



(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 I696701 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 06 月 21 日

(21)申請案號：104133206

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 10 月 08 日

(51)Int. Cl. : C12N5/077 (2010.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：王耀賢 WANG, YAO HSIEN (TW)；陳崇桓 CHEN, CHUNG HWAN (TW)；何美冷 HO, MEI LING (TW)；張瑞根 CHANG, JE KEN (TW)

(74)代理人：林文杰

(56)參考文獻：

TW 201400612A

CN 1592781A

CN 102550542A

CN 102719396A

CN 104164403A

Siciliano C et al., "Optimization of the isolation and expansion method of human mediastinal-adipose tissue derived mesenchymal stem cells with virally inactivated GMP-grade platelet lysate", Cytotechnology, vol.67, no.1, p.165-174, 2013/12/04

Yang XF et al., "High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells", Journal of Biomedical Science, vol.18, article no.59, p.1-9, 2011/08/19

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：9 項 圖式數：7 共 23 頁

(54)名稱

一種快速分離脂肪間質細胞之組合物

(57)摘要

本發明提供一種分離脂肪間質細胞之組合物，其包含一第一型膠原蛋白酶為 0.5-8%(w/v)；一胰蛋白酶為 0.1-0.6%(w/v)；及一金屬離子螯合劑 0.01-0.2%(w/v)。本發明進一步提供一種分離脂肪間質細胞的方法，該方法包括取得一脂肪組織；以本發明之組合物處理該脂肪組織；離心該脂肪組織；及分離該脂肪組織以獲得脂肪間質細胞。本發明有助於未來在手術室中短時間快速分離間質細胞並運用於再生醫學。

The present invention provides a composition for isolation of adipose-derived mesenchymal cells, wherein the composition comprises a type I collagenase 0.5-8% (w/v), a Trypsin 0.1-0.6% (w/v), and a metal ion chelating agent 0.01-0.2% (w/v). The present invention further provides a method for isolation of adipose-derived mesenchymal cells, wherein the method comprises obtaining an adipose tissue; treating the adipose tissue with the composition of the present invention; centrifuging the liquid adipose tissue; and isolating the adipose-derived mesenchymal cells. The present invention can be beneficial to isolate the mesenchymal cells quickly and can also be used in regenerative medicine.

指定代表圖：

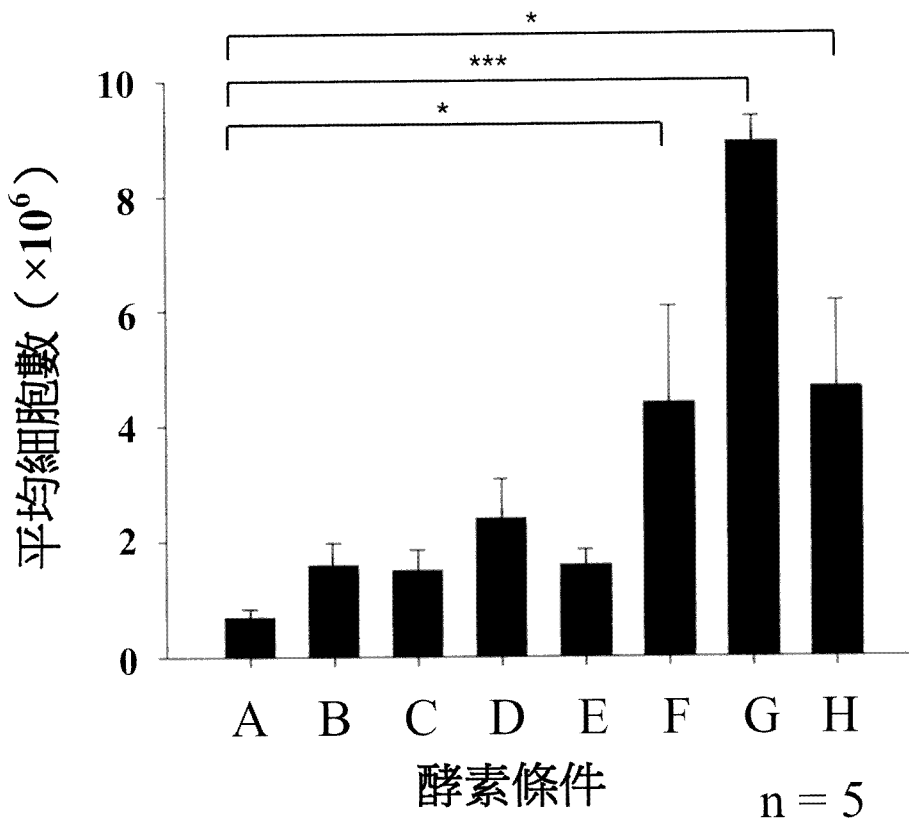


圖 2

符號簡單說明：

A:0.5%第一型膠原蛋白酶+0.05%胰蛋白酶+0.02% EDTA

B:0.5%第一型膠原蛋白酶+0.1%胰蛋白酶+0.02% EDTA

C:0.5%第一型膠原蛋白酶+0.2%胰蛋白酶+0.02% EDTA

D:1%第一型膠原蛋白酶+0.1%胰蛋白酶+0.02% EDTA

E:2%第一型膠原蛋白酶+0.1%胰蛋白酶+0.02% EDTA

F:2.5%第一型膠原蛋白酶+0.1%胰蛋白酶+0.02% EDTA

G:3%第一型膠原蛋白酶+0.1%胰蛋白酶+0.02% EDTA

H:4%第一型膠原蛋白酶+0.1%胰蛋白酶+0.02% EDTA

I696701

發明摘要

※ 申請案號：104133206

※ 申請日：104年10月8日

※IPC 分類：C12N 5/077 (2010.01)

【發明名稱】(中文/英文)

一種快速分離脂肪間質細胞之組合物/COMPOSITION FOR RAPID ISOLATION OF ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL CELLS

【中文】

本發明提供一種分離脂肪間質細胞之組合物，其包含一第一型膠原蛋白酶為0.5-8% (w/v)；一胰蛋白酶為0.1-0.6% (w/v)；及一金屬離子螯合劑0.01-0.2% (w/v)。本發明進一步提供一種分離脂肪間質細胞的方法，該方法包括取得一脂肪組織；以本發明之組合物處理該脂肪組織；離心該脂肪組織；及分離該脂肪組織以獲得脂肪間質細胞。本發明有助於未來在手術室中短時間快速分離間質細胞並運用於再生醫學。

【英文】

The present invention provides a composition for isolation of adipose-derived mesenchymal cells, wherein the composition comprises a type I collagenase 0.5-8% (w/v), a Trypsin 0.1-0.6% (w/v), and a metal ion chelating agent 0.01-0.2% (w/v). The present invention further provides a method for isolation of adipose-derived mesenchymal cells, wherein the method comprises obtaining an adipose tissue; treating the adipose tissue with the composition of the present invention; centrifuging the liquid adipose tissue; and isolating the adipose-derived mesenchymal cells. The present invention can

2020年03月05日 替換頁

be beneficial to isolate the mesenchymal cells quickly and can also be used in regenerative medicine.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 2 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

- A 0.5% 第一型膠原蛋白酶 + 0.05% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA
- B 0.5% 第一型膠原蛋白酶 + 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA
- C 0.5% 第一型膠原蛋白酶 + 0.2% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA
- D 1% 第一型膠原蛋白酶 + 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA
- E 2% 第一型膠原蛋白酶 + 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA
- F 2.5% 第一型膠原蛋白酶 + 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA
- G 3% 第一型膠原蛋白酶 + 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA
- H 4% 第一型膠原蛋白酶 + 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

2020年03月05日 替換頁

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

一種快速分離脂肪間質細胞之組合物/COMPOSITION FOR RAPID
ISOLATION OF ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL CELLS

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種分離脂肪間質細胞之組合物及快速分離脂肪間質細胞的方法

【先前技術】

【0002】 脂肪幹細胞 (adipose-derived stem cells, ADSCs) 是目前廣泛應用於組織工程及再生醫學領域的一種成體幹細胞，與骨髓間充質幹細胞一樣具有多向分化潛能。目前實驗室常用的ADSCs分離培養方法是從脂肪組織中分離獲取細胞，該方式已沿用數十年，通用方式為組織取下後將其剪碎並佐以膠原蛋白酶 (collagenase) 分解細胞外基質使其單細胞從組織釋出。組織分解約需十二小時以上 (通常靜置過夜)。除了時間消耗外，長時間讓細胞處於酵素環境並不利於細胞存活，常造成細胞生理狀態不穩定甚至死亡減少細胞獲得數量。經機械和酶處理方法除去紅細胞等成熟細胞後，利用含10%胎牛血清的培養基進行培養。這種培養幹細胞方法的缺點是方法複雜，提取的幹細胞數量少，純度不高，繼代增殖緩慢。

【0003】 坊間使用抽脂技術取得之液態脂肪組織佐以膠原蛋白酶分離離心後取得之非脂肪單細胞稱為間質血管層細胞 (Stromal Vascular Fraction, SVF)，取得單細胞雖然快速，但抽脂用探頭使用超音波震盪方

2020年03月05日 替換頁

式溶脂吸出，對細胞傷害極大，影響細胞存活率。

【0004】 近年來於再生醫學，特別於骨科學研究強調，間質幹細胞可運用於骨再生與修復的細胞來源，因此自體幹細胞之移植，特別是成體脂肪幹細胞之自體移植成為未來幹細胞移植研發的趨勢。然而，從自體組織中分離與純化間質幹細胞需要相當複雜的操作程序且耗時。如在自體外將間質幹細胞放大到足夠使用的細胞數量，則需要優良實驗室操作規範（Good Laboratory Practice，GLP）實驗場所進行，延長體外操作之時間並降低細胞受細菌或病毒感染的機率。前述係幹細胞在臨床上運用之限制因素，本發明將有助於未來在手術室中短時間快速分離間質細胞並運用於再生醫學。

【發明內容】

【0005】 除非本文另外界定，否則本發明所用之科學及技術術語應具有一般熟習此項技術者通常所理解之含義。該等術語之含義及範疇應為清晰的；然而，在任何潛在歧義之情況下，本文所提供之定義優於任何辭典或外在定義。

【0006】 本文中，術語「複數個」係用以描述本發明之元件或單元之數量。此用語除非明確另有所指，否則應理解為兩個以上。

【0007】 本文中的用語「一」或「一種」係用以敘述本發明之元件及成分。此術語僅為了敘述方便及給予本發明之基本觀念。此敘述應被理解為包括一種或至少一種，且除非明顯地另有所指，表示單數時亦包括複數。

2020年03月05日 替換頁

【0008】 本文中的用語「或」其意同「及/或」。

【0009】 本發明為了彌補現有技術的不足，提供了一種減少病人痛苦、滿足臨床安全應用及短時間快速分離間質細胞之組合物及其方法。

【0010】 本發明提供一種分離脂肪間質細胞之組合物，其包含一第一型膠原蛋白酶（type I collagenase），濃度為0.5-8%（w/v）；一胰蛋白酶（Trypsin），濃度為0.1-0.6%（w/v）；及一金屬離子螯合劑，濃度為0.01-0.2%（w/v）。

【0011】 本發明中所使用的術語「金屬離子螯合劑」係選自乙烯二胺四乙酸（Ethylenediaminetetraacetic acid，EDTA）或其鈉鹽、乙二醇雙氨基乙基醚四乙酸（ethylene glycol tetraacetic acid，EGTA）或其鈉鹽、二乙基三胺五乙酸（Diethyltriaminepentaacetic acid，DTPA）或其鈉鹽、聚磷酸鹽、有機磷酸鹽、磷酸酯、聚丙烯酸酯、有機磷酸鹽、葡萄糖鈉、或彼等之混合。

【0012】 在一較佳具體實施例中，本發明之一種分離脂肪間質細胞之組合物，其中該金屬離子螯合劑係EDTA。

【0013】 在另一較佳具體實施例中，本發明之一種分離脂肪間質細胞之組合物，其包含該第一型膠原蛋白酶2-4%（w/v）、胰蛋白酶0.1-0.3%（w/v）及EDTA 0.01-0.1%（w/v）。

【0014】 在一具體實施例中，本發明之一種分離脂肪間質細胞之組合物係無菌。

【0015】 在一具體實施例中，本發明之一種分離脂肪間質細胞之組合物，具有使脂肪間質細胞充分游離出來，同時保護細胞不受傷害的效

2020年03月05日 替換頁

果。

【0016】 本發明進一步提供一種分離脂肪間質細胞的方法，包括步驟：(a) 取得一脂肪組織；(b) 加入本發明所述分離脂肪間質細胞之組合物均質並反應後，從而獲得一經消化之組織混合物；其中該組合物包含一第一型膠原蛋白酶為0.5-8% (w/v)；一胰蛋白酶為0.1-0.6% (w/v)；及一金屬離子螯合劑0.01-0.2% (w/v)；(c) 將步驟(b)之經消化之組織混合物離心，除去雜質，以獲得含脂肪間質細胞之一濾液；(d) 將一低張溶液加入步驟(c)之濾液並反應，從而獲得去除血球細胞之脂肪間質細胞濾液；及(e) 中和步驟(d)之濾液後離心以獲得脂肪間質細胞。

【0017】 在本發明之一具體實施例中，該脂肪組織係來自於一個體；其中該個體係包含動物或人類。

【0018】 在本發明之一較佳具體實施例中，該金屬離子螯合劑係EDTA。

【0019】 在本發明之另一較佳具體實施例中，該第一型膠原蛋白酶濃度為2-4% (w/v)、胰蛋白酶濃度為0.1-0.3% (w/v) 及EDTA 濃度為0.01-0.1% (w/v)。

【0020】 在本發明之一具體實施例中，分離脂肪間質細胞的方法係無菌。

【0021】 在一較佳具體實施例中，本發明之一種分離脂肪間質細胞的方法進一步具有在總反應時間為一小時內可以充分將該脂肪組織消化，更容易大量獲取脂肪間質細胞之特徵。

【0022】 在另一較佳具體實施例中，本發明之一種分離脂肪間質細

2020年03月05日 替換頁

胞的方法，其可於5克脂肪組織中分離出至少一百萬顆脂肪間質細胞。

【0023】 在一具體實施例中，本發明之一種分離脂肪間質細胞的方法，其中該脂肪間質細胞係可分化為脂肪細胞、造血細胞、血管內皮細胞、成骨細胞、成軟骨細胞、神經細胞或上皮細胞。

【0024】 在一較佳具體實施例中，本發明之一種分離脂肪間質細胞的方法，其中該脂肪間質細胞係可分化為脂肪細胞、成骨細胞或成軟骨細胞。

【0025】 在一較佳具體實施例中，本發明之一種分離脂肪間質細胞的方法，具有使脂肪間質細胞充分游離出來，同時保護細胞不受傷害的效果。

【圖式簡單說明】

【0026】 圖1顯示本發明之一種分離脂肪間質細胞的方法之一實施步驟流程示意圖。

【0027】 圖2顯示SD大鼠大腿內側皮下取出5公克脂肪組織，經不同濃度酵素比例配方於一小時內分離之間質細胞數量結果。

【0028】 圖3顯示天竺鼠大腿內側皮下取出5公克脂肪組織，經不同濃度酵素比例配方於一小時內分離之間質細胞數量結果。

【0029】 圖4顯示所萃取之脂肪間質細胞經篩選後之脂肪幹細胞的分化能力分析。

【0030】 圖5顯示分離的脂肪幹細胞之細胞表面生物標記表現量

【0031】 圖6顯示不同酵素配方濃度對於間質細胞存活之影響。

【0032】 圖7顯示不同酵素種類取代本案發明組合物內容比較。

2020年03月05日 替換頁

【實施方式】

【0033】 本發明可能以不同的形式來實施，並不僅限於下列文中所提及的實例。下列實施例僅作為本發明不同面向及特點中的代表。

【0034】 以單因子變異數分析 (A one-way ANOVA (analysis of variance)) 檢定其統計上差異並利用Scheffe's檢定法進行多重比較 (multiple comparisons)。顯著差異之定義為顯著機率值 (p-value) <0.05 。

【0035】 實施例1 快速間質細胞分離術

【0036】 如圖1所示，為本案發明之酵素配方運用於大鼠史一道二氏大鼠 (Sprague-Dawley rat, 簡稱SD大鼠) 及天竺鼠 (Genia pig) 之脂肪組織之快速間質細胞分離流程示意圖。

【0037】 從SD大鼠及天竺鼠之大腿內側取出5公克脂肪組織，加入等量 (約5 mL) 之本發明之酵素配方緩衝溶液 (0.5-3% (w/v) 第一型膠原蛋白酶 (type I collagenase)、0.1-0.3% (w/v) 胰蛋白酶 (Trypsin) 及 0.02% (w/v) EDTA溶於磷酸鹽緩衝溶液 (PBS) 內); 置入無菌組織均質機 (GentleMACs) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 均質1分鐘將組織打散成單顆細胞狀態，然後浸泡於37°C水浴槽中反應10分鐘; 之後，再置入無菌組織均質機均質1分鐘後，隨後浸泡於37°C水浴槽中反應10分鐘。接著，以 (300 ×g) 離心10分鐘後，移除上層脂肪、結締組織或未切碎之組織，以PBS (5 mL) 清洗後離心 (300 ×g) 10分鐘後，加入等量 (5mL) 低張溶液室溫靜置5分鐘以移除血球細胞後加入10mL PBS緩衝

2020年03月05日 替換頁

溶液中中和反應。以3,000 rpm 10分鐘後移除溶液，將最下層細胞以1mL PBS重新懸浮後取樣計算細胞數。總反應時間在一小時內。

【0038】 實施例2 間質細胞產量分析

【0039】 於實施例1中所分離之脂肪間質細胞樣本中取出20 μ L，加入20 μ L台酚藍 (Trypan blue) 均勻混合染色後，滴入細胞計數盤中，計算存活細胞 (非染色細胞)。

【0040】 如圖2所示，為SD大鼠大腿內側皮下取出5公克脂肪組織，經不同濃度酵素比例配方於一小時內分離之間質細胞數量。結果顯示，以3% (w/v) 第一型膠原蛋白酶 (type I collagenase)、0.1% (w/v) 胰蛋白酶 (Trypsin) 及0.02% (w/v) EDTA之酵素配方 (代號G) 在一小時內萃取之單細胞數量最多，能分離出約 9×10^6 cells/mL 顆間質細胞。

【0041】 如圖3所示，為天竺鼠大腿內側皮下取出5公克脂肪組織，經不同濃度酵素比例配方於一小時內分離之間質細胞數量。結果顯示，以3-4% (w/v) 第一型膠原蛋白酶、0.1% (w/v) 胰蛋白酶 (Trypsin) 及0.02% (w/v) EDTA之酵素配方 (代號G、H) 在一小時內萃取之單細胞數量最多，約能分離出 8×10^6 至 8.5×10^6 cells/mL 顆間質細胞。

【0042】 實施例3 篩選後之脂肪幹細胞的分化能力

【0043】 依據國際間質幹細胞協會在2006年發表對間質幹細胞的定義，其中間質幹細胞包含三項特徵：

1. 細胞須能貼附於細胞培養皿；
2. 表面抗原需表現CD105、CD73、或CD90，但不表現 CD45、

CD34、CD14或CD11b、CD79a 或CD19、或HLA-DR；及

2020年03月05日 替換頁

3. 間質幹細胞經誘導後需要具有分化成脂肪細胞，造骨細胞與軟骨細胞的特性。

【0044】 將實施例1中所分離之脂肪間質細胞以選擇性培養基 (Keratinocyte-SFM；產品編號：10724-001；GIBCO, New York, USA) (選擇性留下間質幹細胞，非間質幹細胞則會凋亡) 培養一周後可篩選出脂肪間質幹細胞。如圖4中之(a)中所示，所分離之脂肪間質幹細胞為貼附型細胞。而利用流式細胞儀分析該分離之脂肪間質細胞亦可發現細胞表面CD271、CD73及CD90的表現量顯著高於控制組值，並且CD34的表現量低於控制組值，如圖5所示。故亦可得知該分離的脂肪間質細胞係屬於間質幹細胞。以下進一步檢測該間質幹細胞受誘導分化成脂肪細胞，造骨細胞與軟骨細胞之能力。

【0045】 前述所分離之脂肪間質幹細胞經繼代後，以不同誘導分化的培養基培養兩週 (Adipo-medium：誘發分化成脂肪細胞之培養基；Osteo-medium：誘發分化成造骨細胞之培養基；及Chondro-medium：誘發分化成軟骨細胞之培養基；其中，Adipo-medium：Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、10% Fetal Bovine Serum (FBS)、1% penicillin/streptomycin、500 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、1 μ M dexamethasone、1 μ M indomethacin、10 μ g/mL insulin；Chondro-medium：Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、10% Fetal Bovine Serum (FBS)、1% penicillin/streptomycin、50 nM L-Ascorbate-2-phosphate、6.25 μ g/mL insulin、10 ng/mL TGF- β ；及Osteo-medium：Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、10% Fetal Bovine Serum (FBS)、1%

2020年03月05日 替換頁

penicillin/streptomycin、50 μ M L-Ascorbate-2-phosphate、0.1 μ M dexamethasone、10 mM β -glycerophosphate)。

【0046】 利用醣胺聚多醣 (glycosaminoglycan, 簡稱GAG) 之測定評估間質幹細胞分化成軟骨細胞能力, 該GAG之檢測以艾爾遜藍 (Alcian blue) 染色進行。在Chondro-medium兩週培養之後, 移除舊培養基, 加入10% 福馬林 (formalin) 或 4% 聚甲醛 (paraformaldehyde) 固定10分鐘。以蒸餾水 (3 mL) 洗滌兩次。接著以3%冰醋酸 (Acetic acid) (3 mL) 振盪5分鐘。移除全部的液體後, 於盤中加入艾爾遜藍 (1%), 振盪15分鐘, 移除染劑後以蒸餾水 (3 mL) 洗滌2-3次後進行拍照記錄。

【0047】 如圖4之 (b) 所示, 艾爾遜藍對於細胞外基質GAG進行染色, 該GAG染色呈藍色且細胞聚集, 為軟骨細胞之特性。

【0048】 利用油紅O (Oil Red O) 對脂肪細胞中油滴之染色, 評估間質幹細胞分化成脂肪細胞之能力。在Adipo-medium培養兩週之後, 移除舊培養基, 加入10% 福馬林或 4% 聚甲醛固定10分鐘。以蒸餾水 (3 mL) 洗滌兩次。移除全部的液體後, 於盤中加入Oil Red O (0.5%), 擺盪10分鐘, 移除染劑後以蒸餾水 (3 mL) 洗滌2-3次, 加入蒸餾水後進行拍照記錄。

【0049】 如圖4之 (c) 所示, 該染色細胞內油滴呈紅色點狀, 為脂肪細胞之特性。

【0050】 利用茜紅 (Alizarin-red) 染色檢測所分離之脂肪間質幹細胞誘發骨生成作用的效果。在Osteo-medium培養兩週之後, 移除舊培養基, 加入4% 福馬林固定15分鐘。以蒸餾水 (3 mL) 洗滌兩次。移除全部

2020年03月05日 替換頁

的液體後，於盤中加入2% 茜紅溶液，以常溫下反應20分，移除染劑後以蒸餾水（3 mL）洗滌2-3次後進行拍照記錄。

【0051】 如圖4之（d）所示，該染色細胞產生之鈣沉積呈紅色點狀，為造骨細胞之特性。

【0052】 實施例4 不同酵素配方濃度對於間質細胞存活之影響

【0053】 經實施例1所分離之脂肪間質細胞以選擇性培養基培養（Keraticytr-SFM；產品編號：10724-001；GIBCO）（選擇性留下間質幹細胞，非間質幹細胞則會凋亡）培養一周後可篩選出脂肪間質幹細胞。以下述三種在實施例1所揭示的較佳脂肪間質細胞分離產量之酵素配方進行細胞毒性試驗：

1. 2.5%（w/v）第一型膠原蛋白酶、0.1%（w/v）胰蛋白酶（Trypsin）及0.02%（w/v）EDTA之酵素配方；
2. 3%（w/v）第一型膠原蛋白酶、0.1%（w/v）胰蛋白酶（Trypsin）及0.02%（w/v）EDTA之酵素配方；及
3. 4%（w/v）第一型膠原蛋白酶、0.1%（w/v）胰蛋白酶（Trypsin）及0.02%（w/v）EDTA之酵素配方。

將 10^5 顆脂肪間質幹細胞置於該等酵素配方，並培養0.5、1、2小時。

【0054】 於培養0.5、1、2小時後，取出細胞進行實施例2之Trypan-blue染色進行細胞存活率之計數，如圖6所示，該等配方並未有明顯細胞毒殺現象。

【0055】 實施例5 不同酵素種類取代比較

【0056】 將相同配方濃度更換成類似本發明中使用的不同型酵素：

2020年03月05日 替換頁

2% (w/v) 第四型膠原蛋白酶、0.1% (w/v) 胰蛋白酶 (Trypsin)、0.02% (w/v) EDTA；2.5%第四型膠原蛋白酶、0.1% Trypsin、0.02% EDTA；3%第四型膠原蛋白酶、0.1% Trypsin、0.02% EDTA；3.5%第四型膠原蛋白酶、0.1% Trypsin、0.02% EDTA；4%第四型膠原蛋白酶、0.1% Trypsin、0.02% EDTA，並依實施例1所教示之分離脂肪間質細胞操作方法進行實施。其結果如圖7所示，本實施例之配方並無法如同3% (w/v) 第一型膠原蛋白酶、0.1% (w/v) 胰蛋白酶及0.02% (w/v) EDTA之酵素配方得到相近的細胞數。因此3% (w/v) 第一型膠原蛋白酶、0.1% (w/v) 胰蛋白酶及0.02% (w/v) EDTA之酵素配方在快速分離脂肪間質細胞中是無可取代的。

【0057】 以上內容闡述了很多具體細節以便於充分理解本發明，但是本發明還可以採用其他不同於在此描述的其它方式來實施，本領域技術人員可以在不違背本發明內涵的情況下做類似推廣，因此本發明不受前面公開的具體實施例的限制。

【符號說明】

【0058】

- A 0.5% 第一型膠原蛋白酶 + 0.05% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA
- B 0.5% 第一型膠原蛋白酶 + 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA
- C 0.5% 第一型膠原蛋白酶 + 0.2% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA
- D 1% 第一型膠原蛋白酶 + 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA
- E 2% 第一型膠原蛋白酶 + 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA

2020年03月05日 替換頁

- F 2.5% 第一型膠原蛋白酶 + 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA
- G 3% 第一型膠原蛋白酶 + 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA
- H 4% 第一型膠原蛋白酶 + 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA
- E' 2% 第四型膠原蛋白酶 + 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA
- F' 2.5% 第四型膠原蛋白酶 + 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA
- G' 3% 第四型膠原蛋白酶 + 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA
- I' 3.5% 第四型膠原蛋白酶 + 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA
- H' 4% 第四型膠原蛋白酶 + 0.1% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

無

2020年04月16日 替換頁

申請專利範圍

1. 一種組合物用於分離脂肪間質細胞之用途，其中該組合物包含一1-4% (w/v)之第一型膠原蛋白酶；一0.1%(w/v)之胰蛋白酶；及一0.02%(w/v)之金屬離子螯合劑，其中該組合物用於分離脂肪間質細胞具有於5克脂肪組織中分離出至少一百萬顆脂肪間質細胞之功效。
2. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該金屬離子螯合劑選自乙烯二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 或其鈉鹽、乙二醇雙氨乙基醚四乙酸 (ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA) 或其鈉鹽、二乙基三胺五乙酸 (Diethyltriaminepentaacetic acid, DTPA) 或其鈉鹽、聚磷酸鹽、有機磷酸鹽、磷酸酯、聚丙烯酸酯、有機磷酸鹽、葡萄糖鈉、或彼等之混合。
3. 如申請專利範圍第2項之用途，其中該金屬離子螯合劑係EDTA。
4. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該第一型膠原蛋白酶之濃度為3% (w/v)。
5. 一種分離脂肪間質細胞的方法，包括步驟：
 - (a) 取得一脂肪組織；
 - (b) 加入申請專利範圍第1項所述之組合物均質並反應後，從而獲得一經消化之組織混合物；其中該組合物包含一1-4% (w/v) 之第一型膠原蛋白酶；一0.1% (w/v) 之胰蛋白酶；及一0.02% (w/v) 之金屬離子螯合劑；
 - (c) 將步驟(b)之經消化之組織混合物離心，除去雜質，以獲得含脂肪間質細胞之一第一濾液；

2020年04月16日 替換頁

- (d) 將一低張溶液加入步驟(c)之第一濾液，從而獲得去除血球細胞之脂肪間質細胞之一第二濾液；及
- (e) 中和步驟(d)之第二濾液並離心，
- 其中該方法具有於5克脂肪組織中分離出至少一百萬顆脂肪間質細胞之功效。
6. 如申請專利範圍第5項之方法，其中該金屬離子螯合劑選自乙烯二胺四乙酸（Ethylenediaminetetraacetic acid，EDTA）或其鈉鹽、乙二醇雙氨乙基醚四乙酸（ethylene glycol tetraacetic acid，EGTA）或其鈉鹽、二乙基三胺五乙酸（Diethyltriaminepentaacetic acid，DTPA）或其鈉鹽、聚磷酸鹽、有機磷酸鹽、磷酸酯、聚丙烯酸酯、有機磷酸鹽、葡萄糖鈉、或彼等之混合。
 7. 如申請專利範圍第6項之方法，其中該金屬離子螯合劑係EDTA。
 8. 如申請專利範圍第5項之方法，其進一步具有在總反應時間為一小時內將一脂肪組織消化，以獲取該脂肪間質細胞之特徵。
 9. 如申請專利範圍第5項之方法，其中該脂肪間質細胞係可分化為脂肪細胞、造血細胞、血管內皮細胞、成骨細胞、軟骨細胞、神經細胞或上皮細胞。

圖式

脂肪幹細胞 (ADSC) 分離流程

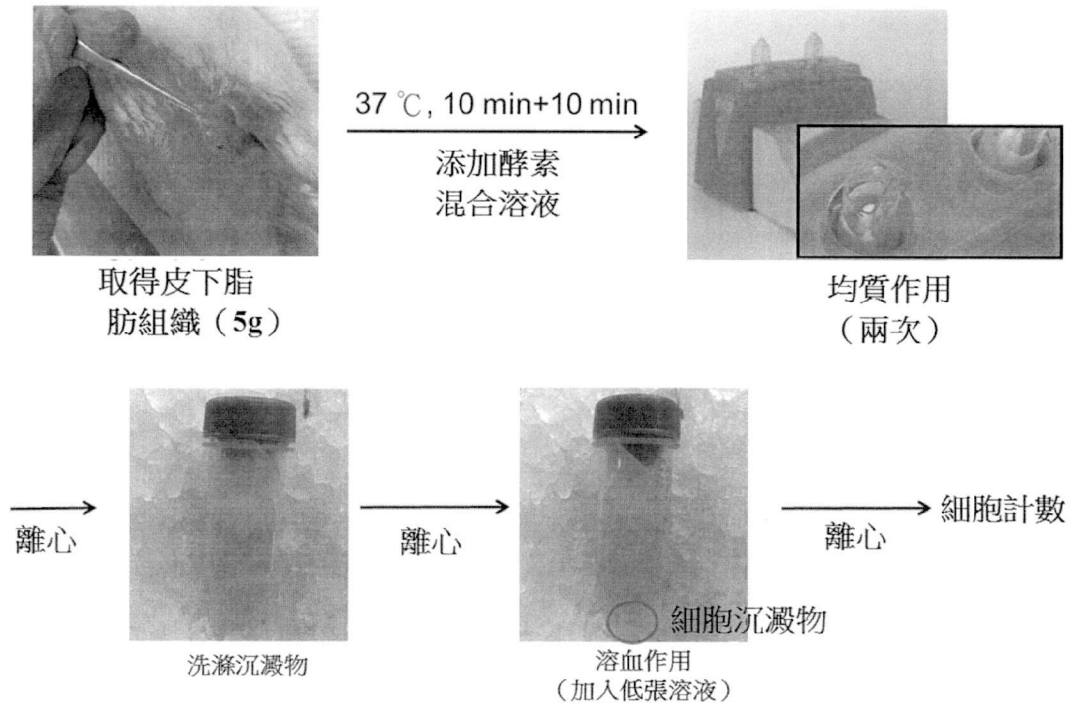


圖 1

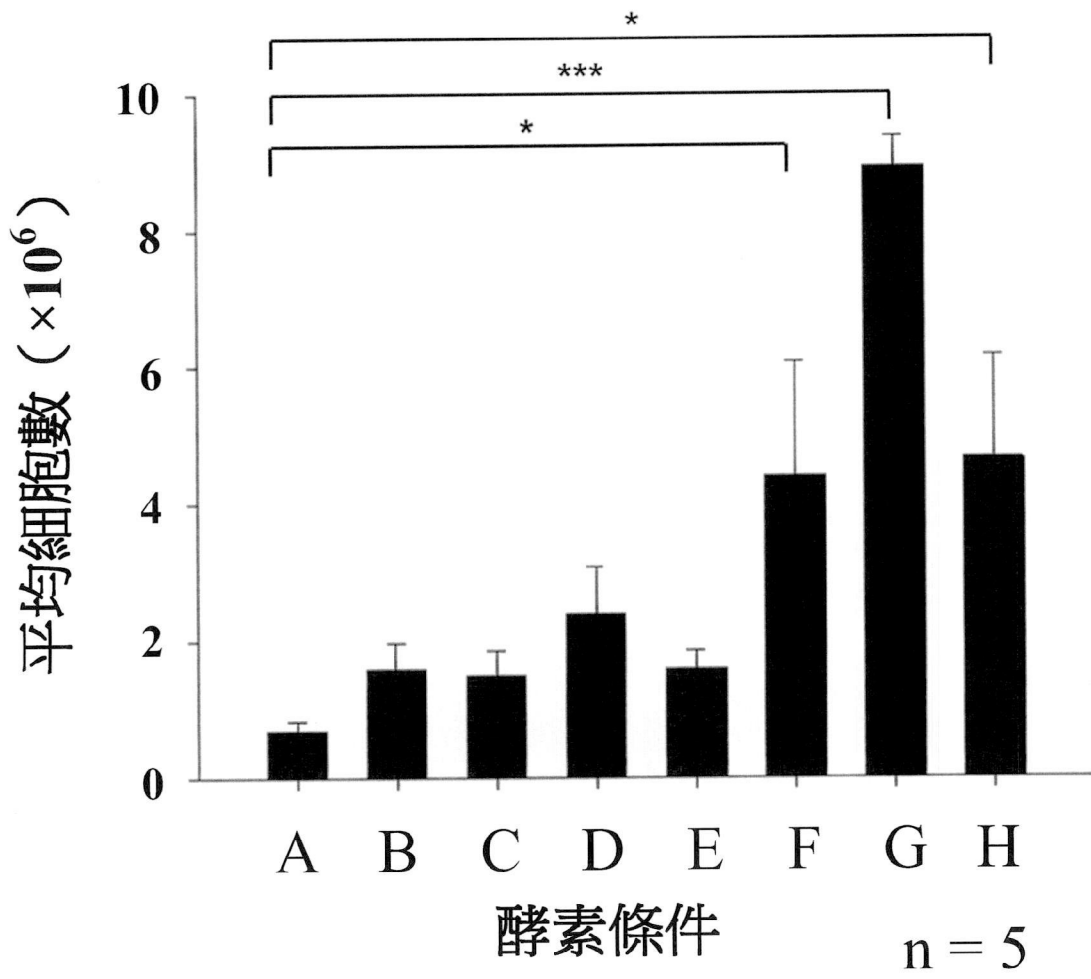


圖 2

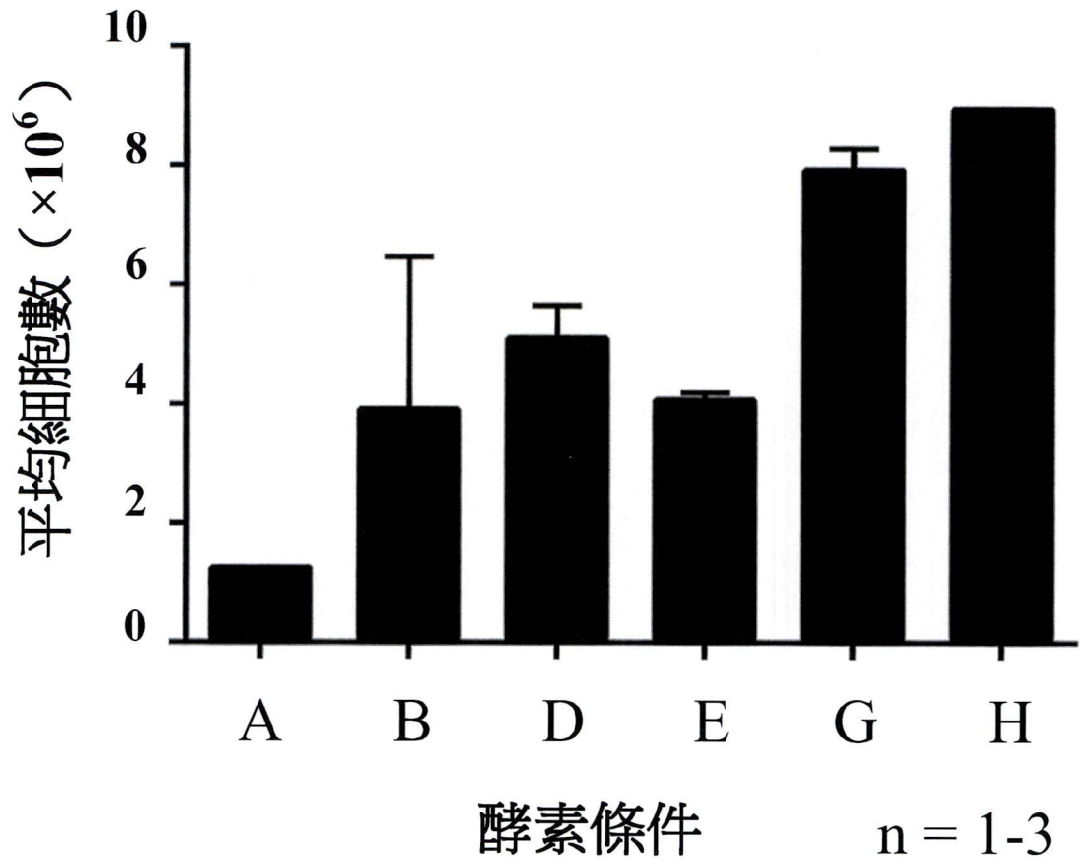


圖 3

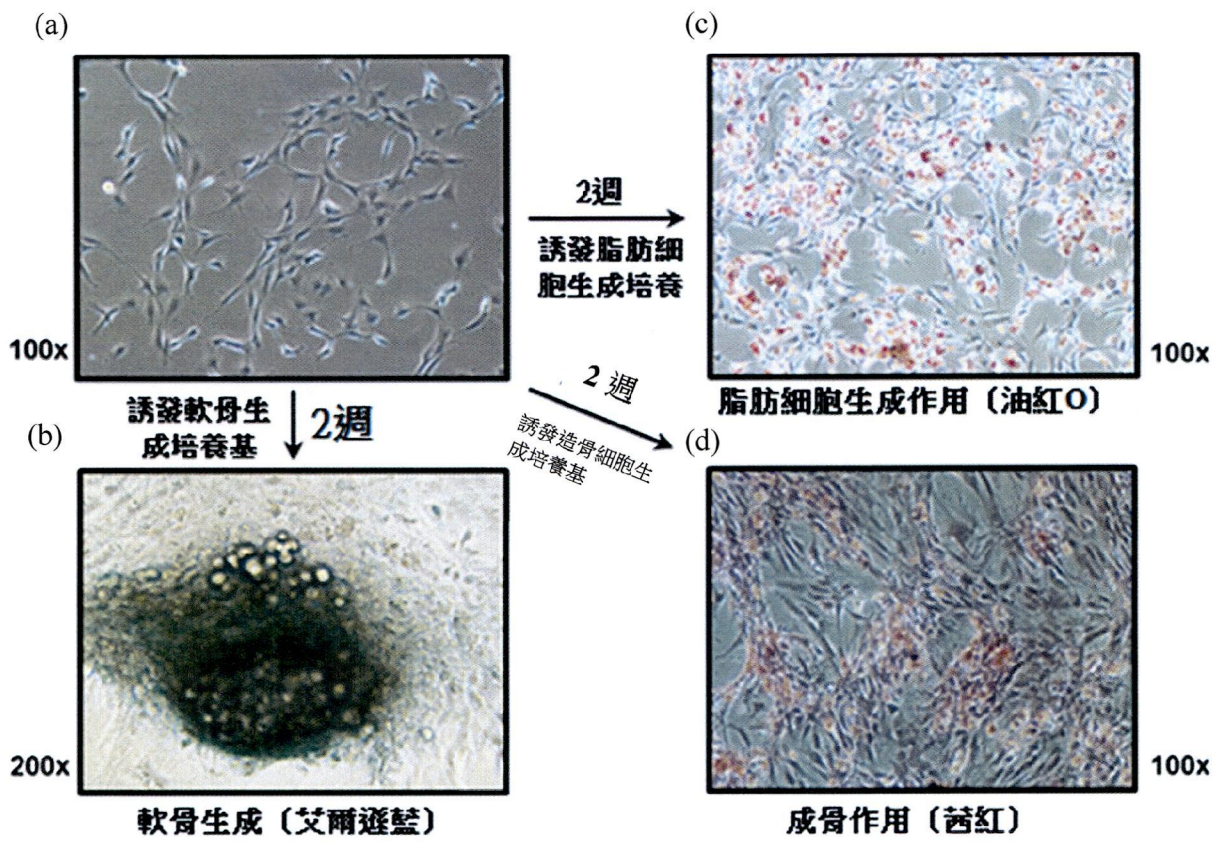


圖 4

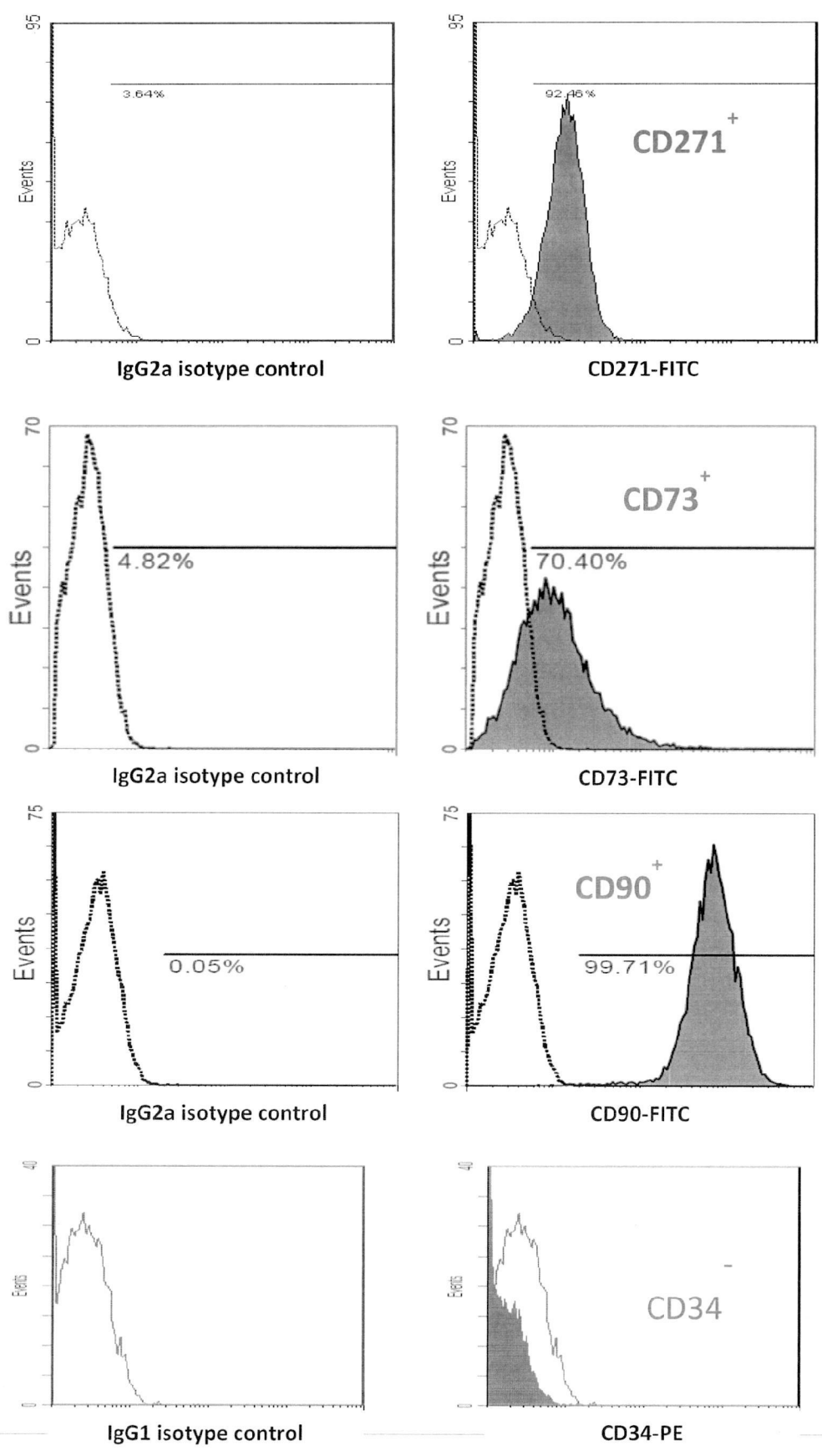


圖 5

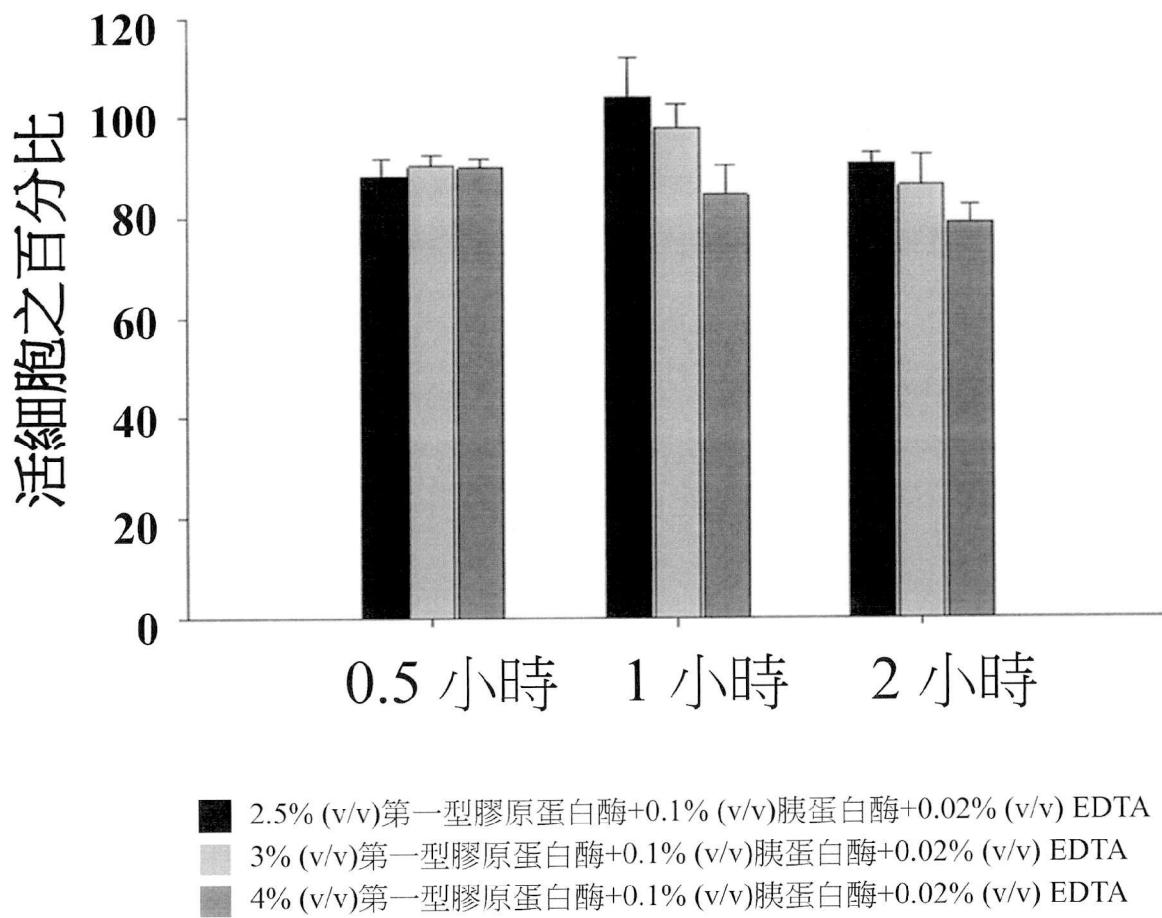


圖 6

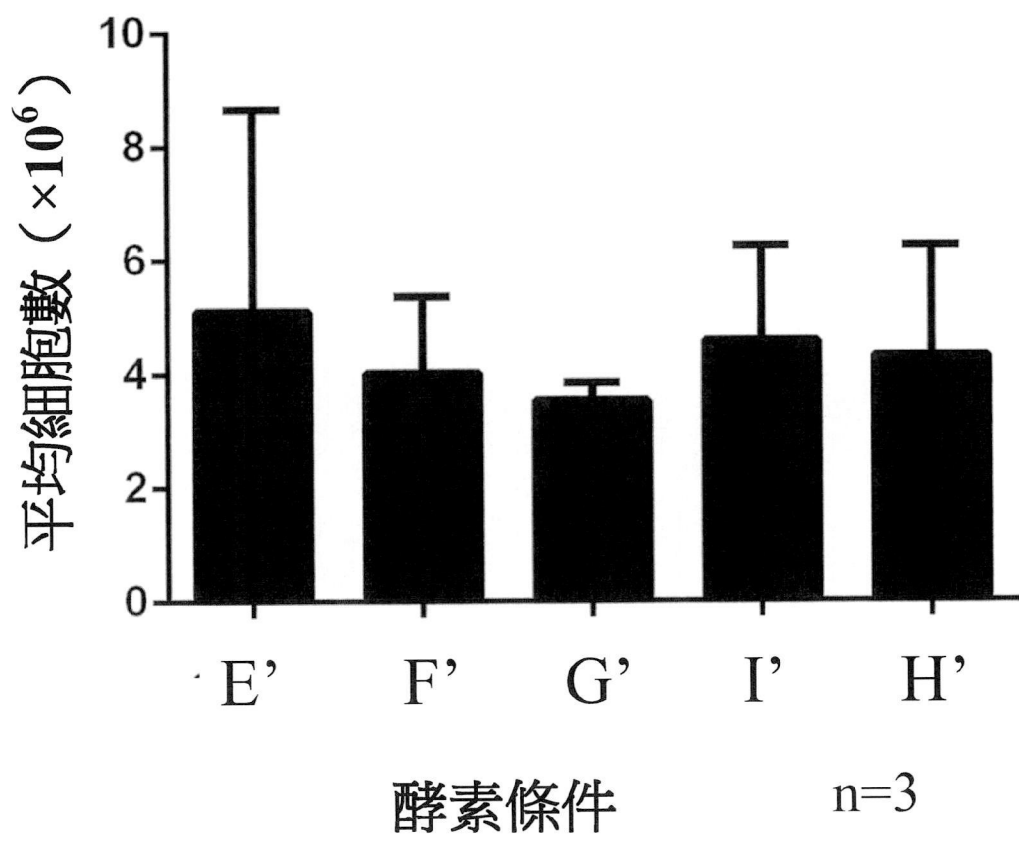


圖 7