

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-521086

(P2023-521086A)

(43)公表日 令和5年5月23日(2023.5.23)

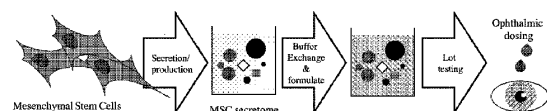
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K	35/28	2 G 0 4 5	
A 6 1 K	38/19 (2006.01)	A 6 1 K	38/19	4 B 0 6 5	
A 6 1 K	38/18 (2006.01)	A 6 1 K	38/18	4 C 0 7 6	
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	38/48 (2006.01)	A 6 1 K	38/48	4 C 0 8 7	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全140頁) 最終頁に続く
(21)出願番号 特願2022-561111(P2022-561111)		(71)出願人 521445029			
(86)(22)出願日 令和3年4月6日(2021.4.6)				コンバンジョ・インコーポレイテッド	
(85)翻訳文提出日 令和4年11月25日(2022.11.25)				Combango, Inc.	
(86)国際出願番号 PCT/US2021/026059				アメリカ合衆国94025カリフォルニア	
(87)国際公開番号 WO2021/207282				ア州メンロ・パーク、オブライエン・ド	
(87)国際公開日 令和3年10月14日(2021.10.14)				ライブ1440、スウィート・ディ	
(31)優先権主張番号 63/006,680		(74)代理人 100145403			
(32)優先日 令和2年4月7日(2020.4.7)				弁理士 山尾 憲人	
(33)優先権主張国・地域又は機関		(74)代理人 100106518			
米国(US)				弁理士 松谷 道子	
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		(74)代理人 100138911			
,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(				弁理士 櫻井 陽子	
AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		(72)発明者 アルフォード, スペンサー			
T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR				アメリカ合衆国94560カリフォルニア	
,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,				ア州ニューアーク、シカモア・ストリー	
最終頁に続く				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 凍結乾燥間葉系幹細胞由来セクレトーム及びその使用

(57)【要約】

本出願は、凍結乾燥間葉系幹細胞セクレトームを作製及び使用するための方法及びプロセス、ならびに本明細書に記載の再構成凍結乾燥間葉系幹細胞セクレトームを用いて眼の状態及び／または障害を治療するための方法を提供する。

FIGURE 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物であって、前記組成物は、

i. 約 250 μ M 未満の IDO（インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ）酵素活性と、

ii. HGF、FGF-7、TIMP-1、TIMP-2、PAI-1（セルピン E1）、VEGF-A、及び／または b-NGF からなる群から選択される少なくとも 1 つの栄養因子／サイトカインと、

iii. sFLT-1、PEDF（セルピン F1）、セルピン A1、IGFBP-2、IGFBP-3、SDF-1、TSG-14、カリクレイン 3、MCP-1、bFGF、アンジオゲニン、MCP-2、アンジオ-2、IL-6、IL-17、G-CSF、M-CSF、GM-CSF、IL-8、TNF-ベータ、PDGF、SOD1、SOD2、SOD3、及び／または HO-1 からなるグループから選択される少なくとも 1 つの追加因子と、

iv. DPPIV（ジペプチジルペプチダーゼ-4）、uPA、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンボスポンジン-2、及び／またはトロンボスポンジン-1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの追加因子と、を含む、前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物。

【請求項 2】

前記 MSC セクレトームが、「より高いレベル」の、セルピン E1、セルピン A1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第 4 因子及び／またはセルピン F1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの因子をさらに含み、任意選択的に 1 ng/mL ~ 400 ng/mL、任意選択的に 1 ng/mL ~ 300 ng/mL、任意選択的に 1 ng/mL ~ 200 ng/mL、任意選択的に 1 ng/mL ~ 100 ng/mL、任意選択的に 1 ng/mL ~ 50 ng/mL、任意選択的に 1 ng/mL ~ 10 ng/mL、任意選択的に 1 ng/mL ~ 8 ng/mL である、請求項 1 に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の MSC セクレトーム組成物。

【請求項 3】

前記 MSC セクレトームが、「中程度」レベルの、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンボスポンジン-2、トロンボスポンジン-1、アンジオゲニン、DPPIV、IGFBP-3、及び／または uPA からなる群から選択される少なくとも 1 つの因子をさらに含み、任意選択的に 400 pg/mL ~ 3000 pg/mL である、請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の MSC セクレトーム組成物。

【請求項 4】

前記 MSC セクレトームが、アポリポタンパク質 A1、補体因子 D、C 反応性タンパク質、シスタチン C、DKK-1、エンブリン、オステオポンチン、ビタミン D BP、MIF、RANTES、uPAR、IL-17a、GDF-15、及び／または IFN γ からなる群から選択される少なくとも 1 つの因子をさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の MSC セクレトーム組成物。

【請求項 5】

前記 MSC セクレトームが、抗血管新生因子対血管新生促進因子を、> 2、> 3、> 4、または > 5 の比の値で含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の MSC セクレトーム組成物。

【請求項 6】

前記 MSC セクレトームが、「低」レベルの VEGF、任意選択で 0 pg/mL ~ 200 pg/mL、または任意選択で 1 pg/mL ~ 400 pg/mL の VEGF をさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の MSC セ

10

20

30

40

50

クレトーム組成物。

【請求項 7】

前記 V E G F のレベルがセルピン E 1 のレベルより 5 ～ 1 0 倍低い、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

【請求項 8】

前記組成物が 1 つ以上の抗血管新生因子を含み、前記 V E G F の濃度に対する前記 1 つ以上の抗血管新生因子の濃度の合計は、 > 2 、 > 3 、 > 4 、または > 5 である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

【請求項 9】

前記 M S C セクレトームが、b F G F、P L G F、及び P D G F を含まないか、及び／または非常に低レベルで含み、任意選択で 1000 pg/mL 未満である、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

【請求項 10】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物が約 4.7 ～ 約 7.5 の pH を有する、請求項 1 ～ 9 に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

【請求項 11】

前記 M S C セクレトームが、リン酸二ナトリウム／一ナトリウム、クエン酸ナトリウム／クエン酸、ホウ酸／クエン酸ナトリウム、ホウ酸／四ホウ酸ナトリウム、及びクエン酸／リン酸二ナトリウムからなる群から選択される緩衝系で配合される、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

【請求項 12】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物が、張性改変剤をさらに含む、請求項 1 ～ 11 に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

【請求項 13】

前記張性改変剤が、N a C l、K C l、マンニトール、デキストロース、スクロース、ソルビトール、及びグリセリンからなる群から選択される、請求項 12 に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

【請求項 14】

前記 M S C セクレトームが、リン酸一ナトリウム／二ナトリウム、マンニトール、及びトレハロースをさらに含み、前記組成物が、約 pH 7.4 の pH を有する、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

【請求項 15】

前記 M S C セクレトームが、二価カチオンをさらに含む、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

【請求項 16】

前記二価カチオンが、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、及び Zn^{2+} からなる群から選択される、請求項 15 に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

【請求項 17】

前記 M S C セクレトームが、リン酸二ナトリウム／クエン酸、マンニトール、及びトレハロースをさらに含み、前記組成物が約 pH 6.4 の pH を有する、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

【請求項 18】

前記組成物が、接着剤をさらに含む、請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

前記接着剤が、ヒプロメロース、ポロキサマー４０７、ポロキサマー１８８、ポロキサマー２３７、ポロキサマー３３８、ヒプロメロース（ＨＰＭＣ）、ポリカルボフィル、ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）、ＰＶＡ（ポリビニルアルコール）、ポリイミド、ヒアルロン酸ナトリウム、ジェランガム、ポリ（乳酸－コ－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）、ポリシロキサン、ポリイミド、カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、フィブリン接着剤、ポリエチレングリコール、及びＧｅｌＣＯＲＥからなる群から選択される、請求項１８に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のＭＳＣセクレトーム組成物。

【請求項２０】

凍結乾燥用の間葉系幹細胞（ＭＳＣ）セクレトーム組成物を作製する方法であって、

- i. 最初の培地で間葉系幹細胞（ＭＳＣ）を培養することと、
- ii. ステップ（i）からの第１の培地を前記ＭＳＣから取り除くことと、
- iii. ステップ（ii）の前記ＭＳＣを洗浄することと、
- iv. 第２の培地を追加し、約１～５日間培養することと、
- v. ステップ（iv）からの前記第２の培地を馴化培地として収穫することと、
- vi. ステップ（v）の前記馴化培地を、請求項１～１９のいずれか一項に記載のＭＳＣセクレトーム組成物に処理することと、
- vii. ステップviの前記ＭＳＣセクレトーム組成物を凍結乾燥することと、を含む、前記方法。

【請求項２１】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のＭＳＣセクレトーム組成物が、請求項１～１９のいずれか一項に記載のセクレトーム組成物である、請求項１９に記載の方法。

【請求項２２】

ステップ（v）の前記馴化培地を前記セクレトーム組成物に処理するステップ（vi）が、

- a) ステップ（v）から採取した前記馴化培地を濾過して細胞粒子を除去することと、
- b) ステップ（a）からの前記濾過された馴化培地を濃縮することと、
- c) 製剤緩衝液と緩衝液交換することと、
- d) ステップviの前記ＭＳＣセクレトーム組成物を凍結乾燥することと、を含む、請求項２０または２１に記載の方法。

【請求項２３】

前記ステップc)が、リン酸二／一ナトリウム、クエン酸ナトリウム／クエン酸、ホウ酸／クエン酸ナトリウム、ホウ酸／四ホウ酸ナトリウム、及びクエン酸／リン酸二ナトリウムからなる群から選択される緩衝系と緩衝液交換することを含む、請求項２２に記載の方法。

【請求項２４】

前記濾過ステップ（a）が、０．４５μmフィルター、０．２２μmフィルター、０．８μmフィルター、及び０．６５μmフィルター、低タンパク質結合ＰＶＤＦ膜、及び／またはＰＥＳ（ポリエーテルスルホン）の使用を含む、請求項２２または２３に記載の方法。

【請求項２５】

前記濃縮ステップ（b）が、中空繊維フィルター、接線流濾過システム、または遠心分離ベースのサイズ排除技術を使用することを含む、請求項２２～２４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６】

前記遠心分離ベースのサイズ排除技術が３～１０kDaのMWカットオフを使用する、請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

眼疾患の治療方法であって、治療有効量の請求項１～１９のいずれか一項に記載の間葉

10

20

30

40

50

系幹細胞セクレトーム組成物をそれを必要とする患者に、または請求項 20～26 のいずれか一項に従って作製された組成物をそれを必要とする患者に投与することを含む、前記治療方法。

【請求項 28】

前記組成物が標的領域に投与される、請求項 27 に記載の治療方法。

【請求項 29】

治療を必要とする患者の眼構造への外傷後の視覚機能障害を治療するための方法であって、治療有効量の請求項 1～19 のいずれか一項に記載の再構成凍結乾燥間葉系幹細胞セクレトーム組成物、または請求項 20～26 のいずれか一項に従って作製された組成物を、前記患者に投与することを含む、前記方法。

10

【請求項 30】

治療を必要とする患者の眼創傷治癒を誘導及び／または促進する方法であって、治療有効量の請求項 1～19 のいずれか一項に記載の再構成凍結乾燥間葉系幹細胞セクレトーム組成物、または請求項 20～26 のいずれか一項に従って作製された組成物を、前記患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項 31】

治療を必要とする患者の血管新生を低減及び／または阻害し、瘢痕化を低減及び／または阻害し、視力を促進及び／または維持し、及び／または創傷閉鎖率を増加させる（例えば、創傷閉鎖時間を減少させる）ための方法であって、治療有効量の請求項 1～19 のいずれか一項に記載の再構成凍結乾燥間葉系幹細胞セクレトーム組成物、または請求項 20～26 のいずれか一項に従って作製された組成物を、前記患者に投与することを含む、前記方法。

20

【請求項 32】

治療を必要とする患者の視力維持を促進するために、血管新生を低減及び／または抑制し、瘢痕化を低減する方法であって、治療有効量の請求項 1～19 のいずれか一項に記載の再構成凍結乾燥間葉系幹細胞セクレトーム組成物、または請求項 20～26 のいずれか一項に従って作製された組成物を、前記患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項 33】

前記再構成凍結乾燥間葉系幹細胞セクレトーム組成物が局所投与用に配合される、請求項 27～32 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 34】

前記再構成凍結乾燥間葉系幹細胞セクレトーム組成物が結膜下注射用に配合される、請求項 27～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

MSC セクレトームを特徴付けるための方法であって、

(i) 凍結乾燥 MSC セクレトームを 1 つ以上の特徴付けアッセイに供することであって、前記特徴付けアッセイは、物理的成分の特徴付け、酸化ストレスアッセイ、安全性分析、安定性アッセイ、増殖アッセイ、遊走アッセイ、血管新生アッセイ、分化／瘢痕化アッセイ、炎症アッセイ、及び／または上皮バリア完全性アッセイからなる群から選択される、前記供することと、

40

(ii) (i) の 1 つ以上のアッセイから結果を決定することと、を含む、前記方法。

【請求項 36】

凍結乾燥 MSC セクレトームの生物効力及び安定性を決定する方法であって、

(i) MSC セクレトームを 1 つ以上の特徴付けアッセイに供することであって、前記特徴付けアッセイは、物理的成分の特徴付け、酸化ストレスアッセイ、安全性分析、安定性アッセイ、増殖アッセイ、遊走アッセイ、血管新生アッセイ、分化／瘢痕化アッセイ、炎症アッセイ、及び／または上皮バリア完全性アッセイからなる群から選択される、前記供することと、

(ii) (i) の 1 つ以上のアッセイから結果を決定することと、を含む、前記方法。

【請求項 37】

50

複数のMSCセクレトームロット間の凍結乾燥MSCセクレトームロットの一貫性を決定するための方法であって、

(i) MSCセクレトームを1つ以上の特徴付けアッセイに供することであって、前記特徴付けアッセイは、物理的成分の特徴付け、酸化ストレスアッセイ、安全性分析、安定性アッセイ、増殖アッセイ、遊走アッセイ、血管新生アッセイ、分化／瘢痕化アッセイ、炎症アッセイ、及び／または上皮バリア完全性アッセイからなる群から選択される、前記供することと、

(ii) (i) の1つ以上のアッセイから結果を決定することと、を含む、前記方法。

【請求項38】

前記物理的成分の特徴付けからの(ii)の結果が、請求項1～19のいずれか一項に記載の抗血管新生MSCセクレトームまたは請求項20～26のいずれか一項に従って作製された組成物を同定する、請求項35～37のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項39】

前記安全性分析からの(ii)の結果が、血液適合性を示し、パイロジェン及び／またはエンドトキシンが低い及び／またはないMSCセクレトームを提供する、請求項35～37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項40】

前記安定性アッセイからの(ii)の結果が、 -20°C 、 4°C 、及び／または 20°C （例えば、室温）で少なくとも7日間または少なくとも14日間安定性を示すMSCセクレトームを提供する、請求項35～37のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項41】

前記増殖アッセイからの(ii)の結果が、増殖を誘導するMSCセクレトームを提供する、請求項35～37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項42】

前記遊走アッセイからの(ii)の結果が、遊走を誘導するMSCセクレトームを提供する、請求項35～37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項43】

前記血管新生アッセイからの(ii)の結果が、血管新生を抑制するかまたは促進しないMSCセクレトームを提供する、請求項35～37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

前記分化／瘢痕化アッセイからの(ii)の結果が、分化及び／または瘢痕化を抑制するMSCセクレトームを提供する、請求項35～37のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項45】

前記炎症アッセイからの(ii)の結果が、炎症を抑制するMSCセクレトームを提供する、請求項35～37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項46】

(iii) (ii) の結果に基づいてMSCセクレトームロットを同定すること、をさらに含む、請求項37に記載の方法。

【請求項47】

凍結乾燥MSCセクレトームを特徴付けるための試験及び／またはアッセイのパネルであって、前記パネルは、少なくとも2つの特徴付けアッセイを含み、前記特徴付けアッセイは、物理的成分の特徴付け、酸化ストレスアッセイ、安全性分析、安定性アッセイ、増殖アッセイ、遊走アッセイ、血管新生アッセイ、分化／瘢痕化アッセイ、炎症アッセイ、及び／または上皮バリア完全性アッセイからなる群から選択される、前記試験及び／またはアッセイのパネル。

40

【請求項48】

凍結乾燥MSCセクレトームロット間の一貫性を決定するための試験及び／またはアッセイのパネルであって、前記パネルは、1つ以上の特徴付けアッセイを含み、前記特徴付けアッセイは、物理的成分の特徴付け、酸化ストレスアッセイ、安全性分析、安定性アッセイ、増殖アッセイ、遊走アッセイ、血管新生アッセイ、分化／瘢痕化アッセイ、炎症ア

50

ッセイ、及び／または上皮バリア完全性アッセイからなる群から選択される、前記試験及び／またはアッセイのパネル。

【請求項 49】

前記物理的成分の特徴付けが、請求項 1～19 のいずれか 1 つに記載されるような MSC セクレトームまたは請求項 20～26 のいずれか 1 つに従って作成された組成物を同定する、請求項 47 または 48 に記載の試験及び／またはアッセイのパネル。

【請求項 50】

前記安全性分析からの (ii) の結果が、血液適合性を示し、パイロジェン及び／またはエンドトキシンが低い及び／またはない MSC セクレトームを提供する、請求項 47 または 48 に記載の試験及び／またはアッセイのパネル。

10

【請求項 51】

前記安定性アッセイが、-20℃、4℃、及び／または 20℃（例えば、室温）で少なくとも 7 日間または少なくとも 14 日間安定性を示す MSC セクレトームを同定する、請求項 47 または 48 に記載の試験及び／またはアッセイのパネル。

【請求項 52】

前記増殖アッセイが、増殖を誘導する MSC セクレトームを同定する、請求項 47 または 48 に記載の試験及び／またはアッセイのパネル。

【請求項 53】

前記遊走アッセイが、遊走を誘導する MSC セクレトームを同定する、請求項 47 または 48 に記載の試験及び／またはアッセイのパネル。

20

【請求項 54】

前記血管新生アッセイが、血管新生を抑制するかまたは促進しない MSC セクレトームを同定する、請求項 47 または 48 に記載の試験及び／またはアッセイのパネル。

【請求項 55】

前記分化／瘢痕化アッセイが、分化及び／または瘢痕化を抑制する MSC セクレトームを同定する、請求項 47 または 48 に記載の試験及び／またはアッセイのパネル。

【請求項 56】

前記炎症アッセイが炎症を抑制する MSC セクレトームを同定する、請求項 47 または 48 に記載の試験及び／またはアッセイのパネル。

【請求項 57】

物理的成分の特徴付け、酸化ストレスアッセイ、安全性分析、安定性アッセイ、増殖アッセイ、遊走アッセイ、血管新生アッセイ、分化／瘢痕化アッセイ、炎症アッセイ、及び／または上皮バリア完全性アッセイがすべて実行される、請求項 47 または 48 に記載の試験及び／またはアッセイのパネル。

30

【請求項 58】

前記試験及び／またはアッセイが、請求項 49～56 に記載の MSC セクレトームを同定する、請求項 57 に記載の試験及び／またはアッセイのパネル。

【請求項 59】

前記 MSC セクレトームが、抗血管新生 MSC セクレトーム及び／または抗瘢痕化 MSC セクレトームである、請求項 47～58 のいずれか一項に記載の試験及び／またはアッセイのパネル。

40

【請求項 60】

前記 MSC セクレトームが、抗血管新生 MSC セクレトーム及び／または抗瘢痕化 MSC セクレトームである、請求項 20～46 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 61】

前記 MSC セクレトームが、抗血管新生 MSC セクレトームまたは抗瘢痕化 MSC セクレトームである、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の凍結乾燥組成物または請求項 20～26 のいずれか一項に従って作製された凍結乾燥組成物。

【請求項 62】

安定した間葉系幹細胞 (MSC) セクレトーム凍結乾燥製剤であって、

50

i. 1 mLあたり1~20 μ g、任意に2 μ g~8 μ gのMSCセクレトームと、
 ii. 1 mLあたり2 mg~3 mgの一塩基性リン酸ナトリウムと、
 iii. 1 mLあたり11 mg~12 mgの二塩基性リン酸ナトリウムと、
 iv. 1 mLあたり11.5 mg~13 mgのマンニトールと、
 v. 23 mg~24 mgのトレハロース二水和物と、
 vi. 1 mLあたり0.5 mg~2 mgの任意選択のヒプロメロースと、を含み、
 pHは約4.7~約7.5である、前記安定した間葉系幹細胞(MSC)セクレトーム凍結乾燥製剤。

【請求項63】

凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の安定した間葉系幹細胞(MSC)セクレトーム製剤であって、

i. 0.004%~0.0375%、任意に0.008%~0.015% w/wのMSCセクレトームと、
 ii. 4%~5% w/wの一塩基性リン酸ナトリウムと、
 iii. 21.5%~23% w/wの二塩基性リン酸ナトリウムと、
 iv. 23%~25% w/wのマンニトールと、
 v. 46%~48% w/wのトレハロース脱水と、
 vi. 1%~3% w/wの任意選択のヒプロメロースと、を含み、
 pHは約4.7~約7.5である、前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の安定した間葉系幹細胞(MSC)セクレトーム製剤。

【請求項64】

凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の安定した間葉系幹細胞(MSC)セクレトーム製剤であって、

vii. 1 mLあたり6 μ gのMSCセクレトームと、
 viii. 1 mLあたり2.28 mgの一塩基性リン酸ナトリウムと、
 ix. 1 mLあたり11.45 mgの二塩基性リン酸ナトリウムと、
 x. 1 mLあたり12.2 mgのマンニトールと、
 xi. 24 mgのトレハロース二水和物と、
 xii. 1 mLあたり1 mgの任意選択のヒプロメロースと、を含み、
 pHは約7.4である、前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の安定した間葉系幹細胞(MSC)セクレトーム製剤。

【請求項65】

凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の安定した間葉系幹細胞(MSC)セクレトーム製剤であって、

viii. 0.012% w/wのMSCセクレトームと、
 viii. 4.5% w/wの一塩基性リン酸ナトリウムと、
 ix. 22.4% w/wの二塩基性リン酸ナトリウムと、
 x. 24% w/wのマンニトールと、
 xi. 47.1% w/wのトレハロース脱水と、
 xii. 2.0% w/wの任意選択のヒプロメロースと、を含み、
 pHは約7.4である、前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の安定した間葉系幹細胞(MSC)セクレトーム製剤。

【請求項66】

凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞(MSC)セクレトーム組成物であって、

a. HGF、TIMP-1、TIMP-2、PAI-1(セルピンE1)、VEGF-A、及びb-NGFからなる群から選択される少なくとも1つの栄養因子／サイトカインと、

b. PEDF(セルピンF1)、IGFBP-2、IGFBP-3、SDF-1、TSG-14、カリクレイン3、MCP-1、アンジオゲニン、MCP-2、アンジオ-2、

IL-6、IL-17、G-CSF、M-CSF、GM-CSF、IL-8、TNF- α 、及びPDGFからなるグループから選択される少なくとも1つの追加因子と、

c. DPP IV (ジペプチジルペプチダーゼ-4)、uPA、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンスポンジン-2、及びトロンスポンジン-1からなる群から選択される少なくとも1つの追加因子と、を含む、前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項67】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される高レベルの少なくとも1つの因子をさらに含む、請求項66に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

10

【請求項68】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が、1 ng/mL ~ 400 ng/mLの、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む、請求項66または67に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

20

【請求項69】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が、「中程度」レベルの、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンスポンジン-2、トロンスポンジン-1、アンギオゲニン、DPP IV、IGFBP-3、及び／またはuPAからなる群から選択される少なくとも1つの因子をさらに含む、請求項66~68のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項70】

前記MSCセクレトーム組成物が、400 pg/mL ~ 3000 pg/mLの、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンスポンジン-2、トロンスポンジン-1、アンギオゲニン、DPP IV、IGFBP-3、及びuPAからなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む、請求項66~69のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

30

【請求項71】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が、アポリポタンパク質A1、補体因子D、C反応性タンパク質、シスタチンC、DKK-1、エンプリン、オステオポンチン、ビタミンDBP、MIF、RANTES、uPAR、IL-17a、GDF-15、及びIFN γ からなる群から選択される少なくとも1つの因子をさらに含む、請求項66~70のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

40

【請求項72】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が、抗血管新生因子対血管新生促進因子を、>2、>3、>4、または>5の比の値で含む、請求項66~71のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項73】

前記抗血管新生因子が、PEDF、低レベルのVEGF、及びセルピンE1からなる群から選択される1つ以上の因子を含み、前記血管新生促進因子は、VEGF、アンギオゲニン、IGFBP-3、uPA、アンジオ-1、アンジオ-2、エンドセリン-1からなる群から選択される1つ以上の因子を含む、請求項66~72のいずれか一項に記載の凍

50

結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項74】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が、低レベルのVEGFをさらに含む、請求項66～73のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項75】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が、1pg/mL～400pg/mLのVEGFを含む、請求項66～74のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項76】

前記VEGFのレベルが、前記セルピンE1のレベルより5～10倍低い、請求項66～75のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項77】

前記組成物が、1つ以上の抗血管新生因子を含み、前記VEGFの濃度に対する前記1つ以上の抗血管新生因子の濃度の合計が>2、>3、>4、または>5である、請求項66～76のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項78】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が、bFGF、PLGF、及びPDGFを含まない、及び／または非常に低レベルで含む、請求項66～77のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項79】

前記MSCセクレトームが、1000pg/mL未満のbFGF、PLGF、及びPDGFを含む、請求項66～78のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項80】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が、約4.7～約7.5のpHを有する、請求項66～79のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項81】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が、リン酸二ナトリウム／一ナトリウム、クエン酸ナトリウム／クエン酸、ホウ酸／クエン酸ナトリウム、ホウ酸／四ホウ酸ナトリウム、及びクエン酸／リン酸二ナトリウムからなる群から選択される緩衝系で配合される、請求項66～80のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項82】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が張性改変剤をさらに含む、請求項66～81のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項83】

前記張性改変剤が、NaCl、KCl、マンニトール、デキストロース、スクロース、ソルビトール、及びグリセリンからなる群から選択される、請求項82に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項84】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が、リン酸一ナトリウム／二ナトリウム、マンニトール、及びトレハロースをさらに含み、前記組成物が約pH7.4のpHを有する、請求項66～83のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 85】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が、二価カチオンをさらに含む、請求項66～84のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項 86】

前記二価カチオンが、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、及び Zn^{2+} からなる群から選択される、請求項85に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項 87】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が、リン酸二ナトリウム／クエン酸、マンニトール、及びトレハロースをさらに含み、前記組成物が約pH 6.4のpHを有する、請求項66～86のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項 88】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が、接着剤をさらに含む、請求項66～87のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項 89】

前記接着剤が、ヒプロメロース、ポロキサマー407、ポロキサマー188、ポロキサマー237、ポロキサマー338、ヒプロメロース（HPMC）、ポリカルボフィル、ポリビニルピロリドン（PVP）、PVA（ポリビニルアルコール）、ポリイミド、ヒアルロン酸ナトリウム、ジェランガム、ポリ（乳酸-コグリコール酸）（PLGA）、ポリシロキサン、ポリイミド、カルボキシメチルセルロース（CMC）、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、フィブリン接着剤、ポリエチレングリコール、GelCOREからなる群から選択される、請求項88に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項 90】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が、生体異物成分、フェノールレッド、ペプチド及び生体分子<3kDa、抗生物質、タンパク質凝集体>200nm、細胞、非エクソソーム／非細胞外小胞細胞破片、ホルモン、及びレグルタミンからなる群から選択される1つ以上の成分を含まない、請求項66～89のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項 91】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が、HGF、ペントラキシン-3（TSG-14）、VEGF、TIMP-1、セルピンE1、及び<5ng/mL IL-8を含む、請求項66～90のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項 92】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が、
 i. 0.3～4.5ng/mLのHGFと、
 ii. 0.5～20ng/mLのペントラキシン-3（TSG-14）と、
 iii. 100～600pg/mLのVEGFと、
 iv. 10～200ng/mLのTIMP-1と、
 v. 20～80ng/mLのセルピンE1と、
 vi. <5ng/mLのIL-8と、を含む、請求項66～91のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物。

【請求項 93】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が、
 i. 0.3～4.5ng/mLのHGFと、
 ii. 0.5～20ng/mLのペントラキシン-3（TSG-14）と、

10

20

30

40

50

i i i . 100 ~ 600 pg / mL の V E G F と、
 i v . 10 ~ 200 ng / mL の T I M P - 1 と、
 v . 20 ~ 80 ng / mL の セルピン E 1 と
 v i . 100 ~ 400 ng / mL の セルピン F 1 と、
 v i i . < 5 ng / mL の I L - 8 と、を含む、請求項 66 ~ 92 のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

【請求項 94】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物が、抗血管新生 M S C セクレトームまたは抗瘢痕化 M S C セクレトームを含む、請求項 66 ~ 93 のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

10

【請求項 95】

凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の安定した間葉系幹細胞 (M S C) セクレトーム製剤であって、

i . 1 mL あたり 2 μ g ~ 20 μ g の M S C セクレトームと、
 i i . 1 mL あたり 2 mg ~ 3 mg の一塩基性リン酸ナトリウムと、
 i i i . 1 mL あたり 11 mg ~ 12 mg の二塩基性リン酸ナトリウムと、
 i v . 1 mL あたり 11.5 mg ~ 13 mg のマンニトールと、
 v . 23 mg ~ 24 mg のトレハロース二水和物と、
 v i . 1 mL あたり 0.5 mg ~ 2 mg の任意選択のヒプロメロースと、を含み、
 p H は約 4.7 ~ 約 7.5 である、前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の安定した間葉系幹細胞 (M S C) セクレトーム製剤。

20

【請求項 96】

凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の安定した間葉系幹細胞 (M S C) セクレトーム製剤であって、

i . 0.004 % ~ 0.08 % w / w の M S C セクレトームと、
 i i . 4 % ~ 5 % w / w の一塩基性リン酸ナトリウムと、
 i i i . 21.5 % ~ 23 % w / w の二塩基性リン酸ナトリウムと、
 i v . 23 % ~ 25 % w / w のマンニトールと、
 v . 46 % ~ 48 % w / w のトレハロース脱水と、
 v i . 1 % ~ 3 % w / w の任意選択のヒプロメロースと、を含み、
 p H は約 4.7 ~ 約 7.5 である、前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の安定した間葉系幹細胞 (M S C) セクレトーム製剤。

30

【請求項 97】

必要とする対象の眼の状態の治療方法であって、再構成凍結乾燥間葉系幹細胞 (M S C) セクレトーム組成物を前記対象に投与することを含み、前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、

i . H G F、T I M P - 1、T I M P - 2、P A I - 1 (セルピン E 1)、V E G F - A、及び b - N G F からなる群から選択される少なくとも 1 つの栄養因子／サイトカインと、

i i . P E D F (セルピン F 1)、セルピン A 1、I G F B P - 2、I G F B P - 3、S D F - 1、T S G - 14、カリクレイン 3、M C P - 1、アンジオゲニン、M C P - 2、アンジオー 2、I L - 6、I L - 17、G - C S F、M - C S F、G M - C S F、I L - 8、T N F - ベータ、及び P D G F からなる群から選択される少なくとも 1 つの追加因子と、

40

i i i . D P P I V (ジペプチジルペプチダーゼ - 4)、u P A、アンジオポエチン - 1、アンジオポエチン - 2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン - 1、トロンボスポンジン - 2、及びトロンボスポンジン - 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの追加因子と、を含む、前記治療方法。

【請求項 98】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥 M S C セクレトーム組成物が

50

、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TS G-14)、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される高レベルの少なくとも1つの因子をさらに含む、請求項97に記載の治療方法。

【請求項99】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥MSCセクレトーム組成物が、1 ng/mL～100 ng/mLの、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TS G-14)、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む、請求項97または98に記載の治療方法。

【請求項100】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥MSCセクレトーム組成物が、中程度レベルの、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンボスポンジン-2、トロンボスポンジン-1、アンジオゲニン、DPP IV、IGFBP-3、及びuPAからなる群から選択される少なくとも1つの因子をさらに含む、請求項97～99のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項101】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥MSCセクレトーム組成物が、400 pg/mL～3000 pg/mLの、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンボスポンジン-2、トロンボスポンジン-1、アンジオゲニン、DPP IV、IGFBP-3、及びuPAからなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む、請求項97～100のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項102】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥MSCセクレトーム組成物が、アポリタンパク質A1、補体因子D、C反応性タンパク質、シスタチンC、DKK-1、エンブリン、オステオポンチン、ビタミンDBP、MIF、RANTES、uPAR、IL-17a、GDF-15、及びIFN γ からなる群から選択される少なくとも1つの因子をさらに含む、請求項97～101のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項103】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥MSCセクレトーム組成物が、抗血管新生因子対血管新生促進因子を、>2、>3、>4、または>5の比の値で含む、請求項97～102のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項104】

前記抗血管新生因子が、PEDF、低レベルのVEGF、及びセルピンE1及び血管新生促進剤：VEGF、アンジオゲニン、IGFBP-3、uPA、アンジオ-1、アンジオ-2、エンドセリン-1からなる群から選択される1つ以上の因子を含む、請求項97～103のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項105】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥MSCセクレトーム組成物が、低レベルのVEGFをさらに含む、請求項97～104のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項106】

前記再構成凍結乾燥MSCセクレトームが、1 pg/mL～400 pg/mLのVEGFを含む、請求項97～104のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項107】

前記VEGFのレベルが、前記セルピンE1のレベルより5～10倍低い、請求項97～106のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項108】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥MSCセクレトーム組成物が

10

20

30

40

50

、１つ以上の抗血管新生因子を含み、前記 V E G F の濃度に対する前記 １つ以上の抗血管新生因子の濃度の合計が > 2、> 3、> 4、または > 5 である、請求項 97～107 のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項 109】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥 M S C セクレトーム組成物が、b F G F、P L G F、及び P D G F を含まないか、または非常に低レベルで含む、請求項 97～108 のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項 110】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥 M S C セクレトーム組成物が、1000 p g / m L 未満の b F G F、P L G F、及び P D G F を含む、請求項 97～109 のいずれか一項に記載の治療方法。

10

【請求項 111】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥 M S C セクレトーム組成物が、約 4.7～約 7.5 の p H を有する、請求項 97～110 のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項 112】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥 M S C セクレトーム組成物が、リン酸二ナトリウム／一ナトリウム、クエン酸ナトリウム／クエン酸、ホウ酸／クエン酸ナトリウム、ホウ酸／四ホウ酸ナトリウム、及びクエン酸／リン酸二ナトリウムからなる群から選択される緩衝系で配合される、請求項 97～111 のいずれか一項に記載の治療方法。

20

【請求項 113】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥 M S C セクレトーム組成物が、張性改変剤をさらに含む、請求項 97～112 のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項 114】

前記張性改変剤が、N a C l、K C l、マンニトール、デキストロース、スクロース、ソルビトール、及びグリセリンからなる群から選択される、請求項 113 に記載の治療方法。

【請求項 115】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥 M S C セクレトーム組成物が、リン酸一ナトリウム／二ナトリウム、マンニトール、及びトレハロースをさらに含み、前記組成物が約 p H 7.4 の p H を有する、請求項 97～114 のいずれか一項に記載の治療方法。

30

【請求項 116】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥 M S C セクレトーム組成物が、二価カチオンをさらに含む、請求項 97～115 のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項 117】

前記二価カチオンが、M g ²⁺、C a ²⁺、及び Z n ²⁺ からなる群から選択される、請求項 116 に記載の治療方法。

【請求項 118】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥 M S C セクレトーム組成物が、リン酸二ナトリウム／クエン酸、マンニトール、及びトレハロースをさらに含み、前記組成物が約 p H 6.4 の p H を有する、請求項 97～117 のいずれか一項に記載の治療方法。

40

【請求項 119】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥 M S C セクレトーム組成物が、接着剤をさらに含む、請求項 97～118 のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項 120】

前記接着剤が、ヒプロメロース、ポロキサマー 407、ポロキサマー 188、ポロキサマー 237、ポロキサマー 338、ヒプロメロース（H P M C）、ポリカルボフィル、ポ

50

リビニルピロリドン（PVP）、PVA（ポリビニルアルコール）、ポリイミド、ヒアルロン酸ナトリウム、ジェランガム、ポリ（乳酸-コグリコール酸）（PLGA）、ポリシロキサン、ポリイミド、カルボキシメチルセルロース（CMC）、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、フィブリン接着剤、ポリエチレングリコール、GelCOREからなる群から選択される、請求項119に記載の治療方法。

【請求項121】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥MSCセクレトーム組成物が、生体異物成分、フェノールレッド、ペプチド及び生体分子<3kDa、抗生物質、タンパク質凝集体>200nm、細胞、非エクソソーム／非細胞外小胞細胞破片、ホルモン、及びL-グルタミンからなる群から選択される1つ以上の成分を含まない、請求項97～120のいずれか一項に記載の治療方法。

10

【請求項122】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥MSCセクレトーム組成物が、HGF、ペントラキシン-3（TSG-14）、VEGF、TIMP-1、セルピンE1、及び<5ng/mLのIL-8を含む、請求項97～121のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項123】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥MSCセクレトーム組成物が、

20

i. 0.3～4.5ng/mLのHGFと、
 ii. 0.5～20ng/mLのペントラキシン-3（TSG-14）と、
 iii. 100～600pg/mLのVEGFと、
 iv. 10～200ng/mLのTIMP-1と、
 v. 20～80ng/mLのセルピンE1と、
 vi. 100～400ng/mLのセルピンF1と、
 vii. <5ng/mLのIL-8と、を含む、請求項97～122のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項124】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の再構成凍結乾燥MSCセクレトーム組成物が、抗血管新生MSCセクレトームまたは抗瘢痕化MSCセクレトームを含む、請求項97～123のいずれか一項に記載の治療方法。

30

【請求項125】

治療を必要とする対象における眼の状態の治療方法であって、再構成凍結乾燥間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物を前記対象に投与することを含み、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の前記MSCセクレトーム組成物は、安定した間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム製剤であり、前記安定した間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム製剤は、

i. 1mLあたり2μg～20μgのMSCセクレトームと、
 ii. 1mLあたり2mg～3mgの一塩基性リン酸ナトリウムと、
 iii. 1mLあたり11mg～12mgの二塩基性リン酸ナトリウムと、
 iv. 1mLあたり11.5mg～13mgのマンニトールと、
 v. 23mg～24mgのトレハロース二水和物と、
 vi. 1mLあたり0.5mg～2mgの任意選択のヒプロメロースと、を含み、
 pHは約4.7～約7.5である、前記治療方法。

40

【請求項126】

治療を必要とする対象における眼の状態の治療方法は、前記対象に再構成凍結乾燥間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物を投与することを含み、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の前記MSCセクレトーム組成物は、安定した間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム製剤であり、前記安定した間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム製剤は、

50

i . 0 . 0 0 4 % ~ 0 . 0 8 % w / w の M S C セクレトームと、
i i . 4 % ~ 5 % w / w の一塩基性リン酸ナトリウムと、
i i i . 2 1 . 5 % ~ 2 3 % w / w の二塩基性リン酸ナトリウムと、
i v . 2 3 % ~ 2 5 % w / w のマンニトールと、
v . 4 6 % ~ 4 8 % w / w のトレハロース脱水と、
v i . 1 % ~ 3 % w / w の任意選択のヒプロメロースと、を含み、
p H は約 4 . 7 ~ 約 7 . 5 である、治療方法。

【請求項 1 2 7】

前記アッセイのパネルが少なくとも 1 つの遊走アッセイを含む、請求項 4 7 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の試験及び／またはアッセイのパネル。

10

【請求項 1 2 8】

前記遊走アッセイがインビトロ創傷閉鎖アッセイである、請求項 4 7 ~ 4 8 または 1 2 7 のいずれか一項に記載の試験及び／またはアッセイのパネル。

【請求項 1 2 9】

前記インビトロ創傷閉鎖アッセイが、「スクラッチアッセイ」（「スクラッチ創傷アッセイ」とも呼ばれる）、円形スクラッチ創傷法、円形スクラッチ創傷アッセイ、及び円形創傷閉鎖アッセイからなる群から選択される、請求項 1 2 8 に記載の試験及び／またはアッセイのパネル。

【請求項 1 3 0】

前記凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物が抗酸化賦形剤をさらに含む、請求項 1 ~ 1 9 及び請求項 6 6 ~ 9 4 のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

20

【請求項 1 3 1】

前記抗酸化賦形剤が、アスコルビン酸、クエン酸、アセチルシステイン、システイン、メチオニン、亜硫酸塩（亜硫酸水素塩、メタ亜硫酸塩）、モノチオグリセロール、グルタチオン、トコフェロールアルファ、及び没食子酸プロピルからなる群から選択される、請求項 1 3 0 に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

【請求項 1 3 2】

前記抗酸化賦形剤が、配合時及び／または凍結乾燥前に前記 M S C セクレトーム組成物に添加される、請求項 1 3 0 または請求項 1 3 1 に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

30

【請求項 1 3 3】

前記凍結乾燥組成物が、前記 M S C セクレトーム組成物を瞬間凍結（- 8 0 ° C で実施）または凍結し、前記 M S C セクレトーム組成物を凍結乾燥することによって得られる、請求項 1 3 0 ~ 1 3 2 のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

【請求項 1 3 4】

凍結乾燥後の前記 M S C セクレトーム組成物中に、凍結乾燥前の前記 M S C セクレトーム組成物中の因子の少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、または少なくとも 9 0 % が存在する、請求項 1 3 0 ~ 1 3 3 のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

40

【請求項 1 3 5】

凍結乾燥後の前記 M S C セクレトーム組成物が、凍結乾燥前の前記 M S C セクレトーム組成物と比較して少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、または少なくとも 9 0 % の生物活性を示す、請求項 1 3 0 ~ 1 3 4 のいずれか一項に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物。

【請求項 1 3 6】

前記再構成凍結乾燥 M S C セクレトーム組成物が、抗酸化賦形剤をさらに含む、請求項 2 7 ~ 3 4 及び／または請求項 9 7 ~ 1 2 6 のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項 1 3 7】

50

前記抗酸化賦形剤が、アスコルビン酸、クエン酸、アセチルシステイン、システイン、メチオニン、亜硫酸塩（亜硫酸水素塩、メタ亜硫酸塩）、モノチオグリセロール、グルタチオン、トコフェロールアルファ、及び没食子酸プロピルからなる群から選択される、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

前記抗酸化賦形剤が、配合時及び／または凍結乾燥前に前記再構成凍結乾燥 M S C セクレトーム組成物に添加される、請求項 1 3 6 または請求項 1 3 7 に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

前記凍結乾燥組成物が、前記再構成 M S C セクレトーム組成物を瞬間凍結（－80℃で実施）または凍結し、前記再構成 M S C セクレトーム組成物を凍結乾燥することによって得られる、請求項 1 3 6 ～ 1 3 8 のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項 1 4 0】

凍結乾燥後の前記再構成 M S C セクレトーム組成物中に、凍結乾燥前の前記再構成 M S C セクレトーム組成物中の因子の少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、または少なくとも 90 % が存在する、請求項 1 3 6 ～ 1 3 9 のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項 1 4 1】

凍結乾燥後の前記再構成 M S C セクレトーム組成物が、凍結乾燥前の前記再構成 M S C セクレトーム組成物と比較して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、または少なくとも 90 % の生物活性を示す、請求項 1 3 6 ～ 1 3 9 のいずれか一項に記載の治療方法。

【請求項 1 4 2】

前記製剤がヒプロメロースを含まない、先行請求項のいずれか一項に記載の眼の状態の治療方法。

【請求項 1 4 3】

前記 M S C セクレトーム組成物及び／または製剤がヒプロメロースを含まない、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

前記組成物及び／または製剤がヒプロメロースを含まない、先行請求項のいずれか一項に記載の M S C セクレトーム組成物及び／または製剤。

【請求項 1 4 5】

アッセイによって選択されるまたはアッセイから得られる凍結乾燥組成物であって、前記アッセイが、

(i) a) 角膜細胞の層を提供するステップと、

b) 前記角膜細胞の層に創傷ギャップを導入するステップと、

c) 前記凍結乾燥組成物の存在下で前記創傷ギャップが治癒するかどうかを決定するステップであって、ステップ b) の前または後のいずれかに前記凍結乾燥組成物を前記角膜細胞に投与する、前記決定するステップと、

を含むスクラッチアッセイであって、

前記凍結乾燥組成物が眼の創傷治癒を誘導することができ、前記眼の創傷治癒が、前記スクラッチアッセイにおける前記創傷ギャップの閉鎖によって示される前記スクラッチアッセイ、ならびに

(i i) a) 多孔質膜を含むチャンバーに角膜細胞を添加するステップであって、前記組成物が存在しない基本培地を前記角膜細胞に補給する、前記添加するステップと、

b) 前記組成物が存在する前記基本培地を含む容器内に前記チャンバーを設置するステップであって、前記多孔質膜によって前記容器内の前記組成物から前記チャンバー内の前記角膜細胞が隔てられる、前記設置するステップと、

c) 前記角膜細胞を約 1 8 ～ 2 4 時間インキュベートするステップと、

d) 前記多孔質膜を介して遊走及び／または増殖した前記角膜細胞を測定するステップと、

10

20

30

40

50

を含むトランスウェル遊走アッセイであって、

前記凍結乾燥組成物が細胞遊走／増殖を誘導することができ、前記細胞遊走／増殖が、前記多孔質膜を介する前記角膜細胞の遊走及び／または増殖を誘導する前記組成物の能力によって示される前記トランスウェル遊走アッセイ、
からなる群から選択される、前記凍結乾燥組成物。

【請求項 1 4 6】

前記凍結乾燥組成物が凍結乾燥 M S C セクレトームである、請求項 1 4 5 に記載の凍結乾燥組成物。

【請求項 1 4 7】

前記組成物が、少なくとも約 $45 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも約 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、または少なくとも約 $55 \mu\text{g}/\text{ml}$ のタンパク質を含む、請求項 1 4 5 または請求項 1 4 6 に記載の凍結乾燥組成物。

【請求項 1 4 8】

組成物が眼の創傷治癒を誘導する能力を決定する方法または眼の創傷治癒を誘導するための組成物をスクリーニングする方法であって、前記方法が、

a) 角膜細胞の層を提供することと、

b) 前記角膜細胞の層に創傷ギャップを導入することと、

c) 前記組成物の存在下で前記創傷ギャップが治癒するかどうかを決定することであって、ステップ b) の前または後のいずれかに前記組成物を前記角膜細胞に投与する、前記決定することと、

を含み、

前記創傷ギャップの閉鎖が、眼の創傷治癒を誘導する能力を前記組成物が有することを示す、前記方法。

【請求項 1 4 9】

組成物が角膜細胞の遊走及び／または増殖を誘導する能力を決定する方法であって、前記方法が、

a) 多孔質膜を含むチャンバーに角膜細胞を添加することであって、前記組成物が存在しない基本培地を前記角膜細胞に補給する、前記添加することと、

b) 前記組成物が存在する前記基本培地を含む容器内に前記チャンバーを設置することであって、前記多孔質膜によって前記容器内の前記組成物から前記チャンバー内の前記角膜細胞が隔てられる、前記設置することと、

c) 前記角膜細胞を約 18～24 時間インキュベートすることと、

d) 前記多孔質膜を介して遊走及び／または増殖した前記角膜細胞を測定することであって、前記遊走及び／または増殖が、前記角膜細胞の遊走及び／または増殖を誘導する能力を前記組成物が有することを示す、前記測定することと、

を含む、前記方法。

【請求項 1 5 0】

前記組成物が、少なくとも約 $45 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも約 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、または少なくとも約 $55 \mu\text{g}/\text{ml}$ のタンパク質を含む、請求項 1 4 8 または請求項 1 4 9 に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

前記組成物が凍結乾燥される、請求項 1 4 8～1 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

前記組成物が凍結乾燥 M S C セクレトームである、請求項 1 4 8～1 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、米国特許法第 1 1 9 条 (e) の下で、2020 年 4 月 7 日出願の米国仮出願

10

20

30

40

50

第63／006，680号に基づく優先権の利益を主張し、当該出願の開示は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

再生医療は、正常な機能を回復または確立するために、人間の細胞、組織、または臓器の置換または再生に関係する医学の分野である。例えば、幹細胞治療は、様々な疾患及び障害を治療、予防、または治療するために利用することができる。

【0003】

幹細胞は、無制限に分裂する能力を持ち、特定の条件下で、さまざまな異なる細胞型に分化できる細胞である。全能性幹細胞は、胚を構成するすべての細胞と組織を生成する可能性のある幹細胞である。多能性幹細胞は、中胚葉、内胚葉、外胚葉の細胞を生み出す幹細胞である。複能性幹細胞は、2つ以上の細胞型に分化する能力を持つ幹細胞であり、単能性幹細胞は、1つの細胞型のみで分化する幹細胞である。そのような幹細胞の1つのタイプは間葉系幹細胞である。例えば、米国特許出願第20190046576を参照されたい。

【0004】

ただし、臨床的に適切な規模で生きた幹細胞ベースの治療法を生成して保存することは困難である。(Trainor et al., Nature Biotechnology 32(1)(2014)を参照)。さらに、そのような治療法の治療効力及び再生能力はしばしば変動し、細胞は移植前または移植中に死ぬ可能性がある。(Newell, Seminars in Immunopathology 33(2):91(2011)を参照)。移植された幹細胞はまた、宿主の免疫系の攻撃及び／または拒絶の影響を受けやすく、効力を評価すること及び／または「投薬」を制御することはしばしば困難である。したがって、当技術分野では、現在細胞ベースの再生医療療法に関連しているコスト、保管、及び製造品質管理の制限を克服することができる追加の再生療法が必要とされている。特に眼の状態において。

【0005】

眼への爆風及び鈍的損傷は、網膜コモチオ、外傷性白内障、水晶体への小帯付着の破壊、角の後退、虹彩透析、及び瞳孔括約筋の破裂を含む、眼の内容物に対する一連の機械的破壊を引き起こす可能性がある。これらの損傷の治療は、虹彩の機械的修復(可能な場合)、水晶体のプラスチックレンズインプラントへの交換、及び網膜剥離の修復に限定されている。網膜または前房の細胞構造を修復する治療法がない。さらに、外傷性視神経障害と視神経剥離は、イラクの自由作戦中に専門的な眼のケアを必要とした6つの主要なタイプの眼の損傷の内の1つであり(Cho and Savitsky, "Ocular Trauma Chapter 7", in Combat Casualty Care: Lessons learned from Oef and Oif, by Brian Eastbridge and Eric Savitsky, pp. 299-342, Ft. Detrick, Md.: Borden Institute (US) Government Printing Office, 2012)、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。外傷性頭部損傷の60%は、神経眼科学的異常を引き起こす(Van Stavern, et al., J Neuro-Ophthalmol 21(2):112-117, 2001)(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)その内の半分は視神経に関係する神経または視覚経路が関わっている。ニューロンの外傷性損傷は、軸索損傷及び不可逆的なニューロン喪失をもたらす。多くの潜在的な神経保護療法が動物で確認されているが、これらの単剤は一般にヒトの臨床試験での療法に変換できなかった((Turner, et al., J Neurosurg 118(5):1072-1085, 2013, その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。ニューロンの損傷を防ぐために、いくつかの細胞標的に影響を与える併用療法が必要になる可能性がある。

【0006】

10

20

30

40

50

角膜は目の最も外側の組織として保護的な役割を果たすが、重度の怪我や病気に対して非常に脆弱である。血管がないため透明性があるが、治療能力も制限される。角膜損傷は、不可逆的な失明を引き起こす可能性があるため、迅速な介入と積極的な治療が必要である。改善された眼表面治療法が極めて必要であることは、化学熱傷及び急性慢性移植片vの眼症状などの重度の角膜疾患において特に明白である。宿主病（GvHD）、ステューブンス・ジョンソン症候群、眼粘膜類天疱瘡、及び持続性の角膜上皮欠損を引き起こすその他の状態は、合計で年間10万件超発生している。（Dietrich-Ntoukas et al. Cornea. 2012, 31 (3) : 299-310; Steven son W, et al., Clin Ophthalmol. 2013, 7 : 2153-2158.

10

White KD, et al., J Allergy Clin Immunol Pract. 2018; 6 (1) : 38-69; Tauber J. (2002) Autoimmune Diseases Affecting the Ocular Surface. In : Ocular Surface Disease Medical and Surgical Management. Springer, New York, NY.; Wiro stko B, et al., Ocul Surf. 2015 Jul; 13 (3) : 204-21; Haring, RS., et al., JAMA Ophthalmol. 2016 Oct 1; 134 (10) : 1119-1124を参照）。

【0007】

局所点眼薬の開発は、涙液の代謝回転と希釈、鼻涙管ドレナージ、及び反射まばたきを含む、多くの解剖学的制約によって妨げられ、深い眼組織に到達するのは局所投与量の5%未満になることが多いにある（Gaudana et al, 2009）。角膜創傷の場合、最初の外傷が角膜上皮に裂け目を引き起こし、それによって局所的に適用されたMSC-Sの通過が上皮層に浸透することを可能にする。

20

【0008】

したがって、当分野において、眼を標的とし、外傷に続発する炎症（例えば、火傷、急性炎症、年齢、及び／または酸化ストレス）により悪化する可能性のある届きにくい知覚細胞に治療用ペイロードを送達することのできるような眼の治療法に関するいまだ対処されていない大きな必要性がある。本発明は、そのような治療で使用するための再構成凍結乾燥間葉系幹細胞セクレトーム組成物、ならびにそのような凍結乾燥間葉系幹細胞セクレトーム組成物及び製剤を作製するための方法を提供することによって、この必要性を満たす。

30

【発明の概要】

【0009】

本発明は、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物を提供し、本組成物は、

i. 約250 μM未満のIDO（インドールアミン-2, 3-ジオキシゲナーゼ）酵素活性と、

ii. HGF、FGF-7、TIMP-1、TIMP-2、PAI-1（セルピンE1）、VEGF-A、及び／またはb-NGFからなる群から選択される少なくとも1つの栄養因子／サイトカインと、

40

iii. sFLT-1、PEDF（セルピンF1）、セルピンA1、IGFBP-2、IGFBP-3、SDF-1、TSG-14、カリクレイン3、MCP-1、bFGF、アンジオゲニン、MCP-2、アンジオ-2、IL-6、IL-17、G-CSF、M-CSF、GM-CSF、IL-8、TNF-ベータ、PDGF、SOD1、SOD2、SOD3、及び／またはHO-1からなるグループから選択される少なくとも1つの追加因子と、

iv. DPPIV（ジペプチジルペプチダーゼ-4）、uPA、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンボスポンジン-2、及び／またはトロンボスポンジン-1からなる群から選択される少な

50

くとも1つの追加の因子と、を含む。

【0010】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、「より高いレベル」の、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第4因子及び／またはセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子をさらに含み、任意選択的に1 ng/mL～8 ng/mLである。

【0011】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトームは、「中程度」レベルの、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンボスポンジン-2、トロンボスポンジン-1、アンジオゲニン、DPP-IV、IGFBP-3、及び／またはuPAからなる群から選択される少なくとも1つの因子をさらに含み、任意選択的に400 pg/mL～3000 pg/mLである。

【0012】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトームは、アポリポタンパク質A1、補体因子D、C反応性タンパク質、シスタチンC、DKK-1、エンブリン、オステオポンチン、ビタミンDBP、MIF、RANTES、uPAR、IL-17a、GDF-15、及び／またはIFN γ からなる群から選択される少なくとも1つの因子をさらに含む。

【0013】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトームは、抗血管新生因子対血管新生促進因子を、>2、>3、>4、または>5の比の値で含む。

【0014】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトームは、「低」レベルのVEGFをさらに含み、任意選択で0 pg/mL～200 pg/mLである。

【0015】

いくつかの実施形態では、VEGFのレベルは、セルピンE1のレベルより5～10倍低い。

【0016】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の組成物は、1つ以上の抗血管新生因子を含み、VEGFの濃度に対する1つ以上の抗血管新生因子の濃度の合計は、>2、>3、>4、または>5である。

【0017】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトームは、bFGF、PLGF、及びPDGFを含まない、及び／または非常に低レベルで含み、任意選択で1000 pg/mL未満である。

【0018】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、約4.7～約7.5のpHを有する。

【0019】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトームは、リン酸二／一ナトリウム、クエン酸ナトリウム／クエン酸、ホウ酸／クエン酸ナトリウム、ホウ酸／四ホウ酸ナトリウム、及びクエン酸／リン酸二ナトリウムからなる群から選択される緩衝系で配合される。

【0020】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、張性改变剤をさらに含む。

【0021】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、張性改変剤は、 NaCl 、 KCl 、マンニトール、デキストロース、スクロース、ソルビトール、及びグリセリンからなる群から選択される。

【0022】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトームは、リン酸ナトリウム／リン酸二ナトリウム、マンニトール、及びトレハロースをさらに含み、組成物は、約pH7.4のpHを有する。

【0023】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトームは、二価カチオンをさらに含む。

【0024】

いくつかの実施形態では、二価カチオンは、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、及び Zn^{2+} からなる群から選択される。

【0025】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトームは、リン酸二ナトリウム／クエン酸、マンニトール、及びトレハロースをさらに含み、組成物は、約pH6.4のpHを有する。

【0026】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の組成物は、接着剤をさらに含む。

【0027】

いくつかの実施形態では、接着剤は、ヒプロメロース、ポロキサマー407、ポロキサマー188、ポロキソマー237、ポロキソマー338、ヒプロメロース、(HPMC)、ポリカルボフィル、ポリビニルピロリドン(PVP)、PVA(ポリビニルアルコール)、ポリイミド、ヒアルロン酸ナトリウム、ジェランガム、ポリ(乳酸-コグリコール酸)(PLGA)、ポリシロキサン、ポリイミド、カルボキシメチルセルロース(CMC)、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、フィブリン接着剤、ポリエチレングリコール、及びGelCOREからなる群から選択される。

【0028】

本発明はまた、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞(MSC)セクレトーム組成物を作製する方法を提供し、本方法は、

- i. 最初の培地で間葉系幹細胞(MSC)を培養することと、
- ii. ステップ(i)からの最初の培地をMSCから取り除くことと、
- iii. ステップ(ii)のMSCを洗浄することと、
- iv. 2番目の培地を追加し、約1~5日間培養することと、
- v. ステップ(iv)からの第2の培地を馴化培地として収穫することと、
- vi. ステップ(v)の馴化培地を本明細書に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物に処理することと、を含む。

【0029】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、本明細書に記載されるようなセクレトーム組成物である。

【0030】

いくつかの実施形態では、ステップ(v)の馴化培地をセクレトーム組成物に処理するステップ(vi)は、

- a) ステップ(v)から採取した馴化培地を濾過して細胞粒子を除去することと、
- b) ステップ(a)からの濾過された馴化培地を濃縮することと、
- c) 製剤緩衝液と緩衝液交換することと、
- d) ステップviのMSCセクレトーム組成物を凍結乾燥することと、を含む。

【0031】

いくつかの実施形態では、ステップc)は、リン酸二／一ナトリウム、クエン酸ナトリ

10

20

30

40

50

ウム／クエン酸、ホウ酸／クエン酸ナトリウム、ホウ酸／四ホウ酸ナトリウム、及びクエン酸／リン酸二ナトリウムからなる群から選択される緩衝系と緩衝液交換することを含む。

【0032】

いくつかの実施形態では、濾過ステップ（a）は、0.45 μm フィルター、0.22 μm フィルター、0.8 μm フィルター、及び0.65 μm フィルター、低タンパク質結合PVD F膜、及び／またはPES（ポリエーテルスルホン）の使用を含む。

【0033】

いくつかの実施形態では、濃縮ステップ（b）は、中空繊維フィルター、接線流濾過システム、または遠心分離ベースのサイズ排除技術を使用することを含む。

10

【0034】

いくつかの実施形態では、遠心分離ベースのサイズ排除技術は、3～10 kDaのMWカットオフを使用する。

【0035】

いくつかの実施形態では、本発明は、眼疾患の治療方法を提供し、本方法は、それを必要とする患者に、本明細書に記載の治療有効量の間葉系幹細胞セクレトーム組成物または本明細書に記載の方法に従って作製された組成物を患者に投与することを含む。

【0036】

いくつかの実施形態では、組成物は標的領域に投与される。

【0037】

本発明はまた、必要とする患者に眼構造への外傷後の視覚機能障害を治療するための方法を提供し、本方法は、本明細書に記載される治療有効量の間葉系幹細胞セクレトーム組成物または本明細書に記載される方法に従って作製された組成物を患者に投与することを含む。

20

【0038】

本発明はまた、必要とする患者に眼の創傷治癒を誘導及び／または促進するための方法を提供し、本方法は、本明細書に記載される治療有効量の間葉系幹細胞セクレトーム組成物または本明細書に記載される方法に従って作製された組成物を患者に投与することを含む。

【0039】

本発明はまた、必要とする患者に血管新生を低減及び／または抑制し、瘢痕化を低減及び／または抑制し、視力を促進及び／または維持し、及び／または創傷閉鎖率を増加させる（例えば、創傷閉鎖時間を減少させる）ための方法を提供し、本方法は、本明細書に記載の治療有効量の間葉系幹細胞セクレトーム組成物または本明細書に記載の方法に従って作製された組成物を患者に投与することを含む。

30

【0040】

本発明はまた、必要とする患者に血管新生を低減及び／または抑制し、瘢痕化を低減して視力維持を促進するための方法を提供し、本方法は、本明細書に記載の治療有効量の間葉系幹細胞セクレトーム組成物または本明細書に記載の方法に従って作製された組成物を患者に投与することを含む。

40

【0041】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞セクレトーム組成物は、局所投与のために配合される。

【0042】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞セクレトームは、結膜下注射用に配合される。

【0043】

本発明はまた、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトームを特徴付けるための方法を提供し、本方法は、

（i）MSCセクレトームを1つ以上の特徴付けアッセイに供することであって、特徴付

50

けアッセイは、物理的成分の特徴付け、酸化ストレスアッセイ、安全性分析、安定性アッセイ、増殖アッセイ、遊走アッセイ、血管新生アッセイ、分化／瘢痕化アッセイ、炎症アッセイ、及び／または上皮バリア完全性アッセイからなる群から選択される、供すること、

(i i) (i) の 1 つ以上のアッセイから結果を決定することと、を含む。

【 0 0 4 4 】

本発明はまた、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトームの生物効力及び安定性を決定する方法を提供し、本方法は、

(i) M S C セクレトームを 1 つ以上の特徴付けアッセイに供することであって、特徴付けアッセイは、物理的成分の特徴付け、酸化ストレスアッセイ、安全性分析、安定性アッセイ、増殖アッセイ、遊走アッセイ、血管新生アッセイ、分化／瘢痕化アッセイ、炎症アッセイ、及び／または上皮バリア完全性アッセイからなる群から選択される、供すること、

10

(i i) (i) の 1 つ以上のアッセイから結果を決定することと、を含む。

【 0 0 4 5 】

本発明はまた、複数の M S C セクレトームロット間の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトームロットの一貫性を決定するための方法を提供し、本方法は、

(i) M S C セクレトームを 1 つ以上の特徴付けアッセイに供することであって、特徴付けアッセイは、物理的成分の特徴付け、酸化ストレスアッセイ、安全性分析、安定性アッセイ、増殖アッセイ、遊走アッセイ、血管新生アッセイ、分化／瘢痕化アッセイ、炎症アッセイ、及び／または上皮バリア完全性アッセイからなる群から選択される、供すること、

20

(i i) (i) の 1 つ以上のアッセイから結果を決定することと、を含む。

【 0 0 4 6 】

いくつかの実施形態では、物理的成分の特徴付けからの (i i) の結果は、本明細書に記載される抗血管新生 M S C セクレトームを同定する。

【 0 0 4 7 】

いくつかの実施形態では、安全性分析からの (i i) の結果は、血液適合性を示し、パイロジェン及び／またはエンドトキシンが低い及び／またはない M S C セクレトームを提供する。

30

【 0 0 4 8 】

いくつかの実施形態では、安定性アッセイからの (i i) の結果は、4℃、20℃、及び／または25℃（または室温）で少なくとも7日間安定性を示す M S C セクレトームを提供する。

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態では、増殖アッセイからの (i i) の結果は、増殖を誘導する M S C セクレトームを提供する。

【 0 0 5 0 】

いくつかの実施形態では、遊走アッセイからの (i i) の結果は、遊走を誘発する M S C セクレトームを提供する。

40

【 0 0 5 1 】

いくつかの実施形態では、血管新生アッセイからの (i i) の結果は、血管新生を抑制するかまたは促進しない M S C セクレトームを提供する。

【 0 0 5 2 】

いくつかの実施形態では、分化／瘢痕化アッセイからの (i i) の結果は、分化及び／または瘢痕化を抑制する M S C セクレトームを提供する。

【 0 0 5 3 】

いくつかの実施形態では、炎症アッセイからの (i i) の結果は、炎症を抑制する M S C セクレトームを提供する。

【 0 0 5 4 】

50

いくつかの実施形態では、本方法はさらに、

(i i i) (i i) の結果に基づいて M S C セクレトームロットを同定することを含む。

【 0 0 5 5 】

本発明はまた、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトームを特徴付けるための試験及び／またはアッセイのパネルを提供し、パネルは、少なくとも 2 つの特徴付けアッセイを含み、特徴付けアッセイは、物理的成分の特徴付け、酸化ストレスアッセイ、安全性分析、安定性アッセイ、増殖アッセイ、遊走アッセイ、血管新生アッセイ、分化／瘢痕化アッセイ、及び／または炎症アッセイからなる群から選択される。

【 0 0 5 6 】

本発明はまた、M S C セクレトームロット間の一貫性を決定するための試験及び／またはアッセイのパネルを提供し、パネルは、1 つ以上の特徴付けアッセイを含み、特徴付けアッセイは、物理的成分の特徴付け、酸化ストレスアッセイ、安全性分析、安定性アッセイ、増殖アッセイ、遊走アッセイ、血管新生アッセイ、分化／瘢痕化アッセイ、及び／または炎症アッセイからなる群から選択される。

【 0 0 5 7 】

いくつかの実施形態では、物理的成分の特徴付けは、本明細書に記載されるように M S C セクレトームを同定する。

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態では、安全性分析からの (i i) の結果は、血液適合性を示し、パイロジェン及び／またはエンドトキシンが低い及び／またはない M S C セクレトームを提供する。

【 0 0 5 9 】

いくつかの実施形態では、安定性アッセイは、4 °C、2 0 °C、及び／または 2 5 °C (または室温) で少なくとも 7 日間安定性を示す M S C セクレトームを同定する。

【 0 0 6 0 】

いくつかの実施形態では、増殖アッセイは、増殖を誘導する凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトームを同定する。

【 0 0 6 1 】

いくつかの実施形態では、遊走アッセイは、遊走を誘発する凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトームを同定する。

【 0 0 6 2 】

いくつかの実施形態では、血管新生アッセイは、血管新生を抑制するかまたは促進しない凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトームを同定する。

【 0 0 6 3 】

いくつかの実施形態では、分化／瘢痕化アッセイは、分化及び／または瘢痕化を抑制する凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトームを同定する。

【 0 0 6 4 】

いくつかの実施形態では、炎症アッセイは、炎症を抑制する凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトームを同定する。

【 0 0 6 5 】

いくつかの実施形態では、物理的成分の特徴付け、酸化ストレスアッセイ、安全性分析、安定性アッセイ、増殖アッセイ、遊走アッセイ、血管新生アッセイ、分化／瘢痕化アッセイ、炎症アッセイ、及び／または上皮バリア完全性アッセイがすべて実行される。

【 0 0 6 6 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の試験及び／またはアッセイのパネルは、本明細書に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトームを同定する。

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の試験及び／またはアッセイのパネルは、少なくとも 1 つの遊走アッセイを含む。いくつかの実施形態では、遊走アッセイは、インビトロ創傷閉鎖アッセイである。いくつかの実施形態では、インビトロ創傷閉鎖アッセイは

10

20

30

40

50

、「スクラッチアッセイ」（「スクラッチ創傷アッセイ」とも呼ばれる）、円形スクラッチ創傷法、円形スクラッチ創傷アッセイ、及び円形創傷閉鎖アッセイからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトームは、抗血管新生MSCセクレトーム及び／または抗瘢痕化MSCセクレトームである。

【0068】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトームは、抗血管新生MSCセクレトーム及び／または抗瘢痕化MSCセクレトームである。

【0069】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトームは、抗血管新生MSCセクレトームまたは抗瘢痕化MSCセクレトームである。 10

【0070】

本発明はまた、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の安定した間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム製剤を提供し、本製剤は、

- i. 1 mLあたり1～20 µg、任意に2 µg～8 µgのMSCセクレトームと、
 - ii. 1 mLあたり2 mg～3 mgの一塩基性リン酸ナトリウムと、
 - iii. 1 mLあたり11 mg～12 mgの二塩基性リン酸ナトリウムと、
 - iv. 1 mLあたり11.5 mg～13 mgのマンニトールと、
 - v. 23 mg～24 mgトレハロース二水和物と、
 - vi. 1 mLあたり0.5 mg～2 mgの任意選択のヒプロメロースと、を含み、
- pHは約4.7～約7.5である。 20

【0071】

本発明はまた、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の安定した間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム製剤を提供し、本製剤は、

- i. 0.004%～0.0375%、任意に0.008%～0.015% w/wのMSCセクレトームと、
 - ii. 4%～5% w/wの一塩基性リン酸ナトリウムと、
 - iii. 21.5%～23% w/wの二塩基性リン酸ナトリウムと、
 - iv. 23%～25% w/wのマンニトールと、
 - v. 46%～48% w/wのトレハロース脱水と、
 - vi. 1%～3% w/wの任意選択のヒプロメロースと、を含み、
- pHは約4.7～約7.5である。 30

【0072】

本発明はまた、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の安定した間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム製剤を提供し、本製剤は、

- i. 1 mLあたり6 µgのMSCセクレトームと、
 - ii. 1 mLあたり2.28 mgの一塩基性リン酸ナトリウムと、
 - iii. 1 mLあたり11.45 mgの二塩基性リン酸ナトリウムと、
 - iv. 1 mLあたり12.2 mgのマンニトールと、
 - v. 24 mgトレハロース二水和物と、
 - vi. 1 mLあたり1 mgの任意選択のヒプロメロースと、を含み、
- pHは約7.4である。 40

【0073】

本発明はまた、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の安定した間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム製剤を提供し、本製剤は、

- i. 0.012% w/wのMSCセクレトームと、
 - ii. 4.5% w/wの一塩基性リン酸ナトリウムと、
 - iii. 22.4% w/wの二塩基性リン酸ナトリウムと、
 - iv. 24% w/wのマンニトールと、
 - v. 47.1% w/wのトレハロース脱水と、
- 50

v i . 2 . 0 % w / w の任意選択のヒプロメロースと、を含み、
p H は約 7 . 4 である。

【 0 0 7 4 】

本発明はまた、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞（M S C）セクレトーム組成物を提供し、本組成物は、

i . H G F、T I M P - 1、T I M P - 2、P A I - 1（セルピン E 1）、V E G F - A、及び b - N G F からなる群から選択される少なくとも 1 つの栄養因子／サイトカインと、

i i . P E D F（セルピン F 1）、セルピン A 1、I G F B P - 2、I G F B P - 3、S D F - 1、T S G - 1 4、カリクレイン 3、M C P - 1、アンジオゲニン、M C P - 2、
アンジオ - 2、I L - 6、I L - 1 7、G - C S F、M - C S F、G M - C S F、I L - 8、T N F - ベータ、及び P D G F からなる群から選択される少なくとも 1 つの追加因子と、

i i i . D P P I V（ジペプチジルペプチダーゼ - 4）、u P A、アンジオポエチン - 1、アンジオポエチン - 2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン - 1、トロンボスポンジン - 2、及びトロンボスポンジン - 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの追加因子と、を含む。

【 0 0 7 5 】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、セルピン E 1、セルピン A 1、T I M P - 1、トロンボスポンジン - 1、ペントラキシン - 3（T S G - 1 4）、血小板第 4 因子及びセルピン F 1 からなる群から選択される高レベルの少なくとも 1 つの因子をさらに含む。

【 0 0 7 6 】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、1 n g / m L ~ 4 0 0 n g / m L の、セルピン E 1、T I M P - 1、トロンボスポンジン - 1、ペントラキシン - 3（T S G - 1 4）、血小板第 4 因子、及びセルピン F 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの因子を含む。

【 0 0 7 7 】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、アンジオポエチン - 1、アンジオポエチン - 2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン - 1、トロンボスポンジン - 2、トロンボスポンジン - 1、アンジオゲニン、D P P I V、I G F B P - 3、及び u P A からなる群から選択される中程度レベルの少なくとも 1 つの因子をさらに含む。

【 0 0 7 8 】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、4 0 0 p g / m L ~ 3 0 0 0 p g / m L の、アンジオポエチン - 1、アンジオポエチン - 2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン - 1、トロンボスポンジン - 2、トロンボスポンジン - 1、アンジオゲニン、D P P I V、I G F B P - 3、及び u P A からなる群から選択される少なくとも 1 つの因子を含む。

【 0 0 7 9 】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、アポリポタンパク質 A 1、補体因子 D、C 反応性タンパク質、シスタチン C、D K K - 1、エンプリン、オステオポンチン、ビタミン D B P、M I F、R A N T E S、u P A R、I L - 1 7 a、G D F - 1 5、及び I F N γ からなる群から選択される少なくとも 1 つの因子をさらに含む。

【 0 0 8 0 】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、抗血管新生因子対血管新生促進因子を、> 2、> 3、> 4、または > 5 の比の値で含む。

【 0 0 8 1 】

凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物のいくつかの実施形態では、抗血管新生因子は、PEDF、低レベルのVEGF、及びセルピンE1からなる群から選択される1つ以上の因子を含み、血管新生促進因子は、VEGF、アングリオゲニン、IGFBP-3、uPA、アングジオ-1、アングジオ-2、エンドセリン-1からなる群から選択される1つ以上の因子を含む。

【0082】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、低レベルのVEGFをさらに含む。

【0083】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、1pg/mL～400pg/mLのVEGFを含む。

10

【0084】

凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物のいくつかの実施形態では、VEGFのレベルは、セルピンE1のレベルより5～10倍低い。

【0085】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、1つ以上の抗血管新生因子を含み、VEGFの濃度に対する1つ以上の抗血管新生因子の濃度の合計は、>2、>3、>4、または>5である。

【0086】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、bFGF、PLGF、及びPDGFを含まない、及び／または非常に低レベルで含む。

20

【0087】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、1000pg/mL未満のbFGF、PLGF、及びPDGFを含む。

【0088】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、約4.7～約7.5のpHを有する。

【0089】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、リン酸二ナトリウム／一ナトリウム、クエン酸ナトリウム／クエン酸、ホウ酸／クエン酸ナトリウム、ホウ酸／四ホウ酸ナトリウム、及びクエン酸／リン酸二ナトリウムからなる群から選択される緩衝系で配合される。

30

【0090】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、張性改変剤をさらに含む。

【0091】

凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物のいくつかの実施形態では、張性改変剤は、NaCl、KCl、マンニトール、デキストロース、スクロース、ソルビトール、及びグリセリンからなる群から選択される。

40

【0092】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、リン酸一ナトリウム／リン酸二ナトリウム、マンニトール、及びトレハロースをさらに含み、組成物は、約pH7.4のpHを有する。

【0093】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、二価カチオンをさらに含む。

【0094】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、二価カチオンが、Mg²⁺、Ca²⁺、及びZn²⁺からなる群から選択される

50

。

【0095】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、リン酸二ナトリウム／クエン酸、マンニトール、及びトレハロースをさらに含み、組成物は、約pH6.4のpHを有する。

【0096】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、接着剤をさらに含む。

【0097】

凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物のいくつかの実施形態では、接着剤は、ヒプロメロース、ポロキサマー407、ポロキサマー188、ポロキサマー237、ポロキサマー338、ヒプロメロース（HPMC）、ポリカルボフィル、ポリビニルピロリドン（PVP）、PVA（ポリビニルアルコール）、ポリイミド、ヒアルロン酸ナトリウム、ジェランガム、ポリ（乳酸-コグリコール酸）（PLGA）、ポリシロキサン、ポリイミド、カルボキシメチルセルロース（CMC）、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、フィブリン接着剤、ポリエチレングリコール、GelCOREからなる群から選択される。

【0098】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、生体異物成分、フェノールレッド、ペプチド及び生体分子<3kDa、抗生物質、タンパク質凝集体>200nm、細胞、非エクソソーム／非細胞外小胞細胞破片、ホルモン、及びレグルタミンからなる群から選択される1つ以上の成分を含まない。

【0099】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、HGF、ペントラキシン-3（TSG-14）、VEGF、TIMP-1、セルピンE1、及び<5ng/mLIL-8を含む。

【0100】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、

- i. 0.3~4.5ng/mLのHGFと、
- ii. 0.5~20ng/mLのペントラキシン-3（TSG-14）と、
- iii. 100~600pg/mLVEGF；
- iv. 10~200ng/mLのTIMP-1と、
- v. 20~80ng/mLのセルピンE1と、
- vi. <5ng/mLのIL-8と、を含む。

【0101】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、抗血管新生MSCセクレトームまたは抗瘢痕化MSCセクレトームを含む。

【0102】

本発明はまた、安定した間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム製剤を提供し、本製剤は、

- i. 1mLあたり2μg-20μgのMSCセクレトームと、
- ii. 1mLあたり2mg~3mgの一塩基性リン酸ナトリウムと、
- iii. 1mLあたり11mg~12mgの二塩基性リン酸ナトリウムと、
- iv. 1mLあたり11.5mg~13mgのマンニトールと、
- v. 23mg~24mgトレハロース二水和物と、
- vi. 1mLあたり0.5mg~2mgの任意選択のヒプロメロースと、を含み、pHは約4.7~約7.5である。

【0103】

本発明はまた、安定した間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム製剤を提供し、本製剤は

- i. 0.004%~0.08% w/wのMSCセクレトームと、
 - ii. 4%~5% w/wの一塩基性リン酸ナトリウムと、
 - iii. 21.5%~23% w/wの二塩基性リン酸ナトリウムと、
 - iv. 23%~25% w/wのマニトールと、
 - v. 46%~48% w/wのトレハロース脱水と、
 - vi. 1%~3% w/wの任意選択のヒプロメロースと、を含み、
- pHは約4.7~約7.5である。

【0104】

本発明はさらに、必要とする対象に眼の状態を治療するための方法を提供し、本方法は、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物を対象に投与することを含み、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の本MSCセクレトーム組成物は、

- i. HGF、TIMP-1、TIMP-2、PAI-1（セルピンE1）、VEGF-A、及びb-NGFからなる群から選択される少なくとも1つの栄養因子／サイトカインと

- ii. PEDF（セルピンF1）、セルピンA1、IGFBP-2、IGFBP-3、SDF-1、TSG-14、カリクレイン3、MCP-1、アンジオゲニン、MCP-2、アンジオ-2、IL-6、IL-17、G-CSF、M-CSF、GM-CSF、IL-8、TNF-ベータ、及びPDGFからなる群から選択される少なくとも1つの追加因子と、

- iii. DPPIV（ジペプチジルペプチダーゼ-4）、uPA、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンスポンジン-2、及びトロンスポンジン-1からなる群から選択される少なくとも1つの追加因子と、を含む。

【0105】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、セルピンE1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子、及びセルピンF1からなる群から選択される高レベルの少なくとも1つの因子をさらに含む。

【0106】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、1ng/mL~100ng/mLの、セルピンE1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。

【0107】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンスポンジン-2、トロンスポンジン-1、アンジオゲニン、DPPIV、IGFBP-3、及びuPAからなる群から選択される中程度レベルの少なくとも1つの因子をさらに含む。

【0108】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、400pg/mL~3000pg/mLの、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンスポンジン-2、トロンスポンジン-1、アンジオゲニン、DPPIV、IGFBP-3、及びuPAからなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。

【0109】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、アポリポタンパク質A1、補体因子D、C反応性タンパク質、シスタチンC、D

10

20

30

40

50

K K-1、エンブリン、オステオポンチン、ビタミンDBP、MIF、RANTES、uPAR、IL-17a、GDF-15、及びIFN γ からなる群から選択される少なくとも1つの因子をさらに含む。

【0110】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、抗血管新生因子対血管新生促進因子を、 >2 、 >3 、 >4 、または >5 の比の値で含む。

【0111】

いくつかの実施形態では、抗血管新生因子は、PEDF、低レベルのVEGF、及びセルピンE1及び血管新生促進剤、VEGF、アンジオゲニン、IGFBP-3、uPA、アンジオ-1、アンジオ-2、エンドセリン-1からなる群から選択される1つ以上の因子を含む。

10

【0112】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、低レベルのVEGFをさらに含む。

【0113】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、 $1\text{ pg/mL} \sim 400\text{ pg/mL}$ のVEGFを含む。

【0114】

いくつかの実施形態では、VEGFのレベルは、セルピンE1のレベルより5～10倍低い。

20

【0115】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、1つ以上の抗血管新生因子を含み、VEGFの濃度に対する1つ以上の抗血管新生因子の濃度の合計は、 >2 、 >3 、 >4 、または >5 である。

【0116】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、bFGF、PLGF、及びPDGFを含まない、及び／または非常に低レベルで含む。

【0117】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、 1000 pg/mL 未満のbFGF、PLGF、及びPDGFを含む。

30

【0118】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、約4.7～約7.5のpHを有する。

【0119】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、リン酸二ナトリウム／一ナトリウム、クエン酸ナトリウム／クエン酸、ホウ酸／クエン酸ナトリウム、ホウ酸／四ホウ酸ナトリウム、及びクエン酸／リン酸二ナトリウムからなる群から選択される緩衝系で配合される。

40

【0120】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、張性改変剤をさらに含む。

【0121】

いくつかの実施形態では、張性改変剤は、NaCl、KCl、マンニトール、デキストロース、スクロース、ソルビトール、及びグリセリンからなる群から選択される。

【0122】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、リン酸一ナトリウム／リン酸二ナトリウム、マンニトール、及びトレハロースをさらに含み、組成物は、約pH7.4のpHを有する。

50

【0123】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、二価カチオンをさらに含む。

【0124】

いくつかの実施形態では、二価カチオンは、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、及び Zn^{2+} からなる群から選択される。

【0125】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、リン酸二ナトリウム／クエン酸、マンニトール、及びトレハロースをさらに含み、組成物は、約pH6.4のpHを有する。

10

【0126】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、接着剤をさらに含む。

【0127】

いくつかの実施形態では、接着剤は、ヒプロメロース、ポロキサマー407、ポロキサマー188、ポロキサマー237、ポロキサマー338、ヒプロメロース、(HPMC)、ポリカルボフィル、ポリビニルピロリドン(PVP)、PVA(ポリビニルアルコール)、ポリイミド、ヒアルロン酸ナトリウム、ジェランガム、ポリ(乳酸-コグリコール酸)(PLGA)、ポリシロキサン、ポリイミド、カルボキシメチルセルロース(CMC)、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、フィブリン接着剤、ポリエチレングリコール、及びGelCOREからなる群から選択される。

20

【0128】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、生体異物成分、フェノールレッド、ペプチド及び生体分子<3kDa、抗生物質、タンパク質凝集体>200nm、細胞、非エクソソーム／非細胞外小胞細胞破片、ホルモン、及びL-グルタミンからなる群から選択される1つ以上の成分を含まない。

【0129】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、HGF、ペントラキシン-3(TSG-14)、VEGF、TIMP-1、セルピンE1、及び<5ng/mLのIL-8を含む。

30

【0130】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、

- i. 0.3~4.5ng/mLのHGFと、
- ii. 0.5~20ng/mLのペントラキシン-3(TSG-14)と、
- iii. 100~600pg/mL VEGF；
- iv. 10~200ng/mLのTIMP-1と、
- v. 20~80ng/mLのセルピンE1と、
- vi. <5ng/mLのIL-8と、を含む。

40

【0131】

いくつかの実施形態では、結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、抗血管新生MSCセクレトームまたは抗瘢痕化MSCセクレトームを含む。

【0132】

本発明はまた、必要とする対象に眼の状態を治療するための方法を提供し、本方法は、間葉系幹細胞(MSC)セクレトーム組成物を対象に投与することを含み、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の本MSCセクレトーム組成物は、

- i. 1mLあたり2μg-20μgのMSCセクレトームと、
- ii. 1mLあたり2mg~3mgの一塩基性リン酸ナトリウムと、
- iii. 1mLあたり11mg~12mgの二塩基性リン酸ナトリウムと、

50

i v . 1 m L あたり 1 1 . 5 m g ~ 1 3 m g のマンニトールと、
v . 2 3 m g ~ 2 4 m g のトレハロース二水和物と、
v i . 1 m L あたり 0 . 5 m g ~ 2 m g の任意選択のヒプロメロースと、を含み、
p H は約 4 . 7 ~ 約 7 . 5 である、安定した間葉系幹細胞 (M S C) セクレトーム製剤である。

【 0 1 3 3 】

本発明はまた、必要とする対象に眼の状態を治療するための方法を提供し、本方法は、間葉系幹細胞 (M S C) セクレトーム組成物を対象に投与することを含み、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の本 M S C セクレトーム組成物は、

i . 0 . 0 0 4 % ~ 0 . 0 8 % w / w の M S C セクレトームと、
i i . 4 % ~ 5 % w / w の一塩基性リン酸ナトリウムと、
i i i . 2 1 . 5 % ~ 2 3 % w / w の二塩基性リン酸ナトリウムと、
i v . 2 3 % ~ 2 5 % w / w のマンニトールと、
v . 4 6 % ~ 4 8 % w / w のトレハロース脱水と、
v i . 1 % ~ 3 % w / w の任意選択のヒプロメロースと、を含み、
p H は約 4 . 7 ~ 約 7 . 5 である、安定した間葉系幹細胞 (M S C) セクレトーム製剤である。

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、抗酸化賦形剤をさらに含む。

【 0 1 3 5 】

いくつかの実施形態では、抗酸化賦形剤は、アスコルビン酸、クエン酸、アセチルシステイン、システイン、メチオニン、亜硫酸塩（亜硫酸水素塩、メタ重亜硫酸塩）、モノチオグリセロール、グルタチオン、トコフェロールアルファ、及び没食子酸プロピルからなる群から選択される。

【 0 1 3 6 】

いくつかの実施形態では、抗酸化賦形剤は、配合時／凍結乾燥前に凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物に添加される。

【 0 1 3 7 】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥組成物は、M S C セクレトーム組成物を瞬間凍結（- 8 0 ° C で実施）または凍結し、M S C セクレトーム組成物を凍結乾燥することによって得られる。

【 0 1 3 8 】

凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物のいくつかの実施形態では、凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物中に、凍結乾燥前の M S C セクレトーム組成物中の因子の少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、または少なくとも 9 0 % が存在する。

【 0 1 3 9 】

凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物のいくつかの実施形態では、当該 M S C セクレトーム組成物は、凍結乾燥前の M S C セクレトーム組成物と比較して少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、または少なくとも 9 0 % の生物活性を含む。

【 0 1 4 0 】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療方法を提供し、再構成凍結乾燥 M S C セクレトーム組成物は、抗酸化賦形剤をさらに含む。

【 0 1 4 1 】

いくつかの実施形態では、抗酸化賦形剤は、アスコルビン酸、クエン酸、アセチルシステイン、システイン、メチオニン、亜硫酸塩（亜硫酸水素塩、メタ重亜硫酸塩）、モノチオグリセロール、グルタチオン、トコフェロールアルファ、及び没食子酸プロピルからなる群から選択される。

10

20

30

40

50

【0142】

いくつかの実施形態では、抗酸化賦形剤は、配合時／凍結乾燥前に再構成凍結乾燥MSCセクレトーム組成物に添加される。

【0143】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥組成物は、再構成MSCセクレトーム組成物を瞬間凍結（-80℃で実施）または凍結し、再構成MSCセクレトーム組成物を凍結乾燥することによって得られる。

【0144】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥後の再構成MSCセクレトーム組成物中に、凍結乾燥前の再構成MSCセクレトーム組成物中の因子の少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、または少なくとも90%が存在する。

10

【0145】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥後の再構成MSCセクレトーム組成物は、凍結乾燥前の再構成MSCセクレトーム組成物と比較して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、または少なくとも90%の生物活性を示す。

【0146】

眼の状態を治療するための方法のいくつかの実施形態では、MSCセクレトーム製剤は、ヒプロメロースを含まない。

【0147】

方法のいくつかの実施形態では、MSCセクレトーム組成物及び／または製剤は、ヒプロメロースを含まない。

20

【0148】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のMSCセクレトーム組成物及び／または製剤、組成物及び／または製剤は、ヒプロメロースを含まない。

【0149】

いくつかの実施形態では、本発明は、アッセイによって選択されるまたは得られる凍結乾燥組成物を提供し、このアッセイは、

(i) a) 角膜細胞の層を提供するステップと、

b) 角膜細胞の層に創傷ギャップを導入するステップと、

c) 凍結乾燥組成物の存在下で創傷ギャップが治癒するかどうかを決定するステップであって、ステップb)の前または後のいずれかに凍結乾燥組成物を角膜細胞に投与する、決定するステップと、

30

を含むスクラッチアッセイであって、

凍結乾燥組成物が眼の創傷治癒を誘導することができ、当該眼の創傷治癒が、スクラッチアッセイにおける創傷ギャップの閉鎖によって示されるスクラッチアッセイ、ならびに

(ii) a) 多孔質膜を含むチャンバーに角膜細胞を添加するステップであって、組成物が存在しない基本培地を角膜細胞に補給する、添加するステップと、

b) 組成物が存在する基本培地を含む容器内にチャンバーを設置するステップであって、多孔質膜によって容器内の組成物からチャンバー内の角膜細胞が隔てられる、設置するステップと、

40

c) 角膜細胞を約18～24時間インキュベートするステップと、

d) 多孔質膜を介して遊走及び／または増殖した角膜細胞を測定するステップと

、

を含むトランスウェル遊走アッセイであって、

凍結乾燥組成物が細胞遊走／増殖を誘導することができ、当該細胞遊走／増殖が、多孔質膜を介する角膜細胞の遊走及び／または増殖を誘導する組成物の能力によって示されるトランスウェル遊走アッセイ、からなる群から選択される。

【0150】

50

いくつかの実施形態では、凍結乾燥組成物は、凍結乾燥MSCセクレトームである。

【0151】

いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または少なくとも約55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含む。

【0152】

いくつかの実施形態では、本発明は、組成物が眼の創傷治癒を誘導する能力を決定する方法または眼の創傷治癒を誘導するための組成物をスクリーニングする方法を提供し、この方法は、

a) 角膜細胞の層を提供することと、

b) 角膜細胞の層に創傷ギャップを導入することと、

c) 組成物の存在下で創傷ギャップが治癒するかどうかを決定することであって、ステップb)の前または後のいずれかに組成物を角膜細胞に投与する、決定することと、

を含み、創傷ギャップの閉鎖が、眼の創傷治癒を誘導する能力を組成物が有することを示す。

【0153】

いくつかの実施形態では、本発明は、組成物が角膜細胞の遊走及び／または増殖を誘導する能力を決定する方法を提供し、この方法は、

a) 多孔質膜を含むチャンバーに角膜細胞を添加することであって、組成物が存在しない基本培地を角膜細胞に補給する、添加することと、

b) 組成物が存在する基本培地を含む容器内にチャンバーを設置することであって、多孔質膜によって容器内の組成物からチャンバー内の角膜細胞が隔てられる、設置することと、

c) 角膜細胞を約18～24時間インキュベートすることと、

d) 多孔質膜を介して遊走及び／または増殖した角膜細胞を測定することであって、当該遊走及び／または増殖が、角膜細胞の遊走及び／または増殖を誘導する能力を組成物が有することを示す、測定することと、

を含む。

【0154】

いくつかの実施形態では、組成物は、凍結乾燥される。

【0155】

いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または少なくとも約55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含む。

【0156】

いくつかの実施形態では、組成物は、凍結乾燥MSCセクレトームである。

【図面の簡単な説明】

【0157】

【図1】MSCセクレトームの調製、処理、及び使用の実施形態の概略図。

【図2】MSC-Sは創傷治癒因子を含む。ヒトXLサイトカインアレイ(R&D Systems)を使用して、MSC-Sに存在するいくつかのタンパク質因子を同定した。破線のボックス：参照スポット。

【図3】MSC-Sは凝集の傾向が低いことを示している。A) pH 7.4のリン酸緩衝液で配合したMSC-SをSECで分析した。最初の解凍後、MSC-Sを4℃、20℃、または37℃で7日間維持し、SECによって分析した。高次の凝集体のわずかな増加のみが観察され、より高い保管温度と相関している。試料を、ダイオードアレイ検出器及びTSK gel Super SW2000、4.6 x 300 mmカラムを備えたAgilent 1100 HPLCシステムで、0.25 mg/mLの流速と1 x PBSの移動相を使用して分離した。観察された波長は214 nmであった。28 μg のMSC-Sを充填した。B) pH 7.4で配合したMSC-Sは、熱凝集傾向によりC) pH 6.4よりも安定している。試料を評価し、266 nm及び473 nm (大きな凝集体の場合)でシグナルを観察した。8.8 μL の1 mg/mL MSC-SをUniキュベットに4回繰り返す

10

20

30

40

50

て充填した。温度スキャンを、毎分 0.6°C のスキャン速度で 20°C から 90°C まで実行した。

【図4】MSC-Sは、一次ヒト角膜上皮細胞の遊走を促進する。A) 写真は、MSC-Sまたは 0.1% 成長サプリメントとの24回のインキュベーション後のトランスウェルメンブレンの下側である。B) MSC-Sは遊走を大幅に促進する。遊走した細胞は、処理ごとに3つの複製で、複製ごとに3つのフィールドで数えられた。両側独立t検定は、GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA (graphpad.comのWorldWideWebを参照) を使用して実行した。提示されたデータは平均 $\pm$ SE: **** $p < 0.0001$ 。

10

【図5】MSC-Sは、タンパク質発現による抗血管新生プロファイルを有する。A) ヒト血管新生アレイを使用して、MSC-Sの血管新生促進因子及び抗血管新生因子を評価した。B) 抗血管新生因子(黒)は高レベルで存在し、血管新生促進因子(白)は低レベルで存在している。平均ピクセル強度は、ImageJ (NIH, Bethesda, MD) を使用して決定された。

【図6】MSC-Sは、管形成アッセイで抗血管新生特性を示す。HUV EC細胞 ($100\mu\text{L}$ 中 10K) を、MSC-S ($300\mu\text{g}/\text{mL}$) の非存在下または存在下で、 $100\mu\text{L}$ の内皮細胞基礎培地と低血清増殖サプリメント (Life Technologies) 中の 10K 細胞でマトリゲルに播種した。細胞を6時間インキュベートして内皮管を形成させた後、画像を取得して処理した。条件ごとに5回の反復試験を実行した。A) 画像パネルは、MSC-Sが管形成を減衰させることを示している。B) MSC-Sは、血管新生の測定基準(ループの合計、管の長さの合計、分岐点の合計)を減少させる。Wimasis、2016を使用して処理された画像。WimTube: 管形成アッセイ画像分析ソリューション。リリース4.0。両側独立t検定は、GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com を使用して実行した。提示されたデータは平均 $\pm$ SE: ** $p < 0.001$ 、及び*** $p < 0.0005$ 。

20

【図7】MSC-Sは傷跡防止特性を示している。ヒト皮膚線維芽細胞は、MSC-Sの存在下で $\text{TGF}\beta-1$ を使用して筋線維芽細胞に分化した。24時間後、全単離RNAに対してqPCRを実行した。MSC-Sは、瘢痕化バイオマーカー $\text{TGF}\beta 2$ 及びSMAの発現を低下させる。データは、9回の反復試験の平均 $\pm$ SDを表している。比較は、一元配置分散分析 (ANOVA) と、それに続く事後ダネット検定を使用して実行された。* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.0001$ 。

30

【図8】MSC-S治療は、角膜アルカリ熱傷による創傷閉鎖を大幅に改善する。アルカリ熱傷動物モデル: ドブネズミ (150g 、10週齢) をケトプロフェンの皮下投与により深く麻酔し、ケタミン/キシラジンをSC注射した。次に、1滴の局所プロパラカインを、右眼を治療することを目的として適用した。次に、深麻酔した各ラットの右眼に、 1N NaOH に浸した直径 5mm の円形の濾紙を中央の角膜に30秒間置き、 100mL の平衡塩類溶液 (BSS) で洗浄することによってアルカリ燃焼を引き起こした。術後疼痛管理は、24時間ごとに合計3回ケトプロフェンを皮下注射して投与することにより達成された。次に、動物をランダムに2つの治療グループに割り当てた: ビヒクル ($n=4$) 及びMSC-S ($n=4\sim 5$)。眼をフルオレセイン (BSSで希釈した 1.0% リン酸フルオレセイン $20\mu\text{L}$) で染色し、最初の創傷時及びアルカリ熱傷の誘発後毎日写真を撮り、上皮欠損の面積を測定した。最初のフルオレセイン染色の直後に、局所治療を開始した: ビヒクル (BSS、 $5\mu\text{L}$) 及びMSC-S ($5\text{mg}/\text{mL}$ 、 $5\mu\text{L}$) を1日3回 (TID)、7日間。角膜擦過傷の面積を、コンピューター支援画像分析器 (ImageJ 1.38x ; National Institutes of Health, Bethesda, MD) を使用して写真から定量化した。治療の程度は、24時間ごとの直の創傷と残りの創傷領域との間の差の比率によって決定した。両側独立t検定は、GraphPa

40

50

dPrismversion8.0.0forWindows, GraphPadSoftware, SanDiego, CaliforniaUSA, www.graphpad.comを使用して実行した。データは平均±SEで表される：* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、及び*** $p < 0.001$ 。

【図9】MSC-S治療は、角膜混濁及び新生血管サイズを大幅に改善する。角膜熱傷を負わせた眼をビヒクル（ $n = 4$ ）及びMSC-S（ $n = 4 \sim 5$ ）で7日間処理（TID）した。0～4のスケールでの角膜混濁。0＝完全に透明である。1＝わずかにかすんでいるが、虹彩及び瞳孔が容易に視認可能である。2＝わずかに不透明であるが、虹彩及び瞳孔は依然として検出可能である。3＝不透明であり、瞳孔がほぼ検出不可可能である。4＝完全に不透明であり、瞳孔が見えない。0～3のスケールでの新生血管サイズ。0＝新生血管なし。1＝外科用顕微鏡下で新生血管が検出可能である。2＝外科用顕微鏡下で新生血管が容易に見える。3＝顕微鏡なしでも新生血管が容易に見える。両側独立t検定は、GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.comを使用して実施した。データは、平均±SEで表される：* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、及び*** $p < 0.001$ 。

【図10】MSC-Sは、5℃及び25℃（周囲温度）で保存した場合、7日間、移行促進生物活性を維持する〔研究CM19__TWS01〕。細胞ベースの遊走安定性バイオアッセイは、トランスウェル遊走原理と一次角膜線維芽細胞を利用している。簡単に説明すると、細胞は、多孔質膜を備えた上部チャンバー内の基本的な（栄養素が枯渇した）培地に播種される。次に、チャンバーをMSC-Sを含む基本培地のウェルに設置する。24時間後、膜の底面に遊走した細胞が染色、画像化、及び定量化される。

【図11】MSC-Sは一次ヒト角膜上皮細胞の遊走を促進する。写真は、0.1%成長サプリメント（GS、A）またはMSC-S（300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、B）と24時間インキュベートした後のトランスウェルメンブレンの下側である。遊走した細胞は、処理ごとに3つの複製で、複製ごとに3つのフィールドで数えられた：denat：90℃で10分間熱で変性。提示されたデータは、両側独立t検定を使用した平均±SE、**** $p < 0.0001$ である。

【図12】MSC-Sは、ヒト一次角膜上皮細胞の集密的な単層における創傷ギャップの閉鎖を改善する。A）写真は、ビヒクル対照（上部パネル）またはMSC-S（45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；下部パネル）で処理された一次ヒト角膜上皮細胞単層の創傷ギャップの代表的な画像であり、 $T = 0$ 、24、そして48時間で画像化された。細胞単層は緑で描かれ、破線（赤）は創傷ギャップに対応する。B）細胞を45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MSC-Sで48時間処理すると、創傷ギャップの閉鎖が大幅に改善される。両側独立t検定は、GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA. を使用して実行した。提示されたデータは平均±SE：* $p < 0.001$ 。

【図13】MSC-Sはヒト一次角膜線維芽細胞の遊走を促進する。写真は、MSC-Sまたはビヒクル対照との20時間のインキュベーション後のトランスウェルメンブレンの下側である。

【図14】MSC-Sは抗血管新生タンパク質プロファイルを示す。A）ヒト血管新生アレイを使用して、MSC-Sの血管新生促進及び抗血管新生タンパク質因子を同定した。Aの写真の番号（1-14）は、パネルBのラベル付き密度棒グラフに対応する。B）抗血管新生因子（黒）は高レベルで存在し、血管新生促進因子（白）は低レベルで存在する。平均ピクセル強度は、画像処理ソフトウェア、ImageJ（NIH, Bethesda, MD）を使用して決定された。

【図15】MSC-Sは、管形成アッセイで抗血管新生特性を示す。100 μL の内皮細胞基礎培地と低血清増殖サプリメント（Life Technologies）、MSC-S（40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の存在下または非存在下で、12,000細胞のマトリゲル。細胞を6時間インキュベートして内皮管を形成させた後、画像を取得して処理した。条件ごと

に5回の反復試験を実行した。A) 画像パネルは、MSC-SがVEGFポジティブ対照と比較して管形成を弱めることを示している。B) MSC-Sは、血管新生の測定基準（管の全長、ループの合計、分岐点の合計）を減少させる。Wimasiss、2016を使用して処理された画像。WimTube：管形成アッセイ画像分析ソリューション。リリース4.0。両側独立t検定は、GraphPadPrismversion8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA. を使用して実行した。提示されたデータは平均±SE：**p<0.05。

【図16】MSC-SはTGFβ-1によって誘発される角膜筋線維芽細胞の分化を減少する。ビヒクル緩衝液またはMSC-S（10μg/mL）の存在下でTGFβ-1で処理することにより筋線維芽細胞に分化するように誘導されたヒト一次角膜が示されている。24時間後、細胞を固定し、核色素（DAPI；青チャンネル）及び平滑筋アクチン（緑チャンネル）で染色した。すべての治療群に、同じ画像とカメラ設定が適用された。

【図17】MSC-S治療は創傷閉鎖を加速させる。角膜アルカリ熱傷をドブネズミ（約150g、12週齢）の右眼に配置し、及び動物は5μLのビヒクル（HPMC、n=7）またはMSC-S（0.6μg/mL、n=7；6μg/mL、n=7；60μg/mL、n=8）1日3回または6μg/mLのMSC-Sを1日6回（n=8）で処置された。4日目のデータであり、パネル（a）は創傷閉鎖率を示し、パネル（b）は代表的なフルオレセイン染色を示す。動物の識別番号は左上隅に白で表示される。創傷閉鎖の程度は、フルオレセイン染色を介して、即時創傷と残りの創傷領域との間の差の比によって評価された。

【図18】MSC-S治療は、角膜混濁と血管新生を大幅に改善する。5μLのビヒクル（HPMC、n=6）またはMSC-S（0.6μg/mL、n=6；6μg/mL、n=6；60μg/mL、n=6）1日3回または6μg/mL MSC-S（n=7）1日6回を10日間）で処理された角膜熱傷の角膜混濁（A）及び血管新生（B）データを示す。0～4のスケールでの角膜混濁。0＝完全にクリア。1＝わずかにかすんでいて、虹彩と瞳孔が簡単に見える。2＝わずかに不透明で、虹彩と瞳孔はまだ検出可能。3＝不透明、瞳孔はほとんど検出できない。4＝完全に不透明で、瞳孔が見えない。0～4のスケールでの血管新生。0＝新生血管なし；1＝輪部の新生血管；2＝輪部にまたがる新生血管；3＝角膜の中心に到達し、角膜の他の場所に透明なゾーンが残っている新生血管。4＝角膜中心を含む角膜の4つの象限すべての新生血管。データは、標準誤差のある平均として表される。パラメータの比較は、一元配置分散分析とそれに続く事後ボンフェローニ検定を使用して実行された。<0.05の*P値は、統計的に有意であると見なされた（Graph Pad Prismversion8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA USA）。

【図19】6μg/mLのMSC-Sは、角膜損傷の影響を改善する上で、ビヒクルよりも著しく優れている。（5μL）のビヒクル（a）及び6μg/mLのMSC-S（b）を角膜アルカリ損傷誘発ラットに10日間毎日3回局所適用したときの角膜損傷の変化。眼の臨床的外観を記録するために、眼のデジタル画像を7日目と14日目に取得した。動物の識別番号は、各ラット複合体の右上隅に表示される。

【図20】EVのサイズ分布。網掛け部分は洗剤処理後に残っている粒子であり、粒子の85%以上が洗剤に不安定な脂質ベースの小胞であることを示している。

【図21】増殖アッセイは、一次角膜実質細胞とMSCセクレトームを使用して形成された。MSCセクレトームは角膜実質細胞の増殖を促進する。一次角膜実質細胞を、5000個の細胞/cm²で播種し、一晚培養した。次に、細胞を1時間血清飢餓状態にし、さまざまな濃度のMSCセクレトームで処理した。増殖は、CKK-8アッセイ（細胞計数キット；Dojindo Molecular Technologies）を使用して、処理後最大3日間毎日監視された。

【図22】MSCセクレトームの安定性－組成物。MSCセクレトームの新しいバッチを製造し、原薬（製剤緩衝液中）の安定性を評価した。アリコートは、7日間または14日

10

20

30

40

50

間のプログラムの一環として、 -20°C 、 4°C 、または室温（RT）で保存された。研究の終わりに、試料をELISAで分析して、セルピンE1、セルピンF1、及びTIMP-1を測定した。MSCセクレトーム因子は、少なくとも14日間は液体製剤中で分解しない。複数の因子が安定であることは、製剤が広範囲のタンパク質安定化を裏付けていることを示唆している。

【図23】インビトロ創傷閉鎖アッセイ。パネル上：MSCセクレトームは、円形の傷の部位で一次角膜実質細胞の遊走を刺激する。角膜実質細胞の集密的な単層に円形の創傷を作成し、創傷ギャップの閉鎖を毎日観察した。無血清培地中の100及び50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のMSCセクレトームは、48時間以内に創傷を閉じる。示される画像は、ゲンチアナバイオレットで染色された創傷領域であり、創傷の2日後に画像化されている。パネル下：MSCセクレトームは、円形の傷の部位で角膜上皮細胞の遊走を刺激する。角膜上皮細胞の集密的な単層に円形の創傷を作成し、創傷ギャップの閉鎖を毎日観察した。無血清培地中の100及び50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量では、MSCセクレトームは72時間以内に創傷を閉じる。示される画像は、ゲンチアナバイオレットで染色された創傷領域であり、創傷の2日後に画像化されている。

【図24】MSCセクレトームの安定性－生物活性。MSCセクレトームの新しいバッチを製造し、原薬（製剤緩衝液中）の安定性を評価した。アリコートは、7日間または14日間のプログラムの一環として、 -20°C 、 4°C 、または室温で保存された。研究の終わりに、試料を角膜上皮細胞を使用した円形創傷アッセイで評価した。創傷閉鎖を3日間毎日観察した。参考基準として、製造時に瞬間凍結した原薬を使用した。指定創傷閉鎖率%WC。MSCセクレトームは、 -20°C 、 4°C で冷蔵、及び室温（RT）で保存した場合、少なくとも14日間インビトロで創傷治癒の生物活性を維持する。安定性は、角膜上皮細胞と線維芽細胞の両方で観察された。

【図25】3D組織モデル。負傷後24、負傷した組織は対照TEERの10%（未処理と比較して）を示すが、負傷してからMSCセクレトームで処理した組織は対照TEERの55%（未処理と比較して）を示す。この研究の目的は、EpiCorneal組織モデル（MatTek Corp）を利用して、ナイトロジェンマスタード（NM）への局所曝露によって引き起こされた角膜上皮損傷後の試験品（MSCセクレトーム）の局所適用後のバリア完全性への影響を評価することである。MSCセクレトームを6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （プラセボ溶液で希釈）で局所塗布した。EpiCorneal組織は、標準的な培養条件で5 mLの培地で24時間培養された。

【図26】MSCセクレトームの安定性－凍結乾燥。MSCセクレトームの新しいバッチを製造し、原薬（製剤緩衝液中）を瞬間凍結（ -80°C で実施）または凍結し、凍結乾燥した。分析の直前に、凍結乾燥物質を滅菌水（凍結体積と等体積のもの）中に再懸濁した。角膜上皮細胞（または角膜実質細胞）及び新たに解凍した物質（DF；ダイアフィルトレーション）または新たに再構成した物質を使用してインビトロ円形創傷閉鎖アッセイを実施した。結果は、凍結乾燥後に、上皮細胞及び角膜実質細胞においてMSCセクレトーム原薬が凍結液体物質と同等に創傷閉鎖を引き起こすことを示す。

【図27】凍結乾燥原薬は、凍結物質（ -80°C ）と同等の創傷閉鎖生物活性を示す。MSCセクレトームは、ナイトロジェンマスタードによる化学創傷の後にバリア完全性を改善する。

【図28】凍結乾燥原薬の凍結乾燥ケーキ。

【発明を実施するための形態】

【0158】

I. 導入

本発明は、係る治療で使用するための凍結乾燥間葉系幹細胞セクレトーム組成物、ならびにそのような組成物を作製するための方法を提供する。係る組成物、使用、及び関連する方法は、以下でさらに詳細に説明される。

【0159】

A. 定義

特許請求の範囲及び明細書で使用される用語は、特に明記しない限り、以下に記載されるように定義される。親仮特許出願で使用されている用語と直接矛盾する場合は、本明細書で使用されている用語が優先するものとする。

【0160】

本明細書で使用される場合、「分離された」とは、元の環境から除去され、したがって「人間の手によって」その自然の状態から変更された材料を指す。

【0161】

本明細書で使用する場合、「濃縮」とは、不要な材料を排除するか、混合物から望ましい材料を選択及び分離することによって、1つ以上の材料を選択的に濃縮または量を増やすことを意味する（例えば、集団内のすべての細胞がマーカーを発現するわけではない不均一な細胞から特定の細胞マーカーを用いて細胞を分離する）。

10

【0162】

本明細書で使用される場合、「実質的に精製された」という用語は、特定のマーカーまたはマーカーの組み合わせに対して実質的に均質な細胞の集団を意味する。実質的に均質とは、特定のマーカーまたはマーカーの組み合わせに対して少なくとも90%、好ましくは95%均質であることを意味する。本明細書で使用される場合、「多能性幹細胞」という用語は真の幹細胞であるが、限られた数のタイプにしか分化することができない。例えば、骨髄には多能性幹細胞が含まれており、血液のすべての細胞を生成するが、他の種類の細胞に分化できない場合がある。

【0163】

本明細書に記載の特定の組成物、増殖条件、培地などを指す場合の「動物を含まない」という用語は、ウシ血清、タンパク質、脂質、炭水化物、核酸、ビタミンなどの非ヒト動物由来材料が、特定の組成物またはプロセスの調製、成長、培養、膨張、貯蔵または配合に使用されないことを意味する。「非ヒト動物由来材料がない」とは、物質が非ヒト動物の体内または物質内に存在または動物の体または物質に接触したことがなく、異種汚染されていないことを意味する。一般に、組換え生産されたヒトタンパク質などの臨床グレードの材料は、そのような組成物及び／またはプロセスの調製、成長、培養、膨張、貯蔵及び／または配合に使用される。

20

【0164】

細胞組成物に関して「拡張された」という用語は、細胞集団が、以前の方法を使用して得られるよりも有意に高い濃度の細胞を構成することを意味する。例えば、AMP細胞の拡張組成物中の羊膜組織の1グラムあたりの細胞レベルは、以前の方法を使用したそのような細胞の約20倍の倍増と比較して、5継代後の一次培養物中の細胞数よりも少なくとも50倍及び最大150倍高い。別の例では、AMP細胞の拡張組成物中の羊膜組織1グラムあたりの細胞のレベルは、3継代後の一次培養物中の細胞の数よりも少なくとも30倍、最大100倍高い。したがって、「拡張された」集団は、以前の方法と比較して、羊水組織の1グラムあたりの細胞数が少なくとも2倍、最大で10倍改善されている。「拡張された」という用語は、細胞の数を増やすために人が介入した状況のみを含むことを意味する。

30

【0165】

本明細書で使用される場合、「馴化培地」は、特定の細胞または細胞集団が培養され、次いで除去された培地である。細胞を培地で培養すると、他の細胞をサポートしたり、他の細胞の挙動に影響を与えたりする可能性のある細胞因子を分泌する可能性がある。このような因子には、ホルモン、サイトカイン、細胞外マトリックス（ECM）、タンパク質、小胞、抗体、ケモカイン、受容体、抑制剤、及び顆粒が含まれるが、これらに限定されない。細胞因子を含む培地は馴化培地である。馴化培地を調製する方法の例は、米国特許第6,372,494号に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書で使用される場合、馴化培地はまた、馴化培地または例えば、MSC細胞から回収及び／または精製されるタンパク質などの成分を指す。

40

【0166】

50

本明細書で使用される場合、「間葉系幹細胞組成物」または「MSC組成物」という用語は、MSCに由来し、場合によってはさらなる処理を受けた馴化培地を意味する。いくつかの実施形態では、「MSCセクレトーム」は、MSCに由来する粗馴化培地を指すことができる。いくつかの実施形態では、「MSCセクレトーム」は、それが本明細書に記載されるようにさらなる処理に供された後に粗馴化培地から得られる組成物を指すことができる。

【0167】

本明細書で使用される場合、「懸濁液」という用語は、分散成分、例えば、サイトカインを含む液体を意味する。分散された成分は、完全に可溶化されるか、部分的に可溶化されるか、懸濁されるか、さもなければ液体中に分散され得る。適切な液体には、水、塩及び／または糖溶液などの浸透圧溶液、細胞培養培地、及び他の水溶液または非水溶液が含まれるが、これらに限定されない。そのような液体懸濁液は、本発明の凍結乾燥MSCセクレトームを調製するために凍結乾燥され得る。

【0168】

「アミノ酸」とは、天然に存在するアミノ酸及び合成アミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と同様の方法で機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣体を指す。天然に存在するアミノ酸は、遺伝子コードによってコードされるもの、ならびに後で修飾されるアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタメート、及びO-ホスホセリンである。アミノ酸類似体とは、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造を有する化合物、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、及びR基に結合された α 炭素、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。そのような類似体は、修飾されたR基（例えば、ノルロイシン）または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造を保持する。アミノ酸模倣体とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様に機能する化学化合物を指す。アミノ酸は、本明細書では、それらの一般に知られている3文字記号またはIUPAC-IUB生化学命名委員会によって推奨される1文字記号のいずれかで呼ぶことができる。同様に、ヌクレオチドは、一般に受け入れられている1文字コードで呼ぶことができる。

【0169】

「アミノ酸置換」は、所定のアミノ酸配列（開始ポリペプチドのアミノ酸配列）における少なくとも1つの既存のアミノ酸残基の、第2の異なる「置換」アミノ酸残基による置換を指す。「アミノ酸挿入」は、所定のアミノ酸配列への少なくとも1つの追加のアミノ酸の組み込みを指す。挿入は通常、1つまたは2つのアミノ酸残基の挿入からなるが、現在のより大きな「ペプチド挿入」、例えば、約3～約5または最大で約10、15、または20のアミノ酸残基の挿入を行うことができる。挿入された残基は、上記に開示されているように、天然に存在する場合もあれば、天然に存在しない場合もある。「アミノ酸欠失」は、所定のアミノ酸配列からの少なくとも1つのアミノ酸残基の除去を指す。

【0170】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指す。この用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工化学的類似体であるアミノ酸ポリマー、及び天然に存在するアミノ酸ポリマー、天然に存在しないアミノ酸ポリマーも含む。

【0171】

「核酸」は、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド及びそれらのポリマーを指す。特に限定されない限り、この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと同様の方法で代謝される天然ヌクレオチドの既知の類似体を含む核酸を包含する。特に明記しない限り、特定の核酸配列はまた、その保存的に修飾された変異体（例えば、縮重コドン置換）及び相補的配列、ならびに明示的に示された配列も暗黙的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つ以上の選択された（またはすべての）コドンの3番目の位置が混合塩基及び／また

10

20

30

40

50

はデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することによって達成することができる (Batzer et al, Nucleic Acid Res. 19:5081、1991; Ohtsuka et al, Biol. Chem. 260:2605-2608、1985; 及び Cassol et al、1992; Rossolini et al、Mol. Cell. プローブ 8:91-98、1994)。アルギニンとロイシンの場合、2 番目の塩基での修飾も保守的である可能性がある。核酸という用語は、遺伝子、cDNA、及び遺伝子によってコードされる mRNA と互換的に使用される。本明細書で使用するポリヌクレオチドは、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドから構成することができ、これらは、非修飾 RNA または DNA または修飾 RNA または DNA であり得る。例えば、ポリヌクレオチドは、一本鎖及び二本鎖 DNA、一本鎖及び二本鎖領域の混合物である DNA、一本鎖及び二本鎖 RNA、及び一本鎖及び二本鎖領域の混合物である RNA、一本鎖、またはより典型的には二本鎖、または一本鎖領域と二本鎖領域の混合物であり得る DNA 及び RNA を含むハイブリッド分子から構成され得る。さらに、ポリヌクレオチドは、RNA または DNA、あるいは RNA と DNA の両方を含む三本鎖領域から構成され得る。ポリヌクレオチドはまた、安定性または他の理由のために修飾された 1 つ以上の修飾された塩基または DNA または RNA 骨格を含み得る。「修飾された」塩基には、例えば、トリチル化された塩基及びイノシンなどの異常な塩基が含まれる。DNA と RNA にはさまざまな変更を加えることができ、したがって、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的、または代謝的に修飾された形態を包含する。

10

20

【0172】

本明細書で 사용되는場合、「セクレトーム組成物」という用語は、細胞から分泌される 1 つ以上の物質を含む組成物を指す。特定の実施形態では、セクレトーム組成物は、1 つ以上のサイトカイン、1 つ以上のエクソソーム、及び／または 1 つ以上の微小胞を含み得る。セクレトーム組成物は、精製されていても、精製されていなくてもよい。いくつかの実施形態では、セクレトーム組成物は、細胞から分泌されない 1 つ以上の物質（例えば、培養培地、添加物、栄養素など）をさらに含み得る。いくつかのセクレトーム組成物は、細胞から分泌されない微量の 1 つ以上の物質（例えば、培地、添加物、栄養素など）だけを含むか、または含まない。

【0173】

本明細書で使用する「治療 (treatment)」、「治療 (treat)」、または「治療する」などの用語は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物（例えば、齧歯動物、猫、犬、馬、牛、羊、及び霊長類など）の任意の治療を含み、疾患または状態の素因がある可能性があるが、まだそれを有すると診断されていない対象において、疾患または状態が発生するのを防ぐことを含む。また、疾患、状態、及び／または関連する症状の抑制（発症の停止）、緩和または改善（退行の原因）、または疾患、状態及び／または関連する症状の治療（発症または進行の恒久的な停止）も含まれる。本明細書で使用する「治療」、「治療する」、または「治療する」という用語は、哺乳動物、特にヒトの疾患または状態の任意の治療を含み、(a) 対象において病気や状態の素因があるかもしれないが、まだそれを持っていると診断されていない疾患または状態が発生するのを防ぐこと、(b) 疾患または状態を抑制すること、例えば、その発症を阻止すること、(c) 疾患または状態を緩和及び／または改善すること、例えば、疾患または状態の退行を引き起こすこと、または (d) 疾患または状態を治療すること、例えば、その発症または進行を停止することを含む。本発明の方法によって治療される対象の集団には、望ましくない状態または疾患に苦しむ対象、ならびに状態または疾患の発症のリスクがある対象が含まれる。いくつかの実施形態では、「治療 (treatment)」（「治療 (treat)」または「治療する」も）は、部分的または完全に緩和、改善、回復、抑制、発症の遅延、重症度の軽減、及び／または特定の疾患、障害、及び／または状態の 1 つ以上の症状、特徴、及び／または原因の発生率の低下をもたらす治療の任意の投与を指す。いくつかの実施形態では、そのような治療は、関連する疾患、障害、及び／または状態の兆候を示さない対象

30

40

50

、及び／または疾患、障害、及び／または状態の初期の兆候のみを示す対象のものであり得る。あるいは、及び／またはさらに、そのような治療は、関連する疾患、障害、及び／または状態の1つ以上の確立された兆候を示す対象のものであり得る。いくつかの実施形態では、治療は、関連する疾患、障害、及び／または状態に罹患していると診断された対象のものであり得る。いくつかの実施形態では、治療は、関連する疾患、障害、及び／または状態の発症のリスクの増加と統計的に相関する1つ以上の感受性因子を有することが知られている対象のものであり得る。

【0174】

本明細書で使用される場合、「創傷」は、機械的（例えば、挫傷、貫通）、熱的、化学的、電気的、放射線、衝撃及び切開による損傷などの外傷性障害、例えば外科手術及び結果的な切開創ヘルニア、瘻などの待機的創傷；急性創傷、慢性創傷、感染した創傷、及び無菌の創傷、ならびに病状（例えば、眼の挫傷）に関連する創傷を含むが、それらに限定されない、通常組織（内部組織及び／または外部組織）を何らかの原因で崩壊するものである。創傷は動的であり、治癒のプロセスは、創傷時に始まり、最初の創傷閉鎖を超えて安定した創傷閉鎖に到達するまで進行する一連の、統合され相互に関連する細胞プロセスを必要とする連続的なものである。これらの細胞プロセスは、サイトカイン、リンホカイン、成長因子、及びホルモンを含むがこれらに限定されない体液性物質によって媒介または調節される。本発明によれば、「創傷治癒」は、何らかの形態の介入によって、治癒がより速くなるような、及び／または結果として生じる治癒領域がより少ない傷跡となるような、及び／または治癒領域が無傷の組織の強度に近い組織強度を有するような、及び／または創傷組織が、ある程度の機能回復を達成するような、組織修復の自然の細胞プロセス及び体液性物質を改善することを指す。

【0175】

本明細書で使用される場合、「a」または「an」という用語は、1つ以上または少なくとも1つを意味する。

【0176】

本明細書で使用される場合、組成物の「治療上有効な」または「有効な」投与量または量は、所与の病状にプラスの効果をもたらすのに十分な量である。即時ではない場合、治療上有効または有効な投与量または量は、ある期間にわたって、患者の健康及び幸福に顕著なまたは測定可能な効果をもたらす。

【0177】

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」は、送達成分と組み合わせた本明細書に記載される組成物の有効量を指す。医薬組成物は、任意選択的に、組成物及び／またはその個々の成分の対象への投与を容易にし得る、薬学的に適切な担体及び賦形剤などの他の成分を含み得る。

【0178】

「薬学的に許容される担体」という用語は、対象に重大な刺激を引き起こさず、投与された化合物の生物学的活性及び特性を無効にしない担体または希釈剤を指す。

【0179】

「賦形剤」という用語は、化合物の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性物質を指す。

【0180】

本明細書で使用される場合、「混合」、「混合する」などの用語は、成分の機械的プロセスまたは機械的処理を説明する。例えば、混合は、提供された疎水性マトリックスの強力な圧縮及び混合をもたらす、加圧及び折り畳みの繰り返しサイクルまたは同等の処理ステップを実行するという意味であり得る。

【0181】

成体幹細胞は、骨髄、脂肪、歯髄組織など、さまざまな成体組織から採取できる。すべての成体幹細胞は自己複製のケーブルであり、多能性であると考えられているが、それらの治療機能はそれらの起源によって異なる。その結果、成体幹細胞の種類ごとに、特定の

10

20

30

40

50

病気に適した独自の特性がある。間葉系幹細胞（MSC）は典型的には中胚葉に由来し、多能性であり、様々な組織に分化することができるものから単離された（由来する）非造血性（非血液）幹細胞であり、骨芽細胞（例えば、骨細胞）、軟骨細胞（例えば、軟骨細胞）、筋細胞（例えば、筋肉細胞）及び脂肪細胞（例えば、骨髄脂肪組織を生じさせる脂肪細胞）を含む。本明細書で使用される場合、「単離された」とは、それらの元の環境から除去された細胞を指す。幹細胞は、成長因子など、複数の生物学的プロセスを調節する、または調節するために重要な因子を産生する。成長因子は、細胞の成長及び／または増殖及び／または細胞分化を刺激することができる天然に存在する物質などの薬剤である。一般的に、成長因子はタンパク質またはステロイドホルモンである。本明細書では、「成長因子」及び「因子」などの用語は交換可能に使用されるが、「生物学的因子」という用語は、成長因子に限定されない。

10

【0182】

ヒト間葉系幹細胞（MSC）は、CD45－／CD31－／CD73＋／CD90＋／CD105＋／CD44＋（またはその適切なサブセット）の表面マーカープロファイルによって特徴付けることができる。（Bourin et al, Cytotherapy 15（6）：641－648（2013）を参照）。さらに、適切な幹細胞は、単離時にCD34＋陽性を示すが、培養中にこのマーカーを失う。したがって、本出願に従って使用され得る1つの幹細胞タイプの完全なマーカープロファイルは、CD45－／CD31－／CD73＋／CD90＋／CD105＋を含む。マウス幹細胞を利用する別の実施形態では、幹細胞は、CD34の代わりにScα-1マーカーによって特徴付けられ、残りのマーカーは同じままで、上記のヒト細胞と相同であると思われるものを定義する。

20

【0183】

「馴化培地」または「CM」という句は、MSCによって分泌される生物学的因子を含む培地を指す。これは、本明細書では「セクレトーム」、「MSC－CM」、「MSCセクレトーム」及び／または「MSC由来セクレトーム」と呼ばれることもある。また、MSCによって分泌される生物学的因子を含み、例えば、濾過、精製、及び／または濃縮手順によってさらに処理された、処理された「馴化培地」も提供される。「馴化培地」は、本明細書に詳細に記載されるように、培地中で幹細胞を培養し、幹細胞及びそれらの分泌された幹細胞産物（セクレトーム）を含む得られた培地を、生物学的因子及び分離前に存在していた数よりも少ない幹細胞を含む馴化培地に分離することによって得られる。馴化培地は、本明細書に記載の方法で使用することができ、幹細胞を実質的に含まない（わずかな割合の幹細胞を含み得る）か、または幹細胞を含まない。馴化培地に存在し得る生物学的因子には、タンパク質（例えば、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、酵素）、核酸（例えば、miRNA）、脂質（例えば、リン脂質）、多糖類、及び／またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。これらの生物学的因子の任意の組み合わせは、細胞外小胞（例えば、エクソソーム）の内部または表面に結合するか、または細胞外小胞から分離することができる。

30

【0184】

B．組成物及び配合物

本明細書によれば、間葉系幹細胞（MSC）セクレトームを含む馴化培地及び／またはさらに凍結乾燥するための間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム（処理されたMSCセクレトームを含む）を含む組成物が本明細書で提供される。

40

【0185】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、一般に、血管新生因子が低い。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは血管新生を促進しない。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、抗血管新生特性を示す。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、他のセクレトームと比較して、血管新生の減少を提供する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、または99％の血管新生の減少を提供する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、別のセクレトームと比較して、10％、2

50

0%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の血管新生の減少を提供する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、MSCセクレトームに処理する前の馴化培地と比較して、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の血管新生の減少を提供する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、低い血管新生誘導を有する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、低下した血管新生反応を有する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、低下した血管新生能力を有する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、血管新生を支持する培地の存在下で血管の正常な形成を損なう及び／または減少させる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、MSCセクレトームが未処理の対照と比較した場合、低下した血管新生能力を有する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、血清含有培地で処理された試料と比較して、低下した血管新生能力を有する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは血管新生反応を弱める。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、血清含有培地によって誘発される血管新生反応を低下させる。いくつかの実施形態では、血管新生反応の低下は、セクレトームと血清含有培地（血管新生反応の低下またはなし）を血清含有培地（血管新生反応）と比較した場合、MSCセクレトームによって誘導される。いくつかの実施形態では、血管新生応答は、細胞ベースのアッセイにおける管形成によって示される。いくつかの実施形態では、血管新生応答は、内皮細胞管形成アッセイにおける管形成によって示される。いくつかの実施形態では、血管新生反応は、CAM（ニワトリ絨毛尿膜）アッセイにおける血管形成によって示される。いくつかの実施形態では、血管新生応答は、当技術分野で知られている任意の血管形成アッセイにおける血管形成によって示される。

10

20

30

40

50

【0186】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、

- i. IDO（インドールアミン-2，3-ジオキシゲナーゼ）酵素活性と、
- ii. HGF、FGF-7、TIMP-1、TIMP-2、PAI-1（セルピンE1）、VEGF-A、及びb-NGFからなるグループから選択される少なくとも1つの栄養因子／サイトカインの「閾値」ppmレベルと、
- iii. sFLT-1、PEDF（セルピンF1）、IGFBP-2、IGFBP-3、SDF-1、TSG-14、カリクレイン3、MCP-1、bFGF、アンジオゲニン、MCP-2、アンジオ-2、IL-6、IL-17、G-CSF、M-CSF、GM-CSF、IL-8、TNF-ベータ、PDGF、SOD1、SOD2、SOD3、及びHO-1からなるグループから選択される少なくとも1つの追加因子の「閾値」ppmレベルと、
- iv. DPPiV（ジペプチジルペプチダーゼ-4）、uPA、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1トロンボスポンジン2、及びトロンボスポンジン1からなるグループから選択される少なくとも1つの追加因子の「閾値」ppmレベルと、を含む。

【0187】

間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、

- i. 約250µM未満のIDO（インドールアミン-2，3-ジオキシゲナーゼ）酵素活性と、
- ii. HGF、FGF-7、TIMP-1、TIMP-2、PAI-1（セルピンE1）、VEGF-A、及び／またはb-NGFからなる群から選択される少なくとも1つの栄養因子／サイトカインと、
- iii. sFLT-1、PEDF（セルピンF1）、IGFBP-2、IGFBP-3、SDF-1、TSG-14、カリクレイン3、MCP-1、bFGF、アンジオゲニン、MCP-2、アンジオ-2、IL-6、IL-17、G-CSF、M-CSF、GM-CSF、IL-8、TNF-ベータ、PDGF、SOD1、SOD2、SOD3、及び／ま

たはH O - 1 からなるグループから選択された少なくとも1つの追加因子と、

i v . D P P I V (ジペプチジルペプチダーゼ-4)、u P A、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンボスポンジン-2、及び／またはトロンボスポンジン-1 からなる群から選択される少なくとも1つの追加の因子と、を含む。

【0188】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞(M S C)セクレトーム組成物は、

i . H G F、T I M P - 1、T I M P - 2、P A I - 1 (セルピンE 1)、V E G F - A、及びb - N G F からなる群から選択される少なくとも1つの栄養因子／サイトカインと、

10

i i . P E D F (セルピンF 1)、I G F B P - 2、I G F B P - 3、S D F - 1、T S G - 1 4、カリクレイン3、M C P - 1、アンギオゲニン、M C P - 2、アンギオ-2、I L - 6、I L - 1 7、G - C S F、M - C S F、G M - C S F、I L - 8、T N F - ータ、及びP D G F からなる群から選択される少なくとも1つの追加因子と、

i i i . D P P I V (ジペプチジルペプチダーゼ-4)、u P A、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンボスポンジン-2、及びトロンボスポンジン-1 からなる群から選択される少なくとも1つの追加因子と、を含む。

【0189】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞(M S C)セクレトーム組成物は、アポリポタンパク質A 1、補体因子D、C反応性タンパク質、シスタチンC、D K K - 1、エンプリン、オステオポンチン、ビタミンD B P、M I F、R A N T E S、u P A R、I L - 1 7 a、G D F - 1 5、及び／またはI F N γを含むがこれらに限定されない少なくとも1つの追加の因子を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞(M S C)セクレトーム組成物は、アポリポタンパク質A 1、補体因子D、C反応性タンパク質、シスタチンC、D K K - 1、エンプリン、オステオポンチン、ビタミンD B P、M I F、R A N T E S、u P A R、I L - 1 7 a、G D F - 1 5、及びI F N γからなる群から選択される少なくとも1つの追加の因子を含む。

【0190】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞(M S C)セクレトーム組成物は、セリンプロテアーゼ抑制剤：セルピンF 1、セルピンE 1、セルピンA 1、セルピンG 1、セルピンH 1、セルピンB 6、セルピンE 2、セルピンA 3、セルピンC 1、セルピンF 2、セルピンI 1)、セルピンB 1、セルピンB 7、セルピンD 1、セルピンB 3、セルピンB 8、セルピンB 2、セルピンB 1 2、セルピンA 7、セルピンA 4、及び／またはセルピンA 6を含むセルピンファミリーメンバーを含むがこれらに限定されない少なくとも1つの追加の因子を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞(M S C)セクレトーム組成物は、セルピンF 1(P E D Fとも呼ばれる)、セルピンE 1、及びセルピンA 1を含むがこれらに限定されない少なくとも1つの追加の因子を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞(M S C)セクレトーム組成物は、セルピンE 1を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞(M S C)セクレトーム組成物は、セルピンA 1を含む。

30

40

【0191】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞(M S C)セクレトーム組成物は、抗酸化に關与するタンパク質を含むがこれらに限定されない少なくとも1つの追加の因子を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞(M S C)セクレトーム組成物は、カタラーゼ、プロテインジスルフィドイソメラーゼ、プロテインジスルフィドイソメラーゼA 3、プロテインジスルフィドイソメラーゼA 4、プロテインジスルフィドイソメラーゼA 6、ペルオキシレドキシン-6、ペルオキシレドキシン-1、

50

ペルオキシレドキシン-2、及び／またはペルオキシレドキシン-4を含むがこれらに限定されない少なくとも1つの追加の因子を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物はカタラーゼを含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物はプロテインジスルフィドイソメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物はプロテインジスルフィドイソメラーゼA3を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、プロテインジスルフィドイソメラーゼA4を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、プロテインジスルフィドイソメラーゼA6を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、ペルオキシレドキシン-6を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、ペルオキシレドキシン-1を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、ペルオキシレドキシン-2を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、ペルオキシレドキシン-4を含む。

10

【0192】

いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、マトリックスメタロプロテイナーゼを含むがこれらに限定されない少なくとも1つの追加の因子を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、MMP2、MMP1、及び／またはMMP14を含むがこれらに限定されない少なくとも1つの追加の因子を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、MMP2を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、MMP1を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、MMP14を含む。

20

【0193】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、可溶性スカベンジャー受容体システインリッチドメイン含有タンパク質SSC5D、腫瘍壊死因子誘導性遺伝子6タンパク質（別名TSG-6）、血清アルブミン、及び潜在的なトランスフォーミング成長因子結合タンパク質（LTGFBP-1）（さまざまなアイソフォーム、LTGFBP-2、LTGFBP-3、及びLTGFBP-4を含む）からなる群から選択されるタンパク質を含むがこれらに限定されない少なくとも1つの追加因子を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、可溶性スカベンジャー受容体システインリッチドメイン含有タンパク質SSC5Dを含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、腫瘍壊死因子誘導性遺伝子6タンパク質（別名TSG-6）を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、血清アルブミンを含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、LTGFBP-1を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、LTGFBP-2を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、LTGFBP-3を含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、LTGFBP-4を含む。

30

40

【0194】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、ペントラキシン-3、TIMP-1、セルピンE1、TSP-1、及びHGFを含む。

【0195】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物は、2～16 ng/mL、または9.8+/-0.5 ng/mLのペントラキシン-3を含む。

【0196】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞（MSC

50

）セクレトーム組成物は、 $10 \sim 200 \text{ ng/mL}$ 、または $90 + / - 21.5 \text{ ng/mL}$ の **TIMP-1** を含む。

【0197】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞（**MSC**）セクレトーム組成物は、 $10 \sim 100 \text{ ng/mL}$ 、または $49.2 + / - 9.8 \text{ ng/mL}$ の **セルピンE1** を含む。

【0198】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞（**MSC**）セクレトーム組成物は、 $0.1 \sim 10 \text{ ng/mL}$ 、または $2.0 + / - 0.3 \text{ ng/mL}$ の **HGF** を含む。

【0199】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞（**MSC**）セクレトーム組成物は、 $100 \sim 800 \text{ pg/mL}$ 、または $304 + / - 44 \text{ pg/mL}$ の **VEGF** を含む。

【0200】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞（**MSC**）セクレトーム組成物は、 $0.1 \sim 100 \text{ pg/mL}$ 、または $< 1 \text{ ng/mL}$ の **IL-8** を含む。

【0201】

いくつかの実施形態では、**IDO**（インドールアミン-2，3-ジオキシゲナーゼ）酵素活性は、約 $250 \mu\text{M}$ 未満である。いくつかの実施形態では、**IDO**（インドールアミン-2，3-ジオキシゲナーゼ）酵素活性は、 $0 \mu\text{M} \sim$ 約 $250 \mu\text{M}$ である。いくつかの実施形態では、**IDO**（インドールアミン-2，3-ジオキシゲナーゼ）酵素活性は、 $50 \mu\text{M} \sim$ 約 $250 \mu\text{M}$ の **Ｌ-キヌレニン／百万MSC** である。いくつかの実施形態では、**IDO**（インドールアミン-2，3-ジオキシゲナーゼ）酵素活性は、 $50 \mu\text{M} \sim$ 約 $200 \mu\text{M}$ の **Ｌ-キヌレニン／百万MSC** である。いくつかの実施形態では、**IDO**（インドールアミン-2，3-ジオキシゲナーゼ）酵素活性は、 $100 \mu\text{M} \sim$ 約 $250 \mu\text{M}$ の **Ｌ-キヌレニン／百万MSC** である。いくつかの実施形態では、**IDO**（インドールアミン-2，3-ジオキシゲナーゼ）酵素活性は、 $100 \mu\text{M} \sim$ 約 $200 \mu\text{M}$ の **Ｌ-キヌレニン／百万MSC** である。いくつかの実施形態では、**IDO**（インドールアミン-2，3-ジオキシゲナーゼ）酵素活性は、約 $0 \mu\text{M}$ 、約 $10 \mu\text{M}$ 、約 $20 \mu\text{M}$ 、約 $30 \mu\text{M}$ 、約 $40 \mu\text{M}$ 、約 $50 \mu\text{M}$ 、約 $60 \mu\text{M}$ 、約 $70 \mu\text{M}$ 、約 $80 \mu\text{M}$ 、約 $90 \mu\text{M}$ 、約 $100 \mu\text{M}$ 、約 $110 \mu\text{M}$ 、約 $120 \mu\text{M}$ 、約 $130 \mu\text{M}$ 、約 $140 \mu\text{M}$ 、約 $150 \mu\text{M}$ 、約 $160 \mu\text{M}$ 、約 $170 \mu\text{M}$ 、約 $180 \mu\text{M}$ 、約 $190 \mu\text{M}$ 、約 $200 \mu\text{M}$ 、約 $210 \mu\text{M}$ 、約 $220 \mu\text{M}$ 、約 $230 \mu\text{M}$ 、約 $240 \mu\text{M}$ 、または約 $250 \mu\text{M}$ **Ｌ-キヌレニン／百万MSC** である。

【0202】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の**MSC**セクレトームは、**sFLT-1**、**PEDF**（**セルピンF1**）、**IGFBP-2**、**IGFBP-3**、**SDF-1**、**TSG-14**、**カリクレイン3**、**MCP-1**、**bFGF**、**アンジオゲニン**、**MCP-2**、**アンジオ-2**、**IL-6**、**IL-17**、**G-CSF**、**M-CSF**、**GM-CSF**、**IL-8**、**TNF-ベータ**、**PDGF**、**SOD1**、**SOD2**、**SOD3**、及び／または**HO-1**を含むがこれらに限定されない少なくとも1つの追加の因子に対する「閾値」**ppm**レベルをさらに含む。いくつかの実施形態では、**MSC**セクレトームは、**sFLT-1**、**PEDF**（**セルピンF1**）、**IGFBP-2**、**IGFBP-3**、**SDF-1**、**TSG-14**、**カリクレイン3**、**MCP-1**、**bFGF**、**アンジオゲニン**、**MCP-2**、**アンジオ-2**、**IL-6**、**IL-17**、**G-CSF**、**M-CSF**、**GM-CSF**、**IL-8**、**TNF-ベータ**、**PDGF**、**SOD1**、**SOD2**、**SOD3**、及び**HO-1**からなる群から選択される少なくとも1つの追加の因子に対する「閾値」**ppm**レベルをさらに含む。いくつかの実施形態では、**MSC**セクレトームは、 $200 \text{ pg/mL} \sim 5000 \text{ pg/mL}$ の

10

20

30

40

50

濃度範囲における1つの追加の因子をさらに含み、1つの追加の因子は、sFLT-1、PEDF（セルピンF1）、IGFBP-2、IGFBP-3、SDF-1、TSG-14、カリクレイン3、MCP-1、bFGF、アンジオゲニン、MCP-2、アンジオ-2、IL-6、IL-17、G-CSF、M-CSF、GM-CSF、IL-8、TNF-ベータ、PDGF、SOD1、SOD2、SOD3、及び／またはHO-1を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、1000～3000 pg/mLのsFLT-1をさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、400～800 pg/mLのTSG-6をさらに含む。

【0203】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトームは、2000～8000 pg/mLのPEDFをさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、2000～7000 pg/mLのPEDFをさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、2000～6000 pg/mLのPEDFをさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、2000～5000 pg/mLのPEDFをさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、2000～4000 pg/mLのPEDFをさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、2000～3000 pg/mLのPEDFをさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、150～300 ng/mLのPEDFをさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、200～300 ng/mLのPEDFをさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、200～275 ng/mLのPEDFをさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、225～275 ng/mLのPEDFをさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、150～300 ng/mLのPEDFをさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、 273 ± 27 ng/mLのPEDFをさらに含む。

【0204】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトームは、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される「より高い」レベルの少なくとも1つの因子をさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、「より高い」レベルのセルピンE1をさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、「より高い」レベルのセルピンA1をさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、「より高い」レベルのTIMP-1をさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、「より高い」レベルのトロンボスポンジン-1をさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、「より高い」レベルのペントラキシン-3（TSG-14）をさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、「より高い」レベルの血小板第4因子をさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、「より高い」レベルのセルピンF1をさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、1 ng/mL～20 ng/mLのセルピンE1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子、及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、1 ng/mL～8 ng/mLのセルピンE1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子、及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、2 ng/mL～8 ng/mLのセルピンE1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子、及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、3 ng/mL～8 ng/mLのセルピンE1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子、及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは

、 $4 \text{ ng/mL} \sim 8 \text{ ng/mL}$ のセルピンE1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第4因子、及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、 $5 \text{ ng/mL} \sim 8 \text{ ng/mL}$ のセルピンE1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第4因子、及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、 $6 \text{ ng/mL} \sim 8 \text{ ng/mL}$ のセルピンE1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第4因子、及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、 $2 \text{ ng/mL} \sim 7 \text{ ng/mL}$ のセルピンE1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第4因子、及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。

10

【0205】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンボスポンジン-2、及びトロンボスポンジン-1、アンギオゲニン、DPP-IV (ジペプチジルペプチダーゼ-4)、IGFBP-3、及び／またはuPAを含むがこれらに限定されない少なくとも1つの因子の「中程度」レベルをさらに含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンボスポンジン-2、及びトロンボスポンジン-1、アンギオゲニン、DPP-IV、IGFBP-3、ならびにuPAからなる群から選択される「中程度」レベルの少なくとも1つの因子をさらに含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、アンギオゲニン、DPP-IV、IGFBP-3、及びuPAからなる群から選択される少なくとも1つの因子の「中程度」レベルをさらに含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、約 $200 \text{ pg/mL} \sim 800 \text{ pg/mL}$ の、アンギオゲニン、DPP-IV、IGFBP-3、及びuPAからなる群から選択される少なくとも1つの因子をさらに含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、約 $200 \text{ pg/mL} \sim 700 \text{ pg/mL}$ 、約 $300 \text{ pg/mL} \sim 800 \text{ pg/mL}$ 、約 $200 \text{ pg/mL} \sim 500 \text{ pg/mL}$ 、または約 $300 \text{ pg/mL} \sim 500 \text{ pg/mL}$ の、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンボスポンジン-2、及びトロンボスポンジン-1、アンギオゲニン、DPP-IV、IGFBP-3及びuPAからなる群から選択される少なくとも1つの因子をさらに含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、約 200 pg/mL 、約 300 pg/mL 、約 400 pg/mL 、約 500 pg/mL 、約 600 pg/mL 、約 700 pg/mL 、または約 800 pg/mL の、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンボスポンジン-2、及びトロンボスポンジン-1、アンギオゲニン、DPP-IV、IGFBP-3、及びuPAからなる群から選択される少なくとも1つの因子をさらに含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、約 $200 \text{ pg/mL} \sim 800 \text{ pg/mL}$ 、約 $300 \text{ pg/mL} \sim 800 \text{ pg/mL}$ 、約 $200 \text{ pg/mL} \sim 500 \text{ pg/mL}$ 、または約 $300 \text{ pg/mL} \sim 500 \text{ pg/mL}$ のアンギオゲニンを含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、約 $200 \text{ pg/mL} \sim 800 \text{ pg/mL}$ 、約 $300 \text{ pg/mL} \sim 800 \text{ pg/mL}$ 、約 $200 \text{ pg/mL} \sim 500 \text{ pg/mL}$ 、または約 $300 \text{ pg/mL} \sim 500 \text{ pg/mL}$ のDPP-IVをさらに含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、約 $200 \text{ pg/mL} \sim 800 \text{ pg/mL}$ 、約 300 pg/mL

20

30

40

50

【 0 2 0 6 】

20

【 0 2 0 7 】

50

[illegible]

【 0 2 0 8 】

凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物のいくつかの実施形態では、VEGFのレベルは、セルピンE1のレベル

10

20

30

40

50

20

30

50

／mL未満、約50pg/mL未満、または約25pg/mL未満のPDGFを含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、PDGFを含まない。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、bFGFを含まない。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、PDGFを含まない。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、非常に低レベルのbFGF、PLGF、及びPDGFを含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、非常に低レベルのbFGFを含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、非常に低レベルのPLGFを含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、非常に低レベルのPDGFを含む。

10

【0210】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、アポリポタンパク質A1、補体因子D、C反応性タンパク質、シスタチンC、DKK-1、エンプリン、オステオポンチン、ビタミンDBP、MIF、RANTES、uPAR、IL-17a、GDF-15及び／またはIFN γ を含む。

20

【0211】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトームは、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される「より高い」レベルの少なくとも1つの因子をさらに含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、1ng/mL～400ng/mLの、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、1ng/mL～300ng/mLの、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、1ng/mL～200ng/mLの、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、1ng/mL～100ng/mLの、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、10ng/mL～400ng/mLの、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、10ng/mL～300ng/mLの、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／

30

40

50

[illegible]

50

50

[illegible]

態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、 $160\text{ ng/mL} \sim 400\text{ ng/mL}$ の、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンプスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、 $160\text{ ng/mL} \sim 300\text{ ng/mL}$ の、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンプスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、 $160\text{ ng/mL} \sim 200\text{ ng/mL}$ の、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンプスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、 $170\text{ ng/mL} \sim 400\text{ ng/mL}$ の、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンプスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、 $170\text{ ng/mL} \sim 300\text{ ng/mL}$ の、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンプスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、 $180\text{ ng/mL} \sim 400\text{ ng/mL}$ の、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンプスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、 $180\text{ ng/mL} \sim 300\text{ ng/mL}$ の、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンプスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、 $190\text{ ng/mL} \sim 400\text{ ng/mL}$ の、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンプスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、 $190\text{ ng/mL} \sim 300\text{ ng/mL}$ の、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンプスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、 $200\text{ ng/mL} \sim 400\text{ ng/mL}$ の、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンプスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子及

10
20
30
40
50

50

50

4 因子及びセルピン F 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の MSC セクレトーム組成物は、 $380 \text{ ng/mL} \sim 400 \text{ ng/mL}$ の、セルピン E 1、セルピン A 1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第 4 因子及びセルピン F 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の MSC セクレトーム組成物は、 $390 \text{ ng/mL} \sim 400 \text{ ng/mL}$ の、セルピン E 1、セルピン A 1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第 4 因子及びセルピン F 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥

10

用及び／または凍結乾燥後の MSC セクレトーム組成物は、 $10 \text{ ng/mL} \sim 90 \text{ ng/mL}$ の、セルピン E 1、セルピン A 1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第 4 因子及びセルピン F 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の MSC セクレトーム組成物は、 $10 \text{ ng/mL} \sim 80 \text{ ng/mL}$ の、セルピン E 1、セルピン A 1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第 4 因子及びセルピン F 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の MSC セクレトーム組成物は、 $20 \text{ ng/mL} \sim 100 \text{ ng/mL}$ の、セルピン E 1、セルピン A 1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第 4 因子及びセルピン F 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の MSC セクレトーム組成物は、 $30 \text{ ng/mL} \sim 100 \text{ ng/mL}$ の、セルピン E 1、セルピン A 1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第 4 因子及びセルピン F 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の MSC セクレトーム組成物は、 $40 \text{ ng/mL} \sim 100 \text{ ng/mL}$ の、セルピン E 1、セルピン A 1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第 4 因子及びセルピン F 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の MSC セクレトーム組成物は、 $50 \text{ ng/mL} \sim 100 \text{ ng/mL}$ の、セルピン E 1、セルピン A 1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第 4 因子及びセルピン F 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の MSC セクレトーム組成物は、 $10 \text{ ng/mL} \sim 70 \text{ ng/mL}$ の、セルピン E 1、セルピン A 1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第 4 因子及びセルピン F 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の MSC セクレトーム組成物は、 $10 \text{ ng/mL} \sim 60 \text{ ng/mL}$ の、セルピン E 1、セルピン A 1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第 4 因子及びセルピン F 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの因子を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の MSC セクレトーム組成物は、 $10 \text{ ng/mL} \sim 50 \text{ ng/mL}$ の、セルピン E 1、セルピン A 1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第 4 因子及びセルピン F 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの因子を含む。

20

30

40

【0212】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の MSC セクレトーム組成物は、

i. $0.3 \sim 4.5 \text{ ng/mL}$ の HGF と、

ii. $0.5 \sim 20 \text{ ng/mL}$ のペントラキシン-3 (TSG-14) と、

iii. $100 \sim 600 \text{ pg/mL}$ VEGF；

50

i v . 10 ~ 200 ng / mL の T I M P - 1 と、
v . 20 ~ 80 ng / mL の セルピン E 1 と、
v i . < 5 ng / mL の I L - 8 と、を含む。

【0213】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、

i . 1 . 5 ~ 3 . 5 ng / mL の H G F と、
i i . 5 ~ 15 ng / mL の ペントラキシン - 3 (T S G - 14) と、
i i i . 200 ~ 400 pg / mL の V E G F と、
i v . 50 ~ 200 ng / mL の T I M P - 1 と、
v . 30 ~ 70 ng / mL の セルピン E 1 と、
v i . < 3 ng / mL の I L - 8 と、を含む。

10

【0214】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、

i . 1 . 5 ~ 2 . 5 ng / mL の H G F と、
i i . 8 ~ 12 ng / mL の ペントラキシン - 3 (T S G - 14) と、
i i i . 250 ~ 350 pg / mL の V E G F と、
i v . 70 ~ 110 ng / mL の T I M P - 1 と、
v . 30 ~ 70 ng / mL の セルピン E 1 と、
v i . < 2 ng / mL の I L - 8 と、を含む。

20

【0215】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、

i . 2 . 0 + / - 0 . 3 ng / mL の H G F と、
i i . 9 . 8 + / - 0 . 5 ng / mL の ペントラキシン - 3 (T S G - 14) ;
i i i . 304 + / - 44 pg / mL の V E G F と、
i v . 90 + / - 20 ng / mL の T I M P - 1 と、
v . 49 . 2 + / - 10 ng / mL の セルピン E 1 と、
v i . < 1 ng / mL の I L - 8 と、を含む。

30

【0216】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、約 pH 4 . 5 ~ 約 pH 8 の pH で配合される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、約 pH 4 . 7 ~ 約 pH 7 . 8 の pH で配合される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、約 pH 5 . 0 ~ 約 pH 7 . 5 の pH で配合される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、約 pH 5 . 5 ~ 約 pH 7 . 5 の pH で配合される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、約 pH 6 ~ 約 pH 7 . 5 の pH で配合される。

40

【0217】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、約 pH 4 . 5、約 pH 5 . 0、約 pH 5 . 5、約 pH 6 . 0、約 pH 6 . 5、約 pH 7 . 0、約 pH 7 . 4、約 pH 8 . 0 の pH で配合される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、約 pH 4 . 5、4 . 6、4 . 7、4 . 8、4 . 9、5 . 0、5 . 1、5 . 2、5 . 3、5 . 4、5 . 5、5 . 6、5 . 7、5 . 8、5 . 9、6 . 0、6 . 1、6 . 2、6 . 3、6 . 4、6 . 5、6 . 6、6 . 7、6 . 8、6 . 9、7 . 0、7 . 1、7 . 2、7 . 3、7 . 4、7 . 5、7 . 6、7 . 7、7 . 8、7 . 9、または 8 . 0 の pH で配合される。

【0218】

50

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、特定の成分を含まない。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、細胞培地に見られる特定の成分を含まない。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、生体異物成分（例えば、動物血清）；フェノールレッド；ペプチド及び生体分子＜3 kDa；抗生物質；タンパク質凝集体（例えば、タンパク質凝集体＞200 nm）；細胞；細胞破片（細胞破片にはエクソソーム／細胞外小胞（EV）は含まれない；例えば、非エクソソーム、非EV細胞破片）；ホルモン（例えば、ホルモンにはインスリン及び／またはヒドロコルチゾンが含まれるが、これらに限定されない）；及び／またはL-グルタミンからなる群から選択される1つ以上の成分を含まない。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、生体異物成分を含まない。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物はフェノールレッドを含まない。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、3 kDa未満のペプチド及び生体分子を含まない。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は抗生物質を含まない。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、タンパク質凝集体（例えば、200 nmを超えるタンパク質凝集体）を含まない。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は細胞を含まない。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、細胞破片を含まない（細胞破片は、エクソソーム／EVを含まない；例えば、非エクソソーム、非EV細胞破片）。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、ホルモンを含まない（例えば、ホルモンは、インスリン及び／またはヒドロコルチゾンを含むが、これらに限定されない）。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、L-グルタミンを含まない。

10

20

【0219】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、マンニトール、ラクトース、ソルビトール、キシリトール、スクロース、トレハロース、マンノース、マルトース、ラクトース、グルコース、ラフィノース、セロビオース、ゲンチオビオース、イソマルトース、アラビノース、グルコサミン、フルクトース、デキストロース、及び／またはそれらの組み合わせをさらに含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、リン酸塩をさらに含む。いくつかの実施形態では、リン酸塩源は、リン酸ナトリウムまたはリン酸カリウムである。いくつかの実施形態では、リン酸塩源はリン酸ナトリウムである。いくつかの実施形態では、リン酸塩源はリン酸カリウムである。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、モノリン酸ナトリウム／ジリン酸ナトリウム、マンニトール、及びトレハロースをさらに含み、組成物は、約pH 7.4のpHを有する。

30

【0220】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、グリシン、グリセロール、塩化ナトリウム、塩化カリウム、及び／またはデキストロースを含むがこれらに限定されない1つ以上の追加の薬剤を含むことができる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、グリシン、グリセロール、塩化ナトリウム、塩化カリウム、及びデキストロースからなる群から選択される1つ以上の追加の薬剤を含むことができる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、グリシン及びグリセロール、ならびにデキストロースからなる群から選択される1つ以上の追加の薬剤を含むことができる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、塩化ナトリウム及び塩化カリウムからなる群から選択される1つ以上の追加の薬剤を含むことができる。

40

【0221】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組

50

成物は、緩衝系において配合される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、リン酸二／一ナトリウム、クエン酸ナトリウム／クエン酸、クエン酸／クエン酸ナトリウム、ホウ酸／四ホウ酸ナトリウム、及び／またはクエン酸／リン酸二ナトリウムを含むがこれらに限定されない緩衝系で配合される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、リン酸二／一ナトリウム、クエン酸ナトリウム／クエン酸、ホウ酸／クエン酸ナトリウム、ホウ酸／四ホウ酸ナトリウム、及び／またはクエン酸／リン酸二ナトリウムからなる群から選択される緩衝系において配合される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、リン酸二／一ナトリウム緩衝液系で配合される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、クエン酸ナトリウム／クエン酸緩衝液系で配合される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、ホウ酸／クエン酸ナトリウム緩衝系で配合される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、ホウ酸／四ホウ酸ナトリウム緩衝系で配合される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、クエン酸／リン酸二ナトリウム緩衝液系で配合される。

10

【0222】

いくつかの実施形態では、リン酸塩源は、リン酸ナトリウムまたはリン酸カリウムである。いくつかの実施形態では、リン酸塩源はリン酸ナトリウムである。いくつかの実施形態では、リン酸塩源はリン酸カリウムである。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、リン酸二ナトリウム／クエン酸、マンニトール、及びトレハロースを含み、組成物は、約pH6.4のpHを有する。

20

【0223】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、張性調整剤または張性改変剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、張性調整剤または張性改変剤は、NaCl、KCl、マンニトール、デキストロース、スクロース、ソルビトール、及び／またはグリセリンを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、張性調整剤または張性改変剤は、NaCl、KCl、マンニトール、デキストロース、スクロース、ソルビトール、及び／またはグリセリンからなる群から選択される。

30

【0224】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、接着剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、ヒプロメロース、ポロキサマー407、ポロキサマー188、ポロキサマー237、ポロキサマー338、ヒプロメロース（HPMC）、HEC、ポリカルボフィル、ポリビニルピロリドン（PVP）、PVA（ポリビニルアルコール）、ポリイミド、ヒアルロン酸ナトリウム、ジェランガム、ポリ（乳酸-コグリコール酸）（PLGA）、ポリシロキサン、ポリイミド、カルボキシメチルセルロース（CMC）、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、フィブリン接着剤、ポリエチレングリコール、及びGelCOREを含むが、これらに限定されない接着剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、接着剤はヒプロメロースである。いくつかの実施形態では、接着剤はフィブリン接着剤である。いくつかの実施形態では、接着剤はポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態では、接着剤はGelCOREである（Sani, et al., Science Advances, Vol. 5, no. 3 (2019)を参照）。

40

【0225】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、（a）本明細書に記載の方法のいずれか1つによって生成されるMSCセクレトームを含む処理された馴化培地、及び（b）ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、

50

凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、本明細書に記載されるように生成されるMSCセクレトームを含む馴化培地及びポリマーを含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、本明細書に記載されるように生成されるMSCセクレトームを含む処理された馴化培地及びポリマーを含む。いくつかの実施形態では、ポリマーは、MSCセクレトーム及び／または処理されたMSCセクレトーム成分が放出され得る生分解性ポリマーであり得る。いくつかの実施形態では、ポリマーは、MSCセクレトーム成分の持続的（遅い）放出を可能にする。

【0226】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、治療用包帯の形態である（例えば、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物を含浸させたポリマー）。治療用包帯は、用途に応じて、必要に応じて構成することができる。いくつかの実施形態では、包帯は、形態またはパッチであるか、またはメッシュとして構成される。

【0227】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、生体浸透度、例えば、眼への浸透、角膜への浸透、及び／または角膜への浸透を示す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、眼によって吸収される能力を示す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、固有の生体浸透度を示す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、賦形剤対応の生体浸透度を示す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、より小さな因子のアップレギュレーションによる生体浸透度を示す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、生物保存剤の存在による生体浸透度を示す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、生物保存性塩化ベンザルコニウムの存在による生物浸透度を示す。

【0228】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、他の治療と比較して、長い半減期を示す、及び／または増加した安定性を有する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、MSCセクレトームの安定性の増加を可能にするタンパク質のアップレギュレーションを可能にする。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、シャペロンタンパク質をアップレギュレートして、MSCセクレトーム内の他のタンパク質の安定性を改善することを可能にする。

【0229】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、それを必要とする対象に投与された場合、超効力を示す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、1日1滴または1回の投与で治療効果を可能にする。

【0230】

C. 生産／製造の方法

本発明によれば、馴化培地（したがって、間葉系幹細胞分泌因子）は、治療される患者または個体（それを必要とする患者）または別の（ドナー）個体から得られた間葉系幹細胞、すなわち若いかつ／または健康なドナー及び／または商業的に得られた間葉系幹細胞から得ることができる。例えば、治療される個体（自家幹細胞）またはドナー（同種異系幹細胞）から得られたMSCを使用して、本明細書に記載の馴化培地を生成することができ、その後、記載されるように凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物にさらに処理することができる。いくつかの実施形態では、MSCはまた、商業的

10

20

30

40

50

供給者から入手することができる。いくつかの実施形態では、商業的に得られたMSCは、MSCセクレトーム生産において使用され得る。

【0231】

本発明によれば、抗血管新生間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物を作製する方法は、

- i. 最初の培地で間葉系幹細胞（MSC）を培養することと、
- ii. ステップ（i）からの最初の培地をMSCから取り除くことと、
- iii. ステップ（ii）のMSCを洗浄することと、
- iv. 2番目の培地を追加し、約1～5日間培養することと、
- v. ステップ（iv）からの第2の培地を馴化培地として収穫することと、
- vi. ステップ（v）の馴化培地を本明細書に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物に処理することと、を含む。

10

【0232】

いくつかの実施形態では、培養は、細胞を培養するためのバイオリアクターシステムを使用して実施することができる。いくつかの実施形態では、培養は、幹細胞を培養するためのバイオリアクターシステムを使用して実施することができる。いくつかの実施形態では、培養は、間葉系幹細胞を培養するためのバイオリアクターシステムを使用して実施することができる。いくつかの実施形態では、培養は、培地混合技術を使用して実施することができる。いくつかの実施形態では、培養は、PBS Vertical Wheel（商標）混合技術を使用して実施することができる。

20

【0233】

いくつかの実施形態では、ステップ（iv）において、ステップ（v）の馴化培地をセクレトーム組成物に処理することは、

- a) ステップ（v）から採取した馴化培地を濾過して細胞粒子を除去することと、
 - b) ステップ（a）からの濾過された馴化培地を濃縮することと、
 - c) 製剤緩衝液と緩衝液交換することと、
 - d) ステップviのMSCセクレトーム組成物を凍結乾燥することと、
- を含む。

【0234】

いくつかの実施形態では、ステップc)は、リン酸二／一ナトリウム、クエン酸ナトリウム／クエン酸、ホウ酸／クエン酸ナトリウム、ホウ酸／四ホウ酸ナトリウム、及びクエン酸／リン酸二ナトリウムからなる群から選択される緩衝系と緩衝液交換することを含む。

30

【0235】

いくつかの実施形態では、濾過ステップ（a）は、0.45 μmフィルター、0.22 μmフィルター、0.8 μmフィルター、及び0.65ミクロン、低タンパク質結合PVDF膜、及び／またはPES（ポリエーテルスルホン）の使用を含む。いくつかの実施形態では、濾過ステップ（a）は、0.45 μmのフィルターの使用を含む。いくつかの実施形態では、濾過ステップ（a）は、0.22 μmフィルターの使用を含む。いくつかの実施形態では、濾過ステップ（a）は、0.8 μmフィルターの使用を含む。いくつかの実施形態では、フィルタリングステップ（a）は、0.65ミクロンの使用を含む。いくつかの実施形態では、濾過ステップ（a）は、低タンパク質結合PVDF膜の使用を含む。いくつかの実施形態では、濾過工程（a）は、PES（ポリエーテルスルホン）の使用を含む。

40

【0236】

いくつかの実施形態では、濃縮ステップ（b）は、中空繊維フィルター、接線流濾過システム、または遠心分離ベースのサイズ排除技術を使用することを含む。いくつかの実施形態では、濃縮ステップ（b）は、中空繊維フィルター技術を使用することを含む。いくつかの実施形態では、濃縮ステップ（b）は、タンジェンシャルフロー濾過システムを使用することを含む。いくつかの実施形態では、濃縮ステップ（b）は、遠心分離ベースの

50

サイズ排除技術を使用することを含む。

【0237】

いくつかの実施形態では、遠心分離ベースのサイズ排除技術は、3～10 kDaのMWカットオフを使用する。いくつかの実施形態では、遠心分離ベースのサイズ排除技術は、少なくとも3 kDa MWカットオフ、少なくとも4 kDa MWカットオフ、少なくとも5 kDa MWカットオフ、少なくとも6 kDa MWカットオフ、少なくとも7 kDa MWカットオフ、少なくとも8 kDa MWカットオフ、少なくとも9 kDa MWカットオフ、少なくとも10 kDa MWカットオフ、少なくとも11 kDa MWカットオフ、少なくとも12 kDa MWカットオフ、少なくとも13 kDa MWカットオフ、少なくとも14 kDa MWカットオフ、少なくとも15 kDa MWカットオフ、少なくとも16 kDa MWカットオフ、少なくとも17 kDa MWカットオフ、少なくとも18 kDa MWカットオフ、少なくとも19 kDa MWカットオフ、少なくとも20 kDa MWカットオフ、少なくとも21 kDa MWカットオフ、少なくとも22 kDa MWカットオフ、少なくとも23 kDa MWカットオフ、少なくとも24 kDa MWカットオフ、少なくとも25 kDa MWカットオフ、少なくとも26 kDa MWカットオフ、少なくとも27 kDa MWカットオフ、少なくとも28 kDa MWカットオフ、少なくとも29 kDa MWカットオフ、及び／または少なくとも30 kDa MWカットオフを使用する。

10

【0238】

いくつかの実施形態では、本方法は、本明細書で上記に記載されるような凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物及び／または製剤を生成する。いくつかの実施形態では、第1及び／または第2の培養培地は、MSC培地及び／またはMSC-XFである。

20

【0239】

MSC、またはMSCから分化した細胞は、例えば、本明細書に記載の所望のサイトカイン及び／または所望の治療特性を含む、所望のセクレトームを含む馴化培地を生成するように作製することができる。例えば、セクレトームは、スーパードナー細胞株のMSCから産生することができる。セクレトームは、商業的に入手したMSCからも産生することができる。来たる実施形態では、同種異系MSC（及び／またはそれに由来する細胞）及び／または同種異系MSC由来のセクレトーム組成物は、個体の大きなグループのために調製及び保存され得る。同種異系MSC（及び／またはそれに由来する細胞）及び／またはMSC由来のセクレトーム組成物は、人々がそれらを必要とするときに準備ができるように、事前に作製することができる。特定の実施形態では、MSC（及び／またはそれに由来する細胞）及び／またはMSC由来のセクレトーム組成物を処理して、より濃縮された溶液または組成物（例えば、本明細書に記載の凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の間葉系幹細胞由来のセクレトーム組成物またはMSCセクレトーム組成物）を製造することができる。

30

【0240】

いくつかの実施形態では、最初の培養培地及び第1の培養培地は異なる。いくつかの実施形態では、最初の培地及び第1の培地は同じである。本発明によるMSCセクレトームを含む馴化培地を産生するためにMSCを培養するのに有用な細胞培養培地または培地の非限定的な例には、hMSC Media Booster XFM、hMSC High Performance Basal Media、Minimum Essential Medium Eagle (MEME)、ADC-1、LPM (Bovine Serum Albumin非含有)、F10 (HAM)、F12 (HAM)、DCCM1、DCCM2、RPMI1640、BGJ Medium (Fittion-Jackson Modification有り及び無し)、StemPro、MSCGro、MesenCult、NutriStem、Basal Medium Eagle (BME-Eagle's salt baseの追加有り)、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-血清有りまたは無し)、Yamane、IMEM-20、Glasgow Modification Eagle Medium (GMEM

40

50

)、Leibovitz L-15 Medium、McCoy's 5A Medium、Medium M199 (M199E-Earle's salt base 有り)、Medium M199 (M199H-Hank's salt base 有り)、Minimum Essential Medium Alpha (MEM-アルファ)、Minimum Essential Medium Eagle (MEM-E-Earle's salt base 有り)、Minimum Essential Medium Eagle (MEM-H-Hank's salt base 有り) 及び Minimum Essential Medium Eagle (MEM-NAA 欠アミノ酸 有り) が挙げられるが、とりわけ、培地 199、CMRL1415、CMRL1969、CMRL1066、NCTC135、MB75261、MAB8713、DM145、Williams' G、Neuman & Tytell、Higuchi、MCDB301、MCDB202、MCDB501、MCDB401、MCDB411、MDBC153 が挙げられる。本発明で使用するための好ましい媒体は、MEM-アルファである。これら及びその他の有用な培地は、とりわけ GIBCO (Grand Island, N. Y., USA) 及び Biological Industries (Bet HaEmek, Israel) から入手することができる。これらの培地の多くは、Enzymology, Volume LVIII, "Cell Culture", pp. 6272, edited by William B. Jakoby and Ira H. Pastan, published by Academic Press, Inc. に要約されている。

10

20

30

40

50

【0241】

いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞のための細胞培養培地は、無血清培地であり得る。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞のための細胞培養培地は、血清で補充され得る。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞のための細胞培養培地は、補充されたヒト血小板溶解物であり得る。いくつかの実施形態では、血清は、ウシ胎児血清 (FBS) を含む得る。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞のための細胞培養培地は、ウシまたは他の種の胎児血清などの血清を補充することができる。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞のための細胞培養培地は、細胞増殖を促進し、及び／または細胞の健康を促進するために、メルカプトエタノール及び／または抗生物質などの他の成分で補充することができる。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞のための細胞培養培地は、抗生物質が補充されていない。

【0242】

いくつかの実施形態では、酸素の割合は、細胞増殖を促進し、かつ／または細胞の健康を促進するために変動する。いくつかの実施形態では、酸素は、細胞増殖を促進し、かつ／または細胞の健康を促進するために、5%、10%、15%、20%、または25%の量である。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞は、細胞増殖を促進し、及び／または細胞の健康を促進するために、部分酸素圧下で増殖される。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞は、細胞増殖を促進し、及び／または細胞の健康を促進するために、低酸素分圧環境下で増殖される。

【0243】

一態様では、本発明は、間葉系幹細胞によって分泌される生物学的因子を含む馴化培地 (CM) を対象とし、MSC セクレトームを含む馴化培地と呼ぶことができる。馴化培地は、本明細書に記載のように、培地中で間葉系幹細胞を培養し、間葉系幹細胞及びそれらの分泌された間葉系幹細胞産物 (生物学的因子及び／またはセクレトームと呼ばれる) を含む得られた培地を、馴化培地で増殖したセクレトーム及び間葉系幹細胞を含有する馴化培地の成分部分に分離することによって得ることができる。分離された馴化培地は、間葉系幹細胞セクレトームを含み、本明細書に記載の方法に従ってさらに処理及び／または使用することができる。間葉系幹細胞を実質的に含まない (少量の幹細胞及び／または微量の幹細胞を含む得る) または間葉系幹細胞を含まない。MSC セクレトームは、ホルモン、サイトカイン、細胞外マトリックス、タンパク質、小胞、抗体、ケモカイン、受容体、抑制剤、顆粒など、さまざまな生物学的因子で構成されている。本明細書に記載されるよう

に、MSCセクレトームを含む馴化培地または複数の培地（CMまたはMSCセクレトームを含む馴化培地）をさらに処理して、濃縮された馴化培地（pCMまたは濃縮MSCセクレトーム）を生成することができる。

【0244】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームまたは濃縮MSCセクレトームを含む馴化培地は、間葉系幹細胞が培養された培養培地に代わって、培養培地中で間葉系幹細胞を培養することによって生成される。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームを含む得られた馴化培地は、収穫（回収）され、次いで、濃縮されたMSCセクレトームを生成するために処理される。特定の実施形態では、MSCセクレトームを含む収穫された馴化培地の処理は、培地のいくつか、ほとんど、または本質的にすべての除去、または馴化培地の選択された成分のいくつか、ほとんど、または本質的にすべての除去を含む。

10

【0245】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームを含む収穫された馴化培地は、濃縮されたMSCセクレトームを産生するために濾過される。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームを含む収穫された馴化培地は、濃縮されたMSCセクレトームを産生するために限外濾過される。

【0246】

一態様では、本明細書で提供されるのは、処理された馴化培地を生成する方法であり、本方法は、（a）細胞培養培地中で幹細胞を培養し、それにより間葉系幹細胞によって分泌される因子を含む馴化培地（例えば、間葉系幹細胞セクレトームを含む馴化培地）を生成することと、（b）馴化培地を収穫し、それによって収穫された馴化培地（例えば、収穫された間葉系幹細胞セクレトーム）を生成することと、（c）収穫された馴化培地（例えば、収穫された間葉系幹細胞セクレトーム）を濾過して、処理された馴化培地（間葉系幹細胞セクレトーム）を生成することと、を含む。いくつかの実施形態では、（a）の幹細胞は、成長因子を含まない培地で培養される前に、増殖培地で培養される（培養されている）。したがって、いくつかの実施形態では、方法は、（a）第1の増殖培地中で間葉系幹細胞を培養することと、（b）第1の増殖培地を第2の増殖培地と交換し、第2の増殖培地で幹細胞を培養し、それにより間葉系幹細胞セクレトームを含む馴化培地を生成することと、（c）間葉系幹細胞セクレトームを含む馴化培地を収穫し、それによって間葉系幹細胞セクレトームを含む収穫された馴化培地を生成することと、（d）収穫された馴化培地を濾過して、間葉系幹細胞セクレトームを含む処理された馴化培地を生成することと、を含む。

20

30

【0247】

いくつかの実施形態では、幹細胞は間葉系幹細胞である。間葉系幹細胞（MSC）は、骨髄や脂肪組織を含むさまざまな成人組織から単離された（由来する）多能性（全てではないが、複数の細胞系譜に分化することができる）非造血性（非血液）幹細胞である。特定の実施形態では、間葉系幹細胞は、骨髄から単離される。「分離される」とは、元の環境から移転された細胞を指す。MSCは、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞などの中胚葉系細胞に分化し得る。MSCは細胞プロセスがほとんどない長くて薄い小さな細胞体を有する。細胞体は、核小体が目立つ大きな丸い核を含み、それは細かく分散したクロマチン粒子に囲まれており、核に明確な外観を与えている。細胞体の残りの部分には、少量のゴルジ装置、粗面小胞体、ミトコンドリア、及びポリソームが含まれている。長くて薄い細胞は広く分散しており、隣接する細胞外マトリックスにはいくつかの網状フィブリルが存在するが、他のタイプのコラーゲンフィブリルがない [Brighton, et al. 1991 The Journal of Bone and Joint Surgery 73 (6): 832-47]。本明細書に記載のMSCは、以下の分子マーカー（細胞または細胞型の前駆質膜に特徴的なタンパク質分子）プロファイルを発現し得る：骨形態形成タンパク質受容体「1」（BMPR⁺）；CD34⁺Scal⁺；Lin⁻；CD44⁺；c-kit⁺；Scal⁺；Thy-1⁺；NOTCH3；JAG1；ITGA11。MSCは、他の細胞型特異的マーカーを発現する（stemcells.nih.gov

40

50

v; Kaltz, et al. 2010 Exp Cell Res Oct 1; 316 (16): 2609-17、参照により本明細書に組み込まれる)。本明細書に記載のMSCは、MSCの多能性分化能(MSCがどの細胞型に生じるか)を検出するためのコロニー形成単位アッセイに基づいて同定することができる。ただし、ある程度分化した細胞(前駆細胞)も使用することができる。

【0248】

i. MSCセクレトーム処理

本明細書に記載のMSCセクレトームを含む馴化培地は、いくつかの実施形態では、細胞粒子及び／または他の有害な成分を除去するために収集及び濾過及び／または精製することができる。例えば、上記のステップ(v)で説明したように、ステップ(iv)から第2の培養培地を馴化培地として収穫する。本明細書で使用される濾過膜は、細胞粒子及び／または他の有害な成分を通過させながら、所望のMSCセクレトーム成分を保持することができるように、適切な膜及び構成を有する当技術分野で知られているもののいずれかから選択され得る。したがって、有害な成分が除去のために通過することを可能にしながら、選択された流体力学的条件下で細胞の保持を可能にする任意の適切な膜を使用することができる。いくつかの実施形態では、約5ミクロンの細孔サイズの上限及び約0.1ミクロンの下限が適切であろう。いくつかの実施形態では、濾過は、ミクロ細孔フィルターを使用して実施することができる。いくつかの実施形態では、濾過は、0.5 μm ～0.2 μm のフィルターを使用して実施することができる。いくつかの実施形態では、濾過は、0.5 μm 、0.45 μm 、0.4 μm 、0.35 μm 、0.3 μm 、0.25 μm 、0.22 μm 及び／または0.2 μm フィルターを使用して実施することができる。いくつかの実施形態では、濾過は、0.45 μm のフィルターを使用して実施することができる。いくつかの実施形態では、濾過は、0.22 μm フィルターを使用して実施することができる。いくつかの実施形態では、濾過／精製は、低タンパク質結合ポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜を使用して実施することができる。いくつかの実施形態では、濾過／精製は、ポリエーテルスルホン(PES)を使用して実施することができる。

【0249】

いくつかの実施形態では、濾過は限外濾過による。いくつかの実施形態では、馴化培地は、3 kDのフィルターサイズを使用して濾過される(フィルターサイズよりも大きい分子の処理された馴化培地における精製、脱塩、及び濃縮を達成するため)。いくつかの実施形態では、3 kD未満のフィルターサイズが馴化培地を濾過するために使用され、他の実施形態では、処理された馴化培地が使用される用途に応じて、3 kDを超えるフィルターサイズが使用される。他の実施形態では、収穫された馴化培地の限外濾過は、得られるMSCセクレトームを含む処理された馴化培地の成分のサイズを決定するために選択された異なる細孔サイズ(例えば、2 kD、2 kD未満または2 kD超)のフィルターを使用して実施される。

【0250】

いくつかの実施形態では、成長支持培地中の有害な成分は、培地交換によって、好ましくは「クロスフロー濾過」を介して除去される。クロスフロー濾過とは、MSCセクレトーム細胞の懸濁液が、細胞以外の懸濁液の成分を透過するフィルターと実質的に平行に流れる濾過モードを指す。クロスフロー濾過プロセスは、 Re = レイノルズ数、 γ_w = 壁せん断速度、 ΔP = 圧力損失、 TMP = 膜貫通圧力を含む一連の流体力学パラメータによって特徴付けられる。 Re 、 γ_w 、及び ΔP は、濾過システムの構造、流れの状態、及び流体の特性に依存する。そのようなクロスフロープロセスは、いくつかの実施形態では、中空繊維濾過システムも含むことができる。例えば、米国特許第5053334を参照されたく、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0251】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、濾過の非存在下及び／または濾過後にさらに濃縮される可能性がある。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、中空繊維接線流技術を使用して濃縮することができ、または

【0252】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、遠心分離ベースのサイズ排除技術を使用して濃縮することができ、例えば、アミコン及び／またはセントリコンを、濃縮ステップ中に使用することができる。いくつかの実施形態では、サイズカットオフは、3～10 kDaのMWカットオフである。いくつかの実施形態では、遠心分離ベースのサイズ排除技術濃縮法中に使用するための分子量カットオフは、少なくとも約3 kDa、少なくとも約4 kDa、少なくとも約5 kDa、少なくとも約6 kDa、少なくとも約7 kDa、少なくとも約8 kDa、少なくとも約9 kDa、または少なくとも約10 kDaである。

【0253】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、約5倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約30倍、約35倍、約40倍、約45倍、約50倍、約55倍、約60倍、約65倍、約70倍、約75倍、約80倍、約85倍、約90倍、約95倍、または約100倍に濃縮される。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、濃縮前の馴化培地と比較して、約5倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約30倍、約35倍、約40倍、約45倍、約50倍、約55倍、約60倍、約65倍、約70倍、約75倍、約80倍、約85倍、約90倍、95倍、または約100倍に濃縮される。

【0254】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、濃縮ステップの後に、最終製剤緩衝液にさらに緩衝液交換される。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、濃縮（centration）ステップの後に、接着剤なしで最終製剤緩衝液にさらに緩衝液交換される。いくつかの実施形態では、緩衝液交換は、MSCセクレトームの緩衝液成分を変更することを含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、緩衝液交換ステップ中に希釈されない。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、緩衝液交換ステップ中に、1%未満、5%未満、10%未満、15%未満、20%未満、または25%未満に希釈される。

【0255】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、微量の培養培地成分のすべてが除去されるように、濃縮ステップの後に緩衝液交換される。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、または約1%未満、または約0%の培養培地成分が残っているように、濃縮ステップ後に緩衝液交換される。

【0256】

i i . MSCセクレトーム－配合

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、約2 µg～20 µg/mLのMSCセクレトームを含む配合で調製される。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、0.004%～0.0375%/1 mLのMSCセクレトームを含む配合で調製される。

【0257】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、約2 µg～8 µg/mLのMSCセクレトームを含む配合で調製される。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、0.008%～0.015%/mLのMSCセクレトームを含む配合で調製される。

【0258】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、2 mg～3 mg/mLの一塩基性リン酸ナトリウムを含む配合で調製される。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、4%～5%/mLの一塩基性リン酸ナトリウムを含む配合で調製される。

【0259】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、11 mg～12 mg/mLの二塩基性リン酸ナトリウムを含む配合物で調製される。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、21.5%～23%/mLの二塩基性リン酸ナトリウムを含む配合で調製される。

10

20

30

40

50

【0260】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、11.5mg～13mg/mLのマニトールを含む配合で調製される。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、23%～25%/mLのマニトールを含む配合で調製される。

【0261】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、23mg～25mg/mLのトレハロース二水和物を含む配合で調製される。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、46%～48%/mLのトレハロース二水和物を含む配合で調製される。

【0262】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、ヒプロメロースを含まない背後で調製される。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、必要に応じてヒプロメロースを含む配合で調製される。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、0.5mg～2mg/mLのヒプロメロースを含む配合で調製される。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、1%～3%/mLのヒプロメロースを含む配合で調製される。

【0263】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、塩酸及び／または水酸化ナトリウムを含む配合で調製される。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、塩酸を含む配合で調製される。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、水酸化ナトリウムを含む配合で調製される。いくつかの実施形態では、塩酸及び／または水酸化ナトリウムは、所望のpHを得るために使用される。

【0264】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、以下の表1に提供されるような成分を含む配合で調製される。

【表1】

表1：MSCセクレトーム配合の実施形態。

存在する構成要素	製品1mLあたりの量	1mLあたりの存在率(%)
MSCセクレトーム	0.006mg (6μg)	0.012
一塩基性リン酸ナトリウム	2.28mg	4.5
二塩基性リン酸ナトリウム	11.45mg	22.4
マニトール	12.2mg	24.0
トレハロース二水和物	24mg	47.1
ヒプロメロース	1mg	2.0
塩酸及び／または水酸化ナトリウム	必要に応じて調整する	必要に応じて調整する
総量	50.936mg	100%

【0265】

i i i. MSCセクレトームの凍結乾燥－配合

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、抗酸化賦形剤をさらに含む。

【0266】

いくつかの実施形態では、抗酸化賦形剤は、アスコルビン酸、クエン酸、アセチルシステイン、システイン、メチオニン、亜硫酸塩（亜硫酸水素塩、メタ重亜硫酸塩）、モノチオグリセロール、グルタチオン、トコフェロールアルファ、及び没食子酸プロピルからなる群から選択される。

【0267】

いくつかの実施形態では、抗酸化賦形剤は、配合時及び／または凍結乾燥前にMSCセクレトーム組成物に添加される。

【0268】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥組成物は、MSCセクレトーム組成物を瞬間凍結（ -80°C で実施）または凍結し、MSCセクレトーム組成物を凍結乾燥することによって得られる。

【0269】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物中に、凍結乾燥前のMSCセクレトーム組成物中の因子の少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、または少なくとも90%が存在する。

【0270】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、凍結乾燥前のMSCセクレトーム組成物と比較して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、または少なくとも90%の生物活性を示す。

【0271】

いくつかの実施形態では、再構成凍結乾燥MSCセクレトーム組成物は、抗酸化賦形剤をさらに含む。

【0272】

いくつかの実施形態では、抗酸化賦形剤は、アスコルビン酸、クエン酸、アセチルシステイン、システイン、メチオニン、亜硫酸塩（亜硫酸水素塩、メタ重亜硫酸塩）、モノチオグリセロール、グルタチオン、トコフェロールアルファ、及び没食子酸プロピルからなる群から選択される。

【0273】

いくつかの実施形態では、抗酸化賦形剤は、配合時及び／または凍結乾燥前に再構成凍結乾燥MSCセクレトーム組成物に添加される。

【0274】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥組成物は、再構成MSCセクレトーム組成物を瞬間凍結（ -80°C で実施）するか、または凍結し、再構成MSCセクレトーム組成物を凍結乾燥することによって得られる。

【0275】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥後の再構成MSCセクレトーム組成物中に、凍結乾燥前の再構成MSCセクレトーム組成物中の因子の少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、または少なくとも90%が存在する。

【0276】

凍結乾燥後の前記再構成MSCセクレトーム組成物が、凍結乾燥前の前記再構成MSCセクレトーム組成物と比較して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、または少なくとも90%の生物活性を有する、請求項146～150のいずれか一項に記載の治療方法。

【0277】

D. アッセイ方法／治療特性

本発明のいくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、特定の成分比／濃度ならびにMSCセクレトームの特性を達成するために処理される。

【0278】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、抗血管新生因子対血管新生促進因子を >1 の比の値で含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、抗血管新生因子対血管新生促進因子を、 >2 、 >3 、 >4 、または >5 の比の値で含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、（凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物が生成される馴化培地中の血

10

20

30

40

50

管新生促進因子の濃度と比較して)増加した血管新生促進因子の濃度を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、VEGFのレベルを超えるいくつかの抗血管新生因子の合計を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、VEGFに対する2つ以上の抗血管新生因子の比の値が >2 、 >3 、 >4 、または >5 であるようないくつかの抗血管新生因子の合計を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、1つ以上の抗血管新生因子を含み、VEGFの濃度に対する1つ以上の抗血管新生因子の濃度の合計は、 >2 、 >3 、 >4 、または >5 である。いくつかの実施形態では、血管新生促進因子には、セルピンE1からVEGF-Aが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、血管新生促進因子はセルピンE1である。いくつかの実施形態では、血管新生促進因子は、VEGF-Aである。

10

【0279】

本発明のいくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、特定の効力性能基準を達成するために処理される。いくつかの実施形態では、緩衝液交換ステップは、強力なMSCセクレトームの取得を促進する。

【0280】

細胞外小胞は、上記の可溶性及び不溶性物質の積荷を運ぶ膜結合粒子である。「細胞外小胞」という用語は、様々な種の分泌または脱落した小胞のグループを指す。これらは一般に次のサブタイプに分類される：1)通常50~1500nmのサイズ範囲を示す微小小胞またはShed微小小胞、2)通常30~120nmのサイズ範囲を示すエクソソーム、3)典型的には500nm未満(すなわち、 <500 nm)のサイズ範囲を示す小胞。(例えば、WO2019016799を参照されたく、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは粒子計数のために及び／またはセクレトームに存在する細胞外小胞(EV)を定量するために分析することができる。

20

【0281】

いくつかの実施形態では、EVは、約 $2.5 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $2.6 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $2.7 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $2.8 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $2.9 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.1 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.2 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.3 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.4 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.5 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.6 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.7 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.8 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.9 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.1 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.2 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.3 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.4 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.5 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.6 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.7 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.8 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.9 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、または約 $5.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$ の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、EVは、約 $3.8 \times 10^5 / \mu\text{L} + / - 0.8 \times 10^5$ の濃度で存在する。

30

【0282】

いくつかの実施形態では、EVは、約 $2.5 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $2.6 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $2.7 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $2.8 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $2.9 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.1 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.2 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.3 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.4 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.5 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.6 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.7 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.8 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.9 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.1 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.2 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.3 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.4 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.5 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.6 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.7 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.8 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.9 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、または約 $5.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$ の濃度で存在し、直径は平均110~120nmである。いくつかの実施形態では、EVは、約 $2.5 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $2.6 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $2.7 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $2.8 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $2.9 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.1 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.2 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.3 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.4 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.5 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.6 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.7 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.8 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $3.9 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.1 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.2 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.3 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.4 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.5 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.6 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.7 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.8 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、 $4.9 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 、または約 $5.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$ の濃度で存在する。

40

50

／uL、 3.4×10^5 ／uL、 3.5×10^5 ／uL、 3.6×10^5 ／uL、 3.7×10^5 ／uL、 3.8×10^5 ／uL、 3.9×10^5 ／uL、 4.0×10^5 ／uL、 4.1×10^5 ／uL、 4.2×10^5 ／uL、 4.3×10^5 ／uL、 4.4×10^5 ／uL、 4.5×10^5 ／uL、 4.6×10^5 ／uL、 4.7×10^5 ／uL、 4.8×10^5 ／uL、 4.9×10^5 ／uL、または約 5.0×10^5 ／uLの濃度で存在し、直径は平均112～116 nmである。いくつかの実施形態では、EVは、約 2.5×10^5 ／uL、 2.6×10^5 ／uL、 2.7×10^5 ／uL、 2.8×10^5 ／uL、 2.9×10^5 ／uL、 3.0×10^5 ／uL、 3.1×10^5 ／uL、 3.2×10^5 ／uL、 3.3×10^5 ／uL、 3.4×10^5 ／uL、 3.5×10^5 ／uL、 3.6×10^5 ／uL、 3.7×10^5 ／uL、 3.8×10^5 ／uL、 3.9×10^5 ／uL、 4.0×10^5 ／uL、 4.1×10^5 ／uL、 4.2×10^5 ／uL、 4.3×10^5 ／uL、 4.4×10^5 ／uL、 4.5×10^5 ／uL、 4.6×10^5 ／uL、 4.7×10^5 ／uL、 4.8×10^5 ／uL、 4.9×10^5 ／uL、または約 5.0×10^5 ／uLの濃度で存在し、直径は平均114 nmである。いくつかの実施形態では、EVは、約 3.8×10^5 ／uL＋／－ 0.8×10^5 の濃度で存在し、直径は平均114 nmである。

10

【0283】

i. MSCセクレトーム－治療特性

本開示のMSCセクレトームは、例えば、抗血管新生特性（血管及び／またはリンパ管）、抗線維化特性、抗炎症特性、細胞の遊走及び増殖を促進する特性、分裂促進特性、抗酸化ストレス／損傷特性を含む、様々な治療特性を示す。

20

【0284】

いくつかの実施形態では、抗血管新生（血管及び／またはリンパ管）特性は、MSCセクレトームにおける1つ以上の因子の存在及び／またはレベルによって決定され得る。いくつかの実施形態では、抗血管新生因子は、PEDF、sFLT-1、より低いレベルのVEGF、及び／またはセルピンE1のうちの1つ以上を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、抗血管新生因子は、PEDF、より低いレベルのVEGF、及び／またはセルピンE1のうちの1つ以上を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、抗血管新生因子はPEDFである。いくつかの実施形態では、抗血管新生因子は、sFLT-1である。いくつかの実施形態では、抗血管新生因子は、より低いレベルのVEGFに対応する。いくつかの実施形態では、抗血管新生因子はセルピンE1である。

30

【0285】

いくつかの実施形態では、血管新生促進（血管及び／またはリンパ管）特性は、MSCセクレトームにおける1つ以上の因子の存在及び／またはレベルによって決定され得る。いくつかの実施形態では、血管新生促進因子は、VEGF、アングリオゲニン、IGFBP-3、uPA、アングジオ-1、アングジオ-2、エンドセリン-1からなる群から選択される1つ以上の因子を含む。いくつかの実施形態では、血管新生促進因子はVEGFである。いくつかの実施形態では、血管新生促進因子はアングリオゲニンである。いくつかの実施形態では、血管新生促進因子はIGFBP-3である。いくつかの実施形態では、血管新生促進因子は、uPAである。いくつかの実施形態では、血管新生促進因子は、アングジオ-1である。いくつかの実施形態では、血管新生促進因子は、アングジオ-2である。いくつかの実施形態では、血管新生促進因子はエンドセリン-1である。

40

【0286】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、抗線維化特性を示す。いくつかの実施形態では、そのような抗線維化特性は、標準的なアッセイを使用するためにアッセイされ得る。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームに関する様々な因子及び／または活性の存在は、抗線維化特性を示している。いくつかの実施形態では、抗線維化特性を示す因子には、FGF7及び／またはFGF10が含まれるが、これらに限定されない。い

50

くつかの実施形態では、抗線維化特性を示す因子は F G F 7 である。いくつかの実施形態では、抗線維化特性を示す因子は F G F 10 である。いくつかの実施形態では、抗線維化特性を示す因子は、H G F である。いくつかの実施形態では、抗線維化特性を示す活性には、S M A D の活性化、T G F β 経路の抑制、筋線維芽細胞分化の抑制、及び／または過剰な E C M 沈着の抑制が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、抗線維化特性を示す活動には、S M A D の活性化が含まれる。いくつかの実施形態では、抗線維化特性を示す活性は、T G F β 経路の抑制を含む。いくつかの実施形態では、抗線維化特性を示す活性は、筋線維芽細胞分化の抑制を含む。いくつかの実施形態では、抗線維化特性を示す活動は、過剰な E C M 沈着の抑制を含む。

【0287】

いくつかの実施形態では、M S C セクレトームは、抗炎症特性を示す。いくつかの実施形態では、M S C セクレトームは炎症を抑制する。いくつかの実施形態では、M S C セクレトームは、炎症を 5 %、10 %、15 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または 100 %（例えば、炎症の完全な減少）抑制する。いくつかの実施形態では、M S C セクレトームは、肥満細胞の脱顆粒を防止する。

【0288】

いくつかの実施形態では、M S C セクレトームは、例えば、分裂促進及び運動促進活性を含む、細胞の遊走及び増殖を促進する。いくつかの実施形態では、M S C セクレトームはマイトジェン活性を促進する。いくつかの実施形態では、M S C セクレトームは、運動原性活性を促進する。いくつかの実施形態では、M S C セクレトームは、M S C セクレトームの細胞移動及び増殖活性を提供する F G F 7 を含む。

【0289】

いくつかの実施形態では、M S C セクレトームは、M S C セクレトームの細胞移動及び増殖活性を提供する F G F 7 を含む。

【0290】

いくつかの実施形態では、M S C セクレトームは、M S C セクレトームの細胞移動及び増殖活性を提供する H G F を含む。

【0291】

いくつかの実施形態では、M S C セクレトームは、M S C セクレトームの細胞移動及び増殖活性を提供する抗アポトーシス剤を含む。いくつかの実施形態では、M S C セクレトームは、F G F - 2、H G F 及び I G F - 1 を含むがこれらに限定されない、M S C セクレトームの細胞移動及び増殖活性を提供する抗アポトーシス剤を含む。いくつかの実施形態では、M S C セクレトームは、F G F - 2、H G F 及び I G F - 1 からなる群から選択され、M S C セクレトームの細胞移動及び増殖活性を提供する抗アポトーシス剤を含む。

【0292】

いくつかの実施形態では、M S C セクレトームは、M S C セクレトームの細胞移動及び増殖活性を提供する N G F を含む。

【0293】

いくつかの実施形態では、M S C セクレトームは、抗酸化ストレス及び／または細胞損傷の低減を提供する。いくつかの実施形態では、M S C セクレトームは、抗酸化ストレス及び細胞損傷因子の減少を含む。いくつかの実施形態では、抗酸化ストレス及び細胞損傷因子の減少には、これらに限定されない、S O D - 1、S O D - 2、S O D - 3、H O - 1 が含まれる。いくつかの実施形態では、抗酸化ストレス及び細胞損傷因子の減少は、S O D - 1、S O D - 2、S O D - 3、H O - 1 からなる群から選択される。

【0294】

i i . M S C セクレトーム - 生物物理学的／生化学的特性
生化学的及び生物物理学的特徴付け：

いくつかの実施形態では、本発明は、M S C セクレトームの特徴付けのための方法を提供する。いくつかの実施形態では、M S C セクレトームの特徴付けには、1) M S C セクレトーム中の分子実体の包括的及び／または定量的マッピングすることと、2) 生物活性

10

20

30

40

50

に対する選択された要因の寄与を測定することと、3) 生物物理学的パラメータを測定することと、を含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームの特性を決定するために、本明細書に記載されるように、MSCセクレトームに対して様々な有効性アッセイを実施することができる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、MSCセクレトームにおける分子実体の包括的及び／または定量的マッピング、2) 生物活性に対する選択された要因の寄与の測定、3) 生物物理学的パラメータの測定に供され得る。いくつかの実施形態では、特徴付けアッセイは、生物物理学的アッセイ、生化学的アッセイ、及びバイオアッセイを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、特徴付けアッセイは、物理的成分の特徴付け、酸化ストレスアッセイ、安全性分析、安定性アッセイ、増殖アッセイ、遊走アッセイ、血管新生アッセイ、分化／瘢痕化アッセイ、炎症アッセイ、及び／または上皮バリア完全性アッセイを含み得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、特徴付けアッセイは、物理的成分の特徴付け、酸化ストレスアッセイ、安全性分析、安定性アッセイ、増殖アッセイ、遊走アッセイ、血管新生アッセイ、分化／瘢痕化アッセイ、炎症アッセイ、及び／または上皮バリア完全性アッセイからなる群から選択される。

10

【0295】

物理的成分の特徴付け：

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームの特徴付けは、生物分析技術の組み合わせを使用する方法を含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームの特徴付けは、MSCセクレトームの物理的成分を決定することを含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームの特徴付けは、タンパク質アレイ、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、質量分析、及びイムノプロットティングの使用を含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームの特徴付けを使用して、MSCセクレトーム内の分子を同定することができる。いくつかの実施形態では、タンパク質アレイは、MSCセクレトームにおける因子を同定するために使用され得る。いくつかの実施形態では、質量分析は、MSCセクレトームにおける1つ以上の因子の存在を決定するために使用され得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の因子のレベルを測定するために定量的技術を使用することができる。いくつかの実施形態では、ELISAなどの定量的技術を使用して、各因子のレベルを測定することができる。

20

【0296】

いくつかの実施形態では、セクレトームは、タンパク質因子及び細胞外小胞（EV）を含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは栄養因子を含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームのタンパク質因子は、ペントラキシン-3、TIMP-1、セルピンE1、TSP-1、HGFを含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームはEVを含む。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、総脂質を定量的に測定するために、単純な脂質含有量について分析される。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームがEVマーカーについて評価され得る場合のEV画分。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームが、AUX、TSG101、CD63、CD9、及びCD8を含むがこれらに限定されないEVマーカーについて評価され得る場合のEV画分。

30

【0297】

いくつかの実施形態では、セクレトームは、30～200 nmの範囲のサイズの細胞外小胞（EV）及び1 mLあたり $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$ のEVを含む。

40

【0298】

いくつかの実施形態では、枯渇研究を実施して、重要な因子の個々の寄与を抽出することができる。いくつかの実施形態では、抗体ベースのプルダウン法を使用して、定義された因子をMSCセクレトームから除去することができる。いくつかの実施形態では、枯渇は、ウエスタンブロットによって検証され得、次いで、以下に記載されるように、1つ以上のバイオアッセイによって評価され得る。いくつかの実施形態では、枯渇研究を実施して、タンパク質画分及びEV画分の寄与を評価することができる。いくつかの実施形態では、TIMP1及び／またはセルピンE1を枯渇させることができる。いくつかの実施形

50

態では、TIMP 1 及び／またはセルピン E 1 を枯渇させることができる。

【0299】

酸化ストレス：

いくつかの実施形態では、酸化ストレス防止アッセイは、MSCセクレトームに対して実施され得る。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、角膜上皮の損傷を防止する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、炎症の存在を減少させる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、抗炎症マーカーの存在の増加によって決定されるように、炎症の存在を減少させる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、例えば、IL-8 などの抗炎症マーカーの存在の増加によって決定されるように、炎症の存在を減少させる。

10

【0300】

安全性の特徴付け：

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、血液適合性について評価され、無菌性ならびにパイロジェン及びエンドトキシンレベルについての試験を実施することができる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、血液適合性を評価することができる。いくつかの実施形態では、血液適合性の評価には、溶血及び血球凝集のアッセイが含まれる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、全身曝露で有害な影響を示さない。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、重度の眼の火傷などの全身曝露で有害な影響を示さない。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは血球凝集活性を示さない。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは溶血を誘発しない。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは溶血活性を誘発しない。

20

【0301】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、それが製剤の一部として投与することができるように無菌であり得る。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、エンドトキシンを含まないか、または実質的に含まないものであり得る。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、微生物を含まないか、または実質的に含まないものであり得る。

【0302】

安定性：

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームの生物物理学的特性を評価及び／または決定することができる。いくつかの実施形態では、蛍光、静的光散乱、及び動的光散乱が、タンパク質の安定性測定基準を特徴付ける。いくつかの実施形態では、セクレトームをさらに特徴付けるために、以下のパラメータを測定することができる：熱融解、熱凝集、デルタ G、及び／または粘度。いくつかの実施形態では、熱融解アッセイを使用して、MSCセクレトームの安定性を決定する。いくつかの実施形態では、熱凝集アッセイを使用して、MSCセクレトームの安定性を決定する。いくつかの実施形態では、デルタ G が、MSCセクレトームの安定性を決定するための尺度として使用される。いくつかの実施形態では、粘度は、MSCセクレトーム特性として測定される。いくつかの実施形態では、粘度は、MSCセクレトームの安定性を決定するものである。

30

【0303】

いくつかの実施形態では、生物物理学的測定基準を使用して、異なる MSCセクレトーム製剤を特徴付けるための安定性パラメータを確立することができる。

40

【0304】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、-20℃、4℃、及び室温（20℃）で、少なくとも7日間安定である。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、-20℃、4℃、及び室温（20℃）で少なくとも14日間安定である。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、少なくとも7日間、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、または少なくとも1ヶ月間安定である。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、約-20℃で少なくとも7日間、少なくとも14日間、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2

50

ヶ月、または少なくとも3ヶ月間安定である。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、約4℃で少なくとも7日間、少なくとも14日間、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、または少なくとも1ヶ月間安定である。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、約20℃（または室温）で少なくとも7日間、少なくとも14日間、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、または少なくとも1ヶ月間安定である。

【0305】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、約-20℃で少なくとも7日間安定である。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、約4℃で少なくとも7日間安定である。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、約20℃で少なくとも7日間安定である。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、約25℃（室温）で少なくとも7日間安定である。

10

【0306】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、約-20℃で少なくとも14日間安定である。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、約4℃で少なくとも14日間安定である。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、約20℃（または室温）で少なくとも14日間安定である。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、約25℃（室温）で少なくとも14日間安定である。

【0307】

上皮バリア完全性アッセイ

角膜上皮、より正確には、上皮の頂端表面は、角膜の全体的なバリア特性に大きく貢献しており、角膜バリアへの変化は、生体適合性分析の敏感な要因となる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームの生物物理学的特徴は、上皮バリア完全性アッセイなどによって評価及び／または決定され得る。いくつかの実施形態では、上皮バリア完全性アッセイは、経上皮電気抵抗（TEER）である。いくつかの実施形態では、経上皮電気抵抗（TEER）を評価して、全体的なバリア特性を測定することができる。いくつかの実施形態では、3D組織は、2mLのTEER緩衝液を含む24ウェルプレートに移され、10分間インキュベートされ得る。いくつかの実施形態では、TEERは、上皮ボルトオームメーターEVOM6及びEndOhm-12チャンパー（World Precision, Sarasota, FL）を使用して測定することができる。いくつかの実施形態では、手順の最後に、組織は、以下の式を使用して組織生存率評価に使用することができる。

20

30

$\% \text{バリア完全性} = 100 \times [\text{TEER (処理組織)} / \text{TEER (プラセボ対照)}]$

【0308】

いくつかの実施形態では、TEERを使用して、MSCセクレトームの局所適用後のバリアの完全性に対する効果を評価することができる。いくつかの実施形態では、TEERは、EpiCorneal組織モデル（MatTek Corp）を利用して、ナイトロジェンマスタード（NM）への局所曝露によって引き起こされる角膜上皮損傷後のMSCセクレトームの局所適用後のバリア完全性に対する効果を評価するために使用され得る。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、実施例6に記載されるように、例えば、6μg/mL（プラセボ溶液で希釈された）で局所的に適用され得る。いくつかの実施形態では、EpiCorneal組織を5mLの培地で標準的な培養条件で24時間培養した。

40

【0309】

バイオアッセイ

いくつかの実施形態では、バイオアッセイが、MSCセクレトームを特徴付けるために使用され得る。いくつかの実施形態では、バイオアッセイは、角膜創傷治癒に関連し得る：上皮細胞の遊走及び増殖、間質細胞の分化（例えば、瘢痕化）、血管新生、及び炎症。いくつかの実施形態では、バイオアッセイは、角膜創傷治癒を媒介するMSCセクレトームの能力を評価するために使用され得る：上皮細胞の遊走及び増殖、間質細胞の分化（瘢

50

痕化)、血管新生及び炎症。

【0310】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、MSCセクレトームが創傷治癒(眼の創傷治癒など)を促進する能力について評価され得る。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、増殖及び遊走を促進するMSCセクレトームの能力について評価することができる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、MSCセクレトームが増殖を促進する能力について評価することができる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、遊走を促進するMSCセクレトームの能力について評価することができる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、増殖及び／または遊走を促進する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、眼の創傷治癒を促進する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは増殖を促進する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは遊走を促進する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、スクラッチアッセイを使用して評価することで、治癒促進能力が決定され得る。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、トランスウェル遊走アッセイを使用して評価して、増殖促進能力を決定することができる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、トランスウェル遊走アッセイを使用して評価することで、遊走促進能力が決定され得る。

10

【0311】

スクラッチアッセイ

いくつかの実施形態では、本発明のアッセイは、「スクラッチアッセイ」(「スクラッチ創傷アッセイ」、「スクラッチ創傷閉鎖アッセイ」、「創傷閉鎖アッセイ」、または「創傷治癒アッセイ」とも呼ばれる)を含み得る。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは遊走を促進し、この遊走の促進は、「スクラッチアッセイ」を利用して決定及び／または検査される。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは増殖を促進し、この増殖の促進は、スクラッチアッセイを利用して決定及び／または検査される。一般に、スクラッチアッセイ法は、「スクラッチ」とも呼ばれる人工ギャップが集密的な細胞単層で発生することに基づく。「スクラッチ」は、新しく作成されたギャップの端にあるセルが開口部に向かって遊走して「スクラッチ」を閉じる／覆うかどうかを監視することができる。例えば、Liang, C., Park, A. & Guan, J. *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. Nat Protoc 2, 329-333 (2007)を参照されたい。いくつかの実施形態では、スクラッチアッセイは、創傷治癒を誘導する能力を有する候補のスクリーニングに用いられる。

20

30

【0312】

一実施形態例では、本明細書で提供されるスクラッチアッセイは、

(a) 細胞の層を提供するステップと、

(b) 細胞の層に創傷ギャップ／スクラッチを導入するステップと、

(c) 被検組成物の存在下で創傷ギャップが治癒／閉鎖するかどうかを決定するステップであって、ステップ(b)の前または後のいずれかに組成物を細胞に投与し、創傷ギャップの閉鎖が、被検組成物が眼の創傷治癒を誘導する能力を有することを示す、決定するステップと、を含む。

40

【0313】

いくつかの実施形態では、スクラッチアッセイは、角膜細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、アッセイされる細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、アッセイされる細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態では、スクラッチアッセイは、網膜細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、スクラッチアッセイは、上皮細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、スクラッチアッセイは、角膜実質細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、スクラッチアッセイは、線維芽細胞に用いられる。いく

50

つかの実施形態では、スクラッチアッセイは、視神経細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、スクラッチアッセイは、神経節細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、スクラッチアッセイは、網膜色素上皮細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、スクラッチアッセイは、網膜色素上皮細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、スクラッチアッセイは、水晶体上皮細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、スクラッチアッセイは、虹彩色素上皮細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、スクラッチアッセイは、結膜線維芽細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、スクラッチアッセイは、非色素毛様体上皮細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、スクラッチアッセイは、線維柱帯細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、スクラッチアッセイは、眼球脈絡膜線維芽細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、スクラッチアッセイは、結膜上皮細胞に用いられる。

10

【0314】

いくつかの実施形態では、アッセイされる細胞は、1つ以上のスクラッチ（「ギャップ」または「創傷」とも称される）が導入される時点で集密的な層を形成している。いくつかの実施形態では、アッセイされる細胞の集密的な層は単層である。

【0315】

いくつかの実施形態では、1つ以上のスクラッチが細胞に導入される。いくつかの実施形態では、単一のスクラッチが導入される。いくつかの実施形態では、複数のスクラッチが細胞に導入される。いくつかの実施形態では、1つ以上のスクラッチは、細胞に化学的に導入される。いくつかの実施形態では、1つ以上のスクラッチは、化学熱傷を介して細胞に導入される。いくつかの実施形態では、1つ以上のスクラッチは、既製薬または化合物を介して導入される。一実施形態例では、化学熱傷はアルカリ熱傷である。別の実施形態例では、化学熱傷はナイトロジェンマスタードガス熱傷である。いくつかの実施形態では、1つ以上のスクラッチは、細胞の層を機械的に破壊することによって細胞に導入される。いくつかの実施形態では、1つ以上のスクラッチは、熱ショックによって導入される。いくつかの実施形態では、1つ以上のスクラッチは、レーザーパルスを介して導入される。

20

【0316】

いくつかの実施形態では、細胞に導入されるスクラッチは、直線状スクラッチを含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入されるスクラッチは、クロスハッチ状スクラッチを含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入されるスクラッチは、円形スクラッチを含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入されるスクラッチは、ジグザグ状スクラッチを含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入されるスクラッチは、上述の形状を1つ以上組み合わせたものを含む。

30

【0317】

いくつかの実施形態では、導入されるスクラッチのサイズ（すなわち、創傷／スクラッチの両側に存在する遊走前線を分離する横断長）は約0.01mm～10mmである。いくつかの実施形態では、スクラッチのサイズは、約0.01mm～0.1mm、約0.1mm～1mm、約1mm～10mm、またはこれらの範囲内の任意の適切な値である。

【0318】

いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は、1つ以上のスクラッチが導入された後に細胞に投与される。いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は、1つ以上のスクラッチが導入される前に細胞に投与される。いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物はMSCセクレトームである。いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は馴化培地である。いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物はバイオポリマー（タンパク質など）である。いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は1つ以上の活性化合物の医薬組成物である。いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は、それが眼の創傷治癒を促進する能力についてスクリーニングされる。

40

【0319】

いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は、細胞に投与される前に濃縮される。い

50

いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は、細胞に投与される前に希釈される。いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は、細胞に投与される前に精製（緩衝液交換など）される。いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は、細胞に投与される前に凍結乾燥される。いくつかの実施形態では、細胞に投与される被検試薬／組成物は、約 $10 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の活性成分を含む。いくつかの実施形態では、細胞に投与される被検試薬／組成物は、約 $10 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、細胞に投与される被検試薬／組成物は、約 $10 \sim 90 \mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、細胞に投与される被検試薬／組成物は、約 $20 \sim 80 \mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、細胞に投与される被検試薬／組成物は、約 $30 \sim 70 \mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、細胞に投与される被検試薬／組成物は、約 $40 \sim 60 \mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、細胞に投与される被検試薬／組成物は、約 $45 \mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、細胞に投与される被検試薬／組成物は、約 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、細胞に投与される被検試薬／組成物は、約 $55 \mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含む。

10

20

30

40

50

【0320】

いくつかの実施形態では、1つ以上のスクラッチの閉鎖は、被検試薬が眼の創傷治癒を促進する能力を有することを示す。いくつかの実施形態では、1つ以上のスクラッチの閉鎖は、被検試薬が細胞増殖を促進する能力を有することを示す。いくつかの実施形態では、1つ以上のスクラッチの閉鎖は、被検試薬が細胞遊走を促進する能力を有することを示す。いくつかの実施形態では、スクラッチの閉鎖は、スクラッチに遊走した細胞の総数として特徴付けられる。いくつかの実施形態では、スクラッチに遊走した細胞の総数は、染色（比色分析または蛍光分析）を行ってまたは行わずに物理的な計数（画像解析ソフトウェア）によって測定される。いくつかの実施形態では、スクラッチに遊走した細胞の総数を吸光度ベースまたは蛍光分析ベースの方法によって測定することで、スクラッチ中の細胞量が分光学的に定量化される。いくつかの実施形態では、スクラッチの閉鎖は、創傷閉鎖の割合またはそれとは別の数学的な値として特徴付けられ、すなわち、最初の創傷表面積から、ある特定の時点の残存スクラッチ表面積を引いたものを、最初のスクラッチ表面積によって割ったものとして特徴付けられる。いくつかの実施形態では、スクラッチの閉鎖は、残存スクラッチ面積の割合として特徴付けられ、すなわち、全体割合から創傷閉鎖の割合を引いたものとして特徴付けられる。いくつかの実施形態では、スクラッチの閉鎖は、スクラッチのサイズ（すなわち、創傷の両側に存在する遊走前線を分離する横断長）として特徴付けられる。いくつかの実施形態では、画像解析ソフトウェアを用いることで、遊走するスクラッチ前線（または境界）を確立し、残存するスクラッチの距離（ピクセル、 μm などで表されるものなど）が測定される。いくつかの実施形態では、スクラッチの閉鎖は、スクラッチの表面積として特徴付けられる。いくつかの実施形態では、スクラッチの表面積（例えば、 ピクセル^2 または μm^2 ）は、画像解析ソフトウェアによって決定される。いくつかの実施形態では、スクラッチの閉鎖は、時間的な関数として特徴付けられる。いくつかの実施形態では、スクラッチの閉鎖は、スクラッチのすべてまたは一定割合（例えば、50%）の閉鎖に要する時間として特徴付けられる。いくつかの実施形態では、スクラッチの閉鎖は、時間の関数としての速度（スクラッチの細胞非含有表面積など）として特徴付けられる。いくつかの実施形態では、測定される速度は、細胞遊走距離／遊走時間である。

【0321】

いくつかの実施形態では、1つ以上のスクラッチの閉鎖は、約1～5日間測定される。いくつかの実施形態では、1つ以上のスクラッチの閉鎖は、約2～4日間測定される。いくつかの実施形態では、1つ以上のスクラッチの閉鎖は、約2～3日間測定される。いくつかの実施形態では、1つ以上のスクラッチの閉鎖は、約2日間測定される。いくつかの実施形態では、1つ以上のスクラッチの閉鎖は、約3日間測定される。いくつかの実施形態では、1つ以上のスクラッチの閉鎖は、一定の間隔で測定される。いくつかの実施形態

【 0 3 2 2 】

40

【 0 3 2 3 】

50

イにおいて創傷閉鎖を少なくとも2倍増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも3倍増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも4倍増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも5倍増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも6倍増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも7倍増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも8倍増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも9倍増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも10倍増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、またはそれを超える%増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも10%増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも20%増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも30%増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも40%増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも50%増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも60%増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも70%増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも80%増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも90%増加させる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥MSCセクレトームは、スクラッチアッセイにおいて創傷閉鎖を少なくとも100%増加させる。

10

20

30

【0324】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるスクラッチアッセイにおいて眼の創傷治癒をもたらすには、少なくとも $30\mu\text{g}/\text{mL}$ の被検試薬が必要である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるスクラッチアッセイにおいて眼の創傷治癒をもたらすには、少なくとも $35\mu\text{g}/\text{mL}$ の被検試薬が必要である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるスクラッチアッセイにおいて眼の創傷治癒をもたらすには、少なくとも $40\mu\text{g}/\text{mL}$ の被検試薬が必要である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるスクラッチアッセイにおいて眼の創傷治癒をもたらすには、少なくとも $45\mu\text{g}/\text{mL}$ の被検試薬が必要である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるスクラッチアッセイにおいて眼の創傷治癒をもたらすには、少なくとも $50\mu\text{g}/\text{mL}$ の被検試薬が必要である。

40

【0325】

トランスウェル遊走アッセイ

いくつかの実施形態では、本発明のアッセイは、「トランスウェル遊走アッセイ」（「トランスウェル細胞浸潤アッセイ」または「トランスウェルアッセイ」とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイを利用することで、細胞の遊走及び／または増殖に対する候補試薬の能力が評価される。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイを利用することで、細胞遊走に対する候補試薬の能力が評価される。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイを利用することで、細胞増殖に対する候補試薬の能力が評価される。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊

50

走アッセイを利用することで、細胞の遊走／増殖を誘導する能力を有する候補がスクリーニングされる。

【0326】

一実施形態例では、本明細書で提供されるトランスウェル遊走アッセイは、

(a) 孔を有する膜を含む上部チャンバーに細胞を添加するステップであって、被検試薬／組成物が存在しない基本培地を細胞に補給する、添加するステップと、

(b) 被検試薬／組成物を含む容器内に上部チャンバーを設置するステップであって、孔を有する膜によって容器内の被検試薬／組成物から上部チャンバー内の角膜細胞が隔てられる、設置するステップと、

(c) 細胞をインキュベートするステップと、

(d) 膜を介して遊走する細胞を測定／定量化するステップであって、当該遊走が、被検試薬／組成物が細胞の遊走及び／または増殖を誘導する能力を有することを示す、測定／定量化するステップと、

を含む。

【0327】

いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイは、角膜細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイは、網膜細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイは、上皮細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイは、角膜実質細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイは、線維芽細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイは、視神経細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイは、神経節細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイは、網膜色素上皮細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイは、網膜色素上皮細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイは、水晶体上皮細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイは、虹彩色素上皮細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイは、結膜線維芽細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイは、非色素毛様体上皮細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイは、線維柱帯細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイは、眼球脈絡膜線維芽細胞に用いられる。いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイは、結膜上皮細胞に用いられる。

【0328】

いくつかの実施形態では、トランスウェル遊走アッセイの上部チャンバーは、孔を有する膜によって密封される。いくつかの実施形態では、上部チャンバーはガラスチャンバーである。いくつかの実施形態では、上部チャンバーはプラスチックチャンバーである。いくつかの実施形態では、上部チャンバーはボイデンチャンバーである。

【0329】

いくつかの実施形態では、上部チャンバーの膜は、規定された孔径を有するポリカーボネート膜である。いくつかの実施形態では、膜は、基底膜である。いくつかの実施形態では、膜の平均孔径は、アッセイされる細胞のサイズを下回る。いくつかの実施形態では、膜の平均孔径は約1～15 μm である。いくつかの実施形態では、膜の平均孔径は約3 μm である。いくつかの実施形態では、膜の平均孔径は約5 μm である。いくつかの実施形態では、膜の平均孔径は約8 μm である。いくつかの実施形態では、膜の平均孔径は約12 μm である。

【0330】

いくつかの実施形態では、上部チャンバーの膜は、事前に処理される。いくつかの実施形態では、膜は、細胞接着及び／または増殖を増強する1つ以上の化合物またはバイオポリマーで事前にコーティングされる。いくつかの実施形態では、膜は、細胞外マトリックスで事前にコーティングされる。いくつかの実施形態では、膜は、コラーゲンで事前にコ

10

20

30

40

50

ーティングされる。いくつかの実施形態では、膜は、フィブロネクチンで事前にコーティングされる。いくつかの実施形態では、膜は、ラミニンで事前にコーティングされる。

【0331】

いくつかの実施形態では、基本細胞培養培地を含む上部チャンバーに細胞が添加される。いくつかの実施形態では、上部チャンバー内の基本細胞培養培地は血清を含まない。細胞培養培地の例としては、限定されないが、hMSC Media Booster XFM、hMSC High Performance Basal Media、Minimum Essential Medium Eagle (MEME)、ADC-1、LPM (ウシ血清アルブミン非含有)、F10 (HAM)、F12 (HAM)、DCCM1、DCCM2、RPMI 1640、BGJ Medium (Fittton-Jackson 改変あり及びなし)、StemPro、MSCGro、MesenCult、NutriStem、Basal Medium Eagle (BME-Earle's salt base の添加あり)、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-血清含有または血清非含有)、Yamane、IMEM-20、Glasgow Modification Eagle Medium (GMEM)、Leibovitz L-15 Medium、McCoy's 5A Medium、Medium M199 (M199E-Earle's salt base 含有)、Medium M199 (M199H-Hank's salt base 含有)、Minimum Essential Medium Alpha (MEM-アルファ)、Minimum Essential Medium Eagle (MEM-E-Earle's salt base 含有)、Minimum Essential Medium Eagle (MEM-H-Hank's salt base 含有)、及び Minimum Essential Medium Eagle (必須アミノ酸を含む MEM-NAA) が挙げられ、その他多数あるが、とりわけ、medium199、CMRL1415、CMRL1969、CMRL1066、NCTC135、MB75261、MAB8713、DM145、Williams' G、Neuman & Tytell、Higuchi、MCDDB301、MCDDB202、MCDDB501、MCDDB401、MCDDB411、MDBC153 が挙げられる。本発明における使用のための培地の例は MEM-アルファである。いくつかの実施形態では、アッセイされる細胞は、ゲルを含む上部チャンバーに添加される。いくつかの実施形態では、ゲルは、生体マトリックス (細胞外マトリックス など) を含む。

10

20

30

【0332】

いくつかの実施形態では、上部チャンバーは、1つ以上の被検試薬／組成物を含む容器内に浮遊される。いくつかの実施形態では、上部チャンバー及び容器は、1つ以上の被検試薬／組成物を除けば、同じ組成物を含む。他の実施形態では、上部チャンバー及び容器は、1つ以上の被検試薬／組成物以外にも、異なる組成物を含む。いくつかの実施形態では、容器は、1つ以上の成長因子を含む。

【0333】

いくつかの実施形態では、容器は反応容器である。いくつかの実施形態では、容器は、マルチウェルプレート中のウェルである。いくつかの実施形態では、容器は、マルチウェルプレート (6ウェルプレート、12ウェルプレート、24ウェルプレート、48ウェルプレート、または96ウェルプレートなど) 中のウェルである。

40

【0334】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される被検試薬／組成物は、アッセイされる細胞の化学誘引物質を含む。いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は、MSCセクレトームを含む。いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は、馴化培地を含む。いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は、バイオポリマー (タンパク質など) を含む。いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は、1つ以上の活性化合物の医薬組成物を含む。いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は、それが細胞の遊走及び／または増殖を促進する能力についてスクリーニングされる。

50

【0335】

いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は、容器内にのみ存在し、上部チャンバーからは排除されている。いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は、上部チャンバー内にも容器内にも存在する。一実施形態例では、上部チャンバーから容器へと被検試薬／組成物の濃度が上昇する濃度勾配が存在する。

【0336】

いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は、添加前に濃縮される。いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は、添加前に希釈される。いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は、添加前に精製（緩衝液交換など）される。いくつかの実施形態では、被検試薬／組成物は、添加前に凍結乾燥される。いくつかの実施形態では、容器内の被検試薬／組成物は、約10～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の活性成分を含む。いくつかの実施形態では、容器内の被検試薬／組成物は、約10～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、容器内の被検試薬／組成物は、約10～90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、容器内の被検試薬／組成物は、約20～80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、容器内の被検試薬／組成物は、約30～70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、容器内の被検試薬／組成物は、約40～60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、容器内の被検試薬／組成物は、約45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、容器内の被検試薬／組成物は、約50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、容器内の被検試薬／組成物は、約55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含む。

【0337】

いくつかの実施形態では、細胞は、上部チャンバーにおいて約6～72時間インキュベートされる。いくつかの実施形態では、インキュベーション時間は約12時間～60時間である。いくつかの実施形態では、インキュベーション時間は約18時間～48時間である。いくつかの実施形態では、インキュベーション時間は、これらの範囲内の任意の適切な値である。いくつかの実施形態では、インキュベーション時間は約6時間である。いくつかの実施形態では、インキュベーション時間は約18時間である。いくつかの実施形態では、インキュベーション時間は約24時間である。いくつかの実施形態では、インキュベーション時間は約30時間である。いくつかの実施形態では、インキュベーション時間は約36時間である。いくつかの実施形態では、インキュベーション時間は約42時間である。いくつかの実施形態では、インキュベーション時間は約48時間である。

【0338】

いくつかの実施形態では、膜を介して遊走した細胞の総数は、染色（比色分析（例えば、カルセインAM）または蛍光分析（例えば、クリスタルバイオレット））を行ってまたは行わずに物理的な計数（画像解析ソフトウェア）によって測定される。いくつかの実施形態では、生細胞染色を使用して遊走細胞が定量化される。いくつかの実施形態では、膜を介して遊走した細胞の総数を吸光度ベースまたは蛍光分析ベースの方法によって測定することで、細胞量が分光学的に定量化される。いくつかの実施形態では、遊走細胞は、フローサイトメトリーによって定量化される。

【0339】

いくつかの実施形態では、本発明のMSCセクレトームは、本明細書で提供されるトランスウェル遊走アッセイにおいて眼の創傷治癒を誘導する能力を示す。いくつかの実施形態では、本発明のMSCセクレトームは、本明細書で提供されるトランスウェル遊走アッセイにおいて細胞の遊走及び／または増殖を誘導する。いくつかの実施形態では、本発明のMSCセクレトームは、本明細書で提供されるトランスウェル遊走アッセイにおいて細胞遊走を誘導する。いくつかの実施形態では、本発明のMSCセクレトームは、本明細書で提供されるトランスウェル遊走アッセイにおいて細胞増殖を誘導する。いくつかの実施形態では、本発明の凍結乾燥MSCセクレトームは、本明細書で提供されるトランスウェル遊走アッセイにおいて眼の創傷治癒を誘導する能力を示す。いくつかの実施形態では、本発明の凍結乾燥MSCセクレトームは、本明細書で提供されるトランスウェル遊走アッ

Q

【 0 3 4 0 】

を少なくとも100%増加させる。

【 0 3 4 1 】

は、凍結乾燥MSCセクレトームは、トランスウェルアッセイにおいて細胞の遊走及び／

50

30

40

50

【0343】

いくつかの実施形態では、内皮細胞管形成アッセイは、MSCセクレトームに対して実施され得る。いくつかの実施形態では、内皮細胞管形成アッセイは、MSCセクレトームが血管新生促進性ではないことを示し得る。いくつかの実施形態では、内皮細胞管形成アッセイは、MSCセクレトームの血管新生の可能性の尺度を提供する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、抗血管新生特性を示す。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは抗血管新生特性である。いくつかの実施形態では、内皮細胞管形成アッセイは、抗血管新生シグナル及び血管新生促進シグナルの比を提供する。いくつかの実施形態では、内皮細胞管形成アッセイは、陰性の結果が、抗：促進比が高いことを確認し、MSCセクレトームが血管新生を促進しないことを確実にするであろう。いくつかの実施形態では、内皮細胞管形成アッセイが陰性の結果は、抗：促進比が高いことを確認し、MSCセクレトームがCNV（脈絡膜血管新生）または一般的な血管新生を促進しないことを確実にする。いくつかの実施形態では、TGFβ誘導性筋線維芽細胞分化の抑制アッセイは、MSCセクレトームに対して実施され得る。いくつかの実施形態では、TGFβ誘導性筋線維芽細胞分化の抑制アッセイは、MSCセクレトームが癒痕化を抑制することを示すために、MSCセクレトームに対して実施され得る。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは癒痕化を防ぐ。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、角膜混濁の癒痕化を防ぐ。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、低い血管新生誘導を有する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、低下した血管新生反応を有する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、低下した血管新生能力を有する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、血管新生を支持する培地の存在下で血管の正常な形成を損なう及び／または減少させる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、MSCセクレトームが未処理の対照と比較した場合、低下した血管新生能力を有する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、血清含有培地で処理された試料と比較して、低下した血管新生能力を有する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは血管新生反応を弱める。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、無血清培地によって誘発される血管新生反応を低下させる。いくつかの実施形態では、血管新生反応の低下は、セクレトームと血清含有培地（血管新生反応の低下またはなし）を血清含有培地（血管新生反応）と比較した場合、MSCセクレトームによって誘導される。いくつかの実施形態では、血管新生応答は、細胞ベースのアッセイにおける管形成によって示される。いくつかの実施形態では、血管新生応答は、内皮細胞管形成アッセイにおける管形成によって示される。

10

20

30

【0344】

分化／癒痕化：

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、分化を防止し、癒痕化を防止する能力について評価することができる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、癒痕化を防止及び／または阻害する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは癒痕化を防止する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、他の標準的な治療と比較して、癒痕化を低減する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、分化を防止及び／または阻害する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、筋線維芽細胞の分化を防止及び／または阻害する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、角膜の透明性の喪失を低減する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、筋線維芽細胞の分化を防止及び／または阻害することにより、角膜の透明性の喪失を低減する。

40

【0345】

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、分化に関与する因子を調節するMSCセクレトームの能力について評価することができる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、TGFβ2、コラーゲンI、コラーゲンIII（通常、分化中に上方制御される）、TFGB3、MMP-2、及びMMP-9（通常、分化中にダウンレギュレーションされる）を含むがこれらに限定されない、分化に関与する因子を調節するMSC

50

セクレトームの能力を評価することができる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、TGFB2、コラーゲンI、コラーゲンIII（通常、分化中に上方制御される）、TFGB3、MMP-2、及びMMP-9（通常、分化中に下方制御される）からなる群から選択される因子を調節する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、正常な分化の間に上方制御される因子の減少を誘導する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、正常な分化の間にダウンレギュレーションされる因子の増加を誘導する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、SMAなどの因子の発現の減少を誘導する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、MSCセクレトーム効力を示すSMAなどの因子の発現の減少を誘導する。

【0346】

10

血管新生：

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、血管新生を防止する能力について評価することができる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、血管新生を予防、阻害、抑制、及び／または低減する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、血管新生を抑制するか、または促進しない。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、血管新生を防止する能力について評価することができる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、血管新生を防止、阻害、抑制、及び／または低減する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは血管新生を抑制する。

【0347】

20

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、枯渇アッセイを使用してさらに評価することができる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、特定の因子を枯渇させることができる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、例えば、TIMP1及び／またはセルピンE1を含むがこれらに限定されない特定の因子を枯渇させることができる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、TIMP1及び／またはセルピンE1を枯渇させることができる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、TIMP1を枯渇させることができる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、セルピンE1を枯渇させることができる。

【0348】

炎症：

30

いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、炎症を予防、阻害、抑制、及び／または低減する能力について評価することができる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、炎症を予防、阻害、抑制、及び／または低減する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは炎症を抑制する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、炎症を予防、阻害、抑制、及び／または低減する能力を決定するために、インビトロ及び／またはインビボで特徴付けられる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、インビトロ及び／またはインビボでの炎症を予防、阻害、抑制、及び／または低減する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、インビトロで炎症を予防、阻害、抑制、及び／または低減する。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、炎症またはインビボでの炎症を予防、阻害、抑制、及び／または低減する。いくつかの実施形態では、組織モデルを使用して、インビトロでの炎症の予防、阻害、抑制、及び／または減少を特徴付けることができる。いくつかの実施形態では、3D組織モデルを使用して、インビトロでの炎症の予防、阻害、抑制、及び／または低減を特徴付けることができる。いくつかの実施形態では、ナイトロジェンマスタード（NM）ガス熱傷モデルを使用して、インビトロでの炎症の予防、阻害、抑制、及び／または軽減を評価することができる。いくつかの実施形態では、ナイトロジェンマスタード（NM）ガス熱傷モデルを使用して、インビトロでの炎症の予防、阻害、抑制、及び／または低減を評価し、インビボ条件の代理として使用することができる。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームによる治療及び／または投与に応答するサイトカインプロファイルを決定することができる。いくつかの実施形態では、特定のサイトカインのレベルを決定することができる。いくつかの実施形態では、IL-8のレベルを決定することができる。いくつかの実施形態では、I

40

50

L-8 発現のレベルは、MSCセクレトームで処理された組織において低下させることができる。いくつかの実施形態では、IL-8 発現のレベルは、MSCセクレトームで処理された組織において低下し、これは、炎症を予防、阻害、抑制、及び／または減少させることを示している。

【0349】

E. 治療の方法

本開示はまた、本開示の凍結乾燥及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトームを使用する治療方法を提供する。本開示はまた、本開示の再構成MSCセクレトームを使用する治療方法を提供する。特に、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは眼の状態の治療に使用されている。特に、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、眼疾患を含むがこれに限定されない眼の状態の治療に使用されている。いくつかの実施形態では、眼疾患は、眼の表面に関連している。いくつかの実施形態では、眼疾患は、損傷した眼組織及び／または損傷した眼組織の徴候に関連している。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、創傷治癒の加速を含む、眼の状態の治療において使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、瘢痕化の減少を含む、眼の状態の治療において使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、炎症の軽減を含む、眼の状態の治療において使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、炎症を軽減し、したがって成長を促進することを含む、眼の状態の治療において使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、眼の表面での炎症を軽減するなどの眼の状態の治療において使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、血管新生の減少を含む、眼の状態の治療において使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、角膜における血管新生の減少を含む、眼の状態の治療において使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、ドライアイ治療（例えば、上皮細胞が損傷している場所を含む、重度のドライアイの治療を含む）を含む眼の状態の治療において使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、損傷した眼組織への完全性の回復などの眼の状態の治療において使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、損傷した眼組織の治癒を加速することなどの眼の状態の治療において使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、損傷した眼神経組織の再生などの眼の状態の治療において使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、PCEDに関連する損傷した眼神経組織の再生などの眼の状態の治療において使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、PCEDなどの眼の状態の治療において使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、眼表面への炎症性損傷などの眼の状態の治療において使用を見出す。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、例えば、GVHD及び／またはシェーグレン症候群などの眼の状態の治療において使用を見出す。

【0350】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、創傷治癒を加速させるにおいて使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、瘢痕化を減少させることにおいて使用を見出す。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、炎症を軽減させることにおいて使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、炎症を軽減させる、したがって成長を

促進させることにおいて使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、眼表面での炎症を軽減させることにおいて使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、血管新生を減少させることにおいて使用を見出す。いくつかの実施形態では、MSCセクレトームは、角膜における血管新生を減少させることにおいて使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、網膜上皮細胞及び網膜神経節細胞の保護及び修復において使用を見出す。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトームは、小柱網の再生の誘導及び眼圧の低減において使用を見出す。

【0351】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）間葉系幹細胞セクレトームは、眼疾患の治療のために投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるような治療有効量の間葉系幹細胞セクレトーム組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞セクレトームは、眼の創傷治癒を促進または誘導するために、それを必要とする患者に投与される。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞セクレトームは、血管新生を低減及び／または抑制し、瘢痕化を低減及び／または抑制し、視力を促進及び／または維持し、及び／または創傷閉鎖率を増加させる（例えば、創傷閉鎖時間を短縮）ために、それを必要とする患者に投与される。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞セクレトームは、血管新生を予防、低減、及び／または抑制するために、それを必要とする患者に投与される。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞セクレトームは、瘢痕化の減少を予防、低減、及び／または抑制するために、それを必要とする患者に投与される。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞セクレトームは、視力を促進及び／または維持するために、それを必要とする患者に投与される。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞セクレトームは、創傷をより速く閉鎖することを促進及び／または誘導するために投与される（例えば、創傷閉鎖に必要な時間を短縮する）。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞セクレトームは、視力の保存を促進するために、血管新生を防止、低減、及び／または抑制するか、または促進せず、瘢痕化を低減する。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞セクレトームは、血管新生を予防、低減、及び／または抑制するために、そして視力維持を促進するために瘢痕化を低減するために、それを必要とする患者に投与される。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞セクレトームは、炎症を予防、軽減、及び／または抑制する。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞セクレトームは、炎症を予防、軽減、及び／または抑制するために、それを必要とする患者に投与される。

【0352】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）間葉系幹細胞セクレトームは、眼の構造への外傷性損傷後の視覚機能障害の治療のために投与される。いくつかの実施形態では、治療は、本明細書に記載されるような治療有効量の間葉系幹細胞セクレトーム組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む。

【0353】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）間葉系幹細胞セクレトームは、衝撃性損傷後の視神経変性の外傷性損傷の治療のために投与される。いくつかの実施形態では、眼への衝撃性損傷は、眼の挫傷及び眼への鈍的損傷からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞セクレトームは、視神経の外傷性損傷の治療のために投与される。いくつかの実施形態では、治療は、それを必要とする患者に、本明細書に記載されるような治療有効量の間葉系幹細胞セクレトーム組成物を投与することを含む。

【0354】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）間葉系幹細胞セクレトームは、眼への衝撃性損傷に続く視神経変性を改善するために投与される。いくつかの実施形態では、視神経変性を改善するための方法は、本明細書に記載されるよう

10

20

30

40

50

な治療有効量の間葉系幹細胞セクレトーム組成物を患者に投与することを含む。いくつかの実施形態では、眼への衝撃性損傷は、眼の挫傷及び眼への鈍的損傷からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、眼への衝撃性損傷は、眼の挫傷である。いくつかの実施形態では、眼への衝撃性損傷は、眼への鈍的損傷である。

【0355】

有効性の読み出しには、例えば、生活の質の向上を含む、症状の軽減及び／または病状の減少が含まれ得る。いくつかの実施形態では、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%の症状の軽減及び／または病状の減少は、治療効果を示す。いくつかの実施形態では、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%の炎症の軽減は、治療効果を示す。いくつかの実施形態では、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%の瘢痕化の減少は、治療効果を示す。いくつかの実施形態では、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%の血管新生の減少は、治療効果を示す。

10

【0356】

いくつかの実施形態では、疾患または状態は、眼の疾患または眼の状態である。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、眼の構造への外傷後の視覚機能障害である。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、眼への衝撃的な（例えば、鈍的または非鈍的）損傷である。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、眼への化学熱傷を含む火傷である。

20

【0357】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）間葉系幹細胞セクレトームは、特定の標的領域に投与される。いくつかの実施形態では、特定の標的領域は目である。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞セクレトームは、特定の標的領域に投与され、他の周囲の領域に広がらないように配合される。

【0358】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）間葉系幹細胞セクレトームは、特定の標的領域に投与され、他の周囲の領域に広がらないように配合される。

30

【0359】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）間葉系幹細胞セクレトームは、特定の標的領域に投与され、標的領域に少なくとも1分間、少なくとも約2分間、3つ少なくとも約1分間、少なくとも約4分間、少なくとも約5分、少なくとも約10分、少なくとも約15分、少なくとも約20分、少なくとも約30分、少なくとも約40分、少なくとも約50分、少なくとも約60分、少なくとも約70分、少なくとも約80分、少なくとも約90分、または少なくとも約2時間留まるように配合される。

【0360】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）間葉系幹細胞セクレトームは、創傷または損傷の直後に患部に投与される。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞セクレトームは、15秒、30秒、1分、2分、3分、4分、5分、10分、15分、20分、30分、40分、50分、60分、70分、80分、90分、2時間、4時間、8時間、12時間、24時間、36時間、48時間、または96時間以内に患部に投与される。

40

【0361】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）間葉系幹細胞セクレトームは局所的に投与される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥及び／または凍結乾燥後（及び再構成）間葉系幹細胞セクレトームは、結膜下注射によって投与される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の凍結乾燥及び／または

50

凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトーム組成物は、それを必要とする対象に投与された場合、超効力を示す。いくつかの実施形態では、間葉系幹細胞セクレトームは、1日1回、2、3、4、5、及び／または最大6回局所的に投与される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後（及び再構成）MSCセクレトーム組成物は、1日1滴または1回の投与で治療効果を可能にする。いくつかの実施形態では、1滴は、1日1、2、3、4、5、または6回投与される。いくつかの実施形態では、1滴は、1時間、2時間、3時間、または4時間の間隔で投与される。いくつかの実施形態では、1滴は、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、または10週間、少なくとも1日1回投与される。いくつかの実施形態では、1滴は、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、または10週間、少なくとも1日2回投与される。いくつかの実施形態では、1滴は、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、または10週間、少なくとも1日3回投与される。いくつかの実施形態では、1滴は、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、または10週間、少なくとも1日4回投与される。いくつかの実施形態では、1滴は、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、または10週間、少なくとも1日5回投与される。いくつかの実施形態では、1滴は、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、または10週間、少なくとも1日6回投与される。

10

【0362】

いくつかの実施形態では、必要とする対象における眼の状態の治療方法は、間葉系幹細胞（MSC）セクレトーム組成物を対象に投与することを含み、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、

20

i. HGF、TIMP-1、TIMP-2、PAI-1（セルピンE1）、VEGF-A、及びb-NGFからなる群から選択される少なくとも1つの栄養因子／サイトカインと、

ii. PEDF（セルピンF1）、IGFBP-2、IGFBP-3、SDF-1、TSG-14、カリクレイン3、MCP-1、アンジオゲニン、MCP-2、アンジオ-2、IL-6、IL-17、G-CSF、M-CSF、GM-CSF、IL-8、TNF- α 、及びPDGFからなる群から選択される少なくとも1つの追加因子と、

iii. DPP-IV（ジペプチジルペプチダーゼ-4）、uPA、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンスポンジン-2、及びトロンスポンジン-1からなる群から選択される少なくとも1つの追加因子と、を含む。

30

【0363】

いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される高レベルの少なくとも1つの因子をさらに含む。

【0364】

いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、1 ng/mL～100 ng/mLの、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、1 ng/mL～200 ng/mLの、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシン-3（TSG-14）、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、1 ng/mL～300 ng/mLの、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンスポンジン-1、ペントラキシ

40

50

ン-3 (TSG-14)、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、1 ng/mL～400 ng/mLの、セルピンE1、セルピンA1、TIMP-1、トロンボスポンジン-1、ペントラキシン-3 (TSG-14)、血小板第4因子及びセルピンF1からなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。

【0365】

いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンボスポンジン-2、トロンボスポンジン-1、アンジオゲニン、DPP-IV、IGFBP-3、及びuPAからなる群から選択される中程度レベルの少なくとも1つの因子をさらに含む。

10

【0366】

いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、400 pg/mL～3000 pg/mLの、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンフィレグリン、エンドスタチン、エンドセリン-1、トロンボスポンジン-2、トロンボスポンジン-1、アンジオゲニン、DPP-IV、IGFBP-3、及びuPAからなる群から選択される少なくとも1つの因子を含む。

【0367】

いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、アポリポタンパク質A1、補体因子D、C反応性タンパク質、シスタチンC、DKK-1、エンプリン、オステオポンチン、ビタミンDBP、MIF、RANTES、uPAR、IL-17a、GDF-15、及びIFN γ からなる群から選択される少なくとも1つの因子をさらに含む。

20

【0368】

いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、抗血管新生因子対血管新生促進因子を、>2、>3、>4、または>5の比の値で含む。いくつかの実施形態では、抗血管新生因子は、PEDF、低レベルのVEGF、及びセルピンE1からなる群から選択される1つ以上の因子及び血管新生促進剤は、VEGF、アンジオゲニン、IGFBP-3、uPA、アンジオ-1、アンジオ-2、エンドセリン-1からなる群から選択される1つ以上の因子を含む。

30

【0369】

いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、低レベルのVEGFをさらに含む。いくつかの実施形態では、治療方法で使用するためのMSCセクレトームは、1 pg/mL～400 pg/mLのVEGFを含む。いくつかの実施形態では、VEGFのレベルは、セルピンE1のレベルより5～10倍低い。いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、1つ以上の抗血管新生因子を含み、VEGFの濃度に対する1つ以上の抗血管新生因子の濃度の合計は、>2、>3、>4、または>5である。

40

【0370】

いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、bFGF、PLGF、及びPDGFを含まない、または非常に低レベルで含む。

【0371】

いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、1000 pg/mL未満のbFGF、PLGF、及びPDGFを含む。

【0372】

50

いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、約4.7～約7.5のpHを有する。

【0373】

いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、リン酸二ナトリウム／一ナトリウム、クエン酸ナトリウム／クエン酸、ホウ酸／クエン酸ナトリウム、ホウ酸／四ホウ酸ナトリウム、及びクエン酸／リン酸二ナトリウムからなる群から選択される緩衝系で配合される。

【0374】

いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、張性改変剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、張性改変剤は、NaCl、KCl、マンニトール、デキストロース、スクロース、ソルビトール、及びグリセリンからなる群から選択される。

10

【0375】

いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、リン酸一ナトリウム／リン酸二ナトリウム、マンニトール、及びトレハロースをさらに含み、組成物は、約pH7.4のpHを有する。

【0376】

いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、二価カチオンをさらに含む。いくつかの実施形態では、二価カチオンは、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、及び Zn^{2+} からなる群から選択される。

20

【0377】

いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、リン酸二ナトリウム／クエン酸、マンニトール、及びトレハロースをさらに含み、組成物は、約pH6.4のpHを有する。

【0378】

いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、接着剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、接着剤は、ヒプロメロース、ポロキサマー407、ポロキサマー188、ポロキサマー237、ポロキサマー338、ヒプロメロース、(HPMC)、ポリカルボフィル、ポリビニルピロリドン(PVP)、PVA(ポリビニルアルコール)、ポリイミド、ヒアルロン酸ナトリウム、ジェランガム、ポリ(乳酸-コグリコール酸)(PLGA)、ポリシロキサン、ポリイミド、カルボキシメチルセルロース(CMC)、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、フィブリン接着剤、ポリエチレングリコール、及びGelCOREからなる群から選択される。

30

【0379】

いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、生体異物成分、フェノールレッド、ペプチド及び生体分子<3kDa、抗生物質、タンパク質凝集体>200nm、細胞、非エクソソーム／非細胞外小胞細胞破片、ホルモン、及びレグルトミンからなる群から選択される1つ以上の成分を含まない。

40

【0380】

いくつかの実施形態では、治療方法で使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後のMSCセクレトーム組成物は、HGF、ペントラキシン-3(TSG-14)、VEGF、TIMP-1、セルピンE1、及び<5ng/mLのIL-8を含む。

【0381】

いくつかの実施形態では、治療組成物の方法で使用するためのMSCセクレトームは、
i. 0.3～4.5ng/mLのHGFと、
ii. 0.5～20ng/mLのペントラキシン-3(TSG-14)と、
iii. 100～600pg/mLのVEGF；

50

i v . 1 0 ~ 2 0 0 n g / m L の T I M P - 1 と、
v . 2 0 ~ 8 0 n g / m L の セ ル ピ ン E 1 と、
v i . < 5 n g / m L の I L - 8 と、を含む。

【 0 3 8 2 】

いくつかの実施形態では、治療方法において使用するための凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の M S C セクレトーム組成物は、抗血管新生 M S C セクレトームまたは抗瘢痕化 M S C セクレトームを含む。

【 0 3 8 3 】

いくつかの実施形態では、本開示は、眼の状態を治療するための方法をそれを必要とする対象に提供し、本方法は、間葉系幹細胞 (M S C) セクレトーム組成物を対象に投与することを含み、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の本 M S C セクレトーム組成物は、

i . 1 m L あたり 2 μ g ~ 2 0 μ g の M S C セクレトームと、
i i . 1 m L あたり 2 m g ~ 3 m g の一塩基性リン酸ナトリウムと、
i i i . 1 m L あたり 1 1 m g ~ 1 2 m g の二塩基性リン酸ナトリウムと、
i v . 1 m L あたり 1 1 . 5 m g ~ 1 3 m g のマンニトールと、
v . 2 3 m g ~ 2 4 m g トレハロース二水和物と、
v i . 1 m L あたり 0 . 5 m g ~ 2 m g の任意選択のヒプロメロースと、を含み、
p H は約 4 . 7 ~ 約 7 . 5 である、安定した間葉系幹細胞 (M S C) セクレトーム製剤である。

【 0 3 8 4 】

いくつかの実施形態では、本開示は、眼の状態を治療するための方法をそれを必要とする対象に提供し、本方法は、間葉系幹細胞 (M S C) セクレトーム組成物を対象に投与することを含み、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の本 M S C セクレトーム組成物は、

i . 0 . 0 0 4 % ~ 0 . 0 8 % w / w の M S C セクレトームと、
i i . 4 % ~ 5 % w / w の一塩基性リン酸ナトリウムと、
i i i . 2 1 . 5 % ~ 2 3 % w / w の二塩基性リン酸ナトリウムと、
i v . 2 3 % ~ 2 5 % w / w のマンニトールと、
v . 4 6 % ~ 4 8 % w / w のトレハロース脱水と、
v i . 1 % ~ 3 % w / w の任意選択のヒプロメロースと、を含み、
p H は約 4 . 7 ~ 約 7 . 5 である、安定した間葉系幹細胞 (M S C) セクレトーム製剤である。

【 0 3 8 5 】

いくつかの実施形態では、本開示は、眼の状態を治療するための方法をそれを必要とする対象に提供し、本方法は、間葉系幹細胞 (M S C) セクレトーム組成物を対象に投与することを含み、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の本 M S C セクレトーム組成物は、

i . 1 m L あたり 2 μ g ~ 2 0 μ g の M S C セクレトームと、
i i . 1 m L あたり 2 m g ~ 3 m g の一塩基性リン酸ナトリウムと、
i i i . 1 m L あたり 1 1 m g ~ 1 2 m g の二塩基性リン酸ナトリウムと、
i v . 1 m L あたり 1 1 . 5 m g ~ 1 3 m g のマンニトールと、
v . 2 3 m g ~ 2 4 m g のトレハロース二水和物と、を含み、
v i . p H は約 4 . 7 ~ 約 7 . 5 である、安定した間葉系幹細胞 (M S C) セクレトーム製剤である。

【 0 3 8 6 】

いくつかの実施形態では、本開示は、眼の状態を治療するための方法をそれを必要とする対象に提供し、本方法は、間葉系幹細胞 (M S C) セクレトーム組成物を対象に投与することを含み、凍結乾燥用及び／または凍結乾燥後の本 M S C セクレトーム組成物は、

i . 0 . 0 0 4 % ~ 0 . 0 8 % w / w の M S C セクレトームと、
i i . 4 % ~ 5 % w / w の一塩基性リン酸ナトリウムと、
i i i . 2 1 . 5 % ~ 2 3 % w / w の二塩基性リン酸ナトリウムと、
i v . 2 3 % ~ 2 5 % w / w のマンニトールと、

v . 4 6 % - 4 8 % w / w のトレハロース脱水と、を含み、
v i . p H は約 4 . 7 ~ 約 7 . 5 である、安定した間葉系幹細胞 (M S C) セクレトーム
製剤である。

【 0 3 8 7 】

F . キット

キットは、本明細書に開示されるように、容器に入った M S C セクレトームまたは同じ
く容器に入った M S C セクレトームを調製するための馴化培地、及び使用説
明書を含むことができる。さらに、キットには、眼の治療に使用するための溶液を調製す
るための混合用の構成要素、及び混合及び使用のための説明書を含めることができる。

【 0 3 8 8 】

容器は、少なくとも 1 つのバイアル、ウェル、試験管、フラスコ、ボトル、注射器、ま
たは他の容器手段を含むことができ、そこに容器に入った M S C セクレトームまたは M S
C セクレトームの調製に使用するための馴化培地を含み、場合によっては、適切に等分さ
れる。追加の構成要素が提供される場合、キットには、このコンポーネントを配置できる
追加の容器を含めることができる。そのような容器は、所望のバイアルが保持される射出
成形または吹込成形されたプラスチック容器を含み得る。容器及び / またはキットには、
使用説明書及び / または警告を記載したラベルを含めることができる。

【 0 3 8 9 】

本開示は、以下の実施例によってさらに説明され、これは、さらなる限定として解釈さ
れるべきではない。本出願を通して引用されたすべての図及びすべての参考文献、 G e n
b a n k 配列、特許、及び公開された特許出願の内容は、参照により本明細書に明示的に
組み込まれる。

【 0 3 9 0 】

本発明は、 M S C セクレトームを特徴付けるための試験及び / またはアッセイのパネル
を含むキットを提供することができ、パネルは、少なくとも 2 つの特徴付けアッセイを含
み、特徴付けアッセイは、物理的成分の特徴付け、酸化ストレスアッセイ、安全性分析、
安定性アッセイ、増殖アッセイ、遊走アッセイ、血管新生アッセイ、分化 / 瘢痕化アッセ
イ、炎症アッセイ、及び / または上皮バリア完全性アッセイからなる群から選択される。
いくつかの実施形態では、試験及び / またはアッセイのパネルは、本明細書に記載される
ように、 M S C セクレトームを同定する。

【 0 3 9 1 】

本発明は、 M S C セクレトームロット間の一貫性を決定するための試験及び / またはア
ッセイのパネルを含むキットを提供することができ、パネルは、 1 つ以上の特徴付けアッ
セイを含み、特徴付けアッセイは、物理的成分の特徴付け、酸化ストレスアッセイ、安全
性分析、安定性アッセイ、増殖アッセイ、遊走アッセイ、血管新生アッセイ、分化 / 瘢痕
化アッセイ、炎症アッセイ、及び / または上皮バリア完全性アッセイからなる群から選
択される。いくつかの実施形態では、試験及び / またはアッセイのパネルは、本明細書に記
載されるように、 M S C セクレトームを同定する。

【実施例】

【 0 3 9 2 】

実施例 1 : セクレトームの特徴付け
生化学構成

M S C セクレトームの生化学構成は、次のようなさまざまな因子や活性の存在について
分析でき、以下を含む。

- ・ I D O (インドールアミン - 2 , 3 - ジオキシゲナーゼ) 酵素活性アッセイ、
- ・ H G F 、 F G F - 7 、 T I M P - 1 、 T I M P - 2 トロンボスポンジン、 P A I - 1 (セルピン E 1) 、 V E G F - A 、 b - N G F を含むがこれらに限定されないいくつかの栄
養因子 / サイトカインの閾値 p p m レベル (E L I S A または l u m i n e x によって評
価される) 、
- ・ 追加因子 : s F L T - 1 、 P E D F (セルピン F 1) 、 I G F B P - 2 、 I G F B P -

10

20

30

40

50

3、SDF-1、TSG-14、カリクレイン3、MCP-1、bFGF（FGF2）、
アンジオゲニン、MCP-2、アンジオ-2、IL-6、IL-17、G-CSF、M-
CSF、GM-CSF、IL-8、TNF-ベータ、PDGF。

【0393】

MSCセクレトームの生化学構成は、1日あたり約10～150,000pg/10⁵
細胞の範囲の因子に基づいて分析することができる。

【0394】

セクレトーム内のEV（細胞外小胞）を定量化するための粒子カウントも実行される。

【0395】

脂質含有量は必要に応じて評価される。

【0396】

生物物理学的特徴付け／リリースを実行でき、1）FTIR分光法、2）緩衝液交換／
濃縮セクレトームプロセス（緩衝液交換プロセスは、セクレトームを濃縮するために使用
され、また、場合によっては、事前定義された分子量カットオフ未満の分子を除去できる
サイズ排除プロセスである）を含む。例えば、VEGFは非常に小さいタンパク質（42
kDa）であるため、採用されている濾過カットオフに基づいて、VEGFのほぼすべて
（または事実上すべて）を除去することができる。

【0397】

精製及び濃縮されると、MSCセクレトームはさらに下流の処理にかけられる。このよ
うな下流の処理には、MSCセクレトームを投与用に準備するための緩衝液交換プロセス
が含まれる。緩衝液交換は、媒体成分を除去し、それらを所望の配合成分と交換するため
に、中空繊維接線流法を採用することができる。緩衝液交換処理工程はまた、セクレト
ームの濃縮をもたらす可能性もある。

【0398】

その後、セクレトームを投与用に配合することができる。

【0399】

実施例2：セクレトームの生物作用能と生物物理学的特徴付け

本実施例では、セクレトームの同一性を決定する方法、組成分析、生化学的及び生物物
理学的特徴付け、及びセクレトーム特徴付けで使用するための細胞ベースのアッセイにつ
いて記載する。

【0400】

この実施例に記載される分析手法を使用して、さまざまな配合の性能と安定性を評価す
ることができる。最高の安定性と耐性プロファイルを備えた配合物は、アルカリ性齧歯類
熱傷モデルを使用して、用量反応及び投与計画の評価を受ける。創傷治癒までの時間及び
創傷部位での組織病理学、ならびに局所毒性を評価することができる。

【0401】

有効性アッセイ：

馴化培地の特性を決定するために、以下を含む様々な有効性アッセイを実施することが
できる：

【0402】

トランスウェル遊走アッセイ角膜炎細胞（または検証後の他の細胞代理）－（例えば
、創傷閉鎖）を実施することができる。このアッセイは、セクレトームに存在する栄養成
長因子（例えば、HGF、FGF）の測定基準を提供する。

【0403】

ヒト角膜炎細胞増殖アッセイ（例えば、創傷閉鎖）。このアッセイは、セクレトーム
に存在する栄養成長因子（例えば、HGF、FGF）の測定基準を提供する。

【0404】

ロットが血管新生促進性ではないことを示すための特徴付けアッセイであることができ
る内皮細胞管形成アッセイを実施することができる。このアッセイは、セクレトーム製品
の血管新生の可能性の尺度を提供する－それは抑制性のはずである（例えば、抗血管新生

10

20

30

40

50

特性を示す)。このアッセイにより、血管新生能の低下を試験することができる。アッセイでは、血管新生反応または血管新生能力は、未処理と比較して低下する。例えば、実験には2つの試料グループが設けられる：1) セクレトームで処理されていないが血清含有培地（通常の血管新生反応として知られる管形成を誘発する）で処理される、2) セクレトームと血清含有培地で処理される。セクレトームがこの正常な血管新生反応を弱めるため、血管新生の可能性が低下する。例えば、図5及び6を参照。このアッセイは、抗血管新生シグナルと血管新生促進シグナルの比率を反映する。陰性の結果は、抗：促進比が高いことを確認し、セクレトーム製品がCNV（脈絡膜血管新生）または一般的な血管新生を促進しないことを確実にする。例えば、MSCセクレトームの血管新生調節能力を評価するために、いくつかの因子の発現レベル及び活性を評価するための他のアッセイ（本明細書に記載の枯渇実験を通して明らかにされる）も使用される。TGF β 誘導性筋線維芽細胞分化の抑制アッセイ（例えば、抗瘢痕化）を実施することができる。このアッセイは、瘢痕化（または角膜混濁）を抑制するセクレトームの能力を評価し、qPCR、蛍光顕微鏡、及びウエスタンブロットによって評価されるのは、間質線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化（例えば、平滑筋アクチン）及びマトリックス沈着に特徴的な要因である。

10

【0405】

酸化ストレス防止アッセイを実施することができる。3Dモデルアッセイを使用して、読み取り値として効力を評価し、角膜上皮へのナイトロジェンマスタードガスの損傷を防止／修復することもできる。このようなアッセイでは、肉眼で観察して組織の健康状態を確認するとともに、さまざまな抗炎症マーカー（例えば、IL-8など）をアッセイする。

20

【0406】

FDAガイダンスは、細胞及び遺伝子製品に関する業界ガイダンスを提供している。（参照により本明細書に組み込まれる [fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/cellularandgenetherapy/ucm243392.pdf](https://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/cellularandgenetherapy/ucm243392.pdf) を参照）。このガイダンスは、効力アッセイと試験の実施、及びそのような有効性アッセイがMSCセクレトームの治療効果とどのように相関しているかを標準のFDAガイドラインの下で有効性について評価できることを規定している。

30

【0407】

安全性の特徴付け

セクレトームは、血液の適合性を評価し、無菌性、パイロジェン及びエンドトキシンレベルのテストを実施することができる。一般に、現在の最新FDAガイダンスは、そのような分析に使用できる（例えば、2012FDAガイダンス：パイロジェン及びエンドトキシン試験）。（参照により本明細書に組み込まれる、[fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM310098.pdf](https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM310098.pdf) を参照）。

【0408】

溶血及び血球凝集のアッセイを含む血液適合性を評価する方法も、例えば重度の眼熱傷で全身曝露が発生した場合に、準備されたMSCセクレトームで全身曝露の問題がないことを確認するために用いられる。これらの方法は、既存の技術（Majiet al. ; Saswati et al. ; Nayak et al.）に基づいており、健康な同意ドナーからの血液を使用する。簡単に説明すると、溶血の場合、赤血球（RBC）をMSCセクレトームと37℃で1時間共インキュベートできる。オストニックPBSで処理されたRBCはネガティブ対照として機能し、蒸留水はポジティブ対照として機能する。インキュベーションと遠心分離の後、540nm（ A_{max} ヘモグロビン）での吸光度を測定できる。溶血％は： $100\% \times (A_{MSC} - A_{blank}) / A_{蒸留水}$ として計算できる。この研究により、溶血を誘発し始める用量を確立し、MSCセクレトームがISO/TR7406（溶血率<5%）に従って血液適合性があるかどうかを評価すること

40

50

ができる。血球凝集の場合、RBC懸濁液を96ウェルU底ディッシュでMSCセクレトームと37℃で2時間共インキュベートできる。血球凝集の肯定的な結果はRBC懸濁液（凝集したRBC格子は溶液から落ちないため）であるが、否定的な結果は、RBCが溶液から落ちた、結果としてウェルの底にあるRBC「ボタン」である。MSCセクレトームは血球凝集活性を示さない。

【0409】

分析のための無菌及びエンドトキシン法も開発される。これらの方法は、生成された各MSCセクレトームの無菌及びエンドトキシンテストを実行するのに役立つ。これらのアッセイは、試験が生存可能な汚染微生物または汚染エンドトキシンの存在を確実に検出できることを実証するために用いることができる。すべてのテストコンポーネントを検証して、テスト方法が生存可能な微生物またはエンドトキシンの存在を一貫して検出できることを実証することもできる。

10

【0410】

生化学的及び生物物理学的特徴付け

MSCセクレトームは複雑に構成要素が組み合わされているため、最も関連性が高く意味のある有効性アッセイを開発するために、セクレトーム構成要素を特徴付けることが有益である。分子分析、生化学的分析、生物物理学的分析など、特徴付け手法のさまざまな組み合わせを使用して、有効性を測定できる。

【0411】

このような特徴付け研究は、1) MSCセクレトーム中の分子実体の包括的（及び定量的）マッピングすることと、2) 生物活性に対する選択された要因の寄与を測定することと、3) 生物物理学的パラメータを測定することと、に焦点を当てる。重要なのは、各フォーカスエリアをMSCセクレトームの各調製に適用して、調製の一貫性を評価できることである。

20

【0412】

この実施例では、MSCセクレトームの分子構成の特性について記載する。MSCセクレトームは、タンパク質因子と細胞外小胞（EV）で構成されているため、両方の画分を特徴付ける必要がある。生物分析技術（タンパク質アレイ、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、質量分析、及びイムノプロットティングを含む）の組み合わせを使用して、MSCセクレトーム内のこれらの分子の特性を評価することができる。タンパク質アレイと質量分析は、因子の存在を決定し、因子を特定するために採用されてきた。ELISAなどのより定量的な手法を使用して、存在する各因子のレベルを測定し、いくつかの分析物の範囲を確立することができる。

30

【0413】

MSCセクレトームの栄養因子や、全体的な低血管新生誘導などの特性を含む、いくつかの因子が特定されている。これまでにMSCセクレトームについて特定された因子には、ペントラキシン-3、TIMP-1、セルピンE1、TSP-1、HGFが含まれる。

【0414】

栄養及びその他の因子に加えて、EVはセクレトームの主要な構成要素であり、EV自体が治療キャンペーンの焦点となっている。APIのEVコンポーネントを評価するために、一連の分析を実行することができる。まず、脂質結合色素（ナイルレッドなど）を使用して簡単な脂質含有量分析を実行し、製品ロットの総脂質の定量的測定値を生成することができる。さらに、NanoSightNS300を使用して粒子数とサイズ分布の評価を行うことができる。この分析は、粒子濃度と一貫した粒子分布サイズの範囲を確立するために、各ロットで実行できる。標準マーカー（AUX、TSG101、CD63、CD9、及びCD81を含む）のイムノプロットティングを使用したEV画分の生化学的特徴付けを実行できる。

40

【0415】

発明者らの生化学的分析を補完するために、枯渇研究を実行して、重要な因子の個々の寄与を抽出することができる。簡単に説明すると、抗体ベースのプルダウン法を使用して

50

、定義された因子をMSCセクレトームから除去することができる。枯渇はウエスタンブロットによって確認でき、一連のバイオアッセイで評価できる（以下で説明）。タンパク質画分とEV画分の寄与を評価するために、同様の研究を行うことができる。

【0416】

MSCセクレトームの生物物理学的特性は、蛍光、静的光散乱、動的光散乱を使用してタンパク質の安定性指標を特徴付けるプラットフォームで評価することも可能である。次のパラメータを測定できる：

- ・熱融解：曝露したトリプトファンまたはチロシン残基のタンパク質が配座変化を起こす固有の蛍光を測定する。このアッセイは、タンパク質が変性し始めるときの蛍光強度の変化またはピークシフトを測定する。さまざまな配合のランク付けと比較を可能にする。
- ・SYPROによる熱融解：示差走査熱量測定（DSF）を使用する。タンパク質が変性する際に曝露した疎水性残基に結合するときの色素（SYPRO Orange、Molecular Probes、Inc.）のスペクトルシフトを測定する。蛍光の感度により、非常に低濃度のMSCセクレトームでの測定が可能になる。
- ・熱凝集：熱傾斜中にAPIが凝集する凝集挙動と温度を監視する。SLSを使用して2つの波長（266 nm及び463 nm）で測定し、小さい粒子と大きい粒子を区別する。さまざまな製剤のランク付けと比較を可能にし、タンパク質の変性と凝集のダイナミクスに関する情報を提供する。
- ・デルタG：化学変性剤の添加後のAPIの蛍光の変化を測定する。タンパク質の安定性の定量値、またはMSCセクレトーム、デルタGの変性に必要なエネルギー量の計算を可能にする。
- ・粘度：少量の材料を使用してMSCセクレトーム製剤の粘度を測定する。さまざまな配合での評価と比較を可能にする。

【0417】

上記の生物物理学的測定基準は、さまざまなMSCセクレトーム製剤を評価し、MSCセクレトームの拡張された及び／または促進された安定性研究を実行するための重要な安定性パラメータを確立する。pH 6.4及び7.4で配合された2つの異なるMSCセクレトームの安定性分析を実施した。

【0418】

生物作用能

理論的根拠：MSCセクレトームの効力を評価するための細胞ベースのアッセイプログラムの開発が始まった。細胞ベースのアッセイプログラムは、以下を達成することを目的としている：

- ・製品開発全体を通じて、製品の活性、品質、一貫性を実証すること、
- ・ロットリリースの仕様をサポートするデータのコレクションを生成すること、
- ・製造の変更を評価するための基礎を提供すること、
- ・MSCセクレトームの安定性を評価すること。

【0419】

MSCセクレトームを適切に評価するために、本明細書で提供される実施例に記載されるように、一連のバイオアッセイを開発して、MSCセクレトームの生物作用能を評価することができる。

【0420】

バイオアッセイ

MSCセクレトームの一連のバイオアッセイを開発するために、角膜創傷治癒、即ち、上皮細胞の移動と増殖、間質細胞の分化（瘢痕化）、血管新生、及び炎症を調整する主要なイベントを含むプロセスに焦点を当てることができる。これらの各プロセスを仲介するMSCセクレトームの能力を評価するためのバイオアッセイを採用することができる。

【0421】

遊走と増殖：

外傷に続いて、角膜上皮細胞は、閉鎖を媒介するために、創傷の前縁で分裂及び遊走し

10

20

30

40

50

なければならない (Ljubimov A V.、Prog Retin Eye Res. 2015 Nov; 49: 17-45)。一次角膜上皮細胞 (または不死化角膜上皮細胞) 及びインビトロ細胞アッセイにより増殖と遊走を促進するMSCセクレトームの能力を評価する。

【0422】

増殖のために、角膜上皮細胞は、定義された用量でMSC-Sの存在下で培養することができる。定義されたインキュベーション期間 (例えば、24時間及び48時間) 後の生細胞を定量化するための生細胞染色 (例えば、MTTまたはWST-8)。遊走については、角膜上皮細胞を、成長因子を差し引いた基礎培地中の8ミクロンのポリカーボネート膜を備えたチャンバーに播種することができるトランスウェル遊走アッセイを使用することができる。チャンバーは、定義された用量でAPIが追加された基本培地を含む培養皿ウェル (24ウェル皿) に配置できる。24時間のインキュベーション後、膜を通して移動した細胞は、蛍光 (例えば、カルセインAM) または比色 (例えば、クリスタルバイオレット) 染色のいずれかを使用して定量化することができる。

10

【0423】

分化／瘢痕化：

角膜の間質層 (上皮の下層) を破る眼の外傷の後、角膜線維芽細胞は、トランスフォーミング成長因子- β (TGF β) によって媒介されるプロセスで平滑筋アクチン (SMA) を発現する筋線維芽細胞に分化するように誘発される。このプロセスは通常の創傷治癒プロセスを伴うが、瘢痕化や視力障害など、目には望ましくない結果をもたらす。この視力障害は、筋線維芽細胞が大量の無秩序な細胞外マトリックスを沈着させ、角膜の透明性が失われる。筋線維芽細胞の分化を防止または阻害するMSCセクレトームの能力を評価するためのアッセイが開発されており、したがって、MSCセクレトームの効力の尺度でもある。

20

【0424】

ヒト角膜線維芽細胞は、モデル細胞システムで利用できる。細胞をTGF β 1で処理して、漸増する濃度のAPIの存在下 (または非存在下) で分化を誘導し、さらに24時間インキュベートさせる。TGF β 1で処理された線維芽細胞は、筋線維芽細胞に急速に分化し、平滑筋アクチンの発現レベルが著しく増加し、TGF β 2、コラーゲンI、コラーゲンIII (通常は分化中にアップレギュレートされる) 及びTFGB3、MMP-2、MMP-9 (通常、分化中にダウンレギュレートされる) などのいくつかの他の因子の変調によって特徴付けられる。qPCR及びイムノブロットングを (それぞれmRNA及びタンパク質に対して) 使用して、これらの分化の分子的特徴の発現レベルに対するMSCセクレトームの効果を測定することができる。MSCセクレトーム治療は、SMAなどの因子の発現を減少させ、その有効性の反映指標となり得る。

30

【0425】

血管新生：

健康な角膜は無血管で血管がない。しかし、外傷後、角膜血管新生がしばしば起こり、それが視力障害、さらには視力喪失の一因となる。より具体的には、血管新生は、組織の瘢痕化、脂質沈着、間質出血、及び角膜浮腫を誘発し、視力を著しく変化させる可能性がある。MSCセクレトームの重要な特徴は、治癒過程で血管新生を阻害する能力である。血管新生を阻害するMSCセクレトームの能力を評価するために、細胞ベースのアッセイを実施することができる。

40

【0426】

内皮管形成アッセイは、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUEVC) を使用して実施することができる。このアッセイは、毛細血管様の血管構造を形成する内皮細胞の再編成を測定することにより、血管の発達を評価するための標準的なアッセイである。簡単に説明すると、HUEVC細胞を基底膜抽出物 (コラーゲンまたはMatrigel (登録商標); BD Biosciences) の薄層に播種し、APIの存在下または非存在下でインキュベートする。2~6時間以内に、血管新生促進分子によってサポートされている場合、内

50

皮細胞は分裂し、血管ネットワークを形成し始める。MSCセクレトームがこのネットワークの形成を阻害することができるかどうかを評価することができる。画像を取得し、画像解析ソフトウェアを使用して、分岐点、管の長さ、数、ループの数と面積、細胞で覆われた面積を測定することができる。MSCセクレトームは血管新生を抑制することができる。

【0427】

管形成アッセイを補完するために、特定の因子（例えば、TIMP1、セルピンE1）をAPIから削除または枯渇させ、アッセイで影響を評価する枯渇研究を行うことが役立つ。これらのアッセイを実行する際の目標は、MSC-Sの重要な抗血管新生分子（多数）を特定することであり、これは放出基準の開発に役立つ。

10

【0428】

炎症：

いくつかの動物モデル（Yamagami S., et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005 Apr; 46 (4) : 1201-7; Gao, N., et al., Am J Pathol. 2011 Nov; 179 (5) : 2243-53; and Jin, Y., et al., Mol Vis. 2007 Apr 27; 13 : 626-34）は、角膜上皮の損傷が角膜輪部の血管に急性の炎症反応を引き起こし、白血球と好中球の蓄積と、樹状細胞、マクロファージ、リンパ球の支質と損傷した上皮への遊走を引き起こすことを示している。角膜のこの増加した免疫浸潤は血管新生を引き起こし、それは視力喪失をもたらす。実際、発明者らの科学諮問委員会の臨床医は、角膜損傷の急性期における炎症反応を弱めることの重要性を強調している。MSCセクレトームのこの重要な能力を特徴付け、プロセスのバイオアッセイを開発するために、インビトロ細胞アッセイ及びインビトロ組織アッセイを開発して使用することができる。

20

【0429】

インビトロ細胞アッセイを開発するために、炎症反応を誘発するリポ多糖（LPS）の能力を利用することができる。LPSはグラム陰性菌の細胞膜の成分であり、炎症細胞によって産生されるさまざまなサイトカインの分泌の強力なトリガーである。LPSを角膜実質に注入すると、好中球や単球細胞などの炎症細胞が間質に急速に浸潤し、ウサギの角膜潰瘍を引き起こす。具体的には、間質線維芽細胞は、ケモカイン及び接着分子の発現を通してLPS及びトリガー炎症性細胞浸潤の存在を認識する（例えば、IL-8及びMCP-1）（Fukuda K., Int J Mol Sci. 2017 Aug 23; 18 (9)）。一次ヒト角膜線維芽細胞は、MSCセクレトームの存在下または非存在下でLPSで処理することができる。細胞は、評価の前に24時間インキュベートすることができ、その間、培養液中でIL-8及びMCP-1（免疫細胞化学誘引物質）のレベルを測定することができる。ELISAを、サイトカインレベルを測定するための定量的手法として使用することができる。MSCセクレトームによる治療は、培地中のIL-8及びMCP-1のレベルを低下させる。

30

【0430】

第二に、3D組織モデルを使用できるモデルは、インビトロで再構築されたヒト角膜組織モデルであり、インビボの角膜組織の重要な特徴を構造的及び機能的に再現する。重要なのは、このモデルは自然の角膜組織のように振る舞い、化学熱傷（例えば、窒素マスタード）に炎症反応を複製する。ナイトロジェンマスタード（NM）ガス熱傷のモデルを実装でき、MSCセクレトームが免疫応答を弱める能力を評価するために使用できる。このモデルは一般に、炎症反応を評価するためのインビボ条件を模倣するために使用される。インビトロモデルと同様に、NM熱傷後のMSCセクレトームによる治療に応答したサイトカインプロファイル（例えば、IL-8のレベル）を評価することができる。MSCセクレトームで治療した組織ではIL-8のレベルを下げる可以降低することができる。

40

【0431】

実施例3：MSCセクレトームの特徴と特性

50

創傷治癒及び修復に関連する顕著な因子がMSC-Sを構成する。MSC-Sの生化学的特徴付けは、105種類のタンパク質を含むヒト成長因子／サイトカインアレイを使用して行われ（図2）、高度に表現されたタンパク質のほとんどは、創傷治癒の促進または組織修復の重要なプロセスの調節（例：酸化ストレスの低減）に関与している。

【0432】

MSC-Sは、凝集の傾向が低いことを示している。MSC-Sを分析して、安定性と凝集傾向を評価した。この研究では、MSC-SをpH6.4及び7.4にてリン酸緩衝液で調製した。MSC-Sは、MSC-Sを4℃、室温（20℃）、37℃で7日間保存することにより、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって最初に特徴付けられ、次にSECによってそれらの試料を再評価した。1つのSECピーク（RT8.5分）のわずかな増加のみが観察され、温度の上昇と相関しており、経時的な凝集物質のわずかな増加を反映している。

【0433】

凝集傾向をさらに分析するために、静的光散乱（SLS）熱凝集分析を実施した（図3）。このアッセイは、266nm及び473nmでSLSを測定し、SLS266測定は、試料強度の変化に対してより敏感であり、小さな粒子形成の開始を通知するが、SLS473測定は、より大きな凝集体を検出するのに役立つ。小さな凝集体（Tagg-266nm）の開始温度は、pH6.4（54℃、図3B）と比較して、pH7.4（68～70℃、Fig3A）の試料の方が高いことが観察された。これは、MSC-Sが熱凝集傾向の観点からpH7.4でより安定していることを示している。重要なことに、大きな凝集体（SLS473nm）の感知できる信号は、テストした両方のpH値の温度傾斜全体で観察されず（図3A、3B）、これは、大きな凝集体の形成の程度が非常に低いことを示している。

【0434】

MSC-Sは、一次ヒト角膜上皮細胞の遊走を促進する。MSC-S（ロット2）の能力を、急速な創傷閉鎖の重要なプロセスである、角膜上皮細胞の遊走を促進するために評価した。一次ヒト角膜上皮細胞を使用して遊走を測定するトランスウェル遊走アッセイを実施した。細胞は、多孔質膜底部を備えた上部チャンバー内の基本培地に播種された。次に、チャンバーをMSC-Sを含む培地に入れた。24時間後、遊走した細胞を定量した。データは、MSC-Sが実際に上皮細胞の遊走を促進することを示した（図4A、B）。さらなるデータは、熱変性（90℃／10分）はMSC-Sの遊走促進活性を無効にし（図4B）、アッセイは安定性を示すアッセイとして確立された。

【0435】

MSC-Sは抗血管新生特性を示す。MSC-Sの特徴付けを、血管新生に関連する重要なタンパク質を特定し、インビトロでの内皮管形成への影響を評価するために実施した。MSC-Sの含有量を、ヒト血管新生タンパク質アレイ（R&D Systems）を使用して分析した（図5A）。さまざまな製造ロットが分析され、タンパク質組成は、同一性と相対量の両方が一貫していることがわかった。アレイの分析は、最も顕著なタンパク質が抗血管新生として分類され、血管新生促進分子の2～7倍過剰に存在することを示している（図5B）。特に、マトリックスメタロプロテアーゼ抑制剤であるTIMP-1は高レベルで存在し、これは、TIMP-1をMSCによって産生される主要な抗血管新生モジュレーターとして特定する報告と一致している（Zanotti, et al., Leukemia. 2016 May; 30(5): 1143-54）。抗血管新生生化学的フィンガープリントは、血管新生機能の抑制が観察された細胞ベースのアッセイに変換された。HUVEC管形成アッセイを使用して、MSC-Sとのインキュベーションにより、管の全長、分岐点の数、ループの数などの管形成パラメータが減衰することが示された（図6）。まとめると、これらの特性の抑制は、MSC-Sが血管新生を阻害することを強調している。MSC-Sのこれらの抗血管新生特性は、創傷治癒中に角膜血管新生を阻害する可能性があり、それによって視力障害または失明の可能性を減らすため、眼科治療として非常に適している。

【0436】

MSC-Sは抗瘢痕化特性を示す。MSC-Sの抗瘢痕化能力の評価が実施した。角膜の外傷に続いて、間質の線維芽細胞は、いくつかのバイオマーカーによって特徴付けられるプロセスで、瘢痕化の特徴である筋線維芽細胞に分化する。筋線維芽細胞の分化は、皮膚線維芽細胞を使用し、分化の強力な誘導因子であるTGFβ-1で処理することにより、インビトロで複製することがでる(Li, M. et al., Int Wound J. 2017 Feb; 14 (1) : 64-73)。このアッセイを使用して分化を阻害するMSC-Sの能力を評価し、qPCRを使用して、筋線維芽細胞の分化中にアップレギュレートされる主要なバイオマーカーであるTGFβ-2及び平滑筋アクチン(SMA)の発現を評価した(図7)。データは、MSC-SがTGFβ-2とSMAの両方の発現を弱めるのに強力な効果を持っていることを示し、筋線維芽細胞の分化の抑制を示している。したがって、MSC-Sは、抗瘢痕化特性と、瘢痕のない角膜創傷治癒を仲介する可能性を示した。

10

【0437】

MSC-Sはインビトロ角膜細胞増殖を増加させる。細胞増殖を促進するMSC-Sの能力を評価するために、一次ウサギ角膜上皮細胞を使用してインビトロアッセイを実施した。MSC-Sと共にインキュベートした場合、一次ウサギ角膜細胞におけるインキュベーション後に用量依存的に細胞増殖が増加する(例えばFernandes-Cunha, GM, et al., Stem Cells Transl. Med. 2019を参照)。

20

【0438】

MSC-Sは、さまざまな角膜外傷モデルのインビボ創傷閉鎖を改善する。インビトロ設定で細胞増殖の増加を示した後、マウスモデルにおける機械的角膜損傷に続いて創傷治癒を評価した。MSC-Sは1滴として4日間毎日投与され、治療中止後24時間で評価した。生理食塩水と比較して、MSC-Sを受けた眼に有意な創傷閉鎖が観察された(例えば、Fernandes-Cunha, GM, et al., Stem Cells Transl. Med. 2019を参照) (*、 $p < .05$)。

【0439】

MSC-Sの2番目のロット(BSSで配合)を、ラットの角膜アルカリ熱傷モデルを使用して評価した。角膜アルカリ熱傷誘発ラットへのMSC-Sの局所適用は、角膜損傷を有意に減少させた(図8)。アルカリ熱傷は、重度の上皮創傷、血管新生及び混濁を含む非常に明白な重度の角膜損傷を誘発し、それは8日目まで持続した(図8)。図8は、アルカリ熱傷によって誘発された実質的な上皮損傷が、損傷後2、3、及び4日目に、たった16.7±14.3%、48.0±6.04%、及び69.4±6.74%の創傷閉鎖であったビヒクル対照群対して、MSC-S治療群それぞれ47.0±37.2%、75.7±23.6%、及び92.1±5.73%の創傷閉鎖の実質的な改善を示した。

30

【0440】

MSC-Sは、角膜化学熱傷の不透明度と新生血管サイズを減少させる。MSC-Sは、角膜アルカリ熱傷モデルの不透明度と新生血管サイズを大幅に減少させた(図10)。不透明度スコアは、ビヒクル処置群の5、6、7、8日目の3.0±0、4.0±0、3.75±0.5及び3.75±0.5と比較して、MSC-S治療群では2.25±0.5、2.75±0.5、2.0±0及び2.5±0.6であった。(それぞれ $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 及び $*p < 0.05$)。さらに、新生血管サイズスコアは、ビヒクル対照治療群の5、6、及び7日目の2.5±0.6、3.0±0、及び3.0±0と比較して、MSC-S治療群では1.5±0.6、1.75±0.5、及び1.75±0.5であった。(それぞれ $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $**p < 0.01$)。このデータは、MSC-Sの抗血管新生特性(図5及び6)及びMSC-Sの抗瘢痕化特性(図7)を示したインビトロデータと一致している。

40

【0441】

実施例4：角膜創傷の治療に安全で効果的なMSCセクレトームMSC-Sを含む薬学的

50

眼科用製剤

局所点眼薬の開発は、涙液の代謝回転と希釈、鼻涙管ドレナージ、及び反射まばたきを含む、多くの解剖学的制約によって妨げられ、深い眼組織に到達するのは局所投与量の5%未満になることが多いにある (Gaudana et al., 2009)。角膜創傷の場合、最初の外傷が角膜上皮に裂け目を引き起こし、それによって局所的に適用されたMSC-Sの通過が上皮層に浸透することを可能にする。角膜上での配合された治療薬の滞留時間はあまりにも限られている可能性があるため、配合戦略は、1) 涙のpH (pH 7.4) を模倣して刺痛及び涙を減らすことを含むpHの評価することと、2) 有害事象を引き起こすことなくMSCセクレトームの濃度を最大化して、涙液の希釈を克服し、送達される有効用量を最適化することと、3) FDA承認の粘液粘着性の薬品、ヒドロキシル・プロピル・メチルセルロース (HPMC、ヒプロメロース) を利用して、滞留時間を増加、眼浸透を増加かつ持続的に治療剤を送達させることと、4) 非選択的な真核生物毒性を引き起こすことなく角膜の浸透を最適化するための製剤の親油性を増加させることと、を含む。これらの配合変更はすべて、MSC-Sが安定して強力なままであることを保証する必要がある。

10

【0442】

製剤は、治療効果を維持しながら、最も安定した、許容できる製剤であり得る。FDA承認の医薬品添加剤、HPMCは初期評価に利用でき、必要に応じて修正して、効果的で適切で安定した製剤を実現できる。HPMCは、半合成、不活性、粘弾性ポリマーであり、眼科用潤滑剤及び制御された送達剤として広く使用されている。その生体接着特性は、セルロース系ポリマーのカルボン酸基と粘膜層に存在するムチンの糖タンパク質との間の水素結合の形成に起因する。塩、ソルビトール、またはプロピレングリコールなどの浸透圧調整剤を含むリン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩などの緩衝液を添加して、粘度、親油性、したがって滞留時間を増加させることができる。

20

【0443】

適切なpH (pH 6.8及び7.4) 及び張性 (285 mOsm/L) の製剤であり、安定性評価のために、適切な粘度 (例えば、15~150 mPa·s) にゲル化される。治療を受ける臨床患者または治療を受けている臨床患者に、2~8℃で安定した1週間の持ち帰り用の供給に使用するための2つのプロトタイプ製剤を開発することができる。選択したプロトタイプ製剤の物理的及び化学的安定性を評価するために、1か月の安定性評価を実施することができ、時点には、2~8℃で時間ゼロ、その次に1、2、4週間、その次に、室温で1週間が含まれる (安定性の加速) を含む。試料は生物活性について分析することができる。

30

【0444】

そのようなMSC-S製剤は、製剤の粘度の増加、したがって眼表面での抗菌剤の滞留時間が増加することにより、より効果的な医薬品を提供するであろう。

【0445】

最適化されたMSCセクレトーム製剤の眼の耐容性の評価：

眼刺激性試験を使用して、MSC-S及び製剤中の賦形剤が患者に許容できることを確認できる。動物実験を減らすために、眼の刺激性評価は、EpiOcular (商標) 眼刺激性試験、ヒト細胞由来のインビトロ角膜組織モデルを使用して実施することができる。EpiOcular (商標) 眼刺激性試験は、ドレイズウサギ眼科試験のインビトロ代替試験である (Kandarov et al., 2019)。

40

【0446】

ヒト角膜細胞に対する耐性は、EpiOcular (商標) 眼刺激性試験を使用して評価することができる。耐性は、生物発光ヒト上皮細胞ベースのアッセイ (Lumigenics) を使用して評価することもできる。

【0447】

最高の安全性プロファイルを備えた製剤は、齧歯類の角膜創傷モデルで評価することができる。

50

【0448】

齧歯類の化学熱傷モデルにおける最適化された製剤の治療可能性の評価：

角膜アルカリ熱傷モデルの使用は、現在最も臨床的に関連する角膜熱傷モデルである（Chen et al., 2016; Fernandes-Cunha et al., 2019）。角膜のアルカリ熱傷は、各ラットの左眼に誘発され得る。1 M NaOHを浸した濾紙ディスク（直径5 mm）を角膜表面の中心に30秒間置き、続いて200 mlの生理食塩水で洗浄した。角膜アルカリ熱傷後直後に開始し、動物は処置を受けた（See, Choi, H., et al., Curr Eye Res. 2017 Oct; 42 (10) : 1348-1357を参照）。血管新生、混濁、及び上皮欠損は、角膜アルカリ熱傷創傷モデルで評価することができる。

10

【0449】

グループ間で治療の効果を比較する統計分析は、一元配置分散分析と、ビヒクル対照群または治療グループのいずれかを参照として使用するダネットの事後比較検定を使用して実行することができる。データは、 $P < 0.05$ で大幅に異なると見なされ得る。

【0450】

この臨床的に関連する齧歯類の創傷モデルの頑健性及び以前の研究で示された結果によって証明されるように、角膜の創傷は、ビヒクル対照の眼に発生することが期待できる（Fernandes-Cunha et al., 2019）。一貫した創傷が観察されない場合は、水酸化ナトリウムを角膜に置く時間の変更、及び／またはラットのサイズ及び系統の変更などの実験パラメータの変更を採用することができる。HBB Sで製剤化されたものと比較して、より効果的な医薬品は、粘膜付着性のHPMCの添加によるものであり、製剤の粘度が増加し、したがって眼表面でのMSC-Sの滞留時間が増加すると推定される。これは、臨床スコアの大幅な低下、創傷サイズ、血管新生、混濁、及び上皮欠損の減少として現れる（必要に応じて更新する）。より高いMSC-S用量は、より低い濃度よりも効果的であると予想される。場合によっては、MSC-Sの局所塗布の頻度を増やすか、MSC-S製剤の負荷量を変更することで、有効性を評価することができる。

20

【0451】

実施例5：角膜の化学熱傷及び／または永続的な角膜上皮欠損（PCED）

化学、製造及び管理の概要

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞セクレトームに由来するMSC-Sは、生理学的レベルで存在するサイトカインや成長因子などの生物学的に活性な内因性成分の混合物で構成されている。間葉系幹細胞セクレトームは、ケモカイン、サイトカイン、成長因子、タンパク質、酵素、リボ核酸（RNA）などの非常に強力な生物学的物質で構成されている。

30

【0452】

マスターセルバンク（MCB）及びワーキングセルバンク（WCB）の作成を含む、MSC-Sの製造プロセス全体は、現在の適正製造基準（cGMP）に準拠して実行される。ドナー間葉系幹細胞（MSC）が試験され、ウイルス及び伝染病の病原体が陰性であることが確認された。

【0453】

MSC-Sの製造は、ドナーMSCの1回の抽出から得られたMCBから始まる。WCBはMCBから作成され、セクレトームのバッチはWCBから生成され、濃縮され、ダイアフィльтраーションされてMSC-S原薬が生成される。MSC-S医薬品は、6 µgのMSC-S原薬と眼科用医薬品用の公定薬添加剤を組み合わせ、5 mLのMSC-S医薬品を製造する。

40

【0454】

MSC-Sは、局所眼科用に配合され、点眼ボトルにパッケージされており、各ボトルは1日使用することを目的としている。ボトル入りのMSC-Sは、使用前に最大24時間冷蔵庫で解凍し、目的の日の使用中は冷蔵保存する。

【0455】

非臨床所見の要約

50

M S C - S の非臨床評価には、インビトロ薬理学研究、ラットのインビボ薬理学、ヒト組織モデルのインビトロ刺激性、及びラットとウサギの反復投与毒性試験が含まれる。

【0456】

トランスウェル遊走アッセイは、M S C - S が角膜上皮細胞及びヒト一次線維芽細胞の遊走を刺激することを発見した。M S C - S の遊走促進効果は、創傷ギャップアッセイを使用して確認され、M S C - S は、対照と比較して角膜上皮細胞単層のギャップの治癒を促進した。

【0457】

ヒト血管新生タンパク質アレイを使用した M S C - S のタンパク質組成の生化学的評価は、存在する最も顕著なタンパク質が血管新生促進分子の 2 ～ 7 倍過剰であったことから、M S C - S の抗血管新生能力を裏付けている。治療用化合物の血管新生の可能性を評価するための確立されたインビトロモデルであるヒト臍帯管形成アッセイは、M S C - S が血管新生を促進せず、血管内皮増殖因子のみと比較して管形成パラメータを減衰させることを示した。

【0458】

M S C - S は、ドブネズミを対象としたアルカリ熱傷の用量設定試験で評価した。この研究では、0.6 または 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の M S C - S を 1 日 3 回局所投与すると、創傷閉鎖が強化され、角膜混濁と血管新生が減少し、これは、M S C - S が角膜外傷後の角膜再上皮化の潜在的な治療薬である可能性を示唆している。

【0459】

E p i O c u l a r ヒト組織モデルで実施されたインビトロ刺激性試験では対照と M S C - S の両方で処理組織の生存率を対照組織の 50 % (E T 5 0) に低下させるために試験物品に必要な 60 分を超える暴露では、M S C - S は非刺激性である。

【0460】

反復投与毒性学を、ラットとウサギで評価した。ラットで反復投与範囲調査を実施し、正式な Good Laboratory Practice (G L P) ウサギ毒性試験で調査する用量を特定した。臨床試験の治療期間と一致させるために、M S C - S の眼への点滴注入後の 14 日間の G L P 毒性試験をウサギで実施した。ウサギは、人間の目と解剖学的に類似しているため、毒物学の種として選ばれ、ウサギの角膜の直径が 13 mm であるのに対し、ヒトでは角膜の直径が 11 mm であり、ウサギでは 6 分ごと、ヒトでは 5 秒ごととまばたきの速度が低下しているため、M S C - S の眼への暴露に対する厳密な安全性試験が提供される (V e z i n a 2 0 1 2) 。

【0461】

8 8 7 7 7 8 ` 5 6 4 4 4 3

【0462】

序文

製品の概要

M S C - S は、新しい間葉系幹細胞セクレトーム (M S C - S) 療法であり、視力を脅かす角膜の傷を治療するために開発されている。M S C - S は、サイトカインや成長因子などの生物学的に活性な成分の混合物で構成されており、ラットでのアルカリ化学熱傷モデルの非臨床研究において、角膜創傷治癒を促進し、瘢痕、炎症、角膜血管新生を軽減することが示されている生理学的レベルで存在する。

【0463】

ヒト M S C は、骨髄、血液、骨格筋、胎盤、羊水、ヒト角膜の辺縁間質など、多くの成人組織から分離された線維芽細胞様細胞の不均一な集団である。M S C は、自己複製能力、高い可塑性、免疫応答調節能力、及び遺伝子組み換え能力により、実質的な再生能力を示す (F e r r e i r a e t a l . 2 0 1 8 ; H a r k i n e t a l . 2 0 1 5) 。一般に M S C - S と呼ばれる M S C によって生成されるバイオ因子は、ケモカイン、サイトカイン、成長因子、タンパク質、酵素、RNA などの非常に強力な生物学的内因性物質を含む。文献には、角膜上皮の創傷治癒を含む、M S C - S の治療の可能性を強調す

る前臨床研究が豊富に存在する (Samaeekia et al. 2018; Vizoso et al. 2017)。さらに、MSC-Sは無細胞療法であり、侵襲的な細胞収集手順を必要としない馴化培地から得られるため、幹細胞療法に比べて臨床的及び商業的転換にいくつかの重要な利点がある。これらの利点には、移植されたMSCの安全性リスクの排除（腫瘍形成性、免疫系の拒絶及び遊走、急性治療のより迅速な利用可能性（侵襲的な細胞収集手順を回避することによって可能になる）、制御された生産、放出及び効力の可能性（従来の医薬品と同様）、長期保管、安定性と携帯性、及び調達コストの削減が含まれる。

【0464】

MSC-S原薬は、cGMP MSCから派生したcGMP準抛のMSBを使用して製造されている。MSCを解凍、播種、及び拡張して、3.0 Lの量の中間体MSC-S原薬を生成した。次に、中間体を濃縮及びダイアフィルトレーションして、点眼薬ボトルの無菌充填用の最終的なMSC-S医薬品製剤を配合した。

10

【0465】

MSC-Sは、5 mLの点眼薬ボトルに局所的に点眼することで投与される。MSC-Sは、一塩基性リン酸ナトリウム、無水（2.28 mg）、二塩基性リン酸ナトリウム、乾燥（11.45 mg）、トレハロース二水和物（24 mg）、マンニトール（12.2 mg）、ヒプロメロース（0.1 mg）、注射用水、米国薬局方（USP）グレード、及びpHを調整するための塩酸及び／または水酸化ナトリウム中に6 µg/mLのMSC-S原薬を含有するように配合される。

20

【0466】

対象となる疾患と効果の概要

角膜は目の最も外側の組織として保護的な役割を果たすが、それでも重傷や病気に対して非常に脆弱である。血管がないため透明性を与えるが、治癒能力も制限される。米国（US）では、240万人以上の個人が眼の損傷を経験しており、救急科または眼の外傷センターで提示される推定発生率は、人口1000人あたり約3.15である (McGwinandowsley 2005; Serrano et al. 2013)。

【0467】

化学熱傷などの重傷は、眼表面上皮、角膜、前眼部、輪部幹細胞に広範囲の損傷を与える可能性があり、視力喪失、変形、及び困難な眼表面合併症を引き起こすことがよくある (Baradaran-Raffi et al. 2017; Singh et al. 2013)。化学熱傷は、酸またはアルカリへの暴露によって引き起こされる可能性があり、アルカリ熱傷はより深刻である。アルカリ熱傷は、酸よりも前房に浸透しやすく、白内障の形成、毛様体の損傷、小柱網の損傷を引き起こす可能性がある (Singh et al. 2013)。

30

【0468】

眼の損傷は、損傷時の輪部の関与の量によって分類され、最良の予後を予測する角膜輪部虚血がない (Baradaran-Raffi et al. 2017)。角膜の化学熱傷の臨床経過は、4つの段階に分けることができる：即時段階、急性段階、初期修復段階、ならびに後期修復及び後遺症段階。角膜損傷の段階の明確な臨床的特徴は、表1に要約されている。

40

【表 2】

表 1：角膜熱傷の段階と臨床的特徴

段階	時間枠	臨床的特徴
即時	化学薬品が眼の表面に接触した瞬間	角膜及び結膜の欠損、角膜輪部の白化、角膜混濁、眼圧の上昇、及び水晶体の透明度の喪失をもたらす損傷。
急性	負傷後最初の 7 日	角膜上皮の表層保護層を再構築しながら、組織自身で汚染物質を取り除く。
早期修復	負傷後 8～20 日後	この段階は、慢性炎症、間質修復及び癭痕化を特徴とする。再生中の角膜上皮及び多形核白血球は、コラゲナーゼ、メタロプロテイナーゼ及び他のプロテアーゼを放出する。
後期修復	負傷後 3 週間	この時期は、治癒の完了を特徴とする。

(Singh et al., 2013)

10

【0469】

従来の治療にもかかわらず、1～2週間の予想される時間枠内に治癒しない上皮欠損は、持続性角膜上皮欠損（PCED）として定義される（Katzman and Jeng 2014）。角膜過敏症、糖尿病性角膜症、輪部幹細胞欠損症、ドライアイ疾患、曝露角膜症、及びヘルペス感染または以前の角膜移植による神経栄養性角膜症を含む、PCEDに寄与する可能性のある多くの危険因子がある（Katzman and Jeng 2014）。病因に関係なく、PCEDの治療は依然として困難であり、その結果は影響を受けた患者の生活の質に深刻な影響を及ぼす。

20

【0470】

現在の治療法

角膜創傷の管理は過去数十年で大きく変化しておらず、主に潤滑、抗生物質、ステロイド、パッチング、自家血清眼、場合によっては縫合蓋閉鎖または羊膜移植の形での支援手段で構成されている（Baradarán-Raffi et al., 2017; Ziaei, Greene, and Green 2018）。これらの治療は限られた成功しか収めておらず、ロジスティクス、処置上の感染、及び患者の不耐症に問題を引き起こしている。したがって、重度の眼表面損傷を有する患者のための改善された眼表面治療法に対する満たされていない重大な必要性がある（Fernandes-Cunha et al., 2019）。

30

【0471】

物理的、化学的、及び製薬的な特性と配合

MSC-Sは、サイトカインや成長因子など、生理活性レベルで存在する生物学的に活性な内因性成分の混合物で構成されている。MSC-S原薬中間体は、ヒト骨髄由来のMSCに由来するセクレトームである。この実施例では、単一のドナーからのMSCの単一の抽出から派生したMCB及び、このMCBからのWCBを提供する。セクレトームのバッチを、WCBのバイアルを使用して生成し、次に濃縮及びダイアフィルトレーションして、MSC-S原薬を生成した。MSC-S医薬品を、6 µgのMSC-S原薬（1 mLあたり）を一塩基性リン酸ナトリウム、無水（2.28 mg）、二塩基性リン酸ナトリウム、乾燥（11.45 mg）、トレハロース二水和物（24 mg）、マンニトール（12.2 mg）、ヒプロメロース（0.1 mg）、注射用水、USP、及び塩酸及び／または水酸化ナトリウムを組み合わせることでpH 7.4に調整することにより点眼薬用の大要の賦形剤を併せて配合した。

40

【0472】

50

M C B 及び W C B の作成を含む、M S C - S の製造プロセス全体は、c G M P に準拠して実行される。M C B、W C B、セクレトーム抽出物の説明と特徴付けについては、次のセクションに記載する。

【0473】

オリジナルのマスターセルバンク製造

M C B の作成に使用された M S C (ドナー M S C) は、正常な健康なドナーのヒト骨髓に由来し、c G M P 条件下で制御された製造プロセスを使用して2回継代増殖した。これらの細胞は、増殖能、細胞表面マーカーの発現、及び脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞への分化能について特徴付けられた。それらは、2回の継代増殖後に特徴付けられ、継代4 (P 4) の細胞は、細胞増殖の可能性がある、主に ($\geq 80\%$) C D 1 6 6 及び C D 9 0 陽性細胞であり、C D 3 4 及び C D 4 5 (造血系統) に対して $\leq 20\%$ 陽性であり、インターフェロンガンマ (I F N - γ) による刺激後、予想される骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化を示し、炎症性傷害に対する先天性及び適応免疫応答に対する強力な局所効果を媒介する酵素、インドールアミン2、3 ジオキシゲナーゼの誘導を通じて免疫調節活性を示し、及び免疫活性化のマーカーであるキヌレニンを形成した。M S C は、継代及び増殖後、正常なヒト男性からのものであることが確認された。

10

【0474】

ドナー M S C は、ヒト免疫不全ウイルス、B 型及び C 型肝炎、ヒト T リンパ球向性ウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス、ヒト乳頭腫ウイルス、アデノ関連ウイルス、ヒトヘルペスウイルス6、パルボウイルス、ヒト伝染性海綿状脳症及びマイコプラズマを含むさまざまなウイルス及びその他の伝染性病原体に対して陰性であることが試験及び確認された。

20

【0475】

ドナー M S C は、c G M P 準拠の製造サイトで製造及び特徴付けされ、ドナー M S C の分析証明書は、陰性の無菌性、エンドトキシンレベル < 0.50 エンドトキシンユニット (E U) / m L、陰性のマイコプラズマ、及び外来物質が検出されないことを記録し、100.0%の細胞が C D 9 0 を示し、97.8%が C D 1 6 6 を示し、1.2%が C D 3 4 を示し、1.4%が C D 4 5 表面マーカーを示す、ヒト細胞として確認された。細胞数はバイアルあたり 2.3×10^7 細胞で、98%の生存率が計算された。細胞を継代し、この増殖後に特徴付けられ、生存可能であることが確認され、主に ($\geq 80\%$) C D 1 6 6 及び C D 9 0 陽性細胞であり、C D 3 4 及び C D 4 5 (造血系統) に対して $\leq 20\%$ 陽性であった。継代した細胞を試験し、マイコプラズマ (陰性)、不稔性 (陰性)、静菌 / 真菌症 (抑制なし)、及びエンドトキシン (< 10 E U / m L) の放出基準を満たした。

30

【0476】

ワーキングセルバンク

細胞はこの増殖後に特徴付けられ、生存可能であることが確認され、主に ($\geq 80\%$) C D 1 6 6 及び C D 9 0 陽性細胞であり、C D 3 4 及び C D 4 5 (造血系統) に対して $\leq 20\%$ 陽性であった。細胞を試験し、マイコプラズマ (陰性)、無菌性 (陰性)、及びエンドトキシン (< 10 E U / m L) の放出基準を満たした。これらのバイアルは、以下に説明するように、M S C - S の製造で将来使用するために凍結及び保管された。

40

【0477】

M S C - S 原薬製造

細胞を使用して、臨床グレードの M S C - S を作製した。バイアルを解凍し、播種し、収穫して、中間体 M S C - S 原薬 (ヒト間葉系幹 / 間質細胞 [h M S C] セクレトーム) の3Lバッチを製造した。セクレトームの内因性の生物学的成分には、T I M P - 1 (メタロプロテイナーゼ1の組織抑制剤)、H G F (肝細胞増殖因子)、V E G F (血管内皮増殖因子) 及び E V (細胞外小胞) が含まれる。

【0478】

次に、セクレトーム中間体原薬を濃縮し、ダイアフィルトレーションして、300 m L の精製 M S C - S 原薬を提供した。最終的な M S C - S 原薬の物理的及び化学的特性を、

50

表 2 に提供する。

【表 3】

表 2：原薬の物理的及び化学的特性

物質	MSC-S
承認された名前 (USAN)：	割り当てられていない
化学名 (IUPAC)：	割り当てられていない
分子量：	MW 20～60 kDa のタンパク質の範囲
物理的形態：	MSC-S 原薬は無色透明の液体である
pH：	7.0～7.4
浸透圧：	280～320 ミリオスモル (mOsm) / kg

USAN＝米国一般名、IUPAC＝国際純正応用化学連合

10

【0479】

薬学的プレゼンテーション

最終的な医薬品が配合された。MSC-S 医薬品は、標準的な医療グレードの USP クラス VI ポリエチレン樹脂滅菌点眼薬ボトルに無菌的に充填された。各ボトルには、5 mL の MSC-S 製剤が含まれている。ボトルあたりの配合の詳細を表 3 に示す。

20

【0480】

MSC-S 医薬品は、pH 7.0～7.4、浸透圧 280～320 mOsm / kg の無菌の透明で無色の溶液であった。最終医薬品の分析証明書は、マイコプラズマ（陰性）、静菌／真菌症（抑制なし）、不稔（陰性）、及びエンドトキシン（＜10 EU / mL）の放出基準を満たしていることを確認する。

【0481】

MSC-S 医薬品の各ボトル（5 mL）は、1 日の投与のみに使用することを目的としている。

【0482】

賦形剤を含む配合

MSC-S 点眼液は、表 3 に示されるように配合された滅菌液である。MSC-S 医薬品を、6 µg の MSC-S 原薬（% w / w）を、一塩基性リン酸ナトリウム、無水（0.27 mg）、乾燥二塩基性リン酸ナトリウム（1.09 mg）、マンニトール（0.4 mg）、ヒプロメロース（0.1 mg）、注射用水、USP、塩酸及び／または水酸化ナトリウム含む眼科用医薬品用に承認された大要の賦形剤と組み合わせ、pH 7.4 に調整することにより、調製した。

30

40

50

【表 4】

表 3 : MSC-S 製品の配合

構成要素の存在	製品 1 mL あたりの量	1 mL あたりの存在率 (%)
MSC-S (hMSC セクレトーム)	0.006 mg (6 µg)	0.012
一塩基性リン酸ナトリウム	2.28 mg	4.5
二塩基性リン酸ナトリウム	11.45 mg	22.4
マンニトール	12.2 mg	24.0
トレハロース二水和物	24 mg	47.1
ヒプロメロース	1 mg	2.0
塩酸及び／または水酸化ナトリウム	必要に応じて調整する	必要に応じて調整する
総量	50.936 mg	100%

10

20

【0483】

保管と取り扱い

各 MSC-S 医薬品は、臨床現場で -20℃ で保管し、冷蔵庫 (2～8℃) で解凍し、使用予定日の使用前に最大 24 時間冷蔵保存する。使用予定日は、MSC-S は冷蔵保存する必要がある。保管と取り扱いの詳細は、研究プロトコルに記載されている。

【0484】

安定性データ

MSC-S 医薬品は安定性が評価されている。MSC-S を、25℃ または 5℃ で一定期間保管した後の物理的特性と生物活性を評価するために配合し、安定性プログラムにかけた。具体的には、外観、pH、浸透圧、及び粘度を評価した。物理的属性は、5℃ で最大 30 日間、25℃ で 1 週間評価した。安定性プログラムの期間中、有意な変化は観察されなかった。さらに、MSC-S の安定性を、細胞ベースの遊走バイオアッセイ (以下に説明するアッセイ) を使用して評価した。図 10 は、MSC-S が 5℃ 及び 25℃ (周囲温度) で 7 日間保存された場合に、強力な遊走促進挙動を維持することを示している。

30

【0485】

瓶詰めされた製品は、製造後最大 6 か月間 -20℃ で安定している。MSC-S は、冷蔵保存条件 (2～8℃) で少なくとも 1 日安定しており、室温で短時間 (<4 時間) 安定している。得られた安定性データに基づいて、スポンサーは MSC-S 点眼液の製造日から 6 か月の貯蔵寿命を割り当てた。貯蔵寿命は、進行中／将来の安定性研究から生成されたデータに基づいて延長される可能性がある。

40

【0486】

MSC-S 点眼液は -80℃ で保存する必要がある。使用前に解凍し、使用予定日の使用前及び使用中に最大 24 時間冷蔵 (2～8℃) して保管する必要がある。

【0487】

非臨床研究

序文

非臨床開発プログラム

局所眼投与による角膜創傷の治療のための MSC-S の臨床開発を支援するために、包括的な非臨床プログラムが実施された。非臨床開発プログラムは、一次薬理学と毒物学的評価で構成されている。これらの研究の要約は、本実施例で提供される。すべてのインビ

50

ボ研究において、治験薬（IMP）を、臨床投薬の意図された経路である点眼を介して送達した。

【0488】

非臨床試験材料の配合

非臨床試験用の試験材料を、臨床製剤と組成が類似した緩衝食塩水で製剤化した。すべてのインビトロ細胞ベースのアッセイを、緩衝生理食塩水で配合された試験品を用いて直接実施し、インビボ研究は、緩衝生理食塩水とHPMCで配合された試験品を用いて実施した。

【0489】

インビトロ薬理学

MSC-Sは、一次ヒト角膜上皮細胞と角膜線維芽細胞の遊走を促進する [研究CM19-TWM01]

MSC-Sは、一次ヒト角膜上皮細胞の遊走を促進した。角膜の外傷に続いて、前縁の角膜上皮細胞が移動し始め、創傷を閉じる。遊走を促進するMSC-Sの能力を、トランスウェル遊走アッセイを使用して評価した。簡単に説明すると、細胞は、多孔質膜を備えた上部チャンバー内の基本的な（栄養素が枯渇した）培地に播種した。次に、チャンバーをMSC-Sを含む基本培地のウェルに設置する。24時間後、膜の底面に遊走した細胞を染色、画像化、及び定量化した。第一に、MSC-Sは角膜上皮細胞の遊走を刺激することがわかり、これは急速な創傷治癒に重要なプロセスである。さらに、予想通り、熱（90℃/10分）は、タンパク質成分の変性により、MSC-Sの遊走促進活性を無効にする（図11）。

【0490】

MSC-Sは角膜上皮細胞の創傷閉鎖を促進する [研究CM19-WGA01]。

MSC-Sの遊走促進効果も、創傷ギャップアッセイを使用して確認した。この創傷治癒アッセイでは、細胞単層に「創傷ギャップ」が作成され、ギャップの中心に向かう細胞の遊走と成長によるこのギャップの「治癒」が監視される。このアッセイでは、MSC-Sで処理された一次角膜上皮細胞は、ビヒクル（ネガティブ）対照と比較して、創傷ギャップの治癒が促進されていることを示している（図12）。

【0491】

MSC-Sはヒト一次線維芽細胞の遊走を促進する [研究CM19-TWM02]

角膜の外傷に続いて、角膜線維芽細胞は周囲の間質から患部に遊走する。角膜上皮細胞で観察された効果と同様に、MSC-Sで処理された一次角膜線維芽細胞で強力な遊走促進反応が観察された（図13）。

【0492】

MSC-Sは負の血管新生の可能性を示す

MSC-S組成物は抗血管新生をサポートする [研究CM19-PA01]

外傷後、角膜血管新生がしばしば起こり、これが視力障害の一因となる。より具体的には、血管新生は、組織の瘢痕化、脂質沈着、間質出血、及び角膜浮腫を誘発し、視力を著しく変化させる可能性がある（Maddula et al., 2011）。ヒト血管新生タンパク質アレイを使用したMSC-Sのタンパク質組成の生化学的評価は、その負の血管新生の可能性を強調している（図14A）。驚くべきことに、分析は、MSC-Sに存在する最も顕著なタンパク質が抗血管新生の役割を持ち、血管新生促進分子の2～7倍過剰に存在することを示している（図14B）。特に、マトリックスメタロプロテアーゼ抑制剤であるTIMP-1は高レベルで存在し、MSCによって産生される主要な抗血管新生モジュレーターとしてTIMP-1を特定した報告と一致している（Zanotti et al., 2016）。

【0493】

MSC-Sは、細胞ベースのアッセイで負の血管新生の可能性を示す [研究CM19-TFA02]

角膜血管新生を特異的に評価するための確立されたインビトロ細胞ベースのアッセイは

10

20

30

40

50

ないが、ヒト臍帯静脈内皮細胞（H U V E C）管形成アッセイは、治療用化合物の血管新生の可能性を評価するための確立されたインビトロモデルである。このアッセイは、毛細血管様の血管構造を形成するための内皮細胞の再編成を測定することにより、血管形成を促進または損なう化合物の能力を評価する。簡単に説明すると、H U V E C細胞をM a t r i g e l（登録商標）（B D B i o s c i e n c e s）の薄層に播種し、活性原薬の存在下または非存在下でインキュベートする。血管新生促進分子によってサポートされている場合、2～6時間以内に内皮細胞が分裂し、血管網を形成し始める。本方法を使用して、M S C－Sの因子の合計が血管新生を促進せず、管の全長、分岐点の数、ループの数などの管形成パラメータを減衰させることを示した（図15）。比較すると、血管内皮増殖因子（V E G F）単独での治療は、強力な血管新生促進反応を誘発する。

10

【0494】

M S C－Sは抗瘢痕化特性を示す〔C M 1 9 _ C F S 0 4〕

角膜の外傷に続いて、間質の線維芽細胞は、いくつかのバイオマーカーの調節不全によって特徴付けられるプロセスで、瘢痕化の特徴である筋線維芽細胞に分化する。筋線維芽細胞の分化は、一次角膜線維芽細胞と、分化の強力な誘導因子であるT G F β －1による治療を使用して、インビトロで複製することができる（L i , e t a l 2 0 1 7）。分化を阻害するM S C－Sの能力を、筋線維芽細胞の分化中に強く上方制御される主要な瘢痕化バイオマーカーである平滑筋アクチン（S M A）の免疫蛍光染色を使用して評価した。発明者らのデータは、M S C－Sが強力な効果を持ち、S M Aの発現を減少させることを示し（図16）、筋線維芽細胞の分化の抑制を示し、したがって、瘢痕化を阻害するか予防する能力を示している。

20

【0495】

インビボ薬理学

14日間のドブネズミ角膜アルカリ熱傷用量設定試験〔研究C O M B . 0 0 2〕

M S C－Sの局所眼製剤の有効な投薬強度とレジメンを決定するために、ドブネズミのアルカリ誘発性角膜損傷の改善のために14日間の用量設定試験を実施した。表4に示すように、膜アルカリ熱傷をドブネズミ（複数）（約150g、12週齢）の右眼に配置し、それらの動物は、5 μ Lのビヒクル（ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔H P M C〕、n = 9）または5 μ L M S C－S（0.6 μ g / m L、n = 8；6 μ g / m L、n = 10；60 μ g / m L、n = 8）1日3回または6 μ g / m LのM S C－Sを1日6回（n = 9）で処置した。

30

【0496】

アルカリ化学熱傷モデルは、M S C－Sがその重度の角膜病変を考慮して、治療を意図している適応症の重症度に最も臨床的に関連しているため、主要なi n v i v o有効性モデルとして選択された（C h e n e t a l . 2 0 1 6；C h o i、C h o i、及びJ o o 2 0 1 1；K i m e t a l . 2 0 1 5）。

【0497】

角膜上皮の穿孔は視力に悪影響を及ぼし、角膜が感染しやすくなる（A k p e k a n d G o t t s c h 2 0 0 3）。したがって、再上皮化の速度を上げることは、患者が眼の感染症を発症したり、角膜の融解などの他の問題を引き起こしたりする可能性を減らすため、重要である。細胞増殖、遊走、及び接着を調節することによって角膜上皮の創傷閉鎖を強化しようとする眼の治療が不可欠であるため、100%の創傷閉鎖の速度を評価した。

40

【0498】

角膜混濁及び角膜血管新生は、視力喪失により高いレベルに関連する角膜アルカリ損傷モデルにおける試験薬剤の活性を検出するための予測可能なパラメータであるため、さらに評価された（E p s t e i n e t a l . 1 9 8 7；S c h r a g e e t a l . 2 0 0 2）。

50

【表 5】

表 4：ラットにおける 14 日間の角膜アルカリ熱傷研究

グループ	治療	治療の詳細	評価
1	HPMC (対照) n = 9	右眼のみへの片側局所点眼、1 日 3 回、1～10 日目 (5 μ l / 点眼)	初回投与前の 1 日目のフルオレセイン染色による初期角膜創傷サイズの定量化。
2	MSC-S 0.6 μ g / mL n = 8		ベースライン時及び 1～4 日目と 7～14 日目の体重。
3	MSC-S 6 μ g / mL n = 10		2～4 日目の初回投与後 1 時間のフルオレセイン染色による角膜創傷閉鎖の定量化。
4	MSC-S 60 μ g / mL n = 8		2～4 日目及び 7～14 日目の初回投与後 1 時間の角膜混濁及び血管新生の臨床スコアリング
5	MSC-S 6 μ g / mL n = 9	右眼のみへの片側局所点眼、1 日 6 回、1～10 日目 (5 μ l / 点眼)	7 日目と 14 日目に撮影されたフルオレセインを含まないデジタル画像。
			15 日目に全眼の収集と固定

HPMC：ヒドロキシプロピルメチルセルロース

ビヒクルは、リン酸ナトリウム、マンニトール、2%HPMC pH 7.4 で構成される。

【0499】

研究結果

角膜へのアルカリの適用は、それが適用されたすべての眼に重度の化学熱傷を引き起こした。予定された終了の前に、各グループ内で死亡が発生した。動物の死亡頻度は単一の治療とは相関せず、グループ間の全体的な有効性の比較には影響しなかった。グループ 1、2、3、4、及び 5 でそれぞれ 3、2、4、1、及び 2 匹の早期死亡が発生し、合計 6、6、6、7、及び 7 匹の動物が 14 日目に評価のために残った。平均体重の傾向はすべての治療群で一貫しており、1 日目～7 日目まで毎日体重が減少し、その後 8 日目～14 日目まで徐々に体重が増加した。

【0500】

アルカリ熱傷は、重度の上皮創傷、血管新生及び混濁を含む非常に明白な重度の角膜損傷を誘発した。角膜アルカリ熱傷誘発眼への MSC-S の 1 日 3 回の局所塗布は、4 日目に 0.6 及び 6 μ g / mL で治療された眼の 57% で完全な（すなわち 100%）創傷閉鎖をもたらしたことに比べて、ビヒクル及び 60 μ g / mL MSC-S で治療された眼では 27% であった（図 17a）。比較すると、6 μ g / mL の MSC-S で 1 日 6 回治療した眼は、12.5% の創傷閉鎖率であった。各治療群の代表的な眼からの角膜損傷を示すフルオレセイン血管造影図を図 17b に示す。0.6、6、及び 60 μ g / mL の MSC-S を 1 日 3 回投与した眼が 3 日目に示した創傷は、1 日 3 回投与したビヒクル対照及

び1日6回6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のMSC-Sを投与した群と比較して、小さかった。6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MSC-Sの投与量を1日3回から1日6回に増やしても、活性は増加せず、代わりにビヒクルに匹敵する結果であった。これは、創傷部位での刺激の増加の結果である可能性がある。

【0501】

MSC-Sは、0.6及び6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を1日3回局所投与すると角膜混濁を、6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を1日3回投与すると血管新生を有意に減少させた(図18)。1日3回の0.6及び6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MSC-Sグループの不透明度スコアは両方とも 3.33 ± 0.21 であり、それに比べ、ビヒクルの 4.0 ± 0 (レベル4が最高の不透明度レベル)及び60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MSC-Sグループの 3.86 ± 0.14 、続いて6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のMSC-Sを10日間毎日6回送達した 4.0 ± 0 であった。すべてのMSC-S 1日3回グループは、ビヒクル1日3回対照グループの 4.0 ± 0 (レベル4が最高の血管新生レベル)と比較して、より低い角膜血管新生スコアをもたらし、1日3回6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を投与したグループは 3.33 ± 0.21 で最も効果的であり、次に0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MSC-Sの 3.67 ± 0.21 、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MSC-Sの 3.83 ± 0.17 であった。1日6回送達された6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MSC-Sは、1日3回のビヒクル対照よりも活性が高くなかった。

【0502】

全体として、MSC-Sを0.6または6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で1日3回、10日間投与すると、ビヒクルと比較して創傷治癒活性が増強した。ただし、MSC-Sのプラスの効果の一部は、グループ間の違いを識別するために必要な、この研究で適用されたスコアリングパラメータのダイナミックレンジの制限によって隠されている可能性がある。図に示すように、6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MSC-Sを1日3回、及びビヒクル治療群の7日目と14日目の個々の眼は、創傷治癒の顕著な違いを示している。14日目に、MSC-Sで治療された眼はすべて角膜損傷からの回復を示しているが、ビヒクルで治療された眼の半分はまだ角膜損傷の深刻な兆候を示している。

【0503】

結論として、0.6または6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のMSC-Sを1日3回局所投与すると、角膜熱傷の齧歯類モデルにおいて、創傷閉鎖が強化され、角膜混濁と血管新生が減少した。これらの結果は、MSC-Sが角膜外傷後の角膜再上皮化の潜在的な治療薬である可能性があることを示唆している。実例として、典型的な投薬ドロップ(20-30 μL)には、120-180 ngの医薬品が含まれている。

【0504】

インビトロ刺激性

EpiOcularヒト組織モデルを使用した局所塗布製剤の眼刺激性の評価[研究046-19]

MSC-Sの眼の刺激性の可能性を評価するために、EpiOcular組織を使用してインビトロ刺激性研究を実施した。MSC-Sを、表3に示される提案されている臨床濃度6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で配合し、ビヒクル対照(MSC-Sを含まない製剤ソリューション)と比較した。EpiOcular組織を3、30、及び60分間治療群に曝露し、治療組織の生存率をMTT(3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド;チアゾリルブルー)生存組織試験を使用して評価し、ET50を算出した。超純水を対照として使用し、組織の生存率を評価する前に、EpiOcular組織に60分間曝露した。

【0505】

60分の曝露で、すべての試験品は非刺激性として分類された。結果の要約を表5に提供する。

10

20

30

40

50

【表 6】

表5：EpiOcular ET₅₀結果

試験品	ET ₅₀ (分)	可能なドレイズスコア	カテゴリー
MSC-S-pH 7.4	> 60	< 8.4	刺激性がなく、最小限
ビヒクル、pH 7.4	> 60	< 8.4	刺激性がなく、最小限

ET₅₀：処理された組織の生存率を対照組織の50％に低下させるために試験品に必要な曝露

10

【0506】

反復投与試験

正式なGLPウサギ毒性試験で調査する用量を特定するために、ラットで反復投与の非GLP用量範囲調査を実施した。臨床試験の治療期間と一致させるために、MSC-Sの眼への点滴注入後の14日間のGLP毒性試験をウサギで実施した。ウサギは、人間の目と解剖学的に類似しているため、毒物学の種として選ばれ、ウサギの角膜の直径が13mmであるのに対し、ヒトでは角膜の直径が11mmであり、ヒトでは5秒ごとに対してウサギでは6分ごとと、まばたきの速度が低下している。局所的な眼への適用後に急速なクリアランスが発生し、これは、一部には、試験薬の排出、まばたき、涙液膜、及び涙液膜の裏返しが原因である。したがって、潜在的な毒性を完全に評価するために、眼へのMSC-Sの滞留時間を、ヒトと比較してまばたき速度が大幅に遅いウサギを利用することによって最大化した（Vezina2012）。

20

【0507】

ドブネズミに7日間繰り返し眼球注入した後のMSC-Sの眼球耐容性研究〔研究COMB.004〕

MSC-S（6μg/mL）の眼の耐容性は、7日間の反復試験で評価され、ドブネズミ（約12週齢）（n=1/グループ）に、1日3回（午前9時、午後1時及び午後5時、5μL/点滴）または1日6回午前7時、午前9時、午前11時、午後1時、午後3時、午後5時、5μL/点滴）の両側局所点滴と、1日3回（1%HPMC）のビヒクルとを比較した。最終的な1日量投与後約30分で、1日目から7日目に、結膜浮腫、充血、及び分泌物のドレイズスコアリングで眼の耐容性を評価した。

30

【0508】

すべての動物は予定された終了まで生き残った。研究実施後、この研究のいずれの試験グループにも、結膜浮腫、充血、または分泌物は観察されなかった。したがって、ドブネズミでMSC-S（6μg/mL）を1日3回（最大0.09μgのMSC-S）または6回（最大0.18μgのMSC-S）の7日間の局所投与は十分に耐容される。

【0509】

局所眼投与（GLP）後のウサギにおけるMSC-Sの14日間の反復投与毒性試験〔試験p19-0838-00b〕

40

この研究の目的は、オランダベルトウサギに2週間繰り返し局所眼投与した後のMSC-Sの眼毒性及び全身毒性を決定することである。ウサギの眼は解剖学的に人間の眼と似ており、ウサギの角膜の直径が13mmであるのに対し、ヒトでは角膜の直径が11mmであり、ウサギのまばたき速度は遅いことから（人間の5秒ごとと比較して6分ごと）、眼へのMSC-Sの滞留時間が長くなり、安全性の厳密な評価が可能になる（Vezina2012）。

【0510】

9匹のオスのオランダベルトウサギ（18～28週齢）にMSC-S（6μg/mL、各用量30μL）を1日3回（低用量；n=4）または1日6回（高用量；n=5）2週

50

間、1週間の回復期間を設けて右眼に局所点眼により投与した。最初の投薬の日は0日目として定義された。左眼は対側の対照として機能し、右のMSC-S治療眼と同じ頻度で100mMリン酸ナトリウム、0.4%マンニトール、2%HPMC、pH7.4のビヒクルを受けた。低用量（3x/日）と高用量（6x/日）を、それぞれ約4時間と2時間間隔で投与した。

【0511】

ウサギは15日目（低用量で4匹、高用量で3匹、最後の投与から24時間後）または22日目（高用量で2匹、最後の投与から168時間後）に犠牲となった。毒性を、死亡率、臨床観察（1日2回）、体重（投与前、毎週、及び終了時）、眼科検査、眼圧（投与前及び終了時）、臨床病理学（血液学、臨床化学、及び凝固；投与前及び終了時）、肉眼的病理学、臓器重量、及び眼の組織病理学に基づいて評価した。すべての眼の眼科検査は、理事会認定の獣医眼科医によってマクドナルド-シャダックスコアリングシステム及び眼後眼部スコアリングスケールを用いた細隙灯生体顕微鏡検査及び間接検眼鏡検査を投与前、その後1、3、14日目及び終了時に実施した。

【0512】

すべてのウサギは予定された犠牲日まで生き残った。肉眼的病変及び異常は記録されなかった。体重、眼圧、臨床病理学、肉眼的病理学、臓器重量、眼科検査または組織病理学に関する試験品関連の所見はなかった。

【0513】

結論として、6µg/mLのMSC-Sを1日3回及び1日6回、14日間繰り返し局所投与することは両方とも安全で忍容性が高く、6µg/mLのMSC-Sを1日3回、14日間の臨床試験を裏付けている。

【0514】

ヒトへの影響

MSC-Sを人間の被験者で試験する。ヒト初回投与試験の用量選択は、複数の因子に基づいている。

【0515】

用量の正当化

MSC-Sを1日3回（TID）6µg/mLで局所点滴により投与することは、人間の眼に安全であると予測され、選択された濃度は、効果的かつ安全であるとしてin vivo動物実験によって裏付けられている。MSC-S耐容性ウサギ試験（2週間の投与、その後1週間の回復期間）、及び薬理活性齧歯類試験を実施して、ヒトの治療に適切な用量を特定した。ラットの化学熱傷モデルでは、0.6µg/mLと6µg/mLの両方（1日3回）のMSC-Sが角膜創傷治癒を促進し、0.6µg/mLと6µg/mLの両方を1日3回投与すると、ビヒクルと比較して角膜混濁が大幅に減少し、6µg/mLを1日3回投与すると、ビヒクル対照と比較して血管新生が大幅に減少した[Study COMB.002]。さらに、健康なウサギの眼に1日3～6回、14日間投与されたMSC-Sの臨床製剤6µg/mLでは副作用は観察されていない[研究p19-0838-00b]。

【0516】

局所点眼薬の開発は、涙液の代謝回転と希釈、鼻涙管ドレナージ、及び反射まばたきを含む、多くの解剖学的制約によって妨げられ、深い眼組織に到達するのは局所投与量の5%未満になることが多いにある（Gaudana et al., 2009）。角膜上での配合された治療薬の滞留時間はあまりにも限られている可能性があり、ウサギのまばたき速度は遅いことから（人間の5秒ごとと比較して6分ごと（Vezina 2012））、MSC-Sの安全性を評価する毒物種としてウサギが選択され、これにより、MSC-Sの眼への滞留時間が長くなり、安全性の厳密な評価が可能になる。さらに、ウサギの研究では、MSC-S製剤は、より高濃度のHPMC粘性及び粘膜付着性ポリマーを利用して、滞留時間を増加させ、眼への浸透を増加させた。したがって、同等の投与量がドロップすることを仮定すると、角膜表面のMSC-S濃度は、ヒトよりもウサギの方が高いと予想

され、ウサギの眼には悪影響がないことから、MSC-S濃度はヒトの眼ではより低いと予想され（まばたき率が高いため）、ヒトへの6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （TID）の投与は安全であることが正当化される。

【0517】

適応症、使用法、剤形

MSC-Sは、角膜の化学熱傷及び／または持続性角膜上皮欠損（PCED）の治療に適応される。MSC-Sの剤形は、無菌の点眼液である。MSC-Sは、眼への1滴（約30 μL ／滴）として局所点眼により1日3回投与される。MSC-Sの濃度は6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になる。さらに、6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は、化学熱傷ラットモデルにおいて、10日間にわたって1日3回投与した後、角膜創傷治癒を有意に改善することが示され、健康なウサギの眼に1日6回まで14日間適用しても悪影響は見られなかった。

10

参考文献

Akpek, E. K., and J. D. Gottsch. 2003. "Immune Defense at the Ocular Surface." *Eye* (London, England) 17 (8): 949–56. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6700617>.

Baradaran-Rafii, Alireza, Medi Eslani, Zeeshan Haq, Ebrahim Shirzadeh, Michael J. Huvar, and Ali R. Djalilian. 2017. "Current and Upcoming Therapies for Ocular Surface Chemical Injuries." *The Ocular Surface* 15 (1): 48–64. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2016.09.002>.

20

Chen, Yanfeng, Wenzhao Yang, Xiaobo Zhang, Shu Yang, Gao Peng, Ting Wu, Yueping Zhou, et al. 2016. "MK2 Inhibitor Reduces Alkali Burn-Induced Inflammation in Rat Cornea." *Scientific Reports* 6 (June): 28145. <https://doi.org/10.1038/srep28145>.

Choi, Jin A., Jun-Sub Choi, and Choun-Ki Jo. 2011. "Effects of Amniotic Membrane Suspension in the Rat Alkali Burn Model." *Molecular Vision* 17 (February): 404–12.

30

Epstein, R. J., R. D. Stulting, R. L. Hendricks, and D. M. Harris. 1987. "Corneal Neovascularization. Pathogenesis and Inhibition." *Cornea* 6 (4): 250–57. <https://doi.org/10.1097/00003226-198706040-00004>.

Fernandes-Cunha, Gabriella Maria, Kyung-Sun Na, Ilham Putra, Hyun Jong Lee, Sarah Hull, Yu-Chia Cheng, Ignacio Jesus Blanco, Medi Eslani, Ali R Djalilian, and David Myung. 2019. "Corneal Wound Healing Effects of Mesenchymal Stem Cell Secretome Delivered within a Viscoelastic Gel Carrier." *Stem Cells Translational Medicine* 8 (5): 478–89.

40

Ferreira, Joana R, Graciosa Q Teixeira, Susana G Santos, Mario A Barbosa, Graca Almeida-Porada, and Raquel M Goncalves. 2018. "Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influence

50

ncing Therapeutic Potential by Cellular Pre-Conditioning." *Frontiers in Immunology* 9.

Gaudana R, Jwala J, Boddu SH, Mitra AK. 2009 "Recent perspectives in ocular drug delivery." *Pharm Res.* 26 (5) : 1197–216.

Harkin Damien G, Leanne Foy, Laura J Bray, Allison J Sutherland, Fiona J Li, and Brendan G Cronin. 2015. "Concise Reviews: Can Mesenchymal Stromal Cells Differentiate into Corneal Cells? A Systematic Review of Published Data." *Stem Cells* 33 (3) : 785–91. 10

Katzman, Lee R, and Bennie H Jeng. 2014. "Management Strategies for Persistent Epithelial Defects of the Cornea." *Saudi Journal of Ophthalmology: Official Journal of the Saudi Ophthalmological Society* 28 (3) : 168–72. <https://doi.org/10.1016/j.sjopt.2014.06.011>.

Kim, Dae Won, Sung Ho Lee, Min Jea Shin, Kibom Kim, Sae Kwang Ku, Jong Kyu Youn, Su Bin Cho, et al. 2015. "PEP-1-FK506BP Inhibits Alkali Burn-Induced Corneal Inflammation on the Rat Model of Corneal Alkali Injury." *BMB Reports* 48 (11) : 618–23. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2015.48.11.041>. 20

Li M, Luan F, Zhao Y, Hao H, Liu J, Dong L, Fu X, Han W. "Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates wound healing with fewer scars." *Int Wound J.* 2017, 14 : 64–73. 30

Maddula, Surekha, Don K. Davis, Soumya Maddula, Michael K. Burrow, and Balamurali K. Ambati. 2011. "Horizons in Therapy for Corneal Angiogenesis." *Ophthalmology* 118 (3) : 591–99. <https://doi.org/10.1016/j.optha.2011.01.041>.

McGwin, Gerald, and Cynthia Owsley. 2005. "Incidence of Emergency Department-Treated Eye Injury in the United States." *Archives of Ophthalmology* 123 (5) : 662–66. 40

Samaeekia, Ravand, Behnam Rabiee, Ilham Putra, Xiang Shen, Young Jae Park, Peiman Hemahti, Medi Eslani, and Ali R Djalilian. 2018. "Effect of Human Corneal Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes on Corneal Epithelial Wound Healing." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 59 (12) : 5194–5200.

Schrage, Norbert Franz, Sirpa Kompa, Wolfram 50

- m Haller, and Stephanie Langefeld. 2002. "Use of an Amphoteric Lavage Solution for Emergency Treatment of Eye Burns. First Animal Type Experimental Clinical Considerations." *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries* 28 (8): 782–86. [https://doi.org/10.1016/s0305-4179\(02\)00194-8](https://doi.org/10.1016/s0305-4179(02)00194-8).
- Serrano, Felipe, Lawrence B Stack, R Jason Thurman, Lara Phillips, and Wesley H Self. 2013. "Traumatic Eye Injuries: Management Principles for the Prehospital Setting." *JEMS: A Journal of Emergency Medical Services* 38 (12): 56.
- Singh, Parul, Manoj Tyagi, Yogesh Kumar, K K Gupta, and P D Sharma. 2013. "Ocular Chemical Injuries and Their Management." *Oman Journal of Ophthalmology* 6 (2): 83–86. <https://doi.org/10.4103/0974-620X.116624>.
- Vezina, Mark. 2012. "Comparative Ocular Anatomy in Commonly Used Laboratory Animals." In *Assessing Ocular Toxicology in Laboratory Animals*, 1–21. Springer.
- Vizoso, Francisco J, Noemi Eiro, Sandra Cid, Jose Schneider, and Roman Perez-Fernandez. 2017. "Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (9): 1852.
- Zanotti, L., R. Angioni, B. Cali, C. Soldani, C. Ploia, F. Moalli, M. Garghesha, et al. 2016. "Mouse Mesenchymal Stem Cells Inhibit High Endothelial Cell Activation and Lymphocyte Homing to Lymph Nodes by Releasing TIMP-1." *Leukemia* 30 (5): 1143–54. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.33>.
- Ziaei, Mohammed, Carol Greene, and Colin R Green. 2018. "Wound Healing in the Eye: Therapeutic Prospects." *Advanced Drug Delivery Reviews* 126: 162–76.

【0518】

実施例6：さらなるMSCセクレトームの特徴付けと研究

MSCセクレトーム—さらなる特徴付け

新しいタンパク質因子について、さらにELISA分析を行った。さらに2つのタンパク質因子を10のバッチにわたって分析した。PEDF（別名セルピンF1）、10バッチ分析：273±27 ng/mL、及びDPPIV（ジペプチジルペプチダーゼ-4）、10バッチ分析：1.35±0.15 ng/mL。

【0519】

別のMSCセクレトーム分析では、他の多くの因子と因子のファミリーを特定した。

【0520】

セルピンファミリー（セリンプロテアーゼ抑制剤）：存在の信頼性が高い（セルピン F 1、E 1、A 1、G 1、H 1、B 6、E 2、A 3、C 1、F 2、I 1）。信頼性／存在量が低い（セルピン B 1、B 7、D 1、B 3、B 8、B 2、B 1 2、A 7、A 4、A 6）。セルピン F 1、E 1、及び A 1 が非常に豊富である。＊注：セルピン F 1（別名 P E D F）が、さらに同定された分析物の中で最も豊富である。

【0521】

抗酸化に關与するタンパク質：カタラーゼ、プロテインジスルフィドイソメラーゼ、プロテインジスルフィドイソメラーゼ A 3、プロテインジスルフィドイソメラーゼ A 4、プロテインジスルフィドイソメラーゼ A 6、ペルオキシレドキシニン-6、ペルオキシレドキシニン-1、ペルオキシレドキシニン-2、ペルオキシレドキシニン-4

10

【0522】

マトリックスメタロプロテイナーゼ：MMP 2、MMP 1、MMP 1 4

【0523】

MSCセクレトーム分析でさらに特定された個々のタンパク質またはファミリー。抗炎症剤：可溶性スカベンジャー受容体システインリッチドメイン含有タンパク質 SSC 5 D。抗炎症剤：腫瘍壊死因子誘導性遺伝子 6 タンパク質（別名 TSG-6）。血清アルブミン（最も豊富）。潜在的トランスフォーミング成長因子結合タンパク質（LTGFBP-1）、アイソフォーム、LTGFBP-2、3、4。

【0524】

エクソソーム画分及びエクソソームの特徴付けに関して、さらなる分析を実施した。フローサイトメトリーを使用して、エクソソームが CD 8 1 及び CD 6 3 陽性であることが確認された。

20

【0525】

液体MSCセクレトーム製剤の安定性

安定性分析を実施し、3つの因子の生化学的含有量を調べた。調べた3つの因子は、セルピン E 1、セルピン F 1、及び TIMP-1 であった。

【0526】

分析のために、MSCセクレトームのバッチを製造し、原薬（表 1 に記載されている製剤緩衝液中）の安定性を評価した。アリコート、7日間または14日間のプログラムの一環として、-20°C、4°C、または室温で保存した。研究の終わりに、試料を ELISA で分析して、セルピン E 1、セルピン F 1、及び TIMP-1 を測定した。図 2 2 にデータを示す。MSCセクレトーム因子は、液体製剤中で少なくとも14日間は分解しない（図 2 2 を参照）。複数の要因の安定性は、製剤が MSCセクレトームの全体的なタンパク質安定化を裏付けていることを示唆している。

30

【0527】

インビトロ円形創傷閉鎖アッセイを使用して調べた生物活性

図 2 3 に示すように、角膜実質細胞（または線維芽細胞）と角膜上皮細胞に対して円形創傷閉鎖アッセイを実施した。図 2 3 に示すグラフには、時間プロットによる閉鎖を示す速度データも示されている。図 2 3（上部パネル）のデータに示されているように、MSCセクレトームは、円形の創傷部位で一次角膜実質細胞の遊走を刺激する。角膜実質細胞の集密的な単層に円形の創傷を作成し、創傷ギャップの閉鎖を毎日観察した。無血清培地中の 100 及び 50 µg/mL の MSCセクレトームは、48 時間以内に創傷を閉じる。示される画像は、ゲンチアナバイオレットで染色された創傷領域であり、創傷の 2 日後に画像化されている。また、図 2 3 の下のパネルに示されているように、パネル下：MSCセクレトームは、円形の傷の部位で角膜上皮細胞の遊走を刺激する。角膜上皮細胞の集密的な単層に円形の創傷を作成し、創傷ギャップの閉鎖を毎日観察した。無血清培地中の 100 及び 50 µg/mL の用量では、MSCセクレトームは 72 時間以内に創傷を閉じる。示される画像は、ゲンチアナバイオレットで染色された創傷領域であり、創傷の 2 日後に画像化されている。

40

【0528】

50

アッセイでは、Oris（商標）Cell Migration Assayプラットフォームは、「ストッパー」バリアを備えた96ウェルプレートを使用して、細胞遊走用の中央の無細胞検出ゾーンを作成した。実験に使用した細胞は、ATCC（Manassas, VI）から入手した不死化細胞株であった。細胞を80%の集密で増殖及び継代（1:3）した。アッセイに使用された細胞は7回の継代を超えていない。

【0529】

最初に、細胞を各ウェル（コラーゲンコーティング）に一晩のインキュベーション後に集密的な単層を提供するように、密度（ 3.5×10^4 ）で播種した。次に、単層が確立された後、ストッパーが取り外されて、細胞が移動できる円形の空隙領域が作成された。ストッパーを取り外した後、細胞を洗浄し、培地を無血清の基本培地と交換することにより、30分間血清飢餓状態にした。血清飢餓後、遊走前の参照として明視野顕微鏡を使用して空隙の創傷領域を画像化した。次に、無血清培地を、 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ のMSCセクレトームを添加した試験培地と交換し、細胞をインキュベーターに戻した。無血清基本培地のネガティブ対照と通常の完全増殖培地のポジティブ対照を使用した（3日目までに>80%の閉鎖を提供するはずである）。すべての試験条件と対照条件は2連で調製された。毎日（遊走前の画像を取得してから約24時間後）、創傷領域の明視野画像を取得する。また、培地を24時間ごとに新しい試験培地または対照培地と交換した。

10

【0530】

インビトロ円形創傷閉鎖を使用して調べた液体MSC製剤の安定性

上記と同じ円形創傷閉鎖アッセイを使用して、液体MSCセクレトーム製剤の安定性を調べた。

20

【0531】

MSCセクレトームの新しいバッチを製造し、原薬（製剤緩衝液中）の安定性を評価した。アリコート、7日間または14日間のプログラムの一環として、 -20°C 、 4°C 、または室温で保存した。研究の終わりに、試料を角膜上皮細胞を使用した円形創傷アッセイで評価した。創傷閉鎖を3日間毎日観察した。参考基準として、製造時に瞬間凍結した原薬を使用した。指定創傷閉鎖率%WC。図24のデータを参照。

【0532】

3D組織モデルー上皮バリア完全性アッセイ

角膜上皮、より正確には、上皮の頂端表面は、角膜の全体的なバリア特性に大きく貢献しており、角膜バリアへの変化は、生体適合性分析の敏感な要因となる。

30

【0533】

経上皮電気抵抗（TEER）を評価して、全体的なバリア特性を測定することができる。簡単に説明すると、3D組織は、2mLのTEER緩衝液を含む24ウェルプレートに移し、10分間インキュベートする。TEERを、上皮ボルトオームメーターEVOMO及びEndOhm-12チャンパー（World Precision, Sarasota, FL）を使用して測定した。手順の最後に、3つの組織すべてを組織生存率評価に使用した。

%バリア完全性 = $100 \times [\text{TEER (処理組織)} / \text{TEER (プラセボ対照)}]$

【0534】

この研究の目的は、EpiCorneal組織モデル（MatTek Corp）を利用して、ナイトロジェンマスタード（NM）への局所曝露によって引き起こされた角膜上皮損傷後の試験品（MSCセクレトーム）の局所適用後のバリア完全性への影響を評価することである。MSCセクレトームを $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ （プラセボ溶液で希釈）で局所塗布した。EpiCorneal組織は、標準的な培養条件で5mLの培地で24時間培養された。

40

【0535】

実施例7：凍結乾燥MSCセクレトームの特徴付け及び試験

MSCセクレトームー凍結乾燥

図26には、凍結乾燥後のタンパク質及びエクソソームの含有量分析が示される。

50

【0536】

MSCセクレトーム－生物活性

図26及び図27に示されるように、MSCセクレトームの新たなバッチを製造し、原薬（製剤緩衝液中）を瞬間凍結（－80℃で実施）または凍結し、凍結乾燥した。分析の直前に、凍結乾燥物質を滅菌水（凍結体積と等体積のもの）中に再懸濁した。角膜上皮細胞（または角膜実質細胞）及び新たに解凍した物質（DF；ダイアフィルトレーション）または新たに再構成した物質を使用してインビトロ円形創傷閉鎖アッセイを実施した。結果は、凍結乾燥後に、上皮細胞及び角膜実質細胞においてMSCセクレトーム原薬が凍結液体物質と同等に創傷閉鎖を引き起こすことを示す。

【0537】

図27のデータによって示されるように、凍結乾燥原薬（例えば、凍結乾燥MSCセクレトーム）は、凍結物質（－80℃）と同等の創傷閉鎖生物活性を示す。図28には、凍結乾燥MSCセクレトームの例も示される。

【0538】

上記の実施例は、当業者に、本発明の組成物、システム、及び方法の実施形態をどのように作製及び使用するかについての完全な開示及び説明を与えるために提供されており、発明者らが自身の発明とみなすものの範囲を限定するようには意図されていない。当業者に明らかである本発明を実施するための上記の様式の修正は、以下の特許請求の範囲内にあるよう意図されている。本明細書中で言及されているすべての特許及び刊行物は、本発明が関係する当業者の技術水準を示している。本開示において引用されたすべての参考文献は、あたかも各参考文献が参照によりその全体が個別に組み込まれているのと同程度に参照により組み込まれる。

【0539】

すべての見出し及び節の表記は、明確さ及び参照目的のために使用されているにすぎず、決して限定するものとみなされるべきではない。例えば、当業者であれば、本明細書に記載の本発明の趣旨及び範囲に従って、必要に応じて異なる見出し及び節からの様々な態様を組み合わせることの有用性を認識するであろう。

【0540】

本明細書に引用されるすべての参考文献は、各個々の刊行物または特許または特許出願が参照によりその全体がすべての目的のために組み込まれているかのように具体的かつ個別に示されるのと同程度に、参照によりそれらの全体がすべての目的のために本明細書に組み込まれる。

【0541】

当業者には明らかなように、本出願の趣旨及び範囲から逸脱することなく、本出願の多くの修正及び変形をなすことができる。本明細書に記載の特定の実施形態及び実施例はほんの一例として提供されており、本出願は、特許請求の範囲が権利を与えられる等価物の全範囲に加えて、添付の特許請求の範囲の用語によってのみ限定されるべきである。

10

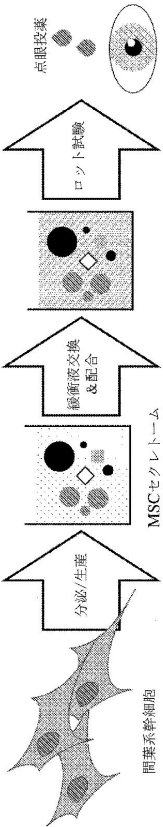
20

30

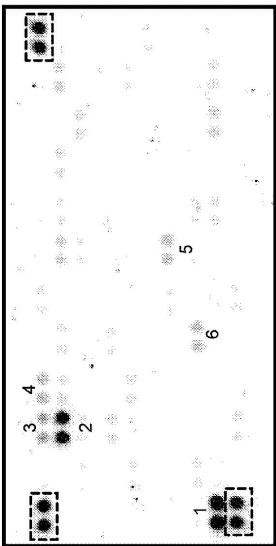
40

50

【図面】
【図 1】

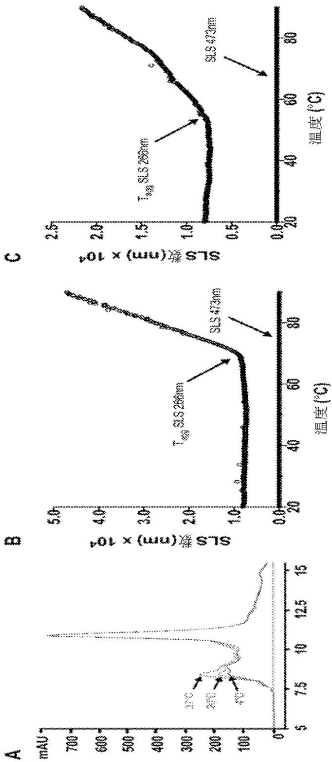


【図 2】

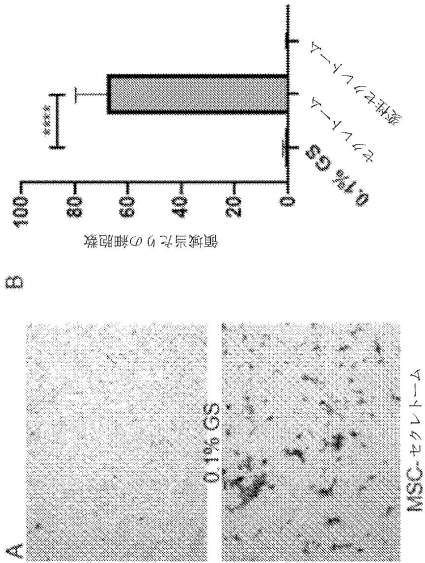


タンパク質ID	機能
1 セルピンE1	角質修復 (Q92432); 抗血管新生 (Q92441)
2 キチナーゼ3様	抗重 (Q92441)
3 アポリポタンパク質A1	脂質代謝 (Q92441)
4 アンギオタニン	細胞増殖/抗細胞死 (Q92441)
5 MIF	酸化ストレス低減 (Q92441)
6 ペントキシシン-3	組織修復; 繊維再形成 (Q92441)

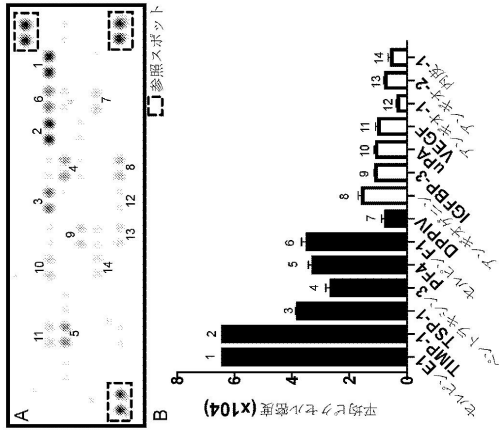
【図 3】



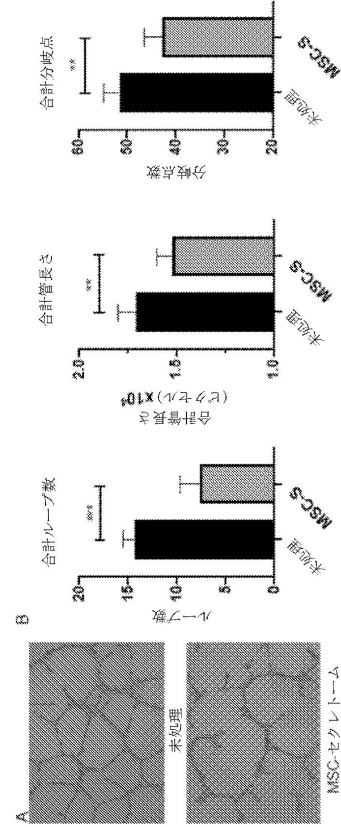
【図 4】



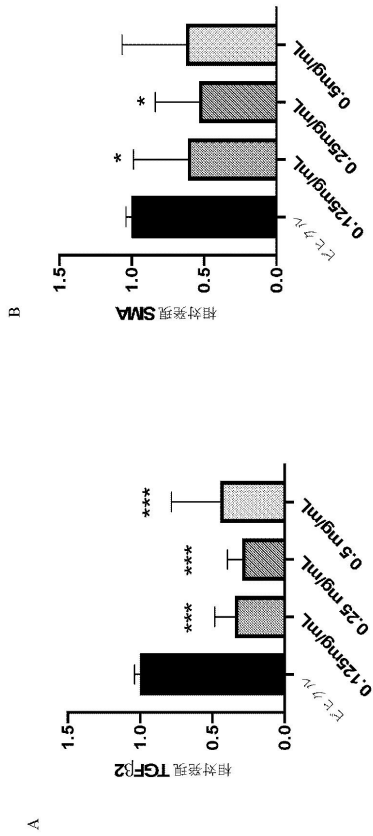
【図 5】



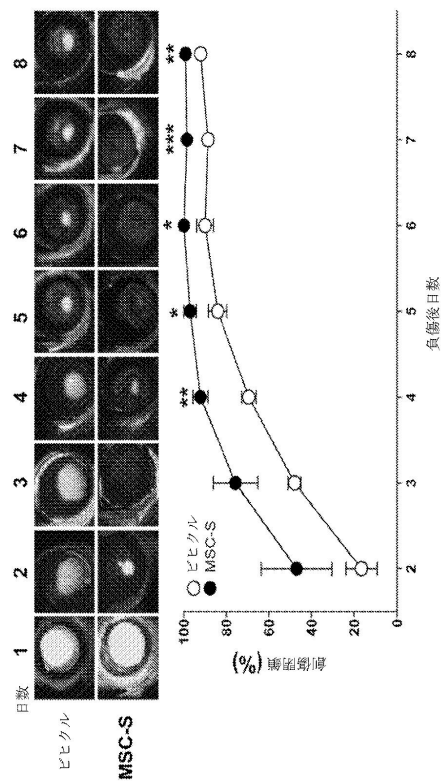
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

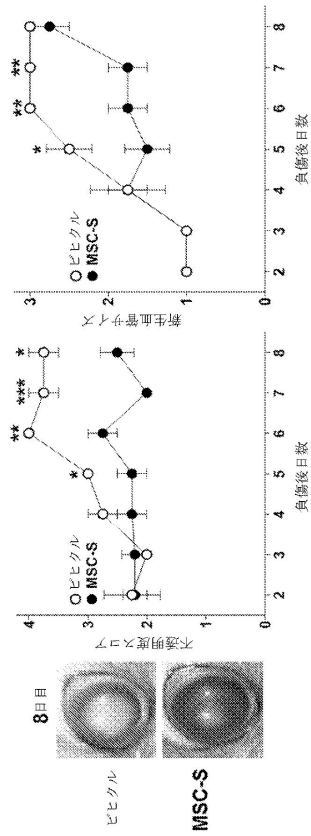
20

30

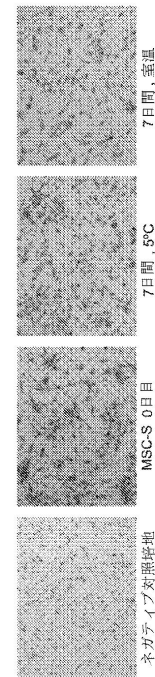
40

50

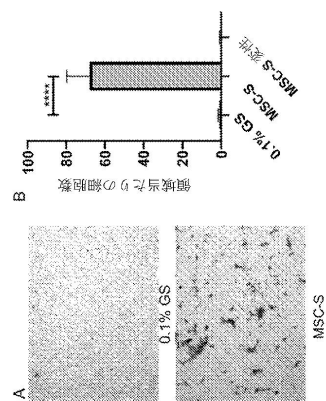
【図 9】



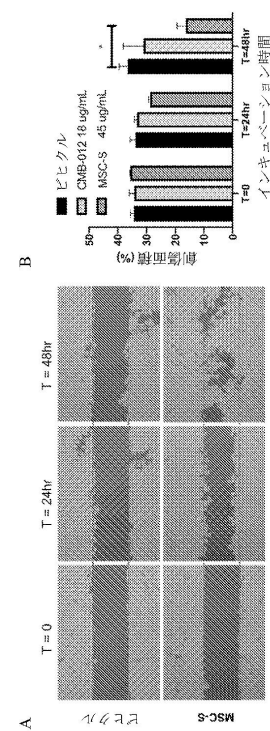
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

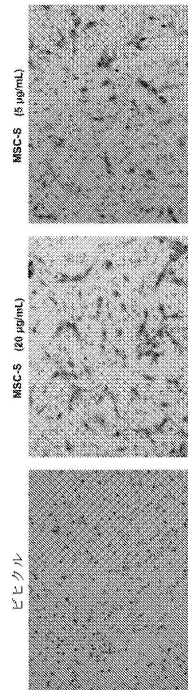
20

30

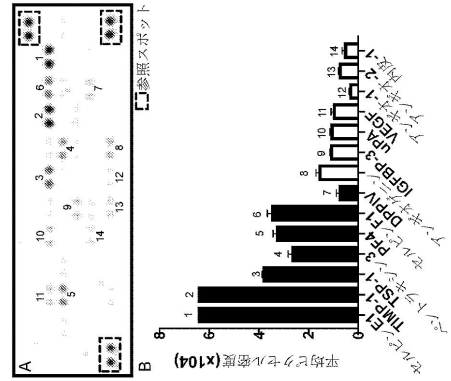
40

50

【図 1 3】



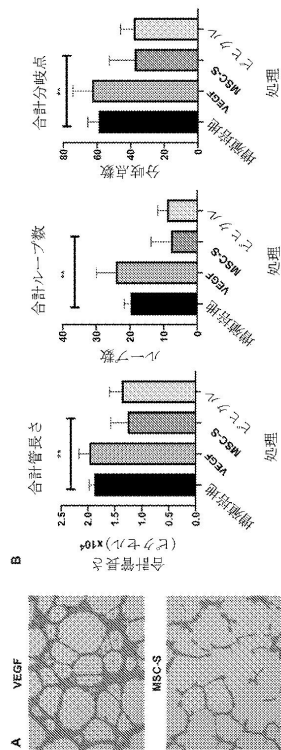
【図 1 4】



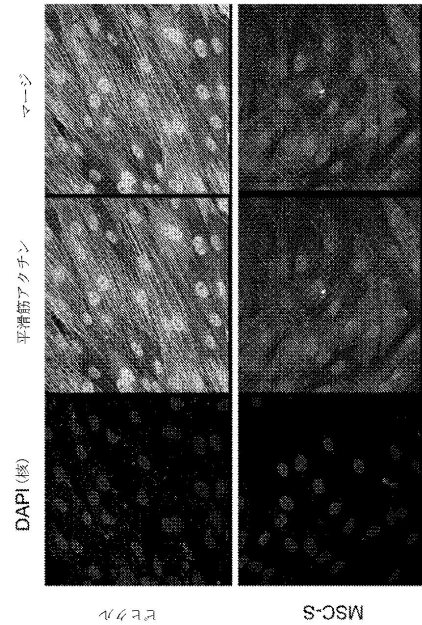
10

20

【図 1 5】



【図 1 6】

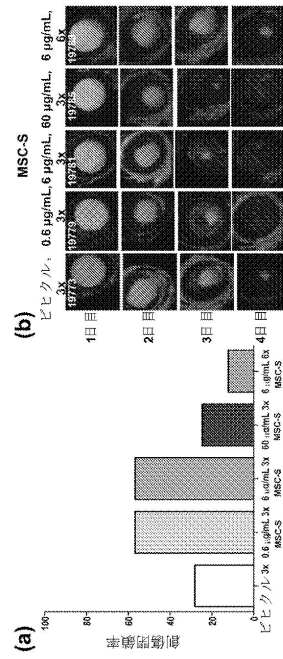


30

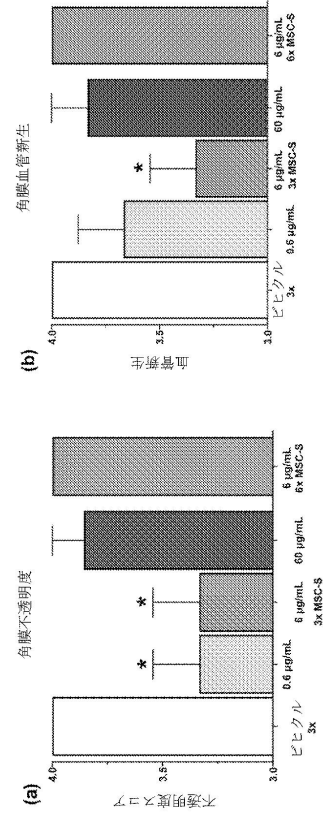
40

50

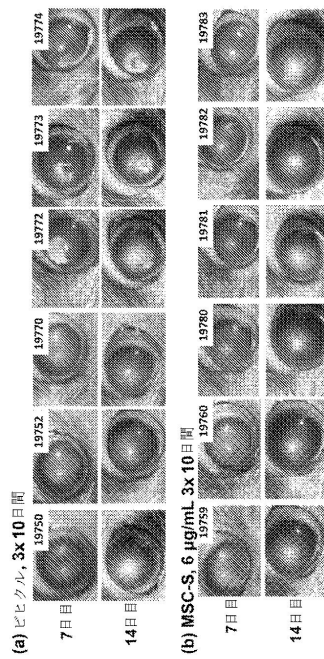
【図 17】



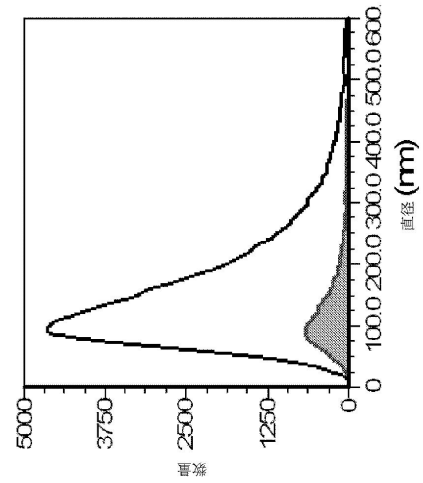
【図 18】



【図 19】



【図 20】



10

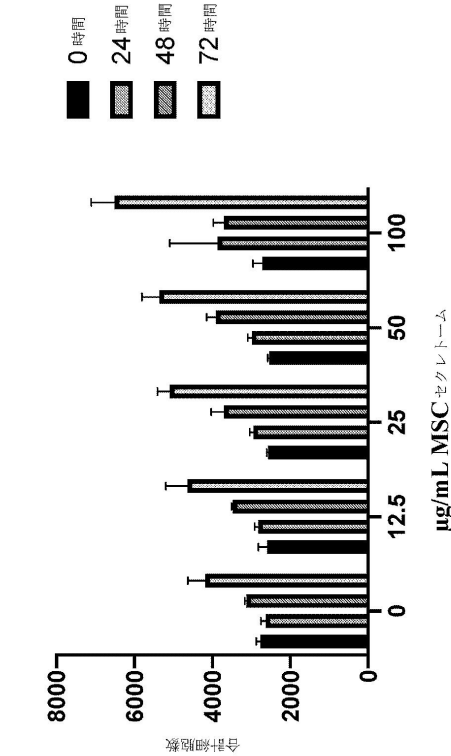
20

30

40

50

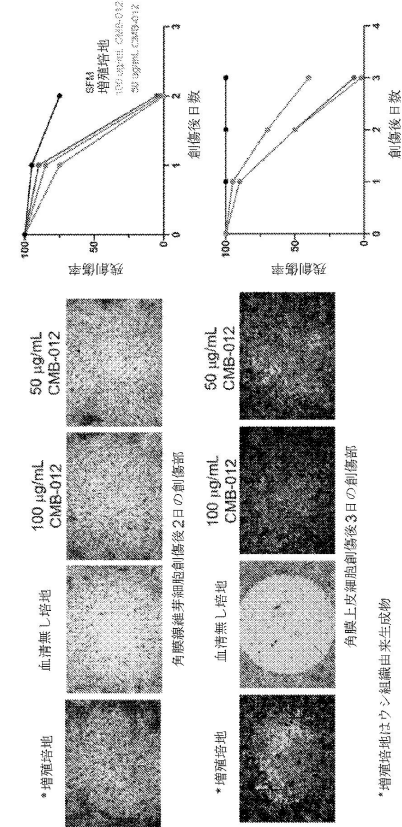
【図 2 1】



【図 2 2】

7日間プログラム				14日間プログラム			
保管状態	TTMP-1 (ng/mL)	セルペンE1 (ng/mL)	セルペンF1 (ng/mL)	TTMP-1 (ng/mL)	セルペンE1 (ng/mL)	セルペンF1 (ng/mL)	セルペンF1 (ng/mL)
-80°C (基準)	607	181	685	607	181	685	685
-20°C	576	168	615	512	209	717	717
4°C	532	166	621	570	190	722	722
20-25°C (RT)	700	192	627	595	210	736	736

【図 2 3】



【図 2 4】

7日間プログラム		14日間プログラム	
48時間WC%	72時間WC%	48時間WC%	72時間WC%
保管状態			
-80°C (基準)	48	100	100
-20°C	51	100	90
4°C	54	100	100
20-25°C (RT)	56	98	100
ネガティブ (SFMI)	3	4	3
ポジティブ (増殖培養地)	35	56	35

%WC: 創傷閉鎖の割合 | 全ての創傷は50 μg/mL MSCセクレトームで治療された

ネガティブ

創傷後3日

ヒト角膜上皮細胞

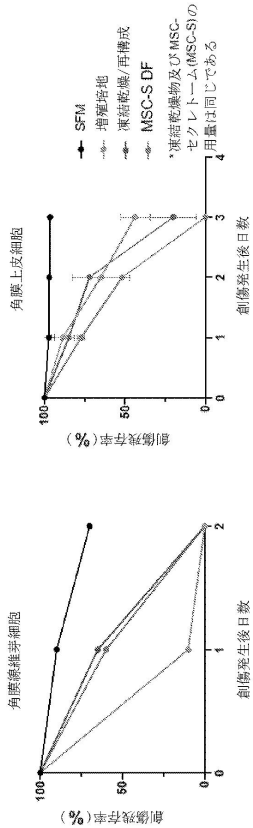
【図 2 5】

治療	TEER ($\Omega \times \text{cm}^2$)		対ネガティブ対照 (%)	
	平均	Sid Dev	平均	Sid Dev
治療無し	8796.16	136.76	100	15.6
ピヒクル単体	698.59	65.55	79	7.5
創傷	92.85	37.32	11	4.2
MSCセクレトーム	482.21	88.91	55	10

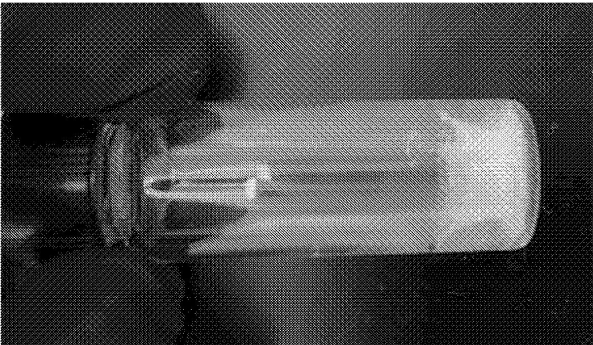
【図 2 6】

MSCセクレトームの状態	タンパク質因子			エクソソーム	
	TIMP-1 (ng/mL)	セルペン E1 (ng/mL)	セルペン FI (ng/mL)	濃度 (粒子数/ μL)	平均直径 (nm)
凍結乾燥前	607	181	685	5.25×10^5	103
再構成後	456	135	620	4.07×10^5	103
回収率 (%)	75%	75%	91%	77%	N/A

【図 2 7】



【図 2 8】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 21/28059
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 35/28, C12N 5/0775, C07K 14/475, A61K 45/06 (2021.01) CPC - A61K 35/28, C12N 5/0663, C12N 5/0668, A61K 38/1866, A61K 45/06, C07K 14/475, C07K 14/8121		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/0060405 A1 (KLEINMAN et al.) 27 March 2003 (27.03.2003) abstract; para [0011], [0090], [0113]-[0114]; claim 66	145, 147/145
Y	US 2018/0028570 A1 (UCL BUSINESS PLC) 01 February 2018 (01.02.2018) abstract; para [0015], [0025]-[0027], [0033], [0068]	146, 147/146
Y	US 2018/0028570 A1 (UCL BUSINESS PLC) 01 February 2018 (01.02.2018) abstract; para [0015], [0025]-[0027], [0033], [0068]	1-3, 146, 147/146
Y	DEL FATTORE et al., Immunoregulatory Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles on T Lymphocytes. Cell Transplantation. 2015, Vol. 24, No. 12, pages 2615-2627; pg 2615, col 1, para 1; pg 2615, col 2, para 1	1-3
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 03 September 2021		Date of mailing of the international search report OCT 04 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Kari Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/26059

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-34, 38, 49, 58-61, 69-94, 100-124, 128-144, 151-152
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

—See Supplemental Box —

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-3, 145-147

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/26059

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, Claims 1-3, 145-147, directed to a mesenchymal stem cell (MSC) secretome composition.

Group II, claims 35-37, 39-48, 50-57, 127, 148-150, directed to a method for characterizing a MSC secretome and a panel of tests and/or assays for the same.

Group III+, claims 62-68, 95-96, directed to a stable mesenchymal stem cell (MSC) secretome lyophilized formulation. Group III+ will be searched upon payment of additional fees. The formulation may be searched, for example, to encompass a lyophilized formulation comprising:

- i. 1-20 ug, optionally 2 ug- 8 ug of MSC secretome per mL;
- ii. 2 mg -3 mg monobasic sodium phosphate per mL;
- iii. 11 mg -12 mg dibasic sodium phosphate per mL;
- iv. 11.5 mg - 13 mg mannitol per mL;
- v. 23 mg-24 mg trehalose dihydrate;

vi. 0.5 mg- 2 mg optionally hypromellose per mL; and wherein the pH is about 4.7 to about 7.5, for an additional fee and election as such. It is believed that claim 62 reads on this exemplary invention. Additional formulation(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected formulation(s). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Another exemplary election would be a lyophilized formulation comprising: i. 0.004% - 0.0375%, optionally 0.008% - 0.015 % w/w of MSC secretome;

- ii. 4 % - 5 % w/w monobasic sodium phosphate;
- iii. 21.5 % - 23 % w/w dibasic sodium phosphate;
- iv. 23 % - 25 % w/w mannitol;
- v. 46 % - 48 % w/w trehalose dehydrate;
- vi. 1 % - 3 % w/w optionally hypromellose; and wherein the pH is about 4.7 to about 7.5 (claim 63).

Group IV, claims 97-99, 125-126, directed to a method of treatment for an ocular condition in a subject in need thereof.

The inventions listed as Groups I, II, III+ and IV do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

Group I has the special technical feature of a MSC secretome composition for lyophilization, that is not required by Groups II, III+ and IV.

Group II has the special technical feature of a method for characterizing a MSC secretome, and assays for characterization, that is not required by Groups I, III+ and IV.

Group III+ has the special technical feature of MSC secretome lyophilized formulation, that is not required by Groups I, II and IV.

Group IV has the special technical feature of treatment for an ocular condition in a subject, that is not required by Groups I, II and III+.

Common technical features

The inventions of Groups I, II, III+ and IV share the common technical feature of:

a mesenchymal stem cell (MSC) secretome composition for lyophilization and/or after being lyophilized comprising:

- ii. at least one trophic factors/cytokines selected from the group consisting of HGF, FGF-7, TIMP-1, TIMP-2, PAI-1 (Serpin EI), VEGF-A, and/or b-NGF;
 - iii. at least one additional factor selected from the group consisting of sFLT-1, PEDF (Serpin F1), Serpin AI, IGFBP-2, IGFBP-3, SDF-1, TSG-14, Kallikrein 3, MCP-1, bFGF, Angiogenin, MCP-2, Angio-2, IL-6, IL-17, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-8, TNF-beta, PDGF, SOD1, SOD2, SOD3, and/or HO-1; and
 - iv. at least one additional factor selected from the group consisting of DPPIV (dipeptidyl peptidase-4), uPA, Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, Amphiregulin, Endostatin, Endothelin-1, Thrombospondin-2, and/or Thrombospondin-1;
- a stable mesenchymal stem cell (MSC) secretome formulation comprising:
- i. 2ug -20 ug of MSC secretome per mL;
 - ii. 2 mg -3 mg monobasic sodium phosphate per mL;
 - iii. 11 mg -12 mg dibasic sodium phosphate per mL;
 - iv. 11.5 mg -13 mg mannitol per mL;
 - v. 23 mg -24 mg trehalose dihydrate;
 - vi. 0.5 mg -2 mg optionally hypromellose per mL; and wherein the pH is about 4.7 to about 7.5.

---See Supplemental Box ---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/28059

Box No. III Observations where unity of invention is lacking - continued

However, these shared technical features are made obvious by US 2018/0028570 A1 to UCL Business PLC (hereinafter "UCL") in view of WO 2018/078524 A1 to Pharmaexceed S.R.L. (hereinafter "Pharmaexceed").

UCL discloses a mesenchymal stem cell (MSC) secretome composition (para [0068] - "a structure produced by thermally induced phase separation wherein the structure has one or more cells which produce an angiogenic factor attached to its surface"; para [0015] - "The formation of structures by TIPS, from suitable polymers, results in highly porous structures which are ideal for cell attachment and culture. The attached cells show increased secretion of angiogenic factors which can be isolated and used to treat disease"; para [0026] - "the cells are Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells"; para [0025] - "The broad spectrum of secreted proteins released in response to local environmental stimuli includes growth peptides, cytokines, and chemokines and is defined as the MSC secretome") for lyophilization and/or after being lyophilized (para [0033] - "quenching the substrate having the polymer and solvent coating in a quenching fluid; and iii) freeze-drying the coating to obtain the substrate coated with the structure") comprising: a. at least one trophic factors/cytokines selected from the group consisting of VEGF-A (para [0027] - "Preferably the angiogenic factor is VEGF"); b. at least one additional factor selected from the group consisting of PEDF, Serpin F1, IGFBP-2, IGFBP-3, Angiogenin, GM-CSF, and PDGF (para [0027] - "The angiogenic factor may be selected from...angiogenin, ...GM-CSF ...IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3...Platelet Derived Growth Factor (PDGF-AA), ... Serpin F1/PEDF, ...and mixtures thereof"); and c. at least one additional factor selected from the group consisting of DPPIV, dipeptidyl peptidase-4, uPA, Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, Amphiregulin, Endostatin, Endothelin-1, Thrombospondin-2, and Thrombospondin-1 (para [0027] - "The angiogenic factor may be selected from... angiopoietin 1, angiopoietin 2,... amphiregulin, ... DPPIV/CD26,... Endostatin/Collagen XVIII, Endothelin-1,..., Thrombospondin-1, Thrombospondin-2,... and mixtures thereof").

Pharmaexceed discloses a stable mesenchymal stem cell (MSC) secretome lyophilized formulation (pg 9, In 20-22 - "MSC produce a considerable and reproducible amount of microvesicles and/or exosomes that are released into the culture medium"; pg 30, In 1-2 - "The percentage composition of the lyophilized product has a secretome content ranging between about 5% and about 48% w/w") comprising: i. 5-48% w/w of MSC secretome (pg 30, In 1-2 - "The percentage composition of the lyophilized product has a secretome content ranging between about 5% and about 48% w/w"); ii. PBS (Table 2 - PBS at a concentration of 0.6-2.5 mg/well) (Note: PBS contains monobasic sodium phosphate); iii. 10 mM dibasic sodium phosphate (pg 10, In 30-31; pg 11, In 1-2 - "Buffer mixtures such as phosphate buffered saline (PBS) comprising sodium and potassium chloride, disodium phosphate and monopotassium phosphate may advantageously be used"; pg 11, In 4 - "a solution of Na₂HPO₄ * 7H₂O, 10mM"); iv. 11.5 mg - 13 mg mannitol per mL (pg 24, In 14 - "mannitol as a cryo-protector, 0-30 mg/ml"); v. trehalose dihydrate (pg 11, In 29-31 - "Examples of sugars useful as cryo-protectors in the process of the present invention are: mannitol, lactose, sucrose, trehalose, sorbitol, glucose, maltose, fructose, and raffinose"); and wherein the pH is about 4.7 to about 7.5 (pg 10, In 30-31; pg 11, In 1-2 - "Buffer mixtures such as phosphate buffered saline (PBS) comprising sodium and potassium chloride, disodium phosphate and monopotassium phosphate may advantageously be used"). Pharmaexceed does not expressly disclose i. 1-20 ug of MSC secretome per mL; ii. 2 mg - 3 mg monobasic sodium phosphate per mL; iii. 11 mg - 12 mg dibasic sodium phosphate per mL; v. 23 mg - 24 mg trehalose dihydrate. However, one of ordinary skill in the art would have further optimized using routine experiments, to identify the exact value for each of the components in the formulation and the pH thereof.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I, II, III+ and IV inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

NOTE, continuation of Item 4 above: claims 4-34, 38, 49, 58-61, 69-94, 100-124, 128-144, 151-152 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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 K	38/55 (2006.01)	A 6 1 K	38/55	
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17	
A 6 1 K	38/46 (2006.01)	A 6 1 K	38/48	1 1 0
A 6 1 K	38/44 (2006.01)	A 6 1 K	38/46	
A 6 1 K	38/49 (2006.01)	A 6 1 K	38/44	
A 6 1 K	38/22 (2006.01)	A 6 1 K	38/49	
A 6 1 K	9/19 (2006.01)	A 6 1 K	38/22	
A 6 1 K	47/02 (2006.01)	A 6 1 K	9/19	
A 6 1 K	47/12 (2006.01)	A 6 1 K	47/02	
A 6 1 K	47/26 (2006.01)	A 6 1 K	47/12	
A 6 1 K	47/10 (2017.01)	A 6 1 K	47/26	
A 6 1 K	47/38 (2006.01)	A 6 1 K	47/10	
A 6 1 K	47/34 (2017.01)	A 6 1 K	47/38	
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/34	
A 6 1 K	47/36 (2006.01)	A 6 1 K	47/24	
A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 K	47/36	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 K	47/42	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
C 1 2 N	5/0775(2010.01)	A 6 1 P	29/00	
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	C 1 2 N	5/0775	
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
		G 0 1 N	33/15	Z

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

ト 3 7 1 7 1、アパートメント 1 1 2 0

F ターム (参考)	2G045	BA20
	4B065	AA90X AC15 CA24 CA44
	4C076	AA12 AA29 BB24 CC29 DD22Z DD23D DD26Z DD38D DD43Z DD67D EE09 EE16 EE23 EE24 EE26 EE27 EE30 EE32 EE37 EE41 FF61 GG06
	4C084	AA02 AA03 BA44 CA56 DA01 DA12 DA18 DA25 DB01 DB52 DB55 DB57 DB58 DB59 DB62 DC04 DC05 DC09 DC22 DC23 DC24 DC32 MA17 MA44 MA58 NA14 ZA331 ZA332 ZA361 ZA362 ZB111 ZB112
	4C087	AA01 AA02 BB64 CA04 CA05 CA06 CA16 MA17 MA44 MA58 NA14 ZA33 ZA36 ZB11