(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107812014 B
(45)授权公告日 2021.11.16

(21)申请号 201710907274.2
(22)申请日 2011.05.05
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107812014 A
(43)申请公布日 2018.03.20
(30)优先权数据
12/776,163 2010.05.07 US
(62)分案原申请数据
201180023038.5 2011.05.05
(73)专利权人 卡斯尔克里克生物科学有限责任公司
地址 美国宾尼法尼亚州
(72)发明人 约翰·马斯洛斯基
(74)专利代理机构 北京易光知识产权代理有限公司 11596
代理人 耿晓兵
(51)Int.Cl.
C12N 5/071(2010.01)
审查员 徐丹

权利要求书3页 说明书20页 附图6页

(54)发明名称

自体真皮成纤维细胞的剂量单位调配物

(57)摘要

剂量单位由自体细胞疗法产品组成，所述产品由针对待治疗的每个个体所生长的成纤维细胞构成。使用现行良好制造规范(CGMP)和标准组织培养程序从每个个体自身皮肤的活检体生长的自体成纤维细胞的悬浮液在含有具有至少98％成纤维细胞纯度以及至少85％成活力的低温保存的成纤维细胞或其前驱体的小瓶中供应，用于以1.0-2.0×107个细胞/毫升的浓度投予1到6mL、优选2mL的细胞。当注射到鼻唇沟皱纹(鼻侧上延伸到嘴角的皱褶)中时，认为自体成纤维细胞会增加细胞外基质组分(包括胶原蛋白)的合成，从而减轻这些皱纹的严重程度。已证实投药剂量和时机对达成临床上显著的成果至关重要。

CN 107812014 B

1.一种剂量调配物,其包含1.0 × 10^7到2.7 × 10^7个细胞/毫升,其中至少98%的所述细胞是自体人类成纤维细胞,其中至少85%为存活的;以及可选的低温保存培养基;

其中所述成纤维细胞的纯度以及身份的确认方法包括:所述成纤维细胞经通过采用针对CD104的抗体以去除角化细胞来纯化,且所述成纤维细胞进一步通过采用针对CD90的抗体以确认身份;

其中所述成纤维细胞与染料试剂一起培育,所述染料试剂包含两种染料:将所有有核细胞染色的膜可渗透性染料及只将受损细胞或垂死细胞染色的膜不可渗透性染料;以及

其中与所述染料试剂一起培育的所述成纤维细胞进一步由Guava® PCA系统进行分析。

2.如权利要求1所述的剂量调配物,其包含由伊斯科夫改良达尔伯克培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium,IMDM)和Profreeze™加7.5%二甲亚砜(DMSO)组成的低温保存培养基。

3.如权利要求1所述的剂量调配物,其中98%或更多的所述细胞是成纤维细胞。

4.如权利要求1所述的剂量调配物,其包含1、2、3或6 mL。

5.一种有效量的包含1.0 × 10^7到2.7 × 10^7个细胞/毫升的剂量调配物在制备用于治疗皮肤缺陷的药物中的应用,其中至少98%的所述细胞是自体人类成纤维细胞,其中至少85%为存活的,

其中所述成纤维细胞的纯度以及身份的确认方法包括:所述成纤维细胞经通过采用针对CD104的抗体以去除角化细胞来纯化,且所述成纤维细胞进一步通过采用针对CD90的抗体以确认身份;

其中所述成纤维细胞与染料试剂一起培育,所述染料试剂包含两种染料:将所有有核细胞染色的膜可渗透性染料及只将受损细胞或垂死细胞染色的膜不可渗透性染料;

其中与所述染料试剂一起培育的所述成纤维细胞进一步由Guava® PCA系统进行分析;以及

所述调配物是用于两次或三次治疗,所述治疗隔开四周或五周加减七到十天。

6.如权利要求5所述的应用,其用于治疗皱皮、鼻唇和唇颊沟、口周纹、外眼角纹、眶周纹以及眉间纹。

7.如权利要求5所述的应用,其包括每线性厘米长度注射0.05到0.5 mL的所述剂量调配物。

8.如权利要求5所述的应用,其包括在每次治疗中注射2到6 mL。

9.一种有效量的包含1.0 × 10^7到2.7 × 10^7个细胞/毫升的剂量调配物在制备用于治疗鼻唇沟皱纹的药物中的应用,其中至少98%的所述细胞是自体人类成纤维细胞,其中至少85%为存活的,

其中所述成纤维细胞的纯度以及身份的确认方法包括:所述成纤维细胞经通过采用针对CD104的抗体以去除角化细胞来纯化,且所述成纤维细胞进一步通过采用针对CD90的抗体以确认身份;

其中所述成纤维细胞与染料试剂一起培育,所述染料试剂包含两种染料:将所有有核细胞染色的膜可渗透性染料及只将受损细胞或垂死细胞染色的膜不可渗透性染料;

其中与所述染料试剂一起培育的所述成纤维细胞进一步由Guava® PCA系统进行分

析;以及

所述治疗包括每个治疗期投予1到2 mL的所述剂量调配物,所述剂量调配物以每线性厘米长度0.1 mL的剂量分布注射到所述皱纹的浅表乳头状真皮中,所述治疗持续三个治疗期,所述治疗期隔开五周加减七到十天。

10.一种有效量的包含1.0 × 10^7到2.7 × 10^7个细胞/毫升的剂量调配物在制备用于治疗多个面部区域中的皱皮的药物中的应用,其中至少98%的所述细胞是自体人类成纤维细胞,其中至少85%为存活的,

其中所述成纤维细胞的纯度以及身份的确认方法包括:所述成纤维细胞经通过采用针对CD104的抗体以去除角化细胞来纯化 ,且所述成纤维细胞进一步通过采用针对CD90的抗体以确认身份;

其中所述成纤维细胞与染料试剂一起培育,所述染料试剂包含两种染料:将所有有核细胞染色的膜可渗透性染料及只将受损细胞或垂死细胞染色的膜不可渗透性染料;

其中与所述染料试剂一起培育的所述成纤维细胞进一步由Guava® PCA系统进行分析;以及

所述治疗包括每个治疗期将5到6 mL以每线性厘米长度0.05 mL的剂量分布注射到浅表乳头状真皮中,所述治疗持续一个或两个治疗期,所述治疗期隔开五周加减七到十天。

11.一种有效量的包含1.0 × 10^7到2.7 × 10^7个细胞/毫升的剂量调配物在制备用于治疗痤疮瘢痕的药物中的应用,其中至少98%的所述细胞是自体人类成纤维细胞,其中至少85%为存活的,

其中所述成纤维细胞的纯度以及身份的确认方法包括:所述成纤维细胞经通过采用针对CD104的抗体以去除角化细胞来纯化,且所述成纤维细胞进一步通过采用针对CD90的抗体以确认身份;

其中所述成纤维细胞与染料试剂一起培育,所述染料试剂包含两种染料:将所有有核细胞染色的膜可渗透性染料及只将受损细胞或垂死细胞染色的膜不可渗透性染料;

其中与所述染料试剂一起培育的所述成纤维细胞进一步由Guava® PCA系统进行分析;以及

所述治疗包括每个治疗期将2到12 mL以每平方厘米瘢痕区0.1 mL的剂量分布注射到浅表乳头状真皮中,所述治疗持续一到三个治疗期,所述治疗期隔开十四天加减三天。

12.一种有效量的包含1.0 × 10^7到2.7 × 10^7个细胞/毫升的剂量调配物在制备用于治疗限制性烧伤瘢痕的药物中的应用,其中至少98%的所述细胞是自体人类成纤维细胞,其中至少85%为存活的,

其中所述成纤维细胞的纯度以及身份的确认方法包括:所述成纤维细胞经通过采用针对CD104的抗体以去除角化细胞来纯化,且所述成纤维细胞进一步通过采用针对CD90的抗体以确认身份;

其中所述成纤维细胞与染料试剂一起培育,所述染料试剂包含两种染料:将所有有核细胞染色的膜可渗透性染料及只将受损细胞或垂死细胞染色的膜不可渗透性染料;

其中与所述染料试剂一起培育的所述成纤维细胞进一步由Guava® PCA系统进行分析;以及

所述治疗包括每个治疗期将1至10 mL以每平方厘米瘢痕区0.1-0.5 mL的剂量分布注

射到所述烧伤瘢痕的经过触诊的限制带中，所述治疗持续一到五次治疗，所述治疗隔开两周到六周。

13.一种制备用于组织修复或再生的多能细胞的方法，其包括：

提供包含1.0 × 10^7到2.7 × 10^7个细胞/毫升的剂量调配物，其中至少98%的所述细胞是自体人类成纤维细胞，其中至少85%为存活的，

其中所述成纤维细胞的纯度以及身份的确认方法包括：所述成纤维细胞经通过采用针对CD104的抗体以去除角化细胞来纯化，且所述成纤维细胞进一步通过采用针对CD90的抗体以确认身份；

其中所述成纤维细胞与染料试剂一起培育，所述染料试剂包含两种染料：将所有有核细胞染色的膜可渗透性染料及只将受损细胞或垂死细胞染色的膜不可渗透性染料；

其中与所述染料试剂一起培育的所述成纤维细胞进一步由Guava® PCA系统进行分析；以及

提供用于使所述细胞去分化的方式。

14.如权利要求13所述的方法，其中所述细胞是通过细胞编程、细胞融合或体细胞转移而去分化的。

15.如权利要求1所述的剂量调配物，其中所述剂量调配物是可注射的。

16.如权利要求1所述的剂量调配物，其中所述剂量调配物是可冷冻的。

17.如权利要求5所述的应用，其中所述剂量调配物是可注射的。

18.如权利要求5所述的应用，其中所述剂量调配物是可冷冻的。

19.如权利要求9所述的应用，其中所述剂量调配物是可注射的。

20.如权利要求9所述的应用，其中所述剂量调配物是可冷冻的。

21.如权利要求10所述的应用，其中所述剂量调配物是可注射的。

22.如权利要求10所述的应用，其中所述剂量调配物是可冷冻的。

23.如权利要求11所述的应用，其中所述剂量调配物是可注射的。

24.如权利要求11所述的应用，其中所述剂量调配物是可冷冻的。

25.如权利要求12所述的应用，其中所述剂量调配物是可注射的。

26.如权利要求12所述的应用，其中所述剂量调配物是可冷冻的。

27.如权利要求13所述的应用，其中所述剂量调配物是可注射的。

28.如权利要求13所述的应用，其中所述剂量调配物是可冷冻的。

自体真皮成纤维细胞的剂量单位调配物

技术领域

[0001] 本发明关于经过分离和制备的自体真皮成纤维细胞的剂量单位调配物，其用于在一个部位注射以供修复和/或长期改善人类个体的皮肤和软组织缺陷。

背景技术

[0002] 如美国专利第5,591,444号、第5,660,850号、第5,665,372号以及第5,858,390号中所述，个体皮肤中的美容和审美缺陷可以通过将自体真皮成纤维细胞的悬浮液注射到较邻近于缺陷的真皮和皮下组织中来矫正。可以通过此方法矫正的典型缺陷包括皱皮、萎缩纹、凹陷性瘢痕、非外伤来源的皮肤凹陷、由寻常痤疮引起的瘢痕以及唇部发育不全。所述细胞与个体组织相容，优选地通过培养从个体获取的活检标本而得到，并且已通过在细胞培养系统中继代培养而扩增。

[0003] 将材料(“注射物(injectate)”)注射到体内并且尤其注射到面部以产生美学效果从接近十九世纪开始。举例来说，注射石蜡来矫正面部轮廓缺陷在第I次世界大战之前多年中享有一段短暂的接受期。然而，并发症和长期结果不能令人满意的性质导致放弃了实施。可注射硅酮的可用性使得这些事件在1960年代早期开始实质上重现。专门制造的“医用级”硅酮溶液，例如道康宁(Dow Corning)MDX 4.4011，已在美国的许多经过批准的测试中心在实验的基础上加以使用。并发症，如对硅酮的局部和全身反应、注射物迁移以及局部组织崩塌，限制了硅酮注射液的使用。通过注射非生物性材料而获得的不良结果促使尝试使用外来蛋白质(尤其牛胶原蛋白)作为注射物。虽然未经过加工的牛胶原蛋白对于注射到人体内来说具有过度免疫原性，但是通过酶促降解而去除牛胶原蛋白的C端和N端肽会得到一种材料(“去端肽胶原蛋白(atelocollagen)”)，如果患者经过预筛选以排除那些具有免疫反应性的患者，那么所述材料可按有限量使用。虽然被广泛使用，但是所述材料与约90％的个体中产生抗牛抗体以及约1-3％的个体中的明显免疫并发症相关联。德鲁斯特F.(DeLustro,F.)等人，1987，整形与改造外科学(Plastic and Reconstructive Surgery)79:581。呈溶液形式的去端肽胶原蛋白经证实不能完全令人满意，这是因为所述材料在相对较短时间内被个体从注射部位吸收而不被主体材料替换。通过戊二醛交联、随后通过细筛过滤并剪切来延长在体内的滞留。然而，增加以及不规律的粘度使得所述材料难以使用。完全来源于个体自身组织样品的注射用的人类胶原蛋白是可用的，但是没有证据表明人类胶原蛋白注射液比牛胶原蛋白注射液更持久。

[0004] 这些问题通过开发自体成纤维细胞制剂来解决。然而，有了问题的解决方案并不代表有了已通过反复试验验证并通过临床试验确认，并且已遵照美国食品药品管理局(U.S.Food and Drug Administration)的要求制造并包装，按规定剂量稳定存储的产品。

[0005] 因此，本发明的一个目标在于提供自体真皮成纤维细胞的规定剂量单位调配物，用于注射到患者体内以供修复和长期改善皮肤缺陷。

[0006] 本发明的另一个目标在于提供含有干细胞、前驱细胞或部分分化的细胞的剂量单位调配物，其可用于修复和长期改善皮肤缺陷。

发明内容

[0007] 剂量单位由自体细胞疗法产品组成，所述产品由针对待治疗的每个个体所生长的成纤维细胞构成。使用现行良好制造规范(CGMP)和标准组织培养程序从每个个体自身皮肤的活检体生长的自体成纤维细胞的悬浮液在含有具有至少98％成纤维细胞纯度以及至少85％成活力的低温保存的成纤维细胞或其前驱体的小瓶中供应，用于以1.0-2.0×10^7个细胞/毫升的浓度分三次，约间隔五周投予1到6mL、优选2mL的细胞，每线性厘米长度注射0.05到0.5mL。通过在无蛋白质的培养基中培育经过扩增的成纤维细胞一段时间，使得经过继代培养的真皮成纤维细胞实质上不含培养基中所存在的免疫原性蛋白质。当注射到鼻唇沟皱纹(鼻侧上延伸到嘴角的皱褶)中时，认为自体成纤维细胞会增加细胞外基质组分(包括胶原蛋白)的合成，从而减轻这些皱纹的严重程度。已证实投药剂量和时机对达成临床上显著的成果至关重要。

[0008] 虽然在美国(US)有若干种经过批准的疗法用于治疗鼻唇沟皱纹，如Restylane®、Juvéderm™以及Radiesse®，但是成纤维细胞悬浮液并不属于与这些产品相同的药理学类别。这些产品是注射到面部组织中以通过暂时为面部组织增加体积来平复皱纹和沟的结构填充剂。成纤维细胞剂量调配物通过一种极为不同的提议作用机理而起作用。本文所述的剂量调配物单位适用于治疗皱皮、鼻唇和唇颊沟、口周纹、外眼角纹、眶周纹以及眉间纹。

[0009] 成纤维细胞剂量调配物还适用于提供用于组织修复和再生的多能细胞。

附图说明

[0010] 图1为标准化制造工艺流程图。

[0011] 图2为来自伯恩(Byrne)2008人类分子遗传学(Hum.Mol.Gen.)17:R37-R41的示意图，其展示使用外遗传重编程可使源自皮肤的成纤维细胞去分化成多能干细胞的方式，所述多能干细胞接着可分化成神经细胞、心肌细胞、β胰岛细胞以及造血细胞。

[0012] 图3为可使成纤维细胞去分化成多能细胞的方法的示意图：细胞融合(科文(Cowan)等人，2005)、直接重编程(高桥(Takahashi)等人，2007)以及体细胞核转移(伯恩(Byrne)等人，2007)。

[0013] 图4为用于医师客观评估的痤疮瘢痕严重程度的活动期分级，即“评估者活动期痤疮瘢痕评估量表(Evaluator Live Acne Scar AssessmentScale)”中的图解，所述量表采用在直接和切线照明下相对瘢痕外观的比较性评估。

具体实施方式

[0014] 已开发出一种自体成纤维细胞产品。所述细胞疗法产品是由使用标准组织培养程序从每个个体自身皮肤的活检体生长的自体成纤维细胞的悬浮液构成。从患者耳后区域提取皮肤组织(真皮和表皮层)的活检体并且经由次日送达在2-8℃下运送到制造设施。将经由酶消化从组织分离的成纤维细胞扩增到足以注射到患者的目标治疗区域中的量。细胞疗法产品由经过扩增的成纤维细胞组成，这些成纤维细胞被调配成目标细胞疗法产品的细胞浓度且在冷冻小瓶中低温保存，称为冷冻小瓶装散装原料药。最终细胞疗法产品由解冻的散装细胞疗法产品-经过解冻、洗涤并且准备用于患者注射的冷冻小瓶细胞组成。

[0015] 最初销售批准是用于治疗中度到重度鼻唇沟皱纹。当前临床开发集中于治疗真皮

轮廓畸形、声带瘢痕、牙龈退缩、限制性烧伤瘢痕以及痤疮瘢痕。如下文所论述，视待治疗的病状而定，剂量和投药方案有所不同。虽然确切机理未知，但是认为构成成纤维细胞剂量调配物的活性组分的自体成纤维细胞当注射到患者皮肤中时会增加细胞外基质组分(如胶原蛋白)的合成，由此增强皮肤完整性并且最终使得细纹和皱纹减少。

[0016] 本文中使用以下定义：

[0017] ATM分析测试法

[0018] AZFICEL-T自体培养的成纤维细胞的USAN名称

[0019] 散装收集物(BULK HARVEST)在最终收集之后、在低温保存培养基中调配之前的材料

[0020] CGMP现行良好制造规范

[0021] CS细胞堆叠

[0022] DMEM达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modification ofEagle's Medium)

[0023] DMSO二甲亚砜

[0024] 注射用药品(DRUG PRODUCT-INJECTION)经过洗涤并于DMEM中重新调配、装入小瓶并且准备运送到临床场所的材料

[0025] 冷冻小瓶装原料药(DRUG SUBSTANCE-CRYOVIAL)在低温保存培养基中调配并且等分装入冷冻小瓶中的材料

[0026] EDTA乙二胺四乙酸

[0027] FACS荧光激活细胞分选(Fluorescence Activated Cell Sorting)

[0028] FBS胎牛血清

[0029] GA庆大霉素(Gentamicin)和两性霉素B(Amphotericin B)

[0030] IMDM伊斯科夫改良达尔伯克培养基(Iscove's ModifiedDulbecco's Medium)

[0031] IND新药研究申请

[0032] PBS磷酸盐缓冲盐水

[0033] PCA个人细胞分析

[0034] QC质量控制

[0035] USP美国药典(United States Pharmacopeia)

[0036] I.剂量单位调配物

[0037] A细胞来源

[0038] 1.自体真皮成纤维细胞

[0039] 调配物中的细胞当以培养的单层形式生长时展示典型的成纤维细胞形态。具体来说，细胞可展示具有细长延伸的狭长的梭状或纺锤状外观，或细胞可表现为可具有细胞质前导边缘的较大的扁平状星形细胞。还可以观察到这些形态的混合物。所述细胞表达正常成纤维细胞的特征性蛋白质，包括成纤维细胞特异性标志物CD90(Thy-1)、35kDa细胞表面糖蛋白以及细胞外基质蛋白(胶原蛋白)。成纤维细胞剂量调配物是由使用标准组织培养程序从每个个体自身皮肤的活检体生长的自体成纤维细胞的悬浮液构成的自体细胞疗法产品。从患者耳后区域提取皮肤组织(真皮和表皮层)的活检体。

[0040] 2.前驱细胞

[0041] 成纤维细胞还可以用于产生供组织修复或再生用的其他细胞类型。通过体细胞核转移(SCNT)衍生遗传上与患者相同的胚胎干(ES)细胞保持了治愈或减轻许多退化性疾病的症状的潜力,同时避免了关于被宿主免疫系统排斥的问题。伯恩(Byrne)等人,自然(Nature)2007年11月22日;450(7169):497-502使用经过修改的SCNT方法从成人皮肤成纤维细胞产生恒河猴(rhesus macaque)胚泡,并且从这些胚胎中成功分离出两个ES细胞系。DNA分析确认了细胞核DNA与供体体细胞相同并且线粒体DNA来源于卵母细胞。两个细胞系都展现正常的ES细胞形态,表达关键的干细胞标志物,在转录方面类似于对照ES细胞且在试管内和活体内分化成多种细胞类型。还参看斯丕曼(Sparman)等人,干细胞(Stem Cells)2009;27(6):1255-64。图2为来自伯恩(Byrne)2008人类分子遗传学(Hum.Mol.Gen.)17:R37-R41的示意图,其展示使用外遗传重编程可使源自皮肤的成纤维细胞去分化成多能干细胞的方式,所述多能干细胞接着可分化成神经细胞、心肌细胞、β胰岛细胞以及造血细胞。参看霍切林格(Hochedlinger)等人,发育(Development.)2009年2月;136(4):509-23以及卡纳瓦蒂(Kanawaty)等人,生物学论文集(Bioessays.)2009年2月;31(2):134-8。

[0042] 图3为可使成纤维细胞去分化成多能细胞的方法的示意图:细胞融合(科文(Cowan)等人,科学(Science.)2005年8月26;309(5739):1369-73)、直接重编程(高桥(Takahashi)等人,细胞(Cell.)200730;131(5):861-72)以及体细胞核转移(伯恩(Byrne)等人,2007)。高桥(Takahashi)等人展示了从具有以下相同的四个因子的成人真皮成纤维细胞中产生iPS细胞:Oct3/4、Sox2、Klf4以及c-Myc。人类iPS细胞在形态、增殖、表面抗原、基因表达、多能细胞特异性基因的外遗传状态以及端粒酶活性方面类似于人类胚胎干(ES)细胞。此外,这些细胞可在试管内以及在畸胎瘤内分化成具有三个胚层的细胞类型。这些发现展示了iPS细胞可从成人成纤维细胞产生。

[0043] B.制备细胞

[0044] 原料药中的自体成纤维细胞是通过从接受者自身皮肤的活检体中长出,随后使用标准细胞培养技术在培养基中扩增而得到。从个体耳后区域提取皮肤组织(真皮和表皮层)的活检体。初始材料由使用标准无菌规范收集的三个3mm打孔皮肤活检体构成。所述活检体是由治疗医师收集,放置到含有无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS)的小瓶中。活检体在2-8℃下冷藏的运送器材中运送回制造设施。

[0045] 在抵达制造设施之后,检查活检体并且在验收后直接转移到制造区域。在工艺开始之后,接着洗涤活检体组织,随后进行酶消化。洗涤之后,在未切碎的情况下加入释放酶消化酶溶液(Liberase DigestiveEnzyme Solution),并且在37.0±2℃下培育活检体组织一小时。活检体组织消化的时间是一个关键的工艺参数,它会影响培养中的细胞的成活力和生长速率。释放酶是一种胶原蛋白酶/中性蛋白酶混合物,它是从龙沙沃克斯维尔公司(Lonza Walkersville,Inc.)(沃克斯维尔(Walkersville),马里兰州(MD))以调配形式获得,以及从罗氏诊断公司(Roche Diagnostics Corp.)(印第安纳波利斯(Indianapolis),印第安纳州(IN))以未调配形式获得。或者,可使用其他可商购的胶原蛋白酶,如赛瓦胶原蛋白酶NB6(Serva Collagenase NB6)(海德堡(Helidelburg),德国(Germany))。消化之后,加入起始生长培养基(IMDM,GA,10%胎牛血清(FBS))来中和所述酶,通过离心使细胞集结并且再悬浮于5.0mL起始生长培养基中。或者,不进行离心,仅仅通过加入起始生长培养基就使酶完全灭活。加入起始生长培养基,随后将细胞悬浮液接种到T-175细胞培养烧瓶中以

起始细胞生长并扩增。可使用T-75、T-150、T-185或T-225烧瓶代替T-75烧瓶。

[0046] 在37±2.0℃以及5.0±1.0％CO_2下培育细胞并且每三到五天供给新鲜的完全生长培养基。工艺中的所有供料都是通过去除一半的完全生长培养基并且用新鲜培养基替换相同体积来进行的。或者，可进行完全供料。细胞在继代培养之前在T-175烧瓶中所保持的时间不应超过30天。在整个工艺中监控汇合以确保在培养分裂(culture splitting)期间有足够的接种密度。当在T-175烧瓶中细胞汇合度大于或等于40％时，通过去除耗尽的培养基，洗涤细胞并且用胰蛋白酶-EDTA处理以将烧瓶中的粘附细胞释放到溶液中来对细胞进行继代培养。接着对细胞进行胰蛋白酶处理并且接种到T-500烧瓶中以进行连续的细胞扩增。或者，可使用一个或两个T-300烧瓶、一层细胞堆叠(1CS)、一层细胞工厂(1CF)或两层细胞堆叠(2CS)代替T-500烧瓶。

[0047] 在每个继代中并在收集之前评估形态以监控整个工艺中的培养物纯度。通过比较所观察的样品与目测标准物对细胞培养物进行形态检查来评估形态。所述细胞当以培养的单层形式生长时展示典型的成纤维细胞形态。细胞可展示具有细长延伸的狭长的梭状或纺锤状外观，或表现为可具有细胞质前导边缘的较大的扁平状星形细胞。还可以观察到这些形态的混合物。在汇合度较小的区域中的成纤维细胞可具有类似形状，但随机定向。还评估细胞培养物中角化细胞的存在。角化细胞似乎呈圆形以及不规则形状，并且在较高汇合度下它们似乎组织成鹅卵石构形。在较低汇合度下，角化细胞可在小群落中观察到。

[0048] 在37±2.0℃以及5.0±1.0％CO_2下培育细胞并且每三到五天在T-500烧瓶中并且每五到七天在十层细胞堆叠(10CS)中供料。细胞在继代培养之前在T-500烧瓶中所保持的时间不应超过10天。散装原料药安全性的质量控制(QC)出厂测试包括无菌和内毒素测试。当在T-500烧瓶中细胞汇合度≥95％时，将细胞继代培养到10CS培养容器中。或者，可使用两个五层细胞堆叠(5CS)或十层细胞工厂(10CF)代替10CS。通过去除耗尽的培养基，洗涤细胞并且用胰蛋白酶-EDTA处理以将烧瓶中的粘附细胞释放到溶液中来进行继代培养达到10CS。接着将细胞转移到10CS。加入额外的完全生长培养基来中和胰蛋白酶并且将来自T-500烧瓶的细胞吸移到含有新鲜的完全生长培养基的2L瓶中。将2L瓶的内含物转移到10CS中且跨越所有层进行接种。接着在37±2.0℃以及5.0±1.0％CO_2下培育细胞并且每五到七天供给新鲜的完全生长培养基。细胞在继代培养之前在10CS中所保持的时间不应超过20天。

[0049] 通过在无蛋白质的培养基中培育经过扩增的成纤维细胞一段时间，使得经过继代培养的真皮成纤维细胞实质上不含培养基中所存在的免疫原性蛋白质。初级收集：当在10CS中细胞汇合度为95％或更高时，收集细胞。通过去除耗尽的培养基，洗涤细胞，用胰蛋白酶-EDTA处理以将粘附细胞释放到溶液中，并且加入额外的完全生长培养基以中和胰蛋白酶来进行收集。通过离心收集细胞，再悬浮，并且进行工艺中QC测试以测定总活细胞计数以及细胞成活力。

[0050] 对于治疗鼻唇沟，总细胞计数必须为3.4×10^8个细胞且成活力必须为85％或更高。或者，用于其他适应症的总细胞产量可在3.4×10^8至1×10^9个细胞的范围内。收集时的细胞计数和成活力为用以确保有足够量的活细胞用于调配原料药的关键参数。如果总活细胞计数足以用于预期治疗，那么就测试细胞等分试样和耗尽的培养基的支原体污染。进行支原体测试。调配所收集的细胞并且低温保存。

[0051] 如果从初级10CS收集接收到细胞计数结果之后需要额外的细胞，那么就进行额外的继代培养达到多个细胞堆叠(至多四个10CS)(图1中的步骤5a)。对于额外的继代培养，将来自初级收集的细胞加入到含有新鲜的完全生长培养基的2L培养基瓶中。将再悬浮的细胞加入到多个细胞堆叠中且在37±2.0℃以及5.0±1.0％CO_2下培育。除了在细胞收集之前细胞汇合度必须为80％或更高以外，如上文所述对细胞堆叠进行供料并收集。收集程序与上文关于初级收集所述相同。从细胞和耗尽的培养基收集支原体样品，并且如上文关于初级收集所述进行细胞计数和成活力测定。

[0052] 所述方法减少或消除了免疫原性蛋白质，从而避免其从动物源性试剂引入。为减少工艺残留，将细胞在无蛋白质冷冻培养基中低温保存，接着在准备用于最终注射之前解冻并且洗涤以进一步减少剩余残留。

[0053] 如果在完成收集并且低温保存来自额外继代培养的细胞(图1中的步骤5a)之后需要额外的原料药，那么就解冻经过冷冻的冷冻小瓶装原料药的等分试样并且用于接种5CS或10CS培养容器(图1中的步骤7a)。或者，可使用四层细胞工厂(4CF)、两个4CF或两个5CS代替5CS或10CS。将经过冷冻的细胞冷冻小瓶解冻，洗涤，加入到含有新鲜的完全生长培养基的2L培养基瓶中，并且如上文所述进行培养，收集并且低温保存。加入细胞悬浮液。在细胞收集之前细胞汇合度必须为80％或更高。

[0054] C.制备细胞悬浮液

[0055] 在完成培养物扩增时，收集细胞并洗涤，接着调配成含有1.0-2.7×10^7个细胞/毫升，目标为2.2×10^7个细胞/毫升。或者，可在调配物范围内调整目标以适应不同适应症剂量。原料药由悬浮于低温保存培养基中的活的自体人类成纤维细胞的群体组成，所述低温保存培养基由伊斯科夫改良达尔伯克培养基(IMDM)和Profeeze-CDM™(龙沙公司(Lonza)，沃克斯维尔(Walkerville)，马里兰州(MD))加7.5％二甲亚砜(DMSO)组成。或者，可使用较低DMSO浓度代替7.5％或CryoStor™ CS5，或可使用CryoStor™ CS 10(美国生物科技公司(BioLifeSolutions)，巴萨尔(Bothell)，华盛顿州(WA))代替IMDM/Profreeze/DMSO。冷冻工艺由以下匀变程序的控制速率冷冻步骤组成：

[0056] 步骤1:在4.0℃下等待

[0057] 步骤2:1.0℃/minC/m到-4.0℃(样品探针)

[0058] 步骤3:25.0℃/minC/m到-40℃(腔室探针)

[0059] 步骤4:10.0℃/minC/m到-12.0℃(腔室探针)

[0060] 步骤5:1.0℃/minC/m到-40℃(腔室探针)

[0061] 步骤6:10.0℃/minC/m到-90℃(腔室探针)

[0062] 步骤7:结束

[0063] 在完成控制速率冷冻步骤之后，将散装原料药小瓶转移到低温冷冻器中以在蒸气相中存储。在低温冷冻之后，提交原料药进行质量控制测试。原料药规格还包括在低温保存之前进行以及再次针对冷冻小瓶装原料药进行的细胞计数和细胞成活力测试。对于产品出厂，细胞成活力必须为85％或更高。使用自动化细胞计数系统(加瓦技术公司(Guava Technologies))进行细胞计数和成活力测定，所述系统利用可渗透和不可渗透的荧光DNA嵌入染料的组合来检测并区分活细胞和死细胞。或者，可使用采用锥虫蓝排除法的手动细胞计数分析代替上述自动化细胞法。或者，可使用其他自动化细胞计数系统来进行细胞计

数和成活力方法，包括Cedex(罗氏伊诺斯AG公司(Roche InnovatisAG)，比勒费尔德(Bielefield)，德国(Germany))、ViaCell™(贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter)，贝瑞阿(Brea)，加利福尼亚州(CA))、NuceloCounter™(新布伦兹威克科学仪器公司(New BrunswickScientific)，埃迪逊(Edison)，新泽西州(NJ))、Countless®(英杰，生命技术公司分部(Invitrogen,division of Life Technologies)，卡尔斯巴德(Carlsbad)，加利福尼亚州(CA))或Cellometer®(莱科洛生物科学公司(Nexcelom Biosciences)，劳伦斯(Lawrence)，马萨诸塞州(MA))。冷冻小瓶装原料药样品在出厂前必须满足1.0-2.7×10^7个细胞/毫升的细胞计数规格。在出厂测试期间还进行无菌和内毒素测试。

[0064] 除了细胞计数和成活力以外，还进行原料药的纯度/身份分析并且必须确认悬浮液含有98％或更多的成纤维细胞。常见细胞污染物包括角化细胞。纯度/身份分析采用针对CD90和CD 104(分别为成纤维细胞和角化细胞的细胞表面标志物)的荧光标记抗体来量化成纤维细胞群体的纯度百分比。CD90(Thy-1)为35kDa细胞表面糖蛋白。已显示针对CD90蛋白质的抗体对人类成纤维细胞展现高特异性。CD 104整合素β4链为205kDa跨膜糖蛋白，它与整合素α6链(CD49f)缔合形成α6/β4复合物。已显示此复合物充当角化细胞的分子标志物(亚当斯(Adams)和瓦特(Watt)1991)。

[0065] 针对CD 104蛋白质的抗体结合于100％的人类角化细胞。通过将样品与维康特染料试剂(Viacount Dye Reagent)一起培育并且使用Guava PCA系统分析样品来测定细胞计数和成活力。所述试剂由两种染料构成，即，将所有有核细胞染色的膜可渗透性染料以及只将受损细胞或垂死细胞染色的膜不可渗透性染料。此染料组合的使用使得Guava PCA系统能够估算样品中所存在的细胞的总数，并且确定哪些细胞存活、凋亡或死亡。所述方法为专门开发的，特定用于确定自体培养的成纤维细胞的纯度/身份。具体程序如下：

[0066] 程序

[0067] 制备25％(W/V)叠氮化钠的PBS溶液

[0068] 制备FACS(荧光激活细胞分选)缓冲液：

[0069] 在1000mL纳根瓶(Nalgene bottle)中，将966mL PBS、30mL FBS以及4mL 25％叠氮化钠的PBS溶液组合。

[0070] 制备1％(v/v)HuS的PBS溶液：

[0071] 每个测试样品制备1mL 1％HuS的PBS溶液。向标记为1％HuS等分试样的1.5mL管中加入990μL PBS。将10μL人类血清加入到标记为1％HuS的管中。

[0072] 样品接收和制备：

[0073] 核实在结果通过当日已进行每日Guava检查。使用Guava PCA对测试小瓶进行细胞计数和成活力分析。记录所获得的平均细胞计数值。

[0074] 对于每个样品组，每个测试小瓶标记如下四个1.5mL微量离心管：“CD90”、“CD104”、“小鼠”(对应于小鼠IgG1同型对照)以及“大鼠”(对应于大鼠IgG2b同型对照)。

[0075] 使用平均细胞计数结果，计算用于等分的细胞的适当体积，以使得每个管接收1×10^5个活细胞。

[0076] 实例：

[0077] 如果平均活细胞计数结果记载为1.5×10^7个细胞/毫升，那么1×10^5除以1.5×10^7个细胞/毫升即为适当体积。此体积(mL)乘以1000以将单位转换成μL。

[0078] $1\times10^5/1.5\times10^7$个细胞/毫升＝0.0066mL×1000＝7μL细胞溶液等分试样。

[0079] 将足量FACS缓冲液加入到每个管中使得总体积将为1mL。

[0080] 实例：

[0081] 如果所加入的细胞溶液为7μL，那么从1mL或1000μL减去7μL。加入1000μL-7μL＝993μL FACS缓冲液。

[0082] 通过在涡旋设置8上连续涡旋3秒钟来混合测试小瓶。

[0083] 将适量细胞溶液加入到FACS缓冲液中。通过在涡旋设置8上连续涡旋3秒钟来混合。

[0084] 通过以3,000rpm离心3分钟使每个样品管中的细胞集结。如果难以形成集结粒，那么再次以3,000rpm使管离心3分钟。如果在第二次离心之后集结粒形成足够，那么继续进行上清液抽吸。借助于吸移管，将上清液抽吸到含有20％漂白剂的去离子水溶液的废物容器中。在每个管中留下约50μL上清液以使无意地抽吸细胞的情况降至最低。

[0085] 加入200μL 1％HuS的PBS溶液。通过在涡旋设置8上连续涡旋3秒钟来混合。

[0086] 在2-8℃下将管培育25分钟±5分钟。

[0087] 将5.0μL抗体或同型对照加入到各别管中。通过在涡旋设置8上连续涡旋3秒钟来混合。

[0088] 在2-8℃下将管培育25分钟±5分钟。避光。

[0089] 将800μL FACS缓冲液加入到每个管中。通过在涡旋设置8上连续涡旋3秒钟来混合。

[0090] 借助于吸移管，抽吸上清液并且在每个管中留下约50μL上清液以使无意地抽吸细胞的情况降至最低。加入400μL FACS缓冲液。通过在涡旋设置8上连续涡旋3秒钟来混合。

[0091] 使用GuavaPCA采集样品：

[0092] 打开CytoSoft 2.1.5并且点击主菜单中的“Guava Express”。点击“新数据集(New Data Set)”并且遵循屏幕命令来生成新文件。确保在用以采集Guava Express采集屏幕的部分的事件(Events To Acquiresection of the Guava Express Acquisition screen)中输入2000。调整关于小鼠IgG1同型对照的设置。在样品信息控制面板内输入样品部分、批次以及同型对照或抗体(例如“DR01200502001小鼠”)以标识样品ID字段中的每个样品。

[0093] 在涡旋设置8上使小鼠IgG1同型对照管连续涡旋3秒钟，将其装载到Guava PCA中并且点击“设置(Settings)”。将出现消息窗口，选择“调整设置(Adjust Settings)”。将出现另一个消息窗口，提示装载对照样品，选择“确定(OK)”。

[0094] 应出现“调整设置”屏幕并且系统将自动设置阈值以排除背景荧光。选择一个FSC增益强度(Gain intensity)以将规定细胞群集的中心定位在FSC相对于成活力(PM1)图(例如“x2”)的X轴上的右下方象限中在10e3之上。定位FSC相对于成活力(PM1)图上的FSC阈值条以排除碎片。

[0095] 将PM2调整到300V。将PM1调整到300-400V之间，以使得阴性对照群体定位在FSC相对于PM1以及PM1相对于PM2点阵图上的10e0与10e1之间。

[0096] 采集小鼠IgG1同型对照：

[0097] 在涡旋设置8上使小鼠IgG1同型对照管连续涡旋3秒钟，将其装载到Guava PCA中并且点击“采集下一个样品(Acquire Next Sample)”。确保将所有默认的门控选项设置成

非门控(ungated)。在PM1荧光相对于计数的柱状图上,在默认位置处设置标记。点击标记进行设置,以使得PM1门控样品的柱状图事件的百分比为约1.0%。

[0098] 采集CD90样品:

[0099] 在样品信息控制面板内输入样品部分、批次以及同型对照或抗体(例如"DR01200502001CD90")以标识样品ID字段中的每个样品。核实将PM1荧光标记设置成与小鼠IgG1同型对照样品相同的设置。

[0100] 调整关于大鼠IgG2b同型对照的设置:

[0101] 在涡旋设置8上使大鼠IgG1同型对照管连续涡旋3秒钟,将其装载到Guava PCA中并且点击"设置"。应出现"调整设置"屏幕并且系统将自动设置阈值以排除背景荧光。选择一个FSC增益强度以将规定细胞群集的中心定位在FSC相对于成活力(PM1)图(例如"x2")的X轴上的右下方象限中在10^3之上。定位FSC相对于成活力(PM1)图上的FSC阈值条以排除碎片。将PM2调整到300V。将PM1调整到300-400V之间,以使得阴性对照群体定位在FSC相对于PM1以及PM1相对于PM2点阵图上的10e0与10e1之间。

[0102] 采集大鼠IgG1同型对照样品:

[0103] 在涡旋设置8上使大鼠IgG1同型对照管连续涡旋3秒钟,将其装载到Guava PCA中并且点击"采集下一个样品"。将所有门控选项设置成非门控。在PM1荧光相对于计数的柱状图上,在默认位置处设置标记。点击标记进行设置,以使得PM1门控样品的柱状图事件的百分比为约1.0%。标记的位置以数值显示在"标记位置"框中。

[0104] 采集CD 104样品:

[0105] 在涡旋设置8上使CD 104管连续涡旋3秒钟,将其装载到GuavaPCA中并且点击"采集下一个样品"。核实将PM1荧光标记设置成与大鼠IgG1同型对照样品相同的设置。

[0106] 使用Guava PCA分析样品:

[0107] 点击"执行(Go)"从采集屏幕进行分析。点击"打印(Print)",接着点击"确定(OK)"。在每个印刷报告上签上姓名和日期。

[0108] 纯度计算:

[0109] PM1事件计数[用CD90(CD90)标记的总事件]-PM1事件计数[用抗CD90(小鼠IgG1)标记的总事件]=用CD90标记的总事件(针对背景/非特异性荧光归一化)(例如1918个事件-20个事件=1898个事件)。

[0110] PM1事件计数[用CD 104(CD 104)标记的总事件]-PM1事件计数[用抗CD 104(大鼠IgG2b)标记的总事件]=用CD 104标记的总事件(针对背景/非特异性荧光归一化)(例如31个事件-23个事件=8个事件)。

[0111] 用CD90标记的总事件(针对背景/非特异性荧光归一化)+用CD 104标记的总事件(针对背景/非特异性荧光归一化)=总归一化标记事件(例如1898个事件+8个事件=1906个事件)。

[0112] 如下计算纯度%:1898个总CD90事件/1906个总归一化标记事件×100=99.58,或100%。

[0113] 系统适宜性和规格:

[0114] 在开始分析之前必须进行成功的珠粒检查(Bead Check)。

[0115] 总粒子计数必须采集2000。

[0116] 所有样品的纯度百分比必须≥98％。

[0117] 替代的制造方法

[0118] 或者，可将细胞从T-175烧瓶(或替代物)或T-500烧瓶(或替代物)继代培养到含有微载体作为细胞生长表面的旋转烧瓶中。微载体为小珠状结构，它用作悬浮培养中的贴壁依赖性细胞的生长表面。所述微载体经过设计以在小体积中产生大细胞产量。

[0119] 在此设备中，将体积在50mL-300mL范围内的完全生长培养基加入到500mL、1L或2L无菌一次性旋转烧瓶中。将无菌微载体加入到旋转烧瓶中。在37±2.0℃以及5.0±1.0％ CO_2培育箱中使培养物保持静态或放置在处于低RPM(15-30RRM)下的搅拌板上较短的一段时间(1-24小时)以使得细胞粘附于载体。附着期之后，提高旋转板的速度(30-120RPM)。每一到五天或当根据颜色变化培养基似乎耗尽时为细胞供给新鲜的完全生长培养基。

[0120] 以有规律的时间间隔通过对微载体进行采样，分离细胞并且进行细胞计数和成活力分析来收集细胞。使用每个载体的细胞浓度来确定何时按比例放大培养。当产生足够的细胞时，用PBS洗涤细胞并且使用胰蛋白酶-EDTA从微载体中收集细胞，并且在更大量的微载体以及更大体积的完全生长培养基(300mL-2L)中接种回旋转烧瓶中。或者，可将额外的微载体以及完全生长培养基直接加入到含有现有微载体培养物的旋转烧瓶中，允许在不使用胰蛋白酶处理和重新接种的情况下进行细胞的直接珠粒间转移。或者，如果从初始T-175或T-500烧瓶中产生足够的细胞，那么可将细胞直接接种到按比例放大量的微载体中。

[0121] 附着期之后，提高旋转板的速度(30-120RPM)。每一到五天或当根据颜色变化培养基似乎耗尽时为细胞供给新鲜的完全生长培养基。当浓度达到预期适应症所需的细胞计数时，用PBS洗涤细胞并且使用胰蛋白酶-EDTA收集细胞。注射用药品的所有出厂测试、低温保存以及制备将遵循部分C和D中所述的工艺。

[0122] 一次性旋转烧瓶中所用的微载体可由以下材料制成：聚合物共混体(poly blend)，如BioNOC II®(赛宇生物工程公司(CescoBioengineering)，由贝尔克生物技术公司(Bellco Biotechnology)配送，瓦恩兰(Vineland)，新泽西州(NJ))以及FibraCel®(新布伦兹威克科学仪器公司(New Brunswick Scientific)，埃迪逊(Edison)，新泽西州(NJ))；明胶，如Cultispher-G(派赛尔生物公司(Percell Biolytica)，阿斯托(Astrop)，瑞典(Sweden))；纤维素，如Cytopore™(通用电气医疗健康集团(GE Healthcare)，皮斯卡塔韦(Piscataway)，新泽西州(NJ))；或经过涂布/未经过涂布的聚苯乙烯，如2D MicroHex™(能肯公司(Nunc)，威斯巴登(Weisbaden)，德国(Germany))；Cytodex®(通用电气医疗健康集团(GE Healthcare)，皮斯卡塔韦(Piscataway)，新泽西州(NJ))或Hy-Q Sphere™(赛默飞世尔科技公司(ThermoScientific Hyclone)，洛根(Logan)，犹他州(UT))。

[0123] 或者，可在聚合物共混体2D微载体(如BioNOC II®以及FibraCel®)上，使用自动波纹系统(如FibraStage™(新布伦兹威克科学仪器公司(New Brunswick Scientific)，埃迪逊(Edison)，新泽西州(NJ))或BelloCell®(赛宇生物工程公司(Cesco Bioengineering)，由贝尔克生物技术公司(Bellco Biotechnology)配送，瓦恩兰(Vineland)，新泽西州(NJ)))代替旋转烧瓶设备加工细胞。将细胞从T-175(或替代物)或T-500烧瓶(或替代物)继代培养到含有微载体和适当量的完全生长培养基的波纹瓶中，并且放置到系统中。所述系统将培养基泵送到微载体之上以对细胞进行供料，并且吸走培养基以允许在重复固定周期中进行氧化。以与上文所述相同的顺序对细胞进行监控，供料，洗涤并收集。

[0124] 或者，可使用自动化系统加工细胞。在消化活检体组织之后或在完成第一次继代培养(T-175烧瓶或替代物)之后，可将细胞接种到自动化装置中。一种方法为自动化细胞扩增(ACE)系统，它是一系列可商购的或专门制造的连接在一起形成细胞生长平台的组件，在所述平台中细胞可在无人为干预下扩增。细胞在细胞塔中扩增，所述细胞塔由能够支持贴壁依赖性细胞附着的圆盘堆叠组成。所述系统自动循环培养基且进行胰蛋白酶处理以便在完成细胞扩增阶段后加以收集。

[0125] 或者，可将ACE系统按比例缩小成单批次单元型式，其包含由以下组成的一次性组件：细胞生长表面、递送管道、培养基和试剂，以及安置用于加热/冷却、培养基转移以及执行自动化编程周期的机构以及计算机处理容量的永久基座。验收后，将每个经过无菌照射的ACE一次性单元从它的包装中打开并且通过悬挂预先填充的袋子并将袋子通过无菌连接器连接到现有管道来装载培养基和试剂。工艺如下继续进行：

[0126] 在生物安全柜(BSC)中，将来自已经过酶消化的活检体的细胞的悬浮液引入到已经填充有含有抗生素的起始生长培养基的“前生长腔室”(细胞塔顶部的小单元)中。将一次性物品从BSC转移到已处于适当位置处的永久ACE单元中。

[0127] 约三天后，对前生长腔室内的细胞进行胰蛋白酶处理并且引入到预填充有完全生长培养基的细胞塔本身中。此处，通过CO_2注射引起的“鼓泡作用”迫使培养基以使得细胞螺旋向下并且以均匀分布的方式沉降在圆盘表面上的速率循环。

[0128] 持续约七天，使细胞倍增。此时，检查汇合度(在写作当时方法未知)以核实培养物正在生长中。此时，还将完全生长培养基用新鲜的完全生长培养基替换。每七天替换CGM，持续三到四周。在培养期结束时，再一次检查汇合度以核实有充分生长，从而可能得到用于预期治疗的所需量的细胞。

[0129] 如果培养物充分汇合，那么就将其收集。从容器中排出耗尽的培养基(上清液)。接着将PBS泵送到容器中(用以洗涤培养基，来自细胞的FBS)并且几乎立即排出。将胰蛋白酶-EDTA泵送到容器中以使细胞从生长表面脱离。将胰蛋白酶/细胞混合物从容器中排出并且进入旋转分离器。将低温保存剂泵送到容器中以从圆盘表面冲洗去任何残余细胞，并且同样送到旋转分离器。旋转分离器收集细胞，接着使细胞均匀地再悬浮于运送/注射培养基中。从旋转分离器，细胞将通过自动化细胞计数装置发送或收集样品以通过实验室分析进行细胞计数和成活力测试。一旦已计数到特定数目的细胞并且已达到适当细胞浓度，即将所收集的细胞递送到收集小瓶中，可移出所述收集小瓶以将样品等分用于低温冷冻。

[0130] 或者，可使用自动化机器人系统在工艺的整个长度或在一部分中进行细胞供料、继代培养以及收集。可将细胞在消化并接种到T-175烧瓶(或替代物)中之后直接引入到机器人装置中。所述装置可具有培育细胞、进行细胞计数和成活力分析以及进行供料并转移到更大培养容器中的能力。所述系统还可以具有计算机化编目功能以追踪个别批次。对于机器人选项可使用现有技术或定制系统。

[0131] D.剂量单位

[0132] 用于制备最终剂量单位的冷冻小瓶装原料药由成纤维细胞组成，所述成纤维细胞是从最终培养容器中收集，调配成所需细胞浓度并且在冷冻小瓶中低温保存。将冷冻小瓶装原料药存储在由IMDM和Profreeze™加7.5％DMSO组成的低温保存培养基中，达到2.2×10^7个细胞/毫升的目标。在经历控制速率冷冻周期之后，将冷冻小瓶装原料药冷冻存储在

液氮冷冻器的气相中。

[0133] 将所收集的细胞汇集，在包括Profreeze、DMSO以及IMDM培养基的低温保存培养基中调配，等分到冷冻小瓶中，并且通过控制速率冷冻而作为冷冻小瓶装原料药材料冷冻存储在液氮中。

[0134] 对瓶盖和小瓶进行辐射灭菌并且从制造商处无菌接收。从冷冻存储中移出治疗所需要的所需体积的散装材料，解冻并汇集。用4×散装体积的PBS洗涤细胞并且以150×g离心10分钟(5±3℃)。此后通过再悬浮用4×散装体积的DMEM洗涤并且以150×g离心10分钟(5±3℃)。使经过洗涤的细胞再悬浮于不含酚红的DMEM中，达到1.0-2.0×10^7个细胞/毫升的目标浓度。或者，可用Hypothermosol®-FRS(美国生物科技公司(BioLifeSolutions)，巴萨尔(Bothell)，华盛顿州(WA))进行第二次4×洗涤以及最终再悬浮。接着在生物安全柜中将最终无菌冷冻小瓶容器手动填充到1.2毫升/容器的体积。在2-8℃下存储注射用药品直到在2-8℃下冷藏的运送器材中运送到投药场所为止。

[0135] 或者，可从低温存储中移出原料药小瓶并且直接运送到投药场所以供稀释和投药。在直接注射概念中，收集细胞并且制备用于在较高细胞浓度(3.0-4.0×10^7个细胞/毫升，与2.2×10^7个细胞/毫升的当前目标相比)下低温保存。在等待注射时，将冷冻的小瓶在干冰上或液氮杜瓦瓶(dewar)中运送到研究场所。在投药场所用手或用加热块将小瓶解冻，并且在研究场所使用典型的注射稀释剂对冷冻细胞进行1:1比率稀释，所述注射稀释剂如抑菌水、无菌水、氯化钠或磷酸盐缓冲盐水。或者，可使用DMEM作为稀释剂。此概念消除了对洗涤并制备新鲜的注射悬浮液用于连夜运送到研究场所的需要。

[0136] 或者，可将从烧瓶或细胞堆叠中新鲜收集的细胞在DMEM中调整到1.0-2.0×10^7个细胞/毫升的目标浓度，经历上文所述的所有散装收集物和冷冻小瓶装原料药测试，并且作为最终注射产品在2-8℃下冷藏的运送器材中连夜新鲜运送到投药场所。在此种情况下，可在收集上游进行无菌和支原体测试以在运送之前留有出结果的时间。

[0137] II.投药方法

[0138] A.制备剂量单位

[0139] azficel-T Azficel-T注射用药品由每个患者自身所生存的自体成纤维细胞调配在不含酚红的达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)中的悬浮液组成。Azficel-T成纤维细胞剂量调配物以两个2mL小瓶供应，每个小瓶含有1.2mL的1.0-2.0×10^7个细胞/毫升的药品。打算将无菌细胞悬浮液用于真皮内注射。最初，在由FDA规范Azficel-T成纤维细胞剂量调配物之前，Azficel-成纤维细胞剂量调配物的细胞剂量是基于由临床医师投予的细胞数。成功地使用每1.2-1.4mL注射液1.5-7.0×10^7个细胞的剂量范围。粘度成为浓度高于此范围的成纤维细胞剂量调配物注射液的问题。此剂量范围转换成1.1-5.8×10^7个细胞/毫升。

[0140] 在IND下进行的第一临床研究中，调配0.5-3.0×10^7个细胞/毫升。在第二临床研究中，调配1.0-3.0×10^7个细胞/毫升。所有后续临床研究的标准出厂规格为1.0-2.0×10^7个细胞/毫升。

[0141] 在稍后的临床研究IT-R-005和IT-R-006中，提供在两个2.0mL冷冻小瓶中的每个小瓶中调配成1.0-2.0×10^7个细胞/毫升的1.2mL成纤维细胞的溶液。在所提供的2.4mL中，打算将2.0mL用于以每线性厘米长度0.1mL的剂量注射，用于面部两侧总共20cm的最大预测鼻唇沟长度。打算过量0.2mL以确保可从小瓶中获得1.0mL，从而治疗至多10线性厘米长度

的鼻唇沟。

[0142] B.投予剂量单位

[0143] 将小瓶加温到室温并且轻轻倒置以使沉降的细胞再悬浮。使用配备有可拆卸针或固定针的小单位注射器从容器中抽出细胞悬浮液。推荐使用短而尖的针和小单位注射器(例如0.5mL胰岛素注射器)来实现较佳的注射控制并且降低发炎风险。产品的真皮内注射需要29号或30号针。然而,可使用具有更大孔的21号可拆卸针的注射器以帮助从容器中抽出产品。一旦抽出,即可将21号针切换成30号针并且投予产品。

[0144] 一个批次由三次注射治疗组成。对于治疗鼻唇沟皱纹,单次注射治疗(批次)需要两个含有1.2毫升/小瓶的azficelAzficel-T成纤维细胞剂量调配物的2mL小瓶。

[0145] C.待治疗的病状

[0146] 皮肤的老化过程由内在和外在两种因素引发。促成内在或自然老化的因素为结构性和功能性因素。在结构方面,表皮变得较薄,角质细胞粘附性较小并且真皮-表皮接合处变平。在功能方面,成纤维细胞的数目和生物合成能力减小并且真皮变得萎缩并且相对无细胞以及无血管。暴露于紫外光辐射是外在老化或光老化的主要原因。外在老化特征为弹性缺失、粗糙度和干燥度增加、不规则的色素沉着、深皱纹形成、革质外观、形成疱疤以及伤口愈合减退。可见的老化外观,尤其面部皱纹和沟,为患者设法要减少的常见结果。治疗面部纹路、皱纹以及沟的选项包括外科手术、神经毒素、填充剂、激光、非剥脱性疗法、微晶磨皮术(microdermabrasion)以及化学去皮。这些治疗中有许多在治疗老化征象中的安全性、功效以及作用持续时间方面有所不同。相信本文所述的调配物会增加真皮中产生胶原蛋白的细胞的数目,其可能对改善皮肤具有多因子作用。

[0147] 使用自体人类成纤维细胞来治疗轮廓畸形是由威廉K.波斯(William K.Boss),MD,哈肯萨克大学医学中心医学整形科副主席(Vice Chairman of the Department of Plastic Surgery at HackensackUniversity Medical Center)首创。他在真皮修复区域中所进行的工作始于1992年。他从患者手腕中移出一小片皮肤,培养来自活检体的自体成纤维细胞,将自体细胞注射到患者手腕皮肤中的皱褶中,并且观察到皱褶随着时间推移而消失。他连续数年观察所述区域并且注意到测试部位的皱褶保持被修正。对此单次治疗无不良反应。

[0148] 在1995年3月进行小型临床试验。最初,将自体培养的成纤维细胞分两到三次注射到约12名个体的所选皱皮和瘢痕中。追踪12个月之后,在每个个体中都注意到进行性的改善。波斯博士(Dr.Boss)和马科博士(Dr.Marko)报导了治疗超过100名患者,在超过2年半的观察期内未观察到过敏反应或不良反应的征象。在1995年12月,自体成纤维细胞在美国可商购得到。美国商业经历包括在皮肤学、面部整形外科以及再造整形外科领域中的约100名临床医师,他们治疗具有面部皱皮、瘢痕、唇部发育不全、烧伤以及其他问题的患者。报导了近1,000名患者的患者经历,其中354名被纳入到信息回顾报告的功效群体中。

[0149] 在加州大学洛杉矶分校(University of California Los Angeles,UCLA)对10名健康成人进行使用成纤维细胞悬浮液的真皮内注射用于治疗显著的面部皱皮以及凹陷的面部瘢痕的试点研究。以3周的时间间隔进行两(2)个注射期之后,十名患者中有九名注意到治疗实现的60-100%改善;临床医师观察到类似观察结果。通过光学测量(激光)证实所有经过治疗的畸形的尺寸减小10-85%。在显微镜下,有证据表明真皮层的厚度和密度增

加。

[0150] 研究已显示,将成纤维细胞悬浮液注射到真皮的轮廓缺陷中可使受损真皮和皮下组织得到修正。皮肤的真皮含有成纤维细胞,其主要负责分泌细胞外基质组分,如胶原蛋白和弹性蛋白,所述组分为皮肤提供机械强度和完整性。虽然确切的机理未知,但是成纤维细胞悬浮液含有自体成纤维细胞,所述成纤维细胞当注射到患者皮肤中时会增加细胞外基质组分的合成,由此增强皮肤完整性,最终使得细纹和皱纹减少。所述疗法的效果并非即时的,而是提供纹路和皱纹的外观随着时间推移的逐渐改善。

[0151] 成纤维细胞悬浮液最初在1995年由威廉波斯博士(Dr.WilliamBoss)进行的临床研究中评估,接着从1995年12月到1999年2月在美国作为面部轮廓畸形的美容治疗而投放市场。1999年2月之后,FDA被要求在PHS法案下规范所有体细胞疗法。

[0152] 依据成纤维细胞悬浮液将归入新的细胞和组织法规下的FDA通告,商业流通停止并且开始依据8641号新药研究申请(IND)进行临床开发。在两项II期研究(研究IT-R-001和IT-R-007)以及五项III期研究(研究IT-R-002、IT-R-003A、IT-R-003B、IT-R-005以及IT-R-006)中进行关于治疗面部皱纹和皱褶的研究。研究IT-R-003A、IT-R-003B、IT-R-005以及IT-R-006提供稳固的、受到良好控制的资料,其展示成纤维细胞悬浮液的安全性和功效概况。在痤疮瘢痕的治疗中研究成纤维细胞悬浮液(研究IT-A-008;13455号IND)。在研究IT-A-008期间99名个体接受成纤维细胞悬浮液治疗。亦开发成纤维细胞悬浮液用于其他适应症,包括治疗限制性烧伤瘢痕(13308号IND)、声带瘢痕(9892号IND)以及牙龈修复(10805号IND)。

[0153] 更早期的001和002试验提供支持性的探索性资料,其指导003A/B和005/006试验的设计。研究IT-R-001为成纤维细胞悬浮液用于治疗皱皮(治疗鼻唇和唇颊沟、口周纹、眉间纹、痤疮瘢痕以及前额)的II期双盲、随机化以及安慰剂对照的研究。在研究的急性期,每个个体接受成纤维细胞悬浮液(0.5×10^7、1.0×10^7或2.0×10^7个细胞/毫升)或安慰剂的三次治疗,投药间隔约两周。在研究的急性期个体(40)用成纤维细胞悬浮液(N=30)或安慰剂(N=10)治疗。

[0154] 研究IT-R-002为成纤维细胞悬浮液用于治疗面部轮廓畸形和瘢痕的III期双盲、随机化以及安慰剂对照的研究。在此研究的急性期,每个个体接受含有2.0×10^7个细胞/毫升的成纤维细胞悬浮液或安慰剂的三次治疗,每14±7天进行投药。在研究的急性期个体(151)用成纤维细胞悬浮液(N=112)或安慰剂(N=39)治疗。在两个研究中,在试验的急性期个体(213)用成纤维细胞悬浮液(N=100)或安慰剂(N=113)治疗。

[0155] 虽然研究IT-R-003B对两个联合初级终点显示出功效,但是研究IT-R-003A中的一个联合初级终点未能满足统计显著性准则(对于研究者评估),因而产生两个新的方案作为成纤维细胞悬浮液的关键III期试验(研究IT-R-005和IT-R-006)。相信003A中错失终点的原因在于包括了次最佳的给药。细胞浓度保持相同,但是所递送的体积增加。鉴别出其他原因,包括培训技术以及一系列注射之间的时间。

[0156] 研究IT-R-005和IT-R-006为成纤维细胞悬浮液在治疗鼻唇沟皱纹中的功效和安全性的III期多中心、双盲、随机化、安慰剂对照的研究。依据服从FDA SPA协议的相同方案进行这些研究。在这些研究的急性期,每个个体接受含有$1.0\text{-}2.0\times10^7$个细胞/毫升的成纤维细胞悬浮液或安慰剂的三次治疗,每5周±1周进行投药。在研究IT-R-005中,83名个体用

成纤维细胞悬浮液治疗并且92名个体用安慰剂治疗。在研究IT-R-006中，98名个体用成纤维细胞悬浮液治疗并且99名个体用安慰剂治疗。

[0157] 研究IT-R-007为成纤维细胞悬浮液在治疗面部皱纹和皱褶中的安全性和功效的II期多中心、开放标记研究，所述研究经过设计以获得关于使用成纤维细胞悬浮液用于除鼻唇沟以外的用途的安全性和功效资料。在此研究的急性期，每个个体接受至多6mL的含有1.0-2.0×10^7个细胞/毫升的成纤维细胞悬浮液的两次治疗，每5周±10天进行投药。在研究的急性期期间，45名个体用成纤维细胞悬浮液治疗。此研究将个体暴露于总剂量为005/006研究中所用的总剂量的三倍的成纤维细胞悬浮液。

[0158] 入选到成纤维细胞的III期关键功效试验，即研究IT-R-005和IT-R-006(005/006)中的个体群体主要为年龄在50岁与60岁之间的女性白种人。个体年龄在23-82岁的范围内，平均年龄为56.1岁。入选到研究中时个体的鼻唇沟皱纹的严重程度在评估者皱纹严重程度评估量表上的3-5级范围内，右侧皱纹的平均评分为3.7并且左侧皱纹的平均评分为3.6。

[0159] 入选到III期IT-R-003A和IT-R-003B(003A/B)研究中的群体类似于005/006中的群体。女性占003A/B研究中群体的94％并且群体的95％为白种人。在两项研究中个体的平均年龄为54.1岁。虽然003A/B方案在设计方面极类似于005/006方案，但是003A/003B允许皱纹严重程度在更宽范围内的个体入选，在入选时初级鼻唇沟畸形的评分在评估者量表上的2-5级范围内，但是平均严重程度评分类似地为3.9。

[0160] 所有关键功效研究都使用由个体自我评估手段以及临床研究者进行的评估组成的联合初级终点。

[0161] 在005/006研究中，联合初级功效终点为：个体皱纹评估：使用5点皱纹评估量表在随访6时对面部下端部分的皱纹进行的个体活动期综合评估，其中反应定义为与基线相比时量表上两个点或更佳的改善。

[0162] 评估者皱纹严重程度评估：使用6点顺序皱纹严重程度量表使用光导在随访6时对静止状态的两侧鼻唇沟皱纹进行的不知情评估者活动期评估，其中反应定义为与基线相比量表上两个点或更佳的改善。选择这些终点以提供公正评估(由不知情医师评级)以及临床相关性(个体对其自身外貌的看法)。评估者皱纹严重程度评估所用的量表为用于评估鼻唇沟(NLF)的6点顺序皱纹严重程度量表，所述量表由蓝博(Lemperle)等人，整形和再造外科学(Plast Reconstr Surg.)2001108(6):1735-50开发并验证。蓝博量表(Lemperle scale)已经过验证以检测鼻唇沟皱纹的严重程度的一个点的改善。然而，因为外观的评估可能是主观的并且倾向于可变化，因此此终点的成功定义为每个NLF的两个点的改善，即，对于指定患者，左侧与右侧NLF在评估者的评估中都必需有两个点的改善以便被视为反应者。蓝博量表为皮肤学领域中公认的度量标准，且已成功地用于经过FDA批准的产品在类似适应症中的关键临床试验中。

[0163] 个体皱纹评估所用的量表是基于由科恩(Cohen)和霍姆斯(Holmes)，整形和再造外科学(Plast Reconstr Surg.)200415;114(4):964-76使用的公开量表。如同评估者评估一样，确立两个点的改善作为对治疗的成功反应的准则。

[0164] 003A/B研究经设计成具有类似的联合初级终点，但是使用不同于005/006研究的个体评估工具。如003A/B方案中所规定。联合初级功效终点为使用研究者的6点顺序量表以及个体的VAS评估在6个月随访时在初级鼻唇沟中成纤维细胞剂量调配物注射液的功效。

[0165] 方案中所提及的6点顺序量表为005/006研究中所用的相同蓝博量表，不过005/006研究为量表上的每个点提供比003A/B研究中所用的更具描述性的文本。视觉类比量表用于个体评估。此量表要求个体通过在10cm线上放置记号而将每个轮廓畸形从0(无缺陷)到100(极严重缺陷)分级。虽然两项研究使用此评估工具都满足改善的统计显著性，但是在005/006研究中VAS量表用顺序个体皱纹评估量表替换以改善个体评估资料的临床相关性以及可解释性。

[0166] 005/006两项研究的结果展示IT治疗的个体与安慰剂治疗的个体之间的反应有极其显著的差异，如两个联合初级终点所度量。

[0167] 在003A/B研究中，对于四个终点中的三个终点观察到IT治疗的个体与安慰剂治疗的个体之间的反应的统计显著差异。在研究IT-R-003A中，IT治疗的个体通过评估者评估而评为反应者的百分比高于安慰剂治疗的个体，但是差异并不满足统计显著性。

[0168] 使用相同研究方案同时进行研究IT-R-005和IT-R-006，因此在研究设计方面没有差异。还在独立的方案下同时进行研究IT-R-003A和IT-R-003B。尽管如此，在每个研究组内结果仍有差异。在005/006研究中成功地满足所有初级终点，但是其中005研究报导了在成纤维细胞悬浮液治疗组中的反应者比率对于个体和评估者评估分别为57％和33％，006研究报导了反应者比率对于相同量度为46％和19％。在003A研究中，在评估者评估中IT治疗组中21％的个体被评为反应者，而在成纤维细胞剂量调配物组中48％的个体根据此量度在研究IT-R-003B中有反应。

[0169] 在005/006研究中，在两个试验之间的患者人口统计(性别、种族、年龄或基线严重程度)方面没有显著差异。然而，在每个研究内在部位之间观察到反应率的可变性。随后，对参与的所有研究者进行培训以使用相同技术进行鼻唇沟注射，且期望证明他们可以产生如对于注射到乳头状真皮中所期望产生的“水疱”。此在IT-R-003试验之前不进行。还观察到评估方法的差异。部位差异当与这些观察结果相结合时得出结论：部位之间的许多不一致性可能由于在注射技术与评估方面都缺乏普通培训而引起。

[0170] 在回顾并分析来自003A/B研究的资料之后设计005/006研究。作为此回顾的结果，与003A/B研究相比作出许多修改以设计005/006方案。表6中提供可能促成观察到的初级终点结果的差异的修改的概述。

[0171] 剂量和给药方案的影响

[0172] 面部皱皮和鼻唇沟

[0173] 用于治疗鼻唇沟的所选剂量(至多2mL的1.0-2.0×10^7个细胞/毫升，每线性厘米长度投予0.1mL)不但基于在IND 8641下进行的临床试验中产生的资料，而且基于在美国和国外通过商业上使用成纤维细胞剂量调配物所获得的信息。研究IT-R-001为安慰剂对照的II期剂量范围研究，其评估0.5、1.0以及2.0×10^7个细胞/毫升的成纤维细胞悬浮液(每线性厘米长度0.1mL)相对于安慰剂在治疗面部皱皮中的安全性和初步功效。在最高剂量组(2.0×10^7个细胞/毫升)中，基线到初始注射之后四个月(研究IT-R-001的初级功效时间点)得到最佳结果。因此，此为所有后续研究中所用的细胞密度。

[0174] 在003A/B研究中，每线性厘米长度的剂量与针对此适应症的其他azficel-T成纤维细胞剂量调配物研究中所用的剂量相同(每线性厘米长度0.1mL)。然而，每个治疗的总剂量在总共10cm的总治疗区域上被限制为1mL。此差异是因为研究003A/B不可用于治疗有时

称为近中唇沟皱纹的皱纹，其为从嘴角朝下巴向下延伸的沟或皱纹。在005/006中将总剂量增加到2mL，以允许治疗近中唇沟皱纹，因为它常常与鼻唇沟皱纹相连并且因此为促成整体审美效果的组分。虽然所允许的总剂量并不是003A/B方案与005/006方案之间的唯一差异，但是所投予的产品体积的此增加被视为从005/006研究获得的成功结果的促成因素。

[0175] 基于研究者从003A/B研究提供的反馈以及005/006试验的结果来确定5周±1周的推荐给药时间间隔。003A/B研究者建议使用艾斯丽质(Isolagen)，它在那些研究中的治疗之间的时间(7到14天)不足以允许由一次注射诱发的发炎在施予下一次注射之前消退。此发炎持续时间只有在注射过程中才被注意到并且未被报导为不良事件。当在方案所允许的更长时间间隔下施予连续注射时，研究者报导注射部位更有可能似乎更接近于正常皮肤，此引起对注射深度和体积的更大控制。此使得在005/006研究中延长注射之间的时间间隔，首先延长到4周，接着延长到5周±1周。此变化也被视为成功的005/006研究结果的促成因素。

[0176] 在005/006研究中对意向治疗群体(Intent to Treat Population)的初级功效分析评估成纤维细胞悬浮液与安慰剂治疗组之间的治疗反应，如联合初级功效终点所度量。对于随访6时的评估者皱纹严重程度评估(联合初级功效终点)，26％的IT随机化个体相对于7％的安慰剂随机化个体显示两侧鼻唇沟皱纹有两个点的改善。当只将实际上接受成纤维细胞剂量调配物或安慰剂的至少一次治疗的那些个体纳入到分析中(修正型意向治疗(MITT)群体)时，在评估者皱纹严重程度评估上两个点反应的百分比在IT治疗的个体中为30％，相比之下安慰剂治疗的个体为8％。在评估者皱纹严重程度评估上MITT群体中的一个点反应率在成纤维细胞剂量调配物治疗的个体中为64％并且在安慰剂治疗的个体中为36％。最后，在使用IT时所观察的微秒的作用起始的示范中，由评估者和个体对功效进行的照相评估显示在IT治疗的个体与安慰剂治疗的个体之间的治疗反应中有高度统计显著差异。当评估者将基线时获取的个体照片与最后功效随访时获取的照片并列比较时，MITT群体中57％的IT治疗个体以及此群体中只有20％的安慰剂治疗个体被评为有改善。在个体的照相评估(个体改善评估)上，当个体将其自身的基线照片与在最后功效随访时获取的照片比较时，67％的IT治疗个体以及26％的安慰剂治疗个体显示出改善。使用此评估手段所获得的反应率相比于活动期评估结果有所增加，显示微秒的、逐渐的作用起始，其在将外观与基线比较之前可能不为个体或评估者所显见。

[0177] 总之，出于上文所论述的原因，用于治疗鼻唇沟皱纹的优选剂量为在每个治疗期将1到2mL的剂量调配物以每线性厘米长度0.1mL的剂量分布注射到皱纹的浅表乳头状真皮中，优选持续三个治疗期，隔开五周加减七到十天。

[0178] 用于治疗多个面部区域(即“全面部”)中的皱皮的优选剂量为在每个治疗期将5到6mL的剂量调配物根据图4中的治疗图以每线性厘米长度0.05mL的剂量分布注射到浅表乳头状真皮中，优选持续一个或两个治疗期，隔开五周加减七到十天。

[0179] 痤疮瘢痕

[0180] 可使用经过验证的方法以及医师客观评估的痤疮瘢痕严重程度的活动期分级的量表，即“评估者活动期痤疮瘢痕评估量表”来确定用于治疗痤疮瘢痕的适当剂量，所述量表采用在直接和切线照明下相对瘢痕外观的比较性评估，参考图2。

[0181] 表1.评估者活动期痤疮瘢痕评估量表

[0182]

等级	术语	描述
0	透明	在治疗区域中未见凹陷。可见黄斑部变色。
1	极轻微	在直接照明下可容易地注意到单个凹陷（深）。所见的大多数或所有凹陷只有在切线照明下才显而易见（浅）。
2	轻度	在直接照明下可容易地注意到极少到数个、但少于一半的所有凹陷（深）。所见的大多数凹陷只有在切线照明下才显而易见（浅）。
3	中度	多于一半的凹陷在直接照明下显见（深）。
4	重度	在直接照明下可见所有或几乎所有伤痕（深）。

[0183] 由林顿(Layton)等人在利兹总医院(Leeds General Infirmary)进行的研究中，通过萎缩性和肥厚性/瘢痕瘤性瘢痕的伤痕计数来评估痤疮瘢痕的严重程度。萎缩性瘢痕-形态上定义为黄斑部萎缩性或滤泡性黄斑部萎缩性冰锥状物-转化为1到6范围内的评分，分别代表1-5个、6-10个、11-25个、26-50个、51-100个以及多于100个瘢痕。冰锥状瘢痕描述为具有不规则边沿、锯齿状边缘以及尖锐边界的瘢痕，其陡峭的侧边通向纤维性基底。黄斑部萎缩性瘢痕为柔软而可扩大的，其中基底常常容易皱褶。滤泡性黄斑部萎缩性瘢痕描述为小的白色滤泡周丘疹或斑丘疹。作者因为瘢痕瘤性和肥厚性瘢痕较大程度的损形而各别地对其进行定量。2、4以及6的评分配置分别代表1到3个、4到7个或多于7个此类型瘢痕。瘢痕瘤性瘢痕描述为坚硬的并且延伸超出起始发炎性痤疮伤痕的边界的瘢痕，而肥厚性瘢痕定义为较少凸起并且适应初级痤疮伤痕的区域。接着通过加上来自萎缩性和肥厚性种类的评分来获得总瘢痕评分。此类总评分可各别地针对面部、胸部以及背部来计算以提供用于瘢痕评估的综合系统，并且还提供用于评估有效剂量和治疗方案的方式。

[0184] 在优选实施例中，通过在每个治疗期将2到12mL的成纤维细胞剂量调配物以每平方厘米瘢痕区0.1mL的剂量分布注射到浅表乳头状真皮中来治疗痤疮瘢痕，持续一到三个治疗期，隔开十四天加减三天。

[0185] 烧伤

[0186] 到达深层真皮的烧伤的潜在严重的长期后果为损伤后瘢痕。因严重烧伤而形成限制性瘢痕可能阻碍受影响区域的正常活动并且限制活动范围(弯曲、内收及/或伸展)。事实上，“影响功能的烧伤瘢痕和挛缩仍为烧伤最让人沮丧的后期併发症”(乌加乌(Iwuagwu)，整形和再造外科学(Plast Reconstr Surg.)1999年4月;103(4):1198-204)。这些瘢痕可通过引起疼痛以及功能性降低而对生活质量有显著的负面影响。视位置而定，限制性烧伤瘢痕可能引起上肢的显著损伤以及功能丧失。成纤维细胞剂量调配物尤其适用于治疗上肢的限制性烧伤瘢痕，具体来说降低个体所经历的损伤以及相关残疾的程度。

[0187] 用于治疗限制性烧伤瘢痕的优选剂量为在每个治疗期将1到10mL的剂量调配物以每平方厘米瘢痕区0.1-0.5mL的剂量分布注射到经过触诊的限制带中，优选地持续一到五

次治疗,隔开二到六周。

[0188] 来自英国的病例报告,其中可使用先前可用的成纤维细胞调配物,显示成功用于烧伤瘢痕和伤口而无不良作用。

[0189] 伦敦的克里斯·英格尔菲尔德博士(Dr.Chris Inglefield)报导了在颈部、下面部、眼睛和耳朵的部分有多处烧伤的男性的病例。所述个体先前已接受成纤维细胞调配物用于面部皱皮并且因此在他被烧伤之时存储细胞。此使得他能够在他初始受伤的六周内接受面部烧伤治疗。他在受伤之后三个月成功地接受三次额外治疗。每次治疗都在局部麻醉下进行并且包含通过30-40次注射所给予的3-4ml细胞。个体先前已用皮肤移植治疗。所述个体在首次治疗的三周内报告他的面部和颈部的活动有所改善并且他的皮肤的肌理和柔韧性有所改善。

[0190] 印第安纳大学的W.格雷戈里·切尔诺夫博士(Dr.W.GregoryChernoff)也已经在十个难愈合性激光烧伤伤口中使用成纤维细胞调配物。尽管这些伤口在用成纤维细胞治疗之前持续三到九个月未愈合,但是他注意到在最终注射细胞之后六周完全愈合(波斯(Boss)等人,2000临床整形外科学(Clinical Plastic Surgery)27:613-626)。

[0191] 在美国,两名烧伤受害者已经从以赠送方式使用的成纤维细胞调配物中获益,他们的难愈合性烧伤伤口有很大改善。奥克拉荷馬市爆炸案(Oklahoma City Bombing)的受害者悲惨地在爆炸中留下瘢痕。在持续数月的外科手术、激光重修表面以及其他治疗以挽救她的生命并且改善她的外貌之后,用成纤维细胞对她进行治疗以帮助已失败的皮肤移植以及还留在她面部和颈部的其他难愈合性伤口。治疗后,难愈合性伤口闭合并愈合。另外,她注意到她的瘢痕外观有所改善。

[0192] 以赠送方式使用为基础,用成纤维细胞调配物治疗因激光烧伤而在前额和颧骨区上具有12个难愈合性伤口的另一名个体。她在被治疗时的唯一替代物为牛皮移植物。在治疗后,大多数伤口在注射六周内愈合。

[0193] 以下病例报告表明成纤维细胞调配物可能不只是改善亚急性或愈合性烧伤伤口,而且还改善长久存在的已良好愈合但使人衰弱的限制性烧伤瘢痕。

[0194] 英国伦敦的克里斯·英格尔菲尔德博士(Dr.Chris Inglefield)报导了在呈递之前两年持续具有多处烧伤的一名女性的病例,导致较大的面部瘢痕,限制了她左侧面部的表情。个体的损伤具有严重的负面心理后果并且她感觉到已经“丧失了自我”。所述个体的面部接受三次治疗,每次3mL。在六到八周内,所述个体、她的家人以及治疗医师注意到显著的改善,使得她的母亲感觉到她的大女儿“回来了”。她面部活动的能力和皮肤肌理以及外观一样都有改善。同一个体接着在她的手部接受针对收缩性瘢痕以及难愈合性伤口的疗法。在疗法之前,个体在她的珠宝制作过程中难以操控小的物体。在治疗之后的四周内,伤口已愈合并且她执行珠宝制作任务的能力改善。

[0195] 英国利兹的马克·帕尔默博士(Dr.Mark Palmer)报导了针对颈部、肩部以及上臂上持续10年的长期伤口进行治疗的另一名个体。在治疗之前,个体的颈部和肩部的活动范围严重受限并且她的长期疼痛需要每天用鸦片剂止痛。所述个体在她的颈部区域中接受总共两次4mL治疗。甚至在首次治疗之后,个体便报告活动范围以及皮肤肌理有所改善。通过第二次治疗,个体的活动范围接近正常并且注意到瘢痕外观和肌理的惊人变化。

[0196] 同一个体随后接受上臂瘢痕的治疗。在治疗之前,这些瘢痕已严重致残,使得她由

于疼痛而不能举起她的手臂超过90°。在对两个收缩性瘢痕带进行单次治疗(每个带1.5mL)之后截止到三个月,瘢痕已经几乎消失并且个体已恢复180°的活动范围而没有疼痛。

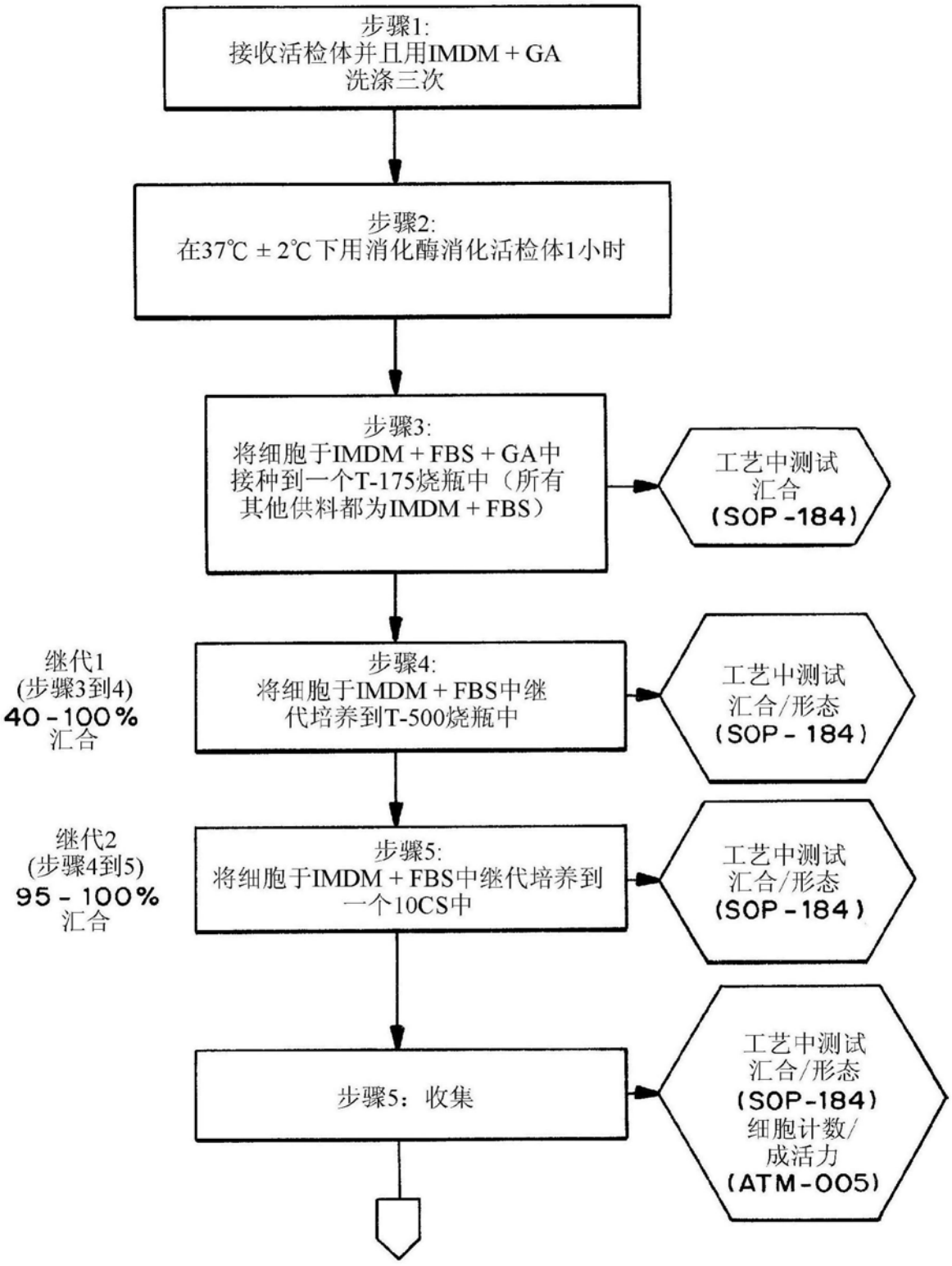

步骤1:
接收活检体并且用IMDM + GA
洗涤三次
步骤2:
在37℃ ± 2℃下用消化酶消化活检体1小时
步骤3:
将细胞于IMDM + FBS + GA中
接种到一个T-175烧瓶中（所有
其他供料都为IMDM + FBS）
工艺中测试
汇合
(SOP-184)
继代1
(步骤3到4)
40 - 100%
汇合
步骤4:
将细胞于IMDM + FBS中继
代培养到T-500烧瓶中
工艺中测试
汇合/形态
(SOP - 184)
继代2
(步骤4到5)
95 - 100%
汇合
步骤5:
将细胞于IMDM + FBS中继代培养到
一个10CS中
工艺中测试
汇合/形态
(SOP-184)
步骤5：收集
工艺中测试
汇合/形态
(SOP-184)
细胞计数/
成活力
(ATM-005)

图1

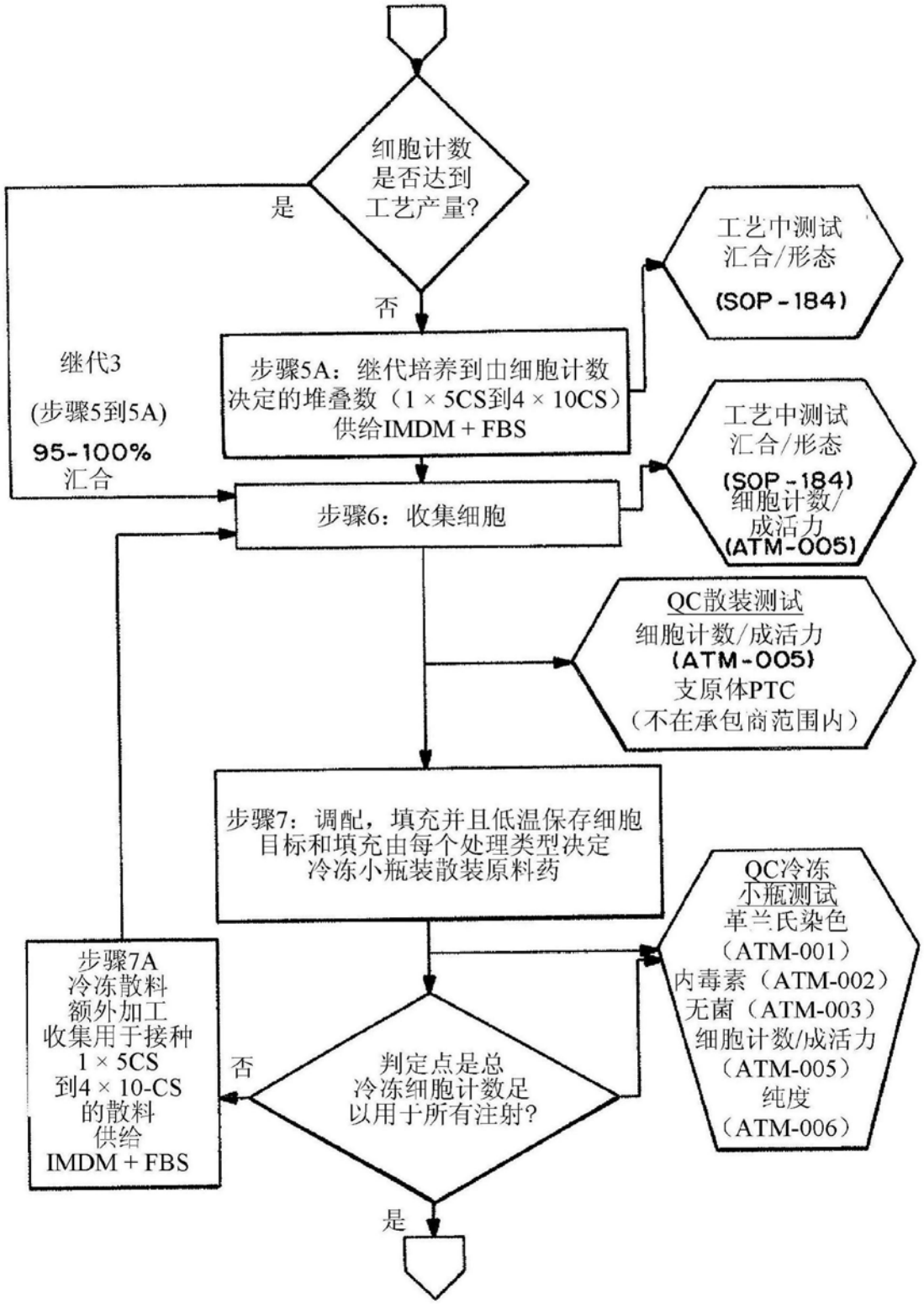

细胞计数
是否达到
工艺产量?
是
否
继代3
(步骤5到5A)
95-100%
汇合
步骤5A：继代培养到由细胞计数
决定的堆叠数（1 × 5CS到4 × 10CS）
供给IMDM + FBS
工艺中测试
汇合/形态
(SOP-184)
工艺中测试
汇合/形态
(SOP-184)
细胞计数/
成活力
(ATM-005)
步骤6：收集细胞
QC散装测试
细胞计数/成活力
(ATM-005)
支原体PTC
（不在承包商范围内）
步骤7：调配，填充并且低温保存细胞
目标和填充由每个处理类型决定
冷冻小瓶装散装原料药
步骤7A
冷冻散料
额外加工
收集用于接种
1 × 5CS
到4 × 10-CS
的散料
供给
IMDM + FBS
否
判定点是总
冷冻细胞计数足
以用于所有注射?
是
QC冷冻
小瓶测试
革兰氏染色
（ATM-001）
内毒素（ATM-002）
无菌（ATM-003）
细胞计数/成活力
（ATM-005）
纯度
（ATM-006）

图1(续)

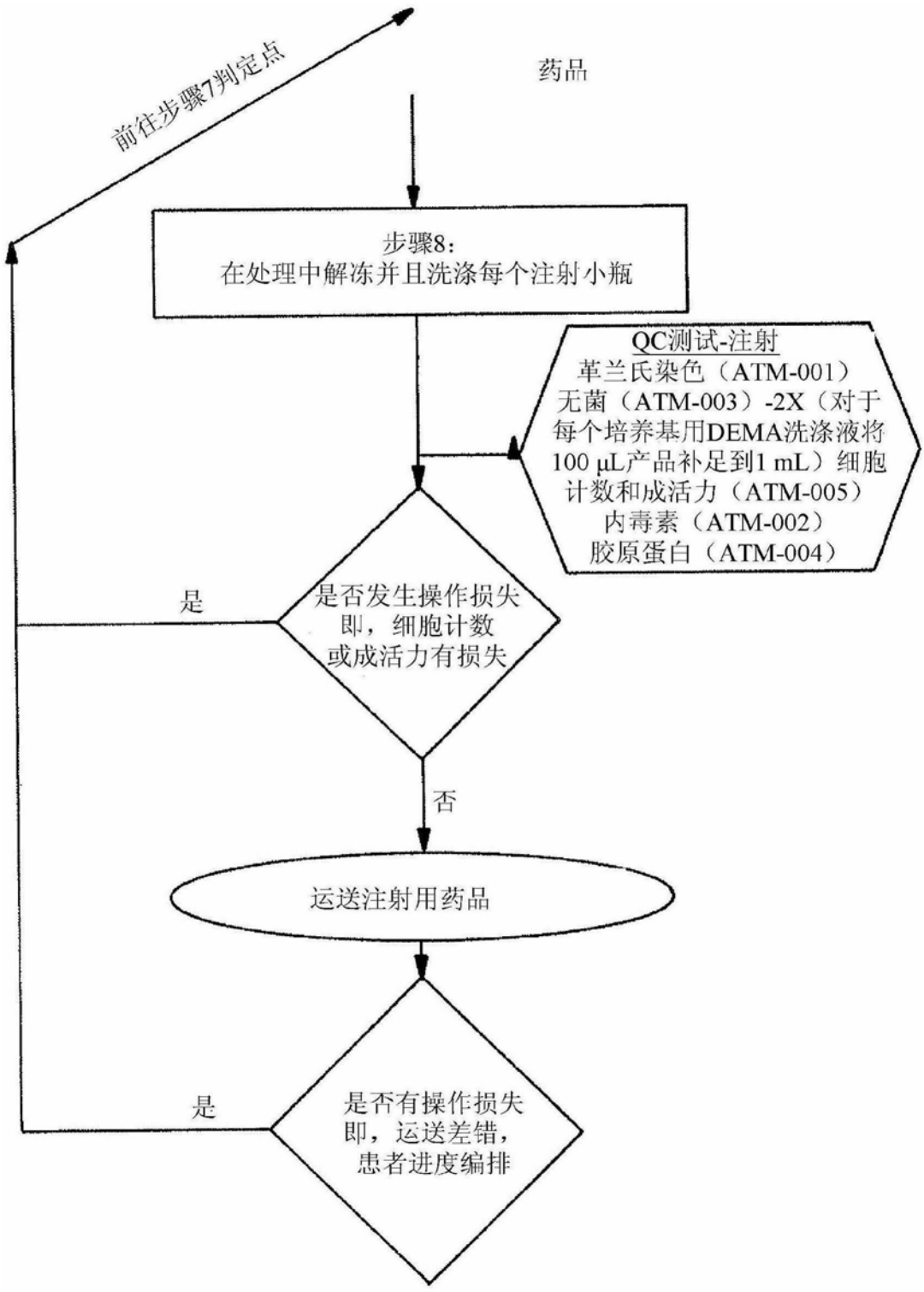

前往步骤7判定点
药品
步骤8：
在处理中解冻并且洗涤每个注射小瓶
QC测试-注射
革兰氏染色（ATM-001）
无菌（ATM-003）-2X（对于每个培养基用DEMA洗涤液将100 μL产品补足到1 mL）细胞计数和成活力（ATM-005）
内毒素（ATM-002）
胶原蛋白（ATM-004）
是否发生操作损失
即，细胞计数
或成活力有损失
是
否
运送注射用药品
是否有操作损失
即，运送差错，
患者进度编排
是

图1(续)

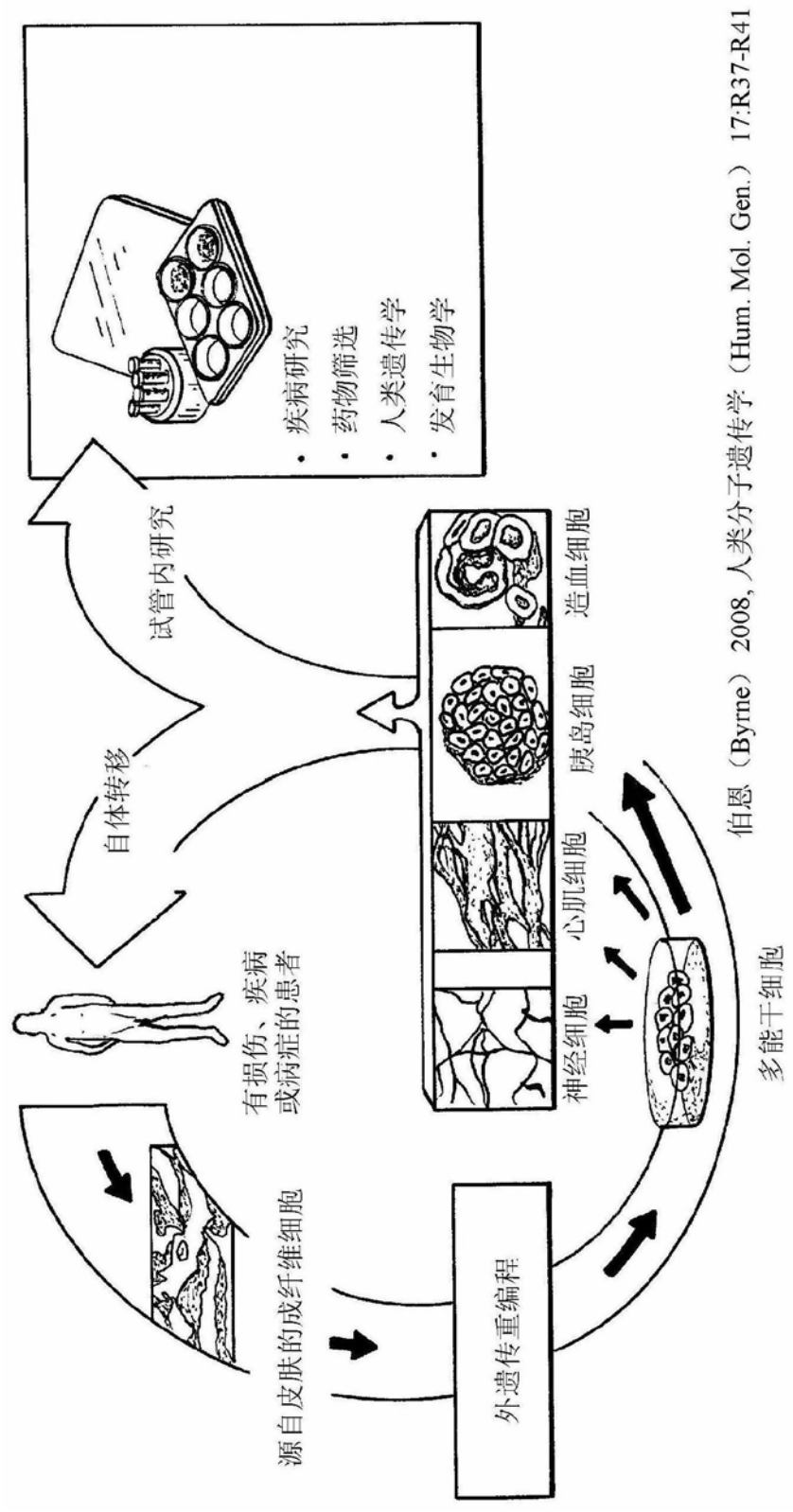

伯恩（Byrne） 2008,人类分子遗传学（Hum. Mol. Gen.） 17:R37-R41
多能干细胞
外遗传重编程
源自皮肤的成纤维细胞
有损伤、疾病
或病症的患者
自体转移
试管内研究
神经细胞
心肌细胞
胰岛细胞
造血细胞
• 疾病研究
• 药物筛选
• 人类遗传学
• 发育生物学

图2

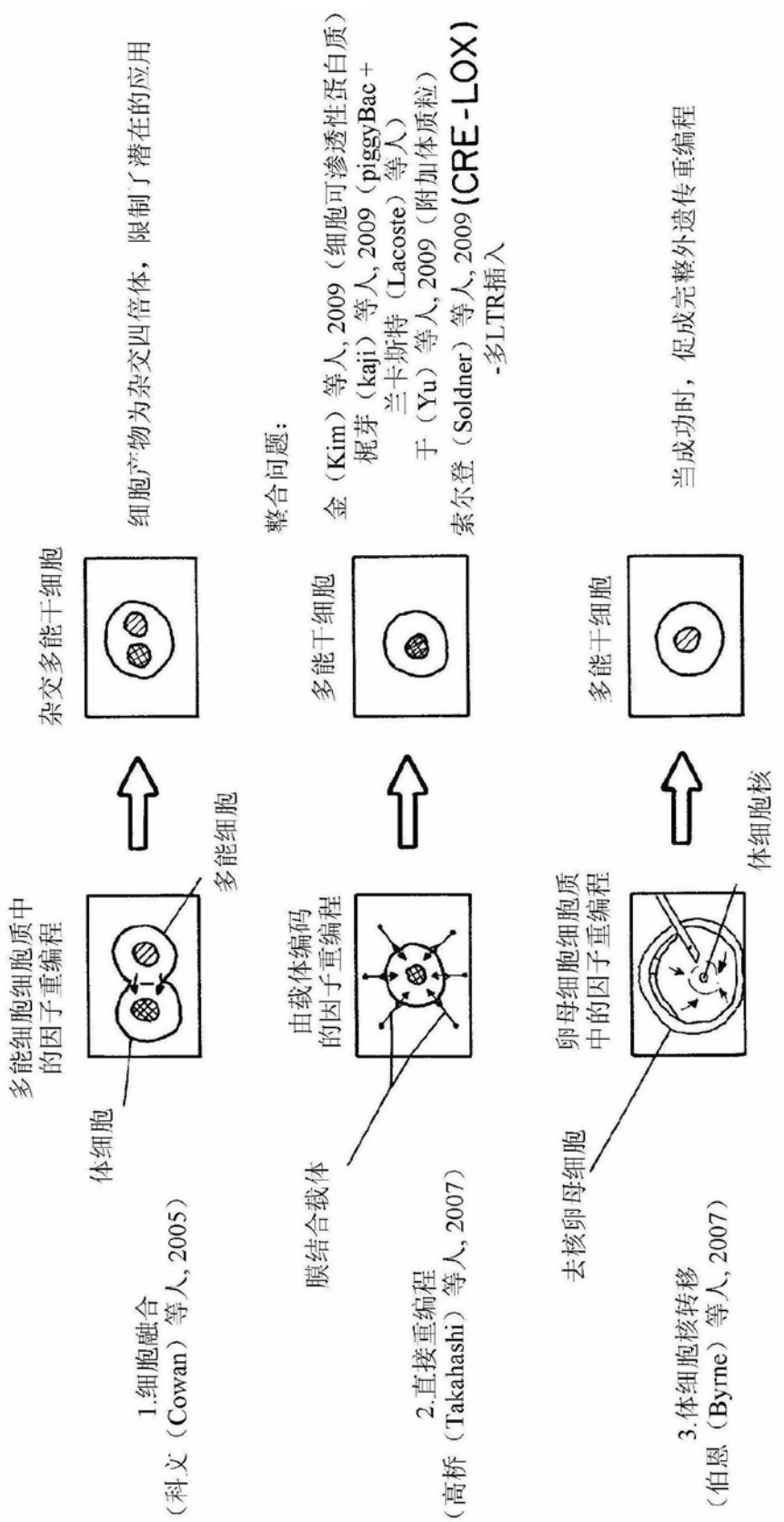

多能细胞细胞质中
的因子重编程
体细胞
多能细胞
1.细胞融合
（科义（Cowan）等人, 2005）
杂交多能干细胞
细胞产物为杂交凹倍体，限制了潜在的应用
由载体编码
的因子重编程
膜结合载体
2.直接重编程
（高桥（Takahashi）等人, 2007）
多能干细胞
整合问题：
金（Kim）等人, 2009（细胞可渗透性蛋白质）
梶芽（kaji）等人, 2009（piggyBac +
兰卡斯特（Lacoste）等人）
于（Yu）等人, 2009（附加体质粒）
索尔登（Soldner）等人, 2009 (CRE-LOX)
-多LTR插入
卵母细胞细胞质
中的因子重编程
去核卵母细胞
3.体细胞核转移
（伯恩（Byrne）等人, 2007）
体细胞核
多能干细胞
当成功时，促成完整外遗传重编程

图3

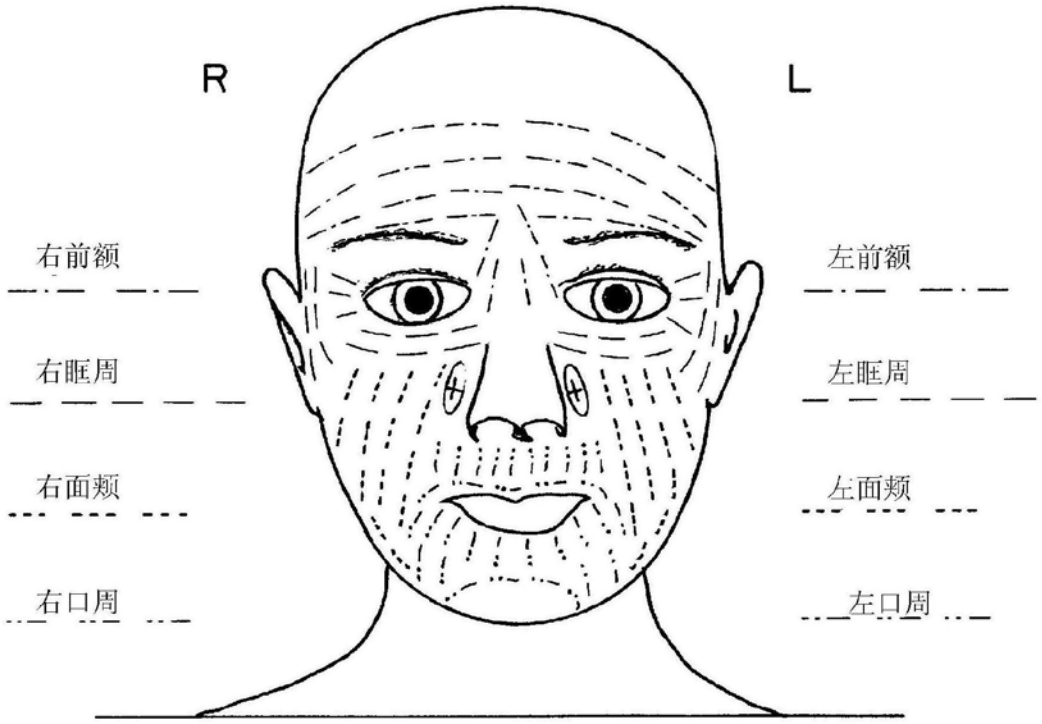


图4