



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113679740 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 23

(21) 申请号 202110968902.4

(22) 申请日 2014.11.14

(30) 优先权数据

61/905,076 2013.11.15 US

61/905,077 2013.11.15 US

(62) 分案原申请数据

201480073194.6 2014.11.14

(71) 申请人 人类起源公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 乔迪·P·格尼 张小葵

斯泰西·赫布

罗伯特·J·哈黎里

(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 韦昌金

(51) Int.Cl.

A61K 35/50 (2015.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61K 35/28 (2015.01)

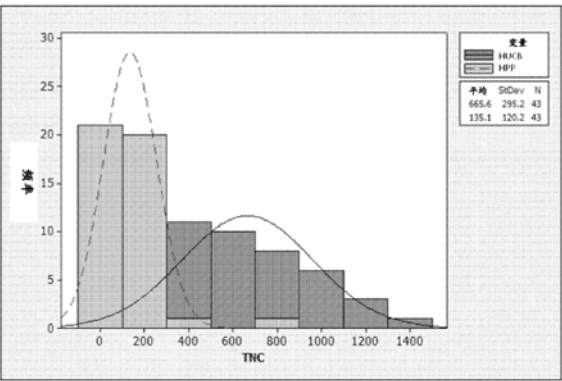
权利要求书3页 说明书34页 附图10页

(54) 发明名称

包含人胎盘灌注液细胞、其亚群的组合物及其用途

(57) 摘要

本文提供了包含来自人胎盘灌注液的单核细胞的组合物和使用该细胞的方法,包括使用该细胞和造血细胞以例如建立嵌合体,降低移植物抗宿主疾病的严重程度或持续时间,治疗或减轻肌肉减少症、代谢紊乱和血液学疾病例如恶性血液病的症状,和治疗或减轻缺血性脑病(例如,缺氧缺血性脑病)及其它中枢神经系统损伤的症状。



1. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物,其中人胎盘灌注液包含至少 $6 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>细胞。
2. 权利要求1的组合物,其中该组合物进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>细胞。
3. 权利要求1的组合物,其中该组合物进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>细胞。
4. 权利要求1的组合物,其中该组合物进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>细胞。
5. 权利要求1的组合物,其中该组合物包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>细胞。
6. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物,其中人胎盘灌注液包含至少 $5 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。
7. 权利要求6的组合物,其中该组合物进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。
8. 权利要求6的组合物,其中该组合物进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。
9. 权利要求6的组合物,其中该组合物进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。
10. 权利要求6的组合物,其中该组合物包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。
11. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物,其中人胎盘灌注液包含至少 $6 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>细胞。
12. 权利要求11的组合物,其中该组合物进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>细胞。
13. 权利要求11的组合物,其中该组合物进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>细胞。
14. 权利要求11的组合物,其中该组合物进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>细胞。
15. 权利要求11的组合物,其中该组合物包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>细胞。
16. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物,其中人胎盘灌注液包含至少 $5 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>细胞。
17. 权利要求16的组合物,其中该组合物进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>细胞。
18. 权利要求16的组合物,其中该组合物进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>细胞。
19. 权利要求16的组合物,其中该组合物进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>细胞。
20. 权利要求16的组合物,其中该组合物包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>细胞。
21. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物,其中人胎盘灌注液包含至少 $5 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞。
22. 权利要求21的组合物,其中该组合物进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞。
23. 权利要求21的组合物,其中该组合物进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞。
24. 权利要求21的组合物,其中该组合物进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞。
25. 权利要求21的组合物,其中该组合物包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞。
26. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物,其中人胎盘灌注液包含至少 $6 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。
27. 权利要求26的组合物,其中该组合物进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。
28. 权利要求26的组合物,其中该组合物进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。
29. 权利要求26的组合物,其中该组合物进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。
30. 权利要求26的组合物,其中该组合物包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。
31. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物,其中人胎盘灌注液包含至少 $7 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>

CD117<sup>-</sup>细胞。

32. 权利要求31的组合物, 其中该组合物进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。

33. 权利要求31的组合物, 其中该组合物进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。

34. 权利要求31的组合物, 其中该组合物进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。

35. 权利要求31的组合物, 其中该组合物包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。

36. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物, 其中人胎盘灌注液包含至少 $6 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。

37. 权利要求36的组合物, 其中该组合物进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。

38. 权利要求36的组合物, 其中该组合物进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。

39. 权利要求36的组合物, 其中该组合物进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。

40. 权利要求36的组合物, 其中该组合物包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。

41. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物, 其中人胎盘灌注液包含至少 $3 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。

42. 权利要求40的组合物, 其中该组合物进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。

43. 权利要求40的组合物, 其中该组合物进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。

44. 权利要求40的组合物, 其中该组合物进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。

45. 权利要求40的组合物, 其中该组合物是基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。

46. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物, 其中人胎盘灌注液包含至少 $3 \times 10^4$  CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。

47. 权利要求46的组合物, 其中该组合物进一步包含2倍更多数量的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。

48. 权利要求46的组合物, 其中该组合物进一步包含10倍更多数量的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。

49. 权利要求46的组合物, 其中该组合物进一步包含50倍更多数量的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。

50. 权利要求46的组合物, 其中该组合物是基本上纯的人胎盘灌注液CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。

51. 权利要求1-50任一项的组合物, 其中人胎盘灌注液分离自单一胎盘灌注。

52. 治疗对象中的中枢神经系统损伤、疾病或障碍的方法, 包括对对象给药权利要求1-50任一项的组合物和来自另一来源的造血细胞。

53. 权利要求52的方法, 其中所述中枢神经系统损伤、疾病或障碍是缺氧缺血性脑病。

54. 治疗对象中的肌肉减少症的方法, 包括对对象给药权利要求1-50任一项的组合物

和来自另一来源的造血细胞。

55. 诱导对象中的嵌合体的方法, 包括对对象给药权利要求1-50任一项的组合物和来自另一来源的造血细胞。

56. 用于对象中的细胞移植的方法, 包括对对象给药权利要求1-50任一项的组合物和来自另一来源的造血细胞。

57. 降低对象中的移植物抗宿主疾病 (GVHD) 的严重程度或持续时间的方法, 包括对对象给药权利要求1-50任一项的组合物和来自另一来源的造血细胞。

58. 治疗对象中的代谢障碍的方法, 包括对对象给药权利要求1-50任一项的组合物和来自另一来源的造血细胞。

59. 治疗对象中的血液学疾病或恶性血液病的方法, 包括对对象给药权利要求1-50任一项的组合物和来自另一来源的造血细胞。

60. 用于下述方法的如权利要求1-50任一项中定义的组合物:

(a) 治疗对象中的中枢神经系统损伤、疾病或障碍, 优选的所述中枢神经系统损伤、疾病或障碍是缺氧缺血性脑病;

(b) 在对象中诱导嵌合体;

(c) 用于细胞移植;

(d) 用于降低对象中移植物抗宿主疾病 (GVHD) 的严重程度或持续时间;

(e) 治疗对象中的代谢障碍;

(f) 治疗对象中的血液学疾病或恶性血液病; 或

(g) 治疗对象中的肌肉减少症。

61. 用于权利要求60中的用途的组合物, 其中该组合物进一步包含来自另一来源的造血细胞。

## 包含人胎盘灌注液细胞、其亚群的组合物及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请为2014年11月14日提交的、发明名称为“包含人胎盘灌注液细胞、其亚群的组合物及其用途”、申请号为201480073194.6的中国发明专利申请的分案申请。

[0003] 本申请要求2013年11月15日提交的美国临时专利申请号61/905,076和2013年11月15日提交的美国临时专利申请号61/905,077的权益,其公开内容在此全文引入作为参考。

### 1. 技术领域

[0004] 本文提供了包含来自人胎盘灌注液的单核细胞的组合物和使用该方法,包括将该细胞与造血细胞一起使用,例如用于建立嵌合体(chimerism);降低移植物抗宿主疾病的严重程度或持续时间;治疗或减轻肌肉减少症的症状、代谢紊乱和血液学疾病例如恶性血液病;和治疗或减轻缺血性脑病的症状(例如,缺氧缺血性脑病)及其它中枢神经系统损伤。

### 2. 背景技术

[0005] 胎盘灌注液包含通过将灌注液穿过胎盘脉管系统获得的胎盘细胞集合和来自脉管系统、来自胎盘的母体表面、或来自两者的灌注液集合。灌注哺乳动物胎盘的方法描述于,例如,美国专利号7,045,146和美国专利号7,255,879。通过灌注获得的胎盘细胞的群是不均匀的,包括,尤其是,CD34<sup>+</sup>细胞,有核细胞例如粒细胞,单核细胞和巨噬细胞,和组织培养基质-贴壁胎盘干细胞。

### 3. 发明概述

[0007] 本文提供了包含分离的人胎盘灌注液的组合物。在特别的实施方式中,人胎盘灌注液包含至少 $6 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>细胞。在一个更具体的实施方式中,人胎盘灌注液包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>细胞。

[0008] 在其它特别的实施方式中,人胎盘灌注液包含至少 $5 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。在一个更具体的实施方式中,人胎盘灌注液包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。

[0009] 在其它特别的实施方式中,人胎盘灌注液包含至少 $6 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>细胞。在一个更具体的实施方式中,人胎盘灌注液包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>细胞。

[0010] 在其它特别的实施方式中,人胎盘灌注液包含至少 $5 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>细胞。在一个更具体的实施方式中,人胎盘灌注液包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>细胞。

[0011] 在其它特别的实施方式中,人胎盘灌注液包含至少 $5 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞。在一个更具体的实施方式中,人胎盘灌注液包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞。

[0012] 在其它特别的实施方式中,人胎盘灌注液包含至少 $6 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。在一个更具体的实施方式中,人胎盘灌注液包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。

[0013] 在其它特别的实施方式中,人胎盘灌注液包含至少 $7 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。在一个更具体的实施方式中,人胎盘灌注液包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。

[0014] 在其它特别的实施方式中,人胎盘灌注液包含至少 $6 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。在一个更具体的实施方式中,人胎盘灌注液包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。

[0015] 在其它特别的实施方式中,人胎盘灌注液包含至少 $3 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。在一个更具体的实施方式中,人胎盘灌注液包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。

[0016] 在其它特别的实施方式中,人胎盘灌注液包含至少 $3 \times 10^4$ CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含2倍更多数量的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含10倍更多数量的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。在一些实施方式中,人胎盘灌注液进一步包含50倍更多数量的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。在一个更具体的实施方式中,人胎盘灌注液包含基本上纯的人胎盘灌注液CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。

[0017] 在一些实施方式中,人胎盘灌注液分离自对单一胎盘的灌注。

[0018] 本文还提供了治疗对象中的中枢神经系统损伤、疾病或障碍的方法,包括对对象施用含有本文提供的分离的人胎盘灌注液和来自另一来源的造血细胞的组合物。在一个具

体实施方式中,所述中枢神经系统损伤、疾病或障碍是缺血性脑病(例如,缺氧缺血性脑病)。

[0019] 本文还提供了治疗对象中肌肉减少症的方法,包括对对象施用含有本文提供的分离的人胎盘灌注液和来自另一来源的造血细胞的组合物。

[0020] 本文提供了在对象中诱导嵌合体的方法,包括对对象施用含有本文提供的分离的人胎盘灌注液和来自另一来源的造血细胞的组合物。

[0021] 本文提供了用于对象中细胞移植的方法,包括对对象施用含有本文提供的分离的人胎盘灌注液和来自另一来源的造血细胞的组合物。

[0022] 本文提供了用于降低对象中移植物抗宿主疾病(GVHD)的严重程度或持续时间的方法,包括对对象施用含有本文提供的分离的人胎盘灌注液和来自另一来源的造血细胞的组合物。

[0023] 本文提供了治疗对象中代谢障碍的方法,包括对对象施用含有本文提供的分离的人胎盘灌注液和来自另一来源的造血细胞的组合物。

[0024] 本文提供了治疗对象中的血液学疾病或恶性血液病的方法,包括对对象施用含有本文提供的分离的人胎盘灌注液和来自另一来源的造血细胞的组合物。

[0025] 本文提供了用于下述方法的包含分离的人胎盘灌注液或人胎盘灌注液细胞的组合物:(a)用于治疗对象中的中枢神经系统损伤、疾病或障碍,优选的所述中枢神经系统损伤、疾病或障碍是缺氧缺血性脑病;(b)用于在对象中诱导嵌合体;(c)用于细胞移植;(d)用于降低对象中移植物抗宿主疾病(GVHD)的严重程度或持续时间;(e)用于治疗对象中的代谢障碍;(f)用于治疗对象中的血液学疾病或恶性血液病;或(g)用于治疗对象中的肌肉减少症。

[0026] 本文还提供了用于下述方法的包含分离的人胎盘灌注液或人胎盘灌注液细胞的组合物:(a)用于治疗对象中的中枢神经系统损伤、疾病或障碍,优选的所述中枢神经系统损伤、疾病或障碍是缺氧缺血性脑病;(b)用于在对象中诱导嵌合体;(c)用于细胞移植;(d)用于降低对象中移植物抗宿主疾病(GVHD)的严重程度或持续时间;(e)用于治疗对象中的代谢障碍;(f)用于治疗对象中的血液学疾病或恶性血液病;或(g)用于治疗对象中的肌肉减少症,其中该组合物进一步包含来自另一来源的造血细胞。

[0027] 4.附图简述

[0028] 图1描述了43个人胎盘灌注液和脐带血单位配对的全有核细胞计数。

[0029] 图2A-2C描述了人胎盘灌注液细胞(A) 闸门(gated) 优先CD45<sup>+</sup>细胞(B) 和闸门优先CD34<sup>+</sup>细胞(C)的FACS分析。

[0030] 图3A-3E描述了人胎盘灌注液(A) 和脐带血(B) 闸门优先CD34<sup>+</sup>细胞的比较。然后人胎盘灌注液细胞闸门CD34<sup>+</sup>细胞(C) 可以被分选以分离CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>(D) 和CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>(E) 细胞。

[0031] 图4描述了人胎盘灌注液(HPP) 或脐带血(HUCB) 中表达特异性CD34<sup>+</sup>表型的有核细胞百分比。

[0032] 图5描述了使用人胎盘灌注液内皮细胞(上图) 的脂蛋白摄入实验和HUVECs和人胎盘灌注液(HPP) 细胞中观察到的微管形成(下图)。

[0033] 图6描述了人胎盘灌注液(HPP) 或脐带血(HUCB) 中表达CD34和/或巢蛋白的有核细胞百分比。

[0034] 图7描述了人胎盘灌注液 (HPP) 或脐带血 (HUCB) 中表达特异性HLA抗原的有核细胞百分比。

[0035] 图8描述了人胎盘灌注液或脐带血 (HUCB) 中表达CD3而有或没有CD4和有或没有CD8的有核细胞百分比。

[0036] 5. 发明详述

[0037] 在多个方面, 本文提供了生产来自人胎盘灌注液的单核细胞 (HPC) 的方法, 例如人胎盘灌注液, 包含该细胞的组合物, 和该细胞在治疗患有中枢神经系统损伤、疾病、障碍或病况的个体中的用途。在一个更具体的实施方式中, 所述疾病、障碍或病况是缺血性脑病 (例如, 缺氧缺血性脑病)。本文还提供了对对象 (例如人对象) 施用HPC (例如人胎盘灌注液) 以减轻移植物抗宿主疾病严重程度和治疗或减轻代谢和血液学疾病的症状 (例如恶性血液病) 的方法。本文还提供了对对象 (例如人对象) 施用HPC (例如人胎盘灌注液) 以治疗或减轻肌肉减少症的症状的方法。

[0038] 5.1 包含胎盘灌注液细胞的组合物和使用其的方法

[0039] 胎盘灌注液包含如本文所述获得自流经胎盘的灌注溶液的总单核细胞。通常, 来自单一胎盘灌注的胎盘灌注液包含约100百万个至约500百万个有核细胞。在某些实施方式中, 来自单一胎盘灌注的胎盘灌注液包含约100百万个至约400百万个有核细胞, 约100百万个至约300百万个有核细胞, 或约100百万个至约200百万个有核细胞。

[0040] 用于按照本公开的用途的来自人胎盘灌注液的单核细胞 (HPC), 例如, 人胎盘灌注液, 可以以任何医学或药学可接受方式进行收集, 并可存在于组合物中, 例如, 药物组合物。在某些实施方式中, 本文提供的组合物 (例如, 药物组合物, 即, 适于对人施用的制药等级的溶液) 包含人胎盘灌注液。

[0041] 在某些实施方式中, 胎盘灌注液或灌注液细胞包含CD34<sup>+</sup>细胞, 例如, 造血干细胞或祖细胞或内皮祖细胞。在一个更具体的实施方式中, 这种细胞可以包含CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>干细胞或祖细胞, CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>干细胞或祖细胞, 骨髓祖细胞, 淋巴祖细胞, 和/或红系祖细胞。

[0042] 在其它实施方式中, 胎盘灌注液和胎盘灌注液细胞包含, 例如, 内皮祖细胞, 骨祖细胞, 和/或自然杀伤细胞。

[0043] 在某些实施方式中, 从胎盘中收集并去除红细胞的胎盘灌注液, 或从该灌注液中分离的灌注液细胞, 包含约60-90%, 例如, 约60%, 65%, 70%, 80%, 85%, 或90%, 例如, 约60-90%, 65-90%, 70-90%或约75-90%的白细胞。在某些实施方式中, 从胎盘中收集并去除红细胞的胎盘灌注液, 或从该灌注液中分离的灌注液细胞, 包含约2-11%, 例如, 约2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10或11%, 例如, 约5-8%, 或约6-7%的自然杀伤细胞 (CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>); 和/或约7-37%, 例如, 约7, 8, 9, 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, 35, 36, 或37%, 例如, 约20-25%, 约22-24%, 或约22-23%的T细胞 (CD3<sup>+</sup>); 和/或约5-15%, 例如, 约5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 或15%, 例如, 约8-12%, 或约10-11%B细胞 (CD19<sup>+</sup>); 和/或约20-32%, 例如, 约20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 或32%, 例如, 约22-28%, 25-28%, 或约26-27%的单核细胞 (CD14<sup>+</sup>); 和/或约1-5%, 例如, 约1, 2, 3, 4, 或5%, 例如约2-4%或约2-3%的内皮祖细胞 (例如, CD34<sup>+</sup>, CD31<sup>+</sup>); 和/或约0.5-5%, 例如, 约0.5, 1, 2, 3, 4, 或5%, 例如约2-4%或约2-3%的神经祖细胞 (巢蛋白<sup>+</sup>); 和/或约1-7%, 例如, 约1, 2, 3, 4, 5, 6, 或7%, 例如约2-4%或约3-4%的造血祖细胞 (CD34



<sup>+</sup>);和/或约1-5%,例如,约1,2,3,4,或5%,例如约2-4%,约2-3%,或约1-2%的贴壁胎盘干细胞(例如,CD34<sup>+</sup>,CD117<sup>-</sup>,CD105<sup>+</sup>和CD44<sup>+</sup>),如通过例如流式细胞术如FACS分析测定。

[0044] 在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞包含CD34<sup>+</sup>细胞。在一个更具体的实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>细胞是CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。在另一实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>细胞分离自胎盘。在又一实施方式中,所述胎盘灌注液细胞群进一步包含不是分离自所述灌注液的额外的分离的CD34<sup>+</sup>细胞(例如,分离自脐带血,胎盘血,外周血,骨髓,等等)。在另一实施方式中,所述额外的CD34<sup>+</sup>细胞分离自脐带血,胎盘血,外周血,或骨髓。

[0045] 在其它实施方式中,CD34<sup>+</sup>细胞另外是CD117<sup>-</sup>。在某些实施方式中,CD34<sup>+</sup>细胞另外是CD31<sup>+</sup>,CXCR4<sup>+</sup>,和/或KDR<sup>+</sup>。在某些实施方式中,CD34<sup>+</sup>细胞另外是CD140a<sup>+</sup>。在某些实施方式中,CD34<sup>+</sup>细胞另外是巢蛋白<sup>+</sup>。在某些实施方式中,所述人胎盘灌注液细胞,例如所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更多的CD117<sup>-</sup>细胞。在某些实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更多的CD31<sup>+</sup>,CXCR4<sup>+</sup>,和/或KDR<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,任意所述CD34<sup>+</sup>细胞是CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。在某些实施方式中,所述人胎盘灌注液细胞,例如所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更多的CD140a<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述人胎盘灌注液细胞,例如所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更多的巢蛋白<sup>+</sup>细胞。

[0046] 在另一具体实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞以比相当量的来自脐带血的CD34<sup>+</sup>细胞更高的水平产生大量的一种或多种血管生成相关的标记。在具体实施方式中,所述标记包括CD31,KDR和/或CXCR4。在一个具体实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>细胞是CD45<sup>-</sup>。在一个更具体的实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>细胞或CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞比相当量的来自脐带血的CD34<sup>+</sup>细胞表达更高水平的至少一种CD31,CXCR4或KDR。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>胎盘细胞比相当量的脐带血细胞表达更高水平的巢蛋白。

[0047] 在另一具体实施方式中,所述胎盘灌注液富集CD34<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液富集CD45<sup>-</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液富集CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液富集CD31<sup>+</sup>,KDR<sup>+</sup>和/或CXCR4<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液富集CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>,CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>,和/或CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液富集CD140a<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液富集CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液富集CD117<sup>-</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液富集CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液富集CD38<sup>-</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液富集CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液富集巢蛋白<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液富集CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液富集CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。

[0048] 关于富集,特定细胞群可以通过,例如,将该细胞类型引入细胞群、在细胞群中增加额外数量的细胞类型和/或从细胞群中去除(去除一些或总的)一种或多种细胞类型,例如,表现不同的特异性细胞表面标记表型的细胞,来富集一种或多种细胞类型,例如,表现特异性细胞表面标记表型的细胞。

[0049] 在一些实施方式中,在所述胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中富集特定细胞群或细胞亚群通过一轮或多轮的细胞分选,例如,FACS细胞分选来完成。在一些实施方式中,在所述胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中富集特定细胞群或细胞亚群通过去除一个或多个细胞

群或细胞亚群来完成。在一些实施方式中,在所述胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中富集特定细胞群或细胞亚群通过添加已被分离自胎盘灌注液的细胞群或细胞亚群来完成。在一些实施方式中,在所述胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中富集特定细胞群或细胞亚群通过添加已被分离自另一来源(例如脐带血)的细胞群或细胞亚群来完成。在一些实施方式中,在所述胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中富集特定细胞群或细胞亚群通过添加已针对该细胞群或细胞亚群进行了富集的胎盘灌注液来完成。在其它实施方式中,在所述胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中富集特定细胞群或细胞亚群通过扩增该细胞群或细胞亚群来完成。在一些实施方式中,在所述胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中富集特定细胞群或细胞亚群通过增加所述胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中那些细胞的总数来完成。在一些实施方式中,在所述胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中富集特定细胞群或细胞亚群通过增加所述胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中那些细胞的比例来完成。在一些实施方式中,在所述胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中富集特定细胞群或细胞亚群通过培养扩增特定细胞群或细胞亚群来完成。在一些实施方式中,去除所述胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中的特定细胞群或细胞亚群通过培养扩增另一特定细胞群或细胞亚群来完成。富集或分离特定细胞群或细胞亚群可以在扩增特定细胞群或细胞亚群后进行,或对来自胎盘灌注液的总有核细胞进行。

[0050] 在另一具体实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含约 $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ , 或  $9 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $6 \times 10^5$ 至 $3 \times 10^7$  CD34<sup>+</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^7$  CD34<sup>+</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^8$  CD34<sup>+</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^4$ 至 $1 \times 10^8$  CD34<sup>+</sup>细胞。在一个具体实施方式中,用针对CD34的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选获得所述CD34<sup>+</sup>细胞。在一些实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>细胞已从胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞中分离。在一些实施方式中,胎盘灌注液的CD34<sup>+</sup>细胞已培养扩增。

[0051] 在另一具体实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含约10% CD34<sup>+</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含8%至12% CD34<sup>+</sup>细胞。

[0052] 在另一具体实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含约 $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ , 或  $9 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $5 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^7$  CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^7$  CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^8$  CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^4$ 至 $1 \times 10^8$  CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。在一个具体实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞已经用针对CD34的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选、随后用针对CD45的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选获得。在另一具体实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞已经用针对CD45的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选、随后用针对CD34的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选获得。在一些实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞已从胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞中分离。

[0053] 在另一具体实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含约 $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ , 或  $9 \times 10^6$   $CD34^+CD31^+$  细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含  $6 \times 10^5$  至  $3 \times 10^7$   $CD34^+CD31^+$  细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含  $1 \times 10^6$  至  $1 \times 10^7$   $CD34^+CD31^+$  细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含  $1 \times 10^5$  至  $1 \times 10^8$   $CD34^+CD31^+$  细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含  $1 \times 10^4$  至  $1 \times 10^8$   $CD34^+CD31^+$  细胞。在一个具体实施方式中,所述  $CD34^+CD31^+$  细胞已经用针对  $CD34$  的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选、随后用针对  $CD31$  的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选获得。在另一具体实施方式中,所述  $CD34^+CD31^+$  细胞已经用针对  $CD31$  的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选、随后用针对  $CD34$  的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选获得。在一些实施方式中,所述  $CD34^+CD31^+$  细胞已从胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞中分离。

[0054] 在另一具体实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含约  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ , 或  $9 \times 10^6$   $CD34^+KDR^+$  细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含  $5 \times 10^5$  至  $2 \times 10^7$   $CD34^+KDR^+$  细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含  $1 \times 10^6$  至  $1 \times 10^7$   $CD34^+KDR^+$  细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含  $1 \times 10^5$  至  $1 \times 10^8$   $CD34^+KDR^+$  细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含  $1 \times 10^4$  至  $1 \times 10^8$   $CD34^+KDR^+$  细胞。在一个具体实施方式中,所述  $CD34^+KDR^+$  细胞已经用针对  $CD34$  的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选、随后用针对  $KDR$  的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选获得。在另一具体实施方式中,所述  $CD34^+KDR^+$  细胞已经用针对  $KDR$  的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选、随后用针对  $CD34$  的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选获得。在一些实施方式中,所述  $CD34^+KDR^+$  细胞已从胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞中分离。

[0055] 在另一具体实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含约  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ , 或  $9 \times 10^6$   $CD34^+CXCR4^+$  细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含  $6 \times 10^5$  至  $3 \times 10^7$   $CD34^+CXCR4^+$  细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含  $1 \times 10^6$  至  $1 \times 10^7$   $CD34^+CXCR4^+$  细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含  $1 \times 10^5$  至  $1 \times 10^8$   $CD34^+CXCR4^+$  细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含  $1 \times 10^4$  至  $1 \times 10^8$   $CD34^+CXCR4^+$  细胞。在一个具体实施方式中,所述  $CD34^+CXCR4^+$  细胞已经用针对  $CD34$  的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选、随后用针对  $CXCR4$  的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选获得。在另一具体实施方式中,所述  $CD34^+CXCR4^+$  细胞已经用针对  $CXCR4$  的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选、随后用针对  $CD34$  的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选获得。在一些实施方式中,所述  $CD34^+CXCR4^+$  细胞已从胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞中分离。

[0056] 在另一具体实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含约  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ , 或  $9 \times 10^6$   $CD34^+CD38^-$  细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含  $6 \times 10^5$  至  $3 \times 10^7$   $CD34^+CD38^-$  细胞。在另一实

施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^7$ CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^8$ CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^4$ 至 $1 \times 10^8$ CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。在一个具体实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞已经用针对CD34的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选、随后用针对CD38的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选获得。在另一具体实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞已经用针对CD38的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选、随后用针对CD34的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选获得。在一些实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞已从胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞中分离。

[0057] 在另一具体实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含约 $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ , 或 $9 \times 10^6$ CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $7 \times 10^5$ 至 $2 \times 10^7$ CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^7$ CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^8$ CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^4$ 至 $1 \times 10^8$ CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。在一个具体实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞已经用针对CD34的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选、随后用针对CD117的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选获得。在另一具体实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞已经用针对CD117的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选、随后用针对CD34的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选获得。在一些实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞已从胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞中分离。

[0058] 在另一具体实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含约 $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ , 或 $9 \times 10^6$ CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $6 \times 10^5$ 至 $2 \times 10^7$ CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^7$ CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^8$ CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^4$ 至 $1 \times 10^8$ CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。在一个具体实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞已经用针对CD34的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选、随后用针对CD140a的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选获得。在另一具体实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞已经用针对CD140a的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选、随后用针对CD34的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选获得。在一些实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞已从胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞中分离。

[0059] 在另一具体实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含约 $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ , 或 $9 \times 10^6$ CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $6 \times 10^5$ 至 $2 \times 10^7$ CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^7$ CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^8$ CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^4$ 至 $1 \times$

$10^8$ CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。在一个具体实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞已经用针对CD34的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选、随后用针对巢蛋白的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选获得。在另一具体实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞已经用针对巢蛋白的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选、随后用针对CD34的抗体对胎盘灌注液的总有核细胞进行细胞分选获得。在一些实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞已从胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞中分离。

[0060] 在另一具体实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含约 $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ , 或  $9 \times 10^6$  CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $4 \times 10^4$  to  $5 \times 10^6$  CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^7$  CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^8$  CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞包含 $1 \times 10^4$ 至 $1 \times 10^8$  CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。在一个具体实施方式中,所述CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞已被分离。在一个更具体的实施方式中,所述CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞已使用人CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>调节T细胞 (Cat#15861, Stem Cell) 完整试剂盒进行分离。

[0061] 在某些实施方式中,富集的CD34<sup>+</sup>细胞2倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中,富集的CD34<sup>+</sup>细胞3倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中,富集的CD34<sup>+</sup>细胞2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在另一实施方式中,胎盘灌注液细胞是纯的或基本纯的CD34<sup>+</sup>细胞群。

[0062] 在某些实施方式中,富集的CD45<sup>-</sup>细胞2倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中,富集的CD45<sup>-</sup>细胞3倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中,富集的CD45<sup>-</sup>细胞2、3、4、5、6、7、8、9、10、15, 或20倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在另一实施方式中,胎盘灌注液细胞是纯的或基本纯的CD45<sup>-</sup>细胞群。

[0063] 在某些实施方式中,富集的CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞2倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中,富集的CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞3倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中,富集的CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在另一实施方式中,胎盘灌注液细胞是纯的或基本纯的群CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞。

[0064] 在某些实施方式中,富集的CD31<sup>+</sup>, KDR<sup>+</sup>和/或CXCR4<sup>+</sup>细胞2倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中,富集的CD31<sup>+</sup>, KDR<sup>+</sup>和/或CXCR4<sup>+</sup>细胞3倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中,富集的CD31<sup>+</sup>, KDR<sup>+</sup>和/或CXCR4<sup>+</sup>细胞2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在另一实施方式中,胎盘灌注液细胞是纯的或基本纯的CD31<sup>+</sup>, KDR<sup>+</sup>和/或CXCR4<sup>+</sup>细胞群。

[0065] 在某些实施方式中,富集的CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>和/或CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞2倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中,富集的CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>和/或CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞3倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中,

富集的CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>和/或CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在另一实施方式中, 胎盘灌注液细胞是纯的或基本纯的CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>和/或CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞群。

[0066] 在某些实施方式中, 富集的CD117<sup>+</sup>细胞2倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中, 富集的CD117<sup>+</sup>细胞3倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中, 富集的CD117<sup>+</sup>细胞2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在另一实施方式中, 胎盘灌注液细胞是纯的或基本纯的CD117<sup>+</sup>细胞群。

[0067] 在某些实施方式中, 富集的CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>细胞2倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中, 富集的CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>细胞3倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中, 富集的CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>细胞2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在另一实施方式中, 胎盘灌注液细胞是纯的或基本纯的CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>细胞群。

[0068] 在某些实施方式中, 富集的CD38<sup>+</sup>细胞2倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中, 富集的CD38<sup>+</sup>细胞3倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中, 富集的CD38<sup>+</sup>细胞2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在另一实施方式中, 胎盘灌注液细胞是纯的或基本纯的CD38<sup>+</sup>细胞群。

[0069] 在某些实施方式中, 富集的CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>细胞2倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中, 富集的CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>细胞3倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中, 富集的CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>细胞2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在另一实施方式中, 胎盘灌注液细胞是纯的或基本纯的CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>细胞群。

[0070] 在某些实施方式中, 富集的CD140a<sup>+</sup>细胞2倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中, 富集的CD140a<sup>+</sup>细胞3倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中, 富集的CD140a<sup>+</sup>细胞2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在另一实施方式中, 胎盘灌注液细胞是纯的或基本纯的CD140a<sup>+</sup>细胞群。

[0071] 在某些实施方式中, 富集的CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞2倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中, 富集的CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞3倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中, 富集的CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在另一实施方式中, 胎盘灌注液细胞是纯的或基本纯的CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞群。

[0072] 在某些实施方式中, 富集的巢蛋白<sup>+</sup>细胞2倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中, 富集的巢蛋白<sup>+</sup>细胞3倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中, 富集的巢蛋白<sup>+</sup>细胞2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在另一实施方式中, 胎盘灌注液细胞是纯的或基本纯的巢蛋白<sup>+</sup>细胞群。

[0073] 在某些实施方式中, 富集的CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞2倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌

注液细胞。在某些实施方式中,富集的CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞3倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中,富集的CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在另一实施方式中,胎盘灌注液细胞是纯的或基本纯的CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞群。

[0074] 在某些实施方式中,富集的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞2倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中,富集的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞3倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在某些实施方式中,富集的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50倍于未富集的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞。在另一实施方式中,胎盘灌注液细胞是纯的或基本纯的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞群。

[0075] 在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞,比相当量的脐带血细胞表达更低水平的CD3。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞,比相当量的脐带血细胞表达更低水平的CD3和CD8。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞,比相当量的脐带血细胞表达更低水平的CD3和CD4。

[0076] 在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞已被去除了CD3<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞已被去除了CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞已被去除了CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>细胞。

[0077] 在某些实施方式中,去除CD3<sup>+</sup>细胞导致比未去除的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中2倍更少的CD3<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,去除CD3<sup>+</sup>细胞导致比未去除的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中3倍更少的CD3<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,去除CD3<sup>+</sup>细胞导致比未去除的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中2、3、4、5、6、7、8、9、10、15,或20倍更少的CD3<sup>+</sup>细胞。

[0078] 在某些实施方式中,去除CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞导致比未去除的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中2倍更少的CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,去除CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞导致比未去除的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中3倍更少的CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,去除CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞导致比未去除的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50倍更少的CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞。

[0079] 在某些实施方式中,去除CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>细胞导致比未去除的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中2倍更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,去除CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>细胞导致比未去除的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中3倍更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,去除CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>细胞导致比未去除的胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50倍更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>细胞。

[0080] 在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>CD45RA<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细



胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>CD45RA<sup>-</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>CD45RA<sup>-</sup>HLADR<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+/-</sup>CD127<sup>+/-</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+/-</sup>CD127<sup>+/-</sup>CD45RA<sup>+</sup>HLADR<sup>-</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+/-</sup>CD127<sup>+/-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+/-</sup>CD127<sup>+/-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+/-</sup>CD127<sup>+/-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+/-</sup>CD127<sup>+/-</sup>CD45RA<sup>-</sup>HLADR<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+/-</sup>CD127<sup>+/-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD69<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌注液细胞,例如,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血细胞包含更少的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD69<sup>+</sup>细胞。

[0081] 在某些实施方式中,本文描述的任何CD34<sup>+</sup>细胞或CD34<sup>+</sup>细胞群被扩增。在某些实施方式中,本文描述的任何CD34<sup>+</sup>细胞或CD34<sup>+</sup>细胞群被富集。在某些实施方式中,本文描述的任何CD3<sup>+</sup>细胞,例如CD34<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>细胞,被去除。

[0082] 在某些实施方式中,对所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞进行处理以抑制CD3<sup>+</sup>细胞增殖。在某些实施方式中,对所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞进行处理以抑制CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞增殖。在某些实施方式中,对所述胎盘灌注液或所述胎盘灌注液细胞进行处理以抑制CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>细胞增殖。在一个具体实施方式中,CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>细胞增殖的抑制通过添加分离的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞来完成。

[0083] 胎盘灌注液、胎盘灌注液细胞及其任何群和亚群可以进行组合。在一个实施方式中,一种或多种所述胎盘灌注液细胞群或亚群与来自胎盘灌注液的总有核细胞组合。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液细胞的一种或多种群或亚群彼此组合。在一个具体实施方式中,所述一种或多种群或亚群已富集一种或多种特定表型的细胞。在另一具体实施方式



中,所述一种或多种群或亚群已从自胎盘灌注液或胎盘灌注液细胞中分离。在另一具体实施方式中,所述一种或多种群或亚群通过一轮或多轮细胞分选获得。在另一具体实施方式中,所述一种或多种群或亚群已被去除了一种或多种特定表型的细胞。

[0084] 在又一实施方式中,胎盘灌注液或灌注液细胞群与多种CD34<sup>+</sup>细胞组合。该CD34<sup>+</sup>细胞可包含在,例如,未处理的胎盘、脐带血或外周血中;胎盘血、脐带血或外周血的总有核细胞中;分离的胎盘血、脐带血或外周血CD34<sup>+</sup>细胞群中;未处理的骨髓中;骨髓总有核细胞中;分离的骨髓CD34<sup>+</sup>细胞群中,等等。在一个具体实施方式中,造血干细胞是CD34<sup>+</sup>胎盘内皮祖细胞。

[0085] 在一个方面,本文提供了一种治疗患有中枢神经系统损伤、疾病或障碍的方法,包括以足以对一种或多种中枢神经系统损伤、疾病或障碍的症状产生可检测的改善或减轻恶化的量对该个体施用胎盘灌注液或本文呈现的任何细胞群或亚群,或其任意组合。在一个具体实施方式中,中枢神经系统损伤、疾病或障碍是缺血性脑病(例如,缺氧缺血性脑病)。在另一具体实施方式中,所述胎盘灌注液细胞是来自胎盘灌注液的总有核细胞。在另一实施方式中,所述胎盘灌注液细胞是包含本文描述的胎盘灌注液细胞的任何群、亚群或组合。在另一具体实施方式中,所述胎盘灌注液细胞群包含分离自单一胎盘灌注的胎盘灌注液细胞。在另一具体实施方式中,所述胎盘灌注液细胞群包含不是分离自所述灌注液的分离的CD34<sup>+</sup>细胞。在一个更具体的实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>细胞分离自胎盘。在另一更具体的实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>细胞分离自脐带血,胎盘血,外周血,或骨髓。在另一更具体的实施方式中,所述CD34<sup>+</sup>细胞比相当量的脐带血CD34<sup>+</sup>细胞表达更高水平的巢蛋白。

[0086] 在另一方面,本文提供了对对象(例如人对象)施用HPC(例如人胎盘灌注液)以减轻移植抗宿主疾病严重程度和/或治疗或减轻代谢和血液学疾病的症状(例如恶性血液病)的方法。

[0087] 在另一方面,本文提供了对对象(例如人对象)施用HPC(例如人胎盘灌注液)以治疗或减轻肌肉减少症的症状的方法。该方法的进一步实施方式在后文中详细描述。

[0088] 5.2胎盘灌注液细胞的分离、分选和表征

[0089] 本文提供了从哺乳动物胎盘获得胎盘灌注液和胎盘灌注液细胞的方法。在本文描述的所有实施方式中,优选的灌注液是人胎盘灌注液,优选的灌注液细胞是人胎盘灌注液细胞。本文还描述了用于分离细胞群和亚群和用于表征细胞群和亚群及其组合的方法。

[0090] 用于按照本公开的用途的来自人胎盘灌注液的单核细胞(HPC),例如,人胎盘灌注液,可以以任何医学或药学可接受方式进行收集,并可存在于组合物中,例如,药物组合物。在某些实施方式中,本文提供的组合物(例如,药物组合物,即,适于对人施用的制药等级的溶液)包含人胎盘灌注液。在某些实施方式中,组合物包含从部分抽血的胎盘获得的人胎盘灌注液。在某些实施方式中,组合物包含从抽血的胎盘获得的人胎盘灌注液。在某些实施方式中,组合物包含细胞,例如干细胞,分离自人胎盘灌注液。在某些实施方式中,组合物包含有核细胞分离自人胎盘灌注液,例如,单核细胞或总有核细胞。

[0091] 在一个实施方式中,HPC例如人胎盘灌注液,是无菌的。

[0092] 在一个具体实施方式中,通过按照标准方法去除红血细胞和/或粒细胞来加工HPC或人胎盘灌注液以产生有核细胞群。该富集的细胞群可不冷冻使用,或冷冻以待后用。如果细胞群要进行冷冻,那么可以在其冷冻前向富集的细胞群中添加标准冷冻保护剂(例如,

DMSO,甘油,Epilife™细胞冷冻剂(Cascade Biologics))。

[0093] 在某些实施方式中,从胎盘灌注液获得的细胞包含来自胎盘灌注液的单核细胞。在某些实施方式中,从胎盘灌注液获得的细胞包含来自胎盘灌注液的总有核细胞。在特别的实施方式中,可以加工灌注液以通过向灌注液中添加羟乙基淀粉并随后重力沉降去除或基本去除红细胞。

[0094] 在某些实施方式中,从胎盘灌注液获得的细胞获得自单一胎盘。在某些实施方式中,从胎盘灌注液获得的细胞获得自多于一个胎盘。在某些实施方式中,从胎盘灌注液获得的细胞获得自两个胎盘。在细胞获得自多于一个胎盘的实施方式中,来自不同胎盘的细胞可不必彼此相关或匹配。

[0095] 如本文所述,胎盘灌注液可以获得自在灌注获得胎盘细胞前已排出脐带血并灌注去除残余血的胎盘。胎盘灌注液可以获得自己排出脐带血但没有灌注去除残余血的胎盘。胎盘灌注液可以获得自胎盘,所述胎盘分离自差不多0.5-6.0英寸,例如,0.5-1.0,1.0-1.5,1.5-2.0,2.0-2.5,2.5-3.0,3.0-3.5,3.5-4.0,或4.0-6.0英寸的脐带,其中脐带可以含有残余脐带血,其一部分可以在灌注过程中进入胎盘灌注液,并从而包含在胎盘灌注液中。胎盘灌注液可以获得自既没有排出脐带血也没有灌注去除残余血的胎盘。在后两种实施方式中,胎盘细胞,例如,来自胎盘灌注液的有核细胞,例如,HPC,包含来自胎盘血和/或脐带血的有核细胞。在一个具体实施方式中,按照本公开的胎盘灌注液不含脐带血。在另一具体实施方式中,按照本公开的胎盘灌注液基本不含脐带血,例如,所述胎盘灌注液包含少于10%,少于5%,少于1%,少于0.5%,或少于0.1%的脐带血。通常,如果灌注液细胞中包含脐带血细胞,那么为了本文提供的方法的目的,该细胞被认为是HPC群的一部分,而不是HT细胞例如UCB细胞的一部分。

[0096] 胎盘灌注液可从单一个体收集(即,作为单一单位)用于给药,或与其它单位混合,例如来自相同个体或来自一名或多名其他个体。在某些实施方式中,由此获得的胎盘灌注液或细胞在给药前进行储存。在某些实施方式中,一单位胎盘灌注液包含足够数量的细胞,从而对每公斤对象体重给药至少约 $1.0 \times 10^5$ , $0.5 \times 10^6$ , $1.0 \times 10^6$ , $1.5 \times 10^6$ , $2.0 \times 10^6$ , $2.5 \times 10^6$ , $3.0 \times 10^6$ , $4.0 \times 10^6$ , $5.0 \times 10^6$ ,或 $1.0 \times 10^7$ 从胎盘灌注液获得的细胞,例如,总有核细胞。在某些实施方式中,给药一单位由此获得的胎盘灌注液或细胞。在某些实施方式中,给药少于一个单位。在某些实施方式中,给药多于一个单位。

[0097] 用于获得胎盘灌注液的胎盘可在成功的生产和胎盘排出后回收。在某些实施方式中,胎盘来自足月生产。在某些实施方式中,胎盘来自早产。在一些实施方式中,胎盘是怀孕约23至约25周出生的婴儿的胎盘。在一些实施方式中,胎盘是怀孕约26至约29周出生的婴儿的胎盘。在一些实施方式中,胎盘是怀孕约30至约33周出生的婴儿的胎盘。在一些实施方式中,胎盘是怀孕约34至约37周出生的婴儿的胎盘。在一些实施方式中,胎盘是怀孕约37至约42周出生的婴儿的胎盘。

[0098] 在特别的实施方式中,在灌注胎盘以去除任何残余脐带血前,或在灌注胎盘而不去除残余脐带血前,可将胎盘储存约1小时至约72小时或约4至约24小时。可将胎盘储存于约5℃至约25℃,例如室温下的抗凝溶液中。合适的抗凝溶液是本领域熟知的。例如,可以使用肝素或华法林钠溶液。在一个实施方式中,抗凝溶液包含肝素溶液(1%w/w,1:1000溶液中)。在某些实施方式中,在收集HPC例如人胎盘灌注液前胎盘储存不超过36小时。

[0099] 由此获得的用于按照本公开的用途的人胎盘灌注液或细胞通常与细胞的对象接受对象无关。由此获得的用于按照本公开的用途的人胎盘灌注液或细胞通常与细胞的对象接受对象不匹配或部分不匹配。

[0100] 由此获得的用于按照本公开的用途的人胎盘灌注液或细胞可通过任何方法获得。可以按照例如美国专利号7,045,148,美国专利号7,255,879,和/或美国专利号8,057,788中公开的内容获得胎盘灌注液,其各自内容在此全文引入作为参考。该灌注可以是例如通过盘(pan)法灌注,其中将灌注液加压流过胎盘脉管,在一个容纳胎盘的盘中收集从胎盘(通常是产妇一侧)渗出的灌注液。灌注也可以是例如封闭回路灌注,其中灌注液仅流经并收集自胎盘的胎儿脉管。参见,例如,美国专利号8,057,788,其内容在此全文引入作为参考。在一个具体实施方式中,该灌注可以是连续的,即,在分离从胎盘灌注液获得的细胞(例如,HPC或来自胎盘灌注液的总有核细胞)之前,流经胎盘的灌注液二次流过或多次流过。

[0101] 在某些实施方式中,使用约0.5-2升灌注液,例如,约0.5-1升,或约750mL灌注一个胎盘。在具体实施方式中,胎盘的灌注在约15分钟至2小时内完成,例如,约30分钟至1.5小时,约30分钟至1小时,或约30分钟。

[0102] 从哺乳动物胎盘收集的细胞数量和类型可以通过例如使用标准细胞检测技术来检测形态学和细胞表面标记的改变进行监控,所述标准细胞检测技术例如流式细胞术、细胞分选、免疫细胞化学(例如,用组织特异性或细胞标记特异性抗体染色)、荧光激活细胞分选(FACS)、磁激活细胞分选(MACS)、通过使用光学或共聚焦显微镜检测细胞形态、和/或通过使用本领域熟知技术例如PCR和基因表达谱检测基因表达的改变。这些技术也可以用于鉴定对一种或多种特定标记呈阳性的细胞。例如,使用CD34的抗体,人们可以使用上述技术判断细胞是否包含可检测量的CD34;如果包含,则该细胞是CD34<sup>+</sup>。类似的,如果细胞产生可被RT-PCR检测到的足够的特定标记RNA,或比成体细胞显著多的特定标记RNA,那么该细胞对于该标记是阳性的。细胞表面标记(例如,CD标记如CD34)的抗体和特异性基因的序列是本领域熟知的。

[0103] 在另一实施方式中,胎盘细胞,例如,胎盘灌注液或灌注液细胞可通过集落形成单位分析进行鉴定和表征。集落形成单位分析是本领域熟知的。

[0104] 可使用本领域已知的标准技术对胎盘灌注液或灌注液细胞额外评价活力、增殖潜力和寿命,例如台盼蓝排除分析、荧光素二乙酸酯摄取分析、碘化丙啶摄取分析(以评价活力)和胸苷摄取分析、MTT细胞增殖分析(以评价增殖)。可通过本领域熟知的技术确定寿命,例如通过测定延长培养中的最大群体倍增数确定。

[0105] 细胞可以被例如分选,例如,使用荧光激活细胞分选仪(FACS)分选。荧光激活细胞分选(FACS)是一种众所周知的方法,用来基于颗粒的荧光性质分离颗粒,包括细胞(Kamarch,1987,Methods Enzymol,151:150-165)。激光激发个体颗粒中的荧光部分产生小的电荷,允许阳性和阴性颗粒从混合物中电磁分离。在一个实施方式中,细胞表面标记-特异性抗体或配体用不同荧光标签标记。用细胞分选仪处理细胞,允许基于细胞结合所用抗体的能力来分离细胞。FACS分选的颗粒可以直接置于96孔板或384孔板的单个孔中以便于分离和克隆。

[0106] 在另一实施方式中,磁珠可用于分离或分选细胞,和/或去除细胞群。细胞可以例如使用磁珠激活细胞分选(MACS)技术进行分选,后者是一种基于颗粒结合磁珠(0.5-100μm

直径)的能力来分离颗粒的方法。可以在磁珠上进行多种有用的修饰,包括共价加入特异性识别特定细胞表面分子或半抗原的抗体。然后将磁珠与细胞混合以使之结合。然后将细胞通过磁场以分离具有特异性细胞表面标记的细胞。在一个实施方式中,这些细胞可以随后进行分离并重新与偶联有针对另外的细胞表面标记的抗体的磁珠混合。再将细胞通过磁场,分离结合两种抗体的细胞。然后可以将该细胞稀释入分开的盘中,例如微量滴定盘用于克隆分离。

[0107] 胎盘灌注液细胞可使用其它本领域已知的方法分离,例如,选择性生长期望的细胞(正向选择),选择性破坏不需要的细胞(负向选择);基于混合群中的差速细胞凝集性,例如,使用大豆凝集素;冻融流程;过滤;常规和区带离心;离心淘洗(逆流离心);单位重力分离;反流分布;电泳;等等。

[0108] 5.3使用造血细胞例如脐带血细胞和人胎盘灌注液细胞的方法

[0109] 在一个方面,本文提供了对对象例如人对象移植造血细胞的方法,包括施用造血细胞组合来自人胎盘灌注液的单核细胞(HPC),例如,人胎盘灌注液。所述HPC可以是人胎盘灌注液,来自胎盘灌注液的总有核细胞,或本文所述来自人胎盘灌注液的单核细胞的任何群、亚群或组合,包括那些富集或去除特定群或亚群的。可用于本文描述的移植造血细胞的方法的造血细胞的来源包括,例如,骨髓或其中的细胞,外周血或其中的细胞,和脐带血或其中的细胞。如本文使用的,这些来源的造血细胞一起被称为“HT细胞”。

[0110] 在一个实施方式中,本文提供了一种对对象例如人对象移植HT细胞例如人脐带血细胞(UCB)细胞例如人脐带血的方法,包括给药HT细胞,例如,人脐带血细胞(UCB)细胞,例如,人脐带血,并组合来自人胎盘灌注液的单核细胞(HPC),例如,人胎盘灌注液。在一个实施方式中,HT细胞,例如,人UCB细胞,例如,人UCB,与对象无关。在一个具体实施方式中,HT细胞例如UCB细胞,例如,人UCB,与对象部分不匹配。在另一实施方式中,HPC例如人胎盘灌注液,与对象无关。在一个具体实施方式中,HPC例如人胎盘灌注液,与对象部分不匹配。在另一具体实施方式中,HPC例如人胎盘灌注液,与对象不匹配。在又一实施方式中,HT细胞,例如,人UCB细胞,例如,人UCB,与对象无关且HPC例如人胎盘灌注液,与对象无关。在又一实施方式中,HT细胞,例如,人UCB细胞,例如,人UCB,与对象无关和部分不匹配且HPC例如人胎盘灌注液,与对象无关和部分不匹配或与对象不匹配。在一个实施方式中,HPC例如人胎盘灌注液,与HT细胞例如人UCB细胞如UCB,无关和不匹配。在一个实施方式中,HPC,例如人胎盘灌注液,与HT细胞例如人UCB细胞如UCB和受试对象无关和不匹配。

[0111] 除非另有说明,否则如本文使用的“相关”在UCB或HPC的背景下指自体或一级或二级血亲。例如,与对象相关的UCB指的是来自对象自体的UCB,或来自对象的一级或二级血亲的UCB。在另一实施例中,与HPC相关的UCB指的是来自同一供体的UCB和HPC,或是一级或二级血亲的供体。类似的,除非另有说明,否则“无关”在这些背景下指比二级血亲更远的亲缘关系。

[0112] 除非另有说明,否则如本文使用的“匹配”在来自人胎盘灌注液(例如,HPC)的UCB或细胞的背景下指的是HLA匹配的。此外,如本文使用的“部分匹配”在来自人胎盘灌注液(例如,HPC)的UCB或细胞的背景下指的是在3/6,4/6,或5/6HLA基因座匹配的情形。同样,除非另有说明,否则如本文使用的“不匹配”在来自人胎盘灌注液(例如,HPC)的UCB或细胞的背景下指的是在0/6,1/6,或2/6HLA基因座匹配。“匹配”、“部分匹配”和“不匹配”可以例如

指HT细胞例如UCB细胞和HPC之间的关系;HT细胞例如UCB细胞,单位之间的关系;和/或HT细胞例如UCB细胞,和/或HPC和作为细胞受体的对象之间的关系。

[0113] 在某些实施方式中,该方法包括给药一个单位的UCB或其中的细胞。在另一实施方式中,本文给出的方法包括给药多个单位的UCB或其中的细胞。例如,本文给出的方法可以包括给药2、3或4单位的UCB或其中的细胞。在其中使用了大于一个单位的HT细胞例如UCB细胞的情况下,在某些实施方式中,至少部分HT细胞例如UCB细胞,可以与对象、与HPC和/或其它部分的HT细胞例如UCB细胞(例如,其它UCB细胞单位)无关。在其中使用了大于一个单位的HT细胞例如UCB细胞的情况下,在某些实施方式中,至少部分HT细胞例如UCB细胞,可以与对象、与HPC和/或其它部分的HT细胞例如UCB细胞(例如,其它UCB细胞单位)不匹配或部分匹配。在另一实施方式中,本文给出的方法可以包括给药少于一个单位的HT细胞或UCB,或其中的细胞。例如,本文给出的方法可以包括给药0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8,或0.9单位的HT细胞或UCB,或其中的细胞。在特别的实施方式中,本文给出的方法可以包括在多次给药中给药特定数量的单位(少于1,1,或大于1)。

[0114] 在另一方面,本文提供了用于在对象中诱导嵌合体的方法,包括对对象给药组合的HT细胞例如UCB细胞如UCB,和HPC例如人胎盘灌注液,其中至少部分HT细胞例如UCB细胞,与对象部分不匹配,和/或HPC与对象不匹配或部分匹配,从而在对象中发生嵌合体。除非另有说明,否则如本文使用的“嵌合体”指对象中非自体DNA的存在,例如,来自相对于受体对象不匹配或部分匹配的细胞的DNA的存在。

[0115] 在该方法的一个实施方式中,多于一个单位的HT细胞例如UCB细胞,被给药至对象,例如,2,3,或4单位的HT细胞例如UCB细胞,被给药至对象。在其中多于一个单位的HT细胞例如UCB细胞被给药至对象的特别的实施方式中,诱导嵌合体的方法可导致多嵌合体,即可产生涉及大于1个至多达全部的给药的HT细胞例如UCB细胞单位或其后代的嵌合体。

[0116] 在该方法的另一实施方式中,可以产生涉及HPC或其后代的嵌合体。。在又一实施方式中,可以产生涉及HT细胞例如UCB细胞(包括在其中给药多于一个单位的HT细胞例如UCB细胞的情况中的多嵌合体)或其后代,和HPC或其后代的嵌合体。

[0117] 在该方法的又一实施方式中,HT细胞例如UCB细胞,与对象无关。在其中给药多于一个单位的HT细胞例如UCB的情况下,一种或多种HT细胞例如UCB细胞单位可以与对象无关。在该方法一个具体实施方式中,HPC与对象无关且另外可以与HT细胞例如UCB细胞无关。在该方法的又一实施方式中,HT细胞例如UCB细胞和HPC都与对象无关。

[0118] 在该方法的某些实施方式中,在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、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62天内,或对对象给药更多HT细胞例如UCB细胞组合HPC,首先在对象中检测到嵌合体(包括HT细胞例如UCB细胞或其后代,或HPC或其后代的一种或两种)。

[0119] 可以使用本领域公知的方法检测嵌合体。例如,可以使用血样检测嵌合体。在一个实施方式中,使用基于聚合酶链反应(PCR)的方法检测嵌合体,例如,通过短串联重复试验。在一个实施方式中,造血干细胞移植后的嵌合体检测涉及鉴定受体和供体的的基因谱并随后评价受体的血液、骨髓或其它组织中混合物的程度。通过DNA进行嵌合体测试(移植分析)使用人身份鉴定中通常使用的方法,并通过称为短串联重复(STR)基因座的基因组多态性

分析来完成。在一个实施方式中,在第7、14、30、60、100和180天(+/-10天)评价外周血供体嵌合体(UCB/s和灌注液细胞)(全血、NK和T细胞)的定量(例如,使用短串联重复实验),外周血受体嵌合体的定量(例如,使用短串联重复实验)在基线与供体细胞(UCB和灌注液细胞)嵌合体在基线一起评价。

[0120] 在又一方面,本文提供了用于对象中的细胞移植的方法,包括对对象给药组合的HT细胞例如人UCB细胞如UCB,和HPC例如人胎盘灌注液,其中至少部分HT细胞例如UCB细胞部分匹配对象,和/或HPC与对象不匹配或部分匹配,从而对象中发生细胞移植。在某些实施方式中,细胞移植包括HT细胞例如UCB细胞或其后代的移植。在某些其它实施方式中,细胞移植包含HPC或其后代的移植。在其它实施方式中,移植包括HT细胞例如UCB细胞或其后代,和HPC或其后代的移植。

[0121] 在该方法的一个实施方式中,HT细胞例如UCB细胞与对象无关。在一个具体实施方式中,HT细胞例如UCB细胞与对象部分不匹配。在另一具体实施方式中,HPC与对象无关并可以另外与HT细胞例如UCB细胞无关。在一个具体实施方式中,HPC与对象部分不匹配。在另一具体实施方式中,HPC与对象不匹配。在又一实施方式中,UCB细胞与对象无关且HPC与对象无关。在又一实施方式中,HT细胞例如UCB细胞与对象无关和部分不匹配且HPC与对象无关和部分不匹配或与对象不匹配。在某些实施方式中,本文给出的方法表现出相对于单独给药HT细胞例如UCB细胞而言增强的移植能力。

[0122] 可以使用本领域已知的方法检测移植。例如,在一个实施方式中,可以自第0天至达到最低点后3天嗜中性细胞绝对计数 $>500/\text{mm}^3$ 和直至在3个不同的天数独立于最少7天的血小板输注的连续3天中测量血小板计数达到 $\geq 20,000/\text{mm}^3$ 每1-3天进行全血差速计数。如本文使用的,“嗜中性细胞移植”指嗜中性细胞绝对计数高于 $500/\text{mm}^3$ 的嗜中性细胞最低点后第一个3天。如本文使用的,“血小板移植”至无输注下血细胞 $\geq 20,000/\text{mm}^3$  7天后显示血小板计数 $\geq 20,000/\text{mm}^3$ 的第一个连续3天。

[0123] 在某些实施方式中,在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、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、或62天、或2个月、2.5个月、3个月,或对对象给药更多HT细胞例如UCB细胞组合HPC,在对象中检测到细胞移植。

[0124] 在某些实施方式中,本文给出的方法包括给药一个单位的HT细胞例如UCB细胞如UCB。在另一实施方式中,本文给出的方法包括给药多个单位的HT细胞例如UCB细胞如UCB。例如,本文给出的方法可以包括给药2、3或4单位的HT细胞例如UCB细胞如UCB。

[0125] 在又一方面,本文提供了用于降低对象中GVHD持续时间或严重程度的方法,包括对对象给药组合的HT细胞例如人UCB细胞如UCB,和HPC例如人胎盘灌注液,其中至少部分HT细胞例如UCB细胞部分匹配对象,和/或HPC与对象不匹配或部分匹配,从而发生对象中GVHD持续时间或严重程度降低。

[0126] 在该方法的一个实施方式中,HT细胞例如UCB细胞与对象无关。在一个具体实施方式中,HT细胞例如UCB细胞与对象部分不匹配。在另一具体实施方式中,HPC与对象无关并可以另外与HT细胞例如UCB细胞无关。在一个具体实施方式中,HPC与对象部分不匹配。在另一具体实施方式中,HPC与对象不匹配。在又一实施方式中,UCB细胞与对象无关且HPC与对象无关。在又一实施方式中,HT细胞例如UCB细胞与对象无关和部分不匹配且HPC与对象无关

和部分不匹配或与对象不匹配。在某些实施方式中,本文给出的方法显示了与单独给药HT细胞例如UCB细胞相比降低的GVHD持续时间或严重程度。

[0127] 在某些实施方式中,本文给出的方法包括给药一个单位的HT细胞例如UCB细胞如UCB。在另一实施方式中,本文给出的方法包括给药多个单位的HT细胞例如UCB细胞如UCB。例如,本文给出的方法可以包括给药2、3或4单位的HT细胞例如UCB细胞如UCB。

[0128] 在另一方面,本文提供了用于治疗患有肌肉减少症的个体的方法,包括以足以产生针对一种或多种肌肉减少症的症状的可检测的改进或减轻其恶化程度的量对个体给药胎盘灌注液或任何本文给出的细胞群或亚群,或其任意组合,包括对对象给药组合的HT细胞例如人UCB细胞如UCB,和HPC例如人胎盘灌注液。

[0129] 在又一方面,本文提供了用于治疗患有中枢神经系统损伤、疾病或障碍的个体的方法,包括以足以产生针对一种或多种中枢神经系统损伤、疾病或障碍的症状的可检测的改进或减轻其恶化程度的量对个体给药胎盘灌注液或任何本文给出的细胞群或亚群,或其任意组合,包括对对象给药组合的HT细胞例如人UCB细胞如UCB,和HPC例如人胎盘灌注液。在一个具体实施方式中,中枢神经系统损伤、疾病或障碍是缺血性脑病(例如,缺氧缺血性脑病)。

[0130] 在某些实施方式中,本文给出的方法包括同时给药HT细胞例如UCB细胞如UCB与HPC例如人胎盘灌注液。在一个具体实施方式中,细胞同时给药至对象。在另一实施方式中,在0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、10、12、16、18、或24小时内或更久,或在1、2、3、4、5、6、或7天内或更久,对对象给药HT细胞例如UCB细胞和HPC。在一个具体实施方式中,HT细胞例如UCB细胞如UCB,被给药至对象,然后给药HPC例如人胎盘灌注液,例如,在给药UCB的1小时内,或在确认对象未表现出对UCB给药的不良反应所需的最短时间内给药。

[0131] 本文提供的方法可以表现出下列优点,包括,例如,相对于单独给药HT细胞例如UCB细胞如UCB而言,减少细胞移植的时间,限制对象中性粒细胞减少的时间,限制对象血小板减少的时间,建立嵌合体,以及减少GVHD的严重程度或持续时间,或防止GVHD。

[0132] HT细胞例如UCB细胞和HPC的给药比例可以变化。HT细胞例如UCB细胞和HPC的给药比例可根据本领域技术人员的判断确定。在某些实施方式中,HT细胞例如UCB细胞和HPC的比例为约100,000,000:1、50,000,000:1、20,000,000:1、10,000,000:1、5,000,000:1、2,000,000:1、1,000,000:1、500,000:1、200,000:1、100,000:1、50,000:1、20,000:1、10,000:1、5,000:1、2,000:1、1,000:1、500:1、200:1、100:1、50:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1、1:2、1:5、1:10、1:100、1:200、1:500、1:1,000、1:2,000、1:5,000、1:10,000、1:20,000、1:50,000、1:100,000、1:500,000、1:1,000,000、1:2,000,000、1:5,000,000、1:10,000,000、1:20,000,000、1:50,000,000或约1:100,000,000。在某些实施方式中,HT细胞例如UCB细胞和HPC的比例为约20:1至约1:20,或约1:10,约1:5,约1:1,约5:1或约10:1。

[0133] HT细胞例如UCB细胞和HPC的给药可以使用本领域已知的任何细胞给药技术进行。在一个实施方式中,给药是静脉方式,例如,静脉内,例如,通过IV,PICC管,中线,等等。例如,HT细胞例如UCB细胞和HPC可在分离的组合物中或在单一组合物中以任何药学或医学可接受的方式对对象给药,包括注射或输液。在某些实施方式中,组合物可制剂为可注射组合物(例如,W096/39101,在此全文引入作为参考)。

[0134] 在某些实施方式中,HT细胞例如UCB细胞或HPC对对象进行肠道外给药。如本文使

用的术语“肠道外”包括皮下注射、静脉内注射、肌肉注射、动脉内注射或输液技术。在某些实施方式中,HT细胞例如UCB细胞或HPC静脉内对对象给药。在某些其它实施方式中,HT细胞例如UCB细胞或HPC心室内对对象给药。

[0135] HT细胞例如UCB细胞和HPC可单独或合并包装在任何药学可接受的载体内。HT细胞例如UCB细胞或HPC可以在任何药学或医学可接受容器内进行装载、储存或运输,例如血袋、转移袋、塑料管、注射器、小瓶等等。

[0136] HT细胞例如UCB细胞和/或HPC对对象的给药可进行一次或多次。在某些实施方式中,给药进行一次。在某些实施方式中,给药进行多次,例如,2、3、4或更多次。在某些实施方式中,HT细胞例如UCB细胞给药多次。在某些实施方式中,HPC给药多次。

[0137] 在某些实施方式中,按照本文描述的方法对对象给药的脐带血或从中获得的细胞(例如,脐带血总有核细胞)的量可根据脐带血中存在的细胞的量来确定。对对象给药的UCB或从中获得的细胞(例如,脐带血总有核细胞)和/或人胎盘灌注液或HPC或总有核从中获得的细胞的量或数目取决于脐带血或从中获得的细胞(例如,脐带血总有核细胞)和/或人胎盘灌注液或HPC或从中获得的总有核细胞的来源、障碍或病况的严重程度或性质、以及对象的年龄、体重和身体状况,等等。在某些实施方式中,每公斤对象体重给药约0.01至约0.1、约0.1至约1、约1至约10、约10至约 $10^2$ 、约 $10^2$ 至约 $10^3$ 、约 $10^3$ 至约 $10^4$ 、约 $10^4$ 至约 $10^5$ 、约 $10^5$ 至约 $10^6$ 、约 $10^6$ 至约 $10^7$ 、约 $10^7$ 至约 $10^8$ 、或约 $10^8$ 至约 $10^9$ 脐带血细胞(例如,脐带血总有核细胞),人胎盘灌注液或从中获得的细胞(例如,HPC或来自胎盘灌注液的总有核细胞),或总脐带血细胞和从胎盘灌注液获得的细胞(例如,HPC或总有核细胞)。在各实施方式中,每公斤对象体重给药至少约0.1、1、10、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、或 $10^9$ 脐带血细胞(例如,脐带血总有核细胞),从胎盘灌注液获得的细胞(例如,HPC或来自胎盘灌注液的总有核细胞),或脐带血细胞和从胎盘灌注液获得的细胞。

[0138] 在具体实施方式中,每公斤对象体重给药至少约 $0.5 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.5 \times 10^6$ 、 $2.0 \times 10^6$ 、 $2.5 \times 10^6$ 、 $3.0 \times 10^6$ 、 $3.5 \times 10^6$ 、 $4.0 \times 10^6$ 、 $4.5 \times 10^6$ 、 $5.0 \times 10^6$ 、 $5.5 \times 10^6$ 、 $6.0 \times 10^6$ 、 $6.5 \times 10^6$ 、 $7.0 \times 10^6$ 、 $7.5 \times 10^6$ 、 $8.0 \times 10^6$ 、 $8.5 \times 10^6$ 、 $9.0 \times 10^6$ 、 $9.5 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^7$ 、 $1.5 \times 10^7$ 、 $2.0 \times 10^7$ 、 $2.5 \times 10^7$ 、 $3.0 \times 10^7$ 、 $3.5 \times 10^7$ 、 $4.0 \times 10^7$ 、 $4.5 \times 10^7$ 、 $5.0 \times 10^7$ 、 $5.5 \times 10^7$ 、或 $6.0 \times 10^7$ 脐带血细胞(例如,脐带血总有核细胞),从胎盘灌注液获得的细胞(例如,HPC或来自胎盘灌注液的总有核细胞),或脐带血细胞和从胎盘灌注液获得的细胞(例如,HPC或来自胎盘灌注液的总有核细胞)。在一个更具体的实施方式中,每公斤对象体重给药至少约 $0.5 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.5 \times 10^6$ 、 $2.0 \times 10^6$ 、 $2.5 \times 10^6$ 、 $3.0 \times 10^6$ 、 $3.5 \times 10^6$ 、 $4.0 \times 10^6$ 、 $4.5 \times 10^6$ 、或 $5.0 \times 10^6$ 从胎盘灌注液获得的细胞(例如,HPC或来自胎盘灌注液的总有核细胞)。在一个更具体的实施方式中,每公斤对象体重给药至少约 $1.5 \times 10^7$ 、 $2.0 \times 10^7$ 、 $2.5 \times 10^7$ 、 $3.0 \times 10^7$ 、 $3.5 \times 10^7$ 、 $4.0 \times 10^7$ 、 $4.5 \times 10^7$ 、 $5.0 \times 10^7$ 、 $5.5 \times 10^7$ 、或 $6.0 \times 10^7$ 脐带血细胞(例如,脐带血总有核细胞)。在各实施方式中,每公斤对象体重给药至多约 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、或 $10^9$ 脐带血细胞,从胎盘灌注液获得的细胞(例如,HPC或来自胎盘灌注液的总有核细胞),或脐带血细胞和从胎盘灌注液获得的细胞(例如,HPC或来自胎盘灌注液的总有核细胞)。在具体实施方式中,每公斤对象体重给药至多约 $0.5 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.5 \times 10^6$ 、 $2.0 \times 10^6$ 、 $2.5 \times 10^6$ 、 $3.0 \times 10^6$ 、 $3.5 \times 10^6$ 、 $4.0 \times 10^6$ 、 $4.5 \times 10^6$ 、 $5.0 \times 10^6$ 、 $5.5 \times 10^6$ 、 $6.0 \times 10^6$ 、 $6.5 \times 10^6$ 、 $7.0 \times 10^6$ 、 $7.5 \times 10^6$ 、 $8.0 \times 10^6$ 、 $8.5 \times 10^6$ 、 $9.0 \times 10^6$ 、 $9.5 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^7$ 、 $1.5 \times 10^7$ 、 $2.0 \times 10^7$ 、 $2.5 \times 10^7$ 、 $3.0 \times 10^7$ 、 $3.5 \times 10^7$ 、 $4.0 \times 10^7$ 、 $4.5 \times 10^7$ 、 $5.0 \times 10^7$ 、 $5.5 \times 10^7$ 、或 $6.0 \times 10^7$ 脐带血细胞(例



如,脐带血总有核细胞),从胎盘灌注液获得的细胞(例如,HPC或来自胎盘灌注液的总有核细胞),或脐带血细胞和从胎盘灌注液获得的细胞(例如,HPC或来自胎盘灌注液的总有核细胞)。在一个更具体的实施方式中,每公斤对象体重给药至多约 $0.5 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.5 \times 10^6$ 、 $2.0 \times 10^6$ 、 $2.5 \times 10^6$ 、 $3.0 \times 10^6$ 、 $3.5 \times 10^6$ 、 $4.0 \times 10^6$ 、 $4.5 \times 10^6$ 、或 $5.0 \times 10^6$ 从胎盘灌注液获得的细胞(例如,HPC或来自胎盘灌注液的总有核细胞)。在一个更具体的实施方式中,每公斤对象体重给药至多约 $1.5 \times 10^7$ 、 $2.0 \times 10^7$ 、 $2.5 \times 10^7$ 、 $3.0 \times 10^7$ 、 $3.5 \times 10^7$ 、 $4.0 \times 10^7$ 、 $4.5 \times 10^7$ 、 $5.0 \times 10^7$ 、 $5.5 \times 10^7$ 、或 $6.0 \times 10^7$ 脐带血细胞(例如,脐带血总有核细胞)。

[0139] 在上述实施方式的具体实施方式中,脐带血细胞(例如,脐带血总有核细胞)或从胎盘灌注液获得的细胞(例如,总HPC或来自胎盘灌注液的有核细胞)是CD34+细胞。在某些实施方式中,每公斤体重给药至少约 $10^4$ 至约 $10^7$ CD34+细胞。该CD34+细胞可单独来自脐带血,或可以来自脐带血和胎盘灌注液。

[0140] HT细胞例如UCB细胞如UCB和HPC例如胎盘灌注液可以以适合对象大小的体积递送。典型的成人血体积是约85-100mL/kg体重。从而,成人血体积范围为约40mL至约300mL。在各实施方式中,因此,HT细胞例如UCB细胞如UCB,和HPC例如胎盘灌注液以总体积约0.5mL、1.0mL、2mL、3mL、4mL、5mL、6mL、7mL、8mL、9mL、10mL、11mL、12mL、13mL、14mL、15mL、16mL、17mL、18mL、19mL、20mL、21mL、22mL、23mL、24mL、25mL、26mL、27mL、28mL、29mL、或约30mL、或更多的量给药。该体积的给药可以是单一给药或多次给药。该体积的脐带血或脐带血细胞数量,或人胎盘灌注液或从中获得的细胞(例如,HPC或来自胎盘灌注液的总有核细胞)的给药时间可以是例如,0.5小时、1小时、1.5小时、2小时、2.5小时、3小时、3.5小时、4小时、或更多。

[0141] 在某些实施方式中,20mL以下的小的输液使用注射器进行。大体积的输液可通过输液器给药,例如,在1-4小时内。

[0142] 本文提供的的方法可以对任何有需要的对象进行。在一个方面,对象需要造血重建、部分重建或增加。在某些实施方式中,对象是人对象。在某些实施方式中,对象是成人对象。在某些实施方式中,对象25岁或更小。在某些实施方式中,对象是婴儿。

[0143] 在某些实施方式中,在本文给出的方法例如移植、诱导嵌合体的方法和/或移植的方法之前,对象已经使用例如TBI、氯法拉滨和/或Ara-C1进行脊髓抑制调节;使用例如白消安、氟达拉滨和/或阿伦单抗进行减毒调节;或进行放疗或其它治疗例如免疫抑制治疗或降低血细胞计数的治疗。

[0144] 在一个具体的方面,本文提供的方法可被用作治疗代谢障碍的方法,如有需要的先天代谢缺陷、肾上腺脑白质营养不良、粘多糖病、尼曼-皮克病、异染性脑白质营养不良、沃尔曼病、克拉伯病、高雪氏症、岩藻糖苷贮积症、或Batten病的对象。

[0145] 在另一具体方面,本文提供的方法可被用作治疗血液学病症或恶性肿瘤的方法,例如有需要的淋巴造血恶性肿瘤、骨髓增生异常综合征、低巨核细胞性血小板减少症、白血病、如急性淋巴细胞白血病(ALL)和急性粒细胞白血病(AML)、粒细胞减少症、镰状细胞病如镰状细胞性贫血、 $\beta$ -地中海贫血(例如乙型重症地中海贫血)、重症联合免疫缺陷病、骨髓衰竭、或贫血如重型再生障碍性贫血或Diamond-Blackfan贫血的对象。

[0146] 如本文使用的术语“治疗”指的是疾病或病症或该疾病或病症的任何参数或症状的进展、严重性和/或持续时间的减轻或改善。如果对象存活,或如果要被治疗的病症或状

况作为治疗的结果以任何方式有可测量改进,则治疗可被认为是有效的。这种改进可通过例如一个或多个可测量的指标显示,包括,例如,生理条件或与特定疾病、障碍或病况相关的一组生理状况的可检测的变化。如果与不存在治疗的情况下一个或多个指标的期望值相比,所述指标对于例如相似年龄的个体通过改变至正常值内或接近正常值的变化显示应答所述治疗,那么治疗也被认为是有效的。

[0147] 在本文提供的方法的某些实施方式中,在障碍或病况的治疗中本文提供的方法可被用作第一疗法组合一种或多种第二疗法。所述第二疗法包括但不限于手术、激素疗法、免疫疗法、光疗或用某些药物治疗。可与本文提供的方法组合的示例疗法包括环境温度的控制;供氧;呼吸器或通风机;外周血输血;补铁;静脉营养;光疗;手术;代谢紊乱或血液病(包括血液肿瘤)的治疗剂;抗生素或抗病毒药物;抗炎剂(例如,甾体抗炎化合物,非甾体抗炎(NSAID)化合物);一氧化氮;抗组胺药;免疫抑制剂;和免疫调节化合物(例如,TNF- $\alpha$ 抑制剂)。

#### [0148] 5.4脐带血细胞

[0149] 用于按照本公开使用的脐带血(本文也称为UCB或“脐血”)可以任何医学或药学可接受的方式收集,并可存在于组合物中,例如,药物组合物中。已有多种用于收集脐带血的方法的描述。参见,例如,美国专利号6,102,871;美国专利号6,179,819和美国专利号7,147,626,其各自内容全文引入作为参考。收集脐带血的常规技术基于针或插管的使用,其在重力辅助下使用。脐带血可收集至例如血袋、转移袋或无菌塑料管。

[0150] 在一些实施方式中,脐带血从商业脐带血库获得(例如,LifeBankUSA,等)。在另一实施方式中,脐带血从产后哺乳动物脐带收集并立即使用(例如,收集后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、或12小时)。在其它实施方式中,用于治疗对象的脐带血是冷冻保存的脐带血。脐带血可收集自单一脐带或多个脐带。

[0151] 在某些实施方式中,HT细胞例如UCB细胞与对象和/或HPC无关。在另一实施方式中,HT细胞例如UCB细胞与对象和/或HPC部分不匹配。在又一实施方式中,HT细胞例如UCB细胞与HPC不匹配。在又一实施方式中,HT细胞例如UCB细胞与HPC无关和不匹配。在特别的实施方式中UCB在3/6,4/6,或5/6HLA基因座与对象匹配。在特别的实施方式中,HT细胞,例如,来自成体来源的,在6/8,7/8,或8/8HLA基因座与对象匹配。

[0152] 在一些实施方式中,脐带血制备自早产脐带。在其它实施方式中,脐带血制备自足月脐带。在某些实施方式中,脐带血获得自足月产的产后哺乳动物脐带。在其它实施方式中,脐带血获得自早产的产后哺乳动物脐带。在一些实施方式中,脐带是怀孕约23至约25周出生的婴儿的脐带。在一些实施方式中,脐带是怀孕约26至约29周出生的婴儿的脐带。在一些实施方式中,脐带是怀孕约30至约33周出生的婴儿的脐带。在一些实施方式中,脐带是怀孕约34至约37周出生的婴儿的脐带。在一些实施方式中,脐带是怀孕约37至约42周出生的婴儿的脐带。

[0153] 脐带血或从中获得的细胞(例如,其中来源的总有核细胞或干细胞)可收集自单一个体(即,作为单一单位)用于给药,或可以与其它单位混合。在某些实施方式中,脐带血或从中获得的细胞(例如,其中来源的总有核细胞或干细胞)在使用前储存。当脐带血混合自多个脐带时,混合的脐带血可以包含仅来自足月产的脐带血、来自组合的足月产的脐带血或仅来自早产的脐带血。例如,来自早产婴儿的脐带血可以与例如来自其它早产婴儿的脐

带血、仅来自足月产的脐带血或来自早产和足月产胎盘的脐带血混合物进行混合。脐带血，包括自体或异体脐带血，也可以与外周血混合。在某些实施方式中，使用来自早产儿的脐带血，因为这种脐带血与来自足月产的脐带血相比包含相对高的每单位体积CD34+干细胞数量。在某些实施方式中，一个单位的脐带血包含足够数量的细胞从而每公斤对象体重给药至少约 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.5 \times 10^6$ 、 $2.0 \times 10^6$ 、 $1.5 \times 10^6$ 、 $2.0 \times 10^6$ 、 $2.5 \times 10^6$ 、 $3.0 \times 10^6$ 、 $3.5 \times 10^6$ 、 $4.0 \times 10^6$ 、 $4.5 \times 10^6$ 、 $6.0 \times 10^6$ 、 $6.5 \times 10^6$ 、 $7.0 \times 10^6$ 、 $7.5 \times 10^6$ 、 $8.0 \times 10^6$ 、 $8.5 \times 10^6$ 、 $9.0 \times 10^6$ 、 $9.5 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^7$ 、 $1.5 \times 10^7$ 、 $2.0 \times 10^7$ 、 $2.5 \times 10^7$ 、 $3.0 \times 10^7$ 、 $3.5 \times 10^7$ 、 $4.0 \times 10^7$ 、 $4.5 \times 10^7$ 、 $5.0 \times 10^7$ 、 $5.5 \times 10^7$ 、或 $6.0 \times 10^7$ 获得自所述脐带血的细胞，例如，脐带血总有核细胞。在某些实施方式中，给药一个单位的脐带血或从中获得的细胞。在某些实施方式中，给药少于一个单位。在某些实施方式中，给药多于一个单位，例如，给药2个或多个（例如，2、3、4、5、6或多个）单位。

## 实施例

[0154] 6.1 实施例1: 人胎盘灌注液细胞组合物

[0155] 本实施例显示了通过细胞类型和关联表型确定人胎盘灌注液组合物。

[0156] 人胎盘灌注液 (HPP) 如上5.2节的描述获得。供体匹配的HPP和人脐带血 (HUCB) 袋在37℃分别解冻，然后用等体积的解冻液 (IMDM (Cat#30-2005, ATCC) +2% FBS (Cat# SH30070.03, Hyclone) +P/S (Cat#15140-122, Gibco)) 稀释。稀释的细胞混合物在400g旋转8min (使用15ml圆锥管)，如果使用50ml圆锥管则旋转10min。用FACS缓冲液 (PBS (Cat# 10010-023, Gibco) +2% FBS+P/S) 重悬细胞团至 $1 \times 10^7$ /ml。以氯化铵比细胞9:1的比例在冰上添加氯化铵溶液 (Cat#07850, Stem Cell) 10min裂解RBC (红血细胞)。RBC裂解后，将样品在400g下旋转5min，然后用FACS缓冲液洗涤两次。然后用Cytotfix/cytoperm溶液 (Cat# 554722, BD Biosciences) 在4℃重悬细胞团20分钟至1ml每 $1 \times 10^7$ 细胞。样品用FACS缓冲液洗涤两次，然后在RT (室温) 下暗处用荧光染料缀合抗体染色20min。表型板 (panel) 列于表1和表2。抗体信息列于表3。染色的样品用FACS缓冲液洗涤两次并重悬于200μl FACS缓冲液用于数据收集: 9色板来自FACS Aria (BD Biosciences)，6色板来自FACS Canto II (BD Biosciences)，按照生产商提供的说明进行。数据分析由FlowJo (Tree Star) 进行。使用配对学生t检验进行统计分析。

[0157] 表1: 9色表型板

[0158]

	TC <sup>FI</sup>	PE	PerCP	APC	P E-CY7	AP C-CY7	AF7 00	BV 421/PC	V50 0
1. 空白									
2. T 细胞	C D45RA	CD25	CD8	CD69	CD127	D3 <sup>C</sup>	R7 <sup>CC</sup>	HL A DR	CD4
3. B 细胞	D <sup>Ig</sup>	CD24	CD20	CD27	CD38	D45 <sup>C</sup>	-	19 <sup>CD</sup>	CD3
4. 单核细胞/NK	D83 <sup>C</sup>	CD14 <sub>2</sub>	CD16 <sub>3</sub>	CD14	CD56	D16 <sup>C</sup>	CD3 +CD19	HL A DR	CD4 <sub>5</sub>
5. DC 细胞	D83 <sup>C</sup>	CD86	CD14	CD12 <sub>3</sub>	CD11c	D16 <sup>C</sup>	CD3 +CD19	HL A DR	CD4 <sub>5</sub>

[0159] 表2:6色表型板

[0160]

	FITC	PE	Per CP	APC	PE- CY7	AP C-CY7
1. 空白						

[0161]

2. 同种型对照	小鼠 IgG1	小鼠 IgG1	小鼠 IgG1	小鼠 IgG1	小鼠 IgG1	小鼠 IgG1
3. EPC	CD31	K <sub>DR</sub>		CXC <sub>R4</sub>	CD <sub>34</sub>	CD <sub>5</sub>
4. HPC	CD34	CD <sub>38</sub>		AC1 <sub>33</sub>	CD <sub>117</sub>	CD <sub>5</sub>
5. 祖细胞	CD45RA(B220)	CD <sub>61</sub>		CD <sub>1</sub>	CD <sub>34</sub>	CD <sub>5</sub>
6. NPC	巢蛋白	CD140A	CD45	AC133	CD117	CD34
7. MHC	HLA-DR, DP,DQ	HL <sub>A-G</sub>	C <sub>D56</sub>	HLA <sub>-ABC</sub>		CD <sub>3</sub>
8. MHC-2	HLA-A	HL <sub>A-B</sub>		HLA <sub>-E</sub>		
9. MSC	CD105	CD <sub>44</sub>	C <sub>D34</sub>	CD <sub>200</sub>	CD <sub>117</sub>	CD <sub>10</sub>
10. MSC-2	CD105	SS <sub>EA4</sub>	SS <sub>EA3</sub>	CD <sub>73</sub>	CD <sub>44</sub>	

[0162] 表3:用于表型表征的抗体信息。

[0163]

抗体	供应商	Cat#
FITC 小鼠 IgG1	BD	555748
FITC 抗人 CD31	BD	555445
FITC 抗人 CD34	BD	555821
FITC 抗人 CD45RA	BD	347723
FITC 抗人巢蛋白	BD	IC125F
FITC 抗人 HLA-DR,DP,DQ	BD	555558
FITC 抗人 HLA-A	LS Bio	LC-C2 4431
FITC 抗人 CD105	BD	561443
FITC 抗人 CD45RA	BD	556626
FITC 抗人 IgD	BD	555778
FITC 抗人 CD83	Ebioscience	11-083 9-42
PE 小鼠 IgG1	BD	551436
PE 抗人 KDR	R&D	LGE25 12101
PE 抗人 CD38	BD	347687
PE 抗人 CD61	BD	555754
PE 抗人 CD140a	BD	556002
PE 抗人 HLA-G	Ebiosci	12-995

[0164]

	ence	7-42
PE 抗人 HLA-B	LS Bio	36621
PE 抗人 CD44	BD	550989
PE 抗人 SSEA4	BD	560128
PE 抗人 CD25	BD	557138
PE 抗人 CD24	BD	555428
PE 抗人 CD142	BD	550312
PE 抗人 CD14	BD	557154
PerCP 小鼠 IgG1	BD	559425
PerCP 抗人 CD45	BD	555484
PerCP 抗人 CD56	BD	555517
PerCP 抗人 CD34	BD	555832
PerCP 抗人 SSEA3	BD	561564
PerCP 抗人 CD8	Biolege nd	344708
PerCP 抗人 CD20	BD	347674
PerCP 抗人 CD163	Biolege nd	333608
PerCP 抗人 CD86	Biolege nd	305420
APC 小鼠 IgG1	BD	550854
APC 抗人 CXCR4	BD	555976
APC 抗人 AC133	MACS	130-09 0-826
APC 抗人 CD41	R&D	FAB76 16A
APC 抗人 HLA-ABC	BD	555555
APC 抗人 HLA-E	Ebiosci ence	17-995 3-42
APC 抗人 CD200	R&D	FAB27 241A
APC 抗人 CD73	BD	560847
APC 抗人 CD69	BD	555533
APC 抗人 CD27	BD	558664
APC 抗人 CD14	BD	555399
APC 抗人 CD123	Ebiosci ence	17-123 9-42
PE-Cy7 小鼠 IgG1	BD	557646
PE-Cy7 抗人 CD34	BD	348791
PE-Cy7 抗人 CD117	BD	339195
PE-Cy7 抗人 CD44	BD	560533

[0165]

PE-Cy7 抗人 CD127	BD	560822
PE-Cy7 抗人 CD38	BD	335790
PE-Cy7 抗人 CD56	nd Biolege	304628
PE-Cy7 抗人 CD11c	BD	561356
APC-Cy7 小鼠 IgG1	BD	557873
APC-Cy7 抗人 CD45	BD	557833
APC-Cy7 抗人 CD34	nd Biolege	343514
APC-Cy7 抗人 CD3	BD	557832
APC-Cy7 抗人 CD10	nd Biolege	312212
APC-Cy7 抗人 CD3	BD	641406
APC-Cy7 抗人 CD45	BD	641408
APC-Cy7 抗人 CD16	BD	560195
BV421/PB 抗人 HLA-DR	nd Biolege	307633
BV421/PB 抗人 CD19	BD	562440
V500/PB 抗人 CD4	BD	561488
V500/PB 抗人 CD3	BD	561416
V500/PB 抗人 CD45	BD	560777
AF700 抗人 CCR7	BD	561143
AF700 抗人 CD3	BD	557943
AF700 抗人 CD19	BD	557921

[0166] 分析来自HPP的单核细胞来确定各种单核细胞类型的组成。表4详细显示了鉴定的细胞类型：

[0167] 表4:人胎盘灌注液组分

[0168]

白细胞~70%至 90%	
细胞类型	关联表型
T 淋巴细胞	CD3 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> (22.51%±14.85%)
B 淋巴细胞	CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup> (10.12%±4.88%)
自然杀伤细胞	CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> (6.45%±4.08)
单核细胞	CD3 <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup> (26.56%±5.22%)
粒细胞	CD3 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup>

[0169]

祖细胞	
细胞类型	关联表型
造血干细胞	CD34 <sup>+</sup> (3.65%±2.50%), CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>-</sup> (1.91%±1.13%)
内皮祖细胞	CD34 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> (2.93%±1.87%), CD34 <sup>+</sup> KDR <sup>+</sup> (1.63%±1.14%), CD34 <sup>+</sup> CXCR4 <sup>+</sup> (3.28%±2.27%)
MSC-样细胞	CD117 <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> CD105 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> (1.91%±1.08%), CD34 <sup>-</sup> CD10 <sup>+</sup> CD200 <sup>+</sup> CD105 <sup>+</sup> (0.56%±0.71%), CD105 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> CD73 <sup>+</sup> (2.32%±1.45%)
神经祖细胞	CD34 <sup>+</sup> 巢蛋白 <sup>+</sup> (2.23%±1.75%)

[0170] 6.2实施例2:人胎盘灌注液中的总有核细胞计数

[0171] 本实施例显示了人胎盘灌注液和脐带血单位的全有核细胞计数测定。

[0172] 对43对供体匹配的HPP和HUCB单位进行处理测定总有核细胞计数。单一单位的HPP的平均总有核细胞计数为~135百万个细胞。单一单位的HUCB的平均总有核细胞计数为~666百万个细胞(图1)。

[0173] 6.3实施例3:人胎盘灌注液中的祖细胞群

[0174] 本实施例显示了人胎盘灌注液和脐带血中CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>和CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>细胞群的测定。

[0175] 使用荧光激活细胞分选(FACS)测定人胎盘灌注液细胞的亚群(图2A)。CD34<sup>+</sup>细胞的一个亚群是CD45<sup>-</sup>,因此被从使用ISHAGE方案计数中排除(Barnett等,1999, Clin.Lab.Haem.21:301-308),后者是一种序贯闸门策略(sequential gating strategy)(图2B),其闸门优先针对CD45<sup>+</sup>细胞。建立了使用另一种序贯闸门策略的方案,其中闸门优先针对CD34<sup>+</sup>细胞,以分析人胎盘灌注液中的CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>和CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>细胞两者(图2C)。使用该方案,清楚的CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞群在人胎盘灌注液中非常明显。

[0176] FACS细胞分选如下进行:供体匹配的HPP和HUCB袋分别在37℃解冻,然后氯化铵RBC裂解。然后用FITC抗人CD34(Cat#555821, BD Biosciences)和PE抗人CD45(Cat#555483, BD Biosciences)室温暗处染色15min。用FACS缓冲液洗涤两次后,将样品重悬至1×10<sup>7</sup>每ml并通过FACS Aria(BD Biosciences)使用制造商提供的方案进行分选。

[0177] 使用FACS分选方案测得人胎盘灌注液含有比供体匹配的配对中的脐带血更大比例的CD34<sup>+</sup>细胞(图3A-3B)。使用人胎盘灌注液细胞的集落形成实验显示了分选后CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>细胞和CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞的生长。

[0178] 6.4实施例4:人胎盘灌注液中的CD34<sup>+</sup>亚群

[0179] 本实施例显示了人胎盘灌注液和脐带血中CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>和CD34<sup>+</sup>CXCR-4<sup>+</sup>细胞群的确定。

[0180] 使用如6.1节描述的表型表征方案,我们确定HPP CD34<sup>+</sup>细胞包含比HUCB CD34<sup>+</sup>细胞更高百分比的CD31<sup>+</sup>、KDR<sup>+</sup>和CXCR-4<sup>+</sup>细胞(图4)。这些表型与含成血管细胞群的HPP一致。

[0181] 6.5实施例5:人胎盘灌注液细胞的功能评价

[0182] 本实施例显示了与脐带血细胞相比人胎盘灌注液细胞血管生成性质的确定。如图5所示,在本文描述的试验中人胎盘灌注液较之脐带血显示了更高的血管生成(血管形成)活性。

[0183] 按照上述5.5节获得HPP细胞。将HPP细胞(图5,上左)与10μg/mL Dil-AC LDL(Cat#



L3484,Life technology) 在37℃一起孵育4h,用Axiovert 200M(Zeiss) 拍摄来自HPP的内皮细胞的脂蛋白摄入荧光照片(图5,上右)。进行体外功能试验来评价人胎盘灌注液细胞的血管生成性质。将按照上述5.5节获得的HPP细胞在ECMATRIX™上培养18-24小时至96孔板中约 $10^6$ 细胞每孔,使用体外血管生成试验试剂盒(Chemicon cat#ECM625),其中细胞在TGF- $\beta$ 、FGF、纤溶酶原、tPA和基质金属蛋白酶存在下培养。在人胎盘灌注液细胞培养中观察到微血管形成(图5,下右)。HUVECs(人脐静脉内皮细胞)被用作阳性对照(图5,下左)。脐带血培养中未观察到显著的管形成。

[0184] 6.6实施例6:人胎盘灌注液中的原始祖细胞群

[0185] 本实施例显示了人胎盘灌注液和脐带血中各种CD34<sup>+</sup>原祖细胞群的确定。

[0186] 使用如6.1节描述的表型表征方案,我们确定人胎盘灌注液含有比脐带血实质上更大比例的巢蛋白<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>细胞(图6)。巢蛋白<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>细胞被建议是更原始的神经元祖细胞(Mii等,J.Cell Biol.,2013)。

[0187] 人胎盘灌注液含有比脐带血显著更大数量的不成熟造血干细胞群(即,CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>,CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>),如表5所示。与表2所示类似,发现推定的成血管细胞群(即,CD34<sup>+</sup>C31<sup>+</sup>,CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>,和CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>) 在人胎盘灌注液中比脐带血中数量更多。

[0188] 表5:人胎盘灌注液和脐带血中的原始祖细胞.

HSC 群	HPP (n=6)		HUCB (n=6)	
	均值	范围(min, max)	均值	范围(min, max)
CD34 <sup>+</sup>	$7.25 \times 10^6$	$6.62 \times 10^5, 2.44 \times 10^7$	$5.70 \times 10^6$	$7.20 \times 10^4, 1.87 \times 10^7$
CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>-</sup>	$3.28 \times 10^6$	$5.00 \times 10^5, 1.00 \times 10^7$	$4.73 \times 10^5$	$2.00 \times 10^4, 1.68 \times 10^6$
CD34 <sup>+</sup> CD31 <sup>-</sup>	$8.76 \times 10^5$	$2.06 \times 10^4, 2.45 \times 10^6$	$2.45 \times 10^6$	$1.40 \times 10^4, 8.02 \times 10^6$
CD34 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup>	$6.12 \times 10^6$	$6.30 \times 10^5, 2.35 \times 10^7$	$2.84 \times 10^6$	$4.88 \times 10^4, 9.70 \times 10^6$
[0189] CD34 <sup>+</sup> KDR <sup>-</sup>	$3.56 \times 10^6$	$1.62 \times 10^5, 9.62 \times 10^6$	$4.16 \times 10^6$	$1.63 \times 10^4, 1.68 \times 10^7$
CD34 <sup>+</sup> KDR <sup>+</sup>	$3.45 \times 10^6$	$5.11 \times 10^5, 1.49 \times 10^7$	$1.36 \times 10^6$	$4.56 \times 10^4, 5.72 \times 10^6$
CD34 <sup>+</sup> CXCR4 <sup>-</sup>	$3.49 \times 10^5$	$6.72 \times 10^4, 7.14 \times 10^5$	$3.80 \times 10^5$	$4.67 \times 10^3, 1.78 \times 10^6$
CD34 <sup>+</sup> CXCR4 <sup>+</sup>	$6.70 \times 10^6$	$5.62 \times 10^5, 2.38 \times 10^7$	$4.98 \times 10^6$	$6.08 \times 10^4, 1.62 \times 10^7$
CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup>	$5.97 \times 10^6$	$6.49 \times 10^5, 2.26 \times 10^7$	$5.81 \times 10^5$	$5.20 \times 10^4, 2.45 \times 10^6$
CD34 <sup>+</sup> CD117 <sup>-</sup>	$5.68 \times 10^6$	$7.56 \times 10^5, 1.91 \times 10^7$	$1.15 \times 10^6$	$5.44 \times 10^4, 2.02 \times 10^6$
CD34 <sup>+</sup> CD140a <sup>+</sup>	$4.39 \times 10^6$	$6.55 \times 10^5, 1.07 \times 10^7$	$7.99 \times 10^6$	$6.72 \times 10^4, 1.80 \times 10^7$
CD34 <sup>+</sup> 巢蛋白 <sup>+</sup>	$4.30 \times 10^6$	$3.67 \times 10^5, 1.25 \times 10^7$	$4.32 \times 10^6$	$2.40 \times 10^4, 1.10 \times 10^7$

[0190] 6.7实施例7:人胎盘灌注液中的T-细胞含量

[0191] 本实施例显示了人胎盘灌注液和脐带血中多种T细胞群的确定。

[0192] 使用9色T细胞FACS板对人胎盘灌注液和脐带血进行了I和II类总HLA评价和大量免疫表型表征,以描述T细胞亚群、CD45RA、CD8、CD25、CD127、CD69、CD3、CCR7、HLADR和CD4,如上6.1节所示。

[0193] 如表6所示,结果显示人胎盘灌注液含有比脐带血显著更低的T细胞含量。类似的,人胎盘灌注液细胞具有更低表达的I类和II类HLA(图7)。还对人胎盘灌注液和脐带血确定了表达CD3、CD4和/或CD8的特异性T-细胞群的相对比例(图8)。人胎盘灌注液的T细胞含量

表明,例如,人胎盘灌注液细胞适于同种异体错配移植。

[0194] 表6:人胎盘灌注液和脐带血中的T细胞群。“Hi”和“low”表示特定表型标记的表达强度。

T-细胞群		HPP (n=6)		HUCB (n=6)	
		均值	范围(min, max)	均值	范围(min, max)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD127 <sup>low</sup>	Treg	1.88 × 10 <sup>6</sup>	3.57 × 10 <sup>4</sup> , 4.52 × 10 <sup>6</sup>	8.57 × 10 <sup>6</sup>	1.46 × 10 <sup>6</sup> , 1.46 × 10 <sup>7</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD127 <sup>low</sup> CD45RA <sup>+</sup>	初始 Treg	6.37 × 10 <sup>5</sup>	7.66 × 10 <sup>3</sup> , 2.65 × 10 <sup>5</sup>	3.09 × 10 <sup>6</sup>	1.46 × 10 <sup>6</sup> , 4.85 × 10 <sup>6</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD127 <sup>low</sup> CD45RA <sup>-</sup>	记忆 Treg	1.40 × 10 <sup>5</sup>	2.80 × 10 <sup>4</sup> , 3.95 × 10 <sup>5</sup>	1.29 × 10 <sup>6</sup>	7.35 × 10 <sup>3</sup> , 2.54 × 10 <sup>6</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD127 <sup>low</sup> CD45RA <sup>+</sup> HLADR <sup>+</sup>	HLADR <sup>+</sup> 记忆 Treg	1.46 × 10 <sup>4</sup>	1.47 × 10 <sup>3</sup> , 3.43 × 10 <sup>4</sup>	8.84 × 10 <sup>4</sup>	7.62 × 10 <sup>2</sup> , 2.10 × 10 <sup>5</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> 效应子细胞	1.92 × 10 <sup>7</sup>	1.12 × 10 <sup>6</sup> , 4.22 × 10 <sup>7</sup>	1.11 × 10 <sup>8</sup>	1.88 × 10 <sup>7</sup> , 1.65 × 10 <sup>8</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> HLADR <sup>-</sup>	CD45RA <sup>+</sup> (初始)CD4 <sup>+</sup> 细胞	1.54 × 10 <sup>7</sup>	4.67 × 10 <sup>5</sup> , 3.49 × 10 <sup>7</sup>	8.87 × 10 <sup>7</sup>	1.85 × 10 <sup>7</sup> , 1.44 × 10 <sup>8</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup>	中心记忆 CD4 <sup>+</sup> 细胞	3.57 × 10 <sup>6</sup>	6.43 × 10 <sup>5</sup> , 1.16 × 10 <sup>7</sup>	2.03 × 10 <sup>7</sup>	7.73 × 10 <sup>4</sup> , 3.21 × 10 <sup>7</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>-</sup>	效应子记忆 CD4 <sup>+</sup> 细胞	3.35 × 10 <sup>4</sup>	8.65 × 10 <sup>3</sup> , 1.18 × 10 <sup>5</sup>	7.19 × 10 <sup>5</sup>	7.59 × 10 <sup>2</sup> , 2.29 × 10 <sup>6</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>-</sup>	CD4 <sup>+</sup> 终止效应子细胞	1.35 × 10 <sup>5</sup>	5.62 × 10 <sup>3</sup> , 5.49 × 10 <sup>5</sup>	1.03 × 10 <sup>6</sup>	2.62 × 10 <sup>5</sup> , 2.81 × 10 <sup>6</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> HLADR <sup>+</sup>	HLADR <sup>+</sup> 记忆 CD4 <sup>+</sup> 细胞	3.66 × 10 <sup>5</sup>	7.46 × 10 <sup>4</sup> , 9.17 × 10 <sup>5</sup>	1.82 × 10 <sup>6</sup>	7.54 × 10 <sup>4</sup> , 2.65 × 10 <sup>6</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	CD69 <sup>+</sup> 记忆 CD4 <sup>+</sup>	3.75 × 10 <sup>4</sup>	3.93 × 10 <sup>3</sup> , 8.86 × 10 <sup>4</sup>	4.14 × 10 <sup>5</sup>	5.65 × 10 <sup>3</sup> , 7.85 × 10 <sup>5</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> 效应子细胞	1.02 × 10 <sup>7</sup>	2.40 × 10 <sup>5</sup> , 2.35 × 10 <sup>7</sup>	4.70 × 10 <sup>7</sup>	9.44 × 10 <sup>6</sup> , 8.91 × 10 <sup>7</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> HLADR <sup>-</sup> CCR7 <sup>+</sup>	初始 CD8 <sup>+</sup> 细胞	9.30 × 10 <sup>6</sup>	2.52 × 10 <sup>5</sup> , 2.26 × 10 <sup>7</sup>	4.34 × 10 <sup>7</sup>	9.07 × 10 <sup>6</sup> , 8.38 × 10 <sup>7</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> 中心记忆	7.41 × 10 <sup>5</sup>	8.40 × 10 <sup>4</sup> , 1.79 × 10 <sup>6</sup>	3.14 × 10 <sup>6</sup>	1.98 × 10 <sup>4</sup> , 5.88 × 10 <sup>6</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>-</sup>	CD8 <sup>+</sup> 终止效应子细胞	1.13 × 10 <sup>5</sup>	3.03 × 10 <sup>3</sup> , 5.36 × 10 <sup>5</sup>	3.10 × 10 <sup>5</sup>	1.22 × 10 <sup>5</sup> , 5.44 × 10 <sup>5</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>-</sup>	CD8 <sup>+</sup> 效应子记忆细胞	1.75 × 10 <sup>4</sup>	9.18 × 10 <sup>2</sup> , 5.92 × 10 <sup>4</sup>	8.53 × 10 <sup>4</sup>	2.08 × 10 <sup>3</sup> , 1.82 × 10 <sup>5</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> HLADR <sup>+</sup>	HLADR <sup>+</sup> 记忆 CD8 <sup>+</sup> 细胞	3.73 × 10 <sup>4</sup>	5.10 × 10 <sup>2</sup> , 9.12 × 10 <sup>4</sup>	2.22 × 10 <sup>5</sup>	1.13 × 10 <sup>3</sup> , 6.57 × 10 <sup>5</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> 淋巴细胞	1.68 × 10 <sup>5</sup>	1.71 × 10 <sup>4</sup> , 6.16 × 10 <sup>5</sup>	5.96 × 10 <sup>5</sup>	2.31 × 10 <sup>5</sup> , 1.26 × 10 <sup>6</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> 淋巴细胞	9.57 × 10 <sup>6</sup>	7.93 × 10 <sup>5</sup> , 2.34 × 10 <sup>7</sup>	2.16 × 10 <sup>7</sup>	3.50 × 10 <sup>6</sup> , 5.47 × 10 <sup>7</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD69 <sup>+</sup>	CD69 <sup>+</sup> 双阴性淋巴细胞	2.67 × 10 <sup>5</sup>	1.06 × 10 <sup>4</sup> , 5.01 × 10 <sup>5</sup>	1.26 × 10 <sup>6</sup>	1.98 × 10 <sup>5</sup> , 4.02 × 10 <sup>6</sup>

[0197] 6.8实施例8:T细胞分离、功能评价和扩增

[0198] 本实施例显示了可用于在人胎盘灌注液和脐带血中成功分离、评价和扩增T<sub>reg</sub>细胞群的方法。类似方法可用于分离、评价和扩增人胎盘灌注液细胞的其它群或亚群。

[0199] 可以使用针对人CD4<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>CD25<sup>+</sup>调节T细胞(Cat#15861, Stem Cell)的完全试剂盒从供体匹配的HPP或HUCB中分别分离T<sub>reg</sub>细胞。从供体匹配的HPP或HUCB、供体匹配的HPP或HUCB、或不含T<sub>reg</sub>细胞的供体匹配的HPP或HUCB中分别分离的T<sub>reg</sub>细胞可通过体外磁珠T细胞反应(BTR)试验进行评价。简言之,用抗CD3/CD28磁珠激活的来自外周血(PB)的T细胞可以与上文列出的样品共培养5天。可以通过FACS检测对CD4和CD8 T细胞增殖的抑制。

[0200] 可以使用 $T_{reg}$ 扩增试剂盒 (Cat#:130-095-345, Miltenyi) 和 DYNABEADS® 调节  $CD4^+CD25^+$ T 细胞试剂盒 (Cat#11363D, Life Technology) 评价两种分别来自供体匹配的 HPP 和 HUCB 的基于磁珠的扩增试剂盒的  $T_{reg}$  细胞扩增。可以使用用于增强的坏死因子受体家族成员: OX40、4-1BB 来完成临床应用的扩增 Treg 细胞的能力改进 (Hippen 等, 2008)

[0201] 等价:

[0202] 本发明的范围将不受本文描述的具体实施方式的限制。事实上, 除了那些本文描述的之外, 根据之前的描述, 本发明的多种修饰对于本领域技术人员而言将是显而易见的, 这种修饰旨在落入附加权利要求的范围内。

[0203] 本文引用的所有参考文献在此全文引入作为参考并用于所有目的, 其程度如同每种单独的出版物、专利或专利申请特别并单独地表明用于所有目的而被全文引入作为参考那样。

[0204] 任何出版物的引用是为了其在提交日前的公开内容, 且不应该被解释为承认本发明由于在先发明而无权享有先于这些出版物的资格。

[0205] 方案1. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物, 其中人胎盘灌注液包含至少  $6 \times 10^5 CD34^+$  细胞。

[0206] 方案2. 如方案1的组合物, 其中该组合物进一步包含2倍更多数量的  $CD34^+$  细胞。

[0207] 方案3. 如方案1的组合物, 其中该组合物进一步包含10倍更多数量的  $CD34^+$  细胞。

[0208] 方案4. 如方案1的组合物, 其中该组合物进一步包含50倍更多数量的  $CD34^+$  细胞。

[0209] 方案5. 如方案1的组合物, 其中该组合物包含基本上纯的人胎盘灌注液  $CD34^+$  细胞。

[0210] 方案6. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物, 其中人胎盘灌注液包含至少  $5 \times 10^5 CD34^+CD45^-$  细胞。

[0211] 方案7. 如方案6的组合物, 其中该组合物进一步包含2倍更多数量的  $CD34^+CD45^-$  细胞。

[0212] 方案8. 如方案6的组合物, 其中该组合物进一步包含10倍更多数量的  $CD34^+CD45^-$  细胞。

[0213] 方案9. 如方案6的组合物, 其中该组合物进一步包含50倍更多数量的  $CD34^+CD45^-$  细胞。

[0214] 方案10. 如方案6的组合物, 其中该组合物包含基本上纯的人胎盘灌注液  $CD34^+CD45^-$  细胞。

[0215] 方案11. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物, 其中人胎盘灌注液包含至少  $6 \times 10^5 CD34^+CD31^+$  细胞。

[0216] 方案12. 如方案11的组合物, 其中该组合物进一步包含2倍更多数量的  $CD34^+CD31^+$  细胞。

[0217] 方案13. 如方案11的组合物, 其中该组合物进一步包含10倍更多数量的  $CD34^+CD31^+$  细胞。

[0218] 方案14. 如方案11的组合物, 其中该组合物进一步包含50倍更多数量的  $CD34^+CD31^+$  细胞。

[0219] 方案15. 如方案11的组合物, 其中该组合物包含基本上纯的人胎盘灌注液  $CD34^+$

CD31<sup>+</sup>细胞。

[0220] 方案16. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物, 其中人胎盘灌注液包含至少 $5 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>细胞。

[0221] 方案17. 如方案16的组合物, 其中该组合物进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>细胞。

[0222] 方案18. 如方案16的组合物, 其中该组合物进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>细胞。

[0223] 方案19. 如方案16的组合物, 其中该组合物进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>细胞。

[0224] 方案20. 如方案16的组合物, 其中该组合物包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>细胞。

[0225] 方案21. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物, 其中人胎盘灌注液包含至少 $5 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞。

[0226] 方案22. 如方案21的组合物, 其中该组合物进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞。

[0227] 方案23. 如方案21的组合物, 其中该组合物进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞。

[0228] 方案24. 如方案21的组合物, 其中该组合物进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞。

[0229] 方案25. 如方案21的组合物, 其中该组合物包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>细胞。

[0230] 方案26. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物, 其中人胎盘灌注液包含至少 $6 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。

[0231] 方案27. 如方案26的组合物, 其中该组合物进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。

[0232] 方案28. 如方案26的组合物, 其中该组合物进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。

[0233] 方案29. 如方案26的组合物, 其中该组合物进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。

[0234] 方案30. 如方案26的组合物, 其中该组合物包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞。

[0235] 方案31. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物, 其中人胎盘灌注液包含至少 $7 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。

[0236] 方案32. 如方案31的组合物, 其中该组合物进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。

[0237] 方案33. 如方案31的组合物, 其中该组合物进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。

[0238] 方案34. 如方案31的组合物, 其中该组合物进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。

[0239] 方案35. 如方案31的组合物, 其中该组合物包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>细胞。

[0240] 方案36. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物, 其中人胎盘灌注液包含至少 $6 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。

[0241] 方案37. 如方案36的组合物, 其中该组合物进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。

[0242] 方案38. 如方案36的组合物, 其中该组合物进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。

[0243] 方案39. 如方案36的组合物, 其中该组合物进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。

[0244] 方案40. 如方案36的组合物, 其中该组合物包含基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>细胞。

[0245] 方案41. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物, 其中人胎盘灌注液包含至少 $3 \times 10^5$ CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。

[0246] 方案42. 如方案40的组合物, 其中该组合物进一步包含2倍更多数量的CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。

[0247] 方案43. 如方案40的组合物, 其中该组合物进一步包含10倍更多数量的CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。

[0248] 方案44. 如方案40的组合物, 其中该组合物进一步包含50倍更多数量的CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。

[0249] 方案45. 如方案40的组合物, 其中该组合物是基本上纯的人胎盘灌注液CD34<sup>+</sup>巢蛋白<sup>+</sup>细胞。

[0250] 方案46. 包含分离的人胎盘灌注液的组合物, 其中人胎盘灌注液包含至少 $3 \times 10^4$ CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。

[0251] 方案47. 如方案46的组合物, 其中该组合物进一步包含2倍更多数量的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。

[0252] 方案48. 如方案46的组合物, 其中该组合物进一步包含10倍更多数量的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。

[0253] 方案49. 如方案46的组合物, 其中该组合物进一步包含50倍更多数量的CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。

[0254] 方案50. 如方案46的组合物, 其中该组合物是基本上纯的人胎盘灌注液CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>细胞。

[0255] 方案51. 如方案1-50任一项的组合物, 其中人胎盘灌注液分离自单一胎盘灌注。

[0256] 方案52. 治疗对象中的中枢神经系统损伤、疾病或障碍的方法, 包括对对象给药如方案1-50任一项的组合物和来自另一来源的造血细胞。

[0257] 方案53. 如方案52的方法, 其中所述中枢神经系统损伤、疾病或障碍是缺氧缺血性脑病。

[0258] 方案54. 治疗对象中的肌肉减少症的方法, 包括对对象给药如方案1-50任一项的组合物和来自另一来源的造血细胞。

[0259] 方案55. 诱导对象中的嵌合体的方法, 包括对对象给药如方案1-50任一项的组合物和来自另一来源的造血细胞。

[0260] 方案56. 用于对象中的细胞移植的方法, 包括对对象给药如方案1-50任一项的组合物和来自另一来源的造血细胞。

[0261] 方案57. 降低对象中的移植物抗宿主疾病 (GVHD) 的严重程度或持续时间的方法, 包括对对象给药如方案1-50任一项的组合物和来自另一来源的造血细胞。

[0262] 方案58. 治疗对象中的代谢障碍的方法, 包括对对象给药如方案1-50任一项的组合物和来自另一来源的造血细胞。

[0263] 方案59. 治疗对象中的血液学疾病或恶性血液病的方法, 包括对对象给药如方案1-50任一项的组合物和来自另一来源的造血细胞。

[0264] 方案60. 用于下述方法的如方案1-50任一项中定义的组合物:

[0265] 治疗对象中的中枢神经系统损伤、疾病或障碍, 优选的所述中枢神经系统损伤、疾病或障碍是缺氧缺血性脑病;

[0266] 在对象中诱导嵌合体;

[0267] 用于细胞移植;

[0268] 用于降低对象中移植物抗宿主疾病 (GVHD) 的严重程度或持续时间;

[0269] 治疗对象中的代谢障碍;

[0270] 治疗对象中的血液学疾病或恶性血液病; 或

[0271] 治疗对象中的肌肉减少症。

[0272] 方案61. 用于如方案60中的用途的组合物, 其中该组合物进一步包含来自另一来源的造血细胞。

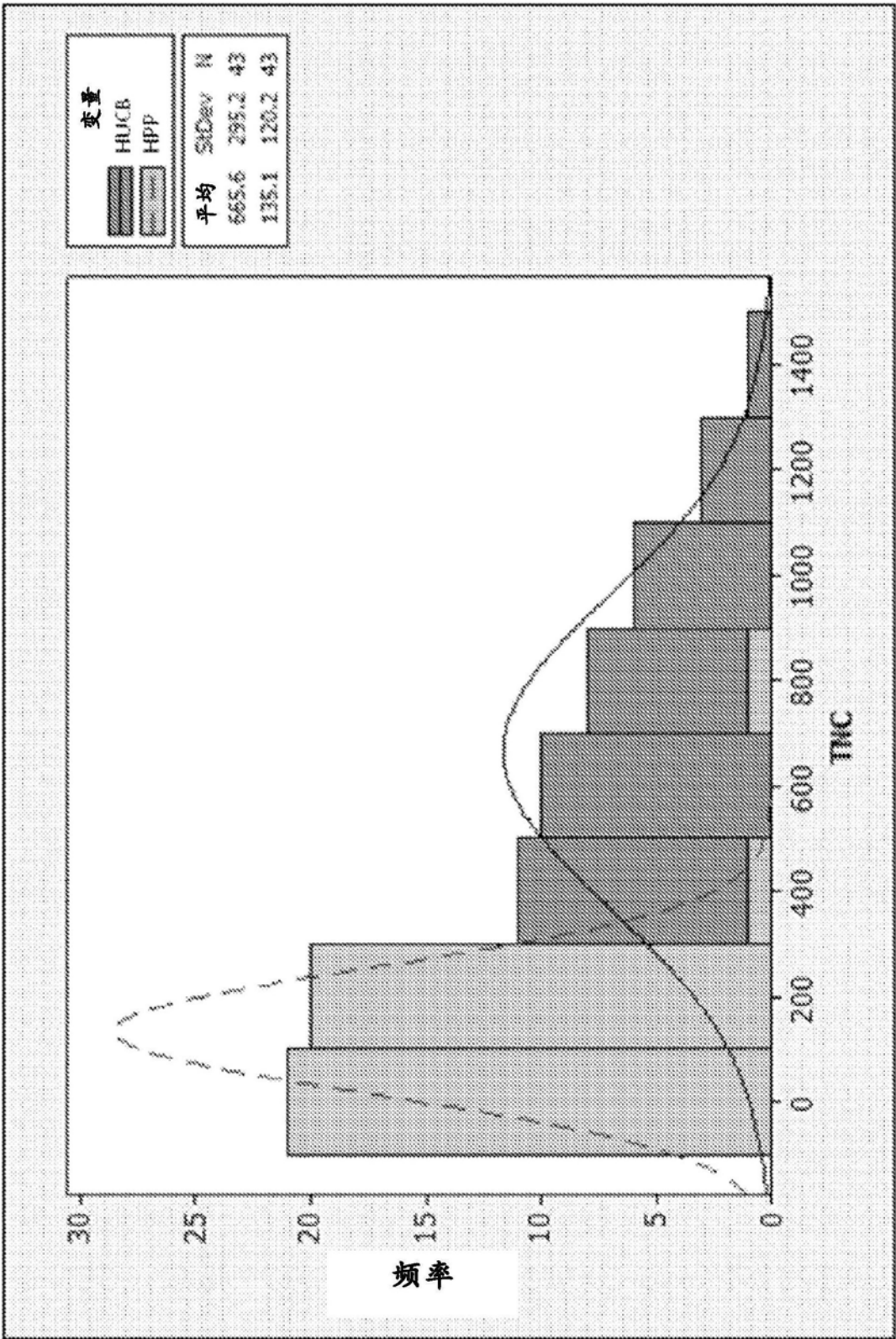


图1

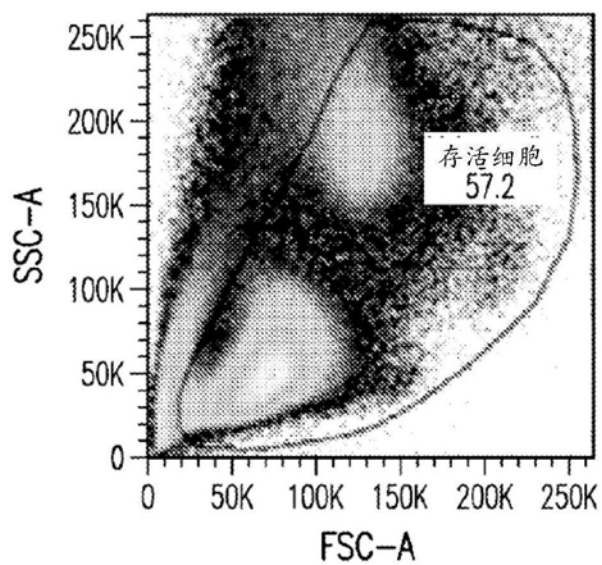


图2A

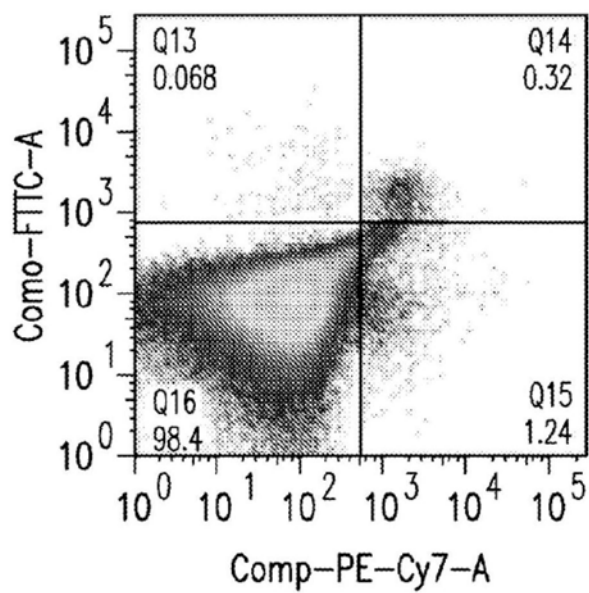


图2B



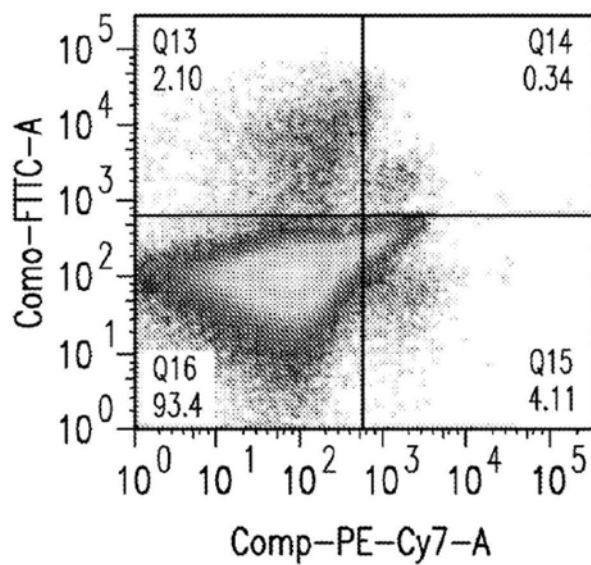


图2C

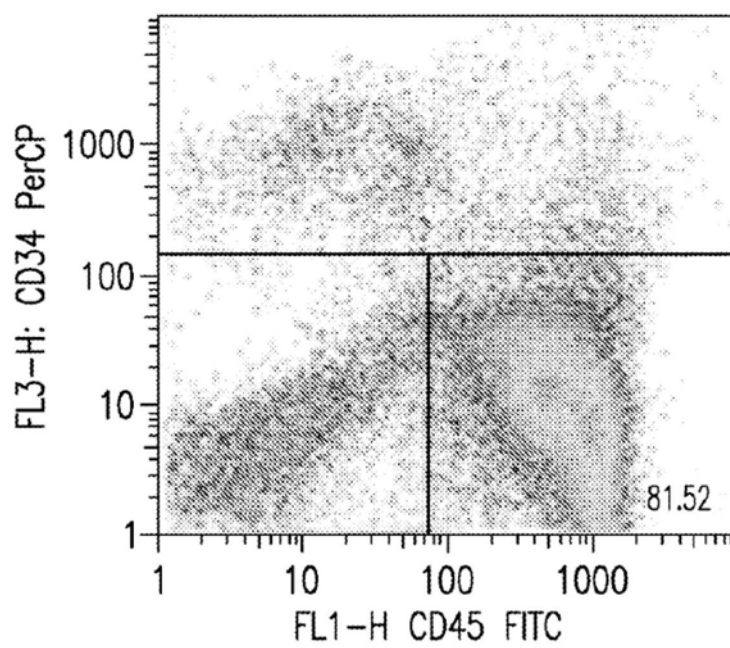


图3A

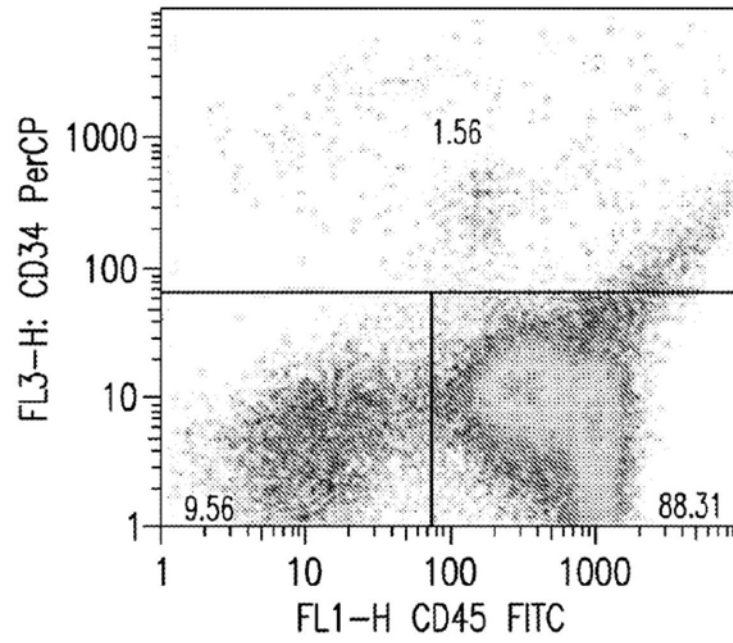


图3B

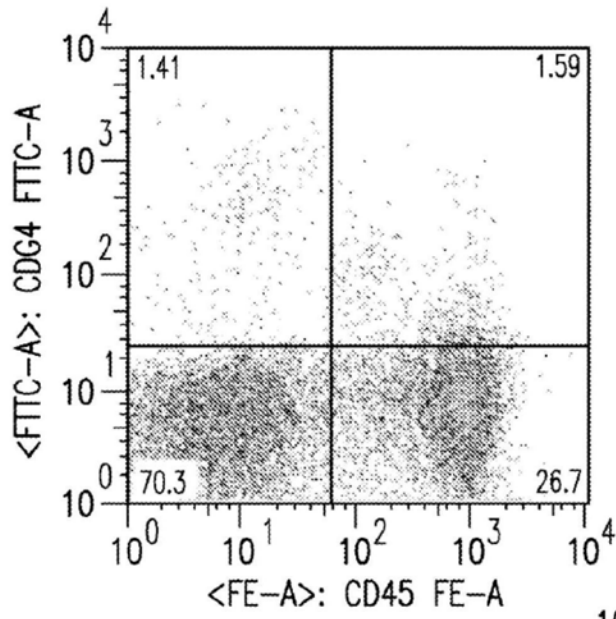


图 3C

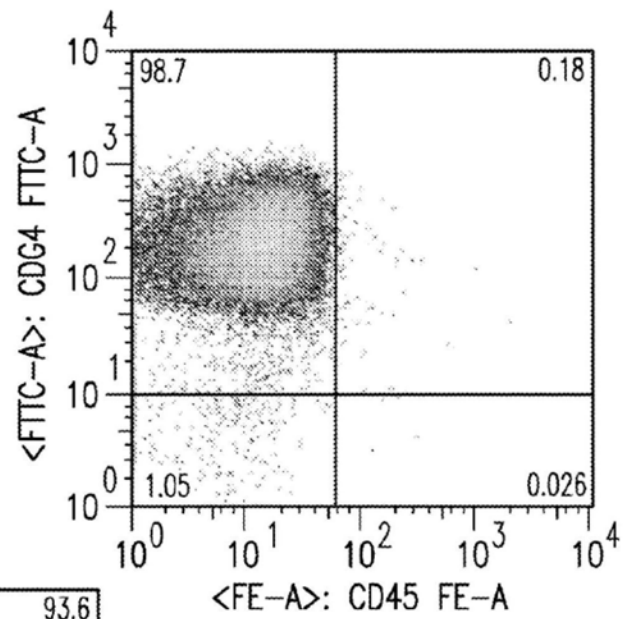


图 3D

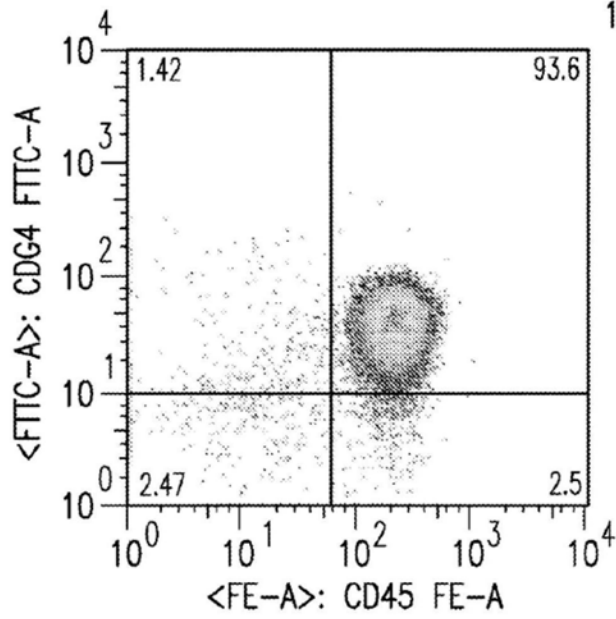


图 3E

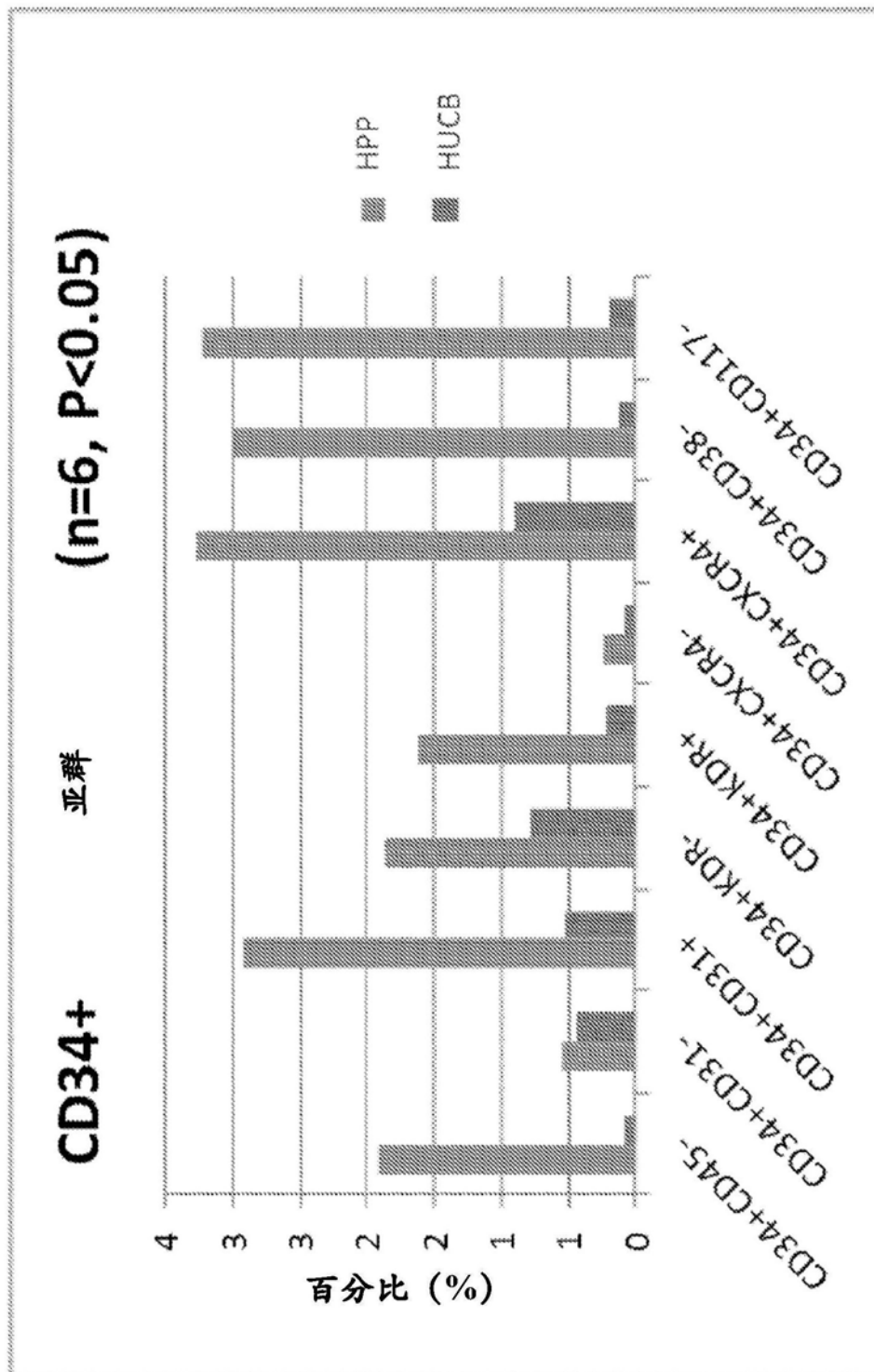


图4

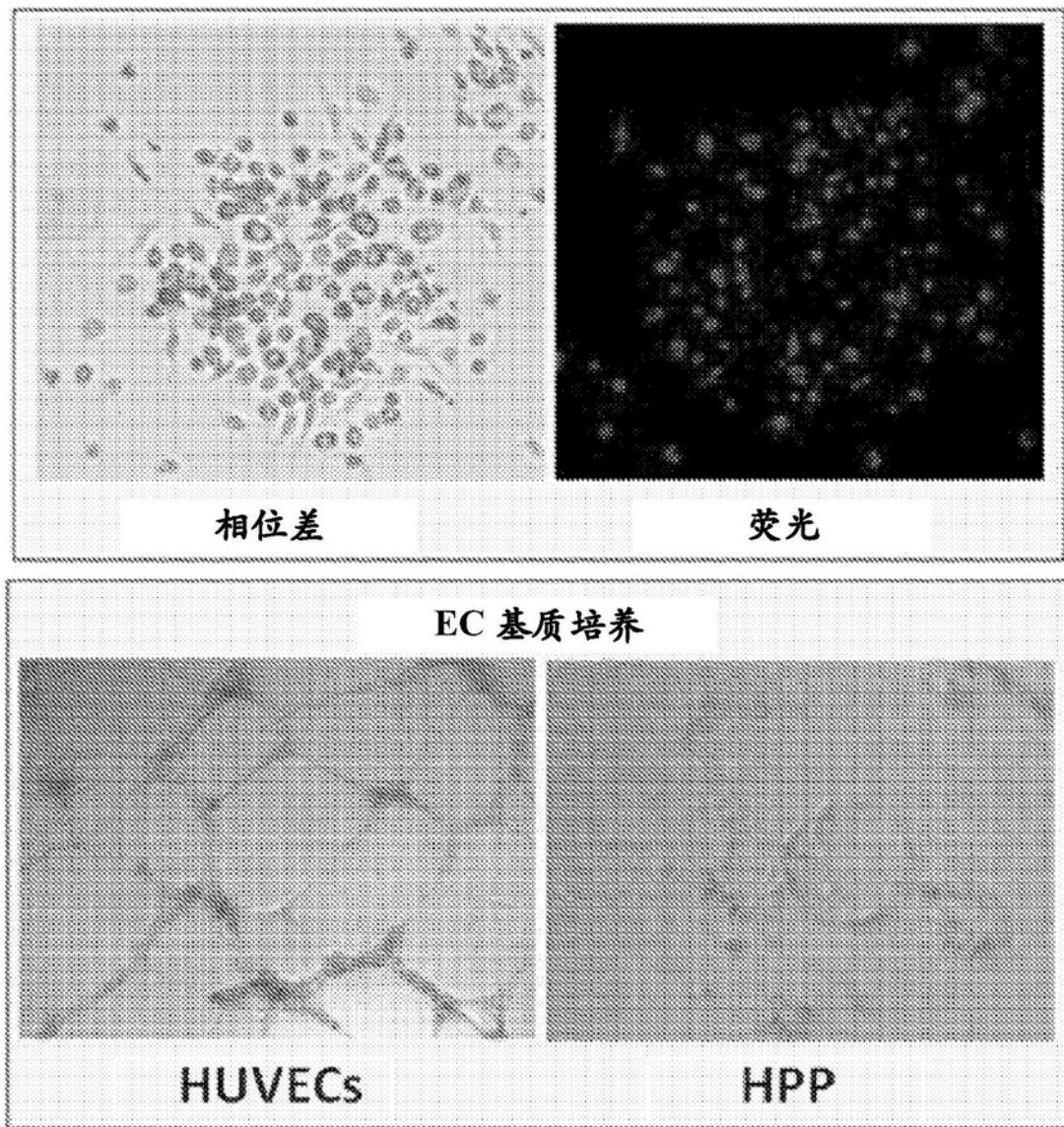


图5

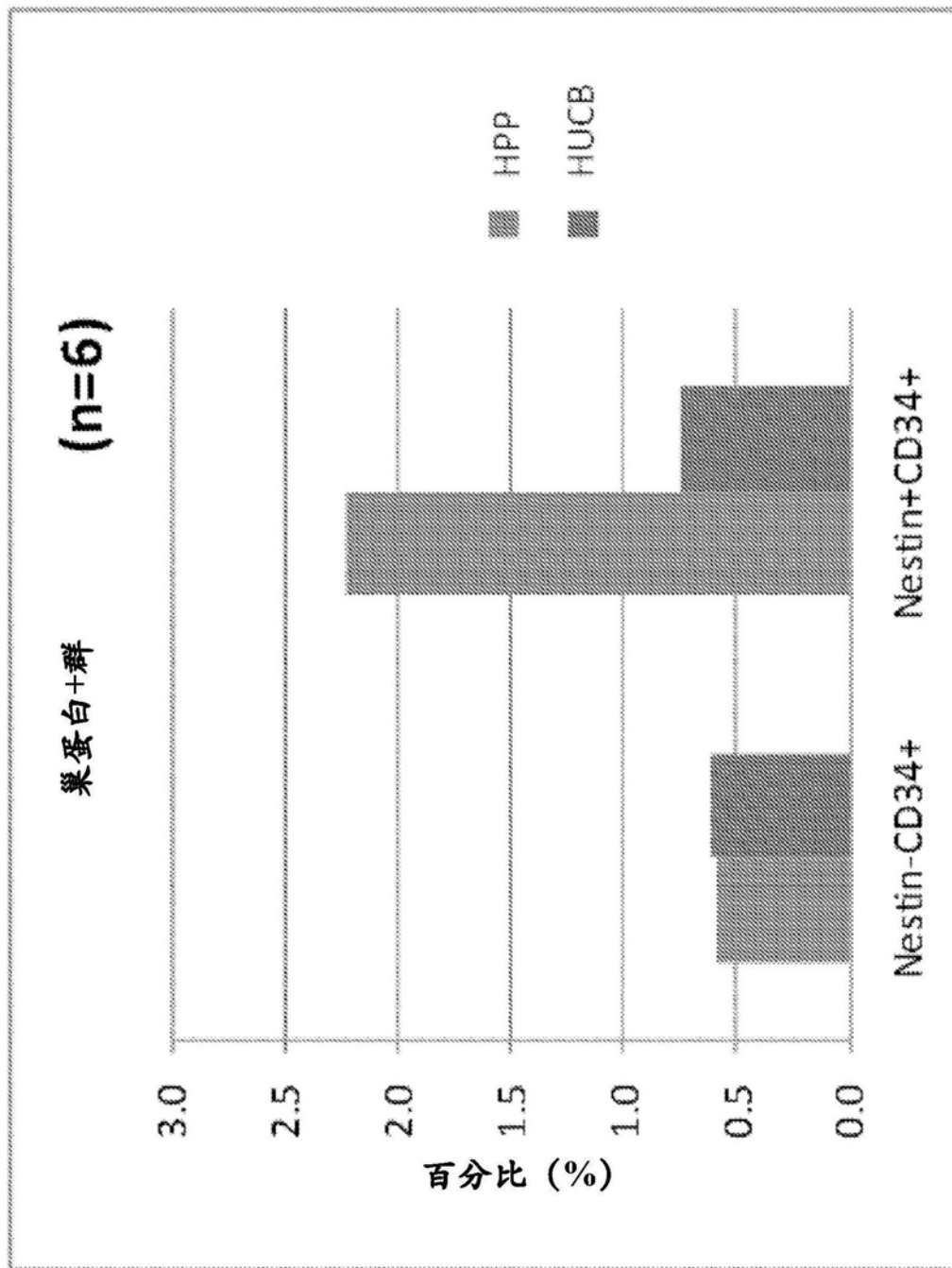


图6

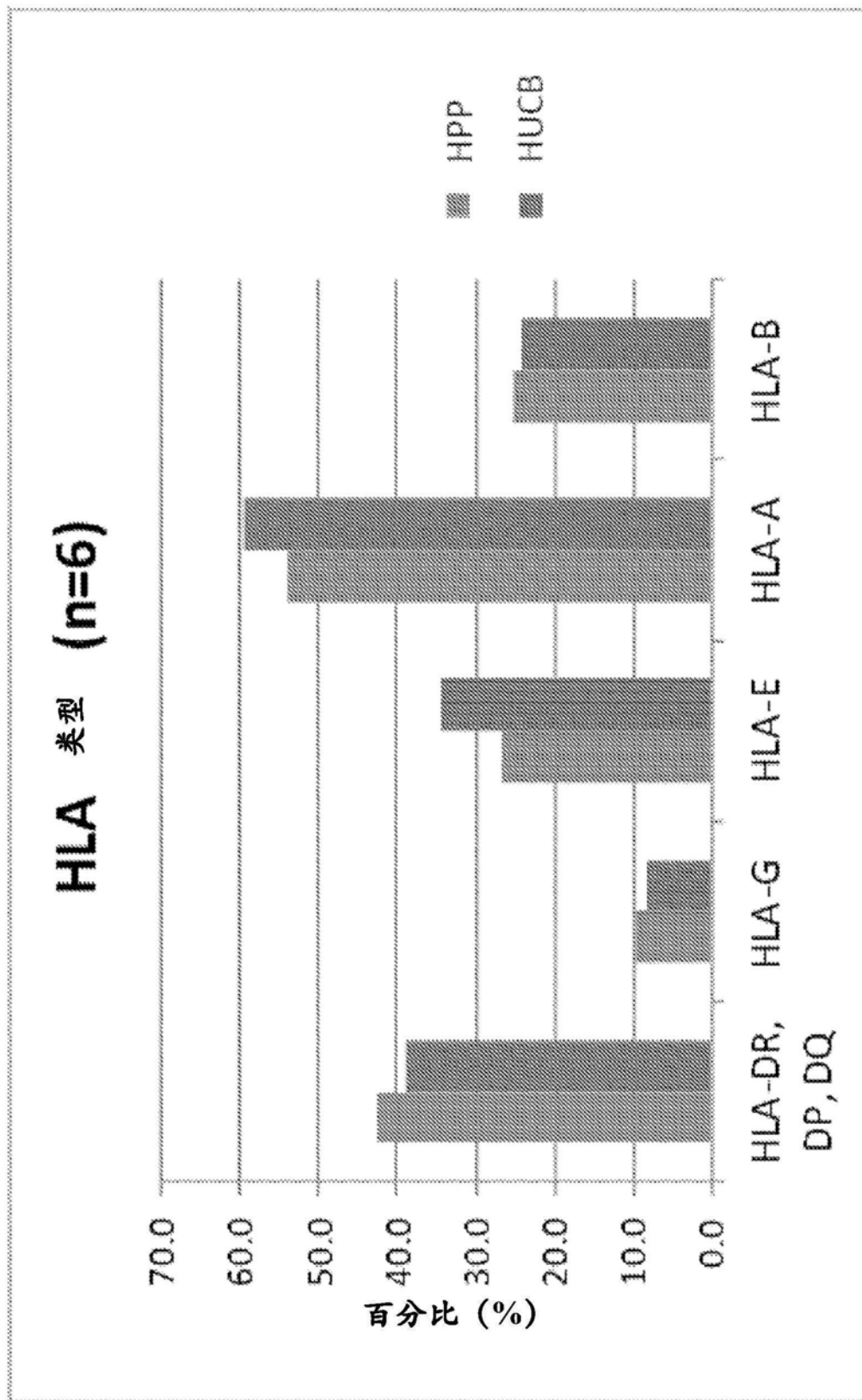


图7

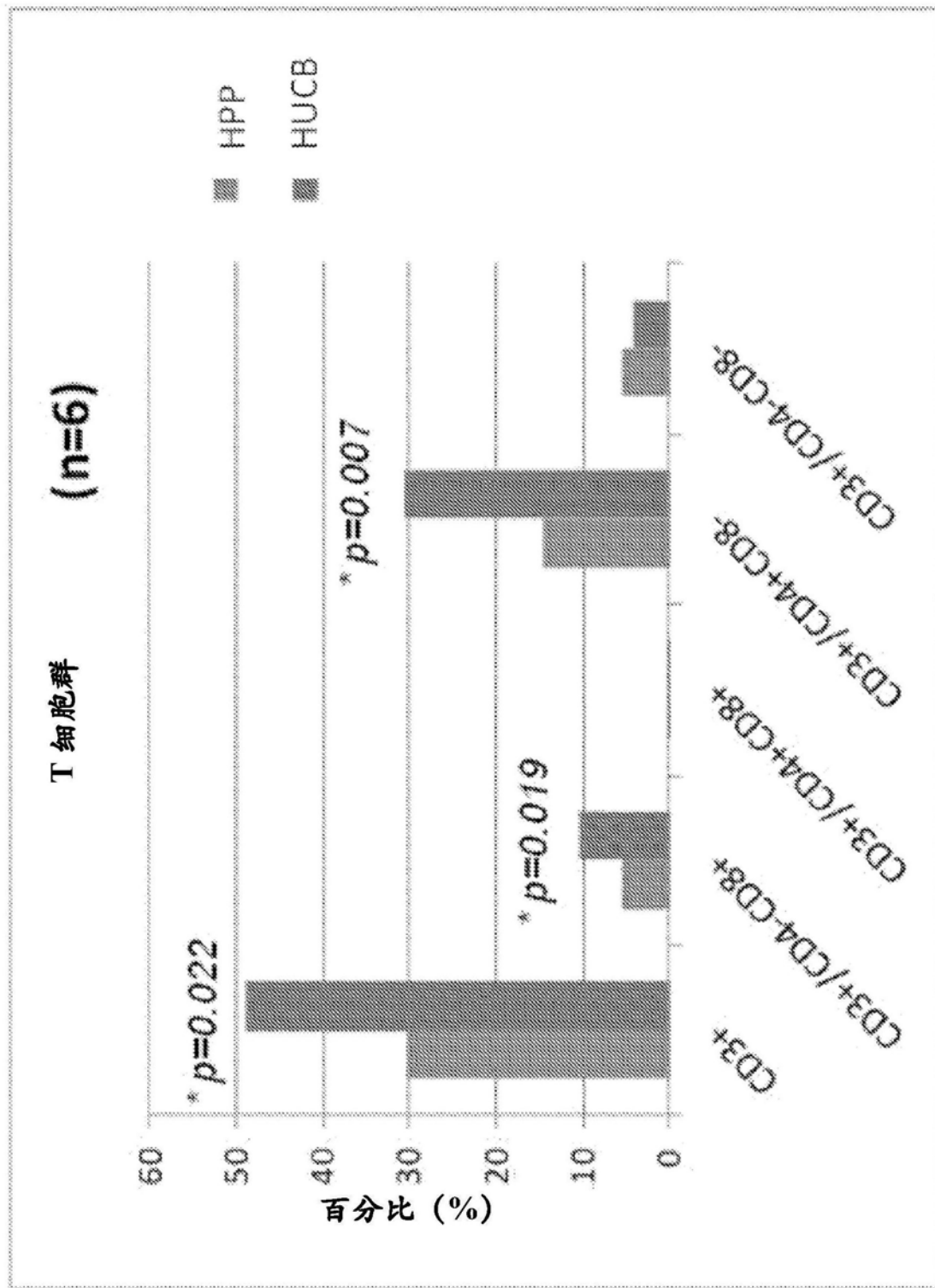


图8