

【11】證書號數：I864278

【45】公告日：中華民國 113 (2024) 年 12 月 01 日

【51】Int. Cl. : C12N5/071 (2010.01) C07K4/06 (2006.01)
C07K14/375 (2006.01) A61K36/074 (2006.01)

發明

全 8 頁

【54】名稱：促進幹細胞增殖與繁殖之方法

【21】申請案號：110114207 【22】申請日：中華民國 110 (2021) 年 04 月 20 日

【11】公開編號：202214843 【43】公開日期：中華民國 111 (2022) 年 04 月 16 日

【30】優先權：2020/10/05 美國 63/087,677

【72】發明人：李澧洲 (TW) LEE, MICHAEL

【71】申請人：磨法生物科技股份有限公司 MYCOMAGIC BIOTECHNOLOGY CO., LTD

新北市深坑區北深路三段 270 巷 12 號 8 樓之 1

【74】代理人：陳長文

【56】參考文獻：

US 2007/0207954A1

審查人員：吳祖漢

【57】申請專利範圍

1. 一種用於增殖或繁殖未分化幹細胞之方法，其包含使幹細胞群體與有效量之靈芝免疫調節蛋白接觸，其中該靈芝免疫調節蛋白之序列為 SEQ ID NO：3 之胺基酸序列。
2. 如請求項 1 之方法，其中該等幹細胞在該繁殖之後保持未分化。
3. 如請求項 1 之方法，其中該靈芝免疫調節蛋白的量小於 15 μ g/mL。
4. 如請求項 1 之方法，其中該靈芝免疫調節蛋白的量小於 12.5 μ g/mL。
5. 如請求項 1 之方法，其中該靈芝免疫調節蛋白的量在約 1.0 μ g/mL 至約 15 μ g/mL 範圍內。
6. 如請求項 1 之方法，其中該靈芝免疫調節蛋白的量在約 1.5 μ g/mL 至約 12.5 μ g/mL 範圍內。
7. 如請求項 1 之方法，該靈芝免疫調節蛋白的量在約 1.5 μ g/mL 至約 6.5 μ g/mL 範圍內。
8. 如請求項 1 之方法，其中該幹細胞群體係人類來源的。
9. 如請求項 1 之方法，其中該幹細胞群體包含誘導性富潛能幹(iPS)細胞群體、胚胎幹(ES)細胞群體、生殖細胞群體、組織特異性幹細胞群體或成體幹細胞群體。
10. 如請求項 1 之方法，其中該等幹細胞為胚胎幹細胞、間葉幹細胞(MSC)、骨髓基質細胞、造血幹細胞、脂肪來源幹細胞、內皮幹細胞、牙髓幹細胞或神經幹細胞。

圖式簡單說明

圖 1(A)及 1(B)展示 GMI 對 ADSC 增殖之作用。將 ADSC (5×10^5 個細胞)用不同濃度之 GMI (0、1、3 及 5 μ g/ml)處理 3 天。在處理之後，收穫細胞，且藉由血球計分析總細胞數目 (B)。藉由光學顯微鏡拍攝相差影像(A)。一式三份地進行實驗(n=3)。對比無 GMI 處理之對照細胞，**p < 0.01 及***p < 0.001。

圖 2 展示在 GMI 處理之後 ADSC 中之表面標記物之表現量的比較。將 ADSC (5×10^5 個細胞)用不同濃度之 GMI (0、1、3 及 5 μ g/ml)處理 3 天。在培育之後，收穫細胞且用特異性 MSC 陽性(CD29、CD146、CD166、CD106、CD90、CD105、CD73、CD44)及陰性(CD34、

(2)

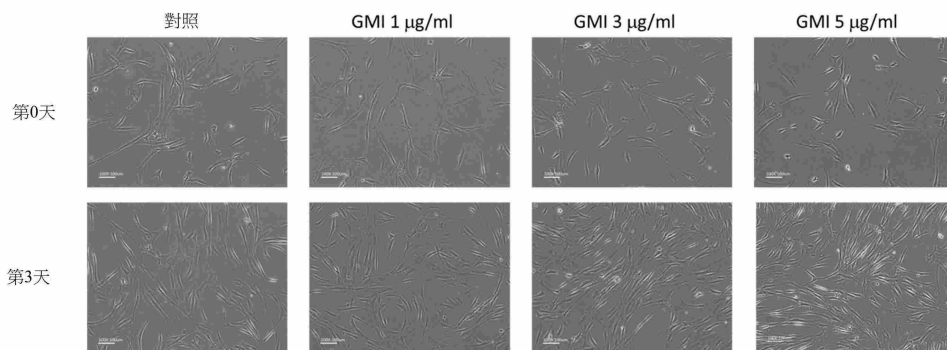
CD45、CD11b、CD19、HLA-DR)表面標記物抗體染色。藉由流動式細胞測量術(BD AccuriTMC6 Plus)分析結果。一式三份地進行實驗(n=3)。

圖 3(A)及 3(B)展示對照 ADSC 或經 GMI 處理之 ADSC 中之分化能力。將 ADSC 用不同濃度之 GMI (0、3 及 5 $\mu\text{g/ml}$)處理 3 天。在處理之後，將對照 ADSC (6×10^4 個細胞)及經 GMI 處理之 ADSC (6×10^4 個細胞)與生脂分化培養基一起培養 21 天(A)或與成骨分化培養基一起培養 14 天(B)。在所指示時間點拍攝 ADSC 之相差影像。上圖及中間圖展示在生脂或成骨分化誘導之後改變的細胞形態。下圖展示在生脂或成骨分化誘導之後的染色結果。成骨分化中比例尺等於 100 μm 且生脂分化中等於 50 μm 。

圖 4(A)及 4(B)展示 GMI 對 BMSC 增殖之作用。將 BMSC (2×10^5 個細胞)用不同濃度之 GMI (0、1、3 及 5 $\mu\text{g/ml}$)處理 3 天。在處理之後，收穫細胞，且藉由血球計分析總細胞數目(B)。藉由光學顯微鏡拍攝相差影像(A)。一式三份地進行實驗(n=3)。對比無 GMI 處理之對照細胞，* $p < 0.05$ 及** $p < 0.01$ 。

圖 5 展示在 GMI 處理之後 BMSC 中之表面標記物之表現量的比較。將 BMSC (2×10^5 個細胞)用不同濃度之 GMI (0、1、3 及 5 $\mu\text{g/ml}$)處理 3 天。在培育之後，收穫細胞且用特异性 MSC 陽性(CD29、CD146、CD166、CD106、CD90、CD105、CD73、CD44)及陰性(CD34、CD45、CD11b、CD19、HLA-DR)表面標記物抗體染色。藉由流動式細胞測量術(BD AccuriTMC6 Plus)分析結果。一式三份地進行實驗(n=3)。

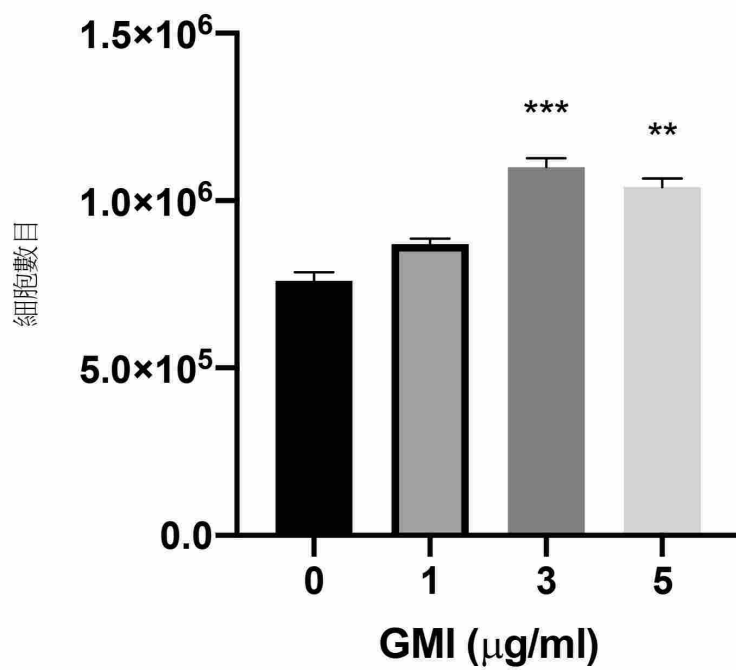
圖 6(A)及 6(B)展示對照 BMSC 或經 GMI 處理之 BMSC 中之分化能力。將 BMSC 用不同濃度之 GMI (0、3 及 5 $\mu\text{g/ml}$)處理 3 天。在處理之後，將對照 BMSC (6×10^4 個細胞)及經 GMI 處理之 BMSC (6×10^4 個細胞)與生脂分化培養基一起培養 21 天(A)或與成骨分化培養基一起培養 14 天(B)。在所指示時間點拍攝 BMSC 之相差影像。上圖及中間圖展示在生脂或成骨分化誘導之後改變的細胞形態。下圖展示在生脂或成骨分化誘導之後的染色結果。成骨分化相片中比例尺等於 100 μm 且生脂分化相片中等於 50 μm 。



【圖1(A)】

(3)

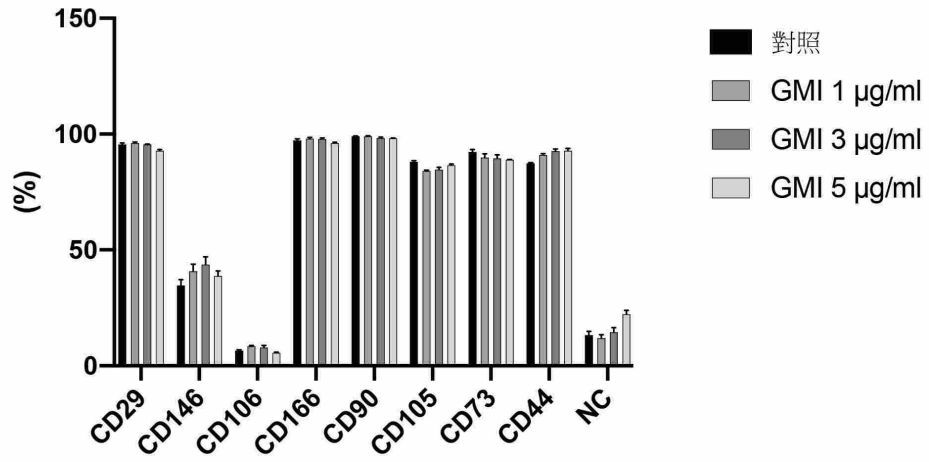
ADSC



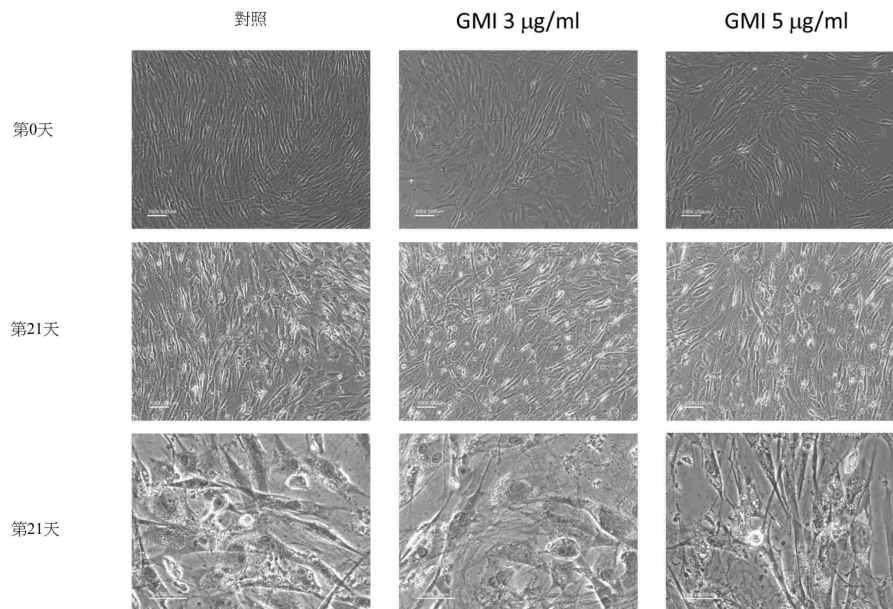
【圖1(B)】

(4)

用GMI處理之ADSC

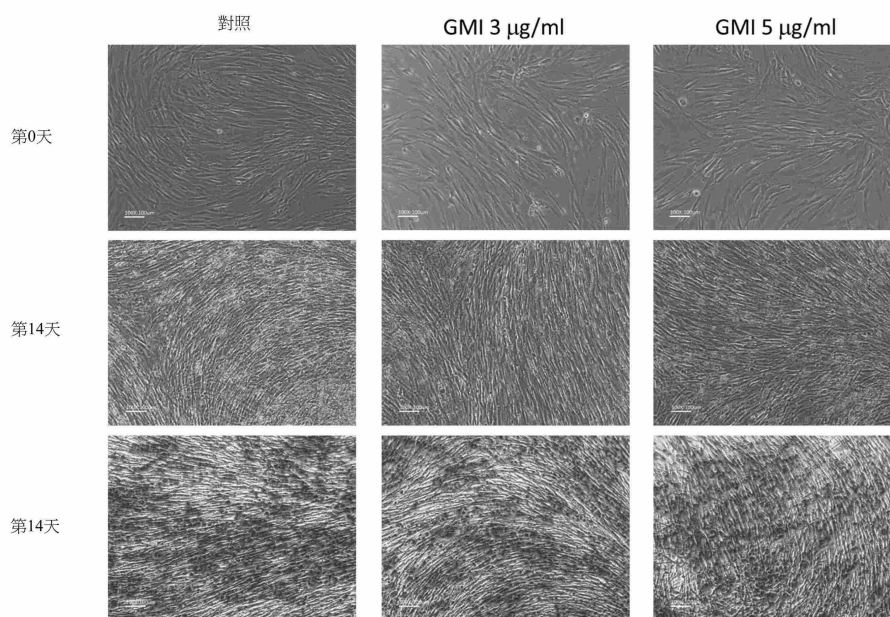


【圖2】

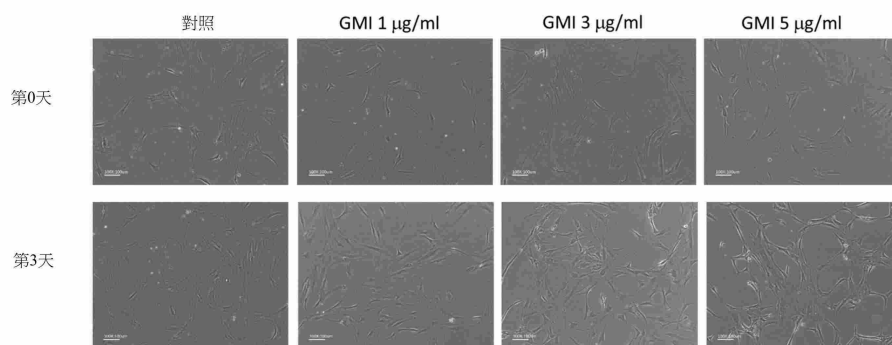


【圖3(A)】

(5)

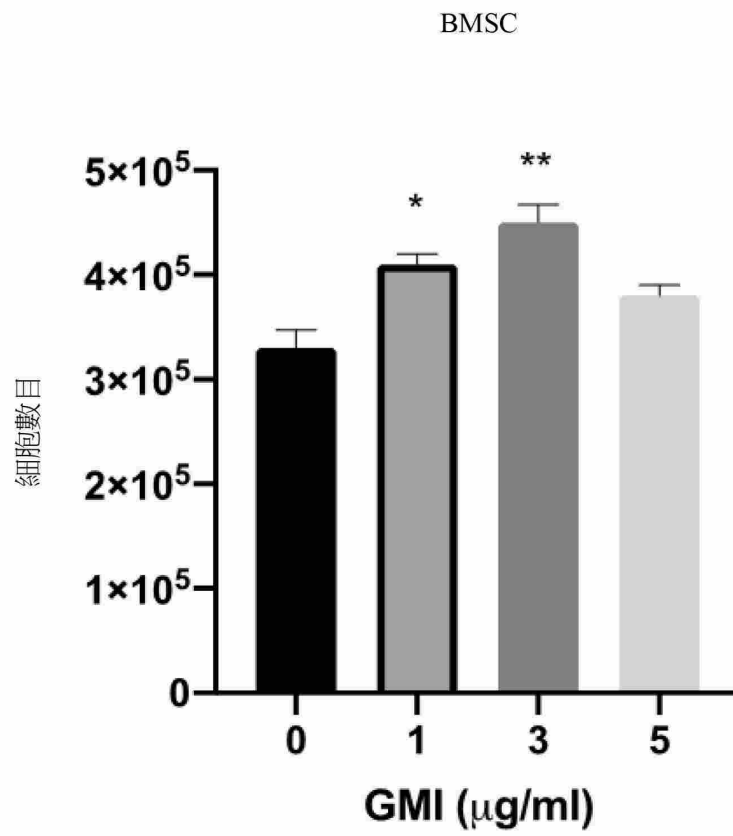


【圖3(B)】



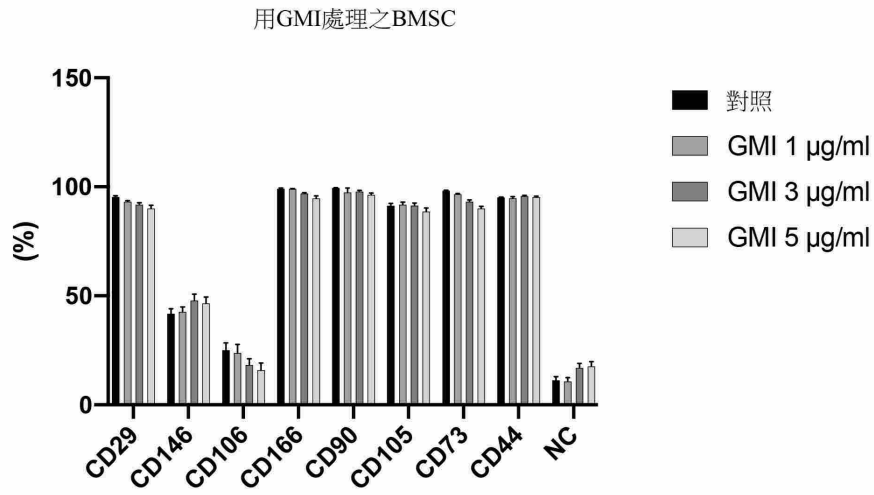
【圖4(A)】

(6)

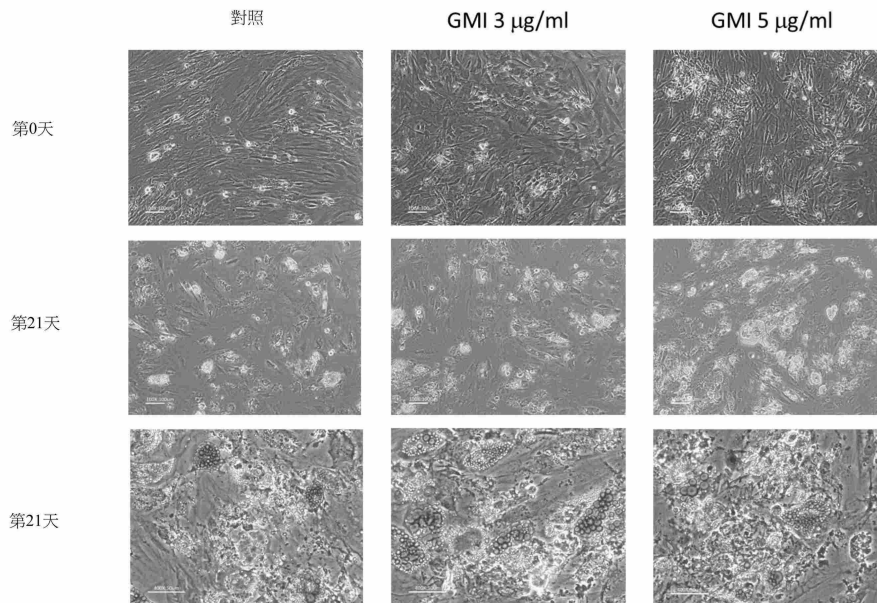


【圖4(B)】

(7)

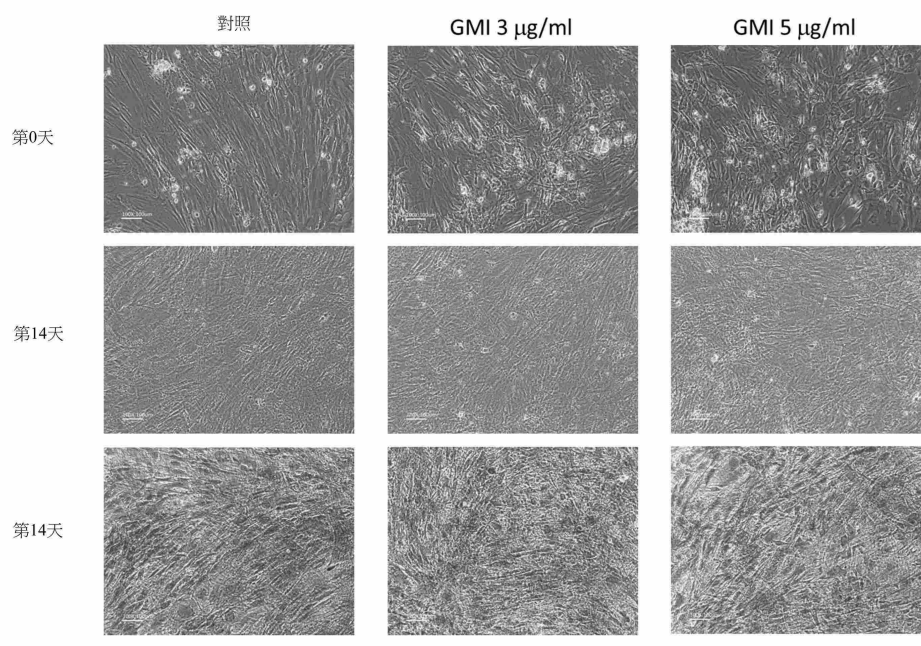


【圖5】



【圖6(A)】

(8)



【圖6(B)】