

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880011764.3

[51] Int. Cl.

C12N 5/071 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 35/50 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 3 月 31 日

[11] 公开号 CN 101688177A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 1/16 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61F 2/30 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
C12R 1/93 (2006.01)

[22] 申请日 2008.2.12

[21] 申请号 200880011764.3

[30] 优先权

[32] 2007. 2. 12 [33] US [31] 60/901,066
[32] 2007. 2. 12 [33] US [31] 60/901,076
[32] 2007. 3. 7 [33] US [31] 60/905,664
[32] 2007. 3. 8 [33] US [31] 60/906,064
[32] 2007. 8. 28 [33] US [31] 60/966,577

[86] 国际申请 PCT/US2008/001830 2008.2.12

[87] 国际公布 WO2008/100497 英 2008.8.21

[85] 进入国家阶段日期 2009.10.12

[71] 申请人 人类起源公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 詹姆士·W·爱丁格

罗伯特·J·哈黎里 王佳伦

叶倩 马里安·佩雷拉

萨沙·道恩·阿布拉门逊

克利斯登·拉巴左

[74] 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司

代理人 武晶晶 郑霞

权利要求书 5 页 说明书 149 页 附图 10 页

[54] 发明名称

来自贴壁胎盘干细胞的肝细胞和软骨细胞；
以及 CD34⁺、CD45⁻ 胎盘干细胞富集的细胞群

[57] 摘要

本发明提供了由胎盘干细胞产生肝细胞的方法和组合物。本发明还提供了这类肝细胞在治疗和干预例如肝脏的创伤、炎症疾病和退行性疾病中的用途。本发明还提供了与纳米纤维支架和贴壁胎盘干细胞的组合有关的组合物和方法，以及使用它们修复软骨的方法。最后，本发明提供了与来自胎盘的非贴壁 CD34⁺ CD45⁻ 干细胞有关的组合物和方法。

1、产生肝细胞的方法，包括将 CD10⁺、CD34⁻、CD105⁺和 CD200⁺胎盘干细胞在足以使所述干细胞呈现肝细胞特征的环境下与丁酸钠接触足以使所述干细胞呈现肝细胞特征的时间。

2、权利要求 1 的方法，其中所述特征是产生唾液酸糖蛋白受体、 α -1-抗胰蛋白酶、白蛋白、细胞色素 P450 活性，或者是相对于未分化的胎盘干细胞而言细胞角蛋白 18 产量增加。

3、权利要求 1 的方法，其中所述培养包括将所述干细胞胶囊化在褐藻胶-聚-L-赖氨酸之中。

4、通过权利要求 1 的方法产生的肝细胞或肝性细胞。

5、治疗患有与肝脏炎症相关的疾病、病症或不适的患者的方法，包括向所述患者体内导入权利要求 4 的肝细胞或肝性细胞。

6、权利要求 5 的方法，其中所述疾病、病症或不适是硬化或病毒感染。

7、含有人胎盘干细胞来源肝细胞或肝原性细胞的小鼠，其中所述小鼠的产生方法包括步骤：

a. 用足以基本上杀死所有内源骨髓细胞的 γ 辐射辐照所述小鼠；

b. 向所述小鼠施用足够的来自 NOD/SCID 小鼠的骨髓或骨髓来源细胞，以重建小鼠的造血系统；和

c. 向所述小鼠移植多种肝细胞或肝原性细胞，其中所述肝细胞或肝原性细胞由多种 $CD10^+$ 、 $CD34^-$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 胎盘干细胞分化而来。

8、权利要求 7 的小鼠，其中所述胎盘干细胞还另外是细胞角蛋白 18^+ 的。

9、权利要求 7 的小鼠，其中所述肝细胞或肝原性细胞施用至小鼠的耳壳。

10、权利要求 8 的小鼠，其中所述肝细胞或肝原性细胞用病毒感染。

11、权利要求 10 的小鼠，其中所述病毒是甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒或戊型肝炎病毒。

12、鉴定抗病毒剂的方法，包括将权利要求 12 的小鼠与感兴趣的化合物接触，其中来自所述小鼠的血清具有可检测水平的病毒，且其中与来自所述小鼠、未接触所述感兴趣的化合物的血清相比，如果所述接触导致来自所述小鼠的血清中所述病毒的量可检测的下降，则所述化合物为抗病毒剂。

13、权利要求 12 的方法，其中所述病毒是甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒或戊型肝炎病毒。

14、权利要求 13 的方法，其中检测所述病毒的抗原。

15、权利要求 13 的方法，其中检测所述病毒的核酸。

16、权利要求 14 的方法，其中所述病毒是乙型肝炎病毒。

17、权利要求 14 的方法，其中所述抗原是 HBeAg 或 HBsAg。

18、含有多种胶囊化在褐藻胶之中的细胞的组合物，其中所述细胞由胎盘干细胞分化而来，且其中所述细胞表达至少一种不为 CD10⁺、CD34⁻、CD105⁺和 CD200⁺贴壁胎盘干细胞所表达、或表达程度与之具有可检测差异的肝细胞标记。

19、权利要求 18 的组合物，其中所述褐藻胶为珠子的形式。

20、权利要求 19 的组合物，其中所述珠子大小为大约 200 μm 至大约 800 μm 。

21、权利要求 19 的组合物，其中所述珠子平均大小为大约 500 μm 。

22、组合物，包含分离的贴壁 CD10⁺、CD34⁻、CD105⁺、CD200⁺胎盘干细胞和电镀纳米纤维支架。

23、权利要求 22 的组合物，其中所述纳米纤维支架包含如下的纤维：
聚 L-乳酸(PLLA)、聚乳酸乙醇酸(PLGA)、I 型胶原、偏二氟乙烯和三氟乙
烯的共聚物(PVDF-TrFE)、聚己内酯、聚(L-丙交酯-共- ϵ -己内酯) [P(LLA-CL)]

(例如 75:25), 和/或聚(3-羟基丁酸-共-3-羟基戊酸) (PHBV) 和 I 型胶原的共聚物。

24、权利要求 22 的组合物, 其中所述纳米纤维支架包括平均厚度大约 250 纳米至大约 10 μm 的纤维。

25、权利要求 22 的组合物, 其中所述组合物与胎盘干细胞分化为软骨源性细胞或软骨细胞的条件接触。

26、制备组合物的方法, 包括将贴壁 $\text{CD}10^+$ 、 $\text{CD}34^-$ 、 $\text{CD}105^+$ 、 $\text{CD}200^+$ 胎盘干细胞与电镀纳米纤维支架接触, 其中所述纳米纤维支架通过在大约 20 kV、针距离收集器大约 30 cm、以大约 0.05 mL/min 至大约 0.1 mL/min 的流速电镀 PLLA 或 PLGA 制备, 其中所述 PLLA 或 PLGA 处于大约 10% w/w 至大约 20% w/w 的溶液中。

27、富集 $\text{CD}34^+$ 、 $\text{CD}45^-$ 胎盘干细胞的分离的细胞群。

28、权利要求 27 的细胞群, 其中所述群中至少 50% 的细胞为 $\text{CD}34^+$ 和 $\text{CD}45^-$ 的。

29、权利要求 27 的细胞群, 其中所述群中至少 70% 的细胞为 $\text{CD}34^+$ 和 $\text{CD}45^-$ 的。

30、权利要求 27 的细胞群, 其中所述群中至少 90% 的细胞为 $\text{CD}34^+$ 和 $\text{CD}45^-$ 的。

31、权利要求 27 的细胞群，其中所述群包含非 $CD34^{+}$ 和 $CD45^{-}$ 的干细胞。

32、权利要求 31 的细胞群，其中所述非 $CD34^{+}$ 和 $CD45^{-}$ 的干细胞为 $CD34^{-}$ 贴壁胎盘干细胞。

33、权利要求 32 的细胞群，其中所述贴壁胎盘干细胞为 $CD200^{+}$ 、 $CD105^{+}$ 、 $CD90^{+}$ 、 $CD10^{+}$ 、 $CD34^{-}$ 和 $CD45^{-}$ 的。

34、权利要求 31 的细胞群，其中所述非 $CD34^{+}$ 和 $CD45^{-}$ 的干细胞为骨髓来源间充质干细胞。

35、权利要求 31 的细胞群，其中所述非 $CD34^{+}$ 和 $CD45^{-}$ 的干细胞为 $CD34^{+}$ 、 $CD45^{+}$ 造血干细胞。

36、权利要求 8 的细胞群，其中所述非 $CD34^{+}$ 和 $CD45^{-}$ 的干细胞包含在脐带血或胎盘血之中。

37、产生 $CD34^{+}$ 、 $CD45^{-}$ 胎盘干细胞群的方法，包括从胎盘细胞群中选择 $CD34^{+}$ 细胞以形成 $CD34^{+}$ 胎盘细胞群，和从所述 $CD34^{+}$ 胎盘细胞群中去除 $CD45^{+}$ 细胞，由此产生 $CD34^{+}$ 、 $CD45^{-}$ 胎盘干细胞群。

来自贴壁胎盘干细胞的肝细胞和软骨细胞；
以及 CD34⁺、CD45⁻胎盘干细胞富集的细胞群

本申请要求 2007 年 2 月 12 日提交的美国临时申请号 60/901,066；2007 年 2 月 12 日提交的美国临时申请号 60/901,076；2007 年 3 月 7 日提交的美国临时申请号 60/905,664；2007 年 3 月 8 日提交的美国临时申请号 60/906,064；和 2007 年 8 月 28 日提交的美国临时申请号 60/966,577 的权益，各申请的公开内容在此通过引用并入本文。

1. 发明领域

本发明提供了与来自胎盘的干细胞有关的方法和组合物。本发明提供了由人贴壁胎盘干细胞产生肝细胞的方法，以及这类肝细胞在治疗和干预例如肝脏的创伤、炎性疾病和退行性疾病中的用途。本发明还提供了与纳米纤维支架和贴壁胎盘干细胞的组合有关的组合物和方法，以及使用它们修复软骨的方法。最后，本发明提供了与来自胎盘的非贴壁 CD34⁺CD45⁻干细胞有关的组合物和方法。

2. 发明背景

人们已经提出将体干细胞用于多种治疗应用，包括例如在细胞补给治疗动物模型中的应用。只有在使用了伦理上可接受来源的自体干细胞、且只有在实现了对自身更新和程序干细胞成熟为特定细胞类型的最终确定的控制的情况下，移植干细胞的治疗潜能才能转化为临床应用。

许多研究已经描述过胚胎干细胞沿肝细胞系的分化(参见例如 Sharma, N. S.等, *Biotechnology & Bioengineering*, 94 (6): 1053-93 (2006); Maguire, T. 等, *Biotechnology & Bioengineering*, 93(3):581-591(2006)和 Chen Y 等, *Cell Transplant.* 2006;15(10):865-71)。另外, 还研究了人骨髓来源间充质细胞分化为功能肝细胞的能力, 其取得了一定程度的成功(Ong SY, Dai H, Leong KW, *Tissue Eng.* 2006 年 10 月 1 日; Ong SY, Dai H, Leong KW *Biomaterials* (22):4087-97 (2006)(电子公开 2006 年 4 月 17 日); Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, *Blood.* 106(2):756-63 (2005) (电子公开 2005 年 4 月 7 日)。

肝病日渐成为重大发病率和死亡率的原因。环境和致病因素所致的肝脏功能破坏对健康的个体构成重大的公共卫生风险。因此替换这类损坏器官中损坏或杀死的肝细胞成为重要的临床目标。然而, 伦理上可接受来源的、能够分化成为肝细胞的干细胞依然难以获得。本发明提供了这样那样未满足的需求。

3. 发明概述

一方面, 本发明提供了由贴壁胎盘干细胞产生肝细胞的方法和组合物, 以及利用这类肝细胞治疗疾病、病症或不适的方法, 例如涉及肝脏的创伤、炎症和系统性疾病的那些, 例如与肝炎症相关的疾病、病症或不适。在一实施方案中, 本发明提供了产生肝细胞的方法, 包括在足以使胎盘干细胞呈现肝细胞特征的条件和时间下培养所述胎盘干细胞。在具体实施方案中, 所述特征是产生白蛋白或表达编码白蛋白的基因。在另一具体实施方案中, 所述特征是产生豚。在另一具体实施方案中, 所述培养包括将所述干细胞与丁酸钠接触。在另一具体实施方案中, 所述培养包括将所述干细胞胶囊

化在褐藻胶-聚-L-赖氨酸之中。在另一具体实施方案中，本发明提供了通过胎盘来源干细胞分化而产生的肝细胞。本发明还提供了治疗患有与异常肝脏功能相关的疾病、病症或不适的患者的方法，包括向所述患者体内导入这样的肝细胞。在更具体的实施方案中，所述疾病、病症或不适是肝硬化。在某些实施方案中，所述疾病或不适由例如因酒精或毒素如蘑菇毒素摄取所致的肝脏毒性而引起。在某些实施方案中，所述疾病或不适是病毒感染，例如甲型、乙型、丙型、丁型或戊型肝炎感染。在某些实施方案中，所述疾病或不适是爆发性或亚爆发性肝炎。另一方面，本发明提供了确定化合物是否具有肝脏毒性活性的方法，包括将通过胎盘来源干细胞分化而产生的肝细胞与所述化合物接触，并确定所述化合物是否对肝细胞具有毒性。

在另一实施方案中，胎盘干细胞为细胞角蛋白 18 阳性。在另一实施方案中，本发明提供了胎盘干细胞群或由之分化的细胞群，其中至少 50%、70%、80%、90%、95%或 99%为细胞角蛋白 18 阳性。在另一实施方案中，本发明提供了含有胎盘干细胞或由之分化的细胞的细胞群，其中至少 50%、70%、80%、90%、95%或 99%的所述胎盘干细胞或由之分化的细胞为细胞角蛋白 18 阳性。在另一实施方案中，本发明提供了分离胎盘干细胞、或胎盘干细胞群、或由之分化的细胞的方法，其包括选择一种或多种细胞角蛋白 18⁺胎盘干细胞，和从其它胎盘细胞中分离所述一种或多种干细胞。

另一方面，本发明提供了含有多囊化在褐藻胶之中的细胞的组合物，其中所述细胞由胎盘干细胞分化而来。在一实施方案中，所述细胞表达至少一种不为胎盘干细胞所表达、或表达程度与胎盘干细胞具有可检测差异的肝细胞标记。在另一实施方案中，所述褐藻胶为珠子的形式。在具

体实施方案中,所述珠子大小为大约 200 μm 至大约 800 μm 。在另一具体实施方案中,所述珠子平均大小为大约 500 μm 。

另一方面,本发明提供了含有人胎盘干细胞来源的肝细胞或肝原性细胞的小鼠,其中所述小鼠的生产方法包括步骤:(a)用足以基本上杀死所有内源骨髓细胞的 γ 辐射辐照所述小鼠;(b)向所述小鼠施用足够的来自 NOD/SCID 小鼠的骨髓或骨髓来源细胞,以重建小鼠的造血系统;和(c)向所述小鼠移植多种肝细胞或肝原性细胞,其中所述肝细胞或肝原性细胞由多种 $\text{CD}10^+$ 、 $\text{CD}34^+$ 、 $\text{CD}105^+$ 、 $\text{CD}117^+$ 、 $\text{CD}200^+$ 胎盘干细胞分化而来。在一实施方案中,所述胎盘干细胞还另外是细胞角蛋白 18⁺ 的,且是至少一种由分化的肝细胞所表达的其它细胞角蛋白阴性的。在另一实施方案中,所述肝细胞或肝原性细胞施用至小鼠的耳壳。在另一实施方案中,所述肝细胞或肝原性细胞用病毒感染。在具体实施方案中,所述病毒是甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒或戊型肝炎病毒。在更具体的实施方案中,所述病毒是乙型肝炎病毒。

另一方面,本发明提供了鉴定抗病毒剂的方法,包括将小鼠与感兴趣的化合物接触,其中来自所述小鼠的血清具有可检测水平的病毒,且其中与来自所述小鼠、未接触感兴趣的化合物的血清相比,如果所述接触导致来自所述小鼠的血清中所述病毒的量可检测的下降,则所述化合物为抗病毒剂,且其中所述小鼠的生产方法包括步骤:a.用足以基本上杀死所有内源骨髓细胞的 γ 辐射辐照所述小鼠;b.向所述小鼠施用足够的来自 NOD/SCID 小鼠的骨髓或骨髓来源细胞,以重建小鼠的造血系统;和 c.向所述小鼠移植多种肝细胞或肝原性细胞,其中所述肝细胞或肝原性细胞多种 $\text{CD}10^+$ 、 $\text{CD}34^+$ 、 $\text{CD}105^+$ 、 $\text{CD}117^+$ 、 $\text{CD}200^+$ 胎盘干细胞分化而来。在所述方法的一

实施方案中,所述病毒是甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒或戊型肝炎病毒。在所述方法的具体实施方案中,检测所述病毒的抗原或核酸。在更具体的实施方案中,所述病毒为乙型肝炎病毒。在所述方法的具体实施方案中,其中检测病毒抗原,所述抗原是 HBeAg 或 HBsAg。在另一具体实施方案中,其中检测病毒核酸,所述核酸为共价闭环形式的乙型肝炎病毒。在更具体的实施方案中,使用特异于所述共价闭环形式乙型肝炎病毒的引物通过 PCR 来检测所述核酸。

另一方面,本发明提供了基质以及含有这样的基质的组合物,其中所述基质包含已经向肝原性或软骨原性系或者肝细胞或软骨细胞分化的胎盘干细胞。在更具体的实施方案中,所述基质为三维支架。在另一更具体的实施方案中,所述基质包含胶原、明胶、层粘连蛋白、纤粘连蛋白、果胶、鸟氨酸或玻连蛋白。在另一更具体的实施方案中,所述基质是或者包含纳米纤维支架,例如电镀纳米纤维支架。在更具体的实施方案中,所述纳米纤维支架包含聚 L-乳酸(PLLA)、I 型胶原、偏二氟乙烯和三氟乙烯的共聚物(PVDF-TrFE)、聚己内酯、聚(L-丙交酯-共- ϵ -己内酯) [P(LLA-CL)] (例如 75:25), 和/或聚(3-羟基丁酸-共-3-羟基戊酸) (PHBV)和 I 型胶原的共聚物。在更具体的实施方案中,所述电镀纳米纤维支架促进胎盘干细胞分化为软骨细胞或肝细胞。在另一具体实施方案中,所述电镀纳米纤维基质或支架包含已经分化为软骨性细胞和/或软骨细胞、或者肝性细胞和/或肝细胞的胎盘干细胞。在另一更具体的实施方案中,所述基质是羊膜或羊膜来源的生物材料。在另一更具体的实施方案中,所述基质包含胞外膜蛋白。在另一更具体的实施方案中,所述基质包含合成化合物。在另一更具体的实施方案中,所述基质包含生物活性化合物。在另一更具体的实施方案中,所述

生物活性化合物是生长因子、细胞因子、抗体或小于 5,000 道尔顿的有机分子。

在另一实施方案中, 本发明提供了包含分离的贴壁 $CD10^+$ 、 $CD34^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 胎盘干细胞和电镀纳米纤维支架的组合物。在具体实施方案中, 所述纳米纤维支架包含纤维聚 L-乳酸(PLLA)、聚乳酸乙醇酸(PLGA)、I 型胶原、偏二氟乙烯和三氟乙烯的共聚物(PVDF-TrFE)、聚己内酯、聚(L-丙交酯-共- ϵ -己内酯) [P(LLA-CL)] (例如 75:25), 和/或聚(3-羟基丁酸-共-3-羟基戊酸) (PHBV) 和 I 型胶原的共聚物。在另一具体实施方案中, 所述纳米纤维支架包含平均厚度大约 250 纳米至大约 10 μm 的纤维。在另一具体实施方案中, 所述组合物与胎盘干细胞分化为软骨原性细胞或软骨细胞的条件接触。在另一实施方案中, 本发明提供了制备组合物的方法, 包括将分离的贴壁 $CD10^+$ 、 $CD34^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 胎盘干细胞与电镀纳米纤维支架接触, 其中所述纳米纤维支架通过在大约 20 kV、针距离收集器大约 30 cm、以大约 0.05 mL/min 至大约 0.1 mL/min 的流速电镀 PLLA 或 PLGA 制备, 其中所述 PLLA 或 PLGA 处于大约 10% w/w 至大约 20% w/w 的溶液中。

另一方面, 本发明提供了分离的 $CD34^+$ 和 $CD45^+$ 胎盘干细胞。在具体实施方案中, 所述 $CD34^+$ 、 $CD45^+$ 干细胞是造血细胞。在另一具体实施方案中, 所述 $CD34^+$ 、 $CD45^+$ 干细胞在组织培养表面如在塑料上培养时是非贴壁的。在具体实施方案中, 本发明提供了分离的富集 $CD34^+$ 和 $CD45^+$ 胎盘干细胞的细胞群。在具体实施方案中, 所述群中至少 50%、70%、90% 或 95% 的细胞为 $CD34^+CD45^+$ 胎盘干细胞。在另一具体实施方案中, 与胎盘灌洗液(例如用 750 mL 0.9% 盐溶液灌洗胎盘而得的灌洗液)相比, 所述分离的细胞群包含更高比例的 $CD34^+$ 和 $CD45^+$ 胎盘干细胞。在另一具体实施方案中, 所述分

离的细胞群包含非 CD34⁺和 CD45⁻的干细胞。在更具体的实施方案中,所述非 CD34⁺和 CD45⁻的干细胞是 CD34⁻贴壁胎盘干细胞。在更具体的实施方案中,所述贴壁胎盘干细胞为 CD200⁺、CD105⁺、CD90⁺、CD10⁺、CD34⁻和/或 CD45⁻的。在另一具体实施方案中,所述非 CD34⁺和 CD45⁻的干细胞为骨髓来源间充质干细胞。在另一具体实施方案中,所述非 CD34⁺和 CD45⁻的干细胞为 CD34⁺、CD45⁺造血干细胞。在另一具体实施方案中,所述非 CD34⁺和 CD45⁻的干细胞包含在脐带血或胎盘血之中

在另一具体实施方案中,所述分离的细胞群为来自胎盘灌洗液的多种总有核细胞(TNC)。在具体实施方案中,所述来自胎盘灌洗液的 TNC 包含来自至少或至多 50、100、150、200、250、300、350、400、450 或 500 mL 胎盘灌洗液的胎盘细胞。在另一具体实施方案中,所述来自胎盘灌洗液的 TNC 已经过处理以除去至少一种类型的非红血细胞。

在另一实施方案中,CD34⁺、CD45⁻造血胎盘干细胞是胎儿的(不是母体的)。在另一实施方案中,CD34⁺、CD45⁻造血胎盘干细胞是母体的。在另一实施方案中,分离的造血胎盘干细胞群包含胎儿的(不是母体的)CD34⁺、CD45⁻造血胎盘干细胞。在另一实施方案中,分离的造血胎盘干细胞群包含母体的 CD34⁺、CD45⁻造血胎盘干细胞。

另一方面,本发明提供了分离 CD34⁺、CD45⁻造血胎盘干细胞的方法。在一实施方案中,本发明提供了分离 CD34⁺、CD45⁻胎盘干细胞群的方法,包括从胎盘细胞群中选择 CD34⁺细胞以形成分离的 CD34⁺胎盘细胞群,和从所述 CD34⁺胎盘细胞群中去除 CD45⁺细胞,由此产生 CD34⁺、CD45⁻胎盘干细胞群。在具体实施方案中,所述 CD34⁺细胞的选择通过免疫分离进行。

在另一具体实施方案中,所述 $CD45^{+}$ 细胞的去除是通过免疫分离进行。在另一具体实施方案中,所述选择或所述去除通过流式细胞仪进行。

另一方面,本发明提供了增补细胞群的方法,包括添加多种 $CD34^{+}$ 、 $CD45^{-}$ 造血胎盘干细胞以创建增补细胞群,从而使所述增补细胞群比增补前包含明显更多的 $CD34^{+}$ 、 $CD45^{-}$ 细胞。在本发明的多个具体实施方案中,“明显上更多”表示至少多 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9% 或多至少 10%。在其它具体实施方案中,待增补的细胞群包括脐带血、胎盘血、外周血或其组合。在更具体的实施方案中,待增补的细胞群是脐带血、胎盘血、外周血或其组合。在另一更具体的实施方案中,待增补的细胞群包含从脐带血、胎盘血、外周血或其组合分离的有核细胞。在其它具体实施方案中,待增补的干细胞群包括造血干细胞群、成人干细胞群或胚胎干细胞群。

如本发明中使用的,术语“SH2 指与标记 $CD105$ 上的表位结合的抗体。因此,称作 $SH2^{+}$ 的细胞为 $CD105^{+}$ 的。

如本发明中使用的,术语“SH3 和“SH4 指与标记 $CD73$ 上存在的表位结合的抗体。因此,称作 $SH3^{+}$ 和/或 $SH4^{+}$ 的细胞为 $CD73^{+}$ 的。

如本发明中使用的,术语“分离的干细胞”表示基本上与干细胞所来源的组织(如胎盘)中的其它、非干细胞分离的干细胞。如果在例如干细胞的收集和/或培养过程中,从干细胞中去除了至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%、或至少 99% 的与干细胞天然相伴的非干细胞或展示不同标记谱的干细胞,则所述干细胞是“分离的”。

如本发明中使用的,术语“分离细胞的群”表示基本上与细胞群所来源的组织(如胎盘)中的其它细胞分离的细胞的群。如果在例如干细胞的收集和/

或培养过程中,从干细胞中去除了至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%、或至少 99%的与细胞群或者细胞群来自的细胞天然相伴的细胞(即展示不同标记谱的干细胞),则所述干细胞是“分离的”。

如本发明中使用的,术语“胎盘干细胞”指来源于哺乳动物胎盘的干细胞或前体细胞,例如多能细胞,不考虑形态学、细胞表面标记、或原代培养后的传代数。然而,本发明所用的术语“胎盘干细胞”不表示滋养层、细胞滋养层、胚胎生殖细胞或胚胎干细胞。如果细胞保留了干细胞的至少一种属性,例如与一种或多种类型的干细胞相关的标记或基因表达谱;在培养中复制至少10-40次的能力;多能性,例如在体外、在体内或在体内和体外分化为三个胚层中的一个或多个胚层的能力;缺乏成体(即分化的)细胞特征等等,则认为所述细胞是“干细胞”。术语“胎盘干细胞”和“胎盘来源的干细胞”可互换使用。除非文中另有说明,术语“胎盘”包括脐带。在某些实施方案中,本发明公开的贴壁胎盘干细胞在体外是多能的(即细胞在体外在分化条件下分化),在体内是多能的(即细胞在体内分化),或两者兼而有之。

如本发明中使用的,当特定标记可检测地高于背景时,则干细胞为该具体标记“阳性”。例如,由于例如通过流式细胞仪,CD73在胎盘干细胞上以可检测地大于背景(例如,与同型对照相比)的量可检测,因此胎盘干细胞为CD73阳性。当标记能用于将细胞与至少一种其它细胞类型区分开时,或当所述标记在细胞中存在或表达时能用于选择或分离所述细胞时,则所述细胞也为所述标记阳性的。在例如抗体介导的检测的上下文中,“阳性”作为特定细胞表面标记存在的指示,表示所述标记利用该标记的特异性抗体如荧光标记抗体可检测;“阳性”也表示细胞以产生例如在血细胞计数器中可检测地高于背景的信号的量携带该标记。例如,在细胞用CD200特异性抗体

可检测地标记,且来自所述抗体的信号可检测地高于对照(例如背景)的情况下,则所述细胞为“CD200⁺的”。相反,相同上下文中的“阴性”表示与背景相比,利用该标记特异性抗体不能检测到细胞表面标记。例如,当细胞用 CD34 特异性抗体不能可检测地标记时,则所述细胞为“CD34⁻的”。除非另有说明,利用抗体检测分化簇(“CD”)标记。如果利用 RT-PCR 可检测到 OCT-4,则 OCT-4 确定存在且细胞为“OCT-4⁺的”。

如本发明中使用的,“分离的”胎盘干细胞,例如贴壁胎盘干细胞或 CD34⁺、CD45⁻干细胞,表示去除了至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或 99%的在完整哺乳动物胎盘中通常与干细胞相伴的细胞。当来自器官的干细胞所存在的细胞群中包含少于 50%的在完整器官中与干细胞通常相伴的细胞时,它是“分离的”。当“模糊(dim)”与细胞标记联用时,表示所述标记可检测地高于背景存在,但落在高于背景大约 5%至大约 10%的范围内。

如本发明中使用的,“肝细胞”表示细胞从视觉上、生化上和/或基因表达模式上看起来是肝细胞,正如该术语通常为人所理解的那样。如本发明中使用的,“肝原性细胞”指由胎盘干细胞或脐带干细胞分化而来的细胞,是展示终端分化肝细胞的一种或多种特征的细胞,所述特征未在胎盘干细胞或脐带干细胞中发现,或者未以相同的水平在向肝细胞或肝原性细胞分化之前的胎盘干细胞或脐带干细胞(例如处于扩增培养的胎盘干细胞或脐带干细胞)中发现(例如,当在等同条件下与测定特征的胎盘干细胞或脐带干细胞相比时,在肝原性细胞中可检测地更高或更低)。因而,本发明的多种组合物、方法和其它实施方案也涵盖来源于胎盘干细胞、已经完全或部分分化为肝细胞的细胞。

4. 附图说明

图 1: 来自灌洗液(A)、羊膜(B)、绒毛膜(C)、或羊膜-绒毛膜盘(D)、或脐带干细胞(E)的胎盘干细胞的活力。X-轴上的数字表示从中获得干细胞的胎盘。

图 2: 通过 FACSCalibur 确定的来自灌洗液(A)、羊膜(B)、绒毛膜(C)、或羊膜-绒毛膜盘(D)、或脐带干细胞(E)的 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 细胞的百分比。X-轴上的数字表示从中获得干细胞的胎盘。

图 3: 通过 FACS Aria 确定的来自灌洗液(A)、羊膜(B)、绒毛膜(C)、或羊膜-绒毛膜盘(D)、或脐带干细胞(E)的 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 细胞的百分比。X-轴上的数字表示从中获得干细胞的胎盘。

图 4: 在来源于胎盘灌洗液的干细胞中的 HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200 的表达。

图 5: 在来源于羊膜的干细胞中的 HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200 的表达。

图 6: 在来源于绒毛膜的干细胞中的 HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200 的表达。

图 7: 在来源于羊膜-绒毛膜盘的干细胞中的 HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200 的表达。

图 8: 在来源于脐带的干细胞中的 HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200 的表达。

图 9: 在来源于灌洗液(A)、羊膜(B)、绒毛膜(C)、或羊膜-绒毛膜盘(D)、或脐带(E)的干细胞中的 HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200 的平均表达。

图 10: 来自六个匹配的人胎盘灌洗液和脐带单位的总细胞的平均百分比。X 轴: Y-轴所示表型的总有核细胞的百分比。

5. 发明详述

5.1 肝细胞的产生

本领域的普通技术人员将会理解, 在本节及后面的讨论中, 多种组合物和方法中有的许多可以针对或利用已沿着肝细胞系分化或已被沿着肝细胞系分化的胎盘干细胞或脐带干细胞进行。

一方面, 本发明提供了由胎盘来源细胞, 特别是胎盘干细胞或脐带干细胞产生肝细胞和/或肝原性细胞的方法和组合物。如本发明中使用的, 除非另有说明, “胎盘干细胞”或“脐带干细胞”表示贴壁干细胞。可以通过灌洗从哺乳动物胎盘或脐带中获得干细胞(参见例如 Hariri 的美国专利号 7,045,148 和 7,255,879, 在此通过引用并入本文)。也可以通过破坏(例如浸软)胎盘或其部分从胎盘或脐带获得干细胞(参见例如下文 6.2 节)。展示肝细胞特征的细胞, 例如肝细胞和/或肝原性细胞, 可以从胎盘干细胞获得。这些细胞可用于治疗例如与肝硬化, 包括但不限于因酒精摄取、肝毒素例如在鹅膏属(*Amanita*)蘑菇发现的那些毒素的摄取所导致的, 或因病毒感染例如甲型、乙型、丙型、丁型或戊型肝炎感染所导致的硬化相关的疾病、病症或不适。

在一实施方案中，可以如下从胎盘或脐带中获得可分化的细胞，如干细胞。从胎盘，例如从人胎盘灌洗液，或从物理和/或酶促破坏的胎盘组织中分离单核细胞的原代培养物(MNC)。在提供者知情同意的情况下在足月婴儿出生后获得胎盘。简言之，为进行灌洗，向脐血管插入导管，使其与流体控制回路相连，并用含高葡萄糖、1%肝素和青霉素/链霉素的 Dulbecco's 改良 Eagle's 培养基(DMEM, Gibco/BRL)以例如 1 mL/min (室温，长达 24 小时)灌洗胎盘。然后收集胎盘灌洗液(750 mL)，离心，将细胞沉淀重悬于含 1%胎牛血清(FBS)的 PBS 中，然后借助 LYMPHOPREP™ (Gibco/BRL)通过差速梯度密度离心进行分离。回收含有包括贴壁胎盘干细胞在内的单核细胞的淡黄色层界面，重悬于 DMEM/10% FBS，在纤粘连蛋白包被的 Falcon 板(Sigma)上铺板，并在 37°C 用 5%潮湿 CO₂ 孵育。在 24 小时孵育后，弃去非贴壁细胞，保留贴壁细胞，并在新鲜培养基中扩增；个体细胞集落在 10-18 天显出，并作为胎盘干细胞系扩增。

人贴壁胎盘干细胞在培养时展示成纤维细胞样形态，为 HLA I 类阳性。利用 FACS 分析发现这些细胞不表达造血标记 CD34 或 CD45。然而，它们的确表达多能细胞标记 CD10 (CALLA)、CD29 (β_1 整联蛋白)、CD54 (ICAM-I)、CD90 (Thy-1)以及 SH2 (CD 105)、SH3 (CD73)和 CD200。在标准生长条件下，胎盘干细胞的倍增时间为大约 18-36 小时，且细胞在体外维持这种表型大于 40 次群倍增。人贴壁胎盘干细胞有别于人胚胎干细胞或胚胎生殖细胞，区别在于人胚胎干细胞或生殖细胞仅获自囊胚或胎儿性腺的内细胞群而不是胎盘。人贴壁胎盘干细胞还有别于来自例如骨髓、脐带血或外周血的间充质干细胞或骨髓来源干细胞，区别在于胎盘干细胞在培养时形成胚状体样体，而间充质干细胞或骨髓来源干细胞不，且胎盘干细胞

相对于间充质干细胞展示独特的基因表达模式。参见2006年12月28日提交的美国专利申请号11/648,813,其公开内容在此通过引用并入本文。

胎盘干细胞通过在包含丁酸钠的培养基中培养,或通过将所述细胞胶囊化在适宜的微胶囊聚合物如褐藻胶-聚-L-赖氨酸之中,从而向肝细胞分化。肝细胞可以如上文所述由胎盘来源干细胞产生,并如下文所述维持或培养。肝细胞分化可以利用流式细胞仪进行评估,并如下文所述监测特定的基因表达或酶活性。

5.2 胎盘干细胞和胎盘干细胞群

一方面,本发明提供的方法使用贴壁胎盘干细胞,即可从胎盘或其部分(例如羊膜、绒毛膜、羊膜/绒毛膜盘、脐带等)获得的干细胞,其(1)贴壁于组织培养基质;和(2)在适当的分化条件下分化成为一种或多种非胎盘细胞类型,和/或具有组织特异性细胞特征的细胞。胎盘干细胞不来源于、亦不可来源于血液(例如,胎盘血或脐带血)或骨髓。

胎盘干细胞在起源上可以是胎儿或母体的(即,可以具有母亲或胎儿的基因型)。胎盘干细胞群,或包含胎盘干细胞的细胞群,可包含在起源上仅为胎儿或母体的胎盘干细胞,或者可以兼而包含胎儿和母体起源的胎盘干细胞的混合群。所述胎盘干细胞,和包含胎盘干细胞的细胞群可以通过下文讨论的形态学、标记和培养特征来鉴定和选择。

5.2.1 物理和形态学特征

本发明公开方法所用的胎盘干细胞在进行原代培养或细胞培养时贴壁于组织培养基质,例如组织培养容器表面(如组织培养塑料)上。培养中(例如组织培养表面)的胎盘干细胞一般呈现成纤维细胞样外观,从中央细胞体

延伸出大量胞质突起。然而，所述胎盘干细胞与在相同条件下培养的成纤维细胞在形态学上不同，因为胎盘干细胞比成纤维细胞表现出更大量的此类突起。形态学上，胎盘干细胞也与造血干细胞是可区分的，后者在培养中通常呈现出更圆的或鹅卵石状的形态。

5.2.2 细胞表面、分子和遗传标记

可用于本发明所公开的方法和组合物的贴壁胎盘干细胞和贴壁胎盘干细胞群，表达大量可用于鉴定和/或分离该干细胞或包含干细胞的细胞群的标记。本发明公开的胎盘干细胞和干细胞群(即，两种或多种胎盘干细胞)包括从胎盘或其任何部分(例如：羊膜、绒毛膜、胎盘绒毛叶、脐带等)直接获得的干细胞和含干细胞的细胞群。胎盘干细胞群还包括培养中的胎盘干细胞群(即，两种或多种)，以及容器例如袋子中的群。然而，胎盘干细胞不是滋养层。

本发明公开的胎盘干细胞是多能的，他们能够在体外分化为三个胚层的代表性细胞，例如脂肪细胞、软骨细胞、肝细胞、神经原性细胞、心脏细胞等等。然而，本发明公开的胎盘干细胞无需在体内分化才认为是多能或者有用。因此，术语“胎盘干细胞”涵盖本发明公开的在体外而不在体内分化、在体内而不在体外分化、或既在体外又在体内分化的细胞。在一实施方案中，本发明提供的胎盘干细胞能够在体外分化为三个胚层中一个或多个胚层的代表性细胞，但在体内如 NOD-SCID 小鼠中不分化。

贴壁(非造血)胎盘干细胞一般表达标记 CD73、CD105、CD200、HLA-G 和/或 OCT-4，而不表达 CD34、CD38 或 CD45。胎盘干细胞还能够表达 HLA-ABC (MHC-I)，但一般不表达 HLA-DR。在具体实施方案中，贴壁胎

盘干细胞为 CD10⁺、CD34⁻、CD105⁺和 CD200⁺的。这些标记可用于鉴定胎盘干细胞，并将胎盘干细胞与其它干细胞类型区分开。由于胎盘干细胞能够表达 CD73 和 CD105，因此它们具有间充质干细胞样特征。然而，由于胎盘干细胞能够表达胎儿特异性标记 CD200 和 HLA-G，因此它们能与间充质干细胞(例如骨髓来源的间充质干细胞，其既不表达 CD200 也不表达 HLA-G)区分开。以相同的方式，缺少 CD34、CD38 和/或 CD45 表达将胎盘干细胞鉴定为非造血干细胞。这样的胎盘干细胞以及包含这样的胎盘干细胞的细胞群能够分化为肝细胞、肝原性细胞、肝细胞群、肝原性细胞群以及前述的组合。

在一实施方案中，本发明提供的方法和组合物使用为 CD200⁺和 HLA-G⁺的分离的胎盘干细胞。在具体实施方案中，所述干细胞还是 CD73⁺和 CD105⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞还是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在更具体的实施方案中，所述干细胞还是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺和 CD105⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞已经过扩增，例如传代至少一次、至少三次、至少五次、至少 10 次、至少 15 次或至少 20 次。

在另一实施方案中，本发明提供的方法和组合物使用包含多种为 CD200⁺、HLA-G⁺的胎盘干细胞的分离的细胞群。在多个实施方案中，所述群中至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%或至少 95%的所述胎盘干细胞为所述 CD200⁺、HLA-G⁺干细胞。在所述分离的群的具体实施方案中，所述干细胞还是 CD73⁺和 CD105⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞还是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在更具体的实施方案中，所述干细胞还是 CD34⁻、CD38⁻、

CD45⁻、CD73⁺和 CD105⁺的。在另一实施方案中，当在允许胚样体形成的条件下培养时，所述分离群产生一个或多个胚样体。在另一具体实施方案中，所述群已经过扩增，例如传代至少一次、至少三次、至少五次、至少 10 次、至少 15 次或至少 20 次。

在另一实施方案中，本发明提供的方法和组合物使用为 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺的分离的胎盘干细胞。在所述群的具体实施方案中，所述干细胞还是 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞还是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述干细胞还是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在更具体的实施方案中，所述干细胞还是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻和 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞已经过扩增，例如传代至少一次、至少三次、至少五次、至少 10 次、至少 15 次或至少 20 次。

在另一实施方案中，本发明提供的方法和组合物使用包含多种为 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺的胎盘干细胞的分离的细胞群。在多个实施方案中，所述群中至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%或至少 95%的所述胎盘干细胞为所述 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺细胞。在所述群的具体实施方案中，所述干细胞是 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在更具体的实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻和 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中，当在允许胚样体形成的条件下培养时，所述细胞群产生一个或多个胚样体。在另一具体实施方案中，所述群已经过扩增，例如传代至少一次、至少三次、至少五次、至少 10 次、至少 15 次或至少 20 次。

在另一实施方案中，本发明提供的方法和组合物使用为 CD200⁺、OCT-4⁺的分离的胎盘干细胞。在具体实施方案中，所述干细胞还是 CD73⁺和 CD105⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞还是 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞还是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在更具体的实施方案中，所述干细胞还是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞已经过扩增，例如传代至少一次、至少三次、至少五次、至少 10 次、至少 15 次或至少 20 次。

在另一实施方案中，本发明提供的方法和组合物使用包含多种为 CD200⁺、OCT-4⁺的胎盘干细胞的分离的细胞群。在多个实施方案中，所述群中至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%或至少 95%的所述胎盘干细胞为所述 CD200⁺、OCT-4⁺细胞。在具体实施方案中，所述干细胞是 CD73⁺和 CD105⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在更具体的实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中，当在允许胚样体形成的条件下培养时，所述群产生一个或多个胚样体。在另一具体实施方案中，所述群已经过扩增，例如传代至少一次、至少三次、至少五次、至少 10 次、至少 15 次或至少 20 次。

在另一实施方案中，本发明提供的方法和组合物使用为 CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺的分离的胎盘干细胞。在上述多种细胞的具体实施方案中，所述干细胞还是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述干细胞还是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述干细胞还是 OCT-4⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞还是 CD200⁺的。在更

具体的实施方案中，所述干细胞还是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 、 $OCT-4^+$ 和 $CD200^+$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞已经过扩增，例如传代至少一次、至少三次、至少五次、至少 10 次、至少 15 次或至少 20 次。

在另一实施方案中，本发明提供的方法和组合物使用包含多种为 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 $HLA-G^+$ 的胎盘干细胞的分离的细胞群。在多个实施方案中，所述群中至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90% 或至少 95% 的所述胎盘干细胞为所述 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 $HLA-G^+$ 细胞。在上述多种细胞的具体实施方案中，所述干细胞还是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 或 $CD45^-$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞还是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞还是 $OCT-4^+$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞还是 $CD200^+$ 的。在更具体的实施方案中，所述干细胞还是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 、 $OCT-4^+$ 和 $CD200^+$ 的。在另一具体实施方案中，所述群已经过扩增，例如传代至少一次、至少三次、至少五次、至少 10 次、至少 15 次或至少 20 次。

在另一实施方案中，本发明提供的方法和组合物使用包含多种为 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 干细胞的胎盘干细胞的分离的细胞群，其中所述多种的细胞在允许胚样体形成的条件下形成一个或多个胚样体。在多个实施方案中，所述群中至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90% 或至少 95% 的所述胎盘干细胞为所述 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 干细胞。在具体实施方案中，所述干细胞还是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 或 $CD45^-$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞还是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞还是 $OCT-4^+$ 的。在更具体的实施方案中，所述干细胞还是 $OCT-4^+$ 、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的。在另一具体实施

方案中,所述群已经过扩增,例如传代至少一次、至少三次、至少五次、至少10次、至少15次或至少20次。

在另一实施方案中,本发明提供的方法和组合物使用包含多种为OCT-4⁺干细胞的胎盘干细胞的分离细胞群,其中当所述群在允许胚样体形成的条件下培养时形成一个或多个胚样体。在多个实施方案中,所述群中至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的所述胎盘细胞是所述OCT-4⁺干细胞。在上述群的具体实施方案中,所述干细胞是CD73⁺和CD105⁺的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是CD34⁻、CD38⁻或CD45⁻的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是CD200⁺的。在更具体的实施方案中,所述干细胞是CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻、CD38⁻和CD45⁻的。在另一具体实施方案中,所述群已经过扩增,例如传代至少一次、至少三次、至少五次、至少10次、至少15次或至少20次。

在另一实施方案中,本发明提供的方法和组合物使用分离的胎盘干细胞或者包含多种胎盘干细胞的细胞群,该胎盘干细胞为CD29⁺、CD44⁺、CD73⁺、CD90⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻和CD133⁻的。

在另一实施方案中,本发明提供的方法和组合物使用为CD10⁺、CD34⁻、CD105⁺和CD200⁺的分离的胎盘干细胞。本发明还提供了分离的细胞群,例如胎盘干细胞群,其中至少大约70%、至少大约80%、至少大约90%、至少大约95%或至少大约99%的所述胎盘干细胞为CD10⁺、CD34⁻、CD105⁺、CD200⁺的。在上述实施方案的具体实施方案中,所述干细胞还另外为CD90⁺和CD45⁻的。在具体实施方案中,所述干细胞或胎盘干细胞群与非干细胞的胎盘细胞分离开。在另一具体实施方案中,所述干细胞或胎盘干细胞群与

不展示这些特征的胎盘干细胞分离开。在另一具体实施方案中，所述分离的胎盘干细胞是非母体来源的。在另一具体实施方案中，所述分离的胎盘干细胞群中至少大约 90%、至少大约 95%或至少大约 99%的所述细胞是非母体来源的。

在另一实施方案中，本发明提供的方法和组合物使用为 HLA-A,B,C⁻、CD45⁻、CD133⁻和 CD34⁻的分离的胎盘干细胞。本发明还提供了分离的胎盘干细胞群的使用，其中至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%、至少大约 95%或至少大约 99%的所述胎盘干细胞为 HLA-A,B,C⁻、CD45⁻、CD133⁻和 CD34⁻的。在具体实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群与非干细胞的胎盘细胞分离开。在另一具体实施方案中，所述胎盘干细胞群与不展示这些特征的胎盘干细胞分离开。在另一具体实施方案中，所述分离的胎盘干细胞是非母体来源的。在另一具体实施方案中，所述分离的胎盘干细胞群中至少大约 90%、至少大约 95%或至少大约 99%的所述细胞是非母体来源的。在另一实施方案中，所述 HLA-A,B,C⁻、CD45⁻、CD133⁻和 CD34⁻胎盘干细胞是从胎盘灌洗液中分离的干细胞。在另一实施方案中，所述 HLA-A,B,C⁻、CD45⁻、CD133⁻和 CD34⁻胎盘干细胞是通过物理和/或酶促破坏胎盘组织分离的干细胞。

在另一实施方案中，本发明提供的方法和组合物使用为 CD10⁺、CD13⁺、CD33⁺、CD45⁻、CD117⁻和 CD133⁻的分离的胎盘干细胞。本发明还提供了分离的胎盘干细胞群，其中至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%、至少大约 95%或至少大约 99%的所述胎盘干细胞为 CD10⁺、CD13⁺、CD33⁺、CD45⁻、CD117⁻和 CD133⁻的。在具体实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群与非干细胞的胎盘细胞分离开。在另一具体实施方案中，所述分离的

胎盘干细胞是非母体来源的。在另一具体实施方案中,所述分离的胎盘干细胞群中至少大约 90%、至少大约 95%或至少大约 99%的所述细胞是非母体来源的。在另一具体实施方案中,所述干细胞或胎盘干细胞群与不展示这些特征的胎盘干细胞分离开。在另一实施方案中,本发明提供了获得为 CD10⁺、CD13⁺、CD33⁺、CD45⁻、CD117⁻和 CD133⁻的胎盘干细胞的方法,包括从胎盘灌洗液中分离所述细胞。在另一实施方案中,所述 HLA-A,B,C⁻、CD45⁻、CD133⁻和 CD34⁻胎盘干细胞是通过物理和/或酶促破坏胎盘组织分离的干细胞。

在另一实施方案中,本发明提供的方法和组合物使用为 CD10⁻、CD33⁻、CD44⁺、CD45⁻和 CD117⁻的分离的胎盘干细胞。本发明还提供了分离的胎盘干细胞群,其中至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%、至少大约 95%或至少大约 99%的所述胎盘干细胞为 CD10⁻、CD33⁻、CD44⁺、CD45⁻和 CD117⁻的。在具体实施方案中,所述干细胞或胎盘干细胞群与非干细胞的胎盘细胞分离开。在另一具体实施方案中,所述分离的胎盘干细胞是非母体来源的。在另一具体实施方案中,所述分离的胎盘干细胞群中至少大约 90%、至少大约 95%或至少大约 99%的所述细胞是非母体来源的。在另一具体实施方案中,所述干细胞或胎盘干细胞群与不展示这些特征的胎盘干细胞分离开。在另一实施方案中,本发明提供了获得为 CD10⁻、CD33⁻、CD44⁺、CD45⁻、CD117⁻的胎盘干细胞的方法,包括从胎盘灌洗液中分离所述细胞。在另一实施方案中,所述 HLA-A,B,C⁻、CD45⁻、CD133⁻和 CD34⁻胎盘干细胞是通过物理和/或酶促破坏胎盘组织分离的干细胞。

在另一实施方案中,本发明提供的方法和组合物使用为 CD10⁻、CD13⁻、CD33⁻、CD45⁻和 CD117⁻的分离的胎盘干细胞。本发明还提供了分离的胎盘

干细胞群，其中至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%、至少大约 95%或至少大约 99%的所述胎盘干细胞为 CD10⁻、CD13⁻、CD33⁻、CD45⁻和 CD117⁻的。在具体实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群与非干细胞的胎盘细胞分离开。在另一具体实施方案中，所述分离的胎盘干细胞是非母体来源的。在另一具体实施方案中，所述分离的胎盘干细胞群中至少大约 90%、至少大约 95%或至少大约 99%的所述细胞是非母体来源的。在另一具体实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群与不展示这些特征的胎盘干细胞分离开。在另一实施方案中，本发明提供了获得为 CD10⁻、CD13⁻、CD33⁻、CD45⁻和 CD117⁻的胎盘干细胞的方法，包括从胎盘灌洗液中分离所述细胞。在另一实施方案中，所述 HLA-A,B,C⁻、CD45⁻、CD133⁻和 CD34⁻胎盘干细胞是通过物理和/或酶促破坏胎盘组织分离的干细胞。

在另一实施方案中，本发明提供的方法和组合物使用为 HLA-A,B,C⁻、CD45⁻、CD34⁻、CD133⁻，CD10、CD13、CD38、CD44、CD90、CD105、CD200 和/或 HLA-G 阳性，和/或 CD117 阴性的分离的胎盘干细胞。在另一实施方案中，本发明提供的方法和组合物中所使用的胎盘干细胞的分离群为 HLA-A,B,C⁻、CD45⁻、CD34⁻、CD133⁻的，且所述群中至少大约 20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或大约 99%的干细胞为 CD10、CD13、CD38、CD44、CD90、CD105、CD200 和/或 HLA-G 阳性，和/或 CD117 阴性的。在具体实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群与非干细胞的胎盘细胞分离开。在另一具体实施方案中，所述分离的胎盘干细胞是非母体来源的。在另一具体实施方案中，所述分离的胎盘干细胞群中至少大约 90%、至少大约 95%或至少大约 99%的所述细胞是非母体来源的。在另一具体实施方案中，所述干细

胞或胎盘干细胞群与不展示这些特征的胎盘干细胞分离开。在另一实施方案中,本发明提供了获得为 HLA-A,B,C⁻、CD45⁻、CD34⁻、CD133⁻,和 CD10、CD13、CD38、CD44、CD90、CD105、CD200 和/或 HLA-G 阳性,和/或 CD117 阴性的胎盘干细胞的方法,包括从胎盘灌洗液中分离所述细胞。

在另一实施方案中,本发明提供的方法和组合物使用通过抗体结合测定为 CD200⁺和 CD10⁺,和通过抗体结合以及 RT-PCR 均测定为 CD117⁻的胎盘干细胞、或这种细胞的群、或包含这种分离的胎盘干细胞的细胞群。在另一实施方案中,本发明提供的方法和组合物使用为 CD10⁺、CD29⁻、CD54⁺、CD200⁺、HLA-G⁺、HLA I 类⁻和 β -2-微球蛋白⁻的胎盘干细胞。在另一实施方案中,本发明提供了胎盘干细胞,其中至少一种标记的表达比间充质干细胞(如骨髓来源间充质干细胞)的高至少两倍。在另一具体实施方案中,所述分离的胎盘干细胞是非母体来源的。在另一具体实施方案中,所述分离的胎盘干细胞群中至少大约 90%、至少大约 95%或至少大约 99%的所述细胞是非母体来源的。

在另一实施方案中,本发明提供的方法和组合物中所使用的胎盘干细胞为细胞角蛋白 18 阳性的。在另一实施方案中,本发明提供了胎盘干细胞群或由之分化的细胞群,其中至少 50%、70%、80%、90%、95%或 99%为细胞角蛋白 18 阳性的。在另一实施方案中,本发明提供了包含胎盘干细胞或由之分化的细胞的细胞群,其中至少 50%、70%、80%、90%、95%或 99%的所述胎盘干细胞或由之分化的细胞为细胞角蛋白 18 阳性的。在另一实施方案中,本发明提供了分离胎盘干细胞、或胎盘干细胞群、或由之分化的细胞的方法,包括选择一种或多种细胞角蛋白 18⁺胎盘干细胞,并从其它胎盘细胞中分离所述一种或多种干细胞。

在另一实施方案中，本发明提供的方法和组合物使用胎盘干细胞的分离群，其中多种所述胎盘干细胞通过醛脱氢酶活性测定而评估为醛脱氢酶(ALDH)阳性。这样的测定是本领域公知的(参见例如 Bostian 和 Betts, *Biochem. J*, 173, 787, (1978))。在具体实施方案中，所述 ALDH 测定利用 ALDEFLUOR® (Aldagen, Inc., Ashland, Oregon)作为醛脱氢酶活性的标记。在另一具体实施方案中，所述多种细胞为所述细胞群中大约 3%至大约 25%的细胞。在另一实施方案中，本发明提供的方法和组合物使用胎盘干细胞群，其中多种所述胎盘干细胞被评估为醛脱氢酶(ALDH)阳性，其通过利用 ALDEFLUOR®作为醛脱氢酶活性指示的脱氢酶测定来检测。在具体实施方案中，所述多种细胞为所述细胞群中大约 3%至大约 25%的细胞。在另一实施方案中，所述胎盘干细胞群或脐带干细胞群显示出比具有相同细胞数、且在相同条件下培养的骨髓来源间充质干细胞群高至少三倍、或至少五倍的 ALDH 活性。

在上述胎盘干细胞的具体实施方案中，所述胎盘干细胞组成型地分泌 IL-6、IL-8 和单核细胞化学趋化剂蛋白(MCP-I)。

每种上述胎盘干细胞或多种胎盘干细胞都可以包含从哺乳动物胎盘直接获得和分离的胎盘干细胞，或者已经培养和传代至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40 或更多代的胎盘干细胞，或其组合。

上文所述的多种胎盘干细胞可以包含大约、至少、或不超过 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多个胎盘干细胞。

5.2.3 选择和生产胎盘干细胞群

在另一实施方案中，本发明提供了从多种胎盘细胞中选择多种胎盘干细胞的方法，其中肝细胞和/或肝原性细胞能够由之分化，包括选择胎盘细胞群，其中至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%或至少 95%的所述细胞是 CD200⁺、HLA-G⁺胎盘干细胞。在具体实施方案中，所述选择包括选择还是 CD73⁺和 CD105⁺的干细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的干细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺和 CD105⁺的胎盘干细胞。在另一具体实施方案中，所述选择还包括选择在允许胚样体形成的条件下培养时，形成一个或多个胚样体的多种胎盘干细胞。

在另一实施方案中，本发明提供了从多种胎盘细胞中选择多种胎盘干细胞的方法，包括选择多种胎盘细胞，其中至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%或至少 95%的所述细胞是 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺胎盘干细胞。在具体实施方案中，所述选择包括选择还是 HLA-G⁺的干细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的胎盘干细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的胎盘干细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻和 HLA-G⁺的胎盘干细胞。在另一具体实施方案中，所述选择还包括选择在允许胚样体形成的条件下培养时，形成一个或多个胚样体的胎盘细胞群。

在另一实施方案中，本发明提供了从多种胎盘细胞中选择多种胎盘干细胞的方法，包括选择多种胎盘细胞，其中至少 10%、至少 20%、至少 30%、

至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%或至少 95%的所述细胞是 $CD200^{+}$ 、 $OCT-4^{+}$ 胎盘干细胞。在具体实施方案中，所述选择包括选择还是 $CD73^{+}$ 和 $CD105^{+}$ 的胎盘干细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 $HLA-G^{+}$ 的胎盘干细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 和 $CD45^{-}$ 的胎盘干细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 、 $CD45^{-}$ 、 $CD73^{+}$ 、 $CD105^{+}$ 和 $HLA-G^{+}$ 的胎盘干细胞。

在另一实施方案中，本发明提供了从多种胎盘细胞中选择多种胎盘干细胞的方法，包括选择多种胎盘细胞，其中至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%或至少 95%的所述细胞是 $CD73^{+}$ 、 $CD105^{+}$ 和 $HLA-G^{+}$ 胎盘干细胞。在具体实施方案中，所述选择包括选择还是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 或 $CD45^{-}$ 的胎盘干细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 和 $CD45^{-}$ 的胎盘干细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 $CD200^{+}$ 的胎盘干细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 、 $CD45^{-}$ 、 $OCT-4^{+}$ 和 $CD200^{+}$ 的胎盘干细胞。

在另一实施方案中，本发明提供了从多种胎盘细胞中选择多种胎盘干细胞的方法，包括选择多种胎盘细胞，其中至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%或至少 95%的所述细胞是 $CD73^{+}$ 、 $CD105^{+}$ 胎盘干细胞，并且其中所述多种细胞在允许胚样体形成的条件下形成一个或多个胚样体。在具体实施方案中，所述选择包括选择还是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 或 $CD45^{-}$ 的胎盘干细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 和 $CD45^{-}$ 的胎盘干细胞。

在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 OCT-4⁺的胎盘干细胞。在更具体的实施方案中，所述选择包括选择还是 OCT-4⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的胎盘干细胞。

在另一实施方案中，本发明提供了从多种胎盘细胞中选择多种胎盘干细胞的方法，包括选择多种胎盘细胞，其中至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%或至少 95%的所述分离的胎盘细胞是 OCT-4⁺干细胞，并且其中所述多种的细胞在允许胚样体形成的条件下形成一个或多个胚样体。在具体实施方案中，所述选择包括选择还是 CD73⁺和 CD105⁺的胎盘干细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的胎盘干细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 CD200⁺的胎盘干细胞。在更具体的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的胎盘干细胞。

本发明还提供了生产胎盘干细胞群或多种胎盘干细胞的方法；这样的细胞可在本发明提供的方法和组合物中使用。例如，本发明提供了生产细胞群的方法，包括选择任何上述多种胎盘干细胞，并从其它细胞，例如其它胎盘细胞中分离所述多种胎盘干细胞。在具体实施方案中，本发明提供了生产细胞群的方法，包括选择胎盘细胞，其中所述胎盘细胞(a)贴壁于基质，和(b)表达 CD200 和 HLA-G；或表达 CD73、CD105 和 CD200；或表达 CD200 和 OCT-4；或表达 CD73、CD105 和 HLA-G；或表达 CD73 和 CD105，且当包含所述干细胞的胎盘细胞群在允许胚样体形成的条件下培养时，有助于在所述群中形成一个或多个胚样体；或表达 OCT-4，且当包含所述干

细胞的胎盘细胞群在允许胚样体形成的条件下培养时，有助于在所述群中形成一个或多个胚样体。

在更具体的实施方案中，本发明提供了生产细胞群的方法，包括选择胎盘干细胞，其中所述胎盘干细胞(a)贴壁于基质，和(b)表达 CD200 和 HLA-G；并从其它细胞中分离所述胎盘干细胞以形成细胞群。在另一具体实施方案中，本发明提供了生产细胞群的方法，包括选择胎盘干细胞，其中所述胎盘干细胞(a)贴壁于基质，和(b)表达 CD73、CD105 和 CD200；并从其它细胞中分离所述胎盘干细胞以形成细胞群。在另一具体实施方案中，本发明提供了生产细胞群的方法，包括选择胎盘干细胞，其中所述胎盘干细胞(a)贴壁于基质，和(b)表达 CD200 和 OCT-4；并从其它细胞中分离所述胎盘干细胞以形成细胞群。在另一具体实施方案中，本发明提供了生产细胞群的方法，包括选择胎盘干细胞，其中所述胎盘干细胞(a)贴壁于基质，(b)表达 CD73 和 CD105，和(c)当在允许胚样体形成的条件下培养时形成胚样体；并从其它细胞中分离所述胎盘干细胞以形成细胞群。在另一具体实施方案中，本发明提供了生产细胞群的方法，包括选择胎盘干细胞，其中所述胎盘干细胞(a)贴壁于基质，和(b)表达 CD73、CD105 和 HLA-G；并从其它细胞中分离所述胎盘干细胞以形成细胞群。生产细胞群的方法包括选择胎盘干细胞，其中所述胎盘干细胞(a)贴壁于基质；(b)表达 OCT-4，和(c)当在允许胚样体形成的条件下培养时形成胚样体；并从其它细胞中分离所述胎盘干细胞以形成细胞群。

5.2.4 培养生长

正如任何哺乳动物细胞那样，本发明描述的胎盘干细胞的生长部分地依赖于选择用于生长的特定培养基。在最优条件下，胎盘干细胞一般在3-5天内数量加倍。在培养过程中，本发明提供的胎盘干细胞贴壁在培养基质上，例如组织培养容器的表面(例如：组织培养皿的塑料、纤粘连蛋白包被的塑料等)，并形成单层细胞。

包含本发明提供的胎盘干细胞的分离的胎盘细胞群在合适的条件下培养时，形成胚样体，即，在贴壁的干细胞层上面生长的三维细胞簇。胚样体内的细胞预期表达与极早期干细胞例如 OCT-4、Nanog、SSE3 和 SSE4 相关的标记。如同本发明描述的胎盘干细胞那样，胚样体内的细胞一般不贴壁在培养基质上，但是在培养过程中保持附着于贴壁的细胞。胚样体细胞的活力依赖于贴壁胎盘干细胞，因为在缺少贴壁干细胞时不形成胚样体。因此，贴壁胎盘干细胞有助于包含贴壁胎盘干细胞的胎盘细胞群中的一个或多个胚样体的生长。不希望受制于理论，认为胚样体细胞在贴壁胎盘干细胞上的生长与胚胎干细胞在滋养层细胞上的生长相似。间充质干细胞，例如骨髓来源间充质干细胞在培养中不产生胚样体。

5.2.5 分化

可用于本发明提供的方法的胎盘干细胞可分化为不同的定型细胞系。例如，所述胎盘干细胞能够分化为肝细胞性系的细胞。这样的分化可以例如通过本领域公知的用于将例如骨髓来源间充质干细胞分化为相似细胞系的任何方法来实现。参见 2006 年 12 月 28 日提交的美国专利申请号 11/648,813，其公开内容在此通过引用并入本文。

待分化的胎盘干细胞可以包含在聚合物载体如褐藻胶之中。在一实施方案中，本发明提供了包含胶囊化在褐藻胶之中的多种细胞的组合物。所述细胞可以是胎盘干细胞，未与导致胎盘干细胞分化为肝细胞或肝原性细胞的条件相接触。所述细胞还可以是肝原性细胞或肝细胞。所述细胞还可以是任何前述细胞的组合。包含在聚合物如褐藻胶之中的肝原性细胞和/或肝细胞是从胎盘干细胞分化而来的细胞。在一实施方案中，所述细胞表达至少一种不为胎盘干细胞所表达、或表达程度与之具有可检测差异的肝细胞标记。优选聚合物如褐藻胶为珠子的形式，其胶囊化多种胎盘干细胞、肝原性细胞、肝细胞或其组合。珠子大小可以变化不等，例如珠子可以从大约(例如 $\pm 10\%$) $100\ \mu\text{m}$ 至大约 $1000\ \mu\text{m}$ 不等。在具体实施方案中，所述珠子大小从大约 $200\ \mu\text{m}$ 至大约 $800\ \mu\text{m}$ 。在另一具体实施方案中，所述珠子大约平均大约 $500\ \mu\text{m}$ 。

5.3 $\text{CD}34^+\text{CD}45^-$ 胎盘干细胞和包含它们的细胞群

另一方面，本发明提供了分离的造血 $\text{CD}34^+$ 、 $\text{CD}45^-$ 胎盘干细胞和/或 $\text{CD}34^+\text{CD}45^{\text{模糊}}$ 胎盘干细胞，以及富集 $\text{CD}34^+$ 、 $\text{CD}45^-$ 胎盘干细胞的分离的细胞群。如本发明中使用的，“ $\text{CD}34^+$ 、 $\text{CD}45^-$ 胎盘干细胞”表明细胞能够分化为至少一种类型的成熟血细胞或成熟血细胞的祖细胞，其由胎盘获得但不从胎盘血或脐带血获得，且在某些实施方案中包括 $\text{CD}34^+\text{CD}45^{\text{模糊}}$ 胎盘干细胞。利用 $\text{CD}34$ 的标记抗体， $\text{CD}34^+$ 、 $\text{CD}45^-$ 胎盘干细胞可检测地为 $\text{CD}34$ 标记阳性，且为 $\text{CD}45$ 模糊或阴性，例如，不被 $\text{CD}45$ 的荧光标记抗体标记，从而细胞可检测地高于背景。 $\text{CD}34^+$ 、 $\text{CD}45^-$ 胎盘干细胞和 $\text{CD}34^+\text{CD}45^{\text{模糊}}$ 胎盘干细胞通常是非贴壁的，即，不贴壁于组织培养表面。

本发明还提供了富集 $CD34^+$ 、 $CD45^-$ 胎盘干细胞和/或 $CD34^+CD45^-$ 模糊胎盘干细胞的胎盘细胞群。如本发明中使用的,“富集”表明所述胎盘干细胞群包含比胎盘灌洗液中所见的更高数目或更高百分比的 $CD34^+CD45^-$ 细胞,其中所述胎盘灌洗液包含当胎盘已经排干脐带血和胎盘血,且用大约 100 mL 灌洗液预灌洗之后,以大约 50 mL/min 的流速通过人胎盘的大约 750 mL 灌洗液(例如 0.9% NaCl)。在具体实施方案中, $CD34^+CD45^-$ 胎盘干细胞以比胎盘灌洗液中所见的更高的百分比存在于细胞群之中,例如,所述胎盘干细胞构成所述细胞群中至少 1%、2%、3%、4%、5%、7%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 的细胞。在另一具体实施方案中,所述干细胞群包含大约或至少 1×10^3 、 5×10^3 、 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 或 1×10^7 $CD34^+CD45^-$ 胎盘干细胞。

通常,在胎盘灌洗液的大约 1 亿个总有核细胞群中,大约有 5% 为 $CD34^+$ 细胞,且考虑到活力,胎盘的终产率为大约 100 万个 $CD34^+$ 干细胞。 $CD34^+$ 干细胞收集时看起来是圆的,具有低细胞复杂度。

包含 $CD34^+CD45^-$ 胎盘干细胞的胎盘干细胞群还可以包含其它 $CD34^+$ 细胞群,例如, $CD34^+CD38^+$ 细胞和/或 $CD34^+CD38^-$ 细胞。在具体实施方案中,所述 $CD34^+CD38^-$ 细胞包含 $CD34^+CD38^-lin^-$ 干细胞。在另一具体实施方案中,所述 $CD34^+$ 胎盘干细胞包含为 $ALDH^+$ 的细胞,即 $CD34^+$ 、 $ALDH^+$ 胎盘干细胞。

在另一实施方案中, $CD34^+$ 、 $CD45^-$ 胎盘干细胞与第二类型的干细胞组合。在一实施方案中,所述第二类型的干细胞包含为 $OCT-4^+$ 或 $ABC-p^+$ 的贴壁胎盘干细胞。在另一具体实施方案中,所述贴壁胎盘干细胞包含为

OCT4⁺ABC-p⁺的细胞。在另一更具体的实施方案中,所述造血胎盘干细胞包含在基本上缺乏红细胞和细胞碎片的胎盘灌洗液之中。

在另一实施方案中,与造血胎盘干细胞如 CD34⁺CD45⁻胎盘干细胞组合的所述贴壁胎盘干细胞包含表达 CD10、CD29、CD44、CD54、CD90、CD73 或 CD105 标记的一种或多种、且不表达 CD34、CD38、CD45、SSEA3 和 SSEA4 标记的一种或多种的细胞。在另一实施方案中,所述贴壁胎盘干细胞包含 CD10、CD29、CD44、CD54、CD90、CD73 或 CD105 阳性、且 CD34、CD38、CD45、SSEA3 和 SSEA4 阴性的细胞。在另一实施方案中,所述贴壁胎盘干细胞包含含有 CD10、CD29、CD44、CD54、CD90、CD73 和 CD105 标记的一种或多种、且缺乏 CD34、CD38、CD45、SSEA3 和 SSEA4 标记的一种或多种的细胞。在另一实施方案中,所述贴壁胎盘干细胞包含 CD10、CD29、CD44、CD54、CD90、CD73 和 CD105 阳性、且 CD34、CD38、CD45、SSEA3 和 SSEA4 阴性的细胞。在另一实施方案中,所述贴壁胎盘干细胞包含 CD34⁻细胞。在具体实施方案中,所述贴壁胎盘干细胞为 CD34⁻CD38⁻胎盘干细胞。在另一实施方案中,所述贴壁胎盘干细胞包含对 CD10、CD29、CD33、CD44、CD73、CD105、CD117 和 CD 133 中至少之一为阳性、且对 CD34 或 CD45 中至少之一为阴性的细胞。在另一实施方案中,所述贴壁胎盘干细胞包含 CD10、CD29、CD33、CD44、CD73、CD105、CD117 和 CD 133 阳性、且 CD34 或 CD45 阴性的细胞。在更具体的实施方案中,所述贴壁胎盘干细胞包含为 HLA-ABC⁺的细胞。在更具体的实施方案中,所述贴壁胎盘干细胞包含为 HLA-ABC⁻的细胞。在更具体的实施方案中,所述贴壁胎盘干细胞包含为 HLA-DR⁺的细胞。在更具体的实施方案中,所述贴壁胎盘干细胞包含为 HLA-DR⁻的细胞。在另一具体实施方案中,所述贴壁胎

盘干细胞包含为 $CD200^+$ 或 $HLA-G^+$ 的细胞。在另一具体实施方案中, 所述贴壁胎盘干细胞包含为 $CD200^+$ 和 $HLA-G^+$ 的细胞。在另一具体实施方案中, 所述贴壁胎盘干细胞包含为 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 $CD200^+$ 的细胞。在另一具体实施方案中, 所述贴壁胎盘干细胞包含为 $CD200^+$ 和 $OCT-4^+$ 的细胞。在另一具体实施方案中, 所述贴壁胎盘干细胞包含为 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 、且在包含所述干细胞的分离的胎盘细胞群在允许胚样体形成的条件下培养时有助于在所述群中形成胚样体的细胞。在另一具体实施方案中, 所述贴壁胎盘干细胞包含为 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 $HLA-G^+$ 的细胞。在另一具体实施方案中, 所述贴壁胎盘干细胞包含为 $OCT-4^+$ 、且在包含所述干细胞的分离的胎盘细胞群在允许胚样体形成的条件下培养时, 有助于在所述群中形成胚样体的细胞。

在另一实施方案中, 所述第二干细胞群包含脐带血干细胞和/或骨髓干细胞。

待组合的 $CD34^+CD45^-$ 胎盘干细胞和其它干细胞可以是完全一致地 HLA 匹配的, 即, 它们可以来源于同一个体。在另一实施方案中, 所述 $CD34^+CD45^-$ 胎盘干细胞和其它干细胞可以是 HLA 不匹配的, 即, 它们可以来源于不同的个体。 $CD34^+CD45^-$ 胎盘干细胞和其它干细胞的所述组合可以包含为与目标接受者 HLA 匹配的、部分 HLA 匹配的和/或 HLA 不匹配的干细胞。对于包含非脐带血干细胞的组合干细胞群而言, 优选第二来源的干细胞与目的受体至少为 HLA 匹配的或部分 HLA 匹配的。

在多个实施方案中, 相比各群中的总有核细胞数, 或相比各群中的干细胞总数, $CD34^+CD45^-$ 胎盘干细胞与第二类型干细胞的比率可以是大约 100,000,000:1、50,000,000:1、20,000,000:1、10,000,000:1、5,000,000:1、

2,000,000:1、1,000,000:1、500,000:1、200,000:1、100,000:1、50,000:1、20,000:1、10,000:1、5,000:1、2,000:1、1,000:1、500:1、200:1、100:1、50:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1；1:2；1:5；1:10；1:100；1:200；1:500；1:1,000；1:2,000；1:5,000；1:10,000；1:20,000；1:50,000；1:100,000；1:500,000；1:1,000,000；1:2,000,000；1:5,000,000；1:10,000,000；1:20,000,000；1:50,000,000；或大约 1:100,000,000。在多个优选的实施方案中，所述比率为大约 1:10 至大约 10:1，或大约 3:1 至大约 1:3。

本发明还提供了包含 $CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘干细胞和第二类型干细胞的干细胞群，其中所述干细胞群包含治疗有效量的 $CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘干细胞、第二类型的干细胞、或两者皆是。在多个实施方案中，所述群包含至少 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 或 1×10^{11} $CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘干细胞、第二类型的干细胞、或两者皆是；或者至多 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 或 1×10^{11} $CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘干细胞、第二类型的干细胞、或两者皆是；或者包含来自胎盘干细胞群和第二类型干细胞两者的 3、5、10、20、30、40 或 50 单位或更多的总有核细胞。

5.4 获得胎盘干细胞的方法

5.4.1 干细胞收集组合物

本发明提供的方法和组合物中所使用的胎盘干细胞如贴壁胎盘干细胞和/或 $CD34^{+}$ 、 $CD45^{-}$ 胎盘干细胞可以通过本领域公知的从组织中收集细胞的任何方法来收集，例如通过灌洗胎盘和/或通过物理和/或酶促破坏胎盘组织

来收集。一般利用生理学可接受的溶液，例如，干细胞收集组合物从哺乳动物胎盘中获得干细胞。干细胞收集组合物详细地在2006年12月28日提交的名为“用于收集胎盘干细胞和保存器官的改良组合物(Improved Composition for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs)”的相关美国申请公开号2007/0190042中进行了描述。

所述干细胞收集组合物可以包括适合干细胞收集和/或培养的任何生理学可接受的溶液，例如，盐溶液(例如：磷酸缓冲盐溶液、Kreb氏液、改良的Kreb氏液、Eagle氏液、0.9% NaCl等)、培养基(例如：DMEM、H.DMEM等)，等等。

干细胞收集组合物可以包含旨在保存胎盘干细胞的一种或多种组分，即，从收集时间到培养的时间内，保护胎盘干细胞免于死亡，或延缓胎盘干细胞的死亡，降低细胞群中胎盘干细胞的死亡数等。此类组分可以是例如，凋亡抑制剂(例如：半胱天冬酶抑制剂或JNK抑制剂)、血管扩张剂(例如：硫酸镁、抗高血压药物、心钠肽(ANP)、促肾上腺皮质激素、皮质激素释放激素、亚硝基铁氰化钠、胍苯哒嗪、三磷酸腺苷、腺苷、吲哚美辛或硫酸镁、磷酸二酯酶抑制剂等)；坏死抑制剂(例如：2-(1H-吲哚-3-基)-3-戊氨基-马来酰亚胺、吡咯烷二硫代氨基甲酸盐、或氯硝西泮)；TNF- α 抑制剂；和/或携氧全氟化碳(例如：全氟辛基溴、全氟癸基溴等)。

干细胞收集组合物可以包含一种或多种组织降解酶，例如：金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、中性蛋白酶、透明质酸酶、RNA酶或DNA酶等。此类酶包括但不限于：胶原酶(例如胶原酶I、II、III或IV，来源于溶组织梭状芽胞杆菌(*Clostridium histolyticum*)的胶原酶等)、分散酶、嗜热菌蛋白酶、弹性蛋白酶、胰蛋白酶、LIBERASE、透明质酸酶等。

干细胞收集组合物可以包含杀菌或抑菌有效量的抗生素。在某些非限制性的实施方案中，所述抗生素是：大环内酯(例如：妥布霉素)、头孢菌素(例如：头孢氨苄、头孢拉定、头孢呋辛、头孢罗齐、头孢克洛、头孢克肟或头孢羟氨苄)、克拉仙霉素、红霉素、青霉素(例如：青霉素 V)或喹诺酮(例如：氧氟沙星、环丙沙星或诺氟沙星)、四环素、链霉素等。在特定实施方案中，所述抗生素是抗革兰氏阳性和/或革兰氏阴性细菌活性的，例如绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等。

干细胞收集组合物还可以包含一种或多种下列化合物：腺苷(约 1 mM 至约 50 mM); D-葡萄糖(约 20 mM 至约 100 mM); 镁离子(约 1 mM 至约 50 mM); 分子量大于 20,000 道尔顿的高分子，在一实施方案中，以足够维持内皮完整性和细胞活力的量存在(例如：合成的或天然存在的胶体，多糖例如葡聚糖或聚乙二醇，以约 25 g/l 至约 100 g/l、或约 40 g/l 至约 60 g/l 的量存在); 抗氧化剂(例如：叔丁对甲氧酚、丁基羟基甲苯、谷胱甘肽、维生素 C 或维生素 E，以约 25 μ M 至约 100 μ M 的量存在); 还原剂(例如：N-乙酰半胱氨酸，以约 0.1 mM 至约 5 mM 的量存在); 防止钙进入细胞内的药剂(例如：维拉帕米，以约 2 μ M 至约 25 μ M 的量存在); 硝化甘油(例如：约 0.05 g/L 至约 0.2 g/L); 抗凝剂，在一实施方案中，以足够帮助防止残留血液凝结的量存在(例如，肝素或水蛭素，以约 1000 单位/l 至约 100,000 单位/l 的浓度存在); 或含有阿米洛利的化合物(例如，阿米洛利、乙基异丙基阿米洛利、环己基阿米洛利、二甲基阿米洛利或异丁基阿米洛利，以约 1.0 μ M 至约 5 μ M 存在)。

5.4.2 胎盘的收集和处理

一般,在生产排出后立即回收人胎盘。在优选的实施方案中,在知情同意、采集患者的完整医疗史并与胎盘关联起来后,从患者处回收胎盘。优选在分娩后继续记录医疗史。此类医疗史可用于协调胎盘或由之收获的干细胞的后续应用。例如,根据医疗史,人胎盘干细胞可用于与胎盘相关的婴儿、或用于所述婴儿的父母、兄弟姐妹或其它亲戚的个人化医疗。

在回收胎盘干细胞之前,去除了脐带血和胎盘血。在某些实施方案中,在分娩后回收胎盘中的脐带血。可以对胎盘实施常规的脐带血回收方法。一般使用针头或套管,借助于重力对胎盘放血(参见例如:Anderson 的美国专利号 5,372,581; Hessel 等的美国专利号 5,415,665)。所述针头或套管通常置于脐静脉内,并且可以轻轻地按摩胎盘帮助从胎盘中排出脐带血。此类脐带血回收可以商业化进行,例如 LifeBankUSA, Cedar Knolls, N.J.; ViaCord; Cord Blood Registry; Cryocell 等等。优选对所述胎盘通过重力来放血不进行其它操作,从而使脐带血回收过程中的组织破坏最小化。

通常将胎盘从产房或出生室运输至另一地点如实验室,进行脐带血回收和干细胞收集,例如,通过灌洗或组织解离收集。胎盘优选在消毒保温的运输装置(维持胎盘温度在 20-28℃)中运输,例如,将脐带近端夹紧的胎盘放置在消毒、拉拉链封闭的塑料袋中,然后将其放置在保温容器内。在另一实施方案中,胎盘在基本上如美国专利号 7,147,626 或美国专利申请公开号 2006/0060494 中描述的脐带血收集试剂盒中运输。优选在分娩后 4 至 24 小时将胎盘递送至实验室。在某些实施方案中,在脐带血回收前,夹紧脐带近端,优选夹在距胎盘插入处 4-5 cm (厘米)。在其它实施方案中,在脐带血回收后但是在胎盘的进一步处理前夹紧近端脐带。

在收集干细胞前，胎盘可储存在无菌条件和室温或 5-25℃(摄氏度)下。胎盘可以储存超过 48 小时的时间，并优选在灌洗胎盘以去除任何残留的脐带血前储存 4 至 24 小时。胎盘优选在 5 至 25℃(摄氏度)的温度下储存在抗凝剂溶液中。合适的抗凝剂溶液是本领域众所周知的。例如，可以使用肝素或华法令钠(warfarin sodium)溶液。在优选的实施方案中，抗凝剂溶液含有肝素溶液(例如，1% w/w 的 1:1000 溶液)。在收集胎盘干细胞前，放血的胎盘优选储存不超过 36 小时。

一旦哺乳动物胎盘或其部分一般如上所述进行收集和制备，便可以按照本领域已知的任何方法处理，例如，可以进行灌洗或破坏，如用一种或多种组织破坏酶来消化从而获得干细胞。

5.4.3 胎盘组织的物理破坏和酶促消化

在一实施方案中，通过器官的物理破坏，例如酶促消化，从哺乳动物胎盘中收集干细胞。例如，可以在与本发明描述的干细胞收集组合物接触的同时，例如将胎盘或其部分压碎(crush)、剪碎(shear)、绞碎(mince)、切块(dice)、剁碎(chop)、浸软(macerate)等，随后用一种或多种酶来消化组织。胎盘或其部分还可以进行物理破坏，并用一种或多种酶消化，然后将得到的材料浸入或混入本发明描述的干细胞收集组合物中。任何物理破坏的方法均可以使用，只要该破坏方法通过例如台盼蓝排除所确定的那样，能使所述器官中多数、更优选大多数、更优选至少 60%、70%、80%、90%、95%、98%或 99%的细胞存活。

在物理破坏和/或酶促消化和干细胞回收前，胎盘可以被分割成部分。例如，可以从羊膜、绒毛膜、胎盘绒毛叶或其任何组合中获得胎盘干细胞。

优选胎盘干细胞获自包含羊膜和绒毛膜的胎盘组织。一般胎盘干细胞可以通过破坏小块胎盘组织解来获得，例如胎盘组织块的体积是约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900 或约 1000 立方毫米。

优选的干细胞收集组合物包含一种或多种组织破裂酶。酶促消化优选使用酶的组合，例如基质金属蛋白酶和中性蛋白酶的组合，例如胶原酶和分散酶的组合。在一实施方案中，胎盘组织的酶促消化使用基质金属蛋白酶、中性蛋白酶和用于消化透明质酸的粘液溶解酶的组合，例如胶原酶、分散酶和透明质酸酶的组合或者 LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind.)和透明质酸酶的组合。可用于破坏胎盘组织的其它酶包括木瓜蛋白酶、脱氧核糖核酸酶、丝氨酸蛋白酶如胰蛋白酶、糜蛋白酶、或弹性蛋白酶。丝氨酸蛋白酶可被血清中的 α_2 微球蛋白所抑制，因此用于消化的基质通常是不含血清的。在酶促消化方法中通常使用 EDTA 和 DNA 酶来增加细胞回收的效率。优选稀释消化物，以避免干细胞陷入粘稠的消化物中。

任何组织消化酶的组合均可以使用。组织消化酶的典型浓度包括例如：50-200 U/ml 的 I 型胶原酶和 IV 型胶原酶，1-10 U/ml 的分散酶，和 10-100 U/ml 的弹性蛋白酶。可以组合使用蛋白酶，即在同一消化反应中使用两种或多种蛋白酶，或者可以按顺序相继使用从而释放胎盘干细胞。例如，在一实施方案中，胎盘或其部分首先用合适量的 I 型胶原酶按 2 mg/ml 消化 30 分钟，然后用 0.25% 的胰蛋白酶在 37°C 消化 10 分钟。丝氨酸蛋白酶优选在使用其它酶后再连续使用。

在另一实施方案中，在用干细胞收集组合物分离干细胞之前，向含有干细胞的干细胞收集组合物、或者向组织在其中进行破坏和/或消化的溶液中添加螯合剂来进一步破坏组织：例如乙二醇双(2-氨基乙醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)或乙二胺四乙酸(EDTA)。

可以理解，在完整的胎盘或胎盘的一部分同时含有胎儿和母体细胞(例如，胎盘的一部分包含绒毛膜或绒毛小叶)的情况下，收集的胎盘干细胞将同时包含来源于胎儿和母体源的胎盘干细胞的混合物。在胎盘的部分不含或只含有可忽略数的母体细胞(例如，羊膜)的情况下，收集的胎盘干细胞将几乎只含有胎儿的胚胎干细胞。

5.4.4. 胎盘灌洗

可用于本发明提供的方法和组合物的胎盘干细胞还可以通过灌洗哺乳动物胎盘获得。灌洗哺乳动物胎盘以获得干细胞的方法公开在例如 Hariri 的美国专利号 7,045,148 和 7,255,879 以及名为“用于收集和保存器官的改良组合物(Improved Composition for Collecting and Preserving Organs)”的美国申请公开号 2007/0190042 中。

可以利用例如干细胞收集组合物作为灌洗液，通过灌洗例如通过胎盘脉管系统来收集胎盘干细胞。在一实施方案中，通过使灌洗液流经脐动脉和脐静脉中任一或两者来灌洗哺乳动物胎盘。可以利用如重力流入胎盘来实现灌洗液在胎盘中的流动。优选利用泵如蠕动泵来迫使灌洗液流经胎盘。例如，可以用套管，如 TEFLON® 或塑料套管对脐静脉进行插管，所述套管与无菌的连接装置，如无菌管相连。无菌的连接装置与灌洗歧管相连。

为准备灌洗，胎盘优选按脐动脉和脐静脉位于胎盘最高点的方式放置(如，悬挂)。可以通过灌洗液，例如本发明提供的干细胞收集组合物，在胎盘脉管系统中或在胎盘脉管系统和周围组织中的流动来灌洗胎盘。在一实施方案中，脐动脉和脐静脉同时连接移液器，所述移液器通过柔性连接器与灌洗液的储器相连。灌洗液流入脐静脉及动脉。灌洗液渗出和/或流经血管壁进入胎盘的周围组织，并从在孕期附着于母亲子宫的胎盘表面合适的开放血管中收集。灌洗液还可以通过脐带开口导入，并允许从与母体子宫壁接触的胎盘壁中的开口流出或滤出。在另一实施方案中，灌洗液流经脐静脉并从脐动脉收集，或者流经脐动脉并从脐静脉收集，即仅流经胎盘脉管系统(胎儿组织)。这可以称为“闭路式”灌洗法。在一实施方案中，闭路式灌洗法可以如下实施。产后胎盘在出生后 48 小时之内获得。夹紧脐带并在夹钳上方切开。脐带可以弃去，或者可以加工以回收例如脐带干细胞，和/或加工脐带膜用于生物材料的生产。羊膜在灌洗期间可以保留，或者可以与绒毛膜分离，例如用手指通过钝器解剖实现。如果羊膜在灌洗之前与绒毛膜分离，它可以例如弃去，或者加工，例如通过酶促消化以获得干细胞，或生产羊膜生物材料，例如美国申请公开号 2004/0048796 中所述的生物材料。在例如利用消毒纱布清洁掉胎盘上所有的可见血凝块和残留血液之后，例如通过部分切开脐带膜露出脐带横截面而露出脐带血管。辨认血管，例如通过沿着各血管切口端推进闭合的鳄鱼夹而打开血管。然后向各胎盘动脉中插入仪器，例如与灌洗装置或蠕动泵相连的塑料管。泵可以是适合目的的任何泵，例如蠕动泵。然后向胎盘静脉中插入与无菌收集储器例如储血袋如 250 mL 收集袋相连的塑料管。可选地，向胎盘静脉中插入与泵相连的管，而向一根或两根胎盘动脉中均插入与收集储器相连的管。然后用一

定体积的灌洗液例如大约 750 ml 的灌洗液灌洗胎盘。然后例如通过离心收集灌洗液中的细胞。

在一实施方案中，在灌洗过程中夹紧脐带近端，更优选夹在脐带插入胎盘 4-5 cm (厘米)处。

在放血过程中从哺乳动物胎盘首先收集的灌洗液一般都被脐带血和/或胎盘血残留的血红细胞着色。随着灌洗继续和残留的脐带血细胞从胎盘中洗出，灌洗液变得越来越无色。一般 30 至 100 ml 灌洗液足以初步使胎盘放血，但根据观察的结果可以使用或多或少的灌洗液。

用于收集胎盘干细胞的灌洗液体积可以根据待收集的干细胞数、胎盘大小、对单个胎盘进行的收集次数等而变化。在多个实施方案中，灌洗液的体积可以自 50 mL 至 5000 mL、50 mL 至 4000 mL、50 mL 至 3000 mL、100 mL 至 2000 mL、250 mL 至 2000 mL、500 mL 至 2000 mL，或 750 mL 至 2000 mL。一般，在放血后用 700-800 mL 灌洗液来灌洗胎盘。

胎盘可以在数小时或数天的时程内进行多次灌洗。当胎盘进行多次灌洗时，可以在容器或其它合适的器皿中在无菌条件下维持或培养，并用干细胞收集组合物或标准灌洗液(例如，普通的盐溶液如磷酸缓冲盐溶液(“PBS”))灌洗，其中含有或不含抗凝剂(如，肝素、华法令钠、香豆素、双羟香豆素)，和/或含有或不含抗微生物剂(如， β -巯基乙醇(0.1 mM)；抗生素如链霉素(如 40-100 μ g/ml)、青霉素(如 40 U/ml)、两性霉素 B (如 0.5 μ g/ml))。在一实施方案中，将分离的胎盘维持或培养一段时间而不收集灌洗液，从而胎盘在灌洗和收集灌洗液前，维持或培养 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 个小时，或者 2 或 3 或更多天。灌洗的胎盘可以维持例如，1、2、3、4、5、6、7、

8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或更多个小时，从而再进行一次或多次灌洗，并用例如 700-800 mL 灌洗液灌洗第二次。胎盘可以灌洗 1、2、3、4、5 或更多次，例如每 1、2、3、4、5 或 6 小时一次。在优选的实施方案中，胎盘的灌洗和灌洗液如干细胞收集组合物的收集，重复进行，直至回收的有核细胞数低于 100 细胞/ml。不同时间点的灌洗液可以进一步单独处理以回收时间依赖性的细胞群，如干细胞。不同时间点的灌洗液也可以汇集在一起。

不希望受制于任何理论，在放血并灌洗胎盘足够长时间后，认为胎盘干细胞迁移到经放血和灌洗的胎盘的微循环中，根据本发明描述的方法，收集干细胞，优选通过灌洗冲洗到收集器皿中。灌洗分离的胎盘不仅用来去除残留的脐带血，而且为胎盘提供了合适的营养，包括氧气。胎盘可以采用用于去除残留脐带血细胞的相似溶液来培养和灌洗，所述溶液优选不添加抗凝剂。

根据本发明描述方法的灌洗通常导致收集的胎盘干细胞显著多于未用所述溶液灌洗，或者未经其它处理(例如，通过组织破坏如酶促消化)来获得干细胞的哺乳动物胎盘中可获得的数量。在此上下文中，“显著多于”表示多至少 10%。如本发明描述的灌洗产生的胎盘干细胞显著多于例如，从用以培养胎盘或其部分的培养基中可获得的胎盘干细胞数量。

通过用包含一种或多种蛋白酶或其它组织破裂酶的溶液灌洗，可以从胎盘中分离干细胞。在具体实施方案中，使胎盘或其部分(例如，羊膜、羊膜和绒毛膜、胎盘小叶或绒毛小叶、脐带或任何上述的组合)达到 25-37°C，并在 200 mL 培养基中与一种或多种组织破裂酶孵育 30 分钟。收集灌洗液中的细胞，降至 4°C，并用包含 5 mM EDTA、2 mM 二硫苏糖醇和 2 mM β -

巯基乙醇的冷却抑制剂混合物洗涤。数分钟后,用冷却的(如 4℃)干细胞收集组合物来洗涤干细胞。

可以理解,利用淘洗法(pan method)(其中在灌洗液从胎盘的母体侧渗出后收集之)灌洗获得的是胎儿和母体细胞的混合物。结果,通过该方法收集的细胞包含混合的胎儿和母体来源的胎盘干细胞群。相反,仅通过胎盘脉管系统灌洗,其中灌洗液流经一根或两根胎盘血管,并仅通过剩余的血管收集,导致收集的胎盘干细胞群几乎都是胎儿来源的。

5.4.5 胎盘干细胞的分离、分选和表征

来源于哺乳动物胎盘的干细胞,不论是由灌洗还是酶促消化所获得的,均可以通过 Ficoll (聚蔗糖)梯度离心从其它细胞中初步纯化(即分离)。此类离心可以遵循任何标准离心方法的速度等。例如,在一实施方案中,从胎盘收集的细胞是通过在 5000×g 室温离心 15 分钟从灌洗液中回收的,这使得细胞与例如污染的碎片和血小板分离开。在另一实施方案中,胎盘灌洗液被浓缩至约 200 ml,轻轻地铺在 Ficoll 上,在 22℃ 以约 1100×g 离心 20 分钟,收集低密度的细胞中间层用于进一步处理。

细胞沉淀可重悬于新鲜的干细胞收集组合物中,或适合干细胞维持的培养基中,例如含 2 U/ml 肝素和 2 mM EDTA 的 IMDM 无血清培养基(GibcoBRL, NY)。可以例如利用 LYMPHOPREP™ (Nycomed Pharma, Oslo, 挪威),按照生产商的推荐方法来分离总单核细胞级分。

如本发明中使用的,“分离”的胎盘干细胞是指除去至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或 99%的在完整哺乳动物胎盘

中通常与干细胞相伴的细胞。当来源于器官的干细胞存在的细胞群中包含少于 50%的在完整器官内正常与干细胞相伴的细胞时，它就是“分离的”。

通过灌洗或消化获得的胎盘细胞可以例如采用例如具有 0.2% EDTA 的 0.05%胰蛋白酶溶液(Sigma, St. Louis MO)通过差异胰酶消化来进一步或初步地分离。由于胎盘干细胞一般在约 5 分钟内从塑料表面脱离，而其它的贴壁群一般要求 20-30 分钟以上的孵育，因此差异胰酶消化是可能的。在胰酶消化和利用例如胰蛋白酶中和溶液(TNS, Cambrex)的胰蛋白酶中和反应后，可以收获脱离的胎盘干细胞。在分离贴壁细胞的一实施方案中，将等份试样如 $5-10 \times 10^6$ 个细胞置于每个 T-75 瓶中，优选纤粘连蛋白包被的 T75 瓶中。在这样的实施方案中，细胞可以用商购的间充质干细胞生长培养基(MSCGM™)(Cambrex), 并置于组织培养箱(37°C , $5\%\text{CO}_2$)中来培养。在 10-15 天后，经用 PBS 洗涤从瓶中去除非贴壁细胞。然后用 MSCGM™替代 PBS。优选每天检查培养瓶中各种贴壁细胞类型的存在，特别是鉴定和扩增成纤维细胞样细胞簇。

可以监测从哺乳动物胎盘收集的细胞数量和类型，例如通过利用标准的细胞检测技术，如流式细胞仪、细胞分选、免疫细胞化学(例如，用组织特异性或细胞标志特异性抗体染色)、荧光激活细胞分选(FACS)、磁激活细胞分选(MACS)来测量形态学和细胞表面标记的改变；通过利用光学或共聚焦显微镜来研究细胞形态学；和/或利用本领域公知的技术，例如 PCR 和基因表达谱来测量基因表达的改变。这些技术也可用于鉴定对于一种或多种特定标记呈阳性的细胞。例如，利用 CD34 的抗体，利用上述技术，人们可以确定细胞是否含有可检测量的 CD34；如果是，则细胞是 CD34^+ 的。同样，如果细胞产生足够的 RT-PCR 可检测的 OCT-4 RNA，或者显著多于成体细

胞的 OCT-4 RNA, 则该细胞是 OCT-4⁺的。细胞表面标记(例如 CD 标记如 CD34)的抗体, 以及干细胞特异性基因例如 OCT-4 的序列, 都是本领域熟知的。

胎盘细胞, 特别是已经过 Ficoll 分离、差异贴壁, 或两者的结合所分离的细胞可以利用荧光激活细胞分选仪(FACS)来分选。荧光激活细胞分选(FACS)是基于颗粒的荧光性质用于分离颗粒(包括细胞)的熟知方法(Kamarch, 1987, *Methods Enzymol*, 151:150-165)。单个颗粒中荧光部分的激光激发产生微小的电荷, 从而允许混合物中正电和负电颗粒的电磁分离。在一实施方案中, 用不同的荧光标记来标记细胞表面标记特异性抗体或配体。细胞经过细胞分选仪处理, 从而允许基于其与所用抗体的结合能力来分离细胞。FACS 分选的颗粒可以直接置入 96 孔或 384 孔板的单个孔中, 从而便于分离和克隆。

在一个分选技术策略中, 来自胎盘的干细胞基于标记 CD34、CD38、CD44、CD45、CD73、CD105、CD117、CD200、OCT-4 和/或 HLA-G 的表达进行分选。这可以通过结合基于细胞在培养中的贴壁属性来选择干细胞的步骤实现。例如, 可以在基于标记表达的分选之前或之后实现贴壁选择干细胞。例如, 在一实施方案中, 细胞首先基于其 CD34 的表达进行分选; 保留 CD34⁺细胞, 并将 CD200⁺HLA-G⁺的细胞与所有其它 CD34⁺细胞分离。在另一实施方案中, 来自胎盘的细胞基于其 CD200 和/或 HLA-G 标记的表达进行分选; 例如, 分离展示任一这些标记的细胞以供进一步使用。在具体实施方案中, 表达例如 CD200 和/或 HLA-G 的细胞可以基于其 CD73 和/或 CD105 的表达, 或抗体 SH2、SH3 或 SH4 所识别的表位, 或缺少 CD34、CD38 或 CD45 的表达而进行进一步的分选。例如, 在一实施方案中, 胎盘

细胞通过 CD200、HLA-G、CD73、CD105、CD34、CD38 和 CD45 的表达或缺少进行分选，并将 CD200⁺、HLA-G⁺、CD73⁺、CD105⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的细胞与其它胎盘细胞分离，供进一步使用。

就抗体介导的胎盘干细胞检测和分选而言，可以使用特异于特定标记的任何抗体，与适用于检测和分选细胞的任何荧光团或其它标记(如荧光激活细胞分选)组合使用。针对特定标记的抗体/荧光团组合包括但不限于：异硫氰酸荧光素(FITC)缀合的抗 HLA-G (可购自 Serotec, Raleigh, North Carolina)、CD10 (可购自 BD Immunocytometry Systems, San Jose, California)、CD44 (可购自 BD Biosciences Pharmingen, San Jose, California)和 CD 105 (可购自 R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota)的单克隆抗体；藻红蛋白(PE)缀合的抗 CD44、CD200、CD117 和 CD13 的单克隆抗体(BD Biosciences Pharmingen)；藻红蛋白-Cy7 (PE Cy7)缀合的抗 CD33 和 CD10 的单克隆抗体(BD Biosciences)；别藻蓝蛋白(APC)缀合的链霉亲和素和抗 CD38 的单克隆抗体(BD Biosciences Pharmingen)；和生物素化的 CD90 (BD Biosciences Pharmingen)。可以使用的其它抗体包括但不限于：CD133-APC (Miltenyi)、KDR-生物素(CD309, Abcam)、细胞角蛋白 K-Fitc (Sigma 或 Dako)、HLA ABC-Fitc (BD)、HLA DRDQDP-PE (BD)、β-2-微球蛋白-PE (BD)、CD80-PE (BD)和 CD86-APC (BD)。

可以使用的其它抗体/标记组合包括但不限于：CD45-PerCP (藻多甲素叶绿素蛋白(peridin chlorophyll protein))；CD44-PE；CD 19-PE；CD10-F (荧光素)；HLA-G-F 和 7-氨基-放线菌素 D (7-AAD)；HLA-ABC-F 等等。

胎盘干细胞可以利用例如藻红蛋白-Cy5 (PE Cy5)缀合的链霉亲和素和生物素缀合的抗 CD117 或 CD 133 的单克隆抗体来测定 CD117 或 CD 133；

然而,利用此系统,细胞可以分别地表现为 CD117 或 CD133 阳性,这是因为相对高的背景所致。

胎盘干细胞可以用针对单一标记的抗体进行标记、检测和/或分选。胎盘干细胞还可以用针对不同标记的多个抗体同时进行标记。

在另一实施方案中,可以使用磁珠来分离细胞。可以利用磁激活细胞分选(MACS)技术,一种基于颗粒结合磁珠(直径 0.5-100 μm)的能力进行颗粒分离的方法来分选细胞。对磁微球体可以进行多种有用的修饰,包括共价添加特异性识别特定细胞表面分子或半抗原的抗体。磁珠随后与细胞混合,从而允许结合。然后使细胞通过磁场,以分离出具有特定细胞表面标记的细胞。在一实施方案中,这些细胞可随后分离,并与偶联了抗其它细胞表面标记的抗体的磁珠再混合。细胞再次通过磁场,分离与两种抗体均结合的细胞。然后将此类细胞稀释到不同的器皿中,例如微滴培养皿中用于克隆分离。

胎盘干细胞还可以基于细胞形态学和生长特征来表征和/或分选。例如,胎盘干细胞可以表征为在培养中具有成纤维细胞样外观,和/或基于成纤维细胞样外观来选择。胎盘干细胞还可以表征为具有形成胚样体的能力,和/或基于其形成胚样体的能力来选择。在一实施方案中,例如,将形状为成纤维细胞样,表达 CD73 和 CD105,并在培养中产生一个或多个胚样体的胎盘细胞与其它胎盘细胞分离。在另一实施方案中,将培养中产生一个或多个胚样体的 OCT-4⁺胎盘细胞与其它胎盘细胞分离。

在另一实施方案中,胎盘干细胞可以通过集落形成单位试验来鉴定和表征。集落形成单位试验是本领域普遍公知的,例如 MESENCULT[®]培养基(Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver British Columbia)。

利用本领域已知的标准技术,例如台盼蓝排除测定、荧光素二乙酸酯摄取测定、碘化丙锭摄取测定(评估活力);和胸苷摄取测定、MTT 细胞增殖测定(ATCC; 评估增殖)来评估胎盘干细胞的活力、增殖潜力和寿命。寿命可以通过本领域熟知的方法确定,例如通过延长培养中群倍增的最大数来确定。

利用本领域已知的其它技术也可以将胎盘干细胞与其它胎盘细胞分离开,例如,期望细胞的选择性生长(阳性选择),不需要细胞的选择性破坏(阴性选择);基于混合群中差异细胞可凝集性的分离,例如采用大豆凝聚素;冻融方法;过滤;常规离心和区带离心;离心淘析(逆流离心);单位重力分离;逆流分配;电泳等等。

5.5 胎盘干细胞的培养

5.5.1 培养基

分离的胎盘干细胞,或胎盘干细胞群,或从其中长出胎盘干细胞的细胞或胎盘组织,可用于起始或接种细胞培养物。细胞一般转移到无菌的组织培养容器内,所述容器使用或未使用胞外基质或配体如层粘连蛋白、胶原(如:天然的或变性的)、明胶、纤粘连蛋白、鸟氨酸、玻连蛋白、和胞外膜蛋白(例如: MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.))包被。

可以在本领域公认为适合干细胞培养的任何培养基和任何条件下培养胎盘干细胞。优选培养基含有血清。胎盘干细胞可以培养在例如:DMEM-LG (Dulbecco 改良的必需培养基,低糖)/MCDB 201 (鸡成纤维细胞基础培养基),其含有 ITS (胰岛素-转铁蛋白-硒)、LA+BSA (亚油酸-牛血清白蛋白)、右旋糖、L-抗坏血酸、PDGF、EGF、IGF-1 和青霉素/链霉素;含有 10%胎

牛血清(FBS)的 DMEM-HG (高糖); 含有 15% FBS 的 DMEM-HG; 含有 10% FBS、10%马血清和氢化可的松的 IMDM (Iscove 改良的 Dulbecco 培养基); 含有 10% FBS、EGF 和肝素的 M199; 含有 10% FBS、GLUTAMAX™ 和庆大霉素的 α -MEM (最低必需培养基); 含有 10% FBS、GLUTAMAX™ 和庆大霉素等的 DMEM。优选的培养基是含有 2% FBS、ITS、LA+BSA、右旋糖、L-抗坏血酸、PDGF、EGF 和青霉素/链霉素的 DMEM-LG/MCDB-201。

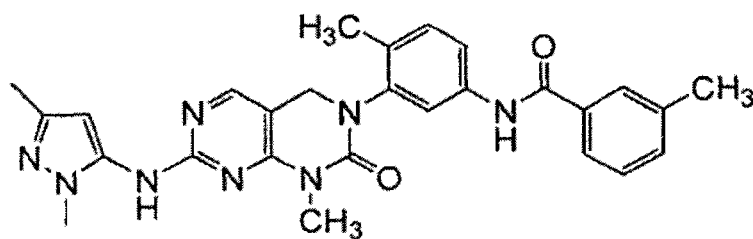
可用于培养胎盘干细胞的其它培养基包括 DMEM (高糖或低糖)、Eagle 基础培养基、Ham 氏 F10 培养基(F10)、Ham 氏 F-12 培养基(F12)、Iscove 改良的 Dulbecco 培养基、间充质干细胞生长培养基(MSCGM)、Liebovitz 氏 L-15 培养基、MCDB、DMEM/F12、RPMI 1640、改进的 DMEM (Gibco)、DMEM/MCDB201 (Sigma)和 CELLGRO FREE™。

培养基可以添加一种或多种组分, 包括例如: 血清(如: 胎牛血清(FBS), 优选约 2-15% (v/v); 马血清(ES); 人血清(HS)); β -巯基乙醇(BME), 优选约 0.001% (v/v); 一种或多种生长因子, 例如, 血小板衍生生长因子(PDGF)、表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、白血病抑制因子(LIF)、血管内皮生长因子(VEGF)、和促红细胞生成素(EPO); 氨基酸, 包括 L-缬氨酸; 用于控制微生物污染的一种或多种抗生素和/或抗真菌剂, 例如青霉素 G、硫酸链霉素、两性霉素 B、庆大霉素和制霉菌素, 单独或组合使用; 以及一种或多种神经外胚层指定因子, 例如音猬因子(shh)和/或视黄酸(ra)。

胎盘干细胞可以在标准组织培养条件下培养, 例如在组织培养皿或多孔板中培养。胎盘干细胞还可以利用悬滴法培养。在此方法中, 胎盘干细胞以大约 1×10^4 细胞/mL 悬浮于大约 5 mL 培养基中, 且将一滴或多滴培养

基置于组织培养容器如 100 mL 皮氏培养皿的盖子里面。悬滴可以是例如单个的悬滴，或者是来自例如多通道移液管的多个悬滴。将盖子小心地倒置在皿底之上，皿底上含有一定量的液体，例如足以维持皿中大气水分的无菌 PBS，并培养干细胞。

在一实施方案中，胎盘干细胞在起维持胎盘干细胞未分化表型作用的化合物的存在下培养。在具体实施方案中，化合物为取代的 3,4-二氢吡啶醇 [4,5-d]嘧啶(3,4-dihydropyridimol[4,5-d]pyrimidine)。在更具体的实施方案中，化合物为具有如下化学结构的化合物：



化合物可以例如大约 1 μM 至大约 10 μM 的浓度与胎盘干细胞或胎盘干细胞群接触。

5.5.2 胎盘干细胞的扩增和增殖

分离的胎盘干细胞或分离的干细胞群(例如，与至少 50% 的在体内通常与干细胞或干细胞群相伴的胎盘细胞分离的干细胞或干细胞群)一旦分离，就可以在体外增殖或扩增所述干细胞或干细胞群。例如，可以在组织培养容器(例如皿、瓶、多孔板等)中培养胎盘干细胞群，培养时间足以使干细胞增殖至 70-90% 汇合度，即，直到干细胞及其后代占据组织培养容器 70-90% 的培养表面区域。

胎盘干细胞可以允许细胞生长的密度接种在培养容器内。例如，细胞可以以低密度(例如约 1,000 至约 5,000 细胞/ cm^2)至高密度(例如约 50,000 或

更多细胞/cm²)接种。在优选的实施方案中,在约0%至约5%体积CO₂的空气中培养细胞。在一些优选的实施方案中,在约2%至约25%体积O₂的空气中培养细胞,优选在约5%至约20%体积O₂的空气中培养。细胞优选在约25℃至约40℃,优选37℃培养。细胞优选在培养箱中培养。培养基可以是静态的或搅动的,例如,利用生物反应器。胎盘干细胞优选生长在低氧化压力下(例如,添加谷胱甘肽、抗坏血酸、过氧化氢酶、生育酚、N-乙酰半胱氨酸等)。

一旦获得70%-90%汇合度,细胞就可以传代。例如,细胞可以利用本领域熟知的技术进行酶促处理,例如胰蛋白酶消化,从而将其与组织培养表面分离。在通过移取细胞和计数细胞后,将约20,000-100,000个干细胞,优选约50,000个干细胞传代到含有新鲜培养基的新培养容器内。一般地,新培养基与从中移取干细胞的培养基是相同类型的培养基。本发明还提供了已经传代至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18或20次或更多次的胎盘干细胞群。

5.5.3 胎盘干细胞群

一方面,利用胎盘干细胞和胎盘干细胞群作为分化细胞,例如肝细胞和/或肝原性细胞,或者软骨细胞和/或软骨原性细胞的来源。胎盘干细胞群可以直接分离自一个或多个胎盘;即,胎盘干细胞群可以是包含胎盘干细胞的胎盘细胞群,所述胚胎干细胞获自或包含于灌洗液,或者获自或包含于消化物(即,通过酶促消化胎盘或其部分所获得的细胞收集物)。还可以培养和扩增本发明描述的分离的胎盘干细胞来产生胎盘干细胞群。还可以培养和扩增包含胎盘干细胞的胎盘细胞群来产生胎盘干细胞群。

本发明提供的胎盘干细胞群包含胎盘干细胞，例如本发明描述的胎盘干细胞。在多个实施方案中，分离的胎盘干细胞群中至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或 99%的细胞是胎盘干细胞。即，胎盘干细胞群可以包含例如至多 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的非干细胞。

本发明还提供了生产分离的胎盘干细胞群的方法，通过例如选择源于酶促消化的或灌洗的、表达特定标记和/或特定培养或形态学特征的胎盘干细胞来生产。这样的胎盘干细胞可用于生产例如肝细胞和/或肝原性细胞，或未分化的胎盘干细胞和由胎盘干细胞分化而来的肝原性细胞和/或肝细胞的混合群；或软骨细胞和/或软骨原性细胞，或未分化的胎盘干细胞和软骨细胞和/或软骨原性细胞的混合群。

包含胎盘干细胞的细胞群可由多种不同的方法产生。例如，在一实施方案中，包含胎盘干细胞的细胞群可以通过如下步骤产生：选择胎盘细胞，所述胎盘细胞(a)贴壁于基质，和(b)表达 CD200 和 HLA-G；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中，生产细胞群的方法包括选择胎盘细胞，其中所述胎盘细胞(a)贴壁于基质，和(b)表达 CD73、CD105 和 CD200；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中，生产细胞群的方法包括选择胎盘细胞，其中所述胎盘细胞(a)贴壁于基质，和(b)表达 CD200 和 OCT-4；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中，生产细胞群的方法包括选择胎盘细胞，其中所述胎盘细胞(a)贴壁于基质，(b)表达 CD73 和 CD105，和(c)当包含所述干细胞的胎盘细胞群在允许胚样体形成的条件下培养时，有助于在所述群中形成一个或多个胚样体；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一

实施方案中，生产细胞群的方法包括选择胎盘细胞，其中所述胎盘细胞(a)贴壁于基质，和(b)表达 CD73、CD105 和 HLA-G；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中，生产细胞群的方法包括选择胎盘细胞，其中所述胎盘细胞(a)贴壁于基质；(b)表达 OCT-4，和(c)当包含所述干细胞的胎盘细胞群在允许胚样体形成的条件下培养时，有助于在所述群中形成一个或多个胚样体；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在任何上述实施方案中，所述方法可以另外包括选择表达 ABC-p (一种胎盘特异性 ABC 转运蛋白；参见例如 Allikmets 等, *Cancer Res.* 58(23):5337-9 (1998))的胎盘细胞。所述方法还可以包括选择呈现特异于例如间充质干细胞的至少一种特征的细胞，例如表达 CD29，表达 CD44，表达 CD90，或表达前述的组合。

在任何上述生产细胞群的实施方案中，所产生的细胞群还可以另外评估所述细胞或细胞群生产肝细胞、肝源性细胞、软骨细胞或软骨源性细胞的能力。

在上述实施方案中，基质可以是能实现细胞例如胎盘干细胞的培养和/或选择的任何表面。一般地，基质是塑料，例如组织培养皿或多孔板塑料。组织培养塑料可以用生物分子例如层粘连蛋白或纤粘连蛋白包被。

可以采用细胞选择领域中的任何已知的方法来选择细胞例如胎盘干细胞用于胎盘干细胞群。例如，可以利用抗一种或多种细胞表面标记的一种或多种抗体选择细胞，例如，在流式细胞仪或 FACS 中。利用与磁珠连接的抗体可以实现选择。特异性于某些干细胞相关标记的抗体是本领域已知的。例如，抗 OCT-4 抗体(Abcam, Cambridge, MA)、CD200 抗体(Abcam)、HLA-G 抗体(Abcam)、CD73 抗体(BD Biosciences Pharmingen, San Diego,

CA)、CD105 抗体(Abcam; BioDesign International, Saco, ME)等。其它标记的抗体也是可商购的,例如:可以从如 StemCell Technologies 或 BioDesign International 获得的 CD34、CD38 和 CD45 抗体。

分离的胎盘干细胞群可以包括非干细胞的胎盘细胞,或者非胎盘细胞的细胞。

分离的胎盘干细胞群可以与一个或多个非干细胞群或非胎盘细胞群组合。例如,分离的胎盘干细胞群可以与血液(例如胎盘血或脐带血)、血液来源的干细胞(例如来源于胎盘血或脐带血的干细胞)、血液来源的有核细胞群、骨髓来源的间充质干细胞、骨来源的干细胞群、原始骨髓、成人(体)干细胞、包含在组织内的干细胞群、培养的干细胞、完全分化的细胞群(例如软骨细胞、成纤维细胞、羊膜细胞、成骨细胞、肌肉细胞、心脏细胞等)等相组合。相比各群中的总有核细胞数,分离的胎盘干细胞群中的细胞可以如下比率与多种另一类型的细胞组合:大约 100,000,000:1、50,000,000:1、20,000,000:1、10,000,000:1、5,000,000:1、2,000,000:1、1,000,000:1、500,000:1、200,000:1、100,000:1、50,000:1、20,000:1、10,000:1、5,000:1、2,000:1、1,000:1、500:1、200:1、100:1、50:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1,000; 1:2,000; 1:5,000; 1:10,000; 1:20,000; 1:50,000; 1:100,000; 1:500,000; 1:1,000,000; 1:2,000,000; 1:5,000,000; 1:10,000,000; 1:20,000,000; 1:50,000,000 或大约 1:100,000,000。在分离的胎盘干细胞群中的细胞也可以与多种细胞类型的多种细胞组合。

在一实施方案中,分离的胎盘干细胞群与多种造血干细胞组合。这类造血干细胞可以是例如,包含在未处理的胎盘、脐带血或外周血中;在来自胎盘血、脐带血或外周血的总有核细胞中;在来自胎盘血、脐带血或外

周血的分离的 CD34⁺细胞群中；在未处理的骨髓中；在来自骨髓的总有核细胞中；在来自骨髓的分离的 CD34⁺细胞群中；等等。

就本发明提供的组合物和方法而言，可以使用的其它胎盘干细胞和胎盘干细胞群描述在例如美国专利申请号 11/648,813 和美国临时申请号 60/846,641 中，其中每一篇都在此通过引用并入本文。

5.5.4 诱导分化为肝性细胞

胎盘干细胞分化为肝性细胞可以例如通过将胎盘干细胞置于诱导分化为肝性细胞的细胞培养条件下来实现。在具体实施方案中，胎盘干细胞与丁酸钠接触足以使胎盘干细胞呈现肝细胞或肝原性细胞的一种或多种特征的时间。

示例性的肝原性细胞培养基包括添加丁酸钠的 DMEM。细胞培养例如 14-28 天，每 3-4 天重新补料一次。分化可以通过测定，例如细胞角蛋白 18 产量的增加(相对于未分化的胎盘干细胞)来证实。一般地，胎盘干细胞表达细胞角蛋白 18，但是不表达肝细胞所表达的至少一种其它细胞角蛋白。分化还可以通过唾液酸糖蛋白受体、 α -1-抗胰蛋白酶、白蛋白和细胞色素 P450 活性中一种或多种的存在来确认。当细胞展示一种或多种这些特征时即认为胎盘干细胞已经分化为肝性细胞。

一方面，本发明提供了生产和分离肝细胞群和/或肝原性细胞群的方法，通过例如选择源于酶促消化的或灌洗的、表达特定标记和/或特定培养或形态学特征的多种胎盘干细胞，并使这样的细胞与导致至少一些所述胎盘干细胞分化为肝细胞和/或肝原性细胞的条件接触而实现。在一实施方案中，例如，本发明提供了生产肝细胞和/或肝原性细胞的方法，包括(1)选择胎盘

细胞, 其中所述胎盘细胞(a)贴壁于基质; 和(b)表达 CD200 和 HLA-G, 或表达 CD73、CD105 和 CD200, 或表达 CD200 和 OCT-4, 或表达 CD73、CD105 和 HLA-G, 或表达 CD73 和 CD105, 且当包含所述干细胞的胎盘细胞群在允许胚样体形成的条件下培养时, 有助于在所述群中形成一个或多个胚样体; 或表达 OCT-4; 和(c)当包含所述干细胞的胎盘细胞群在允许胚样体形成的条件下培养时, 有助于在所述群中形成一个或多个胚样体; (2) 从其它胎盘细胞中分离所述胎盘细胞; 并使所述细胞与丁酸钠接触足以产生可检测量的所述肝细胞和/或肝原性细胞的时间。在具体实施方案中, 胎盘干细胞为 CD10⁺、CD34⁻、CD105⁺和 CD200⁺。

在上述方法的多个具体实施方案中, 至少或大约 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 98%的所述胎盘干细胞分化为所述肝细胞和/或肝原性细胞。在所述方法的任何上述实施方案的另一具体实施方案中, 所述胎盘细胞与丁酸钠接触足以使多种所述细胞相对于未分化的胎盘干细胞呈现可检测的细胞角蛋白 18 产量增加、可检测量的唾液酸糖蛋白受体、或可检测量的细胞色素 P450 7A1 活性、可检测量的白蛋白、或可检测量的白蛋白编码基因的表达的时间。

5.5.5 诱导分化为软骨性细胞

贴壁胎盘干细胞的软骨原性分化可以例如通过将胎盘干细胞置于诱导分化为软骨细胞的细胞培养条件下实现。优选的软骨性培养基包括 MSCGM (Cambrex)或 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM), 添加 15%脐带血清。在一实施方案中, 将胎盘干细胞等分到无菌聚丙烯管中, 离心(例如在 150×g

离心 5 分钟), 并在不完全软骨发生培养基(Cambrex)中洗涤两次。将细胞以大约 $1-20 \times 10^5$ 细胞/ml 的浓度重悬于含 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 转化生长因子 β -3 (TGF- β 3)的完全软骨发生培养基(Cambrex)中。在其它实施方案中, 胎盘干细胞与外源生长因子例如 GDF-5 或 TGF- β 3 接触, 加或不加抗坏血酸。

软骨发生培养基的另一实例包括 DMEM、1% FBS、胰岛素、抗坏血酸 2-磷酸酯和 TGF- β 1。1L 相似的软骨发生培养基包括 DMEM、1% FBS、1% 青霉素-链霉素、37.5 $\mu\text{g/ml}$ 抗坏血酸 2-磷酸酯、ITS 预混物(包括例如 100 mg 胰岛素、100 mg 转铁蛋白和 100 μg 硒酸钠)和 10 ng/ml TGF-1。软骨发生培养基的另一实例为限定培养基(适合于哺乳动物细胞培养的任何标准限定培养基), 包括 100 nM 地塞米松和 10 ng/ml 转化生长因子- β 3 (TGF- β 3)。

软骨发生培养基可以添加氨基酸, 包括脯氨酸和谷氨酰胺, 丁酸钠, 地塞米松、抗坏血酸和胰岛素/转铁蛋白/硒。软骨发生培养基可以添加氢氧化钠和/或胶原。

贴壁胎盘干细胞可以高密度或低密度培养。细胞优选在不存在血清时培养。胎盘干细胞可以在软骨发生条件下静态或动态培养, 例如在培养基围绕细胞循环的条件下培养。可以继续细胞培养以发生可检测量的分化。在具体实施方案中, 贴壁胎盘干细胞在软骨发生条件下培养约 28 天至约 56 天。

通过将贴壁胎盘干细胞接种到电镀非织微纤维或纳米纤维毡上, 并在软骨发生条件下培养细胞, 可以诱导其分化为软骨细胞或软骨性细胞。这样的毡及其生产描述在本发明 5.7.1.4 节。

可以通过例如观察嗜曙红背景物质的产生, 针对葡胺聚糖表达的番红精-O 染色; 确定葡胺聚糖表达的亚甲基蓝染色结合; 评估细胞形态学的苏

木精/曙红染色；和/或胶原 2 和胶原 9 基因表达的 RT/PCR 确认或染色，来评估软骨发生。软骨发生还可以通过培养干细胞团块来观察，所述团块通过例如温和离心悬液中的干细胞(例如以大约 800 g 离心大约 5 分钟)形成。在大约 1-28 天之后，干细胞团块开始形成坚硬的基质并表现出结构整体性，这未见于未诱导的或非软骨原性细胞系，这类团块在刺激时倾向于散开。软骨发生还可以，例如在这样的细胞团块中通过用染色胶原的着色剂，例如天狼星红和/或染色葡胺聚糖(GAG)的着色剂，例如阿尔新蓝(也称为阿利新兰 8GX，纱染蓝 1 或 C.I. 74240)染色而证明。当细胞展示一种或多种这些特征时即认为胎盘干细胞已经分化为软骨细胞。软骨发生还可以例如通过实时 PCR，通过测定早期软骨发生标记纤调蛋白和软骨寡聚基质蛋白的基因表达；中期软骨发生标记聚集蛋白聚糖(aggrecan)、多功能蛋白聚糖(versican)、核心蛋白聚糖(decorin)和双链蛋白聚糖(biglycan)的基因表达；以及成熟软骨细胞标记 II 型和 X 型胶原以及软骨粘附素(chondroadherein)的基因表达来评估。

5.6 胎盘干细胞的保存

胎盘干细胞和由之分化的细胞如肝细胞和/或肝原性细胞、软骨细胞和/或软骨性细胞可以保存，即置于允许长期储存的条件下，或置于抑制例如凋亡或坏死所致的细胞死亡的条件下。

如 2006 年 12 月 28 日提交的名为“用于收集胎盘干细胞和保存器官的改良组合物(Improved Composition for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs)”的相关美国申请号 11/648,812 中所述，可以利用例如包含凋亡抑制剂、坏死抑制剂和/或携氧全氟化碳的组合物来保存胎盘干细胞

和由之分化的细胞如肝细胞和/或肝原性细胞、软骨细胞和/或软骨性细胞。

在一实施方案中，本发明提供了保存细胞群的方法，例如胎盘干细胞，和/或由之分化的肝细胞和/或肝原性细胞，和/或软骨细胞和/或软骨性细胞，包括将所述细胞与含有凋亡抑制剂和携氧全氟化碳的干细胞收集组合物相接触，其中与未接触凋亡抑制剂的干细胞群相比，所述凋亡抑制剂存在的量和时间足以降低或防止干细胞群中的凋亡。在具体实施方案中，所述凋亡抑制剂是半胱天冬酶抑制剂；在另一具体实施方案中，所述凋亡抑制剂是 JNK 抑制剂。在更具体的实施方案中，所述 JNK 抑制剂并不调节所述干细胞的分化或增殖。在另一实施方案中，所述干细胞收集组合物包含所述凋亡抑制剂和处于分离的相中的所述携氧全氟化碳。在另一实施方案中，所述干细胞收集组合物包含所述凋亡抑制剂和处于乳液中的所述携氧全氟化碳。在另一实施方案中，所述干细胞收集组合物另外还包含乳化剂，例如卵磷脂。在另一实施方案中，在接触细胞时，所述凋亡抑制剂和所述全氟化碳处于约 0°C 和约 25°C 之间。在另一更具体的实施方案中，在接触细胞时，所述凋亡抑制剂和所述全氟化碳处于约 2°C 和约 10°C 之间，或约 2°C 和约 5°C 之间。在另一更具体的实施方案中，所述接触是在运输所述干细胞群的过程中实施的。在另一更具体的实施方案中，所述接触是在冷冻和融化所述干细胞群的过程中实施的。

在另一实施方案中，本发明提供了保存胎盘干细胞群和/或由之分化的细胞如肝细胞和/或肝原性细胞、软骨细胞和/或软骨性细胞的方法，包括将所述细胞群与凋亡抑制剂和器官防腐化合物相接触，其中与未接触凋亡抑制剂的细胞群相比，所述凋亡抑制剂存在的量和时间足以降低或防止细胞群中的凋亡。在具体实施方案中，器官防腐化合物是 UW 溶液(描述于美国

专利号 4,798,824 中;也称为 VIASPAN[®];还参见 Southard 等,*Transplantation* 49(2):251-257(1990))或是 Stern 等的美国专利号 5,552,267 中描述的溶液。在另一实施方案中,所述器官防腐化合物是羟乙基淀粉、乳糖酸(lactobionic acid)、棉子糖,或其组合。在另一实施方案中,干细胞收集组合物另外还包含处于两相或作为乳液的携氧全氟化碳。

在所述方法的另一实施方案中,胎盘干细胞在灌洗过程中与包含凋亡抑制剂和携氧全氟化碳、器官防腐化合物、或其组合的干细胞收集组合物相接触。在另一实施方案中,所述细胞在组织破坏例如酶促消化过程中产生接触。在另一实施方案中,在通过灌洗收集后,或在通过组织破坏例如酶促消化收集后,胎盘干细胞与所述干细胞收集化合物相接触。

一般的,在胎盘细胞收集、富集和分离过程中,优选最小化或消除由于缺氧和机械应力导致的细胞应力。因此,在所述方法的另一实施方案中,干细胞或干细胞群在所述保存期间,在收集、富集或分离过程中,与低氧条件接触少于 6 个小时,其中所述低氧条件是氧浓度低于正常的血氧浓度。在更具体的实施方案中,所述干细胞群在所述保存期间与所述低氧条件接触少于 2 个小时。在另一更具体的实施方案中,所述干细胞群在收集、富集或分离过程中与所述低氧条件接触少于 1 个小时、或少于 30 分钟、或不接触低氧条件。在另一具体实施方案中,所述干细胞群在收集、富集或分离过程中不接触剪切应力。

在本发明提供的组合物和方法中所使用的胎盘干细胞可以低温保存,例如置于小容器如安瓿瓶中的低温保存培养基中。合适的低温保存培养基包括但不限于:包括例如生长培养基或细胞冷冻培养基,例如可商购的细胞冷冻培养基,例如 C2695、C2639 或 C6039 (Sigma)在内的培养基。低温

保存培养基优选包含 DMSO (二甲亚砜), 其浓度为例如约 10% (v/v)。低温保存培养基可以包含其它试剂, 例如甲基纤维素和/或甘油。在低温保存过程中, 胎盘干细胞优选以约 1°C/分钟冷却。优选的低温保存温度是约-80°C 至约-180°C, 优选约-125°C 至约-140°C。在解冻使用前, 低温保存的细胞可以转移到液氮中。在一些实施方案中, 例如, 一旦安瓿瓶达到约-90°C, 就将其转移至液氮储存区域。低温保存的细胞优选在约 25°C 至约 40°C 的温度, 优选在约 37°C 的温度解冻。

5.7 胎盘干细胞的用途

5.7.1 包含胎盘干细胞的组合物

本发明描述的方法可以使用包含胎盘干细胞或由之而来的生物分子的组合物。以相同的方式, 本发明的多种胎盘干细胞和胎盘干细胞群可以与任何生理学上可接受的或医学上可接受的化合物、组合物或装置相组合, 以用于例如研究或治疗。

5.7.1.1 低温保存的胎盘干细胞

本发明描述的胎盘干细胞群可以保存, 例如低温保存供后期使用。低温保存细胞如干细胞的方法是本领域公知的。胎盘干细胞群可以制备成易于向个体施用的形式。例如, 本发明提供了包含在适合医学用途的容器内的胎盘干细胞群。此类容器可以是例如, 无菌的塑料袋、瓶、罐, 或其它可以方便的从中分配胎盘干细胞群的容器。例如, 容器可以是适合将液体静脉施用至接受者的血袋或其它塑料的、医学上可接受的袋。容器优选是允许低温保存组合的干细胞群的容器。

低温保存的胎盘干细胞群可以包含来源于单个提供者或多个提供者的胎盘干细胞。胎盘干细胞群可以与目标接受者是完全 HLA 匹配的，或者部分 HLA 不匹配的、或完全 HLA 不匹配的。

低温保存的胎盘干细胞可以为例如处于容器中的包含胎盘干细胞群的组合物的形式。在具体实施方案中，干细胞群是低温保存的。在另一具体实施方案中，容器是袋、瓶或罐。在更具体的实施方案中，所述袋是无菌塑料袋。在更具体的实施方案中，所述袋适合、允许或有助于静脉施用所述胎盘干细胞群。所述袋可以包括相互连接的多个内腔或隔室，以允许在施用前或施用期间将胎盘干细胞与一种或多种其它溶液例如药物进行混合。在另一具体实施方案中，所述组合物包含有助于低温保存所述组合的干细胞群的一种或多种化合物。在另一具体实施方案中，所述胎盘干细胞群包含在生理学上可接受的水性溶液中。在更具体的实施方案中，所述生理学上可接受的水性溶液为 0.9% NaCl 溶液。在另一具体实施方案中，所述胎盘干细胞群包含与所述干细胞群的接受者 HLA 匹配的胎盘细胞。在另一具体实施方案中，所述组合的干细胞群包含与所述干细胞群的接受者至少部分 HLA 不匹配的胎盘细胞。在另一具体实施方案中，所述胎盘干细胞来源于多个提供者。

5.7.1.2 药物组合物

胎盘干细胞群或包含胎盘干细胞的细胞群可以配制成体内使用的药物组合物。此类药物组合物包含处于可药用载体(例如用于体内施用的盐溶液或其它生理学上可接受的溶液)中的胎盘干细胞群或包含胎盘干细胞的细胞群。本发明提供的包含胎盘干细胞的药物组合物可以包含本发明别处描述

的任何胎盘干细胞群或胎盘干细胞类型。所述药物组合物可以包含胎儿、母体、或同时包括胎儿和母体的胎盘干细胞。所述药物组合物还可以包含获自单个个体或单个胎盘或者获自多个个体或多个胎盘的胎盘干细胞。

所述药物组合物可以包含任何数量的胎盘干细胞。例如，在不同的实施方案中，单个单位剂量的胎盘干细胞可以包含大约、至少、或不超过 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多个胎盘干细胞。

所述药物组合物可以包含含有 50% 或更多活细胞的细胞群(即，群中至少 50% 的细胞是功能性的或活的)。优选群中至少 60% 的细胞是活的。更优选药物组合物的群中至少 70%、80%、90%、95% 或 99% 的细胞是活的。

本发明提供的药物组合物可以包含一种或多种例如有助于移植的化合物(例如抗 T 细胞受体、免疫抑制剂等等); 稳定剂如白蛋白、葡聚糖 40、明胶、羟乙基淀粉等等。

5.7.1.3 胎盘干细胞条件培养基

本发明提供的胎盘干细胞可用于生产条件培养基，即含有干细胞分泌或排出的一种或多种生物分子的培养基。在多个实施方案中，所述条件培养基包含在其中胎盘干细胞已经生长了至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或更多天的培养基。在其它实施方案中，所述条件培养基包含在其中胎盘干细胞已经生长达至少 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 汇合度，或高达 100% 汇合度的培养基。此类条件培养基可用于支持胎盘干细胞或其它类干细胞的独立群的培养。在另一实施方案中，所述条件培养基包含在其中的胎盘干细胞已经分化为成体细胞类型的培养

基。在另一实施方案中，条件培养基包含在其中已经培养了胎盘干细胞和非胎盘干细胞的培养基。

因而，在一实施方案中，本发明提供了包含来自贴壁胎盘干细胞培养物的培养基例如条件培养基的组合物，其中所述贴壁胎盘干细胞(a)贴壁于基质；(b)表达 CD200 和 HLA-G；或表达 CD73、CD105 和 CD200；或表达 CD200 和 OCT-4；或表达 CD73、CD105 和 HLA-G；或表达 CD73 和 CD105，且当包含胎盘干细胞的胎盘细胞群在允许胚样体形成的条件下培养时，有助于在所述群中形成一个或多个胚样体；或表达 OCT-4，且当包含胎盘干细胞的胎盘细胞群在允许胚样体形成的条件下培养时，有助于在所述群中形成一个或多个胚样体；其中所述胎盘干细胞培养物已经在所述培养基中培养 24 小时或以上。在具体实施方案中，所述组合物包含经 CD34⁺、CD45⁻胎盘干细胞条件化的培养基。在另一具体实施方案中，所述组合物还包含多种所述胎盘干细胞，例如多种贴壁胎盘干细胞和/或多种非贴壁 CD34⁺、CD45⁻胎盘干细胞。在另一具体实施方案中，所述组合物包含多种非胎盘细胞。在更具体的实施方案中，所述非胎盘细胞包含 CD34⁺细胞，例如由非胎盘来源得来的造血祖细胞，如外周血造血祖细胞，脐带血造血祖细胞，或胎盘血造血祖细胞。所述非胎盘细胞还可以包含其它干细胞，例如间充质干细胞，例如骨髓来源间充质干细胞。所述非胎盘细胞还可以是一种或多种类型的成体细胞或细胞系。在另一具体实施方案中，所述组合物包含抗增殖剂，例如，抗 MIP-1 α 抗体或抗 MIP-1 β 抗体。

在另一实施方案中，条件培养基是或包含经一群由胎盘干细胞分化而来的肝细胞、肝原性细胞、软骨细胞和/或软骨性细胞条件化的培养基。这样的群可以包含胎盘干细胞，由胎盘干细胞分化而来的肝原性细胞或软骨

原性细胞，由胎盘干细胞分化而来的肝细胞或软骨细胞，或前述的任意组合。因而，在一实施方案中，本发明提供了包含来自由胎盘干细胞分化而来的肝细胞、肝原性细胞、软骨细胞和/或软骨性细胞的培养物的培养基的组合物，其中所述胎盘干细胞(a)贴壁于基质；(b)表达 CD200 和 HLA-G；或表达 CD73、CD105 和 CD200；或表达 CD200 和 OCT-4；或表达 CD73、CD105 和 HLA-G；或表达 CD73 和 CD105，且当包含胎盘干细胞的胎盘细胞群在允许胚样体形成的条件下培养时，有助于在所述群中形成一个或多个胚样体；或表达 OCT-4，且当包含胎盘干细胞的胎盘细胞群在允许胚样体形成的条件下培养时，有助于在所述群中形成一个或多个胚样体；其中所述肝细胞、肝原性细胞、软骨细胞和/或软骨性细胞的培养物已经在所述培养基中培养 24 小时或以上。在具体实施方案中，所述组合物还包含多种所述胎盘干细胞。在另一具体实施方案中，所述组合物包含多种非胎盘细胞，例如来自原代培养物的肝细胞；肝细胞系细胞；肝细胞瘤细胞等等。在更具体的实施方案中，所述非胎盘细胞包含 CD34⁺细胞，例如造血祖细胞，如外周血造血祖细胞，脐带血造血祖细胞，或胎盘血造血祖细胞。所述非胎盘细胞还可以包含其它干细胞，例如间充质干细胞，例如骨髓来源间充质干细胞。所述非胎盘细胞还可以是一种或多种类型的成体细胞或细胞系。在另一具体实施方案中，所述组合物包含抗增殖剂，例如，抗 MIP-1 α 抗体或抗 MIP-1 β 抗体。

5.7.1.4 包含胎盘干细胞的基质

另一方面, 本发明提供了包含一群由本发明描述的贴壁胎盘干细胞分化而来的肝细胞、肝原性细胞、软骨细胞和/或软骨性细胞的基质、水凝胶、支架等等。

胎盘干细胞或由胎盘干细胞分化而来的肝细胞、肝原性细胞、软骨细胞和/或软骨性细胞可以接种在天然基质上, 例如胎盘生物材料, 如羊膜材料。此类羊膜材料可以是例如: 直接从哺乳动物胎盘切割的羊膜、固定的或热处理的羊膜、基本干燥(即, $<20\% \text{ H}_2\text{O}$)的羊膜、绒毛膜、基本干燥的绒毛膜、基本干燥的羊膜和绒毛膜等等。优选的可以接种胎盘干细胞的胎盘生物材料描述在 Hariri 的美国申请公开号 2004/0048796 中。

胎盘干细胞或由之分化而来的细胞, 例如肝细胞、肝原性细胞、软骨细胞和/或软骨性细胞, 可以悬浮在适合例如注射的水凝胶溶液中。适合此类组合物的水凝胶包括自组装肽, 例如 RAD16。在一实施方案中, 水凝胶溶液包含可以允许在例如模具中硬化的细胞, 从而形成细胞分散其中的、用于移植的基质。也可以培养此类基质中的细胞使得细胞在移植前有丝分裂扩增。水凝胶可以是例如通过共价键、离子键或氢键交联的有机聚合物(天然的或合成的), 从而产生三维开放的晶格结构, 从而将水分子陷于其中形成凝胶。水凝胶形成材料包括多糖, 例如褐藻胶及其盐, 肽、聚磷腈和离子交联的聚丙烯酸脂, 或嵌段聚合物, 例如分别通过温度或 pH 交联的聚环氧乙烷-聚丙二醇嵌段共聚物。在一些实施方案中, 水凝胶或基质是可生物降解的。

在一些实施方案中, 所述制剂包含原位的可聚合凝胶(参见例如美国专利申请公开 2002/0022676; Anseth 等, *J. Control Release*, 78(1-3): 199-209 (2002); Wang 等, *Biomaterials*, 24(22):3969-80(2003))。

在一些实施方案中,所述聚合物在水性溶液(例如水、缓冲盐溶液、或水性醇溶液)中至少是部分可溶的,所述聚合物具有带电的侧基,或其单价离子盐。具有酸性侧基、可以与阳离子反应的聚合物实例是聚(膦嗪)、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸)、丙烯酸和甲基丙烯酸的共聚物、聚(醋酸乙烯酯)和磺化聚合物,例如磺酸化聚苯乙烯。也可以使用通过丙烯酸或甲基丙烯酸与乙烯醚单体或聚合物反应形成的具有酸性侧基的共聚物。酸性基团的实例是羧酸基、磺酸基、卤代(优选氟代)醇基、酚羟基、和酸羟基。

胎盘干细胞,或由胎盘干细胞分化而来的肝细胞、肝原性细胞、软骨细胞和/或软骨性细胞,或其共培养物,可以接种在三维框架或支架上,并植入体内。此类框架可以与任何一种或多种生长因子、细胞、药物或刺激组织形成的其它组分联合植入。

可以使用的支架的实例包括:非织毡、多孔泡沫、或自组装肽。可以利用由合成的可吸收性乙醇酸和乳酸的共聚物(例如 PGA/PLA)组成的纤维形成非织毡(VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.)。由例如聚(ϵ -己酸内酯)/聚(乙醇酸)(PCL/PGA)共聚物组成的泡沫也可作为支架使用,其通过例如冷冻干燥或低压冻干处理形成(参见例如:美国专利号 6,355,699)。

在另一实施方案中,所述支架是或包含纳米纤维支架,例如电镀纳米纤维支架。在更具体的实施方案中,所述纳米纤维支架包含聚 L-乳酸(PLLA)、聚乳酸乙醇酸(PLGA)、I 型胶原、偏二氟乙烯和三氟乙烯的共聚物(PVDF-TrFE)、聚己内酯、聚(L-丙交酯-共- ϵ -己内酯) [P(LLA-CL)] (例如 75:25), 和/或聚(3-羟基丁酸-共-3-羟基戊酸) (PHBV)和 I 型胶原的共聚物。在另一更具体的实施方案中,所述支架促进胎盘干细胞分化为软骨细胞。生产纳米纤维支架例如电镀纳米纤维支架的方法在本领域公知。参见例如

Xu 等, *Tissue Engineering* 10(7):1160-1168 (2004); Xu 等, *Biomaterials* 25:877-886 (2004); Meng 等, *J. Biomaterials Set, Polymer Edition* 18(1):81-94 (2007)。

上文所列的组合物可以电镀到由具有可控孔隙度的纳米级纤维网组成的非织毡上。电镀利用高电压产生聚合物溶液荷电的喷射流体, 其干燥或凝固留下聚合物纤维。将一个电极置于在例如管或毛细管如针中的聚合物溶液中, 而另一个电极连接于收集器。电场通过管或毛细管底端, 在液体表面产生感应电荷。相互的电荷排斥作用造成与溶液表面张力截然相反的作用力。随着电场强度增大, 相斥的静电力超过表面张力, 故而荷电的喷射流体从管或毛细管顶端的溶液喷射而出。经放电的聚合物溶液喷射流体中的溶剂蒸发, 留下荷电的聚合物纤维, 其本身随机地平铺在接地的收集金属滤网上。毡子的厚度以及毡子中纤维的厚度, 可以通过增大或减小管和收集滤网之间的距离来调整, 其中增大距离通常导致更为纤细的纤维和不太密实的毡子; 通过增大或减小以千伏计量的电势来调整, 其中增大电势通常导致减小的纤维厚度; 通过增大或减小流速来调整, 其中增大流速通常导致更厚的纤维; 或者通过增大或减小溶液中的聚合物浓度来调整, 其中增大聚合物浓度通常导致增大的纤维厚度。管顶的直径也可以改变。在具体实施方案中, 适合电镀以产生纳米级非织纤维网或毡的任何聚合物, 例如本发明公开的任何聚合物, 例如 PLLA 或 PLGA, 可以在大约 5 kV、10 kV、15 kV、20 kV、25 kV、30 kV、35 kV 或大约 40 kV 的电压进行电镀; 并且针距可以改变, 例如针头和收集滤网之间大约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48 或大约 50 cm。针的规格可以改变, 例如从大约

8G 到大约 24G, 例如 12G 或 22G。流速可以改变, 例如从大约 0.01 到大约 1.0 mL/min, 例如从大约 0.05 到大约 0.1 mL/min。使用任何聚合物, 溶液浓度范围可以从大约 5% 到大约 50% w/w 的溶液, 例如从大约 10% 到大约 25% w/w。在具体实施方案中, 大约 10% 到大约 25% w/w 的 PLLA 或 PLGA 溶液可以利用 12G 针或 22G 针, 针头距离收集滤网 30 cm, 以大约 0.05 mL/min 到大约 0.1 mL/min 的流速进行电镀, 以生产由平均直径大约 250 nm 到大约 10 μ m 的纤维组成的电镀毡。

本发明的胎盘干细胞还可以接种在生理学上可接受的陶瓷材料上, 或与其接触, 所述陶瓷材料包括但不限于: 磷酸一钙、磷酸二钙、磷酸三钙、 α -磷酸三钙、 β -磷酸三钙和磷酸四钙、羟磷灰石、氟磷灰石、硫酸钙、氟化钙、氧化钙、碳酸钙、磷酸镁钙、生物学活性玻璃例如 BIOGLASS[®], 及其混合物。目前可商购的多孔生物相容性陶瓷材料包括 SURGIBONE[®] (CanMedica Corp., Canada)、ENDO BON[®] (Merck Biomaterial France, France)、CEROS[®] (Mathys, AG3 Bettlach, Switzerland), 和矿化胶原骨骼移植产品, 例如 HEALOS[™] (DePuy, Inc., Raynham, MA) 和 VITOSS[®]、RHAKOSS[™] 和 CORTOSS[®] (Orthovita, Malvern, Pa.)。所述框架可以是天然和/或合成材料的混合物、掺合物或复合物。

在另一实施方案中, 胎盘干细胞或由胎盘干细胞分化而来的肝细胞和/或肝原性细胞可以接种在毡上, 或与其接触, 所述毡可以由生物可吸收性材料如 PGA、PLA、PCL 共聚物或掺合物或透明质酸制成的复丝组成。

在另一实施方案中, 本发明的胎盘干细胞或由胎盘干细胞分化而来的肝细胞、肝原性细胞、软骨细胞和/或软骨性细胞可以接种在可以是复合结构的泡沫支架上。此类泡沫支架可以模制成有用的形状, 例如需要修复、

取代或强化的机体特定结构的一部分。在一些实施方案中,在接种细胞前,用例如 0.1 M 乙酸处理框架,再将框架孵育在聚赖氨酸、PBS 和/或胶原中,从而增加细胞贴壁。可以修饰基质的外表面来改善细胞的贴壁或生长以及组织的分化,例如通过血浆包被基质,或添加一种或多种蛋白质(例如胶原、弹性纤维、网状纤维)、糖蛋白、葡胺聚糖(例如硫酸肝素、4-硫酸软骨素、6-硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素等)、细胞基质,和/或其它材料,例如但不限于明胶、褐藻胶、琼脂、琼脂糖和植物胶等。

在一些实施方案中,所述支架包含使其具有非血栓形成性的材料,或用所述材料处理。这类处理和材料还可以促进和维持内皮生长、迁移和胞外基质沉积。这类材料和处理的实例包括但不限于:天然材料例如基膜蛋白如层粘连蛋白和 IV 型胶原、合成材料例如 EPTFE,和片段化的聚氨酯脲硅树脂(segmented polyurethaneurea silicones)例如 PURSPAN™ (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.)。所述支架还可以包含抗血栓形成剂例如肝素;所述支架还可以在用胎盘干细胞接种之前进行处理以改变表面电荷(例如用血浆包被)。

因此,另一方面,本发明提供了包含分离的贴壁 CD10⁺、CD34⁺、CD105⁺、CD200⁺ 胎盘干细胞和电镀纳米纤维支架的组合物。在具体实施方案中,所述纳米纤维支架包含纤维聚 L-乳酸(PLLA)、聚乳酸乙醇酸(PLGA)、I 型胶原、偏二氟乙烯和三氟乙烯的共聚物(PVDF-TrFE)、聚己内酯、聚(L-丙交酯-共-ε-己内酯) [P(LLA-CL)] (例如 75:25), 和/或聚(3-羟基丁酸-共-3-羟基戊酸) (PHBV) 和 I 型胶原的共聚物。在另一具体实施方案中,所述纳米纤维支架包含平均厚度大约 250 纳米至大约 10 μm 的纤维。在另一具体实施方案中,所述组合物与胎盘干细胞分化为软骨原性细胞或软骨细胞的条件接触。

在另一实施方案中,本发明提供了制备组合物的方法,包括将贴壁 CD10⁺、CD34⁺、CD105⁺、CD200⁺ 胎盘干细胞与电镀纳米纤维支架接触,其中所述纳米纤维支架通过在大约 20 kV、针距离收集器大约 30 cm、以大约 0.05 mL/min 至大约 0.1 mL/min 的流速电镀 PLLA 或 PLGA 来制备,其中所述 PLLA 或 PLGA 处于大约 10% w/w 至大约 20% w/w 的溶液中。

5.7.2 遗传修饰的胎盘干细胞

另一方面,本发明描述的胎盘干细胞和脐带干细胞可以进行遗传修饰,例如以产生感兴趣的核酸或多肽,或产生分化的细胞,例如肝细胞、肝源性细胞、软骨细胞和/或软骨性细胞,所述分化的细胞产生感兴趣的核酸或多肽。遗传修饰可以例如利用基于病毒的载体来实现,所述载体包括但不限于:非整合型复制载体,例如乳头瘤病毒载体、SV40 载体、腺病毒载体;整合型病毒载体,例如逆转录病毒载体或腺相关病毒载体;或复制缺陷型病毒载体。将 DNA 导入细胞的其它方法包括使用脂质体、电穿孔、粒子枪、直接 DNA 注射,等等。

干细胞可以例如用受一个或多个适宜的表达控制元件(例如启动子或增强子序列、转录终止子、多聚腺苷酸位点、内部核糖体进入位点)控制的或与之可操作性连接的 DNA 来转化或转染。优选这样的 DNA 掺入可选择性标记。在导入外源 DNA 之后,工程化的干细胞可以例如生长在富集培养基中,然后转换到选择培养基中。在一实施方案中,用于工程化胎盘干细胞的 DNA 包含编码感兴趣的多肽(例如细胞因子、生长因子、分化剂或治疗性多肽)的核苷酸序列。

用于工程化干细胞的 DNA 可以包含任何本领域公知的、驱动核苷酸序列在哺乳动物细胞如人细胞中表达的启动子。例如,启动子包括但不限于:CMV 启动子/增强子、SV40 启动子、乳头瘤病毒启动子、Epstein-Barr 病毒启动子、弹性蛋白基因启动子,等等。在具体实施方案中,启动子是可控的,从而核苷酸序列仅在期望时表达。启动子可以是诱导型(例如与金属硫蛋白和热休克蛋白相连的那些)或组成型。

在另一具体实施方案中,启动子是组织特异性的或者呈现出组织特异性。此类启动子的实例包括但不限于:髓磷脂碱性蛋白基因控制区 (Readhead 等, 1987, *Cell* 48:703) (少突细胞);弹性蛋白酶 I 基因控制区 (Swit 等, 1984, *Cell* 38:639; Ornitz 等, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425) (胰腺腺细胞);胰岛素基因控制区 (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115) (胰腺 β 细胞);肌球蛋白轻链-2 基因控制区 (Shani, 1985, *Nature* 314:283) (骨骼肌)。

本发明的细胞可以工程化以“敲除”或“敲掉”一个或多个基因的表达。可以减小细胞天然基因的表达,例如,通过例如同源重组使基因完全失活而抑制表达。例如,在一实施方案中,编码蛋白质重要区域的外显子或该区域的 5' 外显子,通过阳性可选择标记如 neo 而中断,阻止来源于靶基因的正常 mRNA 的产生,从而导致基因失活。基因还可以通过在基因的部分产生缺失或通过缺失整个基因来失活。通过使用具有在基因组中相隔很远的两个靶基因同源区域的构建体,插在两个区域之间的序列可以缺失掉 (Mombaerts 等, 1991, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 88:3084)。还可以使用抑制靶基因表达的反义分子、DNA 酶、小干扰 RNA 及核酶分子,以降低干细胞中靶基因的活性水平。例如,已经证明抑制主要组织相容性基因复合体

(HLA)表达的反义 RNA 分子在免疫反应方面是最为通用的。可以利用三螺旋分子来降低靶基因的活性水平。参见例如 L.G. Davis 等(编辑), 1994, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 第二版, Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 在作为参考并入本发明中。

在具体实施方案中, 本发明的胎盘干细胞或脐带干细胞可以用包含编码感兴趣的多肽的核酸序列的核酸分子进行遗传修饰, 其中感兴趣的多肽的表达可由外源因子如多肽、有机小分子等控制。这样的多肽可以是治疗性多肽。在更具体的实施方案中, 感兴趣的多肽是 IL-12 或白介素-1 受体拮抗剂(IL-1Ra)。在另一更具体的实施方案中, 感兴趣的多肽是白介素-1 受体拮抗剂和二氢叶酸还原酶(DHFR)的融合蛋白, 而外源因子是抗叶酸剂, 如甲氨蝶呤。这样的构建体可用于工程化胎盘干细胞或脐带干细胞, 所述细胞在接触甲氨蝶呤时表达 IL-1Ra 或 IL-1Ra 和 DHFR 的融合蛋白。这样的构建体可以用于例如治疗类风湿性关节炎。在此实施方案中, IL-1Ra 和 DHFR 的融合蛋白在接触抗叶酸剂如甲氨蝶呤时翻译上调。因此, 在另一具体实施方案中, 用于遗传工程化胎盘干细胞或脐带干细胞的核酸可以包含编码第一多肽和第二多肽的核苷酸序列, 其中所述第一和第二多肽作为融合蛋白表达, 在外源因子的存在下其翻译上调。多肽可以瞬时或长时期表达(例如为期数周或数月)。

这样的核酸分子可以另外包含编码允许阳性选择工程化干细胞或允许工程化干细胞可见的多肽的核苷酸序列。在另一更具体的实施方案中, 所述核苷酸序列编码例如在适宜的可见条件下发荧光的多肽, 例如荧光素酶(Luc)。在更具体的实施方案中, 这样的核酸分子可以包含

IL-1Ra-DHFR-IRES-Luc, 其中 IL-1Ra 是白介素-1 受体拮抗剂, IRES 是内部核糖体进入位点, 而 DHFR 是二氢叶酸还原酶。

5.7.3 永生化的胎盘干细胞系

哺乳动物胎盘细胞通过用任何含有生长促进基因的合适的载体转染可以条件性永生, 即, 编码在适宜条件下促进所转染的细胞生长的蛋白质的基因, 从而所述生长促进蛋白质的产量和/或活性可通过外部因子调控。在优选的实施方案中, 所述生长促进基因是癌基因, 例如但不限于: v-myc、N-myc、c-myc、p53、SV40 大 T 抗原、多瘤病毒大 T 抗原、E1a 腺病毒或人乳头瘤病毒的 E7 蛋白。

生长促进蛋白质的外部调控可以通过将生长促进基因置于外部可调控启动子的控制之下来实现, 例如其活性能够通过例如改变所转染的细胞的温度或者与细胞接触的培养基的组成来控制的启动子, 在一实施方案中, 可以采用四环素(tet)控制的基因表达系统(参见 Gossen 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551, 1992; Hoshimaru 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1518-1523, 1996)。不存在 tet 时, 此载体内 tet 控制的转录激活子(tTA)强有力地激活来自 $ph_{CMV^{*}-1}$ 的转录, 为与操纵子序列融合的来自人巨细胞病毒的最小启动子。tTA 是大肠杆菌(*Escherichia coli*)转座子-10 来源的 tet 抗性操纵子的阻遏蛋白(tetR)和单纯疱疹病毒 VP 16 酸性结构域的融合蛋白。无毒低浓度的 tet (例如 0.01-1.0 $\mu\text{g/mL}$)几乎完全消除 tTA 的转录激活作用。

在一实施方案中, 载体还含有编码可选择性标记(例如赋予药物抗性的蛋白质)的基因。细菌新霉素抗性基因(neo^R)是一种这样的可以采用的标记。

携带 neo^R 的细胞可以通过本领域普通技术人员公知的方法来选择，例如向生长培养基中添加例如 100-200 $\mu\text{g/mL}$ G418。

转染可以通过本领域普通技术人员公知的多种方法中的任何一种来实现，包括但不限于逆转录病毒感染。一般而言，细胞培养物可以通过与从载体生产细胞系收集的条件培养基和含 N2 补充剂的 DMEM/F12 的混合物孵育来转染。例如，如上文所述制备的胎盘细胞培养物可以在例如 5 天后，通过在体外在一体积的条件培养基和两体积的含 N2 添加剂的 DMEM/F12 中孵育大约 20 小时进行感染。携带可选择标记的经转染的细胞可以随之如上文所述进行选择。

在转染之后，培养物在允许增殖的表上传代，例如允许至少 30% 的细胞在 24 小时的周期内倍增。优选基质是由包被聚鸟氨酸(10 $\mu\text{g/mL}$)和/或层粘连蛋白(10 $\mu\text{g/mL}$)的组织培养塑料组成的聚鸟氨酸/层粘连蛋白基质，聚赖氨酸/层粘连蛋白基质，或用纤粘连蛋白处理的表面。培养物然后每 3-4 天用生长培养基补料，培养基可以或不添加一种或多种增殖促进因子。当培养物不足 50% 汇合度时可以向生长培养基中添加增殖促进因子。

条件性永生化的胎盘干细胞系可以利用标准技术传代，例如在 80-95% 汇合时通过胰酶消化。在一些实施方案中，维持选择直到大约第二十几次传代是有益的(通过例如，对含新霉素抗性基因的细胞添加 G418)。细胞还可以在液氮中冷冻进行长期储存。

可以从如上文所述制备的条件性永生化人胎盘干细胞系中分离克隆细胞系。一般而言，这样的克隆细胞系可以利用标准技术如通过有限稀释或利用克隆环分离并扩增。克隆细胞系可以大体如上文所述进行补料和传代。

条件性永生化的胎盘干细胞系可以是但不必须是克隆的，一般可以通过在有助于分化的培养条件下抑制生长促进蛋白质的产量和/或活性来诱导分化。例如，如果编码生长促进蛋白质的基因处于外部可调控启动子的控制之下，则可以改变条件例如温度或培养基的组成，以抑制生长促进基因的转录。对于如上文所讨论的四环素控制的基因表达系统，可以通过添加四环素抑制生长促进基因的转录来实现分化。一般而言，1 $\mu\text{g/mL}$ 四环素在4-5天足以启动分化。为促进进一步的分化，生长培养基中可以包括另外的试剂。

5.7.4 测定

本发明描述的胎盘干细胞或肝细胞和/或肝原性细胞可在测定中使用，以确定培养条件、环境因素、分子(例如生物分子、有机小分子等)等与不接触此类条件的细胞相比，对此类细胞增殖、扩增和/或分化的影响。

在一实施方案中，测定本发明描述的肝细胞和/或肝原性细胞在接触分子时在增殖、扩增或分化方面的变化。例如，在一实施方案中，本发明提供了鉴定调节由胎盘干细胞分化而来的多种肝细胞和/或肝原性细胞的增殖的化合物的方法，包括将所述细胞与所述化合物在允许增殖的条件下接触，其中与不接触所述化合物的此类细胞相比，如果所述化合物导致所述细胞增殖可检测地改变，则鉴定所述化合物被鉴定为调节肝细胞和/或肝原性细胞增殖的化合物。在具体实施方案中，所述化合物被鉴定为增殖抑制剂。在另一具体实施方案中，所述化合物被鉴定为增殖增强剂。

在另一实施方案中，本发明提供了鉴定调节由胎盘干细胞分化而来的多种肝细胞和/或肝原性细胞的扩增的化合物的方法，包括将所述肝细胞和/

或肝原性细胞与所述化合物在允许扩增的条件下接触，其中与不接触所述化合物的多种肝细胞和/或肝原性细胞相比，如果所述化合物导致所述肝细胞和/或肝原性细胞扩增可检测地改变，则鉴定所述化合物为调节肝细胞和/或肝原性细胞扩增的化合物。在具体实施方案中，鉴定所述化合物为扩增抑制剂。在另一具体实施方案中，鉴定所述化合物为扩增增强剂。

在另一实施方案中，本发明提供了鉴定调节胎盘干细胞的分化(例如分化为肝细胞和/或肝原性细胞)的方法，包括将所述干细胞与所述化合物在允许向肝细胞和/或肝原性细胞分化的条件下接触，其中与不接触所述化合物的干细胞相比，如果所述化合物导致所述干细胞分化可检测地改变，则鉴定所述化合物为调节胎盘干细胞分化的化合物。在具体实施方案中，鉴定所述化合物为分化抑制剂。在另一具体实施方案中，鉴定所述化合物为分化增强剂。

5.7.5 细胞库

来自产后胎盘的干细胞可以由多种不同的方法培养，以产生一系列批次的、例如一系列独立施用剂量的胎盘干细胞。这样的批次可以例如由来自胎盘灌洗液的干细胞获得，或来自酶消化的胎盘组织。由多种胎盘获得的系列批次的胎盘干细胞可以制备为胎盘干细胞库例如进行长期储存。通常，由胎盘材料的初始培养物获得贴壁干细胞，以形成种子培养物，其在可控的条件下扩增，形成来自大致等同倍增次数的细胞群。所述批次优选来源于单个胎盘的组织，但是可以来源于多个胎盘的组织。

在一实施方案中，如下获得干细胞批次。首先破坏胎盘组织，例如通过绞碎，用适宜的酶如胶原酶消化(见上文 5.2.3 节)。胎盘组织优选含有例

如来自单个胎盘的完整羊膜、完整绒毛膜或两者均含，但是可以仅含有羊膜或绒毛膜的一部分。经消化的组织培养例如大约 1-3 周，优选大约 2 周。在去除非贴壁细胞之后，通过例如胰酶消化收集形成的高密度集落。收集这些细胞，重悬于适当体积的培养基中，并定义为 0 代细胞。

0 代细胞随之用于接种扩增培养物。扩增培养物可以是任意排列的不同细胞培养装置，例如 NUNC™ 的细胞工厂 (Cell Factory)。0 代培养物中的细胞可以细分至任何程度，从而用例如 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、 1×10^4 、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 或 10×10^4 干细胞接种扩增培养物。优选利用大约 2×10^4 到大约 3×10^4 个 0 代细胞接种各扩增培养物。扩增培养物的数量可以取决于 0 代细胞的数量，并且取决于获得干细胞的特定胎盘，数量可以更大或更小。

扩增培养物可以生长直到培养物中的细胞密度达到特定值，例如大约 1×10^5 细胞/cm²。在此时间点细胞可以进行收集或低温保存，或如上文所述传代为新的扩增培养物。细胞可以在使用前传代例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 次。优选在扩增培养期间保留群倍增的累积数记录。来自 0 代培养物的细胞可以扩增达 2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38 或 40 次倍增或达 60 次倍增。不过，优选在将细胞群划分为独立剂量之前，群倍增数在大约 15 和大约 30 之间，优选大约 20 次倍增。细胞可以在整个扩增过程中连续培养，或者可以在扩增期间的一个或多个时间点冷冻。

待用于独立剂量的细胞可以冷冻，例如低温保存以备随后使用。独立剂量可以包含例如每毫升大约一百万至大约一亿个细胞，并且可以包含总计大约 10^6 到大约 10^9 个细胞。

在所述方法的具体实施方案中，0 代细胞培养达大约 4 次倍增，然后冷冻在第一细胞库中。来自第一细胞库的细胞冷冻并用于接种第二细胞库，其细胞扩增达大约另外 8 次倍增。收集此阶段的细胞，冷冻，并用于接种新的扩增培养物，使之继续大约另外 8 次倍增，使细胞倍增累积数达到大约 20 次。处于所述传代中间点的细胞可以大约 100,000 到大约 10,000,000 细胞/ml，优选大约 1,000,000 细胞/ml 的单位冷冻，用于随后的扩增培养。经大约 20 次倍增的细胞可以冷冻为大约一百万至一亿细胞/ml 的独立剂量，用于给药或者用于制备含干细胞的组合物。

在优选的实施方案中，对由之获得胎盘的提供者(例如母亲)测试至少一种病原体。如果母亲测试为所测病原体阳性，则弃掉来自胎盘的全部批次。这样的测试可以在胎盘干细胞批次生产期间的任何时间进行，包括在确立 0 代细胞之前或之后，或在扩增培养期间。测试其存在的病原体可以非限制性地包括甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、人免疫缺陷病毒(I 型和 II 型)、巨细胞病毒、疱疹病毒，等等。

在上述细胞库的改良方案中，库中的多种或所有胎盘干细胞，例如来自单个胎盘或来自多个胎盘的胎盘干细胞，与导致所述细胞分化为肝细胞和/或肝原性细胞的条件接触。这样的细胞可以基于一种或多种肝细胞标记的表达来选择，所述标记在胎盘干细胞中不存在，或以可检测的不同水平

存在。在这样的实施方案中，细胞库可以包含单独的、或者与未分化成肝细胞或肝原性细胞的胎盘干细胞组合的成群的肝细胞和/或肝原性细胞。

5.7.6 肝脏疾病的治疗

另一方面，本发明提供了治疗患有与异常肝脏功能相关的疾病、病症或不适的患者的方法，包括向所述患者体内导入根据本发明公开的将胎盘干细胞分化为肝细胞的方法所生产的肝细胞或肝细胞群。在更具体的实施方案中，所述疾病、病症或不适是肝硬化。在某些实施方案中，所述疾病或病症由例如因酒精或毒素如蘑菇毒素摄取所致的肝脏毒性而引起。在某些实施方案中，所述疾病或病症是病毒感染，例如甲型、乙型、丙型、丁型或戊型肝炎感染。

患有与异常肝脏功能相关的疾病的个体，例如诊断患有肝硬化的个体，可以在疾病发展过程中的任何时间，用多种胎盘干细胞和任选的一种或多种治疗剂来治疗。例如，所述个体可以在诊断后立即治疗，或在诊断1、2、3、4、5、6天之内，或在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50周或更多周之内，或在诊断1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年或更多年后治疗。在临床疾病病程期间，个体可以治疗一次或多次。在一实施方案中，向个体施用大约3亿胎盘干细胞的剂量。然而，剂量可以根据个体的身体特征如体重而改变，且范围可以是每剂1百万到100亿胎盘干细胞，优选每剂1千万到10亿，或在每剂1亿和5亿胎盘干细胞之间。

施用优选是静脉施用，但可以是任何本领域公认的活细胞施用途径。胎盘干细胞，例如已经分化为表达一种或多种肝细胞特征的细胞的胎盘干

细胞，可以直接移植到肝脏的一个或多个部位，例如在缓冲液或培养基溶液、水凝胶、褐藻胶中。在一实施方案中，胎盘干细胞来自细胞库。

在另一实施方案中，所述多种胎盘干细胞已经接触一种或多种促进胎盘干细胞分化为肝细胞或肝原性细胞的试剂。在这样的多种细胞中，有些细胞可以是未分化的胎盘干细胞(即，尚未开始分化成肝细胞的胎盘干细胞)；有些细胞可以是已经开始表达一种或多种肝细胞特征的胎盘干细胞；而有些可以是胎盘干细胞分化而来的细胞，其已经开始表达终端分化肝细胞的多种、绝大多数或所有特征。

5.7.7 利用胎盘干细胞来源的肝细胞鉴定抗病毒剂

本发明描述的肝细胞和肝细胞培养物可以在体外或体内测定中使用，以确定化合物是否为抗病毒剂。

体外测定。在一实施方案中，多种(例如一群)胎盘干细胞可以在如下的实施方式中用于鉴定抗病毒剂。如本发明别处所述确立胎盘干细胞群。将所述胎盘干细胞群与促进胎盘干细胞分化为肝细胞的一种或多种化合物或试剂接触。然后培养胎盘干细胞，直到多种胎盘干细胞表达一种或多种肝细胞特有的标记，或者在例如细胞角蛋白 18 的情况下，以肝细胞特有的水平表达。

胎盘来源的肝细胞或肝原性细胞随之用病毒感染。病毒优选为特异性感染肝组织的病毒，例如甲型、乙型、丙型、丁型或戊型肝炎。病毒贮液可以从一个或多个感染病毒个体的血清获得，其血清中具有可检测水平的病毒。病毒还可以从感染的动物，例如感染的啮齿动物、兔子等获得；从商业来源或从感染病毒的细胞系获得。

不管来源是什么, 将病毒与胎盘来源的肝细胞或包含肝细胞和/或肝原性细胞的胎盘干细胞群接触, 并留出足够的时间感染。肝细胞或胎盘细胞群在感染时在例如组织培养皿或烧瓶中可以大约、至少或至多 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%汇合。在多个实施方案中, 由胎盘干细胞分化而来的肝细胞或肝原性细胞或一群肝细胞或肝原性细胞用病毒例如嗜肝病毒以例如大约 1×10^8 到 1×10^9 病毒粒子进行感染。

在具体实施方案中, 通过胰酶消化、离心、洗涤、重悬于培养基中而从细胞培养物中收集胎盘来源的肝细胞或包含肝细胞和/或肝原性细胞的胎盘干细胞群。将等份细胞置于 12 孔板的盖片上, 用 2%二甲亚砜(DMSO)处理, 任选处理 6-10 天。细胞随之与例如感染血清中的病毒粒子在 37°C 孵育 10-20 小时。在另一实施方案中, 胎盘干细胞来源的肝细胞或包含肝细胞和/或肝原性细胞的胎盘干细胞群通过与脱落病毒的病毒感染细胞系例如用 HBV 感染的肝细胞瘤细胞系 HB 611 共培养来感染(参见 Ochiya 等, "An In Vitro System for Infection with Hepatitis B Virus That Uses Primary Human Fetal Hepatocytes," *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 86:1875-1879 (1989))。

感染后 2-5 天收集细胞, 测定病毒存在的水平。病毒水平可以利用例如识别病毒抗原的一种或多种抗体来测定, 例如甲型肝炎病毒表面抗原(可由 AbD Serotec 获得的抗体); 乙型肝炎病毒 HBsAg 或 HBeAg; 丙型肝炎病毒核心抗原; 丁型肝炎病毒核心抗原或戊型肝炎病毒核心抗原。在另一实施方案中, 感染细胞中的病毒水平通过定量或半定量 PCR 来测定。在具体实施方案中, 所用的引物检测或特异于复制形式的病毒, 例如, 特异于共价闭环形式的 HBV (cccHBV)。在另一具体实施方案中, 所用的引物既能够扩增 cccHBV, 又能够扩增松弛环形式的 HBV。

可以在上文所列方法的若干时间点测试化合物或试剂的抗病毒活性。例如，化合物可以在从培养物中收集本发明提供的肝细胞或肝原性细胞的时候与之接触；在离心之后但是接触病毒之前；在与病毒接触的相同时间(例如同时或在数分钟之内)；或在接触病毒之后。例如，在一实施方案中，化合物与本发明提供的肝细胞或肝原性细胞之间的接触可以在用病毒感染之前实现，以确定化合物对初始感染所具有的影响。在另一实施方案中，化合物可以与本发明提供的经感染的肝细胞或肝原性细胞在感染后大约 1 到大约 5 天接触，以确定例如与未接触化合物的细胞相比，化合物是否对病毒产量有影响。在另一实施方案中，经感染的细胞可以与感兴趣的化合物接触，并与本发明提供的未感染的肝细胞或肝原性细胞、或原代肝细胞培养物进行共培养，以确定化合物是否对未感染细胞的感染有任何影响。

在具体实施方案中，与未接触化合物的肝细胞或肝原性细胞相比，如果化合物导致本发明提供的感染的肝细胞或肝原性细胞在任何时间，例如接触化合物后 1、2、3、4、5、6 或 7 天内所产生的病毒量可检测地下降，则所述化合物为抗病毒化合物。在另一具体实施方案中，与不存在化合物时感染肝细胞和未感染肝细胞的共培养物相比，如果存在化合物时化合物导致共培养物中感染肝细胞数量可检测地下降，则所述化合物为抗病毒化合物。

体内测定。由胎盘干细胞分化而来的肝细胞或肝原性细胞可以用作为体内测定的一部分，以鉴定抗病毒化合物。在所述测定中，肝细胞或肝原性细胞用病毒例如乙型肝炎病毒感染，并植入特定小鼠宿主中，以在小鼠体内引发病毒血症。然后对小鼠施用化合物，并确定化合物对所产生的病毒载量或病毒复制的影响。这样的测定在实施例 10 中有详细说明。

在一实施方案中,所述测定使用以否则致死剂量(otherwise-lethal dose)的 γ 辐射辐照、并通过施用来自免疫限制小鼠如 NOD/SCID 小鼠的骨髓加以保护的正常宿主小鼠。在向宿主小鼠施用骨髓的相同时间,或在施用骨髓后 6-7 天之内,向所述宿主小鼠施用多种感染的胎盘干细胞来源的肝细胞或肝原性细胞,例如在腹膜内、肾囊下、宿主小鼠肝脏中、耳壳中等等施用。在移植后 6-20 天之内,向小鼠施用感兴趣的化合物。这样的施用可以是任何医学上可接受的途径,但优选腹膜内或局部施用。

宿主小鼠可以在施用化合物后的任何时间进行评估,以确定例如血清中的病毒载量或病毒存在或复制的其它指征。在多个实施方案中,测定来自小鼠的组织中病毒粒子的存在,例如复制形式的病毒。如上所述,病毒水平可以利用例如识别病毒抗原的一种或多种抗体来测定,例如甲型肝炎病毒表面抗原(可由 AbD Serotec 获得的抗体);乙型肝炎病毒 HBsAg 或 HBeAg;丙型肝炎病毒核心抗原;丁型肝炎病毒核心抗原或戊型肝炎病毒核心抗原。例如,在具体实施方案中,利用针对乙型肝炎病毒包膜蛋白、表面抗原或核心抗原的一种或多种抗体来检测来自宿主小鼠的血清样品中乙型肝炎病毒的存在。在另一实施方案中,感染细胞中的病毒水平通过定量或半定量 PCR 来测定。在具体实施方案中,所用的引物检测或特异于复制形式的病毒,例如,特异于共价闭环形式的 HBV (cccHBV)。在另一具体实施方案中,所用的引物既能够扩增 cccHBV,又能够扩增松弛环形式的 HBV。

5.7.8 软骨损伤的治疗

在其它实施方案中，分离的胎盘干细胞，分离的胎盘干细胞群，和/或由之分化而来的软骨性细胞或软骨细胞，可以用于自体或异体组织再生或替换疗法或方案，包括但不限于软骨组织的修复。在具体实施方案中，胎盘干细胞可用于治愈或修复影响软骨的疾病、病症或不适，包括软骨创伤(例如骨折、撕裂等)。在更具体的实施方案中，软骨是关节软骨。胎盘干细胞可以在例如细胞悬液中直接向软骨施用，或者可以组合基质例如电镀纳米纤维支架如上文 5.7.1.4 节描述的电镀纳米纤维支架而向软骨施用。接触(例如接种于)软骨的胎盘干细胞，无论带还是不带支架，优选为 $CD200^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD90^+$ 、 $CD34^-$ 、 $CD45^-$ 胎盘干细胞，但可以是本发明描述的任何胎盘干细胞。用于治疗软骨疾病、病症或不适的所有或多种胎盘干细胞可以在向软骨施用之前分化为软骨细胞，或者可以未分化的状态施用。软骨性细胞或软骨细胞可以在细胞悬液中单独地或与胎盘干细胞和/或其它类型的干细胞组合施用，或者可以组合基质如电镀纳米纤维支架向软骨施用。

单独或与支架如电镀纳米纤维支架组合的特定胎盘干细胞群的功效，可以在软骨损伤不自发愈合的动物模型中进行评价，例如兔骨软骨缺损模型，例如下文实施例 14 所述。

5.7.9 $CD34^+$ 、 $CD45^-$ 胎盘干细胞的用途

本发明提供的 $CD34^+$ 、 $CD45^-$ 胎盘干细胞以及富集 $CD34^+$ 、 $CD45^-$ 胎盘干细胞的细胞群，可以用于治疗需要造血干细胞的个体，例如在例如化疗或清髓(myeloablation)之后需要造血重建的个体。在一实施方案中，胎盘 $CD34^+CD45^-$ 干细胞单独用于治疗这样的个体。在另一实施方案中，胎盘 $CD34^+CD45^-$ 干细胞组合或补充第二类型的干细胞或第二干细胞群来使用。

这样的第二群中的干细胞可以包含造血干细胞、非造血干细胞、或两者均含。在一实施方案中，第二干细胞群包含脐带血中的干细胞。在另一实施方案中，第二干细胞群包含骨髓中的干细胞。在具体实施方案中，将干细胞移植到个体中。

通常，接受干细胞输注例如骨髓移植的患者，接受一单位的有核细胞，其中一单位大约为 1×10^9 有核细胞(相当于 $1-2 \times 10^6$ CD34⁺干细胞)。因而，在一实施方案中，向个体施用的包含 CD34⁺CD45⁻胎盘干细胞的有核细胞数至少为骨髓替换中通常施用细胞数的五倍。在所述方法的另一具体实施方案中，向个体施用的有核细胞数至少为骨髓替换中通常施用细胞数的十倍。在另一具体实施方案中，向个体施用的有核细胞数至少为骨髓替换中通常施用细胞数的十五倍。在所述方法的另一实施方案中，向个体施用的包括 CD34⁺CD45⁻胎盘干细胞在内的有核细胞的总数在每千克体重 $1-1000 \times 10^8$ 之间。

在另一实施方案中，与不接受富集 CD34⁺CD45⁻胎盘干细胞的造血干细胞群的个体中的移植相比，CD34⁺CD45⁻胎盘干细胞，例如富集 CD34⁺CD45⁻胎盘干细胞的细胞群，改善了需要干细胞如造血干细胞的个体中的移植。在多个实施方案中，移植至少在或在移植后 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或 21 天改善。在另一更具体的实施方案中，CD34⁺CD45⁻胎盘干细胞至少在移植后 21 天、在移植后 21 天、或在移植后 21 天以上改善了需要干细胞的个体中的移植。在具体实施方案中，CD34⁺CD45⁻胎盘干细胞至少在移植后 25、30、35、40、45、50、55 周或 1 年或更长时间、在移植后 25、30、35、40、45、50、55 周或 1 年

或更长时间、或在移植后 25、30、35、40、45、50、55 周或 1 年或更长时间以上改善了需要干细胞的个体中的移植。

CD34⁺CD45⁻胎盘干细胞及包含此类干细胞的干细胞群可制备为易于向个体施用的形式。例如，细胞或细胞群可包含在适于医学用途的容器之中。此类容器可以是例如，无菌的塑料袋、瓶、罐，或其它可以方便地从中分配组合干细胞群的容器。优选容器是允许或有助于静脉施用组合干细胞群的容器。容器例如袋可以一起盛有胎盘来源的干细胞和来自第二来源的干细胞，例如作为混合细胞群，或者可以分开地盛有两者干细胞群。在后一种实施方案中，所述袋优选包括相互连接的多个内腔或隔室，以允许在施用前或施用期间将胎盘来源的干细胞与来自第二来源的干细胞进行混合。所述容器优选允许低温保存组合的干细胞群。

因而，在一实施方案中，本发明提供了处于容器中的包含富集 CD34⁺CD45⁻胎盘干细胞的细胞群的组合物。在另一实施方案中，本发明提供了处于容器中的包含干细胞群的组合物，其中所述干细胞群包含 CD34⁺CD45⁻胎盘来源的干细胞和第二类型的干细胞。在具体实施方案中，容器是袋、瓶或罐。在更具体的实施方案中，所述胎盘来源的干细胞和所述第二类型的干细胞一起包含在所述袋中。在另一更具体的实施方案中，所述胎盘来源的干细胞和所述第二类型的干细胞分开包含在所述袋中。在另一具体实施方案中，所述组合物包含有助于低温保存所述组合的干细胞群的一种或多种化合物。在另一具体实施方案中，所述组合的干细胞群包含在生理学上可接受的水性溶液中。在更具体的实施方案中，所述生理学上可接受的水性溶液为 0.9% NaCl 溶液。在另一更具体的实施方案中，所述袋是无菌塑料袋。在更具体的实施方案中，所述袋允许或有助于静脉施

用所述干细胞。在另一具体实施方案中,所述干细胞包含与所述来自第二来源的干细胞 HLA 匹配的 $CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘细胞。在另一具体实施方案中,所述干细胞包含与所述第二类型的干细胞至少部分 HLA 不匹配的 $CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘干细胞。在另一具体实施方案中,所述胎盘来源的干细胞来源于多个提供者。在另一具体实施方案中,所述来自第二来源的干细胞来源于多个提供者。

$CD34^{+}CD45^{-}$ 干细胞以及包含 $CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘干细胞的细胞群可以在向个体施用前培养一段时间。例如,在一实施方案中,所述干细胞可以在包含 Notch 激动剂的培养基中培养,例如基本上由 Notch 蛋白的胞内结构域组成的缺失形式的 Notch 蛋白或 δ 蛋白。参见 U.S. 2004/0067583。

在另一实施方案中,相继向需要的患者施用本发明提供的 $CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘干细胞群和脐带血细胞群。在一实施方案中,首先施用胎盘干细胞群,其次施用第二类型的干细胞群。在另一实施方案中,首先施用第二类型的干细胞,其次施用 $CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘干细胞。

$CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘干细胞和第二类型的干细胞(例如脐带血来源的干细胞或祖细胞或脐带血,包括库存或低温保存的脐带血)的组合群可以在移植前通过任何医学上可接受的方法进行混合。在一实施方案中,所述两个细胞群进行物理混合。在所述方法的另一实施方案中,所述细胞群在向所述个体施用之前现混(即在 1、2、3、4、5、7、10 分钟之内)。在另一实施方案中,所述细胞群在向所述个体施用前 5 分钟以上的时间点混合。在所述方法的另一实施方案中,所述 $CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘干细胞和/或第二类型的干细胞在向所述个体施用前进行低温保存和融化。在另一实施方案中,所述干细胞在向所述个体施用前 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、

14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 小时以上的时间点混合，其中任一或两个干细胞群均在所述施用之前已经进行低温保存和融化。在另一实施方案中，所述干细胞群可以施用多次。

在另一实施方案中，所述 $CD34^+CD45^-$ 胎盘干细胞和/或第二类型的干细胞在移植前进行预处理。在优选的实施方案中，预处理包括将细胞在透气容器中一般在 -5°C 到大约 23°C ，大约 0°C 到大约 10°C ，或优选大约 4°C 到大约 5°C 储存一段时间。细胞可以储存 18 小时到 21 天，48 小时到 10 天，优选 3-5 天。细胞可以在预处理前低温保存，或者可以在施用前现行预处理。

$CD34^+CD45^-$ 胎盘干细胞或第二类型干细胞中的任一或两者可以在接触需要干细胞的个体之前进行分化。例如，为进行造血移植目的的接触，干细胞可以分化为造血系的细胞。在某些实施方案中，所述移植干细胞群的方法包括：(a) 诱导 $CD34^+CD45^-$ 胎盘干细胞分化，(b) 将所述胎盘干细胞与第二类型的干细胞群例如脐带血干细胞混合，以形成组合的细胞群，和(c) 向需要的个体施用所述组合的细胞群。在另一实施方案中，所述移植的方法包括：(a) 诱导第二类型干细胞分化；(b) 将所述分化的细胞与 $CD34^+CD45^-$ 胎盘干细胞混合，以形成组合的细胞群；和(c) 向需要的个体施用所述组合的细胞群。在另一实施方案中，所述移植组合的干细胞群的方法包括：(a) 将 $CD34^+CD45^-$ 胎盘干细胞与脐带血细胞群混合；(b) 诱导脐带血细胞和 $CD34^+CD45^-$ 胎盘干细胞混合物分化；和(c) 向需要的患者施用所述混合物。

本发明提供的富集 $CD34^+CD45^-$ 胎盘干细胞的干细胞群可以任何药理学上或医学上可接受的方式移植到患者体内，包括注射，例如静脉内注射、肌肉注射、腹膜内注射、眼内注射、直接注射到特定组织、输血等。例如，可以通过静脉内输注来移植组合的干细胞群，例如与脐带血来源的干细胞

组合的胎盘干细胞。在另一实施方案中,处于悬液中的包含胎盘干细胞和心脏干细胞的组合干细胞群可以直接注射到心脏组织中,例如心脏的缺血区域。所述组合的干细胞群可以包含或悬浮于可药用载体中。所述组合的干细胞群可以在任何药学上或医学上可接受的容器例如血袋、移送袋、塑料管或瓶中携带、储存或运输。

移植后,可以利用例如核酸或蛋白质检测或分析方法来评估接受人的移植情况。例如,聚合酶链式反应(PCR)、STR、SSCP、RFLP 分析、AFLP 分析等等可用于鉴定来自接受者的组织样品中移植的细胞特异性核苷酸序列。这样的核酸检测和分析方法是本领域熟知的。在一实施方案中,移植可以通过来自接受者的组织样品中出现可区别于背景的移植的细胞特异性核酸的来确定。所分析的组织样品可以是例如活检切片(例如骨髓吸出物)或血样。

在一实施方案中,在医学操作如骨髓之前现行从患者中采取外周血样。在所述操作之后,向患者施用如本发明所提供的组合的干细胞。施用后至少一次采取第二外周血样。利用例如针对可购自例如 LabCorp (Laboratory Corporation of America)的标记(等位基因)的 PCR 引物,获得两份样品的 STR 谱。施用后标记(等位基因)数量或特征方面的差异表明发生了移植。

也可以通过检测嗜中性粒细胞的重新出现来证明移植。

在另一实例中,可以利用针对标记的抗体,在来自接受者的组织样品中检测移植的细胞特异性标记,其中所述标记特异于移植的干细胞或特异于移植的干细胞预期将分化成为的细胞。在一实施方案中,可以通过添加适宜的抗体并使之结合;洗涤(例如用 PBS);固定细胞(例如用 1%多聚甲醛);并在合适的 FACS 仪器(例如 FACSCalibur 流式血细胞计数器(Becton

Dickinson))上进行分析,通过FACS分析确定 $CD45^+$ 、 $CD19^+$ 、 $CD33^+$ 、 $CD7^+$ 和/或 $CD3^+$ 细胞的存在,来评估组合的胎盘干细胞和脐带血来源的干细胞的移植。在胎盘干细胞和/或来自第二来源的干细胞来自与接受者不同性别的个体的情况下,例如雄性提供者和雌性接受者,移植可以通过检测性别特异性标记如Y染色体特异性标记来确定。胎盘干细胞和/或来自第二来源的干细胞还可以进行遗传修饰以表达有助于鉴定的独特标记或核酸序列,例如RFLP标记, β -半乳糖苷酶或绿色荧光蛋白的表达,等等。

移植程度可以通过本领域公知的任何方法来评估。在一实施方案中,移植程度通过如下评分系统来评估,该系统使用来自移植接受者的结合了抗体的固定组织薄切片。在此示例评分系统中,移植评分如下:0=无阳性细胞(即,没有细胞被特异于移植细胞的抗体所结合);0.5=1或2个阳性细胞,或许是阳性,但是难于与背景或非特异性染色相区分;1=2-20个离散的阳性细胞;2=遍布组织的大约20-100个离散的或成簇的阳性细胞;3=100个以上的阳性细胞,少于组织的50%;4=50%以上的细胞为阳性。在具体实施方案中,移植确定为多于0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、7.5%、10%、15%、20%或者更多的细胞被阳性染色。

在另一实施方案中,通过分析移植的细胞所执行的一种或多种生物学功能的增加来确定移植程度。例如,在经历清髓治疗的接受者接受包含胎盘干细胞和脐带血来源干细胞的组合干细胞群移植的情况下,移植程度可以确定为正常造血作用、血细胞群以及血功能恢复正常的程度。

在组合干细胞群与目的接受者完全或部分地HLA不匹配的情况下,可能有必要治疗接受者,以减小对提供者细胞的免疫排斥。减小免疫排斥的

方法公开在例如美国专利号 5,800,539 和 5,806,529 中, 两者均在此引入并入本发明中。

因此, 在一实施方案中, 包含造血干细胞的组合干细胞群可用于治疗患有血癌的患者, 例如淋巴瘤、白血病(如慢性或急性髓性白血病、急性淋巴性白血病、霍奇金氏病等)、脊髓发育不良、脊髓发育不良综合症等等。

在另一实施方案中, 所述疾病、病症或不适是慢性肉芽瘤疾病。

由于造血重建可用于贫血症的治疗, 本发明还提供了用本发明的 $CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘干细胞治疗个体, 其中所述个体患有贫血症或血液血红蛋白紊乱。所述贫血症或紊乱可以是天然的(例如由遗传或疾病所致), 或者可以是人为诱发的(例如由于意外或蓄意重度、化疗等)。在另一实施方案中, 所述疾病或紊乱是骨髓衰竭综合征(例如再生障碍性贫血, 科斯曼病, 戴-布二氏贫血, 无巨核细胞性血小板减少症, 等等), 骨髓紊乱或造血疾病或紊乱。在具体实施方案中, $CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘干细胞与多种间充质干细胞和/或多种贴壁胎盘干细胞一起施用。

在另一实施方案中, 本发明提供的 $CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘干细胞可以单独或组合第二类型的干细胞如间充质干细胞或贴壁胎盘干细胞而导入到受损器官中用于器官新生和体内损伤修复。这样的损伤可以归结为包括但不限于如下的病症和紊乱: 心肌梗塞、惊厥紊乱、多发性硬化症、中风、低血压、心搏停止、缺血、炎症、老龄化认知功能丧失、大脑性麻痹、神经变性疾病、阿尔茨海默病、帕金森病、利氏病(Leigh disease)、艾滋病痴呆、记忆丧失、肌萎缩性侧索硬化、缺血性肾病、脑或脊髓损伤、心肺分流(heart-lung bypass)、青光眼、视网膜缺血或视网膜损伤。

在其它实施方案中，所述疾病、病症或不适包括但不限于：溶酶体贮积病，例如泰萨二氏病(Tay-Sachs)、尼曼-匹克病(Niemann-Pick)、Fabry 病、戈谢病(例如葡萄糖脑苷脂酶缺陷)、亨特氏综合征(Hunter's)及赫尔勒氏综合征(Hurler's syndromes)、马-拉综合征(Maroteaux-Lamy syndrome)、岩藻糖苷贮积病(岩藻糖苷酶缺陷)、巴滕病(Batten disease) (CLN3)，以及其它神经节苷脂贮积病，粘多糖贮积病和糖原贮积病。

在其它实施方案中，本发明提供的 $CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘干细胞可以在基因治疗中用作自体或异体转基因载体，以矫正例如先天代谢障碍、脑白质营养不良(例如辅酶 A 连接酶缺陷)、异染性脑白质营养不良(芳基硫酸酯酶 A 缺陷)(例如症状性或症状前幼儿型或青少年型)、球形细胞脑白质营养不良(克拉伯病；半乳糖脑苷脂酶缺陷)、酸性脂肪酶缺陷(沃尔曼病)、囊性纤维化、糖原贮积病、甲状腺机能减退、镰状细胞性贫血、地中海贫血症(例如 β 地中海贫血症)、皮尔逊综合症、庞贝氏症、苯丙酮尿症(PKU)、卟啉症、枫糖尿症、高胱氨酸尿症、粘多糖贮积病、慢性肉芽肿病以及酪氨酸血症和泰萨二氏病，或治疗实体瘤或其它病症。

在其它实施方案中，所述疾病、病症或不适是需要替换或修复一种或多种组织的疾病、病症或不适。例如，本发明提供的 $CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘干细胞，单独或组合第二类型的干细胞如间充质干细胞或贴壁胎盘干细胞，可用于治疗性移植方法，以例如补充或替换肝脏、胰脏、肾脏、肺脏、神经系统、肌肉系统、骨骼、骨髓、胸腺、脾脏、粘膜组织、性腺或毛发的干细胞或祖细胞。本发明提供的组合的干细胞群也可以用于补充、修复或替换例如软骨、腱或韧带。例如，在某些实施方案中，假体(prostheses)(例如腕部假体)采用本发明提供的组合的干细胞群长出的软骨组织构建体来涂

层。在其它实施方案中，关节(例如膝关节)采用组合的干细胞群长出的软骨组织构建体来重建。软骨组织构建体也可以在不同类型关节的重大修复手术中采用(有关方案参见例如 Resnick, D.和 Niwayama, G.编辑, 1988, DIAGNOSIS OF BONE AND JOINT DISORDERS, 第二版, W. B. Saunders Co.)。所述组合的干细胞群可用于修复因外伤、代谢紊乱或疾病所致的组织和器官损伤。在一实施方案中，可以对患者施用组合的干细胞群，以再生或修补由于疾病已经受损的组织或器官，例如，在心肌梗塞后修复心脏组织。

在其它实施方案中，本发明提供的 $CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘干细胞，单独或组合第二类型的干细胞如间充质干细胞或贴壁胎盘干细胞，可用于治疗已经接受致死或亚致死剂量辐射的个体。这样的辐射可以意外接受的，例如在核事故中，不论是与工作还是侵略有关的，或者是治疗性的，例如作为医学操作的一部分。辐射的具体类型(例如 α 、 β 、 γ)并不重要。本发明提供的组合的干细胞群可用于改善辐射病的一种或多种症状，例如，恶心、胃口不好、嗜眠、呼吸困难、白血球计数下降、长期贫血、疲乏、虚弱、苍白、呼吸困难、感觉不适等等，不论这样的症状是否指示可痊愈或致命性的辐射病。在另一实施方案中，所述个体具有与急性放射综合症(ARS)相关的一种或多种症状。本发明提供的组合的干细胞群也可以用于部分或完全地重建已接受致死或亚致死剂量辐射个体的造血系统，从而所述个体变成部分或完全的嵌合体。这样的嵌合现象可以是暂时性或永久性的(例如，可以持续1、2、3周，或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11个月或更长时间)。在优选实施方案中，在个体接触辐射后的头24个小时内向个体供应本发明提供的组合的干细胞群。个体可在接触辐射后的头1个小时、2个小时、3

个小时、4 个小时、5 个小时、6 个小时、9 个小时、12 个小时、15 个小时、18 个小时或 21 个小时内施用组合的干细胞群。如本发明所提供的组合的干细胞群也可以在接触辐射后的 2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、1 周、2 周、3 周、4 周或 5 周内施用。

如果疾病、病症或不适以任何方式可测量地得以改善,则可以认为本发明提供的 $CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘干细胞对个体的治疗性或预防性治疗有效。此类改善可通过多种指标显示出来。可测量的指标包括例如与特定疾病、病症或不适相关的生理条件或一系列生理条件可检测的变化(包括但不限于:血压、心率、呼吸速率、多种血细胞类型的计数、血液中某些蛋白质、糖类、脂质或细胞因子的水平、或与所述疾病、病症或不适相关的遗传标记受调节的表达)。如果任一这样的指标对这样的治疗有反应,变成落入或接近正常值范围的数值,则认为本发明提供的 $CD34^{+}CD45^{-}$ 胎盘干细胞对个体的治疗有效。正常值可以通过本领域公知的多种指标的正常范围、或通过与对照中这样的数值进行比较而确立。如果导入组合的干细胞群的个体呈现出任何移植的迹象(例如出现在活检或组织样品或血液样品中的移植的细胞标记;检测移植细胞执行的一种或多种生化功能等),则认为用于移植目的如造血移植而导入如本发明提供的组合的干细胞群是成功的。在医学领域,治疗功效也常常通过个体的印象和个体身体状况的主观感受来表征。因此,改善也可以通过施用本发明提供的干细胞或补充细胞群之后的主观指标来表征,例如个体主观感受的改善,健康增强,身体状况增强,精力水平提高,等等。

6. 实施例

6.1 实施例 1: 获得胎盘干细胞

6.1.1 组织破坏/酶促消化

通过酶促消化从胎盘组织获得干细胞的示例方案如下。获得冷冻胎盘组织(三块, 每块大约 $\sim 1 \times 1 \times 0.5$ cm)。组织为脐带、母体的胎盘表面或羊膜。所用的消化性酶包括胰蛋白酶-EDTA (0.25%, GIBCO BRL); 胶原酶 IA (Sigma), 胶原酶 I (Worthington), 胶原酶 1A (Sigma)+胰蛋白酶-EDTA, 胶原酶 1 (Worthington)+胰蛋白酶-EDTA, 或者弹性蛋白酶+胶原酶 I+胶原酶 IV+Daspase (Worthington)。胎盘组织的消化如下。组织在酶(1 g 溶于 10 ml, 50 ml 管中)的存在下绞碎, 于 37°C 下, 管呈 45°角以 250 rpm 震荡 1 hr (C25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA)。然后弃去上清液。沉淀用 20 ml Hank 氏液+5% FCS 洗涤(3 次), 并重悬于 12 ml 培养基中。将 3 ml 所得悬液的等份试样移入分别含 10 ml 培养基的 T-75 瓶中(每份消化四瓶)。任选添加 10 ml 胰蛋白酶/EDTA, 在 37°C 以 250 rpm 震荡 30 分钟, 再离心, 并用 10 ml Hank 氏液+5% FCS 再次洗涤。细胞铺板, 培养, 选择贴壁细胞。

也可以使用如下方法。在排出后不到 24 小时获得胎盘。清洗胎盘后, 在脐带远端夹上止血钳。在与胎盘连接处剪开脐带并转移到无菌皿中。在止血钳下方剪开脐带后, 按摩脐带以除去血凝块, 并转移到含庆大霉素和两性霉素 B 的 500 ml PBS 中。使用 5 g 这样的脐带。通过使用手术刀自脐带附着点以大约 3 英寸的半径切下来修剪残余的胎盘物质。从余下的材料中挤出血凝块, 将以脐带根为中心的 5 g 羊膜-绒毛膜转移到脐带的同一容器中。对脐带和羊膜-绒毛膜组织切片, 然后切碎成大约 1 mm^3 大小的碎块。组织随之用 1 mg/ml 胶原酶 1A (20 ml/g 组织)在 37°C 消化 1 小时, 接着是胰

蛋白酶-EDTA (10 ml/g 组织)在 37℃ 消化 30 分钟。在 5% FBS 的 PBS 溶液中洗涤三次之后, 将组织重悬于培养基(20 ml/g 组织)中, 然后以大约 0.22 ml/cm² 转移到 T 型瓶中。

6.1.2 灌洗

在出生后 24 小时之内获得产后胎盘。用脐带钳在胎盘附近大约 3-4 英寸处夹紧脐带, 并在脐带钳上方剪开脐带。所述脐带或者弃掉, 或者加工以回收例如脐带干细胞, 和/或加工脐带膜以生产生物材料。从胎盘上切下多余的羊膜和绒毛膜, 沿胎盘边缘四周留下大约 1/4 英寸。弃去修剪掉的材料。

由胎盘膜边缘开始, 用手指通过钝器解剖将羊膜与绒毛膜分离。当羊膜完全与绒毛膜分离时, 用剪刀沿脐带基部周围剪下羊膜, 并从胎盘上扯下。羊膜可以弃掉, 或加工以例如通过酶促消化获得干细胞, 或生产例如羊膜生物材料。

胎儿侧余下的胎盘材料利用消毒纱布清洁掉所有的可见血凝块和残留血液, 然后先后用碘酒拭子和酒精拭子擦拭消毒。然后用消毒止血钳在脐带钳的下方与之呈十字交叉状夹紧脐带, 然后旋转止血钳, 将脐带拉至止血钳上面产生折叠。然后在止血钳以下部分地剪开脐带, 露出由止血钳支撑的脐带横截面。或者, 用消毒止血钳夹紧脐带。然后将脐带置于消毒纱布上, 并用止血钳托住以提供张力。然后紧挨止血钳下方笔直地横切脐带, 并重新夹紧靠近血管处的脐带边缘。

如上所述露出血管, 通常辨认出一根静脉和两根动脉, 并如下打开血管。沿着各血管切口端推进闭合的鳄鱼夹, 小心勿使鳄鱼夹穿透血管壁。

当鳄鱼夹头稍稍超过脐带基部时，停止推进。然后略微打开鳄鱼夹，慢慢从血管上拿开，使血管膨大。

向各胎盘动脉中插入与灌洗装置或蠕动泵相连的塑料管。向胎盘静脉中插入与 250 mL 收集袋相连的塑料管。将所述管接好。

小体积的无菌注射级 0.9% NaCl 溶液用于检查泄漏。如果没有泄漏，则提高泵速，通过胎盘脉管系统泵入大约 750 mL 注射级 0.9% NaCl 溶液。通过从脐带外缘轻轻按摩胎盘可以辅助灌洗。当收集袋满时，从将管连于袋的连接器上取下袋，并在管上接上新袋。

当完成收集时，称重收集袋，平衡后离心。离心后，将各袋置于血浆分离器内，而不破坏细胞沉淀。然后移出袋内上清液并弃去。然后轻轻按摩袋，以使细胞重悬在残余上清液中。利用消毒的 1 mL 注射器通过取样点连接器从收集袋中抽取大约 300-500 μ L 细胞，并转移到 1.5 mL 离心管中。确定剩余灌洗液的重量和体积，向灌洗液中添加 1/3 体积的淀粉代血浆，并充分混合。确定每 mL 的细胞数。利用血浆分离器从灌洗液中除去红血球。

胎盘细胞随后立即进行培养以分离胎盘干细胞，或者低温保存以备后用。

6.1.3 分离的干细胞的培养

原代培养：原代培养的目的是从消化的胎盘组织确立细胞。将消化的组织悬浮于培养基中，并置于 Corning T 型瓶中，在潮湿的培养箱中于 37°C 5% CO₂ 中孵育。培养 5 天后补充一半的培养基。培养到 2 周时形成高密度细胞集落。用胰蛋白酶-EDTA 收获集落，然后以 2% FBS 的 PBS 溶液淬灭。

细胞离心，并重悬于培养基中用于接种扩增培养物。这些细胞定义为倍增 0 次的 0 代细胞。

扩增培养：从原代培养物收获、从扩增培养物收获或从细胞库解冻的细胞用于接种扩增培养物。细胞工厂(NUNC™)用 5% CO₂ 的大气以 50 ml/min/盘通过无菌过滤器处理 10 分钟，并在维持在 37℃、5% CO₂ 的温箱中保温。在血球计数器上用台盼蓝计数细胞种子，并记录细胞数、活力、传代次数和累积倍增次数。将细胞悬浮在培养基中至大约 2.3×10^4 细胞/ml，并以 110 ml/盘接种在细胞工厂中。3-4 天后和培养的 5-6 天再次除去培养基，替换为新鲜培养基，接着用 5% CO₂ 的大气再一次处理。当细胞达到大约 10^5 细胞/cm² 时，用胰蛋白酶-EDTA 收获细胞，接着用 2% FBS 的 PBS 溶液淬灭。然后离心细胞，并重悬于培养基中。

6.2 实施例 2：从灌洗液分离和表征胎盘干细胞

该实施例示范了来自几种不同灌洗实验的胎盘干细胞的收集和表征。

材料和方法

从注册私人脐带血库计划、并提供知情同意书许可为研究目的在回收脐带血后使用放血胎盘的孕妇募集胎盘提供者。这些提供者还允许使用由其低温保存用脐带血样本正常处理所生成的隐蔽数据。这允许对收集的脐带血和利用下文所述实验方法回收的流出灌洗液之间的组成进行比较。所有提供者的数据保密。

在脐带和胎盘放血后，将胎盘置于消毒保温的室温容器中，并在出生 4 小时之内运送到实验室。如果胎盘经检查具有物理损坏的迹象，例如器官破碎或脐带血管撕裂，则丢掉。胎盘在消毒容器中的室温(23±2℃)或冷冻

(4°C)维持 2-20 小时。将胎盘周期性地于 $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ 浸入无菌盐水中并洗涤，以去除任何可见的表面血液或碎片。脐带在距入胎盘处大约 5 cm 的地方横切，向脐带血管中插入 Teflon 或聚丙烯导管，它们连接于无菌流体通路，以允许胎盘的双向灌洗和流出液的回收。

胎盘条件化

在获得父母书面同意之后，胎盘连同脐带一起从产房获得，并在产后 12-24 小时内在室温处理。处理前，除去膜，母体侧洗净残留血液。胎盘维持在多样化的条件下，力图模拟和维持生理学上相容的环境，用以增殖和募集残余细胞。脐带血管中插入由 20 号蝶形针制成的导管，用于血样收集。导管用含 2 U/ml 肝素(EJkins-Sinn, N. J.)的 IMDM 无血清培养基(GibcoBRL, NY)冲洗。胎盘随之用肝素化的(2U/mL) Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)以 15 mL/分钟的流速灌洗 10 分钟，由母体侧收集 1 小时内的灌洗液，并计数有核细胞。以每分钟 50 mL 的速率持续灌洗胎盘，直到收集到大约 150 mL 灌洗液。该体积的灌洗液标记为“早期级分”。所述灌洗和收集操作重复一两次，直到回收的有核细胞数低于 $100/\mu\text{L}$ 。以相同的速率继续灌洗胎盘，导致收集到大约 150 mL 的第二级分，并标记为“晚期级分”。在所述操作过程中，轻轻按摩胎盘以辅助灌洗操作，并帮助回收细胞材料。通过重力引流以及动脉插管吸引两种方式从灌洗回路中收集流出液。

汇集灌洗液，并进行轻度离心，以除去血小板、碎片及去核细胞膜。然后通过 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心分离有核细胞，洗涤后重悬于 DMEM 中。为分离所述贴壁细胞，将等份的 $5-10\times 10^6$ 细胞分别置于几个 T-75 瓶中，用可由 BioWhittaker 商购的间充质干细胞生长培养基(MSCGM)培养，

并置于组织培养温箱(37°C, 5% CO₂)中。10-15 天后, 通过用 PBS 洗涤除去非贴壁细胞, 随后替换为 MSCGM。每天检查瓶中各种贴壁细胞类型的存在, 特别是鉴定和扩增贴壁成纤维细胞样细胞簇。

细胞回收和分离

通过在室温以 400×g 离心 15 分钟从灌洗液中回收细胞。细胞沉淀重悬于含 2 U/ml 肝素和 2 mM EDTA 的 IMDM 无血清培养基(GibcoBRL, NY)中。利用 LYMPHOPREP™ (Nycomed Pharma, Oslo, Norway)按照生产商推荐的方法分离总单核细胞级分, 并重悬所述单核细胞级分。利用血球计数器来计数细胞。通过台盼蓝排除法评价活力。利用具有 0.2% EDTA 的 0.05% 胰蛋白酶溶液(Sigma)通过差异胰酶消化实现间充质细胞的分离。由于成纤维细胞样细胞, 包括贴壁胎盘干细胞, 一般在约 5 分钟内从塑料表面脱离, 而其它的贴壁群一般要求 20-30 分钟以上的孵育, 因此差异胰酶消化是可能的。

在胰酶消化和利用胰蛋白酶中和溶液(TNS, Cambrex)的胰蛋白酶中和反应后, 可以收获脱离的成纤维细胞样细胞。细胞在 DMEM 中洗涤, 并重悬于 MSCGM 中。利用 Becton-Dickinson FACSCalibur 设备以及 FITC 和 PE 标记的单克隆抗体进行流式细胞仪分析, 所述抗体基于公知的骨髓来源 MSC (间充质干细胞)的标记选择, 包括 CD10、CD34、CD44、CD45 和 CD90 的抗体。抗体购自 Becton-Dickinson 和 Caltag laboratories (South San Francisco, Calif.), 而 SH2、SH3 和 SH4 抗体生产杂交瘤获自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)。所述单抗在其培养上清液中的反应性通过 FITC 或 PE 标记的 F(ab)₂ 山羊抗小鼠抗体来检测。利用可商

购的诱导和维持培养基(BioWhittaker)按照生产商的使用说明来进行系分化。

胎盘干细胞的分离

培养瓶中贴壁细胞的显微镜检显示了形态学上不同的细胞类型，包括纺锤形的细胞；圆形细胞，具有大的细胞核及众多核周小液泡；以及星形细胞，具有若干突起，细胞通过其中一个突起而附着在瓶上。虽然没有尝试进一步表征这些贴壁细胞，但在骨髓、脐带和外周血的培养中观察到相似的细胞，因此认为在性质上为非干细胞。

成纤维细胞样贴壁细胞成簇出现，在外观上与间充质干细胞(MSC)相似，通过差异胰酶消化分离，并在二级瓶中进行传代培养。所述细胞在胰酶消化后呈圆形。对胰酶消化后的圆形细胞进行相差显微镜检，表明所述细胞高度粒化，类似于在实验室中生产的或从商业来源如 BioWhittaker 购买的骨髓来源 MSC。当传代培养时，所述贴壁胎盘细胞与其初期阶段不同，在数小时内贴壁，呈现特征性的成纤维细胞样形状，并形成类似于参照骨髓来源 MSC 的生长模式。而且，在传代培养和重新给料之后，洗掉了松散结合的单核细胞，且培养物保持均质，不含任何可见的非成纤维细胞样细胞污染物。

流式细胞仪分析

通过流式细胞仪分析评估了早期和晚期级分纯化单核细胞 CD34、CD38、SH2、SH3、SH4 及其它干细胞相关表面标记的表达。在特定情况下，细胞在 PBS 中洗涤，然后用抗 CD34 藻红蛋白和抗 CD38 异硫氰酸荧光素(Becton Dickinson, Mountain View, Calif.)双染。

在独立实验中,通过流式细胞仪分析评估了由不同灌洗液获得的、命名为 PLSC-1 到 PLSC-29 的胎盘干细胞 CD10、CD29、CD34、CD44、CD45、CD54、CD90、SH2 (CD 105)、SH3 (CD73)、SH4 (CD73)和 HLA-1 的表达。发现命名为 PLSC-1 到 PLSC-3、PLSC-5 到 PLSC-10、PLSC-15 到 PLSC-21、PLSC-23、PLSC-26 和 PLSC-27 的贴壁细胞为 CD10、CD29、CD54、SH2、SH3 和 SH4 阳性的,且为 CD34 和 CD45 阴性的。另外还发现命名为 PLSC-15 到 PLSC-21、PLSC-23、PLSC-26 和 PLSC-27 的贴壁细胞为 CD44、CD90 和 HLA1 阳性的。参见下文表 1。

从来自 PLSC-3 及 PLCS-6 到 PLSC-10 细胞的贴壁细胞中收集 mRNA,并利用特异于 OCT-4 (POU5F)的引物进行 rtPCR。所有测试的细胞群为 OCT-4 mRNA 阳性。

表1: 从不同培养流变实验中收集的胎盘干细胞(PLSC)的特征

ID #	培养基	Frozen (Vials)	CD34	CD45	CD10	CD29	CD54	SH2	SH3	SH4	SSEA4	CD44	HLA1	CD90	Oct4
PLSC-1	BW	Y (2)	-	-	+	+	+	+	+	+					
PLSC-2	BW	Y (6)	-	-	+	+	+	+	+	+					
PLSC-3	BW	Y (2)	-	-	+	+	+	+	+	+					+
PLSC-4	BW	None													
PLSC-5	BW	Y (9)	-	-	+	+	+	+	+	+					
PLSC-6	BW	Y (26)	-	-	+/low	+	+	+	+	+					+
PLSC-7	BW	Y (2)	-	-	+	+	+	+	+	+					+
PLSC-8	BW	Y (10)	-	-	+	+	+	+	+	+					+
PLSC-9	BW	Y (11)	-	-	+	+	+	+	+	+					+
PLSC-10	BW	Y (10)	-	-	+	+	+	+	+	+					+
PLSC-11	D-5%FCS	Y (9)													
PLSC-12	D-5%FCS	Y (7)													
PLSC-13	D-5%FCS	Y (5)													
PLSC-14	D-5%FCS	Y (9)													
PLSC-15	Anthro-1	Y (7)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
PLSC-16	Anthro-1	Y (8)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
PLSC-17	Anthro-1	Y (8)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
PLSC-18	Anthro-1	Y (8)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
PLSC-19	BWtoA	Y (17)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
PLSC-20	BWtoA	Y (40)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
PLSC-21	BWtoA	Y (9)	-	-	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	
PLSC-22	BWtoA	FTE													
PLSC-23	Anthro-1	Y (10)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
PLSC-24	Anthro-1	FTE													
PLSC-25	Anthro-1	FTE													
PLSC-26	Anthro-1	Y (15)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
PLSC-27	Anthro-1	Y (25)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	

+: 通过流式细胞计数检测, 或对于 OCT-4 而言, 通过 RT-PCR 检测的基因表达。 - : 未检测到。 空白: 未测试到所标记的存在。 FTE: 未能扩增。
 BW - BioWhittaker 完全培养基 (RPMI 1640 + 10% FBS), D-5%FCS; DMEM-5% FCS. BWtoA: BW 到 Anthro-1 培养基

分化

在分开的实验中，证明了所述贴壁成纤维细胞样细胞是干细胞。所述细胞在体外分化为脂肪细胞系的细胞，如形成油红染色可检测的油滴所证明的那样。所述细胞在体外还分化为神经原性系的细胞，如形成神经细胞特征性的树突样纺锤、以及出现胶质纤维酸性蛋白(glial acid fibrillary protein)和神经丝蛋白(两者均为神经细胞的标记)所证明的那样。所述细胞在体外还分化为软骨原性系的细胞，如出现软骨生产细胞所生产的、高碘酸-希夫试剂可检测的葡胺聚糖所证明的那样。在分开的实验中，确定了胎盘干细胞在 NOD-SCID 小鼠模型中不分化。

6.3 实施例 3：从胎盘结构中分离干细胞

6.3.1 材料&方法

6.3.1.1 分离包含胎盘干细胞的胎盘细胞群

从正常的、足月妊娠的胎盘中获得截然不同的胎盘细胞群。所有提供者均提供了为研究目的使用其胎盘的完全书面同意。从如下来源获得胎盘干细胞：(1)胎盘灌洗液(来自胎盘脉管系统的灌洗)；和以下的酶促消化物：(2)羊膜、(3)绒毛膜、(4)羊膜-绒毛膜盘，和(5)脐带。将各种胎盘组织在无菌 PBS (Gibco-Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)中清洁，并将其置于分开的无菌皮氏培养皿中。用无菌外科手术刀切碎各种组织，并置于 50 mL Falcon 锥形管内。切碎的组织用 1×胶原酶(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)在 37°C 水浴中消化 20 分钟，离心，然后用 0.25%胰蛋白酶-EDTA(Gibco-Invitrogen Corp)在 37°C 水浴中消化 10 分钟。在消化后离心各种组织，并用无菌 PBS(Gibco-Invitrogen Corp)漂洗一次。然后过滤重构的细

胞两次，一次用 100 μm 细胞过滤器，一次用 30 μm 分离滤器，以去除任何残留的胞外基质或细胞碎片。

6.3.1.2 细胞活力评估和细胞计数

在消化后采用人工台盼蓝排除方法来计算细胞计数并评估细胞活力。细胞与台盼蓝染料(Sigma-Aldrich)按 1:1 的比例混合，并在血球计数器上读出细胞计数。

6.3.1.3 细胞表面标记表征

选择 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺的细胞进行表征。通过两种 Becton-Dickinson 流式细胞仪，即 FACSCalibur 和 FACS Aria (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA)来鉴定、定量和表征具有该表型的细胞。在室温下在摇床上，以约 10 μL 抗体/1 百万个细胞的比例对各种胎盘细胞染色 30 分钟。使用下列抗人抗体：异硫氰酸荧光素(FITC)缀合的抗 HLA-G 的单克隆抗体(Serotec, Raleigh, NC)、抗 CD10 的单克隆抗体(BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA)、抗 CD44 的单克隆抗体(BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA)和抗 CD105 的单克隆抗体(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN)；藻红蛋白(PE)缀合的抗 CD44、CD200、CD117 和 CD13 的单克隆抗体(BD Biosciences Pharmingen)；藻红蛋白-Cy5 (PE Cy5)缀合的链抗生物素蛋白和抗 CD117 的单克隆抗体(BD Biosciences Pharmingen)；藻红蛋白-Cy7 (PE Cy7)缀合的抗 CD33 和 CD10 的单克隆抗体(BD Biosciences)；别藻蓝蛋白(APC)缀合的链抗生物素蛋白和抗 CD38 的单克隆抗体(BD Biosciences Pharmingen)；和生物素化的 CD90 (BD Biosciences Pharmingen)。在孵育后，漂洗细胞一次，以去除未结合的抗体，

并用 4%多聚甲醛(USB, Cleveland, OH)在 4℃固定过夜。第二天，漂洗细胞两次，通过 30 μm 分离过滤器过滤，并在流式细胞仪上计数。

使用抗小鼠 IgG 抗体(BD Biosciences Pharmingen)染色的样品作为阴性对照，来调整光电倍增管(PMT)。使用抗人抗体单染的样品作为阳性对照，来调整光谱重叠/补偿。

6.3.1.4 细胞分选和培养

在任何培养之前，用 7-氨基放线菌素 D (7AAD；BD Biosciences Pharmingen)和特异于感兴趣的表型的单克隆抗体对一组胎盘细胞染色(来自灌洗液、羊膜或绒毛膜)。以约 10 μL 抗体/1 百万个细胞的比例对所述细胞染色，于室温在摇床上孵育 30 分钟。然后，在 BD FACS Aria 上阳性分选这些细胞中表达感兴趣的表型的活细胞，并铺板培养。将分选(感兴趣的群)和“所有的”(未分选)的胎盘细胞群铺板用于比较。以表 2 中列举的细胞密度(细胞/cm²)将细胞铺板在纤粘连蛋白(Sigma-Aldrich)包被的 96 孔板上。细胞密度以及无论是一式两份还是一式三份的进行铺板的细胞类型，将根据表达感兴趣的表型的细胞数来确定和管理。

表 2：细胞铺板密度

96 孔板培养			
铺板细胞密度			
条件	分选的	所有的	全体最大密度
细胞来源	灌洗液		
组#1	40.6 K/cm ²	40.6 K/cm ²	93.8 K/cm ²
组#2	40.6 K/cm ²	40.6 K/cm ²	93.8 K/cm ²
组#3	40.6 K/cm ²	40.6 K/cm ²	93.8 K/cm ²
细胞来源	羊膜		
组#1	6.3 K/cm ²	6.3 K/cm ²	62.5 K/cm ²

组#2	6.3 K/cm ²	6.3 K/cm ²	62.5 K/cm ²
细胞来源	绒毛膜		
组#1	6.3 K/cm ²	6.3 K/cm ²	62.5 K/cm ²
组#2	6.3 K/cm ²	6.3 K/cm ²	62.5 K/cm ²

向 96 孔板的各孔中加入完全培养基(60% DMEM-LG (Gibco)和 40% MCDB-201 (Sigma)、2%胎牛血清(Hyclone Labs.); 1×胰岛素-转铁蛋白-硒(ITS); 1×亚麻酸-牛血清白蛋白(LA-BSA); 10⁻⁹ M 地塞米松(Sigma); 10⁻⁴ M 抗坏血酸 2-磷酸酯(Sigma); 表皮生长因子 10 ng/ml (R&D Systems); 和血小板衍生生长因子(PDGF-BB) 10 ng/ml (R&D Systems), 并将平板置于 5% CO₂/37°C 孵育箱中。在第 7 天, 向各孔中加入 100 μL 完全培养基。监测 96 孔板约 2 周, 并在第 12 天完成培养物的最终评估。这是极早期的胎盘干细胞培养, 代表 0 代细胞。

6.3.1.5 数据分析

利用标准的脉冲选通技术(gating technique)在 FlowJo (Tree Star, Inc)上分析 FACSCalibur 数据。利用 FACSDiva 软件(Becton-Dickinson)分析 BD FACS Aria 数据。利用偶极甄别脉冲选通和标准脉冲选通技术使偶极最小化, 来分析 FACS Aria 数据。所有结果均汇编于 Microsoft Excel 中, 且所有数值在本发明均以均值±标准偏差(数字, 均值的标准误差)表示。

6.3.2 结果

6.3.2.1 细胞活力

利用人工台盼蓝排除方法来评估消化后活力(图 1)。获自大部分消化组织(来自羊膜、绒毛膜或羊膜-绒毛膜盘)的细胞的平均活力约为 70%。羊膜

的平均活力为 $74.35\% \pm 10.31\%$ ($n=6$, $SEM=4.21$), 绒毛膜的平均活力为 $78.18\% \pm 12.65\%$ ($n=4$, $SEM=6.32$), 羊膜-绒毛膜盘的平均活力为 $69.05\% \pm 10.80\%$ ($n=4$, $SEM=5.40$), 而脐带的平均活力为 $63.30\% \pm 20.13\%$ ($n=4$, $SEM=10.06$)。来自灌洗、但未经消化的细胞保留了最高的平均活力, 即 $89.98\% \pm 6.39\%$ ($n=5$, $SEM=2.86$)。

6.3.2.2 细胞定量

分析所述胎盘细胞及脐带细胞的群以确定 HLA ABC⁺/CD45⁺/CD34⁺/CD133⁺细胞数。根据对 BD FACSCalibur 数据的分析, 观察到羊膜、灌洗液和绒毛膜分别含有最大的这些细胞总数: 分别为 30.72 ± 21.80 个细胞 ($n=4$, $SEM=10.90$), 26.92 ± 22.56 个细胞 ($n=3$, $SEM=13.02$), 和 18.39 ± 6.44 个细胞 ($n=2$, $SEM=4.55$) (数据未显示)。羊膜-绒毛膜盘和脐带分别含有最小的表达感兴趣的表型的细胞总数: 分别为 4.72 ± 4.16 个细胞 ($n=3$, $SEM=2.40$) 和 3.94 ± 2.58 个细胞 ($n=3$, $SEM=1.49$) (数据未显示)。

与之相似, 当分析表达感兴趣的表型的总细胞百分比时, 观察到羊膜和胎盘灌洗液含有最高的表达该表型的细胞百分比, 分别是 $0.0319\% \pm 0.0202\%$ ($n=4$, $SEM=0.0101$) 和 $0.0269\% \pm 0.0226\%$ ($n=3$, $SEM=0.0130$) (图 2)。虽然脐带含有少量表达感兴趣的表型的细胞 (图 2), 但是它含有第三高的表达感兴趣的表型的细胞百分比, $0.020\% \pm 0.0226\%$ ($n=3$, $SEM=0.0131$) (图 2)。绒毛膜和羊膜-绒毛膜盘含有最低的表达感兴趣的表型的细胞百分比: 分别是 $0.0184\% \pm 0.0064\%$ ($n=2$, $SEM=0.0046$) 和 $0.0177\% \pm 0.0173\%$ ($n=3$, $SEM=0.010$) (图 2)。

与 BD FACSCalibur 分析的结果一致, BD FACS Aria 数据也鉴定到羊膜、灌洗液和绒毛膜比其它来源提供更高的 HLA ABC⁺/CD45⁺/CD34⁺/CD133⁺细胞数。在羊膜、灌洗液和绒毛膜中表达感兴趣的表型的平均总细胞数分别是: 126.47 ± 55.61 个细胞($n=15$, SEM=14.36)、 81.65 ± 34.64 个细胞($n=20$, SEM=7.75)和 51.47 ± 32.41 个细胞($n=15$, SEM=8.37)(数据未显示)。羊膜-绒毛膜盘和脐带含有最小的表达感兴趣的表型的总细胞数, 分别是 44.89 ± 37.43 个细胞($n=9$, SEM=12.48)和 11.00 ± 4.03 个细胞($n=9$, SEM=1.34)(数据未显示)。

BD FACS Aria 数据揭示了灌洗液和羊膜产生最高的 HLA ABC⁺/CD45⁺/CD34⁺/CD133⁺细胞百分比, 分别是 $0.1523 \pm 0.0227\%$ ($n=15$, SEM=0.0059)和 $0.0929 \pm 0.0419\%$ ($n=20$, SEM=0.0094)(图 3)。羊膜-绒毛膜盘含有第三高的表达感兴趣的表型的细胞百分比, $0.0632 \pm 0.0333\%$ ($n=9$, SEM=0.0111)(图 3)。绒毛膜和脐带含有最低的表达感兴趣的表型的细胞百分比, 分别是 $0.0632 \pm 0.0249\%$ ($n=15$, SEM=0.0064)和 $0.0457 \pm 0.0055\%$ ($n=9$, SEM=0.0018)(图 3)。

在对每种细胞来源的 HLA ABC⁺/CD45⁺/CD34⁺/CD133⁺细胞进行了鉴定和定量后, 还对其细胞进一步分析和表征了其细胞表面标记 HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200 和 CD105 的表达。

6.3.2.3 胎盘灌洗液来源的细胞

灌洗液来源的细胞一般呈 HLA-G、CD33、CD117、CD10、CD44、CD200、CD90、CD38、CD105 和 CD13 阳性(图 4)。灌洗液来源细胞的每种标记的

平均表达如下：37.15%±38.55% (n=4, SEM=19.28)的细胞表达 HLA-G；36.37%±21.98% (n=7, SEM=8.31)的细胞表达 CD33；39.39%±39.91% (n=4, SEM=19.96)的细胞表达 CD117；54.97%±33.08% (n=4, SEM=16.54)的细胞表达 CD10；36.79%±11.42% (n=4, SEM=5.71)的细胞表达 CD44；41.83%±19.42% (n=3, SEM=11.21)的细胞表达 CD200；74.25%±26.74% (n=3, SEM=15.44)的细胞表达 CD90；35.10%±23.10% (n=3, SEM=13.34)的细胞表达 CD38；22.87%±6.87% (n=3, SEM=3.97)的细胞表达 CD105；而25.49%±9.84% (n=3, SEM=5.68)的细胞表达 CD13。

6.2.2.4 羊膜来源的细胞

羊膜来源的细胞一致是 HLA-G、CD33、CD117、CD10、CD44、CD200、CD90、CD38、CD105 和 CD13 阳性(图 5)。羊膜来源细胞的每种标记的平均表达如下：57.27%±41.11% (n=3, SEM=23.73)的细胞表达 HLA-G；16.23%±15.81% (n=6, SEM=6.46)的细胞表达 CD33；62.32%±37.89% (n=3, SEM=21.87)的细胞表达 CD117；9.71%±13.73% (n=3, SEM=7.92)的细胞表达 CD10；27.03%±22.65% (n=3, SEM=13.08)的细胞表达 CD44；6.42%±0.88% (n=2, SEM=0.62)的细胞表达 CD200；57.61%±22.10% (n=2, SEM=15.63)的细胞表达 CD90；63.76%±4.40% (n=2, SEM=3.11)的细胞表达 CD38；20.27%±5.88% (n=2, SEM=4.16)的细胞表达 CD105；而 54.37%±13.29% (n=2, SEM=9.40)的细胞表达 CD13。

6.2.2.5 绒毛膜来源的细胞

绒毛膜来源的细胞一致是 HLA-G、CD117、CD10、CD44、CD200、CD90、CD38 和 CD13 阳性，而 CD33 和 CD105 的表达各异(图 6)。绒毛膜

细胞的每种标记的平均表达如下：53.25%±32.87% (n=3, SEM=18.98)的细胞表达 HLA-G；15.44%±11.17% (n=6, SEM=4.56)的细胞表达 CD33；70.76%±11.87% (n=3, SEM=6.86)的细胞表达 CD117；35.84%±25.96% (n=3, SEM=14.99)的细胞表达 CD10；28.76%±6.09% (n=3, SEM=3.52)的细胞表达 CD44；29.20%±9.47% (n=2, SEM=6.70)的细胞表达 CD200；54.88%±0.17% (n=2, SEM=0.12)的细胞表达 CD90；68.63%±44.37% (n=2, SEM=31.37)的细胞表达 CD38；23.81%±33.67% (n=2, SEM=23.81)的细胞表达 CD105；而 53.16%±62.70% (n=2, SEM=44.34)的细胞表达 CD13。

6.3.2.6 羊膜-绒毛膜盘来源的细胞

羊膜-绒毛膜盘来源的细胞一致是 HLA-G、CD33、CD117、CD10、CD44、CD200、CD90、CD38、CD105 和 CD13 阳性(图 7)。羊膜-绒毛膜盘来源细胞的每种标记的平均表达如下：78.52%±13.13% (n=2, SEM=9.29)的细胞表达 HLA-G；38.33%±15.74% (n=5, SEM=7.04)的细胞表达 CD33；69.56%±26.41% (n=2, SEM=18.67)的细胞表达 CD117；42.44%±53.12% (n=2, SEM=37.56)的细胞表达 CD10；32.47%±31.78% (n=2, SEM=22.47)的细胞表达 CD44；5.56% (n=1)的细胞表达 CD200；83.33% (n=1)的细胞表达 CD90；83.52% (n=1)的细胞表达 CD38；7.25% (n=1)的细胞表达 CD105；而 81.16% (n=1)的细胞表达 CD13。

6.3.2.7 脐带来源的细胞

脐带来源的细胞一致是 HLA-G、CD33、CD90、CD38、CD105 和 CD13 阳性，而 CD117、CD10、CD44 和 CD200 的表达各异(图 8)。脐带来源细胞的每种标记的平均表达如下：62.50%±53.03% (n=2, SEM=37.50)的细胞

表达 HLA-G ; 25.67%±11.28% (n=5 , SEM=5.04) 的细胞表达 CD33 ; 44.45%±62.85% (n=2 , SEM=44.45) 的细胞表达 CD117 ; 8.33%±11.79% (n=2 , SEM=8.33) 的细胞表达 CD10 ; 21.43%±30.30% (n=2 , SEM=21.43) 的细胞表达 CD44 ; 0.0% (n=1) 的细胞表达 CD200 ; 81.25% (n=1) 的细胞表达 CD90 ; 64.29% (n=1) 的细胞表达 CD38 ; 6.25% (n=1) 的细胞表达 CD105 ; 而 50.0% (n=1) 的细胞表达 CD13。

所有标记平均表达的概况示于图 9。

6.3.2.8 BD FACS Aria 分选报告

表达最大百分比的 HLA ABC、CD45、CD34 和 CD133 的三种截然不同的胎盘细胞群(来源于灌洗液、羊膜和绒毛膜的细胞)用 7AAD 和这些标记的抗体来染色。阳性分选这三个群中表达感兴趣的表型的活细胞。BD FACS Aria 分选的结果如表 3 所示。

表 3:

BD FACS Aria 分选报告			
细胞来源	处理事件	分选事件(感兴趣的表型)	总的%
灌洗液	135540110	51215	0.037786
羊膜	7385933	4019	0.054414
绒毛膜	108498122	4016	0.003701

将三种截然不同的阳性分选细胞群(“分选的”)及其相应的未分选的细胞铺板,并于第 12 天评估培养的结果(表 3)。分选的灌洗液来源的细胞,以 40,600/cm² 的密度铺板,获得小的、圆的、非贴壁的细胞。三组未分选的灌洗液来源的细胞中的两组,均以 40,600/cm² 的密度铺板,获得大部分小的、圆的、非贴壁的细胞,其中围绕孔的边缘分布着一些贴壁细胞。未

分选的灌洗液来源的细胞，以 $93,800/\text{cm}^2$ 的密度铺板，获得大部分小的、圆的、非贴壁的细胞，其中围绕孔的边缘分布着一些贴壁细胞。

分选的羊膜来源的细胞，以 $6,300/\text{cm}^2$ 的密度铺板，获得小的、圆的、非贴壁的细胞。未分选的羊膜来源的细胞，以 $6,300/\text{cm}^2$ 的密度铺板，获得小的、圆的、非贴壁的细胞。未分选的羊膜来源的细胞，以 $62,500/\text{cm}^2$ 的密度铺板，获得小的、圆的、非贴壁的细胞。

分选的绒毛膜来源的细胞，以 $6,300/\text{cm}^2$ 的密度铺板，获得小的、圆的、非贴壁的细胞。未分选的绒毛膜来源的细胞，以 $6,300/\text{cm}^2$ 的密度铺板，获得小的、圆的、非贴壁的细胞。未分选的绒毛膜来源的细胞，以 $62,500/\text{cm}^2$ 的密度铺板，获得小的、圆的、非贴壁的细胞。

大多数上述非贴壁细胞在培养时贴壁于组织培养表面，并呈现出成纤维细胞样形状。

继上述开展的实验之后，进一步培养了胎盘干细胞，确定标记 CD117 和 CD133 的抗体后(其中用生物素缀合的藻红蛋白(PE)来标记链抗生物素蛋白缀合的抗体)，产生了足够高的类似于阳性读出的背景。此背景最初导致认为胎盘干细胞两种标记均为阳性。当使用不同的标记如 APC 或 PerCP 时，则背景降低，且正确地确定了胎盘干细胞 CD117 和 CD133 均为阴性。

6.4 实施例 4：胎盘干细胞标记表达的表征

此实施例描述的实验设计用以进一步表征胎盘干细胞如下多种蛋白表达标记的表达：CD200⁺、CD105⁺、CD90⁺、CD10⁺、细胞角蛋白 18⁺、CD34⁺ 和 CD45⁻。另外，还评估了未诱导的胎盘干细胞上肝细胞标记的基线表达，

例如, 包括细胞角蛋白 18 的表达、肝细胞生长因子(HGF)的分泌和唾液酸糖蛋白受体的表达。

按照如下的例示性流式细胞仪分析方案评估了胎盘干细胞的标记表达。胎盘干细胞首先进行胰酶消化, 然后与荧光物缀合的抗体在冰上在黑暗中一起孵育 30 分钟, 用冷 PBS-2% BSA 漂洗两次, 然后用 FACSCalibur (BD Biosciences)进行分析。适用于这些测定的例示性抗体有 PerCP 缀合的抗 CD34、FITC 缀合的抗 CD105、APC 缀合的抗 CD10 以及 PE 缀合的 CD200。其它合适的抗体试剂包括适当的荧光团组合: APC 缀合的抗 HLA-ABC、PE 缀合的抗 CD31、PerCP 缀合的抗 CD45、FITC 缀合的抗 CD38、PE 缀合的抗 CD44、FITC 缀合的抗细胞角蛋白 K (或细胞角蛋白 18)、APC 缀合的抗 CD90、APC 缀合的抗 CD86、FITC 缀合的抗 CD80、FITC 缀合的抗 HLA DR,DQ,DP、PE 缀合的抗 β -2-微球蛋白、APC 缀合的抗 CD133 以及 PerCP 缀合的抗 CD117。除非另行指出, 这些抗体可购自 BD-Pharmingen。流式细胞仪数据的分析和统计由 Flowjo (Tree Star, Inc. Ashland, OR)完成。

胎盘干细胞所产生的细胞因子通过收集培养细胞的上清液, 利用 LincoPlex 脂原性分析试剂盒(Adipogenic analysis kit)和 Luminex 设备根据生产商的说明来分析。

6.5 实施例 5: 利用丁酸钠诱导胎盘细胞分化为肝细胞

此实施例描述了利用丁酸钠诱导胎盘干细胞的肝细胞分化的示例方法。设计所述方法用以表征经丁酸钠诱导的胎盘干细胞, 其中利用多种蛋白表达标记、肝细胞特异性基因以及肝细胞特异性标记如细胞角蛋白 18 (一

种早已在未分化的胎盘干细胞中表达的分子)和唾液酸糖蛋白受体的表达。

评估了诱导的胎盘干细胞产生胞内白蛋白以及分泌豚的能力。

为诱导分化, 将胎盘干细胞以大约 10^5 细胞/孔的密度在 0.1%明胶包被的 6 孔板的 Iscove 改良 Dulbecco 培养基(IMDM) (Gibco, Cat # 31980-030)中铺板, 所述培养基含 20 %胎牛血清(Gibco)、4 mM L-谷氨酸(Gibco)、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素(Gibco)和 10 μ g/ml 庆大霉素(Gibco)。明胶溶液(0.1%)通过将 0.5 mg 猪明胶(Sigma- Aldrich, Cat # G-2500)溶于 500 ml 磷酸缓冲盐溶液(PBS) (Gibco, Cat # 20012-027)中来制备, 其间温和加热。为用明胶包被板, 向聚苯乙烯组织培养处理板的各孔中添加 2 ml 0.1%明胶溶液。板孵育 2 小时, 之后吸出凝胶溶液。板用 PBS 洗涤一次, 然后添加 2.5 ml IMDM, 之后大约 10^5 细胞/孔铺板。任选接下来的 4 天使细胞接触 1% DMSO (Sigma-Aldrich), 之后与不同浓度(1、2.5、5、10 mM)的丁酸钠(Sigma Aldrich, Cat # B5887)接触 6 天。每天更换培养基。

为了测量分化细胞的功能, 起始次级培养, 其中从原代培养皿中取出细胞, 以大约 10^5 细胞/孔的密度重新铺板在 I 型胶原包被板(BD Biosciences)和聚苯乙烯 12 孔板中。在重新铺板后 24 小时更换培养基, 并在重新铺板后 48 小时对细胞测试, 进行功能测定。

6.6 实施例 6: 通过褐藻胶-聚-L-赖氨酸微囊化来聚集胎盘干细胞为分化为肝细胞作准备

此实施例描述了利用褐藻胶微囊化技术来聚集胎盘干细胞, 为使所述细胞分化为肝细胞作准备的示例方法。

褐藻胶-聚-L-赖氨酸胶囊化

利用加热的磁力搅拌极板通过在 45°C 将 2.2 g 褐藻胶(Sigma-Aldrich, 分子量: 100,000-200,000 g/mol, G 含量: 65%-70%)溶于 100 mL 不含 Ca^{2+} 的 DMEM (Gibco)中生成褐藻胶溶液。然后利用 25 μm 注射器过滤器(Fisher Brand, Pittsburg, PA)过滤溶液。在胰蛋白酶孵育后去除汇合的单层贴壁细胞, 以 1200 rpm 离心 10 分钟, 并重悬于 PBS 中。细胞用 PBS (Gibco)再洗涤两次, 重悬于 2 mL 其相应的培养基中, 并利用台盼蓝(Gibco)排除法评估细胞数和活力。为产生细胞-褐藻胶混合物, 将 1 mL 等份细胞悬液以大约 5×10^7 细胞/ml 的接种密度添加到 9 mL 2.2% (w/v)褐藻胶溶液中, 以得到大约 5×10^6 细胞/ml 的终细胞接种密度和 2.0% (w/v)的终褐藻胶浓度。将此溶液转移到 10 mL 注射器(BD Biosciences)中, 其依次连接于注射器泵(KD Scientific, Holliston, MA)。利用静电珠子生成器(Nisco, Zurich, Switzerland)以 40 mL/小时的流速和 6.5 kV 的输入电压生成褐藻胶珠子, 得到直径 500 μm 的珠子。将珠子挤出到含 145 mM NaCl (Sigma-Aldrich)和 10 mM MOPS (Sigma-Aldrich)的 200 mL CaCl_2 (100 mM) (Sigma-Aldrich)水浴中, 并在室温静置聚合 10 分钟。在聚合步骤之后, 将珠子转移到组织培养处理的 T-25 瓶(Falcon, BD Biosciences)中。利用 5 mL 移液管吸走 CaCl_2 溶液, 并用 5 mL HEPES (Gibco)洗涤珠子。除去缓冲液, 将珠子于 5 mL 聚-L-赖氨酸(PLL) (Sigma-Aldrich, 分子量: 68,600 g/mol) (0.05% w/v)中重悬 2 分钟。然后轻轻除去 PLL, 替换为 HEPES 以洗涤珠子, 并最终将珠子重悬于 5 mL 细胞培养基中。在例如胶囊化后第 4、8、11、14 和 17 天更换培养基。

胶囊内活力的评估

在胶囊化后立即利用钙黄绿素(Molecular Probes, Eugene, OR)、溴乙非啶同型二聚体(Molecular Probes)染色评估珠子内的活力。钙黄绿素仅在活细胞中切割形成荧光产物,而溴乙非啶同型二聚体仅掺入死细胞的细胞核中。利用装备有 495 nm 激发滤光器以及分别为 515 nm 和 635 nm 的发射滤光器的 Zeiss Axiovert LSM 激光扫描共聚焦显微镜(Germany)获取钙黄绿素和溴乙非啶同型二聚体图像。具体而言,以 10 μm 间隔、总景深 250 μm 对 500 μm 直径的珠子进行 z 轴扫描。三个实验整合为每个实验分析 15 个珠子。数字图像利用 Olympus MICROSUITE™来定量。评估了每个珠子的每个横截面。

聚合反应之后的细胞回收和评估

在细胞从珠子中释放出来后的每一个分析日进行功能分析和聚集体大小计算。每种条件下每份重复分析至少 1500 个珠子。珠子用 PBS 洗涤,并添加含 10 mM MOPS (Sigma- Aldrich)和 27 mM NaCl (Sigma-Aldrich)的 100 mM 柠檬酸钠(Fisher Scientific), 37°C 30 分钟,以诱发聚合反应。为确定聚合反应之后的回收产率,胶囊化已知浓度的细胞并立即解聚。离心后,利用台盼蓝排除法(其不染色胶囊)计数细胞沉淀和上清液(其含有珠子颗粒,但不含完整的珠子),经质量权衡后,证实与起始群中存在大致相同数量的细胞。该方法显示了回收到 98%胶囊化的细胞群。所述释放的细胞在 1200 rpm 离心 10 分钟,吸出柠檬酸钠溶液,细胞沉淀用 PBS (3 $\times$)洗涤,并重悬于细胞特异性培养基中。然后利用上文所述的台盼蓝方法计数细胞。

胶囊内聚集体大小测定

在胶囊化后立即(第 0 天)以及分析日第 8、11、14、17、20 天从组织培养处理的 T-25 瓶中取样珠子,并转移到 35 mm Mattek 皿(Mattek, Ashland,

Massachusetts)中。利用 Zeiss Axiovert LSM 激光扫描共聚焦显微镜(Germany)获取明视场图象。具体而言,为避免多次定量同一聚集体,以 50 μm 间隔、总景深 250 μm 对 500 μm 直径的珠子进行 z 轴扫描。图像利用 Olympus Microsuite 来定量。简而言之,首先应用色阈,以便区分细胞聚集体和图像背景。然后利用平均直径颗粒测量来确定聚集体的直径。

6.7 实施例 7: 原位间接荧光免疫分析细胞角蛋白-18 和胞内白蛋白分析

此实施例描述了评估由分化的胎盘干细胞获得的肝细胞的细胞角蛋白-18 和白蛋白表达的示例方法。将分化的细胞(如果合适,则在聚合反应之后回收的)转移到组织培养处理的 24 孔板(Falcon, BD Biosciences)中。具体而言,将分离的细胞群在 0.75 ml 培养基中稀释到大约 6×10^4 细胞,并在 37°C 孵育 1 小时以允许细胞附着。细胞随之在冷 PBS 中洗涤 10 分钟,并在 4%多聚甲醛(Sigma-Aldrich)的 PBS 溶液中于室温固定 15 分钟。细胞在冷 PBS 中洗涤两次,每次 10 分钟,随后在含 1%胎牛血清(BSA)(Sigma-Aldrich)、0.5%皂角苷(Sigma-Aldrich)和 0.1%叠氮化钠(Sigma-Aldrich)的冷皂角苷/PBS (SAP)膜渗透缓冲液中洗涤两次,每次 10 分钟。为检测胞内白蛋白,细胞随后在含有兔抗小鼠白蛋白抗体(150 $\mu\text{g/ml}$) (MP Biomedicals, Irvine, CA)或者作为同种型对照的正常兔血清(150 $\mu\text{g/ml}$) (MP Biomedicals)的 SAP 溶液中于 4°C 孵育 30 分钟,在冷 SAP 缓冲液中洗涤两次,每次 10 分钟,然后在 4°C 用第二抗体即 1:500 稀释的 FITC 缀合的驴抗兔抗体(Jackson Immuno Labs, Westgrove, PA)处理 30 分钟。为检测细胞角蛋白 18,细胞在含有兔抗小鼠细胞角蛋白 18 (IgG1) (1:50 稀释) (Santa Cruz Biotechnology) 或者作为同种型对照的正常兔血清(1:100 稀释) (Santa Cruz

Biotechnology) IgG1 级分的 SAP 溶液中于 4℃ 孵育 30 分钟, 然后在 4℃ 用第二抗体即 1:200 稀释的 FITC 缀合的山羊抗兔抗体(Jackson Immuno Labs, Westgrove, PA)处理 30 分钟。为进行两种染色, 细胞随之用冷 SAP 缓冲液洗涤一次, 并用冷 PBS 洗涤一次。利用计算机接口的倒置 Olympus IX70 显微镜获取荧光图像。利用 515 nm 滤光器激发样本。利用 Olympus MICROSUITE™测定各细胞的荧光强度值。在减去同种型对照的平均强度后计算出各细胞的实验强度值。

6.8 实施例 8: 糖原染色

此实施例描述了评估从分化的胎盘干细胞获得的肝细胞产生的糖原的示例方法。在聚合反应之后, 将细胞转移到组织培养处理的 24 孔板(Falcon, BD Biosciences)中, 并用 10%福尔马林-乙醇固定液在室温固定 15 分钟, 随后用 PBS 洗涤。固定的细胞与每孔 0.25 ml 的高碘酸溶液(Sigma Aldrich)在室温接触 5 分钟。在此过程中乙二醇氧化为乙醛。在用 PBS 洗涤细胞以除去 PAS 之后, 每个孔中加入 1 ml 希夫试剂, 细胞与之在室温接触 15 分钟。希夫试剂为副品红与焦亚硫酸钠的混合物, 反应后释放副品红产物, 染色含乙二醇的细胞元件。第三次 PBS 洗涤以除去所述试剂, 接着用 Olympus IX 70 显微镜和 Olympus 数码相机获取图像。

6.9 实施例 9: 葡萄糖和乳酸盐测量

此实施例描述了评估由分化的胎盘干细胞获得肝细胞的葡萄糖和乳酸盐消耗和/或产量的示例方法。一式三份收集每种细胞类型次级培养物的上清液(1 ml), 然后利用 Bioprofile Bioanalyzer 400 (Nova Biomedical, Waltham, MA)对其测试, 进行葡萄糖和乳酸盐的代谢测量。在分析的每一天, 测量

了基础培养基的葡萄糖和乳酸盐测量值，并从试验值中减去其平均值，以获得吸收值或产量。对每个条件计数细胞，以得到最终的消耗率或生产率。

6.10 实施例 10：脲分析

此实施例描述了评估由分化的胎盘干细胞获得肝细胞的脲产量的示例方法。直接从细胞培养物收集培养基样品，并储存在-20°C 用于随后的脲含量分析。利用可商购的试剂盒(StanBio, Boerne, Texas)测定脲合成。通过建立从 300 µg/ml 到 0 µg/ml 系列稀释的脲标准品来生成标准曲线。利用具有 585 nm 发射滤光器的 Biorad (Hercules, CA) 680 型板读数器获得吸光值读数。脲值针对收集培养基样品当天记录的细胞数进行标准化。

6.11 实施例 11：用于检测白蛋白分泌的夹心 ELISA

此实施例描述了评估由分化的胎盘干细胞获得的肝细胞的白蛋白分泌的示例方法。为了检测在每个分析日获得的培养基上清液中的分泌的白蛋白，使用可商购的小鼠白蛋白 ELISA 试剂盒(Bethyl Laboratories, #E90-134)。通过建立从 7.8 到 10,000 ng/mL 系列稀释的白蛋白标准品来生成标准曲线。利用具有 450 nm 发射滤光器的 Biorad (Hercules, CA) 680 型板读数器获得吸光值读数。白蛋白值针对收集培养基样品当天记录的细胞数进行标准化。

6.12 实施例 12：小鼠乙型肝炎感染模型

此实施例描述了使用由本发明别处描述的胎盘干细胞分化的肝细胞的小鼠乙型肝炎病毒(HBV)感染模型。通过(1)辐照小鼠，该小鼠然后通过施用 SCID 小鼠骨髓来保护；和(2)施用已经由胎盘干细胞分化的 HBV 感染的

肝细胞产生所述小鼠。随之向所述小鼠施用待测试其减小病毒复制或病毒载量能力的化合物。

胎盘干细胞。贴壁胎盘干细胞通过上文实施例 1 中描述的一种或多种方法获得。

肝细胞的制备。胎盘干细胞按照上文实施例 4 中描述的方法进行分化。

胎盘干细胞来源肝细胞的 HBV 感染。通过离心收集处于褐藻胶中的胎盘干细胞来源肝细胞，并重悬于添加 3 μg 溴化己二甲胺(hexidementhrine bromide) (Sigma-Aldrich, H-9268, St. Louis, MO)和 0.5 μg 人白介素 6 (IL-6; Preprotech, London, England)的 1 mL 高滴度 HBV DNA 人血清中。

小鼠的制备。使用 6-10 周龄的 CB16F 或 BNX (淡棕色/裸鼠/xid)小鼠及 NOD/SCID 小鼠。向小鼠饲喂消毒食物和含环丙沙星(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的酸性水。CB16F 小鼠(Harlan Laboratories, Weizmann Institute Animal Breeding Center, Rehovot, Israel)以大约 4 Gy 的剂量接触全身辐射, 3 天后接触大约 11 Gy 的剂量, 射线来自大约 0.7 Gy/分辐照速率的伽马射束 150-A ^{60}Co 源(Atomic Energy of Canada, Kanata, Ontario, Canada)。立即向所述辐照的小鼠移植大约 4×10^6 到大约 6×10^6 处于 0.2 mL 磷酸缓冲盐溶液中的来自 NOD/SCID 小鼠的骨髓细胞。通过在 Omni-Mixer 中于磷酸缓冲盐溶液中破坏股骨和胫骨以获得骨髓细胞, 接着从所得的细胞悬液中排空 T 细胞来制备骨髓细胞。参见 Levite 等, *Transplantation* 8:1-3 (1991)。在骨髓移植后, 小鼠每天腹膜内注射 1 mg 复达欣(Fortum) (Glaxo), 共计 5 天。在骨髓移植后立即将 HBV 感染的胎盘干细胞来源肝细胞(大约 5×10^7)移植到所述辐照的小鼠肾包膜下或耳壳中。可以通过活检和苏木精-曙红染色以及通过检测移植的组织中人血清白蛋白编码 mRNA 的表达来评估肝细胞的移植。

BNX 小鼠同 CB16F 小鼠一样制备,除了 BNX 小鼠以 11 Gy 的剂量辐照一次,且至少在骨髓细胞移植后 10 天进行 HBV 感染肝细胞的移植。

从 HBV 感染血清中提取 DNA。在含 0.25% 十二烷基硫酸钠、5 mmol/L EDTA、10 mmol/L Tris HCl (pH 8.0) 和 250 µg/mL 蛋白酶 K (Sigma, St. Louis, MO) 的 400 µL 反应混合物中通过蛋白酶 K 消化从 100 µL 血清中提取 DNA。65°C 消化 2.5 小时后,添加 1 µg DNA 载体和 0.5 mg BSA。然后通过酚-氯仿提取 DNA,并在乙醇中于 -20°C 沉淀过夜。在 20,000 g 离心 15 分钟后,用 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀,干燥,并重悬于 50 µL 水中。

测定小鼠血清中的 HBV DNA 水平。利用 HBV 特异性引物通过半定量 PCR 来确定 HBV DNA 拷贝数。在标准 2% 琼脂糖凝胶上分离 PCR 产物。50 µL 产物进行斑点印迹,并在 42°C 与适当 [³²P] 标记的 DNA 片段 (Rediprime DNA labeling system, Amersham, Buckinghamshire, UK) 杂交过夜。印迹随之在 0.1 × 0.15 mol/L NaCl 和 0.015 mol/L 柠檬酸钠, pH 7.0 及 1% SDS 中于 55°C 洗涤,并曝光至 X 光胶片。在 ELISA 读数器上(如 Dynatech 在 630 nm)或在 Molecular Dynamics 计算光密度计 300A 型上读出斑点强度。利用从标准化人血清中获得的 DNA 样品构成的标准曲线来确定病毒载量,所述人血清在正常小鼠血清中稀释,每 100 µL 样品含 10² 到 10⁷ 个拷贝。病毒载量低于大约 5 × 10³/mL 血清的小鼠视为未感染。此操作中所使用的引物共价闭环和松弛形式的 HBV 均能识别。

可选地或另外地,可以利用识别 HBV 表面抗原的一种或多种抗体通过 ELISA 来确定 HBV 病毒载量。

确定移植的肝细胞中的 HBV 共价闭环 DNA。如果需要确认病毒复制,可实施此步骤。从离心收集的肝细胞(大约 1 × 10⁵)中提取 DNA,并重悬于

100 μL 水中。50 μL 利用 HBV 特异性引物在含 13 Taq Pol 缓冲液、2.5 mmol/L MgCl_2 、0.2 mmol/L 各 dNTP、50 pmol 各引物、1 mg/mL BSA 和 2.5 U Taq Pol. (Promega) 的 100 μL 反应混合物中进行 PCR。PCR 反应程序设计为 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 分钟, 然后是 30 个循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 分钟 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 分钟, 最后是延伸反应 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 分钟。在 2% 琼脂糖凝胶上分析 PCR 产物, 并利用对应于部分核心序列的 DNA 片段进行斑点印迹杂交。此操作使用仅识别共价闭环形式 HBV 的引物。

确定化合物的抗病毒活性。一旦确立了病毒血症, 对小鼠施用待测试其抗 HBV 活性的化合物。施用途径基于具体化合物来确定, 但通常要么是腹膜内要么是静脉内。在用感染的肝细胞移植后 6-17 天进行化合物的施用。在施用后第 2 天和第 9 天, 从小鼠抽取血清, 利用 HBsAg (HBV 表面抗原) 的抗体评估病毒载量, 并利用 PCR 检测 HBV 共价闭环 DNA (cccHBV)。与未施用化合物小鼠的病毒载体相比, 如果病毒载量可检测地减少(例如具有统计学意义的减少), 则确定所述化合物为抗病毒化合物。可将病毒载量与存在的 cccHBV 量进行比较, 以确定减少病毒载量的化合物是否为 HBV 复制抑制剂。

6.13 实施例 13: 诱导胎盘干细胞分化为软骨细胞

6.13.1 通用方法

胎盘干细胞的软骨原性分化通常如下实现:

1. 在添加 15% 脐带血清的 MSCGM (Cambrex) 或 DMEM 中维持胎盘干细胞。

2. 将胎盘干细胞等分到消毒的聚丙烯管中。细胞离心($150 \times g$ 5 分钟), 并在不完全软骨发生培养基(Cambrex)中洗涤两次。

3. 在最后一次洗涤后, 将细胞以 $5 \times 10^{(5)}$ 细胞/ml 的浓度重悬于含 0.01 $\mu\text{g/ml}$ TGF- β -3 的完全软骨发生培养基(Cambrex)中。

4. 将 0.5 ml 等份的细胞移至 15 ml 聚丙烯培养管中。细胞以 $150 \times g$ 离心 5 分钟以形成团块。团块原封不动地静置在培养基中。

5. 将松散盖上的管在 37°C , 5% CO_2 中孵育 24 小时。

6. 每 2-3 天用新鲜制备的完全软骨发生培养基饲喂细胞团块。

7. 通过每天利用低速涡旋搅拌使团块保持悬浮在培养基之中。

8. 在培养 14-28 天后, 收获软骨原性细胞团块。

9. 通过例如观察嗜曙红背景物质的产生, 评估细胞形态学, 和/或 RT/PCR 确认胶原 2 和/或胶原 9 的基因表达, 和/或如通过阿尔新蓝细胞化学染色所确认的软骨基质酸性粘多糖的产生, 来表征软骨发生。

软骨发生还可以通过早期软骨发生标记纤调蛋白和软骨寡聚基质蛋白的基因表达; 中期软骨发生标记聚集蛋白聚糖、多功能蛋白聚糖、核心蛋白聚糖和双链蛋白聚糖的基因表达; 以及成熟软骨细胞标记 II 型和 X 型胶原以及软骨粘附素的基因表达来评估。

还可以通过上文的方法诱导胎盘干细胞的软骨发生, 其中从步骤 3 开始, 在纳米纤维支架如聚 L-乳酸(PLLA)、I 型胶原或偏二氟乙烯和三氟乙烯的共聚物(PVDF-TrFE)上培养胎盘干细胞, 没有离心步骤 4。

6.13.2 胎盘干细胞和脐带干细胞分化为软骨原性细胞

此实施例示范了如何将胎盘干细胞分化为软骨源性细胞并从此类细胞形成软骨样组织。

软骨是缺乏神经供给的无血管、无淋巴的组织。软骨具有低软骨细胞密度(<5%),然而这些细胞令人惊讶地有效地维持着其周围的胞外基质。机体内存在三类主要的软骨:(1)关节软骨,其有助于关节中的关节润滑;(2)纤维软骨,其在例如半月板和椎间盘中提供减震;和(3)弹性软骨,其提供例如鼻和耳中的解剖结构。所有三类软骨在生化结构上是相似的。

关节疼痛是造成残废的主要原因,对整形外科领域提出了未满足的解除之需。原发性骨关节炎(其可引起关节变性)和损伤是两种常见的疼痛原因。大约9%的美国人患有髌或膝骨关节炎,且每年进行200万例以上的膝外科手术。不幸的是,现有的治疗更适合于治疗症状而不是修复软骨。当成纤维细胞样细胞侵入所述区域并以纤维组织填充之时,发生天然修复,但其不如正常组织有弹力或弹性,因此造成更大的损伤。过去的治疗选择包括组织移植、软骨下骨钻孔或全关节置换。然而,更近的治疗包括CARTICEL[®],自体软骨细胞注射;SYNVISC[®]和 ORTHOVISC[®],为透明质酸注射用以临时缓解疼痛;和 CHONDROGEN[™],注射成体间充质干细胞用于半月板修复。总的来说,这种趋势似乎更多地取向于涉及软骨细胞或干细胞的细胞治疗和/或组织工程产物。

材料和方法。

下文所述的研究中使用了命名为 AC61665, P3 (3代)和 AC63919, P5 的两种来自羊膜/绒毛膜的胎盘干细胞系,以及命名为 UC67249, P2 和 UC67477, P3 的两种来自脐带的干细胞系。人间充质干细胞(MSC)用作阳

性对照，而骨肉瘤细胞系 MC3T3 和人皮肤成纤维细胞(HDF)用作阴性对照。

通过酶促消化从足月人胎盘中分离和纯化胎盘干细胞和脐带干细胞。人 MSC 细胞核 HDF 细胞购自 Cambrex，而 MC3T3 细胞购自美国典型培养物保藏中心。所使用的所有细胞系在聚丙烯离心管中以 800 RPM 离心 5 分钟形成团块，并在软骨发生诱导培养基(Cambrex)和非诱导基础 MSC 培养基(Cambrex)中生长。收获团块，在第 7、14、21 和 28 天通过用阿尔新蓝染色葡胺聚糖(GAG)，和/或用天狼星红染色胶原来进行组织学分析。利用免疫染色进一步评估了胶原类型。在第 7 和 14 天进行软骨特异性基因的 RNA 分析。

结果

实验 1：设计软骨发生研究以实现三个主要目标：(1)证明胎盘干细胞和脐带干细胞能够分化并形成软骨组织；(2)证明胎盘干细胞和脐带干细胞能够功能性地分化为软骨细胞；和(3)通过评价对照细胞系来证实由所述干细胞获得的结果。

对于目标 1，在初步研究中，以细胞团块的形式在有或无 500 ng/mL 终浓度骨形态发生蛋白(BMP)的软骨发生诱导培养基中培养一种胎盘干细胞系。连续 4 周每周评估团块的软骨发生诱导迹象。结果表明团块大小确实随着时间而增大。然而，在 BMP⁺和 BMP⁻样品间未发现视觉上的差异。还通过阿尔新蓝染色对团块进行了 GAG (一种软骨组织指标)的组织学分析。BMP⁺细胞一般呈现出代谢较为活跃，而 BMP⁻细胞较小，细胞核强染色，细胞质较少(反映了滴代谢活性)。在第 7 天，BMP⁺细胞已染成深深的蓝色，

而 BMP⁺ 细胞仅微弱染色。至诱导第 28 天, BMP⁺ 和 BMP⁻ 细胞均大致同等地被阿尔新蓝染色。总体上, 细胞密度随着时间下降, 且基质超过了团块。相反, MC3T3 阴性细胞系在用阿尔新蓝染色时不显示任何 GAG 的存在。

实验 2: 基于实验 1 的结果, 设计了更为详细的研究以评估两种胎盘干细胞和两种脐带干细胞系的软骨发生分化潜能。除了阿尔新蓝组织学之外, 还用特异于 II 型胶原的天狼星红染色细胞。对每种细胞系制备了有或无诱导培养基的多种团块。

首先通过大致观察宏观软骨生成来评估团块培养的细胞系。总体上, 观察到所述干细胞系早在第 1 天就形成团块。这些团块随着时间增大, 形成呈白色光亮软骨样的坚韧基质, 并变得机械上也坚韧起来。通过视觉检查, 来自胎盘干细胞或脐带干细胞的团块比 MSC 对照要大得多。非诱导培养基中的对照团块到第 11 天开始散开, 且在第 28 天比培养在软骨发生诱导培养基中的细胞所形成的团块要小得多。从视觉上看, 由胎盘干细胞或脐带干细胞形成的团块之间没有差异。然而, 在不含地塞米松的培养基中起始培养的 UC67249 干细胞系形成更大的团块。阴性对照 MC3T3 细胞不形成团块; 不过, HDF 确实形成团块。

对来自所有测试组的代表性团块进行了 GAG 和胶原的组织学分析。一般而言, 所述干细胞在诱导条件下的形成的团块比非诱导条件下形成的团块要大得多, 且更佳地保持完整。诱导条件下形成的团块早在第 7 天就显示出 GAG 生产和随着时间渐增的胶原, 而非诱导条件下形成的团块显示出很少或没有胶原生产, 如弱阿尔新蓝染色所证明的那样。一般而言, 通过视觉观察, 胎盘干细胞和脐带干细胞看来比间充质干细胞产生更坚韧、更大的团块, 且看来随着时间产生更多的胶原。而且, 随着研究的进程, 所

述胶原看起来增厚,且胶原类型看起来发生变化,如偏振光下纤维颜色变化所证明的那样(颜色与纤维厚度相关,可以指示胶原类型)。与诱导的干细胞相比,未诱导的胎盘干细胞产生的II型胶原(如果有的话)要少得多。在所述28天期间,细胞密度随着基质产量增加而降低,为软骨组织的特有性质。

这些研究证实了胎盘干细胞和脐带干细胞能够沿软骨发生途径分化,且能够容易地诱导其形成软骨组织。初始的观察结果表明这样的干细胞对于形成软骨组织而言比MSC更可取。

6.14 实施例 14: 通过纳米纤维支架诱导分化为软骨细胞

此实施例描述了用纳米纤维支架诱导干细胞(包括胎盘干细胞或来自骨髓的间充质干细胞(BM-MSC))分化为软骨细胞的方法。此实施例的目标有三重:1)表征胎盘干细胞的体外软骨发生分化;2)确定刺激胎盘干细胞体外软骨发生分化的最佳支架;和3)利用胎盘干细胞-支架构建体评价兔模型中骨软骨缺损的体内修复。

为实现目标1,利用动态团块胎盘干细胞培养物以延长培养持续时间超过28天。评估了静态以及动态团块培养物中胎盘干细胞软骨发生早期和晚期标记的临时基因表达以及生化和组织学分析。胎盘干细胞在有或无TGF- β 3的团块培养物中在静态或动态条件下培养长达56天。通过实时PCR,对早期标记纤调蛋白和软骨寡聚基质蛋白进行定量基因表达分析。也评估了中期标记聚集蛋白聚糖、多功能蛋白聚糖、核心蛋白聚糖和双链蛋白聚糖。也评估了成熟软骨细胞特有的II型和X型胶原以及软骨粘附素的基因。对II型胶原、葡胺聚糖和蛋白聚糖的合成进行了生化测定。也通过时间进程期间的组织学染色表征了软骨发生团块的组织形态学。

为实现目标 2, 评估了电镀纳米纤维支架促进胎盘干细胞分化为软骨细胞的能力。评估了由聚 L-乳酸(PLLA)、I 型胶原以及偏二氟乙烯和三氟乙烯的共聚物(PVDF-TrFE)构成的支架。将胎盘干细胞装载到由这些材料生成的支架上, 并在静态和动态两种条件下培养。在研究进程期间进行了定量基因表达、生化和组织学分析以及机械试验。

为实现目标 3, 通过在软骨缺损不会自发愈合的动物模型(例如兔骨软骨缺损模型)中进行体内功能评价来评估胎盘干细胞的软骨修复。在此模型中结合胎盘干细胞评价了支持软骨发生分化的支架。通过组织化学染色来评价修复, 具体评估未受损软骨和修复软骨之间的软骨联合程度。还通过对从最初缺损部位切下的样品进行机械评价来测量骨软骨修复。

6.14.1 纤维支架制作

此实施例描述了示例纳米纤维非织网的制作和表征。采用电镀计数来生产纳米级纤维网。所产生的网具有高表面积、可控的孔隙度、构造和机械性能。用该技术生产的纤维与 ECM 纤维处于相同的等级。利用聚 L-乳酸(PLLA)和聚乳酸乙醇酸(PLGA)作为聚合组分, 因为它们是组织工程领域最广泛使用的生物材料之一。然后通过人 MSC 的细胞增殖和繁华评估了这些支架作为组织工程支架的潜在用途。

电镀过程受电势、流速、溶液浓度、毛细管收集器距离、针直径以及环境参数如温度变动的影响。为制作具有四种截然不同纤维直径的 PLLA 和 PLGA 支架, 即 290 nm、1 μm 、5 μm 和 9 μm , 电压[20 KV]和收集器距针距离[30 cm]保持不变。针规大小[12G; 22G]、流速[0.05-0.1 mL/min]和溶液浓度[10-25 w/w%]改变。

由此生成的 PLLA 和 PLGA 电镀毡的平均直径分布列于表 4。PLLA 和 PLGA 的微米纤维和纳米纤维支架均分别具有 39%和 47%的孔隙度。通过扫描电子显微镜来观察电镀纤维的形态学。经检查，纤维没有珠子，呈圆形且以非织方式随机排列。

表 4:

聚合物	平均直径	聚合物	平均直径
PLLA-1	290±84nm	PLGA-1	380±0.80nm
PLLA-2	1±0.4µm	PLGA-2	1±0.3µm
PLLA-3	5 ± 1.5 µm	PLGA-3	6 ± 1.5µm
PLLA-4	9± 2.0 µm	PLGA-4	9 ± 1.6 µm

6.14.2 在纳米纤维支架上接种人 MSC

从全部骨髓中分离并进行了次培养的人 BM-MSC 接种在微米纤维和纳米纤维支架上。细胞培养塑料用作为对照表面。生长在纳米和微米纤维支架上的 BM-MSC 均具有相似的生长动力学。通过 SEM 观察细胞形态学和细胞层的均匀性。接种在纳米纤维上的细胞在支架表面上均一分布，而微米纤维支架上的细胞沿着纤丝铺展，分布不太均一，不论其组成如何。该发现也利用肌动蛋白细胞骨架染色并通过共聚焦显微镜观察得到了证实。

静态组织培养条件下 BM-MSC 的软骨发生分化也显示，培养基中不存在诱导因子，接种在纳米纤维支架上的细胞也表达 II 型胶原。因而，这些发现提示纳米纤维构造促进软骨发生分化，即使培养基中不存在诱导因子时也是如此。

6.14.3 胎盘干细胞的体外软骨发生分化

为研究在典型条件下分离和扩增的胎盘干细胞的软骨发生潜能，在团块培养物中在软骨发生诱导培养基的存在下培养胎盘干细胞。由于团块细胞含量下降，静态细胞培养实验的持续时间限于 28 天。取组织切片以研究团块的功能分化以及葡胺聚糖(GAG)和胶原的存在。利用定量蛋白质和基因表达分析来进一步表征团块。分化的胎盘干细胞上的免疫标记与已知为免疫抑制性的未分化胎盘干细胞进行了比较。

根据组织切片，确定胎盘干细胞形成比 BM-MS C 更紧密的团块。胎盘干细胞和 BM-MS C 均呈 GAG 和胶原染色，而对照细胞系(人皮肤成纤维细胞，HDF)形成松散结构的团块，无 GAG 表达，很少的胶原表达。

分别通过 ELISA 和 RT-PCR 利用蛋白质和基因表达分析来定量软骨发生。ELISA 数据证实了由胎盘干细胞所产生的团块中存在 GAG 和 I 型胶原。通过 ELISA 未能在团块中发现 II 型胶原，但发现低水平的 II 型胶原基因表达。此外，基因表达数据证实与未诱导的团块相比，诱导的胎盘干细胞团块中许多软骨发生标记上调(表 5)。

表 5:

基因	上调	基因	上调
聚集蛋白聚糖 1	+	IX 型胶原	+
骨形态发生蛋白 2	++	连接蛋白	-
软骨寡聚基质蛋白	++++	Matrilin 3	+
软骨来源的 ret. acid sens	+	甲状旁腺激素受体 1	+
II 型胶原	+	转录因子 SOX9	+

(上调水平: - = 无上调, + = 1 - 10 倍; ++ = 10 - 100 倍, +++ = 100 - 1,000 倍; 而 ++++ = 1,000 - 10,000 倍)

利用流式细胞仪比较了未分化的和软骨发生分化的胎盘干细胞的潜在免疫原性，以对如下免疫系统分子的存在进行染色：MHC A,B,C；MHC DR,DP,DQ； β -2-微球蛋白和 CD86。缺少 MHC II 和 CD86 的表达，小量 MHC A,B,C 和 β -2-微球蛋白的阳性表达，这在未分化的胎盘干细胞和在软骨发生条件下培养的胎盘干细胞之间是相似的(表 6)。

表 6:

标记	未分化的胎盘干细胞表达	软骨发生分化的胎盘干细胞表达
MHC II 类	无	无
CD 86	无	无
MHC A, B, C	低	低
β -2 微球蛋白	低	低

6.14.4 胎盘干细胞体外软骨发生分化的表征

此实施例描述了实现上文 6.11 节所述目标 1 的示例方法。在此实施例中，利用动态团块培养物以允许延长培养持续时间。这种延长允许评估静态以及长达 56 天的动态团块培养物中胎盘干细胞软骨发生早期和晚期标记的临时基因表达以及生化和组织学分析。

按照例如上文实施例 1 从产后胎盘中分离胎盘干细胞。按照例如上文实施例 1 在含低浓度胎牛血清和有限生长因子的完全培养基中从破坏的组织中确立胎盘干细胞。在达到 80-85%汇合后，如本发明别处所述对胎盘干细胞进行次培养和/或低温保存。按照例如上文实施例 3 中公开的方法进行流式细胞仪分析以确保至少 70% 或更多的分离细胞为例如

CD200⁺CD105⁺CD73⁺CD34⁻CD45⁻。胎盘干细胞的功能表征进一步包括软骨发生分化测定。

6.14.5 静态及动态系统中的团块培养

胎盘干细胞的软骨发生分化可以如下进行。培养胎盘干细胞至接近汇合,胰酶消化,在不完全软骨发生培养基(Cambrex)中洗涤2次,并以大约500,000 细胞/mL 重悬于如上文所述的完全软骨发生培养基中。移取500 μ L 的等份到15 mL 聚丙烯离心管中并离心(800 rpm, 5 分钟),以诱导团块形成。向离心管中加入溶于DMEM-低糖溶液中的包含1 mM 丙酮酸钠(Sigma)、0.1 mM 抗坏血酸-2-磷酸酯(Wako)、 1×10^{-7} M 地塞米松(Sigma)、1% ITS (胰岛素-转铁蛋白-硒) (Collaborative Biomedical Products)和 10 ng/mL 重组人TGF- β 3 (Oncogene Sciences)的无血清软骨发生完全培养基(CCM)。将一些团块转移到含无血清CCM的生物反应器(Synthecon, model #RCCS-4H)中进行动态培养。静态或动态培养条件下的团块在37°C, 5% CO₂中孵育,且每2-3天更换培养基。在第7、14、28和56天,从培养物中取出团块,并处理以进行基因表达、生化或组织学分析。对生长在静态或动态培养条件下的MSC进行了比较。

为标准分化的软骨细胞,用不含钙和镁的HEPES缓冲盐溶液洗涤团块,并用3 mg/ml 2型胶原酶、1 mg/ml 透明质酸酶和0.25%胰蛋白酶柠檬酸盐在37°C消化。消化后悬沉细胞,重悬于1 ml DPBS缓冲液中,并洗涤。通过台盼蓝染色细胞计数来确定回收的细胞量。通过用裂解缓冲液裂解细胞来回收RNA。RNA利用Qiagen RNEASY®试剂盒分离,并利用Nanodrop分光光度计定量。利用TAQMAN®基因表达探针就软骨发生基因表达进行

RT-PCR。对早期标记纤调蛋白和软骨寡聚基质蛋白进行定量基因表达分析。也研究了中期标记聚集蛋白聚糖、多功能蛋白聚糖、核心蛋白聚糖和双链蛋白聚糖。也研究了成熟软骨细胞特有的 II 型和 X 型胶原以及软骨粘附素的基因。对 II 型胶原、葡胺聚糖和蛋白聚糖的合成进行了生化测定。

为进一步表征分化的软骨细胞，利用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定法研究了软骨分化的胎盘干细胞的蛋白质表达。首先，溶解团块。在获得干重之后，利用胃蛋白酶和胰弹性蛋白酶消化再水合的团块。利用收集的上清液进行 II 型胶原和蛋白聚糖 ELISA。通过亚甲蓝染色结合测定法来测量葡胺聚糖(GAG)。

还对分化的软骨细胞进行了如下组织学分析。团块在 10%福尔马林中固定，通过梯度酒精脱水，并包埋在石蜡中。以 5 μm 的厚度切割切片，并利用葡胺聚糖染料(例如阿尔新蓝和/或番红精-O)及胶原染料如天狼星红进行染色。阿尔新蓝为水溶性的铜酞菁碱性染料，由于其铜内含物而呈蓝色。当在 3%乙酸溶液(pH 2.5)中使用时，阿尔新蓝既染色硫酸化和羧化的酸性粘多糖又染色硫酸化和羧化的唾液粘蛋白。正染色形式的番红精 O 染色福尔马林固定、石蜡包埋组织切片上的关节软骨、粘蛋白和肥大细胞颗粒。蛋白聚糖染成红色，细胞质染成灰绿色，而细胞核染成黑色。天狼星红染料可用于区分组织切片中的不同胶原类型。在偏振光下，纤维表面上看来发出有别于黑色背景的明亮色彩。纤维的颜色取决于其厚度；随着厚度增加，颜色从绿色变成黄色至橙色至红色。I 型胶原倾向于形成由密实堆积的厚纤丝构成的厚胶原纤维，呈现为强烈的黄色到红色。III 型胶原形成由松散沉积的细纤丝构成的细纤维，并具有微弱绿色的双折射。因而，所显示的颜色是由纤维厚度以及胶原分子的排列引起的。

该研究中使用 4 个实验组；细胞生长在静态或动态培养系统的标准生长培养基或 CCM 中。在第 7、14、28 和 56 天进行定量测定。对于所有定量生化测定(葡胺聚糖、II 型胶原和蛋白聚糖)、基因表达和组织学分析应用 $n=4$ 的样品大小。进行了分别为 $p<0.05$ 的单因素和两因素方差分析来检验组间在每个时间点以及随着时间的统计学差异。利用 $p<0.05$ 的 Tukey-Kramer 方法进行组间的多重比较。

6.14.6 最优化支架以刺激胎盘干细胞的体外软骨发生分化

此实施例描述了设计用以实现上文所述目标 2 的实验。简言之，测试了纳米纤维支架促进胎盘干细胞分化为软骨细胞的能力。如上文所显示的那样，无论组成如何，电镀纳米纤维支架都促进间充质干细胞在体外分化为软骨细胞。待检测的作为支架基质的材料包括聚 L-乳酸(PLLA)、I 型胶原以及偏二氟乙烯和三氟乙烯的共聚物(PVDF-TrFE)。将胎盘干细胞装载到由这些材料生成的支架上，并在静态以及动态两种条件下培养。也在研究进程期间进行了定量基因表达、生化和组织学分析以及机械试验。

6.14.6.1 支架制作和表征

如上文所述，电镀装置包括安装在 Harvard 注射泵 901 型上配有针(16-22 号)的注射器。注射器中注满聚合物溶液。高压电源(γ 高压电源 ES30P)的正极输出引线连接在针上。收集器为电接地的大小 25×30 cm 的不锈钢板。电镀过程受流速、溶液浓度、针直径变动的影响。施加于溶液的电压为 20 KV，收集器距针的距离为 20 cm。支架作为收集器上的非织毡收集。这些支架/毡由直径大约 200-400 nm 的纤维制成。

6.14.6.2 用于支架制备的聚合物溶液

最初的支架由聚 L-乳酸(Alkermes Inc., Medisorb Polymer 75/25 DL High IV)的二氯甲烷溶液电镀。通过将胶原溶解在三氟乙酸(TFA)中生产类似的 I 型胶原(来源于牛腱)支架。如以前所示范的那样,将压电聚合物 p(VDF-TrFE)从该化合物的 10% 甲乙酮溶液中悬沉。参见 Sachlos 和 Czernuszka, 2003, *Eur. Cells Mater.* 5:29-40。

6.14.6.3 支架表征

所有支架通过如下方案研究。通过偏振光光学显微镜和扫描电子显微镜对支架成像。利用图像分析技术来确定平均纤维直径和变异系数,以及纤维之间的区域分布。通过汞孔隙率法来分析纤维参数平均阵列孔容和孔径。内部支架结构通过多种热分析技术包括酌情选择的 DSC、TGA、DMA、TMA 和 TSC 来监控。

对于 p(VDF-TrFE)支架,利用 Sawyer-Tower 电路的施加电场电流扫描来鉴定指示 p(VDF-TrFE)材料极化强度的性质。这些性质包括剩余及饱和极化强度以及矫顽电场(极性转换发生时的电场)。p(VDF-TrFE)材料的这些性质具有众所周知的值。还可以利用静电计来测量电镀 p(VDF-TrFE)震荡电极毡注入或释放的小电流。热放电电流(TSC)检测仪表用于这些研究。当对其施加高电压(10-100 MV/m)周期性电场时,p(VDF-TrFE)电极膜在长度、宽度和厚度上发生 1-10% 变形。所述变形是由于所述铁电微晶内含物的大小对外加电场做出反应而引起的。可以预期电镀 p(VDF-TrFE)电极毡会发生类似的变形。

6.14.6.4 支架接种和分化方案

利用上文以及本发明别处(参见例如上文 5.4.5 节)所述的培养基进行胎盘干细胞的软骨发生分化。所有支架利用常规技术真空荷载大约 200,000 细胞。参见例如 Dennis 等, 1998, *Biomaterials* 19:1323-8。将荷载了细胞的支架置于含 CCM 的生物反应器(Synthecon, model #RCCS-4H)中。细胞维持培养长达 56 天。每 2-3 天更换培养基。对阳性对照、利用 CCM 标准团块培养条件无支架培养的胎盘干细胞、阴性对照、以及不存在 CCM 时(利用标准生长培养基)有或无支架培养的胎盘干细胞进行了比较。

6.14.6.5 软骨特异性胞外基质组分和细胞数的定量测量

在第 7、14、28 和 56 天收获软骨发生团块以及荷载了细胞的支架, 并分析葡胺聚糖、II 型胶原和蛋白聚糖的合成。这些测定允许利用 96 孔板形式快速高通量地筛选软骨标记。为此, 用磷酸缓冲盐溶液洗涤样品, 并用 200 μ L 木瓜蛋白酶溶液(1 μ g/mL, 溶于 50 mM 磷酸钠 pH 6.5, 含 2 mM N-乙酰半胱氨酸和 2 mM EDTA)在 65°C 消化 16 小时。利用 ELISA 试剂盒(BLYSCAN™ Kit, Accurate Chemical and Scientific Corporation, Westbury, NY)定量测量葡胺聚糖和蛋白聚糖的合成。通过 ELISA 试剂盒(Arthrogen-CIA, Chondrex, Inc.)测量 II 型胶原合成。利用 pico-green 荧光测定(Molecular Probes, Inc.), 通过 DNA 测量来定量细胞数。

6.14.6.6 借助组织学分析的组织形态学

利用第 21 和 35 天的组织学染色和观察来表征软骨发生支架的细胞和组织形态学。收获细胞团块以及荷载了细胞的支架, 并在 10%缓冲福尔马林中室温固定 2 小时。团块和支架通过系列梯度酒精处理进行脱水, 通过

二甲苯及二甲苯取代物处理进行透明，并用石蜡进行渗透。薄切片安装在载片上，并用甲苯胺蓝和番红精 O 染色。

6.14.6.7 分析由分化引起的 mRNA 变化

如前面描述的团块培养物一样，用不含钙和镁的 HEPES 缓冲盐溶液洗涤样品，并用 3 mg/ml 2 型胶原酶、1 mg/ml 透明质酸酶和 0.25%胰蛋白酶柠檬酸盐在 37°C 消化。消化后悬沉细胞，重悬于 1 ml DPBS 缓冲液(Dulbecco 磷酸缓冲盐溶液)中，并洗涤。通过台盼蓝染色细胞计数来确定回收的细胞量。通过用裂解缓冲液裂解细胞来回收 RNA。RNA 利用 Qiagen RNEASY®试剂盒分离，并利用 Nanodrop 定量。利用来自 ABI 的 TAQMAN®基因表达探针来实现软骨发生基因表达的 RT-PCR。对早期标记纤调蛋白和软骨寡聚基质蛋白进行定量基因表达分析。也研究了中期标记聚集蛋白聚糖、多功能蛋白聚糖、核心蛋白聚糖和双链蛋白聚糖。也研究了成熟软骨细胞特有的 II 型和 X 型胶原以及软骨粘附素的基因。

6.14.6.8 分组数和统计学分析

该研究中使用了 6 个实验组：三种材料组分(PLLA、I 型胶原和 pVDF-TrFE)，且细胞生长在标准生长培养基或 CCM 中。在第 7、14、21 和 28 天进行定量测定。对于所有定量测定(葡胺聚糖、II 型胶原和蛋白聚糖)应用 n=4 的样品大小。进行了分别为 $p < 0.05$ 的单因素和两因素方差分析来检验组间在每个时间点以及随着时间的统计学差异。利用 $p < 0.05$ 的 Tukey-Kramer 方法进行组间的多重比较。

6.14.7 利用胎盘干细胞-支架构建体评估兔模型中骨软骨缺损的体内修复

此实施例描述了设计用以实现上文所述目标 3 的实验。简言之，在兔骨软骨缺损修复方面结合胎盘干细胞对鉴定为支持软骨发生分化的支架进行了评价。

6.14.7.1 动物模型

采用兔减重步态训练关节软骨修复模型来研究细胞/支架构建体的软骨发生效应。根据支持胎盘干细胞软骨发生的支架数来确定兔子数。新西兰兔随机分配到组中。每组 $n=4$ 进行移植。平均动物体重为 3-5 kg，且动物无特定病原(SPF)。

在每只动物远端股骨的内髁沟造成 3.5 mm 的圆柱形缺损，并以压配合的方式向缺损处植入圆柱形的细胞/支架构建体。每只兔子的对侧膝盖作为内对照。造成同样的缺损，并插入无细胞的相同组成和构造的支架。在操作前通过拿起指定左侧或右侧作为对照膝盖的不透明信封而随机化作为内对照的膝。

为植入支架，静脉内施用戊巴比妥(45 mg/kg)，以起始麻醉。通过吸入由氧气递送的 0.5-2% 异氟醚而维持麻醉。使兔子置于仰卧位，削开各膝盖，并在切口部位用 70% 酒精擦洗的消毒方式进行准备工作。用消毒帷帘隔离手术部分。

进行髌旁外侧切割术和关节切开术。通过髌骨医学脱位暴露股骨髁部。利用 3.5 mm 的钻头在远端股骨的内髁沟造成缺损。缺损深度为 3-5 mm 深。利用小号可吸收缝线(6-0/7-0 vicryl)将有或无细胞的支架缝合到缺损处。然后用缝线逐层闭合伤口。如上文所述对对侧膝盖进行相同操作，以作为内对照。

术后，令所有动物进行其笼箱所能耐受的负重训练。在术后的头 5-7 天每 12 小时皮下施用 0.03 mg/kg 丁丙诺啡，作为术后疼痛对照。供应常规饮食。

术后 12 周利用致死剂量的戊巴比妥对兔子实施安乐死。收获每只兔子的远端股骨。对修复部分进行总的评价，记录与正常周围组织相比的颜色和外观；而且记录关节病的迹象。样本(每组 n=4)脱钙，石蜡包埋，进行组织学评价和染色。利用改良的 O'Driscoll 计分系统对组织学评价来评定等级。每组 N=8 个样本用于机械试验。基于前面报道的纳米纤维支架方案进行压缩试验。

6.15 实施例 15：在胎盘灌洗液中鉴定 CD34⁺CD45⁻细胞群

此研究的目的在于从表型上表征和比较来自匹配的胎盘灌洗液(HPP)和脐带(HUCB)单位(n=10)的细胞，并利用多参数流式细胞计数来鉴定其它有用的胎盘灌洗液细胞表面标记。为评估细胞质量，还测量了总有核细胞(TNC)和细胞活力。由于解冻后的样品接近于其临床前或临床研究使用前的细胞状况，胎盘灌洗液的表征集中于这些样品。为比较目的，测试了各胎盘单位提供者匹配的脐带。在此项目中纳入匹配的 HUCB 单位允许评估从同一提供者收集的胎盘灌洗液和脐带血中细胞群间的差异。

材料和方法。利用 0.9% NaCl 通过正常出生胎盘的灌洗获得胎盘灌洗液。收集匹配单位的脐带血，通过标准方法低温保存，并在用前现行解冻。从液氮罐中取出冷冻的 HPP 和 HUCB 样品，并立即在 37°C 水浴中解冻。在具有 2%胎牛血清的 PBS 中洗涤细胞，用缀合抗体染色，并利用 BD FACS Calibur 或 BD ARIA (Becton Dickinson, San Jose, CA)通过流式细胞仪分

析来评估细胞。所用的抗体包括 PE-CD34 (BD Cat# 348057)和 PerCP-CD45 (BD Cat# 340665)。在用所述适当抗体染色后进行细胞分选实验,并将细胞置于使用 MethoCult 的标准 CFU 测定系统中。

结果: 流式细胞仪分析确定与 HUCB 相比, HPP 中具有 $CD34^+CD45^-$ 表型的细胞富集了 4 倍(图 10)。表 7 中的数据来源于利用 Becton Dickinson 的 FACS ARIA 细胞分选仪所分选的 HPP 和 HUCB 细胞。胎盘灌洗液干细胞基于如下表型分选: $CD34^-CD45^-$ 、 $CD34^+CD45^-$ 和 $CD34^+CD45^+$ 。预期双阴性细胞类型不产生任何 CFU,并作为分选纯度对照。 $CD34^+CD45^+$ 细胞类型为典型的 CB 干细胞,并作为分选和 CFU 测定的阳性对照。HUCB 中存在的 $CD34^+CD45^-$ 测试表型不足以进行分选和 CFU,但从 HPP 中获得了 $CD34^+CD45^-$ 细胞。从表 7 可知,来自 HPP 的细胞产生了更多种的 CFU-E 和 BFU-E,而且提供了与 HUCB 中所见相同的 CFU 模式。另外, HPP $CD34^+CD45^+$ 细胞提供了 CFU-GEMM,该群在 HUCB 中未检测到,且 HUCB 中 $CD34^+CD45^+$ 细胞也不产生该群。

表7:

CFU 数据														
Unit #	表格													
	CD34+; CD45- 细胞													
	CFU-E/BFU-E		CFU-GM		CFU-GEMM									
327950HPP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
327940CB	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	CD34+; CD45 细胞													
	CFU-E/BFU-E		CFU-GM		CFU-GEMM									
327950HPP	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
327940CB	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	CD34+; CD45+ 细胞													
	CFU-E/BFU-E		CFU-GM		CFU-GEMM									
327950HPP	1	4	7	4	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
327940CB	0	0	1	5	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
一式两份孔 CD34+; CD45- 细胞														
	CFU-E/BFU-E					CFU-GM					CFU-GEMM			
	1000 细胞/孔	3000 细胞/孔	9000 细胞/孔	1000 细胞/孔	1000 细胞/孔	1000 细胞/孔	3000 细胞/孔	9000 细胞/孔	1000 细胞/孔	1000 细胞/孔	1000 细胞/孔	3000 细胞/孔	9000 细胞/孔	1000 细胞/孔
327950HPP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
327940CB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD34+; CD45- 细胞														
	CFU-E/BFU-E					CFU-GM					CFU-GEMM			
	50 细胞/孔	150 细胞/孔	450 细胞/孔	1000 细胞/孔	1000 细胞/孔	50 细胞/孔	150 细胞/孔	450 细胞/孔	1000 细胞/孔	1000 细胞/孔	50 细胞/孔	150 细胞/孔	450 细胞/孔	1000 细胞/孔
327950HPP	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
327940CB	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CD34+; CD45+ 细胞														
	CFU-E/BFU-E					CFU-GM					CFU-GEMM			
	50 细胞/孔	150 细胞/孔	450 细胞/孔	1000 细胞/孔	1000 细胞/孔	50 细胞/孔	150 细胞/孔	450 细胞/孔	1000 细胞/孔	1000 细胞/孔	50 细胞/孔	150 细胞/孔	450 细胞/孔	1000 细胞/孔
327950HPP	3	2	8	2	2	14	0	0	0	0	0	0	0	0
327940CB	0	0	0	16	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0

HPP:人胎盘灌流液
CB: 脐带血
CFU-E/BFU-E:红细胞集落形成单位/红细胞爆发形成单位
CFU-GM:粒细胞-巨噬细胞集落形成单位
CFU-GEMM:粒细胞-红核细胞-单核细胞-巨核细胞集落形成单位

在另一研究中,比较了从相同胎盘灌洗液(HPP)中分离的 $CD34^+CD45^-$ 和 $CD34^+CD45^+$ 细胞群的 CD34、CD45、CD31 和 CDH5 基因表达水平。

材料和方法: 如上文所述获得细胞纯度大于 90%的 $CD34^+CD45^-$ 和 $CD34^+CD45^+$ 细胞群,并利用 RNAQUEOUS®-4PCR 试剂盒(Ambion, Cat #AM1914)进行 RNA 制备。简言之,分离的细胞(5×10^5 细胞)在胍盐裂解溶液中裂解。然后将样品裂解液与乙醇溶液混合,并施加到基于硅胶的滤器中,其选择性且定量地结合 mRNA 和大核糖体 RNA。极小 RNA 如 tRNA 和 5S 核糖体 RNA 并不定量结合。然后洗涤过滤器以去除残留的 DNA、蛋白质及其它污染物,然后在无核酸酶的水中洗脱 RNA,水中含痕量的 EDTA 以整合重金属。硅胶滤器收纳在小型滤筒中,后者安装在试剂盒提供的无 RNA 酶微量离心管中。通过离心或真空加压使样品裂解液、洗涤溶液和洗脱溶液穿过滤器。在从过滤器上洗脱 RNA 后,用试剂盒提供的超纯 DNA 酶 1 处理,以去除痕量的 DNA。最后,通过也是试剂盒提供的试剂去除 DNA 酶和二价阳离子。回收的 RNA 的浓度和纯度通过测量其在 260 和 280 nm 的吸光值来确定。所述 RNA 随之可以利用 TAQMAN®反转录试剂(Applied Biosystems, Cat #N8080234)进行 cDNA 合成,接着利用针对 CD34 (Applied Biosystems, Cat #Hs00990732_m1)、CD45 (Applied Biosystems, Cat #Hs00236304_m1)、CD31 (Applied Biosystems, Cat #Hs01065289_m1)和 CDH5 (Applied Biosystems, Cat #Hs00174344_m1)的 Taqman 基因表达测定系统通过 7900HT 快速实时 PCR 系统进行实时 PCR 分析。

结果: 实时 PCR 分析确定 $CD34^+CD45^-$ 和 $CD34^+CD45^+$ 细胞中的 CD34 表达相当。如预期的那样,CD45 表达在 $CD34^+CD45^-$ 细胞中不可检测,然而在 $CD34^+CD45^+$ 细胞中却可检测。 $CD34^+CD45^+$ 细胞中的 CD31 表达为

CD34⁺CD45⁻细胞中 CD31 表达的 0.05%。CD34⁺CD45⁺细胞中的 CDH5 表达为 CD34⁺CD45⁻细胞中 CDH5 表达的 13.66%。

6.16 实施例 16：从人胎盘灌洗液中富集 CD34⁺细胞

此实施例描述了如何利用抗体包被的磁珠分离法(MACS)从人胎盘中富集 CD34⁺细胞。

获得来自人胎盘灌洗液的细胞悬液，并重悬于含 ACD (柠檬酸葡萄糖抗凝液)的 MACS 缓冲液(PBS pH 7.2,+0.5% BSA+2 mmol EDTA)中。收集等份试样作为第一流体样品。向另一分离的 15 mL 管中加入 6 mL Ficoll，极慢地将所述细胞悬液铺在 Ficoll 层上。所述 Ficoll 中的细胞悬液在 Beckman coulter Allegra X12R 离心机中用 SC4750 转子以 300×g (平均) 20℃ 无制动离心 35 分钟。离心完成后，小心吸出上清液，并将沉降在界面处的单核细胞收集到不同分离的管中。用含 ACD 的 MACS 缓冲液将这种材料重悬于 10 mL 的总体积中。收集等份试样作为第二流体样品。计数细胞并检查活力。细胞随之在 SC4750 转子中以 400×g (平均) 4℃ 离心 15 分钟。当离心完成时，吸出上清液，并将细胞重悬于 100 μL 含 ACD 的 MACS 缓冲液中。以 100 μL/1 mL 细胞(浓度为 1 μL/2×10⁶ 细胞)的浓度加入 STEMSEP™选择混合物(StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC Canada)。使细胞和混合物充分混合，并在 4-8℃ 孵育 10 分钟。以 60 μL/1 mL 细胞(浓度为 1 μL/3.33×10⁶ 细胞)加入磁胶体。使细胞和胶体充分混合，并在 4-8℃ 孵育 10 分钟。然后向细胞中加入 10 倍体积冷冻的含 ACD 的 MACS 缓冲液，且所得的溶液在 SC4750 转子中以 400×g (平均)室温离心 8 分钟。吸出上清液，并将细胞重悬于 2 mL 含 ACD 的 MACS 缓冲液中。所述悬液任选地在此时

间点过滤。第三次收集等份试样作为流体样品。然后在 AUTOMACS™ 自动化磁细胞分选仪(Miltenyi Biotec)上, 利用 POSSELD2 程序, 将收集管置于“POS 2 和“NEG1 位上, 来分析细胞。收集到大约 2 mL 阳性选择的细胞。然后洗涤细胞悬液, 以 $400 \times g$ (SC4750 转子) 室温离心 10 分钟, 并在含 1% FBS 的 PBS 中重悬至 1 mL。

6.17 实施例 17: 体外集落形成单位测定

通过淀粉代血浆从一组脐带中分离总有核细胞。通过 Ficoll 分离从 750 毫升胎盘灌洗液中获得总有核胎盘细胞。将来自胎盘和脐带的总有核细胞一式三份混入 35 mm 培养皿的 Methocult GF⁺H4435 培养基(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)或添加了 2%胎牛血清和 1 % Stemspan CC 100 细胞因子混合物(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)的 RPMI 1640 培养基中。所述细胞以至少两种比例混合(例如, $2 \times 10^5:2 \times 10^5$; $1 \times 10^5:3 \times 10^5$; $3 \times 10^5:1 \times 10^5$), 并培养 14 天。然后在相差显微镜下研究的细胞的形态学, 并记录集落形成单位总数(例如 CFU-GM、CFU-L、CFU-M、CFU-G、CFU-DC、CFU-GEMM、CFU-E)。然后确定那个比例产生最高的集落形成单位数。

等同物:

本发明并不局限于本发明描述的具体实施方案的范围。实际上, 根据前述说明书和所附附图, 除了描述过的方案外, 本发明的各种改进方案对于本领域技术人员都将是显而易见的。此类改进方案都意在落入所附权利要求书的保护范围内。

本发明引用的各种出版物、专利和专利申请，其公开内容在此通过引用并入本文。

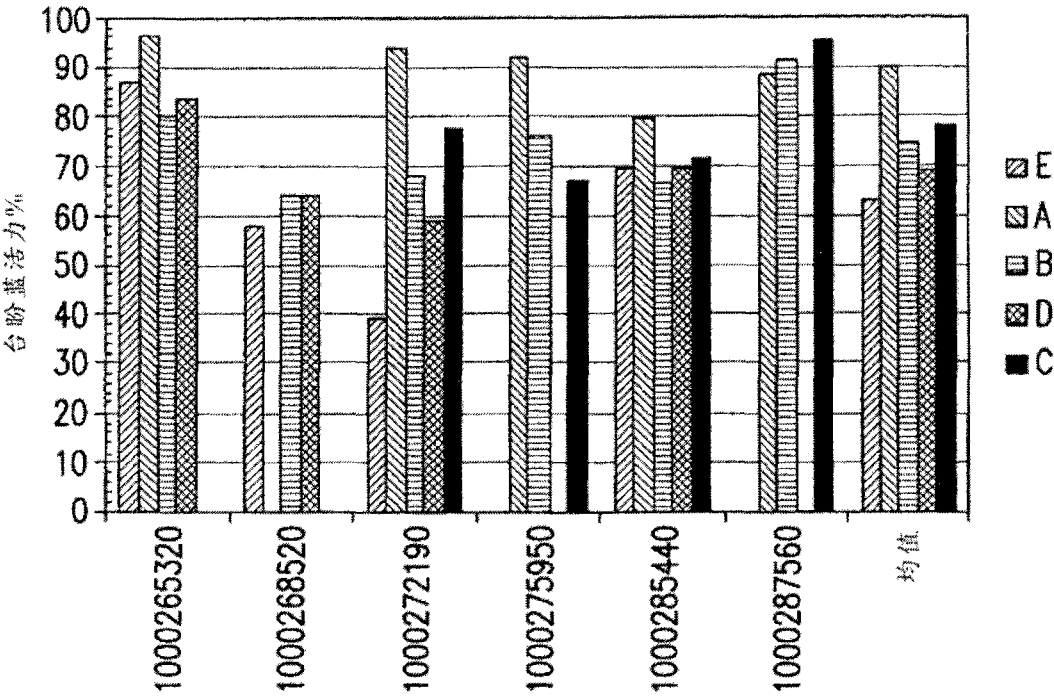


图 1

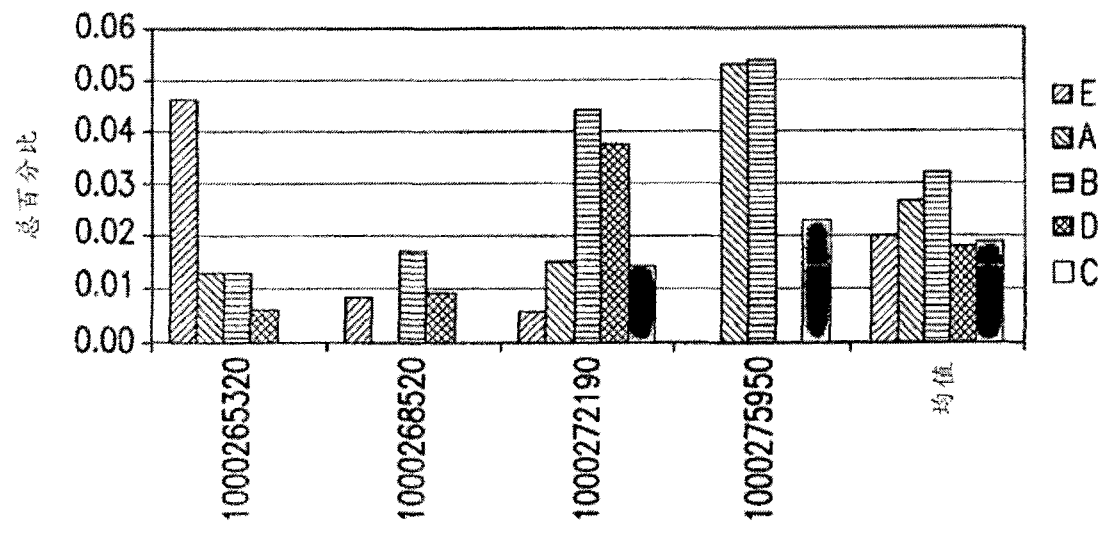


图 2

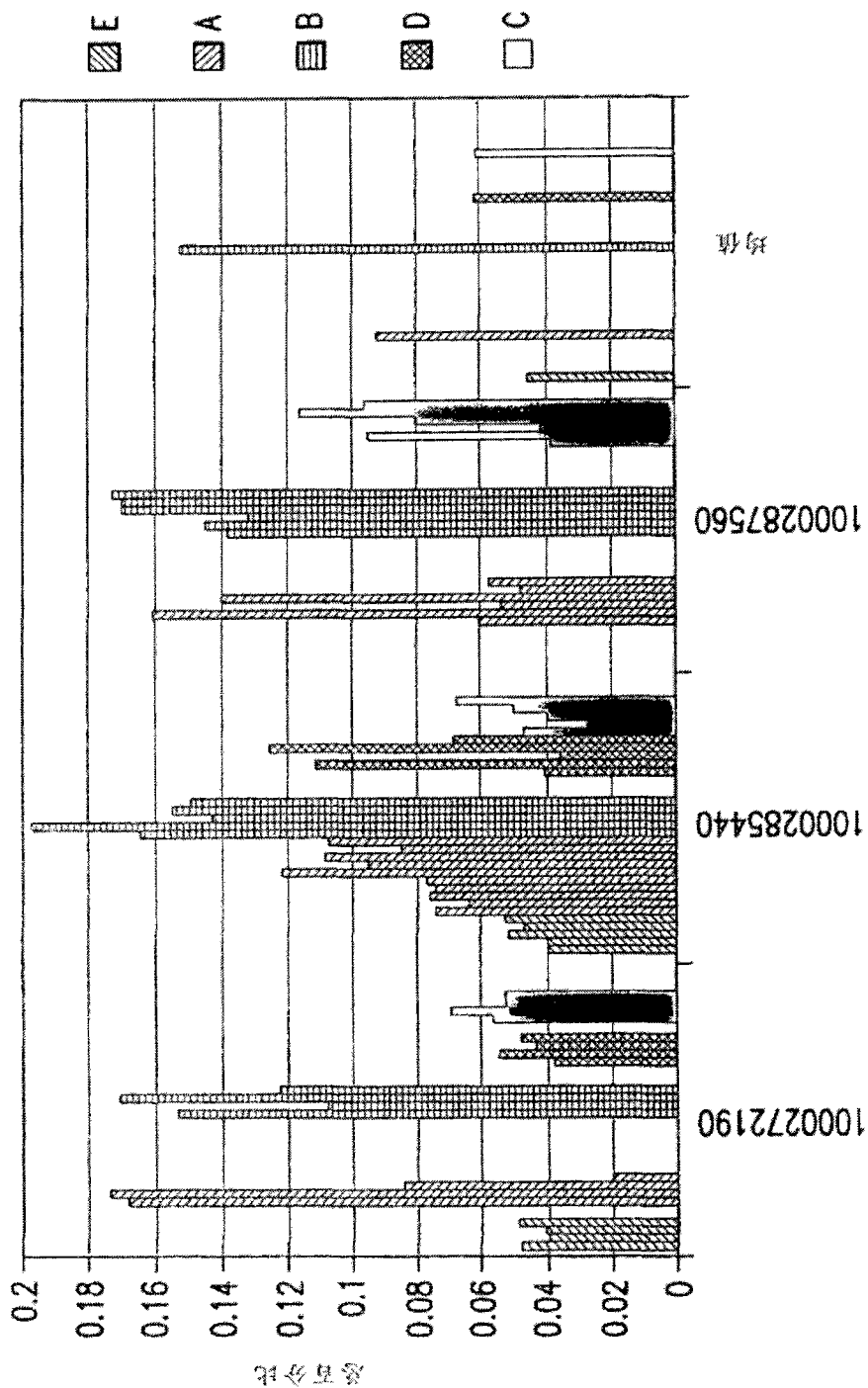


图 3

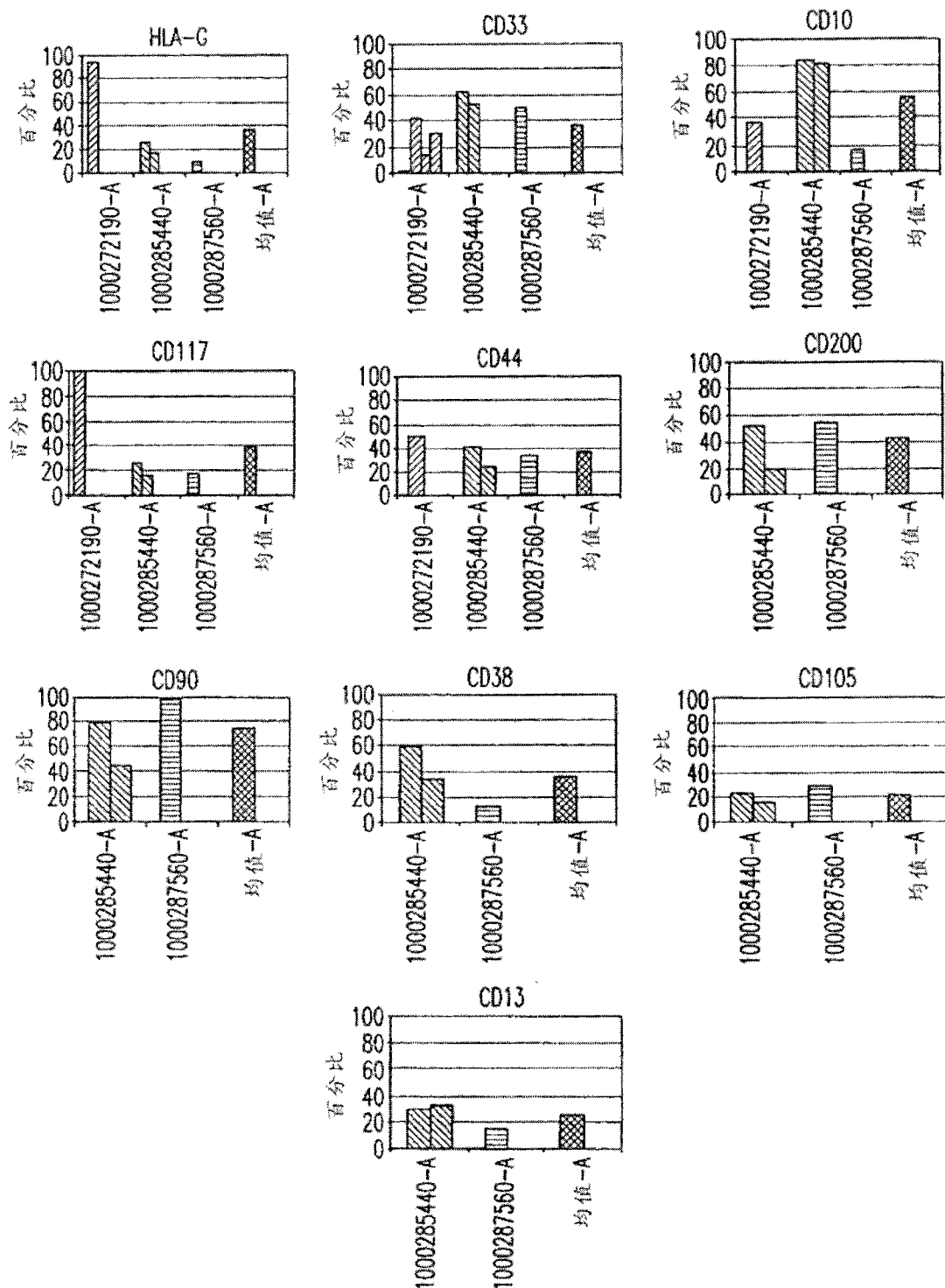


图 4

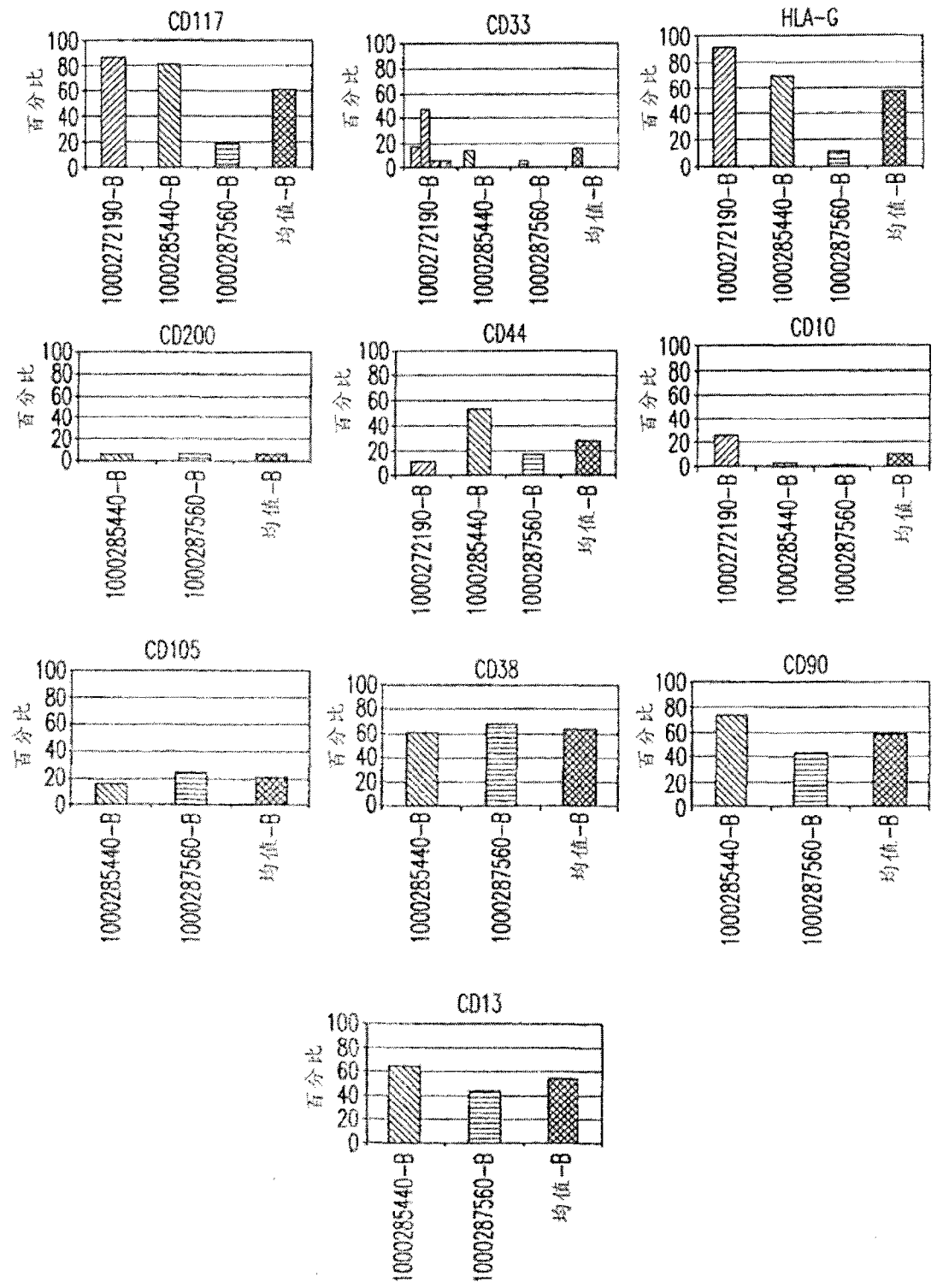


图 5

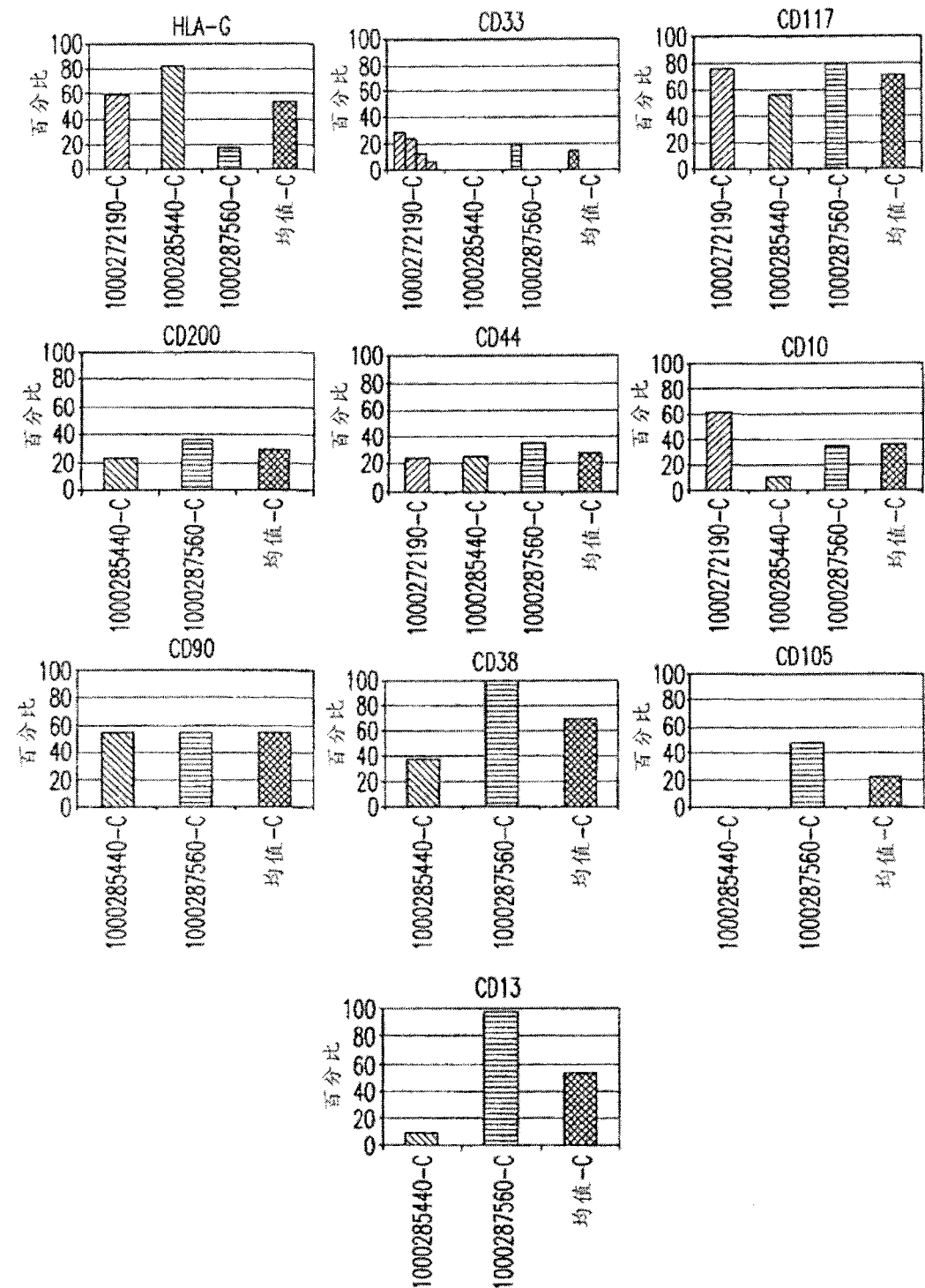


图 6

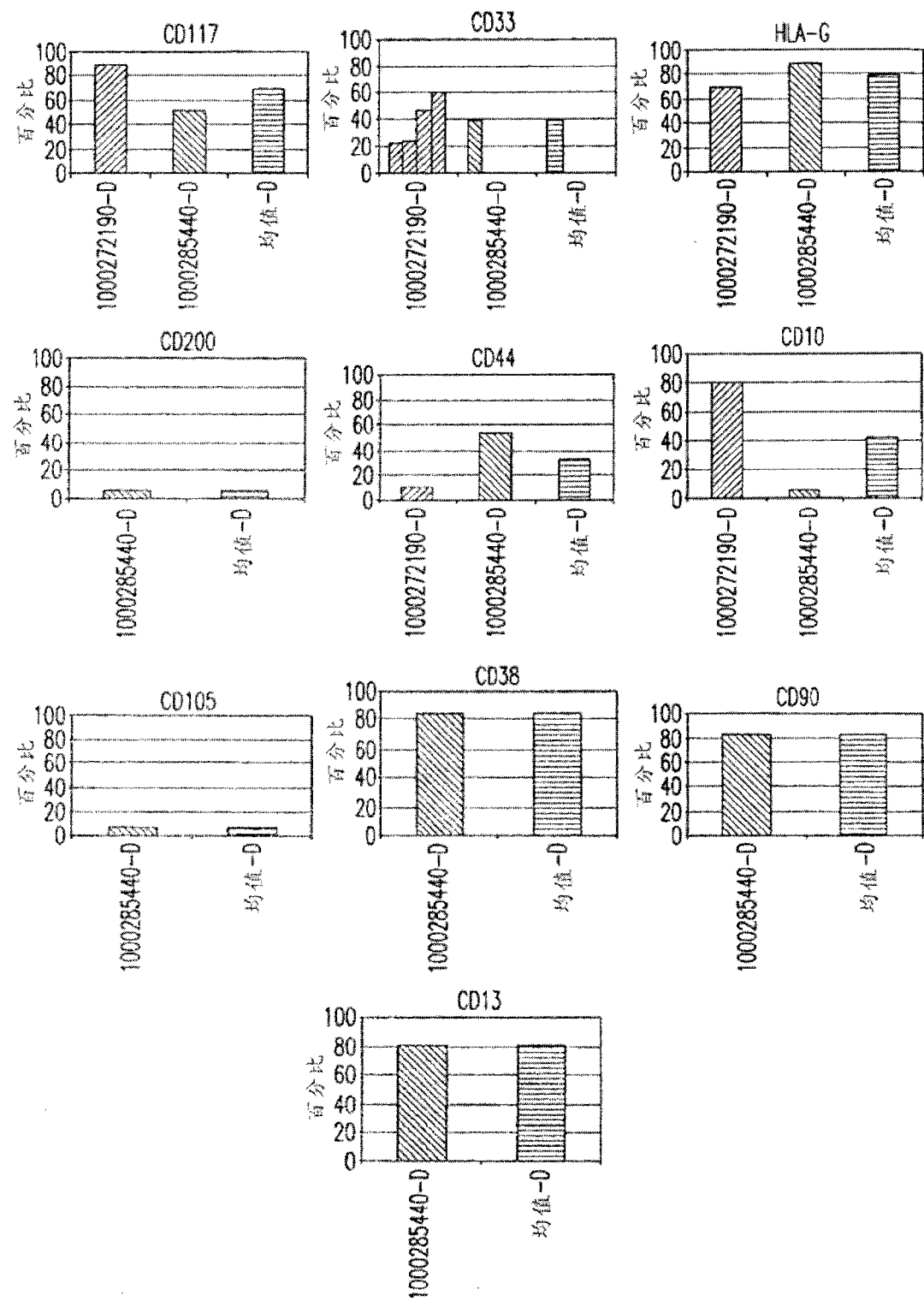


图 7

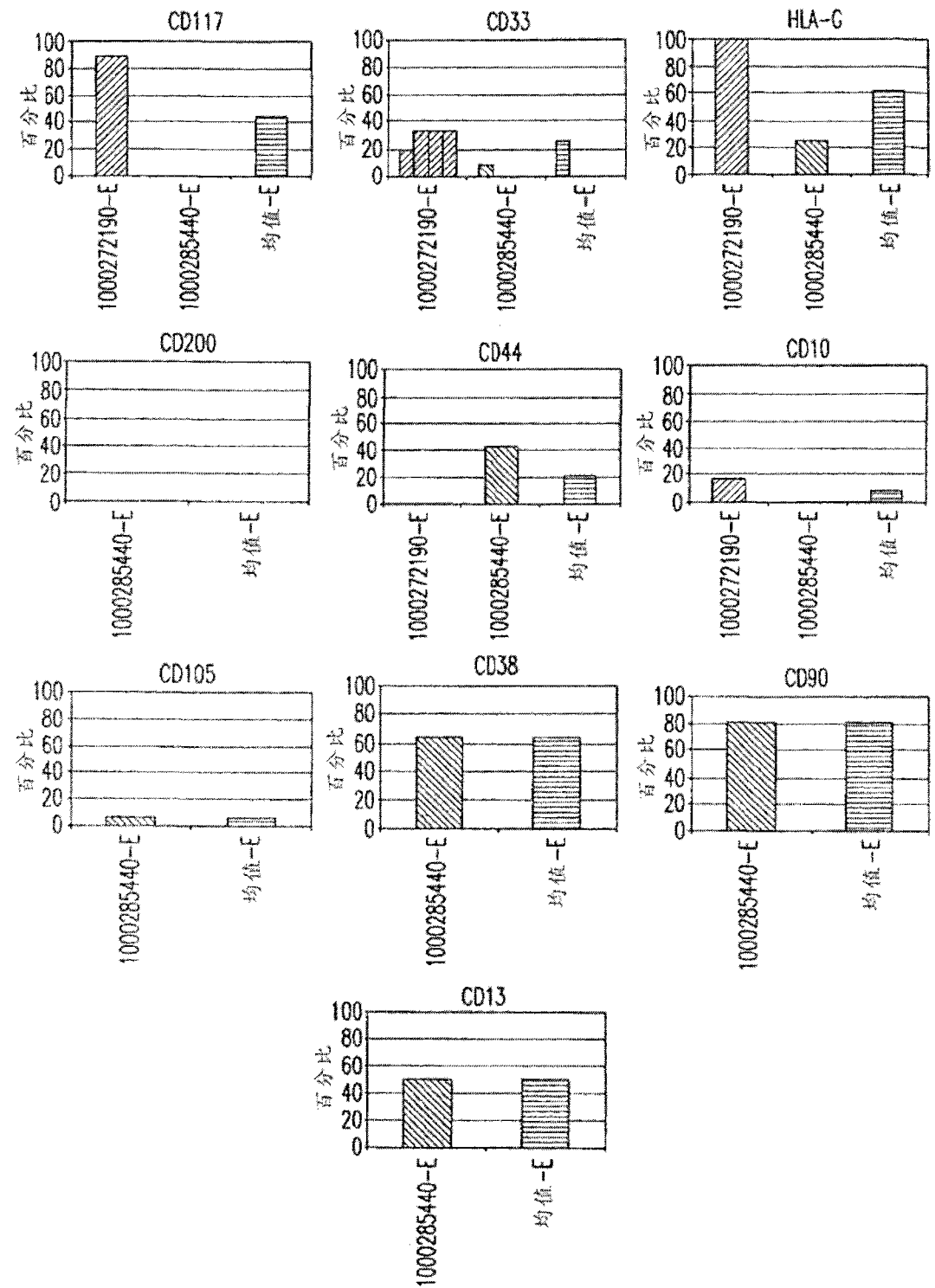


图 8

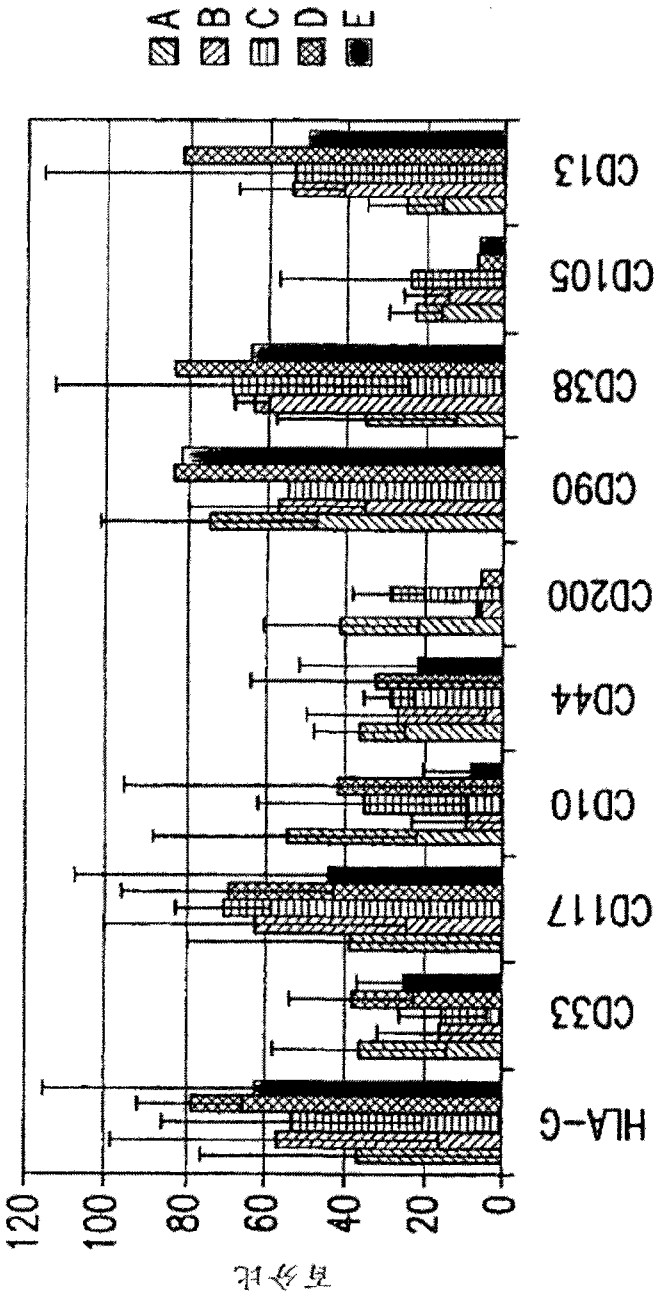


图 9

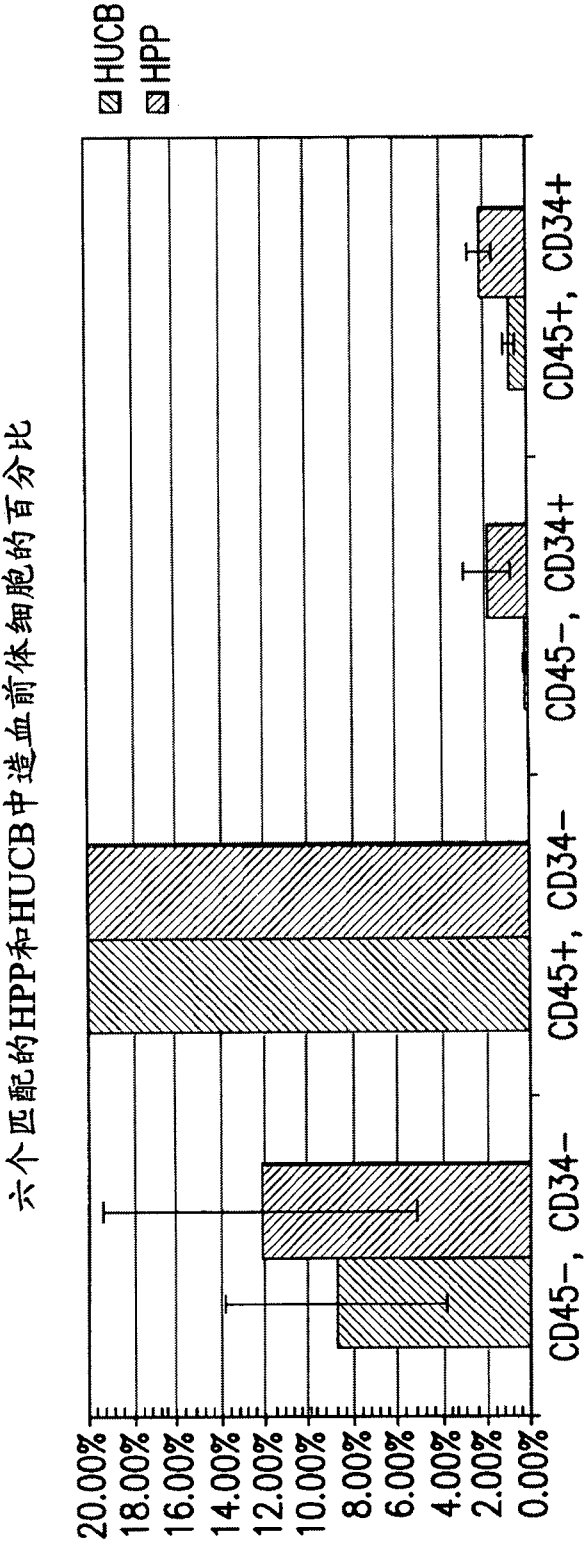


图10