



(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 I836505 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 03 月 21 日

(21)申請案號：111125698

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 10 月 05 日

(51)Int. Cl. : C12N5/0775 (2010.01)

A61K35/50 (2015.01)

A61K35/28 (2015.01)

(30)優先權：2016/10/05 美國

62/404,582

(71)申請人：新加坡商細胞研究私人有限公司 (新加坡) CELLRESEARCH CORPORATION PTE. LTD. (SG)

新加坡

(72)發明人：樊 東森 PHAN, TOAN-THANG (SG)

(74)代理人：鄭志玲

(56)參考文獻：

CN 105420179A

WO 2006019357A1

期刊 Van Pham, Phuc et al. "Isolation and proliferation of umbilical cord tissue derived mesenchymal stem cells for clinical applications." Cell Tissue Bank, Vol. 17, Issue 2, 17 December 2015, Pages 289-302

審查人員：王顥棟

申請專利範圍項數：37 項 圖式數：3 共 61 頁

## (54)名稱

從臍帶的羊膜分離間質幹細胞的方法、從臍帶的羊膜分離的間質幹細胞群以及用於從臍帶的羊膜分離間質幹細胞的細胞培養基

## (57)摘要

本發明涉及一種從臍帶羊膜分離間質幹細胞群的方法，該方法包括在包含 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium，達爾伯克改良伊格爾培養基)、F12 (Ham's F12 培養基)、M171(培養基 171)，以及 FBS (Fetal Bovine Serum，胎牛血清)的培養基中培養臍帶組織。本發明亦涉及一種從臍帶的羊膜分離的間質幹細胞群，其中該幹細胞群的至少約 90%或更多的細胞表現下列標記物中的每一種：CD73、CD90 以及 CD105，並缺乏表現以下標記物：CD34、CD45 以及 HLA-DR。本發明還涉及一種此間質幹細胞群的醫藥組合物。

The present invention relates to a method of isolating a mesenchymal stem cell population from the amniotic membrane of the umbilical cord, the method comprising cultivating umbilical cord tissue in a culture medium comprising DMEM (Dulbecco's modified eagle medium), F12 (Ham's F12 Medium), M171 (Medium 171) and FBS (Fetal Bovine Serum). The invention also relates to a mesenchymal stem population isolated from the amniotic membrane of the umbilical cord, wherein at least about 90 % or more cells of the stem cell population express each of the following markers: CD73, CD90 and CD105 and lack expression of the following markers: CD34, CD45 and HLA-DR. The invention also relates to a pharmaceutical composition of this mesenchymal stem population.



I836505

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 從臍帶的羊膜分離間質幹細胞的方法、從臍帶的羊膜分離的間質幹細胞群以及用於從臍帶的羊膜分離間質幹細胞的細胞培養基

【英文發明名稱】 A METHOD OF ISOLATING MESENCHYMAL STEM CELLS FROM THE AMNIOTIC MEMBRANE OF THE UMBILICAL CORD, A MESENCHYMAL STEM CELL POPULATION ISOLATED FROM THE AMNIOTIC MEMBRANE OF THE UMBILICAL CORD AND A CELL CULTURE MEDIUM FOR ISOLATING MESENCHYMAL STEM CELLS FROM THE AMNIOTIC MEMBRANE OF THE UMBILICAL CORD

【中文】本發明涉及一種從臍帶羊膜分離間質幹細胞群的方法，該方法包括在包含DMEM (Dulbecco's modified eagle medium，達爾伯克改良伊格爾培養基)、F12 (Ham's F12培養基)、M171(培養基171)，以及FBS (Fetal Bovine Serum，胎牛血清)的培養基中培養臍帶組織。本發明亦涉及一種從臍帶的羊膜分離的間質幹細胞群，其中該幹細胞群的至少約90%或更多的細胞表現下列標記物中的每一種：CD73、CD90以及CD105，並缺乏表現以下標記物：CD34、CD45以及HLA-DR。本發明還涉及一種此間質幹細胞群的醫藥組合物。

【英文】 The present invention relates to a method of isolating a mesenchymal stem cell population from the amniotic membrane of the umbilical cord, the method comprising cultivating umbilical cord tissue in a culture medium comprising DMEM (Dulbecco's modified eagle medium), F12 (Ham's F12 Medium), M171 (Medium 171)

and FBS (Fetal Bovine Serum). The invention also relates to a mesenchymal stem population isolated from the amniotic membrane of the umbilical cord, wherein at least about 90 % or more cells of the stem cell population express each of the following markers: CD73, CD90 and CD105 and lack expression of the following markers: CD34, CD45 and HLA-DR. The invention also relates to a pharmaceutical composition of this mesenchymal stem population.

【指定代表圖】 圖6c

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

## 【發明說明書】

**【中文發明名稱】** 從臍帶的羊膜分離間質幹細胞的方法、從臍帶的羊膜分離的間質幹細胞群以及用於從臍帶的羊膜分離間質幹細胞的細胞培養基

**【英文發明名稱】** A METHOD OF ISOLATING MESENCHYMAL STEM CELLS FROM THE AMNIOTIC MEMBRANE OF THE UMBILICAL CORD, A MESENCHYMAL STEM CELL POPULATION ISOLATED FROM THE AMNIOTIC MEMBRANE OF THE UMBILICAL CORD AND A CELL CULTURE MEDIUM FOR ISOLATING MESENCHYMAL STEM CELLS FROM THE AMNIOTIC MEMBRANE OF THE UMBILICAL CORD

### 【技術領域】

**【0001】** 相關申請案：本申請案主張於2016年10月5日申請之美國臨時申請案號為62/404,582的優先權權益，其內容係在此透過引用之方式為了所有目的而整體併入本文。

**【0002】** 本發明涉及一種從臍帶的羊膜中分離間質幹細胞(或幹細胞群)的方法，以及從臍帶的羊膜分離的間質幹細胞群。本發明還涉及一種用於從臍帶的羊膜分離間質幹細胞之細胞培養基。本發明亦涉及一種該分離的間質幹細胞群之醫藥組合物及用途。本發明還涉及一種治療疾病或病症之方法，包含向有需要之個體施用間質幹細胞群或含有本發明之間質幹細胞群之醫藥組合物。

### 【先前技術】

【0003】從臍帶的羊膜分離的間質幹細胞已經在美國專利申請 2006/0078993 (導致授予美國專利9,085,755與9,737,568)以及相應的國際專利申請WO2006/019357中首先被報告。自此之後，臍帶組織作為多潛能細胞之來源便受到關注；由於其廣泛的可用性，臍帶，具體而言是自臍帶羊膜中分離出的幹細胞(也稱為「臍帶幹細胞」)被認為是用於再生醫學之細胞的優良替代來源。參見 Jeschke 等人，Umbilical Cord Lining Membrane and Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: the Similarities and Differences ; The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal，2011年，第4期，第21-27頁。

【0004】隨後的研究比較了源自臍帶羊膜(臍帶內襯(CL-MSCs))、臍帶血(CB-MSCs)、胎盤(P-MSCs)，以及瓦頓氏凝膠(Wharton's jelly(WJ-MSCs))的人類間質幹細胞(MSCs)的表現型、增殖速率、遷移、免疫原性，以及免疫調節能力(Stubbendorf等人，衍生自妊娠組織的胚外人類間質基質細胞的免疫學特性，STEM CELLS AND DEVELOPMENT，第22卷，第19期，2013年，第2619-2629頁；Stubbendorf等人的結論是，胚外妊娠組織來源的MSC群顯示出不同的潛能以逃避免疫反應以及發揮免疫調節作用。該些作者還發現CL-MSCs顯示出最有希望的基於細胞的治療之潛力，雖然細胞表現出低免疫原性，但是它們也表現出增強的增殖及遷移潛能，因此將來的研究應該集中在CL-MSCs可被施用的最好的疾病模型。

【0005】儘管使用美國專利申請 2006/0078993 與國際專利申請 WO2006/019357中所述之方法可以容易地獲得羊膜的間質幹細胞，但對於這些臍帶襯膜MSC的臨床試驗而言，具有手邊可用之方法，以允許分離高度均質的這些臍帶襯膜MSC的細胞群，並且因此可用於臨床試驗仍是有利的。

【0006】 因此，本發明之目的為提供一種從臍帶羊膜中分離滿足這種需求之間質幹細胞群之方法。因此，本發明之目的亦在於提供一種從臍帶的羊膜中分離的高度均質之間質幹細胞群。

### 【發明內容】

【0007】 透過具有獨立請求項的特徵之方法、間質幹細胞群、相應的醫藥組合物以及細胞培養基來實現該目的。

【0008】 於第一方面，本發明提供一種從臍帶羊膜分離間質幹細胞群之方法，該方法包括在包含DMEM (達爾伯克改良伊格爾培養基)、F12 (Ham's F12培養基)、M171 (培養基171)以及FBS (胎牛血清)的培養基中培養臍帶組織。

【0009】 於第二方面，本發明提供一種臍帶羊膜的分離之間質幹細胞群，其中至少約90%或更多的幹細胞群的細胞表現下列標記物中的每一個：CD73、CD90以及CD105。較佳地，分離之間質幹細胞群缺乏以下標記物之表現：CD34、CD45以及HLA-DR。在該第二方面之具體實施例中，至少約91%或更多、約92%或更多、約92%或更多、約93%或更多、約94%或更多、約95%或更多、約96%或更多、約97%或更多、約98%或更多、約99%或更多的分離之間質幹細胞群的細胞表現每一個CD73、CD90以及CD105。此外，在該第二方面的這些具體實施例中，至少約91%或更多、約92%或更多、約92%或更多、約93%或更多、約94%或更多、約95%或更多、約96%或更多、約97%或更多、約98%或更多、約99%或更多的分離之間質幹細胞群的細胞較佳缺乏標記物CD34、CD45以及HLA-DR的表現。該間質幹細胞群可以透過該第一方面的的分離間質幹細胞群之方法獲得。

【0010】於第三方面，本發明提供一種含有本發明(該第二方面)的哺乳動物細胞之醫藥組合物。

【0011】於第四方面，本發明提供一種用於分離該方法的培養基之製備方法，該方法包含混合以獲得終體積為500 ml的培養基：

i. 250 ml的DMEM

ii. 118 ml的M171

iii. 118 ml的DMEM/F12

iv. 12.5 ml的胎牛血清(FBS)以獲得一終濃度為2.5% (v/v)。

【0012】於第五方面，本發明提供一種透過該第四方面之方法獲得的細胞培養基。

【0013】於第六方面，本發明提供一種從臍帶羊膜分離間質幹細胞之方法，該方法包含在透過該第四方面之方法製備的培養基中培養羊膜組織。

【0014】於第七方面，本發明提供了一種細胞培養基，包含：

- 終濃度為約55至65% (v/v)的DMEM，

- 終濃度為約5至15% (v/v)的F12，

- 終濃度約為15至30% (v/v)的M171，以及

- 終濃度為約1至8% (v/v)的FBS。

【0015】於第八方面，本發明提供一種該第七方面之細胞培養基用於從臍帶的羊膜分離間質幹細胞之用途。

【0016】於第九方面，本發明提供一種該第七方面之細胞培養基用於培養來自臍帶羊膜的間質幹細胞之用途。

**【圖式簡單說明】**

**【0017】** 當參考結合非限制性實施例與圖式時，本發明將以詳細描述而被更清楚地理解，其中：

**【0018】** 圖1所示為成分表，包括其商業供應商與在實驗部分中用於製造該培養基PTT-6的目錄型號。

**【0019】** 圖2所示為流式細胞儀實驗之結果，其中對於間質幹細胞標記物CD73、CD90以及CD105的表現，已分析了從臍帶分離的間質幹細胞。針對這些實驗，透過在三種不同的培養基中培養臍帶組織以自該臍帶組織分離間質幹細胞，接著在相應之培養基中繼代培養該間質幹細胞。在這些實驗中使用以下三種培養基：a) 90% (v/v)補充有10% FBS (v/v)的DMEM，b) 在美國專利申請2006/0078993與相應之國際專利申請WO2006/019357中描述的培養基PTT-4，其由90% (v/v) CMRL1066與10% (v/v) FBS所組成(參見WO2006/019357的第[0183]段)，以及c)本發明之培養基PPT-6其組成係在本文中描述。在該流式細胞儀分析中，針對這三種所用之培養基中的每一種，以二種不同的臍帶襯膜間質幹細胞(CLMC)群之樣品進行分析。結果如圖2a至圖2c所示。更詳細地，圖2a所示為從臍帶組織分離後並在DMEM/10% FBS中培養的分離的間質臍帶襯膜幹細胞表現幹細胞標記物CD73、CD90以及CD105之百分比，圖2b所示為從臍帶組織分離後並在PTT-4中培養的分離的間質臍帶襯膜幹細胞表現幹細胞標記物CD73、CD90以及CD105之百分比，以及圖2c所示為從臍帶組織分離後並在PTT-6中培養的分離的間質臍帶襯膜幹細胞表現幹細胞標記物CD73、CD90以及CD105之百分比。

**【0020】** 圖3所示為流式細胞儀實驗之結果，其中分析了從臍帶分離之間質幹細胞的幹細胞標記物(CD73、CD90以及CD105，CD34、CD45以及HLA-DR

(人類白細胞抗原-抗原D相關))之表現，其用於確定多能人類間質幹細胞用於細胞治療之適用性，以及與骨髓間質幹細胞表現的這些標記物進行比較。本實驗中，臍帶羊膜の間質幹細胞係透過在本發明之培養基PPT-6中培養臍帶組織以自臍帶組織中分離，而使用標準方法自人類骨髓中分離骨髓間質幹細胞。圖3a所示為自臍帶組織分離並培養於PTT-6培養基後，表現幹細胞標記物CD73、CD90與CD105以及缺乏表現CD34、CD45與HLA-DR之分離的間質臍帶襯膜幹細胞的百分比，而圖3b所示為表現CD73、CD90與CD105以及缺乏表現CD34、CD45與HLA-DR之分離的骨髓間質幹細胞的百分比。

#### 【實施方式】

【0021】 如上所述，本發明之第一方面涉及一種從臍帶的羊膜分離間質幹細胞群之方法，該方法包括在包含DMEM、F12 (Ham's F12培養基)、M171 (培養基171)以及FBS (胎牛血清)的培養基中培養臍帶組織。在本申請案中令人驚訝地發現，使用這種培養基提供了自臍帶的羊膜分離間質幹細胞群，其中超過90%，或甚至99%或更多的細胞對於三種間質幹細胞標記物CD73、CD90呈現陽性，而同時這些幹細胞缺乏CD34、CD45與HLA-DR的表現(參見實驗部分)，表示該細胞群的99%或甚至更多的細胞表現幹細胞標記物CD73、CD90以及CD105，而不表現標記物CD34、CD45與HLA-DR。這種非常均勻且明確界定的細胞群是臨床試驗與基於細胞之治療的理想候選者，因為例如它們完全符合通常所接受的用於細胞治療的人類間質幹細胞之標準，例如透過Dominici等人，「Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement」，Cytotherapy (2006年)第8卷，第4期，第315-第6頁，共 48 頁(發明說明書)

317頁；Sensebe等人，「Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices : a review」，Stem Cell Research & Therapy，2013年，第4卷：第66頁；Vonk等人，Stem Cell Research & Therapy (2015年)第6卷：第94頁，或Kundrotas Acta Medica Lituanica，2012年，第19卷，第2期，第75-79頁。此外，使用量子細胞擴增系統等生物反應器，每次運行可以獲得大量的間質幹細胞，例如300至700百萬個間質幹細胞(也參見實驗部分)。因此，本發明允許以具成本效益的方式提供治療應用所需之幹細胞的量，例如它們在傷口癒合中之用途。另外，用於製造本發明之培養基的所有組成分皆購買具GMP品質者。因此，本發明打開了從臍帶的羊膜中產生這種高度均勻的間質幹細胞群之GMP的途徑。

**【0022】** 在這種情況下，注意到本發明的培養基允許在允許間質幹細胞/先驅細胞增殖而不分化該間質幹細胞/先驅細胞的條件下，從羊膜分離間質幹細胞群(也稱為「間質幹細胞」)。因此，在如本文所述從羊膜分離間質幹細胞之後，分離的間質幹細胞/先驅細胞群具有分化為多種細胞類型的能力，如美國專利申請2006/0078993、美國專利9,085,755、國際專利申請WO2006/019357、美國專利8,287,854或WO2007/046775所述。例如，如美國專利申請2006/0078993中所述，臍帶羊膜的間質幹細胞具有紡錘形，表現以下基因：POU5f1、Bmi-1、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor，LIF)，以及分泌激活素A與濾泡抑素(Follistatin)。在本發明中分離的間質幹細胞可以，例如，分化成任何類型的間質細胞，例如，但不限於，脂肪細胞、皮膚纖維母細胞、軟骨細胞、成骨細胞、肌腱細胞、韌帶纖維母細胞、心肌細胞、平滑肌細胞、骨骼肌細胞、脂肪細胞、黏蛋白生成細胞，來自內分泌腺的細胞，如：胰島素生成細胞(例如 $\beta$ -胰島細胞)，

第7頁，共 48 頁(發明說明書)

或神經外胚層細胞。在本發明中分離的幹細胞可以在體外分化以便隨後將分化的細胞用於醫療目的。這種方法的說明性實例為，將間質幹細胞分化為產生胰島素的 $\beta$ -胰島細胞，然後可將其例如透過植入，而給予患有胰島素缺乏症，如糖尿病，的患者(在這方面也參見WO2007/046775)。或者，本發明的間質幹細胞可以其未分化的狀態用於基於細胞的治療，例如，用於傷口癒合的目的，例如治療燒傷或慢性糖尿病傷口。在這些治療應用中，本發明的間質幹細胞可以透過與周圍的患病組織相互作用來促進傷口癒合，或者也可以分化為相應的皮膚細胞(例如再次參見WO2007/046775)。

**【0023】** 在這種情況下，應當指出的是，只要臍帶組織含有羊膜(這也稱為「臍帶襯膜」)，本文所述之間質幹細胞群可以從任何臍帶組織中分離並培養(即衍生)。因此，如本申請案的實驗部分所述，間質幹細胞群可以從整個臍帶的(部分)分離。因此，除了羊膜之外，該臍帶組織可以包含臍帶的任何其他組織/組成分。例如，如在美國專利申請2006/0078993或國際專利申請WO2006/019357的圖16所示，該臍帶的羊膜為臍帶的最外部分，覆蓋著臍帶。此外，臍帶含有一條靜脈(攜帶含氧、營養豐富的血液給胎兒)以及二條動脈(攜帶去氧、營養物消耗的血液遠離胎兒)。為了保護與機械支持這三種血管嵌入瓦頓氏凝膠中，這種凝膠狀物質主要由黏多醣製成。據此，本發明中使用的臍帶組織也可以包含這種靜脈、這二種動脈以及瓦頓氏凝膠。使用臍帶的這種整體的(完整的)部分具有羊膜不需要與臍帶的其他組成分分開之優點。這減少了分離步驟，從而使得本發明的方法為更簡單、更快速、較少出錯，且更經濟 - 這些都是GMP生產的所有重要方面，而GMP生產是間質幹細胞的治療應用所必需的。因此，間質幹細胞的分離可以透過組織外植體開始，如果需要更大量的間質幹細胞，例如用於臨床試驗，可以

隨後進行分離的間質幹細胞之繼代(培養)。或者，也可以首先將羊膜與臍帶的其它成分分離，並通過在本發明的培養基中培養羊膜來將間質臍帶襯膜幹細胞與羊膜分離。這種培養也可以透過組織外植體進行，任選地接著繼代培養分離的間質幹細胞。在本文中，「組織外植體」或「組織外植體方法」等詞以其在本領域中的常規含義使用，係指一種方法，其中一旦組織被收穫，或一片組織被放置在含有培養(生長)培養基的細胞培養皿中，隨著時間的推移，幹細胞從組織中遷移出來到培養皿表面。然後，這些原代幹細胞可以進一步擴大，並透過微繁殖(繼代培養)轉移到新鮮的培養皿中，這也在本文中描述。在這種情況下，應該注意的是，就用於治療目的之細胞的生產而言，在從臍帶分離羊膜間質幹細胞的第一步中，獲得分離的間質幹細胞的主細胞庫，而隨後可以獲得工作細胞庫的繼代培養物。如果本發明的間質幹細胞群(具體而言是至少約98%或99%，或者表現每個標記物CD73、CD90以及CD105的間質幹細胞群，並且缺乏以下每種標記物的表現：CD34、CD45以及HLA-DR)用於臨床試驗或作為批准的治療劑，工作細胞庫的細胞群將通常用於此目的。分離步驟的幹細胞群(其可以構成主細胞庫)與繼代培養步驟的幹細胞群(其可以構成工作細胞庫)可以，例如，以低溫保存的形式保存。

**【0024】** 如上所述，從臍帶羊膜分離間質幹細胞的本發明方法之優點在於，本發明培養基中使用的所有組成分均具有GMP品質，因此提供了在GMP條件下分離間質幹細胞的可能性，以用於隨後的治療施用。

**【0025】** 「DMEM」係指達爾伯克(Dulbecco)改良的伊格爾培養基，其係在1969年被開發，且為基礎培養基(BME)的改良(參見表1，顯示了Lonza公司的DMEM數據表)。最初的DMEM配方含有1000 mg/L的葡萄糖，並首次被報告用於

培養胚胎小鼠細胞。然後，DMEM自此成為可從各種來源，例如，Thermo Fisher Scientific公司(目錄型號11965-084)、Sigma Aldrich公司(目錄型號D5546)或Lonza公司商購獲得的標準培養基，至僅有少數供應商。因此，任何可商購的DMEM都可用於本發明。於較佳的具體實施例中，本文使用的DMEM可從Lonza公司的目錄型號12-604F獲得之DMEM培養基。該培養基為補充有4.5 g/L葡萄糖與L-麩醯胺酸的DMEM。於另一較佳的具體實施例中，本文使用的DMEM為Sigma Aldrich公司目錄型號D5546之DMEM培養基，其含有1000 mg/L葡萄糖與碳酸氫鈉，但不含L-麩醯胺酸。

**【0026】** 「F12」培養基係指Ham's F12培養基。這種培養基也是一種標準的細胞培養基，其最初為被設計用來培養各種哺乳動物與雜交瘤細胞的營養混合物，當與血清及激素與運鐵蛋白組合使用時(參見表2，顯示了來自Lonza公司的Ham's F12培養基之數據表)。任何可商購的Ham's F12培養基(例如，來自Thermo Fisher Scientific公司(目錄型號11765-054)、Sigma Aldrich公司(目錄型號N4888)或Lonza公司，僅用於少數幾個供應商)可用於本發明。於較佳的具體實施例中，使用來自Lonza公司的Ham's F12培養基。

**【0027】** 「DMEM/F12」或「DMEM:F12」係指DMEM與Ham's F12培養基的1:1混合物(參見表3，顯示來自Lonza公司的DMEM:F12 (1:1)培養基的數據表)。另外，DMEM/F12 (1:1)培養基是用於支持許多不同哺乳動物細胞生長的廣泛使用的基礎培養基，並且可從各種供應商，如Thermo Fisher Scientific公司(目錄型號11330057)、Sigma Aldrich公司(目錄型號D6421)或Lonza公司商購。任何可商購的DMEM:F12培養基均可用於本發明。於較佳的具體實施例中，本文使用的DMEM:F12培養基為可從Lonza公司的目錄型號12-719F獲得的

DMEM/F12 (1 : 1)培養基(其為具有L-麩醯胺酸、15 mM HEPES，以及3.151 g/L 葡萄糖的DMEM : F12)。

【0028】 「M171」係指培養基171，其係以作為用於培養正常人類乳房上皮細胞生長的基礎培養基而被開發(參見表4，顯示來自Life Technologies公司的M171培養基的數據表)。這種基礎培養基也被廣泛使用，例如可以從Thermo Fisher Scientific公司或Life Technologies公司(目錄型號M171500)等供應商處購得。任何商購的M171培養基均可用於本發明。在較佳的具體實施例中，本文使用的M171培養基為可獲自Life Technologies公司的目錄型號為M171500的M171培養基。

【0029】 「FBS」係指胎牛血清(也稱為「胎牛血清」)，即在血液自然凝固之後保留的血液部分，然後離心以除去任何剩餘的紅血球細胞。胎牛血清為用於真核細胞體外細胞培養的最廣泛使用的血清補充物，因為其具有非常低的抗體含量並含有更多的生長因子，允許在許多不同的細胞培養應用中具有多功能性。FBS較佳從國際血清工業協會(International Serum Industry Association， ISIA)的成員獲得，其主要焦點為血清與動物衍生產品的安全及安全使用，通過適當的原產地可追溯性、標籤真實性，以及適當的標準化及監督。作為ISIA成員的FBS供應商包括Abattoir Basics公司、Animal Technologies公司、Biomim Biotechnologia LTDA公司、GE Healthcare公司、Thermo Fisher Scientific公司的Gibco，以及Life Science Production公司等。在目前較佳的具體實施例中，FBS從GE Healthcare公司獲得，目錄型號為A15-151。

【0030】 現在轉向本發明之培養基，該培養基可包含以終濃度為約55-65% (v/v)的DMEM、終濃度為約5-15% (v/v)的F12、終濃度為約15-30% (v/v)的M171，

以及終濃度為約1-8% (v/v)的FBS分離或培養間質臍帶襯膜幹細胞。本文使用之「% (v/v)」的值係指單個組成分相對於培養基的終體積之體積。其代表，若 DMEM為，例如，在培養基中存在約55-65% (v/v)的終濃度，則1公升培養基含有約550-650 ml的DMEM。

【0031】 於其他具體實施例中，該培養基可以包含終濃度為約57.5 - 62.5% (v/v)的DMEM、終濃度為約7.5 - 12.5% (v/v)的F12、終濃度為約17.5 - 25.0% (v/v)的M171，以及終濃度為約1.75 - 3.5% (v/v)的FBS。於進一步的具體實施例中，培養基可以包含終濃度為約61.8% (v/v)的DMEM、終濃度為約11.8% (v/v)的F12、終濃度為約23.6% (v/v)的M171，以及終濃度為約2.5% (v/v)的FBS。

【0032】 除了上述組成分之外，該培養基可以包含對培養間質臍帶襯膜幹細胞有利的補充劑。本發明的培養基可以，例如，包含表皮生長因子(EGF)。如果存在的話，EGF可以約1 ng/ml至約20 ng/ml的終濃度存在於培養基中。在這些具體實施例的一些實施例中，該培養基可以包含約10 ng/ml終濃度的EGF。

【0033】 本發明之培養基還可以包含胰島素。如果存在的話，胰島素可以約1 µg/ml至10 µg/ml的終濃度存在。在這些具體實施例的一些實施例中，該培養基可以包含終濃度為約5 µg/ml的胰島素。

【0034】 培養基可進一步包含以下補充物中的至少一種：腺嘌呤、氫皮質酮，以及3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)。在這樣的具體實施例中，該培養基可包含腺嘌呤、氫皮質酮，以及3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)中的全部三種。在這些具體實施例中，該培養基可以包含終濃度為約0.05至約0.1 µg/ml的腺嘌呤，終濃度為約1至約10 µg/ml的氫皮質酮，及/或終濃度為約0.5至約5 ng/ml的3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)。

【0035】 在本發明之方法中，可以培養臍帶組織直至適當數量的(初級)間質臍帶襯膜幹細胞已經從組織中長出。在典型的具體實施例中，培養臍帶組織直到羊膜の間質幹細胞的細胞生長達到約70至約80%匯合。這裡應注意的是，「匯合性」或「匯合」等詞以其在細胞培養領域中的常規含義使用，並且意指培養皿或培養瓶中貼壁細胞的數量的估計/指示物，係指被細胞覆蓋的表面之比例。例如，50%的匯合代表大約一半的表面被覆蓋，細胞仍然有生長的空間。100%的匯合代表表面被細胞完全覆蓋，沒有更多空間讓細胞成長為單層。

【0036】 一旦透過組織外植體從臍帶襯膜組織獲得了合適數量的原代細胞(間質臍帶幹細胞)，將間質幹細胞從用於培養的培養容器中取出。透過這樣做，可以獲得含有羊膜的(初級)分離の間質幹細胞的主細胞庫。通常，因為間質幹細胞為黏附細胞，所以使用標準的酶處理進行去除。例如，酶處理可以包含如國際美國專利申請2006/0078993、國際專利申請WO2006/019357，或國際專利申請WO2007/046775中所述之胰蛋白酶消化，係指可透過胰蛋白酶消化(0.125%胰蛋白酶/0.05% EDTA)收穫生長細胞，以進一步擴增細胞。如果收穫の間質幹細胞，例如，用於產生主細胞庫，則細胞也可以被低溫保存並儲存以供進一步使用，如下文所述。

【0037】 一旦被收穫，可將該間質幹細胞轉移到培養容器中進行繼代培養。繼代培養也可以從冷凍原代細胞，即從主細胞庫開始。為了繼代培養，可將任何適量的細胞接種在培養容器，如細胞培養盤中。該間質細胞可以，為此目的，被懸浮在合適的培養基(最方便地，本發明之培養基中)，用於在濃度為，例如，約 $0.5 \times 10^6$  個細胞/ml至約 $5.0 \times 10^6$  個細胞/ml繼代培養。於一具體實施例中，該懸浮細胞以約 $1.0 \times 10^6$  個細胞/ml的濃度繼代培養。繼代培養可以透過在簡單的培養

瓶中進行，以及例如，在一多層系統如CellStacks (康寧公司，康寧市，紐約州，美國)或Cellfactory (Nunc公司，Thermo Fisher Scientific公司的一部分，沃爾瑟姆，麻州，美國)，細胞可以被堆放在孵化器中。另外，繼代培養也可以在封閉的自含式系統，例如，生物反應器中進行。生物反應器的不同設計是本領域技術人員已知的，例如，平行平板，中空纖維，或微流體生物反應器。參見例如，Sensebe 等人「Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices : a review」，同上。商業中空纖維生物反應器的一個說明性的實例為 Quantum<sup>®</sup> Cell Expansion System (Terumo BCT公司)，其，例如，已被用於骨髓間質幹細胞進行臨床試驗(參見，Hanley等人，Efficient Manufacturing of Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells Using the Quantum Cell Expansion System，*Cytherapy*，2014年八月；16(8): 1048–1058)。可用於本發明的間質幹細胞群繼代培養的市售生物反應器的另一個例子為，GE Healthcare公司提供的Xuri Cell Expansion System。如果要在GMP條件下生產用於治療應用的工作細胞庫並且需要大量細胞，則在自動化系統，如Quantum<sup>®</sup>細胞擴增系統，中培養間質幹細胞群是特別有益的。

**【0038】** 本發明的間質臍帶襯膜幹細胞的繼代培養發生在本發明之培養基中。因此，本發明的培養基既可用於從羊膜中分離間質幹細胞，又可用於繼代培養分離的原代細胞。此外，為了繼代培養，可以培養間質幹細胞直至適量的細胞生長。在示例性具體實施例中，將間質幹細胞繼代培養至間質幹細胞達到約70至約80%匯合。

**【0039】** 間質臍帶襯膜幹細胞群的分離/培養可以在培養哺乳動物細胞的標準條件下進行。通常，分離間質臍帶襯膜幹細胞群的本發明之方法一般在正常

用於培養該細胞來源之細胞的條件(溫度、大氣)下進行。例如，人類臍帶組織與間質臍帶襯膜幹細胞通常分別在37°C、5%CO<sub>2</sub>的空氣氛圍中培養。在這種情況下，注意到在本發明中，該間質細胞可以源自任何哺乳動物物種，例如小鼠、大鼠、天竺鼠、兔、山羊、馬、狗、貓、綿羊、猴或人類，於一個具體實施例中具有人源的間質幹細胞為較佳的。

**【0040】** 一旦從繼代培養物中獲得所需/合適數量的間質臍帶襯膜幹細胞，透過從用於繼代培養的培養容器中除去間質幹細胞來收穫間質幹細胞。間質幹細胞的收穫通常透過酶處理再次進行，包括細胞的胰蛋白酶化。隨後收集分離的間質幹細胞，並將其直接使用或保存備用。通常，保存是透過低溫保存進行的。「低溫保存」乙詞在本文中以其常規含義使用，以描述間質幹細胞透過冷卻至低於零度以下的溫度，例如(通常)-80°C或-196°C (液態氮的沸點)來保存的製程。可以如本領域技術人員已知的那樣進行低溫保存，並且可以包括使用低溫保護劑，例如二甲基亞砷(DMSO)或甘油，其減慢臍帶細胞中冰晶的形成。

**【0041】** 通過本發明之分離方法獲得的間質臍帶襯膜幹細胞的分離群高度確定且均質。在該方法的典型具體實施例中，至少約90%或更多、約91%或更多、約92%或更多、約92%或更多、約93%或更多、約94%或更多、約95%或更多、約96%或更多、約97%或更多、約98%或更多、約99%或更多的分離的間質幹細胞表現以下標記：CD73、CD90以及CD105。此外，在這些具體實施例中，至少約90%或更多、約91%或更多、約92%或更多、約92%或更多、約93%或更多、約94%或更多、約95%或更多、約96%或更多、約97%或更多、約98%或更多、約99%或更多的分離的間質幹細胞可能缺乏以下標記物的表現：CD34、CD45以及HLA-DR。在特定的具體實施例中，分離的間質幹細胞群的約97%或更多、約98%

或更多、或約99%或更多表現CD73、CD90以及CD105，同時缺乏CD34、CD45以及HLA-DR的表現。

【0042】 因此，根據上述公開內容，本發明還涉及從臍帶羊膜分離的間質幹細胞群，其中至少約90%或更多的幹細胞群細胞表現下列標記物中的每一個：CD73、CD90以及CD105。在較佳具體實施例中，至少約91%或更多、約92%或更多、約92%或更多、約93%或更多、約94%或更多、約95%或更多、約96%或更多、約97%或更多、約98%或更多、約99%或更多的分離的間質幹細胞群的細胞為CD73+、CD90+以及CD105+，這代表該百分比的分離細胞群表現CD73、CD90以及CD105的每一個(參見本申請案實驗的部分)。另外，至少約90%或更多、約91%或更多、約92%或更多、約92%或更多、約93%或更多、約94%或更多、約95%或更多、約96%或更多、約97%或更多、約98%或更多、約99%或更多的分離的間質幹細胞可能缺乏表現以下標記的缺乏表現。在特定的具體實施例中，分離的間質幹細胞群中約97%或更多、約98%或更多、或約99%或更多表現CD73、CD90以及CD105，同時缺乏CD34、CD45以及HLA-DR的表現。這種來源於臍帶羊膜的高度均一的間質幹細胞群首次在本文中被報告，並滿足用於細胞治療的間質幹細胞的標準(也參見實驗部分，以及例如，Sensebe等人「Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices : a review」，上文)。在本文中注意到，如果需要的話，可以通過本發明的分離方法獲得這種間質幹細胞群，但也可以通過不同的方法，如細胞分選法，獲得。

【0043】 與上文一致，本發明還涉及包含從臍帶羊膜分離的間質幹細胞群的醫藥組合物，其中幹細胞群的至少約90%或更多的細胞表現下列各項標記物：CD73、CD90以及CD105，以及任選缺乏CD34、CD45以及HLA-DR的表現。該醫

藥組合物可以包含任何醫藥上可接受的賦形劑並且可以配製用於任何期望的醫藥施用方式。醫藥組合物可以例如適用於全身或局部應用。

【0044】於另一方面，本發明涉及一種用於分離的培養基之製備方法，該方法包含，混合以獲得終體積為500 ml的培養基：

- i. 250 ml的DMEM
- ii. 118 ml的M171
- iii. 118 ml的DMEM/F12
- iv. 12.5 ml的胎牛血清(FBS)以達到一2.5% (v/v)的終濃度。

【0045】如上所述，DMEM/F12培養基為DMEM與Ham's F12培養基的1：1混合物。因此，118 ml的DMEM/F12培養基含有59 ml的DMEM與59 ml的F12。據此，當使用這種培養基的製備方法時，符合500 ml總體積的終濃度(v/v)如下：

DMEM：250 ml + 59 ml = 309 ml，相當於 $309/500 = 61.8\%$  (v/v)

M171：118 ml，相當於 $118/500 = 23.6\%$  (v/v)

F12：59 ml，相當於 $59/500 = 11.8\%$  (v/v)。

【0046】這種培養基的製備方法之具體實施例還包含添加

- v. 1 ml的EGF原液(5  $\mu\text{g/ml}$ )以達到10 ng/ml的最終EGF濃度，以及
- vi. 0.175 ml的胰島素原液(14.28 mg/ml)以達到5  $\mu\text{g/ml}$ 的最終胰島素濃度。

【0047】這裡要注意的是，在這些具體實施例中，這些組成分i至vi的上述體積，導致最終體積為499.675 ml的培養基。如果不向培養基中加入其他組成分，剩餘的0.325 ml (加起來至500 ml的體積)可以是，例如，組成分i至iv中的任何一種，這表示DMEM、M171、DMEM/F12或FBS任一。或者，EGF或胰島素的原液之濃度當然可以被調整，以使得培養基的總體積為500 ml。另外，還注意到組成

分i.至iv.不一定必須按照它們被列出的順序添加，但是當然也可以使用任何順序來混合這些組成分以達到本發明之培養基。這代表，例如，可以將M171與DMEM/F12混合在一起，然後與DMEM及FBS組合，以達到如本文所述之終濃度，即一終濃度為約55至65% (v/v)的DMEM、一終濃度為約5-15% (v/v)的F12、一終濃度為約15-30% (v/v)的M171，以及一終濃度為約1-8% (v/v)的FBS。

**【0048】** 在其他具體實施例中，該方法進一步包含向DMEM加入0.325 ml 體積的一種或多種以下補充物：腺嘌呤、氫皮質酮、3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)，從而到達總體積為500 ml的培養基。在這個具體實施例中，這些補充物在DMEM中的終濃度可以如下：

約0.05至0.1  $\mu\text{g/ml}$ 的腺嘌呤，例如約0.025  $\mu\text{g/ml}$ 腺嘌呤，

約1至10  $\mu\text{g/ml}$ 的氫皮質酮，

約0.5至5  $\text{ng/ml}$ 的3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)，例如1.36  $\text{ng/ml}$ 的3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)。

**【0049】** 根據上述公開內容，本發明還涉及透過如本文所述之培養基的製備方法可獲得或獲得的細胞培養基。

**【0050】** 另外，本發明還涉及一種從臍帶羊膜分離間質幹細胞之方法，其中該方法包含在以本文所述之方法製備的培養基中培養羊膜組織。

**【0051】** 因此，本發明還涉及一種細胞培養基，包含：

- 終濃度為約55至65% (v/v)的DMEM，

- 終濃度為約5至15% (v/v)的F12，

- 終濃度約為15至30% (v/v)的M171，以及

- 終濃度為約1至8% (v/v)的FBS。

【0052】 於本文所述之培養基的某些具體實施例中，該培養基包含終濃度為約57.5至62.5% (v/v)的DMEM、終濃度為約7.5至12.5% (v/v)的F12、終濃度為約17.5至25.0% (v/v)的M171，以及終濃度為約1.75至3.5% (v/v)的FBS。於其他具體實施例中，該培養基可以包含終濃度為約61.8% (v/v)的DMEM、終濃度為約11.8% (v/v)的F12、終濃度為約23.6% (v/v)的M171，以及終濃度為約2.5% (v/v)的FBS。

【0053】 此外，該培養基可進一步包含終濃度為約1 ng/ml至約20 ng/ml的表皮生長因子(Epidermal Growth Factor, EGF)。於某些具體實施例中，該培養基包含終濃度為約10 ng/ml的EGF。本文所述之培養基可進一步包含終濃度為約1 µg/ml至10 µg/ml的胰島素。於這樣的具體實施例中，該培養基可以包含終濃度為約5 µg/ml的胰島素。

【0054】 本發明之細胞培養基可進一步包含以下補充物中的至少一種：腺嘌呤、氫皮質酮，以及3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)。於某些具體實施例中，該培養基包含腺嘌呤、氫皮質酮，以及3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)中的全部三種。如果存在的話，培養基可包含終濃度為約0.01至約0.1 µg/ml腺嘌呤或約0.05至約0.1 µg/ml腺嘌呤的腺嘌呤，終濃度為約0.1至約10 µg/ml氫皮質酮或約1至約10 µg/ml氫皮質酮的氫皮質酮，及/或終濃度為約0.5至約5 ng/ml的3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)。

【0055】 於該細胞培養基的具體實施例中，500 ml的本發明之細胞培養基包含：

- i. 250 ml的DMEM
- ii. 118 ml的M171

iii. 118 ml的DMEM/F12

iv. 12.5 ml的胎牛血清(FBS)(終濃度為2.5%)。

**【0056】** 於進一步的具體實施例中，該細胞培養基可以進一步包含

v. 終濃度為10 ng/ml的EGF；以及

vi. 終濃度為5 µg/ml的胰島素。

**【0057】** 胰島素與EGF都可以使用選擇的原液加入到該培養基中，使得該培養基的總體積不超過500 ml。

**【0058】** 在特定的實施例中，本發明之培養基的組成分i.至vi.為圖1中所示之組成分，這表示它們是從使用圖1中所示的目錄型號之各個製造商所獲得的。混合在圖1中所示之組成分i.至vi.所得之培養基在本文中亦稱為「PTT-6」。在本文中再次指出，組成分i.至vi.以及任何其他成分例如任何其他商業供應商的抗生素可用於製備本發明之培養基。

**【0059】** 此外，本發明之細胞培養基可包含一終濃度為約0.01至約0.1 µg/ml或約0.05至約0.1 µg/ml的腺嘌呤，終濃度為約0.1至10 µg/ml、約0.5至約10 µg/ml或約1至約10 µg/ml的氫皮質酮，及/或終濃度為約0.1至約5 ng/ml或約0.5至約5 ng/ml的3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)。

**【0060】** 最後，本發明還提供了治療一患有疾病之患者的方法，該方法包含向該患者施用如本文所公開之間質臍帶襯膜幹細胞或一含有幹細胞的醫藥組合物。該疾病可以是以上所述之任何疾病。為了治療該個體，本發明之間質幹細胞群可以任何合適之方式施用，例如，包括，但不限於，局部施用、透過植入或透過注射。該幹細胞群可以，例如，直接置於例如燒傷或糖尿病傷口的傷口上(參

見國際專利申請WO2007/046775)。或者，也可將該幹細胞群以皮下植入，例如，直接皮下植入體內脂肪或腹膜中。

**【0061】** 將通過以下非限制性實驗的實施例進一步闡述本發明。

### 實驗的實施例

**【0062】 1. 間質幹細胞分離前之臍帶組織的冷凍保存**

**【0063】** 處理臍帶組織(在獲得母親的知情同意書之情況下捐獻臍帶)，以於隨後以如下之方法自臍帶的羊膜分離間質幹細胞。

**【0064】 1.1 臍帶組織樣本之清洗：**

- a. 從保護套上取下手術刀。
- b. 以鑷子緊握住臍帶，以手術刀將該臍帶切成10 cm長的片段。將未用到的臍帶放回原來的紙巾杯中。
- c. 將10 cm長的臍帶片段轉移到新的150 mm的培養皿中。該150 mm的培養皿可用來代替杯子。
- d. 以該150 mm的培養皿的蓋子置放鑷子及手術刀。
- e. 以30 ml的注射器去除25 ml Plasmalyte A (Baxter公司，目錄型號# 2B2543Q)。以單手以45°角握住該注射器，並直接將Plasmalyte A分配到臍帶組織上。
- f. 將該培養皿保持在一小角度，以一30 ml注射器及鈍針去除Plasmalyte A。
- g. 將用過的Plasmalyte A收集在一個作為垃圾桶的300 ml轉移袋中，並將其丟棄在生物危險箱中。

h. 重複洗滌程序，如有必要，每次洗滌使用新的培養皿。確保表面上的所有血塊已被清除。若需要清潔組織，可以使用更多的Plasmalyte A。

i. 將該組織放入一新標記的組織培養皿中以繼續切割該組織。將20ml的Plasmalyte A放入培養皿中，以便在切割時組織不會乾燥。

j. 將該臍帶切成約1 cm的片段，總共產生10個片段。

k. 進一步將每個1 cm的片段切成約0.3 cm × 0.3 cm 至0.5 cm × 0.5 cm 的小塊。

l. 去除培養皿中的任何的Plasmalyte A。

m. 自原來的Plasmalyte A袋中以30 ml注射器拉取出25 ml的Plasmalyte A，並直接分配在該臍帶組織片上。

n. 將培養皿保持在一角度以收集所有用於清洗組織一側的Plasmalyte A，並以一注射器及鈍針將其去除。

o. 重複清洗一次。不應該殘留任何血塊。

**【0065】** 注意：若該臍帶沒有立即冰凍，將該臍帶組織保存於Plasmalyte A中直到準備冰凍。

**【0066】** 1.2 臍帶組織的冷凍保存：

a. 製備冷凍保存液：

i. 製備由60% Plasmalyte A、30%的5%人類血清白蛋白，以及10%二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)所組成之50 ml冷凍溶液。

ii. 以「組織冷凍溶液」標記一個150 ml的轉移袋，並使用無菌技術將一個血漿轉移組件連接到該端口。

iii. 從原始的Plasmalyte A袋中以一30 ml的注射器取出30 ml的Plasmalyte A，並將其轉移至標有「組織冷凍溶液」的轉移袋中，並標記溶液的製備時間及日期。

iv. 以一20 ml的注射器取出15 ml的5%人類血清白蛋白，並將其轉移到標記的轉移袋中。

v. 將5 ml DMSO加入該轉移袋中。

vi. 充分混合並記錄冷凍溶液的混合。

b. 在加入冷凍溶液之前，從該組織中取出Plasmalyte A。

c. 使用一60 ml注射器，將所有50 ml的冷凍溶液注入注射器中，將約30 ml的冷凍溶液加入含有該臍帶組織的150 mm的細胞培養皿中。將一鈍針放在該注射器上，使其保持無菌狀態。

d. 每分鐘旋轉含有該組織及冷凍溶液的培養皿共10分鐘。

e. 使用鑷子，挑選8個隨機選擇的部分，並將其放置在四個4 ml的冷凍管中。挑選4個隨機選擇的部分，並將其放入一個1.8 ml的冷凍管中。這些部分應該沒有任何血塊。

f. 針對4 ml的冷凍管，將含有該臍帶組織的每個冷凍管以剩餘的冷凍溶液填充至3.6 ml的填充線，針對1.8 ml的Nunc小瓶則填充至1.8 ml填充線。

g. 以組織ID標註一個Bactec Lytic/10 - 厭氧/F以及一個Bactec Plus需氧/F瓶。

h. 以一注射器與鈍針從該培養皿中去除20 ml冷凍溶液，之後以酒精棉片擦拭該Bactec小瓶，並將該鈍針換成一18g針頭，並於需氧及厭氧Bactec瓶中各接種10 ml。

- i. 開啟控制速率的冷凍機。
- j. 在控制速率的冷凍完成之後，將這些單元置於連續溫度監控的液態氮冷凍器中以備用。

**【0067】 2. 自臍帶組織中分離間質臍帶襯膜幹細胞****【0068】 2.1. 製備用於處理來自臍帶組織之MSCs的培養基：**

a. 為了製造500 ml的PTT6 (培養/生長培養基)，按照以下順序添加以下內容物：

- i. DMEM，250 ml
- ii. M171 118 ml
- iii. DMEM F12 118 ml
- iv. FBS 12.5 ml (終濃度為2.5%)
- v. EGF 1ml (終濃度為10 ng/ml)
- vi. 胰島素0.175 ml (終濃度為5  $\mu\text{g/ml}$ )。

**【0069】** 上述含量的組成分i.至vi導致最終體積為499.675 ml的培養基。若不向培養基加入其他組成分，剩餘的0.325 ml (加至500 ml的體積)可以是，例如，組成分i至vi中的任何一種，這表示為DMEM、M171、DMEM/F12或FBS任一種。或者，EGF或胰島素原液的濃度當然可以被調整，使得該培養基的總體積為500 ml。或者，可以加入抗生素如青黴素-鏈黴素-兩性黴素的原液，使終體積為500 ml。也可以向該培養基加入0.325 ml的一種或多種下列補充物：腺嘌呤、氫皮質酮、3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)，從而達到總體積為500 ml的培養基。

vii. 將「PTT6」的瓶子標示培養基的製備日期、起始操作員，以及在「到期日期」的詞彙後寫上到期日期。到期日期為任何組成分中的最早到期日期，或是自製備日起1個月內，以先到者為準。

b. 為了製備沖洗培養基(不含鈣或鎂，含有5% FBS的Hank's緩衝鹽溶液(HBSS))，在一50 ml離心管中加入2.5 ml FBS至47.5 ml的HBSS中。將「沖洗培養基」的管子標示起始操作員與該培養基的製備日期。

c. 使用Bactec Lytic/10-厭氧/F (Becton Dickinson公司)與Bactec Pluc + 有氧/F (Becton Dickinson公司)對所有培養基進行無菌檢測。將20 ml製備的培養基注入每個瓶子中。

#### 【0070】 2.2 用於MSC收穫的臍帶組織之解凍：

a. 一旦操作員準備在潔淨室中處理樣品，就開始解凍。除非小瓶來自同一個捐贈者，否則一次不要解凍超過1個小瓶。

b. 以消毒劑擦拭水浴，然後以70%異丙醇擦洗，並注入1L無菌水。將水浴加熱至36-38°C。

c. 在生物安全櫃的潔淨室內製備10 ml由70%到90%的PlasmaLyte A組成的沖洗培養基。以一連接到一10 ml注射器上的0.2- $\mu$ m注射器過濾器將該溶液進行無菌過濾，並將該溶液保持於冷藏下備用。

d. 將一處理標籤放在一50 ml錐形管上。

e. 確認水浴溫度在36-38°C。

f. 從液態氮儲存器中取出小瓶的組織並迅速在充滿1L無菌水的37°C水浴中解凍。Mr. Frosty Nalgene Cryo 1°C 冷凍容器的小瓶支架與小瓶浮在適當位置，可以在解凍樣品時作為浮動樣品架使用。

g. 從水浴中取出小瓶，並以70%異丙醇溶液噴霧。將小瓶從水浴中取出的好時機為在小瓶中可以看到小冰塊 – 表示小瓶內部溫度低於37°C。

h. 將小瓶放入通道並警告潔淨室的處理技術人員。

**【0071】 2.3 準備組織處理：**

a. 臍帶組織處理應在一環境監測(environmentally monitored, EM)的潔淨室中進行。在每次輪班結束時，執行整個房間及通風櫥的清潔。

b. 準備/清潔生物安全櫃。

c. 在該生物安全櫃中工作時執行活體粒子的計數。

d. 在該生物安全櫃內組裝所有必要的用品，檢查每個包裝的損壞與有效日期。當處理注射器、血清移液管、無菌鑷子、解剖刀、組織板，以及針頭時，確保不要接觸到任何會接觸無菌產品的表面。只有注射器針筒、導管、柱塞頭及/或針帽或護套的外部可以安全地處理。若表面已被觸摸或觸及非無菌表面，丟棄該耗材。

e. 記錄要使用的所有試劑及耗材的批號與有效日期(如適用)。

f. 在轉移到生物安全櫃之前，以70%酒精潤濕的無絨抹布清潔小瓶，以接收解凍的小瓶。

g. 使用注射器抽吸針，從小瓶中取出盡可能多的液體。避免抽吸該組織。

h. 使用無菌鑷子，將該組織移轉到一個無菌的100 mm培養皿。

i. 向該組織碎片中加入一5 ml沖洗培養基的等分試樣。

j. 將內容物旋轉15-30秒，然後以移液管或帶有抽吸針的注射器取出沖洗培養基。重複該沖洗過程二次。

k. 添加2 ml沖洗培養基至該組織，以避免該組織乾燥。

**【0072】 2.4. 從組織中啟動MSC生長：**

a. 將一6孔盤的底部標記「生長物1」以及MSC批號或臍帶組織ID，並開始生長日期。如果使用60 mm組織培養皿，則通過在培養皿底部畫一個格柵將培養皿分成4個象限。

b. 使用無菌的一次性鑷子，將一個3×3 mm至5×5 mm的組織放入每個孔中。若使用60 mm組織培養皿，則將組織放置在每個象限的中間以保持組織分離(彼此的距離超過1 cm)。

c. 以3 ml的PTT6填充每個孔。

d. 使用連接到30 ml注射器的抽吸針，抽出足夠的培養基以幾乎覆蓋該組織。不要傾斜培養盤。不要用抽吸針觸摸孔的底部。

e. 使用倒置光學顯微鏡，每天(24±6小時)觀察細胞生長。即時細胞培養成像系統可以用來代替光學顯微鏡。

f. 每天更換培養基。使用前務必將培養基平衡至室溫。

i. 吸走該培養基。

ii. 加入3 ml的PTT6。

iii. 吸出，直到組織幾乎沒有浸在培養基中。

g. 當從組織中觀察到細胞生長時，使用與上述4.a至4.e相同的程序將組織移植至新的6孔盤，除了標記培養盤為「生長物2」之外。維持在「生長物1」盤中的細胞生長，每孔加入2 ml PTT6。每天觀察匯合。每2-3天更換一次培養基(使用前務必將培養基平衡至室溫)。

h. 當在「生長物2」盤中觀察到細胞生長時，重複步驟4.a至4.e，除了標記培養盤為「生長物3」之外。透過向每個孔添加2 ml PTT6維持「生長物2」盤中

的細胞生長。每天觀察匯合。每2-3天更換一次培養基(使用前務必將培養基平衡至室溫)。

- i. 當在「生長物3」盤中觀察到生長物時，丟棄組織。如果組織非常小，並且似乎不干擾細胞生長，則在繼代培養時處理該組織。
- j. 當細胞達到40-50%匯合時，每天觀察細胞以防止過度擴增。
- k. 當細胞達到70-80%匯合時，繼代培養細胞。不要讓細胞擴張超過80%的匯合。

**【0073】** 由於組織外植體的大小約為1-3 mm，並且組織外植體/細胞培養在175 mm平方的培養皿中進行，從外植體收穫的間質幹細胞的平均數通常為約4,000-6,000個細胞/外植體。因此，當從48個外植體中同時生長間質幹細胞時，可以在收穫時獲得約300,000個細胞。然後將這些從外植體收集的300,000個間質幹細胞通過接種如下面的實施例2.5中所述之這種300,000個細胞的175 cm<sup>2</sup>細胞培養瓶進行繼代培養(這可稱為第1代)。然後可使用從第1代獲得的間質幹細胞再次種於175 cm<sup>2</sup>培養瓶(第2代)，並如下面實施例2.5中所述使細胞擴張。從第1代與第2代獲得的細胞可以透過冷凍保存「儲存」，第2代之後獲得的間質幹細胞被認為代表用於進一步擴增間質幹細胞的主要細胞庫，例如，在下面的實施例2.7中所述之生物反應器中。

#### **【0074】 2.5. MSC在細胞培養皿中繼代培養**

- a. 在生物安全櫃中工作時執行監視活性粒子。使用前將所有培養基平衡至室溫。
- b. 當細胞生長達到約70-80%匯合時，繼代培養細胞。
  - i. 從培養皿中取出PTT6。

- ii. 用不含鈣或鎂的HBSS沖洗。
  - iii. 加入0.2 ml 1X TrypLE-EDTA並以渦旋混合1-2分鐘。
  - iv. 傾斜該培養皿30-45°，讓細胞通過引力流向下移動。輕輕敲擊培養盤的一側，使其加速脫離。
  - v. 加入1 ml的PTT6。輕輕地上下移液，然後將細胞轉移到15 ml離心管中。每個孔井使用乾淨的吸頭。來自所有6個孔的細胞可以合併到單個15 ml管中。
  - vi. 以1,200 rpm離心10分鐘。
  - vii. 去除上清液並用5 ml PTT6重新懸浮細胞。
- c. MSC的繼代培養
- i. 分裝50  $\mu$ l的細胞懸浮液並通過台盼藍排除分析測定TNC與細胞存活率。
  - ii. 以血球細胞計數器計數細胞。預計數20-100個細胞/平方。如果計數高於100，則將原始樣品稀釋1：5，並以血球細胞計數器重複台盼藍法。
  - iii. 計算活細胞/ml與總活細胞數：
    1. 活細胞數/ml = 活細胞數 $\times$ 稀釋倍數 $\times 10^4$
    2. 總活細胞 = 活細胞數 $\times$ 稀釋因子 $\times$ 總體積 $\times 10^4$
  - iv. 計算%存活率：
    1. 活力% = 活細胞數 $\times 100 /$ (活細胞數+死細胞數)
  - v. 將細胞懸浮液稀釋至 $1.0 \times 10^6$ 個細胞/ml：
    1. 「X」體積 = 總活細胞/ $10^6$ 個細胞/ml
    2. 例如，如果總活細胞數為 $1.0 \times 10^7$ ;
    3. 「X」 =  $10^7/10^6$ 個細胞/ ml或10 ml，因此，通過加入5 ml到該細胞懸浮液(即在5 ml)，總細胞體積將達到10 ml。

vi. 如果細胞懸浮液小於 $10^6$ /ml，則確定每個150 mm培養皿或175 cm<sup>2</sup>培養瓶接種 $2 \times 10^6$ 個細胞所需的體積。

1.  $2 \times 10^6$ 個細胞的體積 =  $2 \times 10^6$ 個細胞 ÷ 活細胞/ml

2. 例如，如果活細胞/ml為 $8 \times 10^5$ 細胞/ml，則需要 $2 \times 10^6$ 個細胞 ÷  $8 \times 10^5$ 個細胞/ml或2.5ml。

vii. 留出0.5 ml進行MSC標記分析。

viii. 接種 $2 \times 10^6$ 細胞到每個具有30 ml PTT6的150 mm培養皿或175 cm<sup>2</sup>培養瓶。

ix. 每三天觀察細胞的附著、集落形成，以及匯合。當細胞達到40-50%匯合時，每隔一天觀察一次細胞以防止過度擴增。不要讓細胞擴張超過80%的匯合。可以使用即時細胞培養監測系統代替光學顯微鏡。

x. 每2-3天更換一次培養基。

### 【0075】 2.6 冷凍保存MSC細胞

a. 在生物安全櫃中工作時執行監測活性粒子。

b. 當細胞達到70-80%匯合時，針對每個150 mm培養皿或175 cm<sup>2</sup>培養瓶，使用2 ml 1X TrypLE-EDTA分離細胞。

i. 從培養皿中取出PTT6。

ii. 以5 ml HBSS或不含鈣或鎂的PBS洗滌。

iii. 加入2 ml 1X TrypLE-EDTA並渦旋混合1-2分鐘。

iv. 傾斜培養皿30-45°，讓細胞通過引力流向下移動。輕輕拍打培養皿一側有助於加速分離。

v. 加入10 ml PTT6以不活化TrypLE。充分混合以解離細胞團塊。

- vi. 使用巴斯德移液管將細胞轉移到 15 ml 離心管中。
  - vii. 以 1,200 rpm 離心 10 分鐘。
  - viii. 以 10 ml PTT6 吸取培養基並重新懸浮。
  - ix. 分裝 50  $\mu$ l，並如上所述測定總活細胞數量以及 % 存活率。細胞計數將需要在 15 分鐘內進行，因為細胞可能開始結塊。
- c. 準備細胞以進行冷凍保存
    - i. 準備細胞懸浮液培養基以及低溫保存培養基並冷凍細胞。

**【0076】 2.7. 在 Quantum 生物反應器 (Terumo BTC 公司) 中進行 MSC 的繼代培養 (擴增)**

**【0077】** 也可以使用 Quantum 生物反應器來擴大 MSC。Quantum 生物反應器中擴增的起始細胞數量應為每次運行 20 至 30 百萬個細胞。每輪收穫的典型產量為 300 至 700 百萬 MSC。生物反應器按照製造商的方法運行。如此獲得的間質幹細胞通常是低溫保存的 (參見下文) 並作為工作細胞庫。

**【0078】 材料/試劑：**

1. Quantum 擴展套組
2. Quantum 垃圾袋
3. Quantum 培養基袋
4. Quantum 入口袋
5. PTT6
6. PBS
7. 纖維連接蛋白
8. TrypLE

9. 3 ml注射器
10. 葡萄糖試紙
11. 乳酸鹽試紙
12. 60 ml細胞培養盤或等同物
13. 醫用級5%CO<sub>2</sub>氣體混合物
14. 50 ml Combi-tip分注吸管。

**【0079】 設備：**

1. 生物安全櫃
2. 血糖儀(Bayer Healthcare公司/Ascensia Contour血糖儀)
3. Lactate Plus血乳酸分析儀(Nova Biomedical公司)
4. 具有頭部的蠕動幫浦
5. 離心機，Eppendorf 5810
6. 無菌管連接器
7. M4重複移液器
8. 射頻封口機

**【0080】 程序：****【0081】 1. 準備Quantum生物反應器**

a) 啟動Quantum生物反應器

b) 塗覆該生物反應器：

1) 在生物安全櫃中準備纖維連接蛋白溶液。

1) 使凍乾的纖維連接蛋白回溫至室溫(室溫下≥15分鐘)

2) 加5 ml無菌蒸餾水；不要以漩渦混合或攪動

第32頁，共 48 頁(發明說明書)

3) 使纖維連接蛋白進入溶液30分鐘。

4) 使用裝有18g針頭的10 ml注射器，將纖維連接蛋白溶液轉移到含有95 ml PBS的細胞入口袋中。

2) 將袋子連接到「試劑」線上

3) 檢查氣泡(使用「移除IC空氣」或「移除EC空氣」並使用「清洗」作為入口源可能會除去氣泡)。

4) 打開或設置生物反應器塗層程序(表1. 步驟3-5)。

5) 運行該程序

6) 當程序運行以塗覆生物反應器時，準備一個培養基袋與4 L的PTT6培養基。

7) 使用一無菌管連接器將培養基袋連接到IC培養基線。

8) 當生物反應器塗覆步驟完成時，使用RF封口機拆下用於纖維連接蛋白溶液的細胞入口袋。

c) 洗掉多餘的纖維連接蛋白

d) 以培養基調節該生物反應器

## 【0082】 2. 在Quantum生物反應器中培養細胞

a) 以均勻懸浮液加載並附著該細胞：

b) 餵養並培養該細胞

1) 選擇培養基流速以餵養該細胞。

2) 每天取乳酸鹽及葡萄糖樣品。

3) 隨著乳酸鹽含量的增加，調整培養基的流速。實際最大可耐受的乳酸鹽濃度將由細胞起源的培養瓶培養物來定義。確定培養基袋中是否有足夠的PTT6培養基。如有必要，請以新的PTT6培養基袋來更換PTT6培養基袋。

4) 當流量達到所需值時，每8-12小時測量一次乳酸鹽含量。若乳酸鹽含量不降低或乳酸鹽含量繼續增加，則收穫細胞。

### 【0083】 3. 自Quantum生物反應器收穫細胞

a) 當乳酸鹽濃度不降低時，最後一次採樣乳酸鹽與葡萄糖後收穫細胞。

b) 收穫細胞：

1) 使用無菌管連接器將裝有100 ml TrypLE的細胞入口袋連接到「試劑」線上。

2) 確認PBS袋中有足夠的PBS。如果沒有，使用無菌管連接器將一個至少有1.7 L PBS的新袋子連接到「清洗」線上。

3) 運行收穫程序。

### 【0084】 4. 低溫保存細胞

1) 細胞收穫後，將細胞轉移到50 ml離心管中沉澱細胞。

2) 使用25 ml冷細胞懸浮液重新懸浮細胞。使用Sysmex或Biorad細胞計數器計數細胞。將細胞計數報告附加到相應的Quantum處理批記錄。

3) 調整細胞濃度至 $2 \times 10^7$  個/ml

4) 加入等體積的低溫保存液並充分混合(不要搖晃或旋轉)

5) 使用重複移液管，加入在冷凍保存液中的細胞懸浮液1 ml到每個1.8 ml小瓶。使用CRP程序的冷凍保存，如SOP D6.100 CB使用控制速率冷凍器的低溫保存所述。

6) 將該小瓶存放在指定的液態氮儲存空間內。

7) 將CRF運行報告附加到相應的MSC P3-Quantum處理批記錄中。

### 【0085】 3. 使用不同培養基從臍帶組織分離的間質臍帶襯膜幹細胞群中 幹細胞標記物表現的分析

【0086】 進行流式細胞儀實驗以分析從臍帶分離的間質幹細胞用於表現間質幹細胞標記物CD73、CD90以及CD105。

【0087】 對於這些實驗，透過在三種不同培養基中培養臍帶組織，以從臍帶組織中分離間質幹細胞，然後如實施例2中所述在各培養基中繼代培養間質幹細胞。

【0088】 在這些實驗中使用以下三種培養基：a) 90% (v/v/補充有10% (v/v) FBS的DMEM)，b) 美國專利申請案2006/0078993以及相應的國際專利申請案WO2006/019357中描述的培養基PTT-4，其係由90% (v/v) CMRL1066以及10% (v/v) FBS組成(參見WO2006/019357的段落[0183])，以及c) 本發明的培養基PPT-6，在此描述了其組成分。在該流式細胞儀分析中，對三種所用培養基中的每一種分析了兩種不同的臍帶襯膜間質幹細胞群(cord lining mesenchymal stem cell，CLMC)群的樣品。

【0089】 以下方案係用於流式細胞儀分析。

### 【0090】 材料與方法

儀器名稱	公司名稱	系列名稱
BD FACS CANDO	BD	V07300367
倒立顯微鏡，CKX41SF	Olympus	4K40846
離心機，Micro spin Tabletop	Biosan	010213-1201-0003

試劑清單	公司名稱	目錄型號
10 X 胰蛋白酶	Biowest	X0930-100
10 X PBS	Lonza	17-517Q

DMEM	Lonza	12-604F
胎牛血清	GE healthcare	A11-151

抗體清單	公司名稱	目錄型號
人類 CD73 純化的 AD2 0.1 mg	BD	550256
人類 CD90 純化的 5E10 1 mL	BD	550402
人類 CD105 純化的 266 0.1mg	BD	555690
Alexa Fluor 647 山羊抗小鼠 IgG (H+L) *2 mg/mL*	BD	A21235

試劑名稱	組成分
1 X PBS (1L)	100 ml 的 10 X PBS + 900 ml 的無菌蒸餾水
1x PBA (50ml)	49.5 ml 的 1X PBS + 0.5 ml 的 FBS

### 【0091】 程序

#### 【0092】 a) 從臍帶襯膜分離與培養細胞

1. 將外植體組織樣品在細胞培養盤中培養並浸沒在各自的培養基中，然後如實施例2所述將其保持在37°C的CO<sub>2</sub>培養箱中。

2. 培養基每3天更換一次。

3. 在光學顯微鏡下監測來自組織培養外植體的細胞生長。

4. 在約70%的匯合時，透過胰蛋白酶消化(0.0125%胰蛋白酶/0.05% EDTA)

從培養皿中分離細胞並用於流式細胞儀實驗。

#### 【0093】 b) 用於實驗的細胞胰蛋白酶消化作用

1. 自細胞培養盤中移除培養基

2. 以無菌1X PBS輕輕沖洗以除去FBS的殘跡，因為FBS會干擾胰蛋白酶的酵素作用。

3. 將1X胰蛋白酶加入細胞培養盤中，並於37°C下培養3-5分鐘。

4. 在顯微鏡下觀察細胞，確認其脫落。透過加入含有FBS (含10% FBS的DMEM)的完全培養基以中和胰蛋白酶。
5. 使用移液器透過將培養基中的細胞吸移到培養皿的壁上來分解細胞團塊。收集細胞懸浮液並將其轉移到50 ml離心管中
6. 加入無菌1X PBS至細胞盤中並沖洗，收集細胞懸浮液至同一個離心管。
7. 以1800 rpm離心10分鐘。
8. 去除上清液，以PBA培養基重新懸浮細胞沉澱物。

**【0094】 c) 計數細胞**

1. 確認血球細胞計數器與蓋玻片清潔乾燥，最好以70%乙醇清洗，並擦乾，然後以Kim wipes(無絨紙)擦拭。
  2. 將少量細胞懸浮於微量離心管中，並從BSC抽風櫥中取出。
  3. 用等體積的台盼藍將懸浮細胞染色，向如500  $\mu$ l懸浮液中加入500  $\mu$ l台盼藍(稀釋因子 = 2X，產生0.2%台盼藍溶液)。
  4. 避免將細胞暴露於台盼藍超過30分鐘，因為台盼藍是有毒的，會導致死細胞的增加，進而導致錯誤的細胞計數結果。
  5. 將20  $\mu$ l細胞懸浮液混合物加入血球細胞計數器的每個腔室內，並在光學顯微鏡下觀察。
    - a. 在血球細胞計數器的每個象限中計數活細胞的數量(明亮的細胞；死細胞很容易吸收台盼藍，因此呈現暗色的)，在上下腔室中共有8個象限。
- 總細胞計數為(細胞/象限的平均數) $\times 10^4$ 個細胞/ml。

**【0095】 d) 染色細胞****i. 細胞染色前的準備**

第37頁，共 48 頁(發明說明書)

• 將細胞懸浮液分裝至3個試管(CD73、CD90以及CD105)中，二重複，且二管陰性對照，每根試管中含有50,000個細胞。

ii. 以一級抗體(Ab)染色

• 向100 ul細胞懸浮液中加入1  $\mu$ l [0.5 mg/ml Ab]一級抗體。在4°C下培養45分鐘。

- 以PBA補足1 ml體積。
- 在4°C下以8000 rpm離心5分鐘。
- 移除上清液。
- 加入1 ml PBA，重新懸浮沉澱
- 在4°C下以8000 rpm離心5分鐘。
- 移除上清液。
- 重新懸浮於100 ul PBA。

iii. 以二級抗體染色 - 在黑暗中

• 向100 ul細胞懸浮液加入1ul [0.5 mg/ml ab]二級抗體。在4°C下培養30分鐘。

- 以PBA補足1ml體積。
- 在4°C下以8000 rpm離心5分鐘。
- 移除上清液。
- 加入1 ml PBA，重新懸浮沉澱
- 在4°C下以8000 rpm離心5分鐘。
- 移除上清液
- 重新懸浮於200-300 ul PBA以進行流式細胞儀分析

• 將細胞轉移到FACS管中以便在BD FACS CANDO流式細胞儀中讀取數值。

【0096】 流式細胞儀分析的結果如圖2a至圖2c所示。圖2a所示為從臍帶組織中分離並在DMEM/10%FBS中培養後表現幹細胞標記物CD73、CD90以及CD105的分離的間質臍帶襯膜幹細胞的百分比，圖2b所示為分離的間質臍帶襯膜幹細胞在從臍帶組織中分離並在PTT-4中培養後表現幹細胞標記物CD73、CD90以及CD105的分離的間質臍帶襯膜幹細胞的百分比，圖2c所示為從臍帶組織中分離並在PTT-6中培養後表現幹細胞標記物CD73、CD90以及CD105的分離的間質臍帶襯膜幹細胞的百分比。從圖2a可以看出，使用DMEM/10% FBS作為培養基的細胞群具有約75%的CD73+細胞、78%的CD90+細胞，以及80%的CD105+細胞(兩次實驗的平均值)，而在分離/使用PPT-4培養基培養的臍帶組織(參見圖2b)，CD73-陽性，CD90-陽性，以及CD105-陽性的間質幹細胞的數量為約87% (CD73+細胞)，93% (CD90+細胞)以及86% (CD105+細胞)，兩次實驗的平均值。透過在本發明的PTT-6培養基中培養獲得的間質幹細胞群的純度相對於全部三種標記物(CD73、CD90以及CD105)為至少99.0%，這表示該細胞群的純度顯著高於以PPT-4培養基或DMEM/10%FBS培養者。此外，甚至更重要的是，透過在PTT-6中培養獲得的間質幹細胞群基本上是100%純度且確定的幹細胞群。這使得本發明的幹細胞群成為幹細胞療法的理想候選者。因此，這種間質臍帶襯膜幹細胞群可能成為這種基於幹細胞的治療方法的黃金標準。

【0097】 圖2所示的發現進一步透過圖3a與圖3b所示的流式細胞儀分析的結果得到證實。圖3a所示為從臍帶組織分離後並且在PTT-6培養基中培養，表現幹細胞標記物CD73、CD90以及CD105並且缺乏CD34、CD45與HLA-DR的表現

的分離的間質臍帶襯膜幹細胞(臍帶羊膜的間質幹細胞)的百分比。如圖3a所示，間質幹細胞群含有97.5%的活細胞，其中100%分別表現CD73、CD90以及CD105 (參見「CD73+CD90+」與「CD73+CD105+」的行列)，而99.2%幹細胞群不表現CD45，且100%的幹細胞群不表現CD34與HLA-DR (參見「CD34-CD45-」與「CD34-HLA-DR-」的行列)。因此，透過在PTT-6培養基中培養而獲得的間質幹細胞群基本上為100%純度且確定的幹細胞群，其符合將間質幹細胞用於細胞療法的標準(95%或更多幹細胞群表現CD73、CD90以及CD105，且98%或更多的幹細胞群缺乏CD34、CD45以及HLA-DR的表現，參見Sensebe等人「Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review」，同上)。這裡注意到，本發明之羊膜的間質幹細胞在標準培養條件下黏附於塑料，並在體外分化為成骨細胞、脂肪細胞與成軟骨細胞，參見美國專利9,085,755、美國專利8,287,854或WO2007/046775，因此符合通常被接受在細胞療法中使用間質幹細胞的標準。

【0098】圖3b所示為表現CD73、CD90以及CD105並缺乏CD34、CD45以及HLA-DR表現的分離的骨髓間質幹細胞的百分比。如圖3b所示，骨髓間質幹細胞群含有94.3%活細胞，其中100%分別表現CD73、CD90以及CD105 (見「CD73+CD90+」與「CD73+CD105+」的行列)，而僅有62.8%的骨髓幹細胞群缺乏CD45的表現，並且99.9%的幹細胞群缺乏CD34與HLA-DR的表現(參見「CD34-CD45」與「CD34-HLA-DR-」的行列)。因此，現被認為是間質幹細胞的黃金標準之骨髓間質幹細胞在幹細胞標記物方面，均質/純度遠低於本發明之(臍帶的羊膜的)間質幹細胞群。這一發現還顯示，本發明的幹細胞群可能是基於幹細胞療法的理想候選者，並且可能成為基於幹細胞的治療方法的黃金標準。

表1：所示為針對達爾伯克改良伊格爾培養基(DMEM)之Lonza公司的技術資訊表，包括在實驗部分中用於製造本發明之培養基(PTT-6)的說明性實施例的DMEM之目錄型號

爾伯克改良伊格爾培養基(DMEM)		快速參照表				
產品使用		葡萄糖	L-麩醯胺酸	酚紅	HEPES緩衝液	丙酮酸鈉
達爾伯克改良伊格爾培養基係在1969年被開發，且為基礎培養基伊格爾(BME)的改良，其與BME與MEM培養基不同之處在於：						
<ul style="list-style-type: none"> <li>維生素較MEM多4倍。維生素及胺基酸較BME多</li> <li>胺基酸的類型及含量較MEM及BME多</li> <li>鐵(硝酸鐵)</li> </ul>						
描述						
12-604	具有4.5 g/L葡萄糖，具有L-麩醯胺酸	4.5 g/L	+	+	-	+
12-614	具有4.5 g/L葡萄糖，不具L-麩醯胺酸	4.5 g/L	-	+	-	+
12-707	具有1.0 g/L葡萄糖，不具L-麩醯胺酸	1.0 g/L	-	+	-	+
12-708	具有4.5 g/L葡萄糖，不具L-麩醯胺酸	1.0 g/L	-	+	+	+
12-709	具有1.0 g/L葡萄糖，不具L-麩醯胺酸	4.5 g/L	-	+	+	+
12-708	具有4.5 g/L葡萄糖，以及25 mM HEPES緩衝液，不具L-麩醯胺酸	4.5 g/L	-	+	-	-
12-741	具有4.5 g/L葡萄糖，以及25 mM HEPES緩衝液，不具L-麩醯胺酸	4.5 g/L	+	+	-	-
12-914	具有4.5 g/L葡萄糖，不具L-麩醯胺酸	4.5 g/L	-	+	-	+
12-733	具有4.5 g/L葡萄糖，不具L-麩醯胺酸，不具丙酮酸鈉	4.5 g/L	-	-	-	+
12-917	具有4.5 g/L葡萄糖，具有L-麩醯胺酸，不具丙酮酸鈉	4.5 g/L	-	-	-	+
12-914	具有4.5 g/L葡萄糖，不具L-麩醯胺酸，篩選以支援融合瘤生長					
12-917	具有4.5 g/L葡萄糖，不具L-麩醯胺酸或酚紅					
15-604	具有4.5 g/L葡萄糖，具有L-麩醯胺酸，不具丙酮酸鈉，粉末					
15-614	具有4.5 g/L葡萄糖，具有L-麩醯胺酸或丙酮酸鈉，粉末 (粉狀配方需要添加49.3 mL的NaHCO <sub>3</sub> 7.5% 溶液或3.70 g/L的NaHCO <sub>3</sub> 粉末)					

## 說明書

	無菌度	pH值	滲透重量莫爾濃度 (mOsm)	細胞生長產率(對 照組的%)	內毒素(EU/ml)
12-604	Neg.	7.0-7.4	324-352	≥75%	FIO
12-614	Neg.	7.0-7.4	324-352	≥75%	FIO
12-707	Neg.	7.0-7.4	306-346	≥75%	FIO
12-708	Neg.	7.03- 7.27	300-326	≥75%	FIO
12-709	Neg.	7.0-7.4	321-351	≥75%	FIO
12-733	Neg.	7.0-7.4	318-360	≥75%	FIO
12-741	Neg.	7.0-7.4	318-360	≥75%	FIO
12-914	Neg.	7.0-7.4	324-352	≥85% **	FIO
12-917	Neg.	7.0-7.4	329-343	≥75%	FIO
15-604 ***	-	5.5-7.0	235-265	≥75%	≤1.0
15-614 ***	-	5.5-7.0	235-265	≥75%	≤1.0

FIO – 僅供參考

\*\* 功能測試之結果

\*\*\* 溼度含量#1.0

## 儲存

2°C 至 8°C

## 產品使用聲明

這些產品僅供研究使用。不允許用於人類或獸醫使用，用於人體或動物之應用，或用於臨床或活體外程序之用。

## 訂購資訊

型號	描述	大小
12-604F	DMEM具有4.5 g/L葡萄糖，具有L-麩醯胺酸	500 ml
12-604Q	DMEM具有4.5 g/L葡萄糖，具有L-麩醯胺酸	1 L
12-614F	DMEM具有4.5 g/L葡萄糖，不具L-麩醯胺酸	500 ml
12-614Q	DMEM具有4.5 g/L葡萄糖，不具L-麩醯胺酸	1 L
12-707F	DMEM具有1.0 g/L葡萄糖，不具L-麩醯胺酸	500 ml
12-708F	DMEM具有1.0 g/L葡萄糖，以及25 mM HEPES緩衝液，不具L-麩醯胺酸	500 ml
12-709F	DMEM具有4.5 g/L葡萄糖，以及25 mM HEPES緩衝液，不具L-麩醯胺酸	500 ml
12-733F	DMEM具有4.5 g/L葡萄糖，不具L-麩醯胺酸，不具丙酮酸鈉	500 ml
12-733Q	DMEM具有4.5 g/L葡萄糖，不具L-麩醯胺酸，不具丙酮酸鈉	1 L
12-741F	DMEM具有4.5 g/L葡萄糖，具有L-麩醯胺酸，不具丙酮酸鈉	500 ml
12-914F	DMEM具有4.5 g/L葡萄糖，不具L-麩醯胺酸，篩選以支援融合瘤生長	500 ml
12-917F	DMEM具有4.5 g/L葡萄糖，不具L-麩醯胺酸或酚紅	500 ml
15-604D	DMEM具有4.5 g/L葡萄糖，具有L-麩醯胺酸，不具丙酮酸鈉，粉末	1 x 10L
15-604F	DMEM具有4.5 g/L葡萄糖，不具L-麩醯胺酸或丙酮酸鈉，粉末	1 x 50L
15-614D	DMEM具有4.5 g/L葡萄糖，具有L-麩醯胺酸或丙酮酸鈉，粉末	1 x 10L

表2：所示為針對Ham's F12培養基之Lonza公司的技術資訊表；

### Ham's F12培養基

#### 產品使用

Ham's F12培養基是一種營養混合物，當與激素及運鐵蛋白合併之血清一起使用時，可以培養各種哺乳動物及融合瘤細胞。

#### 說明書

無菌度	pH值	滲透重量莫爾 濃度 (mOsm)
陰性	7.07-7.40	286-305

細胞生長產率	內毒素 (EU/ml)
≥ 對照組的 75%	F10

#### 儲存

2°C 至 8°C

#### 產品使用聲明

這些產品僅供研究使用。不允許用於人類或獸醫使用，用於人體或動物之應用，或用於臨床或活體外程序之用。

#### 訂購資訊

型號	描述	大小
12-615F	Ham's F12培 養基具有L- 麩醯胺酸	500 ml

表3：所示為針對DMEM：F12 (1：1)培養基之Lonza公司的技術資訊表，包括在實驗部分中用於製造本發明之培養基(PTT-6)的說明性實施例的DMEM：F12 (1：

### 1)培養基之目錄型號

#### DMEM: F12 (1:1)培養基

產品使用				儲存			
DMEM與Ham's F12的組合已被廣泛用於展示各種激素與生長因子在目標組織上的效果。				2°C 至 8°C			
描述				產品使用聲明			
12-719 具有L-麩醯胺酸，15 mM HEPES，以及3.151 g/L葡萄糖				這些產品僅供研究使用。不允許用於人類或獸醫使用，用於人體或動物之應用，或用於臨床或活體外程序之用。			
15-719 粉末 - 具有L-麩醯胺酸，15 mM HEPES，以及3.151 g/L葡萄糖。粉狀培養基需要添加16.0 ml/L的NaHCO <sub>3</sub> ，7.5%溶液或1.2 g/L的NaHCO <sub>3</sub> 粉末				訂購資訊			
04-687 具有3.151 g/L葡萄糖，具有L-麩醯胺酸，不具有HEPES				型號	描述	大小	
				12-719F	DMEM:F12具有L-麩醯胺酸，15 mM HEPES，以及3.151 g/L葡萄糖	500 ml	
				12-719Q	DMEM:F12具有L-麩醯胺酸，15 mM HEPES，以及3.151 g/L葡萄糖	1 L	
說明書				15-719D	DMEM:F12 粉末 - 具有L-麩醯胺酸，15 mM HEPES，以及3.151 g/L葡萄糖	1 x 10L	
	無菌度	pH值	滲透重量莫爾濃度 (mOsm)				
12-719	陰性	7.0-7.4	286-356				
15-719*	陰性	4.5-6.5	260-290				
04-687	陰性	FIO	FIO				
	細胞生長產率	內毒素 (EU/ml)	溼度				
12-719	≥ 對照組的75%	FIO	--	04-687Q	DMEM:F12具有3.151 g/L葡萄糖，具有L-麩醯胺酸，不具有HEPES	1 L	
15-719*	≥ 對照組的75%	≤ 1 EU/ml	≤2%				
04-687	--	FIO	--				
* pH值、滲透重量莫爾濃度、內毒素，以及溼度測試在不含有NaHCO <sub>3</sub> 的情況下進行；添加NaHCO <sub>3</sub> 以進行細胞生長測試。							

表4：所示為針對M171培養基之Life Technologies公司的技術資訊表，包括在實驗部分中用於製造本發明之培養基(PTT-6)的說明性實施例的M171培養基之目錄型號；

### 培養基171，培養基171PRF，以及MEGS

培養基171 M-171-500 500ml	培養基171PRF (無酚紅) M-171PRF-500 500ml
<p><b>產品描述</b></p> <p>培養基171與培養基171PRF為無菌的液體組織培養基，其意圖用於作為在完整培養環境中的一種組成分，用於正常人類乳腺上皮細胞之生長。培養基171為含有必需與非必需胺基酸、維生素、其他有機化合物、微量礦物質以及無機鹽的基礎培養基。培養基171PRF為一種不含酚紅的培養基171。這些培養基不含抗生素、抗真菌劑、激素、生長因子或蛋白質。這些培養基為HEPES與碳酸氫鹽緩衝液，設計用於5%CO<sub>2</sub>/95%空氣的培養箱。為了支援正常人類乳腺上皮細胞的接種及長期增殖，這些培養基必須補充乳腺上皮生長添加劑(MEGS，目錄型號S-015-5)。</p> <p><b>意圖使用</b></p> <p>培養基171意圖用於正常人類乳腺上皮細胞的常規培養。培養基171PRF適用於希望在不存在酚紅的情況下培養正常人類乳腺上皮細胞的研究人員所使用。當補充MEGS時，這些培養基將支援在2.5×10<sup>3</sup> 個細胞/cm<sup>2</sup>以及8×10<sup>4</sup> 個細胞/cm<sup>2</sup>之間的密度之正常人類乳腺上皮細胞的接種及增殖。<b>本產品僅供研究使用。不適用於動物、人類或診斷程序。</b></p> <p><b>小心：如果處理不當，本產品的某些組成分可能會對健康造成危害。處理本產品時應採取適當的防護措施，包括穿戴防護服及眼鏡。妥善處置。</b></p>	<p><b>儲存與穩定性</b></p> <p>培養基171與培養基171PRF在4°C下儲存於我們的設施中，並在環境溫度下運輸。收到後，這些培養基應該保存在4°C，<u>不</u>應該被冰凍。<b>避光</b>。這些組織培養基的幾個組成成分是不穩定的，我們建議培養基不要長時間暴露於光線下。如果培養基在使用前加熱，請勿超過37°C。如果在4°C的黑暗環境中儲存，產品在標籤上的有效期限內保持穩定。</p> <p><b>補充培養基171之製備</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 解凍一瓶MEGS。從冷藏庫中取一瓶培養基。確保容器的蓋子是鎖緊的。</li> <li>2. 輕輕地旋轉補充瓶。避免將添加劑濺到瓶子的蓋子上或引起補充劑發泡。</li> <li>3. 以消毒溶液(如70%乙醇或異丙醇)擦拭容器外部。</li> <li>4. 在層流式培養罩中使用無菌技術，將補充瓶的全部內容物轉移到培養基瓶中。</li> <li>5. 密封瓶中的補充培養基，並旋轉混合內容物，以確保溶液均勻。避免使培養基發泡。</li> </ol> <p><b>補充培養基171之儲存與穩定性</b></p> <p>一旦培養基171或培養基171PRF補充了MEGS，補充的培養基應在4°C黑暗中保存，<u>不</u>應被冷凍。當在4°C黑暗中儲存時，補充的培養基可穩定儲存1個月。</p> <p><b>選擇的參照</b></p> <p>培養基171配方基於培養基MCDB 170，並進行了修改。</p> <p>Hammond SL，Ham RG，Stampfer MR； PNAS 81：5435-5439,1984</p>

## MEGS

### 乳腺上皮生長補充劑

型號 S-015-5

5 ml

#### 產品描述

乳腺上皮生長補充劑(MEGS)為一種無菌的濃縮(100X)溶液，作為完整培養環境中的一個組成分，用於正常人類乳腺上皮細胞的生長。每5 ml的MEGS瓶含有培養正常人類乳腺上皮細胞所必需的所有生長因子、激素及組織萃取物，而且為一瓶500 ml的培養基171或培養基171PRF的正確補充量。MEGS為含有牛垂體萃取物(BPE)、牛胰島素、氫皮質酮與重組人類表皮生長因子的離子平衡補充劑。當一瓶500 ml的培養基171或培養基171PRF補充有MEGS時，補充培養基中組成分的最終濃度為：BPE，0.4% v/v；牛胰島素，5 µg/ml；氫皮質酮，0.5 µg/ml；以及重組人類表皮生長因子，3 ng/ml。

#### 意圖使用

MEGS意圖與培養基171或培養基171PRF配合使用，用於正常人類乳腺上皮細胞的常規無血清培養。**本產品僅供研究使用。不適用於動物、人類或診斷程序。**

**小心：如果處理不當，本產品的某些組成分可能會對健康造成危害。處理本產品時應採取適當的防護措施，包括穿戴防護服及眼鏡。妥善處置。**

#### 有限使用標籤許可證第5號：Invitrogen技術

購買此產品時，向買方傳達在買方(無論買方為學術型還是營利型實體)進行的研究中不可轉讓使用購買的產品之數量及組成分之權利。買方不得將(a)本產品(b)其組成分或(c)使用本產品或其組成分的材料出售或以其他方式轉讓給第三方或以其他方式使用本產品或其組成分或使用本產品或其組成分為商業目的。買方可以將通過使用本產品所獲得的訊息或材料轉讓給科學合作者，前提是此類轉讓非用於任何商業目的，且合作者書面同意(a)不將此類材料轉讓給任何第三方，以及(b)僅將這些轉讓的材料及/或訊息用於研究，而非用於商業目的。商業目的係指任何一方當事人考慮的活動，可能包括，但不限於：(1)在製造過程中使用產品或其組成分；(2)使用產品或其組成分以提供服務、訊息或數據；(3)產品或其組成分用於治療、診斷或預防目的；或(4)轉售產品或其組成分，無論該產品或其組成分是否轉售用於研究。對於受多個有限使用標籤許可限制的產品，應以最嚴格限制使用標籤許可條款為準。Life Technologies公司不會向Life Technologies公司所擁有或控制的專利侵權買方索賠，該專利涵蓋了基於製造、使用或銷售由研究開發的治療性、臨床診斷性、疫苗或預防性產品。買方使用本產品或其組成分，但前提是本產品及其任何組成分均不得用於生產此類產品。如果購買者不願意接受這個限制使用聲明，Life Technologies公司願意接受退貨並全額退款。有關為研究以外的目的購買本產品許可證的訊息，請聯繫美國加州92008卡爾斯巴德市範艾倫路5791號Life Technologies公司授權部門，電話：(760)603-7200。傳真(760)602-6500。電子郵件：outlicensing@invitrogen.com。

©2009 Life Technologies Corporation。版權所有。

僅供研究使用。不適用於任何動物或人類治療或診斷用途。

**僅供研究使用。**

#### 儲存與穩定性

MEGS儲存在-20°C我們的設施中，並於乾冰內運送。收到後，產品應存放於-20°C不能自動除霜的冷凍箱中。當儲存在-20°C時，產品是穩定的，直到標籤上顯示的有效日期。

在-20°C長期儲存後，MEGS可能含有少量沉澱。這種沉澱物是由MEGS的BPE組成分中的冷-不溶的物質形成的，不會影響產品的性能。

#### 解凍

要解凍，請將產品置於37°C水浴中或4°C整夜。如果在水浴中解凍，產品解凍後請勿將產品置於37°C。有關將MEGS添加到培養基171的說明，請參閱基本培養基附帶的說明。

選擇的參照

MEGS配方基於公開的培養基MCDB 170補充劑，並作了修改。

Hammond SL, Ham RG, Stampfer MR;  
PNAS 81: 5435-5439,1984。

【0099】對於本領域技術人員顯而易見的是，在不脫離本發明的範圍及精神的情況下，可以對本文公開的發明進行各種替換及修改。

【0100】說明書中提及的所有專利及出版物指示了本發明所屬領域的普通技術人員之水準。所有的專利及出版物都透過引用方式併入本文，其程度如同每個單獨的出版物被具體地且單獨地指出透過引用併入。

【0101】這裡說明性描述的發明可適當地在沒有任何一個或多個要素，一個或多個限制的情況下實施，這裡沒有具體公開。因此，例如，「包含」，「包括」，「含有」等詞應該被廣義地解讀而沒有限制。此外，這裡使用的術語及表達已經被作為描述性的術語而非限制性的，且不意圖使用這樣的術語及表達來排除所示出及描述的特徵或者其部分的任何等同物，但其認識到在要求保護的本發明之範圍內可以進行各種修改。因此，應該理解的是，儘管透過較佳具體實施例及可選特徵特定公開了本發明，但是本領域技術人員可以採取本文公開之其中體現本發明之修改及變化，且這樣的修改及變化被認為在本發明之範圍內。這裡已經廣泛地且一般性地描述了本發明。落入一般性公開內容中的每個較窄的物種及亞屬群也構成本發明之一部分。這包括對本發明的一般性描述，附帶條件或負面限制從該屬中移除任何主題，而不管在本文中是否具體列舉了所摘取的材料。另外，在根據馬庫西群組描述本發明之特徵或方面的情況下，本領域的技術人員將認識到，本發明也由此根據馬庫西群組的任何單個成員或亞組成員進行描述。從下面的申請專利範圍中，本發明的其它具體實施例將變得明顯。

【符號說明】無

【生物材料寄存】無

**【發明申請專利範圍】**

**【請求項1】**一種從臍帶的羊膜分離間質幹細胞群之方法，該方法包括在包含達爾伯克氏改良伊格爾培養基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、F12 (Ham's F12培養基)、M171 (培養基171)以及胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)的培養基中培養臍帶組織，其中該培養基包含終濃度為約55至65% (v/v)的DMEM、終濃度為約5至15% (v/v)的F12、終濃度為約15至30% (v/v)的M171以及終濃度為約1至8% (v/v)的FBS。

**【請求項2】**如請求項1之方法，其中該培養基包含終濃度為約57.5至62.5% (v/v)的DMEM、終濃度為約7.5至12.5% (v/v)的F12、終濃度為約17.5至25.0% (v/v)的M171以及終濃度為約1.75至3.5% (v/v)的FBS。

**【請求項3】**如請求項2之方法，其中該培養基包含終濃度為約61.8% (v/v)的DMEM、終濃度為約11.8% (v/v)的F12、終濃度為約23.6% (v/v)的M171以及終濃度為約2.5% (v/v)的FBS。

**【請求項4】**如請求項1-3中任一項之方法，其中該培養基進一步包含終濃度為約1 ng/ml至約20 ng/ml的表皮生長因子(Epidermal Growth Factor, EGF)。

**【請求項5】**如請求項4之方法，其中該培養基包含終濃度為約10 ng/ml的EGF。

**【請求項6】**如請求項1-3中任一項之方法，其中該培養基包含終濃度為約1 µg/ml至10 µg/ml的胰島素。

**【請求項7】**如請求項6之方法，其中該培養基包含終濃度為約5 µg/ml的胰島素。

**【請求項8】**如請求項1-3中任一項之方法，其中該培養基進一步包含以下補充物中的至少一種：腺嘌呤、氫皮質酮，以及3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)。

【請求項9】如請求項8之方法，其中該培養基包含腺嘌呤、氫皮質酮，以及 3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)中的全部三種。

【請求項10】如請求項8之方法，其中該培養基包含終濃度為約0.01至約0.1 µg/ml腺嘌呤的腺嘌呤，終濃度為約0.1至約10 µg/ml氫皮質酮的氫皮質酮及/或終濃度為約0.5至約5 ng/ml的3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)。

【請求項11】如前述請求項1-3中任一項之方法，包含培養該臍帶組織直到該羊膜の間質幹細胞的細胞生長達到約70-80%匯合(confluency)。

【請求項12】如請求項1-3中任一項之方法，其中該臍帶組織為整個臍帶的一部分或該臍帶的羊膜。

【請求項13】如請求項1-3中任一項之方法，其中至少約90%或更多、約91%或更多、約92%或更多、約92%或更多、約93%或更多、約94%或更多、約95%或更多、約96%或更多、約97%或更多、約98%或更多、約99%或更多的分離の間質幹細胞表現以下標記物：CD73、CD90以及CD105。

【請求項14】如請求項1-3中任一項之方法，其中至少約90%或更多、約91%或更多、約92%或更多、約92%或更多、約93%或更多、約94%或更多、約95%或更多、約96%或更多、約97%或更多、約98%或更多、約99%或更多的分離の間質幹細胞缺乏以下標記物的表現：CD34、CD45以及HLA-DR (人類白細胞抗原-抗原D相關)。

【請求項15】如請求項14之方法，其中約97%或更多、約98%或更多、約99%或更多的該分離の間質幹細胞表現CD73、CD90以及CD105，並缺乏CD34、CD45以及HLA-DR的表現。

【請求項16】如前述請求項1-3中任一項之方法，進一步包含保存該分離的幹細胞/先驅細胞以供進一步使用。

【請求項17】如請求項16之方法，其中保存係透過低溫保存進行。

【請求項18】一種適於從臍帶的羊膜分離間質幹細胞群的培養基之製備方法，該方法包含混合以獲得起始體積為498.5ml的培養基：

i. 250 ml的DMEM

ii. 118 ml的M171

iii. 118 ml的DMEM/F12

iv. 12.5 ml的胎牛血清(FBS)(終濃度為2.5%)。

【請求項19】如請求項18方法，進一步包含添加

v. 1 ml的EGF原液(5  $\mu\text{g/ml}$ )以達到10  $\text{ng/ml}$ 的終濃度

vi. 0.175 ml的胰島素原液(14.28  $\text{mg/ml}$ )以達到5  $\mu\text{g/ml}$ 的終濃度。

【請求項20】如請求項18或19之方法，進一步包含向DMEM添加一或多種以下補充物：腺嘌呤、氫皮質酮、3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)，從而達到總體積為500 ml的培養基。

【請求項21】如請求項20之方法，其中在DMEM中的該補充物的終濃度如下：

約0.05至0.1  $\mu\text{g/ml}$ 的腺嘌呤，例如約0.025  $\mu\text{g/ml}$ 腺嘌呤，

約1至10  $\mu\text{g/ml}$ 的氫皮質酮，

約0.5至5  $\text{ng/ml}$ 的3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)，例如1.36  $\text{ng/ml}$ 的3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)。

【請求項22】一種從臍帶羊膜分離間質幹細胞的方法，包含在透過如請求項18-21中任一項所定義之方法製備的細胞培養基中培養羊膜組織。

【請求項23】一種細胞培養基，包含：

- 終濃度為約55至65% (v/v)的DMEM，
- 終濃度為約5至15% (v/v)的F12，
- 終濃度約為15至30% (v/v)的M171，以及
- 終濃度為約1至8% (v/v)的FBS。

【請求項24】如請求項23之細胞培養基，其中該培養基包含終濃度為約57.5至62.5% (v/v)的DMEM、終濃度為約7.5至12.5% (v/v)的F12、終濃度為約17.5至25.0% (v/v)的M171，以及終濃度為約1.75至3.5% (v/v)的FBS。

【請求項25】如請求項24之細胞培養基，其中該培養基包含終濃度為約61.8% (v/v)的DMEM、終濃度為約11.8% (v/v)的F12、終濃度為約23.6% (v/v)的M171，以及終濃度為約2.5% (v/v)的FBS。

【請求項26】如請求項23-25中任一項之細胞培養基，其中該培養基進一步包含終濃度為約1 ng/ml至約20 ng/ml的表皮生長因子(EGF)。

【請求項27】如請求項26之細胞培養基，其中該培養基包含終濃度為約10 ng/ml的EGF。

【請求項28】如請求項23-25中任一項之細胞培養基，其中該培養基包含終濃度為約1 µg/ml至10 µg/ml的胰島素。

【請求項29】如請求項28之細胞培養基，其中該培養基包含終濃度為約5 µg/ml的胰島素。

【請求項30】如請求項23-25中任一項之細胞培養基，其中該培養基進一步包含以下補充物中的至少一種：腺嘌呤、氫皮質酮以及3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)。

【請求項31】如請求項30之細胞培養基，其中該培養基包含腺嘌呤、氫皮質酮以及3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)中的全部三種。

【請求項32】如請求項30之細胞培養基，其中該培養基包含終濃度為約0.05至約0.1  $\mu\text{g/ml}$ 腺嘌呤的腺嘌呤、終濃度為約1至約10  $\mu\text{g/ml}$ 氫皮質酮的氫皮質酮，及/或終濃度為約0.5至約5  $\text{ng/ml}$ 的3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)。

【請求項33】如請求項23-25中任一項之細胞培養基，其中500 ml的該細胞培養基包含：

- i. 250 ml的DMEM
- ii. 118 ml的M171
- iii. 118 ml的DMEM/F12
- iv. 12.5 ml的胎牛血清(FBS)(終濃度為2.5%)。

【請求項34】如請求項33之細胞培養基，進一步包含

- v. 終濃度為10  $\text{ng/ml}$ 的EGF
- vi. 終濃度為5  $\mu\text{g/ml}$ 的胰島素；以及
- vii. 0.175 ml的胰島素(終濃度為5  $\mu\text{g/ml}$ )。

【請求項35】如請求項33之細胞培養基，進一步包含終濃度為約0.05至約0.1  $\mu\text{g/ml}$ 腺嘌呤的腺嘌呤、終濃度為約1至約10  $\mu\text{g/ml}$ 氫皮質酮的氫皮質酮，及/或終濃度為約0.5至約5  $\text{ng/ml}$ 的3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺酸鈉鹽(T3)。

【請求項36】一種如請求項23-35中任一項所定義之細胞培養基用於自臍帶的羊膜分離間質幹細胞之用途。

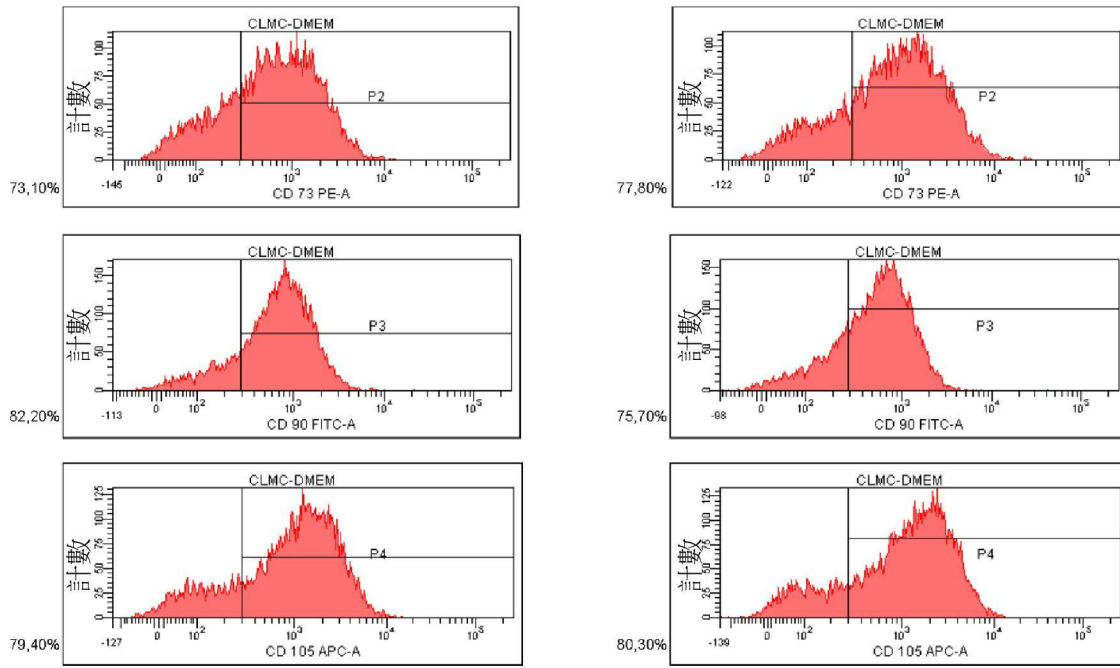
【請求項37】一種如請求項23-35中任一項所定義之細胞培養基用於培養來自臍帶羊膜的間質幹細胞之用途。

## 【發明圖式】

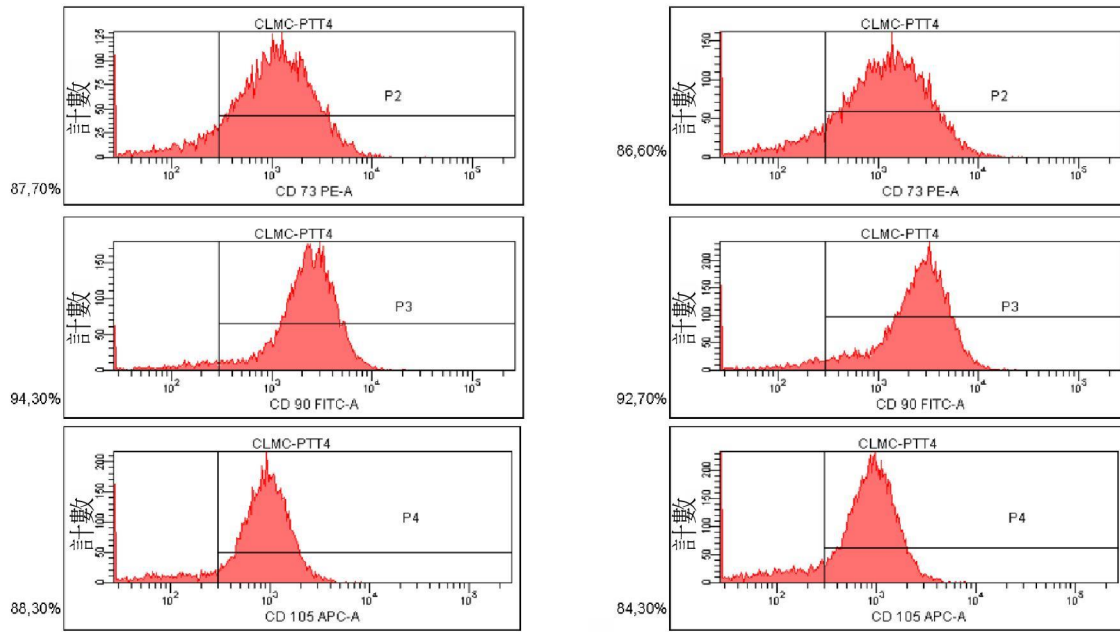
PTT6培養基成分清單

培養基組成分清單	公司名稱	型號
<b>基礎培養基</b>		
DMEM (在本文中也被稱為 PTT6基礎培養基)	Lonza公司	12-604F
DMEM/F12	Lonza公司	12-719F
M171	Life Technologies公司	M171500
<b>血清</b>		
胎牛血清	GE Healthcare公司	A15-151
<b>抗生素</b>		
青黴素 - 鏈黴素 - 兩性黴素B	Lonza公司	17-745E
<b>補充劑</b>		
腺嘌呤(選擇性)	Sigma公司	A8626-25G
氫皮質酮(選擇性)	Sigma公司	H-0888
表皮生長因子	Millipore公司	GF-144
T3 (3,3',5-三碘-L-甲狀腺胺 酸鈉鹽) (選擇性)	Sigma公司	200-223-5
重組人類胰島素AOF	Life Technologies公司	A11382IJ

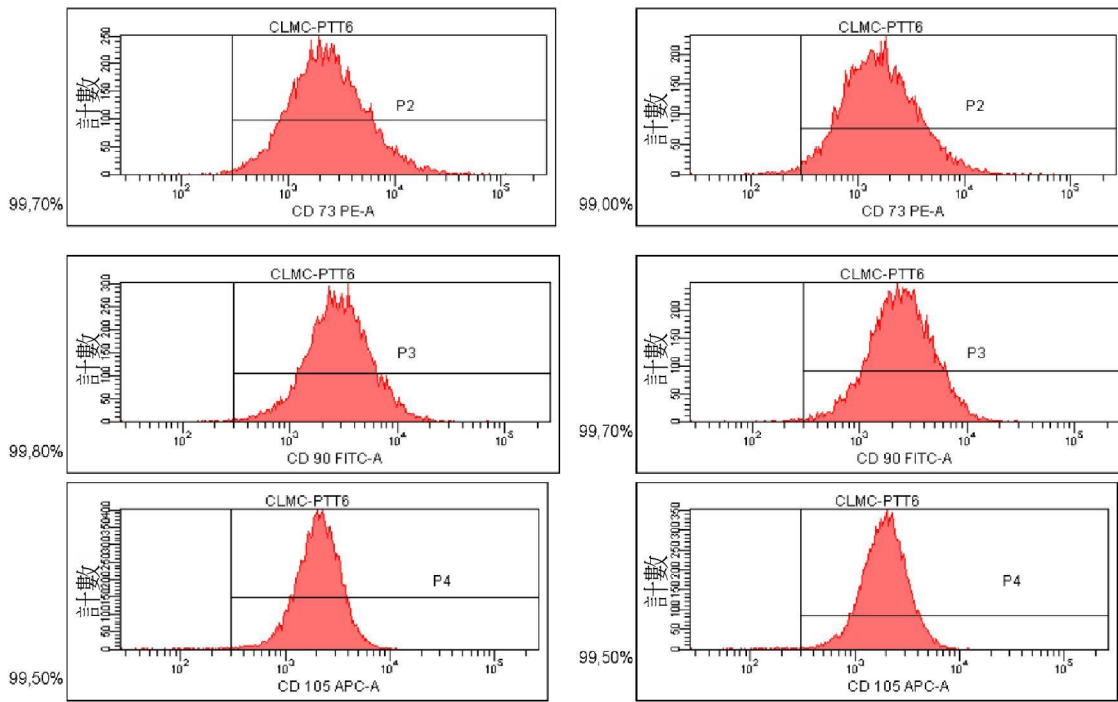
## 【圖1】



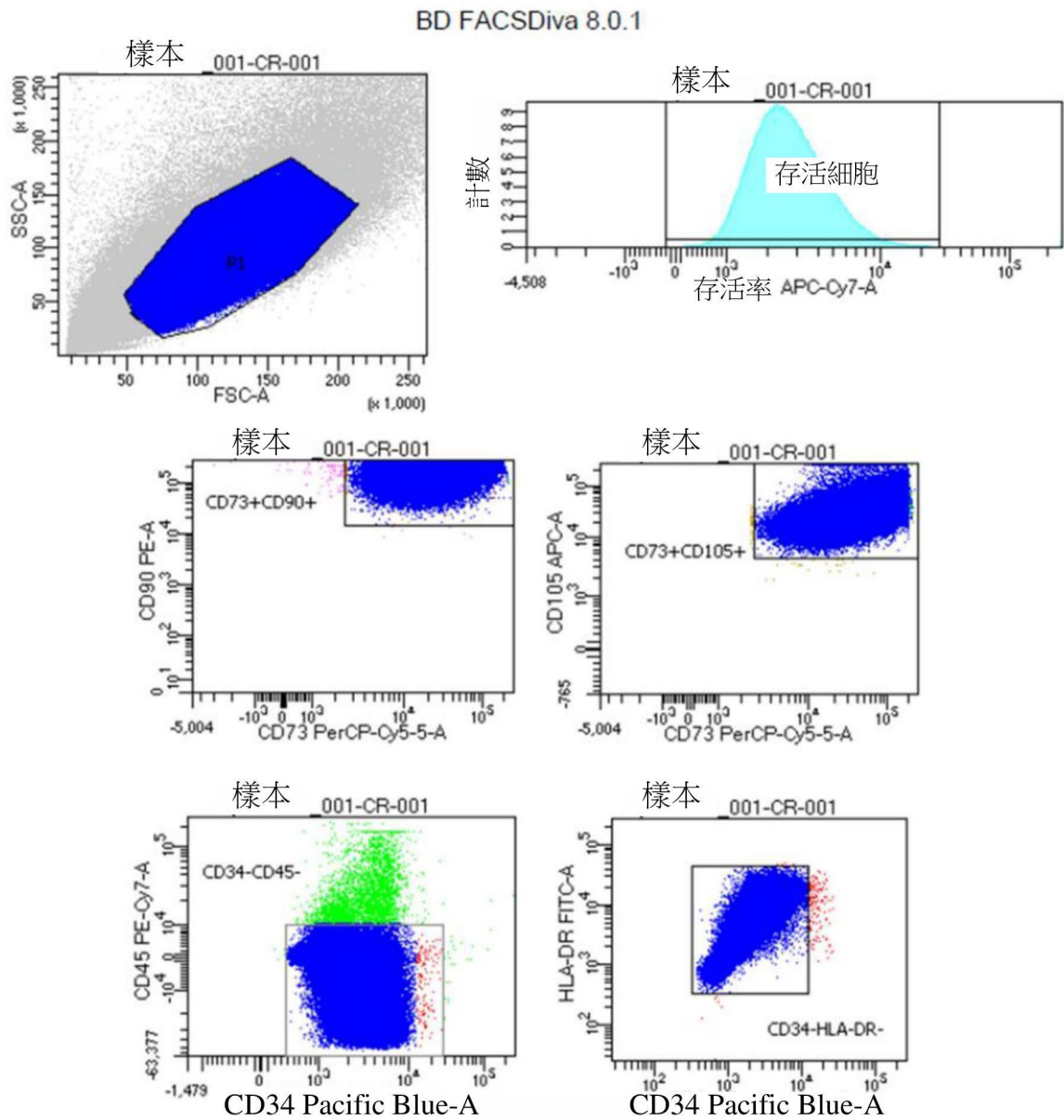
【圖2a】



【圖2b】

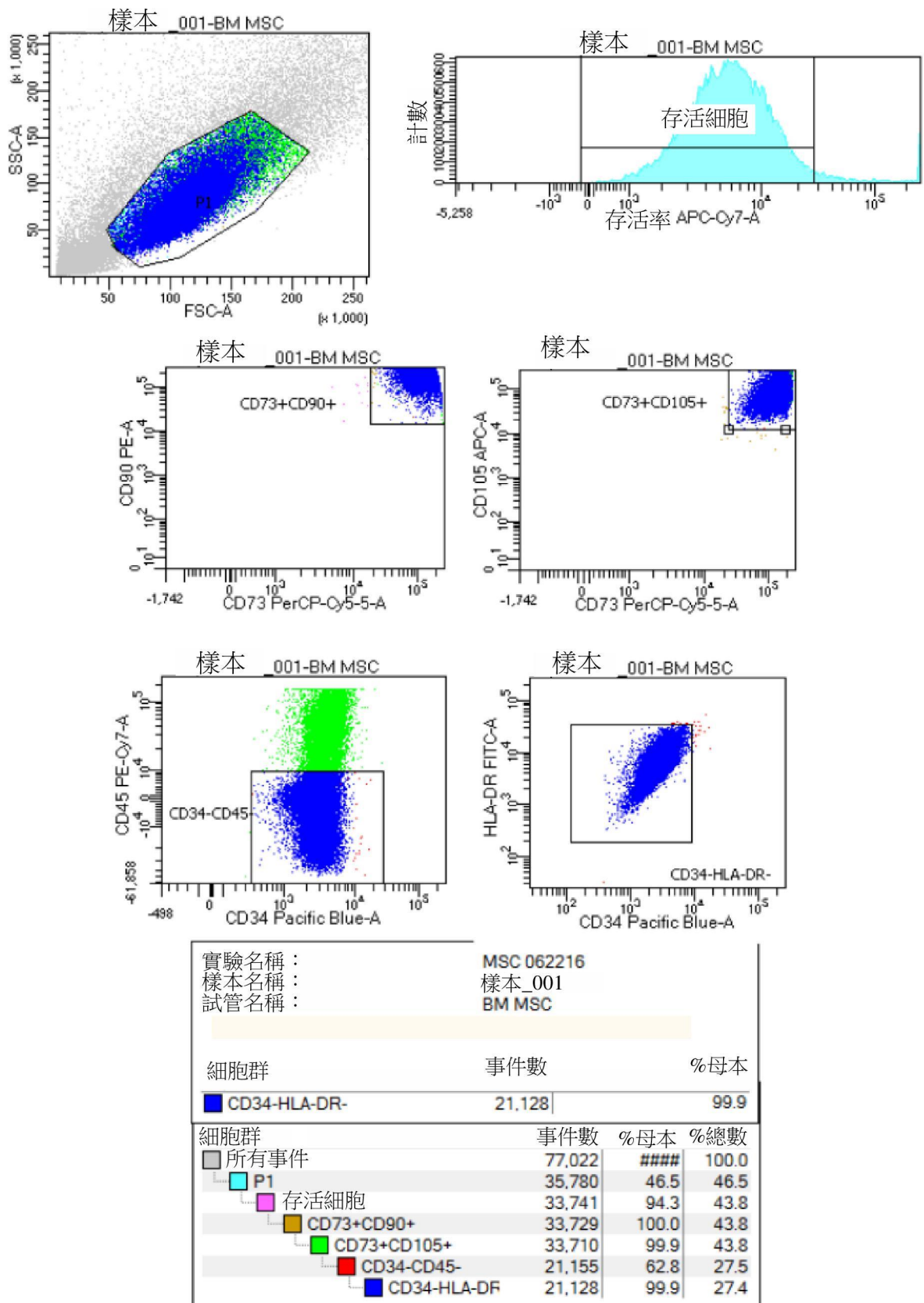


【圖2c】



試管: CR-001	事件數	%母本	%總數
細胞群			
■ 所有事件	540.988	####	100.0
■ P1	425.093	78.6	78.6
■ 存活細胞	414.643	97.5	76.6
■ CD73+CD90+	414.554	100.0	76.6
■ CD73+CD105+	414.490	100.0	76.6
■ CD34-CD45-	411.206	99.2	76.0
■ CD34-HLA-DR-	411.061	100.0	76.0

【圖3a】



【圖3b】