



(21)申請案號：108133407

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 05 月 06 日

(51)Int. Cl. : C12N5/071 (2010.01)

C12M3/02 (2006.01)

(30)優先權：2010/05/07 美國

61/332,441

(71)申請人：北卡羅來納大學教堂山 (美國) THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL (US)

美國

(72)發明人：杜納 瑞秋 TURNER, RACHAEL (US) ; 葛伯爾 大衛 GERBER, DAVID (US) ; 瑞德 羅拉 M REID, LOLA M. (US) ; 羅奏亞 歐斯沃度 LOZOYA, OSWALDO (US)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：8 項 圖式數：15 共 60 頁

(54)名稱

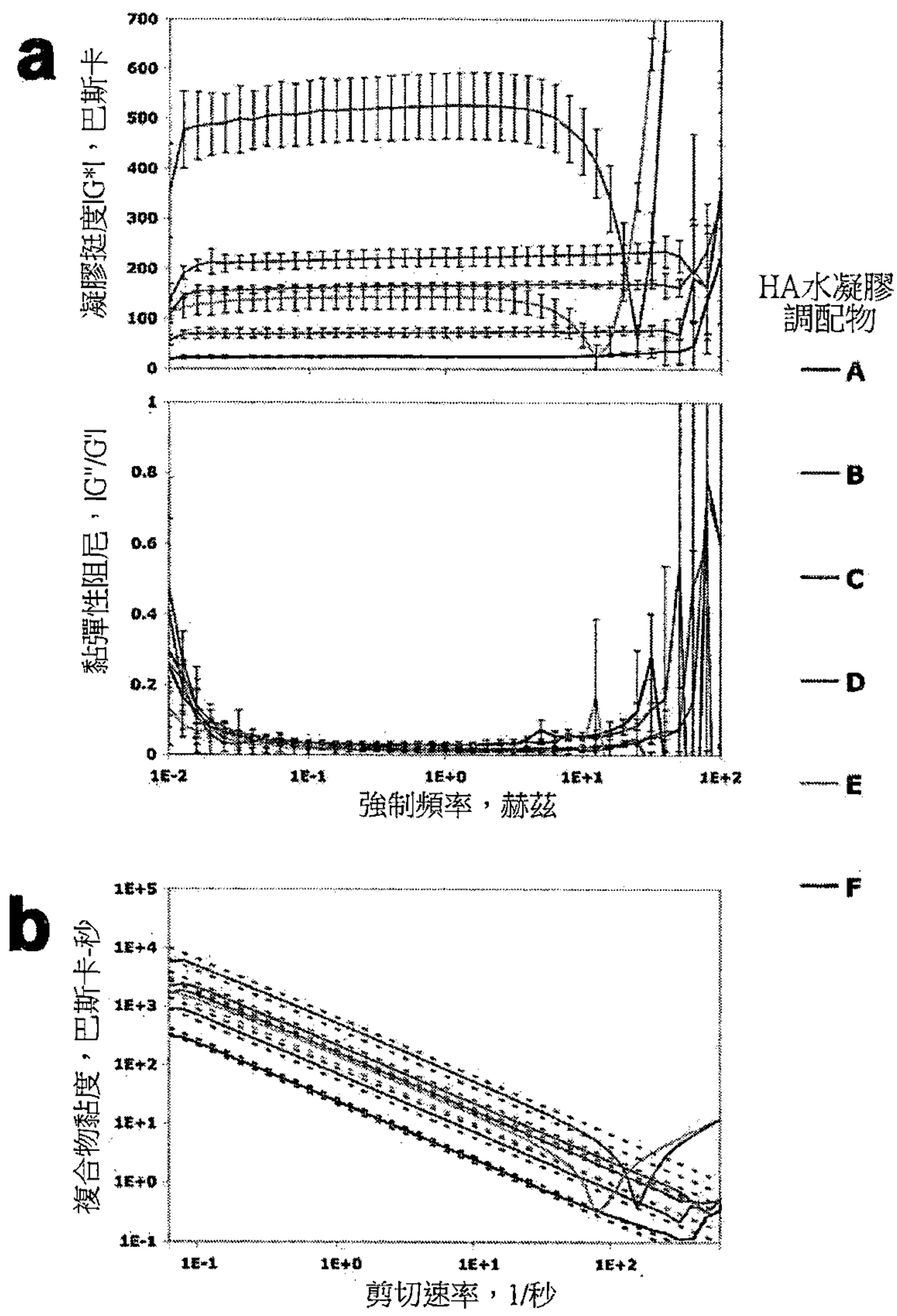
移植來自固型組織之細胞的方法

(57)摘要

本發明提供一種修復生病或不正常器官或建立疾病狀態的模型系統之方法。對修復生病的器官來說，該方法包括移植來自生病或不正常器官的健康組織之細胞，將該細胞與凝膠形成生物材料及培養基、發信分子及細胞外基質組分混合，該混合物可製成在移殖後快速地不溶而形成植入物。在此方法中，該植入物以最少的組分數目模仿允許細胞移殖的天然微環境之複合性，以成功地移植、擴展然後重建生病或不正常器官的部分或全部。在使用植入方法來建立疾病模型的情況中，可將生病的細胞移植在生物材料中及進入實驗宿主中。

A method of repairing diseased or dysfunctional organs or of establishing a model system of a disease state is provided. For repairing diseased organs, the method involves engraftment of cells from healthy tissue of the diseased or dysfunctional organ admixed with gel-forming biomaterials and nutrient medium, signaling molecules and extracellular matrix components that can be made insoluble rapidly upon transplantation to form a graft. In this way, the graft mimics the complexity of the native microenvironment with a minimum number of components that allow transplantation of cells to successfully engraft, expand and then rebuild part or the entirety of the diseased or dysfunctional organ. In the case of using grafting methods for establishing a disease model, diseased cells may be transplanted in the biomaterials and into experimental hosts.

指定代表圖：



【圖2】

發明摘要

※ 申請案號：108133407

※ 申請日：100.05.06

※IPC 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

移植來自固型組織之細胞的方法

METHOD OF ENGRAFTING CELLS FROM SOLID TISSUES

【中文】

本發明提供一種修復生病或不正常器官或建立疾病狀態的模型系統之方法。對修復生病的器官來說，該方法包括移植來自生病或不正常器官的健康組織之細胞，將該細胞與凝膠形成生物材料及培養基、發信分子及細胞外基質組分混合，該混合物可製成在移植後快速地不溶而形成植入物。在此方法中，該植入物以最少的組分數目模仿允許細胞移植的天然微環境之複合性，以成功地移植、擴展然後重建生病或不正常器官的部分或全部。在使用植入方法來建立疾病模型的情況中，可將生病的細胞移植在生物材料中及進入實驗宿主中。

【英文】

A method of repairing diseased or dysfunctional organs or of establishing a model system of a disease state is provided. For repairing diseased organs, the method involves engraftment of cells from healthy tissue of the diseased or dysfunctional organ admixed with gel-forming biomaterials and nutrient medium, signaling molecules and extracellular matrix components that can be made insoluble rapidly upon transplantation to form a graft. In this way, the graft mimics the complexity of the native microenvironment with a minimum number of components that allow transplantation of cells to successfully engraft, expand and then rebuild part or the entirety of the diseased or dysfunctional organ. In the case of using grafting methods for establishing a disease model, diseased cells may be transplanted in the biomaterials and into experimental hosts.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 2a, 2b ）圖。

【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)

移植來自固型組織之細胞的方法

METHOD OF ENGRAFTING CELLS FROM SOLID
TISSUES

【技術領域】

發明領域

[0001]本發明廣泛針對組織移植領域。更特別的是，本發明係關於一種用於細胞移植的組成物及方法。

【先前技術】

發明背景

[0002]細胞移植治療的現行方法係經由血管途徑將供體細胞引進宿主中(一種在造血治療後的模範對策)。但是，造血細胞治療相對容易地進行，因為這些細胞已釋放出而存在於懸浮液中且具有支持其返回特定標的組織之固有特徵。因此，數千個在造血細胞亞群之移植上的研究皆與來自固型器官(諸如，皮膚或內臟(例如，肝、肺、心))的細胞之移植只有少許關聯。更確切來說，當經由血管途徑移植來自固型器官的細胞時，會由於效能差的移植、差的細胞存活及形成威脅生命的血栓之傾向而有消除的效應。因此，大部分固型器官的疾病若嘗試另一種移植方法時，其必需能和目前它們可達成般一樣成功地治療。

[0003]因此，本發明係針對一種藉由植入協定，使用可獲得的多種策略移植來自固型器官之細胞的方法。

【發明內容】

發明概要

[0004] 在本發明的一個具體實例中，提供一種在具有生病或不正常狀態的內臟之患者中移植內臟組織的方法。該方法包括：(a)從一供體獲得該內臟之分離的細胞；(b)將該等細胞置於包含細胞外基質組分的生物材料中，且選擇性混合一培養基及/或發信分子(生長因子、細胞素、荷爾蒙)；及c)將該等細胞引進標的器官中，其中該細胞與生物材料之混合物適當地在內臟中或在其表面上或二者活體內凝膠或固化。該內臟可為肝、膽樹、胰、肺、腸、甲狀腺、前列腺、乳房、子宮或心臟。合適的發信分子係生長因子及細胞素，及可包括例如表皮生長因子(EGF)、肝細胞生長因子(HGF)、基質細胞衍生出的生長因子(SGF)、類視色素類(例如，維他命A)、纖維組織母細胞生長因子(FGF，例如，FGF2、FGF10)、血管內皮細胞生長因子(VEGF)、類胰島素生長因子I(IGF-I)、類胰島素生長因子II(IGF-II)、抑制瘤素M、白血病抑制因子(LIF)、運鐵蛋白、胰島素、葡萄糖皮質素類(例如，氫化可體松)、生長激素、任何腦下腺激素(例如，促濾泡素(FSH))、雌激素、雄性激素及甲狀腺激素(例如，T3或T4)。

[0005] 對生病或不正常器官的治療來說，細胞之供體可為除了接受者外的細胞(異體移植)，或亦可為具有生病或不正常狀態的內臟之對象(自體)，其限制條件為該正常細胞係從未生病或非不正常的內臟之部分獲得。對建立研究疾病

的模型系統來說，該供體細胞可具有疾病及被移植到在實驗宿主之正常組織上/中。

[0006]該細胞可包括幹細胞、成熟細胞、血管母細胞、內皮細胞、間質幹細胞(來自任何來源)、星狀細胞、纖維組織母細胞或這些之混合物。此外，該生物材料可包括膠原、黏附分子(基膜素、纖連蛋白(fibronectins)、巢蛋白(nidogen))、彈力蛋白、蛋白多醣、透明質酸(hyaluronans)(HAs)、葡萄糖胺聚合醣鏈、聚甲殼糖、藻酸鹽、及合成、可生物降解及可生物相容的聚合物。透明質酸係較佳的物質之一。

[0007]該內臟之經分離的細胞可在將該等細胞引進宿主前，於生物材料中體外固化；或再者，可以流體物質注射及允許活體內固化。在或靠近生病或不正常組織處引進該等細胞較佳，及其可經由注射、可生物降解物覆蓋或用海綿擦拭引進。

[0008]在本發明的另一個具體實例中，提供一種在內臟遭遇生病或不正常狀態之患者中修復內臟組織的方法。該方法包括(a)從一供體獲得該內臟之正常細胞；(b)結合該細胞與一或多種生物材料；(c)選擇性讓該細胞懸浮液與發信分子(生長因子、細胞素)、額外的細胞或其組合結合；及(d)將該混合物(b)引進患者中，其中該混合物變成不溶及在該內臟上或中活體內形成植入物。

[0009]在本發明的更另一個具體實例中，提供一種將內臟細胞定位到標的內臟之表面上、進入內部部分中或二者

的方法，該方法包括於有效量的交聯劑存在下，將一包含內臟細胞的製劑及一或多種水凝膠形成前驅物的溶液活體內引進到標的內臟之表面上、進入內部部分中或二者，其中該製劑在標的內臟之表面上、在內部部分中或二者形成一包含內臟細胞的水凝膠。該混合物可進一步包含培養基、細胞外基質分子及發信分子。已固化的混合物(諸如水凝膠)將植入物提供至標的內臟其表面上、內部部分中或二者。

[0010]該細胞可被定位至標的內臟中/上一段時期至少12小時、至少24小時、至少約48小時或至少約72小時，其中該內臟可為肝、胰、膽樹、肺、甲狀腺、腸、乳房、前列腺、子宮、骨頭或腎臟。在患者之治療中，該內臟的供體細胞應該不為生病的細胞(例如，腫瘤或癌細胞)。但是，當嘗試建立疾病的實驗模型系統時，該植入物可考慮生病的細胞。

[0011]可形成水凝膠或相似不溶的複合物之生物材料可包括葡萄糖胺聚糖、蛋白多醣、膠原、基膜素、巢蛋白、透明質酸、經硫醇改質的玻尿酸鈉、其變性形式(例如，明膠)、或其組合。固化反應之觸發可為引起該基質組分交聯或那些可凝膠的組分凝膠化之任何因子。該交聯劑可包括聚二丙烯酸乙二醇酯或其含二硫醚衍生物。較佳的是，該細胞與生物材料的不溶複合物所擁有之黏度範圍從約0.1至約100千巴斯卡，以約1至約10千巴斯卡為較佳，以約2至約4千巴斯卡為更佳；及最佳的挺度係約11至約3500巴斯

卡。

[0012]在本發明的又更另一個具體實例中，提供一種極冷保藏細胞的方法，其包括：(a)獲得經分離的細胞；(b)讓該細胞與凝膠形成生物材料、及選擇性一或多種等滲壓基礎媒質、發信分子(細胞素、生長因子、荷爾蒙)及細胞外基質組分(例如，透明質酸)結合；及冷凍該細胞混合物，以便其被貯存在-90℃或-180℃冷凍器中。該等滲壓媒質可為CS10(生物生活(biolife))或相等的等滲壓極冷保藏緩衝液。該發信分子可為。合適的發信分子有生長因子及細胞素，及包括例如表皮生長因子(EGF)、肝細胞生長因子(HGF)、基質細胞衍生出的生長因子(SGF)、類視色素類(例如，維他命A)、纖維組織母細胞生長因子(FGF，例如，FGF2、FGF10)、血管內皮細胞生長因子(VEGF)、類胰島素生長因子I(IGF-I)、類胰島素生長因子II(IGF-II)、抑制瘤素M、白血病抑制因子(LIF)、運鐵蛋白、胰島素、葡萄糖皮質素類(例如，氫化可體松)、生長激素、任何腦下腺激素(例如，促濾泡素(FSH))、雌激素、雄性激素及甲狀腺激素(例如，T3或T4)。該細胞外基質組分可為糖胺聚多糖、透明質酸、膠原、黏附分子(基膜素、纖連蛋白)、蛋白多醣、聚甲殼糖、藻酸鹽、及合成、可生物降解及可生物相容的聚合物、或其組合。

[0013]對該細胞與生物材料之混合物的極冷保藏來說，該混合物它們可進一步與下列結合：(i)選自於由下列所組成之群的冷凍保護劑：二甲亞砷(DMSO)、甘油、乙二

醇、ethylenediol、ethalenediol、1,2-丙二醇、2,3-丁二醇、甲醯胺、N-甲基甲醯胺、3-甲氧基-1,2-丙二醇，藉由它們本身及其組合；及/或(ii)選自於由下列所組成之群的添加劑：糖類(sugara)、甘胺酸、丙胺酸、聚乙烯吡咯啶酮、丙酮酸鹽、細胞凋亡抑制劑、鈣、乳糖酸鹽、蜜三糖、迪皮質醇、還原的鈉離子、膽鹼、抗氧化劑、荷爾蒙或其組合。該糖可為漏蘆糖、果糖、葡萄糖或其組合；及該抗氧化劑可為維他命E、維他命A、 α -胡蘿蔔素或其組合。

【圖式簡單說明】

[0014]圖1係根據本發明將細胞植入至多種標的組織的方法之圖式。這些方法包括可植入的植入物、可注射的植入物及可貼到標的器官表面上的植入物(“黏膠繃帶(bandaïd)植入物”)。

[0015]圖2提供以久保田(Kubota)媒質製備的透明質酸(KM-HAs)之流變測量。a)對所測試的每種調配物來說，當黏彈性阻尼 $|G''/G'|$ (在外部施力後，變形反應延遲的度量)在0.1赫茲-10赫茲強制頻率範圍內可忽略時，KM-HAs之剪切模數 $|G^*|$ (機械凝膠挺度的度量)保持固定；誤差槓：在每個測試頻率處的度量之95%信賴區間。b)遍及實驗0.6 1/秒-60 1/秒的剪切速率範圍[0.1赫茲-10赫茲強制頻率]，KM-HAs具有剪稀(即，黏度隨著強制頻率增加而減少)；上及下限：以乘冪律模型為基礎的95%信賴區間(科克斯-梅爾姿(Cox-Merz)規則假設，對全部調配物來說，在0.3 1/秒-30 1/秒的剪切速率範圍[0.05赫茲-5赫茲強制頻率]內，

R²>0.993)。僅有在表3中顯示出之標有字母的調配物上進行流變測量。

[0016]圖3顯示出人類肝幹細胞(hHpSCs)在KM-HAs中的大小、形態及增殖資料。hHpSCs的聚落獲得三維組態及在接種於KM-HAs中之後具有a)球形體似的團聚物(底部左)或折疊(中間、上部右)[影像框：900微米×1200微米]。在接種hHpSC的KM-HAs之組織學切片上的共焦顯微鏡顯露出，於培養1星期後，在實質細胞[細胞核呈藍色(來自DAPI對比染色)，EpCAM呈紅色(對b)及c)二者來說)，綠色(對b)CD44或c)CDH1來說)；b)及c)的影像框：150微米×150微米；在b)及c)中強調的白色：15微米×15微米]當中，混合的細胞形態表現型具有細胞尺寸b)約7微米，或c)最高10-15微米。d)hHpSCs在KM-HAs中的生存能力(藉由阿拉瑪藍(AlamarBlue)新陳代謝減少測量)，遍及1星期的培養，在含有1.6%CMHA-S及0.4%PEGDA的KM-HA水凝膠(調配物E，表3)中顯露出功能恢復及增殖；在24小時培養後之阿拉瑪藍減少測量已相對於在接種後2-3天的測量常態化；資料以平均±標準誤差報導。

[0017]圖4提供在接種於KM-HA的hHpSCs中之分化標記於1星期培養後的蛋白質表現性。對在hHpSCs中的分化標記來說，hHpSCs的聚落因為與KM-HAs性質相依之轉譯程度而具有差別的表現性程度。人類AFP之新陳代謝分泌速率遍及KM-HA調配物皆與mRNA表現程度相關聯。NCAM表現性在全部KM-HAs中皆為正，同時CD44表現性

在具有CMHA-S含量1.2%或較少的KM-HAs(標有字母的調配物A、B、C、D；表3)中最豐富。CDH1表現性對具有 $|G^*| < 200$ 巴斯卡的KM-HA水凝膠來說為正，及對 $|G^*| > 200$ 巴斯卡來說為負。人類AFP分泌速率的資料以平均 $\pm$ 標準誤差報導。在15-20微米切片(~ 2 至3 hHpSCs厚；hHpSC直徑：5-7微米)上進行EpCAM、NCAM、CD44及CDH1之免疫組織化學染色，及藉由螢光性顯微鏡造像[影像框：100微米 $\times$ 100微米]。KM-HA調配物以相關增加的挺度排序(對A來說， $|G^*| = 25$ 巴斯卡；對B來說， $|G^*| = 73$ 巴斯卡；對E來說， $|G^*| = 140$ 巴斯卡；對C來說， $|G^*| = 165$ 巴斯卡；對D來說， $|G^*| = 220$ 巴斯卡；及對F來說， $|G^*| = 520$ 巴斯卡)。

[0018]圖5提供在KM-HA生長的hHpSCs中之肝祖代標記在1星期培養後的基因表現程度(藉由qRT-PCR)。在hHpSCs與其直接後代hHBs的標記之mRNA表現程度(肝特定的AFP、EpCAM、NCAM、CD44及CDH1)間的比較顯示出，KM-HA生長的hHpSCs在消極培養1星期中，於轉錄程度上獲得早期hHB特徵。在hHpSCs及新鮮分離的hHBs中，對CD44之表現性範圍可比較；剩餘標記的表現程度統計上可區別，其在EpCAM上減少大約2倍，在hHpSCs分化成hHBs後的CDH1、NCAM壓制及AFP富含化上減少3倍。在全部KM-HAs中，接種的hHpSCs對AFP、NCAM及CDH1之平均表現程度朝向hHB範圍偏移至hHpSC範圍外，同時EpCAM表現性在1星期培養後遍及各處富含化。KM-HA調配物以相關增加的挺度排序(對A來說， $|G^*| = 25$ 巴斯卡；對

B來說， $|G^*|=73$ 巴斯卡；對E來說， $|G^*|=140$ 巴斯卡；對C來說， $|G^*|=165$ 巴斯卡；對D來說， $|G^*|=220$ 巴斯卡；及對F來說， $|G^*|=520$ 巴斯卡)。表現程度(平均 $\pm$ 標準誤差)係相關於GAPDH常態化。在標有字母的KM-HA調配物中之測量(表3)係比較hHpSC聚落(綠色)及新鮮分離的hHBs(紅色)之顯著性(學生T檢定)。

[0019]圖6為所揭示的極冷保藏及解凍方法之一個具體實例的圖式。

[0020]圖7顯示出來自由螢光素製造細胞(與透明質酸植入對以細胞懸浮液注射二者)所產生的螢光信號之活體內即時成像的結果。

[0021]圖8提供在健康及CC14肝損傷模型二者中，於移植後第7天處，在植入對細胞懸浮液中的血清人類白蛋白。

[0022]圖9顯示出肝幹細胞表現型標記的基因表現。表現程度已對GAPDH表現常態化，及倍數變化已對在聚落中的初始表現常態化。*代表在實驗條件與初始聚落表現間之顯著性 $p<0.05\%$ 。**代表在實驗條件與初始聚落表現間之顯著性和在二種實驗條件間之顯著表現性 $p<0.05\%$ 。

[0023]圖10提供來自肝功能之功能性試驗隨著時間的資料。每細胞在三維透明質酸培養中之A)白蛋白、B)運鐵蛋白及C)尿素隨著時間的程度已常態化。

[0024]圖11提供來自KM-HAs的機械特徵之資料。a)KM-HAs的挺度可控制及依CMHA-S及PEGDA含量而定。平均剪切模數 $|G^*|$ 隨著CMHA-S及PEGDA含量增加遵循

乘羣律行為而增加，從而在初始水凝膠混合期間提供KM-HAs之最後機械性質的直接控制；僅在顯示於表3中標有字母的調配物上進行流變測量。誤差槓：對在0.05赫茲-5赫茲強制頻率中的測量 ± 1 標準偏差。b)在KM-HAs中擴散。FRAP(70kDa經螢光黃標記的葡萄聚糖)在KM-HAs中的擴散性之測量與單獨久保田媒質沒有明顯不同；在顯示於表3的全部調配物上進行擴散性測量。誤差槓：測量的95%信賴區間。

[0025]圖12顯示出由接種至KM-HAs中的hHpSCs所分泌之人類AFP、白蛋白及尿素。hHpSCs在KM-HAs中的聚落於接種後第7天具有某些肝功能，其在培養媒質(KM)中實測到人類AFP及白蛋白之濃度增加及尿素合成保持平衡。接種後第7天，在KM-HA調配物當中之人類AFP、人類白蛋白及尿素的新陳代謝分泌速率明顯，且在含有1.6%CMHA-S及0.4%PEGDA的KM-HAs中(調配物E，表3)之AFP、白蛋白具有最小速率及尿素合成減少。左列：在對每種標有字母的調配物(表3)培養24小時後，於每日收集的培養媒質中之代謝物濃度。右列：在24小時培養後，於培養媒質中之每個hHpSC聚落的代謝物質分泌速率；在媒質中之總代謝物質已對在每個區間之功能性hHpSC聚落數常態化，如藉由生存能力試驗與阿拉瑪藍減少來計算(每個樣品接種的聚落大約數目：12)。全部資料皆以平均 $\pm$ 標準誤差報導。

[0026]圖13顯示出經控制的速率冷凍程式減少液體-冰

相熵防止內部冰損傷及允許可重覆的冷凍。A)曲線圖顯示出關於樣品溫度的艙溫(10%DMSO)。B)使用於克萊歐美(Cryomed)1010系統的冷凍程式速率。

[0027]圖14提供二者(A)經極冷保藏的胎兒肝細胞解凍後之細胞生存能力%;及(B)在每種條件下培養3週後的聚落計數,已對新鮮樣品常態化。結果以平均 $\pm$ 平均的標準誤差報導。KM=含有10%DMSO及10%FBS的久保田媒質。CS10=克萊歐斯特(Cryostor), CS10+sup=含有KM補充品的克萊歐斯特10。0.05%及0.10%指為在每個樣品中所補充的HA%。

[0028]圖15顯示出已對GAPDH表現性常態化的相對mRNA表現性。平均 $\pm$ 平均的標準誤差。對新鮮樣品來說,顯著性 $*p>0.05$ 。KM=含有10%DMSO及10%FBS的久保田媒質。CS10=克萊歐斯特, CS10+sup=含有KM補充品的克萊歐斯特10。0.05%及0.10%指為在每個樣品中所補充的HA%。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

[0029]目前,典型經由血管途徑進行包含源自於固型器官的細胞之細胞移植,結果例行性提供壓倒性效能差的移植證據,對成熟細胞來說典型在級數約20-30%,及對幹細胞來說少於5%。差異的移植係由於其尺寸,其在肝中對幹細胞來說係小(典型在10微米下)及對成熟細胞來說較大(典型 >18 微米)。我們的研究已證實此觀察。例如,在一個研究中,將人類肝幹細胞(hHpSCs)及肝母細胞

(hepatoblasts)(hHBs)注射進入免疫功能不足的老鼠中(藉由將細胞注射進入脾中)。因為脾直接與肝連接，細胞會流入它們預計移植的肝中。但是，大部分細胞在移植或種入除了想要的標的外之組織(異位位置)前死亡。

[0030]甚至當細胞確實合適地到達其目的地時，該等細胞轉換成完全功能性細胞係受血管形成缺乏、生長缺乏(當移植成熟細胞時)、及細胞的高產生免疫性質(若使用成熟細胞時)及需要長時間免疫抑制所阻礙。其它困難包括臨床等級來源、高品質細胞及由於極冷保藏困難而需要使用新鮮分離的細胞。

[0031]除了所提到的無效率及困難外，經由血管途徑移植來自固型器官的細胞危險。來自固型器官的細胞具有使得細胞彼此快速結合及提高團聚之表面分子(細胞黏附分子，緊密連接蛋白質)。此聚集現象可造成威脅生命的肺血栓。

[0032]為了解決這些困難及掛念的某些，本發明係有關植入技術，其包括將經移植的細胞以團聚物傳遞至可被定位至生病組織的台架上或中，以促進所需要的增殖及移植。因此，本發明不僅考慮到欲移植的細胞型式，而且亦考慮到該細胞型式與適當生物材料之組合及用於最有效率及成功的移植治療之植入方法。本發明的植入技術可在患者中轉移成治療用途，及提供另一種再生藥治療以重建生病或不正常組織。

細胞來源

[0033]根據本發明，想要的細胞種群可直接從具有“正常”、“健康”的組織及/或細胞(其意謂著不受疾病或功能障礙折磨的任何組織及/或細胞)之供體獲得。當然，此細胞種群可從遭受疾病或功能障礙的器官之人士獲得，然而其來自不在此症狀下的器官部分。該細胞可從任何適當的哺乳動物(不管年齡)組織獲得，包括胎兒、新生兒、兒童及成年人組織。若欲建立疾病狀態的實驗模型時，則可在欲移植進適當的實驗宿主之植入物中使用生病細胞。

[0034]更特別的是，細胞可因不同治療根據治療需求從“譜系分期(lineage-staged)”的種群獲得。例如，在對快速取得僅由晚期譜系細胞提供的功能有需求之情況中，或若接受者具有優先感染幹細胞及/或祖細胞的譜系依賴性病毒(諸如，隨著肝炎C或乳突狀瘤病毒發生)時，較晚期的“成熟”細胞可較佳。在任何事件中，可使用“祖代”細胞來建立其各別組織的任何譜系期。

[0035]對譜系分期的肝細胞種群及其分離方法之討論，參見美國專利申請案案號11/560,049及12/213100，此二揭示其整體以參考方式併入本文。簡單來說，肝內有至少八個成熟化譜系期。下列提供那些期及關於其的簡短說明：

[0036]譜系期1：人類肝幹細胞(hHpSCs)係有多種能力的細胞，其位於胎兒及新生兒肝的導管板內及在兒童與成年人肝的赫林(Hering)管中。這些細胞的直徑範圍通常從7-10微米及具有高核對細胞質比率。它們能忍受缺血，可

在心縮性死亡(systolic death)後多於48小時在屍體肝中發現，及形成能分化成成熟細胞的hHpSCs聚落。這些細胞構成全部年齡供者的肝之實質的大約0.5-2%。

[0037]譜系期2：肝母細胞(hHBs)係hHpSCs的直接後代及係肝很可能的過渡增殖細胞(transit amplifying cells)。它們僅位於適合的幹細胞棲所(niche)外部。這些細胞較大(10-12微米)而含有較高量的細胞質，及活體內可遍及胎兒及新生兒肝的實質及在接近兒童及成年人肝的赫林管末端或與其毗連處發現。隨著年齡增加，肝母細胞數量遞減至在產後肝中的實質細胞之<0.01%。在再生過程(特別是與某些疾病(諸如硬化)相關的那些)期間，此細胞種群已經顯示出擴展開。肝母細胞會成熟成肝細胞(H)或膽管細胞(cholangiocytes)(亦稱為膽管上皮細胞(B))。

[0038]譜系期3H及3B：定向(committed)(單潛能)的肝細胞(3H)及膽管細胞祖細胞(progenitors)-膽祖細胞(3B)係在肝內發現。這些單潛能前身僅引起一種成年細胞型式，及不再表現出幹細胞基因的某些(例如，CD133/1、刺蝟蛋白質(Hedgehog proteins)(索尼克(Sonic)/印度(Indian))的表現性程度低或無)，但是表現出典型在胎兒組織中的細胞之基因。

[0039]譜系期4H及4B：門靜脈周的(periportal)成年實質細胞包含相當小的肝細胞(4H)及肝內膽管上皮細胞(4B)。該肝細胞係二倍體，直徑大約18微米及表現出與糖質新生相關的多重因子/酵素(諸如PEPCK、連接蛋白(connexins)26及

32)。

[0040]此期的膽管細胞(4B)係二倍體，直徑大約6-7微米，勾勒出郝林管的一部分輪廓，及表現出多種基因(包括水通道蛋白1及4、MDR1、分泌激素受體)，但非 CL^-/HCO_3^- 交換劑或體抑素受體。

[0041]譜系期5H及5B：此期之細胞包含相對較大的肝細胞(5H)及膽管細胞(5B)，二者皆二倍體。該肝細胞的尺寸之直徑大約22-25微米，及它們係在中腺泡(midacinar)區域中發現。該中腺泡肝細胞表現出高程度的白蛋白及酪胺酸胺基轉移酶(TAT)；特別是，特徵為它們以蛋白質表現出運鐵蛋白(相較之下，譜系期1-4僅以mRNA表現出其)。

[0042]譜系期5B膽管細胞之直徑大約14微米，位於小葉內導管中及表現出CFTR、分泌激素受體、體抑素受體、MDR1及MDR3、及 CL^-/HCO_3^- 交換器。

[0043]譜系期6H：第6期之二倍體中心周圍肝細胞可在培養中形成聚落，但是具有有限的擴展能力及基本上沒有被次培養的能力。這些的百分比隨著年齡增加而遞減(與四倍體中心周圍細胞的百分比增加相比)。除了白蛋白、TAT及運鐵蛋白外，它們亦強烈地表現出一些P450s(諸如P450-3A)、麩醯胺酸合成酶(GT)、肝磷脂蛋白多醣及與尿素形成相關的基因。

[0044]譜系期7H：此期包含四倍體中心周圍實質細胞，其不再能夠進行完全細胞分裂。它們可進行DNA合成，但是具有有限的胞質分裂能力。它們係更大的細胞(直徑

>30微米)及表現出高基因程度(其在譜系期5-6中變明顯)。

[0045]譜系期8：凋亡細胞：表現出多種凋亡標記及闡明DNA碎片。

[0046]除了本身需要提供生病或不正常內臟“功能”之細胞外，該植入物較佳包括額外的細胞組分，其模擬包含上皮-間質細胞關係(全部組織的細胞基礎)之細胞類型較佳。上皮-間質細胞關係在每個成熟化譜系期有區別。上皮幹細胞係與間質幹細胞搭伴，及其成熟係彼此協調，如它們在組織內成熟成全部多種成年細胞型式。在二種間之交互作用係由旁分泌信號(其包括可溶的信號(例如，生長因子)及細胞外基質組分)調和。

[0047]在肝中，例如，肝幹細胞(HpSCs)產生肝細胞及膽管細胞。HpSCs的間質伙伴係血管母細胞。有證據指出血管母細胞產生內皮細胞前身及肝星狀細胞前身(肝內譜系期2實質(肝母細胞(HBs))的間質細胞伙伴)二者。該內皮細胞前身在隨後的譜系期中成熟成內皮(其變成肝細胞的譜系期之間質伙伴)。星狀細胞前身細胞產生星狀細胞，然後基質細胞，然後肌纖維母細胞(膽管細胞的間質細胞伙伴)。

[0048]肝之形成(稱為肝細胞生成(hepatogenesis))係透過來自血管母細胞在與心臟相關的胚胎間質中的信號調節。在肝成長的初始階段期間，從心前(pre-cardiac)中胚層分泌出纖維母細胞生長因子(FGFs)，同時從該間質輸送出骨成形蛋白質(BMPs)。這些近來具體指為肝細胞，然後打

破及漂移進入該周圍間質中及與前身交互作用成內皮及基質二者。該間質細胞遍及成長各處皆保持與肝細胞接觸。

[0049]人類肝幹細胞(hHpSCs)為了存活需要與間質細胞接觸。它們將自身複製，也就是說，當在血管母細胞的供給器上時保持如為hHpSCs。若在肝星狀細胞的供給器上培養時，它們譜系限制為肝母細胞。若在成熟內皮上培養時，它們成熟成成年肝細胞；及若在成熟基質(例如，成熟星狀細胞或肌纖維母細胞)上時，則成為膽管細胞。幹細胞的命運由供給器控制已經顯示出係由於在譜系中於每個上皮-間質關係中所產生之旁分泌信號的精確組合。

[0050]根據本發明的一個具體實例，該經分離的細胞種群與已知的旁分泌信號(在下列討論)及“天然”上皮-間質伙伴(如需要)結合，以最佳化該植入物。因此，該植入物將包含上皮幹細胞、肝幹細胞，一起與其天然的間質伙伴(血管母細胞)混合。對過渡增殖細胞棲所植入物來說，肝母細胞可與肝星狀細胞及內皮細胞前身搭伴。在某些植入物中，可製得二組之混合：肝幹細胞、肝母細胞、血管母細胞、內皮細胞前身、肝星狀細胞前身細胞，以在宿主組織中最佳化肝細胞之建立。接種該細胞的植入物之微環境將包含旁分泌信號、基質及可溶的信號(其皆在使用於該植入物的相關譜系期處產生)。

[0051]亦可修改植入物來操縱疾病狀態。例如，為了減少譜系依賴性病毒(例如，某些肝炎病毒，其感染早期譜系期然後與宿主細胞同等地成熟)的影響，可製備晚後譜系期

(例如，肝細胞及其天生伙伴(竇內皮細胞)，其不許可病毒感染)的植入物。亦可使用植入物，藉由在植入物中使用生病的細胞，在實驗動物模型中將其移植到標的器官上來建立疾病模型。

[0052]幹細胞植入物(使用肝細胞治療作為模型)的實施例將包含肝幹細胞、血管母細胞及肝星狀細胞前身。比較上，“成熟”肝細胞之植入物將包含肝細胞、成熟內皮細胞及外皮細胞(其係成熟星狀細胞)。對肝的上皮-間質細胞關係之討論，參見美國專利申請案案號11/753,326，其揭示全文以參考方式併入本文。

[0053]血管形成的問題對全部植入物皆重要，因此應該在對血管形成有益的場所(例如，肝)中植入。對大部分疾病症狀來說，幹細胞植入物較佳，其提供其擴展潛力、其成熟成全部成年細胞型式的能力、其對缺血的容忍度、其來源能夠來自屍體組織及其最小(若有的話)致免疫性。

植入物質

[0054]使用根據本發明之凝膠形成生物材料提供用於細胞支撐、協助植入及再生過程成功的信號之台架。當在有機體中的固型器官之組織進行固定的重修復時，游離的細胞趨向於在適當的環境條件下再形成其天然結構。該細胞可與一或多種培養基(例如，RPM 1640)、發信分子(例如，胰島素、運鐵蛋白、VEGF)及一或多種細胞外基質組分(例如，透明質酸、膠原、巢蛋白、蛋白多醣)結合。

[0055]在全部組織中，該旁分泌發信包含可溶(無數生

長因子及荷爾蒙)及不溶(細胞外基質(ECM)信號)二者。在可溶與(不溶的)基質因子間之協同效應可由移植的細胞來支配生長及分化反應。基質組分係附著、存活、細胞形狀(和細胞台架的組織)、及需要的細胞表面受體(其讓該細胞接觸抗原以對特定的細胞外信號反應)之穩定性的主要決定因素。

[0056]已知ECM調節細胞形態、生長及細胞基因表現。可藉由使用已純化的ECM組分體外達成類似於活體內之組織特定的化學。這些之許多可商業購得及對模仿活體內的細胞行為有益。

[0057]合適的基質組分包括膠原、黏附分子(例如，細胞黏附分子(CAMs)、緊密接合劑(鈣黏素)、基礎黏附分子(基膜素、纖連蛋白)、間隙接合蛋白質(連接蛋白))、彈力蛋白及硫酸化的碳水化合物(其形成蛋白多醣(PGs)及葡萄糖胺聚糖(GAGs))。這些類型每種定義出一類的分子。例如，存在有至少25種膠原質型式，每種由可區別的基因譯出且具有獨特的調節及功能。額外的生物材料包括無機、天然物質(如聚甲殼糖及藻酸鹽)和許多合成、可生物降解及可生物相容的聚合物。這些物質經常透過一些方法“固化”(例如，製成凝膠或不溶的物質)，包括熱凝膠化、光交聯、或化學交聯、或曝露至引起該等物質不溶的微環境(例如，高鹽)。但是，每種方法皆需要對細胞損傷負責(例如，來自過度的溫度範圍、UV曝光)。對生物材料的更詳細討論(特別是使用透明質酸水凝膠)，參見美國專利申請案案號

12/073,420，此揭示其全文以參考方式併入本文。

[0058]此基質組分的特別選擇可由活體內梯度(例如，從在與幹細胞腔隙結合中所發現的組分過渡至在與晚期譜系期細胞結合中所發現者)指導。該植入物生物材料模仿該植入物想要的特別譜系期之基質化學較佳。所選擇的基質組分之混合物的效力可使用經純化的基質組分及可溶的信號(其許多可根據優良藥品製造規範(GMP)協定從商業購得)在體外研究中分析。對成功移植來說，對該植入物所選擇的生物材料引起該細胞所需要的適當生長及分化反應較佳。

[0059]關於肝器官，與肝實質細胞相關且在幹細胞及過渡增殖細胞棲所外的基質化學存在於狄氏腔(Space of Disse)中，該區域位於實質與內皮或間質細胞的其它形式間。除了在肝之不同區域中的細胞成熟度變化外，亦觀察在基質化學中的變化。門靜脈周地在區域1中的基質化學類似於在胎兒肝中所發現者，及由型式III及型式IV膠原、透明質酸(HA)、基膜素及硫酸軟骨素蛋白多醣之形式組成。此區域轉變成在中心周圍區域3中的不同基質化學，其包含型式I膠原質、纖維結合素、及肝磷脂、及硫酸乙醯肝素(heparan sulfate)蛋白多醣的獨特形式。

[0060]肝的幹細胞棲所已經部分地被標出特徵，且已發現包含透明質酸、黏合至 $\alpha 6$ - $\beta 4$ 整合素(integrin)的板素形式(例如，板素5)、型式III膠原質及最低限度硫酸化的硫酸軟骨素蛋白多醣(CS-PGs)之獨特形式。在此棲所中有有限量

的型式IV膠原質及無型式I膠原質。

[0061]此棲所基質化學轉變成與過渡增殖細胞腔隙相關，及包含型式IV膠原質、黏合至其它整合素($\alpha\beta 1$)的板素形式、及GAGs及PGs形式(其包括具有較高硫酸化的CS-PGs形式、硫酸皮膚素(dermatan sulfate)-PGs、及特定的硫酸乙酰肝素-PGs(HS-PGs)形式)。

[0062]該過渡增殖細胞腔隙轉變成更晚後的譜系期，且隨著每個相繼的期，該基質化學變成更穩定(例如，更高穩定的膠原)，較少更新，及包含GAGs及PGs的更高硫酸化形式。大部分成熟細胞與肝磷脂-PGs(HP-PGs)形式相關，其意謂著無數蛋白質(例如，生長因子及荷爾蒙、凝固蛋白質、多種酵素)可黏合至基質，及於此經由黏合至在GAGs中之分立及特定的硫酸化形態而保持穩定。因此，該基質化學從其在幹細胞棲所中的開始點(其具有與高更新及最小硫酸化相關(因此信號以靠近至細胞的穩定方式黏合最小)之不穩定基質化學)，轉變成穩定、具有增加的硫酸化量(因此愈來愈高的信號黏合程度及保持靠近至細胞)之基質化學。

[0063]因此，本發明考慮到基質分子的化學隨著成熟化階段、隨著宿主年齡及隨著疾病狀態改變。與適當物質植入應該最佳化移植的細胞在組織中之移植、防止細胞擴散至異位位置、減少栓塞形成問題、及提高該細胞在組織內儘可能快速地整合的能力。再者，亦可選擇在該植入物中的因子，以減少致免疫性問題。

[0064]在人類肝的情況中，細胞可在無血清狀態下培養。人類肝幹細胞或肝母細胞(hHpSC或hHB)可以它們本身植入，或與血管母細胞/內皮細胞前身及星狀細胞前身細胞組合植入。可將細胞懸浮在包含媒質之經硫醇化及化學改質的HA(CMHA-S，或葛萊可西爾(Glycosil)，UT鹽湖市(Salt Lake City)的葛萊可山生物系統(Glycosan Biosystems)) (HA-M)及在KM(久保田媒質)中，及負載至成對注射器組的注射器之一中。其它注射器可負載交聯劑(例如，聚二丙烯酸(乙二醇)酯或PEGDA)，其在KM中製備(或使用引起生物材料的不溶性所需要之條件)。二個注射器藉由向外展開進入二個魯爾(Luer)鎖接頭中的針耦合。因此，在水凝膠及交聯劑中的細胞可經由一根針噴出，以允許CMHA-S在注射後快速交聯成凝膠(或藉由另一種方法改變生物材料的不溶性)。

[0065]在CMHA-S及交聯劑中的細胞懸浮液可直接注射或植入至肝，使用該繫膜組織以形成袋。再者，該等細胞可裝入葛萊可西爾中沒有使用PEGDA交聯劑，藉由允許該懸浮液在空氣中靜置過夜導致二硫醚鍵交聯成軟的、黏的水凝膠。此外，可加入其它經硫醇改質的大單體(例如，明膠-DTPH、肝磷脂-DTPH、硫酸軟骨素-DTPH)來提供模仿活體內特別棲所的基質化學之共價網狀物。在另一個表示中，可在將PEGDA加入至葛萊可西爾前將包含半胱胺酸或硫醇殘基的多胜肽耦合至PEGDA，允許特定的多胜肽信號併入該水凝膠中。再者，可在交聯前將任何多胜肽、生

- 長因子或基質組分(諸如膠原質之異構型、板素、玻璃體結合蛋白(vitronectin)、纖維結合素等等)加入至葛萊可西爾及細胞溶液，允許在水凝膠中惰性捕獲重要的多肽組分。

[0066] 透明質酸：透明質酸(HAs)係碳水化合物的6大葡萄糖胺聚合醣(GAG)家族之一的成員，其全部係糖醛酸及胺基糖[1-3]的聚合物。其它家族包括硫酸軟骨素類(CS，[葡萄糖醛酸-半乳糖胺]_x)、硫酸皮膚素類(DS，更高硫酸化的[葡萄糖醛酸-半乳糖胺]_x)、硫酸乙醯肝素類(HS，[葡萄糖醛酸-葡萄糖胺]_x)、肝素類(HP，更高硫酸化的[葡萄糖醛酸-葡萄糖胺]_x)及硫酸角質素(keratan sulfate)類(KS，[半乳糖-N-乙醯葡萄糖胺]_x)。

[0067] HAs係由一藉由β1-4、β1-3鍵連結的葡萄糖胺及葡萄糖醛酸之雙醣單元組成。該聚合的聚糖係生物學地由數百至多如20,000或更多個雙醣單元之線性重覆單元組成。該HAs具有分子量範圍典型從在血清中的100,000Da至多如在滑液中的2,000,000，至多如在臍帶及玻璃體中的8,000,000。因為其高負電荷密度，HA吸引正離子(在水中獲取)。此水合允許HA支撐非常壓縮的負載。HAs係位於全部組織及體液中，且在軟的結締組織中最豐富，及天然水攜帶能力適合推測至其它角色(包括影響組織形成及功能)。其在細胞外基質中、在細胞表面上及在細胞內發現。

[0068] HA化學的天然形式多樣化。最常見的變數係鏈長。某些係高分子量，此由於具有長的碳水化合物鏈(例如，在鵝雞類鳥的雞冠中及在臍帶中的那些)；及其它為低

分子量，此由於具有短鏈(例如，來自細菌的培養物)。HAs的鏈長度在所引起之生物功能中扮演關鍵角色。低分子量HA(低於 3.5×10^4 kDa)可引起與基質更新相關及顯示出與在組織中的發炎相關之細胞素活性。高分子量(大於 2×10^5 kDa)可抑制細胞增殖。小的HA碎片(在1-4kDa間)已經顯示出增加血管生成。

[0069]HA的天然形式已經改質，以引進想要的性質(例如，HAs之改質具有硫醇基團，允許硫醇使用於其它基質組分或荷爾蒙的黏合或用於交聯的新穎形式)。同樣地，有本質發生交聯的形式(例如，藉由氧調節)；及更其它已經藉由以某些試劑(例如，烷基化試劑)處理天然及經改質的HAs而人工引進者；或如上述提到，建立經改質的HAs使得其許可以獨特的形式交聯(例如，在經硫醇改質的HAs中形成二硫醚橋)。

[0070]根據本發明，經硫醇改質的HAs及使用於其的就地聚合技術較佳。這些技術包括經硫醇化羧甲基化的HA(已知為CMHA-S或葛萊可西爾)之二硫醚交聯。對活體內研究來說，可使用具有較低分子量(例如，70-250 kDa)的HA，因為該交聯(二硫醚或PEGDA)產生非常高分子尺寸的水凝膠。硫醇反應性連結劑(聚二丙烯酸乙二醇酯(PEGDA)交聯劑)合適於細胞膠囊及活體內注射二者。此結合的葛萊可西爾-PEGDA物質透過共價反應及在幾分鐘內交聯，其具生物相容性及允許細胞生長及增殖。

[0071]該水凝膠物質(葛萊可西爾)考慮到對幹細胞活

體內組織工程有益之凝膠性質。葛萊可西爾為可從UT鹽湖市的葛萊可山生物科學購得之半合成細胞外基質(sECM)技術的部分。在艾曲西爾(Extracel)及亥斯頓(HyStem)商標線中的多種產物可商業購得。這些物質具可生物相容性、可生物降解性及無致免疫性。

[0072]再者，葛萊可西爾及艾曲林克(Extralink)可容易地與其它ECM物質結合用於組織工程應用。HA可從許多商業來源獲得，且較佳物為使用鏈絲菌(*Streptomyces*)株的細菌發酵(例如，健臻(Genzyme)、來福可(LifeCore)、諾伐美曲(NovaMatrix)及其它)，或在ISO 9001：2000方法(諾維信(Novozymes)獨有)中使用枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)作為宿主的細菌發酵方法。

[0073]細胞種群的理想比率應該複製活體內及在組織之細胞懸浮液中所發現的那些。細胞的混合物允許祖代細胞成熟及/或維持成年細胞型式伴隨著所需要的血管形成發展。在此方法中，對包含多重基質組分及可溶的發信因子之複合物達成一使用透明質酸作為基礎的合成微環境，及該微環境經設計以模仿包含由上皮細胞及間質細胞在特定成熟化譜系期所產生之特定旁分泌信號組的特定微環境棲所。下列係實施例：

• 表1：祖細胞的典型棲所植入物

	幹細胞棲所植入物	過渡增殖細胞棲所植入物
細胞組分	hHpSCs，血管母細胞	肝母細胞、肝星狀細胞前身、內皮細胞前身(或間質幹細胞)
基礎媒質	久保田媒質(對內胚層祖細胞最理想)或經修改用於特定的幹細胞種類之媒質	久保田媒質或對特定內胚層祖細胞最理想之媒質，其經修改用於過渡增殖細胞
額外可溶的因子 [經修改用於肝]	LIF，VEGF	EGF，HGF，VEGF
基礎台架	HA 或經化學改質的HA作為sECM	HA或經化學改質的HA作為sECM
其它基質組分	型式III膠原質，板素的胚胎形式(例如，板素5，其與 $\alpha6/\beta4$ 整合素結合)；硫酸軟骨素-PG(在棲所中所發現的新穎形式)	型式IV膠原質，一定數量之任何基膜素、CS-PGs、HS-PGs形式

表2：成熟實質細胞的典型棲所植入物

	譜系期4肝細胞	譜系期5，肝內的膽管細胞
細胞組分	門靜脈周的肝細胞(直徑~18微米)；門靜脈周的內皮細胞	肝內的膽管細胞(直徑~15微米)；基質細胞
基礎媒質	久保田媒質(或經修改用於成年肝細胞的媒質)：加入銅(10E-10M)，鈣(0.6 mM)，EGF(10奈克/毫升)	久保田媒質(或經修改用於成年膽管細胞的媒質)：加入銅(10E-10M)，鈣(0.6 mM)，EGF(10奈克/毫升)
額外可溶的因子 [經修改用於肝]	VEGF(10奈克/毫升)，EGF(10奈克/毫升)，T3(10E-9M)，葡萄糖皮質素類(10E-8M)	PDGF(10 奈 克 / 毫 升)，EGF(10奈克/毫升)，HGF(10奈克/毫升)，T3(10E-9M)，葡萄糖皮質素類(10E-8M)
基礎台架	HA 或經化學改質的HA作為ECM	HA或經化學改質的HA作為ECM
其它基質組分	型式III膠原質，板素的胚胎形式(例如，板素5，其與 $\alpha6/\beta4$ 整合素結合)；硫酸軟骨素-PG(在棲所中發現的新穎形式)	型式IV膠原質，任何數目與 $\alpha/\beta1$ 、CS-PGs、HS-PGs結合的板素形式

[0074] 幹細胞棲所在肝中的微環境由在肝幹細胞與血管母細胞間之旁分泌信號組成。其包含透明質酸、型式III膠原質、特定的板素形式(例如，板素5)、獨特的硫酸軟骨素蛋白糖(CS-PG)形式(其幾乎無硫酸化及具有接近或精確地為“久保田媒質”(一種用於肝祖細胞成長的媒質)之可溶

的信號/媒質組成物)。無嚴格需要其它因子，然而可藉由以幹細胞因子、白血病抑制因子(LIF)及/或某些白細胞介素(例如，IL 6、IL 11及TGF- β 1)補充而觀察到效應。CS-PG的幹細胞棲所形式尚未獲得。

[0075] 過渡增殖細胞在肝中的微環境形態學上係在肝母細胞與肝星狀細胞間。此微環境的組分包括透明質酸、型式IV膠原質、結合至 β 1整合素的基膜素之特定形式、更硫酸化的CS-PGs、硫酸乙醯肝素-蛋白多醣(HS-PGs)形式、及可溶的信號(其包括進一步以表皮生長因子(EGF)、肝細胞生長因子(HGF)、基質細胞衍生出的生長因子(SGF)、及類視色素類(例如，維他命A)補充的久保田媒質)。

植入方法

[0076] 可依組織型式來選擇適當的植入方法。對植入物將置換生病或遺漏的組織(例如，骨頭)之組織來說，可植入的植入物合適。然後，可依所選擇的方法來選擇適當的生物材料來襯托該方法。將需要不同方法。例如，在骨頭實施例中，固態基質允許細胞與需要的生長因子接種進該基質中，培養，然後植入患者中。圖1。

[0077] 可注射的植入物具有它們可填充任何短絀形狀或空間(例如，損傷的器官或組織)之優點。根據此方法，細胞經共培養及注射在置於可凝膠的生物材料(其使用多種交聯方法就地固化)中之細胞懸浮液中。該混合物可直接注射進宿主組織或器官(例如，肝)中；注射在器官被膜、包住器官或組織的任何薄膜下；注射進藉由將該繫膜之部分折

疊到其自身上及黏著其以形成袋所形成的袋中；或藉由使用外科用膠將另一種物質(例如，蜘蛛絲)固定至器官表面形成一袋，及將該混合物注射進入其中。

[0078]直接注射可由在多重位置處注射在肝的葛立森(Glisson)被膜下及進入實質中組成，但是儘可能小地避免來自水凝膠的靜水壓力(其可造成肝組織損傷)。使用如於此上述所描述的雙筒注射器完成將肝幹細胞棲所植入物注射進入肝中。簡單地說，將細胞-基質-媒質混合物負載進注射器的一邊中，且將針連接至包含交聯劑PEGDA的其它注射器。混合物可透過25標準規格針直接注射進入肝中及立即交聯以形成水凝膠。使用在pH 7.4處的CMHA-S與PEGDA允許細胞膠囊和活體內注射，因為依交聯劑濃度而定，該交聯反應在數分鐘或最高10-20分鐘時間範圍內發生。

[0079]無機、天然物質(如聚甲殼糖、藻酸鹽、透明質酸、纖維蛋白、明膠和許多合成的聚合物)可足夠作為用於注射之生物材料。這些物質經常透過包括熱凝膠化、光交聯或化學交聯之方法固化。該細胞懸浮液亦可以可溶的信號或特定的基質組分補充。因為這些植入物可相當容易地注射進入目標區域中，對侵入性手術無(或最小)需求，此減低成本、患者不適、感染危險及疤形成。CMHA亦由於其長持續效應同時維持生物相容性而可使用於可注射物質而用於組織工程。交聯方法亦維持該物質的生物相容性，及其存在於再生或幹/祖代棲所的廣大區域中，使得其為一種有吸引力的可注射物質。

[0080]在某些具體實例中，在該植入物將以生物相容及可生物降解的覆蓋物(“黏膠繃帶”)固定之情況中，可將植入物設計成放置到器官或組織之表面上。對某些腹部器官來說，此覆蓋物可來自自體組織。例如，可藉由使用宿主繫膜形成注射袋來完成將肝細胞(例如，肝祖細胞)植入到肝之表面上。該繫膜係從其在腹腔內的場所移出及使用外科用膠(例如，纖維蛋白膠、得美棒(dermabond))黏著到肝上以形成用於該移植物質的袋。可再次使用雙筒注射器將該基質物質注射在肝的外部上之袋內。

[0081]同樣地，可在繫膜袋(與標的組織各自獨立)中形成植入物。例如，取代將移植物植入到標的組織中或上，可對異位位置使用該植入方法。該植入物可在繫膜袋中建立，此袋將由纖維蛋白膠(或同等物)形成。當宿主肝確實地結疤或具有某些其它參數(其將阻礙植入物成功進入組織其自身中)時，此方法可特別合適於肝植入物。另一個實施例為內分泌細胞(例如，胰島)，其具有能夠進入血管供應的主要需求。內分泌細胞(諸如，胰島)的植入物可被製成繫膜袋。

[0082]本發明家已學習到KM-HA水凝膠的挺度、黏彈性性質及黏度可依CMHA-S及PEGDA含量而定。例如，KM-HA水凝膠遍及寬廣的強制頻率範圍維持固定的挺度，同時具有完美的彈性行為(圖2a)及剪稀，其中其黏度隨著強制頻率增加而減少(圖2b)。這些KM-HA水凝膠可隨著不同的PEGDA及CMHA-S濃度(當在經緩衝的蒸餾水中混合時)產生範圍從11至3500巴斯卡之剪切模量，但是這些值

可藉由使用多種基礎媒質(如久保田媒質)調節(圖2及11)。

[0083]接種欲移植的細胞之ECM的機械性質可在發信、運輸上，及在細胞對機械力量的反應(使用共同已知為力學傳導(mechanotransduction)的機制)之能力上具有深遠的效應。例如，人類肝祖細胞(諸如，肝幹細胞)當接種在機械上堅硬的植入物(諸如，在具有降伏剪切模量(yield shear moduli)範圍從11至3500巴斯卡與不同PEGDA及CMHA-S濃度的硬HA水凝膠(當在經緩衝的蒸餾水中混合時)內)中時，其可分化(圖2)。

[0084]根據讓其當宿主的KM-HA水凝膠之組成物，肝幹細胞聚落具有明顯的新陳代謝活性。對遍及培養的肝功能指示劑(AFP、白蛋白及尿素)來說，可貫穿KM-HA調配物比較絕對分泌；但是，與新陳代謝效率結合之絕對分泌則描出與HA含量相依的選擇方法(圖12)。在此方法中，對具有CMHA-S含量低於1.2%的KM-HA水凝膠來說，分泌速率在新陳代謝脅迫下增加；比較上，在具有更多CMHA-S(1.6%)及較高的新陳代謝功能或甚至增加的生存能力之KM-HA水凝膠中(如在調配物E中般)，分泌速率比較差(圖3d)。因為hHpSCs及hHBs具有不同的新陳代謝能力，可對肝祖細胞之擴展或分化選擇KM-HA水凝膠。

[0085]分化標記在肝祖細胞中的表現性分析證實在KM-HA水凝膠內發生分化，如由EpCAM的整體基因表現增加超過對在塑膠板上的hHpSC聚落所建立之程度(圖5)，和異質性NCAM表現性遍及聚落朝向外界限及在外部細胞的

- 頂面(apical surface)上(圖4)明瞭。已發現CD44以mRNA表現程度表現在hHpSCs及hHBs二者上(圖5)。不像NCAM，在1.2%或較少CMHA-S含量的KM-HA水凝膠中觀察到較大的CD44表現性(圖4)。

[0086] mRNA表現程度依KM-HA水凝膠的挺度而定(圖5)，此在挺度上的依賴性定義出二種工作狀態(一種在低植入剛性處，其中基因表現隨著挺度增加而減少，及其之一為在具有 $|G^*| > 200$ 巴斯卡的高植入剛性處，其基因表現恢復)。該效應對E-鈣黏附素(cadherin)甚至更激烈：經過 $|G^*| = 200$ 巴斯卡附近的分叉缺乏蛋白質表現性，雖然強的mRNA表現程度與較軟的水凝膠那些相配，其中有E-鈣黏附素的蛋白質表現性。(圖4)。因此，已認為直接曝露至外部機械力量的細胞能夠在聚落的外部表面處將信號連通至毗連細胞。

[0087] 在此方法中，藉由顯示出E-鈣黏附素表現性的轉變控制與環境挺度相依，在hHpSCs中的發信機制可與其共同適應於其基材的挺度之能力連結。因此，在hHpSCs中的基因-至-蛋白質轉換方法接受挺度依賴性分叉準則。

[0088] 在KM-HA水凝膠中培養的hHpSC聚落之基因表現性變化建議在這些3D環境中逐步分化。最顯著的是，在本培養模型中的分化可在缺乏生化補充時發生。這些結果指示出置於多種KM-HA水凝膠中的hHpSCs在靜置培養1星期內顯示出分化成中間hHB譜系。

極冷保藏

[0089]在本發明的另一個具體實例中，可使用HA凝膠與習知的極冷保藏方法來產生優異的保藏及在解凍後之生存能力。該方法的綜述顯示在圖6中。不由理論佔據或限制，咸信內含HA藉由刺激黏附機制(例如，整合素 $\beta 1$ 的表現性)改善保藏，其使細胞之培養及解凍後保存功能容易。HA濃度範圍以0.01至1重量百分比為較佳，及以0.5至0.10%為更佳。

[0090]除非其它方面有定義，否則於本文中所使用的全部工藝及科學用語皆具有與通常由一般技藝人士所了解者相同且本發明適用之意義。於本文中所提到的全部公告、專利申請案、專利及其它參考資料其全文以參考方式併入本文。在衝突的情況中，本專利說明書(包括定義)將控制。此外，物質、方法及實施例僅有闡明用及不想要限制。

[0091]現在，將以下列闡明性實施例詳細描述本發明；但是，本發明的範圍不想要及應該不限於下列所例示之具體實例。

實施例1

[0092]根據所報導的協定，從宿主C57/BL6老鼠(4-5週)分離出老鼠肝祖代細胞。對“植入”研究來說，將GFP報導子引進該肝祖代細胞中。然後，將細胞與透明質酸(HA)水凝膠混合，及在引進實驗老鼠中之前，該HA與聚二丙烯酸(乙二醇)酯(PEG-DA)交聯。對引進/移殖來說，以氯胺酮(90-120毫克/公斤)及甲苯噻吡(10毫克/公斤)麻醉老鼠及打開其腹部。然後，將細胞(含或不含HA)慢慢注射進前肝葉中。閉

合切口位置及每12小時對動物提供0.1毫克/公斤的丁基原啡因(buprenorphine)48小時。在48小時後，讓動物安樂死，及移出組織、固定及切片用於組織學。

[0093]為了測量在老鼠模型中的細胞定位，在37°C下，以表現出發光酶之腺病毒載體在50 POI下感染“對照”肝祖代細胞4小時。如上所述進行存活手術，及將細胞(1-1.5E6)直接注射進肝葉中(含或不含HA)。僅在成像前，以螢光素皮下注射老鼠，由移植的細胞產生螢光信號。使用IVIS動力學光學成像器測量細胞在老鼠內的定位。

結果

[0094]在24小時處，在肝及肺二者中發現經注射不含HA植入的“對照”細胞。但是，在72小時處，大部分細胞無法被固定而僅有少數可辨認的細胞殘餘在肝中。相較之下，根據本發明所植入的細胞經觀察在24及72小時二者處皆為成功整合進入肝中的細胞群，甚至在二週後仍然存在。亦看見經由此幹細胞棲所植入物移植的細胞幾乎專門局限在肝組織中且未在其它組織中發現(藉由在隨機化組織樣品上試驗)(圖7)。

實施例2

[0095]根據所報導的協定，從胎兒肝組織(16-20週)中分離出人類肝祖代細胞。將表現出發光酶的腺病毒載體引進肝祖代細胞中。然後，在引進實驗老鼠中之前，於交聯劑聚二丙烯酸(乙二醇)酯(PEG-DA)存在下，將細胞與經硫醇改質的羧甲基HA(CMHA-S)混合。更特別的是，水凝膠係

藉由下列方式建構：將HA乾試劑溶解在KM中以提供2.0%溶液(重量/體積)，及將交聯劑溶解在KM中以提供4.0%重量/體積溶液。然後，允許在37°C水槽中培養樣品以完全溶解。在濃度1.0毫克/毫升下製備膠原質III及板素，且與比率1：4的交聯劑/水凝膠摻合。

[0096]對引進/移植來說，以氯胺酮(90-120毫克/公斤)及甲苯噻吡(10毫克/公斤)麻醉老鼠及打開其腹部。然後，將該細胞(含或不含HA)慢慢注射進前肝葉中。閉合切口位置及每12小時對動物提供0.1毫克/公斤的丁基原啡因48小時。對肝損傷模型來說，在0.6微升/克下IP給藥一次劑量的四氯化碳(CCl_4)。在48小時後，讓動物安樂死，及移出組織、固定及切片用於組織學。

[0097]為了測量細胞在老鼠模型中的定位，在37°C下，以表現出發光酶的腺病毒載體在50 POI下感染“對照”肝祖代細胞4小時。如上所述進行存活手術，及將細胞($1-1.5\text{E}6$)直接注射進肝葉中(含或不含HA)。僅在成像前，以螢光素K鹽(150毫克/公斤)IP注射老鼠，由移植的細胞產生螢光信號。使用IVIS動力學的光學成像器，之後測量在老鼠內的細胞定位10-15分鐘。(圖7)。

[0098]於第7天時，評估在老鼠血清中所分泌的人類白蛋白之濃度程度，以測量所移植的人類肝祖代細胞之功能。藉由ELISA，以結合蕁菜過氧化酶的螢光探針(fluoroprobes)及比色法在450奈米處的吸收度來測量白蛋白產物。(圖8)。在第7天時，從老鼠移出組織樣品及在4%PFA

中固定2天，並貯存於70%乙醇中。染色5微米厚切片用於組織學檢驗。

結果

[0099]在第7天時，採取血液樣品及移出組織及固定用於組織學。在損傷模型對健康模型中，於血清白蛋白中觀察到稍微增加，及HA植入方法亦顯示出增加(當與來自缺乏HA的細胞懸浮液之結果比較時)(圖8)。

[0100]來自經CCl₄處理的老鼠之組織對人類白蛋白染色。已發現經由植入方法，使用HA移植的細胞在宿主細胞內聚集及維持移植的細胞之大細胞主體。但是，經由細胞懸浮液移植的細胞產生小的團聚而遍及肝分散。

實施例3

[0101]從胰組織中分離出人類胰祖代細胞。將表現出發光酶的腺病毒載體引進祖代細胞中。然後，於交聯劑聚二丙烯酸(乙二醇)酯(PEG-DA)存在下，讓該細胞與經硫醇改質的羧甲基HA(CMHA-S)混合(如在實施例2中所描述)。

[0102]對引進/移植來說，以氯胺酮(90-120毫克/公斤)及甲苯噻吡(10毫克/公斤)麻醉老鼠及打開其腹部。然後，將該細胞(含或不含HA)慢慢注射進胰臟中。閉合切口位置及每12小時對動物提供0.1毫克/公斤的丁基原啡因48小時。在48小時後，讓動物安樂死，及移出組織、固定及切片用於組織學。

[0103]為了測量在老鼠模型中的細胞定位，在37°C下，以表現出發光酶的腺病毒載體在50 POI下感染“對照”祖代

細胞4小時。如上所述進行存活手術，及將細胞(1-1.5E6)直接注射進胰臟中(含或不含HA)。僅在成像前，以螢光素K鹽(150毫克/公斤)IP注射老鼠，由移植的細胞產生螢光信號。使用IVIS動力學的光學成像器，之後測量細胞在老鼠內的定位10-15分鐘。

結果

[0104]在24小時處，除了別的器官以外，在胰臟中發現注射不含HA植入的“對照”細胞。但是，在72小時處，大部分細胞會不固定且僅有少數可辨認的細胞殘餘在胰臟中。相較之下，根據本發明之移植的細胞經觀察在24及72小時二者處皆為成功整合進胰臟中之細胞群，及甚至在二週後仍然存在。

實施例4

[0105]進行研究以評估接種在水凝膠中的肝幹細胞之生存能力及功能。使用分子探針鈣黃綠素(Molecular Probes Calcein)AM活細胞生存能力配套元件(分子探針(Molecular Probes)，尤金奧勒崗(Eugene Oregon))評估在培養物中的生存能力。薄膜滲透物鈣黃綠素AM在活細胞中被酯酶切割而產生細胞質的綠色螢光性。測量在1星期培養期間所分泌的白蛋白、運鐵蛋白及尿素在培養媒質中之濃度程度。簡單地說，收集媒質上層液及冷凍貯存在-20℃下直到分析。藉由ELISA，使用人類白蛋白ELISA定量組來測量白蛋白產物。使用血液尿素氮比色試劑來分析尿素產物。以賽脫弗史貝錯馬克斯(cytofluor Spectramax)250多井讀盤器各別地

測量全部分析物。

結果

[0106]結果提供在圖9及10中。在3週培養後，分析細胞其基因表現性。將mRNA表現性的程度對GAPDH常態化。全部測量皆以倍數變化(與在透明質酸水凝膠中三維培養前的初始肝幹細胞聚落比較)表現出。在二實驗透明質酸培養條件(HA及HA+膠原質III+板素)中，在EpCAM(7.72 ± 1.42 ， 9.04 ± 1.82)及白蛋白(5.57 ± 0.73 ， 4.84 ± 0.84)上有明顯增加(當與初始聚落表現性比較時)。在二條件下，在肝母細胞分化標記AFP上亦有明顯減少(0.55 ± 0.11 ， 0.17 ± 0.03)。此外，HA+CIII+Lam條件顯示出在AFP表現性上明顯減少(當與基本HA培養比較)。

實施例5

[0107]評估含有多種HA及PEGDA濃度的HA水凝膠在無血清媒質中培養之埋置的hHpSCs上之機械性質的效應。所使用的調配物總整理在下列表3中：

最後含量 (4：1分配)		PEGDA初始溶液含量(1份)			
		2.0%(w/v)	4.0%(w/v)	6.0%(w/v)	8.0%(w/v)
CMHA-S 初始溶液 含量 (4份)	1.0% (w/v)	調配物A CMHA-S 0.8%(w/v) PEGDA 0.4%(w/v)	CMHA-S 0.8%(w/v) PEGDA 0.8%(w/v)	CMHA-S 0.8%(w/v) PEGDA 1.2%(w/v)	調配物B CMHA-S 0.8%(w/v) PEGDA 1.6%(w/v)
	1.5% (w/v)	CMHA-S 1.2%(w/v) PEGDA 0.4%(w/v)	調配物C CMHA-S 1.2%(w/v) PEGDA 0.8%(w/v)	調配物D CMHA-S 1.2%(w/v) PEGDA 1.2%(w/v)	CMHA-S 1.2%(w/v) PEGDA 1.6%(w/v)
	2.0% (w/v)	調配物E CMHA-S 1.6%(w/v) PEGDA 0.4%(w/v)	CMHA-S 1.6%(w/v) PEGDA 0.8%(w/v)	CMHA-S 1.6%(w/v) PEGDA 1.2%(w/v)	調配物F CMHA-S 1.6%(w/v) PEGDA 1.6%(w/v)

[0108]藉由以4：1比率混合經硫醇改質的羧甲基

HA(CMHA-S)與聚二丙烯酸(乙二醇)酯(PEGDA)溶液達成用於每種調配物的最後KM-HA水凝膠組成物。在特定的CMHA-S及PEGDA濃度下，於pH 7.4下，分別在KM中混合特定濃度的CMHA-S及PEGDA乾試劑，及在37°C下加溫30分鐘以提高乾試劑之溶解。在無菌條件下，於培養器中，在5%CO₂/空氣混合物中及37°C下發生最大水凝膠交聯(沒有額外的媒質)1小時。之後，以2.5毫升HK媒質補充水凝膠及在測試前培養過夜。

[0109]對擴散性試驗來說，藉由渦動均質化水凝膠調配物及將其鋪平成~1毫米厚。在無菌條件下，於培養器中，在5%CO₂/空氣混合物中及37°C下培養該水凝膠(沒有額外的媒質)1小時，以允許在混合後最大交聯。然後，以相等體積的額外KM(以2.5毫克/毫升(0.036 mM)結合螢光黃的70-kDa葡萄聚糖分子補充)補充樣品，允許在測試前，於培養過夜期間擴散進入樣品中。

[0110]使用在光漂白(FRAP)系統後的螢光性恢復來測量HA水凝膠之擴散係數。為了成像目的，在平衡至室溫後，於樣品上進行“在井內(in-well)”測試，沒有先前抽吸以D70補充的KM。每個樣品測試總共5個光漂白斑點各別30秒(13.5毫瓦，458/488奈米激發氬雷射，漂白的幾何形狀：直徑35微米圓形)，及單一單向掃描漂白前的影像，立即在光漂白結束後單一單向掃描影像，及之後，透過單一管道(LP 505奈米，綠色發射管道)，於處理後以4.0秒延遲區間獲得28個單向掃描時間系列影像(256×256畫素框尺寸，0.9

微米/畫素解析度)。

結果

[0111]KM-HA水凝膠的挺度、黏彈性性質及黏度依CMHA-S及PEGDA含量而定。KM-HA水凝膠貫穿寬廣的強制頻率範圍維持固定的挺度，同時具有完美的彈性行為及具有剪稀(如其黏度隨著強制頻率增加而減少)。CMHA-S及PEGDA的含量控制KM-HA水凝膠之機械性質(圖11a)。比較上，KM-HA水凝膠的擴散性質最理想，因為它們可與單獨的久保田煤質比較(圖11b)。

[0112]將肝幹細胞聚落與KM-HA水凝膠混合，及其開始拋棄平面組態而偏愛團聚成球形體似的結構或折疊成複雜的3D結構(二者皆為分化的跡象)。在培養1星期後，細胞形態變成多樣化及某些細胞尺寸擴大至約15微米(其為hHBs的特徵)。以抗體對hHpSCs及hHBs之細胞表面標記(如EpCAM、CD44及CDH1)進行免疫染色來證實分化。

[0113]遍及培養，在全部KM-HA水凝膠的測試組成物中，hHpSCs所分泌的AFP及白蛋白濃度增加，同時第7天時，在全部KM-HA水凝膠中之尿素合成平衡至可比較的程度(圖12)。在培養1星期後，在接種於KM-HA水凝膠內的hHpSC聚落細胞中，EpCAM之mRNA表現性程度明顯高於2D生長的hHpSC聚落或新鮮分離的hHBs那些。對在KM-HA水凝膠中的hHpSCs來說，NCAM、AFP及E-鈣黏附素(CDH1)之mRNA表現性程度亦與2D生長的hHpSC聚落那些明顯不同。(圖5)。

[0114]hHpSCs的分化標記(NCAM、AFP、CDH1)及hHpSCs與hHBs的常見標記(CD44、EpCAM)之基因表現性的定量測量顯示出，隨著KM-HA水凝膠挺度增加而逐漸減少(對 $|G^*| < 200$ 巴斯卡來說)及之後恢復(圖5)。來自全部水凝膠調配物的細胞皆表現出EpCAM、NCAM及CD44蛋白質；但是，在含有1.2%CMHA-S或較少的KM-HA調配物中，CD44顯露出富含化，然而NCAM在全部KM-HA水凝膠中仍然富含。(圖4)。

實施例6

[0115]評估HA改善黏附機制的保存(其可使培養細胞容易及解凍後保存功能)之效應。從胎兒肝中分離出新鮮分離的hHpSCs及肝母細胞，且將其極冷保藏在一些不同極冷保藏緩衝液(含或不含0.5或0.10%透明質酸(HA)補充)之一中。更特別的是，在 2×10^6 細胞/毫升下，在包含以10%DMSO或克萊歐斯特TM-CS10(生物生活溶液)補充且含有0、0.05或0.10%HA水凝膠(以重量計)的培養媒質之極冷保藏溶液中冷凍該樣品。在冷凍前，於未交聯的HA中，以經控制的方式允許該等細胞在4℃下於極冷保藏溶液中平衡10分鐘，如顯示在圖13中。

[0116]在解凍後，將該等細胞鋪平到以膠原質III塗佈(以1微克/平方公分)之組織培養板上，以促進幹細胞附著。

結果

[0117]全部測試的緩衝液皆在解凍時產生高生存能力(80-90%)(圖14)。但是，以HA補充顯示出在被保藏的細胞

附著至組織培養表面及被培養之能力上相當大地改良。在以小量透明質酸(0.05或0.10%)補充的CS10等滲壓媒質中極冷保藏之細胞觀察到最好結果。研究結果顯露出在無血清條件下極冷保藏新鮮分離的人類肝祖細胞之經改良的方法；對幹細胞銀行業來說，在研究及潛在的治療應用二者上提供更有效率的方法。

[0118]測量細胞-細胞及細胞-基質黏附因子的表現性。可在圖15中看見在極冷保藏的樣品中之細胞黏附分子的基因表現性曲線圖之總整理。在CS10+0.05%HA中冷凍之樣品中看見整合素 $\beta 1$ 的最高表現性(0.130 ± 0.028 ， $n=28$)。當與在新鮮樣品中看見的表現性(0.069 ± 0.007 ， $n=24$ ， $p<0.01$)比較時，此明顯不同。同樣地，在CS10+0.1%HA (0.049 ± 0.006 ， $n=20$)及CS10+0.05%HA (0.064 ± 0.003 ， $n=16$)中冷凍的細胞中之CDH-1(E-鈣黏附素)表現性顯示出在表現性上明顯增加(當與新鮮樣品(0.037 ± 0.005 ， $n=36$ ， $p<0.05$)比較時)。

[0119]雖然本發明已經與其特定具體實例銜接來描述，將要了解其能進一步改質且本申請案想要涵蓋遵循本發明之任何變化、用途或改變。通常來說，本發明的原理及包括來自本揭示之此偏差落入本發明所涉及的技藝之已知或常用的實施中，及可應用至在上文中提出的基本特徵及如下在附加的申請專利範圍之範圍中。

【符號說明】

(無)

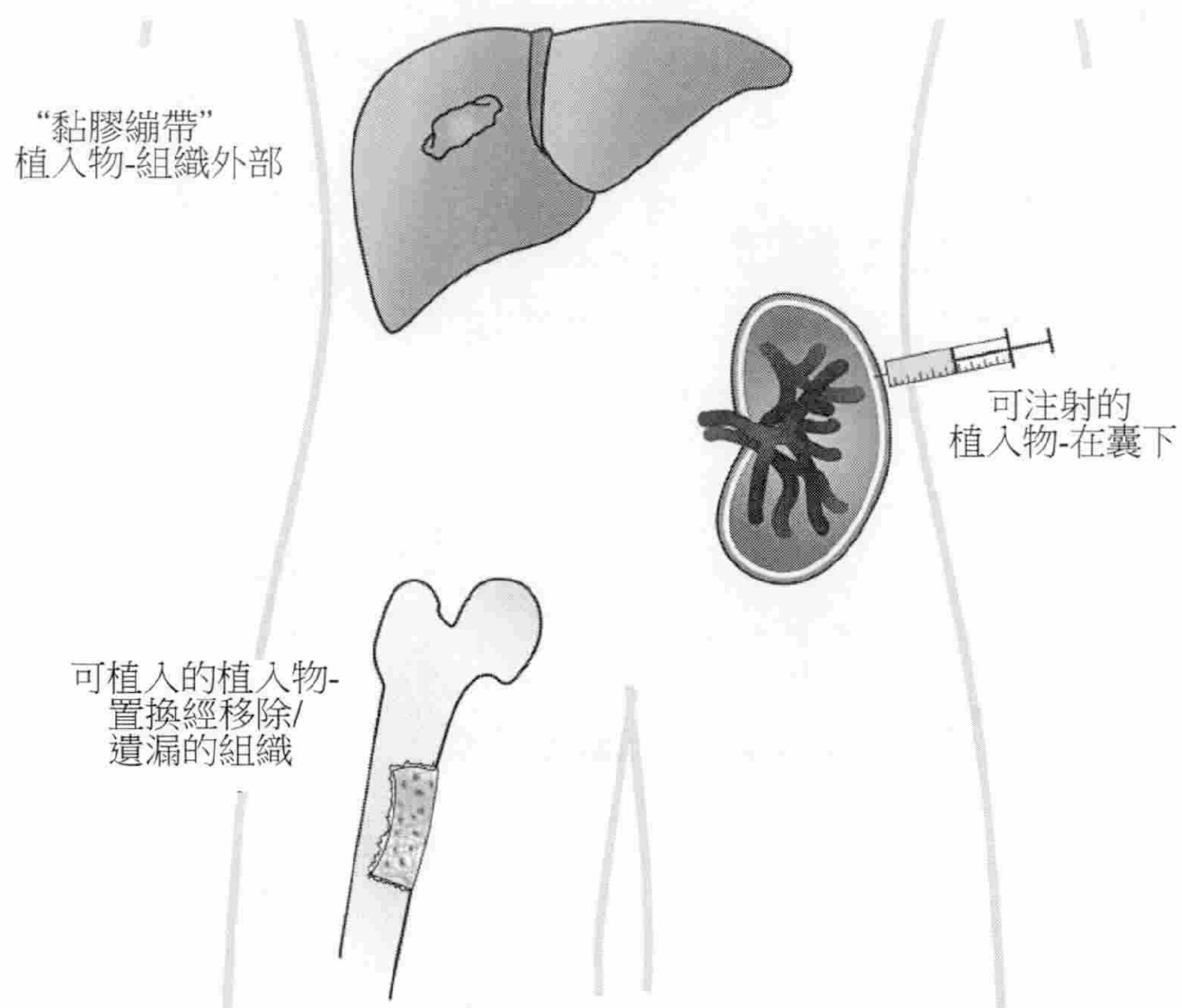
申請專利範圍

1. 一種極冷保藏一或多種細胞的方法，其包含：
 - a) 將該一或多種細胞與凝膠形成生物材料結合以形成一混合物；
 - b) 可選地(optionally)，將該混合物與等滲壓培養基、發信分子(signaling molecules)及細胞外基質組分之一或多者結合；及
 - c) 冷凍該混合物。
2. 如請求項1之方法，其中該生物材料包含膠原、基膜素(laminins)、黏附分子、蛋白多醣、透明質酸(hyaluronans)、葡萄糖胺聚合醣鏈(glycosaminoglycan chains)、聚甲殼糖(chitosan)、藻酸鹽、及合成、可生物降解及可生物相容的聚合物、或其組合。
3. 如請求項2之方法，其中該生物材料包含透明質酸。
4. 如請求項1之方法，其中該混合物係進一步與選自於由下列所組成之群的一冷凍保護劑結合：二甲亞砜(DMSO)、甘油、乙二醇(ethylene glycol)、乙基二醇(ethaediol)、1,2-丙二醇(1,2-propaendiol)、2,3-丁二醇(2,3-butenediol)、甲醯胺、N-甲基甲醯胺、3-甲氧基-1,2-丙二醇它們本身、及其組合。
5. 如請求項1之方法，其中該混合物係進一步與糖、甘胺酸、丙胺酸、聚乙烯吡咯啉酮(polyvinylpyrrolidone)、丙酮酸鹽、細胞凋亡抑制劑、鈣、乳糖酸鹽、蜜三糖、

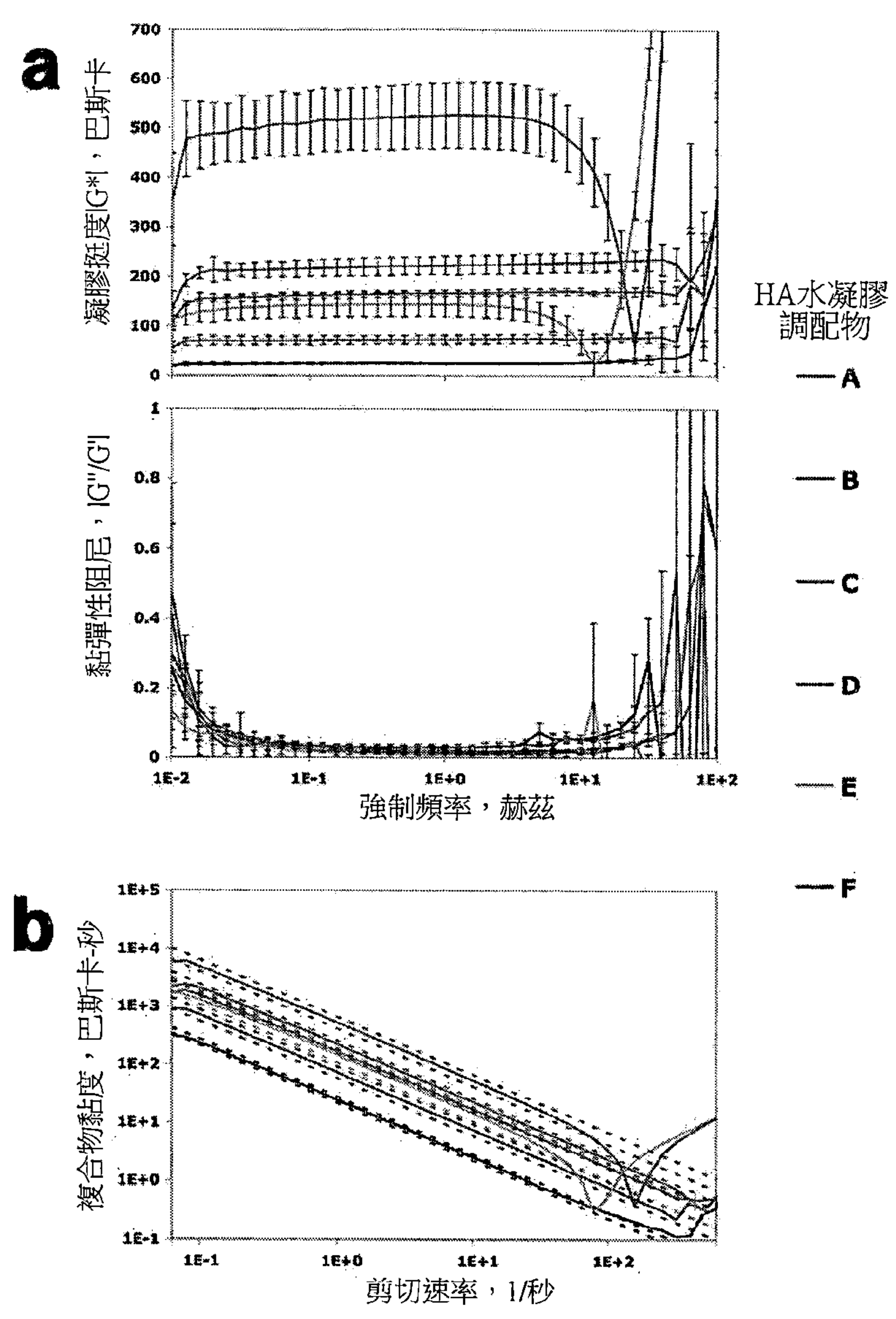
迪皮質醇、還原的鈉離子、膽鹼、抗氧化劑、荷爾蒙、或其組合結合。

6. 如請求項5之方法，其中該糖為漏蘆糖(trehalose)、果糖、葡萄糖、或其組合。
7. 如請求項1之方法，其中該一或多種細胞為肝臟細胞，其中該肝臟細胞包含肝幹細胞、肝母細胞、肝細胞的定向祖細胞(committed progenitors of hepatocytes)、或成熟肝細胞。
8. 如請求項7之方法，其中該肝臟細胞係與血管母細胞、或星狀細胞前身結合。

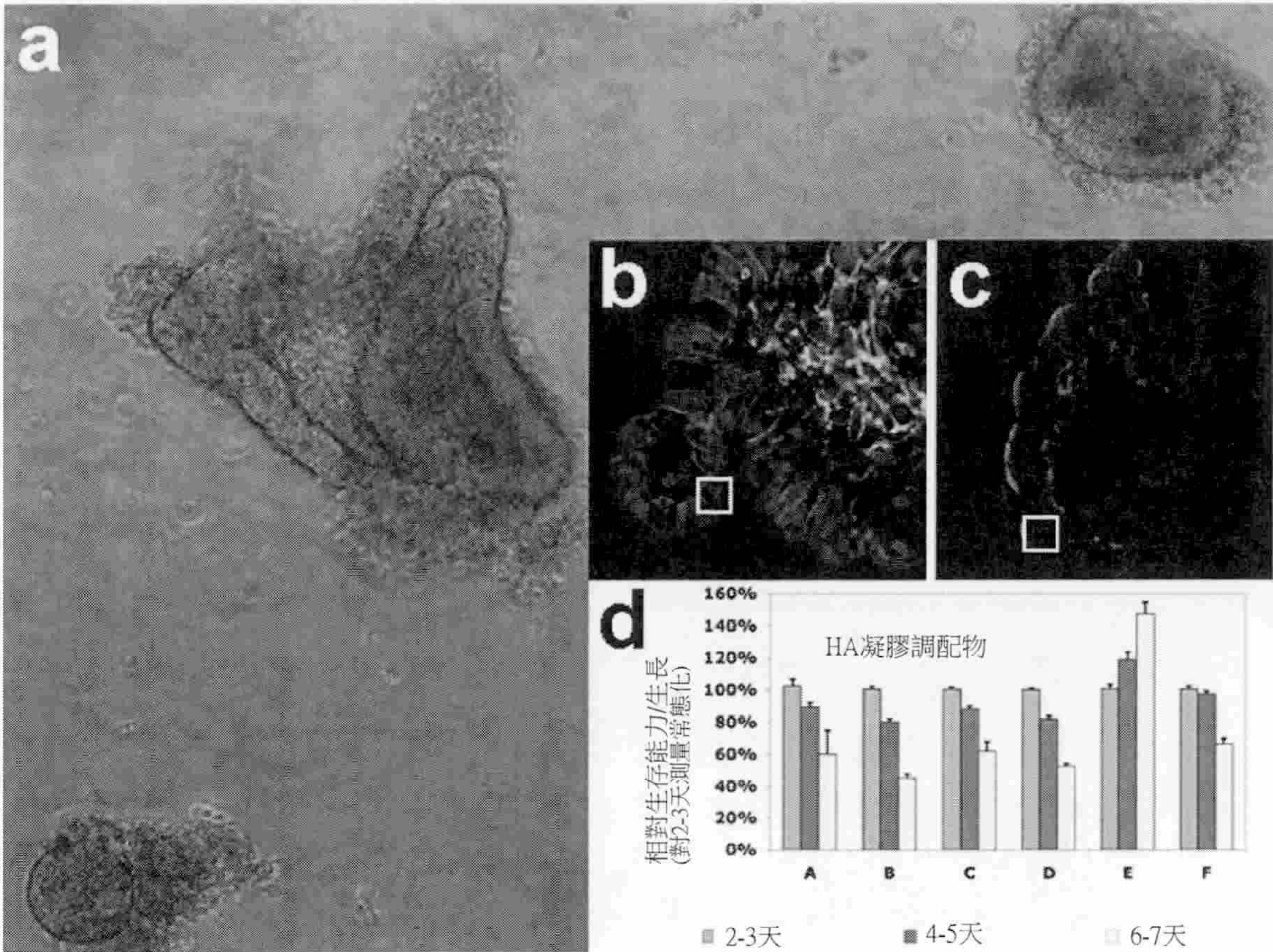
圖式



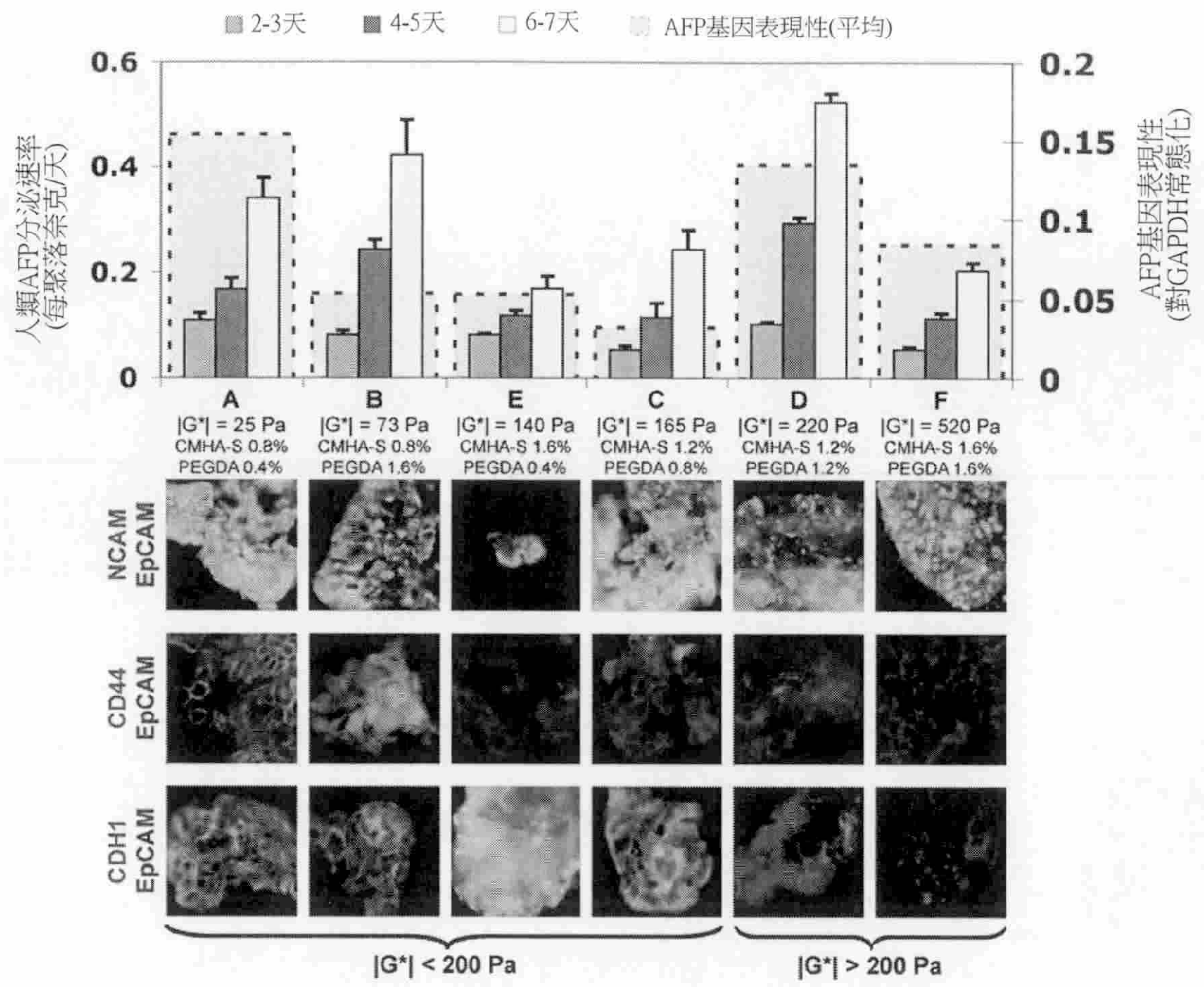
【圖1】



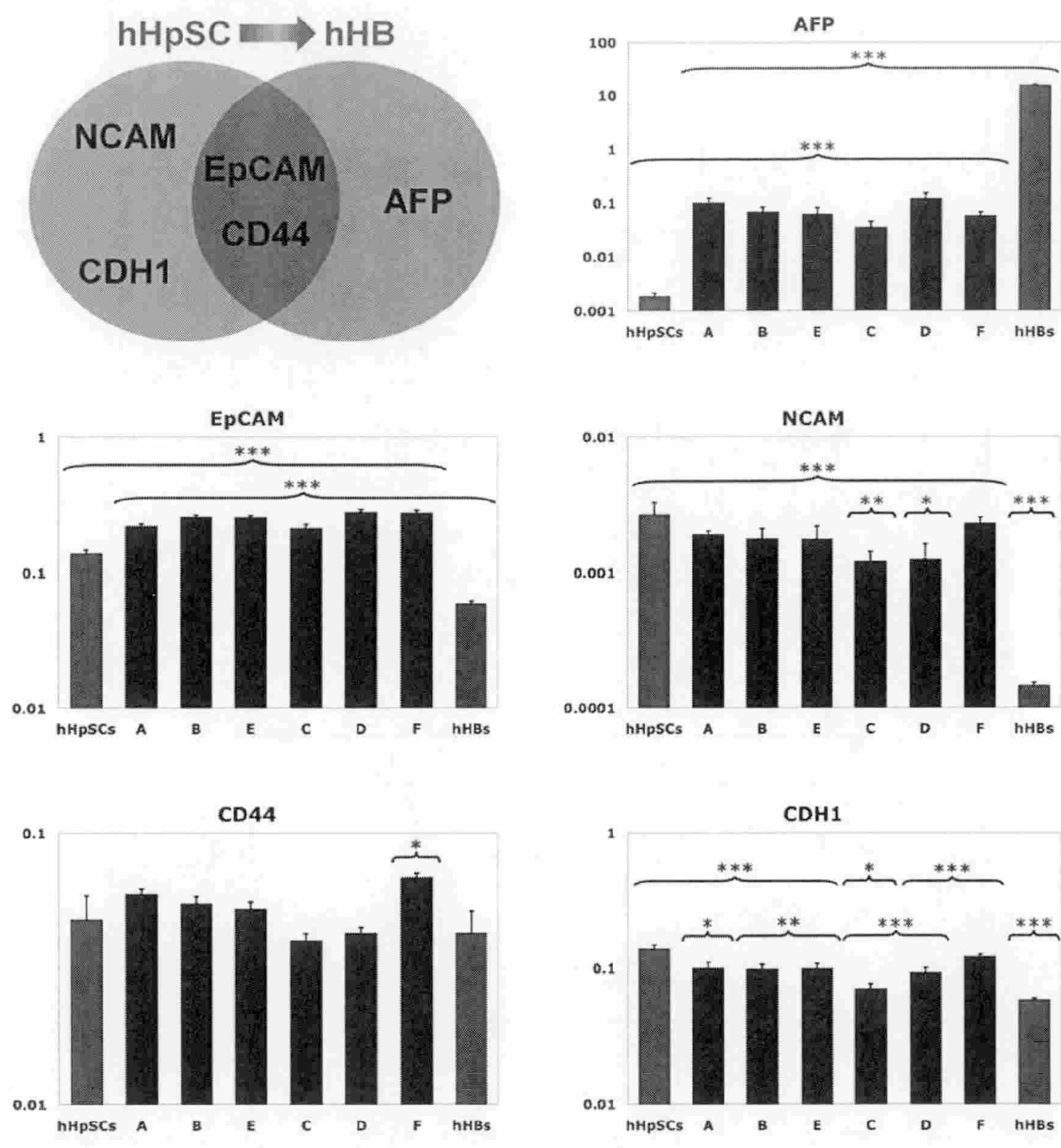
【圖2】



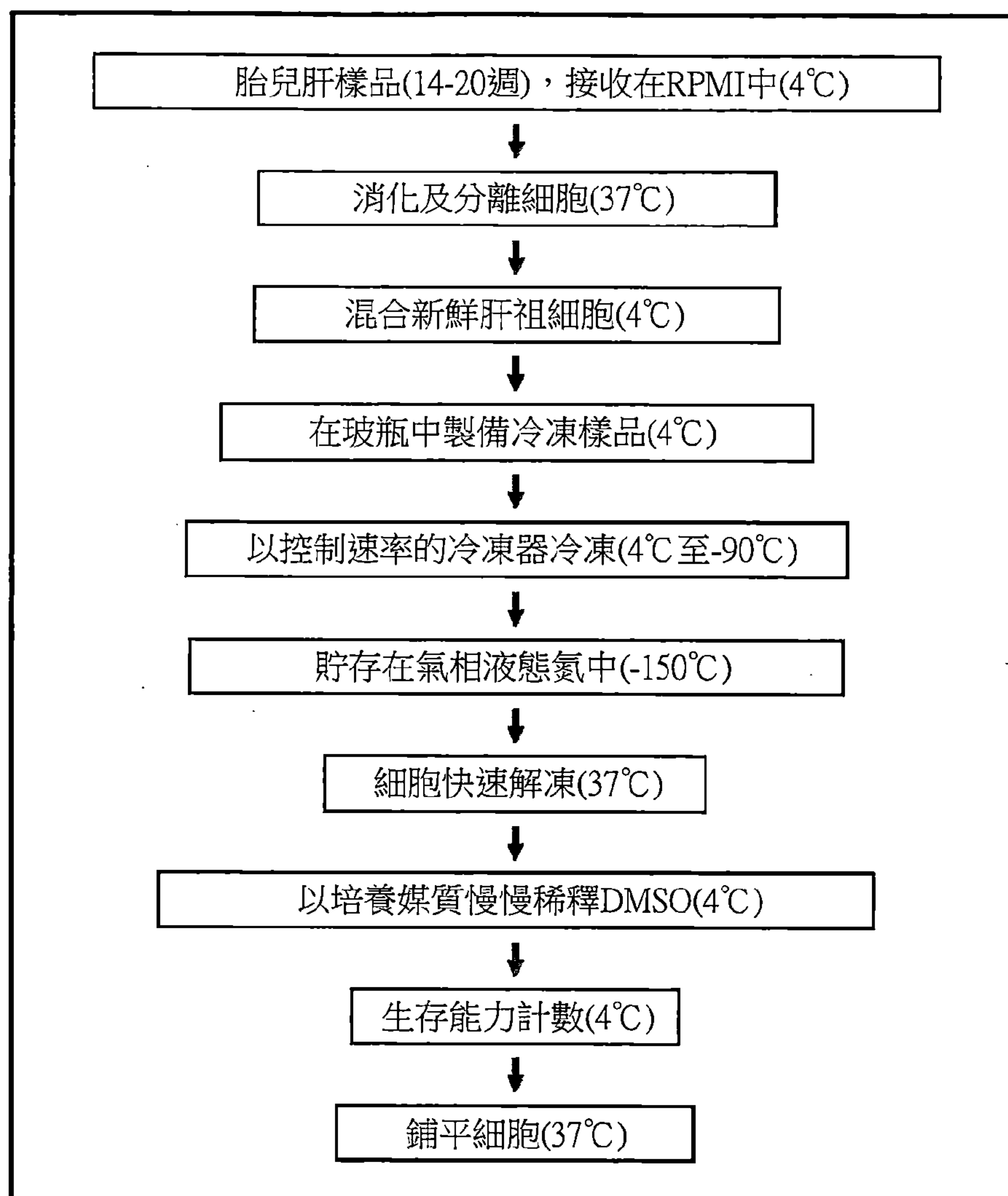
【圖3】



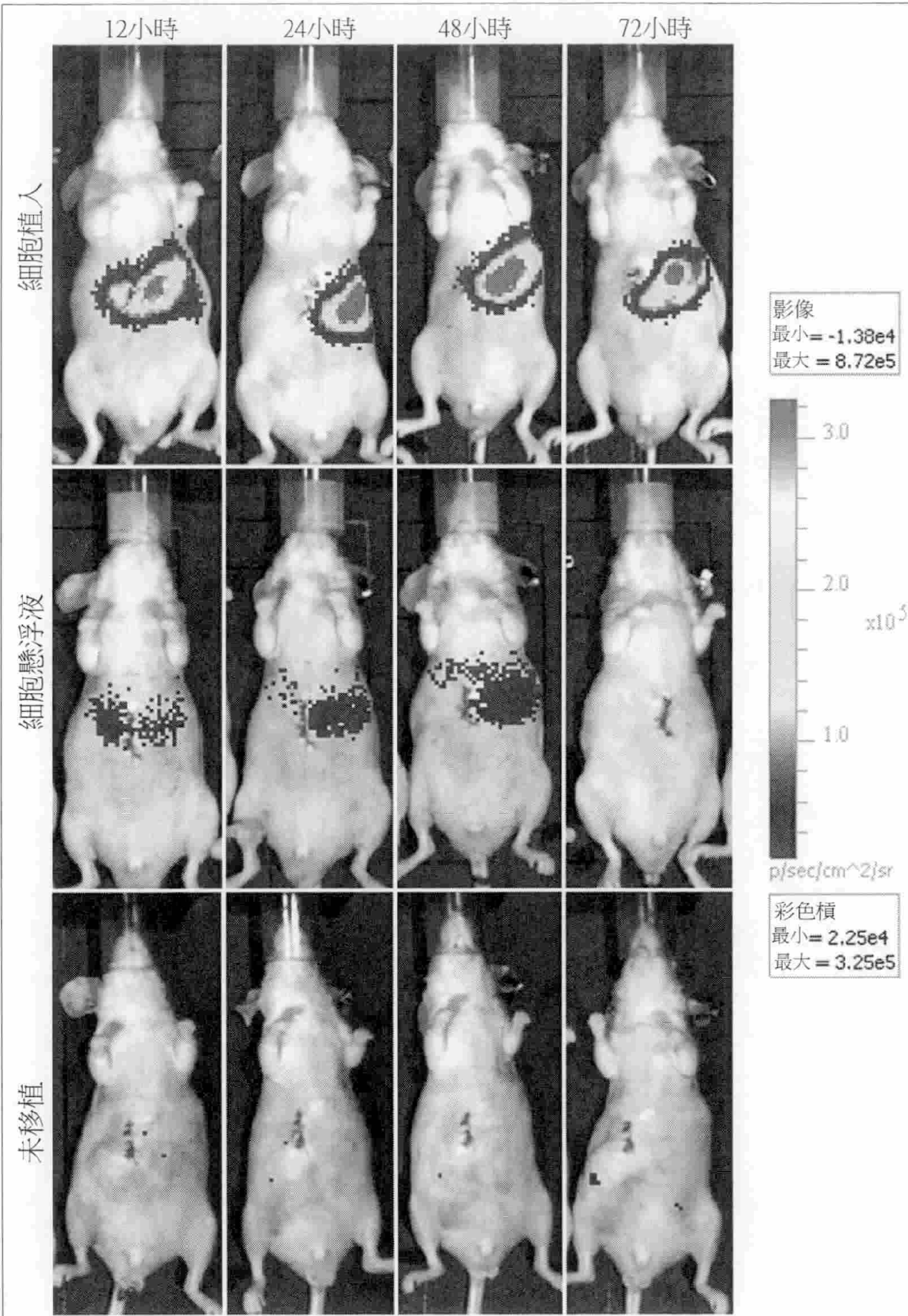
【圖4】



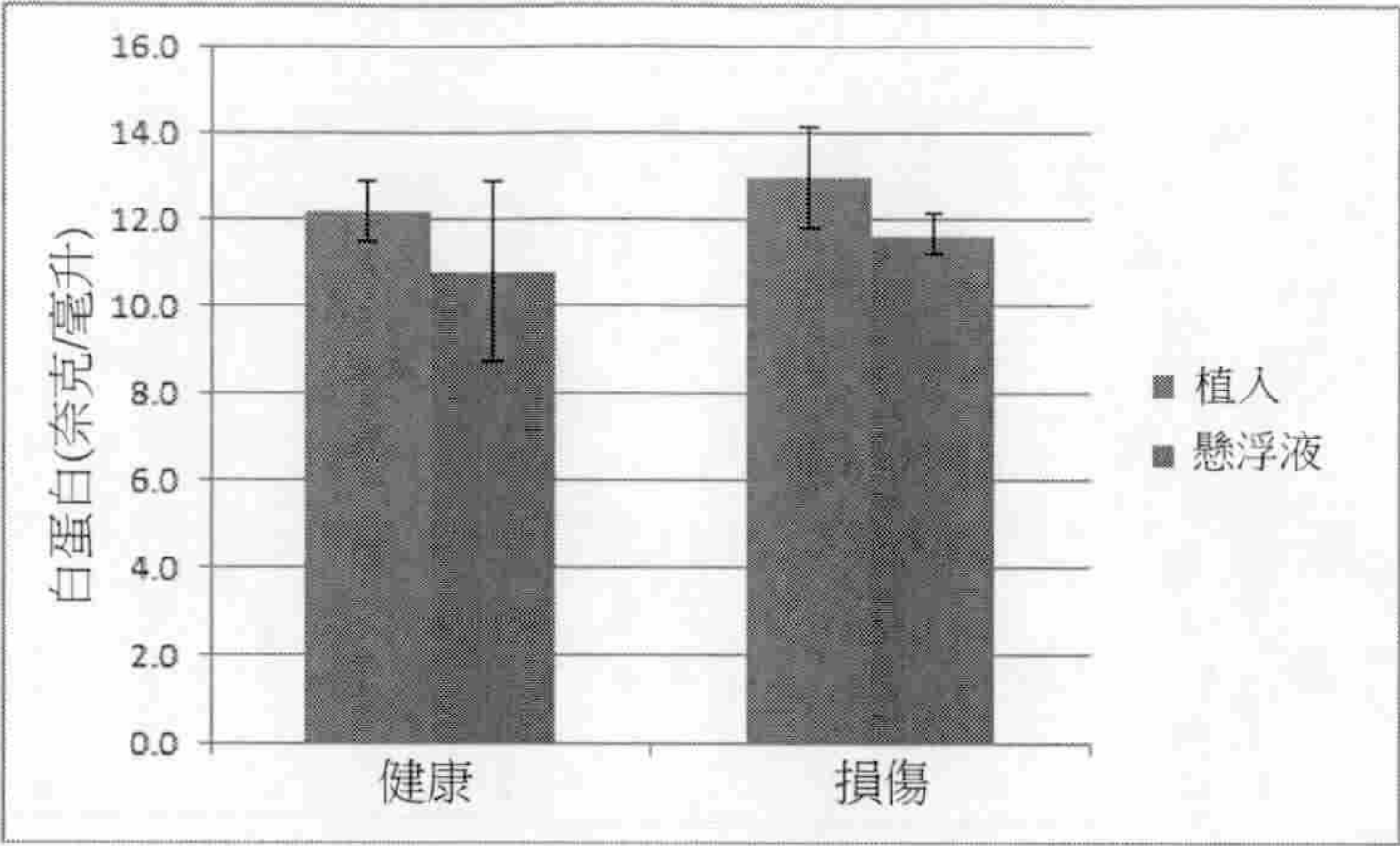
【圖5】



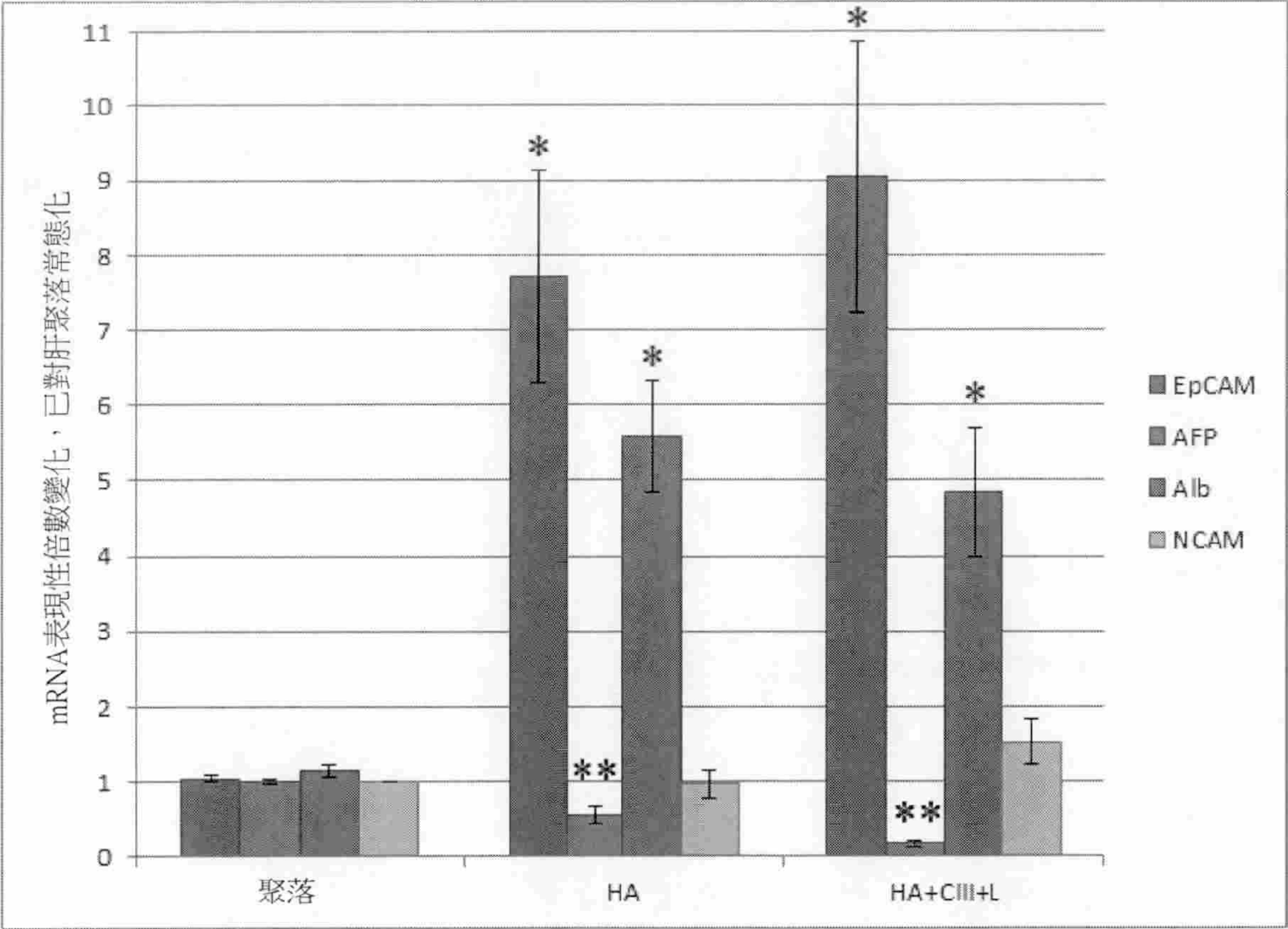
【圖6】



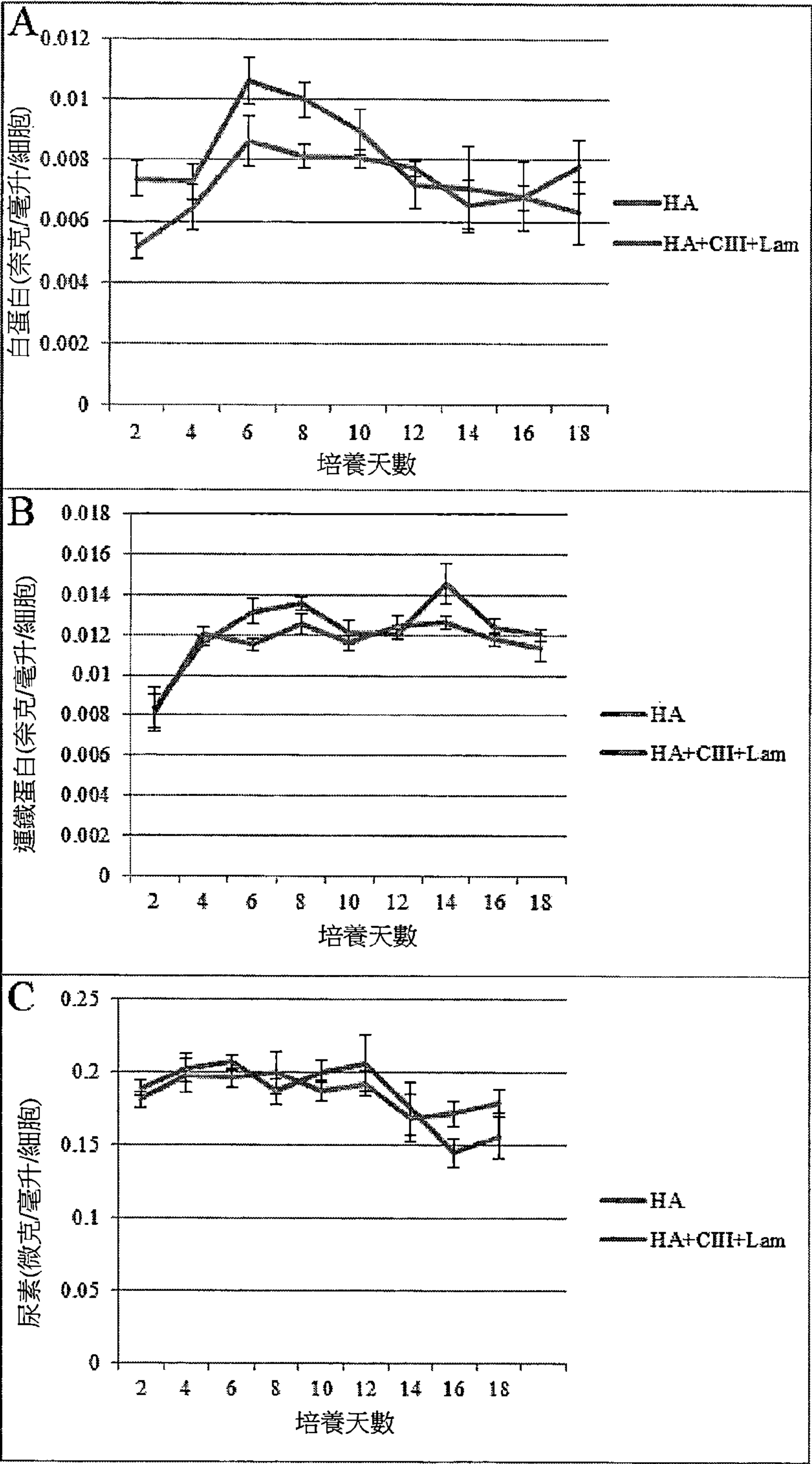
【圖7】



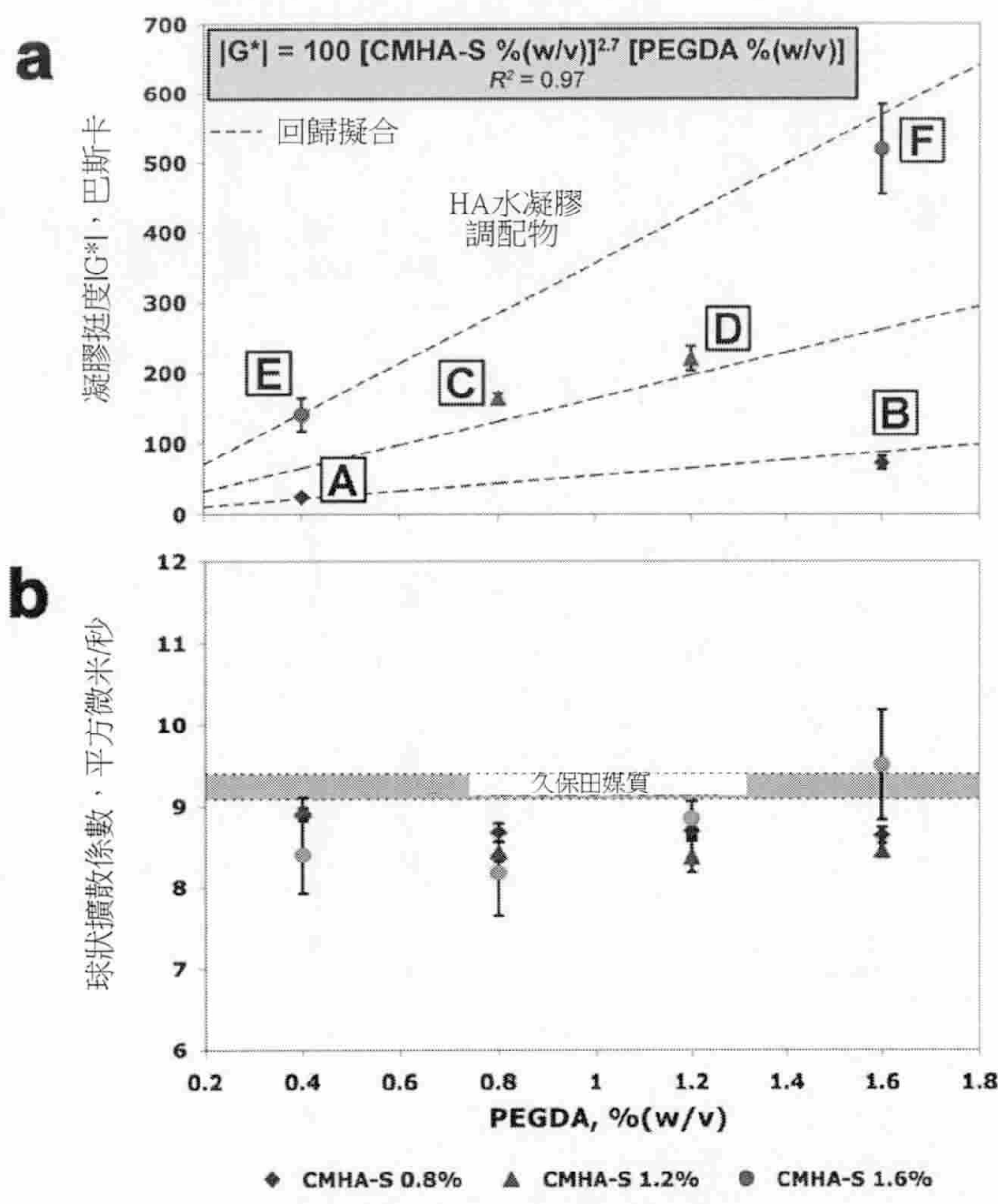
【圖8】



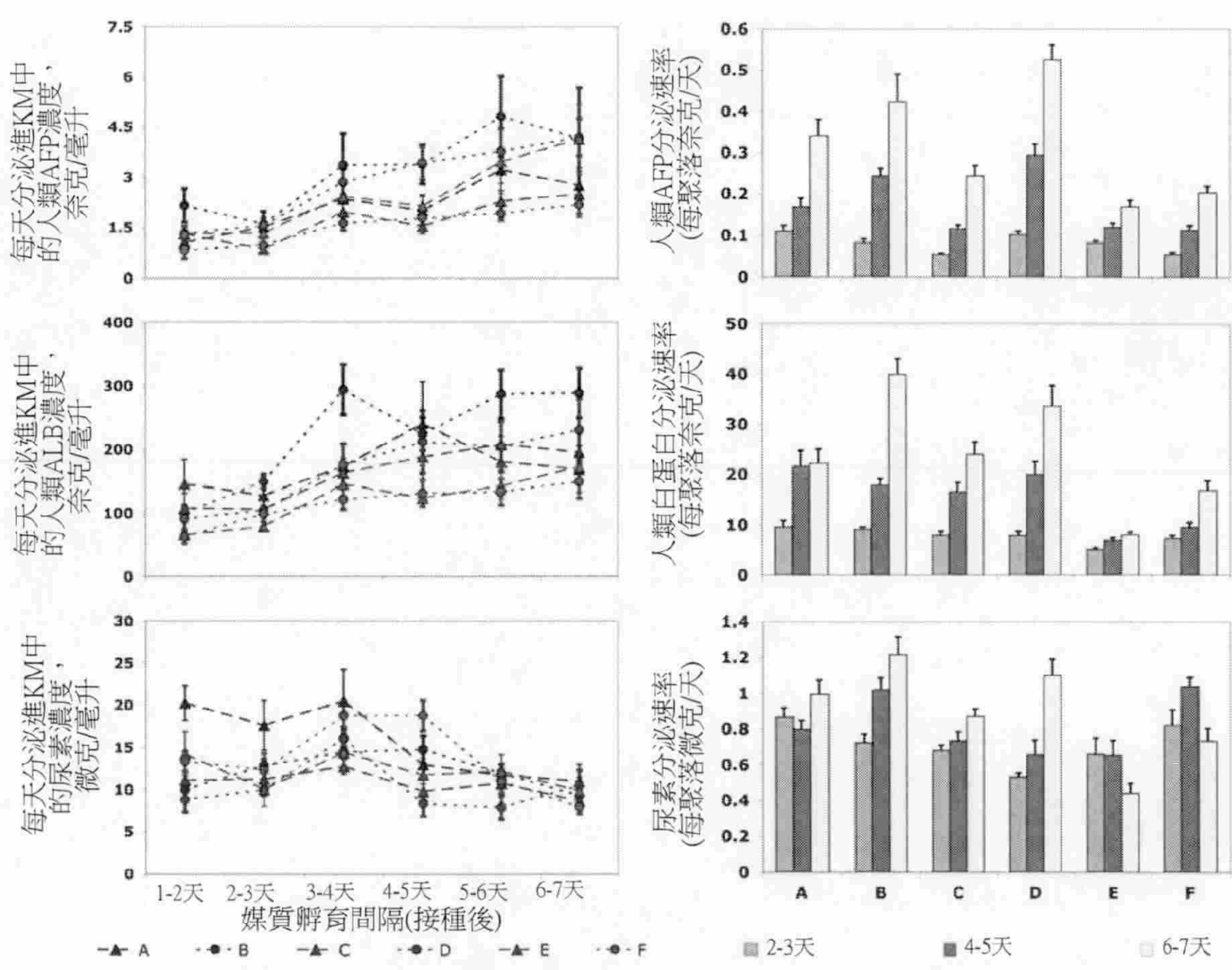
【圖9】



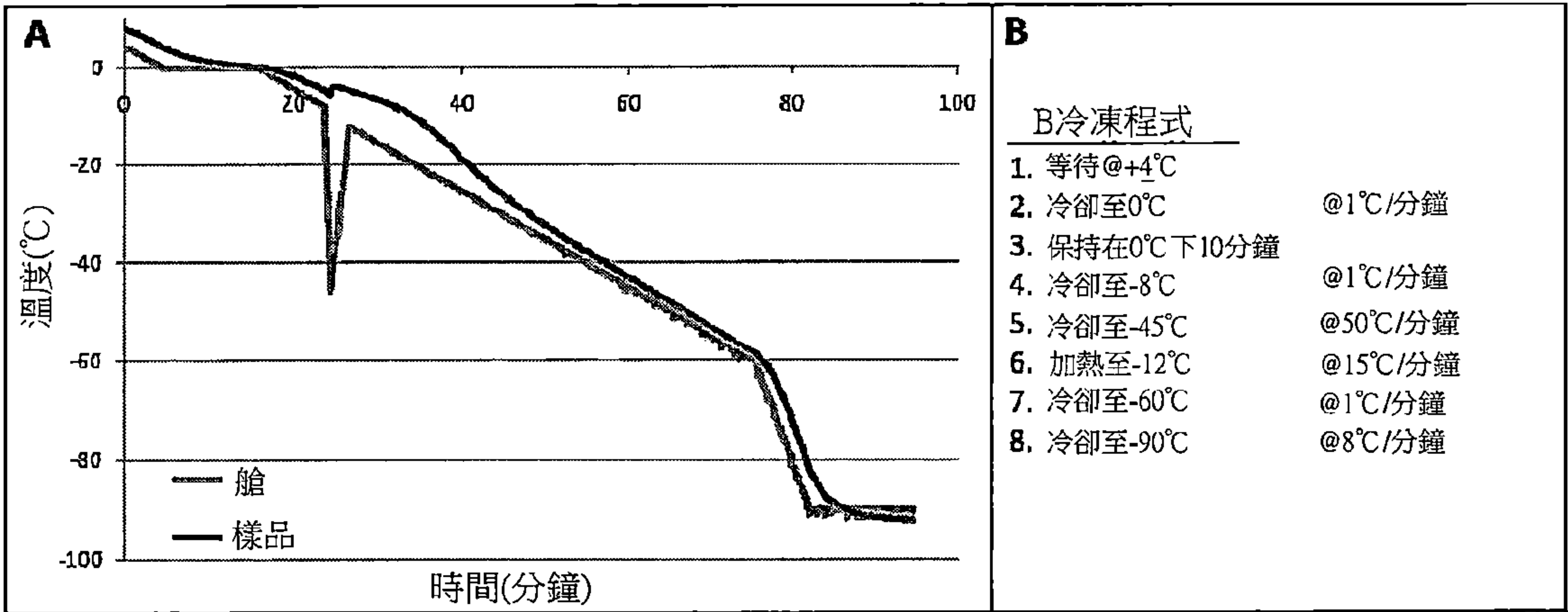
【圖10】



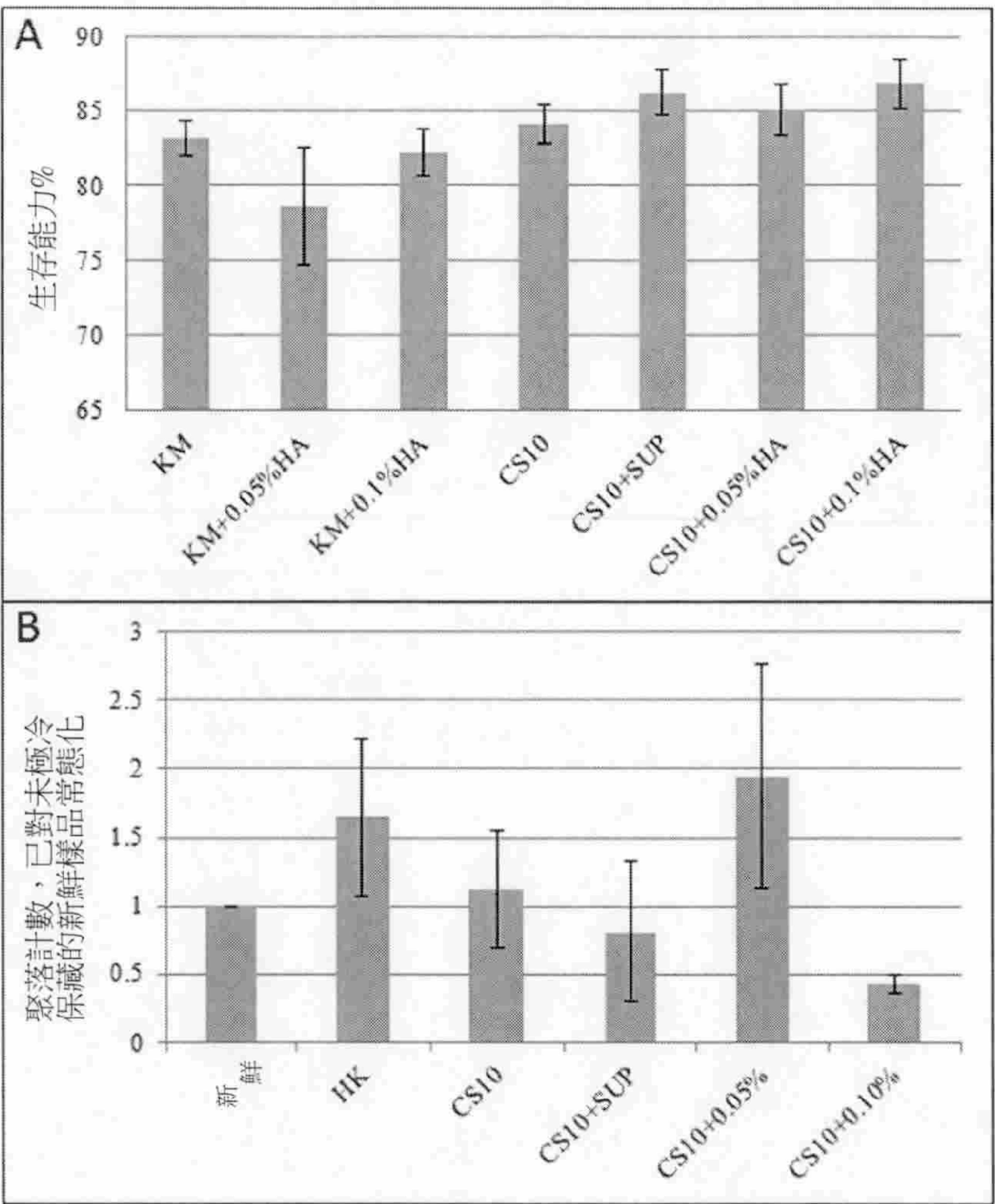
【圖11】



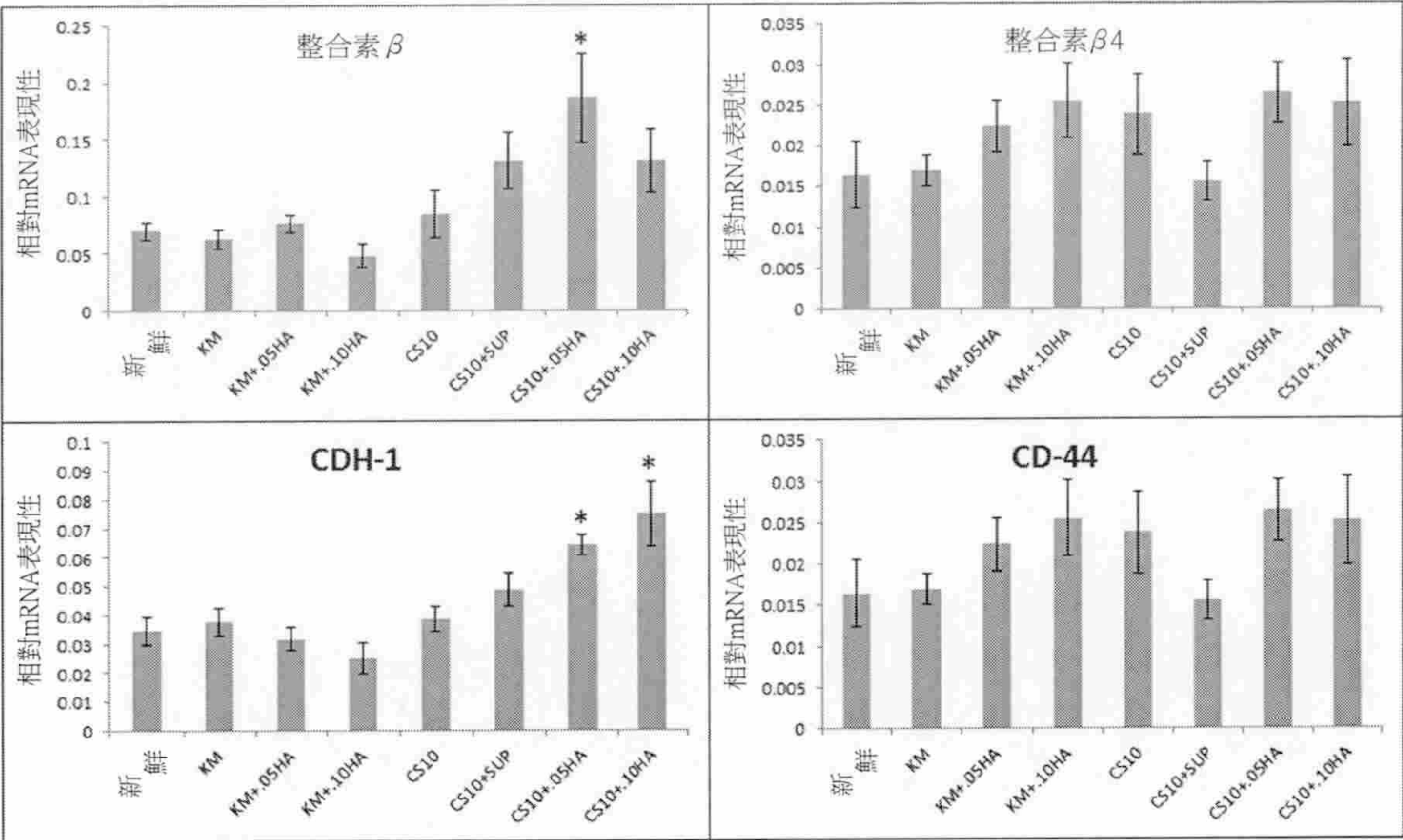
【圖12】



【圖13】



【圖14】



【圖15】