

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021年12月2日 (02.12.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/237762 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 5/0775 (2010.01) C12N 5/00 (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/093716

(22) 国际申请日: 2020年6月1日 (01.06.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010448992.X 2020年5月25日 (25.05.2020) CN

(71) 申请人: 青岛瑞思德生物科技有限公司 (QINGDAO RESTORE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国山东省青岛市高新区河东路368号青岛蓝色生物医药产业园孵化中心7#楼1、2层, Shandong 266000 (CN)。

(72) 发明人: 张炳强 (ZHANG, Bingqiang); 中国山东省青岛市城阳区高新区河东路368号7

号楼1、2层, Shandong 266000 (CN)。 陈梦梦 (CHEN, Mengmeng); 中国山东省青岛市城阳区高新区河东路368号7号楼1、2层, Shandong 266000 (CN)。

(74) 代理人: 无锡市汇诚永信专利代理事务所 (普通合伙) (WUXI HUICHENGYONGXIN PATENT FIRM (GENERAL PARTNERSHIP)); 中国江苏省无锡市无锡新区龙山路4号融智大厦C幢6楼602,604, Jiangsu 214000 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: METHOD FOR IN VITRO SCREENING, ACTIVATION, PROLIFERATION, AND CRYOPRESERVATION OF MESENCHYMAL STROMAL/STEM CELLS AND MESENCHYMAL STROMAL/STEM CELL BANK ESTABLISHMENT

(54) 发明名称: 间充质干细胞体外筛选、激活、扩增、冻存及其细胞库建立的方法

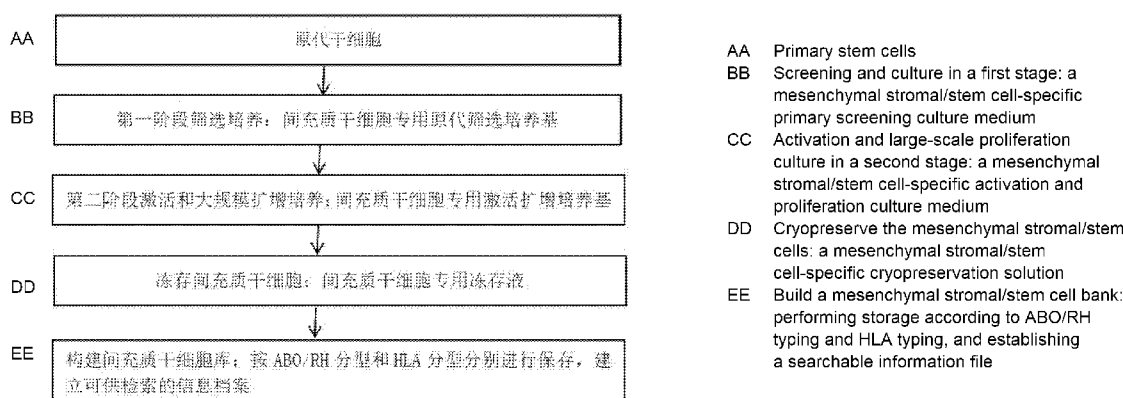


图 1

(57) Abstract: Disclosed in the present invention is a method for in vitro screening, activation, proliferation, and cryopreservation of mesenchymal stromal/stem cells and mesenchymal stromal/stem cell bank establishment. The method comprises: carrying out screening and culture in a first stage by using a mesenchymal stromal/stem cell-specific primary screening culture medium to obtain purified mesenchymal stromal/stem cells; carrying out activation and large-scale proliferation culture in a second stage on the purified mesenchymal stromal/stem cells by using a mesenchymal stromal/stem cell-specific activation and proliferation culture medium to obtain a large number of mesenchymal stromal/stem cells having the function activated; and cryopreserving the mesenchymal stromal/stem cells by using a mesenchymal stromal/stem cell-specific cryopreservation solution, storing same according to ABO/RH typing and HLA typing, and establishing a searchable information file, to build a mesenchymal stromal/stem cell bank.

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括经修改的权利要求及声明(条约第19条(1))。

(57) 摘要: 本发明公开了一种间充质干细胞体外筛选、激活、扩增、冻存及其细胞库建立的方法。该方法包括: 利用间充质干细胞专用原代筛选培养基进行第一阶段筛选培养, 得到纯化的间充质干细胞; 利用间充质干细胞专用激活扩增培养基将纯化的间充质干细胞进行第二阶段激活和大规模扩增培养, 获得大量激活功能的间充质干细胞; 利用间充质干细胞专用冻存液冻存干细胞, 并按ABO/RH分型和HLA分型进行保存, 建立可供检索的信息档案, 构建间充质干细胞库。

间充质干细胞体外筛选、激活、扩增、冻存及其细胞库建立的方法

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体地，涉及一种间充质干细胞体外筛选、激活、扩增、冻存及其细胞库建立的方法。

背景技术

干细胞作为近年来生物界的最大热点，其发展将为医疗领域提供革命性的技术手段。干细胞是一类具有自我复制能力和多向分化潜能的原始细胞，在一定条件下，它可以分化成多种功能细胞，可用于治疗白血病、先天性代谢疾病、某些实体肿瘤、糖尿病、心脏病和脑瘫等多种疾病，具有非常广阔的医疗用途。人体有 220 余种细胞，它们通过有机整合形成复杂的组织和器官，各有其特定功能，如心肌细胞的收缩功能、神经细胞的信息传递功能等。干细胞是这些细胞的祖细胞，医学界也称其为“万用细胞”。

间充质干细胞（Mesenchymal stromal/stem cell, MSC）来源于发育早期的中胚层和外胚层，属于多能干细胞，具有多向分化潜能，可分化为脂肪、骨、软骨、肌肉、肌腱、韧带、神经、肝、心肌、内皮等多种组织细胞。2006 年，国际细胞治疗协会（ISCT）规范了 MSC 的定义。只有同时符合以下三个标准的细胞，才能称之为 MSC：①贴壁生长；②细胞表面表达一些特异性抗原（标记物）；③具有向脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞分化的能力。MSC 是目前在治疗方面最为安全有效和应用广泛的成体干细胞，主要来源于骨髓、脂肪、脐带、胎盘、羊膜等。与其他干细胞相比，MSC 具有易获取、易体外培养、长期传代稳定性、低免疫原性、组织修复能力强等优势。此外，MSC 来自于成年的细胞，甚至可以从患者自身体内获得，而非胚胎或胎儿干细胞，因而不涉及道德和伦理学的问题。MSC 在经过连续传代和冷冻保存之后，仍具有多向分化和自我复制的潜能。研究表明人骨髓 MSC 可在体外传代 40 代以上仍保持干细胞特性。

MSC 功能较多，应用广泛，主要功能是进行细胞移植治疗，亦可作为一种理想的靶细胞用于基因治疗，同时在生物组织工程和免疫治疗中也有一定的应用。近些年 MSC 被大量应用于实验和临床研究中，已有大量研究揭示了它在心血管、神经系统、运动系统、消化系统、自身免疫病、血液系统、泌尿系统、眼科、骨科等系统疾病的诊断和治疗上的应用价值。

2016年，中国公布首批30家干细胞临床研究机构，2019年起干细胞临床研究机构与项目备案将实行动态管理，截止到2019年9月，国家批准干细胞临床治疗研究医院增至106家，军队系统的医院批准的共12家，一共118家机构；备案项目增至62个，文献研究专利申请不断增长。截止到2020年3月，在ClinicalTrial.gov上注册的干细胞相关临床研究已达5432项，其中中国有469项，较多开展的城市为广州、北京、上海。

然而，获得更高品质的细胞是MSC治疗的关键。干细胞治疗的挑战在于干细胞产品十分复杂，细胞来源和生产工艺的差异对干细胞的质量和疗效的影响很大，这也是之前众多干细胞治疗临床试验结果不理想的主要原因。因此，如何获取大量的、标准化的、高质量、高活性的MSC成为制约干细胞行业发展最重要的因素，MSC体外筛选、激活、扩增、冻存、建库的方法需要改进。

发明内容

本发明旨在解决现有技术中存在的技术问题。为此，本发明提出了间充质干细胞体（MSC）体外筛选、激活、扩增、冻存及其细胞库建立的方法，该方法筛选、激活、扩增MSC的效率高、速度快、安全性高且成本低，并且筛选扩增获得的大量功能激活的MSC可建立细胞库进行长期保存，复苏后依然保持良好的细胞活性。

本发明提供了一种间充质干细胞体外筛选、激活、扩增、冻存及其细胞库建立的方法。根据本发明的实施例，该方法包括：

利用间充质干细胞专用原代筛选培养基进行第一阶段筛选培养，得到纯化的MSC；利用间充质干细胞专用激活扩增培养基将纯化的MSC进行第二阶段激活和大规模扩增培养，获得大量激活功能的MSC；利用间充质干细胞专用冻存液冻存干细胞，并按ABO/RH分型和HLA分型进行保存，建立可供检索的信息档案，构建间充质干细胞库。

所述间充质干细胞专用原代筛选培养基是添加了2-8ng/ml SCF、2-4ng/ml BMP-4、10-30IU/ml IL-10和1-4ng/ml LIF、1-4ng/ml TGF- β 、2-8ng/ml 雷帕霉素、2-12ng/ml 曲美替尼、10-20ng/ml 对乙酰氨基酚、1-3ng/ml 5-HMF、10-20ng/ml 磷酸氯喹的间充质干细胞无血清完全培养基。

所述间充质干细胞专用激活扩增培养基是添加了2-8ng/ml SCF、1-4ng/ml bFGF、10-20ng/ml 芍药苷、20-30ng/ml 盐酸二甲双胍、1-4ng/ml 氢化可的松、2-4ng/ml CXCL10、1-2ng/ml Forskolin、

1-3ng/ml 5-HMF、10-20ng/ml 磷酸氯喹的间充质干细胞无血清完全培养基。

所述间充质干细胞专用冻存液是包含 5-10 体积%的 DMSO、5-10 体积%的复方电解质注射液、5-10 体积%羟乙基淀粉 200/0.5 氯化钠注射液、1-2 体积%的白蛋白、1-2 体积%羟喜树碱注射液、66-83 体积%的间充质干细胞无血清完全培养基。

所述间充质干细胞专用原代筛选培养基、间充质干细胞专用激活扩增培养基、间充质干细胞专用冻存液中，所述的无血清完全培养基为 TheraPEAK™ MSCGM-CD™ Medium、MesenPRO RS™ Medium、Corning® MSC Xeno-Free SFM 或市售其他类型无血清培养基。

本发明的方法，将间充质干细胞培养分为第一阶段筛选培养和第二阶段激活和大规模扩增培养，两个阶段利用不同的培养条件。

第一阶段筛选培养，主要是为了去掉原代中杂细胞。无论骨髓、脐带、胎盘来源的 MSC，在原代制备过程中或多或少会混杂进血液细胞、内皮细胞等杂细胞。间充质干细胞专用原代筛选培养基特别添加了细胞促生长因子和筛选因子。SCF (Recombinant Human Stem Cell Factor) 在体外，能刺激细胞增殖、迁移。BMP-4 (Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 4) 是一种有效的骨形成蛋白，同时为转化生长因子 (TGF-β)超家族的一部分，在间质细胞形成和多个器官的发育过程中起作用。对乙酰氨基酚为常见解热镇痛药，本发明发现，添加适当浓度对乙酰氨基酚后，原代培养中非 MSC 明显抑制，杂细胞凋亡速度加快，对 MSC 无影响。雷帕霉素是一种特异性的 mTOR 抑制剂，IC50 为 0.1nM，雷帕霉素通过诱导自噬发挥抗肿瘤作用，以剂量依赖性方式抑制肿瘤细胞活力。本发明低剂量雷帕霉素可诱导原代中非 MSC 自噬和凋亡。本发明发现，极低剂量（不高于 20ng/ml）的磷酸氯喹(常规浓度约为 5ug/ml 可作为自噬抑制剂和溶酶体抑制剂),可以显著促进 MSC 增值，可以作为自噬抑制剂对抗雷帕霉素诱导的自噬。曲美替尼 (Trametinib) 是丝裂原活化的细胞外信号调节激酶 1(MEK1)和 MEK2 激活和 MEK1 和 MEK2 激酶活性的可逆性抑制剂。MEK 蛋白质是细胞外信号相关激酶(ERK)通路的上游调节器，它促进细胞增殖。5-HMF (5-羟甲基糠醛) 具有抗氧化作用，可对抗过氧化氢引起的氧化损伤，作用机制可能与 5-HMF 降低核因子κB 蛋白表达、增加 Bcl-2 蛋白表达有关。

第二阶段是激活和大规模扩增培养。SCF、bFGF(basic fibroblast growth factor)在体外，能刺激细胞增殖、迁移。二甲双胍从问世至今，已经走过了 50 年的历程，因其具有抑制肝葡萄糖输出，增加外周组织对胰岛素的敏感性等多方面的药理作用，已被广泛应用于 2 型糖尿病、多囊卵巢综合征、肥胖等代谢性疾病的治疗。近年来研究发现二甲双胍越来越多的作用。本发明首次发现，盐酸二甲双胍可激活 MSC，促进干细胞增值、活化，显著提升 MSC 因子分泌能力。芍药苷(Paeoniflorin, PF)为常用中药芍药的主要有效成分，是一种单萜类糖苷化合物。近年来，国内外学者对芍药苷的药理作用展开了较为深入的研究，发现芍药苷具有抗自由基损伤，抑制细胞内钙超载和抗神经毒性等活性，体内实验证明其有降低血液黏度、抗血小板聚集、扩张血管、改善微循环、抗氧化、抗惊厥等多种生物学效应，并且毒副作用较小。本发明首次发现，芍药苷可激活 MSC，促进干细胞增值、活化，抑制干细胞凋亡，显著提升 MSC 因子分泌能力。CXCL10 (CXC chemokine ligand-10, CXC 趋化因子配体 10)，即 IP-10 (interferon-inducible protein-10)，能够抑制造血细胞集落形成，趋化单核细胞、活化 T 细胞和自然杀伤细胞，刺激 T 细胞黏附内皮细胞以及自然杀伤细胞介导的细胞融解，抑制血管生成等，而本发明首次发现 CXCL10 可激活 MSC，促进干细胞增值、活化，抑制干细胞凋亡，显著提升 MSC 因子分泌能力。Forskolin（毛喉萜），是一种普遍存在的真核细胞腺苷酸环化酶（AC）激活剂，在细胞生理学研究中，通常用来提高 cAMP 水平。可通过其催化亚基直接激活腺苷酸环化酶(AC)，以增加细胞内环磷酸腺苷(cAMP)的水平。文献研究发现 Forskolin，可促进体外培养的嗅鞘细胞增值，也诱导干细胞分化。本发明发现合适浓度的 Forskolin 可促进 MSC 增值、活化，抑制干细胞凋亡，促进 MSC 表面标记物的表达。

本发明间充质干细胞专用冻存液特别添加 5-10 体积%的复方电解质注射液，可以更好维持晶体渗透压。特别添加 5-10 体积%羟乙基淀粉 200/0.5 氯化钠注射液和 1-2 体积%的白蛋白，可以更好维持胶体渗透压。添加 1-2 体积%羟喜树碱注射液，可以大幅提升复苏后细胞活率。

利用本发明对 MSC 进行筛选、激活、扩增培养可得到大量的、标准化的、高质量、高活性的 MSC。本发明具有筛选效率高、扩增速度快、安全性高和成本低等优点。且本发明建立相应的细胞库，分类进行大规模的干细胞存储，有效保存时间长，复苏后细胞依然保持良好的细胞活力，细胞回收率高，从而满足临床治疗中大量干细胞的需求。

附图说明

图 1 是本发明方法的流程图。

图 2 是本发明方法培养 14d 获得的脂肪 MSC (200×)。

图 3 是本发明方法与常规培养方法干细胞增值速度对比。

具体实施方式

本发明提供了一种间充质干细胞体外筛选、激活、扩增、冻存及其细胞库建立的方法，包括：利用间充质干细胞专用原代筛选培养基进行第一阶段筛选培养，得到纯化的 MSC；利用间充质干细胞专用激活扩增培养基将纯化的间充质干细胞进行第二阶段激活和大规模扩增培养，获得大量激活功能的 MSC；利用间充质干细胞专用冻存液冻存干细胞，并按 ABO/RH 分型和 HLA 分型进行保存，建立可供检索的信息档案，构建间充质干细胞库。

根据本发明的实施例，间充质干细胞专用原代筛选培养基是添加了 2-8ng/ml SCF、2-4ng/ml BMP-4、10-30IU/ml IL-10 和 1-4ng/ml LIF、1-4ng/ml TGF- β 、2-8ng/ml 雷帕霉素、2-12ng/ml 曲美替尼、10-20ng/ml 对乙酰氨基酚、1-3ng/ml 5-HMF、10-20ng/ml 磷酸氯喹的间充质干细胞无血清完全培养基。

根据本发明的实施例，间充质干细胞专用激活扩增培养基是添加了 2-8ng/ml SCF、1-4ng/ml bFGF、10-20ng/ml 芍药苷、20-30ng/ml 盐酸二甲双胍、1-4ng/ml 氢化可的松、2-4ng/ml CXCL10、1-2ng/ml Forskolin、1-3ng/ml 5-HMF、10-20ng/ml 磷酸氯喹的间充质干细胞无血清完全培养基。

根据本发明的实施例，间充质干细胞专用原代筛选培养基、间充质干细胞专用激活扩增培养基、间充质干细胞专用冻存液中，所用的无血清完全培养基为 TheraPEAK™ MSCGM-CD™ Medium、MesenPRO RS™ Medium、Corning® MSC Xeno-Free SFM 或市售其他类型无血清培养基。

根据本发明的实施例，第一阶段间充质干细胞原代筛选培养中，每 2-3d 传代一次，传代 2 次；第二间充质干细胞激活和大规模扩增培养过程中，每 2-3d 传代一次，多次传代。因此，MSC 可在短时间内实现高纯度规模化扩增，获得充足的功能激活的 MSC，用于可能的临床治疗。

根据本发明的实施例，间充质干细胞专用冻存液是包含 5-10 体积%的 DMSO、5-10 体积%的复方电解质注射液、5-10 体积%羟乙基淀粉 200/0.5 氯化钠注射液、1-2 体积%的白蛋白、1-2 体积%

羟喜树碱注射液、66-83 体积%的间充质干细胞无血清完全培养基。其中，间充质干细胞的冻存浓度为 $(1 \times 10^7 - 5 \times 10^8)/\text{ml}$ 。因此，冻存的细胞浓度高，适于大规模干细胞的冻存，冻存成本低，并且细胞冻存效果好，复苏后细胞活率和细胞得率高。

根据本发明的实施例，将激活扩增的间充质干细胞，按 ABO/RH 分型和 HLA 分型进行保存，建立可供检索的间充质干细胞信息档案，构建间充质干细胞库。

下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法，所需试剂耗材及实验仪器等均可通过商业途径购得。

实施例 1

利用本发明的间充质干细胞体外筛选、激活、扩增的方法，分离获取脂肪 MSC。

1 供体筛选：采集医院须与供体签署知情同意书，一式 3 份。供体、采集医疗机构各一份，另一份随标本送交实验室。医院以询问和填表方式征询供体个人信息、过往治疗史、家族遗传史，以及是否有传染病史及造血或免疫系统的异常情况等信息。供体体检信息应包括如下项目：艾滋病病毒抗体、乙肝表面抗原和抗体、丙肝抗体、巨细胞病毒抗体、梅毒螺旋体抗体、转氨酶等。知情同意书、个人信息采集表、检查信息等需编号密封保存，任何接触资料的人员未经供体本人或其授权人员的同意，不得泄露其隐私。按 ABO/RH 分型和 HLA 分型进行保存，建立可供检索的干细胞供体档案信息库。

2 脂肪干细胞的制备：实验用脂肪取自腹部吸脂手术者。注意预留 5ml 外周血做快检和血型鉴定。无菌条件下，获得脂肪生理盐水混合物 20 mL，离心，PBS 清洗两遍去除麻醉药品及血细胞，获得纯度较高的脂肪颗粒。0.1%胶原酶 37℃恒温摇床消化 60 min，1500 r/min，离心 10 min，去上层未消化的脂肪组织及油脂，沉淀重悬 200um 滤器过滤，再次离心，红细胞裂解液裂解红细胞 5 min、磷酸盐缓冲液洗涤两遍，获得 SVF。SVF (Stromal Vascular Fraction)，即血管基质组分，是从患者自体抽取的脂肪组织中提取有效成分，含有多种具有修复功能的细胞，是内皮细胞、非特征性的基质细胞、血液细胞、组织型巨噬细胞、造血祖细胞和 MSC 等形成的细胞群。分别应用下述三种方式进行培养，传统含血清培养基 (DMEM+10%FBS+8ng/ml bFGF) 培养、无血清培养基 MSCGM-CD™ 培养基培养和本发明方法培养。

2.1 传统含血清培养基 (DMEM+10%FBS+8ng/ml bFGF) 培养: 根据 SVF 细胞数, 按照 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 的密度加入 (DMEM+10%FBS+8ng/ml bFGF) 20ml, 接种 1 个 T175 培养瓶, 置于二氧化碳培养箱, 培养条件: $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 二氧化碳体积分数为 $(5 \pm 0.2)\%$ 。每隔 2-3d 换液一次。6d 左右, 原代培养细胞达 70%~80%融合时, 进行传代, 连续传代 4 次。

2.2 无血清培养基 TheraPEAK™ MSCGM-CD™ Medium(品牌 LONZA, 货号 00190632)培养: 根据 SVF 细胞数, 按照 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 的密度加入 MSCGM-CD™ 培养基 20ml, 接种 1 个 T175 培养瓶, 置于二氧化碳培养箱, 培养条件: $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 二氧化碳体积分数为 $5 \pm 0.2\%$ 。每隔 2-3d 换液一次。6d 左右, 原代培养细胞达 80%融合时, 进行传代, 连续传代 4 次。

2.3 本发明方法培养:

2.3.1 根据 SVF 细胞数, 按照 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 的密度加入 MSC 专用原代筛选培养 20ml, 即添加了 5 ng/ml SCF、5ng/ml BMP-4、20IU/ml IL-10 和 2ng/ml LIF、2ng/ml TGF- β 、5ng/ml 雷帕霉素、8ng/ml 曲美替尼、10ng/ml 对乙酰氨基酚、2ng/ml 5-HMF、15ng/ml 磷酸氯喹的 MSCGM-CD™ Medium, 接种 1 个 T175 培养瓶, 置于二氧化碳培养箱, 培养条件: $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 二氧化碳体积分数为 $5 \pm 0.2\%$ 。其中, 每日观察细胞, 根据培养基的颜色, 2-3d 进行换液。5d 左右, 原代培养细胞达 70%~80%融合时, 进行传代 1 次。

2.3.2 传代更换培养体系为间充质干细胞专用激活扩增培养基, 即添加了 5ng/ml SCF、2ng/ml bFGF、10ng/ml 芍药苷、20ng/ml 盐酸二甲双胍、2ng/ml 氢化可的松、3ng/ml CXCL10、1ng/ml Forskolin、1ng/ml 5-HMF、10ng/ml 磷酸氯喹的间充质干细胞无血清完全培养基, 继续培养。每日观察细胞, 根据培养基的颜色, 每 2-3d 换液传代一次。

2.4 上述是三个方法培养扩增 14d 时, 将获得的 MSC 全部回收, 并进行细胞计数, 计算细胞得率。均留取 10ml 培养基 (培养 72h) 上清 Elisa 法进行分泌细胞因子 TGF- β 、GM-CSF、IL-2、IL-10、VEGF、HGF、PDGF 的检测。将回收的细胞用 200ml 生理盐水重悬, 并加入 10ml 人血清白蛋白, 混匀; 并从中取 10ml 细胞悬液待检, 剩余的细胞可注入回输袋中准备回输。从回输袋中抽取 10ml 细胞悬液进行检测: 支原体、内毒素、微生物和病毒五项。剩余部分细胞继续培养至 28d。

2.5 流式细胞仪检测 MSC 表面标记物。三个方法培养 14d 获得的建充质干细胞 1×10^5 (100ul),

分别加入 20ul CD29、CD73、CD90、CD105、CD34、CD45、CD14、HLA-DR 抗体, 混匀, 避光孵育 30 min, PBS 洗涤两次, 美国 Backman Clouter FC500 流式细胞仪检测。

2.6 细胞增值速度对比: 分别取上述三种方法培养收集到的培养 14d 的脂肪 MSC, 消化制作成单细胞悬液, 按 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于 96 孔培养板中, 每孔分别加上述三种培养液 (其中本发明方法为添加间充质干细胞专用激活扩增培养基) 100 μl 。同时取培养板一列加入生长培养基不加脂肪 MSC, 每孔培养液为 100 μl , 作为空白对照组。每 12h 取 4 孔, MTT 比色法测 570nm 波长光吸收值 (D570 值), 连续测 3d, 绘制细胞生长曲线。方法如下: 终止培养时, 每孔加入 MTT 溶液 20 μl (浓缩液 5mg/ml), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4h, 吸掉上清液, 每孔加入 150 μl DMSO, 室温振荡 10min, 选择 570nm 波长, 调空白对照组一列均值为零, 在酶联免疫检测仪上测定各孔的 D570 值, 求其平均值。以时间为横轴, D570 值为纵轴绘制细胞的生长曲线。

2.7 裸鼠致瘤试验: SPF 级雌性 BALB/c 裸鼠, 4-6 周龄, 体重 18-20g, 于空气层流架中带盖鼠笼内饲养, 饮用水、标准饲料及其它与动物接触品均经灭菌处理。将上述培养 28d 的 MSC 按 3×10^7 个/0.2ml 接种裸鼠肋部皮下, 用苦味酸标记, 为期 2 个月观察成瘤情况。

3 实验结果

3.1 三种方法培养扩增 14d 的细胞得率和活率结果: 传统含血清培养基 2×10^7 个 SVF 培养 14d 后获得 2.17×10^9 个 MSC, 活率 94.36%; 无血清培养基 MSCGM-CD™ 培养 14d 后获得 2.69×10^9 个 MSC, 活率 96.71%; 而本发明培养方法培养 14d 后获得 4.35×10^9 个 MSC, 活率 98.73%。本发明方法培养 MSC 得率远优于其他两种目前常规培养方法。

3.2 三种方法培养扩增 14d 培养基上清 Elisa 分泌因子检测结果如下表 1 所示。本发明方法培养获得的 MSC 细胞因子分泌能力强于其他两种常规培养方法。

表 1. 三种方法培养 14d 后培养基上清细胞因子检测结果

	TGF- β	GM-CSF	IL-2	IL-10	VEGF	HGF	PDGF
	(pg/ml)	(ng/ml)	(pg/ml)	(pg/ml)	(pg/ml)	(ng/ml)	(ng/ml)
传统含血清培养	436.40	46.29	30.43	36.10	21.61	0.60	0.04

无血清培养	194.18	53.95	35.02	35.47	20.94	0.52	0.02
本发明方法培养	446.06	78.07	44.80	44.57	41.56	0.72	0.05

3.3 三种方法培养扩增 14d 获得的 MSC 悬液委托检测平台检测了抗体乙肝表面抗原、丙肝抗原、人类免疫缺陷病毒抗体、梅毒螺旋体特异性抗体、巨噬细胞病毒以及支原体、细菌和内毒素，检测结果均呈阴性。说明该批次 MSC 是安全的，培养过程中没有造成污染。

3.4 三种方法培养扩增 14d 获得的细胞流式检测结果：三种方法培养扩增获得的细胞均符合 MSC 表面标记物的特征，阳性指标为 CD29、CD73、CD90、CD105 结果如表 2 所示，阴性指标 CD34、CD45、CD14、HLA-DR 结果如表 3 所示。

表 2.三种方法培养 14d 后细胞流式检测阳性指标结果

	CD29	CD73	CD90	CD105
传统含血清培养	87.01%	91.74%	89.61%	90.32%
无血清培养	96.00%	95.33%	95.99%	96.38%
本发明方法培养	99.10%	99.36%	99.51%	99.03%

表 3.三种方法培养 14d 后细胞流式阴性指标检测结果

	CD34	CD14	HLA-DR	CD45
传统含血清培养	1.85%	1.94%	1.52%	1.71%
无血清培养	0.98%	1.60%	1.27%	0.82%
本发明方法培养	0.91%	0.54%	0.49%	0.62%

可以看出，本发明培养方法，获得的 MSC 细胞表面标记物阳性指标率和阴性指标率的表达均明显优于其他两种常规培养方法。

3.5 三种方法培养扩增 14d 获得 MSC 分别在对应培养体系中细胞增值速度对比结果：如图 3 所示，可以看出，本发明方法培养 MSC 时，细胞增值速度明显优于其他两种常规培养方法。

3.6 裸鼠致瘤实验结果：在 2 个月观察期内皮下注射 0.2ml 生理盐水和 3×10^7 个/0.2ml 培养 28d 的 MSC 的两组小鼠均未见肿瘤形成。该结果说明本发明的方法即使培养到 28d，MSC 依然是安全

有效的，不会导致肿瘤的形成。培养扩增后的 MSC 不会在体内形成肿瘤。

实施例 2

对实施例 1 中本发明方法获得的 MSC 进行冻存，比较冻存效果。分组如下：

冻存液 1：10 体积%的 DMSO、90 体积%的 MesenPRO RS™ Medium；

冻存液 2：5 体积%的 DMSO、90 体积%的 MesenPRO RS™ Medium；

冻存液 3：5 体积%的 DMSO、10 体积%的复方电解质注射液、75 体积%的 MesenPRO RS™ Medium；

冻存液 4：5 体积%的 DMSO、10 体积%的复方电解质注射液、10 体积%羟乙基淀粉 200/0.5 氯化钠注射液、75 体积%的 MesenPRO RS™ Medium；

冻存液 5：5 体积%的 DMSO、10 体积%的复方电解质注射液、10 体积%羟乙基淀粉 200/0.5 氯化钠注射液、2 体积%的白蛋白、73 体积%的 MesenPRO RS™ Medium；

冻存液 6（本发明间充质干细胞专用冻存液）：5 体积%的 DMSO、10 体积%的复方电解质注射液、10 体积%羟乙基淀粉 200/0.5 氯化钠注射液、2 体积%的白蛋白、2 体积%羟喜树碱注射液、71 体积%的 MesenPRO RS™ Medium；

按照以下步骤冻存 MSC 细胞：将冷冻保存液与细胞混匀后，速移入冻存管，并放入冻存盒中，-80℃过夜，次日转入液氮内。其中，每 5×10^7 个 MSC 细胞采用 1ml 冻存液。冷冻保存 MSC 细胞 90d，然后进行复苏。检测冻存前后细胞的存活率，以及复苏后细胞回收率。具体地，冻存前以及冻存并复苏后的细胞存活率计算方法为：【活细胞数/(活细胞数+死细胞数)】 $\times 100\%$ 。复苏后细胞回收率的计算方法为：(复苏后活细胞数/冻存时活细胞数) $\times 100\%$ 。

复苏 MSC 细胞检查结果：

表 4.不同冻存液冻存复苏效果比较

	细胞活率 (%)	细胞得率 (%)
冻存液 1	91.12	89.38
冻存液 2	92.86	90.17

冻存液 3	93.75	91.92
冻存液 4	95.63	93.49
冻存液 5	96.17	94.99
冻存液 6	99.35	97.11

如表 4 所示, 复苏后细胞存活率均低于冻存前。冻存液 2 保存的细胞活率和细胞得率优于冻存液 1, 表明 5%DMSO 浓度是最适浓度, 增加 DMSO 浓度将增加 DMSO 的细胞毒性作用, 反而不能提高 MSC 细胞活率和细胞得率。冻存液 3 保存的细胞活率和细胞得率优于冻存液 2, 表明复方电解质注射液有稳定和调节晶体渗透压的作用, 可以提高冻存细胞复苏后活率和得率。冻存液 4 保存的细胞活率和细胞得率优于冻存液 3, 表明羟乙基淀粉 200/0.5 氯化钠注射液有稳定和调节胶体渗透压的作用, 可以提高冻存细胞复苏后活率和得率。冻存液 5 保存的细胞活率和细胞得率优于冻存液 4, 表明白蛋白有稳定和调节胶体渗透压的作用, 可以提高冻存细胞复苏后活率和得率。冻存液 6 保存的细胞活率和细胞得率优于冻存液 5, 表明羟喜树碱注射液可以提高冻存细胞复苏后活率和得率。冻存液 6 保存的细胞活率和细胞得率明显优于其余 5 种冻存液, 且复苏后 MSC 活率达到 99%以上, 得率 97%以上, 表明本发明的间充质干细胞专用冻存液适用于 MSC 冻存。

实施例 3

利用本发明实施例的一种间充质干细胞体外筛选、激活、扩增的方法, 获得脐带 MSC, 按 ABO/RH 分型和 HLA 分型进行保存, 建立可供检索的脐带间充质干细胞信息档案, 构建脐带间充质干细胞细胞库。

1 供体筛选

医院以询问和填表方式征询供体个人信息、过往治疗史、家族遗传史, 以及是否有传染病史及造血或免疫系统的异常情况等信息。医院须与供体签署知情同意书取得供体本人或其授权人员的同意, 查阅其体检资料, 获得体检信息。供体体检信息应包括如下项目: 艾滋病病毒抗体、乙肝表面抗原和抗体、丙肝抗体、巨细胞病毒抗体、梅毒螺旋体抗体、转氨酶等。个人信息采集表、知情同意书、检查信息等需编号密封保存, 建立可供检索的脐带供体档案信息库。

2 具体制备方法包括以下步骤, 以 5cm 脐带为例操作如下(所有操纵步骤均在洁净工作台完成):

2.1 运输脐带：上述供体筛选合格的，采集脐带 5cm，2-8℃ 恒温保存在疫苗箱中，48h 内送至实验室。

2.2 分解脐带：取脐带置于 5cm 培养皿中，洗涤，将其剪成数段，并剔除中间三根血管。位于羊膜与血管之间的白色结缔组织即为华尔通氏胶，用长柄有齿镊将其撕下，放入无菌平皿中。用无菌长柄手术剪，在离心管中将华尔通氏胶剪切成 1mm³ 左右的组织匀浆块，剪切时间 15-20min；加入与组织匀浆块等体积的加入与组织块等体积的 1mg/ml II 型胶原酶（预热到 37℃），置于恒温振荡培养箱，37℃，200rpm，消化 60-90min（每 20min 取出轻轻摇匀后放回去），至脐带组织匀浆块呈糜状即可。将酶消化后的组织匀浆按照体积比 1: 6，加入 6 倍体积的生理盐水，通过无菌 200 目滤网过滤除去残留物，400g 离心 8min，弃上清，获得下层细胞。

2.3 原代筛选培养：根据细胞计数，按照 1.0×10^6 个 / ml 的密度加入 MSC 专用原代筛选培养 50ml，即添加了 8ng/ml SCF、4ng/ml BMP-4、30IU/ml IL-10 和 4ng/ml LIF、4ng/ml TGF- β 、8ng/ml 雷帕霉素、12ng/ml 曲美替尼、20ng/ml 对乙酰氨基酚、3ng/ml 5-HMF、20ng/ml 磷酸氯喹的 Corning® MSC Xeno-Free SFM，接种 3 个 T175 培养瓶，置于二氧化碳培养箱，培养条件：(37±0.5)℃，二氧化碳体积分数为 (5±0.2)%，每隔 2-3d 换液一次。

2.4 传代激活扩增：5-7d 左右，原代培养细胞达 80%融合时，吸弃旧细胞培养液，消化传代，传代后更换培养体系为 MSC 专用激活扩增培养基，即添加了 8ng/ml SCF、4ng/ml bFGF、20ng/ml 芍药苷、30ng/ml 盐酸二甲双胍、4ng/ml 氢化可的松、4ng/ml CXCL10、2ng/ml Forskolin、3ng/ml 5-HMF、20ng/ml 磷酸氯喹的 Corning® MSC Xeno-Free SFM，继续培养。每日观察细胞，根据培养基的颜色，每 2-3d 换液传代一次。

3 建立细胞库：按 5 体积%的 DMSO、5 体积%的复方电解质注射液、5 体积%羟乙基淀粉 200/0.5 氯化钠注射液、1 体积%的白蛋白、1 体积%羟喜树碱注射液、83 体积%的 Corning® MSC Xeno-Free SFM 配置间充质干细胞专用冻存液。收集上述激活扩增的脐带 MSC。将 MSC 细胞悬液进行检测：支原体、内毒素、微生物和病毒五项。检测合格的 MSC，每 5×10^7 个 MSC 细胞采用 1ml 上述配置好的 MSC 专用冻存液，进行冻存操作，按 ABO/RH 分型和 HLA 分型进行保存，建立可供检索的脐带间充质干细胞信息档案，构建脐带间充质干细胞库。

实施例 4

利用本发明实施例的一种间充质干细胞体外筛选、激活、扩增的方法，获得胎盘 MSC，按 ABO/RH 分型和 HLA 分型进行保存，建立可供检索的胎盘间充质干细胞信息档案，构建胎盘间充质干细胞细胞库。

1 供体筛选

医院以询问和填表方式征询供体个人信息、过往治疗史、家族遗传史，以及是否有传染病史及造血或免疫系统的异常情况等信息。医院须与供体签署知情同意书取得供体本人或其授权人员的同意，查阅其体检资料，获得体检信息。供体体检信息应包括如下项目：艾滋病病毒抗体、乙肝表面抗原和抗体、丙肝抗体、巨细胞病毒抗体、梅毒螺旋体抗体、转氨酶等。个人信息采集表、知情同意书、检查信息等需编号密封保存，建立可供检索的胎盘供体档案信息库。

2 胎盘 MSC 制备

2.1 采集一份供体筛选合格者的完整胎盘，加入适量的胎盘保存液（100mg 青霉素、100mg 链霉素、2.5mg 两性霉素、0.5g 肝素钠注射液、2.5g 人血白蛋白溶于 500ml DMEM 培养基中即得），以浸没过胎盘为宜，2-8℃恒温保存在疫苗箱中，24h 内送至实验室。

2.2 吸弃胎盘保存液，加入适量体积的含双抗的生理盐水，反复振荡几次，直至胎盘表面的血渍洗涤干净。去除胎盘表面的羊膜和蜕膜，加入适量体积的含双抗的生理盐水，将胎盘组织剪碎，并将组织块内的血液清洗干净。

2.3 消化胎盘：收集剪碎的胎盘组织块，加入与胎盘组织块等体积的含 0.2%IV 型胶原酶的 DMEM（胶原酶 IV 终浓度为 0.1%），于 37℃ 水浴摇床中消化 20-30min，之后再加入胎盘组织块 1/4 体积的含 0.25%胰蛋白酶的 DMEM，于 37℃ 水浴摇床中消化 10-20min。将两次消化后胎盘组织块经 200 目分析筛过滤收集滤液，混匀后于 1800rpm 室温离心 10min，弃上清，用适量的生理盐水重悬细胞沉淀，按照重悬液:HES 体积比 4:1 加入 HES，300rpm 离心 10min，收集上层液体，离心后获得细胞。

2.4 原代筛选培养：根据细胞计数，按照 1.0×10^6 个 / ml 的密度加入 MSC 专用原代筛选培养 50ml，即添加了 2ng/ml SCF、2ng/ml BMP-4、10IU/ml IL-10 和 1ng/ml LIF、1ng/ml TGF- β 、2ng/ml

雷帕霉素、2ng/ml 曲美替尼、10ng/ml 对乙酰氨基酚、1ng/ml 5-HMF、10ng/ml 磷酸氯喹的 MesenPRO RS™ Medium，接种 3 个 T175 培养瓶，置于二氧化碳培养箱，培养条件： $(37 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ ，二氧化碳体积分数为 $(5 \pm 0.2) \%$ ，每隔 2-3d 换液一次。

2.5 传代激活扩增：5-7d 左右，原代培养细胞达 80%融合时，吸弃旧细胞培养液，消化传代，传代后更换培养体系为 MSC 专用激活扩增培养基，即添加了 2ng/ml SCF、1-4ng/ml bFGF、10ng/ml 芍药苷、20ng/ml 盐酸二甲双胍、1ng/ml 氢化可的松、2ng/ml CXCL10、1ng/ml Forskolin、1ng/ml 5-HMF、10ng/ml 磷酸氯喹的 MesenPRO RS™ Medium，继续培养。每日观察细胞，根据培养基的颜色，每 2-3d 换液传代一次。

3 建立细胞库：按 5 体积%的 DMSO、10 体积%的复方电解质注射液、10 体积%羟乙基淀粉 200/0.5 氯化钠注射液、2 体积%的白蛋白、2 体积%羟喜树碱注射液、71 体积%的 MesenPRO RS™ Medium 配置间充质干细胞专用冻存液。收集上述激活扩增的胎盘 MSC。将 MSC 细胞悬液进行检测：支原体、内毒素、微生物和病毒五项。检测合格的 MSC，每 5×10^7 个 MSC 细胞采用 1ml 上述配置好的 MSC 专用冻存液，进行冻存操作，按 ABO/RH 分型和 HLA 分型进行保存，建立可供检索的胎盘间充质干细胞信息档案，构建胎盘间充质干细胞库。

权利要求书

1.一种间充质干细胞体外筛选、激活、扩增、冻存及其细胞库建立的方法，其特征在于，包括：利用间充质干细胞专用原代筛选培养基进行第一阶段筛选培养，得到纯化的间充质干细胞；利用间充质干细胞专用激活扩增培养基将纯化的间充质干细胞进行第二阶段激活和大规模扩增培养，获得大量激活功能的间充质干细胞；利用间充质干细胞专用冻存液冻存干细胞，并按 ABO/RH 分型和 HLA 分型进行保存，建立可供检索的信息档案，构建间充质干细胞库。

2.根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述间充质干细胞专用原代筛选培养基是添加了 2-8ng/ml SCF、2-4ng/ml BMP-4、10-30IU/ml IL-10 和 1-4ng/ml LIF、1-4ng/ml TGF- β 、2-8ng/ml 雷帕霉素、2-12ng/ml 曲美替尼、10-20ng/ml 对乙酰氨基酚、1-3ng/ml 5-HMF、10-20ng/ml 磷酸氯喹的间充质干细胞无血清完全培养基。

3.根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述间充质干细胞专用激活扩增培养基是添加了 2-8ng/ml SCF、1-4ng/ml bFGF、10-20ng/ml 芍药苷、20-30ng/ml 盐酸二甲双胍、1-4ng/ml 氢化可的松、2-4ng/ml CXCL10、1-2ng/ml Forskolin、1-3ng/ml 5-HMF、10-20ng/ml 磷酸氯喹的间充质干细胞无血清完全培养基。

4.根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述间充质干细胞专用冻存液是包含 5-10 体积%的 DMSO、5-10 体积%的复方电解质注射液、5-10 体积%羟乙基淀粉 200/0.5 氯化钠注射液、1-2 体积%的白蛋白、1-2 体积%羟喜树碱注射液、66-83 体积%的间充质干细胞无血清完全培养基。

5.根据权利要求 2、3、4 所述的方法，其特征在于，所述间充质干细胞专用原代筛选培养基、间充质干细胞专用激活扩增培养基、间充质干细胞专用冻存液中，所述的无血清完全培养基为 TheraPEAK™ MSCGM-CD™ Medium、MesenPRO RS™ Medium、Corning® MSC Xeno-Free SFM 或市售其他类型无血清培养基。

经修改的权利要求

国际局收到日：2021年4月2日（02.04.2021）

1.一种间充质干细胞体外筛选、激活、扩增、冻存及其细胞库建立的方法，其特征在于，包括：利用间充质干细胞专用原代筛选培养基进行第一阶段筛选培养，得到纯化的间充质干细胞；所述间充质干细胞专用原代筛选培养基是添加了 2-8ng/ml SCF、2-4ng/ml BMP-4、10-30IU/ml IL-10 和 1-4ng/ml LIF、1-4ng/ml TGF- β 、2-8ng/ml 雷帕霉素、2-12ng/ml 曲美替尼、10-20ng/ml 对乙酰氨基酚、1-3ng/ml 5-HMF、10-20ng/ml 磷酸氯喹的间充质干细胞无血清完全培养基；利用间充质干细胞专用激活扩增培养基将纯化的间充质干细胞进行第二阶段激活和大规模扩增培养，获得大量激活功能的间充质干细胞；利用间充质干细胞专用冻存液冻存干细胞，并按 ABO/RH 分型和 HLA 分型进行保存，建立可供检索的信息档案，构建间充质干细胞库。

2.根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述间充质干细胞专用激活扩增培养基是添加了 2-8ng/ml SCF、1-4ng/ml bFGF、10-20ng/ml 芍药苷、20-30ng/ml 盐酸二甲双胍、1-4ng/ml 氢化可的松、2-4ng/ml CXCL10、1-2ng/ml Forskolin、1-3ng/ml 5-HMF、10-20ng/ml 磷酸氯喹的间充质干细胞无血清完全培养基。

3.根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述间充质干细胞专用冻存液是包含 5-10 体积%的 DMSO、5-10 体积%的复方电解质注射液、5-10 体积%羟乙基淀粉 200/0.5 氯化钠注射液、1-2 体积%的白蛋白、1-2 体积%羟喜树碱注射液、66-83 体积%的间充质干细胞无血清完全培养基。

4.根据权利要求 1、2、3 任一项所述的方法，其特征在于，所述间充质干细胞专用原代筛选培养基、间充质干细胞专用激活扩增培养基、间充质干细胞专用冻存液中，所述的无血清完全培养基为 TheraPEAK™ MSCGM-CD™ Medium、MesenPRO RS™ Medium、Corning® MSC Xeno-Free SFM 或市售其他类型无血清培养基。

按照专利合作条约第 19 条所作的声明

国际申请号：PCT/CN2020/093716；国际申请日：2020.06.01；
申请人：青岛瑞思德生物科技有限公司，申请人按照专利合作条约第 19 条作如下声明：

修改之后的权利要求 1 为：一种间充质干细胞体外筛选、激活、扩增、冻存及其细胞库建立的方法，其特征在于，包括：利用间充质干细胞专用原代筛选培养基进行第一阶段筛选培养，得到纯化的间充质干细胞；所述间充质干细胞专用原代筛选培养基是添加了 2-8ng/ml SCF、2-4ng/ml BMP-4、10-30IU/ml IL-10 和 1-4ng/ml LIF、1-4ng/ml TGF- β 、2-8ng/ml 雷帕霉素、2-12ng/ml 曲美替尼、10-20ng/ml 对乙酰氨基酚、1-3ng/ml 5-HMF、10-20ng/ml 磷酸氯喹的间充质干细胞无血清完全培养基；利用间充质干细胞专用激活扩增培养基将纯化的间充质干细胞进行第二阶段激活和大规模扩增培养，获得大量激活功能的间充质干细胞；利用间充质干细胞专用冻存液冻存干细胞，并按 ABO/RH 分型和 HLA 分型进行保存，建立可供检索的信息档案，构建间充质干细胞库。

新的权利要求 1 增加了对间充质干细胞专用原代筛选培养基的进一步限定。修改之后本发明具有筛选效率高、扩增速度快、安全性高和成本低等优点。且本发明建立相应的细胞库，分类进行大规模的干细胞存储，有效保存时间长，复苏后细胞依然保持良好的细胞活力，细胞回收率高，从而满足临床治疗中大量干细

胞的需求。

相对原权利要求 1，新的权利要求 1 缩小了保护范围。故上述修改未超出原说明书限定的范围，不会对说明书造成影响。

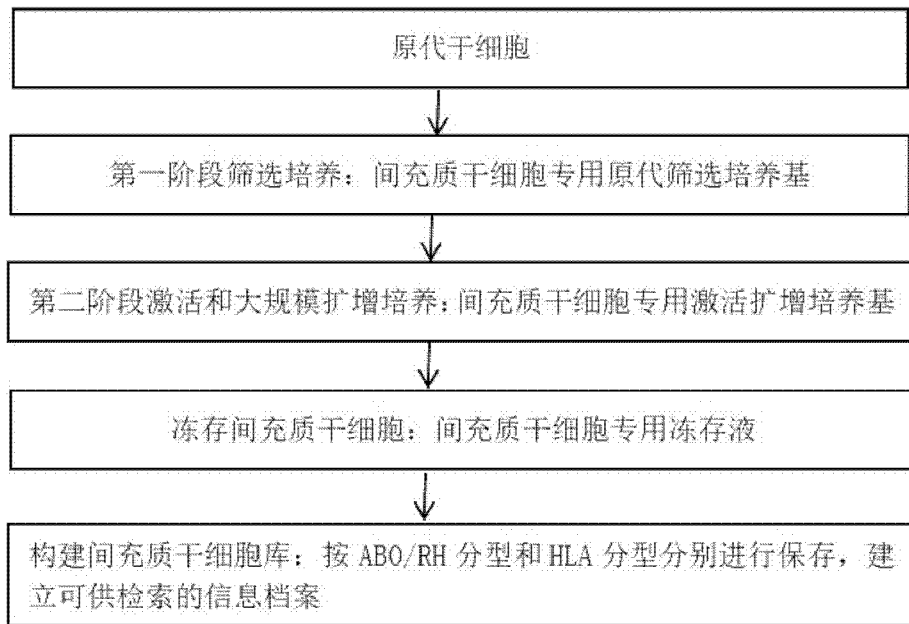


图 1

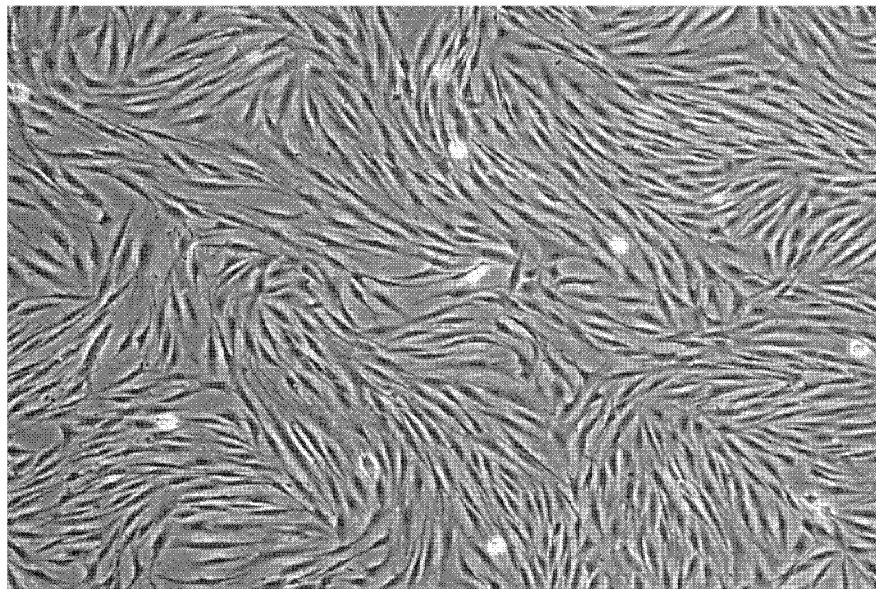


图 2

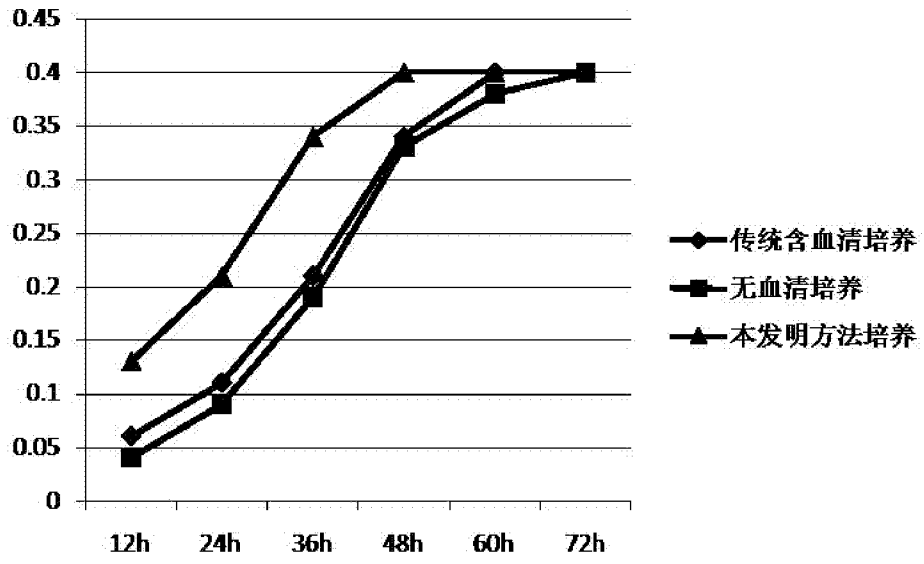


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/093716

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 5/0775(2010.01)i; A61K 35/28(2015.01)i; C12N 5/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12N; A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNABS, CNTXT, TWTXT, CNKI, DWPI, WOTXT, USTXT, EPTXT, GBTXT, JPTXT, KRTXT, NCBI, ELSEVIER, ISI-WEB OF SCIENCE; 间充质干细胞, 干细胞, 培养基, 培养, 分离, 扩增, 激活, 活化, 芍药苷, 雷帕霉素, 对乙酰氨基酚, 曲美替尼, 磷酸氯喹, 二甲双胍, 氢化可的松, SCF, FGF, CXCL10, TGF, LIF, Mesenchymal stem cells, stem cells, culture, cultivation, isolat+, medium, media, expansion, activat+, paeoniflorin, Rapamycin, metformin, trametinib, chloroquine phosphate, ABO, RH, HLA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
,X	CN 103422176 A (庞希宁) 04 December 2013 (2013-12-04) see claim 1	1
A	CN 103422176 A (庞希宁) 04 December 2013 (2013-12-04) see claim 1	2-5
A	CN 102660501 A (BOYALIFE STEM CELL TECHNOLOGY CO., LTD.) 12 September 2012 (2012-09-12) see claims 1-9	1-5
A	晁二涛等 (CHAO, Ertao et al.). "芍药苷对骨髓间充质干细胞增殖的影响 (Effects of Paeoniflorin on the Proliferation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells)" <i>中国组织工程研究 (Chinese Journal of Tissue Engineering Research)</i> , Vol. 19, No. 1, 01 January 2015 (2015-01-01), pp. 101-107, see abstract	1-5
A	CN 106754683 A (HUANG, Bing) 31 May 2017 (2017-05-31) see claims 1-2	1-5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 February 2021		02 March 2021
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/093716

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103422176	A	04 December 2013	CN	103422176	B	07 January 2015
CN	102660501	A	12 September 2012	None			
CN	106754683	A	31 May 2017	CN	106754683	B	24 March 2020

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/093716

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 5/0775(2010.01)i; A61K 35/28(2015.01)i; C12N 5/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																																
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N; A61K</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, CNTXT, TWTXT, CNKI, DWPI, WOTXT, USTXT, EPTXT, GBTXT, JPTXT, KRTXT, NCBI, ELSEVIER, ISI-WEB OF SCIENCE: 间充质干细胞, 干细胞, 培养基, 培养, 分离, 扩增, 激活, 活化, 芍药苷, 雷帕霉素, 对乙酰氨基酚, 曲美替尼, 磷酸氯喹, 二甲双胍, 氢化可的松, SCF, FGF, CXCL10, TGF, LIF, Mesenchymal stem cells, stem cells, culture, cultivation, isolat+, medium, media, expansion, activat+, paeoniflorin, Rapamycin, metformin, trametinib, chloroquine phosphate, ABO, RH, HLA</p>																																
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>, X</td> <td>CN 103422176 A (庞希宁) 2013年 12月 4日 (2013 - 12 - 04) 参见权利要求1</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103422176 A (庞希宁) 2013年 12月 4日 (2013 - 12 - 04) 参见权利要求1</td> <td>2-5</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102660501 A (博雅干细胞科技有限公司) 2012年 9月 12日 (2012 - 09 - 12) 参见权利要求1-9</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>晁二涛等. “芍药苷对骨髓间充质干细胞增殖的影响” 中国组织工程研究, 第19卷, 第1期, 2015年 1月 1日 (2015 - 01 - 01), 第101-107页 参见摘要</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106754683 A (黄兵) 2017年 5月 31日 (2017 - 05 - 31) 参见权利要求1-2</td> <td>1-5</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <table border="1"> <tr> <td>* 引用文件的具体类型:</td> <td>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</td> </tr> <tr> <td>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</td> <td>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</td> <td>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</td> <td>“&” 同族专利的文件</td> </tr> <tr> <td>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</td> <td></td> </tr> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	, X	CN 103422176 A (庞希宁) 2013年 12月 4日 (2013 - 12 - 04) 参见权利要求1	1	A	CN 103422176 A (庞希宁) 2013年 12月 4日 (2013 - 12 - 04) 参见权利要求1	2-5	A	CN 102660501 A (博雅干细胞科技有限公司) 2012年 9月 12日 (2012 - 09 - 12) 参见权利要求1-9	1-5	A	晁二涛等. “芍药苷对骨髓间充质干细胞增殖的影响” 中国组织工程研究, 第19卷, 第1期, 2015年 1月 1日 (2015 - 01 - 01), 第101-107页 参见摘要	1-5	A	CN 106754683 A (黄兵) 2017年 5月 31日 (2017 - 05 - 31) 参见权利要求1-2	1-5	* 引用文件的具体类型:	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件	“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性	“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性	“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“&” 同族专利的文件	“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件		“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																														
, X	CN 103422176 A (庞希宁) 2013年 12月 4日 (2013 - 12 - 04) 参见权利要求1	1																														
A	CN 103422176 A (庞希宁) 2013年 12月 4日 (2013 - 12 - 04) 参见权利要求1	2-5																														
A	CN 102660501 A (博雅干细胞科技有限公司) 2012年 9月 12日 (2012 - 09 - 12) 参见权利要求1-9	1-5																														
A	晁二涛等. “芍药苷对骨髓间充质干细胞增殖的影响” 中国组织工程研究, 第19卷, 第1期, 2015年 1月 1日 (2015 - 01 - 01), 第101-107页 参见摘要	1-5																														
A	CN 106754683 A (黄兵) 2017年 5月 31日 (2017 - 05 - 31) 参见权利要求1-2	1-5																														
* 引用文件的具体类型:	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件																															
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性																															
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性																															
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“&” 同族专利的文件																															
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件																																
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件																																
国际检索实际完成的日期	2021年 2月 18日	国际检索报告邮寄日期	2021年 3月 2日																													
ISA/CN的名称和邮寄地址	中国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	授权官员	田园																													
传真号 (86-10)62019451		电话号码 62411047																														

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/093716

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103422176	A	2013年 12月 4日	CN	103422176	B	2015年 1月 7日
CN	102660501	A	2012年 9月 12日	无			
CN	106754683	A	2017年 5月 31日	CN	106754683	B	2020年 3月 24日