



(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 201831673 A

(43) 公開日：中華民國 107 (2018) 年 09 月 01 日

- (21) 申請案號：107114254 (22) 申請日：中華民國 102 (2013) 年 07 月 24 日
- (51) Int. Cl. : C12M3/02 (2006.01) C12N5/071 (2010.01)  
 C12N5/09 (2010.01) G01N33/15 (2006.01)  
 C40B30/06 (2006.01)
- (30) 優先權：2012/07/24 日本 2012-164227  
 2012/11/30 日本 2012-263801  
 2013/01/31 日本 2013-017836
- (71) 申請人：日商日產化學工業股份有限公司 (日本) NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.  
 (JP)  
 日本  
 國立大學法人京都大學 (日本) KYOTO UNIVERSITY (JP)  
 日本
- (72) 發明人：西野泰斗 NISHINO, TAITO (JP)；金木達朗 KANAKI, TATSURO (JP)；大谷彩子 OTANI, AYAKO (JP)；猿橋康一郎 SARUHASHI, KOICHIRO (JP)；戶村美沙代 TOMURA, MISAYO (JP)；岩間武久 IWAMA, TAKEHISA (JP)；堀川雅人 HORIKAWA, MASATO (JP)；中辻憲夫 NAKATSUJI, NORIO (JP)；尾辻智美 OTSUJI, TOMOMI (JP)
- (74) 代理人：洪武雄；陳昭誠
- 申請實體審查：有 申請專利範圍項數：7 項 圖式數：25 共 212 頁

## (54) 名稱

培養基組成物

MEDIUM COMPOSITION

## (57) 摘要

本發明提供一種細胞及/或組織之培養方法等，該方法之特徵為使用具有防止細胞及/或組織沉降之效果的培養基組成物，以懸浮狀態培養細胞及/或組織，其中，該培養基組成物係藉由在液體培養基中形成不定形的構造體，使該構造體均勻分散在該溶液中，在未實質地提高該溶液之黏度且實質地保持細胞及/或組織，而具有防止細胞及/或組織沉降之效果者。

This invention provides a method for culturing cells and/or tissues etc., characterized in culturing cells and/or tissues in a floating state by using a medium composition which can keep the cells and/or the tissues in the solution without substantially increasing the viscosity of the solution by forming amorphous structures in a liquid medium (solution) and making the amorphous structures evenly dispersed in the solution, thereby preventing the cells and /or tissues from sedimentation.

# 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】(中文/英文)

培養基組成物

MEDIUM COMPOSITION

## 【技術領域】

【0001】本發明係關於含有可使細胞或組織懸浮之構造體之培養基組成物，及以使用該培養基組成物為特徵之細胞或組織之培養方法。本發明之培養基組成物及使用該培養基組成物之細胞培養方法，特別適合使用在以懸浮狀態培養動植物細胞及/或組織時。

## 【先前技術】

【0002】近年來，正發展用以在活體外增殖或維持在動物或植物體內擔任不同角色之各式各樣的器官、組織、及細胞之技術。在活體外之增殖或維持此等器官、組織一事，係分別被稱為器官培養、組織培養；在活體外進行增殖、分化或維持從器官、組織所分離之細胞，係被稱為細胞培養。細胞培養係在培養基中將所分離之細胞進行活體外增殖、分化或維持之技術，其為詳細解析活體內之各種器官、組織、細胞之功能及構造所不可或缺者。又，藉由該技術所培養之細胞及/或組織，可利用於化學物質、醫藥品等之藥效及毒性評估；酵素、細胞增殖因子、抗體等有用物質之大量生產；彌補因疾病或缺損而喪失之器官、組織、細胞的再生醫療；植物之品種改良；基因重組作物之

製成等各種領域。

【0003】來自動物之細胞，係從其性狀分為懸浮細胞及接著細胞 2 大類。雖然懸浮細胞係在繁殖/增殖上無需支架(scaffold)之細胞，而接著細胞係在繁殖/增殖上需要支架之細胞，但構成生物體之大部分細胞係屬後者之接著細胞。就接著細胞之培養方法而言，已知單層培養、分散培養、包埋培養、微載體(microcarrier)培養、及球體(sphere)培養等。

【0004】單層培養，係以由玻璃或已進行各種表面處理之合成高分子材料所製成之培養容器、或被稱為餵養細胞(feeder cell)之補助細胞作為支架，而以單層狀培養目標細胞之方法，是最為一般普遍的方法。例如，已開發：使用對聚苯乙烯施行各種表面處理(電漿處理、電暈處理等)者，塗覆有膠原蛋白、纖維黏連蛋白(fibronectin)、聚離胺酸等細胞接著因子者，或預先接種有餵養細胞者等，使用各種形狀或性狀之培養容器的培養方法。但是，單層培養，由於其之二維培養環境與在活體內之環境完全不同，所以有：細胞無法長時間維持在活體內所具有之特異功能，無法再構築與活體內同樣的組織，因每單位面積之細胞數有所限制而不適合細胞之大量培養等問題(專利文獻 1)。又，就在餵養細胞上培養目的細胞之方法而言，會有餵養細胞與目的細胞之分離之問題(非專利文獻 1)。

【0005】分散培養，係於將細胞接種於培養基後，在已預先施行阻礙細胞附著之表面處理的培養容器中，藉由

持續攪拌其培養液，阻礙細胞接著於培養容器，而以懸浮狀態培養接著細胞之方法。但是，由於該方法所培養之接著細胞無法接著於支架，所以無法應用於細胞增殖時需接著於支架之細胞。又，由於用剪切力不斷打碎而無法發揮原本之細胞功能，所以會有無法用於大量培養具功能之細胞之情形(非專利文獻 2)。

【0006】包埋培養，係將細胞埋入瓊脂、甲基纖維素、膠原蛋白、明膠、纖維蛋白(fibrin)、瓊脂糖(agarose)、藻酸鹽等固體或半固體之凝膠基材中，使其固定而培養之方法。該方法可將細胞以近似在活體內之形態進行三維地培養，由於凝膠基材本身亦會促進細胞之增殖及分化，故與單層培養及分散培養相比，可以高密度培養維持細胞原本之功能之細胞(專利文獻 2、3)。再者，亦開發出以將細胞埋入該等凝膠基材之狀態製成大小為 100 至 300  $\mu\text{m}$  之微膠囊，然後使該微膠囊分散同時用水溶液培養基培養細胞之方法(非專利文獻 3)。然而，該等方法係有下述問題：在可見光無法穿透凝膠基材時，無法隨時間觀察培養細胞；由於包含凝膠基材之培養基或微膠囊之黏度高，故為了從該培養基中回收細胞，需進行酵素處理(例如，在使用膠原蛋白凝膠時，係以膠原蛋白酶處理)等繁雜且會對細胞造成障礙之操作；難以進行長期培養時所需的培養基交換等。近年，雖然開發藉由熱、剪切力等之處理而可從凝膠基材回收細胞之技術，但熱和剪切力等除了會對細胞功能造成不良影響之外，有關該凝膠基材對於活體之安全性尚



不明朗(專利文獻 4、5、非專利文獻 4、5、6、7)。又，雖然在食品領域開發出用於使切成小粒之果實及蔬菜等粒狀食品均勻分散、懸浮，並防止其沈澱或浮上之溶膠狀食品，但該溶膠狀食品無需考慮將分散的粒狀食品回收，亦未進行是否可以懸浮狀態培養細胞、組織之檢討(專利文獻 6)。

【0007】 微載體培養，係使細胞在僅略重於水之微粒子(以下，亦稱為微載體)之表面上單層地增殖，並將該微粒子在燒瓶等培養容器內攪拌，以懸浮狀態進行培養者。通常，該方法中所使用之微載體係直徑 100 至 300  $\mu\text{m}$ ，表面積 3000 至 6000  $\text{cm}^2/\text{g}$ ，比重 1.03 至 1.05 之球狀粒子，係由葡聚糖、明膠、藻酸或聚苯乙烯等材料所構成。為了使細胞容易附著於微載體之表面，亦可賦予膠原蛋白、明膠、或二甲胺基乙基等帶電基。由於該方法可使培養面積大幅增加，所以可應用於細胞之大量培養(專利文獻 7、8)。然而，難以使目的細胞大致均勻地附著於全部的微載體，又，因攪拌中之剪切力而使細胞從微載體脫離、細胞受到障礙等亦成為問題(非專利文獻 8)。

【0008】 球體培養，係形成由數十至數百個目的細胞所構成之凝集塊(以下亦稱為球體)後，將該凝集塊在培養基中進行靜置或振盪培養之方法。已知球體係細胞密度高，可再構築近似活體內環境之細胞-細胞間相互作用及細胞構造體，較單層培養、分散培養法更可以長期維持細胞原本的功能而進行培養(非專利文獻 9、10)。然而，球體培養在球體之尺寸過大時，由於球體內部之營養分之供給及

廢物之排出變得困難，所以不可形成大的球體。又，由於所形成之球體需在培養容器之底面以分散狀態進行培養，所以難以增加每單位體積之球體數，而不宜大量培養。再者，球體之製成方法雖已知有：懸滴培養、在細胞非接著表面之培養、在微孔(microwell)內之培養、旋轉培養、利用細胞支架之培養、藉由離心力或超音波、電場/磁場而凝集等，但是該等方法係有操作繁雜、球體之回收困難、尺寸之控制及難以大量生產、對於細胞之影響不明、需要特殊的專用容器和裝置等問題(專利文獻 9)。

【0009】 另一方面，關於植物，係可以無菌狀態培養細胞、除去細胞壁之原生質體或植物之葉、莖、根、生長點、種子、胚、花粉等器官、組織、癒傷組織(callus)並進行增殖。使用此種植物之組織及細胞之培養技術，亦可改良植物之品種和生產有用物質。就使植物之細胞、組織於短期間大量增殖之方法而言，已知將植物細胞、組織在液體培養基中懸浮培養之方法(非專利文獻 11)。為了達成該等之良好增殖，供給充分的氧及維持均勻的混合狀態，進而防止細胞之破損等係頗為重要。供給氧氣至培養液及細胞、組織之懸浮，雖然有組合通氣及機械攪拌而進行之情況及僅藉由通氣而進行之情況，但前者會有因攪拌造成細胞或組織之破損，導致增殖不良之情形；另一方面，後者雖然細胞及組織之剪斷少，但由於在高密度培養時會有難以維持均勻的混合狀態之情形，因此會有細胞及組織沈降，而增殖效率降低等問題。

【0010】再者，為了於抗癌劑之研究開發或於癌治療時選擇適當的抗癌劑，係藉由在含有候選藥劑或抗癌劑之培養液中進行活體外培養癌細胞，來評估藥劑對於癌細胞之抗癌活性。然而，既有之抗癌活性之評估方法中，係有於活體外之評估結果與實際臨床效果會乖離等問題存在。為了改善該問題，已開發使用盡可能地使體內環境再現之細胞培養條件來進行活性評估之方法。例如，開發藉由用軟瓊脂(soft agar)、膠原蛋白凝膠、水凝膠(hydrogel)等支撐物包埋癌細胞，並於阻礙癌細胞接著於培養容器之環境中培養癌細胞，來進行抗癌劑之評估的方法(專利文獻 10、非專利文獻 12、13)。又，正開發藉由用阻礙細胞接著之材料塗覆培養容器表面或對表面施行特殊的加工以阻礙細胞接著，而在使癌細胞凝集之狀態下進行培養(球體培養)，來進行抗癌活性之評估的方法(專利文獻 11、12)。

【0011】然而，該等癌細胞培養法係有下述之各種問題：培養容器之製作過程及細胞培養之操作繁雜；從膠原蛋白等支撐物回收細胞並評估抗癌活性時之操作繁雜；支撐物為來自動物之成分時由於價格高昂，會在其供給方面有所限制；細胞凝集塊(球體)彼此會合而尺寸變得過大，使得細胞生存率及再現性變低等。此外，實施抗癌劑之篩選(screening)時，係要求可簡便、均勻地處理大量樣本、再現性高之癌細胞的培養方法。

【0012】另外，藉由在含有醫藥品候選劑或醫藥品之培養液中，將肝細胞進行活體外培養，可評估醫藥品候選

劑或醫藥品對於肝細胞之各種活性。但是，由於若於活體外培養肝細胞，則肝細胞會有喪失原本於活體內所具有之功能之情形，所以就既有之肝細胞之培養方法而言，係有無法正確評估醫藥品候選劑或醫藥品、難以評估多個樣本等問題存在。為了克服此等問題，已開發出在盡可能地使體內環境再現之細胞培養條件下進行活性評估的手法。例如，正開發在膠原蛋白、層黏連蛋白(laminin)、基質膠(matrigel)(註冊商標)等之細胞外基質(extracellular matrix)上培養肝細胞，並維持肝細胞之功能的方法(專利文獻 13、非專利文獻 14、15)。又，正開發藉由用阻礙細胞接著之材料塗覆培養容器表面、對容器表面施行特殊的加工而阻礙細胞接著、藉由使培養容器振盪等處理而使肝細胞之凝集塊(球體)形成，維持肝細胞之功能的方法(專利文獻 14、15、非專利文獻 16、17)。

【0013】但是，該等肝細胞培養法係有下述之各種問題：培養容器之製作過程及細胞培養之操作繁雜；從膠原蛋白等支撐物回收細胞並評估肝細胞功能時之操作繁雜；支撐物為來自動物之成分時由於價格高昂，其供給會在其供給方面有所限制；細胞凝集塊(球體)彼此會合而尺寸變得過大，而使細胞生存率及再現性變低等。此外，實施醫藥品候選劑或醫藥品之篩選時，係要求可簡便、均勻地處理大量樣本、再現性高之肝細胞的培養方法。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

## 【0014】

- [專利文獻 1]日本特開 2001-128660 號公報  
[專利文獻 2]日本特開昭 62-171680 號公報  
[專利文獻 3]日本特開昭 63-209581 號公報  
[專利文獻 4]日本特開 2009-29967 號公報  
[專利文獻 5]日本特開 2005-60570 號公報  
[專利文獻 6]日本特開平 8-23893 號公報  
[專利文獻 7]日本特開 2004-236553 號公報  
[專利文獻 8]國際公開第 2010/059775 號  
[專利文獻 9]日本特開 2012-65555 號公報  
[專利文獻 10]日本特開 2008-11797 號公報  
[專利文獻 11]日本特開 2008-61609 號公報  
[專利文獻 12]日本特開 2012-249547 號公報  
[專利文獻 13]國際公開第 2005/028639 號  
[專利文獻 14]國際公開第 2010/079602 號  
[專利文獻 15]日本特開 2009-50194 號公報

[非專利文獻]

## 【0015】

- [非專利文獻 1]Klimanskaya etc., Lancet 2005, 365 :  
1636-1641  
[非專利文獻 2]King etc., Curr Opin Chem Biol. 2007,  
11 : 394-398  
[非專利文獻 3]Murua etc., J. of Controlled Release 2008,  
132 : 76-83

[非專利文獻 4] Mendes, Chemical Society Reviews 2008,  
37 : 2512-2529

[非專利文獻 5] Moon etc., Chemical Society Reviews  
2012, 41 : 4860-4883

[非專利文獻 6] Pek etc. Nature Nanotechnol. 2008, 3 :  
671-675

[非專利文獻 7] Liu etc., Soft Matter 2011, 7 : 5430-5436

[非專利文獻 8] Leung etc., Tissue Engineering 2011,  
17 : 165-172

[非專利文獻 9] Stahl etc., Biochem. Biophys. Res. Comm.  
2004, 322 : 684-692

[非專利文獻 10] Lin etc., Biotechnol J. 2008, 3 : 1172-  
1184

[非專利文獻 11] Weathers etc., Appl Microbiol  
Biotechnol 2010, 85 : 1339-1351

[非專利文獻 12] Takamura etc., Int. J. Cancer 2002, 98 :  
450-455

[非專利文獻 13] Yang etc. Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
1979, 76 : 3401-3405

[非專利文獻 14] Bissell etc., J. Clin. Invest. 1987, 79 :  
801-812

[非專利文獻 15] Lecluyse etc., Critical Reviews in  
Toxicology 2012, 42 : 501-548

[非專利文獻 16] Brophy etc., Hepatology 2009, 49 : 578-

586

[非專利文獻 17] Franziska etc., World J Hepatol 2010, 2 : 1-7

### 【發明內容】

[發明欲解決之課題]

【0016】 本發明之目的在於解決上述之先前技術問題，而提供特別用於以三維或懸浮狀態培養動植物細胞及/或組織之培養基組成物，以及使用該培養基組成物之動植物細胞及/或組織之培養方法。

又，本發明之目的在於提供一種解決上述之先前技術問題，而用以於三維環境培養癌細胞之細胞凝集塊(球體)之培養基組成物、以及使用該培養基組成物之癌細胞之試驗方法。

或者，本發明之目的在於提供一種解決上述之先前技術問題，而用以於三維環境培養肝細胞之細胞凝集塊(球體)之培養基組成物、以及使用該培養基組成物之癌細胞之試驗方法。

再者，本發明之目的在於提供一種於癌細胞之培養中，促進癌細胞之增殖的培養基添加劑，以及於肝細胞之培養中，抑制肝細胞數之減少的培養基添加劑。

[解決課題之手段]

【0017】 本發明者等係針對於各種化合物及含有該等化合物之液體培養基中之細胞及/或組織之懸浮效果加以深入研究，結果成功發現一種未實質提高該液體培養基中

之黏度、且可使細胞及/或組織以懸浮狀態均勻分散之構造體。發現若使用至少包含該構造體之培養基組成物，則細胞及/或組織可在維持懸浮狀態下進行增殖、分化或維持。再者，亦發現可容易地從該培養基組成物回收所培養之細胞及/或組織，遂完成本發明。

又，本發明者等係針對各種化合物及含有該等化合物之液體培養基對於癌細胞凝集塊(球體)之效果加以深入研究，結果成功發現可防止該球體彼此會合，並使其均勻分散之培養基組成物。又發現若使用該培養基組成物，將能以高生存率培養該球體，而可有效率且高感度地評估抗癌劑對於癌細胞之活性。再者，亦發現可容易從該培養基組成物回收所培養之球體來進行評估，遂完成本發明。

或者，本發明者等係針對各種化合物及含有該等化合物之液體培養基對於肝細胞凝集塊(球體)之效果加以深入研究，結果成功發現可防止該球體彼此會合，並使其均勻分散之培養基組成物。又發現若使用該培養基組成物，將能以高生存率並維持肝細胞原本之功能進行培養該球體，而可有效率且高感度地評估醫藥品候選劑或醫藥品對於肝細胞之效果。再者，亦發現可容易地從該培養基組成物回收所培養之球體來進行評估，遂完成本發明。

再者，本發明者等發現在包含癌細胞之培養基中，添加有脫醯基化結蘭膠或其鹽時，將大幅促進癌細胞之增，遂完成本發明。

此外，本發明者等發現在包含肝細胞之培養基中，添



加有脫醯基化結蘭膠(Gellan Gum)或其鹽時，將抑制肝細胞數之減少，遂完成本發明。

【0018】 亦即，本發明如下所述：

【0019】

(1)一種培養基組成物，其特徵為含有可懸浮而培養細胞及/或組織之構造體。

(2)如(1)所述之培養基組成物，其中，可進行培養時之培養基組成物之交換處理、及培養結束後之細胞或組織之回收。

(3)如(1)所述之培養基組成物，其中，在從培養基組成物回收細胞或組織時，無需進行溫度變化、化學處理、酵素處理、剪切力中之任一者。

(4)如(1)所述之培養基組成物，其中，黏度為  $8\text{mPa}\cdot\text{s}$  以下。

(5)如(1)所述之培養基組成物，其中，前述構造體之大小為，在使用過濾器進行過濾時可通過孔徑  $0.2\ \mu\text{m}$  至  $200\ \mu\text{m}$  之過濾器者。

(6)如(1)所述之培養基組成物，其中，前述構造體含有高分子化合物。

(7)如(6)所述之培養基組成物，其中，前述高分子化合物含有具陰離子性官能基之高分子化合物。

(8)如(6)所述之培養基組成物，其中，前述高分子化合物為多糖類。

(9)如(7)所述之培養基組成物，其中，前述陰離子性官能基係選自羧基、磺酸基及磷酸基所成之群組中之至少1種。

(10)如(8)所述之培養基組成物，其中，前述多糖類係選自

玻尿酸、結蘭膠、脫醯基化結蘭膠、鼠李聚糖膠(Rhmsan gum)、迪特膠(音譯, Diutan gum)、三仙膠(xanthan gum)、角叉菜膠(carrageenan)、褐藻糖膠(fucoidan)、果膠(pectin)、果膠酸(pectic acid)、果膠酯酸(pectinic acid)、硫酸乙醯肝素(heparan sulfate)、肝素(heparin)、硫酸類肝素(heparitin sulfate)、硫酸角質(keratosulfate)、硫酸軟骨素(chondroitin sulfate)、硫酸皮膚素(dermatan sulfate)、硫酸鼠李聚糖(rhamnan sulfate)及此等之鹽所成之群組中之至少 1 種。

(11)如(10)所述之培養基組成物,其中,前述多糖類係選自玻尿酸、脫醯基化結蘭膠、迪特膠、三仙膠、角叉菜膠及此等之鹽所成之群組中之至少 1 種。

(12)如(10)或(11)所述之培養基組成物,其中,前述多糖類係脫醯基化結蘭膠或其鹽。

(13)如(12)所述之培養基組成物,其中,相對於培養基組成物,前述脫醯基化結蘭膠或其鹽之最終濃度為 0.001 至 1.0%(重量/體積)。

(14)如(13)所述之培養基組成物,其中進一步含有脫醯基化結蘭膠或其鹽以外之多糖類。

(15)如(14)所述之培養基組成物,其中,前述多糖類係選自三仙膠、藻酸、角叉菜膠、迪特膠及此等之鹽所成之群組中之至少 1 種。

(16)如(14)所述之培養基組成物,其中,前述多糖類係選自甲基纖維素、刺槐豆膠及此等之鹽所成之群組中之至少 1 種。

(17)如(1)至(16)中任一項所述之培養基組成物，其中進一步含有金屬離子。

(18)如(17)所述之培養基組成物之培養基組成物，其中，前述金屬離子係 2 價金屬離子。

(19)如(18)所述之培養基組成物，其中，前述金屬離子係選自鈣離子、鎂離子、鋅離子、鐵離子及銅離子所成之群組中之至少 1 種。

(20)如(19)所述之培養基組成物，其中，前述金屬離子係鈣離子。

(21)如(20)所述之培養基組成物，其中進一步含有鈣離子以外之金屬離子。

(22)如(21)所述之培養基組成物，其中，前述金屬離子係選自鎂離子、鈉離子及鉀離子所成之群組中之至少 1 種。

(23)如(1)至(22)中任一項所述之培養基組成物，其進一步含有細胞外基質及/或細胞接著分子。

(24)如(23)所述之培養基組成物，其中，前述細胞外基質係選自膠原蛋白、玻尿酸及蛋白聚醣(proteoglycan)所成之群組中之至少 1 種。

(25)如(23)所述之培養基組成物，其中，前述細胞接著分子係選自鈣黏連蛋白(cadherin)、層黏連蛋白、纖維黏連蛋白(fibronectin)及玻璃黏連蛋白(vitronectin)所成之群組中之至少 1 種。

(26)如(1)至(25)中任一項所述之培養基組成物，其係細胞培養用者。

(27)如(26)所述之培養基組成物，其中，前述細胞係接著細胞或懸浮細胞。

(28)如(27)所述之培養基組成物，其中，接著細胞係呈附著於微載體之狀態。

(29)如(27)所述之培養基組成物，其中，前述接著細胞係呈包埋於載體之狀態。

(30)如(27)所述之培養基組成物，其中，前述接著細胞係球體。

(31)如(27)所述之培養基組成物，其中，前述接著細胞係選自多潛能幹細胞(pluripotent stem cell)、癌細胞及肝細胞所成之群組。

(32)一種細胞或組織培養物，其包含如(1)至(31)中任一項所述之培養基組成物、以及細胞或組織。

(33)一種細胞或組織之培養方法，其特徵為在如(1)至(31)中之任一項所述之培養基組成物中培養細胞或組織。

(34)如(33)所述之培養方法，其中前述細胞係選自多潛能幹細胞、癌細胞、肝細胞所成之群組。

(35)一種細胞或組織之回收方法，其特徵為從(32)所述之培養物中分離細胞或組織。

(36)如(35)所述之回收方法，其中，前述分離係藉由過濾、離心或磁性分離而進行。

(37)一種球體之製造方法，其特徵為在(1)至(31)中任一項所述之培養基組成物中培養接著細胞。

(38)一種抗癌劑之篩選方法，其特徵為包含：

(a)於受驗物質存在下及未存在下，在(1)至(31)中任一項所述之培養基組成物中培養癌細胞的步驟；及

(b)解析癌細胞之增殖之變化的步驟。

(39)如(38)所述之方法，其中進一步包含選擇與受驗物質未存在下之情況相比可抑制癌細胞之增殖的物質作為候選物質的步驟。

(40)一種篩選作用於肝細胞之醫藥品候選物質的方法，其特徵為包含：

(a)於受驗物質之存在下及未存在下，在(1)至(31)中任一項所述之培養基組成物中培養肝細胞的步驟；及

(b)解析肝細胞之生理功能之變化的步驟。

(41)如(40)所述之方法，其中進一步包含選擇與受驗物質未存在下之情況相比可抑制或增加肝細胞之生理功能之物質的步驟。

(42)一種評估作用於肝細胞之醫藥品候選物質之藥效或毒性之方法，其特徵為包含：

(a)於受驗物質之存在下及未存在下，在(1)至(31)中任一項所述之培養基組成物中培養肝細胞的步驟；及

(b)解析肝細胞之生理功能之變化的步驟。

(43)一種培養基添加劑，其係用於調製能懸浮而培養細胞或組織之培養基組成物的培養基添加劑，且係由高分子化合物溶解或分散於溶劑中而製成者。

(44)如(43)所述之培養基添加劑，其係呈已滅菌之狀態。

(45)如(43)或(44)所述之培養基添加劑，其中，前述高分子

化合物係具有陰離子性官能基之高分子化合物。

(46)如(43)或(44)所述之培養基添加劑，其中，前述高分子化合物係脫醯基化結蘭膠或其鹽。

(47)一種培養基組成物之製造方法，其係能懸浮而培養細胞或組織之培養基組成物的製造方法，該方法係將高分子化合物與培養基混合。

(48)如(47)所述之培養基組成物之製造方法，其中，係將第43至46項中任一項所述之培養基添加劑與培養基混合。

(49)如(48)所述之培養基組成物之製造方法，其中，前述培養基係溶解或分散於溶劑中。

(50)如(47)所述之培養基組成物之製造方法，其中，前述高分子化合物係具有陰離子性官能基之高分子化合物。

(51)如(50)所述之培養基組成物之製造方法，其中，前述高分子化合物係脫醯基化結蘭膠或其鹽。

(52)如(47)所述之培養基組成物之製造方法，其中前述高分子化合物係與培養基、水混合。

(53)如(52)所述之培養基組成物之製造方法，其中，與水混合後，係於80至130°C加熱。

(54)如(53)所述之培養基組成物之製造方法，其中，係於100至125°C加熱。

(55)如(47)所述之培養基組成物之製造方法，其中，係進行過濾滅菌。

(56)如(55)所述之培養基組成物之製造方法，其中，前述過濾滅菌係通過0.1至0.5  $\mu\text{m}$ 之過濾器(filter)。

(57)一種癌細胞用培養基添加劑，其係包含脫醯基化結蘭膠或其鹽、或者迪特膠或其鹽。

(58)如(57)所述之添加劑，其在癌細胞之培養方面，可促進癌細胞之增殖。

(59)如(57)所述之添加劑，其係用於評估抗癌劑之抗癌活性。

(60)一種癌細胞用培養基組成物，其係含有如(57)至(59)中任一項所述之添加劑。

(61)一種癌細胞之培養方法，其係於如(57)至(59)中任一項所述之添加劑存在下或在如(60)所述之培養基組成物中，培養該癌細胞。

(62)一種評估抗癌劑對於癌細胞之活性之方法，其係於(57)至(59)中任一項所述之添加劑存在下或在如(60)所述之培養基組成物中，培養該癌細胞。

(63)如(61)或(62)所述之方法，其中，前該癌細胞係在該癌細胞用培養基組成物中形成細胞凝集塊。

(64)如(61)或(62)所述之方法，其中，培養該癌細胞時之培養容器可抑制癌細胞之附著。

(65)一種肝細胞用培養基添加劑，其係包含脫醯基化結蘭膠或其鹽、或者迪特膠或其鹽。

(66)如(65)所述之添加劑，其在肝細胞之培養中，係抑制肝細胞數之減少。

(67)如(65)所述之添加劑，其係用於評估醫藥品及醫藥品候選劑對於肝細胞之效果。

(68)一種肝細胞用培養基組成物，其係含有(65)至(67)中任

一項所述之添加劑。

(69)一種評估醫藥品及醫藥品候選劑對於肝細胞之活性之方法，其係於(65)至(67)中任一項所述之添加劑存在下或在(68)所述之培養基組成物中，培養該肝細胞。

(70)如(69)所述之方法，其中，該肝細胞在該肝細胞用培養基組成物中形成細胞凝集塊。

(71)如(69)所述之方法，其中，培養該肝細胞時之培養容器可抑制肝細胞之附著。

#### [發明之效果]

【0020】本發明提供一種培養基組成物，其係包含特定的化合物(以下，亦稱為特定化合物)，尤其是包含具有陰離子性官能基之高分子化合物的構造體。若使用該培養基組成物，即可在未伴隨有引起細胞和組織之障礙和功能喪失之虞的振盪或旋轉等操作下，以懸浮狀態培養細胞及/或組織。再者，若使用該培養基組成物，除了培養時可容易地交換培養基之外，亦可容易地回收所培養之細胞及/或組織。本發明之該培養方法適用於從動物活體或植物體所採取之細胞及/或組織，並可不損及目的細胞及/或組織之功能而大量調製目的細胞及/或組織。而且，在該培養方法中所得之細胞及/或組織係可利用於：化學物質、醫藥品等之藥效及毒性評估；酵素、細胞增殖因子、抗體等有用物質之大量生產；彌補因疾病或缺損所喪失之器官、組織、細胞而實施再生醫療等情形。特別優異者為由脫醯基化結蘭膠所製作之培養基組成物，其係具有以下之特徵。



因為使性能表現之濃度極低(約低至 1 位數)，故可將對培養基成分造成之影響抑制至於最低限度。又，因為使其溶解於水時不易結塊，所以即使在大量製造時，亦不易發生問題。再者，因為在表現性能之濃度域之黏度低，故細胞及/或組織之回收等操作性極為良好。

又，若使用本發明之培養基組成物，因為可抑制癌細胞之凝集塊(球體)彼此會合，而可以分散狀態培養該球體，故可促進癌細胞之增殖。再者，若使用該培養基組成物，則實施抗癌劑之評估時，除了可容易地在培養基中添加抗癌劑之外，亦可容易地添加評估細胞增殖用之檢測試藥。又，因為可回收所培養之癌細胞，所以可容易地實施回收細胞之功能評估。本發明可適合利用在使用該培養方法所得到之癌細胞進行實施化學物質、抗癌劑等之藥效評估或篩選時。

若以本發明之培養基組成物進行培養，因為二維培養時之來自非活體內環境的影響少以及只會引起細胞彼此之接著，所以癌細胞會促進癌化之 HB-EGF(肝素結合性上皮生長因子樣增殖因子)之感受性，並可提高對於位在其下游之 EGF 受體之抑制劑的感受性。再者，亦可提高對於就癌細胞之支架非依賴型增殖而言為重要之信號傳達路徑之 MEK(Mitogen-activated protein/Extracellular signal-regulated Kinase)抑制劑及 Akt 抑制劑的感受性。

或者，因為使用本發明之培養基組成物，可抑制肝細胞之凝集塊(球體)彼此會合，使該球體以分散狀態培養，

所以可在活體外維持肝細胞之生存及細胞功能。再者，若使用該培養基組成物，在實施醫藥品候選劑或醫藥品之評估時，除了可容易地在培養基中添加醫藥品候選劑或醫藥品之外，還可以容易地添加評估細胞功能用之檢測試藥。又，因為可回收所培養之肝細胞，所以亦可容易地實施所回收細胞之功能評估。本發明可適合利用在實施使用該培養方法所得到之肝細胞化學物質、醫藥品候選劑或醫藥品等之藥效評估及毒性評估或篩選時。

再者，本發明之包含脫醯基化結蘭膠或其鹽之培養基添加劑，在癌細胞之培養方面，可大幅促進癌細胞之增殖。

此外，本發明之包含脫醯基化結蘭膠或其鹽之培養基添加劑，在肝細胞之培養方面，可抑制肝細胞數之減少。

### 【圖式簡單說明】

#### 【0021】

第 1 圖係表示以本發明之培養基組成物培養 HepG2 細胞之球體時，球體係可以均勻分散而且以懸浮狀態培養之圖。

第 2 圖係表示以本發明之培養基組成物培養 HeLa 細胞之球體時，球體係可以均勻分散而且以懸浮狀態培養之圖。

第 3 圖係表示以本發明之培養基組成物培養 HeLa 細胞之球體，並用顯微鏡觀察本球體時，與既有培養基相比，係抑制球體彼此會合之圖。

第 4 圖係表示以本發明之培養基組成物培養多潛能幹

細胞時，未見到對於該細胞之毒性之圖。

第 5 圖係表示以本發明之培養基組成物培養多潛能幹細胞時，球體被均勻分散，而且呈懸浮狀態之圖。

第 6 圖係表示以本發明之培養基組成物培養多潛能幹細胞時，多潛能幹細胞係效率良好地增殖之圖。

第 7 圖係表示以本發明之培養基組成物所培養之多潛能幹細胞係維持未分化性之圖。

第 8 圖係表示以本發明之培養基組成物所懸浮靜置培養之多潛能幹細胞係保持正常核之圖。

第 9 圖係表示以本發明之培養基組成物所培養之多潛能幹細胞係維持未分化性之圖。

第 10 圖係表示以本發明之培養基組成物培養附著有 HepG2 細胞之微載體時，HepG2 細胞可在微載體上增殖之圖。

第 11 圖係表示在本發明之培養基組成物添加 HeLa 細胞之球體時，球體被均勻地分散，而且呈懸浮狀態之圖。

第 12 圖係表示藉由本發明之培養基組成物而形成 HeLa 細胞之球體之圖。

第 13 圖係表示本發明構造體的一態樣之薄膜之圖。相對於培養基組成物之脫醯基化結蘭膠之濃度係 0.02%(重量/體積)。

第 14 圖係表示藉由本發明之培養基組成物而形成 HepG2 細胞之球體之圖。

第 15 圖係表示將附著有 HepG2 細胞之塗覆層黏連蛋白

之 GEM 以本發明之培養基組成物培養時之懸浮狀態之圖。

第 16 圖係表示將包埋有 HepG2 細胞之藻酸珠粒 (beads) 以本發明之培養基組成物培養時之懸浮狀態之圖。

第 17 圖係表示將包埋有 HepG2 細胞之膠原蛋白凝膠膠囊以本發明之培養基組成物培養時之懸浮狀態之圖。

第 18 圖係表示以本發明之培養基組成物培養來自稻子之癒傷組織 (callus) 時之懸浮狀態之圖。

第 19 圖係表示以本發明之培養基組成物培養 HeLa 細胞之球體時，球體被均勻分散，而且能以懸浮狀態培養之圖。

第 20 圖係表示以本發明之培養基組成物培養 A549 細胞及 HCT116 細胞之球體時，球體被均勻分散，而且能以懸浮狀態培養之圖。

第 21 圖係表示以本發明之培養基組成物培養人類初代肝細胞時，可形成球體而培養之圖。

第 22 圖係表示係本發明之培養基組成物培養食蟹猴 (crab-eating macaque) 初代肝細胞時，可形成球體而培養之圖。

第 23 圖係表示以本發明之培養基組成物培養 MCF-7 細胞 5 日後之 MCF-7 細胞之凝集塊之圖。

第 24 圖係表示以本發明之培養基組成物培養 A375 細胞及 MNNG/HOS 細胞 4 日後之凝集塊之圖。

第 25 圖係表示以本發明之培養基組成物培養 MIAPaCa-2 細胞 6 日後之凝集塊之圖。

**【實施方式】**

【0022】以下，更詳細地說明本發明。

在本說明書中所使用之用語係定義如下。

【0023】在本發明中之細胞係構成動物或植物之最基本單元，係以在細胞膜之內部具有細胞質及各種細胞小器官作為其要素。此時，在細胞內部可含或不含內包 DNA 之核。例如，本發明中之來自動物之細胞包含：精子及卵子等生殖細胞、構成生物體之體細胞、幹細胞(多潛能幹細胞等)、前驅細胞、從生物體分離之癌細胞、從生物體分離並獲得不死化能力且在體外可被安定維持之細胞(細胞株)、從生物體分離並經人為基因改造而成之細胞、從生物體分離並經人為核交換之細胞等。就構成生物體之體細胞之例子而言，雖不限於以下所列者，但包含：纖維母細胞、骨髓細胞、B 淋巴球、T 淋巴球、嗜中性白血球(neutrophil)、紅血球、血小板、巨噬細胞、單核球、骨細胞、骨髓細胞、外皮細胞、樹狀細胞、角質細胞、脂肪細胞、間葉細胞、上皮細胞、表皮細胞、內皮細胞、血管內皮細胞、肝實質細胞、軟骨細胞、卵丘細胞、神經系細胞、神經膠細胞(glial cell)、神經元(neuron)、寡樹突細胞(oligodendrocyte)、小神經膠細胞(microglia)、星狀神經膠細胞、心臟細胞、食道細胞、肌肉細胞(例如，平滑肌細胞或骨骼肌細胞)、胰臟  $\beta$  細胞、黑色素細胞、造血前驅細胞(例如，來自臍帶血之 CD34 陽性細胞)、及單核細胞等。該體細胞係例如包含：從皮膚、腎臟、脾臟、副腎、肝臟、肺、卵巢、胰臟、子

宮、胃、結腸、小腸、大腸、膀胱、前列腺、睪丸、胸腺、肌肉、結締組織、骨、軟骨、血管組織、血液(包含臍帶血)、骨髓、心臟、眼、腦或神經組織等任意組織採取而來之細胞。所謂幹細胞，係兼具複製其自身之能力及分化成其他複數種系統之細胞之能力的細胞，就其例子而言，係包含：胚性幹細胞(ES 細胞)、胚性腫瘤細胞、胚性生殖幹細胞、人工多潛能幹細胞(iPS 細胞)、神經幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞、胰幹細胞、肌幹細胞、生殖幹細胞、腸幹細胞、癌幹細胞、毛囊幹細胞等，但不限於以上所列者。就多潛能幹細胞而言，可列舉上述幹細胞中之ES 細胞、胚性生殖幹細胞、iPS 細胞。所謂前驅細胞係從上述幹細胞分化成特定的體細胞或生殖細胞途中之階段的細胞。所謂癌細胞，係從體細胞而來且獲得無限增殖能力的細胞。所謂細胞株，係在活體外藉由人為操作而獲得無限增殖能力的細胞。

【0024】就癌組織之例子而言，雖不限於以下所列者，但可列舉：來自胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、胰臟癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、骨髓癌、腎細胞癌、輸尿管癌、肝癌、膽管癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、睪丸癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、顛咽癌、喉頭癌、舌癌、纖維肉瘤、黏膜肉瘤、脂肪肉瘤、軟骨肉瘤、骨原性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管內皮肉瘤、滑液膜瘤、中皮瘤、伊文氏肉瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、

橫紋肌肉瘤、生殖腺上皮瘤、威爾姆氏腫瘤(Wilms tumor, 又稱腎母細胞瘤)、神經膠瘤、星狀細胞瘤、骨髓母細胞瘤(myeloblastoma)、髓膜瘤、黑色素瘤、神經母細胞瘤(neuroblastoma)、成神經管細胞瘤(medulloblastoma)、視網膜母細胞瘤、惡性淋巴瘤、得自罹癌者之血液等組織。就癌細胞株之例子而言, 雖不限於以下所列者, 但可列舉: 屬人類乳癌細胞株之 HBC-4、BSY-1、BSY-2、MCF-7、MCF-7/ADR RES、HS578T、MDA-MB-231、MDA-MB-435、MDA-N、BT-549、T47D; 屬人類子宮頸癌細胞株之 HeLa; 屬人類肺癌細胞株之 A549、EKVX、HOP-62、HOP-92、NCI-H23、NCI-H226、NCI-H322M、NCI-H460、NCI-H522、DMS273、DMS114; 屬人類大腸癌細胞株之 Caco-2、COLO-205、HCC-2998、HCT-15、HCT-116、HT-29、KM-12、SW-620、WiDr; 屬人類前列腺癌細胞株之 DU-145、PC-3、LNCaP; 屬人類中樞神經系癌細胞株之 U251、SF-295、SF-539、SF-268、SNB-75、SNB-78、SNB-19; 屬人類卵巢癌細胞株之 OVCAR-3、OVCAR-4、OVCAR-5、OVCAR-8、SK-OV-3、IGROV-1; 屬人類腎癌細胞株之 RXF-631L、ACHN、UO-31、SN-12C、A498、CAKI-1、RXF-393L、786-0、TK-10; 屬人類胃癌細胞株之 MKN45、MKN28、St-4、MKN-1、MKN-7、MKN-74; 屬皮膚癌細胞株之 LOX-IMVI、LOX、MALME-3M、SK-MEL-2、SK-MEL-5、SK-MEL-28、UACC-62、UACC-257、M14; 屬白血病細胞株之 CCRF-CRM、K562、MOLT-4、HL-60TB、RPMI8226、SR、UT7/TPO、Jurkat;

屬人類上皮樣癌細胞株之 A431；屬人類黑色素瘤細胞株之 A375；屬人類骨原性肉瘤細胞株之 MNNG/HOS；屬人類胰臟癌細胞株之 MIAPaCa-2 等。就細胞株之例子而言，係包含 HEK293(人類胎兒腎細胞)、MDCK、MDBK、BHK、C-33A、AE-1、3D9、Ns0/1、NIH3T3、PC12、S2、Sf9、Sf21、High Five(註冊商標)、Vero 等，惟並不限於以上所列者，。

【0025】 在本發明中之肝細胞，除了從肝臟組織所採取之初代肝細胞之外，可列舉以最適於活體外培養之條件下由繼代培養所確立之肝細胞株；以及由來自肝臟以外之組織之細胞、iPS 細胞和 ES 細胞等多潛能幹細胞、間葉系幹細胞、來自末梢血液之幹細胞、骨髓幹細胞、脂肪幹細胞、肝幹細胞、肝前驅細胞等，在活體外分化誘導所成之肝細胞等。肝臟組織係從人類、大鼠、小鼠、天竺鼠、倉鼠、兔子、豬、牛、馬、狗、貓、或猴子等所採取之肝臟，不僅是正常的肝臟，也可為癌化之肝臟。初代肝細胞，雖然可藉由使用膠原蛋白酶(collagenase)之灌流法從該等肝臟分離、採取而得，但也可為購自初代細胞股份有限公司(Primary Cell Company)、Becton, Dickinson and Company Japan 股份有限公司、Takara Bio 股份有限公司、Hokkaido System Science 股份有限公司、Lonza Japan 股份有限公司、Veritas 股份有限公司、Life Technologies Japan 股份有限公司等試藥公司者。購入之肝細胞可為凍結狀態或附著於膠原蛋白等載體之狀態。就肝細胞株之例子而言，可列舉：HepG2、Hep3B、HepaRG(註冊商標)、JHH7、HLF、HLE、



PLC/PRF/5、WRL68、HB611、SK-HEP-1、HuH-4、HuH-7等，但不限定於以上所述者。

【0026】 在本發明中之肝細胞之功能沒有特殊限制，包含：CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4、CYP3A5等細胞色素(cytochrome) P450(亦稱為 CYP)活性之表現以及藉由該酵素進行之醫藥品等之代謝；由葡萄糖醛酸、麩胱甘肽、硫酸、甘胺酸等造成的與醫藥品等之結合，白蛋白、脂蛋白元(apolipoprotein)、促血小板生成素(thrombopoietin)等有用蛋白質之生產，膽紅素(bilirubin)之分泌、尿素之合成、膽汁酸和脂肪酸之合成，藉由轉運蛋白(transporter)進行之醫藥品等之輸送等。就本發明之實施態樣而言，肝細胞以維持上述功能中之細胞色素 P450 之活性、白蛋白之生產及/或藉由轉運蛋白進行之醫藥品等之輸送(例如羧基二氯螢光素二乙酸酯(Carboxydichlorofluorescein diacetate)、溴化四乙基銨(Tetraethylammonium Bromide)、牛磺膽酸(Taurocholate)、瑞舒伐他汀(Rosvastatin)之攝取、羧基二氯螢光素(Carboxydichlorofluorescein)之排泄)為較佳。

【0027】 在本發明中，醫藥品係包含供於醫療用途之全部物質。所謂醫藥品候選劑，係指被探索或開發研究作為醫藥品之候補的物質，可列舉合成化合物、蛋白質、核酸、糖類、天然物質等。

【0028】 在本發明中之抗癌劑，除了包含直接作用於癌細胞而抑制癌細胞之增殖或功能之藥劑之外，亦包含雖

然未直接作用於癌細胞，但藉由與生物體內之免疫細胞或其他藥劑之協同作用，而抑制癌細胞之增殖或功能，或使癌細胞死亡之藥劑。此種抗癌劑之例子係無特殊限制，可列舉：烷化劑；鉑衍生物；以 5FU 系抗癌劑為代表之代謝拮抗劑；拓樸異構酶(topoisomerase)抑制劑；微管抑制劑；以泛艾黴素(epirubicin)為代表之抗癌性抗生素；以吉非替尼(gefitinib)、曲妥珠單抗(trastuzumab)、西妥昔單抗(cetuximab)、埃羅替尼(erlotinib)、帕尼單抗(panitumumab)、拉帕替尼(lapatinib)、坦羅莫司(temsirolimus)、依維莫司(everolimus)、易普利單抗(ipilimumab)、凡德他尼(vandetanib)、克里唑蒂尼(crizotinib)、盧克索替尼(ruxolitinib)、曲美替尼(trametinib)為代表之分子標靶藥等。分子標靶藥之標靶分子係無特殊限制，可列舉：各種激酶、Her2、EGFR(上皮生長因子受體)、PI3K(磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase))、mTOR(哺乳類雷帕黴素標靶蛋白質(mammalian target of rapamycin protein))、Akt、CDK(細胞週期蛋白依賴型激酶(cyclin-dependent kinase))、VEGFR(血管內皮細胞增殖因子受體(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor))、PDGFR(來自血小板之生長因子受體(platelet-derived growth factor receptor))、FGFR(纖維母細胞生長因子受體(fibroblast growth factor receptor))、C-Met、Raf、p38MAPK、CTLA-4、ALK、JAK、MEK(MAPK/ERK 激酶)、Hsp90、組蛋白去乙酰酶(histone deacetylase)等。再者，本發明中之抗癌劑亦包含具有此種效果的藥劑之候選

者之合成化合物、蛋白質、核酸、糖類、天然物質等。

【0029】在本發明中之來自植物之細胞包含從植物體之各組織分離出之細胞，亦包含人為地從該細胞除去細胞壁而得之原生質體。

【0030】在本發明中之組織，係好幾種具有不同性質和功能之細胞以一定之樣式集合而成之構造之單元，就動物組織之例子而言，包含：上皮組織、結締組織、肌肉組織、神經組織等。就植物組織之例子而言，包含：分生組織、表皮組織、同化組織、葉肉組織、通導組織、機械組織(mechanical tissue，又稱支持組織)、薄壁組織、經反分化(dedifferentiation)之細胞塊(癒傷組織)等。

【0031】用本發明之方法培養細胞及/或組織之時，所培養之細胞及/或組織可從前文所所述之細胞及/或組織任意選擇來培養。細胞及/或組織可從動物或植物體直接採取。亦可藉由施行特定的處理而從動物或植物體誘導細胞及/或組織，使其成長，或者使其轉化後採取。此時，該處理可在活體內，也可在活體外進行。就動物而言，可列舉如：昆蟲、魚類、兩棲類、爬蟲類、鳥類、泛甲殼類(pancrustacea)、六足類、哺乳類等。哺乳動物之例係無限定，可列舉：大鼠、小鼠、兔子、天竺鼠、松鼠、倉鼠、田鼠、鴨嘴獸、海豚、鯨魚、狗、貓、山羊、牛、馬、羊、豬、大象、狨猴(common marmoset)、松鼠猴、恆河獼猴(macaca mulatta)、黑猩猩及人類。就植物而言，只要是所採取之細胞及/或組織為可液體培養者，即無特殊限定。可

列舉例如：生產生藥類(例如，皂苷(saponin)、生物鹼(alkaloid)類、小蘗鹼(berberine)、異東莨菪醇(scopoline)、植物固醇等)之植物(例如，藥用人參、長春花、莨菪(又名天仙子)、黃蓮、顛茄(belladonna)等)；生產作為化妝品/食品原料之色素和多糖體(例如，花青素、紅花(safflower)色素、茜草(Rubia akane)色素、番紅花(saffron)色素、黃酮(flavone)類等)之植物(例如，藍莓、紅花、茜草(madder)、番紅花等)；或生產醫藥品本身之植物，成為飼料或食品之植物(稻子、玉米、小麥或大麥等)等，但不限定於此等。

【0032】 所謂本發明中之細胞及/或組織之懸浮，係指細胞及/或組織為未接著於培養容器之狀態(非接著)。再者，在本發明中，使細胞及/或組織增殖、分化或維持之時，在未從外部對液體培養基組成物施加壓力或振盪或者未伴隨該組成物中之振盪、旋轉操作等之情形下，細胞及/或組織係均勻分散於該液體培養基組成物中，而且呈懸浮狀態之狀態，係被稱為「懸浮靜置」，於該狀態培養細胞及/或組織者被稱為「懸浮靜置培養」。又，在「懸浮靜置」中，就可使細胞及/或組織懸浮之期間而言，雖包含至少之5至60分鐘、1小時至24小時、1日至21日，但只要保持懸浮狀態，即沒有限定該等之懸浮期間。

【0033】 本發明之培養基組成物，係含有可使細胞或組織懸浮而培養(以可懸浮靜置培養為較佳)之構造體及培養基的組成物。

本發明之培養基組成物，以係培養時，於培養基組成

物之交換處理及培養結束後，可從培養基組成物回收細胞或組織的組成物為較佳；以係當從培養基組成物回收細胞或組織時，無需溫度變化、化學處理、酵素處理、剪切力之任一者的組成物為更佳。

所謂本發明中之構造體係由特定化合物所形成者，且表示使細胞及/或組織均勻地懸浮之效果。更詳而言之，係包含：高分子化合物經由離子而集合者，或高分子化合物已形成三維之網狀結構(three dimensional network)者。又，多糖類經由金屬離子形成微凝膠(microgel)為眾所公知(例如，日本特開 2004-129596 號公報)，在本發明之構造體中，亦以包含該微凝膠作為態樣之一。

又，就高分子化合物經由離子而集合者而言，可列舉以薄膜狀之構造體為態樣之一。該薄膜係例示於第 13 圖。

關於本發明中之構造體之大小，在經過濾器過濾時，以通過孔徑為  $0.2\ \mu\text{m}$  至  $200\ \mu\text{m}$  之過濾器為較佳。就該孔徑之下限而言，以超過  $1\ \mu\text{m}$  者為較佳，若考慮使細胞或組織安定地懸浮，則以超過  $5\ \mu\text{m}$  者為更佳。就該孔徑之上限而言，以  $100\ \mu\text{m}$  以下者為更佳；若考慮細胞或組織之大小，則以  $70\ \mu\text{m}$  以下者為又更佳。

所謂本發明中之特定化合物，係將特定化合物與液體培養基混合時，可形成不定形的構造體，該構造體係均勻分散於該液體中，未實質提高該液體之黏度且可實質保持細胞及/或組織，而具有防止其沈降之效果者。所謂「未實質提高液體之黏度」，意指液體之黏度未超過  $8\text{mPa}\cdot\text{s}$ 。

此時該液體之黏度(即本發明之培養基組成物之黏度)為 8mPa·s 以下，以 4mPa·s 以下為較佳，以 2mPa·s 以下為更佳。再者，只要為在液體培養基中形成該構造體，且表示未實質提高該液體之黏度並使細胞及/或組織均勻懸浮(以懸浮靜置為較佳)之效果者，即對於特定化合物之化學構造、分子量、物性等無任何限制。

包含構造體之液體之黏度，可藉由例如在後述之實施例中記載之方法來測定。具體而言，係可於 37°C 之條件下，使用 E 型黏度計(東機產業股份有限公司製，TV-22 型黏度計，機種：TVE-22L，錐形轉子(conerotor)：標準轉子 1°34'×R24、旋轉數 100rpm)來測定。

【0034】本發明所使用之特定化合物之例子並無特殊限制，可列舉高分子化合物，而以列舉具有陰離子性官能基之高分子化合物為較佳。

就陰離子性之官能基而言，可列舉：羧基、磺酸基、磷酸基及此等之鹽，以羧基或其鹽為較佳。

關於在本發明中所使用之高分子化合物，可使用具有選自前述陰離子性官能基之群中之 1 種或 2 種以上者。

本發明所使用之高分子化合物之較佳具體例子並無特殊限制，可列舉 10 個以上之單糖類(例如，丙糖、丁糖、戊糖、己糖、庚糖等)聚合而成之多糖類，更佳為具有陰離子性官能基之酸性多糖類。在此所謂的酸性多糖類，只要為其構造中具有陰離子性官能基者，即無特殊限制，不僅包含從天然品得到之多糖類，亦包含：由微生物所產生之

多糖類、以基因工程方式所產生之多糖類、或使用酵素而人工合成之多糖類；上述從天然品得到之多糖類係例如：具有糖醛酸(uronic acid) (例如，葡萄糖醛酸、艾杜糖醛酸(iduronic acid)、半乳糖醛酸(galacturonic acid)、甘露糖醛酸(mannuronic acid))之多糖類、於構造中之一部分具有硫酸基或磷酸基之多糖類，或為具有這二種構造之多糖類。更具體而言，可例示：由玻尿酸、結蘭膠、脫醯基化結蘭膠(以下，亦稱為 DAG)、鼠李聚糖膠、迪特膠、三仙膠、角叉菜膠、三仙膠、己糖醛酸、褐藻糖膠、果膠、果膠酸、果膠酯酸、硫酸乙醯肝素、肝素、硫酸類肝素、硫酸角質、硫酸軟骨素、硫酸皮膚素、硫酸鼠李聚糖及此等之鹽所成之群組中之 1 種或 2 種以上所構成者。多糖類，以係玻尿酸、DAG、迪特膠、三仙膠、角叉菜膠或此等之鹽為較佳；若考慮低濃度使用即可使細胞或組織懸浮，而且回收細胞或組織之容易度，將以 DAG 為最佳。

此處的鹽，可列舉如：所謂鋰、鈉、鉀之鹼金屬之鹽；所謂鈣、鋇、鎂之鹼土金屬之鹽；或鋁、鋅、銅、鐵、鉍、有機鹼及胺基酸等之鹽。

此等高分子化合物(多糖類等)之重量平均分子量，以 10,000 至 50,000,000 為較佳，以 100,000 至 20,000,000 為更佳，以 1,000,000 至 10,000,000 為又更佳。例如，該分子量可藉由膠體滲透層析(GPC)並以聚三葡萄糖(pullulan)換算而測定。

再者，如後述之實施例所記載，DAG 亦可使用經磷酸

化者。該磷酸化可藉由公知之方法進行。

【0035】 在本發明中，可將複數種(以 2 種為較佳)之上述多糖類組合使用。多糖類之組合種類，只要為在液體培養基中形成上述構造體，且未實質提高該液體之黏度、可使細胞及/或組織均勻懸浮(以懸浮靜置為較佳)者，即無特殊限定，而以該組合至少包含 DAG 或其鹽為較佳。亦即，在較佳的多糖類組合中，係包含 DAG 或其鹽，以及 DAG 或其鹽以外之多糖類(例如，三仙膠、藻酸、角叉菜膠、迪特膠、甲基纖維素、刺槐豆膠或此等之鹽)。就具體的多糖類組合而言，雖可列舉 DAG 與鼠李聚糖膠、DAG 與迪特膠、DAG 與三仙膠、DAG 與角叉菜膠、DAG 與三仙膠、DAG 與刺槐豆膠、DAG 與  $\kappa$ -角叉菜膠、DAG 與藻酸鈉、DAG 與甲基纖維素等，但非限定於該等者。

【0036】 就本發明所使用之特定化合物的更佳具體例而言，可列舉：玻尿酸、脫醯基化結蘭膠、迪特膠、角叉菜膠及三仙膠以及此等之鹽，若考慮可降低培養基組成物之黏度之點，及細胞或組織之回收容易度之點，最佳例係可列舉脫醯基化結蘭膠或其鹽。

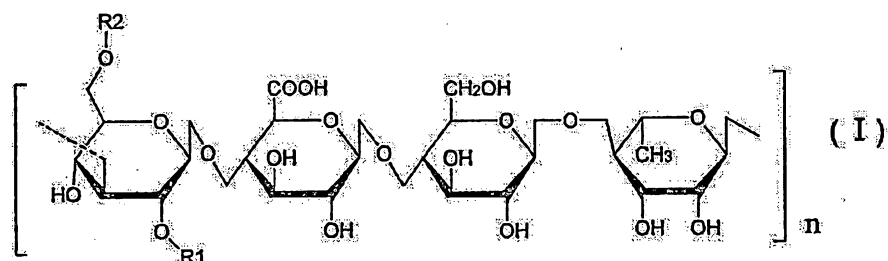
本發明之脫醯基化結蘭膠，意指以 1-3 鍵結之葡萄糖、1-4 鍵結之葡萄糖醛酸、1-4 鍵結之葡萄糖及 1-4 鍵結之鼠李糖(rhamnose)的 4 分子糖作為構成單元之直鏈狀高分子多糖類，且係下述之通式(I)所表示之多糖類，通式(I)中，R1、R2 皆為氫原子，n 為 2 以上之整數。惟，R1 雖可包含甘油基，R2 雖可包含乙醯基，但乙醯基及甘油基之含量係



以 10% 以下為較佳，以 1% 以下為更佳。

本發明中之構造體雖隨特定化合物而呈各種形態，不過就脫醯基化結蘭膠之情況而言，脫醯基化結蘭膠係在與液體培養基混合時攝入液體培養基中之金屬離子(例如鈣離子)，經由該金屬離子形成以不定形構造體，而使細胞及/或組織懸浮。由脫醯基化結蘭膠所調製之本發明培養基組成物的黏度為  $8\text{mPa}\cdot\text{s}$  以下，以  $4\text{mPa}\cdot\text{s}$  以下為較佳，若考慮細胞或組織之回收容易度，係以  $2\text{mPa}\cdot\text{s}$  以下為更佳。

【0037】



【0038】 在本發明中之特定化合物，雖亦可用化學合成法得到，不過該化合物為天然物質時，係以使用習用技術而藉由從含有該化合物之各種植物、各種動物、各種微生物萃取及分離精製而得到為較佳。在該萃取方面，若使用水或超臨界氣體，即可有效率地萃取該化合物。例如，就結蘭膠之製造方法而言，只要以發酵培養基培養生產微生物，將菌體外所生產之黏膜物質用通常之精製方法回收，於乾燥、粉碎等步驟後形成粉末狀即可。又，為脫醯基化結蘭膠時，只要於回收黏膜物時施行鹼處理，將結合於 1-3 已鍵結之葡萄糖殘基上之甘油基及乙醯基脫醯基化後回收即可。就精製方法而言，例如可藉由單獨或以任何

順序組合，或者反覆使用下述方式，來除去雜質而精製：液-液萃取，分段沈澱(fractional precipitation)，結晶化，各種離子交換層析，使用 Sephadex LH-20 等之凝膠過濾層析，利用活性碳、矽石凝膠等之吸附層析或利用薄層層析之活性物質的吸脫附處理，或使用逆相管柱之高速液體層析等。就生產結蘭膠之微生物之例子而言，可列舉少動鞘胺醇單胞菌(*Sphingomonas elodea*)及改變該微生物之基因而得的微生物，惟不限於該等微生物。

而且，為脫醯基化結蘭膠時，可使用市售品，例如，可使用三晶股份有限公司製之「KELCOGEL(CP Kelco 公司之註冊商標)CG-LA」、三榮源 FFI 股份有限公司製之「KELCOGEL(CP Kelco 公司之註冊商標)」等。又，就原型(native type)結蘭膠而言，可使用三榮源 FFI 股份有限公司製「KELCOGEL (CP Kelco 公司之註冊商標)HT」等。

【0039】在培養基中之特定化合物之濃度，係依賴於特定化合物之種類而定，特定化合物可適宜地設定在能使於液體培養基中形成上述之構造體，並於實質上未提高該液體培養基之黏度，且能使細胞及/或組織均勻地懸浮(較佳為使其懸浮靜置)之範圍內不過只要能成為 0.0005%至 1.0%(重量/體積)，較佳為 0.001%至 0.4%(重量/體積)，更佳為 0.005%至 0.1%(重量/體積)、又更佳為 0.005%至 0.05%(重量/體積)即可。例如，為脫醯基化結蘭膠時，可在培養基中添加 0.001%至 1.0%(重量/體積)，以 0.003%至 0.5%(重量/體積)為較佳，以 0.005%至 0.1%(重量/體積)為更佳，以

0.01%至 0.05%(重量/體積)為又更佳，以 0.01%至 0.03%(重量/體積)為最佳。為三仙膠時，可在培養基中添加 0.001%至 5.0%(重量/體積)，以 0.01%至 1.0%(重量/體積)為較佳，以 0.05%至 0.5%(重量/體積)為更佳，以 0.1%至 0.2%(重量/體積)為最佳。為  $\kappa$ -角叉菜膠及刺槐豆膠之混合系時，可在培養基中添加 0.001%至 5.0%(重量/體積)，以 0.005%至 1.0%(重量/體積)為較佳，以 0.01%至 0.1%(重量/體積)為更佳，以 0.03%至 0.05%(重量/體積)為最佳。為原型結蘭膠時，可為 0.05%至 1.0%(重量/體積)，以 0.05%至 0.1%(重量/體積)為較佳。

【0040】 將複數種(較佳為 2 種)上述多糖類組合而使用時，該多糖類之濃度可適宜地設定在能使該多糖類之組合於液體培養基中形成上述構造體，並在實質上未提高該液體培養基之黏度且能使細胞及/或組織均勻地懸浮(較佳為使其懸浮靜置)之範圍內。例如，在使用 DAG 或其鹽、與 DAG 或其鹽以外之多糖類之組合時，DAG 或其鹽之濃度可例示為 0.005 至 0.02%(重量/體積)，以 0.01 至 0.02%(重量/體積)為較佳，DAG 或其鹽以外之多糖類之濃度可例示為 0.005 至 0.4%(重量/體積)，以 0.1 至 0.4%(重量/體積)為較佳。具體之濃度範圍之組合係例示如下。

DAG 或其鹽：0.005 至 0.02%(較佳為 0.01 至 0.02%)(重量/體積)

DAG 以外之多糖類

三仙膠：0.1 至 0.4%(重量/體積)

藻酸鈉：0.1 至 0.4%(重量/體積)

刺槐豆膠：0.1 至 0.4%(重量/體積)

甲基纖維素：0.1 至 0.4%(重量/體積)(較佳為 0.2 至 0.4%(重量/體積))

角叉菜膠：0.05 至 0.1%(重量/體積)

迪特膠：0.05 至 0.1%(重量/體積)

【0041】再者，該濃度可用下式算出。

濃度(%) = 特定化合物之重量(g)/培養基組成物之體積(mL)×100

【0042】前述化合物亦可進一步藉由化學合成法改變成別種衍生物，在本發明中亦可有效地使用以此種方式所得到之該衍生物。具體而言，為脫醯基化結蘭膠時，將該通式(I)所示之化合物之 R1 及/或 R2 之羥基以 C1-3 烷氧基、C1-3 烷基磺醯基、葡萄糖或果糖等單糖殘基，蔗糖、乳糖等寡糖殘基，甘胺酸、精胺酸等胺基酸殘基等置換而成之衍生物亦可使用於本發明中。又，亦可使用 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞胺(EDC, 1-ethyl-3-(3-di-methylaminopropyl)carbodiimide)等交聯劑將該化合物交聯。

【0043】在本發明中所使用之特定化合物或其鹽，可視製造條件以任何結晶形式存在，或作為任意之水合物存在，而本發明之範圍中亦包含此等結晶形式或水合物以及該等之混合物。又，有時亦係作為包含丙酮、乙醇、四氫呋喃等有機溶劑之溶劑合物存在，該等形式中之任一種均

包含於本發明之範圍中。

【0044】在本發明中所使用之特定化合物可為由環內或環外異構化所生成之互變異構物、幾何異構物、互變異構物或幾何異構物之混合物、或該等的混合物之形式存在。本發明之化合物，不管是否係藉由異構化生成，在具有不對稱中心時，可為呈經分割之光學異構物或以任何比率包含該等之之混合物的形式存在。

【0045】在本發明之培養基組成物中，可存在金屬離子，例如 2 價之金屬離子(鈣離子、鎂離子、鋅離子、鐵離子及銅離子等)，以含有鈣離子為較佳。該金屬離子能以例如鈣離子與鎂離子、鈣離子與鋅離子、鈣離子與鐵離子、鈣離子與銅離子之方式，將 2 種以上組合使用。所屬技術領域中具有通常知識者可適宜決定其組合。在一態樣中，藉由在培養基組成物中含有金屬離子，高分子化合物經由金屬離子集合，藉由高分子化合物形成三維網狀構造(例如，藉由多糖類經由金屬離子形成微凝膠)而形成本發明之構造體。金屬離子之濃度，可在能使特定化合物於液體培養基中形成上述之構造體，而在實質上未提高該液體培養基之黏度且使細胞及/或組織均勻地懸浮(較佳為使其懸浮靜置)之範圍內適宜地進行設定。鹽濃度為 0.1mM 及至 300mM，以 0.5mM 及至 100mM 為較佳，不過不以該等為限。該金屬離子可與培養基一起混合，或另行調製鹽溶液，再添加於培養基中。又，在本發明之培養基組成物中，亦可包含後述之細胞外基質、接著分子等。

本發明亦包含使用該培養基組成物，使細胞或組織增殖之培養方法，將所得之細胞或組織藉由例如過濾、離心或磁性分離而回收之方法，使用該培養基組成物製造球體之方法。

【0046】由本發明中所使用之特定化合物所構成的構造體，係在將細胞及/或組織於活體外培養時，呈現使該細胞及/或組織懸浮於含有該特定化合物之構造體的液體中的效果(較佳呈現懸浮靜置效果)者。藉由該懸浮效果，與單層培養相比，可增加每一定體積培養之細胞及/或組織。又，在以往之懸浮培養方法中伴隨旋轉或振盪操作之情況，由於對細胞及/或組織造成剪切力，故細胞及/或組織之增殖率或回收率低，或者會有導致細胞之功能受損之情形，不過因為藉由使用本發明之含有特定化合物之構造體的培養基組成物，可不進行振盪等操作而使細胞及/或組織均勻分散，因此能在不損傷細胞功能之情形下，容易且大量地取得目標細胞及/或組織。又，在先前之包含凝膠基材之培養基中懸浮培養細胞及/或組織時，係難以進行細胞及/或組織之觀察或回收，或在回收時會有使其功能受損之情形，不過藉由使用本發明之含有特定化合物之構造體的培養基組成物，即可懸浮培養細胞及/或組織，且不會損及其功能地進行觀察、回收。又，先前之含有凝膠基材之培養基，會有黏度增高而難以進行培養基之交換的情況，不過本發明之含有特定化合物之構造體的培養基組成物因為係低黏度，所以可用吸量管或泵等容易地交換培養基。

【0047】藉由本發明之方法所培養之來自人類之細胞及/或組織，可基於治療目的而移植至具有疾患或障礙之患者。此時，可隨當事者而適宜選擇成為治療對象之疾患或障礙的種類、前處置方法及細胞移植方法。藉由移植治療領域中之一般方法，可適當地檢查、判斷所移植之細胞對接受者(recipient)之植入及從疾患或障礙之恢復、有無伴隨移植之副作及治療之效果。

【0048】再者，因為藉由本發明之方法，可使細胞及/或組織效率良好地增殖，故本發明之含有特定化合物及其之構造體的培養基組成物係可使用作為細胞之研究用試藥。例如，在解明調節細胞或組織之分化或增殖的因子時，係解析將細胞與目的因子共存培養時之細胞數量或種類、細胞表面分化標記或表現基因的變化，而在此時藉由使用本發明之培養基組成物，不僅可效率良好地使為解析對象之細胞之數目擴增，且可將之效率良好地回收。解明目的因子時的培養條件、培養裝置、培養基種類、本發明化合物之種類、特定化合物之含量、添加物之種類、添加物之含量、培養期間、培養溫度等，係可由當事者從本說明書所記載之範圍適當地進行選擇。藉由培養而增殖或出現之細胞，可使用該領域中之標準顯微鏡進行觀察。此時，亦可對於所培養之細胞使用特異性抗體進行染色。對於因目的因子而改變之表現基因，係可藉由從所培養之細胞中萃取 DNA(去氧核糖核酸)或 RNA(核糖核酸)之由南方轉漬(southern blotting)法、北方轉漬(northern blotting)法、

RT-PCR 法等來檢測。又，細胞表面分化標記係使用特異性抗體並藉由 ELISA 或流式細胞技術(flow cytometry)來檢測，而可觀察的因子對於分化或增殖的效果。

【0049】 在使用本發明之培養方法培養細胞及/或組織時，可使用細胞之培養中一般所用之培養皿、燒瓶、塑膠袋、鐵氟龍(註冊商標)袋、皿(dish)、佩垂皿(petri dish)、組織培養皿、多功能培養皿(multidish)、微量盤(microplate)、微孔養盤、多功能培養盤(multiplate)、多孔培養盤(multiwell plate)、腔式載玻片(chamber slide)、細胞培養瓶、攪拌式培養瓶(spinner flask)、試管、淺盤(tray)、培養袋、滾瓶(roller bottle)等培養器材進行培養。此等培養器材之材質並無特殊限制，可列舉如：玻璃、聚氯乙烯、乙基纖維素或乙醯基纖維素等纖維素系聚合物、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚碳酸酯、聚砜、聚胺酯、聚酯、聚醯胺、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚丁二烯、聚(乙烯-乙酸乙烯酯)共聚物、聚(丁二烯-苯乙烯)共聚物、聚(丁二烯-丙烯晴)共聚物、聚(乙烯-丙烯酸乙酯)共聚物、聚(乙烯-甲基丙烯酸酯)共聚物、聚氯平(polychloroprene)、苯乙烯(styrol)樹脂、氯磺化聚乙烯(chlorosulfonated polyethylene)、乙烯-乙酸乙烯酯、丙烯酸系嵌段共聚物等塑膠等。此等塑膠，較佳係不僅對氧或二氧化碳等氣體之穿透性優良，在工業上之成形加工性優良，耐各種滅菌處理者，而且為可觀察培養器材內部樣子的透明性材質。其中，施行滅菌處理之方法無特別限制，可列舉例如：放射線滅菌、環氧乙烷氣體滅菌、高壓



釜 (autoclave) 滅菌等。又，亦可對該等塑膠施行各種表面處理 (例如，電漿處理、電暈處理等)。再者，亦可對該等培養器材預先塗覆細胞外基質或細胞接著分子等。就此種塗覆材料而言，可列舉：膠原蛋白 I 至 XIX、明膠、纖維黏連蛋白、玻璃黏連蛋白、層黏連蛋白-1 至 12、巢蛋白 (nidogen)、肌腱蛋白 (tenascin)、凝血酶敏感蛋白 (thrombospondin)、馮威里氏 (Von Willebrand) 因子、骨橋蛋白 (osteopontin)、纖維蛋白原 (fibrinogen)、各種彈力蛋白、各種蛋白聚醣、各種鈣黏連蛋白、橋粒蛋白 (desmocollin)、橋粒芯蛋白 (desmoglein)、各種整合蛋白 (integrin)、E-選擇蛋白 (E-selectin)、P-選擇蛋白、L-選擇蛋白、免疫球蛋白 (immunoglobulin)、玻尿酸、超家族蛋白 (superfamily)、基質膠、聚-D-離胺酸、聚-L-離胺酸、幾丁質、幾丁聚醣、瓊脂糖 (sepharose)、藻酸凝膠、水凝膠 (hydrogel)，以及該等之切斷斷片等。此等塗覆材料，亦可使用藉由基因重組技術而經人為改變胺基酸序列者。又，亦可使用用以阻礙細胞及/或組織接著於培養器材的塗覆材料。此種塗覆材料可列舉：矽 (silicon)、聚(甲基丙烯酸 2-羥基甲酯)、聚(丙烯酸 2-甲氧基甲酯)、聚(2-甲基丙烯酸醯氧基乙基磷醯基膽鹼)、聚-N-異丙基丙烯酸醯胺、Mebiol Gel (註冊商標) 等，不過不以此等為限。

【0050】 細胞及/或組織之培養，可在機械控制下之閉鎖環境中，以自動方式實施細胞接種、培養基交換、細胞圖像取得、回收培養細胞，亦可控制 pH、溫度、氧濃度

等，同時藉由能以高密度培養之生物反應器(bioreactor)或自動培養裝置來進行。就使用該等裝置，於培養途中補充新培養基，以將所需物質以恰到好處地供給細胞及/或組織之方法而言，係有流加培養(feeding culture)、連續培養及灌流培養，任一種方法均可使用於本發明之培養方法中。又，在生物反應器或自動培養裝置中所用之培養容器而言，係有：開關容易且與外界之接觸面積大的開放式培養容器(例如有蓋的培養容器)、及開關不易且與外界之接觸面積小的封閉式培養容器(例如匣(cartridge)型培養容器)，而任一種培養容器均可使用於本發明之培養方法中。

【0051】 使用本發明中之特定化合物培養細胞及/或組織時，可將於培養細胞及/或組織時所用之培養基與特定化合物混合而調製培養基組成物。若根據此種培養基之組成來分類，則可列舉：天然培養基、半合成培養基、合成培養基；又若根據形狀來分類，則可列舉：半固體培養基、液體培養基、粉末培養基(以下，亦稱為粉培養基)等。當細胞及/或組織係來自動物時，只要為用於培養動物細胞之培養基，任一種均可使用。此種培養基可列舉如：經杜百可氏修改之伊格氏培養基(Dulbecco' s Modified Eagles' s Medium ; DMEM)、漢姆氏 F12 培養基(Ham' s Nutrient Mixture F12)、DMEM/F12 培養基、麥考伊氏 5A 培養基(McCoy' s 5A medium)、伊格氏 MEM 培養基(Eagle' s Minimum Essential Medium ; EMEM)、 $\alpha$  MEM 培養基(alpha modified Eagle' s Minimum Essential Medium ;  $\alpha$  MEM)、

MEM 培養基 (Minimum Essential Medium(最低必需培養基))、RPMI1640 培養基、經伊斯科夫氏修改之杜百可氏培養基 (Iscove' s Modified Dulbecco' s Medium ; IMDM)、MCDB131 培養基、威廉 (William) 培養基 E、IPL41 培養基、費歇爾氏 (Fischer 's) 培養基、StemPro34 (Invitrogen 公司製)、X-VIVO 10 (Kenlex 公司製)、X-VIVO 15 (Kenlex 公司製)、HPGM (Kenlex 公司製)、StemSpan H3000 (Stem Cell Technology 公司製)、StemSpanSFEM (Stem Cell Technology 公司製)、Stemline II (Sigma Aldrich 公司製)、QBSF-60 (Quality Biological 公司製)、StemProhESCSFM (Invitrogen 公司製)、Essential8 (註冊商標) 培養基 (Gibco 公司製)、mTeSR1 或 2 培養基 (Stem Cell Technology 公司製)、Repro FF 或 Repro FF2 (Reprocell 公司製)、PSGro hESC/iPSC 培養基 (System Bioscience 公司製)、NutriStem (註冊商標) 培養基 (Biological Industries 公司製)、CSTI-7 培養基 (細胞科學研究所公司製)、MesenPRO RS 培養基 (Gibco 公司製)、MF-Medium (註冊商標) 間葉系幹細胞增殖培養基 (東洋紡股份有限公司製)、Sf-900II (Invitrogen 公司製)、Opti-Pro (Invitrogen 公司製) 等。

【0052】在癌細胞之培養中所使用之培養基，可在上述培養基中包含細胞接著因子，其例可列舉：基質膠、膠原蛋白凝膠、明膠、聚-L-離胺酸、聚-D-離胺酸、層黏連蛋白、纖維黏連蛋白。就此等細胞接著因子而言，亦可將2種以上組合而添加。再者，可於培養癌細胞球體時所使

用之培養基進一步混入瓜爾膠、大瑪琳膠(tamarind gum)、藻酸丙二醇酯、刺槐豆膠、阿拉伯膠、塔拉膠(Tara gum)、大瑪琳膠、甲基纖維素等增黏劑。

【0053】就培養肝細胞時所使用之培養基而言，除上述培養基外，可列舉：HepatoZYME-SFM (Life Technologies 公司製)、HCM(註冊商標)-肝細胞培養培養基 BulletKit(註冊商標，Lonza 公司製)、HBM(註冊商標)-肝細胞基本培養基(Lonza 公司製)、HMM(註冊商標)-肝細胞維持培養基(Lonza 公司製)、經修改之 Langford 培養基(日水製藥股份有限公司製)、ISOM' s 培養基、肝細胞增殖培養基(Takara Bio 股份有限公司製)、肝細胞維持培養基(Takara Bio 股份有限公司製)、肝細胞基本培養基(Takara Bio 股份有限公司製)、活性維持超培養基(In Vitro ADMET Laboratories 公司製)等。此等培養基中可包含細胞接著因子，其例可列舉：基質膠、膠原蛋白凝膠、明膠、聚-L-離胺酸、聚-D-離胺酸、層黏連蛋白、纖維黏連蛋白。就此等細胞接著因子而言，亦可將 2 種以上組合而添加。再者，可於培養癌細胞或肝細胞之球體時所使用之培養基進一步混入瓜爾膠、大瑪琳膠、藻酸丙二醇酯、刺槐豆膠、阿拉伯膠、塔拉膠、大瑪琳膠、甲基纖維素等增黏劑。

【0054】當細胞及/或組織為來自植物時，培養基可列舉如下：培養植物組織時通常所使用之 Murashige & Skoog (MS)培養基、Linsmaier & Skoog(LS)培養基、白培養基、Gamborg' s B5 培養基、Niche 培養基、Heller 培養基、Morel

培養基等基本培養基；或者，在將此等培養基成分修正至適當濃度的修正培養基(例如，將氨態氮濃度減半等)中，添加有適當濃度之植物生長素(auxin)類，以及視需要之連同細胞分裂素(cytokinin)類等植物生長調節物質(植物激素)的培養基。在該等培養基中，可視需要進一步補充酪蛋白分解酵素、玉米浸液(corn steep liquor)、維生素類等。就植物生長素而言，可列舉如：3-吲哚乙酸(IAA)、3-吲哚丁酸(IBA)、1-萘乙酸(NAA)、2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)等，不過不以該等為限。植物生長素類，可以例如以約 0.1 至約 10ppm 之濃度添加於培養基中。就細胞分裂素類而言，可列舉如：激動素(kinetin)、苄基腺嘌呤(BA (benzyladenine))、玉米素(zeatin)等，不過不以此等為限。細胞分裂素類能以例如約 0.1 至約 10ppm 之濃度添加於培養基中。

【0055】 在上述之培養基中，所屬技術領域中具有通常知識者可將鈉、鉀、鈣、鎂、磷、氯、各種胺基酸、各種維生素、抗生素、血清、脂肪酸、糖等，依照目的自由地添加。為來自動物之細胞及/或組織培養時，所屬技術領域中具有通常知識者亦可依照目的而組合添加一種以上之其他化學成分或活體成分。

就來自動物之細胞及/或組織之培養基中所添加的成分而言，可列舉：胎牛血清、人類血清、馬血清、胰島素、轉鐵蛋白(transferrin)、乳鐵蛋白、膽固醇、乙醇胺、亞硒酸鈉、單硫代甘油(monothioglycerol)、2-巰基乙醇、牛血

清白蛋白、丙酮酸鈉、聚乙二醇、各種維生素、各種胺基酸、瓊脂、瓊脂糖、膠原蛋白、甲基纖維素、各種細胞介素(cytokine)、各種激素、各種增殖因子、各種細胞外基質或各種細胞接著分子等。就添加於培養基中之細胞介素(cytokine)而言，可列舉如：介白素-1(interleukin-1, IL-1)、介白素-2(IL-2)、介白素-3(IL-3)、介白素-4(IL-4)、介白素-5(IL-5)、介白素-6(IL-6)、介白素-7(IL-7)、介白素-8(IL-8)、介白素-9(IL-9)、介白素-10(IL-10)、介白素-11(IL-11)、介白素-12(IL-12)、介白素-13(IL-13)、介白素-14(IL-14)、介白素-15(IL-15)、介白素-18(IL-18)、介白素-21(IL-21)、干擾素- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )、干擾素- $\beta$  (IFN- $\beta$ )、干擾素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、顆粒性白血球群落刺激因子(G-CSF(Granulocyte-Colony Stimulating Factor))、單核球群落刺激因子(M-CSF(Monocyte Colony-Stimulating Factor))、顆粒性白血球-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor))、幹細胞因子(SCF(stem cell factor))、flk2/flt3 配體(FL)、白血病細胞阻礙因子(LIF)、制瘤素 M(Oncostatin M, OM)、促紅血球生成素(EPO (erythropoietin))、促血小板生成素(TPO)等，但不限定於此等。

就培養基中所添加之激素而言，可列舉：褪黑激素(melatonin)、血清素(serotonin)、甲狀腺素、三碘甲狀腺素(triiodothyronine)、腎上腺素(epinephrine)、去甲腎上腺素(norepinephrine)、多巴胺(dopamine)、抗密拉氏管激素(anti-Mullerian hormone)、脂聯素(adiponectin)、促副腎皮

質激素、血管收縮素原(angiotensinogen)及血管收縮素(angiotensin)、抗利尿激素、心房利尿鈉肽(atrial natriuretic peptide)、降鈣素、膽囊收縮素、促腎上腺皮質激素釋出激素(corticotropin releasing hormone)、促紅血球生成素(erythropoietin)、促卵泡激素(follicle stimulating hormone)、胃泌素、腦腸肽(ghrelin)、升糖素(glucagon)、促性腺激素釋出激素(gonadotropin-releasing hormone)、生長激素釋出激素、人類絨毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin)、人類胎盤性催乳素(human placental lactogen)、成長激素、抑制素、胰島素、胰島素樣生長因子、瘦體素(leptin)、黃體成長激素、促黑激素(melanocyte-stimulating hormone)、催產素、副甲狀腺激素、催乳素、胰泌素(secretin)、生長抑素(somatostatin)、促血小板生成素、促甲狀腺激素、促甲狀腺激素釋出激素、皮質醇(cortisol)、醛固酮(aldosterone)、睪固酮(testosterone)、去氫表雄固酮(dehydroepiandrosterone (DHEA))、雄固烯二酮(androstenedione)、二氫睪固酮(dihydrotestosterone)、雌二醇、雌固酮(estrone)、雌三醇(estriol)、黃體固酮(progesterone)、鈣化三醇(calcitriol)、鈣化二醇、前列腺素、白三烯(leukotriene)、前列環素(prostacyclin)、凝血脂素(thromboxane)、催乳素釋出激素、促脂解素(lipotropin)、腦利尿鈉肽、神經肽 Y、組織胺、內皮素、胰多肽、腎素(renin)及腦啡肽(enkephalin)，不過不以此等為限。

就培養基所添加之增殖因子而言，可列舉：轉變生長

因子- $\alpha$  (TGF- $\alpha$  , Transforming Growth Factor- $\alpha$  )、轉變生長因子- $\beta$  (TGF- $\beta$  )、巨噬細胞炎症蛋白質-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$  , Macrophage-Inflammatory Protein-1 $\alpha$  )、上皮細胞增殖因子 (EGF)、纖維母細胞增殖因子-1、2、3、4、5、6、7、8 或 9(FGF-1、2、3、4、5、6、7、8、9)、神經細胞增殖因子(NGF)、肝細胞增殖因子(HGF)、白血病抑制因子(LIF)、蛋白酶連接素 I (protease nexin I)、蛋白酶連接素 II、來自血小板之生長因子(PDGF)、膽鹼激導性分化因子(CDF, Cholinergic Differentiation Factor)、趨化激素(chemokine)、Notch 配體 (Delta1( $\delta$  -1)等)、Wnt 蛋白質、血管生成素樣蛋白質 2、3、5 或 7(Angpt(angiotensin-like protein) 2、3、5、7)、胰島素樣生長因子(IGF)、胰島素樣生長因子結合蛋白質(IGFBP)、多效素(Pleiotrophin)等，不過不以此等為限。

又，亦可添加藉由基因重組技術以人為方式使此等細胞介素(cytokine)或增殖因子之胺基酸序列改變者。就其例而言，可列舉：IL-6/可溶性 IL-6 受體複合體或 Hyper IL-6 (IL-6 與可溶性 IL-6 受體之融合蛋白質)等。

就各種細胞外基質或各種細胞接著分子之例而言，可列舉：膠原蛋白 I 至 XIX、纖維黏連蛋白、玻璃黏連蛋白、層黏連蛋白-1 至 12、巢蛋白、肌腱蛋白、凝血酶敏感蛋白、馮威里氏(von Willebrand)因子、骨橋蛋白、纖維蛋白原、各種彈力蛋白、各種蛋白聚醣、各種鈣黏連蛋白、橋粒蛋白、橋粒芯蛋白、各種整合蛋白、E-選擇蛋白、P-選擇蛋白、L-選擇蛋白、免疫球蛋白超家族蛋白、基質膠、聚-D-



離胺酸、聚-L-離胺酸、幾丁質、幾丁聚醣、瓊脂糖、玻尿酸、藻酸凝膠、各種水凝膠、及進一步之該等之切斷斷片等。

【0056】就在培養基中所添加之抗生素之例子而言，可列舉：磺胺(sulfa)製劑、盤尼西林(penicillin，又稱青黴素)、非奈西林(phenethicillin，又稱苯氧乙青霉素)、甲氧西林(methicillin，又稱二甲苯青黴素)、苯唑西林(oxacillin)、氯唑西林(cloxacillin)、雙氯西林(dicloxacillin)、氟氯西林(flucloxacillin)、萘夫西林(nafcillin)、安比西林(ampicillin)、盤尼西林、阿莫西林(amoxicillin)、環己西林(ciclacillin)、卡本西林(carbenicillin)、替卡西林(ticarcillin)、哌拉西林(piperacillin)、阿洛希林(azlocillin)、美洛希林(meclocillin)、美西林(mecillinam)、氮卓西林(amdinocillin)、頭孢菌素(cephalosporin)及其衍生物、歐索林酸(oxolinic acid)、胺氟沙星(amifloxacin)、替馬沙星(temafloxacin)、喹啉酮酸(nalidixic acid)、吡咯米酸(piromidic acid)、環丙沙星(ciprofloxacin)、西諾沙星(cinoxacin)、諾氟沙星(norfloxacin)、培氟沙星(perfloxacin)、羅索沙星(Rosaxacin)、氧氟沙星(ofloxacin)、依諾沙星(enoxacin)、吡哌酸(pipemidic acid)、舒巴坦(sulbactam)、克拉維酸、 $\beta$ -溴青黴烷酸( $\beta$ -bromopenicillanic acid)、 $\beta$ -氯青黴烷酸、6-乙醯基亞甲基-青黴烷酸、頭孢噁唑(cephoxazole)、舒他西林(sultampicillin)、氮卓西林(adinocillin)及舒巴坦之甲醛·水合物酯、他唑巴坦(tazobactam)、胺曲南(aztreonam)、硫伐汀(sulfazethin)、

異硫伐汀(isosulfazethin)、諾卡迪辛(norcardicin)、間-羧基苯基、苯基乙醯胺磷酸甲酯、氯四環素、氧四環素、四環素、去甲基氯四環素(demeclocycline)、多西環素(doxycycline)、美他環素(methacycline)以及米諾環素(minocycline)。

【0057】在將本發明之特定化合物添加於上述培養基時，首先，係藉由適當溶劑使該特定化合物於使用時溶解或分散(以此作為培養基添加劑)。然後，以如以上詳述之方式，使培養基中之特定化合物濃度成為未實質提高該液體培養基之黏度且可使細胞及/或組織均勻地懸浮(較佳為使其懸浮靜置)之濃度，例如：以使成為 0.0005%至 1.0%(重量/體積)，較佳 0.001%至 0.4%(重量/體積)，更佳 0.005%至 0.1%(重量/體積)，又更佳 0.005%至 0.05%(重量/體積)之方式，將該培養基添加劑添加於培養基中即可。例如，為脫醯基化結蘭膠時，以於培養基中添加 0.001%至 1.0%(重量/體積)，較佳係添加 0.003%至 0.5%(重量/體積)，更佳係添加 0.005%至 0.1%(重量/體積)，最佳係添加 0.01%至 0.03%(重量/體積)即可。又，就其他方面而言，為脫醯基化結蘭膠時，以於培養基中添加 0.0005%至 1.0%(重量/體積)，較佳係添加 0.001%至 0.5%(重量/體積)，更佳係添加 0.003%至 0.1%(重量/體積)，最佳係添加 0.005%至 0.03%(重量/體積)即可。為三仙膠時，以於培養基中添加 0.001%至 5.0%(重量/體積)，較佳係添加 0.01%至 1.0%(重量/體積)，更佳係添加 0.05%至 0.5%(重量/體積)，最佳係添加 0.1%至 0.2%(重量/體積)即可。為  $\kappa$ -角叉菜膠與刺槐豆膠之混合系時，以

於培養基中添加 0.001%至 5.0%(重量/體積)，較佳係添加 0.005%至 1.0%(重量/體積)，更佳係添加 0.01%至 0.1%，最佳係添加 0.03%至 0.05%(重量/體積)即可。為脫醯基化結蘭膠與迪特膠之混合系時，以於培養基中添加 0.001%至 1.0%(重量/體積)，最佳係添加 0.005%至 0.01%(重量/體積)即可。為脫醯基化結蘭膠與甲基纖維素之混合系時，以於培養基中添加 0.001%至 1.0%(重量/體積)，最佳係添加 0.005%至 0.2%(重量/體積)即可。為脫醯基化結蘭膠與刺槐豆膠之混合系時，以於培養基中添加 0.001%至 1.0%(重量/體積)，最佳係添加 0.01%至 0.1%(重量/體積)即可。為脫醯基化結蘭膠與藻酸鈉之混合系時，以於培養基中添加 0.001%至 1.0%(重量/體積)，最佳係添加 0.01%至 0.1%(重量/體積)即可。為脫醯基化結蘭膠與三仙膠之混合系時，以於培養基中添加 0.001%至 1.0%(重量/體積)，最佳係添加 0.01%至 0.1%(重量/體積)即可。為脫醯基化結蘭膠與  $\kappa$ -角叉菜膠之混合系時，以於培養基中添加 0.001%至 1.0%(重量/體積)，最佳係添加 0.01%至 0.1%(重量/體積)添加於培養基中即可。再者，該濃度可用下式算出。

濃度(%) = 特定化合物之重量(g)/培養基組成物之體積(mL) × 100

【0058】其中，培養基添加劑中所使用之適當溶劑之例可列舉：水、二甲基亞砷(DMSO)、甲醇、乙醇、丁醇、丙醇、甘油、丙二醇、丁二醇等各種醇等水性溶劑，不過不以此等為限。此時，特定化合物濃度宜為 0.001%至 5.0%

(重量/體積),較佳為 0.01%至 1.0%(重量/體積),更佳為 0.1%至 0.6%(重量/體積)。此時,亦可進一步添加既可提高該特定化合物之效果,又可降低使用時之濃度的添加物。就此種添加劑之例子而言,係可將瓜爾膠、大瑪琳膠、藻酸丙二醇酯、刺槐豆膠、阿拉伯膠、塔拉膠、大瑪琳膠、甲基纖維素、羧基甲基纖維素、瓊脂糖、大瑪琳籽膠、聚三葡萄糖等多糖類之 1 種以上進行混合。又,亦可將該特定化合物於培養時固定在載體表面上或擔載於載體內部而使用。該特定化合物,於提供時或保存時可為任何形狀。該特定化合物可為:如錠劑、丸劑、膠囊劑、顆粒劑的經製劑化之固體,如溶解於適當溶劑及溶解劑之溶液或懸浮液之液體,或呈與基板或單體結合之狀態。就為經製劑化者時之添加物而言,可列舉對羥基苯甲酸酯類等防腐劑;乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露醇等賦形劑;硬脂酸鎂、滑石等潤滑劑;聚乙烯醇、羥基丙基纖維素、明膠等黏合劑;脂肪酸酯等界面活性劑;甘油等可塑劑等。此等添加物並不限定於上述者,所屬技術領域中具有通常知識者可自由選擇能利用者。又,本發明中之特定化合物,視需要亦可施行滅菌處理。滅菌方法無特別限制,可列舉如:放射線滅菌、環氧乙烷氣體滅菌、高壓釜滅菌、過濾器滅菌等。進行過濾器滅菌(以下亦稱為過濾滅菌)時之過濾器部分的材質並無特別限制,可列舉如:玻璃纖維、尼龍、PES(聚醚砜)、親水性 PVDF(聚偏二氟乙烯)、纖維素混合酯、纖維素乙酸酯、聚四氟乙烯等。過濾器之細孔大小並無特別限

制，較佳為  $0.1\ \mu\text{m}$  至  $10\ \mu\text{m}$ ，更佳為  $0.1\ \mu\text{m}$  至  $1\ \mu\text{m}$ ，最佳為  $0.1\ \mu\text{m}$  至  $0.5\ \mu\text{m}$ 。進行該等滅菌處理時，特定化合物可為固體，亦可為溶液之狀態。

【0059】藉由將上述調製之特定化合物之溶液或分散液添加於液體培養基中，可於液體培養基中形成上述構造體，而得到本發明之培養基組成物。由於在培養基中，通常含有足以使高分子化合物經由離子集合、或使高分子化合物形成三維網狀構造所需之濃度之金屬離子，所以只要藉由將本發明之特定化合物之溶液或分散液添加於液體培養基中，即可得到本發明之培養基組成物。或者，亦可於培養基添加劑(特定化合物之溶液或分散液)中添加培養基。再者，本發明之培養基組成物，亦可藉由將特定化合物及培養基成分混合於水性溶劑(例如包含離子交換水或超純水等之水)中而調製。就混合之態樣而言，可列舉：(1)將液體培養基與培養基添加劑(溶液)混合，(2)在液體培養基中混合上述高分子化合物(粉末等固體)，(3)在培養基添加劑(溶液)中混合粉末培養基，(4)將粉末培養基及上述高分子化合物(粉末等固體)與水性溶劑混合等，不過不以此等為限。為了防止本發明之培養基組成物中之特定化合物的分布變得不均勻，以(1)或(4)、或者是(1)或(3)之態樣為較佳。

將特定化合物溶解於溶劑(例如水、液體培養基等水性溶劑)，或將特定化合物及粉末培養基溶解於溶劑時，為了促進溶解，以將該混合液加熱為較佳。就加熱之溫度而言，

可列舉如：80°C 至 130°C，較佳為加熱滅菌所需之 100°C 至 125°C (例如，121°C)。加熱後，將所得到之特定化合物的溶液冷卻至室溫為止。藉由在該溶液中添加上述之金屬離子(例如藉由將該溶液添加於液體培養基)，形成由該特定化合物所構成之上述構造體。或者，亦可藉由在將特定化合物溶解於含有上述金屬離子之溶劑(例如，水、液體培養基等水性溶劑)時，進行加熱(例如 80°C 至 130°C，較佳為 100°C 至 125°C (例如，121°C))，將所得到之溶液冷卻至室溫，而形成由該特定化合物所構成之上述構造體。

【0060】 雖然例示本發明之培養基組成物之調製方法，不過本發明並不受其限定。將特定化合物添加於離子交換水或超純水中。然後，以可使該特定化合物溶解之溫度(例如，60°C 以上，80°C 以上，90°C 以上)加熱，同時進行攪拌，使其溶解至成為透明狀態為止。溶解後，於攪拌同時放冷，進行滅菌(例如，於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌)。回到室溫後，將靜置培養所使用之任意的培養基進行攪拌(例如用均質混合機等)，同時在該培養基中添加前述滅菌後之水溶液，並與該培養基混合至成為均勻。本水溶液與培養基之混合方法並無特別限制，可列舉例如：以吸液(pipetting)等手動方式來混合；使用磁性攪拌器(magnetic stirrer)或機械攪拌器(mechanical stirrer)、均質混合機(homomixer)、均質機(homogenizer)等機器來混合。又，混合後可將本發明之培養基組成物以過濾器過濾。過濾處理時所使用之過濾器的細孔大小為 5  $\mu$  m 至 100  $\mu$  m，較佳

為  $5\ \mu\text{m}$  至  $70\ \mu\text{m}$ ，更佳為  $10\ \mu\text{m}$  至  $70\ \mu\text{m}$ 。

或者，將粉末培養基及上述高分子化合物(粉末等固體)與水性溶劑混合，藉由於上述溫度加熱而調製本發明之培養基組成物。

例如，在調製脫醯基化結蘭膠時，以成為 0.1% 至 1%(重量/體積)，較佳係以成為 0.2% 至 0.5%(重量/體積)，更佳係以成為 0.3% 至 0.4%(重量/體積)之方式，將脫醯基化結蘭膠添加於離子交換水或超純水中。又，在另一方面之調製脫醯基化結蘭膠時，係以成為 0.1% 至 1%(重量/體積)，較佳係 0.2% 至 0.8%(重量/體積)，更佳 0.3% 至 0.6%(重量/體積)之方式，將脫醯基化結蘭膠添加於離子交換水或超純水中。

又，只要為可使前述脫醯基化結蘭膠溶解之溫度，幾度皆可，而藉由於  $60^\circ\text{C}$  以上，較佳於  $80^\circ\text{C}$  以上，更佳於  $90^\circ\text{C}$  以上(例如， $80$  至  $130^\circ\text{C}$ )加熱同時攪拌，使溶解至成為透明狀態為止。溶解後，於攪拌同時放冷，而例如於  $121^\circ\text{C}$  進行 20 分鐘高壓釜滅菌。回到室溫後，將例如 DMEM/F12 培養基以均質混合機等攪拌，同時，以使本水溶液成為所期望之最終濃度方式添加至該培養基中(例如，當終濃度為 0.015% 時，0.3% 水溶液：培養基之比率為 1：19)，並使其均勻地混合。本水溶液與培養基之混合方法並無特別限制，可列舉例如：藉由吸液等方式手動混合，使用磁性攪拌器或機械攪拌器、均質混合機、均質機等機器來混合。又，亦可在混合後，將本發明之培養基組成物以過濾器過濾。過濾處理時所使用之過濾器的細孔大小為

5  $\mu$  m 至 100  $\mu$  m，較佳為 5  $\mu$  m 至 70  $\mu$  m，更佳為 10  $\mu$  m 至 70  $\mu$  m。

再者，本發明之培養基組成物係可於調製後藉由離心處理而使構造體沈降。

**【0061】** 以本發明之方法培養之細胞及/或組織的形態或狀態，係可由所屬技術領域中具有通常知識者任意選擇。其較佳之具體例係無特別限制，而可列舉下述狀態：細胞及/或組織單獨地分散於培養基組成物中之狀態、細胞及/或組織接著於載體表面上之狀態、細胞及/或組織包埋於載體內部之狀態、複數個細胞集合而形成細胞塊(球體)之狀態或 2 種以上細胞集合而形成細胞塊(球體)之狀態等；更佳為下述列舉之狀態：細胞及/或組織接著於載體表面上之狀態、細胞及/或組織包埋於載體內部之狀態、複數個細胞集合而形成細胞塊(球體)之狀態、或 2 種以上細胞集合而形成細胞塊(球體)之狀態；又更佳為下述列舉之狀態：細胞及/或組織接著於載體表面上之狀態、複數個細胞集合而形成細胞塊(球體)之狀態、或 2 種以上細胞集合而形成細胞塊(球體)之狀態。該等狀態中，因為形成細胞塊(球體)之狀態係接近活體內環境，而可再構築細胞-細胞間相互作用及細胞構造體，並於長期維持細胞原本的功能之情形下進行培養，且較容易回收細胞，故可列舉作為本發明之方法中進行培養之最佳狀態。

**【0062】** 就在表面上擔載細胞及/或組織之載體而言，可列舉由各種高分子所構成之微載體或玻璃珠粒、陶瓷珠



粒、聚苯乙烯珠粒、葡聚糖珠粒等。就該高分子之例子而言，係可使用：乙烯系樹脂、胺酯樹脂、環氧樹脂、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯聚酯、聚醯胺、聚醯亞胺、聚矽氧樹脂、酚樹脂、三聚氰胺樹脂、尿素樹脂(urea resin)、苯胺樹脂、離子聚合物(ionomer)樹脂、聚碳酸酯、膠原蛋白、葡聚糖、明膠、纖維素、藻酸鹽及該等之混合物等。該載體亦可用提高細胞之接著，或提高物質從細胞之釋出的化合物來進行塗覆。就此種塗覆材料之例子而言，可列舉：聚(單硬脂醯甘油-共-琥珀酸酯)(poly(monostearyl glyceride co-succinic acid)、聚-D,L-乳酸交酯-共-乙醇酸(poly-D,L-lactide-co-glycolide)、玻尿酸鈉、正異丙基丙烯酸醯胺、膠原蛋白 I 至 XIX、纖維黏連蛋白、玻璃黏連蛋白、層黏連蛋白-1 至 12、巢蛋白、肌腱蛋白、凝血酶敏感蛋白、馮威里氏(von Willebrand)因子、骨橋蛋白、纖維蛋白原、各種彈力蛋白、各種蛋白聚醣、各種鈣黏連蛋白、橋粒蛋白、橋粒芯蛋白、各種整合蛋白、E-選擇蛋白、P-選擇蛋白、L-選擇蛋白、免疫球蛋白超家族蛋白、基質膠、聚-D-離胺酸、聚-L-離胺酸、幾丁質、幾丁聚醣、瓊脂糖、藻酸凝膠、各種水凝膠、以及該等之切斷斷片等。此時，亦可將 2 種以上之塗覆材料組合。再者，係可在「培養於表面上擔載有細胞及/或組織之載體時所使用之培養基」中，混入瓜爾膠、大瑪琳膠、刺槐豆膠、阿拉伯膠、塔拉膠、大瑪琳膠、甲基纖維素、羧基甲基纖維素、瓊脂糖、大瑪琳籽膠、聚三葡萄糖等多糖類中之 1 種以上。又，該載體亦

可含有磁性體材料，例如含有鐵氧磁體(ferrite)。該載體之直徑為數十  $\mu\text{m}$  至數百  $\mu\text{m}$ ，更佳為  $100\mu\text{m}$  至  $200\mu\text{m}$ ，其比重以接近 1 為較佳，更佳為 0.9 至 1.2，特佳為約 1.0。就該載體之例子而言，可列舉：Cytodex 1(註冊商標)、Cytodex 3(註冊商標)、Cytoline1(註冊商標)、Cytoline2(註冊商標)、Cytopore1(註冊商標)、Cytopore2(註冊商標)(以上，由 GE Healthcare Life Sciences 販售)；Biosilon(註冊商標)(NUNC)、Cultispher-G(註冊商標)、Cultispher-S(註冊商標)(以上，由 Thermo SCIENTIFIC 販售)；HILLEXCT(註冊商標)、ProNectinF-COATED(註冊商標)、及 HILLEXII(註冊商標)(SoloHillEngineering)、GEM(註冊商標)(Global Eukaryotic Microcarrier)等，但不以此等為限。對於該載體，亦可視需要而施行滅菌處理。滅菌方法係無特別限制，可列舉如：放射線滅菌、環氧乙烷氣體滅菌、高壓釜滅菌及乾熱滅菌等。就使用該載體培養動物細胞之方法係無特別限制，可使用通常之使用流動層型培養槽或充填層型培養槽的培養方法等。此時，因為在表面上擔載有細胞及/或組織之載體，係藉由使用本發明之含有特定化合物之構造體的培養基組成物而可在不進行振盪等操作之情形下均勻地分散，所以可在不損及細胞功能該下培養目的細胞及/或組織。依照本法所培養之細胞及/或組織，可在培養後，以擔載於載體之原本的狀態藉由進行離心或過濾處理而回收。此時，亦可於添加所用之液體培養基後，進行離心或過濾處理。例如，離心時之重力加速度(G)為 50G 至 1000G，更

佳為 100G 至 500G，過濾處理時所用之過濾器的細孔大小為  $10\ \mu\text{m}$  至  $100\ \mu\text{m}$ ，不過不以此等為限。又，只要在載體中內包鐵氧磁體等具有磁性之材料，即可藉由磁力回收所培養的載體。依照本法所培養之細胞及/或組織，可藉由使用各種螯合劑、熱處理或酵素，從載體剝離而回收。

【0063】 將細胞及/或組織包埋於載體內部時，可選擇由各種高分子構成之材料作為該載體。就此種高分子之例子而言，可列舉：膠原蛋白、明膠、藻酸鹽、幾丁聚醣、瓊脂糖、聚甘醇酸(polyglycolic acid)、聚乳酸、纖維蛋白接著劑、聚乳酸-聚甘醇酸共聚物、蛋白聚醣、糖胺多醣(glucosaminoglycan)、聚胺酯發泡體等海綿、DseA-3D(註冊商標)、聚 N-取代丙烯醯胺衍生物、聚 N-取代甲基丙烯醯胺衍生物及該等之共聚物、聚乙烷基甲基醚、聚環氧丙烷、聚環氧乙烷、聚乙烯醇部分乙酸化物(partially acetylated polyvinyl alcohol)等溫度感受性高分子、聚丙烯醯胺、聚乙烯醇、甲基纖維素、硝基纖維素、丁酸纖維素、聚環氧乙烷、聚(甲基丙烯酸 2-羥基乙酯)/聚己內酯(poly(2-hydroxyethylmethacrylate)/polycaprolactone)等水凝膠。又，亦可使用 2 種以上之此等高分子來製作包埋細胞用的載體。再者，該載體中，亦可在此等高分子以外具有生理活性物質。就該生理活性物質之例子而言，可列舉：細胞增殖因子、分化誘導因子、細胞接著因子、抗體、酵素、細胞介素(cytokine)、激素、凝集素、或細胞外基質等，亦可含有複數個該等物質。就細胞接著因子之例子而言，

可列舉：聚(單硬脂醯甘油-共-琥珀酸酯)、D,L-乳酸交酯-共-乙醇酸、玻尿酸鈉、正異丙基丙烯醯胺、膠原蛋白 I 至 XIX、明膠、纖維黏連蛋白、玻璃黏連蛋白、層黏連蛋白-1 至 12、巢蛋白、肌腱蛋白、凝血酶敏感蛋白、馮威里氏(von Willebrand)因子、骨橋蛋白、纖維蛋白原、各種彈力蛋白、各種蛋白聚醣、各種鈣黏連蛋白、橋粒蛋白、橋粒芯蛋白、各種整合蛋白、E-選擇蛋白、P-選擇蛋白、L-選擇蛋白、免疫球蛋白超家族蛋白、基質膠、聚-D-離胺酸、聚-L-離胺酸、幾丁質、幾丁聚醣、瓊脂糖、藻酸凝膠、各種水凝膠、以及該等之切斷斷片等。此時，亦可將 2 種以上細胞接著因子組合。再者，可進一步在進行包埋細胞及/或組織之載體之培養時所使用之培養基中，混入瓜爾膠、大瑪琳膠、藻酸丙二醇酯、刺槐豆膠、阿拉伯膠、塔拉膠、大瑪琳膠、甲基纖維素、羧基甲基纖維素、瓊脂糖、大瑪琳籽膠、聚三葡萄糖等增黏劑中之 1 種以上。

將細胞及/或組織包埋於此等載體中之方法並無特別限制，例如可使用將細胞與前述高分子之混合液吸取至注射器(syringe)，而經由約 25G 至 19G 之注射針滴入培養基中，或用微吸量管滴入培養基中等方法。其中，所形成之珠粒狀載體的大小，係取決於滴入細胞與前述高分子混合液時所用之器具前端的形狀，較佳為數十  $\mu\text{m}$  至數千  $\mu\text{m}$ ，更佳為 100  $\mu\text{m}$  至 2000  $\mu\text{m}$ 。能以珠粒狀載體培養之細胞數並無特別限制，可配合其珠粒大小而自由選擇。例如，當為直徑約 2000  $\mu\text{m}$  之珠粒狀載體時，可將達 500 萬個之細

胞包埋於此種大小之珠粒狀載體中。又，細胞在載體內可為各個分散，亦可為複數個細胞集合而形成細胞塊。此時，包埋細胞及/或組織之載體，因為藉由使用本發明之含有特定化合物之構造體的培養基組成物，而可在不進行攪拌等操作之情形下均勻分散，所以可在不損及細胞功能之情形下培養目的之細胞及/或組織。依照本法所培養之細胞及/或組織，可藉由在培養後以包埋於載體之狀態進行離心或過濾處理而回收。此時，亦可在添加所使用之液體培養基後進行離心或過濾處理。例如，離心時之重力加速度(G)為 50G 至 1000G，更佳為 100G 至 500G，過濾處理時所用之過濾器的細孔大小為  $10\ \mu\text{m}$  至  $100\ \mu\text{m}$ ，不過不以此等為限。依照本法所培養之細胞及/或組織，可藉由用各種螯合劑、熱或酵素等處理將載體分解而使其分散、進行回收。

【0064】 形成細胞凝集塊(球體)之方法並無特別限制，可由所屬技術領域中具有通常知識者適宜選擇。其例子可列舉：使用具有細胞非接著表面之容器的方法、懸滴(hanging drop)法、旋轉培養法、3維支架(3D-scaffold)法、離心法、藉由電場或磁場凝集的方法等。例如就使用具有細胞非接著表面之容器的方法而言，可將目的細胞在已施行阻礙細胞接著之表面處理的培養容器中培養，使其形成球體。使用該細胞非接著性培養容器時，首先，在採取目的細胞後，調製其細胞懸浮液，然後接種在該培養容器中進行培養。若持續培養約一星期，細胞將自發性地形成球體。就此時所用之細胞非接著性表面而言，可使用在一般

所用之培養皿等培養容器之表面塗覆阻礙細胞接著之物質者等。就此種物質而言，可列舉：瓊脂糖、瓊脂、聚-HEMA(聚-(甲基丙烯酸 2-羥基-乙酯)、2-甲基丙烯酸醯氧基乙基磷醯基膽鹼與其他單體(例如甲基丙烯酸丁酯等)之共聚物、聚(丙烯酸 2-甲氧基甲酯)、聚-N-異丙基丙烯酸醯胺、Mebiol Gel(註冊商標)等，不過只要無細胞毒性即可，不以此等為限。

又，就使細胞凝集塊(球體)形成之方法而言，亦可使用於 NATURE BIOTECHNOLOGY, VOL.28, NO.4, APRIL 2010, 361-366、NATURE PROTOCOLS, VOL.6, NO.5, 2011, 689-700、NATURE PROTOCOLS, VOL.6, NO.5, 2011, 572-579、Stem Cell Research, 7, 2011, 97-111 及 Stem Cell Rev and Rep, 6, 2010, 248-259 等所記載之方法。

又，在使球體形成之培養時所用之培養基中，亦可含有提早球體之形成，或促進其之維持的成分。就具有此種效果之成分之例而言，可列舉：二甲基亞砷、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)、血漿銅藍蛋白(ceruloplasmin)、過氧化氫酶(catalase)、過氧化酶、L-抗壞血酸、L-抗壞血酸磷酸酯、生育酚、類黃酮、尿酸、膽紅素、含硒化合物、轉鐵蛋白、不飽和脂肪酸、白蛋白、茶鹼、氟斯克寧(forskolin, 又稱毛喉素)、升糖素(glucagon)、二丁醯基 cAMP 等。就含硒化合物而言，可列舉：亞硒酸鈉、硒酸鈉、二甲基硒化物、硒化氫、硒代甲硫胺酸(selenomethionine)、Se-甲基硒代半胱胺酸、硒代胱硫醚、硒代半胱胺酸、硒代升半胱胺酸(selenohomocysteine)、腺苷-5'-磷硒酸、Se-腺

昔基砒代甲硫胺酸、Y27632，Fasudil(HA1077)、H-1152、Wf-536 等 ROCK 抑制劑。又，為了得到為目的大小之均勻細胞凝集塊，亦可在所使用之細胞非附著性培養容器上，導入與目的細胞凝集塊相同直徑之複數個凹穴。若此等凹穴互相連接，或者在目的細胞凝集塊之直徑之範圍內，則於接種細胞時，接種之細胞不會在凹穴與凹穴之間形成細胞凝集塊，而係於凹穴中確實地形成對應於其容積大小之細胞凝集塊，藉此可得到均一大小的細胞凝集塊集團。就此時之凹穴形狀而言，以半球或圓錐狀為較佳。

或者，基於具有細胞接著性之支撐物，亦可形成球體。就此種支撐物之例子而言，可列舉：膠原蛋白、聚輪烷(polyrotaxane)、聚乳酸(PLA)、聚乳酸乙醇酸共聚物(PLGA)、水凝膠等。

又，藉由與餵養細胞共培養，亦可使球體形成。就用於促進球體形成之餵養細胞而言，可使用任何接著性細胞，較佳為對應各種細胞之餵養細胞。雖無限定，不過例如在形成來自肝臟或軟骨之細胞之球體時，就其餵養細胞之例子而言，可列舉 COS-1 細胞或血管內皮細胞作為較佳之細胞種類。

再者，亦可使用本發明之含有特定化合物之構造體的培養組成物，使球體形成。此時，該特定化合物之濃度如以上所詳述，為在實質上未提高該液體培養基之黏度且可使細胞及/或組織均勻地懸浮(較佳為使其懸浮靜置)的濃度；例如，將該特定化合物以成為 0.0005%至 1.0%(重量/

體積)，較佳係成為 0.001%至 0.3%(重量/體積)，更佳係成為 0.005%至 0.1%(重量/體積)，又更佳係成為 0.01%至 0.05%(重量/體積)之方式，添加於形成球體時所用之培養基中即可。又，另一方面之該特定化合物之濃度，係如以上所詳述，為在實質上未提高該液體培養基之黏度且可使細胞及/或組織均勻地懸浮(較佳為使其懸浮靜置)的濃度，例如，將該特定化合物以成為 0.0005%至 1.0%(重量/體積)，較佳係成為 0.001%至 0.3%(重量/體積)，更佳係成為 0.003%至 0.1%(重量/體積)，又更佳係成為 0.005%至 0.05%(重量/體積)之方式，添加於形成球體形成時所用之培養基中即可。

球體，係藉由使目的細胞均勻分散在含有該特定化合物之構造體的培養基中，靜置培養 3 日至 10 日而調製。其中，所調製之球體可藉由進行離心或過濾處理而回收。例如，離心時之重力加速度(G)為 50G 至 1000G，更佳為 100G 至 500G，過濾處理時所用之過濾器的細孔大小為 10  $\mu$  m 至 100  $\mu$  m，不過不以此等為限。又，亦可使用於表面上塗覆有可與目的細胞特異性結合之抗體的磁性微粒子，而藉由磁力回收所培養之球體。就此種磁性微粒子之例子而言，可列舉：Dynabeads(Veritas 公司製)、MACS 微珠粒(Miltenyi Biotec 公司製)、BioMag(Techno Chemical 公司製)等。

球體之大小係因細胞種類及培養期間而異，並無特別限定，不過在為球狀或橢圓球狀時，所具有之直徑為 20  $\mu$  m 至 1000  $\mu$  m，較佳 40  $\mu$  m 至 500  $\mu$  m，更佳 50  $\mu$  m 至 300  $\mu$  m，



最佳 80  $\mu$  m 至 200  $\mu$  m。

此種球體，縱使以原樣持續靜置培養，在 10 日以上，較佳係 13 日以上，又更佳係 30 日以上之期間仍可保持增殖能力，而藉由於靜置培養期間進一步定期地進行機械性分割，或進一步進行單細胞化處理及凝集，將可實質上無期限地保持增殖能力。

球體之培養中所用之培養容器，只要為可用於一般動物細胞培養者即無特別限定，可列舉如：燒瓶、皿、佩垂皿、組織培養皿、多功能培養皿、微量盤、微孔培養盤、多功能培養盤、多孔培養盤、腔式載玻片、細胞培養瓶、攪拌式培養瓶、培養皿、試管、淺盤(tray)、培養袋、滾瓶、EZ SPHERE(旭硝子公司製)、Sumilon Cell-tight 培養盤(住友巴克萊(Sumitomo Bakelite)公司製)等。

在此等培養容器之中，於實施多種抗癌劑之評估、醫藥品候選化合物或醫藥品之評估時，係適合使用微量盤、微孔培養盤、多功能培養盤、多孔培養盤。此等培養盤之孔底形狀無特別限制，可使用平底、U 字型、V 字型者，較佳為使用 U 字型者。該等培養器材之材質並無特殊限制，可列舉例如：玻璃、聚氯乙烯、纖維素系聚合物、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚碳酸酯、聚砵、聚胺酯、聚酯、聚醯胺、聚苯乙烯、聚丙烯等塑膠等。

【0065】用於球體之靜置培養之培養基可包含細胞接著因子，就其例子可列舉：基質膠、膠原蛋白凝膠、明膠、聚-L-離胺酸、聚-D-離胺酸、層黏連蛋白、纖維黏連蛋白。

該等細胞接著因子，亦可係將 2 種類以上組合而添加。又，可進一步在用於球體培養之培養基中混入瓜爾膠、大瑪琳膠、藻酸丙二醇酯、刺槐豆膠、阿拉伯膠、塔拉膠、大瑪琳膠、甲基纖維素、羧基甲基纖維素、瓊脂糖、大瑪琳籽膠、聚三葡萄糖等增黏劑。

由於藉由使用本發明之含有特定化合物之構造體的培養基組成物，可在不進行振盪等操作之情形下均勻分散於培養液中，所以可在不損及細胞功能之情形下以球體形式培養目的細胞及/或組織。藉由本法靜置培養之球體，可於培養後藉由離心或過濾處理而回收。此時，亦可於添加所用之液體培養基後，進行離心或過濾處理。例如，離心時之重力加速度(G)為 50G 至 1000G，更佳為 100G 至 500G，過濾處理時所用之過濾器的細孔大小為  $10\ \mu\text{m}$  至  $100\ \mu\text{m}$ ，不過不以此等為限。又，使用在表面上塗覆有可與目的細胞特異性結合之抗體的磁性微粒子，將可藉由磁力回收培養之球體。就此種磁性微粒子之例子而言，可列舉：Dynabeads(Veritas 公司製)、MACS 微珠粒(Miltenyi Biotec 公司製)、BioMag(Techno Chemical 公司製)等。所回收之球體可藉由進一步使用各種螯合劑、熱、過濾器或酵素等處理，使其成為單一細胞而分散。細胞之回收或培養基組成物之交換，亦可藉由使用於機械控制下可於閉鎖環境中實行之生物反應器或自動培養裝置，進行離心、過濾處理或藉由磁性之回收處理而達成。

【0066】 就將來自植物之細胞及/或組織進行靜置培

養時之方法而言，可培養為未分化之植物細胞塊的癒傷組織。癒傷組織之誘導，可針對所使用之植物種類，分別藉由公知之方法而進行。例如，將分化之植物體一部分之組織(例如，根、莖、葉之切片；種子、生長點、胚、花粉等)表面，視需要使用 70%醇或 1%次氯酸鈉溶液等滅菌後，視需要而使用手術刀等切出適當大小的組織片(例如，約 1 至約 5mm 見方之根切片)，並使用無塵實驗台(clean bench)等進行無菌操作，藉此將該組織片接種於預先滅菌之癒傷組織誘導培養基，並於適當條件下進行無菌培養。其中，所誘導之癒傷組織，可立即付諸於液體培養以大量增殖，或者亦可藉由繼代用培養基進行繼代培養，以維持作為種株。繼代培養亦可使用液體培養基及固態培養基中之任一種進行。

使用本發明之培養基組成物開始靜置培養時，所接種之植物細胞塊之量係因目的細胞之增殖速度、培養樣式(分批培養、流加培養、連續培養等)、培養期間等而有所變動，而例如在培養癒傷組織等植物細胞塊時，係以相對於本發明之培養基組成物之細胞塊之濕重成為 4 至 8(重量/容積(w/v))%，較佳 5 至 7(w/v)%之方式，將細胞塊接種於本發明之培養基組成物中。培養時，植物細胞塊之粒徑為 1mm 至 40mm，較佳為 3mm 至 20mm，更佳為 5mm 至 15mm。其中之「粒徑」，例如當植物細胞塊為球形時，意指其直徑，當為橢圓球形時，意指其長徑，當為其他形狀時，亦同樣地意指可量測到之最大長度。

【0067】 培養細胞及/或組織時之溫度，若為動物細胞，通常為 25 至 39°C，較佳為 33 至 39°C。CO<sub>2</sub> 濃度通常在培養之環境氣體中占 4 至 10 體積%，而以 4 至 6% 體積為較佳。培養期間通常為 3 至 35 日，不過可配合培養之目的而自由設定。植物細胞之培養溫度通常為 20 至 30°C，若需要光，在照度 2000 至 8000 Lux 之光照條件下培養即可。

培養期間通常為 3 至 70 日，不過可配合培養之目的而自由設定。

【0068】 以本發明之方法培養細胞及/或組織時，只要將另外調製之細胞及/或組織添加至本發明之培養組成物中，並以使其均勻分散之方式混合即可。此時之混合方法無特別限制，可列舉如：以吸液等手動方式之混合、或使用攪拌器、漩渦混合機(vortex mixer)、微量盤混合機(microplate mixer)、振盪機等機器進行混合。混合後，可使培養液成為靜置狀態，視需要亦可將培養液旋轉、振盪或攪拌。其旋轉數及頻率，只要配合所屬技術領域中具有通常知識者之目的而適宜設定即可。又，在靜置培養之期間內，需進行培養基組成物之交換時，只要藉由進行離心或過濾處理，將細胞及/或組織與培養基組成物分離後，將新培養基組成物添加於細胞及/或組織即可。或者，只要藉由進行離心或過濾處理，將細胞及/或組織適宜濃縮後，將新培養基組成物添加於該濃縮液即可。

例如，離心時之重力加速度(G)為 50G 至 1000G，更佳

為 100G 至 500G，過濾處理時所用之過濾器的細孔大小為  $10\ \mu\text{m}$  至  $100\ \mu\text{m}$ ，不過不以此等為限。又，可使用於表面上塗覆有可與目的細胞特異性結合之抗體的磁性微粒子，而藉由磁力將所培養之細胞及/或組織分離。就此種磁性微粒子之例子而言，可列舉：Dynabeads(Veritas 公司製)、MACS 微珠粒(Miltenyi Biotec 公司製)、BioMag(Techno Chemical 公司製)、磁性微球體(Polysciences Inc.製)等。此等培養基組成物之交換，亦可藉由在機械控制下可於閉鎖環境下實行之生物反應器或自動培養裝置來進行。

【0069】 因為依照本發明之方法，可使癌細胞效率良好地增殖，所以本發明中之含有特定化合物之培養基組成物可用於評估抗癌劑對於癌細胞之效力。例如，評估阻礙癌細胞增殖的抗癌劑時，係解析使癌細胞與抗癌劑共存而培養時之細胞數或種類、以及細胞表面分化標記或表現基因之變化，此時，藉由使用本發明之培養基組成物，不僅可效率良好地使解析對象之細胞數擴增，還可效率良好地將之回收。在本發明中，尤其可將含有脫醯基化結蘭膠或其鹽之癌細胞用培養基添加劑、含有該添加劑之癌細胞用培養基組成物，用於癌細胞之增殖、或抗癌活性之評估等。此時之脫醯基化結蘭膠或其鹽的濃度如前述。

雖然使用迪特膠亦可使癌細胞增殖，不過從對癌細胞之增殖效果格外優良之觀點，及因為可以低濃度(前述之較佳濃度)使用而不易在培養液中產生氣泡之觀點來看，以及易於回收癌細胞之觀點來考量，以脫醯基化結蘭膠為更佳。

【0070】就更具體之抗癌劑的篩選方法而言，可列舉包含：(a)於受驗物質存在下及未存在下，在本發明之培養基組成物中培養癌細胞之步驟、及(b)解析癌細胞之增殖變化之步驟的方法。該方法與受驗物質未存在下之情況相比，可進一步包含：選擇抑制癌細胞增殖之物質的步驟，及/或回收癌細胞的步驟。變化意指癌細胞之增殖增加或減少。解析能以上述方法進行，不過不以此等為限。

【0071】當事者係可從本說明書所記載之範圍適宜決定評估抗癌劑之活性時之培養條件、培養器具、培養裝置、培養基種類、特定化合物之種類、特定化合物之含量、添加物之種類、添加物之含量、培養期間、培養溫度、抗癌劑之種類、抗癌劑之含量等。藉由培養增殖或生成之細胞，可使用該領域中之標準顯微鏡來觀察。測定細胞數時，可使用群落形成法、結晶紫(crystal violet)法、胸苷(thymidine)攝取法、台盼藍(trypan blue)染色法、ATP(腺苷 3 磷酸)測定法、3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎢溴化物(MTT)染色法、WST-1(註冊商標)染色法、WST-8(註冊商標)染色法、流式細胞技術(flow cytometry)法、使用細胞數量自動測定裝置之方法等。此等中，以利用 WST-8(註冊商標)染色法為最佳。又，評估對細胞之障礙性時，可採用乳酸脫氫酵素(LDH)活性測定法、CytoTox-ONE(註冊商標)法等。或者，使用特異性抗體將所培養之細胞染色後，藉由 ELISA 或流式細胞技術檢測細胞表面分化標記，可觀察抗癌劑對於增殖或細胞凋亡的效果。再者，可藉由從所培養

之細胞萃取 DNA(去氧核糖核酸)或 RNA(核糖核酸)，並以南方轉漬(southern blotting)法、北方轉漬(northern blotting)法、RT-PCR 法等，來檢測因抗癌而表現發生變化之基因。

【0072】因為依照本發明之方法，可維持肝細胞之生存及功能，故本發明中之含有特定化合物的培養基組成物，可用於評估醫藥品或醫藥候選物質對肝細胞之各種效果。例如，評估醫藥候選物質對肝細胞之毒性效果時，係使肝細胞與評估對象之受驗物質共存，並解析培養時之細胞數或種類、細胞表面分化標記或表現基因之變化。此時，藉由使用本發明之培養基組成物，不僅可維持為解析對象之肝細胞之生存及功能，且可效率良好地回收肝細胞。

【0073】就篩選作用於肝細胞之醫藥品候選物質之方法而言，可列舉包含下述步驟之方法：(a)在受驗物質存在下及未存在下，於本發明之培養基組成物中培養肝細胞的步驟，及(b)解析肝細胞之生理功能之變化的步驟。

就評估作用於肝細胞之醫藥品候選物質之藥效或毒性之方法而言，可列舉包含下述步驟之方法：(a)在受驗物質存在下及未存在下，於本發明之培養基組成物中培養肝細胞的步驟，及(b)解析肝細胞之生理功能之變化的步驟。此等方法與受驗物質未存在下之情況相比，可進一步包含下述步驟：選擇可抑制或增加肝細胞之生理功能之物質的步驟，及/或回收肝細胞的步驟。該變化意指肝細胞之生理功能(例如，肝細胞增殖、細胞色素 P450 之酵素活性等)增加或減少。而且，在肝細胞之生理功能增加時，可評估為

藥效或毒性低；在肝細胞之生理功能降低時，可評估為藥效或毒性高等。

【0074】 評估該醫藥候選物質之活性時之培養條件、培養器具、培養裝置、培養基之種類、特定化合物之種類、特定化合物之含量、添加物之種類、添加物之含量、培養期間、培養溫度、醫藥品或醫藥候選物質之種類或其含量等，當事者可從本說明書所記載之範圍適宜選擇。對於藉由培養而維持或出現之細胞，可使用該領域中標準顯微鏡來觀察。又，測定細胞數時，可使用群落形成法、結晶紫法、胸苷攝取法、台盼藍染色法、ATP(腺苷 3 磷酸)測定法、3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎘溴化物(MTT)染色法、WST-1(註冊商標)染色法、WST-8(註冊商標)染色法、流式細胞技術法、使用細胞數自動測定裝置之方法等。其中，最適合利用 WST-8(註冊商標)染色法。又，評估對細胞之障礙性時，可使用乳酸脫氫酵素(LDH)活性測定法、CytoTox-ONE(註冊商標)法等。又，可使用特異性抗體將所培養之細胞染色後，藉由 ELISA(酵素連結免疫吸附分析；enzyme-linked immunosorbent assay)或流式細胞技術檢測細胞表面分化標記，觀察醫藥品或醫藥候選物質對於增殖或細胞凋亡之效果。因醫藥品或醫藥候選物質而表現發生變化之基因，可藉由從所培養之細胞萃取 DNA(去氧核糖核酸)或 RNA(核糖核酸)，並以南方轉漬法、北方轉漬法、RT-PCR 法等來檢測。又，因醫藥品或醫藥候選物質而表現發生變化之蛋白質，可藉由 ELISA、西方轉漬法、流式細



胞技術法等來檢測。再者，關於細胞色素 P450 之酵素活性，可藉由使用放射性同位體法、高速液體層析法、發光法、顯色法等來檢測該酵素所引起之基質構造改變活性。

#### [實施例]

【0075】以下雖然藉由以本發明之培養基組成物之分析例、試驗例作為實施例來具體地陳述，而更詳細地說明本發明，不過本發明不受該等之限定。

【0076】(分析例 1: 含有脫醯基化結蘭膠之培養基的黏度測定及細胞懸浮試驗)

#### 含有脫醯基化結蘭膠之培養基的調製及黏度測定

使脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA, 三晶股份有限公司製)以成為 0.4%(w/v)之方式懸浮於純水後，於 90°C 加熱攪拌使其溶解。將本水溶液於攪拌同時放冷至室溫，於 121°C 高壓釜滅菌 20 分鐘。在 300mL 高型燒杯中加入 50mL 之 2 倍濃度之 DMEM/F-12 培養基(Aldrich 公司製)及 47.5mL 之滅菌水，於室溫用均質混合機(3000rpm)攪拌，同時添加 2.5mL 之脫醯基化結蘭膠水溶液，並以原樣持續攪拌 1 分鐘，調製成脫醯基化結蘭膠之終濃度為 0.01%之培養基組成物。同樣地以使終濃度成為 0.02%、0.03%、0.05%(w/v)之方式，調製添加有脫醯基化結蘭膠水溶液之培養基組成物。本培養基組成物之黏度係於 37°C 條件下，使用 E 型黏度計(東機產業股份有限公司製，Viscometer TVE-22L，標準轉子 1°34'×R24)以旋轉數 100rpm 旋轉 5 分鐘來測定。

#### 含有脫醯基化結蘭膠之培養基的細胞懸浮試驗

將人類子宮頸癌細胞株 HeLa(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 250000 個/mL 之方式懸浮於含 10%(v/v)胎牛血清之 EMEM 培養基(WAKO 公司製)中，將 10mL 之本懸浮液接種於 EZ SPHERE(旭硝子公司製)後，在 CO<sub>2</sub> 培養箱(CO<sub>2</sub> Incubator) (5%CO<sub>2</sub>)內培養 3 日。將其中所得到之球體(直徑 100 至 200  $\mu$  m)之懸浮液 10mL 以離心處理(200G, 5 分鐘)，使球體沈降，藉由除去上清液，調製成 1.0mL 之球體懸浮液。接著，在 1.5mL 之 Eppendorf 管中各加入 1.0mL 之上述調製之含有脫醯基化結蘭膠之培養基，然後再添加 10  $\mu$  L 之 HeLa 細胞球體懸浮液。藉由敲擊(tapping)使細胞塊分散，於 37°C 培育，以目視觀察 1 小時後之細胞分散狀態。

【0077】 (比較例)含有甲基纖維素、膠原蛋白之培養基的調製

含有甲基纖維素之培養基的調製

在 200mL 茄型燒瓶中加入 100mL 之 DMEM/F-12 培養基(Aldrich 公司製)，並添加 0.1g 之甲基纖維素(M0387, Aldrich 公司製)。以冰浴冷卻同時進行攪拌，使甲基纖維素溶解。使用本溶液，以使終濃度成為 0.1、0.3、0.6、1.0%(w/v)之方式，調製添加有甲基纖維素水溶液之培養基組成物。

含有膠原蛋白之培養基的調製

在 6.5mL 之 0.3%細胞基質型 I-A(新田明膠公司製)中，加入 1mL 之 10 倍濃度之 DMEM/F-12 培養基(Aldrich 公司製)、1mL 之再構成用緩衝液(新田明膠公司製)及

1.5mL 之純水，於冰中攪拌同時調製含有 0.2% 膠原蛋白之培養基。以同樣方式，調製添加有終濃度成為 0.01、0.05、0.1、0.2%(w/v) 之膠原蛋白的培養基組成物。

對於上述所調製之培養基組成物，也以與含有脫醯基化結蘭膠之培養基同樣之方式實施 HeLa 細胞球體之懸浮試驗及黏度測定。惟 1.0%(w/v) 甲基纖維素之黏度係根據裝置之測定範圍，而以 50rpm 來測定。

【0078】[表 1]

脫醯基化結蘭膠濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)	HeLa 細胞 懸浮/沉澱
0.01	液狀	1.31	懸浮
0.02	液狀	1.92	懸浮
0.03	液狀	2.38	懸浮
0.05	液狀	3.34	懸浮

【0079】[表 2]

甲基纖維素濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)	HeLa 細胞 懸浮/沉澱
0.1	液狀	2.31	沉澱
0.3	液狀	8.15	沉澱
0.6	液狀	13.0	沉澱
1.0	液狀	48.2	沉澱

【0080】 [表 3]

膠原蛋白濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)	HeLa 細胞 懸浮/沉澱
0.01	液狀	1.18	懸浮
0.05	液狀/固體(凝膠)	無法測定	懸浮
0.1	固體(凝膠)	無法測定	懸浮
0.2	固體(凝膠)	無法測定	懸浮

## 【0081】 [試驗例]

繼而，在以下之試驗例中，具體地說明本發明之培養基組成物在細胞培養中之有用性，不過本發明不僅以此等為限。再者，CO<sub>2</sub> 培養箱中之 CO<sub>2</sub> 之濃度(%), 係以環境氣體中之 CO<sub>2</sub> 的體積%表示。又，PBS 意指磷酸緩衝生理食鹽水(Sigma Aldrich Japan 公司製)，FBS 意指胎牛血清(Biological Industries 公司製)。又，(w/v)表示每 1 單位體積之重量。

## 【0082】

(試驗例 1：使單一細胞分散時之細胞增殖試驗)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，於 90°C 加熱同時藉由攪拌使其溶解，將本水溶液於 121°C 進行 20 分鐘高壓釜滅菌。使用本溶液，調製培養基組成物，該培養基組成物係於 IMDM 培養基(Gibco 公司製)中添加有終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基

組成物，而該 IMDM 培養基係含有 10%(v/v)胎牛血清及 10ng/mL 之促血小板生成素(WAKO 公司製)者。接著，將人類白血病細胞株 UT7/TPO 以成為 20000 細胞/mL 之方式接種於添加有上述脫醯基化結蘭膠之培養基組成物中之後，以每 1 孔之量成為 5mL 之方式分注在 6 孔平底微量盤(康寧(Corning)公司製)之孔中。以同樣方式，將人類子宮頸癌細胞株 HeLa(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 20000 細胞/mL 之方式接種於培養基組成物後，以每 1 孔 5mL 之量分注在 6 孔平底微量盤(康寧公司製)之孔中，其中，該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 EMEM 培養基(WAKO 公司製)中添加 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)而製成。將此等細胞懸浮液在 CO<sub>2</sub> 培養箱(5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養 3 日。然後，將培養液之一部分回收，並添加等量之台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，以血球計數盤(Erma 販賣股份有限公司製)測定活細胞之數目。

【0083】 其結果為，確認到 UT7/TPO 細胞及 HeLa 細胞可藉由使用本發明之培養基組成物而以懸浮狀態均勻地培養，並以該培養基組成物進行增殖。將懸浮靜置培養 3 日後之 UT7/TPO 細胞及 HeLa 細胞的細胞數示於表 4。

【0084】[表 4]

	UT7/TPO 細胞	Hela 細胞
細胞數 (x10000/mL)	38	40

【0085】(試驗例 2：培養來自細胞株之球體時之細胞增殖試驗)

將人類肝癌細胞株 HepG2(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 250000 個/mL 之方式懸浮於含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)中，將 10mL 之本懸浮液接種於 EZ SPHERE(旭硝子公司製)後，在 CO<sub>2</sub> 培養箱(5%CO<sub>2</sub>)內培養 7 日。以同樣方式，將人類子宮頸癌細胞株 HeLa(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 250000 個/mL 之方式懸浮於含 10%(v/v)胎牛血清之 EMEM 培養基(WAKO 公司製)中，將 10mL 之本懸浮液接種於 EZ SPHERE(旭硝子公司製)後，在 CO<sub>2</sub> 培養箱(5%CO<sub>2</sub>)內培養 7 日。將 2.5mL 之前述所得到之各個細胞株之球體(直徑 100 至 200 μm)的懸浮液進行離心處理(200G，5 分鐘)，使球體沈降並除去上清液。接著，在本球體(約 800 個)中添加 10mL 之上述培養基使之懸浮後，移至平底試管(BM 機器公司製)。以同樣方式，使用在上述培養基中添加有 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)的培養基組成物製成球體之懸浮液，並移至平底試管(BM 機器公司製)。又，添加有 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成

物，係以下述方式調製：首先，將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA, 三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，於 90°C 加熱，同時藉由攪拌使其溶解，將本水溶液於 121°C 進行 20 分鐘高壓釜滅菌後，進行 1/20 稀釋，然後添加於含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基中。

【0086】 於 37°C，將上述球體懸浮液在 CO<sub>2</sub> 培養箱(5%CO<sub>2</sub>)內靜置培養 3 日後，添加 2 倍體積之培養基，藉由離心處理(200G，5 分鐘)使球體沉降，然後除去上清液。在此，分取球體之一部分，以光學顯微鏡(OLMPUS 公司製，CK30-F100)觀察其形狀。接著，將回收之球體以 10mL 之 PBS 洗淨 1 次後，添加 1mL 之胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四乙酸)溶液(WAKO 公司製)，並於 37°C 保溫 5 分鐘。添加 9mL 之上述培養基後，藉由離心處理(200G，5 分鐘)回收細胞。在此處所得到之細胞懸浮液 2mL 的一部分中，添加等量的台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，以血球計數盤(Erma 販賣股份有限公司製)測定活細胞及死細胞之數目。

【0087】 其結果為，確認到 HepG2 細胞及 HeLa 細胞之球體可藉由使用本發明之培養基組成物而以懸浮狀態培養，且以該培養基組成物可效率良好地進行細胞增殖。而且，確認到本發明之培養基組成物與既有培養基相比，使細胞增殖之時死細胞之比率較少，促進細胞增殖之效果較為優良。此時，以既有培養基所培養之球體係沉降於培養容器之底面。再者，以光學顯微鏡觀察所培養之球體的形

狀時，在本發明之培養基組成物中未見到球體彼此會合，相對地，在既有培養基中可觀察到球體彼此會合。

關於 HepG2 細胞及 HeLa 細胞，將在不含脫醯基化結蘭膠之培養基中培養時之細胞數當作 1 時之相對細胞數示於表 5 中。又，將在不含脫醯基化結蘭膠之培養基中培養時之死細胞率(死細胞數/活細胞數)當做 1 時之相對死細胞率示於表 6 中。又，將以本發明之培養基組成物培養 HepG2 細胞及 HeLa 細胞之球體時之懸浮狀態分別示於第 1 圖及第 2 圖中。再者，將所培養之 HeLa 細胞之球體的形狀示於第 3 圖中。

【0088】[表 5]

脫醯基化結蘭膠		HepG2 細胞	Hela 細胞
無	相對細胞數	1.0	1.0
有	相對細胞數	1.7	1.5

【0089】[表 6]

脫醯基化結蘭膠		HepG2 細胞	Hela 細胞
無	相對死細胞率	1.0	1.0
有	相對死細胞率	0.5	0.5

【0090】(試驗例 3：在人類多潛能幹細胞之接著培養中之細胞增殖試驗)

人類多潛能幹細胞(hPSCs)，通常在使其接著於餵養細胞上或塗覆有基質膠之培養皿上的平面培養條件下被維持



增殖。為了評估脫醯基化結蘭膠對於 hPSCs 之毒性，係於使用基質膠(Becton Dickinson 公司製)之平面培養條件下，將脫醯基化結蘭膠以成為 0.000%至 0.020% (w/v)之濃度的方式添加於 mTeSR 培養基(STEM CELL Technologies 公司製)中，並檢討其對 hPSCs 之增殖的影響。此時，係培養京都大學 253G1 株作為人類 iPS 細胞，培養京都大學 KhES-1 株作為人類 ES 細胞株。再者，添加有上述濃度之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物，係藉由下述方式調製：首先，將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱同時攪拌而溶解，將此水溶液於 121°C 進行高壓釜滅菌 20 分鐘後，以成為預定濃度之方式添加於 mTeSR 培養基中。其結果為：人類 iPS 細胞及人類 ES 細胞，在添加有脫醯基化結蘭膠之培養基中，皆可得到與通常之 mTeSR 培養基相同程度的細胞數，而未發現脫醯基化結蘭膠所產生之毒性。將其結果示於第 4 圖中。第 4 圖之培養後的細胞數，係將 hPSCs 接種於塗覆有基質膠之培養皿中，用含脫醯基化結蘭膠之 mTeSR 培養基培養 5 日所得到之細胞數，以用不含脫醯基化結蘭膠之 mTeSR 培養基培養所得到之細胞數當作 1 時的相對值來表示。

【0091】(試驗例 4：在人類多潛能幹細胞之球體培養中脫醯基化結蘭膠抑制沈降之試驗)

hPSCs 係於佩垂皿等低接著性之培養皿中形成球體。例如，該球體亦可使用在 NATURE BIOTECHNOLOGY,

VOL.28,NO.4,APRIL 2010,361-366、NATURE PROTOCOLS, VOL.6,NO.5,2011,689-700、NATURE PROTOCOLS,VOL.6, NO.5,2011,572-579、Stem Cell Research,7,2011,97-111、Stem Cell Rev and Rep,6,2010,248-259 中記載之任一方法形成。將餵養細胞(胎小鼠纖維母細胞)上所維持之 hPSCs(京都大學 253G1 株或京都大學 KhES-1 株)回收，將餵養細胞藉由自然沈降除去後，使 hPSCs 再懸浮於添加有 Rho 激酶抑制劑 Y-27632( $10 \mu\text{M}$ )之 mTeSR 培養基中。接著，將一定大小之 hPSCs 群落接種於佩垂皿(BD Falcon 公司製)，並藉由於  $37^\circ\text{C}$  在  $\text{CO}_2$  培養箱( $5\%\text{CO}_2$ )內培養而使球體形成。培養基交換，係用不含 Y-27632 之 mTeSR 培養基，於繼代後第 1 日及第 3 日進行，繼代係每 5 日以含 Y-27632 之 mTeSR 培養基進行。將以此種方式調製之 hPSCs 的球體(培養第 4 日)懸浮於培養基組成物後，移至分析管(cuvette)，其中，前述培養基組成物係(藉由與試驗例 3 同樣之方法調製之)於 mTeSR 培養基中添加 0.000%至 0.020%(w/v)之脫醯基化結蘭膠而製成者。將前述分析管於  $37^\circ\text{C}$  在  $\text{CO}_2$  培養箱( $5\%\text{CO}_2$ )內放置一夜，並針對脫醯基化結蘭膠抑制球體沈降之效果進行檢討。將其結果示於第 5 圖。如第 5 圖所示，藉由脫醯基化結蘭膠之添加，而可在全部濃度域中使球體以三維懸浮狀態保持於培養基中。另一方面，可知在未添加脫醯基化結蘭膠之既有培養基中，球體沉降於培養容器之底面，無法呈現懸浮狀態。又，脫醯基化結蘭膠之效果，就人類 iPS 細胞及人類 ES 細胞而言共通的。從以上之結

果，表示脫醯基化結蘭膠可使 hPSCs 之球體保持懸浮狀態。

【0092】(試驗例 5：人類多潛能幹細胞之球體培養之細胞增殖試驗)

檢討 hPSCs 能否以三維懸浮狀態進行試管培養。對於含 0.000%、0.015% 或 0.020%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的 mTeSR 培養基藉由與試驗例 4 同樣之方法調製，將繼代之 hPSCs 球體(600 至 800 個/3mL)，以各成為相同球體數之方式接種於 5mL 之聚苯乙烯試管(BD Falcon 公司製)中，於 37°C，在 CO<sub>2</sub> 培養箱(5%CO<sub>2</sub>)內培養 5 日。培養基交換，係於繼代後第 1 日及第 3 日，以將 3 倍體積之 DMEM/F-12 培養基(Sigma 公司製)添加於培養液後，藉由離心處理(100G，3 分鐘)使球體沈降，然後在該球體添加新培養基之方式進行。在第 5 日添加等量之 DMEM/F-12 培養基(Sigma 公司製)後，藉由離心處理(100G，3 分鐘)將球體全部回收，使用胰蛋白酶-EDTA 溶液(Invitrogen 公司製)解離為單細胞後，以 Nucleocounter (Chemometec 公司製)測定細胞數。其結果為：在不含脫醯基化結蘭膠之培養基中，球體沉至管底，形成大細胞塊，未呈現增殖，不過在含 0.015%或 0.020%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基中，係呈三維懸浮狀態而球體之大小變大，若將接種之細胞數當做 1，則在第 5 日時得到約 10 倍之細胞數，而確認到細胞增殖。將此結果示於第 6 圖。第 6 圖係將接種之細胞數當做 1 時相對地表示第 5 日之細胞數。又，人類 ES 細胞在聚苯乙烯試管中培養第 5 日，每 3mL 實際上可得到 3,000,000 個之細胞數(相當於

1000mL 培養基中約 1,000,000,000 個之細胞數)。

【0093】(試驗例 6：在人類多潛能幹細胞之球體培養中維持未分化性之確認試驗)

關於在含 0.015%或 0.020%(w/v)之脫醯基化結蘭膠之 mTeSR 培養基中懸浮靜置培養的 hPSCs 球體細胞，係藉由流式細胞技術解析及檢討其未分化能力之維持。關於在聚苯乙烯試管中為球體狀態之人類 ES 細胞(KhES-1)，係回收經 3 次繼代之細胞，關於人類 iPS 細胞(253G1)，係回收經 4 次繼代之細胞，之後用表示 hPSCs 之未分化性之表面標記之 SSEA4 之抗體(# MAB4304，Millipore 公司製)及 TRA-1-60(# MAB4360，Millipore 公司製)之抗體進行染色，並使用 FACSCantoII(Becton Dickinson 公司製)評估細胞之抗體染色的陽性率。將其結果示於第 7 圖。如第 7 圖所示，A：人類 iPS 細胞(253G1)及 B：人類 ES 細胞(KhES-1)皆與在基質膠上所維持之細胞相同，係在含添加脫醯基化結蘭膠之培養基中所懸浮靜置培養之細胞之 90%以上表現多潛能幹細胞標記。再者，以只實施二次抗體之染色者作為陰性對照組。如以上方式，判定就人類 iPS 細胞及人類 ES 細胞而言，在含添加脫醯基化結蘭膠之培養基中所懸浮靜置培養的 hPSCs 球體皆維持未分化性。

【0094】(試驗例 7：球體培養之人類多潛能幹細胞之特性解析 1)

使用以與試驗例 3 同樣之方法調製之含 0.020%(w/v)脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)

的 mTeSR 培養基(STEM CELL Technologies 公司製)，以與試驗例 4 同樣之方法繼代培養人類 iPS 細胞 (253G1)或人類 ES 細胞 (KhES-1)之球體共計 9 次，關於培養後之各個細胞，係將繼代第 1 日之球體接種於胎小鼠纖維母細胞上。次日，實施  $300 \mu\text{g/mL}$  之胸苷(Sigma Aldrich 公司製)處理一夜。接著，進行  $100\text{ng/mL}$  之 Colcemid(Nacalai Tesque 公司製)處理，用胰蛋白酶-EDTA 溶液解離成單一細胞後，用  $0.075\text{M}$  之 KCl 進行低張處理。之後，用卡諾氏固定液(Carnoy's fixing solution)(甲醇：乙酸 = 3：1)將細胞固定。

本固定細胞之核型解析，係以 Q 顯帶(Q banding)法來分析(委託 Chromosome Science Labo 股份有限公司進行試驗)。其結果為：判定就人類 iPS 細胞及人類 ES 細胞而言，在本發明之培養基組成物中所懸浮靜置培養之細胞皆同樣保持正常核型。將其結果示於第 8 圖中。

【0095】(試驗例 8：球體培養之人類多潛能幹細胞之特性解析 2)

使用以與試驗例 3 同樣之方法調製之含  $0.020\%(w/v)$  之脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)的 mTeSR 培養基(STEM CELL Technologies 公司製)，藉由與試驗例 4 同樣之方法繼代培養人類 iPS 細胞 (253G1)之球體，共計繼代 21 次至 22 次，每次 5 日，並將培養後之球體以  $4\%(w/v)$  聚甲醛(paraformaldehyde)(Nacalai Tesque 公司製)固定。用含  $20\%$  蔗糖(w/v)之 PBS 浸漬後，以凍結用包埋劑(O.C.T 複合物，Sakura Finetek Japan 股份有限公

司製)包埋。以 Cryostat(Thermo Scientific 公司製)製成厚度  $12\ \mu\text{m}$  之切片，以表示 hPSCs 之未分化性的 NANOG(# 4903, Cell Signaling 公司製)及 OCT3/4(# sc-5279, Santa Cruz 公司製)、SSEA4(# MAB4304, Millipore 公司製)之抗體進行染色。其結果為明瞭在含脫醯基化結蘭膠之培養基組成物中所懸浮靜置培養的細胞可表現多潛能幹細胞之未分化標記。以上述方式，判定以含脫醯基化結蘭膠之培養基組成物懸浮靜置培養 100 日以上之人類 iPS 細胞的球體係維持未分化性。將其結果示於第 9 圖中。

【0096】(試驗例 9：培養附著於微載體上之細胞株時之細胞增殖試驗)

將微載體 Cytodex(註冊商標) 1(GE Healthcare Life Sciences 公司製)以成為  $0.02\text{g/mL}$  之方式懸浮於 PBS 中，靜置 1 夜後，捨棄上清液，用新的 PBS 將該微載體洗淨 2 次。然後，再度以成為  $0.02\text{g/mL}$  之方式懸浮於 PBS，並於  $121^\circ\text{C}$  進行 20 分鐘高壓釜滅菌。接著，將該微載體用 70% 乙醇洗淨 2 次，用 PBS 洗淨 3 次後，以成為  $0.02\text{g/mL}$  之方式懸浮於含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)。使用該微載體懸浮液，調製含 120mg 之 Cytodex(註冊商標) 1 及 4000000 個 HepG2 細胞的 DMEM 培養基(含有 10%(v/v)胎牛血清) 20mL，將本細胞懸浮液在預先用聚矽氧塗覆劑(Asahi Techno Glass 公司製)處理之燒杯中，於  $37^\circ\text{C}$  用攪拌器攪拌(100rpm)下培養 6 小時。此時，藉由顯微鏡確認到 HepG2 細胞係接著於微載體之。接著，將與細

胞接著之微載體用含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基洗淨 2 次，並懸浮於 3mL 之相同培養基中。

【0097】在 20mL 之含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基或於該培養基中添加有 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)之培養基組成物中，分別添加 300  $\mu$  L 之上述之微載體懸浮液，於 37°C 培養 3 日。此時，不含脫醯基化結蘭膠之培養液係在攪拌器攪拌(100rpm)下進行培養。培養後，用顯微鏡確認微載體上之細胞的附著狀態後，以離心處理(200G，5 分鐘)使微載體沈降。以 10mL 之 PBS 洗淨該微載體後，添加 1mL 之胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四乙酸)溶液(WAKO 公司製)，於 37°C 保溫 5 分鐘。再添加 9mL 之含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基後，使用網格大小(mesh size)70  $\mu$  m 之細胞過濾器(cell strainer) (BD Falcon 公司製)除去微載體。藉由將於此所得到之濾液離心處理(200G，5 分鐘)而回收細胞。將該細胞懸浮於 500  $\mu$  L 之培養基中，對其之一部分添加等量之台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，用血球計數盤(Erma 販賣股份有限公司製)測定活細胞之數目。其結果為：不含脫醯基化結蘭膠之培養液含有 123,000 個細胞，而含脫醯基化結蘭膠之培養液含有 1,320,000 個細胞。如上述，可確認到本發明之含特定化合物之構造體的培養基組成物，即便是使用微載體實施細胞培養，細胞增殖之促進效果與既有培養基相比仍係較為優良。將使用本發明之含特定化合物之構造體的培養基組成物實施 3 日微載體培養

時之 HepG2 細胞的附著狀態，係示於第 10 圖中。

【0098】(試驗例 10：使用來自細胞株之球體的細胞懸浮試驗)

將三仙膠(KELTROL CG，三晶股份有限公司製)以成為 1%(w/v)之濃度的方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90℃ 加熱下攪拌而溶解。使用所得之水溶液，調製三仙膠之終濃度為 0.1、0.15、0.2%(w/v)之 DMEM/F-12 培養基組成物。又，藉由於 90℃ 加熱而調製含 0.2%(w/v)之  $\kappa$ -角叉菜膠(GENUGEL WR-80-J，三晶股份有限公司製)及 0.2%(w/v)之刺槐豆膠(GENUGUM RL-200-J，三晶股份有限公司製)的水溶液，並使用該水溶液，調製含 0.03、0.04、0.05%(w/v)之  $\kappa$ -角叉菜膠及刺槐豆膠的 DMEM/F-12 培養基(Sigma 公司製)組成物。

【0099】 使用與試驗例 2 同樣之方法製成 HeLa 細胞之球體，在 1mL 之上述所調製之培養基中，分別添加數十個球體後，於 37℃ 靜置 1 小時，藉由目視觀察球體細胞之懸浮狀態。其結果為：確認到 HeLa 細胞之球體在上述培養基組成物中全部維持懸浮狀態。再者，確認到在所得細胞懸浮液中添加等量之培養基後，可藉由離心處理(300 至 400G，5 分鐘)使 HeLa 細胞之球體沈降而回收。將以本發明之培養基組成物培養 HeLa 細胞之球體時之懸浮狀態分別示於第 11 圖中。又，將以與分析例 1 同樣之方法測定之黏度示於表 7、8 中。



【0100】[表 7]

三仙膠濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)	HeLa 細胞 懸浮/沉澱
0.1	液狀	3.69	懸浮
0.15	液狀	5.46	懸浮
0.2	液狀	7.26	懸浮

【0101】[表 8]

$\kappa$ -角叉菜膠、刺槐豆膠濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)	HeLa 細胞 懸浮/沉澱
0.03	液狀	1.34	懸浮
0.04	液狀	1.55	懸浮
0.05	液狀	1.95	懸浮

【0102】(試驗例 11：使用經過濾器過濾之培養基組成物的細胞懸浮試驗)

使用與試驗例 2 同樣之方法調製含有 0.015% 之脫醯基化結蘭膠 (KELCOGEL CG-LA, 三晶股份有限公司製) 之 DMEM/F-12 培養基組成物。接著，將 1mL 之該培養基組成物分別使用 70  $\mu$ m、40  $\mu$ m 之過濾器 (BD Falcon 公司製)，30  $\mu$ m、20  $\mu$ m 之過濾器 (As One 公司製)，10  $\mu$ m 之過濾器 (Partec 公司製)，5  $\mu$ m、1.2  $\mu$ m、0.45  $\mu$ m、0.2  $\mu$ m 之過濾器 (日本 Sartorius Stedim 公司製) 進行過濾。將使用與試驗例 2 同樣之方法所製成之 HepG2 細胞之球體約數十個添加於上述濾液後，於 37°C 靜置 1 小時，以目視觀察球體細胞

之懸浮狀態。其結果為：確認到 HepG2 細胞之球體，雖然在透過  $10\ \mu\text{m}$  以上之過濾器之培養基組成物中會維持懸浮狀態，但在透過  $5\ \mu\text{m}$  以下之過濾器之培養基組成物中為沉澱。再者，確認到在此處為懸浮狀態之 HepG2 細胞之球體，可藉由於室溫施行 300G 之離心處理 5 分鐘，或加入等量之培養基後於室溫施行 200G 之離心處理 5 分鐘而沈降、回收。

【0103】(試驗例 12：球體形成試驗)

使用與試驗例 2 同樣之方法調製含有 0.01% 之脫醯基化結蘭膠 (KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製) 及 10% (v/v) 胎牛血清之 EMEM 培養基 (WAKO 公司製) 的組成物。接著，將 HeLa 細胞以成為 1000 個/mL 之濃度的方式添加後，分注於 24 孔培養盤 (康寧公司製) 中。將該培養盤於  $37^\circ\text{C}$  懸浮靜置培養 9 日後，用顯微鏡確認球體之形成。再者，藉由進行 300G 離心處理 5 分鐘，以使球體細胞沈降，並以 5mL 之 PBS 洗淨 1 次後，添加  $100\ \mu\text{L}$  之胰蛋白酶-EDTA (乙二胺四乙酸) 溶液 (WAKO 公司製)，於  $37^\circ\text{C}$  保溫 5 分鐘。在此處所得到之  $100\ \mu\text{L}$  之細胞懸浮液中添加  $100\ \mu\text{L}$  之含 10% (v/v) 胎牛血清之 EMEM 培養基，並對其之一部分細胞懸浮液添加等量之台盼藍染色液 (Invitrogen 公司製) 後，用血球計數盤 (Erma 販賣股份有限公司製) 測定活細胞之數目。其結果為：確認到 HeLa 細胞增至 170000 個/mL。將以本發明之培養基組成物所形成之 HeLa 細胞的球體示於第 12 圖中。

**【0104】(試驗例 13：構造體之光學顯微鏡觀察)**

使脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.4%(w/v)之方式懸浮於純水後，於 90°C 加熱攪拌，使其溶解。在 300mL 高型燒杯(tall beaker)中加入 95mL 之 2 倍濃度之 DMEM/F-12 培養基(Aldrich 公司製)，於室溫用磁性攪拌器攪拌同時添加 5mL 之脫醯基化結蘭膠水溶液，並於該狀態持續攪拌 5 分鐘，調製成脫醯基化結蘭膠之終濃度為 0.02%之培養基組成物。再者，將該培養基組成物藉由均質混合機(3000rpm)攪拌 5 分鐘。藉由光學顯微鏡(KEYENCE 公司，BIOREVO BZ-9000)觀察所調製之培養基組成物。將所觀察到之構造體示於第 13 圖。

**【0105】(試驗例 14：藉由混合過熱粉培養基與 DAG 而調製)**

將 20mg 之脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)及 1.58g 之 DMEM/F-12 培養基(Life Technologies 公司製)加入 200mL 三角燒瓶中，注入 100mL 之純水。於 121°C 進行 20 分鐘高壓釜滅菌，調製成脫醯基化結蘭膠濃度為 0.02%之 DMEM/F-12 培養基組成物。在所調製之培養基中，添加葡聚糖珠粒(dextran beads)Cytodex1 (尺寸 200  $\mu$ m，GE Healthcare Life Sciences 公司製)，以目視確認珠粒之分散狀態。以懸浮分散狀態為○，一部分沈降/分散狀態為△，沈降狀態為×來進行評估。將結果示於表 9。

【0106】[表 9]

脫醯基化結蘭膠濃度 %(w/v)	狀態	Cytodex1 之分散
0.05	液體狀	○
0.02	液體狀	○
0.01	液體狀	○

## 【0107】(試驗例 15: 混合有多糖類之培養基組成物的調製)

將三仙膠(KELTROL CG, 三晶股份有限公司製)以成為 0.5%(w/v)濃度之方式懸浮於純水後, 藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解。以同樣方式, 製作藻酸鈉(Duck Algin NSPM, Food Chemifa 製)、刺槐豆膠(GENUGUM RL-200-J, 三晶股份有限公司製)、 $\kappa$ -角叉菜膠(GENUGEL WR-80-J, 三晶股份有限公司製)、迪特膠(KELCO CRETE DG-F, 三晶股份有限公司製)之 0.5%(w/v)之水溶液。

將所得水溶液與 0.2%或 0.1%(w/v)之脫醯基化結蘭膠溶液與 10 倍濃度之 DMEM/F-12 培養基混合, 於 80°C 過熱 30 分鐘。放冷至室溫後, 添加 7.5%碳酸氫鈉水溶液, 調製成含有終濃度為 0.01、0.02%(w/v)之脫醯基化結蘭膠及終濃度為 0.1、0.2、0.3、0.4%(w/v)之其他多糖的 DMEM/F-12 培養基組成物。又, 以與前述同樣方式調製含脫醯基化結蘭膠之培養基後, 添加甲基纖維素(CP400, WAKO 股份有限公司製)之粉末。於冰浴中攪拌, 使甲基纖維素溶解, 調製成含有終濃度為 0.01、0.02%(w/v)之脫醯基化結蘭膠及終濃度為 0.1、0.2、0.3、0.4%(w/v)之其他甲基纖維素的

DMEM/F-12 培養基組成物。

【0108】在以上述方式調製之培養基中，添加聚苯乙烯珠粒(尺寸 500-600  $\mu$  m, Polysciences Inc.製)，以目視確認珠粒之分散狀態。以懸浮分散狀態為○，一部分沈降/分散狀態為△，沈降狀態為×來進行評估。將結果示於表 10。

【0109】 [表 10]

脫鹽基化結蘭膠濃度 % (w/v)	多糖濃度 % (w/v)	三仙膠	藻酸鈉	刺槐豆膠	甲基纖維素	$\kappa$ -角叉菜膠	迪特膠
0.01	0.1	○	○	○	×	○	○
	0.2	○	○	○	△/×	固化	未實施
	0.3	○	○	○	△/×	固化	未實施
	0.4	○	○	○	△/×	固化	未實施
0.02	0.1	○	○	○	○/×	○	○
	0.2	○	○	○	○	固化	未實施
	0.3	○	○	○	○	固化	未實施
	0.4	○	○	○	○	固化	未實施

【0110】(試驗例 16: 混合有多糖類之培養基組成物之黏度測定)

以與試驗例 15 之多糖混合系同樣之方法，調製含終濃度為 0.005、0.01% (w/v) 之脫鹽基化結蘭膠及其他多糖的 DMEM/F-12 培養基。多糖係以使三仙膠、藻酸鈉、刺槐豆膠之終濃度成為 0.1% (w/v)，甲基纖維素之終濃度成為

0.2%(w/v)、 $\kappa$ -角叉菜膠及迪特膠之終濃度成為 0.05%(w/v) 之方式進行調製。將各個培養基組成物之狀態及以與分析例 1 同樣方法測定之黏度示於表 11 至 16。

【0111】 [表 11]

三仙膠濃度 %(w/v)	脫醯基化結蘭膠濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)
0.1	0.005	液體狀	4.36
0.1	0.010	液體狀	4.59

【0112】 [表 12]

藻酸鈉濃度 %(w/v)	脫醯基化結蘭膠濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)
0.1	0.005	液體狀	1.53
0.1	0.010	液體狀	1.75

【0113】 [表 13]

刺槐豆膠濃度 s %(w/v)	脫醯基化結蘭膠濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)
0.1	0.005	液體狀	1.92
0.1	0.010	液體狀	2.36

【0114】 [表 14]

甲基纖維素濃度 %(w/v)	脫醯基化結蘭膠濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)
0.2	0.005	液體狀	3.36
0.2	0.010	液體狀	3.81

【0115】[表 15]

$\kappa$ -角叉菜膠濃度 %(w/v)	脫醯基化結蘭膠濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)
0.05	0.005	液體狀	1.04
0.05	0.010	液體狀	1.28

【0116】[表 16]

迪特膠濃度 %(w/v)	脫醯基化結蘭膠濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)
0.1	0.005	液體狀	2.76
0.1	0.010	液體狀	3.04

【0117】(試驗例 17: 變更 2 價金屬離子濃度之培養基組成物之調製)

使用不含氯化鈣、硫酸鎂、氯化鎂之 DMEM/F-12 (D9785、Aldrich 製), 以與試驗例 14 之方法同樣方式調製含 0.02%(w/v)脫醯基化結蘭膠之 DMEM/F-12 培養基組成物。又, 以終濃度成為 DMEM/F-12 培養基之規定量的方式, 調製添加有氯化鈣或硫酸鎂、氯化鎂的 DMEM/F-12 培養基組成物。依照 DMEM/F-12 培養基之規定組成, 終濃度分別為氯化鈣 0.116g/L、硫酸鎂 0.049g/L、氯化鎂 0.061g/L。

在所調製之培養基組成物中, 添加葡聚糖珠粒 Cytodex1 (GE Healthcare Life Sciences 公司製), 並於 2 日後以目視確認珠粒之分散。以懸浮分散狀態為○, 一部分沈降/分散狀

態為△，沈降狀態為×來進行評估。將結果示於表 17。

【0118】[表 17]

脫醯基化結蘭膠濃度 %(w/v)	氯化鈣	硫酸鎂 氯化鎂	Cytodex1 之 分散
0.02	+	+	○
0.02	+	-	○
0.02	-	+	△
0.02	-	-	×

【0119】(試驗例 18：後續添加 2 價金屬離子之培養基組成物之調製)

調製將 0.1%(w/v)脫醯基化結蘭膠溶液及 5 倍濃度之 DMEM/F-12 培養基(不含氯化鈣、硫酸鎂、氯化鎂，D9785，Aldrich 製)、1167mg 之氯化鈣、489mg 之硫酸鎂、287mg 之氯化鎂溶解於 300mL 之純水而成之鹽溶液。在 200mL 之高型燒杯中加入脫醯基化結蘭膠水溶液及純水，使用錨型攪拌翼，以 200rpm 攪拌該溶液。添加培養基液與水混合而成之 A 液，並以原樣攪拌 10 分鐘。繼而添加鹽溶液，進一步添加 7.5%碳酸氫鈉水溶液，調製成含終濃度為 0.02% 之脫醯基化結蘭膠的 DMEM/F-12 培養基組成物。將各液之混合量示於表中。在調製 4 小時後，針對 6 個培養基組成物進行聚苯乙烯珠粒及 Cytodex1 之分散評估。將結果示於表 18、19。



【0120】[表 18]

	脫醯基化結蘭膠水溶液 0.1%(w/v)	純水	A 液		鹽溶液 氯化鈣 氯化鎂 硫酸鎂
			5 倍濃度 DMEM/F-12	純水	
1	20mL	10mL	20mL	50mL	無
2	20mL	10mL	20mL	47mL	3 mL
3	20mL	10mL	20mL	40mL	3 mL/水 7 mL
4	20mL	30mL	20mL	30mL	無
5	20mL	30mL	20mL	27mL	3 mL
6	20Ml	30mL	20mL	20mL	3 mL/水 7 mL

【0121】[表 19]

	脫醯基化結蘭膠濃 度%(w/v)	鹽溶液	聚苯乙烯珠粒之 分散	Cytodex1 之分散
1	0.02	-	×	×
2	0.02	+	○	○
3	0.02	+	○	○
4	0.02	-	×	×
5	0.02	+	○	○
6	0.02	+	○	○

【0122】(試驗例 19：各種培養基組成物之調製)

調製 0.1%(w/v)脫醯基化結蘭膠溶液及高濃度之培養基液。高濃度之培養基液係調製 10 倍濃度之 MEM(M0268, Aldrich 製)、RPMI-1640(R6504, Aldrich 製)及 5 倍濃度之 DMEM(對應高壓滅菌之培養基, 日水製)。將 0.1%(w/v)脫

醯基化結蘭膠溶液與各高濃度培養基、濃度調整用純水混合，並於 80°C 過熱 30 分鐘。放冷至室溫後，添加 7.5% 碳酸氫鈉水溶液，分別調製成含有終濃度為 0.01、0.02、0.03% (w/v) 之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物。

對於所調製之 9 個培養基組成物，以聚苯乙烯珠粒及葡聚糖珠粒 Cytodex1 呈懸浮分散狀態為 ○，一部分沈降 / 分散狀態為 △，沈降狀態為 × 之方式來進行評估。將結果示於表 20、21。

【0123】 [表 20]

MEM 培養基			
脫醯基化結蘭膠 濃度 % (w/v)	狀態	聚苯乙烯珠 粒之分散	Cytodex1 之分散
0.01	液體狀	△	△
0.02	液體狀	○	○
0.03	液體狀	○	○

【0124】 [表 21]

DMEM 培養基			
脫醯基化結蘭膠 濃度 % (w/v)	狀態	聚苯乙烯珠 粒之分散	Cytodex1 之分散
0.01	液體狀	△	△
0.02	液體狀	○	○
0.03	液體狀	○	○

【0125】 (試驗例 20：含脫醯基化結蘭膠之培養基組成物之粒度分布測定)

仿照分析例 1，調製含 0.038%(w/v)之脫醯基化結蘭膠之 DMEM/F-12 培養基組成物。培養基係使用均質混合機，以 3000rpm 及 6000rpm 攪拌 1 分鐘而調製。關於該培養基組成物之粒度分布，係使用 Beckman Coulter(股份有限公司)製 Multisizer4(依照庫爾特原理設計之精密粒度分布測定裝置)測定，求取體積基準粒度分布之平均直徑(d50)。將結果示於表 22。

【0126】 [表 22]

調製培養基時混合器之旋轉數	d50( $\mu$ m)
3000rpm	1.709
6000rpm	1.499

【0127】 (試驗例 21：脫醯基化結蘭膠之磷酸化)

秤取 1g 之脫醯基化結蘭膠及 40mL 之純水至玻璃製之 100mL 試驗管中，於 100°C 加熱 30 分鐘，調製成懸浮液。在該懸浮液中添加 1g 之磷酸水溶液(85%)，並加熱回流 5 小時。然後，攪拌 12 小時，同時放冷至室溫而得到之白色懸浮液，將該白色懸浮液注入至 99%乙醇(500mL)中。濾取所生成之綿狀白色固體後，使其乾燥，藉此得到脫醯基化結蘭膠之磷酸化物之淡褐色固體(0.4g)。所導入之磷酸基可藉由傅立葉變換(Fourier transform)紅外線分光分析(島津製作所股份有限公司製，IR-Prestage21)而確認(1700cm<sup>-1</sup>，P-OH、1296cm<sup>-1</sup>、1265cm<sup>-1</sup>，P=O)。將淡褐色固體藉由微波加熱分解裝置(ETHOS TC，Milestone General 製)分解後，

藉由感應偶合(inductively coupled)式電漿發光分光分析裝置(ICP-OES) (SPS 5520, SII Nano Technologies 公司製)測定磷原子之含有率，結果為 3.5wt%(n = 2)。

【0128】(試驗例 22: 含磷酸化之脫醯基化結蘭膠之培養基組成物之調製)

將任意量之磷酸化之脫醯基化結蘭膠(30mg)、1.56g 之 DMEM/F-12 培養基(Life Technologies 公司製)加入 200mL 三角燒瓶中，注入 100mL 之純水。於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌，調製成脫醯基化結蘭膠濃度為 0.03% 之 DMEM/F-12 培養基組成物。在所調製之培養基中，添加葡聚糖珠粒 Cytodex1(GE Healthcare Bioscience 公司製)，以目視確認珠粒之分散狀態。在 0.03%(w/v)之磷酸化之脫醯基化結蘭膠濃度中，可見到珠粒呈分散狀態。

【0129】(試驗例 23: 含脫醯基化結蘭膠之培養基組成物之調製)

對於脫醯基化結蘭膠水溶液與培養基溶液以下表所示之比率進行添加及混合而調製脫醯基化結蘭膠濃度為 0.02% 之 DMEM/F-12 培養基組成物時之聚苯乙烯珠粒(尺寸 500-600  $\mu$  m, Polysciences Inc.製)之分散狀態進行評估。將結果示於表 23、24。經 1 日以上靜置之所有條件下之苯乙烯珠粒係為分散。

【0130】 [表 23]

脫醯基化結蘭膠/純水	DMEM/F12 粉培養基/純水	靜置時間
20mg/10mL	1.56g/90mL	5 分鐘
20mg/20mL	1.56g/80mL	5 分鐘
20mg/30mL	1.56g/70mL	5 分鐘
20mg/40mL	1.56g/60mL	6 小時
20mg/50mL	1.56g/50mL	6 小時
20mg/60mL	1.56g/40mL	6 小時
20mg/70mL	1.56g/30mL	6 小時
20mg/80mL	1.56g/20mL	1 日
20mg/90mL	1.56g/10mL	1 日

在「脫醯基化結蘭膠/純水」中添加「DMEM/F12 粉培養基/純水」

【0131】[表 24]

脫醯基化結蘭膠/純水	DMEM/F12 粉培養基/純水	靜置時間
20mg/10mL	1.56g/90mL	5 分鐘
20mg/20mL	1.56g/80mL	5 分鐘
20mg/30mL	1.56g/70mL	1 小時
20mg/40mL	1.56g/60mL	6 小時
20mg/50mL	1.56g/50mL	6 小時
20mg/60mL	1.56g/40mL	6 小時
20mg/70mL	1.56g/30mL	1 日
20mg/80mL	1.56g/20mL	1 日
20mg/90mL	1.56g/10mL	1 日

在「DMEM/F12 粉培養基/純水」中添加「脫醯基化結蘭膠/純水」

【0132】(試驗例 24：使用過濾器之培養基組成物之調製)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以最終濃度成為 0.02 或 0.04%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱 30 分鐘或於 121°C 加熱 20 分鐘而溶解。再者，將 100mL 之所得水溶液以孔徑為 0.22  $\mu$ m 之聚醚砜製膜濾器(康寧公司製)進行過濾。接著，將所得濾液與 2 至 4 倍濃度之 DMEM/F-12 培養基(Sigma Aldrich 公司製)混合後，以震盪機(mild mixer)(SI-24，Tietech 公司製)振盪 1 小時，分別調製含最終濃度為 0.01 或 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物

(例如，將各 25mL 之 0.02%(w/v)脫醯基化結蘭膠水溶液及 2 倍濃度之 DMEM/F-12 培養基混合，調製 50mL 之 0.01%(w/v) 之脫醯基化結蘭膠培養基組成物)。使用與試驗例 2 同樣之方法，製成 HepG2 細胞之球體，在 1mL 之上述所調製之培養基中分別添加數十個球體後，以目視觀察於 37°C 靜置 1 小時及 1 夜後之球體細胞之懸浮狀態。其結果為：確認到 HepG2 細胞之球體於全部培養基組成物中，均維持懸浮狀態。再者，確認到：添加 2 倍體積之培養基後，可藉由將所得細胞懸浮液藉由離心處理(500G，5 分鐘)，使 HepG2 細胞之球體沈降而回收細胞。以目視確認 1 夜後之球體之分散狀態時，係以懸浮分散狀態為○，一部分沈降/分散狀態為△，沈降狀態為×來進行評估。將結果示於表 25 中。

【0133】[表 25]

脫醯基化結蘭膠水溶液濃度 (%)	溶解時之溫度 (°C)	培養基組成物之脫醯基化結蘭膠濃度(%)	HePG2 細胞之懸浮效果
0.02	90	0.010	○
		0.015	○
	120	0.010	○
		0.015	○
0.04	90	0.010	○
		0.015	○
	120	0.010	○
		0.015	○
		0.015	○

【0134】(試驗例 25：培養來自細胞株之球體時之細胞增殖試驗)

將人類胎兒腎細胞株 HEK293(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 250000 個/mL 之方式懸浮於含 10%(v/v)胎牛血清之 EMEM 培養基(WAKO 公司製)中，將 10mL 之所得懸浮液接種於 EZ SPHERE(旭硝子公司製)後，於 CO<sub>2</sub> 培養箱(5%CO<sub>2</sub>)內培養 2 日。將 10mL 之此處所得到之 HEK293 細胞的球體(直徑 100 至 200  $\mu$ m)之懸浮液進行離心處理(200G，5 分鐘)，使球體沈降並除去上清液後，懸浮於 1mL 中。接著，在 200  $\mu$ L 之所得球體懸浮液(細胞數約 200000 個)中添加 10mL 之上述培養基並懸浮後，移至平底試管(BM 機器公司製)中。以同樣方式，使用在上述培養基中添加有 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)之培養基組成物，製成球體之懸浮液，並移至平底試管(BM 機器公司製)中。再者，添加有 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物之調製方式如下：首先將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解，將所得水溶液於 121°C 進行 20 分鐘高壓釜滅菌後，稀釋成 1/20，並添加於含 10%(v/v)胎牛血清之 EMEM 培養基中。

【0135】將上述球體懸浮液，於 37°C 在 CO<sub>2</sub> 培養箱(5%CO<sub>2</sub>)內靜置培養 5 日後，添加 2 倍體積之培養基，並藉由進行離心處理(500G，5 分鐘)使球體沈降，除去上清液。



接著，將回收之球體以 10mL 之 PBS 洗淨 1 次後，添加 1mL 之胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四乙酸)溶液(WAKO 公司製)，並於 37°C 保溫 5 分鐘。添加 9mL 之上述培養基後，藉由離心處理(500G，5 分鐘)回收細胞。對於此所得之 2mL 細胞懸浮液之一部分添加等量之台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，藉由血球計數盤(Erma 販賣股份有限公司製)測定活細胞及死細胞之數。再者，製成不含脫醯基化結蘭膠之培養基組成物，進行同樣之實驗，以作為對照組。

【0136】其結果為：確認到 HEK293 細胞之球體可藉由使用本發明之培養基組成物而以懸浮狀態培養，且以該培養基組成物中可使細胞效率良好地增殖。並且，本發明之培養基組成物與不含脫醯基化結蘭膠之培養基組成物相比，使細胞增殖時死細胞之比率較少，確認細胞增殖之促進效果優良。此時，以既有培養基培養之球體係沉降於培養容器之底面。

關於 HEK293 細胞，係將以不含脫醯基化結蘭膠之培養基培養時之細胞數當做 1 時之相對細胞數示於表 26 中。又，將以不含脫醯基化結蘭膠之培養基培養時之死細胞率(死細胞數/活細胞數)當做 1 時之相對死細胞率示於表 27 中。

【0137】 [表 26]

脫醯基化結蘭膠		HEK293 細胞
無	相對的細胞數	1.0
有	相對的細胞數	1.6

【0138】 [表 27]

脫醯基化結蘭膠		HEK293 細胞
無	相對的死細胞率	1.0
有	相對的死細胞率	0.3

## 【0139】 (試驗例 26：培養昆蟲細胞時之細胞增殖試驗)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解，並將所得水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液，調製培養基組成物，該培養基組成物係於 Sf-900(註冊商標)IIISFM 培養基(Gibco 公司製)中添加有終濃度為 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠者。接著，將來自秋盜夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)之 Sf9 細胞(Gibco 公司製)，以成為 100000 細胞/mL 之方式接種於添加有上述之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物後，以每 1 孔 1mL 之方式分注於 24 孔平底微量盤(康寧公司製)之孔中。將此等細胞懸浮液在培養箱內於 25°C 靜置培養 5 日。然後，回收培養液之一部分，添加等量之台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，用血球計數盤(Erma

販賣股份有限公司製)測定活細胞之數目。再者，製成不含脫醯基化結蘭膠之培養基組成物，進行同樣之實驗，以作為對照組。

【0140】其結果為：確認到 Sf9 細胞可藉由使用本發明之培養基組成物而以懸浮狀態均勻地培養，並以該培養基組成物進行增殖。再者，可確認本發明之培養基組成物與不含脫醯基化結蘭膠之培養基組成物相比，使細胞增殖之時之細胞增殖之促進效果更為優良。將懸浮靜置培養 5 日後之 Sf9 細胞之細胞數示於表 28 中。

【0141】 [表 28]

脫醯基化結蘭膠	Sf9 細胞數(x10000)
無	33.5
有	47.4

【0142】(試驗例 27：培養 CD34 陽性細胞時之細胞增殖試驗)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90℃ 加熱下攪拌使其溶解，將所得水溶液於 121℃ 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液，調製培養基組成物，該培養基組成物係在 StemSpan SFEM 培養基(Stem Cell Technologies 公司製)中添加有終濃度為 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠、20ng/mL 之促血小板生成素(WAKO 公司製)及 100ng/mL 之幹細胞因子(SCF、WAKO 公司製)者。接

著，將來自人類臍帶血之 CD34 陽性細胞(Lonza 公司製)以成為 10000 細胞/mL 之方式接種在上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以每 1 孔 1mL 之方式分注於 24 孔平底微量盤(康寧公司製)之孔中。將此等細胞懸浮液於 37°C，在 CO<sub>2</sub> 培養箱(5%CO<sub>2</sub>)內靜置培養 7 日。然後，回收培養液之一部分，並添加等量之台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，用血球計數盤(Erma 販賣股份有限公司製)測定活細胞之數目。又，在殘餘之培養液中添加 3 倍體積之培養基，藉由進行離心處理(500G，5 分鐘)，使所有細胞沈降。再者，製成不含脫醯基化結蘭膠之培養基組成物，並進行同樣之實驗，以作為對照組。

【0143】其結果為：確認到 CD34 陽性細胞可藉由使用本發明之培養基組成物而以懸浮狀態均勻地培養，並以該培養基組成物進行增殖。再者，確認本發明之培養基組成物與不含脫醯基化結蘭膠之既有培養基相比，係具有同等以上之細胞增殖促進效果。又，確認到藉由離心處理使細胞沈降，可回收細胞。將以不含脫醯基化結蘭膠之培養基培養時之細胞數當做 1 時，於懸浮靜置培養 7 日後從 CD34 陽性細胞所增殖之細胞的相對細胞數示於表 29 中。

【0144】[表 29]

脫醯基化結蘭膠	相對的細胞數
無	1.0
有	1.2

**【0145】(試驗例 28：球體形成試驗)**

使用與試驗例 2 同樣之方法，調製含有 0.015%之脫鹽基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)及 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)之組成物。接著，將 HepG2 細胞以成為 15000 個/mL 之細胞濃度的方式添加後，於 24 孔培養盤(康寧公司製)分注 1mL。將該培養盤於 37°C 懸浮靜置培養 7 日後，藉由顯微鏡確認球體之形成。再者，藉由進行 400G 之離心處理 5 分鐘，使球體細胞沈降，用 5mL 之 PBS 洗淨 1 次後，添加 100  $\mu$  L 之胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四乙酸)溶液(WAKO 公司製)，並於 37°C 保溫 5 分鐘。對於此所得之 100  $\mu$  L 細胞懸浮液添加 100  $\mu$  L 之含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基，對其之一部分細胞懸浮液添加等量之台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，用血球計數盤(Erma 販賣股份有限公司製)測定活細胞之數目。其結果為：確認到 HepG2 細胞於本發明之培養基組成物中形成球體，又，細胞數亦增加至 80800 個/mL。將在本發明之培養基組成物中所形成之 HepG2 細胞之球體示於第 14 圖中。

**【0146】(試驗例 29：使用來自細胞株之球體的細胞懸浮試驗)**

將迪特膠(KELKO-CRETE DG，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之濃度的方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解。使用所得之水溶液調製迪特膠之終濃度為 0.1%(w/v)的 DMEM/F-12 培養基組

成物。又，藉由於 90°C 加熱而調製含 0.5%(w/v)之原型結蘭膠(Kelcogel HT, 三榮源 FFI 股份有限公司製)之水溶液，並使用該水溶液調製含 0.05、0.1%(w/v)之原型結蘭膠的 DMEM/F-12 培養基(Sigma 公司製)組成物。

【0147】 使用與試驗例 2 同樣之方法製成 HeLa 細胞之球體，在 1m L 之上述調製之培養基中分別添加數十個球體後，於 37°C 靜置 1 小時，並以目視觀察球體細胞之懸浮狀態。其結果為：確認到 HeLa 細胞之球體，在上述之全部培養基組成物中均維持懸浮狀態。再者，確認到可藉由將含 0.1%(w/v)之迪特膠的該細胞懸浮液離心處理(200G，5 分鐘)，使 HeLa 細胞之球體沈降而回收細胞。

【0148】(試驗例 30: 使用具有細胞接著能力之磁性珠粒的細胞懸浮試驗 1)

將塗覆有層黏連蛋白或纖維黏連蛋白之 GEM(註冊商標，Global Eukaryotic Microcarrier，GL Sciences 股份有限公司製)之懸浮溶液以每微試管 500  $\mu$  L 之方式分注於 1.5mL 體積之微試管(Eppendorf 公司製)中，使用磁石架(TA4899N12，多摩川精機股份有限公司製)使 GEM 從上述 GEM 懸浮溶液中聚集並除去溶劑。再者，將 GEM 藉由 500  $\mu$  L 之含有 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 培養基(WAKO 公司製)洗淨 2 次後，使之懸浮於 500  $\mu$  L 之與上述相同的培養基中。將所得懸浮液以每 1 孔 50  $\mu$  L 之方式分注於為細胞低接著性培養盤之 Sumilon Cell-tight 培養盤 24F(住友巴克萊股份有限公司製)中。接著，以成為 250000 細胞/mL

之方式添加另行調製之 HepG2 細胞，並用與上述相同的培養基將最終體積調為  $500 \mu\text{L}$ /孔。以手動方式攪拌該細胞懸浮液後，將該培養盤於  $\text{CO}_2$  培養箱 ( $5\%\text{CO}_2$ ) 內靜置一晚。藉由顯微鏡確認細胞接著於 GEM 上之後，將細胞懸浮液移至  $1.5\text{mL}$  體積之微試管 (Eppendorf 公司製) 中，使用上述磁石架使附著有細胞之 GEM 聚集並除去上清液。

【0149】使用與試驗例 2 同樣之方法調製含有  $0.015\%$  之脫醯基化結蘭膠 (KELCOGEL CG-LA, 三晶股份有限公司製) 及  $10\%$  (v/v) 胎牛血清之 DMEM 培養基 (WAKO 公司製) 之組成物。分別將  $1\text{mL}$  之該培養基組成物、或不含脫醯基化結蘭膠之與上述相同的培養基添加於上述調製之附著有 HepG2 細胞之 GEM (該 GEM 塗覆有層黏連蛋白或纖維黏連蛋白) 中，使其懸浮後，移至 Sumilon Cell-tight 培養盤 24F 中。接著，將該培養盤靜置於  $\text{CO}_2$  培養箱 ( $5\%\text{CO}_2$ ) 內 6 日後，將細胞培養液移至  $1.5\text{mL}$  體積之微試管 (Eppendorf 公司製) 中，於上述磁石架上徐緩地進行吸液，同時使附著有細胞之 GEM 聚集並除去上清液。將該 GEM 用  $1\text{mL}$  之 PBS 洗淨 1 次，添加  $200 \mu\text{L}$  之胰蛋白酶-EDTA (乙二胺四乙酸) 溶液 (WAKO 公司製)，並於  $37^\circ\text{C}$  保溫 10 分鐘。對  $200 \mu\text{L}$  之於此所得之細胞懸浮液添加  $800 \mu\text{L}$  之含  $10\%$  (v/v) 胎牛血清之 DMEM 培養基，對其之一部分細胞懸浮液添加等量之台盼藍染色液 (Invitrogen 公司製) 後，用血球計數盤 (Erma 販賣股份有限公司製) 測定活細胞之數目。

【0150】其結果為：確認到接著有 HepG2 細胞之 GEM

可藉由使用本發明之培養基組成物而以懸浮狀態培養，且細胞藉由該培養基組成物效率良好地增殖。並且，可確認到本發明之培養基組成物與不含脫醯基化結蘭膠之既有培養基相比，細胞增殖之促進效果較為優良。又，確認到可藉由使用磁力使附著有 HepG2 細胞之 GEM 從本發明之培養基組成物聚集，而可進一步從該 GEM 回收 HepG2 細胞。

將用含有或未含有脫醯基化結蘭膠之培養基於 GEM 上培養 HepG2 細胞 6 日時之細胞數示於表 30 中。又，將附著有 HepG2 細胞之以層黏連蛋白塗覆之 GEM 用本發明之培養基組成物中培養時之懸浮狀態示於第 14 圖中。

【0151】 [表 30]

脫醯基化結蘭膠	HepG2 細胞數(×10000/mL)	
	塗覆有層黏連蛋白 之 GEM	塗覆有纖維黏連蛋白 之 GEM
無	50.0	54.7
有	112.3	94.0

【0152】(試驗例 31：使用具有細胞接著能力之磁性珠粒的細胞懸浮試驗 2)

與試驗例 30 以同樣方式，使以纖維黏連蛋白塗覆之 GEM(註冊商標，Global Eukaryotic Microcarrier，GL Sciences 股份有限公司製)懸浮於 MF-Medium(註冊商標)間葉系幹細胞增殖培養基(東洋紡股份有限公司製)中。將所得懸浮液以每 1 孔 50  $\mu$  L 之方式分注於為細胞低接著性培養盤之



Sumilon Cell-tight 培養盤 24F(住友巴克萊股份有限公司製)。接著，以成為 250000 細胞/mL 之方式添加另行調製之來自人類骨髓之間葉系幹細胞(Cell Applications 公司製)，與試驗例 30 以同樣方式，使該培養盤在 CO<sub>2</sub> 培養箱(5%CO<sub>2</sub>)內靜置一晚，調製成接著有間葉系幹細胞之 GEM。

【0153】使用與試驗例 2 同樣之方法調製含有 0.015% 之脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)之 MF-Medium(註冊商標)間葉系幹細胞增殖培養基(東洋紡股份有限公司製)之組成物。分別將 1mL 之該培養基組成物、或不含脫醯基化結蘭膠之與上述相同的培養基添加於上述調製之附著有間葉系幹細胞之 GEM(該 GEM 塗覆有纖維黏連蛋白)，使其懸浮後，移至 Sumilon Cell-tight 培養盤 24F 中。接著，將該培養盤於 CO<sub>2</sub> 培養箱(5%CO<sub>2</sub>)內靜置 4 日後，將細胞培養液移至 1.5mL 體積之微試管(Eppendorf 公司製)中，於上述磁石架上徐緩地進行吸液，同時使附著有細胞之 GEM 聚集並除去上清液。將該 GEM 以 1mL 之 PBS 洗淨 1 次，添加 200  $\mu$  L 之胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四乙酸)溶液(WAKO 公司製)，並於 37°C 保溫 10 分鐘。對 200  $\mu$  L 之於此所得之細胞懸浮液添加 800  $\mu$  L 之含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基，對其之一部分細胞懸浮液添加等量之台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，用血球計數盤(Erma 販賣股份有限公司製)測定活細胞之數目。

【0154】其結果為：確認到接著有間葉系幹細胞之 GEM 可藉由使用本發明之培養基組成物而以懸浮狀態培

養，且細胞藉由該培養基組成物效率良好地增殖。並且，確認到本發明之培養基組成物與不含脫醯基化結蘭膠之既有培養基相比，細胞增殖之促進效果較為優良。又，確認到藉由使用磁力，可使附著有間葉系幹細胞之 GEM 從本發明之培養基組成物聚集，而可進一步從該 GEM 回收間葉系幹細胞。

將以含有或未含有脫醯基化結蘭膠之培養基於 GEM 上培養間葉系幹細胞 4 日時之細胞數示於表 31。

【0155】[表 31]

脫醯基化結蘭膠	間葉系幹細胞數(×10000/mL)
無	11.3
有	20.9

【0156】(試驗例 32：使用藻酸珠粒之細胞懸浮試驗)

以下之試驗係依據 PG Research 股份有限公司製之藻酸三維培養套組之方法實施。將另行調製之 HepG2 細胞以成為 400000 細胞/mL 之方式添加至 2.5mL 之藻酸鈉溶液 (PG Research 股份有限公司製) 中，進一步以成為 5  $\mu$ g/mL 之方式添加人類重組層黏連蛋白 511 (Veritas 股份有限公司製)，調製成細胞懸浮液。對該細胞懸浮液，以安裝有探頭 (sonde) 之 5mL 注射器 (Terumo 股份有限公司製) 回收後，在該注射器上安裝 22G 注射針 (Terumo 股份有限公司製)。接著，對在各孔添加有 2mL 氯化鈣水溶液 (PG Research 股份有限公司製) 之 24 孔平底微量盤 (PG Research 股份有限公

司製)之孔，各添加 10 滴所得之細胞懸浮液。於室溫靜置 10 分鐘後確認形成藻酸珠粒之後，除去氯化鈣溶液，添加 2mL 之 PBS，並於室溫靜置 15 分鐘。進一步於除去 PBS 後，添加 2mL 之含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)，並於室溫靜置 15 分鐘。除去培養基後，於各孔分別添加 1mL 之用與試驗例 2 同樣之方法所調製之含有 0.03%之脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)及 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)之培養基組成物、或不含脫醯基化結蘭膠之與上述相同的培養基，在 CO<sub>2</sub> 培養箱(5%CO<sub>2</sub>)內靜置培養 8 日。再者，培養基交換係於培養第 4 日實施。

【0157】使用 1mL 體積之吸管(tip)將所培養之藻酸珠粒移至 1.5mL 體積之微試管(Eppendorf 公司製)後，將檸檬酸鈉溶液(PG Research 股份有限公司製)以 1mL 添加於各試管中，並於室溫攪拌 15 分鐘使藻酸珠粒溶解。接著，藉由進行 300G 之離心處理 3 分鐘使細胞沈降，並除去上清液。於所得之細胞添加 200  $\mu$  L 之胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四乙酸)溶液(WAKO 公司製)，於 37°C 保溫 5 分鐘。在 200  $\mu$  L 之此處所得到之細胞懸浮液中添加 800  $\mu$  L 之含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基，對其之一部分細胞懸浮液添加等量之台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，用血球計數盤(Erma 販賣股份有限公司製)測定活細胞之數目。

【0158】其結果為：確認到包埋有 HepG2 細胞之藻酸珠粒可藉由使用本發明之培養基組成物而以懸浮狀態培

養，且細胞藉由該培養基組成物效率良好地增殖。而且，確認到本發明之培養基組成物與不含脫醯基化結蘭膠之既有培養基相比，細胞增殖之促進效果較為優良。

使用含有或未含有脫醯基化結蘭膠培養基將 HepG2 細胞於藻酸珠粒內培養 8 日時之細胞數係示於表 32 中。又，將包埋有 HepG2 細胞之藻酸珠粒於本發明之培養基組成物中培養時之懸浮狀態係示於第 16 圖中。

【0159】 [表 32]

脫醯基化結蘭膠	HepG2 細胞數(×10000/mL)
無	34.9
有	51.8

【0160】(試驗例 33：使用膠原蛋白凝膠膠囊之細胞懸浮試驗)

分別將 A：組織培養用膠原蛋白 Cellmatrix(註冊商標) TYPEI-A (細胞基質、新田明膠股份有限公司製)、B：10 倍濃度之 DMEM/F-12 培養基(Aldrich 公司製)、C：再構成用緩衝液(於 100mL 之 0.05N 氫氧化鈉溶液中添加 2.2g 之碳酸氫鈉、4.77g 之 HEPES(4-(2-羥基乙基)-1-哌吡乙磺酸)(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid))並經過濾滅菌者)於冰中冷卻，同時以成為 A：B：C=8：1：1 之方式混合。再者，將人類重組層黏連蛋白 511(Veritas 股份有限公司製)以成為 5 μg/mL 之方式添加於其中，調製成 500 μL 之膠原蛋白混合溶液。於所得之混合溶液中，以成

為 200000 細胞/mL 之方式添加另行調製之 HepG2 細胞，使用安裝有 25G 注射針(Terumo 股份有限公司製)之 1.5mL 注射器(Terumo 股份有限公司製)將全部量回收。接著，在添加有 10mL 之預先保溫於 37°C 且含有 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)的平底試管(BM 機器公司製)中，使用上述注射器各滴入 1 滴細胞懸浮液。於 37°C 水浴中保溫 10 分鐘，確認形成直徑約 2mm 之不定形之膠原蛋白凝膠膠囊後，依照與試驗例 2 同樣之方法，以使最終濃度成為 0.04% 之方式添加脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)，輕輕攪拌使上述膠囊懸浮。接著，將該試管在 CO<sub>2</sub> 培養箱(5%CO<sub>2</sub>)內靜置培養 5 日。

【0161】 在含膠原蛋白凝膠膠囊之培養液中添加 25mL 之 PBS，藉由進行 400G 之離心處理 5 分鐘使膠原蛋白凝膠膠囊沈降，然後除去上清液。再度添加 25mL 之 PBS 並進行離心處理，以殘餘量成為 5mL 之方式除去上清液。在所得之液中添加 20  $\mu$  L 之 1%(W/V)之膠原蛋白酶 L (Collagenase L) (新田明膠股份有限公司製)後，於 37°C 振盪 2 小時。確認膠原蛋白凝膠溶解後，添加 10mL 之 PBS，藉由進行 400G 之離心處理 5 分鐘，使細胞沈降，然後除去上清液。添加 1mL 之胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四乙酸)溶液(WAKO 公司製)至所得之細胞，並於 37°C 保溫 5 分鐘。對於此所得之細胞懸浮液添加 4mL 之含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基，藉由進行 400G 之離心處理 5 分鐘，使細胞沈降，然後除去上清液。將所得到之細胞懸浮於 2mL

之與上述相同的培養基中，對其之一部分添加等量之台盼藍染色液 (Invitrogen 公司製)後，用血球計數盤 (Erma 販賣股份有限公司製)測定活細胞之數目。

【0162】其結果為：確認到包埋有 HepG2 細胞之膠原蛋白凝膠膠囊可藉由使用本發明之培養基組成物而以懸浮狀態培養，且細胞藉由該培養基組成物效率良好地增殖。並且，確認到本發明之培養基組成物與不含脫醯基化結蘭膠之既有培養基相比，細胞增殖之促進效果較為優良。

使用含有或未含有脫醯基化結蘭膠之培養基將 HepG2 細胞於膠原蛋白凝膠膠囊內培養 5 日時之細胞數係示於表 33 中。又，將包埋有 HepG2 細胞之膠原蛋白凝膠膠囊以本發明之培養基組成物培養時之懸浮狀態示於第 17 圖中。

【0163】 [表 33]

脫醯基化結蘭膠	HepG2 細胞數 (×10000/mL)
無	62.4
有	106.0

【0164】 (試驗例 34：使用過濾器之球體之回收試驗)

使用與試驗例 2 同樣之方法調製含有 0.015% 之脫醯基化結蘭膠 (KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)及 10% (v/v) 胎牛血清之 DMEM 培養基 (WAKO 公司製) 之組成物。又，調製不含脫醯基化結蘭膠之與上述相同的培養基作為對照組。使用與試驗例 2 同樣之方法製成 HepG2 細胞之球體，將球體分別以成為 86000 個細胞數之方式添加至

1mL 之上述調製之培養基後，於 37°C 靜置 1 小時，藉由目視觀察球體細胞之懸浮狀態。再者，在網格大小為 40  $\mu$  m 之細胞過濾器(Becton Dickinson 公司製)上添加所得之細胞懸浮液，於過濾器上捕捉。接著，藉由從過濾器之背面流入 10mL 之 PBS，將球體回收至 15mL 試管中，藉由進行 300G 之離心處理 5 分鐘，使球體沈降。除去上清液後，對球體添加 500  $\mu$  L 之胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四乙酸)溶液(WAKO 公司製)，於 37°C 保溫 5 分鐘。對於此所得之細胞懸浮液添加 1mL 之含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基，並對其之一部分添加等量之台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，用血球計數盤(Erma 販賣股份有限公司製)測定活細胞之數目。其結果為：確認到 HepG2 細胞之球體於上述之培養基組成物中能維持懸浮狀態。再者，確認到藉由用過濾器處理含 0.015% 之脫醯基化結蘭膠的該球體懸浮液，可將 HepG2 細胞之球體，以與不含脫醯基化結蘭膠之培養基同等之回收率回收細胞。將使用不含脫醯基化結蘭膠之培養基而以過濾器回收之 HepG2 細胞數當做 1 時之從含脫醯基化結蘭膠之培養基回收的相對細胞數示於表 34 中。

【0165】 [表 34]

脫醯基化結蘭膠	相對之 HepG2 細胞數
無	1.0
有	1.1

【0166】(試驗例 35：使用各種多糖類之混合劑的球體之細

## 胞懸浮試驗)

使用與試驗例 15 同樣之方法，將三仙膠(KELTROL CG，三晶股份有限公司製)、藻酸鈉(Duck Algin 酸 NSPM、Food Chemifa 製)、刺槐豆膠(GENUGUM RL-200-J，三晶股份有限公司製)、甲基纖維素(cP400，WAKO 股份有限公司製)、 $\kappa$ -角叉菜膠(GENUGEL WR-80-J，三晶股份有限公司製)、果膠(GENU Pectin LM-102AS，三晶股份有限公司製)或迪特膠(KELCO CRETE DG-F，三晶股份有限公司製)，與脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)組合而調製成混合的 DMEM/F-12 培養基組成物。使用與試驗例 2 同樣之方法製成 HepG2 細胞之球體，在 1mL 之上述調製之培養基分別添加數十個球體後，於 37°C 靜置 1 小時及 1 夜後，以目視觀察球體細胞之懸浮狀態。其結果為：確認到 HepG2 細胞之球體在全部之上述培養基組成物中均可維持懸浮狀態。再者，確認添加 2 倍體積之培養基後，藉由離心處理(500G，5 分鐘)所得之細胞懸浮液，可使 HepG2 細胞之球體沈降，而可回收細胞。以目視確認 1 夜後之球體之分散狀態時，以懸浮分散狀態為○，一部分沈降/分散狀態為△，沈降狀態為×進行評估。將結果示於表 35 及表 36 中。再者，表中之「-」表示未實施。



【0167】[表 35]

脫醯基化結蘭膠濃度 (%)	糖類添加濃度 (%)	甲基纖維素	迪特膠
0.005	0.05	-	△
	0.2	△	-

【0168】[表 36]

脫醯基 化結蘭 膠濃度 (%)	糖類添 加濃度 (%)	三仙膠	藻酸鈉	刺槐 豆膠	甲肌纖 維素	$\kappa$ -角叉 菜膠	果膠	迪特膠
0.01	0.05	-	-	-	-	○	-	○
	0.1	○	○	○	-	-	△	-
	0.2	-	-	-	○	-	-	-

【0169】珠粒與細胞之分散性比較 1

對於以上述(比較例)所調製之含有脫醯基化結蘭膠之培養基及含有甲基纖維素之培養基，進行葡聚糖珠粒 Cytodex(註冊商標) 1(GE Healthcare Life Sciences 公司製) 與 HeLa 細胞球體在其中的分散狀態之比較。將結果示於表 37 及表 38 中。由於 Cytodex1 與 HeLa 細胞球體之分散狀態相關性高，故可使用 Cytodex1 作為細胞球體模型。

【0170】[表 37]

脫醯基化結蘭膠濃度 %(w/v)	Cytodex1 懸浮/沉澱	HeLa 細胞 懸浮/沉澱
0.01	懸浮/一部分沉澱	懸浮
0.02	懸浮	懸浮
0.03	懸浮	懸浮
0.05	懸浮	懸浮

【0171】[表 38]

甲基纖維素 %(w/v)	Cytodex1 懸浮/沉澱	HeLa 細胞 懸浮/沉澱
0.1	沉澱	沉澱
0.3	沉澱	沉澱
0.6	沉澱	沉澱
1.0	沉澱	沉澱

【0172】珠粒與細胞之分散性比較 2

對於試驗例 15 中所調製之含有多糖及脫醯基化結蘭膠之培養基，進行聚苯乙烯珠粒(尺寸 500-600  $\mu\text{m}$ ，Polysciences Inc.製)及 HepG2 細胞球體在其中的分散狀態之比較。以懸浮分散狀態為○，一部分沈降/分散狀態為△，沈降狀態為×來進行評估。將結果示於表 39 中。由於聚苯乙烯珠粒與 HepG2 細胞球體之分散狀態相關性高，故可使用聚苯乙烯珠粒作為細胞球體模型。

【0173】[表 39]

	多糖 濃度	三仙膠		藻酸 Na		刺槐豆膠		迪特膠	
		PS 珠粒	HepG2 塊	PS 珠粒	HepG2 塊	PS 珠粒	HepG2 塊	PS 珠粒	HepG2 塊
脫醯基化結蘭	0.05%							○	○
膠濃度	0.1%	○	○	○	○	○	○	○	
0.01%(w/v)	0.2%	○		○		○			

【0174】(試驗例 36：來自稻子之植物癒傷組織之懸浮培養試驗)

將 50 粒用鹽水選所精選之日本晴稻之完熟種子(從湖東農業協同組合購入)移入 50mL 之聚苯乙烯試管(BD Falcon 公司製)中，用 50mL 之滅菌水洗淨後，在 30mL 之 70%乙醇水溶液中攪拌 1 分鐘。除去乙醇水後，添加 30mL 之 Kitchen haitee(商品名，為一種廚房漂白劑)(花王股份有限公司製)，並攪拌 1 小時。除去 Kitchen haitee 後，用 50mL 之滅菌水洗淨 4 次。將經滅菌之種子置床於 24 孔平底微量盤(康寧公司製)上，該平底微量盤之每孔中添加有 1.5mL 之含  $2 \mu\text{g/mL}$  之 2,4-二氯苯氧基乙酸(Sigma Aldrich 公司製)及瓊脂之 Murashige & Skoog 基礎培養基(M9274, Sigma Aldrich 公司製)。在  $30^{\circ}\text{C}$ ，16 小時暗處/8 小時暗處之條件下培養 3 星期，採取在種子之胚盤上所增殖之乳白色(cream colour)的癒傷組織(1 至 2mm)。

【0175】將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水

(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解，將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液調製培養基組成物，該培養基組成物係於含 2  $\mu$ g/mL 之 2,4-二氯苯氧基乙酸(Sigma Aldrich 公司製)之 Murashige & Skoog 基礎培養基(M9274, Sigma Aldrich 公司製)中添加有終濃度 0.03%(w/v)之脫醯基化結蘭膠者。將 15 個經上述方法調製之癒傷組織添加於 10mL 之所得之培養基組成物/平底試管(BM 機器公司製)中，於 25°C 進行振盪培養 7 日。其結果為：確認來自稻子之癒傷組織可藉由使用本發明之培養基組成物而以懸浮狀態培養，而該培養基組成物可以維持癒傷組織。將來自稻子之癒傷組織在本發明之培養基組成物中培養時之懸浮狀態示於第 18 圖中。

**【0176】(試驗例 37：使 HeLa 細胞分散時之細胞增殖試驗)**

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA, 三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解，將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液，調製培養基組成物，該培養基組成物係於含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)中以終濃度成為 0.015%(w/v)或 0.030%(w/v)之方式添加有脫醯基化結蘭膠者。接著，將人類子宮頸癌細胞株 HeLa(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 50000 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以成為每孔 200  $\mu$ L 之方式分注於 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製, # 3474)

之孔中。又，作為陰性對照組，係分注：於不含脫醯基化結蘭膠之與上述相同的培養基中懸浮有 HeLa 細胞者。接著，將該培養盤在 CO<sub>2</sub> 培養箱 (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) 內，以靜置狀態培養 8 日。於培養 3、8 日後之培養液添加 20 μL 之 WST-8 溶液 (同仁化學研究所股份有限公司製) 後，於 37°C 培養 100 分鐘，用吸光度計 (Molecular Device 公司製, SPECTRA MAX 190) 測定於 450nm 之吸光度，然後減去培養基單獨之吸光度，藉此測定活細胞之數目。細胞密度係將含有培養 8 日後之細胞的培養液以吸量管進行攪拌，將 20 μL 之所得到之攪拌液與 20 μL 之 0.4% 台盼藍染色液 (Invitrogen 公司製) 混合後，於顯微鏡下計測。

【0177】 其結果為：確認到 HeLa 細胞不會因使用本發明之培養基組成物使細胞凝集塊之大小變得過剩，而能以均勻分散之狀態培養，並於該培養基組成物中有效地增殖。將培養 8 日後之 HeLa 細胞凝集塊之顯微鏡觀察結果示於第 19 圖中。又，將靜置培養 3、8 日後之於 450nm 之吸光度 (相當於 HeLa 細胞之細胞數) 示於表 40 中。將培養 8 日後之 HeLa 細胞之細胞密度示於表 41 中。

【0178】[表 40]

培養日數		3	8
細胞數	陰性對照	0.119	0.191
	脫醯基化結蘭膠 0.015%	0.426	0.329
	脫醯基化結蘭膠 0.030%	0.547	0.423

【0179】[表 41]

實驗群	細胞密度( $10^4$ 細胞/mL)
陰性對照	3.7
脫醯基化結蘭膠 0.015%	8.9
脫醯基化結蘭膠 0.030%	11.2

【0180】(試驗例 38：使 A549 細胞及 HCT116 細胞分散時之細胞增殖試驗)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90℃ 加熱下攪拌使其溶解，將所得之水溶液於 121℃ 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液，調製培養基組成物，該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)或麥考伊氏 5a 培養基(DS Pharma Biomedical 公司製)中添加有終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠者。接著，將人類肺癌細胞株 A549(DS Pharma Biomedical 公司製)或人類大腸癌細胞株 HCT116(DS Pharma Biomedical 公司製)，以成為 50000 細胞/mL 之方式

接種在上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以每 1 孔成為 200  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製，# 3474)之孔中。又，作為陰性對照組，係分注：於不含脫醯基化結蘭膠之與上述相同的培養基中懸浮有 A549 細胞及 HCT116 細胞者。接著，將該培養盤於 CO<sub>2</sub> 培養箱(37°C，5%CO<sub>2</sub>)內，以靜置狀態培養 7 日。於培養 3、5、7 日後之培養液添加 20  $\mu$  L 之 WST-8 溶液(同仁化學研究所股份有限公司製)後，於 37°C 培養 100 分鐘，用吸光度計(Molecular Device 公司製，SPECTRA MAX 190)測定於 450nm 之吸光度，然後減去培養基單獨之吸光度，藉此測定活細胞之數目。

【0181】 其結果為：確認到 A549 細胞及 HCT116 細胞不會因使用本發明之培養基組成物使細胞凝集塊之大小變得過剩，而能以均勻分散之狀態培養，且於該培養基組成物中有效率地增殖。將培養 5 日後之 A549 細胞及 HCT116 細胞之凝集塊之顯微鏡觀察結果示於第 20 圖中。又，將靜置培養 3、5、7 日後之於 450nm 之吸光度(相當於 A549 細胞之細胞數)示於表 42 中，將於 450nm 之吸光度(相當於 HCT116 細胞之細胞數)示於表 43 中。

【0182】 [表 42]

培養日數		3	5	7
細胞數	陰性對照	0.152	0.139	0.213
	脫醯基化結蘭膠	0.435	1.406	2.041

【0183】[表 43]

培養日數		3	5	7
細胞數	陰性對照	0.177	0.114	0.115
	脫醯基化結蘭膠	1.444	1.959	2.191

【0184】(試驗例 39：使用 U 底之低接著表面培養盤時之細胞增殖試驗)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解，將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液，調製培養基組成物，該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)中添加有終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠者。接著，將人類子宮頸癌細胞株 HeLa(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 50000 細胞/mL 之方式接種在上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以每 1 孔成為 200  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔 U 底低接著表面微量盤(住友巴克萊製，# MS-9096U)之孔中。又，作為陰性對照組，係分注：於不含脫醯基化結蘭膠之與上述相同的培養基中懸浮有 HeLa 細胞者。接著，將該培養盤在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37°C，5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養 7 日。於培養 2、5、7 日後之培養液添加 20  $\mu$  L 之 WST-8 溶液(同仁化學研究所股份有限公司製)後，於 37°C 培養 100 分鐘，用吸光度計(Molecular Device 公司製，SPECTRA MAX 190)測



定於 450nm 之吸光度，然後減去培養基單獨之吸光度，藉此測定活細胞之數目。

【0185】其結果為：確認到藉由使用本發明之培養基組成物，即使在其他低接著培養盤中，亦可藉由該培養基組成物有效率地進行增殖。將靜置培養 2、5、7 日後之於 450nm 之吸光度(相當於 HeLa 細胞之細胞數)示於表 44 中。

【0186】[表 44]

培養日數		2	5	7
細胞數	陰性對照組	0.042	0.048	0.019
	脫醯基化結蘭膠	0.357	0.488	0.451

【0187】(試驗例 40：使用其他公司之低接著表面培養盤時之細胞增殖試驗)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解，將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液，調製培養基組成物，該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)中添加有終濃度 0.005%及 0.030%(w/v)之脫醯基化結蘭膠者。接著，將人類子宮頸癌細胞株 HeLa(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 50000 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以每 1 孔為 200  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底低接著表面微量盤(IWAKI 製，# Ez-BindShut)之孔中。又，

作為陰性對照組，係分注：於不含脫醯基化結蘭膠之與上述相同的培養基中懸浮有 HeLa 細胞者。接著，將該培養盤於 CO<sub>2</sub> 培養箱(37°C，5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養 7 日。於培養 3 日後之培養液添加 20 μL 之 WST-8 溶液(同仁化學研究所股份有限公司製)後，於 37°C 培養 100 分鐘，用吸光度計(Molecular Device 公司製，SPECTRA MAX 190)測定於 450nm 之吸光度，然後減去培養基單獨之吸光度，藉此測定活細胞之數目。

【0188】其結果為：確認到藉由使用本發明之培養基組成物，即使在其他低接著培養盤中，亦可以該培養基組成物有效率地增殖。將靜置培養 3 日後之於 450nm 之吸光度(相當於 HeLa 細胞之細胞數)示於表 45 中。

【0189】[表 45]

培養日數		3
細胞數	陰性對照組	0.064
	脫醯基化結蘭膠 0.005%	0.140
	脫醯基化結蘭膠 0.030%	0.257

【0190】(試驗例 41：與 Happy Cell ASM 培養基之細胞增殖比較試驗)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解，將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液，調製培養

基組成物，該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)中添加有終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠者。Happy Cell ASM 培養基(biocroi 公司製)係以成為預先指定濃度(以 1:1 混合)之方式用 DMEM 培養基(WAKO 公司製)來調製。接著，將人類子宮頸癌細胞株 HeLa(DS Pharma Biomedical 公司製)或人類肺癌細胞株 A549(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 50000 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物或 Happy Cell ASM 培養基組成物後，以每 1 孔為 200  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製，# 3474)之孔中。又，作為陰性對照組，係分注於不含脫醯基化結蘭膠之與上述相同的培養基中懸浮有 HeLa 細胞及 A549 細胞者。接著，將該培養盤在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37°C，5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養 5 日。於培養 3、5 日後之培養液添加 20  $\mu$  L 之 WST-8 溶液(同仁化學研究所股份有限公司製)後，於 37°C 培養 100 分鐘，用吸光度計(Molecular Device 公司製，SPECTRA MAX 190)測定於 450nm 之吸光度，然後減去培養基單獨之吸光度，藉此測定活細胞之數目。

【0191】 其結果為：確認到藉由使用本發明之培養基組成物，與 Happy Cell ASM 相比，在該培養基組成物中可較有效率地增殖。將靜置培養 3、5 日後之於 450nm 之吸光度(相當於 HeLa 細胞之細胞數)示於表 46 中；將於 450nm 之吸光度(相當於 A549 細胞之細胞數)示於表 47 中。

【0192】[表 46]

培養日數		3	5
細胞數	陰性對照組	0.111	0.091
	脫醯基化結蘭膠	0.288	0.325
	Happy Cell ASM	0.074	0.063

【0193】[表 47]

培養日數		3	5
細胞數	陰性對照組	0.244	0.262
	脫醯基化結蘭膠	0.696	2.177
	Happy Cell ASM	0.286	0.546

## 【0194】(試驗例 42：使用其他多糖類時之細胞增殖試驗)

將迪特膠(KELCO CRETE DG-F, 三晶股份有限公司製)以成為 1.5%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後,藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解,並將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液,調製培養基組成物,該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(日水製藥公司製)中添加有終濃度 0.2%及 0.3%(w/v)之迪特膠者。接著,將人類肺癌細胞株 A549(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 50000 細胞/mL 之方式接種於上述之添加有迪特膠之培養基組成物後,以每 1 孔為 200  $\mu$ L 之方式分注於 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製, # 3474)之孔中。又,作為陰性對照組,係分注:於不

含迪特膠之與上述相同的培養基中懸浮有 A549 細胞者。接著，將該培養盤在 CO<sub>2</sub> 培養箱 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 內以靜置狀態培養 3 日。於培養 3 日後之培養液添加 20  $\mu$  L 之 WST-8 溶液 (同仁化學研究所股份有限公司製) 後，於 37°C 培養 100 分鐘，用吸光度計 (Molecular Device 公司製, SPECTRA MAX 190) 測定於 450nm 之吸光度，然後減去培養基單獨之吸光度，藉此測定活細胞之數目。

【0195】 其結果為：藉由使用本發明之培養基組成物，可於含其他多糖類之該培養基組成物中有效率地增殖。將靜置培養 3 日後之於 450nm 之吸光度 (相當於 A549 細胞之細胞數) 示於表 48 中。

【0196】 [表 48]

培養日數		3
細胞數	陰性對照組	0.696
	迪特膠 0.1%	1.781
	迪特膠 0.030%	2.367

【0197】 (試驗例 43：使用各種抗癌劑之細胞增殖試驗)

將脫醯基化結蘭膠 (KELCOGEL CG-LA, 三晶股份有限公司製) 以成為 0.3% (w/v) 之方式懸浮於超純水 (Milli-Q 水) 後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解，並將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液，調製培養基組成物，該培養基組成物係在含 10% (v/v) 胎牛血清之 DMEM 培養基 (WAKO 公司製) 中添加有終濃度 0.030% (w/v)

之脫醯基化結蘭膠及終濃度 0.001、0.01、0.1、1  $\mu$  M 之各種抗癌劑者。抗癌劑係使用阿德力黴素(Adriamycin)(WAKO 公司製)、紫杉醇(Paclitaxel)(WAKO 公司製)或絲裂黴素 C (Mitomycin C)(WAKO 公司製)。接著，將人類子宮頸癌細胞株 HeLa(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 50000 細胞/mL 之方式接種在上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以每 1 孔為 200  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製，# 3474)之孔中。

再者，就無添加者而言，係分注於只含終濃度 0.030% (w/v)之脫醯基化結蘭膠之與上述相同的培養基中懸浮有 HeLa 細胞者。接著，將該培養盤在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37°C，5%CO<sub>2</sub>)內，以靜置狀態培養 7 日。於培養 3、5、7 日後之培養液添加 20  $\mu$  L 之 WST-8 溶液(同仁化學研究所股份有限公司製)後，於 37°C 培養 100 分鐘，用吸光度計(Molecular Device 公司製，SPECTRA MAX 190)測定於 450nm 之吸光度，然後減去培養基單獨之吸光度，藉此測定活細胞之數目。細胞密度係將含培養 5 日後之細胞的培養液以吸量管進行攪拌，將 20  $\mu$  L 之攪拌液與 20  $\mu$  L 之 0.4%台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)混合，於顯微鏡下計測。

【0198】 其結果為：確認到藉由使用本發明之培養基組成物之細胞增殖試驗法，可有效率地評估抗癌劑。又，將靜置培養 3、5、7 日後之於 450nm 之吸光度(相當於 HeLa 細胞之細胞數)示於表 49 中。將 5 日後之 HeLa 細胞之細胞密度示於表 50 中。

【0199】 [表 49]

培養日數		3	5	7
細胞數	無添加	0.200	0.254	0.242
	阿德力黴素 0.001 $\mu$ M	0.237	0.246	0.184
	阿德力黴素 0.01 $\mu$ M	0.230	0.098	0.068
	阿德力黴素 0.1 $\mu$ M	0.037	0.005	<0
	阿德力黴素 1 $\mu$ M	<0	<0	<0
	紫杉醇 0.001 $\mu$ M	0.276	0.223	0.222
	紫杉醇 0.01 $\mu$ M	0.019	<0	<0
	紫杉醇 0.1 $\mu$ M	<0	<0	<0
	紫杉醇 1 $\mu$ M	<0	<0	<0
	絲裂黴素 C 0.01 $\mu$ M	0.089	0.016	<0
	絲裂黴素 C 0.1 $\mu$ M	0.032	<0	<0
	絲裂黴素 C 1 $\mu$ M	<0	<0	<0

【0200】[表 50]

實驗群	細胞密度( $10^4$ 細胞/mL)
無添加	4.8
阿德力黴素 0.001 $\mu$ M	5.1
阿德力黴素 0.01 $\mu$ M	2.6
阿德力黴素 0.1 $\mu$ M	1.7
阿德力黴素 1 $\mu$ M	0.6
紫杉醇 0.001 $\mu$ M	5.3
紫杉醇 0.01 $\mu$ M	1.6
紫杉醇 0.1 $\mu$ M	0.9
紫杉醇 1 $\mu$ M	0.2
絲裂黴素 C 0.01 $\mu$ M	1.0
絲裂黴素 C 0.1 $\mu$ M	0.4
絲裂黴素 C 1 $\mu$ M	0.1

## 【0201】(試驗例 44：人類初代肝細胞之維持及功能試驗)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解，將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液，調製培養基組成物，該培養基組成物係在含添加劑(HCMsingleQuots (註冊商標)、無脂肪酸牛血清白蛋白(BSA-Fatty acid-fre)、EGF、抗壞血酸、轉鐵蛋白、胰島素、GA-1000、21-半琥



珀酸氫化皮質酮(hydrocortisone 21-hemisuccinate)；Lonza Japan 股份有限公司製)之 HBM 培養基 Lonza Japan 股份有限公司製)中添加有終濃度 0.015%或 0.030%(w/v)之脫醯基化結蘭膠者。接著，將凍結之人類初代肝細胞(Xenotech 公司製)以成為 250000 細胞/mL 之方式接種在上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以每 1 孔為 200  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔 U 底超低接著性表面微量盤(住友巴克萊股份有限公司製，PrimeSurface，MS-9096U)之孔中。又，作為陰性對照組，係分注：於不含脫醯基化結蘭膠之與上述相同的培養基中懸浮有人類初代肝細胞者。接著，將該培養盤於 CO<sub>2</sub> 培養箱(37°C，5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養 3 日。

#### 【0202】

##### 1.活細胞數測定

於培養 4 小時、8 小時、1 日後之培養液添加 20  $\mu$  L 之 WST-8 溶液(同仁化學研究所股份有限公司製)後，於 37°C 培養 100 分鐘，用吸光度計(Molecular Device 公司製，SPECTRA MAX 190)測定於 450nm 之吸光度，藉此測定活細胞之數目。

#### 【0203】

##### 2.白蛋白分泌量之解析

回收培養 3 日後之含肝細胞的培養液，藉由離心(400g，3 分鐘)回收培養上清液。培養基中之人類白蛋白濃度，係使用白蛋白 ELISA 定量套組(Albumin ELISA Quantitation Kit)(Bethyl Laboratories 公司製)來測定。

## 【0204】

3.藉由即時聚合酶鏈鎖反應(real-time PCR)法(亦稱即時PCR法)之 mRNA 之表現解析

回收 8 小時培養後之含肝細胞的培養液，藉由離心分離(400g，3 分鐘)回收細胞。使用 RNeasy Mini kit(QIAGEN 公司製)從細胞萃取全部 RNA。使用全部 RNA 及 PrimeScript (註冊商標) RT Master Mix(Takara Bio 公司製)，並用 GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems 公司製)進行逆轉錄反應，合成 cDNA。使用於 PCR 反應中之各 cDNA 樣本，係使用經分注並以滅菌水稀釋成 1/10 者。又，使用於檢量線之樣本，係設定為使用經分注並混合之 cDNA，以 3 倍公比稀釋至 1/3 至 1/243 之定量範圍內。PCR 反應係使用各 cDNA 樣本、檢量樣本、Premix Ex Taq(註冊商標)(Takara Bio 公司製)及各種 Taqman 探針(Applied Biosystems 公司製)，用 7500 Real Time PCR System(Applied Biosystems 公司製)實施。特異性係以 GAPDH 之 mRNA 作為內在性對照，各 mRNA 之表現係以 GAPDH(甘油醛 3-磷酸酯脫氫酶；glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)之值補正，以陰性對照組當做 100%而算出。

【0205】 所用之各探針(Applied Biosystems 公司製)如以下所示。

GAPDH：HS99999905

白蛋白：HS99999922

Cyp3A4：HS00604506

Cyp2C9 : HS02383631

PXR(孕甾烷 X 受體(Pregnane X receptor)): HS01114267

ApoA1(脂蛋白元 A1): HS00163641

【0206】 其結果為：確認到本發明之培養基組成物，藉由將人類初代肝細胞以分散之狀態保存、保護，而具有抑制活細胞數之減少之效果。又確認到在該培養基組成物中與白蛋白產生能力及藥物動態有關之 mRNA 群之表現能力係比陰性對照組高。將靜置培養 4 小時、8 小時、1 日後之於 450nm 之吸光度(相當於人類初代肝細胞之細胞數)示於表 51 中。將靜置培養 3 日後之培養上清液中之白蛋白值示於表 52 中。又，將以靜置培養 8 小時後之陰性對照組當做 100%時之各 mRNA 表現值示於表 53 中。將人類初代肝細胞進行 4 小時培養時之細胞狀態示於第 21 圖中。

【0207】 [表 51]

培養日數		4 小時	8 小時	1 日
細胞數	陰性對照組	0.763	0.470	0.267
	脫醯基化結蘭膠 0.015%	1.223	0.779	0.376
	脫醯基化結蘭膠 0.030%	0.918	0.739	0.352

【0208】 [表 52]

實驗群	白蛋白 (ng/mL)
陰性對照組	452
脫醯基化結蘭膠 0.015%	614
脫醯基化結蘭膠 0.030%	685

【0209】[表 53]

	陰性對照組	脫醯基化結蘭膠 0.015%	脫醯基化結蘭膠 0.030%
白蛋白	100	124	135
Cyp3A4	100	101	113
Cyp2C9	100	106	125
PXR	100	117	202
ApoA1	100	95	153

## 【0210】(試驗例 45: 食蟹猴初代肝細胞之維持及功能試驗)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA, 三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後, 藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解, 將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液, 調製培養基組成物, 該培養基組成物係在添加有添加劑(HCMsingleQuots (註冊商標)、無脂肪酸牛血清白蛋白、EGF、抗壞血酸、轉鐵蛋白、胰島素、GA-1000、21-半琥珀酸氫化皮質酮(Lonza Japan 股份有限公司製)之 HBM 培養基(Lonza Japan 股份有限公司製)中添加有終濃度 0.015%或 0.030%(w/v)之脫醯基化結蘭膠者。接著, 將凍結之食蟹猴初代肝細胞(Ina Research 股份有限公司製)以成為 250000 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後, 以每 1 孔為 200  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔 U 底超低接著性表面微量盤(住友巴克萊股份有限公司製, PrimeSurface, MS-9096U)

之孔中。又，作為陰性對照組，係分注：於不含脫醯基化結蘭膠之與上述相同的培養基中懸浮有食蟹猴初代肝細胞者。接著，將本培養盤在 CO<sub>2</sub> 培養箱 (37°C，5%CO<sub>2</sub>) 內以靜置狀態培養 3 日。

### 【0211】

#### 1. 活細胞數測定

於培養 4 小時、8 小時、1 日、3 日後之培養液添加 20  $\mu$  L 之 WST-8 溶液 (同仁化學研究所股份有限公司製) 後，於 37°C 培養 100 分鐘，用吸光度計 (Molecular Device 公司製，SPECTRA MAX 190) 測定於 450nm 之吸光度，藉此測定活細胞之數目。

### 【0212】

#### 2. 白蛋白分泌量之解析

回收培養 3 日後之含肝細胞的培養液，並藉由離心分離 (400g，3 分鐘) 回收培養上清液。培養基中之人類白蛋白濃度，係使用白蛋白 ELISA 定量套組 (Bethyl Laboratories 公司製) 來測定。

### 【0213】

#### 3. 藉由即時 PCR 法之 mRNA 之表現解析

回收培養 1、2、3 日後之含肝細胞的培養液，並藉由離心分離 (400g，3 分鐘) 回收細胞。使用 RNeasy Mini kit (QIAGEN 公司製) 從細胞萃取全部 RNA。使用全部 RNA 及 PrimeScript (註冊商標) RT Master Mix (Takara Bio 公司製)，用 GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 公司

製)進行逆轉錄反應，合成 cDNA。用於 PCR 反應中之各 cDNA 樣本，係使用經分注並以滅菌水稀釋至 1/10 者。又用於檢量線之樣本，係設定為使用經分注並混合之 cDNA，並以 3 倍公比稀釋至 1/3 至 1/243 之定量範圍內。PCR 反應係使用各 cDNA 樣本、檢量樣本、Premix Ex Taq(註冊商標)(Takara Bio 公司製)及各種 Taqman 探針(Applied Biosystems 公司製)，用 7500 Real Time PCR System(Applied Biosystems 公司製)實施。特異性係以 GAPDH 之 mRNA 為內在性對照，各 mRNA 之表現以 GAPDH 之值補正而算出。

【0214】所用之各探針(Applied Biosystems 公司製)如以下所示。

GAPDH：Rh02621745

白蛋白：Rh02789672

ApoA1(脂蛋白元 A1)：Rh02794272

【0215】其結果為：確認到本發明之培養基組成物係具有藉由保護食蟹猴初代肝細胞而抑制活細胞數之減少的效果。又確認到在該培養基組成物中所培養之肝細胞，白蛋白產生能力與白蛋白及 ApoA1 之 mRNA 群之表現能力比陰性對照組高。將靜置培養 4 小時、8 小時、1 日、3 日後之於 450nm 之吸光度(相當於食蟹猴初代肝細胞之細胞數)示於表 54 中。將靜置培養 3 日後之培養上清液中之白蛋白值示於表 55 中。又將靜置培養 2、3 日後，將陰性對照組當做 100%時之白蛋白之 mRNA 表現值示於表 56 中，將 ApoA1 之 mRNA 表現值示於表 57 中。將食蟹猴初代肝細胞

進行 4 小時培養時之細胞狀態示於第 22 圖中。

【0216】[表 54]

培養日數		4 小時	8 小時	1 日	3 日
細胞數	陰性對照組	0.442	0.328	0.267	0.240
	脫醯基化結 蘭膠 0.015%	0.708	0.563	0.360	0.266
	脫醯基化結 蘭膠 0.030%	0.662	0.542	0.381	0.251

【0217】[表 55]

實驗群組	白蛋白 (ng/mL)
陰性對照組	420
脫醯基化結蘭膠 0.015%	485
脫醯基化結蘭膠 0.030%	499

【0218】[表 56]

白蛋白	陰性對照組	脫醯基化結 蘭膠 0.015%	脫醯基化結 蘭膠 0.030%
第 2 日	100	124	111
第 3 日	100	132	153

【0219】[表 57]

ApoA1	陰性對照組	脫醯基化結蘭膠 0.015%	脫醯基化結蘭膠 0.030%
第 2 日	100	139	221
第 3 日	100	118	105

【0220】(試驗例 46: 塗覆有膠原蛋白之微量盤中之肝細胞之維持及功能試驗)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA, 三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後, 藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解, 將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液, 調製培養基組成物, 該培養基組成物係在添加有添加劑(HCMsingleQuots(註冊商標)、無脂肪酸牛血清白蛋白、EGF、抗壞血酸、轉鐵蛋白、胰島素、GA-1000、21-半琥珀酸氫化皮質酮(Lonza Japan 股份有限公司製)之 HBM 培養基(Lonza Japan 股份有限公司製)中添加有終濃度 0.015%或 0.030%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物。接著, 將凍結之食蟹猴初代肝細胞(Ina Research 股份有限公司製)以成為 100000 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠的培養基組成物後, 以每 1 孔為 200  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔塗覆有膠原蛋白之微量盤(IWAKI 公司製, 4860-010)之孔中。又, 作為陰性對照組, 係分注: 於不含脫醯基化結蘭膠之與上述相同的培養基中懸浮有食蟹猴初代肝細胞者。接著, 將該培養盤在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養 3 日。

【0221】

#### 1. 活細胞數測定

於培養 1 日後之培養液添加 20  $\mu$  L 之 WST-8 溶液(同仁化學研究所股份有限公司製)後, 於 37°C 培養 100 分鐘,



用吸光度計(Molecular Device 公司製，SPECTRA MAX 190)測定於 450nm 之吸光度，藉此測定活細胞之數目。

【0222】

2.白蛋白分泌量之解析

回收培養 3 日後之含肝細胞的培養液，並藉由離心分離(400g，3 分鐘)回收培養上清液。培養基中之人類白蛋白濃度係使用白蛋白 ELISA 定量套組(Bethyl Laboratories 公司製)來測定。

【0223】其結果為：確認到藉由使用本發明之培養基組成物，即使使用塗覆有膠原蛋白之培養盤，仍可以該培養基組成物保護初代肝細胞而抑制活細胞數之減少。又確認到在該培養基組成物中之白蛋白產生能力比陰性對照組高。將靜置培養 1 日後之於 450nm 之吸光度(相當於食蟹猴初代肝細胞之細胞數)示於表 58 中。又將靜置培養 3 日後之培養上清液中之白蛋白值示於表 59 中。

【0224】[表 58]

培養日數		1 日
細胞數	陰性對照組	0.038
	脫醯基化結蘭膠 0.015%	0.067
	脫醯基化結蘭膠 0.030%	0.087

【0225】[表 59]

實驗群組	白蛋白 (ng/mL)
陰性對照組	97
脫醯基化結蘭膠 0.015%	161
脫醯基化結蘭膠 0.030%	157

【0226】(試驗例 47：與 Happy Cell ASM 培養基之比較試驗)

將脫醯基化結蘭膠 (KELCOGEL CG-LA, 三晶股份有限公司製) 以成為 0.3% (w/v) 之方式懸浮於超純水 (Milli-Q 水) 後, 藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解, 將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液調製培養基組成物, 該培養基組成物係於添加有添加劑 (HCMsingleQuots (註冊商標)、無脂肪酸牛血清白蛋白、EGF、抗壞血酸、轉鐵蛋白、胰島素、GA-1000、21-半琥珀酸氫化皮質酮 (Lonza Japan 股份有限公司製) 之 HBM 培養基 (Lonza Japan 股份有限公司製) 中以 1:1 之比例混入 DMEM 培養基 (WAKO 公司製), 然後添加終濃度 0.015% (w/v) 之脫醯基化結蘭膠而製成者。Happy Cell ASM 培養基 (bioCroi 公司製) 係以成為預先指定之濃度 (以 1:1 混合) 的方式, 用 DMEM 培養基調製。接著, 將凍結之人類初代肝細胞 (Xenotech 公司製) 以成為 250000 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠的培養基組成物或 Happy Cell ASM 培養基組成物後, 以每 1 孔為 200  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔 U 底超低接著性表面微

量盤(住友巴克萊股份有限公司製)之孔中。又，作為陰性對照組，係分注：於不含脫醯基化結蘭膠之與上述相同的培養基中懸浮有人類初代肝細胞者。接著，將該培養盤在CO<sub>2</sub>培養箱(37°C，5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養6日。

【0227】

1.活細胞數測定

於培養2小時、4小時、8小時、1日、4日、6日後之培養液添加20 $\mu$ L之WST-8溶液(同仁化學研究所股份有限公司製)後，於37°C培養100分鐘，用吸光度計(Molecular Device公司製，SPECTRA MAX 190)測定於450nm之吸光度，藉此測定活細胞之數目。

【0228】其結果為：確認到藉由使用本發明之培養基組成物，與Happy Cell ASM比較，保護初代肝細胞而抑制活細胞數之減少的效果較為優良。將靜置培養2小時、4小時、8小時、1日、4日、6日後之於450nm之吸光度(相當於人類初代肝細胞之細胞數)示於表60中。

【0229】[表60]

	培養日數	2小時	4小時	1日	4日	6日
細胞數	陰性對照組	1.162	0.544	0.396	0.336	0.241
	脫醯基化 結蘭膠 0.015%	2.057	1.060	0.478	0.390	0.314
	Happy Cell ASM	1.184	0.564	0.368	0.229	0.223

**【0230】(試驗例 48：化合物對肝細胞之毒性試驗)**

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解，將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。另一方面，針對 DMEM 培養基(WAKO 公司製)，將 HepG2 細胞以成為 100000 細胞/mL 之方式混合，將細胞懸浮液以每 1 孔為 100  $\mu$  L 之方式分注在 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製，# 3474)之孔中。針對上述之脫醯基化結蘭膠水溶液，添加各濃度之曲格列酮(Troglitazone)(WAKO 公司製，# 71750)，將 10  $\mu$  L 之所得之溶液添加於 100  $\mu$  L 之上述細胞懸浮液。藉由以上之處理，調製 DMSO 濃度為 0.18%(v/v)，曲格列酮濃度為 20.0、40.0、60.0、100 ( $\mu$  mol/L)，脫醯基化結蘭膠濃度為 0.015%(w/v)之細胞懸浮液。接著，將該培養盤在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37°C，5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養 1 日。

**【0231】****1.活細胞數測定**

將 50  $\mu$  L 之培養 1 日後之培養液分注於 96 孔滴定培養盤(96 well titer plate)(康寧公司製)，於該培養液添加 50  $\mu$  L 之 CellTiter-Glo(註冊商標)試藥(Promega 公司製)後，並於室溫培養 10 分鐘，藉由用多功能培養盤判讀儀(multiplate reader)(Molecular Device 公司製，FlexStation3)測定發光強度(RLU 值)而測定活細胞之數目。

**2.乳酸脫氫酵素(LDH)活性測定**

於 100  $\mu$  L 之培養 1 日後之培養液添加 100  $\mu$  L 之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)，並將每個培養盤以 440G 離心 15 分鐘。將 100  $\mu$  L 之上清液分注於 96 孔滴定培養盤(康寧公司製)中，添加 100  $\mu$  L 之細胞傷害性檢測套組(Roche Applied Science 公司製)之反應混合液，於室溫且為遮光下靜置 30 分鐘。接著，依照上述套組之規程，藉由以吸光度計(Molecular Device 公司製，SPECTRA MAX 190)測定於 490nm 之吸光度(參考值：600nm)，藉此測定受到障礙之細胞之比率，亦即細胞障礙率(%)。

【0232】其結果為：確認到使用本發明之培養基組成物，曲格列酮具有肝細胞之細胞障礙性。將培養 1 日後而未添加之條件當做 1 時之相對細胞數及細胞障礙率(%)示於表 61 中。

【0233】[表 61]

培養日數	曲格列酮( $\mu$ M)				
陰性對照組	0	20	40	60	100
相對細胞數	1.00	0.68	0.50	0.48	0.39
細胞障礙率(%)	0	2.68	14.7	22.5	60.7

【0234】(試驗例 49：使用 A549 細胞並藉由 ATP 定量法之細胞增殖試驗)

將脫鹽基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解，將所得之水溶液於

121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液，調製培養基組成物，該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)中添加有終濃度 0.005%(w/v)、0.015%(w/v)或 0.030%(w/v)之脫醯基化結蘭膠者。接著，將人類肺癌細胞株 A549(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 100000 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以每 1 孔為 100  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製，# 3474)之孔中。又，作為陰性對照組，係分注：在不含脫醯基化結蘭膠之與上述相同的培養基中懸浮有 A549 細胞者。接著，將該培養盤在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37°C，5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養 5 日。於培養 1、3、5 日後之培養液添加 100  $\mu$  L 之 ATP 試藥(CellTiter-Glo(註冊商標)發光法細胞活力檢測試劑盒(Luminescent Cell Viability Assay)，Promega 公司製)並使其懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，用 FlexStation3(Molecular Device 公司製)測定發光強度(RLU 值)，然後減去培養基單獨之發光值，藉此測定活細胞之數目。WST-8 測定，係在培養 3 日後之細胞添加 10  $\mu$  L 之 WST-8 溶液(同仁化學研究所股份有限公司製)後，於 37°C 培養 100 分鐘，用吸光度計(Molecular Device 公司製，SPECTRA MAX 190)測定於 450nm 之吸光度，然後減去培養基單獨之吸光度，藉此測定活細胞之數目。

【0235】其結果為：以 ATP 測定法亦確認到 A549 細胞可藉由使用本發明之培養基組成物而有效率地增殖。將

靜置培養 1、3、5 日後之 RLU 值(ATP 測定，發光強度)示於表 62 中。將培養 3 日後之於 450nm 之吸光度(WST-8)及 RLU 值(ATP 測定，發光強度)示於表 63 中。

【0236】 [表 62]

培養日數		1	3	5
細胞數	陰性對照組	7931	11183	16169
	脫醯基化結蘭膠 0.005%	7931	17623	29535
	脫醯基化結蘭膠 0.015%	8567	21021	39506
	脫醯基化結蘭膠 0.030%	7688	20492	39020

【0237】 [表 63]

實驗群組	WST-8	ATP
陰性對照組	0.617	11183
脫醯基化結蘭膠 0.005%	0.906	17623
脫醯基化結蘭膠 0.015%	1.149	21021
脫醯基化結蘭膠 0.030%	1.239	20492

【0238】(試驗例 50：使用抗癌劑之細胞增殖試驗與單層培養法之比較)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90℃ 加熱下攪拌使其溶解，將所得之水溶液於 121℃ 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液，調製培養基組成物，該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之

DMEM 培養基(WAKO 公司製)中添加有終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物、或不含脫醯基化結蘭膠之未經添加的培養基組成物。接著，將人類子宮頸癌細胞株 HeLa(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 37000 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製，# 3474)之孔中。單層培養法為將人類子宮頸癌細胞株 HeLa 以成為 37000 細胞/mL 之方式接種於上述不含脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底微量盤(康寧公司製，# 3585)之孔中。各培養盤係在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37 °C，5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養。在培養第 1 日，以使終濃度成為 0.001 至 1  $\mu$  M 之方式，分別添加 15  $\mu$  L 之含 10 倍濃度之各種抗癌劑及終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物(添加脫醯基化結蘭膠之群組)，以及只含有 10 倍濃度之各種抗癌劑之培養基組成物(單層培養群組)，再繼續培養 3 日。抗癌劑係使用阿德力黴素(WAKO 公司製)、紫杉醇(WAKO 公司製)或絲裂黴素 C(WAKO 公司製)。接著，於第 4 日之培養液添加 150  $\mu$  L 之 ATP 試藥(CellTiter-Glo(註冊商標)發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega 公司製)並使其懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，用 FlexStation3(Molecular Device 公司製)測定發光強度(RLU 值)，然後減去培養基單獨之發光值，藉此測定活細胞之數目。WST-8 測定，係在添加 15  $\mu$  L 之 WST-8 溶液(同仁化



學研究所股份有限公司製)後，於 37°C 培養 100 分鐘，用吸光度計(Molecular Device 公司製，SPECTRA MAX 190)測定於 450nm 之吸光度，然後減去培養基單獨之吸光度，藉此測定活細胞之數目。

【0239】其結果為：可知藉由使用本發明培養基組成物的細胞增殖試驗法與單層培養法相比，係顯示較強之絲裂黴素 C 之藥效。將靜置培養第 4 日之 RLU 值(ATP 測定，發光強度)之 % 對照值(%Control 值)示於表 64 中。將靜置培養第 4 日於 450nm 之吸光度(WST-8 測定)之 % 對照值示於表 65 中。

【0240】[表 64]

培養條件		單層培養 群組	添加脫醯基化結蘭 膠之群組
%對照	DMSO	100	100
	阿德力黴素 0.001 $\mu$ M	97	96
	阿德力黴素 0.01 $\mu$ M	97	81
	阿德力黴素 0.1 $\mu$ M	65	41
	阿德力黴素 1 $\mu$ M	5	15
	紫杉醇 0.001 $\mu$ M	95	107
	紫杉醇 0.003 $\mu$ M	36	34
	紫杉醇 0.01 $\mu$ M	10	18
	紫杉醇 0.03 $\mu$ M	4	17
	絲裂黴素 C 0.005 $\mu$ M	99	83
	絲裂黴素 C 0.05 $\mu$ M	89	48
	絲裂黴素 C 0.5 $\mu$ M	86	29

【0241】[表 65]

培養條件		單層培養群組	添加脫醯基化結蘭膠之群組
%對照	DMSO	100	100
	阿德力黴素 0.001 $\mu$ M	109	105
	阿德力黴素 0.01 $\mu$ M	107	86
	阿德力黴素 0.1 $\mu$ M	74	36
	阿德力黴素 1 $\mu$ M	6	4
	紫杉醇 0.001 $\mu$ M	99	125
	紫杉醇 0.003 $\mu$ M	32	33
	紫杉醇 0.01 $\mu$ M	10	5
	紫杉醇 0.03 $\mu$ M	5	3
	絲裂黴素 C 0.005 $\mu$ M	101	94
	絲裂黴素 C 0.05 $\mu$ M	83	37
	絲裂黴素 C 0.5 $\mu$ M	71	12

【0242】(試驗例 51: 使用細胞凋亡誘導劑之細胞增殖試驗

與單層培養法的比較)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA, 三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後,藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解,將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液,調製培養基組成物,該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)中添加有終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物,或不含脫醯基化結蘭膠之未經添加的培養基組成物。接著,將人類子宮頸癌細胞株 HeLa(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 37000 細胞/mL 之方式接種在上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後,以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製, # 3474)之孔中。單層培養法為將人類子宮頸癌細胞株 HeLa 以成為 37000 細胞/mL 之方式接種於上述不含脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後,以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底微量盤(康寧公司製, # 3585)之孔中。各培養盤係在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37 °C, 5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養。在培養第 1 日,以使終濃度成為 0.2 至 10  $\mu$  M 之方式,分別添加 15  $\mu$  L 之含 10 倍濃度之各種細胞凋亡誘導劑及終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物(添加脫醯基化結蘭膠之群組),以及只含 10 倍濃度之各種細胞凋亡誘導劑之培養基組成物(單層培養群組),再繼續培養 3 日。關於細胞凋亡誘導劑,係使用細胞凋亡誘導劑套組(Apoptosis Inducer set)

(Merck Millipore 公司製，APT800：放線菌素 D(Actinomycin D)、喜樹鹼(Camptothecin)、環己醯亞胺(Cycloheximide，亦稱放線菌酮)、地塞米松(Dexamethasone)、依托泊苷(Etoposide))。於第 4 日之培養液添加 150  $\mu$  L 之 ATP 試藥(CellTiter-Glo(註冊商標)發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega 公司製)並使其懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，用 FlexStation3(Molecular Device 公司製)測定發光強度(RLU 值)，然後減去培養基單獨之發光值，藉此測定活細胞之數目。WST-8 測定係添加 15  $\mu$  L 之 WST-8 溶液(同仁化學研究所股份有限公司製)後，於 37°C 培養 100 分鐘，用吸光度計(Molecular Device 公司製，SPECTRA MAX 190)測定於 450nm 之吸光度，然後減去培養基單獨之吸光度，藉此測定活細胞之數目。

【0243】 其結果為：可知藉由使用本發明之培養基組成物的細胞增殖試驗法，與單層培養法相比，係顯示較強之喜樹鹼及依托泊苷之藥效。將靜置培養第 4 日之 RLU 值(ATP 測定，發光強度)之%對照值示於表 66 中。將靜置培養第 4 日之於 450nm 之吸光度(WST-8 測定)的%對照值示於表 67 中。

【0244】[表 66]

培養條件		單層培 養群組	添加脫醯基化結蘭膠 之群組
%對照	DMSO	100	100
	阿德力黴素 1 $\mu$ M	3	5
	放線菌素 D 1 $\mu$ M	2	4
	放線菌素 D 10 $\mu$ M	2	6
	喜樹鹼 0.2 $\mu$ M	63	27
	喜樹鹼 2 $\mu$ M	44	11
	環己醯亞胺 10 $\mu$ M	29	9
	環己醯亞胺 100 $\mu$ M	9	4
	地塞米松 1 $\mu$ M	117	232
	地塞米松 10 $\mu$ M	116	241
	依托泊苷 1 $\mu$ M	64	35
	依托泊苷 10 $\mu$ M	65	24

【0245】[表 67]

培養條件		單層培養 群組	添加脫醯基化結蘭膠之群 組
%對照	DMSO	100	100
	阿德力黴素 1 $\mu$ M	3	3
	放線菌素 D 1 $\mu$ M	2	3
	放線菌素 D 10 $\mu$ M	4	12
	喜樹鹼 0.2 $\mu$ M	68	24
	喜樹鹼 2 $\mu$ M	28	7
	環己醯亞胺 10 $\mu$ M	21	4
	環己醯亞胺 100 $\mu$ M	7	1
	地塞米松 1 $\mu$ M	89	184
	地塞米松 10 $\mu$ M	92	173
	依托泊苷 1 $\mu$ M	68	39
	依托泊苷 10 $\mu$ M	63	23

【0246】(試驗例 52：使用曲美替尼及 MK-2206 之 HeLa 細

## 胞增殖試驗與單層培養法之比較)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA, 三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後,藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解,將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液,調製培養基組成物,該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)中添加有終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物,或不含脫醯基化結蘭膠之未經添加的培養基組成物。接著,將人類子宮頸癌細胞株 HeLa(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 37000 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後,以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製, # 3474)之孔中。單層培養法,係將人類子宮頸癌細胞株 HeLa 以成為 7400 細胞/mL 之方式接種於上述不含脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後,以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底微量盤(康寧公司製, # 3585)之孔中。各培養盤係在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養。在培養第 1 日,以使終濃度成為 0.001 至 30  $\mu$  M 之方式,分別添加 15  $\mu$  L 之含 10 倍濃度之各抗癌劑及終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物(添加脫醯基化結蘭膠之群組),以及只含 10 倍濃度之各抗癌劑的培養基組成物(單層培養群組),然後繼續培養 5 日。抗癌劑係使用曲美替尼(Santa Cruz 公司製, MEK 抑制劑)及 MK-2206(Santa Cruz 公司製, Akt 抑制劑)。



於第 6 日之培養液添加 150  $\mu$  L 之 ATP 試藥 (CellTiter-Glo (註冊商標)發光法細胞活力檢測試劑盒, Promega 公司製)並使其懸浮,於室溫靜置約 10 分鐘後,用 FlexStation3(Molecular Device 公司製)測定發光強度(RLU 值),然後減去培養基單獨之發光值,藉此測定活細胞之數目。

【0247】其結果為:可知藉由使用本發明之培養基組成物的細胞增殖試驗法,與單層培養法相比,係顯示較強之 MK-2206 及曲美替尼之藥效。將靜置培養第 4 日之 RLU 值(ATP 測定,發光強度)之%對照值示於表 68 中。

【0248】[表 68]

培養條件		單層培養群組	添加脫醯基化結蘭膠之群組
%對照	DMSO	100	100
	紫杉醇 0.001 $\mu$ M	89	104
	紫杉醇 0.003 $\mu$ M	15	46
	紫杉醇 0.01 $\mu$ M	2	5
	曲美替尼 0.001 $\mu$ M	102	73
	曲美替尼 0.01 $\mu$ M	93	12
	曲美替尼 0.1 $\mu$ M	20	1
	曲美替尼 1 $\mu$ M	3	1
	MK-2206 0.03 $\mu$ M	93	57
	MK-2206 0.3 $\mu$ M	84	21
	MK-2206 3 $\mu$ M	69	21
	MK-2206 30 $\mu$ M	0	0

【0249】(試驗例 53：使用曲美替尼及 MK-2206 之 A549 細胞增殖試驗與單層培養法之比較)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA, 三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後,藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解,將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液調製培養基組成物,該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)中添加有終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物,或不含脫醯基化結蘭膠之未經添加的培養基組成物。接著,將人類肺癌細胞株 A549(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 14800 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後,以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製, # 3474)之孔中。單層培養法係將人類肺癌細胞株 A549 以成為 14800 細胞/mL 之方式接種於上述不含脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後,以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底微量盤(康寧公司製, # 3585)之孔中。各培養盤係在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養。在培養第 1 日,以使終濃度成為 0.001 至 30  $\mu$  M 之方式,分別添加 15  $\mu$  L 之含 10 倍濃度之各抗癌劑及終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物(添加脫醯基化結蘭膠之群組),以及只含 10 倍濃度之各抗癌劑的培養基組成物(單層培養群組),然後繼續培養 5 日。抗癌劑係使用曲美替尼(Santa Cruz 公司製, MEK 抑制劑)及 MK-2206(Santa Cruz 公司製, Akt 抑制劑)。於第 6 日之培養液添加 150  $\mu$  L 之 ATP 試藥(CellTiter-Glo(註冊商標))

發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega 公司製)並使其懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，用 FlexStation3(Molecular Device 公司製)測定發光強度(RLU 值)，然後減去培養基單獨之發光值，藉此測定活細胞之數目。

【0250】其結果為：可知藉由使用本發明之培養基組成物的細胞增殖試驗法，與單層培養法相比，係顯示較強之 MK-2206 之藥效。將靜置培養第 4 日之 RLU 值(ATP 測定，發光強度)的 % 對照值示於表 69 中。

【0251】[表 69]

培養條件		單層培養群組	添加脫醯基化結蘭膠之群組
%對照	DMSO	100	100
	紫杉醇 0.001 $\mu$ M	81	93
	紫杉醇 0.003 $\mu$ M	31	52
	紫杉醇 0.01 $\mu$ M	16	32
	曲美替尼 0.001 $\mu$ M	71	72
	曲美替尼 0.01 $\mu$ M	37	35
	曲美替尼 0.1 $\mu$ M	5	2
	曲美替尼 1 $\mu$ M	1	0
	MK-2206 0.03 $\mu$ M	93	84
	MK-2206 0.3 $\mu$ M	79	45
	MK-2206 3 $\mu$ M	53	21
	MK-2206 30 $\mu$ M	0	0

【0252】(試驗例 54：在以人類 HB-EGF 刺激之 HeLa 細胞之增殖作用方面與單層培養法的比較)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA, 三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後,藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解,將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液,調製培養基組成物,該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)中添加有終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物,或不含脫醯基化結蘭膠之未經添加的培養基組成物。接著,將人類子宮頸癌細胞株 HeLa(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 37000 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後,以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製, # 3474)之孔中。單層培養法係將人類子宮頸癌細胞株 HeLa 以成為 37000 細胞/mL 之方式接種於上述不含脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後,以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底微量盤(康寧公司製, # 3585)之孔中。各培養盤係在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37 °C, 5%CO<sub>2</sub>)內係以靜置狀態培養。在培養第 1 日,以使終濃度 10、30、100ng/mL 之方式,分別添加 15  $\mu$  L 之含 10 倍濃度之人類 HB-EGF(肝素結合性上皮生長因子樣增殖因子、PEPROTECH 公司製)及終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物(添加脫醯基化結蘭膠之群組),以及只含 10 倍濃度之人類 HB-EGF 的培養基組成物(單層培養群組),然後繼續培養 7 日。於第 6 日及第 8 日之培養液添加 150  $\mu$  L 之 ATP 試藥(CellTiter-Glo(註冊商標)發光法細

胞活力檢測試劑盒，Promega 公司製)並使其懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，用 FlexStation3(Molecular Device 公司製)測定發光強度(RLU 值)，然後減去培養基單獨之發光值，藉此測定活細胞之數目。

【0253】其結果為：可知藉由使用本發明之培養基組成物的 HeLa 細胞增殖試驗法，與單層培養法相比，係顯示較強之人類 HB-EGF 之細胞增殖促進效果。將靜置培養第 6 日之 RLU 值(ATP 測定，發光強度)的 % 對照值示於表 70 中。將靜置培養第 8 日之 RLU 值(ATP 測定，發光強度)之 % 對照值示於表 71 中。

【0254】[表 70]

培養條件 第 6 日		單層培養 群組	添加脫醯基化結蘭 膠之群組
%對照	陰性對照組	100	100
	人類 HB-EGF 10ng/mL	102	109
	人類 HB-EGF 30ng/mL	99	109
	人類 HB-EGF 100ng/mL	105	133

【0255】[表 71]

培養條件 第 8 日		單層培養 群組	添加脫醯基化結蘭 膠之群組
%對照	陰性對照組	100	100
	人類 HB-EGF 10ng/mL	100	107
	人類 HB-EGF 30ng/mL	99	115
	人類 HB-EGF 100ng/mL	88	161

【0256】(試驗例 55：在以人類 HB-EGF 刺激之 A549 細胞之增殖作用方面與單層培養法之比較)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解，將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液，調製培養基組成物，該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)中添加有終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物，或不含脫醯基化結蘭膠之未經添加的培養基組成物。接著，將人類肺癌細胞株 A549(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 14800 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底超低接著



性表面微量盤(康寧公司製，# 3474)之孔中。單層培養法係將人類肺癌細胞株 A549 以成為 14800 細胞/mL 之方式接種在上述不含脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底微量盤(康寧公司製，# 3585)之孔中。各培養盤係在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37°C，5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養。在培養第 1 日，以使終濃度成為 10、30、100ng/mL 之方式，分別添加 15  $\mu$  L 之含 10 倍濃度之人類 HB-EGF(PEPROTECH 公司製)及終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物(添加脫醯基化結蘭膠之群組)，以及只含 10 倍濃度之人類 HB-EGF 的培養基組成物(單層培養群組)，然後繼續培養 7 日。於第 6 日及第 8 日之培養液添加 150  $\mu$  L 之 ATP 試藥(CellTiter-Glo(註冊商標)發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega 公司製)並使其懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，用 FlexStation3(Molecular Device 公司製)測定發光強度(RLU 值)，然後減去培養基單獨之發光值，藉此測定活細胞之數目。

【0257】 其結果為：可知藉由使用本發明之培養基組成物的 A549 細胞增殖試驗法，與單層培養法相比，係顯示較強之人類 HB-EGF 之細胞增殖促進效果。將靜置培養第 6 日之 RLU 值(ATP 測定，發光強度)之%對照值示於表 72 中。將靜置培養第 8 日之 RLU 值(ATP 測定，發光強度)之%對照值示於表 73 中。

【0258】[表 72]

培養條件 第 6 日		單層培養 群組	添加脫醯基化結蘭 膠之群組
%對照	陰性對照組	100	100
	人類 HB-EGF 10ng/mL	92	99
	人類 HB-EGF 30ng/mL	95	115
	人類 HB-EGF 100ng/mL	96	140

【0259】[表 73]

培養條件 第 8 日		單層培養 群組	添加脫醯基化結蘭 膠之群組
%對照	陰性對照組	100	100
	人類 HB-EGF 10ng/mL	97	103
	人類 HB-EGF 30ng/mL	99	108
	人類 HB-EGF 100ng/mL	100	128

【0260】(試驗例 56：在以人類 HB-EGF 刺激之 A431 細胞之增殖作用方面與單層培養法的比較)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解，將所得之水溶液於

121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液，調製培養基組成物，該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 EMEM 培養基(DS Pharma Biomedical 公司製)中添加有終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物，或不含脫醯基化結蘭膠之未經添加的培養基組成物。接著，將人類扁平上皮癌細胞株 A431(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 37000 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製，# 3474)之孔中。單層培養法係將人類扁平上皮癌細胞株 A431，以成為 37000 細胞/mL 之方式接種於上述不含脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底微量盤(康寧公司製，# 3585)之孔中。各培養盤係在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37°C，5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養。在培養第 1 日，以使終濃度成為 10、30、100ng/mL 之方式，分別添加 15  $\mu$  L 之含 10 倍濃度之人類 HB-EGF(PEPROTECH 公司製)及終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物(添加脫醯基化結蘭膠之群組)，以及只含 10 倍濃度之人類 HB-EGF 之培養基組成物(單層培養群組)，然後繼續培養 7 日。於第 6 日及第 8 日之培養液添加 150  $\mu$  L 之 ATP 試藥(CellTiter-Glo(註冊商標)發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega 公司製)並使其懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，用 FlexStation3(Molecular Device 公司製)測定發光強度(RLU 值)，然後減去培養基單獨之發光值，藉此測定活細

胞之數目。

【0261】 其結果為：可知藉由使用本發明之培養基組成物的 A431 細胞增殖試驗法，與單層培養法相比，係顯示較強之人類 HB-EGF 之細胞增殖促進效果。將靜置培養第 6 日之 RLU 值(ATP 測定，發光強度)之 % 對照值示於表 74 中。將靜置培養第 8 日之 RLU 值(ATP 測定，發光強度)之 % 對照值示於表 75 中。

【0262】 [表 74]

培養條件 第 6 日		單層培養 群組	添加脫醯基化結蘭 膠之群組
%對照	陰性對照組	100	100
	人類 HB-EGF 10ng/mL	96	241
	人類 HB-EGF 30ng/mL	95	557
	人類 HB-EGF 100ng/mL	83	1018

【0263】[表 75]

培養條件 第 8 日		單層培養 群組	添加脫醯基化結蘭 膠之群組
%對照	陰性對照組	100	100
	人類 HB-EGF 10ng/mL	105	370
	人類 HB-EGF 30ng/mL	100	772
	人類 HB-EGF 100ng/mL	89	1886

【0264】(試驗例 57：在以人類 HB-EGF 刺激之 SKOV3 細胞之增殖作用方面與單層培養法的比較)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解，將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液，調製培養基組成物，該培養基組成物係在含 15%(v/v)胎牛血清之麥考伊氏 5a 培養基(DS Pharma Biomedical 公司製)中添加有終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物，或不含脫醯基化結蘭膠之未經添加的培養基組成物。接著，將人類卵巢癌細胞株 SKOV3(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 37000 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以每 1 孔為 135  $\mu$ L 之方式分注

於 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製, # 3474) 之孔中。單層培養法係將人類卵巢癌細胞株 SKOV3 以成為 37000 細胞/mL 之方式接種於上述不含脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後, 以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底微量盤(康寧公司製, # 3585)之孔中。各培養盤係在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養。在培養第 1 日, 以使終濃度成為 10、30、100ng/mL 之方式, 分別添加 15  $\mu$  L 之含 10 倍濃度之人類 HB-EGF(PEPROTECH 公司製) 及終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物(添加脫醯基化結蘭膠之群組), 以及只含 10 倍濃度之人類 HB-EGF 之培養基組成物(單層培養群組), 然後繼續培養 8 日。於第 6 日及第 9 日之培養液添加 150  $\mu$  L 之 ATP 試藥 (CellTiter-Glo(註冊商標)發光法細胞活力檢測試劑盒, Promega 公司製)並使其懸浮, 於室溫靜置約 10 分鐘後, 用 FlexStation3(Molecular Device 公司製)測定發光強度(RLU 值), 然後減去培養基單獨之發光值, 藉此測定活細胞之數目。

【0265】 其結果為: 可知藉由使用本發明之培養基組成物的 SKOV3 細胞增殖試驗法, 與單層培養法相比, 係顯示較強之人類 HB-EGF 之細胞增殖促進效果。將靜置培養第 6 日之 RLU 值(ATP 測定, 發光強度)之 % 對照值示於表 76 中。靜置培養第 9 日之 RLU 值(ATP 測定, 發光強度)之 % 對照值示於表 77 中。

【0266】 [表 76]

培養條件 第 6 日		單層培養 群組	添加脫醯基化結蘭膠 之群組
%對照	陰性對照組	100	100
	人類 HB-EGF 10ng/mL	103	138
	人類 HB-EGF 30ng/mL	103	191
	人類 HB-EGF 100ng/mL	121	282

【0267】 [表 77]

培養條件第 9 日		單層培養 群組	添加脫醯基化結蘭 膠之群組
%對照	陰性對照組	100	100
	人類 HB-EGF 10ng/mL	100	136
	人類 HB-EGF 30ng/mL	101	176
	人類 HB-EGF 100ng/mL	108	343

【0268】 (試驗例 58：在以人類 HB-EGF 刺激之 HeLa 細胞中之 VEGF 的 mRNA 表現方面與單層培養法的比較)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA, 三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後,藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解,將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液,調製培養基組成物,該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)中添加有終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物,或不含脫醯基化結蘭膠之未經添加的培養基組成物。接著,將人類子宮頸癌細胞株 HeLa(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 37000 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後,以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製, # 3474)之孔中。單層培養法係將人類子宮頸癌細胞株 HeLa,以成為 37000 細胞/mL 之方式接種於上述不含脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後,以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底微量盤(康寧公司製, # 3585)之孔中。各培養盤係在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37 °C, 5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養。在培養第 1 日,以使終濃度成為 10、30、100ng/mL 之方式,分別添加 15  $\mu$  L 之含 10 倍濃度之人類 HB-EGF(PEPROTECH 公司製)及終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物(添加脫醯基化結蘭膠之群組),以及只含 10 倍濃度之人類 HB-EGF 之培養基組成物(單層培養群組),然後繼續培養 6 日。回收第 7 日之含癌細胞的培養液,並藉由離心分離(400g, 3 分鐘)回收細胞。使用 RNeasy Mini kit(QIAGEN 公司製)從



細胞萃取全部 RNA。使用全部 RNA 及 PrimeScript(註冊商標) RT Master Mix(Takara Bio 公司製)，並用 GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems 公司製)進行逆轉錄反應，合成 cDNA。用於 PCR 反應之各 cDNA 樣本，係使用分注而以滅菌水稀釋至 1/10 者。又，檢量線所用之樣本，係設定為使用經分注混合之 cDNA，且以 3 倍公比稀釋成 1/3 至 1/243 之定量範圍內。PCR 反應係使用各 cDNA 樣本、檢量樣本、Premix Ex Taq(註冊商標)(Takara Bio 公司製)及各種 Taqman 探針(Applied Biosystems 公司製)，用 7500 Real Time PCR System(Applied Biosystems 公司製)實施。特異性係以 GAPDH(甘油醛 3-磷酸酯脫氫酶)之 mRNA 作為內在性對照，VEGF(血管內皮細胞增殖因子；Vascular endothelial growth factor)之 mRNA 之表現，係以 GAPDH 之值補正並將陰性對照組當做 100%而算出。所用之各探針(Applied Biosystems 公司製)如以下所示。

GAPDH：HS99999905

VEGF：HS00173626

【0269】其結果為：可知使用本發明之培養基組成物所培養之 HeLa 細胞，與單層培養法相比，係顯示較強之由人類 HB-EGF 所引起之 VEGF 之 mRNA 表現促進效果。又，將靜置培養第 7 日之以陰性對照組當做 100%時之 VEGFmRNA 表現值示於表 78 中。

【0270】[表 78]

培養條件 第 7 日		單層培養群 組	脫醯基化結蘭膠 添加群組
%對照	陰性對照組	100	100
	人類 HB-EGF 10ng/mL	82	121
	人類 HB-EGF 30ng/mL	88	148
	人類 HB-EGF 100ng/mL	89	195

【0271】(試驗例 59：吉非替尼對於以人類 HB-EGF 刺激之 A549 細胞之增殖的效果)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解，將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液，調製培養基組成物，該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)中添加有終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物，或不含脫醯基化結蘭膠之未經添加的培養基組成物。接著，將人類肺癌細胞株 A549(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 14800 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製，# 3474)之孔中。各培養盤係

在 CO<sub>2</sub> 培養箱 (37°C , 5%CO<sub>2</sub>) 內以靜置狀態培養。在培養第 1 日，以使各抗癌劑之終濃度成為 0.1 至 30  $\mu$  M，且使人類 HB-EGF 之終濃度成為 0ng/mL 或 100ng/mL 之方式，分別添加 15  $\mu$  L 之含 10 倍濃度之各抗癌劑及人類 HB-EGF (PEPROTECH 公司製) 以及終濃度 0.015%(w/v) 之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物 (添加脫醯基化結蘭膠之群組)，然後繼續培養 5 日。抗癌劑係使用吉非替尼 (Santa Cruz 公司製，EGF 受體抑制劑)。於第 6 日之培養液添加 150  $\mu$  L 之 ATP 試藥 (CellTiter-Glo (註冊商標) 發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega 公司製) 並使其懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，用 FlexStation3 (Molecular Device 公司製) 測定發光強度 (RLU 值)，然後減去培養基單獨之發光值，藉此測定活細胞之數目。

【0272】 其結果為：藉由使用本發明之培養基組成物及人類 HB-EGF 之 A549 細胞增殖試驗法，在添加有 HB-EGF 之培養條件下，吉非替尼之抑制效果較強。將靜置培養第 6 日之 RLU 值 (ATP 測定，發光強度) 之 % 對照值示於表 79 中。

【0273】[表 79]

培養條件 第 6 日		未添加 HB-EGF	HB-EGF 100ng/mL
%對照	DMSO	100	100
	吉非替尼 0.1 $\mu$ M	89	91
	吉非替尼 0.3 $\mu$ M	84	74
	吉非替尼 1 $\mu$ M	77	59
	吉非替尼 3 $\mu$ M	69	53

【0274】(試驗例 60: 吉非替尼、埃羅替尼在以人類 HB-EGF 刺激之 A431 細胞增殖作用方面的效果)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA, 三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後, 藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解, 將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液, 調製培養基組成物, 該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 EMEM 培養基(DS Pharma Biomedical 公司製)中添加有終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠者, 或不含脫醯基化結蘭膠之未經添加的培養基組成物。接著, 將人類扁平上皮癌細胞株 A431(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 37000 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後, 以每 1 孔為 135  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底超

低接著性表面微量盤(康寧公司製, # 3474)之孔中。各培養盤係在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養。在培養第 1 日, 以各抗癌劑成為終濃度 0.1 至 30  $\mu$ M, 且人類 HB-EGF 成為終濃度 0ng/mL 或 100ng/mL 之方式, 分別添加 15  $\mu$ L 之含有 10 倍濃度之各抗癌劑及人類 HB-EGF (PEPROTECH 公司製)以及終濃度 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠的培養基組成物(添加脫醯基化結蘭膠之群組), 然後繼續培養 7 日。抗癌劑係使用吉非替尼(Santa Cruz 公司製, EGF 受體抑制劑)、埃羅替尼(Erlotinib)(Santa Cruz 公司製, EGF 受體抑制劑)。於第 4 日、第 6 日及第 8 日之培養液添加 150  $\mu$ L 之 ATP 試藥(CellTiter-Glo(註冊商標)發光法細胞活力檢測試劑盒, Promega 公司製)並使其懸浮, 於室溫靜置約 10 分鐘後, 用 FlexStation3(Molecular Device 公司製)測定發光強度(RLU 值), 然後減去培養基單獨之發光值, 藉此測定活細胞之數目。

【0275】 其結果為: 在將本發明之培養基組成物與人類 HB-EGF 組合之培養法中, 可見到 A431 細胞在低接著培養條件下增殖。再者, 藉由使用組合本發明之培養基組成物與人類 HB-EGF 之 A431 細胞增殖試驗法, 可判定吉非替尼及埃羅替尼對於 HB-EGF 之增殖促進作用有抑制效果。關於人類 HB-EGF 之增殖促進作用, 係將靜置培養第 4 日、第 6 日、第 8 日之 RLU 值(ATP 測定, 發光強度)示於表 80 中。再者, 關於各抗癌劑對於人類 HB-EGF 之增殖促進作用的效果, 係將靜置培養第 4 日、第 8 日之 RLU 值(ATP

測定，發光強度)之%對照值示於表 81 中。

【0276】 [表 80]

培養條件		HB-EGF 無添加	HB-EGF 100ng/mL
細胞數	第 4 日	2532	15303
	第 6 日	1332	23273
	第 8 日	613	38854

【0277】 [表 81]

培養條件		第 4 日	第 8 日
%對照	DMSO	100	100
	吉非替尼 0.1 $\mu$ M	83	68
	吉非替尼 0.3 $\mu$ M	82	45
	吉非替尼 1 $\mu$ M	10	2
	吉非替尼 3 $\mu$ M	3	0
	埃羅替尼 0.1 $\mu$ M	88	56
	埃羅替尼 0.3 $\mu$ M	89	27
	埃羅替尼 1 $\mu$ M	21	4
	埃羅替尼 3 $\mu$ M	4	0

【0278】(試驗例 61：使 MCF-7 細胞分散時之細胞增殖試驗)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解，將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液，調製培養基組成物，該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 EMEM 培養基(DS Pharma Biomedical 公司製)中添加有終濃度 0.005%(w/v)或 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠者。接著，將人類乳癌細胞株 MCF-7(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 50000 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以每 1 孔為 100  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製，# 3474)之孔中。又，作為陰性對照組，係分注：於不含脫醯基化結蘭膠之與上述相同的培養基中懸浮有 MCF-7 細胞者。接著，將該培養盤在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37°C，5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養 5 日。於培養 2、5 日後之培養液添加 100  $\mu$  L 之 ATP 試藥(CellTiter-Glo(註冊商標)發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega 公司製)並使其懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，用 FlexStation3(Molecular Device 公司製)測定發光強度(RLU 值)，然後減去培養基單獨之發光值，藉此測定活細胞之數目。WST-8 測定係藉由在培養 2、5 日後之細胞添加 10  $\mu$  L 之 WST-8 溶液(同仁化學研究所股份有限公司製)後，於 37°C 培養 100 分鐘，用吸光度計(Molecular Device

公司製，SPECTRA MAX 190)測定於 450nm 之吸光度，然後減去培養基單獨之吸光度，藉此測定活細胞之數目。

【0279】其結果為：用 ATP 測定法及 WST-8 測定法確認到 MCF-7 細胞藉由使用本發明之培養基組成物而有效率地增殖。將靜置培養 2、5 日後之 RLU 值(ATP 測定，發光強度)示於表 82 中。將培養 2、5 日後之於 450nm 之吸光度(WST-8))示於表 83 中。將培養 5 日後之 MCF-7 細胞凝集塊之顯微鏡觀察結果示於第 23 圖中。

【0280】[表 82]

培養日數		2	5
細胞數	陰性對照組	5765	9556
	0.005%脫醯基化結蘭膠	6242	15103
	0.015%脫醯基化結蘭膠	6024	18314

【0281】[表 83]

培養日數		2	5
細胞數	陰性對照組	0.070	0.095
	0.005%脫醯基化結蘭膠	0.075	0.117
	0.015%脫醯基化結蘭膠	0.065	0.173

【0282】(試驗例 62：使 A375 細胞及 MNNG/HOS 細胞分散時之細胞增殖試驗)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限



公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解，將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液，調製培養基組成物，該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)或 EMEM 培養基(DS Pharma Biomedical 公司製)中添加有終濃度為 0.005%(w/v)或 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠者。接著，將人類黑色素瘤細胞株 A375(ATCC 製)或人類骨原性肉瘤細胞株 MNNG/HOS(ATCC 製)以成為 50000 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以每 1 孔為 100  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製，# 3474)之孔中。又，作為陰性對照組，係分注：於不含脫醯基化結蘭膠之與上述相同的培養基中懸浮有 A375 細胞及 MNNG/HOS 細胞者。接著，該培養盤在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37°C，5%CO<sub>2</sub>)內以靜置狀態培養 4 日。於培養 4 日後之培養液添加 100  $\mu$  L 之 ATP 試藥(CellTiter-Glo(註冊商標)發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega 公司製)並使其懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，用 FlexStation3(Molecular Device 公司製)測定發光強度(RLU 值)，然後減去培養基單獨之發光值，藉此測定活細胞之數目。於培養 4 日後之培養液添加 10  $\mu$  L 之 WST-8 溶液(同仁化學研究所股份有限公司製)後，於 37°C 培養 100 分鐘，用吸光度計(Molecular Device 公司製，SPECTRA MAX 190)測定於 450nm 之吸光度，然後減去培養基單獨之吸光度，藉此測定活細胞之數目。

【0283】 其結果為：確認到 A375 細胞及 MNNG/HOS 細胞不會因使用本發明之培養基組成物使細胞凝集塊之大小變得過剩，而能以均勻分散之狀態培養，並於該培養基組成物中有效率地增殖。將培養 4 日後之 A375 細胞及 MNNG/HOS 細胞之凝集塊的顯微鏡觀察結果係示於第 24 圖中。又，將 A375 細胞靜置培養 4 日後之於 450nm 之吸光度(WST-8)及 RLU 值(ATP 測定，發光強度)示於表 84 中。將 MNNG/HOS 細胞靜置培養 4 日後之於 450nm 之吸光度(WST-8)及 RLU 值(ATP 測定，發光強度)示於表 85 中。

【0284】 [表 84]

實驗群組	WST-8	ATP
陰性對照組	0.738	55193
脫醯基化結蘭膠 0.005%	2.088	98739
脫醯基化結蘭膠 0.015%	3.336	115365

【0285】 [表 85]

實驗群組	WST-8	ATP
陰性對照組	0.294	41529
脫醯基化結蘭膠 0.005%	0.843	66913
脫醯基化結蘭膠 0.015%	2.197	102199

【0286】 (試驗例 63：使 MIAPaCa-2 細胞分散時之細胞增殖試驗)

將脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限

公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後，藉由於 90°C 加熱下攪拌使其溶解，將所得之水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用該溶液，調製培養基組成物，該培養基組成物係在含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)中添加有終濃度 0.005%(w/v)或 0.015%(w/v)之脫醯基化結蘭膠者。接著，將人類胰臟癌細胞株 MIAPaCa-2(ATCC 製)以成為 50000 細胞/mL 之方式接種於上述添加有脫醯基化結蘭膠之培養基組成物後，以每 1 孔為 100  $\mu$  L 之方式分注於 96 孔平底超低接著性表面微量盤(康寧公司製，# 3474)之孔中。又，作為陰性對照組，係分注：於不含脫醯基化結蘭膠之與上述相同的培養基中懸浮有 MIAPaCa-2 細胞者。接著，將該培養盤在 CO<sub>2</sub> 培養箱(37°C，5%CO<sub>2</sub>)內，以靜置狀態培養 6 日。於培養 6 日後之培養液添加 100  $\mu$  L 之 ATP 試藥(CellTiter-Glo(註冊商標)發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega 公司製)並使其懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，用 FlexStation3(Molecular Device 公司製)測定發光強度(RLU 值)，然後減去培養基單獨之發光值，藉此測定活細胞之數目。於培養 6 日後之培養液添加 10  $\mu$  L 之 WST-8 溶液(同仁化學研究所股份有限公司製)後，於 37°C 培養 100 分鐘，用吸光度計(Molecular Device 公司製，SPECTRA MAX 190)測定於 450nm 之吸光度，然後減去培養基單獨之吸光度，藉此測定活細胞之數目。

【0287】 其結果為：確認到 MIAPaCa-2 細胞，不會因

使用本發明之培養基組成物使細胞凝集塊之大小不過剩，而能以均勻分散之狀態培養，並於該培養基組成物中有效率地增殖。將培養 6 日後之 MIAPaCa-2 細胞之凝集塊的顯微鏡觀察結果示於第 25 圖。又，將 MIAPaCa-2 細胞靜置培養 4 日後之於 450nm 之吸光度(WST-8)及 RLU 值(ATP 測定，發光強度)示於表 86。

【0288】 [表 86]

實驗群組	WST-8	ATP
陰性對照組	2.030	52674
脫醯基化結蘭膠 0.005%	3.102	86650
脫醯基化結蘭膠 0.015%	3.621	85412

【0289】(試驗例 64：含脫醯基化結蘭膠之培養基之濃縮及稀釋)

將使用與試驗例 2 同樣之方法所調製之含 0.015%(w/v) 脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA、三昌股份有限公司製)的 DMEM 培養基(WAKO 公司製)以每管 10mL 之方式分注於 15mL 離心管(VIOLAMO 公司製)中，藉由以 Swing Rotor LC-200(Tomy 精工公司製)離心(700G，5 分鐘)使脫醯基化結蘭膠沈降後，用吸引裝置(aspirator)除去 8mL 之上清液，藉此進行含有脫醯基化結蘭膠之培養基之濃縮。再者，在所得之濃縮培養基中添加不含脫醯基化結蘭膠之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)並藉由吸液混合，分別製成任何濃縮率之培養基。

另一方面，將人類肝癌細胞 HepG2(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 500000 個/mL 之方式懸浮於含 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)中，將 10mL 之所得之懸浮液接種於 EZ SPHERE(旭硝子公司製)後，在 37°C，CO<sub>2</sub> 培養箱(5%CO<sub>2</sub>)內培養 7 日。藉由離心處理 10mL 使此處所得到之球體(直徑 100 至 200 μm)之懸浮液(200G，5 分鐘)沈降，然後除去上清液，藉此調製成 1.0mL 之球體懸浮液。在上述製成任何濃度之培養基中，各添加 100 μL 之所得之球體懸浮液，並藉由吸液使球體分散，於 37°C 進行培養，以目視觀察 1 小時後之球體分散狀態。其結果示於表 87 中。

【0290】 如表 87 中所示，確認到將脫醯基化結蘭膠調製成培養基組成物後，可濃縮或稀釋成任何濃度，而經如此濃縮或稀釋之培養基組成物係具有球體之懸浮效果。

【0291】 [表 87]

脫醯基化結蘭膠 之濃縮率(倍)	0.33	0.66	1.00	1.67	2.50	5.00
球體狀態(沉澱 或懸浮)	沉澱	懸浮	懸浮	懸浮	懸浮	懸浮

【0292】 (試驗例 65：含有脫醯基化結蘭膠之 DMEM/Ham' sF12 培養基之製作)

使 120mg 之脫醯基化結蘭膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份有限公司製)懸浮於 72mL 之純水中，於 90°C 加熱攪拌

使其溶解。於其中加入純水，調製成 720mL 之脫醯基化結蘭膠 0.017%(w/v)之溶液後，使用滅菌過濾器(孔隙大小 (pore size)0.22  $\mu$  m)進行滅菌。另一方面，對 DMEM/Ham' s F12 等量混合之粉末培養基(Life Technologies 公司)與碳酸氫鈉添加相當於調製培養基時推薦值之 10 分之 1 量的純水，調製成呈 10 倍濃度之 80mL 之水溶液後，使用滅菌過濾器(孔隙大小 0.22  $\mu$  m)滅菌。將此等於滅菌條件下，於 25°C 攪拌同時混合，藉此調製成 800mL 之脫醯基化結蘭膠濃度為 0.015%(w/v)之目的培養基。

[產業上之可利用性]

【0293】本發明之培養基組成物係顯示優良之細胞及/或組織懸浮效果，可維持來自動植物之細胞及/或組織之功能，而且於大量培養時極為有用。又，藉由本發明之方法所培養之細胞及/或組織，在化學物質、醫藥品等之藥效及毒性評估；酵素、細胞增殖因子、抗體等有用物質之大量生產；彌補因疾患或缺損所喪失之器官、組織、細胞的再生醫療等領域中極為有用。

【0294】本案係以於日本申請之特願 2012-164227(申請日：2012 年 7 月 24 日)、特願 2012-263801(申請日：2012 年 11 月 30 日)、特願 2013-017836(申請日：2013 年 1 月 31 日)為基礎，本說明書中包含其之全部內容。

#### 【符號說明】

無。

# 發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※ I P C 分類：

## 【發明名稱】(中文/英文)

培養基組成物

MEDIUM COMPOSITION

## 【中文】

本發明提供一種細胞及/或組織之培養方法等，該方法之特徵為使用具有防止細胞及/或組織沉降之效果的培養基組成物，以懸浮狀態培養細胞及/或組織，其中，該培養基組成物係藉由在液體培養基中形成不定形的構造體，使該構造體均勻分散在該溶液中，在未實質地提高該溶液之黏度且實質地保持細胞及/或組織，而具有防止細胞及/或組織沈降之效果者。

## 【英文】

This invention provides a method for culturing cells and/or tissues etc., characterized in culturing cells and/or tissues in a floating state by using a medium composition which can keep the cells and/or the tissues in the solution without substantially increasing the viscosity of the solution by forming amorphous structures in a liquid medium (solution) and making the amorphous structures evenly dispersed in the solution, thereby preventing the cells and /or tissues from sedimentation.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】：**無。

**【本代表圖之符號簡單說明】：**

本案圖式不足以代表本案申請專利範圍第一項所請  
培養基組成物之技術特徵，故本案無指定代表圖。

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：**

本案無代表化學式



## 申請專利範圍

1. 一種培養基組成物，其含有：
  - (a) 培養基、
  - (b) 脫醯基化結蘭膠(deacylated gellan gum)或其鹽、以及
  - (c) 接著細胞，該接著細胞係球體狀態之多潛能幹細胞(pluripotent stem cell)；其中，

前述脫醯基化結蘭膠或其鹽係以允許球體在懸浮靜置培養中培養的濃度存在，以及

於 37°C 條件下，前述培養基組成物具有未超過 8mPa·s 之黏度。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之培養基組成物，其中，前述培養基組成物中之脫醯基化結蘭膠或其鹽的濃度為 0.01 至 0.05% 重量/體積。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之培養基組成物，更包含脫醯基化結蘭膠或其鹽以外之多糖類。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之培養基組成物，係包含金屬離子。
5. 如申請專利範圍第 4 項所述之培養基組成物，其中，前述金屬離子係鈣離子。
6. 如申請專利範圍第 4 項所述之培養基組成物，其中，前述脫醯基化結蘭膠或其鹽係經由前述金屬離子集合或形成三維網狀構造。
7. 如申請專利範圍第 1 項所述之培養基組成物，其中，前述多潛能幹細胞係增殖的多潛能幹細胞。



































