



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110974847 B

(45) 授权公告日 2021.07.06

(21) 申请号 201911352949.7

A61P 9/10 (2006.01)

(22) 申请日 2019.12.25

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 109674819 A, 2019.04.26

申请公布号 CN 110974847 A

CN 109674819 A, 2019.04.26

(43) 申请公布日 2020.04.10

CN 102586184 A, 2012.07.18

(73) 专利权人 博雅干细胞科技有限公司

CN 105796600 A, 2016.07.27

地址 214092 江苏省无锡市滨湖区马山梅

CN 106754680 A, 2017.05.31

梁路88号博雅干细胞公司

CN 105463058 A, 2016.04.06

审查员 孟强

(72) 发明人 许晓椿 肖海蓉 刘冰

(51) Int. Cl.

G12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

权利要求书1页 说明书19页

(54) 发明名称

干细胞治疗下肢缺血性疾病的方法

(57) 摘要

本发明涉及干细胞治疗下肢缺血性疾病的方法。涉及的用于治疗下肢缺血性疾病的细胞治疗组合物中包括：脐带间充质干细胞、氯化钠、和水。该细胞治疗组合物制法如下：将氯化钠等物料加入水中溶解，任选地对该溶液进行除菌，获得制剂的基质；将预先制得的间充质干细胞混悬于该基质中，分装，即得。本发明还涉及所述细胞治疗组合物的制备方法，以及它们的医学用途。本发明方法呈现如说明书所述优异技术效果，例如，本发明所得组合物在细胞复苏时呈现优良的细胞复苏性能，细胞经历复苏过程的活力以及复苏后细胞的存活稳定性方面，显著高于现有技术方案。此外，本发明组合物呈现更为有益生物学活性。

1. 用于治疗下肢缺血性疾病的细胞治疗组合物,该组合物组成为:胎盘间充质干细胞 2×10^7 个/mL $\sim 5 \times 10^7$ 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.1% $\sim 0.3\%$ 、氯化钠0.8% $\sim 1.0\%$ 、氯化镁0.05% $\sim 0.1\%$ 、乙二胺四乙酸钙钠0.02% $\sim 0.05\%$ 和注射用水,所述百分数为质量体积百分数。

2. 根据权利要求1的细胞治疗组合物,所述磷脂酰丝氨酸的质量体积百分数为0.15% $\sim 0.25\%$ 。

3. 根据权利要求1的细胞治疗组合物,所述磷脂酰丝氨酸的质量体积百分数为0.2%。

4. 根据权利要求1的细胞治疗组合物,所述间充质干细胞的密度为 3×10^7 个/mL。

5. 根据权利要求1的细胞治疗组合物,所述氯化钠的质量体积百分数为0.9%。

6. 根据权利要求1的细胞治疗组合物,所述氯化镁的质量体积百分数为0.08%。

7. 根据权利要求1的细胞治疗组合物,所述乙二胺四乙酸钙钠的质量体积百分数为0.03%。

8. 根据权利要求1的细胞治疗组合物,其组成为:胎盘间充质干细胞 4×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.2%、氯化钠0.9%、氯化镁0.08%、乙二胺四乙酸钙钠0.03%和注射用水。

9. 根据权利要求1的细胞治疗组合物,其组成为:胎盘间充质干细胞 2×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.3%、氯化钠0.8%、氯化镁0.1%、乙二胺四乙酸钙钠0.02%和注射用水。

10. 根据权利要求1的细胞治疗组合物,其组成为:胎盘间充质干细胞 5×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.1%、氯化钠1.0%、氯化镁0.05%、乙二胺四乙酸钙钠0.05%和注射用水。

11. 根据权利要求1的细胞治疗组合物,其组成为:胎盘间充质干细胞 3×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.2%、氯化钠0.9%、氯化镁0.08%、乙二胺四乙酸钙钠0.04%和注射用水。

12. 根据权利要求1的细胞治疗组合物,所述间充质干细胞为原代 \sim 第十代的间充质干细胞。

13. 根据权利要求1的细胞治疗组合物,所述的间充质干细胞的获取方法包括如下步骤:

(a) 用PBS缓冲液充分冲洗胎盘小叶,以去除胎盘中残留的血液;

(b) 将胎盘小叶剪成块状,加入含有组织消化酶的PBS缓冲液,再在 37°C 孵育消化;

(c) 将组织块用铜网过滤,研磨以促使过滤;

(d) 将收集的过滤液离心,分离单个核细胞,再用MSC培养基悬浮所获得的细胞,然后在 37°C 、5%的 CO_2 培养箱中培养;

(e) 待散在细胞形成克隆后,挑取各克隆细胞,用MSC培养基分别培养,待细胞融合后,用胰酶消化传代,即得胎盘间充质干细胞。

14. 制备权利要求1-13任一项所述细胞组合物方法,包括以下步骤:

将磷脂酰丝氨酸和氯化钠、氯化镁、乙二胺四乙酸钙钠加入水中溶解,对该溶液进行除菌,获得制剂的基质;

将预先制得的间充质干细胞混悬于该基质中,分装,即得;

所述制备过程是在无菌条件下进行的;

所述制备过程中,在与间充质干细胞混和前所述基质的温度低于 25°C ;

所述制备过程中,在温度低于 25°C 条件下将所述基质与间充质干细胞混和。

15. 权利要求1-13任一项所述细胞治疗组合物在制备用于治疗下肢缺血性疾病的药物中的用途。

干细胞治疗下肢缺血性疾病的方法

技术领域

[0001] 本发明属于医药生物技术领域,其涉及用于治疗 and/或预防急性和/或慢性下肢缺血性疾病方法,该方法中使用的药物组合物,以及该组合物用于治疗下肢缺血性疾病的用途。特别是涉及使用干细胞治疗下肢缺血性疾病的方法和组合物。

背景技术

[0002] 下肢缺血性疾病是一种常见疾病,严重影响病人的生活质量、肢体存活甚至危及生命。下肢缺血性疾病是指由各种原因导致的下肢动脉狭窄或闭塞、血流灌注不足,从而导致下肢出现间歇性跛行(intermittent claudication, IC)、溃疡、坏疽等缺血表现的一类疾病。最常见的导致下肢缺血性疾病的原因是动脉硬化造成的下肢动脉硬化闭塞症(lower extremities arteriosclerosis obliterans, LEAO),除此之外还包括其他非动脉硬化性的原因,如下肢动脉栓塞、血栓闭塞性脉管炎、主动脉狭窄、下肢动脉肌纤维发育不良、大动脉炎、结节性多动脉炎,永存坐骨动脉、腘动脉压迫综合征、腘动脉外膜囊性变、腘动脉瘤、原发性血管肿瘤、髂动脉内纤维化以及因各种高凝状态导致的动脉内血栓形成等。

[0003] 下肢缺血性疾病在临床上可分为I-IV期:I期,症状轻微期:这一期的主要症状是感觉发冷、凉,轻度麻木,活动后易感疲乏;II期,间歇性跛行期:此时行走后患肢疲乏、无力,肌肉酸痛,休息后症状可完全缓解,每次行走的距离、休息的时间一般较为固定;III期,静息痛,休息时也感到麻木、疼痛;夜间疼痛加重;IV期,组织坏死期,肢端出现缺血性溃疡或大面积坏死。I期和II期时常采用药物治疗,包括止痛剂,抗凝剂,抗血小板剂。III期和IV期时常采用介入手术,包括球囊、支架、斑块旋切等,或脊髓电刺激术、交感神经节阻滞或神经切断术等。糖尿病下肢缺血性疾病是指在糖尿病发生发展和治疗中因下肢动脉硬化、狭窄而造成的肢体慢性缺血缺氧而出现的疾病,常规药物治疗收效甚微,部分患者经介入治疗或血管搭桥手术的远期疗效不够理想,尤其是下肢动脉流出道闭塞而且缺乏代偿性侧支形成,采用任何手段均很难使血管再通。随着干细胞基础研究和临床应用的进展,为糖尿病下肢缺血患者提供了一个新的治疗手段,将干细胞移植到糖尿病下肢缺血患者的下肢肌肉内后,在缺血缺氧环境下诱导生成血管内皮细胞、表皮细胞等,形成新生毛细血管、再生表皮,逐渐分化并形成新的毛细血管,达到促进血管再生,改善和恢复糖尿病下肢缺血患者的患肢血流;但采集外周血或骨髓干细胞风险较大,对患者年龄、身体条件、心理接受程度要求较高;糖尿病下肢缺血患者多为年龄偏大的老年患者,考虑其自体干细胞数量、分化能力下降,且糖尿病患者外周血中内皮祖细胞不仅数量减少,而且增殖潜能、黏附和成血管能力均降低。与骨髓和自体外周血干细胞相比,脐带资源丰富,间充质干细胞更原始,扩增能力更强,诱导分化后可获得足量干细胞且向血管、骨、肌肉、神经分化能力更强大,具有更加有效的干细胞潜能,且细胞采集简单,以容易获得、免疫原性弱。

[0004] 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是一组源于基质的异质细胞群,可以从人体大多数组织获取。大量实验研究显示,间充质干细胞具有表皮细胞分化潜能,可促进受创皮肤的愈合。骨髓源性间充质干细胞由于存在病毒污染的隐患,且随着供者年龄增

长,其细胞数量和扩增、分化能力出现明显下降趋势,不适合批量制备。而来源于人脐带、胎盘或羊膜的间充质干细胞,成功避开了胚胎干细胞来源缺乏、异物排斥、道德伦理等诸多限制,成为了骨髓源间充质干细胞的很好的替代物;它们具有自我更新、组织修复、免疫调节能力,可以向中胚层谱系分化,例如分化为脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞等,此外还能够向及其它胚层谱系细胞分化,例如向表皮细胞、血管内皮细胞分化;而且细胞在体外易于扩增,扩增后分化能力、增殖能力保持稳定,适合大规模制备。

[0005] 已知有将间充质干细胞用于治疗下肢缺血性疾病的文献报道。然而在将其地应用于临床时,却需要面临诸多技术性问题例如生物学效果不足的问题。因此,提供一种包含间充质干细胞并且可用于治疗下肢缺血性疾病的方法和组合物,仍然是本领域技术人员迫切期待的。

发明内容

[0006] 本发明的另一目的在于提供一种使用干细胞治疗下肢缺血性疾病的方法和组合物,特别是该细胞治疗组合物可以用于治疗下肢缺血性疾病。已经出人意料地发现本发明组合物具有优异的性能。

[0007] 本发明是通过如下方案实现的。

[0008] 在本发明的第一方面,提供了一种用于治疗下肢缺血性疾病的细胞治疗组合物,该组合物中包括:间充质干细胞(可简称为MSC,其来源例如可以是脐带或胎盘)、磷脂酰丝氨酸、氯化钠、和水。

[0009] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述磷脂酰丝氨酸的质量体积百分数为0.1%~0.3%。

[0010] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述磷脂酰丝氨酸的质量体积百分数为0.15%~0.25%。

[0011] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述磷脂酰丝氨酸的质量体积百分数为0.2%。

[0012] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述间充质干细胞的密度为 2×10^7 个/mL~ 5×10^7 个/mL。

[0013] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述间充质干细胞的密度为 3×10^7 个/mL。

[0014] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述氯化钠的质量体积百分数为0.8%~1.0%。

[0015] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述氯化钠的质量体积百分数为0.9%。

[0016] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中还包含氯化镁。

[0017] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述氯化镁的质量体积百分数为0.05%~0.1%。

[0018] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述氯化镁的质量体积百分数为0.08%。

[0019] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中还包含乙二胺四乙酸钙钠。

[0020] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述乙二胺四乙酸钙钠的质量体积百分数为0.02%~0.05%。

[0021] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述乙二胺四乙酸钙钠的质量体积百分数为

0.03%。

[0022] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中磷脂酰丝氨酸的质量体积百分数为0.1%、间充质干细胞的密度为 3×10^7 个/mL、氯化钠的质量体积百分数为0.9%。

[0023] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中磷脂酰丝氨酸的质量体积百分数为0.2%、间充质干细胞的密度为 5×10^7 个/mL、氯化钠的质量体积百分数为0.9%。

[0024] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中磷脂酰丝氨酸的质量体积百分数为0.3%、间充质干细胞的密度为 5×10^7 个/mL、氯化钠的质量体积百分数为0.9%。

[0025] 根据本发明的细胞治疗组合物,其特征在于:

[0026] (1) 其中包含:胎盘间充质干细胞 4×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.2%、氯化钠0.9%、氯化镁0.08%、乙二胺四乙酸钙钠0.03%和注射用水;或者,

[0027] (2) 其中包含:胎盘间充质干细胞 2×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.3%、氯化钠0.8%、氯化镁0.1%、乙二胺四乙酸钙钠0.02%和注射用水;或者,

[0028] (3) 其中包含:胎盘间充质干细胞 5×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.1%、氯化钠1.0%、氯化镁0.05%、乙二胺四乙酸钙钠0.05%和注射用水;或者,

[0029] (4) 其中包含:胎盘间充质干细胞 3×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.2%、氯化钠0.9%、氯化镁0.08%、乙二胺四乙酸钙钠0.04%和注射用水;或者,

[0030] (5) 其中包含:脐带间充质干细胞 4×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.2%、氯化钠0.9%、氯化镁0.08%、乙二胺四乙酸钙钠0.03%和注射用水;或者,

[0031] (6) 其中包含:脐带间充质干细胞 2×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.3%、氯化钠0.8%、氯化镁0.1%、乙二胺四乙酸钙钠0.02%和注射用水;或者,

[0032] (7) 其中包含:脐带间充质干细胞 5×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.1%、氯化钠1.0%、氯化镁0.05%、乙二胺四乙酸钙钠0.05%和注射用水;或者,

[0033] (8) 其中包含:脐带间充质干细胞 3×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.2%、氯化钠0.9%、氯化镁0.08%、乙二胺四乙酸钙钠0.04%和注射用水。

[0034] 本发明的细胞治疗组合物中,干细胞密度过大则存活率会因营养不足而大幅降低,而干细胞密度过小也不利于存活率的保持,且过小的干细胞密度会导致用所需制剂量的增大。本发明通过实验证实,干细胞密度为 2×10^7 个/mL~ 5×10^7 个/mL时,干细胞存活率最高。

[0035] 本发明组合物为水混悬液,其中包含氯化钠,其浓度基本上与生理盐水相当。生理盐水是指生理学实验或临床上常用的渗透压与动物或人体血浆的渗透压相等的氯化钠溶液。因此,本发明细胞治疗组合物中的间充质干细胞基本上是分散于生理盐水即质量体积百分数为0.9%的氯化钠溶液中,其与人体组织的渗透压一致,以此生理盐水作为溶剂,不会对间充质干细胞产生损伤。

[0036] 磷脂酰丝氨酸是存在于细菌、酵母、植物、哺乳动物细胞中的一种重要的膜磷脂。磷脂酰丝氨酸又称复合神经酸。英文名Phosphatidylserine,简称PS,由天然大豆榨油剩余物提取。是细胞膜的活性物质,尤其存在于大脑细胞中。其功能主要是改善神经细胞功能,调节神经脉冲的传导,增进大脑记忆功能,由于其具有很强的亲脂性,吸收后能够迅速通过血脑屏障进入大脑,起到舒缓血管平滑肌细胞,增加脑部供血的作用。磷脂酰丝氨酸又称丝氨酸磷脂,二酰甘油酰磷酸丝氨酸,是一类普遍存在的磷脂,通常位于细胞膜的内层,磷酯

化合物中的磷酸甘油酯类,是细胞膜组分之一,与一系列的膜功能有关。尤其在人体的神经系统,是大脑的细胞膜的重要组成成分之一,同时对大脑的各种功能(尤其是对大脑的记忆力和情绪的稳定)起到重要的调节作用,如它能影响着细胞膜的流动性、通透性,并且能激活多种酶类的代谢和合成。如人红细胞膜上就有磷脂酰胆碱(占19%)、鞘磷脂(占8%)、磷脂酰乙醇胺(占16%)和磷脂酰丝氨酸(占10%)。并且只有后者在细胞膜上具有净负电荷,有助于膜的不对称性。还能活化已损伤表面凝血酶原。并与磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺在体内可互相转化。由于R1和R2的各不相同而使磷脂酰丝氨酸实际成了一类化合物的总称。1942年由Jordi Folch首次提取并定性。PS由三部分组成:亲水性的甘油骨架为头部,两个较长烃链的亲油基团为尾部。头部由三个基团组成:丝氨酸残基与磷酸残基结合后与C-3位甘油的羟基连接;甘油的另外两个羟基分别与脂肪酸成酯后组成尾部。甘油C-2位的脂肪酸与C-1位的脂肪酸相比,碳链一般更长,而且不饱和键更多。磷脂酰丝氨酸(PS)指的是一组化合物,而并非单一成分,这是由于不同来源的原料提取的产品脂乙酰残基变化非常大。PS具有双亲性,即它有亲水性的同时又具有亲油性。其结构决定了它的独特性质,带有负电荷的头部为亲水性(或水溶性),由脂肪酸组成的尾部为亲脂性(或脂溶性)。磷脂酰丝氨酸(PS)可由人体利用丝氨酸合成产生,它可影响脑内化学讯息的传递,并帮助脑细胞储存和读取资料,是维持大脑正常记忆力、反应和健康情绪的重要营养元素。磷脂酰丝氨酸被誉为是继胆碱和“脑黄金”DHA之后的一大新兴的“智能营养素”。专家认为,这种天然物质能够帮助细胞壁保持柔韧性,并且能够增强传送大脑信号的神经递质的效率,帮助大脑高效运转,激发大脑的活化状态。具体来说,磷脂酰丝氨酸有以下功能。(1) 提高大脑机能,集中注意力,改善记忆力。欧美涌现出大量对磷脂酰丝氨酸的荟萃分析(荟萃分析指对某个问题所做的多个独立研究结果进行系统的定量或定性的综合),其主要目的是将以往的研究结果更为客观地综合反映出来。有人分析了9个双盲、安慰剂对照、共1224例患者参与的临床试验,结果显示,补充磷脂酰丝氨酸后,关于认知和记忆的参数得到显著改善。毫无疑问,补充磷脂酰丝氨酸可以提高长期记忆、长期认知以及自由谈吐和逻辑性发言能力。随着年龄的增长,磷脂酰丝氨酸和其他重要的脑内化学物质会逐渐减少,从而导致记忆力、认知力减弱。补充磷脂酰丝氨酸能增加脑突刺数目、脑细胞膜的流动性及促进脑细胞中葡萄糖代谢,从而使脑细胞更活跃,促进注意力集中,提高警觉性和记忆力。意大利、斯堪的纳维亚半岛和欧洲其他国家都广泛应用磷脂酰丝氨酸补充剂来治疗衰老引发的认知障碍症及老年记忆损失。(2) 提高学习能力。曾有人专门测试了磷脂酰丝氨酸缓解精神压力的效果,试验采用了双盲、安慰剂对照,连续30天,每天给予健康大学生300毫克磷脂酰丝氨酸。大学生必须在给定时间内完成具有一定难度的数学测试,并记录他们面对压力的反应。结果发现,使用磷脂酰丝氨酸的学生在反应力、自信和表现方面均好于对照组,他们在考试中的成绩也更好。一项研究针对高三年级学生的研究还发现,服用强化磷脂酰丝氨酸的学生,经过40天后,其语言和非语言的记忆力都有显著提高。(3) 缓解压力,促进用脑疲劳的恢复、平衡情绪。多项研究表明,磷脂酰丝氨酸能显著降低工作紧张者体内过多的应激激素的水平,减轻压力,缓解脑部疲劳;磷脂酰丝氨酸还可作用于大脑内影响心情的神经递质水平,可以促进注意力集中、提高警觉性和记忆力,帮助缓解不良情绪(如抑郁、沮丧等)。(4) 帮助修复大脑损伤。磷脂酰丝氨酸是脑部神经的主要成分之一,可营养和活化脑中各种酶的活性,能延缓神经递质的减少进程,有助于修复、更新大脑受损细胞和清除有害物质。它可以使老年人的记忆

力恢复到14年前的水平,研究显示,食用磷脂酰丝氨酸12周后,66岁的人拥有了52岁人的记忆力。除此之外,磷脂酰丝氨酸和DHA可以相互促进吸收,对神经2A细胞起到保护作用。丰富的磷脂酰丝氨酸可以增加细胞膜的流动性,促进智力的发育。磷脂酰丝氨酸和DHA一起可以保护中枢神经系统,促进胎儿智力发育。研究表明,磷脂酰丝氨酸之所以能够增强人的智力,主要原因在于它能够迅速穿过血脑屏障,进入大脑。在脑部起到舒缓大脑毛细血管平滑肌细胞,增加脑部供血的作用。所以近几年有很多针对脑卒中方面的产品都以PS作为原料。

[0037] 本发明使用的乙二胺四乙酸钙钠,其分子式为 $C_{10}H_{12}N_2O_8CaNa_2 \cdot 2H_2O$,是一种白色结晶颗粒或白色至灰白色粉末,其1%水溶液的pH值=6.0-7.0。乙二胺四乙酸钙钠无臭,微带咸味,稍吸湿,空气中稳定,易溶于水,几乎不溶于乙醇,乙二胺四乙酸钙钠通常作为螯合剂、防腐剂、抗氧化剂,具有对游离金属结合而使产品质量稳定的作用,通常用于消除因痕量重金属引起的对酶催化反应的抑制。

[0038] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述间充质干细胞为原代~第十代的间充质干细胞。

[0039] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述的间充质干细胞可以来自已知的各种途径,例如其可以是来自于骨髓、脐带或胎盘。

[0040] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述的间充质干细胞的获取方法是众所周知的,例如CN102586184A(2012100446386)中所记载的方法从胎盘中获取间充质干细胞的方法。

[0041] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述的间充质干细胞的获取方法是众所周知的,例如CN102660497A(2012101599162)中所记载的方法从脐带中获取间充质干细胞的方法。

[0042] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述的间充质干细胞的获取方法包括如下步骤(胎盘来源):

[0043] (a) 用PBS缓冲液充分冲洗胎盘小叶,以去除胎盘中残留的血液;

[0044] (b) 将胎盘小叶剪成块状,加入含有组织消化酶的PBS缓冲液,再在37℃孵育消化;

[0045] (c) 将组织块用铜网过滤,必要时研磨以促使过滤;

[0046] (d) 将收集的过滤液离心,分离单个核细胞,再用MSC培养基悬浮所获得的细胞,然后在37℃、5%的CO₂培养箱中培养;

[0047] (e) 待散在细胞形成克隆后,挑取各克隆细胞,用MSC培养基分别培养,待细胞融合后,用胰酶消化传代,即得胎盘间充质干细胞。必要时进行传代和/或在液氮中冻存以备用。

[0048] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述的间充质干细胞的获取方法包括如下步骤(脐带来源):

[0049] (1) 脐带组织贴壁处理:取细胞培养平皿,将组织块平铺于平皿中,每个平皿中的组织块数量维持在5-20块,使组织块风干2-50分钟直至组织贴在平皿上;

[0050] (2) 脐带组织培养:沿平皿边缘慢慢加入间充质干细胞培养基至组织淹没即可;将平皿放进CO₂浓度为5%的37℃培养箱进行培养,培养至第3-7天时将平皿从培养箱取出,补加适量间充质干细胞培养基;在第9-11天时将平皿中的培养基移出,加入适量新鲜的间充质干细胞培养基,继续培养;在第11-13天时清除所有脐带组织块并继续培养;此后每1-3天进行一次全换液;

[0051] (3) 细胞传代:当平皿内的贴壁细胞融合率达到50-70%时,使用消化酶TrypLE Express使贴壁细胞脱离平皿底部;离心,去除上清液,加入间充质干细胞培养基重新悬浮细胞,再接种于T25细胞培养瓶进行传代并进行扩增培养;此后每1-3天换液一次,直至融合率达到70-90%后,即得脐带间充质干细胞。必要时进行传代和/或在液氮中冻存以备。必要时对所得间充质干细胞的以下项目中的一项或多项进行检测:细胞活性、细胞污染、遗传病、HLA-ABC/DR配型。

[0052] 根据本发明的细胞治疗组合物,其是按照包括如下步骤的方法制备得到的:

[0053] 将磷脂酰丝氨酸和氯化钠(以及任选的氯化镁和/或任选的乙二胺四乙酸钙钠)加入水中溶解,任选地对该溶液进行除菌,获得制剂的基质:[需要说明的是,本发明所用磷脂酰丝氨酸浓度下所得该基质为澄清溶液,即磷脂酰丝氨酸达到溶解的程度]

[0054] 将预先制得的间充质干细胞混悬于该基质中,分装,即得。

[0055] 根据本发明的细胞治疗组合物,其制备过程中,所述制剂的基质是通过选自下列的方式除菌的:过滤除菌、热压灭菌。在本发明的具体实例中,如未特别说明,所述除菌是热压灭菌。

[0056] 根据本发明的细胞治疗组合物,其制备过程是在无菌条件下进行的。

[0057] 根据本发明的细胞治疗组合物,其制备过程中,在与间充质干细胞混和前所述基质的温度低于25℃。

[0058] 根据本发明的细胞治疗组合物,其制备过程中,在温度低于25℃条件下将所述基质与间充质干细胞混和。

[0059] 本发明提供的间充质干细胞的细胞治疗组合物的制备方法简单温和,不会损伤干细胞的活性,从而提高间充质干细胞制剂中干细胞的存活率。

[0060] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述分装是将配制得到的细胞治疗组合物分装到预充注射器中,尤其是分装到一次性使用的预充注射器中。

[0061] 根据本发明的细胞治疗组合物,其中所述预充式注射器的针筒材质为高分子聚合物(例如聚丙烯)、活塞材质为橡胶,本发明具体实例中如未特别说明,所用预充式注射器的针筒材质为高分子聚合物(例如聚丙烯)、活塞材质为橡胶。

[0062] 预充式注射器首次出现于第二次世界大战期间,目的是为了满足不同战地医院对现场无菌医疗的需要。预充式注射器再度被强力推向市场是在上世纪50年代初,当时Becton Dickinson公司为Jonas Salks博士的脊髓灰质炎疫苗项目提供玻璃预充式注射器。此后,预充式注射器继续得到应用,大多是在胰岛素和人生长素给药领域。不过,预充式注射器真正盛行起来是在过去5年中,它几乎成为注射剂供应商必需提供的一种产品。而多数创新性的液体药品,如果适合的话,将装在预充式注射器中上市。预充式注射器之所以走俏主要由于产品本身具有的优势,尤其是使用简便。医药市场正在发生变化,生物技术疗法以及仅能通过注射途径给药的候选药物数量增多,它们涉及的治疗领域非常广泛,如多发性硬化、不孕、骨质疏松、肝炎、类风湿性关节炎、癌症、贫血及血友病等。一些生物技术药物需要患者本人频繁注射给药,他们从预充式注射器的便利中受益最深,因为预充式注射器省却了一些操作步骤,让使用更快捷、更简便。患者的需要是推动预充式注射器发展的真正动力。从小瓶中量出药品装入注射器中是一件费时的工作,缺乏充分训练的人很容易出错。此外,一些疾病如类风湿性关节炎患者常常难以,甚至不能拿稳小瓶并量出准确剂量。制药厂家已

经将一些药品由冻干剂型改为液体剂型,以便于装入预充式注射器中,例如Berlex的治疗多发性硬化药物Betaseron、诺和诺德的人生长素Norditropin以及基因泰克的人生长素Nutropin都已由冻干剂型改为液体剂型,装在预充式注射器中出售。注射器元件生产商加快步伐以满足对即用性元件不断增长的需求。法国Stelmi公司的即用型柱塞以及Becton Dickinson公司的Hypak SCF预充式注射器使得灌装现场无需进行清洗、除热原以及消毒操作。即用性元件经过清洗、环氧乙烷或 γ 射线消毒、验证后可以直接使用。预充式注射器的另一优势是可以显著减少产品过度充填量。使用预充式注射器,可以节省10%、15%,有时甚至是20%的原料药。有些将小瓶改为预充式注射器的厂家还降低了原料药产量,因为新剂型不再需要那么多原料药。Becton Dickinson公司的一项研究显示,与小瓶相比,预充式注射器中的剂量可以高出23%,因为在从小瓶向注射器转移过程中药品损失更少。

[0063] 在本发明的第二方面,提供了一种制备细胞治疗组合物的方法,该细胞治疗组合物可用于治疗下肢缺血性疾病,该组合物中包括:间充质干细胞(其来源例如可以是脐带或胎盘)、磷脂酰丝氨酸、氯化钠、和水。

[0064] 根据本发明的方法,其中所述细胞治疗组合物中还包含氯化镁和/或乙二胺四乙酸钙钠。

[0065] 根据本发明的方法,其包括以下步骤:

[0066] 将磷脂酰丝氨酸和氯化钠(以及任选的氯化镁和/或任选的乙二胺四乙酸钙钠)加入水中溶解,任选地对该溶液进行除菌,获得制剂的基质;

[0067] 将预先制得的间充质干细胞混悬于该基质中,分装,即得。

[0068] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合物中,所述磷脂酰丝氨酸的质量体积百分数为0.1%~0.3%。

[0069] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合物中,所述磷脂酰丝氨酸的质量体积百分数为0.15%~0.25%。

[0070] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合物中,所述磷脂酰丝氨酸的质量体积百分数为0.2%。

[0071] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合物中,所述间充质干细胞的密度为 2×10^7 个/mL~ 5×10^7 个/mL。

[0072] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合物中,所述间充质干细胞的密度为 3×10^7 个/mL。

[0073] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合物中,所述氯化钠的质量体积百分数为0.8%~1.0%。

[0074] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合物中,所述氯化钠的质量体积百分数为0.9%。

[0075] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合物中,还包含氯化镁。

[0076] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合物中,所述氯化镁的质量体积百分数为0.05%~0.1%。

[0077] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合物中,所述氯化镁的质量体积百分数为0.08%。

[0078] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合物中,还包含乙二胺四乙酸钙钠。

[0079] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合中,所述乙二胺四乙酸钙钠的质量体积百分数为0.02%~0.05%。

[0080] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合中,所述乙二胺四乙酸钙钠的质量体积百分数为0.03%。

[0081] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合中,磷脂酰丝氨酸的质量体积百分数为0.1%、间充质干细胞的密度为 3×10^7 个/mL、氯化钠的质量体积百分数为0.9%。

[0082] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合中,磷脂酰丝氨酸的质量体积百分数为0.2%、间充质干细胞的密度为 5×10^7 个/mL、氯化钠的质量体积百分数为0.9%。

[0083] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合中,磷脂酰丝氨酸的质量体积百分数为0.3%、间充质干细胞的密度为 5×10^7 个/mL、氯化钠的质量体积百分数为0.9%。

[0084] 根据本发明的方法,其特征在于,其所制得的细胞治疗组合中,

[0085] (1) 其中包含:胎盘间充质干细胞 4×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.2%、氯化钠0.9%、氯化镁0.08%、乙二胺四乙酸钙钠0.03%和注射用水;或者,

[0086] (2) 其中包含:胎盘间充质干细胞 2×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.3%、氯化钠0.8%、氯化镁0.1%、乙二胺四乙酸钙钠0.02%和注射用水;或者,

[0087] (3) 其中包含:胎盘间充质干细胞 5×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.1%、氯化钠1.0%、氯化镁0.05%、乙二胺四乙酸钙钠0.05%和注射用水;或者,

[0088] (4) 其中包含:胎盘间充质干细胞 3×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.2%、氯化钠0.9%、氯化镁0.08%、乙二胺四乙酸钙钠0.04%和注射用水;或者,

[0089] (5) 其中包含:脐带间充质干细胞 4×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.2%、氯化钠0.9%、氯化镁0.08%、乙二胺四乙酸钙钠0.03%和注射用水;或者,

[0090] (6) 其中包含:脐带间充质干细胞 2×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.3%、氯化钠0.8%、氯化镁0.1%、乙二胺四乙酸钙钠0.02%和注射用水;或者,

[0091] (7) 其中包含:脐带间充质干细胞 5×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.1%、氯化钠1.0%、氯化镁0.05%、乙二胺四乙酸钙钠0.05%和注射用水;或者,

[0092] (8) 其中包含:脐带间充质干细胞 3×10^7 个/mL、磷脂酰丝氨酸0.2%、氯化钠0.9%、氯化镁0.08%、乙二胺四乙酸钙钠0.04%和注射用水。

[0093] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合中,所述间充质干细胞为原代~第十代的间充质干细胞。

[0094] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合中,所述的间充质干细胞可以来自自己知的各种途径,例如其可以是来自于骨髓、脐带或胎盘。

[0095] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合中,所述的间充质干细胞的获取方法是众所周知的,例如CN102586184A(2012100446386)中所记载的方法从胎盘中获取间充质干细胞的方法。

[0096] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合中,所述的间充质干细胞的获取方法是众所周知的,例如CN102660497A(2012101599162)中所记载的方法从脐带中获取间充质干细胞的方法。

[0097] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合中,所述的间充质干细胞的获取方法包括如下步骤(胎盘来源):

- [0098] (a) 用PBS缓冲液充分冲洗胎盘小叶,以去除胎盘中残留的血液;
- [0099] (b) 将胎盘小叶剪成块状,加入含有组织消化酶的PBS缓冲液,再在37℃孵育消化;
- [0100] (c) 将组织块用铜网过滤,必要时研磨以促使过滤;
- [0101] (d) 将收集的过滤液离心,分离单个核细胞,再用MSC培养基悬浮所获得的细胞,然后在37℃、5%的CO₂培养箱中培养;
- [0102] (e) 待散在细胞形成克隆后,挑取各克隆细胞,用MSC培养基分别培养,待细胞融合后,用胰酶消化传代,即得胎盘间充质干细胞。必要时进行传代和/或在液氮中冻存以备用。
- [0103] 根据本发明的方法,所述细胞治疗组合物中,所述的间充质干细胞的获取方法包括如下步骤(脐带来源):
- [0104] (1) 脐带组织贴壁处理:取细胞培养皿,将组织块平铺于平皿中,每个平皿中的组织块数量维持在5-20块,使组织块风干2-50分钟直至组织贴在平皿上;
- [0105] (2) 脐带组织培养:沿平皿边缘慢慢加入间充质干细胞培养基至组织淹没即可;将平皿放进CO₂浓度为5%的37℃培养箱进行培养,培养至第3-7天时将平皿从培养箱取出,补加适量间充质干细胞培养基;在第9-11天时将平皿中的培养基移出,加入适量新鲜的间充质干细胞培养基,继续培养;在第11-13天时清除所有脐带组织块并继续培养;此后每1-3天进行一次全换液;
- [0106] (3) 细胞传代:当平皿内的贴壁细胞融合率达到50-70%时,使用消化酶TrypLE Express使贴壁细胞脱离平皿底部;离心,去除上清液,加入间充质干细胞培养基重新悬浮细胞,再接种于T25细胞培养瓶进行传代并进行扩增培养;此后每1-3天换液一次,直至融合率达到70-90%后,即得脐带间充质干细胞。必要时进行传代和/或在液氮中冻存以备用。
- [0107] 必要时对所得间充质干细胞的以下项目中的一项或多项进行检测:细胞活性、细胞污染、遗传病、HLA-ABC/DR配型。
- [0108] 根据本发明的方法,其制备过程是在无菌条件下进行的。
- [0109] 根据本发明的方法,其制备过程中,在与间充质干细胞混和前所述基质的温度低于25℃。
- [0110] 根据本发明的方法,其制备过程中,在温度低于25℃条件下将所述基质与间充质干细胞混和。
- [0111] 本发明提供的间充质干细胞的细胞治疗组合物的制备方法简单温和,不会损伤干细胞的活性,从而提高间充质干细胞制剂中干细胞的存活率。
- [0112] 根据本发明的任一方面,其中所述细胞治疗组合物中,包含规定量的氯化镁和/或任选的乙二胺四乙酸钙钠,已经出人意料地发现,组合添加氯化镁和/或乙二胺四乙酸钙钠所得组合物在细胞冻存后复苏时呈现优良的细胞复苏性能,细胞经历冻存复苏过程的活力以及复苏后细胞的存活稳定性方面,显著高于其它未添加氯化镁和乙二胺四乙酸钙钠技术方案。此外,本发明人还出人意料地发现,在本发明细胞治疗组合物中添加规定量的磷脂酰丝氨酸,可以显著地提高使用细胞治疗剂后的毛细血管密度。
- [0113] 本发明提供的间充质干细胞的细胞治疗组合物优选的是可注射用的组合物,其在常温下呈注射液状态,所述注射溶液适于经肌肉施用(肌肉注射)给哺乳动物对象(优选人类患者)。例如,本发明提供的间充质干细胞的细胞治疗组合物也适于局部施用,例如肌肉注射至哺乳动物对象、优选人类患者的下肢缺血性疾病区别或其附近。本发明提供的间充

质干细胞的细胞治疗组合物,对哺乳动物对象(特别是人类患者)施用所述药物组合物能够增加下肢毛细血管密度、治疗或预防下肢缺血性疾病及其相关的症状。

[0114] 本发明还涉及用于治疗 and/or 预防选自上述疾病或症状之病症特别是下肢缺血性疾病的方法,该方法包括以下步骤:向哺乳动物对象(优选人类患者)施用足够量的本发明的间充质干细胞的细胞治疗组合物,例如其通过肌肉内施用(特别是在哺乳动物对象(优选人类患者)的下肢肌肉中)来实现。

[0115] 在本发明上述制备方法的步骤中,虽然其描述的具体步骤在某些细节上或者语言描述上与下文具体实施方式部分的制备例中所描述的步骤有所区别,然而,本领域技术人员根据本发明全文的详细公开完全可以概括出以上所述方法步骤。

[0116] 本发明的任一方面的任一实施方案,可以与其它实施方案进行组合,只要它们不会出现矛盾。此外,在本发明任一方面的任一实施方案中,任一技术特征可以适用于其它实施方案中的该技术特征,只要它们不会出现矛盾。下面对本发明作进一步的描述。

[0117] 本发明所引述的所有文献,它们的全部内容通过引用并入本文,并且如果这些文献所表达的含义与本发明不一致时,以本发明的表述为准。此外,本发明使用的各种术语和短语具有本领域技术人员公知的一般含义,即便如此,本发明仍然希望在此对这些术语和短语作更详尽的说明和解释,提及的术语和短语如有与公知含义不一致的,以本发明所表述的含义为准。

[0118] 有文献(陈跃鑫,等,下肢缺血性疾病规范化治疗争议与共识,中国实用外科杂志2017,37(12):1349-1354)概述了下肢缺血性疾病的现有治疗方法主要分为5大类,包括危险因素的控制、药物治疗、一般治疗、腔内治疗和手术治疗,具体如下。

[0119] 1、危险因素的控制。高血压、糖尿病、吸烟、高脂血症、高同型半胱氨酸血症、肥胖、慢性肾功能不全等是LEAO的主要危险因素。合理控制危险因素有助于减缓LEAO的进展,预防心脑血管事件的发生。主要危险因素控制措施和目标包括:(1)戒烟,包括自主戒烟或通过尼古丁替代疗法等达到戒烟的目的。(2)控制体重,使体重指数(BMI)控制在20~25的范围。(3)降低低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)的水平。对于心血管风险极高危的病人,LDL-C须 $<1.8\text{mmol/L}$ (70mg/dL);心血管风险高危的病人,LDL-C须 $<2.6\text{mmol/L}$ (100mg/dL);其余病人LDL-C控制在 3.4mmol/L (130mg/dL)以下。心血管风险程度评分参照SCORE评分系统(Systematic Coronary Risk Estimation)。实际上,根据评分系统,需要再血管化或已经再血管化的LEAO病人都属于心血管风险极高危的病人,对此类病人尤其应注意将LDL-C控制在 1.8mmol/L 以下。对于LDL-C水平较高难以达标的病人,可将LDL-C降低50%作为替代目标。(4)将血压控制在 $140/90\text{mmHg}$ ($1\text{mmHg}=0.133\text{kPa}$)以下,并且注意收缩压不要低于 $110\sim 120\text{mmHg}$ 。降压药物优选血管紧张素转换酶抑制剂(ACEIs)和血管紧张素受体阻滞剂(ARBs)类药物,但其他类型降压药物,包括 β 受体阻滞剂也可应用。

[0120] 2、抗栓治疗。抗栓治疗是下肢缺血性疾病的重要治疗措施。抗栓药物主要包括两类,一是抗血小板药物,包括血栓素A₂抑制剂(阿司匹林)、P₂Y₁₂受体拮抗剂(氯吡格雷、替格瑞洛等)和糖蛋白IIb/IIIa受体抑制剂(替罗非班等);另一类是抗凝药物,包括肝素、低分子肝素、华法林、新型口服抗凝药物等。对于症状性LEAO,抗血小板药物的合理应用有助于减少下肢动脉缺血性事件以及相关的心血管事件的发生率,同时有助于提高下肢动脉重建

术后通畅率。但是,抗血小板药物带来的出血风险也是影响病人预后的重要因素,临床必须充分考虑和权衡。目前,对于LEAO的抗栓治疗仍存在较多争议,主要包括以下几点。(1) 无症状性LEAO,是否需要启动抗血小板药物治疗。根据2009年抗栓试验协作组的Meta分析,ACCP建议对于无症状型LEAO病人可予口服阿司匹林75~100mg/d以预防相关心血管事件发生。但是,两项大型RCT研究认为,仅有踝肱指数(ABI)降低(<0.9 或 1.0)而无下肢缺血症状,且无心脑血管症状的病人,应用阿司匹林抗血小板治疗并不能降低下肢血管事件或心血管事件的发生率。因此,欧洲心脏病学会(ESC)2017指南推荐无症状性LEAO无须应用抗血小板药物。(2) 抗血小板药物的选择,何者最优。或者各种不同抗血小板方案各自适合哪些类型的病人——是选择单一抗血小板治疗(single antiplatelet therapy, SAPT),还是双联抗血小板治疗(dual antiplatelet therapy, DAPT),甚至三联抗血小板治疗(triple antiplatelet therapy, TAPT)。目前可以达成共识的是,症状性LEAO,至少需要长期SAPT, DAPT与SAPT相比,虽然可以降低症状性LEAO病人心血管事件的发生率,但却增加了病人发生严重或致命性大出血的风险,因而病人的临床获益并不明确。但是LEAO病人腔内血管重建后如何进行抗血小板治疗,目前证据有限。MIRROR研究认为DAPT相比SAPT有助于改善腔内治疗后的通畅率,但其研究样本仅为80例。尽管相应的循证医学证据不多,但大部分临床医生会选择腔内血管重建术后至少应用DAPT 1个月,而且病变部位越靠近末梢,DAPT时间越长。而如果腔内治疗应用了药物涂层球囊或药物支架,则DAPT需要更长时间:Zilver PTX研究中采用的方案是强制DAPT 2个月,而IN.PACT SFA研究则采用了更长时间的DAPT。总之,对于LEAO血管重建后的抗血小板用药策略,异质性较强,存在较多争论和临床不一致性,需要有强有力的循证医学证据予以支持。(3) SAPT时是选择阿司匹林还是氯吡格雷?CAPRIE研究的LEAO亚组分析提示,氯吡格雷优于阿司匹林,美国心脏病学会/美国心脏协会(ACC/AHA)2016年指南和ESC2017年指南均指出SAPT时氯吡格雷优于阿司匹林。然而,不容忽视的是,实际应用中,氯吡格雷抵抗在LEAO的病人中并不少见,尤其是病人合并糖尿病、肾功能不全时,氯吡格雷抵抗将直接影响LEAO病人的结局。替格瑞洛虽然能提高氯吡格雷抵抗病人的血小板抑制率,但在EUCLID研究中,替格瑞洛与氯吡格雷相比,并未在外周动脉疾病的病人中体现出疗效和安全性的优势,因此,目前仍不推荐将替格瑞洛作为SAPT的一线用药。(4) 抗凝治疗,包括现有的华法林、新型口服抗凝药如利伐沙班等,对于慢性LEAO的长期治疗究竟地位如何,长期以来一直存在较大的争议。既往研究认为,之所以不支持LEAO病人应用抗凝治疗主要基于两大理由:一是抗凝治疗不能减低LEAO病人心脑血管事件发生率,反而增加出血并发症发生率;二是抗凝治疗不能改善LEAO病人的跛行距离。事实上,抗凝治疗在动脉硬化疾病的长期治疗中有着积极的临床意义。从机制上来看,动脉内皮损伤、血小板聚集、血管收缩均可以导致凝血系统激活,从而加剧动脉狭窄和闭塞,而抗凝治疗可以较好地阻断凝血系统的激活。如果合理控制出血风险,联用抗血小板药物和抗凝药物有助于改善PTA术后再狭窄率,改善旁路术后移植通畅率。因此,抗凝药物在LEAO的治疗中仍应占有一席之地,主要体现在:①慢性LEAO病人短期内缺血加重。②急性下肢缺血病人(症状14d以内)。③LEAO病人合并房颤或机械瓣置换后,须长期抗凝。④LEAO病人合并高凝倾向。⑤LEAO病人PTA术后的特殊情况下,如流出道条件差、血栓负荷重等。⑥LEAO病人旁路术后的特殊情况下,如远端流出道不佳、桥血管口径较小($\leq 6\text{mm}$)、膝下旁路术、桥血管路径较长、复合旁路术等。对于合并房颤、机械瓣置换或明确高凝倾向等需要长期抗凝的LEAO病

人,如未重建血运或者是采取旁路手术重建血运,则可单纯应用抗凝药物;在采用PTA等腔内治疗后,如果病人出血风险不高,则抗血小板联合抗凝的用药方案至少持续至术后1个月,之后可行联合或单纯抗凝;如果病人出血风险高,则考虑单纯抗凝治疗。新型口服抗凝药物作为抗凝药物中的后起之秀,已在静脉血栓栓塞症(VTE)的防治中占据重要地位,在动脉疾病的治疗中,也逐渐获得重视。近期的急性冠脉综合征二级预防的ATLAS TIMI 51研究认为利伐沙班联合双联抗血小板治疗,可显著降低血栓事件,但增加出血风险,却不增加颅内出血或致死性出血风险。而在PIONEER AF-PCI研究中,与VKA+DAPT相比,利伐沙班15mg口服+SAPT,和利伐沙班2.5mg,每日2次+DAPT可显著改善安全性,且疗效与VKA+DAPT相当。利伐沙班在冠状动脉疾病和外周动脉疾病的二级预防的COMPASS研究,利伐沙班2.5mg每日2次联合阿司匹林,较单用阿司匹林效果更为显著。

[0121] 3、下肢缺血性疾病病人的运动锻炼治疗和组织缺损最小化管理。运动锻炼是LEAO病人治疗的重要组成部分。规律的运动锻炼可减轻下肢缺血症状、改善无痛步行距离和最大步行距离,提高生活质量和生活能力。推荐的行走锻炼方法为每次步行30~45min,每周至少3次,至少持续12周。除此以外,应指导LEAO病人,尤其是合并糖尿病的LEAO病人,进行足部自我检查和健康的足部运动,避免外伤和烫伤,有助于降低糖尿病足、下肢溃疡和截肢的发生率。一旦发现足部溃疡坏疽,应高度重视、及时就医。

[0122] 4、IC病人的血管重建。IC的LEAO病人是否需要血管重建,采用何种方式进行血管重建,须结合病人的缺血症状、症状对生活质量和机体功能状态的影响程度、病人合并的危险因素、血管重建术给病人带来的风险收益比、病人的主观愿望以及病人对生活质量的的要求来综合决定。对于IC病人,与治疗重症下肢缺血(critical limb ischemia, CLI)不同,血管重建的目标是缓解症状、同时要尽可能提高血管重建后的远期通畅率。目前对于IC病人的治疗存在某些不规范的做法:(1)只重视血管重建治疗,忽略生活指导、运动锻炼和基础药物治疗。(2)一味根据病变治疗,不考虑病人的症状和对生活质量的要求。(3)只考虑开通率,而忽视血管重建后的远期通畅率。常可见到双侧SFA相同病变的病人,一侧在血管重建后发生再闭塞,结果症状甚至比未干预侧更严重。IC病人的规范化处理流程可参照2017年ESC指南,需要强调的是:(1)单纯IC的病人,应该给予运动锻炼治疗(最好是监督下的运动锻炼治疗)和药物治疗,疗程3个月,再根据治疗效果决定是否需要血管重建。处理的时机和指征上,不同部位和程度的病变可能略有争议:单纯的髂动脉TASC A/B疾病,由于病变腔内治疗后通畅率较高,是否可以放宽处理指征以更积极进行干预;单纯SFA病变的IC病人,尤其是长段病变,考虑到重建后的通畅率,可适当收紧血管重建指征。(2)孤立性膝下动脉病变的IC病人,尽量选择运动治疗和药物治疗。(3)主髂动脉病变的IC病人,尽管在目前的技术条件下,腔内治疗即使在TASC D级病变也能有很好的开通率,但如果病人比较年轻,一般情况好,考虑到血管远期通畅率,血管重建方式仍建议首选开放手术。另外,平肾主髂动脉闭塞和累及到肾动脉的主髂动脉闭塞,在病人可耐受的情况下,应尽量考虑开放手术重建。(4)所有累及股总动脉的病变应尽量考虑杂交手术或开放手术。(5)单纯SFA病变的IC病人,更应充分重视运动和药物治疗的重要性。如需要血管重建,则应充分考虑重建后的通畅率:如病变过长(>25cm)或腔内治疗后再狭窄,如病人可耐受或自体静脉条件尚可,可考虑选择开放手术,而其他病人则采取腔内治疗。(6)IC病人,股腘动脉旁路手术首选自体静脉,在自体静脉条件不佳时,膝上股腘动脉旁路手术可考虑选择人工血管。股-膝下动脉旁路手术不

适合于单纯IC的病人。(7) 药物涂层球囊对于SFA短段病变(<25cm)和支架内再狭窄的IC病人有一定的优势。

[0123] 5、CLI病人的血管重建。CLI是LEAO最严重的表现形式,预后极差,具有较高的截肢率和病死率。因此,CLI病人在条件许可下应积极进行血管重建,目的是重建有效的下肢血运,以降低截肢平面,或减少静息痛、促使溃疡愈合,力求组织缺损最小化、尽可能保留下肢功能以及改善生活质量。重症下肢缺血的治疗流程可参照2017年ESC指南。下肢广泛弥漫性慢性病变更倾向于外科开放手术。肢体有未愈合溃疡或坏疽者,往往要求参照Angiosome的概念尽可能重建一条直达足部的血流。单纯静息痛的病人可以考虑采取分期干预的方式。如肢体已经坏疽伴严重感染(如气性坏疽或败血症),紧急截肢可能是必要选择。对于顽固的缺血性静息痛、预期生存时间较短的CLI病人,合理镇痛及其他支持性治疗或许是最好的治疗方式,必要时也可考虑截肢。

[0124] 6、LEAO病人各种血管重建方式。LEAO病人血管重建的方式主要包括腔内治疗、开放手术治疗和复合手术。尤其以腔内治疗目前可供选择的处理方式最多,包括普通球囊扩张、球囊扩张加支架、药物涂层球囊(drug coated balloon,DCB)、药物涂层球囊加补救性支架、药物支架、腔内减容(旋切、激光消融、抽吸)、腔内减容加药物涂层球囊和补救性支架、覆膜支架等。但是哪种方式最优,目前尚无定论,相应的临床研究的数据也较为有限。药物涂层球囊是目前较为广泛接受的腔内治疗器械,药物涂层球囊可以通过药物作用于血管内中膜,达到抑制血管内膜增生的目的。在药物涂层球囊时代,支架已经不再是必须,“leave nothing behind”的概念已深入人心。但须注意,药物涂层球囊也并非全能,对于严重钙化病变药物涂层球囊的应用存在一定的局限性。药物涂层球囊治疗后管腔的回缩和夹层,也仍然需要应用相应的补救性支架。另外,药物涂层球囊也非一劳永逸,它虽然可以改善腔内治疗术后的1、2年的通畅率,但是正如DEBATE-ISR研究指出,DCB的远期通畅率的改善并不明显。在膝下动脉病变的处理中,药物涂层球囊的应用更是存在争议:一部分研究认为药物涂层球囊能改善膝下动脉病变腔内处理后1年的再狭窄率和再干预率;然而另一些研究却认为,12个月的随访期,DCB降低再狭窄率和再干预率的优势并不明显,反而有可能会提高重大截肢率。有作者认为,这种差异化的结论,也可能与缺乏标准的伤口管理方案,DCB种类差异相关。另外,减容技术(包括定向腔内斑块旋切术、经皮机械血栓切除术、准分子激光血管成形术等)可以与药物涂层球囊联合应用,进一步提高血管重建术后通畅率,但目前还缺乏较大样本的临床研究数据。

[0125] 7、急性下肢缺血的血管重建。急性下肢缺血,一方面要积极查找诱发急性下肢缺血的原因,另一方面应在给予抗凝治疗的基础上,积极予以血管重建。重建方式包括导管溶栓、腔内血栓抽吸,切开取栓和搭桥手术等。导管溶栓和腔内血栓抽吸可以联合应用以减少溶栓药物的剂量,提高开通率。PTA+/-支架可用于辅助处理溶栓或取栓后的残余血管病变。但对于缺血严重,尤其是已经出现神经功能障碍的急性下肢缺血病人,应尽快开通血运,而单纯导管溶栓则不适用于这类病人。

[0126] 本发明提供的间充质干细胞的细胞治疗组合物具备优异的性质。

具体实施方式

[0127] 通过下面的实施例可以对本发明进行进一步的描述,然而,本发明的范围并不限

于下述实施例。本领域的专业人员能够理解,在不背离本发明的精神和范围的前提下,可以对本发明进行各种变化和修饰。本发明对试验中所使用到的材料以及试验方法进行一般性和/或具体的描述。虽然为实现本发明目的所使用的许多材料和操作方法是本领域公知的,但是本发明仍然在此作尽可能详细描述。以下实施例进一步说明本发明,而不是限制本发明。在下文中,如未特别说明,间充质干细胞为第五代的间充质干细胞。在本文中,如未另外说明,参照CN102586184A或CN102660497A获取的间充质干细胞悬液浓度大于 10^9 个/mL,以便能用于后续的组合物配制时的稀释过程。实施例1、胎盘MSC的组合物

[0128] 终产物的配料比例(浓度):间充质干细胞, 4×10^7 个/mL;磷脂酰丝氨酸,0.2%;氯化钠,0.9%;注射用水,余量。

[0129] 制法:参照CN102586184A(2012100446386)之实施例1~2所记载的方法从胎盘中获取间充质干细胞。称取磷脂酰丝氨酸和氯化钠,加适量注射用水溶解,121℃高压灭菌15分钟,冷却备用;使间充质干细胞悬液与磷脂酰丝氨酸和氯化钠的水溶液混合,补加水至全量,混合均匀后,分装到预充注射器中,即得。可以放到-80℃冰箱中冻存以备临床应用。

[0130] 实施例2、胎盘MSC的组合物

[0131] 终产物的配料比例(浓度):间充质干细胞, 2×10^7 个/mL;磷脂酰丝氨酸,0.3%;氯化钠,0.8%;注射用水,余量。

[0132] 制法:参照CN102586184A(2012100446386)之实施例1~2所记载的方法从胎盘中获取间充质干细胞。称取磷脂酰丝氨酸和氯化钠,加适量注射用水溶解,121℃高压灭菌15分钟,冷却备用;使间充质干细胞悬液与磷脂酰丝氨酸和氯化钠的水溶液混合,补加水至全量,混合均匀后,分装到预充注射器中,即得。可以放到-80℃冰箱中冻存以备临床应用。

[0133] 实施例3、胎盘MSC的组合物

[0134] 终产物的配料比例(浓度):间充质干细胞, 5×10^7 个/mL;磷脂酰丝氨酸,0.1%;氯化钠,1.0%;注射用水,余量。

[0135] 制法:参照CN102586184A(2012100446386)之实施例1~2所记载的方法从胎盘中获取间充质干细胞。称取磷脂酰丝氨酸和氯化钠,加适量注射用水溶解,121℃高压灭菌15分钟,冷却备用;使间充质干细胞悬液与磷脂酰丝氨酸和氯化钠的水溶液混合,补加水至全量,混合均匀后,分装到预充注射器中,即得。可以放到-80℃冰箱中冻存以备临床应用。

[0136] 实施例4、胎盘MSC的组合物

[0137] 终产物的配料比例(浓度):间充质干细胞(第三代), 3×10^7 个/mL;磷脂酰丝氨酸,0.2%;氯化钠,0.9%;注射用水,余量。

[0138] 制法:参照CN102586184A(2012100446386)之实施例1~2所记载的方法从胎盘中获取间充质干细胞。称取磷脂酰丝氨酸和氯化钠,加适量注射用水溶解,121℃高压灭菌15分钟,冷却备用;使间充质干细胞悬液与磷脂酰丝氨酸和氯化钠的水溶液混合,补加水至全量,混合均匀后,分装到预充注射器中,即得。可以放到-80℃冰箱中冻存以备临床应用。

[0139] 实施例5、脐带MSC的组合物

[0140] 终产物的配料比例(浓度):间充质干细胞(第七代), 4×10^7 个/mL;磷脂酰丝氨酸,0.2%;氯化钠,0.9%;注射用水,余量。

[0141] 制法:参照CN102660497A(2012101599162)之实施例1所记载的方法从脐带中获取间充质干细胞。称取磷脂酰丝氨酸和氯化钠,加适量注射用水溶解,121℃高压灭菌15分钟,

冷却备用;使间充质干细胞悬液与磷脂酰丝氨酸和氯化钠的水溶液混合,补加水至全量,混合均匀后,分装到预充注射器中,即得。可以放到-80℃冰箱中冻存以备临床应用。

[0142] 实施例6、脐带MSC的组合物

[0143] 终产物的配料比例(浓度):间充质干细胞(第十代), 2×10^7 个/mL;磷脂酰丝氨酸,0.3%;氯化钠,0.8%;注射用水,余量。

[0144] 制法:参照CN102660497A(2012101599162)之实施例1所记载的方法从脐带中获取间充质干细胞。称取磷脂酰丝氨酸和氯化钠,加适量注射用水溶解,121℃高压灭菌15分钟,冷却备用;使间充质干细胞悬液与磷脂酰丝氨酸和氯化钠的水溶液混合,补加水至全量,混合均匀后,分装到预充注射器中,即得。可以放到-80℃冰箱中冻存以备临床应用。

[0145] 实施例7、脐带MSC的组合物

[0146] 终产物的配料比例(浓度):间充质干细胞(原代), 5×10^7 个/mL;磷脂酰丝氨酸,0.1%;氯化钠,1.0%;注射用水,余量。

[0147] 制法:参照CN102660497A(2012101599162)之实施例1所记载的方法从脐带中获取间充质干细胞。称取磷脂酰丝氨酸和氯化钠,加适量注射用水溶解,121℃高压灭菌15分钟,冷却备用;使间充质干细胞悬液与磷脂酰丝氨酸和氯化钠的水溶液混合,补加水至全量,混合均匀后,分装到预充注射器中,即得。可以放到-80℃冰箱中冻存以备临床应用。

[0148] 实施例8、脐带MSC的组合物

[0149] 终产物的配料比例(浓度):间充质干细胞, 3×10^7 个/mL;磷脂酰丝氨酸,0.2%;氯化钠,0.9%;注射用水,余量。

[0150] 制法:参照CN102660497A(2012101599162)之实施例1所记载的方法从脐带中获取间充质干细胞。称取磷脂酰丝氨酸和氯化钠,加适量注射用水溶解,121℃高压灭菌15分钟,冷却备用;使间充质干细胞悬液与磷脂酰丝氨酸和氯化钠的水溶液混合,补加水至全量,混合均匀后,分装到预充注射器中,即得。可以放到-80℃冰箱中冻存以备临床应用。

[0151] 实施例11、胎盘MSC的组合物

[0152] 终产物的配料比例(浓度):间充质干细胞, 4×10^7 个/mL;磷脂酰丝氨酸,0.2%;氯化钠,0.9%;氯化镁,0.08%;乙二胺四乙酸钙钠,0.03%;注射用水,余量。

[0153] 制法:参照CN102586184A(2012100446386)中之实施例1~2所记载的方法从胎盘中获取间充质干细胞。称取磷脂酰丝氨酸和氯化钠、氯化镁、乙二胺四乙酸钙钠,加适量注射用水溶解,121℃高压灭菌15分钟,冷却备用;使间充质干细胞悬液与磷脂酰丝氨酸和氯化钠、氯化镁、乙二胺四乙酸钙钠的水溶液混合,补加水至全量,混合均匀后,分装到预充注射器中,即得。可以放到-80℃冰箱中冻存以备临床应用。

[0154] 实施例12、胎盘MSC的组合物

[0155] 终产物的配料比例(浓度):间充质干细胞, 2×10^7 个/mL;磷脂酰丝氨酸,0.3%;氯化钠,0.8%;氯化镁,0.1%;乙二胺四乙酸钙钠,0.02%;注射用水,余量。

[0156] 制法:参照CN102586184A(2012100446386)中之实施例1~2所记载的方法从胎盘中获取间充质干细胞。称取磷脂酰丝氨酸和氯化钠、氯化镁、乙二胺四乙酸钙钠,加适量注射用水溶解,121℃高压灭菌15分钟,冷却备用;使间充质干细胞悬液与磷脂酰丝氨酸和氯化钠、氯化镁、乙二胺四乙酸钙钠的水溶液混合,补加水至全量,混合均匀后,分装到预充注射器中,即得。可以放到-80℃冰箱中冻存以备临床应用。

[0157] 实施例13、胎盘MSC的组合物

[0158] 终产物的配料比例(浓度):间充质干细胞, 5×10^7 个/mL; 磷脂酰丝氨酸, 0.1%; 氯化钠, 1.0%; 氯化镁, 0.05%; 乙二胺四乙酸钙钠, 0.05%; 注射用水, 余量。

[0159] 制法:参照CN102586184A(2012100446386)中之实施例1~2所记载的方法从胎盘中获取间充质干细胞。称取磷脂酰丝氨酸和氯化钠、氯化镁、乙二胺四乙酸钙钠,加适量注射用水溶解,121℃高压灭菌15分钟,冷却备用;使间充质干细胞悬液与磷脂酰丝氨酸和氯化钠、氯化镁、乙二胺四乙酸钙钠的水溶液混合,补加水至全量,混合均匀后,分装到预充注射器中,即得。可以放到-80℃冰箱中冻存以备临床应用。

[0160] 实施例14、胎盘MSC的组合物

[0161] 终产物的配料比例(浓度):间充质干细胞(第三代), 3×10^7 个/mL; 磷脂酰丝氨酸, 0.2%; 氯化钠, 0.9%; 氯化镁, 0.08%; 乙二胺四乙酸钙钠, 0.04%; 注射用水, 余量。

[0162] 制法:参照CN102586184A(2012100446386)中之实施例1~2所记载的方法从胎盘中获取间充质干细胞。称取磷脂酰丝氨酸和氯化钠、氯化镁、乙二胺四乙酸钙钠,加适量注射用水溶解,121℃高压灭菌15分钟,冷却备用;使间充质干细胞悬液与磷脂酰丝氨酸和氯化钠、氯化镁、乙二胺四乙酸钙钠的水溶液混合,补加水至全量,混合均匀后,分装到预充注射器中,即得。可以放到-80℃冰箱中冻存以备临床应用。

[0163] 实施例15、脐带MSC的组合物

[0164] 终产物的配料比例(浓度):间充质干细胞(第七代), 4×10^7 个/mL; 磷脂酰丝氨酸, 0.2%; 氯化钠, 0.9%; 氯化镁, 0.08%; 乙二胺四乙酸钙钠, 0.03%; 注射用水, 余量。

[0165] 制法:参照CN102660497A(2012101599162)之实施例1所记载的方法从脐带中获取间充质干细胞。称取磷脂酰丝氨酸和氯化钠、氯化镁、乙二胺四乙酸钙钠,加适量注射用水溶解,121℃高压灭菌15分钟,冷却备用;使间充质干细胞悬液与磷脂酰丝氨酸和氯化钠、氯化镁、乙二胺四乙酸钙钠的水溶液混合,补加水至全量,混合均匀后,分装到预充注射器中,即得。可以放到-80℃冰箱中冻存以备临床应用。

[0166] 实施例16、脐带MSC的组合物

[0167] 终产物的配料比例(浓度):间充质干细胞(第十代), 2×10^7 个/mL; 磷脂酰丝氨酸, 0.3%; 氯化钠, 0.8%; 氯化镁, 0.1%; 乙二胺四乙酸钙钠, 0.02%; 注射用水, 余量。

[0168] 制法:参照CN102660497A(2012101599162)之实施例1所记载的方法从脐带中获取间充质干细胞。称取磷脂酰丝氨酸和氯化钠、氯化镁、乙二胺四乙酸钙钠,加适量注射用水溶解,121℃高压灭菌15分钟,冷却备用;使间充质干细胞悬液与磷脂酰丝氨酸和氯化钠、氯化镁、乙二胺四乙酸钙钠的水溶液混合,补加水至全量,混合均匀后,分装到预充注射器中,即得。可以放到-80℃冰箱中冻存以备临床应用。

[0169] 实施例17、脐带MSC的组合物

[0170] 终产物的配料比例(浓度):间充质干细胞(原代), 5×10^7 个/mL; 磷脂酰丝氨酸, 0.1%; 氯化钠, 1.0%; 氯化镁, 0.05%; 乙二胺四乙酸钙钠, 0.05%; 注射用水, 余量。

[0171] 制法:参照CN102660497A(2012101599162)之实施例1所记载的方法从脐带中获取间充质干细胞。称取磷脂酰丝氨酸和氯化钠、氯化镁、乙二胺四乙酸钙钠,加适量注射用水溶解,121℃高压灭菌15分钟,冷却备用;使间充质干细胞悬液与磷脂酰丝氨酸和氯化钠、氯化镁、乙二胺四乙酸钙钠的水溶液混合,补加水至全量,混合均匀后,分装到预充注射器中,

即得。可以放到-80℃冰箱中冻存以备临床应用。

[0172] 实施例18、脐带MSC的组合物

[0173] 终产物的配料比例(浓度):间充质干细胞, 3×10^7 个/mL; 磷脂酰丝氨酸, 0.2%; 氯化钠, 0.9%; 氯化镁, 0.08%; 乙二胺四乙酸钙钠, 0.04%; 注射用水, 余量。

[0174] 制法:参照CN102660497A (2012101599162) 之实施例1所记载的方法从脐带中获取间充质干细胞。称取磷脂酰丝氨酸和氯化钠、氯化镁、乙二胺四乙酸钙钠, 加适量注射用水溶解, 121℃高压灭菌15分钟, 冷却备用; 使间充质干细胞悬液与磷脂酰丝氨酸和氯化钠、氯化镁、乙二胺四乙酸钙钠的水溶液混合, 补加水至全量, 混合均匀后, 分装到预充注射器中, 即得。可以放到-80℃冰箱中冻存以备临床应用。

[0175] 实施例20:测定细胞活率

[0176] 针对本发明实施例1-8以及实施例11~18配制得到的全部细胞治疗组合物, 采用公知的台盼蓝拒染法计数活细胞, 测定并计算其细胞活率(即活细胞的比例), 其计算式如下:

[0177] 细胞活率 = (细胞总数 - 死细胞数) / 细胞总数 $\times 100\%$

[0178] 结果:

[0179] 上述实施例1-8以及实施例11~18的全部组合物, 它们在冻存之前, 经测定, 细胞活率在96~99%范围内(例如实施例1和实施例11组合物分别为98.1%和96.6%); 冻存之前室温放置6小时细胞活率在91~94%范围内(例如实施例1和实施例5组合物分别为93.3%和91.7%, 实施例11和实施例15组合物分别为92.3%和93.6%); 冻存之前室温放置24小时细胞活率在80~84%范围内(例如实施例1和实施例5组合物分别为81.2%和83.4%, 实施例11和实施例15组合物分别为83.7%和82.4%), 显示细胞具有优异的存活率。

[0180] 上述实施例1-8的全部组合物, 它们在-80℃冰箱中冻存10天之后, 常温融化复苏后细胞活率在85~88%范围内(例如实施例1和实施例5组合物分别为85.3%和86.8%); 复苏后常温放置6小时细胞活率在74~77%范围内(例如实施例1和实施例5组合物分别为74.7%和75.4%), 显示细胞具有优异的存活率。

[0181] 上述实施例11-18的全部组合物, 它们在-80℃冰箱中冻存10天之后, 常温融化复苏后细胞活率在93~96%范围内(例如实施例11和实施例15组合物分别为94.8%和93.3%); 复苏后常温放置6小时细胞活率在89~92%范围内(例如实施例11和实施例15组合物分别为91.6%和90.2%), 显示细胞具有比之于实施例1~8具有更优异的存活率。

[0182] 上述-80℃冻存10天, 对于药品来说明显是偏短的, 难以满足药品贮藏、运输的常规要求。例如, 细胞可以在经典的冻存液中以-196℃冻存相当长的时间, 但是在将其配制成注射用的液体组合物时, 细胞环境发生巨大变化, 长期冻存是不可取的, 而采取临用预配的方法灌装于预充式注射器中后在-80℃冻存3个月通常能够满足临床关于贮藏、运输的要求。因此, 参照本文测定方法, 使实施例1~8以及实施例11~18全部组合物在-80℃冻存3个月, 然后测定这些组合物常温融化复苏后细胞活率和复苏后常温放置6小时细胞活率, 结果:

[0183] 上述实施例1-8的全部组合物, 它们在-80℃冰箱中冻存3个月之后, 常温融化复苏后细胞活率在61~65%范围内(例如实施例1和实施例5组合物分别为64.3%和62.7%), 经

测定,6小时细胞活率在45~49%范围内(例如实施例1和实施例5组合物分别为45.8%和47.6%);

[0184] 上述实施例11-18的全部组合物,它们在-80℃冰箱中冻存3个月之后,常温融化复苏后细胞活率在88~91%范围内(例如实施例11和实施例15组合物分别为90.2%和89.6%),经测定,6小时细胞活率在83~86%范围内(例如实施例11和实施例15组合物分别为84.4%和85.6%),显示细胞具有比之于实施例1~8具有更优异的存活率。

[0185] 实施例21:分别参照实施例11~18的配方和制法,不同的仅是不添加氯化镁,得到8种液体组合物。实施例22:分别参照实施例11~18的配方和制法,不同的仅是不添加乙二胺四乙酸钙钠,得到8种液体组合物。

[0186] 上述实施例21-22的全部组合物,它们在-80℃冰箱中冻存3个月之后,常温融化复苏后细胞活率在65~69%范围内(例如实施例21分别参照实施例11和实施例15所得组合物分别为66.7%和68.4%),经测定,复苏后常温放置6小时细胞活率在46~51%范围内(例如实施例21分别参照实施例11和实施例15所得组合物分别为49.7%和47.3%)。这一结果表明,本发明人意料的发现是:组合物中不添加氯化镁或者不添加乙二胺四乙酸钙钠,不能获得优良的复苏后细胞活率(反映细胞经历复苏过程的活力)以及复苏后6小时细胞活率(反映复苏后细胞的存活稳定性)。

[0187] 上述实施例1-8以及实施例11-18的全部细胞组合物,通过利用流式细胞仪对细胞表面标记物进行检测,根据美国“The International Society for Cellular Therapy (ISCT)”在2006年发布的有关检定间充质干细胞的准则,该细胞在标记物检测中应符合以下要求:标记物CD73、CD90、CD105表达阳性;标记物CD11b、CD34、CD45、CD19、HLA-DR表达阴性。经测定上述实施例1-8以及实施例11-18的全部细胞组合物,各标记物检测结果均符合标准要求。

[0188] 实施例31:参照实施例11的配方和制法,不同的仅是不添加磷脂酰丝氨酸,得到液体组合物。

[0189] 实施例32:参照实施例15的配方和制法,不同的仅是不添加磷脂酰丝氨酸,得到液体组合物。

[0190] 实施例33:脐血干细胞移植治疗糖尿病大鼠下肢缺血的实验研究

[0191] 材料和试剂:雄性SD大鼠购自苏州大学实验动物中心,约10周龄,体重190~230g;淋巴细胞分离液购自Mediatech公司,低糖DMEM培养液购自GIBCO公司,磷酸盐缓冲液(PBS, pH6.8)据中国药典2015年版四部通则8004自配,兔抗大鼠Ⅷ因子相关抗原购自Sigma公司,链脲佐菌素(STZ)购自Sigma公司,SP9001免疫组化试剂盒购自中杉金桥公司,测定血管内皮生长因子(VEGF)的酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒及DAB显色试剂盒购自博士德生物;试药:实施例11、实施例15、实施例31和实施例32所得液体组合物,制备后2~6℃存放并在8小时内注射使用。

[0192] 糖尿病大鼠下肢缺血模型的制备:对60只雄性SD大鼠中余下的50只大鼠,禁食12h后,按体重给予60mg/kg链脲佐菌素(4mg/mL,以0.1mol/L、pH4.0无菌柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液临用新配)腹腔一次性注射,1周后,断料不断水12h,剪尾测血糖,连续测得血糖浓度>16.7mmol/L,即认为糖尿病大鼠造模成功[Thierry Couflinhal, Marcy Silver, Lu P, et al. Mouse Model of Angiogenesis[J]. Am J Pathol, 1998, 152(1):1667-1679],每只以

10%水合氯醛按3.0ml/kg腹腔注射麻醉,常规备皮,消毒左下肢,铺无菌铺单,沿左侧腹股沟中点至膝内侧作约1.5cm长的切口,钝性分离皮下组织,暴露股神经血管鞘及其分支,分离出股动脉及大隐动脉、旋髂外动静脉及股动静脉肌支共4处,分别用3/0号线结扎后切断,再逐层缝合组织皮肤,注射青霉素10万U/只,连续4d,预防感染,最终制备成功糖尿病大鼠下肢缺血模型,大鼠注入STZ后1周血糖逐步升高,均在16.7mmol/L以上,且稳定地保持在较高水平,大鼠逐渐出现毛色灰暗、枯黄,杂乱,易激惹,皮肤变薄,多饮、多尿症状明显,糖尿病大鼠模型建立成功,造模成功的糖尿病雄性大鼠,左下肢经血管结扎2~3d后,大鼠即出现食欲下降,缺血左下肢逐渐出现萎缩,下肢活动力降低,所有造模成功的糖尿病下肢缺血大鼠在28d后处死取材时局部均无明显坏疽。

[0193] 细胞移植:将50只糖尿病大鼠下肢缺血模型动物随机分为5组,即生理盐水组、实施例11组、实施例15组、实施例31组、实施例32组,每组10只,下肢缺血模型制作术后第二天,沿股动脉走向选取5个点,间距约0.3cm×0.3cm,肌肉注射移植液体,每个点注射细胞治疗组合物适量(10^5 个细胞,生理盐水组平行注射等体积生理盐水)。

[0194] 左下肢肌肉组织中VEGF含量的检测:注射细胞治疗剂4周后,颈椎脱臼大鼠,切取各组大鼠左下肢肌组织,于冰盐水中漂洗,去除血污,以干纱布浸干水分后,在电子天平上称湿重,称取100mg,将标本剪碎,加入PBS液1ml,容器置于冰上,将肌组织用匀浆器研磨成匀浆,然后在4℃下12000r/min离心10min,取上清液,-80℃保存备用;应用ELISA试剂盒按说明书操作检测VEGF的含量;生理盐水组、实施例11组、实施例15组、实施例31组、实施例32组的VEGF含量结果(均数±标准差,pg/ml)分别为:138.53±26.38、327.38±39.31***、305.67±33.48***、247.24±36.72***##、226.43±42.17***##(与生理盐水组比较***p<0.005,**p<0.01;与实施例11组比较##p<0.05)。本发明以均数±标准差表示的结果,两组间比较采用t检验,以p<0.05认为差异有统计学意义。

[0195] 左下肢肌肉组织中毛细血管密度的测定:取大鼠注射细胞治疗剂部位的肌肉,石蜡包埋,切片,厚度为4μm,并进行抗原修复,然后以体积分数为3%过氧化氢酶孵育10min,PBS液冲洗,滴加山羊血清工作液,室温下孵育10min,然后加入兔抗大鼠VIII因子相关抗原,37℃下孵育2h,4℃过夜,再依次加入生物素标记的山羊抗兔抗体和辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液,DAB显色,接着用自来水充分冲洗,苏木素复染;光镜下观察棕黄色细胞每个标本在高倍镜(400倍)下随机观察5个视野,计算毛细血管密度;全部数据采用统计软件包SPSS11.0进行分析;生理盐水组、实施例11组、实施例15组、实施例31组、实施例32组的毛细血管密度结果(均数±标准差,个/HP)分别为:3.43±0.63、9.44±0.75***、9.73±0.58***、7.13±0.54***##、6.68±0.66***##(与生理盐水组比较***p<0.005,**p<0.01;与实施例11组比较##p<0.05)。

[0196] 实验期间各组糖尿病下肢缺血大鼠中均未发现皮肤出血点、剥皮性皮炎等急性排斥反应症状,四周后处死,心脏、肾脏、肝脏、脾脏及肺脏未发现肿瘤样生长。

[0197] 上述结果表明,实施例11和实施例15细胞治疗剂在用于治疗或预防下肢缺血性疾病方面显著优于实施例31和实施例32的细胞治疗剂。

[0198] 以上所述实施例仅是为充分说明本发明而所举的较佳的实施例,本发明的保护范围不限于此。本技术领域的技术人员在本发明基础上所作的等同替代或变换,均在本发明的保护范围之内。本发明的保护范围以权利要求书为准。