



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105283075 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 27

(21) 申请号 201380072901. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 12. 13

A01N 63/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 15/00(2006. 01)

61/737, 498 2012. 12. 14 US

C12N 5/02(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 08. 13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/074892 2013. 12. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/093753 EN 2014. 06. 19

(71) 申请人 人类起源公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 张小葵 斯图尔特·阿博特

瓦内萨·沃斯基纳里安-贝尔斯

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 郑霞

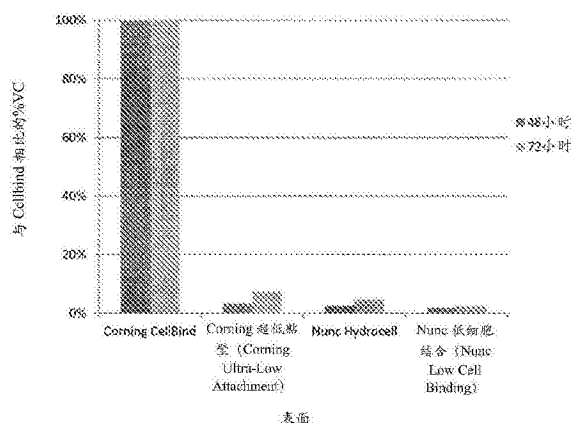
权利要求书4页 说明书55页 附图7页

(54) 发明名称

抗失巢凋亡胎盘干细胞及其应用

(57) 摘要

抗失巢凋亡的胎盘干细胞 (arPSC) 在低贴壁环境中具有增加的存活, 并因此基于它们在非贴壁状态下维持更长时间的能力, 能够有利地用于 (例如) 治疗中。修饰胎盘干细胞使它们抗失巢凋亡的方法包括使胎盘干细胞与有效量的调控 RNA 分子接触, 从而抑制与胎盘干细胞的失巢凋亡有关的一种或多种基因。还公开了与失巢凋亡有关的基因以用于调控。



1. 分离的胎盘干细胞,其中,所述胎盘干细胞抗失巢凋亡。

2. 分离的胎盘干细胞,其中,与未修饰的胎盘干细胞中的相同失巢凋亡相关基因的表达相比,所述胎盘干细胞以降低的水平表达至少一种失巢凋亡相关基因。

3. 根据权利要求 2 所述的分离的胎盘干细胞,其中,所述失巢凋亡相关基因为 AMIG01(NCBI GENE ID NO:57463);ARHGAP20(NCBI GENE ID NO:57569);CD38(NCBI GENE ID NO:952);CLCC1(NCBI GENE ID NO:23155);CNTF(NCBI GENE ID NO:1270);ZFP91-CNTF(NCBI GENE ID NO:386607);COX8A(NCBI GENE ID NO:1351);DHX34(NCBI GENE ID NO:9704);FAM175A(NCBI GENE ID NO:51023);MRPS18C(NCBI GENE ID NO:84142);FAM44C(NCBI GENE ID NO:284257);FBP2(NCBI GENE ID NO:8789);FLI1(NCBI GENE ID NO:2313);FREM3(NCBI GENE ID NO:166752);IFIT5(NCBI GENE ID NO:24138);LOC399851(NCBI GENE ID NO:399851);LOC400713(NCBI GENE ID NO:400713);LOC651610(NCBI GENE ID NO:651610);PIGP(NCBI GENE ID NO:51227);SH3TC2(NCBI GENE ID NO:79628);SLC2A3(NCBI GENE ID NO:6515);STAU2(NCBI GENE ID NO:27067);TMEFF1(NCBI GENE ID NO:8577);TMEM217(NCBI GENE ID NO:221468);TMEM79(NCBI GENE ID NO:84283);USHBP1(NCBI GENE ID NO:83878);APH1B(NCBI GENE ID NO:83464);ATP2B2(NCBI GENE ID NO:491);C13orf39(NCBI GENE ID NO:196541);C4orf17(NCBI GENE ID NO:84103);C4orf46(NCBI GENE ID NO:201725);DDX41(NCBI GENE ID NO:51428);DKFZp547J222(NCBI GENE ID NO:84237);FGFR1(NCBI GENE ID NO:2260);FHDC1(NCBI GENE ID NO:85462);GNAI2(NCBI GENE ID NO:2771);GP5(NCBI GENE ID NO:2814);IL1RN(NCBI GENE ID NO:3557);KIF24(NCBI GENE ID NO:347240);KNDC1(NCBI GENE ID NO:85442);LOC100132598(NCBI GENE ID NO:100132598);LOC151760(NCBI GENE ID NO:151760);LOC152024(NCBI GENE ID NO:152024);LOC339833(NCBI GENE ID NO:339833);LPAR4(NCBI GENE ID NO:2846);LSG1(NCBI GENE ID NO:55341);MAP3K5(NCBI GENE ID NO:4217);PDK3(NCBI GENE ID NO:5165);PELI2(NCBI GENE ID NO:57161);RNF103(NCBI GENE ID NO:7844);SNX31(NCBI GENE ID NO:169166);TXN2(NCBI GENE ID NO:25828);或 XKR7(NCBI GENE ID NO:343702)。

4. 根据权利要求 3 所述的分离的胎盘干细胞,其中,所述失巢凋亡相关基因为 FHDC1(NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2(NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1(NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4(NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5(NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3(NCBI GENE ID NO:6515) 或 STAU2(NCBI GENE ID NO:27067)。

5. 包含抗失巢凋亡的胎盘干细胞的分离的细胞群。

6. 根据权利要求 5 所述的分离的细胞群,其中,所述细胞群中至少 50%的所述细胞是抗失巢凋亡的胎盘干细胞。

7. 根据权利要求 5 所述的分离的细胞群,其中,所述细胞群中至少 60%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%的细胞是抗失巢凋亡的胎盘干细胞。

8. 根据权利要求 5-7 中任一项所述的分离的细胞群,其中,与未修饰的胎盘干细胞中相同失巢凋亡相关基因的表达相比,所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞以降低的水平表达至少一种失巢凋亡相关基因。

9. 根据权利要求8所述的分离的细胞群,其中,所述失巢凋亡相关基因为AMIGO1(NCBI GENE ID NO:57463);ARHGAP20(NCBI GENE ID NO:57569);CD38(NCBI GENE ID NO:952);CLCC1(NCBI GENE ID NO:23155);CNTF(NCBI GENE ID NO:1270);ZFP91-CNTF(NCBI GENE ID NO:386607);COX8A(NCBI GENE ID NO:1351);DHX34(NCBI GENE ID NO:9704);FAM175A(NCBI GENE ID NO:51023);MRPS18C(NCBI GENE ID NO:84142);FAM44C(NCBI GENE ID NO:284257);FBP2(NCBI GENE ID NO:8789);FLI1(NCBI GENE ID NO:2313);FREM3(NCBI GENE ID NO:166752);IFIT5(NCBI GENE ID NO:24138);LOC399851(NCBI GENE ID NO:399851);LOC400713(NCBI GENE ID NO:400713);LOC651610(NCBI GENE ID NO:651610);PIGP(NCBI GENE ID NO:51227);SH3TC2(NCBI GENE ID NO:79628);SLC2A3(NCBI GENE ID NO:6515);STAU2(NCBI GENE ID NO:27067);TMEFF1(NCBI GENE ID NO:8577);TMEM217(NCBI GENE ID NO:221468);TMEM79(NCBI GENE ID NO:84283);USHBP1(NCBI GENE ID NO:83878);APH1B(NCBI GENE ID NO:83464);ATP2B2(NCBI GENE ID NO:491);C13orf39(NCBI GENE ID NO:196541);C4orf17(NCBI GENE ID NO:84103);C4orf46(NCBI GENE ID NO:201725);DDX41(NCBI GENE ID NO:51428);DKFZp547J222(NCBI GENE ID NO:84237);FGFR1(NCBI GENE ID NO:2260);FHDC1(NCBI GENE ID NO:85462);GNAI2(NCBI GENE ID NO:2771);GP5(NCBI GENE ID NO:2814);IL1RN(NCBI GENE ID NO:3557);KIF24(NCBI GENE ID NO:347240);KNDC1(NCBI GENE ID NO:85442);LOC100132598(NCBI GENE ID NO:100132598);LOC151760(NCBI GENE ID NO:151760);LOC152024(NCBI GENE ID NO:152024);LOC339833(NCBI GENE ID NO:339833);LPAR4(NCBI GENE ID NO:2846);LSG1(NCBI GENE ID NO:55341);MAP3K5(NCBI GENE ID NO:4217);PDK3(NCBI GENE ID NO:5165);PELI2(NCBI GENE ID NO:57161);RNF103(NCBI GENE ID NO:7844);SNX31(NCBI GENE ID NO:169166);TXN2(NCBI GENE ID NO:25828);或XKR7(NCBI GENE ID NO:343702)。

10. 根据权利要求9所述的分离的细胞群,其中,所述失巢凋亡相关基因为FHDC1(NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2(NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1(NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4(NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5(NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3(NCBI GENE ID NO:6515)或STAU2(NCBI GENE ID NO:27067)。

11. 产生抗失巢凋亡的胎盘干细胞的方法,包括使胎盘干细胞与有效量的调控RNA分子接触,以使得在与所述调控RNA分子接触后,所述胎盘干细胞(i)与未与所述调控RNA分子接触的相等量的胎盘干细胞中的相同失巢凋亡相关基因的表达相比,以降低的水平表达至少一种失巢凋亡相关基因和/或(ii)在低贴壁环境下,比未与所述调控RNA分子接触的相等量的胎盘干细胞存活更长的时间。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中,所述调控RNA分子包括小干扰RNA(siRNA)、微小RNA抑制剂(miR抑制剂)、微小RNA类似物(miR类似物)、反义RNA、短发夹RNA(shRNA)或它们的任意组合。

13. 根据权利要求11或12所述的方法,其中,所述调控RNA分子靶向所述胎盘干细胞的至少一种失巢凋亡相关基因。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中,所述失巢凋亡相关基因为AMIGO1(NCBI GENE ID NO:57463);ARHGAP20(NCBI GENE ID NO:57569);CD38(NCBI GENE ID NO:952);

CLCC1(NCBI GENE ID NO:23155);CNTF(NCBI GENE ID NO:1270);ZFP91-CNTF(NCBI GENE ID NO:386607);COX8A(NCBI GENE ID NO:1351);DHX34(NCBI GENE ID NO:9704);FAM175A(NCBI GENE ID NO:51023);MRPS18C(NCBI GENE ID NO:84142);FAM44C(NCBI GENE ID NO:284257);FBP2(NCBI GENE ID NO:8789);FLI1(NCBI GENE ID NO:2313);FREM3(NCBI GENE ID NO:166752);IFIT5(NCBI GENE ID NO:24138);LOC399851(NCBI GENE ID NO:399851);LOC400713(NCBI GENE ID NO:400713);LOC651610(NCBI GENE ID NO:651610);PIGP(NCBI GENE ID NO:51227);SH3TC2(NCBI GENE ID NO:79628);SLC2A3(NCBI GENE ID NO:6515);STAU2(NCBI GENE ID NO:27067);TMEFF1(NCBI GENE ID NO:8577);TMEM217(NCBI GENE ID NO:221468);TMEM79(NCBI GENE ID NO:84283);USHBP1(NCBI GENE ID NO:83878);APH1B(NCBI GENE ID NO:83464);ATP2B2(NCBI GENE ID NO:491);C13orf39(NCBI GENE ID NO:196541);C4orf17(NCBI GENE ID NO:84103);C4orf46(NCBI GENE ID NO:201725);DDX41(NCBI GENE ID NO:51428);DKFZp547J222(NCBI GENE ID NO:84237);FGFR1(NCBI GENE ID NO:2260);FHDC1(NCBI GENE ID NO:85462);GNAI2(NCBI GENE ID NO:2771);GP5(NCBI GENE ID NO:2814);IL1RN(NCBI GENE ID NO:3557);KIF24(NCBI GENE ID NO:347240);KNDC1(NCBI GENE ID NO:85442);LOC100132598(NCBI GENE ID NO:100132598);LOC151760(NCBI GENE ID NO:151760);LOC152024(NCBI GENE ID NO:152024);LOC339833(NCBI GENE ID NO:339833);LPAR4(NCBI GENE ID NO:2846);LSG1(NCBI GENE ID NO:55341);MAP3K5(NCBI GENE ID NO:4217);PDK3(NCBI GENE ID NO:5165);PELI2(NCBI GENE ID NO:57161);RNF103(NCBI GENE ID NO:7844);SNX31(NCBI GENE ID NO:169166);TXN2(NCBI GENE ID NO:25828);或 XKR7(NCBI GENE ID NO:343702)。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中,所述失巢凋亡相关基因为FHDC1(NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2(NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1(NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4(NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5(NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3(NCBI GENE ID NO:6515)或STAU2(NCBI GENE ID NO:27067)。

16. 通过根据权利要求11-15中任一项所述的方法产生的分离的抗失巢凋亡的胎盘干细胞或其群体。

17. 包含根据权利要求1所述的分离的抗失巢凋亡的胎盘干细胞的组合物。

18. 包含通过根据权利要求11-15中任一项所述的方法产生的分离的抗失巢凋亡的胎盘干细胞的组合物。

19. 根据权利要求18所述的组合物,其中,所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞(i)与未与所述调控RNA分子接触的胎盘干细胞中的相同失巢凋亡相关基因的表达相比,以降低的水平表达至少一种失巢凋亡相关基因和/或(ii)在低贴壁环境中,比未与所述调控RNA分子接触的胎盘干细胞存活更长的时间。

20. 包含增强的胎盘干细胞的组合物,其中,所述增强的胎盘干细胞已通过根据权利要求19所述的方法修饰。

21. 根据权利要求1-4或16中任一项所述的胎盘干细胞,其中,所述胎盘干细胞是CD10+、CD34-、CD105+、CD200+胎盘干细胞。

22. 根据权利要求5-10中任一项所述的细胞群,其中,所述群体中所述抗失巢凋亡的

胎盘干细胞是 CD10+、CD34 - 、CD105+、CD200+ 胎盘干细胞。

23. 根据权利要求 11-15 中任一项所述的方法,其中,所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞为 CD10+、CD34 - 、CD105+、CD200+ 胎盘干细胞。

24. 根据权利要求 17-20 中任一项所述的组合物,其中,所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞为 CD10+、CD34 - 、CD105+、CD200+ 胎盘干细胞。

抗失巢凋亡胎盘干细胞及其应用

[0001] 本发明申请主张 2012 年 12 月 14 日提交的美国临时专利申请 No. 61/737, 498 的优先权, 该专利申请的公开内容以其全部内容作为参考并入本文。

1. 技术领域

[0002] 本文提供了抗失巢凋亡胎盘细胞及其组合物以及使用这些细胞和组合物的方法。

[0003] 2. 发明背景

[0004] 由于哺乳动物胎盘是大量的并且通常作为医学废物丢弃, 因此它们代表了医学有用细胞, 例如, 胎盘干细胞的唯一来源。胎盘干细胞通常贴壁 (附着) 于培养表面, 如组织培养板和细胞外基质。失巢凋亡是当它们在低贴壁环境中培养 / 存在时, 在贴壁依赖性细胞中发生的一种程序性细胞死亡 (细胞凋亡)。对抗失巢凋亡并因此在非贴壁状态中存活更长时间的胎盘干细胞群存在需要。本文提供了这些改善的胎盘干细胞、这些胎盘干细胞的群体和使用它们的方法。

[0005] 3. 发明概述

[0006] 在一个方面, 本文提供了修饰胎盘干细胞以使其抗失巢凋亡的方法。本文所提供的抗失巢凋亡胎盘干细胞 (arPSC) 在低贴壁环境中显示出存活增加, 并因此可以有利地基于它们在非贴壁状态下持续更长时间 (例如, 与未修饰的胎盘干细胞 (例如, 未修饰为抗失巢凋亡的胎盘干细胞)) 的能力在 (例如) 使用胎盘干细胞施用 (例如, 胎盘干细胞的全身施用) 的疗法中使用。在某些实施方式中, 如果它们能够在胎盘干细胞通常将经历失巢凋亡的条件下存活, 则胎盘干细胞是抗失巢凋亡的。在某些实施方式中, 如果在胎盘干细胞通常将经历失巢凋亡的条件下, 相对于未修饰的胎盘干细胞, 它们能够存活更长的时间, 则胎盘干细胞是抗失巢凋亡的。

[0007] 在一种实施方式中, 本文提供了修饰胎盘干细胞使它们抗失巢凋亡的方法, 其包括将所述胎盘干细胞与有效量的寡聚或聚合分子接触, 从而抑制与胎盘干细胞的失巢凋亡有关的一个或多个基因 (例如, 与未修饰的, 例如, 未与所述分子接触的胎盘干细胞相比下调)。本文所述的这些修饰的胎盘干细胞在本文中称为“抗失巢凋亡的胎盘干细胞” (“arPSC”)。在某些实施方式中, 所述寡聚或聚合分子为调控 RNA 分子。在具体的实施方式中, 调控 RNA 分子为小干扰 RNA (siRNA)、微小 RNA 抑制剂 (miR 抑制剂)、miR 类似物 (miR mimics)、反义 RNA、小发夹 RNA (shRNAs)、微小 RNA-adapted shRNA (shRNAmirs) 或它们的任意组合。

[0008] 在某些实施方式中, 在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的调控 RNA 分子靶向在本文中鉴别为与胎盘干细胞中失巢凋亡有关的一个或多个胎盘干细胞基因 (“失巢调控 - 相关基因”)。在具体的实施方式中, 在本文所述的方法中靶向以产生 arPSC 的所述一个或多个失巢调控 - 相关基因包括下表 1 中所列的一个或多个基因:

[0009] 表 1: 人胎盘干细胞失巢凋亡相关基因

[0010]

基因 ID (NCBI)	基因符号	基因说明
57463	AMIGO1	具有 Ig 样域 1 的粘附分子
57569	ARHGAP20	Rho GTP 酶激活蛋白 20
952	CD38	CD38 分子
23155	CLCC1	氯离子通道 CLIC 样 1
1270, 386607	CNTF, ZFP91-CNTF	睫状神经营养因子 ZFP91-CNTF 通读转录本
1351	COX8A	细胞色素 C 氧化酶亚单位 8A (普遍型)
9704	DHX34	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) 框多肽 34
51023, 84142	FAM175A, MRPS18C	线粒体核糖体蛋白 S18C 家族, 序列相似性 175, 成员 A
284257	FAM44C	序列相似性 44 家族, 成员 C
8789	FBP2	果糖-1,6-二磷酸酶 2
2313	FLI1	Friend 白血病毒整合体 1
166752	FREM3	FRAS1 相关细胞外基质 3
24138	IFIT5	干扰素诱导蛋白, 具有三十四肽重复序列 (tetratricopeptide repeats) 5
399851	LOC399851	AY129010 支持的假想基因
400713	LOC400713	锌指样
651610	LOC651610	丝氨酸蛋白激酶 ATM 样
51227	PIGP	磷脂酰肌醇聚糖锚定生物合成, P 类
79628	SH3TC2	SH3 域和三十四肽重复序列 2
6515	SLC2A3	溶质运载蛋白家族 2 (辅助葡萄糖转运蛋白), 成员 3
27067	STAU2	staufer, RNA 结合蛋白, 同源物 2 (果蝇)
8577	TMEFF1	跨膜蛋白, 具有 EGF 样和两个卵泡抑素样域 1
221468	TMEM217	跨膜蛋白 217
84283	TMEM79	跨膜蛋白 79
83878	USHBP1	乌谢尔综合征 1C 结合蛋白 1
83464	APH1B	前咽缺陷蛋白 1 同源物 B (线虫)

[0011]

基因 ID (NCBI)	基因符号	基因说明
491	ATP2B2	ATP 酶, Ca ⁺⁺ 转运, 质膜 2
196541	C13orf39	染色体 13, 开放阅读框 39
84103	C4orf17	染色体 4, 开放阅读框 17
201725	C4orf46	染色体 4, 开放阅读框 46
51428	DDX41	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 框多肽 41
84237	DKFZp547J2 22	假想 LOC84237
2260	FGFR1	成纤维细胞生长因子受体 1
85462	FHDC1	含 FH2 域的蛋白 1
2771	GNAI2	鸟苷酸结合蛋白 (G 蛋白), α 抑制活性多肽 2
2814	GP5	糖蛋白 V (血小板)
3557	IL1RN	白介素 1 受体拮抗剂
347240	KIF24	驱动蛋白家族成员 24
85442	KNDC1	含激酶非催化 C-端半段结构域 (KIND) 的蛋白 1
100132598	LOC1001325 98	类似于 hCG2001192
151760	LOC151760	假想 LOC151760
152024	LOC152024	假设蛋白 LOC152024
339833	LOC339833	假设蛋白 LOC339833
2846	LPAR4	溶血磷脂酸受体 4
55341	LSG1	大亚基 GTP 酶 1 同源物 (酿酒酵母)
4217	MAP3K5	有丝分裂原激活的蛋白激酶激酶激酶 5
5165	PDK3	丙酮酸脱氢酶激酶, 同工酶 3
57161	PELI2	pellino 同源物 2 (果蝇)
7844	RNF103	环指蛋白 103
169166	SNX31	选择连接蛋白 31
25828	TXN2	硫氧还蛋白 2
343702	XKR7	XK, 凯尔血型复合物亚单位相关家族, 成员 7

[0012] 在一种实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的调控 RNA 分子为小干扰 RNA (siRNA)。在具体的实施方式中,所述 siRNA 靶向上表 1 中所列的一个或多个失巢凋亡-相关基因。在另一种具体的实施方式中,所述 siRNA 为双链的,其中所述 siRNA 的一条链具有与上表 1 中所鉴别的基因(如基于表中所提供的基因的基因 ID 所鉴别的)中的一个的序列至少约 70%、80%、90%、95%、98% 或 100% 互补的序列。

[0013] 在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 siRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 siRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 siRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)。在

另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 siRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 siRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 siRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 siRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067)。

[0014] 在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 siRNA 靶向以下胎盘干细胞失巢凋亡 - 相关基因中的 1 个、2 个、3 个或更多个 :FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 siRNA 靶向以下胎盘干细胞失巢凋亡 - 相关基因中的 1 个、2 个、3 个或更多个 :FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067),并且靶向表 1 中所列的至少一个其他失巢凋亡相关基因。

[0015] 在另一种实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的调控 RNA 分子为小发夹 RNA (shRNA)。在具体的实施方式中,所述 shRNA 靶向上表 1 中所列的一个或多个失巢凋亡 - 相关基因。在另一种具体的实施方式中,所述 shRNA 具有与上表 1 中所鉴别的基因 (如基于表中所提供的基因的基因 ID 所鉴别的) 中的一个的序列至少约 70%、80%、90%、95%、98% 或 100% 互补的序列。

[0016] 在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 shRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 shRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 shRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 shRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 shRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 shRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 shRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067)。

[0017] 在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 shRNA 靶向以下胎盘干细胞失巢凋亡 - 相关基因中的 1 个、2 个、3 个或更多个 :FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于

产生 arPSC 的 shRNA 靶向以下胎盘干细胞失巢凋亡 - 相关基因中的 1 个、2 个、3 个或更多个 :FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067), 并且靶向表 1 中所列的至少一个其他失巢凋亡相关基因。

[0018] 在另一种实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的调控 RNA 分子为反义 RNA。在具体的实施方式中,所述反义 RNA 靶向上表 1 中所列的一个或多个失巢凋亡 - 相关基因。在另一种具体的实施方式中,所述反义 RNA 具有与上表 1 中所鉴别的基因 (如基于表中所提供的基因的基因 ID 所鉴别的) 中的一个的序列至少约 70%、80%、90%、95%、98% 或 100% 互补的序列。

[0019] 在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的反义 RNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的反义 RNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的反义 RNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的反义 RNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的反义 RNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的反义 RNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的反义 RNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067)。

[0020] 在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的反义 RNA 靶向以下胎盘干细胞失巢凋亡 - 相关基因中的 1 个、2 个、3 个或更多个 :FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的反义 RNA 靶向以下胎盘干细胞失巢凋亡 - 相关基因中的 1 个、2 个、3 个或更多个 :FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067), 并且靶向表 1 中所列的至少一个其他失巢凋亡相关基因。

[0021] 在另一种实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的调控 RNA 分子靶向起作用以调节一种或多种失巢凋亡 - 相关基因的产生的胎盘细胞中的一个或多个微小 RNA (miRNA)。在一种实施方式中,所述调控 RNA 分子为 miR 抑制剂。在另一种实施方式中,所述调控 RNA 分子为 miR 类似物。在具体的实施方式中,靶向的 miRNA 是调节上表 1 中所列的一个或多个失巢凋亡 - 相关基因的 miRNA。在某些实施方式中,所述 miR 抑制剂或所述 miR 类似物具有与调节表 1 中所鉴别的基因之一的产生的 miRNA 的序列至少约 70%、80%、90%、95%、98% 或 100% 互补的序列。

[0022] 在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 miR 抑制剂或 miR 类似物靶向调节胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462) 的产生的 miRNA。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 miR 抑制剂或 miR 类似物靶向调节胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771) 的产生的 miRNA。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 miR 抑制剂或 miR 类似物靶向调节胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442) 的产生的 miRNA。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 miR 抑制剂或 miR 类似物靶向调节胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846) 的产生的 miRNA。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 miR 抑制剂或 miR 类似物靶向调节胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217) 的产生的 miRNA。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 miR 抑制剂或 miR 类似物靶向调节胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515) 的产生的 miRNA。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 miR 抑制剂或 miR 类似物靶向调节胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067) 的产生的 miRNA。

[0023] 在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 miR 抑制剂或 miR 类似物靶向 1 个、2 个、3 个或更多个 miRNA,其中所述 miRNA 调节以下胎盘干细胞失巢凋亡 - 相关基因中的 1 个、2 个、3 个或更多个的产生: FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 miR 抑制剂或 miR 类似物靶向 1 个、2 个、3 个或更多个 miRNA,其中所述 miRNA 调节以下胎盘干细胞失巢凋亡 - 相关基因中的 1 个、2 个、3 个或更多个的产生: FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067),和靶向调节表 1 中所列的至少一个其他失巢凋亡相关基因的产生的至少一种 miRNA。

[0024] 在另一个方面,本文提供了分离的抗失巢凋亡的胎盘干细胞 (arPSC),和根据本文所述的方法产生的它们的组合物,例如,通过将所述胎盘干细胞与有效量的寡聚或聚合分子 (例如,调控 RNA 分子) 接触进行修饰以使它们抗失巢凋亡的胎盘干细胞。与 (例如) 未修饰的胎盘干细胞 (例如,未与有效量的寡聚或聚合分子 (例如,调控 RNA 分子) 接触的胎盘干细胞) 相比,这些抗失巢凋亡的胎盘干细胞在低贴壁环境中显示出存活增加。

[0025] 在一种实施方式中,与未修饰的胎盘干细胞中相同失巢凋亡相关基因的表达相比,本文所提供的分离的 arPSC 以降低的水平表达至少一种失巢凋亡相关基因。在具体的实施方式中,本文提供了分离的 arPSC 或其群体,其中与未修饰的胎盘干细胞中相同失巢凋亡相关基因的表达相比,所述分离的 arPSC 以降低的水平表达表 1 中所列那些中的至少一种基因。在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 arPSC 或其群体,其中与未修饰的胎盘干细胞中相同失巢凋亡相关基因的表达相比,所述分离的 arPSC 以降低的水平表达表 1 中所列那些中的超过一种基因,例如,与未修饰的胎盘干细胞中相同失巢凋亡相关基

因的表达相比,所述分离的 arPSC 以降低的水平表达表 1 中所列那些中的 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或超过 10 个基因。

[0026] 在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 arPSC,其中与未修饰的胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因 FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462) 的表达相比,所述 arPSC 以降低的水平表达失巢凋亡相关基因 FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)。在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 arPSC,其中与未修饰的胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因 GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771) 的表达相比,所述 arPSC 以降低的水平表达失巢凋亡相关基因 GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)。在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 arPSC,其中与未修饰的胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因 KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442) 的表达相比,所述 arPSC 以降低的水平表达失巢凋亡相关基因 KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)。在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 arPSC,其中与未修饰的胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因 LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846) 的表达相比,所述 arPSC 以降低的水平表达失巢凋亡相关基因 LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)。在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 arPSC,其中与未修饰的胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因 MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217) 的表达相比,所述 arPSC 以降低的水平表达失巢凋亡相关基因 MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)。在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 arPSC,其中与未修饰的胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因 SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515) 的表达相比,所述 arPSC 以降低的水平表达失巢凋亡相关基因 SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515)。在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 arPSC,其中与未修饰的胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067) 的表达相比,所述 arPSC 以降低的水平表达失巢凋亡相关基因 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067)。本文还提供了包含这些 arPSC 的细胞群和包含这些 arPSC 的组合物。

[0027] 在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 arPSC,其中与未修饰的胎盘干细胞中相同失巢凋亡相关基因的表达相比,所述 arPSC 以降低的水平表达以下胎盘干细胞失巢凋亡 - 相关基因中的 1、2、3 或更多个: FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067)。在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 arPSC,其中 (i) 与未修饰的胎盘干细胞中相同失巢凋亡相关基因的表达相比,所述 arPSC 以降低的水平表达以下胎盘干细胞失巢凋亡 - 相关基因中的 1、2、3 或更多个: FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067); (ii) 与未修饰的胎盘干细胞中相同失巢凋亡相关基因的表达相比,所述 arPSC 以降低的水平表达表 1 中所列的至少一种其他失巢凋亡相关基因。本文还提供了包含这些 arPSC 的细胞群和包含这些 arPSC 的组合物。

[0028] 在具体的实施方式中,本文所述的 arPSC 是 CD10⁺、CD34⁻、CD105⁺和 CD200⁺。在另一种具体的实施方式中,本文所述的 arPSC 表达 CD200 但不表达 HLA-G;或表达 CD73、CD105 和 CD200;或表达 CD200 和 OCT-4;或表达 CD73 和 CD105,但不表达 HLA-G;或表达 CD73 和 CD105 并且当在允许胚状体形成体形成的情况下培养所述群体时有利于在包含所述干细胞的

胎盘细胞群中形成一个或多个胚状体状体;或表达 OCT-4 并且当在允许胚状体状体形成的情况下培养所述群体时有利于在包含所述干细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个胚状体状体。在另一种具体的实施方式中,本文所述的 arPSC 另外为 CD90⁺和 CD45⁻。在另一种具体的实施方式中,本文所述的 arPSC 另外为 CD80 和 CD86⁻。在其他实施方式中,本文所述的 arPSC 表达 CD44、CD90、HLA-A, B, C 或 HLA-p 中的一种或多种,和 / 或不表达 CD45、CD117、CD133、KDR、CD80、CD86、HLA-DR、SSEA3、SSEA4 或 CD38 中的一种或多种。在某些实施方式中,本文所述的 arPSC 抑制免疫细胞的活性,例如,以比未修饰的胎盘干细胞(例如,未与有效量的寡聚或聚合分子(例如,调控 RNA 分子)接触的胎盘细胞)可检测更大的程度抑制 T 细胞的增殖,如(例如)通过混合白细胞反应测定、退缩测定(regression assay)或珠 T 细胞测定可确定的。

[0029] 在另一个方面,本文提供了用于免疫应答的方法,例如,调节受试者(例如,人受试者)的免疫应答,或体外调节免疫应答,其包括将免疫细胞与本文所述的 arPSC 或其组合物接触。在具体的实施方式中,本文提供的 arPSC 能够以和相等量的未修饰的胎盘干细胞(例如,不抗失巢凋亡的胎盘干细胞)相同的程度调节免疫应答。测量细胞(例如,胎盘干细胞,包括 arPSC)调节免疫应答的能力的测定在本领域中是已知的(参见,例如,美国专利 No. 7682803,该专利的公开内容以其全部内容作为参考并入本文)并且是本文描述的,例如,混合淋巴细胞反应、退缩测定。

[0030] 在另一个方面,本文提供了促进血管生成的方法。在具体的实施方式中,本文提供了促进受试者,例如,人受试者中血管生成的方法,其包括向所述受试者施用本文所述的 arPSC 或其混合物。在另一种具体的实施方式中,本文提供的 arPSC 能够以和相等量的未修饰的胎盘干细胞(例如,不抗失巢凋亡的胎盘干细胞)相同的程度促进血管生成。测量细胞(例如,胎盘干细胞,包括 arPSC)促进血管生成的能力的测定在本领域中是已知的(参见,例如,美国专利申请公开 No. 2011/0250182,该专利的公开内容以其全部内容作为参考并入本文),例如,测定细胞促进内皮细胞的管形成能力,测定细胞促进内皮细胞迁移和 / 或增殖的能力和测定细胞分泌促进血管生成的因子的能力。

[0031] 3.1 定义

[0032] 如本文所使用的,当表示胎盘干细胞,例如,本文所述的抗失巢凋亡的胎盘干细胞时,术语“量”表示胎盘干细胞(例如,抗失巢凋亡的胎盘干细胞)的具体个数。

[0033] 如本文所使用的,术语“来源于”表示分离自或另外表示纯化自。例如,胎盘源贴壁细胞分离自胎盘。术语“源”涵盖了从直接分离自组织(例如胎盘)的细胞培养的细胞以及从原代分离物培养或扩增的细胞。

[0034] 如本文所使用的,“免疫定位”表示在(例如)流式细胞术、荧光激活细胞分类术、磁性细胞分选、原位杂交、免疫组织化学等中使用免疫蛋白(例如,抗体或其片段)的化合物(例如,细胞标志物)的检测。

[0035] 如本文所使用的,术语“SH2”是指结合标志物 CD105 上的表位的抗体。因此,称为 SH2⁺的细胞是 CD105⁺。

[0036] 如本文所使用的,术语“SH3”和“SH4”是指结合标志物 CD73 上所存在的表位的抗体。因此,称为 SH3⁺和 / 或 SH4⁺的细胞是 CD73⁺。

[0037] 如本文所使用的,如果在(例如)干细胞的收集和 / 或培养期间从干细胞中除去

了至少 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或至少 99% 的干细胞与之天然相联系的其他细胞,那么干细胞得到“分离”。“分离的”细胞群表示与所述细胞群来源的组织(例如,胎盘)的其他细胞基本分离的细胞群。如果在(例如)干细胞群的收集和/或培养期间从所述干细胞群中除去了至少 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或至少 99% 的所述干细胞群与之天然相联系的细胞,则(例如)干细胞群是“分离的”。

[0038] 如本文所使用的,术语“胎盘干细胞”是指不考虑原代培养后的传代次数,来源于(例如,分离自)哺乳动物胎盘的干细胞或祖细胞,其以未修饰的状态贴壁至组织培养基底(例如,组织培养塑料板或者纤连蛋白涂覆的组织培养板)。然而,如本文所使用的术语“胎盘干细胞”不表示滋养母细胞、细胞滋养细胞、胚胎生殖细胞或胚胎干细胞,这是因为本领域技术人员理解这些细胞。术语“胎盘干细胞”和“胎盘来源的干细胞”可以互换使用。除非在本文中另作说明,否则术语“胎盘”包括脐带。在某些实施方式中,本文所公开的胎盘干细胞是体外多能的(即所述细胞在分化条件下能够体外分化)、体内多能的(即所述细胞能够体内分化)或两者。

[0039] 如本文所使用的,当标志物是可检测的时,则细胞对具体的标志物是“阳性的”。例如,由于 CD73 在胎盘干细胞上是以比背景(与(例如)任何给定测定的同型对照或实验阴性对照相比)可检测地更大的量可检测的,因此胎盘干细胞对于(例如)CD73 是阳性的。当由细胞所提供或表达时标志物可用于将该细胞与至少一种其他细胞类型进行区分或可用于选择或分离该细胞时,该细胞对于标志物也是阳性的。

[0040] 如本文所使用的,术语“干细胞”限定了保留了干细胞的至少一种属性的细胞,例如,与干细胞的一种或多种类型有关的标志物或基因表达谱;在培养中复制至少 10-40 次的能力;多潜能性,例如,体外、体内或体外和体内分化为具有三个胚层中的一个或多个的细胞的能力;对成体(即分化的)细胞特征的缺乏等。

[0041] 如本文所使用的,“免疫调节”和“免疫调节的”表示造成免疫应答可检测的变化或具有造成所述变化的能力,和造成免疫应答可检测的变化的能力。

[0042] 如本文所使用的,“免疫抑制”和“免疫抑制的”表示造成免疫应答可检测的降低或具有造成所述降低的能力,和造成免疫应答可检测的抑制的能力。

[0043] 如本文所使用的,术语“寡聚或聚合分子”是指能够靶向所关心的基因、RNA 或蛋白质(例如,通过结合或杂交至所关心的基因、RNA 或蛋白质的区域)的生物分子。该术语包括(例如)寡核苷酸、寡核苷酸类似物、寡核苷酸模拟物(oligonucleotide mimetics)、寡肽或多肽及其任意组合(例如,嵌合组合)。照此,这些化合物可以是单链、双链、环状、分支的或者具有发夹并且可以包括结构元件,如内凸或端凸或者内环或端环。寡聚或聚合双链分子可以是杂交以形成双链化合物的两条链,或者具有足够的自互补性以使得能够杂交和形成完全或部分双链分子的单链。

[0044] 如本文所使用的,术语“调控 RNA 分子”是指直接或间接调节(例如,上调或下调)可选择靶标(例如,靶标基因、RNA 或蛋白质)的表达或活性的 RNA 分子。在某些实施方式中,“调控 RNA 分子”为调节宿主细胞中可选择靶标的表达的 siRNA、miR 抑制剂,miR 类似物、反义 RNA、shRNA、shRNAmir 或其杂交物或组合。在某些实施方式中,本文所提供的调控 RNA 分子包含约 1 至约 100、约 8 至约 80、10 至 50、13 至 80、13 至 50、13 至 30、13 至 24、18 至 22、19 至 23、20 至 80、20 至 50、20 至 30 或 20 至 24 个核碱基(即约 1 至约 100 个连接

的核苷)。

[0045] 如本文所使用的,当与未修饰的胎盘干细胞相比,描述抗失巢凋亡的胎盘干细胞的存活时,短语“增强的存活”是指在引起未修饰的胎盘干细胞死亡(例如,通过细胞凋亡)的条件下(例如,其中胎盘干细胞不能贴壁于基底(例如,组织培养板或生物基底,如细胞外基质)或贴壁于基底的能力降低的条件,即低贴壁条件)仍保持存活的抗失巢凋亡的胎盘干细胞的能力。在某些实施方式中,相对于未修饰的胎盘干细胞,本文所述的 arPSC 增强存活是指当在低贴壁条件下培养时,相对于相同条件下培养的相等量的未修饰的胎盘干细胞,arPSC 在存活时间上显示出至少 1.5 倍、2 倍、2.5 倍、3 倍、3.5 倍、4 倍、4.5 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍提高的能力。在某些实施方式中,相对于未修饰的胎盘干细胞,本文所述的 arPSC 提高的存活是指当在低贴壁条件下培养时,相对于相同条件下培养的相等量的未修饰的胎盘干细胞,arPSC 在存活时间上显示出至少 1.5 倍至 2.5 倍、2 倍至 3 倍、2.5 倍至 3.5 倍、3 倍至 4 倍、3.5 倍至 4.5 倍、4 倍至 5 倍、5 倍至 6 倍、6 倍至 7 倍、7 倍至 8 倍、8 倍至 9 倍或 9 倍至 10 倍提高的能力。可以使用本领域中已知的方法评价 arPSC 和未修饰的胎盘干细胞的存活,例如,台盼蓝拒染测定、荧光素二乙酸酯吸收测定、碘化丙啶吸收测定;胸苷吸收测定和 MTT (3-(4, 5-二甲基噻唑-2-基)-2, 5-二苯四唑溴化物)测定。

[0046] 如本文所使用的,当与未修饰的胎盘干细胞中相同基因的表达相比,表示抗失巢凋亡的胎盘干细胞中给定基因的表达水平时,短语“降低的水平”是指抗失巢凋亡的胎盘干细胞中基因表达下调或抑制,从而导致(例如)所述基因生产的 mRNA 转录本减少和/或由基因表达所产生的蛋白质减少。可以通过任何本领域承认用于检测通过细胞的蛋白质产生或核酸产生的方法来完成对给定基因是否以减少的水平表达的确定,例如,核酸基方法,例如, RNA 印迹分析、反转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)、实时 PCR、定量 PCR 等。可以使用结合至所关心的蛋白质的抗体评价蛋白质的表达,例如,在 ELISA、免疫印迹、夹心测定等中评价。在某些实施方式中,如果与未修饰的胎盘干细胞中的基因的表达相比,其表达减少至少 1.5 倍、2 倍、2.5 倍、3 倍、3.5 倍、4 倍、4.5 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍或 10 倍,则抗失巢凋亡的胎盘干细胞中的基因(例如,失巢凋亡相关基因)以减少的水平表达。在某些实施方式中,如果与未修饰的胎盘干细胞中的基因的表达相比,其表达减少至少 1.5 倍至 2.5 倍、2 倍至 3 倍、2.5 倍至 3.5 倍、3 倍至 4 倍、3.5 倍至 4.5 倍、4 倍至 5 倍、5 倍至 6 倍、6 倍至 7 倍、7 倍至 8 倍、8 倍至 9 倍或 9 倍至 10 倍,则抗失巢凋亡的胎盘干细胞中的基因(例如,失巢凋亡相关基因)以减少的水平表达。

4. 附图说明

[0047] 图 1 示出了胎盘干细胞在允许细胞贴壁的板(Corning Cellbind)上和和低贴壁条件下,在不允许细胞贴壁的板(低贴壁板:Corning Ultra-Low Attachment;Nunc Hydrocell;和 Nunc Low Cell Binding)上的生长。

[0048] 图 2 示出了在允许细胞贴壁的板(Corning Cellbind)上和和低贴壁条件下,在不允许细胞贴壁的板(Corning Ultra-Low Attachment)上胎盘干细胞培养的显微镜图像。

[0049] 图 3 示出了在组织培养板的孔中,用 GFP 表达慢病毒 shRNA 转导的胎盘干细胞的生长。在组织板的孔中,亮点对应于转导的胎盘干细胞的 GFP 表达。

[0050] 图 4 示出了对胎盘干细胞进行的 MTS 测定的结果,其中用 siRNA 靶向指定的失巢

凋亡相关基因（在 x 轴上列出）。未处理的对照表示未修饰的胎盘干细胞；NTP 对照表示用非特异性 siRNA 处理的胎盘干细胞。

[0051] 图 5 示出了对胎盘干细胞进行的 CyQuant 直接活力测定的结果，其中用 siRNA 靶向指定的失巢凋亡相关基因（在 y 轴上列出）。未处理的对照表示未修饰的胎盘干细胞；NTP 对照表示用非特异性 siRNA 处理的胎盘干细胞。

[0052] 图 6 示出了对胎盘干细胞进行的 CyQuant 直接活力测定的结果，其中用 siRNA 靶向指定的失巢凋亡相关基因（在 x 轴上列出）。NTP 对照表示用非特异性 siRNA 处理的胎盘干细胞。

[0053] 图 7：细胞生长。A) 显示低贴壁条件下（不允许细胞贴壁的板上），抗失巢凋亡的干细胞群的生长。B) 显示低贴壁条件下（不允许细胞贴壁的板上），未修饰的胎盘干细胞群的生长。

[0054] 5. 发明详述

[0055] 5.1 抗失巢凋亡的胎盘干细胞的产生

[0056] 在一个方面，本文提供了修饰胎盘干细胞以使它们抗失巢凋亡的方法。这些方法包括使胎盘干细胞与有效量的一种或多种寡聚或聚合分子接触，从而抑制在胎盘干细胞中赋予失巢凋亡的一种或多种基因，即与未与相同寡聚或聚合分子接触的胎盘干细胞中基因的表达相比，与寡聚或聚合分子接触的胎盘干细胞中基因的表达减少。通过本文所述方法产生的抗失巢凋亡的胎盘干细胞 (arPSC) 是与未修饰的胎盘干细胞相比，在低贴壁条件下显示出增强存活的胎盘干细胞。在某些实施方式中，在本文所述的方法中使用的寡聚或聚合分子包括核苷酸（例如，DNA 或 RNA 分子）、核苷、核苷酸类似物、核苷酸模拟物、多肽、核苷酸类似物、核苷酸模拟物及其任意组合（例如，嵌合组合）。

[0057] 在一种实施方式中，核苷酸类似物是 RNA 类似物，例如，通过（例如）用基团取代在 2'-OH 基团中进行修饰的 RNA 类似物，所述基团例如 -O-CH₃、-O-CH₂-CH₂-O-CH₃、-O-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂、-O-CH₂-CH₂-CH₂-OH 或 -F。

[0058] 在某些实施方式中，在本文所述的方法中使用的寡聚或聚合分子包含糖、碱基或核苷间键中的一种或多种修饰（例如，化学修饰）。如本文所使用的，术语“核苷间键基团”是指能够将两个核苷酸共价连接在一起的基团，如 RNA 单元之间连接。实例包括磷酸酯、磷酸二酯基团和硫代磷酸酯基团。在一种实施方式中，在本文所述的方法中使用的寡聚或聚合分子包含至少一个磷酸酯核苷间键基团。在一种实施方式中，在本文所述的方法中使用的寡聚或聚合分子包含至少一个磷酸二酯核苷间键基团。

[0059] 在某些实施方式中，在本文所述的方法中使用的寡聚或聚合分子为单链寡核苷酸或多核苷酸。在某些实施方式中，在本文所述的方法中使用的寡聚或聚合分子为双链寡核苷酸或多核苷酸。在某些实施方式中，在本文所述的方法中使用的寡核苷酸或多核苷酸包含糖、碱基或核苷间键中的一种或多种修饰（例如，化学修饰）。

[0060] 在具体的实施方式中，在本文所述的方法中使用的寡聚分子为调控 RNA 分子。在某些实施方式中，调控 RNA 分子为小干扰 RNA (siRNA)、微小 RNA 抑制剂（抗 miR）、其他调控 RNA 分子，如反义 RNA、miR 类似物、小发夹 RNA (shRNAs)、微小 RNA 适应的 shRNA (shRNAmirs) 或它们的任意组合。

[0061] 5.1.1 siRNA

[0062] 在某些实施方式中,本文所提供的用于抗失巢凋亡的胎盘干细胞的产生的方法包括使胎盘干细胞与有效量的小干扰 RNA(siRNA) 接触,从而(例如)与未修饰的,例如,未与 siRNA 接触的胎盘干细胞相比,在所述胎盘干细胞中赋予了抗失巢凋亡性。如本文所使用的,术语“小干扰 RNA”或“siRNA”是指干扰特定基因表达的 RNA 分子。

[0063] 在本文所述的方法中使用的 siRNA 可以是单链或双链的,并且可以是修饰或未修饰的。在一种实施方式中,在本文所述的方法中使用的 siRNA 具有一个或多个 2'-脱氧或 2'-O-修饰的碱基。在一些实施方式中,在本文所述的方法中使用的 siRNA 具有一个或多个碱基取代和反转(例如,3-4 核碱基反转)。

[0064] 在一些实施方式中,在本文所述的方法中使用的 siRNA 是双链的。在一种实施方式中,siRNA 的一条链对靶标核酸是反义的,而另一条链对第一条链是互补的。在某些实施方式中,所述 siRNA 包含第一和第二链之间的中间互补区和在所述第一和第二链之间或与靶标 RNA 任选地互补的末端区域。

[0065] 在某些实施方式中,在本文所述的方法中使用的 siRNA 具有约 2 至约 50 个核碱基的长度。在一些实施方式中,在本文所述的方法中使用的 siRNA 是双链的,并且具有约 5 至 45、约 7 至 40 或约 10 至约 35 个核碱基的长度。在一些实施方式中,在本文所述的方法中使用的 siRNA 是双链的,并且长度约 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 或 35 个核碱基。

[0066] 在某些实施方式中,通过添加一个或多个天然或修饰的核碱基以形成突出来修饰在本文所述的方法中使用的 siRNA 的第一和/或第二链的一端或两端。在某些实施方式中,在本文所述的方法中使用的 siRNA 的第一和/或第二链的一端或两端为平端。有可能对于在本文所述的方法中使用的 siRNA 的第一和/或第二链的一端是平端,而另一端具有突出核碱基。在一种实施方式中,所述突出的长度为约 1 至约 10,约 2 至约 8,约 3 至约 7,约 4 至约 6 个核碱基。在另一种实施方式中,所述突出长度为约 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个核碱基。在具体的实施方式中,在本文所述的方法中使用的 siRNA 为双链的,并且具有约 21 个核碱基的长度。在另一种具体的实施方式中,所述 siRNA 为双链的,并且具有约 21 个核碱基长度,其包含二核苷酸 3' 突出(例如,二核苷酸 3' DNA 突出,如 UU 或 TT 3'-突出),从而在正义链和反义链之间存在 19nt 的互补区。

[0067] 在具体的实施方式中,本文提供了产生 arPSC 的方法,包括使胎盘干细胞或胎盘干细胞群与靶向本文鉴别为与胎盘干细胞中失巢凋亡有关的一个或多个基因的一个或多个 siRNA 接触,即所述方法包括用一个或多个 siRNA 靶向一个或多个失巢凋亡-相关基因。根据本文所述的方法可以通过 siRNA 靶向的失巢凋亡-相关基因包括上表 1 中所列的基因。

[0068] 在具体的实施方式中,本文提供了产生 arPSC 的方法,其包括使胎盘干细胞或胎盘干细胞群与靶向上表 1 中所列的一个或多个失巢凋亡相关基因的 siRNA 接触。在一种实施方式中,所述 siRNA 是双链的。在具体的实施方式中,所述双链 siRNA 的一条链(例如,正义链)具有与上表 1 中所鉴别的基因(如基于表中所提供的基因的基因 ID 所鉴别的)之一的序列至少约 70%、80%、90%、95%、98% 或 100% 互补的序列。

[0069] 在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 siRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 FHDC1(NCBI GENE ID NO:85462)。在另一种具体的实施方

式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 siRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 GNAI2(NCBI GENE ID NO:2771)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 siRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 KNDC1(NCBI GENE ID NO:85442)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 siRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 LPAR4(NCBI GENE ID NO:2846)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 siRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 MAP3K5(NCBI GENE ID NO:4217)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 siRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 SLC2A3(NCBI GENE ID NO:6515)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 siRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 STAU2(NCBI GENE ID NO:27067)。

[0070] 在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 siRNA 靶向以下胎盘干细胞失巢凋亡-相关基因中的 1 个、2 个、3 个或更多个: FHDC1(NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2(NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1(NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4(NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5(NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3(NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2(NCBI GENE ID NO:27067)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 siRNA 靶向以下胎盘干细胞失巢凋亡-相关基因中的 1 个、2 个、3 个或更多个: FHDC1(NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2(NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1(NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4(NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5(NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3(NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2(NCBI GENE ID NO:27067),并且靶向表 1 中所列的至少一个其他失巢凋亡相关基因。

[0071] 在另一种具体的实施方式中,胎盘干细胞的失巢凋亡-相关基因与 siRNA 的接触导致所述胎盘干细胞中所述基因的 mRNA 水平降低,例如,相对于未修饰的胎盘干细胞(即未与 siRNA 接触的胎盘干细胞)中相同基因的 mRNA 的水平,所得 arPSC 中失巢凋亡-相关基因的 mRNA 水平降低。在某些实施方式中,例如,与未修饰的胎盘干细胞中所述基因的表达(mRNA 水平)相比,根据本文所述的方法产生的 arPSC 中失巢凋亡-相关基因的 mRNA 水平降低了约、高达或不超过 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99%。

[0072] 可以通过商品化厂商(例如, Ambion ;Dharmacon) 提供或通过(例如)固相合成或根据以下文献中所述的程序合成在本文所述的方法中使用的 siRNA,所述文献例如, Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Agrawal 主编(1993), Humana Press ;Scaringe, Methods(2001), 23, 206-217 ;Gait 等人, Applications of Chemically synthesized RNA in RNA:Protein Interactions, Smith 主编(1998), 1-36 ;Gallo 等人, Tetrahedron(2001), 57, 5707-5713。

[0073] 可以通过本领域中已知的多种方法鉴别用于抗失巢凋亡的胎盘干细胞的产生的 siRNA。在某些实施方式中,任选地通过筛选法,例如,中或高通量筛选法,从一个或多个 siRNA 文库鉴别并获得了这些 siRNA,例如,可商购的文库(例如, Ambion, **Silencer®** Select Human Nuclear Hormone Receptor(HNR) siRNA Library V4 ;Dharmacon, siRNA library Human ON-TARGETplus siRNA Nuclear Receptors Sub-Library)。在一种实施方式中,这种文库可以涵盖广泛的基因(例如,人全基因组 siRNA 文库)或预定涵盖特定

的靶标基因或基因家族（例如，人核受体 siRNA 文库，磷酸酶 siRNA 文库等）。可以（例如）使用自动机器人、液体处理设备、数据处理软件和 / 或灵敏的检测器进行筛选法，例如，Precision XS 自动移液器系统、EL406 液体处理系统或 synergy 酶标仪。

[0074] 5.1. 2miR抑制剂和 miR类似物

[0075] 在某些实施方式中，本文所提供的用于抗失巢凋亡的胎盘干细胞的产生的方法包括使胎盘干细胞与有效量的微小 RNA 抑制剂（miR 抑制剂）接触，从而（例如）与未修饰的，例如，未与 miR 抑制剂接触的胎盘干细胞相比，在所述胎盘干细胞中赋予了抗失巢凋亡性。如本文所使用的，术语“微小 RNA”、“miRNA”或“miR”是指短核糖核酸（RNA）分子，其包括（但不限于）成熟的单链 miRNA、前体 miRNA (pre-miR) 及其变体。如本文所使用的，术语“微小 RNA 抑制剂”、“miRNA 抑制剂”、“miR 抑制剂”或“抗 -miR”表示设计抑制 miRNA 的核糖核酸分子（例如，内源 miRNA）。在一些实施方式中，miR 抑制剂通过抑制一种或多种内源 miR 下调（例如，抑制）靶标基因。在一种实施方式中，微小 RNA 是天然存在的。在某些实施方式中，微小 RNA 是转录后调控因子，其结合至靶标信使 RNA 转录本（mRNA）上的互补序列并导致翻译抑制和基因沉默。在某些实施方式中，单一前体含有不止一个成熟 miRNA 序列。在其他实施方式中，多个前体 miRNA 含有相同成熟序列。在一些实施方式中，当相对丰度明显表明哪个是主要表达的 miRNA 时，术语“微小 RNA”、“miRNA”和“miR”是指主要产物，并且术语“微小 RNA*”、“miRNA*”和“miR*”是指前体相对的臂。在一种实施方式中，miRNA 是最终进入 RNA- 诱导的沉默复合体（RISC）的“引导”链，而 miRNA* 是另一条“随从”链（“passenger”strand）。在另一种实施方式中，细胞中 miRNA* 的水平以相对于相应 miRNA 较低的水平（例如，≤ 15%）存在。在一些实施方式中，当在细胞中存在较高比例的随从链时，使用命名法 miRNA-3p（即来源于前体 miRNA 3' 臂的 miRNA）和 miRNA-5p（即 miRNA-5p 是来源于前体 miRNA 5' 臂的 miRNA）而不是 miRNA/miRNA*。

[0076] 如本文所使用的，术语“微小 RNA 类似物”或“miR 类似物”是指可以用于模仿或模拟一种或多种 miRNA 的基因沉默能力的分子。在一种实施方式中，miR 类似物通过模仿一种或多种内源 miR 下调（例如，抑制）靶标基因。在某些实施方式中，miRNA 类似物是合成的非编码 RNA（即所述 miRNA 不是通过从内源 miRNA 来源纯化获得的）。在某些实施方式中，miRNA 类似物能够进入 RNAi 途径并调控基因表达。在某些实施方式中，miRNA 类似物可以设计为成熟分子（例如，单链的）或类似物前体（例如，初始或前 miRNA）。

[0077] 在一些实施方式中，本文所提供的 miR 抑制剂或 miRNA 类似物包含核酸（修饰或修饰的核酸），其包括寡核苷酸，包括，例如，RNA、DNA、修饰的 RNA、修饰的 DNA、锁核酸或 2' -O, 4' -C- 乙烯 - 桥连核酸（ENA）或其任意组合。

[0078] miR 抑制剂或 miR 类似物可以是单链或双链的，并且可以是修饰或未修饰的。在某些实施方式中，miR 抑制剂或 miR 类似物具有约 2 至约 30 个核碱基的长度。在某些实施方式中，miR 抑制剂或 miR 类似物为单链，并且具有约 15 至约 30 个核碱基的长度。在一些实施方式中，miR 抑制剂是单链的，并且长度约 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个核碱基。

[0079] 在具体的实施方式中，本文提供了产生 arPSC 的方法，包括使胎盘干细胞或其群体与靶向所述胎盘干细胞中一个或多个 miR 的 miR 抑制剂或 miR 类似物接触，所述 miR 调控本文鉴别为与胎盘干细胞中失巢凋亡有关的一个或多个基因的活性。可以根据本文所述

的方法通过 miR 抑制剂和 / 或 miR 类似物靶向的 miR 包括与上表 1 中所列的失巢凋亡相关基因的调控有关的 miR。

[0080] 在另一种具体的实施方式中,本文提供了产生 arPSC 的方法,包括使胎盘干细胞或胎盘干细胞群与靶向所述胎盘干细胞中 miR 的 miR 抑制剂或 miR 类似物接触,所述 miR 调控所述胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因(例如,上表 1 中所列的失巢凋亡相关基因)的产生,从而(例如)与相等数目的未修饰的胎盘干细胞相比,所述胎盘干细胞产生的失巢凋亡相关基因减少。在某些实施方式中,所述 miR 抑制剂或所述 miR 类似物具有与调节表 1 中所鉴别的基因之一的产生的 miRNA 的序列至少约 70%、80%、90%、95%、98% 或 100% 互补的序列。

[0081] 在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 miR 抑制剂或 miR 类似物靶向调节胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462) 的产生的 miRNA。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 miR 抑制剂或 miR 类似物靶向调节胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771) 的产生的 miRNA。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 miR 抑制剂或 miR 类似物靶向调节胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442) 的产生的 miRNA。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 miR 抑制剂或 miR 类似物靶向调节胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846) 的产生的 miRNA。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 miR 抑制剂或 miR 类似物靶向调节胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217) 的产生的 miRNA。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 miR 抑制剂或 miR 类似物靶向调节胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515) 的产生的 miRNA。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 miR 抑制剂或 miR 类似物靶向调节胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067) 的产生的 miRNA。

[0082] 在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 miR 抑制剂或 miR 类似物靶向 1 个、2 个、3 个或更多个 miRNA,其中所述 miRNA 调节以下胎盘干细胞失巢凋亡 - 相关基因中的 1 个、2 个、3 个或更多个的产生: FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 miR 抑制剂或 miR 类似物靶向 1 个、2 个、3 个或更多个 miRNA,其中所述 miRNA 调节以下胎盘干细胞失巢凋亡 - 相关基因中的 1 个、2 个、3 个或更多个的产生: FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067),和靶向调节表 1 中所列的至少一个其他失巢凋亡相关基因的产生的至少一种 miRNA。

[0083] 在另一种具体的实施方式中,调控胎盘干细胞的失巢凋亡 - 相关基因的产生的 miRNA 与 miR 抑制剂或 miR 类似物的接触导致所述胎盘干细胞中所述基因的 mRNA 水平降低,例如,相对于未修饰的胎盘干细胞(即未与 miR 抑制剂或 miR 类似物接触的胎盘干细

胞)中相同基因的 mRNA 水平,所得 arPSC 中失巢凋亡-相关基因的 mRNA 水平降低。在某些实施方式中,例如,与未修饰的胎盘干细胞中所述基因的表达(mRNA 水平)相比,根据本文所述的方法产生的 arPSC 中失巢凋亡-相关基因的 mRNA 水平降低了约、高达或不超过 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或 99%。

[0084] 可以通过商品化厂商(例如, Ambion ;Dharmafect)提供或通过(例如)固相合成或根据以下文献中所述的程序合成在本文所述的方法中使用的 miR 抑制剂和 miR 类似物,所述文献例如, Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Agrawal 主编(1993), Humana Press ;Scaringe, Methods(2001), 23, 206-217 ;Gait 等人, Applications of Chemically synthesized RNA in RNA:Protein Interactions, Smith 主编(1998), 1-36 ;Gallo 等人, Tetrahedron(2001), 57, 5707-5713)。

[0085] 可以通过本领域中已知的多种方法鉴别在本文所述的方法中使用的 miR 抑制剂和 miR 类似物。在某些实施方式中,任选地通过筛选法,例如,中或高通量筛选从一个或多个 miR 抑制剂或 miR 类似物文库,例如,可商购的文库(例如, Ambion, Anti-miR miRNA Precursor Library Human V13)鉴别并获得了这些 miR 抑制剂和/或 miR 类似物。在一种实施方式中,这种文库可以涵盖广泛的靶标 miR(例如,人全基因组 siRNA 文库)或预定涵盖特定靶标基因或基因家族(例如,核受体 siRNA 文库,磷酸酶 siRNA 文库等)。可以(例如)使用自动机器人、液体处理设备、数据处理软件和/或灵敏的检测器进行筛选法,例如, Precision XS 自动移液器系统、EL406 液体处理系统或 synergy 酶标仪。

[0086] 5.1.3 其他调控 RNA 分子

[0087] 用于 arPSC 产生的其他调控 RNA 分子包括反义 RNA、shRNA 和 shRNAmirs。这些 RNA 分子可以以任意组合使用或者可以与 siRNA、miR 类似物和/或 miR 抑制剂组合使用以产生如本文所述的 arPSC。

[0088] 如本文所使用的,术语“反义 RNA”是反义核糖核酸分子。仅通过说明并且无限制地,反义 RNA 杂交至靶标核酸(例如,基因)并调控靶标核酸的表达活性,如转录或翻译。

[0089] 如本文所使用的,术语“小发夹 RNA”或者“shRNA”是指包含茎环结构的 RNA 分子;术语“shRNAmir”是指“微小 RNA- 适应的 shRNA”。在某些实施方式中,所述 shRNA 包含互补序列的第一和第二区域,所述区域的互补性程度和取向足以使得在区域之间发生碱基配对,通过环区域相连的第一和第二区,由于环区域内核苷酸(或核苷酸类似物)之间缺少碱基配对所产生的环。可以(例如)通过细胞机制将 shRNA 发夹结构切割成 siRNA,其然后结合至 RNA- 诱导的沉默复合体(RISC)。该复合体结合至并切割与 siRNA 相匹配的 mRNA,所述 siRNA 与 mRNA 结合。

[0090] 在一些实施方式中,本文所提供的 shRNAmir 或微小 RNA- 适应的 shRNA 是通过添加 miRNA 环和 shRNA 的 miRNA 侧翼序列,模拟天然存在的初级转录本 miRNA 的 shRNA 构件。不希望受任何理论的束缚,首先通过 Drosha 将 shRNAmir 切割产生 shRNA,然后再通过 Dicer 切割产生 siRNA。然后,将 siRNA 引入 RISC 用于靶标 mRNA 降解。这使得能够通过 Drosha 切割 shRNAmir,借此使得更大地提高敲减效率。已报道当与无微小 RNA 的常规 shRNA 构件相比时,在 shRNA 发夹的任一侧加入 miR30 环和 125nt 的 miR30 侧翼序列会导致 Drosha 和 Dicer 过程中表达的发夹大于 10 倍的提高。

[0091] 在具体的实施方式中,本文提供了产生 arPSC 的方法,包括使胎盘干细胞或胎盘干细胞群与靶向本文鉴别为与胎盘干细胞中失巢凋亡有关的一个或多个基因的一个或多个反义 RNA、shRNA 和 shRNAmirs 接触,即所述方法包括用一个或多个反义 RNA、shRNA 和 shRNAmirs 靶向一个或多个失巢凋亡-相关基因。根据本文所述的方法可以通过反义 RNA、shRNA 和 shRNAmir 靶向的失巢凋亡-相关基因包括上表 1 中所列的基因。

[0092] 在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的调控 RNA 分子为小发夹 RNA 或 shRNA。在具体的实施方式中,所述 shRNA 靶向上表 1 中所列的一个或多个失巢凋亡-相关基因。在另一种具体的实施方式中,所述 shRNA 具有与上表 1 中所鉴别的基因(如基于表中所提供的基因的基因 ID 所鉴别的)中的一个的序列至少约 70%、80%、90%、95%、98%或 100%互补的序列。

[0093] 在另一种实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的调控 RNA 分子为反义 RNA。在具体的实施方式中,所述反义 RNA 靶向上表 1 中所列的一个或多个失巢凋亡-相关基因。在另一种具体的实施方式中,所述反义 RNA 具有与上表 1 中所鉴别的基因(如基于表中所提供的基因的基因 ID 所鉴别的)中的一个的序列至少约 70%、80%、90%、95%、98%或 100%互补的序列。

[0094] 在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 shRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 shRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 shRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 shRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 shRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 shRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 shRNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067)。

[0095] 在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 shRNA 靶向以下胎盘干细胞失巢凋亡-相关基因中的 1 个、2 个、3 个或更多个: FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的 shRNA 靶向以下胎盘干细胞失巢凋亡-相关基因中的 1 个、2 个、3 个或更多个: FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067),并且靶向表 1 中所列的至少一个其他失巢凋亡相关基因。

[0096] 在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的反义 RNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462)。在另一种具体的实施方

式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的反义 RNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 GNAI2(NCBI GENE ID NO:2771)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的反义 RNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 KNDC1(NCBI GENE ID NO:85442)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的反义 RNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 LPAR4(NCBI GENE ID NO:2846)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的反义 RNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 MAP3K5(NCBI GENE ID NO:4217)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的反义 RNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 SLC2A3(NCBI GENE ID NO:6515)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的反义 RNA 靶向胎盘干细胞失巢凋亡相关基因 STAU2(NCBI GENE ID NO:27067)。

[0097] 在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的反义 RNA 靶向以下胎盘干细胞失巢凋亡-相关基因中的 1 个、2 个、3 个或更多个: FHDC1(NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2(NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1(NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4(NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5(NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3(NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2(NCBI GENE ID NO:27067)。在另一种具体的实施方式中,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的反义 RNA 靶向以下胎盘干细胞失巢凋亡-相关基因中的 1 个、2 个、3 个或更多个: FHDC1(NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2(NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1(NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4(NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5(NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3(NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2(NCBI GENE ID NO:27067),并且靶向表 1 中所列的至少一个其他失巢凋亡相关基因。

[0098] 在另一种具体的实施方式中,胎盘干细胞的失巢凋亡-相关基因与 shRNA 或反义 RNA 的接触导致所述胎盘干细胞中所述基因的 mRNA 水平降低,例如,相对于未修饰的胎盘干细胞(即未与 shRNA 或反义 RNA 接触的胎盘干细胞)中相同基因的 mRNA 水平,所得 arPSC 中失巢凋亡-相关基因的 mRNA 水平降低。在某些实施方式中,例如,与未修饰的胎盘干细胞中所述基因的表达(mRNA 水平)相比,根据本文所述的方法产生的 arPSC 中失巢凋亡-相关基因的 mRNA 水平降低了约、高达或不超过 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99%。

[0099] 可以通过商品化厂商(例如, Ambion ;Dharmafect) 提供或通过(例如)固相合成或根据以下文献中所述的程序合成在本文所述的方法中使用的反义 RNA、shRNA 和 shRNAmirs,所述文献例如, Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Agrawal 主编(1993), Humana Press ;Scaringe, Methods(2001), 23, 206-217。 Gait 等人, Applications of Chemically synthesized RNA in RNA:Protein Interactions, Smith 主编(1998), 1-36。 Gallo 等人, Tetrahedron(2001), 57, 5707-5713)。

[0100] 可以通过本领域中已知的多种方法鉴别用于抗失巢凋亡的胎盘干细胞的产生的反义 RNA、shRNA、shRNAmirs 及其他调控 RNA 分子。在某些实施方式中,任选地通过筛选法,例如,中或高通量筛选法从一个或多个文库,例如,可商购的文库(Thermo Scientific, shRNAmir 文库)鉴别和获得这些反义 RNA、shRNA、shRNAmirs 及其他调控 RNA 分子。在一种实施方式中,这种文库可以涵盖广泛的基因(例如,人基因组靶标文库)或预定涵盖特定的靶标基因或基因家族(例如,人核受体靶标文库、磷酸酶靶标文库等)。可以

(例如)使用自动机器人、液体处理设备、数据处理软件和/或灵敏的检测器进行筛选法,例如,Precision XS 自动移液器系统、EL406 液体处理系统或 synergy 酶标仪。

[0101] 在某些实施方式中,在本文所述的方法中使用的反义 RNA、shRNA 和 shRNAmirs 包含约 1 至约 100、约 8 至约 80、10 至 50、13 至 80、13 至 50、13 至 30、13 至 24、18 至 22、19 至 23、20 至 80、20 至 50、20 至 30 或 20 至 24 个核碱基(核碱基(即约 1 至约 100 连接的核苷))。

[0102] 在本文所述的方法中使用的反义 RNA、shRNA 和 shRNAmirs 可以是单链或双链的,修饰或未修饰的。在某些实施方式中,所述反义 RNA、miR 类似物,shRNA、shRNAmirs 及其他调控 RNA 分子包含约 1 至约 100、约 8 至约 80、10 至 50、13 至 80、13 至 50、13 至 30、13 至 24、18 至 22、19 至 23、20 至 80、20 至 50、20 至 30 或 20 至 24 个核碱基(即约 1 至约 100 个连接的核苷)。在某些实施方式中,在本文所述的方法中使用的反义 RNA、shRNA 和 shRNAmirs 为单链的,包含约 12 至约 35 个核碱基(即约 12 至约 35 个连接的核苷)。在一种实施方式中,在本文所述的方法中使用的反义 RNA、miR 类似物、shRNA 和 shRNAmirs 的长度为约 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 或 35 个核碱基。

[0103] 可以通过任何已知的方法将在本文所述的方法中使用的 shRNAmirs 输送至细胞。在具体的实施方式中,将在本文所述的方法中使用的 shRNAmir 引入真核表达载体。在另一种具体的实施方式中,将在本文所述的方法中使用的 shRNAmir 引入病毒载体用于基因表达。这些病毒载体包括(但不限于)反转录病毒载体,例如,慢病毒和腺病毒。在具体的实施方式中,将在本文所述的方法中使用的 shRNAmir 引入慢病毒载体。

[0104] 5.1.4 调控 RNA 分子向胎盘干细胞的输送

[0105] 可以通过转染(例如,瞬时或稳定转染)或本领域中已知其他方式将在本文所述的方法中使用的调控 RNA 分子输送到胎盘干细胞。在某些实施方式中,可以(例如)使用脂质(例如,脂质体)、磷酸钙、环糊精、树枝状聚合物或聚合物(例如,阳离子聚合物);通过电穿孔、光学转染、基因电转移、穿刺转染(impalefection)、基因枪或磁转染;通过病毒(例如,病毒载体);或其组合来进行所述转染。在一种实施方式中,使用可商购的转染试剂或试剂盒(例如,Ambion, siPORT Amine, siPORT NeoFX's; Dharmafect, Dharmafect 3 转染试剂或 Dharmafect 1 转染试剂; Invitrogen, Lipofectamine RNAiMAX; Integrated DNA Technologies, Transductin; Mirus Bio LLC, TransIT-siQUEST, TransIT-TKO)进行所述转染。在具体的实施方式中,可以使用 Dharmacon ON-TARGET plus SMARTpool siRNA 试剂和 Dharmafect 1 转染试剂进行所述转染。在一些实施方式中,可以以中或高通量的方式进行所述转染,其包括(但不限于)微量滴定板(例如,96 孔板)和酶标仪(例如, synergy 酶标仪)或自动化系统,例如, Precision XS 自动吸液系统、EL406 液体处理系统的使用。在其他实施方式中,以大规模进行所述转染,其包括(但不限于)组织培养盘或培养瓶(例如, T25、T75 或 T225 烧瓶)的使用。可以将胎盘干细胞在组织培养容器(例如,盘、烧瓶、多孔板等)中铺板并培养足够使所述胎盘干细胞在转染时增殖至约 20-80% 汇合或约 30-70% 汇合的时间。例如,转染时,96 孔板中每孔可以有约 2000、2500、3000、3500 或 4000 个胎盘干细胞。在一种实施方式中,转染时胎盘干细胞为约 50% 汇合。在另一种实施方式中,直接转染时,96 孔板中每孔有约 3000 或 3500 个胎盘干细胞。在另一种实施方式中,反转染时,

96 孔板中每孔有约 3500 个胎盘干细胞。

[0106] 可以通过瞬时转染将在本文所述的方法中使用的调控 RNA 分子施用于细胞,或者可以将其稳定转染至细胞以用于所述调控 RNA 分子(例如, siRNA)所靶向的基因的长期调节(例如,抑制)。在一种实施方式中,可以(例如)通过使用表达功能性调控 RNA 分子的质粒或表达载体来进行调控 RNA 分子的稳定转染。在一种实施方式中,这些质粒或表达载体包含可选择的标志物(例如,抗生素选择标志物)。在另一种实施方式中,这些质粒或表达载体包含巨细胞病毒(CMV)启动子、RNA 聚合酶 III(RNA pol III)启动子(例如,U6 或 H1)或 RNA 聚合酶 II(RNA pol II)启动子。在另一种实施方式中,这些质粒或表达载体是可商购的(例如,Ambion,pSilencer 4.1-CMV 载体)。

[0107] 哺乳动物表达载体的其他实例包括 pLOC(Open Biosystems),其含有巨细胞病毒启动子;pCDM8(Seed,Nature 329:840(1987))和 pMT2PC(Kaufman 等人,EMBO J. 6:187-195(1987))。可以使用的其他表达载体实例包括 pFN10A(ACT)FLEXI 载体(Promega)、pFN11A(BIND)FLEXI 载体(Promega)、pGL4.31[luc2P/GAL4UAS/Hygro](Promega)、pFC14K(HALOTAG 7)MCV FLEXI 载体(Promega)、pFC15A(HALOTAG 7)MCV FLEXI 载体(Promega)等。

[0108] 当在哺乳动物细胞中使用时,可以通过病毒调控元件提供表达载体的控制功能。例如,常用的启动子来源于多形瘤病毒、腺病毒 2、巨细胞病毒和猿猴病毒 40。其他适合于原核和真核细胞的表达系统在以下文献中有所描述,例如,Sambrook 等人主编,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第 2 版,第 16 和 17 章,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y. (1989)。

[0109] 重组表达载体可以包括可以(例如)操作性地连接至编码要表达的基因的核酸序列上的一个或多个控制序列。这些控制序列在(例如)Goeddel,Gene Expression Technology:Methods in Enzymology 185,Academic Press,San Diego,Calif. (1990)中描述。在某些实施方式中,载体包括指导胎盘干细胞中核苷酸序列的组成型表达的控制序列。在某些其他实施方式中,控制序列仅指导 arPSC 接受者中某些组织细胞中的核苷酸序列的表达,例如,所述接受者内的肺、神经、肌肉、皮肤、血管系统或其他组织中。在某些其他实施方式中,所述载体包含通过(例如)与化学试剂接触(例如,四环素)接触可诱导的控制序列。

[0110] 可以通过本领域技术人员已知的任何技术(例如,通过直接转染)将所述调控 RNA 分子施用于所述细胞。例如,所述直接转染可以在转染前包括将细胞预铺板的步骤,从而使它们在暴露于转染复合物之前贴壁并恢复生长一段时间(例如,24 小时)。还可以通过反向转染将所述调控 RNA 分子施用于细胞。例如,所述反向转染可以包括在铺板前在细胞处于混悬液时将转染复合物加入至细胞的步骤。

[0111] 在多个实施方式中,调控 RNA 分子对胎盘干细胞的作用(例如,所述胎盘干细胞中一种或多种失巢凋亡-相关基因的下调从而从所述胎盘干细胞产生 arPSC)可以持续长达、约或不超过 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 或 23 小时,或者 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27 或 28 天或更长的时间。在某些实施方式中,在不超过 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 或 23 小时,或者 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、

15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27 或 28 天的 arPSC 产生时间内使用了使用本文所述的方法产生的 arPSC(例如,施用于受试者)。在某些实施方式中,在使用前(例如,在施用于受试者前),保存(例如,冷冻保存)使用本文所述的方法产生的 arPSC。在某些实施方式中,调控 RNA 分子对 arPSC 的作用是可诱导的。在某些其他实施方式中,在修饰胎盘干细胞以产生 arPSC 的时间和施用或冷冻保存 arPSC 的时间之间不进行或基本不进行细胞扩增(arPSC 的培养、增殖等)。

[0112] 可以通过本领域认可的任何用于检测细胞的蛋白质产生或核酸产生的方法完成在本文所述的方法中使用的调控 RNA 分子的功能评价(例如,失巢凋亡-相关基因的沉默),例如,基因沉默的水平或程度。例如,可以通过与未用该核酸序列转染或转化的等价胎盘干细胞相比,确定 arPSC 样品中所关心的基因的 mRNA 或蛋白水平(例如, 10×10^5 至 10×10^7 个 arPSC,或 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9% 或 10% 的所述 arPSC)来进行评价。可以使用(例如)核酸基方法,例如, RNA 印迹分析、反转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)、实时 PCR、定量 PCR 等进行该评价。在其他实施方式中,可以(例如)在 ELISA、夹心测定等中使用结合至所关心的蛋白质的抗体评价蛋白表达。在具体的实施方式中,使用本文所述的方法产生的抗失巢凋亡的胎盘干细胞产生了比未修饰的胎盘干细胞(例如,相等量的未修饰的胎盘干细胞(即,未与调控 RNA 分子接触的胎盘干细胞))少 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100% 的靶标基因(例如,失巢凋亡-相关基因)的 mRNA。在具体的实施方式中,使用本文所述的方法产生的抗失巢凋亡的胎盘干细胞产生了比未修饰的胎盘干细胞(例如,相等量的未修饰的胎盘干细胞(即,未与调控 RNA 分子接触的胎盘干细胞))少 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100% 的靶标基因(例如,失巢凋亡-相关基因)的蛋白。

[0113] 5.2 抗失巢凋亡的胎盘干细胞的使用

[0114] 本文所述的 arPSC 的一个优势是它们维持了未修饰的胎盘干细胞的功能特征(例如,在美国专利 No. 7311904 ;7311905 ;7468276 和 8057788,这些专利的公开内容以其全部内容作为参考并入本文),但是它们抗失巢凋亡并因此在低贴壁条件下与(例如)非抗失巢凋亡的未修饰的胎盘干细胞相比表现出增强存活。因此,本文所述的 arPSC 可以有利地在包括将胎盘干细胞施用于受试者的方法中使用,其中在低贴壁环境中施用所述胎盘干细胞,例如,全身施用胎盘干细胞或者局部施用胎盘干细胞并且在局部环境中不贴壁于基底(例如,细胞外基质)。

[0115] 在一种实施方式中,可以在治疗患有或具有发展由不希望的或有害的免疫应答所引起或与之有关疾病、病症或病况(例如,具有炎性部分的疾病、病症或病况)的个体的方法中使用本文所述的 arPSC。在另一种实施方式中,本文提供了通过将免疫细胞与多种 arPSC(例如,包含 arPSC 的组合物)接触,用于调控(例如,抑制)免疫细胞或多个免疫细胞的活性(例如,增殖)的方法。根据这些方法,可以向个体施用治疗有效量的 arPSC,其中所施用的 arPSC 可以在所述个体中在低贴壁条件下比(例如)相同方式施用的未修饰的胎盘干细胞存活更长的一段时间。

[0116] 在具体的实施方式中,本文提供了抑制免疫应答的方法,其包括将多个免疫细胞与多个抗失巢凋亡的胎盘干细胞接触足以使所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞可检测地抑制

免疫应答的一段时间,其中所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞在混合淋巴细胞反应 (MLR) 测定或者退缩测定中可检测地抑制 T 细胞增殖。在该方法的背景中,“免疫细胞”表示免疫系统的任何细胞,具体地 T 细胞和 NK(自然杀伤)细胞。因此,在所述方法的多种实施方式中,抗失巢凋亡的胎盘干细胞与多个免疫细胞接触,其中所述多种免疫细胞是或包括多种 T 细胞(例如,多种 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞和 / 或 CD8⁺T 细胞)和 / 或自然杀伤细胞。在该方法的背景中,“免疫应答”可以是免疫细胞对通常由免疫细胞所感知的刺激物的任何应答,例如,对抗原存在性的应答。在多种实施方式中,免疫应答可以是对外源抗原(如输注或移植物中存在的抗原)或对自体抗原(如在自身免疫病中)应答的 T 细胞(例如,CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞和 / 或 CD8⁺T 细胞)的增殖。免疫应答还可以是移植物内所含的 T 细胞的增殖。所述免疫应答还可以是自然杀伤(NK)细胞的任何活性、树突状细胞的成熟等。免疫应答还可以是一类或多类免疫细胞的活性的局部、组织或器官特异或全身效应,例如,所述免疫应答可以是移植物抗宿主病、炎症、炎症相关瘢痕组织的形成、自身免疫病(例如,类风湿性关节炎、I 型糖尿病、红斑狼疮等)等。

[0117] 如在本文中在该背景下使用的,“接触”涵盖了使胎盘干细胞和免疫细胞在单一容器(例如,培养皿、烧瓶、小瓶等)或体内(例如,在相同个体(例如,哺乳动物,例如,人)内)处于一起。在一种实施方式中,所述接触是接触足够的时间并且与足够个数的 arPSC 和免疫细胞接触,从而免疫细胞的免疫功能变化是可检测的。在某些实施方式中,与不存在 arPSC 的免疫功能相比,所述接触足以将免疫功能(例如,对抗原应答的 T 细胞增殖)抑制至少 50%、60%、70%、80%、90%或 95%。可以在体外测定(参见下文)中确定体内背景中的这种抑制;即,可以对于受体个体中抗失巢凋亡的胎盘干细胞的具体数目和免疫细胞的数目将体外测定中的抑制程度外推至个体中的抑制程度。

[0118] 可以(例如)体外评价抗失巢凋亡的胎盘干细胞抑制免疫应答的能力。在某些实施方式中,与未修饰的胎盘干细胞(例如,非抗失巢凋亡的胎盘干细胞)相比,本文所提供的抗失巢凋亡的胎盘干细胞将免疫应答抑制了至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%。在某些实施方式中,本文所提供的抗失巢凋亡的胎盘干细胞对免疫应答的抑制程度与未修饰的胎盘干细胞(例如,非抗失巢凋亡的胎盘干细胞)相同。例如,可以在 MLR(以约 10:1:2 的比值包含混合的 CD4⁺或 CD8⁺T 细胞、树突状细胞(DC)和抗失巢凋亡的胎盘干细胞)中测试多种抗失巢凋亡的胎盘干细胞,其中用染料(如,例如,分配至子代细胞的 CFSE)对 T 细胞染色,并且其中允许 T 细胞增殖约 6 天。如果与在存在 DC 但不存在胎盘干细胞的情况下的 T 细胞增殖相比,在存在抗失巢凋亡的胎盘干细胞的情况下 6 天时 T 细胞增殖可检测地降低,则多种抗失巢凋亡的胎盘干细胞是免疫抑制性的。另外,可以平行进行使用未修饰的胎盘干细胞的对照以表明抗失巢凋亡的胎盘干细胞比未修饰的或未处理的胎盘干细胞是更加免疫抑制的。在该 MLR 中,例如,抗失巢凋亡的胎盘干细胞可以融化或收获自培养物。将约 20000 个抗失巢凋亡的胎盘干细胞再悬浮于 100 μ l 培养基(RPMI 1640, 1mM HEPES 缓冲液,抗生素和 5%混合人血清),并使其贴壁于孔底 2 小时。从整个周围血单核细胞 Miltenyi 磁珠分离 CD4⁺和 / 或 CD8⁺T 细胞。所述细胞是 CFSE 染色的,并且每孔加入总计 100000 个 T 细胞(仅 CD4⁺T 细胞、仅 CD8⁺T 细胞或相等量的 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞)。使孔中体积达到 200 μ l,并允许进行 MLR。可以以类似方式使用退缩测定或 BTR 测定。

[0119] 在另一个方面,本文提供了促进血管生成的方法。在具体的实施方式中,本文提供了促进受试者,例如,人受试者中血管生成的方法,其包括向所述受试者施用本文所述的 arPSC 或其混合物。在某些实施方式中,与未修饰的胎盘干细胞(例如,非抗失巢凋亡的胎盘干细胞)相比,本文所提供的抗失巢凋亡的胎盘干细胞将血管生成提高了至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%。在某些实施方式中,本文所提供的抗失巢凋亡的胎盘干细胞对血管生成的提高程度与未修饰的胎盘干细胞(例如,非抗失巢凋亡的胎盘干细胞)相同。测量细胞(例如,胎盘干细胞,包括 arPSC)促进血管生成的能力的测定在本领域中是已知的(参见,例如,美国专利申请公开 No. 2011/0250182,该专利的公开内容以其全部内容作为参考并入本文),例如,测定细胞促进内皮细胞的管形成能力,测定细胞促进内皮细胞迁移和/或增殖的能力和测定细胞分泌促进血管生成的因子的能力。

[0120] 本文所述的抗失巢凋亡的胎盘干细胞可以与一种或多种第二类型的干细胞(例如,来自骨髓的间质干细胞)一起施用。可以将这些第二干细胞与所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞以(例如)约 1:10 至约 10:1 之间的比值施用于个体。

[0121] 可以以本领域中已知的任何方式将本文所述的抗失巢凋亡的胎盘干细胞施用于个体,例如,全身、局部、静脉内、肌内、腹膜内、眼内、肠胃外、鞘内施用或直接施用于器官,例如,胰腺。对于体内施用,可以将抗失巢凋亡的胎盘干细胞配制为药物组合物,如下所述。

[0122] 5.3 抗失巢凋亡的胎盘干细胞和抗失巢凋亡的胎盘干细胞群

[0123] 本文所提供的抗失巢凋亡的胎盘干细胞(arPSC)是使用本文所述的方法从胎盘干细胞产生的。根据本文所述的用于产生 arPSC 的方法,与未修饰的胎盘干细胞中相同失巢凋亡相关基因的表达相比,本文所述的 arPSC 以降低的水平表达一种或多种失巢凋亡-相关基因(如本文所鉴别的,例如,上表 1 中所鉴别的一种或多种失巢凋亡相关基因)(即,一种或多种失巢凋亡-相关基因的表达下调)。

[0124] 从中产生抗失巢凋亡的胎盘干细胞的胎盘干细胞不来源于血液,例如,胎盘血或脐带血。在本文提供的方法和组合物中使用的用于产生抗失巢凋亡的胎盘干细胞的胎盘干细胞具有抑制个体免疫系统的能力,并且可以对它们的抑制能力进行选择。

[0125] 胎盘干细胞在来源上可以是胎儿的或母体的(即,可以具有母体或胎儿的基因型)。胎盘干细胞群或包含胎盘干细胞的细胞群可以包含仅是胎儿或母体来源的胎盘干细胞,或者可以包含胎儿和母体来源的胎盘干细胞的混合群体。可以通过(例如)以下所讨论的形态学、标志物和培养特征来鉴别和选择胎盘干细胞和包含胎盘干细胞的细胞群。

[0126] 5.3.1 物理和形态特征

[0127] 当在原代培养或在细胞培养中培养时,在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞贴壁到组织培养基基底上,例如,组织培养容器表面(例如,组织培养塑料制品)。培养中的胎盘干细胞呈现出一般成纤维样星形外观,其中多个胞质突从中央细胞体中伸出。然而,由于胎盘干细胞显示出比成纤维细胞数目更多的这些过程,因此在用于产生本文所述的 arPSC 的方法中使用的胎盘干细胞在形态上与相同条件下培养的成纤维细胞是可区分的。在形态上,胎盘干细胞还与造血干细胞是可区分的,造血干细胞在培养时一般呈现出更圆的或卵石形态。

[0128] 因此,本文所述的 arPSC 不同于(例如)成纤维细胞和造血干细胞。另外,本文所述的 arPSC 不同于用于产生 arPSCs 的胎盘干细胞,具体地相对于细胞在低贴壁条件下存活

的能力；由于它们抗失巢凋亡，因此相对于未修饰的胎盘干细胞，本文所述的 arPSC 在低贴壁条件下显示出增加的存活能力，而未修饰的胎盘干细胞不抗失巢凋亡。

[0129] 5.3.2 细胞表面、分子和遗传标志物

[0130] 就象未修饰的胎盘干细胞一样，本文所述的 arPSC 表达多种可以用于鉴别和 / 或分离 arPSC 或包括 arPSC 的细胞群的标志物。通常，与本文所述的 arPSC 有关的鉴别标志物与可以用于鉴别 arPSC 所来源的胎盘干细胞（即，在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞）的那些相同。因此，就细胞表面、分子和遗传标志物而言，本文所述的 arPSC 与未修饰的胎盘干细胞相当，但细胞之间的差异在于相对于相等量的未修饰的胎盘干细胞中所述基因的表达，本文所述的 arPSC 以较低的水平表达至少一种失巢凋亡相关基因（例如，上表 1 中所鉴别的至少一种基因），即本文所述的 arPSC 中至少一种失巢凋亡相关基因下调 / 抑制，其中在未修饰的胎盘干细胞中所述失巢凋亡相关基因未下调 / 抑制。

[0131] 本文所述的 arPSC，如 arPSC 所来源的胎盘干细胞，不是骨髓源间充质细胞、脂肪源间质干细胞或得自脐带血、胎盘血或周围血液的间充质细胞。

[0132] 在某些实施方式中，所述本文所述的 arPSC（和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞）为 CD34⁻、CD10⁺和 CD105⁺，如通过流式细胞术所检测的。在具体的实施方式中，本文所述的分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺arPSC（和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞）具有分化为神经表型细胞、成骨表型细胞和 / 或软骨形成表型细胞的潜能。在另一种具体的实施方式中，本文所述的分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺arPSC（和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞）另外是 CD200⁺。在另一种具体的实施方式中，本文所述的分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺arPSC（和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞）另外是 CD45⁻或 CD90⁺。在另一种具体的实施方式中，本文所述的分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺arPSC（和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞）另外是 CD45⁻和 CD90⁺。在另一种具体的实施方式中，本文所述的分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺arPSC（和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞）另外是 CD90⁺或 CD45⁻，如通过流式细胞术所检测的。在另一种具体的实施方式中，本文所述的分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺arPSC（和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞）另外是 CD90⁺和 CD45⁻，如通过流式细胞术所检测的，即所述细胞为 CD34⁻、CD10⁺、CD45⁻、CD90⁺、CD105⁺和 CD200⁺。在另一种具体的实施方式中，本文所述的 CD34⁻、CD10⁺、CD45⁻、CD90⁺、CD105⁺、CD200⁺arPSC（和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞）另外是 CD80⁻和 CD86⁻。

[0133] 在某些实施方式中，本文所述的 arPSC（和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞）为 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺和 CD200⁺和 CD38⁻、CD45⁻、CD80⁻、CD86⁻、CD133⁻、HLA-DR、DP、DQ⁻、SSEA3⁻、SSEA4⁻、CD29⁺、CD44⁺、CD73⁺、CD90⁺、CD105⁺、HLA-A、B、C⁺、PDL1⁺、ABC-p⁺和 / 或 OCT-4⁺中的一种或多种，如通过流式细胞术所检测的。在其他实施方式中，本文所述的任何 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺arPSC（和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞）另外是 CD29⁺、CD38⁻、CD44⁺、CD54⁺、SH3⁺或 SH4⁺中的一种或多种。在另一种具体的实施方式中，本文所述的 arPSC（和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞）另外是 CD44⁺。在另一个具体实施方式中，本文所述的任何分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺arPSC 中任一种（和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细

胞) 另外是 CD117、CD133、KDR (VEGFR2)、HLA-A, B, C⁺、HLA-DP, DQ, DR- 或编程死亡-1 配体 (PDL1)⁺中的一种或多种, 或它们的任意组合。

[0134] 在另一种实施方式中, 本文所述的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺arPSC (和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞) 另外是 CD13⁺、CD29⁺、CD33⁺、CD38⁺、CD44⁺、CD45⁺、CD54⁺、CD62E⁺、CD62L⁺、CD62P⁺、SH3⁺(CD73⁺)、SH4⁺(CD73⁺)、CD80⁺、CD86⁺、CD90⁺、SH2⁺(CD105⁺)、CD106/VCAM⁺、CD117⁺、CD144/VE- 钙粘素^低、CD184/CXCR4⁺、CD200⁺、CD133⁺、OCT-4⁺、SSEA3⁺、SSEA4⁺、ABC-p⁺、KDR (VEGFR2)、HLA-A, B, C⁺、HLA-DP, DQ, DR-、HLA-G- 或编程死亡-1 配体 (PDL1)⁺中的一种或多种, 或它们的任意组合。在另一种实施方式中, 本文所述的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺arPSC (和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞) 另外是 CD13⁺、CD29⁺、CD33⁺、CD38⁺、CD44⁺、CD45⁺、CD54/ICAM⁺、CD62E⁺、CD62L⁺、CD62P⁺、SH3⁺(CD73⁺)、SH4⁺(CD73⁺)、CD80⁺、CD86⁺、CD90⁺、SH2⁺(CD105⁺)、CD106/VCAM⁺、CD117⁺、CD144/VE- 钙粘素^低、CD184/CXCR4⁺、CD200⁺、CD133⁺、OCT-4⁺、SSEA3⁺、SSEA4⁺、ABC-p⁺、KDR (VEGFR2)、HLA-A, B, C⁺、HLA-DP, DQ, DR、HLA-G 和编程死亡-1 配体 (PDL1)⁺。

[0135] 在另一种具体的实施方式中, 本文所述的任何 arPSC (和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞) 另外是 ABC-p⁺, 如通过流式细胞术所检测的, 或 OCT-4⁺(POU5F1⁺), 如通过反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 所确定的, 其中 ABC-p 是胎盘特异性 ABC 转运蛋白 (也称为乳腺癌耐药蛋白 (BCRP) 或者耐米托蒽醌蛋白 (MXR)), 并且 OCT-4 是八聚物-4 蛋白 (POU5F1)。在另一种具体的实施方式中, 本文所述的任何 arPSC (和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞) 另外是 SSEA3⁻或 SSEA4⁻, 如通过流式细胞术所确定的, 其中 SSEA3 是阶段特异性胚胎抗原 3, 并且 SSEA4 是阶段特异性胚胎抗原 4。在另一种具体的实施方式中, 本文所述的任何 arPSC (和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞) 另外是 SSEA3⁻和 SSEA4⁻。

[0136] 在另一种具体的实施方式中, 本文所述的任何 arPSC (和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞) 为或另外为 MHC-I⁺ (例如, HLA-A, B, C⁺)、MHC-II (例如, HLA-DP, DQ, DR) 或 HLA-G 中的一种或多种。在另一种具体的实施方式中, 本文所述的任何 arPSC (和 / 或在本文所述的方法中用于产生 arPSC 的胎盘干细胞) 另外为 MHC-I⁺ (例如, HLA-A, B, C⁺)、MHC-II (例如, HLA-DP, DQ, DR) 和 HLA-G。

[0137] 本文还提供了本文所述的 arPSC 群体。在某些实施方式中, 本文描述了包含本文所述的分离的 arPSC 的 arPSC 群体, 其中所述细胞群包含 (例如) 至少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 98% 的分离的 CD10⁺、CD105⁺和 CD34⁺ arPSC; 即所述群体中至少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 98% 的细胞是分离的 CD10⁺、CD105⁺和 CD34⁺ arPSC。在具体的实施方式中, 分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺arPSC 另外是 CD200⁺。在另一种具体的实施方式中, 分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺arPSC 另外是 CD90⁺或 CD45⁻, 如通过流式细胞术所检测的。在另一种具体的实施方式中, 分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺arPSC 另外是 CD90⁺和 CD45⁻, 如通过流式细胞术所检测的。在另一种具体的实施方式中, 任何如上所述的分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺arPSC 另外是 CD29⁺、CD38⁺、CD44⁺、CD54⁺、SH3⁺或 SH4⁺中的一种或多种。在另一种具体的实施方式中, 分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺arPSC 或分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺胎盘干

细胞另外是 CD44⁺。在任何包含上述分离的 CD34⁺、CD10⁺、CD105⁺arPSC 的细胞群的具体实施方式中,分离的 arPSC 另外是 CD13⁺、CD29⁺、CD33⁺、CD38⁺、CD44⁺、CD45⁺、CD54⁺、CD62E⁺、CD62L⁺、CD62P⁺、SH3⁺(CD73⁺)、SH4⁺(CD73⁺)、CD80⁺、CD86⁺、CD90⁺、SH2⁺(CD105⁺)、CD106/VCAM⁺、CD117⁺、CD144/VE-钙粘素^低、CD184/CXCR4⁺、CD200⁺、CD133⁺、OCT-4⁺、SSEA3⁺、SSEA4⁺、ABC-p⁺、KDR (VEGFR2⁺)、HLA-A, B, C⁺、HLA-DP, DQ, DR、HLA-G 或编程死亡-1 配体 (PDL1)⁺中的一种或多种,或它们的任意组合。在另一种具体的实施方式中,所述 CD34⁺、CD10⁺、CD105⁺arPSC 另外是 CD13⁺、CD29⁺、CD33⁺、CD38⁺、CD44⁺、CD45⁺、CD54/ICAM⁺、CD62E⁺、CD62L⁺、CD62P⁺、SH3⁺(CD73⁺)、SH4⁺(CD73⁺)、CD80⁺、CD86⁺、CD90⁺、SH2⁺(CD105⁺)、CD106/VCAM⁺、CD117⁺、CD144/VE-钙粘素^低、CD184/CXCR4⁺、CD200⁺、CD133⁺、OCT-4⁺、SSEA3⁺、SSEA4⁺、ABC-p⁺、KDR (VEGFR2⁺)、HLA-A, B, C⁺、HLA-DP, DQ, DR、HLA-G 和编程死亡-1 配体 (PDL1)⁺。

[0138] 在某些实施方式中,所述细胞群中分离的 arPSC 是 CD10⁺、CD29⁺、CD34⁺、CD38⁺、CD44⁺、CD45⁺、CD54⁺、CD90⁺、SH2⁺、SH3⁺、SH4⁺、SSEA3⁺、SSEA4⁺、OCT-4⁺和 ABC-p⁺中的一种或多种或者全部,其中在产生所述分离的 arPSC 的方法中使用的所述胎盘干细胞是通过胎盘组织的物理和/或酶促破坏获得的。在具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 OCT-4⁺和 ABC-p⁺。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 OCT-4⁺和 CD34⁺,其中所述分离的 arPSC 具有以下特征中的至少一种:CD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD45⁺、CD54⁺、CD90⁺、SH3⁺、SH4⁺、SSEA3⁺和 SSEA4⁺。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 OCT-4⁺、CD34⁺、CD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD45⁺、CD54⁺、CD90⁺、SH3⁺、SH4⁺、SSEA3⁺和 SSEA4⁺。在另一种实施方式中,分离的 arPSC 是 OCT-4⁺、CD34⁺、SSEA3⁺和 SSEA4⁺。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 OCT-4⁺和 CD34⁺,以及 SH2⁺或 SH3⁺。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 OCT-4⁺、CD34⁺、SH2⁺和 SH3⁺。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 OCT-4⁺、CD34⁺、SSEA3⁺和 SSEA4⁺,以及 SH2⁺或 SH3⁺。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 OCT-4⁺和 CD34⁺,以及 SH2⁺或 SH3⁺,并且是 CD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD45⁺、CD54⁺、CD90⁺、SSEA3⁺或 SSEA4⁺中的至少一种。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 OCT-4⁺、CD34⁺、CD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD45⁺、CD54⁺、CD90⁺、SSEA3⁺和 SSEA4⁺,并且是 SH2⁺或 SH3⁺。

[0139] 在另一种实施方式中,分离的 arPSC 是 SH2⁺、SH3⁺、SH4⁺和 OCT-4⁺。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 CD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD54⁺、CD90⁺、CD34⁺、CD45⁺、SSEA3⁺或 SSEA4⁺。在另一种实施方式中,分离的 arPSC 是 SH2⁺、SH3⁺、SH4⁺、SSEA3⁺和 SSEA4⁺。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 SH2⁺、SH3⁺、SH4⁺、SSEA3⁺和 SSEA4⁺、CD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD54⁺、CD90⁺、OCT-4⁺、CD34⁺或 CD45⁺。

[0140] 在另一种实施方式中,本文所述的分离的 arPSC 为 CD10⁺、CD29⁺、CD34⁺、CD44⁺、CD45⁺、CD54⁺、CD90⁺、SH2⁺、SH3⁺和 SH4⁺;其中所述分离的 arPSC 另外是 OCT-4⁺、SSEA3⁺或 SSEA4⁺中的一个或多个。

[0141] 在某些实施方式中,分离的 arPSC 是 CD200⁺或 HLA-G⁺。在具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 CD200⁺和 HLA-G⁺。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 另外是 CD73⁺和 CD105⁺。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 另外是 CD34⁺、CD38⁺或 CD45⁺。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 另外是 CD34⁺、CD38⁺和 CD45⁺。在另一种具体的实施方式中,所述 arPSC 为 CD34⁺、CD38⁺、CD45⁺、CD73⁺和 CD105⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD200⁺或 HLA-G⁺ arPSC 在允许胚状体样体形成的条件下在包含分离的胎盘干细

胞的胎盘细胞群中有利于胚状体样体的形成。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是从非所述 arPSC 的胎盘细胞中分离的。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 是从不显示该标志物的组合的胎盘细胞中分离的。

[0142] 在另一种实施方式中,在本文所述的方法和组合中有用的细胞群是包含(例如,富含)CD200⁺、HLA-G arPSC 的细胞群。在具体的实施方式中,所述群体是胎盘细胞群。在多种实施方式中,所述细胞群中至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%或至少约 60%的细胞是分离的 CD200⁺、HLA-G arPSC。优选地,所述细胞群中至少约 70%的细胞是分离的 CD200⁺、HLA-G arPSC。更优选地,至少约 90%、95%或 99%的所述细胞是分离的 CD200⁺、HLA-G arPSC。在所述细胞群的具体实施方式中,所述分离的 CD200⁺、HLA-G arPSC 还是 CD73⁺和 CD105⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD200⁺、HLA-G arPSC 还是 CD34、CD38 或 CD45。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD200⁺、HLA-G arPSC 还是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺和 CD105⁺。在另一种实施方式中,当在允许胚状体样品形成的条件下培养时,所述细胞群产生一个或多个胚状体样品。在另一种具体的实施方式中,所述细胞群是从非 arPSC 的胎盘细胞中分离的。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD200⁺、HLA-G arPSC 是从不表现出这些标志物的胎盘细胞中分离出来的。

[0143] 在另一种实施方式中,本文所述的分离的 arPSC 是 CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 HLA-G。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 CD34、CD38 或 CD45。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 CD34、CD38 和 CD45。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 CD34、CD38、CD45 和 HLA-G。在另一种具体的实施方式中,当所述群体在允许胚状体样品形成的条件下培养时,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺ arPSC 在包含分离的 arPSC 的胎盘细胞群中有利于一个或多个胚状体样品的形成。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是从非分离的 arPSC 的胎盘细胞中分离的。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是从不显示该标志物的组合的胎盘细胞中分离的。

[0144] 在另一种实施方式中,在本文所述的方法和组合中有用的细胞群是包含(例如,富含)分离的 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺ arPSC 的细胞群。在多种实施方式中,所述细胞群中至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%或至少约 60%的细胞是分离的 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺ arPSC。在另一种实施方式中,所述细胞群中至少约 70%的所述细胞是分离的 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺ arPSC。在另一种实施方式中,所述细胞群中至少约 90%、95%或 99%的细胞是分离的 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺ arPSC。在所述群体的具体实施方式中,分离的 arPSC 是 HLA-G。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 另外是 CD34、CD38 或 CD45。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 另外是 CD34、CD38 和 CD45。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 另外是 CD34、CD38、CD45 和 HLA-G。在另一种具体的实施方式中,当在允许胚状体样品形成的条件下培养时,所述细胞群产生一个或多个胚状体样品。在另一种具体的实施方式中,所述 arPSC 群体是从非 arPSC 的胎盘细胞中分离的。在另一种具体的实施方式中,所述 arPSC 群体是从不表现出这些特征的胎盘细胞中分离的。

[0145] 在某些其他实施方式中,分离的 arPSC 是 CD10⁺、CD29⁺、CD34、CD38、CD44⁺、CD45、CD54⁺、CD90⁺、SH2⁺、SH3⁺、SH4⁺、SSEA3、SSEA4、OCT-4⁺、HLA-G 或 ABC-p⁺中的一种或多种。在

具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 CD10⁺、CD29⁺、CD34⁺、CD38⁺、CD44⁺、CD45⁺、CD54⁺、CD90⁺、SH2⁺、SH3⁺、SH4⁺、SSEA3⁺、SSEA4⁺和 OCT-4⁺。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 CD10⁺、CD29⁺、CD34⁺、CD38⁺、CD45⁺、CD54⁺、SH2⁺、SH3⁺和 SH4⁺。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 CD10⁺、CD29⁺、CD34⁺、CD38⁺、CD45⁺、CD54⁺、SH2⁺、SH3⁺、SH4⁺和 OCT-4⁺。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 CD10⁺、CD29⁺、CD34⁺、CD38⁺、CD44⁺、CD45⁺、CD54⁺、CD90⁺、HLA-G⁺、SH2⁺、SH3⁺、SH4⁺。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 OCT-4⁺和 ABC-p⁺。在另一种具体的实施方式中,分离的 arPSC 是 SH2⁺、SH3⁺、SH4⁺和 OCT-4⁺。在另一种实施方式中,分离的 arPSC 是 OCT-4⁺、CD34⁺、SSEA3⁺和 SSEA4⁺。在具体的实施方式中,所述分离的 OCT-4⁺、CD34⁺、SSEA3⁺和 SSEA4⁺ arPSC 另外是 CD10⁺、CD29⁺、CD34⁺、CD44⁺、CD45⁺、CD54⁺、CD90⁺、SH2⁺、SH3⁺和 SH4⁺。在另一种实施方式中,分离的 arPSC 是 OCT-4⁺和 CD34⁺,以及 SH3⁺或 SH4⁺。在另一种实施方式中,所述分离的 arPSC 是 CD34⁺,以及 CD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD54⁺、CD90⁺或 OCT-4⁺。

[0146] 在另一种实施方式中,分离的 arPSC 是 CD200⁺和 OCT-4⁺。在具体的实施方式中,分离的 arPSC 另外是 CD73⁺和 CD105⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 是 HLA-G⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD200⁺、OCT-4⁺arPSC 是 CD34⁺、CD38⁺或 CD45⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD200⁺、OCT-4⁺arPSC 是 CD34⁺、CD38⁺和 CD45⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD200⁺、OCT-4⁺arPSC 是 CD34⁺、CD38⁺、CD45⁺、CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺。在另一种具体的实施方式中,当所述群体在允许胚状体样体形成的条件下培养时,所述分离的 CD200⁺、OCT-4⁺arPSC 通过包含 arPSC 的胎盘细胞群有利于一个或多个胚状体样体产生。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD200⁺、OCT-4⁺arPSC 是从非所述 arPSC 的胎盘细胞中分离的。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD200⁺、OCT-4⁺arPSC 是从不表现出这些特征的胎盘细胞中分离的。

[0147] 在另一种实施方式中,在本文所述的方法和组合物中有用的细胞群是包含(例如,富含)CD200⁺、OCT-4⁺arPSC 的细胞群。在多种实施方式中,所述细胞群中至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%或至少约 60%的细胞是分离的 CD200⁺、OCT-4⁺arPSC。在另一种实施方式中,至少约 70%的所述细胞是所述分离的 CD200⁺、OCT-4⁺arPSC。在另一种实施方式中,所述细胞群中至少约 80%、90%、95%或 99%的细胞是所述分离的 CD200⁺、OCT-4⁺arPSC。在所述分离的群体的具体实施方式中,所述分离的 CD200⁺、OCT-4⁺arPSC 另外是 CD73⁺和 CD105⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD200⁺、OCT-4⁺arPSC 另外是 HLA-G⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD200⁺、OCT-4⁺arPSC 另外是 CD34⁺、CD38⁺和 CD45⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD200⁺、OCT-4⁺arPSC 另外是 CD34⁺、CD38⁺、CD45⁺、CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺。在另一种具体的实施方式中,当在允许胚状体样体形成的条件下培养时,所述细胞群产生一个或多个胚状体样体。在另一种具体的实施方式中,所述细胞群是从非分离的 CD200⁺、OCT-4⁺arPSC 的胎盘细胞中分离的。在另一种具体的实施方式中,所述细胞群是从不表现出这些标志物的胎盘细胞中分离出来的。

[0148] 在另一种实施方式中,在本文所述的方法和组合物中有用的所述分离的 arPSC 是 CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺ arPSC 另外是 CD34⁺、CD38⁺或 CD45⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、

CD105⁺、HLA-G arPSC 另外是 CD34、CD38 和 CD45。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺, HLA-G arPSC 另外是 OCT-4⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺, HLA-G arPSC 另外是 CD200⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺、HLA-G arPSC 另外是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、OCT-4⁺和 CD200⁺。在另一种具体的实施方式中,当所述群体在允许胚状体样体形成的条件下培养时,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺、HLA-G arPSC 在包含所述 arPSC 的胎盘细胞群中有利于胚状体样体的形成。在另一种具体的实施方式中,分离的 CD73⁺、CD105⁺、HLA-G arPSC 是从非分离的 CD73⁺、CD105⁺、HLA-G arPSC 的胎盘细胞分离的。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺、HLA-G arPSC 是从不表现出这些标志物的胎盘细胞中分离出来的。

[0149] 在另一种实施方式中,在本文所述的方法和组合物中有用的细胞群是包含(例如,富含)分离的 CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G arPSC 的细胞群。在多种实施方式中,所述细胞群中至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%或至少约 60%的细胞是所述分离的 CD73⁺、CD105⁺, HLA-G arPSC。在另一种实施方式中,所述细胞群中至少约 70%的细胞是分离的 CD73⁺、CD105⁺, HLA-G arPSC。在另一种实施方式中,所述细胞群中至少约 90%、95%或 99%的细胞是分离的 CD73⁺、CD105⁺、HLA-G arPSC。在上述群体的具体实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺、HLA-G arPSC 另外是 CD34、CD38 或 CD45。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺、HLA-G arPSC 另外是 CD34、CD38 和 CD45。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺、HLA-G arPSC 另外是 OCT-4⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺、HLA-G arPSC 另外是 CD200⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺、HLA-G arPSC 另外是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、OCT-4⁺和 CD200⁺。在另一种具体的实施方式中,所述细胞群是从非 CD73⁺、CD105⁺、HLA-G arPSC 的胎盘细胞中分离的。在另一种具体的实施方式中,所述细胞群是从不表现出这些标志物的胎盘细胞中分离出来的。

[0150] 在另一种实施方式中,当所述群体在允许胚状体样体形成的条件下培养时,所述分离的 arPSC 是 CD73⁺和 CD105⁺,并且在包含所述 CD73⁺、CD105⁺细胞的分离的胎盘细胞群中有利于一个或多个胚状体样体的形成。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺arPSC 另外是 CD34、CD38 或者 CD45。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺arPSC 另外是 CD34、CD38 和 CD45。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺arPSC 另外是 OCT-4⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺arPSC 另外是 OCT-4⁺、CD34、CD38 和 CD45。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺arPSC 是从非所述细胞的胎盘细胞中分离的。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺arPSC 是从不表现出这些特征的胎盘细胞中分离的。

[0151] 在另一种实施方式中,当所述群体在允许胚状体样体形成的条件下培养时,在本文所述的方法和组合物中有用的细胞群是包含(例如,富含)作为 CD73⁺、CD105⁺的分离的 arPSC 的细胞群并且在包含所述细胞的分离的胎盘细胞群中有利于一个或多个胚状体样体的形成。在多种实施方式中,所述细胞群中至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%或至少约 60%的细胞是所述分离的 CD73⁺、CD105⁺arPSC。在另一种实施方式中,所述细胞群中至少约 70%的细胞是所述分离的 CD73⁺、CD105⁺arPSC。在另一种实施方式中,所述细胞群中至少约 90%、95%或 99%的细胞是所述分离的 CD73⁺、CD105⁺arPSC。

在上述群体的具体实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺arPSC 另外是 CD34、CD38 或者 CD45。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺arPSC 另外是 CD34、CD38 和 CD45。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺arPSC 另外是 OCT-4⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺arPSC 另外是 CD200⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺arPSC 另外是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、OCT-4⁺和 CD200⁺。在另一种具体的实施方式中,所述细胞群是从非所述分离的 CD73⁺、CD105⁺arPSC 的胎盘细胞中分离的。在另一种具体的实施方式中,所述细胞群是从不表现出这些标志物的胎盘细胞中分离出来的。

[0152] 在另一种实施方式中,当所述细胞群在允许胚状体样体形成的条件下培养时,所述分离的 arPSC 是 OCT-4⁺,并且在包含所述 arPSC 的分离的胎盘细胞群中有利于一个或多个胚状体样体的形成。在具体的实施方式中,所述分离的 OCT-4⁺arPSC 另外是 CD73⁺和 CD105⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 OCT-4⁺arPSC 另外是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 OCT-4⁺arPSC 另外是 CD200⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 OCT-4⁺arPSC 另外是 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 OCT-4⁺arPSC 是从非 OCT-4⁺arPSC 的胎盘细胞分离的。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 OCT-4⁺arPSC 是从不表现出这些特征的胎盘细胞中分离的。

[0153] 在另一种实施方式中,当所述群体在允许胚状体样体形成的条件下培养时,在本文所述的方法和组合物中有用的细胞群是包含(例如,富含)作为 OCT-4⁺的分离的 arPSC 的细胞群并且在包含所述细胞的分离的胎盘细胞群中有利于一个或多个胚状体样体的形成。在多种实施方式中,所述细胞群中至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%或至少约 60%的细胞是所述分离的 OCT-4⁺arPSC。在另一种实施方式中,所述细胞群中至少约 70%的细胞是所述分离的 OCT-4⁺arPSC。在另一种实施方式中,所述细胞群中至少约 80%、90%、95%或 99%的细胞是所述分离的 OCT-4⁺arPSC。在上述群体的具体实施方式中,所述分离的 OCT-4⁺arPSC 另外是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 OCT-4⁺arPSC 另外是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 OCT-4⁺arPSC 另外是 CD73⁺和 CD105⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 OCT-4⁺arPSC 另外是 CD200⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 OCT-4⁺arPSC 另外是 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻。在另一种具体的实施方式中,所述细胞群是从非所述 arPSC 的胎盘细胞中分离的。在另一种具体的实施方式中,所述细胞群是从不表现出这些标志物的胎盘细胞中分离出来的。

[0154] 在另一种实施方式中,在本文所述的方法和组合物中有用的分离的胎盘干细胞是分离的 HLA-A, B, C⁺、CD45、CD133 和 CD34 arPSC。在另一种实施方式中,在本文所述的方法和组合物中有用的细胞群是包含分离的 arPSC 的细胞群,其中所述细胞群中至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%或至少约 99%的细胞是分离的 HLA-A, B, C⁺、CD45、CD133 和 CD34 arPSC。在具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 或分离的 arPSC 群体是从非 HLA-A, B, C⁺、CD45⁻、CD133⁻和 CD34⁻arPSC 的胎盘细胞中分离的。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 是非母体来源的。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 群体基本不含母体成分;例如,所述分离的 arPSC 群体中至少约 40%、45%、50%、55%、60%、

65%、70%、75%、90%、85%、90%、95%、98%或99%的所述细胞是非母体来源的。

[0155] 在另一种实施方式中,在本文所述的方法和组合物中有用的分离的 arPSC 是分离的 $CD10^+$ 、 $CD13^+$ 、 $CD33^+$ 、 $CD45^-$ 、 $CD117^-$ 和 $CD133^-$ arPSC。在另一种实施方式中,在本文所述的方法和组合物中有用的细胞群是包含分离的 arPSC 的细胞群,其中所述细胞群中至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%或至少约 99%的细胞是分离的 $CD10^+$ 、 $CD13^+$ 、 $CD33^+$ 、 $CD45^-$ 、 $CD117^-$ 和 $CD133^-$ arPSC。在具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 或分离的 arPSC 群体是从非所述分离的 arPSC 的胎盘细胞中分离的。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 $CD10^+$ 、 $CD13^+$ 、 $CD33^+$ 、 $CD45^-$ 、 $CD117^-$ 和 $CD133^-$ arPSC 在来源上是非母体的,即具有胎儿基因型。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 群体中至少约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、90%、85%、90%、95%、98%或99%的所述细胞在来源上是非母体的。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 或分离的 arPSC 群体是从不表现出这些特征的胎盘细胞中分离的。

[0156] 在另一种实施方式中,分离的 arPSC 是分离的 $CD10^+$ 、 $CD33^-$ 、 $CD44^+$ 、 $CD45^-$ 和 $CD117^-$ arPSC。在另一种实施方式中,在本文所述的方法和组合物中有用的细胞群是包含(例如,富含)分离的 arPSC 的细胞群,其中所述细胞群中至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%或至少约 99%的细胞是分离的 $CD10^+$ 、 $CD33^-$ 、 $CD44^+$ 、 $CD45^-$ 和 $CD117^-$ arPSC。在具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 或分离的 arPSC 群体是从非所述细胞的胎盘细胞中分离的。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 是非母体来源的。在另一种具体的实施方式中,所述细胞群中至少约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、90%、85%、90%、95%、98%或99%的所述 arPSC 在来源上是非母体的。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 或分离的 arPSC 群体是从不表现出这些标志物的胎盘细胞中分离的。

[0157] 在另一种实施方式中,在本文所述的方法和组合物中有用的分离的 arPSC 是分离的 $CD10^+$ 、 $CD13^-$ 、 $CD33^-$ 、 $CD45^-$ 和 $CD117^-$ arPSC。在另一种实施方式中,在本文所述的方法和组合物中有用的细胞群是包含(例如,富含)分离的 $CD10^+$ 、 $CD13^-$ 、 $CD33^-$ 、 $CD45^-$ 和 $CD117^-$ arPSC 的细胞群,其中所述群体中至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%或至少约 99%的细胞是 $CD10^+$ 、 $CD13^-$ 、 $CD33^-$ 、 $CD45^-$ 和 $CD117^-$ arPSC。在具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 或分离的 arPSC 群体是从非所述 arPSC 的胎盘细胞中分离的。在另一种具体的实施方式中,所述分离的胎盘细胞是非母体来源的。在另一种具体的实施方式中,所述细胞群中至少约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、90%、85%、90%、95%、98%或99%的所述细胞在来源上是非母体的。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 或分离的 arPSC 群体是从不表现出这些特征的胎盘细胞中分离的。

[0158] 在另一种实施方式中,在本文所述的方法和组合物中有用的分离的 arPSC 是 HLA A, B, C⁺、 $CD45^-$ 、 $CD34^-$ 和 $CD133^-$, 并且另外是 $CD10^+$ 、 $CD13^+$ 、 $CD38^+$ 、 $CD44^+$ 、 $CD90^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 和 / 或 HLA-G, 和 / 或对 CD117 是阴性的。在另一种实施方式中,在本文所述的方法中有用的细胞群是包含分离的 arPSC 的细胞群,其中所述群体中至少约 20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或约 99%的细胞是分离的 arPSC,所述分离的 arPSC 是 HLA A, B, C⁺、 $CD45^-$ 、 $CD34^-$ 、 $CD133^-$, 并且另外对 CD10、CD13、CD38、CD44、CD90、CD105、CD200 是阳性的,和 / 或对 CD117 和 / 或 HLA-G 是阴性的。

在具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 或分离的 arPSC 群体是从非所述 arPSC 的胎盘细胞中分离的。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 是非母体来源的。在另一种具体的实施方式中,所述细胞群中至少约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、90%、85%、90%、95%、98%或 99%的所述 arPSC 在来源上是非母体的。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 或分离的 arPSC 群体是从不表现出这些特征的胎盘细胞中分离的。

[0159] 在另一种实施方式中,分离的 arPSC 是作为 CD200⁺和 CD10⁺的分离的 arPSC,如通过抗体结合所确定的,并且是 CD117⁺,如通过抗体结合和 RT-PCR 两者所确定的。在另一种实施方式中,分离的 arPSC 是作为 CD10⁺、CD29⁻、CD54⁺、CD200⁺、HLA-G⁻、MHC I⁺型和 β -2-微球蛋白⁺的分离的胎盘干细胞。在另一种实施方式中,在本文所述的方法和组合物中有用的分离的 arPSC 是 arPSC,其中至少一种细胞标志物的表达比相同数目的间质干细胞(例如,骨髓源间质干细胞)高至少两倍。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 是非母体来源的。在另一种具体的实施方式中,所述细胞群中至少约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、90%、85%、90%、95%、98%或 99%的所述细胞在来源上是非母体的。

[0160] 在另一种实施方式中,所述分离的 arPSC 是作为 CD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD45⁻、CD54/ICAM⁺、CD62E⁻、CD62L⁻、CD62P⁻、CD80⁻、CD86⁻、CD103⁻、CD104⁻、CD105⁺、CD106/VCAM⁺、CD144/VE-钙粘素^低、CD184/CXCR4⁻、 β 2-微球蛋白^低、MHC-I^低、MHC-II⁻、HLA-G^低和/或 PDL1^低中一种或多种的分离的 arPSC。在具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 是至少 CD29⁺和 CD54⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 是至少 CD44⁺和 CD106⁺。在另一种具体的实施方式中,所述分离的 arPSC 是至少 CD29⁺。

[0161] 在另一种实施方式中,在本文所述的方法和组合物中有用的细胞群包含分离的 arPSC,并且在所述细胞群中至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或 99%的细胞是作为 CD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD45⁻、CD54/ICAM⁺、CD62-E⁻、CD62-L⁻、CD62-P⁻、CD80⁻、CD86⁻、CD103⁻、CD104⁻、CD105⁺、CD106/VCAM⁺、CD144/VE-钙粘素^{dim}、CD184/CXCR4⁻、 β 2-微球蛋白^{dim}、HLA-I^{dim}、HLA-II⁻、HLA-G^{dim}和/或 PDL1^{dim} arPSC 中的一种或多种的分离的 arPSC。在另一种具体的实施方式中,所述细胞群中至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或 99%的细胞是 CD10⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD45⁻、CD54/ICAM⁺、CD62-E⁻、CD62-L⁻、CD62-P⁻、CD80⁻、CD86⁻、CD103⁻、CD104⁻、CD105⁺、CD106/VCAM⁺、CD144/VE-钙粘素^{dim}、CD184/CXCR4⁻、 β 2-微球蛋白^{dim}、MHC-I^{dim}、MHC-II⁻、HLA-G^{dim}和 PDL1^{dim} arPSC。在某些实施方式中,当通过干扰素 γ (IFN- γ) 诱导时,arPSC 表达 HLA-II 标志物。

[0162] 在另一种实施方式中,在本文所述的方法和组合物中有用的分离的 arPSC 是作为 CD10⁺、CD29⁺、CD34⁻、CD38⁻、CD44⁺、CD45⁻、CD54⁺、CD90⁺、SH2⁺、SH3⁺、SH4⁺、SSEA3⁻、SSEA4⁻、OCT-4⁺和 ABC-p⁺中的一种或多种或者全部的分离的 arPSC,其中 ABC-p 是胎盘特异性 ABC 转运蛋白(也称为乳腺癌耐药蛋白(BCRP)或耐米托蒽醌蛋白(MXR)),其中所述分离的 arPSC 来源于通过已排出脐带血并灌注以除去残余血液的哺乳动物(例如,人)胎盘的灌注获得的胎盘干细胞。

[0163] 在任何上述实施方式的另一种具体实施方式中,通过流式细胞术确定了所列举的细胞标志物的表达(例如,分化或免疫原性标志物簇)。在另一种具体的实施方式中,通过 RT-PCR 确定标志物的表达。

[0164] 基因谱确认分离的 arPSC 和分离的 arPSC 群体与其他细胞（例如，间质干细胞，例如，骨髓源间质干细胞）是可区分的。根据一种或多种基因的表达，本文所述的分离的 arPSC 可以不同于（例如）骨髓源间质干细胞，与骨髓源间质干细胞相比，在分离的 arPSC 中所述基因的表达显著更高。具体地，根据一种或多种基因的表达，在本文提供的治疗方法中有用的分离的 arPSC 可以不同于骨髓源间质干细胞，当细胞在相同条件下生长时，在分离的 arPSC 中所述基因的表达显著高于（即至少两倍高于）相等个数的骨髓源间质干细胞中的表达，其中所述一种或多种基因包括 ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ARTS-1、B4GALT6、BCHE、C11orf9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPRC5B、ICAM1、IER3、IGFBP7、IL1A、IL6、IL18、KRT18、KRT8、LIPG、LRAP、MATN2、MEST、NFE2L3、NUAK1、PCDH7、PDLIM3、PKP2、RTN1、SERPINB9、ST3GAL6、ST6GALNAC5、SLC12A8、TCF21、TGFB2、VTN、ZC3H12A 或任何上述基因的组合。参见，例如，美国专利申请公开 No. 2007/0275362，该专利的公开内容以其全部内容作为参考并入本文。在某些具体的实施方式中，通过（例如）RT-PCR 或微阵列分析（例如，使用 U133-A 微阵列（Affymetrix））确定了所述一种或多种基因的所述表达。

[0165] 在另一种具体的实施方式中，当在包含 DMEM-LG（例如，得自 Gibco）；2% 胎牛血清（例如，得自 Hyclone Labs）；1× 胰岛素 - 转铁蛋白 - 硒（ITS）；1× 亚油酸 - 牛血清白蛋白（LA-BSA）； 10^{-9} M 地塞米松（例如，得自 Sigma）； 10^{-4} M 抗坏血酸 2- 磷酸酯（例如，得自 Sigma）；10ng/mL 表皮生长因子（例如，得自 R&D Systems）；和 10ng/mL 血小板源性生长因子（PDGF-BB）（例如，得自 R&D Systems）的培养基中培养多次群体倍增（例如，约 3 至约 35 次之间任何次数的群体倍增）时，所述分离的 arPSC 表达所述一种或多种基因。在另一种具体的实施方式中，所述胎盘细胞特异性基因是 CD200。

[0166] 这些基因的具体序列可见于 GenBank 中登录号 no. NM_001615 (ACTG2)、BC065545 (ADARB1)、(NM_181847 (AMIGO2)、AY358590 (ARTS-1)、BC074884 (B4GALT6)、BC008396 (BCHE)、BC020196 (C11orf9)、BC031103 (CD200)、NM_001845 (COL4A1)、NM_001846 (COL4A2)、BC052289 (CPA4)、BC094758 (DMD)、AF293359 (DSC3)、NM_001943 (DSG2)、AF338241 (ELOVL2)、AY336105 (F2RL1)、NM_018215 (FLJ10781)、AY416799 (GATA6)、BC075798 (GPR126)、NM_016235 (GPRC5B)、AF340038 (ICAM1)、BC000844 (IER3)、BC066339 (IGFBP7)、BC013142 (IL1A)、BT019749 (IL6)、BC007461 (IL18)、(BC072017) KRT18、BC075839 (KRT8)、BC060825 (LIPG)、BC065240 (LRAP)、BC010444 (MATN2)、BC011908 (MEST)、BC068455 (NFE2L3)、NM_014840 (NUAK1)、AB006755 (PCDH7)、NM_014476 (PDLIM3)、BC126199 (PKP-2)、BC090862 (RTN1)、BC002538 (SERPINB9)、BC023312 (ST3GAL6)、BC001201 (ST6GALNAC5)、BC126160 或 BC065328 (SLC12A8)、BC025697 (TCF21)、BC096235 (TGFB2)、BC005046 (VTN) 和 BC005001 (ZC3H12A)，到 2008 年 3 月为止。

[0167] 在某些具体的实施方式中，当细胞在相同条件下生长时，所述分离的 arPSC 以比相等个数的骨髓源间质干细胞可检测地更高的水平表达 ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ARTS-1、B4GALT6、BCHE、C11orf9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPRC5B、ICAM1、IER3、IGFBP7、IL1A、IL6、IL18、KRT18、KRT8、LIPG、LRAP、MATN2、MEST、NFE2L3、NUAK1、PCDH7、PDLIM3、PKP2、RTN1、SERPINB9、ST3GAL6、

ST6GALNAC5、SLC12A8、TCF21、TGFB2、VTN 和 ZC3H12A 中的每一个。

[0168] 在具体的实施方式中，arPSC 以比相等个数的骨髓源间质干细胞可检测地更高的水平表达 CD200 和 ARTS1 (1 型肿瘤坏死因子氨肽酶调控因子)、ARTS-1 和 LRAP (白血球源性精氨酸氨肽酶); IL6 (白介素 -6) 和 TGFB2 (转化生长因子, β 2); IL6 和 KRT18 (角蛋白 18); IER3 (即刻早期反应蛋白 3)、MEST (中胚层特异性转录本同源物) 和 TGFB2; CD200 和 IER3; CD200 和 IL6; CD200 和 KRT18; CD200 和 LRAP; CD200 和 MEST; CD200 和 NFE2L3 (核因子 (红细胞来源 2) - 样 3) 或者 CD200 和 TGFB2, 其中所述骨髓源间质干细胞在培养中经历了与所述分离的胎盘干细胞所经历的传代次数相等的传代次数。在其他具体的实施方式中, 所述 arPSC 以比相同个数的骨髓源间质干细胞可检测更高的水平表达 ARTS-1、CD200、IL6 和 LRAP; ARTS-1、IL6、TGFB2、IER3、KRT18 和 MEST; CD200、IER3、IL6、KRT18、LRAP、MEST、NFE2L3 和 TGFB2; ARTS-1、CD200、IER3、IL6、KRT18、LRAP、MEST、NFE2L3 和 TGFB2; 或 IER3、MEST 和 TGFB2, 其中在培养中所述骨髓源间质干细胞经历了与所述分离的 arPSC 所经历的传代次数相等的传代次数。

[0169] 可以通过标准技术评价上述提及的基因的表达。例如, 可以通过常规方法分别选择并构建基于所述基因序列的探针。可以在 (例如) 包含一种或多种基因的探针的微阵列 (例如, Affymetrix GENECHIP 人基因组 U133A 2.0 阵列或 Affymetrix GENECHIP 人基因组 U133 Plus 2.0 (Santa Clara, California)) 上评价基因的表达。由于可以使用众所周知的标准技术容易地产生对修改的序列特异的探针, 因此即使特定 GenBank 登录号的序列被修改, 但仍可以评价这些基因的表达。

[0170] 这些基因的表达水平可用于确认分离的 arPSC 群体的身份, 以将细胞群鉴别为包含至少多个分离的 arPSC 等。身份确认的分离的 arPSC 群体可以是无性系的, 例如, 分离的 arPSC 群体是从单个分离的 arPSC 或 arPSC 的混合群体扩增的, 所述混合群体例如, 包含从多个分离的 arPSC 扩增的分离的 arPSC 的细胞群, 或者包含如本文所述的分离的 arPSC 和至少一种其他类型细胞的细胞群。

[0171] 这些基因的表达水平可用于选择分离的 arPSC 群体。例如, 如果在来自细胞群的样品中以上所列的一种或多种基因的表达显著高于相等骨髓源间质干细胞群中的表达, 则可以选择细胞群, 例如, 克隆扩增的 arPSC。这种选择可以是来自多个分离的 arPSC 群体, 来自身份未知的多个细胞群等的群体。

[0172] 与 (例如) 骨髓源间质干细胞对照中所述一种或多种基因的表达水平相比, 可以根据一种或多种这类基因的表达水平选择分离的 arPSC。在一种实施方式中, 将包含相等个数的骨髓源间质干细胞的样品中所述一种或多种基因的表达水平用作对照。在另一种实施方式中, 在一定条件下测试的分离的 arPSC 的对照是表示在所述条件下骨髓源间质干细胞中所述一种或多种基因的表达水平的数值。

[0173] 类似地, 失巢凋亡相关基因的表达可用于选择分离的 arPSC 群体。例如, 如果在来自细胞群的样品中一种或多种失巢凋亡相关基因 (例如, 本文所述的一种或多种失巢凋亡相关基因) 的表达相对于等价的未修饰的胎盘干细胞群减少, 则可以选择细胞群, 例如, 克隆扩增的 arPSC。

[0174] 本文所述的分离的 arPSC 在原代培养中或者在包含 (例如) DMEM-LG (Gibco)、2% 胎牛血清 (FCS) (Hyclone Laboratories)、 $1\times$ 胰岛素 - 转铁蛋白 - 硒 (ITS)、 $1\times$ 亚油

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)、10ng/ml 表皮生长因子 (EGF) (R&D Systems)、10ng/ml 血小板源性生长因子 (PDGF-BB) (R&D Systems) 和 100U 青霉素 /1000U 链霉素的培养基中增殖期间显示出上述特征 (例如, 细胞表面标志物和 / 或基因表达谱的组合)。

[0175] 在本文所公开的任何 arPSC 的某些实施方式中, 所述细胞是人细胞。在本文所公开的任何 arPSC 的某些实施方式中, 所述细胞标志物特征或基因表达特征是人标志物或人基因。

[0176] 在所述分离的 arPSC 或包含所述分离的 arPSC 的细胞群的另一种具体的实施方式中, 所述细胞或群体已扩增 (例如) 传代了至少, 约或不超过 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 次, 或者增殖了至少, 约或者不超过 1、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 次群体倍增。在所述分离的 arPSC 或包含所述分离的 arPSC 的细胞群的另一种具体的实施方式中, 所述细胞或群体是原代分离物。在分离的 arPSC 或包含本文所公开的分离的 arPSC 的细胞群的另一种具体的实施方式中, 所述分离的 arPSC 在来源上是胎儿的 (即, 具有胎儿的基因型)。

[0177] 在某些实施方式中, 所述分离的 arPSC 在生长培养基 (即, 配制以促进增殖的培养基) 中培养期间 (例如, 在生长培养基中增殖期间) 不分化。在另一种具体的实施方式中, 所述分离的 arPSC 不需要饲养层来增殖。在另一种具体的实施方式中, 仅由于饲养细胞层的缺少, 所述分离的 arPSC 在不存在饲养层的情况下培养时不分化。

[0178] 在另一种实施方式中, 所述分离的 arPSC 对醛脱氢酶 (ALDH) 是阳性的, 如通过醛脱氢酶活性测定所评价的。这些测定是本领域中已知的 (参见, 例如, Bostian 和 Betts, Biochem. J., 173, 787, (1978))。在具体的实施方式中, 所述 ALDH 测定使用 ALDEFLUOR (Aldagen, Inc., Ashland, Oregon) 作为醛脱氢酶活性的标志物。在具体的实施方式中, 约 3% 至约 25% 的 arPSC 对 ALDH 是阳性的。在另一种实施方式中, 所述分离的 arPSC 显示出比具有大致相同细胞个数并且在相同条件下培养的骨髓源间质干细胞群高至少三倍或至少五倍的 ALDH 活性。

[0179] 在包含本文所述的分离的 arPSC 的任何细胞群的某些实施方式中, 所述细胞群中的 arPSC 基本不含具有母体基因型的细胞; 例如, 所述群体中至少 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 的 arPSC 具有胎儿基因型。在包含本文所述的分离的 arPSC 的任何细胞群的某些其他实施方式中, 包含所述 arPSC 的细胞群基本不含具有母体基因型的细胞; 例如, 所述群体中至少 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 的细胞具有胎儿基因型。

[0180] 在任何上述分离的 arPSC 或包含分离的 arPSC 的细胞群的具体实施方式中, 细胞 (例如, 所述群体中所有细胞或至少约 95% 或约 99% 的细胞) 的染色体组型是正常的。在任何上述 arPSC 或群体或 arPSC 的另一种具体实施方式中, 所述 arPSC 是非母体来源的。

[0181] 在本文所公开的胎盘细胞的任何实施方式的具体实施方式中, 所述胎盘细胞是遗传稳定的, 其显示出正常的二倍体染色体数和正常的染色体组型。

[0182] 可以将具有任何上述标志物组合的分离的 arPSC 或分离的 arPSC 群体以任何比例混合。可以将任何两种或更多种上述分离的 arPSC 群体混合以形成分离的 arPSC 群体。例如, 分离的 arPSC 群体可以包含由如上所述的标志物组合之一所定义的第一分离的 arPSC

群体和由如上所述的标志物组合的另一个所定义的第二分离的 arPSC 群体,其中所述第一和第二群体以约 1:99、2:98、3:97、4:96、5:95、10:90、20:80、30:70、40:60、50:50、60:40、70:30、80:20、90:10、95:5、96:4、97:3、98:2 或约 99:1 的比值混合。以类似的方式,可以将任何三种、四种、五种或更多种上述分离的 arPSC 或分离的胎盘干细胞群混合。

[0183] 可以(例如)使用或不使用酶促消化或灌注通过胎盘组织的破坏获得在用于产生本文所述的 arPSC 的方法中有用的分离的胎盘干细胞。例如,可以根据以下方法产生分离的胎盘干细胞群,所述方法包括灌注已排出脐带血并灌注以除去残余血液的哺乳动物胎盘;用灌注溶液灌注所述胎盘;和收集所述灌注溶液,其中灌注后的所述灌注溶液包含含有分离的胎盘干细胞的胎盘细胞群;和从所述细胞群分离所述胎盘干细胞。在具体的实施方式中,将灌注溶液通过脐静脉和脐动脉并在其从胎盘流出后收集。在另一种具体的实施方式中,将灌注溶液通过脐静脉并从脐动脉收集,或者通过脐动脉并从脐静脉收集。

[0184] 在多种实施方式中,包含在得自胎盘灌注的细胞群内在用于产生本文所述的 arPSC 的方法中有用的分离的胎盘干细胞是所述胎盘干细胞群的至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或至少 99.5%。在另一种具体的实施方式中,通过灌注收集的分离的胎盘干细胞包含胎儿细胞和母细胞。在另一种具体的实施方式中,通过灌注收集的分离的胎盘干细胞是至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或至少 99.5%的胎儿细胞。

[0185] 在另一种具体的实施方式中,本文提供了包含通过灌注收集(分离)的在用于产生本文所述的 arPSC 的方法中有用的分离的胎盘干细胞群的组合物,其中所述组合物包含用于分离所述胎盘干细胞的灌注溶液的至少一部分。

[0186] 可以通过以下方法产生在用于产生本文所述的 arPSC 的方法中有用的分离的胎盘干细胞群:用组织破坏酶消化胎盘组织以获得包含胎盘干细胞的胎盘细胞群,和从所述胎盘细胞的剩余物中分离或基本分离多个胎盘干细胞。可以将全部或任何部分的胎盘消化以获得本文所述的分离的胎盘干细胞。在具体的实施方式中,例如,所述胎盘组织可以是整个胎盘(例如,包括脐带)、羊膜、绒毛膜、羊膜和绒毛膜的组合,或任何上述的组合。在其他具体的实施方式中,所述组织破坏酶是胰蛋白酶或胶原酶。在多种实施方式中,包含在得自胎盘消化的细胞群内的所述分离的胎盘干细胞是所述胎盘细胞群的至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或至少 99.5%。

[0187] 如上所述的分离的 arPSC 群体和分离的 arPSC 群体一般可以包含约、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} 或更多个分离的 arPSC。在本文所述的方法和组合物中有用的分离的 arPSC 群体包含至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或 99%的活的分离的胎盘干细胞,例如,如通过(例如)台盼蓝排阻法所确定的。

[0188] 对于任何上述胎盘干细胞或胎盘干细胞群(例如,在产生本文所述的 arPSC 的方法中有用的未修饰的胎盘干细胞或本文所述的 arPSC 或其组合物),所述细胞或胎盘干细胞群为或者可以包含已传代至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18 或 20 次或扩增 1、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 次群体倍增或更多次群体倍增的细胞。

[0189] 在任何上述胎盘干细胞或胎盘干细胞群(例如,在产生本文所述的 arPSC 的方法中有用的未修饰的胎盘干细胞,或本文所述的 arPSC,或其组合物)的具体实施方式中,所

述群体中细胞或至少约 95%或约 99%的细胞的染色体组型是正常的。在任何上述胎盘干细胞或胎盘干细胞群（例如，在产生本文所述的 arPSC 的方法中有用的未修饰的胎盘干细胞，或本文所述的 arPSC，或其组合物）的另一种具体实施方式中，所述细胞或细胞群中的细胞是非母体来源的。

[0190] 具有任何上述标志物组合的分离的胎盘干细胞或分离的胎盘干细胞群（例如，在产生本文所述的 arPSC 的方法中有用的未修饰的胎盘干细胞或本文所述的 arPSC 或其组合物）可以任何比例混合。可以将任何两种或更多种上述胎盘干细胞群分离或富集以形成胎盘干细胞群。例如，包含由如上所述的标志物组合之一所定义的第一胎盘干细胞群的分离的胎盘干细胞群可以与由如上所述的标志物组合的另一个所定义的第二胎盘干细胞群混合，其中所述第一和第二群体以约 1:99、2:98、3:97、4:96、5:95、10:90、20:80、30:70、40:60、50:50、60:40、70:30、80:20、90:10、95:5、96:4、97:3、98:2 或约 99:1 的比值混合。以类似的方式，可以将任何三种、四种、五种或更多种上述胎盘干细胞或胎盘干细胞群混合。

[0191] 在上述胎盘干细胞（例如，在产生本文所述的 arPSC 的方法中有用的未修饰的胎盘干细胞或本文所述的 arPSC 或其组合物）的具体实施方式中，所述胎盘干细胞组成性地分泌 IL-6、IL-8 和单核细胞化学引诱蛋白（MCP-1）。

[0192] 如上所述的多种免疫抑制性 arPSC 可以包含约、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 arPSC。

[0193] 在某些实施方式中，在暴露于 1 至 100ng/mL VEGF 4 至 21 天后，在本文所提供的方法中有用的 arPSC 不表达 CD34，如通过免疫定位所检测的。在另一种具体的实施方式中，例如，当在（例如）基底（如 MATRIGEL）上，在存在血管生成因子，如血管内皮生长因子（VEGF）、上皮生长因子（EGF）、血小板源生长因子（PDGF）或碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）的情况下培养时，所述 arPSC 诱导内皮细胞形成芽或管样结构。

[0194] 在另一个方面，本文所提供的 arPSC 或细胞群（例如，arPSC 群体）或所述细胞群中至少约 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 98% 的细胞是 arPSC 的细胞群将 VEGF、HGF、IL-8、MCP-3、FGF2、卵泡抑素、G-CSF、EGF、ENA-78、GRO、IL-6、MCP-1、PDGF-BB、TIMP-2、uPAR 或半乳凝素-1 中的一种或多种或全部分泌到（例如）所述细胞生长的培养基中。在另一种实施方式中，与含氧量正常的情况（例如，约 20% 或约 21% 的 O_2 ）相比，arPSC 在低含氧量（例如，小于约 5% 的 O_2 ）的情况下表达较高水平的 CD202b、IL-8 和 / 或 VEGF。

[0195] 在另一种实施方式中，任何本文所述的 arPSC 或包含 arPSC 的细胞群可以导致在与所述 arPSC 接触的内皮细胞群中形成芽或管样结构。在具体的实施方式中，例如，当在存在细胞外基质蛋白（如 I 型和 IV 型胶原）和 / 或血管生成因子（如血管内皮生长因子（VEGF）、上皮生长因子（EGF）、血小板源生长因子（PDGF）或碱性成纤维细胞生长因子（bFGF））的情况下在（例如）如胎盘胶原或 MATRIGEL™ 的基质中或上培养至少 4 天时，所述 arPSC 与人内皮细胞共培养，从而形成芽或管样结构或支持内皮细胞芽的形成。在另一种实施方式中，当在存在细胞外基质蛋白（如 I 型或 IV 型胶原）的情况下在（例如）基质（如胎盘胶原或 MATRIGEL™）中或上培养时，本文所述的包含 arPSC 的任何细胞群分泌血管生成因子，如血管内皮生长因子（VEGF）、肝细胞生长因子（HGF）、血小板源生长因子（PDGF）、碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）或白细胞介素-8（IL-8）并借此可以诱导人内皮细胞形成芽

或管样结构。

[0196] 在另一种实施方式中,包含 arPSC 的任何上述细胞群分泌血管生成因子。在具体的实施方式中,所述细胞群分泌血管内皮生长因子 (VEGF)、肝细胞生长因子 (HGF)、血小板源生长因子 (PDGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和 / 或白细胞介素 -8 (IL-8)。在其他具体的实施方式中,包含 arPSC 的细胞群分泌一种或多种血管生成因子并借此诱导人内皮细胞在体外伤口愈合测定中的迁移。在其他具体的实施方式中,包含 arPSC 的细胞群诱导人内皮细胞、内皮祖细胞、肌细胞或成肌细胞的成熟、分化或增殖。

[0197] 在另一种实施方式中,本文提供了 arPSC 和 arPSC 的群体,其中所述 arPSC 包含任何上述特性 (例如,为 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺和 CD200⁺),并且其中相对于相等个数的未修饰的胎盘干细胞 (例如,CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺和 CD200⁺未修饰的胎盘干细胞) 中所述失巢凋亡相关基因的表达水平,所述 arPSC 中至少一种失巢凋亡相关基因下调 / 抑制。在具体的实施方式中,所述至少一种失巢凋亡相关基因为 AMIGO1 (NCBI GENE ID NO:57463); ARHGAP20 (NCBI GENE ID NO:57569); CD38 (NCBI GENE ID NO:952); CLCC1 (NCBI GENE ID NO:23155); CNTF (NCBI GENE ID NO:1270); ZFP91-CNTF (NCBI GENE ID NO:386607); COX8A (NCBI GENE ID NO:1351); DHX34 (NCBI GENE ID NO:9704); FAM175A (NCBI GENE ID NO:NO 51023); MRPS18C (NCBI GENE ID NO:84142); FAM44C (NCBI GENE ID NO:284257); FBP2 (NCBI GENE ID NO:8789); FLI1 (NCBI GENE ID NO:2313); FREM3 (NCBI GENE ID NO:166752); IFIT5 (NCBI GENE ID NO:24138); LOC399851 (NCBI GENE ID NO:399851); LOC400713 (NCBI GENE ID NO:400713); LOC651610 (NCBI GENE ID NO:651610); PIGP (NCBI GENE ID NO:51227); SH3TC2 (NCBI GENE ID NO:79628); SLC2A3 (NCBI GENE ID NO:6515); STAU2 (NCBI GENE ID NO:27067); TMEFF1 (NCBI GENE ID NO:8577); TMEM217 (NCBI GENE ID NO:221468); TMEM79 (NCBI GENE ID NO:84283); USHBP1 (NCBI GENE ID NO:83878); APH1B (NCBI GENE ID NO:83464); ATP2B2 (NCBI GENE ID NO:491); C13orf39 (NCBI GENE ID NO:196541); C4orf17 (NCBI GENE ID NO:84103); C4orf46 (NCBI GENE ID NO:201725); DDX41 (NCBI GENE ID NO:51428); DKFZp547J222 (NCBI GENE ID NO:84237); FGFR1 (NCBI GENE ID NO:2260); FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462); GNAI2 (NCBI GENE ID NO:2771); GP5 (NCBI GENE ID NO:2814); IL1RN (NCBI GENE ID NO:3557); KIF24 (NCBI GENE ID NO:347240); KNDC1 (NCBI GENE ID NO:85442); LOC100132598 (NCBI GENE ID NO:100132598); LOC151760 (NCBI GENE ID NO:151760); LOC152024 (NCBI GENE ID NO:152024); LOC339833 (NCBI GENE ID NO:339833); LPAR4 (NCBI GENE ID NO:2846); LSG1 (NCBI GENE ID NO:55341); MAP3K5 (NCBI GENE ID NO:4217); PDK3 (NCBI GENE ID NO:5165); PELI2 (NCBI GENE ID NO:57161); RNF103 (NCBI GENE ID NO:7844); SNX31 (NCBI GENE ID NO:169166); TXN2 (NCBI GENE ID NO:25828); 或 XKR7 (NCBI GENE ID NO:343702)。在具体的实施方式中,相对于相等数目的未修饰的胎盘干细胞 (例如,CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺和 CD200⁺未修饰的胎盘干细胞) 中所述失巢凋亡相关基因的表达水平,2、3、4、5、6、7、8、9、10 或大于 10 个所述失巢凋亡相关基因下调 / 抑制。

[0198] 在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺和 CD200⁺arPSC,其中与未修饰的胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因 FHDC1 (NCBI GENE ID NO:85462) 的表达相比,所述 arPSC 以降低的水平表达失巢凋亡相关基因 FHDC1 (NCBI

GENE ID NO:85462)。在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺和 CD200⁺arPSC,其中与未修饰的胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因 GNAI2(NCBI GENE ID NO:2771) 的表达相比,所述 arPSC 以降低的水平表达失巢凋亡相关基因 GNAI2(NCBI GENE ID NO:2771)。在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺和 CD200⁺arPSC,其中与未修饰的胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因 KNDC1(NCBI GENE ID NO:85442) 的表达相比,所述 arPSC 以降低的水平表达失巢凋亡相关基因 KNDC1(NCBI GENE ID NO:85442)。在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺和 CD200⁺arPSC,其中与未修饰的胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因 LPAR4(NCBI GENE ID NO:2846) 的表达相比,所述 arPSC 以降低的水平表达失巢凋亡相关基因 LPAR4(NCBI GENE ID NO:2846)。在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺和 CD200⁺arPSC,其中与未修饰的胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因 MAP3K5(NCBI GENE ID NO:4217) 的表达相比,所述 arPSC 以降低的水平表达失巢凋亡相关基因 MAP3K5(NCBI GENE ID NO:4217)。在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺和 CD200⁺arPSC,其中与未修饰的胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因 SLC2A3(NCBI GENE ID NO:6515) 的表达相比,所述 arPSC 以降低的水平表达失巢凋亡相关基因 SLC2A3(NCBI GENE ID NO:6515)。在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺和 CD200⁺arPSC,其中与未修饰的胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因 STAU2(NCBI GENE ID NO:27067) 的表达相比,所述 arPSC 以降低的水平表达失巢凋亡相关基因 STAU2(NCBI GENE ID NO:27067)。本文还提供了包含这些 arPSC 的细胞群和包含这些 arPSC 的组合物。

[0199] 在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺和 CD200⁺arPSC,其中与未修饰的胎盘干细胞中相同失巢凋亡相关基因的表达相比,所述 arPSC 以降低的水平表达以下胎盘干细胞失巢凋亡-相关基因中的 1、2、3 或更多个: FHDC1(NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2(NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1(NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4(NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5(NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3(NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2(NCBI GENE ID NO:27067)。在另一种具体的实施方式中,本文提供了分离的 CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺和 CD200⁺arPSC,其中与未修饰的胎盘干细胞中相同失巢凋亡相关基因的表达相比,(i) 所述 arPSC 以降低的水平表达以下胎盘干细胞失巢凋亡-相关基因中的 1、2、3 或更多个: FHDC1(NCBI GENE ID NO:85462)、GNAI2(NCBI GENE ID NO:2771)、KNDC1(NCBI GENE ID NO:85442)、LPAR4(NCBI GENE ID NO:2846)、MAP3K5(NCBI GENE ID NO:4217)、SLC2A3(NCBI GENE ID NO:6515) 和 STAU2(NCBI GENE ID NO:27067); 和 (ii) 与未修饰的胎盘干细胞中相同失巢凋亡相关基因的表达相比,以降低的水平表达表 1 中所列的至少一种其他失巢凋亡相关基因。本文还提供了包含这些 arPSC 的细胞群和包含这些 arPSC 的组合物。

[0200] 5.3.3 培养中的生长

[0201] 就任何哺乳动物细胞而言,胎盘细胞(包括本文所述的 arPSC) 的生长部分取决于选择用于生长的特定培养基。在培养期间,在培养中在本文所提供的 arPSC 的生产方法中使用的胎盘干细胞贴壁至基底上,例如,组织培养容器(例如,塑料组织培养皿、纤连蛋白涂覆的塑料制品等)的表面上,并且形成单层。在不存在胎盘干细胞贴壁的基底的情况下(例如,在低贴壁条件下),胎盘干细胞经历失巢凋亡并显示出降低的存活。相反,在不存在

arPSC 贴壁的基底的情况下（例如，低贴壁条件下），本文所述的 arPSC 不经历失巢凋亡，并因此相对于未修饰的胎盘干细胞，在这些条件下显示出提高的存活。

[0202] 在具体的实施方式中，当在体外低贴壁条件下培养时，例如，当在低贴壁组织培养板中培养时，相对于未修饰的胎盘干细胞，本文所述的 arPSC 显示出提高的存活。在另一种具体的实施方式中，当在体外低贴壁条件下培养时，例如，当全身或局部施用于受试者时，或者通过其中在低贴壁环境中施用细胞的另一种施用方法，相对于未修饰的胎盘干细胞，本文所述的 arPSC 显示出提高的存活。

[0203] 在某些实施方式中，当在低贴壁条件下培养时（体外或体内），相对于在相同条件下培养的相等个数的未修饰的胎盘干细胞，本文所述的 arPSC 的存活显示出至少 1.5 倍、2 倍、2.5 倍、3 倍、3.5 倍、4 倍、4.5 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍或 10 倍的提高。在某些实施方式中，当在低贴壁条件下培养时（体外或体内），相对于相同条件下培养的相等量的未修饰的胎盘干细胞，本文所述的 arPSC 的存活显示出 1.5 倍至 2.5 倍、2 倍至 3 倍、2.5 倍至 3.5 倍、3 倍至 4 倍、3.5 倍至 4.5 倍、4 倍至 5 倍、5 倍至 6 倍、6 倍至 7 倍、7 倍至 8 倍、8 倍至 9 倍或 9 倍至 10 倍的提高。在另一种具体的实施方式中，当在低贴壁条件下培养时（体外或体内），相对于在相同条件下培养的相等量的未修饰的胎盘干细胞，本文所述的 arPSC 的存活显示出大于 10 倍的提高。可以使用本领域中已知的方法评价 arPSC 和未修饰的胎盘干细胞的存活，例如，台盼蓝拒染测定、荧光素二乙酸酯吸收测定、碘化丙啶吸收测定；胸苷吸收测定和 MTT (3-(4, 5-二甲基噻唑-2-基)-2, 5-二苯四唑溴化物) 测定。

[0204] 5.4 获得在产生抗失巢凋亡的胎盘干细胞的方法中使用的胎盘干细胞的方法

[0205] 5.4.1 干细胞收集组合物

[0206] 可以根据本文所提供的方法收集和分离在产生本文所述的 arPSC 的方法中使用的胎盘干细胞。一般地，胎盘干细胞是使用生理学可用的溶液（例如，干细胞收集组合物）从哺乳动物胎盘获得的。在相关美国专利申请公开 No. 20070190042 中详细描述了干细胞收集组合物。

[0207] 干细胞收集组合物可以包括适合于干细胞的收集和 / 或培养的任何生理学可用的溶液，例如，盐溶液（例如，磷酸盐缓冲盐水、克氏液、改良的克氏液、伊格尔氏溶液、0.9% NaCl 等）、培养基（例如，DMEM、HDMEM 等）等。

[0208] 干细胞收集组合物可以包含趋于维持胎盘干细胞的一种或多种成分，即在从收集到培养期间防止胎盘干细胞死亡或延缓胎盘干细胞死亡、减少细胞种群中死亡的胎盘干细胞的数目等。这些成分可以是（例如）细胞凋亡抑制剂（例如，半胱天冬氨酸酶抑制剂或 JNK 抑制剂）；血管扩张剂（例如，硫酸镁、抗高血压药、心房钠尿肽 (ANP)、促肾上腺皮质激素、促肾上腺皮质激素释放激素、硝普钠、胍屈嗪、三磷酸腺苷、腺苷、吡咯美辛或硫酸镁、磷酸二酯酶抑制剂等）；坏死抑制剂（例如，2-(1H-吡咯-3-基)-3-戊基氨基-马来酰亚胺、吡咯烷二硫代氨基甲酸盐或氯硝西洋）；TNF- α 抑制剂；和 / 或携氧全氟化碳（例如，全氟溴辛烷、全氟溴癸烷等）。

[0209] 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、核糖核酸酶或脱氧核糖核酸酶等。这些酶包括（但不限于）胶原酶（例如，胶原酶 I、II、III 或 IV，来自溶组织梭状芽孢杆菌 (*Clostridium histolyticum*) 的胶原酶等）；分散酶、嗜热菌蛋白酶、弹性酶、胰蛋白酶、释放酶、玻璃酸酶等。

[0210] 干细胞收集组合物可以包含杀菌或细菌抑制有效量的抗生素。在某些非限制性实施方式中,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、环己烯胺头孢菌素、头孢呋辛、头孢丙烯、头孢克洛、头孢克肟或头孢羟氨苄)、克拉霉素、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。在具体的实施方式中,所述抗生素对革兰氏(+)和/或革兰氏(-)细菌是有活性的,例如,铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等。

[0211] 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 1mM 至约 50mM); D-葡萄糖(约 20mM 至约 100mM);镁离子(约 1mM 至约 50mM);分子量大于 20000 道尔顿的大分子,在一种实施方式中,其以足以维持内皮完整性和细胞活力的量存在(例如,合成或天然存在的胶体,如葡聚糖的多糖或聚乙二醇,其以约 25g/l 至约 100g/l 或者约 40g/l 至约 60g/l 存在);抗氧化剂(例如,丁基羟基苯甲醚、丁基化羟基甲苯、谷胱甘肽、维生素 C 或维生素 E,其以约 25 μ M 至约 100 μ M 存在);还原剂(例如,以约 0.1 μ M 至约 5 μ M 存在的 N-乙酰半胱氨酸);防止钙进入细胞的试剂(例如,以约 2 μ M 至约 25 μ M 存在的维拉帕米);硝酸甘油(例如,约 0.05g/L 至约 0.2g/L);抗凝血剂,在一种实施方式中,其以足以防止残余血液凝固的量存在(例如,以约 1000 单位/l 至约 100000 单位/l 的浓度存在的肝素或水蛭素);或者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、六亚甲基阿米洛利、二甲基阿米洛利或异丁基阿米洛利,其以约 1.0 μ M 至约 5 μ M 存在)。

[0212] 5.4.2 胎盘的收集和处理

[0213] 一般地,在分娩后胎盘去除后不久回收人胎盘。在优选的实施方式中,在知情同意后并且在获得患者的完整病历并且该病历与胎盘有关后从患者回收胎盘。优选地,病历在产后继续。该病历可用于配合由此收获的胎盘或干细胞的后继使用。例如,根据病历,人胎盘细胞可用于与胎盘有关的婴儿或者婴儿的父母、兄弟或其他亲属的个人化医学。

[0214] 在回收胎盘干细胞前,除去脐带血和胎盘血。在某些实施方式中,产后回收胎盘中的脐带血。可以对胎盘进行常规脐带血回收过程。通常,借助于重力使用针或插管对胎盘抽血(参见,例如,Anderson, 美国专利 No. 5372581;Hessel 等人, 美国专利 No. 5415665)。通常将针或插管置于脐静脉中,并且可以轻轻地按摩胎盘以帮助从胎盘中排出脐带血。可以通过商业进行这种脐带血回收,例如,LifeBank Inc., Cedar Knolls, N. J., ViaCord, Cord Blood Registry and Cryocell。优选地,将胎盘重力放血而无需其他操作从而使脐带血回收期间的组织破坏程度最小。

[0215] 通常,将胎盘从分娩或生产房间输送到另一个位置(例如,实验室)以用于通过(例如)灌注或组织解离用于回收脐带血和收集胎盘干细胞。优选地,将胎盘在无菌、隔热的输送装置(将胎盘温度维持在 20-28°C 之间)中输送,例如,通过将近端脐带夹紧的胎盘置于无菌自封塑料袋中,然后置于保温容器中。在另一种实施方式中,在基本如 2005 年 9 月 19 日提交的未决美国专利申请 No. 11/230760 中所述的脐带血收集试剂盒中输送胎盘。优选地,在分娩后的 4 至 24 小时将胎盘输送到实验室。在某些实施方式中,在脐带血回收之前将近端脐带夹紧,优选地,在胎盘中插入的 4-5cm(厘米)内。在其他实施方式中,在脐带血回收后但在胎盘的其他处理前将近端脐带夹紧。

[0216] 在胎盘干细胞收集前,可以将胎盘储存在无菌条件下和室温或 5°C 至 25°C(摄氏

度)的温度下。在灌注胎盘以除去任何残留脐带血之前,可以将胎盘储存大于 48 小时的一段时间,并且优选地储存 4 至 24 小时的一段时间。优选地,将胎盘在 5℃至 25℃(摄氏度)的温度下储存在抗凝剂溶液中。适合的抗凝剂溶液在本领域中是熟知的。例如,可以使用肝素或华法令钠溶液。在优选的实施方式中,所述抗凝剂溶液包括肝素溶液(例如,1:1000 溶液中的 1% (w/w))。优选地,在收集胎盘细胞之前将放血的胎盘储存不超过 36 小时。

[0217] 一旦一般地如上所述收集并制备,则可以采用任何本领域已知的方式(例如,可以灌注或破坏,例如,用一种或多种组织破坏酶消化)处理哺乳动物胎盘或其部分以获得干细胞。

[0218] 5.4.3 胎盘的物理破坏和酶促消化

[0219] 在一种实施方式中,使用(例如)如上所述的干细胞收集组合物,通过器官物理破坏(例如,酶促消化)从哺乳动物胎盘收集胎盘干细胞。例如,可以在与(例如)缓冲液、培养基或干细胞收集组合物接触的同时,例如,将胎盘或其部分挤压、剪切、剁碎、切块、切碎、浸软等,并且随后用一种或多种酶消化组织。还可以将胎盘或其部分物理破坏并用一种或多种酶水解,并且然后将所得材料浸没或混合到缓冲液,培养基或干细胞收集组合物中。可以使用任何物理破坏方法,但前提条件是所述破坏方法在所述器官中留下多个,更优选地大多数,并且更优选地至少 60%、70%、80%、90%、95%、98%或 99%的活细胞,如通过(例如)台盼蓝排阻法所确定的。

[0220] 通常,可以通过小块胎盘组织(例如,体积为约 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 立方毫米的胎盘组织块)的破坏获得胎盘细胞。

[0221] 可以使用单个酶或酶组合进行酶促消化。在一种实施方式中,胎盘组织的酶促消化使用了基质金属蛋白酶、中性蛋白酶和用于透明质酸消化的粘多糖酶的组合物,如胶原酶、分散酶和玻璃酸酶的组合物或者释放酶(Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind.)和玻璃酸酶的组合物。可以用于破坏胎盘组织的其他酶包括木瓜蛋白酶、脱氧核糖核酸酶、丝氨酸蛋白酶,如胰蛋白酶、糜蛋白酶或弹性酶。可以通过血清中的 $\alpha 2$ 微球蛋白抑制丝氨酸蛋白酶,并因此用于消化的培养基通常是不含血清的。通常在酶消化程序中使用 EDTA 和脱氧核糖核酸酶以提高细胞回收的效率。优选地,稀释消化物以避免将干细胞限制在粘稠的消化液内。

[0222] 用于组织消化酶的典型浓度包括(例如)对于胶原酶 I 和胶原酶 IV 的 50-200U/mL,对于分散酶的 1-10U/mL 和对于弹性酶的 10-100U/mL。蛋白酶可以组合使用,即在相同消化反应中使用两种或更多种蛋白酶,或者可以顺序使用以释放胎盘细胞。例如,在一种实施方式中,首先用 2mg/ml 的适量的胶原酶 I 将胎盘或其部分消化 30 分钟,然后以 0.25% 的浓度使用胰蛋白酶在 37℃消化 10 分钟。优选地,在使用其他酶之后,连续使用丝氨酸蛋白酶。

[0223] 在另一种实施方式中,还可以通过将螯合剂(例如,乙二醇双(2-氨基乙醚)-N,N',N'-四乙酸(EGTA)或乙二胺四乙酸(EDTA))加入至包含干细胞的干细胞收集组合物中,或者加入到其中在胎盘干细胞的分离之前用干细胞收集组合物破坏和/或消化组织的溶液中来破坏组织。

[0224] 将理解当将包含胎儿和母体细胞两者(例如,当胎盘的一部分包含绒毛膜或绒毛

叶时) 的整个胎盘或胎盘的一部分消化以获得胎盘干细胞时, 所收集的胎盘细胞将包含来源于胎儿和母体来源两者的胎盘细胞的混合。当不包含或包含个数可忽略的母体细胞(例如, 羊膜) 的胎盘部分用于获得胎盘干细胞时, 所收集的胎盘干细胞将包含几乎只有胎儿胎盘干细胞。

[0225] 5.4.4 胎盘灌注

[0226] 还可以通过哺乳动物胎盘灌注获得胎盘干细胞。例如, 在 Hariri, 美国专利申请公开 No. 2002/0123141 以及 2005 年 12 月 29 日提交的题目为“用于收集和保存胎盘细胞的改善的组合物以及使用所述组合物的方法”的相关美国临时专利申请 No. 60/754969 中公开了灌注哺乳动物胎盘以获得干细胞的方法。

[0227] 可以通过使用(例如) 干细胞收集组合物作为灌注溶液(例如) 通过胎盘脉管系统灌注来收集胎盘干细胞。在一种实施方式中, 通过将灌注溶液通过脐动脉和脐静脉之一或两者来灌注哺乳动物胎盘。可以使用(例如) 重力流动至胎盘来完成灌注溶液通过胎盘的流动。优选地, 使用泵(例如, 蠕动泵) 迫使灌注溶液通过胎盘。可以(例如) 用连接到无菌连接装置(如, 无菌管) 的插管(例如, TEFLON 或塑料插管) 插入脐静脉。将无菌连接装置连接到灌注歧管。

[0228] 在为灌注做准备时, 优选地以使脐动脉和脐静脉位于胎盘最高点的方式定向(例如, 悬挂) 胎盘。可以通过将灌注液体(例如, 本文所提供的干细胞收集组合物) 穿过胎盘脉管系统或通过胎盘脉管系统和周围组织来灌注胎盘。在一种实施方式中, 同时将脐动脉和脐静脉连接至通过挠性连接器连接至灌注溶液储罐的吸移管。将灌注溶液通过至脐静脉和动脉。灌注溶液从血管壁流出和/或穿过血管壁至胎盘的周围组织, 并且从连接至妊娠期间母体子宫的胎盘表面收集至适合的开放容器中。还可以将灌注溶液引入通过脐带开口并允许从与母体子宫壁连接的胎盘壁中的开口中流出或渗出。在另一种实施方式中, 将灌注溶液通过脐静脉并从脐动脉收集, 或者通过脐动脉并从脐静脉收集。

[0229] 在一种实施方式中, 在灌注期间将近端脐带夹紧, 并且更优选地, 在胎盘中脐带插入的 4-5cm(厘米) 内夹紧近端脐带。

[0230] 一般地, 放血过程中来自哺乳动物胎盘的第一次收集的灌注液被脐带血和/或胎盘血的残留红细胞染色; 这部分灌注液可以丢弃。随着灌注的进行, 灌注液变得更无色并且残留的脐带血细胞被清洗出胎盘。

[0231] 可以根据要收集的胎盘干细胞的数目、胎盘的尺寸、对单个胎盘进行收集的次数等改变用于收集胎盘干胎盘的灌注液的量。在多个实施方式中, 灌注液的体积可以为 50mL 至 5000mL、50mL 至 4000mL、50mL 至 3000mL、100mL 至 2000mL、250mL 至 2000mL、500mL 至 2000mL 或者 750mL 到 2000mL。通常, 在放血后用 700-800mL 的灌注液灌注胎盘。

[0232] 可以在几小时或几天的过程中灌注胎盘多次。当将胎盘灌注多次时, 可以将其在无菌条件下在容器或其他适合的器皿中维持或培养, 并用干细胞收集组合物或标准灌注溶液(例如, 生理盐溶液, 如加入或未加入抗凝剂(例如, 肝素、华法令钠、香豆素、双香豆素) 和/或加入或未加入抗微生物剂(例如, β -巯基乙醇 (0.1mM); 抗生素, 如链霉素(例如, 40-100 μ g/ml)、青霉素(例如, 40U/ml)、两性霉素 B(例如, 0.5 μ g/ml)) 的磷酸盐缓冲盐水(“PBS”)) 灌注。在一种实施方式中, 将分离的胎盘维持或培养一段时间而不收集灌注液, 从而在灌注液的灌注和收集之前将该胎盘维持或培养 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 小时,或者 2 或 3 或更多天。可以将灌注的胎盘维持额外的一次或多次,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,并用(例如)700-800mL 灌注液灌注第二次。可以将胎盘灌注 1、2、3、4、5 或更多次,例如,每 1、2、3、4、5 或 6 小时一次。在优选的实施方式中,重复胎盘的灌注和灌注溶液(例如,干细胞收集组合物)的收集直至回收的有核细胞的数目低于 100 个细胞/毫升。可以各自在不同时间点进一步处理灌注液以回收时间依赖性胎盘干细胞群。还可以将来自不同时间点的灌注液混合。

[0233] 不希望受任何理论束缚,在放血并灌注胎盘足够时间后,相信胎盘干细胞迁移至放血并灌注的胎盘微循环中,在此它们是可收集的,优选地通过灌注清洗至收集容器中。灌注分离的胎盘不仅用于除去残留的脐带血,而且为胎盘提供了适当的营养物,包括氧。可以用相似的溶液培养和灌注胎盘,所述溶液用于除去残留的脐带血细胞,优选地,其不加入抗凝血剂。

[0234] 可以通过用包含一种或多种蛋白酶或其他组织破坏酶的溶液灌注来将干细胞与胎盘分离。在具体的实施方式中,使胎盘或其部分恢复到 25-37°C,并在 200mL 培养基中与一种或多种组织破坏酶培育 30 分钟。从灌注液收集细胞,使其达到 4°C,用包含 5mM EDTA、2mM 二硫苏糖醇和 2mM β -巯基乙醇的冷的抑制剂混合物清洗。几分钟后,用在本文其他地方所述的冷(例如,4°C)干细胞收集组合物清洗胎盘干细胞。

[0235] 使用盘法(即,其中在灌注液从胎盘母体侧流出后收集灌注液)的灌注导致产生了胎儿和母体细胞的混合物。因此,通过该方法收集的细胞包含胎儿和母体来源的胎盘干细胞的混合群体。相反,仅通过胎盘脉管系统的灌注(其中灌注液通过一个或两个胎盘血管并仅通过剩余的血管收集)导致收集了几乎只有胎儿来源的胎盘干细胞群。

[0236] 5.4.5 胎盘细胞的分离、分选和鉴别

[0237] 无论是通过灌注还是酶促消化获得的,开始可以通过聚蔗糖梯度离心将来自哺乳动物胎盘的干细胞从其他细胞中纯化(即从中分离)。这种离心作用可以按照对于离心速度等的任何标准规程进行。在一种实施方式中,例如,通过在室温下以 5000×g 离心 15 分钟从灌注液回收了收集自胎盘的细胞,该离心作用将细胞与(例如)污染碎片和血小板分离。在另一种实施方式中,将胎盘灌注液浓缩至约 200mL,轻轻地在聚蔗糖上方成层,并在 22°C 以约 1100×g 离心 20 分钟,并且收集细胞的低密度中间层以用于其他处理。

[0238] 可以将细胞颗粒在新鲜的干细胞收集组合物中或者在适合于干细胞维持的培养基(例如,含有 2U/ml 肝素和 2mM EDTA 的 IMDM 无血清培养基(GibcoBRL, NY))中再悬浮。可以(例如)根据生产商推荐的程序使用 Lymphoprep(Nycomed Pharma, Oslo, Norway)分离总单核细胞部份。

[0239] 如本文所使用的,“分离”胎盘干细胞表示除去至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 99% 的细胞,这些细胞是在完整哺乳动物胎盘中胎盘干细胞通常相关联的细胞。

[0240] 可以通过使用(例如)含有 0.2% EDTA(Sigma, St. Louis MO)的 0.05% 的胰蛋白酶溶液的差异胰酶消化进一步或初始分离通过灌注或消化获得的胎盘干细胞。由于胎盘干细胞通常在约 5 分钟内从塑料表面脱去,而其他贴壁群体通常需要超过 20-30 分钟的培育,因此差异胰酶消化是可能的。可以在胰酶消化和使用(例如)胰蛋白酶中和溶液

(TNS, Cambrex) 的胰蛋白酶中和后收获分开的胎盘干细胞。

[0241] 在胎盘干细胞分离的一种实施方式中,将(例如)约 $5-10 \times 10^6$ 个胎盘细胞的等份分别置于几个 T-75 烧瓶中,优选地纤连蛋白涂覆的 T75 烧瓶。在这种实施方式中,可以用可商购的间质干细胞生长培养基 (MSCGM) (Cambrex) 培养细胞并将其置于组织培养箱 (37°C , $5\% \text{CO}_2$) 中。10 到 15 天后,通过用 PBS 清洗从烧瓶中除去非贴壁细胞。然后,用 MSCGM 代替 PBS。优选地,每天针对多种贴壁细胞类型的存在检验烧瓶,并且具体地,针对成纤维样细胞簇的鉴别与扩增检验烧瓶。

[0242] 可以(例如)通过使用标准细胞检测技术(如流式细胞术、细胞分选、免疫细胞化学(例如,用组织特异或细胞标志物特异的抗体染色)、荧光激活细胞分选 (FACS)、磁性激活细胞分选 (MACS)) 测量形态和细胞表面标志物的变化,通过使用光学或共聚焦显微镜检查法检查细胞形态和/或通过使用本领域中熟知的技术(如 PCR 和基因表达谱)测量基因表达的变化来监测从哺乳动物胎盘收集的细胞的个数和类型。这些技术也可以用于鉴别对一种或多种特定标志物呈阳性的细胞。例如,使用抗 CD34 抗体,人们可以使用上述技术确定细胞是否包含与(例如)同型对照相比,可检测数量的 CD34;如果包含,则所述细胞是 CD34^+ 。同样,如果细胞产生通过 RT-PCR 可检测的足够的 OCT-4RNA 或者产生比终末分化细胞显著更多的 OCT-4RNA,则该细胞是 OCT-4^+ 。抗细胞表面标志物(例如,CD 标志物,如 CD34)的抗体和干细胞特异基因(如 OCT-4)的序列在本领域中是熟知的。

[0243] 可以使用荧光激活细胞分选仪 (FACS) 分选(例如,进一步分离)胎盘细胞,特别是已通过 Ficol1 分离、差异贴壁或两者组合分离的细胞。荧光激活细胞分选 (FACS) 是根据颗粒的荧光性能分离包括细胞在内的颗粒的熟知方法 (Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151:150-165)。各个颗粒中荧光部分的激光激发导致产生少量电荷,其使得正负颗粒与混合物电磁分离。在一种实施方式中,用不同的荧光标记物标记细胞表面标志物特异的抗体或配体。通过细胞分选仪处理细胞,从而允许根据它们与所使用的抗体结合的能力分离细胞。可以将 FACS 分选的颗粒直接沉积到 96 孔板或 384 孔板的各个孔中以有利于分离和克隆。

[0244] 在一个分选方案中,根据标志物 CD34、CD38、CD44、CD45、CD73、CD105、OCT-4 和/或 HLA-G,或者在本文其他地方所列的其他标志物中的任一种的表达,可以分选胎盘干细胞。这可以与根据它们在培养中的贴壁特性选择干细胞的程序结合完成。例如,可以在根据标志物表达的分选之前或之后完成胎盘干细胞的贴壁选择。在一种实施方式中,例如,首先根据它们的 CD34 表达分选胎盘干细胞;保留 CD34^+ 细胞,并且将是 CD200^+ 或 HLA-G^+ 的细胞与所有其他 CD34^+ 细胞分离。在另一种实施方式中,可以基于他们的 CD200 和/或 HLA-G 的表达或缺乏来分选胎盘干细胞;例如,可以分离显示出这些标志物中任一个的细胞用于以后使用。在具体的实施方式中,可以根据它们的 CD73 和/或 CD105 表达,或者通过抗体 SH2、SH3 或 SH4 识别的表位,或者 CD34、CD38 或 CD45 表达的缺乏进一步分选表达(例如) CD200 和 HLA-G 的细胞。例如,在一种实施方式中,通过 CD200、HLA-G、CD73、CD105、CD34、CD38 和 CD45 的表达或表达缺乏来分选胎盘干细胞,并且将 CD200^+ 、 HLA-G^+ 、 CD73^+ 、 CD105^+ 、 CD34^+ 、 CD38^+ 和 CD45^+ 胎盘干细胞与其他胎盘细胞分离以用于以后使用。

[0245] 在另一种实施方式中,可以使用磁珠将细胞(例如,胎盘干细胞)与其他胎盘细胞分离。可以使用磁激活细胞分选术 (MACS) 技术分选细胞,该方法是基于结合磁珠

(0.5-100 μm 直径) 的能力来分离颗粒的方法。可以在磁性微球上进行多种有用的修饰, 其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。然后, 将珠与细胞混合以使其结合。然后, 将细胞穿过磁场以分离出具有特异性细胞表面标志物的细胞。在一种实施方式中, 然后可以将这些细胞分离并与和抗其他细胞表面标志物的抗体结合的磁珠再混合。将这些细胞再次通过磁场, 从而分离出与两种抗体结合的细胞。然后, 可以将这些细胞稀释至单独的盘中, 如用于无性系分离的微量滴定盘。

[0246] 还可以根据细胞形态和生长特征来鉴别和 / 或分选胎盘干细胞。例如, 可以将培养中的胎盘干细胞鉴别为具有 (例如) 成纤维样外观和 / 或根据 (例如) 成纤维样外观进行选择。还可以将胎盘干细胞鉴定为具有形成胚状体样体的能力和 / 或根据它们形成胚状体样体的能力进行选择。在一种实施方式中, 例如, 可以将处于成纤维样形状, 表达 CD73 和 CD105 并且在培养中产生一个或多个胚状体样体的胎盘细胞与其他胎盘细胞分离。在另一种实施方式中, 将在培养中产生一个或多个胚状体样体的 OCT-4⁺ 胎盘细胞与其他胎盘细胞分离。

[0247] 在另一种实施方式中, 可以通过集落形成单位测定鉴别胎盘干细胞和显示其特征。集落形成单位测定一般在本领域中是已知的, 如 Mesen Cult 培养基 (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver British Columbia)。

[0248] 可以使用本领域中已知的标准技术评价胎盘干细胞的存活力、增殖潜能和寿命, 所述标准技术如台盼蓝排阻测定、荧光素二乙酸酯吸收测定、碘化丙啶吸收测定 (以评价存活力); 和胸苷吸收测定、MTT 细胞增殖测定 (以评价增殖)。可以通过本领域中熟知的方法确定寿命, 如通过确定扩大培养中群体倍增的最大次数。

[0249] 还可以使用本领域中已知的其他技术将胎盘干细胞与其他胎盘细胞分离, 所述技术例如所需细胞的选择性生长 (阳性选择)、不希望细胞的选择性破坏 (阴性选择); 基于混合群体中差异细胞可凝集性的分离, 如 (例如) 使用大豆凝集素; 冻融程序; 过滤; 常规和区带离心; 离心淘选 (逆流离心); 单位重力分离; 逆流分配; 电泳等。

[0250] 5.5 胎盘干细胞的培养

[0251] 5.5.1 培养基

[0252] 可以在本领域中认为对干细胞培养可用的任何培养基中并在任何条件下培养胎盘干细胞, 包括本文所述的 arPSC。在某些实施方式中, 所述培养基包含血清。在某些实施方式中, 胎盘干细胞, 包括本文所述的 asPSC, 可以在 (例如) 含有 ITS (胰岛素 - 转铁蛋白 - 硒)、LA⁺BSA (亚油酸 - 牛血清白蛋白)、葡萄糖、L- 抗坏血酸、PDGF、EGF、IGF-1 和青霉素 / 链霉素的 DMEM-LG (达尔伯克氏改良基础培养基, 低葡萄糖) / MCDB 201 (小鸡成纤维细胞基础培养基); 包含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM-HG (高葡萄糖); 包含 15% FBS 的 DMEM-HG; 包含 10% FBS、10% 马血清和氢化可的松的 IMDM (伊思考夫改良达尔伯克氏培养基); 包含 10% FBS、EGF 和肝素的 M199; 包含 10% FBS、GLUTAMAX 和庆大霉素的 α -MEM (最低必需培养基); 包含 10% FBS、GLUTAMAX 和庆大霉素的 DMEM 等。优选的培养基是含有 2% FBS、ITS、LA⁺BSA、葡萄糖、L- 抗坏血酸、PDGF、EGF 和青霉素 / 链霉素的 DMEM-LG/MCDB-201。

[0253] 其中可用于培养胎盘干细胞 (包括本文所述的 asPSC) 的其他培养基包括 DMEM (高或低葡萄糖)、伊格尔基础培养基、汉姆氏 F10 培养基 (F10)、汉姆氏 F-12 培养基 (F12)、伊思考夫改良的达尔伯克氏培养基、间质干细胞生长培养基 (MSCGM)、莱博维茨

L-15 培养基 (Liebovitz's L-15 medium)、MCDB、DMEM/F12、RPMI 1640、高级 DMEM (Gibco)、DMEM/MCDB201 (Sigma) 和 CELL-GRO FREE。

[0254] 所述培养基可以单独或组合补充一种或多种成分,其包括(例如)血清(例如,胎牛血清(FBS),优选地约 2-15% (v/v);马(马)血清(ES);人血清(HS)); β -巯基乙醇(BME),优选地约 0.001% (v/v);一种或多种生长因子,例如,血小板源性生长因子(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,其包括 L-缬氨酸;和控制微生物污染的一种或多种抗生素和/或抗霉菌剂,如(例如)青霉素、链霉素硫酸盐、两性霉素 B、庆大霉素和制霉菌素。

[0255] 5.5.2 胎盘干细胞的扩增和增殖

[0256] 一旦胎盘干细胞(包括本文所述的 asPSC)分离(例如,与干细胞或干细胞群在体内通常与之相连的至少 50% 的胎盘细胞分离),则所述干细胞或干细胞群可以体外增殖和扩增。例如,一旦产生了抗失巢凋亡的胎盘干细胞,则这些细胞还可以体外增殖和扩增。可以在组织培养容器(例如,盘、烧瓶、多孔板等)中将胎盘干细胞(包括本文所述的 asPSC)培养足以使所述胎盘干细胞增殖至 70-90% 汇合(即,直至所述胎盘干细胞以及它们的子代占据组织培养容器的培养表面积的 70-90%)的一段时间。

[0257] 可以将胎盘干细胞(包括本文所述的 asPSC)以允许细胞生长的密度接种到培养容器中。例如,可以将胎盘干细胞以低密度(例如,约 1,000 至约 5,000 个细胞/cm²)至高密度(例如,约 50,000 个细胞/cm²或以上)接种。在优选的实施方式中,在空气中在约 0 至约 5 体积%的 CO₂ 下培养胎盘干细胞。在一些优选的实施方式中,将胎盘干细胞在空气中在约 2 至约 25% 的 O₂ 下培养,优选地,在空气中在约 5 至约 20% 的 O₂ 下培养。优选地,将胎盘干细胞在约 25°C 至约 40°C 培养,优选地,在 37°C 培养。优选地,将胎盘干细胞在培育箱中培养。培养基可以是静止的或搅拌的,例如,使用生物反应器。胎盘干细胞可以在低氧胁迫(例如,加入谷胱甘肽、抗坏血酸、过氧化氢酶、维生素 E、N-乙酰半胱氨酸等)条件下生长。

[0258] 一旦获得 70%-90% 的汇合,则可以将胎盘干细胞(包括本文所述的 asPSC)传代。例如,可以使用本领域中熟知的技术将细胞酶促处理(例如,胰蛋白酶化)以将它们从组织培养表面上分离。通过吸取除去胎盘干细胞并对细胞计数后,将约 20,000-100,000 个干细胞,优选地约 50,000 个胎盘干细胞传代至含有新鲜培养基的新培养容器中。通常,新培养基与从中除去干细胞的培养基类型相同。本文提供了胎盘干细胞群(包括本文所述的 asPSC)和它们的组合,其已传代至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18 或 20 次或更多次。

[0259] 5.6 抗失巢凋亡的胎盘细胞的保存

[0260] 可以保存抗失巢凋亡的胎盘干细胞,即可以将它们置于使其长期保存的条件或抑制通过(例如)细胞凋亡或坏死所导致的细胞死亡的条件。

[0261] 可以使用(例如)包含细胞凋亡抑制剂、坏死抑制剂和/或携氧全氟化碳的组合物保存抗失巢凋亡的胎盘干细胞,如 2005 年 12 月 25 日提交的标题为“收集和保存胎盘细胞的改善的组合物和使用所述组合物的方法”的相关美国临时专利申请 No. 60/754,969 中所述。

[0262] 在一种实施方式中,本文提供了保存抗失巢凋亡的胎盘干细胞的方法,其包括将所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞与包含细胞凋亡抑制剂和携氧全氟化碳的干细胞收集组合物接触,其中所述细胞凋亡抑制剂以与未接触细胞凋亡抑制剂的抗失巢凋亡的胎盘干细胞群相比足以降低或防止抗失巢凋亡的胎盘干细胞群中细胞凋亡的量和时间存在。在具体的实施方式中,所述细胞凋亡抑制剂是半胱氨酸天冬氨酸酶抑制剂。在另一种具体的实施方式中,所述细胞凋亡抑制剂是 JNK 抑制剂。在更具体的实施方式中,所述 JNK 抑制剂不调节所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞的分化或增殖。在另一种实施方式中,所述干细胞收集组合物包含处于单独的相中的所述细胞凋亡抑制剂和所述携氧全氟化碳。在另一种实施方式中,所述干细胞收集组合物包含处于乳液中的所述细胞凋亡抑制剂和所述携氧全氟化碳。在另一种实施方式中,所述干细胞收集组合物另外包含乳化剂,例如,卵磷脂。在另一种实施方式中,所述细胞凋亡抑制剂和所述全氟化碳在与干细胞接触时处于约 0℃ 至约 25℃ 之间。在另一个更具体的实施方式中,所述细胞凋亡抑制剂和所述全氟化碳在与干细胞接触时处于约 2℃ 至 10℃ 之间,或者约 2℃ 至约 5℃ 之间。在另一个更具体的实施方式中,在所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞的输送期间进行所述接触。在另一种更具体的实施方式中,在所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞群的冻融期间进行所述接触。

[0263] 在另一种实施方式中,可以通过以下方法保存抗失巢凋亡的胎盘干细胞,所述方法包括将所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞与细胞凋亡抑制剂和器官保存化合物接触,其中所述细胞凋亡抑制剂以与未接触细胞凋亡抑制剂的抗失巢凋亡的胎盘干细胞相比足以降低或防止抗失巢凋亡的胎盘干细胞的细胞凋亡的量和时间存在。在具体的实施方式中,所述器官保存化合物是 UW 溶液(在美国专利 No. 4798824 中描述;还称为 ViaSpan;另外参见 Southard 等人,Transplantation 49(2):251-257(1990))或 Stern 等人,美国专利 No. 5,552,267 中所述的溶液。在另一种实施方式中,所述器官保存化合物是羟乙基淀粉、乳糖酸、棉子糖或它们的组合。

[0264] 在另一种实施方式中,在灌注期间将用于产生抗失巢凋亡的胎盘干细胞的胎盘干细胞与包含细胞凋亡抑制剂和携氧全氟化碳的干细胞收集组合物、器官保存化合物或它们的组合接触。在另一种实施方式中,在组织破坏处理(例如,酶促消化)期间接触用于产生抗失巢凋亡的胎盘干细胞的所述胎盘干细胞。在另一种实施方式中,在通过灌注收集后或在通过组织破坏(例如,酶促消化)收集后,将用于生产抗失巢凋亡的胎盘干细胞的胎盘细胞与所述干细胞收集化合物接触。

[0265] 通常,在胎盘干细胞收集、富集和分离期间,优选地减少或消除由于缺氧和机械应力所造成的细胞胁迫。因此,在所述方法的另一种实施方式中,在收集、富集或分离期间将用于产生抗失巢凋亡的胎盘干细胞的胎盘干细胞在所述保存期间在缺氧条件下暴露小于 6 小时,其中缺氧条件是低于正常血氧浓度的氧浓度。在更具体的实施方式中,在所述保存期间将所述胎盘干细胞在所述缺氧条件下暴露小于两小时。在另一个更具体的实施方式中,在收集、富集或分离期间将所述胎盘干细胞在所述缺氧条件下暴露小于 1 小时,或小于 30 分钟,或不暴露于缺氧条件。在另一种具体的实施方式中,在收集、富集或分离期间未将所述胎盘干细胞暴露于切应力。

[0266] 本文所述的抗失巢凋亡的胎盘干细胞以及用于产生抗失巢凋亡的胎盘干细胞的胎盘干细胞可以在(例如)小容器(例如,安瓿瓶)中的冷冻保存媒介中冷冻保存。适合

的冷冻保存培养基包括（但不限于）包含（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)）的培养基。冷冻保存培养基优选地包含浓度为（例如）约 10% (v/v) 的 DMSO（二甲亚砜）。冷冻保存培养基可以包含其他试剂，例如，Plasmalyte、添加或未添加甘油的甲基纤维素。优选地，在冷冻保存期间将所述干细胞以约 1°C /min 冷却。优选的冷冻保存温度为约 -80°C 至约 -180°C，优选地约 -125°C 至约 -140°C。在融化使用前，可以将冷冻保存的细胞转移至液氮。在一些实施方式中，例如，一旦安瓿 达到约 -90°C，则将它们转移至液氮储存区。优选地，在约 25°C 至约 40°C 的温度下，优选地在约 37°C 的温度下融化冷冻保存的细胞。在某些实施方式中，在与调控 RNA 分子接触（例如，转染）后，本文提供的抗失巢凋亡的胎盘干细胞冷冻保存约 12、24、36、48、60 或 72 小时。在一种实施方式中，在与调控 RNA 分子接触（例如，转染）后，将本文提供的抗失巢凋亡的胎盘干细胞冷冻保存约 24 小时。

[0267] 5.7 组合物

[0268] 5.7.1 包含抗失巢凋亡的胎盘干细胞的组合物

[0269] 本文提供了包含本文所述的抗失巢凋亡的胎盘干细胞的组合物。这些组合物可以包含与在（例如）研究或治疗中使用的任何生理学可用或医学可用的化合物、组合物或装置结合的本文所提供的抗失巢凋亡的胎盘干细胞群。

[0270] 5.7.1.1 冷冻保存的抗失巢凋亡的胎盘干细胞

[0271] 可以保存，例如冷冻保存本文所述的抗失巢凋亡的胎盘干细胞以备随后使用。用于细胞（如干细胞）冷冻保存的方法在本领域中是熟知的。可以将抗失巢凋亡的胎盘干细胞制备成易于施用至个体的形式。例如，本文所述的抗失巢凋亡的胎盘干细胞可以包含在适合于医学使用的容器内。这种容器可以是（例如）无菌塑料袋、烧瓶、瓶、小瓶或从中可以容易地分配胎盘细胞群的其他容器。例如，所述容器可以是血袋或者是适合于液体静脉内施用至受者的其他医学上可用的塑料袋。优选地，所述容器是允许抗失巢凋亡的胎盘干细胞冷冻保存的容器。

[0272] 冷冻保存的抗失巢凋亡的胎盘干细胞群可以包含来源于单个供体或多个供体的抗失巢凋亡的胎盘干细胞。所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞可以是与预定受体完全 HLA 匹配的或者是部分或完全 HLA 不匹配的。

[0273] 因此，在一种实施方式中，本文在容器中提供了包含抗失巢凋亡的胎盘干细胞的组合物。在具体的实施方式中，将抗失巢凋亡的胎盘干细胞保存。在另一种具体的实施方式中，所述容器是袋、烧瓶、小瓶或瓶。在更具体的实施方式中，所述袋是无菌塑料袋。在更具体的实施方式中，所述袋适合于，允许或有利于所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞的静脉内施用。所述袋可以包含互相连接以允许在施用之前或期间抗失巢凋亡的胎盘干细胞和一种或多种其他溶液（例如，药物）混合的多个腔或隔室。在另一种具体的实施方式中，所述组合物包含有利于混合的干细胞群冷冻保存的一种或多种化合物。在另一种具体的实施方式中，所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞包含在生理学可用的水溶液内。在更具体的实施方式中，所述生理学可用的水溶液是 0.9% NaCl 溶液。在另一种具体的实施方式中，所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞与所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞的受体是 HLA 匹配的。在另一种具体的实施方式中，所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞与所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞的受体是至少部分 HLA 不匹配的。在另一种具体的实施方式中，所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞来源于来自

多个供体的胎盘干细胞。

[0274] 5.7.1.2 药物组合物

[0275] 在另一个方面,本文提供了用于治疗患有或具有发展疾病、病症或病况(所述疾病、病症或病况具有炎性部分)的风险的个体的药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的抗失巢凋亡的胎盘干细胞。

[0276] 可以将本文所提供的抗失巢凋亡的胎盘干细胞配制为体内使用的药物组合物。这些药物组合物可以包含药物可用载体(例如,用于体内施用的盐溶液或其他可用的生理学可用溶液)中的抗失巢凋亡的胎盘干细胞。本文所提供的药物组合物可以包含本文所述的任何抗失巢凋亡的胎盘干细胞。所述药物组合物可以包含胎儿、母体或胎儿和母体两者的抗失巢凋亡的胎盘干细胞。本文所提供的药物组合物还可以包含由得自单个个体或胎盘或得自多个个体或胎盘的胎盘干细胞产生的抗失巢凋亡的胎盘干细胞。

[0277] 本文所提供的药物组合物可以包含任意数目的抗失巢凋亡的胎盘干细胞。例如,在多个实施方式中,单一单位剂量的抗失巢凋亡的胎盘干细胞可以包含约、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} 或更多个抗失巢凋亡的胎盘干细胞。

[0278] 本文所提供的药物组合物可以包含抗失巢凋亡的胎盘干细胞群,所述抗失巢凋亡的胎盘干细胞群包含 50% 或以上的活抗失巢凋亡的胎盘干细胞(即所述群体中至少 50% 的细胞是功能性的或活的)。优选地,在所述群体中至少 60% 的细胞是有活力的。更优选地,在所述药物组合物中,所述群体中至少 70%、80%、90%、95% 或 99% 的抗失巢凋亡的胎盘干细胞是活的。

[0279] 5.7.1.3 包含抗失巢凋亡的胎盘干细胞的基质

[0280] 本文还提供了包含抗失巢凋亡的胎盘干细胞的基质、水凝胶、支架等。可以将本文所提供的抗失巢凋亡的胎盘干细胞接种到天然基质上,例如,胎盘生物材料,如羊膜材料。这种羊膜材料可以是(例如)直接从哺乳动物胎盘上切下的羊膜;固定或热处理的羊膜、基本干燥(即, <20% 的 H₂O) 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。在 Hariri, 美国专利申请公开 No. 2004/0048796 中描述了其上可以接种抗失巢凋亡的胎盘干细胞的优选的胎盘生物材料。

[0281] 可以将本文所提供的抗失巢凋亡的胎盘干细胞悬浮在适合于(例如)注射的水凝胶溶液中。适合这些组合物的水凝胶包括自组装肽,如 RAD16。抗失巢凋亡的胎盘干细胞还可以与(例如)海藻酸盐或富血小板血浆,或其他含纤维蛋白基质混合以用于局部注射。在一种实施方式中,可以使包含抗失巢凋亡的胎盘干细胞的水凝胶溶液在(例如)模具中硬化以形成具有分散于其中的细胞的移植用基质。还可以在该基质中培养抗失巢凋亡的胎盘干细胞从而使细胞在移植前通过有丝分裂扩增。水凝胶可以是(例如)通过共价键、离子键或氢键交联以产生捕获水分子以形成凝胶的立体开放网格结构的(天然或合成)有机聚合物。水凝胶形成材料包括多糖(如海藻酸盐及其盐)、肽、聚磷腈和聚丙烯酸酯,它们通过阴离子交联或者是嵌段聚合物(如聚环氧乙烷-聚丙二醇嵌段共聚物),其分别是通过温度或 pH 交联的。在一些实施方式中,所述水凝胶或基质是生物可降解的。

[0282] 在一些实施方式中,所述基质包含原位可聚合凝胶(参见,例如,美国专利申请公开 2002/0022676 ;Anseth 等人, J. Control Release, 78(1-3):199-209(2002) ;Wang 等人,

Biomaterials, 24(22):3969-80(2003))。

[0283] 在一些实施方式中,具有带电侧基的聚合物或其一价离子盐在水溶液(如水、缓冲盐溶液或酒精水溶液)中至少是部分可溶的。具有可以与阳离子反应的酸性侧基的聚合物的实例是聚(磷腈)、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,如磺化聚苯乙烯。还可以使用具有通过丙烯酸或甲基丙烯酸与乙烯基醚单体或聚合物反应形成的酸性侧基的共聚物。酸性基团的实例是羧基、磺酸基、卤化(优选地,氟化)醇基、酚OH基和酸性OH基。

[0284] 可以将抗失巢凋亡的胎盘干细胞接种到立体框架或支架上并体内移植。该框架可以与任何一种或多种刺激组织形成或否则提高或改善在本文其他处描述的治疗方法的实践的生长因子、细胞、药物或其他组分结合移植。

[0285] 可以在本文中使用的支架的实例包括无纺垫、多孔泡沫或自组装肽。可以使用由乙醇酸和乳酸(例如,PGA/PLA)的合成可吸收共聚物(VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N. J.)组成的纤维来形成非纺织垫。还可以将由(例如)聚(ϵ -己内酯)/聚(乙醇酸)(PCL/PGA)共聚物组成的泡沫用作支架,所述泡沫是通过如冷冻干燥或冻干法(参见,例如,美国专利 No. 6355699)的方法形成的。

[0286] 在另一种实施方式中,所述支架是或包含纳米纤维支架,例如,静电纺丝纳米纤维支架。在更具体的实施方式中,所述纳米纤维支架包括聚(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)[(LLA-CL)](例如,75:25)和/或聚(3-羟基丁酸酯-共-3-羟基戊酸酯)的共聚物(PHBV)和I型胶原。产生纳米纤维支架,例如,静电纺丝纳米纤维支架的方法是本领域已知的。参见,例如,Xu等人,Tissue Engineering 10(7):1160-1168(2004); Xu等人,Biomaterials 25:877-886(2004); Meng等人,J. Biomaterials Sci., Polymer Edition 18(1):81-94(2007)。

[0287] 本文所述的抗失巢凋亡的胎盘干细胞还可以接种到生理学可用的陶瓷材料上或与之接触,所述陶瓷材料包括,但不限于,单磷酸钙、二磷酸钙、三磷酸钙、 α -三磷酸钙、 β -三磷酸钙和四磷酸钙、羟基磷灰石、氟磷灰石、硫酸钙、氟化钙、氧化钙、碳酸钙、磷酸镁钙、生物活性玻璃,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)、ENDOBN(Merck Biomaterial France, France)、CEROS(Mathys, AG, Bettlach, Switzerland)和矿化胶原骨移植产品,如HEALOSTM(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、共混物或复合材料。

[0288] 在另一种实施方式中,可以将抗失巢凋亡的胎盘干细胞接种到毡制物上或者与毡制物接触,所述毡制物可以由(例如)生物可吸收材料(如PGA、PLA、PCL共聚物或共混物)或者透明质酸制成的复丝组成。

[0289] 在另一种实施方式中,可以将本文所述的抗失巢凋亡的胎盘干细胞接种到可以是复合结构的泡沫支架上。这些泡沫支架可以模制成有用的形状。在一些实施方式中,在抗失巢凋亡的胎盘干细胞接种之前用(例如)0.1M乙酸处理所述框架,然后在聚赖氨酸、PBS和/或胶原中培育以提高细胞贴壁。可以(如)通过血浆涂覆基质或一种或多种蛋白(例

如,胶原、弹性纤维、网状纤维)、糖蛋白、糖胺聚糖(例如,硫酸肝素、4-硫酸软骨素、6-硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角蛋白等)、细胞基质和/或其他材料(如,但不限于,明胶、海藻酸盐、琼脂、琼脂糖和植物树胶等)的加入来修饰基质的外表面以改善细胞的附着或生长和组织的分化。

[0290] 在一些实施方式中,所述支架包含使其为非血栓形成性的材料或用该材料处理。这些处理和材料还可以促进并保持内皮的生长、迁移和胞外基质的沉积。这些材料和处理的实例包括(但不限于)天然材料,如基底膜蛋白(如层粘连蛋白和IV型胶原蛋白);合成材料,如EPTFE和嵌段聚氨酯脲硅酮(polyurethaneurea silicones),如PURSPANTM(The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.)。所述支架还可以包含抗血栓形成试剂,如肝素;还可以在抗失巢凋亡的胎盘干细胞接种之前处理所述支架以改变表面电荷(例如,用血浆涂覆)。

6. 实施例

[0291] 6.1 实施例1:胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因的鉴别

[0292] 根据生产商的说明,使用Decode™RNAi病毒筛选文库(Thermo Scientific)确定胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因的存在。简要地,所述测定使用RNAi基慢病毒技术将shRNAmir引入到靶标宿主细胞基因组的基因中。用shRNAmir转导细胞,并且能够基于shRNAmir的绿色荧光蛋白(GFP)表达或者使用嘌呤霉素测定(因为shRNAmir含有给予转导细胞嘌呤霉素抗性的基因)通过细胞分选来选择细胞。然后,应用选择压力以鉴别在压力下存活的细胞,并因此作为存活表型以提高或降低的水平表达某些基因。通过存活细胞的基因组DNA的PCR扩增鉴别这些差异表达的基因,其中扩增引入到特定基因(并因此抑制/下调那些基因的表达)的shRNAmir序列。因此,能够鉴别赋予存活表型的特定基因。

[0293] 首先,开展胎盘干细胞的失巢凋亡测定。已确定满足与对照未修饰的胎盘干细胞(贴壁条件下培养)相比,大于90%的未修饰的胎盘干细胞死亡或凋亡的目标的适合于胎盘干细胞的失巢凋亡测定包括:在补充有0.1% FBS的DMEM中以 1×10^5 个细胞/毫升的浓度将胎盘干细胞铺板并在37°C, 5% CO₂下将细胞在对照板(允许细胞贴壁)或选自Corning Ultra-Low Attachment、Nunc Hydrocell或Nunc Low Cell Binding的低贴壁板上培养细胞48-72小时。图1表明未修饰的胎盘干细胞在培养48小时后在低贴壁条件下显示出极低的存活,而相等个数的未修饰的胎盘干细胞在允许细胞贴壁的测定条件下显示出近100%的存活。如图2所示,显微镜检查确认在72小时培养后,贴壁条件下(Corning CellBind plates)培养的胎盘干细胞是活的并显示出胎盘干细胞的形态特征,而在相当的培养条件下培养72小时后,低贴壁条件下(Corning Ultra-Low Attachment plates)培养的胎盘干细胞不能存活。

[0294] 在Decode™RNAi病毒筛选文库(Thermo Scientific)中,将建立的胎盘干细胞失巢凋亡测定用作选择压力。简要地,根据生产商的说明,在具有聚凝胺的不含血清的DMEM中以0.3MOI用Decode病毒文库转导胎盘干细胞。使用GFP作为可选择标志物,使用FACS Aria(Becton Dickinson)细胞分选仪选择转导的细胞。然后,对转导的胎盘干细胞进行如上所述的优化失巢凋亡测定以用于选择抗失巢凋亡的胎盘干细胞。通过单细胞分选(使用FACS)或GFP⁺细胞的连续稀释分离在失巢凋亡测定中培养48小时后幸存的细胞(例如,抗

失巢凋亡的胎盘干细胞)。将分离的细胞在 384 孔板中扩增以达到 >500 个细胞/孔。图 3 显示了包含在测定中鉴别的扩增的胎盘干细胞群的孔(孔中亮色标记代表 GFP 阳性细胞)。通过从细胞分离基因组 DNA 并随后 PCR 扩增含有条型码的片段以辅助所进行的序列靶标基因鉴别,评价了来自细胞的 187 个孔(具有强 GFP 表达的孔)的基因表达谱以鉴别失巢凋亡相关基因。失巢凋亡相关基因包含在存活细胞中抑制/下调并因此鉴别为与胎盘干细胞中失巢凋亡途径有关的那些。

[0295] 鉴别了在胎盘干细胞失巢凋亡中具有作用的 73 个基因,其包括以下基因: AMIGO1(NCBI GENE ID NO:57463);ARHGAP20(NCBI GENE ID NO:57569);CD38(NCBI GENE ID NO:952);CLCC1(NCBI GENE ID NO:23155);CNTF(NCBI GENE ID NO:1270);ZFP91-CNTF(NCBI GENE ID NO:386607);COX8A(NCBI GENE ID NO:1351);DHX34(NCBI GENE ID NO:9704);FAM175A(NCBI GENE ID NO:NO 51023);MRPS18C(NCBI GENE ID NO:84142);FAM44C(NCBI GENE ID NO:284257);FBP2(NCBI GENE ID NO:8789);FLI1(NCBI GENE ID NO:2313);FREM3(NCBI GENE ID NO:166752);IFIT5(NCBI GENE ID NO:24138);LOC399851(NCBI GENE ID NO:399851);LOC400713(NCBI GENE ID NO:400713);LOC651610(NCBI GENE ID NO:651610);PIGP(NCBI GENE ID NO:51227);SH3TC2(NCBI GENE ID NO:79628);SLC2A3(NCBI GENE ID NO:6515);STAU2(NCBI GENE ID NO:27067);TMEFF1(NCBI GENE ID NO:8577);TMEM217(NCBI GENE ID NO:221468);TMEM79(NCBI GENE ID NO:84283);USHBP1(NCBI GENE ID NO:83878);APH1B(NCBI GENE ID NO:83464);ATP2B2(NCBI GENE ID NO:491);C13orf39(NCBI GENE ID NO:196541);C4orf17(NCBI GENE ID NO:84103);C4orf46(NCBI GENE ID NO:201725);DDX41(NCBI GENE ID NO:51428);DKFZp547J222(NCBI GENE ID NO:84237);FGFR1(NCBI GENE ID NO:2260);FHDC1(NCBI GENE ID NO:85462);GNAI2(NCBI GENE ID NO:2771);GP5(NCBI GENE ID NO:2814);IL1RN(NCBI GENE ID NO:3557);KIF24(NCBI GENE ID NO:347240);KNDC1(NCBI GENE ID NO:85442);LOC100132598(NCBI GENE ID NO:100132598);LOC151760(NCBI GENE ID NO:151760);LOC152024(NCBI GENE ID NO:152024);LOC339833(NCBI GENE ID NO:339833);LPAR4(NCBI GENE ID NO:2846);LSG1(NCBI GENE ID NO:55341);MAP3K5(NCBI GENE ID NO:4217);PDK3(NCBI GENE ID NO:5165);PELI2(NCBI GENE ID NO:57161);RNF103(NCBI GENE ID NO:7844);SNX31(NCBI GENE ID NO:169166);TXN2(NCBI GENE ID NO:25828);和 XKR7(NCBI GENE ID NO:343702)。

[0296] 本实施例表明胎盘干细胞在低贴壁条件下经历失巢凋亡,并且存在在胎盘干细胞中引起失巢凋亡的特定胎盘干细胞基因(失巢凋亡相关基因)。

[0297] 6.2 实施例 2:抗失巢凋亡的胎盘干细胞的产生

[0298] 使用针对所关心的特定基因的 siRNA,在胎盘干细胞中靶向在实施例 1 中鉴别的所选择的失巢凋亡相关基因。使用 Dharmafect 1 转染试剂,以 25nM 的最终 siRNA 浓度,使用对所选基因特异的 Dharmacon ON-TARGETplus SMARTpool siRNA 转染胎盘干细胞。使用实时定量 PCR 分析基因表达,所述分析是使用 **TaqMan®** 基因表达试剂盒,通过 7900HT Fast 实时 PCR 系统进行的以检验基因沉默效率。

[0299] 一旦确认对所选的失巢凋亡相关基因特异的 siRNA 有效地抑制/下调这些基因的表达,则在实施例 1 中所述的失巢凋亡测定中培养其中靶向失巢凋亡相关基因的胎盘干细

胞。使用 CellTiter AQueous One Solution 细胞增殖测定 (MTS) 和 CyQuant 直接测定评价这些胎盘干细胞的存活力以确定是否可以通过特异性靶向胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因来产生抗失巢凋亡的胎盘干细胞。

[0300] 图 4 显示了 MTS 测定的结果,其中使用对基因特异的 siRNA,在胎盘干细胞中抑制/下调了实施例 1 中鉴别的所选失巢凋亡相关基因。对胎盘干细胞进行 48 小时的实施例 1 中所述的失巢凋亡测定,确定这些细胞的存活力并与未修饰的胎盘干细胞(未与对失巢凋亡相关基因特异的 siRNA 接触的胎盘干细胞;“未处理的”)和与非靶标混合 siRNA(“NTP”,对本文所鉴别的任何失巢凋亡相关基因是非特异的)接触的胎盘干细胞的存活力相比较。

[0301] 如图 4 所示,靶向实施例 1 中所鉴别的多个失巢凋亡相关基因导致与未处理和 NTP 胎盘干细胞组(在任何情况下,相对于 NTP 胎盘干细胞组,失巢凋亡相关基因特异性 siRNA 所靶向的胎盘干细胞显示出提高的存活力)相比,胎盘干细胞的存活力提高。基于与未修饰的胎盘干细胞相比,在低贴壁条件下增加的存活能力,靶向失巢凋亡相关基因后显示出存活力提高的胎盘干细胞代表了抗失巢凋亡的胎盘干细胞(arPSC)。CyQuant 直接活力测定验证在与 MTS 测定相当条件下,可以通过靶向胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因产生 arPSC(图 5)。

[0302] 对所选择的失巢凋亡相关基因进行进一步分析,胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因的抑制导致失巢凋亡测定(即低贴壁条件)中胎盘干细胞存活力显著提高。具体地,另外评价了以下失巢凋亡相关基因的抑制作用:含 FH2 域 1(FHDC1;NCBI GENE ID NO:85462)、鸟苷酸结合蛋白 α 抑制 2(GNAI2;NCBI GENE ID NO:2771)、含激酶非催化 C-端半段结构域 1(KNDC1;NCBI GENE ID NO:85442)、溶血磷脂酸受体 4(LPAR4;NCBI GENE ID NO:2846)、有丝分裂原-激活的蛋白激酶激酶激酶 5(MAP3K5;NCBI GENE ID NO:4217)、溶质运载蛋白家族 2,成员 3(SLC2A3;NCBI GENE ID NO:6515)和 staufer 同源物 2(STAU2;NCBI GENE ID NO:27067)。

[0303] CyQuant 直接活力测定确认在如上所述的失巢凋亡测定中培养 48 小时后,可以通过靶向胎盘干细胞中失巢凋亡相关基因产生 arPSC(图 6)。每个测定的失巢凋亡相关基因的抑制/下调导致与非特异性 siRNA(NTP)靶向的胎盘干细胞相比,胎盘干细胞在低贴壁条件下存活的能力提高,其中所测试的 7 种基因中 5 种的抑制/下调导致胎盘干细胞存活的统计学显著提高,从而确认胎盘干细胞成为抗失巢凋亡的。

[0304] 为了进一步确认抗失巢凋亡的干细胞的存活力,其中溶质运载蛋白家族 2,成员 3(SLC2A3;NCBI GENE ID NO:6515)抑制/下调的 arPSC 群体和相等量的未修饰的胎盘干细胞在低贴壁条件下单独培养 3 天。三天培养期后,使用显微镜检查使两个细胞群显象。图 7 显示与存活的未修饰的胎盘干细胞相比(图 7B),在培养期后较高数目的抗失巢凋亡的胎盘干细胞保持存活(图 7A)。

[0305] 本实施例显示可以使用调控失巢凋亡相关基因表达的方法(包括用 siRNA 靶向这些基因),通过靶向胎盘干细胞中特定的失巢凋亡相关基因使胎盘干细胞抗失巢凋亡。基于它们不需要贴壁的基底以保持体内存活(例如,全身或局部施用于受试者后)的事实,可以有利地将在本实施例中产生的 arPSC 用作治疗剂,并且还可以作为悬浮培养在胎盘干细胞的大规模增殖中有利地使用所述 arPSC。

[0306] 等同性:

[0307] 本文所公开的组合物和方法不限于本文所述的具体实施方式的范围。事实上,根据以上说明和附图,除所述那些之外,所述组合物和方法的多种改变对于那些本领域技术人员将是显而易见的。这些改变旨在包括在所附权利要求的范围内。

[0308] 在本文中引用了多篇出版物、专利和专利申请,以上出版物、专利和专利申请的公开内容以其全部内容作为参考并入。

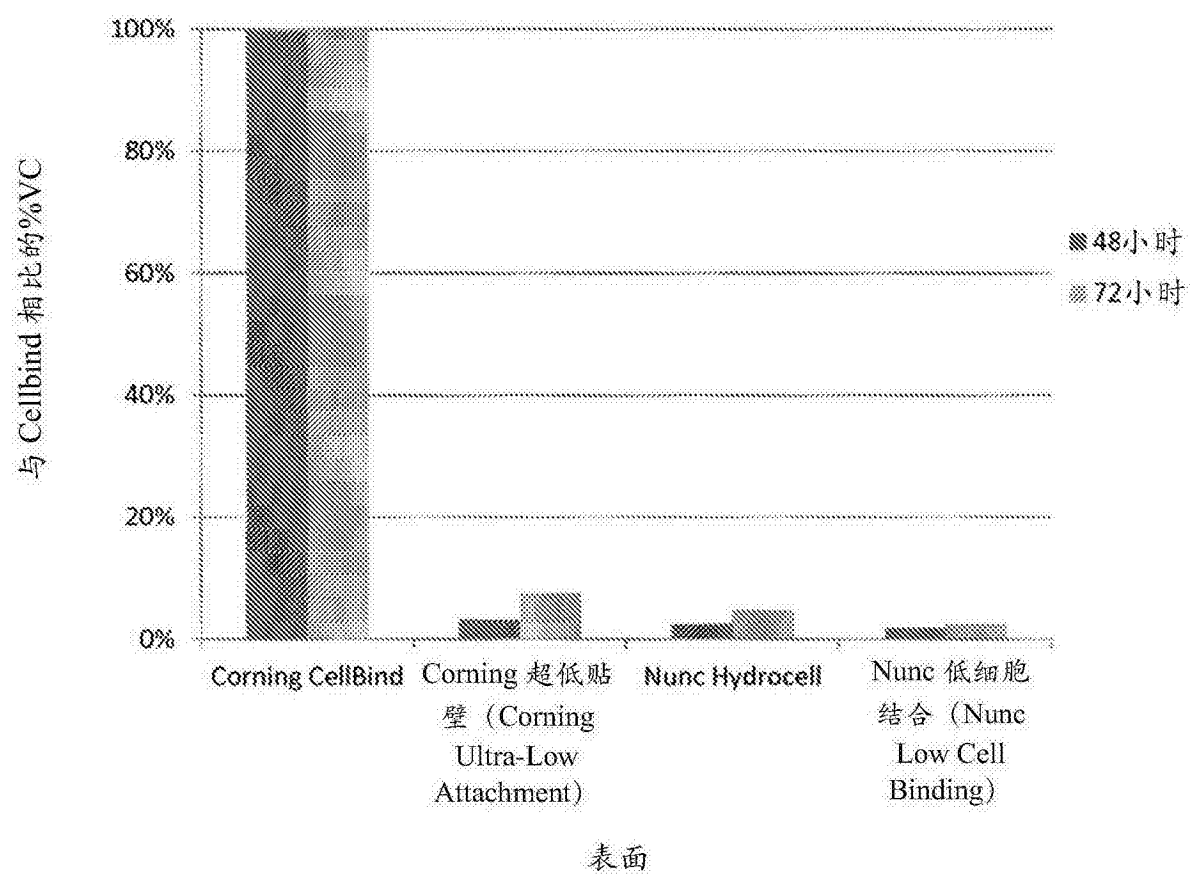


图 1

Coning 超低贴壁表面

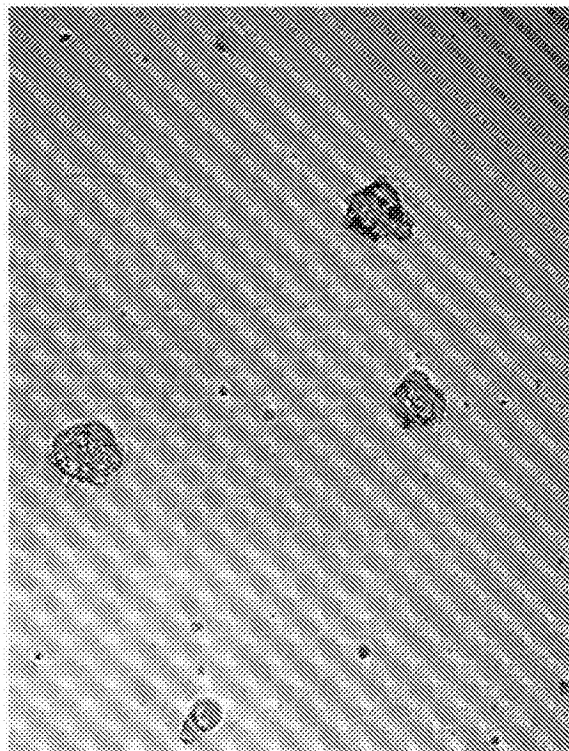
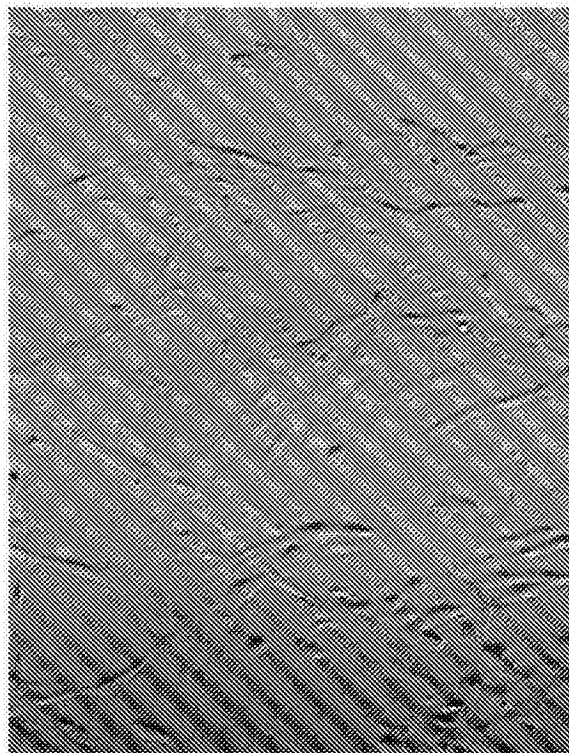
Coning Cellbind 贴壁表面;
贴壁

图 2

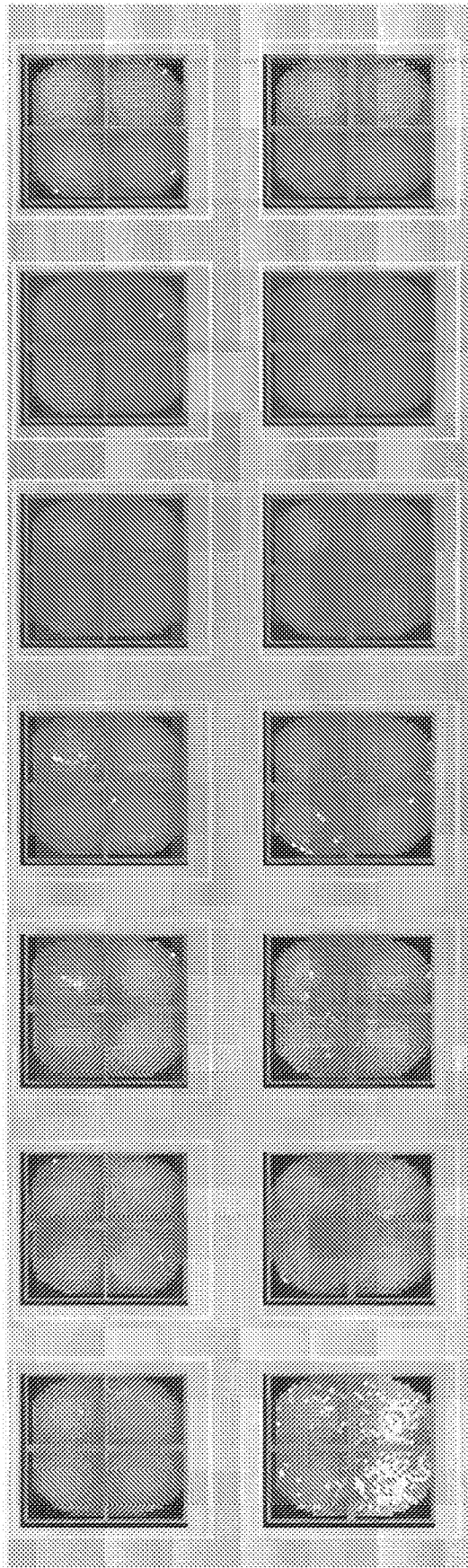


图 3

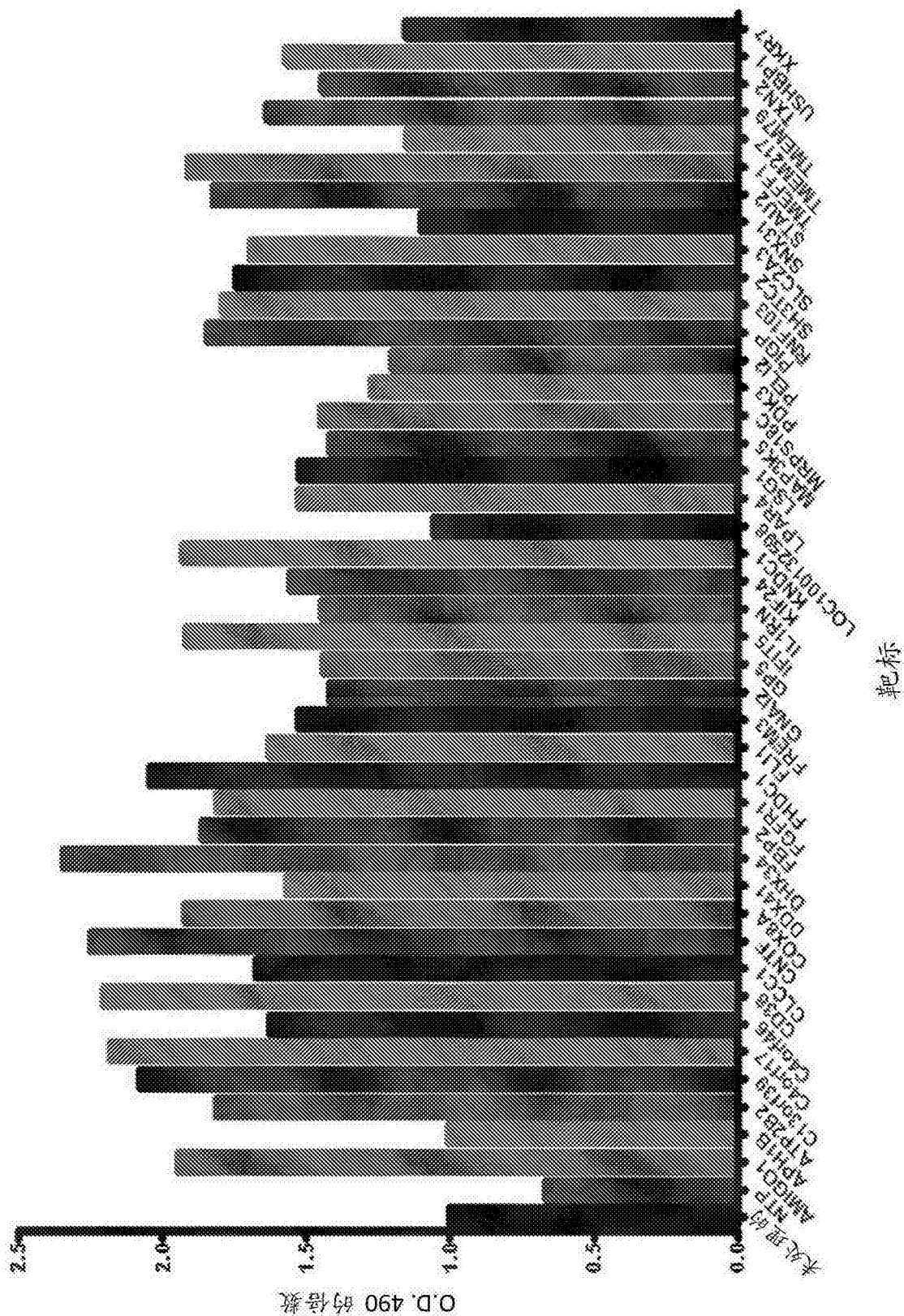


图 4

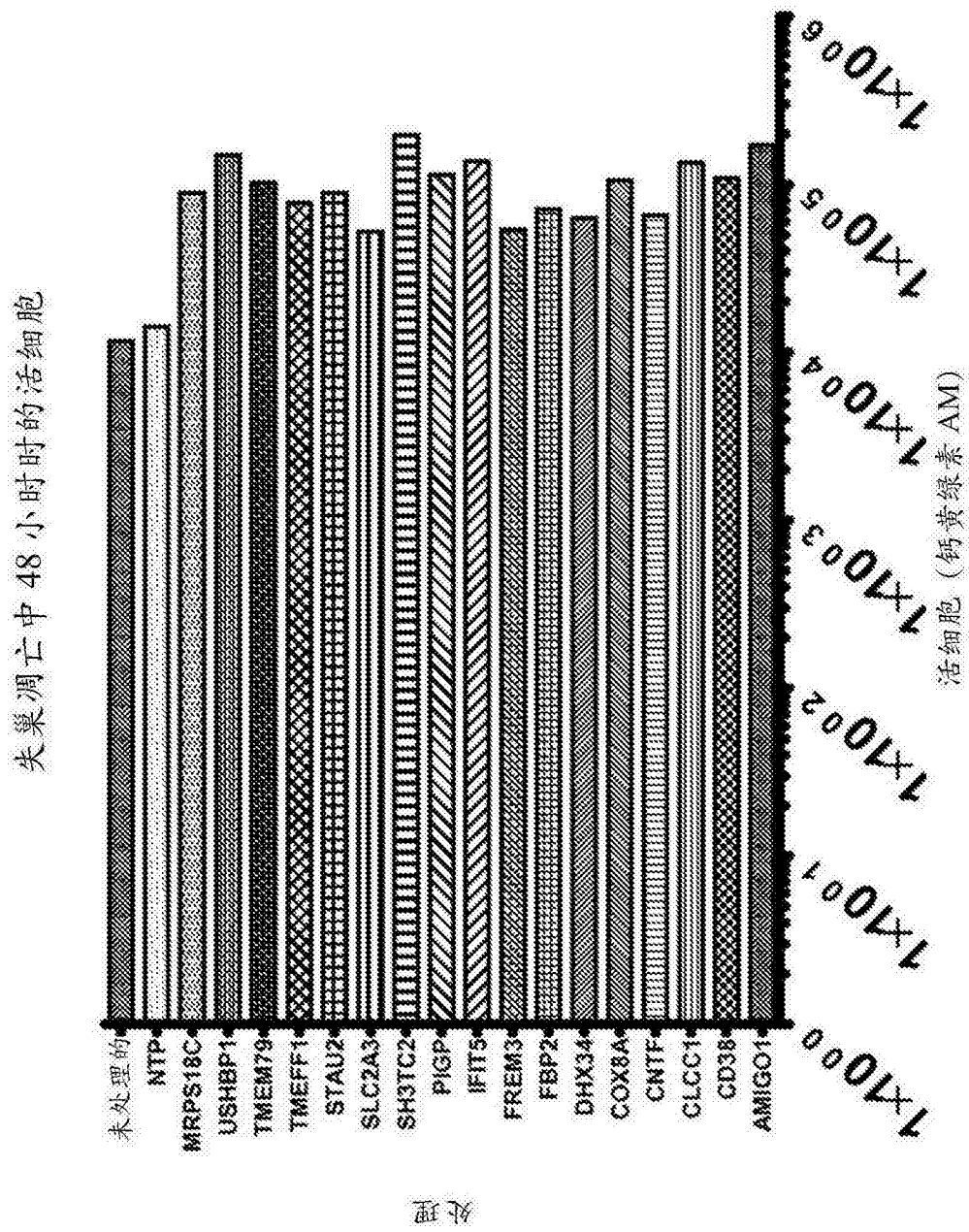


图 5

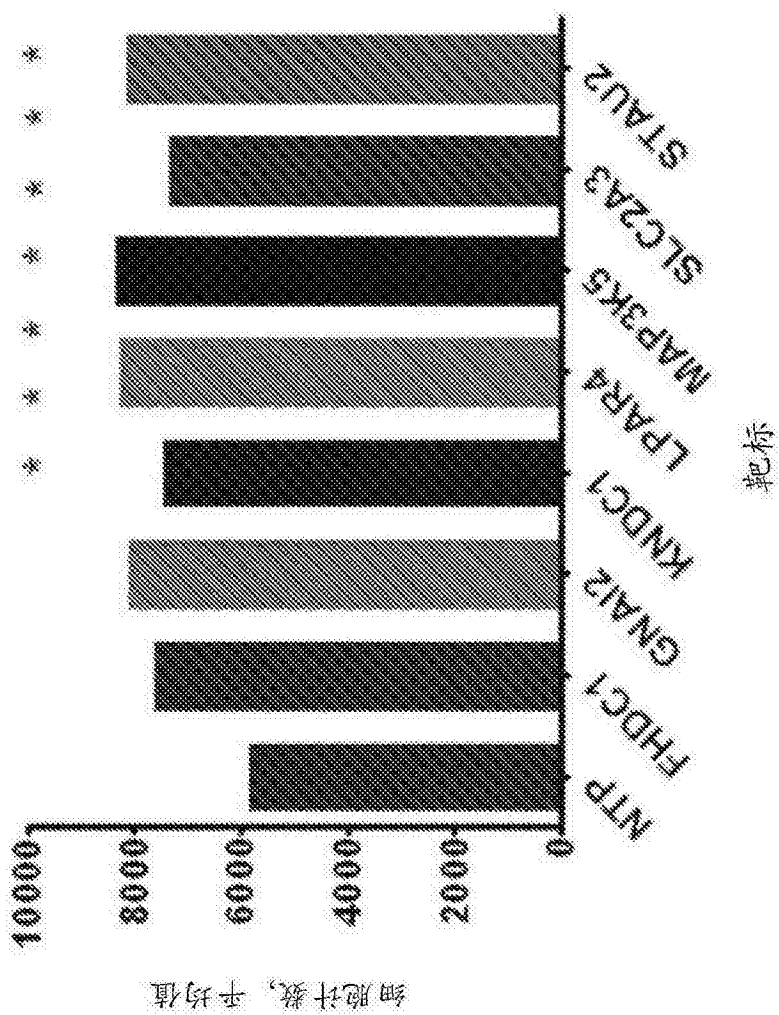


图 6

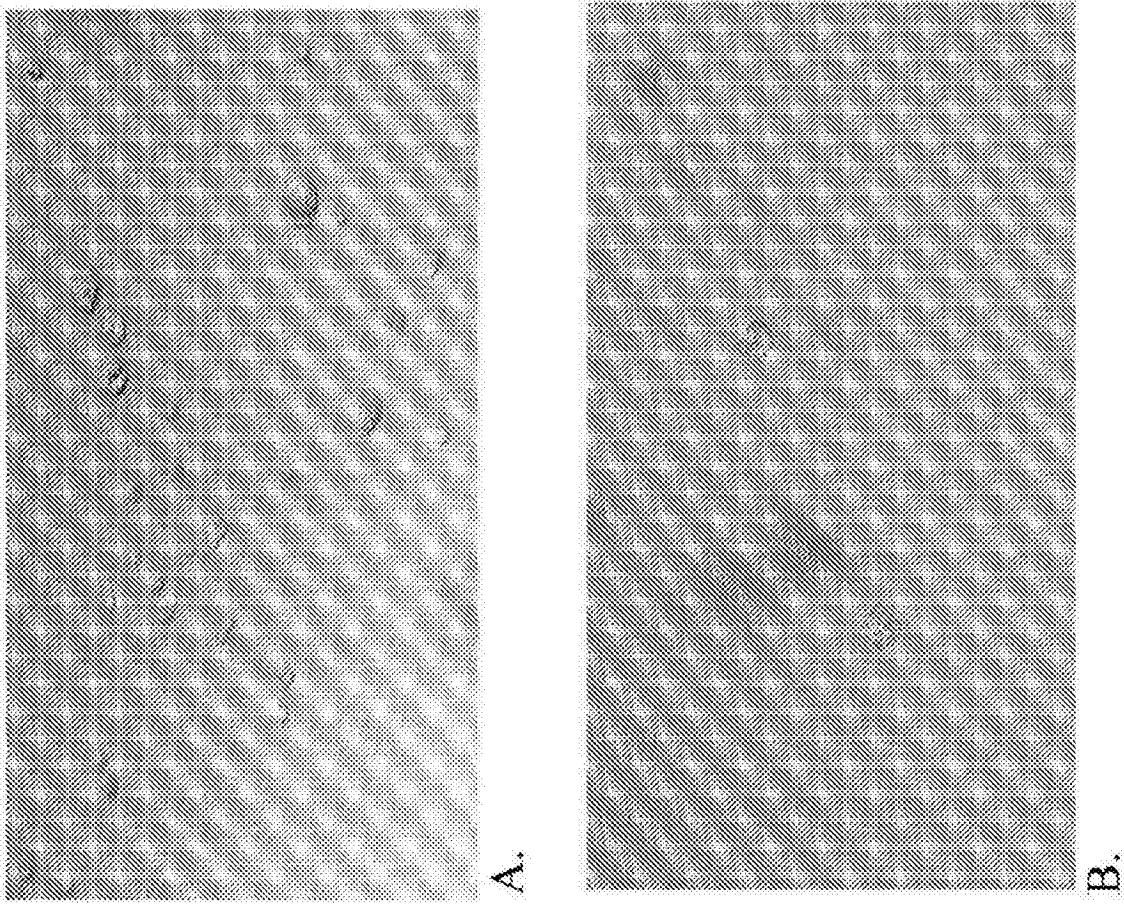


图 7