



(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 201527534 A

(43)公開日：中華民國 104 (2015) 年 07 月 16 日

(21)申請案號：103144675

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 12 月 19 日

(51)Int. Cl. : C12N5/00 (2006.01)

(30)優先權：2013/12/20 美國

61/918,833

(71)申請人：必需品製藥有限公司 (美國) ESSENTIAL PHARMACETICALS, LLC (US)  
美國

(72)發明人：艾荷菲 亞當 ELHOFY, ADAM (US)；韋伯 亞倫 WEBER, ALLAN (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：46 項 圖式數：4 共 50 頁

(54)名稱

細胞培養基

MEDIA FOR CELL CULTURE

(57)摘要

本發明大體上關於一種培養基，例如血清替代物、培養基補充物、完全培養基或低溫保存培養基，所述培養基包括基礎生理緩衝劑及包括膽固醇、卵磷脂以及脂肪酸的脂質體。預期與不使用本文中所描述的血清替代物培養的細胞相比，培養基提供改良培養中細胞生長的優點。

The present disclosure relates, in general, to a media, e.g., a serum replacement, media supplement, complete media or cryopreservation media, comprising a base physiological buffer and liposomes comprising cholesterol, phosphatidylcholine and fatty acids. It is contemplated that media provides advantages to improve cell growth in culture compared to cells cultured not using the serum replacement described herein.

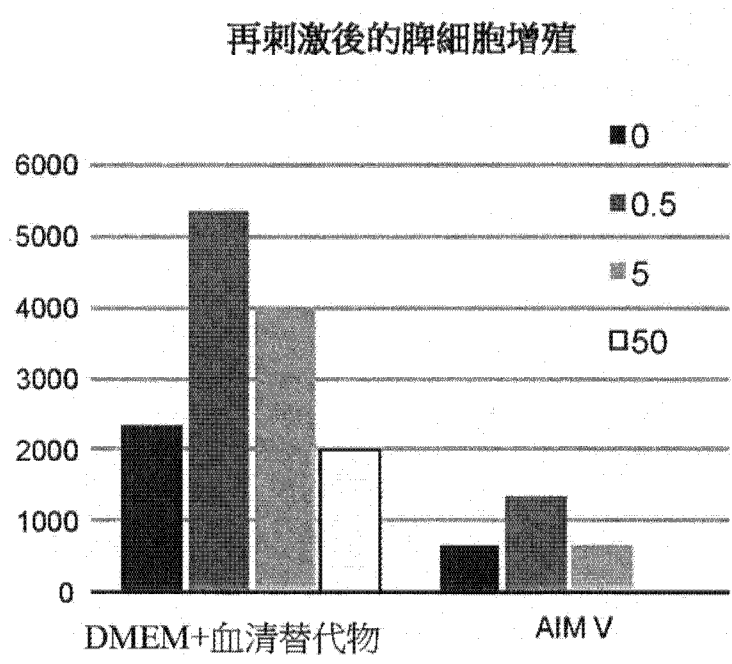


圖 1

## 發明摘要

※ 申請案號：103/44675

※ 申請日：103.12.19

※IPC 分類：C12N 5/00 (2006.01)

## 【發明名稱】

細胞培養基

MEDIA FOR CELL CULTURE

## 【中文】

本發明大體上關於一種培養基，例如血清替代物、培養基補充物、完全培養基或低溫保存培養基，所述培養基包括基礎生理緩衝劑及包括膽固醇、卵磷脂以及脂肪酸的脂質體。預期與不使用本文中所描述的血清替代物培養的細胞相比，培養基提供改良培養中細胞生長的優點。

## 【英文】

The present disclosure relates, in general, to a media, e.g., a serum replacement, media supplement, complete media or cryopreservation media, comprising a base physiological buffer and liposomes comprising cholesterol, phosphatidylcholine and fatty acids. It is contemplated that media provides advantages to improve cell growth in culture compared to cells cultured not using the serum replacement described herein.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】：**第（1）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】：**

無

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：**

無

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】

細胞培養基

MEDIA FOR CELL CULTURE

本申請案主張2013年12月20日申請的美國臨時專利申請案第61/918,833號的優先權，所述臨時專利申請案以全文引用的方式併入本文中。

## 【技術領域】

本發明大體上關於一種細胞培養基組成物，例如血清替代物、完全培養基或培養基補充物，其包括熱力學穩定脂質體及液體基礎混合物以在無血清環境中培養細胞。預期脂質體包括膽固醇及卵磷脂以及脂肪酸。亦預期包括脂質體的低溫保存培養基，其用於在冷凍期間保存細胞。

## 【先前技術】

用於活體外實驗或離體培養以投予人類或動物的細胞(例如哺乳動物細胞或昆蟲細胞)培養為人類疾病研究及治療的一種重要工具。細胞培養廣泛用於生產各種生物活性產品，諸如病毒疫苗、單株抗體、多肽生長因子、激素、酶以及腫瘤特異性抗原。然而，用於培養細胞的許多培養基或方法包括可能對細胞生長及/或未分化細胞培養物的維持具有負面影響的組分。舉例而言，哺乳動物或昆蟲細胞培養基常常補充有來自血液的血清，諸如小牛血清(fetal calf serum；FCS)或胎牛血清(fetal bovine serum；FBS)，以便提供促進細胞在培養物中增殖及生長的生長因子、載體蛋白、附著及擴散因子、養分以及微量

5

元素。然而，在FCS或FBS中發現的因子(諸如轉型生長因子(transforming growth factor; TGF) $\beta$ 或網膜酸)可促進特定細胞類型分化(科(Ke)等人，美國病理學雜誌(Am J Pathol)137:833-43, 1990)或引發細胞中可促進培養物中非所需細胞活性的不希望的下游信號傳導(費爾德霍恩(Veldhoen)等人，自然免疫學(Nat Immunol)7(11): 1151-6, 2006)。

血清組成物的非典型性及血清的批間差異使得無血清培養基中血清替代物及培養物的使用為理想的(佩(Pei)等人，男科學集刊(Arch Androl)49(5):331-42, 2003)。另外，由於在向人體投予時潛在的病毒污染及/或動物蛋白的潛在免疫原性效應，因此對於在細胞培養物中生長的用於治療用途的細胞、重組蛋白或疫苗而言，添加來源於動物的組分為不希望的。

已經研發血清替代物以嘗試最小化FCS對細胞培養的影響，以及最小化用於人類細胞培養的動物蛋白的量。諸如KNOCKOUT™血清替代物(加利福尼亞州卡爾斯巴德的英維羅根(Invitrogen, Carlsbad, CA))的血清替代物稱為化學成分確定的培養基，其缺乏血清且含有用於細胞生長的基本養分及其他蛋白質。由於缺乏附著因子，使得此調配物中細胞附著不充分，因此KNOCKOUT SR™無法用作飼養細胞平板培養中的FBS的替代物。PC-1™無血清培養基(馬里蘭州沃克斯維爾的龍沙(Lonza, Walkersville, MD))為在特殊改質DMEM/F12培養基基礎中調配的低蛋白無血清培養基且含有具有已知量的胰島素、轉鐵蛋白、脂肪酸以及專有蛋白質的完全HEPES緩衝系統。

賽爾格魯 COMPLETE™(弗吉尼亞州馬納薩斯的賽爾格魯(Cellgro, Manassas, VA))為基於DMEM/F12、RPMI 1640以及麥克柯伊氏5A基礎培養基(McCoy's 5A base Medium)混合物的無血清低蛋白培養基。賽爾格魯 COMPLETE™不含胰島素、轉鐵蛋白、膽固醇、生長

或附著因子，但包括微量元素及高分子量碳水化合物、附加維生素、非動物蛋白源以及牛血清白蛋白的混合物。

無血清培養基亦描述於國際專利公開案第WO2009023194號、國際專利公開案第WO2008137641號、國際專利公開案第WO2006017370號、國際專利公開案第WO2001011011號、國際專利公開案第WO2007071389號、國際專利公開案第WO2007016366號、國際專利公開案第WO2006045064號、國際專利公開案第WO2003064598號、國際專利公開案第WO2001011011號；美國專利公開案第US20050037492號、美國專利公開案第US20080113433號、美國專利公開案第US20080299540號；美國專利第4,560,655號、美國專利第5,324,666號、美國專利第6,162,643號、美國專利第6,103,529號、美國專利第6,048,728號、美國專利第7,709,229號以及歐洲專利申請案第EP2243827號中。

美國專利7,220,538描述一種包括親脂性奈米粒子及基礎營養培養基的細胞培養基。

### 【發明內容】

本發明提供一種包括基礎生理緩衝劑液體混合物及包括膽固醇、卵磷脂以及脂肪酸的脂質體的培養基，其可用作血清替代物、完全培養基或培養基補充物。所述培養基適用於促進初生細胞或細胞株在細胞培養物中存活、生長及增殖，其中所述培養基包括具有有助於細胞維持及生長的脂質形態的脂質體。亦預期包括脂質體的低溫保存培養基。

在各種實施例中，本發明提供一種用於懸浮液或貼壁培養物中的細胞的培養基，所述培養基包括：基礎生理緩衝劑液體混合物；及(a)包括膽固醇、卵磷脂以及脂肪酸的脂質體，其中所述脂質體的量使得膽固醇在細胞懸浮液或貼壁培養物中的最終濃度為1毫克/公升至5

20毫克/公升，且其中卵磷脂在細胞懸浮液或貼壁培養物中的最終濃度為100毫克/公升至1000毫克/公升；或(b)果膠；或(a)及(b)。

在各種實施例中，脂質體包括脂質、脂肪酸、固醇及/或游離脂肪酸。例示性脂肪酸包含(但不限於)次亞麻油酸、亞麻油酸、肉豆蔻酸、油酸肉豆蔻油酸、棕櫚油酸、十六碳烯酸、反油酸、異油酸、反亞油酸、 $\alpha$ -次亞麻油酸、二十碳四烯酸、二十碳五烯酸、芥子酸、二十二碳六烯酸、辛酸、癸酸、月桂酸、棕櫚酸、硬脂酸、二十烷酸、二十二烷酸、二十四烷酸以及蠟酸。在各種實施例中，脂質體包括一或多種由次亞麻油酸、亞麻油酸、肉豆蔻酸以及油酸所構成的群組中選出的脂肪酸。

在各種實施例中，脂質體更包括乙醇胺及聚山梨醇酯。在各種實施例中，脂質體包括抗氧化劑。

在各種實施例中，基礎生理緩衝劑液體混合物包括有機鹽、無機鹽、緩衝劑、鐵源或鐵轉運體、甘油、胺基酸、維生素、糖以及微量元素中的一或多者。視需要，基礎生理緩衝劑液體混合物包括抗氧化劑。

在各種實施例中，鐵源或鐵轉運體是由以下各者所構成的群組中選出：轉鐵蛋白、乳鐵蛋白、硫酸亞鐵、檸檬酸亞鐵、檸檬酸鐵、硝酸鐵、硫酸鐵、檸檬酸鐵銨、草酸鐵銨、反丁烯二酸鐵銨、蘋果酸鐵銨以及丁二酸鐵銨。

在各種實施例中，基礎生理緩衝劑液體混合物包括一或多種由以下各者所構成的群組中選出的胺基酸：甘胺酸、L-丙胺酸、L-精胺酸、L-天冬醯胺、L-天冬胺酸、L-瓜胺酸、鹽酸L-半胱胺酸、L-胱胺酸、L-麩胺酸、L-麩醯胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-白胺酸、L-離胺酸、L-甲硫胺酸、L-鳥胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸以及L-纈胺酸。

在各種實施例中，基礎生理緩衝劑液體混合物包括一或多種由以下各者所構成的群組中選出的有機鹽或無機鹽：磷酸鉀、氯化鈣(無水)、硫酸銅、硝酸鐵、硫酸鐵、氯化鎂(無水)、硫酸鎂(無水)、氯化鉀、氯化鈉、無水磷酸氫二鈉、磷酸二氫鈉、氯化錫、硫酸鋅以及碳酸氫鈉。

在各種實施例中，脂質體或基礎生理緩衝劑液體混合物包括一或多種抗氧化劑。例示性抗氧化劑包含(但不限於)生育酚、生育三烯酚、 $\alpha$ -生育酚、 $\beta$ -生育酚、 $\gamma$ -生育酚、 $\delta$ -生育酚、 $\alpha$ -生育三烯酚、 $\beta$ -生育三烯酚、 $\alpha$ -生育醌、水溶性維生素E(6-羥基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-甲酸)、丁基化羥基甲氧苯(butylated hydroxyanisole; BHA)、丁基化羥基甲苯(butylated hydroxytoluene; BHT)、類黃酮、異黃酮、番茄紅素、 $\beta$ -胡蘿蔔素、硒、泛醌、梅毒菌素、S-腺苷甲硫胺酸、麩胱甘肽、牛磺酸、N-乙醯半胱胺酸、檸檬酸、L-肉鹼、BHT、單硫代甘油、抗壞血酸、沒食子酸丙酯、甲硫胺酸、半胱胺酸、高半胱胺酸、麩胱甘肽、胱胺及胱硫醚(cysstathionine)以及甘胺酸-甘胺酸-組胺酸(三肽)。

在各種實施例中，基礎生理緩衝劑液體混合物包括一或多種由以下各者所構成的群組中選出的維生素：生物素、氯化膽鹼、D-泛酸鈣、葉酸、菸鹼醯胺、鹽酸吡哆醇、雙黃素(bioflavin)、鹽酸硫胺、維生素B12以及異肌醇。

在各種實施例中，基礎生理緩衝劑液體混合物包括一或多種由以下各者所構成的群組中選出的微量元素：硒、鉬酸鹽、鉻、鈷、鎳、鋅、銅、錳、鋇、鎂、鋁、錫、鈦、溴、碘、鈣、鎳、鉍、鈾、鈾、鐵、氟、銀、銻、鎘、鎘以及鋁。在各種實施例中，液體混合物包括硒及鉬酸鹽。

在各種實施例中，培養基為血清替代物、完全培養基、培養基

補充物或低溫保存培養基。

在各種實施例中，用於細胞培養的血清替代物、完全培養基或培養基補充物包括脂質體及基礎生理緩衝劑液體混合物。視需要，完全培養基或培養基補充物包括果膠。在各種實施例中，血清替代物、完全培養基或培養基補充物更包括基礎生理緩衝劑液體混合物，其包括一或多種有機鹽或無機鹽、鐵供體，且視需要包括果膠、甘油、胺基酸、維生素、糖、有機鹽、無機鹽以及微量元素。

在各種實施例中，本發明亦提供包括脂質體及基礎生理緩衝劑液體混合物的血清替代物、完全培養基或培養基補充物，其中脂質體包括卵磷脂、乙醇胺、次亞麻油酸、亞麻油酸、膽固醇以及聚山梨醇酯，且基礎液體混合物包括至少一種有機鹽或無機鹽、至少一種糖、甘油、至少一種微量元素、至少一種非離子界面活性劑以及至少一種鐵源。在各種實施例中，脂質體或基礎液體混合物包括至少一種抗氧化劑。

在各種實施例中，對於本文中所描述的血清替代物、完全培養基或培養基補充物，脂質體的量使得膽固醇在細胞懸浮液或貼壁培養物中的最終濃度為1毫克/公升至20毫克/公升，且其中卵磷脂在細胞懸浮液或貼壁培養物中的最終濃度為100毫克/公升至1000毫克/公升。

在各種實施例中，脂質體包括一或多種由次亞麻油酸、亞麻油酸、肉豆蔻酸以及油酸所構成的群組中選出的脂肪酸。預期的額外脂肪酸包含(但不限於)肉豆蔻油酸、棕櫚油酸、十六碳烯酸、反油酸、異油酸、反亞油酸、 $\alpha$ -次亞麻油酸、二十碳四烯酸、二十碳五烯酸、芥子酸、二十二碳六烯酸、辛酸、癸酸、月桂酸、棕櫚酸、硬脂酸、二十烷酸、二十二烷酸、二十四烷酸以及蠟酸。

在各種實施例中，脂質體更包括乙醇胺。在各種實施例中，脂質體更包括聚山梨醇酯。預期聚山梨醇酯可為聚山梨醇酯20、聚山梨

醇酯 40、聚山梨醇酯 60 或聚山梨醇酯 80。例示性聚山梨醇酯包含 TWEEN<sup>®</sup> 20 及 TWEEN<sup>®</sup> 80。

在各種實施例中，一或多種有機鹽或無機鹽是由以下各者所構成的群組中選出：磷酸鉀、氯化鈣(無水)、硫酸銅、硝酸鐵、硫酸鐵、氯化鎂(無水)、硫酸鎂(無水)、氯化鉀、氯化鈉、無水磷酸氫二鈉、磷酸二氫鈉、氯化錫、硫酸鋅以及碳酸氫鈉。在各種實施例中，液體混合物包括氯化鈉、氯化鉀、磷酸鈉以及磷酸鉀。

在各種實施例中，培養基更包括鐵源或鐵轉運體。在各種實施例中，鐵源或鐵轉運體是由以下各者所構成的群組中選出：轉鐵蛋白、乳鐵蛋白、硫酸亞鐵、檸檬酸亞鐵、檸檬酸鐵、硝酸鐵、硫酸鐵、檸檬酸鐵銨、草酸鐵銨、反丁烯二酸鐵銨、蘋果酸鐵銨以及丁二酸鐵銨。在各種實施例中，鐵源為檸檬酸鐵。在各種實施例中，鐵轉運體為轉鐵蛋白。

在各種實施例中，血清替代物更包括銅源或銅轉運體(例如 GHK-Cu)。例示性銅源包含(但不限於)氯化銅及硫酸銅。

在各種實施例中，液體混合物包括一或多種由普洛尼克-68(Pluronic-68；F68 佩斯蒂爾(F68 Pastille))、普洛尼克-128、去水山梨醇、聚山梨醇酯以及嵌段共聚物所構成的群組中選出的非離子界面活性劑。在各種實施例中，非離子界面活性劑為普洛尼克-68(F68 佩斯蒂爾)。

在各種實施例中，每公升培養基提供甘油在細胞培養物(例如細胞懸浮液或貼壁培養物)中的最終濃度為約 2 微升/公升至 0.5 毫升/公升。

在各種實施例中，培養基提供果膠在細胞培養物(例如細胞懸浮液或貼壁培養物)中的最終濃度為約 0.25 公克/公升至 0.5 公克/公升，或 25 毫克/公升至 500 毫克/公升。

在各種實施例中，培養基提供硒在細胞培養物(例如細胞懸浮液或貼壁培養物)中的最終濃度為約0.005毫克/公升至0.050毫克/公升。

在各種實施例中，亦預期血清替代物，其中來自脂質體的膽固醇在血清替代物中的最終濃度為約10毫克/公升至200毫克/公升，且來自脂質體的卵磷脂在血清替代物中的最終濃度為約50毫克/公升至1公克/公升，或約1000毫克/公升至10公克/公升。

在各種實施例中，本發明提供一種完全培養基，其中來自脂質體的膽固醇在完全培養基中的濃度為約1毫克/公升至20毫克/公升，且來自脂質體的卵磷脂在完全培養基中的濃度為約100毫克/公升至1000毫克/公升。

在各種實施例中，本發明提供一種培養基補充物，其中來自脂質體的膽固醇在培養基補充物中的濃度為約100毫克/公升至2000毫克/公升或大於2000毫克/公升，且來自脂質體的卵磷脂在培養基補充物中的濃度為約10公克/公升至100公克/公升。

在各種實施例中，本發明提供一種低溫保存培養基，其中來自脂質體的膽固醇在低溫保存培養基中的最終濃度為約10毫克/公升至200毫克/公升，且來自脂質體的卵磷脂在低溫保存培養基中的最終濃度為約1000毫克/公升至10公克/公升。

在各種實施例中，脂質體為奈米粒子。在各種實施例中，奈米粒子具有範圍為約50奈米至500奈米，約100奈米至約300奈米或約100奈米至200奈米的平均直徑。

本文提供脂質體為熱力學穩定的。在各種實施例中，脂質體在水溶液中為穩定的(例如不沈澱)。在各種實施例中，脂質體在水溶液中在37°C、25°C、4°C、0°C或-20°C下穩定至少7天、10天、14天、21天、30天、2個月、3個月、6個月或1年或大於1年的時間段。例示性水溶液包含(但不限於)水、緩衝生理鹽水及其他平衡鹽溶液、基礎細



胞培養基以及完全細胞培養基。

本文亦提供一種細胞低溫保存培養基，其包括脂質體、基礎生理緩衝劑液體混合物以及視情況存在的果膠。

本文亦預期一種細胞低溫保存培養基，其包括基礎生理緩衝劑液體混合物及果膠。

在各種實施例中，在低溫保存培養基中，果膠在細胞懸浮液中的最終濃度為約0.25公克/公升至5公克/公升，或250毫克/公升至5000毫克/公升或約50毫克/公升至5公克/公升。

在各種實施例中，本文中所描述的低溫保存培養基更包括甘油。在各種實施例中，當使用低溫保存培養基時，甘油在細胞懸浮液中的最終濃度為約0.2毫升/公升至5毫升/公升。

在各種實施例中，低溫保存培養基更包括脂質體，其中脂質體包括膽固醇、卵磷脂以及脂肪酸，其中脂質體的量使得膽固醇在細胞懸浮液中的最終濃度為約10毫克/公升至200毫克/公升，且其中卵磷脂在細胞懸浮液中的最終濃度為約1公克/公升至10公克/公升。

在各種實施例中，低溫保存培養基更包括二甲亞砜(dimethyl sulfoxide; DMSO)，其中DMSO在低溫保存培養基中的濃度小於或等於4%。在各種實施例中，DMSO的濃度為4%、3%、2%、1%或0.5%。

在各種實施例中，低溫保存培養基更包括聚離胺酸。在各種實施例中，聚離胺酸為改質聚離胺酸。在各種實施例中，聚離胺酸為 $\epsilon$ -聚-L-離胺酸。在某些實施例中，聚離胺酸包括羧化胺基。在各種實施例中，聚離胺酸的最終濃度為約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或0.5%。

在各種實施例中，在添加至細胞培養物前，將血清替代物或培養基補充物添加至基礎培養基。標準基礎培養基在本領域中已知且可

購得。此類培養基的實例包含(但不限於)杜爾貝科氏改質伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; DMEM)、DMEM F12、伊斯寇氏改質達爾伯克培養基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)、漢姆氏養分混合物F-10(Ham's Nutrient mixture F-10)(漢姆氏F-10(Ham's F-10))或漢姆氏F-12、羅斯威爾帕克紀念學會培養基(Roswell Park Memorial Institute Medium ; RPMI)、MCDB 131、克里克氏培養基(Click's medium)、麥克柯伊氏5A培養基、培養基199、威廉姆氏培養基E(William's Medium E)以及諸如格雷斯氏培養基(Grace's medium)及TNM-FH的昆蟲培養基。

這些培養基中的任一者視情況補充有鹽、胺基酸、維生素、緩衝劑、核苷酸、抗生素、微量元素以及葡萄糖或等效能量來源。亦可包含本領域中具通常知識者已知的適當濃度的其他視情況選用的補充物。培養基補充物為本領域中眾所周知且可購得，且更詳細描述於實施方式中。

在各種實施例中，更預期血清替代物本身包括如上文所描述的基礎培養基及補充物的要素，例如鹽、胺基酸、維生素、緩衝劑、核苷酸、抗生素、微量元素、抗氧化劑以及葡萄糖或等效能量來源，以使得血清替代物以無血清完全培養基形式提供。

在各種實施例中，培養基不含動物組分。

在各種實施例中，脂質體負載有本文中所描述的基礎液體混合物。更預期脂質體負載有在細胞培養中有利的其他組成物。在細胞培養中有利的例示性組成物包含(但不限於)緩衝劑、鐵轉運體、游離脂肪酸、生長肽(例如胰島素、包括甘胺酸-組胺酸-離胺酸三聚體的GHK肽)、胺基酸(必需及非必需)、維生素、微量元素、抗氧化劑及/或鹽。

在各種實施例中，本發明提供一種培養細胞的方法，其包括在

完全培養基或含有本文中所描述的血清替代物或培養基補充物的培養基中培養細胞。

在各種實施例中，細胞在由哺乳動物細胞及昆蟲細胞所構成的群組中選出。在各種實施例中，細胞自哺乳動物個體分離。在各種實施例中，細胞為原始培養物或細胞株。在各種實施例中，細胞是由以下各者所構成的群組中選出：多能性幹細胞、胚胎幹細胞、骨髓基質細胞、造血祖細胞、淋巴幹細胞、骨髓幹細胞、T細胞、B細胞、巨噬細胞、肝細胞、胰腺細胞以及細胞株。

預期的哺乳動物細胞株包含(但不限於)CHO、CHOK1、DXB-11、DG-44、CHO/-DHFR、CV1、COS -7、HEK293、BHK、TM4、VERO、HELA、MDCK、BRL 3A、W138、Hep G2、SK-Hep、MMT、TRI、MRC 5、FS4、T細胞株(例如尤爾卡特(Jurkat))、B細胞株(例如BJAB、EW36、CA46、ST486以及MC116、拉吉(Raji)、納莫伐(Namalva)以及道迪(Daudi))、3T3、RIN、A549、PC12、K562、PER.C6<sup>®</sup>、SP2/0、NS-0、U20S、HT1080、L929、融合瘤、癌細胞株以及本領域中眾所周知的其他細胞株。預期的昆蟲細胞株包含(但不限於)Sf9、Sf21、HIGH FIVE<sup>™</sup>、EXPRESSF+<sup>®</sup>、S2、Tn5、TN-368、BmN、施奈德2(Schneider 2)、D2、C6/36以及KC細胞。

在各種實施例中，本發明涵蓋一種低溫保存細胞的方法，其包括使細胞懸浮在本文中所描述的低溫保存培養基中，所述低溫保存培養基視情況包括果膠或視情況包括脂質體，且將細胞置放於小於8°C的環境中。低於8°C的例示性溫度包含(但不限於)溫度處於或低於4°C、0°C、-20°C、-70°C、-135°C或在液氮(-196°C)中。

在各種實施例中，所述方法更包括使細胞解凍且將其置放於如本文所描述的培養基中。

在各種實施例中，解凍後，當置放於本文中所描述的培養基

時，無論用作血清替代物、培養基補充物或完全培養基，至少30%的冷凍細胞仍然有活力。在各種實施例中，解凍後細胞的存活率為約40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%或高於80%。

在一個實施例中，以10毫升、50毫升、100毫升、500毫升或1公升的體積封裝培養基(血清替代物、培養基補充物、完全培養基或低溫保存培養基)。在一相關實施例中，將血清替代物、培養基補充物或低溫保存培養基封裝於1X、5X、10X或20X溶液中。

亦提供一種製造本文中所描述的脂質體的方法。在各種實施例中，製造脂質體的方法包括將所需量的膽固醇溶解於非甲醇或非氯仿溶液中。在各種實施例中，將膽固醇溶解於液體磷脂溶液中。在各種實施例中，在室溫下膽固醇混合在非甲醇或非氯仿溶液中，或在非甲醇或非氯仿溶液中加熱，直至膽固醇成溶液。溶液可加熱至約35°C、40°C、45°C、50°C、55°C或60°C，且不超過80°C。一旦成溶液，將以下組成物添加至膽固醇組成物且混合：聚山梨醇酯、乙醇胺以及脂肪酸。將最終混合物儲存在4°C、0°C或-20°C下。視情況，混合膽固醇溶液，隨後添加殘餘化合物。

在各種實施例中，預期如本文所描述的某些培養基組成物或脂質體組成物促進改良的細胞培養，例如相比於包括不同組的組分的培養基或脂質體組成物，細胞生長增加、細胞存活率增加或重組蛋白質表現增加。預期那些促進改良的細胞培養的培養基或脂質體組成物用於進一步實驗。

應理解本文中所描述的特徵或實施例或組合為本發明態樣中任一者的非限制性、例示性實例，且因而，意欲與本文中所描述的任何其他特徵或實施例或組合可組合。這些類型實施例中每一者為特徵的一個非限制性實例，所述特徵意欲與本文中所描述的任何其他特徵或特徵組合進行組合而不必列出每個可能的組合。此類特徵或特徵組

合適用於本發明態樣中的任一者。當揭露落在範圍內的數值實例時，預期這些實例中任一者為一個範圍的可能端點，預期在所述端點之間的任何及所有數值，且預想上端點與下端點的任何及所有組合。

### 【圖式簡單說明】

圖1展示相比於市售美國食品藥物管理局(FDA)認可的無血清培養基，本文中描述的血清替代物對所刺激脾細胞的影響。

圖2A及圖2B展示相比於在包括胎牛血清的培養基中的脾細胞培養，本文中所描述的血清替代物對所刺激脾細胞生長的影響。

圖3A展示與培養基加FBS相比，血清替代物加生長因子將誘發更大程度的細胞增生。

圖3B展示相比於FBS，當用血清替代物培養細胞時，增殖中的實驗內差異減小。

圖4A展示歷經3天培養，相比於在培養基加FBS中培養的細胞，血清替代物加生長因子中的細胞培養減少細胞死亡水準。

圖4B展示相比於包括FBS的培養基，當用含血清替代物的培養基培養細胞時，細胞凋亡的實驗內差異減小。

### 【實施方式】

本發明提供一種包括基礎生理緩衝劑液體混合物及包括膽固醇、卵磷脂以及脂肪酸的脂質體的培養基，其中培養基可為血清替代物、完全培養基或培養基補充物組成物，其用於活體外細胞培養以便提供類似在胎牛血清細胞(FBS)中生長的生長而沒有FBS對細胞生理機能所貢獻的非特定副作用。血清替代物、完全培養基或培養基補充物提供一種包括生理學相關濃度的膽固醇及卵磷脂與脂肪酸組合的脂質體以使得在血清替代物、完全培養基或培養基補充物中的脂質體向細胞提供一個類似於血漿膜的環境。視情況，完全培養基、血清替代物或培養基補充物包括果膠。亦提供一種包括脂質體及/或果膠的低s

溫保存培養基。本文的培養基(血清替代物、完全培養基、培養基補充物或低溫保存培養基)組成物提供優於在含FBS培養基中或在無血清培養基中進行細胞培養的優勢。

如本說明書及所附申請專利範圍中所使用，除非上下文明確規定，否則不定冠詞「一(a)」及「一(an)」以及定冠詞「所述(the)」包含複數以及單數指示物。

術語「約(about)」或「大約(approximately)」意謂由本領域具有通常知識者確定的可接受特定值誤差，其在某種程度上視所述值如何量測或測定而定。在某些實施例中，術語「約」或「大約」意謂在1、2、3或4個標準差內。在某些實施例中，術語「約」或「大約」意謂在給定值或範圍的30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.05%內。

如本文中所使用，「培養基(media)」或「細胞培養基(cell culture media)」是指提供細胞生長、存活或儲存的水溶液類溶液。如本文中預期的培養基可補充有如實施方式中描述的養分以促進培養基中所培養的細胞的所需細胞活性，諸如細胞存活率、生長、增殖、分化。如本文所使用的培養基包含血清替代物、培養基補充物、完全培養基或低溫保存培養基。

如本文所使用，「血清替代物(serum replacement)」或「血清替代物培養基(serum replacement media)」是指可與基礎培養基結合使用或用作完全培養基以便促進培養物中細胞生長及生存的組成物。在各種實施例中，血清替代物作為典型地添加至活體外細胞培養的培養基中的任何血清的替代物用於基礎或完全培養基中。預期血清替代物包括蛋白質及用於培養物中細胞生長及生存的其他因子。在各種實施例中，在用於細胞培養前，將血清替代物添加至基礎培養基。在各種實施例中，更預期血清替代物可包括基礎培養基及基礎養分，諸如鹽、

胺基酸、維生素、微量元素、抗氧化劑以及其類似物，以使得血清替代物適用作用於細胞培養的無血清完全培養基。

如本文所使用，「基礎培養基(basal media/base media/base medium)」或「基礎營養培養基(base nutritive media)」是指基礎鹽養分或鹽及其他要素的水溶液，其向細胞提供正常細胞代謝所必需的水及某些大量無機離子，且維持細胞內及細胞外滲透平衡。在各種實施例中，基礎培養基包括至少一種碳水化合物作為能量來源，及/或緩衝系統以維持培養基在生理pH範圍內。市售基礎培養基的實例包含(但不限於)磷酸鹽緩衝鹽水(phosphate buffered saline；PBS)、杜爾貝科氏改質伊格爾培養基(DMEM)、最低必需培養基(Minimal Essential Medium；MEM)、伊格爾基礎培養基(Basal Medium Eagle；BME)、RPMI 1640、漢姆氏F-10、漢姆氏F-12、 $\alpha$ -最低必需培養基( $\alpha$ MEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(Glasgow's Minimal Essential Medium；G-MEM)、伊斯科夫氏改質杜爾貝科氏培養基或經改質用於多能細胞的通用培養基，諸如X-VIVO(龍沙)或造血幹細胞基礎培養基。基礎培養基可補充有如實施方式中更詳細描述的養分。

如本文中所使用，「完全培養基(complete media)」是指更包括可促進細胞生長的額外補充物(諸如生長因子、激素、蛋白質、血清或血清替代物、微量元素、糖、抗生素抗氧化劑等)的基礎培養基。舉例而言，市售完全培養基包括補充物，諸如乙醇胺、麩胱甘肽(還原型)、抗壞血酸磷酸酯、胰島素、人類轉鐵蛋白、富含脂質牛血清蛋白、微量鹽、亞硒酸鈉、偏鉬酸銨、硫酸銅以及氯化亞錳(DMEM ADVANCED™培養基，生命技術(Life Technologies))。

如本文中所使用，「培養基補充物(media supplement)」是指在細胞培養前添加至基礎培養基的試劑或組成物。培養基補充物可為對培養物中細胞生長有利的試劑，諸如生長因子、激素、蛋白質、血清或

血清替代物、微量元素、糖、抗生素、抗氧化劑等。典型地，培養基補充物為所需補充物的濃縮溶液，其稀釋成完全或基礎培養基以達到適用於細胞培養的最終濃度。

如本文所使用，「低溫保存培養基(cryopreservation media)」是指適於在處於或低於8℃溫度(包含處於或低於4℃、0℃、-20℃、-70℃、-135℃或在液氮(-196℃)中的溫度)下將細胞懸浮儲存或冷凍的培養基。

如本文所使用，「果膠(pectin)」是指來源於植物細胞壁的結構性雜多醣，其分子量為30,000道爾頓(Da)至250,000道爾頓。果膠主要由 $\alpha$ -1-4鍵聯半乳糖醛酸殘基構成。在某些實施例中，果膠酯化，例如55%、60%、65%、70%、75%或高於75%酯化，且可為高酯果膠或低酯果膠。在各種實施例中，果膠對鈣敏感。鈣敏感果膠能夠與鈣相互作用形成凝膠，而非鈣敏感果膠不能。預期果膠在pH4.5-6.9範圍內的酸性溶液內或pH 7.5至10範圍內的鹼性溶液內，視所用果膠類型而定。視情況，果膠在pH範圍7.0-7.4的溶液中。使用本領域中的常識及技能，可測定在不同pH位準下使用的果膠，且在所需pH位準下使用的果膠受果膠的酯化程度或鈣敏感性影響。

藉由商業來源供應果膠，且其可來自具有果膠的任何植物，諸如梨、蘋果、番石榴、冥欖、李子、醋栗、柑橘及其他柑桔類水果、櫻桃、葡萄以及草莓。具有不同酯化(甲基化)度及鈣敏感性的果膠組成物描述於WO 2000008952中，其以引用的方式併入本文中。

如本文中所使用，「脂質體(liposome)」是指包括包圍內部水溶液空間的外脂質雙層或多層膜的封閉結構。脂質體可為多層或單層。預期脂質體的尺寸在直徑5微米至10微米至奈米粒子尺寸範圍內。在某些實施例中，脂質體奈米粒子直徑為約50奈米至500奈米，約100奈米至300奈米或約100奈米至200奈米。

如本文所使用，「液體基礎混合物(liquid base mix)」或「基礎生理緩衝劑液體混合物(base physiological buffer liquid mix)」是指血清替代物或培養基補充物的基礎液體溶液，其中脂質體懸浮以形成細胞培養基組成物。在各種實施例中，更預期將液體基礎混合物裝載入脂質體以使得當與細胞培養物中的細胞融合/由細胞吸收時，脂質體向細胞傳遞一定量的液體基礎混合物。在各種實施例中，本文中預期液體基礎混合物或基礎生理緩衝劑液體混合物為基礎培養基、完全培養基或生理緩衝溶液，諸如磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)及其他平衡鹽溶液，其可與脂質體及/或本文中其他組分結合使用來形成血清替代物、完全培養基、培養基補充物或低溫保存培養基。

如本文所使用，「改良的細胞培養」是指相比於使用不包括脂質體的血清替代物或無血清培養基的細胞培養，當使用本文中所描述的培養基組成物(血清替代物、完全培養基或培養基補充物)培養時，細胞增殖增加、細胞生長增加、細胞死亡減少或細胞的蛋白質產生(重組型或內源性)增加。使用本領域中眾所周知的方法，包含生長曲線分析、刺激指數、錐蟲藍微觀評估、氘化胸苷( $^3\text{H}$ )、增殖分析、MTT分析、刃天青類分析以及DNA梯度變化分析來量測增殖增加、生長增加及細胞死亡變化。使用本領域中已知的技術，包含量化總蛋白質或mRNA，或定量相關特定蛋白質的含量，量測細胞的蛋白質產生(重組型或內源性)增加。

如本文中所使用，「無動物組分」是指其中組分不來源於動物的組成物。預期組分以重組方式產生或來源於植物或其他來源，而非直接自動物分離。如本文中所使用，無動物組分允許培養基組分在動物類細胞株中重組產生。

## 培養基組成物

先前已描述包括脂質組分及脂質體的細胞培養基用於細胞培

養，但成就有限。舉例而言，漢姆斯(Hams)等人(美國科學院院刊(Proc Natl Acad USA)78:5588-92, 1981)揭露在包括不同脂質組分(例如包括膽固醇、卵磷脂或純化卵磷脂、鞘磷脂以及維生素E的脂質體)的培養基中培養人類纖維母細胞。然而，漢姆斯描述脂質體不穩定，因為其需要在使用的24小時內製備，且展示在完全培養基中僅使用脂質體不促進細胞生長。斯賓斯(Spens)等人(生物技術進展(Biotechnol Prog)21:87-95, 2005)描述在尤其更包括膽固醇、環糊精、卵磷脂、維生素E、檸檬酸鐵、普洛尼克及胺基酸的無蛋白質培養基中培養NS0骨髓瘤細胞。斯賓斯(前述)描述脂質自溶液以高水準沈澱(引用基恩(Keen)等人，細胞技術學(Cytotechnology)17(3):203-11, 1995)。

製造脂質體的方法在本領域中已知，包含用於製造多層小泡(具有一系列同心雙層脂質)的液體水合或溶劑小球製備，用以製備單層小泡(具有單層脂質)的衛生設備、法式壓製、溶劑注入、清潔劑移除、逆相蒸發、鈣誘發融合、微流體化或凍融方法。

脂質體製備描述於美國專利7,220,538號、美國專利第6,217,899號；美國專利公開案第20100021531號；李克屯白(Lichtenberg)等人，生物化學分析方法(Methods Biochem Anal)33:337-462, 1988；以及格雷戈里亞季斯(G. Gregoriadis):「脂質體技術脂質體製備及相關技術」，第2版，第I-III卷，CRC出版社。用於醫藥用途的脂質體已揭露於莫紮法瑞(Mozafari M)，脂質體、方法及方案第1卷，第2章，韋辛(V. Wessing)編，2010，胡馬納(Humana)出版社。

在各種實施例中，本發明提供一種用於懸浮液或貼壁培養物中的細胞的培養基，所述培養基包括基礎生理緩衝劑液體混合物及(a)包括膽固醇、卵磷脂以及脂肪酸的脂質體，其中所述脂質體的量使得膽固醇在細胞懸浮液或貼壁培養物中的最終濃度為1毫克/公升至20毫克/公升，且其中卵磷脂在細胞懸浮液或貼壁培養物中的最終濃度為5

毫克/公升至100毫克/公升；或(b)果膠；或(a)及(b)。

在各種實施例中，培養基為血清替代物、培養基補充物或完全培養基。在各種實施例中，本發明提供一種包括脂質體及基礎生理緩衝劑液體混合物，視情況包括果膠的細胞低溫保存培養基，其中脂質體包括膽固醇、卵磷脂以及脂肪酸。在各種實施例中，脂質體的量使得膽固醇在細胞懸浮液中的最終濃度為1毫克/公升至20毫克/公升，且其中卵磷脂在細胞懸浮液中的最終濃度為5毫克/公升至100毫克/公升。

在各種實施例中，本發明提供一種包括基礎生理緩衝劑液體混合物及果膠的低溫保存培養基。

脂質體可為多層或單層。預期脂質體的尺寸在直徑5微米至10微米至奈米粒子尺寸範圍內。在一些實施例中，脂質體為奈米粒子。在某些實施例中，奈米粒子具有範圍為約50奈米至500奈米，約100奈米至約300奈米，或約100奈米至200奈米的平均直徑。可使用本領域中已知的方法，包含使用雷射粒度儀(Zetasizer)(馬爾文儀器(Malvern Instruments), 英國)，量測脂質體尺寸，其藉由動態光散射方法量測粒度為整個粒子的平均直徑值。

在各種實施例中，脂質體包括脂質、脂肪酸、固醇及/或游離脂肪酸。在各種實施例中，脂質體包括為細胞生長提供更加生理相關環境的濃度的膽固醇及卵磷脂以及脂肪酸。血清替代物、完全培養基或培養基補充物組成物中的脂質體組分的例示性最終濃度闡明於表1中。

表1

| 組分  | 培養基補充物             | 血清替代物                            | 完全培養基                              |
|-----|--------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 膽固醇 | 100毫克/公升至2000毫克/公升 | 10毫克/公升至200毫克/公升                 | 1毫克/公升至20毫克/公升                     |
| 卵磷脂 | 10公克/公升至100公克/公升   | 50毫克/公升至1公克/公升；1000毫克/公升至10公克/公升 | 5毫克/公升至100毫克/公升；100毫克/公升至1000毫克/公升 |
| 脂肪酸 | 5毫克/公升至50毫克/公升     | 0.5毫克/公升至5毫克/公升                  | 0.05毫克/公升至0.5毫克/公升                 |
| 乙醇胺 | 1公克/公升至5公克/公升      | 0.5毫克/公升至50毫克/公升                 | 5毫克/公升至500毫克/公升                    |

在各種實施例中，血清替代物脂質體包括最終濃度為約10毫克/公升至200毫克/公升、25毫克/公升至175毫克/公升、50毫克/公升至150毫克/公升、60毫克/公升至120毫克/公升、20毫克/公升至100毫克/公升、30毫克/公升至90毫克/公升、40毫克/公升至80毫克/公升或50毫克/公升至70毫克/公升的膽固醇。在各種實施例中，血清替代物脂質體包括最終濃度為約50毫克/公升、約55毫克/公升、約60毫克/公升、約65毫克/公升、約70毫克/公升或約75毫克/公升的膽固醇。

在各種實施例中，血清替代物中脂質體的量使得膽固醇在細胞懸浮液或貼壁培養物中的最終濃度為1毫克/公升至20毫克/公升，且其中卵磷脂在細胞懸浮液或貼壁培養物中的最終濃度為5毫克/公升至100毫克/公升或100毫克/公升至1000毫克/公升。

在各種實施例中，脂質體包括一或多種脂肪酸。例示性脂肪酸包含(但不限於)次亞麻油酸、亞麻油酸、肉豆蔻酸、油酸、肉豆蔻油酸、棕櫚油酸、十六碳烯酸、反油酸、異油酸、反亞油酸、 $\alpha$ -次亞麻油酸、二十碳四烯酸、二十碳五烯酸、芥子酸、二十二碳六烯酸、辛酸、癸酸、月桂酸、棕櫚酸、硬脂酸、二十烷酸、二十二烷酸、二十四烷酸以及蠟酸。在各種實施例中，血清替代物脂質體包括最終濃度

為約0.5毫克/公升至5毫克/公升、0.75毫克/公升至4毫克/公升、1毫克/公升至3毫克/公升、0.5毫克/公升至3毫克/公升、0.5毫克/公升至2毫克/公升或1毫克/公升至2毫克/公升的脂肪酸。在各種實施例中，血清替代物脂質體包括最終濃度為約0.5毫克/公升至5毫克/公升的亞麻油酸或次亞麻油酸。

在各種實施例中，血清替代物脂質體包括最終濃度為約0.5毫克/公升至50毫克/公升、1毫克/公升至50毫克/公升、2.5毫克/公升至40毫克/公升、5毫克/公升至35毫克/公升、10毫克/公升至30毫克/公升或15毫克/公升至25毫克/公升的乙醇胺。在各種實施例中，乙醇胺在血清替代物中的最終濃度為約1毫克/公升、2.5毫克/公升、5毫克/公升、10毫克/公升、15毫克/公升、20毫克/公升、25毫克/公升、30毫克/公升、35毫克/公升、40毫克/公升、45毫克/公升或50毫克/公升。

在各種實施例中，脂質體更包括聚山梨醇酯。在某些實施例中，聚山梨醇酯為聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60或聚山梨醇酯80。例示性聚山梨醇酯包含TWEEN<sup>®</sup> 20或TWEEN<sup>®</sup> 80。預期聚山梨醇酯在血清替代物中的最終濃度在約100微升/公升與1000微升/公升之間，200微升/公升至800微升/公升，300微升/公升至700微升/公升或400至600微升/公升。在各種實施例中，聚山梨醇酯在血清替代物中的最終濃度為約500微升/公升。

上文所描述的關於血清替代物組成物的最終濃度可用作計算培養基補充物或完全培養基中的組分濃度的基礎。各別組分在培養基補充物中的最終濃度為用於血清替代物組成物中的最終濃度的10倍。各別組分在完全培養基中的最終濃度為用於血清替代物中的最終濃度的1/10。例示性濃度闡明於表1及表2中。

更預期以大於5X或10X的稀釋度使用血清替代物。在各種實施例中，以1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:50、1:100、1:200、1:250、5

1:300、1:400、1:500、1:600、1:700、1:800、1:900、1:1000、1:1500或1:2000的稀釋度使用血清替代物。

對於低溫保存培養基，組分的起始濃度與用於血清替代物培養基的濃度相同，亦即，為用於完全培養基濃度的10倍濃度。然而，低溫保存培養基無需稀釋或僅在最低稀釋度下即可使用，使得組分的最終濃度與起始濃度大約相等。舉例而言，在各種實施例中，對於低溫保存培養基，膽固醇在細胞懸浮液中的最終濃度為10毫克/公升至200毫克/公升，且卵磷脂在細胞懸浮液中的最終濃度為50毫克/公升至1公克/公升，或1000毫克/公升至10公克/公升。

預期當用於完全細胞培養基溶液中時，儘管高濃度的膽固醇及卵磷脂存在於用於血清替代物或培養基補充物中的脂質體中且考慮到長期暴露於水溶液，本文中所描述的脂質體在水溶液中為熱力學穩定的。本發明提供本文中所描述的具有如表1中闡明的組分最終濃度的脂質體在水溶液中為穩定的(例如不沈澱)。在各種實施例中，脂質體在水溶液中在37°C、25°C、4°C、0°C或-20°C下穩定至少7天、10天、14天、21天、30天、2個月、3個月、6個月或1年或大於1年的時間段。例示性水溶液包含(但不限於)水、緩衝生理鹽水及其他平衡鹽溶液、基礎細胞培養基以及完全細胞培養基。本發明脂質體組成物的優勢為其含有生理學相關含量的固醇及脂肪酸，此提供極佳生長增效而在若干天後不自溶液沈澱，所述優勢已在包括高含量諸如膽固醇及卵磷脂的試劑的其他培養基中觀察到(斯賓斯等人、基恩等人，*前述*)。

預期培養基的液體基礎混合物組分包括果膠、甘油、硒及鐵源中的一或多者。視情況，液體基礎混合物更包括胺基酸、維生素、糖、無機鹽、抗氧化劑以及微量元素。類似於上文所描述的脂質體複合物，在其中製造脂質體的液體基礎混合物可以用於血清替代物、培養基補充物或完全培養基的不同濃度製造。例示性最終濃度闡明於表

2中。

表2

| 組分 | 培養基補充物               | 血清替代物                  | 完全培養基                     |
|----|----------------------|------------------------|---------------------------|
| 甘油 | 2毫升/公升至100<br>毫升/公升  | 0.02毫升/公升至5<br>毫升/公升   | 2微升/公升至0.5<br>毫升/公升       |
| 果膠 | 2.5公克/公升至50<br>公克/公升 | 0.25公克/公升至5<br>公克/公升   | 25毫克/公升至500<br>毫克/公升      |
| 硒  | 0.5毫克/公升至5<br>毫克/公升  | 0.05毫克/公升至<br>0.5毫克/公升 | 0.005毫克/公升至<br>0.050毫克/公升 |

在各種實施例中，甘油在血清替代物中的最終濃度為約0.02毫升/公升至5毫升/公升(L)，或0.05毫升/公升至4毫升/公升、0.1毫升/公升至3毫升/公升、0.5毫升/公升至2.5毫升/公升或1毫升/公升至2毫升/公升。在各種實施例中，甘油在血清替代物中的最終濃度為約0.02毫升/公升、0.05毫升/公升、0.1毫升/公升、0.25毫升/公升、0.5毫升/公升、1.0毫升/公升、1.5毫升/公升、2毫升/公升、2.5毫升/公升、3毫升/公升、3.5毫升/公升、4毫升/公升、4.5毫升/公升或5毫升/公升。

在各種實施例中，果膠在血清替代物中的最終濃度為約0.25公克/公升至5公克/公升、0.5公克/公升至4公克/公升、1.5公克/公升至3公克/公升或1公克/公升至2公克/公升。在各種實施例中，果膠在血清替代物中的最終濃度為約0.25公克/公升、0.5公克/公升、0.75公克/公升、1公克/公升、1.5公克/公升、2公克/公升、2.5公克/公升、3公克/公升、3.5公克/公升、4公克/公升、4.5公克/公升或5公克/公升。

例示性無機鹽包含(但不限於)磷酸鉀、氯化鈣(無水)、硫酸銅、硝酸鐵、硫酸鐵、氯化鎂(無水)、硫酸鎂(無水)、氯化鉀、碳酸氫鈉、氯化鈉、無水磷酸氫二鈉、磷酸二氫鈉、氯化錫以及硫酸鋅。例示性有機鹽包含(但不限於)碳酸氫鈉或HEPES。

例示性糖包含(但不限於)右旋糖、葡萄糖、乳糖、半乳糖、果糖

以及這些糖的多聚體。

例示性抗氧化劑包含(但不限於)生育酚、生育三烯酚、 $\alpha$ -生育酚、 $\beta$ -生育酚、 $\gamma$ -生育酚、 $\delta$ -生育酚、 $\alpha$ -生育三烯酚、 $\beta$ -生育三烯酚、 $\alpha$ -生育醌、水溶性維生素E(6-羥基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-甲酸)、丁基化羥基甲氧苯(BHA)、丁基化羥基甲苯(BHT)、類黃酮、異黃酮、番茄紅素、 $\beta$ -胡蘿蔔素、硒、泛醌、梅毒菌素、S-腺苷甲硫胺酸、麩胱甘肽、牛磺酸、N-乙醯半胱胺酸、檸檬酸、L-肉鹼、BHT、單硫代甘油、抗壞血酸、沒食子酸丙酯、甲硫胺酸、半胱胺酸、高半胱胺酸、麩胱甘肽、胱胺及胱硫醚以及甘胺酸-甘胺酸-組胺酸(三肽)。

例示性微量元素包含(但不限於)銅、鐵、鋅、錳、矽、鉬酸鹽、鉬、釩、鎳、錫、鋁、銀、鋇、溴、鎘、鈷、鉻、鈣、二價陽離子、氟、銻、碘、銣、銩或硒。額外微量金屬揭露於WO 2006/004728中。

在各種實施例中，培養基或液體基礎混合物包括鐵源或鐵轉運體。例示性鐵源包含(但不限於)鐵鹽及亞鐵鹽，諸如硫酸亞鐵、檸檬酸亞鐵、檸檬酸鐵、硝酸鐵、硫酸鐵；鐵銨化合物，諸如檸檬酸鐵銨、草酸鐵銨、反丁烯二酸鐵銨、蘋果酸鐵銨以及丁二酸鐵銨。例示性鐵轉運體包含(但不限於)轉鐵蛋白及乳鐵蛋白。

在各種實施例中，培養基或液體基礎混合物或脂質體包括一或多種如上文所描述的基礎培養基及補充物的要素，例如鹽、胺基酸、維生素、緩衝劑、核苷酸、抗生素、微量元素、抗氧化劑以及葡萄糖或等效能量來源，以使得培養基能夠用作無血清完全培養基。

在各種實施例中，培養基或液體基礎混合物更包括銅源或銅轉運體(例如GHK-Cu)。例示性銅源包含(但不限於)氯化銅及硫酸銅。

在各種實施例中，鐵源或銅源以在約0.05奈克/毫升至250奈克/毫

升、0.05奈克/毫升至100奈克/毫升、約0.05奈克/毫升至50奈克/毫升、約0.05奈克/毫升至10奈克/毫升、約0.1奈克/毫升至5奈克/毫升、約0.5奈克/毫升至2.5奈克/毫升或約1奈克/毫升至5奈克/毫升範圍內的最終濃度添加至血清替代物培養基。更預期鐵源或銅源在血清替代物中的最終濃度為約0.05奈克/毫升、0.1奈克/毫升、0.25奈克/毫升、0.35奈克/毫升、0.45奈克/毫升、0.5奈克/毫升、0.6奈克/毫升、0.7奈克/毫升、0.8奈克/毫升、1奈克/毫升、1.5奈克/毫升、2奈克/毫升、2.5奈克/毫升、3奈克/毫升、4奈克/毫升、5奈克/毫升、6奈克/毫升、7奈克/毫升、8奈克/毫升、9奈克/毫升或10奈克/毫升。

上文所描述的關於血清替代物組成物的培養基或液體混合物中的組分的最終濃度可用作計算培養基補充物或完全培養基中組分濃度的基礎。各別組分在培養基補充物中的最終濃度為用於血清替代物組成物中的最終濃度的10倍。各別組分在完全培養基中的最終濃度為用於血清替代物中的最終濃度的1/10。

關於低溫保存培養基，預期用於血清替代物的起始濃度範圍與預期用於低溫保存培養基的起始濃度範圍相同。然而，低溫保存培養基無需稀釋或僅在最低稀釋度下即可使用，使得組分的最終濃度與起始濃度大約相等。舉例而言，在低溫保存培養基的各種實施例中，果膠在細胞懸浮液中的最終濃度為約0.25公克/公升至5公克/公升、0.5公克/公升至4公克/公升、1.5公克/公升至3公克/公升或1公克/公升至2公克/公升。

在各種實施例中，脂質體負載有有利於細胞培養的組分。有利於細胞培養的例示性組成物包含(但不限於)鐵轉運體、游離脂肪酸、生長肽(例如胰島素、包括甘胺酸-組胺酸-離胺酸三聚體的GHK肽)、胺基酸(必需及非必需)、維生素、微量元素、抗氧化劑以及鹽。在各種實施例中，預期脂質體負載有額外乙醇胺及游離脂肪酸。

5

在各種實施例中，將血清替代物或培養基補充物添加至基礎培養基。標準基礎培養基為細胞培養領域中已知且可購得。基礎培養基的實例包含(但不限於)杜爾貝科氏改質伊格爾培養基(DMEM)、DMEM F12(1:1)、伊斯寇氏改質達爾伯克培養基、漢姆氏養分混合物F-10或F-12、羅斯威爾帕克紀念學會培養基(RPMI)、MCDB 131、克里克氏培養基、麥克柯伊氏5A培養基、培養基199、威廉姆氏培養基E以及諸如格雷斯氏培養基及TNM-FH的昆蟲培養基。

亦預期本文中所描述的血清替代物及培養基補充物用於市售無血清培養基。例示性無血清培養基包含(但不限於)AIM-V(加利福尼亞州卡爾斯巴德的生命技術)、PER-C6(加利福尼亞州卡爾斯巴德的生命技術)、Knock-Out™(生命技術)、StemPro®(生命技術)、CellGro®(弗吉尼亞州馬納薩斯的康寧生命科學-美的泰克公司(Corning Life Sciences - Mediatech Inc., Manassas, VA))。

這些培養基中的任一者視情況補充有鹽(諸如氯化鈉、鈣、鎂以及磷酸鹽)、胺基酸、維生素、緩衝劑(諸如HEPES)、核苷酸(諸如腺苷及胸苷)、抗生素(諸如慶大黴素(gentamicin)藥物)、微量元素(定義為通常以在微莫耳範圍內的最終濃度存在的無機化合物)、抗氧化劑以及葡萄糖或等效能量來源。亦可包含本領域中具通常知識者已知的適當濃度的任何其他必要的補充物。諸如溫度、pH值以及其類似物的培養條件將為本領域的具有通常知識者所顯而易見。

預期培養基組成物呈單元形式封裝。在一個實施例中，以10毫升、50毫升、100毫升、500毫升或1公升的體積封裝培養基(血清替代物、培養基補充物、完全培養基或低溫保存培養基)。在一相關實施例中，將血清替代物、培養基補充物或低溫保存培養基封裝於1X、5X、10X或20X溶液中。

## 細胞培養

預期本文中所描述的培養基，例如血清替代物、培養基補充物、完全培養基或低溫保存培養基適用於細胞活體外培養，較佳適用於活體外充分生長典型地需要血清補充物或明確培養基的細胞。此類細胞包含真核細胞(諸如哺乳動物細胞)及昆蟲細胞。預期得益於使用血清替代物、完全培養基或培養基補充物的哺乳動物細胞包含(但不限於)倉鼠、猴、黑猩猩、狗、貓、母牛/公牛、豬、小鼠、大鼠、家兔、綿羊以及人類細胞。昆蟲細胞包含來源於草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)(毛蟲)、埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)(蚊子)、白蚊伊蚊(*Aedes albopictus*)(蚊子)、黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)(果蠅)以及家蠶(*Bombyx mori*)的細胞。

預期經血清替代物、完全培養基或培養基補充物培養或經低溫保存培養基冷凍的細胞為不朽化細胞(細胞株)或非不朽化(初級或次生)細胞，且可為在活體內發現的多種細胞類型中的任一者。例示性細胞類型包含(但不限於)纖維母細胞、角質細胞、上皮細胞、卵巢細胞、內皮細胞、膠質細胞、神經細胞、血液成形成分(例如淋巴細胞、骨髓細胞)、軟骨細胞及其他骨來源細胞、肝細胞、胰腺細胞以及這些體細胞類型的前驅細胞。

在各種實施例中，預期用於培養基的細胞自哺乳動物個體分離。自哺乳動物個體分離的細胞包含(但不限於)多能幹細胞、胚胎幹細胞、骨髓基質細胞、造血祖細胞、淋巴幹細胞、骨髓幹細胞、淋巴細胞、T細胞、B細胞、巨噬細胞、內皮細胞、膠質細胞、神經細胞、軟骨細胞及其他骨來源細胞、肝細胞、胰腺細胞、體細胞類型的前驅細胞以及任何癌瘤或腫瘤來源細胞。

在各種實施例中，細胞為細胞株。例示性細胞株包含(但不限於)中國倉鼠卵巢細胞，包含CHOK1、DXB-11、DG-44以及CHO/-DHFR；猴腎CV1、COS-7；人胚腎(HEK)293；幼倉鼠腎細胞(BHK)；

小鼠塞特利氏(sertoli)細胞(TM4)；非洲綠猴腎臟細胞(VERO)；人類子宮頸癌細胞(HELA)；犬類腎臟細胞(MDCK)；布法羅(buffalo)大鼠肝臟細胞(BRL 3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝癌細胞(Hep G2；SK-Hep)；小鼠乳房腫瘤(MMT)；TRI細胞；MRC 5細胞；FS4細胞；T細胞株(尤爾卡特)、B細胞株、小鼠3T3、RIN、A549、PC12、K562、PER.C6<sup>®</sup>、SP2/0、NS-0、U20S、HT1080、L929、融合瘤、腫瘤細胞以及不朽化初生細胞。

例示性昆蟲細胞株包含(但不限於)Sf9、Sf21、HIGH FIVE<sup>™</sup>、EXPRESSF<sup>+</sup>、S2、Tn5、TN-368、BmN、施奈德2、D2、C6/36以及KC細胞。

額外細胞類型及細胞株揭露於WO 2006/004728中，其以引用的方式併入本文中。這些細胞包含(但不限於)CD34+造血細胞及骨髓譜系細胞、293胚胎腎臟細胞、A-549、尤爾卡特、納莫瓦(Namalwa)、HeLa、293BHK細胞、HeLa子宮頸上皮細胞、PER-C6視網膜細胞(PER.C6)、MDBK(NBL-I)細胞、911細胞、CRFK細胞、MDCK細胞、BeWo細胞、張氏細胞(Chang cell)、底特律562細胞(Detroit 562 cell)、HeLa 229細胞、HeLa S3細胞、Hep-G2細胞、KB細胞、LS 180細胞、LS 174T細胞、NCI-H-548細胞、RPMI 2650細胞、SW-13細胞、T24細胞、WI-28 VA1 3、2RA細胞、WISH細胞、BS-C-I細胞、LLC-MK2細胞、純系M-3細胞、1-10細胞、RAG細胞、TCMK-I細胞、Y-I細胞、LLC-PK1細胞、PK(15)細胞、GH1細胞、GH3細胞、L2細胞、LLC-RC 256細胞、MH1C1細胞、XC細胞、MDOK細胞、VSW細胞、TH-I、B1細胞或其衍生物；來自任何組織或器官(包含(但不限於)心臟、肝臟、腎臟、結腸、腸、食道、胃、神經組織(大腦、脊髓)、肺、血管組織(動脈、靜脈、毛細管)、淋巴組織(淋巴腺、腺樣增殖體、扁桃體、骨髓以及血液)、脾、纖維母細胞以及纖維母細胞

類細胞株)的纖維母細胞、TRG-2細胞、IMR-33細胞、Don細胞、GHK-21細胞、瓜胺酸血症細胞、登普西細胞(Dempsey cell)、底特律551細胞、底特律510細胞、底特律525細胞、底特律529細胞、底特律532細胞、底特律539細胞、底特律548細胞、底特律573細胞、HEL299細胞、MR-90細胞、MRC-5細胞、WI-38細胞、WI-26細胞、MiC11細胞、CV-I細胞、COS-I細胞、COS-3細胞、COS-7細胞、Vero細胞、DBS-FrhL-2細胞、BALB/3T3細胞、F9細胞、SV-T2細胞、M-MSV-BALB/3T3細胞、K-BALB細胞、BLO-11細胞、NOR-10細胞、C3H/IOTI/2細胞、HSDM1C3細胞、KLN205細胞、McCoy細胞、小鼠L細胞、株系2071(小鼠L)細胞、L-M株系(小鼠L)細胞、L-MTK(小鼠L)細胞、NCTC純系2472及NCTC純系2555、SCC-PSA1細胞、NSO、NS1、瑞士/3T3細胞、印度麂細胞、SIRC細胞、Cn細胞、延森細胞(Jensen cell)、COS細胞、及Sp2/0細胞、模擬細胞及/或其衍生物。

本文中預期的細胞培養條件可經調整以適於適用於生長細胞的任何培養基板。具有適合表面的基板包含組織培養孔、培養瓶、滾瓶、可透氣容器、平面或平行板生物反應器或細胞培養器。亦預期其中細胞附著至懸浮保存於攪拌槽容器中的微載體或粒子的培養條件。

細胞培養方法通常描述於動物細胞的培養：基礎技術手冊(Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique)第6版, 2010(弗瑞旭尼(R. I. Freshney)編, 威利父子公司(Wiley & Sons))；細胞培養的一般技術(General Techniques of Cell Culture)(哈里森(M.A. Harrison)及雷伊(I. F. Rae), 劍橋大學出版社(Cambridge Univ. Press))；以及胚胎幹細胞：方法及方案(Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols)(特克森(K. Turksen)編, 胡馬納出版社)。其他參考文獻文本包含創造高效能培養物(Creating a High Performance Culture)(埃洛塞利(Aroselli, Hu)研究發展進程(Res. Dev. Pr.)1996)及限5

制生長(Limits to Growth)(梅多斯(D. H. Meadows)等人，宇宙出版社(Universe Publ.)1974)。組織培養用品及試劑為具通常知識者熟知且可購得。

應瞭解將細胞以適合於與血清替代物、完全培養基或培養基補充物一起使用的特定細胞株或分離細胞類型的密度置放於具有培養物中。在某些實施例中，細胞以 $1 \times 10^3$ 個細胞/毫升、 $5 \times 10^3$ 個細胞/毫升、 $1 \times 10^4$ 個細胞/毫升、 $5 \times 10^4$ 個細胞/毫升、 $1 \times 10^5$ 個細胞/毫升、 $5 \times 10^5$ 個細胞/毫升、 $1 \times 10^6$ 個細胞/毫升或 $5 \times 10^6$ 個細胞/毫升培養。

在各種實施例中，預期本文中所描述的培養基用作低溫保存培養基。低溫保存是指細胞或組織儲存在小於 $8^\circ\text{C}$ 的環境中，其允許細胞長期儲存且可處於低於 $8^\circ\text{C}$ 的任何溫度下，包含處於或低於 $4^\circ\text{C}$ 、 $0^\circ\text{C}$ 、 $-20^\circ\text{C}$ 、 $-70^\circ\text{C}$ 、 $-135^\circ\text{C}$ 或在液氮( $-196^\circ\text{C}$ )中的溫度。用含膽鹼鹽及蔗糖的培養基低溫保存細胞的方法揭露於美國專利5,985,538中。額外低溫保存組成物及方法揭露於美國專利7,935,478及美國專利7,112,576中。預期本文中所描述的低溫保存培養基可更包括以下試劑中的一或多者：二甲亞砜(DMSO)、甘油、乙二醇、聚乙二醇、丙二醇、糖(諸如蔗糖、右旋糖、海藻糖、果膠)、蛋白質、碳水化合物(諸如羥基乙基澱粉(hydroxy ethyl starch; HES))、聚葡萄糖及/或聚離胺酸。在各種實施例中，低溫保存培養基包括脂質體及/或果膠。

在各種實施例中，解凍後，當置放於本文中的培養基時，無論用作血清替代物、培養基補充物或完全培養基，至少30%細胞仍然有活力。在各種實施例中，解凍後細胞的存活率為40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%或高於80%。

量測在低溫保存後存活率的額外分析包含(但不限於)幹細胞菌落形成單位的測定、細胞倍增時間及增殖的測定、MTT分析、刃天青分析以及本領域用以量測細胞存活率及生長的其他分析。

在各種實施例中，預期如本文所描述的某些培養基組成物或脂質體組成物促進改良的細胞培養，例如相比於包括不同組的組分的培養基或脂質體組成物，細胞生長增加、細胞存活率增加或重組蛋白質表現增加。預期那些促進改良的細胞培養的培養基或脂質體組成物用於進一步實驗。

在各種實施例中，已證明包括具有抗氧化劑的脂質體的血清替代物培養基支持細胞在培養物中生長增加。這個結果與展示抗氧化劑維生素E或 $\alpha$ -生育酚抑制培養物中的細胞生長的先前研究形成對比。

### 套組

本發明更提供一種包括如本文所描述的培養基(例如血清替代物、培養基補充物、完全培養基或低溫保存培養基)及使用說明書的套組。在各種實施例中，培養基為血清替代物、培養基補充物或低溫保存培養基，且套組提供適用於產生完全培養基的基礎培養基及/或附加因子。在各種實施例中，培養基封裝在標籤貼附至容器的容器中，或包含於描述組成物用於活體外、活體內或離體用途的包裝中。例示性容器包含(但不限於)容器、小瓶、管、安瓿、瓶、燒瓶以及其他類似物。更預期容器經調整以適於封裝液體或冷暖形式的培養基，例如血清替代物、培養基補充物或低溫保存培養基。預期容器由本領域中眾所周知的材料製成，包含(但不限於)玻璃、聚丙烯、聚苯乙烯以及其他塑膠。在各種態樣中，組成物以單位劑型封裝。套組視情況包含一種適用於組合血清替代物、培養基補充物或低溫保存培養基與基礎培養基，且或者組合培養基與附加生長因子的裝置。在各種態樣中，套組含有描述培養基用於細胞培養或低溫保存用途的標籤及/或說明書。

本發明血清替代物的額外態樣及細節將自以下實例顯而易見，所述實例意欲說明性而非限制性的。

# 實例1

## 例示性脂質體血清替代物組成物

下文描述本文中預期的製造例示性脂質體及血清替代物培養基的方法。適用於血清替代物的組分闡明於表3及表4中。在所述表中列出的組分不意欲限制，而是證明脂質體複合物在血清替代物中的功效。表3闡明脂質體組成物的例示性組分。視情況，脂質體複合物可包括Tween<sup>®</sup>(例如50微升/公升)。

表3

| 成分                           | 濃度(每公升) | 實例來源             | 目錄號    |
|------------------------------|---------|------------------|--------|
| <b>PHOSAL<sup>®</sup> 53</b> | 250微升   | 利珀德(Lipoid)      | 368204 |
| <b>乙醇</b>                    | 750微升   | 考珀科技<br>(KOPTEC) | V1016  |
| <b>乙醇胺</b>                   | 5毫克     | 西格瑪(Sigma)       | 398136 |
| <b>次亞麻油酸</b>                 | 0.1毫克   | 西格瑪              | L2376  |
| <b>亞麻油酸</b>                  | 0.5毫克   | 西格瑪              | L1012  |
| <b>膽固醇</b>                   | 50毫克    | 西格瑪              | C1231  |

為製成脂質體，將700微升乙醇置放入1.5毫升微量離心管，且將250微升PHOSAL<sup>®</sup> 53添加至乙醇。將50毫克膽固醇添加至PHOSAL<sup>®</sup>混合物且加熱至50℃直至膽固醇成溶液。使混合物渦旋(VORTEX GENIE<sup>®</sup>，紐約波希米亞的科學工業公司(Scientific Industries Inc., Bohemia, NY))10秒，歷經20秒至30秒增量，直至溶液為透明琥珀色(短暫渦旋且將脂質混合物放回，進行加熱且重複直至其成溶液)。視情況，將50微升Tween<sup>®</sup> 20添加至脂質混合物且渦旋。將乙醇胺添加至混合物且渦旋。隨後，添加諸如亞麻油酸及次亞麻油酸的脂肪酸且藉由渦旋混合。最終脂質混合物儲存在暗處4℃下。

血清替代物亦包括與上文所描述的脂質混合物組合的基礎培養基液體混合物。在一個實施例中，基礎培養基液體混合物包括以下組

分：果膠、氯化鈉 (NaCl)、右旋糖、氯化鉀 (KCl)、磷酸鈉 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、磷酸鉀 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、硒、鉬酸鹽、檸檬酸鐵、甘油以及普洛尼克。基礎液體混合物的一個例示性實施例描述於表4中。

表4

| 成分                                   | 濃度(每公升) | 實例來源                        | 目錄號    |
|--------------------------------------|---------|-----------------------------|--------|
| <b>液態組分</b>                          |         |                             |        |
| <b>NaCl</b>                          | 8公克     | 西格瑪                         | S9888  |
| <b>KCl</b>                           | 0.2公克   | 西格瑪                         | P4504  |
| <b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> | 1.5公克   | 西格瑪                         | S0876  |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>  | 0.2公克   | 西格瑪                         | P5379  |
| <b>右旋糖</b>                           | 5公克     | 西格瑪                         | G6138  |
| <b>果膠</b>                            | 1公克     | 吉爾科(Gillco)<br>(杜邦(DuPont)) | 413720 |
| <b>甘油</b>                            | 0.03毫升  | 西格瑪                         | G2025  |
| <b>硒</b>                             | 50微克    | 西格瑪                         | S5261  |
| <b>普洛尼克68</b>                        | 0.5公克   | 西格瑪                         | P1300  |
| <b>鉬酸鹽</b>                           | 10微克    | 西格瑪                         | M1651  |
| <b>檸檬酸鐵</b>                          | 2毫克     | 西格瑪                         | F3388  |

將右旋糖、果膠以及NaCl混合成粉末且緩慢添加至600毫升再蒸餾水(double distilled water ; ddH<sub>2</sub>O)。將氯化鉀、磷酸鈉以及磷酸鉀粉末添加至果膠-NaCl溶液且混合直至成溶液。硒、鉬酸鹽以及檸檬酸鐵在磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中稀釋且混合直至成溶液。添加甘油，且使用1N NaOH使溶液pH至7.2。將普洛尼克添加至溶液且體積用ddH<sub>2</sub>O增加至1公升。

為組合脂質及液體混合物，隨後將1毫升脂質混合物在10毫升血清替代物基礎液體中混合。經由低黏結過濾器孔徑(例如0.22微米)過濾脂質混合物。將10毫升基礎培養基混合物置放入100毫升無菌容器。將脂質混合物緩慢滴入10毫升基礎培養基，同時例如使用渦旋，

且隨後震盪瓶來渦旋10毫升基礎培養基且劇烈混合。視情況，使脂質體混合物經過微流化床，其將有助於製造均勻尺寸化的奈米脂質體。為製得較大體積溶液，將10毫升脂質體混合物緩慢滴入990毫升液體混合物，同時渦旋基礎培養基以達到1公升溶液。

## 實例2

### 脂質體血清替代物促進細胞生長及存活

為證明實例1中描述的血清替代物促進細胞的細胞生長及增殖的能力，在包括血清替代物的儲備液培養基中培養分離自小鼠的初生細胞或細胞株。

如先前所描述，脾細胞自預先用磷脂蛋白(phospholipoprotein；PLP)139-151免疫接種的SJL小鼠分離(麥克雷(McRae)等人，實驗醫學雜誌(J Exp Med). 182(1):75-85, 1995)，且將在DMEM + 10%血清替代物中的細胞生長與在市售無血清培養基AIM-V®(加利福尼亞州卡爾斯巴德的英維羅根)中的生長相比較。將 $5 \times 10^5$ 個細胞於200微升生長培養基中置放於96孔板中，且在3天後量測回應PLP139-151(0微克/毫升、0.5微克/毫升、5微克/毫升或50微克/毫升)再刺激的脾細胞增殖程度。圖1展示在DMEM + 10%血清替代物中的細胞培養與無血清培養基相比產生顯著更大的增殖。亦比較脾細胞在含FBS的DMEM或DMEM + 10%血清替代物中的生長。圖2A展示無論受刺激還是未受刺激，在DMEM + 10% FBS中培養的細胞均增殖，刺激指數低，而DMEM + 10%血清替代物中培養的脾細胞的數目加倍。圖2B表示第二增殖分析，其中脾細胞在DMEM + 10% FBS或DMEM + 10%血清替代物中培養。圖2B展示在DMEM/10% FBS中培養的細胞具有高於3的刺激指數，而在DMEM/10%血清替代物中培養的細胞具有略低於3的刺激指數。有趣的是，圖2A及圖2B中的資料展示在DMEM/10%血清替代物中的細胞培養與在DMEM/FBS中的細胞培養相

比提供一致的增殖結果，即使在未受刺激細胞群體中其亦可產生非特定增殖。相比於在FBS中培養，本文中所描述的血清替代物提供更一致、可再生的細胞培養條件，其可具有細胞刺激特性且可引起具有內部批間差異的細胞刺激。

除了原生細胞培養外，測定血清替代物對細胞株生長的影響。單獨在漢姆氏(F12)或含10%血清替代物的漢姆氏培養基中培養中國倉鼠卵巢(Chinese hamster ovary; CHO)細胞( $5 \times 10^5$ 在96孔板中)，且量測細胞生長及存活率。在漢姆氏培養基中培養的CHO細胞數目在4天內加倍，而在漢姆氏/10%血清替代物中培養的CHO細胞數目在4天內增加大約8倍。在4天內，細胞在任一培養條件中的存活率為大約90%。

亦已證明相比於具有缺乏抗氧化劑的脂質體的血清替代物，包含包括 $\alpha$ 生育酚的脂質體的血清替代物培養基改良細胞生長。這個結果與 $\alpha$ 生育酚在培養中抑制細胞生長的報導形成對比。參見例如西貝斯特(Sylvester)等人，「維生素E抑制正常乳房上皮細胞生長與蛋白激酶C( $\alpha$ )活性減小相關 (Vitamin E inhibition of normal mammary epithelial cell growth is associated with a reduction in protein kinase C( $\alpha$ )activation)」細胞增殖(Cell Prolif.)34(6):347-57, 2001或諾依齊(Neuzil)等人，「維生素E類似物作為細胞凋亡的誘導劑：其潛在抗腫瘤作用的影響 (Vitamin E analogues as inducers of apoptosis: implications for their potential antineoplastic role)」氧化還原報告(Redox Rep.)6(3):143-51, 2001。

這些結果證明包括本文中所描述的脂質體的血清替代物有效地提供活體外細胞株生長。

### 實例3

相比於血清，脂質體血清替代物減少細胞死亡及實驗內變化

5

亦使用經分離的CD4<sup>+</sup> T細胞，檢驗本文中所描述的血清替代物在培養期間減緩或減少細胞死亡的能力。

使用磁珠分離度方案(參見例如加利福尼亞州奧本的美天旋生物科技有限公司(Miltenyi Biotec Inc.)的MACS<sup>®</sup>分離或加利福尼亞州卡爾斯巴德的生命技術的DYNABEADS<sup>®</sup>)，自小鼠脾分離CD4<sup>+</sup> T細胞。比較細胞在DMEM + 10%血清替代物中的生長與在包括10% FBS的DMEM中的生長。包括血清替代物的培養基亦補充有各種生長因子以補償在FBS中發現的那些額外生長因子(參見例如美國專利公開案20130130373)。將5×10<sup>5</sup>個CD4<sup>+</sup> T細胞於200微升生長培養基中置放於96孔板中，且經由併入WST-1歷經3天量測回應於抗-CD3/抗-CD28刺激的T細胞增殖程度(參見例如法郎庫(Francoeur)等人，生物化學(Biochemica)3:19-25, 1996)。WST-1分析使用四唑鎢鹽WST-1斷裂成可溶性甲染料來量測細胞增殖。隨著細胞數目增加，四唑鎢還原酶的含量上升，使WST-1至可偵測染料的轉化增加。在440奈米處，藉由吸光度量測染料的量。

圖3展示受刺激CD4<sup>+</sup> T細胞的增殖比在培養基加FBS中培養的細胞中觀察到的增殖更好或至少相當。八個複製培養物用於各刺激組以可以計算實驗內變數。差異確定為增殖中觀察到的標準差的平方。圖3B展示與在FBS中培養相比，血清替代物與生長因子中的細胞培養產生最低實驗內差異。藉由乳酸脫氫酶(lactate dehydrogenase; LDH)細胞凋亡分析，亦量測歷經3天培養過程的細胞死亡(參見例如沃爾特比克H.T.(Wolterbeek H.T.)及凡迪爾米爾J.G.M.(van deer Meer J.G.M.)分析藥物發展技術(Assay Drug Dev Technol)3:675-682, 2005)。分析量測LDH在由細胞膜斷裂產生的上清液中的含量。經由一系列反應，LDH引起可偵測可溶性染料產生，藉由490奈米至520奈米的吸光度來定量。更高LDH含量表示細胞凋亡增加。圖4A展示與用FBS培養相比，

培養基加血清替代物及生長因子中的培養減少在培養期間發生的細胞凋亡程度。圖4B展示與用含FBS培養基培養的實驗內差異相比，在這個實驗中，在血清替代物中培養的細胞中的實驗內差異亦為最低。

這些結果展示本文中所描述的血清替代物，以及包括脂質體的完全培養基或培養基補充物提供類似於FBS中生長的細胞培養環境，但缺乏在用FBS培養中所見的缺點，諸如批間差異及實驗內差異。

預期本領域中具通常知識者想到如上文說明性實例中闡明的本發明的大量修改及變化。因此，僅諸如在所附申請專利範圍中呈現的限制應施於本發明。

#### **【符號說明】**

無

# 申請專利範圍

1. 一種用於懸浮或貼壁培養中細胞的培養基，所述培養基包括基礎生理緩衝劑液體混合物及
  - (a)包括膽固醇、卵磷脂以及脂肪酸的脂質體，其中所述脂質體的量使得膽固醇在細胞懸浮液或貼壁培養物中的最終濃度為1毫克/公升至20毫克/公升，且其中卵磷脂在細胞懸浮液或貼壁培養物中的最終濃度為100毫克/公升至1000毫克/公升；或
  - (b)果膠；或
  - (a)及(b)。
2. 如請求項1之用於懸浮或貼壁培養中細胞的培養基，其中所述脂質體包括一或多種由次亞麻油酸、亞麻油酸、肉豆蔻酸以及油酸所組成的群組中選出的脂肪酸。
3. 如請求項1或2之用於懸浮或貼壁培養中細胞的培養基，其中所述脂質體更包括乙醇胺及聚山梨醇酯。
4. 如請求項1至3中任一項之用於懸浮或貼壁培養中細胞的培養基，其中果膠在細胞懸浮液或貼壁培養物中的最終濃度為25毫克/公升至500毫克/公升。
5. 如請求項1至4中任一項之用於懸浮或貼壁培養中細胞的培養基，其中所述基礎生理緩衝劑液體混合物包括一或多種有機鹽、無機鹽、緩衝劑、鐵源或鐵轉運體、甘油、胺基酸、維生素、糖、抗氧化劑以及微量元素。
6. 如請求項5之用於懸浮或貼壁培養中細胞的培養基，其中甘油在細胞懸浮液或貼壁培養物中的最終濃度為2微升/公升至0.5毫升/公升。
7. 如請求項5之用於懸浮或貼壁培養中細胞的培養基，其中所述鐵

源或鐵轉運體是由以下各者所構成的群組中選出：轉鐵蛋白、乳鐵蛋白、硫酸亞鐵、檸檬酸亞鐵、檸檬酸鐵、硝酸鐵、硫酸鐵、檸檬酸鐵銨、草酸鐵銨、反丁烯二酸鐵銨、蘋果酸鐵銨以及丁二酸鐵銨。

8. 如請求項5之用於懸浮或貼壁培養中細胞的培養基，其中所述培養基包括一或多種由以下各者所構成的群組中選出的胺基酸：甘胺酸、L-丙胺酸、L-精胺酸、L-天冬醯胺、L-天冬胺酸、L-瓜胺酸、鹽酸L-半胱胺酸、L-胱胺酸、L-麩胺酸、L-麩醯胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-白胺酸、L-離胺酸、L-甲硫胺酸、L-鳥胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸以及L-纈胺酸。
9. 如請求項5之用於懸浮或貼壁培養中細胞的培養基，其中所述培養基包括一或多種由以下各者所構成的群組中選出的鹽：磷酸鉀、氯化鈣(無水)、硫酸銅、硝酸鐵、硫酸鐵、氯化鎂(無水)、硫酸鎂(無水)、氯化鉀、氯化鈉、無水磷酸氫二鈉、磷酸二氫鈉、氯化錫、硫酸鋅以及碳酸氫鈉。
10. 如請求項5之用於懸浮或貼壁培養中細胞的培養基，其中所述培養基包括一或多種由以下各者所構成的群組中選出的維生素：生物素、氯化膽鹼、D-泛酸鈣、葉酸、菸鹼醯胺、鹽酸吡哆醇、雙黃素(bioflavin)、鹽酸硫胺、維生素B12以及異肌醇。
11. 如請求項5之用於懸浮或貼壁培養中細胞的培養基，其中所述培養基包括一或多種由以下各者所構成的群組中選出的微量元素：硒、鉬酸鹽、鉻、鈷、鎳、鋅、銅、錳、鋇、鎂、鋁、錫、鈦、溴、碘、鈣、鎳、鈷、矽、鐵、氟、銀、銻、鎘、鎘以及鋁。
12. 如請求項11之用於懸浮或貼壁培養中細胞的培養基，其中所述微

量元素為硒，且硒在細胞懸浮液或貼壁培養物中的最終濃度為0.005毫克/公升至0.05毫克/公升。

13. 如前述請求項中任一項之用於懸浮或貼壁培養中細胞的培養基，其中所述培養基為血清替代物、完全培養基、培養基補充物或低溫保存培養基。
14. 一種血清替代物、完全培養基或培養基補充物，包括脂質體及基礎生理緩衝劑液體混合物，其中所述脂質體包括卵磷脂、乙醇胺、次亞麻油酸、亞麻油酸、膽固醇以及聚山梨醇酯，且所述基礎液體混合物包括至少一種無機鹽、至少一種糖、甘油以及至少一種微量元素。
15. 如請求項14之血清替代物、完全培養基或培養基補充物，更包括至少一種非離子界面活性劑及至少一種鐵源。
16. 如請求項14之血清替代物、完全培養基或培養基補充物，其中所述脂質體的量使得膽固醇在細胞懸浮液或貼壁培養物中的最終濃度為1毫克/公升至20毫克/公升，且其中卵磷脂在細胞懸浮液或貼壁培養物中的最終濃度為100毫克/公升至1000毫克/公升。
17. 如請求項14至16中任一項之血清替代物、完全培養基或培養基補充物，其中所述基礎生理緩衝劑液體混合物包括一或多種由以下各者所構成的群組中選出的鹽：磷酸鉀、氯化鈣(無水)、硫酸銅、硝酸鐵、硫酸鐵、氯化鎂(無水)、硫酸鎂(無水)、氯化鉀、碳酸氫鈉、氯化鈉、無水磷酸氫二鈉、磷酸二氫鈉、硫酸鋅以及氯化錫。
18. 如請求項14至17中任一項之血清替代物、完全培養基或培養基補充物，其中所述液體混合物包括氯化鈉、氯化鉀、磷酸鈉以及磷酸鉀。

19. 如請求項14至18中任一項之血清替代物、完全培養基或培養基補充物，其中所述液體混合物包括一或多種由以下各者所構成的群組中選出的微量元素：硒、鉬酸鹽、鉻、鈷、鎳、鋅、銅、錳、鋇、鎂、鋁、錫以及鈦。
20. 如請求項19之血清替代物、完全培養基或培養基補充物，其中所述液體混合物包括硒及鉬酸鹽。
21. 如請求項13至19中任一項之血清替代物、完全培養基或培養基補充物，其中所述液體混合物包括一或多種由以下各者所構成的群組中選出的鐵源或鐵轉運體：轉鐵蛋白、乳鐵蛋白、硫酸亞鐵、檸檬酸亞鐵、硝酸鐵、硫酸鐵、檸檬酸鐵、檸檬酸鐵銨、草酸鐵銨、反丁烯二酸鐵銨、蘋果酸鐵銨以及丁二酸鐵銨。
22. 如請求項20之血清替代物、完全培養基或培養基補充物，其中所述鐵源為檸檬酸鐵。
23. 如請求項14至22中任一項之血清替代物、完全培養基或培養基補充物，其中所述液體混合物包括一或多種由以下各者所構成的群組中選出的非離子界面活性劑：普洛尼克-68(Pluronic-68)、F68佩斯蒂爾(F68 Pastille)、普洛尼克-128、去水山梨醇、聚山梨醇酯以及嵌段共聚物。
24. 如請求項23之血清替代物、完全培養基或培養基補充物，其中所述非離子界面活性劑為普洛尼克-68。
25. 如請求項14至24中任一項之血清替代物，其中膽固醇在所述血清替代物中的最終濃度為約10毫克/公升至200毫克/公升，且卵磷脂在所述血清替代物中的最終濃度為約1000毫克/公升至10公克/公升。
26. 如請求項14至24中任一項之完全培養基，其中膽固醇在所述完



全培養基中的濃度為約1毫克/公升至20毫克/公升，且卵磷脂在所述完全培養基中的濃度為約100毫克/公升至1000毫克/公升。

27. 如請求項14至24中任一項之培養基補充物，其中膽固醇在所述培養基補充物中的濃度為約100毫克/公升至2000毫克/公升，且卵磷脂在所述培養基補充物中的濃度為約10公克/公升至100公克/公升。
28. 如請求項14至24中任一項之血清替代物、完全培養基或培養基補充物，更包括果膠。
29. 如前述請求項中任一項之培養基、血清替代物、完全培養基或培養基補充物，其中所述脂質體為奈米粒子。
30. 如請求項28或29之培養基、血清替代物、完全培養基或培養基補充物，其中所述奈米粒子具有在約50奈米至約500奈米範圍內的平均直徑。
31. 如前述請求項中任一項之培養基、血清替代物、完全培養基或培養基補充物，其不含動物性成分。
32. 一種細胞低溫保存培養基，其包括脂質體及基礎生理緩衝劑液體混合物，其中膽固醇在所述低溫保存培養基中的最終濃度為約10毫克/公升至200毫克/公升，且卵磷脂在所述低溫保存培養基中的最終濃度為約1000毫克/公升至10公克/公升。
33. 如請求項32之低溫保存培養基，更包括果膠。
34. 如請求項33之低溫保存培養基，其中果膠在細胞懸浮液中的最終濃度為約50毫克/公升至5公克/公升。
35. 如請求項32或33之低溫保存培養基，更包括甘油。
36. 如請求項35之低溫保存培養基，其中甘油在細胞懸浮液中的最終濃度為約0.02毫升/公升至5毫升/公升。
37. 如請求項32至36中任一項之低溫保存培養基，更包括二甲亞砷

(dimethyl sulfoxide; DMSO)，其中所述DMSO的濃度小於4%。

38. 如請求項32至37中任一項之低溫保存培養基，其中所述培養基更包括聚離胺酸。
39. 一種培養細胞的方法，包括在含有如前述請求項中任一項之血清替代物、完全培養基或培養基補充物的培養基中培養細胞。
40. 如請求項39之培養細胞的方法，其中所述細胞是由以下所構成的群組中選出：多能幹細胞、胚胎幹細胞、骨髓基質細胞、造血祖細胞、淋巴幹細胞、骨髓幹細胞、T細胞、B細胞、巨噬細胞、肝細胞、胰腺細胞、癌瘤細胞以及細胞株。
41. 如請求項40之培養細胞的方法，其中所述細胞株是由以下各組所構成的群組中選出：CHO、CHOK1、DXB-11、DG-44、CHO/-DHFR、CV1、COS-7、HEK293、BHK、TM4、VERO、HELA、MDCK、BRL 3A、W138、Hep G2、SK-Hep、MMT、TRI、MRC 5、FS4、T細胞株、B細胞株、3T3、RIN、A549、PC12、K562、PER.C6、SP2/0、NS-0、U20S、HT1080、L929、融合瘤以及癌細胞株。
42. 一種低溫保存細胞的方法，包括將細胞懸浮於如前述請求項中任一項之低溫保存培養基中，且將所述細胞置放於小於8℃的環境中。
43. 如請求項42之低溫保存細胞的方法，更包括使所述細胞解凍且將其置放於如前述請求項中任一項之培養基中。
44. 如請求項42或43之低溫保存細胞的方法，其中至少30%所述細胞在解凍後仍然有活力。
45. 如請求項42至44中任一項之低溫保存細胞的方法，其中所述細胞是由以下各者所構成的群組中選出：多能幹細胞、胚胎幹細胞、骨髓基質細胞、造血祖細胞、淋巴幹細胞、骨髓幹細胞、T

細胞、B細胞、巨噬細胞、肝細胞、胰腺細胞、癌瘤細胞以及細胞株。

46. 如請求項45之低溫保存細胞的方法，其中所述細胞株是由以下各者所構成的群組中選出：CHO、CHOK1、DXB-11、DG-44、CHO/-DHFR、CV1、COS-7、HEK293、BHK、TM4、VERO、HELA、MDCK、BRL 3A、W138、Hep G2、SK-Hep、MMT、TRI、MRC 5、FS4、T細胞株、B細胞株、3T3、RIN、A549、PC12、K562、PER.C6、SP2/0、NS-0、U20S、HT1080、L929、融合瘤以及癌細胞株。

圖式

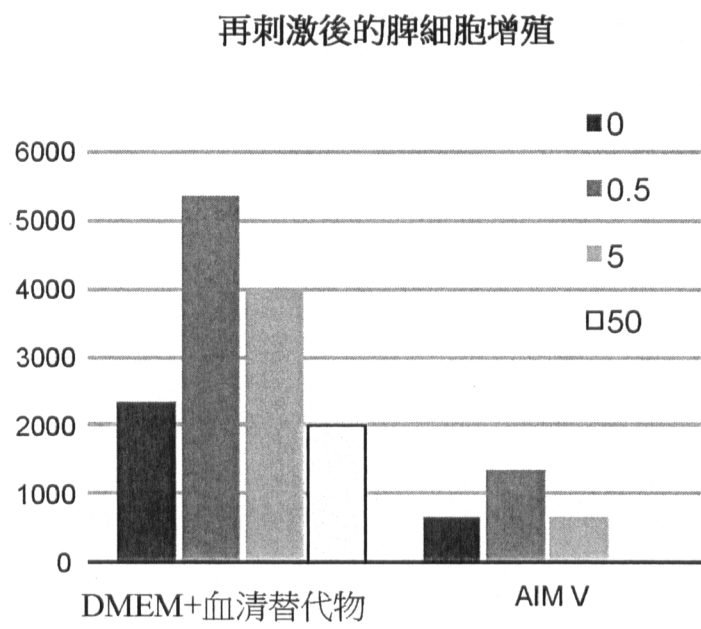


圖 1

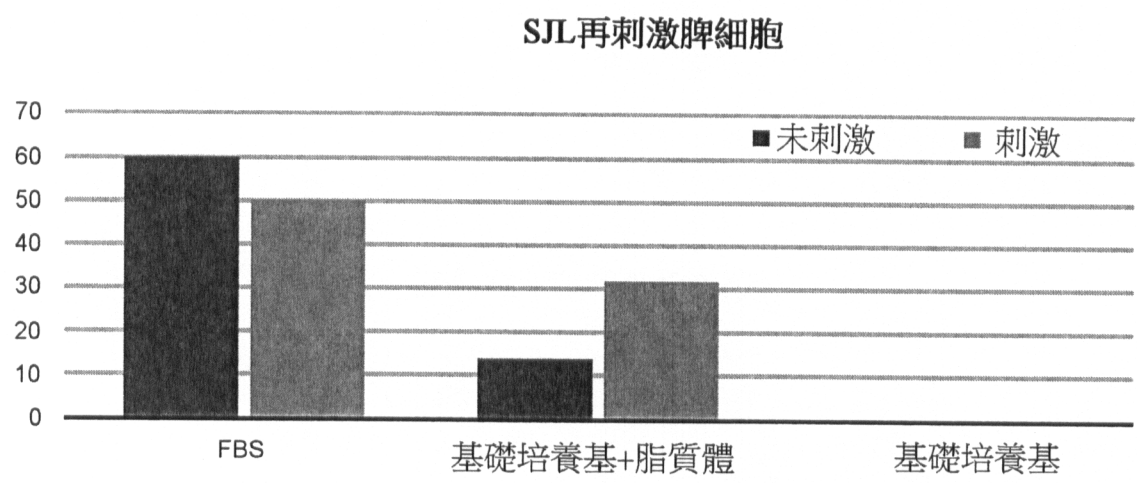


圖 2A

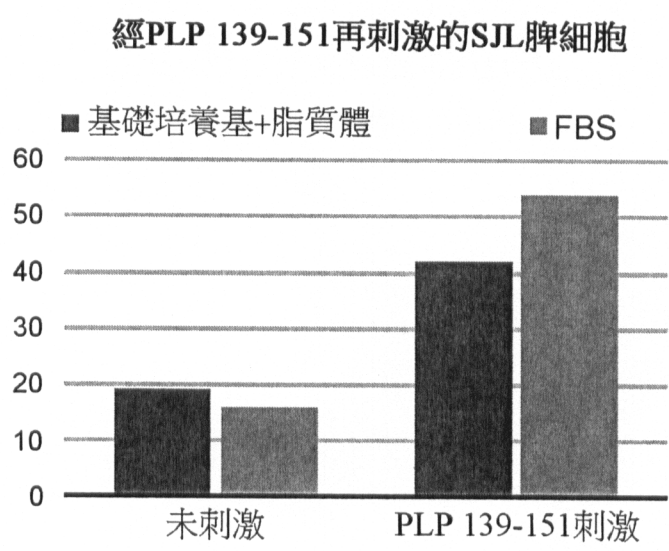


圖 2B

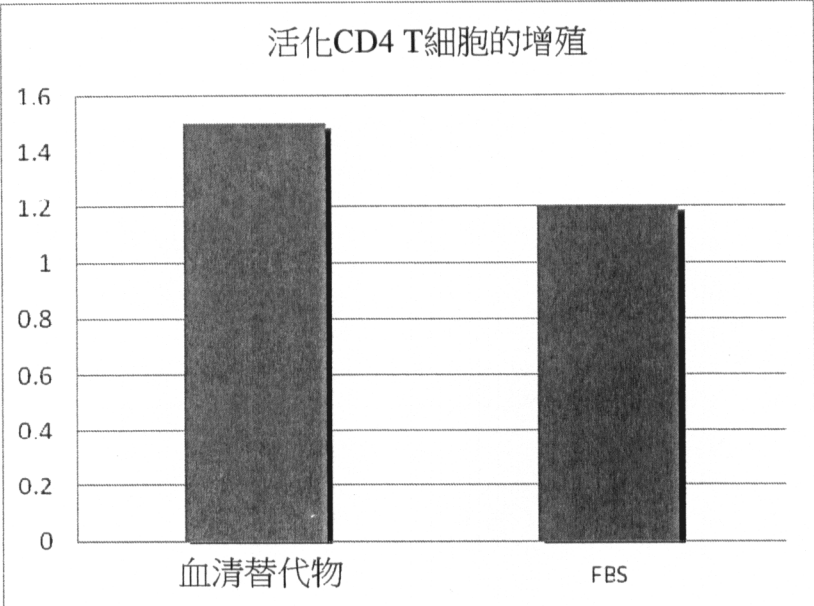


圖 3A

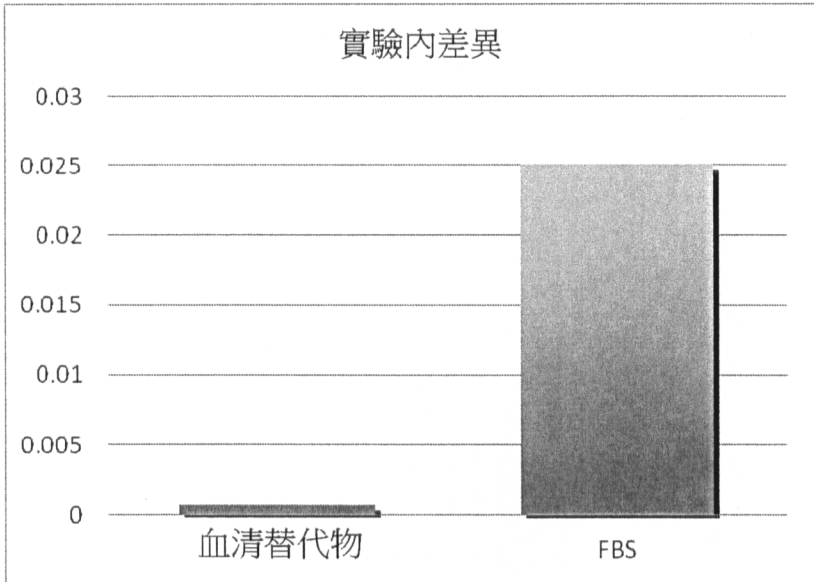


圖 3B

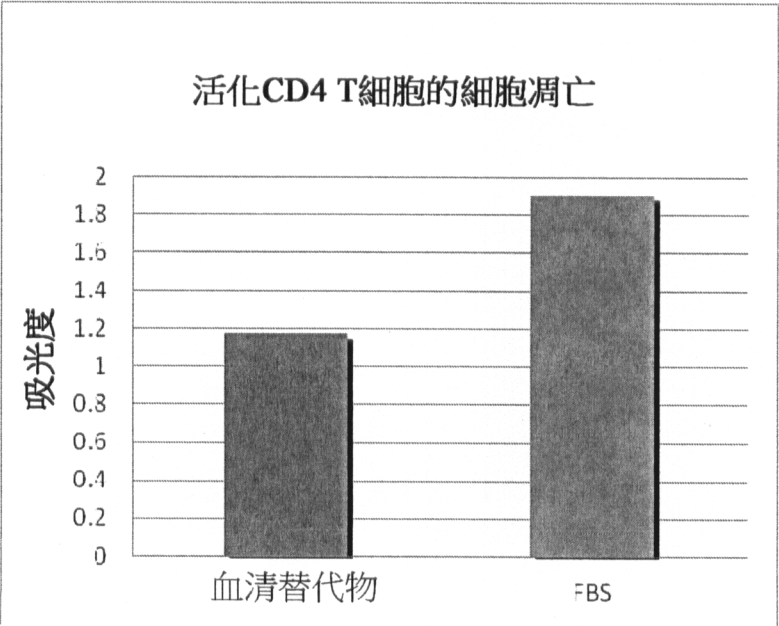


圖 4A

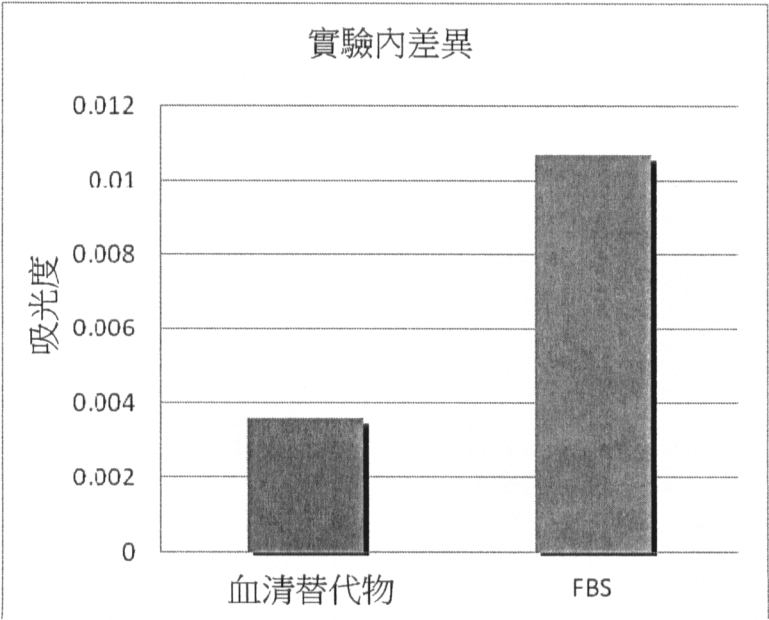


圖 4B