(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2021 年 9 月 23 日 (23.09.2021)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2021/185364 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 8/98 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 8/97 (2017.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/081854

(22) 国际申请日: 2021 年 3 月 19 日 (19.03.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
62/992,546 2020年3月20日 (20.03.2020) US

(71) 申请人: 台湾粒线体应用技术股份有限公司 (**TAIWAN MITOCHONDRION APPLIED TECHNOLOGY CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国台湾省新竹县竹北市高铁七路65号17楼之7, Taiwan 302 (CN)。

(72) 发明人: **郑汉中 (CHENG, Han-Chung)**; 中国台湾省新竹县竹北市高铁七路65号17楼之7, Taiwan 302 (CN)。 **许智凯 (HSU, Chih-Kai)**; 中国台湾省新竹县竹北市高铁七路65号17楼之7, Taiwan 302 (CN)。 **曾惠卿 (TSENG, Hui-Ching)**; 中国台湾省新竹县竹北市高铁七路65号17楼之7, Taiwan 302 (CN)。 **杨舜杰 (YANG, Shun-Chieh)**; 中国台湾省新竹县竹北市高铁七路65号17楼之7, Taiwan 302 (CN)。 **涂启堂 (TU, Chi-Tang)**; 中国台湾省新竹县竹北市高铁七路65号17楼之7, Taiwan 302 (CN)。 **刘思廷 (LIU, Szu-Ting)**; 中国台湾省新竹县竹北市高铁七路65号17楼之7, Taiwan 302 (CN)。 **姚莉歆 (YAO, Li-Hsin)**; 中国台湾省新竹县竹北市高铁七路65号17楼之7, Taiwan 302 (CN)。

(74) 代理人: **北京信慧永光知识产权代理有限责任公司 (BEIJING SUNHOPE INTELLECTUAL PROPERTY LTD.)**; 中国北京市海淀区知春路9号坤讯大厦1106室, Beijing 100191 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,

(54) **Title:** CELL CULTURE COMPOSITION AND USE THEREOF

(54) **发明名称:** 细胞培养组合物及其用途

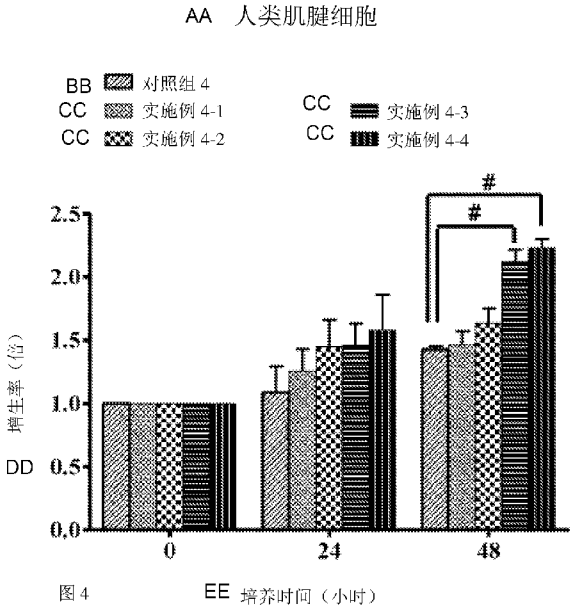


图 4

AA Human tendon cells
BB Control group
CC Example
DD Proliferation rate (times)
EE Culture time (hours)

(57) **Abstract:** Provided are a cell culture composition and use thereof. The cell culture composition comprises a culture medium and mitochondria, and can promote cell growth and improve the function of damaged or aged stem cells, thereby improving the growth condition of the cells.

(57) **摘要:** 提供了一种细胞培养组合物及其用途。该细胞培养组合物包含培养基以及线粒体, 可促进细胞生长、改善受损或老化的干细胞的功能, 藉以改善细胞的生长状况。

WO 2021/185364 A1

[见续页]

LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

细胞培养组合物及其用途

技术领域

本发明是关于细胞培养组合物及其用途，尤其是关于包含线粒体的细胞培养组合物及其用途。

背景技术

细胞培养基（cell culture medium）是一种模拟动植物体内细胞的生长环境的营养基础物质，其提供细胞本身不能合成的营养物并维持适宜的 pH 值及渗透压，使细胞能在体外存活并增殖。在培养细胞的过程中，为了提高细胞的生长效率与细胞的功能，会添加辅助性的培养添加物。

在贫瘠的培养基中或是严苛的培养条件下，细胞成长的速率较慢，生长出来的细胞可能较脆弱、不易存活，甚至无法成长。培养出的细胞若是不够健康或是成长的速度过慢，对后续的实验或研究皆会造成不利的影响。

发明内容

根据本发明实施例，通过包含线粒体与培养基的细胞培养组合物，可改善细胞的生长状况。

本发明实施例提供一种细胞培养组合物，包含培养基以及线粒体。

本发明实施例提供一种细胞培养组合物在促进细胞生长的用途，其中该细胞培养组合物包含培养基以及线粒体。

本发明实施例提供一种细胞培养组合物在改善受损或老化的干细胞的功能的用途，其中该细胞培养组合物包含培养基以及线粒体。

根据本发明实施例，藉由在细胞培养基中添加线粒体，可帮助细胞生长、提高细胞的增生率。对于受损或老化的细胞而言，根据本发明实施例亦能改善受损或老化的细胞的生长、降低老化细胞比例。除此之外，根据本发明实施例还能改善受损或老化的细胞的功能。在学术方面，本发明确保细胞的生长效率及稳定性有助于进行后续的研究或实验，以奠定科学发展、生物学研究的基础。在产业方面，本发明确保细胞的生长效率及稳定性有助于稳定产率及良率，可降低细胞培养成本并控管产品质量，以达成利益最大化。

附图说明

图 1A 及图 1B 显示使用实施例的细胞培养组合物培养 ARPE-19 的细胞增生率，图 1A 的培养时间为 24 小时，图 1B 的培养时间为 48 小时。

图 2 显示使用实施例的细胞培养组合物培养 HepG2 的细胞增生率，培养时间为 24 小时。

图 3 显示使用实施例的细胞培养组合物培养 MDCK 的细胞增生率，培养时间为 24 小时。

图 4 显示使用实施例的细胞培养组合物培养人类肌腱细胞的细胞增生率，培养时间为 24 小时及 48 小时。

图 5 显示使用实施例的细胞培养组合物培养自然杀手细胞的细胞增生率，培养时间为 24 小时及 48 小时。

图 6 显示使用实施例的细胞培养组合物培养受损或老化的 ADSC 的老化细胞比例。

图 7 显示使用实施例的细胞培养组合物培养受损或老化的 AMSC 的老化细胞比例。

图 8 显示使用仅含血小板的对照组的细胞培养组合物培养 CCD-996SK 的细胞增生率，培养时间为 24 小时及 48 小时。

图 9 显示使用仅含线粒体的实施例的细胞培养组合物培养 CCD-996SK 的细胞增生率，培养时间为 24 小时及 48 小时。

图 10 显示使用含线粒体及血小板的实施例的细胞培养组合物培养 CCD-996SK 的细胞增生率，培养时间为 24 小时及 48 小时。

图 11 显示使用含线粒体及补体 C3 的实施例的细胞培养组合物培养 ARPE-19 的细胞增生率，培养时间为 24 小时及 48 小时。

具体实施方式

于以下实施方式中详细叙述本发明的详细特征及优点，其内容足以使任何熟习相关技艺者了解本发明的技术内容并据以实施，且根据本说明书所揭露的内容、申请专利范围及图式，任何熟习相关技艺者可轻易理解本发明相关的目的及优点。以下实施例系进一步详细说明本发明的观点，但非以任何观点限制本发明之范畴。

线粒体是细胞内进行氧化磷酸化反应及合成三磷酸腺苷（ATP）的场所，除了提供细胞正常代谢所需

的能量外，还负责调控细胞内氧化压力处理、讯号传递等功能。在细胞的培养过程中，线粒体的功能与细胞的生长有相当大的关联。线粒体功能较差的细胞在产生能量方面的效率亦较差，造成细胞生长缓慢或细胞生长不健全。因此，发明人藉由以线粒体作为细胞培养组合物中的添加物来改善细胞的生长情况。

根据本发明一实施例，细胞培养组合物包含培养基及线粒体。细胞培养组合物在常温常压下可呈液态，可保存于室温，以保存于4℃为佳。

培养基可包含DMEM、F12、DMEM/F12、MEM、MEM-α、Keratinocyte SFM (1X)、IMEM、RPMI 1640、M-199、Opti-MEM、Ham's F-10 Nutrient Mixture、Ham's F-12 Nutrient Mixture或IMDM，但不以此为限。培养基可为液体或固体，可依据所欲培养的细胞选择适当的培养基并添加适当的营养添加物及水。

线粒体可为取自动物细胞或植物细胞的线粒体，但不以此为限。在本发明部分实施例中，培养动物细胞时添加动物细胞的线粒体至培养基中。提供线粒体的动物细胞可包含脂肪干细胞、单核球细胞、胚胎干细胞、间质干细胞、造血干细胞、CD34+干细胞、骨髓干细胞、骨骼肌细胞、肝脏细胞、肾脏细胞、血小板、纤维母细胞、内皮细胞等具有线粒体的细胞。细胞培养组合物中，每一毫升的细胞培养组合物可包含1微克至100微克的线粒体，但不以此为限。在其他实施例中，每一毫升的细胞培养组合物可包含5微克至80微克的线粒体。在其他实施例中，每一毫升的细胞培养组合物可包含15微克至40微克的线粒体。

根据本发明其他实施例，细胞培养组合物可包含培养基、至少一种营养添加物及线粒体。

营养添加物可包含胎牛血清（Fetal Bovine Serum，FBS）、盐类、胺基酸、马血清、人类血清、维生素、葡萄糖、生长因子、蛋白质、动物体萃取物、碳水化合物、肌醇、巯乙醇或叶酸，但不以此为限。盐类包含钠盐、钾盐、镁盐、钙盐、氯盐、碳酸盐、丙酮酸盐、硝酸盐、磷酸盐或无机盐，但不以此为限。可依据所欲培养的细胞选择适当的营养添加物。

根据本发明其他实施例，细胞培养组合物可包含培养基、线粒体及血小板。

血小板可为动物血液中的血小板，但不以此为限。在细胞培养组合物中，每一毫升的细胞培养组合物可包含1×10^6至1×10^8个血小板，但不以此为限。在其他实施例中，每一毫升的细胞培养组合物可包含1×10^8个血小板。

根据本发明其他实施例，细胞培养组合物可包含培养基、线粒体及补体C3。

在细胞培养组合物中，每一毫升的细胞培养组合物可包含0.1微克至20微克的补体C3，但不以此为限。在其他实施例中，每一毫升的细胞培养组合物可包含10微克的补体C3。

根据本发明一实施例，细胞培养组合物可促进细胞生长，提高细胞增生率。使用本发明实施例的细胞培养组合物所培养的细胞可包含任意体细胞。体细胞可包含视网膜细胞、肝脏细胞、肾脏细胞、肌腱细胞、皮肤细胞或免疫细胞。免疫细胞可包含自然杀手细胞，自然杀手细胞可具有CD56+、CD3-、CD94+、CD122+、CD127+、KIR+、NKG2A+、NKG2D+、NKp30+、NKp44+、NKp46+及NKp80+中的至少一种标记。

根据本发明一实施例，细胞培养组合物可改善受损或老化的细胞的老化程度。使用本发明实施例的细胞培养组合物所培养的细胞可包含任意体细胞或任意干细胞。体细胞可为视网膜细胞、肝脏细胞、肾脏细胞、肌腱细胞、皮肤细胞或免疫细胞。干细胞可包含间质干细胞，间质干细胞可具有CD44+、CD90+、CD105+、CD106+、CD166+、Stro-1+及CD34-中的至少一种标记。间质干细胞可为脂肪干细胞、脐带干细胞、胎盘干细胞、骨髓干细胞、羊水干细胞、皮肤干细胞、周边血干细胞、子宫内膜干细胞、羊膜干细胞、牙龈干细胞或牙髓干细胞。

以下说明如何制备本发明实施例的细胞培养组合物。

本发明一实施例所使用的线粒体取自人类脂肪干细胞（adipose-derived stem cell，ADSC）。干细胞培养液包含Keratinocyte SFM（1X）溶液（Gibco）、牛垂体提取物（bovine pituitary extract（BPE），Gibco）、重量百分浓度10%的胎牛血清（HyClone）。首先，在培养皿中将人类脂肪干细胞培养至细胞数为1.5×10^8个细胞，再以杜氏磷酸盐缓冲液（DPBS）冲洗培养皿中的人类脂肪干细胞。接着，移除培养皿中的杜氏磷酸盐缓冲液后，在培养皿中加入细胞剥离用的胰蛋白酶（Trypsin），并在37℃下反应3分钟后，再加入干细胞培养液以终止反应。接着，将人类脂肪干细胞自培养皿中冲洗下来后打散，以600 g离心10分钟后，移除上清液。接着，将离心后留下的人类脂肪干细胞及80毫升的IBC-1缓冲液（225 mM甘露醇、75mM蔗糖、0.1 mM EDTA、30 mM Tris-HCl pH 7.4）加入均质器中，并在冰上以均质器对人类脂肪干细胞进行研磨15次。接着，以1000 g离心研磨后的人类脂肪干细胞15分钟，将上清液收集至另一离心管，再以9000 g再次离心收集的上清液10分钟，移除再次离心后得到的上清液，获得的沉淀物即为线粒体。在线粒体沉淀物中加入1.5毫升的IBC-2缓冲液（225 mM甘露醇、75mM蔗糖、30 mM Tris-HCl pH 7.4）及蛋白质分解酶抑制剂，并置于4℃下保存。

进行细胞培养时，根据细胞种类选用适当的培养基，接着依期望浓度加入所需的营养添加物以及如上

所述的线粒体并混合均匀即可使用。细胞培养组合物以新鲜配制为佳，但不以此为限，亦可事先配制完成细胞培养组合物后保存于4℃，待进行细胞培养时再取用。

以下说明使用本发明实施例的细胞培养组合物进行细胞培养。

〔实验一，提高细胞增生率〕

在本实验中，使用实施例的细胞培养组合物作为培养液，来培养人类视网膜色素上皮细胞株（Human retinal pigment epithelium cell，ARPE-19）、肝脏细胞（HepG2）、肾脏上皮细胞（Madin-Darby Canine Kidney cell，MDCK）、人类肌腱细胞（Human tenocyte）及自然杀手细胞（Nature killer cell，NK92MI）。并且，通过阿尔玛蓝检测试剂来评估包含线粒体的细胞培养组合物对于细胞生长的影响，并以增生率（亦称为细胞增生率）来表示。

阿尔玛蓝（Alamar blue）是用于检测细胞活力的检测试剂。检测套组内的刃天青（resazurin）是一种氧化还原指示剂，其为无毒、可穿透细胞膜且低荧光性的深蓝色染料。当刃天青进入健康的细胞中，会因活细胞体内的还原环境而被还原成粉红色且具高荧光性的试卤灵（resorufin）。可藉由测量试卤灵的光吸收值或荧光值来评估细胞的增生率（cell proliferation）。试卤灵的光吸收值或荧光值越高，表示细胞量越多，细胞的增生率越高。细胞的增生率越高也表示细胞越健康、增生能力越强。因此，本实验使用阿尔玛蓝作为评估细胞增生率或细胞存活率的指标。

本实验所使用各实施例的细胞培养组合物的详细成分如表1至表5所示。

ARPE-19的培养基可为DMEM/F12（Gibco），营养添加物可包含2.5 mM麸酰胺酸、15 mM HEPES、0.5 mM丙酮酸钠、1200毫克/升（mg/L）碳酸氢钠及重量百分浓度10%胎牛血清，线粒体浓度可为1微克/毫升（μg/mL）至100 μg/mL，可为5 μg/mL至80 μg/mL，可为15 μg/mL至40 μg/mL，或者可为15μg/mL或40 μg/mL。

HepG2的培养基可为DMEM/F12，营养添加物可包含重量百分浓度10%胎牛血清，线粒体浓度可为1微克/毫升(μg/mL)至100 μg/mL，可为5 μg/mL至80 μg/mL，可为15 μg/mL至40 μg/mL，或者可为15 μg/mL或40 μg/mL。

MDCK的培养基可为含有Earle's Balanced Salt的MEM-α（Thermo Fisher Scientific），营养添加物可包含重量百分浓度5%胎牛血清，线粒体浓度可为1微克/毫升（μg/mL）至100 μg/mL，可为5 μg/mL至80 μg/mL，可为15 μg/mL至40 μg/mL，或者可为15 μg/mL或40 μg/mL。

人类肌腱细胞的培养基可为DMEM/F12，营养添加物可包含重量百分浓度10%胎牛血清，线粒体浓度可为1微克/毫升（μg/mL）至100 μg/mL，可为5 μg/mL至80 μg/mL，可为15 μg/mL至40 μg/mL，或者可为1 μg/mL、15 μg/mL、40 μg/mL或100 μg/mL。

自然杀手细胞的培养基可为含有Earle's Balanced Salt的MEM-α（Thermo Fisher Scientific），营养添加物可包含0.02 mM肌醇、0.1 mM巯乙醇、0.02 mM叶酸、重量百分浓度12.5%胎牛血清及重量百分浓度12.5%马血清，线粒体浓度可为1微克/毫升(μg/mL)至100 μg/mL，可为5 μg/mL至80 μg/mL，可为15 μg/mL至40 μg/mL，或者可为1 μg/mL、15 μg/mL、40 μg/mL或100 μg/mL。

〔表1〕

培养细胞	ARPE-19	
组别	实施例1-1	实施例1-2
培养基	DMEM/F12	
营养添加物	2.5 mM麸酰胺酸 15 mM HEPES 0.5 mM丙酮酸钠 1200 mg/L碳酸氢钠 10%胎牛血清	
线粒体	15 μg/mL	40 μg/mL

〔表2〕

培养细胞	HepG2	
组别	实施例2-1	实施例2-2
培养基	DMEM/F12	
营养添加物	10%胎牛血清	
线粒体	15 μg/mL	40 μg/mL

〔表3〕

培养细胞	MDCK	
组别	实施例 3-1	实施例 3-2
培养基	MEM-α（含有 Earle's Balanced Salt）	
营养添加物	5%胎牛血清	
线粒体	15 μg/mL	40 μg/mL

〔表 4〕

培养细胞	人类肌腱细胞				
组别	对照组 4	实施例 4-1	实施例 4-2	实施例 4-3	实施例 4-4
培养基	DMEM/F12				
营养添加物	10%胎牛血清				
线粒体	-	1 μg/mL	15 μg/mL	40 μg/mL	100 μg/mL

〔表 5〕

培养细胞	自然杀手细胞				
组别	对照组 5	实施例 5-1	实施例 5-2	实施例 5-3	实施例 5-4
培养基	MEM-α（含有 Earle's Balanced Salt）				
营养添加物	0.02 mM 肌醇 0.1 mM 巯乙醇 0.02 mM 叶酸 12.5%胎牛血清 12.5%马血清				
线粒体	-	1 μg/mL	15 μg/mL	40 μg/mL	100 μg/mL

以下说明各细胞的培养流程。首先，取培养代数为 4 至 10 代间的各细胞进行实验。使用不含线粒体的培养液，将各细胞培养至其体积为培养皿的八分满时，移除培养皿中的培养液并使用磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）润洗细胞。接着，在培养皿中加入 0.25%的胰蛋白酶并使胰蛋白酶在 37℃下反应 5 分钟，再加入培养液以终止胰蛋白酶的反应。接者，将培养皿中的各细胞及培养液移至离心管中，以每分钟转速 1000（Revolutions Per Minute，rpm）离心 5 分钟后，移除上清液。接着，再加入新的培养液至离心管中，进行细胞计数。接着，将 ARPE-19 以每孔 2×10^4 个细胞的密度于实施例 1-1 及 1-2 的细胞培养组合物中培养 24 或 48 小时。将 HepG2 以每孔 5×10^4 个细胞的密度于实施例 2-1 及 2-2 的细胞培养组合物中培养 24 小时。将 MDCK 以每孔 5×10^4 个细胞的密度于实施例 3-1 及 3-2 的细胞培养组合物中培养 24 小时。将人类肌腱细胞以每孔 2×10^4 个细胞的密度于实施例 4-1 至 4-4 的细胞培养组合物中培养 24 或 48 小时。将自然杀手细胞以每孔 2×10^4 个细胞的密度于实施例 5-1 至 5-4 的细胞培养组合物中培养 24 或 48 小时。培养完成后，使用磷酸盐缓冲液清洗各细胞，并将培养液更换为含有阿尔玛蓝的培养液，培养 3 小时。培养完成后，以 OD530/595 的波长量测荧光，计算各细胞的增生率。

ARPE-19 的实验结果请参考表 6 及图 1A 及图 1B，图 1A 及图 1B 显示使用实施例的细胞培养组合物培养 ARPE-19 的细胞增生率，图 1A 的培养时间为 24 小时，图 1B 的培养时间为 48 小时。HepG2 的实验结果请参考表 7 及图 2，图 2 显示使用实施例之细胞培养组合物培养 HepG2 的细胞增生率，培养时间为 24 小时。MDCK 的实验结果请参考表 8 及图 3，图 3 显示使用实施例的细胞培养组合物培养 MDCK 的细胞增生率，培养时间为 24 小时。人类肌腱细胞的实验结果请参考表 9 及图 4，图 4 显示使用实施例的细胞培养组合物培养人类肌腱细胞的细胞增生率，培养时间为 24 小时及 48 小时。自然杀手细胞的实验结果请参考表 10 及图 5，图 5 显示使用实施例的细胞培养组合物培养自然杀手细胞的细胞增生率，培养时间为 24 小时及 48 小时。初始对照组为细胞刚开始培养时（第 0 小时）的细胞数，将其定为 1。增生率为细胞培养后的细胞数相对于初始对照组的倍数。对照组为未添加线粒体的组别。图 1A 至图 3 中，#表示相对初始对照组具有显著差异（$P<0.05$），##表示相对初始对照组具有高显著差异（$P<0.01$），###表示相对初始对照组具有非常显著差异（$P<0.001$）。图 4 及图 5 中，#表示相对于对照组具有显著差异（$P<0.05$）。

〔表 6〕

培养细胞：ARPE-19			
	线粒体（μg/mL）	24 小时增生率（倍）	48 小时增生率（倍）

实施例 1-1	15	1.18±0.16	1.25±0.05
实施例 1-2	40	1.26±0.16	1.39±0.07

〔表 7〕

培养细胞：HepG2		
	线粒体（μg/mL）	24 小时增生率（倍）
实施例 2-1	15	1.16±0.15
实施例 2-2	40	1.28±0.09

〔表 8〕

培养细胞：MDCK		
	线粒体（μg/mL）	24 小时增生率（倍）
实施例 3-1	15	1.05±0.05
实施例 3-2	40	1.1±0.05

〔表 9〕

培养细胞：人类肌腱细胞			
	线粒体（μg/mL）	24 小时增生率（倍）	48 小时增生率（倍）
对照组 4	-	1.09±0.21	1.42±0.02
实施例 4-1	1	1.26±0.17	1.46±0.09
实施例 4-2	15	1.45±0.22	1.63±0.12
实施例 4-3	40	1.46±0.18	2.12±0.10
实施例 4-4	100	1.58±0.28	2.23±0.07

〔表 10〕

培养细胞：自然杀手细胞			
	线粒体（μg/mL）	24 小时增生率（倍）	48 小时增生率（倍）
对照组 5	-	1.19±0.08	1.57±0.13
实施例 5-1	1	1.22±0.08	1.63±0.09
实施例 5-2	15	1.32±0.09	1.70±0.13
实施例 5-3	40	1.33±0.08	1.81±0.10
实施例 5-4	100	1.37±0.10	1.83±0.14

上述实验结果显示，使用含有线粒体的细胞培养组合物来培养细胞，可使细胞具有提高的增生率，且增生率随着线粒体的浓度增加而提升，表示含有线粒体的细胞培养组合物确实有助于细胞的生长。并且，增生率的提高随培养时间增长而更加明显，表示含有线粒体的细胞培养组合物可稳定帮助细胞生长。

〔实验二，改善受损或老化的干细胞的老化程度〕

在本实验中，使用醣化终产物（advanced glycation end product，AGE）诱导干细胞损伤或老化，再使用实施例的细胞培养组合物作为培养液来培养受损或老化的干细胞。并且，通过 SA-β-gal 套组来评估包含线粒体的细胞培养组合物对于受损或老化的干细胞的影响，并以老化细胞比例（%）来表示老化程度。本实验使用的干细胞包含脂肪干细胞（Adipose-derived stem cell，ADSC）及羊膜干细胞（Amniotic membrane stem cell，AMSC）。

在老化的细胞中，老化相关-β-半乳糖苷酶（Senescence-associated beta-galactosidase，SA-β-gal）会被过度表达，因此 SA-β-gal 可作为细胞衰老的标记之一。本实验使用 SA-β-gal 套组（Senescence β-Galactosidase Staining Kit #9860，Cell Signaling technology）来评估干细胞的老化状态。

本实验所使用的细胞培养组合物的详细成分如表 11 及表 12 所示。

ADSC 的培养基可为 Keratinocyte SFM（1X）（Catalog number: 17005042，Life Technologies），营养添加物可包含重量百分浓度 10%胎牛血清，线粒体浓度可为 1 微克/毫升（μg/mL）至 100 μg/mL，可为 5 μg/mL 至 80 μg/mL，可为 15 μg/mL 至 40 μg/mL，或者可为 1 μg/mL、15 μg/mL 或 40 μg/mL。

AMSC 的培养基可为 DMEM/F12（Gibco），营养添加物可包含重量百分浓度 10%胎牛血清，线粒体浓度可为 1 微克/毫升（μg/mL）至 100 μg/mL，可为 5 μg/mL 至 80 μg/mL，可为 15 μg/mL 至 40 μg/mL，或

者可为 1 μg/mL、15 μg/mL 或 40 μg/mL。

［表 11］

培养细胞	ADSC			
组别	对照组 6	实施例 6-1	实施例 6-2	实施例 6-3
培养基	Keratinocyte SFM (1X)			
营养添加物	10%胎牛血清			
线粒体	-	1 μg/mL	15 μg/mL	40 μg/mL

［表 12］

培养细胞	AMSC			
组别	对照组 7	实施例 7-1	实施例 7-2	实施例 7-3
培养基	DMEM/F12			
营养添加物	10%胎牛血清			
线粒体	-	1 μg/mL	15 μg/mL	40 μg/mL

以下说明干细胞的培养流程。首先，取培养代数为第 10 代的干细胞进行实验。使用不含线粒体的培养液，将干细胞培养至其体积为培养皿的八分满时，移除培养皿中的培养液并使用磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）润洗干细胞。接着，在培养皿中加入 0.25%的胰蛋白酶并使胰蛋白酶在 37℃下反应 5 分钟，再加入培养液以终止胰蛋白酶的反应。接者，将培养皿中的各细胞及培养液移至离心管中，以每分钟转速 1000（Revolutions Per Minute，rpm）离心 5 分钟后，移除上清液。接着，再加入新的培养液至离心管中，进行细胞计数。接着，将干细胞以每孔 1.5×10^4 个细胞的密度培养 24 小时。接着，于孔盘中加入 AGE，使干细胞在含有浓度为 400 μg/mL 的 AGE 的培养液中培养 4 小时。接着，将含有 AGE 的细胞培养液移除，加入实施例的细胞培养组合物，使干细胞在含有不同线粒体浓度的细胞培养组合物中培养 24 小时。细胞培养组合物中线粒体的浓度为 0、1 μg/mL、15 μg/mL 或 40 μg/mL。培养完成后，使用磷酸盐缓冲液清洗各细胞并使用 SA-β-gal 套组进行细胞老化的评估。

ADSC 的实验结果请参考表 13 及图 6，图 6 显示使用实施例的细胞培养组合物培养受损或老化的 ADSC 的老化细胞比例。AMSC 的实验结果请参考表 14 及图 7，图 7 显示使用实施例的细胞培养组合物培养受损或老化的 AMSC 的老化细胞比例。对照组为添加 AGE 且不包含线粒体的培养组合物。控制组为未添加 AGE 且未添加线粒体的组别。老化细胞比例为在单位面积中老化细胞的数量占所有细胞的数量的百分比，以代表老化程度。图 6 至图 7 中，纵轴为老化细胞比例（%），#表示相对对照组具有显著差异（P<0.05），##表示相对对照组具有高显著差异（P<0.01），###表示相对对照组具有非常显著差异（P<0.001）。

〔表 13〕

培养细胞：ADSC			
	AGE（μg/mL）	线粒体（μg/mL）	老化细胞比例（%）
控制组 6	-	-	11.8±2.32
对照组 6	400	-	30.8±6.7
实施例 6-1		1	29±5.9
实施例 6-2		15	19.33±6.25
实施例 6-3		40	18±5.55

〔表 14〕

培养细胞：AMSC			
	AGE（μg/mL）	线粒体（μg/mL）	老化细胞比例（%）
控制组 7	-	-	11.3±1.75
对照组 7	400	-	62.67±12.03
实施例 7-1		1	53.17±11.57
实施例 7-2		15	27.33±8.5
实施例 7-3		40	23.67±7.92

上述实验结果显示，使用含有线粒体的细胞培养组合物来培养受损或老化的干细胞，可降低老化细胞比例，且老化细胞比例随着线粒体的浓度增加而降低，表示含有线粒体的细胞培养组合物确实有助于改善受损或老化的干细胞的生长，同时有助于改善受损或老化的干细胞的功能。

〔实验三，细胞培养组合物包含血小板〕

在本实验中，进一步在细胞培养组合物中添加血小板，以包含血小板的细胞培养组合物作为培养液来培养纤维母细胞 CCD-996SK。并且，通过阿尔玛蓝检测试剂来评估包含线粒体的细胞培养组合物对于细胞生长的影响，并以增生率（亦称为细胞增生率）来表示。

以下说明本实验所使用的血小板的制备流程。首先，将血液抽取至含有抗凝血剂的采血管或离心管中，采血管为例如 CPT 管（BD Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tube，REF362761）。接着，将血液离心使血液分层，例如以 1500 g 离心 10 分钟使血液分层为红血球层、胶体层、白细胞层（buffy coat）及血浆层，将白细胞层收集至新的离心管中，其中白细胞层包含单核球细胞及血小板。接着，将白细胞层与 HEP buffer（140 mM NaCl、2.7mM KCl、3.8 mM HEPES、5 mM EGTA，pH 7.4）以 1：1 的比例均匀混合，再加入 Prostaglandin E1 使其浓度为 1 μM 以防止血小板活化。接着，将白细胞层以 100 g 离心 15 至 20 分钟使白血球及残余的红血球沉淀，将含有血小板的上清液收集至新的离心管中。接着，将含有血小板的上清液以 800 g 离心 15 至 20 分钟使血小板沉淀。移除上清液，使用 wash buffer（10 mM 柠檬酸钠、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1%(w/v) dextrose）将所沉淀的血小板润洗两次。接着，使用 Tyrode's buffer（134 mM NaCl、12 mM $NaHCO_3$、2.9 mM KCl、0.34 mM Na_2HPO_4、1 mM $MgCl_2$、10 mM HEPES，pH 7.4）进行回溶，以血球计数器进行血小板计数。制备完成的血小板可保存于 20℃至 24℃，待培养细胞时再加入细胞培养组合物中，但以配制后立即使用为佳。

本实验所使用的细胞培养组合物的详细成分如表 15 及表 16 所示。

CCD-996SK 的培养基可为含有 2 mM 麸酰胺酸的 DMEM（Gibco；10566016），营养添加物可包含重量百分浓度 10%胎牛血清，线粒体浓度可为 1 微克/毫升（μg/mL）至 100 μg/mL，可为 5 μg/mL 至 80 μg/mL，可为 15 μg/mL 至 40 μg/mL，或者可为 1 μg/mL、15 μg/mL、40 μg/mL，血小板可为 1×10^6 至 1×10^8 个/mL 或者可为 1×10^6 个、1×10^7 个或 1×10^8 个/mL。

〔表 15〕

培养细胞	CCD-996SK		
组别	对照组 8-1	对照组 8-2	对照组 8-3
培养基	DMEM（含有 2 mM 麸酰胺酸）		
营养添加物	10%胎牛血清		
血小板	1×10^6 个	1×10^7 个	1×10^8 个
线粒体	-	-	-

〔表 16〕

培养细胞	CCD-996SK				
组别	控制组 8	实施例 8-1	实施例 8-2	实施例 8-3	实施例 8-4
培养基	DMEM（含有 2 mM 麸酰胺酸）				
营养添加物	10%胎牛血清				
血小板	-	-	-	-	1×10^6 个
线粒体	-	1 μg/mL	15 μg/mL	40 μg/mL	40 μg/mL

本实验的细胞培养流程请参考实验一，进行细胞计数时，将 CCD-996SK 以每孔 1.5×10^4 个细胞的密度培养于控制组、对照组及实施例 8-1 至 8-4 的细胞培养组合物中培养 24 小时。培养完成后，使用磷酸盐缓冲液清洗各细胞，并将培养液更换为含有阿尔玛蓝的培养液，培养 3 小时。培养完成后，以 OD530/595 的波长量测荧光，计算各细胞的增生率。

CCD-996SK 的实验结果请参考表 17 及图 8 至图 10。图 8 显示使用仅含血小板的对照组的细胞培养组合物培养 CCD-996SK 的细胞增生率，培养时间为 24 小时及 48 小时。图 9 显示使用仅含线粒体的实施例的细胞培养组合物培养 CCD-996SK 的细胞增生率，培养时间为 24 小时及 48 小时。图 10 显示使用含线粒体及血小板的实施例的细胞培养组合物培养 CCD-996SK 的细胞增生率，培养时间为 24 小时及 48 小时。初始对照组为细胞刚开始培养时（第 0 小时）的细胞数，将其定为 1。增生率为细胞培养后的细胞数相对于初始对照组的倍数。对照组为未添加线粒体的组别。控制组为未添加线粒体且未添加血小板的组别。图 8 至图 10 中，#表示相较于控制组具有显著差异（$P<0.05$），##表示相较于控制组具有高显著差异（$P<0.01$），

###表示相较于控制组具有非常显著差异（P<0.001）。

〔表 17〕

培养细胞：CCD-996SK				
	线粒体（μg/mL）	血小板（个）	24 小时增生率（倍）	48 小时增生率（倍）
控制组 8	-	-	1.16±0.08	1.77±0.06
对照组 8-1	-	1×10^6	1.20±0.06	1.85±0.10
对照组 8-2	-	1×10^7	1.23±0.13	1.96±0.07
对照组 8-3	-	1×10^8	1.30±0.04	2.08±0.10
实施例 8-1	1	-	1.17±0.06	1.77±0.07
实施例 8-2	15	-	1.28±0.08	1.90±0.12
实施例 8-3	40	-	1.31±0.07	2.20±0.16
实施例 8-4	40	1×10^6	1.42±0.05	2.13±0.06

根据上述实验结果，由对照组可知，在细胞培养基中添加血小板可提高细胞增生率，且增生率随着血小板的数量增加而提升。由实施例 8-1 至 8-3 可知，使用含有线粒体的细胞培养组合物来培养细胞，可使细胞具有提高的增生率，且增生率随着线粒体的浓度增加而提升，表示含有线粒体的细胞培养组合物确实有助于细胞的生长。由对照组 8-1、实施例 8-3 及实施例 8-4 可知，使用含有线粒体及血小板的细胞培养组合物来培养细胞，可进一步提升细胞的增生率。实施例 8-3 及实施例 8-4 证实在线粒体浓度皆为 40 μg/mL 的情况下，添加 1×10^6 个/mL 的血小板可使细胞增生率进一步提升。实施例 8-4 及对照组 8-1 证实在血小板数量皆为 1×10^6 的情况下，添加 40 μg/mL 的线粒体可使细胞增生率超过血小板数量为 1×10^8（对照组 8-3）始能达到的效果。因此，相较于仅添加血小板或仅添加线粒体的细胞培养组合物，同时含有线粒体及血小板的细胞培养组合物在提升细胞增生率上可具有加乘的效果。并且，增生率的提高随培养时间增长而更加明显，表示含有线粒体的细胞培养组合物可稳定帮助细胞生长。于此，特别说明，实施例 8-4 的 48 小时增生率略低于实施例 8-3 的 48 小时增生率，原因在于细胞已生长至饱和，细胞生长至饱和时细胞总数应略为相等，故细胞生增生率的差异不明显。

〔实验四，细胞培养组合物包含补体 C3〕

在本实验中，进一步在细胞培养组合物中添加补体 C3（Sigma-Aldrich，204885），以包含补体 C3 的细胞培养组合物作为培养液来培养 ARPE-19。并且，通过阿尔玛蓝检测试剂来评估包含线粒体的细胞培养组合物对于细胞生长的影响，并以增生率（亦称为细胞增生率）来表示。

本实验所使用的细胞培养组合物的详细成分如表 18 所示。

ARPE-19 的培养基可为 DMEM/F12（Gibco），营养添加物可包含 2.5 mM 麸酰胺酸、15 mM HEPES、0.5 mM 丙酮酸钠、1200 毫克/升（mg/L）碳酸氢钠及重量百分浓度 10%胎牛血清，线粒体浓度可为 1 微克/毫升（μg/mL）至 100 μg/mL，可为 5 μg/mL 至 80 μg/mL，可为 15 μg/mL 至 40 μg/mL，或者可为 15 μg/mL。补体 C3 浓度可为 0.1 μg/mL 至 20 μg/mL，或者可为 10 μg/mL。

〔表 18〕

培养细胞	ARPE-19	
组别	控制组 9	实施例 9-1
培养基	DMEM/F12	
营养添加物	2.5 mM 麸酰胺酸 15 mM HEPES 0.5 mM 丙酮酸钠 1200 mg/L 碳酸氢钠 10%胎牛血清	
补体 C3	-	10 μg/mL
线粒体	-	15 μg/mL

本实验的细胞培养流程请参考实验一，进行细胞计数时，将 ARPE-19 以每孔 2×10^4 个细胞的密度于实施例的细胞培养组合物中培养 24 或 48 小时。孔盘中线粒体的浓度为 15 μg/mL。孔盘中补体 C3 的浓度为 10 μg/mL。培养完成后，使用磷酸盐缓冲液清洗各细胞，并将培养液更换为含有阿尔玛蓝的培养液，培养 3 小时。培养完成后，以 OD530/595 的波长量测荧光，计算各细胞的增生率。

ARPE-19 的实验结果请参考表 19 及图 11，图 11 显示使用含线粒体及补体 C3 的实施例的细胞培养组合物培养 ARPE-19 的细胞增生率，培养时间为 24 小时及 48 小时。控制组为未添加线粒体且未添加补体

C3 的组别，将其定为 1。增生率为细胞培养后的细胞数相对于控制组的倍数。

〔表 19〕

培养细胞：ARPE-19				
	线粒体（μg/mL）	补体 C3（μg/mL）	24 小时增生率（倍）	48 小时增生率（倍）
控制组 9	-	-	1	1
实施例 9-1	15	10	1.22	1.28

上述实验结果显示，使用含有线粒体及补体 C3 的细胞培养组合物来培养细胞，可进一步提升细胞的增生率。并且，增生率的提高随培养时间增长而更加明显，表示含有线粒体的细胞培养组合物可稳定帮助细胞生长。

根据本发明实施例，藉由在细胞培养基中添加线粒体，可帮助细胞生长、提高细胞的增生率。对于受损或老化的细胞而言，根据本发明实施例亦能改善受损或老化的细胞的生长、降低老化细胞比例。除此之外，根据本发明实施例还能改善受损或老化的细胞的功能。在学术方面，本发明确保细胞的生长效率及稳定性有助于进行后续的研究或实验，以奠定科学发展、生物学研究的基础。在产业方面，本发明确保细胞的生长效率及稳定性有助于稳定产率及良率，可降低细胞培养成本并控管产品质量，以达成利益最大化。

权利要求书

1. 一种细胞培养组合物，包含：
培养基；以及
线粒体。

2. 如权利要求 1 所述的细胞培养组合物，其中，每一毫升的所述细胞培养组合物包含 1 微克至 100 微克的线粒体。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的细胞培养组合物，进一步包含血小板，其中，每一毫升的所述细胞培养组合物包含 1×10^6 至 1×10^8 个血小板。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的细胞培养组合物，进一步包含补体 C3，其中，每一毫升的所述细胞培养组合物包含 0.1 微克至 20 微克的补体 C3。

5. 一种细胞培养组合物在促进细胞生长中的用途，其中，所述细胞培养组合物包含培养基以及线粒体。

6. 如权利要求 5 所述的用途，其中，每一毫升的所述细胞培养组合物包含 1 微克至 100 微克的线粒体。

7. 如权利要求 5 或 6 所述的用途，其中，所述细胞包含视网膜细胞、肝脏细胞、肾脏细胞、肌腱细胞、皮肤细胞或免疫细胞。

8. 如权利要求 7 所述的用途，其中，所述免疫细胞为具有 CD56+及 CD3-标记的自然杀手细胞。

9. 一种细胞培养组合物在改善受损或老化的干细胞的功能中的用途，其中，所述细胞培养组合物包含培养基以及线粒体。

10. 如权利要求 9 所述的用途，其中，每一毫升的所述细胞培养组合物包含 1 微克至 100 微克的线粒体。

11. 如权利要求 9 或 10 所述的用途，其中，使用所述细胞培养组合物培养的干细胞为间质干细胞。

12. 如权利要求 9 或 10 所述的用途，其中，使用所述细胞培养组合物培养的干细胞具有 CD90+及 CD34-标记。

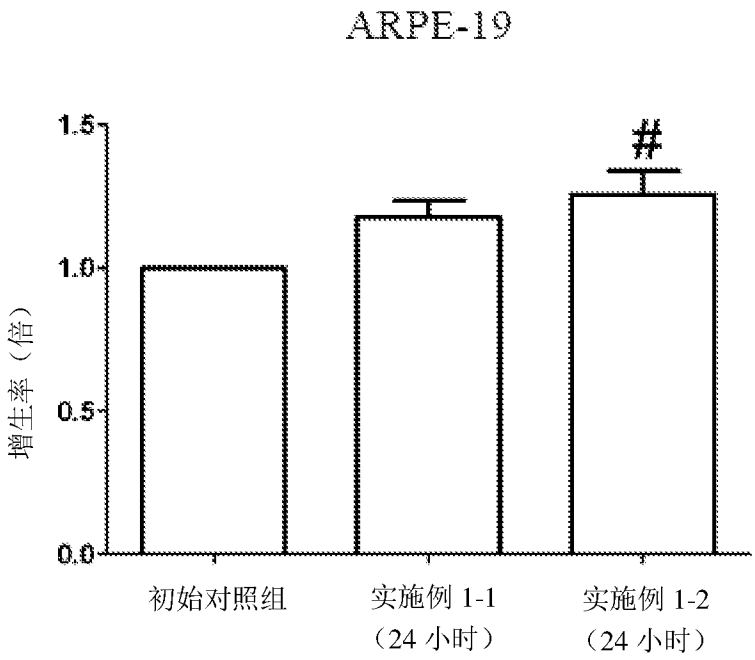

ARPE-19
1.5
1.0
0.5
0.0
增生率（倍）
#
初始对照组
实施例 1-1
（24 小时）
实施例 1-2
（24 小时）

图 1A

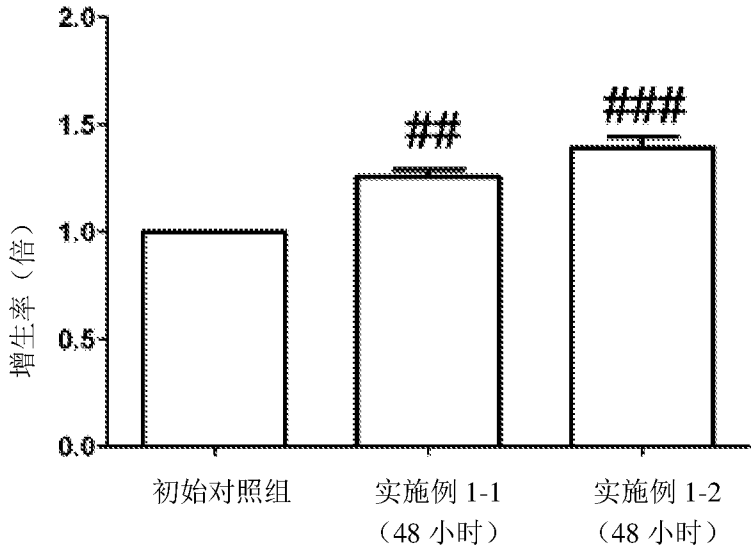

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
增生率（倍）
##
###
初始对照组
实施例 1-1
（48 小时）
实施例 1-2
（48 小时）

图 1B

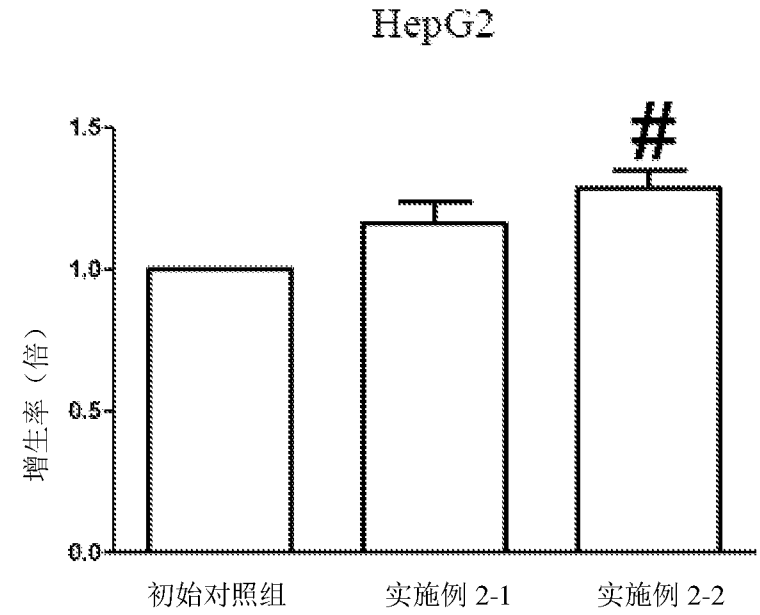

HepG2
1.5
1.0
0.5
0.0
增生率（倍）
#
初始对照组
实施例 2-1
实施例 2-2

图 2

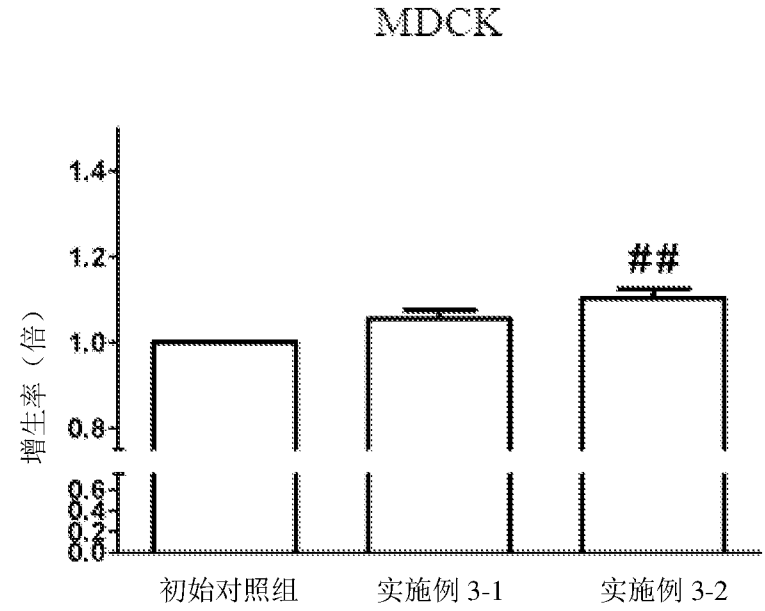

MDCK
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
增生率（倍）
##
初始对照组
实施例 3-1
实施例 3-2

图 3

人类肌腱细胞

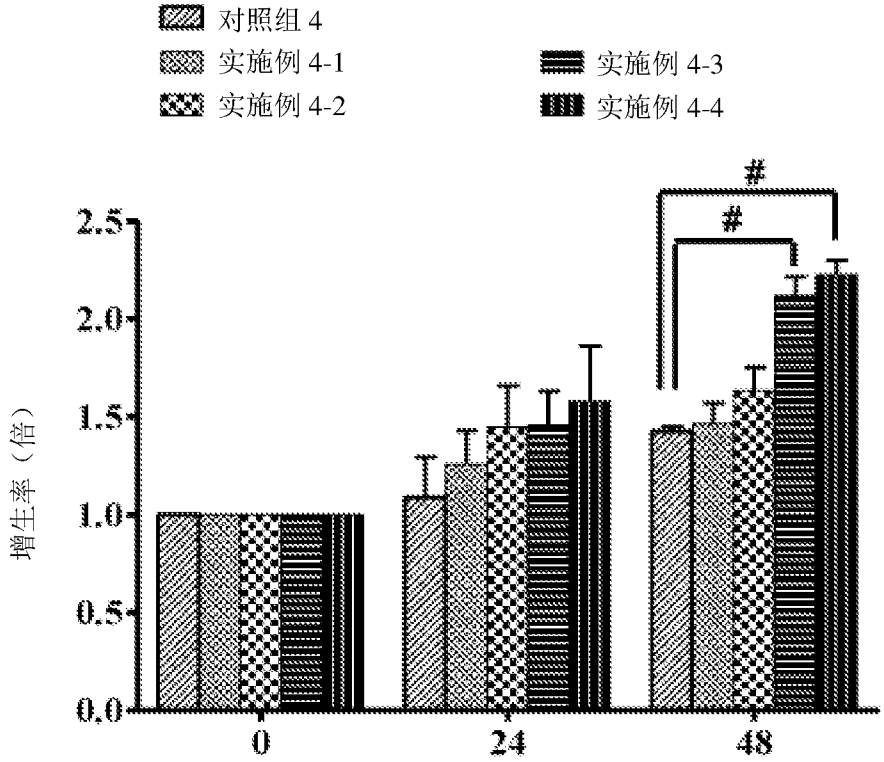

对照组 4
实施例 4-1
实施例 4-2
实施例 4-3
实施例 4-4
#
#
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
增生率（倍）
0
24
48
培养时间（小时）

图 4

自然杀手细胞

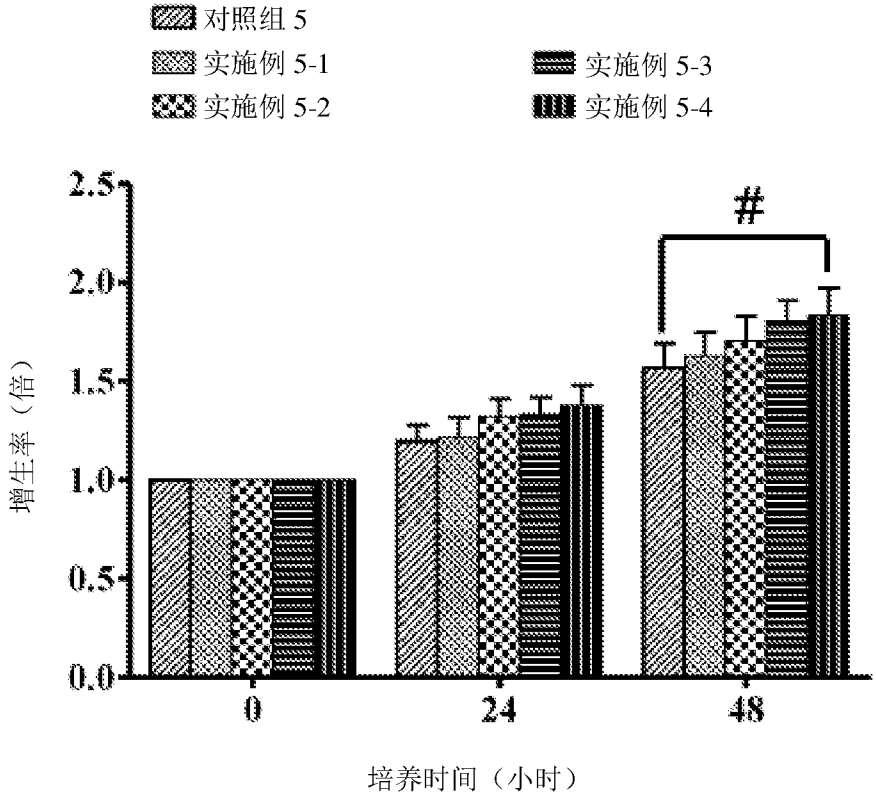


图 5

ADSC

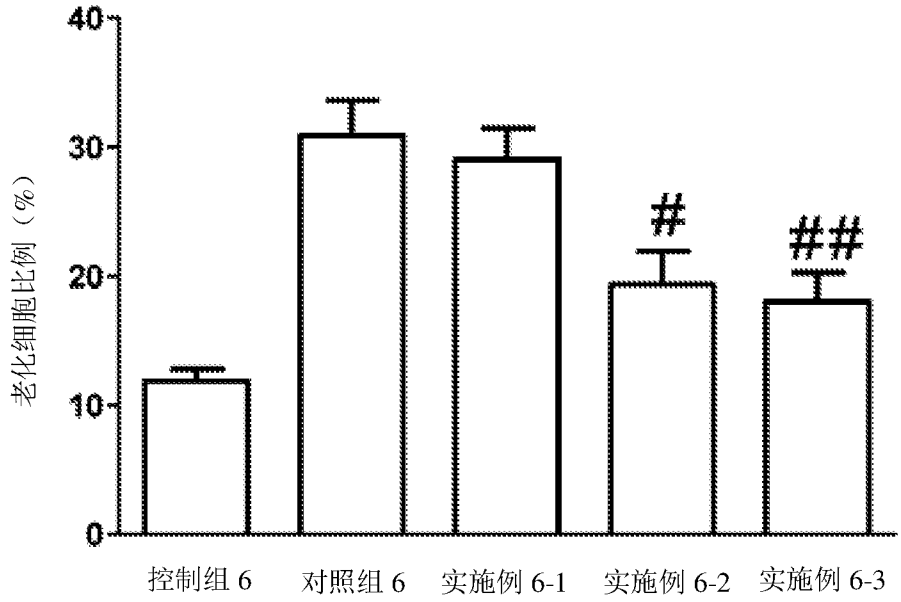


图 6

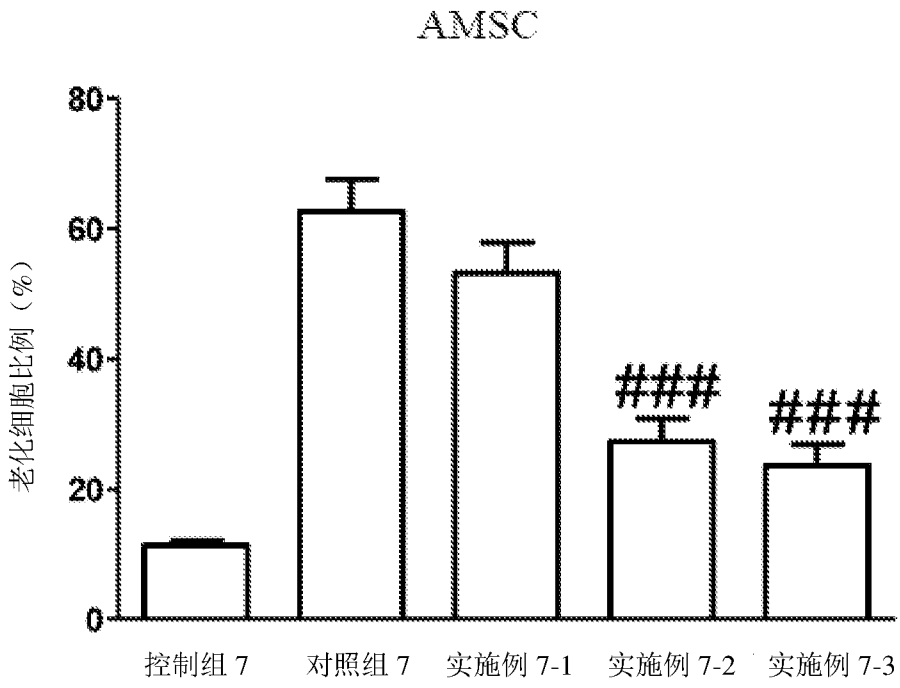

AMSC
老化细胞比例（%）
80
60
40
20
0
###
###
控制组 7
对照组 7
实施例 7-1
实施例 7-2
实施例 7-3

图 7

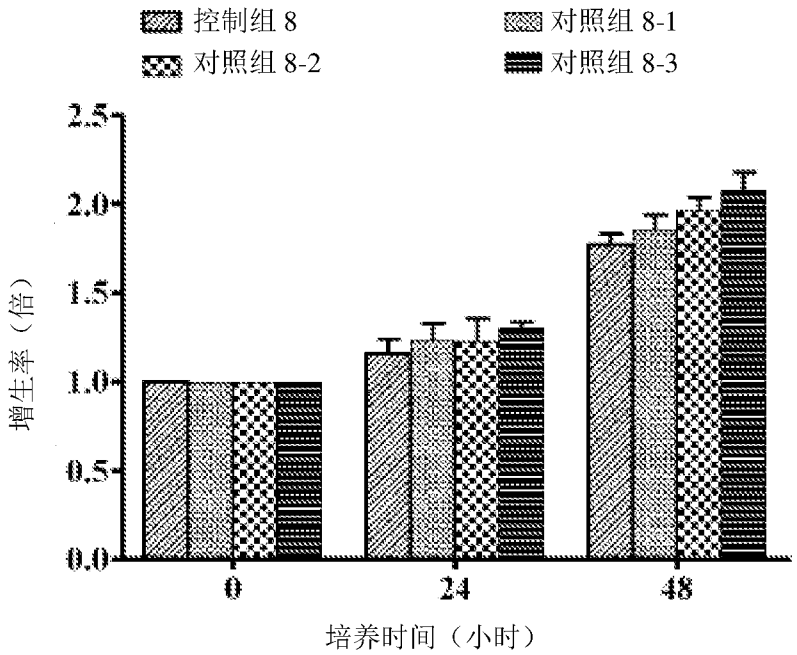

控制组 8
对照组 8-1
对照组 8-2
对照组 8-3
增生率（倍）
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
24
48
培养时间（小时）

图 8

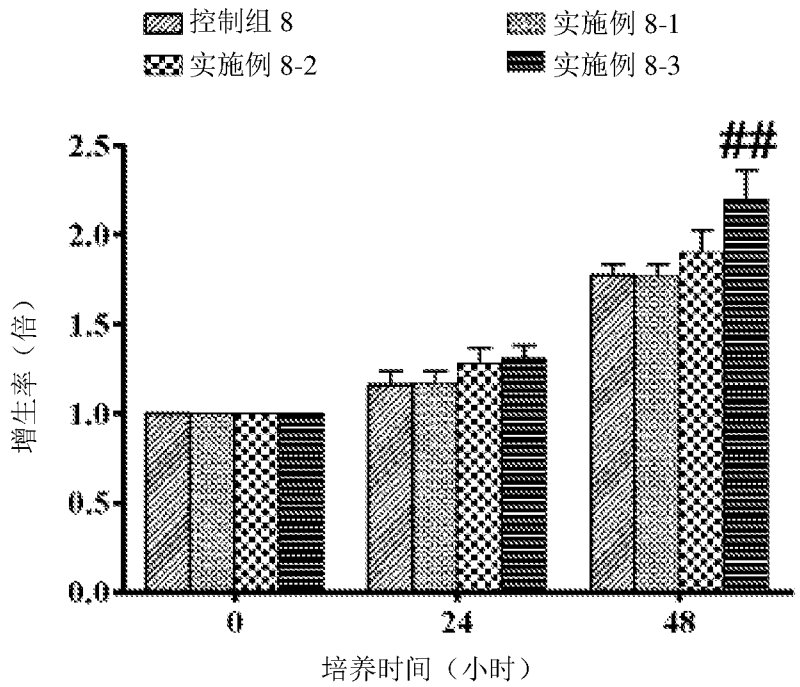

控制组 8
实施例 8-1
实施例 8-2
实施例 8-3
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
增生率（倍）
##
0
24
48
培养时间（小时）

图 9

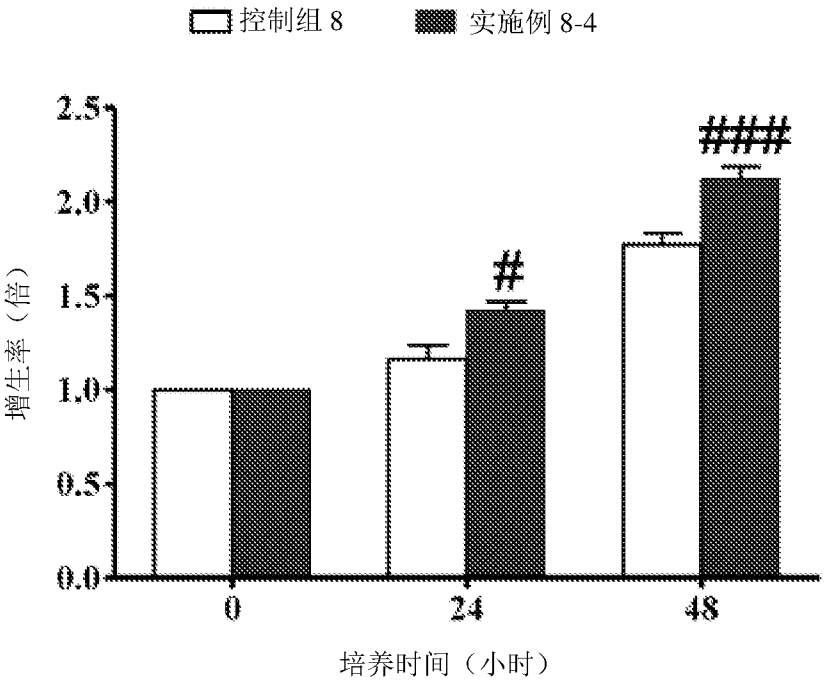

控制组 8
实施例 8-4
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
增生率（倍）
#
###
0
24
48
培养时间（小时）

图 10

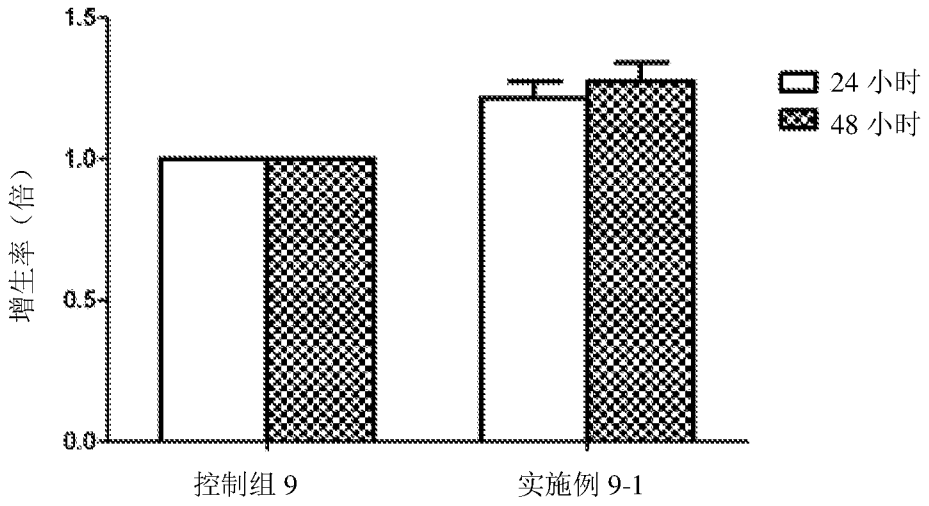


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/081854

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 8/98(2006.01)i; A61K 8/97(2017.01)i; A61P 43/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; DWPI; TWABS; SIPOABS; CNTXT; WOTXT; USTXT; EPTXT; CNKI; 万方数据库; PUBMED; ISI WEB OF SCIENCE: 线粒体, 补体, 培养基, 血小板, mitochondria, complement, C3, medium, platelet.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 105520891 A (LI, Decai) 27 April 2016 (2016-04-27) see claims 1-8, embodiments 1-2, 4-11	1-12
A	CN 107249600 A (NAT UNIV CHUNG HSING) 13 October 2017 (2017-10-13) see entire document	1-12
X	Jui-Chih Chang et al. "Functional recovery of human cells harbouring the Mitochondrial DNA mutation MERRF A8344G via peptide-mediated mitochondrial delivery" *Neurosignals*, Vol. 21, 31 December 2013 (2013-12-31), ISSN: 1424-862X, pages 160-173, see abstract, page 161 right-hand column last paragraph to page 162 left-hand column paragraph 2	1-2, 5-12
A	Michael P.King et al. "Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA" *Cell*, Vol. 52, 25 March 1988 (1988-03-25), ISSN: 0092-8674, pp. 811-819, see entire document	1-12

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 May 2021	**23 June 2021**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Jeffrey L. Spees et al. "Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration" *PNAS*, Vol. 31, No. 5, 31 January 2006 (2006-01-31), ISSN: 0027-8424, pp. 1283-1288, see entire document	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/081854

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 105520891 A	27 April 2016	CN 105520891 B	21 May 2019
CN 107249600 A	13 October 2017	WO 2016106660 A1	07 July 2016
		JP 2018500379 A	11 January 2018
		US 2017340668 A1	30 November 2017
		JP 6355220 B2	11 July 2018
		US 10420798 B2	24 September 2019

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/081854

A. 主题的分类

A61K 8/98(2006.01)i; A61K 8/97(2017.01)i; A61P 43/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS;DWPI;TWABS;SIPOABS;CNTXT;WOTXT;USTXT;EPTXT;CNKI;万方数据库;PUBMED;ISI WEB OF SCIENCE:线粒体，补体，培养基，血小板，mitochondria，complement，C3，medium，platelet。

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 105520891 A (李德财) 2016年 4月 27日 (2016-04-27) 参见权利要求1-8，实施例1-2，4-11	1-12
A	CN 107249600 A (台湾粒线体应用技术股份有限公司) 2017年 10月 13日 (2017-10-13) 参见全文	1-12
X	Jui-Chih Chang等. "Functional recovery of human cells harbouring the Mitochondrial DNA mutation MERRF A8344G via peptide-mediated mitochondrial delivery" Neurosignals, 第21卷，2013年 12月 31日 (2013-12-31), ISSN：1424-862X, 第160-173页，参见摘要，第161页右栏最后一段到第162页左栏第2段	1-2，5-12
A	Michael P.King 等. "Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA" Cell, 第52卷，1988年 3月 25日 (1988-03-25), ISSN：0092-8674, 第811-819页，参见全文	1-12

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2021年 5月 21日	2021年 6月 23日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 王慧梅 电话号码 62411090

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	Jeffrey L. Spees等. "Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration" PNAS, 第31卷，第5期，2006年 1月 31日 (2006-01-31), ISSN：0027-8424, 第1283-1288页，参见全文	1-12

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/081854

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	105520891	A	2016年 4月 27日	CN	105520891	B	2019年 5月 21日
CN	107249600	A	2017年 10月 13日	WO	2016106660	A1	2016年 7月 7日
				JP	2018500379	A	2018年 1月 11日
				US	2017340668	A1	2017年 11月 30日
				JP	6355220	B2	2018年 7月 11日
				US	10420798	B2	2019年 9月 24日