



(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 I757366 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 03 月 11 日

(21)申請案號：106139206

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 11 月 13 日

(51)Int. Cl. : C12N1/04 (2006.01)

C08B37/02 (2006.01)

(30)優先權：2016/12/14 日本

2016-242200

(71)申請人：日商大塚製藥工廠股份有限公司 (日本) OTSUKA PHARMACEUTICAL FACTORY, INC. (JP)

日本

(72)發明人：西村益浩 NISHIMURA, MASUHIRO (JP)；渡邊奈月 WATANABE, NATSUKI (JP)；藤田泰毅 FUJITA, YASUTAKA (JP)；和田圭樹 WADA, TAMAKI (JP)

(74)代理人：蔡清福；蔡駁理

(56)參考文獻：

TW 201534722A

CN 105076116A

審查人員：張維纓

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：0 共 25 頁

(54)名稱

哺乳動物細胞凍結保存液

(57)摘要

本發明的課題在於提供一種凍結保存哺乳動物細胞，並於融解後可有效抑制細胞死亡的哺乳動物細胞凍結保存液及哺乳動物細胞投予用液，或使用該細胞凍結保存液的哺乳動物細胞的凍結保存方法。若將本發明的等張液作為哺乳動物細胞凍結保存液及哺乳動物細胞投予用液，於該細胞凍結保存液中凍結保存哺乳動物細胞，則相較於以往的哺乳動物細胞凍結保存液，可有效抑制融解後的細胞死亡，其中前述等張液包含：2.0~6.0(w/v)%的海藻糖或其衍生物、或者前述海藻糖或其衍生物的鹽類；4.0~7.0(w/v)%的葡聚糖或其衍生物、或者前述葡聚糖或其衍生物的鹽類；及 DMSO 或甘油。

I757366

公告本

2021 年 8 月 26 日訂正替換頁

發明摘要

※ 申請案號：106139206

※ 申請日：106年11月13日 ※IPC 分類：C12N 1/04 (2006.01)
C08B 37/02 (2006.01)

【發明名稱】 哺乳動物細胞凍結保存液

【中文】

本發明的課題在於提供一種凍結保存哺乳動物細胞，並於融解後可有效抑制細胞死亡的哺乳動物細胞凍結保存液及哺乳動物細胞投予用液，或使用該細胞凍結保存液的哺乳動物細胞的凍結保存方法。若將本發明的等張液作為哺乳動物細胞凍結保存液及哺乳動物細胞投予用液，於該細胞凍結保存液中凍結保存哺乳動物細胞，則相較於以往的哺乳動物細胞凍結保存液，可有效抑制融解後的細胞死亡，其中前述等張液包含：2.0～6.0(w/v)%的海藻糖或其衍生物、或者前述海藻糖或其衍生物的鹽類；4.0～7.0(w/v)%的葡聚糖或其衍生物、或者前述葡聚糖或其衍生物的鹽類；及DMSO或甘油。

【英文】

2021 年 8 月 26 日訂正替換頁

【代表圖】**【本案指定代表圖】：****【本代表圖之符號簡單說明】：****【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：**

2021年8月26日訂正替換頁

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】 哺乳動物細胞凍結保存液

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種由等張液所組成的哺乳動物細胞凍結保存液及哺乳動物細胞投予用液，或具備將哺乳動物細胞凍結保存於該細胞凍結保存液中的步驟的哺乳動物細胞的凍結保存方法；其中前述等張液包含：2.0~6.0(w/v)%的海藻糖或其衍生物、或者前述海藻糖或其衍生物的鹽類(以下有時稱為「海藻糖類」)；4.0~7.0(w/v)%的葡聚糖或其衍生物、或者前述葡聚糖或其衍生物的鹽類(以下有時稱為「葡聚糖類」)；及二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide；以下稱為「DMSO」)或甘油(glycerol)。

【先前技術】

【0002】 於細胞生物學的研究中，細胞的凍結保存作為不可或缺的技術而廣受利用。近年來，細胞凍結保存技術不僅應用在全世界的細胞庫，保存各種確立細胞株，還應用在畜產業界的原種保存、家畜增產用的精子、卵子或受精卵的凍結保存，或生殖醫療的生殖細胞的凍結保存等。

【0003】 胚胎幹細胞(Embryonic Stem cell；ES細胞)或誘導性多潛能性幹細胞(induced pluripotent stem cell；iPS細胞)等多潛能性幹細胞是具有無限增殖能力，及對於各種組織細胞的多分化能力的細胞。誘導性多潛能性幹細胞被期待利用其性質而應用於再生醫療，其實現必須確立高品質的細胞凍結技術，亦即必須確立保障凍結後的高細胞生存率或未分化性的細胞

2021 年 8 月 26 日訂正替換頁

凍結技術。

【0004】 細胞的凍結保存方法一般大致區分為緩慢凍結法及急速凍結法(玻璃化凍結法)。緩慢凍結法是於凍結保存液中懸浮細胞，以1分鐘1℃的程度逐漸降低溫度來逐漸凍結的方法，其中前述凍結保存液包含甘油、DMSO、角蛋白水解物、水解明膠、血清、血清白蛋白等來作為凍結保護劑(專利文獻1～5)。藉由緩慢冷卻，將細胞內的水分子與凍結保護劑置換、脫水，抑制細胞內或細胞周邊部的冰晶成長，防止細胞膜及細胞內構造損傷，或蛋白質變性及切斷(非專利文獻1)。近來已知除了凍結保存胚胎的情況以外，凍結一般細胞時，即便不使用程式降溫儀嚴密控制溫度調節，仍可使用發泡苯乙烯箱或市售的細胞凍結盒來緩慢凍結。由於該類方法簡便，因此亦稱為簡易緩慢凍結法，在研究室或細胞庫等受到廣泛採用。

【0005】 另，玻璃化凍結法是藉由急速冷卻來凍結為玻璃狀，以抑制凍結造成細胞內外生成冰晶的方法。玻璃化凍結法從1937年報告後，需要漫長期間進行技術開發，以達到實用化，於1985年開發了使用玻璃化保存液的方法，該玻璃化保存液包含由高濃度的DMSO、乙醯胺、丙二醇及聚乙二醇所組成的凍結保護劑。由於該方法的開發，實現了小鼠初期胚胎的凍結保存、或以緩慢凍結法難以達成的牛胚胎或豬胚胎的凍結保存。現在以胚胎庫為首的許多機關均採用玻璃化凍結法。

【0006】 近來盛行開發人類ES細胞或iPS細胞的凍結保存液，或改良凍結保存方法。已揭示了例如若於包含5%DMSO、10%胎牛血清(Fetal bovine serum；FBS)及10%乙二醇(EG)的凍結保存液中，懸浮人類ES細胞，並利用簡易緩慢凍結法來凍結保存，則融解後的細胞生存率會升高(非專利文獻

2021 年 8 月 26 日訂正替換頁

2)。又，於凍結保存液(STEM-CELLBANKER[日本全藥工業社製])中懸浮人類ES細胞或iPS細胞，並利用簡易緩慢凍結法來凍結保存，則融解後的細胞生存率會升高(非專利文獻3)。

先行技術文獻

專利文獻

【0007】 [專利文獻1]國際公開第2003/064634號手冊

[專利文獻2]日本特開平6-46840號公報

[專利文獻3]日本特開平7-255469號公報

[專利文獻4]日本特開平8-325101號公報

[專利文獻5]日本特開2002-233356號公報

非專利文獻

【0008】 [非專利文獻1]J. R. Dobrinsky, Theriogenology, 45, 17-26 (1996)

[非專利文獻2]Y. S. Ha et al., Human Reprod., 20, 1779-1785 (2005)

[非專利文獻3]F. Holm et al., Human Reprod., 25, 1271-1279 (2010)

【發明內容】

發明所欲解決之問題

【0009】 本發明的課題在於提供一種凍結保存哺乳動物細胞，並於融解後可有效抑制細胞死亡的哺乳動物細胞凍結保存液及哺乳動物細胞投予用液，或使用該細胞凍結保存液的哺乳動物細胞的凍結保存方法。

解決問題之技術手段

【0010】 本發明人為了解決上述課題而銳意累積研究，發現若於等

2021 年 8 月 26 日訂正替換頁

張液添加DMSO或甘油，並進一步分別以2.0～6.0(w/v)%及4.0～7.0(w/v)%添加海藻糖類及葡聚糖類而製成溶液，於該溶液中凍結保存哺乳動物細胞，則可有效抑制融解後的細胞死亡，終至完成本發明。

【0011】 亦即，本發明如下。

[1]一種哺乳動物細胞凍結保存液，其特徵為：由包含2.0～6.0(w/v)%的海藻糖或其衍生物、或者前述海藻糖或其衍生物的鹽類，4.0～7.0(w/v)%的葡聚糖或其衍生物、或者前述葡聚糖或其衍生物的鹽類，及DMSO或甘油的等張液所組成。

[2]如上述[1]所記載的哺乳動物細胞凍結保存液，其特徵為：哺乳動物細胞為哺乳動物間質幹細胞。

[3]如上述[2]所記載的哺乳動物細胞凍結保存液，其特徵為：哺乳動物間質幹細胞為人類脂肪間質幹細胞。

[4]如上述[1]～[3]中任一項所記載的哺乳動物細胞凍結保存液，其特徵為：DMSO或甘油為1.0～15(v/v)%的DMSO。

[5]如上述[1]～[4]中任一項所記載的哺乳動物細胞凍結保存液，其特徵為：等張液為乳酸林格氏液。

[6]一種哺乳動物細胞投予用液，其特徵為：由如上述[1]～[5]中任一項所記載的哺乳動物細胞凍結保存液所組成。

[7]如上述[6]所記載的之哺乳動物細胞投予用液，其特徵為：哺乳動物細胞為哺乳動物間質幹細胞。

[8]如上述[7]所記載的之哺乳動物細胞投予用液，其特徵為：哺乳動物間質幹細胞為人類脂肪間質幹細胞。

2021 年 8 月 26 日訂正替換頁

[9]一種哺乳動物細胞的凍結保存方法，其特徵為：具備於上述[1]至[5]中任一項所記載的哺乳動物細胞凍結保存液中，凍結保存哺乳動物細胞的步驟。

[10]如上述[9]所記載的凍結保存方法，其特徵為：哺乳動物細胞為哺乳動物間質幹細胞。

[11]如上述[10]所記載的凍結保存方法，其特徵為：哺乳動物間質幹細胞為人類脂肪間質幹細胞。

【0012】 本發明其他的實施形態可舉出：為了凍結保存哺乳動物細胞之海藻糖類、葡聚糖類、DMSO或甘油、及等張液的組合；或為了調製哺乳動物細胞凍結保存液之海藻糖類、葡聚糖類、DMSO或甘油、及等張液的組合。

發明之效果

【0013】 藉由本發明，相較於以往的哺乳動物細胞凍結保存液，可有效抑制將凍結保存的哺乳動物細胞融解時的細胞死亡，因此可提供再生醫療優質的移植用細胞含有液。

【實施方式】

用以實施發明之形態

【0014】 本發明的哺乳動物細胞凍結保存液限定於「用以凍結保存哺乳動物細胞」的用途，由包含海藻糖類、葡聚糖類、及DMSO及/或甘油的等張液(以下有時稱為「本件凍結保存液」)組成。

【0015】 上述等張液若是藉由鈉離子、鉀離子、鈣離子等，調整過鹽濃度或糖濃度等，以便與體液或細胞液的滲透壓大致相同的等張液均

2021 年 8 月 26 日訂正替換頁

可，未特別限制，具體而言可舉出生理食鹽水、或具緩衝效果的生理食鹽水(磷酸緩衝生理食鹽水[Phosphate buffered saline；PBS]、三緩衝生理食鹽水[Tris Buffered Saline；TBS]、HEPE緩衝生理食鹽水等)、林格氏液、乳酸林格氏液、醋酸林格氏液、碳酸氫鈉林格氏液、5%葡萄糖水溶液、動物細胞培養用基礎培養基(DMEM、EMEM、RPMI-1640、 α -MEM、F-12、F-10、M-199等)、等張劑(葡萄糖、D-山梨糖醇、D-甘露醇、乳糖、氯化鈉等)等，該類等張液之中尤以乳酸林格氏液較適宜。等張液為市售等張液或自製等張液均可。市售等張液可舉出大塚生食注(大塚製藥工廠製)(生理食鹽液)、林格氏液「OTSUKA」(大塚製藥工廠製)(林格氏液)、Lactec(註冊商標)注(大塚製藥工廠製)(乳酸林格氏液)、乳酸林格氏液「KS」(共立製藥製)(乳酸林格氏液)、Veen-F輸液(興和創藥製)(醋酸林格氏液)、大塚糖液5%(大塚製藥工廠製)(5%葡萄糖水溶液)、BICANATE輸液(大塚製藥工廠製)(碳酸氫鈉林格氏液)。於本說明書，「等張」是意味滲透壓在250~380mOsm/L的範圍內。

【0016】 上述海藻糖類的海藻糖除了2個 α -葡萄糖形成1,1-糖苷鍵的雙糖類 α,α -海藻糖以外，還可舉出 α -葡萄糖與 β -葡萄糖形成1,1-糖苷鍵的雙糖類 α,β -海藻糖，或2個 β -葡萄糖形成1,1-糖苷鍵的雙糖類 β,β -海藻糖。該類海藻糖之中尤以 α,α -海藻糖較適宜。該類海藻糖可藉由利用化學合成、微生物的生產、利用酵素的生產等任一習知的方法來製造，或亦可使用市售品。可舉出例如 α,α -海藻糖(林原股份有限公司製)、 α,α -海藻糖(和光純藥製)等市售品。

【0017】 上述海藻糖類的海藻糖衍生物若是於雙糖類的海藻糖，結合了1或複數個糖單位的糖苷海藻糖類均可，未特別限制，糖苷海藻糖類包

2021年8月26日訂正替換頁

含糖苷海藻糖、麥芽糖基海藻糖、麥芽三糖基海藻糖等。

【0018】 上述海藻糖類的海藻糖或其衍生物的鹽類可舉出例如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽、磷酸鹽、硝酸鹽、硫酸鹽、醋酸鹽、丙酸鹽、甲苯磺酸鹽、琥珀酸鹽、草酸鹽、乳酸鹽、酒石酸鹽、乙醇酸鹽、甲磺酸鹽、丁酸鹽、戊酸鹽、檸檬酸鹽、反丁烯二酸鹽、順丁烯二酸鹽、蘋果酸鹽等酸附加鹽，或鈉鹽、鉀鹽、鈣鹽等金屬鹽，或銨鹽、烷基銨鹽等。再者，該等鹽類在使用時是作為溶液使用，以其作用與使用海藻糖時相同效果的鹽類為宜。該等鹽類可形成水合物或溶劑合物，或者亦可單獨使用任一者，或適當組合2種以上來使用。

【0019】 上述葡聚糖類的葡聚糖是由D-葡萄糖所組成的多糖 $(C_6H_{10}O_5)_n$ ，若以 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 鍵為主鏈均可，未特別限制，葡聚糖的重量平均分子量(Mw)可舉出例如葡聚糖40(Mw=40000)、葡聚糖70(Mw=70000)等。該等葡聚糖可藉由利用化學合成、微生物的生產、利用酵素的生產等任一習知的方法來製造，或亦可使用市售品。可舉出例如葡聚糖40(東京化成工業製)、葡聚糖70(東京化成工業製)等市售品。

【0020】 上述葡聚糖類的葡聚糖衍生物包含葡聚糖硫酸、羧化葡聚糖、二乙胺基乙基(DEAE)-葡聚糖等。

【0021】 上述葡聚糖類的葡聚糖或其衍生物的鹽類可舉出例如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽、磷酸鹽、硝酸鹽、硫酸鹽、醋酸鹽、丙酸鹽、甲苯磺酸鹽、琥珀酸鹽、草酸鹽、乳酸鹽、酒石酸鹽、乙醇酸鹽、甲磺酸鹽、丁酸鹽、戊酸鹽、檸檬酸鹽、反丁烯二酸鹽、順丁烯二酸鹽、蘋果酸鹽等酸附加鹽，或鈉鹽、鉀鹽、鈣鹽等金屬鹽，或銨鹽、烷基銨鹽等。再

2021 年 8 月 26 日訂正替換頁

者，該等鹽類在使用時是作為溶液使用，以其作用與使用葡聚糖時相同效果的鹽類為宜。該等鹽類可形成水合物或溶劑合物，或者亦可單獨使用任一者，或適當組合2種以上來使用。

【0022】 本件凍結保存液中的海藻糖的濃度若在2.0～6.0(w/v)%的範圍內即可，可舉出例如2.0～5.6(w/v)%、2.0～5.2(w/v)%、2.0～4.8(w/v)%、2.0～4.4(w/v)%、2.0～4.0(w/v)%、2.0～3.6(w/v)%、2.0～3.2(w/v)%、2.0～3.0(w/v)%、2.4～6.0(w/v)%、2.8～6.0(w/v)%、3.2～6.0(w/v)%、3.6～6.0(w/v)%、4.0～6.0(w/v)%、4.4～6.0(w/v)%、4.8～6.0(w/v)%、5.0～6.0(w/v)%、2.4～6.0(w/v)%、2.4～5.6(w/v)%、2.4～5.2(w/v)%、2.4～4.8(w/v)%、2.4～4.4(w/v)%、2.4～4.0(w/v)%、2.4～3.6(w/v)%、2.4～3.2(w/v)%、2.4～3.0(w/v)%，宜為2.4～3.0(w/v)%。

【0023】 本件凍結保存液中的葡聚糖的濃度若在4.0～7.0(w/v)%的範圍內即可，可舉出例如4.0～6.6(w/v)%、4.0～6.2(w/v)%、4.0～5.8(w/v)%、4.0～5.4(w/v)%、4.0～5.0(w/v)%、4.4～7.0(w/v)%、4.8～7.0(w/v)%、5.2～7.0(w/v)%、5.6～7.0(w/v)%、6.0～7.0(w/v)%，宜為4.0～5.0(w/v)%。

【0024】 本件凍結保存液中的DMSO的濃度一般為0.1(v/v)%以上，宜為0.3(v/v)%以上，更宜為0.6(v/v)%以上，進而宜為1.0(v/v)%以上，又，從避免細胞毒性的觀點考量，一般為30(v/v)%以下，宜為25(v/v)%以下，更宜為20(v/v)%以下，進而宜為15(v/v)%以下。因此，本件凍結保存液中的DMSO的濃度一般為0.1～30(v/v)%的範圍內，宜為0.3～25(v/v)%，更宜為0.6～20(v/v)%，進而宜為1.0～15(v/v)%。DMSO可藉由化學合成來製造，但亦可使用市售品。可舉出例如和光純藥工業製、Nacalai Tesque製等之市

2021 年 8 月 26 日訂正替換頁

售品。

【0025】 本件凍結保存液中的甘油的濃度一般為0.1(v/v)%以上，宜為0.3(v/v)%以上，更宜為0.6(v/v)%以上，進而宜為1.0(v/v)%以上，又，從本件凍結保存液調製的容易度考量，一般為50(v/v)%以下，宜為40(v/v)%以下，更宜為30(v/v)%以下，進而宜為20(v/v)%以下。因此，本件凍結保存液中的甘油的濃度一般為0.1~50(v/v)%的範圍內，宜為0.3~45(v/v)%，更宜為0.6~30(v/v)%，進而宜為1.0~20(v/v)%。甘油可藉由化學合成來製造，但亦可使用市售品。可舉出例如和光純藥工業製、Nacalai Tesque製等之市售品。

【0026】 作為凍結保存哺乳動物細胞，抑制其後融解時的細胞死亡的有效成分(凍結保護成分)，本件凍結保存液包含海藻糖類、葡聚糖類、及DMSO及/或甘油(以下有時將該等成分總稱為「本件凍結保護成分」)。本件凍結保存液可利用台盼藍(Trypan Blue)染色法、TUNEL法、Nexin法、FLICA法等可檢測細胞死亡的習知方法，來確認可凍結保存哺乳動物細胞，抑制其後融解時的細胞死亡。

【0027】 本件凍結保存液的任意成分可舉出本件凍結保護成分以外的凍結保護成分(例如乙二醇、丙二醇、聚乙二醇、絲膠、異麥芽寡糖)、等張劑(例如葡萄糖、D-山梨醇、D-甘露醇、乳糖、氯化鈉等)、螯合劑(例如EDTA、EGTA、檸檬酸、柳酸酯)、溶解輔助劑、保存劑、抗氧化劑、胺基酸(例如脯胺酸、麩胺酸)等。於本說明書，「任意成分」意味包含或不包含均可的成分。

又，本件凍結保存液不包含來自人類、牛等的血清或血清來源成分(例

2021 年 8 月 26 日訂正替換頁

如白蛋白)。

【0028】 本發明的哺乳動物細胞投予用液是限定於「用以將哺乳動物細胞投予哺乳動物」的用途的本件凍結保存液，亦即限定於「用以凍結保存哺乳動物細胞」及「用以將哺乳動物細胞投予哺乳動物」的用途，包含海藻糖類、葡聚糖類及DMSO及/或甘油的等張液。本件凍結保存液(較宜幾乎不含或完全不含上述血清或血清來源成分)即使直接對哺乳動物投予(例如靜脈投予)，仍不會對哺乳動物的活體造成不良影響。因此，本件凍結保存液(較宜幾乎不含或完全不含上述血清或血清來源成分)有利作為「用以凍結保存哺乳動物細胞，於融解後，將哺乳動物細胞投予哺乳動物(例如靜脈投予)」的液體使用。

【0029】 本發明的哺乳動物細胞的凍結保存方法若具備於本件凍結保存液中，凍結保存哺乳動物細胞的步驟，亦即具備將含有哺乳動物細胞的本件凍結保存液予以凍結保存的步驟均可，未特別限制，緩慢凍結法或急速凍結法(玻璃化凍結法)均可。該緩慢凍結法可舉出例如於低溫降溫儀或超低溫降溫儀(一般為 -20°C ～ -150°C 的範圍內)，凍結含有哺乳動物細胞的本件凍結保存液，其後於液體氮(一般為 -150°C ～ -196°C 的範圍內)中保存的方法。上述急速凍結法可舉出例如於本件凍結保存液中懸浮哺乳動物細胞，因應需要移至吸管内，於液體氮(一般為 -150°C ～ -196°C 的範圍內)中急速冷凍、保存的方法。凍結保存哺乳動物細胞，其後融解時的細胞生存率，有時依哺乳動物細胞的種類而不同。因此，宜因應凍結保存對象的細胞，選擇凍結融解後的細胞生存率較高的凍結保存方法。

【0030】 上述哺乳動物細胞除了再生醫療等經由血管投予的哺乳動

2021年8月26日訂正替換頁

物幹細胞以外，還可例示對I型糖尿病患者經靜脈投予的哺乳動物的胰臟細胞、對癌症患者經靜脈投予的哺乳動物的樹狀細胞、自然殺手細胞、alpha/beta($\alpha\beta$)T細胞、gamma/delta($\gamma\delta$)T細胞、細胞毒性T細胞(cytotoxic T lymphocyte；CTL)等。於本說明書，哺乳動物可例示：小鼠、大鼠、倉鼠、天竺鼠等齧齒類；兔等兔形目；豬、牛、山羊、馬、綿羊等有蹄目；狗、貓等貓目；人類、猴、恆河猴、食蟹獼猴、狨猿、猩猩、黑猩猩等靈長類等，其中尤其適宜例示小鼠、豬、人類。

【0031】 又，上述「幹細胞」意味具有自我複製能力及分化・增殖能力的未成熟細胞。依分化能力，幹細胞包含多潛能性幹細胞(pluripotent stem cell)、複能性幹細胞(multipotent stem cell)、單能性幹細胞(unipotent stem cell)等亞集團。多潛能性幹細胞意味其本身無法成為個體，但具有可分化為構成活體的所有組織或細胞的能力的細胞。複能性幹細胞意味無法分化為所有種能，但具有可分化為複數種組織或細胞的能力的細胞。單能性幹細胞意味具有可分化為特定組織或細胞的能力的細胞。

【0032】 多潛能性幹細胞可舉出胚胎幹細胞(ES細胞)、EG細胞、iPS細胞等。ES細胞可藉由於餵養細胞上或於包含LIF的培養基中，培養內部細胞塊來製造。ES細胞的製造方法記載於例如WO96/22362、WO02/101057、US5,843,780、US6,200,806、US6,280,718等。EG細胞可藉由於包含mSCF、LIF及bFGF的培養基中，培養原始生殖細胞來製造(Ce11,70:841-847,1992)。iPS細胞可藉由於體細胞(例如纖維母細胞、皮膚細胞等)，導入Oct3/4、Sox2及Klf4(因應需要進一步導入c-Myc或n-Myc)等重新編程因子來製造(Ce11,126:p.663-676,2006；Nature,448:p.313-317,2007；Nat Biotechnol,26；

2021 年 8 月 26 日訂正替換頁

p,101-106,2008 ; Cell 131:p.861-872,2007 ; Science,318:p.1917-1920,2007 ; Cell Stem Cells 1:p.55-70,2007 ; Nat Biotechnol,25:p.1177-1181,2007 ; Nature,448:p.318-324,2007 ; Cell Stem Cells 2:p.10-12,2008 ; Nature451:p.141-146,2008 ; Science,318:p.1917-1920,2007)。又，將體細胞核進行核移植而製作早期胚胎，藉由培養該早期胚胎所建立的幹細胞亦適宜作為多潛能性幹細胞。(Nature,385,810(1997); Science,280,1256(1998); Nature Biotechnology,17,456(1999) ; Nature,394,369(1998) ; Nature Genetics,22,127(1999) ; Proc.Natl. Acad.Sci.USA,96,14984(1999))、Rideout III(Nature Genetics,24,109(2000))。

【0033】 複能性幹細胞可舉出：可分化成脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞等細胞之間質幹細胞；可分化成白血球、紅血球、血小板等血球系細胞的造血系幹細胞；可分化成神經元、星狀細胞、寡樹突膠細胞等細胞的神經系統幹細胞；骨髓幹細胞、生殖幹細胞等體幹細胞等。複能性幹細胞較宜為間質幹細胞。間質幹細胞意味可分化為骨母細胞、軟骨母細胞及脂肪母細胞中之所有或數種細胞的幹細胞。複能性幹細胞本身藉由習知的方法從活體單獨分離出來。例如間質幹細胞可從哺乳動物的骨髓、脂肪組織、末梢血、臍帶血等，以習知的一般方法來抽取。又，藉由將骨髓穿刺後的造血幹細胞等予以培養、繼代，可單獨分離出人類間質幹細胞(Journal of Autoimmunity,30(2008)163-171)。複能性幹細胞亦可藉由在適當的誘導條件下，培養上述多潛能性幹細胞來取得。間質幹細胞較宜為來自人類脂肪的間質幹細胞。

【0034】 保存於本件凍結保存液中的哺乳動物細胞，可例示附著性

2021年8月26日訂正替換頁

的細胞。本說明書中，「附著性細胞」意味藉由黏著於基材而可生存、增殖、進行物質生產的基材依附性細胞。附著性幹細胞可舉出多潛能性幹細胞、間質幹細胞、神經系統幹細胞、骨髓幹細胞、生殖幹細胞等。附著性幹細胞較宜為間質幹細胞。

【0035】 保存於本件凍結保存液中的哺乳動物細胞(集團)從活體內分離，或在活體內經繼代培養均可，但以單獨分離或精製為宜。本說明書中，「單獨分離或精製」意味施以去除目標成分以外的成分的操作。單獨分離或精製的哺乳動物細胞的純度(哺乳動物幹細胞的目標細胞相對於全細胞數的比率)一般為30%以上，較宜為50%以上，更宜為70%以上，進而宜為90%以上(例如100%)。

【0036】 保存於本件凍結保存液中的哺乳動物細胞(集團)宜為單一細胞(single cell)狀態。於本說明書，「單一細胞的狀態」意味未與其他細胞聚集而成塊(亦即未凝集的狀態)。單一細胞狀態的哺乳動物細胞可藉由以胰蛋白酵素/EDTA，將活體內培養的哺乳動物細胞進行酵素處理後，藉由移液或放液等該當技術領域中習知的方法，將細胞懸浮來調製。哺乳動物細胞中所含單一細胞狀態的哺乳動物細胞的比率，一般為70%以上，較宜為90%以上，更宜為95%以上，進而宜為99%以上(例如100%)。單一細胞狀態的細胞的比率可藉由將哺乳動物細胞分散於PBS，於顯微鏡下觀察，針對隨意選擇的複數個(例如1000個)細胞，調查有無凝集來決定。

【0037】 以下藉由實施例來更具體說明本發明，但本發明的技術範圍不受到該等例示所限定。再者，於以下實施例，為了方便有時將包含3(w/v)%海藻糖及5(w/v)%葡聚糖40的乳酸林格氏液稱為「TDR液」。

2021 年 8 月 26 日訂正替換頁

[實施例1]

【0038】 1.確認本件凍結保存液作為哺乳動物細胞凍結保存液有用

為了確認本件凍結保存液作為哺乳動物細胞凍結保存液有用，於DMSO或甘油、與TDR液的混合液中，凍結保存哺乳動物細胞，分析融解後的細胞生存率。

1-1材料及方法

[哺乳動物細胞]

試驗採用以下表1所記載的人類脂肪來源間質幹細胞(hAD-MSC；Human Adipose derived Mesenchymal Stem Cell)。

【0039】 [表1]

施體年齡、性別、來源	38 歲、女性、脂肪
施體數	1
批號	0000421627
進料時的繼代次數	1 次
保存方法	保存於液體氮中
供給源	Lonza Walkersville
代理商	LONZA Japan

【0040】 [TDR液]

TDR液是使用海藻糖(林原股份有限公司製)、低分子葡聚糖L注(10[w/v]%葡聚糖含有Lactec注)(大塚製藥工廠製)及Lactec注(大塚製藥工廠製)。

【0041】 [哺乳動物細胞培養]

2021 年 8 月 26 日訂正替換頁

hAD-MSC按照既定方法培養。亦即，將hAD-MSC放入添加有包含人類脂肪來源幹細胞添加因子套裝(Lonza Walkersville 製，PT-4503)之ADSC-BM(Adipose Derived Stem Cell Basal Medium)(Lonza Walkersville 製，PT-3273)(以下僅稱為「培養液」)的75cm²燒瓶，於CO₂恆溫箱(37℃條件下)進行繼代培養。又，每3天進行培養液交換。

【0042】 [哺乳動物細胞含有凍結保存液的調製及凍結]

哺乳動物細胞含有凍結保存液的調製及凍結是按照以下[1]～[12]的程序來進行。

[1]將個人恆溫箱預先加溫至37±2℃。

[2]將培養有hAD-MSC的75cm²燒瓶從CO₂恆溫箱取出。

[3]於倒立顯微鏡下觀察細胞狀態，使用約90%(80～100%)匯合的細胞。

[4]吸取培養液，於各75cm²燒瓶分別添加8mL的PBS(-)。

[5]吸取PBS(-)後，於燒瓶各添加4mL的胰蛋白酵素/EDTA(CC-5012，Lonza Walkersville製)，以個人恆溫箱，在37±2℃的條件下孵育5分鐘。

[6]於倒立顯微鏡下觀察，直到細胞剝離至90%程度，緩慢搖晃。

[7]各加入8mL的胰蛋白酵素中和液(TNS；CC-5002，Lonza Walkersville製)，以使胰蛋白酵素反應停止，藉由移液剝離細胞，並移至50mL的離心管。

[8]離心(離心機設定條件：210×g，離心時間5分鐘，20℃)處理後，去除上澄液，添加定量(各75cm²燒瓶添加2mL)的PBS(-)，懸浮細胞。

[9]從細胞懸浮液分取一部分(20μL)，與20μL的台盼藍染色液(Gibco製)混合，以細胞計數盤記測全細胞數及死細胞數。

再者，記測細胞數是利用細胞計數盤之1處細胞計數部四角的細胞計數室區

2021 年 8 月 26 日訂正替換頁

的合計細胞數。

[10]使用Finnpipette(100-1000 μ L)，於15mL澄清聚丙烯離心管，將剩餘的細胞懸浮液各分注定量，以210 $\times$ g、5分鐘、25 $^{\circ}$ C進行離心處理。

[11]去除上澄液，於各種細胞凍結保存液(包含0、0.5、1.0、2.0、5.0或10(v/v)%DMSO(和光純藥工業製)，或10(v/v)%甘油(和光純藥工業製)的TDR液，或者STEM-CELLBANKER[日本全藥工業製])中懸浮細胞，以成為 3.0×10^6 細胞/mL。

[12]於專用的小玻璃瓶，各分注1mL的細胞懸浮液，放入BICELL凍結處理容器(Nihonfreezer製)，以-80 $^{\circ}$ C凍結細胞(3小時以上)，其後迅速移至液體氮槽。

【0043】 [評估法]

將哺乳動物細胞含有凍結保存液予以凍結融解後，按照以下程序[1]～[6]進行生細胞率及細胞增殖率的評估。

[1]將恆溫槽設定在37 $^{\circ}$ C，預先加溫。

[2]於培養所需個數的75cm²燒瓶，添加培養液，於CO₂恆溫箱內靜置30分鐘以上，使其平衡化。

[3]從液體氮槽取出包含凍結細胞的小玻璃瓶，迅速移至設定為37 $^{\circ}$ C的恆溫槽，輕輕攪拌使其融解。

[4]緩慢攪拌(5次移液)，於細胞懸浮的狀態下，將其一部分(20 μ L)分取至預先添加有台盼藍染色液20 μ L之1.5mL微量試管。將與台盼藍染色液混合的細胞懸浮液，分取至細胞計數盤，記測全細胞數及台盼藍陽性細胞(死細胞)數，藉此算出剛凍結融解後的細胞生存率(表2[n=1]及表4[n=3])。

2021年8月26日訂正替換頁

[5]使用剩餘的細胞懸浮液，於包含預先準備的培養液的75cm²燒瓶播種，使其成為 3.0×10^6 細胞/mL，於CO₂恆溫箱內培養。又，剩餘的一部分細胞懸浮液以25℃靜置6小時及24小時後，按照上述[哺乳動物細胞含有凍結保存液的調製及凍結]項目所記載的程序[9]，記測全細胞數及死細胞數，藉此算出凍結融解後以25℃靜置6小時及24小時之細胞生存率(表5[n=3]及表6[n=3])。

[6]於培養後第1、3、5及7天，按照上述[哺乳動物細胞含有凍結保存液的調製及凍結]項目所記載的程序[1]～[9]，回收細胞，記測全細胞數，藉此算出凍結融解後培養1、3、5及7天時的細胞增加率(表3[n=2]及表7[n=3])。

【0044】 1-2結果

首先，檢討添加於TDR液之DMSO的濃度。其結果，若於包含1.0～10%的DMSO的TDR液中凍結保存細胞，則剛融解後的細胞生存率(表2)或細胞增殖率(表3)均高。根據該結果，於以下實驗中，將添加於TDR液之DMSO的濃度固定在10%。

【0045】 接著，與既有的細胞凍結保存液STEM-CELLBANKER(日本全藥工業社製)進行比較實驗。其結果，於包含10%DMSO的TDR液中凍結保存細胞時，剛融解後的細胞生存率會與STEM-CELLBANKER顯示相同層級的高生存率值(表4)。又，凍結融解後以25℃靜置6小時及24小時之細胞生存率，於包含10%DMSO的TDR液中凍結保存細胞，會比於STEM-CELLBANKER中凍結保存細胞時高(表5及表6)。進而言之，使用以甘油取代DMSO而添加於TDR液的細胞凍結保存液時，亦得到相同的效果(表5及6)。再者，將DMSO或甘油混合於TDR液後，海藻糖濃度為2.7%，葡聚糖濃度為4.5%。另，於包含10%DMSO或10%甘油的TDR液中凍結保存細胞

2021 年 8 月 26 日訂正替換頁

胞時的細胞增殖效率，會與STEM-CELLBANKER顯示相同層級的高增殖效率值(表7)。

以上結果表示若於包含2.7%前後(2.0~6.0%)的海藻糖及4.5%前後(4.0~7.0%)的葡聚糖、及DMSO或甘油的等張液中，凍結保存哺乳動物細胞，可獲得與使用既有的哺乳動物細胞凍結保存液(STEM-CELLBANKER)時相同程度的增殖效率，並且就凍結融解後的細胞生存率而言，比使用既有的哺乳動物細胞凍結保存液(STEM-CELLBANKER)時高，得到優異的效果。

【0046】 [表2]

DMSO 濃度(%)	生存率(%)
0	81
0.5	89
1.0	91
2.0	96
5.0	96
10	95

【0047】 [表3]

	DMSO 濃度 (%)	0	0.5	1.0	2.0	5.0	10
剛融解後		100	100	100	100	100	100
第 5 天	第 1 次	260	270	395	346	389	294
	第 2 次	162	273	358	364	348	371
	平均	211	272	376	355	369	332

表中的數值(細胞數)是就以各濃度的DMSO保存的細胞，將剛(凍結)融解後的細胞數設為100時的相對值。

【0048】 [表4]

	STEM-CELLBANKER	10%DMSO 含有 TDR 液	10%甘油含有 TDR 液
第 1 次	89	99	97
第 2 次	96	97	98
第 3 次	93	97	94

2021 年 8 月 26 日訂正替換頁

平均	93	98	97
標準差(SD)	4	1	2

表中的數值表示剛凍結融解後的細胞生存率(%)。

【0049】 [表5]

	STEM-CELLBANKER	10%DMSO 含有 TDR 液	10%甘油含有 TDR 液
第 1 次	82	98	98
第 2 次	88	98	99
第 3 次	92	95	96
平均	87	97	97
標準差(SD)	5	1	2

表中的數值表示凍結融解後以25℃靜置6小時的細胞生存率(%)。

【0050】 [表6]

	STEM-CELLBANKER	10%DMSO 含有 TDR 液	10%甘油含有 TDR 液
第 1 次	81	96	93
第 2 次	82	94	91
第 3 次	86	95	95
平均	83	95	93
標準差(SD)	3	1	2

表中的數值表示凍結融解後以25℃靜置24小時的細胞生存率(%)。

【0051】 [表7]

細胞凍結保存液	播種時	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
STEM-CELLBANKER	100	121±37	337±50	504±82	701±117
10%DMSO 含有 TDR 液	100	137±6	419±81	568±109	798±125
10%甘油含有 TDR 液	100	98±15	293±22	398±87	576±59

表中的數值(細胞數)是就以各種細胞凍結保存液，將播種時(剛凍結融解後)的細胞數設為100時的相對值。又，第1天～第7天的值為平均值±標準差(SD)。

2021 年 8 月 26 日訂正替換頁

[實施例2]

【0052】 2.併用海藻糖及葡聚糖的凍結保護效果，以及哺乳動物細胞凍結保存液中的海藻糖及葡聚糖濃度的檢討

為了檢討併用海藻糖及葡聚糖的凍結保護效果，以及哺乳動物細胞凍結保存液中的海藻糖及葡聚糖濃度，按照實施例1所記載的方法，來調製3%的海藻糖、及包含0～10%的葡聚糖的乳酸林格氏液、與10%的DMSO的混合液(表8)，或0～10%的海藻糖、及包含5%的葡聚糖的乳酸林格氏液、與10%的DMSO的混合液(表9)，於該等混合液中，凍結保存hAD-MSC，算出融解後的細胞生存率(表8及9)。

其結果顯示併用海藻糖及葡聚糖比單獨使用海藻糖或葡聚糖時，凍結融解後的細胞生存率變高。又，顯示若海藻糖及葡聚糖的濃度分別至少有0.9%，則9成以上的細胞會生存(表8及9)。

【0053】 [表8]

海藻糖濃度	葡聚糖濃度	生存率
3.0(2.7)	0(0)	83.8±4.0
	0.5(0.45)	87.3±1.4
	1.0(0.9)	91.0±3.0
	3.0(2.7)	93.8±1.5
	5.0(4.5)	91.2±3.4
	7.0(6.3)	93.7±3.5
	10(9.0)	96.4±2.7

表中的海藻糖及葡聚糖的濃度表示DMSO混合前的濃度(%），於括弧內表示DMSO混合後的濃度(%）。又，表中的生存率表示剛凍結融解後的細胞生存率(平均值±標準差[SD]，n=3)(%)。

【0054】 [表9]

葡聚糖濃度	海藻糖濃度	生存率
-------	-------	-----

2021 年 8 月 26 日訂正替換頁

5.0(4.5)	0(0)	85.3±3.7
	0.5(0.45)	83.9±5.6
	1.0(0.9)	90.1±6.7
	3.0(2.7)	96.5±1.4
	5.0(4.5)	94.9±1.3
	7.0(6.3)	94.3±1.4
	10(9.0)	91.5±2.5

表中的海藻糖及葡聚糖的濃度表示DMSO混合前的濃度(%), 於括弧內表示DMSO混合後的濃度(%)。又, 表中的生存率表示剛凍結融解後的細胞生存率(平均值±標準差[SD], n=3)(%)。

產業上之可利用性

【0055】 依據本發明, 可有效抑制將凍結保存的哺乳動物細胞融解時的細胞死亡, 因此在再生醫療等之移植醫療領域或癌症治療領域甚為有用。

2021年8月26日訂正替換頁

申請專利範圍

1. 一種哺乳動物細胞凍結保存液，其特徵為：由包含2.0～6.0(w/v)%的海藻糖或其衍生物、或者前述海藻糖或其衍生物的鹽類，4.0～7.0(w/v)%的葡聚糖或其衍生物、或者前述葡聚糖或其衍生物的鹽類，及二甲基亞砷或甘油的等張液所組成。
2. 如請求項1之哺乳動物細胞凍結保存液，其中哺乳動物細胞為哺乳動物間質幹細胞。
3. 如請求項2之哺乳動物細胞凍結保存液，其中哺乳動物間質幹細胞為人類脂肪間質幹細胞。
4. 如請求項1至3中任一項之哺乳動物細胞凍結保存液，其中二甲基亞砷或甘油為1.0～15(v/v)%的二甲基亞砷。
5. 如請求項1至4中任一項之哺乳動物細胞凍結保存液，其中等張液為乳酸林格氏液。
6. 一種哺乳動物細胞投予用液，其特徵為：由如請求項1至5中任一項之哺乳動物細胞凍結保存液所組成。
7. 如請求項6之哺乳動物細胞投予用液，其中哺乳動物細胞為哺乳動物間質幹細胞。
8. 如請求項7之哺乳動物細胞投予用液，其中哺乳動物間質幹細胞為人類脂肪間質幹細胞。
9. 一種哺乳動物細胞的凍結保存方法，其特徵為：具備於請求項1至5中任一項之哺乳動物細胞凍結保存液中，凍結保存哺乳動物細胞的步驟。

2021年8月26日訂正替換頁

- 10.如請求項9之凍結保存方法，其中哺乳動物細胞為哺乳動物間質幹細胞。
- 11.如請求項10之凍結保存方法，其中哺乳動物間質幹細胞為人類脂肪間質幹細胞。