



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I760313 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 04 月 11 日

(21)申請案號：105129180

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 09 月 08 日

(51)Int. Cl. : C12N5/02 (2006.01)

C12N5/0775 (2010.01)

A61K35/28 (2015.01)

A61K31/726 (2006.01)

A61K31/737 (2006.01)

A61P19/02 (2006.01)

A61P29/00 (2006.01)

(30)優先權：2015/09/08 澳大利亞

2015903658

(71)申請人：澳大利亞商愛迪雅股份有限公司 (澳大利亞) CELL IDEAS PTY LTD (AU)
澳大利亞(72)發明人：班納吉 巴拉卡 BANERJEE, BALARKA (AU)；摩根 夏洛特 MORGAN,
CHARLOTTE (AU)；維西 格拉漢姆 VESEY, GRAHAM (GB)；派克 妮可 漢
娜 PACKER, NICOLLE HANNAH (AU)

(74)代理人：楊長峯

(56)參考文獻：

US 2012/0276632A1

US 2014/0219972A1

do Amaral, Ronaldo JFC, et al. "Platelet-rich plasma releasate
differently stimulates cellular commitment toward the chondrogenic
lineage according to concentration." Journal of tissue engineering
6 (2015): 2041731415594127.

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：4 共 72 頁

(54)名稱

細胞擴增方法及治療組成物

(57)摘要

本發明係關於用於生產間質幹細胞(MSCs)的方法，具體為 MSCs，例如同種異體 MSCs 的大規模生產之方法，以用於治療人類及其他動物的各種疾病。本發明亦關於允許選擇適用於 MSCs 的大規模生產之較佳供體細胞的方法。本發明亦關於藉由本發明的方法製備的純化 MSCs。本發明亦關於血小板裂解液在製備 MSCs 的培養物之方法中的用途及關於富含細胞外基質分泌物的製備。本發明亦關於組成物之製備方法，該組成物包含自具有改善穩定性特性之培養 MSCs 分泌的一或多種成分。本發明亦關於治療發炎症狀的方法，其包括藉由施予富含高分子量醣複合物條件培養基以緩解發炎症狀的疼痛，且關於藉由施予富含高分子量醣複合物條件培養基治療神經性疼痛的方法。

The invention relates to methods for the production of mesenchymal stem cells (MSCs), in particular to methods for the large scale production of MSCs, such as allogeneic MSCs, for use in treating various diseases in humans and other animals. The invention also relates to methods which permit the selection of preferred donor cells suitable for large scale production of MSCs. The invention also relates to purified MSCs prepared by the methods of the invention. The invention also relates to the use of platelet lysate in methods for preparing cultures of MSCs and to the preparation of extracellular matrix-enriched secretions. The invention also relates to methods for the preparation of compositions comprising one or more component

(s) secreted from cultured MSCs, having improved stability characteristics. The invention also relates to methods for treating inflammatory conditions, including alleviating the pain thereof, by administering high molecular mass glycoconjugate-enriched conditioned media, and to methods for treating neuropathic pain by administering high molecular mass glycoconjugate-enriched conditioned media.



I760313

【發明摘要】

【中文發明名稱】細胞擴增方法及治療組成物

【英文發明名稱】CELL EXPANSION METHODS AND THERAPEUTIC

COMPOSITIONS

【中文】

本發明係關於用於生產間質幹細胞(MSCs)的方法，具體為 MSCs，例如同種異體 MSCs 的大規模生產之方法，以用於治療人類及其他動物的各種疾病。本發明亦關於允許選擇適用於 MSCs 的大規模生產之較佳供體細胞的方法。本發明亦關於藉由本發明的方法製備的純化 MSCs。本發明亦關於血小板裂解液在製備 MSCs 的培養物之方法中的用途及關於富含細胞外基質分泌物的製備。本發明亦關於組成物之製備方法，該組成物包含自具有改善穩定性特性之培養 MSCs 分泌的一或多種成分。本發明亦關於治療發炎症狀的方法，其包括藉由施予富含高分子量醣複合物條件培養基以緩解發炎症狀的疼痛，且關於藉由施予富含高分子量醣複合物條件培養基治療神經性疼痛的方法。

【英文】

The invention relates to methods for the production of mesenchymal stem cells (MSCs), in particular to methods for the large scale production of MSCs, such as allogeneic MSCs, for use in treating various diseases in humans and other animals. The invention also relates to methods which permit the selection of preferred donor cells suitable for large scale production of MSCs. The invention also relates to purified MSCs prepared by the methods of the invention. The invention also relates

to the use of platelet lysate in methods for preparing cultures of MSCs and to the preparation of extracellular matrix-enriched secretions. The invention also relates to methods for the preparation of compositions comprising one or more component(s) secreted from cultured MSCs, having improved stability characteristics. The invention also relates to methods for treating inflammatory conditions, including alleviating the pain thereof, by administering high molecular mass glycoconjugate-enriched conditioned media, and to methods for treating neuropathic pain by administering high molecular mass glycoconjugate-enriched conditioned media.

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】細胞擴增方法及治療組成物

【英文發明名稱】CELL EXPANSION METHODS AND THERAPEUTIC

COMPOSITIONS

【技術領域】

【0001】本發明係關於生產間質幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 的方法，特別是關於大規模生產用於治療人類或其他動物之各種疾病的MSCs的方法。在一特定實施例中，該方法允許用於治療的同種異體MSCs之有效大規模生產。本發明亦關於允許篩選適合MSCs大規模生產的較佳供體細胞之方法。本發明亦關於利用本發明之方法製備的純化MSCs。本發明亦關於血小板裂解液(platelet lysate)在製備MSCs之培養方法中的用途及富含細胞外基質分泌物(extracellular matrix-enriched secretions)的製備。本發明亦關於組成物的製備方法，該組成物係包含由培養之MSCs分泌的一或多種成分，如具有改善的穩定性特性之血管內皮生長因子(VEGF)。本發明亦關於藉由施予富含高分子量醣複合物條件培養基(high molecular mass glycoconjugate-enriched conditioned media)治療發炎症狀的方法，其包括緩解發炎症狀的疼痛。本發明亦關於藉由施予富含高分子量醣複合物條件培養基治療神經性疼痛的方法。

【先前技術】

【0002】使用同種異體の間質幹細胞(MSCs)治療人類及動物的各種疾病是許多團隊感興趣之快速擴展的領域。現今，大量的臨床試驗探討MSCs用於治療各種疾病的用途，包含骨關節炎 (osteoarthritis)、心肌梗塞 (myocardial

infarction)、中風 (stroke) 以及免疫系統明確參與的其他疾病，如移植物抗宿主疾病 (graft-versus-host disease)、克隆氏症 (Crohn's disease)、類風濕性關節炎 (rheumatoid arthritis) 以及糖尿病 (diabetes)。MSCs以細胞治療的形式使用，以治療骨頭及軟骨缺損以及幫助創傷癒合，或在組織工程開發中與生物材料組合。

【0003】對於同種異體之間質幹細胞的商業化生產而言，著重於由單一供體的細胞可被有效擴增至足以生產大量的劑量。即使已有用於生產適用於治療的間質幹細胞之習知方法，該方法於大規模生產間質幹細胞的應用仍受限制。例如，該限制為用於建立培養系統的不同組織樣本或細胞樣本之間的增生潛力的不一致性，以使一供體樣本可能具有更多細胞倍增的潛力且適用於細胞的大規模生產，反之另一供體樣本可能具有有限潛力而不適用。目前並沒有讓使用者於早期階段區分上述樣本的可靠手段，其結果造成由一個樣本產生的細胞在達到劑量的可接受數量之前可能變得衰老，而導致努力及資源的浪費。

【0004】此外，除同種異體之間質幹細胞(MSCs) 於治療人類或動物的各種疾病的用途，亦擴大關注在自MSCs的分泌物對治療各種疾病之用途。分泌物可為各種型態，例如描述於申請者的同在審查中的申請案PCT國際公告第WO2013/040649號，名稱「治療方法及組成物」，其內容於此併入作為參考。

【0005】在本文所描述的實施例中，本發明滿足生產MSCs及MSC類的產品的改良方法之需求以及基於MSCs的產物，特別是改善應用於MSCs的大規模生產的習知方法之一或多個限制之方法，例如用於大劑量的同種異體細胞的生產。在實施例中，本發明滿足生產包含MSC分泌的細胞介素及生長因子的組成物的改良方法之需求，以及對於上述組成物，該改良方法或組成物可減輕習知

方法及組成物之一或多個限制，例如容易使用、組成物的儲藏穩定性或治療潛力。

【0006】在實施例中，本發明滿足用於治療發炎症狀，其包含緩解其疼痛的改良方法或替代方法或試劑之需求。在實施例中，本發明滿足用於治療神經性疼痛的改良方法或替代方法及試劑之需求。

【發明內容】

【0007】發明人開發可由單一供體生產非常大劑量的MSCs之方法。該方法包含首先由供體收取大體積的脂肪組織。脂肪抽取物 (lipoaspirate) 接著被消化以分離基質血管部分 (stromal vascular fraction, SVF)，其接著置入組織培養並擴增。

【0008】如本文所述，發明人亦開發在包含血小板裂解液的培養基中生產MSCs的創新方法。發明人已確認在包含血小板裂解液的培養基中MSCs的生長，在如本文所述之條件下，具有令人驚訝的優點，即該細胞分泌高程度的高分子量醣複合物至組織培養基中。此優點可生產富含高分子量醣複合物條件培養基，其提供用於發炎症狀的治療或其疼痛的緩解之額外的治療優點，其包括骨關節炎、或用於神經性疼痛的緩解。由此方式產生的條件培養基具有比在缺少血小板裂解液的情形下生長的MSCs所產生的條件培養基高的黏度。因此，黏度可作為自培養收穫細胞及/或條件培養基的適當時間的指標。如本文所示，培養於包含纖維母細胞生長因子 (fibroblast growth factor, FGF) 及表皮生長因子 (epidermal growth factor, EGF) 之培養基的MSCs亦產生有黏性的條件培養基。

【0009】如本文所述，發明人亦開發用於篩選自不同供體的細胞或組織樣本或來自單一供體的細胞或組織樣本的方法，以選擇適用於大規模生產的細胞。

【0010】在本發明的一態樣中，提供治療個體的發炎症狀的方法，該方法包含施予治療有效量的富含高分子量醣複合物條件培養基至個體。

【0011】在一實施例中，發炎症狀為骨關節炎。在一實施例中，該方法更包含施予治療有效量的擴增培養的MSCs。在一實施例中，該方法包含施予含擴增培養的MSCs及富含高分子量醣複合物條件培養基的組成物。在一實施例中，富含高分子量醣複合物條件培養基是藉由在含血小板裂解液的培養基中培養MSCs所製備。

【0012】在另一態樣中，本發明提供用於製備富含高分子量醣複合物條件培養基之血小板裂解液的用途。

【0013】在一實施例中，血小板裂解液係為人類血小板裂解液。

【0014】在另一態樣中，本發明提供用於製備富含高分子量醣複合物條件培養基的方法，該方法包含在含血小板裂解液的培養基中培養間質幹細胞(MSCs)。在另一態樣中，本發明提供用於製備富含高分子量醣複合物條件培養基的方法，該方法包含在含FGF及/或EGF的培養基中培養間質幹細胞(MSCs)。在一實施例中，細胞被培養至大於約80%匯聚(confluence)。在一實施例中，細胞在匯聚後培養1到10天之間。在一實施例中，細胞在匯聚後培養1到6天之間。在一實施例中，細胞在匯聚後培養大約1天，或在匯聚後大約2天、或在匯聚後大約3天、或在匯聚後大約4天、或在匯聚後大約5天、或在匯聚後大約6天、或在匯聚後大約7天、或在匯聚後大約8天。在一實施例中，條件培養基具

有至少約1.5厘拖(censtokes)的黏度。在一實施例中，條件培養基具有至少約1.6厘拖的黏度。在一實施例中，條件培養基具有至少約1.7厘拖的黏度。在一實施例中，條件培養基具有至少約1.8厘拖的黏度。在一實施例中，條件培養基具有至少約1.9厘拖的黏度。在一實施例中，條件培養基具有至少約2厘拖的黏度。在一實施例中，條件培養基具有至少約2.1厘拖的黏度。在一實施例中，條件培養基具有至少約2.2厘拖的黏度。在一實施例中，條件培養基具有至少約2.3厘拖的黏度。在一實施例中，條件培養基具有大於1.5厘拖的黏度。在一實施例中，條件培養基具有大於1.7厘拖的黏度。在一實施例中，條件培養基具有大於2厘拖的黏度。在一實施例中，條件培養基具有大於2.5厘拖的黏度。

【0015】 在一實施例中，MSCs係為脂肪組織衍生MSCs(adipose tissue-derived MSCs)。在一實施例中，血小板裂解液係為人類血小板裂解液。在一實施例中，培養基包含大約5%至大約10% v/v血小板裂解液。在一實施例中，富含培養基包含蛋白聚醣(proteoglycan)、醣胺聚多醣(glycosaminoglycan)及黏蛋白(mucin)中的一或多種。在一實施例中，富含培養基包含硫酸角質素(keratan sulphate) 硫酸軟骨素(chondroitin sulphate) 或軟骨蛋白聚醣(aggrecan)。在一實施例中，該方法更包含由培養基中移除細胞的步驟。

【0016】 在一實施例中，包含來自培養細胞的分泌物之條件培養基包含與由缺乏血小板裂解液培養的MSC所製備的MSC分泌生長因子或細胞介素相比具有改善穩定性的一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素。在一實施例中，包含來自培養細胞的分泌物之條件培養基包含與由缺乏FGF及EGF培養的MSCs所製備的MSC-分泌生長因子或細胞介素相比具有改善穩定性的一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素。在一實施例中，一或多種MSC分泌生長因子或細胞

介素係選自由 IFN- γ 、IL-8、IL-9、IL-12、IL-15、TNF- α 、IL-10、MCP-1、RANTES、GM-CSF、IP-10、PDGF-bb、VEGF及IL-6所組成之群組。在一實施例中，一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素係為VEGF。

【0017】 在一實施例中，改善的穩定性包含在室溫狀態1個月後保持至少60%活性。在一實施例中，改善的穩定性包含在室溫狀態1個月後保持至少70%活性。在一實施例中，改善的穩定性包含在室溫狀態1個月後保持至少80%活性。在一實施例中，改善的穩定性包含在室溫狀態1個月後保持至少90%活性。

【0018】 在一實施例中，改善的穩定性包含在室溫狀態3個月後保持至少60%活性。在一實施例中，改善的穩定性包含在室溫狀態3個月後保持至少70%活性。在一實施例中，改善的穩定性包含在室溫狀態3個月後保持至少80%活性。在一實施例中，改善的穩定性包含在室溫狀態3個月後保持至少90%活性。

【0019】 在一實施例中，改善的穩定性包含在室溫狀態6個月後保持至少60%活性。在一實施例中，改善的穩定性包含在室溫狀態6個月後保持至少70%活性。在一實施例中，改善的穩定性包含在室溫狀態6個月後保持至少80%活性。在一實施例中，改善的穩定性包含在室溫狀態6個月後保持至少90%活性。

【0020】 在本發明的另一態樣中，提供一種組成物，其包含富含高分子量醣複合物條件培養基。在一實施例中，包含富含高分子量醣複合物條件培養基的組成物包含與由缺乏血小板裂解液或缺乏FGF及EGF培養的MSCs所製備的MSC-分泌生長因子或細胞介素相比具有改善穩定性的一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素。在一實施例中，一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素選自由 IFN- γ 、IL-8、IL-9、IL-12、IL-15、TNF- α 、IL-10、MCP-1、RANTES、GM-CSF、IP-10、PDGF-bb、VEGF及IL-6 所組成之群組。在一實施例中，一

或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素為VEGF。在一實施例中，該組成物中一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素與缺乏富含高分子量醣複合物條件培養基中包含一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素的組成物相比具有改善的穩定性。

【0021】 在一實施例中，組成物係由培養於包含血小板裂解液之培養基的MSCs所製備。在一實施例中，組成物係由培養於包含FGF及/或EGF之培養基的MSCs所製備。

【0022】 在本發明的另一態樣中，提供用於製備包含穩定的一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素的組成物的方法，其中穩定性包含在室溫狀態1個月後保持至少60%活性，該方法包含將在含血小板裂解液的培養基中的間質幹細胞(MSCs)培養足以使一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素分泌進入該培養基的時間。在一實施例中，血小板裂解液的濃度為5% v/v至10% v/v。在一實施例中，血小板裂解液的濃度為10% v/v。在本發明的另一態樣中，提供一種用於製備包含穩定的一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素的組成物的方法，其中穩定性包含在室溫狀態1個月後保持至少60%活性，該方法包含將在含FGF及/或EGF的培養基中的間質幹細胞(MSCs) 培養足以使一或多種MSC-分泌生長因子或細胞素分泌進入培養基的時間。在一實施例中，FGF及/或EGF的濃度係在10 ng/ml及30 ng/ml之間。在一實施例中，FGF的濃度為20 ng/ml。在一實施例中，EGF的濃度為20 ng/ml。在一實施例中，一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素係選自由IFN- γ 、IL-8、IL-9、IL-12、IL-15、TNF- α 、IL-10、MCP-1、RANTES、GM-CSF、IP-10、PDGF-bb、VEGF及IL-6所組成之群組。

在一實施例中，一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素係為VEGF。在一實施例中，MSCs係為人類脂肪衍生MSCs。

【0023】 在一實施例中，該方法包含將在含血小板裂解液的培養基中的MSCs培養至大於約80%匯聚的細胞密度。在一實施例中，該方法包含將在含血小板裂解液的培養基中的MSCs培養至大於約85%匯聚的細胞密度。在一實施例中，該方法包含將在含血小板裂解液的培養基中的MSCs培養至大於約90%匯聚的細胞密度。在一實施例中，該方法包含將在含血小板裂解液的培養基的MSCs培養至超越約95%匯聚的細胞密度。在一實施例中，該方法包含將在含血小板裂解液的培養基中的MSCs培養至大於約100%匯聚的細胞密度。在一實施例中，培養時間係足以製備具有至少約1.5厘拖(censtokes，cSt)的黏度的條件培養基的時間。在一實施例中，培養時間係足以製備具有至少約1.6厘拖的黏度的條件培養基的時間。在一實施例中，培養時間係足以製備具有至少約1.7厘拖的黏度的條件培養基的時間。

【0024】 在一實施例中，該方法更包含由培養物收集條件培養基。在一實施例中，該方法更包含由培養物收集條件培養基及擴增培養的MSCs。

【0025】 在複數實施例中，穩定度可選擇地包含，一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素在室溫狀態1個月後保持至少70%活性、一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素在室溫狀態1個月後保持至少80%活性、一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素在室溫狀態1個月後保持至少90%活性、一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素在室溫狀態3個月後保持至少70%活性、一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素在室溫狀態3個月後保持至少80%活性、一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素在室溫狀態3個月後保持至少90%活性、一或

多種MSC-分泌生長因子或細胞介素在室溫狀態6個月後保持至少60%活性、一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素在室溫狀態6個月後保持至少70%活性、一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素在室溫狀態6個月後保持至少80%活性、一或多種MSC-分泌生長因子或細胞介素在室溫狀態6個月後保持至少90%活性。

【0026】 在本發明的另一態樣中，提供包含擴增培養之MSCs及富含高分子量醣複合物條件培養基的組成物。

【0027】 在一實施例中，根據本發明之組成物係為醫藥組成物。在一實施例中，醫藥組成物為可注射組成物。在一實施例中，醫藥組成物為局部施用的組成物，例如對個體的皮膚、牙齦或黏膜。在一實施例中，醫藥組成物為霜劑、膠體、液體或洗劑。在一實施例中，醫藥組成物包含配製成用於局部施用的膠體或霜劑之富含高分子量醣複合物條件培養基。在一實施例中，組成物不包含界面活性劑。

【0028】 在一實施例中，組成物包含擴增培養的MSCs及富含高分子量醣複合物條件培養基，其中細胞不貼附於包含該組成物的容器。

【0029】 在本發明的另一態樣中，提供一種醫藥組成物，其包含 (i)富含高分子量醣複合物條件培養基，或(ii)擴增培養的MSCs及富含高分子量醣複合物條件培養基、及醫藥上可接受載體、賦形劑或佐劑。

【0030】 在本發明的另一態樣中，提供一種篩選適合用於培養MSCs的大規模生產的MSCs樣本的方法，其包含以下步驟：(i) 在包含血小板裂解液或FCS的培養基中的該樣本的細胞培養1次、2次或3次傳代(passage)以及(ii) 在步驟(i)後於包含同種異體血清的培養基中培養該細胞或其等分樣品(aliquot)，其中

細胞在包含同種異體血清的培養基中持續增生為樣本適用於培養MSCs的大規模生產的指標。

【0031】 在一實施例中，適用於培養MSCs的大規模生產包含在老化前至少25次族群倍增的能力。在一實施例中，適用於培養MSCs之大規模生產包含在老化前至少30次族群倍增的能力。在一實施例中，適用於培養MSCs之大規模生產包含在老化前至少35次族群倍增的能力。在一實施例中，適用於培養MSCs的大規模生產包含在老化前至少40次族群倍增的能力。在一實施例中，適用於培養MSCs之大規模生產包含在老化前至少45次族群倍增的能力。

【0032】 在一實施例中，MSCs樣本係為MSCs的脂肪組織衍生樣本。在一實施例中，MSCs樣本係選自人類、犬、馬及貓的MSCs。

【0033】 在本發明的另一態樣中，提供一種篩選不適用於培養MSCs的大規模生產的MSCs樣本的方法，其包含以下步驟：(i) 在包含血小板裂解液或FCS的培養基中的該樣本細胞培養1次、2次或3次傳代及(ii) 在步驟(i)後於包含同種異體血清的培養基中培養該細胞或其等分樣品，其中細胞在包含同種異體血清的培養基中增生失敗為樣本不適用於培養MSCs的大規模生產的指標。

【0034】 在一實施例中，細胞無法達到匯聚係為細胞增生失敗的指標。

【0035】 在本發明的另一態樣中，提供一種培養MSCs之大規模生產的方法，其包含以下步驟：(i) 取得包含MSCs的細胞樣本或組織樣本；(ii) 將樣本的至少部分培養在包含血小板裂解液或FCS的培養基中用於1次、2次或3次傳代，以提供培養細胞群；(iii) 將自步驟(ii)的培養細胞群的部分培養在包含同種異體血清的培養基中，其中細胞於包含同種異體血清的培養基中持續增生；(iv) 將

自步驟(i)或步驟(ii)的培養細胞群的至少部分培養在包含血小板裂解液或FCS的培養基中用於額外傳代，以提供培養MSCs的大規模製備。

【0036】 在一實施例中，細胞樣本為包含脂肪組織的基質血管部分的細胞懸浮液。在一實施例中，細胞樣本包含分離的MSCs。在一實施例中，細胞樣本包含擴增培養的MSCs。在一實施例中，步驟(i)到步驟(iv)的至少其一的細胞被冷凍。在一實施例中，步驟(iv)包含培養該細胞群用於10次或更多次的族群倍增；或用於15次或更多次的族群倍增；或用於20次或更多次的族群倍增；或用於25次或更多次的族群倍增；或用於25次或更多次的族群倍增；或用於35次或更多次的族群倍增。在一實施例中，該方法更包含在傳代之後收穫擴增培養的MSCs且可選地，將該收穫的細胞等分至構成MSCs的治療劑量的個別容器。在一實施例中，MSCs的治療劑量包含約200萬及約1000萬個MSCs之間。在一實施例中，MSCs的治療劑量包含約500萬個MSCs。

【0037】 在本發明的另一態樣中，提供一種用於製備擴增培養的脂肪組織衍生間質幹細胞之純化族群的方法，其包含以下步驟：

(i)自個體取得脂肪組織的樣本，

(ii)在適當的條件下培養脂肪組織，以至少部分消化脂肪組織，其中該條件包含在含濃度 50mg/L 至 500mg/L 之間的鈣之緩衝液，以及存在濃度 0.2% 重量/體積(wt/vol)至 0.02% wt/vol 之間的膠原蛋白酶(collagenase)中進行培養，

(iii)離心培養的脂肪組織，以取得基質血管部分(SVF)細胞，

(iv)以需求植入密度將該 SVF 細胞植入至組織培養中，

(v)在適當條件下將該培養物在補血清的培養基培養至至少 85%培養瓶(flask)匯聚，

(vi)自培養物收穫 MSCs，

(vii)將收穫的 MSCs 或其子代(progeny)傳代至少 10 次的族群倍增，以取得擴增培養的 MSCs。

【0038】 在一實施例中，膠原蛋白酶濃度為0.05% wt/vol。在一實施例中，鈣的濃度係在300 mg/L至400 mg/L之間。在一實施例中，鈣的濃度為330 mg/L。在一實施例中，該條件包含在一軌道旋轉器上混合。在一實施例中，植入密度為組織培養瓶的每cm²約5,000至約15,000個細胞。在一實施例中，組織培養物包含培養細胞於微載體(microcarrier)珠或盤上。在一實施例中，補充血清培養基包含FCS或血小板裂解液。在一實施例中，FCS的濃度係在大約5%到10%之間。在一實施例中，血小板裂解液的濃度係在大約5%到10%之間。在一實施例中，血小板裂解液的濃度為10% v/v。在一實施例中，該方法更包含在細胞經歷超過三次傳代前，將該細胞的等分樣品培養於包含同種異體血清之培養基，以辨別適合持續使用於培養MSCs的大規模生產的細胞。在一實施例中，該方法更包含細胞在包含FCS或血小板裂解液的培養基中持續傳代，該細胞已辨別為適合持續使用於培養MSCs的大規模生產。在一實施例中，該方法包含傳代收穫的MSCs或其子代用於至少25次的族群倍增；或用於至少30次的族群倍增；或用於至少35次的族群倍增；或用於至少40次的族群倍增；或用於至少45次的族群倍增，以取得擴增培養的MSCs。

縮寫

【0039】 DMEM，杜貝克氏修改伊格斯培養基 (Dulbecco's Modified Eagles Medium)。

【0040】 SVCs ，基質血管細胞 (stromal vascular cells) 。

【0041】 SVF ，基質血管部分 (stromal vascular fraction) 。

【0042】 MSC ，間質幹細胞 (mesenchymal stem cell(s)) 。

【0043】 FCS ，胎牛血清 (fetal calf serum) (本文中亦可縮寫為FBS ，為胎牛血清(fetal bovine serum)) 。

【0044】 ABC ，碳酸氫銨緩衝液(ammonium bicarbonate buffer) 。

【0045】 wt/vol ，重量/體積 (weight/volume) 。

【0046】 (v/v)或v/v ，體積/體積 (volume/volume) 。

【0047】 VEGF ，血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor) 。

【0048】 (cSt) ，厘拖(centistokes) 。

【圖式簡單說明】

【0049】 第1圖：生長於胎牛血清及血小板裂解液的MSCs的培養基之黏度比較。MSCs培養於補充有10%FCS(方形)或10%血小板裂解液(圓形)的DMEM且於匯聚後的0、1、3及6天測定分別培養基的黏度。動黏度 (Kinematic viscosity)係如實例5所描述來測定，且以厘托(cSt)表示。

【0050】 第2圖：VEGF的穩定度。於DMEM加上5%血小板裂解液培養10天的人類脂肪衍生MSCs的培養物收穫的上清液中的VEGF量利用酵素免疫測定法(ELISA)測量，在上清液組成物儲藏於室溫(約23°C)下的六個月期間內的不同時間點進行測試。

【0051】 第3圖：比較14種不同的細胞介素在黏性(淺色陰影)及非黏性(深色陰影)的條件培養基於22°C儲藏5個月後的百分比變化。數值以與儲藏於-80°C的起始材料的百分比變化表示。

【0052】 第4圖：取自小於或大於80%匯聚的培養物的培養基黏度比較。

【實施方式】

【0053】 在本說明書中，除非全文中另有說明，「一 (a)」、「一個 (one)」元件不排除其複數形式。相似地，除非全文中另有說明，「一實施例」係不排除描述實施例的特性應用於與一或多種其他描述實施例的組合。

【0054】 在本說明書的內文中，用語「包含 (comprising)」意指包括，但不必為僅包括。此外，「包含 (comprising)」一詞的變異，如「包含 (comprise)」及「包含 (comprises)」係具有相應變化的含義。因此，用語「包含 (comprising)」及其變異用於包括而非排除的含義，以使額外的整數或特徵可選地存在於組成物、方法等，換言之，可被描述為包含整數A，或包含整數A及B等。

【0055】 在本說明書之內文中，用語「大約 (about)」及「大約 (approximately)」將被理解為表達具通常知識者將與給定數值相關的常用公差 (usual tolerances)。

【0056】 在本說明書的內文中，參數所記載的範圍將理解為，該參數包含表示範圍內所有的數值，包括範圍的表示端點。例如，範圍「5到10」將理解為包括數值5、6、7、8、9及10及任何記載範圍內的子範圍，如包含子範圍6

到10、7到10、6到9、7到9等，且包含所示範圍的全文中的有理整數之間的任何數值及範圍，如5.5、6.5、7.5、5.5到8.5及6.5到9等。

【0057】本說明書包含的任何文件、法律(acts)、材料、裝置、文章等僅用於提供本發明之內文為目的。不應將其視為承認任何或所有這些內容形成習知技術基礎的一部分，或是在本申請的優先權日之前的本發明相關領域的通常知識。

【0058】在本說明書的內文中，用語「複數的 (plurality)」及「複數的 (multiple)」表示任何大於一的數量。

【0059】將注意的是，參照本文的發明方法及組成物於治療 (treatment) 或治療 (therapy)，或由供體取得之組織或細胞的用途將理解為可應用於人類及非人類，如獸醫的應用。因此將理解的是，除另有表示，提及的供體、病患、個體(subject)或個體(individual)係指人類或非人類，如任何社會、經濟、農業或研究重要性的任何種類的個體，其包含但不限於以下類別對象：羊、牛、馬、豬、貓、犬、靈長類、嚙齒類，特指這些類別的馴養對象或養殖對象：如綿羊、牛、馬、豬、貓或狗。

【0060】當本文中描述的本發明的各種實施例或態樣的實例時，將通常以適當的用語，包含「如 (such as)」或「例如 (for example)」或「包含 (including)」作為引語。將理解的是，實例被描述成包含可能性 (inclusive possibilities)，例如用於說明或理解的目的，且除非另有說明，否則其不被限制。

【0061】本文所指之醫藥組成物例如當意圖用於治療用途時，亦可稱作藥劑。因此，將理解的是，除非全文中另有說明，當本發明描述為包含所述成

分之組成物用於製備預期治療目的的醫藥組成物的用途時，該描述亦意同用於製備預期治療目的的藥劑的用途。

【0062】 在本說明書的內文中，以及特指擴增培養MSCs用於治療用途的用途內文中，「劑量 (dose)」係指施予至個體以向個體提供治療效益的足量的擴增培養MSCs的等分樣品。根據內文，關於本文中的「劑量 (dose)」可包含或可不包含額外的治療成分，如富含高分子量醣複合物條件培養基。在「劑量 (dose)」中的細胞的確切數量的範圍通常為約200萬到約2,000萬個細胞，較佳地例如約400萬到約1,000萬個細胞、或較佳地為約500萬個細胞。將理解的是，「劑量(dose)」可以一次或多於注射來施予。「劑量 (dose)」亦可被視為擴增培養MSCs的適合儲藏的單位。

【0063】 本說明書內文中的用語「治療 (treating)」、「治療 (treatment)」或「治療 (therapy)」等係指症狀及/或徵狀或疾病的根本原因，如發炎疾病的緩解。在部分實施例中，治療將至少暫時的減緩、延遲或停止疾病的進展或疾病或損傷的症狀，或反轉疾病或損傷的進展。因此，本發明的內文中的用語「治療 (treatment)」或其衍生詞如「治療 (treating)」，當其用於關於治療的應用包含治療的所有態樣，如與所治療的徵狀相關的疼痛的緩解、所治療的徵狀相關的嚴重度的緩解、改善與所治療的徵狀相關的一或多種症狀等。用語「治療 (treatment)」或其衍生詞的用法將理解為表示所「治療 (treated)」的個體可經歷前述益處的任一或多項。

【0064】 用語「預防 (preventing)」及在疾病的「預防 (prevention)」的內文中的相似詞係指症狀之進展或疾病的根本原因的阻礙。將理解的是，疾病的完全預防是可發生的，以使疾病不發生於所治療的動物或個體。同樣地，將理

解的是該用語包含部分預防，例如疾病不會進展至未被治療的動物或個體所觀察到的典型狀態。

【0065】 將理解的是，本文之描述指出由本發明的實施例提供的具潛力優點或具潛力改善，並非所有的實施例需具備該優點或改善。

【0066】 在允許的程度內，本文所引用的所有參考文獻之全體內容藉由參照而併入本文中。

【0067】 在本文所述之實施例中，本發明係關於用於擴增培養間質幹細胞(MSCs)之大規模製備的改良方法，如用於治療方法中。該方法允許自脂肪組織的單一供體製備以生產數百萬治療劑量的MSCs。

【0068】 間質幹細胞(MSCs)係為後天的(post-natal)、多功能的成體幹細胞。間質幹細胞(MSCs)係存在於體內許多組織且於組織修復及再生扮演重要的角色。用於治療目的，MSCs通常由骨髓、胎盤、臍帶血及脂肪組織收穫。在許多情況，細胞在使用前先藉由組織培養而擴增。本發明提供擴增培養細胞的大規模生產的改良方法，其包含篩選具有較佳地用於大規模生產的潛力的供體細胞的方法。

脂肪組織

【0069】 在本發明的內文中，間質幹細胞(MSCs)較佳地源自脂肪組織。「源自 (originate)」係意謂自用於本發明之方法或組成物所分離的MSCs的組織類型。MSCs可自特別以用於本發明的方法及組成物為目的之組織分離出來，或MSCs可事先自與本發明之方法或組成物無關的程序中的組織源分離。

【0070】脂肪組織可為人類脂肪組織或哺乳類動物脂肪組織，如犬、馬或貓科動物。典型地，脂肪組織的來源將與作為MSCs的預期受體(recipient)為相同物種。脂肪組織可包含「白色」脂肪組織或「棕色」脂肪組織。

【0071】伴隨著豐富的MSCs，脂肪組織亦包含免疫細胞、血管平滑肌細胞、內皮細胞及外皮細胞，其與MSC一起被共稱為基質血管部分(SVF)。

脂肪組織的收集與處理

【0072】脂肪組織是藉由抽脂手術或切除而自供體收集。在本發明的方法中，針對培養MSCs的大規模製造而收集或可利用大量(大約200克到2000克)的脂肪抽取物作為起始材料，其將影響可製造的細胞量。

【0073】為了自狗取得細胞，脂肪組織通常從鑷狀、鼠蹊部脂肪墊或肩膀切除而收集。為了自馬取得細胞，脂肪組織通常從馬尾根部、胸腔或腹部切除而收集。為了自人類取得細胞，脂肪組織自腹部、大腿或臀部收集。

【0074】脂肪組織起初可利用該技術領域中易取得的技術而藉由機械式分離脂肪組織來處理。可使用任何適用脂肪組織的機械式分離的方法，例如藉用刀片、或用剪刀切碎脂肪組織、或迫使脂肪組織通過具有足以將組織破壞成分離細胞或小塊的脂肪組織的孔徑的篩子或篩孔，或上述技術的組合。在較佳方法中，當使用機械式分離的場合，脂肪組織在消化前藉由剪刀精細地切碎。

【0075】令人驚訝的是，發現自脂肪組織萃取的細胞量可在保持細胞存活的同時最大化，因此通過最佳的脂肪組織消化的使用而最大化SVF細胞產率及存活率，如以下文所述。當最大化SVF細胞產率及存活率對操作者具重要性的場合，該方法將為較佳的。

【0076】 脂肪組織藉由與存在於適當緩衝液中的膠原蛋白酶培養來消化。在消化過程中，膠原蛋白酶加入以達到大約0.2%重量/體積(wt/vol)及大約0.02% wt/vol之間的最終濃度、如大約0.2% wt/vol、或大約0.15% wt/vol、或大約0.1% wt/vol、或大約0.9% wt/vol、或大約0.08% wt/vol、或大約0.07% wt/vol、或大約0.06% wt/vol、或大約0.05% wt/vol、或大約0.04% wt/vol、或大約0.03% wt/vol或大約0.02% wt/vol。在一較佳實施例中，消化步驟中的膠原蛋白酶加入以達到大約0.05 wt/vol的最終濃度。

【0077】 發明人已確認的是，改善細胞產率及存活率亦藉由消化時含鈣緩衝液的使用來輔助。消化步驟時的鈣濃度在大約50 mg/L到大約500 mg/L的範圍，如大約50 mg/L、100 mg/L、125 mg/L、150 mg/L、175 mg/L、200 mg/L、225 mg/L、250 mg/L、300 mg/L、325 mg/L、330 mg/L、350 mg/L、375 mg/L、400 mg/L、425 mg/L、450 mg/L、475 mg/L、500 mg/L。在一較佳實施例中，消化時的鈣濃度為大約330 mg/L。在一較佳實施例中，緩衝液為含鈣的林格氏緩衝液(Ringers buffer)或含鈣的磷酸鹽緩衝生理鹽水 (PBS)。

【0078】 脂肪組織於膠原蛋白酶的存在下在適當溫度，如大約37°C培養適當時間，如大約30到大約120分鐘。在一較佳實施例，培養大約90分鐘。發明人已確認的是，改善細胞產率及存活率亦藉由在消化步驟時謹慎的混合來輔助，以釋出細胞，由於過度混合或太劇烈混合將影響細胞存活率。混合可藉手進行，如在培養期間以間隔，例如約每15分鐘將材料緩和地反轉。混合可藉機械手段進行，如在大約50 rpm至大約200 rpm的範圍混合，例如在軌道旋轉器上。在一較佳實施例中，混合係藉由手或在軌道旋轉器上以大約100 rpm混合。

【0079】 脂肪組織衍生細胞懸浮液的製備可包含離心步驟。懸浮於液體，如培養基中的分離細胞或小型聚集或小塊的脂肪組織的離心為大約500 g，10分鐘，或在足夠時間及足夠的G力(g-force)，以產生包含脂肪衍生之非脂肪細胞的細胞團塊，在其上為培養基層，漂浮在其上依序為包含存活之脂肪細胞的層，及漂浮在最上層為自破裂的脂肪細胞衍生的脂質層。離心後，較佳地丟棄脂質層、脂肪細胞及培養基層，且留存被稱為SVF及包含MSCs的團塊材料。細胞團塊亦稱為脂肪衍生之非脂肪細胞或SVF細胞。

組織培養

【0080】 SVF細胞置入組織培養系統。SVF包含包括MSCs的細胞類型的混合族群。紅血球細胞(red blood cells，RBCs)通常亦存在於SVF中，其可為細胞叢。RBCs通常以少量的污染物形式存在，多數的RBCs在以膠原蛋白酶消化之前藉由清洗脂肪組織塊移除。其他研究者通常在進行組織培養前先自其他細胞類型純化MSCs，如藉由螢光激發細胞分選(fluorescence activated cell sorting，FACS) 或免疫磁性細胞分離(immune-magnetic cell separation，IMS)或藉由密度梯度離心部分純化、或裂解或移除紅血球細胞、或移除細胞叢。在本發明的方法中，不需在組織培養前從SVF更進一步純化MSCs。發明人驚訝地確認的是，不需事先純化MSCs，且事實上當MSCs不在培養前進一步由SVF純化時，在培養上獲得改善的MSC產率及存活率。不期望受理論所限，關於藉由部分習知方法進行裂解以移除紅血球細胞的步驟，發明人懷疑裂解紅血球細胞會負面影響MSC的產率及存活率。

【0081】SVF細胞以組織培養瓶的每 cm^2 大約5,000及大約15,000個細胞之間的程度植入。MSCs為存在於SVF中成長最快速的細胞且長的比其他細胞類型快(out-grow)而產生MSCs的純族群。令人驚訝的是，儘管競爭汙染或非MSC細胞存在，此擴增方法比在組織培養前先純化MSCs的起始族群還高的細胞產率。

【0082】培養MSCs的方法為該技術領域中已知，且包含例如培養細胞以形成貼附細胞培養，如匯聚的貼附細胞培養。在培養細胞期間或之後的任何適當，例如自可為匯聚的貼附細胞培養之貼附的細胞培養收集上清液，且可選地，自上清液移除細胞，以形成包含脂肪組織衍生分泌物的組成物。任何適當的培養基可用於細胞的培養。適當的培養基包含，例如，DMEM、RPMI及最低必要培養基 (minimal essential media)。在一實施例中，細胞培養於DMEM中。

【0083】細胞培養較佳地為在無菌血清的存在下。培養內的血清濃度可為輔助脂肪組織衍生細胞的培養的任何適當濃度，例如在大約1%體積/體積(v/v)到大約30% v/v的範圍，如大約10% v/v、或大約15% v/v、或大約20% v/v。血清可為用於培養脂肪組織衍生細胞的任何適當血清，如商業性胎牛血清，或如用該技術領域中的已知方法自馬製成的血清。在本發明的實施例中，血清係由與取得脂肪組織的相同個體所製備的自體(autologous)血清，或同種異體(allogeneic)血清。典型地，細胞於37°C與5% CO_2 進行培養。

【0084】在本發明的實施例中，血清係來自不同的物種。例如，細胞可為犬、馬、或人類的且可分別培養於含有非犬、馬、或人類的血清之培養基。在本發明的實施例中，細胞培養於添加胎牛血清的培養基。在本發明的實施例

中，培養基包含10% FCS。細胞可在後期傳代(later passage)，例如最終傳代由FCS轉換至同種異體的血清，以自最終產物移除FCS。

【0085】 在用於培養MSCs之大規模製備的方法中，細胞通常於培養基及血清中在37°C的CO₂細胞培養箱中培養4到21天而生長至至少85%培養瓶匯聚(定義匯聚的方式係經由顯微鏡)。

【0086】 本發明亦提供培養於微載體上的MSCs，例如在攪拌生物反應器中。MSCs可被培養在可不塗布或塗布有特定蛋白質，如膠原蛋白且表面可經處理以具有特定電荷分布的微載體珠(90 - 400 μm)上。微載體可用於在許多容器中的細胞生長，如旋轉培養瓶、微生物反應器、攪拌槽、搖動平台或微重力(microgravity)。細胞亦可培養於Fibra-Cel®盤上(New Brunswick Scientific, Edison, NJ)，其可保持在生物反應器中而作為懸浮攪拌系統(suspended stirred system)或作為靜態封裝床(static packed bed)。

【0087】 在培養的細胞，如MSCs，分泌成分進入培養基，以使自培養取得的液態將包含由細胞分泌的成分。該分泌成分在本文中可總稱為分泌體(secretome)。當細胞培養時產生的液態在本文中可稱為分泌物，或在培養的細胞為脂肪組織衍生的非脂肪細胞的場合，可稱為脂肪組織衍生的非脂肪細胞的分泌物。替代地，培養時產生及可選地由培養取得的液態在本文中亦可稱為條件培養基。

在血小板裂解液中培養的MSCs及富含高分子量醣複合物培養基的生產

【0088】 在本發明的實施例中，細胞培養於血小板裂解液中。在本文中所述之方法，血小板裂解液較佳為人類細胞的組織培養的血清源。使用的血小

板裂解液的濃度為大約1%體積/體積(v/v)到大約20% v/v，如大約1% v/v、或大約2% v/v、或大約3% v/v、或大約4% v/v、或大約5% v/v、或大約6% v/v、或大約7% v/v、或大約8% v/v、或大約9% v/v、或大約10% v/v、或大約11% v/v、或大約12% v/v、或大約13% v/v、或大約14% v/v、或大約15% v/v、或大約16% v/v、或大約17% v/v、或大約18% v/v、或大約19% v/v、或大約20% v/v，較佳的濃度範圍為大約2%到7.5%，如大約5% v/v，或更加的濃度範圍為大約7.5%到15%，如大約10%。

【0089】血小板裂解液產生高細胞產率的細胞，且藉由細胞在添加血小板裂解液的培養基中生長，發明人驚訝地發現其可產生含有高量的細胞外基質(extracellular matrix，ECM)成分的條件培養基。如本文所述，在血小板裂解液中生長的細胞分泌高濃度的細胞外基質(ECM)成分，其可包含蛋白聚醣類(proteoglycans)、醣胺聚多醣類(glycosaminoglycans)及黏蛋白類(mucins)。

【0090】如本文的實例所述，發明人亦展示相似的非常黏的條件培養基可藉由細胞在含有表皮生長因子(EGF)及/或鹼性的纖維母細胞生長因子(FGF)之培養基中生長而達成。在培養基中的EGF濃度可為大約10 ng/ml到大約30 ng/ml的範圍，如大約20 ng/ml。在培養基中的FGF濃度可為大約10 ng/ml到大約30 ng/ml的範圍，如大約20 ng/ml。

【0091】富含的條件培養基在本文中通常被稱為富含高分子量醣複合物培養基或包含ECM成分的條件培養基。動黏度的初步結果支持的推論是，黏度成分為GAG、蛋白聚醣、軟骨蛋白聚醣、多功能蛋白聚醣(versican)、人類基膜聚醣(lumican)、黏蛋白或其他高分子量的分子或分子的複合物。

【0092】本發明因此亦提供用於生產富含高分子量醣複合物培養基的方法。此培養基提供用於治療發炎症狀，其包含骨關節炎的額外治療優點。應注意的是，雖然藉由在添加血小板裂解液的培養基培養MSCs所生產的富含高分子量醣複合物培養基最初是發明人藉由本文所述的本發明方法而利用自脂肪組織取得的MSCs來開發，但發明人認為用於製備富含的培養基的MSCs並不僅限於以本文所述之收集與消化而自脂肪組織中取得。

【0093】例如，本文中描述在用於大規模MSC生產的組織培養的脂肪組織衍生SVF的製備中，SVF較佳地在初始組織培養步驟前不進一步分餾或純化成分離MSCs。在藉由將MSCs培養在添加血小板裂解液的培養基中以製備富含高分子量醣複合物培養基的方法中，可根據該方法所製備的MSCs或可根據提供MSCs的任何其他適當方法所製備或取得的MSCs可用於組織培養。

【0094】例如，較佳的大規模方法在初始培養前不自SVF純化MSCs，用於藉由將MSCs培養在添加血小板裂解液的培養基製備富含高分子量醣複合物培養基的方法可在SVF的初始分離後且在置入包含血小板裂解液的培養基之前可藉由任何適用手段進一步純化。

【0095】作為進一步的例子，用於製備富含高分子量醣複合物培養基的方法的MSCs可為純化且儲藏的MSCs，如事先已純化的細胞及/或藉細胞培養擴增之培養物或自冷凍儲藏恢復的細胞。

【0096】亦將注意的是，用於製備富含高分子量醣複合物培養基的方法的MSCs不限於脂肪組織衍生MSCs。用於製備富含高分子量醣複合物培養基的方法的MSCs因此可源自MSCs的任何適當來源，例如自骨髓、牙髓、脂肪組織、臍帶組織、臍帶血及循環血液。

【0097】再者，本發明因此亦提供MSCs及包含細胞外基質(ECM)成分的條件培養基的組合，該培養基於本文亦可稱為富含高分子量醣複合物培養基。發明人設想細胞與包含ECM的條件培養基的組合的醫藥組成物可較單獨使用MSCs或單獨使用取自MSC培養的條件培養基提供額外的治療優點。因此，本發明的方法允許包含MSCs及包含ECM成分的條件培養基的組成物，其中包含ECM成分的條件培養基可為組成物的細胞在其中擴增的培養基或可為取自不包含在組成物的MSCs的擴增的培養基。包含MSCs及包含ECM成分的條件培養基的組成物的用途，其中擴增的該MSCs可提供額外的優點。MSCs或富含高分子量醣複合物培養基或其組成可為醫藥組成物的型態。在此型態中，組成物通常可包括醫藥上可接受載體、賦形劑或佐劑或通常至少不包括不相容於意圖個體的治療用途之成分。醫藥組成物可為用於注射的型態或用於局部施用的型態。在組成物包含MSCs的場合，組成物通常為適用於注射的型態。在組成物用於局部施用的場合，組成物通常將包含膠體、霜劑、液體或洗劑配方。

【0098】血小板裂解液可取自任何適當的來源。適用的商業來源為自Mill Creek Life Sciences(羅徹斯特(Rochester)，明尼蘇達州(Minnesota)，美國)的PLT Max。血小板裂解液可衍生自與培養的MSVs相同或不同的物種。在較佳的實施例中，血小板裂解液為衍生自與培養的MSCs相同的物種。在本文中，血小板裂解液「衍生自 (derived from)」描述由血液樣本製備的血小板裂解液，如藉由從血液樣本分離出血小板並接著裂解分離出的血小板。衍生血小板裂解液的血液樣本可與MSCs、或在自脂肪組織製備MSCs的場合，製備MSCs的脂肪組織相同或不同的個體。典型地，血液樣本為取自與獲得或已獲得的MSCs或脂肪組織不同的個體。

【0099】 血小板裂解液可利用該所屬技術領域已知的方法或套組自新鮮的全血或儲藏的全血製備。血小板裂解液可取自單一供體或可取自混合的血液或細胞。血小板裂解液可自，如收集後5到7天的過期(expired)輸液用全血或血小板製備。血小板裂解液可利用商業可購得套組，如自MacoPharma(法國)的血小板裂解液套組而自血液製備。在一實施例中，血小板裂解液係自收集存在抗凝血劑，如檸檬酸鹽(citrate)的血液製備。血液在適當的條件下離心，如在200g，約20分鐘，接著收集血小板(最上層)並進行凍融(freeze-thawing)以裂解細胞。典型地，進行多次凍融，如二次、三次、四次或更多次。離心裂解的血小板以移除細胞斷片的團塊，例如在4000g，約10分鐘。可滅菌血小板裂解液，如經由適當的基質過濾，例如0.22微米過濾器，並保存於適當的條件，如-80°C直至使用。

【0100】 在本發明的方法中，當細胞培養於血小板裂解液，肝素通常亦加入至細胞培養基以預防凝結。包含於細胞培養基中的肝素可為大約0.6 IU/mL至大約5 IU/mL的範圍。例如包含的肝素的濃度可為大約0.6 IU/mL、大約0.8 IU/mL、大約1 IU/mL、大約1.5 IU/mL、大約2 IU/mL、大約2.5 IU/mL、大約3 IU/mL、大約2.5 IU/mL、大約4 IU/mL、大約4.5 IU/mL或大約5 IU/mL。在較佳實施例中，包含大約2 IU/mL的肝素。

【0101】 如本文中之實例所述，顯示富含的條件培養基具有比將MSCs培養於添加有FCS的培養基(如本文示例，缺乏血小板裂解液、EGF、FGF)所產生的條件培養基更高的黏度。顯示黏度隨著MSCs細胞密度的增加而增加。在本發明的實施例中，富含的條件培養基具有至少大約1.5厘拖、或至少大約1.6厘拖、或至少大約1.7厘拖的黏度。

【0102】 所屬技術領域具有通常知識者將理解的是，黏度可藉由替代方法量測，如藉由動態黏度(dynamic viscosity)測量而不是藉由本文之實例所進行的動黏度(kinematic viscosity)測量。因此，將理解的是，在本發明之實施例中，黏度係為本發明的描述性特徵，包含本發明之所述特徵但具有替代單位描述的黏度，如厘泊(cenipoise, cP)的組成物可發生於若以動態黏度測量黏度時，當測量或描述之黏度以厘拖的單位為至少大約1.5厘拖、或至少大約1.6厘拖、或至少大約1.7厘拖、或本文中定義的其他數值時，仍在本發明的範圍之內。

【0103】 如本文中的實例顯示，本發明之富含的條件培養基提供用於改善分泌的細胞成分的穩定性，以血管內皮生長因子(VEGF)及多種其他細胞介素及生長因子作為示例。在實例中，改善穩定性以於室溫下經過延長時期的儲存期間測定VEGF及其他細胞介素與生長因子的穩定性為特徵。與文獻中所教示的例如VEGF的分泌物之半衰期(half-life)在室溫下為數小時的預期相反，如利用ELISA的測量，在六個月的期間於室溫下(其為約23°C)儲存的富含的條件培養基並不會導致VEGF的明顯損失。這些結果亦顯示於室溫儲存五個月時，多種不同的細胞介素及生長因子在黏性材料中比在非黏性材料中更加穩定。

供體的篩選

【0104】 發明人已確認的是，可由單一供體的擴增細胞取得的擴增培養MSCs與自不同供體的細胞之間的劑量數有很大的不同。來自部分供體的細胞在有限量的細胞倍增後停止生長，而來自其他供體的細胞則持續生長至更大量的細胞倍增。發明人亦確認的是，可藉由自特定個體的供體動物之不同位置所獲得的擴增細胞取得的劑量數存在差異。這些差異的原因並未被理解且目前沒

有令人滿意的方法以分析可在相對早期階段分析細胞，以預測可由特定細胞的擴增生產多少劑量，該細胞自特定特體供體或供體的特定位置所獲得。這代表由不同供體或位置取得的細胞需生長及擴增，若其未達到需求之細胞倍增的期望數則丟棄。因此，適當預測方法的缺乏可能導致例如用於治療目的大規模製備MSCs需要增加成本及增加時間。

【0105】發明人已開發並於本文中描述用於自不同供體或位置篩選細胞的方法，以快速地確認供體細胞是否適合用於大量細胞的製造。

【0106】發明人已開發並於本文中描述用於自不同供體或位置篩選細胞的方法，以快速地確認供體細胞是否適合用於大量細胞的製造，該方法包含將其中培養細胞的組織培養基從添加血小板裂解液或FBS的培養基培養更換成添加同種異體血清的培養基。作為縮寫用語，此篩選方法在本文中可稱為「血清切換 (serum switch)」方法。自不適合用於大量生產的細胞的供體取得的細胞無法良好的對應這種血清的變化。該細胞將停止複製並且無法達到匯聚。

【0107】在基於更換組織培養基的篩選方法中，細胞通常於血小板裂解液或FBS中培養一次、二次或三次傳代，較佳為二次傳代，接著將血小板裂解液或FBS更換為同種異體血清。使用於本發明的此態樣的同種異體血清的濃度通常為約10% v/v至約20% v/v。適合用於大規模生產的細胞將在同種異體血清中持續生長並達到匯聚。多數的供體細胞樣本於同種異體血清中不持續生長，且無法達到匯聚。

【0108】在本篩選方法的一實施例中，在早期傳代，例如兩次傳代以後取得的自供體樣本的細胞的部分作為「測試 (test)」樣本，由於該細胞及其後代可在測試後丟棄，因而亦可稱為犧牲測試樣本。將細胞的測試樣本進行前述的

「血清切換」。若細胞可對應添加同種異體血清的培養基的更換，即其持續生長並達到匯聚，則使用者回歸自該「測試」細胞取得的樣本，並將該細胞或其一部分持續大規模培養於較佳培養基，通常為含FBS或血小板裂解液的培養基。如本文中他處所描述，用於培養人類MSCs的較佳培養基係添加血小板裂解液的培養基。

【0109】因此，於本文中描述之篩選供體細胞或供體樣本的方法允許使用者辨別適合用於或有利於進行MSCs大規模生產與較不適合的供體細胞或樣本。在此方式中，不適合或較不適合用於預期用途的細胞或樣本可在致力於大規模使用該細胞之前丟棄。本篩選適當材料的方法允許使用者可集中致力於具有可培養足夠的族群倍增以生產所需的MSCs大規模生產之能力的細胞及樣本。為了產生預想的MSCs極大規模生產，細胞通常需要在老化前高於約10次的族群倍增、更佳為在老化前高於約15次的族群倍增、或在老化前高於約20次的族群倍增、或在老化前高於約25次的族群倍增、或在老化前高於約30次的族群倍增、或在老化前高於約35次的族群倍增的能力。當產生自供體樣本的細胞株在少於約10次的族群倍增後老化，尤其是在少於約8或7次的族群倍增後老化時，其通常不適合用於MSCs大規模生產。如本文中所述，「血清切換」方法允許操作者於相對早期階段識別細胞樣本是否適合用於MSCs的極大規模生產，其不需大於約一次、兩次、三次或四次傳代。用於識別適合或不適合的細胞樣本的能力對於MSCs的極大規模生產效率為有益的。

生長於血小板裂解液的MSCs分泌高濃度的ECM成分

【0110】 在本發明之方法的開發中，發明人驚訝地確認的是，當MSCs生長於血小板裂解液時，組織培養基隨著細胞增生而變黏。黏性培養基的分析顯示大量的分子量醣複合物存在於培養基中(參照本文中實例4及實例5)。醣複合物可包括蛋白聚醣類、醣胺聚多醣類及/或黏蛋白類。醣複合物的增加與培養基的黏度增加發生於相同時間。進一步地分析培養基發現培養基的黏度係由GAG、蛋白聚醣、黏蛋白或其他高分子量分子或分子的複合體所致，且存在的主要蛋白聚醣可為軟骨蛋白聚醣、多功能蛋白聚醣、人類基膜聚醣及雙糖鏈蛋白聚醣(biglycan)。

【0111】 發明人亦確認的是，當MSCs生長於包含EGF及/或FGF的培養基時，一旦細胞匯聚時亦可獲得黏性條件培養基。

【0112】 本發明因而提供用於製備富含高分子量醣複合物條件培養基的方法，該方法包含在含有血小板裂解液的生長培養基中擴增培養MSCs。本文已描述在包含血小板裂解液的培養基中生長或擴增MSCs之方法。在一實施例中，培養基為DMEM。在一實施例中，血小板裂解液係為人類血小板裂解液。在一實施例中，MSCs係自骨髓衍生的MSC、或自牙髓衍生的MSCs、或自骨髓衍生的MSCs、或自臍帶組織衍生的MSCs、或自臍帶血衍生的MSCs、或自循環血液衍生的MSCs、或脂肪組織衍生MSCs。在一實施例中，MSCs係為脂肪組織衍生MSCs。在一實施例中，MSCs係為人類脂肪組織衍生MSCs。

【0113】 如本文中的實例所示，培養基的黏度隨著MSCs增生而增加。發明人觀察到特定傳代中此現象隨著細胞增生而發生，亦即隨著MSCs更加密集地群聚於培養瓶中。

【0114】因而，操作者例如藉由控制培養中的MSCc增生的程度而對富含高分子醣複合物的培養基進行一定程度的控制。例如，當需要富含較少的培養基(less enriched media)時，在培養的細胞增生至約70%或更少的匯聚時，將停止細胞的生長(增生)，或由操作者收穫培養基。作為進一步的實例，當需要富含較多或黏性培養基時，細胞的生長(增生)可允許持續至高於大約80%匯聚、或高於大約85%匯聚、或高於大約90%匯聚、或高於大約95%匯聚、或大約100%匯聚或更高，以使培養基更加濃縮ECM成分。

【0115】本發明因而提供用於製備富含高分子量醣複合物條件培養基以及擴增培養MSC的方法，該方法包含在含有血小板裂解液的生長培養基中擴增培養MSCs。本發明因而提供包含富含高分子量醣複合物條件培養基及擴增培養的MSCs的組合或組成物。

【0116】此組合亦可稱為組成物，且可用於治療疾病(disease)的治療目的，其在本文中亦可稱為疾病(disorder)或症狀(condition)，如發炎疾病(inflammatory disease)、發炎疾病(inflammatory disorder)、或發炎症狀。組成物可用於製造用於治療上述症狀的醫藥物。

【0117】將理解的是，當細胞生長期間，該組合可存在於容器中，如組織培養瓶。MSCs及富含高分子量醣複合物條件培養基的組合亦可藉由在適合MSCs生長的條件下培養適當的期間後自容器收穫細胞及培養基所製備。

【0118】MSCs及富含高分子量醣複合物條件培養基之組合亦可藉由將在適當的容器中分離的MSCs及實質上不含MSCs的富含高分子量醣複合物條件培養基組合來製備。在此方式中，該組合包含與(擴增培養)產生的細胞不同的富含高分子量醣複合物條件培養基中的細胞。藉由以此方式，亦即藉由使用分離

的MSCs製備MSCs及富含高分子量醣複合物條件培養基之組合，操作者可製備每單位體積培養基具有所需數量細胞的組合。在此方式中，例如，與單獨包含在產生相同細胞的培養基中的MSCs之組合通常達成的相比，可產生具有更高細胞密度、或每單位體積培養基具有更多細胞量的組合。相似地，與單獨包含在產生相同細胞的培養基中的MSCs之組合通常達成的相比，可產生具有更低細胞密度、或每單位體積培養基具有更低細胞量的組合。控制每單位體積培養基的細胞量的能力可有利於在例如藉由施予具有選定的細胞比培養基比值的劑量給個體而可達成的治療優點的情況。分離的MSCs可加入至富含高分子量醣複合物條件培養基及MSCs之組合或加入至實質不含MSCs之富含高分子量醣複合物條件培養基。

【0119】本文中發明人所確認的是，培養於包含血小板裂解液或EGF及/或EGF的培養基的MSCs提供含有高分子量醣複合物的黏性條件培養基，其在本文中通常稱為富含高分子量醣複合物條件培養基，且此材料具有如本文所述之有益特性，亦可由操作者使用於評估適當的階段、或輔助以評估例如自生物反應器的培養系統收穫細胞或條件培養基的適當階段。例如，如本文中實例所示，具有約1.5 cSt或更高黏度的條件培養基係富含高分子量醣複合物，且提供自MSCs分泌的成分的改善穩定性，如VEGF。實例亦顯示富含的材料對於疾病的治療，如發炎症狀及神經性疼痛為有益的。亦如實例所示，通常將成長於存在血小板裂解液的MSCs培養至高於約80%匯聚來達成大約1.5 cSt或更高之黏度。因此，本文中之結果允許操作者使用培養基的黏度，如在生物反應器中或其他培養器皿或容器中，特別是在無法簡單或適當地定義細胞密度而根據操作者所期望或需求的培養基或細胞的特性來作為收穫細胞或條件培養基的適當階

段的指標。其可例如藉由在特定時間測定在培養的液態樣本之黏度，以及根據操作者的需求而基於定義的黏度收穫細胞或培養基或持續培養來達成。

【0120】 在一典型的實施例中，包含富含高分子量醣複合物條件培養基以及擴增培養的MSCs之組成物彼此為原有的(native)，意即組成物中之細胞係為生長於與組成物一起存在之富含高分子量醣複合物條件培養基的細胞。

【0121】 在一實施例中，該方法進一步地包含與培養基分離的MSCs。在本發明的方法中，細胞可藉由所屬技術領域之習知技術自培養基中分離或收穫。在本發明的實施例中，因而提供實質上不含MSCs的富含高分子量醣複合物條件培養基的製備。在本文中，若其不包含MSCs或僅包含在進行自細胞培養收穫或移除貼附細胞的常規步驟之後可殘留污染物MSCs，則富含高分子量醣複合物條件培養基的製備被視為「實質上不含(substantially free)」MSCs。若MSCs的含量為用於治療上不具療效的程度時，則此培養基可視為「實質上不含(substantially free)」MSCs。

【0122】 收穫的富含高分子量醣複合物條件培養基可進行一或多個進一步的製程步驟，例如移除或減少污染物材料的存在。在本文中，污染物材料可為培養基的任何不需之成分，如細胞斷片或碎片。當富含高分子量醣複合物條件培養基意圖用於治療用途，污染物亦包含任何不相容於培養基的醫藥用途之成分，例如對受體動物可具有毒性之成分或可減少培養基之療效之成分或可減少儲藏培養基能力的成分。本文中進一步製程的實例可包括離心或過濾培養基。

【0123】收穫含有或不含MSCs的富含高分子量醣複合物條件培養基可儲藏於任何適當的條件。儲藏通常冷凍於 -20°C 、 -10°C 或 -80°C 。替代地，儲藏可在 4°C 。

【0124】儲藏可為單獨的等分樣品或小瓶(vials)，例如可為適用於治療個體的治療用劑量。在進一步實例中，培養基可以預備注射(injectable-ready)型態儲藏，以使操作者僅需自儲藏狀態取回材料並在治療使用之前解凍或回溫至所需溫度。在一替代型態中，儲藏可為例如在使用前進一步稀釋或等分，或例如更適合用於研究目的的「散裝(bulk)」儲藏。

【0125】本發明亦提供培養於微載體的MSCs，例如在攪拌生物反應器中。MSCs可培養於可未塗布、或塗布有特定蛋白質，如膠原蛋白(collagen)，且可在表面上處理以具有特定電荷分布的微載體珠($90 - 400\mu\text{m}$)上。微載體可用於在多個器皿中生長細胞，如旋轉瓶、微生物反應器、攪拌槽、搖動平台或微重力。細胞亦可培養於Fibra-Cel®盤，其可保持在生物反應器中而作為懸浮攪拌系統或作為靜態封裝床。

組成物及醫藥組成物

【0126】本發明的方法包含組成物的製備，具體為醫藥組成物。在一實施例中，組成物可包含實質上不含MSCs的富含高分子量醣複合物條件培養基。在一實施例中，組成物可包含藉由本發明的方法所製備的擴增培養MSCs。在一實施例中，組成物可包含富含高分子量醣複合物條件培養基及MSCs。在一實施例中，組成物可為任何前述的組合，如MSCs及富含高分子量

醣複合物條件培養基的組合。本發明的組成物可用於製備醫藥組成物。組成物可包含一或多種醫藥上可接受的載體、稀釋劑、賦形劑以及佐劑。

【0127】 本發明的組成物，如醫藥組成物，可以冷凍溶液提供給使用者。例如，富含高分子量醣複合物條件培養基、擴增培養的MSCs、或其組合可在大約 -20°C 儲藏直至需要使用。替代地，富含高分子量醣複合物條件培養基、擴增培養的MSCs或其組合可儲藏於較低的溫度，例如在 -70°C 至 -90°C 的冷凍庫、或在液態氮儲藏、亦可以汽態或液態儲藏直至需要使用。包含細胞的組成物將通常儲存於液態氮中。在一較佳實施例中，包含富含高分子量醣複合物條件培養基、或擴增培養的MSCs的組成物、或富含高分子量醣複合物條件培養基及擴增培養的MSCs的組合儲藏於液態氮儲藏桶的液態。在一較佳實施例，將包含脂肪組織衍生的擴增培養MSCs細胞的組成物與富含高分子量醣複合物條件培養基組合儲藏。替代地，本發明之不含細胞的組成物，如醫藥組成物，可作為冷凍乾燥製劑提供給使用者。例如，可冷凍乾燥富含高分子量醣複合物條件培養基並儲藏於大約 4°C 、 -20°C 或室溫下直至需要使用。

【0128】 在使用上，通常由如治療醫師、臨床醫師、獸醫、技術人員、助理、或畜主(farmer)將組成物在解凍後盡快地施予至個體或動物。在解凍及施予之間，醫藥組成物可替代地儲藏在例如冰上、或在冷藏庫內或在冷卻袋中，較佳為短時間在大約 2°C 至 5°C 下。在本文中，短時間通常為不超過數小時，如不超過約半小時、或不超過約一小時、或不超過約兩小時。由於低溫保護劑通常對細胞具有毒性且若持續解凍可造成存活率降低，組成物，具體為包含活細胞的組成物通常在解凍後盡快注射至受體動物。

【0129】本發明的醫藥組成物可以「即用 (ready-to-use)」型態提供。在這些實施例中，使用者通常僅需在施予組成物前解凍至施予的可接受溫度。在這些實施例中，組成物可以預量測(pre-measured)劑量提供，如預量測或預測定(pre-determined)適用於特定受體個體或動物的劑量，例如基於受體物種、或基於受體個體，如與大型品種狗相比的小品種狗、或與成年動物相比的幼年動物相較於的預測定劑量。預測量劑量可基於治療或意圖預防之疾病或症狀而替代或附加。即用型態的組成物可包含與可注射裝置，如注射器一起提供。可注射裝置可將單一應用的送至獨立受體或可將單一或複數應用遞送至複數受體。可注射裝置可為可調整的，例如允許遞送各種不同的劑量。

【0130】在實施例中，醫藥組成物包含富含高分子量醣複合物條件培養基及擴增培養的MSCs的組合。組成物可作為組合物或作為由使用者組合的單獨組成物提供給使用者。將理解的是，本文中的用語「使用者 (user)」係指確實施予治療用組成物至受體個體或動物的個體且亦指進行施予的團隊或團體成員。例如，使用者可為協助應用本發明的方法的任何個體，如臨床醫師、醫師、獸醫、畜主、臨床護士、獸醫護士、技術助理、或畜牧人員(farmhand)。

【0131】如本文所述，富含高分子量醣複合物條件培養基顯示出例如當培養基儲藏於室溫下，具有成分穩定性的優點，如自培養的MSCs所分泌的VEGF及其他分子。承上所結，本發明亦提供可選地不冷凍或不冷藏儲藏的組成物。典型地，不冷凍或冷藏儲藏的組成物可包含富含高分子量醣複合物條件培養基，但不包含MSCs。

【0132】因此，包含富含高分子量醣複合物條件培養基的醫藥組成物可提供適用於室溫儲藏的即用組成物，該室溫通常在約20°C至25°C的範圍。在一

實施例中，組成物可為局部施用的組成物，如用於需要該應用的個體的皮膚。局部施用的組成物可為任何適合的型態，包括例如，以液體、膠體、霜劑或洗劑的形式。當組成物以局部施用且可儲藏於室溫的型態提供時，本發明提供了個體的易於使用，例如與可注射組成物或最佳為冷藏或冷凍儲藏的組成物等相比，更易於自我施予(self-administration)。

【0133】 包含富含高分子醣複合物條件培養基的醫藥組成物可與任何適當的載體材料進行配製，如適用於治療活性成分或用於局部施用成分的配製。在本文的實例中，使用不包含界面活性劑的載體材料與使用包含界面活性劑的載體材料相比可偵測到更高水平的VEGF。不期望受理論所限，發明人認為其可能因界面活性劑與VEGF的鍵結，因而減少在組成物中可偵測的VEGF。發明人認為，醫藥組成物中界面活性劑的存在，如藉包含於載體材料或在組成物的配製中的方式，可能同樣地減少醫藥組成物在治療上可用的VEGF，因而不含界面活性劑的組成物與包含界面活性劑的組成物相比可提供優異的治療產品。即使此解釋是參照VEGF提供，但亦愈其該原理應用於富含高分子量醣複合物條件培養基中的其他生長因子及細胞介素。在一實施例中，載體材料不包含界面活性劑。在一實施例中，醫藥組成物不包含界面活性劑。在一實施例中，載體材料包含生理食鹽水且可選地包含丙二醇(propylene glycol)。在一實施例中，載體材料為Solugel或其他類似的製劑。在一實施例中，載體材料或醫藥組成物包含一或多種增稠劑，如化妝品或醫藥增稠劑，例如羥乙基纖維素(hydroxyl ethyl cellulose)。

套組

【0134】 本發明亦提供套組，其包含(a)選自由(i)富含高分子量醣複合物條件培養基、(ii)包含擴增培養的MSCs的組成物、以及(iii)由(i)及(ii)的組合所組成之群組之醫藥組成物；以及(b)該套組用於發炎疾病的治療、或與發炎疾病相關的疼痛之緩解的說明書。

【0135】 在一實施例中，套組包含一或多種冷凍組成物。在一實施例中，套組包含在施予組合的組成物之前，用於組合包含富含高分子量醣複合物條件培養基的組成物及包含擴增培養的MSCs的組成物的說明書。在一實施例中，套組進一步包含一或多個注射裝置，如一或多個注射器。在一實施例中，注射裝置包含套組的組成物。

【0136】 本發明的組成物可有利於藉由MSCs或富含蛋白聚醣的條件培養基治療以用於治療或預防的醫學症狀。如本文所示，例如將含有富含高分子量醣複合物條件培養基之組成物施予至患有骨關節炎的患者且患者回報可接受的結果。因而，本發明的組成物可用於需要治療的個體的發炎疾病或骨關節炎的治療或預防。本發明的組成物可用於需要緩解的個體的發炎疾病或骨關節炎的疼痛之緩解。亦如實例中所示，當本發明的組成物施予以治療網球肘(tennis elbow)、肌腱損傷(tendon injury)、凍瘡(chilblains)、肌腱炎(tendonitis)、高爾夫球腕(golfers wrist)、黏液囊炎(bursitis)、肌肉或小腿裂傷(muscle or calf tear)時亦有益於病患。個體可為任何動物。在一實施例中，個體為選自由貓、狗及馬所組成的群組。在一實施例中，個體係為人類。

【0137】 醫藥組成物可施予用於治療個體的發炎疾病及/或緩解與發炎疾病相關的疼痛。

【0138】發炎可隨著由物理、化學或生物因素引發的損傷或不正常刺激的反應而發生。發炎反應可包括局部反應及產生型態改變、破壞或移除有害物質，如感染性生物體、及導致回復及治癒的反應。當用於與疾病相關時，用語「發炎性(inflammatory)」係指由不正常或在正常方式下無法消除的發炎所引起、由該發炎造成、或造成該發炎的病理過程。發炎疾病可為全身性的或局限於特定組織或器官。

【0139】已知發生於多種疾病的發炎包含但不限於：全身性發炎反應(Systemic Inflammatory Response, SIRS)；阿茲海默症(Alzheimer's Disease)(及關連的症狀及徵狀包含：慢性神經性發炎(chronic neuroinflammation)、神經膠細胞活化(glial activation)；小神經膠細胞增加(increased microglia)；神經炎斑點形成(neuritic plaque formation))；肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS)、關節炎(arthritis)(及關連的症狀及徵狀，其包含但不限於：急性關節發炎(acute joint inflammation)、抗原誘發性關節炎(antigen-induced arthritis)、慢性淋巴細胞性甲狀腺炎相關之關節炎(arthritis associated with chronic lymphocytic thyroiditis)、膠原蛋白誘發性關節炎(collagen-induced arthritis)、少年型關節炎(juvenile arthritis)、類風溼性關節炎、骨關節炎(osteoarthritis)、預後及鏈球菌誘發性關節炎(prognosis and streptococcus-induced arthritis)、脊椎關節疾病(spondyloarthropathies)、以及痛風性關節炎(gouty arthritis))、氣喘(asthma)(及相關的症狀或徵狀，其包含：支氣管性氣喘(bronchial asthma)；慢性阻塞性呼吸道疾病(chronic obstructive airway disease)、慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease)、少年型氣喘(juvenile asthma)及職業性氣喘(occupational asthma))；心血管疾病(cardiovascular

diseases)(及相關的症狀及徵狀，其包含：動脈粥狀硬化(atherosclerosis)、自體免疫性心肌炎(autoimmune myocarditis)、慢性心臟缺氧(chronic cardiac hypoxia)、鬱血性心衰竭(congestive heart failure)、冠狀動脈疾病(coronary artery disease)、心肌病(cardiomyopathy)及心肌細胞功能障礙(cardiac cell dysfunction)，包括：主動脈平滑肌細胞活化(aortic smooth muscle cell activation)、心肌細胞凋亡(cardiac cell apoptosis)及心肌細胞功能的免疫調控(immunomodulation))；糖尿病(diabetes)(及相關的症狀，其包含：自體免疫糖尿病(autoimmune diabetes)、胰島素依賴型(第1型)糖尿病(insulin-dependent (Type 1) diabetes)、糖尿病性牙周炎(diabetic periodontitis)、糖尿病性視網膜病變(diabetic retinopathy)及糖尿病性腎病變(diabetic nephropathy))；腸胃道發炎(gastrointestinal inflammations) (及相關症狀或徵狀，其包含：乳糜瀉(celiac disease)、相關的骨質缺乏(associated osteopenia)、慢性結腸炎(chronic colitis)、克隆氏症(Crohn's disease)、炎症性腸道疾病(inflammatory bowel disease)及潰瘍性結腸炎(ulcerative colitis))；胃潰瘍(gastric ulcers)；肝臟發炎如病毒性或其他類型的肝炎、膽固醇膽石(cholesterol gallstones)及肝臟纖維化(hepatic fibrosis))；HIV感染(及相關的症狀，其包含：退化性反應(degenerative responses)、神經退化性反應(neurodegenerative responses)、及HIV相關的霍奇金氏病(Hodgkin's Disease))；川崎氏病(Kawasaki's Syndrome)(及相關疾病或症狀，其包含：黏膜皮膚淋巴結症候群(mucocutaneous lymph node syndrome)、頸部淋巴結病變(cervical lymphadenopathy)、冠狀動脈病變(coronary artery lesions)、水腫(edema)、發燒(fever)、白血球增加(increased leukocytes)、輕度貧血(mild anemia)、脫皮(skin peeling)、皮疹(rash)、結膜發紅(conjunctiva redness)、血小

板增多症(thrombocytosis))；腎病(及相關疾病或症狀，其包括：糖尿病腎病變(diabetic nephropathy)、末期腎衰竭(endstage renal disease)、急性及慢性腎絲球腎炎(acute and chronic glomerulonephritis)、急性及慢性間質性腎炎(acute and chronic interstitial nephritis)、狼瘡性腎炎(lupus nephritis)、古巴士德氏症候群(Goodpasture's syndrome)、血液透析維生(hemodialysis survival)及腎缺血性再灌注損傷(renal ischemic reperfusion injury))；神經退化性疾病或神經病理症狀(及相關的疾病或症狀，其包含：急性神經性退化(acute neurodegeneration)、老化及神經退化性疾病中的IL-1誘發(induction of IL-1 in aging and neurodegenerative disease)、IL-1誘發的下視丘神經元可塑性(IL-1 induced plasticity of hypothalamic neurons)及慢性壓力的過度反應(chronic stress hyperresponsiveness)、脊髓病(myelopathy))；眼病變(ophthalmopathies)(及相關疾病或症狀，其包括：糖尿病性視網膜病變、葛瑞夫茲氏眼病變(Graves' ophthalmopathy)、與與角膜損傷相關的發炎(inflammation associated with corneal injury)或包含角膜潰瘍的感染(infection including corneal ulceration)、以及眼色素層炎(uveitis))、骨質疏鬆症(osteoporosis)(及相關的疾病或症狀，其包括：齒槽(alveolar)、股骨(femoral)、橈骨(radial)、椎骨(vertebral)或腕部(wrist)骨質流失或碎裂的發生、停經後骨質流失(postmenopausal bone loss)、碎裂發生或骨質流失的速率)；中耳炎(otitis media)(成人或小兒)；胰臟炎(pancreatitis)或胰臟腺泡炎(pancreatic acinitis)；牙周病(periodontal disease)(及相關疾病或症狀，其包括成人、早發性及糖尿病性)；肺部疾病，其包括慢性肺部疾病、慢性鼻竇炎(chronic sinusitis)、玻璃膜病(hyaline membrane disease)、缺氧(hypoxia)、嬰兒猝死症(SIDS)中的肺部疾病(hypoxia and pulmonary disease in SIDS)；冠狀或其他人工血管的血管再狹窄

(restenosis of coronary or other vascular grafts)；風濕病(rheumatism)，其包括：類風溼性關節炎、風濕性阿秀夫氏小體(rheumatic Aschoff bodies)、風濕性疾病(rheumatic diseases)及風濕性心肌炎(rheumatic myocarditis)；甲狀腺炎(thyroiditis)，其包括慢性淋巴球性甲狀腺炎(chronic lymphocytic thyroiditis)；尿道感染(urinary tract infections)，其包括慢性攝護腺炎(chronic prostatitis)、慢性骨盆疼痛症候群(chronic pelvic pain syndrome)及尿石症(urolithiasis)；免疫疾病(immunological disorders)，其包括自體免疫疾病(autoimmune diseases)，如圓禿(alopecia areata)、自體免疫心肌炎(autoimmune myocarditis)、葛瑞夫茲氏病(Graves' disease)、葛瑞夫茲氏眼病變(Graves ophthalmopathy)、硬化性苔癬(lichen sclerosus)、多發性硬化症(multiple sclerosis)、牛皮癬(psoriasis)、全身性紅斑狼瘡(systemic lupus erythematosus)、全身性硬皮症(systemic sclerosis)、甲狀腺疾病(thyroid diseases)(如甲狀腺腫(goitre)及淋巴瘤性甲狀腺腫(struma lymphomatosa) (橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、淋巴腺樣甲狀腺腫(lymphadenoid goitre))；肺部損傷(急性出血性肺部損傷(acute hemorrhagic lung injury)、古巴士德氏症候群(Goodpasture's syndrome)、急性缺血性再灌流(acute ischemic reperfusion))、職業及環境污染物造成的心肌功能不全(myocardial dysfunction) (如對毒油症候群敏感性的矽肺病(susceptibility to toxic oil syndrome silicosis))、輻射創傷(radiation trauma)、及創傷癒合反應的效率 (如燒傷或燙傷、慢性創傷、手術傷口及脊髓損傷(spinal cord injuries))、敗血症(septicaemia)、急性期反應(acute phase response)(如發熱性反應(febrile response))、一般發炎性反應、急性呼吸窘迫反應(acute respiratory distress response)、急性全身性發炎反應(acute systemic inflammatory response)、創傷癒

合、沾黏(adhesion)、免疫發炎反應(immuno-inflammatory response)、神經內分泌(neuroendocrine response)、發燒的發展及抵禦(fever development and resistance)、急性期反應(acute-phase response)、壓力反應、疾病敏感性(disease susceptibility)、重複性的動作壓力(repetitive motion stress)、網球肘(tennis elbow)以及疼痛的管理及反應。

【0140】在特定實施例中，發炎疾病係選自關節相關的發炎疾病，角膜發炎(corneal inflammation)、皮膚發炎或創傷癒合。

【0141】在特定實施例中，關節相關的發炎疾病係為關節炎，如骨關節炎。

【0142】在特定實施例中，本發明的組成物用於治療網球肘或用於治療肌腱損傷、或用於治療凍瘡或用於治療如腳部的肌腱炎、或用於治療高爾夫球腕、或用於治療黏液囊炎，如轉子部黏液囊炎(trochanteric bursitis)、或用於治療跟腱炎(Achilles tendonitis)、或用於治療肌肉裂傷，如小腿裂傷。

神經性疼痛

【0143】醫藥組成物可施予以治療個體的神經性疼痛。發明人已確認的是，本發明之組成物對於治療患有無法辨別臨床原因的疼痛，如部分型態的神經性疼痛的個體為有用的。神經性疼痛係指一組疼痛性疾病，其特徵為因神經系統的疾病或功能不全所造成在周邊程度、中樞程度或兩者的疼痛。其為具有隨著時間在次數及強度上波動的多種徵狀及病徵的複雜本質(complex entity)。神經性疼痛的三種常見類型為穩定性神經痛(steady and neuralgic pain)；偶發性的自發性發作(paroxysmal spontaneous attacks)；以及過敏性。

【0144】神經性疼痛可為非常失能(disabling)、嚴重且難治的，其造成個體苦惱且痛苦，其包括感覺遲鈍(dysaesthesia)以及感覺異常(panaesthesia)。亦常見感覺欠缺(Sensory deficits)，如部分或複合的感覺喪失。此外，與慢性神經性疼痛相關的顯著心理性及社會性結果造成生活品質的降低。

【0145】神經性疼痛於一般醫療實務上是相當常見的。在部分型態中，神經性疼痛不與任何可辨別的臨床病因症狀相關。如本文中一實例所示，本發明的組成物對於緩解認定為神經性疼痛的慢性網球肘具有效果。在部分型態中，神經性疼痛與可辨別的臨床症狀相關。三叉神經神經痛(trigeminal neuralgia)的盛行率(prevalence)係在每100,000人口中有2.1至4.7人，且疼痛的糖尿病性神經病變(painful diabetic neuropathy)在11%至16%的第I型糖尿病及在第II型糖尿病中發生，以及帶狀皰疹後神經痛(post-herpetic neuralgia)在每100,000的人口中有約34人中發現。神經性疼痛的治療並不容易。患有神經性疼痛的患者不一定對標準的止痛藥，如非類固醇抗發炎藥(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)有所反應及部分程度的神經性疼痛對鴉片劑(opiates)具有抗性。研究最佳且最長期用於治療神經性疼痛的藥劑為抗憂鬱劑(antidepressants)及抗驚厥劑(anticonvulsant)，兩者皆可能具有嚴重的副作用。

【0146】本發明之組成物可在任何適當位置施予至個體，以用於治療這些疼痛。施予通常可利用適當型態的注射或其可以局部應用的方式。例如，注射可為皮下、肌內、或直接注入疼痛的可及位置或其附近位置。由於這類型的疼痛可能表現於個體身體中的複數區域，例如頷骨疼痛及四肢或肩膀疼痛，因此該施予可位於或靠近於疼痛的一個位置，並遠離受疼痛折磨的另一位置。典型地，當患者發生複數個位置的疼痛時，該施予在位於或靠近於確認為疼痛的

原始或源發位置。如本治療的說明，本文中的實例呈現了藉由局部施用包含富含高分子量醣複合物條件培養基的霜劑或膠體來治療高爾夫球腕及慢性網球肘。局部治療可包含在受影響的區域擦抹膠體或霜劑，替代地其可包含將膠體或霜劑施用至敷料或貼片，接著將其施用至受影響的區域。治療的個體可以單次應用本發明之組成物進行施予、或可較佳地以多次應用進行施予。

【0147】 本發明現將參照以下實例而僅以例證的方式更詳細地描述。這些實例指在用於說明本發明且不應視為限制全文說明書揭示之描述的概要。

實例

實例1：篩選來自不同供體的犬細胞

脂肪組織的處理

【0148】 在例行結紮過程期間，自五隻雌犬收集鐮狀(falciform)脂肪組織的樣本(10g)。脂肪組織的五個樣本係分開處理。利用生理食鹽水潤洗脂肪組織並利用剪刀精細地切碎，再與20ml的杜貝克氏修改伊格斯培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium，DMEM，Sigma)混合。加入膠原蛋白酶(Sigma)直至最終濃度為0.05% wt/vol 並將樣本培養於37°C，90分鐘。在培養期間，每15分鐘以手輕輕地倒轉樣本。

【0149】 在處理膠原蛋白酶之後，樣本通過不鏽鋼篩(700 μm 孔徑)無菌過濾，並轉移至50 ml離心管並於500g離心15分鐘。

【0150】 丟棄漂浮的細胞及上清液，將細胞團塊輕輕地以巴斯德滴管混勻並轉移至15ml離心管。

【0151】 接著在DMEM中清洗細胞以移除膠原蛋白酶。加入DMEM至各管直至最終體積為14 ml並於500g離心10分鐘。丟棄上清液，並將細胞團塊輕輕地再懸浮於4 ml的DMEM及以巴斯德滴管混勻。

在胎牛血清中的細胞擴增

【0152】 將來自各供體的細胞懸浮液的等分樣品(0.5 mls)轉移至包含DMEM加10%胎牛血清的組織培養瓶，並於37°C下培養於CO₂培養箱直至呈現匯聚的單層細胞 (7到10天)。以3 ml的TrypLE Express (Invitrogen)剝離細胞，並移至50 ml的離心管且以500g離心10分鐘。細胞被置於含有DMEM加10%胎牛血清的新組織培養瓶。

細胞至同種異體血清的轉移

【0153】 當培養於胎牛血清的細胞匯聚時，剝離並置於含有DMEM加10%同種異體犬血清的新培養瓶，接著培養7至14天。利用顯微鏡檢查培養瓶，並以0%至100%的範圍評分細胞的匯聚率(confluency)。

犬血清中的細胞增生

【0154】 如以下段落所述，當轉移至犬血清中，來自六個供體中的兩個供體的細胞快速增生。來自其他四個供體的細胞在犬血清中則不生長。

產物的製造

【0155】 當自各六個供體的細胞在含有10%FBS的培養基中擴增直至第2傳代時，此時所有6株的細胞已進行7.5至8.5次的族群倍增。將3次傳代的細胞植入在含有10%同種異體犬血清的培養基中，並在不更換任何培養基的情形下生長至匯聚或長達14天。經觀察，兩個供體(1及2)的細胞中生長至匯聚，而剩餘的四個供體細胞細胞在第14天並未達到匯聚。當收穫細胞時，觀察到自供體1及2的細胞進行額外2次的族群倍增。然而，來自其他供體的細胞在含有10%的同種異體犬血清的培養基中進行少於1次的細胞倍增。

【0156】 來自全部6個供體的細胞從第2傳代在10%FBS培養基中擴增(而不換成犬血清)。當使細胞生長至匯聚並多次傳代，觀察到培養物仍具有典型的MSC型態且觀察到增生並達到匯聚。觀察到來自供體1及供體2的細胞以典型方式增生至第6傳代並具有13-14次的累積族群倍增。因此，來自這些供體(1及2)的細胞治療產物可從已進行13次以上倍增的第5傳代或第6傳代的細胞製造。然而，來自其他供體的細胞於第5傳代停止增生。來自停止細胞增生的這四個供體衍生的細胞形態是與在含有10%同種異體犬血清的培養基中表現相對較差的細胞相同的細胞群集(供體)，其亦在第5傳代明顯地退化。因此，由這些供體所製造的任何細胞治療產物僅為第4傳代，且具有9-10次的累積族群倍增。

【0157】 因此，在FBS中傳代細胞並接著藉由使其暴露於同種異體血清中進行測試以使用作為用於預測將細胞擴增至更高傳代數的能力的方法，其可減少每個小瓶的產品成本且亦減少研究及開發時間。作為縮寫用語，此篩選方法及其變化在本文中可稱為「血清切換(serum switch)」方法。

實例2：血小板裂解液的製造

【0158】 根據本領域之習知技術，將血液收集至具有作為抗凝血劑之檸檬酸鹽的血液收集袋。血液被分裝至離心管並於200g離心20分鐘。收集包含血小板的最上層並進行4個循環的從液態氮到37°C水浴的凍融。接著將裂解的血小板藉由加入凝血酶(thrombin)及氯化鈣進行血清轉換，並以4000g離心10分鐘且丟棄細胞斷片的團塊。

【0159】 接著無菌過濾(0.22微米)血小板裂解液及儲藏於-80°C直至需要。

實例3：人類脂肪衍生幹細胞的製造

脂肪組織的處理

【0160】 利用抽脂以自每個病患的腹部及大腿收集約200克的脂肪組織。在收集後接著立即處理脂肪抽取物，其以溫熱的(37°C)無菌林格氏液(Ringers Solution, Baxter)清洗並接著加入無菌的膠原蛋白酶至0.05% wt/vol的最終濃度來進行消化。樣本於37°C在軌道混合器上以100 rpm輕輕地混合培養20分鐘，接著通過800微米篩孔進行過濾，並轉移至離心管後於500g離心15分鐘。

【0161】 丟棄漂浮的細胞及上清液，並以巴斯德滴管輕輕地混勻細胞團塊，並轉移至15ml離心管。

【0162】 接著以DMEM清洗細胞以移除膠原蛋白酶。加入DMEM至最終體積14ml並將樣本於500g離心10分鐘。丟棄上清液，並將SVF細胞團塊輕輕地再懸浮於4 ml的DMEM及用巴斯德滴管混勻。

細胞的擴增

【0163】轉移細胞懸浮液的等分樣品(0.5 ml)至含有DMEM加5%人類血小板裂解液的組織培養瓶並在37°C下培養於CO₂培養箱直至呈現匯聚的單層細胞(7至10天)。以3ml的TrypL Express (Invitrogen)剝離細胞，並移至50 ml的離心管且以500g離心10分鐘。將細胞進一步傳代至其倍增約8次。接著，剝離並離心傳代的細胞。

細胞的冷凍保存

【0164】將細胞團塊的樣本於CryoStor CS10 (Biolife Solutions, USA)中再懸浮並以2ml等分樣品轉移至冷凍小瓶(cryovial)，並將冷凍小瓶以每分鐘約1°C的控制速率冷凍裝置冷凍於-80°C冷凍器24小時，且接著將其轉移至液態氮杜耳瓶(dewar)內以用於長期儲藏。

實例4：生長於血小板裂解液的MSCs分泌高濃度的ECM成分

條件培養基的產生

【0165】收集自實例3中生長的細胞在第3傳代的培養基並分析其黏度。細胞亦生長於10%胎牛血清作為控制組。培養基的黏度隨著細胞更加匯聚而增加(第1圖)，其生長於FCS中的培養物為輕微地增加，且在生長於血小板裂解液中的培養物為實質地增加。

【0166】黏性條件培養基的分析

【0167】將條件培養基的樣本送至澳洲蛋白質體分析設施(Australian Proteome Analysis Facility, APAF)分析。分析詳述於實例5。

實例5：為了研究細胞培養基黏度的漸增：證實取自生長於血小板裂解液の間質幹細胞的組織培養上清液包含細胞外間質成分及/或黏蛋白

【0168】研究係基於觀察到在5%或10%血小板裂解液培養基的脂肪衍生幹細胞的生長隨著時間提高培養基的黏度。兩個結果為相近的：培養基黏度的定量及確認黏度提升的原因，描述於以下段落。

黏度測量

【0169】黏度利用Cannon-Fenske Routine毛細管黏度劑(Cannon Instrument Company，產品編號T209)測量，其按照製造者指示測量動黏度。簡而言之，藉由吸取而填入約5 ml樣本 (培養基或再懸浮的沉澱)至黏度計且使其在於40°C的水浴中平衡至少10分鐘。一旦達到溫度，以吸取方式將樣本拉高至第一標記點，並測量液面(meniscus)在第一標記點與第二標記點之間移動所花費的時間(流出時間)。接著以流出時間乘以校正常數(0.009001 cSt/s)以取得以厘拖(cSt)為單位的動黏度。繪製六天的細胞生長的黏度。在每次量測，黏度相對於在胎牛血清培養基內的生長而增加(第1圖)。

【0170】如以下段落描述，研究培養基中的黏性成分。

以丙酮(Acetone)以及三氯乙酸(Trichloroacetic acid)沉澱

【0171】在50 ml的Falcon管中，5 mL (1體積)的培養基與20 mL (4體積)的冷卻至-30°C的丙酮混合。混合物以渦流攪拌並接著使其在-30°C下沉澱整夜。以4600g、4°C離心20分鐘以收集沉澱(PT1)。移除上清液(SN1)並將離心管上下

顛倒以晾乾沉澱~2分鐘，注意避免團塊完全乾燥。將PT1再懸浮於pH 7.8的100 mM碳酸氫銨(ammonium bicarbonate)以用於黏度測量及酵素性消化。

【0172】 丙酮沉澱(80%，-30°C)將黏性成分自培養基中沉澱，代表其為高分子量，並估計其在約0.2-0.3 mg/ml的濃度具有與透明質酸(hyaluronic acid)相近的黏度。

藉由高效陰離子交換層析-脈衝安培流檢測法(high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection , HPAEC-PAD) 進行單醣分析

【0173】 製備25%(v/v)的三氟乙酸(trifluoroacetic acid，TFA)原液。將150 μ L的MilliQ水及300 μ L的25%(v/v)TFA加入至50 μ L的樣本。樣本於100°C伴隨搖動培養4小時。培養後，樣本藉由真空離心乾燥並還原(reconstituted)於200 μ L的100 μ M 2-去氧-D-葡萄糖(2-deoxy-D-glucose)(內標準品(internal standard))中。

【0174】 樣本於Dionex HPLC儀器、CarboPac PA1碳水化合物管柱以脈衝安培流檢測法分析。中性單醣類以16 mM NaOH等度(isocratically)沖洗。酸性單醣類是利用100 mM NaOH中醋酸鈉(sodium acetate)梯度進行沖洗。峰值的辨認係以沖洗時間與中性的已知標準品(海藻糖(fucose)、半乳糖(galactose)、葡萄糖(glucose)、甘露糖(mannose))、胺基(N-乙醯半乳胺糖(N-acetylgalactosamine)、N-乙醯葡萄糖胺糖(N-acetylglucosamine))、及酸性(N-乙醯神經胺酸(N-acetylneuraminic acid)、葡萄糖醛酸(glucuronic acid))單醣比較來鑑定。

【0175】 丙酮沉澱的黏性成分的單醣分析顯示單醣葡萄糖醛酸、N-乙醯半乳糖胺及部分半乳糖的存在，其為與作為細胞外基質(ECM)的主要成分之蛋白聚醣連結的醣胺聚多醣類(GAGs)的成分。從組成的分析，其表示材料中的透明質酸、硫酸角質素(keratan sulfate)及/或硫酸軟骨素GAGs 及/或黏蛋白及/或其他醣複合物。

【0176】 接著在37°C下分別以角質素酶(Keratanase，Kase)、透明質酸酶(Hyaluronidase，Hase)、軟骨素酶ABS (Chondroitinase ABS，Csase)A、內-β-半乳糖苷酶(Endo-β-galactosidase，EBG) 進行酵素處理三天後分析丙酮沉澱材料的黏度。控制組培養基則在無酵素下於100mM碳酸氫銨中以37°C培養三天。動黏度的結果呈現在角質素酶、透明質酸酶及軟骨素酶酵素的存在下黏度減少，其顯示酵素確實與沉澱物中各自的GAG作用。此結果支持黏性成分為GAG、蛋白聚醣、黏蛋白或其他高分子量分子或分子的複合物的推論。

【0177】 如表1所示，將硫酸軟骨素、軟骨蛋白聚醣及透明質酸的標準溶液與硫酸軟骨素酶、角質素酶及透明質酸酶的其各自酵素進行酵素消化。

表1：針對硫酸軟骨素、硫酸角質素(軟骨蛋白聚醣的成分)及透明質酸的消化之最佳消化條件

酵素	酵素濃度	反應緩衝液	標準品
軟骨素酶 ABC (20 mU/μl)	5 μl	100 mM 醋酸銨 pH 8	硫酸軟骨素(5 μg) 軟骨蛋白聚醣(10 μg)
角質素酶 (50 mU/μl)	2 μl	100 mM Tris-HCl pH 7	軟骨蛋白聚醣(10 μg)
透明質酸酶(2U/μl)	5 μl	100 mM 醋酸鈉 pH 5	選定的-HA 50K (20 μg)
反應體積 = 20 μl， 37°C 培養整夜			

【0178】 GAG雙醣消化產物藉由LC-MS或直接MS偵測且其組成物是利用多孔性石墨化碳管柱以於乙腈(acetonitrile)中的碳酸氫銨沖洗及具有Thermo Velos離子阱質譜儀(Thermo Velos mass spectrometer)的負離子質譜儀而自分離的成分的MS²斷片(MS² fragmentation)進行確認。

【0179】 細胞分泌樣本係由生長於 α MEM培養基加上10%血小板裂解液(已血清轉換)(Stemulate, Cook Regentec, Bloomington, IN, USA)以及2、DMEM培養基加上5%血小板裂解液(PLTMax, Millcreek, Rochester, MN, USA)加上 2 IU/mL肝素中的細胞所生產。

【0180】 為確認分泌的蛋白聚醣的存在，在真空中，將濃縮的細胞分泌物/培養基樣本固定(immobilised)至PVDF膜，其以GAG降解酶、角質素酶(Kase)、透明質酸素酶(Hase)、軟骨素酶ABS(Csase)及內- β -半乳糖苷酶(EBG)處理並藉MS分析。

【0181】 消化產物的二階MS光譜確認為符合軟骨蛋白聚醣標準品的硫酸軟骨素的硫酸根斷片光譜的質量(m/z 460²⁻ 及 380²⁻ m/z)，藉此確認硫酸軟骨素存在於條件培養基。

【0182】 硫酸軟骨素係為軟骨蛋白聚醣的GAG成分，且亦為其他蛋白聚醣，如多功能蛋白聚糖的GAG成分。硫酸軟骨素的存在確認了前述蛋白聚醣的其一或混合物的存在。

【0183】 多醣類的質譜儀數據由來自丙酮沉澱物取得的沉澱物消化的糖類所定義，且硫酸軟骨素的含量低於預期。然而，當樣本(50 μ l)在真空下利用Bio-Rad點漬設備轉漬至PVDF膜上且在丙酮沉澱之前及之後以艾爾遜藍(Alcian blue)(於0.1%醋酸中的0.1%艾爾遜藍)染色，並比較其染色強度，在丙酮沉澱前

染色強度 (深藍色的染色著色)在細胞分泌樣本中較高(未顯示結果)，其表示並非所有的帶電大分子(即蛋白聚醣)會因丙酮而沉澱。

【0184】 對總細胞分泌物及藉由Sephacrose尺寸分餾所分離的高分子量蛋白質進行蛋白質體分析。利用線上毛細管(on-line capillary)反相(RP)(ProteCol C18, 300 μ m ID, 10 cm, 5 μ m粒徑, 300 Å孔徑)液態層析(LC)質譜儀(MS) 在正極性模式或與共振活化的碰撞誘發解離(resonance activation-collision induced dissociation(CID))下分析胰蛋白酶(Trypsin)消化的胜肽。以100%溶劑A(0.1% (v/v)甲酸(formic acid))平衡管柱且以0% - 30%溶劑B(0.1% (v/v) 甲酸溶於乙腈)，接著以30% - 60%溶劑B的兩階段梯度分離胜肽。胜肽混合物還原於15 μ l去離子水並注射5 μ l至管柱。

【0185】 偵測到的細胞外基質蛋白多醣係為人類基膜聚糖、多功能蛋白聚醣及雙糖鏈蛋白聚醣。硫酸軟骨素係為多功能蛋白聚醣及軟骨蛋白聚醣中的GAG鏈成分。於蛋白質體分析中沒有偵測到軟骨蛋白聚醣，然而蛋白質體分析對於蛋白聚醣為次佳(sub-optimal)且軟骨蛋白聚醣上的廣泛糖鏈(extensive sugar chains)可能抑制蛋白質成分的偵測。

【0186】 具軟骨蛋白聚醣專一性抗體的ELISA套組從兩者培養基類型(含有或不含肝素)及橫跨第1傳代至第10傳代取得的條件培養基確認不同濃度的50至900 pg/mL的軟骨蛋白聚醣(結果未顯示)。測試七個不同脂肪組織供體且可從由全部七個供體得到的條件培養基偵測到軟骨蛋白聚醣。

【0187】 硫酸軟骨素已確認存在於條件培養基中。硫酸軟骨素係為蛋白聚醣的多功能蛋白聚醣及軟骨蛋白聚醣兩者的成分。蛋白質體分析偵測到多功能蛋白聚醣、人類基膜聚醣及雙糖鏈蛋白聚醣，但無法確認軟骨蛋白聚醣的存

在，其可能為蛋白質體分析受到軟骨蛋白聚醣上的廣泛醣鏈抑制。藉由軟骨蛋白聚醣抗體ELISA分析來確認軟骨蛋白聚醣存在於兩者培養基類型的條件培養基且不存在於匹配的空白(blank)成長培養基。

實例6：人類同種異體脂肪衍生MSCs的工業規模生產

供體的選擇

【0188】如實例3所示，自人類供體收集脂肪組織。根據實例1篩選來自各供體的細胞。顯示出適合特性的細胞，如可接受「血清切換」篩選方法中表現者，被選出用於大規模擴增。

細胞的擴增

【0189】如實例3所述，擴增及傳代細胞。將十層的組織培養工廠(factories)用於傳代細胞。細胞持續傳代直到第8傳代而沒有細胞減緩或開始出現老化。

計算可自一個供體生產的瓶數

【0190】表2呈現利用本發明的分法可自一供體生產超過3.32億之各含500萬個細胞的小瓶。

表2: 計算可自一供體生產的瓶數

	植入之細胞	倍增數	細胞產量	產品瓶數
第 0 傳代	173.5	0.13	189.86	38

第 1 傳代	189.9	3.47	2103.81	421
第 2 傳代	2103.8	3.59	25334.08	5,067
第 3 傳代	25334.1	3.2	232809.73	46,562
第 4 傳代	232809.7	2.5	1316970.73	263,394
第 5 傳代	1316970.7	3	10535765.85	2,107,153
第 6 傳代	10535765.9	2	42143063.41	8,428,613
第 7 傳代	42143063.4	2.5	238397167.31	47,679,433
第 8 傳代	238397167.3	2.8	1660294306.33	332,058,861

實例7：用於MSCs的擴增的替代組織培養基

【0191】 如實例3所述，自脂肪組織分離人類細胞並培養。兩次傳代以後，將培養基置換為高葡萄糖DMEM(High Glucose DMEM)、10%胎牛血清、20ng/ml 表皮生長因子(EGF)、20ng/ml 鹼性纖維母細胞生長因子(basic fibroblast growth factor)及2% B27補充劑(Life Technologies)。一旦細胞達到匯聚，則條件培養基具黏性。

實例8：以同種異體細胞及富含高分子量醣複合物條件培養基治療患有骨關節炎的人類病患

脂肪組織的處理

【0192】 使用抽脂方式以自病患的腹部或大腿收集832克的脂肪組織。在收集後接著立即處理脂肪抽取物，其以溫熱的(37°C)無菌林格氏液(Baxter)清洗

並接著加入無菌的膠原蛋白酶至0.05% wt/vol的最終濃度來進行消化。樣本於37°C在軌道混合器上以100 rpm輕輕地混合培養20分鐘，接著通過800微米篩孔進行過濾，並轉移至離心管後於500g離心15分鐘。丟棄漂浮的細胞及上清液，並以巴斯德滴管輕輕地混勻細胞團塊，接著轉移至15ml離心管。

【0193】 接著以DMEM清洗細胞以移除膠原蛋白酶。加入DMEM至最終體積14ml並將樣本於500g離心10分鐘。丟棄上清液，並將SVF細胞團塊集合並分成8個個別的冷凍袋。細胞在Cryostor 10以每袋11.5-12.5ml的體積冷凍保存。

細胞的擴增

【0194】 將一袋細胞解凍並植入於含有 α MEM加上10%人類血小板裂解液的T175組織培養瓶。血小板裂解液已在以離心前藉由附加的凝血酶及氯化鈣處理以移除纖維蛋白原(fibrinogen)。於37°C下在CO₂培養箱中培養細胞直至呈現單層的匯聚細胞(7到10天)。如實例3所示，細胞傳代4次。接著剝離並離心傳代的細胞。收集自最終傳代取得的條件培養基並用於細胞的冷凍保存。

細胞的冷凍保存

【0195】 將細胞團塊樣本再懸浮在1.8mL的條件培養基及0.2mL的bloodstor-100冷凍保存液(Biolife Solutions, USA)並以2mL等分樣品轉移至冷凍小瓶，將冷凍小瓶以每分鐘約1°C的控制速率冷凍裝置冷凍於-80°C冷凍器24小時，且接著將其轉移至液態氮杜耳瓶內以用於長期儲藏。

病患的治療

【0196】對於患有膝蓋的第3級骨關節炎(grade 3 osteoarthritis)的52歲病患以單次關節內(intra-articular)注射擴增的同種異體細胞及富含高分子量醣複合物條件培養基來進行治療。含有細胞及條件培養基的小瓶係於室溫解凍且立即地注射入膝關節。注射劑係由在1.8 mL富含高分子量醣複合物條件培養基中以及0.2 mL的bloodstor-100冷凍保存液中的390萬個細胞所組成。

【0197】注射後一周檢查病患並報告顯著的疼痛減緩。病患對結果相當滿意且詢問他們是否能在另一個膝蓋進行注射。

實例9：分泌物的穩定性

分泌物的製備

【0198】將(如範例8所述取得之)人類脂肪衍生MSCs培養在10層細胞工廠瓶的 α MEM加上10%血小板裂解液(已血清轉換)(Stemulate, Cook Regentec, Bloomington, IN, USA)或在 α MEM加上10%胎牛血清中。不置換培養基且細胞保持在培養系統中4至7天直至細胞為80至100%匯聚。採集上清液且觀察到血小板裂解液培養基具黏性但胎牛血清培養基不具黏性。因觀察到過濾會降低黏度，而上清液不進行過濾。

藉由ELISA的VEGF分析

【0199】利用ELISA(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)測量血管內皮生長因子(VEGF)。

藉由Bioplex的分泌物分析

【0200】 利用Bioplex系統(Biorad)測量十四種不同的細胞介素及生長因子。

穩定性測試

【0201】 分泌物的樣本於22°C儲藏於測試管並以規律間隔測試。樣本亦儲藏在-80°C作為控制組。儲藏在22°C的樣本與-80°C的控制組比較。

結果

【0202】 在6個月的期間藉由ELISA測量分泌物中VEGF的濃度，並未有明顯的下降(第2圖)。

【0203】 在室溫儲藏五個月的黏性條件培養基及非黏性條件培養基測量十四種不同的細胞介素及生長因子。計算每種細胞介素或生長因子的濃度相較於起始時間點的濃度的百分比變化，且顯示所測量的不同種細胞介素及生長因子係在黏性條件培養基中比在非黏性條件培養基中更穩定(第3圖)。

意義

【0204】 令人驚訝地，VEGF的濃度在室溫中可保持穩定超過數天。文獻教示細胞介素，如VEGF及本實例的其他主要分析物除在低溫冷凍外係為不穩定(Kisand等人、Porter等人)。

實例10：黏度的測量

【0205】如實例8所述，製備脂肪衍生細胞。於 α MEM加上10%血小板裂解液(已血清轉換)(Stemulate, Cook Regentec, Bloomington, IN, USA)或DMEM加上10%胎牛血清培養細胞。細胞被培養至第4傳代或第5傳代並在細胞為50%到100%之間時收穫條件培養基。利用Cannon-Fenske U黏度計測量條件培養基的黏度。

結果

【0206】允許達到約>80%匯聚的所有培養物具有高於1.5 cSt的黏度。而在80%匯聚前收穫的所有培養物具有低於1.5 cSt的黏度(第4圖)。

實例11：以包含來自傳代的人類脂肪衍生貼附細胞的分泌物的組成物治療網球肘

【0207】如範例9所述，分泌物由傳代的人類脂肪衍生貼附細胞生成，該細胞生長係於 α MEM加上10%血小板裂解液。

【0208】分泌物以1比10與Solugel(Johnson & Johnson)混合，以生成用於局部施用的膠體。藉由一天兩次施用膠體至肘部治療患有2年網球肘的72歲女性。在五天後，女性回報顯著的疼痛減少，且可進行治療前因肘部疼痛而無法進行的打保齡球的活動。

【0209】第二名女性患者為77歲，患有內側及外側網球肘，藉一天兩次施用膠體以進行治療。患者在4到5天回報較佳的感受。2.5週後，患者因作用的肘部「感覺良好(feels good)」而停止使用膠體。患者回報停止施用膠體的三週後，肘部的感覺並無異常。患者回報她已完全治癒。此改善使患者增加他們的

體力，例如可藉由在開始分泌物治療前，因疼痛而限制僅能打10局保齡球，而在分泌物治療後可打21局作為證明。

【0210】 實例12：以包含來自傳代的人類脂肪衍生貼附細胞的分泌物的組成物治療肌腱損傷

【0211】 在一定範圍症狀的以下個體利用如描述於範例10所製備之來自生長於 α MEM加上10%血小板裂解液的傳代的人類脂肪衍生細胞的分泌物與Solugel混合來進行治療。在所有施用的案例，膠體係局部施予至皮膚的受影響區域，通常為一天兩次。

腳部的凍瘡及肌腱炎

【0212】 75歲的女性在腳部患有凍瘡及肌腱炎。在治療後4天，疼痛及發炎消失。

高爾夫球腕

【0213】 治療患有高爾夫球腕的75歲的女性。在治療後4天，疼痛及發炎消失。

轉子部黏液囊炎

【0214】 轉子部黏液囊炎。在治療後4天，疼痛及發炎消失。

跟腱炎

【0215】 患有已持續數年的跟腱炎的74歲患者以含有分泌物的膠體治療。患者回報使用膠體3天後不適已消失。患者以一天兩次施用膠體持續三周，且疼痛並沒有再發生。

小腿裂傷

【0216】 現患小腿肚裂傷的52歲患者以分泌物膠體治療。患者回報當施予分泌物膠體時給予與薄荷純(menthol)類似的舒緩效果，並且隔日早上注意到腿部沒有在開始治療前影響患者的僵直(stiffness)。患者於每晚再施用分泌物膠體並回報損傷癒合良好。患者回報在治療期間，於一晚忘記施用分泌物膠體，接著隔日早上腿部的影響區域的僵直度增加。

參考資料

【0217】 Cesaretti, M., E. Luppi, F. Maccari, and N. Volpi. , 2003 , 用於羰基醣酸吡啶反應的96孔盤測試(A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction) , Carbohydrate Polymers , 54:59-61 。

【0218】 Kilcoyne, M., J.Q. Gerlach, M.P. Farrell, V.P. Bhavanandan及L. Joshi. , 2011 , 在微量滴定板形式之用於碳水化合物之過碘酸-希夫反應劑測試(Periodic acid-Schiff's reagent assay for carbohydrates in a microtiter plate format) , Analytical Biochemistry , 416:18-26 。

【0219】 Kisand, K., Kerna, I., Kumm, J.等人 , (2010) , 在生物資料庫樣本中冷凍保存對於基質金屬蛋白酶(MMP)-7、TIMP-1、血管生長因子(VEGF)及VEGF-R2的血清濃度的影響(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), pp. 229-235 。

【0220】 Porter AE , Auth J , Prince M , Ghidini A , Brenneman DE , Spong CY. , 在儲存羊水的細胞介素穩定度的最佳化(Optimization of cytokine stability in stored amniotic fluid) , American Journal of Obstetrics and Gynecology [2001, 185(2):459-462] 。

【符號說明】

無

【發明申請專利範圍】

- 【請求項1】一種組合物，其包含一富含高分子量醣複合物條件培養基，用於一個體之發炎症狀的治療，其中該富含高分子量醣複合物條件培養基係為間質幹細胞(MSCs)培養於血小板裂解液、表皮生長因子(EGF)、鹼性纖維母細胞生長因子(FGF)或其任意組合所組成的培養基，以產生包含硫酸軟骨素且黏度至少為 1.5 厘拖 (centistokes)之該富含高分子量醣複合物條件培養基。
- 【請求項2】如請求項 1 所述之組合物，其中該發炎症狀為骨關節炎。
- 【請求項3】如請求項 1 所述之組合物，其中該治療更包含服用治療有效量之擴增培養的間質幹細胞(MSCs)。
- 【請求項4】如請求項 1 所述之組合物，更包含治療有效量之擴增培養的間質幹細胞。
- 【請求項5】如請求項 1 所述之組合物，其中該富含高分子量醣複合物條件培養基係藉由在包含血小板裂解液的培養基中培養間質幹細胞所製備。
- 【請求項6】如請求項 3-5 任一項所述之組合物，其中該擴增培養的間質幹細胞的該有效劑量的範圍為 200 萬到約 1,000 萬個細胞。
- 【請求項7】如請求項 3-5 任一項所述之組合物，其中該擴增培養的間質幹細胞的該有效劑量為約 500 萬個細胞。
- 【請求項8】一種組成物，其包含富含高分子量醣複合物條件培養基，其中該富含高分子量醣複合物條件培養基係為間質幹細胞(MSCs)培養於血小板裂解液、表皮生長因子(EGF)、鹼性纖維母細胞生長因子(FGF)或其任意組合所組成的培養基，以產生包含硫酸軟骨素且黏度至少為 1.5 厘拖 (centistokes)之該富含高分子量醣複
- 第1頁，共 3 頁(發明申請專利範圍)

合物條件培養基。

【請求項9】一種組成物，其包含擴增培養的間質幹細胞以及富含高分子量醣複合物條件培養基，其中該富含高分子量醣複合物條件培養基係為間質幹細胞(MSCs)培養於血小板裂解液、表皮生長因子(EGF)、鹼性纖維母細胞生長因子(FGF)或其任意組合所組成的培養基，以產生包含硫酸軟骨素且黏度至少為 1.5 厘拖(centistokes)之該富含高分子量醣複合物條件培養基。

【請求項10】如請求項 8-9 任一項所述之組成物，其中該組成物係為一醫藥組成物。

【請求項11】如請求項 10 所述之組成物，其中該間質幹細胞不貼附於包含該組成物的一容器。

【請求項12】一種醫藥組成物，其包含根據申請專利範圍第 8 項或第 9 項所述之富含高分子量醣複合物條件培養基以及一醫藥可接受之載體、賦形劑或佐劑。

【請求項13】一種製備包含穩定分泌體的醫藥組成物的方法，其中該穩定分泌體的穩定性包含在室溫狀態 1 個月後保持至少 60%活性，該方法包含：

將間質幹細胞(MSCs)培養於血小板裂解液、表皮生長因子(EGF)、鹼性纖維母細胞生長因子(FGF)或其任意組合所組成的培養基，並足以允許分泌體分泌至該培養基的時間，以產生包含硫酸軟骨素且黏度至少為 1.5 厘拖(centistokes)之該富含高分子量醣複合物條件培養基；以及

收穫該培養基的上清液，且其中該方法不包括過濾該上清液。

【請求項14】如請求項 13 所述之方法，其中穩定的該分泌體包含選自由

第2頁，共 3 頁(發明申請專利範圍)

IFN- γ 、IL-8、IL-9、IL-12、IL-15、TNF- α 、IL-10、MCP-1、RANTES、GM-CSF、IP-10、PDGF-bb、血管內皮生長因子、IL-6 及血管內皮生長因子所組成之群組的一或多種。

【請求項15】 一種組合物在製備治療一個體中發炎症狀之藥物的用途，其中該組合物包含一治療有效量的一富含高分子量醣複合物條件培養基，其中該富含高分子量醣複合物條件培養基係為間質幹細胞(MSCs)培養於血小板裂解液、表皮生長因子(EGF)、鹼性纖維母細胞生長因子(FGF)或其任意組合所組成的培養基，以產生包含硫酸軟骨素且黏度至少為 1.5 厘拖(censtokes)之該富含高分子量醣複合物條件培養基。

【請求項16】 如請求項 15 所述之用途，其中該發炎症狀為骨關節炎。

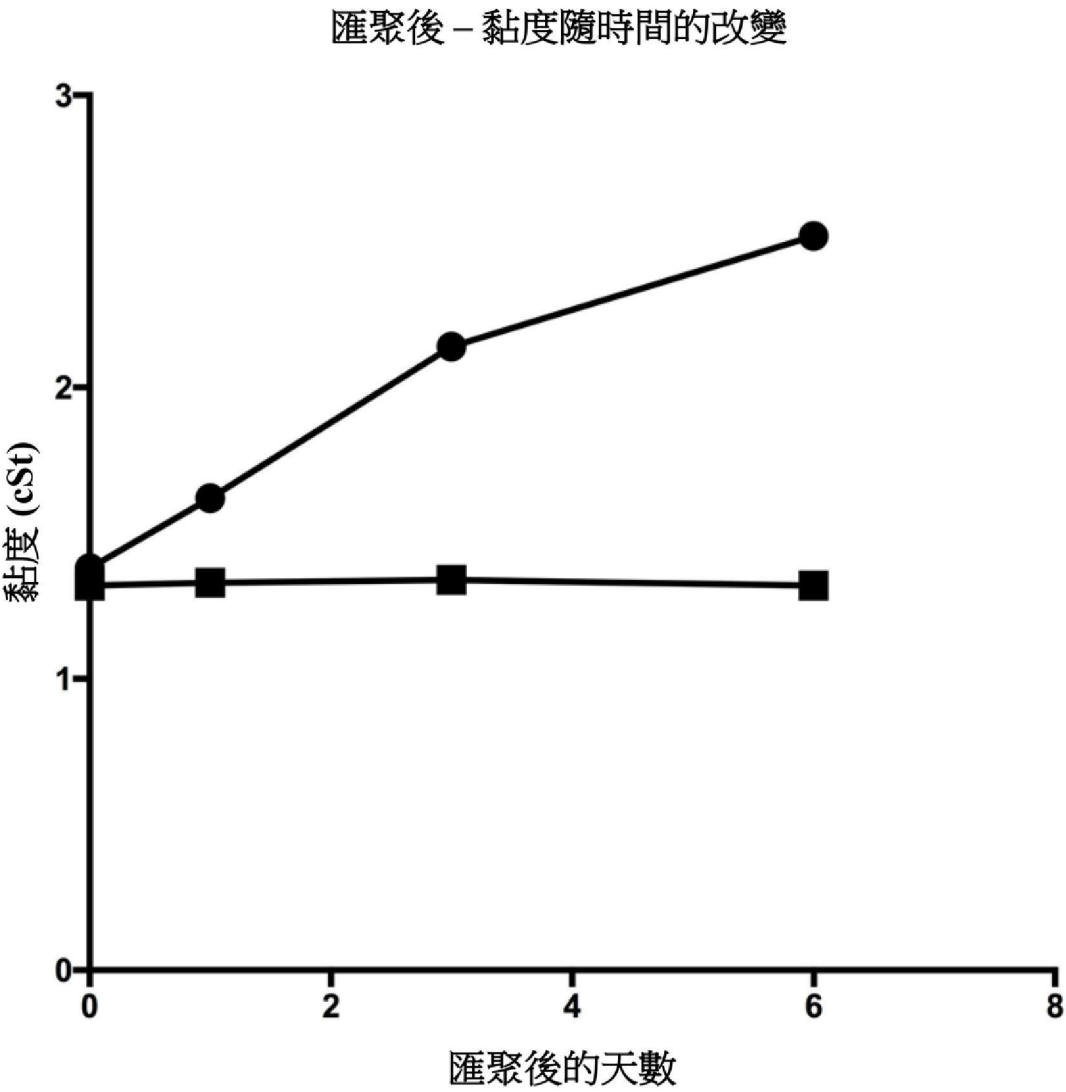
【請求項17】 如請求項 15 所述之用途，其中該治療更包含施予一治療有效量之擴增培養的間質幹細胞(MSCs)。

【請求項18】 如請求項 15 所述之用途，其中該組合物包含擴增培養的間質幹細胞及該富含高分子量醣複合物條件培養基。

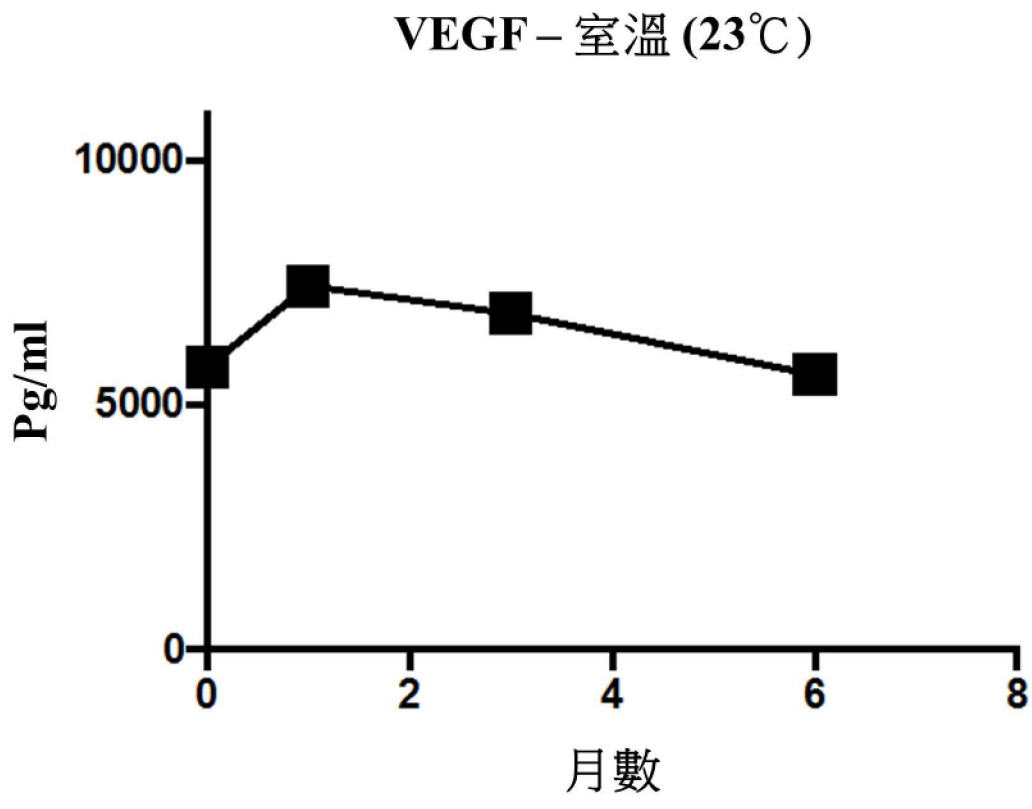
【請求項19】 如請求項 17-18 任一項所述之用途，其中該擴增培養的間質幹細胞的該有效劑量的範圍為 200 萬到約 1,000 萬個細胞。

【請求項20】 如請求項 17-18 任一項所述之用途，其中該擴增培養的間質幹細胞的該有效劑量為約 500 萬個細胞。

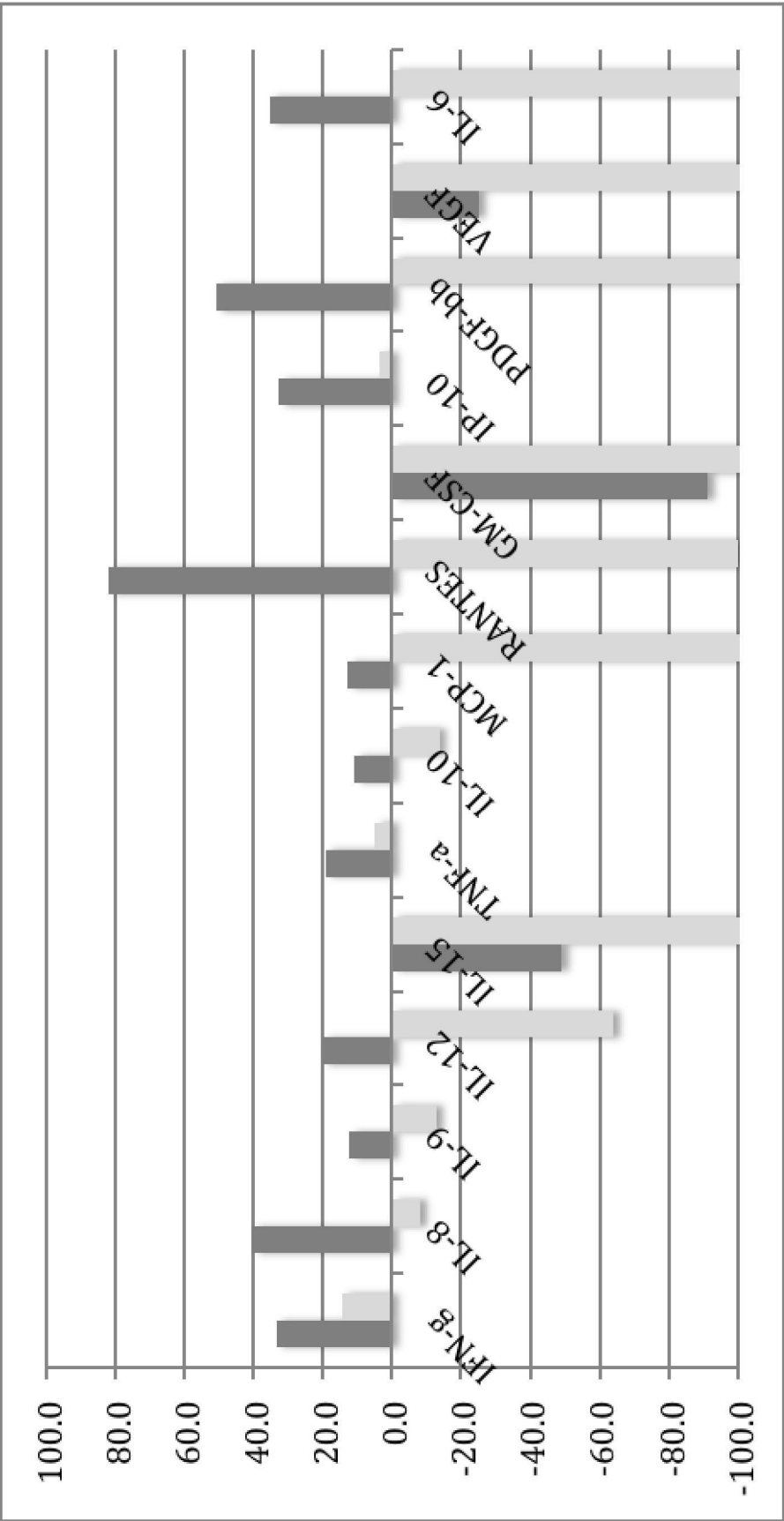
【發明圖式】



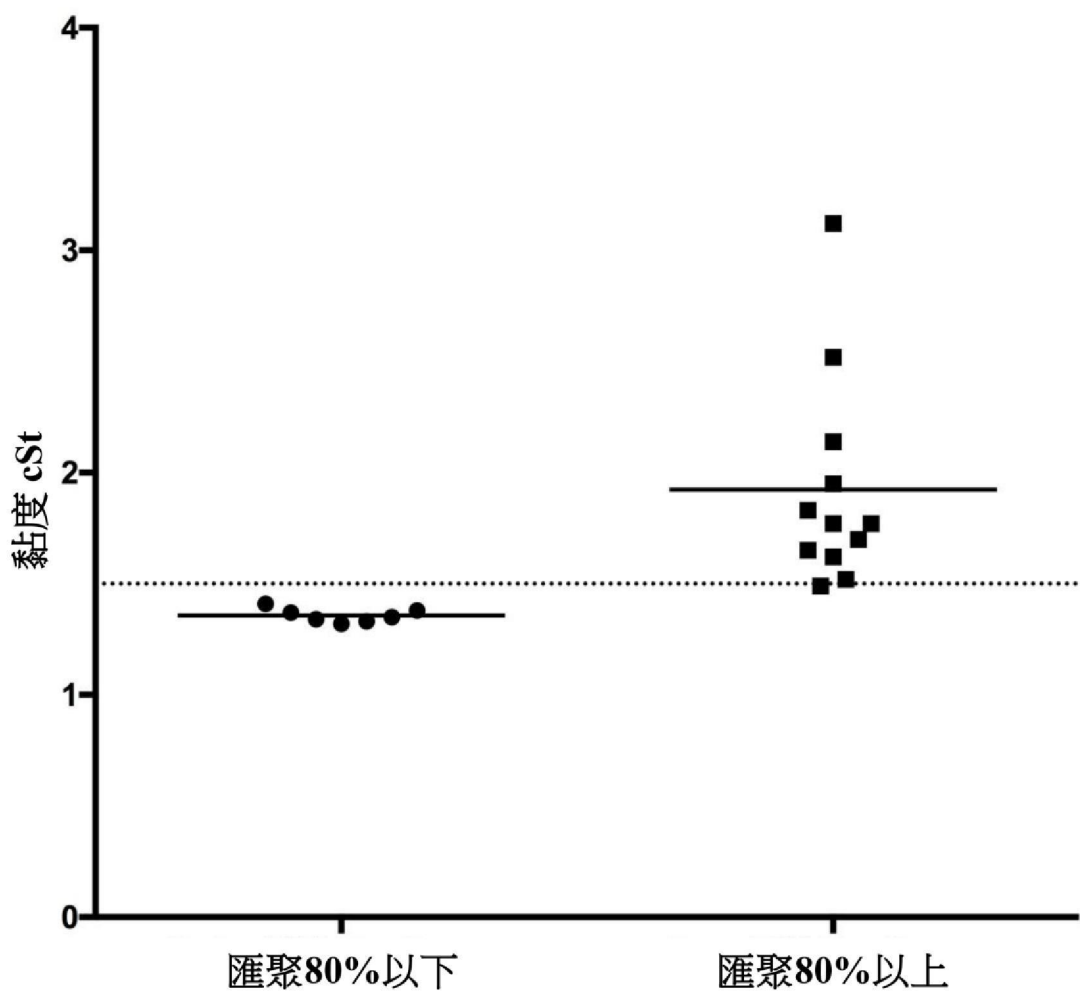
第 1 圖



第 2 圖



第 3 圖



第 4 圖