



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I577379 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 11 日

(21)申請案號：102116059

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 06 日

(51)Int. Cl. : A61K35/12 (2015.01)

A61K31/7016(2006.01)

A61P9/14 (2006.01)

(30)優先權：2012/05/08 日本

2012-106866

(71)申請人：大塚製藥工場股份有限公司(日本) OTSUKA PHARMACEUTICAL FACTORY, INC.

(JP)

日本

(72)發明人：和田圭樹 WADA, TAMAKI (JP)；土居雅子 DOI, MASAKO (JP)；菊地健志

KIKUCHI, TAKESHI (JP)；小林英司 KOBAYASHI, EIJI (JP)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

TW 201226568A1

JP 2012500021A

服部秀美等；"細胞の冷蔵保存の検討"；醫用電子と生体工学，2004，第 42 卷，第 538 頁。

審查人員：蔡明秀

申請專利範圍項數：2 項 圖式數：2 共 26 頁

(54)名稱

含有海藻糖之預防肺栓塞用哺乳動物細胞懸浮液

(57)摘要

本發明係以提供在經由血管投予哺乳動物幹細胞等之哺乳動物細胞時能預防肺栓塞形成的哺乳動物細胞懸浮液，以及在經由血管投予哺乳動物細胞時的肺栓塞形成預防劑作為課題。

本發明之特徵係將哺乳動物幹細胞等之哺乳動物細胞懸浮於含有以海藻糖或其衍生物或該等之鹽作為有效成分的生理性水溶液中，以製作含有哺乳動物細胞及海藻糖或其衍生物或該等之鹽作為有效成分之為了預防在經由血管投予哺乳動物細胞時形成肺栓塞的哺乳動物細胞懸浮液。作為該哺乳動物細胞，哺乳動物幹細胞以外可舉出胰島細胞、樹狀細胞、自然殺手細胞、阿爾發·貝塔 T 細胞、伽瑪·德爾塔 T 細胞、細胞毒性 T 細胞等，此外，作為上述哺乳動物幹細胞可合適地舉例哺乳動物間葉系幹細胞或哺乳動物多能性幹細胞。

## 發明摘要

※申請案號：102116059

※申請日：102年05月06日

※IPC分類：

A61K35/12 (2006.01)

A61K31/7016 (2006.01)

A61P9/14 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

含有海藻糖之預防肺栓塞用哺乳動物細胞懸浮液

## 【中文】

本發明係以提供在經由血管投予哺乳動物幹細胞等之哺乳動物細胞時能預防肺栓塞形成的哺乳動物細胞懸浮液，以及在經由血管投予哺乳動物細胞時的肺栓塞形成預防劑作為課題。

本發明之特徵係將哺乳動物幹細胞等之哺乳動物細胞懸浮於含有以海藻糖或其衍生物或該等之鹽作為有效成分的生理性水溶液中，以製作含有哺乳動物細胞及海藻糖或其衍生物或該等之鹽作為有效成分之為了預防在經由血管投予哺乳動物細胞時形成肺栓塞的哺乳動物細胞懸浮液。作為該哺乳動物細胞，哺乳動物幹細胞以外可舉出胰島細胞、樹狀細胞、自然殺手細胞、阿爾發·貝塔 T 細胞、伽瑪·德爾塔 T 細胞、細胞毒性 T 細胞等，此外，作為上述哺乳動物幹細胞可合適地舉例哺乳動物間葉系幹細胞或哺乳動物多能性幹細胞。

## 【英文】

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：  
無

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

含有海藻糖之預防肺栓塞用哺乳動物細胞懸浮液

## 【技術領域】

[0001] 本發明係關於含有哺乳動物細胞及海藻糖或其衍生物或該等之鹽的爲了預防在經由血管投予哺乳動物細胞時之肺栓塞形成的哺乳動物細胞懸浮液，以及含有海藻糖或其衍生物或該等之鹽作爲有效成分的在經由血管投予哺乳動物細胞時之肺栓塞形成的預防劑。

## 【先前技術】

[0002] 近年，由於幹細胞研究的急速發展，再生醫療之勢頭正在高漲，這方面的知識與理解不只於研究者，也廣泛地普及於一般人。使用幹細胞之再生醫療，係利用幹細胞所持有的自我複製能力及多分化能力、或幹細胞分泌的因子，用以回復各式各樣因疾病而受損傷的細胞或組織之機能爲目的之醫療。白血病及再生不良性貧血等血液難治之症患者進行骨髓移植後，造血系幹細胞著生於患者體內，將近一生都可維持造血功能之事成爲可能。此外，最近多數研究者以將造血幹細胞以外之幹細胞用於臨床應用爲目標，對中樞神經、末梢神經、骨髓、小腸等之中的幹細胞進行認定，並開始針對外傷性疾病或組織變性疾病

實踐組織幹細胞的移植治療（非專利文獻 1~3）。

[0003] 爲了讓哺乳動物細胞能效率良好地被移植到目標損傷部位（患部），謀求幹細胞移植方法（移植途徑）之最適化被認爲是很重要的。至今爲止，作爲幹細胞的移植方法主要有四種方法，即已知的定位性[直接]移植法、髓腔內[腦脊髓內]移植法、經靜脈性移植法及經動脈性移植法。在這之中，定位性移植法係將幹細胞直接移入患部的方法。若使用定位性移植法，雖然侵襲稍劇，但由於是直接投予至患部，著生的捐贈者幹細胞較多，因此可減少投予的幹細胞數。另一方面，髓腔內移植法係透過腦室穿刺法將幹細胞移入髓腔內的方法。髓腔內移植法雖正被檢討主要作爲治療腦中風、腦損傷、脊髓損傷等腦疾病的方法，但腦室穿刺潛在著招至新腦損傷的風險等，在臨床應用上仍殘留許多的課題。

[0004] 經靜脈性移植法及經動脈性移植法係將幹細胞等的細胞移入各動脈及靜脈內的方法（血管經由投予法）。使用血管經由投予法的話，雖然著生的捐贈者肝細胞數量較少於使用定位性移植法，但伴隨低侵襲性的同時，使得幹細胞等的細胞及幹細胞等的細胞分泌之因子能夠循環至全身。最近，作爲於臨床進行之血管經由投予法，已知有對於腦中風疾病之經靜脈性移植間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cells；MSC）的方法或對於腦中風疾病之經靜脈性移植單核球的方法、或經靜脈性移植胰島細胞至 I 型糖尿病患者的方法等。

[0005] 作為使用血管經由投予法來移植幹細胞等的細胞之風險，已被指出經動脈或經靜脈投予的細胞，在通過肺時會產生堵塞肺動脈的微血管的狀態（肺栓塞），其結果招致肺機能及心機能下降（肺栓塞症），甚至依情況有至死的危險性。為將肺栓塞形成及肺栓塞症防範於未然，在臨床現場進行投予幹細胞中，會以脈搏血氧儀監測末梢血中氧分壓，並同時進行幹細胞的移植。

[0006] 另一方面，海藻糖（trehalose）係一種葡萄糖與 1,1-糖苷結合而成的雙糖，海藻糖因為呈現甘甜且有高度保水力，已被使用於各式各樣的食品及化妝品。此外，因為海藻糖能使得細胞膜安定化，且具有抑制細胞傷害的性質，已被使用於臟器移植時作為臟器保護液的有效成分。ET-Kyoto 液及 New ET-Kyoto 液等含有海藻糖的優秀臟器保存液已被開發出來（專利文獻 1 及 2、非專利文獻 4）。然而，讓幹細胞等的細胞懸浮於含有海藻糖的溶液中，並經由血管投予細胞懸浮液的情形下，能否降低細胞引起肺栓塞形成的風險以及預防肺栓塞症尚屬不明。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[0007]

[特許文獻 1] 日本特許第 3253131 號公報

[特許文獻 2] 國際公開第 2007/043698 號手冊

[非專利文獻]

[0008]

[非專利文獻 1] Gage, F.H. Science 287: 1433-1438  
(2000)

[非專利文獻 2] Morrison, S.J. et al., Cell 96: 737-749  
(1999)

[非專利文獻 3] Batle, E. et al., Cell 111: 251-263  
(2002)

[非專利文獻 4] Chem, F. et al., Yonsei Med. J. 45:  
1107-1114 (2004)

### 【發明內容】

#### [發明欲解決之課題]

[0009] 本發明之課題係提供一種在經由血管投予哺乳動物幹細胞等的哺乳動物細胞時能預防肺栓塞形成的哺乳動物幹細胞懸浮液，以及在經由血管投予哺乳動物細胞時的肺栓塞形成預防劑。

#### [解決課題之手段]

[0010] 本發明者們已發現將哺乳動物幹細胞懸浮於含有海藻糖的溶液中，能抑制哺乳動物幹細胞的凝集和抑制生存率下降（日本特願 2010-251273）。幹細胞凝集而成的細胞塊塞住肺動脈微血管雖被認為是幹細胞移植引起肺栓塞形成的原因，但相對於幹細胞，例如間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cells；MSC）的大小為 10~50 $\mu$ m，

肺動脈微血管的內徑為  $10\mu\text{m}$ ，因為 MSC 較肺動脈的微血管更大，所以只單純地阻止細胞凝集的話，被認為是無法阻止幹細胞引起的肺栓塞形成。本發明者們將 MSC 懸浮於含有海藻糖的乳酸林格氏溶液，並向大鼠靜脈投予 MSC 懸浮含海藻糖乳酸林格氏溶液後，於投予中或投予後均沒有發現血中氧分壓的下降，此外，相較於對照組之使用不含海藻糖的乳酸林格氏溶液或生理食鹽水作為懸浮液的情形，發現 MSC 集團於肺中的堆積減少了，而完成了本發明。

[0011] 即本發明係關於：（1）含有哺乳動物細胞及海藻糖或其衍生物或該等之鹽之為了在經由血管投予哺乳動物細胞時預防肺栓塞形成的哺乳動物細胞懸浮液，或（2）如上述（1）記載之哺乳動物細胞懸浮液，其中哺乳動物細胞為哺乳動物幹細胞，或（3）如上述（2）記載之哺乳動物細胞懸浮液，其中哺乳動物幹細胞為哺乳動物間葉系幹細胞或哺乳動物多能性幹細胞，或（4）如上述（1）～（3）中任一項記載之哺乳動物細胞懸浮液，其中哺乳動物細胞包含單一細胞狀態的哺乳動物細胞，或（5）如上述（1）～（4）中任一項記載之哺乳動物細胞懸浮液，其中海藻糖或其衍生物或該等之鹽的濃度為 0.1～20% 範圍內。

[0012] 此外本發明係關於：（6）一種在經由血管投予哺乳動物細胞時的肺栓塞形成預防劑，其含有海藻糖或其衍生物或該等之鹽作為有效成分，或（7）如上述（6）

記載之預防劑，其中哺乳動物細胞為哺乳動物幹細胞，或（8）如上述（7）記載之預防劑，其中哺乳動物幹細胞為哺乳動物間葉系幹細胞或哺乳動物多能性幹細胞。

[0013] 再者本發明係關於：（9）一種海藻糖或其衍生物或該等之鹽之使用，其係為了調製在經由血管投予哺乳動物細胞時之肺栓塞形成預防劑，或（10）如上述（9）記載之使用，其中哺乳動物細胞為哺乳動物幹細胞。

#### [發明效果]

[0014] 依據本發明，能夠降低在經由血管投予哺乳動物幹細胞等的哺乳動物細胞時肺栓塞形成的風險，且能夠降低肺栓塞症發病的風險。

#### 【圖式簡單說明】

[0015]

[圖 1] 表示分別投予三種 MSC 懸浮液（MSC 懸浮生理食鹽液[...▲...]、MSC 懸浮乳酸林格氏溶液[...●...]、及 MSC 懸浮含海藻糖乳酸林格氏溶液[—■—]）之大鼠的血中氧分壓（ $pO_2$ ）之測定結果的圖。縱軸係顯示血中氧分壓。此外，血中氧分壓係以投予 MSC 懸浮液前（0 分）之血中氧分壓作為 1 的相對值表示。另外，橫軸係顯示投予 MSC 懸浮液開始後之時間。

[圖 2] 表示分別投予三種 MSC 懸浮液（MSC 懸浮生理食鹽水、MSC 懸浮乳酸林格氏溶液及 MSC 懸浮含海藻

糖乳酸林格氏溶液)之大鼠(分別為圖中之左、中央及右)的以影像解析 MSC 生體內分佈後的結果之圖。

### 【實施方式】

[0016] 作為本發明之在經由血管投予哺乳動物幹細胞等的哺乳動物細胞時之用於預防肺栓塞形成的哺乳動物細胞懸浮液，只要是含有哺乳動物幹細胞等的哺乳動物細胞及海藻糖或其衍生物或該等之鹽(以下稱為海藻糖類)，就沒有特別的限制。再者，作為本發明之在經由血管投予哺乳動物幹細胞等的哺乳動物細胞時的肺栓塞形成預防劑，只要含有以海藻糖類作為有效成分的組成物，就沒有特別的限制。上述之哺乳動物雖能以小鼠、大鼠、倉鼠、天竺鼠等齧齒目，兔子等兔目，豬、牛、山羊、馬、綿羊等有蹄目，犬、貓等貓目，人、猴、恆河獼猴、食蟹猴、狨猴、紅毛猩猩、黑猩猩等靈長類作為示例，但在這之中又以小鼠、豬、人可作為合適的示例。此外作為上述之哺乳動物細胞，除了用於再生醫療等經由血管投予的哺乳動物幹細胞之外，亦能以用於 I 型糖尿病患者經由靜脈投予的哺乳動物之胰島細胞、用於癌症患者經由靜脈投予的哺乳動物之樹狀細胞、自然殺手細胞、阿爾發·貝塔( $\alpha\beta$ ) T 細胞、伽瑪·德爾塔( $\gamma\delta$ ) T 細胞、細胞毒性 T 細胞(cytotoxic T lymphocyte; CTL)等細胞作為示例。

[0017] 此外上述所謂之「幹細胞」，係指擁有自我複製能力及分化·增值能力的未成熟細胞。相應於其分化

能力，幹細胞包含多能性幹細胞（pluripotent stem cell）、複能性幹細胞（multipotent stem cell）、單能性幹細胞（unipotent stem cell）等亞集團。所謂多能性幹細胞，係指雖不能自成個體，但有能力分化成爲所有構成生體之組織及細胞的細胞。所謂複能性幹細胞，係指雖不是所有種類，但有能力分化成複數種類之組織及細胞的細胞。所謂單能性幹細胞，係指有能力分化成特定之組織及細胞的細胞。

[0018] 作爲多能性幹細胞，可舉例胚性幹細胞（ES 細胞）、EG 細胞、iPS 細胞等。ES 細胞可透過將內部細胞塊在餵養細胞（feeder cell）上或於含有 LIF 的培養基中培養的方式製造。ES 細胞的培製方法，例如 WO96/22362、WO02/101057、US5,843,780、US6,200,806、US6,280,718 等均有記載。EG 細胞可透過在含有 mSCF、LIF 及 bFGF 的培養基中培養原生殖細胞的方式製造（Cell, 70: 841-847,1992）。iPS 細胞可透過將 Oct3/4、Sox2 及 Klf4（因應必要時再加入 c-Myc 或 n-Myc）等重編程因子（reprogramming factor）導入體細胞（例如纖維母細胞、皮膚細胞等）內的方式製造（Cell, 126: p.663-676, 2006; Nature, 448: p.313-317, 2007; Nat Biotechnol, 26; p,101-106, 2008; Cell 131: p.861-872, 2007; Science, 318: p.1917-1920, 2007; Cell Stem Cells 1: p.55-70, 2007; Nat Biotechnol, 25: p.1177-1181, 2007; Nature, 448: p.318-324, 2007; Cell Stem Cells

2: p.10-12, 2008; Nature 451: p.141-146, 2008; Science, 318: p.1917-1920, 2007) 。藉由培養將體細胞的核經核移植所製作而成之初期胚而樹立的幹細胞，作為多能性幹細胞亦佳 ( Nature, 385, 810 (1997) ; Science, 280, 1256 (1998) ; Nature Biotechnology, 17, 456 (1999) ; Nature, 394, 369 (1998) ; Nature Genetics, 22, 127 (1999) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 14984 (1999) ) 、 Rideout III 等 ( Nature Genetics, 24, 109 (2000) ) 。

[0019] 作為複能性幹細胞，可舉例能夠分化成為脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞等細胞的間葉系幹細胞，能夠分化成為白血球、紅血球、血小板等血球系細胞的造血系幹細胞，能夠分化成為神經元、星狀細胞、寡樹突細胞等細胞的神經系幹細胞，骨髓幹細胞、生殖幹細胞等之體性幹細胞等。複能性幹細胞以間葉系幹細胞較佳。所謂間葉系幹細胞，係指能夠分化成為成骨細胞、軟骨母細胞及脂肪母細胞中全部或數種的幹細胞。機能性幹細胞能夠以眾所周知的方法自生體單離。例如間葉系幹細胞，能自哺乳動物骨髓、脂肪組織、末梢血、臍帶血等以周知的一般方法採集。例如透過骨髓穿刺後的造血系幹細胞等之培養、繼代，能夠單離人類間葉系幹細胞 ( Journal of Autoimmunity, 30 (2008) 163-171 ) 。複能性幹細胞也可以透過在適當的誘導條件下培養上述多能性幹細胞的方式獲得。

[0020] 作為本發明的哺乳動物細胞懸浮液中含有之

幹細胞等的細胞，可舉例附著性細胞。附著性細胞雖然在懸浮液中容易凝集，但由於本發明的懸浮液中含有海藻糖類，故可有效地抑制此凝集。本說明書中所謂之「附著性」細胞係指藉由接著於立基點，能夠進行生存、增殖、生產物質的立基點依附性細胞。作為附著性幹細胞，可舉例多能性幹細胞、間葉系幹細胞、神經系幹細胞、骨髓幹細胞、生殖幹細胞等。附著性幹細胞之中，以間葉系幹細胞或多能性幹細胞較佳。

[0021] 哺乳動物細胞可為自生體分離出來的，或者是於體外繼代培養的亦可。此外，本發明的哺乳動物細胞懸浮液中含有之哺乳動物細胞（集團），使用已單離或已被精製的較佳。本說明書中所謂之「單離或精製」係指實施去除目標成分以外的成分之操作。被單離或精製的哺乳細胞的純度（相對於全細胞數，哺乳動物幹細胞數等目標細胞的比例），通常為 30% 以上，較佳為 50% 以上，更佳為 70% 以上，再更佳為 90% 以上（例如 100%）。

[0022] 本發明的懸浮液中含有之哺乳動物細胞（集團）係以含有單一細胞（Single Cell）狀態的哺乳動物細胞為佳。本說明書中所謂之「單一細胞狀態」係指未與其他細胞聚集而形成塊狀（即未凝集的狀態）的狀態。單一細胞狀態的哺乳動物細胞，可透過將體外培養的哺乳動物細胞以胰蛋白酶 / EDTA 等酵素處理的方式調製。哺乳動物細胞中所含單一細胞狀態之哺乳動物細胞的比例，通常為 70% 以上，較佳為 90% 以上，更佳為 95% 以上，再更

佳為 99% 以上（例如 100%）。單一細胞狀態細胞的比例，能將哺乳動物細胞分散於 PBS，在顯微鏡下觀察，再以隨機抽樣選擇複數個（例如 1000 個）細胞來調查是否凝集來決定的。

[0023] 對本發明的懸浮液而言，以浮游的哺乳動物細胞較佳。本說明書中所謂之「浮游」，係指細胞不會接觸到裝入懸浮液之容器的內壁而維持在懸浮液中。

[0024] 作為本發明中使用之海藻糖類中的海藻糖，除了兩個  $\alpha$ -葡萄糖以 1,1-糖苷結合而成的雙糖類之  $\alpha, \alpha$ -海藻糖之外，雖亦可舉出例  $\alpha$ -葡萄糖和  $\beta$ -葡萄糖以 1,1-糖苷結合而成的雙糖類之  $\alpha, \beta$ -海藻糖或兩個  $\beta$ -葡萄糖以 1,1-糖苷結合而成的雙糖類之  $\beta, \beta$ -海藻糖，但其中以  $\alpha, \alpha$ -海藻糖較佳。此等海藻糖雖可化學合成、藉微生物生產、藉酵素生產等任一周知的方法製造，但亦可以使用市售品。例如，可舉例  $\alpha, \alpha$ -海藻糖（林原商事販賣公司製）、 $\alpha, \alpha$ -海藻糖（和光純藥公司製）等市售品。

[0025] 作為本發明中使用之海藻糖類中的海藻糖衍生物，只要是雙糖類的海藻糖與 1 個或複數糖單位結合而成的糖苷基海藻糖類便無特別地限制，糖苷基海藻糖類中包含了葡萄糖苷基海藻糖、麥芽糖基海藻糖、麥芽三糖基海藻糖。

[0026] 作為本發明中使用之海藻糖類中的海藻糖或其衍生物的鹽，可舉例例如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽、磷酸鹽、硝酸鹽、硫酸鹽、醋酸鹽、丙酸鹽、甲苯磺酸

鹽、琥珀酸鹽、草酸鹽、乳酸鹽、酒石酸鹽、乙醇酸鹽、甲磺酸鹽、丁酸鹽、戊酸鹽、檸檬酸鹽、反丁烯二酸鹽、順丁烯二酸鹽、蘋果酸鹽等酸附加鹽，鈉鹽、鉀鹽、鈣鹽等金屬鹽，以及銨鹽、烷基銨鹽等。此等鹽在使用時作為溶液使用，其作用以同效於海藻糖者較佳。此等鹽即使已形成水合物或溶劑合物亦可，也能以單獨任一種或適當地組合兩種以上的方式使用。

[0027] 作為適用於本發明之哺乳動物細胞懸浮液及肺栓塞形成預防劑之海藻糖類濃度，只要是能夠預防幹細胞等的細胞引起之肺栓塞形成的濃度即可，雖然可以因應懸浮細胞數及細胞濃度來適宜地選擇，但以能抑制哺乳動物細胞凝集與生存率下降的充分濃度為佳。雖然越高濃度的海藻糖類預防肺栓塞形成的效果外，抑制凝集與生存率下降的效果會變得越高，但海藻糖類濃度過高的話，便會有對細胞的生存率引起不良影響的可能性。例如適用於本發明之哺乳動物細胞懸浮液及肺栓塞形成預防劑的海藻糖類濃度，通常為 0.1% 以上，較佳為 0.5% 以上，更佳為 1.0% 以上。此外，從迴避對幹細胞生存率之不良影響的觀點來看，通常為 20% 以下，較佳為 15% 以下，更佳為 5.0% 以下。據此，懸浮液中海藻糖類的濃度為 0.1~20%，較佳為 0.5~15%，更佳為 1.0~5.0%。

[0028] 本發明中所謂之經由血管投予時的「肺栓塞形成」，係指經動脈或經靜脈移植（投予）的哺乳動物細胞，使肺末梢的動脈系，例如 1 或 2 以上之肺動脈的微血

管形成阻塞的狀態。前述中所謂之經移植之哺乳動物細胞使肺末梢的動脈系「阻塞之狀態」，細胞並非一定要在肺末梢的動脈系中停止，只要妨害該處的血流便足矣。此外，這種情形的血流不需要完全停止，廣義地說只要會導致血流降低至發生肺機能下降的程度便足矣。前述中所謂之「肺機能」，雖然主要是指從大氣中攝取氧氣至血液中，但也包含著將二氧化碳或其他氣體排出。發生細胞引起之肺栓塞形成之後，肺動脈微血管中的血流降低，發生呼吸過速（呼吸數增加）及心搏過速（脈搏數增加），肺動脈壓等的血壓上升，或者血中氧分壓降低。爲此，藉由預防細胞移植引起之肺栓塞形成，可減低肺栓塞引起呼吸過速、心搏過速、血壓上升或血中氧分壓降低等的風險。此外，細胞移植造成的肺栓塞被形成之後，根據情況肺機能下降、心機能（使血液移動至動脈內部的機能及心臟使血液移動至靜脈之外的機能等）下降等之肺栓塞症會發病。進而，本發明之肺栓塞形成，還包含哺乳動物細胞使肺末梢的動脈系加上其以外的血管均形成阻塞狀態的情形。

[0029] 在本發明的哺乳動物細胞懸浮液中，哺乳動物細胞被懸浮於含有作爲有效成分之普通海藻糖類的生理性水溶液之中。另一方面，本發明的肺栓塞形成預防劑大致分爲液體型與非液體型。液體型預防劑係由含有作爲有效成分之普通海藻糖類的生理性水溶液所構成，將哺乳動物細胞懸浮於該液體型預防劑中之後，便可調製本發明的哺乳動物細胞懸浮液。此外，非液體型預防劑係由添加於

懸浮了普通哺乳動物細胞的生理性水溶液中之粉狀體等的海藻糖類含有物所構成，該非液體型預防劑添加於懸浮了哺乳動物細胞的生理性水溶液中之後，便可調製本發明的哺乳動物細胞懸浮液。

[0030] 再者，作為本發明之哺乳動物細胞懸浮液的不同態樣，係可舉例在經由血管投予含有哺乳動物細胞及海藻糖類的哺乳動物細胞懸浮液之幹細胞等的細胞移植中，預防肺栓塞形成的方法。此外，作為本發明之肺栓塞形成預防劑的不同態樣，係可舉例為了調製經由血管投予哺乳動物細胞時的肺栓塞形成預防劑之海藻糖類的使用。

[0031] 作為上述之生理性水溶液，可舉例例如生理食鹽水、磷酸緩衝化生理食鹽水、Tris 緩衝化生理食鹽水、HEPES 緩衝化生理食鹽水、林格氏液（乳酸林格氏液、醋酸林格氏液、重碳酸林格氏液等）、5% 葡萄糖水溶液、哺乳動物培養用之液體培養基、等張劑（葡萄糖、D-山梨糖醇、D-甘露醇、乳糖、氯化鈉等）水溶液等的等張水溶液，其中又以林格氏液較佳，乳酸林格氏液、醋酸林格氏液或重碳酸林格氏液更佳，乳酸林格氏液再更佳。本說明書中所謂之「等張」，係指滲透壓在 250~380 mOsm/l 的範圍內。生理性水溶液進而可含有安定劑（例如人類血清白蛋白、聚乙二醇等）、緩衝劑（例如磷酸鹽緩衝液、醋酸鈉緩衝液）、螯合劑（例如 EDTA、EGTA、檸檬酸、柳酸鹽）、溶解輔助劑、保存劑、氧化防止劑等。

[0032] 本發明者們發現，海藻糖類可與已被證明與

海藻糖類同樣具有預防肺栓塞形成作用的聚葡萄糖類一起併用。此外，能將被期待與海藻糖類同樣具有預防肺栓塞形成作用的麥芽糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖、阿洛糖、半乳糖、山梨糖醇、木糖醇、糊精、環糊精等替換成海藻糖類或與海藻糖類一同使用。

[0033] 本發明之細胞懸浮液所含有的幹細胞等細胞係以浮游狀態存在，通常浮游狀態的細胞易於凝集，但由於本發明海藻糖類的效果抑制了細胞凝集，使得單一細胞狀態能夠長時間地維持。

[0034] 要讓哺乳動物細胞懸浮於含有海藻糖類的生理性溶液中，可以沖吸（pipetting）或輕敲（tapping）等該技術領域內周知的方法實施。本發明之哺乳動物細胞懸浮液的溫度通常為 0~37℃，較佳為 0~25℃ 的範圍內。本發明之懸浮液中哺乳動物細胞的密度，雖然只要是能預防幹細胞等細胞引起的肺栓塞形成之密度即可，但以能夠透過海藻糖類達到抑制哺乳動物細胞凝集與生存率降低之密度更佳，通常在  $10^3 \sim 10^{10}$  個/ml 的範圍內。

[0035] 本發明之哺乳動物細胞懸浮液，因為藉由海藻糖類抑制了哺乳動物細胞的凝集，藉由用此實施細胞移植，可減低細胞凝集物阻塞套管的風險。此外，因本發明之哺乳動物細胞懸浮液為藉由海藻糖類抑制了懸浮液中哺乳動物細胞的生存率降低，若使用本發明的懸浮液，便能以更佳狀態的細胞實施細胞移植，故可期待治療效果的提升。

[0036] 本發明的哺乳動物細胞懸浮液或肺栓塞形成預防劑，透過收容於適當的滅菌容器內，便可製造作為哺乳動物細胞懸浮液製劑或肺栓塞形成預防製劑。作為該容器，可舉例瓶子、小瓶、針筒、輸液袋等可塑性的袋子、試驗管等。此等容器可以由如玻璃、塑膠之類的各種材料形成。又，對哺乳動物細胞懸浮液製劑用的容器而言，可以能夠將容器內之本發明的哺乳動物細胞懸浮液以點滴注入患者之方式，接續導管（及／或）注射針。

[0037] 以下雖透過實施例做更具體的說明，但本發明之技術範圍並不侷限於這些示例。

#### [實施例 1]

##### [0038]

1. 本發明之幹細胞懸浮用溶液可用於預防幹細胞引起的肺栓塞形成之確認

##### 1-1 方法

1-1-1 用於大鼠靜脈投予之 MSC 懸浮液的調製

(1) 將來自 Lew/SsN Slc 系、雌性大鼠脂肪的 MSC 藉由胰蛋白酶消化處理剝離後，以  $200\times g$  離心 3 分鐘來回收細胞。

(2) 用杜氏磷酸緩衝食鹽水 (D-PBS) (Invitrogen 公司製) 將 MSC 調製成  $2\times 10^6$  個細胞/ml 後，將  $1\times 10^7$  個細胞 (5ml) 分注於 3 個試管中，再各自添加  $13\mu l$  的  $8.3\text{mg/ml}$  XenoLight DiR 螢光試藥 (Caliper 公司製，製品

編號 125964) ，維持 37°C 的溫度 30 分鐘，進行 MSC 的標識。

〔3〕以 200×g 離心 3 分鐘去除標識溶液，加入 5ml D-PBS 後再度進行 200×g 離心 3 分鐘後，去除上清液。將沉澱的細胞分別以 MSC 濃度成爲  $2 \times 10^6$  個細胞/ml 懸浮於生理食鹽液（大塚製藥工廠公司製「大塚生食注」）、乳酸林格氏溶液（大塚製藥工廠公司製「Lactec 注」）及含有 3%（30mg/ml）海藻糖（和光純藥公司製）的乳酸林格氏溶液之中，製作出了 MSC 懸浮生理食鹽液、MSC 懸浮乳酸林格氏溶液、MSC 懸浮含海藻糖乳酸林格氏溶液。

[0039]

#### 1-1-2 MSC 懸浮液對大鼠之靜脈投予

〔1〕大鼠係使用 Lew/SsN Slc 系，雌性 10 週齡者。在投予 MSC 懸浮液 24 小時前實施絕食。

〔2〕爲確保大鼠的投予途徑，以保定器保定大鼠，再以 24G 的靜脈留置針插入尾靜脈內。

〔3〕將 50mg/kg 戊巴比妥（共立製藥股份有限公司製）急速投予至尾靜脈內做麻醉處理。爲維持麻醉，一小時後再執行追加投予 25mg/kg 戊巴比妥（共立製藥股份有限公司製）。

〔4〕爲防止血液凝固，自尾靜脈投予途徑投予 100 IU/kg 肝素（持田製藥股份有限公司製）。

〔5〕以切開頸部使得左頸動脈露出，插入並固定塑

料管。

〔 6 〕 使用體溫維持裝置（將股份有限公司 Neuroscience 製直腸溫探針插入 3.5 公分）讓體溫保持 37°C。

〔 7 〕 氣管內以 16G 的塑膠製留置針插管，置留針的另一端與人工呼吸器接續後置於人工呼吸管理下（藉由空氣換氣，換氣量：10ml/kg/次，換氣次數：約 70 行程/分）。

〔 8 〕 為避免表現自發性呼吸行爲，自尾靜脈投予途徑投予肌肉鬆弛藥（2 或 4mg/kg 的 Myobloc 靜脈注射液；MSD 股份有限公司製）。

〔 9 〕 為測量 MSC 懸浮液投予前的血液氣體分壓（氧分壓 [pO<sub>2</sub>] 及二氧化碳分壓（mmHg），自頸動脈線進行採血 300μl。

〔 10 〕 將依照上述「1-1-1 用於大鼠靜脈投予之 MSC 懸浮液的調製」記載之方法所製作而成的 3 種 MSC 懸浮液（MSC 懸浮生理食鹽液、MSC 懸浮乳酸林格氏溶液、MSC 懸浮含海藻糖乳酸林格氏溶液）分別對大鼠的尾靜脈投予四十分鐘。再者，將分別於大鼠靜脈投予 MSC 懸浮生理食鹽液、MSC 懸浮乳酸林格氏液、MSC 懸浮含海藻糖乳酸林格氏溶液的群，分為 MSC 懸浮生理食鹽液投予群（n=4）、MSC 懸浮乳酸林格氏溶液投予群（n=4）及 MSC 懸浮含海藻糖乳酸林格氏溶液投予群（n=4）。

[0040]

### 1-1-3 投予過 MSC 懸浮液之大鼠中的血中氧分壓及 MSC 影像解析

〔1〕從投予 MSC 懸浮液開始到 60 分鐘後，每 10 分鐘自頸動脈線進行採血 300 $\mu$ l，以 Chiron348 (Siemens 公司製) 測定血液氣體分壓 (氧分壓 [pO<sub>2</sub>]及二氧化碳分壓) (mmHg)。

再者，作為對照組，使用上述「1-1-2 MSC 懸浮液對大鼠之靜脈投予」步驟〔8〕中調製之於投予 MSC 懸浮液前所採血者。

〔2〕從 MSC 懸浮液投予經過六十分鐘後，自頸動脈放血進行安樂死。

〔3〕摘出肺部，透過使用 IVIS Spectrum (Caliper life sciences 公司製) 的影像解析來測定螢光及發光強度 (激發波長 710nm，吸收波長 780nm)。

[0041]

## 1-2 結果

### 1-2-1 投予過 MSC 懸浮液之大鼠中的血中氧分壓解析

使用生理食鹽液及乳酸林格氏液作為 MSC 懸浮液的情況下，在一開始投予 MSC 懸浮液便可發現血中氧分壓的下降，至少直到投予結束後 20 分鐘的時間點 (投予後 60 分鐘) 為止，血中氧分壓的下降為明顯的 (圖 1、表 1)。另一方面，使用含海藻糖乳酸林格氏溶液作為 MSC 懸浮液的情況下，在投予中 (投予開始 0~40 分鐘後) 及

投予後（投予開始 40~60 分鐘後）之至少 20 分鐘，並未確認到血中氧分壓的下降（圖 1、表 1）。從這些結果看來，相對於投予（移植）以不含海藻糖溶液（生理食鹽液及乳酸林格氏溶液）懸浮 MSC 者被認為使肺栓塞形成發生，投予（移植）以含海藻糖乳酸林格氏溶液懸浮 MSC 者被認為預防了肺栓塞形成。

[0042]

[表 1]

平均值		0 分鐘	10 分鐘	20 分鐘	30 分鐘	40 分鐘	50 分鐘	60 分鐘
pO <sub>2</sub>	MSC 懸浮生理食鹽液投予群	1	0.827	0.804	0.785	0.790	0.825	0.901
	MSC 懸浮乳酸林格氏溶液投予群	1	0.810	0.755	0.727	0.718	0.731	0.816
	MSC 懸浮含海藻糖乳酸林格氏溶液投予群	1	1.118	1.067	1.075	1.034	1.070	1.105

表中之血中氧分壓（pO<sub>2</sub>）係以 MSC 懸浮液投予前採血者（0 分鐘）作為 1 時的相對值表示。此外，數值係表示在進行 4 次獨立實驗結果的平均值。

[0043]

#### 1-2-2 投予過 MSC 懸浮液之大鼠中的 MSC 影像解析

藉由影像解析調查大鼠生體中投予後之 MSC 的生體內分佈，在使用生理食鹽液作為 MSC 懸浮液的情況下，肺中來自 MSC 的螢光量最高為明顯的（圖 2、表 2）。另一方面，在使用含海藻糖乳酸林格氏溶液作為 MSC 懸浮液的情況下，來自 MSC 的螢光量最低，此外，和用生理

食鹽液的情況相比，可認定統計學上有顯著差異（以 Tukey's Test  $p < 0.05$ ）（圖 2、表 2）。從這些結果看來，相對於投予（移植）以不含海藻糖溶液（生理食鹽水及乳酸林格氏液）懸浮 MSC 者 MSC 堆積於肺，特別是肺微血管中，投予（移植）以含海藻糖溶液（乳酸林格氏溶液）懸浮 MSC 者顯示該 MSC 於肺，特別是肺微血管中的堆積減少了。

[0044]

[表 2]

	相對全放射效率 (生食=100%)	相對全放射效率之標準差 (生食=100%)
MSC 懸浮生理食鹽液投予群	100.0%	0.0%
MSC 懸浮乳酸林格氏溶液投予群	85.2%	9.4%
MSC 懸浮含海藻糖乳酸林格氏溶液投予群	62.1%	8.0%

Tukey's Test :  $p < 0.05$  (MSC 懸浮生理食鹽液投予群 vs. MSC 懸浮含海藻糖乳酸林格氏溶液投予群) ;  $p = 0.1477$  (MSC 懸浮乳酸林格氏溶液投予群 vs. MSC 懸浮含海藻糖乳酸林格氏溶液投予群)

表中的數值係表示在進行 4 次獨立實驗結果的平均值。

[0045] 從上述兩個結果，若使用不含海藻糖溶液來移植 MSC 的話，被認為是由於 MSC 在肺，特別是肺微血管中堆積使肺栓塞形成，使該處的氧氣攝取能力下降，血中氧分壓降低。另一方面，若使用含海藻糖溶液來移植

MSC 的話，被認為 MSC 在肺中的堆積（肺栓塞形成）被抑制，肺的氧氣攝取能力不會下降，血中氧分壓不會降低。

[產業上利用可能性]

[0046] 依據本發明，因為在移植 MSC 等之幹細胞等細胞時，預防肺栓塞形成，又可減低肺栓塞症發病的風險，故在再生醫療中的移植醫療領域或癌症治療領域是有用的。

## 申請專利範圍

1. 一種海藻糖或其衍生物或該等之鹽之使用，其係用以調製在經由血管投予哺乳動物幹細胞時之肺栓塞形成預防劑，前述海藻糖之衍生物係雙醣類的海藻糖與 1 個或複數個糖單位結合而成的醣苷基海藻糖類。

2. 如請求項 1 之使用，其中哺乳動物幹細胞係哺乳動物間葉系幹細胞或哺乳動物多能性幹細胞。