I512103

(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 I512103 B

(45)公告日： 中華民國 104 (2015) 年 12 月 11 日

(21)申請案號：101141978 (22)申請日： 中華民國 101 (2012) 年 11 月 12 日

(51)Int. Cl.： *C12M3/04 (2006.01)* *C08F20/06 (2006.01)*
C08F20/14 (2006.01) *C08F20/18 (2006.01)*
C08F20/20 (2006.01) *C08F20/28 (2006.01)*
C12N5/077 (2010.01) *C12N5/0775 (2010.01)*

(71)申請人：財團法人工業技術研究院 (中華民國) INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE (TW)
新竹縣竹東鎮中興路 4 段 195 號

(72)發明人：林佩如 LIN, PEI JU (TW)；圖尼艾爾 吉爾漢 TOURNIAIRE, GUILHEM (FR)；陳宜蓁 CHEN, YI CHEN (TW)；斯溫德爾斯 凱薩琳 SWINDELLS, KATHRYN (GB)；施冰如 SHE, BIN RU (TW)；許祥俊 HSU, HSIANG CHUN (TW)；廖智菁 LIAO, CHIH CHING (TW)；林思佑 LIN, SU YO (TW)

(74)代理人：洪澄文；顏錦順

(56)參考文獻：

WO 2009/099552A3 WO 2010/138486A1

審查人員：顏逸瑜

申請專利範圍項數：10 項 圖式數：5 共 38 頁

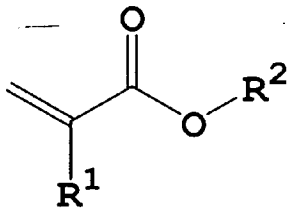
(54)名稱

細胞培養系統、以及無血清細胞培養方法

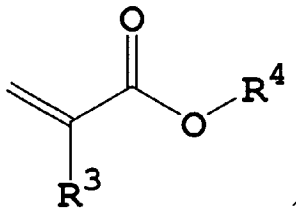
CELL CULTURE SYSTEM AND SERUM-FREE METHOD FOR CULTURING CELL

(57)摘要

本發明提出一種細胞培養系統，以及一無血清細胞培養方法。該細胞培養系統包含：一基質，其中該基質具有一表面；以及一聚合物位於該表面上，其中該聚合物係由一第一單體及一第二單體經由聚合反應所形成，其中該第一單體具有公式(I)所示結構，且該第二單體具有公式(II)所示結構：



公式（I）

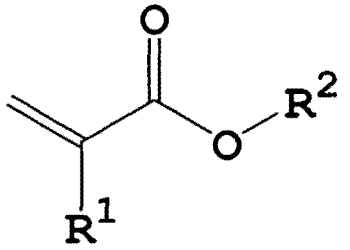


公式（II）

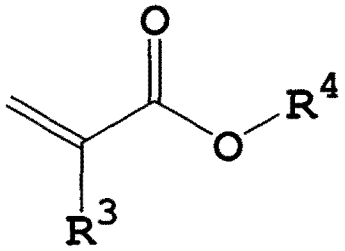
其中，R^1 係為氫、或甲基；R^2 係為甲基、乙基、或-$CH_2CH_2OCH_3$；R^3 係為氫、或甲基；及 R^4 係為氫、-$CH_2CH_2OCOCHCHCOOH$、-$CH_2CH_2OCOCH_2CH_2COOH$、或-CH_2CH_2COOH。

The disclosure provides a cell culture system and a serum-free method for culturing cell. The cell culture system includes a substratum, wherein the substratum has a surface. A polymer is disposed on the surface, wherein the polymer is prepared by polymerizing a first monomer with a second monomer. The first

monomer has a structure represented by Formula (I), and the second monomer has a structure represented by Formula (II):

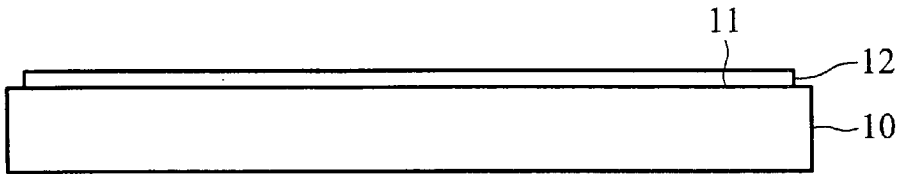


Formula (I)



Formula (II)

wherein, R^1 is hydrogen or methyl; R^2 is methyl, ethyl, or $-CH_2CH_2OCH_3$; R^3 is hydrogen or methyl; and, R^4 is hydrogen, $-CH_2CH_2OCOCHCHCOOH$, $-CH_2CH_2OCOCH_2CH_2COOH$, or $-CH_2CH_2COOH$.

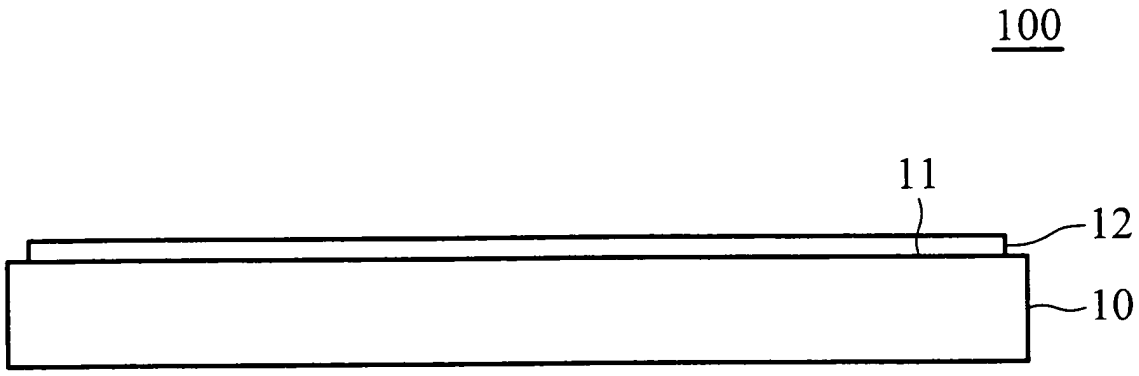


10・・・基質
11・・・上表面
12・・・聚合物膜層
100・・・細胞培養系統

第 1 圖

八、圖式：(如後所示)

公告本



第 1 圖

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關於一種細胞培養系統以及細胞培養方法，且特別是有關於一種無血清細胞培養系統及細胞培養方法。

【先前技術】

動物或人類細胞的體外培養，在傳統研究上係使用含有動物血清的體外培養基。然而血清之使用除了會使產物回收純化之困難度提升外，甚且易伴隨感染性物質污染、以及批次間品質不易控制的嚴重問題。

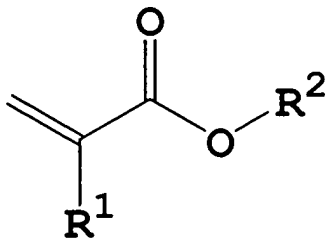
對於以無血清培養基(serum free medium, SFM)培養貼附型細胞時，通常會將細胞外間質(extracellular matrix, ECM)塗佈於培養器皿上或加於培養基中，協助細胞貼附生長，未貼附的細胞則會走向死亡路徑(apoptosis)。細胞外間質(extracellular matrix, ECM)的主要成份為醣胺多醣(glycosaminoglycan、GAG)、或更包含纖維蛋白質(fibrous protein，例如：膠原蛋白(collagen)、層黏連蛋白(laminin)、纖維結合蛋白(fibronectin)、彈性蛋白(elastin))。舉例來說，Invitrogen 公司所製造販售的 StemPro MSC SFM 即需要搭配含細胞外間質(例如 CELLstart™、由 Invitrogen 製造及販售)塗佈於培養皿上。然而，由於細胞外間質絕大部份為生物性蛋白質，因此生產成本高，且大多係由人類組織或血液中萃

取純化而得，因此品質較不穩定。

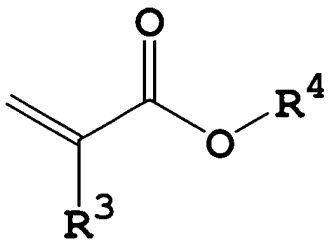
基於上述，發展出可替代細胞外間質以促進貼附型細胞生長的培養系統，避免細胞外間質的使用，實為目前細胞培養技術所期盼。

【發明內容】

本發明提出一種細胞培養系統，包含：一基質，其中該基質具有一表面；以及，一聚合物位於該表面上。值得注意的是，該聚合物係由一第一單體及一第二單體經由聚合反應所形成，其中該第一單體具有公式(I)所示結構，且該第二單體具有公式(II)所示結構：



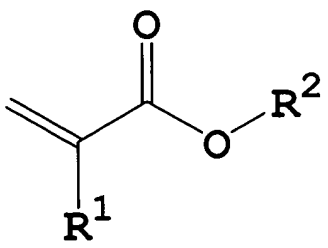
公式(I)



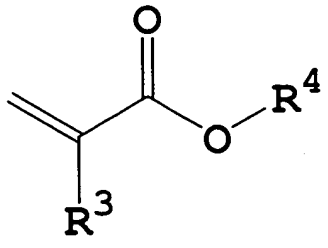
公式(II)

其中，R^1 係為氫、或甲基；R^2 係為甲基、乙基、或 $-CH_2CH_2OCH_3$；R^3 係為氫、或甲基；及 R^4 係為氫、$-CH_2CH_2OCOCHCHCOOH$、$-CH_2CH_2OCOCH_2CH_2COOH$、或 $-CH_2CH_2COOH$。

本發明亦提供一種無血清細胞培養方法，包含：提供一具有聚合物之基質；以及，將細胞置於該聚合物表面，以進行一細胞培養。其中，該聚合物係由一第一單體及一第二單體經由聚合反應所形成，其中該第一單體具有公式(I)所示結構，且該第二單體具有公式(II)所示結構：



公式(I)



公式(II)

其中，R^1 係為氫、或甲基；R^2 係為甲基、乙基、或 $-CH_2CH_2OCH_3$；R^3 係為氫、或甲基；及 R^4 係為氫、$-CH_2CH_2OCOCHCHCOOH$、$-CH_2CH_2OCOCH_2CH_2COOH$、或 $-CH_2CH_2COOH$。值得注意的是，在本發明所述之無血清細胞培養方法中，並沒有使用血清(serum)或細胞貼附因子(cell attachment factor)。

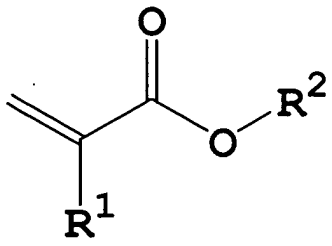
為讓本發明之上述和其他目的、特徵、和優點能更明顯易懂，下文特舉出較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下：

【實施方式】

本發明係揭露一種細胞培養系統以及一種無血清細胞培養方法，可在沒有血清(serum)或細胞貼附因子(cell attachment factor)存在的狀況下，利用特定的聚合物促進細胞貼附及生長，降低細胞的培養成本，並改善品質穩定性。

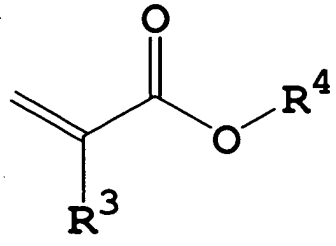
根據本發明一實施例，請參照第 1 圖，本發明所述的細胞培養系統 100，包含一基質(substratum)10，其中該基質 10 具有一表面 11。一聚合物層 12，係配置於該表面 11。值得注意的是，由於本發明係使用特定的聚合物層 12 來促進細胞貼附及生長，因此本發明所使用的基質 10

並無限定，只要可作為該聚合物層之承載(support)即可，可為習知所使用的任何基質。該基質的材質可例如為玻璃、陶瓷、樹脂、塑膠、或是半導體材料，而其形狀亦無限制，在此為簡化圖示，圖中僅以一平整矩形表示。此外，該基質 10 的一表面 11 可為一平面、曲面、或其結合，而該表面 11 可為一平整的表面、一粗糙的表面、或是具有複數孔洞的表面。本發明所述之聚合物層 12，係由一聚合物所構成，其中該聚合物包含由一第一單體及一第二單體經由聚合反應所得之產物。在此，該第一單體可為具有公式(I)所示結構之化合物：



公式(I)

其中，R^1 係為氫、或甲基；R^2 係為甲基、乙基、或 $-CH_2CH_2OCH_3$。舉例來說，該第一單體可包含甲基丙烯酸甲酯(methyl methacrylate、MMA)、甲基丙烯酸甲氧基乙酯(methoxy ethyl methacrylate、MEMA)、丙烯酸甲酯(methyl acrylate、MA)、丙烯酸乙酯(ethyl acrylate、EA)、或其組合；而該第二單體可為具有公式(II)所示結構之化合物：



公式(II)

其中，R^3 係為氫、或甲基；以及 R^4 係為氫、

$-CH_2CH_2OCOCHCHCOOH$、$-CH_2CH_2OCOCH_2CH_2COOH$、或$-CH_2CH_2COOH$。舉例來說，該第二單體可包含甲基丙烯酸(methacrylic acid、MA-H)、琥珀酸單[2-[(2-甲基-丙烯醯基)氧]乙基]酯(mono-2-(methacryloyloxy)ethyl succinate、MAES-H)、2-丙烯酸羧乙酯(2-carboxy ethyl acrylate、CEA)、單(2-丙烯醯乙基醚)琥珀酸(mono-(2-acryloyloxyethyl) succinate、AES-H)、丙烯酸(acrylic acid、A-H)、馬來酸單-2-(甲基丙烯醯氧基)乙酯(mono-2-(methacryloyloxy)ethyl maleate、MAEM-H)、或其組合。根據本發明某些實施例，用來進行聚合反應的該第一單體及該第二單體之莫耳比可介於 1:9 至 9:1 之間，例如介於 1:9 至 8:2 之間、介於 1:9 至 7:3 之間、介於 2:8 至 9:1 之間、介於 3:7 至 9:1 之間、或是介於 2:8 至 8:2 之間。上述由第一單體及第二單體經由聚合反應所得之聚合物可具有一重量平均分子量介於 800,000 至 4,000,000 之間，且該聚合物之分子量分佈係數(dispersion index)介於 1 至 3 之間。

舉例來說，本發明所述之聚合物其製備方式可包含以下步驟：首先，將該第一單體、第二單體、熱起始劑(thermoinitiator)偶氮二異丁腈(azobis(isobutyro)nitrile, AIBN)及溶劑，如二甲基甲醯胺(dimethylformamide, DMF)或異丙醇(isopropyl Alcohol, IPA)，置於一反應管中，內置

攪拌棒，並放入反應釜(Radleys Carousel reactor)中，將反應管充填氮氣 30 分鐘以去除氧氣；接著，將反應管封好，反應釜加熱至 60℃並攪拌過夜(overnight)。然後待冷卻至室溫後，反應後形成之聚合物再沉澱於 150 mL 溶劑(例如：去離子水、飽合鹽溶液(saturated salt solution)或乙醚(diethyl ether))中，沉澱聚合物再以溶劑(例如：去離子水、飽合鹽溶液(saturated salt solution)或乙醚(diethyl ether))清洗，於 40℃真空烘箱中將聚合物乾燥。

本發明所揭露之細胞培養系統，包括一基質 10，將上述之聚合物塗佈於該基質表面 11 之上，得到該聚合物層 12(聚合物在塗佈前可預先溶於揮發性溶劑(例如：四氫呋喃(tetrahydrofuran、THF))。基質表面可以加工處理表面電漿(surface plasma)，以活化表面使得聚合物層更佳貼附於基質上。需進行此表面活化步驟者，僅限於用在特定聚合物及特定基質。依下列步驟方法將聚合物塗佈於該基質表面：首先準備含有聚合物的溶劑，即將聚合物溶解於適當的溶劑中。然後，將此溶劑均勻塗佈於該基質表面，將聚合物溶劑留在基質表面作用，接下來將之乾燥或去除多餘的溶液。此外，該佈聚合物層的基質可放入 40℃烘箱，以確保去除殘留的溶劑。

形成聚合物以及將聚合物形成於一基質表面上的方法可為業界所常用的方法。舉例來說，可以利用電漿聚合技術(plasma polymerization)或是電漿誘導接枝聚合技術(plasma induced graft polymerization)以單

一步驟直接形成聚合物薄膜層於基質表面上。此外，有些共聚合物也可能可以由塊狀聚甲基丙烯酸甲酯(bulk poly(methyl methacrylate))、即商品名為帕斯佩有機玻璃(Perspex)或俗稱壓克力的材料)水解(hydrolysis)製備而得。

本發明亦提供一種無血清細胞培養方法，無需使用血清(serum)或細胞貼附因子(cell attachment factor)，即可完成貼附型細胞的培養。根據本發明另一實施例，該無血清細胞培養方法可包含：提供一具有聚合物之基質；以及，將細胞置於該聚合物表面，以進行一細胞培養。其中該聚合物係由上述具有公式(I)之第一單體及具有公式(II)之第二單體經由聚合反應所得。根據本發明一實施例，在該聚合物表面披覆之細胞可為一貼附型細胞(adherent cells)，例如間質幹細胞(mesenchymal stem cells)、或纖維母細胞(dermal fibroblasts)；間質幹細胞可來自不同組織來源，例如骨髓間質幹細胞(bone marrow mesenchymal stem cells)、脂肪幹細胞(adipose tissue- derived stem cells)、華頓凝膠幹細胞(Wharton's jelly stem cells，又稱之為臍帶幹細胞)。

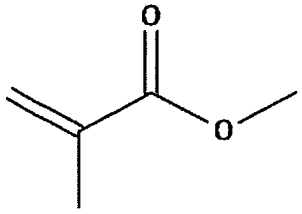
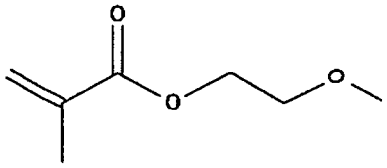
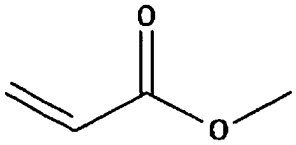
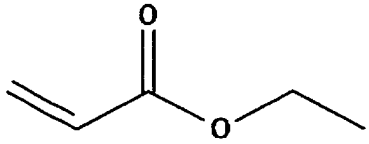
傳統以血清培養基或是添加有細胞外間質(extracellular matrix, ECM)之培養基所進行的細胞培養程式，具有易伴隨感染性物質污染、價格昂貴、以及細胞培養批次間品質不易控制等缺點。由於本發明所述之細胞培養方法可在完全不使用的血清及細胞外間質的條

件下進行細胞培養，且所使用之聚合物成本低廉，適合臨床應用，因此可有效取代傳統血清培養基或是添加細胞外間質的培養方式。

為了讓本發明之上述和其他目的、特徵、和優點能更明顯易懂，下文特舉數實施例及比較實施例，來說明本發明所述之含聚亞醯胺之膜層、以及蝕刻含聚亞醯胺之膜層的方法。

聚合物之製備

表 1 列出於本發明在製備聚合物中所使用之化合物其結構、名稱及代表符號，以期使本發明所述之製備例能更為清楚：

化合物結構	名稱	代表符號
	甲基丙烯酸甲酯 (methyl methacrylate)	MMA
	甲基丙烯酸甲氧基乙酯 (methoxy ethyl methacrylate)	MEMA
	丙烯酸甲酯 (methyl acrylate)	MA
	丙烯酸乙酯 (ethyl acrylate)	EA

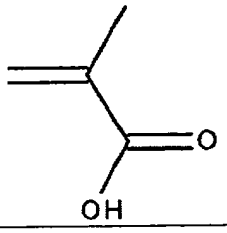
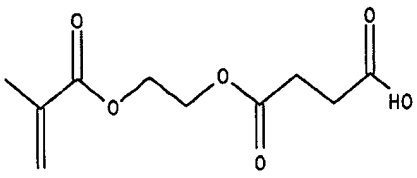
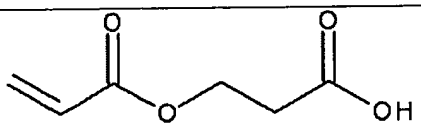
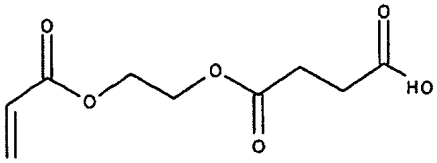
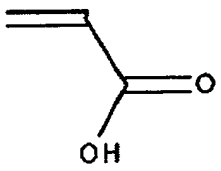
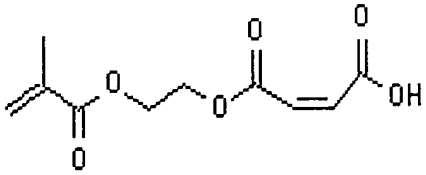
	甲基丙烯酸 (methacrylic acid)	MA-H
	琥珀酸單[2-[(2-甲基-丙烯醯基)氧]乙基]酯 (mono-2-(methacryloyloxy)ethyl succinate)	MAES-H
	2-丙烯酸羧乙酯 (2-carboxy ethyl acrylate)	CEA
	單(2-丙烯醯乙基醚)琥珀酸 (mono-(2-acryloyloxy ethyl) succinate)	AES-H
	丙烯酸(acrylic acid)	A-H
	馬來酸單-2-(甲基丙烯醯氧基)乙酯 (mono-2-(methacryloyloxy)ethyl maleate)	MAEM-H

表 1

製備例 1

首先，將該第一單體(MMA)、第二單體(MAES-H)、偶

氮二異丁腈(azobis(isobutyro)nitrile, AIBN)、及二甲基甲醯胺(Dimethylformamide, DMF)溶劑，置於一反應管中，內置攪拌棒。其中，該第一單體與該第二單體之莫耳比為 7:3。接著，將反應管放入反應釜(radleys Carousel reactor)中，並將反應管充入氮氣 30 分鐘再封好。然後，將反應釜加熱至 60℃，再冷卻至室溫後攪拌過夜(overnight)。反應後形成之聚合物再沉澱於 150 mL 的去離子水中，沉澱聚合物再以去離子水清洗。最後，經乾燥後，得到聚合物(1)。

聚合物以膠體滲透層析儀(gel Permeation Chromatography, GPC)量測所得之聚合物(1)之數量平均分子量(number average molecular weight、M_n)、重量平均分子量(weight average molecular weight、M_w)、以及分子量分佈(dispersion index、M_w/M_n)，結果如表 2 所示。

製備例 2-30

如製備例 1 之相同方式進行，但依據表 2 所述來取代製備例 1 所使用之第一單體、第二單體、以及第一單體與該第二單體之莫耳比，得到聚合物(2)-(30)。

接著，以膠體滲透層析儀量測所得之聚合物(2)-(30)之數量平均分子量(number average molecular weight、Mn)、重量平均分子量(weight average molecular weight、Mw)、以及分子量分佈(dispersion index、Mw/Mn)，結果如表 2 所示。

	聚合物製備			分子量量測		
	第一單體(M1)	第二單體(M2)	第一單體與第二單體之莫耳比(M1:M2)	數量平均分子量(Mn)	重量平均分子量(Mw)	分子量分佈
聚合物(1)	MMA	MAES-H	7:3	2507400	2891500	1.15
聚合物(2)	MMA	MAEM-H	7:3	2132000	3609000	1.69
聚合物(3)	MMA	MAEM-H	5:5	1664000	1923000	1.16
聚合物(4)	MMA	MAEM-H	3:7	793600	1056000	1.33
聚合物(5)	MMA	MAEM-H	1:9	2170000	2602000	1.20
聚合物(6)	MMA	MA-H	7:3	1059000	1141000	1.08
聚合物(7)	MMA	MA-H	6:4	1029000	1122000	1.09
聚合物(8)	MMA	MA-H	5:5	1151000	1257000	1.09
聚合物(9)	MMA	MA-H	4:6	1021000	1111000	1.09
聚合物	MMA	MA-H	3:7	1346000	1468000	1.09

(10)						
聚合物(11)	MMA	MA-H	1:9	1100000	1174000	1.07
聚合物(12)	MMA	CEA	7:3	1211000	1359000	1.12
聚合物(13)	MMA	CEA	5:5	1128000	1248000	1.11
聚合物(14)	MMA	A-H	7:3	1072000	1192000	1.11
聚合物(15)	MMA	A-H	5:5	1024000	1141000	1.11
聚合物(16)	MMA	A-H	1:9	697900	835900	1.20
聚合物(17)	MMA	AES-H	7:3	2620000	3159000	1.21
聚合物(18)	MMA	AES-H	5:5	1200000	1416000	1.18
聚合物(19)	MMA	AES-H	1:9	1065000	1207000	1.13
聚合物(20)	MEMA	AES-H	9:1	945800	2780000	2.94
聚合物(21)	MEMA	AES-H	7:3	1427000	1694000	1.19
聚合物(22)	MEMA	AES-H	3:7	1330000	1538000	1.16
聚合物(23)	MEMA	AES-H	1:9	1163000	1326000	1.14
聚合物	MA	MA-H	7:3	1552000	1750000	1.13

S

(24)						
聚合物(25)	MA	MA-H	5:5	1595000	1804000	1.13
聚合物(26)	MA	MA-H	2:8	1743000	1932000	1.11
聚合物(27)	EA	CEA	5:5	1555000	1779000	1.14
聚合物(28)	EA	CEA	2:8	1584000	1781000	1.12
聚合物(29)	EA	MA-H	5:5	1628000	1847000	1.14
聚合物(30)	EA	MA-H	2:8	2070000	2262000	1.09

表 2

細胞培養

實施例 1

首先準備溶液，將製備例 1 所得之聚合物(1)溶解於四氫呋喃(tetrahydrofuran、THF)。接著，以旋轉塗佈(spin-coating)方式，於室溫真空下將聚合物乾燥形成於一圓形蓋玻片(直徑為 13 mm)上，得到一聚合物層。接著，將人類骨髓間質幹細胞(human bone marrow mesenchymal stem cell、BMSC)以 3000 cells/cm^2 的密度種入(seeded)該聚合物層內，並以 BD Mosaic™ hMSC SF Medium (由 BD Biosciences 製造及販售)作為培養液(cell culture medium)進行培養。在培養

3 天後，以自動細胞計數器(ADAM Cell Counter，由 Digital Bio 製造及販售)評估細胞數量，並與對照組(所有條件與實施例 1 相同，但蓋玻片上未形成該聚合物膜層)比較，結果請參照表 3。

實施例 2-61

如實施例 1 之相同方式進行細胞培養，但實施例 2-61 依據表 3 所述來取代實施例 1 所使用之聚合物、以及所培養的細胞種類。在培養 3 天後，以自動細胞計數器(ADAM Cell Counter，由 Digital Bio 製造及販售)評估細胞數量，結果請參照表 3。

	所使用之聚合物種類	所培養的細胞種類	與對照組比對，細胞數目是否增加
實施例 1	聚合物(1)	BMSC	是
實施例 2	聚合物(3)	BMSC	是
實施例 3	聚合物(3)	Wj Cell	是
實施例 4	聚合物(3)	Fibroblast	是
實施例 5	聚合物(4)	BMSC	是
實施例 6	聚合物(4)	ADSC	是
實施例 7	聚合物(4)	Wj Cell	是
實施例 8	聚合物(4)	Fibroblast	是
實施例 9	聚合物(5)	BMSC	是

實施例 10	聚合物(5)	ADSC	是
實施例 11	聚合物(5)	Wj Cell	是
實施例 12	聚合物(5)	Fibroblast	是
實施例 13	聚合物(6)	BMSC	是
實施例 14	聚合物(6)	ADSC	是
實施例 15	聚合物(7)	BMSC	是
實施例 16	聚合物(7)	ADSC	是
實施例 17	聚合物(8)	BMSC	是
實施例 18	聚合物(8)	ADSC	是
實施例 19	聚合物(9)	BMSC	是
實施例 20	聚合物(9)	ADSC	是
實施例 21	聚合物(10)	BMSC	是
實施例 22	聚合物(10)	ADSC	是
實施例 23	聚合物(11)	BMSC	是
實施例 24	聚合物(11)	ADSC	是
實施例 25	聚合物(12)	BMSC	是
實施例 26	聚合物(12)	ADSC	是
實施例 27	聚合物(12)	Wj Cell	是
實施例 28	聚合物(13)	ADSC	是
實施例 29	聚合物(13)	Fibroblast	是
實施例 30	聚合物(14)	BMSC	是
實施例 31	聚合物(14)	ADSC	是
實施例 32	聚合物(15)	BMSC	是
實施例 33	聚合物(15)	ADSC	是

實施例 34	聚合物(16)	BMSC	是
實施例 35	聚合物(16)	ADSC	是
實施例 36	聚合物(16)	Wj Cell	是
實施例 37	聚合物(16)	Fibroblast	是
實施例 38	聚合物(17)	ADSC	是
實施例 39	聚合物(18)	BMSC	是
實施例 40	聚合物(18)	ADSC	是
實施例 41	聚合物(19)	BMSC	是
實施例 42	聚合物(19)	ADSC	是
實施例 43	聚合物(21)	BMSC	是
實施例 44	聚合物(21)	ADSC	是
實施例 45	聚合物(22)	BMSC	是
實施例 46	聚合物(22)	ADSC	是
實施例 47	聚合物(24)	BMSC	是
實施例 48	聚合物(25)	BMSC	是
實施例 49	聚合物(25	ADSC	是
實施例 50	聚合物(25	Fibroblast	是
實施例 51	聚合物(26)	BMSC	是
實施例 52	聚合物(26)	ADSC	是
實施例 53	聚合物(26)	Fibroblast	是
實施例 54	聚合物(27)	BMSC	是
實施例 55	聚合物(27)	ADSC	是
實施例 56	聚合物(28)	BMSC	是
實施例 57	聚合物(28)	ADSC	是

S

實施例 58	聚合物(29)	BMSC	是
實施例 59	聚合物(29)	ADSC	是
實施例 60	聚合物(30)	ADSC	是
實施例 61	聚合物(30)	Wj Cell	是

表 3

(備註：

BMSC：人類骨髓間質幹細胞(human bone marrow mesenchymal stem cell)；

ADSC: 人類脂肪幹細胞(human adipose tissue derived stem cell)；

Wj cells: 人類臍帶華頓凝膠幹細胞(human umbilical cord Wharton's jelly stem cell)；

Fibroblast: 人類包皮纖維母細胞(human foreskin fibroblasts、 Hs68)

請參照第 2a、及 2b 圖，係分別為實施例 51、及 58 所述之細胞培養系統培養 3 天後，以顯微鏡(放大倍率為 40 倍)觀察下所拍攝的照片；此外，請參照第 2c 圖係為實施例 51、及 58 之對照組(直接在蓋玻片(不具有本發明所述之聚合物膜層)上培養 BMSC 細胞，並以 BD Mosaic™ hMSC SF Medium 作為培養液(cell culture medium))所述之細胞培養系統在培養 3 天後，在顯微鏡(放大倍率為 40 倍)觀察下所拍攝的照片；此外，請參照第 2d 圖係為實施例 51、及 58 之正對照組(在蓋玻片塗佈 BD Mosaic™ hMSC SF Surface Coating 上培養 BMSC 細胞，並以

BD Mosaic™ hMSC SF Medium 作為培養液(cell culture medium))所述之細胞培養系統在培養 3 天後，在顯微鏡(放大倍率為 40 倍)觀察下所拍攝的照片。由第 2a 至 2c 圖可知，細胞在實施例 51、及 58 所述之細胞培養系統中可以存活，且數目增加；反觀在對照組中，則觀察到細胞數目明顯較少，且發生細胞死亡的現象。

請參照第 3a 至 3f 圖，係分別為實施例 14、16、18、20、22、及 24(聚合物皆由相同之第一單體 MMA 及第二單體 MA-H 合成，但第一單體及第二單體比例不同，分別為 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7 及 1:9)所述之細胞培養系統培養 3 天後，在顯微鏡(放大倍率為 40 倍)觀察下所拍攝的照片；此外，請參照第 3g 圖係為該等實施例之對照組(直接在蓋玻片(不具有本發明所述之聚合物膜層)上培養 ADSC 細胞，並以 BD Mosaic™ hMSC SF Medium 作為培養液(cell culture medium))所述之細胞培養系統培養 3 天後，在顯微鏡(放大倍率為 40 倍)觀察下所拍攝的照片。由第 3a 至 3g 圖可知，細胞在實施例 14、16、18、20、22、及 24 所述之細胞培養系統中可以存活，且數目增加；反觀在對照組中，則觀察到細胞數目明顯較少，且發生細胞死亡的現象。

實施例 62

首先準備溶液，將製備例 1 所得之聚合物(1)溶解於四氫呋喃(tetrahydrofuran、THF)。接著，以旋轉塗佈(spin-coating)方式，於室溫真空下將聚合物乾燥形

成於一圓形蓋玻片(直徑為 13 mm)上，得到一聚合物層。接著，將人類骨髓間質幹細胞(human bone marrow mesenchymal stem cell、BMSC)以 3000 cells/cm^2 的密度種入(seeded)該聚合物層內，並以 MesenCult-XF Basal Medium (由 Stem Cell Technologies 製造及販售)作為培養液(cell culture medium)進行培養程序。在培養 3 天後，以自動細胞計數器(ADAM Cell Counter，由 Digital Bio 製造及販售)評估細胞數量，並與對照組(所有條件與實施例 62 相同，但蓋玻片上未形成該聚合物層)比較，結果請參照表 4。

實施例 63-85

如實施例 62 之相同方式進行細胞培養，但實施例 63-85 依據表 4 所述來取代實施例 62 所使用之聚合物、以及所培養的細胞種類。在培養 3 天後，以自動細胞計數器(ADAM Cell Counter，由 Digital Bio 製造及販售)評估細胞數量，結果請參照表 4。

	所使用之聚合物種類	所培養的細胞種類	與對照組比對，細胞數目是否增加
實施例 62	聚合物(1)	BMSC	是
實施例 63	聚合物(1)	ADSC	是
實施例 64	聚合物(1)	Wj Cell	是

實施例 65	聚合物(3)	ADSC	是
實施例 66	聚合物(3)	Wj Cell	是
實施例 67	聚合物(3)	Fibroblast	是
實施例 68	聚合物(4)	ADSC	是
實施例 69	聚合物(4)	Wj Cell	是
實施例 70	聚合物(4)	Fibroblast	是
實施例 71	聚合物(5)	ADSC	是
實施例 72	聚合物(5)	Fibroblast	是
實施例 73	聚合物(6)	BMSC	是
實施例 74	聚合物(6)	ADSC	是
實施例 75	聚合物(7)	BMSC	是
實施例 76	聚合物(7)	ADSC	是
實施例 77	聚合物(7)	Wj Cell	是
實施例 78	聚合物(8)	BMSC	是
實施例 79	聚合物(8)	ADSC	是
實施例 80	聚合物(8)	Wj Cell	是
實施例 81	聚合物(12)	ADSC	是
實施例 82	聚合物(12)	Wj Cell	是
實施例 83	聚合物(18)	Wj Cell	是
實施例 84	聚合物(19)	Fibroblast	是
實施例 85	聚合物(23)	Wj Cell	是

表 4

請參照第 4a、及 4b 圖，係分別為實施例 67、及 70 所述之細胞培養系統培養 3 天後，以顯微鏡(放大倍率為

40 倍)觀察下所拍攝的照片；此外，請參照第 4c 圖係為實施例 67、及 70 之對照組(直接在蓋玻片(不具有本發明所述之聚合物層)上培養 Fibroblast 細胞，並以 MesenCult-XF Basal Medium 作為培養液(cell culture medium))所述之細胞培養系統培養 3 天後，在顯微鏡(放大倍率為 40 倍)觀察下所拍攝的照片。由第 4a 至 4c 圖可知，細胞在實施例 67、及 70 所述之細胞培養系統中可以存活，且數目增加；反觀在對照組中，則觀察到細胞數目明顯較少，且發生細胞死亡的現象。

實施例 86

首先準備溶液，將製備例 2 所得之聚合物(2)溶解於四氫呋喃(tetrahydrofuran、THF)。接著，以旋轉塗佈(spin-coating)方式，於室溫真空下將聚合物乾燥形成於一圓形蓋玻片(直徑為 13 mm)上，得到一聚合物層。接著，將人類脂肪幹細胞(human adipose tissue derived stem cell、ADSC)以 3000 cells/cm^2 的密度種入(seeded)該聚合物膜層內，並以 StemPro MSC SFM Basal Medium (由 Invitrogen 製造及販售)作為培養液(cell culture medium)進行培養。在培養 3 天後，以自動細胞計數器(ADAM Cell Counter，由 Digital Bio 製造及販售)評估細胞數量，並與對照組(所有條件與實施例 86 相同，但蓋玻片上未形成該聚合物層)比較，結果請參照表 5。

實施例 87-102

如實施例 86 之相同方式進行細胞培養，但實施例 87-102 依據表 5 所述來取代實施例 86 所使用之聚合物、以及所培養的細胞種類。在培養 3 天後，以自動細胞計數器(ADAM Cell Counter，由 Digital Bio 製造及販售)評估細胞數量，結果請參照表 5。

	所使用之聚合物種類	所培養的細胞種類	與對照組比對，細胞數目是否增加
實施例 86	聚合物(2)	ADSC	是
實施例 87	聚合物(3)	BMSC	是
實施例 88	聚合物(3)	Wj Cell	是
實施例 89	聚合物(3)	Fibroblast	是
實施例 90	聚合物(5)	BMSC	是
實施例 91	聚合物(5)	ADSC	是
實施例 92	聚合物(5)	Wj Cell	是
實施例 93	聚合物(5)	Fibroblast	是
實施例 94	聚合物(6)	Wj Cell	是
實施例 95	聚合物(8)	Wj Cell	是
實施例 96	聚合物(11)	BMSC	是
實施例 97	聚合物(12)	Wj Cell	是
實施例 98	聚合物(13)	Wj Cell	是
實施例 99	聚合物(14)	Wj Cell	是

實施例 100	聚合物(15)	Wj Cell	是
實施例 101	聚合物(20)	Wj Cell	是
實施例 102	聚合物(20)	Fibroblast	是

表 5

請參照第 5a、及 5b 圖，係分別為實施例 99、及 101 所述之細胞培養系統培養 3 天後，以顯微鏡(放大倍率為 40 倍)觀察下所拍攝的照片；此外，請參照第 5c 圖係為實施例 99、及 101 之對照組(直接在蓋玻片(不具有本發明所述之聚合物層)上培養 Wj Cell 細胞，並以 StemPro MSC SFM Basal Medium 作為培養液(cell culture medium))所述之細胞培養系統培養 3 天後，在顯微鏡(放大倍率為 40 倍)觀察下所拍攝的照片。由第 5a 至 5c 圖可知，細胞在實施例 99、及 101 所述之細胞培養系統中可以存活，且數目增加；反觀在對照組中，則觀察到細胞數目明顯較少，且發生細胞死亡的現象。

由表 3、表 4、及表 5 的結果可知，本發明所述的細胞培養系統及細胞培養方法，使用的特定聚合物，可在沒有血清(serum)或細胞貼附因子(cell attachment factor)存在的狀況下，促進貼附型細胞貼附及生長，降低細胞的培養成本，並改善品質穩定性。

雖然本發明已以數個較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何所屬技術領域中具有通常知識者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作任意之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

第 1 圖係為一剖面示意圖，用以說明本發明一實施例所述之細胞培養系統。

第 2a-2c 圖係係分別為實施例 51、58、及其對照組所述之細胞培養系統培養 3 天後，在顯微鏡觀察下所拍攝的照片。

第 3a-3g 圖係係分別為實施例 14、16、18、20、22、24、及其對照組所述之細胞培養系統培養 3 天後，在顯微鏡觀察下所拍攝的照片。

第 4a-4c 圖係係分別為實施例 67、70、及其對照組所述之細胞培養系統培養 3 天後，在顯微鏡觀察下所拍攝的照片。

第 5a-5c 圖係係分別為實施例 99、101、及其對照組所述之細胞培養系統培養 3 天後，在顯微鏡觀察下所拍攝的照片。

【主要元件符號說明】

10~基質；

11~上表面；

12~聚合物層；以及

100~細胞培養系統。

第 101141978 號　公告本　修正日期:104.9.25　修正(本)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101141978　C12M 3/04

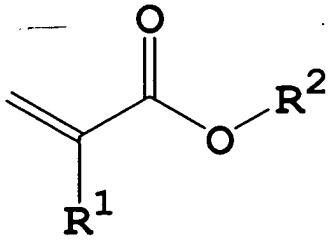
※申請日：101.11.12　※IPC 分類：C08F 20/06, 20/14, 20/18, 20/20, 20/28, C12N 5/077, 5/0775

一、發明名稱：(中文/英文)

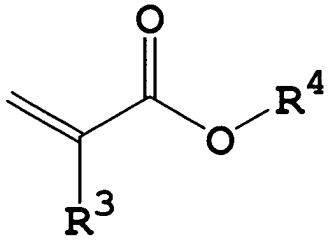
細胞培養系統、以及無血清細胞培養方法/Cell culture system and serum-free method for culturing cell

二、中文發明摘要：

本發明提出一種細胞培養系統，以及一無血清細胞培養方法。該細胞培養系統包含：一基質，其中該基質具有一表面；以及一聚合物位於該表面上，其中該聚合物係由一第一單體及一第二單體經由聚合反應所形成，其中該第一單體具有公式(I)所示結構，且該第二單體具有公式(II)所示結構：



公式(I)



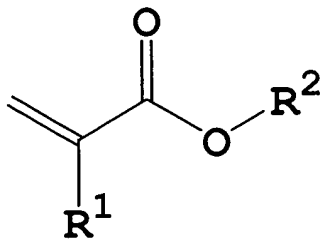
公式(II)

其中，R^1 係為氫、或甲基；R^2 係為甲基、乙基、或 $-CH_2CH_2OCH_3$；R^3 係為氫、或甲基；及 R^4 係為氫、$-CH_2CH_2OCOCHCHCOOH$、$-CH_2CH_2OCOCH_2CH_2COOH$、或 $-CH_2CH_2COOH$。

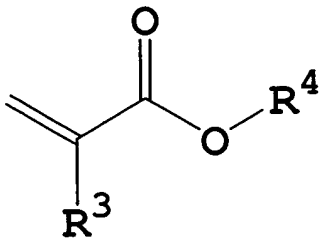
三、英文發明摘要：

The disclosure provides a cell culture

system and a serum-free method for culturing cell. The cell culture system includes a substratum, wherein the substratum has a surface. A polymer is disposed on the surface, wherein the polymer is prepared by polymerizing a first monomer with a second monomer. The first monomer has a structure represented by Formula (I), and the second monomer has a structure represented by Formula (II):



Formula (I)



Formula (II)

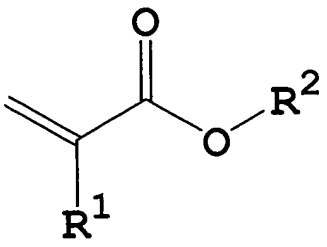
wherein, R^1 is hydrogen or methyl; R^2 is methyl, ethyl, or $-CH_2CH_2OCH_3$; R^3 is hydrogen or methyl; and, R^4 is hydrogen, $-CH_2CH_2OCOCHCHCOOH$, $-CH_2CH_2OCOCH_2CH_2COOH$, or $-CH_2CH_2COOH$.

七、申請專利範圍：

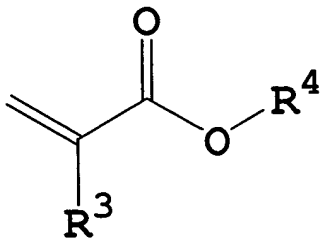
1.一種細胞培養系統，包含：

一基質，其中該基質具有一表面；以及

一聚合物位於該表面上，其中該聚合物係由一第一單體及一第二單體經由聚合反應所形成，其中該第一單體及該第二單體之莫耳比介於1:9至9:1之間，其中該第一單體具有式(I)所示結構，且該第二單體具有式(II)所示結構：



式(I)



式(II)

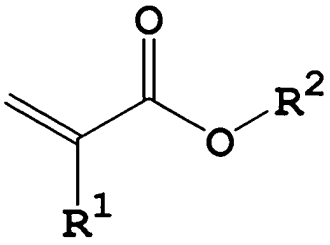
其中，R^1係為氫、或甲基；R^2係為甲基、乙基、或$-CH_2CH_2OCH_3$；R^3係為氫、或甲基；及R^4係為氫、$-CH_2CH_2OCOCHCHCOOH$、$-CH_2CH_2OCOCH_2CH_2COOH$、或$-CH_2CH_2COOH$，其中當R^2係為甲基或乙基時，R^4係為氫、$-CH_2CH_2OCOCHCHCOOH$、或$-CH_2CH_2OCOCH_2CH_2COOH$。

2. 如申請專利範圍第1項所述之細胞培養系統，其中該一單體係包含甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸甲氧基乙酯、丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、或其組合。

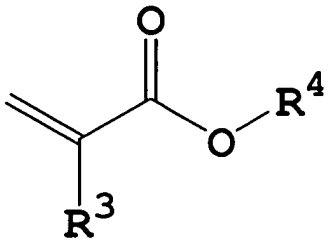
3. 如申請專利範圍第1項所述之細胞培養系統，其中該二單體係包含甲基丙烯酸、琥珀酸單[2-[(2-甲基-丙烯醯基)氧]乙基]酯、2-丙烯酸羧乙酯、單(2-丙烯醯乙基醚)琥珀酸、丙烯酸、馬來酸單-2-(甲基丙烯醯氧基)乙酯、或其組合。

4．一種無血清細胞培養方法，包含：

提供一具有聚合物之基質，其中該聚合物係由一第一單體及一第二單體經由聚合反應所形成，其中該第一單體及該第二單體之莫耳比介於 1:9 至 9:1 之間，其中該第一單體具有式(I)所示結構，且該第二單體具有式(II)所示結構：



式(I)



式(II)

其中，R^1 係為氫、或甲基；R^2 係為甲基、乙基、或 $-CH_2CH_2OCH_3$；R^3 係為氫、或甲基；及 R^4 係為氫、$-CH_2CH_2OCOCHCHCOOH$、$-CH_2CH_2OCOCH_2CH_2COOH$、或 $-CH_2CH_2COOH$，其中當 R^2 係為甲基或乙基時，R^4 係為氫、$-CH_2CH_2OCOCHCHCOOH$、或 $-CH_2CH_2OCOCH_2CH_2COOH$；以及

將一細胞置於該聚合物表面，以進行一細胞培養。

5．如申請專利範圍第 4 項所述之無血清細胞培養方法，其中係該細胞包含一貼附型細胞。

6．如申請專利範圍第 5 項所述之無血清細胞培養方法，其中該貼附型細胞係為間質幹細胞、或纖維母細胞。

7．如申請專利範圍第 4 項所述之無血清細胞培養方法，其中在該無血清細胞培養方法中，並無使用血清或細胞貼附因子。

8．如申請專利範圍第 7 項所述之無血清細胞培養方

法，其中該細胞貼附因子係為細胞外基質。

9. 如申請專利範圍第 4 項所述之無血清細胞培養方法，其中該一單體係包含甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸甲氧基乙酯、丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、或其組合。

10. 如申請專利範圍第 4 項所述之無血清細胞培養方法，其中該二單體係包含甲基丙烯酸、琥珀酸單[2-[(2-甲基-丙烯醯基)氧]乙基]酯、2-丙烯酸羧乙酯、單(2-丙烯醯乙基醚)琥珀酸、丙烯酸、馬來酸單-2-(甲基丙烯醯氧基)乙酯、或其組合。

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

10~基質；

11~上表面；

12~聚合物膜層；

100~細胞培養系統。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無