

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項 ☐ 第一款但書或 ☐ 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☒ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 德國； 2002,03,28； 102 14 095.2
2. PCT； 2003,02,25； PCT/EP03/02121
3. 美國； 2003,02,25； 10/372,657
- 4.
- 5.

☐ 主張國內優先權（專利法第二十五條之一）：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

- 1.
- 2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

說明

本發明係有關自人類單核球所衍生之成年型經去分化
5 的可程式化幹細胞，以及其等的生產作用及用於生產體細胞與組織之用途。如本發明的一個特佳實施例，該等細胞為自體型人類幹細胞，亦即源自該病患的單核球之細胞，而該病患待以自原始細胞所產生的幹細胞及/或以該幹細胞所產生的體細胞進行治療。

10 【先前技術】

在目前的技藝中，“幹細胞”一詞係指(a)具有自我更新能力及(b)因其等的不對稱分化能力而具有形成至少一種及通常數種專化細胞類型的能力之細胞(參見Donovan, J. J.與Gearhart, J.於Nature第414期第92-97頁(2001年)乙文)。“多
15 能性”一詞，係指實質上可分化成為人體或動物體之所有可能的細胞類型之幹細胞。迄今，該等幹細胞僅能自胚胎組織或胚癌(睪丸腫瘤)取得(參見上所引述之Donovan, J. J.與Gearhart, J.乙文)。胚胎幹細胞之使用一直是引起大眾廣泛討論及被視作非常棘手之議題，特別是在德國。除了與胚
20 胎幹細胞相關的道德與法律問題之外，該等細胞的治療用途亦面臨困難。就本質而言，胚胎幹細胞係自捐贈的生物體取得，其與自該等細胞所發育出的分化細胞或組織(此後稱作體標的細胞或標的組織)之可能接受者係屬於異體性質。因此，預期該等標的細胞將在可能接受者體內，引發

排斥形式的立即免疫反應。

自成年人(亦即已分化完成的個體)之不同組織中，亦可分離出幹細胞。該等幹細胞在技藝中稱作“複能性成年型幹細胞”。其等在身體內的組織再生作用與體內平衡作用中，
5 扮演一角色。胚胎型多能性幹細胞與成年型複能性幹細胞之間之主要差異，在於自個別細胞可取得的分化組織數目。據推測，此係歸因於多能性幹細胞來自精細胞或可產生精子之細胞，而成年型複能性幹細胞來自無法產生精子之成年個體的身體或軀體之故(參見上所引述之Donovan, J.
10 J.與Gearhart, J.乙文第94頁)。

然而，與成年型幹細胞的取得與使用相關之實際問題，在於該等細胞之稀有性。因而，在骨髓中，幹細胞僅以1：10,000之比例存在；在周邊血液中為1：250,000；而在肝臟中為1：100,000。因此，對於病患而言，獲取該等
15 幹細胞是非常昂貴及構成極大的壓力。此外，幾乎不可能以合理的花費生產臨床療法所需的大量細胞。

此係與對於可能以“組織工程”或細胞療法治療受損組織之需求的持續增加，呈現對比；在“組織工程”或細胞療法的架構中，係將該皮膚細胞、肌肉細胞、心肌細胞、肝
20 臟細胞、胰島細胞、神經細胞、神經元細胞、骨骼細胞、軟骨細胞、內皮細胞及脂肪細胞等予以置換。

就此而言，西方世界的人口在年齡與疾病分布方面之可預知的發展，必然使得西歐及包括美國與加拿大的健康醫療部門，在往後10年中預期面臨劇烈的轉捩點。就德國

本身而言，由人口成長顯示：在2015年前，45至64歲年齡層的人口將增加21%，而65歲以上年齡層的人口將增加26%。這必然造成病患結構及需要治療的疾病類型之改變。可預期地，將會增加心臟-循環系統的疾病(高血壓、心肌梗塞)；源自動脈硬化與代謝疾病之血管疾病；代謝疾病諸如糖尿病；肝臟代謝作用的疾病；由年齡相關的退化作用所引起之腎臟病以及骨骼系統疾病；及由神經元與神經膠質細胞之喪失所引起的大腦退化性疾病，因而需要創新的治療觀念。

10 這些事實說明了為何相關專家正推動廣大的國家型與國際性研究發展工作，以獲得可程式化成為組織(肝臟、骨骼、軟骨、肌肉、皮膚等)的典型分化細胞之幹細胞。

【發明內容】

因此，本發明所面對的問題在於提供成年型幹細胞，
15 該幹細胞的生產作用並無道德及/或法律問題，而且能以合理的生產成本快速地提供治療所需量以供規劃的治療用途之用，及當作為所涉及病患的“細胞療法”時，並無細胞排斥及引發腫瘤(特別是惡性腫瘤)方面之副作用或無值得提及的副作用。

20 如本發明，藉由自人類單核球生產經去分化的可程式化幹細胞(就本發明目的而言此後稱作“幹細胞”)，而解決該問題。“去分化”一詞係嫻熟相關技藝者所熟悉之辭彙，如見Weissman I. L.於Cell第100期第157-168頁(2000年)乙文第4圖。其強調將一成年的已專化(分化)體細胞回歸至一幹

細胞狀態之作用，亦即可轉化(程式化)成為多種細胞類型之一細胞。意外地，如本發明的方法已顯示導致單核球的去分化作用。依此方式所生產的幹細胞可轉化(程式化)成為多種不同的標的細胞/標的組織(請參見實例)。如本發明的幹

5 細胞除了表現分化型單核球的CD14表面抗原特徵之外，尚表現典型的多能性標記CD90、CD117、CD123及CD135中之至少一者，及較佳表現其中之二或三者。在一種特佳的方式中，如本發明所生產的幹細胞表現CD14表面抗原以及四個多能性標記CD90、CD117、CD123及CD135，如見第2

10 例的第1表。本發明的幹細胞較佳表現膜聯結型單核球專一性表面抗原CD14以及至少一個選自下列群中的多能性標記：CD90、CD117、CD123及CD135。如本發明的幹細胞更佳帶有CD14抗原以及多能性標記CD123及/或CD135中之至少一者。低於3%及較佳低於1%之本發明的幹細胞表現

15 CD34抗原。在本發明的幹細胞中，最佳並無一者表現CD34抗原。依此方式，首次提供成年型幹細胞，及可在短時間內程式化成為較佳的自體組織。

如本發明的幹細胞生產作用，對該名病患完全無害，及在自體使用的情況下係與自體捐血相當。在取得血液後

20 10至14天內，能以具成本效益的方式製得一般治療方案(見上述)所需的幹細胞數量(10^8 至 10^9 個細胞)。此外，在自體使用的情況下，所提供用於療法中之細胞產物不會引起細胞排斥方面的免疫問題，因為該細胞與接受者具有較佳的遺傳同一性。

在動物實驗及細胞培養中，亦證實如本發明的幹細胞並無引發惡性腫瘤方面之風險；而對於引發惡性腫瘤結果之預期僅僅因為具單核球來源的細胞之故，而本發明的幹細胞係衍生自該等細胞。

- 5 如本發明用於生產具人類單核球來源之經去分化的可程式化幹細胞之方法中的重要步驟包括：

(a)自人類血液中分離單核球；

(b)在含有細胞培養基之一適宜容器中增殖該單核球，該培養基中含有巨噬細胞群落刺激因子(此後稱作M-CSF)；

- 10 (c)在間白素-3(IL-3)之存在下培養該單核球；

(d)藉由將細胞與培養基分離，而獲得人類經去分化的可程式化幹細胞。

如本方法的一個特佳實施例，係於第b)步驟中，在細胞培養基中同時添加M-CSF與IL-3。

- 15 然而，在第b)步驟中，亦可能在細胞培養基中最初僅添加M-CSF，以引發單核球的增殖作用；之後再於細胞培養基中添加IL-3。

最後，第b)步驟方法之進行方式，係最初在僅含有M-CSF的細胞培養基中增殖單核球，然後將培養基與細胞

- 20 分離，再使用含有IL-3之第二細胞培養基。

如本發明的一個較佳實施例，將第b)步驟中的培養基與附著於培養容器底部的細胞分離，及藉由自容器底部剝離細胞及藉由分離出細胞，而獲得人類經去分化的可程式化幹細胞。

如本發明的一個較佳實施例，進一步在一硫化合物的存在下，培養該等細胞。該培養作用可在上述第b)步驟培養作用之後之一個分開的方法步驟中進行。然而，藉由進一步在培養基中添加該硫化合物，及該硫化合物較佳在培養作用開始之際已存在，亦可在第b)步驟中進行之。

如本發明的方法意外地導向單核球之去分化作用，其中自去分化作用所產生的成年型幹細胞除了分化型單核球典型具特有的CD14表面抗原之外，尚表現典型的多能性標記CD90、CD117、CD123及CD135中之至少一者或多者，及較佳表現其中之所有者(參見第1表)。本發明的幹細胞較佳表現膜聯結型單核球專一性表面抗原CD14以及至少一個選自下列群中的多能性標記：CD90、CD117、CD123及CD135。如本發明的幹細胞更佳帶有CD14抗原以及多能性標記CD123及/或CD135中之至少一者。低於3%及較佳低於1%之本發明的幹細胞表現CD34抗原。在本發明的幹細胞中，最佳並無一者表現CD34抗原。可藉由對於待偵測的個別抗原具有專一性之商品化抗體，使用標準免疫分析程序，參見第2例，而證實個別標記(表面抗原)的表現作用。

因為細胞在增殖與去分化過程期間黏著於個別培養容器的底部，必須將細胞與第b)步驟的培養基分離，及在去分化作用完成之後將細胞與容器底部剝離。如本發明的一個較佳實施例，在將黏著於底部的細胞剝離之前，棄置細胞培養上清液，接著較佳以未用過的培養基清洗細胞。在清洗之後，在黏著於底部的細胞中再度添加未用過的培養

基，及接著進行自容器底部剝離細胞之步驟(參見第13例)。

如一個較佳的實施例，細胞在第c)步驟結束後及在第d)步驟開始之前，與一種生物耐受性良好的有機溶劑接觸。該生物耐受性良好的有機溶劑可為一種具有1至4個碳
5 原子之醇類，其中較佳使用乙醇。

在另一實施例中，細胞在第c)步驟結束後及在第d)步驟開始之前，與一種生物耐受性良好的有機溶劑之蒸氣相接觸。

該剝離作用亦可進一步以機械方式進行，然而，以一
10 酵素性移除方法為較佳者，例如以胰蛋白酶進行之。

依此方式所獲得的經去分化的可程式化幹細胞係游離漂浮於基質中，及可直接轉移至重新程式化製程中，或於培養基中保存數天；在後者的情況下，較佳在培養基中添加細胞激素或白血病抑制因子(LIF)，以避免過早喪失可程
15 式性(參見上所引述之Donovan, J. J.與Gearhart, J.乙文第94頁)。最後，在不喪失可程式性之下，就儲存目的將細胞深凍。

如本發明的幹細胞與迄今已知之具胚胎來源的多能性幹細胞及來自不同組織的已知成年型幹細胞之不同之處，
20 在於除了膜聯結型單核球專一性表面抗原CD14之外，其等在其表面上帶有至少一個選自下列群中的多能性標記：CD90、CD117、CD123及CD135。本發明的幹細胞較佳帶有膜聯結型單核球專一性表面抗原CD14以及至少一個選自下列群中的多能性標記：CD90、CD117、CD123及

CD135。本發明的幹細胞更佳帶有CD14抗原以及多能性標記CD123及/或CD135中之至少一者。低於3%及較佳低於1%之本發明的幹細胞表現CD34抗原。在本發明的幹細胞中，最佳並無一者表現CD34抗原。

- 5 如本發明的方法所生產之幹細胞，可重新程式化成為任一體細胞。用於重新程式化幹細胞之方法，係技藝中所知者，例如參見 Weissman I. L. 於 Science 第 287 期第 1442-1446 頁 (2000 年) 乙文及於 Insight Review Articles Nature 第 414 期第 92-131 頁 (2001 年) 乙文；及 Academic Press
- 10 公司所出版之由 Atala, A. 及 Lanza, R. P 編輯的“組織工程之方法”手冊，ISBN 0-12-436636-8，國會圖書館目錄卡第 200188747 號。

- 藉由將如本發明的幹細胞重新程式化所獲得之經分化、分離的體標的細胞及/或標的組織，進一步帶有該單核
- 15 球的膜聯結型CD14分化標記。此外，低於3%及較佳低於1%之如本發明的該等體標的細胞及/或標的組織表現CD34抗原。在該等細胞或組織中，最佳並無一者表現CD34抗原。如第11例所示，自本發明的幹細胞所衍生的肝細胞表現單核球典型具有的CD14表面標記，同時製造肝細胞所典型具
- 20 有的蛋白質白蛋白。自本發明的幹細胞所衍生的肝細胞，可因此與天然的肝細胞區別。依此方式，在自本發明的幹細胞所衍生的胰島素製造細胞中，偵測到膜聯結型CD14表面標記(第9例)。

在本發明的一實施例中，可程式化幹細胞係用於在試

管中生產標的細胞及標的組織(參見實例)。因此，藉由如本發明的幹細胞之分化作用(重新程式化作用)所獲得及帶有膜聯結型CD14表面抗原之經分化、分離的組織細胞，亦為本發明之標的。

- 5 如本發明的幹細胞較佳藉由在含有培養基上清液的一基質中生長，該培養基曾培養個別的標的細胞及/或片段(參見第6至8例)，而以簡單與可信賴的方式在試管中分化成為所欲之標的細胞，諸如脂肪細胞(參見第6例)、神經元與神經膠質細胞(參見第3例)、內皮細胞(參見第5例)、角質化細胞(參見第8例)、肝細胞(參見第7例)及胰島細胞(即格爾漢斯(Langerhans)小島，參見第9例)。該上清液此後稱作“經標的細胞調理的基質”。
- 10

可依循下列程序進行如本發明之經去分化的幹細胞之分化作用(重新程式化作用)，其中：

- 15 a)將含有標的細胞或由標的細胞所組成之組織打碎；
 b)獲得組織細胞(標的細胞)及/或其等的片段；
 c)在一適宜的培養基中培養標的細胞及/或其等的片段；
 d)在培養期間與培養之後收集培養基上清液，以作為
 20 經標的細胞調理的基質；及
 e)幹細胞在經標的細胞調理的基質之存在下生長，以將經去分化的幹細胞重新程式化/分化成為所欲之標的細胞或標的組織。

可使用標準的細胞培養基作為培養基(參見實例)。該等

基質較佳含有生長因子，諸如表皮生長因子。

標的細胞及/或其等的片段(“細胞片狀沈澱物”)之培養作用，可進行5至15天，較佳10天。在各情況下，較佳在2至4天後移除上清液(亦即經標的細胞調理的基質)，及以未用過的基質置換之。可在無菌條件下，將所得的上清液以分開或匯集方式加以過濾及儲存於約-20°C，或直接用於幹細胞的重新程式化作用。如上所示，藉由讓幹細胞在經個別標的細胞調理的基質之存在下生長，而將幹細胞重新程式化成為所欲的標的細胞(參見實例)。該生長基質較佳另外含有一種標的細胞專一性因子，諸如“肝細胞生長因子”或“角質化細胞生長因子”(參見實例)。

在本發明的一個實施例中，使用如本發明之經去分化的可程式化幹細胞本身，以製造用於在活體內生產標的細胞與標的組織之一種藥學組成物。

該藥學製劑可含有懸浮於生理上耐受性良好的基質中之如本發明的幹細胞。適宜的基質例如具有20%人類白蛋白溶液等之磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)或生理鹽水。

該等藥學製劑以相對於製劑中所存在的細胞總數之至少1、2、3、4、5、6、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50%之一量，較佳60或70%，特佳80或90%及極佳100%，含有如本發明之經去分化的可程式化活體幹細胞，在幹細胞的表面上具有CD14

表面標記以及複能性幹細胞標記CD90、CD117、CD123及/或CD135中之至少一者；及選擇性地含有其他藥學耐受性良好的佐劑及/或載劑物質。

幹細胞製劑以相對於製劑中所存在的細胞總數之至少
 5 1、2、3、4、5、6、8、9、10、11、12、13、14、15、16、
 17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、
 30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、
 43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、
 56、57、58或59%之一量，較佳至少60%，含有如本發明之
 10 經去分化的可程式化活體幹細胞，在幹細胞的表面上具有
 CD14表面標記以及多能性幹細胞標記CD90、CD117、
 CD123及/或CD135中之至少一者；位於細胞耐受性良好的一
 細胞培養基質或輸送基質如PBS或RPMI等中之細胞懸浮
 液；或位於一適宜的儲存基質中之深凍型細胞製劑，例如
 15 以具有50%人類白蛋白溶液與10%DMSO之RPMI為較佳的
 儲存基質。

可藉由使用”錐蟲藍染料排出技術”，而以光學方式測定活細胞數目及其等在上述組成物中的比例，因為可使用該染料而以光學方式區別活細胞與非存活細胞。

20 原則上，在存有充分數目的功能性幹細胞之前提下，若存在於藥學製劑中之部份細胞並不符合如本發明之經去分化的可程式化幹細胞之標準，對於臨床用途而言並沒有關係。然而，亦可能藉由技藝中以如本發明去分化細胞的典型表面標記為基礎之已知方法，自該等製劑中除去非去

分化細胞，藉此該等製劑含有實質上純的形式之所欲細胞。適宜方法之一實例為“免疫磁性珠選別方法”，參見Romani等人於J. Immunol. Methods第196期第137-151頁(1996年)乙文。

- 5 藉由與一特定細胞類型的細胞群直接接觸，幹細胞另外具有在活體內立即分化成為該類型細胞之能力。在組織生產作用(“組織工程”)中使用可再分化的細胞之方法，係技藝中所知者。例如，Wang, X.等人(於Am. J. Pathol.第158(2)期第571-579頁(2001年)之“藉由植入成年型小鼠胰臟細胞
- 10 之肝臟重建作用與矯正代謝性肝臟疾病”乙文)顯示，即使是小鼠胰臟中的特定成年型細胞，亦能在缺乏富馬醯乙醯乙酸水解酶(FAH)的小鼠中轉化為肝細胞，及其可完全地彌補該等動物中的代謝缺陷。另一實例係Lagasse等人的實驗(於Nature Medicine第6(11)期第1229-1234頁(2000年)之“經
- 15 純化的造血幹細胞可在活體內分化成為肝細胞”乙文)。該等作者顯示：來自骨髓的造血幹細胞在活體轉移至缺乏富馬醯乙醯乙酸水解酶(FAH)的小鼠之後，可轉化為肝細胞，其然後可彌補代謝缺陷；亦見Grompe M.於Hum. Cell第12期第171-180頁(1999年)之“用於治療代謝性肝臟疾病之治
- 20 療性肝臟重建作用”之綜合評論乙文。

如本發明之經去分化的幹細胞之活體內分化作用的特佳實施形式，係在體內一特定細胞群叢中注射、注入或植入該幹細胞，藉由與細胞群叢直接接觸而讓幹細胞在該處分化成為該細胞類型的細胞。就注射或注入作用而言，細

胞可置於磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中投予。

此方面之相關適應症的實例為：肝硬化、胰臟機能不全、急性或慢性腎衰竭、荷爾蒙功能不足、心肌梗塞、肺栓塞，中風及皮膚損傷。

- 5 因此，本發明的較佳實施例係使用經去分化的可程式化幹細胞，以製造用於治療肝硬化、胰臟機能不全、急性或慢性腎衰竭、荷爾蒙功能不足、心肌梗塞、肺栓塞，中風及皮膚損傷之不同的藥學組成物。

就自本發明的幹細胞所得之標的細胞的治療用途而言，存在數種概念(見上述Science第287期第1442-1446頁(2000年)乙文及Nature第414期第92-131頁(2001年)乙文)。

另一種較佳的應用，係將本發明的去分化幹細胞注入腹膜中，藉此幹細胞因為周圍細胞的影響而在該處分化成為腹膜細胞。在患有腎臟機能不全的腹膜透析病患之案例
15 中，該等細胞可經由其等的半滲透性膜而接替腎臟的功能，及將仰賴腎臟的廢棄物質排至腹膜中，再經由透析液而將腹膜中的廢棄物質清除。

因此，藉由幹細胞的重新程式化作用所得及具有特徵性膜聯結型CD14抗原之經分化、分離的體標的細胞及/或標
20 的組織，亦為本發明的標的。該等體標的細胞及/或標的組織較佳包括脂肪細胞、神經元與神經膠質細胞、內皮細胞、角質化細胞、肝細胞及胰島細胞。

然而，亦可將該等細胞直接引入待重建的器官中。可經由經塗覆有對應的分化細胞或能進行分化的細胞之基質

構造物，而進行該引入作用。該基質構造物原則上具有生物可分解性，藉此當新引入的細胞與既存細胞生長在一起時，該基質構造即自體內消失。自此觀點而言，例如胰島細胞、肝細胞、脂肪細胞、皮膚細胞、肌肉、心肌、神經、

5 骨骼、內分泌細胞形式之細胞性及較佳的自體移植物，被考量用於：例如一器官的部份手術切除後之復原作用；例如創傷後的修復作用；或例如在器官功能缺乏或不足情況下之支援性用途。

如本發明的幹細胞及自其等所得的標的細胞，可進一步用於塗覆可植入性物質，以增加生物可相容性。因此，

10 塗覆有經去分化的可程式化幹細胞或體標的細胞及/或標的組織之可植入性物質，亦為本發明之標的。如本發明的一實施例，該等可植入性物質為人工器官。在一個特佳的實施例中，該等人工器官為心臟瓣膜、人工血管、人工骨

15 骼與關節。

可植入性物質亦可為含有經去分化的可程式化幹細胞或標的細胞之人造及/或生物載體物質。就此而言，該載體物質可為用於置入人體之袋或盒。

在本發明的一實施例中，使用含有身為本發明之經分

20 化的體細胞之胰島細胞之該種袋，以用於製造作為供應胰島素的人工胰島細胞配流盒之一藥學建構物。

如本發明的另一實施例，使用含有身為本發明之經分化的體細胞之脂肪細胞之一袋或盒，以用於製造具有裝填脂肪細胞的人造聚合物之一藥學建構物，以在手術後用於

建造乳房或用於整型與美容矯正的其他適應症。

再者，可使用含有廣泛來源的內分泌細胞之半滲透性配流盒系統，以在活體內用於治療內分泌性、代謝性或體內平衡性病徵。該等內分泌細胞的實例為製造甲狀腺素、
5 類固醇、ADH、醛甾固酮、褪黑激素、血清素、腎上腺素、去甲腎上腺素、TSH、LH、FSH、纖瘦素(leptin)、縮膽囊肽、胃泌激素、胰島素、抗胰島素或凝結因子之細胞。

因此，含有經分化、分離的體標的細胞之半滲透性配流盒系統之可植入性物質，亦為本發明之標的。該等半滲
10 透性配流盒系統係用於本發明的不同實施例中，以製造用於在活體內治療內分泌性、代謝性或體內平衡性病徵之一藥學建構物。

此外，自本發明之幹細胞所製得的標的細胞，可作為體外生物反應器中之細胞培養物，例如以進行解毒反應。
15 在急性病況的案例中，該形式的用途特別重要，例如在急性肝臟衰竭的情況下作為一種肝細胞-生物反應器。

在技藝中已多次述及上述建構物之製造作用及對應的治療方法之進行，例如參見Lanlan等人於World J. Surg.第25期第1458-1466頁(2001年)之“組織工程及其對於外科手術
20 之可能衝擊”綜合評論乙文；Nasseri, B. A.等人於Surgery第130期第781-784頁(2001年)之“組織工程：提供重建與移植用的替換物之廿一世紀的新興科學”乙文；及Fuchs, J. R.等人於Ann. Thorax. Surg.第72期第577-591頁(2001年)之“組織工程：廿一世紀對於手術重建之解決方案”乙文。

最後，如本發明的多能性幹細胞開啟基因轉殖改造作用與療法之廣大領域。如本發明的一個較佳實施例，該經去分化的可程式化幹細胞本身或最終自其等所分化之體標的細胞及/或標的組織，係經一或多個基因轉移感染。依此

5 方式，回復及/或支援或重新引入維持特定器官諸如肝臟或腎臟的代謝作用所需之一或多個基因。例如，幹細胞或自其等所衍生的肝細胞，可經轉移感染具有富馬醯乙醯乙酸水解酶(FAH)基因。在缺乏FAH的小鼠模式中，在脾內注射1000個FAH陽性供體肝細胞，即足以在6至8星期後完全重

10 建肝臟，及完全彌補導致肝臟硬化之代謝缺陷(參見Grompe, M.等人於Nat. Genet.第12期第266頁(1996年)乙文)。

對應地，藉由以“多重抗藥性基因”進行程式化(例如造血細胞、肝細胞、卵巢細胞、肌肉細胞、神經細胞、神經元、神經膠質細胞、軟骨或骨骼細胞等)，藉由幹細胞或自

15 幹細胞所得的個別標的細胞之轉移感染作用，可藉由產生對應的造血重建作用或放射性抗性，而在惡性病情況進行長期的激進式化學療法。

【實施方式】

本發明詳細說明如下：

20 用於本發明方法中之起始物質，係來自人類血液的單核球。其等較佳為自體性單核球，亦即來自待以如本發明的幹細胞或自其等所製得的標的細胞加以治療的病患血液之單核球。

為獲得單核球，血液在依據一已知方式以抗凝結劑處

理之後，較佳藉由離心而分離為血漿及分成白血球與紅血球。在離心之後，發現血漿位於上清液；其下一層含有全部的白血球。該層亦稱作“血沈棕黃色層(buffy coat)”。該層下方則為含有紅血球之層。

5 然後使用一已知方法，例如藉由離心，將“血沈棕黃色層”分離與分開，而得單核球。依據一較佳的方法形式，將“血沈棕黃色層”塗覆於一種淋巴球分離基質(如Ficoll Hypaque)上，及加以離心。藉由進一步的離心與清洗，自血液中獲得單核球部份(參見第1例)。

10 用於自完整的血液中獲得單核球之其他方法實例，為“螢光活化細胞選別作用(FACS)”、“免疫磁性珠選別作用”(參見Romani等人於J. Immunol. Methods第196期第137-151頁(1996年)乙文)及“磁性活化細胞選別作用(MACS)”或所謂的“簇集(Rosetting)方法”(參見Gmelig-
15 Meyling, F.等人於Vox Sang.第33期第5-8頁(1977年)之“用於分離人類T與非T細胞之簡化程序”乙文)。

 如本發明，可自任一分離的血液中獲得單核球；而該血液可源自器官諸如脾臟、淋巴結或骨髓。特別在自血液中分離單核球係不可能或無法獲得充分量之情況下，如在
20 貧血或白血病之情況下；及在若位於多重器官摘除架構內的外源用途之情況下；將考量自器官中獲得單核球，而脾臟可作為用於分離單核球之一來源。

 為生產足量之如本發明的幹細胞，首先必須進行單核球的增殖作用。就該目的而言，可使用適於單核球的生長

基質；其中依據本發明，該基質含有巨噬細胞群落刺激因子(M-CSF)。M-CSF(亦稱作CSF-1)係由單核球、纖維母細胞及內皮細胞所製造。培養基中的M-CSF濃度可為2至20微克/公升基質，較佳4至6微克/公升，及特佳為5微克/公升。

- 5 在單核球上，M-CSF與專一性c-Fms受器(亦稱作CSF-1R)結合，該受器僅存在於單核球表面上及僅與M-CSF結合(Sherr, C. J.等人於Cell第41(3)期第665-676頁(1985年)乙文)。當M-CSF與該受器的專一性交互作用引發單核球的分裂作用時，培養該單核球之基質所含有的M-CSF或其類似物，可與該受器結合及將其活化。其他的生長因子諸如
- 10 顆粒性白血球-單核球群落刺激因子(GM-CSF)及顆粒性白血球群落刺激因子(G-CSF)，因為缺乏對於c-Fms受器之親和力而不適用，及其等無法引發單核球的分裂作用。

- 在該方法的一個較佳實施例中，係在該方法的第b)步驟中，在細胞培養基中同時添加M-CSF與IL-3。基質中的
- 15 IL-3濃度可為0.2至1微克/公升，較佳0.3至0.5微克/公升，及特佳為0.4微克IL-3/公升。

 然而，在第b)步驟中，亦可能在細胞培養基中先行添加M-CSF，之後再添加IL-3。

- 20 在另一實施例中，在培養容器最初所含有的細胞培養基中僅含有M-CSF，在細胞分離作用之後，再以含有IL-3的第二細胞培養基置換之。

 如本發明的一個較佳實施例，第b)步驟中之細胞另外在一種硫化合物如一種巰基化合物之存在下培養，其中至

- 少一烴基係與硫鍵結，及該烴基可被一或多個官能基取代。巰基化合物係界定為具有至少一個巰基(-SH)之化合物，該巰基係與一烴基鍵結。藉由附加使用該一硫化合物，可增加藉由表現幹細胞標記CD90、CD117、CD123及CD135
- 5 中之一或多者之具單核球來源的細胞之去分化作用所獲得的幹細胞數目。

該官能基較佳為羥基及/或胺基。在一個特佳的實施例中，該硫化合物為2-巰基乙醇。在另一個較佳的實施例中，該硫化合物為二甲基亞砷(DMSO)。

- 10 硫化合物的用量可介於約4至200毫莫耳硫/公升。較佳約為100毫莫耳/公升。

當使用2-巰基乙醇時，培養基應含有約3微升至13微升的2-巰基乙醇/公升，較佳約7微升的2-巰基乙醇/公升。

- 以IL-3與選擇性地以硫化合物之處理作用，可與藉由
- 15 M-CSF培養作用所進行的單核球增殖作用同時或在其後進行，其中以同時進行增殖作用及IL-3與選擇性的一種硫化合物之處理作用為較佳者。增殖作用與去分化作用總共應不超過10天，而以IL-3與選擇性地以硫化合物之處理作用應進行至少3天及最多10天，較佳進行6天。

- 20 因此，如本發明，在同時含有M-CSF、IL-3及較佳一種巰基化合物的一培養基中培養單核球之情況下，在細胞自培養容器底部剝離前之培養期間至少3天及最多10天，較佳為5至8天，及特佳為6天。

如本發明方法的一個較佳實施例之進行方式，若最初

在僅含有M-CSF的一基質中增殖第b)步驟中的單核球，則在該培養基中的增殖作用可進行至少2天，較佳進行3天及特佳進行4天，及最多進行7天；而在IL-3及選擇性地一種巰基化合物之存在下之後續培養作用，可再進行3天。在該

5 情況下，在僅含有M-CSF的一基質中之培養作用較佳進行最多4天，接著進行在IL-3及選擇性地一種巰基化合物之存在下之培養作用3、4、5或6天。

為了如第2與13例中所述者一起進行增殖作用與去分化作用，在分離單核球之後，將其轉移至同時含有M-CSF、

10 IL-3以及較佳硫化合物(特別是巰基乙醇或DMSO)之一基質中。

因其等的黏著性質，單核球與自其等所產生的幹細胞，在製程期間黏著於個別培養容器的底部。如本發明的一個較佳實施例，在第c)步驟之後，將培養基與黏著於培養容器底部的細胞分離，及將培養基棄置。較佳接著進行

15 以培養基清洗黏著於底部的細胞之清洗作用，然後以未用過的培養基覆蓋該細胞(參見第13例)。

在該步驟中，可使用上述的增殖與去分化基質作為培養基，亦可使用一標準細胞培養基例如RPMI。

20 如本發明的另一較佳實施例，細胞在第c)步驟結束及第d)步驟開始之前，與一種生物耐受性良好的有機溶劑接觸，以增加在製程結束時游離漂浮於基質中之幹細胞數目。該溶劑的量係自10微升至1毫升。其較佳為一種具有1至4個碳原子之醇類，其中較佳添加乙醇。如一個特佳的實

施例，該細胞與前所界定之生物耐受性良好的有機溶劑之蒸氣相接觸，較佳與乙醇蒸氣接觸。暴露於有機溶劑(特佳暴露於乙醇蒸氣)之時間，應為4至12小時，較佳為8至10小時。

- 5 如本發明的方法，較佳在培養容器中進行，該容器表面事先經胎牛血清(FCS)加以塗覆(參見第2例)。任擇地，亦可使用來自男性捐贈者之人類AB-血清。FCS塗覆作用之進行，可藉由在使用前以FCS覆蓋培養容器的表面，及在數小時的暴露時間之後，特別是2至12小時及特佳為7小時的暴露時間之後，以一適宜方式移除未黏附於表面之FCS。
- 10

在第c)步驟之選擇性地更換培養基之後，若進行有機溶劑之處理，則細胞在該製程步驟中已以一特定程度自容器底部剝離。能以機械方式進行(進一步)剝離作用，例如使用一種細微型細胞刮板、刮勺或吸量管頂端(參見第13例)。

- 15 如該方法的一個較佳實施例，藉由以一適宜酵素之處理，例如以胰蛋白酶處理，而進行完整的剝離作用(參見第2例)。細胞可在35°C至39°C及較佳37°C，在二氧化碳的存在下，暴露於胰蛋白酶溶液(0.1至0.025克/公升及較佳0.05克/公升)達2至10分鐘。

- 20 然後藉由一標準方法阻滯胰蛋白酶的活性，及可藉由一種標準方法，例如藉由離心作用及在一實施例中係於第d)步驟結束時藉由懸浮於一適宜的細胞培養基中，而獲得游離漂浮的經去分化的可程式化幹細胞。目前可取得懸浮於一適宜基質中者，例如懸浮於RPMI 1640或DMEM中者，

以用於立即分化作用而成為所欲的標的細胞。然而，其等亦可在基質中儲存數天之久。在一個較佳的實施例中，若該細胞將以經去分化的可程式化幹細胞之形式儲存於培養基中超過約48小時，則該基質含有一種細胞激素或白血病抑制因子(LIF)，參見Nature第414期第94頁(上所引述之 Donovan, J. J.與Gearhart, J.於2000年乙文)。在含有該等因子之基質中，幹細胞能以經去分化的可程式化幹細胞之形式儲存至少10天。

在一個較佳的實施例中，將細胞懸浮而長期儲存於一液態基質中，然後加以深凍。技藝中已知用於深凍活細胞之方法，如參見Academic Press公司於2002年出版之由Atala, A.與Lanza, R. P編輯“組織工程之方法”乙書第4章第131至140頁之Griffith M.等人“表皮細胞培養—角膜”乙文。

本發明參照實例而進一步例示及說明如下。

若在實例中未加以界定，所用的基質及物質之組成如下：

1.盤尼西林/鏈黴素溶液：

每1毫升的生理氯化鈉溶液(氯化鈉0.9%)含有10,000單位盤尼西林G的鈉鹽形式之盤尼西林及1000微克鏈黴素硫酸鹽形式之鏈黴素。

2.胰蛋白酶-EDTA

0.5克胰蛋白酶與0.2克EDTA(4鈉)/公升

3.胰島素

在埃舍利希氏大腸桿菌(E. coli)中所製造的人類重組

型胰島素，約為28單位/毫克。

4. RPMI 1640(1x，液體(11875))含有L-麩胺醯胺酸

RPMI (Roswell Park Memorial Institute)基質1640係經
富化的配方，其可廣泛的用於哺乳類動物細胞。

5

組份	莫耳-重量	濃度(毫克/公升)	克分子濃度(nM)
無機鹽類			
硝酸鈣($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	236	100.00	0.424
氯化鉀(KCl)	75	400.00	5.30
硫酸鎂(MgSO_4)	120	48.84	0.407
氯化鈉(NaCl)	58	6000.00	103.44
碳酸氫鈉(NaHCO_3)	84	2000.00	23.800
磷酸鈉(Na_2HPO_4)	142	800.00	5.63
其他組份			
葡萄糖	180	2000.00	11.10
還原型穀胱甘肽	307	1.50	0.0032
酚紅	398	5.00	0.0125
胺基酸			
L-精胺酸	174	200.00	1.10
L-天冬醯胺	132	50.00	0.379
L-天冬胺酸	133	20.00	0.150
L-半胱胺酸二鹽酸鹽	313	65.00	0.206
L-穀胺酸	147	20.00	0.136
L-穀胺醯胺	146	300.00	2.05
甘胺酸	75	10.00	0.133
L-組織胺酸	155	15.00	0.0967
L-羥基脯胺酸	131	20.00	0.153
L-異亮胺酸	131	50.00	0.382
L-白胺酸	131	50.00	0.382
L-離胺酸鹽酸鹽	146	40.00	0.219
L-甲硫胺酸	149	15.00	0.101
L-苯丙胺酸	165	15.00	0.0909
L-脯胺酸	115	20.00	0.174
L-絲胺酸	105	.0.00	0.286
L-酥胺酸	119	20.00	0.168
L-色胺酸	204	5.00	0.0245
L-酪胺酸二鈉鹽二水合物	261	29.00	0.110
L-纈胺酸	117	20.00	0.171
維生素			
生物素	244	0.20	0.008
D-泛酸鈣	477	0.25	0.0005
氯化膽鹼	410	3.00	0.0214
葉酸	441	1.00	0.0022
異-肌醇	180	35.00	0.194
煙鹼醯胺	122	1.00	0.0081
對-胺基苯甲酸(PABA)	137	1.00	0.0072
鹽酸吡哆醇	206	1.00	0.0048
核黃素	376	0.20	0.0005
鹽酸硫胺素	337	1.00	0.0029
維生素B12	1355	0.005	0.00000369

參考文獻：Moore G. E. 等人於 J. A. M. A. 第 199 期第 519 頁 (1967 年) 乙文

5. PBS(杜貝可氏(Dulbecco)磷酸鹽緩衝鹽水)

參見J. Exp. Med.第98期第167頁(1954年)乙文。

組份	克/公升
氯化鉀(KCl)	0.2
磷酸氫鉀(KH ₂ PO ₄)	0.2
氯化鈉(NaCl)	8.00
磷酸鈉(Na ₂ HPO ₄)	1.15

6. 2-巰基乙醇

合成級品質；含量高於98%，密度為1.115至1.116，如

- 5 參見Momo J.等人於J. Am. Chem. Soc.第73期第4961頁(1951年)乙文。

7. Ficoll-Hypaque

淋巴球分離基質(蔗糖/表氯醇-共聚合物Mg 400,000；密度為1.077，以泛影鈉加以調整)。

10 8. 視黃酸

維生素A酸(C₂₀H₂₈O₂)，300微升位於1.5毫升PBS中及對應1 mM。當作為神經元與神經膠質細胞的程式化作用之基質時，在10毫升基質中使用150微升(對應10⁻⁶ M)。

9. DMEM

- 15 杜貝可(Dulbecco)改良型伊格爾(Eagle)培養基(高葡萄糖)，參見Dulbecco, R.等人於Virology第8期第396頁(1959年)乙文；Smith, J. D.等人於Virology第12期第158頁(1960年)乙文；組織培養標準委員會於In Vitro第6期第2頁(1993年)乙文。

10. L-穀胺醯胺

液體：29.5毫克/毫升。

11.第II型膠原蛋白酶

參見Rodbell, M.等人於J. Biol. Chem.第239期第375頁

5 (1964年)乙文。

12.間白素-3 (IL-3)

來自埃舍利希氏大腸桿菌(E. coli)之人類重組型IL-3
(Yang Y. C.等人於Cell第47期第10頁(1986年)乙文)；約以
1：2之比例含有具133個胺基酸殘基之成熟型IL-3及具有包
10 括甲硫胺醯基在內的134個胺基酸殘基者；經計算的莫耳質
量約為17.5 kD；比活性為 1×10^3 單位/微克(R&D型錄第
203-IL號)。

13.巨噬細胞群落刺激因子(M-CSF)

來自埃舍利希氏大腸桿菌(E. coli)之人類重組型
15 M-CSF；含有包括N-終端甲硫胺酸之具有135個胺基酸殘基
的單體(18.5 kD)；係以莫耳質量為37 kD之同型二聚體存
在；(Sigma型錄第M 6518號)。

14.抗體

在實例中用於對抗CD14、CD31、CD90、CD117、
20 CD123、CD135之抗體，係以商品取得者。其等係自下列來
源取得：

CD14：DAKO公司；單株型小鼠抗人類CD14抗體；單
核球；殖株TUK4；編號M 0825；批號036第02.02.01版。

CD31：PharMingen International公司；單株型小鼠抗

大鼠CD31抗體(PECAM-1)；殖株TLD-3A12；型錄第22711D號；0.5毫克。

CD90：Biozol Diagnostica公司及Serotec公司；小鼠抗人類CDw90抗體；第F15-42-1號殖株；MCAP90；第06995號批號。

CD117：DAKO公司；單株型小鼠抗人類CD117抗體；c-套組；第104D2號殖株；編號M 7140，批號016，第04.05-00版。

CD123：Research Diagnostics公司；小鼠抗人類CD123抗體；殖株9F5；型錄第RDI-CD123-9F5號。

10 CD135：Serotec公司；小鼠抗人類CD135抗體；MCA1843；第BV10A4H2號殖株。

第1例

自全血中分離單核球

為避免血液凝結及為了餵養細胞，將置於一個三腔式袋組中之450毫升的全血，與63毫升的安定化溶液混合；該安定化溶液在每公升的水中含有3.27克檸檬酸、26.3克檸檬酸三鈉、25.5克右旋糖及22.22克二羥基磷酸鈉。該溶液的pH值為5.6至5.8。

然後，在20°C，在4000rpm進行該混合物之“精確離心作用”7分鐘，以分離血液組份。其造成顆粒狀與非顆粒狀組份之三層的層化現象。藉由將該袋組放入用於此目的之壓製機中，然後將紅血球壓入下方的袋中，將血漿壓入上方的袋中，“血沈棕黃色層”留置於中間的袋中及其含有約50毫升的體積。

然後將新製得的50毫升“血沈棕黃色層”，分成各為25毫升的二個部份，然後各以25毫升的Ficoll-Hypaque分離基質加以塗覆，該Ficoll-Hypaque分離基質已事先添加至二個50毫升的Falcon試管中。

- 5 該混合物在無制動作用的情況下，在2500 rpm離心30分鐘。之後，紅血球與死細胞仍存在於位於Ficoll層下方之“血沈棕黃色層”中，而包括單核球的白血球細胞分離成為Ficoll上的一白色中間層。

- 然後，小心地吸出單核球的白色中間層，及與10毫升
10 磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS)混合。

該混合物然後在制動作用下，在1800 rpm離心10分鐘三次；在各次離心作用後，將上清液吸出，及加添未用過的PBS。

- 在離心容器(Falcon試管)底部所收集到的細胞沈澱
15 物，含有單核細胞部份，亦即單核球。

第2例

單核球的增殖與去分化作用

- 在具有下列組成之一營養基質中，在一步驟中一方面
進行單核球的培養與增殖作用，另一方面進行該細胞的去
20 分化作用：

RPMI 1640基質	440毫升
胎牛血清(FCS)	50毫升
盤尼西林/鏈黴素溶液	5毫升
2-巰基乙醇(儲存溶液)	5毫升
總體積	500毫升

該營養基質另外含有2.5微克/500毫升的M-CSF及0.2微克/500毫升的間白素-3 (IL-3)。

將第1例所分離的單核球以各孔約 10^5 個細胞之一量，轉移至六孔式平皿(各孔直徑為30毫米)中之五孔中，及在各孔中加添2毫升的上述營養基質。該六孔式平皿事先充滿純的未活化型FCS，在約7小時之後將FCS傾注，以依此方式獲得經FCS塗覆的平皿。用於各孔實際劑量之細胞數目係依據一已知方法測量之，如參見Academic Press公司於2002年出版之“組織工程之方法”乙書第4章第55至84頁之Hay, R. J. 之“細胞量化與特徵化分析”乙文。

蓋上該六孔式平皿的蓋子，及於37°C的培養箱中存放6天。在24小時後，細胞沈至各孔的底部。每隔一天將上清液吸除，及在各孔中再度加添2毫升未用過的營養基質。

在第6天，在六孔式平皿中原本空無一物的第六孔中加2毫升的70%乙醇，再度將平皿封閉，及於37°C的培養箱中再存放10小時。

之後，將經PBS以1：10稀釋的胰蛋白酶溶液1毫升，吸入孔式平皿中之含有細胞的各孔中。將封閉的孔式平皿置於37°C及5%二氧化碳的培養箱中5分鐘。

之後，藉由在各孔中添加2毫升RPMI 1640基質，而阻滯胰蛋白酶活性。將各孔中的上清液(1毫升胰蛋白酶+2毫升基質)全部吸出，匯集於一個15毫升的Falcon試管中，及於1800 rpm離心10分鐘。然後將上清液棄置，將沈澱物與未用過的RPMI 1640基質混合(2毫升/ 10^5 個細胞)。

該細胞懸浮液可直接用於分化成為不同的標的細胞。

任擇地，在離心作用及棄置含有胰蛋白酶的上清液之後，將細胞與作為一冷凍基質之DMSO/FCS混合，及以 10^6 /毫升之一濃度深凍之。

- 5 該冷凍基質含有95% FCS及5% DMSO。在各情況下，將 10^6 個細胞溶於1毫升的基質中，及以下列方式冷卻：

置於冰上30分鐘；

在預先冷卻的史戴洛普(Styropor)盒中於 -20°C 放置2小時；

- 10 在史戴洛普(Styropor)盒中於 -80°C 放置24小時；

在試管中儲存於 -180°C 的液態氮(N_2)中。

- 就依據上述方法所產生的具單核球來源之經去分化的可程式化幹細胞的細胞族群之免疫-組織化學表現型分析而言，在各情況下取用 10^5 個細胞及固定於載玻片上成為一
- 15 細胞離心製劑，以進行進一步的組織化學染色(Watson, P. 於J. Lab. Clin. Med.第68期第494-501頁(1966年)之“一種載玻片離心機：在一顯微鏡載玻片上用於離心懸浮細胞之一裝置”乙文)。之後，可使用Cordell, J. L.等人(見後述文獻)所述之技術，以APAAP紅色複合物將細胞染色。若未另外
 - 20 說明之，所用的初級抗體係經PBS以1：100稀釋，在各情況下使用20微升的該濃度抗體。使用單株抗體作為對抗第1表所列的細胞抗原決定位之初級抗體。第6圖顯示經染色的細胞離心製劑，及幹細胞標記CD90、CD117、CD123及CD135之對應證據。

與染色技術相關之文獻：

- Cordell, J. L.等人於J. Histochem. Cytochem.第32期第219-229頁(1984年)之“使用鹼性磷酸酶與單株抗鹼性磷酸酶的免疫複合物(APAAP複合物)之單株抗體的免疫酵素標記作用”乙文。

與標記相關之文獻：

CD14

- Ferrero E.及Goyert S. M.於Nucleic Acids Res.第16期第4173-4173頁(1988年)之“編碼單核球分化作用抗原CD14之基因的核苷酸序列”乙文。

CD31

- Newman P. J.、Berndt M. C.、Gorski J.、White J. C. II、Lyman S.、Paddock C.及Muller W. A.於Science第247期第1217-1222頁(1990年)之“PECAM-1 (CD31)選殖作用及與免疫球蛋白基因超級家族的黏著分子之關係”乙文。

CD90

- Seki T.、Spurr N.、Obata F.、Goyert S.、Goodfellow P.及Silver J.於Proc. Natl. Acad. Sci. USA第82期第6657-6661頁(1985年)之“thy-1基因：結構與染色體位置”乙文。

20 CD117

- Yarden Y.、Kuang W.-J.、Yang-Feng T.、Coussens L.、Munemitsu S.、Dull T. J.、Schlessinger J.、Francke U.及Ullrich A.於EMBO J.第6期第3341-3351頁(1987年)之“人類原致癌基因c-套組：用於一未明配位基之一種新的細胞表

面受器酪胺酸激酶”乙文。

CD123

- Kitamura T.、Sato N.、Arai K.及Miyajima A.於Cell第66期第1165-1174頁(1991年)之“人類IL-3受器cDNA之表現
5 選殖作用顯示人類IL-3與GM-CSF受器之一個共有的 β 子單元”乙文。

CD135

- Small D.、Levenstein M.、Kim E.、Carow C.、Amn S.、Rockwell P.、Witte L.、Burrow C.、Ratajczak M. Z.、Gewirtz
10 A. M.及Civin C. I.於Proc. Natl. Acad. Sci. USA第91期第459-463頁(1994年)之“Flk-s/Flt-3的人類同源基因STK-1選擇性地表現於CD34+人類骨髓細胞中及涉及早期祖細胞/幹細胞之增殖作用”乙文。

第1表

15 本發明的幹細胞之抗原表現作用

抗原	顏色反應
幹細胞標記	
CD90	++
CD117	+
CD123	++
CD135	++
分化作用標記	
CD14 (單核球)	+

所示的標度係對應所偵測到的抗原陽性，其在單核球在對應的特定基質中培養4至9天之後變得明顯，及係經由顯微鏡比較個別的細胞離心著色作用與負對照組(在初級

抗體不存在下觀察所得的著色作用)而進行之。

+ 細胞與初級抗體之清楚的顏色反應

++ 細胞與初級抗體之強烈的顏色反應

僅對於具典型幹細胞形態(參見第6圖)的活細胞為70%

- 5 以上之細胞離心製劑進行評估。少於1%之該等細胞表現CD34抗原。

第3例

自成年型幹細胞生產神經元與神經膠質細胞

- 10 在直徑為100毫米的培替氏(Petri)培養皿中，進行神經元與神經膠質細胞之生產作用。為製備培替氏培養皿，在各培養皿中加入5毫升純的去活化胎牛血清(FCS)，藉此覆蓋培養皿底部。在7小時之後，將未黏著於培替氏培養皿底部的FCS部份吸出。在所製備的培替氏培養皿中之一者加入約 10^6 個如第2例所產生的細胞，及添加具有下列組成的營養基質：
- 15 營養基質：

DMEM溶液	440毫升
胎牛血清(FCS)	50毫升
1-穀胺醯胺	5毫升
盤尼西林(100單位/公升)/鏈黴素 (100微克/公升)溶液	5毫升
總體積	500毫升

該營養基質進一步含有 1×10^{-6} M/500毫升之視黃酸。

所用的幹細胞在10天內重新程式化/分化成為神經元與神經膠質細胞，該基質約每隔3天更換一次。在該期間之後，細胞已大部分黏著於培養皿底部；及可依據與前述用

於幹細胞之類似方式，藉由短暫的胰蛋白酶作用而將細胞自培養皿底部剝離。

第4例

神經元先質細胞、神經元與神經膠質細胞之證據

- 5 為進行由經去分化的可程式化幹細胞所引發的標的細胞之後續免疫組織化學特徵分析，將自單核球所產生的幹細胞(10^5 個細胞/玻璃蓋)施用於玻璃蓋(20毫米×20毫米)上，將其等置於6孔式平皿(各孔直徑為30毫米)的底部之上，及以各孔式平皿2毫升營養基質培養之。在個別的標的
- 10 細胞分化之後，將其等依如下方式固定：在除去營養基質(上清液)之後，藉由添加2毫升甲醇而將所培養的標的細胞固化，其於10分鐘期間產生效應。之後將乙醇吸除，以PBS(每次2毫升)清洗孔式平皿二次。之後，使用Cordell, J. L. 等人於J. Histochem. Cytochem.第32期第219-229頁(1994年)
- 15 之“使用鹼性磷酸酶與單株抗鹼性磷酸酶的免疫複合物(APAAP複合物)之單株抗體的免疫酵素標記作用”乙文中所述之技術，以APAAP紅色複合物將細胞染色。除非另外說明之，所添加的初級抗體係經PBS以1：100稀釋，在各情況下在6孔中之各者加入200微升的該濃度抗體。
- 20 藉由以對抗S100-抗原之抗體將細胞染色，而偵測神經元先質細胞，參見第1圖之中間圖片(放大200倍)。

藉由以對應的專一性抗體(初級抗體經PBS以1：300稀釋)進行突觸素(synaptophysin)微管聯結型蛋白質2(MAP2)或神經絲68之專一表現作用，而偵測神經元，參見第1圖之

右側圖片(放大200倍)。

藉由偵測神經膠質纖維絲聯結型蛋白質(GFAP)(初級抗體經PBS以1:200稀釋)，而辨識諸如星形膠質細胞之神經膠質細胞，參見第1圖之左側圖片(放大200倍)。

- 5 依據例如 Academic Press 公司於2002年出版之“組織工程之方法”乙書第2章第19至35頁之 Carmiol S.之“細胞分離與選擇作用”乙文所述的方法，藉由磁性活化細胞選別作用(MACS)之方式，使用專一性對抗MAP2(神經元)或GFAP(神經膠質細胞)之抗體，而進行神經元與神經膠質細胞之分離
- 10 作用。

第5例

自經去分化的可程式化成年型幹細胞生產內皮細胞

- 使用 Matrigel®(美國達拉威爾州海德堡(Heidelberg)之 Beckton & Dickinson 公司)作為基質，以培養內皮細胞。該
- 15 基質含有纖維連結素(fibronectin)、層黏蛋白(laminin)及膠原蛋白I與IV。

- 冷凍基質在4°C的冰箱中，以12小時的期間緩慢解凍。在該期間內，其狀態產生變化；亦即自原有的固態基質變為海綿狀/液態。在該狀態，將其加至一個48孔平皿(各孔的
- 20 直徑為10毫米)中，藉此覆蓋各孔的底部。

在施用之後，將平皿置於室溫中30分鐘，直至膠體在底部固化成為一黏著層為止。

之後，在 Matrigel® 上培養每孔約 1×10^2 個細胞，及添加營養基質(如第2例所述)。

在4至5天之後，出現第一個管狀細胞股，其在6至8天之後發育成為三維細胞網路。可藉由個別的專一性初級抗體(200微升及在各情況下經PBS以1：300稀釋)，而在細胞上辨識出內皮標記CD31與因子VIII。

- 5 在一種任擇的方法中，將液化基質施用於人工血管上，然後塗覆如第2例之經去分化的可程式化成年型幹細胞。約6天之後，可辨識出一片的內皮細胞，該內皮細胞以環狀方式塗覆該人工器官。

- 10 藉由以對應的內皮專一性抗體(如上述)的染色作用而變成可見的內皮細胞，係示於第2圖中。在中間的圖片中，所顯示的細胞係於Matrigel[®]上培養5天。第一管狀股與個別細胞附聚體結合。具深褐色標記的細胞表現CD31抗原(以黃色濾鏡放大200倍拍攝)。在8天之後，三維網路結構之形成作用增加(抗CD31抗原染色作用，以黃色濾鏡放大200倍
- 15 拍攝)。在12天之後，在Matrigel[®]上培養之新近分化的CD31⁺細胞，形成具有多層壁結構之血管類型的三維管，其在形態上以讓人聯想起一血管。認知到在該時點幾乎所有細胞表現CD31抗原(CD31著色作用，以藍色濾鏡放大400倍拍攝)，參見右側圖片。

20 第6例

脂肪細胞(脂肪球)之生產作用

A：

為將如第2例的成年型幹細胞重新程式化/分化成為脂肪細胞，首先製造一調理基質。就該目的而言，如下處理

20克自體脂肪組織，亦即來自與產生單核球的血液相同之捐贈者之脂肪組織。

首先，在陪替氏培養皿中將脂肪組織打碎，將打碎的組織片段過篩(孔徑為100微米)。

- 5 然後將依此方式所得的懸浮液移入直徑為100毫米之一個陪替氏培養皿中，及添加具有30毫克的第II型膠原蛋白酶含量之10毫升DMEM基質。將混合物置於室溫($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)中60分鐘，以讓膠原蛋白酶在脂肪細胞上產生效應。

- 之後，將混合物轉移至一個Falcon試管中，及於1800
10 rpm離心該試管10分鐘。

在離心之後，將上清液棄置，將包括脂肪球與先質細胞之細胞片狀沈澱物溶於具有下列組成之8毫升基質中，置於陪替氏培養皿(直徑為100毫米)中及於 37°C 培養箱中培養10天。

DMEM溶液	444.5毫升
胎牛血清(FCS)	50毫升
胰島素溶液	0.5毫升
盤尼西林(100單位/公升)/鏈黴素 (100微克/公升)溶液	5毫升
總體積	500毫升

- 15 胰島素溶液含有溶於2毫升醋酸水(由40毫升的水與0.4毫升的冰醋酸組成)中之18毫克胰島素(Sigma 1-0259)。該溶液經醋酸水以1：10稀釋。

在10天的培養期間，經脂肪細胞調理的基質(FCCM)形成上清液。每隔2至4天，以未用過的營養基質置換該上清

液。在各次更換基質中所得的FCCM進行無菌過濾作用，及儲存於-20℃。之後，在陪替氏培養皿(直徑為100毫米)中加入10毫升的上述FCCM及約 10^6 個如第2例的幹細胞。在4天之後，含有脂肪泡之第一先質細胞成為可見(第3A圖)。在6天之後，出現第一個脂肪球，其可經由蘇丹紅而加以染色(第3B與3C圖)。在10天之後，該等細胞出現典型的附聚作用及叢集形成作用，其在該步驟已可以宏觀方式視作脂肪組織(第3D圖)。

藉由第3A至3D圖之染色作用，使脂肪細胞變成可見，藉此顯著地不同於第3E及3F圖之對照組。第3E圖顯示具單核球來源之細胞，其在營養基質(如第2例所示)中培養6天，但未在營養基質中添加IL-3與2-巰基乙醇。接著添加FCCM。該等細胞無法分化成為脂肪細胞。第3F圖顯示在完整的基質(如第2例)中培養6天之細胞，然後以營養基質而非FCCM再處理6天(如第2例)。FCCM因而含有提供分化成為脂肪細胞之訊息所需的組份。

依據Academic Press公司於2002年出版之“組織工程之方法”乙書第4章第55至84頁之Patrick Jr., C.W.之“表皮細胞培養：乳房”乙文中所述之方法，進行第3A、3B、3C及3D圖中以蘇丹紅將細胞染色之染色作用。

B：

除了藉由蘇丹紅染色作用之脂肪細胞表現型分析之外，可在mRNA層級進行脂肪細胞的分子生物特性分析，以查驗在以所用之經脂肪細胞調理的基質進行對應的程式

化作用之後，脂肪細胞的基因程式化作用是否進行對應的改變；及查驗在自可程式化單核球所程式化的脂肪細胞中，是否可辨識出脂肪細胞之典型的傳訊核糖核酸(mRNA)轉錄本。藉由聚合酶鏈反應(PCR)之方式，自具單核球來源之經去分化的可程式化幹細胞所分離的RNA試樣，擴增脂肪細胞代謝作用之二種典型的mRNA序列；及在一平行試驗混合物中，自程式化脂肪細胞擴增，即“增殖性受器 γ (PPARG)”-mRNA(Tontonoz, P. 等人於 Cell 第 79 期第 1147-1156 頁(1994 年)之“在纖維母細胞中藉由一種脂質活化型轉錄因子 PPAR γ 2 刺激脂肪生成作用”乙文)及“纖瘦素(小鼠之肥胖同源基因)”-mRNA(Zhang Y. 等人於 Nature 第 372 期第 425-432 頁(1994 年)之“小鼠肥胖基因及人類同源基因之位置選殖作用”乙文；基因銀行(Gene Bank)選取編碼：NM_000320)。

如技藝中所詳述者，如見 Ungefroren H. 等人於 Cancer Res. 第 58 期第 1741-1749 頁(1998 年)之“人類胰腺癌表現對於經 Fas 調節的細胞凋亡仍具抗性之 Fas 與 Fas 配位基”乙文，進行該目的所需之 RNA 分離作用、逆轉錄法及所欲的 mRNA 序列之 PCR 擴增作用的條件。

就該目的而言，選擇針對 PCR 擴增作用所產生的個別引子，藉此正向與逆向引子與 mRNA 序列結合，其在染色體基因中之同源區域係位於二個不同的外顯子中及其間被一個大型內含子所分隔。藉此可確認所得的擴增片段係源自細胞中所含的 mRNA，而非源自存在於染色體 DNA 中的

序列。更詳細地，選擇用於PPAR- γ 與用於纖瘦素之下列引子序列：

PPAR- γ ：正向引子：265-288(對應外顯子1中的基因序列)；逆向引子：487-465(對應外顯子2中的基因序列)，
 5 其造成具487-265鹼基對=223鹼基對的片段之擴增作用，見第3G圖。如第3G圖進一步所示，已可在可程式化幹細胞及腫瘤細胞系HL-60(人類前髓性白血病細胞系)中辨識出微量經轉錄的PPAR- γ 專一性RNA，雖然相較於脂肪細胞本身而言，其訊息帶顯著地窄。相反地，僅可藉由逆轉錄酶
 10 PCR，在mRNA層級，在自可程式化幹細胞衍生的脂肪細胞中偵測到脂肪細胞專一性蛋白質纖瘦素。

作為對照組之可程式化幹細胞(Progr.幹細胞)及人類腫瘤細胞系HL-60、Panc-1及WI-38並未轉錄纖瘦素。同時共同測定未添加逆轉錄酶之試樣(脂肪細胞/-RT)及水試樣，以
 15 作為負對照組。藉由辨識出正對照組中的GAPDH“基本(house-keeping)”基因，而確認個別的PCR擴增步驟係正確地在各混合物中進行。

第7例

肝臟細胞(肝細胞)之生產作用

20 A：

為將如第2例之具單核球來源之經去分化的可程式化幹細胞程式化成為肝細胞，首先製造一調理基質。就該目的而言，如下處理40克的人類肝臟組織。

首先，肝臟組織在PBS中清洗數次，以實質除去紅血

球。然後在陪替氏培養皿中將該組織打碎，及於室溫中以解離溶液培養約45分鐘。該解離溶液包括40毫升磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)、經PBS以1：10稀釋之10毫升胰蛋白酶溶液及30毫克第II型膠原蛋白酶(Rodbel M.等人於J. Biol. Chem.第239期第375頁(1964年)乙文)。在培養45分鐘之後，將組織片段過篩(見第6例)。

然後，將混合物轉移至一個50毫升的Falcon試管中，以PBS加至50毫升，及於1800 rpm離心10分鐘。

在離心之後，將上清液棄置，再度以50毫升PBS清洗含有肝細胞之細胞片狀沈澱物，及加以離心。再度將所得的上清液棄置，將細胞片狀沈澱物溶於具有下列組成之25毫升基質中，置於細胞培養瓶(體積為250毫升)中及於37°C培養箱中培養10天。

肝細胞生長基質：

肝細胞生長基質(LCGM)	
RPMI 1640基質	445毫升
胎牛血清(FCS)	50毫升
胰島素溶液	0.5毫升
盤尼西林(100單位/公升)/鏈黴素(100微克/公升)溶液	5毫升
總體積	500毫升

該營養基質另外含有5微克(10奈克/毫升)的表皮生長因子(Pascall, I. C.等人於J. Mol. Endocrinol.第12期第313頁(1994年)乙文)。胰島素溶液之組成係如第6例所述。

在為期10天的培養期間，經肝細胞調理的基質(LCCM)

形成上清液。每隔2至4天，以未用過的營養基質置換該上清液。在各次更換基質中所得的個別LCCM進行無菌過濾作用(過濾器孔徑為0.2微米)，及儲存於-20℃。

- 然後在一陪替氏培養皿(直徑為100毫米)或一培養瓶
5 中，將 1×10^6 個經去分化的幹細胞與具下列組成的10毫升基質一起培養。

肝細胞分化基質：

肝細胞分化基質(LCCM)	
經肝細胞調理的基質(LCCM)	100毫升
胰島素溶液(參見第6例)	0.1毫升
表皮生長因子	1微克
肝細胞生長因子	2微克

- 以40奈克/毫升之濃度使用肝細胞生長因子(Kobayashi, Y.等人於Biochem. Biophys. Res. Commun.第220期第7頁
10 (1996年)乙文)。在數天之後，在形態上產生變化，可觀察到扁平、多角形單倍體或多倍體細胞(第4A圖)。在10至12天之後，可藉由免疫-組織化學偵測具肝臟專一性的抗原 α -胎蛋白(Jacobsen, G. K.等人於Am. J. Surg. Pathol.第5期第257-66頁(1981年)乙文)，而辨識出自經去分化的幹細胞所
15 產生之肝細胞，如第4B與4C圖所示。

B：

除了藉由 α -胎蛋白的免疫-組織化學辨識作用所進行之肝細胞表現型分析之外，可在mRNA層級進行肝細胞的分子生物特性分析，以查驗在以所用之經肝細胞調理的基

質進行對應的程式化作用之後，肝細胞的基因程式化作用是否進行對應的改變；及查驗在自本發明的幹細胞所產生的肝細胞中，是否可辨識出肝細胞之典型的傳訊核糖核酸(mRNA)轉錄本。就該目的而言，在自具單核球來源之經去

5 分化的可程式化幹細胞所分離的RNA試樣中，藉由聚合酶鏈反應(PCR)之方式，而檢視肝細胞典型所具有的五種不同mRNA序列之存在與否；及在一平行試驗試樣中，檢視自幹細胞的程式化作用所得的肝細胞。更詳細地，其係為智人(*Homo sapien*)白蛋白-mRNA(Lawn, R. M.等人於*Nucleic*

10 *Acids Res.*第9期第6103-6114頁(1981年)之“人類血清白蛋白cDNA之序列及其於埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*)中之表現作用”乙文，基因銀行(Gene Bank)選取編碼：NM-000477)； α -胎蛋白-mRNA(Morinaga T.等人於*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*第80期第4604-4608頁(1983年)之“人類

15 α -胎蛋白及其mRNA之一級結構”乙文，基因銀行選取編碼：V01514)；人類胺基甲醯磷酸酯合成酶I mRNA(Haraguchi, Y.等人於*Gene*第107期第335-340頁(1991年)之“編碼人類胺基甲醯磷酸酯合成酶I之一cDNA之選殖作用與序列：血氨過高之分子分析”乙文，基因銀行選取編碼：

20 D90282)；智人(*Homo sapien*)凝結因子II (凝血酶，F2)-mRNA(Degen, S. J.等人於*Biochemistry*第22期第2087-2097頁(1983年)之“編碼人類凝血酶原之互補去氧核糖核酸與基因之特性分析”乙文，基因銀行(Gene Bank)選取編碼：NM-000506)；智人(*Homo sapien*)凝結因子VII (血清凝血酶

原轉化加速劑，F7)-mRNA(美國馬里蘭州20894巴莎思達(Bethesda)國家健康研究院(NIH)國家生物科技資訊中心之NCBI註解計畫，於2002年2月6日直接提交，基因銀行(Gene Bank)選取編碼：XM-027508)。

5 如技藝中所詳述者，如見Ungefroren H.等人於CancerRes.第58期第1741-1749頁(1998年)之“人類胰腺癌表現對於經Fas調節的細胞凋亡仍具抗性之Fas與Fas配位基”乙文，進行逆轉錄法及所欲的mRNA序列之PCR擴增作用的條件所需的RNA分離作用。

10 選擇用於PCR擴增作用之個別引子，藉此正向與逆向引子與mRNA序列結合，其在染色體基因中之同源區域係位於二個不同的外顯子中及其間被一個大型內含子所分隔。藉此可確認所得的擴增片段係源自細胞中所含的mRNA，而非源自存在於染色體DNA中的序列。

15 所選擇的引子之序列如下列所示，個別的PCR分析之結果再現於第4D圖中。如本發明之經去分化的可程式化幹細胞在此示為“Progr.幹細胞”，及藉由其等的程式化作用所衍生的肝細胞示為“Progr.肝細胞”。

20 α -胎蛋白：正向引子：1458-1478(對應外顯子1中的基因序列)；逆向引子：1758-1735(對應外顯子2中的基因序列)，其造成具1758-1458鹼基對=391鹼基對的片段之擴增作用，見第4D圖。

 如第4圖所示，可將本身未含有 α -胎蛋白的可辨識性專一性mRNA轉錄本之可程式化幹細胞(Progr.幹細胞)，程

式化成為含有該mRNA轉錄本(分子量為301鹼基對之陽性帶)之肝細胞(Progr.肝細胞)。其亦解釋如第4B與4C圖中所示之 α -胎蛋白的免疫-組織化學可偵測性。正對照組(即人類肝臟組織與肝臟腫瘤細胞系HepG2)，亦轉錄 α -胎蛋白專一性mRNA，如301鹼基對之帶所確認者。

白蛋白：正向引子：1450-1473(對應外顯子1中的基因序列)；逆向引子：1868-1844(對應外顯子2中的基因序列)，其造成具1868-1450鹼基對=419鹼基對的片段之擴增作用，見第4D圖。

第4D圖顯示在可程式化幹細胞中之微量經轉錄的白蛋白專一性RNA；藉由幹細胞的程式化作用所得的肝細胞及同時作為正對照組之正常肝臟組織以及腫瘤細胞系HepG2，強烈地表現mRNA，如可藉由清楚的帶所認知者。

胺基甲醯磷酸酯合成酶I：正向引子：3135-3157(對應外顯子1中的基因序列)；逆向引子：4635-4613(對應外顯子2中的基因序列)，其造成具4635-3135鹼基對=1500鹼基對的片段之擴增作用，見第4D圖。

胺基甲醯磷酸酯合成酶I代表一種肝細胞專一性酵素，其在“尿素循環”的尿素代謝作用中扮演一重要角色。由功能性肝細胞確保該去毒功能。如第4D圖所示，在自可程式化幹細胞所產生的肝細胞中及在正對照組(人類肝臟組織及HepG2腫瘤細胞系)中，可辨識出胺基甲醯磷酸酯合成酶I之專一性mRNA帶(1500鹼基對)。程式化肝細胞(progr.肝細胞)的mRNA帶之稍弱的表現作用，係歸因於培養皿中

缺乏可供利用的基質。

凝結因子II：正向引子：1458-1481(對應外顯子1中的基因序列)；逆向引子：1901-1877(對應外顯子2中的基因序列)，其造成具1901-1458鹼基對=444鹼基對的片段之擴增作用，見第4D圖。

5 用，見第4D圖。

僅在程式化肝細胞(progr.肝細胞)及在來自人類肝臟組織的正對照組中，藉由具444鹼基對之帶的表現作用，在mRNA層級偵測出類似的肝細胞專一性蛋白質；而可程式化幹細胞(progr.幹細胞)並未顯示該帶，亦即並未轉錄該基因，如第4D圖中可見者。

凝結因子VII：正向引子：725-747(對應外顯子1中的基因序列)；逆向引子：1289-1268(對應外顯子2中的基因序列)，其造成具1289-725鹼基對=565鹼基對的片段之擴增作用，見第4D圖。

15 在凝結因子VII之情況下，該蛋白質亦僅在程式化肝細胞(progr.肝細胞)及正對照組(人類肝臟組織)中轉錄(見565鹼基對之帶)，雖然弱於凝結因子II。可程式化幹細胞或負對照組(水)皆未顯示該專一性mRNA帶。

甘油醛去氫酶：該基因亦稱作“基本(house-keeping)基因”，可在每一個真核細胞中偵測出，及作為一對照組以檢視PCR擴增作用是否在所有試樣中正確地進行；其係以平行方式共同測定，及係來自添加源自個別細胞試樣之一確
20 定量的RNA。

在所有試驗中，同時共同測定作為負對照組之水試

樣。若水未受RNA之污染，在PCR期間將不產生擴增作用，及未偵測到帶(因此作為反對照組)。

第8例

皮膚細胞(角質化細胞)之生產作用

- 5 為將如第2例之具單核球來源之經去分化的可程式化幹細胞程式化成為皮膚細胞，首先製造一調理基質。就該目的而言，如下處理1至2平方公分的完整人類皮膚。

- 首先，在無菌條件下，將皮膚材料與皮下組織分開。該組織然後在一個無菌容器中，藉由激烈的振動作用而以
10 PBS清洗共10次。在第二次清洗作用之後，將該組織與區分的殘餘結締組織分開。

- 然後將皮膚材料置於一個直徑為60毫米的陪替氏培養皿中，與經PBS以1：100稀釋之3毫升胰蛋白酶溶液混合，及切成小片(約0.5至1立方毫米)。之後，在混合物中再度添
15 加經PBS以1：100稀釋之3毫升胰蛋白酶溶液，在間歇性振動之下，該混合物在37°C培養60分鐘。

- 然後，讓較大型的顆粒沈澱，將含有角質化細胞的上清液倒出，及於800 rpm離心5分鐘。將所產生的上清液吸出，將細胞片狀沈澱物溶於具有下列組成之3毫升基質中，
20 置於陪替氏培養皿(直徑為100毫米)中及於37°C培養箱中培養15天。

角質化細胞生長基質：

角質化細胞生長基質(KGM)	
DMEM	333.5毫升
胎牛血清(FCS)	50毫升
漢姆氏(Ham) F12基質	111毫升
盤尼西林(100單位/公升)/鏈黴素 (100微克/公升)溶液	5毫升
胰島素溶液(參見第6例)	0.5毫升
總體積	500毫升

該營養基質含有5微克的表皮生長因子(詳細說明請見第7例)及5毫克皮質醇(參考文獻默克藥典(Merck Index)第12版第4828頁)。

- 5 在為期15天的培養期間，經角質化細胞調理的基質(KCCM)形成上清液。每隔2至4天，以未用過的營養基質置換該上清液。在各次更換基質中所得的個別KCCM進行無菌過濾作用，及儲存於-20℃。

- 10 然後在一陪替氏培養皿(直徑為100毫米)或一培養瓶中，將 1×10^6 個經去分化的幹細胞與具下列組成的10毫升基質一起培養。

角質化細胞分化基質：

角質化細胞分化基質(LCDM)	
經皮膚細胞調理的基質(KCCM)	100毫升
胰島素溶液(參見第6例)	0.5毫升
表皮生長因子(EFG)	1微克
皮質醇	1毫克
角質化細胞生長因子(KGF)	2.5微克

以25奈克/毫升之濃度使用角質化細胞生長因子，如 Finch等人於Gastroenterology第110期第441頁(1996年)乙文中所述者。

在數天之後，可在細胞中觀察到形態變化。在6天之
 5 後，可偵測到皆與所用的初級抗體(Exp. Cell Res.第162期第
 114頁(1986年)乙文)結合之角質化細胞專一性抗原—細胞
 角質蛋白5與6(第5A圖)。在10天之後，已在培養中發生明
 顯較大型的個別細胞之細胞黏著作用，藉此可偵測會合細
 胞之一可見的細胞組織組合(第5B圖)。

10 第9例

自經去分化的可程式化幹細胞產生胰島素製造細胞

在體積約為250毫升及具有平坦壁之一培養瓶(T75細
 胞培養瓶)中，進行胰島素製造細胞之生產作用。將約 5×10^6
 個如第13例所產生的細胞，懸浮於約5毫升的後述培養基
 15 (用於胰島素製造細胞之分化基質)中，及在加入燒瓶之後，
 再與15毫升的培養基質混合。為進行該等細胞的分化作
 用，將培養瓶以水平位置於37°C與5%二氧化碳的培養箱中
 培養。

培養基質(依據Rameya V. K.等人於Nature Medicine第
 20 6(3)期第278-282頁(2000年)乙文加以改良)：

RPMI 1640	445 毫升
胎牛血清(FCS)	50 毫升
盤尼西林(100單位/公升)/鏈黴素 (100微克/公升)溶液	5 毫升
菸鹼鹽胺	620 毫克
葡萄糖	360 毫克
總體積	500 毫升

該營養基質另外含有10奈克/毫升的表皮生長因子及20奈克/毫升的肝細胞生長因子。

5 在第1小時內，細胞即黏著於培養容器的底部。藉由參照胰島素的製造作用，而監測幹細胞的分化作用。就該目的而言，約每隔2至3天更換培養基質，收集各次的細胞上清液，及儲存於-20℃。如第2例所述，可藉由胰蛋白酶作用，而將黏著於培養瓶底部的細胞剝離。

藉由用於人類胰島素之酵素標記免疫分析(ELISA)的方式(Bruhn H. D.、Folsch U. R.編輯之“實驗室醫學、原理、診斷、臨床病理生物化學教科書”(1999年)第189頁)，測量
10 在不同時點收集的上清液中之胰島素含量，及與基質的空白讀數相比較。再現於第8圖中的結果顯示，在培養14天之後，細胞達到最大的胰島素製造水平。在分化期間經處理的細胞所製造的胰島素量，在14天之後增加至3微單位/毫
15 升，而在對照組基質中未偵測到人類胰島素。第8圖中的條狀各代表三個不同數值，各自三個獨立的個別實驗中測得。

在自本發明的去程式化幹細胞分化成為胰島素製造細胞中測定胰島素製造作用之後，測定仍表現單核球專一性

表面抗原CD14之胰島素製造細胞部份，亦在進行去分化作用3星期後測定之。發現在該等細胞中之一大部分(約30至40%)，偵測到單核球專一性表面抗原CD14，在3星期之後亦然。

5 第10例

自經去分化的可程式化幹細胞產生肝細胞之任擇方法

作為如第7例所述之使用經肝細胞調理的基質(LCCM)之一任擇方法，藉由後述的營養基質(Ha)，引發幹細胞分化成為肝細胞之分化作用。在體積約為250毫升及具有平坦壁之一培養瓶(T75細胞培養瓶)中，進行自幹細胞產生肝細胞之生產作用。將約 5×10^6 個如第13例所產生的細胞，加至約5毫升的後述改良型培養基(Ha，用於肝細胞之分化基質)中，及在加入燒瓶之後，再與15毫升的培養基質混合。為進行該等細胞的分化作用，將培養瓶以水平位置於37°C與5%二氧化碳的培養箱中培養。

用於肝細胞之分化基質(Ha)(依據 Schwarz 等人於 J. Clin. Invest. 第 10(109)期 第 1291-1302 頁 (2002 年)之“來自骨髓的複能性成年型祖細胞分化成為功能性肝細胞類型的細胞”乙文加以改良)：

RPMI 1640	445 毫升
胎牛血清(FCS)	50 毫升
盤尼西林(100單位/公升)/鏈黴素 (100微克/公升)溶液	5 毫升
總體積	500 毫升

該營養基質亦含有30奈克/毫升的纖維母細胞生長因子-4 (FGF-4)。

在第1小時內，細胞即黏著於培養容器的底部。藉由參照白蛋白的製造作用，而監測幹細胞的分化作用。就該目的而言，約每隔2至3天更換培養基質，收集各次的細胞上清液，及儲存於-20℃。如第2例所述，可藉由胰蛋白酶作用，而將黏著於培養瓶底部的細胞剝離。

藉由用於人類白蛋白之酵素標記免疫分析(ELISA)的方式(依據Bethyl Laboratories公司之方法程序及依據上述Schwarz等人乙文)，測量在不同時點收集的上清液中之白蛋白含量，及與基質的空白讀數相比較。呈現於第9圖中的結果顯示，在培養14至28天之期間，細胞的白蛋白製造作用大致上維持一致。在相對於添加Ha基質的第0(基質的空白讀數)、14、21、28及30天，進行測量。在各情況下所測得的數值約為5奈克/毫升、450奈克/毫升、425奈克/毫升、440奈克/毫升及165奈克/毫升。第9圖中的條狀各代表三個不同數值，各自三個獨立的個別實驗中測得。

第11例

在自經去分化的幹細胞所衍生的肝細胞中測定白蛋白與單核球專一性表面抗原CD14之共表現作用

一方面藉由雙重染色作用(A)及另一方面藉由FACS分析(B)，測定自經去分化的幹細胞所衍生的肝細胞中之白蛋白與單核球專一性表面抗原CD14之共表現作用。

A)將如第10例分化成為肝細胞之本發明的幹細胞，於

一個6孔式平皿的覆蓋玻璃上培養，及如第4例所述者以甲醇加以固定。然後進行雙重染色作用，以偵測抗原CD14(單核球的表現型標記)與白蛋白(肝臟專一性標記)之同時表現作用。

- 5 就該目的而言，如第4例所述者，細胞首先與經PBS以1：50稀釋之對抗人類白蛋白之一種初級抗體(天竺鼠相對於人類白蛋白)一起培養。在一清洗步驟之後，該細胞與經PBS以1：50稀釋之與天竺鼠抗體結合的一種二級抗體(小鼠抗大鼠)一起培養45分鐘。然後如第4例所述者，使用Cordell
- 10 J. L.等人(如上所引述者)之方法，以APAAP紅色複合物進行染色作用。

- 就第二染色步驟而言，細胞與該初級抗體(小鼠抗人類CD14)一起培養，在如第4例之一清洗步驟之後，使用Hsu, S. M.等人於Am. J. Clin. Pathol.第75(6)期第816-821頁(1981年)
- 15 之“抗生蛋白抗體及抗生蛋白-生物素-過氧化酶在免疫過氧化酶技術中之用途”乙文使用dem DAB複合物(褐色)(Vector Laboratories公司)之方法，以Vectastain ABC 抗生蛋白鏈菌素套組(Vector公司)進行染色。

- 然後如第4例所述者，以進行核對比染色作用，接著埋
- 20 入凱澤氏(Kaiser)甘油明膠中。

結果示於第10圖中。該圖顯示呈現為褐色的CD14表現作用，其隨著該細胞在形態上轉化為肝細胞之作用而緩慢地降低；同時，呈現為紅色的白蛋白表現作用隨著肝細胞之成熟而增加。第10圖中的第4號圖片顯示經肝細胞調理基

質刺激3星期後之細胞。

B)在進行雙重標記作用之同時，如本發明之分化成為肝細胞的幹細胞，進行螢光活化細胞選別作用(FACS)分析。

如第10例，首先使用一細胞刮板，以機械剝離作用自
5 培養瓶採集如本發明之分化成為肝細胞的幹細胞。在培養
瓶中以PBS小心地清洗細胞二次，每次使用10毫升PBS溶
液。就該目的而言，將位於PBS溶液中之細胞懸浮液倒入一
個15毫升的離心管中，及於1600 rpm沈澱之。以PBS稀釋所
得的細胞沈澱物，藉此在100微升PBS中存在剛好 1×10^5 個
10 細胞。

然後在該細胞懸浮液中，添加經FITC標記的抗CD14
抗體(BD Pharmingen公司)或經FITC標記的抗白蛋白抗體
(Beckmann公司)及經FITC標記的非專一性IgG1小鼠抗人類
抗體各10微升。在20分鐘的培養期間之後，將細胞重新懸
15 浮於500微升PBS中及各於1600 rpm沈澱5分鐘，及最後溶於
200微升PBS中。在細胞的重新懸浮作用之後，以來自BD
BioSciences公司(美國紐澤西州富蘭克林湖(Frankline
Lakes))之BD FACScalibur流式細胞光度計測量螢光(參見
Bruhn H. D.、Folsch U. R.編輯之“實驗室醫學、原理、診斷、
20 臨床病理生物化學教科書”第395-403頁(1999年)；及Holzer
U.等人於J. Immunol.第170期第1218-1223頁(2003年)之“具
有類似TCR抗原性之人類Th1與Th2抗原專一性CD4(+)細胞
中之差示性抗原靈敏度與共刺激需求”乙文)。參照Marquez
M. G.等人於Cytometry第41(2)期第115-122頁(2000年)之

“在威斯塔(Wistar)大鼠的免疫缺乏模式中之小腸內表皮淋巴球的流式細胞光度分析”乙文，使用微軟(Microsoft) WinMDI軟體進行結果評估。

將FACS分析的結果再現於第11圖中。該圖顯示
 5 CD14(上列)與白蛋白抗原(下列)的表現作用，其係於經去分化的單核球(左欄)及於如本發明之分化成為肝細胞的幹細胞(右欄)測量之。在經去分化的單核球中，具有強烈的CD14表現作用，但未能偵測到白蛋白的表現作用；而在自經去分化的單核球所發育的肝細胞中偵測到較弱的CD14表現
 10 作用及非常強烈的白蛋白的表現作用。

第12例

具單核球來源之經去分化的可程式化幹細胞之活體內用途
 為瞭解在經由肝門靜脈注射至具基因同一性的受體動物之肝臟之後，活體內可程式化幹細胞經由存在於肝臟中的
 15 訊息供體進行專一性分化作用之程度，首先以惹卓鹼(retrorsine)處理雌性LEW大鼠的肝臟，以抑制存在於肝臟中的肝細胞(肝臟薄壁細胞)之增殖能力(參見Lacone, E.等人於Am. J. Path.第153期第319-329頁(1998年)之“在經惹卓鹼處理的大鼠中藉由植入分離的肝細胞達成長期、幾乎完全
 20 的肝臟置換作用”乙文)。

就該目的而言，LEW大鼠領受30毫克的吡咯雙烷生物鹼惹卓鹼，其係於14天內注射於腹膜內二次。之後，將依該方式處理的肝臟切除80%，接著將位於1毫升PBS中之 1×10^5 個可程式化幹細胞投入剩餘肝臟的肝門靜脈中。如第2

例所述者，該幹細胞係自雄性LEW大鼠的單核球獲得。在投予幹細胞5天之後，進行肝臟的穿孔式活組織檢查，以進行肝臟的組織分析，及藉由與Y-染色體專一性探針之螢光原位雜交作用(FISH)之方式偵測自幹細胞分化的細胞類型，如詳述於Hoebee, B.等人於Cytogenet. Cell Genet.第66期第277-282頁(1994年)之“藉由雙變數流式選別作用及接著藉由退化寡核苷酸PCR引子之大鼠染色體專一性塗料探針之分離作用”乙文。

第7A圖顯示，在經惹卓鹼預處理及切除80%肝臟的雌性受體動物的肝門靜脈內注射5天之後，自雄性LEW幹細胞衍生出Y-染色體陽性(在細胞核中具有紅色點)的肝細胞。在注射幹細胞25天之後，對於同一肝臟的選擇性移除作用顯示：幹細胞分化成為肝細胞、內皮細胞及膽管上皮。在該時點，肝臟已經達到其正常尺寸，及90%以上的細胞具有Y-染色體。有鑑於此，可獲得之結論為：所注入之具單核球來源之同源可程式化幹細胞，可在活體內達成完全重建具正常代謝功能的肝臟之作用。在此方面，第7C圖顯示在投予惹卓鹼及切除80%肝臟之後，經幹細胞治療的受體大鼠相對於未經治療的受體大鼠之卡普蘭-麥爾(Kaplan-Meier)存活曲線(每一組n=4)。

功能參數膽紅素及氨(NH₃)證實經幹細胞治療的長期存活動物之完整代謝功能性(第7D與7E圖)。

第13例

細胞培養瓶中的單核球之增殖作用與去分化作用

在培養瓶中，以用於孔式平皿培養作用(參見第2例)之相同營養基質，一方面進行單核球的培養與增殖作用，另一方面以一較大的規模進行細胞去分化作用。該營養基質含有2.5微克/500毫升的M-CSF及2.5微克/500毫升的間白素 3 (IL-3)。

將第1例中分離出的單核球，轉移至一個體積為250毫升及具有平坦壁之培養瓶(T75細胞培養瓶)底部。在各培養瓶中加入約10次的 10^6 個細胞，及各加添20毫升的上述營養基質。用於各培養瓶實際劑量之細胞數目，係依據一已知方法測量之，如參見Academic Press公司(2002年)之“組織工程之方法”乙書第4章第55至84頁之Hay, R. J.之“細胞量化與特徵化分析”乙文。

將細胞培養瓶於37°C的培養箱中培養6天。在24小時後，細胞沈至培養瓶的底部。每隔一天將上清液吸除，及各添加20毫升未用過的營養基質。

在第6天，在將培養瓶中的營養基質吸除之後，各以10毫升PBS清洗培養瓶二次。藉此移除未黏著於培養瓶底部的所有細胞。之後，以一無菌的細胞刮板，將生長黏著於培養瓶底部的細胞自培養瓶底部移除。藉由以PBS清洗，而將細胞自培養瓶中移出，及匯集於一個50毫升的Falcon管中，及於1800 rpm離心10分鐘。然後將上清液棄置，將沈澱物重新懸浮於未用過的RPMI 1640基質混合(2毫升/ 10^5 個細胞)。

該細胞懸浮液可直接用於分化成為不同的標的細胞。

任擇地，細胞與作為冷凍基質之DMSO/FCS混合，及以 10^6 /毫升之一濃度深凍之。

該冷凍基質含有95% FCS及5% DMSO。將 10^6 個細胞溶於1毫升的基質中，及以下列方式冷卻：

5 置於冰上30分鐘；

在預先冷卻的史戴洛普(Styropor)盒中於 -20°C 放置2小時；

在史戴洛普(Styropor)盒中於 -80°C 放置24小時；

在試管中儲存於 -180°C 的液態氮(N_2)中。

10 **【圖式簡單說明】**

第 1 圖：去分化之可程式化幹細胞分化的神經元與神經膠質之抗體染色。神經膠質細胞係藉由 GFAP 染色(參見左側圖片，放大 200 倍)，先質細胞係藉由 S100-抗原染色(參見中間圖片，放大 200 倍)，而神經原係藉由突觸素微管聯結型蛋白質 2 染色(參見右側圖片，放大 200 倍)。

第 2 圖：藉由其對應之內皮專一性抗體 CD31 的染色作用而變成可見之內皮細胞。培養細胞於 Matrigel 上 5 天(左側圖片，管狀股的發育，放大 200 倍)，8 天(中間圖片，三維網路結構的形成，放大 200 倍)，以及 12 天(右側圖片，血管類型三維管的形成，放大 200 倍)。

第 3 圖：自成年形幹細胞形成脂肪細胞之中間步驟。A) 為含有脂肪泡之先質細胞，B) 與 C) 為以蘇丹紅染

色之單一脂肪球，D) 為這些細胞 (=脂肪組織) 之附聚作用與叢集形成作用，E) 為培養於未添加 IL-3 與 2-巰基乙醇的營養基質中之具單核球來源細胞，F) 為在完整基質中 6 天後以營養基質而非 FCCM 處理之細胞。

5

第 3G 圖：單核球來源之脂肪細胞 (adipocytes) 的分子生物特性分析 (RT-PCR)，其係藉由比較數個基因間的基因表現。以箭頭指出其尺寸以展示特定的擴增片段。

10 ✓ 第 4 圖：展示來自單核球來源之去分化可程式化幹細胞的肝細胞之發育，培養 6 天 (4A)，10 天 (4B)，及 12 天 (4C)，其係培養於肝細胞分化基質且經由 α -胎蛋白染色。

15 第 4D 圖：單核球來源之肝細胞 (adipocytes) 的分子生物特性分析 (RT-PCR)，其係藉由比較數個基因間的基因表現。以箭頭指出其尺寸以展示特定的擴增片段。

20 第 5 圖：展示來自單核球來源之去分化可程式化幹細胞的角質化細胞之發育，培養 6 天 (5A) 及 10 天 (5B)，其係培養於角質化細胞分化基質且經由細胞角質蛋白 5 與 6 染色。

第 6 圖：由細胞離心法製備之單核球來源的去分化之可程式化幹細胞之細胞總體的之免疫-組織化學表現型分類，其中超過 70% 的活細胞有典型的幹細胞

形態。

第 7 圖：單核球來源之去分化的可程式化幹細胞於大鼠體內之分化，以及 5 天後之細胞偵測。7A) 為在幹細胞所衍生的肝細胞中之 FISH Y 染色體之偵測，7B) 為在幹細胞所衍生的肝細胞、內皮細胞及膽管上皮細胞中之 FISH Y 染色體之偵測，7C) 顯示在投予惹著鹼及切除 80% 肝臟之後，經幹細胞治療的受體大鼠相對於未經治療的受體大鼠之卡普蘭-麥爾存活曲線，7D) 與 E) 為以膽紅素及氮作為功能參數，經幹細胞治療的長期存活動物之完整代謝功能性。

第 8 圖：得自單核球來源之去分化可程式化幹細胞衍生之胰島素製造細胞培養的上清液中胰島素含量，其係由人類胰島素酵素標記免疫分析方法測量而得。

第 9 圖：得自單核球來源之去分化可程式化幹細胞衍生之肝細胞培養的上清液中白蛋白含量，其係由人類白蛋白酵素標記免疫分析方法測量而得。

第 10 圖：單核球 CD14 的表現型標記和肝臟專一性標記白蛋白之雙重染色作用，以測定白蛋白與單核球專一抗原 CD14 在衍生自去分化幹細胞之肝細胞內的同時表現作用。

第 11 圖：展示經 FITC 標記的單核球 CD14 表現型標記與經 FITC 標記的肝臟專一性標記白蛋白之螢光活

化細胞選別作用（FACS）分析，以測定白蛋白與單核球專一抗原 CD14 在衍生自去分化幹細胞之肝細胞內的同時表現作用。

5 【圖式之主要元件代表符號表】

(無)

伍、中文發明摘要：

本發明係有關藉由在含有M-CSF與IL-3的培養基中培養人類單核球，而生產成年型經去分化的可程式化幹細胞。本發明進一步有關含有經去分化的可程式化幹細胞之藥學製劑，及該等幹細胞用於生產標的細胞與標的組織之用途。

陸、英文發明摘要：

The invention relates to the production of adult dedifferentiated, programmable stem cells from human monocytes by cultivation of monocytes in a culture medium which contains M-CSF and IL-3. The invention further relates to pharmaceutical preparations, which contain the dedifferentiated, programmable stem cells and the use of these stem cells for the production of target cells and target tissue.

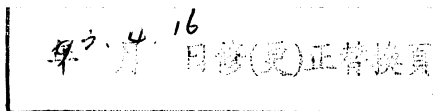
柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 6 ）圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

(無)

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



I288779

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：92106155

※ 申請日期：92.3.27

※ IPC 分類：C12N15/08, A61K35/12

壹、發明名稱：(中文/英文)

具單核球來源之經去分化的可程式化幹細胞及其製造與用途

DEDIFFERENTIATED, PROGRAMMABLE STEM CELLS OF MONOCYTIC ORIGIN,
AND THEIR PRODUCTION AND USE

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

德商·巴拉斯堤康生技研究股份有限公司

Blasticon Biotechnologische Forschung GmbH

代表人：(中文/英文)

克勞斯·蘇特勒/Claus Schüttler

住居所或營業所地址：(中文/英文)

德國凱爾·郵政信箱5113號/Postfach 5113, 24063 Kiel, Germany

國籍：(中文/英文)

德國/Germany

參、發明人：(共 3 人)

姓名：(中文/英文)

1. 貝恩德 K. F. 卡雷米爾/Bernd Karl Friedrich Kremer

2. 佛瑞德·費恩德理希/Fred Faendrich

3. 瑪雷恩·魯恩基/Maren Ruhnke

住居所地址：(中文/英文)

1. 德國凱爾·費瑪恩溫克18號/Fehmarnwinkel 18, 24107 Kiel, Germany

2. 德國凱爾·波斯特法斯5113號/Postfach 5113, 24105 Kiel, Germany

3. 德國凱爾·約克街8號/Yorkstr. 8, 24105 Kiel, Germany

國籍：(中文/英文)

德國/Germany

拾、申請專利範圍：

第92106955號專利申請案申請專利範圍修正本

修正日期：96年6月

1. 一種用於生產具人類單核球來源之經去分化的可程式
5 化幹細胞之方法，其特徵在於：
 - a)自人類血液中分離單核球；
 - b)單核球係於一適宜的培養基中增殖，該培養基含有細胞生長因子M-CSF；
 - c)單核球係與第b)步驟同時或於其後培養於一種
10 含有IL-3之培養基中；及
 - d)藉由自培養基中分離細胞，而得人類成年型經去分化的可程式化幹細胞。
2. 如申請專利範圍第1項之方法，其特徵在於在第c)步驟之培養基中進一步添加一種巰基化合物。
- 15 3. 如申請專利範圍第2項之方法，其特徵在於使用一種巰基化合物，其中至少一碳基係與硫鍵結，及其中該烴基可被一或多個其他官能基取代。
4. 如申請專利範圍第2項之方法，其特徵在於該巰基化合物為2-巰基乙醇或二甲基亞碲。
- 20 5. 如申請專利範圍第3項之方法，其特徵在於該巰基化合物為2-巰基乙醇或二甲基亞碲。
6. 如申請專利範圍第1至5項中任一項之方法，其特徵在於在第c)步驟之後及在第d)步驟之前，細胞與一種生物上可接受的有機溶劑接觸。

7. 如申請專利範圍第6項之方法，其特徵在於該生物上可接受的有機溶劑係一種具有1至4個碳原子之醇類。
8. 如申請專利範圍第7項之方法，其特徵在於該醇類為乙醇。
- 5 9. 如申請專利範圍第6項之方法，其特徵在於細胞係與該生物上可接受的有機溶劑之蒸氣相接觸。
10. 如申請專利範圍第1至5項中任一項之方法，其特徵在於在第d)步驟之後，細胞係懸浮於一適宜的細胞培養基中。
- 10 11. 如申請專利範圍第6項之方法，其特徵在於在第d)步驟之後，細胞係懸浮於一適宜的細胞培養基中。
12. 如申請專利範圍第7項之方法，其特徵在於在第d)步驟之後，細胞係懸浮於一適宜的細胞培養基中。
13. 如申請專利範圍第8項之方法，其特徵在於在第d)步驟
- 15 之後，細胞係懸浮於一適宜的細胞培養基中。
14. 如申請專利範圍第9項之方法，其特徵在於在第d)步驟之後，細胞係懸浮於一適宜的細胞培養基中。
15. 如申請專利範圍第10項之方法，其特徵在於該培養基為RPMI或DMEM。
- 20 16. 如申請專利範圍第11項之方法，其特徵在於該培養基為RPMI或DMEM。
17. 如申請專利範圍第12項之方法，其特徵在於該培養基為RPMI或DMEM。
18. 如申請專利範圍第13項之方法，其特徵在於該培養基為

RPMI或DMEM。

19. 如申請專利範圍第14項之方法，其特徵在於該培養基為
RPMI或DMEM。
- 5 20. 如申請專利範圍第10項之方法，其特徵在於該培養基含
有一細胞激素或LIF。
21. 如申請專利範圍第11項之方法，其特徵在於該培養基含
有一細胞激素或LIF。
22. 如申請專利範圍第12項之方法，其特徵在於該培養基含
有一細胞激素或LIF。
- 10 23. 如申請專利範圍第13項之方法，其特徵在於該培養基含
有一細胞激素或LIF。
24. 如申請專利範圍第14項之方法，其特徵在於該培養基含
有一細胞激素或LIF。
25. 如申請專利範圍第10項之方法，其特徵在於該細胞係懸
15 浮於一液態基質中，及之後加以深凍之。
26. 如申請專利範圍第11項之方法，其特徵在於該細胞係懸
浮於一液態基質中，及之後加以深凍之。
27. 如申請專利範圍第12項之方法，其特徵在於該細胞係懸
浮於一液態基質中，及之後加以深凍之。
- 20 28. 如申請專利範圍第13項之方法，其特徵在於該細胞係懸
浮於一液態基質中，及之後加以深凍之。
29. 如申請專利範圍第14項之方法，其特徵在於該細胞係懸
浮於一液態基質中，及之後加以深凍之。
30. 如申請專利範圍第25項之方法，其特徵在於該基質係一

種細胞培養基。

31. 如申請專利範圍第26項之方法，其特徵在於該基質係一種細胞培養基。

5 32. 如申請專利範圍第27項之方法，其特徵在於該基質係一種細胞培養基。

33. 如申請專利範圍第28項之方法，其特徵在於該基質係一種細胞培養基。

34. 如申請專利範圍第29項之方法，其特徵在於該基質係一種細胞培養基。

10 35. 一種具人類單核球來源之經去分化的可程式化幹細胞，可藉由如申請專利範圍第1至34項中任一項之方法製得。

36. 一種藥學組成物，其含有如申請專利範圍第35項之經去分化的可程式化幹細胞。

15 37. 一種如申請專利範圍第35項之經去分化的可程式化幹細胞在用於生產標的細胞及標的組織之用途。

38. 如申請專利範圍第37項之用途，其特徵在於：

a) 將含有所欲標的細胞之組織打碎；

b) 自打碎的組織中獲得標的細胞及/或其片段；

20 c) 將標的細胞及/或其片段置於一適宜培養基中培養；

d) 收集培養期間與之後的培養基上清液，作為經標的細胞調理的基質；及

e) 讓幹細胞在經標的細胞調理的基質之存在下生

長，以將該幹細胞重新程式化/分化成為所欲的標的細胞。

39. 如申請專利範圍第37或38項之用途，以用於生產脂肪細胞、神經元與神經膠質細胞、內皮細胞、角質化細胞、
5 肝細胞或胰島細胞。
40. 如申請專利範圍第1項之方法，其特徵在於該經去分化的可程式化幹細胞係經一或多個基因轉移感染。
41. 如申請專利範圍第35項之具人類單核球來源之經去分化的可程式化幹細胞，其特徵在於膜聯結型單核球專一
10 性表面抗原CD 14以及至少一個選自下列群中的多能性標記：CD117、CD123及CD135。
42. 如申請專利範圍第35或41項之幹細胞，其特徵在於該經去分化的可程式化幹細胞係經一或多個基因轉移感染。
43. 一種幹細胞製劑，其含有位於一適宜基質中之如申請專利範圍第35、41或42項之經去分化的可程式化幹細胞。
15
44. 一種如申請專利範圍第35、41或42項之經去分化的可程式化幹細胞在製備用於治療肝硬化之一藥學組成物之用途。
45. 一種如申請專利範圍第35、41或42項之經去分化的可程式化幹細胞在製備用於治療胰臟機能不全之一藥學組成物之用途。
20
46. 一種如申請專利範圍第35、41或42項之經去分化的可程式化幹細胞在製備用於治療急性或慢性腎衰竭之一藥學組成物之用途。

47. 一種如申請專利範圍第35、41或42項之經去分化的可程式化幹細胞在製備用於治療荷爾蒙功能不足之一藥學組成物之用途。
- 5 48. 一種如申請專利範圍第35、41或42項之經去分化的可程式化幹細胞在製備用於治療心肌梗塞之一藥學組成物之用途。
49. 一種如申請專利範圍第35、41或42項之經去分化的可程式化幹細胞在製備用於治療肺栓塞之一藥學組成物之用途。
- 10 50. 一種如申請專利範圍第35、41或42項之經去分化的可程式化幹細胞在製備用於治療中風之一藥學組成物之用途。
51. 一種如申請專利範圍第35、41或42項之經去分化的可程式化幹細胞在製備用於治療皮膚損傷之一藥學組成物之用途。
- 15 52. 一種如申請專利範圍第35、41或42項之經去分化的可程式化幹細胞在製備用於在活體內產生標的細胞及標的組織之一藥學組成物之用途。
53. 一種經分化、分離的體標的細胞及/或標的組織，其係藉由重新程式化如申請專利範圍第35、41或42項之幹細胞而製得，其特徵在於膜聯結型表面抗原CD14。
- 20 54. 如申請專利範圍第53項之體標的細胞及/或標的組織，其係選自下列群中：脂肪細胞、神經元與神經膠質細胞、內皮細胞、角質化細胞、肝細胞及胰島細胞。

55. 如申請專利範圍第53或54項之體標的細胞及/或標的組織，其特徵在於其等係經一或多個基因轉移感染。
56. 一種可植入性物質，其係經如申請專利範圍第35、41或42項之經去分化的可程式化幹細胞或經如申請專利範圍第53至55項之體標的細胞及/或標的組織塗覆。
57. 如申請專利範圍第56項之可植入性物質，其特徵在於該物質為人工器官。
58. 如申請專利範圍第57項之可植入性物質，其特徵在於該人工器官係選自下列群中：心臟瓣膜、人工血管、人工骨骼與關節。
59. 如申請專利範圍第56項之可植入性物質，其特徵在於該可植入性物質為人造及/或生物載體物質，其含有如申請專利範圍第35、41或42項之經去分化的可程式化幹細胞或如申請專利範圍第53至55項之標的細胞。
60. 如申請專利範圍第59項之可植入性物質，其特徵在於該載體物質為用於置入人體之袋或盒。
61. 一種如申請專利範圍第60項之可植入性物質之用途，其含有如申請專利範圍第53項之經分化、分離的體標的細胞及/或標的組織，其中該體標的細胞及/或標的組織為胰島細胞，以用於製造作為供應胰島素的人工胰島細胞配流盒之一藥學建構物。
62. 一種如申請專利範圍第60項之可植入性物質之用途，其含有如申請專利範圍第53項之經分化、分離的體標的細胞及/或標的組織，其中該體標的細胞及/或標的組織為

脂肪細胞，以用於製造含有裝填脂肪細胞的人造聚合物之一藥學建構物，以在手術後用於建造乳房或用於整型與美容矯正之情況。

- 5 63. 如申請專利範圍第56或60項之可植入性物質，其特徵在於其等為半滲透性配流盒系統，其含有如申請專利範圍第53項之經分化、分離的體標的細胞。
64. 一種如申請專利範圍第63項之可植入性物質的用途，用以製造用於活體內治療內分泌性、代謝性或體內平衡性病症之一藥學建構物。
- 10 65. 一種M-CSF與IL-3在生產具人類單核球來源之經去分化的可程式化幹細胞之用途。