



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201231663 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：100137771

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 10 月 18 日

(51)Int. Cl. : C12N5/077 (2010.01)

(30)優先權：2010/10/18 美國 61/394,073

(71)申請人：尚翔股份有限公司(中華民國) SUNSHINE LIFE SCIENCE & TECHNOLOGY CORP.
(TW)

新北市八里區商港六路 53 號 10 樓

(72)發明人：施子弼 SHIH, DANIEL TZU-BI (US)；蔡明松 TSAI, MING SONG (TW)

(74)代理人：江謝令涵

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：12 項 圖式數：7 共 34 頁

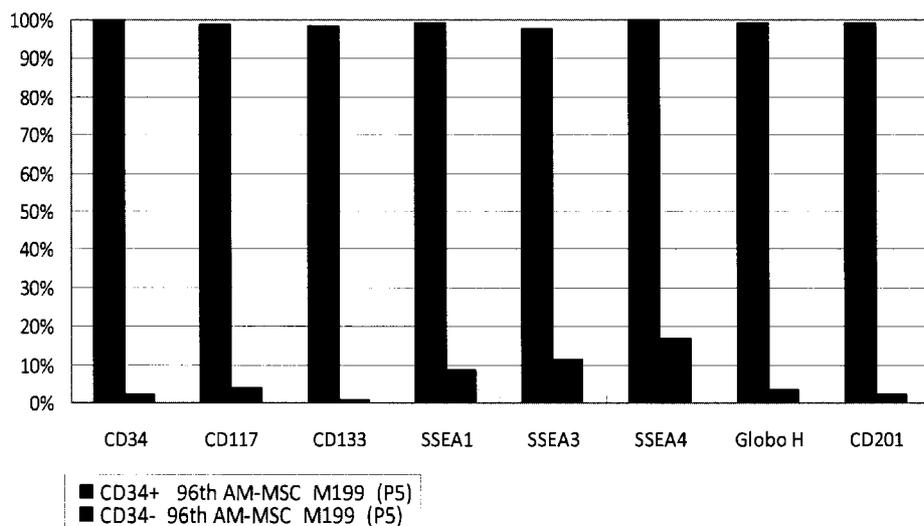
(54)名稱

人類多能性類胚胎幹細胞先驅細胞

HUMAN MULTIPOTENT EMBRYONIC STEM CELL-LIKE PROGENITOR CELLS

(57)摘要

本發明提供類胚胎幹細胞先驅細胞群，該細胞群係藉由系統性篩選人類間葉基質幹/先驅細胞從人類組織中分離，並藉由細胞抗原進行細胞分選，該細胞抗原係選自由 CD34、CD117、CD133、CD201 及 GloboH 所組成之群組，以及將該分選之細胞培養於添加至少一或多種類固醇及一或多種生長因子之培養基中。本發明之細胞會表現 CD34 並於初代具有球狀細胞聚落生成，且會表現多能性類胚胎幹細胞(ESCs)之特徵。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201231663 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：100137771

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 10 月 18 日

(51)Int. Cl. : C12N5/077 (2010.01)

(30)優先權：2010/10/18 美國 61/394,073

(71)申請人：尚翔股份有限公司(中華民國) SUNSHINE LIFE SCIENCE & TECHNOLOGY CORP.
(TW)

新北市八里區商港六路 53 號 10 樓

(72)發明人：施子弼 SHIH, DANIEL TZU-BI (US)；蔡明松 TSAI, MING SONG (TW)

(74)代理人：江謝令涵

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：12 項 圖式數：7 共 34 頁

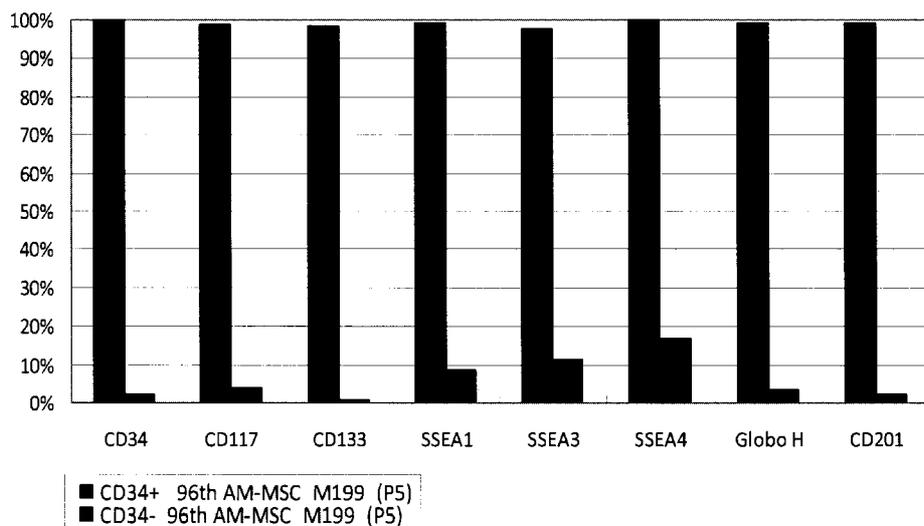
(54)名稱

人類多能性類胚胎幹細胞先驅細胞

HUMAN MULTIPOTENT EMBRYONIC STEM CELL-LIKE PROGENITOR CELLS

(57)摘要

本發明提供類胚胎幹細胞先驅細胞群，該細胞群係藉由系統性篩選人類間葉基質幹/先驅細胞從人類組織中分離，並藉由細胞抗原進行細胞分選，該細胞抗原係選自由 CD34、CD117、CD133、CD201 及 GloboH 所組成之群組，以及將該分選之細胞培養於添加至少一或多種類固醇及一或多種生長因子之培養基中。本發明之細胞會表現 CD34 並於初代具有球狀細胞聚落生成，且會表現多能性類胚胎幹細胞(ESCs)之特徵。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明關於一群前驅／先驅細胞，其特別富集有多能性類胚胎幹細胞間葉共同前驅細胞（mesenchymal common progenitor cells, MCPCs）群，及富集該等細胞之方法。

【先前技術】

於再生醫學中，鑑別出高度安全且有效之幹細胞來源，係為發展生物材料，用以修復及更新損壞及具缺陷的組織之第一步。人類胚胎幹細胞（hESCs）可保持為未分化的狀態；但當將之培養於適當環境中時，便會開始自發地分化為多種不同型態之細胞。此點給予一重要之啟示，在於胚胎幹細胞之培養可做為生產多種不同細胞型態之來源。然而，此方法卻非有效率之方法，原因在於仍須控制胚胎幹細胞之分化（參閱：*幹細胞：科學進度及未來研究方向*（*Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*）。Department of Health and Human Service, 2001年6月）。

間葉幹細胞（MSCs）為多能性幹細胞，可分化為多種不同之細胞型態。MSCs可從胎盤、脂肪組織、肺、骨髓、牙髓及血液分離。已知MSCs於活體外或活體內可分化之細胞型態包括成骨細胞、軟骨細胞、肌細胞、脂肪細胞及 β -胰島細胞。從骨髓中可發現稀少的MSCs，於10,000有核細胞中佔約1個。雖然該MSCs並非永生的，但該等細胞於培養時，具可增殖數倍之能力，且仍維持其生長及分化多向之潛能。Pittenger等人（*科學* 284, 143 (1999)）揭露分離的間葉（幹）細胞皆一致表現SH2、SH3、CD29、CD44、CD71、CD90、CD106、CD120a、CD124及其他許多表面蛋白；然而該等間葉細胞不表現造血細胞系之其他標記，包括脂多醣體受器CD14、CD34，及白血球共同抗原CD45。MSCs可藉由許多分子（包

含 CD44 及 CD105) 之表現以及不表現造血性標記 CD34、CD45 及 CD14 來鑑定。

報導指出，羊膜的間葉基質細胞及人類絨毛膜的間葉基質細胞可從胎盤中分離。該等細胞之表面抗原表現，如下表 A 所示，顯示其無法表現 CD45、CD34、CD14 及 HLA-DR (PAROLINI 等人，*幹細胞* 26: 300-311, 2008)。

表 A. 羊膜的間葉基質細胞及人類絨毛膜的間葉基質細胞於 2-4 代時，其特定抗原之表現

陽性 ($\geq 95\%$)	陰性 ($\leq 2\%$)
CD90	CD45
CD73	CD34
CD105	CD14
	HLA-DR

Caplice (US 7,790,453 B2) 教示衍生自血液的成體平滑肌先驅細胞為 CD34 陽性的。然而，Caplice 所揭露之平滑肌先驅細胞並沒有將之特徵化描述為間葉基質幹／先驅細胞，且該等先驅細胞具有侷限之分化潛能。

Lucas 等人 (US 7,259,011 B2) 教示表現 CD13、CD34、CD56 及 CD117 之分離的人類多能的成體幹細胞 (PPASCs)。根據 Lucas 等人，該 PPASCs 不會表現 CD10、CD14 及階段特异性胚胎抗原 SSEA2。該 PPASCs 亦未被特徵化描述為間葉基質幹／先驅細胞。

Hariri (US 7,468,276 B2) 教示分離的人類胎盤幹細胞為 OCT4⁺ 及 CD34⁺。由 Hariri 揭露之人類胎盤幹細胞為 SSEA3⁻ 及 SSEA4⁻。由 Hariri 揭露之人類胎盤幹細胞未被特徵化描述為間葉基質幹／先驅細胞。

Edinger 等人 (US 2008/0206343 A1) 揭露來自胎盤的非附著之 CD34⁺CD45⁻ 幹細胞。根據 Edinger 等人所述之胎盤幹細

胞為非附著的，故其非為間葉的。

對於組織工程而言，年輕且可長時間自我更新之富集化多能性幹細胞群為組織工程所欲者。

【發明內容】

因此，本發明提供一群類胚胎幹細胞前驅細胞，其係為富集化之多能性人類間葉共同先驅細胞 (MCPCs) 群。該等細胞自人類體細胞組織中，藉由系統性篩選人類間葉基質幹／先驅細胞之方式分離，接著以選自由 CD34、CD117、CD133、CD201 及 GloboH 所組成群組之細胞抗原進行細胞分選 (cell sorting)，以及將該等細胞培養於添加至少一種或多種類固醇，及一種或多種生長因子之培養基中。本發明不可預期地發現，該等細胞會表現 CD34；該等細胞於本發明中稱為 MCPCs，其與習知之不表現 CD34 之人類間葉基質 (幹) 細胞不同。該等 MCPCs 於初代時會形成球狀細胞聚落，且在活體外會表現多能性類胚胎幹細胞 (ESCs) 之特性。

在一方面，本發明提供一群富集化之多能性人類間葉共同先驅細胞 (MCPCs)，其被鑑定為間葉基質幹／先驅細胞，且具有至少下列特徵：CD14⁺、CD34⁺、CD117⁺、CD133⁺ (AC133⁺)、CD201⁺、Nestin⁺、SSEA3⁺、SSEA4⁺及 GloboH⁺。

另一方面，本發明提供一種製備本發明之富集化之多能性人類 MCPCs 群之方法，包含藉由系統性篩選人類間葉基質幹／先驅細胞從人類體細胞組織中分離，接著藉由選自由 CD34、CD117、CD133、CD201、GloboH 所組成之群組之細胞抗原進行細胞分選，以及將該等細胞培養於添加選自由皮質類固醇及膽固醇所組成群組中至少一或多種類固醇，及至少一或多種選自由表皮生長因子 (EGF)、纖維母細胞生長因子 (FGF)、類胰島素生長因子 (IGF)、胰島素、血小板衍生長因子 (PDGF)、IL-6、及血小板生成素 (TPO) 所組成群組中生長因子之培養基中。

另一方面，本發明提供一組合物，其包含包埋於褐藻膠 (alginate) 中的本發明之富集化之多能性人類 MCPCs 群。

又另一方面，本發明提供一用於幹細胞培養之供養細胞層 (feeder cell layer)，其包含本發明之富集化之多能性人類 MCPCs 群。

再另一方面，本發明提供一種幹細胞小生境 (stem cell niche)，其包含一支架 (scaffold) 及種植於該支架上之本發明之富集化之多能性人類 MCPCs 群。

【實施方式】

本文所使用之「一」意指一個或一個以上 (亦即至少一者) 文意所指之物件，除非於文章中另有清楚指出其特定用法僅為單數形式。

本文所使用之「皮質類固醇」為一群類固醇荷爾蒙。皮質類固醇之實例包括但不限於 A 群皮質類固醇 (例如，氫化皮質酮、乙酸皮質醇、及乙酸皮質酮)、B 群皮質類固醇 (例如，曲安奈德 (triamcinolone acetonide)、曲安西龍醇 (triamcinolone alcohol) 及摩米塔松 (mometasone))、C 群皮質類固醇 (例如，貝皮質醇 (betamethasone)、貝皮質醇磷酸鈉 (betamethasone sodium phosphate)、及地塞米松 (dexamethasone)) 及 D 群皮質類固醇 (例如，氫皮質酮-17-戊酸酯 (hydrocortisone-17-valerate)、阿氯米松二丙酸酯 (aclometasone dipropionate) 及氫皮質酮-17-丁酸酯 (hydrocortisone-17-butyrate))。

根據本發明，吾人無預期地發現一群前驅細胞，其係從人類體細胞組織中分離，且該等細胞被鑑別為間葉基質幹/先驅細胞，其至少會表現 CD14、CD34、CD117、CD133 (AC133)、CD201、Nestin、SSEA3、SSEA4 及 GloboH (該細胞稱為 MCPCs)。該 MCPCs 可以下列方法取得，包含之步驟：藉由系統性篩選人類間葉基質幹/先驅細胞從人類體細胞組織中

分離，接著以選自由 CD34、CD117、CD133、CD201 及 GloboH 所組成群組之細胞抗原進行細胞分選，以及將該分選之細胞培養於添加有至少一或多種類固醇，及一或多種生長因子之培養基中；其中該類固醇係選自由皮質類固醇、膽固醇、及其組合所組成之群組；該生長因子係選自由表皮生長因子 (EGF)、纖維母細胞生長因子 (FGF)、類胰島素生長因子 (IGF)、胰島素、血小板衍生長因子 (PDGF)、IL-6、血小板生成素 (TPO) 及其組合所組成之群組。本發明之 MCPCs 會依附於組織培養表面，此點與 Edinger 等人 (US 2008/0206343 A1) 所揭露之 CD34⁺、CD45⁻胎盤幹細胞不同。

本發明之 MCPCs 可從人類體細胞組織中分離，該體細胞組織包含但不限於新生兒胎盤 (例如，羊膜、絨毛膜及臍帶)、子宮內膜、齒齦、骨髓及脂肪。較佳地，該 MCPCs 係從胎盤、子宮內膜及齒齦分離。更佳地，該 MCPCs 係從胎盤羊膜組織分離。根據本發明，從胎盤羊膜組織分離之 MCPCs 被稱為 AM-MSCs-CD34⁺細胞；從子宮內膜所分離之 MCPCs 被稱為 EnMSCs-CD34⁺細胞；從齒齦所分離之 MCPCs 被稱為 GMSCs-CD34⁺細胞。具體而言，AM-MSCs-CD34⁺細胞、EnMSCs-CD34⁺細胞及 GMSCs-CD34⁺細胞之細胞表面標記具有一致之表現圖譜。於本發明中，該 MCPCs 於初代時具有球狀之細胞聚落生成，且於活體外表現出多能性類胚胎幹細胞 (ESCs) 之特徵。型態上，本發明之 MCPCs 較 CD34⁻ MSCs 短小。具體而言，相較於 CD34⁻ MSCs 或未分選之 MSCs，本發明之 MCPCs 具有較高之生長速度，意指本發明之 MCPCs 較具增生性及較為年輕。

根據本發明，該 MCPCs 均質地表現胚胎的 (例如，Oct-4、Nanog、Rex-1、Sox-2)、幹細胞性 (例如，CD117、CD34、CD44) 表面抗原，且亦會表現多種不同細胞系標記，包含 MSC (例如，CD29、CD90、CD73、CD105、CD106)、血液-血管生成的 (hem-angiogenic) (例如，AC133、CD34)、肌-神經生

成的 (myo-nurogenic) (例如, CD54、Nestin、NSE)。再者, 本發明之 MCPCs 為長時間自我更新的 (prolonged self-renewal)。根據本發明之部分具體實施例, 該 MCPCs (例如, AM-MSCs-CD34⁺細胞) 可保留住特定細胞標記的表現為 CD34、CD54、CD117 及 AC133 陽性, 且該等細胞之 MSC 標記之表現甚至可維持超過 20 代。

因此, 在一方面, 本發明提供富集化之多能性人類間葉共同先驅細胞群 (MCPCs), 其被鑑別為間葉基質幹/先驅細胞, 其至少具有以下特徵: CD14⁺、CD34⁺、CD117⁺、CD133⁺ (AC133⁺)、CD201⁺、Nestin⁺、SSEA3⁺、SSEA4⁺ 及 GloboH⁺。

根據本發明之較佳具體實施例, 該 MCPCs 進一步具有下列特徵中至少一者: CD44⁺、CD54⁺、CD56⁺、CD105⁺、CD146⁺ 或 PDGFR⁺。

根據本發明, 該 MCPCs 具有分化為外胚層系、中胚層系及內胚層系之細胞或組織之潛能。在本發明一具體實施例中, 檢驗 AM-MSCs-CD34⁺細胞並發現其為多能性, 可分化為多種不同之體細胞類型, 包括內胚層、中胚層或外胚層細胞。

在本發明之較佳具體實施例中, 該 MCPCs 具有脂肪生成的分化潛能、成骨生成的分化潛能、軟骨生成的分化潛能、神經生成的分化潛能、心肌生成的分化潛能、內皮生成的分化潛能及肝分化潛能。

另一方面, 本發明提供用以製備富集化之多能性人類 MCPCs 群之方法, 其包含藉由系統性篩選人類間葉基質幹/先驅細胞從人類體組織中分離, 並藉由細胞抗原進行細胞分選, 該細胞抗原係選自由 CD34、Nestin、CD117、CD133 及其組合所組成之群組, 以及將該分選細胞培養於添加至少一或多種類固醇及一或多種選自由表皮生長因子 (EGF)、纖維母細胞生長因子 (FGF)、類胰島素生長因子 (IGF)、胰島素、血小板衍生生長因子 (PDGF)、IL-6、血小板生成素 (TPO) 及其組合所組成之群組之生長因子之培養基中。

根據本發明之部分具體實施例，該培養基可進一步添加一或多種選自於由維生素 A、維生素 B 群、維生素 E、生物素、p-氨基苯酸及維生素 K3 所組成之群組之維生素，以及一或多種選自於由尿嘧啶、醋酸鈉、核糖、鳥嘌呤鹽酸 (Guanine HCl)、去氧核糖、腺[核]苷酸、硫酸腺嘌呤、硝酸鐵所組成之群組之化合物。

在本發明之較佳具體實施例中，該細胞分選係藉由螢光活化細胞分選 (FACS) 流式細胞儀進行。較佳地，該細胞分選係為 CD34、CD117、CD133、CD201 或 GloboH 細胞抗原 FACS。

又另一方面，本發明提供一組合物，其包含包埋於褐藻膠中的本發明之細胞。

再一方面，本發明提供一種用於幹細胞培養之供養細胞層。該供養細胞層包含本發明之富集化多能性人類 MCPCs 群。

因此，相較於習知來源，如 ESCs，本發明提供細胞群落生成的類 ESC 幹細胞的較佳來源，其係衍生自非胚胎之初生或成體組織，且具分化為多種不同細胞型態之多能性。本發明之 MCPCs 被發現具有增生能力及分化潛能。該 MCPCs 具有極佳潛力可供臨床再生療法所用。本發明藉由以下之非限制性實施例以進一步說明。

用於以下實施例之人類組織之取得方式，係使用國泰醫院人體試驗委員會及台北醫學大學人體試驗委員會所認可之方法取得。

實施例 1：AM-MSCs-CD34⁺細胞之製備及特徵化 羊膜の間葉細胞之分離

(1) 羊膜之分離：

將羊膜(約 300 cm²、n = 9)從絨毛膜上剝落，並以 1×Hank's 緩衝液 150 ml 沖洗三次以清除血液。

(2) 移除羊膜表皮細胞：

為了將羊膜表皮細胞 (Am-EpCs) 去除，以約 250 cm² 之膜而言，將洗好之羊膜切成 2-3 cm² 之片段，並將之置於具有

1× Hanks 平衡鹽類溶液 (Gibco; CAT# 14185-052; Grand Island, NY) 之 100 ml 0.1% 胰蛋白酶-EDTA (Sigma; St Louis, MO) 中進行培養，並於 37°C 水浴中進行四次反應，每次 15 分鐘。

(3) 收集細胞群落生成的羊膜間葉基質細胞 (AM-MSCs)：

為了分離羊膜間葉基質細胞 (AM-MSCs)，將去除 Am-EpCs 的羊膜以 Hank's 緩衝液洗滌一次，並以膠原蛋白酶 1A，於 37°C 進行消化 45-60 分鐘。以適當體積之 Hank's 緩衝液及 40µm 尼龍細胞過濾器收集細胞群落生成的 AM-MSCs。

(4) 培養 AM-MSCs：

經 170g 離心後，將 AM-MSCs 以每平方公分 5×10^4 細胞數目置於 CELL-BIND T75 角瓶中，並於 5% CO₂、37°C 進行培養。將收集之 AM-MSCs 以添加胎牛血清 (FBS)、表皮生長因子 (EGF)、及氫化皮質酮之培養基 199 (M199 調整培養基) (Lonza CAT# 12-118F; Switzerland) 進行培養。於純化培養過程中，每 3~4 天更換新鮮培養基，於第 7 天時，細胞可增殖至 80% 細胞稠度。以 0.1% 胰蛋白酶-EDTA 收獲貼附的培養細胞，並將之以每 T75 角瓶 1×10^5 細胞數目分殖，以進行新一代細胞培養。

或者，將收集的 CM-MSCs 於添加胎牛血清 (FBS) (10%)、丙酮酸鈉 (0.1 mM)、鹼性纖維母細胞生長因子 (bFGF)、及 EGF (10 ng/ml) 之 RPMI-1640 (GIBCO; Grand Island, NY) 進行培養。當細胞達到 70~80% 之細胞稠度時進行分殖，且每隔 3~4 天更換培養基。

流式細胞分析

為了進行 FACS 分析，將新鮮收獲之 AM-MSCs 進行胰蛋白酶化，並將之與等分量之螢光 (FITC 或 PE) 結合之單株抗體 (mAbs) 進行培養，根據製造商之建議，於 100 µl 磷酸緩衝液、4°C 作用 30 分鐘。用以分析之細胞標記包含間葉幹細胞 (MSC) 系 (CD29、CD90、CD73、CD105、CD106、間絲蛋白 (Vimentin))、

幹細胞性 (CD34、CD44、CD117)、血液-血管生成的 (hem-angiogenic) (AC133、CD34)、肌-神經生成的 (myo-neurogenic) (CD54、巢蛋白(Nestin))、及纖維母細胞標記 (間絲蛋白、 α 平滑肌肌動蛋白(alpha smooth muscle actin))。並以 FACSCanto 流式細胞儀系統(BD Bioscience, San Jose, CA) 分析該等細胞。該流式細胞分析資料遂以 FCS Express V3 軟體 (De Novo; Canada)處理。

流式細胞儀分選

將培養至 2~3 代之增殖的初代 AM-MSCs 以 CD34 抗體標記，以分離 CD34⁺ AM-MSCs 亞群。根據製造商之操作方式，以 FACS Aria 流式細胞儀(BD Bioscience, San Jose, CA)進行細胞分選，可分選出高達 3×10^6 之細胞。再將 CD34 陽性(CD34⁺) 及 CD34 陰性(CD34⁻)之細胞進行分析、分選及收集。

簡言之，將收獲之 $3-4 \times 10^6$ 第三代 AM-MSCs 以胰蛋白酶處理，將之以 PE-結合之 CD34 進行標記(根據製造商建議方式)，於 100 μ l 磷酸緩衝液中、室溫下反應 15 分鐘。接著，將細胞以 40 μ m 之尼龍細胞過濾器 (Becton, Dickinson and Company CAT# 352235)進行過濾，並以 BD FACS Aria 分選出 AM-MSCs-CD34⁺及 AM-MSCs-CD34⁻之細胞群。經過分選後，該 AM-MSCs-CD34⁺及 AM-MSCs-CD34⁻之細胞群會進行再分析，以分析出陽性部分，並將之於前述 M199 調整培養基或 RPMI 調整的培養基中進行增殖。AM-MSCs(第三代)之細胞型態顯示於第一圖，其中 AM-MSCs-CD34⁺細胞形狀(第一 A 圖)較 AM-MSCs-CD34⁻細胞(第一 B 圖)短小，且兩者於後幾代中都顯示相當穩定。AM-MSCs-CD34⁻細胞之起始倍增時間約為 42 小時，其較 AM-MSCs-CD34⁺細胞的 34 小時來得長。接下來，每 5 代確認 AM-MSCs 之 CD34 表現。經過 CD34⁺分選 20 代後，CD34⁺ AM-MSC 仍可維持其特定之細胞標記表現，如 CD34、CD54、CD117、及 CD133 (AC133)陽性，及其 MSC 標記表現。吾人發現，於該細胞之每一代中除了 CD34 之外之

每一個 CD 及基因標記都高度表現，而第一代細胞之 CD34 表現(50~60%)則低於其於第三代或第九代(約 100%)。CD34⁺及 CD34⁻分選之 AM-MSCs 均表現 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、EGFR 為陽性，且 CD31 為陰性。然而，CD34⁺ AM-MSCs 較 CD34⁻ AM-MSCs 表現更多之 CD56 及 PDGFR。參見第二 A 圖。再者，CD34⁺ AM-MSCs 較 CD34⁻ AM-MSCs 表現更多之 CD117、CD133、SSEA1、SSEA3、SSEA4、Globo H 及 CD201(第二 B 圖)。亦藉由 RT-PCR 分析特定基因之表現(資料未呈現)。結果顯示 AM-MSCs-CD34⁺細胞會表現「早期基因」包含 Sox-2、Oct-4、Rex-1 及 Nanog，外胚層系基因，例如，包括巢蛋白(Nestin)、NSE、NFM、NCAM、MAP2 之神經分化標記，中胚層系基因，例如，包括 MyoD、GATA-4 及 MLC-2a 之心肌生成分化標記，及內胚層系基因，例如，包括白蛋白及 HGF 之肝分化標記。

實施例 2：分化之誘導

(1) 血管生成分化

使用第 5 代、細胞數目為 2×10^5 之 AM-MSCs-CD34⁺細胞進行血管生成分化之誘導。收獲之細胞以 EGM-2 培養基(Cambrex)培養，進行 7 天誘導。以 Matrigel (BD Biosciences) 進行微血管形成之分析。具體地，經過誘導培養後，以胰蛋白酶處理 AM-MSCs-CD34⁺，並以每孔 10^5 細胞之細胞密度置於 Matrigel 塗佈的 24 孔盤上(Matrigel: M199 = 1:1)。在接下來三天，於 2、4、24 及 48 小時後，以光學顯微鏡觀察到微血管狀之結構。

(2) 心肌生成分化

收獲第 4-6 代之經分選的 AM-MSCs-CD34⁺細胞，用以誘導心肌生成分化。該 AM-MSCs-CD34⁺細胞以生長培養基[添加 10%FBS、及 MEM 非必須胺基酸(1×) (GIBCO)之 EGM-2:M199 (v : v = 1 : 3)]進行整夜培養。次日早上，將細胞以每平方公分 10^4 個細胞之細胞數目移至心肌生成分化培養基[添加 2%馬血

清(GIBCO)、1× MEM 非必須胺基酸、1×胰島素-轉鐵蛋白-硒(GIBCO)之 IMDM (GIBCO)：含有 GlutaMAX-1 (GIBCO)之 Ham's F12 營養混合物(v:v = 1:1)]。經過 6-8 小時後，將心肌細胞分化劑 5-氮胞苷(Sigma)加入培養基中，使該分化劑之最終濃度為 5 μ M。每天將 4ul/ml 5-氮胞苷(0.25 mM)之原液加入該分化培養基中，並於第四天換回無添加 5-氮胞苷之分化培養基。於分化分析之第 6 天，將抗壞血酸 (10^{-4} M) (Sigma)及 TGF- β 1 (1 ng/ml)(PeoproTech)加入培養基中。從此時間點之後，每隔幾天添加抗壞血酸及 TGF- β 1，且每週兩次。根據培養基之 pH 變化，每 2~3 天更換培養基。當更換培養基時，若有細胞碎片應以 PBS 清洗以移除。於 28 天分化培養後，固定該心肌生成之 AM-MSCs-CD34⁺細胞以進行組織化學染色。藉由 5-氮胞苷誘導肌生成，CD34⁺ AM-MSCs (P5)可輕易轉分化為心肌細胞，且會表現 MyoD、GATA-4、MLC-2a 基因 (資料未呈現)。心肌生成分化 28 天後以組織化學染色分析，CD34⁺ 及 CD34⁻ AM-MSCs 兩者皆會表現肌凝蛋白重鏈(MHC)，但僅有受誘導之 CD34⁺ AM-MSCs 形成典型的心肌細胞型態，且表現末端分化標記肌鈣蛋白 T (Troponin T) (資料未呈現)。

(3) 肝分化

肝分化之細胞標記的表現情形，呈現於下表 1 中。

表 1. AM-MSCs-CD34⁺細胞(第 6 代)之肝分化細胞標記的表現情形

	細胞標記	AM-MSCs-CD34 ⁺	對照組
基因	DAPI	+++	+++
	Cy3 (白蛋白)	+++	—
	FITC (細胞角質蛋白)	+++	—
蛋白質	GAPDH	+++	+++
	白蛋白	+++	—
	HGF	++	—

(4) 脂肪生成、成骨生成及軟骨生成分化

藉由實施例 1 所述方法以取得之 AM-MSCs-CD34⁺細胞，於增殖 5-6 代時，可於多細胞系之分化誘導。該脂肪生成、成骨生成、軟骨生成分化、及神經生成分化可藉由以下之方法進行。

先將 AM-MSCs 或 AM-MSCs-CD34⁺細胞置於添加 10% FBS (Hyclone) 之 Dulbecco's 修改的 Eagle's 培養基 (DMEM/LG, GIBCO) 中進行適應(pre-conditioning)，再以以下之細胞系分化培養基進行誘導：

1) 脂肪生成(AM)：添加 10% FBS、0.5 mM 異丁基甲基花黃素(isobutyl-methylxanthine)、1 μ M 地塞米松、10 μ M 胰島素、200 μ M 引朵美甲辛(indomethacin)之 DMEM/LG 培養基。

2) 成骨生成(OM)：添加 10% FBS、0.1 μ M 地塞米松、50 μ M 抗壞血酸-2-磷酸酯、10 mM β -磷酸甘油酯之 DMEM/LG 培養基。

3) 軟骨生成(CM)：添加 1% FBS、6.25 μ g/ml 胰島素、10 ng/ml TGF- β 1 (R&D)、50 nM 抗壞血酸-2-磷酸酯之 DMEM/LG 培養基。

4) 神經生成(NM)：添加 5 μ g/ml 胰島素、200 μ M 引朵美甲辛、0.5 mM 異丁基甲基花黃素之 DMEM/LG 培養基。(以上用於分化之試劑皆來自 Sigma; St.Louis, MO)

將細胞密度調整為 3 \times 10⁴ 細胞/cm²，以進行脂肪生成、成骨生成、及神經生成分化。為了進行軟骨生成分化，需以較高細胞密度 1-2 \times 10⁵/10 μ l 之細胞用於形成軟骨球體。於所有分化試驗中，每 3 至 4 天更換培養基，且經過 14 天之脂肪生成、成骨生成、軟骨生成分化後將細胞固定以進行組織化學染色。14 天後，於油紅 O 染色 (oil-red O stain) 下可觀察到：細胞內之油滴生成，以及鈣化之細胞外基質之產生，以及 von Kossa 染色為陽性(資料未呈現)。於軟骨分化中，AM-MSCs-CD34⁺細胞於 3 天可形成軟骨球。將 AM-MSCs-CD34⁺細胞以神經生

成分化培養基(Zuk's 方法, P4, 第 21 天)培養可產生神經的型態及表現出神經的標記, 包含巢蛋白(Nestin)、NSE、NFM、NCAM、及 MPA2, 然而 AM-MSCs-CD34⁻細胞則不會表現前述標記(資料未呈現)。

(5) 神經生成分化

步驟 1: 神經球形成: 將細胞以每孔 1000 個細胞之密度培植於神經球培養基(NS 培養基)中。NS 培養基: DMEM/HG/F12 (1:1) + 1× B27 + 20 ng/ml EGF + 20 ng/ml FGF2 + 2 µg/ml 肝素(Heparin)。活體外第七天, 計算大於 75 µm 之初代神經球(主要選擇為漂浮的神經球)之數量。步驟 2: 神經分化試驗: 以胰蛋白酶-EDTA 溶液將神經球分離成單細胞, 並以 DMEM/F12 + 5% FBS 培養該等細胞 24 小時。將該等細胞以特定的神經細胞分化培養基處理。用於神經分化之培養基為添加 2% FBS、10 ng/ml PDGF、50 ng/ml BDNF、及 50 ng/ml GDNF 之 DMEM/F12。第三 A 圖為以 CD34 分選之 MSCs 進行神經的及寡樹突細胞分化之示意圖。第三 B 圖為以 CD34 分選之 MSCs 進行多巴胺神經元分化之示意圖。

經 7 至 9 天後, 藉由使用免疫螢光染色(GFAP 結合 FITC、Hochest 33258、及 TuJ1 結合羅丹明(rhodamine))以評估分化之能力。待初代神經球形成後, CD34⁺及 CD34⁻ AM-MSCs 皆會表現 TuJ1(神經元專一的標記)。然而, CD34⁺ AM-MSCs 誘發之神經元的 GFAP(神經膠細胞專一的標記)表現則幾乎不可見。另一方面, 部分 CD34⁻ AM-MSCs 所誘發之神經元會表現 GFAP, 此暗示一部分受誘導 CD34⁻ AM-MSCs 細胞分化為神經元, 而其中一部分則分化為神經膠細胞。於 B27 誘導中, CD34⁺ AM-MSCs 會表現 Galc 及 TuJ1, 但不會表現 GFAP。至於多巴胺神經元分化方面, 藉由免疫螢光染色偵測, CD34⁺ AM-MSCs 誘發之神經元為 TuJ1、TH 及 MAP2 陽性, 而僅有一小部分之 CD34⁻ AM-MSCs 所誘發之神經元也會表現該等標記(第四圖)。

(6) 結論

CD34⁺ AM-MSCs 表現早期基因，且顯示其具有多能性之分化潛能。下表 2 提供了 CD34⁺ AM-MSc 之特定基因表現情形。

表 2. CD34⁺ AM-MSCs 之基因表現摘要

CD34 ⁺ AM-MSCs							
早期基因		外胚層 (神經生成分化)		中胚層 (心肌生成分化)		內胚層 (肝分化)	
Sox-2	+	巢蛋白 (Nestin)	+	MyoD	+	白蛋白	+
Oct-4	+	NSE	+	GATA-4	+	HGF	+
Rex-1	+	NFM	+	MLC-2a	+	—	—
Nanog	+	NCAM	+	—	—	—	—
—	—	MAP2	+	—	—	—	—

實施例 3：富集自其他體細胞組織之 EnMSCs-CD34⁺細胞、GMSCs-CD34⁺細胞及 CD34⁺ MSCs

初代子宮內膜及齒齦組織，係從台北醫學醫院及 Dr. Wells 牙醫診所之捐贈者中，依據 IRB 規範所收集而來。EnMSCs 及 GMSCs 分別從子宮內膜及齒齦組織中，藉由前述實施例 1 中之相似方法取得。EnMSCs 及 GMSCs 接著進行 CD34 分選。

以 CD34 分選之人類子宮內膜衍生的間葉幹細胞(P5)之相位差影像，如第五圖所示。EnMSCs-CD34⁺細胞之型態與 AM-MSCs-CD34⁺十分相似。再者，如下表 3 所提供者，顯示 AM-MSCs-CD34⁺細胞、EnMSCs-CD34⁺細胞及 GMSCs-CD34⁺細胞皆具有相同一致之細胞表面標記表現曲線。具體而言，本發明之間葉共同先驅細胞(MCPCs)為 CD14⁺、CD34⁺、Nestin⁺、CD117⁺、CD133⁺ (AC133⁺)、SSEA3⁺及 SSEA4⁺。再者，本發明之 MCPCs 亦具有 CD44⁺、CD54⁺、CD105⁺、CD146⁺或 PDGFR⁺之特徵。

表 3. MCPCs 及 CD34⁻ MSCs 之細胞表面標記表現

FACS 標記表現百分比：-：0~20%、+：20~40%、++：40~80%、+++：80~100%。

	AM-MSCs (P4)		EnMSCs (P4)		GMSCs (P4)	
	CD34+	CD34-	CD34+	CD34-	CD34+	CD34-
CD29	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CD44	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CD73	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CD90	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CD105	+++	+++	+++	+++	+++	+++
EGFR	+++	+++	+++	+++	+++	+++
黏素 $\alpha 2\beta 1$ (Integrin $\alpha 2\beta 1$)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
E-鈣黏素 (E-cadherin)	-	-	-	-	-	-
CD34	+++	-	+++	-	+++	-
CD54	+++	+	+++	+	+++	+
PDGFR	++	+	++	+	++	+
巢蛋白 (Nestin)	+++	+	+++	+	+++	+
CD14	+++	-	+++	-	+++	-
CD117	+++	-	+++	-	+++	-

AC133	+++	-	+++	-	+++	-
CD146	+++	-	+++	-	+++	-

MCPCs 及 CD34⁻ MSCs 於細胞型態及細胞倍增時間上的比較，如下表 4 所示。

表 4. 細胞型態及細胞倍增時間之比較

	細胞型態	細胞倍增時間
AM-MSC (CD34+/CD34-)	CD34+：較短小 CD34-：較長且纖細	CD34+：34 小時 CD34-：42 小時
EnMSC (CD34+/CD34-)	CD34+：較短小 CD34-：較長且纖細	CD34+：33 小時 CD34-：47 小時
GMSC (CD34+/CD34-)	CD34+：較短小 CD34-：較長且纖細	CD34+：32 小時 CD34-：45 小時

MCPCs 及 CD34⁻ MSCs 於內皮分化及軟骨生成分化之潛能，如下表 5 所示。

表 5 內皮分化及軟骨生成分化之潛能

	內皮分化	軟骨生成分化
AM-MSCs (CD34+/CD34-)	CD34+：CD31+、KDR+、 較多管束形成。 CD34-：CD31+、KDR+、 較少管束形成。	CD34+：較大之軟骨 球(直徑> 2×)。 CD34-：較小之軟骨 球(直徑< 100 μm)。
EnMSCs (CD34+/CD34-)	CD34+：CD31+、KDR+、 較多管束形成。 CD34-：CD31+、KDR+、 較少管束形成。	CD34+：較大之軟骨 球(直徑 > 2×)。 CD34-：較小之軟骨 球(直徑< 100 μm)。

GMSCs (CD34+/CD34-)	CD34+ : CD31+、KDR+、 較多管束形成。	CD34+ : 較大之軟骨球(直徑 > 2×)。
	CD34- : CD31+、KDR+、 較少管束形成。	CD34- : 較小之軟骨球(直徑 < 100 μm)。

MCPCs 及 CD34⁻ MSCs 之胚胎基因表現的比較，如下表 6 所示。相較 CD34⁻ MSCs，本發明之 MCPCs 具有較高之胚胎基因表現。

表 6 胚胎基因表現比較

	早期基因偵測
AM-MSCs (CD34+/CD34-)	CD34+ : Sox-2 +++, Oct-4 +++, Rex-1 +++, Nanog +++ CD34- : Sox-2 +++, Oct-4 ++, Rex-1 ++, Nanog ++
EnMSCs (CD34+/CD34-)	CD34+ : Sox-2 +++, Oct-4 +++, Rex-1 +++, Nanog +++ CD34- : Sox-2 +++, Oct-4 ++, Rex-1 +++, Nanog ++
GMSCs (CD34+/CD34-)	CD34+ : Sox-2 +++, Oct-4 +++, Rex-1 +++, Nanog +++ CD34- : Sox-2 +++, Oct-4 ++, Rex-1 ++, Nanog ++

MCPCs 及 CD34⁻ MSCs 之神經生成分化及心肌生成分化潛能，如下表 7 所示。EnMSCs 之心肌生成標記的免疫螢光染色影像，如第六圖所示。

表 7. 神經生成分化及心肌生成分化之潛能

	神經生成分化	心肌生成分化
AM-MSCs (CD34+/CD34-)	CD34+ : Nestin+ 、 TuJ1+、GFAP-、 <u>典型</u> <u>神經元形成</u> 。 CD34- : Nestin+ 、 TuJ1(less+)、GFAP-	CD34+:肌凝蛋白重鏈 +、肌鈣蛋白 T+。 CD34-:肌凝蛋白重鏈 +、肌鈣蛋白 T-。
EnMSCs (CD34+/CD34-)	CD34+ : Nestin+ 、 TuJ1+、GFAP-、 <u>類神</u> <u>經球結構</u> 。 CD34- : Nestin+ 、 TuJ1+、GFAP-	CD34+:肌凝蛋白重鏈 +、肌鈣蛋白 T+。 CD34-:肌凝蛋白重鏈 +、肌鈣蛋白 T-。
GMSC (CD34+/CD34-)	CD34+ : Nestin+ 、 TuJ1+、GFAP-、 <u>類神</u> <u>經球結構</u> 。 CD34- : Nestin+ 、 TuJ1+、GFAP-	CD34+:肌凝蛋白重鏈 +、肌鈣蛋白 T+。 CD34-:肌凝蛋白重鏈 +、肌鈣蛋白 T-。

根據本發明之方法，CD34⁺ MSCs 可從許多其他體細胞組織中富集。一般而言，僅有 2-3% 之 MSCs 為 CD34⁺。經過分離及富集化之培養，CD34⁺ MSCs 之百分比介於 15% 至 78% 間，此取決於該等細胞是從何種組織所分離，以及其捐贈者(參閱下表 8)。該培養富集之 CD34⁺ MSCs 可以 FACS 細胞分選以進一步富集，以取得一 MSCs 群，其為含有 99% 或更高富集化的 CD34⁺ MSCs。

表 8. 人類組織之 MSCs 的幹/先驅標記及基因表現的富集

化

標記 組織	% 富集化 % CD34 ⁺ MSCs 於培養中富集
新生兒之胎盤	40 ~ 70 (~55)
羊膜	48 ~ 53 (~50)
絨毛膜	40 ~ 62 (~51)
臍帶	34 ~ 45 (~40)
成熟的體細胞	20 ~ 78 (~50)
子宮內膜	45 ~ 78 (~61)
齒齦	27 ~ 35 (~31)
骨髓	20 ~ 30 (~25)
脂肪	15 ~ 30 (~23)

實施例 4：MCPCs 做為供養細胞

使用本發明之 MCPCs 製備一基質供養物，用以增殖造血幹細胞(HSCs)。將基質細胞(MS-5、或 MSCs)培養於培養盤上，並待其長滿以成為供養物。將 $2\sim 4 \times 10^4$ CD34⁺單核細胞(MNCs)與供養物共同培養於 1 ml 之 HSC 培養基中(X-VIVO10 + 50 ng/ml SCF + 50 ng/ml Flt-3L + (20 ng/ml)10U/ml TPO + 10 ng/ml IL-6)。經過 7 天或 14 天後，計算懸浮細胞，並進行流式細胞儀分析(針對 CD34+CD38-、CD34+CD133+、CD34+CXCR4+等)。

結果顯示於第七圖中，相較於鼠的 MS-5 供養物或 MSCs-CD34⁻供養物，當與 MCPCs(AM-MSCs-CD34⁺細胞)供養物一同培養時，可獲得更多移植的 CD34+CD38-未分化之 HSCs。

雖然本發明以上述具體實施例闡述，但該等具體實施例並非用以侷限本發明。對於該領域具有通常技藝者十分清晰明瞭

的是，可針對本發明架構做之不同修飾及變化而不背離本發明之範疇及精神。根據上述，意指本發明涵蓋對於本發明之修飾及變化，當該些修飾及變化落入後述的申請專利範圍及其同等物之範圍。

【圖式簡單說明】

本發明之發明內容以及實施方式，於閱讀時可搭配所附之圖示以更佳明瞭。

第一圖顯示人類胎盤羊膜間葉細胞之細胞型態。第一 A 圖為 AM-MSCs-CD34⁺細胞之相位差影像。第一 B 圖為 AM-MSCs-CD34⁻細胞之相位差影像。

第二圖顯示 AM-MSCs-CD34⁺及 AM-MSCs-CD34⁻細胞之細胞表面標記的圖譜；其中第二 A 圖顯示 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD31、CD56、EGFR 及 PDGFR 之表現；以及第二 B 圖顯示 CD34、CD117、CD133、SSEA1、SSEA3、SSEA4、GloboH 及 CD201 之表現。

第三 A 圖提供以 CD34 分選之 MSCs 進行神經的及寡樹突細胞分化之示意圖。

第三 B 圖提供以 CD34 分選之 MSCs 進行多巴胺神經元分化之示意圖。

第四圖顯示，於多巴胺神經元誘導後，CD34⁺或 CD34⁻ AM-MSc 之 TuJ1、TH 及 MAP2 表現狀況；其中第四 A 圖提供 CD34⁺ AM-MSc 誘導的神經元之 TuJ1 (上圖)、GFAP (中圖) 及 DAPI (下圖) 之免疫螢光染色影像；第四 B 圖提供 CD34⁻ AM-MSc 誘導的神經元之 TuJ1 (上圖)、GFAP (中圖) 及 DAPI (下圖) 之免疫螢光染色影像；第四 C 圖提供 CD34⁺ AM-MSc 誘導的神經元之 TH (上圖)、MAP2 (中圖) 及 DAPI (下圖) 之免疫螢光染色影像；以及第四 D 圖提供 CD34⁻ AM-MSc 誘導的神經元之 TH (上圖)、MAP2 (中圖) 及 DAPI (下圖) 之免疫螢光染色影像。

第五圖顯示人類子宮內膜間葉細胞之細胞型態；其中第五 A 圖為 EnMSCs-CD34⁺細胞之相位差影像；以及第五 B 圖為 EnMSCs-CD34⁻細胞之相位差影像。

第六圖顯示 EnMSCs-CD34⁺之心肌生成分化潛能；其中第六 A 圖提供，CD34⁺ EnMSCs 經心肌生成誘導後之肌鈣蛋白 T (上圖)、肌凝蛋白重鏈 (MHC) (中圖)及 DAPI (下圖)免疫螢光染色影像；以及第六 B 圖提供，CD34⁻ EnMSCs 經心肌生成誘導後之肌鈣蛋白 T (上圖)、肌凝蛋白重鏈 (MHC) (中圖)及 DAPI (下圖)免疫螢光染色影像。

第七圖顯示，當與老鼠之 MS-5 供養物、MSCs-CD34⁺供養物或 MSCs-CD34⁻供養物一同培養時，帶有特定表面標記之增殖的造血幹細胞(HSCs)數目。

【主要元件符號說明】

無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 100137771

※申請日： 100.10.18 ※IPC 分類： C12N 5/077(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

人類多能性類胚胎幹細胞先驅細胞

HUMAN MULTIPOTENT EMBRYONIC STEM CELL-LIKE
PROGENITOR CELLS

二、中文發明摘要：

本發明提供類胚胎幹細胞先驅細胞群，該細胞群係藉由系統性篩選人類間葉基質幹／先驅細胞從人類組織中分離，並藉由細胞抗原進行細胞分選，該細胞抗原係選自由 CD34、CD117、CD133、CD201 及 GloboH 所組成之群組，以及將該分選之細胞培養於添加至少一或多種類固醇及一或多種生長因子之培養基中。本發明之細胞會表現 CD34 並於初代具有球狀細胞聚落生成，且會表現多能性類胚胎幹細胞 (ESCs) 之特徵。

三、英文發明摘要：

The invention provides a plurality of embryonic stem cell-like progenitor cells, which are isolated from a human tissue by a systemic screening of human mesenchymal stromal stem/progenitor cells and a cell sorting by a cell antigen selected from the group consisting of CD34, CD117, CD133, CD201 and GloboH, and cultured in a medium supplemented with at least one or more steroids and one or more growth factors. The cells of the invention express CD34 and exhibit sphere-like clonogenicity in early passages and express multipotent embryonic stem cells (ESCs) like characteristics.

七、申請專利範圍：

1. 一種富集化之多能性人類間葉共同先驅細胞 (MCPCs) 群，其被鑑別為具有至少以下特徵：CD14⁺、CD34⁺、CD117⁺、CD133⁺ (AC133⁺)、CD201⁺、Nestin⁺、SSEA3⁺、SSEA4⁺ 及 GloboH⁺ 之間葉基質幹／先驅細胞，。
2. 如申請專利範圍第 1 項之富集化之細胞群，其中該 MCPCs 具有下列特徵中至少一者：CD44⁺、CD54⁺、CD56⁺、CD105⁺、CD146⁺ 及 PDGFR⁺。
3. 如申請專利範圍第 1 項之富集化之細胞群，其係從人類體細胞組織分離。
4. 如申請專利範圍第 3 項之富集化之細胞群，其中該人類體細胞組織係選自由羊膜、絨毛膜、臍帶、子宮內膜、齒齦、骨髓及脂肪所組成之群組。
5. 如申請專利範圍第 4 項之富集化之細胞群，其中該人類體細胞組織為羊膜。
6. 如申請專利範圍第 1 項之富集化之多能性人類 MCPCs 群，其具分化成外胚層細胞、中胚層細胞及內胚層細胞之潛力。
7. 如申請專利範圍第 1 項之富集化之多能性人類 MCPCs 群，其具有脂肪生成分化、成骨生成分化、軟骨生成分化、神經生成分化、心肌生成分化、內皮分化及肝分化之潛力。
8. 一種製備如申請專利範圍第 1 項之富集化之細胞群的方法，包含：

藉由系統性篩選人類間葉基質幹／先驅細胞以從人類體細胞組織中分離，接著以選自由 CD34、CD117、CD133、CD201 及 GloboH 所組成群組之細胞抗原進行細胞分選，以及

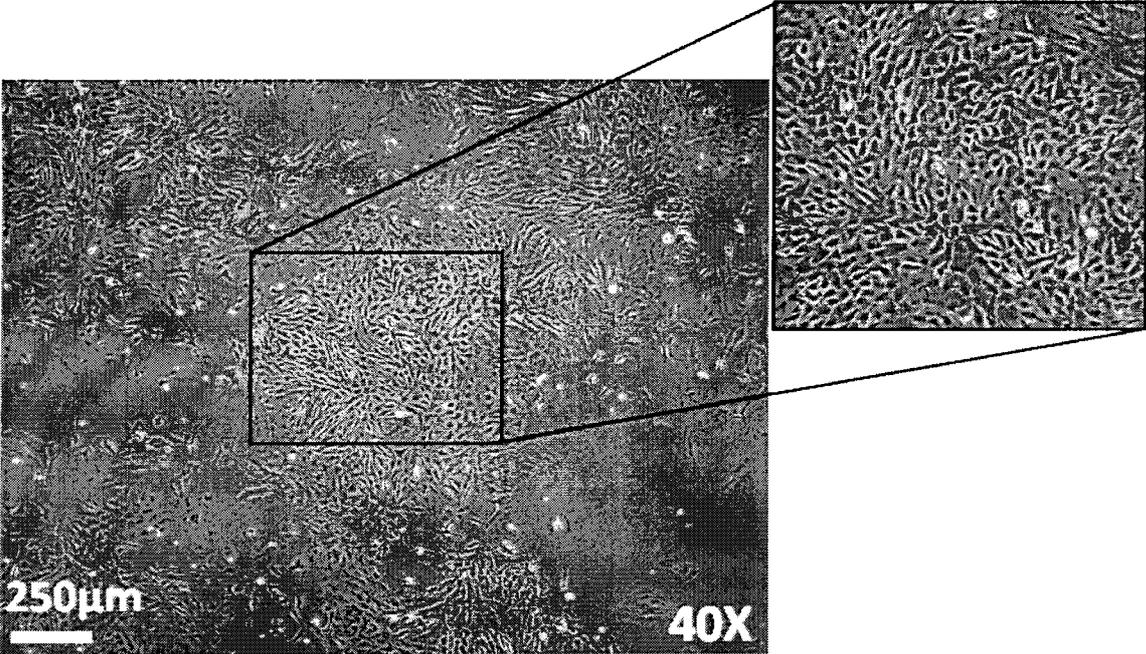
將分選之細胞培養於添加至少一或多種類固醇及一或多種選自由表皮生長因子 (EGF)、纖維母細胞生長因子 (FGF)、類胰島素生長因子 (IGF)、胰島素、血小板衍生長因子 (PDGF)、IL-6、及血小板生成素 (TPO) 所組成

群組之生長因子之培養基中。

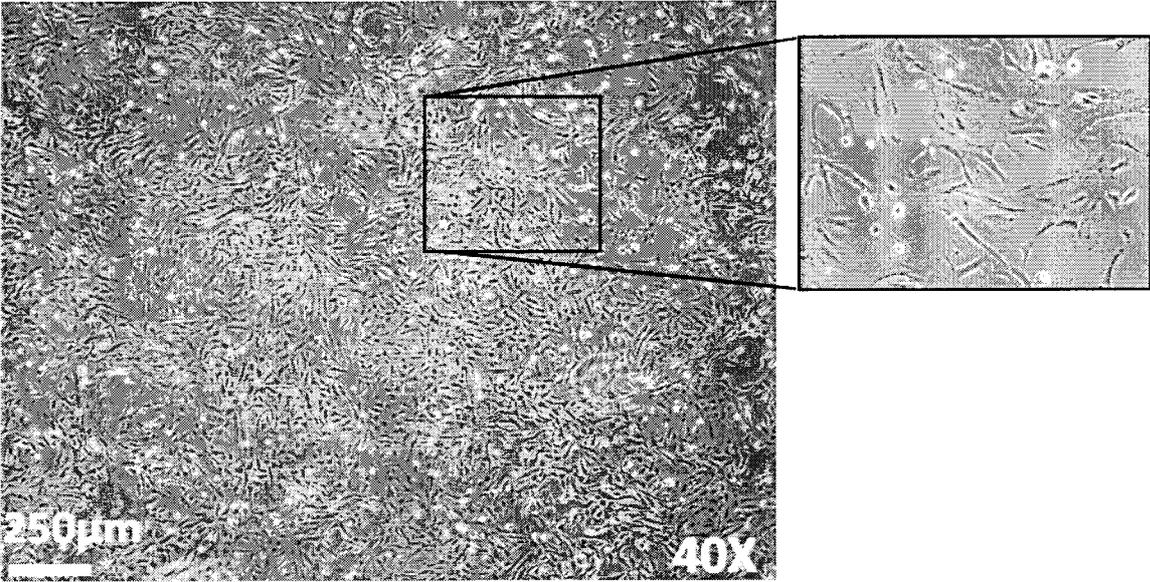
9. 如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該人類體細胞組織係選自由羊膜、絨毛膜、臍帶、子宮內膜、齒齦、骨髓及脂肪所組成之群組。
10. 如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該細胞分選為螢光活化細胞分選 (FACS) 流式細胞法。
11. 一種組合物，其包含包埋於褐藻膠中之如申請專利範圍第 1 項所述之富集化之細胞群。
12. 一種用於幹細胞培養之細胞供養層，其包含如申請專利範圍第 1 項所述之富集化之細胞群。

八、圖式：

(A)

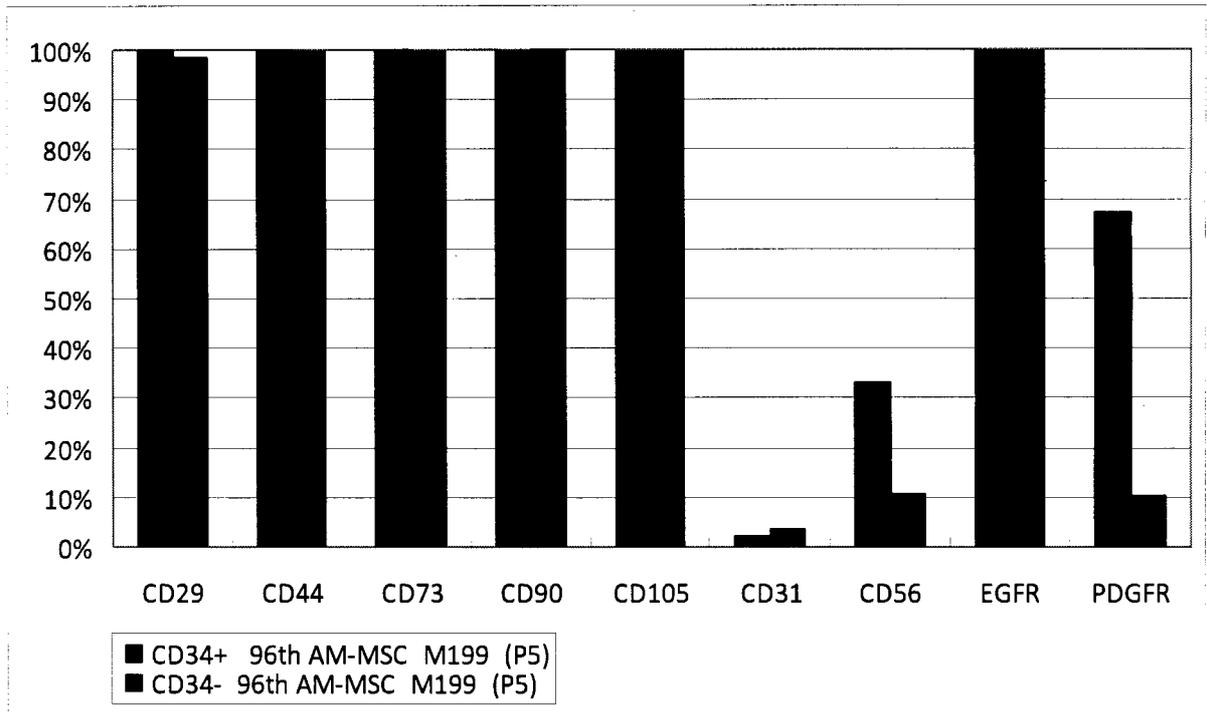


(B)

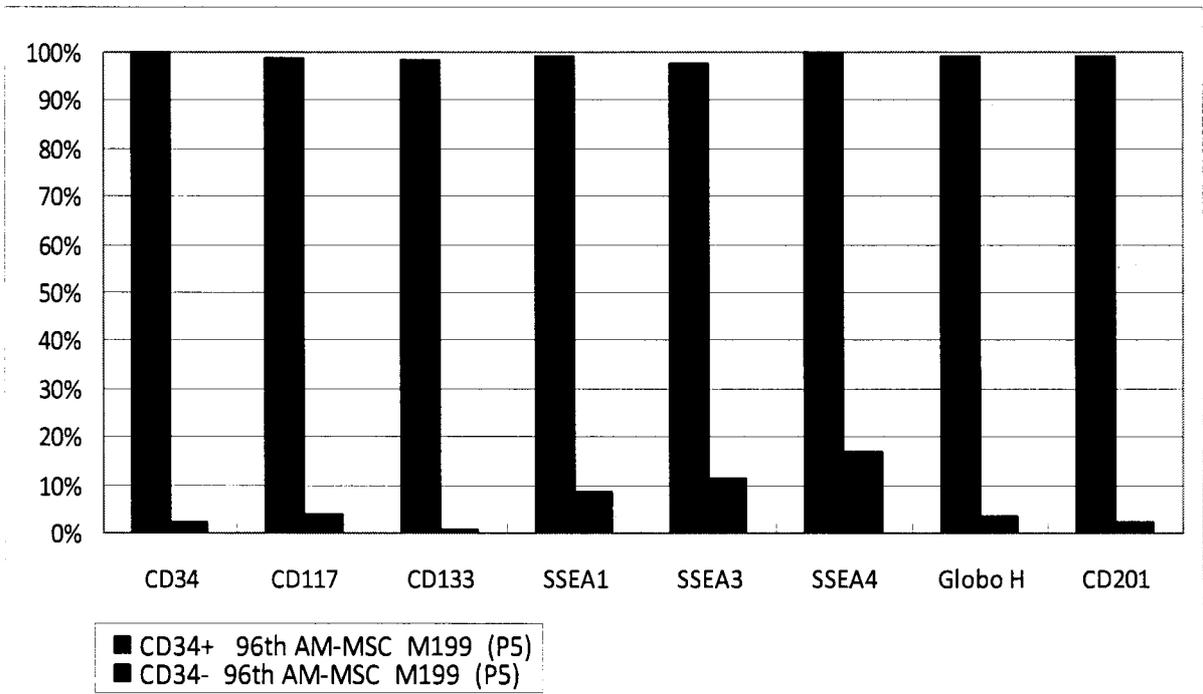


第一圖

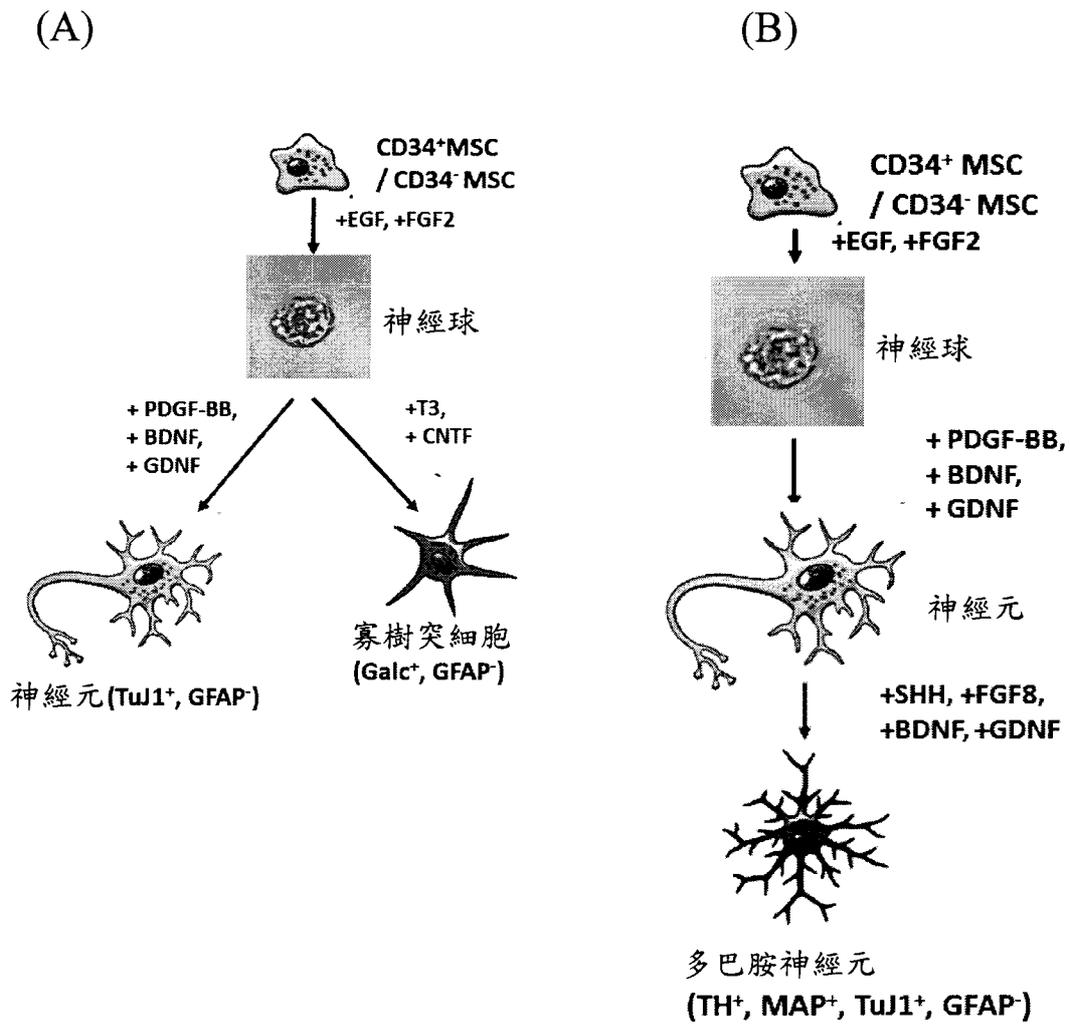
(A)



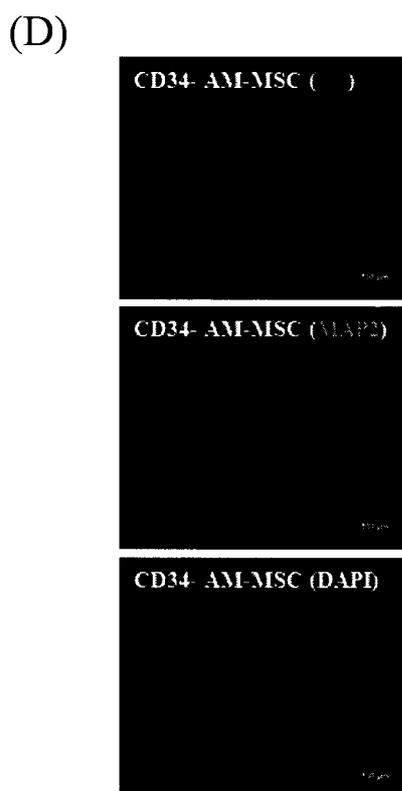
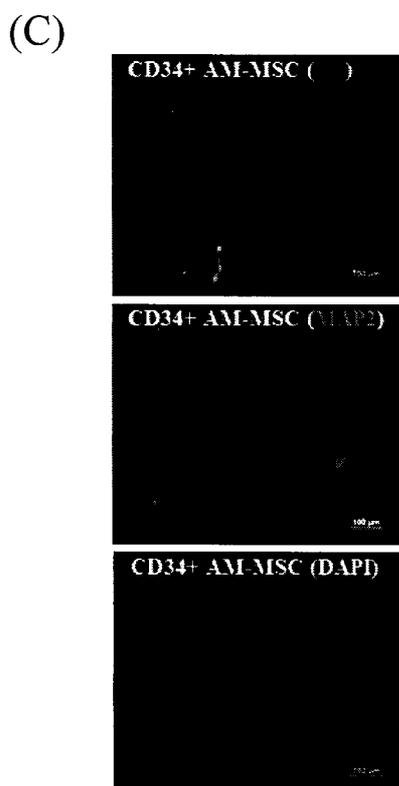
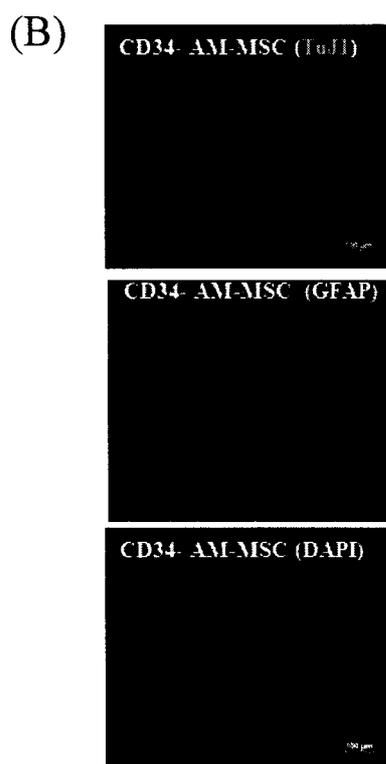
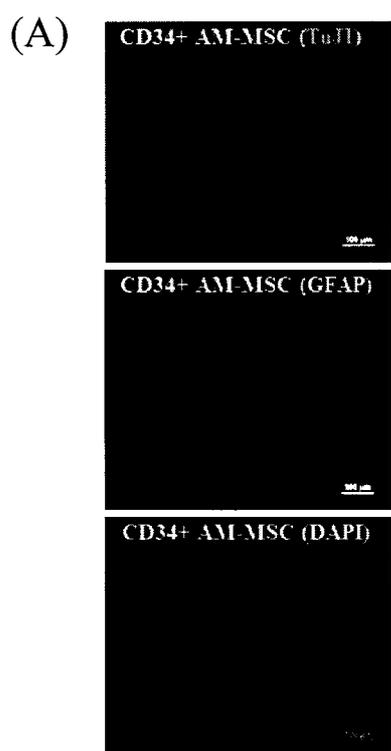
(B)



第二圖

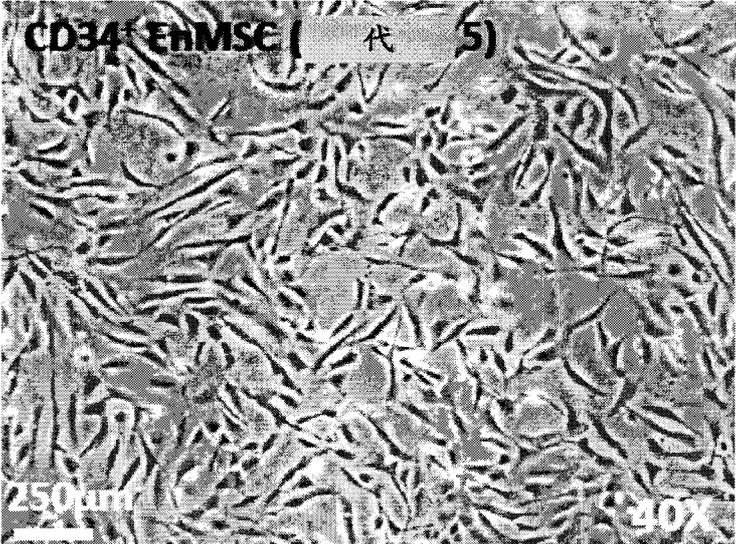


第三圖

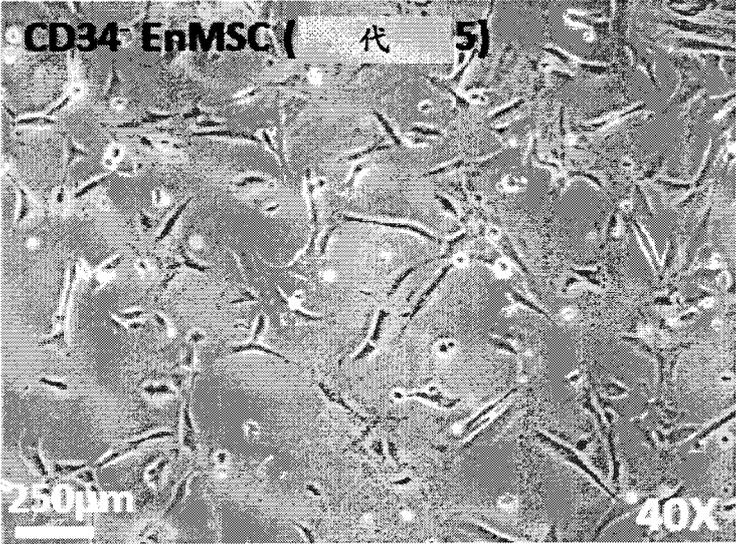


第四圖

(A)

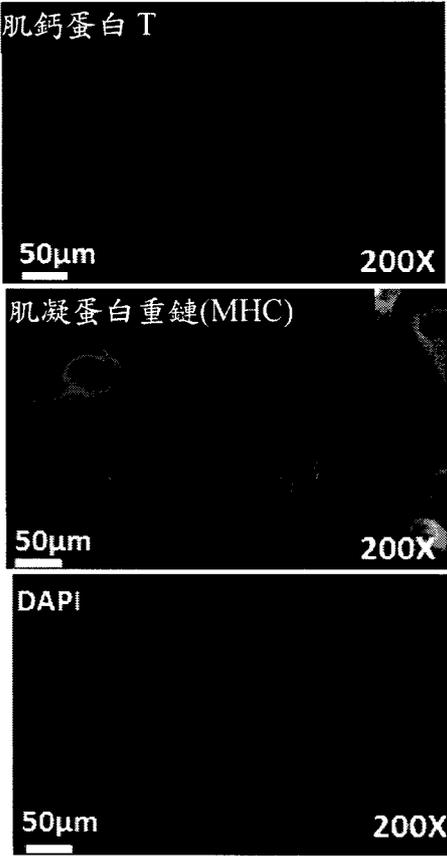


(B)

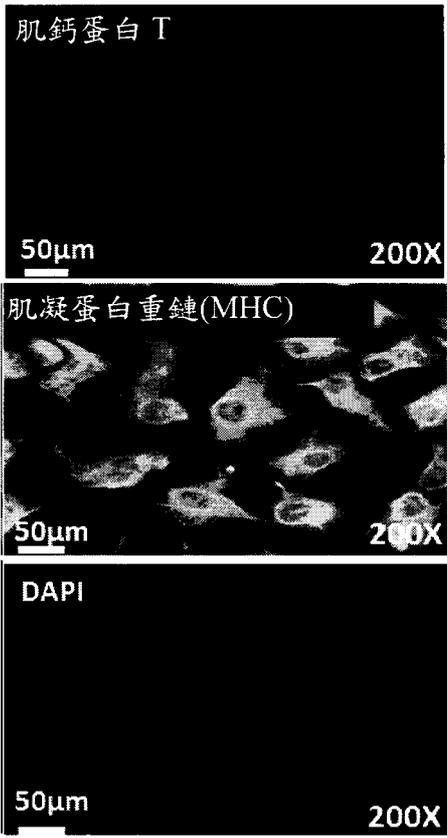


第五圖

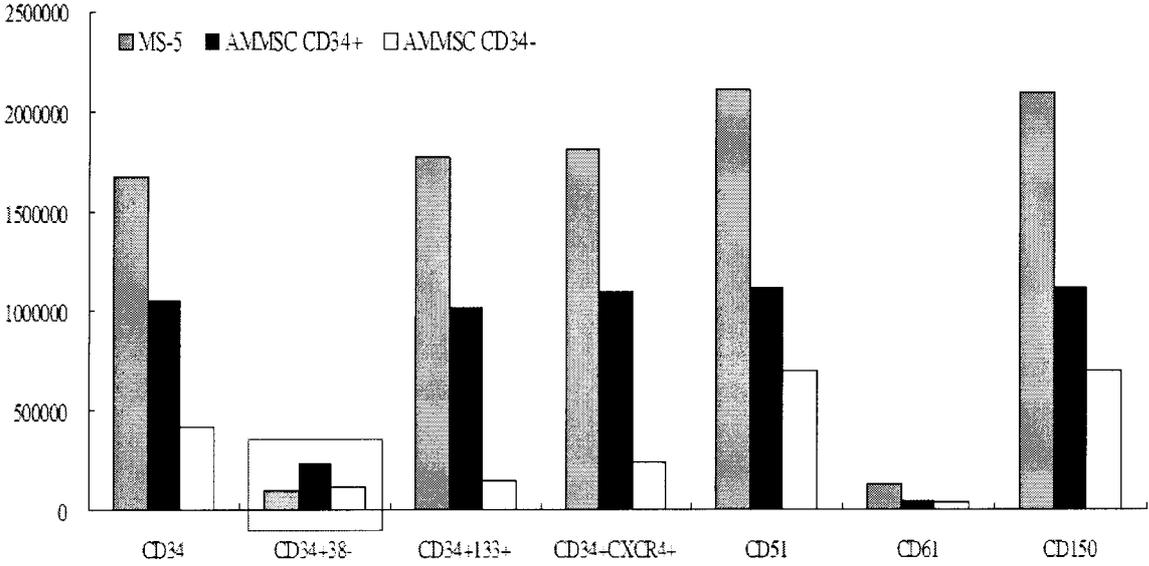
(A)



(B)



第六圖



第七圖

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(二B)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無