(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108559725 A
(43)申请公布日 2018.09.21

(21)申请号 201810489408.8

(22)申请日 2006.12.28

(30)优先权数据
60/754,968 2005.12.29 US
60/846,641 2006.09.22 US

(62)分案原申请数据
200680053575.3 2006.12.28

(71)申请人 人类起源公司
地址 美国新泽西州

(72)发明人 萨沙·道恩·阿布拉门逊
詹姆士·W·爱丁格
赫伯特·费莱克
罗伯特·J·哈黎里
克利斯登·S·拉巴左
马里安·佩雷拉 王佳伦 叶倩

(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 刘晓杰

(51)Int.Cl.
C12N 5/073(2010.01)
C12N 5/074(2010.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12Q 1/6888(2018.01)
A61K 35/50(2015.01)

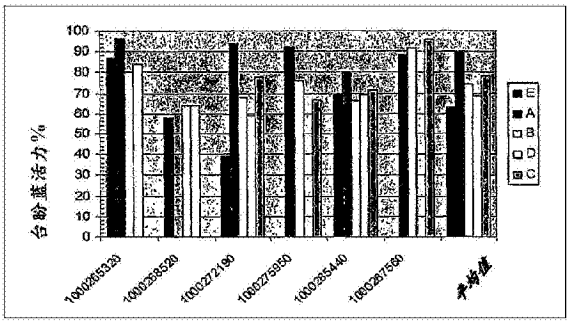
权利要求书4页 说明书64页 附图12页

(54)发明名称

胎盘干细胞群

(57)摘要

本发明提供了胎盘干细胞和胎盘干细胞群，及其培养、增殖和扩增的方法。本发明还提供了分化胎盘干细胞的方法。本发明进一步提供了使用胎盘干细胞进行分析和移植的方法。



CN 108559725 A

1.一种生产细胞群的方法,包括鉴定胎盘细胞,该细胞附着于基质并:

表达CD200和HLA-G;

表达CD73、CD105和CD200;

表达CD200和OCT-4;

表达CD73、CD105和HLA-G;

表达CD73和CD105,和当所述群体在允许形成拟胚体的条件下培养时,促进在胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体;或

表达OCT-4,和(c)当所述群体在允许形成拟胚体的条件下培养时,促进在胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体;

和从其它的细胞中分离所述细胞以形成细胞群。

2.权利要求1的方法,其中所述基质包括纤粘连蛋白。

3.权利要求1的方法,其中所述鉴定使用抗体完成。

4.权利要求1的方法,其中所述鉴定使用流式细胞仪完成。

5.权利要求1的方法,其中所述分离使用磁珠完成。

6.权利要求1的方法,其中所述分离通过荧光激活细胞分选完成。

7.权利要求1的方法,其中在所述分离以后,扩增所述细胞群。

8.一种生产干细胞系的方法,包括用编码生长促进蛋白的DNA序列转化干细胞;和把所述干细胞暴露于促进所述生长促进蛋白生产的条件下。

9.权利要求8的方法,其中所述生长促进蛋白是v-myc、N-myc、c-myc、p53、SV40大T抗原、多瘤大T抗原、E1a腺病毒或人乳头瘤病毒E7蛋白。

10.权利要求8的方法,其中所述DNA序列是可调控的。

11.权利要求8的方法,其中所述DNA序列是可受四环素调控的。

12.权利要求8的方法,其中所述生长促进蛋白具有可调控活性。

13.权利要求8的方法,其中所述生长促进蛋白是温度敏感突变体。

14.一种生产干细胞群的方法,包括鉴定以比在培养中已经进行与所述胎盘干细胞相同的传代次数的骨髓来源的间充质干细胞可检测地更高的水平表达一种或多种基因的附着胎盘干细胞,其中所述基因是ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ATRS-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、PJP2、RTN1、SERPINB9、ST3GAL6、ST6GALNAC5、SLC12A8、TCF21、TGFB2、VTN和ZC3H12A,以及分离所述胎盘细胞。

15.权利要求14的方法,其中所述附着的胎盘细胞以比已经在培养中进行与所述胎盘干细胞相同的传代次数的骨髓来源的间充质干细胞可检测地更高的水平表达5种或更多种所述基因。

16.权利要求14的方法,其中所述附着的胎盘细胞以比已经在培养中进行与所述胎盘干细胞相同的传代次数的骨髓来源的间充质干细胞可检测地更高的水平表达10种或更多种所述基因。

17.权利要求14的方法,其中所述附着的胎盘细胞以比已经在培养中进行与所述胎盘干细胞相同的传代次数的骨髓来源的间充质干细胞可检测地更高的水平表达20种或更多

种所述基因。

18.权利要求14的方法，其中所述附着的胎盘细胞以高于已经在培养中进行与所述胎盘干细胞相同的传代次数的骨髓来源的间充质干细胞的可检测水平表达每种所述基因。

19.一种制备胎盘干细胞库的方法，包括：

扩增来自人分娩后胎盘的原代培养胎盘干细胞至第一若干群倍增；

冷冻保藏所述胎盘干细胞以形成主细胞库；

扩增来自主细胞库的大量胎盘干细胞至第二若干群倍增；

冷冻保藏所述胎盘干细胞以形成工作细胞库；

扩增来自工作细胞库的大量胎盘干细胞至第三若干群倍增；

和以单独剂量冷冻保藏所述胎盘干细胞，

其中所述单独剂量共同组成胎盘干细胞库。

20.权利要求19的方法，其中群倍增的总数为大约20。

21.权利要求19的方法，其中所述第一若干群倍增为大约4次群倍增；所述第二若干群倍增为大约8次群倍增；和所述第三若干群倍增为大约8次群倍增。

22.权利要求19的方法，其中所述原代培养胎盘干细胞包括来自胎盘灌注液的胎盘干细胞。

23.权利要求19的方法，其中所述原代培养胎盘干细胞包括来自消化的胎盘组织的胎盘干细胞。

24.权利要求19的方法，其中所述原代培养胎盘干细胞包括来自胎盘灌注液和来自消化的胎盘组织的胎盘干细胞。

25.权利要求19的方法，其中所述胎盘干细胞原代培养物中的全部所述胎盘干细胞来自于同一胎盘。

26.权利要求19的方法，进一步包括从来自所述工作细胞库的所述大量的所述胎盘干细胞中选择$CD200^+$或$HLA\text{-}G^+$胎盘干细胞，以形成单独剂量。

27.权利要求19的方法，其中所述单独剂量包括大约10^4到大约10^5胎盘干细胞。

28.权利要求19的方法，其中所述单独剂量包括大约10^5到大约10^6胎盘干细胞。

29.权利要求19的方法，其中所述单独剂量包括大约10^6到大约10^7胎盘干细胞。

30.权利要求19的方法，其中所述单独剂量包括大约10^7到大约10^8胎盘干细胞。

31.一种包括条件培养基的组合物，其中所述培养基以下列胎盘干细胞为条件：

$CD200^+$和$HLA\text{-}G^+$；

$CD73^+$、$CD105^+$和$CD200^+$；

$CD200^+$和$OCT\text{-}4^+$；

$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$；

$CD73^+$和$CD105^+$，以及当所述群体在允许形成拟胚体的条件下培养时，促进在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体；或

$OCT\text{-}4^+$，和当所述群体在允许形成拟胚体的条件下培养时，促进在包括干细胞的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体。

32.权利要求31的组合物，其中所述胎盘干细胞已经在所述培养基中生长至少1天。

33.权利要求31的组合物，其中所述胎盘干细胞已经在所述培养基中生长至少3天。

34.一种包括下列胎盘干细胞群的组合物:

$CD200^+$和$HLA\text{-}G^+$;

$CD73^+$、$CD105^+$和$CD200^+$;

$CD200^+$和$OCT\text{-}4^+$;

$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$;

$CD73^+$和$CD105^+$,和当所述胎盘细胞群体在允许形成拟胚体的条件下培养时,促进在包括所述胎盘干细胞群的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体;或

$OCT\text{-}4^+$,和当所述胎盘细胞群体在允许形成拟胚体的条件下培养时,促进在包括所述胎盘干细胞群的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体;或上述的组合;和

不是获自胎盘的干细胞,其中至少70%的所述胎盘干细胞是非母亲来源的。

35.权利要求34的组合物,其中不是获自胎盘的所述干细胞是胚胎干细胞。

36.权利要求34的组合物,其中所述不是获自胎盘的干细胞是间充质干细胞。

37.权利要求34的组合物,其中所述不是获自胎盘的干细胞是骨髓来源的干细胞。

38.权利要求34的组合物,其中所述不是获自胎盘的干细胞是造血祖细胞。

39.权利要求34的组合物,其中所述不是获自胎盘的干细胞是体干细胞。

40.权利要求39的组合物,其中所述体干细胞是神经干细胞、肝干细胞、胰腺干细胞、内皮干细胞、心脏干细胞或肌肉干细胞。

41.一种分离胎盘干细胞群的方法,包括在足以使胎盘干细胞从所述组织增殖出来的时间中培养一部分胎盘,和从所述组织中分离所述胎盘干细胞。

42.权利要求41的方法,其中所述组织是羊膜、绒毛膜、羊膜和绒毛膜的组合,或其任何一部分,或任何上述的组合。

43.一种分离的附着胎盘干细胞,其中所述干细胞是:

$CD200^+$和$HLA\text{-}G^+$;

$CD73^+$、$CD105^+$和$CD200^+$;

$CD200^+$和$OCT\text{-}4^+$;

$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$;

$CD73^+$和$CD105^+$,和当所述群体在允许形成拟胚体的条件下培养时,促进在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体,;或

$OCT\text{-}4^+$,和当所述群体在允许形成拟胚体的条件下培养时,促进在包括干细胞的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体,或其组合;而且其中所述胎盘干细胞是非母亲来源的。

44.一种分离的附着胎盘干细胞群,其中所述干细胞是:

$CD200^+$和$HLA\text{-}G^+$;

$CD73^+$、$CD105^+$和$CD200^+$;

$CD200^+$和$OCT\text{-}4^+$;

$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$;

$CD73^+$和$CD105^+$,和当所述群体在允许形成拟胚体的条件下培养时,促进在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体;或

$OCT\text{-}4^+$,和当所述群体在允许形成拟胚体的条件下培养时,促进在包括干细胞的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体;

而且其中至少70％的所述胎盘干细胞是非母亲来源的。

45.权利要求44的群体，其中至少90％的所述胎盘干细胞是非母亲来源的。

46.权利要求44的群体，其中至少99％的所述胎盘干细胞是非母亲来源的。

47.一种包括权利要求43的分离的胎盘干细胞的组合物。

48.一种包括权利要求44的分离的胎盘干细胞群的组合物。

49.权利要求47的组合物，其呈适于静脉内给药的形式。

50.权利要求48的组合物，其呈适于静脉内给药的形式。

51.权利要求47的组合物，其中所述组合物置于适于所述组合物的静脉内给药的容器中。

52.权利要求48的组合物，其中所述组合物置于适于所述组合物的静脉内给药的容器中。

53.一种收集胎盘干细胞的方法，包括：

对已经排干脐带血并灌注以除去残余血液的哺乳动物胎盘进行灌注；

用灌注溶液通过胎盘脉管系统灌注所述胎盘；

收集仅仅来自所述脉管系统的所述灌注溶液，其中灌注以后，所述灌注溶液包括含有胎盘干细胞的细胞群，其中至少95％的所述胎盘干细胞是胎儿来源的；

和从所述细胞群中分离所述胎盘干细胞。

54.权利要求53的方法，其中使灌注溶液通过脐静脉，并从脐动脉收集。

55.权利要求53的方法，其中使灌注溶液通过脐动脉，并从脐静脉收集。

56.一种通过权利要求53的方法收集的分离的附着胎盘干细胞群，其中至少95％的所述分离的胎盘干细胞群是胎儿来源的。

57.权利要求51的分离的群体，其中大于99％的所述胎盘干细胞是胎儿来源的。

58.权利要求51的分离的群体，其中胎盘干细胞是所述胎盘细胞群的至少50％。

59.权利要求51的分离的群体，其中胎盘干细胞是所述胎盘细胞群的至少95％。

胎盘干细胞群

[0001] 本申请是申请日为2006年12月28日、申请号为200680053575.3、名称为“胎盘干细胞群”的发明申请的分案。

[0002] 本申请要求2005年12月29日提交的美国临时申请号60/754,968的利益;以及2006年12月22日提交的美国临时申请号60/846,641的利益。

1.发明领域

[0003] 本发明提供了分离的胎盘干细胞,胎盘干细胞群,包含该干细胞的组合物,以及获得该干细胞的方法。

[0004] 2.发明背景

[0005] 人类干细胞是全能或多能前体细胞,其能产生多种成熟人类细胞系。有证据证明,干细胞可用于恢复许多,如果不是全部的,组织,以及恢复生理和解剖功能。

[0006] 许多不同类型的哺乳动物干细胞已经被表征。参见,例如,Caplan等,美国专利号5,486,359(人类间充质干细胞);Boyse等,美国专利号5,004,681(胎儿和新生儿造血干细胞和祖细胞);Boyse等,US 5,192,553(相同的);Beltrami等,Cell 114(6):763-766(2003)(心脏干细胞);Forbes等,J.Pathol.197(4):510-518(2002)(肝干细胞)。脐带血和来源于脐带血的全部有核细胞已被用于移植,以部分或完全地恢复已经进行消融治疗(ablative therapy)的患者的造血功能。

[0007] 3.发明概述

[0008] 本发明提供了分离的胎盘干细胞,胎盘干细胞群,包含该干细胞的组合物,以及获得该干细胞的方法。

[0009] 本发明首先提供了分离的干细胞,包含这种干细胞的细胞群,其中该干细胞存在于并可分离自胎盘组织(例如,羊膜、绒毛膜、胎盘小叶等等)。胎盘干细胞显示干细胞的一种或多种特性(例如,显示与干细胞相关的标记,在未分化状态培养时复制至少10-20倍,分化成三个胚层的成熟细胞,等等),并能附着于组织培养基质(例如,组织培养塑料如组织培养皿或多孔板的表面)。

[0010] 在一实施方案中,本发明提供了一种分离的胎盘干细胞,其是$CD200^+$或$HLA\text{-}G^+$。在特定的实施方案中,所述细胞是$CD200^+$和$HLA\text{-}G^+$。在特定的实施方案中,所述细胞是$CD73^+$和$CD105^+$。在另一特定的实施方案中,所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中,所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在另一特定的实施方案中,所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$、$CD73^+$和$CD105^+$。在另一特定的实施方案中,当在允许拟胚体形成的条件下培养所述群时,所述干细胞促进包含胎盘干细胞的分离的胎盘细胞群中一种或多种拟胚体的形成。

[0011] 在另一实施方案中,本发明提供了一种分离的胎盘细胞群,其包括,例如,被富集的$CD200^+$、$HLA\text{-}G^+$干细胞。在不同的实施方案中,至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或者至少95%或以上的所述分离的胎盘细胞是$CD200^+$、$HLA\text{-}G^+$干细胞。在上述群体的特定的实施方案中,所述干细胞是$CD73^+$和

$CD105^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$、$CD73^+$和$CD105^+$。在其它的特定实施方案中，所述群体被扩增，例如，传代至少1次、至少3次、至少5次、至少10次、至少15次、或至少20次。在另一特定的实施方案中，当在允许形成拟胚体的条件下培养该群体时，所述群体形成一种或多种拟胚体。

[0012] 在另一实施方案中，本发明提供了一种分离的干细胞，其是$CD73^+$、$CD105^+$和$CD200^+$。在特定的实施方案中，所述干细胞是$HLA\text{-}G^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$和$HLA\text{-}G^+$。在另一特定的实施方案中，当在允许拟胚体形成的条件下培养所述群体时，所述干细胞促进包含干细胞的分离的胎盘细胞群形成一种或多种拟胚体。

[0013] 在另一实施方案中，本发明提供了一种分离的胎盘细胞群，其包括，例如，被富集的$CD73^+$、$CD105^+$、$CD200^+$干细胞。在不同的实施方案中，至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、或者至少95％的所述分离的胎盘细胞是$CD73^+$、$CD105^+$、$CD200^+$干细胞。在所述群体的特定的实施方案中，所述干细胞是$HLA\text{-}G^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$和$HLA\text{-}G^+$。在其它的特定实施方案中，所述群体被扩增，例如，传代至少1次、至少3次、至少5次、至少10次、至少15次、或至少20次。在另一特定的实施方案中，在允许形成拟胚体的条件下培养该群体时，所述群体形成一种或多种拟胚体。

[0014] 本发明还提供了一种分离的干细胞，其是$CD200^+$和$OCT\text{-}4^+$。在特定的实施方案中，干细胞是$CD73^+$和$CD105^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$HLA\text{-}G^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$、$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$。在另一特定的实施方案中，当在允许形成拟胚体的条件下培养所述群体时，所述干细胞促进在包含胎盘干细胞的分离的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体。

[0015] 在另一实施方案中，本发明提供了一种分离的细胞群，其包括，例如，富集的$CD200^+$、$OCT\text{-}4^+$干细胞。在不同的实施方案中，至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、或至少95％的所述分离的胎盘细胞是$CD200^+$、$OCT\text{-}4^+$干细胞。在上述群体的特定的实施方案中，所述干细胞是$CD73^+$和$CD105^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$HLA\text{-}G^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$、$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$。在其它的特定实施方案中，所述群体被扩增，例如，已经传代至少1次、至少3次、至少5次、至少10次、至少15次、或至少20次。在另一特定实施方案中，当在允许形成拟胚体的条件下培养该群体时，所述群体形成一种或多种拟胚体。

[0016] 在另一实施方案中，本发明提供了一种分离的干细胞，其是$CD73^+$和$CD105^+$，而且当在允许形成拟胚体的条件下培养所述群体时，其促进在包含所述干细胞的分离的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体。在特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所

述干细胞是OCT-4$^+$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是OCT-4$^+$、CD34$^-$、CD38$^-$和CD45$^-$。

[0017] 本发明进一步提供了一种分离的胎盘细胞群，其包括，例如富集的CD73$^+$、CD105$^+$干细胞，其中在允许形成拟胚体的条件下培养所述群体时，形成一种或多种拟胚体。在不同的实施方案中，至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、或至少95％的所述分离的胎盘细胞是CD73$^+$、CD105$^+$干细胞。在上述群体的特定的实施方案中，所述干细胞是CD34$^-$、CD38$^-$或CD45$^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是CD34$^-$、CD38$^-$和CD45$^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是OCT-4$^+$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是OCT-4$^+$、CD34$^-$、CD38$^-$和CD45$^-$。在其它的特定实施方案中，所述群体被扩增，例如，已经传代至少1次、至少3次、至少5次、至少10次、至少15次、或至少20次。

[0018] 本发明进一步提供了一种分离的干细胞，其是CD73$^+$、CD105$^+$和HLA-G$^+$。在特定的实施方案中，所述干细胞是CD34$^-$、CD38$^-$或CD45$^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是CD34$^-$、CD38$^-$和CD45$^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是OCT-4$^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是CD200$^+$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是CD34$^-$、CD38$^-$、CD45$^-$、OCT-4$^+$和CD200$^+$。在另一特定的实施方案中，当在允许形成拟胚体的条件下培养所述群体时，所述干细胞促进在包含胎盘干细胞的分离的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体。

[0019] 本发明进一步提供了一种分离的细胞群，其包括，例如，富集的CD73$^+$、CD105$^+$和HLA-G$^+$干细胞。在不同的实施方案中，至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、或至少95％的所述分离的胎盘细胞是CD73$^+$、CD105$^+$和HLA-G$^+$干细胞。在上述群体的特定的实施方案中，所述干细胞是CD34$^-$、CD38$^-$或CD45$^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是CD34$^-$、CD38$^-$和CD45$^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是OCT-4$^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是CD200$^+$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是CD34$^-$、CD38$^-$、CD45$^-$、OCT-4$^+$和CD200$^+$。在另一特定实施方案中，所述群体被扩增，例如，已经传代至少1次、至少3次、至少5次、至少10次、至少15次、或至少20次。在另一特定实施方案中，当在允许形成拟胚体的条件下培养该群体时，所述群体形成拟胚体。

[0020] 本发明进一步提供了一种分离的干细胞，其是OCT-4$^+$，而且当在允许形成拟胚体的条件下培养所述群体时，该细胞促进在包含所述干细胞的分离的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体。在特定的实施方案中，所述干细胞是CD73$^+$和CD105$^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是CD34$^-$、CD38$^-$或CD45$^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是CD200$^+$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是CD73$^+$、CD105$^+$、CD200$^+$、CD34$^-$、CD38$^-$和CD45$^-$。

[0021] 本发明还提供了一种分离的细胞群，其包括，例如富集的OCT-4$^+$的胎盘干细胞，其中在允许形成拟胚体的条件下培养所述群体时，形成一种或多种拟胚体。在不同的实施方案中，至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、或至少95％的所述分离的胎盘细胞是OCT-4$^+$胎盘干细胞。在上述群体的特定的实施方案中，所述干细胞是CD73$^+$和CD105$^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是CD34$^-$、CD38$^-$或CD45$^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是CD200$^+$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是CD73$^+$、CD105$^+$、CD200$^+$、CD34$^-$、CD38$^-$和CD45$^-$。在另一特定实施方案中，所述群体被扩增，例如，已经传代至少1次、至少3次、至少5次、至少10次、至少15次、或至少20次。

[0022] 本发明进一步提供了一种在此描述的分离的胎盘干细胞群，其根据以下方法生

成，包括灌注哺乳动物胎盘，该胎盘已经被排出脐带血而且被灌注以除去残余血液；用灌注溶液灌注所述胎盘；收集所述灌注溶液，其中灌注后的所述灌注溶液中含有包括胎盘干细胞的胎盘细胞群；和从所述细胞群分离大量所述胎盘干细胞。在特定的实施方案中，灌注溶液通过脐静脉和脐动脉，并在它从胎盘流出以后进行收集。在另一特定的实施方案中，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。

[0023] 本发明进一步提供了一种在此描述的分离的胎盘干细胞群，其根据以下方法生成，包括用组织裂解酶消化胎盘组织以获得包含胎盘干细胞的胎盘细胞群，并从所述胎盘细胞的剩余物中分离大量胎盘干细胞。在特定的实施方案中，所述胎盘组织是全部胎盘、羊膜、绒毛膜、羊膜和绒毛膜的组合，或任何上述的组合。在其它的特定实施方案中，组织裂解酶是胰蛋白酶或胶原酶。

[0024] 在更特定的实施方案中，本发明提供了任何上述的分离的干细胞，其中所述干细胞以可检测地高于骨髓来源的间充质干细胞的水平表达一种或多种基因，其中所述一种或多种基因选自ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ARTS-1、B4GALT6、BCHE、C11orf9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPRC5B、HLA-G、ICAM1、IER3、IGFBP7、IL1A、IL6、IL18、KRT18、KRT8、LIPG、LRAP、MATN2、MEST、NFE2L3、NUAK1、PCDH7、PDLIM3、PJP2、RTN1、SERPINB9、ST3GAL6、ST6GALNAC5、SLC12A8、TCF21、TGFB2、VTN和ZC3H12A，而且其中所述骨髓来源的干细胞已经进行了多次传代培养，以等于所述胎盘干细胞已经进行的传代数。在Affymetrix GENECHIP®阵列上找到相应于这些基因的序列。这些基因也可以下列GenBank登录号找到：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(FUJ10781)、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)，自2006年12月起。

[0025] 在更特定的实施方案中，所述干细胞以可检测地高于骨髓来源的间充质干细胞的水平表达ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ARTS-1、B4GALT6、BCHE、C11orf9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPRC5B、HLA-G、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。

[0026] 在更特定的实施方案中，本发明还提供了上述的任何分离的干细胞群，其中所述干细胞以可检测地高于骨髓来源的间充质干细胞的水平表达一种或多种基因，其中所述一种或多种基因选自ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ARTS-1、B4GALT6、BCHE、C11orf9、CD200、COL4A1、

COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPRC5B、HLA-G、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，其中所述的骨髓来源的干细胞群已经进行多次传代培养，以等于所述胎盘干细胞进行的传代数，其中所述的骨髓来源的间充质干细胞群的细胞数等于所述分离的干细胞群的细胞数。在更特定的实施方案中，分离的干细胞群以可检测地高于骨髓来源的间充质干细胞的水平表达ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ARTS-1、B4GALT6、BCHE、C1lorf9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPRC5B、HLA-G、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。

[0027] 在选择细胞群的方法的更特定的实施方案中，本发明还提供了选择一种上述的细胞群的方法，包括选择以可检测地高于骨髓来源的间充质干细胞的水平表达一种或多种基因的细胞，其中所述的一种或多种基因选自ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ARTS-1、B4GALT6、BCHE、C1lorf9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPRC5B、HLA-G、ICAM1、IER3、IGFBP7、IL1A5、IL6、IL18、KRT18、KRT8、LIPG、LRAP、MATN2、MEST、NFE2L3、NUAK1、PCDH7、PDLIM3、PKP2、RTN1、SERPINB9、ST3GAL6、ST6GALNAC5、SLC12A8、TCF21、TGFB2、VTN和ZC3H12A，而且其中所述骨髓来源的干细胞已经进行了多次传代培养，以等于所述胎盘干细胞已经进行的传代数。在更特定的实施方案中，所述选择包括选择以可检测地高于骨髓来源的间充质干细胞的水平表达ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ARTS-1、B4GALT6、BCHE、C1lorf9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPRC5B、HLA-G、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的细胞。

[0028] 本发明还提供了包含一种或多种本发明干细胞的组合物，其中所述干细胞已经从胎盘中分离。因此，本发明进一步提供了包含干细胞的组合物，其中所述干细胞是$CD200^+$和$HLA\text{-}G^+$。在特定的实施方案中，所述干细胞是$CD73^+$和$CD105^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$、$CD73^+$、$CD105^+$、$CD200^+$和$HLA\text{-}G^+$。

[0029] 在另一实施方案中，本发明提供了包含干细胞的组合物，其中所述干细胞是$CD73^+$、$CD105^+$和$CD200^+$。在特定的实施方案中，所述干细胞是$HLA\text{-}G^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$和$HLA\text{-}G^+$。

[0030] 在另一实施方案中，本发明提供了一种包含干细胞的组合物，其中所述干细胞是$CD200^+$和$OCT\text{-}4^+$。在特定的实施方案中，所述干细胞是$CD73^+$和$CD105^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$HLA\text{-}G^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$、$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$。

[0031] 在另一实施方案中，本发明提供了一种包含干细胞的组合物，该干细胞是$CD73^+$和$CD105^+$，其中在允许形成拟胚体的条件下，所述干细胞促进在分离的胎盘细胞群中形成拟胚体，该分离的胎盘细胞群包含所述干细胞。在特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$OCT\text{-}4^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD200^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$OCT\text{-}4^+$、$CD200^+$、$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。

[0032] 在另一实施方案中，本发明提供了一种包含干细胞的组合物，该干细胞是$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$。在特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$OCT\text{-}4^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD200^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$OCT\text{-}4^+$、$CD200^+$、$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。

[0033] 在另一实施方案中，本发明提供了一种包含干细胞的组合物，该干细胞是$OCT\text{-}4^+$，其中在允许形成拟胚体的条件下，所述干细胞促进在分离的胎盘细胞群中形成拟胚体，该分离的胎盘细胞群包含所述干细胞。在特定的实施方案中，所述干细胞是$CD73^+$和$CD105^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD200^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD73^+$、$CD105^+$、$CD200^+$、$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。

[0034] 在上述组合物的更特定的实施方案中，所述干细胞以可检测地高于骨髓来源的间充质干细胞的水平表达一种或多种基因，其中所述一种或多种基因选自ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ARTS-1、B4GALT6、BCHE、C11orf9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPRC5B、HLA-G、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，而且其中所述骨髓来源的干细胞已经进行了多次传代培养，以等于所述胎盘干细胞已经进行的传代数。在上述组合物的一个更特定的实施方案中，所述干细胞以可检测高于分离的骨髓来源的间充质干细胞群的水平表达ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ARTS-1、B4GALT6、BCHE、C11orf9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPRC5B、HLA-G、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，其中所述的干细胞群和所述的骨髓来源的间充质细胞群具有相等的细胞数。

[0035] 在另一特定的实施方案中，任何上述的组合物包括基质。在更特定的实施方案中，所述基质是三维支架。在另一个更特定的实施方案中，所述基质包括胶原蛋白、明胶、层粘连蛋白、纤粘连蛋白、果胶、鸟氨酸或玻连蛋白。在另一个更特定的实施方案中，所述基质是羊膜或羊膜来源的生物材料。在另一个更特定的实施方案中，所述基质包括胞外膜蛋白。在另一个更特定的实施方案中，所述基质包括合成的化合物。在另一个更特定的实施方案中，所述基质包括生物活性化合物。在另一个更特定的实施方案中，所述的生物活性化合物是生长因子、细胞因子、抗体、或小于5,000道尔顿的有机分子。

[0036] 在另一实施方案中，本发明进一步提供了一种组合物，其包括任何上述干细胞或任何上述干细胞群调节的培养基。在特定的实施方案中，任何这种组合物包括不来源于胎

盘的干细胞。在更特定的实施方案中，所述干细胞是胚胎干细胞。在另一个更特定的实施方案中，所述干细胞是间充质干细胞。在另一个更特定的实施方案中，所述干细胞是骨髓-来源的干细胞。在另一个更特定的实施方案中，所述干细胞是造血祖细胞。在另一个更特定的实施方案中，所述干细胞是体干细胞。在一个更加特定的实施方案中，所述体干细胞是神经干细胞、肝干细胞、胰腺干细胞、内皮干细胞、心脏干细胞或肌肉干细胞。

[0037] 本发明还提供了生产来源于哺乳动物胎盘的干细胞群的方法。在一实施方案中，例如，本发明提供了一种生产细胞群的方法，包括选择(a)附着于基质，和(b)表达CD200和HLA-G的细胞；和从其它细胞中分离所述的细胞以形成细胞群。在另一实施方案中，本发明提供了一种生产细胞群的方法，包括选择(a)附着于基质，和(b)表达CD73、CD105和CD200的细胞；和从其它的细胞分离所述的细胞以形成细胞群。在另一实施方案中，本发明提供了一种生产细胞群的方法，包括选择(a)附着于基质，和(b)表达CD200和OCT-4的细胞；和从其它的细胞分离所述的细胞以形成细胞群。仍然在另一特定的实施方案中，本发明提供了一种生产细胞群的方法，包括选择(a)附着于基质，(b)表达CD73和CD105，和(c)当在允许形成拟胚体的条件下用胎盘细胞群培养时，促进形成一种或多种拟胚体的细胞；和从其它的细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中，本发明提供了一种生产细胞群的方法，包括选择(a)附着于基质，和(b)表达CD73、CD105和HLA-G的细胞；和从其它的细胞中分离所述的细胞以形成细胞群。本发明还提供了一种生产细胞群的方法，包括选择(a)附着于基质，(b)表达OCT-4，和(c)当在允许形成拟胚体的条件下用胎盘细胞群培养时，促进形成一种或多种拟胚体的细胞；和从其它的细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在任何上述方法的特定的实施方案中，所述基质包括纤粘连蛋白。在另一特定的实施方案中，该方法包括选择表达ABC-p的细胞。在另一特定的实施方案中，该方法包括选择显示出至少一种特异于间充质干细胞的特性的细胞。在更特定的实施方案中，所述特异于间充质干细胞的特性是表达CD29、表达CD44、表达CD90、或表达上述的组合。在该方法的另一特定的实施方案中，使用抗体完成所述选择。在另一特定的实施方案中，使用流式细胞仪完成所述选择。在另一特定的实施方案中，使用磁珠完成所述选择。在另一特定的实施方案中，所述选择由荧光激活细胞分类术来完成。在上述方法的另一特定的实施方案中，所述细胞群被扩增。

[0038] 本发明还提供了一种生产干细胞系的方法，包括用编码生长促进蛋白的DNA序列转化干细胞；和把所述干细胞暴露于促进所述生长促进蛋白生产的条件下。在特定的实施方案中，所述生长促进蛋白是v-myc、N-myc、c-myc、p53、SV40大T抗原、多瘤大T抗原、E1a腺病毒或人乳头瘤病毒E7蛋白。在更特定的实施方案中，所述DNA序列是可调控的。在更特定的实施方案中，所述DNA序列是四环素可调控的。在另一特定的实施方案中，所述生长促进蛋白具有可调控活性。在另一特定的实施方案中，所述生长促进蛋白是温度敏感突变体。

[0039] 本发明进一步提供了低温贮藏的干细胞群。例如，本发明提供一种$CD200^+$、$HLA\text{-}G^+$干细胞群，其中所述细胞已经被低温贮藏，而且其中所述群体被包含在容器中。本发明还提供一种$CD73^+$、$CD105^+$、$CD200^+$干细胞群，其中所述干细胞已经被低温贮藏，而且其中所述群体被包含在容器中。本发明还提供一种$CD200^+$、$OCT\text{-}4^+$干细胞群，其中所述干细胞已经被低温贮藏，而且其中所述群体被包含在容器中。本发明还提供了一种$CD73^+$、$CD105^+$干细胞群，其中所述细胞已经被低温贮藏，其中所述群体被包含在容器中，而且当在允许形成拟胚体的条件下，用胎盘细胞群进行培养时，其中所述干细胞促进形成一种或多种拟胚体。本发明

进一步提供了一种$CD73^+$、$CD105^+$、$HLA\text{-}G^+$干细胞群，其中所述细胞已经被低温贮藏，而且其中所述群体被包含在容器中。本发明还提供了一种$OCT\text{-}4^+$干细胞群，其中所述细胞已经被低温贮藏，其中所述群体被包含在容器中，而且当在允许形成拟胚体的条件下，用胎盘细胞群培养时，其中所述干细胞促进形成一种或多种拟胚体。在任一上述低温贮藏的群体的特定实施方案中，所述容器是袋子。在不同的特定实施方案中，所述群体包括大约、至少、或最多1×10^6个所述干细胞、5×10^6个所述干细胞、1×10^7个所述干细胞、5×10^7个所述干细胞、1×10^8个所述干细胞、5×10^8个所述干细胞、1×10^9个所述干细胞、5×10^9个所述干细胞、或1×10^{10}个所述干细胞。在任何上述低温贮藏的群体的其它特定实施方案中，所述干细胞已经传代大约、至少、或至多5次、至多10次、至多15次或至多20次。在任何上述低温贮藏的群体的另一特定实施方案中，所述干细胞已经在所述容器中被扩增。

[0040] 3.1定义

[0041] 如这里使用的，术语“SH2”指结合标记CD105上的抗原表位的抗体。因此，被称为$SH2^+$的细胞是$CD105^+$。

[0042] 如这里使用的，术语“SH3”和“SH4”指结合标记CD73上的抗原表位的抗体。因此，被称为$SH3^+$和/或$SH4^+$的细胞是$CD73^+$。

[0043] 如这里使用的，术语“分离的干细胞”指基本上与从中获取该干细胞的组织例如胎盘中的其它的、非干细胞分离的干细胞。干细胞是“分离的”，如果至少50％、60％、70％、80％、90％、95％或至少99％的与该干细胞天然缔合的非干细胞，或显示不同的标记模式的干细胞，被从该干细胞中除去，例如，在收集和/或培养干细胞期间。

[0044] 如这里使用的，术语“分离的细胞群”指基本上与从中获取该细胞群的组织例如胎盘的其它细胞分离的细胞群。干细胞是“分离的”，如果至少50％、60％、70％、80％、90％、95％或至少99％的与该细胞群、或获得该细胞群的细胞天然缔合的细胞，也即显示不同的标记模式的干细胞，被从该干细胞中除去，例如，在收集和/或培养干细胞期间。

[0045] 如这里使用的，术语“胎盘干细胞”指来源于哺乳动物胎盘的干细胞或祖细胞，无论其形态，细胞表面标记，或原代培养以后的传代数。然而，如这里使用的术语“胎盘干细胞”不指滋养层。细胞被认为是“干细胞”，如果该细胞保留干细胞的至少一种特性，例如，与一种或多种干细胞类型相关的标记或基因表达模式；在培养中复制至少10-40次的能力；分化成具有所有3胚层的细胞的能力；缺乏成熟(也即，分化的)细胞特性，等等。术语“胎盘干细胞”和“胎盘来源的干细胞”可以互换使用。

[0046] 如这里使用的，当该标记是高于背景可检测的时，干细胞对于特定的标记是“阳性的”。例如，胎盘干细胞对于例如CD73是阳性的，因为CD73在胎盘干细胞中是可检测的，其呈现可检测地高于背景的量(例如，与同种型对照相比较)。当该标记可用于从至少一种其它的细胞类型中区别该细胞时，或当通过该细胞呈递或表达时，该标记可用于选择或分离该细胞时，细胞对于该标记也是阳性的。在例如，抗体介导的检测的上下文中，“阳性”，作为特定的细胞表面标记存在的指示，是指当使用特异于该标记的抗体，例如荧光标记抗体时，该标记是可检测的；“阳性”还指细胞其以产生信号的量带有该标记，例如，在细胞计数器中，该信号可检测地高于背景。例如，细胞是“$CD200^+$”，其中细胞用特异于CD200的抗体可检测地标记，而且来自抗体的信号可检测地高于对照(例如，背景)。相反地，在同样的上下文中，“阴性”指当使用标记特异性的抗体时，细胞表面标记与背景相比不能检测到。例如，细胞是

“$CD34^-$”，其中细胞不能用CD34特异性的抗体可检测地标记。除非这里另有说明，分化(“CD”)标记簇使用抗体进行检测。如果使用RT-PCR，OCT-4是可检测的，那么认为OCT-4存在，而且细胞是“$OCT\text{-}4^+$”。

[0047] 4.附图简述

[0048] 图1:来自灌注液(A)、羊膜(B)、绒毛膜(C)、羊膜-绒毛膜板(D)或脐带(E)的胎盘干细胞的活力。X轴上的数字表示从中获得干细胞的胎盘。

[0049] 图2:通过FACSCalibur确定的来自灌注液(A)、羊膜(B)、绒毛膜(C)、羊膜-绒毛膜板(D)或脐带(E)的HLA $ABC^-/CD45^-/CD34^-/CD133^+$细胞的百分数。X轴上的数字表示从中获得干细胞的胎盘。

[0050] 图3:通过FACS Aria确定的来自灌注液(A)、羊膜(B)、绒毛膜(C)、羊膜-绒毛膜板(D)或脐带(E)的HLA $ABC^-/CD45^-/CD34^-/CD133^+$细胞的百分数。X轴上的数字表示从中获得干细胞的胎盘。

[0051] 图4:在来源于胎盘灌注液的干细胞中HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200的表达。

[0052] 图5:在来源于羊膜的干细胞中HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200的表达。

[0053] 图6:在来源于绒毛膜的干细胞中HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200的表达。

[0054] 图7:在来源于羊膜-绒毛膜板的干细胞中HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200的表达。

[0055] 图8:在来源于脐带的干细胞中HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200的表达。

[0056] 图9:在来源于灌注液(A)、羊膜(B)、绒毛膜(C)、羊膜-绒毛膜板(D)或脐带(E)的干细胞中表达的HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200的平均表达。

[0057] 图10:本研究中使用的羊膜/绒毛膜(AC)、脐带(UC)、骨髓来源的干细胞(BM-MSC)和人皮肤成纤维细胞(NHDF)细胞系的培养时间进程。所有的培养物都使用相同的接种和传代密度进行生长和繁殖。圆圈表示用于RNA分离的培养物。正好在衰老之前收获晚期培养物。在38次倍增时收获两个UC培养物(UC-38)，以比较胰蛋白酶消化对基因表达的作用。所有的其它培养物在RNA分离之前直接在它们的培养瓶中进行裂解。

[0058] 图11:在羊膜/绒毛膜(AC)、脐带(UC)、骨髓来源的干细胞(BM-MSC)和人皮肤成纤维(DF)细胞中的8215个基因相对表达水平的线条图。X轴上标明的与每个细胞系相关的数字表示，在评价基因表达水平之前，细胞系被培养的天数。通过GeneSpring软件分析的RNA表达数据产生该图表。AC-03作为选定条件。

[0059] 图12:显示在羊膜/绒毛膜(AC)、脐带(UC)、骨髓来源的干细胞(BM-MSC)和人皮肤成纤维细胞(DF)细胞的AC-03中过表达≥6倍的基因的所有基因列表的子集。X轴上标明的与每个细胞系相关的数字表示，在评价基因表达水平之前，细胞系被培养的天数。通过GeneSpring软件分析的RNA表达数据产生该图表。AC-03作为选定条件。

[0060] 图13:通过倍率变化过滤发现羊膜/绒毛膜(AC)、脐带(UC)、骨髓来源的干细胞(BM-MSC)和人皮肤成纤维细胞(DF)细胞胎盘干细胞特异性或脐带干细胞特异性基因。X轴

上标明的与每个细胞系相关的数字表示，在评价基因表达水平之前，细胞系被培养的天数。通过GeneSpring软件分析的RNA表达数据产生该图表。AC-03作为选定条件。

[0061] 5.发明详述

[0062] 5.1胎盘干细胞和胎盘干细胞群

[0063] 胎盘干细胞是这样的干细胞，可获自胎盘或其部分，其附着于组织培养基质并具有分化成非胎盘细胞类型的能力。胎盘干细胞可以是胎儿或母亲来源的(也即，可以分别具有胎儿或者母亲的基因型)。优选地，本发明的胎盘干细胞和胎盘干细胞群是胎儿来源的。胎盘干细胞群，或包含胎盘干细胞的细胞群，可包括单独胎儿或母亲来源的胎盘干细胞，或者可包括胎儿与母亲来源的胎盘干细胞的混合群体。胎盘干细胞，和包括胎盘干细胞的细胞群，可通过下面所述的形态学、标记和培养特性进行鉴定和选择。

[0064] 5.1.1物理学和形态学特征

[0065] 本发明的胎盘干细胞，当在原代培养或细胞培养中培养时，附着于组织培养基质，例如，组织培养容器表面(例如，组织培养塑料)。培养中的胎盘干细胞呈现一般的成纤维样、星形形态，带有许多从中央细胞体伸出的细胞质突。但是，胎盘干细胞是与在相同条件下培养的成纤维细胞相比形态学可区分的，因为胎盘干细胞显示比成纤维细胞更大数量的这种突出。胎盘干细胞也与造血干细胞是形态学可区分的，造血干细胞在培养中一般呈现更圆，或鹅卵石的形态。

[0066] 5.1.2细胞表面，分子和遗传标记

[0067] 本发明的胎盘干细胞和胎盘干细胞群表达大量的标记，其可用于鉴定和/或分离干细胞，或包含该干细胞的细胞群。本发明的胎盘干细胞和干细胞群(也即，两个或更多个胎盘干细胞)，包括直接从胎盘或其任何部分(例如，羊膜、绒毛膜、胎盘子叶等等)获得的干细胞和包含干细胞的细胞群。胎盘干细胞群也包括培养中的胎盘干细胞群(也即，两个或更多个)，和容器例如袋子中的群体。但是，胎盘干细胞不是滋养层。

[0068] 本发明的胎盘干细胞一般表达标记CD73、CD105、CD200、HLA-G和/或OCT-4，而不表达CD34、CD38或CD45。胎盘干细胞也可以表达HLA-ABC(MHC-1)和HLA-DR。这些标记可用于鉴定胎盘干细胞，和区别其它的干细胞类型与胎盘干细胞。因为胎盘干细胞能表达CD73和CD105，它们具有间充质干细胞样特性。然而，由于胎盘干细胞能表达CD200和HLA-G，一种胎儿特异性标记，它们可以与间充质干细胞，例如，骨髓来源的间充质干细胞区分开，骨髓来源的间充质干细胞既不表达CD200也不表达HLA-G。同样，缺乏CD34、CD38和/或CD45的表达可鉴定胎盘干细胞为非造血干细胞。

[0069] 因此，在一实施方案中，本发明提供了分离的干细胞，其是$CD200^+$或$HLA\text{-}G^+$。在特定的实施方案中，所述干细胞是胚胎干细胞。在特定的实施方案中，所述干细胞是$CD200^+$和$HLA\text{-}G^+$。在特定的实施方案中，所述干细胞是$CD73^+$和$CD105^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$、$CD73^+$和$CD105^+$。在另一特定的实施方案中，在允许形成拟胚体的条件下，所述$CD200^+$或$HLA\text{-}G^+$干细胞促进在包含该干细胞的胎盘细胞群中形成拟胚体。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞与不是干细胞的胎盘细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞与不显示这些标记的胎盘干细胞分离开。

[0070] 在另一实施方案中，本发明还提供了一种从大量胎盘细胞中选择胎盘干细胞的方法，包括选择$CD200^+$或$HLA\text{-}G^+$胎盘细胞，其中所述细胞是胎盘干细胞。在特定的实施方案中，所述选择包括选择为$CD200^+$与$HLA\text{-}G^+$的胎盘细胞。在特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD73^+$与$CD105^+$的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$、$CD73^+$和$CD105^+$的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择在允许形成拟胚体的条件下，促进在包含该干细胞的胎盘细胞群中形成拟胚体的胎盘细胞。

[0071] 在另一实施方案中，本发明提供了一种分离的细胞群包括，例如，富集的$CD200^+$、$HLA\text{-}G^+$干细胞。在特定的实施方案中，所述群是胎盘细胞群。在不同的实施方案中，至少大约10％、至少大约20％、至少大约30％、至少大约40％、至少大约50％、或至少大约60％的所述细胞是$CD200^+$、$HLA\text{-}G^+$干细胞。优选地，至少大约70％的所述细胞是$CD200^+$、$HLA\text{-}G^+$干细胞。更优选地，至少大约90％、95％或99％的所述细胞是$CD200^+$、$HLA\text{-}G^+$干细胞。在分离的群的特定的实施方案中，所述干细胞还是$CD73^+$和$CD105^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞还是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在更特定的实施方案中，所述干细胞还是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$、$CD73^+$和$CD105^+$。在另一特定实施方案中，当在允许形成拟胚体的条件下培养该群体时，所述分离的群产生一种或多种拟胚体。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞群与不是干细胞的胎盘细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞群与不显示这些标记的胎盘干细胞分离开。

[0072] 在另一实施方案中，本发明还提供了一种从大量胎盘细胞中选择胎盘干细胞群的方法，包括选择这样的胎盘细胞群，其中至少大约10％、至少大约20％、至少大约30％、至少大约40％、至少大约50％、至少大约60％、至少大约70％、至少大约80％、至少大约90％、或至少大约95％的所述细胞是$CD200^+$、$HLA\text{-}G^+$干细胞。在特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD73^+$与$CD105^+$的干细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD34^-$，$CD38^-$或$CD45^-$的干细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$、$CD73^+$和$CD105^+$的干细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择还包括选择当在允许形成拟胚体的条件下培养时，形成一种或多种拟胚体的胎盘干细胞群。

[0073] 在另一实施方案中，本发明提供了一种分离的干细胞，其是$CD73^+$、$CD105^+$和$CD200^+$。在特定的实施方案中，所述分离的干细胞是分离的胎盘干细胞。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$HLA\text{-}G^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$和$HLA\text{-}G^+$。在另一特定的实施方案中，当在允许形成拟胚体的条件下培养所述群体时，分离的$CD73^+$、$CD105^+$和$CD200^+$干细胞促进在包含该干细胞的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞与不是干细胞的胎盘细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞与不显示这些标记的胎盘干细胞分离开。

[0074] 在另一实施方案中，本发明还提供了一种从大量胎盘细胞中选择胎盘干细胞的方法，包括选择$CD73^+$、$CD105^+$和$CD200^+$胎盘细胞，其中所述细胞是胎盘干细胞。在特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$HLA\text{-}G^+$的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包

括选择还为$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$和$HLA\text{-}G^+$的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择另外包括选择$CD73^+$、$CD105^+$和$CD200^+$的干细胞，且当在允许促进形成拟胚体的条件下培养所述群体时，其促进在胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体，该胎盘细胞群包含该干细胞。

[0075] 在另一实施方案中，本发明提供了一种分离的细胞群包括，例如，富集的$CD73^+$、$CD105^+$、$CD200^+$干细胞。在特定的实施方案中，所述干细胞是胚胎干细胞。在不同的实施方案中，至少大约10％、至少大约20％、至少大约30％、至少大约40％、至少大约50％、或至少大约60％的所述细胞是$CD73^+$、$CD105^+$、$CD200^+$干细胞。在另一实施方案中，所述细胞群中至少大约70％的所述细胞是$CD73^+$、$CD105^+$、$CD200^+$干细胞。在另一实施方案中，所述细胞群中至少大约90％、95％或99％的所述细胞是$CD73^+$、$CD105^+$、$CD200^+$干细胞。在所述群体的特定的实施方案中，所述干细胞是$HLA\text{-}G^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$和$HLA\text{-}G^+$。在另一特定的实施方案中，当在允许形成拟胚体的条件下培养时，所述细胞群产生一种或多种拟胚体。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞群与不是干细胞的胎盘细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞群与不显示这些特性的胎盘干细胞分离开。

[0076] 在另一实施方案中，本发明还提供了一种从大量胎盘细胞中选择胎盘干细胞群的方法，包括选择这样的胎盘细胞群，其中至少大约10％、至少大约20％、至少大约30％、至少大约40％、至少大约50％、至少大约60％、至少大约70％、至少大约80％、至少大约90％、或至少大约95％的所述细胞是$CD73^+$、$CD105^+$、$CD200^+$干细胞。在特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$HLA\text{-}G^+$的干细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$的干细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$的干细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$和$HLA\text{-}G^+$的干细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择另外包括选择当在允许生产拟胚体的条件下培养时，产生一种或多种拟胚体的胎盘细胞群。

[0077] 本发明还提供了一种分离的干细胞，其是$CD200^+$和$OCT\text{-}4^+$。在特定的实施方案中，所述干细胞是$CD73^+$和$CD105^+$。在特定的实施方案中，干细胞是胚胎干细胞。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$HLA\text{-}G^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$、$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$。在另一特定的实施方案中，当在允许生产拟胚体的条件下培养所述群体时，干细胞促进通过胎盘细胞群生产一种或多种拟胚体，该胎盘细胞群包含该干细胞。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞与不是干细胞的胎盘细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞与不显示这些标记的胎盘干细胞分离开。

[0078] 在另一实施方案中，本发明还提供了一种从大量胎盘细胞中选择胎盘干细胞的方法，包括选择$CD200^+$和$OCT\text{-}4^+$胎盘细胞，其中所述细胞是胎盘干细胞。在特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$HLA\text{-}G^+$的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为

$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$、$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择当在允许形成拟胚体的条件下培养该群体时，还促进在包含该干细胞的胎盘细胞群中产生一种或多种拟胚体的胎盘干细胞。

[0079] 本发明还提供了一种分离的细胞群包括，例如，富集$CD200^+$、$OCT\text{-}4^+$的干细胞。在不同的实施方案中，至少大约10％、至少大约20％、至少大约30％、至少大约40％、至少大约50％、或至少大约60％的所述细胞是$CD200^+$、$OCT\text{-}4^+$干细胞。在另一实施方案中，至少大约70％的所述细胞是所述的$CD200^+$、$OCT\text{-}4^+$干细胞。在另一实施方案中，至少大约90％、95％或99％的所述细胞是$CD200^+$、$OCT\text{-}4^+$干细胞。在分离的群体的特定的实施方案中，所述干细胞是$CD73^+$和$CD105^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$HLA\text{-}G^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$、$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$。在另一特定的实施方案中，当在允许形成拟胚体的条件下培养时，该群体产生一种或多种拟胚体。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞群与不是干细胞的胎盘细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞群与不显示这些特性的胎盘干细胞分离开。

[0080] 在另一实施方案中，本发明还提供了一种从大量胎盘细胞中选择胎盘干细胞群的方法，包括选择这样的胎盘细胞群，其中至少大约10％、至少大约20％、至少大约30％、至少大约40％、至少大约50％、至少大约60％、至少大约70％、至少大约80％、至少大约90％、或至少大约95％的所述细胞是$CD200^+$、$OCT\text{-}4^+$干细胞。在特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD73^+$与$CD105^+$的干细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$HLA\text{-}G^+$的干细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$的干细胞。在另一特定的实施方案中，所述干细胞还是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$、$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$的干细胞。

[0081] 本发明进一步提供了一种分离的干细胞，其是$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$。在特定的实施方案中，所述干细胞是胚胎干细胞。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$OCT\text{-}4^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD200^+$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$、$OCT\text{-}4^+$和$CD200^+$。在另一特定的实施方案中，当在允许形成拟胚体的条件下培养该群体时，所述干细胞促进在包含所述干细胞的胎盘细胞群中形成拟胚体。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞与不是干细胞的胎盘细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞与不显示这些特性的胎盘干细胞分离开。

[0082] 在另一实施方案中，本发明还提供了一种从大量胎盘细胞中选择胎盘干细胞的方法，包括选择$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$胎盘细胞，其中所述细胞是胎盘干细胞。在特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$OCT\text{-}4^+$的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD200^+$的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择还为$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$、$OCT\text{-}4^+$和$CD200^+$的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述选择包括选择当在允许

形成拟胚体的条件下培养所述群体时，还促进在包含所述干细胞的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体的胎盘细胞。

[0083] 本发明还提供了一种分离的细胞群，其包括，例如，富集的$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$干细胞。在特定的实施方案中，所述干细胞是胎盘干细胞。在不同的实施方案中，至少大约10％、至少大约20％、至少大约30％、至少大约40％、至少大约50％、或至少大约60％的所述细胞是$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$干细胞。在另一实施方案中，至少大约70％的所述细胞是$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$。在另一实施方案中，至少大约90％、95％或99％的所述细胞是$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$干细胞。在上述群体的特定实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$OCT\text{-}4^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD200^+$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$、$OCT\text{-}4^+$和$CD200^+$。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞群与不是干细胞的胎盘细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞群与不显示这些特性的胎盘干细胞分离开。

[0084] 在另一实施方案中，本发明还提供了一种从大量胎盘细胞中选择胎盘干细胞群的方法，包括选择胎盘细胞群，其中大多数所述细胞是$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$。在特定的实施方案中，所述多数细胞还是$CD34^-$、$CD38^-$和/或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述多数细胞还是$CD200^+$。在另一特定的实施方案中，所述多数细胞还是$CD34^-$、$CD38^-$、$CD45^-$、$OCT\text{-}4^+$和$CD200^+$。

[0085] 在另一实施方案中，本发明提供了一种分离的干细胞，其是$CD73^+$和$CD105^+$，而且当在允许形成拟胚体的条件下培养所述群体时，其促进在包含所述干细胞的分离的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体。在特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$OCT\text{-}4^+$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是$OCT\text{-}4^+$、$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞与不是干细胞的胎盘细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞与不显示这些特性的胎盘干细胞分离开。

[0086] 本发明进一步提供了一种分离的胎盘细胞群，其包括，例如富集的$CD73^+$、$CD105^+$干细胞，其中在允许形成拟胚体的条件下培养所述群体时，形成一种或多种拟胚体。在不同的实施方案中，至少大约10％、至少大约20％、至少大约30％、至少大约40％、至少大约50％、至少大约60％、至少大约70％、至少大约80％、至少大约90％、或至少大约95％的所述分离的胎盘细胞是$CD73^+$、$CD105^+$干细胞。在上述群体的特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$或$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是$OCT\text{-}4^+$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是$OCT\text{-}4^+$、$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$。在其它的特定实施方案中，所述群体被扩增，例如，已经传代至少1次、至少3次、至少5次、至少10次、至少15次、或至少20次。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞群与不是干细胞的胎盘细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞群与不显示这些特性的胎盘干细胞分离开。

[0087] 本发明进一步提供了一种分离的干细胞，其是$OCT\text{-}4^+$，而且当在允许形成拟胚体的条件下培养所述群体时，其促进在包含所述干细胞的分离的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体。在特定的实施方案中，所述干细胞是$CD73^+$和$CD105^+$。在另一特定的实施方案中，

所述干细胞是CD34$^-$、CD38$^-$或CD45$^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是CD200$^+$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是CD73$^+$、CD105$^+$、CD200$^+$、CD34$^-$、CD38$^-$和CD45$^-$。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞与不是干细胞的胎盘细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞与不显示这些特性的胎盘干细胞分离开。

[0088] 本发明还提供了一种分离的细胞群，其包括，例如富集的OCT-4$^+$干细胞，其中在允许形成拟胚体的条件下培养时，所述群体形成一种或多种拟胚体。在不同的实施方案中，至少大约10％、至少大约20％、至少大约30％、至少大约40％、至少大约50％、至少大约60％、至少大约70％、至少大约80％、至少大约90％、或至少大约95％的所述分离的胎盘细胞是OCT-4$^+$干细胞。在上述群体的特定的实施方案中，所述干细胞是CD73$^+$和CD105$^+$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是CD34$^-$、CD38$^-$或CD45$^-$。在另一特定的实施方案中，所述干细胞是CD200$^+$。在更特定的实施方案中，所述干细胞是CD73$^+$、CD105$^+$、CD200$^+$、CD34$^-$、CD38$^-$和CD45$^-$。在另一特定实施方案中，所述群体被扩增，例如，已经传代至少1次、至少3次、至少5次、至少10次、至少15次、或至少20次。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞群与不是干细胞的胎盘细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞群与不显示这些特性的胎盘干细胞分离开。

[0089] 在另一实施方案中，本发明还提供了一种分离的胎盘干细胞，其是CD10$^+$、CD34$^-$、CD105$^+$和CD200$^+$。本发明进一步提供了一种分离的胎盘干细胞群，其中至少大约70％、至少大约80％、至少大约90％、至少大约95％或至少大约99％的所述胎盘干细胞是CD10$^+$、CD34$^-$、CD105$^+$、CD200$^+$。在上述实施方案的特定的实施方案中，所述干细胞另外是CD90$^+$和CD45$^-$。在特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群与不是干细胞的胎盘细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群与不显示这些特性的胎盘干细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述分离的胎盘干细胞是非母亲来源的。在另一特定的实施方案中，在所述分离的胎盘干细胞群中至少大约90％、至少大约95％或至少大约99％的所述细胞是非母亲来源的。

[0090] 在另一实施方案中，本发明提供了一种分离的胎盘干细胞，其HLA-A,B,C$^-$、CD45$^-$、CD133$^-$和CD34$^-$。本发明进一步提供了一种分离的胎盘干细胞群，其中至少大约70％、至少大约80％、至少大约90％、至少大约95％或至少大约99％的所述胎盘干细胞是HLA-A,B,C$^-$、CD45$^-$、CD133$^-$和CD34$^-$。在特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群与不是干细胞的胎盘细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞群与不显示这些特性的胎盘干细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述分离的胎盘干细胞是非母亲来源的。在另一特定的实施方案中，在所述分离的胎盘干细胞群中至少大约90％、至少大约95％、或至少大约99％的所述细胞是非母亲来源的。在另一实施方案中，本发明提供了一种获得胎盘干细胞的方法，该胎盘干细胞是HLA-A,B,C$^-$、CD45$^-$、CD133$^-$和CD34$^-$，其包括从胎盘灌注液中分离所述细胞。

[0091] 在另一实施方案中，本发明提供了一种分离的胎盘干细胞，其是CD10$^+$、CD13$^+$、CD33$^+$、CD45$^-$、CD117$^-$和CD133$^-$。本发明进一步提供了一种分离的胎盘干细胞群，其中至少大约70％、至少大约80％、至少大约90％、至少大约95％或至少大约99％的所述胎盘干细胞是CD10$^+$、CD13$^+$、CD33$^+$、CD45$^-$、CD117$^-$和CD133$^-$。在特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群与不是干细胞的胎盘细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述分离的胎盘干细胞

是非母亲来源的。在另一特定的实施方案中，在所述分离的胎盘干细胞群中至少大约90％、至少大约95％、或至少大约99％的所述细胞是非母亲来源的。在另一特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群与不显示这些特性的胎盘干细胞分离开。在另一实施方案中，本发明提供了一种获得胎盘干细胞的方法，所述胎盘干细胞是$CD10^+$、$CD13^+$、$CD33^+$、$CD45^-$、$CD117^-$和$CD133^-$，该方法包括从胎盘灌注液中分离所述细胞。

[0092] 在另一实施方案中，本发明提供了一种分离的胎盘干细胞，其是$CD10^-$、$CD33^-$、$CD44^+$、$CD45^-$和$CD117^-$。本发明进一步提供了一种分离的胎盘干细胞群，其中至少大约70％、至少大约80％、至少大约90％、至少大约95％或至少大约99％的所述胎盘干细胞是$CD10^-$、$CD33^-$、$CD44^+$、$CD45^-$和$CD117^-$。在特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群与不是干细胞的胎盘细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述分离的胎盘干细胞是非母亲来源的。在另一特定的实施方案中，在所述分离的胎盘干细胞群中至少大约90％、至少大约95％、或至少大约99％的所述细胞是非母亲来源的。在另一特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群与不显示这些特性的胎盘干细胞分离开。在另一实施方案中，本发明提供了一种获得胎盘干细胞的方法，该胎盘干细胞是$CD10^-$、$CD33^-$、$CD44^+$、$CD45^-$、$CD117^-$，该方法包括从胎盘灌注液中分离所述细胞。

[0093] 在另一实施方案中，本发明提供了一种分离的胎盘干细胞，其是$CD10^-$、$CD13^-$、$CD33^-$、$CD45^-$和$CD117^-$。本发明进一步提供了一种分离的胎盘干细胞群，其中至少大约70％、至少大约80％、至少大约90％、至少大约95％或至少大约99％的所述胎盘干细胞是$CD10^-$、$CD13^-$、$CD33^-$、$CD45^-$和$CD117^-$。在特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群与不是干细胞的胎盘细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述分离的胎盘干细胞是非母亲来源的。在另一特定的实施方案中，在所述分离的胎盘干细胞群中至少大约90％、至少大约95％、或至少大约99％的所述细胞是非母亲来源的。在另一特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群与不显示这些特性的胎盘干细胞分离开。在另一实施方案中，本发明提供了一种获得胎盘干细胞的方法，该胎盘干细胞是$CD10^-$、$CD13^-$、$CD33^-$、$CD45^-$和$CD117^-$，该方法包括从胎盘灌注液中分离所述细胞。

[0094] 在另一实施方案中，本发明提供了一种分离的胎盘干细胞，其是HLA A,B,C^-、$CD45^-$、$CD34^-$、$CD133^-$，其对CD10、CD13、CD38、CD44、CD90、CD105、CD200和/或HLA-G呈阳性，和/或CD117呈阴性。本发明进一步提供了一种分离的胎盘干细胞群，其中所述干细胞是HLA A,B,C^-、$CD45^-$、$CD34^-$、$CD133^-$，而且该群体中至少大约20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、98％或大约99％的干细胞对CD10、CD13、CD38、CD44、CD90、CD105、CD200和/或HLA-G呈阳性，和/或对CD117呈阴性。在特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群与不是干细胞的胎盘细胞分离开。在另一特定的实施方案中，所述分离的胎盘干细胞是非母亲来源的。在另一特定的实施方案中，在所述分离的胎盘干细胞群中至少大约90％、至少大约95％、或至少大约99％的所述细胞是非母亲来源的。在另一特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群与不显示这些特性的胎盘干细胞分离开。在另一实施方案中，本发明提供了一种获得胎盘干细胞的方法，所述细胞是HLA A,B,C^-、$CD45^-$、$CD34^-$、$CD133^-$和对CD10、CD13、CD38、CD44、CD90、CD105、CD200和/或HLA-G呈阳性，和/或对CD117呈阴性，该方法包括从胎盘灌注液中分离所述细胞。

[0095] 在另一实施方案中，本发明提供了一种胎盘干细胞，其是如通过抗体结合确定的

$CD200^+$和$CD10^+$，和如通过抗体结合和RT-PCR确定的$CD117^-$。在另一实施方案中，本发明提供了一种胎盘干细胞，其是$CD10^+$、$CD29^-$、$CD54^+$、$CD200^+$、$HLA\text{-}G^+$、HLA I类$^-$和β-2-小球蛋白$^-$。在另一实施方案中，本发明提供了胎盘干细胞，其中至少一种标记的表达比间充质干细胞(例如，骨髓来源的间充质干细胞)至少高2倍。在另一特定的实施方案中，所述分离的胎盘干细胞是非母亲来源的。在另一特定的实施方案中，在所述分离的胎盘干细胞群中至少大约90％、至少大约95％、或至少大约99％的所述细胞是非母亲来源的。

[0096] 在另一实施方案中，本发明提供了一种分离的胎盘干细胞群，其中大量所述的胎盘干细胞是醛脱氢酶(ALDH)阳性，如通过醛脱氢酶活性分析确定的。这种分析是本领域已知的(参见，例如，Bostian&Berts,Biochem.J.,173,787,(1978))。在特定的实施方案中，所述的ALDH分析使用ALDEFLUOR®作为醛脱氢酶活性的标记(Aldagen,Inc.,Ashland,Oregon)。在特定的实施方案中，所述的大量为所述细胞群中大约3％到大约25％的细胞。在另一实施方案中，本发明提供了一种分离的脐带干细胞群，其中大量所述的脐带干细胞是醛脱氢酶(ALDH)阳性，如通过醛脱氢酶活性分析确定的，其使用ALDEFLUOR®作为醛脱氢酶活性的指示物。在特定的实施方案中，所述的大量为所述细胞群中大约3％到大约25％的细胞。在另一实施方案中，所述胎盘干细胞或脐带干细胞群，显示比具有相同的细胞数和在相同条件下培养的骨髓来源的间充质群高至少3倍，或至少5倍的ALDH活性。

[0097] 本发明提供了任何上述的胎盘干细胞或胎盘干细胞群，其中所述干细胞或胎盘干细胞群已经传代至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18或20次、或更多，或扩增了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群体倍增，或更多。

[0098] 在任何上述胎盘细胞或细胞群的特定的实施方案中，所述群中细胞，或至少大约95％或大约99％的细胞的染色体组型是正常的。在任何上述胎盘细胞或细胞群的另一特定的实施方案中，细胞，或细胞群中的细胞，是非母亲来源的。

[0099] 带有任何的上述标记组合的分离的胎盘干细胞或分离的胎盘干细胞群可以任何比例组合。本发明还提供了任何两种或多种上述胎盘干细胞群的分离或富集，以形成胎盘干细胞群。例如，本发明提供了一种分离的胎盘干细胞群，其包括由如上所述的标记组合中的一个来限定的第一胎盘干细胞群，和由如上所述的另一个标记组合限定的第二胎盘干细胞群，其中所述的第一和第二群体以大约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或大约99:1的比例组合。以同样的方式，任何的3、4、5或多种上述的胎盘干细胞或胎盘干细胞群可以进行组合。

[0100] 本发明进一步提供了胎盘干细胞，其通过使用或不使用酶消化来破坏胎盘组织，接着进行培养(参见5.2.3节)或灌注(参见5.2.4节)来获得。例如，本发明提供了一种分离的胎盘干细胞群，其根据以下方法生产：包括灌注哺乳动物胎盘，该胎盘已经被排出脐带血而且被灌注以除去残余血液；用灌注溶液灌注所述胎盘；收集所述灌注溶液，其中灌注后的所述灌注溶液含有包括胎盘干细胞的胎盘细胞群；和从所述细胞群中分离大量所述胎盘干细胞。在特定的实施方案中，灌注溶液通过脐静脉和脐动脉，并在它从胎盘中流出后进行收集。通过这种方法生产的胎盘干细胞群一般包含胎儿和母亲的细胞的混合物。在另一特定的实施方案中，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。通过这种方法产生的胎盘干细胞群一般基本上是专门胎儿来源的；也即，例如，该群体中大于

90％、95％、99％或99.5％的胎盘干细胞是胎儿来源的。

[0101] 在不同的实施方案中，包含在从胎盘的灌注液中获得的细胞群内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％。在另一特定的实施方案中，通过灌注收集的胎盘干细胞包含胎儿的细胞和母亲的细胞。在另一特定的实施方案中，通过灌注收集的胎盘干细胞是至少50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或至少99.5％的胎儿的细胞。

[0102] 在另一特定的实施方案中，本发明提供了一种包括通过灌注收集的分离的胎盘干细胞群组合物，其中所述的组合物包括用于收集胎盘干细胞的至少一部分灌注溶液。

[0103] 本发明进一步提供了一种在此描述的分离的胎盘干细胞群，其根据以下方法生成，包括用组织裂解酶消化胎盘组织以获得包含胎盘干细胞的胎盘细胞群，并从所述胎盘细胞的剩余物中分离大量的胎盘干细胞。全部胎盘，或胎盘的任何部分均可消化以获得胎盘干细胞。在特定的实施方案中，例如，所述胎盘组织是全部胎盘、羊膜、绒毛膜、羊膜和绒毛膜的组合，或任何上述的组合。在其它的特定实施方案中，组织裂解酶是胰蛋白酶或胶原酶。在不同的实施方案中，包含在从消化胎盘中获得的细胞群内的胎盘干细胞，是所述胎盘细胞群的至少50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或至少99.5％。

[0104] 基因分布图证实了分离的胎盘干细胞和分离的胎盘干细胞群可和其它的细胞，例如间充质干细胞，例如骨髓来源的干细胞区别开。这里描述的胎盘干细胞，可根据一种或多种基因的表达与间充质干细胞区别开，相较于骨髓来源的间充质干细胞，该表达是胎盘干细胞或脐带干细胞特异性的。特别地，胎盘干细胞可根据一种或多种基因的表达与间充质干细胞区分开，该表达在胎盘干细胞中显著高于(也即，至少高两倍)在间充质干细胞中，其中一种或多种基因是：ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ARTS-1，B4GALT6、BCHE、C11orf9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPRC5B、HLA-G、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，或任何上述的组合，其中当干细胞在相同条件下生长时，这些基因在胎盘干细胞或脐带干细胞中的表达高于在骨髓来源的干细胞中。在特定的实施方案中，胎盘干细胞特异性基因或脐带干细胞特异性基因是CD200。

[0105] 这些基因的表达水平可用于确认胎盘细胞群的身份，确定包含至少大量胎盘干细胞的细胞群，等等。其身份被确认的胎盘干细胞群，可以是纯系的，例如，从单个胎盘干细胞扩增的胎盘干细胞群，或混合的干细胞群，例如，仅含有从多个胎盘干细胞扩增的胎盘干细胞的细胞群，或含有胎盘干细胞和至少一种其它类型的细胞的细胞群。

[0106] 这些基因的表达水平可被用于选择胎盘干细胞群。例如，如果一种或多种这些基因的表达在来自细胞群的样本中显著高于等同的间充质干细胞群，可以选择该细胞群，如纯系扩增的细胞。这种选择可以是从大量胎盘干细胞群中选择群体，从身份未知的大量细胞群中选择群体等。

[0107] 可以相较于间充质干细胞对照中所述一种或多种基因的表达水平，根据一种或多种这种基因的表达水平来选择胎盘干细胞。在一实施方案中，含有等量间充质干细胞的样本中所述一种或多种基因的表达水平被作为对照。在另一实施方案中，用于在一定条件下测试胎盘干细胞的对照，是表示在所述条件下间充质干细胞中所述一种或多种基因的表达

水平的数值。

[0108] 本发明的胎盘干细胞，在原代培养中，或在包含60％DMEM-LG(Gibco)、40％MCDB-201(Sigma)、2％胎牛血清(FCS)(Hyclone Laboratories)、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(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血小板来源的生长因子(PDGF-BB)(R&D Systems)和100U青霉素/1000U链霉素的培养基中增殖期间，显示上面的特性(例如，细胞表面标记和/或基因表达分布图的组合)。

[0109] 如上所述分离的胎盘干细胞群和胎盘干细胞群一般可包含大约、至少、或至多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}或更多的胎盘干细胞。

[0110] 5.1.3培养中的生长

[0111] 这里描述的胎盘干细胞的生长，对于任何哺乳动物细胞，部分地取决于选择用于生长的特定培养基。在适宜条件下，胎盘干细胞在3-5天内一般会数量倍增。在培养期间，本发明的胎盘干细胞附着于培养中的基质，例如组织培养容器的表面(例如，组织培养皿塑料、纤粘连蛋白涂层的塑料等等)，而且形成单细胞层。

[0112] 当在合适的条件下培养时，包含本发明的胎盘干细胞的分离的胎盘细胞群形成拟胚体，也即细胞的三维簇生长在附着的干细胞层的顶上。拟胚体内的细胞表达与极早期干细胞相关的标记，例如，OCT-4、Nanog、SSEA3和SSEA4。拟胚体内的细胞一般不附着于培养基质，如这里描述的胎盘干细胞那样，但是在培养期间仍然附着于粘附细胞。拟胚体细胞的活力依赖于附着的胎盘干细胞，因为在缺乏附着的干细胞时不能形成拟胚体细胞。附着的胎盘干细胞因此促进胎盘细胞群中一种或多种拟胚体的生长，该胎盘细胞群包含附着的胎盘干细胞。不希望受理论的约束，拟胚体的细胞被认为在附着的胎盘干细胞上生长，很像胚胎干细胞生长于细胞的滋养层。间充质干细胞，例如，骨髓来源的间充质干细胞，在培养中不生长拟胚体。

[0113] 5.2获得胎盘干细胞的方法

[0114] 5.2.1干细胞收集组合物

[0115] 本发明进一步提供了收集和分离胎盘干细胞的方法。通常，使用生理学可接受的溶液，例如，干细胞收集组合物，可从哺乳动物胎盘中获得干细胞。干细胞收集组合物详细描述于2005年12月29日提交的，题目为“Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs”的相关美国临时申请号60/754,969中。

[0116] 干细胞收集组合物可包含适于收集和/或培养的干细胞的任何生理学可接受的溶液，例如，盐溶液(例如、磷酸缓冲盐溶液、Kreb’s溶液、改良的Kreb’s溶液、Eagle’s溶液、0.9％NaCl等等)，培养基(例如，DMEM、H.DMEM等等)，等等。

[0117] 干细胞收集组合物可包含一种或多种组分，其有助于保藏胎盘干细胞，也即，从收集的时间到培养的时间内，防止胎盘干细胞死亡，或延迟胎盘干细胞的死亡，降低细胞群中死亡的胎盘干细胞的数目等等。这种组分可以是，例如，凋亡抑制剂(例如，半胱氨酸蛋白酶抑制剂或JNK抑制剂)；血管扩张剂(例如，硫酸镁、抗高血压药物、心钠素(ANP)、促肾上腺皮质激素、促肾上腺皮质激素释放激素、硝普酸钠、肼苯哒嗪、腺苷三磷酸、腺嘌呤核苷、硫酸吲哚氯甲酰或硫酸镁、磷酸二酯酶抑制剂，等等)；坏死抑制剂(例如，2-(1H-吲哚-3-基)-3-

戊烷基氨基-顺丁烯二酰亚胺、二硫代氨基甲酸吡咯烷，或氯硝安定)；TNF-α抑制剂；和/或携带氧的全氟化碳(例如，全氟代辛基溴、全氟代癸基溴，等等)。

[0118] 干细胞收集组合物可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、RNA酶、或DNA酶，等等。这些酶包括但不限于，胶原酶(例如，胶原酶I、II、III或IV、来自溶组织梭状芽胞杆菌的胶原酶，等等)；中性蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、弹性蛋白酶、胰蛋白酶、LIBERASE、透明质酸酶，等等。

[0119] 干细胞收集组合物可包含杀菌的或细菌抑制有效量的抗生素。在某些非限制性实施方案中，抗生素是大环内酯(例如，托普霉素)、头孢菌素(例如，头孢氨苄、头孢拉定、头孢氨呋肟、头孢丙烯、氯头孢菌素、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，等等。在特定的实施方案中，抗生素对革兰氏(+)和/或革兰氏(-)细菌，例如，铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌，等等有效。

[0120] 干细胞收集组合物还可以含有一种或多种下列化合物：腺嘌呤核苷(大约1mM到大约50mM)；D-葡萄糖(大约20mM到大约100mM)；镁离子(大约1mM到大约50mM)；分子量大于20,000道尔顿的大分子，在一实施方案中，以足以保持内皮完整性和细胞活力的量存在(例如，合成的或天然存在的胶体，多糖如右旋糖酐或聚乙二醇，以大约25g/l到大约100g/l，或大约40g/l到大约60g/l存在)；抗氧化剂(例如，丁基羟基苯甲醚、2,6-二叔丁基对甲酚、谷胱甘肽、维生素C或维生素E、以大约25μM到大约100μM存在)；还原剂(例如，N-乙酰半胱氨酸，以大约0.1mM到大约5mM存在)；防止钙进入到细胞中的试剂(例如，维拉帕米，以大约2μM到大约25μM存在)；硝化甘油(例如，大约0.05g/L到大约0.2g/L)；抗凝血药，在一实施方案中，以足以帮助防止残余血液凝固的量存在(例如，肝素或水蛭素，以大约1000单位/l到大约100,000单位/l的浓度存在)；或含有阿米洛利的化合物(例如，阿米洛利、乙基异丙基阿米洛利、环六亚甲基阿米洛利、二甲基阿米洛利或异丁基阿米洛利，以大约1.0μM到大约5μM存在)。

[0121] 5.2.2胎盘的收集和处理

[0122] 一般，人胎盘在出生后胎盘排出后不久回收。在优选的实施方案中，在告知同意以后，而且在取得患者的完整病史且将其与胎盘相关联以后，从患者中回收胎盘。优选地，病史在产后继续。这种病史可用于协调胎盘或从其收获的干细胞的随后的应用。例如，根据病史，人胎盘干细胞可用作与该胎盘相关的婴儿或婴儿的双亲、同胞或其它的亲属的个性化药物。

[0123] 回收胎盘干细胞之前，除去脐带血和胎盘血。在某些实施方案中，在产后回收胎盘中脐带血。胎盘可以进行常规的脐带血回收程序。一般，使用针或套管，借助于重力，给胎盘放血(参见，例如，Anderson，美国专利号5,372,581；Hessel等，美国专利号5,415,665)。针或套管通常放入脐静脉中，而且可以轻轻地按摩胎盘以帮助从胎盘中排出脐带血。这种脐带血回收可以商业化地进行，例如，LifeBank USA，Cedar Knolls，N.J.，ViaCord，Cord Blood Registry and Cryocell。优选地，胎盘通过重力排空而不进行进一步操作，以便在脐带血回收期间将组织破坏最小化。

[0124] 一般，胎盘从分娩或出生房间被转移到另一个位置，例如，实验室，用于回收脐带血和通过，例如，灌注或组织解离来收集干细胞。胎盘优选在无菌的，隔热的转运装置中进

行转运(保持胎盘的温度为20-28℃),例如,通过把近端脐带夹紧的胎盘放在无菌的拉链-锁塑料袋中,然后放入保温容器中。在另一实施方案中,基本上如未决美国专利号7,147,626所述,把胎盘放在脐带血收集试剂盒中转运。优选地,在分娩之后4至24小时内把胎盘转运到实验室。在某些实施方案中,在脐带血回收之前,近端脐带被夹紧,优选在插入到胎盘圆盘的4-5cm(厘米)内。在其它的实施方案中,在脐带血回收以后,但是在胎盘的进一步处理之前,夹紧近端脐带。

[0125] 在干细胞收集之前,胎盘可以储存在无菌条件下,而且是室温或者5到25℃(摄氏度)的温度。在灌注胎盘以除去任何残余的脐带血之前,胎盘可以储存4到24小时、高达48小时、或长于48小时。在一实施方案中,从娩出后大约0小时到大约2小时收获胎盘。胎盘优选于5到25℃(摄氏度)储存在抗凝血溶液中。适合的抗凝血溶液是本领域公知的。例如,可以使用肝素或华法林钠的溶液。在一优选实施方案中,抗凝血溶液包括肝素溶液(例如,1%w/w,在1:1000溶液中)。在收集胎盘干细胞之前,被放血的胎盘优选储存至多36小时。

[0126] 哺乳动物胎盘或其部分,一旦通常如同上述收集和制备,可采用本领域已知的任何方式处理,例如,可以灌注或裂解,例如,用一种或多种组织裂解酶消化,以获得干细胞。

[0127] 5.2.3胎盘组织的物理裂解和酶消化

[0128] 在一实施方案中,通过物理裂解完整器官的部分,从哺乳动物胎盘中收集干细胞。例如,胎盘或其部分可以被例如压碎、剪切、切碎、切割成小片、斩碎、浸渍等等。然后可以培养组织以获得干细胞群。一般地,使用例如干细胞收集组合物来裂解胎盘组织(参见5.2.1节和下文)。

[0129] 在物理裂解和/或酶消化以及干细胞回收之前,可以把胎盘解剖成很多部分。胎盘干细胞可以从羊膜、绒毛膜、脐带、胎盘子叶,或其任何组合的全部或部分,包括从全部胎盘中获得。优选地,胎盘干细胞可从包括羊膜和绒毛膜的胎盘组织中获得。一般地,通过裂解一小块胎盘组织,例如,大约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或大约1000立方毫米体积的一块胎盘组织,来获得胎盘干细胞。可以使用任何物理裂解方法,只要该裂解方法能保持所述器官中大量,更优选大多数,更优选至少60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%的细胞存活,如通过例如台盼蓝排除法所确定的。

[0130] 干细胞通常在胎盘娩出后的大约第一个3天内的任何时间内从胎盘或其部分中收集,但是优选娩出后的大约8小时到大约18小时。

[0131] 在特定的实施方案中,裂解的组织在适于胎盘干细胞增殖的组织培养基中培养(参见,例如以下5.3节,描述了胎盘干细胞的培养)。

[0132] 在另一特定的实施方案中,通过胎盘组织的物理裂解来收集干细胞,其中物理裂解包括酶消化,其可能使用一种或多种组织消化酶来实现。胎盘或其部分,也可被物理裂解和用一种或多种酶消化,得到的物质然后浸于,或混合到干细胞收集组合物中。

[0133] 优选的干细胞收集组合物包括一种或多种组织裂解酶。酶消化优选使用酶的组合,例如,基质金属蛋白酶和中性蛋白酶的组合,如胶原酶和分散酶的组合。在一实施方案中,胎盘组织的酶消化使用基质金属蛋白酶、中性蛋白酶和用于消化透明质酸的粘液分解酶的组合,如胶原酶、分散酶和透明质酸酶的组合,或LIBERASE(Boehringer Mannheim Corp.,Indianapolis,Ind.)和透明质酸酶的组合。可用于裂解胎盘组织的其它酶包括木瓜

蛋白酶、脱氧核糖核酸酶、丝氨酸蛋白酶，如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶或弹性蛋白酶。丝氨酸蛋白酶可以被血清中的α2微小球蛋白抑制，因此用于消化的培养基通常是无血清的。EDTA和DNA酶通常用于酶消化，以增加细胞回收的效率。消化物优选地进行稀释，以便避免截留粘性消化液内的干细胞。

[0134] 可以使用组织消化酶的任何组合。组织消化酶的典型浓度包括，例如，胶原酶I和胶原酶IV为50-200U/mL，分散酶为1-10U/mL，弹性蛋白酶为10-100U/mL。蛋白酶可以组合使用，也即，两种或多种蛋白酶处于相同的消化反应中，或可以连续使用以便释放胎盘干细胞。例如，在一实施方案中，胎盘或其部分，在37℃下，首先用大约1到大约2mg/ml的合适量的胶原酶I消化例如30分钟，接着用浓度为大约0.25％的胰蛋白酶消化例如10分钟。丝氨酸蛋白酶优选在使用其它酶之后接连应用。

[0135] 在另一实施方案中，在用干细胞收集组合物分离干细胞之前，可通过将螯合剂，例如乙二醇双(2-氨乙基醚)-N,N,N'N'-四乙酸(EGTA)或乙二胺四乙酸(EDTA)，添加到包含干细胞的干细胞收集组合物中，或添加到组织在其中被裂解和/或消化的溶液中，来进一步裂解组织。

[0136] 在一实施方案中，消化可以如下进行。获得大约1克胎盘组织，并切碎。在含有大约1mg/mL胶原酶1A和大约0.25％胰蛋白酶的10mL溶液中，在振荡器中以大约100RPM在37℃下消化组织。消化物用培养基洗涤3次，将洗涤过的细胞接种到2个T-75培养瓶中。然后通过差异性贴壁来分离细胞，并表征例如活力、细胞表面标记、分化等等。

[0137] 应当理解，当整个胎盘，或胎盘的部分包含胎儿和母亲的细胞时(例如，胎盘的部分包含绒毛膜或子叶)，收集的胎盘干细胞将包括来源于胎儿和母亲来源的胎盘干细胞的混合物。当胎盘的部分不含有，或含有可以忽略数量的母亲的细胞(例如，羊膜)时，收集的胎盘干细胞几乎只包括胎儿胎盘干细胞。

[0138] 干细胞可通过差速胰蛋白酶消化(参见以下5.2.5节)，接着在新鲜的增殖培养基中，在一个或多个新的培养容器中培养，可选地接着进行第二次差速胰蛋白酶消化步骤，从裂解的组织中分离。

[0139] 5.2.4胎盘灌注

[0140] 胎盘干细胞也可以通过哺乳动物胎盘的灌注来获得。灌注哺乳动物胎盘以获得干细胞的方法公开于，例如，Hariri，美国申请公开号2002/0123141，以及2005年12月29日提交的，题目为“Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Prgans”的相关美国临时申请60/754,969中。

[0141] 胎盘干细胞可以通过使用例如干细胞收集组合物作为灌注溶液灌注例如胎盘脉管系统来收集。在一实施方案中，使灌注溶液通过脐动脉或脐静脉中的任一或者二者，来对哺乳动物胎盘进行灌注。灌注溶液流经胎盘，可使用例如重力流动到胎盘来完成。优选地，使用泵例如螺形压缩泵，使灌注溶液强制通过胎盘。脐静脉可以例如用套管例如，TEFLON®或塑料套管插入，该套管与无菌的连接装置如无菌管相连。无菌的连接装置连接于灌注歧管。

[0142] 在灌注准备中，胎盘优选以这样的方式定位(例如，悬浮)，即脐动脉和脐静脉位于胎盘的最高点。可以通过使灌注液体通过胎盘脉管系统和周围的组织，来对胎盘进行灌注。也可以通过使灌注液体进入脐静脉，并从脐动脉收集，或者使灌注液体进入脐动脉，并从脐

静脉收集，来对胎盘进行灌注。

[0143] 在一实施方案中，例如，脐动脉和脐静脉同时与例如移液管连接，该移液管通过弹性接头与灌注溶液的储存器连接。灌注溶液流进脐静脉和动脉。灌注溶液从血管壁流出和/或通过血管壁进入胎盘的周围组织，并从在妊娠期间附着于母亲的子宫的胎盘表面收集到合适的开放容器中。灌注溶液也可通过开口的脐带导入，并允许从胎盘壁中的开口流出或渗出，该胎盘壁与母亲的子宫壁连接。通过这种方法收集的胎盘细胞一般是胎儿和母亲的细胞的混合物，该方法称为“盘(pan)”法。

[0144] 在另一实施方案中，使灌注溶液通过脐静脉并从脐动脉收集，或者使其通过脐动脉并从脐静脉收集。通过这种方法收集的胎盘细胞一般几乎仅仅是胎儿的，该方法称为“闭环(closed circuit)”法。

[0145] 将理解，使用盘法进行的灌注，也即，在灌注液从胎盘的母亲侧流出后收集灌注液，产生了胎儿和母亲的细胞的混合物。因此，通过该方法收集的细胞包括胎儿与母亲来源的胎盘干细胞的混合群体。相反，仅仅通过闭环法中的胎盘脉管系统进行的灌注，使灌注液体通过一条或两条胎盘脉管，并只通过剩余的脉管收集灌注液体，其结果是收集了几乎仅仅胎儿来源的胎盘干细胞群。

[0146] 在一实施方案中，闭环灌注方法可以如下进行。出生后大约48小时获得分娩后胎盘。夹紧脐带，并在夹子上面切口。脐带可以丢弃，或可以进行处理以回收例如脐带干细胞，和/或加工脐带膜用于生产生物材料。灌注期间可保留羊膜，或可以从绒毛膜中分离羊膜，例如，用手指进行钝器解剖。如果在灌注之前，从绒毛膜中分离羊膜，羊膜可以，例如丢弃，或处理，例如以通过酶消化来获得干细胞，或生产例如羊膜生物材料，例如，美国申请公开号2004/0048796中描述的生物材料。清理完胎盘的所有可见的血块和残余血液以后(例如使用消毒纱布)，脐带脉管被暴露，例如，通过部分切割脐带膜以暴露脐带的横截面。确定脉管，并开口，例如，通过推进闭合的弹簧夹通过每个脉管的切口末端。连接到灌注设备或螺形压缩泵的装置，例如，塑料管，随后被插入到每条胎盘动脉中。泵可以是适于该用途的任何泵，例如，螺形压缩泵。连接到无菌收集储存器，例如血袋如250mL收集袋，的塑料管随后被插入到胎盘静脉中。可选地，与泵连接的管被插入到胎盘静脉中，而且与收集储存器连接的管被插入到一条或两条胎盘动脉中。然后胎盘用大量的灌注溶液，例如，大约750ml的灌注溶液来灌注。然后灌注液中的细胞通过例如离心来收集。

[0147] 在一实施方案中，灌注期间夹紧近端的脐带，更优选地，在脐带插入到胎盘的4-5cm(厘米)内夹紧。

[0148] 放血处理期间来自哺乳动物胎盘的灌注液体的第一次收集物一般是有色的，带有脐带血和/或胎盘血的残余红血球。随着灌注进行和残余脐带血细胞被从胎盘中洗涤掉，灌注液变得更加无色。一般30到100ml(毫升)的灌注液足以初步进行胎盘放血，但是根据观察结果，可以使用更多或更少的灌注液。

[0149] 用于收集胎盘干细胞的灌注液的体积，可根据要收集的干细胞的数目，胎盘的大小，来源于单个胎盘的收集物的数目等等而改变。在不同的实施方案中，灌注液的体积可以为50mL到5000mL、50mL到4000mL、50mL到3000mL、100mL到2000mL、250mL到2000mL、500mL到2000mL、或750mL到2000mL。一般，放血之后，胎盘用700-800mL的灌注液进行灌注。

[0150] 胎盘可以在超过几个小时或几天的时间内灌注多次。当胎盘要灌注多次时，胎盘

可以在无菌条件下在容器或其它适合的容器中保持或培养，并用干细胞收集组合物或标准的灌注溶液(例如，常用盐溶液如磷酸盐缓冲盐水(“PBS”))进行灌注，所述标准的灌注溶液带有或没有抗凝血剂(例如，肝素、华法林钠、香豆素、双香豆素)、和/或带有或没有抗微生物剂(例如，β-巯基乙醇(0.1mM)；抗生素如链霉素(例如，40-100μg/ml)、青霉素(例如，40U/ml)、两性霉素B(例如，0.5μg/ml)。在一实施方案中，分离的胎盘保持或培养一段时间，而不收集灌注液，以便在灌注和收集灌注液之前，保持或培养胎盘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天或更多天。灌注的胎盘可以保持一段或多段另外的时间，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灌注液进行第二次灌注。胎盘可以灌注1、2、3、4、5或更多次，例如，每1、2、3、4、5或6小时一次。在优选的实施方案中，可重复灌注胎盘和收集灌注溶液，例如干细胞收集组合物，直到回收的有核细胞的数目降到100细胞/ml之下。不同时间点的灌注液可以进一步分别处理，以回收时间依赖的细胞群，例如，干细胞。也可以合并来自不同时间点的灌注液。在优选的实施方案中，干细胞在胎盘娩出后的大约8小时到大约18小时之间收集一次或多次。

[0151] 不希望受任何理论约束，放血和胎盘灌注足够长时间以后，胎盘干细胞被认为迁移到胎盘的无血和灌注微循环中，根据本发明的方法，收集胎盘干细胞，优选通过灌注洗涤到收集容器中。灌注分离的胎盘不仅用来除去残余的脐带血，而且为胎盘提供合适的养分，包括氧。可以培养胎盘并用与用于除去残余的脐带血细胞的溶液相似的溶液进行灌注，优选地，没有添加抗凝血剂。

[0152] 根据本发明方法的灌注，导致胎盘干细胞的收集物，显著多于从没用所述溶液灌注，而且没有另外处理以获得干细胞(例如，通过组织破坏，如酶消化)的哺乳动物胎盘中可获得的数目。在这里，“显著多于”指至少多10％。根据本发明方法的灌注，产生的胎盘干细胞，显著多于例如从已在其中培养胎盘或其部分的培养基中所获得的胎盘干细胞的数目。

[0153] 可以用包含一种或多种蛋白酶或其它组织裂解酶的溶液进行灌注以从胎盘中分离干细胞。在特定的实施方案中，将胎盘或其部分(例如，羊膜、羊膜和绒毛膜、胎盘小叶或子叶、脐带，或任何上述的组合)置于25-37℃下，并在200mL培养基中用一种或多种组织裂解酶孵育30分钟。从灌注液中收集细胞，置于4℃下，并用包括5mM EDTA、2mM二硫苏糖醇和2mMβ-巯基乙醇的冷抑制剂混合物洗涤。几分钟以后，用冷的(例如，4℃)干细胞收集组合物洗涤干细胞。

[0154] 5.2.5胎盘干细胞的分离、分选和表征

[0155] 来自哺乳动物胎盘的干细胞，无论是通过灌注或酶消化获得的，可通过Ficoll梯度离心从其它的细胞中进行初步纯化(也即，分离)。这种离心可以按照离心速度等的任何标准方案来进行。在一实施方案中，例如，从胎盘中收集的细胞是通过室温下5000×g离心15分钟而从灌注液中回收的，该离心从例如污染碎片和血小板中分离出细胞。在另一实施方案中，胎盘灌注液浓缩到大约200ml，在Ficoll中轻轻地分层，并在22℃以大约1100×g离心20分钟，收集低密度的中间层细胞用于进一步地处理。

[0156] 细胞沉淀可以在新鲜的干细胞收集组合物，或适于干细胞保持的培养基，例如，含有2U/ml肝素和2mM EDTA的IMDM无血清培养基(GibcoBRL，NY)中进行重悬。总的单核细胞成分可使用例如，Lymphoprep(Nycomed Pharma，Oslo，Norway)，根据制造商的推荐方法来进

行分离。

[0157] 如这里使用的，“分离”胎盘干细胞指除去至少20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％或99％的在完整的哺乳动物胎盘中通常与干细胞缔合的细胞。当干细胞存在于包含少于50％的在完整的器官中通常与干细胞缔合的细胞的细胞群中时，来自器官的该干细胞是“分离的”。

[0158] 通过灌注或消化获得的胎盘细胞可以，例如，通过差速胰蛋白酶消化，使用例如，带有0.2％EDTA的0.05％胰蛋白酶溶液(Sigma,St.Louis MO)进行进一步，或初步地分离。差速胰蛋白酶消化是可能的，因为胎盘干细胞一般在大约5分钟内从塑料表面分离，而其它的附着群体一般需要超过20-30分钟孵育。胰蛋白酶消化和使用例如胰蛋白酶中和溶液(TNS,Cambrex)的胰蛋白酶中和之后，可以收获脱附的胎盘干细胞。在附着细胞分离的实施方案中，例如，大约5-10×10^6细胞的等分试样置于每个T-75培养瓶中，优选纤粘连蛋白涂层的T75培养瓶。在这种实施方案中，细胞可以用商业可获得的间充质干细胞生长培养基(MSCGM)(Cambrex)来培养，并置于组织培养孵育箱中(37℃，5％CO_2)。10到15天以后，非附着细胞通过用PBS洗涤从培养瓶中除去。然后用MSCGM代替PBS。优选每天检验培养瓶中不同附着细胞类型的存在，特别是，成纤维样细胞簇的鉴定和扩增。

[0159] 从哺乳动物胎盘收集的细胞的数量和类型可以例如，使用标准细胞检测技术如流式细胞仪、细胞分选、免疫细胞化学(例如，用组织特异性的或细胞标记特异性的抗体进行染色)、荧光激活的细胞分选(FACS)、磁激活细胞分选(MACS)、通过使用光学或共焦显微镜技术检验细胞的形态学，和/或通过使用本领域公知的技术，如PCR和基因表达分布图，测量基因表达的改变来进行监控。也可以使用这些技术，来鉴定对于一种或多种特定标记呈阳性的细胞。例如，使用抗CD34的抗体，使用上述的技术，可以确定细胞是否包含可检测数量的CD34；倘若如此，该细胞是$CD34^+$。同样，如果细胞产生足以通过RT-PCR检测的OCT-4RNA，或显著多于成人细胞的OCT-4RNA，则该细胞是$OCT-4^+$。细胞表面标记抗体(例如，CD标记如CD34)和干细胞特异基因的序列如OCT-4，是本领域公知的。

[0160] 胎盘细胞，尤其是已经通过Ficoll分离、差异性贴壁、或其结合的方法分离的细胞，可以使用荧光激活细胞分选仪(FACS)进行分选。荧光激活细胞分选(FACS)是基于颗粒的荧光特性用于分离颗粒包括细胞的一种公知方法(Kamarch,1987,Methods Enzymol,151:150-165)。单个颗粒中荧光部分的激光激发产生少量的电荷，其允许混合物的阳性和阴性颗粒的电磁分离。在一实施方案中，细胞表面标记特异性抗体或配体用独特的荧光标记进行标记。细胞通过细胞分选仪进行处理，其允许基于它们与使用的抗体的结合能力来分离细胞。FACS分选的颗粒可以直接放置到96孔或384孔板的单个孔中，以便于分离和克隆。

[0161] 在一种分选方案中，来自胎盘的干细胞可根据标记CD34、CD38、CD44、CD45、CD73、CD105、OCT-4和/或HLA-G的表达来进行分选。这可以结合根据干细胞在培养中的附着特性选择干细胞的方法来完成。例如，可以在基于标记表达的分选之前或之后，完成附着选择干细胞。在一实施方案中，例如，细胞首先基于它们的CD34的表达来分选；保留$CD34^-$细胞，且$CD200^+HLA-G^+$细胞被从所有其它的$CD34^-$细胞中分离开。在另一实施方案中，来自胎盘的细胞是根据它们CD200和/或HLA-G标记的表达；例如，显示这些标记中的任何一种的细胞被分离用于进一步的应用。表达例如，CD200和/或HLA-G的细胞，在特定的实施方案中，可以根据

它们的CD73和/或CD 105、或抗体SH2、SH3或SH4识别的抗原表位的表达，或缺乏CD34、CD38或CD45的表达，来进行进一步地分选。例如，在一实施方案中，胎盘细胞通过CD200、HLA-G、CD73、CD105、CD34、CD38和CD45的表达或缺乏来分选，并且$CD200^+$、$HLA\text{-}G^+$、$CD73^+$、$CD105^+$、$CD34^-$、$CD38^-$和$CD45^-$的胎盘细胞被从其它的胎盘细胞中分离出用于进一步地应用。

[0162] 关于抗体介导的检测和胎盘干细胞的分选，可以将特异于特定标记的任何抗体与适用于细胞检测和分选(例如，荧光激活细胞分选)的任何荧光团或其它的标记联合使用。特定标记的抗体/荧光团组合包括，但不限于，异硫氰酸荧光素(FITC)偶联的抗HLA-G的单克隆抗体(可获自Serotec,Raleigh,North Carolina)、CD10(可获自BD Immunocytometry Systems,San Jose,California)、CD44(可获自BD Biosciences Pharmingen,San Jose,California)和CD105(可获自R&D Systems Inc.,Minneapolis,Minnesota)；藻红蛋白(PE)偶联的抗CD44、CD200、CD117和CD13的单克隆抗体(BD Biosciences Pharmingen)；藻红蛋白-Cy7(PE Cy7)偶联的抗CD33和CD10的单克隆抗体(BD Biosciences Pharmingen)；别藻蓝蛋白(APC)偶联的链霉亲和素和抗CD38的单克隆抗体(BD Biosciences Pharmingen)；和生物素化的CD90(BD Biosciences Pharmingen)。可以使用的其它抗体包括但不限于，CD133-APC(Miltenyi)、KDR-生物素(CD309,Abeam)、细胞角蛋白K-Fitc(Sigma或Dako)、HLA ABC-Fitc(BD)、HLA DRDQDP-PE(BD)、β-2-微小球蛋白-PE(BD)、CD80-PE(BD)和CD86-APC(BD)。

[0163] 可以使用的其它抗体/标记组合包括，但不限于，CD45-PerCP(peridin叶绿素蛋白)；CD44-PE；CD19-PE；CD10-F(荧光素)；HLA-G-F和7-氨基-放线菌素-D(7-AAD)；HLA-ABC-F；等等。

[0164] 可以使用，例如，藻红蛋白-Cy5(PE Cy5)偶联的链霉亲和素和生物素偶联的抗CD117或CD133的单克隆抗体来分析胎盘干细胞的CD117或CD133；然而，使用该系统，由于相对较高的背景，细胞可显示出分别对CD117或CD133呈阳性。

[0165] 胎盘干细胞可以用单个标记的抗体进行标记、检测和/或分选。胎盘干细胞也可以用不同标记的多种抗体同时进行标记。

[0166] 在另一实施方案中，磁珠可用于分离细胞。细胞可使用磁激活细胞分选(MACS)技术来分选，其为一种根据其结合磁珠(0.5-100μm直径)的能力来分离颗粒的方法。可以对磁性微球进行各种有用的修饰，包括共价添加能特异性识别特定的细胞表面分子或半抗原的抗体。然后将珠子与细胞混合以允许结合。然后使细胞通过磁场，以分离出具有特定的细胞表面标记的细胞。在一实施方案中，这些细胞然后可被分离，并与抗另外的细胞表面标记的抗体偶联的磁珠重新混合。使细胞再次通过磁场，分离结合两种抗体的细胞。然后把这种细胞稀释到独立的盘中，如用于纯系分离的微量滴定盘。

[0167] 胎盘干细胞也可以根据细胞形态和生长特性来进行表征和/或分选。例如，胎盘干细胞可以表征为具有培养中的成纤维样形态，和/或根据培养中的成纤维样形态进行选择。胎盘干细胞还可以表征为具有形成拟胚体的能力，和/或根据它们形成拟胚体的能力进行选择。在一实施方案中，例如，成纤维样形状的，表达CD73和CD105，并在培养中产生一种或多种拟胚体的胎盘细胞被从其它的胎盘细胞中分离。在另一实施方案中，在培养中产生一种或多种拟胚体的$OCT\text{-}4^+$胎盘细胞被从其它的胎盘细胞中分离。

[0168] 在另一实施方案中，胎盘干细胞可通过集落形成单位分析来鉴定和表征。集落形

成单位分析是本领域公知的，如MESEN CULTTM培养基(Stem Cell Technologies,Inc.,Vancouver British Columbia)。

[0169] 可以使用本领域已知的标准技术，如台盼蓝排除分析、荧光素二乙酸酯吸收分析、碘化吡啶吸收分析(用于测定活力)；和胸腺嘧啶核苷吸收分析、MTT细胞增殖分析(用于测定增殖)，来测定胎盘干细胞的活力、增殖潜能和寿命。可通过本领域公知的方法，如通过测定在延长的培养中群体倍增的最大数量来测定寿命。

[0170] 也可以使用本领域已知的其它技术，例如，理想细胞的选择性生长(正选择)，不需要的细胞的选择性破坏(负选择)；基于混合群体中不同细胞的凝集性的分离，例如，利用大豆凝集素；冻融法；过滤；常规和区带离心法；离心洗脱(逆流离心)；单位重力分离；逆流分配；电泳；等等，从其它胎盘细胞中分离胎盘干细胞。

[0171] 5.3胎盘干细胞的培养

[0172] 5.3.1培养基

[0173] 分离的胎盘干细胞、或胎盘干细胞群、或从中生长出胎盘干细胞的细胞或胎盘组织，可用于起始或接种细胞培养物。细胞一般转入到无菌的组织培养容器中，其未涂有或涂有胞外基质或配体如层粘连蛋白、胶原蛋白(例如，天然的或者变性的)、明胶、纤粘连蛋白、鸟氨酸、玻连蛋白和胞外膜蛋白(例如，MATRIGEL®(BD Discovery Labware,Bedford,Mass.))。

[0174] 胎盘干细胞可在本领域公认的适用于干细胞培养的任何培养基和任何条件下进行培养。优选地，培养基包含血清。胎盘干细胞可以培养在，例如，DMEM-LG(Dulbecco's改良的基本培养基，低葡萄糖)/MCDB 201(鸡成纤维细胞基础培养基)中，其包含ITS(胰岛素-转铁蛋白-硒)、LA+BSA(亚油酸-牛血清白蛋白)、右旋糖、L-抗坏血酸、PDGF、EGF、IGF-1和青霉素/链霉素；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(Iscove's改良的Dulbecco's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，等等。优选的培养基是DMEM-LG/MCDB-201，其包含2％FBS、ITS、LA+BSA、右旋糖、L-抗坏血酸、PDGF、EGF和青霉素/链霉素。

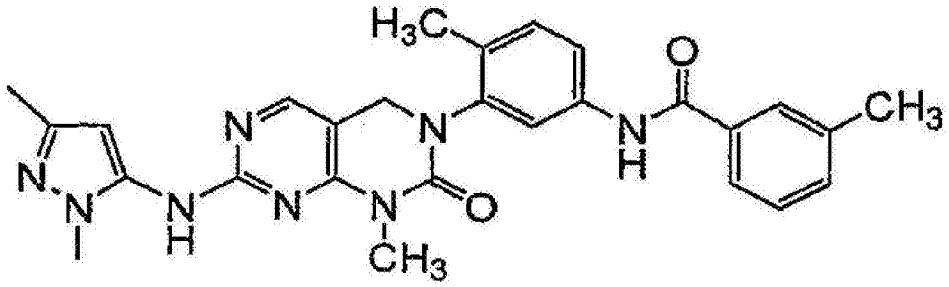
[0175] 可用于培养胎盘干细胞的其它培养基，包括DMEM(高或低葡萄糖)、Eagle's基础培养基、Ham's F10培养基(F10)、Ham's F-12培养基(F12)、Iscove's改良的Dulbecco's培养基、间充质干细胞生长培养基(MSCGM)、Liebovitz's L-15培养基、MCDB、DMEM/F12、RPMI 1640、改进的DMEM(Gibco)、DMEM/MCDB201(Sigma)、和CELL-GRO FREE。

[0176] 培养基可以补充一种或多种组分，包括例如，血清(例如，胎牛血清(FBS)，优选大约2-15％(v/v)；马属(马)血清(ES)；人血清(HS))；β-巯基乙醇(BME)，优选大约0.001％(v/v)；一种或多种生长因子，例如，血小板衍生生长因子(PDGF)、表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、白血病抑制因子(LIF)、血管内皮生长因子(VEGF)、和促红细胞生成素(EPO)；氨基酸，包括L-缬氨酸；和一种或多种用于控制微生物污染的抗生素和/或抗霉菌剂，如例如，青霉素G、硫酸链霉素、两性霉素B、庆大霉素和制霉菌素，单独或其组合。

[0177] 胎盘干细胞可以在标准组织培养条件下，例如，在组织培养皿或多孔板中进行培养。胎盘干细胞也可以使用悬滴法来培养。在这种方法中，胎盘干细胞以大约1×10^4细胞/

ml悬浮在大约5mL的培养基中，一滴或多滴上述培养基置于组织培养容器例如100mL培养皿的盖内。液滴可以是，单滴，或例如来自多道移液管的多滴。小心地反转盖子，并置于培养皿底的顶部，该培养皿中包含足以保持培养皿大气中水汽含量的液体，例如无菌PBS，并培养干细胞。

[0178] 在一实施方案中，在存在用于保持胎盘干细胞中未分化表型的化合物时，培养胎盘干细胞。在特定的实施方案中，所述化合物是取代的3,4-dihydropyridimol[4,5-d]嘧啶。在更特定的实施方案中，所述化合物是具有下列化学结构的化合物：

[0179] 

[0180] 该化合物可以以例如大约1μM到大约10μM的浓度与胎盘干细胞或胎盘干细胞群进行接触。

[0181] 5.3.2胎盘干细胞的扩增和增殖

[0182] 一旦获得分离的胎盘干细胞或分离的干细胞群(例如，与至少50％的在体内通常与干细胞或干细胞群缔合的胎盘细胞分离的干细胞或干细胞群)，干细胞或干细胞群可以在体外增殖和扩增。例如，可以在组织培养容器，例如，培养皿、培养瓶、多孔板等等中，培养足够长时间，使干细胞增殖到70-90％汇合，也即，直到干细胞和它们的后代占据组织培养容器的70-90％的培养表面积时。

[0183] 胎盘干细胞可以允许细胞生长的密度接种到培养容器中。例如，可以低密度(例如，大约1,000到大约5,000细胞/cm^2)到高密度(例如，大约50,000或更多个细胞/cm^2)接种细胞。在优选的实施方案中，细胞培养于含有大约0％到大约5％体积CO_2的空气中。在一些优选的实施方案中，细胞培养于含有大约2％到大约25％O_2的空气中，优选含有大约5％到大约20％O_2的空气中。细胞优选培养于大约25℃到大约40℃下，优选37℃。细胞优选培养于孵育箱中。培养基可以是静态的或摇动的，例如，使用生物反应器。胎盘干细胞优选生长于低氧化压力(例如，添加谷胱甘肽、抗坏血酸、过氧化氢酶、生育酚、N-乙酰半胱氨酸，等等)下。

[0184] 一旦获得70％-90％汇合，细胞可以进行传代。例如，可以使用本领域公知的技术对细胞进行酶处理，如胰蛋白酶化来从组织培养表面分离它们。通过移液移取细胞以后，对细胞计数，大约20,000-100,000个干细胞，优选大约50,000个干细胞，被传代到包含新鲜培养基的新培养容器中。一般，新培养基是与从中移取干细胞的培养基相同类型的培养基。本发明包含已经传代至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18或20次，或更多次的胎盘干细胞群。

[0185] 5.3.3胎盘干细胞群

[0186] 本发明提供了胎盘干细胞群。胎盘干细胞群可以直接从一个或多个胎盘中分离；也即，胎盘干细胞群可以是包含胎盘干细胞的胎盘细胞群，该胎盘干细胞获自或包含在灌注液内，或者获自或包含在破裂的胎盘组织内，例如胎盘组织消化物中(也即，通过胎盘或

其部分的酶消化获得的细胞的集合)。本发明的分离的胎盘干细胞也可以培养和扩增以产生胎盘干细胞群。包含胎盘干细胞的胎盘细胞群也可以培养和扩增以产生胎盘干细胞群。

[0187] 本发明的胎盘干细胞群包括胎盘干细胞,例如,如这里描述的胎盘干细胞。在不同的实施方案中,分离的胎盘干细胞群中至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的细胞是胎盘干细胞。也即,胎盘干细胞群可以包括,例如,差不多1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的非干细胞。

[0188] 本发明提供了通过例如选择表达特定的标记和/或特定的培养或形态特征的胎盘干细胞(无论是来源于酶消化物还是灌注液)生产分离的胎盘干细胞群的方法。在一实施方案中,例如,本发明提供了一种生产细胞群的方法,包括选择(a)附着于基质,和(b)表达CD200和HLA-G的胎盘细胞;和从其它的细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中,本发明提供了一种生产细胞群的方法,包括鉴定表达CD200和HLA-G的胎盘细胞,和从其它的细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中,生产细胞群的方法,包括选择(a)附着于基质,和(b)表达CD73、CD105和CD200的胎盘细胞;和从其它的细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中,本发明提供了一种生产细胞群的方法,包括鉴定表达CD73、CD105和CD200的胎盘细胞,和从其它的细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中,生产细胞群的方法包括选择(a)附着于基质,和(b)表达CD200和OCT-4的胎盘细胞;和从其它的细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中,本发明提供了一种生产细胞群的方法,包括鉴定表达CD200和OCT-4的胎盘细胞,和从其它的细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中,生产细胞群的方法包括选择(a)附着于基质,(b)表达CD73和CD105,和(c)在允许形成拟胚体的条件下培养所述群体时,促进在包含所述干细胞的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体的胎盘细胞;和从其它的细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中,本发明提供了一种生产细胞群的方法,包括鉴定表达CD73和CD105,和在允许形成拟胚体的条件下培养所述群体时,促进在包含所述干细胞的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体的胎盘细胞,和从其它的细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中,生产细胞群的方法包括选择(a)附着于基质,和(b)表达CD73、CD105和HLA-G的胎盘细胞;和从其它的细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中,本发明提供了一种生产细胞群的方法,包括鉴定表达CD73、CD105和HLA-G的胎盘细胞,和从其它的细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中,生产细胞群的方法包括选择(a)附着于基质,(b)表达OCT-4,和(c)在允许形成拟胚体的条件下培养所述群体时,促进在包含所述干细胞的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体的胎盘细胞;和从其它的细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中,本发明提供了一种生产细胞群的方法,包括鉴定表达OCT-4,和在允许形成拟胚体的条件下培养所述群体时,促进在包含所述干细胞的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体的胎盘细胞,和从其它的细胞中分离所述细胞以形成细胞群。

[0189] 这种细胞群可用于治疗下文列举的任何疾病或症状。这种细胞群还可以用于评估胎盘干细胞群,例如,作为质量控制方法的一部分。

[0190] 在任何上述的实施方案中,该方法另外可以包括选择表达ABC-p(一种胎盘特异性的ABC转运蛋白;参见,例如Allikmets等,Cancer Res.58(23):5337-9(1998))的胎盘细胞。该方法还可以包括选择这样的细胞,其显示出至少一种特异于例如间充质干细胞的特性,

例如，表达CD29、表达CD44、表达CD90，或表达上述的组合。

[0191] 在上述的实施方案中，基质可以是细胞例如胎盘干细胞的培养和/或选择可以在其上面完成的任何表面。一般地，基质是塑料，例如组织培养皿或塑料多孔板。组织培养塑料可以涂有生物分子，例如，层粘连蛋白或纤粘连蛋白。

[0192] 细胞，例如，胎盘干细胞可以通过细胞筛选领域已知的任何方法来选择以用于胎盘干细胞群。例如，可以使用一种或多种细胞表面标记的一个抗体或多个抗体，例如，在流式细胞计数或FACS中，来选择细胞。可以使用结合磁珠的抗体来进行选择。特异于某些干细胞相关标记的抗体是本领域已知的。例如，抗OCT-4(Abeam,Cambridge,MA)、CD200(Abeam)、HLA-G(Abeam)、CD73(BD Biosciences Pharmingen,San Diego,CA)、CD105(Abeam;BioDesign International,Saco,ME)等等的抗体。抗其它标记的抗体也是商业可获得的，例如，CD34、CD38和CD45可获自，例如，StemCell Technologies或BioDesign International。

[0193] 分离的胎盘干细胞群可以包括不是干细胞的胎盘细胞，或不是胎盘细胞的细胞。

[0194] 分离的胎盘干细胞群可以与一种或多种非干细胞或非胎盘细胞群组合。例如，分离的胎盘干细胞群可以与血(例如，胎盘血或脐带血)、血来源的干细胞(例如，来源于胎盘血或脐带血的干细胞)、脐带干细胞、血来源的有核细胞群、骨髓来源的间充质细胞、骨来源的干细胞群、天然骨髓、成熟的(体)干细胞、包含在组织内的干细胞群、培养的干细胞、完全分化的细胞群(例如，软骨细胞、成纤维细胞、羊膜细胞、成骨细胞、肌细胞、心脏细胞，等等)等等组合。在特定的实施方案中，本发明提供了一种包含胎盘干细胞和脐带干细胞的干细胞群。分离的胎盘干细胞群中的细胞可以与大量的另一种类型的细胞组合，比较每个群体中总的有核细胞数，以大约100,000,000:1、50,000,000:1、20,000,000:1、10,000,000:1、5,000,000:1、2,000,000:1、1,000,000:1、500,000:1、200,000:1、100,000:1、50,000:1、20,000:1、10,000:1、5,000:1、2,000:1、1,000:1、500:1、200:1、100:1、50:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1、1:2、1:5、1:10、1:100、1:200、1:500、1:1,000、1:2,000、1:5,000、1:10,000、1:20,000、1:50,000、1:100,000、1:500,000、1:1,000,000、1:2,000,000、1:5,000,000、1:10,000,000、1:20,000,000、1:50,000,000或大约1:100,000,000的比例组合。分离的胎盘干细胞群中的细胞也可以与许多细胞类型的许多细胞组合。

[0195] 在一实施方案中，分离的胎盘干细胞群与许多造血干细胞组合。这种造血干细胞可以，例如，包含在未处理的胎盘、脐带血或外周血内；在来自胎盘血、脐带血或外周血的全部有核细胞内；在来自胎盘血、脐带血或外周血的分离的$CD34^+$细胞群中；在未处理的骨髓中；在来自骨髓的全部有核细胞内；在来自骨髓的分离的$CD34^+$细胞群中，等等。

[0196] 5.4胎盘干细胞库的生产

[0197] 来自产后胎盘的干细胞可以许多不同的方式培养，以生产一系列批次，例如，胎盘干细胞的一系列单独给药的剂量。这些批次可以，例如，来源于来自胎盘灌注液或来自酶消化的胎盘组织的干细胞。来源于许多胎盘的胎盘干细胞的批次组，可以安排在胎盘干细胞库中，用于例如长期储存。一般，附着的干细胞来源于胎盘物质的初始培养物，以形成种子培养物，其在控制条件下扩增，以从大约相等数量的倍增物形成细胞群。批次优选来源于单个胎盘的组织，但是也可以来源于许多胎盘的组织。

[0198] 在一实施方案中，干细胞批次如下获得。胎盘组织首先例如，通过切碎进行裂解，

用适合的酶例如胶原酶消化(参见上述5.2.3节)。胎盘组织优选包括,例如,来自一个胎盘的全部羊膜、全部绒毛膜,或两者,但是也可以仅仅包括羊膜或绒毛膜的部分。消化的组织培养例如,大约1-3周,优选大约2周。除去非粘附的细胞以后,例如,通过胰蛋白酶消化,收集形成的高密度集落。收集这些细胞,并重悬于适当体积的培养基中,而且被定义为0代细胞。

[0199] 0代细胞然后用于接种扩增培养物。扩增培养物可以是独立的细胞培养装置的任意安排,例如,NUNC™的Cell Factory。0代培养物中的细胞可以细分到任何程度,以便用例如1×10^3、2×10^3、3×10^3、4×10^3、5×10^3、6×10^3、7×10^3、8×10^3、9×10^3、1×10^4、2×10^4、3×10^4、4×10^4、5×10^4、6×10^4、7×10^4、8×10^4、9×10^4或10×10^4个干细胞接种扩增培养物。优选地,大约2×10^4到大约3×10^4个0代细胞被用于接种每一扩增培养物。扩增培养物的数量取决于0代细胞的数量,而且数量可以更多或更少,这取决于从其获得干细胞的特定胎盘。

[0200] 扩增培养物生长直到培养物中细胞的密度达到某个值,例如,大约1×10^5细胞/cm^2。此时细胞可以收集和冷藏,或者传代到如上所述的新扩增培养物中。使用之前,细胞可以传代,例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20次。在扩增培养期间优选保留群体倍增的累计数的记录。来自0代培养物的细胞可以扩增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倍增,或高达60倍增。但是,优选地,在把细胞群划分为单独剂量之前,群体倍增数为大约15到大约30,优选大约20倍增。细胞可以在整个扩增过程中被连续培养,或者在扩增期间的一个或多个点被冷冻。

[0201] 用于单独剂量的细胞可以被冷冻,例如冷冻保藏用于以后使用。单独剂量可以包括,例如,每毫升大约1百万到大约1千万个细胞,而且可以包括总计大约10^6到大约10^9个细胞。

[0202] 在该方法的特定的实施方案中,0代细胞被培养至第一倍增数,例如,大约4倍增,然后冷冻在第一细胞库中。来自第一细胞库的细胞被冷冻,并用于接种第二细胞库,扩增第二细胞库中的细胞至第二倍增数,例如,大约另一个8倍增。收集该阶段的细胞,冷冻,并用于接种新的扩增培养物,其允许进行至第三倍增数,例如,大约8个另外的倍增,导致细胞倍增的累计数达到大约20。传代中间点的细胞可以每毫升大约100,000到大约1千万细胞,优选每毫升大约1百万细胞的单位冷冻,用于随后的扩增培养。大约20倍增的细胞可以每毫升大约1百万到大约1亿个细胞的单独剂量冷冻,用于给药或用于制备含有干细胞的组合物。

[0203] 在一实施方案中,因此,本发明提供了一种制备胎盘干细胞库的方法,包括:从人分娩后胎盘扩增原代培养胎盘干细胞至第一大量群倍增;冷冻保藏所述胎盘干细胞以形成主细胞库;扩增来自主细胞库的大量的胎盘干细胞至第二大量群倍增;冷冻保藏所述胎盘干细胞以形成工作细胞库;扩增来自工作细胞库的大量胎盘干细胞至第三大量群倍增;和以单独剂量冷冻保藏所述胎盘干细胞,其中所述单独剂量共同组成胎盘干细胞库。在特定的实施方案中,群倍增的总数为大约20。在另一特定的实施方案中,所述第一大量群倍增为大约4个群倍增;所述第二大量群体倍增为大约8个群倍增;和所述第三大量群倍增为大约8个群倍增。在另一特定的实施方案中,所述的原始培养胎盘干细胞包含来自胎盘灌注液的胎盘干细胞。在另一特定的实施方案中,所述的原始培养胎盘干细胞包含来自消化的胎盘组织的胎盘干细胞。在另一特定的实施方案中,所述的原始培养胎盘干细胞包含来自胎盘

灌注液和来自消化的胎盘组织的胎盘干细胞。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞原始培养物中的所有所述胎盘干细胞来自于相同的胎盘。在另一特定的实施方案中，该方法进一步包括，从来自所述工作细胞库的所述大量的所述胎盘干细胞中选择$CD200^+$或$HLA\text{-}G^+$胎盘干细胞以形成单独剂量。在另一特定的实施方案中，所述单独剂量包括大约10^4到大约10^5个胎盘干细胞。在另一特定的实施方案中，所述单独剂量包括大约10^5到大约10^6个胎盘干细胞。在另一特定的实施方案中，所述单独剂量包括大约10^6到大约10^7个胎盘干细胞。在另一特定的实施方案中，所述单独剂量包括大约10^7到大约10^8个胎盘干细胞。

[0204] 在优选的实施方案中，从其获得胎盘的供体(例如，母亲)被测试至少一个病原体。如果母亲化验显示对测试的病原体呈阳性，则丢弃来自该胎盘的整个批次。这种化验可以在生产胎盘干细胞批次期间的任何时候进行，包括建立0代细胞之前或之后，或者扩增培养期间。化验其存在的病原体可非限制性地包括：肝炎A、肝炎B、肝炎C、肝炎D、肝炎E、人类免疫缺陷性病毒(I型和II型)、巨细胞病毒、疱疹病毒，等等。

[0205] 5.5胎盘干细胞的分化

[0206] 5.5.1诱导分化成神经元或神经原性细胞

[0207] 胎盘干细胞的神经元分化可以例如，通过把胎盘干细胞置于诱导分化成神经元的细胞培养条件下来实现。在一示例的方法中，神经原性培养基包括DMEM/20％FBS和1mMβ-巯基乙醇；这种培养基在培养大约24小时后可用由DMEM和1-10mMβ-巯基乙醇组成的培养基替换。在另一实施方案中，细胞与DMEM/2％DMSO/200μM丁基羟基苯甲醚接触。在特定的实施方案中，分化培养基包括无血清的DMEMIF-12、丁基羟基苯甲醚、氯化钾、胰岛素、forskolin、丙戊酸和氢化可的松。在另一实施方案中，神经元分化通过将胎盘干细胞在涂有层粘连蛋白的平板上的Neurobasal-A培养基(Invitrogen，Carlsbad CA)中铺板来实现，该培养基包含B27添加物和L-谷氨酰胺，任选补充bFGF和/或EGF。通过与神经细胞共培养，或在神经元条件培养基中培养，还可以诱导胎盘干细胞神经分化。

[0208] 神经元分化可通过，例如检测神经元样形态(例如，包括延伸突起的双极细胞)，通过RT-PCR检测例如神经生长因子受体和神经丝重链基因的表达；或例如通过膜片钳检测带电活性来进行评价。当细胞显示一种或多种这些特征时，胎盘干细胞被认为已经分化成神经元细胞。

[0209] 5.5.2诱导分化成成脂肪细胞

[0210] 胎盘干细胞的成脂肪分化可以例如，通过把胎盘干细胞置于诱导分化成脂肪细胞的细胞培养条件中来实现。一种优选的成脂肪培养基包括添加15％脐带血血清的MSCGM(Cambrex)或DMEM。在一实施方案中，给胎盘干细胞供给脂肪形成诱导培养基(Cambrex)，并培养3天(于37℃，5％CO_2)，接着在脂肪形成维持培养基(Cambrex)中培养1-3天。3个诱导/维持的全循环以后，细胞在脂肪形成维持培养基中另外再培养7天，其中每2-3天更换培养基。

[0211] 在另一实施方案中，胎盘干细胞在包含1μM地塞米松、0.2mM吲哚美辛、0.01mg/ml胰岛素、0.5mM IBMX、DMEM-高葡萄糖、FBS和抗生素的培养基中进行培养。胎盘干细胞通过培养于包含一种或多种糖皮质激素(例如，地塞米松、indomethasone、氢化可的松、可的松)、胰岛素、提高细胞内cAMP的水平的化合物(例如，双丁酰-cAMP；8-CPT-cAMP(8-(4)硫代氯苯基)-腺苷、3’,5’环单磷酸盐)；8-溴基-cAMP；二辛酰基-cAMP；forskolin)和/或抑制

cAMP降解的化合物(例如,磷酸二酯酶抑制剂如异丁基甲基黄嘌呤(IBMX)、甲基异丁基黄嘌呤、茶碱、咖啡因、吲哚美辛)的培养基中,其也可被诱导向脂肪形成。

[0212] 脂肪形成的标志是多个胞浆内脂囊泡的发育,其使用亲脂性染色油红O可以容易地观察到。脂肪酶和/或脂肪酸结合蛋白基因的表达,可通过已经开始分化成脂肪细胞的胎盘干细胞中的RT/PCR来证实。当细胞显示一种或多种这些特征时,胎盘干细胞被认为已经分化成脂肪细胞。

[0213] 5.5.3诱导分化成软骨细胞

[0214] 胎盘干细胞的软骨形成分化可以例如,通过把胎盘干细胞置于诱导分化成软骨细胞的细胞培养条件中来实现。一种优选的软骨细胞培养基包括添加15%脐带血血清的MSCGM(Cambrex)或DMEM。在一实施方案中,胎盘干细胞等分到无菌的聚丙烯管中,离心(例如,150×g 5分钟),在不完全的软骨形成培养基(Cambrex)中洗涤两次。细胞以大约1-20×10^5细胞/ml的浓度,重悬于包含0.01μg/ml TGFβ-3的完全软骨形成培养基中。在其它的实施方案中,胎盘干细胞在有或没有抗坏血酸的情况下,与外源生长因子,例如,GDF-5或转化生长因子β3(TGF-β3)接触。软骨形成培养基可以添加包括脯氨酸和谷氨酰胺的氨基酸、丙酮酸钠、地塞米松、抗坏血酸、和胰岛素/铁传递蛋白/硒。软骨形成培养基可以添加氢氧化钠和/或胶原质。胎盘干细胞可以在高或低密度下培养。细胞优选在缺乏血清时培养。

[0215] 软骨形成可以通过例如,观察嗜酸性基质的产生,用于氨基多糖表达的番红精-O染色;苏木精/伊红染色、评估细胞形态、和/或胶原质2和胶原质9基因表达的RT/PCR确认来进行评估。软骨形成也可以通过使干细胞生长在例如,通过轻轻离心悬浮液中的干细胞(例如,以大约800g大约5分钟)所形成的沉淀中来进行观察。大约1-28天以后,干细胞沉淀开始形成韧性基体,而且显示出在非诱导的或非软骨形成的细胞系中没有发现的结构的完整性,当被攻击时,这些细胞系的沉淀趋向瓦解。软骨形成也可以,例如在这种细胞沉淀中,通过用能染色胶原质的染剂,例如天狼猩红,和/或能染色氨基多糖(GAGs)的染剂,例如阿利新蓝进行染色来证明。当细胞显示一种或多种这些特征时,胎盘干细胞被认为已经分化成软骨细胞。

[0216] 5.5.4诱导分化成骨细胞

[0217] 胎盘干细胞的成骨分化可通过例如把胎盘干细胞置于诱导分化成为骨细胞的细胞培养条件下来完成。一种优选的骨细胞培养基包括添加15%脐带血血清的MSCGM(Cambrex)或DMEM,接着是成骨诱导培养基(Cambrex),其包含0.1μM地塞米松、0.05mM抗坏血酸-2-磷酸盐、10mMβ甘油磷酸盐。在另一实施方案中,胎盘干细胞在包含大约10^{-7}到大约10^{-9}M地塞米松、大约10-50μM抗坏血酸磷酸盐(例如,抗坏血酸-2-磷酸盐)和大约10nM到大约10mMβ-甘油磷酸盐的培养基(例如,DMEM-低葡萄糖)中培养。成骨培养基还可以包括血清,一种或多种抗生素/抗霉菌剂,转化生长因子-β(例如,TGF-β1)和/或骨形态蛋白(例如,BMP-2、BMP-4,或其组合)。

[0218] 分化可以使用钙特异性染色,例如von Kossa染色,和例如碱性磷酸酶、骨钙蛋白、骨唾液蛋白和/或骨桥蛋白基因表达的RT/PCR检测来进行分析。当该细胞显示一种或多种这些特性时,胎盘干细胞被认为已经分化成为骨细胞。

[0219] 5.5.5诱导分化成胰腺细胞

[0220] 胎盘干细胞分化成产胰岛素的胰腺细胞可通过例如把胎盘干细胞置于诱导分化

成胰腺细胞的细胞培养条件下来实现。

[0221] 胰腺生成培养基的例子包括DMEM/20％CBS，其添加有10ng/ml碱性成纤维细胞生长因子；和2ng/ml转化生长因子β-1。该培养基与来自巢蛋白阳性的神经元细胞培养物的条件培养基以50/50v/v组合。Knockout血清替代品可作为CBS的替代品。细胞培养14-28天，每3-4天重新培养。

[0222] 分化可通过分析例如，胰岛素蛋白的产生或通过RT/PCR确定的胰岛素基因的表达来证实。当该细胞显示一种或多种这些特性时，胎盘干细胞被认为已经分化成胰腺细胞。

[0223] 5.5.6诱导分化成心脏细胞

[0224] 胎盘干细胞的生肌(心源性)分化可通过例如把胎盘干细胞置于诱导分化成心肌细胞的细胞培养条件下来实现。一种优选的心肌细胞培养基包括DMEM/20％CBS，其添加有1μM维甲酸；10ng/ml的碱性成纤维细胞生长因子；和2ng/ml的转化生长因子β-1；和100ng/ml的表皮生长因子。KnockOut血清替代品(Invitrogen，Carlsbad，California)可作为CBS的替代品。可选择地，胎盘干细胞培养在添加有50ng/ml心调理素-1的DMEM/20％CBS中培养24小时。在另一实施方案中，胎盘干细胞可以在无蛋白培养基中培养5-7天，然后用例如通过在添加有1％脐带血血清的1％HEPES缓冲液中均质人心肌生产的人心肌提取物进行刺激。

[0225] 分化可通过证明心肌肌动蛋白基因表达，例如，通过RT/PCR，或通过细胞的可见搏动来证实。当该细胞显示一种或多种这些特性时，胎盘干细胞被认为已经分化成心脏细胞。

[0226] 5.6胎盘干细胞的保藏

[0227] 胎盘干细胞可以进行保藏，也即，将其置于允许长期储存的条件下，或抑制由例如凋亡或坏死导致的细胞死亡的条件下。

[0228] 胎盘干细胞可以使用例如，包含凋亡抑制剂、坏死抑制剂和/或含氧的全氟化碳的组合物来保藏，如2005年12月25日提交的，题目为“Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Prgans”的相关美国临时申请号60/754,969中所述。在一实施方案中，本发明提供了一种保藏干细胞群的方法，包括使所述干细胞群与含有凋亡抑制剂和含氧全氟化碳的干细胞收集组合物接触，相较于没有与凋亡抑制剂接触的干细胞群而言，其中所述的凋亡抑制剂以足以降低或预防干细胞群中的凋亡的量和时间存在。在特定的实施方案中，所述凋亡抑制剂是半胱氨酸蛋白酶抑制剂。在另一特定的实施方案中，所述凋亡抑制剂是JNK抑制剂。在更特定的实施方案中，所述JNK抑制剂不调节所述干细胞的分化或增殖。在另一实施方案中，所述干细胞收集组合物包括呈分离相的所述凋亡抑制剂和所述含氧全氟化碳。在另一实施方案中，所述干细胞收集组合物包括溶于乳液中的所述凋亡抑制剂和的所述含氧全氟化碳。在另一实施方案中，干细胞收集组合物另外包括乳化剂，例如，卵磷脂。在另一实施方案中，在接触干细胞时，所述凋亡抑制剂和所述全氟化碳为大约0℃到大约25℃。在另一个更特定的实施方案中，在接触干细胞时，所述凋亡抑制剂和所述全氟化碳为大约2℃到10℃，或大约2℃到大约5℃。在另一个更特定的实施方案中，所述接触在转运所述干细胞群期间进行。在另一个更特定的实施方案中，所述接触在冻融所述干细胞群期间进行。

[0229] 在另一实施方案中，本发明提供了一种保藏胎盘干细胞群的方法，包括使所述干细胞群与含有凋亡抑制剂和保藏器官的化合物接触，相较于没有与凋亡抑制剂接触的干细胞群而言，其中所述的凋亡抑制剂以足以降低或预防干细胞群中的凋亡的量和时间存在。

在特定的实施方案中，保藏器官的化合物是UW溶液(描述于美国专利号4,798,824中；亦称ViaSpan；也参见Southard等，Transplantation 49(2):251-257(1990))，或Stern等的美国专利5,552,267中描述的溶液。在另一实施方案中，所述保藏器官的化合物是羟乙基淀粉、乳糖酸、棉子糖或其组合。在另一实施方案中，所述干细胞收集组合物另外包括呈两相或乳液状的含氧全氟化碳。

[0230] 在该方法的另一实施方案中，在灌注期间，使胎盘干细胞与干细胞收集组合物接触，该组合物包含凋亡抑制剂和含氧全氟化碳，保藏器官的化合物，或其组合。在另一实施方案中，在组织裂解例如酶消化过程期间，使其与所述干细胞接触。在另一实施方案中，在通过灌注收集以后，或通过组织裂解例如酶消化收集以后，使胎盘干细胞与所述干细胞收集化合物接触。

[0231] 一般，在胎盘细胞收集、富集和分离期间，优选将由于低氧和机械应力而产生的细胞应激最小化或消除。因此，在该方法的另一实施方案中，在所述保藏过程中，在收集、富集或分离期间，干细胞或干细胞群暴露于低氧条件小于6小时，其中低氧条件是氧浓度低于正常的血氧浓度。在更特定的实施方案中，在所述保藏过程中，所述干细胞群暴露于所述低氧条件小于2小时。在另一个更特定的实施方案中，收集、富集或分离期间，所述干细胞群暴露于所述低氧条件小于1小时，或小于30分钟，或不暴露于低氧条件。在另一特定的实施方案中，收集、富集或分离期间，所述干细胞群不暴露于剪切应力下。

[0232] 本发明的胎盘干细胞可以冷冻保藏，例如，在小容器例如安瓿瓶中的冷冻保藏培养基中。适合的冷冻保藏培养基包括但不限于培养基，包括例如生长培养基或细胞冷冻培养基，例如商业可获得的细胞冷冻培养基，如C2695、C2639或C6039(Sigma)。冷冻保藏培养基优选包含DMSO(二甲亚砜)，浓度为例如大约10％(v/v)。冷冻保藏培养基可包括另外的试剂，例如，甲基纤维素和/或甘油。胎盘干细胞优选在冷冻保藏期间以大约1℃/min冷却。优选的冷冻保藏温度为大约-80℃到大约-180℃，优选大约-125℃到大约-140℃。解冻使用之前，冷冻保藏的细胞可以转入到液氮中。在一些实施方案中，例如，一旦安瓿瓶已经达到约-90℃，则它们转入到液氮储存区域。冷冻保藏也可以使用控制速率的冷冻机来进行。冷冻保藏的细胞优选在大约25℃到大约40℃，优选大约37℃的温度下解冻。

[0233] 5.7胎盘干细胞的应用

[0234] 5.7.1胎盘干细胞群

[0235] 胎盘干细胞群可用于治疗任何可以通过给药干细胞群来进行治疗的疾病、紊乱或病症。如这里使用的，“治疗”包括疾病、紊乱或病症，或其任何参数或症状的治愈、修复、改善、减轻严重程度、或减少其时间过程。

[0236] 胎盘干细胞和胎盘干细胞群，可以在体内或体外诱导分化成特定细胞类型，以制备用于施用给需要干细胞或从干细胞分化的细胞的个体。例如，胎盘干细胞可以注射到受损的器官中，用于体内器官再生和损伤的修复。这种损伤可能是由于这些病症和紊乱造成的，其包括但不限于，心肌梗死、癫痫发作、多发性硬化、中风、低血压、心脏骤停、局部缺血、炎症、甲状腺炎、年龄相关的认知功能丧失、辐射损伤、脑性瘫痪、神经变性疾病、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、Leigh病、爱滋病、痴呆、记忆丧失、肌萎缩性侧索硬化、肌营养不良、缺血性肾病、脑或脊髓损伤、心肺分流、青光眼、视网膜局部缺血或视网膜损伤。

[0237] 胎盘干细胞可用于治疗自身免疫病疾如幼年糖尿病、狼疮、肌营养不良、类风湿性

关节炎等等。

[0238] 在特定的实施方案中，分离的胎盘干细胞群可用于自体的或异源的酶代替治疗，以治疗特定的疾病或病症，包括但不限于，溶酶体贮积症、如泰-萨二氏病(Tay-Sachs)、尼曼-皮克病(Niemann-Pick)、Fabry's、Gaucher's病症(例如葡糖脑苷酯酶缺乏)、Hunter's和Hurler's综合症、Maroteaux-Lamy综合症、岩藻糖苷症(岩藻糖苷酶缺乏)、Batten疾病(CLN3)、以及其它的神经节苷脂病、粘多糖累积病和糖原累积病。

[0239] 单独或与干或祖细胞群组合的分离的胎盘干细胞群，可以单独使用，或在基因治疗中用作自体的或异源转基因载体，用于矫正先天性代谢缺陷、囊性纤维化、脑白质营养不良(例如，辅酶A连接酶缺乏)、异染性脑白质营养不良(芳基硫酸酯酶A缺乏)(例如，有症状的或症状发生前的晚期幼儿或幼年型)、球样细胞性脑白质营养不良(Krabbe's症；半乳糖脑苷脂酶缺乏)、酸性脂肪酶缺乏(Wolman症)、糖原贮积病、甲状腺机能减退、贫血(例如，再生障碍性贫血、镰刀形红细胞贫血病，等等)、皮尔森(Pearson)综合征、庞佩氏病(Pompe's)、苯丙酮酸尿症(PKU)、卟啉症、枫糖尿病、同型胱氨酸尿症、粘多糖沉积症、慢性肉芽肿病和酪氨酸血症以及泰-萨二氏病、或用于治疗癌症(例如、血液恶性肿瘤)、肿瘤或其它的病理学病症。胎盘干细胞可用于治疗骨骼发育异常。在一实施方案中，可将经转化以表达组织纤溶酶原激活物(tPA)的胎盘干细胞施用给个体以治疗血栓。

[0240] 在其它的实施方案中，分离的胎盘干细胞群可用于自体的或异源的组织再生或替代治疗或方案，包括但不限于，治疗角膜上皮细胞缺陷、治疗成骨不全、软骨修复、面部皮肤磨削术、粘膜、鼓膜、肠衬里、神经学结构(例如，视网膜、基底膜中的听觉神经元、嗅上皮中的嗅觉神经元)，对皮肤的创伤性损伤的灼伤和伤口修复，或用于其它的损伤或患病器官或组织的重构。

[0241] 在优选的实施方案中，分离的胎盘干细胞群用于个体中的造血重建，其中该个体患有部分或全部造血干细胞丧失，例如，暴露于致命的或亚致命的放射剂量(无论工业的、医学的或军事的)的个体；在治疗例如血液学恶性肿瘤中，作为例如癌症治疗的一部分，等等已经进行了骨髓消融的个体。胎盘干细胞可用于患有贫血(例如，再生障碍性贫血、镰刀形红细胞贫血病，等等)的个体中的造血再生。优选地，胎盘干细胞与造血干细胞群一起施用给这种个体。分离的胎盘来源的干细胞群可用于代替或补充骨髓或来源于骨髓的干细胞群。一般，每千克患者体重灌输大约1×10^8到2×10^8骨髓单核细胞用于骨髓移植中的植入(也即，大约70ml骨髓用于70kg供体)。为了获得70ml，在捐赠过程中导致大强度的捐赠和供体血液的显著损失。在不同的实施方案中，用于造血再生的分离的胎盘干细胞群可包括，大约、至少、或至多1×10^5、5×10^5、1×10^6、5×10^6、1×10^7、5×10^7、1×10^8、5×10^9、1×10^9、5×10^9、1×10^{10}、5×10^{10}、1×10^{11}或更多胎盘干细胞。

[0242] 因此，在一实施方案中，胎盘干细胞可用于治疗患有血液癌症，如淋巴瘤、白血病(如慢性或急性髓性白血病、急性淋巴细胞性白血病、Hodgkin's症等等)、脊髓发育不良、脊髓发育不良综合征，等等的患者。在另一实施方案中，疾病、紊乱或病症是慢性肉芽肿病。

[0243] 由于造血再生可用于治疗贫血，本发明进一步包括用本发明的干细胞组合来治疗个体，其中个体患有贫血或血色素紊乱。贫血或紊乱可以是天生的(例如，由遗传或疾病引起的)，或可以是人工诱导的(例如，由意外或故意的毒害、化疗，等等引起的)。在另一实施方案中，疾病或紊乱是骨髓故障综合征(例如，再生障碍性贫血、Kostmann综合征、Diamond-

Blackfan贫血、无巨核细胞性血小板减少，等等)、骨髓紊乱或造血系统疾病或紊乱。

[0244] 胎盘干细胞还可以用于治疗严重联合免疫缺陷病，包括但不限于，联合免疫缺陷病(例如，Wiskott-Aldrich综合症、严重的DiGeorge综合征，等等)。

[0245] 本发明的胎盘干细胞，单独或与其它的干细胞或祖细胞群组合，可用于体内制造组织或器官。本发明的方法包括使用获自胎盘的细胞，例如，干细胞或祖细胞，用于接种基质，和在允许细胞分化和在基质中繁殖的合适条件下培养。通过本发明获得的组织和器官可用于各种目的，包括研究和治疗目的。

[0246] 在本发明的优选的实施方案中，胎盘干细胞和胎盘干细胞群可用于自体和外源性移植，其包括匹配和不匹配HLA类型造血移植。在使用胎盘干细胞作为外源造血移植的实施方案中，对宿主进行处理以降低对供体细胞的免疫排斥，或产生免疫耐受性(参见，例如，美国专利号5,800,539和5,806,529)。在另一实施方案中，不对宿主进行降低免疫排斥或产生免疫耐受的处理。

[0247] 胎盘干细胞，单独或与一种或多种其它的干细胞群组合，可用于治疗性移植方案，例如，以增加或代替肝脏、胰腺、肾、肺、神经系统、肌肉系统、骨、骨髓、胸腺、脾、粘膜组织、生殖腺或毛发的干细胞或祖细胞。另外，胎盘干细胞可用于在其中一般使用祖细胞的治疗或研究方案中代替特定类型的祖细胞(例如，软骨细胞、肝细胞、造血细胞、胰腺实质细胞、成神经细胞、肌肉祖细胞，等等)。

[0248] 在一实施方案中，本发明提供了胎盘干细胞的应用，尤其是$CD200^+$胎盘干细胞，用作毛发代替治疗的辅助物。例如，在一实施方案中，胎盘干细胞，例如，$CD200^+$胎盘干细胞，在需要毛发生长或再生的位点皮下或皮内注射。注射的干细胞的数目可以是，例如，在大约0.1到大约1.0μL的体积中，每次注射大约100到大约10,000个，但是也可以使用较大或较小体积中的更多或更少的细胞。施用胎盘干细胞促进毛发再生可包括在需要毛发再生的区域单次或多次注射，例如，以定期或随机模式。已知的毛发再生治疗剂可与胎盘干细胞结合使用，例如，局部的米诺地尔。可使用胎盘干细胞治疗的毛发丧失可以是天生的(例如，男性型秃发)或诱导的(例如，源于有毒的化学制品的暴露)。

[0249] 本发明的胎盘干细胞和胎盘干细胞群可用于软骨、腱或韧带的增强、修复或替代。例如，在某些实施方案中，假体(例如，臀部假体)可以涂有由本发明的胎盘干细胞生成的替代软骨组织结构。在其它的实施方案中，关节(例如，膝盖)可以用由胎盘干细胞生成的软骨组织结构重建。软骨组织结构也可大量地用于不同关节类型的外科重建中(参见，例如，Resnick&Niwayama编，1988，Diagnosis of Bone and Joint Disorders，第2版，W.B.Saunders Co.)。

[0250] 本发明的胎盘干细胞可用于修复源于例如，损伤、代谢失调或疾病的组织和器官损害。损伤可以是，例如，来自外科手术例如整容外科的损伤。在这样的实施方案中，可以给患者施用胎盘干细胞，单独或联合其它的干细胞或祖细胞群，以再生或恢复由于疾病所损害的组织或器官。

[0251] 5.7.2包含胎盘干细胞的组合物

[0252] 本发明提供了包含胎盘干细胞，或由此而来的生物分子的组合物。本发明的胎盘干细胞可以联合任何生理学可接受的或医学可接受的化合物，组合物或装置，用于例如研究或治疗。

[0253] 5.7.2.1冷冻保藏的胎盘干细胞群

[0254] 本发明的胎盘干细胞群可以保藏，例如，冷冻保藏用于以后应用。冷冻保藏细胞如干细胞的方法，是本领域公知的。胎盘干细胞群可以易于施用给个体的形式制备。例如，本发明提供了包含在适于医学应用的容器内的胎盘干细胞群。这种容器可以是，例如，无菌的塑料袋、培养瓶、广口瓶、或胎盘干细胞群可以从其容易地分配的其它容器。例如，容器可以是血液袋或其它的塑料的、适于静脉内施用液体给接受者的医学可接受的袋。所述容器优选是允许冷冻保藏组合的干细胞群的容器。

[0255] 冷冻保藏的胎盘干细胞群可以包括来源于单个供体或多个供体的胎盘干细胞。胎盘干细胞群可以与预期的接受者完全地HLA匹配，或者部分或完全地HLA-不匹配。

[0256] 因此，在一实施方案中，本发明提供了包含在容器内的胎盘干细胞群的组合物。在特定的实施方案中，干细胞群是冷冻保藏的。在另一特定的实施方案中，容器是袋、培养瓶或广口瓶。在更特定的实施方案中，所述袋是无菌的塑料袋。在更特定的实施方案中，所述的袋适于、允许或便于所述胎盘干细胞群的静脉内施用。所述袋可以包括多个腔或间隔，其是互相连通的以允许胎盘干细胞，在施用之前或施用期间，与一种或多种其它的溶液，例如，药物混合。在另一特定的实施方案中，所述组合物包括一种或多种便于组合的干细胞群的冷冻保藏的化合物。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞群包含在生理学可接受的水溶液中。在更特定的实施方案中，所述生理学可接受的水溶液是0.9％NaCl溶液。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞群包括与所述干细胞群的接受者HLA匹配的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述组合干细胞群包括与所述干细胞群的接受者至少部分HLA不匹配的胎盘细胞。在另一特定的实施方案中，所述胎盘干细胞来源于许多供体。

[0257] 5.7.2.2药物组合物

[0258] 胎盘干细胞群，或包含胎盘干细胞的细胞群，可以制备成药物组合物用于体内应用。这种药物组合物在药学上可接受的载体中，例如用于体内施用的盐溶液或其它生理学可接受的溶液中，包含胎盘干细胞群或包含胎盘干细胞的细胞群。本发明的药物组合物可以包含本文中别处描述的任何胎盘干细胞群，或胎盘干细胞类型。药物组合物可以包含胎儿的、母亲的、或胎儿与母亲的胎盘干细胞。本发明的药物组合物可进一步包含获自单个个体或胎盘，或获自许多个体或胎盘的胎盘干细胞。

[0259] 本发明的药物组合物可包含任何数量的胎盘干细胞。例如，在不同的实施方案中，单个单位剂量的胎盘干细胞可包含，大约、至少、或至多1×10^5、5×10^5、1×10^6、5×10^6、1×10^7、5×10^7、1×10^8、5×10^8、1×10^9、5×10^9、1×10^{10}、5×10^{10}、1×10^{11}或更多个胎盘干细胞。

[0260] 本发明的药物组合物包括含有50％或更多有生存力的细胞的细胞群(也即，群体中至少50％的细胞是有功能的或活的)。优选地，群体中至少60％的细胞是有生存力的。更优选地，药物组合物中的群体中至少70％、80％、90％、95％或99％的细胞是有生存力的。

[0261] 本发明的药物组合物可包含一种或多种例如促进植入的化合物(例如，抗T细胞受体抗体、免疫抑制剂，等等)；稳定剂如白蛋白、右旋糖苷40、明胶、羟乙基淀粉，等等。

[0262] 在一实施方案中，当配制成可注射的溶液时，本发明的药物组合物包括大约1.25％HAS和大约2.5％的右旋糖苷。适于细胞产品施用的其它注射制剂也可以使用。

[0263] 在一实施方案中，本发明的组合物包括基本上或完全地非母亲来源的胎盘干细胞。例如，在一实施方案中，本发明提供了一种包括胎盘干细胞群的组合物，该胎盘干细胞

为$CD200^+$和$HLA\text{-}G^+$;$CD73^+$、$CD105^+$和$CD200^+$;$CD200^+$和$OCT\text{-}4^+$;$CD73^+$、$CD105^+$和$HLA\text{-}G^+$;$CD73^+$和$CD105^+$,而且当在允许形成拟胚体的条件下培养所述胎盘细胞群时,促进在包含所述胎盘干细胞群的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体;或为$OCT\text{-}4^+$,而且当在允许形成拟胚体的条件下培养所述胎盘细胞群时,促进在包含所述胎盘干细胞群的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体;或上述的组合,其中至少70%、80%、90%、95%或99%的所述胎盘干细胞是非母亲来源的。在特定的实施方案中,该组合物另外包括不是获自胎盘的干细胞。

[0264] 5.7.2.3胎盘干细胞条件培养基

[0265] 本发明的胎盘干细胞可用于生产条件培养基,也即包含由干细胞分泌或排出的一种或多种生物分子的培养基。在不同的实施方案中,条件培养基包括其中胎盘干细胞已经生长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或更多天的培养基。在其它的实施方案中,条件培养基包括其中胎盘干细胞已经生长到至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%汇合,或直到100%汇合的培养基。这种条件培养基可用于支持独立的胎盘干细胞群,或另一种类型的干细胞的培养。在另一实施方案中,条件培养基包括其中胎盘干细胞已经分化成为成熟细胞类型的培养基。在另一实施方案中,本发明的条件培养基包括其中已经培养胎盘干细胞和非胎盘干细胞的培养基。

[0266] 5.7.2.4包含胎盘干细胞的基质

[0267] 本发明进一步包括含有胎盘干细胞或胎盘干细胞群的基质、水凝胶、支架,等等。

[0268] 本发明的胎盘干细胞可以接种至天然基质,例如,胎盘生物材料如羊膜材料中。这种羊膜材料可以是,例如,直接从哺乳动物胎盘解剖的羊膜;固定的或热处理过的羊膜、基本上干燥(也即,<20%H_2O)的羊膜、绒毛膜、基本上干燥的绒毛膜、基本上干燥的羊膜和绒毛膜,等等。其上可接种胎盘干细胞的优选胎盘生物材料描述于Hariri,美国申请公开号2004/0048796中。

[0269] 本发明的胎盘干细胞可以悬浮在适于例如注射的水凝胶溶液中。用于这种组合物的适合的水凝胶包括自我组装的肽,如RAD16。在一实施方案中,包括细胞的水凝胶溶液可以允许例如在模子中凝固,以形成用于移植的具有细胞分散其中的基质。也可以培养这种基质中的胎盘干细胞,以便移植之前细胞进行有丝分裂扩增。水凝胶是,例如,有机聚合物(天然的或合成),其经过共价、离子或氢键交联以产生能捕获水分子而形成凝胶的三维开放式网格结构。形成水凝胶的材料包括:聚糖如藻酸酯和其盐、肽、聚磷腈和离子交联的聚丙烯酸酯,或嵌段聚合物如分别通过温度或pH交联的聚环氧乙烷-聚丙二醇乙二醇嵌段共聚物。在一些实施方案中,本发明的水凝胶或基质是可生物降解的。

[0270] 在本发明的一些实施方案中,制剂包括原位聚合凝胶(参见,例如,美国专利申请公开号2002/0022676;Anseth等,J.Control Release,78(1-3):199-209(2002);Wang et ah,Biomaterials,24(22):3969-80(2003)。

[0271] 在一些实施方案中,聚合物至少部分可溶于水溶液,如水、缓冲盐溶液、或具有带电侧链基团或其一价离子盐的含水酒精溶液。具有可与阳离子反应的酸性侧链基团的聚合物的例子是聚磷腈、聚丙烯酸、聚甲基丙酸烯酸、丙烯酸与甲基丙烯酸的共聚物、聚醋酸乙烯酯,和磺酸酯聚合物如磺酸酯聚苯乙烯。由丙烯酸或甲基丙烯酸与乙烯醚单体或聚合物反应形成的具有酸性侧链基团的共聚物也可以使用。酸性基团的例子是羧基、磺酸基、卤化(优选氟化)醇基、苯酚OH基和酸性OH基。

[0272] 本发明的胎盘干细胞或其共培养物，可以接种到三维骨架或支架上，并植入体内。这种骨架可以与任何一种或多种生长因子、细胞、药物或刺激组织形成或者增强或提高本发明的实施的其它组分联合植入。

[0273] 可用于本发明的支架的例子包括非织毡、多孔泡沫或自我组装的肽。可以使用由羟基乙酸和乳酸(例如，PGA/PLA)的合成吸收共聚物组成的纤维来形成非织毡(VICRYL，Ethicon，Inc.，Somerville，NJ.)。由例如聚(ε-己内酯)/聚(羟基乙酸)(PCL/PGA)共聚物组成的，通过如冷冻干燥或冷冻真空干燥法处理形成(参见，例如，美国专利6,355,699)的泡沫，也可以用作支架。

[0274] 本发明的胎盘干细胞也可以接种到生理学可接受的陶瓷材料上，或与其接触，其包括但不限于，单、二、三、α-三、β-三、和四磷酸钙、羟基磷灰石、氟代磷灰石、硫酸钙、氟化钙、氧化钙、碳酸钙、磷酸钙镁、生物学活化的玻璃如BIOGLASS®，及其混合物。目前商业可获得的多孔生物相容的陶瓷材料包括SURGIBONE®(CanMedica Corp.，Canada)、ENDOBON®(Merck Biomaterial France，France)、CEROS®(Mathys，AG3Bettlach，Switzerland)，和矿化的胶原质骨移植产品如HEALOS™(DePuy，Inc.，Raynham，MA)和VITOSS®、RHAKOSS™以及CORTOSS®(Orthovita，Malvern，Pa.)。支架可以是天然和/或合成材料的混合物、掺合物或复合物。

[0275] 在另一实施方案中，胎盘干细胞可以接种到毡上或与其接触，其可以例如由多纤丝纱组成，多纤丝纱由生物吸收材料如PGA、PLA、PCL共聚物或掺合物，或透明质酸制成。

[0276] 在另一实施方案中，本发明的胎盘干细胞，可以接种到可以是复合结构的泡沫支架上。这种泡沫支架可以铸模成有用的形状，如待修复、替代或增加的机体内特定结构的一部分。在一些实施方案中，在接种本发明的细胞之前，该支架用例如0.1M乙酸处理，接着在聚赖氨酸、PBS和/或胶原质中孵育，以便增强细胞附着。可以修饰基质的外表面以提高细胞的附着或生长和组织分化，例如通过血浆涂层基质，或添加一种或多种蛋白质(例如，胶原质、弹性纤维、网状纤维)、糖蛋白、氨基多糖(例如，硫酸肝素、软骨素-4-硫酸盐、软骨素-6-硫酸盐、硫酸皮肤素、硫酸角蛋白，等等)、细胞基质、和/或其它的材料例如但不限于，明胶、藻酸盐、琼脂、琼脂糖、和植物树胶，等等来实现。

[0277] 在一些实施方案中，所述支架包括使其不引起凝血的材料，或用该材料对其进行处理。这些处理和材料还可促进和支持内皮生长、迁移和细胞外基质沉积。这些材料和处理的例子包括但不限于天然材料如基底膜蛋白如层粘连蛋白和IV型胶原质，合成材料如EPTFE，和片段化的聚亚胺酯尿素硅树脂，如PURSPAN™(The Polymer Technology Group，Inc.，Berkeley，Calif.)。所述支架还可以包括抗血栓形成的试剂如肝素；还可以在用胎盘干细胞接种之前，对所述支架进行处理以改变表面电荷(例如涂上血浆)。

[0278] 5.7.3永生化胎盘干细胞系

[0279] 哺乳动物胎盘细胞可以通过用包含生长促进基因的任何适合载体转染而有条件地永生化，生长促进基因也即编码在合适的条件下促进转染细胞生长的蛋白的基因，由此生长促进蛋白的生产和/或活性可由外界因素调控。在优选的实施方案中，生长促进基因是致癌基因如，但不限于，v-myc、N-myc、c-myc、p53、SV40大T抗原、多瘤大T抗原、E1a腺病毒或人乳头瘤病毒的E7蛋白。

[0280] 生长促进蛋白的外部调节可通过把生长促进基因置于外部调控启动子的控制下而实现，例如，其活性可通过如改变转染细胞的温度或与细胞接触的培养基的组成来调控的启动子。在一实施方案中，可以应用四环素(tet)调控基因表达系统(参见，Gossen等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:5547-5551,1992;Hoshimaru等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:1518-1523,1996)。在缺乏tet的情况下，该载体内的tet调控的反式激活因子(tTA)强烈激活从ph_{CMV*-1}的转录，其是一种来自与tet操纵子序列融合的人巨细胞病毒的最小启动子。tTA是大肠杆菌转座子-10来源的tet抗性操纵子的抑制物(tetR)与单纯疱疹病毒的VP16的酸性结构域的融合蛋白。低无毒浓度的tet(例如，0.01-1.0μg/mL)几乎完全消除了tTA的反式激活。

[0281] 在一实施方案中，所述载体进一步包含编码选择标记，例如提供耐药性的蛋白的基因。细菌新霉素抗性基因(neo^R)是一种可用于本发明的这种标记。携带neo^R的细胞可通过本领域普通技术人员已知的方法筛选，如添加例如100-200μg/mL G418到生长培养基中。

[0282] 可通过本领域普通技术人员已知的各种方法进行转染，其包括但不限于，逆转录病毒感染。通常，细胞培养物可通过用从载体的生产细胞系中收集的条件培养基和包含N2添加物的DMEM/F12的混合物来孵育而进行转染。例如，如上所述制备的胎盘细胞培养物，可以在例如体外5天以后，通过在一倍体积的条件培养基和两倍体积的包含N2添加物的DMEM/F12中孵育大约20小时来进行感染。携带选择标记的转染细胞然后如上所述进行选择。

[0283] 转染以后，培养物传代到容许增殖的表面上，例如，允许至少30％的细胞在24小时内倍增。优选地，所述基质是聚鸟氨酸/层粘连蛋白基质，其由涂有聚鸟氨酸(10μg/mL)和/或层粘连蛋白(10μg/mL)的组织培养塑料组成，聚赖氨酸/层粘连蛋白基质或用纤粘连蛋白处理的表面。然后每3-4天为培养物提供生长培养基，其可以添加或不添加一种或多种增殖增强因子。当培养物小于50％汇合时，增殖增强因子可以添加到生长培养基中。

[0284] 当80-95％汇合时，有条件地永生化的胎盘干细胞系可以使用标准技术，如通过胰蛋白酶消化进行传代。在一些实施方案中，直至大约第二十次传代，保持选择是有益的(通过，例如，添加G418到包含新霉素抗性基因的细胞)。细胞也可以冷冻在液氮中用于长期贮存。

[0285] 可以从如上所述制备的有条件地永生化的人胎盘干细胞系中分离纯系细胞系。通常，可使用标准技术，如通过有限次稀释或使用克隆环，来分离这种纯系细胞系并进行扩增。纯系细胞系一般可如上所述来培养和传代。

[0286] 有条件地永生化的人胎盘干细胞系(可以但是不必是纯系的)一般可通过在促进分化的培养条件下，通过抑制生长促进蛋白的生产和/或活性进行诱导分化。例如，如果编码生长促进蛋白的基因处于外部调控启动子的控制下，可以改变条件，例如，温度或培养基的组成，以抑制生长促进基因的转录。对于上述讨论的四环素调控基因表达系统，可通过添加四环素以抑制生长促进基因的转录而实现分化。通常，使用1μg/mL四环素4-5天足以起始分化。为了促进进一步地分化，另外的试剂可以包含在生长培养基中。

[0287] 5.7.4分析

[0288] 本发明的胎盘干细胞可在分析中使用，以确定和不暴露于这些条件的干细胞相比，培养条件、环境因素、分子(例如，生物分子、小的无机分子等)等等对干细胞的增殖、扩增和/或分化的影响。

[0289] 在优选的实施方案中，分析本发明的胎盘干细胞在与分子接触后，在增殖、扩增或分化方面的改变。在一实施方案中，例如，本发明提供了一种鉴定调节大量胎盘干细胞增殖的化合物的方法，包括使所述大量的干细胞与所述化合物在允许增殖的条件下接触，其中相较于未与所述化合物接触的大量干细胞而言，如果所述化合物导致所述大量的干细胞在增殖方面出现可检测的改变，则所述化合物被鉴定为能调节胎盘干细胞增殖的化合物。在特定的实施方案中，所述化合物被鉴定为增殖抑制剂。在另一特定的实施方案中，所述化合物被鉴定为增殖增强剂。

[0290] 在另一实施方案中，本发明提供了一种鉴定调节大量胎盘干细胞扩增的化合物的方法，包括使所述大量干细胞与所述化合物在允许扩增的条件下接触，其中相较于未与所述化合物接触的大量干细胞而言，如果所述化合物导致所述大量干细胞在扩增方面出现可检测的改变，则所述化合物被鉴定为能调节胎盘干细胞扩增的化合物。在特定的实施方案中，所述化合物被鉴定为扩增抑制剂。在另一特定的实施方案中，所述化合物被鉴定为扩增增强剂。

[0291] 在另一实施方案中，本发明提供了一种鉴定调节胎盘干细胞分化的化合物的方法，包括使所述干细胞与所述化合物在允许分化的条件下接触，其中相较于未与所述化合物接触的干细胞而言，如果所述化合物导致所述干细胞在分化方面出现可检测的改变，则所述化合物被鉴定为能调节胎盘干细胞分化的化合物。在特定的实施方案中，所述化合物被鉴定为分化抑制剂。在另一特定的实施方案中，所述化合物被鉴定为分化增强剂。

6.实施例

[0292] 6.1实施例1：胎盘干细胞的培养

[0293] 通过灌注或者通过物理裂解例如酶消化，从分娩后的哺乳动物胎盘中获得胎盘干细胞。细胞培养于包括60％DMEM-LG(Gibco)、40％MCDB-201(Sigma)、2％胎牛血清(FCS)(Hyclone Laboratories)、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(Sigma)、10^{-4}M抗坏血酸2-磷酸盐(Sigma)、10ng/ml的表皮生长因子(EGF)(R&D Systems)、10ng/ml的血小板来源的生长因子(PDGF-BB)(R&D Systems)和100U青霉素/1000U链霉素的培养基中。

[0294] 细胞培养于其中的培养瓶按如下制备。通过加入包含5ng/ml人FN(Sigma F0895)的5ml PBS至培养瓶中，T75培养瓶用纤粘连蛋白(FN)涂层。盛有FN溶液的培养瓶在37℃放置30min。然后在细胞培养之前，除去FN溶液。处理之后无需干燥培养瓶。可选择地，使培养瓶与FN溶液4℃接触过夜或更长时间；培养之前，加热培养瓶，并除去FN溶液。

[0295] 通过灌注分离的胎盘干细胞

[0296] 来自胎盘灌注液的胎盘干细胞的培养物按如下建立。来自Ficoll梯度的细胞，以15ml培养基中50-100×10^6细胞/培养瓶的量接种到如同上述制备的FN涂层的T75培养瓶中。一般地，接种5到10培养瓶。培养瓶在37℃孵育12-18小时，以允许附着细胞的粘附。添加10ml热PBS到每个培养瓶中，以移出悬浮中的细胞，并轻轻地混合。然后除去15ml培养基，并用15ml新鲜培养基置换。开始培养以后3-4天更换所有的培养基。随后进行培养基更换，其间除去50％或7.5ml培养基。

[0297] 在大约第12天开始，在显微镜下检查培养物以检验附着细胞集落的生长。当细胞

培养物成为大约80％汇合时，一般在开始培养以后第13天到18天，通过胰蛋白酶消化来收获附着细胞。从这些原代培养物中收获的细胞被称为0(零)代。

[0298] 通过物理裂解和酶消化分离的胎盘干细胞

[0299] 按如下方法，从消化的胎盘组织中建立胎盘干细胞培养物。灌注的胎盘置于无菌纸片上，同时母亲侧向上。用刀片刮掉胎盘母亲侧上大约0.5cm的表层，该刀片用于切取测量为大约1×2×1cm的胎盘组织块。然后把该胎盘组织切碎成大约1mm^{3}块。把这些块收集到50ml Falcon管中，并于37℃水浴中用胶原酶IA(2mg/ml，Sigma)消化30分钟，接着用胰蛋白酶-EDTA(0.25％，GIBCO BRL)消化10分钟。得到的溶液于室温400g离心10分钟，并除去消化溶液。沉淀用PBS重悬到大约10倍体积(例如，5ml沉淀用45ml PBS重悬)，并将管置于室温400g离心10分钟。组织/细胞沉淀在130mL培养基中重悬，并将细胞以13ml每纤粘连蛋白涂层的T-75培养瓶的量进行接种。细胞在37℃、含5％CO_2的湿润大气下培养。在此阶段，胎盘干细胞可选择地进行冷冻保藏。

[0300] 胎盘干细胞的继代培养和扩增

[0301] 冷冻保藏的细胞在37℃水浴中迅速地解冻。用10ml热培养基立即从冷冻管中移出胎盘干细胞，并转入15ml无菌管中。细胞在室温下400g离心10分钟。细胞通过移液轻轻地重悬于10ml热培养基中，并通过台盼蓝排除法来确定活细胞计数。细胞然后以每cm^{2}大约6000-7000细胞的量接种至如同上述制备的FN涂层的培养瓶中(每T-75培养瓶大约5×10^{5}细胞)。细胞在37℃、5％CO_2和90％湿度下培养。当细胞达到75-85％汇合时，从培养瓶中无菌地移出所有用过的培养基，并丢弃。添加3ml 0.25％胰蛋白酶/EDTA(w/v)溶液以覆盖细胞层，而且细胞在37℃、5％CO_2和90％湿度下培养5分钟。轻拍培养瓶一或两次，以加快细胞解附。一旦>95％的细胞呈圆形并解附时，添加7ml热培养基到每个T-75培养瓶中，并通过数次吹吸使溶液分散到细胞层表面。

[0302] 在如同上述细胞计数和确定活力以后，细胞在室温下1000RPM离心5分钟。通过用培养基轻轻地重悬来自1个T-75培养瓶的细胞沉淀，并平均地把细胞置于两个FN涂层的T-75培养瓶中，来进行细胞传代。

[0303] 使用上述方法，鉴定表达标记CD105、CD33、CD73、CD29、CD44、CD10和CD90的示例性附着胎盘干细胞群。这些细胞群一般不表达CD34、CD45、CD117或CD133。一些，而不是这些胎盘干细胞的全部培养物，表达HLA-ABC和/或HLA-DR。

[0304] 6.2实施例2:从胎盘结构中分离胎盘干细胞

[0305] 6.2.1材料&方法

[0306] 6.2.1.1包含胎盘干细胞的胎盘细胞群的分离

[0307] 从正常的、足月怀孕的胎盘中获得独特的胎盘细胞群。所有供体就将其胎盘用于研究目的提供了完全的书面同意。胎盘干细胞获自下列来源:(1)胎盘灌注液(来自胎盘脉管系统的灌注);和酶消化的(2)羊膜、(3)绒毛膜、(4)羊膜-绒毛膜片和(5)脐带。在无菌的PBS(Gibco Invitrogen Corporation，Carlsbad，CA)中清洁各种胎盘组织，并将它们置于独立的培养皿中。使用无菌的外科手术解剖刀切碎各种组织，并置于50mL Falcon锥形管中。切碎的组织用1×胶原酶(Sigma-Aldrich，St.Louis，MO)于37℃水浴中消化20分钟，离心，然后用0.25％胰蛋白酶-EDTA(Gibco-Invitrogen Corp)于37℃水浴中消化10分钟。消化以后离心各种组织，并用无菌的PBS(Gibco-Invitrogen Corp)漂洗一次。重构的细胞然

后过滤两次，一次使用100μm细胞过滤器，一次用30μm分离过滤器，以除去任何残余的胞外基质或细胞碎屑。

[0308] 6.2.1.2细胞活力评估和细胞计数

[0309] 消化后，使用人工台盼蓝排除法计算细胞数和评估细胞活力。细胞与台盼蓝染料(Sigma-Aldrich)以1:1的比例混合，而且细胞在血球计数器中读数。

[0310] 6.2.1.3细胞表面标记表征

[0311] 选择HLA ABC$^-$/CD45$^-$/CD34$^-$/CD133$^+$的细胞用于表征。通过Becton-Dickinson流式细胞仪、FACSCalibur和FACS Aria(Becton-Dickinson,San Jose,CA,USA)中的两个来鉴定、定量和表征具有该表型的细胞。以每1百万细胞大约10μL抗体的比例，在振荡器中于室温下对各种胎盘细胞染色30分钟。使用下列抗人抗体:异硫氰酸荧光素(FITC)偶联的抗HLA-G单克隆抗体(Serotec,Raleigh,NC)、抗CD10单克隆抗体(BD Immunocytometry Systems,San Jose,CA)、抗CD44单克隆抗体(BD Biosciences Pharmingen,San Jose,CA)和抗CD105单克隆抗体(R&D Systems Inc.,Minneapolis,MN);藻红蛋白(PE)偶联的抗CD44、CD200、CD117和CD13的单克隆抗体(BD Biosciences Pharmingen);藻红蛋白-Cy5(PE Cy5)偶联的链霉亲和素和抗CD117的单克隆抗体(BD Biosciences Pharmingen);藻红蛋白-Cy7(PE Cy7)偶联的抗CD33和CD10的单克隆抗体(BD Biosciences);别藻蓝蛋白(APC)偶联的链霉亲和素和抗CD38的单克隆抗体(BD Biosciences Pharmingen);以及生物素化的CD90(BD Biosciences Pharmingen)。培养以后，细胞漂洗一次以除去未结合的抗体，并用4％多聚甲醛(USB,Cleveland,OH)4℃固定过夜。随后的一天，将细胞漂洗两次，通过30μm分离过滤器进行过滤，并在流式细胞仪上操作。

[0312] 用抗小鼠IgG抗体(BD Biosciences Pharmingen)染色的样本，作为阴性对照，并用于调节光电倍增管(PMT)。用抗人抗体单染色的样本作为阳性对照，并用于调节光谱重叠/补偿。

[0313] 6.2.1.4细胞分选和培养

[0314] 在进行任何培养之前，将一组胎盘细胞(来自灌注液、羊膜或绒毛膜)，用7-氨基-放线菌素D(7AAD;BD Biosciences Pharmingen)和对具有感兴趣的表型具有特异性的单克隆抗体进行染色。以每1百万细胞10μL抗体的比例来染色细胞，并在振荡器中于室温下孵育30分钟。然后在BD FACS Aria上对这些细胞进行选择表达感兴趣的表型的活细胞的阳性分选，并将其在培养物中铺板。对分选的(感兴趣的群)和“全部”(未分选的)胎盘细胞群铺板，用于比较。细胞以表1中所列的细胞密度(细胞/cm^2)，铺板于纤粘连蛋白(Sigma-Aldrich)涂层的96孔板中。细胞密度以及细胞类型是否以两次重复或三次重复进行铺板取决于表达感兴趣的表型的细胞数目。

[0315] 表1:细胞铺板密度

[0316]

96孔板培养
铺板细胞密度

[0317]

条件	分选	所有	全部最大密度
细胞来源	灌注液		
组#1	40.6K/cm^2	40.6K/cm^2	93.8K/cm^2
组#2	40.6K/cm^2	40.6K/cm^2	93.8K/cm^2
组#3	40.6K/cm^2	40.6K/cm^2	93.8K/cm^2
细胞来源	羊膜		
组#1	6.3K/cm^2	6.3K/cm^2	62.5K/cm^2
组#2	6.3K/cm^2	6.3K/cm^2	62.5K/cm^2
细胞来源	绒毛膜		
组#1	6.3K/cm^2	6.3K/cm^2	62.5K/cm^2
组#2	6.3K/cm^2	6.3K/cm^2	62.5K/cm^2

[0318] 将完全培养基(60％DMEM-LG(Gibco)和40％MCDB-201(Sigma)；2％胎牛血清(Hyclone Labs.)；1×胰岛素-转铁蛋白-硒(ITS)；1×亚油酸-牛血清白蛋白(LA-BSA)；10^{-9}M地塞米松(Sigma)；10^{-4}M抗坏血酸2-磷酸盐(Sigma)；10ng/mL表皮生长因子(R&D Systems)；和10ng/mL血小板衍生生长因子(PDGF-BB)(R&D Systems))，添加到96孔板的每个孔中，并把平板置于5％CO_2/37℃孵育箱中。在第7天，添加100μL完全培养基到每个孔中。对96孔板监控大约两周，并在第12天进行培养物的最终评估。这在胎盘干细胞培养中是非常早期的，并指定为0代细胞。

[0319] 6.2.1.5数据分析

[0320] FACSCalibur数据使用标准选通技术在Flow Jo(Tree star,Inc)上进行分析。BD FACS Aria数据使用FACSDiva软件(Becton-Dickinson)进行分析。FACS Aria数据使用双联体辨别选通技术以将双联体最小化，以及使用标准选通技术进行分析。把全部结果编辑到Microsoft Excel中，而且这里所有的值都表示为平均值±标准偏差(数字，平均数标准误差)。

[0321] 6.2.2结果

[0322] 6.2.2.1细胞活力

[0323] 使用人工的台盼蓝排除法确定消化后的活力(图1)。获自大部分消化组织(来自羊膜、绒毛膜或羊膜-绒毛膜板)的细胞的平均活力为70％左右。羊膜的平均活力为74.35％±10.31％(n＝6,SEM＝4.21)，绒毛膜的平均活力为78.18％±12.65％(n＝4,SEM＝6.32)，羊膜-绒毛膜板的平均活力为69.05％±10.80％(n＝4,SEM＝5.40)，脐带的平均活力为63.30％±20.13％(n＝4,SEM＝10.06)。来自没有进行消化的灌注的细胞，保留最高的平均活力，89.98±6.39％(n＝5,SEM＝2.86)。

[0324] 6.2.2.2细胞定量

[0325] 对胎盘细胞和脐带细胞群进行分析，以确定HLA ABC$^-$/CD45$^-$/CD34$^-$/CD133$^+$细胞的数目。从BD FACSCalibur数据分析，观察到羊膜、灌注液和绒毛膜包含最大总数的这些细胞，分别为30.72±21.80细胞(n＝4,SEM＝10.90)、26.92±22.56细胞(n＝3,SEM＝13.02)和18.39±6.44细胞(n＝2,SEM＝4.55)(数据未显示)。羊膜-绒毛膜板和脐带包含最小总数

的表达感兴趣的表型的细胞，分别为4.72±4.16细胞(n=3,SEM=2.40)和3.94±2.58细胞(n=3,SEM=1.49)(数据未显示)。

[0326] 类似地，当分析表达感兴趣的表型的总细胞百分数时，观察到羊膜和胎盘灌注液包含最高百分比的表达该表型的细胞(分别为0.0319%±0.0202%(n=4,SEM=0.0101)和0.0269%±0.0226%(n=3,SEM=0.0130))(图2)。虽然脐带包含少量表达感兴趣的表型的细胞(图2)，但是它包含第三高百分比的表达感兴趣的表型的细胞，0.020±0.0226%(n=3,SEM=0.0131)(图2)。绒毛膜和羊膜-绒毛膜板包含最低百分比的表达感兴趣的表型的细胞，分别为0.0184±0.0064%(n=2,SEM=0.0046)和0.0177±0.0173%(n=3,SEM=0.010)(图2)。

[0327] 与BD FACSCalibur分析的结果一致，BD FACS Aria数据也确定羊膜、灌注液和绒毛膜为能比剩余的来源提供更高数量的HLA ABC$^-$/CD45$^-$/CD34$^-$/CD133$^+$细胞。羊膜、灌注液和绒毛膜中表达感兴趣的表型的细胞的平均总数分别为126.47±55.61细胞(n=15,SEM=14.36)、81.65±34.64细胞(n=20,SEM=7.75)和51.47±32.41细胞(n=15,SEM=8.37)(数据未显示)。羊膜-绒毛膜板和脐带包含最少总数的表达感兴趣的表型的细胞，分别为44.89±37.43细胞(n=9,SEM=12.48)和11.00±4.03细胞(n=9,SEM=1.34)(数据未显示)。

[0328] BD FACS Aria数据显示，灌注液和羊膜产生最高百分比的HLA ABC$^-$/CD45$^-$/CD34$^-$/CD133$^+$细胞，分别为0.1523±0.0227%(n=15,SEM=0.0059)和0.0929±0.0419%(n=20,SEM=0.0094)(图3)。羊膜-绒毛膜板包含第三高百分比的表达感兴趣的表型的细胞，0.0632±0.0333%(n=9,SEM=0.0111)(图3)。绒毛膜和脐带包含最低百分比的表达感兴趣的表型的细胞，分别为0.0623+±0.0249%(n=15,SEM=0.0064)和0.0457±0.0055%(n=9,SEM=0.0018)(图3)。

[0329] 从每种细胞来源鉴定和定量HLA ABC$^-$/CD45$^-$/CD34$^-$/CD133$^+$细胞后，对细胞进行进一步分析和表征它们的细胞表面标记HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200和CD105的表达。

[0330] 6.2.2.3胎盘灌注液来源的细胞

[0331] 灌注液来源的细胞都是HLA-G、CD33、CD117、CD10、CD44、CD200、CD90、CD38、CD105和CD13阳性的(图4)。灌注液来源的细胞对每种标记的平均表达如下：37.15%±38.55%(n=4,SEM=19.28)的细胞表达HLA-G;36.37%±21.98%(n=7,SEM=8.31)的细胞表达CD33;39.39%±39.91%(n=4,SEM=19.96)的细胞表达CD117;54.97%±33.08%(n=4,SEM=16.54)的细胞表达CD10;36.79%±11.42%(n=4,SEM=5.71)的细胞表达CD44;41.83%±19.42%(n=3,SEM=11.21)的细胞表达CD200;74.25%±26.74%(n=3,SEM=15.44)的细胞表达CD90;35.10%±23.10%(n=3,SEM=13.34)的细胞表达CD38;22.87%±6.87%(n=3,SEM=3.97)的细胞表达CD105;和25.49%±9.84%(n=3,SEM=5.68)的细胞表达CD13。

[0332] 6.2.2.4羊膜来源的细胞

[0333] 羊膜来源的细胞都是HLA-G、CD33、CD117、CD10、CD44、CD200、CD90、CD38、CD105和CD13阳性的(图5)。羊膜来源的细胞对每种标记的平均表达如下：57.27%±41.11%(n=3,SEM=23.73)的细胞表达HLA-G;16.23%±15.81%(n=6,SEM=6.46)的细胞表达CD33;

62.32%±37.89%(n=3,SEM=21.87)的细胞表达CD117;9.71%±13.73%(n=3,SEM=7.92)的细胞表达CD10;27.03%±22.65%(n=3,SEM=13.08)的细胞表达CD44;6.42%±0.88%(n=2,SEM=0.62)的细胞表达CD200;57.61%±22.10%(n=2,SEM=15.63)的细胞表达CD90;63.76%±4.40%(n=2,SEM=3.11)的细胞表达CD38;20.27%±5.88%(n=2,SEM=4.16)的细胞表达CD105;和54.37%±13.29%(n=2,SEM=9.40)的细胞表达CD13。

[0334] 6.2.2.5绒毛膜来源的细胞

[0335] 绒毛膜来源的细胞都是HLA-G、CD117、CD10、CD44、CD200、CD90、CD38和CD13阳性的,而CD33和CD105的表达各异(图6)。绒毛膜细胞对每种标记的平均表达如下:53.25%±32.87%(n=3,SEM=18.98)的细胞表达HLA-G;15.44%±11.17%(n=6,SEM=4.56)的细胞表达CD33;70.76%±11.87%(n=3,SEM=6.86)的细胞表达CD117;35.84%±25.96%(n=3,SEM=14.99)的细胞表达CD10;28.76%±6.09%(n=3,SEM=3.52)的细胞表达CD44;29.20%±9.47%(n=2,SEM=6.70)的细胞表达CD200;54.88%±0.17%(n=2,SEM=0.12)的细胞表达CD90;68.63%±44.37%(n=2,SEM=31.37)的细胞表达CD38;23.81%±33.67%(n=2,SEM=23.81)的细胞表达CD105;和53.16%±62.70%(n=2,SEM=44.34)的细胞表达CD13。

[0336] 6.2.2.6羊膜-绒毛膜板来源的细胞

[0337] 来自羊膜-绒毛膜板的细胞都是HLA-G、CD33、CD117、CD10、CD44、CD200、CD90、CD38、CD105和CD13阳性的(图7)。羊膜-绒毛膜板来源的细胞对每种标记的平均表达如下:78.52%±13.13%(n=2,SEM=9.29)的细胞表达HLA-G;38.33%±15.74%(n=5,SEM=7.04)的细胞表达CD33;69.56%±26.41%(n=2,SEM=18.67)的细胞表达CD117;42.44%±53.12%(n=2,SEM=37.56)的细胞表达CD10;32.47%±31.78%(n=2,SEM=22.47)的细胞表达CD44;5.56%(n=1)的细胞表达CD200;83.33%(n=1)的细胞表达CD90;83.52%(n=1)的细胞表达CD38;7.25%(n=1)的细胞表达CD105;和81.16%(n=1)的细胞表达CD13。

[0338] 6.2.2.7脐带来源的细胞

[0339] 脐带来源的细胞都是HLA-G、CD33、CD90、CD38、CD105和CD13阳性的,而CD117、CD10、CD44和CD200的表达各异(图8)。脐带来源的细胞对每种标记的平均表达如下:62.50%±53.03%(n=2,SEM=37.50)的细胞表达HLA-G;25.67%±11.28%(n=5,SEM=5.04)的细胞表达CD33;44.45%±62.85%(n=2,SEM=44.45)的细胞表达CD117;8.33%±11.79%(n=2,SEM=8.33)的细胞表达CD10;21.43%±30.30%(n=2,SEM=21.43)的细胞表达CD44;0.0%(n=1)的细胞表达CD200;81.25%(n=1)的细胞表达CD90;64.29%(n=1)的细胞表达CD38;6.25%(n=1)的细胞表达CD105;和50.0%(n=1)的细胞表达CD13。

[0340] 表9中显示了所有标记表达平均值的总结。

[0341] 6.2.2.8BD FACS Aria分选报告

[0342] 对表达最大百分比的HLA ABC、CD45、CD34和CD133的3个不同胎盘细胞群(来源于灌注液、羊膜和绒毛膜的细胞),用7AAD和这些标记的抗体进行染色。对3个群进行选择表达感兴趣的表型的活细胞的阳性分选。BD FACS Aria分选的结果列于表2中。

[0343] 表2:

[0344]

BD FACS Aria 分选报告			
细胞来源	处理的事件	分选的事件(感兴趣的表型)	总数的百分比%

[0345]

灌注液	135540110	51215	0.037786
羊膜	7385933	4019	0.054414
绒毛膜	108498122	4016	0.003701

[0346] 3个不同的阳性分选的细胞群(“分选的”),和它们对应的未分选的细胞进行铺板,并在第12天评估培养结果(表3)。分选的灌注液来源的细胞,以40,600/cm^2的细胞密度铺板,产生小的、圆形的、非粘附细胞。3组未分选的灌注液来源的细胞中的两组,每组以40,600/cm^2的细胞密度铺板,主要产生小的、圆形的、非粘附细胞,同时几个粘附细胞位于孔周边的附近。未分选的灌注液来源的细胞,以93,800/cm^2的细胞密度铺板,主要产生小的、圆形的、非粘附细胞,同时几个粘附细胞位于孔周边的附近。

[0347] 分选的羊膜来源的细胞,以6,300/cm^2的细胞密度铺板,产生小的、圆形的、非粘附细胞。未分选的的羊膜来源的细胞,以6,300/cm^2的细胞密度铺板,产生小的、圆形的、非粘附细胞。未分选的羊膜来源的细胞,以62,500/cm^2的细胞密度铺板,产生小的、圆形的、非粘附细胞。

[0348] 分选的绒毛膜来源的细胞,以6,300/cm^2的细胞密度铺板,产生小的、圆形的、非粘附细胞。未分选的的绒毛膜来源的细胞,以6,300/cm^2的细胞密度铺板,产生小的、圆形的、非粘附细胞。未分选的绒毛膜来源的细胞,以62,500/cm^2的细胞密度铺板,产生小的、圆形的、非粘附细胞。

[0349] 进行上述的相关实验之后,进一步培养胎盘干细胞,确定了标记CD117和CD133的抗体(其中链霉亲和素偶联的抗体用生物素偶联的藻红蛋白(PE)标记)产生了足以类似阳性读数的显著背景。该背景起初导致胎盘干细胞被认为是两种标记都阳性的。当使用不同的标记,APC或PerCP时,降低了背景,而且胎盘干细胞被正确地确定为是CD117和CD133都阴性的。

[0350] 6.3实施例3:胎盘干细胞和脐带干细胞的表征

[0351] 该实施例证明了胎盘干细胞的示例性细胞表面标记分布图。

[0352] 培养基中通过酶消化获得的胎盘干细胞或脐带干细胞,通过加入2mL2%FBS-PBS并以400g离心5分钟洗涤一次。丢弃上清液,沉淀重悬于100-200μL 2%FBS-PBS中。通过添加100μl 2%FBS-PBS到每个管中,添加1满滴(大约60μl)BD™CompBeads阴性对照和1滴BD™CompBeads抗小鼠珠子到每个管中,并旋涡振荡,利用BD™CompBeads(目录号#552843)来制备4个管。添加下列抗体到BD™CompBeads的4个管中:

[0353]

管号	抗体	目录号#	克隆	体积μL
1	CD105 FITC	FAB10971F	166707	10
2	CD200 PE	552475	MRC-OX-104	20

[0354]

3	CD10 PE-Cy7	341102	HI10a	5
4	CD34 APC	340667	8G12	5

[0355] 对照管如下制备：

[0356]

管号	抗体	目录号#	克隆	体积μL
1	未染色	-	-	-
2	IgG FITC/IgG PE//IgG APC	555787, 555786, 550931	G18-145	10ea

[0357] 添加下列抗体到样品管中：

[0358]

抗体	目录号#	克隆	体积μL
CD105FITC	FAB10971F	166707	10
CD200PE	552475	MRC-OX-104	20
CD10PE-Cy7	341102	HI10a	5
CD34APC	340667	8G12	5

[0359] 对照和样品管在黑暗中于室温下孵育30分钟。孵育以后，通过添加2mL 2%FBS-PBS并以400g离心5分钟来洗涤。丢弃上清液，沉淀重悬于100-200μL 2%FBS-PBS中，并在流式细胞仪上获得。根据该方法使用所有其它的抗体。

[0360] 匹配的来自羊膜的胎盘干细胞和脐带干细胞，使用荧光标记的抗体和流式细胞仪进行分析，以确定细胞表面标记的存在或缺乏。分析的标记包括CD105(增殖相关的内皮特异性标记)；CD200(与调节功能相关的标记)；CD34(内皮细胞和造血干细胞上表达)；CD10(干细胞/前体细胞标记)；细胞角蛋白K(上皮细胞标记)；CD44(细胞迁移、淋巴细胞归巢、造血)；CD45(世系标记)；CD133(造血祖细胞的标记)；CD117(干细胞因子(c-Kit))；CD90(在正常骨髓、脐带血和胎儿肝细胞中的原始造血干细胞中表达)；HLA ABC(pan MHC I、抗原呈递、免疫原性)；β-2-微小球蛋白(与MHC I、抗原呈递、免疫原性相关)；HLA DR、DQ、DP(pan MHC II、抗原呈递、免疫原性)；和CD80/86(抗原呈递的共刺激分子)。

[0361] 流式细胞仪结果表明，对于测试的胎盘干细胞，93.83%的细胞是$CD105^+$，90.76%的细胞是$CD200^+$，和86.93%的细胞是$CD105^+$和$CD200^+$。99.97%的细胞是$CD10^+$，99.15%的细胞是$CD34^-$，和99.13%的细胞是$CD10^+$和$CD34^-$。98.71%的细胞是细胞角蛋白阳性的，99.95%的细胞是$CD44^+$，和98.71%的细胞是细胞角蛋白和CD44阳性的。99.51%的细胞是$CD45^-$，99.78%的细胞是CD133阴性的，和99.39%的细胞是CD45和CD133阴性的。99.31%的细胞是CD90阳性的，99.7%是CD117阴性的，和99.01%是CD90阳性和CD117阴性的。95.7%的细胞是CD80和CD86均为阴性的。

[0362] 脐带干细胞的流式细胞仪结果表明，95.95%的细胞是$CD200^+$，94.71%是$CD105^+$，和92.69%是$CD105^+$和$CD200^+$。99.93%的细胞是$CD10^+$，99.99%的细胞是$CD34^-$，和99.6%的细胞是$CD10^+$和$CD34^-$。99.45%的细胞是细胞角蛋白阳性的，99.78%的细胞是$CD44^+$，和99.3%的细胞是细胞角蛋白和CD44阳性的。99.33%的细胞是$CD45^-$，99.74%是$CD133^-$，和99.15%的细胞是$CD45^-$和$CD133^-$。99.84%的细胞是$CD117^-$，98.78%的细胞是$CD90^+$，和

98.64%的细胞是$CD90^+$和$CD117^-$。

[0363] 一个表型($CD200^+$、$CD105^+$、$CD10^+$、$CD34^-$)在多种这样的分析中表现一致。该表型还是CD90、CD44、HLA ABC(弱)、β-2-微小球蛋白(弱)和细胞角蛋白K阳性的，而且是HLA DR、DQ、DP、CD117，CD133和CD45阴性的。

[0364] 6.4实施例4：胎盘干细胞中醛脱氢酶活性的测定

[0365] 醛脱氢酶(ALDH)活性水平，一种干细胞植入能力的潜在标记，使用来自Stem Cell Technologies,Inc.的ALDEFLUOR®分析试剂盒来测定。一般，更原始的、未分化的干细胞显示出低于分化程度更高的干细胞的ALDH活性。

[0366] 分析使用ALDEFLUOR®，一种荧光ALDH底物(Aldagen,Inc.,Durham,North Carolina)。按照制造商的方案进行。干燥的ALDEFLUOR®试剂以稳定的、非活性的形式提供。通过把干燥的化合物溶解在二甲亚砜(DMSO)中，并添加2N HCl来活化ALDEFLUOR®，并立即添加到细胞中。通过用ALDEFLUOR®加上DEAB，一种ALDH的特异性抑制剂来梳理细胞，建立对照管。

[0367] 分析的细胞包括4个脐带干细胞系和来自羊膜-绒毛膜板的3个胎盘干细胞系、1个骨髓来源的间充质干细胞系(BM-MSC)、1个脂肪来源的干细胞系(ADSC)、1个人绒毛状的滋养层细胞系(HVT)，和从脐带血纯化的$CD34^+$干细胞。

[0368] 分析如下进行。用ALDEFLUOR®分析试剂盒提供的分析缓冲液把样品浓度调节到1×10^6细胞/ml。添加1mL调节的细胞悬液到每个测试的细胞系的实验管和对照管中，另外添加5μl DEAB到标记作为对照的对照管中。

[0369] 通过添加25μl DMSO到干燥的ALDEFLUOR®试剂中来活化ALDEFLUOR底物，并允许于室温保持1分钟。添加25μl 2N HCL，并较好地混合。该混合物于室温下孵育15分钟。添加360μl ALDEFLUOR®分析缓冲液到小管中，并混合。得到的混合物在使用过程中于2-8℃储存。

[0370] 每1毫升样本添加5μl活化的ALDEFLUOR®试剂到实验管中，并立即把0.5ml这种混合物转移到对照管中。每个细胞系的实验管和对照管于37℃孵育30分钟。孵育以后，管以400×g离心，并弃去上清液。得到的沉淀中的细胞重悬于0.5ml分析缓冲液中，并通过流式细胞仪进行分析。数据使用FLOWJO™软件(Tree Star,Ashland,Oregon)分析。在FLOWJO™工作区建立SSC对FSC和SSC对FL1图表。打开每个样品的对照和实验数据文件，并根据对照样品确定合适的门。阳性细胞计算为计数事件总数的ALDEFLUOR®阳性百分数。

[0371] 胎盘干细胞系显示出ALDH活性为大约3%到大约25%(3.53%、8.76%和25.26%)。脐带干细胞系显示出ALDH活性为大约16%到大约20%(16.59%、17.01%、18.44%和19.83%)。相反，BM-MSC和HVT分别呈ALDH阴性和1.5%的ALDH活性，但是脂肪来源的MSC接近30%$ALDH^+$。从脐带血纯化的阳性对照$CD34^+$细胞，正如所料，是ALDH高度阳性的(75%)。

[0372] 6.5实施例5：通过闭环灌注收集胎盘干细胞

[0373] 该实施例证实了一种通过灌注收集胎盘干细胞的方法。

[0374] 出生后24小时内获得分娩后的胎盘。用脐带夹在位于胎盘的大约3到4英寸处把脐带夹紧，并在夹子上面切割脐带。脐带可以丢弃，或可以进行处理以回收，例如脐带干细胞，

和/或加工脐带膜用于生产生物材料。从胎盘中切掉多余的羊膜和绒毛膜，留下胎盘边缘周围的大约1/4英寸。丢弃裁下的材料。

[0375] 从胎盘膜边缘开始，用手指进行钝器解剖使绒毛膜与羊膜分离。当羊膜完全与绒毛膜分开时，用剪刀在脐带基部周围剪下羊膜，并与胎盘分离。羊膜可以丢弃，或处理，例如，通过酶消化获得干细胞，或生产例如羊膜生物材料。

[0376] 使用消毒纱布清理掉剩余胎盘物质的胎儿侧的全部可见血块和残余血液，然后通过用碘药签而不是醇药签擦净，来进行消毒。然后在脐带夹下面用无菌的止血钳交叉地夹紧脐带，旋转止血钳，把脐带拉过夹子以产生折叠。然后在止血钳下面部分切割脐带，以暴露夹子支撑的脐带的横截面。可选择地，脐带也可以用无菌的止血钳夹紧。然后把脐带置于消毒纱布上，并用止血钳夹住以提供张力。然后在止血钳下面直接横向切割脐带，在接近脉管的脐带边缘再夹紧。

[0377] 如上所述暴露的脉管，通常是一条静脉和两条动脉，被确定并按照如下打开。推进闭合的弹簧夹通过每个脉管的切头，小心不要使夹子刺穿血管壁。当夹子的顶端稍微高于脐带基部时，停止插入。然后稍微打开夹子，并慢慢地退出脉管以扩张脉管。

[0378] 连接到灌注设备或螺形压缩泵的塑料管，然后被插入到每条胎盘动脉中。连接到250毫升收集袋的塑料管，被插入到胎盘静脉中。管被捆好放置。

[0379] 小体积的无菌注射级的0.9％NaCl溶液用于检查泄漏。如果不存在泄漏，增加泵速，大约750mL的注射级0.9％NaCl溶液被泵入通过胎盘脉管系统。可通过从外缘到脐带轻轻地按摩胎盘，来帮助灌注。当收集袋装满时，从连接管与袋的连接器移出袋，并将一个新的袋与管连接。

[0380] 当收集完成时，对收集袋称重，并平衡用于离心。离心以后，在不破坏细胞沉淀的情况下，每个袋内部放入血浆提取器。然后移出袋内的上清液并丢弃。然后轻轻地按摩袋，以在剩余的上清液中重悬细胞。使用无菌的1mL注射器，通过采样点接头从收集袋取出大约300-500μL细胞，并转入1.5mL离心管中。测定剩余灌注液的重量和体积，并添加1/3体积的羟乙基淀粉到灌注液中，充分混合。测定每mL的细胞数目。使用血浆提取器，从灌注液中除去红细胞。

[0381] 然后立即培养胎盘细胞以分离胎盘干细胞，或冷冻保藏用于以后使用。

[0382] 6.6实施例6:胎盘干细胞的分化

[0383] 6.6.1诱导分化成神经元

[0384] 胎盘干细胞的神经元分化也可以如下进行:

[0385] 1.胎盘干细胞在由DMEM/20％FBS和1mMβ-巯基乙醇组成的预诱导培养基中生长24小时。

[0386] 2.除去预诱导培养基，并用PBS洗涤细胞。

[0387] 3.添加由DMEM和1-10mMβ巯基乙醇组成的神经元诱导培养基到细胞中。可选择地，可以使用由DMEM/2％DMSO/200μM丁基羟基苯甲醚组成的诱导培养基。

[0388] 4.在某些实施方案中，暴露于无血清培养基和β巯基乙醇以后60分钟可出现形态学和分子改变。RT/PCR可用于确定例如，神经生长因子受体和神经丝重链基因的表达。

[0389] 6.6.2诱导分化成脂肪细胞

[0390] 在50-70％汇合时，来源于羊膜的酶消化的几种胎盘干细胞培养物，在包括(1)含

有2%FCS、0.5%氢化可的松、0.5mM异丁基甲基黄嘌呤(IBMX)、60μM吲哚氯甲酰的DMEM/MCDB-201;或(2)含有2%FCS和0.5%亚油酸的DMEM/MCDB-201的培养基中诱导。检验细胞的形态变化;3-7天以后,油滴出现。也可通过定量实时PCR检验与脂肪生成相关的特异性基因,也即,PPAR-γ2、aP-2、脂蛋白脂肪酶和骨桥蛋白的表达,来确定分化。胎盘干细胞的两种培养物,显示脂肪细胞特异性基因的表达分别增加6.5倍和24.3倍。4种其它的培养物,显示脂肪生成诱导以后,PPAR-γ2的表达适度增加(1.5-2.0倍)。

[0391] 在另一个实验中,获自灌注液的胎盘干细胞培养于含有2%FCS的DMEM/MCDB-201(鸡成纤维细胞基础培养基)中。细胞胰蛋白酶化并离心。细胞重悬于脂肪诱导培养基(AIM)1或2中。AIM1包括用于人间充质干细胞的MesenCult基础培养基(StemCell Technologies),并添加了间充质干细胞脂肪形成的添加物(StemCell Technologies)。AIM2包括含有2%FCS和LA-BSA(1%)的DMEM/MCDB-201。大约1.25×10^5胎盘干细胞生长在T-25培养瓶中的5mL AIM1或AIM2。细胞在孵育箱中培养7-21天。细胞在细胞质中发育油滴泡,如通过油-红染色证实的,其表明干细胞分化成脂肪细胞。

[0392] 胎盘干细胞的脂肪形成分化也可以如下实行:

[0393] 1.胎盘干细胞生长在添加有15%脐带血血清的MSCGM(Cambrex)或DMEM中。

[0394] 2.使用3个循环的诱导/保持。每个循环组成如下:给胎盘干细胞提供脂肪生成诱导培养基(Cambrex)和培养细胞3天(37℃,5%CO_2),接着在脂肪生成保持培养基(Cambrex)中培养1-3天。可使用的替代的诱导培养基包含1μM地塞米松、0.2mM吲哚氯甲酰、0.01mg/ml胰岛素、0.5mM IBMX、DMEM-高葡萄糖、FBS和抗生素。

[0395] 3.3个诱导/保持全循环以后,细胞在脂肪生成保持培养基中培养另外的7天,每2-3天更换培养基。

[0396] 4.脂肪生成的标志是发育了多个胞质内的脂囊泡,其使用亲脂性染色油红O可以容易地观察到。在已经开始分化成脂肪细胞的胎盘干细胞中,可通过RT/PCR证实脂肪酶和/或脂肪酸结合蛋白基因的表达。

[0397] 6.6.3诱导分化成骨细胞

[0398] 用185mL Cambrex分化基础培养基-成骨和SingleQuots(每个都有地塞米松、L-谷氨酰胺、抗坏血酸、青霉素/链霉素、MCGS5和β-甘油磷酸盐)来制备成骨培养基。对来自灌注液的胎盘干细胞以每cm^2组织培养面积0.2-0.3mL MSCGM中以每cm^2组织培养表面面积大约3×10^3细胞的密度进行铺板。一般地,在MSCGM中5%CO_2,37℃下4-24小时后,所有细胞都附着于培养表面。通过用成骨分化培养基代替该培养基来诱导成骨分化。细胞形态开始变化,从附着的胎盘干细胞的典型梭状形态变为立方形的形态,并伴有矿化。一些细胞在分化期间,从组织培养表面分层。

[0399] 成骨分化还可以如下实行:

[0400] 1.胎盘干细胞的贴壁培养物在添加有15%脐带血血清的MSCGM(Cambrex)或DMEM中培养。

[0401] 2.培养物在组织培养瓶中培养24小时。

[0402] 3.通过用包含0.1μM地塞米松、0.05mM抗坏血酸-2-磷酸盐、10mMβ甘油磷酸盐的成骨诱导培养基(Cambrex)代替MSCGM,来诱导成骨分化。

[0403] 4.每3-4天为细胞提供成骨诱导培养基,持续2-3周。

[0404] 5.使用钙特异性染色和碱性磷酸酶与骨桥蛋白基因表达的RT/PCR,来分析分化。

[0405] 6.6.4诱导分化成胰腺细胞

[0406] 胰腺分化如下进行:

[0407] 1.胎盘干细胞培养在添加有10ng/ml的碱性成纤维细胞生长因子;和2ng/ml转化生长因子β-1的DMEM/20%CBS中。KnockOut血清替代品可用于代替CBS。

[0408] 2.以50/50浓度,添加来自巢蛋白阳性神经元细胞培养物的条件培养基到培养基中。

[0409] 3.细胞培养14-28天,每3-4天重新供给。

[0410] 4.通过分析胰岛素蛋白或通过RT/PCR分析胰岛素基因表达,对分化进行表征。

[0411] 6.6.5诱导分化成心脏细胞

[0412] 生肌(心源性)分化如下进行:

[0413] 1.胎盘干细胞培养在添加1μM的维甲酸;10ng/ml的碱性成纤维细胞生长因子;和2ng/ml的转化生长因子β-1;以及100ng/ml的表皮生长因子的DMEM/20%CBS中。KnockOut血清替代品(Invitrogen,Carlsbad,California)可用于代替CBS。

[0414] 2.可选择地,胎盘干细胞培养在添加有50ng/ml心调理素-1的DMEM/20%CBS中培养24小时。

[0415] 3.可选择地,胎盘干细胞在无蛋白培养基中保持5-7天,然后用人心肌提取物刺激(逐步升高剂量分析)。通过在添加有1%脐带血血清的1%HEPES缓冲液中均质1gm人心肌,来生产心肌提取物。混悬物孵育60分钟,然后离心并收集上清液。

[0416] 4.细胞培养10-14天,每3-4天重新供给。

[0417] 5.通过RT/PCR证明心肌肌动蛋白基因表达,来证实分化。

[0418] 6.6.6诱导分化成软骨细胞

[0419] 6.6.6.1一般方法

[0420] 胎盘干细胞的成软骨分化一般如下进行:

[0421] 1.胎盘干细胞保持在添加有15%脐带血血清的MSCGM(Cambrex)或DMEM中。

[0422] 2.胎盘干细胞等分到无菌的聚丙烯管中。离心细胞(150×g,5分钟),并在不完全的成软骨培养基(Cambrex)中洗涤两次。

[0423] 3.最后的洗涤以后,细胞以5×10^5细胞/ml的浓度重悬在包含0.01μg/ml TGF-β-3的完全成软骨培养基(Cambrex)中。

[0424] 4.0.5ml细胞等分到15ml聚丙烯培养管中。细胞以150×g沉淀5分钟。沉淀完整地保留在培养基中。

[0425] 5.松松盖上的管于37℃,5%CO_2下孵育24小时。

[0426] 6.每2-3天向细胞沉淀提供新制备的完全成软骨培养基。

[0427] 7.通过使用低速涡旋每天振荡使沉淀在培养基中保持悬浮。

[0428] 8.培养14-28天以后,收获成软骨细胞沉淀。

[0429] 9.通过例如观察嗜酸性基质的产生、评估细胞形态、和/或胶原蛋白2和/或胶原蛋白9基因表达的RT/PCR证实、和/或如通过阿利新蓝细胞化学染色证实的软骨基质酸性粘多糖的产生,来表征软骨形成。

[0430] 6.6.6.2胎盘和脐带干细胞分化成成软骨细胞

[0431] 该实施例证明了胎盘干细胞分化成成软骨细胞，并从这种细胞发育成软骨样组织。

[0432] 软骨是一种缺乏神经分布的无血管、无淋巴的组织。软骨具有低的软骨细胞密度(<5%)，但是这些细胞在保持它们周围的胞外基质中却惊人地有效。机体中存在的3种主要软骨类型为：(1)关节软骨，其促进关节中的关节润滑；(2)纤维软骨，其提供例如半月板和椎间盘中的减震；和(3)弹性软骨，其提供例如鼻和耳朵中的解剖结构。所有3种类型的软骨的生化结构是类似的。

[0433] 关节疼痛是残疾的一个主要原因，而且产生了整形外科领域中对缓解的未满足的需要。原发骨关节炎(其可引起关节退化)，和损伤是疼痛的两个常见原因。大约9%的美国人口患有髋或膝骨关节炎，而且每年进行超过2百万膝外科手术。令人遗憾地，目前的治疗更适合于治疗症状，而不是修复软骨。当成纤维细胞样细胞入侵该区域并用纤维组织填充它的时候，发生天然修复，然而纤维组织不像正常组织一样有弹性或有伸缩性，因此导致更多的损害。历史上的治疗方案包括组织嫁接、软骨下钻孔或全关节置换术。然而更新的治疗包括CARTICEL®，一种自身的软骨细胞注射；SYNVISC®和ORTHOVISC®，其是用于临时疼痛解除的透明质酸注射；和CHONDROGEN™，一种用于半月板修复的成人间充质干细胞注射。总之，趋势似乎是更倾向于涉及软骨细胞或干细胞的细胞治疗和/或组织工程产品。

[0434] 材料和方法

[0435] 命名为AC61665，P3(3代)和AC63919，P5的两个胎盘干细胞系，和命名为UC67249，P2和UC67477，p3的两个脐带干细胞系，被用于下面所述的研究。人间充质干细胞(MSC)作为阳性对照，骨肉瘤细胞系，MC3T3，和人真皮成纤维细胞(HDF)作为阴性对照。

[0436] 通过酶消化，从妊娠足月的人胎盘中分离和纯化胎盘和脐带干细胞。人MSC细胞和HDF细胞购自Cambrex，MC3T3细胞购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)。使用的所有细胞系在聚丙烯离心管中以800RPM离心5分钟成为沉淀，并生长于成软骨诱导培养基(Cambrex)和非诱导基础MSC培养基(Cambrex)中。收获沉淀，并于7、14、21和28天通过用阿利新蓝对氨基多糖(GAGs)染色，和/或用天狼猩红对胶原质染色来进行组织学研究。用免疫染色进一步确定胶原质类型。在7和14天进行软骨特异性基因的RNA分析。

[0437] 结果

[0438] 实验1:软骨形成研究用来实现3个主要目标:(1)证明胎盘和脐带干细胞可以分化和形成软骨组织；(2)证明胎盘和脐带干细胞可以功能上分化成软骨细胞；和(3)通过评估对照细胞系证实用干细胞获得的结果。

[0439] 对于目标1，在初步研究中，1个胎盘干细胞系以细胞沉淀的形式培养于成软骨诱导培养基，其有或没有终浓度为500ng/mL的骨形态发生蛋白(BMP)。每周对沉淀进行测定，用于证明软骨形成诱导，并进行4周。结果表明沉淀确实随时间而增大。然而，BMP^+和BMP^-样品之间没有观察到可见的差异。通过用阿利新蓝染色，对沉淀进行软骨组织的指示剂GAG的组织学研究。BMP^+细胞通常具有浅色液泡而显得更加具有代谢活性，但是BMP^-细胞较小，带有浓染色的细胞核和较少细胞质(反映低代谢活性)。7天后，BMP^+细胞被染成深蓝色，而BMP^-只有微弱的染色。通过28天的诱导，BMP^+和BMP^-具有大致相等的阿利新蓝染色。总的说来，细

胞密度随时间降低，而且基质超越沉淀。相反，当用阿利新蓝染色时，MC3T3阴性细胞系没有显示出任何GAG的存在。

[0440] 实验2：根据实验1的结果，设计更详细的研究用来评估两个胎盘干细胞系和两个脐带干细胞系的成软骨分化潜能。除了阿利新蓝组织学外，细胞也采用对II型胶原蛋白特异性的天狼猩红来染色。用或不用诱导培养基，对每个细胞系制备多个沉淀。

[0441] 首先通过对肉眼可见的软骨生成进行大致观察来评估沉淀的、培养的细胞系。总的说来，观察到干细胞系早在第1天就产生沉淀。这些沉淀随着时间生长，并形成韧性基质，出现白色的、发亮的和软骨样外观，而且变得机械坚韧。通过目测检查，来自胎盘干细胞或脐带干细胞的沉淀比MSC对照的要大得多。非诱导培养基中的对照沉淀在第11天开始崩解，而且在第28天比由成软骨诱导培养基中培养的细胞形成的沉淀要小得多。视觉上，由胎盘干细胞或脐带形成的沉淀之间没有差异。但是，在无地塞米松的培养基中起始的UC67249干细胞系形成较大的沉淀。阴性对照MC3T3细胞没有形成沉淀；然而，HDF的确形成了沉淀。

[0442] 然后对来自所有测试组的典型沉淀进行GAG和胶原蛋白的组织学分析。一般，由干细胞在诱导条件下形成的沉淀，比在非诱导条件下形成的沉淀要大得多，而且保持较好的完整性。在诱导条件下形成的沉淀早在7天时就显示产生GAG，且胶原蛋白含量随着时间增加，而在非诱导条件下形成的沉淀显示极少甚至没有胶原蛋白产生，如通过弱阿利新蓝染色证实的那样。一般，通过目测检查，胎盘干细胞和脐带干细胞显现产生比hMSC更坚韧、更大的沉淀，而且显示随着时间产生比hMSC更多的胶原蛋白。而且，随着研究过程，胶原蛋白看来似乎变粗，胶原蛋白类型显示发生变化，如通过偏振光纤维颜色的改变所证实的(颜色与纤维粗细相关，其可能是胶原蛋白类型的指示)的那样。相较于诱导干细胞，非诱导胎盘干细胞产生少得多的II型胶原蛋白(如果有的话)。在28天的时间内，细胞密度随着基质产物的增加而降低，这是软骨组织的一种特征。

[0443] 这些研究证实，胎盘和脐带干细胞可以沿着成软骨途径分化，而且可容易地被诱导形成软骨组织。最初的观察表明，这种干细胞优于MSC用于形成软骨组织。

[0444] 6.7实施例7：胎盘干细胞的悬滴培养

[0445] 培养中的胎盘附着干细胞于37℃进行胰蛋白酶化大约5分钟，并通过轻叩法从培养皿上松脱。添加10％FBS到培养物中终止胰蛋白酶消化。细胞稀释到大约5毫升培养基中每毫升大约1×10^4细胞。液滴(单滴或者来自多通道微量移液管的多滴)被置于100mL培养皿的盖子内部。将盖子小心地反转，并置于培养皿底的顶部，培养皿中包含大约25毫升无菌PBS，以保持培养皿大气中含水量。细胞生长6-7天。

[0446] 6.8实施例8：胎盘组织消化以获得胎盘干细胞

[0447] 该实施例说明了通过酶消化的大规模的胎盘干细胞的分离。

[0448] 获得大约10克胎盘组织(羊膜和绒毛膜)，浸软，并使用相等体积的胶原酶A(1mg/ml)(Sigma)和胰蛋白酶-EDTA(0.25％)(Gibco-BRL)，以大约30ml的总体积于37℃消化大约30分钟。通过消化释放的细胞用3×培养基洗涤，分配到4个T-225培养瓶中，并如实施例1中所述的进行培养。胎盘干细胞产量为每10g起始材料大约4×10^8到5×10^8细胞。在第3代时表征的细胞是显著的$CD10^+$、$CD90^+$、$CD105^+$、$CD200^+$、$CD34^-$和$CD45^-$。

[0449] 6.9实施例9：冷冻干细胞产物和干细胞库的生产

[0450] 该实施例证明了胎盘干细胞的分离和基于冷冻干细胞的产物的生产。

[0451] 概述:解剖胎盘组织并消化,接着进行原代和扩增培养以获得能产生许多细胞剂量的扩增细胞产物。细胞贮存在双层细胞库中,并作为冷冻细胞产物来分发。来源于单个供体胎盘的所有细胞量定义为一批,在专用空间和Class 100层流通风橱中,使用无菌技术,每次处理一个胎盘批次。细胞产物被鉴定为$CD105^+$、$CD200^+$、$CD10^+$和$CD34^-$,其具有正常的染色体组型,而且没有或基本上没有母亲的细胞含量。

[0452] 6.9.1获得干细胞

[0453] 组织解剖和消化:娩出后24小时内获得胎盘。胎盘组织获自羊膜、羊膜和绒毛膜的组合、或绒毛膜。组织切碎成小块,大小为大约1mm。切碎的组织在1mg/ml胶原酶1A中37℃消化1小时,接着胰蛋白酶-EDTA 37℃消化30分钟。在含有5%FBS的PBS中洗涤3次以后,组织重悬于培养基中。

[0454] 原代培养:原代培养的目的是从消化的胎盘组织中建立细胞。消化的组织重悬于培养基中,并置于Corning T-培养瓶中,其在保持37℃并含有5%CO_2的湿润室中孵育。培养5天以后,重新补足一半培养基。通过2周的培养形成细胞的高密度集落。用胰蛋白酶-EDTA收获集落,其然后用含有2%FBS的PBS终止。离心细胞并重悬于培养基中用于接种扩增培养物。这些细胞定义为0代细胞,已经倍增0次。

[0455] 扩增培养:从原代培养收获的、从扩增培养收获的、或从细胞库解冻的细胞用于接种扩增培养物。细胞工厂(NUNC™)用含5%CO_2的空气以50ml/min/盘通过无菌的过滤器处理10分钟并在保持37℃含5%CO_2的湿润孵育箱中加热。细胞种子用台盼蓝在血球计数器中计数,并记录细胞数、活力、传代数和倍增累计数。细胞悬浮于培养基中至大约2.3×10^4细胞/ml,而且以110ml/盘接种到细胞工厂中。3-4天以后,再次培养5-6天,除去培养基,并用新鲜培养基置换,接着在含5%CO_2的空气中进行另一个处理。当细胞达到大约10^5细胞/cm^2时,用胰蛋白酶-EDTA收获细胞,接着用含有2%FBS的PBS终止。然后离心细胞并重悬于培养基中。

[0456] 冷冻保藏:用胰蛋白酶-EDTA从培养物中收获待冷冻的细胞,用含有2%FBS的PBS终止,并在血球计数器上计数。离心以后,细胞用含有10%DMSO的FBS重悬,对于将用于组建细胞库的细胞至大约1百万细胞/ml的浓度,对用于单个冷冻细胞剂量的细胞至1千万细胞/ml的浓度。细胞溶液转入到冷冻容器中,其置于-80℃冰箱中的异丙醇浴中。随后的几天,细胞被转入液氮中。

[0457] 6.9.2胎盘干细胞库的设计

[0458] 一"批"定义为来源于单一供体胎盘的全部细胞量。在扩增培养期间,经过8次传代和30次倍增,细胞保持正常的生长、染色体组型和细胞表面标记表型。考虑到这个限制,剂量包括来自5次传代和大约20次倍增的细胞。为了提供等量细胞,单批细胞在培养物中扩增,并贮存在双层细胞库和冷冻剂量中。特别地,从原代培养收获的细胞,其被定义为已经进行0次倍增的0代细胞,用于起始扩增培养。第一次传代以后,发生大约4次倍增,并把细胞冷冻于主细胞库(MCB)中。MCB中的小管用于接种另外的扩增培养物。从MCB解冻的细胞的两次另外的传代以后,细胞冷冻于工作细胞库(WCB)中,产生大约12次累积倍增。来自WCB的小管用于接种扩增培养基,用于另外的2次传代,其产生大约20次倍增的第5代细胞,冷冻成单独剂量。

[0459] 6.9.3解冻细胞用于培养

[0460] 细胞的冷冻容器置于密封的塑料袋中,并浸于37℃水浴中。轻轻地旋动容器直到

除了一小片冰块之外，所有的内含物都融解。从密封的塑料袋中移出容器，并缓慢添加10×体积的培养基到细胞中，轻轻混合。样品在血球计数器中计数，并接种到扩增培养物中。

[0461] 6.9.4解冻细胞用于注射

[0462] 细胞的冷冻容器在干燥的氮运送装置中转入到给药处。给药之前，容器置于密封的塑料袋中，并浸于37℃水浴中。轻轻地旋动容器直到除了一小片冰块之外，所有的内含物都融解。从密封的塑料袋中取出容器，并添加相等体积的2.5％HSA/5％右旋糖苷。注射细胞，而不进行另外的洗涤。

[0463] 6.9.5检验和规格标准

[0464] 母亲的血样伴随全部供体胎盘。对样品进行肝炎B核心抗体和表面抗原、肝炎C病毒抗体和核酸、以及HIV I和II抗体和核酸筛查。在收到检验结果之前，开始胎盘处理和原代培养，但是只对与所有病毒测试为阴性的母亲血样相关的胎盘才继续处理和培养。如果供体检验为对任何病原体阳性，则这一批淘汰。而且，对MCB、WCB和来源于WCB小管的细胞剂量物质的样品进行表3中所述的检验。只有当所有的规格标准都满足时，这一批才放行。

[0465] 表3：细胞检验和规格标准

[0466]

检验	方法	所需结果
无菌性	BD BACTEC PEDS PLUS/F 和 BACTEC Myco/F Lytic	阴性
内毒素	LAL 凝胶凝结	≤5EU/ml*
活力	台盼蓝	>70% 活的
支原体	直接培养，DNA-荧光染料 (FDA PTC 1993)	阴性
身份	流式细胞仪(参见下面)	$CD105^+$、$CD200^+$、$CD10^+$、$CD34^-$
细胞纯度	微卫星	没有检测到污染的细胞
染色体组型	对中期细胞进行 G-条带和染色体计数	正常

[0467] *对于设计为40ml的冷冻细胞/剂量和5EU/ml的最大值的产品，对于体重超过40kg的接受者，细胞产品低于5EU/kg/剂量的上限。

[0468] 6.9.6表面标记表型分析

[0469] 细胞置于含有1％多聚甲醛(PFA)的PBS中20分钟，并贮存于冰箱中直到染色(高达一周)。细胞用含有2％FBS、0.05％叠氮化钠的PBS(染色缓冲液)洗涤，然后重悬于染色缓冲液中。细胞用下列抗体偶联物染色：CD105-FITC、CD200-PE、CD34-PECy7、CD10-APC。细胞也用同种型对照染色。30分钟孵育以后，用染色缓冲液洗涤细胞并重悬，接着在流式细胞仪上进行分析。相较于同种型对照，具有增加的荧光的细胞被计为标记阳性。

[0470] 6.10实施例10：胎盘干细胞特异性基因的鉴定

[0471] 将来自羊膜-绒毛膜(AC)和脐带(UC)的胎盘干细胞的基因表达模式与多能骨髓来源的间充质干细胞(BM)和真皮成纤维细胞(DF)的基因表达模式进行比较，后者被认为是末

端分化的。细胞生长一次传代、中等传代数和高传代数(包括直到衰老)。结果表明,群倍增的数目对基因表达具有主要影响。一组基因确定为在AC和UC中上调,在BM和DF中下调或缺乏,而且其表达独立于传代数。这组胎盘干细胞或脐带干细胞特异性基因编码许多与上皮细胞相关的细胞骨架和细胞与细胞粘附蛋白,和免疫球蛋白样表面蛋白,CD200,其涉及母亲-胎儿免疫耐受性。胎盘干细胞和脐带干细胞,在本实施例的下文中被总称为AC/UC干细胞。

[0472] 6.10.1方法和材料

[0473] 6.10.1.1细胞系和细胞培养

[0474] BM(目录号#PT-2501)和DF(目录号#CC-2511)购自Cambrex。AC和UC来源于0代组织培养瓶。通过消化,从命名为2063919的供体胎盘中获得培养瓶中的AC和UC。T-75培养瓶以6000细胞/cm^2接种,并且当细胞变成汇合时,对细胞进行传代。利用台盼蓝细胞计数来评估群倍增。在3、11-14和24-38次群倍增以后,分析培养物的基因表达。

[0475] 6.10.1.2RNA、微阵列和分析

[0476] 细胞直接在它们的组织培养瓶中裂解,除了一个培养物在裂解之前进行胰蛋白酶化之外。用来自QIAGEN的RNeasy试剂盒分离总RNA。用Agilent 2100生物分析仪测定RNA完整性和浓度。来自每种培养物的10微克总RNA在Affymetrix GENECHIP®平台上杂交。按照制造商的方法,把总RNA转变成标记的cRNA,并与寡核苷酸人基因组U133A 2.0阵列杂交。图像文件用Affymetrix MAS 5.0软件处理,并用Agilent GeneSpring 7.3软件标准化和分析。

[0477] 6.10.2结果

[0478] 6.10.2.1选择BM-MSC、AC/UC干细胞、和DF培养物的时间点用于微阵列分析

[0479] 为了确定AC/UC干细胞特有的基因表达模式,两个干细胞系,AC(6)和UC(6)与BM-MSC和DF一起平行培养。为了最大化确定归因于细胞来源的基因表达分布图,和最小化外源影响,所有的细胞都生长于同样的培养基中,使用相同的标准接种和继代培养。细胞在3次群倍增、11-14次倍增或35次倍增或衰老(以先发生的为准)时进行收获。其在AC/UC干细胞中的表达没有随培养的时间改变,而且相对于BM和DF上调的基因,是AC/UC干细胞特异性基因的候选者。

[0480] 图10显示了研究中4个细胞系的生长模式;圆形表示其培养物收获用于RNA分离。总计收集了12个样品。3次群倍增以后收获BM、AC(6)和UC(6);这些样品被认为是进行了短时间的培养。不收集短期的DF样品。收集所有细胞类型的中间长度培养物,11到14次倍增。在大约35次群倍增时,或正好在衰老之前(以先发生的为准)收集所有细胞系的长期培养物。在BM 15次倍增之前,和在DF 25次倍增时,出现衰老。购买的BM和DF在基因分析之前多次扩增,而且不能被认为是早期阶段。然而,操作上,生长了3次倍增的BM(BM-03)被认为是短期培养物。同样,BM-11操作上称为中间长度培养物,但是因为在14次倍增时出现衰老,BM-11生物学上很可能是长期培养物。

[0481] 6.10.2.2分级聚类显示了BM、AC/UC干细胞和DF之间的相关

[0482] 微阵列分析确定了基因表达模式,分级聚类(HC)试图发现二维背景下的相似性:基因为第一维,不同条件(不同的RNA样品)为第二维。用于本实验的基因芯片包括超过22,000个探针组(其称为“全部基因目录”),但是这些组中的许多能探测在任何条件下都不表

达的基因。为了减少全部基因目录，淘汰所有样品中不表达或低水平表达(原始值小于250)的基因，以产生8,215个基因的目录。

[0483] 6.10.2.3使用线形图分析基因表达

[0484] 使用线形图在GeneSpring中显示8215个基因的基因表达模式(图11)。X轴表示12个实验条件，Y轴表示对数比例的标准化探针组表达值。Y轴覆盖了10,000倍范围，不表达或低水平表达的基因设置为0.01的值。缺省的标准值设置为1。每条线表示一个基因(实际上是一个探针组，一些基因具有多个探针组)，而且以一种颜色跨越全部12个条件。颜色表明相对表达水平，如heatmap描述的，但是通过选择1个条件来确定着色模式。图11中，AC-03是选择的条件。相对于标准值上调的基因通过软件显示为红色，而下调的那些基因显示为蓝色。AC-03到UC-11中明显的向上和向下的指向峰形，表明许多基因在这些条件是差示表达的。AC-03与UC-03之间着色模式的显著相似性表明，许多相同基因在这两个样品中是上调或下调的。水平线部分表明，基因的表达水平在许多条件是没有变化的。通过比较UC-36、UC-38与UC-38-T，这是最值得注意的。没有显著的峰形，但是存在细微的趋势，因为UC-36与UC-38-T之间的许多红线都在标准值1的下面。这表明这些基因在AC-03和UC-03中上调，在后面的培养物中下调。UC-38与UC-38-T之间表达模式如此相似的事实表明，正好在RNA分离之前胰蛋白酶化细胞对基因表达具有很小的影响。

[0485] 除了计算上增强的HC方法，通过目测检查，两个BM样品比其它的条件更彼此类似。两个DF培养物也同样如此。尽管大量差示表达基因存在于BM和DF样品中，总的表现表明，两个BM与两个DF样品比与AC/UC干细胞更彼此类似。这通过如上所述的HC结果证实。

[0486] 当使用AC-11作为选定条件应用上述处理时，AC-11与UC-11显然共有许多相同的差示表达基因，但是两种条件之间共同基因的总数看来小于AC-03与UC-03共有的差示表达基因数。图12显示了AC-03中，相对于基线，基因差示过表达6倍和更多。在AC-03中上调的大部分基因在UC-03中也是上调的，而且在BM与DF中更散开。

[0487] 6.10.2.4用于鉴定AC/UC干细胞特异性基因的过滤法

[0488] 在所有AC/UC样品中保持恒定，而且在BM与DF中下调的基因，被认为是AC/UC干细胞特异性的。组合两种过滤法以产生一系列58个AC/UC干细胞特异性基因(表4)。

[0489] 表4:58个胎盘干细胞或脐带干细胞特异性基因

[0490]

符号	基因	生物学过程，描述和另外的注解
ACTG2	肌动蛋白，γ2，平滑肌，肠	肌肉发育，细胞骨架，在脐带动脉和前列腺上皮细胞中表达
ADARB1	腺嘌呤核苷脱氨酶，RNA 特异性，Bl(REDl 同源老鼠)	RNA 加工，中枢神经系统发育
AMIGO2	amphoterin 诱导的基因 2	亲同种的和异嗜性的细胞粘附，具有 Ig 样结构域 2 的粘附分子
ARTS-1	1 型肿瘤坏死因子受体脱落氨肽酶调节因子	蛋白质水解，抗原加工，血管发生，胎盘中表达
B4GALT6	UDP-Gal:βGlcNAc β1,4-半乳糖基转移酶，多肽 6	碳水化合物代谢，整合到膜，可在细胞间识别和/或附着中发挥作用
BCHE	丁酰胆碱酯酶	胆碱酯酶活性，丝氨酸酯酶活性，水解酶活性
C11orf9	染色体 11 开放式阅读框 9	假定的蛋白，p53 样转录因子，在视网膜色素上皮细胞中表达
CD200	CD200 抗原	免疫球蛋白样，表面蛋白，抑制巨噬细胞

[0491]

COL4A1	胶原蛋白，IV 型，α1	ECM，基底膜，缠结纤维胶原蛋白，包含 arresten 结构域
COL4A2	胶原蛋白，IV 型，α2	ECM，生物合成，基底膜，与 COL4A1 共表达，在增生上皮细胞中下调
CPA4	羧肽酶 A4	蛋白质水解，组蛋白乙酰化，母亲特征的，在前列腺癌细胞系中高表达
DMD	营养不良蛋白(肌营养不良，Duchenne 和 Becker 型)	肌肉收缩，细胞形状和细胞大小控制，肌肉发育
DSC3	桥粒芯胶粘蛋白 3	亲同种的细胞与细胞粘附，位于细胞桥粒
DSG2	桥粒芯糖蛋白 2	亲同种的细胞与细胞粘附，位于细胞桥粒
ELOVL2	很长链的脂肪酸的延伸(FEN1/Elo2，SUR4/Elo3，酵母)样 2	脂肪酸生物合成，脂质生物合成
F2RL1	凝结因子 II(凝血酶)受体样 1	G 蛋白偶联的受体蛋白信号通道，在结肠上皮细胞和神经元元件中高表达
FLJ10781	假定蛋白 FLJ10781	———
GATA6	GATA 结合蛋白 6	转录因子，肌肉发育
GPR126	G 蛋白偶联的受体 126	信号转导，神经肽信号通道
GPRC5B	G 蛋白偶联的受体，C 家族，5 组，B 成员	G 蛋白偶联的受体蛋白信号通道
ICAM1	分子间粘附分子 1(CD54),人鼻病毒受体	细胞与细胞粘附，细胞粘附，转膜受体活性，在连结上皮细胞中表达
IER3	中间早期应答 3	抗凋亡，胚胎发生和形态发生，细胞生长和/或保持
IGFBP7	胰岛素样生长结合蛋白 7	细胞增殖的负调控，在衰老的上皮细胞中过表达
IL1A	白细胞介素 1，α	免疫应答，信号转导，细胞因子活性，细胞增殖，分化，凋亡
IL1B	白细胞介素 1，β	免疫应答，信号转导，细胞因子活性，细胞增殖，分化，凋亡
IL6	白细胞介素 6(干扰素，β2)	细胞表面受体相关的信号转导，免疫应答
KRT18	角蛋白 18	形态发生，中间纤丝，在胎盘，胎儿和上皮组织中表达
KRT8	角蛋白 8	细胞骨架组织和生物合成，磷酸

[0492]

		化，中间纤丝，与 KRTIB 共表达
LIPG	脂肪酶，内皮的	脂质代谢，脂蛋白脂肪酶活性，脂质转运蛋白，磷脂酶活性，涉及血管生物学
LRAP	白细胞来源的精氨酸氨基肽酶	抗原加工，通过 MHC I 类的内源抗原；N－末端氨基肽酶活性
MATN2	Matrilin 2	在成纤维细胞或内皮来源的细胞系中广泛表达，非关节的软骨 ECM
MEST	中胚层特异性转录同系物(小鼠)	父亲特征的基因，中胚层组织的发育，在胎儿组织和成纤维细胞中表达
NFE2L3	核因子(红血球来源的 2)样 3	转录共因子，在初级胎盘细胞滋养层而不在胎盘成纤维细胞中高表达
NUAK1	NUAK 家族，SNF1 样激酶，1	蛋白氨基酸磷酸化，蛋白丝氨酸－苏氨酸激酶活性
PCDH7	BH－原钙粘着蛋白(大脑－心脏)	细胞与细胞粘附和识别，包含 7 个钙粘着蛋白重复
PDLIM3	PDZ 和 LIM 功能域 3	α－肌动蛋白 2 缔合的 LIM 蛋白，细胞骨架蛋白结合，在骨骼肌中表达
PKP2	斑菲素蛋白 2	细胞与细胞粘附，位于细胞桥粒，在上皮细胞中发现，结合钙粘着蛋白和中间纤丝
RTN1	Reticulon 1	信号转导，神经元分化，神经内分泌，在神经内分泌细胞中的膜运输
SERPINB9	Serpin 肽酶抑制剂，ciade B(卵白蛋白)，成员 9	丝氨酸蛋白酶抑制剂，凝结，纤维蛋白溶解，完全固定，基质重塑，在胎盘中表达
ST3GAL6	唾液酸转换酶 10	氨基糖代谢，蛋白氨基酸糖基化，糖脂质代谢，蛋白－lipoylation
ST6GALNAC5	唾液酸转换酶 7E	蛋白氨基酸糖基化，神经节糖苷生物合成
SLC12A8	溶质载体家族 12(钠/钾/氯化转运蛋白)，成员 8	氨基酸－聚氨转运蛋白活性，氯化阳离子共转运蛋白 9，在上皮细胞免疫性中可能的作用(牛皮癣)
TCF21	转录因子 21	转录调节，中胚层发育，在肾的上皮细胞中发现
TGFB2	转化生长因子，β2	细胞周期的调节，信号转导，细胞与细胞信号，细胞增殖，细胞生长
VTN	玻连蛋白(血清传播因子，促生长	免疫应答，细胞粘附，分泌蛋白，

[0493]

	因子B，补体S蛋白)	结合ECM
ZC3H12A	包含12A的锌指CCCM型	MCP-I处理诱导的蛋白，核酸结合，假定的锌指蛋白

[0494] 首先，选择相对于所有BM与DF样品，在8个AC/UC干细胞条件中的至少7个中过表达≥3倍的那些基因(图13)。对8个AC/UC干细胞条件中的8个进行过滤产生类似的列表。第二个过滤法使用由Affymetrix MAS 5.0软件提供的“缺乏”与“存在”称呼。通过鉴定在所有BM与DF条件中缺乏，在AC-03、AC-11、UC-03和UC-11中存在的基因，建立列表。后面的AC/UC干细胞条件中没有规定基因称呼。

[0495] 两个列表显著地重叠，并对其进行组合。通过除去(1)在大多数或所有AC/UC干细胞条件中表达水平极低的几个基因，和(2)Y染色体中携带的基因，对组合的列表进行进一步整理。用于本研究的AC和UC细胞，通过FISH分析证实是雄性的，而BM和DF来源于雌性供体。得到的46个AC/UC干细胞特异性基因的列表示于表5中。

[0496] 表5.基于存在列出的AC/UC特异性基因

[0497]

细胞粘附	细胞骨架	发育	ECM	涉及上皮细胞
AMIGO2	ACTG2	ADARB1	COL4A1	ACTG2
B4AGALT6	DMD	IER3	COL4A2	C11orf9
DSC3	KRT18	IGFBP7	MATN2	COL4A1
DSG2	KRT8	IL1A	VTN	COL4A2
ICAM1	PDLIM3	IL1B		DSC3
PCDH7		MEST		DSG2
PKP2		TGFB2		F2RL1
VTN				ICAM1
糖基化	应答免疫	蛋白水解	信号	IGFBP7
B4GALT6	ARTS-1	ARTS-1	F2RL1	IL6
ST3GAL6	CD200	CPA4	GPR126	KRT18
ST6GALNAC5	IL1A	LRAP	GPRC5B	KRT8
转录	IL1B		IL1A	MATN2
C11orf9?	IL6		IL1B	PKP2
GATA6	LRAP		IL6	SLC12A8
NFE2L3	SLC12A8		RTN1	TCF21
TCF21	VTN		TGFB2	

[0498] 这列46个基因编码代表了若干存在组的蛋白质的集合。最多呈现的组，细胞粘附组，包含8个基因。没有基因编码涉及DNA复制或细胞分裂的蛋白质。还列出了对于上皮细胞特异性的16个基因。

[0499] 6.10.3讨论

[0500] 鉴定了胎盘干细胞特异性的，而且可和骨髓来源的间充质细胞区分开的表达模式。操作上，该模式包括相对于所有BM和DF样品而言，在所有胎盘干细胞样品中过表达的46个基因。

[0501] 实验设计比较了短期、中期和长期培养的细胞。对于AC和UC细胞，每个培养期都具

有差示表达基因的特征集合。在短期或早期阶段期间(AC-03和UC-03),8次群倍增以后,200个上调基因回退到平均值。不受理论约束,该早期基因表达模式很可能与天然胎盘环境中AC和UC的表达分布图类似。在胎盘中,这些细胞没有活跃地分裂,它们代谢养分,自己之间传递信号,并通过重塑胞外环境来稳固其位置。

[0502] 中间长度培养物的基因表达定义为快速细胞分裂,此时差示表达的基因与早期阶段期间差示表达的那些相当不同。AC-11和UC-11,以及BM-03和DF-14中上调的许多基因,涉及染色体复制和细胞分裂。根据基因表达,BM-03生物学上看来是中期培养物。在该中间阶段,细胞类型特异性基因表达被细胞增殖遮蔽。而且,几乎每个在短期AC或UC培养物中过表达的基因,在中期和后期阶段条件中都是下调的。在该高度增殖阶段,143个基因上调≥5倍,其构成了大约1.7%的表达基因。

[0503] 长期培养物表示最后或衰老阶段。在该阶段,细胞已经耗尽了它们的分裂能力,而且尤其对于AC和UC来说,差示表达基因的绝对数显著降低。这可能是细胞完全适应它们的培养环境,及其从而降低的生物合成负担所产生的结果。令人惊讶地,晚期BM和DF培养物没有显示该相同行为;相对于AC和UC以及标准值1,大量基因在BM-11和DF-24中差示表达。最显著地在长期培养物中,AC和UC可与BM和DF区分开。

[0504] 这里描述的胎盘干细胞特异性基因列表是多变化的。COL4A1和COL4A2是协调调节的,KRT18和KRT8也显示是共表达的。8个基因编码涉及编码细胞与细胞接触的蛋白质,其中的3个(DSC3,DSG2和PKP2)定位于细胞桥粒,锚定中间丝细胞骨架蛋白如角蛋白18和角蛋白8的细胞间接触点。紧密的细胞与细胞接触是上皮细胞与内皮细胞所特有的,而且一般不与成纤维细胞相关。表3列举了上皮细胞特有的总计46个基因中的16个基因。胎盘干细胞一般描述为成纤维细胞样的小梭形细胞。这种形态一般不同于BM与DF,特别是在较低的细胞密度时。CD200的表达模式也是值得注意的,其存在于AC/UC干细胞中,并在所有BM与DF样品中缺乏。而且,CD200已经显示在胎儿发育期间,与胎盘中的免疫耐受性相关(参见,例如,Clark等,Am.J.Reprod.Immunol.50(3):1 87-195(2003))。

[0505] 46个基因的这组基因的子集组成一组分子生物标记,其将AC/UC干细胞与来自骨髓来源的间充质干细胞或成纤维细胞区分开。

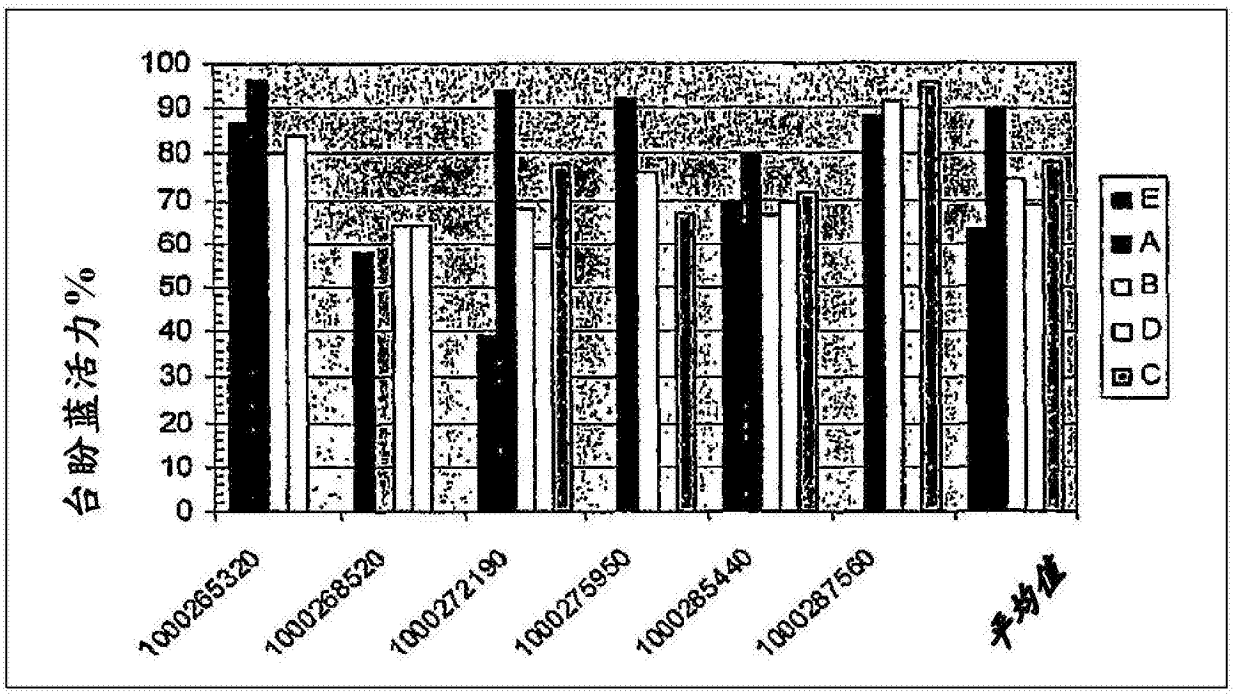

台盼蓝活力%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
E
A
B
D
C
1000265320
1000268520
1000272190
1000275950
1000285440
1000287560
平均值

图1

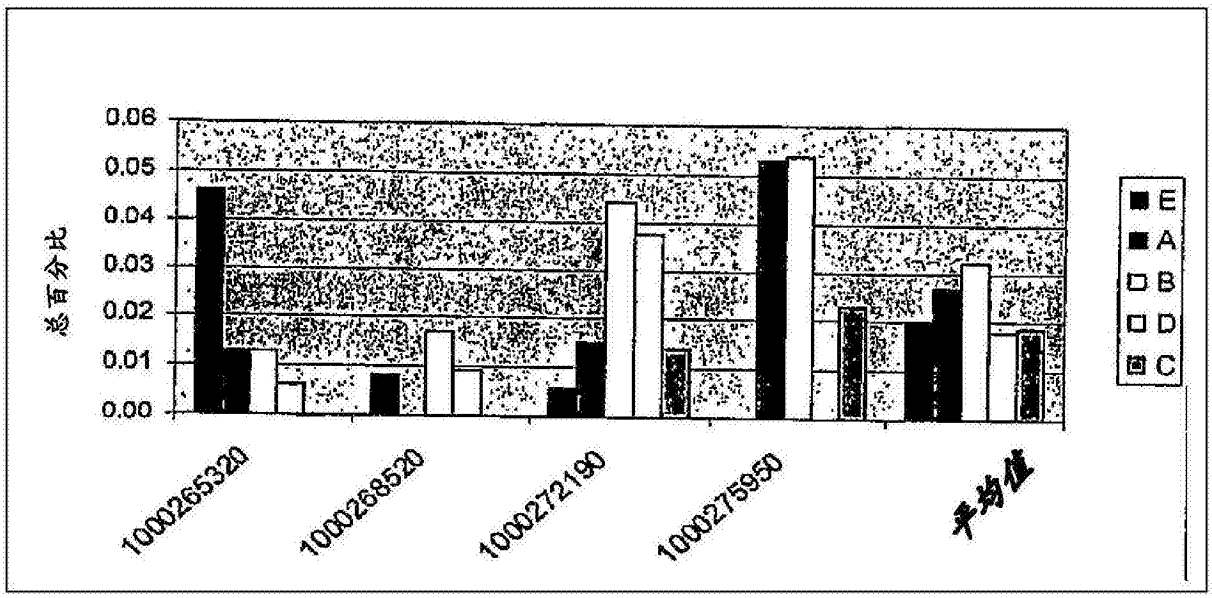

总百分比
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
E
A
B
D
C
1000265320
1000268520
1000272190
1000275950
平均值

图2

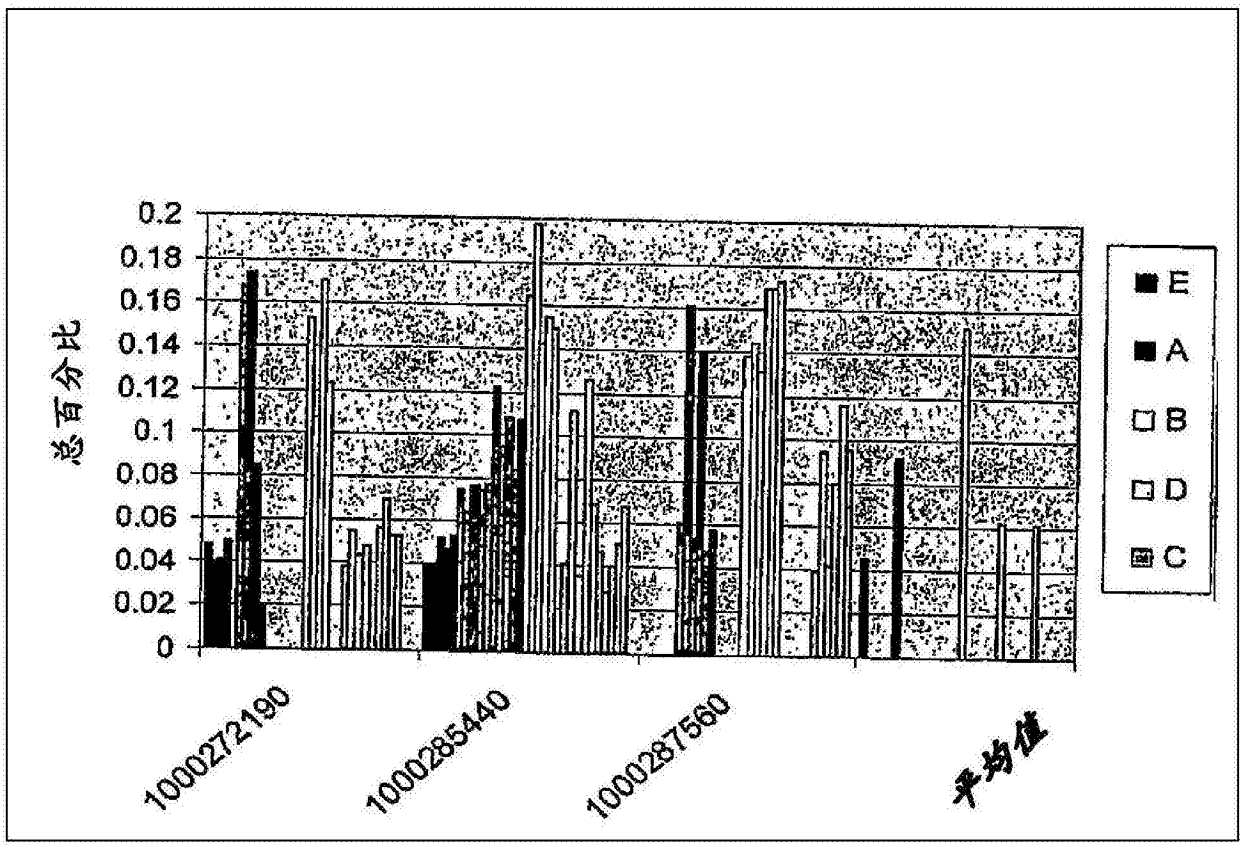

0.2
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
总百分比
E
A
B
D
C
1000272190
1000285440
1000287560
平均值

图3

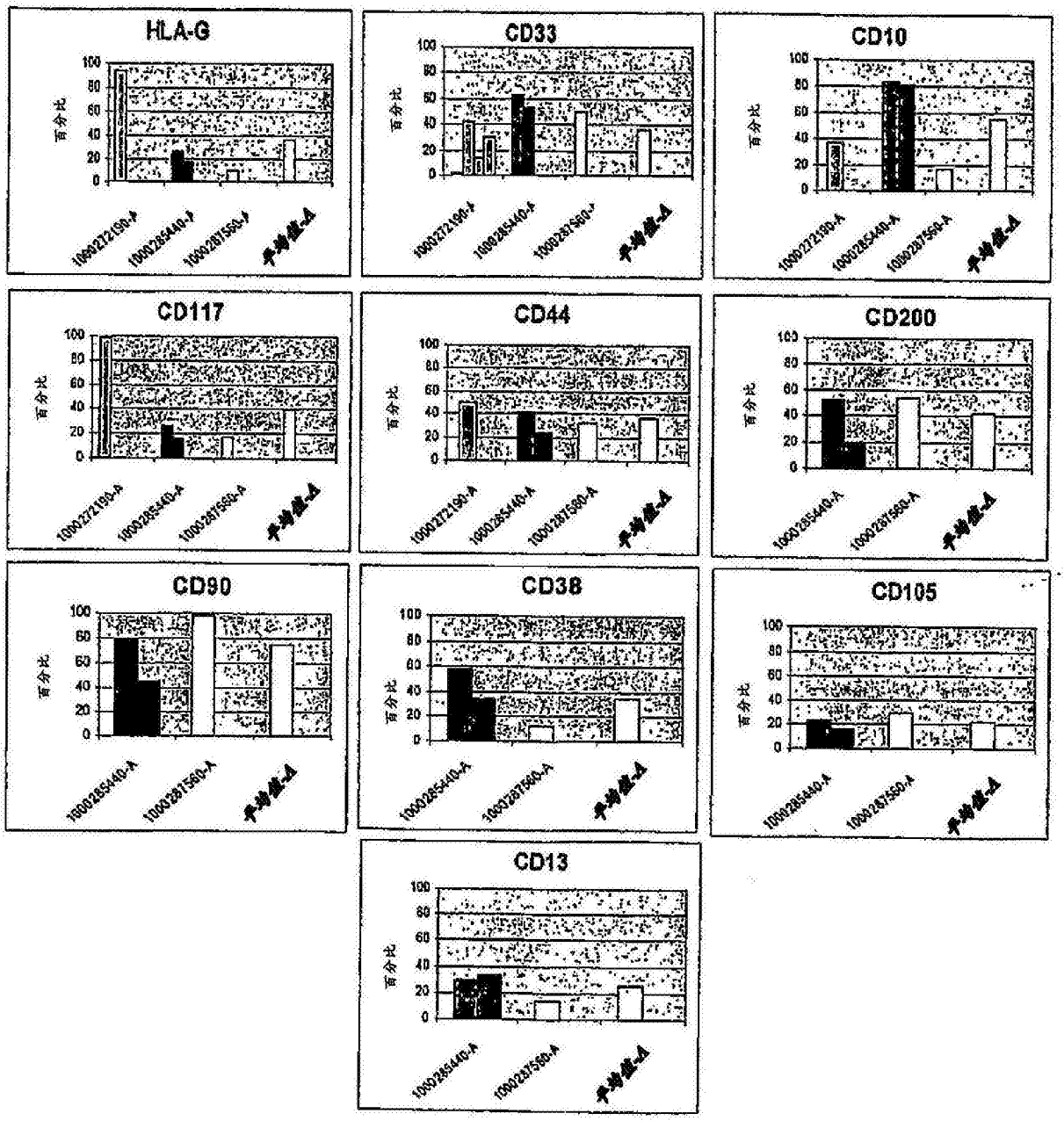


图4

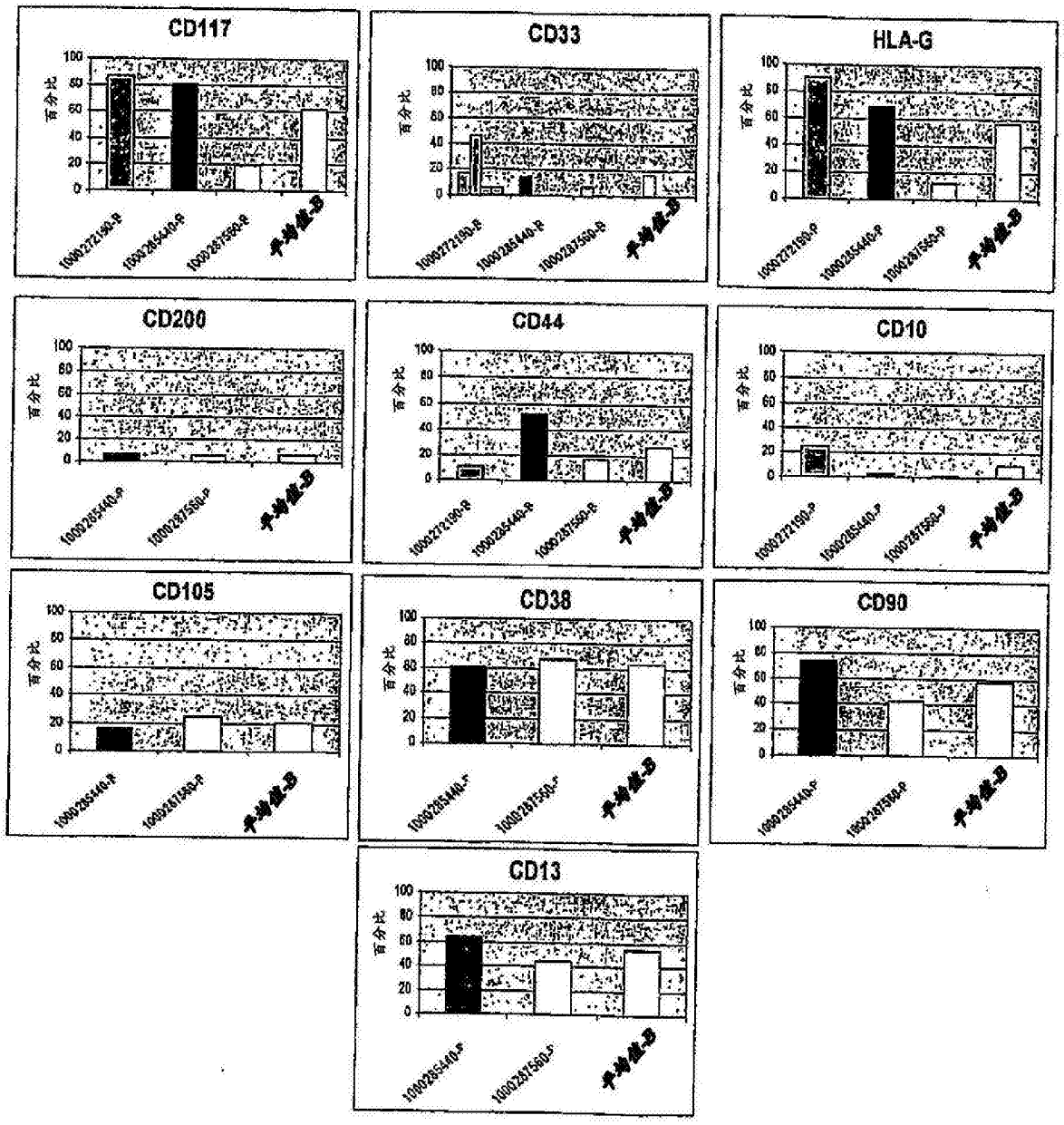


图5

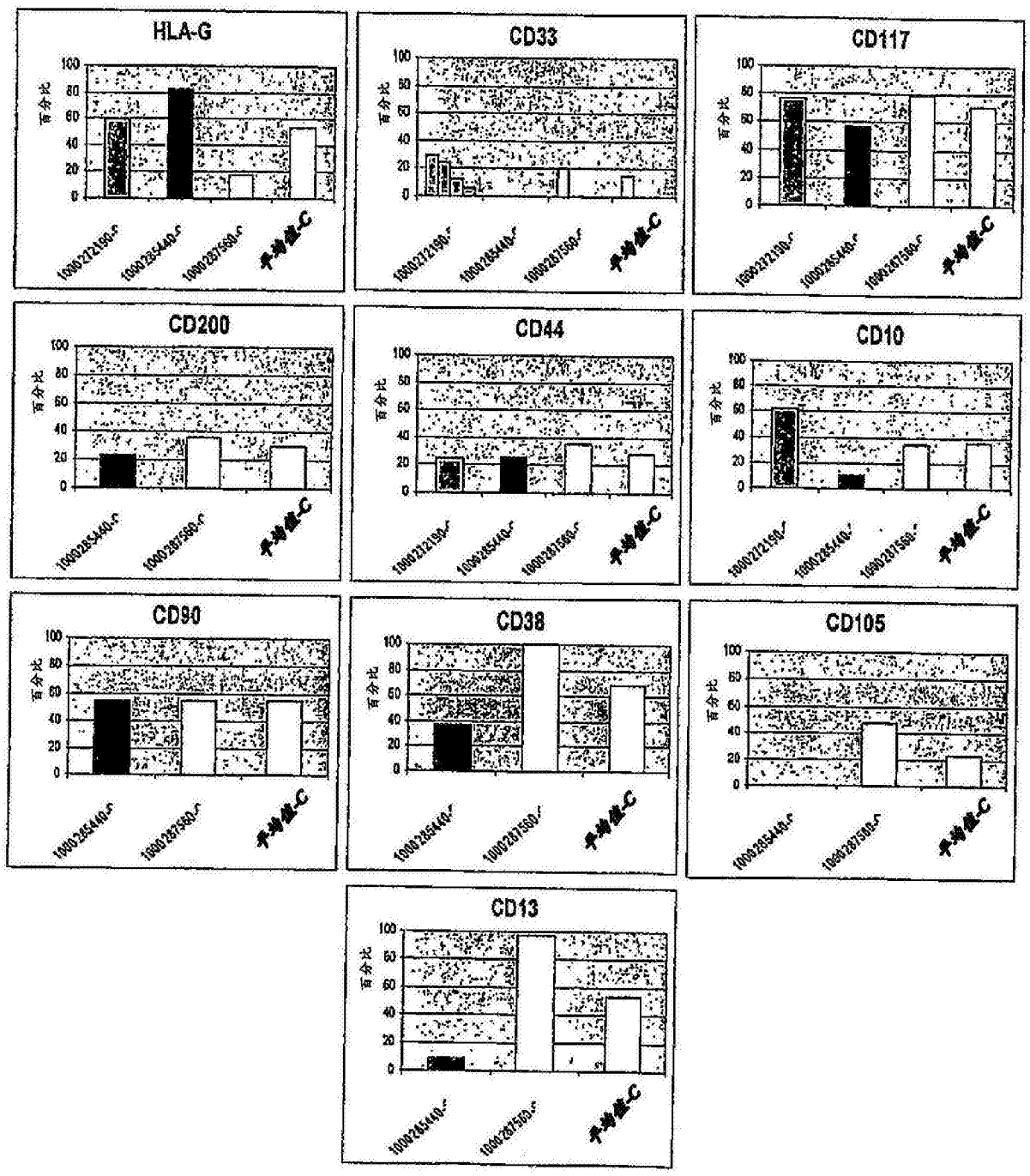


图6

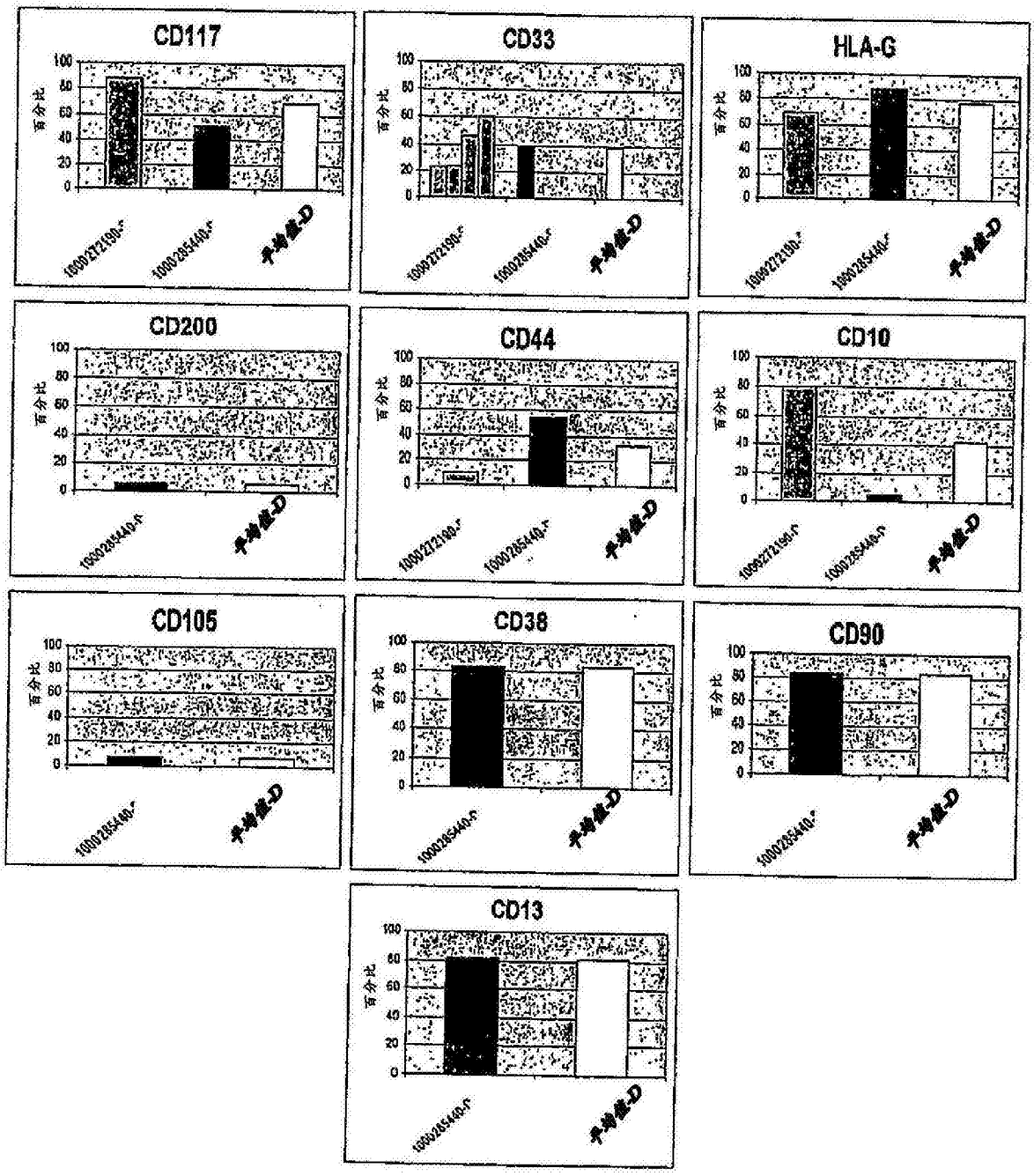


图7

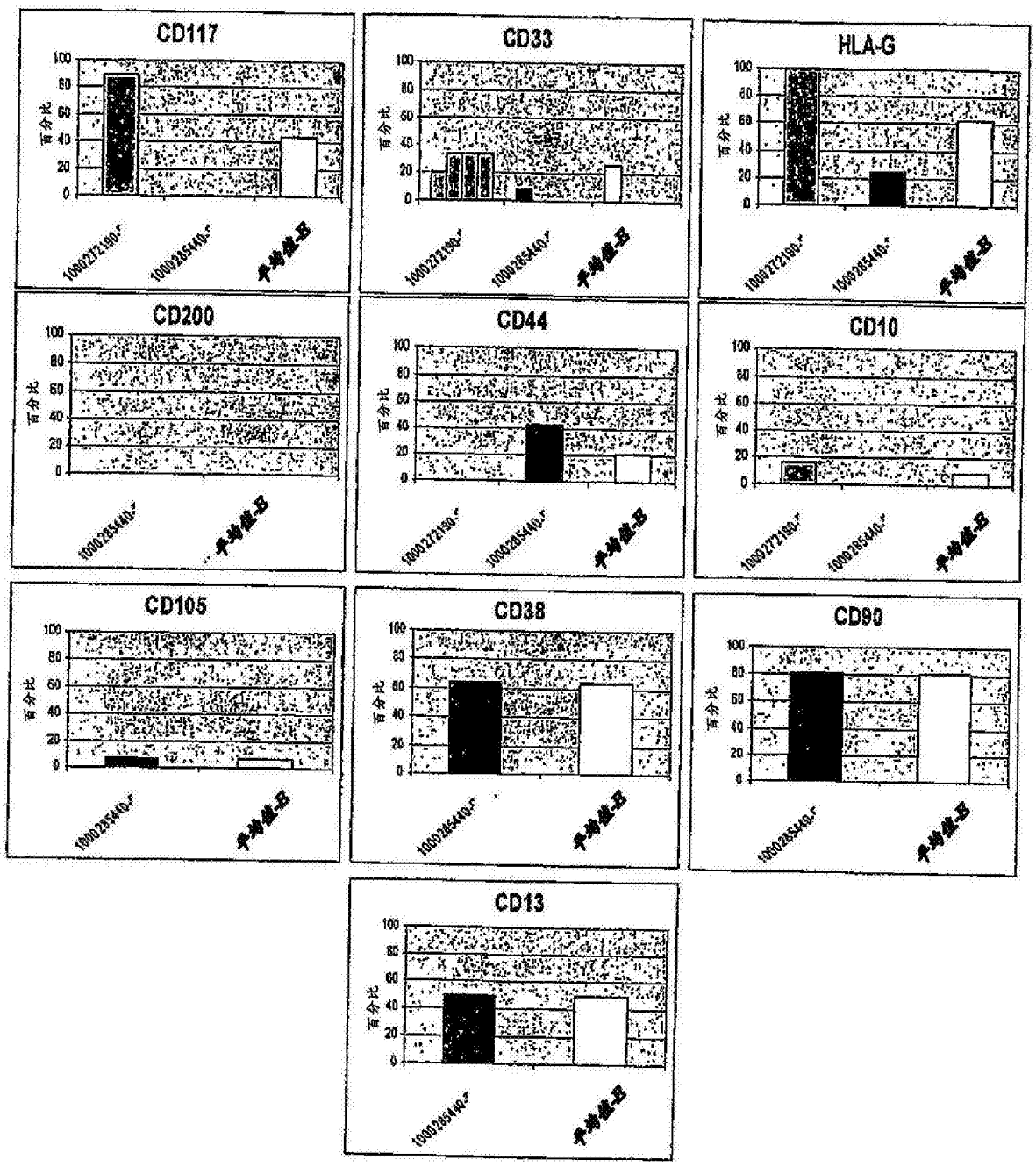


图8

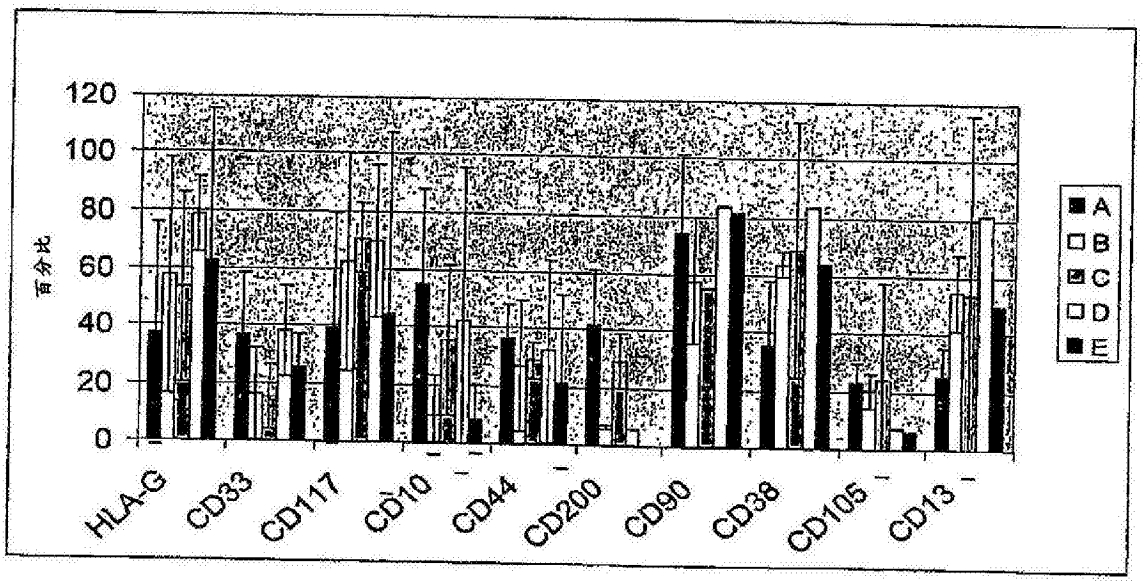

120
100
80
60
40
20
0
百分比
HLA-G
CD33
CD117
CD10
CD44
CD200
CD90
CD38
CD105
CD13
A
B
C
D
E

图9

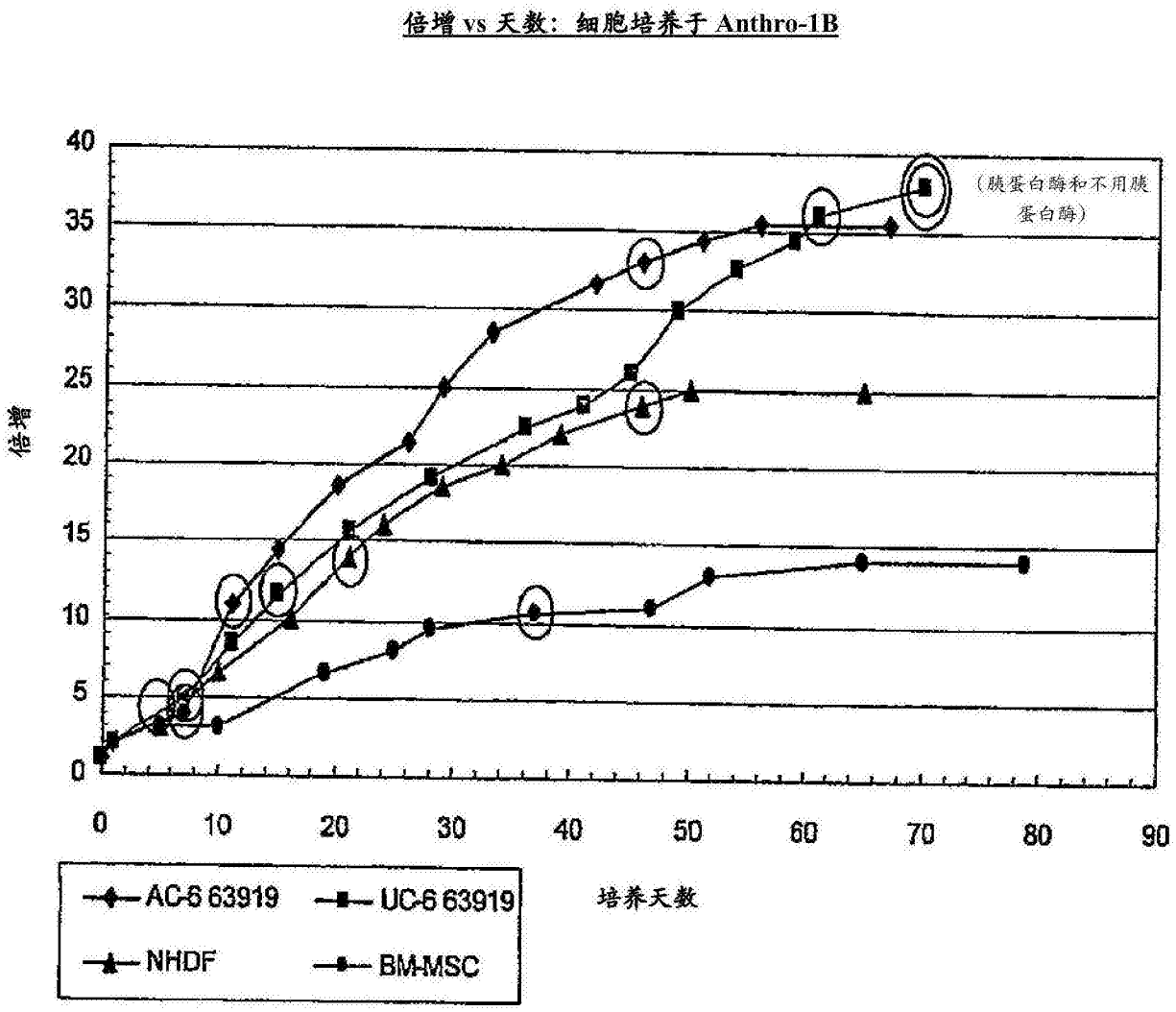

倍增 vs 天数：细胞培养于 Anthro-1B
倍增
培养天数
(胰蛋白酶和不用胰蛋白酶)
AC-6 63919
UC-6 63919
NHDF
BM-MSC
0
5
10
15
20
25
30
35
40
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90

图10

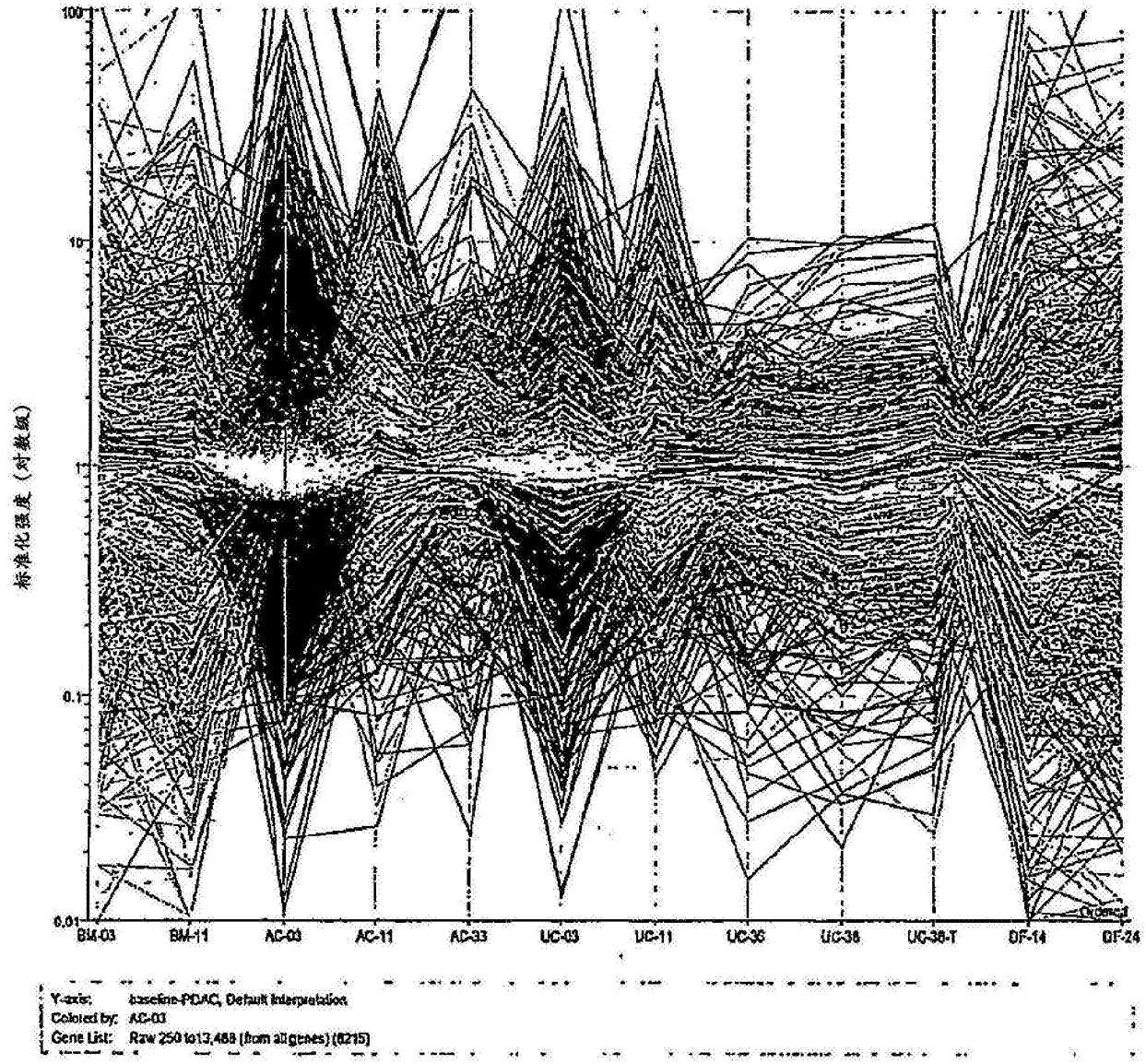

100
10
1
0.1
0.01
标准化强度（对数级）
BM-03
BM-11
AC-03
AC-11
AC-33
UC-03
UC-11
UC-36
UC-38
UC-38-T
DF-14
DF-24
Y-axis: baseline-PDAC, Default Interpretation
Colored by: AC-03
Gene List: Raw 250 to13,488 (from all genes) (6215)

图11

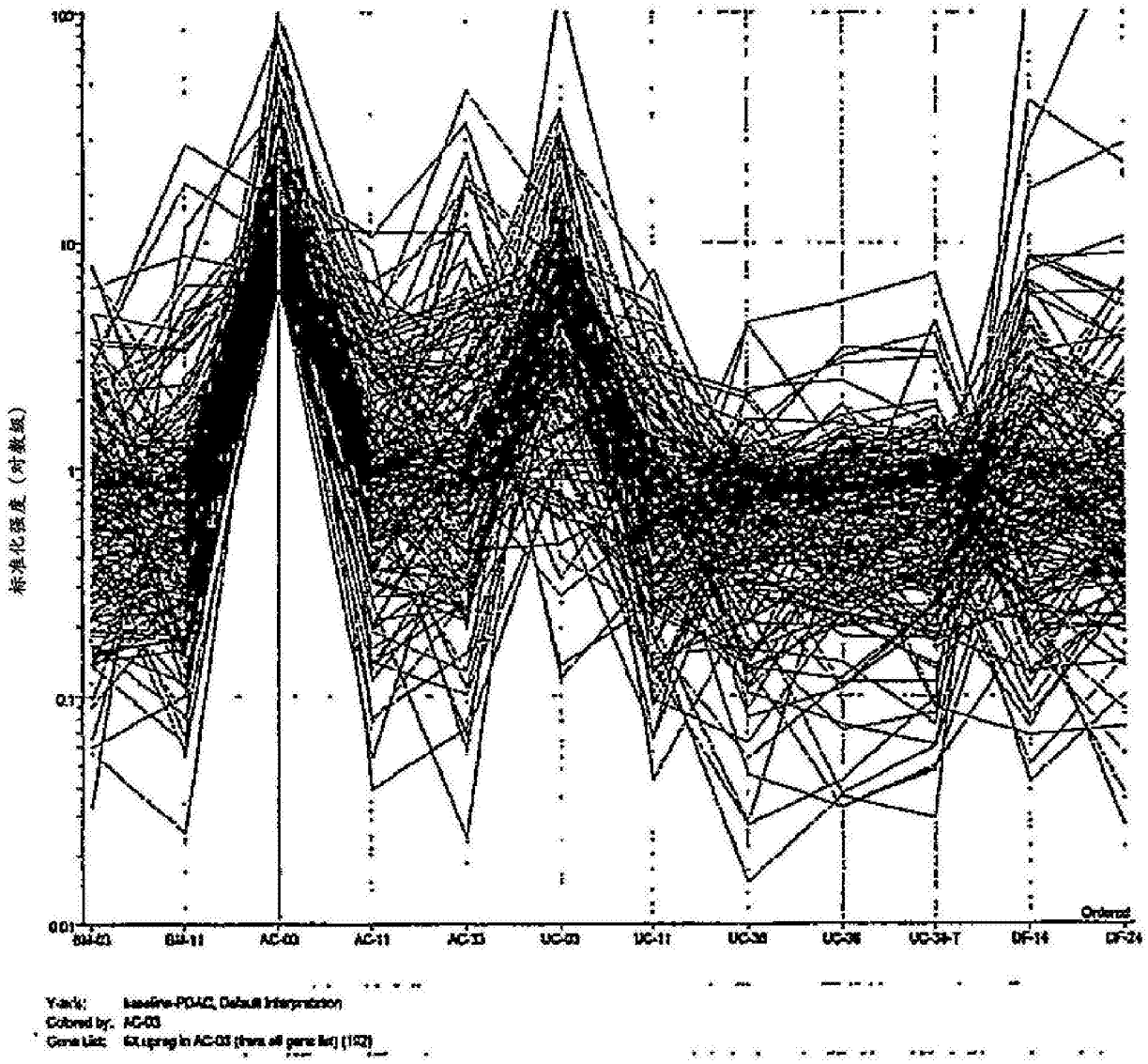

标准化强度（对数级）
100
10
1
0.1
0.01
Ordered
BM-01
BM-11
AC-00
AC-11
AC-33
UC-03
UC-11
UC-39
UC-36
UC-39-T
DF-14
DF-24

图12

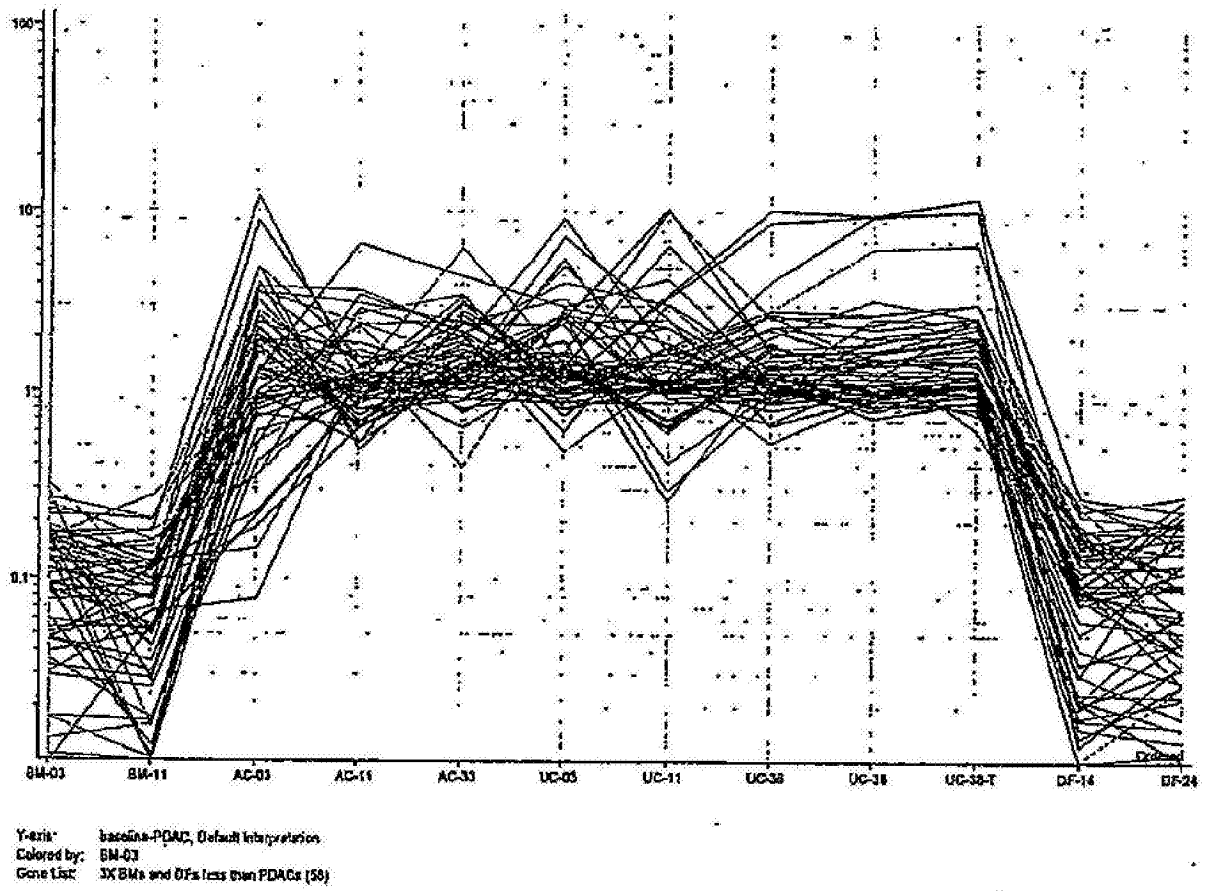

100
10
1
0.1
BM-03
BM-11
AC-03
AC-11
AC-33
UC-05
UC-11
UC-38
UC-38
UC-38-T
DF-14
DF-24
Y-axis:
Colored by: BM-03
Gene List:

图13