

-

-

2.~4. 美國 /USA

5. 荷蘭 / NETHERLANDS

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，
其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國、2003.11.24、60/524,511

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

相關申請案之交互參見：

本案主張於 2003 年 11 月 24 日提申之美國臨時申請案第 60/524,511 號之利益，其完整揭示係以引用方式納入本文中。

【發明所屬之技術領域】

本發明提供了一種藉由移除非幹細胞成分自骨髓及血液成分之非均勻混合物中富集幹細胞組成物之方法，其包括使用切向流式過濾裝置(Tangential flow filtration device)分離非幹細胞成分。

【先前技術】

發明背景

經富集幹細胞的細胞族群在研究或治療領域中是必要的。典型的幹細胞來源包括骨髓、總周圍血液細胞、白血球去除法或分離術產物，特別是來自「經活動化」捐贈者，或是來自較不尋常之來源，例如臍帶血和組織或器官之懸浮液。幹細胞之富集目前有幾種方式，典型的方法包括密度步驟梯度法（例如：FICOLL-HYPAQUE[®]、膠態二氧化矽、及其他相似物）、洗提法、離心法、紅血球低張溶胞法以及各式以上方法之組合。舉例來說，從骨髓純化幹細胞必須先進行紅血球及顆粒性白血球移除，通常以 FICOLL-HYPAQUE[®] 密度梯度離心法達成。以上每個方法皆有缺

點，其中之一便是富集步驟後之耗力清洗步驟，例如對密度梯度離心介質之清洗。

在富集步驟之後，該細胞通常以重複之程序清洗。步驟包括將富集之細胞懸浮液置於離心管後，使用離心機將細胞沈澱於管底。將離心管自離心機移出，並將上清液自細胞清洗沈澱倒除。再加入清洗溶液，懸浮起細胞清洗。以上步驟通常需重複二至四次。

該清洗程序之其一缺點係重複懸浮及離心細胞會降低細胞活性及增加溶胞情形。另一缺點係離心會增加細胞被細菌及其他感染物污染的機會。即使所有材料皆保持無菌狀態，但離心管之重複開啟、吸量管及清洗液瓶與空氣之接觸皆可能會造成污染。此污染風險充分顯著於醫療管理局對於操作細胞必須使用「封閉」系統之要求。

過濾法也常用於自血液中移去細胞而留下其後可使用的其他血液組成。此方法通常係以無法恢復之形式將細胞留在過濾器上，而使其他血液組成物通過過濾器流到集液管中。舉例來說，過濾器可用於自血液中移除白血球，使輸血後產生之同種異體免疫反應降低。白血球之移除通常是以交織塑膠纖維篩製成之過濾器進行。該篩通常製造成可將白血球捕捉在有足夠深度的網狀基質中，使細胞能留在整個過濾器空間中而不會堵塞住過濾器，不至於像白血球在平面過濾法一般堵塞。

除了該物理性細胞捕捉特性之外，過濾器之材料及大表面區域使白血球能可逆地沾黏在表面上，許多會發生沾

黏之細胞是醫療方法中的理想材料。過濾器捕捉及沾黏功能組合創造了輸血治療法中先行移除白血球技術之有效工具；但是，若白血球為該收集之目標細胞，此過濾法則無優點。

有一種已被用於區分各種不同顆粒之方法稱為切向流式過濾法（Tangential flow filtration, TFF），或「交互流」式過濾法。TFF 依賴一股平行於多孔濾膜表面之液體運動。濾膜之孔允許小於孔洞之流動液體及其中之顆粒通過。此外，液體與濾膜平行之交互流動（或稱切向流動）也可避免大於表面孔洞顆粒之堆積。

TFF 茲已應用於各式材料之粗略分離。於製藥領域方面，Genovesi (*J. Parenter. Sci. Technol.*, 37:81, 1983) 將其應用做了詳細縱覽，包括注射用無菌水之過濾、溶劑系統的澄清作用、液狀培養基與細菌培養基中酵素之過濾。Marinaccio 等人（WO 85/03011）提出使用於血漿置換移除特定血液成分之方法；Robinson 等人（美國專利 5,423,738）提出使用切向流式過濾法自血液除去血漿，使血球細胞及血小板再移植回病患體內之方法。

在其他應用上，TFF 曾被出使用於過濾啤酒（EP 0 208 450），特別是於過濾如酵母菌及其他懸浮固體之顆粒狀物。Kothe 等人（美國專利 4,644,056）揭示 TFF 自牛奶或初乳中純化免疫球蛋白之方法；Castino（美國專利 4,420,398）詳述切向流式過濾法自含有病毒、細菌之液體培養基中分離出抗病毒物質，如干擾素之方法。同樣地，TFF 也被用

於自細胞殘骸中分離出細菌酵素（Quirk 等人，*Enzyme Microb. Technol.*, 6:201, 1984）。此外，切向流式過濾器也被用於濃縮懸浮於培養基中之細胞（參見文獻，如 Radlett, *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 22:495, 1972）。

TFF 也曾被報導過依分子大小區分出脂質體及脂肪顆粒（Lenk 等人，美國專利 5,948,411）。TFF 使脂質體及脂肪顆粒的形成及分離自此等顆粒之異質族群有了明確的範圍界定（參見之前 Lenk 等人）。

但是，在 TFF 被使用於生物性液體之粗略劃分，以及例如脂質體分離之同時，利用 TFF 依不同之已知特徵分離活細胞族群在技術中並不被廣為接受。尤其，其獨特的問題在於對其他骨髓細胞、血液細胞、組織或器官懸浮液做幹細胞選擇性分離時，如何維持無菌狀態、細胞活性及再回復細胞活性之方法在當時仍未被提出。此外，如何移除其他細胞族群，例如，相似尺寸大小之細胞族群之問題現在仍未被解決。

因此，欲自其他骨髓或血液組成，包括血漿、紅血球、和/或血小板選擇性富集幹細胞，而且兼顧保持無菌、細胞活性及再回復細胞活性需要技術上額外的裝置及方法。此發明即滿足這些及其他需要。

【發明內容】

發明概述

本發明關於骨髓、血液及血液製備物、組織、組織及

器官製備物中，幹細胞或原始細胞之分離。尤其是使用切向流式過濾裝置製備經富集幹細胞之細胞族群。該發明提供使用該裝置製備經富集幹細胞族群之方法。藉由使用本發明裝置及方法而得之經富集幹細胞及相似細胞的細胞族群可用於製備適於輸入個體之組成物，例如，用於骨髓重建，或受損組織修復，包括心肌或相似組織。

本發明之切向流式過濾裝置包括一個有交互流式槽的移動單位、一個過濾液槽以及一個位於前二者之中之過濾器。該過濾器其中一面與交互流式槽之液體接觸，即被濃縮液表面（retentate surface）；而另一面為過濾液表面（filtrate surface），則與過濾液槽連結。交互流式槽具有一入口可注入含幹細胞樣本，例如骨髓或血液組成物，使樣本進入交互流式槽且平行於過濾器之被濃縮液表面。而位於交互流式槽中央、過濾器被濃縮液表面之背面亦含有一出口。適用於切向流式過濾裝置之過濾器孔洞通常介於1至10微米之間。在某些富集幹細胞之具體實例中，過濾器之平均孔洞大小約為3至7微米，或約為3至5.5微米。一般而言，該移動單位係單次使用之可拋式組件。

該裝置更包括可設定交互流式槽注入口樣本注入速率之工具，以及控制通過過濾器進入過濾液槽過濾速率之工具。調控過濾速率之工具限制過濾速率使其小於過濾器無競爭過濾之速率。含有幹細胞樣本之來源可連接自白血球分離裝置，或連接含有經白血球分離術收集而得細胞之容器，或其他相似裝置。

切向流式過濾裝置可進一步包括回收單位，該回收單位含有一注入口及一出口可與移動單位之交互流式槽交互連結成一個迴路設置。此設置之本具體表現為交互流式槽之注入口與回收單位之出口連結使液體流通，而交互流式槽之出口則是與回收單位之注入口連結使液體流通。該回收單位甚至可包含一樣本注入口及一清洗注入口。在某些切向流式過濾裝置之具體表現中，樣本注入口及清洗注入口實為同一入口。一般而言，清洗注入口與替代物或洗液之來源連結使液體流通。替代物或洗液可以是，例如，等張緩衝溶液或組織培養液。

回收單位之樣本注入口與含有幹細胞之骨髓或血液組成物之樣本來源間具有液體流通。本發明之具體實例之一，含有幹細胞之骨髓或血液組成物之樣本來源係具有針頭之針筒或特別用來移除捐贈者或病患骨髓之特殊裝置。切向流式過濾裝置及其操作說明詳述於 WO 2004/000444，其係全部以引述方式納入本文中。

本發明裝置之具體表現包括一用於富集骨髓樣本幹細胞之切向流式過濾裝置。本裝置包括一個交互流式槽移動單位、一個被過濾器隔開之過濾液槽，其中該交互流式槽具有一注入口及一出口，出口位在上半部中間，而其注入口位在過濾器上方並大致上將樣本平行於過濾器注入；有設定交互流式槽注入口樣本注入速率之工具，以及控制通過過濾器進濾速率之工具；其中該過濾器之孔洞大小約為五微米；樣本幹細胞富集在交互流式槽之被濃縮液面。

本發明另一具體表現中，切向流式過濾裝置用於富集血液組成樣本之幹細胞，此裝置包含一移動單位，其中此移動單位包含一位於過濾液槽之下、且由過濾器隔開之交互流式槽，此交互流式槽包含一注入口及一出口，出口位在下半部中間，而注入口位在過濾器下方並大致上將樣本平行於過濾器注入；有設定交互流式槽注入口樣本注入速率之工具，以及維持通過過濾器過濾速率之工具；其中過濾器之孔洞大小約為 5 微米；樣本幹細胞富集在交互流式槽之被濃縮液。

本發明也提供了自骨髓組成、血液組成、組織、組織或器官製備物等樣本分離出幹細胞之方法。該方法步驟包含了：（1）將樣本由移動單位注入口注入移動單位；（2）使樣本大致平行地交互流過具有一至十微米大小孔洞之過濾器；（3）使液體通過過濾器進行過濾；（4）自樣本中移除非幹細胞組成物以產生經富集幹細胞的細胞族群。樣本注入該移動單位之前，可先行經過部分純化或富集之程序，例如白血球分離術、密度梯度離心、差異性溶胞法、過濾法或血沈棕黃層製備術。在一具體實例中，樣本在流經過濾器表面時，交互流式槽裡的液體同時成漩渦。此外，經富集幹細胞的細胞族群得由洗液清洗。

本發明一特殊具體實例中，細胞樣本（例如包含幹細胞之骨髓組成物樣本）接觸含有藥劑之前處理溶液，該藥劑使樣本中正常尺寸與幹細胞大小相若之細胞皺縮。該皺縮細胞因有通過濾膜之可能，而使幹細胞族群之富集效果

更佳。在一具體實例中，受誘導而皺縮之細胞種類為顆粒性白血球，例如中性球或其他相似細胞。於該具體實例使用之特殊溶液包括，例如，細胞生理可接受範圍內有效量之二甲基亞砜（DMSO）。細胞生理可接受範圍內之溶液可為，例如，低張鹽溶液，如稀釋過之磷酸生理食鹽水（PBS）。或者，該前處理溶液可為含有醣類，例如甘露醇或葡萄糖，之高張溶液或為高張鹽溶液。在另一具體實例中，被誘導皺縮之細胞藉由以抑制已皺縮細胞膨脹之處理或前處理試劑止住再膨脹作用。在一具體實例中該抗膨脹試劑係阻止酪胺酸磷酸化之試劑，例如染料木黃酮及相似物。另一實例中抗膨脹試劑係抑制上鈉-氫交換通道之作用。在另一具體實例中，懸浮例如骨髓組成之細胞樣本溶液不含鈉鹽，而阻斷鈉-氫交換通道作用而防止細胞被誘導再膨脹。

本發明方法中，自細胞樣本中移除之非幹細胞組成物包括結締組織、血漿、血小板、紅血球、及其他相似物。富集所得之細胞族群至少包含 10% 幹細胞，但通常至少是包含 20% 或以上之幹細胞。在本發明方法的一具體實例中，重複步驟（1）、（2）、（3）至少兩次，以產生經富集幹細胞的細胞族群。經富集幹細胞的細胞族群可用以輸入需幹細胞治療的病患體中。

在其他實例中，經富集幹細胞的細胞族群可被誘導成為有療效之其他型態細胞，包括內皮細胞、平滑肌細胞、心肌細胞、神經元、樹突細胞、及其他類型細胞。各式的

幹細胞誘導法係為熟習技術者所知。

本發明方法所使用之細胞樣本通常收集自個體捐贈者。該捐贈者可以是接受幹細胞治療之病患或其他個體。收集捐贈者之細胞樣本之前，捐贈者可先經歷幹細胞活動試劑治療，例如 M-CSF、G-CSF、GM-CSF，或低劑量或高劑量之環磷醯胺、及相似物，使產生富集造血幹細胞之細胞族群。幹細胞活動試劑能誘導釋放至周邊血管之 CD34⁺ 幹細胞增生。接著將個體捐贈者之骨髓、血液(例如白血球分離術後樣本)、組織、組織或器官製備物注入本發明之切向流式過濾置 (TFF)。切向流式過濾裝置包含一交互流式槽、一過濾液槽以及與交互流式槽及過濾液槽液體流通之過濾器。一般而言，TFF 裝置之過濾器孔洞大小約為 3 至 5.5 微米。富集造血幹細胞之細胞樣本在 TFF 裝置中，以預設之輸入速率及過濾速率重複循環，預設輸入速率一般至少為預設過濾速率之五倍，預設之過濾速率小於無競爭之過濾速率；分離出富集 CD34⁺ 白血球之細胞族群。本方法可產出實質上無非白血球血液組成物(例如血漿、血小板、紅血球)之富集細胞族群。以本方法產生之富集細胞族群可提高 CD34⁺ 細胞百分比至構成細胞族群大約 2% 至大約 10%、到 5 大約 % 至大約 40%。

參考說明書之剩下部分，能進一步了解本發明之特性及優點。

【實施方式】

具體實例說明

本發明提供了自骨髓成份、血液成份、組織、組織或器官懸浮液等異質混合物細胞樣本產生幹細胞富集族群之方法。由某方面來看，該法是以選擇性移除非幹細胞組成富集幹細胞，例如結締組織、血漿、血小板及/或紅血球、及其他相似物。由另一角度來看，該法是從混合物中以選擇性移除其他較大類型細胞富集幹細胞，包括多形核細胞，例如顆粒性白血球。在特殊的方法中，可以試劑處理骨髓樣本，該試劑使與幹細胞大小相似之非幹細胞皺縮，使皺縮非幹細胞細胞通過 TFF 裝置之過濾器，而與幹細胞分離。

幹細胞之富集族群通常係來自包含骨髓成分之樣本或液體混合物。在此所用『骨髓成分』一詞通稱所在骨髓之物質，包括生病狀態及無病狀態之此種材料。骨髓成分包括幹細胞及可包含例如淋巴球、單核球、紅血球、中性球、嗜酸性球、自然殺手細胞（NK）、和/或血小板、可溶或不可溶蛋白質或蛋白質複合體（例如酵素、免疫球蛋白、或免疫球蛋白-抗原複合體）、其他大分子成分，例如脂質、或任何其他可作物理性分離之全血成分（不管其精確分子或細胞組成），包括例如基質、血漿或血清。

使用本發明之前，樣本或液體混合物可先做幹細胞部分富集。『幹細胞』一詞可與『先驅細胞』、『原始細胞』或『CD34⁺細胞』等詞通用。這些稱呼包括了造血幹細胞，其包含例如淋巴組織、脊髓組織、造血組織原始細胞，及

能分化成內皮細胞、肌肉細胞（含平滑肌與心肌細胞）、神經元細胞與骨骼細胞（形成骨頭及軟骨）之原始細胞。

本發明由某方面來看，係將包含多形核細胞（PMN）或顆粒性白血球之細胞族群與幹細胞分離。此細胞族群一般而言包含中性球、嗜酸性球、嗜鹼性球及其先驅細胞，在該應用中通稱為 PMN。

本文中『幹細胞族群』一詞係指任何含有幹細胞之細胞群。如上，幹細胞群可包括多種幹細胞亞型或特定幹細胞亞型，例如內皮細胞或肌肉細胞之前驅細胞或原始細胞。『富集作用』、『富集』、『已富集的』等詞係指依使用以上概述之該裝置對骨髓成分混合物之處理，該裝置茲以詳述於 WO 2004/000444（其係全部以引述方式納入本文中），與使用本發明方法能產生比最初細胞樣本（即富集作用前）（和其他成分相比）含較高比例之活幹細胞的細胞族群。如此所用，『活』一詞係形容在適當培養條件或在植入病患或適當動物模式體內可行分化作用之幹細胞。

根據本發明之裝置使用切向流式過濾法富集幹細胞族群。『切向流式過濾法』及『交互流式過濾法』二詞可互換使用，係指自液體混合物分離懸浮顆粒物（例如細胞），包括自液體混合物內異質顆粒混合物中分離已知特性之顆粒（例如顆粒尺寸範圍）。該顆粒藉由液體混合物（例如樣本液）在樣本槽中流動或再循環，以大致平行或切線於過濾器方向（例如面向樣本液之濾膜表面）過濾而分離，

一般而言在某正壓力條件下，包含已濃縮顆粒或幹細胞之液體混合物會繼續以切線方向流向濾膜。

通常，限定何種顆粒被移至『過濾液』（亦即流過濾膜之液體部分）以及決定何種顆粒留在『被濃縮液』中取決於許多因素，這些因素包括例如過濾器孔洞大小、輸入速率、過濾速率、液體混合物中顆粒之濃度、溫度以及液體混合物之黏滯性。在此所使用之『孔洞大小』一詞係指過濾器中平均孔洞大小。『輸入速率』係指樣本（例如液體混合物）進入具過濾器的槽之速率。當樣本多次循環通過過濾器時（根據本發明之裝置之一特定具體實例），輸入速率又可稱為『再循環速率』。『交互流式』係指通過過濾器液體混合物大致平行（在任何方向皆平行於過濾器）於過濾器之流動。『交互流式速率』係指樣本或流體混合物大致平行於過濾器之流動速率。流體混合物之交互流式速率通常決定於許多因素，包括例如輸入速率以及過濾器所在液槽之大小與形狀。『過濾速率』係指流體混合物通過過濾器之流速。根據本發明之裝置與方法，過濾速率通常小於無競爭之過濾速率（例如開放管線時速率）。『輸出速率』係指流體混合物自交互流式槽移出之速率，而非流體混合物通過過濾器（即濾液）之速率。輸出速率通常相等於輸入速率減去過濾速率。

本文中所使用『過濾器』一詞係指由任何材料或混和材料所製成且具有多孔洞性質之任何物件，該物可讓交互流過該物之樣本或流體混合物中一或多種成分（例如血液

和/或骨髓組成)通過，而使該成分(例如非幹細胞、蛋白質、血漿、血清、血小板、及其他相似物)與其他成分(例如幹細胞)分離。過濾器表面可為任何適當大小之面積，例如直徑約 42 至 145 釐米長，但較大或較小之過濾器皆可利用。在某些具體實例中，切向流式過濾裝置只使用一種過濾器。其他具體實例使用額外之過濾器。

本發明 TFF 裝置一般所使用之過濾器選自廣泛圍之有機聚合過濾器，該過濾器係不同材質之微孔膜，包括(但不限制在內)尼龍、聚偏二氟乙烯(PVDF)、醋酸/硝酸纖維素、聚砒、聚碳酸酯、聚乙烯、聚酯、聚丙烯、聚醯胺等材質。其他過濾器如陶瓷過濾器和金屬過濾器亦可使用。親水性與疏水性、附電荷與不附電荷之過濾器都可使用。在某些應用中，親水性過濾材質較佳。

本發明之過濾器通常包含許多分佈過濾器表面之孔洞。在某些具體實例中，過濾器上具有許多尺寸大小略有出入之孔洞。舉例說明，孔洞尺寸大小之變異率約 $\pm 20\%$ ，或約在 $\pm 0\%$ 至 $\pm 20\%$ 範圍之間。在典型具體實例裡，常用『核孔膜』或『徑跡刻蝕』過濾器(例如 Poretics[®]聚乙烯或聚碳酸酯徑跡刻蝕濾膜(Osmonics, Minnetonka, MN))。這些過濾器材質通常具有平滑表面及品管嚴格之孔洞大小。一般而言製備過濾器係將一平坦薄無孔塑膠版暴露在具有足夠穿過塑膠板能量之放射性粒子下。接著係經由接觸化學溶記或刻蝕藥劑而放大徑跡直徑。孔洞大小可由徑跡刻蝕條件控制。

本發明係利用骨髓、血液、組織或器官懸浮液中不同型態細胞之間的差異而進行幹細胞富集。該差異包括了例如尺寸大小、形狀和/或變形能力。人類骨髓、血液、組織或器官懸浮液之細胞尺寸大小和變形能力通常係隨細胞種類而變化。紅血球通常為雙凹面圓盤狀，無核，大部分直徑約為七微米長且相對地較可變形。多形核白血球通常為類球狀，亦約七微米大小，但不若紅血球之變形能力。單核球中的淋巴球通常為七至十微米，而單核球通常為十至十五微米。幹細胞通常約與單核球一般大小。

在許多具體實例中，過濾器孔洞大小之選擇係用於富集幹細胞以及/或是劃分骨髓、血液組成物、組織或器官懸浮液之組成以富集所收集幹細胞族群。舉例來說，在某些例子中，幹細胞之正常直徑為十至十五微米而紅血球正常直徑為七微米，此二者可藉由具孔洞大小為五微米之 TFF 分離開。

在其他具體實例中，過濾器孔洞大小可以是介於約一至十微米、約三至八微米或、約三至五點五微米。三微米大小範圍之過濾器孔洞大小可留住大部分幹細胞及白血球，但無法有效地自幹細胞移除紅血球。相形對照之下，八微米大小範圍之過濾器孔洞大小可有效移除紅血球，但卻提高了濾液中幹細胞及白血球之損失。三至五點五微米孔洞大小之過濾器通常係用以富集幹細胞。

自其他骨髓、血液、組織或器官懸浮液組成中富集幹細胞亦受到輸入速率、過濾速率、和/或樣本或液體混合物

之細胞濃度影響。舉例來說，紅血球較其他型態細胞更易變形，所以可較輕易通過孔洞尺寸小於直徑大小之過濾器（例如小於七微米），在某特殊例子中，可利用孔洞大小約五點五微米之過濾器將紅血球與白血球分離。

自其他細胞骨髓組成、或組織或器官懸浮液組成中富集幹細胞亦受到過濾速率是否維持之影響，該速率在相同輸入速率或再循環速率之情況下，小於無競爭之過濾速率（即開放管線時速率）。在其他具體實例中，濾液中白血球之損失可藉由維持住輸入或再循環速率大於過濾速率之情況而減少。在示範實例中，輸入或再循環速率可以是過濾速率之至少五倍、至少十倍、至少二十倍、至少五十倍，或是至少一百倍。

使用切向流式過濾裝置進行富集幹細胞之樣本或液體混合物（包含骨髓組成物、血液組成物、組織、或組織或器官懸浮液）可源自許多來源，可包括處於任何處理階段之血液製備液體混合物。舉例來說，骨髓及血液來源可為人類或非人類。另外，液體混合物可為例如骨髓、全血、全血之不同倍數稀釋液，亦或是已經過處理之全血、全血之不同倍數稀釋液，例如已移除血漿或其他血液組成、或組織或器官懸浮液。因此，液體混合物可包括例如已經經過部分幹細胞富集之血球族群。

骨髓或血液組成、骨髓或血液細胞族群、或是組織或器官懸浮液可由善於此方法技術之專業者製備，該方法通常包括收集經肝素（heparin）處理過之骨髓或血液、分離

術或白血球分離術、血沈棕黃層製備物、免疫細胞黏附、離心、密度梯度離心（例如，密度梯度材料包括 FICOLL-HYPAQUE[®]、PERCOLL[®]、蔗糖、及其相似物）、非白血球細胞之差異性胞溶、過濾法、及其相似物。

含有骨髓或血液組成之液體混合物可依需求選擇性地進行稀釋或濃縮。舉例來說，在某些具體實例中，骨髓或血液組成被稀釋為 1：2、1：5、1：10，或其他適合之稀釋倍數。骨髓或血液組成可被稀釋於等張緩衝溶液（例如 PBS 或 HEPES 緩衝鹽溶液）、組織培養基及其他相似物中。一般而言，進行 TFF 之骨髓或血液成份樣本之細胞濃度約為每毫升含 10^6 至 10^8 個細胞，其中至少約有 10 至 20% 的幹細胞，除此之外，PMN 之數目從大約 60 至 75% 降到大約 50% 或更低。

骨髓、血液細胞族群或是組織、器官懸浮液可根據所希望之經富集幹細胞的族群使用目的而取自不同類型之受試對象。受試對象可以是健康的受試對象。或者細胞可取自於需要進行骨髓重建之受試對象，例如，因進行化療而骨髓受損之癌症病患。骨髓、血液細胞族群亦可取自己接受幹細胞流動試劑治療之個體，幹細胞流動試劑治療例如有 M-CSF、G-CSF、GM-CSF，抑或低劑量或高劑量之環磷醯胺（Deliliers 等人，*Leuk. Lymphoma* 43:1957,2002）及其相似物。該個體可以是將接受經富集細胞族群之病患、親屬、或是 HLA 相符之個體。

根據本發明之裝置（繪製於圖 1A 至圖 1C）通常包含

一交互流式槽（3）以及一過濾液槽（4），過濾器（5）位於二者之間且一面（被濃縮液表面）與交互流式槽進行液體流通，另一面（過濾液表面）則與過濾液槽流通進行液體流通。交互流式槽、過濾液槽以及過濾器三者組成一個移動單位（1）。該移動單位可製成單次使用拋棄式組裝，經消毒以供本發明方法單一次之使用。每個富集幹細胞之樣本使用一移動單位。在本發明某具體實例中，交互流式槽內體積通常約有 55 毫升，而過濾液槽內體積通常約有 25 毫升。過濾器之直徑通常實質上相等於交互流式槽之直徑長。在某些用來說明本發明之具體實例中，過濾器直徑約 140 釐米到 143 釐米。

本發明方法中，液體混合物經由通常係位於過濾器被濃縮液表面旁之液體入口（6）進入交互流式槽（3），使液體混合物（例如樣本）大致上平行於過濾器被濃縮液表面而進入交互流式槽。通常，液體會經由位於交互流式槽（3）上垂直於過濾器被濃縮液表面之液體出口（7）移出。在某些具體實例中，交互流式槽入口（6）直徑約為七釐米至八釐米長，而交互流式槽出口（7）直徑約為八釐米至十釐米長。濾液係經由位於過濾液槽（4）之出口（8）流出。

通常來說，液體混合物以充足之輸入速率進入交互流式槽，使過濾器表面（被濃縮液表面）之液體混合物交互流動，具有足夠高之速率以輕微打亂及重新混勻過濾器接觸表面（即邊界層）之液體和細胞。此處之『邊界層』一詞

係指相鄰及位於過濾器被濃縮液表面之液體層，通常是通過過濾器之液體所留下。邊界層之混勻能避免過濾器接觸表面物質結合在過濾器上或停滯不動而阻礙有效過濾，而能促進有效過濾。但是，液體混合物輸入速率通常不足以溶解大多數的白血球。

在某些具體實例中，骨髓或血液成分藉著將液體混合物以幫浦打入交互流式槽（3）之方式通過過濾器之被濃縮液表面。用來驅動交互流動液體通過過濾器之幫浦稱為『交互流式幫浦』或『再循環幫浦』（14）。交互流式幫浦可包含任何與交互流式槽（3）液體接觸、足以將液體混合物以特定速率導入槽中通過過濾器、不會造成細胞實質上傷害（例如細胞溶解）之幫浦裝置。適於本發明之交互流式幫浦包括蠕動式幫浦、活塞式幫浦、薄膜式幫浦及滾軸式幫浦，蠕動式幫浦可用於，例如，需維持 TFF 裝置為封閉系統之一部分。

液體混合物通常以遠大於過濾速率之輸入速率由以幫浦打入交互流式槽（3）。在示範具體實例中，輸入速率大約是 1680 毫升/分鐘，而過濾速率約 15 毫升/分鐘。在其他示範具體實例中，輸入速率大約是 1600 至 1800 毫升/分鐘，而過濾速率約 10 至 20 毫升/分鐘。非幹細胞物質（例如紅血球、免疫複合體、蛋白質、PMN、及其相似物）將通過過濾器（5），進入過濾液槽（4）。

依以上所討論，過濾速率通常小於無競爭（例如開放管線）之過濾速率。過濾速率可經由使用第二種幫浦裝置

（例如過濾式幫浦）限制流動、降低或限制過濾液槽出口大小、或相似方法而受到調控。

在另一示範具體實例中，將液體混合物導入裝置會在液體中製造出漩渦運動。此可藉，例如，將液體混合物以約五或十至一百倍過濾速率之輸入速率，大致平行地導入圓筒形交互流式槽內之圓形過濾器達成。該流動將藉由位於圓筒形交互流式槽、垂直於過濾器且通常相鄰於過濾器表面中央之出口（7）而移除。這種配置使液體朝著過濾器向中心螺旋。此種流動通常並不混亂及高速，所以不致使幹細胞溶解。依以上所討論，交互流動亦可『摩擦』過濾器表面，避免在邊界層之結合或停滯不動。藉由校正輸入速率相對過濾速率為大（例如至少約五倍），結果經富集幹細胞的族群之幹細胞數目與細胞樣本族群總細胞數相比之百分比能達到至少約 5%，或至少約 20% 或至少約 60%，或以上。

在另一示範具體實例中，被濃縮液以再循環方式增加分離之效率。舉例來說，包含骨髓、血液組成或組織、器官製備物之液體混合物被導入交互流式槽，接著在過濾期間，被濃縮液可由交互流式槽之液體出口（7）排至另一個槽中，例如最初裝載供應液體的槽（回收單位（2））。回收單位中之液體混合物可再被導入交互流式單位。藉由將回收單位（2）及移動單位（1）連接成迴路形式，可達到連續性的再循環及液體混合物過濾。或者，被濃縮液可由交互流式槽（3）之液體出口（7）排出，然後直接再導

入交互流式槽入口（亦即不經過回收單位或任何其他液槽）。液體混合物可以任何適當之時間間隔通過交互流式槽。在某些具體實例中，液體混合物可再循環約五至六十分鐘，或更多，以達到理想中之幹細胞純度及富集效果。

在另一具體實例中，液體混合物之體積可藉由添加緩衝液、清洗溶液或其他溶液（統稱為替代液體）而調整。清洗溶液可，舉例來說，與液體混合物合併於回收單位（例如經由溶液入口（13））、移動單位、幫浦（14）、接往移動單位或伸出移動單位之管路、或任何常見之處。如此一來，被濃縮液中的細胞可在同一個操作步驟中同時被富集並清洗。一般而言，清洗溶液與細胞等張。適合之緩衝液及清洗溶液包含了各種緩衝液（例如磷酸生理食鹽水（PBS）或 HEPES 緩衝溶鹽液），組織細胞培養基、及其相似物。

在某些具體實例中，包含來自骨髓、血液組成或組織、器官懸浮液細胞族群之細胞樣本係於封閉無菌系統中進行幹細胞富集。此處『封閉無菌系統』或『封閉系統』等詞係指將對無消毒物質、環境、流動空氣或其他無消毒狀況之接觸最小化或完全避免掉之狀態。富集細胞族群所利用之封閉系統通常需避免使用開放開口離心管離心、在暴露空氣中移動細胞、在組織培養皿或無封蓋培養瓶中培養細胞、及其他類似情況。整個過濾系統，包括例如任何裝細胞之容器、恆溫培養器、組織培養器皿或其他有關細胞處理之設備（參見以下），可保持猶如封閉系統。在一典型

具體實例中，封閉系統可達到無菌幹細胞富集，有時可在不與無消毒空氣接觸之下，完成由最初收集器皿傳送細胞至封蓋組織培養器皿之動作。通常，封閉系統使用蠕動幫浦（圖 1A 與圖 1C(15)）裝置。

本發明由另一角度，可視為是利用選擇性移除骨髓或血液組成混合物中非幹細胞成分（例如血液間質、血漿、紅血球或其他相似物）之方法，自骨髓或血液組成、或組織、器官懸浮液等異質混合物中大體上富集幹細胞。本文中『大體上富集』一詞係指經過所設定之許多次數再循環後，被濃縮液中回收得到之細胞族群通常包含至少約 5%，更通常是至少約 20% 或至少 60% 之預定收集目標細胞（例如幹細胞）。在其他具體實例中，利用骨髓或血液組成、或類似物之異質混合物富集幹細胞，大體上能得到不含非幹細胞組成之經富集幹細胞的族群。此處所指『大體上不含』係指經富集幹細胞的細胞族群包含至少約 10% 至約 50% 之幹細胞。

茲已確認出某些變數會影響本裝置之效能。舉例來說，過濾器孔洞大小、液體總體積、再循環與過濾速率、此二者之間的比例以及運作時間都能影響幹細胞之產量。為了決定出選擇的幹細胞分離條件，可使用參數變化而執行分離運轉，亦即在固定時間間隔對細胞濃度（被濃縮液）和過濾液取樣檢查，以觀察隨時間變化之效能情形。如此一來可決定出選擇的過濾器孔洞大小、系統總體積、再循環與過濾速率。

由本發明此角度之示範具體實例中，TFF 濾裝置包含體積約 55 毫升之交交流式槽（3），以及體積約 25 毫升之過濾液槽（4）。此裝置更進一步包含：具多孔之過濾器，孔洞大小約一至十微米，通常更多約為二至八微米，或甚至更常約為三至五微米；過濾器直徑約為 142 釐米。此具體實例中，輸入速率設定為大約 1600 至 1800 毫升/分鐘；過濾速率大約為 12 至 17 毫升/分鐘。通常最初液體混合物之細胞濃度至少大約為每毫升 10^7 個細胞（例如白血球及其他細胞）。使用本發明所得之經富集幹細胞族群約佔總細胞數之 10% 至 20%，大約 1.1 至 2 千萬個細胞。

本發明由另一角度，可視為是利用選擇性移除非幹細胞成分（包含例如自混合物中移除血液間質及淋巴球）之方法，自骨髓或血液組成異質混合物中大體上富集幹細胞。本文中『選擇性移除』、『選擇性地被移除』、『選擇性地移除』等詞係指差別性地移除某一型態細胞而富集其他型態細胞。在此角度之示範具體實例中，TFF 裝置包含體積約 55 毫升之交交流式槽（3），以及體積約 25 毫升之過濾液槽（4）。此裝置更進一步包含：具多孔之過濾器，孔洞大小約一至十微米，或約為二至八微米，或約為三至五微米；輸入速率設定為大約 1600 至 1800 毫升/分鐘；過濾速率大約為 12 至 17 毫升/分鐘；過濾器直徑約為 142 釐米。通常最初液體混合物之細胞濃度至少大約為每毫升 10^7 個細胞（例如幹細胞及其他細胞）。此具體實例中，此裝置以相反之模式操作。

本發明另一具體實例中，來自骨髓、血液、組織、或來自組織或器官懸浮液之血液異質混合物經過前處理，以促進移除某些與幹細胞大小及變形程度相似之細胞種類。這些細胞包括多形核顆粒細胞，包含中性球、嗜酸性球、嗜鹼性球，及其相似細胞。在一具體實例中，前處理包括將骨髓或血液組成與可造成細胞膜內外滲透壓梯度之試劑接觸，使細胞因水分流出而皺縮。該試劑可包括但不侷限於二甲基亞砒（DMSO）、甘油、氯化鈉與其類似物。當使用二甲基亞砒時，其最終有效濃度可約 5% 至 20%，或是約在 10% 至 15% 間。在某具體實例中，二甲基亞砒之有效濃度約為 12.5% 或 15%。二甲基亞砒可溶於緩衝液或離子強度低之生理可接受溶液。另一可使用之試劑為甘油。甘油之有效濃度約為 0.5 莫耳濃度（mol/L）到 2.5 莫耳濃度（mol/L）之間。在特殊具體實例中，甘油最終濃度約為 1 莫耳濃度（mol/L）。將細胞樣本與該試劑接觸可使不想要的顆粒性細胞溶解。依序加入二甲基亞砒及甘油可達到有效溶解。所使用之溶液可含有低滲透壓強度。誘導不想要的細胞皺縮使該細胞在過濾作用移除時更具可塑性，達成以切向流式過濾選擇性移除該細胞。也可包括在分離過程中可避免細胞再膨脹回去之有效量試劑的試劑。該試劑可包括但不侷限於例如阻止酪胺酸磷酸化之試劑（染料木黃酮），或是抑制鈉-氫交換通道作用之試劑。

富集所得之細胞族群之培養、擴展與分化

本發明一具體實例中，本發明之方法用來得到經富集

幹細胞之細胞族群，其可用以產生可用於以下之構成物，例如異體或自體移植。在某些特殊例子裡，經富集幹細胞之族群更進一步經由切向流式分離方法富集出造血幹細胞。自周圍血液白血球來源富集出造血幹細胞之方法茲以發展純熟，並且適用於以上所述分離而得之經富集幹細胞的族群。舉例說明，經富集幹細胞的族群可進一步利用例如免疫磁性分離技術之方法分離出 $CD34^+$ 細胞，（參見文獻，例如 Rowley 等人，*Bone Marrow Transplant.* 21:1253, 1998; Denning-Kendall 等人，*Br. J. Haematol.* 105:780, 1999）。骨髓或血液捐贈物可由接受移植之病患、關係相近之親戚、HLA 對符之個體、或其他相似者分離出來。

在另一具體實例中，本發明之方法亦用以得到非幹細胞子集之用，例如已富集原始細胞（造血或內皮原始細胞）或能分泌目標因子之細胞（造血或血管新生成長因子）之細胞族群。舉例來說，循環內皮原始細胞（CEPs）可依據 VEGFR-及 AC133 之共同表現（如同 VE-cadherin 及 E-selectin），被鑑定為循環 $CD34^+$ 細胞亞群（參見文獻，例如 Peichev 等人，*Blood* 95:952, 2000）。經富集白血球族群可進一步富集 CEPs，利用免疫磁性分離技術，使用直接作用 VEGFR-2 及 AC133 之抗體而進行。使用 TFF 裝置自捐贈者分離細胞族群與富集之前，亦可先使捐贈者體內之 CEPs 活動。此法可以細胞因子處理捐贈者，例如 VEGF（參見，例如 Gill 等人，*Circ Res.*, 88:167, 2001）。甚至，在另一具體實例中，類內皮循環血管新生細胞（CASSs）（其分

泌如 VEGF, HGF, G-CSF 及 GM-CSF) 得自以如 VEGF、bFGF、IGF-1、EGF、和 FBS 以及塗上纖維結合素結合蛋白之表面培養經富集白血球細胞之族群，再捨去非貼附性細胞而得（參見文獻，Rehman 等人, *Circulation*, 107:1164, 2003）。

除此之外，經富集幹細胞之族群可被培養誘導多能性原始或幹細胞之擴展。舉例來說，CD34⁺幹細胞可藉由造血生長因子，例如 IL1、IL3、IL6、幹細胞因子（SCF）、顆粒性白血球-單核球細胞群落刺激因子(GM-CSF)以及 G-CSF 之組合而在體外擴展。（參見文獻，例如 Sun 等人, *Haematologica* 88:561, 2003）。原始或幹細胞可接著藉由任一種各式細胞因子和生長因子處理而誘導分化成造血或非造血品系之細胞。

在其他具體實例中，經富集幹細胞之族群，可被培養在適於誘導分化之條件下（例如原始細胞之分化或較分化細胞類型，如單核球或單核球衍生之樹突細胞，之轉分化）。（本文中『轉分化』一詞係指已分化細胞表現型調整之過程，通常不需任何細胞分裂，其中已分化細胞會分化成型態和/或功能不同之細胞類型。）舉例來說，單核球細胞除了分化成樹突細胞之外，還可轉形成其他造血或非造血細胞類型，包括例如巨噬細胞、蝕骨細胞以及類內皮細胞，其取決於培養條件（參見文獻，例如，Becker 等人, *J. Immunol.* 139:3703, 1987; Nicholson 等人, *Clin. Sci.* 99:133, 2000; Havemann 等人, in *Novel Angiogenic Mechanisms:*

Role of Circulating Progenitor Endothelial Cells 47-57

(Nicanor I. Moldovan eds., 2003))。經富集白血球之族群亦可培養在能誘導相對不分化細胞亞群（例如多能性原始和幹細胞）之條件下，藉由任一種各式細胞因子和生長因子，使成為造血或非造血品系之細胞。由熟習技術者已知的方法可在細胞擴張之前或之後誘導該分化。

本發明之某些具體實例中，經富集幹細胞之族群可用於需要細胞或組織再生、再增殖之病患身上，而影響細胞或組織再生、再增殖。該病患可係身患任何使用幹細胞將有益於病患之疾病，包括帕金森氏症、糖尿病、慢性心臟病、腎病、肝衰竭、癌症、脊髓傷害、多發性硬化症、阿茲海默症，或可需要防止基因型或表現型缺陷之基因治療。

本發明之某些具體實例中，幹細胞接受者可與捐贈者為自體或異體。接受者可因該個體經過骨髓摧毀治療後而需要進行骨髓再生。另一例中，接受者可因心臟梗塞、充血性心臟衰竭或心臟功能不足，而需要進行心臟組織修復。在兩例中，由本發明之分離方法所得之經富集幹細胞族群可注射到循環系統中。再患有心臟梗塞、心臟功能不足或心臟衰竭之接受者中，可將經富集幹細胞族群直接注射入冠狀動脈或直接塗敷於受損心臟組織。幹細胞及經富集幹細胞族群之施用之方法及組成茲已受熟習該技術者詳解，並非本發明所創新部分。

以下提供之實施例僅供解說本發明之各式使用概念，

不應為本發明做任何方向之限制。

實施例 1：

此實施例概略描述自正常捐贈者之骨髓樣本富集幹細胞族群。此骨髓樣本在使用切向流式過濾裝置進行富集之前，先以誘導皺縮試劑處理。簡短地說，自正常志願者髌骨中取出 50 毫升骨髓，加入 15 毫升含組織胺(histamine)磷酸生理食鹽水 (PBS) 以避免凝血。儲存一夜之後，將三分之一的此製備物 (大約 33 毫升) 與 33 毫升之 30% 溶於水二甲基亞砷 (DMSO) 混勻。室溫下反應十分鐘，加入 3 毫升之 25% 人類血清白蛋白 (human serum albumin, HAS) 溶液，再將此混合物加入在以上所簡述切向流式過濾裝置之再循環槽，更多的內容載於 WO 2004/000444，其係全部以引述方式納入本文中。將兩次體積調整後，混合物裡的細胞進行切向流式過濾，並持續補充含 0.625% HSAPBS。運作過程完畢後，細胞被收集及分析。製備品大致上不含紅血球及血小板。CD34⁺之總細胞數百分比由 4.78% 提高到 18.2%，而以螢光流式分析儀測得之中性球卻從 53.9% 降到 51.7%，中性球之細胞平均前向散射大約由 400 降到 250，意指細胞損壞。目前最好的方法是以 DMSO 及 PBS 混和液處理骨髓抽出物 10-20 分鐘，再以 TFF 裝置過濾 60 分鐘。DMSO 衝擊使 PMN 皺縮但同時並不造成其他存在細胞之傷害。實驗結果係 CD34⁺/CD45⁺和 CD133⁺細胞族群濃縮，但 PMN 細胞和淋巴球族群數目減少。在某

實驗方法中，以經 PBS 稀釋之 DMSO 處理骨髓抽出物 20 分鐘後，加入人類血清白蛋白（為了使細胞穩定），再裝載入 TFF 裝置。實驗結果係取決於輸入材料之特定細胞濃度。表 1 解釋了二操作實施例。

表 1、以 TFF 系統對二志願者之骨髓抽出物製備品進行幹細胞濃縮後之記述。

	操作一	操作二
初始骨髓		
CD34 ⁺ /45 ⁺	5%	4.2%
CD133 ⁺ /45 ⁻	無法確定	0.01%
PMN' s	74%	66%
CD3	16%	18%
TFF 操作後		
CD34 ⁺ /45 ⁺	18%	13%
CD133 ⁺ /45 ⁻	無法確定	1.3%
PMN' s	53%	53%
CD3	7%	10%

表 1 顯示了由於細胞尺寸縮小以及受 TFF 系統移除之 PMN' s 部分減少，由高達 74% 降到 53%。CD34⁺/45⁺ 細胞族群富集，在操作一中由 5% 增加到 18%，在操作二中由 4.2% 增加到 13%。除此之外，淋巴球細胞族群減少，在操作一中由 16% 減少到 7%，在操作二中由 18% 減少到

10%。回收所得之原始細胞數目在操作一為一千一百萬個，在操作二為一千六百萬個，遠遠大於本文中參考文獻記載之臨床試驗紀錄。這些骨髓衍生之幹細胞具有正常幹細胞功能，因為聚落形成分析（colony forming assays）結果顯示，在短暫時間內，該細胞具有活躍之聚落形成能力。值得注意的是，操作二顯示 CD133⁺細胞亦出現在分離濃縮過之幹細胞族群中，由初始材料之 0.1% 增加至最後製備品之 1.3%。

實施例 2

本例描述如上述經富集幹細胞之細胞族群如何使用於治療具急性心肌梗塞之病患。簡單地說，在血管支架植入後，將 TFF 自骨髓純化到之幹細胞，注入急性心肌梗塞患者之冠狀動脈。心肌之後續調整會增加左心室末端容積，並且降低以後心臟衰竭之死亡機率。

此處提供之實施例目的在於解說而並非限制本發明申請專利之範圍。其他本發明之變體對熟習該項技術者為明顯且為所附申請專利範圍所涵蓋。此處所引用的所有出版物、專利、專利申請與其他參考文獻並係以引用方式納入本文中。

【圖式簡單說明】

圖 1A 至圖 1C 描繪出利用切向流式過濾裝置自血液產物樣本分離白血球及單核球細胞之具體事實。圖 1A 提供

富集白血球裝置之具體實例，其交互流式槽在過濾液槽上方。圖 1B 描繪該裝置正面，其樣本之輸入在過濾器下面而濾液往上通過濾膜以進行單核球細胞富集。圖 1C 係圖 1B 描繪裝置之俯瞰圖。

【主要元件符號說明】

- 1: 移動單位
- 2: 回收單位
- 3: 交互流式槽
- 4: 過濾液槽
- 5: 過濾器
- 6: 注入口
- 7: 液體出口
- 8: 出口
- 13: 溶液入口
- 14: 交互流式幫浦
- 15: 蠕動幫浦

五、中文發明摘要：

本發明提供了一種藉由移除非幹細胞成分自骨髓及血液成分之非均勻混合物中富集幹細胞組成物之方法，其包括使用切向流式過濾裝置(Tangential flow filtration device)分離非幹細胞成分。

六、英文發明摘要：

The present invention provides methods for enriching a heterogeneous mixture of bone marrow or blood constituents for stem cells by removal of non-stem cell constituents comprising separation of the non-stem cell constituents using a tangential flow filtration device.

十一、圖式：

如次頁

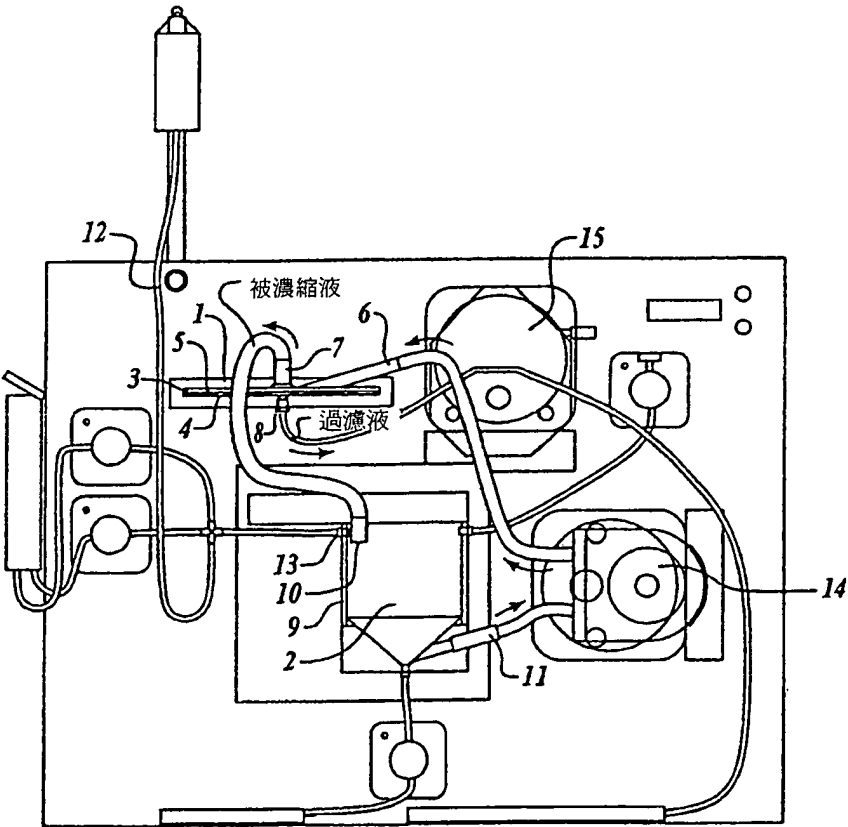


圖 1A.

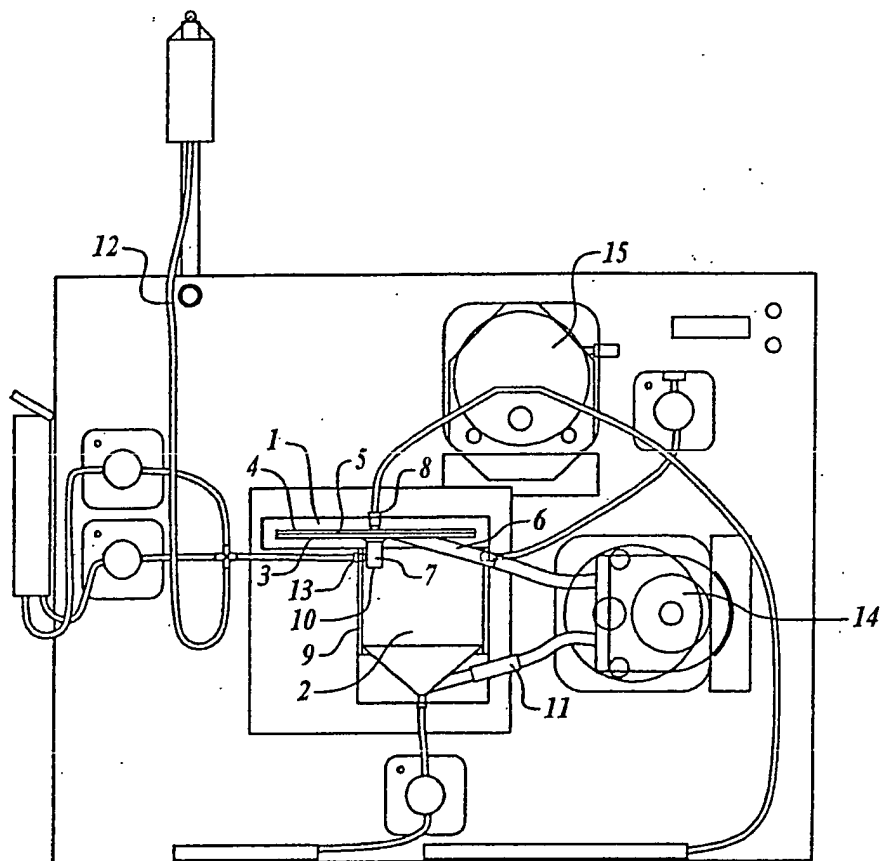


圖 1B.

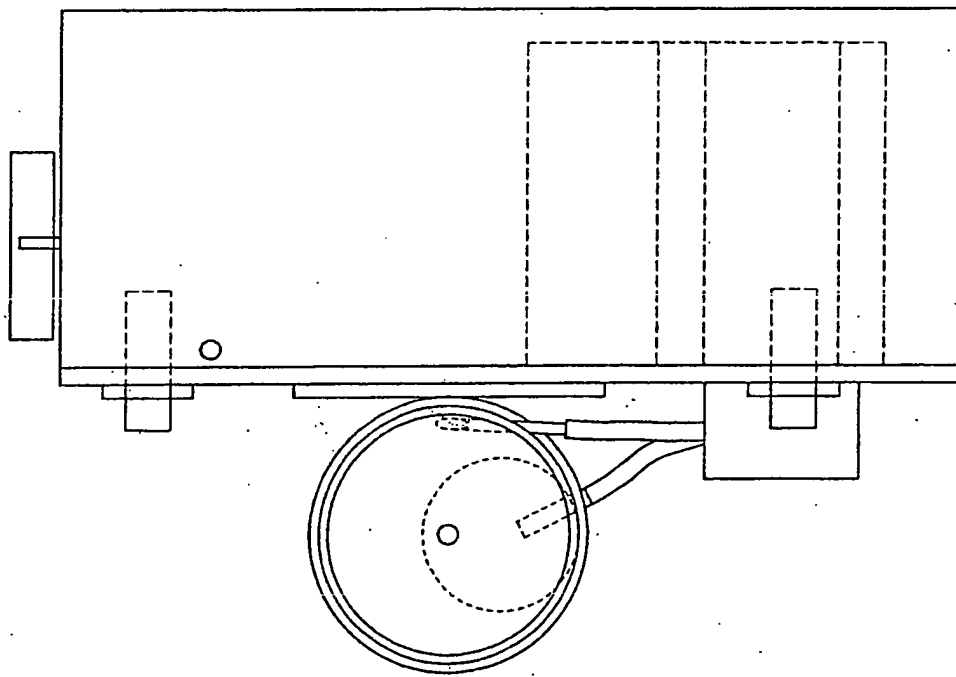


圖 1C.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1A) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

- 1: 移動單位
- 2: 回收單位
- 3: 交互流式槽
- 4: 過濾液槽
- 5: 過濾器
- 6: 注入口
- 7: 液體出口
- 8: 出口
- 13: 溶液入口
- 14: 交互流式幫浦
- 15: 蠕動幫浦

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 93136123

※ 申請日期： 93.11.24

※IPC 分類： A61M 1/34

C12N 5/08

一、發明名稱：(中文/英文)

利用切向流式過濾裝置使幹細胞富集之方法

Methods for Stem Cell Enrichment by the use of Tangential Flow
Filtration Devices

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

西北生物治療公司 / NORTHWEST BIOTHERAPEUTICS, INC.

代表人：(中文/英文)

奧桐 L 柏通 / BOYNTON, ALTON L.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國華盛頓州 98011-9501 波黛爾市 第 120 大道東北向 18701 號 101 公寓
18701-120th Avenue N.E., Apt. 101, Bothell, WA 98011-9501, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 / USA

三、發明人：(共 5 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 馬尼斯 L 柏斯 / BOSCH, MARNIX L.

2. 派崔西亞 A 羅橘 / LODGE, PATRICIA A.

3. 茱莉 安妮 麥克爾雀 / MCEARCHERN, JULIE ANNE

4. 奧桐 L 柏通 / BOYNTON, ALTON L.

5. 保羅 G 修根荷茲 / HUGENHOLTZ, PAUL G.

國 籍：(中文/英文)

1. 荷蘭 / NETHERLANDS

十、申請專利範圍：

1、一種自受試者之樣本分離幹細胞之方法，其中該樣本含有幹細胞及非幹細胞成分，該方法包括藉由以下流程於切向流式過濾裝置上分離：

(i) 將樣本經由移動單位上的注入口(6)導入包含交互流式槽(3)之移動單位(1)；

(ii) 使樣本大致平行於具有大小約 1 至 10 微米孔洞之過濾器(5)交互流動；

(iii) 使樣本經由過濾器進行過濾；以及

(iv) 自樣本選擇性地移除非幹細胞組成物，使形成經富集幹細胞之細胞族群。

2、根據申請專利範圍第 1 項之方法，進一步包括：以白血球分離術、密度離心、差異性溶胞法、過濾法、或血沈棕黃層製備物製備樣本，以用於導入移動單位。

3、根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該樣本為骨髓、組織懸浮液、器官懸浮液、或血液成分。

4、根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該非幹細胞成分為血液基質、紅血球、血漿及血小板。

5、根據申請專利範圍第 1 項之方法，進一步包含重複步驟(i)(ii)(iii)至少二次，以形成經富集幹細胞之細胞族群。

6、根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該幹細胞係造血幹細胞、間質幹細胞、或多能性幹細胞。

7、根據申請專利範圍第 6 項之方法，其中該造血幹細胞係 CD34⁺細胞。

8、根據申請專利範圍第 3 項之方法，其中該幹細胞係造血幹細胞、間質幹細胞、或多能性幹細胞。

9、根據申請專利範圍第 8 項之方法，其中該造血幹細胞係 CD34⁺細胞。

10、根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該受試者藉使用幹細胞活動試劑而已經過幹細胞活動化。

11、根據申請專利範圍第 10 項之方法，其中該幹細胞活動試劑為 M-CSF、G-CSF、GM-CSF 或環磷醯胺。

12、根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該切向流式過濾裝置具有可預設定交互流式槽注入口樣本注入速率之工具；控制通過過濾器進入過濾液槽過濾速率之工具；以及其中該調控過濾速率之工具限制過濾速率使其小於過濾器之無競爭之過濾速率。

13、根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該樣本經前處理誘導基本上與幹細胞具有相同尺寸之細胞族群之細胞皺縮。

14、根據申請專利範圍第 13 項之方法，其中該具有相同尺寸之細胞族群為顆粒性白血球。

15、根據申請專利範圍第 13 項之方法，其中該前處理包括使細胞接觸生理可接受含二甲基亞砷(DMSO)之溶液。

16、根據申請專利範圍第 15 項之方法，其中該 DMSO 濃度在 5% 與 20% 之間。

17、根據申請專利範圍第 16 項之方法，其中該 DMSO 濃度係 12.5% 或 15%。

18、根據申請專利範圍第 16 項之方法，其中該生理可接受之溶液係低離子強度。

19、根據申請專利範圍第 13 項之方法，其中該前處理包括使細胞接觸生理可接受含甘油之溶液。

20、根據申請專利範圍第 19 項之方法，其中該甘油濃度在 0.5mol/L 與 2.5mol/L 之間。

21、根據申請專利範圍第 19 項之方法，其中該甘油濃度係 1mol/L。

22、根據申請專利範圍第 14 項之方法，其中顆粒性白血球經由細胞溶解優先自細胞混合物中移除。

23、根據申請專利範圍第 22 項之方法，其中細胞溶解可由樣本對有效量之 DMSO 及甘油之依序接觸而達到。

24、根據申請專利範圍第 23 項之方法，其中該樣本之接觸係與低滲透壓強度之溶液。

25、一種富集骨髓或血液成分樣本中幹細胞之方法，包括：

(i) 將樣本導入切向流式過濾 (TFF) 單位，該 TFF 單位包括一交互流式槽、一過濾液槽，以及一與交互流式槽和過濾液槽液體流通之過濾器，過濾器之孔洞大小約 1 至 10 微米；

(ii) 使該樣本經由切向流式過濾 (TFF) 單位以預設定好之注入速率及過濾速率進行再循環，該預設定好之注入速率至少係預設定好之過濾速率五倍；其中該預設之過濾速率小於無競爭之過濾速率；和

(iii) 分離富集幹細胞之細胞族群。

26、根據申請專利範圍第 25 項之方法，其中該富集幹細胞之細胞族群大體上不含非白血球細胞之血液組成。

27、根據申請專利範圍第 25 項之方法，進一步包括將富集幹細胞之細胞族群施予個體之步驟。

28、根據申請專利範圍第 27 項之方法，其中該樣本係來自至少以一種幹細胞活動試劑治療之受試者。

29、根據申請專利範圍第 28 項之方法，其中該幹細胞活動試劑包括 M-CSF、G-CSF、GM-CSF 或環磷醯胺。

30、根據申請專利範圍第 27 項之方法，其中該幹細胞係再注射回接受者。

31、根據申請專利範圍第 30 項之方法，其中該接受者與受試者係自體或異體。

32、根據申請專利範圍第 30 項之方法，其中該接受者係需要骨髓重建、係需要心臟組織修復、受過骨髓摧毀治療、經歷過心肌梗塞、係患有充血性心臟衰竭、或係患有心臟功能不足。

33、根據申請專利範圍第 30 項之方法，其中該富集幹細胞之細胞族群係注射到循環系統、係注射入冠狀動脈、或係直接塗敷於受損心臟組織。