维细胞生长因子(FGF)的培养基中生长来获得类似的非常粘性的条件培养基。培养基中EGF的浓度可在约10ng/ml到约30ng/ml范围,例如约20ng/ml。培养基中FGF的浓度可在约10ng/ml到约30ng/ml范围,例如约20ng/ml。

[0103] 经富集的条件培养基在本文中通常将被称为富集高分子量糖缀合物的培养基或包含ECM组分的条件培养基。运动粘度的初步结果支持粘度组分是GAG、蛋白聚糖、聚集蛋白聚糖、多能蛋白聚糖 (versican)、光蛋白聚糖 (lumican)、粘蛋白或其他高分子量分子或分子复合物的推断。

[0104] 因此,本发明还提供用于生产富集高分子量糖缀合物的培养基的方法。该培养基

为治疗包括骨关节炎在内的炎症病况提供了另外的治疗优点。相关应注意的是,尽管通过在补充血小板溶解产物的培养基中培养MSC来生产富集高分子量糖缀合物的培养基最初是由本发明人使用通过本文所描述的本发明的方法从脂肪组织获得的MSC开发的,但在实现该本发明后,本发明人认为用于制备富集培养基的MSC并不仅限于通过本文所描述的收集和消化方法从脂肪组织获得的那些。

[0105] 例如,本文描述了在制备用于大规模MSC生产的组织培养的脂肪组织来源的SVF时,优选不在最初的组织培养步骤之前进一步分级分离或纯化SVF以分离MSC。在通过在补充血小板溶解产物的培养基中培养MSC来制备富集高分子量糖缀合物的培养基的方法中, MSC可根据该方法制备,或者它们可根据提供可用于组织培养中的MSC的任何其他适合方法制备或获得。

[0106] 例如,尽管优选的大规模方法不在初始培养之前从SVF纯化MSC,但可在初始分离SVF之后并且在置于包含血小板溶解产物的培养基中之前,通过任何适合的手段进一步纯化用于通过在补充血小板溶解产物的培养基中培养MSC制备富集高分子量糖缀合物的培养基的方法中的MSC。

[0107] 作为又一示例,用于制备富集高分子量糖缀合物的培养基的方法中的MSC可以是经纯化并储存的MSC,例如先前已通过细胞培养物纯化和/或培养扩增的细胞,或者可以是从冷冻储存中回收的细胞。

[0108] 还应注意,用于制备富集高分子量糖缀合物的培养基的方法中的MSC不限于脂肪组织来源的MSC。因此,用于制备富集高分子量糖缀合物的培养基的方法中的MSC可来源于任何适当的MSC源,例如来自骨髓、牙髓、脂肪组织、脐带(chord)组织、脐带血和循环血。

[0109] 此外,因此,本发明还提供MSC和包含细胞外基质(ECM)组分的条件培养基的组合,此类培养基在本文中还可被称为富集高分子量糖缀合物的培养基。本发明人设想,与使用单独的MSC或单独的来自MSC培养物的条件培养基相比,细胞和包含ECM的条件培养基的这种组合的药物组合物可提供另外的治疗优点。因此,本发明的方法允许包含MSC和包含ECM组分的条件培养基的组合物,其中包含ECM组分的条件培养基可以是所述组合物的细胞在其中扩增的培养基,或者可以是来自不包含在所述组合物中的MSC的扩增的培养基。使用包含MSC和包含ECM组分的、那些MSC在其中扩增的条件培养基的组合物可提供另外的优点。MSC或富集高分子量糖缀合物的培养基或其组合可呈药物组合物的形式。在这种形式中,组合物通常可包含药学上可接受的载体、赋形剂或佐剂,或者至少通常将不包含与预期受试者中的治疗用途不相容的组分。药物组合物可呈用于通过注射使用的形式或呈用于通过局部施加使用的形式。当组合物包含MSC时,该组合物通常将呈适于注射的形式。当组合物用于局部施加时,组合物通常将包含凝胶、乳膏、液体或洗剂。

[0110] 血小板溶解产物可从任何适合的来源获得。适合的商业来源是来自Mill Creek Life Sciences (Rochester, Minnesota, USA) 的PLT Max。血小板溶解产物可来源于与被培养的MSC相同或不同的物种。在优选的实施方案中,血小板溶解产物来源于与被培养的MSC相同的物种。在该背景下,“来源于……”的血小板溶解产物描述已从血样制备的血小板溶解产物,例如通过从血样分离血小板,之后溶解分离的血小板。血小板溶解产物所来源的血样可来自或不来自与MSC相同的个体,或者当由脂肪组织制备MSC时,用于制备MSC的脂肪组织。通常,血样来自与从中获得MSC或脂肪组织的个体不同的个体。

[0111] 可使用本领域技术人员已知的方法或试剂盒从新鲜全血或从储存的全血制备血小板溶解产物。血小板溶解产物可来自单个供体,或者可来自汇集的血液或细胞。血小板溶解产物可由过期的可输注全血或血小板制备,例如收集后约5到7天。血小板溶解产物可使用市售试剂盒(例如来自MacoPharma(France)的血小板溶解产物试剂盒)从血液制备。在一个实施方案中,从在抗凝剂(例如柠檬酸盐)存在下收集的血液制备血小板溶解产物。将血液在适当条件下离心,例如以200g离心约20分钟,之后收集血小板(顶层),然后对血小板进行冷冻-解冻以溶解细胞。通常,进行多轮冷冻-解冻,例如两轮、三轮、四轮或更多轮。将溶解的血小板离心以允许将沉淀的细胞片段丢弃,例如以4000g离心约10分钟。血小板溶解产物可例如通过借助适合的基质(例如0.22微米过滤器)过滤来灭菌,并且储存在适当的条件下(例如-80°C)直到使用。

[0112] 在本发明的方法中,当在血小板溶解产物中培养细胞时,通常还将肝素添加到细胞培养基中以防止凝固。肝素可以约0.6IU/mL到约5IU/mL的范围被包含在细胞培养基中。例如,肝素可以约0.6IU/mL、约0.8IU/mL、约1IU/mL、约1.5IU/mL、约2IU/mL、约2.5IU/mL、约3IU/mL、约2.5IU/mL、约4IU/mL、约4.5IU/mL或约5IU/mL的浓度被包含。在优选实施方案中,肝素以约2IU/mL被包含。

[0113] 如本文实施例中所描述的,证实了所述富集的条件培养基具有比通过在补充有FCS的培养基(不存在血小板溶解产物、FGF和EGF,如本文所例示)中培养MSC产生的条件培养基更高的粘度。示出了粘度随MSC的细胞密度的增加而增加。在本发明的实施方案中,富集的条件培养基具有至少约1.5厘泡、或至少约1.6厘泡、或至少约1.7厘泡的粘度。

[0114] 本领域技术人员应当认识到,粘度可通过替代手段来测量,例如通过测量动态粘度,而不是如本文实施例中所做的那样通过测量运动粘度来测量。因此,应当理解,在本发明的实施方案中,当粘度是本发明的描述性特征时,如果以厘泡为单位测量或描述时的粘度为至少约1.5厘泡、或至少约1.6厘泡、或至少约1.7厘泡、或如本文所定义的其他值,则包含本文中本发明的所述特征、但据称具有以替代单位(例如以厘泊(cP))(通过动态粘度测量粘度时可能发生)描述的粘度的组合物将仍然在本发明的范围内。

[0115] 如本文实施例中所证实的,本发明的富集的条件培养基提供分泌的细胞组分的改进的稳定性,所述分泌的细胞组分例示为血管内皮生长因子(VEGF)和多种其他细胞因子和生长因子。在实施例中,通过确定VEGF以及其他细胞因子和生长因子于室温延长时期的储存期间的稳定性来描述改进的稳定性。与来自教导分泌物如VEGF在室温的半衰期为数小时的文献的预期相反,将富集的条件培养基在室温(其为大约23°C)储存6个月的时期并不导致VEGF的明显损失,如使用ELISA所测量的。结果还显示,当在室温储存5个月的时期时,多种不同的细胞因子和生长因子在粘性材料中比在非粘性材料中更稳定。

[0116] 供体的筛选

[0117] 本发明人已鉴别出,可通过扩增来自单个供体的细胞获得的培养扩增的MSC的剂量数目在来自不同供体的细胞之间变化很大。来自一些供体的细胞在有限次数的细胞倍增后停止生长,而来自其他供体的细胞继续生长到更大次数的细胞倍增。本发明人还鉴别出,可通过扩增从给定个体供体动物的不同位置获得的细胞而获得的剂量的数目可能存在变化。这些差异的原因尚不理解,并且目前还没有令人满意的方法可用于在相对较早的阶段分析细胞,以预测可从特定细胞的扩增产生多少剂量,所述特定细胞是从特定个体供体或

供体上的特定位置获得的细胞。这意味着来自不同供体或位置的细胞不得不被生长并扩增,然后如果它们达不到期望数目的细胞倍增,则被扔掉。因此,缺乏适合的预测方法可能导致大规模制备MSC(例如出于治疗目的)所需的费用增加和时间增加。

[0118] 本发明人已开发并在本文中描述了用于筛选来自不同供体或位置的细胞以快速鉴别哪个供体的细胞将适于制造大量细胞的方法。

[0119] 本发明人已开发并且在本文中描述了用于筛选来自不同供体或位置的细胞以快速鉴别哪个供体的细胞将适于制造大量细胞的方法,所述方法涉及将正在培养所述细胞的组织培养基从补充血小板溶解产物或FBS的培养基改变为补充同种抗体血清的培养基。作为简写术语,这种筛选方法在本文中可被称为“血清转换”方法。来自不适用于产生大量细胞的供体的细胞不会很好地应对血清中的这种变化。它们停止复制并且无法达到汇合。

[0120] 在基于改变组织培养基筛选的方法中,通常将细胞在血小板溶解产物或FBS中培养1次、2次或3次传代,优选2次传代,然后将血小板溶解产物或FBS改变为同种抗体血清。用于本发明这方面的同种抗体血清的浓度通常为约10% v/v到约20% v/v。适用于大规模制造的细胞将在同种抗体血清中继续生长并达到汇合。大部分供体细胞样品不会在同种抗体血清中继续生长,结果它们不能达到汇合。

[0121] 在这种筛选方法的一个实施方案中,来自供体样品的一部分细胞在早期传代时,例如在两次传代之后,被取出作为“测试”样品,该测试样品还可被称为牺牲测试样品,因为它和它的后代可在测试之后被丢弃。使细胞的测试样品经受所描述的“血清转换”。如果细胞适应补充同种抗体血清培养基的变化,即它们继续生长并达到汇合,则使用者返回到从中取出“测试”细胞的样品,并继续在优选的生长培养基(通常是含有FBS或血小板溶解产物的培养基)中大规模培养这些细胞或其一部分。如本文其他地方所描述的,用于培养人MSC的优选培养基是补充血小板溶解产物的培养基。

[0122] 因此,本文所描述的筛选供体细胞或供体样品的方法允许使用者区分适用于或有助于大规模生产MSC的供体细胞或样品和不太适合的供体细胞或样品。以这种方式,不适用于或不太适用于预期用途的细胞或样品可在付出大量努力来使用这些细胞之前被丢弃。这种选择适合材料的方法允许使用者将努力集中于确实具有以下能力的细胞和样品上:被培养足够的群体倍增以产生MSC的期望的大规模生产。为了产生所设想的MSC的非常大规模的生产,细胞通常将需要能够进行在衰老之前大于约10次的群体倍增,更优选在衰老之前大于约15次的群体倍增,或在衰老之前大于约20次的群体倍增,或在衰老之前大于约25次的群体倍增,或在衰老之前大于约30次的群体倍增,或在衰老之前大于约35次的群体倍增。当来源于供体样品的细胞系在小于约10次群体倍增后变得衰老时,尤其是如果在小于约8次或7次群体倍增后衰老,则其通常不适用于大规模生产MSC。如本文所描述的“血清转换”方法允许操作者在相对较早的阶段(即不需要超过约一次、二次、三次或四次传代)将细胞样品鉴别为适用于或不适用于非常大规模生产MSC。这种区分适合的细胞样品和不适合的细胞样品的能力对于超大规模生产MSC的效率是有利的。

[0123] 在血小板溶解产物中生长的MSC分泌高浓度的ECM组分

[0124] 在开发本发明的方法时,本发明人鉴别出,令人惊讶地,当MSC在血小板溶解产物中生长时,组织培养基随着细胞增殖而变粘。对粘性培养基的分析证实,高分子量糖缀合物大量存在于该培养基中(参见本文的实施例4和5)。糖缀合物可包括蛋白聚糖、糖胺聚糖和/

或粘蛋白。糖缀合物的增加与培养基粘度的增加同时发生。对培养基的进一步分析鉴别出培养基的粘度由GAG、蛋白聚糖、粘蛋白或其他高分子量分子或分子复合物促成，并且存在的主要蛋白聚糖可以是聚集蛋白聚糖、多能蛋白聚糖、光蛋白聚糖或双糖链蛋白聚糖(biglycan)。

[0125] 本发明人还鉴别出，当MSC在包含EGF和/或FGF的培养基中生长时，一旦细胞变得汇合，也获得粘性条件培养基。

[0126] 因此，本发明还提供用于制备富集高分子量糖缀合物的条件培养基的方法，所述方法包括在包含血小板溶解产物的生长培养基中培养扩增的MSC。本文描述用于在包含血小板溶解产物的培养基中生长或扩增MSC的方法。在一个实施方案中，培养基是DMEM。在一个实施方案中，血小板溶解产物是人血小板溶解产物。在一个实施方案中，MSC是来源于骨髓的MSC、或来源于牙髓的MSC、或来源于骨髓的MSC、或来源于脐带组织的MSC、或来源于脐带血的MSC、或来源于循环血的MSC、或来源于脂肪组织的MSC。在一个实施方案中，MSC是脂肪组织来源的MSC。在一个实施方案中，MSC是人脂肪组织来源的MSC。

[0127] 如本文实施例中所示，培养基的粘度随着MSC增殖而增加。本发明人已观察到，当细胞在给定的传代内增殖时，即当MSC在培养烧瓶内变得越来越密集时，发生这种情况。

[0128] 因此，操作者可例如通过控制培养物中的MSC被允许增殖的程度来对条件培养基富集高分子量糖缀合物的程度施加一定程度的控制。例如，当期望较不富集的培养基时，当培养物中的细胞已增殖到约70%汇合或更少时，细胞的生长(增殖)将被停止，或由操作者收获培养基。作为又一示例，当期望更富集或更粘性的培养基时，细胞的生长(增殖)将被允许继续，直到大于约80%汇合、或大于约85%汇合、或大于约90%汇合、或大于约95%汇合、或约100%汇合或更高，使得培养基更浓集ECM组分。

[0129] 因此，本发明提供用于制备富集高分子量糖缀合物的条件培养基和培养扩增的MSC的方法，所述方法包括在包含血小板溶解产物的生长培养基中培养扩增的MSC。因此，本发明提供包含富集高分子量糖缀合物的条件培养基和培养扩增的MSC的组合或组合物。

[0130] 该组合(还可被称为组合物)可用于治疗疾病的治疗目的，所述疾病在本文中还可被称为病症或病况，例如炎性疾病、病症或病况。所述组合物可用于制造用于治疗此类病况的药物。

[0131] 将显而易见的是，在细胞生长过程中，此类组合将存在于容器(例如组织培养烧瓶)中。MSC和富集高分子量糖缀合物的条件培养基的组合还可通过在适于MSC生长的条件下孵育适当时间后，从容器中收获细胞和培养基来制备。

[0132] MSC和富集高分子量糖缀合物的条件培养基的组合还可通过在适合的容器中组合分离的MSC和基本上不含MSC的富集高分子量糖缀合物的条件培养基来制备。以这种方式，所述组合包含富集高分子量糖缀合物的条件培养基中的细胞，所述培养基不同于产生(培养扩增的)细胞的培养基。通过以这种方式制备MSC和富集高分子量糖缀合物的条件培养基的组合，即通过使用分离的MSC，操作者能够制备每体积培养基具有期望数目的细胞的组合。以这种方式，例如，可产生具有高于通常以在产生相同细胞的培养基中仅包含MSC的组合可实现的细胞密度或每体积培养基的细胞数的组合。类似地，可产生具有低于通常以在产生相同细胞的培养基中仅包含MSC的组合可实现的细胞密度或每体积培养基的细胞数的组合。控制每体积培养基的细胞数的能力在例如可通过向受试者施用具有所选的细胞对培

养基比的剂量来实现治疗优点的情况下可能是有利的。分离的MSC可被添加到富集高分子量糖缀合物的条件培养基和MSC的组合中,或者可被添加到基本上不含MSC的富集高分子量富集糖缀合物的条件培养基中。

[0133] 本发明人在本文中对于以下情况的鉴别还可被操作者用于评估从培养物(例如从生物反应器)中收获细胞或条件培养基的适当阶段或辅助评估适当阶段:在包含血小板溶解产物或EGF和/或FGF的培养基中培养MSC提供含有高分子量糖缀合物的粘性条件培养基(在本文中通常被称为富集高分子量糖缀合物的条件培养基),以及该材料具有如本文所述的有益特征。例如,如本文实施例中所证实的,粘度为约1.5cSt或更高的条件培养基富集高分子量糖缀合物并提供从MSC分泌的组分(例如VEGF)的改进的稳定性。实施例还证实,富集的材料有益于治疗疾病,例如炎性病况和神经性疼痛。同样如实施例中也证实的,在血小板溶解产物存在下以大于约80%的汇合生长的MSC培养物中通常实现约1.5cSt或更高的粘度。因此,本文的结果允许操作者使用培养基在培养物中(例如在生物反应器或其他培养器皿或容器中)的粘度,特别是在细胞密度不能容易地或可行地确定的培养条件下的粘度,作为收获细胞和/或条件培养基的适当阶段的指示,这取决于操作者期望或需要的培养基或细胞的属性。这可通过例如在给定时间确定培养物液相样品的粘度,并基于确定的粘度,取决于操作者的要求,收获细胞或培养基或继续培养来实现。

[0134] 在一个典型的实施方案中,包含富集高分子量糖缀合物的条件培养基的组合物和培养扩增的MSC彼此是天然的,这意味着所述组合物中的细胞是已在富集高分子量糖缀合物的条件培养基中生长的细胞,它们与所述条件培养基一起存在于所述组合物中。

[0135] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括从培养基中分离MSC。在本发明的方法中,细胞可通过本领域技术人员已知的方法从培养基中分离或收获。在实施方案中,因此,本发明提供基本上不含MSC的富集高分子量糖缀合物的条件培养基的制备。在该背景下,如果富集高分子量糖缀合物的条件培养基的制剂不包含MSC或仅包含在从细胞培养物收获或去除贴壁细胞的常规步骤之后可能残留的残余污染物MSC,则其将被认为“基本上不含”MSC。如果MSC的含量处于如果用于疗法中预期不具有治疗效果的水平,则可认为该培养基“基本上不含”MSC。

[0136] 收获的富集高分子量糖缀合物的条件培养基可经受一个或更多个进一步的处理步骤,例如以去除或减少污染物材料的存在。在该背景下,污染物材料可以是培养基的任何不期望的组分,例如细胞片段或碎片。当意图将富集高分子量糖缀合物的条件培养基用于治疗用途时,污染物还将包括与该培养基的药物用途不相容的任何组分,例如可能对受体动物有毒或可能降低培养基的治疗功效或可能降低培养基的储存能力的组分。在这种情况下进一步处理的示例可包括离心或过滤培养基。

[0137] 收获的富集高分子量糖缀合物的条件培养基,无论有没有MSC,均可储存在任何适当的条件下。储存通常在-20℃、-10℃或-80℃被冷冻。或者,可在4℃进行储存。

[0138] 储存可呈分开的等分试样或小瓶,其例如可适用于治疗受试者的治疗剂量。在另一示例中,培养基可以可注射的即用形式储存,使得操作者仅需要从储存中取回材料并在治疗用途之前将其解冻或升温到所需的温度。在替代形式中,存储可以是“散装(bulk)”储存,其例如在使用之前可能需要进一步稀释或等分,或者例如其可能更适于研究目的。

[0139] 本发明还提供在微载体上(例如在搅拌生物反应器中)培养的MSC。MSC可在微载体

珠粒(90-400μm)上培养,所述微载体珠粒可以是未涂覆的,或者涂覆有特定的蛋白质,例如胶原,并且可被处理以在表面上具有特定的电荷分布。微载体可用于多种容器例如旋转烧瓶、微生物反应器、搅拌槽、摇动平台或微重力中的细胞生长。还可在fibra-cel盘上培养细胞,所述盘可作为悬浮搅拌系统或作为静态填充床维持在生物反应器中。

[0140] 组合物和药物组合物

[0141] 本发明的方法包括组合物、特别是药物组合物的制备。在一个实施方案中,组合物可包含基本上不含MSC的富集高分子量糖缀合物的条件培养基。在一个实施方案中,组合物可包含通过本发明的方法制备的培养扩增的MSC。在一个实施方案中,组合物可包含富集高分子量糖缀合物的条件培养基和MSC。在一个实施方案中,组合物可以是任何上述组合,例如MSC和富集高分子量糖缀合物的条件培养基的组合。本发明的组合物可用于制备药物组合物。所述组合物可包含一种或更多种药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或佐剂。

[0142] 本发明的组合物,例如药物组合物,可作为冷冻溶液供应给使用者。例如,富集高分子量糖缀合物的条件培养基、培养扩增的MSC或其组合可储存在大约-20℃直到需要使用。或者,富集高分子量糖缀合物的条件培养基、培养扩增的MSC或其组合可储存在较低温度,例如在-70℃到-90℃的冷冻器中,或在液氮中储存,在气相或液相中,直到需要使用。通常将包含细胞的组合物储存在液氮中。在一个优选的实施方案中,将包含富集高分子量糖缀合物的条件培养基、或培养扩增的MSC、或富集高分子量糖缀合物的条件培养基和培养扩增的MSC的组合的组合物储存在液氮储存的液相中。在一个优选的实施方案中,将包含脂肪组织来源的培养扩增的MSC细胞的组合物与富集高分子量糖缀合物的条件培养基组合储存。或者,本发明的无细胞组合物,例如药物组合物,可作为冷冻干燥制剂供应给使用者。例如,富集高分子量糖缀合物的条件培养基可被冷冻干燥并储存在大约4℃、-20℃或室温直到需要使用。

[0143] 在例如由治疗医师、临床医生、兽医、技术人员、助理或农夫使用时,所述组合物通常在解冻后尽可能快地被施用给受试者或动物。或者,药物组合物可在解冻和施用之间优选在大约2℃到5℃短时间被储存在例如冰上或冰箱中或冷却包中。在该背景下,短时间通常不超过数小时,例如不超过约半小时,或不超过约一小时,或不超过约两小时。由于冷冻保护剂通常对细胞有毒,并且如果保持解冻,则可能导致存活力的丧失,因此所述组合物,尤其是当其包含活细胞时,通常在解冻后尽可能快地被注射到受体动物中。

[0144] 本发明的药物组合物可以“即用”形式供应。在此类实施方案中,使用者通常仅需要在施用组合物之前解冻到可接受的温度以进行施用。在此类实施方案中,所述组合物可以预先测量的剂量供应,例如适于给定受体受试者或动物的预先测量或预先确定的剂量,所述剂量例如是基于受体物种,或基于受体个体确定的,例如与大型品种的狗相比的小型品种的狗,或与成年动物相比的幼年动物。或者或另外,预先测量的剂量可基于正在治疗或意欲预防的疾病或病况。所述组合物的即用形式可包括用可注射装置(例如注射器)或在可注射装置中供应的组合物。该可注射装置可以能够将一单次施加递送给单个受体,或者可以能够将单次或多次施加递送给多个受体。该可注射装置可以是可调节的,例如以允许递送一定范围的不同剂量。

[0145] 在药物组合物包含富集高分子量糖缀合物的条件培养基和培养扩增的MSC的组合的实施方案中,所述组合物可作为组合或作为供使用者组合的分别的组合物提供给使用

者。应当理解，在本上下文中对“使用者”的提及意指将治疗组合物实际施用给受体受试者或动物的个体，并且还意指进行该施用的团队或组的成员。例如，使用者可以是协助应用本发明方法的任何个体，例如临床医师、医生、兽医、农夫、临床护士、兽医护士、技术助理或农场工人。

[0146] 如本文所述，富集高分子量糖缀合物的条件培养基表现出组分（例如VEGF和由培养的MSC分泌的其他分子）的有利稳定性，例如当培养基储存在室温时。因此，本发明还提供可任选地在不冷冻或不冷藏的情况下储存的组合物。通常，在不冷冻或不冷藏的情况下储存的组合物将包含富集高分子量糖缀合物的条件培养基，但将不包含MSC。

[0147] 因此，包含富集高分子量糖缀合物的条件培养基的药物组合物可作为适于储存在室温的即用组合物提供，所述室温通常在约20°C到25°C范围。在一个实施方案中，所述组合物可以是用于局部施加（例如施加到需要这种施加的受试者的皮肤）的组合物。用于局部施加的组合物可以呈任何适当的形式，包括例如呈液体、凝胶、乳膏或洗剂的形式。当以用于局部施加且可在室温储存的组合物形式提供时，本发明提供供受试者的易用性，例如与例如可注射组合物或被最佳地冷藏或冷冻储存的组合物相比易于自我施用。

[0148] 包含富集高分子量糖缀合物的条件培养基的药物组合物可用任何适当的载体材料配制，所述载体材料例如适于配制用于局部施加的一种或多种治疗活性成分。在本文的实施例中，使用不含表面活性剂的载体材料允许检测到比使用含有表面活性剂的载体材料更高水平的VEGF。不希望受理论束缚，本发明人认为这可能归因于VEGF被表面活性剂结合，由此降低组合物中可检测的VEGF。本发明人认为，在药物组合物中存在表面活性剂（例如通过包含在载体材料中或组合物的配制中），可类似地降低药物组合物中治疗上可用的VEGF，使得不含有表面活性剂的组合物与含有表面活性剂的组合物相比，可提供优越的治疗产品。虽然该解释是参照VEGF提供的，但预计该原理适用于富含高分子量糖缀合物的条件培养基中的其他生长因子和细胞因子。在一个实施方案中，载体材料不包含表面活性剂。在一个实施方案中，药物组合物不包含表面活性剂。在一个实施方案中，载体材料包含盐水和任选的丙二醇。在一个实施方案中，载体材料是Soluge1或与其类似的制剂。在一个实施方案中，载体材料或药物组合物包含一种或更多种稠化剂，例如化妆品或药物稠化剂，例如羟乙基纤维素。

[0149] 试剂盒

[0150] 本发明还提供试剂盒，其包含 (a) 选自以下组成的组的药物组合物：(i) 富集高分子量糖缀合物的条件培养基，(ii) 包含培养扩增的MSC的组合物，以及 (iii) (i) 和 (ii) 的组合；以及 (b) 关于所述试剂盒在治疗炎性病症或减轻与炎性病症相关的疼痛中的用途的说明书。

[0151] 在一个实施方案中，试剂盒包含一种或更多种冷冻组合物。在一个实施方案中，试剂盒包含关于在施用组合的组合物之前组合包含富集高分子量糖缀合物的条件培养基的组合物和包含培养扩增的MSC的组合物的说明书。在一个实施方案中，试剂盒进一步包括一个或更多个注射装置，例如一个或更多个注射器。在一个实施方案中，注射装置含有试剂盒的组合物。

[0152] 本发明的组合物可用于治疗或预防可通过MSC或通过富集蛋白聚糖的条件培养基治疗的医学病况。例如，如本文所证实的，向患有骨关节炎的患者施用包含富集高分子量糖

缀合物的条件培养基的组合物,所述患者报告可接受的结果。因此,本发明的组合物可用于治疗或预防需要所述治疗的受试者的炎性病症或骨关节炎。本发明的组合物可用于减轻需要所述减轻的受试者的炎性病症或骨关节炎的疼痛。同样如实施例中所证实的,当施用本发明的组合物用于治疗网球肘、腱损伤、冻疮、腱炎、高尔夫球员腕、滑囊炎、肌肉或腓肠撕裂时,本发明的组合物也对患者有益。受试者可以是任何动物。在一个实施方案中,受试者选自由猫、狗和马组成的组。在一个实施方案中,受试者是人。

[0153] 炎性病症

[0154] 所述药物组合物可被施用用于治疗受试者的炎性病症和/或用于减轻与炎性病症相关的疼痛。

[0155] 炎症可作为对由物理、化学或生物因素 (agent) 引起的损伤或异常刺激的反应而发生。炎症反应可包括局部反应和由此产生的形态变化、有害物质 (例如感染性生物体) 的破坏或去除、以及导致修复和愈合的应答。在参照病症使用时,术语“炎性”是指由不适当的或不能以正常方式消退的炎症引起、产生或导致炎症的病理过程。炎性疾病可以是全身性的或局限于特定组织或器官。

[0156] 已知炎症发生在许多病症中,所述病症包括但不限于:全身炎症反应 (SIRS) ;阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's Disease) (以及相关病况和症状,包括:慢性神经炎症、神经胶质活化;增加的小胶质细胞;神经炎斑块形成;肌萎缩侧索硬化 (ALS)、关节炎 (以及相关的病况和症状,包括但不限于:急性关节炎症、抗原诱导的关节炎、与慢性淋巴细胞性甲状腺炎相关的关节炎、胶原诱导的关节炎、幼年型关节炎、类风湿性关节炎、骨关节炎、预后和链球菌诱导的关节炎、脊柱关节病变和痛风性关节炎)、哮喘 (以及相关的病况和症状,包括:支气管哮喘;慢性阻塞性气道疾病、慢性阻塞性肺病、青少年哮喘和职业性哮喘) ;心血管疾病 (以及相关的病况和症状,包括动脉粥样硬化、自身免疫性心肌炎、慢性心脏缺氧、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、心肌病变和心脏细胞功能障碍,包括:主动脉平滑肌细胞活化、心脏细胞凋亡和心脏细胞功能的免疫调节) ;糖尿病 (和相关病况,包括自身免疫性糖尿病、胰岛素依赖性 (1型) 糖尿病、糖尿病牙周炎、糖尿病视网膜病变和糖尿病肾病变) ;胃肠炎症 (以及有关的病况和症状,包括乳糜泻、相关的骨质减少、慢性结肠炎、克罗恩氏病 (Crohn's disease)、炎性肠病和溃疡性结肠炎) ;胃溃疡;肝炎症,例如病毒和其他类型的肝炎,胆固醇结石和肝纤维化;HIV感染 (和相关病况,包括退行性反应、神经退行性反应和HIV相关的霍奇金氏病 (Hodgkin's Disease)) ;川崎综合征 (Kawasaki's Syndrome) (以及相关的病况和病症,包括粘膜皮肤淋巴结综合征、颈部淋巴结病变、冠状动脉损害、水肿、发热、增加的白细胞、轻度贫血、皮肤剥落、皮疹、结膜发红、血小板增多) ;肾病变 (以及相关的疾病和病况,包括糖尿病肾病变、末期肾病、急性和慢性肾小球肾炎、急性和慢性间质性肾炎、狼疮肾炎、古德帕斯彻氏综合征 (Goodpasture's syndrome)、血液透析存活和肾缺血再灌注损伤) ;神经退行性疾病或神经病理学病况 (以及相关的疾病和病况,包括急性神经退行、IL-1 在衰老和神经退行性疾病中的诱导、IL-1诱导的下丘脑神经元的可塑性和慢性应激高反应性、脊髓病变) ;眼病 (以及相关的疾病和病况,包括糖尿病视网膜病变、格雷夫斯眼病 (Graves' ophthalmopathy)、与角膜损伤或感染相关的炎症,包括角膜溃疡和葡萄膜炎) ;骨质疏松症 (以及相关的疾病和病况,包括牙槽骨、股骨、桡骨、椎骨或腕骨损失或骨折发生、绝经后骨损失、骨折发生或骨损失速率) ;中耳炎 (成人或儿科) ;胰腺炎或胰腺腺泡炎;牙周

病(以及相关的疾病和病况,包括成人、早发性和糖尿病性的);肺部疾病,包括慢性肺病、慢性鼻窦炎、透明膜病、缺氧和SIDS中的肺部疾病;冠状动脉或其他血管移植物的再狭窄;风湿病,包括类风湿性关节炎、风湿性阿孝夫小体(rheumatic Aschoff bodies)、风湿性疾病和风湿性心肌炎;甲状腺炎,包括慢性淋巴细胞性甲状腺炎;尿路感染,包括慢性前列腺炎、慢性骨盆疼痛综合征和尿石病;免疫病症,包括自身免疫性疾病,例如斑秃、自身免疫性心肌炎、格雷夫斯氏病(Graves' disease)、格雷夫斯眼病、苔藓硬化、多发性硬化、牛皮癣、系统性红斑狼疮、系统性硬化、甲状腺疾病(例如甲状腺肿和淋巴瘤性甲状腺肿(struma lymphomatosa)(桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、淋巴结样甲状腺肿));肺损伤(急性出血性肺损伤、吉德帕斯彻氏综合征、急性缺血再灌注)、由职业和环境污染物引起的心肌功能障碍(例如对毒性油综合征硅肺病的敏感性)、辐射创伤和伤口愈合反应的效率(例如烧伤或热创、慢性伤口、外科手术伤口和脊髓损伤)、败血病、急性期反应(例如发热反应)、普通炎症反应(general inflammatory response)、急性呼吸窘迫反应、急性全身炎症反应、伤口愈合、粘连、免疫炎症反应、神经内分泌反应、发热发展和抵抗、急性期反应、应激反应、疾病敏感性、重复运动应激、网球肘、以及疼痛管理和反应。

[0157] 在特定实施方案中,炎性病症选自关节相关炎性病症、角膜炎症、皮肤炎症或伤口愈合。

[0158] 在特定实施方案中,关节相关炎性病症是关节炎,例如骨关节炎。

[0159] 在特定实施方案中,本发明的组合物用于治疗网球肘或用于治疗腱损伤,或用于治疗冻疮,或用于治疗腱炎,例如足部的腱炎,或用于治疗高尔夫球员腕,或用于治疗滑囊炎,例如转子滑囊炎,或用于治疗跟腱炎,或用于治疗肌肉撕裂,例如腓肠撕裂。

[0160] 神经性疼痛

[0161] 所述药物组合物可被施用用于治疗受试者的神经性疼痛。本发明人已鉴别出,本发明的组合物可用于治疗患有没有可辨别的临床原因的疼痛的受试者,例如某些形式的神经性疼痛。神经性疼痛是指一组疼痛性病症,其特征在于由在外周水平、中枢水平或两者的神经系统的功能障碍或疾病引起的疼痛。它是一个复杂的实体,伴有许多随着时间的推移而在数量和强度上波动的症状和体征。神经性疼痛的三个常见组成部分是稳定的神经痛性疼痛;阵发性自发性发作;和超敏反应。

[0162] 神经性疼痛可以是非常致残、严重且难治的,给个体造成苦恼和困苦,包括感觉迟钝和感觉异常(panesthesia)。感官缺陷,例如部分或复杂的感官丧失,也是常见的。另外,慢性神经性疼痛会带来严重的心理和社会后果,从而导致生活质量下降。

[0163] 神经性疼痛在一般医学实践中相当常见。在一些形式中,神经性疼痛不与任何可辨别的临床病因病况相关。作为示例,本文证实本发明的组合物在减轻被认为是神经性疼痛的慢性网球肘方面有效。在一些形式中,神经性疼痛与可辨别的临床病况相关。三叉神经痛的患病率为人群中每100,000人有2.1到4.7人,11%到16%的1型糖尿病患者以及II型糖尿病患者发生疼痛性糖尿病神经病变,并且人群中每100,000人有大约34人被发现疱疹后神经痛。神经性疼痛的治疗不容易。神经性疼痛患者并不始终对标准镇痛剂例如非类固醇抗炎药(NSAID)有反应,并且在某种程度上神经性疼痛对阿片制剂有抗性。研究地最好且使用时间最长的用于治疗神经病理性疼痛的药剂是抗抑郁剂和抗惊厥剂,两者都可能具有严重的副作用。

[0164] 本发明的组合物可在任何适当的部位被施用给受试者用于治疗此类疼痛。施用通常可使用适当类型的注射,或者可通过局部施加。例如,注射可以是皮下、肌内或直接进入疼痛部位处或附近的可接近部位。由于这种类型的疼痛可表现在受试者身体的多个区域中,例如颌痛和肢痛或肩痛,因此施用可在疼痛的一个部位处或附近,而远离疼痛所累及的另一部位。通常,当患者体内发生疼痛的多个部位时,施用在被鉴别为疼痛的原始部位或原发部位的部位处或附近。作为这种治疗的示例,本文的实施例显示通过局部施加包含富集高分子量糖缀合物的条件培养基的乳膏或凝胶来治疗高尔夫球员腕和慢性网球肘。局部治疗可涉及将凝胶或乳膏摩擦到受影响的区域上,或者可能涉及将乳膏或凝胶施加到敷料或贴片上,然后将所述敷料或贴片施加到受影响的区域。可向正在治疗的受试者施用本发明组合物的单次施加,或者可优选施用多次施加。

[0165] 现在将参照以下实施例,仅通过说明的方式更详细地描述本发明。实施例意在用于说明本发明,并且不应被解释为限制本说明书通篇的说明的公开内容的普遍性。

[0166] 实施例

[0167] 实施例1. 从不同供体筛选犬细胞。

[0168] 脂肪组织的处理

[0169] 在常规绝育手术期间,从五只雌性狗收集镰状脂肪组织样品(10g)。将脂肪组织的五个样品分开处理。将脂肪组织用盐水冲洗,然后用剪刀精细切碎,并与20ml达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM, Sigma)混合。将胶原酶(Sigma)添加到0.05%wt/vol的最终浓度,并将样品在37°C孵育90分钟。在孵育期间,每15分钟用手轻轻倒置样品。

[0170] 在胶原酶处理后,将样品通过不锈钢网(700μm孔径)无菌过滤,转移到50ml离心管中并以500g离心15分钟。

[0171] 丢弃漂浮的细胞和上清液,将沉淀的细胞用巴斯德移液器(pasteur pipette)轻轻混合并转移到15ml离心管中。

[0172] 然后在DMEM中洗涤细胞以去除胶原酶。将DMEM添加到每个管中到14ml的最终体积,并以500g离心10分钟。丢弃上清液,将沉淀的细胞轻轻重悬于4ml DMEM中并用巴斯德移液器混合。

[0173] 胎牛血清中细胞的扩增

[0174] 将来自每个供体的细胞悬浮液的等分试样(0.5ml)转移到装有加10%胎牛血清的DMEM的组织培养烧瓶中,并在CO₂孵育箱中在37°C孵育,直到存在汇合的细胞单层(7到10天)。用3ml TrypLE Express (Invitrogen) 剥离细胞,轻移入50ml离心管中并以500×g离心10分钟。将细胞置于装有加10%胎牛血清的DMEM的新组织培养烧瓶中。

[0175] 将细胞转移到同种异体血清中

[0176] 将在胎牛中培养的细胞在汇合时剥离,并置于装有加10%同种异体犬血清的DMEM的新烧瓶中且孵育7到14天。使用显微镜检查烧瓶,并在0%到100%的范围对细胞的汇合评分。

[0177] 犬血清中的细胞增殖

[0178] 如以下段落中所描述的,来自六个供体中的两个的细胞在被转移到犬血清中时快速增殖。来自其他4个供体的细胞不在犬血清中生长。

[0179] 产品的制造

[0180] 将来自6个供体中的每一个的细胞在含有10%FBS的培养基中扩增直到第2次传代,此时所有6个细胞系中的细胞均已经历7.5-8.5次群体倍增。在第3次传代时,将细胞接种在含有10%同种异体犬血清的培养基中,并生长到汇合或最长达14天而没有任何培养基变化。观察到供体中的两个(1和2)的细胞生长到汇合,而剩余4个供体的细胞在14天内未达到汇合。在收获细胞后,观察到来自供体1和2的细胞已经历另外2次群体倍增。然而,来自其他供体的细胞已在含有10%同种异体犬血清的培养基中经历了小于1次的群体倍增。

[0181] 将来自所有6个供体的细胞在10%FBS培养基(不更换为犬血清)中从第2次传代扩增。使细胞生长到汇合并传代多次,同时观察仍具有典型的MSC形态并观察到增殖且达到汇合的培养物。观察到来自供体1和2的细胞以典型的方式增殖到第6次传代并且具有13-14次的累积群体倍增。因此,从这些供体(1和2),可通过经历超过13次倍增的第5次传代或第6次传代细胞制造细胞治疗产品。然而,来自其他供体的细胞在第5次传代停止增殖。来源于细胞停止增殖的那四个供体的细胞的形态在第5次传代也已明显恶化,所述四个供体是其细胞已在含有10%同种异体犬血清的培养基中表现相对较差的相同细胞群体(供体)。因此,从这些供体制造的任何细胞疗法产品将仅处于第4次传代,并且将具有9-10次的累积群体倍增。

[0182] 因此,在FBS中对细胞传代,然后通过将它们暴露于同种异体血清来测试它们,可被用作预测将细胞扩增到更高传代次数的能力的方法,这将降低每个小瓶的商品成本并且还减少研究和开发时间。作为简写术语,这种筛选方法和其变化形式在本文中可被称为“血清转换”方法。

[0183] 实施例2. 血小板溶解产物的产生

[0184] 根据本领域已知的方法,将血液收集到使用柠檬酸盐作为抗凝剂的血液收集袋中。将血液分配到离心管中并以200g离心20min。收集含有血小板的顶层,并从液氮至37°C水浴进行4个循环的冷冻解冻。然后通过添加凝血酶和氯化钙使溶解的血小板血清转化,然后以4000g离心10min并丢弃沉淀的细胞片段。

[0185] 然后将血小板溶解产物过滤灭菌(0.22微米)并储存在-80°C直到需要。

[0186] 实施例3. 人脂肪来源的干细胞的生产

[0187] 脂肪组织的处理

[0188] 利用脂肪抽吸从每个患者的腹部和/或大腿收集大约200克脂肪组织。在收集后立即通过用温热(37°C)无菌的林格氏溶液(Baxter)洗涤并随后通过将无菌胶原酶添加到0.05%wt/vol的最终浓度进行消化来处理脂肪抽吸物。将样品在37°C孵育20分钟,伴随在轨道混合器上以100rpm轻轻混合,通过800微米网过滤,转移到离心管中,并以500g离心15分钟。

[0189] 丢弃漂浮的细胞和上清液,将沉淀的细胞用巴斯德移液器轻轻混合并转移到15ml离心管中。

[0190] 然后在DMEM中洗涤细胞以去除胶原酶。将DMEM添加到14ml的最终体积,并且将样品以500g离心10分钟。丢弃上清液,将沉淀的SVF细胞轻轻重悬于4ml DMEM中并用巴斯德移液器混合。

[0191] 细胞的扩增

[0192] 将细胞悬浮液的等分试样(0.5ml)转移到装有加5%人血小板溶解产物的DMEM的

组织培养烧瓶中，并在CO₂孵育箱中在37°C孵育，直到存在汇合的细胞单层(7到10天)。用3ml TrypLE Express (Invitrogen) 剥离细胞，轻移入50ml离心管中并以500×g离心10分钟。将细胞进一步传代，直到它们倍长大约8次。然后将传代的细胞剥离并离心。

[0193] 细胞的低温贮藏

[0194] 将沉淀的细胞样品重悬于CryoStor CS10 (Biolife Solutions, USA) 中并以2ml等分试样转移到冷冻小瓶中，并且将所述冷冻小瓶在-80°C冷冻器中在控制速率的冷冻装置中以约1°C/分钟冷冻24小时，然后转移到液氮杜瓦瓶(dewar) 中用于长期储存。

[0195] 实施例4. 在血小板溶解产物中生长的MSC分泌高浓度的ECM组分

[0196] 条件培养基的产生

[0197] 收集来自实施例3中生长的细胞在3次传代后的培养基并分析粘度。也使细胞在10%胎牛血清中生长作为对照。培养基的粘度随着细胞变得更汇合而增加(图1)，在FCS中生长的培养物略有汇合，而在血小板溶解产物中生长的培养物基本上汇合。

[0198] 粘性条件培养基的分析

[0199] 条件培养基的样品被送到澳大利亚蛋白质组分析设施 (Australian Proteome Analysis Facility) (APAF) 进行分析。所述分析详述于实施例5中。

[0200] 实施例5. 研究细胞培养基粘度的逐渐增加: 来自在含有细胞外基质组分和或粘蛋白的血小板溶解产物中生长的间充质干细胞的组织培养上清液的证据。

[0201] 该研究基于脂肪来源干细胞在5%或10%血小板溶解产物培养基中生长随时间增加培养基粘度的观察。讨论了两种结果: 培养基粘度的定量和粘度增加原因的鉴别, 如以下段落中所述。

[0202] 粘度测量

[0203] 使用根据制造商的说明测量运动粘度的Cannon-Fenske常规毛细管粘度计 (Cannon Instrument公司, 序列号T209) 测量粘度。简单地说, 通过抽吸将粘度计用约5ml样品(培养基或重悬的沉淀物) 填充, 并使其在水浴中平衡到40°C达至少10min。一旦达到温度, 通过抽吸将样品上拉到第一标记点, 并测量弯月面在第一标记点和第二标记点之间移动所用时间(流出时间)。然后将流出时间乘以校准常数(0.009001cSt/s) 以获得以厘泡(cSt) 计的运动粘度。将粘度相对于6天的细胞生长绘图。粘度在每次确定时相对于胎牛血清培养基中的生长增加(图1)。

[0204] 如以下段落中所述研究培养基中的粘度组分。

[0205] 用丙酮和三氯乙酸沉淀

[0206] 在50ml falcon管中, 将5mL(1体积) 培养基与冷却到-30°C的20mL(4体积) 丙酮混合。通过涡旋搅动混合物, 然后使其在-30°C沉淀过夜。通过在4600g、4°C离心20分钟来收集沉淀物(PT1)。去除上清液(SN1) 并将管倒置以将沉淀物排液约2min, 注意避免沉淀完全干燥。将PT1重悬浮于100mM碳酸氢铵(pH 7.8) 中, 用于粘度测量和酶消化。

[0207] 丙酮沉淀(80%, -30°C) 使粘度组分从培养基中沉淀, 表明其具有高分子量, 估计其具有在约0.2-0.3mg/ml的浓度的透明质酸的相似粘度。

[0208] 通过高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测(HPAEC-PAD) 进行单糖分析

[0209] 制备25% (v/v) 三氟乙酸(TFA) 的母液。向50μL样品中添加150μL MilliQ水和300μL 25% (v/v) TFA。将样品在振荡下于100°C孵育4小时。在孵育后, 将样品通过真空离心干燥

并在200 μ L的100 μ M 2-脱氧-D-葡萄糖(内标)中重构。

[0210] 在Dionex HPLC仪器上、在CarboPac PA1碳水化合物柱上用脉冲安培检测分析样品。用16mM NaOH等度洗脱中性单糖。使用100mM NaOH中的乙酸钠梯度洗脱来洗脱酸性单糖。通过与中性单糖(岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖)、氨基单糖(N-乙酰半乳糖胺、N-乙酰葡萄糖胺)和酸性单糖(N-乙酰神经氨酸、葡糖醛酸)的已知标准物进行比较,通过洗脱时间确定峰的性质。

[0211] 丙酮沉淀的粘度组分的单糖分析表明存在单糖葡糖醛酸、N-乙酰葡萄糖胺和一些半乳糖,它们是与作为细胞外基质(ECM)的主要组分的蛋白聚糖连接的糖胺聚糖(GAG)的组分。从组成分析来看,这将表明材料中的透明质酸、硫酸角质素和/或硫酸软骨素GAG和/或粘蛋白和/或其他糖缀合物。

[0212] 在用角质素酶(Kase)、透明质酸酶(Hase)、软骨素酶ABS(Csase)、内切- β -半乳糖苷酶(EBG)各自单独在37°C酶处理3天后,分析丙酮沉淀物材料的粘度。将对照培养基在100mM碳酸氢铵中在37°C无酶孵育3天。运动粘度结果显示用角质素酶、透明质酸酶和软骨素酶使粘度降低,表明所述酶确实作用于其在沉淀物内各自的GAG。该结果支持粘度组分是GAG、蛋白聚糖、粘蛋白或其他高分子量分子或分子复合物的推断。

[0213] 如表1中所示,用各自的软骨素酶、角质素酶和透明质酸酶的酶对硫酸软骨素、聚集蛋白聚糖和透明质酸的标准溶液进行酶消化。

[0214] 表1:针对硫酸软骨素、硫酸角质素(聚集蛋白聚糖组分)和透明质酸而优化的消化条件。

酶	酶浓度	反应缓冲液	标准物
[0215]	软骨素酶ABC (20 mU/ μ l)	5 μ l	100 mM 乙酸铵 pH 8 硫酸软骨素(5 μ g)聚 集蛋白聚糖(10 μ g)
	角质素酶 (50 mU/ μ l)	2 μ l	100 mM Tris-HCl pH 7 聚集蛋白聚糖(10 μ g)
	透明质酸酶(2 U/ μ l)	5 μ l	100 mM 乙酸钠 pH5 Select-HA 50K (20 μ g)
反应体积= 20 μ l, 37°C孵育过夜			

[0216] 使用LC-MS或直接MS检测GAG二糖消化产物,并且通过从组分进行MS²碎片化和利用Thermo Velos离子阱质谱仪进行负离子质谱来确认其组成,所述组分是通过使用以乙腈中的碳酸氢铵洗脱的多孔石墨化碳柱分离的。

[0217] 由在加10%血小板溶解产物(血清转化的)(Stemulate, Cook Regentec, Bloomington, IN, USA)的 α MEM培养基和加5%血小板溶解产物(PLTMax, Millcreek, Rochester, MN, USA)加2IU/mL肝素的2.DMEM培养基中生长的细胞产生细胞分泌物样品。

[0218] 为了鉴别存在的分泌的蛋白聚糖,将浓缩的细胞分泌物/培养基样品在真空下固定到PVDF膜上,用GAG降解酶、角质素酶(Kase)、透明质酸酶(Hase)、软骨素酶ABS(Csase)、内切- β -半乳糖苷酶(EBG)处理,并通过MS加以分析。

[0219] 消化产物的第二阶段MS谱确认了质量(m/z 460²⁻和380²⁻ m/z)与聚集蛋白聚糖标准物的硫酸化硫酸软骨素碎片谱匹配,从而确认硫酸软骨素存在于条件培养基中。

[0220] 硫酸软骨素是聚集蛋白聚糖的GAG组分,并且也是其他蛋白聚糖(例如多能蛋白聚糖)的GAG组分。硫酸软骨素的存在确认了此类蛋白聚糖的一种或其混合物的存在。

[0221] 对从取自丙酮沉淀的沉淀物消化的糖确定聚糖质谱数据，并且硫酸软骨素的水平低于预期。然而，当使用Bio-Rad斑点印迹设备在真空下将样品(50 μ l)斑点印迹到PVDF膜上并且在丙酮沉淀之前和之后用阿辛蓝(Alcian blue)(0.1%乙酸中的0.1%阿辛蓝)染色并比较染色强度时，在丙酮沉淀之前的细胞分泌物样品中的染色强度(更深的蓝色染色着色)较高(结果未显示)，表明并非所有带电的大分子(即蛋白聚糖)都被丙酮沉淀。

[0222] 对总细胞分泌物和通过Sephadex大小分级分离所分离的高分子量蛋白质进行蛋白质组学分析。使用在线毛细管反相(RP)(ProteoCol C18, 300 μ m ID, 10cm, 5 μ m粒径, 300 \AA 孔径)液相色谱(LC)质谱(MS)以正极性模式，或者利用共振激活-碰撞诱导解离(CID)分析胰蛋白酶消化的肽。使柱在100%溶剂A(0.1% (v/v) 甲酸)中平衡，并通过0%-30%溶剂B(乙腈中的0.1% (v/v) 甲酸)、之后是30%-60%溶剂B的两步梯度分离肽。将肽混合物在15 μ l去离子水中重构，并将5 μ l注射到柱上。

[0223] 检测到的细胞外基质蛋白聚糖是光蛋白聚糖、多能蛋白聚糖和双糖链蛋白聚糖。硫酸软骨素是多能蛋白聚糖以及聚集蛋白聚糖的GAG链组分。在蛋白质组学分析中未检测到聚集蛋白聚糖，然而蛋白质组学分析对蛋白聚糖来说是次优的，并且聚集蛋白聚糖上的大量糖链可能抑制了蛋白质组分的检测。

[0224] 具有聚集蛋白聚糖特异性抗体的ELISA试剂盒在来自两种培养基类型(含肝素和不含肝素)和跨第1-10次传代(结果未显示)的条件培养基中确认了50-900pg/mL的各种水平的聚集蛋白聚糖。测试了7个不同的脂肪组织供体，并从所有7个供体的条件培养基中检测到聚集蛋白聚糖。

[0225] 证实硫酸软骨素存在于条件培养基中。硫酸软骨素是多能蛋白聚糖和聚集蛋白聚糖二者的组分。蛋白质组学分析检测到多能蛋白聚糖、光蛋白聚糖和双糖链蛋白聚糖，但未确认聚集蛋白聚糖的存在，可能蛋白质组分析受到聚糖蛋白聚糖上延伸糖链的抑制。通过聚集蛋白聚糖抗体ELISA测定确认聚集蛋白聚糖存在于两种培养基类型的条件培养基中，并且不存在于匹配的空白生长培养基中。

[0226] 实施例6. 人同种异体脂肪来源的MSC的工业规模生产。

[0227] 供体选择

[0228] 如实施例3中所述从人供体收集脂肪组织。根据实施例1筛选来自每个供体的细胞。选择显示适当性质(例如在“血清转换”筛选方法中的表现可接受)的细胞用于大规模扩增。

[0229] 细胞的扩增

[0230] 如实施例3中所描述的对细胞扩增并传代。十层组织培养工厂用于对细胞传代。细胞继续传代直到第8次传代，而细胞没有减慢或看起来变得衰老。

[0231] 经计算的可从一个供体生产的小瓶的数目

[0232] 表2显示可使用本发明的方法从一个供体产生超过3.32亿个小瓶，每个小瓶装有500万个细胞。

[0233] 表2:经计算的可从一个供体生产的小瓶的数目。

	接种的细胞	倍增数	输出的细胞	小瓶产品的数目
第0次传代	173.5	0.13	189.86	38

	接种的细胞	倍增数	输出的细胞	小瓶产品的数目
[0235]	第 1 次传代	189.9	3.47	2103.81
	第 2 次传代	2103.8	3.59	25334.08
	第 3 次传代	25334.1	3.2	232809.73
	第 4 次传代	232809.7	2.5	1316970.73
	第 5 次传代	1316970.7	3	10535765.85
	第 6 次传代	10535765.9	2	42143063.41
	第 7 次传代	42143063.4	2.5	238397167.31
	第 8 次传代	238397167.3	2.8	1660294306.33
				332,058,861

[0236] 实施例7. 用于MSC扩增的替代组织培养基

[0237] 从脂肪组织中分离人细胞,并如实施例3所描述的进行培养。在两次传代后,用高葡萄糖DMEM、10%胎牛、20ng/ml表皮生长因子(EGF)、20ng/ml碱性成纤维细胞生长因子和2%B27补充物(Life Technologies)替代所述培养基。一旦细胞变得汇合,条件培养基是粘性的。

[0238] 实施例8. 用同种异体细胞和富集高分子量糖缀合物的条件培养基治疗患有骨关节炎的人患者

[0239] 脂肪组织的处理

[0240] 利用脂肪抽吸从患者的腹部和/或大腿收集832克脂肪组织。在收集后立即通过用温热(37°C)无菌的林格氏溶液(Baxter)洗涤并随后通过将无菌胶原酶添加到0.05%wt/vol的最终浓度进行消化来处理脂肪抽吸物。将样品在37°C孵育20分钟,伴随在轨道混合器上以100rpm轻轻混合,通过800微米网过滤,转移到离心管中,并以500g离心15分钟。丢弃漂浮的细胞和上清液,将沉淀的细胞用巴斯德移液管轻轻混合并转移到15ml离心管中。

[0241] 然后在DMEM中洗涤细胞以去除胶原酶。将DMEM添加到14ml的最终体积,并且将样品以500g离心10分钟。丢弃上清液,并汇集沉淀的SVF细胞且将其划分到8个分开的冷冻袋中。将细胞以每袋11.5-12.5ml的体积低温贮藏在Cryostor 10中。

[0242] 细胞的扩增

[0243] 将一袋细胞解冻并接种于装有Alpha MEM和10%人血小板溶解产物的T175组织培养烧瓶中。血小板溶解产物在离心去除纤维蛋白原之前已通过添加凝血酶和氯化钙进行处理。将细胞于CO₂孵育箱中在37°C中孵育直到存在汇合的细胞单层(7到10天)。如实施例3中所描述的将细胞传代4次。然后将传代的细胞剥离并离心。收集来自最后一次传代的条件培养基并用于细胞的低温低温贮藏。

[0244] 细胞的低温贮藏

[0245] 将沉淀的细胞样品重悬于1.8mL条件培养基和0.2mLbloodstor-100低温贮藏液(Biolife Solutions, USA)中并以2ml等分试样转移到冷冻小瓶中,并且将所述冷冻小瓶在-80°C冷冻器中在以约1°C/分钟的受控速率的冷冻装置中冷冻24小时,然后转移到液氮杜瓦瓶中用于长期储存。

[0246] 患者的治疗

[0247] 用扩增的同种异体细胞和富集高分子量糖缀合物的条件培养基的单次关节内注

射来治疗患有3级膝部骨关节炎的52岁患者。将装有细胞和条件培养基的小瓶在室温解冻并立即注射到膝关节中。注射物由在1.8mL富集高分子量糖缀合物的条件培养基和0.2mL bloodstor-100低温贮藏液中的390万个细胞组成。

[0248] 患者在注射后1周接受检查，并报告疼痛显著减轻。患者对结果非常满意，以致于他们询问他们是否可在另一个膝盖上注射。

[0249] 实施例9. 分泌物的稳定性

[0250] 分泌物的制备

[0251] 在10层细胞工厂烧瓶中，在加10%血小板溶解产物(血清转化的)(Stemulate, Cook Regentec, Bloomington, IN, USA)的αMEM中，或在加10%胎牛血清的αMEM中培养人脂肪来源的MSC(如实施例8中所描述的获得)。培养基不变，且细胞保持培养4-7天，直到细胞80-100%汇合。收获上清液，并且观察到来自血小板溶解产物培养基的上清液是粘性的，但来自胎牛血清培养基的上清液不是粘性的。由于观察到过滤降低粘度，因此上清液未被过滤。

[0252] 通过ELISA分析VEGF

[0253] 使用ELISA(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)测量血管内皮生长因子(VEGF)。

[0254] 通过Bioplex分析分泌物

[0255] 使用Bioplex系统(Biorad)测量14种不同的细胞因子和生长因子。

[0256] 稳定性测试

[0257] 将分泌物样品在试管中储存在22°C并于规则的间隔测试。样品也作为对照储存在-80°C。将储存在22°C的样品与-80°C的对照进行比较。

[0258] 结果

[0259] 跨6个月的时期通过ELISA在分泌物中测量的VEGF水平没有显著下降(图2)。

[0260] 在室温保存5个月的时期的粘性条件培养基和非粘性条件培养基中测量十四种不同的细胞因子和生长因子。计算每种细胞因子或生长因子的水平与起始时间点的水平相比的百分比变化，并且其证实了所测量的不同细胞因子和生长因子在粘性条件培养基中比在非粘性条件培养基中更稳定(图3)。

[0261] 显著性

[0262] 令人惊讶的是，VEGF的水平在室温保持稳定超过数天。文献教导，除非在低温冷冻储存，否则细胞因子(例如VEGF和本实施例中分析的大多数其他细胞因子)是不稳定的(Kisand等, Porter等)。

[0263] 实施例10. 粘度的测量

[0264] 如实施例8所描述的制备脂肪来源的细胞。在加10%血小板溶解产物(血清转化的)(Stemulate, Cook Regentec, Bloomington, IN, USA)的αMEM中，或在加10%胎牛血清的DMEM中培养细胞。将细胞培养到第4次传代或第5次传代，并且当细胞50%到100%汇合时收获条件培养基。使用cannon-feske U粘度计测量条件培养基的粘度。

[0265] 结果

[0266] 允许达到大约>80%汇合的所有培养物均具有大于1.5cSt的粘度。而在80%汇合之前收获的所有培养物的粘度均低于1.5cSt(图4)。

[0267] 实施例11. 用含有来自传代的人脂肪来源的贴壁细胞的分泌物的组合物治疗网球

肘

[0268] 如实施例9中所描述的,从传代的人脂肪来源的贴壁细胞产生分泌物,所述细胞在加10%血小板溶解产物的αMEM中生长。

[0269] 将分泌物与Solugel (Johnson&Johnson) 以1:10混合产生用于局部施加的凝胶。通过每天两次向肘部施加所述凝胶来治疗网球肘已持续2年的72岁女性。在5天后,该女性报告疼痛显著减轻并且能够打保龄球,而在治疗之前,肘部疼痛妨碍她进行此类活动。

[0270] 通过每天两次施加所述凝胶来治疗年龄77岁的第二位女性患者,其患有内侧和外侧网球肘。患者在4到5天内报告了较好的感觉。在2.5周后,患者停止使用凝胶,因为受影响的肘部“感觉良好”。患者报告,在停止施加凝胶后3周,肘部感觉没有减退。患者报告她完全治愈。所述改善允许患者增加其体力,如通过在开始分泌物治疗之前由于疼痛而限于10盘(end)保龄球到在分泌物治疗之后能够完成21盘所证明的。

[0271] 实施例12.用含有来自传代的人脂肪来源贴壁细胞的分泌物的组合物治疗腱损伤

[0272] 使用如实施例10中所描述制备的与Solugel混合的来自传代的人脂肪来源细胞的分泌物治疗患有一系列病况的以下受试者,所述细胞在加10%血小板溶解产物的αMEM中生长。在所有情况下,凝胶的施加是通过局部施加到受影响区域的皮肤,通常一天两次。

[0273] 足部的冻疮和腱炎

[0274] 患有足部的冻疮和肌腱炎的七十五岁女性。治疗4天后疼痛和炎症消失。

[0275] 高尔夫球员腕(Golfers wrist)

[0276] 治疗七十五岁女性的高尔夫球员腕。治疗4天后疼痛和炎症消失。

[0277] 转子滑囊炎。

[0278] 转子滑囊炎。治疗4天后疼痛和炎症消失。

[0279] 跟腱炎。

[0280] 用含有分泌物的凝胶治疗患有跟腱炎的74岁患者,跟腱炎已是持续多年的问题。患者报告在使用凝胶3天后不适已消失。患者继续每天两次施加凝胶,持续3周,且疼痛没有复发。

[0281] 腓肠撕裂

[0282] 用分泌物凝胶治疗有近期腓肠撕裂的52岁患者。患者报告,在施加后,分泌物凝胶产生类似于薄荷醇的舒缓益处,并且在第二天早上,未观察到在开始治疗之前已影响患者的腿部僵硬。患者每晚再次施加分泌物凝胶并报告损伤愈合良好。患者报告,在治疗期间,有一次在夜间错过施加分泌物凝胶,之后在第二天早上出现腿部受影响区域的僵硬增加。

[0283] 参考文献

[0284] Cesaretti, M., E. Luppi, F. Maccari 和 N. Volpi. 2003. 用于糖醛酸咔唑反应的96孔测定(A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction). Carbohydrate Polymers. 54:59-61.

[0285] Kilcoyne, M., J.Q. Gerlach, M.P. Farrell, V.P. Bhavanandan 和 L. Joshi. 2011. 微量滴定板形式的用于碳水化合物的周期性酸-席夫试剂测定(Periodic acid-Schiff's reagent assay for carbohydrates in a microtiter plate format). Analytical Biochemistry. 416:18-26.

[0286] Kisand, K., Kerna, I., Kumm, J. 等 (2010). 低温贮藏对在生物样本库中基质金属蛋

白酶 (MMP) - 7、TIMP-1、血管生长因子 (VEGF) 和 VEGF-R2 的血清浓度的影响 (Impact of cryopreservation on serum concentration of matrix metalloproteinases (MMP) - 7, TIMP-1, vascular growth factors (VEGF) and VEGF-R2 in Biobank samples) . Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 49 (2) , 第229-235页.

[0287] Porter AE, Auth J, Prince M, Ghidini A, Brenneman DE, Spong CY. 储存的羊水中细胞因子稳定性的优化 (Optimization of cytokine stability in stored amniotic fluid) . American Journal of Obstetrics and Gynecology [2001, 185 (2) : 459-462] .

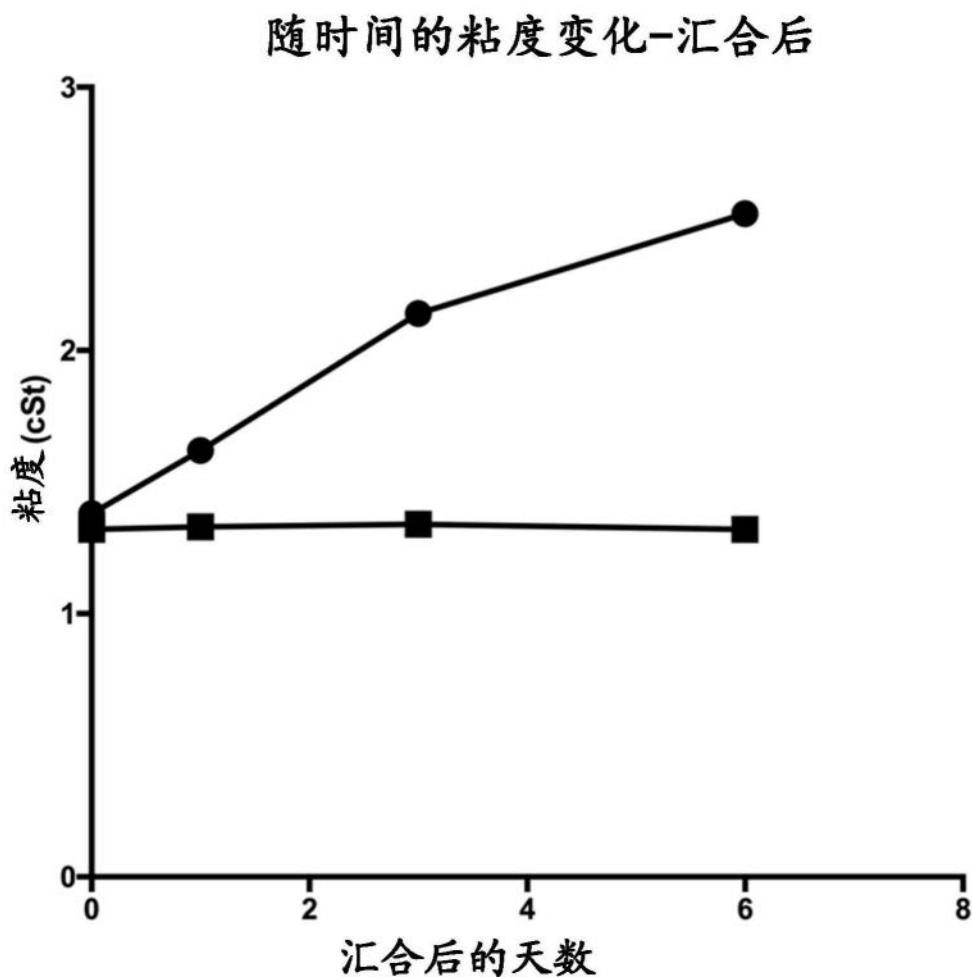


图1

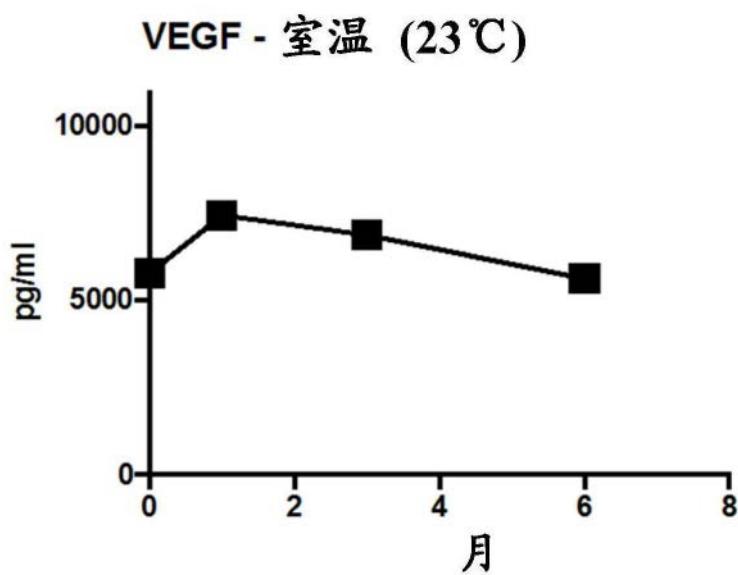


图2

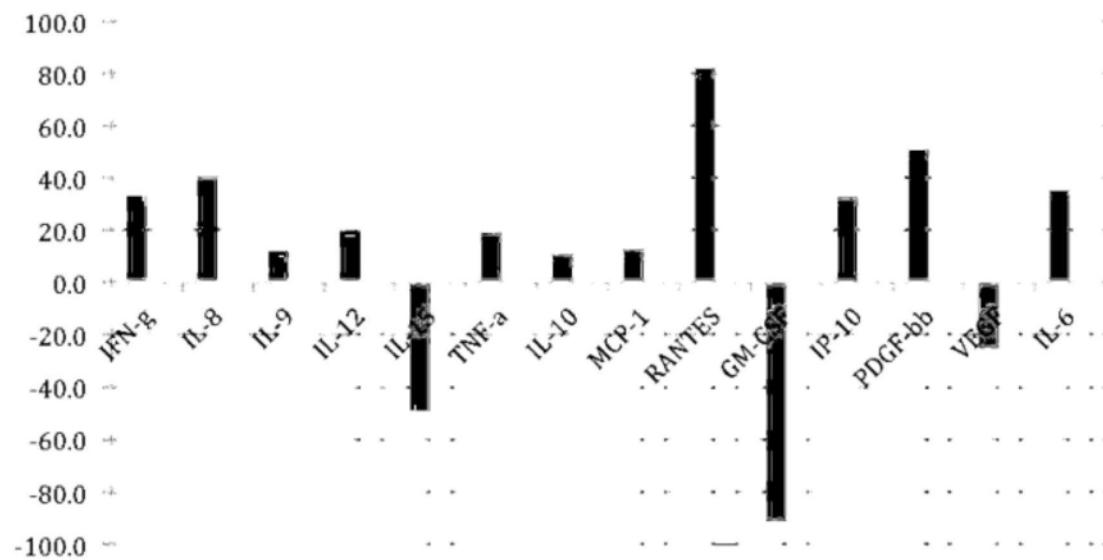


图3

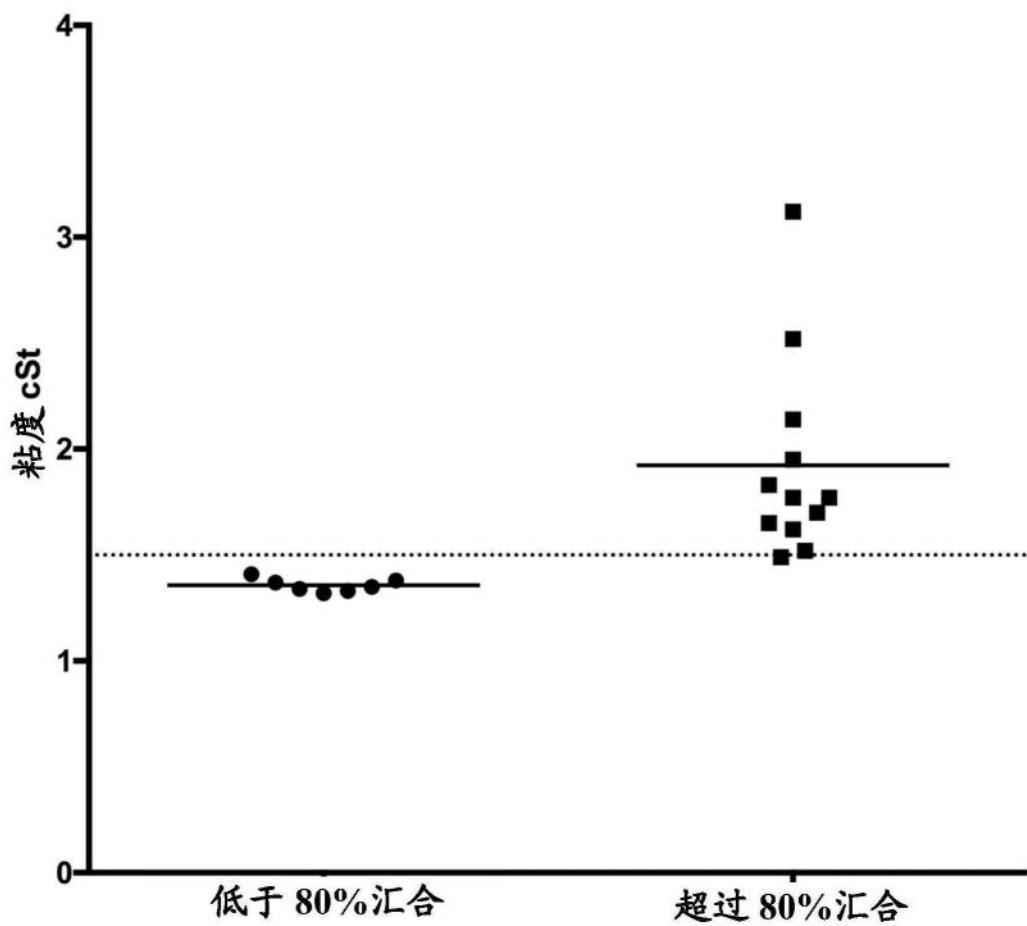


图4