(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105228632 A
(43)申请公布日 2016.01.06

(21)申请号 201480008940.3

(22)申请日 2014.02.14

(30)优先权数据
61/765,075 2013.02.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.08.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/016477 2014.02.14

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/127232 EN 2014.08.21

(71)申请人 谢清河
地址 中国台湾台南市小东路61号Apt.C8-3

(72)发明人 谢清河 赖佳昀

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 陈静

(51)Int.Cl.
A61K 31/728(2006.01)

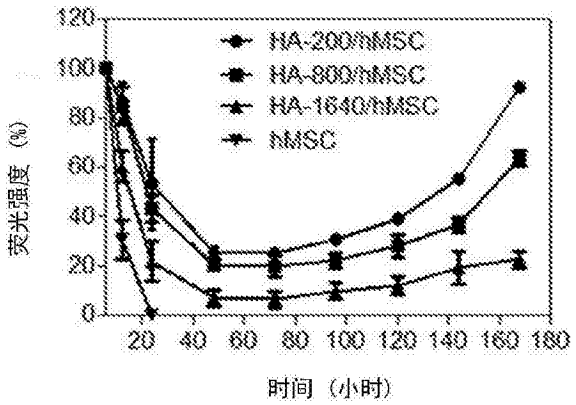
权利要求书2页 说明书14页 附图18页

(54)发明名称

一种用以将一群治疗细胞维持在需要接受细胞治疗个体体内的治疗位置的方法

(57)摘要

本揭示内容是关于一种用以将一群治疗细胞在有需要进行细胞治疗个体体内的治疗位置维持一段时间的方法。该方法包含对该治疗位置投予治疗有效量的治疗细胞及有效量的生物分解性材料。该分解性材料包含透明质酸化合物，且具有与分子量为20千道尔顿到2,000千道尔顿的透明质酸相似的活体内分解特性。



CN 105228632 A

1. 一种用以将一群治疗细胞在有需要进行细胞治疗个体体内的治疗位置维持一段时间的方法，包含：

对该治疗位置投予治疗有效量的治疗细胞；以及

对该治疗位置投予有效量的生物分解性材料，其包含透明质酸化合物，其中该生物分解性材料于活体内的分解特性相似于分子量为 20 千道尔顿到 2,000 千道尔顿的透明质酸于活体内的分解特性。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中该治疗细胞为干细胞、诱导多功能细胞、功能分化细胞或重组细胞。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，该干细胞选自由胚胎干细胞、造血干细胞、神经干细胞、血管干细胞、间叶干细胞、心脏干细胞、脂肪干细胞、肌肉干细胞、牙齿干细胞、骨头干细胞、软骨干细胞、骨膜干细胞、乳腺干细胞、子宫干细胞、内皮干细胞、皮肤干细胞、胎盘干细胞、脐带血干细胞、卵黄囊干细胞及羊水干细胞所组成的群组。

4. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，该功能分化细胞选自由纤维母细胞、软骨细胞、成骨细胞、骨细胞、脂肪细胞、上皮细胞、角质细胞、视网膜细胞、牙细胞、肾细胞、胰岛细胞、肝细胞、神经细胞、免疫细胞、肌肉细胞及血球细胞所组成的群组。

5. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该透明质酸化合物至少是一种选自由透明质酸、透明质酸的部份酯类或全酯类、经己二酸二酰肼修饰的透明质酸、透明质酸酰胺、交联透明质酸、丁二酸的半酯、透明质酸的重金属盐类、硫化透明质酸、N- 硫化透明质酸、经氨基修饰的透明质酸、经双氨修饰的透明质酸及透明质酸与丝的组合物所组成的群组的化合物。

6. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该透明质酸的分子量为 50 千道尔顿到 1,600 千道尔顿。

7. 根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于，该透明质酸的分子量为 200 千道尔顿到 800 千道尔顿。

8. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该一段时间至少为 7 天。

9. 根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，该一段时间至少为 28 天。

10. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该生物分解性材料于活体内的半衰期为 4 小时到 28 天。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其特征在于，该活体内半衰期为 8 小时到 7 天。

12. 根据权利要求 11 所述的方法，其特征在于，该活体内半衰期为 1 到 3 天。

13. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该生物分解性材料更包含至少一种选自由胶原、明胶、藻酸盐、几丁聚糖、纤网蛋白及纤维蛋白胶所组成的群组的成份。

14. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，在投予 3 到 10 天后位于该治疗位置的该群治疗细胞会等于或大于起始投予的该群治疗细胞。

15. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，在投予该生物分解性材料之前或之后投予该治疗细胞。

16. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，在投予该生物分解性材料的同时投予该治疗细胞。

17. 根据权利要求 16 所述的方法，其特征在于，该治疗细胞及该生物分解性材料配制

为单一组合物。

18. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，可分别或同时使用直接施予、以导管辅助传送、以内视镜辅助传送、以机器辅助传送、以仪器辅助传送或以影像仪器引导传送来投予该治疗细胞及该生物分解性材料。

19. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该治疗有效量的治疗细胞为该个体每公斤体重 1×10^{4}至 1×10^{8}细胞。

20. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该有效量的透明质酸为该个体每公斤体重 0.01 到 10 毫克。

一种用以将一群治疗细胞维持在需要接受细胞治疗个体体内的治疗位置的方法

[0001] 本申请案主张 2013 年 2 月 15 日申请、案号为 61/765,175 的美国临时案优先权，该案在此一并引用作为参考。

技术领域

[0002] 本揭示内容是关于细胞治疗。更具体来说，本揭示内容是关于利用至少一种透明质酸化合物来改善细胞治疗的功效。

背景技术

[0003] 依据美国食品药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 的定义，体细胞治疗 (或细胞治疗) 是指投予经离体 (ex vivo) 处理或改造的自体 (autologous)、同种异体 (allogeneic) 或异种 (xenogeneic) 细胞来预防、治疗、治愈或减缓人类的疾病及损伤。一般来说，上述处理及改造包含增殖、增生、筛选及 / 或医药治疗该些细胞。

[0004] 细胞治疗的目的主要是修复、取代或回复受伤的组织或器官。细胞治疗可广泛应用于现代各式医学治疗中。举例来说，在 2011 的 11 月 10 日，美国食品药物管理局即核准纽约血液中心的异基因脐带血产品 (New York Blood Center's allogeneic cord-blood product) HEMACORD 的上市，该产品是第一个经美国食品药物管理局认证的造血前趋细胞治疗 (hematopoietic progenitor cell therapy)。HEMACORD 可用于个体的造血前趋细胞移植，其中该个体是罹患遗传、后天或经骨髓摧毁治疗 (myeloablative treatment) 等会影响造血功能的疾病。一旦将造血前趋细胞移植至病患体内后，细胞会转移至骨髓，进而分裂及成熟。当成熟细胞移动至血液后，即可部分或完全回复血球细胞的数量及功能，例如免疫功能。

[0005] 目前已知多种因素会影响细胞治疗的疗效，例如细胞的移植前制备、移植疗程及接受细胞的活体系统。关于最后一个因素，细胞治疗面临到的问题包含无法将细胞维持于标的位置、无法追踪转植细胞的空间分布及细胞无法于不良环境存活。该些问题往往导致了功效不佳的细胞治疗。

[0006] 相关领域尝试以生物分解性材料，期望藉由控制细胞于活体内的停留时间来解决上述的问题。在理想的情况下，生物分解性材料于活体内的作用时间应足以让细胞附着至周围环境，而不会产生不良反应。一旦知道细胞附着及作用的确切时间点，即可得到较佳的治疗功效。

[0007] 不幸的是，先前技术多是利用活体外测试来评估生物材料的分解特性，而无法适当地仿真活体内系统的复杂机制。举例来说，生物分解性材料于活体内完整性及重量的改变会影响其分解特性，进而影响移植细胞于标的位置的保留特性。因此，无法单以活体外试验来评估生物分解性材料的细胞传送能力。

[0008] 有鉴于此，相关领域亟需提供一种可用以减少细胞于活体内流失的替代策略，藉以改善细胞治疗的治疗功效。

发明内容

[0009] 发明内容旨在提供本揭示内容的简化摘要，以使阅读者对本揭示内容具备基本的理解。此发明内容并非本揭示内容的完整概述，且其用意并非在指出本发明实施例的重要/关键组件或界定本发明的范围。

[0010] 在第一方面，本揭示内容是关于一种用以将一群治疗细胞维持在一个体体内的治疗位置一段时间的方法。在另一方面，本揭示内容是关于一种用以治疗有需要进行细胞治疗的个体的方法。

[0011] 依据本揭示内容的一种实施方式，该方法包含对该治疗位置投予治疗有效量的治疗细胞，以及对该治疗位置投予有效量的生物分解性材料，其中该生物分解性材料包含透明质酸化合物 (hyaluronan compound)。该生物分解性材料于活体内的分解特性相似于分子量为 20 千道尔顿 (kilodalton, kDa) 到 2,000 千道尔顿的透明质酸于活体内的分解特性。

[0012] 依据本揭示内容不同的实施方式，该治疗细胞可以是干细胞、诱导多功能细胞 (induced pluripotent cell)、功能分化细胞 (functionally differentiated cell)、重组细胞 (recombinant cell) 或其组合。

[0013] 范例性的干细胞包含，但不限于，胚胎干细胞 (embryonic stem cell)、造血干细胞 (hematopoietic stem cell)、神经干细胞 (neural stem cell)、血管干细胞 (vascular stem cell)、间叶干细胞 (mesenchymal stem cell)、心脏干细胞 (cardiac stem cell)、脂肪干细胞 (adipose stem cell)、肌肉干细胞 (muscular stem cell)、牙齿干细胞 (dental stem cell)、骨头干细胞 (skeletal stem cells)、软骨干细胞 (cartilage stem cell)、骨膜干细胞 (periosteal stem cell)、乳腺干细胞 (mammary stem cell)、子宫干细胞 (uterus stem cell)、内皮干细胞 (endothelial stem cell)、皮肤干细胞 (skin stem cell)、胎盘干细胞 (placental stem cell)、脐带血干细胞 (umbilical cord blood stem cell)、卵黄囊干细胞 (yolk sac stem cell) 及羊水干细胞 (amniotic fluid stem cell)。范例性的功能分化细胞包含纤维母细胞 (fibroblast)、软骨细胞 (chondrocyte)、成骨细胞 (osteoblast)、骨细胞 (osteocyte)、脂肪细胞 (adipocyte)、上皮细胞 (epithelial cell)、角质细胞 (keratinocyte)、视网膜细胞 (retinal cell)、牙细胞 (dental cell)、肾细胞 (renal cell)、胰岛细胞 (pancreatic islet cell)、肝细胞 (hepatocyte)、神经细胞 (neuronal cell)、免疫细胞 (immune cell)、肌肉细胞 (muscle cell) 及血球细胞 (blood cell)。

[0014] 依据本揭示内容某些实施方式，透明质酸化合物可以是透明质酸 (hyaluronic acid)、透明质酸的部份酯类或全酯类、经己二酸二酰肼修饰的透明质酸 (adipic dihydrazide-modified hyaluronan)、透明质酸酰胺 (amides of hyaluronan)、交联透明质酸 (crosslinked hyaluronic acid)、丁二酸的半酯 (hemiesters of succinic acid)、透明质酸的重金属盐类 (heavy metal salts of hyaluronic acid)、硫化透明质酸 (sulphated hyaluronic acid)、N-硫化透明质酸 (N-sulphated hyaluronic acid)、经氨基修饰的透明质酸 (amine-modified hyaluronic acid)、经双氨修饰的透明质酸 (diamine-modified hyaluronic acid) 或透明质酸与丝 (silk) 的组合物。

[0015] 在某些实施方式中，生物分解性材料于活体内的分解特性相似于分子量为 50 千道尔顿到 1,600 千道尔顿的透明质酸于活体内的分解特性；较佳的情况是，生物分解性材料于活体内的分解特性相似于分子量为 200 千道尔顿到 800 千道尔顿的透明质酸于活体内的分解特性。

[0016] 依据本揭示内容的实施方式，治疗细胞可在治疗位置维持至少 7 天；较佳为至少 14 天；最佳为至少 28 天。

[0017] 在本揭示内容某些实施方式中，生物分解性材料于活体内的半衰期为 4 小时到 28 天；或者是，一旦投予至个体后，生物分解性材料于活体内的半衰期可为 8 小时到 7 天、12 小时到 5 天，或是 1 到 3 天。

[0018] 可任选地，在某些实施方式中，生物分解性材料更包含至少一种生物聚合物；举例来说，该生物聚合物包含，但不限于，胶原 (collagen)、明胶 (gelatin)、藻酸盐 (alginate)、几丁聚糖 (chitosan)、纤网蛋白 (fibronectin) 及纤维蛋白胶 (fibrin glue)。

[0019] 依据本揭示内容的实施方式，在将治疗细胞投予至治疗位置 3-10 天后，治疗位置的治疗细胞群会大致等于或大于初始投予的治疗细胞群。

[0020] 在不同实施方式中，可在投予生物分解性材料之前、同时或之后投予治疗细胞。若要同时投予，则可将治疗细胞与生物分解性材料配制为单一组合物或个别的组合物。

[0021] 依据本揭示内容的实施方式，可分别或同时利用直接投予、以导管辅助传送、以内视镜辅助传送、以机器辅助传送、以仪器辅助传送或以影像仪器引导传送来投予治疗细胞及生物分解性材料。

[0022] 在某些实施方式中，治疗细胞的治疗有效量为每公斤个体体重 1×10^{4} 至 1×10^{8} 细胞。在该些实施例中，透明质酸化合物的有效量为每公斤个体体重 0.01 至 10 毫克。

[0023] 在参阅下文实施方式后，本发明所属技术领域中具有通常知识者当可轻易了解本发明的基本精神和其它发明目的，以及本发明所采用的技术手段与实施方式。

附图说明

[0024] 为让本发明的上述与其它目的、特征、优点与实施例能更明显易懂，所附图式的说明如下：

[0025] 图 1 及图 2 证明 Alexa Fluor 700 卵白素 (streptavidin, SA) 与表达圆盘海葵红 (Discosoma sp. Red, Ds-Red) 的人类间叶干细胞 (human mesenchymal stem cell, hMSC) 之间荧光强度的线性关系；卵白素 (图 1) 及人类间叶干细胞 (图 2) 皆呈现 R = 0.99。

[0026] 图 3 为卵白素及人类间叶干细胞的影像，其由活体影像系统 (in vivo imaging system, IVIS) 搭配用以观察 Alexa Fluor 700 卵白素及会表达 Ds-Red 的人类间叶干细胞的滤镜组进行显像；上方二张 IVIS 图是将卵白素及人类间叶干细胞混合前的影像，下方二张图则是混合后的影像；图中无法显示的是，该些荧光信号为黄色至红色，且以蓝线圈选标记特定区域；570/620：用以观察人类间叶干细胞的激发 / 发散滤镜组；675/720：用以观察 Alexa Fluor 700 卵白素的滤镜组。

[0027] 图 4 为卵白素 (左图) 及人类间叶干细胞 (右图) 在混合前后的荧光强度分析柱状图；不论是 Alexa Fluor 700 卵白素，或是表达 Ds-Red 的人类间叶干细胞，在混合前后皆

不具有显著的荧光差异。

[0028] 图 5 到图 7 为不同分子量的透明质酸的荧光强度线性图，其中该些透明质酸分别有（灰线）或无（黑线）与人类间叶干细胞混合。

[0029] 图 8 为在注射透明质酸 -200(hyaluronic acid-200, HA-200) 后，小鼠后肢的 IVIS 影像。

[0030] 图 9 为注射单剂卵白素后的荧光信号线性图。

[0031] 图 10 为用以证明三种不同分子量的透明质酸的分解特性的线性图，其是以 Alexa Fluor 700 的荧光信号来表示。

[0032] 图 11 是关于由指数回归分析 ($f(x) = ae^{bx}$) 所得的系数 a 及 b。

[0033] 图 12 是关于 HA-200、HA-800 及 HA-1640 的半衰期。

[0034] 图 13 为人类间叶干细胞与特定分子量的透明质酸混合后的荧光强度线性图。

[0035] 图 14 为增生标志 Ki-67 的免疫荧光染色图；代表图是以 Ds-Red、Ki-67 及 4',6- 二脒基 -2- 苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色的三种治疗组；比例尺为 100 微米；箭头所指为 Ki-67 及 Ds-Red 双染色细胞。

[0036] 图 15 为在 Ki-67 及 Ds-Red 双染色细胞中，Ki-67 染色细胞的百分比柱状图。

[0037] 图 16 为末端脱氧核苷酸转移酶脱氧尿苷三磷酸切口末端标记 (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL) 试验与 Ds-Red 的双染色细胞图；代表图是以 Ds-Red、凋亡人类间叶干细胞及 DAPI 染色的三种治疗组；比例尺为 100 微米；箭头所指为 TUNEL 及 Ds-Red 双染色细胞。

[0038] 图 17 为在 Ds-Red 染色细胞中，凋亡人类间叶干细胞的百分比柱状图。

[0039] 图 18 到 20 为人类间叶干细胞及不同分子量的透明质酸于早期的关系图。

[0040] 图 21 为注射 3 天后，预损伤后肢的免疫荧光染色图；若以彩色图式呈现，则红色为 Ds-Red，绿色为肌旋蛋白 (tropomyosin)，蓝色为 DAPI；比例尺为 100 微米。

[0041] 图 22 为图 21 中保留的人类间叶干细胞的统计分析柱状图。

[0042] 图 23 为接受治疗后，小鼠缺血后肢的代表图。

[0043] 图 24 为缺血后肢的血流增加柱状图，其中各小鼠是分别投予与人类间叶干细胞混合或不混合的 HA-200、HA-800 及 HA-1640；利用雷射杜卜勒微流仪 (laser Doppler flowmetry) 来侦测各实验组于第 0、1、7、14、21 及 28 天的血流量（与生理盐水治疗组相比较时，*** 代表 $P<0.001$；与 HA-800/ 人类间叶干细胞组 (HA-800/hMSC) 相比较时，### 代表 $P<0.001$，# 代表 $P<0.05$；与 HA-1640/ 人类间叶干细胞 (HA-1640/hMSC) 组相比较时，+++ 代表 $P<0.001$，++ 代表 $P<0.01$，+ 则代表 $P<0.05$)。

[0044] 图 25 为引发后肢缺血 7 到 28 天后，小鼠的临床分数线性图（与投予生理盐水治疗、单独投予人类间叶干细胞、单独投予 HA-200、单独投予 HA-800、单独投予 HA-1640 及投予 HA-1640/ 人类间叶干细胞组相比较时，### 代表 $P<0.001$；与 HA-800/ 人类间叶干细胞组相比较时，*** 代表 $P<0.001$，** 代表 $P<0.01$)。

[0045] 图 26 为微血管的免疫荧光代表图，该些微血管是源自分别接受对照组 (a 组)、生理盐水 (b 组)、人类间叶干细胞 (c 组)、HA-200(d 组)、HA-800(e 组)、HA-1640(f 组) HA-200/ 人类间叶干细胞 (g 组)、HA-800/ 人类间叶干细胞 (h 组) 及 HA-1640/ 人类间叶干细胞 (i 组) 治疗的小鼠的大腿中段；以抗植物凝集蛋白 (isolectin) 标记微血管，以抗

肌旋蛋白抗体标记骨骼肌，以 DAPI 标记细胞核；比例尺为 100 微米；箭头所指为具有植物凝集蛋白染色且呈现圆形的微血管。

[0046] 图 27 为定量预损伤区域的微血管密度后所绘示的柱状图；在与其它治疗组相比较时，*** 代表 P<0.001。

[0047] 图 28 是关于小动脉的免疫荧光代表图，该些小动脉取自分别接受对照组（a 组）、生理盐水（b 组）、人类间叶干细胞（c 组）、HA-200(d 组）、HA-800(e 组）、HA-1640(f 组）HA-200/ 人类间叶干细胞（g 组）、HA-800/ 人类间叶干细胞（h 组）及 HA-1640/ 人类间叶干细胞（i 组）治疗的小鼠的大腿中段；以抗平滑肌 22α 来标记小动脉，以抗肌旋蛋白抗体标记骨骼肌，并以 DAPI 标记细胞核；比例尺为 100 微米；箭头所指为具有平滑肌 22α 染色的小动脉。

[0048] 图 29 为定量预损伤区域的小动脉密度后所绘示的柱状图；在与 HA-800/ 人类间叶干细胞组相比较时，*** 代表 P<0.001；在与投予生理盐水治疗、单独投予人类间叶干细胞、单独投予 HA-200、单独投予 HA-800 及单独投予 HA-1640 组相比较时，** 代表 P<0.01。

具体实施方式

[0049] 为了使本揭示内容的叙述更加详尽与完备，下文针对了本发明的实施方式与具体实施例提出了说明性的描述；但这并非实施或运用本发明具体实施例的唯一形式。实施方式中涵盖了多个具体实施例的特征以及用以建构与操作这些具体实施例的方法步骤与其顺序。然而，亦可利用其它具体实施例来达成相同或均等的功能与步骤顺序。

[0050] 为阅读方便，下文将针对本说明书、实施例及权利要求书所使用的某些词汇提出说明。除非另有所指，否则所有技术性或科学性的词汇都是以本所属领域具有通常知识者所惯用的意义来解释。

[0051] 除非本说明书另有定义，否则此处所用的科学与技术词汇的含义与本发明所属技术领域中具有通常知识者所理解与惯用的意义相同。此外，在不和上下文冲突的情形下，本说明书所用的单数名词涵盖该名词的复数型；而所用的复数名词时亦涵盖该名词的单数型。具体来说，本说明书及权利要求书所述的单数型“一”(a 及 an) 包含该名词的复数型。此外，本说明书及权利要求书所述的“至少一”(at least one) 及“一或多”(one or more) 为具有相同意义的词汇，且包含一、二、三或多。

[0052] 虽然用以界定本发明较广范围的数值范围与参数皆是约略的数值，此处已尽可能精确地呈现具体实施例中的相关数值。然而，任何数值本质上不可避免地含有因个别测试方法所致的标准偏差。在此处，“约”通常是指实际数值在一特定数值或范围的正负 10％、5％、1％或 0.5％之内。或者是，“约”一词代表实际数值落在平均值的可接受标准误差之内，视本发明所属技术领域中具有通常知识者的考虑而定。除了实验例之外，或除非另有明确的说明，当可理解此处所用的所有范围、数量、数值与百分比（例如用以描述材料用量、时间长短、温度、操作条件、数量比例和其它相似者）均经过“约”的修饰。因此，除非另有相反的说明，本说明书与附随权利要求书所揭示的数值参数皆为约略的数值，且可视需求而更动。至少应将这些数值参数理解为所指出的有效位数与套用一般进位法所得到的数值。在此处，将数值范围表示成由一端点至另一段点或介于二端点之间；除非另有说明，此处所述的数值范围皆包含端点。

[0053] 在本说明书中，“治疗细胞”(therapeutic cell)一词是指可转植至一治疗位置及/或该治疗位置附近的细胞材料。治疗细胞会随着剂型（包含与骨架或其它非细胞成分结合）、细胞与病患间的基因关系（自体、同种异体或异种）及细胞来源的不同而具有不同的特性。细胞来源（捐赠者来源及组织来源）、处理方式及投予时的分化程度皆会影响治疗细胞于活体内的生物活性及安全性。

[0054] “细胞群”(cell population)一词在本说明书是指投予至治疗位置的治疗细胞数量，或是位于治疗位置的治疗细胞及由该些治疗细胞所增生的细胞的总数量。

[0055] 在本说明书中，“治疗位置”(treatment site)一词是指欲投予本发明治疗细胞及生物分解性材料的位置。“治疗位置”(treatment site)包含，但不限于，个体的皮下、静脉内、脊髓内、眼眶内、眼内、耳内、鼓膜内、肌肉内、动脉内、关节内、腔内、导管内、腺体内、血管内、鼻腔内、腹腔内、脊椎内、硬膜外、内、心脏内、心包内、肿瘤周围或肿瘤内（即一癌化生长内）等位置。“治疗位置”(treatment site)亦包含腔内位置，例如特定器官或组织（例如中央神经系统（例如脊髓液）、肾脏、肝脏、胰脏、心脏（例如心包内）、肺脏、眼、内耳、中耳、耳蜗、淋巴结、乳房、前列腺、卵巢、睾丸、甲状腺及脾脏等）内或周围、特定器官或组织中的动脉，或是与微生物（例如细菌、病毒、寄生虫或真菌）感染相关的位置。

[0056] 除非另有所指，否则“治疗”(treatment)一词在本说明书泛指包含预防、治疗或减缓的方法，其可产生期望的医药及/或生理功效。此外，“治疗”(treatment 或 treating)一词是指将本发明于需要进行细胞治疗个体体内的相关应用，其是可以部份或完全减轻、减缓、治愈疾病、延迟发病、抑制病程发展、降低疾病严重性，及/或降低疾病相关的病征、症状、或次要病征的发生。一般来说，“治疗”(treatment)一词不只包含改善病征或降低疾病标记，亦包含中止或减缓疾病的进程或恶化。

[0057] “有效量”(effective amount)在此处是指药物的用量足以产生所欲的疗效反应。具体的有效量取决于多种因素，如欲治疗的特定状况、患者的生理条件（如患者体重、年龄或性别）、接受治疗的哺乳动物或动物的类型、治疗持续时间、目前疗法（如果有的话）的本质以及所用的具体配方和化合物或其衍生物的结构。可将有效量表示成药物的总重量（譬如以克(g)、毫克(mg)或微克（μg）为单位），或表示成药物重量与体重的比例（其单位为毫克/公斤(mg/kg)）。亦或是，有效量可以医药组合物中活性成份的浓度来表示。

[0058] 在本说明书中，“治疗有效量”(therapeutically effective amount)一词是指足以产生期望治疗反应的特定活性成份的含量。治疗有效量亦指化合物或组合物的治疗利益效果超越其毒性或有害影响。

[0059] “个体”(subject)一词是指包含人类的哺乳动物，其是能接受本发明方法的治疗。除非特定指出，否则“个体”(subject)一词同时意指男性及女性。

[0060] 如以下所述，本发明将利用IVIS影像来测量移植干细胞的分布，分析结果证实生物分解性材料的分解特性会影响移植细胞的保留程度。据此，本发明部分是基于发明人首次发现具有特殊分解特性的生物分解性材料可用以增加治疗位置的细胞维持及存活，进而增加细胞治疗的治疗功效。因此，本发明是关于一种方法，其是利用具有分解特性的生物材料来使活体内移植细胞维持最佳化，藉以使移植细胞达到最佳治疗功效。

[0061] 在一个方面，本揭示内容是关于一种用以将一群治疗细胞在个体体内的治疗位置维持一段时间的方法。所述方法特别可应用于需要进行细胞治疗的个体；据此，本揭示内容

亦提供一种用以治疗需要细胞治疗的个体的方法。

[0062] 依据某些实施方式，用以将一群治疗细胞在个体体内的治疗位置维持一段时间的方法，包含：(a) 对该治疗位置投予治疗有效量的治疗细胞；以及 (b) 对该治疗位置投予有效量的包含透明质酸化合物的生物分解性材料。该生物分解性材料于活体内的分解特性相似于分子量为 20 千道尔顿到 2,000 千道尔顿的透明质酸于活体内的分解特性。

[0063] 在不同的实施方式中，步骤 (a) 可在步骤 (b) 之前、同时或之后进行。当步骤 (a) 及 (b) 同时进行时，可将治疗细胞与生物分解性材料配制为单一组合物或个别的组合物。

[0064] 在本揭示内容某些实施方式中，组合物中的生物分解性材料最多占组合物重量的 5％；例如组合物重量的 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5 或 5％。在本揭示内容某些实施方式中，单剂治疗细胞的量为约 1×10^{4}到 1×10^{8}细胞，体积则约为 100 到 2,000 微升。本揭示内容的组合物可更包含药学上可接受的载体或稀释剂。“药学上可接受的载体”(pharmaceutically acceptable carrier) 是指适用于个体而不会产生负面影响（例如毒性、刺激性及过敏反应）的物质；亦即，其可产生合理的利益 / 风险比值。此外，各载体需为“可接受的”(acceptable)，即可与药学组合物中的其它成份兼容。适用于本发明组合物的载体包含，但不限于，固体、半固体或液体释稀等形式。组合物也可以包含其它的添加成份，例如生长因子、细胞激素、抗肿瘤药剂、抗菌药剂，以及等张及吸收延缓药剂等。

[0065] 此外，步骤 (a) 及 / 或 (b) 可直接投予，举例来说，在进行外科手术治疗时，或是治疗位置为体表可接触的区域，可将治疗细胞及 / 或生物分解性材料或包含两者的组合物直接投予至治疗位置，而不需要其它器具（例如滴管等）辅助。或者是，可将治疗细胞及 / 或生物分解性材料或包含两者的组合物直接投予至治疗位置，而不需要外科或显影器具的辅助。举例来说，直接投予可以包含皮内、皮下、肌肉内、静脉内、骨骼内、腹腔内、脊髓内、硬膜外、心脏内、关节内、海绵体内或玻璃体内注射。亦或是，可藉由外科或显影器具的辅助，将治疗细胞及 / 或生物分解性材料或包含两者的组合物投予至治疗位置。举例来说，步骤 (a) 及 / 或 (b) 可于开放性手术、导管插入手术、内视镜手术或机械性手术时进行。适用于本发明方法的影像技术包含，但不限于，超音波、X 光照射、计算机断层扫描、核磁共振、荧光及细胞核影像（例如单光子发散计算机断层扫描 (single-photon emission computed tomography, SPECT) 及正子断层扫描 (positron emission tomography, PET)）。当可想见，步骤 (a) 及 (b) 可由相同或不同的路径投予。

[0066] 依据本揭示内容不同的实施方式，适用于细胞治疗的治疗细胞可以是干细胞、诱导多功能细胞、功能分化细胞、重组细胞或其组合。

[0067] 干细胞的组织来源包含成熟组织（例如造血组织、血管组织、神经组织、间叶组织、心脏组织、脂肪组织、肌肉组织、牙齿组织、骨骼组织、软骨组织、骨膜组织、乳腺组织、子宫组织及皮肤组织）；产期组织（例如胎盘组织及脐带血）；胎儿组织（例如羊水、卵黄囊、神经组织及皮肤组织）；以及胚胎组织。干细胞或其细胞产物具有经细胞分裂周期而完成的自我新生复制能力，且可分化为具有特殊特性 / 功能的各种细胞类型。当细胞投予至活体内后，该些分化及复制主要是由宿主的生理环境所调控。

[0068] 功能分化细胞可以源自成人捐赠者（自体或同种异体）或动物（异种）。来源细胞可以包含纤维母细胞、软骨细胞、成骨细胞、骨细胞、脂肪细胞、上皮细胞、角质细胞、视网膜细胞、牙细胞、肾细胞、胰岛细胞、肝细胞、神经细胞、免疫细胞、肌肉细胞及血球细胞。功

能分化细胞或其细胞产物通常不具自我新生复制的能力，亦无法分化成多种细胞类型；然而，该些细胞保留其组织来源的某些细胞特性。此外，经过特定的细胞外诱导，注入活体后该些细胞可能改变其原本的细胞特性。

[0069] 诱导多功能细胞(induced pluripotent cell,iPS cell)是一群经基因或化学诱导，而具有较高效力(potency)的细胞（例如胚胎干细胞），其可源自已分化的体细胞或干/前趋细胞。诱导多功能细胞具有与胚胎干细胞相似的细胞形态、功能及生长特性。

[0070] 重组细胞是指将重组基因转入后制备的细胞。举例来说，治疗细胞可以是重组CD31+、CD34+、CD45+、CD133+、c-kit+、sca-1+或isl-1+细胞。

[0071] 依据本揭示内容某些实施方式，透明质酸化合物可以是透明质酸或其衍生物。透明质酸是一种由N-乙酰氨基葡萄糖(N-acetylglucosamine)及D-葡萄糖醛酸(D-glucuronic acid)的重复双糖单元(repeating disaccharide unit)所组成的阴离子、非硫化氨基葡聚糖(glycosaminoglycan)。双糖单元的组成数量会影响透明质酸的分子量，该分子量可由20千道尔顿到2,000千道尔顿。透明质酸是细胞外基质(extracellular matrix)不可或缺的必要成份，且被视为是一种免疫中性多糖(immuno-neutral polysaccharide)；因此，生医领域常利用透明质酸进行各种不同的应用。

[0072] 透明质酸衍生物包含，但不限于，透明质酸的部份酯类或全酯类、经己二酸二酰肼修饰的透明质酸、透明质酸酰胺、交联透明质酸、丁二酸的半酯、透明质酸的重金属盐类、硫化透明质酸、N-硫化透明质酸、经胺类修饰的透明质酸及经双胺修饰的透明质酸。透明质酸化合物亦可以包含由透明质酸与丝所形成的组合物，或是透明质酸与其它天然或合成物质所形成的交联产物。可利用本所属领域习知技艺人士所熟知的化学方法来修饰透明质酸及/或与其它分子交联的透明质酸的一或多功能基（例如羧酸基、氢氧基、还原端基及N-乙酰基）来制备透明质酸的衍生物或组合物。

[0073] 依据本揭示内容不同的实施方式，生物分解性材料是由分子量为20到2,000千道尔顿的透明质酸所组成；较佳的情况是，由分子量为50到1,200千道尔顿的透明质酸所组成；最佳的情况是，由分子量为200到800千道尔顿的透明质酸所组成。举例来说，透明质酸化合物的分子量可以是20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500、1,600、1,640、1,700、1,800、1,900、2,000、2,100、2,200、2,300、2,400、2,500、2,600、2,700、2,800、2,900、3,000、3,100、3,200、3,300、3,400、3,500、3,600、3,700、3,800、3,900、4,000、4,100、4,200、4,300、4,400、4,500、4,600、4,700、4,800、4,900或5,000千道尔顿。

[0074] 或者是，生物分解性材料可以包含二或多种透明质酸化合物。在某些实施方式中，生物分解性材料可以选择性地包含至少一种生物聚合物；举例来说，该生物聚合物包含，但不限于，胶原、明胶、藻酸盐、几丁聚糖、纤网蛋白及纤维蛋白胶。在该些实施方式中，生物分解性材料于活体内的整体分解特性应相似于具有上述分子量的透明质酸于活体内的分解相性。

[0075] 在本揭示内容某些实施方式中，生物分解性材料于活体内的半衰期为4小时到28天；或者是，一旦投予至个体后，生物分解性材料于活体内的半衰期可为8小时到7天、12小时到5天或1到3天。举例来说，其于活体内的半衰期可以是4、5、6、7、8、9、10、11、12、

13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 或 23 小时，或是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27 或 28 天。

[0076] 当可想见，一旦投予至个体后，治疗细胞会立刻开始被移除；然而，下述实施例中的实验结果将证明投予本发明生物分解性材料后，可减缓治疗细胞的移除，藉以将较高量的治疗细胞保留于治疗位置。此外，实验结果亦指出，生物分解性材料可抑制活体内的细胞凋亡，并促进细胞生长。因此，投予本发明生物分解性材料至少可藉由延缓细胞分解及促进细胞生长，将细胞群维持于治疗位置。依据本揭示内容的实施方式，可将治疗细胞群维持于治疗位置至少 7 天；较佳为至少 14 天；最佳为至少 28 天。换言之，在投予 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27 或 28 天后，于治疗位置仍具有治疗有效量的治疗细胞。

[0077] 本发明的优势在于本发明方法可于细胞治疗早期（例如前 10 天）提供大量的治疗细胞。举例来说，在将治疗细胞投予至治疗位置 3、4、5、6、7、8、9 或 10 天后，治疗位置的治疗细胞群会大致等于或大于初始投予的治疗细胞群。

[0078] 依据不同的实施方式，治疗细胞的治疗有效量为每公斤个体体重 1×10^4 至 1×10^8 细胞。依据某些实施方式，透明质酸化合物的有效量为每公斤个体体重 0.01 至 10 毫克。较佳的情况是，该个体为一体重介于 45 到 80 公斤的成年人类。本领域技术人员可依据动物模式的剂量来计算药物的人体等效剂量 (human equivalent dose, HED)。举例来说，本领域技术人员可依据美国食品药物管理局所公告的“估算成人健康志愿者在初始临床治疗测式的最大安全起始剂量”(Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers) 来估算人体使用的最高安全剂量。

[0079] 依据本揭示内容的实施方式，本发明方法可用以治疗可接受细胞治疗的不同疾病或病征。举例来说，本发明方法可用以治疗罹患损伤或感染组织、神经退化性疾病及心血管疾病（例如冠状动脉疾病、心肌病变、心肌梗塞、粥状动脉硬化、心脏衰竭、先天性心脏疾病、周边动脉闭塞性疾病、心脏瓣膜疾病、雷诺氏病征 (Raynaud’s phenomenon)、伯格氏病 (Buerger’s Disease)、其它与血管发炎或损伤相关的结缔组织疾病、周边动脉疾病及缺血性心脏疾病）的个体。此外，本发明方法可用以治疗与骨骼、软骨、肌肉、眼睛、视网膜、鼻子、耳朵、甲状腺、副甲状腺、皮肤、牙齿、牙龈、脑部、脊椎、胸部、子宫、卵巢、睾丸、肝脏、胰脏或肾脏相关的疾病或病征。再者，本发明方法亦可应用于药妆或组织重建等医药领域。

[0080] 下文提出多个实验例来说明本发明的某些实施方式，以利本发明所属技术领域中具有通常知识者实施本发明，且不应将这些实验例视为对本发明范围的限制。据信本领域技术人员在阅读了此处提出的说明后，可在不需过度解读的情形下，完整利用并实践本发明。此处所引用的所有公开文献，其全文皆视为本说明书的一部分。

[0081] 材料及方法

[0082] 透明质酸 (Hyaluronic Acid, HA). 由 Creative PEGworks (Winston-Salem, NC, 美国）购买与生物素接合的具有 200、800 或 1640 千道尔顿的透明质酸（即 HA 200kDa、HA 800kDa 及 HA 1640kDa），并保存于 4℃。

[0083] 与荧光素接合的透明质酸．将与生物素接合的透明质酸溶解于去离子水中，反应至隔日；并依照操作使用说明书所述的方法，制备与 Alexa Fluor 700 接合的卵白素

(Invitrogen,Grand Island,NY, 美国)。于4℃温和地混合卵白素及与生物素接合的透明质酸。以Amicon离心过滤单元(Amicon centrifugal filter units, 过滤100千道尔顿以下的分子,Millipore,Billerica,MA, 美国)过滤混合物,移除过量的卵白素。将所得的产物冷冻干燥后,保存于4℃。

[0084] 培养人类间叶干细胞(human mesenchymal stem cell,hMSC).将人类间叶干细胞培养于包含20%胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)及每毫升4纳克的人类纤维母细胞生长因子-碱性(human fibroblast growth factor-basic,bFGF;Invitrogen,Grand Island,NY, 美国)的甲型最少必需培养液(minimum essential alpha medium, α MEM)中。将人类间叶干细胞培养于37℃,且充满5%二氧化碳的环境中。以胰蛋白酶收集细胞后,利用光学显微镜计算细胞数量,再进行移植。

[0085] 实验动物.所有的动物实验皆是依照中央研究院实动委员会的规范进行操作。由国家实验动物中心购买8周大的裸鼠。在进行外科手术操作及活体试验前,皆先以舒泰(Zoletil, 每公斤50毫克,Virbac,Carros, 法国)及龙朋(Rompun, 每公斤0.2毫升,Bayer Healthcare,Kiel, 德国)麻醉小鼠。

[0086] 以荧光信号定量活体内材料分解及细胞保留.将人类间叶干细胞培养于37℃,且充满5%二氧化碳的10公分培养皿。将总数为4×10^6的人类间叶干细胞与200微升的α MEM细胞培养液或1%的透明质酸混合后,注入小鼠的缺血肌肉组织。利用Xenogen IVIS®光谱仪及对应的滤镜组来观察注射后的小鼠影像。计算特定区域中光子的数量以分析荧光强度,再扣除组的自体荧光表达量来进行调整校正。

[0087] 后肢缺血的动物模式及其治疗.外科手术的整体死亡率为0%。将小鼠左侧股动脉及胯骨动脉进行结扎后切断,以引发肢缺血模式。以肌肉注射200微升的生理盐水、4×10^6人类间叶干细胞(悬浮于细胞培液中)、1%的不同分子量的透明质酸溶液及1%的与4×10^6人类间叶干细胞混合且具有不同分子量的透明质酸溶液。将上述溶液分别投予至4个不同的缺血位置(每个位置50微升)。

[0088] 血流测试.利用镭射杜卜勒显像仪(laser Doppler imager,Moor Instrument, 英国)来测量微血管的血流状态。计录小鼠双肢于手术前、手术后1天及接连4周的血流量。以缺血肢体(左侧)与正常肢体(右侧)的血流比例来表示结果。

[0089] 后肢缺血后小鼠的临床分析.临床评估是基于小鼠每日的活动力及后肢状况来进行分析;评分依序为0(正常)、1-3(肌肉萎缩)、4-5(产生坏疽)及6(肢体截断)。

[0090] 免疫组织化学及免疫荧光染色.将固定的远程小腿及大腿肌肉进行脱蜡及脱水后,置于10mM柠檬酸钠(pH 6.0)中煮沸10分钟;之后,加入抗RFP抗体、抗SM22α抗体(Abcam,Cambridge,MA, 美国)、抗Ki-67抗体(BD Biosciences,San Jose,CA, 美国)、抗肌旋蛋白抗体(anti-tropomyosin antibody,DHSB,Iowa city,Iowa, 美国)及抗植物凝集蛋白抗体(anti-isolectin antibody,Invitrogen,Grand Island,NY, 美国),并于4℃作用至隔日;再加入与Alexa Fluor488-或568-接合的第二抗体(Invitrogen,Carlsbad,CA, 美国)。以DAPI(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO, 美国)染色后,将组织封片,并利用荧光显微镜进行观察分析。随机选取各检体中8个缺血的部位,检测并计算其边缘区域的微血管及小动脉的密度及数量(200倍放大);之后再平均所得数值。

[0091] 统计分析.除非另有所指,否则所有的统计皆是以平均值±标准差

(mean±standard deviation) 来表示；在进行活体外光谱分析时，小鼠只数为 3；在进行活体内透明质酸分解试验及人类间叶干细胞维持试验时，小鼠只数为 6；在进行微血管及小动脉密度分析时，小鼠只数为 8)。为多重比较，以变异数 ANOVA 及 Bonferroni 调整来进行分析。当所得机率值 $P<0.05$ 时，则视为具有统计差异。

[0092] 实施例 1

[0093] 分析透明质酸及人类间叶干细胞

[0094] 本实施例将同时定量生物材料的分解及干细胞的维持，藉以评估材料分解速率对干细胞维持的影响。为长时间同时追踪活体内生物材料的分解及干细胞的维持，本实验将利用以 Alexa Fluor 700 标记的透明质酸及会表达圆盘海葵红 (Discosoma sp.Red,Ds-Red) 的人类间叶干细胞，佐以非侵入式影像系统 (IVIS；PerkinElmer,Waltham,MA, 美国）来分析材料于活体内的保留特性，以减少动物的牺牲及实验的变异。

[0095] 先检测荧光强度是否与以 Alexa Fluor 700 标记的卵白素及表达 Ds-Red 的人类间叶干细胞的浓度相关，以建立荧光信号与以生物素标记的透明质酸浓度或与人类间叶干细胞数量的标准关系。

[0096] 透明质酸及人类间叶干细胞的荧光强度皆会随着卵白素浓度及人类间叶干细胞数量的增加而成线性关系的增加（图 1 及图 2)。该些图式亦指出，相较于表达 Ds-Red 的人类间叶干细胞，以与 Alexa Fluor 700 接合的卵白素标记的生物素化透明质酸具有更高的荧光强度。

[0097] 实施例 2

[0098] 确认荧光光谱

[0099] Alexa Fluor 700 及 Ds-Red 的激发与发散光谱分别位于红色及黄橘色的光谱波段中。为确认 IVIS 是否可适度地侦测该些荧光信号，而不造成光谱干扰，分别将以 Alexa Fluor 700 标记的卵白素与表达 Ds-Red 的人类间叶干细胞置于二管微离心管中 (Eppendorf,Hamburg, 德国），再以 675/720（激发 / 发散）的滤镜组来侦测 Alexa Fluor 700，而以 570/620（激发 / 发散）的滤镜组来侦测 Ds-Red。

[0100] 当使用侦测 Ds-Red 的滤镜组时，不会侦测到 Alexa Fluor 700 的信号；反之亦然（图 3，上方二图）。将 Alexa Fluor 700 卵白素与人类间叶干细胞混合于同一离心管中，再次利用上述滤镜组来激发检体。在该显影过程中，二滤镜组是分别用以侦测由 Alexa Fluor 700 或 Ds-Red 所发散的荧光信号（图 3，下方二图）。

[0101] 画出特定区域来评估将卵白素与人类间叶干细胞混合前后的荧光强度。结果指出，卵白素与人类间叶干细胞混合前后的荧光强度并无显著的差异；亦即，Alexa Fluor 700 与 Ds-Red 的光谱并不会相互干扰（图 4)。进一步将透明质酸或透明质酸 / 人类间叶干细胞注入小鼠的后肢来确认该结果；结果显示不论是否有加入人类间叶干细胞，荧光信号皆仅与透明质酸的分解状况相关（图 5 到图 7)。

[0102] 实施例 3

[0103] 检测透明质酸于活体内的分解特性

[0104] 利用小鼠后肢缺血模式来研究不同细胞的保留特性于减缓周边动脉疾病的作用。为观察活体内材料与细胞的特性，本实施例是利用以荧光素标记的卵白素及表达 Ds-Red

的人类间叶干细胞来进行分析试验。

[0105] 将小鼠进行外科手术以产生缺血模式后，立即将 200 微升的 1％具有不同分子量（即 200、800 或 1640 千道尔顿）的透明质酸（以下简称 HA 200kDa、HA800kDa 及 HA 1640kDa）分别注入具有小鼠的后肢，并测量特定区域的活体荧光信号，据以追踪透明质酸于活体内的分解特性。随着时间而减少的荧光信号指出透明质酸的分解（图 8）。

[0106] 为测试卵白素残基是否亦发散信号，将以 Alexa Fluor 700 标记的卵白素注入小鼠后肢，结果指出该荧光信号会快速地于 12 小时内消失（图 9）。

[0107] 所有注入的透明质酸皆会随着时间的增加而呈现指数型的减少（图 10）。该图式亦指出，最低分子量的透明质酸 HA-200 的荧光强度减少最为缓慢；意指相较于高分子量的透明质酸，低分子量的透明质酸分解较为缓慢。同时 HA-1640 的荧光信号衰退最为快速，特别可见于注射后的前 24 小时内。低分子量透明质酸的分解速度低于高分子量透明质酸的分解速度可能是由于高分子量透明质酸具有较大的侵蚀表面所导致。

[0108] 为进一步检测三种透明质酸的指数型分解特性，以传统的指数衰减公式来分析图 10 的结果。分析结果确认了三种透明质酸的指数分解特性（结果未显示）。分别使用系数 a 及 b 来计算结果。为检测各系数与各透明质酸之间的关联性，分别于线性图中绘示出不同透明质酸分子量的相对应系数（图 11）。系数 a 代表注射后立即的材料起始量，可观察到系数 a 大于 100，且数值会随着透明质酸分子量的增加而增加。该结果可能是由于透明质酸膨胀所导致。系数 b 则与透明质酸的半衰期呈反比关系。由该系数可确认透明质酸的半衰期会随着分子量的增加而减少（图 12）。总结上述，二种与分子量相关的系数（图 11）可用以预测其它分子量的透明质酸于活体内的可能分解特性。

[0109] 实施例 4

[0110] 人类间叶干细胞保留与透明质酸分解之间的关联性

[0111] 已知间叶干细胞 (mesenchymal stem cell,MSC) 不仅具有促血管新生功能，亦对缺氧或无血清等常见于缺血疾病动物模式的病状具有抗性。在本实施例中，将利用永生化且经基因改造后可持续表达 Ds-Red 荧光素蛋白的人类间叶干细胞作为非病毒转染方法来进行研究。本实施例所使用的疾病模式可代表周边动脉闭塞疾病的小鼠后肢缺血模式，已知美国约有一千万人罹患该疾病。

[0112] 为了解人类间叶干细胞保留与透明质酸分解之间的关联性，将 4×10^6 人类间叶干细胞与透明质酸混合后，注入小鼠的缺血后肢。

[0113] 在三组治疗组中，人类间叶干细胞所发散的荧光信号呈现相似的表达特性（图 13）。特别是，相较于原始信号强度，在注射 48 小时内，HA-1640 的信号约下降 7％，HA-800 的信号约下降 20％，而 HA-200 的信号则下降约 25％。该些结果指出移植的人类间叶干细胞会因体循环或细胞凋亡而逐渐减少。

[0114] 图 13 亦指出，在注入透明质酸 / 人类间叶干细胞 (HA/hMSC) 组中，人类间叶干细胞的荧光信号的减少会较为缓慢，且于注射后 48 小时达到最低，意指人类间叶干细胞会附着于周边的微环境。然而，72 小时 (3 天后)，荧光信号开始增加，其中又以 HA-200/ 人类间叶干细胞 (HA-200/hMSC) 组的增加最为显著，而以 HA-1640/ 人类间叶干细胞 (HA-1640/hMSC) 组最为缓慢。由于在不同治疗组别中，人类间叶干细胞的生长百分比约略相同（图 14 到图 15），因此推测该差异并非因不同透明质酸引发不同细胞生长速率所导致。如图 13

所示，HA-200/hMSC 组中细胞的保留量约为 HA-1640/hMSC 组的 3.6 倍，故荧光增加可能是由注射 48 小时后保留的人类间叶干细胞比例所造成。同时亦检测移植人类间叶干细胞的凋亡比例，结果显示合并治疗组的荧光表达并非由不同分子量的透明质酸所造成（图 16 到图 17）。

[0115] 可观察到在移植 48 小时内，人类间叶干细胞的荧光强度改变是与透明质酸的分解特性相关。48 小时后，人类间叶干细胞的荧光表达会开始增加，而透明质酸的荧光表达则会持续下降（图 18 到图 20）。

[0116] 由 HA-200/hMSC、HA-800/hMSC 及 HA-1640/hMSC 治疗组取得预损伤组织，并染色观察 Ds-Red 表达，据以分析保留于各组织的细胞百分比。由 HA-200 组的小鼠后肢可观察到最高量的人类间叶干细胞数，HA-800 组则次之（图 21 及图 22）。

[0117] 由该些结果可知，移植的人类间叶干细胞可能会经历三个阶段：耗损、附着及增生。在注射 48 小时内，如荧光信号的减少所指，人类间叶干细胞会在透明质酸中耗损。移植后的 48 到 72 小时间，如稳定的荧光信号所示，人类间叶干细胞会开始附着于周边微环境中。移植后 72 小时的最后阶段，即使无透明质酸，荧光信号依然会逐渐上升，意即细胞开始增生。因此，在进行成功的移植试验（例如干细胞移植）时，伴随的生物性材料应于活体系统中维持至少 48 小时。否则，该材料无法适当地辅助细胞维持停留于损伤位置。

[0118] 实施例 5

[0119] 不同治疗组的治疗功效

[0120] 周边动脉闭塞疾病的进程往往会导致腿痛及严重的并发症，例如截肢。减缓不舒适并保留肢体为临床治疗的首要目的。本实施例将初步检测小鼠在进行左股动脉结扎手术 1 天、2 周及 4 周后，其远程大腿及小腿肌肉的状态，藉以直接观察肢体保留的程度。

[0121] 当仅以人类间叶干细胞或透明质酸治疗缺血肢体时，并不会看到明显的治疗效果；然而，若以透明质酸 / 人类间叶干细胞进行合并治疗，则可观察到缺血肢体显著的改善（图 23）。若能在注射 48 小时后保留大多数的人类间叶干细胞，则可改善治疗结果；例如 HA-200/hMSC 组仅会造成轻微的指甲损伤，而可成功地保留肢体。然而，若是人类间叶干细胞保留量减少，虽可免除截肢，但却无法保留数个脚趾（图 23，最右栏）。相较于以生理盐水治疗的对照组，其它包含单独投予人类间叶干细胞、单独投予 HA-200、单独投予 HA-800 及单独投予 HA-1640 的治疗组皆不具有明显的治疗效果，在该些组别中，小鼠的肢体由于严重坏疽需进行截肢处理。

[0122] 此外，亦利用缺血区域的血流恢复程度作为另一种用以评估治疗功效的临床指标。在注射后，利用镭射杜卜勒微流仪（laser Doppler flowmetry，moorLDI；Moor Instrument，英国）来观察小鼠后肢每周的血流量，藉以比较不同治疗组别的血流恢复程度（图 24）。于以 HA-200 及人类间叶干细胞治疗的小鼠可观察到最高的血流恢复量，而于投予 HA-1640 的小鼠则可观察到较少的人类间叶干细胞保留量及最低的血量恢复量。更具体来说，HA-200/hMSC 组的血流会于第 2 周显著的增加。相较之下，接受人类间叶干细胞或透明质酸单独治疗组别的小鼠，其血流恢复量则与生理盐水治疗组的小鼠无显著差异。

[0123] 进一步计算临床分数来证明各治疗的功效。在以生理盐水、单独投予人类间叶干细胞或单独投予透明质酸的组别可观察到较高的临床分数，意即缺血后肢呈现包含严重截肢等较差的状况。相较之下，于 HA/hMSC 合并治疗组则可观察到较佳的治疗功效，其中又以

HA-200/hMSC 组具有最佳的治疗效果（图 25）。此外，亦利用免疫组织化学染色来分析治疗功效的改善机制；结果显示，HA-200/hMSC 治疗可藉由促进血管新生（图 26 及图 27）及动脉新生（图 28 及图 29）来增加小鼠缺血性后肢的组织修复。

[0124] 同时追踪活体内透明质酸的分解特性及人类间叶干细胞的保留状态可了解在特定治疗期间延长干细胞的保留时间能增加干细胞的治疗功效。活体内较高量的干细胞保留可治疗罹患后肢缺血的小鼠，藉由促进血管生成来增加肢体的保留及血流量的恢复。干细胞的保留时间是与适当的生物分解性材料相关，其中该生物分解性材料的分解速率会因注射位置及注射体积的不同而有所差异。可透过修饰材料、选用不同分子量的物质或调整注射体积使生物材料的分解速率最佳化，其中注射体积乃需经过活体内的特性分析方可进一步确认。

[0125] 综合上述，本发明发现移植干细胞的保留时间是与生物材料紧密相关。本发明亦发现干细胞的保留会影响治疗功效。该些结果证实，具有低分解速率及高细胞保留特性的低分子量透明质酸可用以改善诸如移植人类干细胞等移植细胞的治疗功效。此外，实施例 5 的结果亦证明使用生物分解性材料来辅助递送干细胞具有相加乘的功效，且在选择最适当的生物材料时，应注意考虑其于活体内的保留时间。

[0126] 即使本揭示内容是以特定的材料及疾病模式来进行实验分析，本发明亦可由其它材料及细胞或药物传递系统来完成。此外，疾病模式可以衍伸至其它种缺血性疾病，举例来说，本发明方法亦可用以治疗心肌梗塞及中风等缺血性疾病。

[0127] 虽然上文实施方式中揭露了本发明的具体实施例，然其并非用以限定本发明，本发明所属技术领域中具有通常知识者，在不悖离本发明的原理与精神的情形下，当可对其进行各种更动与修饰，因此本发明的保护范围当以附随权利要求书所界定者为准。

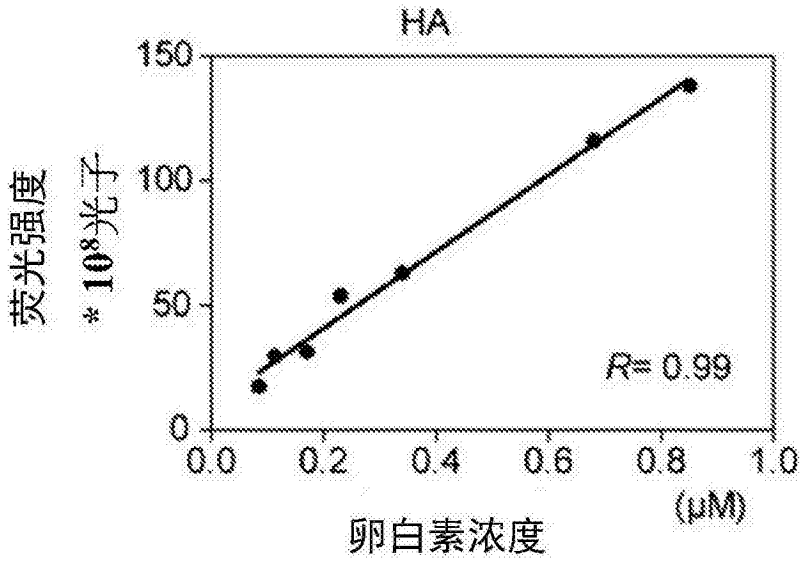

HA
150
100
50
0
荧光强度
* 10⁸光子
R= 0.99
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
(μM)
卵白素浓度

图 1

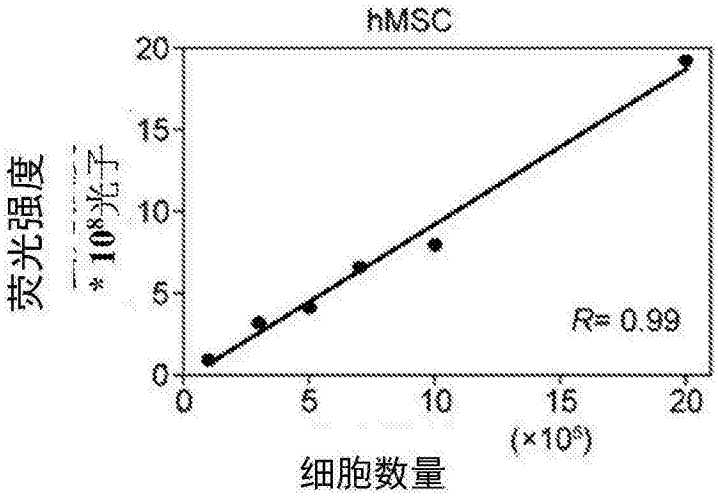

hMSC
20
15
10
5
0
荧光强度
* 10⁸光子
R= 0.99
0
5
10
15
20
(×10⁶)
细胞数量

图 2

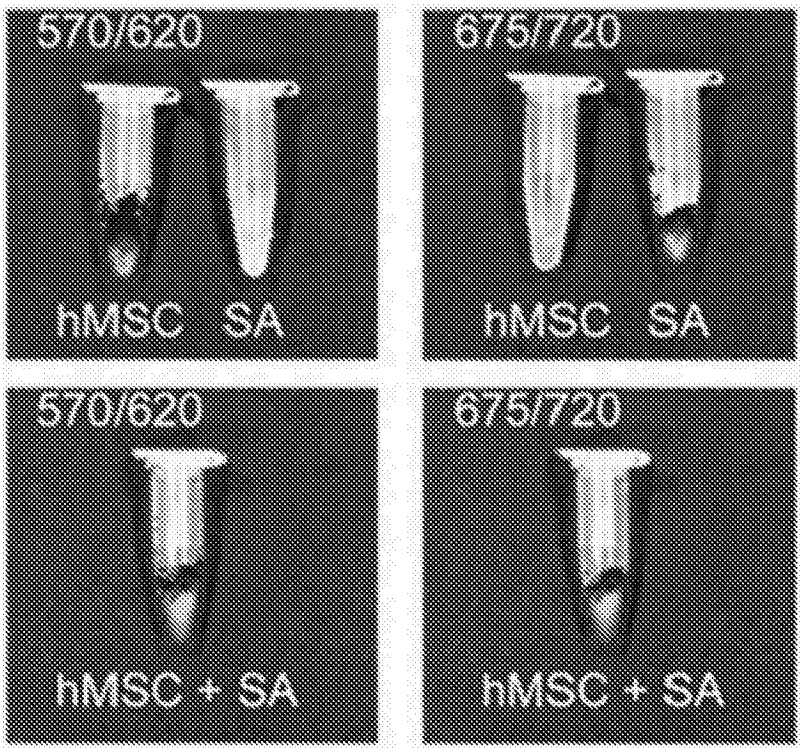

570/620
675/720
hMSC SA
hMSC SA
570/620
675/720
hMSC + SA
hMSC + SA

图 3

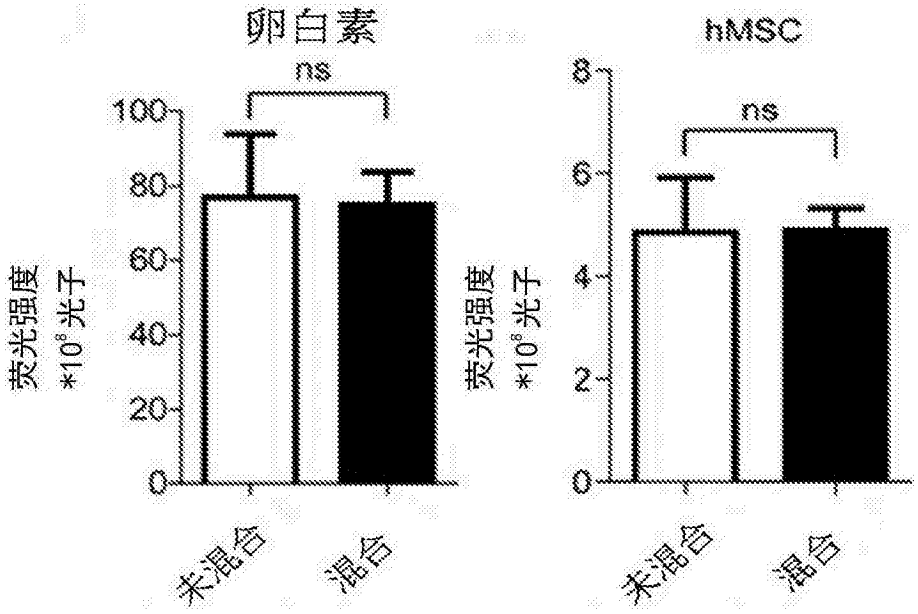

卵白素
hMSC
ns
ns
荧光强度
*10⁸ 光子
荧光强度
*10⁸ 光子
100
80
60
40
20
0
8
6
4
2
0
未混合
混合
未混合
混合

图 4

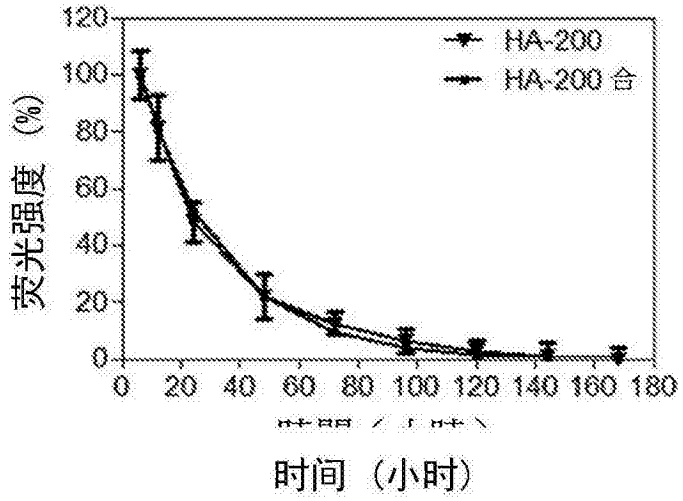

HA-200
HA-200 合
荧光强度（%）
0
20
40
60
80
100
120
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
时间（小时）

图 5

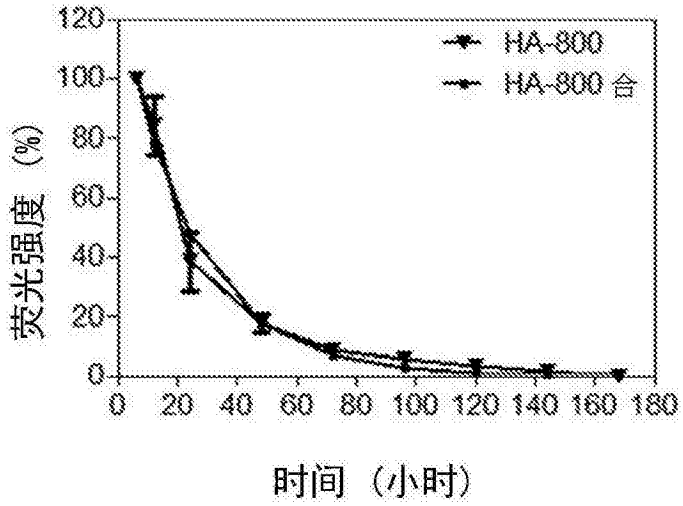

HA-800
HA-800 合
荧光强度（%）
0
20
40
60
80
100
120
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
时间（小时）

图 6

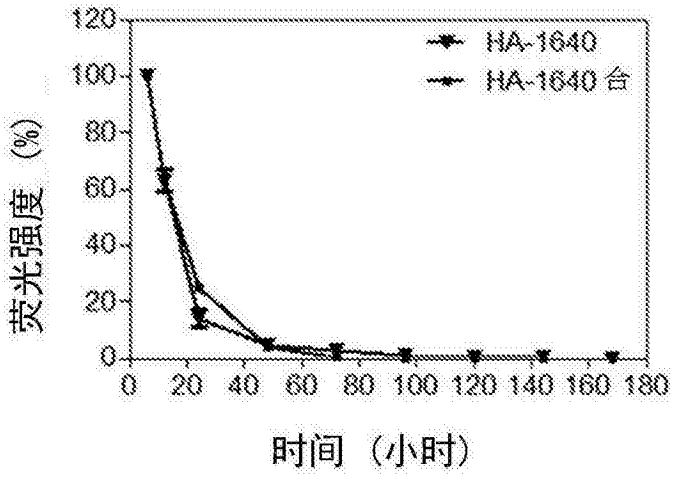

120
100
80
60
40
20
0
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180
荧光强度（%）
时间（小时）
HA-1640
HA-1640 台

图 7

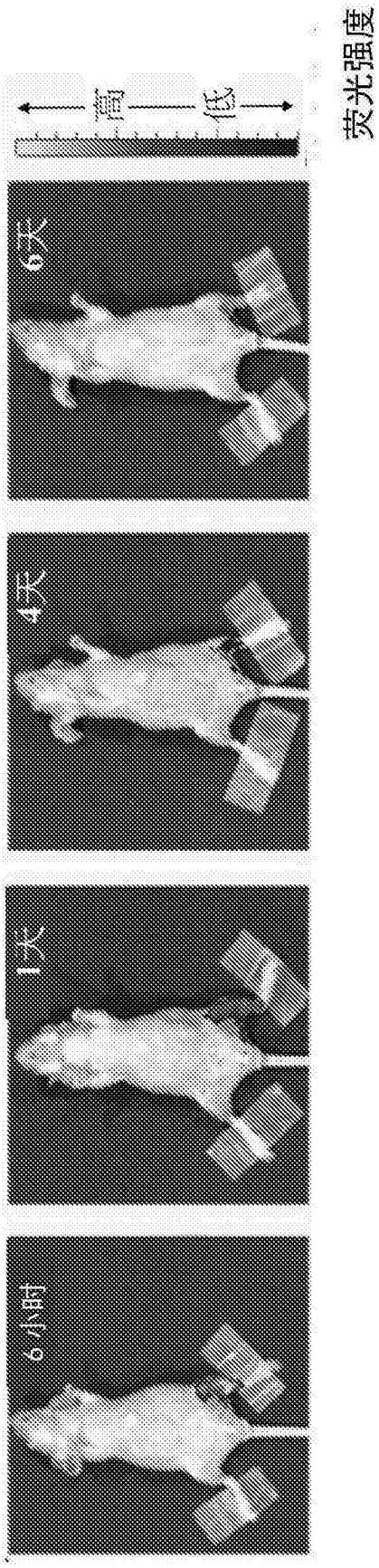

荧光强度
高
低
6天
4天
1天
6小时

图 8

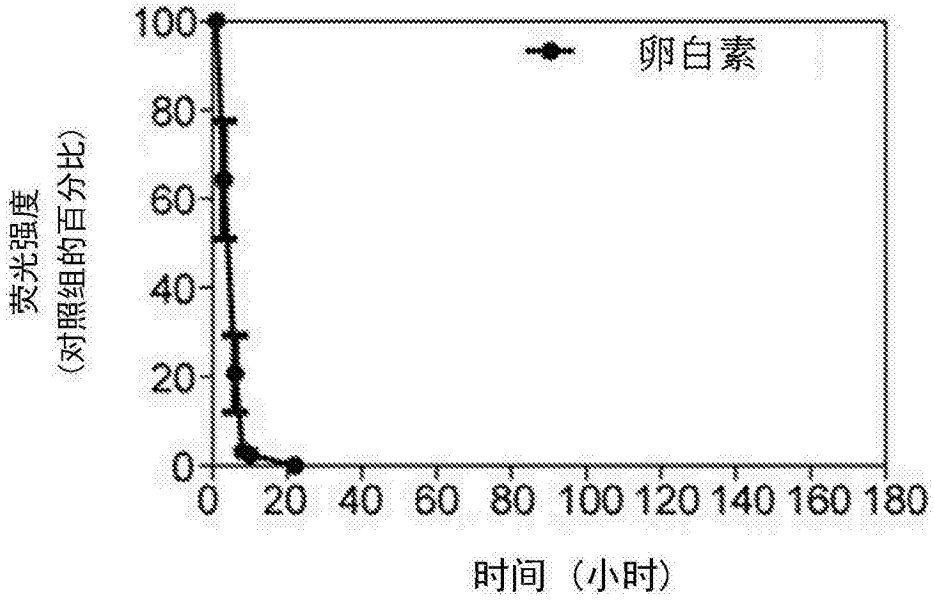

卵白素
荧光强度
(对照组的百分比)
100
80
60
40
20
0
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180
时间（小时）

图 9

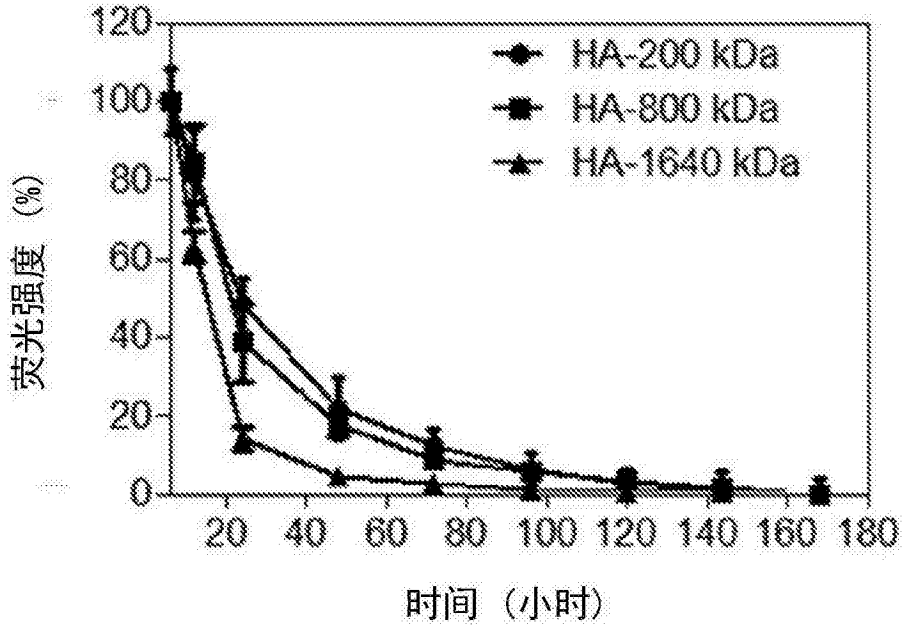

HA-200 kDa
HA-800 kDa
HA-1640 kDa
荧光强度（%）
120
100
80
60
40
20
0
20 40 60 80 100 120 140 160 180
时间（小时）

图 10

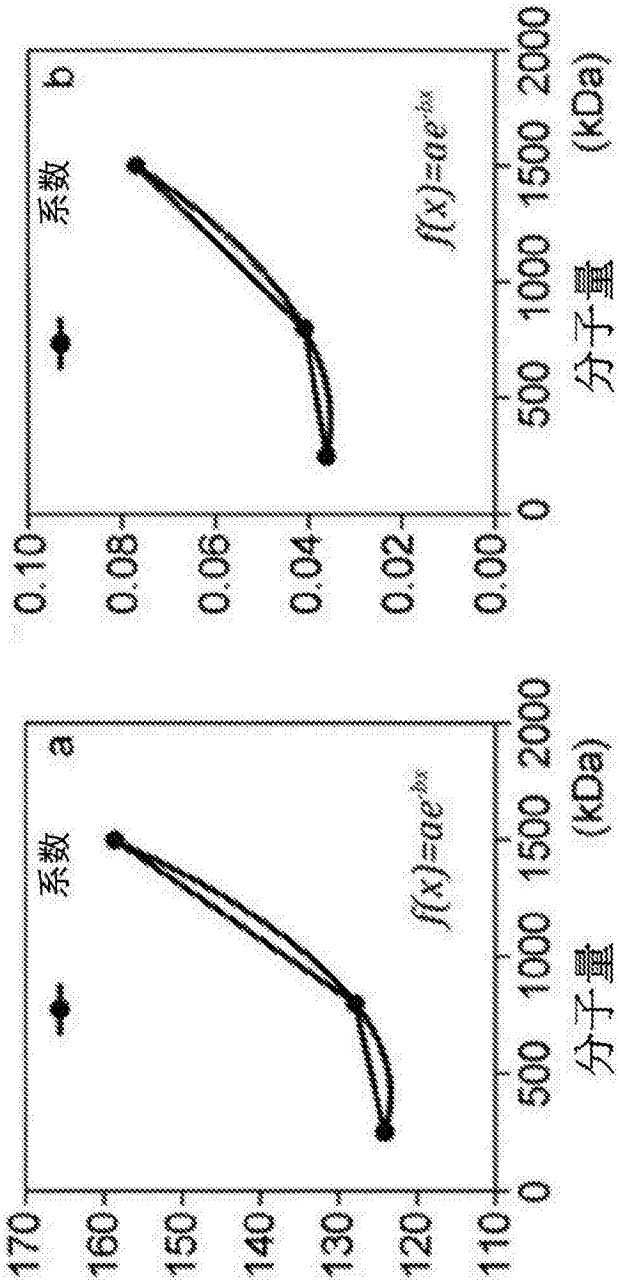

b
系数
$f(x)=ae^{-bx}$
分子量 (kDa)
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
0
500
1000
1500
2000
a
系数
$f(x)=ae^{-bx}$
分子量 (kDa)
170
160
150
140
130
120
110
0
500
1000
1500
2000

图 11

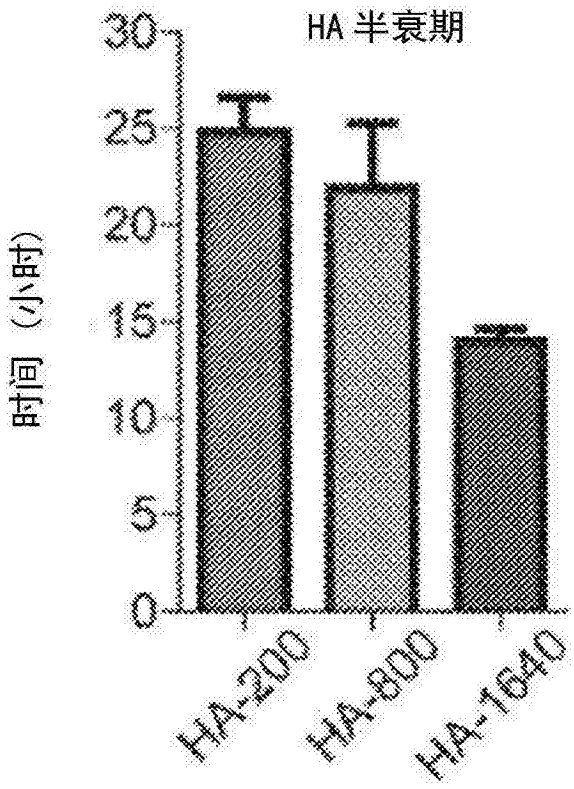

HA 半衰期
时间 (小时)
30
25
20
15
10
5
0
HA-200
HA-800
HA-1640

图 12

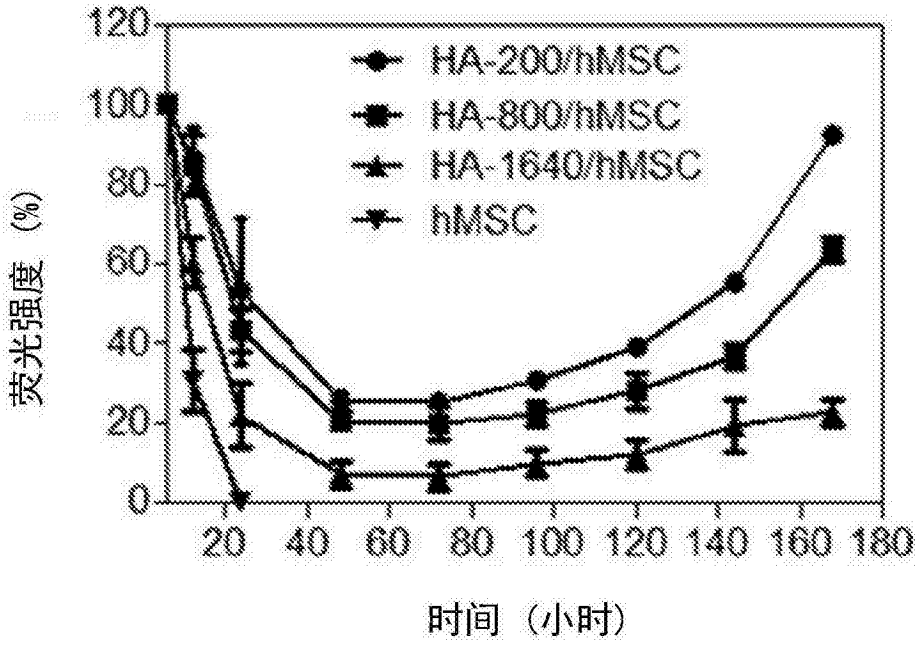

120
100
80
60
40
20
0
荧光强度（%）
HA-200/hMSC
HA-800/hMSC
HA-1640/hMSC
hMSC
20 40 60 80 100 120 140 160 180
时间（小时）

图 13

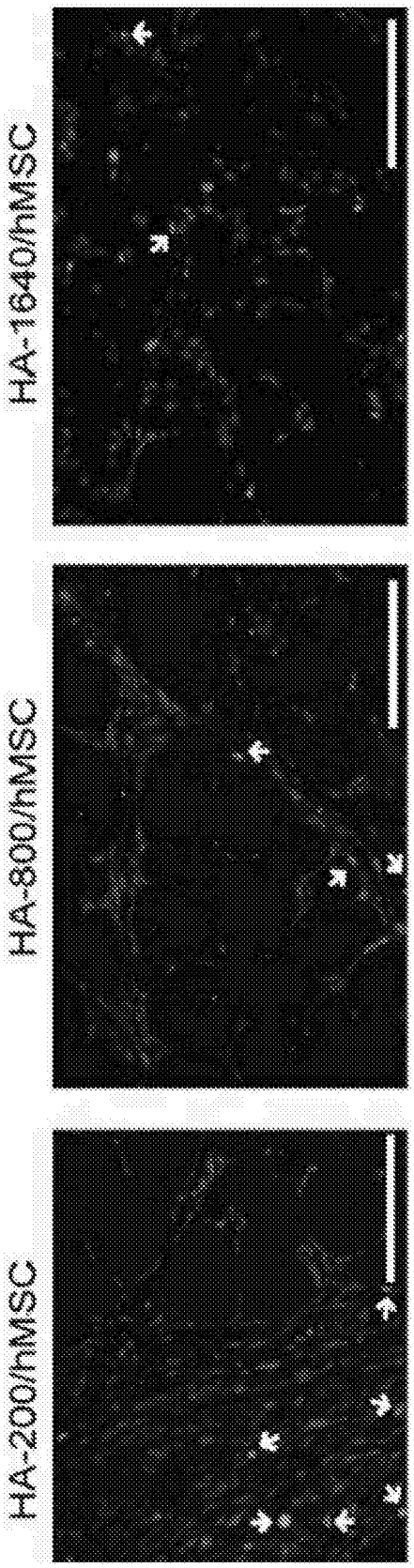

HA-1640/hMSC
HA-800/hMSC
HA-200/hMSC

图 14

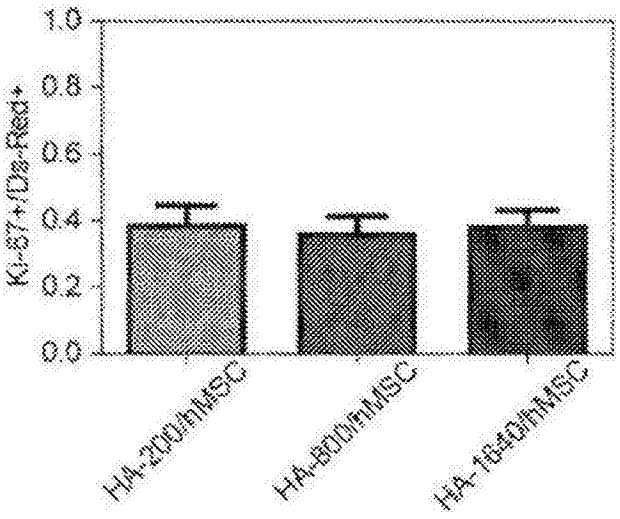

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Ki-67+/Dapi+
HA-200/hMSC
HA-800/hMSC
HA-1640/hMSC

图 15


HA-1640/hMSC
HA-800/hMSC
HA-200/hMSC

图 16

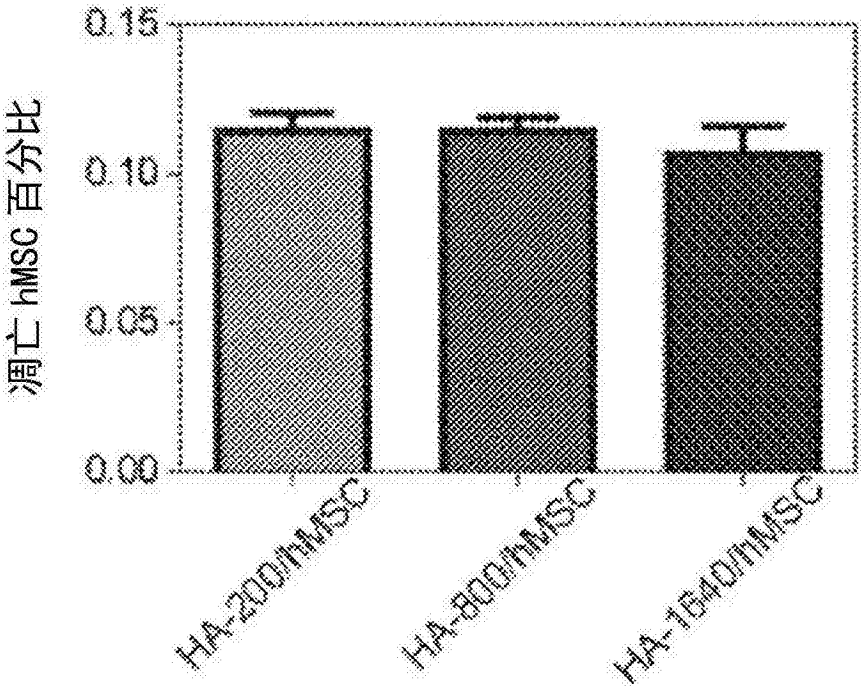

凋亡 hMSC 百分比
0.15
0.10
0.05
0.00
HA-200/hMSC
HA-800/hMSC
HA-1640/hMSC

图 17

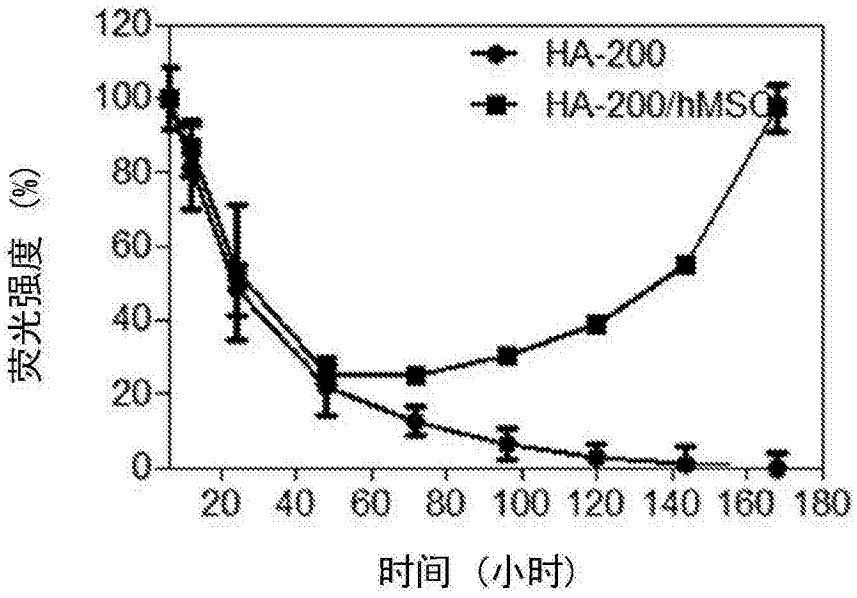

120
100
80
60
40
20
0
荧光强度（%）
HA-200
HA-200/hMSC
20 40 60 80 100 120 140 160 180
时间（小时）

图 18

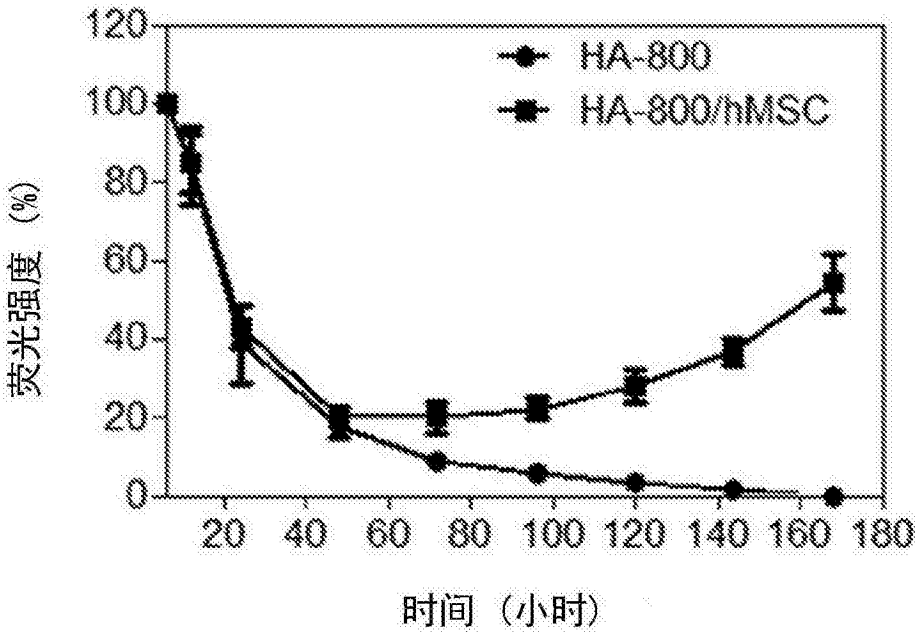

120
100
80
60
40
20
0
荧光强度（%）
HA-800
HA-800/hMSC
20 40 60 80 100 120 140 160 180
时间（小时）

图 19

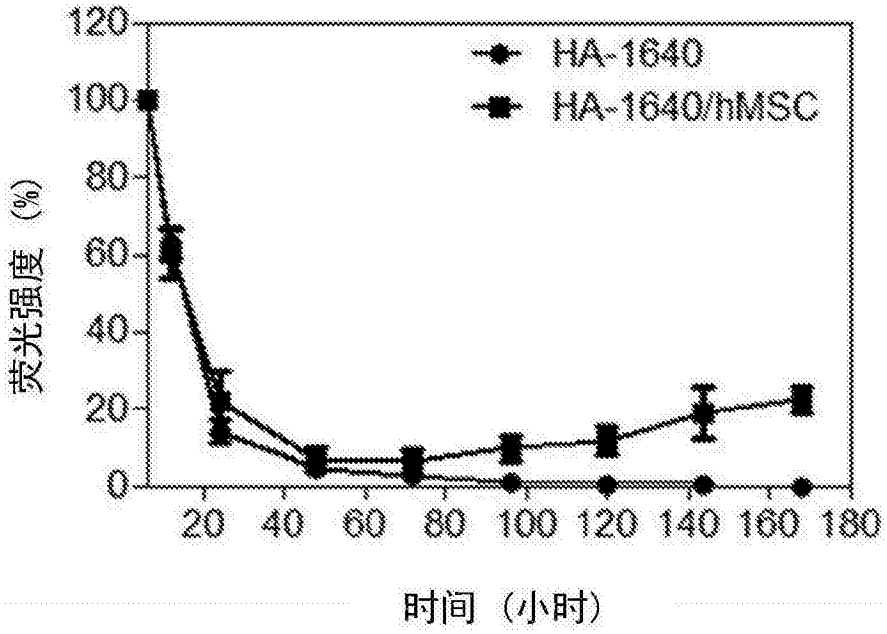

120
100
80
60
40
20
0
荧光强度（%）
HA-1640
HA-1640/hMSC
20 40 60 80 100 120 140 160 180
时间（小时）

图 20

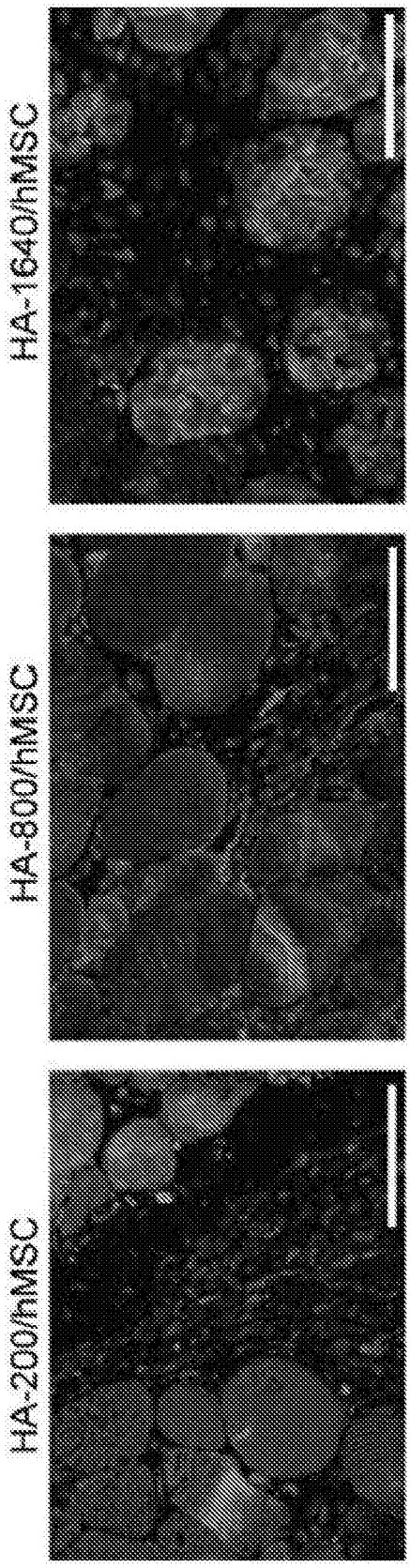

HA-1640/hMSC
HA-800/hMSC
HA-200/hMSC

图 21

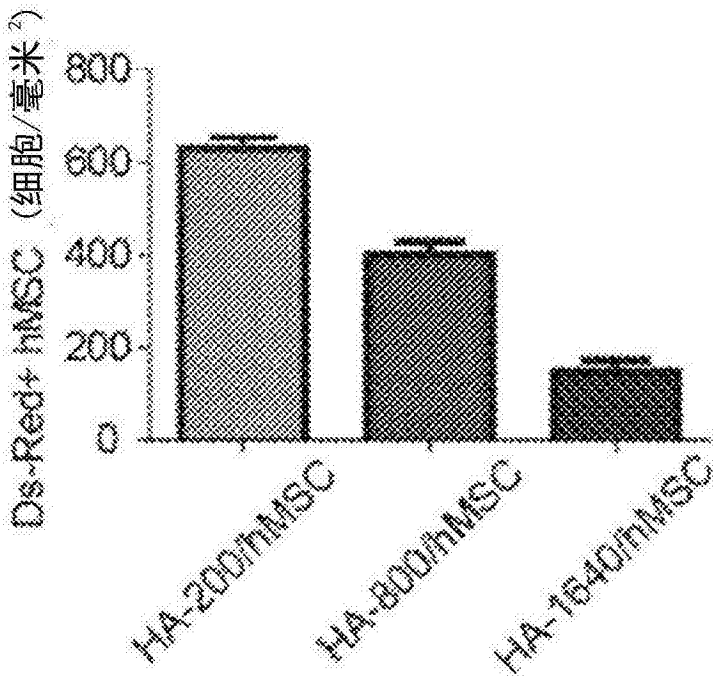

Os-Red+ hMSC (细胞/毫米2)
800
600
400
200
0
HA-200/hMSC
HA-800/hMSC
HA-1640/hMSC

图 22

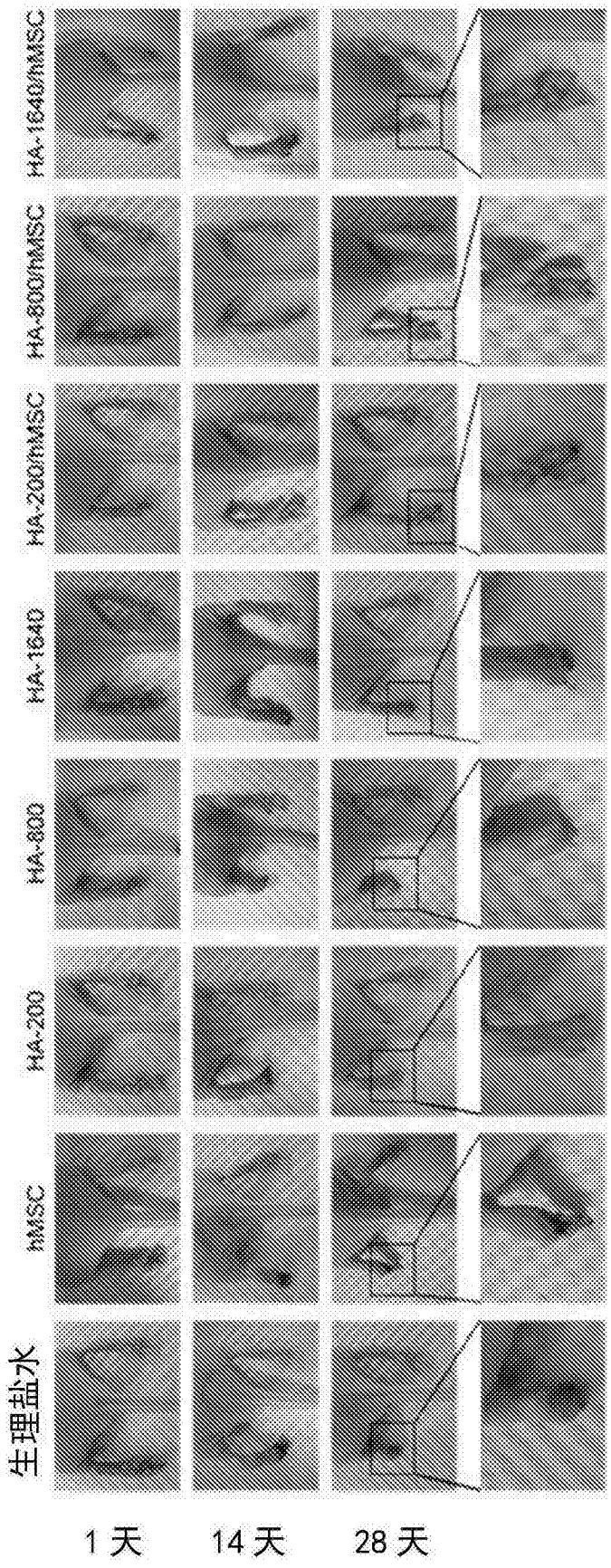

HA-1640/MSC
HA-800/MSC
HA-200/MSC
HA-1640
HA-800
HA-200
MSC
生理盐水
1 天
14 天
28 天

图 23

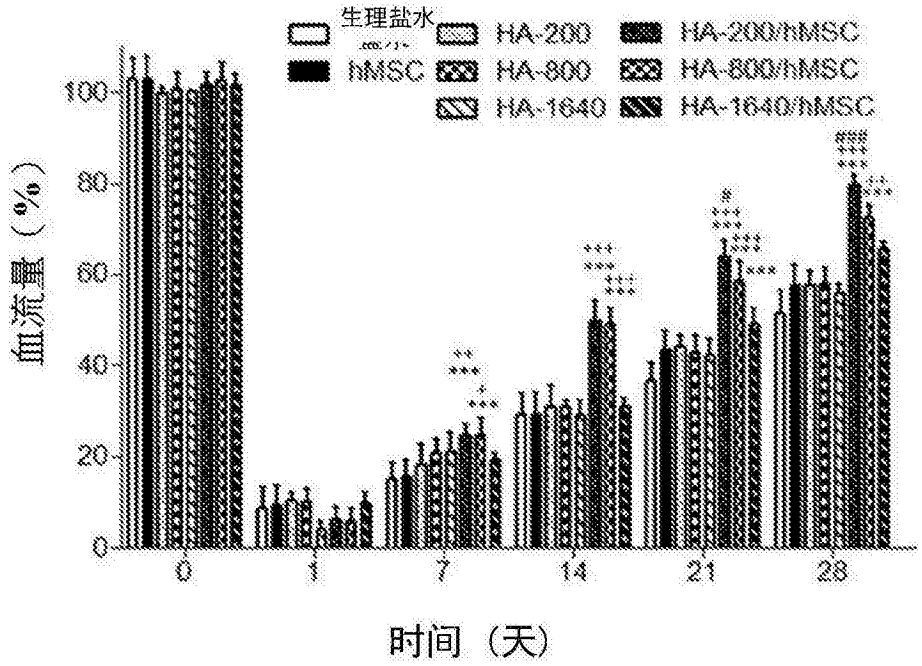

生理盐水
hMSC
HA-200
HA-800
HA-1640
HA-200/hMSC
HA-800/hMSC
HA-1640/hMSC
血流量（%）
100
80
60
40
20
0
0
1
7
14
21
28
时间（天）

图 24

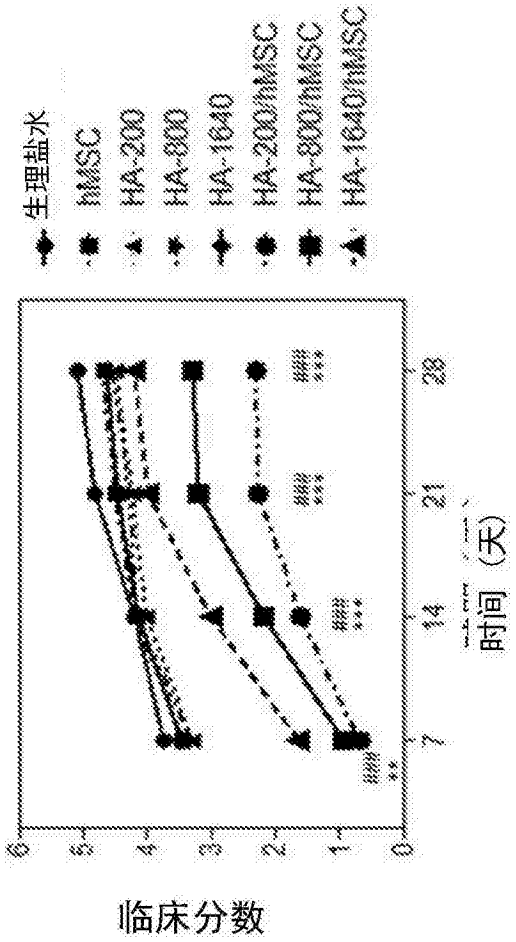

生理盐水
hMSC
HA-200
HA-800
HA-1640
HA-200/hMSC
HA-800/hMSC
HA-1640/hMSC
临床分数
时间（天）
0
1
2
3
4
5
6
7
14
21
28
**
###
***
###
***
###

图 25

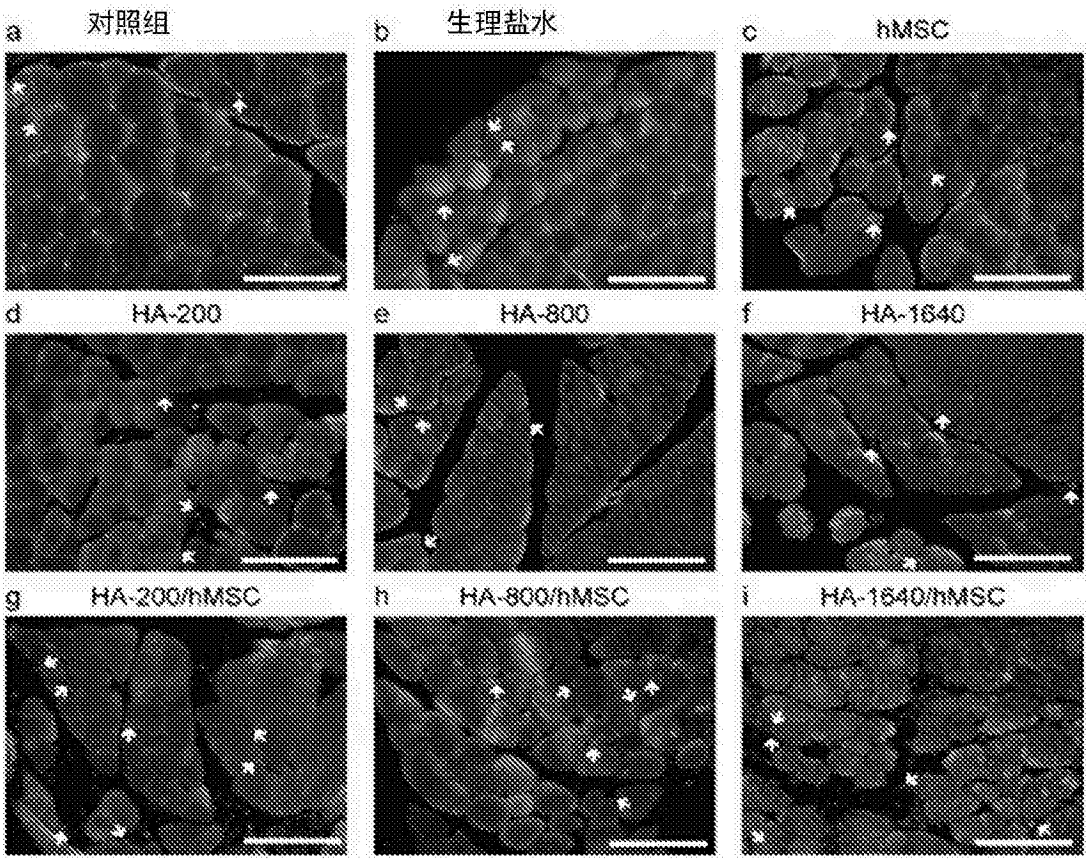

a 对照组
b 生理盐水
c hMSC
d HA-200
e HA-800
f HA-1640
g HA-200/hMSC
h HA-800/hMSC
i HA-1640/hMSC

图 26

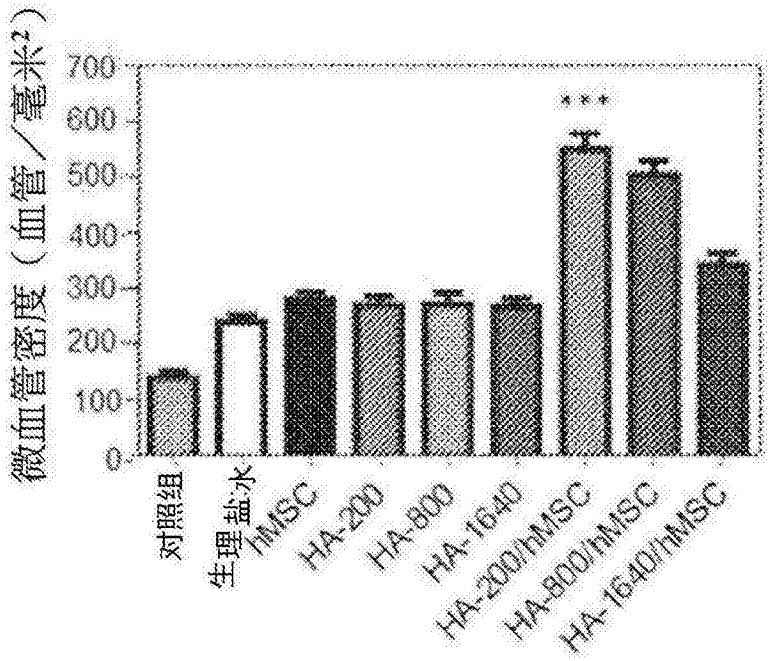

微血管密度（血管/毫米²）
700
600
500
400
300
200
100
0
***
对照组
生理盐水
hMSC
HA-200
HA-800
HA-1640
HA-200/hMSC
HA-800/hMSC
HA-1640/hMSC

图 27

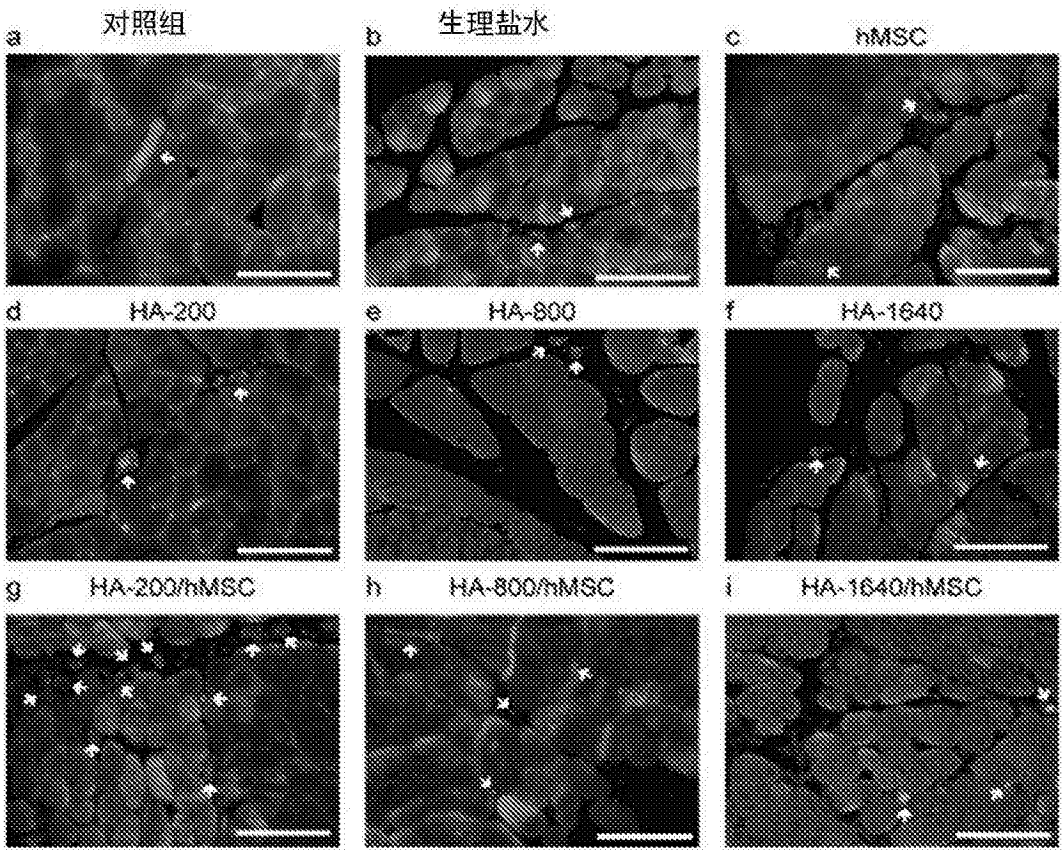

a 对照组
b 生理盐水
c hMSC
d HA-200
e HA-800
f HA-1640
g HA-200/hMSC
h HA-800/hMSC
i HA-1640/hMSC

图 28

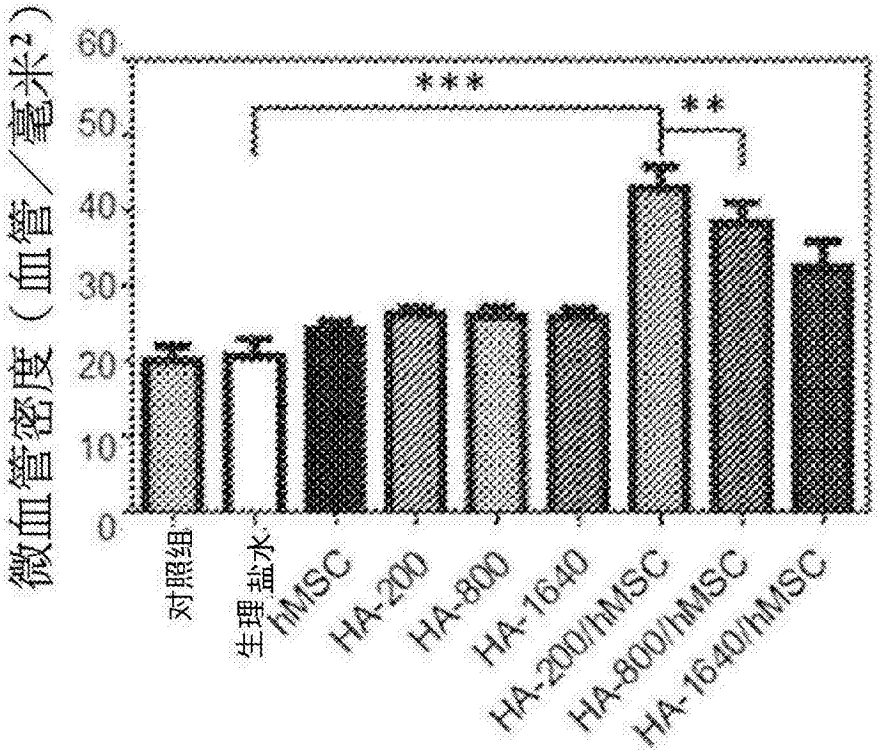

微血管密度（血管／毫米²）
60
50
40
30
20
10
0
***
**
对照组
生理盐水
hMSC
HA-200
HA-800
HA-1640
HA-200/hMSC
HA-800/hMSC
HA-1640/hMSC

图 29