

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)公表特許公報(A)

(11)公表番号  
特表2023-517543  
(P2023-517543A)

(43)公表日 令和5年4月26日(2023.4.26)

(51)国際特許分類		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17 4 C 0 8 3
A 6 1 P	19/00 (2006.01)	A 6 1 P	19/00 4 C 0 8 7
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02
A 6 1 P	27/00 (2006.01)	A 6 1 P	27/00
A 6 1 P	17/14 (2006.01)	A 6 1 P	17/14

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全22頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-553068(P2022-553068)	(71)出願人	522350232 ノヴィステム ソシエタ ペル アチオニ NOVYSYSTEM S.P.A. イタリア国 20129 ミラノ ヴィアレ ピアヴェ 21
(86)(22)出願日	令和3年3月5日(2021.3.5)	(74)代理人	100123788 弁理士 宮崎 昭夫
(85)翻訳文提出日	令和4年10月20日(2022.10.20)	(74)代理人	100127454 弁理士 緒方 雅昭
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/055552	(72)発明者	エラティコ、 シルヴィア イタリア国 20129 ミラノ ヴィアレ ピアヴェ 21 ノヴィステム ソシエタ ペル アチオニ内
(87)国際公開番号	WO2021/176035	(72)発明者	オーランディ、 マッシモ イタリア国 20129 ミラノ ヴィアレ 最終頁に続く
(87)国際公開日	令和3年9月10日(2021.9.10)		
(31)優先権主張番号	20161201.7		
(32)優先日	令和2年3月5日(2020.3.5)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁(EP)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA( AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 創傷治癒および組織再生に有用な血液製剤

## (57)【要約】

本発明は、血小板およびリンパ球に富む血漿からなる血液製剤、創傷治癒および身体組織再生のためのその使用、それを含有する医薬組成物および化粧品組成物、ならびにその調製方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

血小板およびリンパ球に富む血漿からなる単離された血液製剤であって：

$110 \times 10^6 / \text{ml} \sim 330 \times 10^6 / \text{ml}$ 、好ましくは  $150 \times 10^6 / \text{ml} \sim 330 \times 10^6 / \text{ml}$  の濃度の血小板；

$0.1 \times 10^6 / \text{ml} \sim 2.0 \times 10^6 / \text{ml}$ 、好ましくは  $0.1 \times 10^6 / \text{ml} \sim 0.7 \times 10^6 / \text{ml}$  の濃度の白血球  $\text{CD}45^+$ 、 $\text{CD}31^+$  および  $\text{CD}34^-$ ；

$0 \sim 0.03 \times 10^9 / \text{ml}$ 、好ましくは  $0.01 \times 10^9 / \text{ml}$  未満の濃度の赤血球；

を含み、創傷治癒、皮膚組織の再生、または血管新生を刺激する方法に使用される、単離された血液製剤。 10

## 【請求項 2】

白血球  $\text{CD}45^+$ 、 $\text{CD}31^+$  および  $\text{CD}34^-$  が、リンパ球、単球および顆粒球を含む、請求項 1 に記載の単離された血液製剤。

## 【請求項 3】

リンパ球が、全白血球  $\text{CD}45^+$ 、 $\text{CD}31^+$  および  $\text{CD}34^-$  に対して  $46.2\% \sim 80.6\%$ 、好ましくは  $61.6\% \sim 73.7\%$  である、請求項 2 に記載の単離された血液製剤。

## 【請求項 4】

リンパ球が、T 細胞、血管新生 T リンパ球 (Tang)、B 細胞、NK 細胞および EPC 細胞を含む、請求項 2 または 3 に記載の単離された血液製剤。 20

## 【請求項 5】

T 細胞、血管新生 T リンパ球 (Tang)、B 細胞、NK 細胞および EPC 細胞が、フローサイトメトリー分析により測定して、以下の 25% ~ 75% パーセンタイルを有する、請求項 4 に記載の単離された血液製剤。

T 細胞	51.54 ~ 66.11
B 細胞	6.65 ~ 10.66
NK 細胞	4.92 ~ 10.89
Tang (CD3+ / 184+ / 31+)	19.20 ~ 27.32
CD31+ / 146+ / 90+ (EPC)	0.195 ~ 0.565

## 【請求項 6】

単球が  $\text{CD}14^+$  および  $\text{CD}16^+$  または  $\text{CD}16^-$  であり、全白血球  $\text{CD}45^+$ 、 $\text{CD}31^+$  および  $\text{CD}34^-$  に対して  $7.7\% \sim 40.0\%$ 、好ましくは  $15.9\% \sim 23.1\%$  である、請求項 2 に記載の単離された血液製剤。 30

## 【請求項 7】

前記単球がフローサイトメトリー分析により測定して、以下の 25% ~ 75% パーセンタイルである、請求項 6 に記載の単離された血液製剤。

単球	6.44 ~ 13.02
----	--------------

## 【請求項 8】

顆粒球が  $\text{CD}15^+ / 16^+$  であり、全白血球  $\text{CD}45^+$ 、 $\text{CD}31^+$  および  $\text{CD}34^-$  に対して  $3.3\% \sim 32.9\%$ 、好ましくは  $5.9\% \sim 16.7\%$  である、請求項 2 に記載の単離された血液製剤。 40

## 【請求項 9】

顆粒球がフローサイトメトリー分析により測定して、以下の 25% ~ 75% パーセンタイルである、請求項 8 に記載の単離された血液製剤。

顆粒球	2.87 ~ 10.87
-----	--------------

## 【請求項 10】

(i) 2 ~ 7 ml の全血を遠心分離チューブに入れ、293 ~ 660 g で、好ましくは 458 g で、室温で 5 ~ 10 分間遠心分離することにより、分離された上相および下相を得、ここで上相は血小板およびリンパ球に富む血漿を含み、下相は赤血球を含む工程；

50

(i i) 血小板とリンパ球に富む血漿を含む上相を採取する工程；  
を含む、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の血液製剤を調製する方法。

【請求項 11】

前記遠心分離チューブが、ゴム栓 (1) と、請求項 10 の記載に対応する上相および下相を画定する、前記チューブの上部容積および下部容積を分離する膜 (2) と、前記チューブの下部容積を上下させる内側ピストン (3) を操作するための底面に配置されたリングナット (4) とを備える、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記膜が 15～200 ミクロンの多孔度を有し、1.5～2.5 mm の直径の中心孔を備える疎水性ディスクバリアまたは膜からなる、請求項 11 に記載の方法。

10

【請求項 13】

請求項 10～12 のいずれか一項に記載の方法によって得られる血液製剤。

【請求項 14】

骨および軟骨損傷、術後の病変または創傷；皮膚潰瘍、褥瘡痛、床ずれ、静脈性下肢潰瘍、動脈性潰瘍、糖尿病性足潰瘍、角膜および角膜潰瘍の瘢痕化などの角膜病変；歯周組織損傷または骨膜病変などの整形外科または腫瘍学的起源の病変の治療に使用するための、請求項 1～9 または 13 のいずれか一項に記載の血液製剤。

【請求項 15】

抗老化、瘢痕修復、しわ、座瘡、脱毛症および熱傷の美容的処置のための、請求項 1～9 または 13 のいずれか一項に記載の血小板およびリンパ球に富む血漿からなる単離された血液製剤の使用。

20

【請求項 16】

請求項 1～9 または 13 のいずれか一項に記載の単離された血液製剤を含有する、医薬組成物または化粧品組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血小板およびリンパ球に富む血漿を含有する血液製剤、創傷治癒および体組織再生のためのその使用、それを含有する医薬組成物、ならびにその調製方法に関する。

【背景技術】

30

【0002】

皮膚創傷治癒は、組織の完全性および機能の回復をもたらす可溶性メディエーター、血液細胞および細胞外マトリックスによって果たされる高度に組織化された動的プロセスである。プロセスを完了するために必要とされる以下の 3 つの段階がある：血液細胞の血管外遊出、インターロイキン走化性および ROS 産生によって特徴付けられる炎症段階；表皮および真皮区画の創傷閉鎖および再結合を可能にする、血管新生、肉芽組織形成、線維芽細胞およびケラチノサイト増殖によって記述される増殖段階；創傷収縮および細胞外マトリックス再編成が組織修復を完了する、組織リモデリング。正常な創傷治癒プロセスの中断は、非治癒慢性創傷、糖尿病による足潰瘍および脊髄損傷に起因する圧迫潰瘍などのいくつかの疾患の典型的な合併症の発症につながり得る。これらの慢性創傷は我々の社会において高い罹患率の問題であり、そこでは、それらはそれらが不十分にしか回復せず、頻繁に再発するので、医療システムにとって大きなコストをもたらす。創傷ケアの重要な構成要素である清拭工程に加えて、これらの損傷を治療するための異なるアプローチ、例えば、成長因子の適用または刺激、異なるタイプの創傷ドレッシング材、および皮膚代替物などの薬理学的戦略が提案されている。単純なドレッシング材の適用が十分でない場合、抗菌作用を創傷閉鎖促進と組み合わせる、代替アプローチがある。広範な創傷については、起源（同種異系、異種、および自家）、組成物（真皮、表皮、または両方の成分）、またはタイミング（持続性または一時的な代替物）によって分類することができる、様々な皮膚代替物が利用可能である。理想的な皮膚代替物は費用効果が高く、広く利用可能であり、適用が容易である一方で、皮膚の機能を果たす。提案される別のアプローチは、他

40

50

の治療と組み合わせて、血管新生、浮腫および創傷サイズの減少に対する効果を有する局所陰圧療法である。全ての場合（自己皮膚代替物の使用を除く）において、病変部位に外部薬剤を導入する問題は、すでに不安定な微小環境においてさらなる炎症応答を誘導し得る。文献において、PRP（多血小板血漿）は、整形外科的外傷において成功裏に使用される再生治療であることが報告されている（Sanchez, Anitua et al. 2007, Arora, Ramanayake et al. 2009, Sanchez, Anitua et al. 2009）。血小板誘導体の使用は、止血プロセスにおいて血小板によって通常放出される濃縮成長因子を送達する方法を表す。（Anitua, Andia et al. 2004）この血小板の濃度および適用は異なる臨床研究において報告されているように、創傷治癒を促進するより多量の生物活性因子を提供するが（Crovetti, Martinelli et al. 2004, Saldalamacchia, Lapice et al. 2004）、方法論的アプローチは、常に標準化され、再現可能であるとは限らない。潰瘍の治療におけるさらなる改善は、塩化カルシウムを添加するPRPの活性化によって表され；この操作が三次元創傷に適用可能な「ゲル様」テクスチャーであるフィブリン塊の形成を可能にする（Anitua, Aguirre et al. 2008, Rainys, Cepas et al. 2019）。細胞外リモデリングと共に、創傷治癒の障害は、新血管形成の欠如にも依存する；内皮前駆細胞（EPC）が末梢血中の循環細胞として最初に発見された、骨髄ニッヂ内の血管芽細胞に由来する単能性成体幹細胞である。これらの細胞は、CD31、CD144またはCD146などの異なる内皮表面マーカーと組み合わせて、血液学的起源を同定するためのCD45などの異なるマーカーの発現によって単離されている。10

#### 【0003】

さらに、内皮電位を発現するTリンパ球は、Tangとして記載されており（Miao, Qiu et al. 2016, Manetti, Pratesi et al. 2017）、血管新生T細胞は一般に、CD3、CD31およびCD184の共発現によって同定される。インビトロ実験は、Tang細胞が血管内皮増殖因子（VEGF）、インターロイキン（IL）-8、IL-17およびマトリックスマタロプロテイナーゼ（MMP）-9（Hur, Yang et al. 2007）などの高レベルの血管新生促進因子の分泌を介して早期EPCを刺激することによって、血管新生および内皮修復を促進し得ることを示した。20

#### 【0004】

EP3403659は、レグナブの名称において、チキソトロピックゲルを含むチューブ中で全血を遠心分離することによって調製されたトロンビン血清を含有する創傷加熱剤組成物の調製方法を開示している。組織治癒剤組成物は、血小板、白血球、フィブリノゲン、自己トロンビン血清を含有する。30

#### 【0005】

EP3111974はポリエステル系チキソトロピックゲルを含有する分離チューブ中で全血を遠心分離する工程、濃縮血小板血漿を全血漿から分離する工程、および血小板濃縮物を細胞抽出物と混合する工程を含む、細胞組成物の調製方法を開示し、ここで、遠心分離は、血小板含有血漿、リンパ球、および単球と、赤血球を含有するペレットとの間に障壁を形成するのに十分な時間長さで約1500g～2000gの力で行われる。このようにして得られた単離細胞組成物は創傷または組織治癒のために、および組織再生のために、特に皮膚、軟骨、筋肉、腱、脂肪組織、角膜、末梢神経、脊椎または骨再生のために使用される。40

#### 【0006】

EP3395383およびEP2073862は、創傷治癒剤組成物および全血の遠心分離に基づいてそれらを調製するための方法を開示している。一実施形態では全血がチキソトロピックゲルを備えたセパレーターチューブ中で遠心分離され、遠心分離工程は約1500g～最大1700gの力で、約3分～最大約15分、好ましくは1500gで約850

分間、行われる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】E P 3 4 0 3 6 5 9

【特許文献2】E P 3 1 1 1 9 7 4

【特許文献3】E P 3 3 9 5 3 8 3

【特許文献4】E P 2 0 7 3 8 6 2

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0008】

細胞成分に関して最適化され、それによって創傷治癒プロセスを改善し、容易に調製することができ、無菌状態での複雑な作業手順を必要とせずにすぐに使用できる、病変組織、特に皮膚組織の再生に適した組成物が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0009】

これらの目的は、損傷した身体組織の再生に特に効果的であることが証明された、血小板およびリンパ球に富む血漿（本明細書ではAngi o P R Pとも呼ばれる）からなる、本発明による血液製剤によって達成される。血液製剤は、皮膚培養物についてインビトロで、および皮膚病変の動物モデルにおいてインビボで研究され、顕著な組織再生および創傷治癒特性を示した。

20

【0010】

血液製剤をその細胞構成について分析し、それは、血小板に加えて、白血球CD45<sup>+</sup>、CD31<sup>+</sup>およびCD34<sup>-</sup>ならびに赤血球を特異的かつ再現可能な量で含むことが見出された。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1-1】Angi o P R Pの特性を示す図である。（A）Angi o P R P中に存在する血小板および細胞の百分率として表される生成物構成；（B）元の全血と比較したAngi o P R Pの血小板豊富の解析（不対t検定、\*\*p < 0.01）；（C）分離前後の白血球濃縮の比較；（D）Angi o P R P細胞亜集団のグラフ表示：全血白血球処方物と比較した顆粒球、単球およびリンパ球のパーセンテージ；（E）全Angi o P R Pおよび細胞区画；（F）CD45<sup>+</sup> / CD31<sup>+</sup> / CD34<sup>-</sup>の85.00%～97.73%のサイトメトリー解析；（G）リンパ球、（H）単球および（I）顆粒球の異なる細胞亜集団のさらなるサイトメトリー特徴付け。

30

【図1-2】Angi o P R Pの特性を示す図である。（A）Angi o P R P中に存在する血小板および細胞の百分率として表される生成物構成；（B）元の全血と比較したAngi o P R Pの血小板豊富の解析（不対t検定、\*\*p < 0.01）；（C）分離前後の白血球濃縮の比較；（D）Angi o P R P細胞亜集団のグラフ表示：全血白血球処方物と比較した顆粒球、単球およびリンパ球のパーセンテージ；（E）全Angi o P R Pおよび細胞区画；（F）CD45<sup>+</sup> / CD31<sup>+</sup> / CD34<sup>-</sup>の85.00%～97.73%のサイトメトリー解析；（G）リンパ球、（H）単球および（I）顆粒球の異なる細胞亜集団のさらなるサイトメトリー特徴付け。

40

【図2-1】器官型培養物のインビトロおよび動物モデルのインビボでのAngi o P R Pバリデーションを示す図である。（A）Angi o P R P、単一成分（Angi o c e 11sおよびP R P）または陰性対照としてのP B Sで処置した皮膚組織のインビトロモデルにおける創傷閉鎖領域の割合。（B）Angi o P R P、ヒアロマトリクスまたはP B Sで処置したマウス皮膚損傷モデルにおけるインビボでの創傷閉鎖の評価。創傷閉鎖率は様々な時点：4、7、10、14および21日間の処置（\*\*\*\*p < 0.0001）分散二元配置解析（ANOVA）ボンフェローニ修正）で測定された面積と最初の病巣の

50

面積との間の比率として定量化した。(C) AngiopRP およびハイアロマトリックスで処置した皮膚の機械的特性を、PBS および健康な皮膚と比較して決定するために、背側皮膚解析から得られた応力 - 歪曲線のグラフ表示(不対t検定、\* p < 0.05)。健康な皮膚と比較した、AngiopRP およびハイアロマトリックスまたはPBSで処置した組織のアルシアンブルー組織学的染色に基づく、高密度(D)および低密度(E)エラスチン存在の定量化(不対t検定、\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001)。(F)免疫蛍光染色に基づくコラーゲンVI面積定量(不対t検定、\* p < 0.05)。AngiopRP、ハイアロマトリックスまたはPBSで処理した後の皮膚組織における(G)血管新生CD31および(H)炎症性CD206陽性細胞の定量(不対t検定、\* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001)。

【図2-2】器官型培養物のインビトロおよび動物モデルのインビオでのAngiopRPバリデーションを示す図である。(A) AngiopRP、単一成分(Angiocrine 11s およびPRP)または陰性対照としてのPBSで処置した皮膚組織のインビトロモデルにおける創傷閉鎖領域の割合。(B) AngiopRP、ヒアロマトリックスまたはPBSで処置したマウス皮膚損傷モデルにおけるインビオでの創傷閉鎖の評価。創傷閉鎖率は様々な時点: 4、7、10、14および21日間の処置(\*\*\*\* p < 0.0001)分散二元配置解析(ANOVA)ボンフェローニ修正)で測定された面積と最初の病巣の面積との間の比率として定量化した。(C) AngiopRP およびハイアロマトリックスで処置した皮膚の機械的特性を、PBS および健康な皮膚と比較して決定するために、背側皮膚解析から得られた応力 - 歪曲線のグラフ表示(不対t検定、\* p < 0.05)。健康な皮膚と比較した、AngiopRP およびハイアロマトリックスまたはPBSで処置した組織のアルシアンブルー組織学的染色に基づく、(D)高密度エラスチン領域の定量化および(E)低密度エラスチン領域の定量化(不対t検定、\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001)。(F)免疫蛍光染色に基づくコラーゲンVI領域定量(不対t検定、\* p < 0.05)。AngiopRP、ハイアロマトリックスまたはPBSで処理した後の皮膚組織における(G)血管新生CD31および(H)炎症性CD206陽性細胞の定量(不対t検定、\* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001)。

【図3】血液細胞製剤を分離するために使用される遠心分離チューブを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

したがって、第1の実施形態では、本発明が身体組織の再生、創傷治癒、または血管新生を刺激する方法に使用するための、血小板およびリンパ球に富む血漿からなる単離された血液製剤を対象とし、前記製剤は:

110 × 10<sup>6</sup> / ml ~ 330 × 10<sup>6</sup> / ml、好ましくは 150 × 10<sup>6</sup> / ml ~ 330 × 10<sup>6</sup> / ml の濃度の血小板;  
0.1 × 10<sup>6</sup> / ml ~ 2.0 × 10<sup>6</sup> / ml、好ましくは 0.1 × 10<sup>6</sup> / ml ~ 0.7 × 10<sup>6</sup> / ml の濃度の白血球CD45<sup>+</sup>、CD31<sup>+</sup>およびCD34<sup>-</sup>;  
0 ~ 0.03 × 10<sup>9</sup> / ml、好ましくは 0.01 × 10<sup>9</sup> / ml 未満の濃度の赤血球;

を含む。

【0013】

白血球画分を、その細胞成分についてさらに分析し、それは、白血球CD45<sup>+</sup>、CD31<sup>+</sup>およびCD34<sup>-</sup>の総数に対する以下の%量で、リンパ球、単球および顆粒球を含むことが見出された:

46.20% ~ 80.60%、好ましくは 61.60% ~ 73.70% のリンパ球;  
7.70% ~ 40.00%、好ましくは 15.90% ~ 23.10% の単球;  
3.30% ~ 32.90%、好ましくは 5.90% ~ 16.70% の顆粒球。

【0014】

10

20

30

40

50

本発明の好ましい、独立した実施形態において：

リンパ球は、T細胞、血管新生Tリンパ球（Tang）、B細胞およびNK細胞を含み

； 単球はCD14<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>またはCD16<sup>-</sup>であり；

顆粒球はCD15<sup>+</sup>/16<sup>+</sup>である。

【0015】

好ましい実施形態では、製剤がフローサイトメトリー分析によって決定されるように、25%～75%パーセンタイルで表される以下の白血球集団を含む。

【0016】

【表1】

10

T細胞	51. 54-66. 11
B細胞	6. 65-10. 66
NK細胞	4. 92-10. 89
単球	6. 44-13. 02
顆粒球	2. 87-10. 87
Tang (CD3+/184+/31+)	19. 20-27. 32
CD31+/146+/90+ (EPC)	0. 195-0. 565

20

【0017】

別の実施形態によれば、本発明は、リンパ-血小板に富む血漿血液製剤を調製するための方法であって、以下の工程を含む方法を提供する：

・ 2～7ml、好ましくは2～4mlの全血を、293～660gに対応する1200～1800rpm（ラウンド/分）、好ましくは458gに対応する1500rpmで、室温で5～10分間、好ましくは5分間、遠心分離チューブ中で遠心分離することにより、上相および下相の分離が得られ、上相は血小板およびリンパ球に富む血漿を含み、下相は赤血球を含み；

・ 血小板およびリンパ球に富む血漿を含む上相を採取する。

【0018】

好ましくは、遠心分離チューブ（図3）が5mlの内容積を有し、チューブを上部容積および下部容積に分離する隔壁または膜（2）を備え、それによって、血小板およびリンパ球に富む血漿相が上部容積に収集される一方、赤血球が下部容積に蓄積する収集される。下部容積は、チューブの下端に配置されたリングナット（4）によって、下部チューブチャンバーを上下に移動するピストン（3）により操作できる。これにより、遠心分離後の血小板およびリンパ球に富む血漿相を含む約3mlの上部チューブ容積を画定でき、赤血球を含む1～2mlで変動し得る下部容積は、リングナット-ピストンシステムによりによって調節することができる。

【0019】

さらにより好ましくは、隔壁または膜が15～200ミクロンの多孔度を有し、1.5～2.5mmの直径の中心孔を備えた疎水性ディスクバリアまたは膜からなる。ディスクバリアまたは膜に使用される適切な材料としてはポリエチレンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0020】

40

50

さらなる態様では、本発明は、上記の特徴を有する血小板およびリンパ球に富む血漿からなる、本明細書に開示される方法によって得ることができる血液製剤を対象とする。この製剤は血管新生の可能性を示し、皮膚病変に対する血管新生促進効果を促進し、インビボでより効率的な創傷治癒を誘導する。

【0021】

したがって、本発明による血液製剤は、病変した身体組織の再生および創傷治癒の促進のために好都合に使用される。特定の実施形態では、本明細書で定義される血液製剤が化粧用途および治療用途に使用され：

- 化粧品用途としては抗老化、瘢痕修復、しわ、座瘡、脱毛症および熱傷治療が挙げられ、
- 治療用途としては創傷治癒、骨および軟骨損傷などの整形外科または腫瘍学的起源の病変の治療、手術後の病変または創傷；皮膚潰瘍、褥瘡、褥瘡、静脈性下肢潰瘍、動脈性潰瘍、糖尿病性足潰瘍、角膜および角膜潰瘍の瘢痕などの角膜病変；歯周組織損傷または骨膜病変の治療が挙げられる。

【0022】

本発明の血液製剤は、同種または自己の治療方法において使用することができる。好ましい実施形態では血液製剤が自己適用のために使用され、すなわち、それはリンパ-血小板に富む血漿が単離される全血の同じドナーに投与される。

【0023】

本明細書に開示される方法によって得られる血液製剤はすぐに使用可能であり、すなわち、それは、その取得の直後に、それを必要とする対象に適用または投与され得る。あるいは凍結し、必要に応じて解凍して使用することができ、または例えば、適切なビヒクル、担体、賦形剤、保存剤、緩衝剤、安定剤の添加によって実施することができる。例えば、血液製剤は、その収集に使用されるシリンジ内に塩化カルシウム溶液（2.5～10% w/v）を直接添加することによって、ゲル形態で使用することができる。

【0024】

したがって、さらなる態様において、本発明は適切な担体または賦形剤と一緒に、上記で定義された血液製剤を含有する医薬組成物または化粧品組成物を提供する。

【0025】

本発明は以下の図面および実施例によってさらに説明されるが、これらに限定されない。

【実施例1】

【0026】

- リンパ-血小板に富む血漿（AngiopRP）の調製

本発明に係るリンパ-血小板に富む血漿の分取に用いる遠心チューブ（以下、「AngiopRP装置」）は、基本的に（図3）から構成される：

1. 無菌の外部目盛り付き5mlポリプロピレンチューブで作られた本体；
2. ゴム栓（BD Vacutainer Haemogard状）（1）；
3. HDPE、多孔性（孔径<200ミクロン）、疎水性、直径13mm、厚さ1.5mmの円板障壁、中心の直径2mmの孔からなる2つの部分（上部容積56%、下部容積44%）でチューブを分離する隔壁（2）；
4. 内側ピストン（3）を備えたリングナット（4）からなる底部。

【0027】

前もってクエン酸ナトリウムチューブに採取された末梢血のサンプルは、チューブ内のゴム製の蓋を通して注入され、内部バリアは血液サンプルを上部容積内に保持する。

その後、装置は5分間1500rpm（458-460g）で遠心される。ブレーキ減速なし。

内膜は、血小板（PRP）および目的の細胞集団（上部）で富化された血漿の、老廃物（赤血球、下部）からの分離を促進する。

リングナットは、上部チャンバ（膜の上方）内のPRP相全体を調整することを可能に

10

20

30

40

50

する。

上部血漿および細胞は、シリングで引き抜かれ、液体形態で使用する準備ができている。

【0028】

<Angi o P R P 生成物回収>

3つの症例が起こりうる：

【0029】

(1) 血漿相は完全に膜の上にある。

2.5mlのシリングに50mmと21Gの針を使用する。針をラバーストッパに刺し、Angi o P R P 生成物を抜き取る。膜から3~5mmの位置に針を置き、生成物を吸い出し、血漿相に細胞と血小板を再懸濁する。それぞれのNovy Sep装置から平均容量1mlのAngi o P R P を回収する。

Angi o P R P 生成物の量は、性別、年齢、ヘマトクリット値、水分補給量などのパラメータによって異なる

【0030】

(2) 血漿相は、部分的に膜の上下に位置する。

Novy Sepスクリュー(リングナット)を反時計回りに回して、血漿相が膜の上に完全にくるまで膜下の容積を減らす。そして、上記(1)のようにAngi o P R P 生成物を回収する。

【0031】

(3) 血漿相は、膜の上に位置する赤血球によって目に見えて汚染される。

生成物を廃棄する。

【0032】

生/死染色(L3224、Life Technologies、米国カリフォルニア州)を、1、2、3、4および7日間後にAngi o P R P に対してインビトロで実施し、細胞生存を評価した。生存率は数日間減少するが、インビトロで7日後、82.26±8.50%の細胞が生存している。内生性の評価のために、8×10<sup>4</sup> HUVEC(ATCC-LGC、米国バージニア州)を3D Matrigel(BD Biosciences)に配置し、Angi o P R P またはPRPまたはAngi o cellsを150μl加え、24時間後の細胞の細分化をImageJソフトウェア(NIH)により定量化した。Angi o P R P は他の条件よりも長い細分化を誘導した(対照条件と比較して327.75±9.72×10<sup>3</sup>対293.05±8.35×10<sup>3</sup>μm、t検定\*p<0.05)。

【実施例2】

【0033】

- FACS分析

末梢血(PB)はミラノ(イタリア、ミラノ)のポリクリニコ病院の研究におけるヒト被験者の使用に関する委員会のガイドラインに従って、インフォームドコンセント後の健常ボランティアから、ミラノのポリクリニコ病院の輸血医学・血液学部門の血液バンクから入手した。クエン酸ナトリウムチューブに採取した2.5mlの末梢血をNovy Sep装置に充填し、相分離を誘導するために室温で1500rpmで5分間遠心分離した。血小板に富む血漿相および細胞を、赤血球と血漿との間の界面で回収した。分離前の血液およびAngi o P R P を、血液コールター計数器(D×H 500、ベックマンコールター)によって分析した。分離前に採取した血液および細胞相を、以下に示すモノクローナル抗体で直接標識した。細胞を、Syto TM 16、抗CD45 V500、抗CD3 V450、抗CD56 PE-CY7、抗CD14 APC-H7、抗CD16 PE、抗CD19 APC-R700または抗CD31 PE、抗CD184 APC(BD Biosciences-Pharmingen、米国カリフォルニア州サンディエゴ)と共にインキュベートした。対照はアイソタイプマッチマウス免疫グロブリンであった。4で20分間の各インキュベーション後、1%熱不活化FCSおよび0.1%アジ

10

20

30

40

50

化ナトリウムを含む PBS 1 X 中で細胞を洗浄した。サイトメトリー分析は、FACS unite™ソフトウェア (BD Biosciences - Immunocytometry System) を用いて LYRIC フローサイトメーターで行った。各解析は、各ゲートについて少なくとも  $1 \sim 2 \times 10^4$  事象を含んだ。分析から細胞破片を除去するために光散乱ゲートを設定した。陽性細胞のパーセンテージは、特定のフルオロフォアにコンジュゲートされたアイソタイプ対照に反応するパーセンテージについて補正後に評価した。Syto™ 16 の陽性ゲート上で、様々な細胞亜集団の割合を計算した。

#### 【実施例 3】

##### 【0034】

###### - Angiopoietin のインビトロ評価

末梢血の分離を Novy Sep 装置を用いて行い、Angiopoietin を分析して血小板組成物の特徴を調べた。図 1 A に報告されるように、Angiopoietin は主に血小板 ( $85.19 \pm 7.03\%$ ) から構成され、白血球 (WBC) の存在は  $0.85 \pm 0.53\%$  である。血小板濃度は全血中に存在する元の数に比べ Angiopoietin で増加する ( $108.5 \pm 6.62 \times 10^3$  血小板 /  $\mu\text{l}$  に代えて  $146.8 \pm 11.35 \times 10^3$ 、図 1 B)。特に、細胞成分をコールターカウンターによってさらに特徴付け、分離手順の前に元の末梢血組成物と比較した。Angiopoietin では、全血と比較して、リンパ球成分が富化され (Angiopoietin について  $67.15 \pm 9.25\%$  および全血について  $29.98 \pm 6.52\%$ )、一方、顆粒球集団は著しく減少し (Angiopoietin について  $12.32 \pm 7.67\%$  および全血について  $62.36 \pm 7.38\%$ )、単球は部分的に増加した (Angiopoietin について  $20.13 \pm 6.30\%$  および全血について  $7.69 \pm 1.56\%$ 、図 1 D)。

#### 【実施例 4】

##### 【0035】

###### - エクスピボ前臨床実験：器官型皮膚培養

ヒト真皮および表皮多層モデル (MatTek's EpiDermFT Full Thickness EFT-400) をインビトロモデルとして用い、Novy Sep 装置の組織再生能力を評価した。組織モデル (角質層および表皮) 上の皮膚生検を、EpiDerm - FT の製造業者のプロトコールに記載されるように、5 mm パンチによって得た。次の 4 種類の培養条件下で試験した：1) Angiopoietin を用いた器官型皮膚培養、2) Angiocytes、3) PRP、4) PBS 1 X (陰性対照として)。培養 24 時間後、2 日後、4 日後、5 日後、6 日後および 7 日後のヒト皮膚組織を分析し、創傷閉鎖および上皮再生を評価するために、免疫組織化学的および免疫蛍光分析を行った。ヘマトキシリンおよびエオシン染色を、創傷治癒をより良く特徴付けるために行い、画像定量化およびプロセスを、ImageJ ソフトウェア (NIH) を用いて行った。

図 2 A に報告されているように、Angiopoietin で処置された病巣は 6 日後に完全な治癒を示したが、PRP での処置は同じ結果に達するのにもう 1 日かかった。Angiocytes と PBS の使用は 1 週間で完全治癒に成功しなかった。

#### 【実施例 5】

##### 【0036】

###### - インビボ創傷治癒実験

5 ヶ月齢の Scid マウス ( $n = 10$ ) は、Charles River Laboratories International, Inc. (イタリア国カルコ) から入手した；この研究における動物の使用が国立保健省によって認可された (プロトコル番号 51/2018 - PR)。動物をアベルチンで麻酔し、5 mm の全層切除を 2 回行い、これは、マウスの正中線の両側に 1 つずつ、海綿体を背側に作製した。シリコーンスプリントを、接着剤の助けを借りて創傷の周りに配置し、次いで、スプリントを、中断された縫合糸で固定した。各マウスはそれ自体の対照として作用し、一方の創傷は処置を受け、他方のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS 1 X) を受けた。汚染を防ぐために透明な閉塞包帯を適用した。創傷を、2 ~ 3 日ごとに写真を撮ることによってチェックし、面積を、Im

10

20

30

40

50

age J ソフトウェア (NIH) を使用してミリメートル基準に対して定量化し、創傷閉鎖に対応する、損傷の 0、4、7、10、15、および 21 日後に測定された創傷面積のパーセンテージとして表した；マウスを、完全深部麻酔下で頸椎脱臼によって犠牲にし、背部皮膚病変を除去した；生検を、組織学的または分子生物学的分析のためにそれぞれ 2 つの群に分けた。1 群をイソペンタンに入れ、プロテオミクス分析のために -80° で凍結した。他の群は 4% パラホルムアルデヒドの PBS 溶液中、4° で一晩インキュベートし、PBS 1 X 溶液中、30% スクロースにさらに 24 時間移した後、4° でインキュベートし、O.C.T. 化合物中に包埋し、-80° で凍結した。厚さ 12 μm の連続切片を切断し、免疫蛍光法および組織学的分析によって検査した。

## 【0037】

Angi o PRP 処置 (n = 5)、ヒアロマトリクス処置 (n = 5) および PBS 処置 (n = 10) についてそれぞれ皮膚創閉鎖時期を比較した。さらに、異なる条件で全閉鎖に達するのに必要な時間を評価した。21 日目の Angi o PRP による処置は損傷の完全な閉鎖を誘発し、代わりに、ヒアロマトリクスで処置された皮膚は、損傷後 21 日目に 75 ~ 80% の創傷閉鎖を示した。さらに、PBS で処理した試料は、同じ時点で創傷閉鎖の 90% を示した。Angi o PRP 処置では 6.5 / 7 日後に 60% の閉創の達成が観察されたのに対し、ヒアロマトリクス処置では 15 日であった (p < 0.0001、ボンフェローニ補正による二元配置分散解析 (ANOVA))。PBS による対照処理は、ほぼ 10 日で閉鎖の 60% に達する。21 日後において優位な差異が、Angi o PRP とヒアロマトリクスの間 (p < 0.0001、ボンフェローニ補正による二元分散分析 (ANOVA)) および Angi o PRP と PBS の間 (p < 0.0001、ボンフェローニ補正による二元配置分散分析 (ANOVA)) でも認められた (図 2B)。

## 【実施例 6】

## 【0038】

## - 表皮分化

12 μm 皮膚組織切片の連続切片を切断し、ヘマエトキシリンおよびエオシン (H & E)、アルシアンブルーおよびピクロシリウスレッド染色を用いて、形態学的評価のための製造業者の指示に従って染色した。画像を LMD 6000 B (ライカ、ドイツ) で捕捉した。

## 【0039】

免疫蛍光分析のために、組織切片を、マウスモノクローナル抗体抗 - シトケラチン 10 (1:100、アブカム)、ウサギ抗 - インボルクリン (1:100、アブカム)、マウスモノクローナル抗体抗 - シトケラチン 14 (1:100、アブカム)、ウサギ抗 - ロリクリン (1:100、アブカム)、CD206 (1:400、アブカム) と共にインキュベートし、細胞核を、DAPI を用いて室温で 5 分間染色した。スライドを、蛍光顕微鏡 LEICA DMI 8 (ライカ、ドイツ) を用いて分析した。

## 【0040】

21 日間のヘマトキシリン・エオジン染色の結果、Angi o PRP で処理した皮膚は、ヒアロマトリクス (市販品) で処理した皮膚と比較して、線維芽細胞およびケラチノサイトの増殖および創傷部位への移動によって誘発される完全な創傷治癒を示した。また、種々の表皮層に対する特異的マーカーを用いて表皮分化を評価した。21 日間で、Angi o PRP で処置された皮膚は、特異的マーカサイトケラチン 5 についての陽性かつ均一なシグナルによって示されるように、基底層の完全かつ均一な再生を示した。一方、ヒアロマトリクスおよび PBS で処理した試料は、不完全で不連続な再生を示した。顆粒層に関して、Angi o PRP での処理はサイトケラチン 10 染色によって実証されるように、完全な再生を誘導し、健康な皮膚試料と同等であった。一方、ヒアロマトリクスおよび PBS で処置した皮膚病変は顆粒層の後期再生を示し、サイトケラチン 10 の不均一な発現を示した。角質層に関して、最も外側の層を可視化するためにロリクリンについて免疫蛍光染色を行った；我々は Angi o PRP で処理した試料においてのみ完全な再上皮化を観察したが、一方、ヒアロマトリクスおよび PBS で処理した皮膚においては 21 日目

10

20

30

40

50

に不完全な上皮を観察した。

【実施例 7】

【0041】

- 皮膚弹性特性

犠牲にした後、機械的試験のための皮膚を、クランプされた端部を覆うゴム片を有する金属スクリュークランプに入れた。クランプを B o s e E l e c t r o f o r c e 3 1 0 0 機器に入れた。0.15 N の初期トラクションを適用する。M P a で測定したトラクションは、破壊点まで毎秒 0.2 % 増加した。力 (N) および変位 (mm) を x y プロッターで測定し、これらの点を繰り返して応力 ( = 断面積当たりの力 ) および歪み ( = 長さ / 初期長さの変化 ) として記録し、E x c e l ( A s h l e y W . S e i f e r t e t . A l ; 2 0 1 2 ) で再プロットした。 10

【0042】

皮膚の弱さを評価するために、A n g i o P R P 、P B S 、ヒアルロマトリクス (陰性対照として) および健康な皮膚 (陽性対照として) で処置した皮膚の機械的特性を比較する。背側皮膚から応力歪曲線を導き、平均引張強度を決定した。A n g i o P R P で処置した皮膚は、ヒアルロマトリクスまたはP B S で処置した皮膚 (3 M P a ± 0.7 、 0.3 M P a ± 0.3 および 1.8 M P a ± 0.70 ) と比較して、牽引に対してより高い耐性を示した (図 2 C)。さらに、L P E P で処置した皮膚は、健康な皮膚と同等の傾向を示した (3 M P a ± 0.7 および 3.1 ± 0.7 )。A n g i o P R P で処理された皮膚において観察されるより高い弾性率は、単位面積当たりの線維性分子の数の増加によるものであり得る。エラスチンは皮膚弹性線維の主成分であり、皮膚再生に有益であるため、V I 型コラーゲンの免疫蛍光染色を行った。A n g i o P R P で処置された皮膚は図 2 F に定量化され報告されているように、ヒアルロマトリクスで処置された皮膚と比較して、コラーゲン V I 発現に関して有意差を示した (不対 t 検定、\* p < 0.05)。 20

【0043】

表皮の特徴付けに加えて、真皮組成の分析を行った。アルシアンブルー染色を用いて、真皮領域におけるコラーゲン線維の存在を確認した。この染色の強さのおかげで、皮膚試料中の高密度弹性線維と低密度弹性線維とを区別し、様々な処理においてこれらの 2 つの密度タイプによって占められる表面を定量することができた ; 図 2 D および 2 E に報告されるように、A n g i o P R P で処理された試料は、ヒアルロマトリクスおよびP B S 処理と比べ、健康な皮膚とより類似した皮膚組成を示し、高密度エラスチンが高く、低密度エラスチンが少ない (不対 t 検定、\* p < 0.05 、 \*\* p < 0.01 、 \*\*\* p < 0.001)。 30

【実施例 8】

【0044】

- プロテオミクスおよび生化学分析

皮膚サンプルをプロテオミクス分析用に抽出し、4 で 17,000 × g で 10 分間遠心分離し、4 で 1 h で 200,000 × g で超遠心分離を施した。0.1 M 重炭酸アンモニウム (p H 7.9) に再懸濁したペレットを、以前に報告された手順 (B a r i , P e r t e g h e l l a e t a l . 2 0 1 8 ) に従って、各試料からの 50 ± 0.5 μ g のタンパク質を用いてトリプシン処理した。1マイクロリットルのトリプシン消化混合物を、Q - E x a c t i v e 質量分析計 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , 米国) に連結した c H i P L C - n a n o f l e x システム (E k s i g e n t , A B S C I E X , 米国) を備えたナノクロマトグラフィーにより、5 ~ 45 % の溶離剤 B (溶離剤 A 、水中 0.1 % ギ酸 ; 溶離剤 B 、アセトニトリル中 0.1 % ギ酸) の 65 分勾配を介して、300 n L / 分の流速で分析した。完全質量スペクトルは、70000 F W H M 分解能で 400 ~ 1600 m / z の範囲にわたるポジティブイオンモードで記録され、続いて 10 の M S / M S スペクトルで 17,500 F W H M の分解能では、最も豊富なイオンに依存する様式でデータを生成した。生成されたデータはすべて、S E Q U E S T 検索エンジンおよびヒトタンパク質データベース (70726 エントリー、U N I P 50

ROTウェブサイト、www.uniprot.govから2017年1月にダウンロード)に基づいて、Proteome Discoverer 2.1プラットフォーム(Thermoscientific)を用いて検索した。得られたタンパク質リストをアラインメントし、正規化し(Sereni, Castiello et al. 2018)、次いで線形判別解析手段(LDA)により処理した(Hillario and Kalousis 2008)。各被験体を特定の群に割り当てるために、抽出されたマーカータンパク質に従って値パラメータを計算した(Brambilla, Lavatelli et al. 2012)。

#### 【0045】

異なる創傷処置のタンパク質プロファイルを理解するために、本発明者らはnLC-MS/MS分析を実施した；単一のPBS処置を、相対群(Novy Sepまたはヒアロマトリクス)の内部対照として使用し、一方、健康な皮膚を分析して、同じ動物の皮膚の正常対照プロファイル(内部対照)を同定するために分析した。同定されたタンパク質の総数は1514であり、高い技術的および群再現性を有した。ヒアロマトリクス創傷組織からのプロテオミクスプロファイルは、同じ動物からの対照皮膚試料のプロファイルと比較して著しく異なる。試料の主成分解析は、対照試料がAngiopRP処置創傷から収集された試料から類似のクラスターを形成することを示す。実際、ヒアロマトリクスで処理された試料はそれらの内部対照と一致を示し、一方、単一のAngiopRP試料はそれらの単一の相対的内部対照と相関し、このことは、処理の全身作用を示唆する。健康な皮膚試料はヒアルロマトリクス群よりもAngiopRPとクラスター化し、より相関する。ポンフェローニ補正後、179個のタンパク質が少なくとも2群間で差次的に発現されたが、アップレギュレートおよびダウンレギュレートされたタンパク質は同じ比較または同じ評価条件において類似していた。単一処理およびその特異的対照を分析すると、半数の差次的タンパク質が、ヒアルロマトリクス処理よりもAngiopRP処理において変化している。処置された条件が健康な皮膚と比較される場合、同じ挙動が報告される。このことは、AngiopRPがヒアロマトリクスよりも健康な皮膚に近い傾向があることを示唆している。次いで、プロテオーム回復指数(Pri)(Roffia, De Palma et al. 2018, Sereni, Castiello et al. 2018)を適用して、アルゴリズムでホメオスタシス回復に関するタンパク質を同定するために、健常および疾患プロファイルを生成および比較し、3つの異なる条件を比較した。創傷組織に存在しない、AngiopRP処理後の6種のタンパク質、および未処理の病巣に存在し、AngiopRP試料には存在しない12種のタンパク質を同定した(PBS試料を陰性対照として使用した)。97個のタンパク質の濃度はAngiopRP処理後に回収されるが(損傷組織において57個がアップレギュレートされ、40個がダウンレギュレートされる)、一方、23個のみが、ヒアロマトリクス処理後に検出された(AngiopRP群と共通が14個)。正規化されたデータのクラスター化は、同じマクロ群におけるヒアロマトリクスおよび相対対照、ならびに健康な皮膚およびAngiopRPの単一試料を、それらの相対陰性対照と相関させて、結果を確認した。差次的に発現されたタンパク質を、Cytoscapeプラットフォームを用いて分析し、代謝を評価した。ネットワーク分析は、創傷誘導および2つの相対的処置の両方について、異なる代謝クラスターの変動を強調した。特に、セルピン、防御反応に関するタンパク質、細胞骨格構成、補体および凝固カスケード、細胞外マトリクス(ECM)およびリボソームに対するクラスターは、ヒアロマトリクス処理およびその対照条件において過剰発現され、一方、AngiopRPおよび相対対照においては健常試料と同様に正規化される。逆に、ケラチンと脂質代謝に関するタンパク質のクラスターは、ヒアロマトリクスよりもAngiopRP条件でより多く発現する。これら8つの標的群の中で、我々は、2つの処置後に異なる方法で発現され、健康な組織と比較される17の創傷関連タンパク質：カベオリン-1、EGFR、フィブロネクチン、デコリン、プレクチン、セルピンB2、ジソイドドメイン受容体-2、プロトロンビン、ヘムオキシゲナーゼ1、フィブリノーゲン-、-、および-鎖、テナシン、プラスチン-2、-トロポミオシン、サイトケラ

10

20

30

40

50

チン - 6 A およびアネキシン A 1 に注目した。これらのタンパク質の発現は、ヒアロマトリクスおよび AngioPRP 処理に対して逆の傾向を示す：例えば、カベオリン 1 およびデコリンは AngioPRP 処理後にアップレギュレートされるが、ヒアロマトリクス試料においてダウンレギュレートされる。逆に、フィブリノーゲン、セルピン B 2 、およびプロトロンビンなどの凝固に関する因子は、AngioPRP 処置後よりヒアロマトリクス処置後の方がより発現される。

#### 【実施例 9】

##### 【0046】

###### - ネットワークおよび統計分析

差次的および LDA 法によって選択されたタンパク質の一覧から出発して、対応するヒトタンパク質 - タンパク質相互作用 (PPI) ネットワークを抽出し、Cytoscape プラグイン、STRING 8 データベース (Pawlowski, Muszewski, 2010 年) の手段によって、既知の相互作用を、いくつかのデータベース、例えば、ProteinLink, DIP, KEGG および BIND から検索した。さらに、PPI を Cytoscape 3.5 (Shannon, Markiel et al. 2003) を用いて検査し、> 0.15 スコアを有する実験的に検証された相互作用のみが保持された。最後に、Bingo 2.44 (Maere, Heymans et al. 2005) を使用して、機能的に組織化された GO 用語に基づくモジュールを強調した。

##### 【0047】

ペプチド配列および関連タンパク質の同定のための基準は、酵素としてのトリプシン；ペプチドあたり 3 つの失われた切断が許容される；前駆体イオンについて 10 ppm およびフラグメントイオンについて  $\pm 0.6$  Da の質量許容差が適用された。Percolator ノードは  $q$  値に基づく 0.01 (厳密) のペプチドスペクトルマッチ (PSM) レベルでの最終的な偽発見率 (FDR) を与えるために、標的 - デコイ戦略と共に使用され、0.05 の最大 CN を考慮し (Kall, Canterbury et al. 2007) 、6 アミノ酸の最小ペプチド長、およびランク 1 が考慮され、タンパク質グループ化および厳密な節約原理が適用された。

##### 【0048】

カテゴリー変数の差は、二乗検定を用いて評価した。Kruskal Wallis 検定を定量的変数の比較に適用した。R (3.5.2) 統計解析ソフトウェアを用いて解析を行い、p 値 < 0.05 を統計的に有意であるとみなした。

##### 【0049】

SpC は t 検定によっても評価され (Zhang, VerBerkmoes et al. 2006) 、LDA および MAPROMA の両方によって選択されたタンパク質は階層的クラスタリング (Zhao and Karypis 2005) によって、WARD の方法およびユークリッド距離メトリックを適用して評価された。LDA を用いたすべての層別化群の共通共分散行列およびマハラノビス距離 (Jain AK 1999) を用い、JMP 5.1 ソフトウェアにより階層的クラスタリングを行った。層別小児群を識別するタンパク質を選択するために、最大 F 比 (5) と最小 p 値 (0.05) を持つタンパク質を考察した。スペクトルカウント (SpC, PSM とも呼ばれる) と同定されたタンパク質の相対存在量との間の直接相関に基づいて、MAPROMA (多次元アルゴリズムタンパク質マップ) ソフトウェア (Mauri, Riccio et al. 2014) の Dave (Differential Average) および DCI (Differential Coefficient Index) インデックスを使用して、分析された各子供群に対応する平均 (aSpC) を処理した。課せられた閾値は Dave > |0.2| および DCI > |100| であった。

10

20

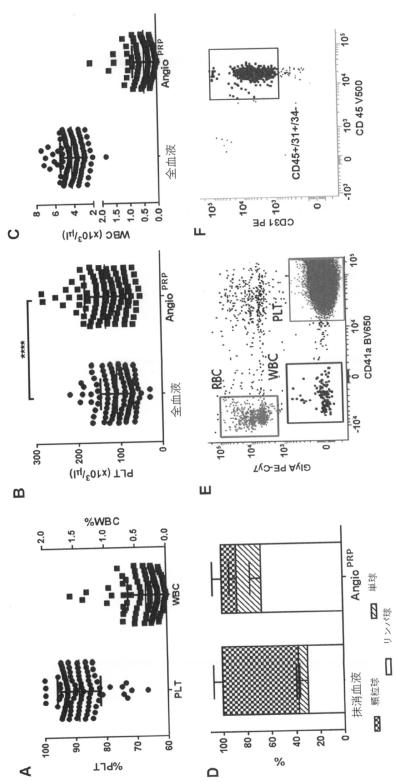
30

40

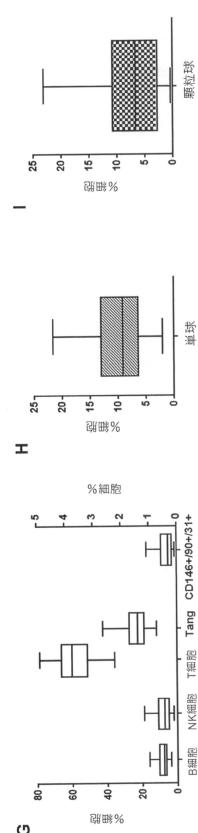
50

## 【図面】

## 【図 1 - 1】



## 【図 1 - 2】



10

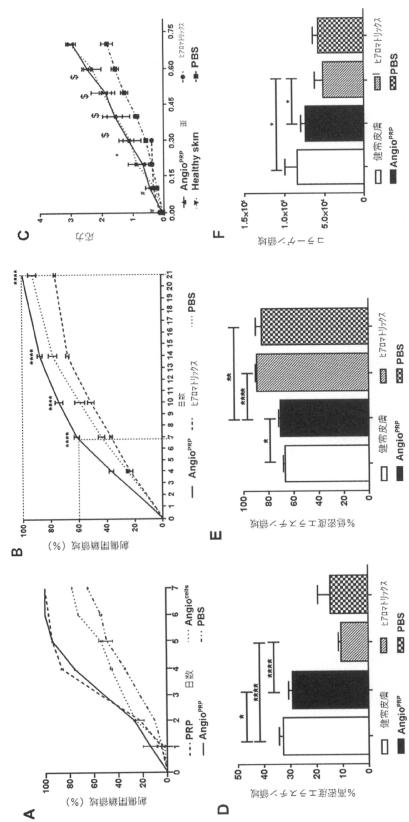
20

30

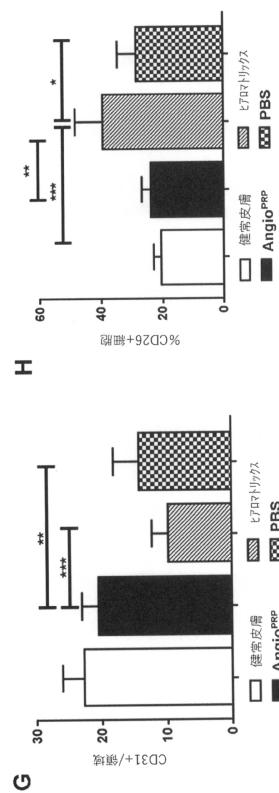
40

50

【図2-1】



【図2-2】



10

20

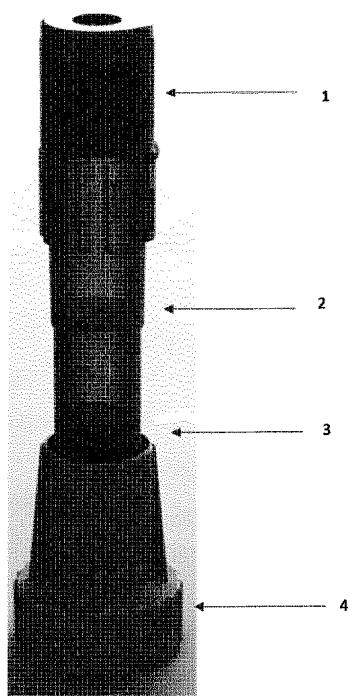
30

40

50

【図3】

Figure 3



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

					International application No PCT/EP2021/055552																																		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K35/17 A61K35/19 A61K8/891 A61Q19/00 A61P17/02 A61K35/14 C12N5/00																																							
ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																																							
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61Q A61P C12N																																							
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																																							
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, WPI Data																																							
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> <th style="text-align: right; padding: 2px;">20</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">AU 2013 203 115 B2 (TURZI ANTOINE [CH]) 3 December 2015 (2015-12-03)</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">1-9, 13-16</td> <td style="text-align: right; padding: 2px;">20</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">figures 4-14, 16 claims 6, 8, 11, 17 page 28 - page 34 page 68 paragraph bridging p. 18 and 19 -----</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">10-12</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">WO 2008/022651 A1 (TURZI ANTOINE [CH]) 28 February 2008 (2008-02-28)</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">1-9, 13-16</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">page 13 - page 14 page 18 - page 19 -----</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">10-12</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">WO 2016/083549 A2 (TURZI ANTOINE [CH]) 2 June 2016 (2016-06-02)</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">1-9, 13-16</td> <td style="text-align: right; padding: 2px;">30</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">page 23 page 40 - page 41 claim 1 -----</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">10-12</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="4" style="text-align: right; padding: 2px;">-/-</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>						Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	20	X	AU 2013 203 115 B2 (TURZI ANTOINE [CH]) 3 December 2015 (2015-12-03)	1-9, 13-16	20	Y	figures 4-14, 16 claims 6, 8, 11, 17 page 28 - page 34 page 68 paragraph bridging p. 18 and 19 -----	10-12		X	WO 2008/022651 A1 (TURZI ANTOINE [CH]) 28 February 2008 (2008-02-28)	1-9, 13-16		Y	page 13 - page 14 page 18 - page 19 -----	10-12		X	WO 2016/083549 A2 (TURZI ANTOINE [CH]) 2 June 2016 (2016-06-02)	1-9, 13-16	30	Y	page 23 page 40 - page 41 claim 1 -----	10-12		-/-					
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	20																																				
X	AU 2013 203 115 B2 (TURZI ANTOINE [CH]) 3 December 2015 (2015-12-03)	1-9, 13-16	20																																				
Y	figures 4-14, 16 claims 6, 8, 11, 17 page 28 - page 34 page 68 paragraph bridging p. 18 and 19 -----	10-12																																					
X	WO 2008/022651 A1 (TURZI ANTOINE [CH]) 28 February 2008 (2008-02-28)	1-9, 13-16																																					
Y	page 13 - page 14 page 18 - page 19 -----	10-12																																					
X	WO 2016/083549 A2 (TURZI ANTOINE [CH]) 2 June 2016 (2016-06-02)	1-9, 13-16	30																																				
Y	page 23 page 40 - page 41 claim 1 -----	10-12																																					
-/-																																							
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.			<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.																																				
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																																							
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																																							
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report																																					
16 June 2021		22/06/2021																																					
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Steinheimer, K																																					

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/055552

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	WO 2013/007308 A1 (GARBIN STEFANIA [CH]) 17 January 2013 (2013-01-17)	1-9, 13-16	
Y	example 1 -----	10-12	
X	WO 2016/001624 A1 (PPLUS SKIN CARELTD [GB]) 7 January 2016 (2016-01-07)	1-9, 13-16	10
Y	page 39 - page 40 page 34 -----	10-12	
Y	WO 2010/122548 A2 (ESTERON AARON [IL]) 28 October 2010 (2010-10-28) page 13 -----	1-16	
Y	PETER EVERTS ET AL: "Platelet-rich plasma and platelet gel: a review", JOURNAL OF AMERICAN SOCIETY OF EXTRA-CORPOREAL TECHNOLOGY, vol. 38, no. 2, 1 June 2006 (2006-06-01), pages 174-187, XP055372878, US ISSN: 0022-1058 page 32 - page 39 -----	1-16	20
Y	EVERTS P A M ET AL: "Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation", TRANSFUSION MEDICINE, OXFORD, GB, vol. 16, no. 5, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 363-368, XP003026088, DOI: 10.1111/j.1365-3148.2006.00708.x the whole document -----	1-16	
Y	SCLAFANI ANTHONY P ET AL: "Platelet Preparations for Use in Facial Rejuvenation and Wound Healing: A Critical Review of Current Literature", AESTHETIC PLASTIC SURGERY, SPRINGER VERLAG, NEW YORK, NY, US, vol. 39, no. 4, 5 June 2015 (2015-06-05), pages 495-505, XP035513791, ISSN: 0364-216X, DOI: 10.1007/s00266-015-0504-x [retrieved on 2015-06-05] page 495 - page 496 -----	1-16	30
		-/-	40

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/055552

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VEITH AUSTIN P ET AL: "Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER, AMSTERDAM , NL, vol. 146, 26 September 2018 (2018-09-26), pages 97-125, XP085893412, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/J.ADDR.2018.09.010 [retrieved on 2018-09-26] page 103 - page 104	1-16
A	FILIPPO GRAZIANI ET AL: "The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts", CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH, vol. 17, no. 2, 1 April 2006 (2006-04-01), pages 212-219, XP055372875, DK ISSN: 0905-7161, DOI: 10.1111/j.1600-0501.2005.01203.x page 217 - page 218	1-16
	-----	
		20
		30
		40

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/EP2021/055552

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
AU 2013203115	B2	03-12-2015	NONE	
WO 2008022651	A1	28-02-2008	EP 2073862 A2 EP 3111974 A2 EP 3395383 A1 ES 2600793 T3 ES 2831708 T3 PL 2073862 T3 PL 3111974 T3 US 2009317439 A1 US 2014010857 A1 US 2016158286 A1 US 2017080028 A1 US 2017258839 A1 US 2018036346 A1 US 2018042964 A1 US 2018353546 A1 US 2020179456 A1 US 2020405765 A1 US 2021030805 A1 WO 2008022651 A1 WO 2008023026 A2	01-07-2009 04-01-2017 31-10-2018 10-02-2017 09-06-2021 31-01-2017 08-02-2021 24-12-2009 09-01-2014 09-06-2016 23-03-2017 14-09-2017 08-02-2018 15-02-2018 13-12-2018 11-06-2020 31-12-2020 04-02-2021 28-02-2008 28-02-2008
WO 2016083549	A2	02-06-2016	AU 2015352458 A1 AU 2021201102 A1 BR 112017010837 A2 CA 2968731 A1 CL 2017001357 A1 CN 107206133 A CO 2017005371 A2 CR 20170288 A DO P2017000128 A EA 201791084 A1 EC SP17039547 A EP 3223875 A2 JP 2017536892 A JP 2018164757 A KR 20170088366 A MA 40376 A1 NI 201700064 A PE 20170931 A1 PH 12017500946 A1 SG 11201704218P A TN 2017000220 A1 US 2018110917 A1 WO 2016083549 A2	15-06-2017 11-03-2021 26-12-2017 02-06-2016 02-03-2018 26-09-2017 31-10-2017 10-08-2017 15-08-2017 29-09-2017 01-12-2017 04-10-2017 14-12-2017 25-10-2018 01-08-2017 29-03-2019 22-09-2017 13-07-2017 27-11-2017 29-06-2017 19-10-2018 26-04-2018 02-06-2016
WO 2013007308	A1	17-01-2013	US 2019160103 A1 US 2021113620 A1 WO 2013007308 A1	30-05-2019 22-04-2021 17-01-2013
WO 2016001624	A1	07-01-2016	AU 2015282443 A1 EP 3164198 A1 JP 6806570 B2 JP 2017520555 A US 2017135950 A1 US 2019307674 A1 WO 2016001624 A1	16-02-2017 10-05-2017 06-01-2021 27-07-2017 18-05-2017 10-10-2019 07-01-2016

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

page 1 of 2

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/EP2021/055552

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010122548 A2	28-10-2010	EP 2421578 A2 KR 20100116106 A US 2012045424 A1 WO 2010122548 A2	29-02-2012 29-10-2010 23-02-2012 28-10-2010

## フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I テーマコード(参考)

A 6 1 P	17/18 (2006.01)	A 6 1 P	17/18
A 6 1 Q	19/08 (2006.01)	A 6 1 Q	19/08
A 6 1 Q	19/00 (2006.01)	A 6 1 Q	19/00
A 6 1 K	8/98 (2006.01)	A 6 1 K	8/98
A 6 1 K	35/19 (2015.01)	A 6 1 K	35/19
A 6 1 K	35/14 (2015.01)	A 6 1 K	35/14

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N  
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,  
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K  
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N  
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,  
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ピアヴェ 21 ノヴィステム ソシエタ ペル アチオニ内

F ターム(参考) 4C083 AA071 AA072 CC02 CC37 EE13 EE14 EE22

4C087 AA01 AA02 AA04 BB35 BB43 CA04 DA15 NA14 ZA89 ZA92  
ZA96 ZC52