



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102851254 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 02

(21) 申请号 201210322545. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 03. 03

C12N 5/074 (2010. 01)

(30) 优先权数据

C12N 5/0789 (2010. 01)

60/904, 836 2007. 03. 01 US

C12M 1/00 (2006. 01)

60/918, 961 2007. 03. 20 US

A01N 1/02 (2006. 01)

60/994, 166 2007. 09. 17 US

A61K 8/98 (2006. 01)

60/998, 255 2007. 10. 09 US

A61K 35/14 (2006. 01)

61/011, 881 2008. 01. 22 US

A61Q 5/12 (2006. 01)

61/067, 849 2008. 02. 29 US

A61Q 17/04 (2006. 01)

(62) 分案原申请数据

A61Q 19/00 (2006. 01)

200880014529. 1 2008. 03. 03

A61Q 19/10 (2006. 01)

(71) 申请人 干细胞国际公司

A61P 17/00 (2006. 01)

地址 美国佛罗里达州

(72) 发明人 默西迪丝·A·沃尔顿

朱莉·G·阿利克逊

(74) 专利代理机构 北京中誉威圣知识产权代理

有限公司 11279

代理人 李春晖 彭晓玲

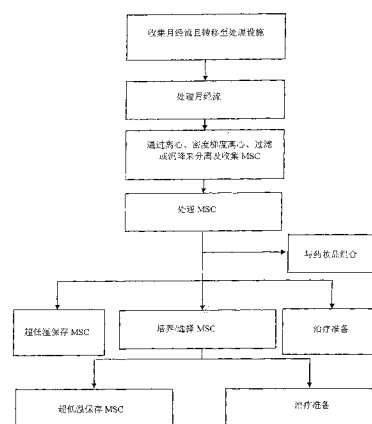
权利要求书 3 页 说明书 49 页 附图 47 页

(54) 发明名称

制备、分离及超低温保存子宫内膜 / 月经细胞

(57) 摘要

本发明提供包含月经干细胞 (MSC) 的组合物及关于获得其的方法、制程及系统。MSC 系经由处理月经期间收集的月经流而得。可将 MSC 超低温保存, 经各个培养及选择步骤处理以为超低温保存作准备, 或经处理以供治疗或药妆用。可将经超低温保存的 MSC 解冻以为治疗及药妆用途作准备。MSC 表现 CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49e、CD49f、CD59、CD81、CD105、CD166 及 HLA I 类且其 CD3 及 HLA II 类表现较少或不表现。



1. 一种用于获得月经干细胞的方法,该方法包含下列步骤:
 - a) 自月经流分离月经干细胞;及
 - b) 处理该自月经流分离的月经干细胞。
2. 如权利要求1所述的方法,其中自月经流分离月经干细胞的步骤包含以离心、密度梯度离心、过滤或沉淀中的至少一个方法处理该月经流。
3. 如权利要求1所述的方法,其中处理自该月经流分离的月经干细胞的步骤包含针对至少一种包含下列的细胞标记选择月经干细胞:CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49e、CD49f、CD59、CD81、CD105、CD166及HLA I类。
4. 如权利要求3所述的方法,其中处理月经干细胞的步骤包含培养月经干细胞的进一步步骤。
5. 如权利要求4所述的方法,其中处理月经干细胞的步骤包含针对至少一种包含下列的细胞标记选择月经干细胞的进一步步骤:CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49e、CD49f、CD59、CD81、CD105、CD166及HLA I类。
6. 如权利要求5所述的方法,其中处理月经干细胞的步骤包含培养月经干细胞的进一步步骤。
7. 如权利要求1所述的方法,其中处理分离自该月经流的月经干细胞的步骤包含培养月经干细胞。
8. 如权利要求7所述的方法,其中处理该月经干细胞的步骤包含选择月经干细胞的进一步步骤。
9. 如权利要求8所述的方法,其中处理月经干细胞的步骤包含培养月经干细胞的进一步步骤。
10. 如权利要求9所述的方法,其中处理月经干细胞的步骤包含针对细胞标记选择月经干细胞的进一步步骤。
11. 如权利要求1所述的方法,其中该方法包含超低温保存月经干细胞的进一步步骤。
12. 如权利要求11所述的方法,其中该方法包含解冻经超低温保存的月经干细胞及处理经解冻的月经干细胞的进一步步骤。
13. 如权利要求1所述的方法,其中该方法包含制备包含月经干细胞及维持月经干细胞存活的细胞培养基的治疗组合物的进一步步骤。
14. 如权利要求1所述的方法,其中该方法包含制备包含月经干细胞和药妆制剂的药妆组合物的进一步步骤。
15. 一种自月经流收集月经干细胞的方法,该方法包含:
 - a) 在一月经周期期间取得月经流;
 - b) 将该月经流输送至一处理设施;
 - c) 将月经干细胞自月经流分离而成细胞制剂;及
 - d) 处理该月经干细胞的细胞制剂。
16. 一种自月经流收集月经干细胞的系统,该系统包含:
 - a) 一月经干细胞分离器,其中月经干细胞分离器将月经干细胞自月经流分离;
 - b) 一月经干细胞收集器,其中该月经干细胞收集器收集月经干细胞;及
 - c) 一月经干细胞处理器,其中该月经干细胞处理器制备供治疗用或供超低温保存的月

经干细胞。

17. 一种超低温保存月经干细胞的方法,该方法包含下列步骤:

- a) 自月经期间所收集的月经流分离月经干细胞;
- b) 收集自月经流分离的月经干细胞;及
- c) 超低温保存分离自该月经流的月经干细胞。

18. 如权利要求 17 所述的方法,其中自该月经流分离月经干细胞的步骤包含经由离心、密度梯度离心、过滤或沉降中的至少一种处理该月经流。

19. 如权利要求 17 所述的方法,其中收集分离自月经流的月经干细胞的步骤包含至少一个针对细胞标记选择月经干细胞的步骤。

20. 如权利要求 19 所述的方法,其中收集分离自月经流的月经干细胞的步骤包含至少一个培养所选择月经干细胞的步骤。

21. 如权利要求 17 所述的方法,其中收集分离自月经流的月经干细胞的步骤包含至少一个培养月经干细胞的步骤。

22. 如权利要求 21 所述的方法,其中收集分离自月经流的月经干细胞的步骤包含至少一个自细胞培养物选择月经干细胞的步骤。

23. 一种月经干细胞群,其通过包含下列步骤的方法获得:

- a) 从月经期间所收集的月经流中分离月经干细胞;及
- b) 收集分离自月经流的月经干细胞。

24. 一种用于富集收集自月经流的月经干细胞群的方法,该方法包含下列步骤:

- a) 从月经期间所收集的月经流中分离月经干细胞;及
- b) 收集分离自月经流的月经干细胞。

25. 如权利要求 24 所述的方法,其中该方法包含至少一个针对下列细胞标记中的至少一者选择月经干细胞的步骤:CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49e、CD49f、CD59、CD81、CD105、CD166 及 HLA I 类。

26. 如权利要求 24 所述的方法,其中该方法包含至少一个培养月经干细胞的步骤。

27. 如权利要求 24 所述的方法,其中该方法包含至少一个选择月经干细胞的步骤及至少一个培养所选择的月经干细胞的步骤。

28. 如权利要求 24 所述的方法,其中该方法包含至少一个培养月经干细胞的步骤及至少一个自细胞培养物选择月经干细胞的步骤。

29. 一种用于富集表达 CD117 的月经干细胞群的方法,该方法包含下列步骤:

- a) 自月经流分离月经干细胞;
- b) 收集分离自月经流的月经干细胞;及
- c) 选择表达 CD117 的月经干细胞。

30. 一种月经干细胞群,其包含至少一种下列细胞标记:CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49e、CD49f、CD59、CD81、CD105、CD166 及 HLA I 类。

31. 一种经富集化的细胞群,其包含:

- a) 表达至少一种包含下列的细胞标记:CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49e、CD49f、CD59、CD81、CD105、CD166 及 HLA I 类的月经干细胞;及
- b) 较低表达或不表达包含 CD3 及 HLA II 类的细胞标记中的至少一者的月经干细胞。

32. 一种组合物,其包含至少一个月经干细胞及超低温保存剂。
33. 一种组合物,其包含至少一个月经干细胞及细胞培养基。
34. 一种组合物,其包含至少一个月经干细胞及药妆剂。
35. 一种组合物,其包含至少一个月经干细胞及维持细胞存活的保存剂。
36. 一种组合物,其包含至少一个月经干细胞及细胞培养基,该组合物位于一容器中以为该至少一个月经干细胞的治疗用途作准备。

制备、分离及超低温保存子宫内膜 / 月经细胞

[0001] 本申请为 2008 年 3 月 3 日提交的申请号为 200880014529.1 名称为“制备、分离及超低温保存子宫内膜 / 月经细胞”的中国发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本案主张美国临时申请案 2007 年 3 月 1 日申请的第 60/904,836, 2007 年 3 月 20 日申请的第 60/918,961 号, 2007 年 9 月 17 日申请的第 60/994,166 号, 2007 年 10 月 9 日申请的第 60/998,255 号, 2008 年 1 月 22 日申请的第 61/011,881 号及 2008 年 2 月 29 日申请的第__号的优先权, 前述每一案的名称为 "Procurement, Isolation, and Cryopreservation of Endometrial/Menstrual Cells" 其整体内容系以引用方式并入本文。

[0003] 本发明通常涉及关于获得月经干细胞 (MSC) 的方法、制程及系统。本发明尤其涉及关于取得及处理月经期间所获得的血液、体液及组织以分离及收集月经干细胞群的方法、制程及系统, 这些月经干细胞可经超低温保存或经由各种培养及选择步骤进一步处理以获得为超低温保存或为治疗或药妆用途作准备的 MSC。本发明还涉及关于包含至少一个月经干细胞的相关组合物。

背景技术

[0004] 干细胞固有地具有经由控制细胞与细胞接触及内在信号而经历活体内细胞分裂及细胞分化的能力。已显示干细胞能藉由经局部环境因子刺激来控制细胞接触及内在信号而活体外分裂及分化成多种细胞。应了解, 干细胞可获自若干来源, 包括多种成人组织 (诸如骨髓) 以及胚胎组织。

[0005] 某些干细胞表达为 c-kit 受体、青灰因子 (Steel factor) 受体及干细胞因子受体的抗原因子 CD117。c-kit 的基因编码干细胞因子 (SCF) 的酪胺酸激酶生长因子, 其亦称为肥大细胞生长因子且为血细胞生成、黑素生成及生育力所必需。应了解, CD117 在造血干细胞、肥大细胞、生殖细胞、黑素细胞、某些基底上皮细胞、乳房的腔室上皮细胞及胃肠道的 Cajal 间质细胞中表达。CD117 在生殖细胞确立、维持及功能方面具有关键作用。研究指示在胚胎性腺中, CD117 及其相应配位体 SCF 为原胚生殖细胞存活及增殖所必需。另外, 研究指示 CD117 及其相应配位体 SCF 为响应促性腺激素产生配子所必需。换言之, 与配位体 SCF 组合的 CD117 为睾丸生殖细胞、精原细胞的存活和增殖以及为卵母细胞的生长和成熟所必需。研究还指示 CD117 为活体外原始造血细胞增殖的有效生长因子。

[0006] 干细胞的治疗应用以骨髓的早期实验起始。近一个世纪前, 医师将骨髓经口投于患有贫血及白血病的患者。尽管该疗法并不成功, 但实验室研究者最终证实可以将取自其它小鼠的骨髓输注至具有缺陷性骨髓的小鼠的血流中而使其恢复健康。这促使医师推测将骨髓自一人移植至另一人 (同种异体移植) 是否可行。来自骨髓及脐带的干细胞已广泛地主要用于造血移植以治疗多种疾病。自利用骨髓的第一干细胞移植出发, 已鉴别出干细胞的其它来源, 包括羊水、胎盘、脐带、带内膜、花顿氏胶 (Wharton's Jelly)、脂肪及上皮细胞。

[0007] 当研究者遇到由细胞的身体排斥反应（稍后表征为移植物抗宿主疾病（GVHD））所引起的疾病及 / 或死亡时，人类免疫系统的作用，亦即防卫本身免受感染及外来物质的身体固有机制，成为早期移植中的关键考虑因素。直至发现人类组织相容性抗原与人类免疫系统之间的关系之后才以较大规模尝试在人类中进行骨髓移植。体内大多数细胞表面上所发现的这些蛋白质被称为人类白血球抗原或 HLA 抗原。身体免疫系统使用这些 HLA 抗原以鉴别哪些细胞属于体内且哪些不属于。每当免疫系统不识别细胞上的抗原时，其即产生抗体及破坏细胞的其它物质。身体寻找且破坏的对象为致感染细菌、病毒、肿瘤细胞及外来对象（诸如碎片）。以此方式，免疫系统防卫身体抵抗可进入体内且引起损害的物质。视治疗所靶向的疾病病况而定，利用个体自身干细胞的自体移植可具有由准确 HLA 匹配效益所产生的某些潜在优势。供体与受体的 HLA 抗原匹配愈接近，所捐赠骨髓的 T 细胞（免疫系统细胞）将反抗患者身体的可能性愈小。

[0008] 来源于骨髓的成人干细胞的移植已成功用于治疗人类疾病，诸如范康尼氏贫血（Fanconi's Anemia）、再生障碍性贫血、急性及慢性白血病、脊髓增生性病症、骨髓发育不良症候群、淋巴增生性病症及其它恶性疾病。骨髓成人干细胞的替代性来源包括外周血液祖细胞、脐带血及自这些来源收集的间质干细胞。然而，存在与成人干细胞的治疗用途相关的若干缺点。已显示成人干细胞具有有限功效，诸如在培养中的若干继代后生长缓慢及多能性损失。

[0009] 胚胎干细胞已证实增殖潜力使其适合于细胞疗法。然而，已显示人类胚胎干细胞产生畸胎瘤。另外，自胚胎收集干细胞部分由于在收集过程中破坏生长中的胚胎而受到伦理关注。

[0010] 已鉴别干细胞的其它来源，其克服至少一些与成人及胚胎干细胞相关的问题。

[0011] 一种来源为含有人类成人干细胞的脐带血。脐带血已出于若干原因而证实为干细胞的可行来源。脐带血相对容易在分娩小孩期间取得且经处理以供超低温保存。脐带血提供能细胞分裂及分化成多种细胞类型的干细胞的合适来源。来源于脐带血的干细胞已在临床背景下使用以作为骨髓替代者来治疗若干已知人类病症及疾病。详言之，来源于脐带血的干细胞已成功用于造血移植、造血重建及治疗脊髓损伤。另外，已显示来源于脐带血的干细胞在动物模型中逆转中风及心肌梗塞的效应。

[0012] 已确定子宫内膜 / 月经干细胞（MSC）证实在培养物中与胚胎干细胞类似的增殖能力。MSC 亦展现某些间质干细胞标记及某些胚胎干细胞标记，其证实活体外及活体内多能性能力的潜力。MSC 用作干细胞来源出于若干原因系有益的。首先，MSC 证实分化成特定细胞谱系的能力。其次，任何伦理关注或考虑因素系藉由收集另外视为废弃的 MSC 而得以缓和。最后，在月经周期期间取得 MSC 的制程对供体相对不赋予危险性。

[0013] 相信，不存在关于收集 MSC 抑或取得合适样本量的 MSC 的已知方法，及适用于获得表现某些间质干细胞标记及 / 或某些胚胎样抗原因子（尤其由 MSC 表现的细胞表面因子）的活的、最大产量 MSC 的相关处理及细胞收集方法。

[0014] 因此，目前需要收集合适量的存在于月经期间排出的体液、血液及组织中的 MSC 以为即期运送至实验室作准备的方法，该实验室处理月经体液、血液及组织以分离及超低温保存或处理 MSC。目前亦需要处理月经体液、血液及组织以获得来源于月经血液、体液及组织的 MSC 的细胞制剂的方法。亦进一步需要自月经流分离、选择及 / 或培养 MSC 以为超

低温保存、进一步处理或治疗用途作准备,诸如,可表现包含 CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49e、CD49f、CD59、CD81、CD105、CD166 及 HLA I 类的细胞表面标记或细胞内标记中的至少一者,而表现较低量或不表现细胞标记 CD3 及 HLA II 类中的至少一者的细胞。其它细胞标记特征系以实施本发明的实施例的结果提供。更进一步需要超低温保存获得及收集自月经血液、体液及组织的 MSC 或特异性 MSC 的群。

发明内容

[0015] 目前需要易于收集、处理及超低温保存且具有治疗、药妆或其它用途的潜力的干细胞来源。本发明的方法、制程及组合物满足此需要。

[0016] 本发明提供获得月经干细胞的方法。在一实施例中,该方法包含自月经期间所收集的月经流分离月经干细胞的步骤。自月经流分离月经干细胞的步骤包含以离心、密度梯度离心、过滤或沉降的至少一个步骤处理该月经流。分离月经干细胞的步骤亦可视情况包含以包含至少一种抗生素的溶液净化该等月经干细胞。在该实施例中,该方法包含处理分离自月经流的月经干细胞的另一步骤。处理分离自月经流样本的月经干细胞的步骤可包含至少一个以下步骤:针对某些细胞表面标记选择月经干细胞,或培养来自月经干细胞的处理后样本、所选样本或解冻样本的月经干细胞。

[0017] 在一实施例中,处理分离自月经流的月经干细胞的步骤包含针对至少一种包含 CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49e、CD49f、CD59、CD81、CD105、CD166 及 HLA I 类的细胞标记选择月经干细胞的步骤。所选细胞可藉由培养月经干细胞来进一步处理。可接着使所培养的月经干细胞经受针对至少一种包含 CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49e、CD49f、CD59、CD81、CD105、CD166 及 HLA I 类的细胞标记选择月经干细胞的又一步骤。可使所选月经干细胞经受培养该等月经干细胞的又一步骤。在选择或培养月经干细胞的步骤之后的任一时刻,可使该等月经干细胞经受制备供超低温保存或供治疗或药妆用的月经干细胞的步骤。可接着将已准备超低温保存的月经干细胞超低温保存且稍后解冻以供使用。

[0018] 在另一实施例中,处理自月经流分离的月经干细胞的步骤包含培养月经干细胞。可接着使所培养的月经干细胞经受针对某些细胞表面标记选择月经干细胞的步骤。可接着使所选月经干细胞经受培养该等月经干细胞的又一步骤。可接着使进一步培养的月经干细胞经受针对细胞标记选择月经干细胞的另一步骤。在选择或培养月经干细胞的步骤之后的任一时刻,可使该等月经干细胞经受制备供超低温保存或供治疗或药妆用的月经干细胞的步骤。可接着将已准备超低温保存的月经干细胞超低温保存且稍后解冻以供使用。

[0019] 在又一实施例中,处理自月经流分离的月经干细胞的步骤包含超低温保存月经干细胞的步骤。

[0020] 在另一实施例中,处理月经干细胞的步骤包含制备包含月经干细胞及维持月经干细胞的生存力的细胞培养基的组合物的又一步骤。

[0021] 在又一实施例中,处理月经干细胞的步骤包含制备包含月经干细胞及药妆制剂的组合物的又一步骤。

[0022] 在又一实施例中,可将经超低温保存的月经干细胞解冻以为进一步处理作准备,该进一步处理包含培养或选择月经干细胞的至少一个步骤。或者,可将经超低温保存的月经干细胞解冻以为治疗或药妆用途作准备。

[0023] 本发明亦提供自月经流收集月经干细胞的制程。在一实施例中,该制程包含在月经周期期间取得月经流,将该月经流输送至处理设施中,将月经干细胞自月经流分离成细胞制剂,及处理月经干细胞的细胞制剂。

[0024] 本发明亦提供自月经流收集月经干细胞的系统。在一实施例中,该系统包含一月经干细胞分离器,其中月经干细胞分离器将月经干细胞自月经流分离;一月经干细胞收集器,其中该月经干细胞收集器收集月经干细胞;及一月经干细胞处理器,其中该月经干细胞处理器制备供治疗用或供超低温保存的月经干细胞。

[0025] 本发明提供超低温保存月经干细胞的方法。在一实施例中,该方法包含以下步骤:自月经期间所收集的月经流分离月经干细胞,收集自月经流分离的月经干细胞,及超低温保存自月经流分离的月经干细胞。

[0026] 包括自月经流分离月经干细胞的步骤的超低温保存月经干细胞的方法包含由离心、密度梯度离心、过滤或沉降的至少一个步骤处理月经流。分离月经干细胞的步骤亦可视情况包含以包含至少一种抗生素的溶液净化该等月经干细胞。该方法可包含在至少一个超低温保存或进一步细胞培养的步骤之前的至少一个针对细胞标记选择月经干细胞的步骤。该方法可包含至少又一培养所选月经干细胞的步骤。

[0027] 包括收集自月经流分离的月经干细胞的步骤的超低温保存月经干细胞的方法包含至少一个培养月经干细胞的步骤。该方法可包含至少一个自细胞培养物选择月经干细胞的步骤。

[0028] 本发明提供藉由包含以下步骤的制程所获得的月经干细胞的群:自月经期间所收集的月经流分离月经干细胞及收集自月经流分离的月经干细胞。

[0029] 本发明提供富集自月经流所收集的月经干细胞群的制程。在一实施例中,该制程包含自月经期间所收集的月经流分离月经干细胞及收集自月经流分离的月经干细胞的步骤。该制程包含至少一个针对包含 CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49e、CD49f、CD59、CD81、CD105、CD166 及 HLA I 类的群的至少一个细胞标记选择月经干细胞的步骤。该制程可包含至少一个培养月经干细胞的步骤。该制程可包含至少一个选择月经干细胞的步骤及至少一个培养所选月经干细胞的步骤。分离月经干细胞的步骤亦可视情况包含以包含至少一种抗生素的溶液净化该等月经干细胞。在替代者中,该制程可包含至少一个培养月经干细胞的步骤及至少一个自细胞培养物选择月经干细胞的步骤。

[0030] 本发明提供富集月经干细胞群的制程。在一实施例中,该制程包含以下步骤:自月经流分离月经干细胞,收集自月经流分离的月经干细胞及选择表现与 MSC 相关的细胞标记的月经干细胞。

[0031] 本发明提供包含细胞标记中的至少一者的月经干细胞群,该等细胞标记包含 CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49e、CD49f、CD59、CD81、CD105、CD166 及 HLA I 类。

[0032] 本发明提供包含月经干细胞的细胞富集群,该等月经干细胞表现包含 CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49e、CD49f、CD59、CD81、CD105、CD166 及 HLA I 类的细胞标记中的至少一者,且较低表现或不表现包含细胞标记 CD3 及 HLA II 类中的至少一者的细胞标记。

[0033] 本发明提供包含至少一个月经干细胞及超低温保存剂的组合物。

[0034] 本发明提供包含至少一个月经干细胞及细胞培养基的组合物。

[0035] 本发明提供包含至少一个月经干细胞及药妆剂的组合物。

[0036] 本发明提供包含至少一个月经干细胞及维持细胞生存力的保存剂的组合物。

[0037] 本发明提供包含至少一个月经干细胞及细胞培养基的组合物,其系于容器中以为该至少一个月经干细胞的治疗用途作准备。

[0038] 根据本发明所收集的细胞可在治疗、药妆或再生医学或其它合适应用中使用。

[0039] 本发明提供以下方法及制程:收集包含月经血液、体液、细胞及组织的月经流的至少一个样本;藉由将月经流样本与收集培养基组合来制备供输送用的月经流;及将该月经流样本输送至处理设施中,在此处理月经流样本以分离、收集及处理供超低温保存或供治疗或药妆用的 MSC。

[0040] 本发明亦提供以产生高产量的活 MSC 的方式分离、收集及浓缩 MSC 的方法及制程。

[0041] 在一实施例中,选择月经干细胞的步骤可包括阳性选择表现与月经干细胞一起存在的细胞标记中的至少一者的细胞。在一替代者中,选择月经干细胞的步骤可包含藉由移除表现不与月经干细胞一起存在的细胞标记的不合需要细胞来阴性选择细胞。阴性选择可包含选择表现(例如)CD45 或不存在于月经干细胞上的其它细胞表面标记的细胞。

[0042] 在又一实施例中,选择月经干细胞的步骤可包含使用市售耗尽或浓缩套组,诸如来自 Stem Cell Technologies, Inc. 的 RosetteSep、EasySep、RoboSep、StemSep 或 SpinSep。

[0043] 在又一实施例中,选择月经干细胞的步骤可包含使用 **ALDEFLUOR[®]** (Aldagen, Inc.) 选择月经干细胞以选择 MSC 且排除无完整细胞膜的死亡及/或濒死细胞。**ALDEFLUOR[®]**套组可用于选择对与月经干细胞一起存在的表面标记呈阳性的 ALDH^{br} 细胞、谱系-抗原阴性 (Lin⁻) 细胞、群落形成细胞、长期培养起始细胞及 NOD/SCID 再生细胞。

[0044] 在又一实施例中,选择月经干细胞的步骤可包含使该等月经干细胞经受血清脱历时约 2 周至约 4 周以浓缩表现相关 MSC 标记的 MSC。一旦收集且培养细胞,即应消除造血干细胞。

附图说明

[0045] 图 1 为一般说明本发明的总体方法及制程的流程图;

[0046] 图 2 为展示收集及超低温保存月经干细胞的本发明的一实施例的流程图;

[0047] 图 3 为展示收集及超低温保存月经干细胞的本发明的另一实施例的流程图;

[0048] 图 4 为展示收集及超低温保存月经干细胞的本发明的另一实施例的流程图;

[0049] 图 5 为展示收集及超低温保存月经干细胞的本发明的又一实施例的流程图;

[0050] 图 6 为展示收集及超低温保存月经干细胞的本发明的又一实施例的流程图;

[0051] 图 7 为展示收集及超低温保存月经干细胞的本发明的又一实施例的流程图;

[0052] 图 8 为展示收集及超低温保存月经干细胞的本发明的又一实施例的流程图;

[0053] 图 9 为展示收集及超低温保存月经干细胞的本发明的另一实施例的流程图;

[0054] 图 10 为展示收集及超低温保存月经干细胞的本发明的又一实施例的流程图;

[0055] 图 11 为展示收集月经干细胞及制备供治疗用的月经干细胞的本发明的一实施例的流程图;

[0056] 图 12 为展示收集月经干细胞及制备供治疗用的月经干细胞的本发明的又一实施

例的流程图；

[0057] 图 13 为展示收集月经干细胞及制备供治疗用的月经干细胞的本发明的又一实施例的流程图；

[0058] 图 14 为展示收集月经干细胞及制备供治疗用的月经干细胞的本发明的又一实施例的流程图；

[0059] 图 15 为展示收集月经干细胞及制备供治疗用的月经干细胞的本发明的又一实施例的流程图；

[0060] 图 16 为展示收集月经干细胞及制备供治疗用的月经干细胞的本发明的另一实施例的流程图；

[0061] 图 17 为展示收集月经干细胞及制备供治疗用的月经干细胞的本发明的另一实施例的流程图；

[0062] 图 18 为展示收集月经干细胞及制备供治疗用的月经干细胞的本发明的又一实施例的流程图；

[0063] 图 19 为展示收集月经干细胞及制备供治疗用的月经干细胞的本发明的另一实施例的流程图；

[0064] 图 20 为展示解冻超低温保存的月经干细胞以为治疗用途作准备的本发明的一实施例的流程图；

[0065] 图 21 为展示制备供治疗用的经超低温保存的月经干细胞的本发明的另一实施例的流程图；

[0066] 图 22 为展示制备供治疗用的经超低温保存的月经干细胞的本发明的另一实施例的流程图；

[0067] 图 23 为展示制备供治疗用的经超低温保存的月经干细胞的本发明的又一实施例的流程图；

[0068] 图 24 为展示制备供治疗用的经超低温保存的月经干细胞的本发明的又一实施例的流程图；

[0069] 图 25 为展示制备供治疗用的经超低温保存的月经干细胞的本发明的又一实施例的流程图；

[0070] 图 26 为展示制备供治疗用的经超低温保存的月经干细胞的本发明的又一实施例的流程图；

[0071] 图 27 为展示制备供治疗用的经超低温保存的月经干细胞的本发明的另一实施例的流程图；

[0072] 图 28 为展示制备供治疗用的经超低温保存的月经干细胞的本发明的又一实施例的流程图；

[0073] 图 29a 至图 29j 展示处理后样本及关于如下所述的 M2-01 的同型的流式细胞仪分析的结果。自 M2-01 收集约 1ml 细胞悬浮液形式的处理后样本且将其置于分析管中以供流式细胞仪分析。结果指示占 TNC 群 0.4% 的 CD117+ 细胞的浓度、占 TNC 群 17.7% 的 CD44+ 细胞的浓度、占 TNC 群 3.6% 的 CD166+ 细胞的浓度、占 TNC 群 8.0% 的 CD105+ 细胞的浓度、占 TNC 群 6.8% 的 CD90+ 细胞的浓度、占 TNC 群 0.1% 的 CD29+ 细胞的浓度、占 TNC 群 0.1% 的 CD34+ 细胞的浓度，及如由 7AAD 所测定的 95.4% 细胞生存力；

[0074] 图 30a 至图 30e 展示关于经由本发明的 CD117 选择方法所获得的阳性溶离份中的细胞的流式细胞仪分析的结果。CD117 选择后,收集约 1ml 细胞悬浮液且将其置于分析管中以便流式细胞仪分析。结果指示占 TNC 群 7.2% 的 CD117+ 细胞的浓度、占 TNC 群 93.6% 的 CD44+ 细胞的浓度及由 7AAD 所测定的 95.8% 细胞生存力。结果系藉由根据本发明的流式细胞仪分析来运作处理样本且减去以与 IgG 抗体的同型一起运作的处理后样本所获得的背景计算值来计算;

[0075] 图 31a 至图 31cc 说明处理后样本及关于如下所述的 M2-02C 的同型的流式细胞仪分析的结果。收集约 1ml 细胞悬浮液形式的处理后样本且将其置于分析管中以便流式细胞仪分析。结果指示占 TNC 群 0.2% 的 CD117+ 细胞的浓度、占 TNC 群 1.8% 的 CD44+ 细胞的浓度、占 TNC 群 0.1% 的 CD166+ 细胞的浓度、占 TNC 群 1.1% 的 CD105+ 细胞的浓度、占 TNC 群 0.4% 的 CD90+ 细胞的浓度、占 TNC 群 0.5% 的 CD29+ 细胞的浓度、占 TNC 群 0.0% 的 CD34+ 细胞的浓度,及如由 7AAD 所测定的 99.5% 细胞生存力;

[0076] 图 32a 至图 32cc 说明关于经由本发明的 CD117 选择方法所获得的阳性溶离份中的细胞的流式细胞仪分析的结果。收集约 1ml 细胞悬浮液形式的阳性溶离份且将其置于分析管中以便流式细胞仪分析。结果指示占 TNC 群 18.40% 的 CD117+ 细胞的浓度、占 TNC 群 93.0% 的 CD44+ 细胞的浓度、占 TNC 群 89.2% 的 CD166+ 细胞的浓度、占 TNC 群 81.4% 的 CD105+ 细胞的浓度、占 TNC 群 78.1% 的 CD90+ 细胞的浓度、占 TNC 群 73.6% 的 CD29+ 细胞的浓度、占 TNC 群 0.1% 的 CD34+ 细胞的浓度及如由 7AAD 所测定的 91.9% 细胞生存力。结果系藉由根据本发明的流式细胞仪分析来运作处理样本且减去以与 IgG 抗体的同型一起运作的处理后样本所获得的背景计算值来计算;

[0077] 图 33a 至图 33r 说明在如本文进一步详述的培养、超低温保存、解冻及解冻后继代中的若干继代后关于 M2-03E 的细胞的流式细胞仪分析的结果。如藉此所示,流式细胞仪结果显示该等细胞表现 MHC I、CD44、CD29、CD90、SSEA-4、CD105、CD49f、CD9、CD166、CD166 及 CXCR4 且较低表现或不表现 CD133、MHC II、CD34、CD45 及 CD38;

[0078] 图 34a 至图 34f 展示月经干细胞 M2-03E 对如图 34a 所示的 CD117 及如图 34c 所示的 SSEA-4 以及如图 34e 所示的 CD117 与 SSEA-4 共定位呈阳性染色。阴性对照对如图 34b 所示的 CD117、如图 34d 所示的 SSEA-4 或如图 34f 所示的 CD117 与 SSEA-4 共定位不呈阳性染色。

[0079] 图 35a 及图 35b 展示月经干细胞 M2-03E 快速生长且表现多能性标记。图 35a 展示月经干细胞 M2-03E 以约 24 小时至约 36 小时的倍增时间在超低温保存前培养中快速生长。此快速生长允许以八次倍增自 50,000 个细胞扩增至 48,000,000 个细胞。如由 RT-PCR 所测定,图 35b 展示月经干细胞 M2-03E 以于培养中至多约 12 个继代的 RNA 水平表现 Oct-4, L, 梯带;水;ESC,胚胎干细胞;P12,第 12 代;

[0080] 图 36a 至图 36g 展示月经干细胞 M2-03E 分化成神经组织。月经干细胞经神经诱导以分化成表现如图 36a 至图 36c 所示的 04 及 GalC 的少突神经胶质细胞。月经干细胞亦表现如图 36d 所示的 Map-2、如图 36e 所示的 Tub-3 及如图 36f 所示的波形蛋白 (Vimentin)。分化细胞的 RT-PCR 结果展示通常对于神经细胞的 RNA 水平表现,RT-PCR:L,梯带;W,水;B,脑对照;神经诱导的月经干细胞;

[0081] 图 37a 至图 37d 展示月经干细胞 M2-03E 分化成心脏组织。月经干细胞经 8 μ M Aza

处理且经图 37b 的免疫细胞化学所示展现肌动蛋白的强表现。如图 37a 所示的肌钙蛋白表现及如图 37c 所示的连接蛋白 43 (connexin 43) 表现系藉由用 800 μ M SNAP 处理细胞来刺激。RT-PCR 确认如图 37d 所示的心脏分化, RT-PCR :L, 梯带 ;W, 水 ;H, 心脏对照 ;心脏诱导 ;

[0082] 图 38a 至图 38f 展示月经干细胞 M2-03E 分化成中胚层型组织。与图 38a 所示的对照相比, 如图 38b 所示诱导经针对脂肪空泡的油红 O 染色而指示分化成脂肪组织的细胞。与如图 38c 所示的对照相比, 当如图 38d 所示诱导时细胞经艾尔逊蓝 (alcian blue) 染色而指示分化成软骨组织。与图 38e 相比, 如图 38f 所示细胞经茜素红 S 染色而指示钙沉积物存在 ;

[0083] 图 39 为展示在解冻后培养的第 12 代, M2-03E 的月经干细胞表现端粒酶活性的图 ; hESC, 人类胚胎干细胞 ;MEF, 小鼠胚胎纤维母细胞 ;MenSCs P12 ;

[0084] 图 40 为展示以分成 3 组且在预设条件下收集的 161 个样本进行研究的结果的图, 其系为了分析与本发明的月经干细胞收集方法相关的变量。进行该研究以测定使用有及无抗生素的收集培养基及在有及无冰的情况下运送月经流样本的影响。图 40 展示总成核细胞计数分析平均在对于三组所收集的所有样本中收集的每个样本为约 7,900,000 个细胞 ;

[0085] 图 41 为展示图 40 所涉及的研究结果的图。图 41 展示处理后样本的细胞生存力平均在对于三组所收集的所有样本中为约 74% 的生存力 ;

[0086] 图 42 为展示图 40 所涉及的研究结果的图。图 42 展示对于三组所收集的所有样本的平均温度平均为约 15°C ;

[0087] 图 43 为展示图 40 所涉及的研究结果的图。图 43 展示对于三组所收集的所有样本的平均样本体积平均为约 11ml, 其包含约 1ml 月经流样本及约 10ml 收集培养基 ;及

[0088] 图 44 为展示图 40 所涉及的研究结果的图。图 44 展示自收集至处理设施处接收所计算的平均样本龄期处于约小于 5 小时至大于 140 小时的范围内。

具体实施方式

[0089] 本发明将藉由考虑本发明的实施例的以下详细描述连同如附随描述及图式中所述的特定例示性实施例而便于理解。应了解, 本发明的图式及描述已经简化以出于清楚理解本发明的目的来说明相关要素。

[0090] 现参看图 1 至图 44, 本发明提供与自月经期间排出的血液、细胞、体液及组织 (本揭示案中于本文中亦称作 " 月经流 ") 分离且根据本发明的方法、制程及系统收集的月经干细胞的取得相关的方法、制程、系统及组合物。如贯穿本发明的揭示内容所用的短语 " 子宫内膜 / 月经细胞 " 、 " 子宫内膜 / 月经干细胞 " 、 " 月经干细胞 " 及 " 月经细胞 " 及术语 " MSC " 及 " 细胞 " 一般关于表现包括 (但不限于) CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49e、CD49f、CD59、CD81、CD105、CD166 及 HLA I 类的细胞标记或细胞内标记中的至少一者而表现较低量或不表现 CD3 及 MHC II 的自月经流收集的任意一或多个细胞而通篇使用。尽管术语 " 细胞 " 以单数含义使用, 但其亦可以复数含义使用以指代本发明的一个以上细胞。尽管细胞的上述特征系作为例示性特征提供, 但月经干细胞的其它细胞表面特征系于本文中贯穿本发明的揭示内容提供 (包括 (但不限于) 于此任何表及图式上所提供的特征) 且提供关于本发明的月经干细胞的进一步揭示内容。

[0091] 现尤其参看图 36 至图 38, 应了解, 一些干细胞性质上具有多能性, 此系归因于该

等细胞分化成许多独特细胞类型的能力。多能性细胞具有经历分化成许多不同哺乳动物细胞类型的能力。详言之,如图 36 至图 38 中所说明,本发明的 MSC 亦表现分化成各种独特细胞谱系的能力,该等细胞谱系系诸如神经谱系、心脏谱系、成软骨谱系、成脂谱系及成骨谱系。

[0092] 相信本发明的 MSC 可能够分化成体内 260 个体细胞中的任一者。举例而言,细胞可至少能够分化成肝细胞、胰腺细胞、肌源细胞、成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、上皮细胞、神经细胞、角质细胞及心肌细胞。如共培养系统中所见,细胞亦可具有与诸如肝细胞、胰腺细胞、肌源细胞、成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、上皮细胞、神经细胞、角质细胞及心肌细胞的其它预处理细胞一起培养时分化的能力。自分化获得的细胞及自共培养获得的细胞亦可具有用于置换或再生疗法、其它治疗应用、药妆、器官排斥疗法及其它应用的处理中的潜力。

[0093] 详言之, MSC 在治疗、药妆及其它应用中的潜在用途出于许多原因是有益的,这是由于 MSC : (a) 易于自其它方面视为生物废物的无争议来源获得, (b) 在无需医学培训的情况下由供体有效收集, (c) 高度增殖, (d) 能分化成所要细胞类型, (e) 能自体应用, (f) 能同种异体应用, (g) 能提供可用作多个疗法的潜在来源的单细胞株, (h) 能与其它健康细胞潜在地共同培养, (i) 能用作专用再生保健解决方案的来源, 及 (j) 能经十年在规则周期上即期及多次收集。

[0094] 自其它来源获得的干细胞的用途已在用于以下病况的各种形式的再生医学中使用: 糖尿病、心肌梗塞、瓣膜 / 动脉置换、帕金森氏病 (Parkinson' s)、阿兹海默氏病 (Alzheimer' s)、MS、中风疗法、胰岛素再生、抗老化血清、烧伤 / 创伤愈合绷带、痤疮管理、白癫风、假发、牙齿再生、假乳 / 丰乳、肝硬化、阴茎增大、运动疗法、贫血、白血病、淋巴瘤、肺纤维化、镰刀型细胞贫血、骨骼置换、骨质疏松症、脊柱侧弯、类风湿性关节炎、脊髓损伤、膝 / 髌 / 肘置换、激素置换疗法、PMS / 抑郁管理、自闭症、不孕疗法、视力再生及晶状体置换。

[0095] 一般而言及在一实施例中, 本发明提供自月经流获得及收集 MSC 的方法。在另一实施例中, 本发明提供自月经流收集 MSC 的系统。在另一实施例中, 本发明提供超低温保存自月经流所收集的 MSC 的方法。在其它实施例中, 包含 MSC 群的产物可藉由自月经流获得及分离 MSC 的各种制程来收集。在其它实施例中, 本发明提供 MSC 的富集群及富集自月经流获得的 MSC 群的制程。在其它实施例中, 本发明提供包含 MSC 及其它试剂的各种组合物, 诸如, 包含 MSC 及超低温保存剂的组合物、包含 MSC 及至少一种药妆剂的组合物、及包含 MSC 及保存剂的组合物。本发明的这些各个实施例在下文中进一步详述。

[0096] 本发明的总体方法及制程的例示性图解于图 1 中说明。一般而言, 各个步骤可用于取得月经流且处理该月经流以获得可经进一步处理用于特定用途的 MSC。详言之, 可将 MSC 超低温保存, 经由细胞选择或培养的单一或多个步骤富集, 及 / 或准备供治疗或药妆使用。贯穿本发明的实施, 可藉由诸如表征所收集的 MSC 的流式细胞仪及鉴别样本的任何可能污染的微生物分析的方法及制程对 MSC 及周围环境进行质量控制分析。

[0097] 图 1 所描绘的本发明的各个实施例系在图 2 至图 28 中以及本发明的工作实例的书面描述中进一步详述。

[0098] 现参看图 2, 本发明提供超低温保存 MSC 的方法及制程。根据图 2, 可以收集制程来收集月经流且接着将其转移至处理设施中, 在此可处理该月经流以分离及收集 MSC。自月

经流分离及收集 MSC 可经由用于使所收集的 MSC 数目最大化的离心、密度梯度离心、过滤或沉降方法来进行。一旦收集,即可将 MSC 进一步处理且与超低温保存剂组合以为超低温保存作准备且接着超低温保存。可接着将经超低温保存的 MSC 稍后解冻以供使用。

[0099] 现参看图 3,本发明提供超低温保存 MSC 的方法及制程。根据图 3,可将月经流收集且转移至处理设施中,在此可接着处理该月经流以分离及收集 MSC。自月经流分离且收集 MSC 可经由用于使所收集的 MSC 数目最大化的离心、密度梯度离心、过滤或沉降方法来进行。一旦收集,即可由表现某些细胞标记的所选 MSC 来进一步富集或浓缩 MSC,该等细胞标记系诸如与 MSC 相关的细胞标记中的任意一或多者。可将经选择及甚至未经选择的 MSC 处理且与超低温保存剂组合以为超低温保存作准备且接着超低温保存。可接着将经超低温保存的 MSC 稍后解冻以供使用。

[0100] 现参看图 4,本发明提供超低温保存 MSC 的方法及制程。根据图 4,可将月经流收集且转移至处理设施中,在此可接着处理该月经流以分离及收集 MSC。自月经流分离及收集 MSC 可经由用于使所收集的 MSC 数目最大化的离心、密度梯度离心、过滤或沉降方法来进行。一旦收集,即可由表现某些细胞标记的所选 MSC 来进一步富集或浓缩 MSC,该等细胞标记系诸如与 MSC 相关的细胞标记中的任意一或多者。可接着培养经选择及甚至未经选择的 MSC 以使该等 MSC 扩增。可接着将经培养的 MSC 与超低温保存剂组合以为超低温保存作准备且接着超低温保存。可接着将经超低温保存的 MSC 稍后解冻以供使用。

[0101] 现参看图 5,本发明提供超低温保存 MSC 的方法及制程。根据图 5,可将月经流收集且转移至处理设施中,在此可接着处理该月经流以分离及收集 MSC。自月经流分离及收集 MSC 可经由用于使所收集的 MSC 数目最大化的离心、密度梯度离心、过滤或沉降方法来进行。一旦收集,即可由表现某些细胞标记的所选 MSC 来进一步富集或收集 MSC,该等细胞标记系诸如与 MSC 相关的细胞标记中的任意一或多者。可接着培养经选择及甚至未经选择的 MSC 以使该等 MSC 扩增。可接着针对特异性细胞表面标记来进一步选择经培养的 MSC 以富集或收集特异性 MSC。可将经选择及甚至未经选择的 MSC 与超低温保存剂组合以为超低温保存作准备且接着超低温保存。可接着将经超低温保存的 MSC 稍后解冻以供使用。

[0102] 现参看图 6,本发明提供超低温保存 MSC 的方法及制程。根据图 6,可将月经流收集且转移至处理设施中,在此可接着处理该月经流以分离及收集 MSC。自月经流分离及收集 MSC 可经由用于使所收集的 MSC 数目最大化的离心、密度梯度离心、过滤或沉降方法来进行。一旦收集,即可由表现某些细胞标记的所选 MSC 来进一步富集或收集 MSC,该等细胞标记系诸如与 MSC 相关的细胞标记中的任意一或多者。可接着培养经选择及甚至未经选择的 MSC 以使该等 MSC 扩增。可接着针对特异性细胞表面标记来进一步选择经培养的 MSC 以富集或收集特异性 MSC。可接着进一步培养经选择及甚至未经选择的 MSC 以扩增 MSC 数目。可接着将 MSC 与超低温保存剂组合以为超低温保存作准备且接着超低温保存。可接着将经超低温保存的 MSC 稍后解冻以供使用。

[0103] 现参看图 7,本发明提供超低温保存 MSC 的方法及制程。根据图 7,可将月经流收集且转移至处理设施中,在此可接着处理该月经流以分离及收集 MSC。自月经流分离及收集 MSC 可经由用于使所收集的 MSC 数目最大化的离心、密度梯度离心、过滤或沉降方法来进行。一旦收集,即可培养 MSC 以扩增 MSC 数目。可将经培养的 MSC 处理且与超低温保存剂组合以为超低温保存作准备且接着超低温保存。可接着将经超低温保存的 MSC 稍后解冻以

供使用。

[0104] 现参看图 8, 本发明提供超低温保存 MSC 的方法及制程。根据图 8, 可将月经流收集且转移至处理设施中, 在此可接着处理该月经流以分离及收集 MSC。自月经流分离及收集 MSC 可经由用于使所收集的 MSC 数目最大化的离心、密度梯度离心、过滤或沉降方法进行。一旦收集, 即可培养 MSC 以扩增 MSC 数目。可藉由选择表现某些细胞标记的 MSC 来富集或浓缩经培养的 MSC, 该等细胞标记系诸如与 MSC 相关的细胞标记中的任意一或多个者。可接着将经选择及甚至未经选择的 MSC 分别与超低温保存剂组合以为超低温保存作准备且接着超低温保存。可接着将经超低温保存的 MSC 稍后解冻以供使用。

[0105] 现参看图 9, 本发明提供超低温保存 MSC 的方法及制程。根据图 9, 可将月经流收集且转移至处理设施中, 在此可接着处理该月经流以分离及收集 MSC。自月经流分离及收集 MSC 可经由用于使所收集的 MSC 数目最大化的离心、密度梯度离心、过滤或沉降方法进行。一旦收集, 即可培养 MSC 以扩增 MSC 数目。可藉由选择表现某些细胞标记的 MSC 来富集或浓缩经培养的 MSC, 该等细胞标记系诸如与 MSC 相关的细胞标记中的任意一或多个者。可接着培养经选择及甚至未经选择的 MSC 以使该等 MSC 扩增。可将 MSC 的经选择及甚至未经选择的培养物分别与超低温保存剂组合以为超低温保存作准备且接着超低温保存。可接着将经超低温保存的 MSC 稍后解冻以供使用。

[0106] 现参看图 10, 本发明提供超低温保存 MSC 的方法及制程。根据图 10, 可将月经流收集且转移至处理设施中, 在此可接着处理该月经流以分离及收集 MSC。自月经流分离及收集 MSC 可经由用于使所收集的 MSC 数目最大化的离心、密度梯度离心、过滤或沉降方法进行。一旦收集, 即可培养 MSC 以扩增 MSC 数目。可藉由选择表现某些细胞标记的 MSC 来富集或浓缩经培养的 MSC, 该等细胞标记系诸如与 MSC 相关的细胞标记中的任意一或多个者。可接着培养经选择及甚至未经选择的 MSC 以使该等 MSC 扩增。可针对特异性细胞标记来进一步选择 MSC 的经选择及未经选择的培养物。可接着将经选择及未经选择的细胞分别与超低温保存剂组合以为超低温保存作准备且接着超低温保存。可接着将经超低温保存的 MSC 稍后解冻以供治疗用。贯穿本发明的实施例的所有描述, 短语“治疗用途”包括使用 MSC 用于任何类型的干细胞疗法且亦包括药妆用途。

[0107] 现参看图 11, 本发明提供超低温保存 MSC 的方法及制程。根据图 11, 可将月经流收集且转移至处理设施中, 在此可接着处理该月经流以分离及收集 MSC。自月经流分离及收集 MSC 可经由用于使所收集的 MSC 数目最大化的离心、密度梯度离心、过滤或沉降方法进行。一旦收集, 即可将 MSC 处理且与维持细胞生存力的细胞培养基组合以为治疗用途作准备。

[0108] 现参看图 12, 本发明提供超低温保存 MSC 的方法及制程。根据图 12, 可将月经流收集且转移至处理设施中, 在此可接着处理该月经流以分离及收集 MSC。自月经流分离及收集 MSC 可经由用于使所收集的 MSC 数目最大化的离心、密度梯度离心、过滤或沉降方法进行。一旦收集, 即可培养 MSC 以扩增 MSC 数目。培养后, 可将 MSC 处理且与维持细胞生存力的细胞培养基组合以为治疗用途作准备。

[0109] 现参看图 13, 本发明提供超低温保存 MSC 的方法及制程。根据图 13, 可将月经流收集且转移至处理设施中, 在此可接着处理该月经流以分离及收集 MSC。自月经流分离及收集 MSC 可经由用于使所收集的 MSC 数目最大化的离心、密度梯度离心、过滤或沉降方法进行。

行。一旦收集,即可培养 MSC 以扩增 MSC 数目。可接着针对某些细胞标记来选择经培养的 MSC。可接着将经选择及未经选择的 MSC 分别与维持细胞生存力的细胞培养基组合以为治疗用途作准备。

[0110] 现参看图 14,本发明提供超低温保存 MSC 的方法及制程。根据图 14,可将月经流收集且转移至处理设施中,在此可接着处理该月经流以分离及收集 MSC。自月经流分离及收集 MSC 可经由用于使所收集的 MSC 数目最大化的离心、密度梯度离心、过滤或沉降方法进行。一旦收集,即可培养 MSC 以扩增 MSC 数目。可接着针对某些细胞标记来选择经培养的 MSC。可接着分别培养经选择及未经选择的 MSC 以扩增细胞数目。可接着将经培养的 MSC 分别与维持细胞生存力的细胞培养基组合以为治疗用途作准备。

[0111] 现参看图 15,本发明提供超低温保存 MSC 的方法及制程。根据图 15,可将月经流收集且转移至处理设施中,在此可接着处理该月经流以分离及收集 MSC。自月经流分离及收集 MSC 可经由用于使所收集的 MSC 数目最大化的离心、密度梯度离心、过滤或沉降方法进行。一旦收集,即可培养 MSC 以扩增 MSC 数目。可接着针对某些细胞标记来选择经培养的 MSC。可接着分别培养经选择及未经选择的 MSC 以扩增细胞数目。可接着针对某些细胞表面标记再次选择经分别培养的 MSC。可接着将经选择及未经选择的 MSC 分别与维持细胞生存力的细胞培养基组合以为治疗用途作准备。

[0112] 现参看图 16,本发明提供超低温保存 MSC 的方法及制程。根据图 16,可将月经流收集且转移至处理设施中,在此可接着处理该月经流以分离及收集 MSC。自月经流分离及收集 MSC 可经由用于使所收集的 MSC 数目最大化的离心、密度梯度离心、过滤或沉降方法进行。一旦收集,即可藉由选择表现某些细胞标记的 MSC 来富集或浓缩 MSC,该等细胞标记系诸如与 MSC 相关的细胞标记中的任意一或多个者。可接着将经选择及甚至未经选择的 MSC 分别与维持细胞生存力的细胞培养基组合以为治疗用途作准备。

[0113] 现参看图 17,本发明提供超低温保存 MSC 的方法及制程。根据图 17,可将月经流收集且转移至处理设施中,在此可接着处理该月经流以分离及收集 MSC。自月经流分离及收集 MSC 可经由用于使所收集的 MSC 数目最大化的离心、密度梯度离心、过滤或沉降方法进行。一旦收集,即可藉由选择表现某些细胞标记的 MSC 来富集或浓缩 MSC,该等细胞标记系诸如与 MSC 相关的细胞标记中的任意一或多个者。可接着分别培养经选择及甚至未经选择的 MSC 以扩增 MSC 数目。可接着将经培养的 MSC 与维持细胞生存力的细胞培养基组合以为治疗用途作准备。

[0114] 现参看图 18,本发明提供超低温保存 MSC 的方法及制程。根据图 18,可将月经流收集且转移至处理设施中,在此可接着处理该月经流以分离及收集 MSC。自月经流分离及收集 MSC 可经由用于使所收集的 MSC 数目最大化的离心、密度梯度离心、过滤或沉降方法进行。一旦收集,即可藉由选择表现某些细胞标记的 MSC 来富集或浓缩 MSC,该等细胞标记系诸如与 MSC 相关的细胞标记中的任意一或多个者。可接着分别培养经选择及甚至未经选择的 MSC 以扩增 MSC 数目。可接着针对特异性细胞标记来选择经培养的 MSC。可接着将经选择及未经选择的 MSC 与维持细胞生存力的细胞培养基组合以为治疗用途作准备。

[0115] 现参看图 19,本发明提供超低温保存 MSC 的方法及制程。根据图 19,可将月经流收集且转移至处理设施中,在此可接着处理该月经流以分离及收集 MSC。自月经流分离及收集 MSC 可经由用于使所收集的 MSC 数目最大化的离心、密度梯度离心、过滤或沉降方法进行。

行。一旦收集,即可藉由选择表现某些细胞标记的 MSC 来富集或浓缩 MSC,该等细胞标记系诸如与 MSC 相关的细胞标记中的任意一或多个者。可接着分别培养经选择及甚至未经选择的 MSC 以扩增 MSC 数目。可接着针对特异性细胞标记来选择经培养的 MSC。可接着进一步培养经选择及未经选择的 MSC 以扩增 MSC 数目。可接着将经培养的 MSC 与维持细胞生存力的细胞培养基组合以为治疗用途作准备。

[0116] 本发明的其它实施例系于图 20 至图 28 中提供且描述。该等其它实施例包括在根据本发明的先前所述实施例中的任一者或任何其它细胞收集及 / 或超低温保存方法或制程收集且超低温保存 MSC 的后处理 MSC。

[0117] 现参看图 20,本发明提供制备根据先前所述方法或制程中的任一者或任何其它细胞收集及 / 或超低温保存方法或制程收集且超低温保存的 MSC 的方法及制程。根据图 20,将经超低温保存的 MSC 解冻且接着与细胞培养基组合以供治疗用。

[0118] 现参看图 21,本发明提供制备根据先前所述方法或制程中的任一者或任何其它细胞收集及 / 或超低温保存方法或制程收集且超低温保存的 MSC 的方法及制程。根据图 21,将经超低温保存的 MSC 解冻且接着针对某些 MSC 细胞表面标记来选择。可接着将经选择及未经选择的细胞与细胞培养基组合以供治疗用。

[0119] 现参看图 22,本发明提供制备根据先前所述方法或制程中的任一者或任何其它细胞收集及 / 或超低温保存方法或制程收集且超低温保存的 MSC 的方法及制程。根据图 22,将经超低温保存的 MSC 解冻且接着针对某些 MSC 细胞表面标记来选择。可接着培养经选择及未经选择的细胞以扩增 MSC 数目。可接着将经培养的 MSC 与细胞培养基组合以供治疗用。

[0120] 现参看图 23,本发明提供制备根据先前所述方法或制程中的任一者或任何其它细胞收集及 / 或超低温保存方法或制程收集且超低温保存的 MSC 的方法及制程。根据图 23,将经超低温保存的 MSC 解冻且接着针对某些 MSC 细胞表面标记来选择。可接着培养经选择及未经选择的细胞以扩增 MSC 数目。可接着针对某些 MSC 细胞标记来选择经培养的 MSC。可接着将经选择及未经选择的细胞与细胞培养基组合以供治疗用。

[0121] 现参看图 24,本发明提供制备根据先前所述方法或制程中的任一者或任何其它细胞收集及 / 或超低温保存方法或制程收集且超低温保存的 MSC 的方法及制程。根据图 24,可将经超低温保存的 MSC 解冻且接着针对某些 MSC 细胞表面标记来选择。可接着培养经选择及未经选择的细胞以扩增 MSC 数目。可接着针对某些 MSC 细胞标记来选择经培养的 MSC。可接着培养经选择及未经选择的细胞以扩增 MSC 数目。可接着将经培养的 MSC 与细胞培养基组合以供治疗用。

[0122] 现参看图 25,本发明提供制备根据先前所述方法或制程中的任一者或任何其它细胞收集及 / 或超低温保存方法或制程收集且超低温保存的 MSC 的方法及制程。根据图 25,可将经超低温保存的 MSC 解冻且接着培养以扩增 MSC 数目。可接着将经培养的 MSC 与细胞培养基组合以供治疗用。

[0123] 现参看图 26,本发明提供制备根据先前所述方法或制程中的任一者或任何其它细胞收集及 / 或超低温保存方法或制程收集且超低温保存的 MSC 的方法及制程。根据图 26,可将经超低温保存的 MSC 解冻且接着培养以扩增 MSC 数目。可接着针对某些细胞标记来选择经培养的 MSC。可接着将经选择及未经选择的 MSC 分别与细胞培养基组合以供治疗用。

[0124] 现参看图 27,本发明提供制备根据先前所述方法或制程中的任一者或任何其它细

胞收集及 / 或超低温保存方法或制程收集且超低温保存的 MSC 的方法及制程。根据图 27, 可将经超低温保存的 MSC 解冻且接着培养以扩增 MSC 数目。可接着针对某些细胞标记来选择经培养的 MSC。可接着分别培养经选择及未经选择的 MSC 以扩增 MSC 数目。可接着将经培养的 MSC 与细胞培养基组合以供治疗用。

[0125] 现参看图 28, 本发明提供制备根据先前所述方法或制程中的任一者或任何其它细胞收集及 / 或超低温保存方法或制程收集且超低温保存的 MSC 的方法及制程。根据图 28, 可将经超低温保存的 MSC 解冻且接着培养以扩增 MSC 数目。可接着针对某些细胞标记来选择经培养的 MSC。可接着分别培养经选择及未经选择的 MSC 以扩增 MSC 数目。可接着针对某些细胞表面标记来选择经培养的 MSC。可接着将经选择及未经选择的 MSC 与细胞培养基组合以供治疗用。

[0126] 如图 1 至图 28 中所涉及的本发明的上述实施例系如下文所提供及描述而进一步详述。根据本发明, 包含月经干细胞及诸如超低温保存剂、细胞培养基或药妆剂的其它试剂的组合物亦于下文提供且描述。

[0127] 收集及输送月经干细胞

[0128] 根据本发明的方法及制程, 月经干细胞系藉由首先在月经期间使用具备收集套组的收集装置来收集包括月经干细胞的月经流而获得。月经流可在月经的任何时间收集, 包括 (但不限于) 月经时期的重度日、中度日或轻度日。视情况, 可自供体收集外周血液的样本以供比较传染病分析用。

[0129] 可出于收集用于处理出月经干细胞的月经流的至少一个样本的目的向供体提供收集套组。举例而言, 可提供月经干细胞收集套组以收集、处理及封装月经流的至少一个样本以供运送。该收集套组可包含: 输送容器, 诸如盒、袋或适合于 (视情况) 于低温下运送月经流的至少一个样本的其它容器 (例如 Nanocool、Styrofoam 或隔热容器); 收集装置, 诸如 Mooncup、Divacup、Instead 杯或适合于收集月经流的至少一个样本的任何其它卫生收集装置; 至少一个尺寸合适的无菌收集容器, 诸如 50ml 管或其它合适尺寸的管; 用于悬浮至少一个月经流样本的收集培养基; 至少一个塑料拉链袋; 至少一条吸收毛巾; 至少一个生物危害品袋; 无菌 4×4 纱布; 用于包覆至少一个收集容器的封口膜; 及消毒清洁小毛巾或抹布。在收集至少一个包含月经干细胞的月经流样本之前, 可对供体身份指定一寄存编号, 该编号可在本发明的实施中使用以鉴别由该供体所收集的任何样本。

[0130] 用于收集套组的收集培养基可包含 DPBS 与肝素的混合物。具有必要 pH 值的合适的相当组织培养基可替代 DPBS 使用。举例而言, 肝素可以约 1000 单位 / 毫升的浓度提供。在一实施例中, 收集培养基可包含具有 200 单位的处于约 1000 单位 / 毫升浓度下的肝素的约 10 毫升 DPBS。收集套组的培养基可藉由将约 0.20 毫升肝素以 1000 单位 / 毫升的浓度添加至约 10 毫升 DPBS 中来制备。可于收集样本前将此体积置于无菌收集容器中。在另一实施例中, 收集培养基可包含: 杜氏磷酸盐缓冲生理食盐水 (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, DPBS) (Mediatech 或合适替代培养基的其它制造商), 其不含钙、镁或酚红; 抗生素, 其可包括盘尼西林 (Penicillin) (约 100 单位 / 毫升)、链霉素 (Streptomycin) (约 100 微克 / 毫升)、两性霉素 B (Amphotericin B) 及 / 或其它合适的抗生素; 及处于每毫升 DPBS 培养基或合适抗凝剂约 10 单位至约 20 单位的范围内的无保存剂肝素, 该抗凝剂系诸如 ACD、CPD、CPDA 或 CPDA-1。收集培养基可使用无菌技术来制备。

[0131] 可用消毒剂清洁阴道区域以为收集至少一个包含月经干细胞的月经流样本作准备。在一实施例中,消毒剂可提供于小毛巾上。供体接着可根据收集装置的使用说明书将先前已用肥皂及水清洁的收集装置置于阴道内。须在供体的月经期间将该收集装置置于阴道内以收集月经流的至少一个样本。在一实施例中,可在月经的重度日期间将收集装置置于阴道内。在一替代实施例中,可在月经的中度日或轻度日期间将收集装置置于阴道内。

[0132] 应将收集装置在阴道内维持一定时间以收集月经流的至少一个样本。举例而言,可将收集装置在阴道内维持约 3 小时或更短时间。收集样本的额外时间可为必需的。在阴道内维持约 3 小时后,可接着移除含有月经流样本的收集装置。月经流样本可包含约 0.1ml 至约 5ml 体积的月经血液、组织、体液及月经干细胞。可接着将月经流样本转移至无菌收集管中的收集培养基中。月经流样本向无菌容器中的转移可藉由将月经流样本自收集装置倾入容器中的培养基中进行以为将月经流样本运送至处理设施作准备。该容器应加以封盖或以其它方式密封以防止月经流样本与收集培养基的溶液泄漏。密封件亦应防止空气进入收集容器内部。在一实施例中,可将具有相应密闭盖的容器用封口膜包覆且封装以供输送。

[0133] 可将一个以上月经流样本收集,转移至容器且准备运送至处理设施。若收集一个以上月经流样本,则可将于收集管中的收集培养基中的各所收集样本维持于冰箱中直至收集最后一个样本为止。一旦收集所有月经流样本,即可接着封装该等样本以供运送。

[0134] 在一实施例中,月经干细胞可由在子宫内膜或子宫颈区域中所进行的帕帕尼科拉乌试验 (Papanicolaou test) 或任何活组织检查来制备。

[0135] 取得后在运送及于处理设施处处理的过程中,可将包含月经干细胞的月经流的至少一个样本维持于低温下。可将容纳月经流与培养基的溶液的任何密封容器封装供运送以在运送至处理设施期间将各样本维持于约 1°C 至约 25°C 的范围内的温度下。在一实施例中,在运送至处理设施期间可将各样本维持于约 1°C 至约 15°C 的温度范围内。在另一实施例中,在取得后及在整个运送中,可将所收集的月经流样本维持于室温或周围空气温度下。

[0136] 含有包含月经干细胞及收集培养基的月经流样本的各收集容器可藉由将该收集容器置于以袋子拉链功能密封的大塑料拉链袋中而封装以供输送。可将封装有杀菌容器的大塑料袋置于第二个大拉链袋中且亦密封。可将两条吸收毛巾置于输送容器的底部。若正使用 Nanocool 装置,则不需要额外冰。泡沫砖或其它装置可用于冷却载运月经流样本的输送容器。可将充满湿冰的袋置于吸收毛巾之上。可将密封袋中的杀菌容器置于冰袋之下。可将其余吸收毛巾置于冰袋之上。将输送容器关闭,紧固且密封。

[0137] 其它合适的容器可用于容器的输送,只要该容器在运送期间将包含月经干细胞的月经流样本维持于约 1°C 与约 25°C 之间的温度下即可。举例而言,其它合适的容器包括(但不限于):由 Therapak Corporation 出售的冷却及隔热运送容器、任何类型的隔热容器或经设计用于运送的苯乙烯泡沫盒 (Styrofoam box)。

[0138] 在运送的至少两个小时内可接触承运方以获取含有于收集培养基中的至少一个月经流样本的输送容器。承运方可为 AirNet 或适合于输送生物材料的其它较佳快递或诸如 FedEx 或 UPS 的其它运送公司。输送容器应在收集后约 5 个小时至约 125 个小时内到达处理设施。在一实施例中,输送容器可在收集后约 24 个小时至约 72 个小时的间到达处理设施。在另一实施例中,输送容器可在约 24 个小时至约 48 个小时的间到达处理设施。输送容器不应储存于热环境中。

[0139] 处理设施接收输送容器且为各供体样本的识别信息编目录以在处理包含月经干细胞的月经流样本期间使用。适当障壁及个人保护措施可在处理设施处处理包含月经干细胞的月经流的任何样本期间使用。一旦在处理设施处接收输送容器,即可将具有月经流样本的各容器自输送容器移除,置于冰盘中(或冰箱中)的冰上,且转移至生物安全柜(BSC)中的清洁室中以自月经流分离月经干细胞、收集月经干细胞且稍后处理以供使用及/或超低温保存。

[0140] 处理设施处的月经流处理

[0141] 由处理设施接收月经流样本且记录至处理设施系统中。一旦在处理设施处接收月经流样本,即可在整个处理期间将其维持于约 1°C 至约 25°C 的温度下。可在 BSC 及离心机中使用无菌技术处理各月经流样本。当在 BSC 中工作时以 70% IPA 频繁擦拭手套。在处理月经流样本之前于无菌条件下置放 BSC 中处理所需的所有其它材料,包括(但不限于):红色顶端管、针、注射器、红色顶端管的托架、BacT 瓶、酒精垫、50ml 锥形管、50ml 锥形管的托架及移液器。在已对 BSC 消毒后设置所有无菌供应品。可将制程所使用的所有无菌供应品置于盘或无菌铺巾中。无菌供应品可包括针、注射器及置于 BSC 中的其它材料,该等材料包括红色顶端管、红色顶端管的托架、血液培养瓶、酒精垫、50ml 锥形收集管、50ml 锥形收集管的托架、移液管及冰盘。基于制造商的说明书,将所有培养基及试剂较佳置于冰上且储存于约 1°C 至约 15°C 之间下,但亦可为约 2°C 至约 8°C。

[0142] 缓冲生理食盐水培养基(DPBS)或合适的替代品可在月经干细胞分离过程期间使用。DPBS 培养基包含具有约 5ml 至约 10ml 肝素(肝素钠 1,000 USP 单位/毫升-American Pharmaceutical Partners)的约 100 毫升 DPBS。

[0143] 在处理设施处接收月经流样本的第一天,可对包含月经干细胞的各月经流试样进行第 1 阶段处理。首先,可对容纳月经流样本的收集容器外部进行消毒,接着离心。可使收集容器中的月经流样本经受离心、密度梯度离心、过滤及/或淀粉沉降。

[0144] 离心

[0145] 在一实施例中,在约 4°C 下月经流样本的离心可以约 2000rpm 进行历时约 7 分钟。离心后,可接着自离心机移除月经流样本的各试样。可对收集容器外部消毒,接着将收集管转移至 BSC 中以抽吸上清液。可使离心块再悬浮于约 10ml DPBS 或相当替代品中,且接着对其进行第 2 阶段处理。亦可根据如本文所述的可选净化步骤处理离心块。

[0146] 密度梯度离心

[0147] 在另一实施例中,月经流样本的离心可使用密度梯度液进行。举例而言,密度梯度液可为淋巴细胞分离培养基(约 20°C 下密度 1.077-1.083g/ml-Cellgro)或为可具有较高或较低密度的其它合适梯度液。使含有月经流样本、收集培养基及密度梯度液的锥形收集管经受离心。举例而言,可在约 15°C 至约 30°C 之间、较佳约 20°C 下将锥形收集管以约 14,000rpm 离心约 30 分钟而无需应用制动器以减缓离心机。

[0148] 作为密度梯度离心的结果,白血球层形成于上清液与密度梯度液的界面处。该白血球层含有包含自月经流样本获得的月经干细胞的所要细胞群。将白血球层上方的上清液抽吸至白血球层上方约 5ml 且摒弃。藉由使白血球层缓缓涡旋且在白血球层处用 10ml 移液管刮拭锥形管侧面来移除白血球层。应尽可能与白血球层一起收集最小体积的密度梯度液。可摒弃剩余密度梯度液及含有红血球的离心块。可在室温下以试剂及细胞进行密度梯

度分离。若将细胞冷却,则分离不会提供最佳细胞回收。

[0149] 可将所收集的白血球层置于 50ml 锥形收集管中且用洗涤溶液使体积达到约 30ml。可接着在约 15℃至约 30℃的间下使细胞悬浮液以约 2000rpm 离心历时约 7 分钟。

[0150] 离心后,可接着自离心机移除试样且可对收集容器外部消毒,接着将收集管转移至 BSC 中以抽吸上清液。可使离心块再悬浮于约 10ml DPBS 中且接着对其进行第 2 阶段处理。亦可根据如本文所述的可选净化步骤处理离心块。

[0151] 过滤

[0152] 在又一实施例中,可在无菌过滤器中使月经流样本经受过滤。该无菌过滤器可为约 40 微米、约 70 微米或约 100 微米。过滤可包含在约 1℃至约 30℃之间下使包含月经干细胞的月经流样本以约 2000rpm 离心约 7 分钟。

[0153] 离心后,可接着自离心机移除试样且可对收集容器外部消毒,接着将收集管转移至 BSC 中以抽吸上清液。可使离心块再悬浮于约 10ml DPBS 中且接着对其进行第 2 阶段处理。亦可根据本文所述的可选净化步骤处理离心块。

[0154] 淀粉沉降

[0155] 在又一实施例中,可藉由淀粉沉降来处理月经流样本。在一实施例中,羟乙基淀粉可以 1 比 5 的比率使用,亦即,约 1 毫升淀粉比约 5 毫升月经流样本。可根据上述比率混合各月经流样本。可使混合物经受离心以有助于以约 50g 沉降约 6 分钟。亦可在有或无上述离心步骤的情况下使混合物沉降历时约 30 分钟或至多约两小时。沉降后,移除包含月经干细胞的白血球层且使其经受离心以浓缩该等月经干细胞。离心包含在约 1℃至约 30℃之间下使悬浮于 DPBS 中的月经干细胞以约 2000rpm 离心约 7 分钟。

[0156] 离心后,可接着自离心机移除试样且对收集容器外部消毒,接着将收集管转移至 BSC 中以抽吸上清液。可使离心块再悬浮于约 10ml DPBS 中且接着对其进行第 2 阶段处理。亦可根据本文所述的可选净化步骤处理离心块。

[0157] 净化

[0158] 可使如根据离心、密度梯度离心、过滤或淀粉沉降之上述步骤中的任一者所收集的月经干细胞的样本经历可选净化过程。在首先计算样本的总体积后可移除离心块周围的过量流体。可使离心块再悬浮于约 5ml 净化培养基中。

[0159] 净化培养基可用于净化月经流样本。净化培养基包含于合适培养基中的至少一种抗生素。作为非限制性实例,抗生素可包含万古霉素 (Vancomycin)、凯福隆 (Claforan)、阿米卡星 (Amikacin)、庆大霉素 (Gentamycin) 及两性霉素 B 中的至少一者。合适的培养基可包含汉克斯平衡盐溶液 (Hanks Balanced Salt Solution, HBSS) 或其它培养基。若以干式提供,则抗生物可需要复水。

[0160] 在一实施例中,净化培养基可包含以下浓度的抗生素:50 μ g/ml 万古霉素、250 μ g/ml 凯福隆、100 μ g/ml 阿米卡星、120 μ g/ml 庆大霉素及 2.7 μ g/ml 两性霉素 B。抗生素的其它浓度水平可为合适的。举例而言,净化培养基可藉由将约 10ml HBSS 添加至万古霉素的约 1g 小瓶中以获得约 100mg/ml 的浓度而制成。将约 1ml 的 100mg/ml 浓度的万古霉素添加至约 199ml HBSS 中以获得约 500 μ g/ml 的浓度。将约 1ml 的约 500 μ g/ml 浓度的万古霉素添加至最终小瓶中用于制备净化培养基。将约 2ml HBSS 添加至约 500 毫克/小瓶的凯福隆中以获得约 250mg/ml 的浓度。将约 1ml 的约 250 μ g/ml 凯福隆溶液添加

至约 99ml HBSS 中以获得约 2500 μ g/ml 的凯福隆浓度。将约 1ml 的约 2500 μ g/ml 浓度的凯福隆添加至净化培养基的最终小瓶中。将约 10ml HBSS 添加至阿米卡星的约 1g 小瓶中以获得约 100mg/ml 的浓度。将约 1ml 的约 100 毫克 / 小瓶浓度的阿米卡星添加至约 99ml HBSS 中以获得约 1000 μ g/ml。将约 1ml 阿米卡星添加至最终小瓶中以制备净化培养基。将约 10ml HBSS 添加至庆大霉素的约 1g 小瓶中以获得约 100mg/ml 的浓度。将约 1ml 的约 100mg/ml 浓度的庆大霉素添加至约 99ml HBSS 中以获得约 1000 μ g/ml 浓度。将约 1.2ml 的约 1000 μ g/ml 庆大霉素溶液添加至最终小瓶中以制备净化培养基。将约 2ml 两性霉素 B 添加至约 8ml 无菌水中以制备约 50 μ g/ml 浓度的两性霉素 B。约 0.540ml (27 μ g) 两性霉素 B 系用以制备最终浓度的两性霉素 B。

[0161] 对于抗生素溶液而言,净化培养基可于 50ml 无菌管中藉由添加约 1ml 的 500 μ g/ml 万古霉素、约 1ml 的 2500 μ g/ml 凯福隆、约 1ml 的 1000 μ g/ml 阿米卡星、约 1.2ml 的 1000 μ g/ml 庆大霉素及约 0.540ml (27 μ g) 两性霉素 B 以构成约 4.74ml 培养基来制备。将 1000 单位 / 毫升的约 0.200ml 肝素添加至抗生素溶液中且将约 5.06ml HBSS 添加至抗生素溶液中以形成最终体积 10ml 的净化培养基。可将培养基储存于约 2°C 至约 8°C 下直至使用。

[0162] 可使离心块再悬浮于约 5ml 净化培养基中。若凝块或其它巨分子存在,则细胞可能需要过滤。若再悬浮的细胞因凝块或出于任何其它原因而需要过滤,则可使用 100 微米过滤器过滤样本。对于过滤而言,可使用 100 微米过滤器或更小尺寸过滤器(视悬浮液中的凝块尺寸而定)及无菌 50ml 锥形管过滤悬浮液。一旦悬浮液穿过过滤器,即可使用额外抗生素培养基洗涤该过滤器。

[0163] 为净化起见可培育净化培养基中的经过滤或未经过滤的细胞。在一实施例中,于清洁室中在冰箱中将净化培养基中的经过滤或未经过滤细胞在约 2°C 至约 8°C 下培育约 20 小时至约 30 小时。培育期间,可将细胞置于旋转器上或以每小时约一次翻转历时培育的头 5 个小时。净化过程结束时,接着对包含月经干细胞的细胞悬浮液进行第 2 阶段处理。

[0164] 在经受或不经受净化过程的情况下,包含月经干细胞的细胞悬浮液可根据第 2 阶段处理来处理。第 2 阶段处理包含使 DPBS 或净化培养基中的细胞悬浮液经受离心。在一实施例中,在约 4°C 下细胞悬浮液的离心可以约 2000rpm 进行历时约 7 分钟。离心之后及转移至 BSC 之前,可对容纳月经干细胞的管外部消毒。一旦于 BSC 中,即可移除上清液,在管底部留下细胞离心块。可使细胞再悬浮于约 10ml DPBS 中,混合且在约 4°C 下以约 2000rpm 离心约 7 分钟。离心后,可将容器净化,接着转移至 BSC 中。

[0165] 月经干细胞的细菌学分析可在处理中的此时进行。在 BSC 中,且使用无菌技术,可使用无菌注射器移除包含月经干细胞的离心块上方的约 5ml 上清液。可将约 4ml 上清液置于厌氧血液培养瓶中且可将约 1ml 上清液置于好氧血液培养瓶中。该等瓶可经组态以供 BacT/Alert 系统中使用。可接着根据制造商的说明书使用 BacT/Alert 系统培育该等瓶。BacT/ALERT 血液培养瓶及系统系作为用于实施本发明的合适测试系统的一实例而提供。可使用其它合适的自动或手动血液培养试样瓶及系统,只要其依照 21C.F.R. 部分 610.12 或经验证效能与此 CFR 部分类似即可。

[0166] 可自离心块上方移除剩余上清液。使包含细胞的离心块再悬浮于 DPBS 中达到约 5.1ml 且混合。可将约 100 μ l 细胞等分至管中以供处理后测试以获得细胞计数及生存力。

可使用自动或手动血球计进行细胞计数。可使用锥虫蓝或其它方法进行细胞生存力分析。

[0167] 悬浮于 DPBS 中的剩余细胞可准备超低温保存、细胞培养、细胞选择或治疗或药妆使用。

[0168] 超低温保存

[0169] 对于超低温保存而言,可将悬浮于 DPBS 中的剩余细胞置于冰上历时至少约 15 分钟以为超低温保存作准备。该准备可包含将超低温保存培养基添加至月经干细胞中且接着利用控速冷冻器或其它合适的冷冻器系统(急降冷冻(dump-freeze)监控或冷冻容器(Nalgene))对混合物进行若干降温步骤以使该等月经干细胞的温度降至约 -90°C 的最终温度。合适的控速冷冻器包括(但不限于):Cryomed Thermo Forma 控速冷冻器 7454(Thermo Electron, Corp.)、Planar 控速冷冻器 Kryo 10/16(TS Scientific)、Gordinier、Bio-Cool-FTS 系统及 Asymptote EF600、BIOSTORCBS 2100 系列。

[0170] 可制备包含培养基及 DMSO 的超低温保存培养基。可将约 3ml DPBS 添加至诸如 50ml 锥形管的容器中。可将约 1ml 人类血清白蛋白(HSA)添加至约 3ml DPBS 中且接着在冰上冷却约 10 分钟。将约 1ml 经冷却的 99% DMSO 添加至 HSA 及 DPBS 中以制备最终超低温保存培养基。可接着将超低温保存培养基及细胞样本置于冰上历时约 15 分钟,随后将该超低温保存培养基添加至该细胞样本中。分批处理可用于将超低温保存培养基等分至细胞样本中。举例而言,可将约 $100\ \mu\text{l}$ 细胞悬浮液的单一等分试样与约 3ml DPBS、1ml HSA 及约 1ml 的 99% DMSO 组合。可将约 $200\ \mu\text{l}$ 细胞悬浮液的约 2 份等分试样与约 6ml DPBS、2ml HSA 及约 2ml 的 99% DMSO 组合。可将细胞样本的约 5 份等分试样与约 15ml DPBS、约 5ml HSA 及约 5ml 的 99% DMSO 组合。可将细胞样本的约 10 份等分试样与约 30ml DPBS、约 10ml HSA 及约 10ml 的 99% DMSO 组合。

[0171] 在一替代实施例中,可使用其它超低温保存培养基。举例而言,具有超低温保存剂的超低温保存培养基可用于维持解冻后高细胞生存力成果,诸如 CryoStor CS10 或 CS5(Biolife)、补充有丙二醇及蔗糖的胚胎超低温保存培养基(Vitrolife)、或 SAGE 培养基(Cooper Surgical)。甘油可与诸如 DMSO 的其它超低温保存剂一起使用,或可以于具有合适蛋白质的培养基中约 10% 的浓度单独使用。

[0172] 可将超低温保存培养基添加至细胞样本中。可将超低温保存培养基逐滴添加至悬浮于 DPBS 中的月经干细胞中直至所悬浮的月经干细胞与超低温保存培养基的总混合物的体积达到超低温保存细胞混合物的最终所要体积为止。可将最终超低温保存细胞培养基转移至 $2\times 5\text{ml}$ 条形码冷冻四级瓶(cryoquat)中,其中 QC 样本储存于 5ml 小瓶的盖中。使用移液器移除样本的约 $200\ \mu\text{l}$ 等分试样且将其等分至 QC 盖中。已填充盖后,将剩余 4.8ml 试样添加至 5ml 小瓶中。应将样本送至进行传染病及其它分析。应将冷冻小瓶置于 CRYOMED 冷冻器中且对其进行控速降温至处于或低于约 -85°C 的温度。应将经超低温保存的试样转移至贮仓中以储存于 -150°C 或更低温度下的液氮蒸气中。应对对传染病测试呈阳性的任何样本进行检疫。可将对传染病测试呈阴性的任何样本转移至不同永久储存仓。

[0173] 可在控速冷冻器中程序化以下降温步骤,首先降低超低温保存剂与月经干细胞的混合物。可使与超低温保存剂组合的月经干细胞经受控速降温以为最终储存于冷冻器中作准备。控速降温可经设计以维持细胞生存力。Cryo-Med 冷冻器(Thermo Electron Corp.)、液氮缸及携带型 Cryo-Med 冷冻器可用于控速降温以为最终储存于冷冻器中作准备。可在

冷冻小瓶或冷冻袋中使细胞经受控速降温以达到约 -90°C 的温度。

[0174] 对于在冷冻袋中所收集的月经干细胞的样本而言,可使细胞经受以下控速降温概况:在约 4°C 下等待, 1.0°C / 分钟至 -6.0°C (样本), 25.0°C / 分钟至 -50.0°C (腔室), 10.0°C / 分钟至 -14.0°C (腔室)、 1.0°C / 分钟至 -45.0°C (腔室)、 10.0°C / 分钟至 -90.0°C (腔室) 及结束 (样本处于或低于 -85.0°C)。

[0175] 对于在冷冻小瓶中所收集的月经干细胞的样本而言,可使细胞经受以下控速降温概况:在 4.0°C 下等待, 1.0°C / 分钟至 -3.0°C (腔室), 10.0°C / 分钟至 -20.0°C (腔室), 1.0°C / 分钟至 -40.0°C (腔室), 10.0°C / 分钟至 -90.0°C (腔室) 及结束。

[0176] 一旦超低温保存剂与月经干细胞的混合物处于或低于约 -85°C , 即将超低温保存小瓶转移至低温储存单元中且在处于或低于约 -135°C 的温度下的液氮蒸气中储存, 或另外可将小瓶储存于液氮的液相中。举例而言, 合适的低温储存单元包括 (但不限于) LN2 冷冻器 MVE 1830 (Chart Industries)。

[0177] 流式细胞仪分析

[0178] 月经干细胞的任何所收集样本可藉由锥虫蓝经由染料排除测试总细胞计数及细胞生存力。亦可分析月经干细胞的样本的表现细胞标记的细胞的存在。

[0179] 可藉由使用血球计、流式细胞仪或适合于获得细胞计数的其它方式 (诸如 ViCell (Beckman Coulter)) 的手动计数或适合于对呈现于显微镜影像上的细胞进行计数的软件来量化细胞的处理前样本、处理后样本及任何其它样本的总细胞计数及细胞生存力。

[0180] 可藉由流式细胞仪分析处理前细胞。若红血球存在, 则可藉由将约 36ml 蒸馏水及约 4ml 的 10 溶胞溶液添加至 50ml 管中来制备 $1\times\text{NH}_4\text{Cl}$ 溶胞溶液 (StemKit)。可将每个委托者约 $100\mu\text{L}$ 处理前样本添加至两个管中以进行分析。一管用于 CD 34+/ 生存力分析且第二管用于异纯系对照 (isoclinic control)。可将约 $20\mu\text{L}$ CD45-FITC/CD34-PE 添加至各管底部。应将约 $20\mu\text{L}$ 7-AAD 生存力染料添加至管中。可使混合物涡旋且接着在免受光照下于约 15°C 至约 30°C 下培育至少 20 分钟。可接着将约 1ml 的 $1\times\text{NH}_4\text{Cl}$ 溶胞溶液添加至各管中且使其涡旋。可将混合物在约 15°C 至约 30°C 下培育约 20 分钟。可将约 $100\mu\text{L}$ Stem-Count 荧光球添加至各管中且使其涡旋。接着应将样本在流式细胞仪上运作以供分析。

[0181] 可藉由流式细胞仪分析处理后细胞。可自 StemKit 藉由将约 36ml 蒸馏水及 4ml 的 10 溶胞溶液添加至 50ml 管中来制备 $1\times\text{NH}_4\text{Cl}$ 溶胞溶液。可将每个委托者约 $50\mu\text{L}$ 处理后样本添加至两个管中以进行分析。一管用于 CD34+/ 生存力分析且第二管用于异纯系对照。可将约 $10\mu\text{L}$ 7-AAD 生存力染料添加至各管中。可将约 $10\mu\text{L}$ CD45-FITC/CD34-PE 添加至第一管中。可将约 $10\mu\text{L}$ CD45-FITC/CTRL-PE 添加至第二管中。可使混合物涡旋且接着在免受光照下于约 15°C 至约 30°C 下培育至少 20 分钟。可接着将约 1ml 的 $1\times\text{NH}_4\text{Cl}$ 溶胞溶液添加至各管中且使其涡旋。可将混合物在约 15°C 至约 30°C 下培育约 20 分钟。可将约 $100\mu\text{L}$ Stem-Count 荧光球添加至各管中且使其涡旋。接着应将样本在流式细胞仪上运作以供分析。

[0182] 月经干细胞的新鲜样本及先前经超低温保存的月经干细胞的解冻样本亦可藉由流式细胞仪分析以分析细胞表面标记、细胞生存力及其它细胞特征。新鲜样本亦可于细胞

溶解后根据以下方案来分析。

[0183] 经超低温保存的月经干细胞须根据本文所述的解冻过程来解冻。在细胞样本须解冻的状况下,细胞可需要在解冻后或在细胞培养后即刻进行流式细胞仪分析以评估某一细胞继代。可将经超低温保存的样本在 37℃ 水浴中搅动而不使细胞完全解冻。可将该等细胞转移至约 1ml 经冷却的洗涤培养基中且藉由翻转来混合。可将样本以约 2000rpm 离心约 7 分钟。可移除上清液且使细胞悬浮于约 100 μ l 洗涤培养基 (25% HSA, DNase, 肝素及 HBSS w/Ca⁺ 与 Mg⁺) 中。可接着将再悬浮的细胞在 Blood Bank Serofuge 中离心约 1 分钟。可倾析上清液且使细胞再悬浮于约 1.2ml 鞘流中且使其涡旋。

[0184] 可针对许多细胞表面标记来分析鞘流中的细胞。举例而言且并非限制性地,可将细胞于鞘流中的约 100 μ l 样本添加至含有下列试剂 (各管中每一试剂 10 μ l 或 20 μ l 体积) 的各管中且接着使管涡旋以将如表 A 中所述的试剂与样本混合。

[0185] 表 A :流式细胞仪负荷示意表

[0186]

管	FITC	PE	ECD	PC5
1	IgG	IgG	IgG	IgG
2	HLA-I	CD133	HLA-II	7AAD
3	CD9	CD54	CD45	CD10
4	CD59	CD63	CD34	CD13
5	CD49e	CD81	无	CD49f
6	CD44	CD117	无	CD38
7	CD29	CD105	CD41	CD3
8	CD19	CD166	无	CD90
9	NANOG	SSEA3	无	7AAD
10	CD14	SSEA4	无	7AAD
11	无	CD56	无	7AAD

[0187]

[0188] 在室温 (15-30℃) 下培育 20 分钟。免受光照。若运作含有 RBC 的新鲜样本,则添加 500 μ l 溶胞溶液且在室温下再培育 10 分钟且免受光照。若运作密度梯度液或经解冻样本,则不溶解。若不溶解样本,则在培育 20 分钟后用 1ml 洗涤培养基洗涤。离心 1 分钟且接着倾析上清液。若溶解样本,则将样本离心 1 分钟且倾析溶胞液。添加 1ml 洗涤培养基,涡旋,再次离心且接着再次倾析。将 500 μ l 鞘流添加至各管中,涡旋且在 FC500 流式细胞仪上运作。

[0189] 在细胞标记分析之前,可对新鲜细胞样本或经解冻样本进行总细胞计数。可使用 Kasumi-3 对照细胞或其它对照细胞设置许多阳性对照用于流式细胞仪分析。

[0190] 用于细胞计数及细胞生存力分析的材料包括(但不限于):流式细胞仪, Isoflow 鞘流, Coulter Clenz 清洁剂, 及包括(但不限于)CD45-FITC/CD34-PE、CD45-FITC/ 异纯系对照 -PE、7-AAD 生存力染料、Stem-Count 荧光球、10× 浓缩氯化铵 (NH_4Cl) 溶胞溶液及 22% 牛白蛋白溶液的试剂。参见 Stem Kit™CD34+HPC 列举套组包装插页 -03 版 (PNIM2390); Beckman Coulter Product Corrective Action, CXP 2.0&2.1 Panel Interruption-3/10/06, PCA-M-D-1013; 14.3StemLab, 创建号 200706260856, 3.2.1 版。用于流式细胞仪的材料亦包括(但不限于): Isoflow 鞘流; Coulter Clenz 清洁剂; 及使用前约 20-25℃ 的以下试剂: CD117-PE、CD29-FITC、CD34-ECD、CD44-FITC、CD45-ECD、CD90-PC5、CD105-PE、CD166-PE、IgG-FITC、IgG-PE、IgG-ECD、IgG1-PC5、HLA-I-FITC、CD133-PE、HLA-II ECD、CD9-FITC、CD54-PE、CD10-PC5、CD59-FITC、CD63-PE、CD13-PC5、CD49e-FITC、CD81-PE、CD49f-PC5、CD44-FITC、CD38-PC5、CD29-FITC、CD105-PE、CD41-ECD、CD3-PC5、CD19-FITC、NANOG-FITC、SSEA3-PE、SSEA4-PE、CD14-FITC、CD56-PE、7-AAD 生存力染料、10× 浓缩氯化铵 (NH_4Cl) 溶胞溶液、洗涤培养基(包含 HBSS(具有 Ca^{2+} 与 Mg^{2+} 的汉克斯液) 500ml、肝素 5ml、人类血清白蛋白 25% 50ml、DNASE-1 安瓿)、Kasumi-3 细胞株 -CD117+ 细胞、定时器及涡旋式混合器。

[0191] 在一替代实施例中,细胞可藉由类似于先前所述的流式细胞仪方法的替代流式细胞仪方法来分析,该等先前所述的流式细胞仪方法包括使用对照及制备月经干细胞的新鲜样本、处理前样本、处理后样本或经解冻样本的方法。细胞标记亦可藉由免疫组织化学分析来评估。

[0192] 可在流式细胞仪的前分析各样本的总细胞计数。若样本含有 $\geq 3.5 \times 10^6$ 个细胞,则可评估全板。若样本含有 $< 3.5 \times 10^6$ 个细胞,则较少管可为必需的。

[0193] 若流动测试需在需要解冻的冷冻样本上进行,则在 37℃ 水浴中搅动小瓶而不使细胞完全解冻。可根据对于先前所讨论的流式细胞仪分析法的方法来处理经解冻样本且视细胞数而定根据下表 B 将其添加至若干管中。

[0194] 表 B:流式细胞仪负荷示意表

[0195]

试剂	1号管	2号管	3号管	4号管
CD44 FITC	20 μl			
7AAD	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl
CD117 PE	10 μl			
CD45 ECD	10 μl	10 μl	10 μl	
CD29 FITC		20 μl		
CD105 PE		20 μl		
CD90 FITC			20 μl	
CD166 PE			20 μl	
IgG FITC				20 μl
IgG ECD				10 μl
IgG PE				10 μl

[0196] 可将各管在约 15℃ 至约 30℃ 下培育约 20 分钟。免受光照。若运作含有 RBC 的新鲜样本,则添加 500 μl 溶胞溶液且在相同温度下培育约 10 分钟且免受光照。若运作密度

梯度液或经解冻样本,则不溶解。若不溶解样本,则在培育约 20 分钟后用 1ml 洗涤培养基洗涤且离心约 1 分钟且接着倾析上清液。若溶解样本,则将样本离心约 1 分钟且倾析溶液。添加约 1ml 洗涤培养基,涡旋,再次离心且接着再次倾析。添加约 1ml 鞘流,涡旋且在 FC500 或合适的替代流式细胞仪上运作。

[0197] 细胞选择

[0198] 可如本文所述针对月经干细胞的细胞标记中的至少一者来选择细胞。亦可使细胞经受阴性选择步骤以移除不当细胞。在细胞选择过程中,可使用无菌技术。细胞选择可用于新鲜细胞、处理后细胞、先前经超低温保存的解冻细胞及培养中的细胞。细胞选择可对至少 2,500,000 个细胞及多达 10,000,000 个细胞进行。亦可自包含少于 2,500,000 个细胞的样本或包含多于 10,000,000 个细胞的样本选择细胞。

[0199] 用于细胞选择的材料包括(但不限于):DNase ;Pulmozyme (Genentech, Inc.)-1 安瓿;有待阴性或阳性选择的任何抗细胞表面标记,例如抗 CD117 抗体 (Santa Cruz 104D2 或 BDBioscience 的 YB5.58)、山羊抗小鼠 IgG 微珠;及磁场。

[0200] 可在约 4°C 下将包含获自月经干细胞的新鲜样本、处理后样本、经解冻样本或经培养样本的月经干细胞的细胞悬浮液以约 300g 离心约 10 分钟。可在不扰动细胞离心块的情况下移除上清液。可以约 100 μ l 工作缓冲液及约 20 μ l 抗细胞表面抗体使小球再悬浮。在一实施例中,抗细胞表面抗体为抗 CD117 抗体。可将溶液中的细胞在冰上培育约 20 分钟至约 25 分钟。培育后,可将约 2ml 工作缓冲液添加至细胞中且轻微混合。可在约 4°C 下将混合物以约 300g 离心约 10 分钟。离心后,可在不扰动离心块的情况下抽吸上清液。可使离心块再悬浮于约 80 μ l 工作缓冲液中。可将约 20 μ l 山羊抗小鼠 IgG 添加至细胞悬浮液中且轻微混合。可将混合物在冰上培育约 30 分钟。培育后,可藉由添加约 2ml 工作缓冲液且接着将溶液混合来洗涤细胞。可在约 4°C 下将细胞以约 300g 离心约 10 分钟。

[0201] 管柱可用于使经选择细胞与未经选择细胞分离。管柱可藉由将其于约 500 μ l 工作缓冲液中润湿来制备。离心后,可在不扰动离心块的情况下抽吸上清液。可使离心块再悬浮于约 500 μ l 工作缓冲液中。为避免细胞黏附,可将额外 DNase 添加至细胞中。可使用移液管将细胞悬浮液添加至管柱中。经抗体标记的细胞(阳性溶离份)应附着于经受由 MACS 分离器提供的磁场的管柱。未经标记的细胞(阴性溶离份)应流经管柱且应加以收集。

[0202] 细胞悬浮液流经管柱且以阴性溶离份的形式收集后,可使用每次洗涤 500 μ l 工作缓冲液将管柱洗涤至少 3 次。各洗涤液可在下次洗涤前完全流经管柱。各洗涤液可与阴性溶离份一起收集。可移除约 100 μ l 阴性溶离份以供分析。可使用血球计进行细胞计数且使用锥虫蓝或另一方法进行生存力分析。表型分析可使用如先前所讨论的流式细胞仪或使用另一流式细胞仪方法来进行。阴性溶离份可准备超低温保存或将其置于培养物中以供进一步细胞生长及扩增及稍后处理。

[0203] 收集阴性溶离份且洗涤管柱后,可将另一管置于管柱下以收集阳性溶离份。可将约 1ml 工作缓冲液添加至管柱中且自该管柱移除磁场。应收集工作缓冲液及阳性溶离份。柱塞可用于自阳性溶离份的管柱移除尽可能多的经标记细胞。可移除约 100 μ l 阳性溶离份以供分析,该分析包括(但不限于)使用锥虫蓝或流式细胞仪的细胞计数及生存力分析。可将阳性溶离份超低温保存,培养或准备供治疗或药妆用。

[0204] 选择表现 MSC 细胞标记的月经干细胞的步骤可根据如图 3 至图 6、图 8 至图 10、图

13 至图 19、图 21 至图 24 及图 26 至图 28 所示的本发明实施例中的任一者来进行。详言之，选择可 (a) 在超低温保存前，(b) 在细胞培养的至少一个步骤之前及 / 或之后，或 (c) 在解冻经超低温保存的细胞之后发生。选择表现某些细胞标记的月经干细胞的步骤提供表现所选细胞标记的富集细胞群，其可根据本发明的方法用于进一步细胞培养、超低温保存或治疗或药妆用途。

[0205] 在一实施例中，自细胞群选择表现 CD117 的月经干细胞的步骤包含以抗人 CD117 抗体标记月经干细胞且接着以能与抗人 CD117 抗体结合的磁性标记抗体标记 CD117 干细胞 - 抗人 CD117 抗体复合物。另外，该方法包含以抗人 CD117 抗体标记表现 CD117 的任何细胞且接着以能与抗人 CD117 抗体结合的磁性标记抗体标记 CD117 细胞 - 抗人 CD117 抗体复合物。选择表现 CD117 的月经干细胞的方法可包括选择根据本发明的方法中的任一者所收集的表现 CD117 的任何细胞。分离月经干细胞的步骤包含将包含 CD117 细胞、抗人 CD117 抗体及磁性标记抗体的复合物暴露于磁场以使磁性标记抗体及复合物的其余部分吸引至管柱且经管柱洗涤所有其它 CD117 阴性细胞以供分析。

[0206] 在选择表现 CD117 的月经干细胞的步骤中，可将细胞与工作缓冲液（具有 Dnase 的 **MACS®** 分离电泳缓冲液，Miltenyi）的细胞悬浮液维持于低温下。其它磁性分离套组可适用（R&DSYSTEMS）。若如本发明的实施例中所证实，选择表现 CD117 的子宫内膜 / 月经细胞的步骤 (a) 在超低温保存前，(b) 在细胞培养的至少一个步骤之前及 / 或之后，或 (c) 在解冻经超低温保存之细胞之后进行，则细胞悬浮液可包含悬浮于洗涤溶液中的细胞群。

[0207] 可将细胞悬浮液以约 300g 离心约 10 分钟。可使离心块悬浮于具有抗人 CD117 抗体的工作缓冲液中。举例而言，该工作缓冲液可包含（例如）处于约 pH 7.2 的 PBS、牛血清白蛋白、EDTA 及约 0.09% 迭氮化合物（或合适溶液）（BD Biosciences）。可使离心块悬浮于（例如）约 100 μ l 工作缓冲液及约 5 μ g 的对人类 CD117 有亲和力的经纯化抗体中。抗体可为单株抗体或多株抗体。抗体可为经纯化的 IgG 或能结合人类 CD117 的其它抗体。抗体可为小鼠抗 CD117 抗体。举例而言，抗体可为单株小鼠抗人 CD117 抗体（作为 104D2 购自 Santa Cruz 或作为 YB5.58 购自 BDBiosciences）。

[0208] 将包含细胞、工作缓冲液及抗 CD117 抗体的溶液培育历时一培育时段。举例而言，培育时段可包含于冰上约 20 分钟至约 25 分钟之间。或者，若温度为至少约 2°C 至约 8°C，则培育时段可缩短至小于约 20 分钟，或若温度为至少室温，则培育时段可缩短至约 5 分钟至约 10 分钟。培育时段后，可用工作缓冲液洗涤具有细胞的溶液以移除未结合的抗体且接着离心。举例而言，离心可以约 300g 进行约 10 分钟。离心后，抽吸上清液且可储存以供分析，且使离心块悬浮于工作缓冲液中。举例而言，工作缓冲液的体积可为约 80 μ l。

[0209] 将附着有微珠且对抗人 CD117 抗体具有亲和力的第二批抗体添加至用于悬浮离心块的工作缓冲液中。微珠可包含（例如）氧化铁及多醣。微珠系生物可降解的。微珠可经 Miltenyi Biotec 购得。举例而言，第二批抗体对对人类 CD117 具有亲和力的抗体（诸如山羊抗小鼠 IgG 抗体）有特异性。抗体可为单株抗体或多株抗体。抗体可能够与小鼠抗体的轻链及 / 或重链接合。抗体可为（例如）经 Miltenyi Biotec 以产品 130-048-401 购得的山羊抗小鼠 IgG 微珠结合物。上述山羊抗小鼠 IgG 的两 (2) 毫升小瓶可用于总共约 1.0×10^9 个未分离细胞。

[0210] 将细胞悬浮液培育历时第二培育时段。举例而言，培育时段可处于约 30 分钟至约

35 分钟的范围内。或者,当培育在约 2℃至约 8℃下进行时培育时段可小于约 30 分钟,或当培育在约室温下进行时培育时段可为约 5 分钟至约 10 分钟。培育时段完成后,用工作缓冲液(诸如约 2ml 工作缓冲液)洗涤细胞,且接着将细胞离心。举例而言,离心可以约 300g 进行约 10 分钟。可抽吸上清液且将其储存以供分析,且使含有细胞的离心块悬浮于工作缓冲液(诸如约 500 μ l 工作缓冲液)中。

[0211] 细胞分离

[0212] 可使用分离 CD117 干细胞的 MS 管柱自工作缓冲液中的细胞悬浮液分离 CD117 干细胞。举例而言,可使用 MS 管柱(Miltenyi Biotec)或其它合适的管柱。或者,可使用分离细胞的其它合适方法。经 Miltenyi Biotec 购得的包含单元式多机座 MS 管柱及微珠的 MiniMACS 套组可用于 CD117 细胞选择。MS 管柱可藉由将其用工作缓冲液冲洗而制备。举例而言,用于冲洗管柱的工作缓冲液的体积可为约 500 μ l。将管柱置于经 Miltenyi Biotec 购得的 MACS 分离器或提供磁场的合适分离器的磁场中。

[0213] 用移液管或能转移一定体积液体的其它装置将工作缓冲液中的细胞悬浮液添加至管柱中。与附着至微珠的抗体结合的经抗人 CD117 抗体标记的 CD117 细胞因 MACS 分离器的磁场而固持于管柱中。任何未经标记细胞连同工作缓冲液一起应流经管柱且可收集于无菌管中以用于细胞表型及细胞计数。可将流经管柱的未经标记细胞鉴别为阴性溶离份。可在添加细胞悬浮液后用工作缓冲液洗涤管柱。举例而言,可将管柱洗涤至少 3 次或任何次数,使所有或大体上所有未经标记细胞穿过管柱。可收集来自洗涤步骤的流出物以用于细胞表型及计数。亦可将该流出物鉴别为阴性溶离份。

[0214] 可在洗涤管柱后自该管柱收集经标记的 CD117 干细胞。藉由将无菌管置于管柱下且自磁场移除管柱来收集经标记的 CD117 细胞。一旦自磁场移除管柱,经标记的 CD117 细胞即穿过管柱进入无菌管。可藉由将工作缓冲液添加至管柱中使其流经管柱而洗出管柱中的残余经标记的 CD117 干细胞,且视情况藉由柱塞冲提管柱以释放细胞。可将所收集的经标记 CD117 细胞鉴别为阳性溶离份。为获得更纯化的经标记 CD117 细胞群,可在先前所揭示的洗涤程序之后视情况使阳性溶离份流经管柱至少一次以上。可将阳性溶离份以约 300g 离心约 10 分钟且抽吸上清液。可使离心块悬浮于约 5ml 工作缓冲液中。

[0215] 用血球计分析阳性溶离份及阴性溶离份以获得活细胞的总计数。藉由流式细胞仪分析阴性溶离份以供表型分析。可视情况藉由流式细胞仪分析阳性溶离份以供表型分析。

[0216] 含有表现 MSC 细胞标记(诸如 CD117 或其它细胞标记)的干细胞的阳性溶离份可准备用于根据本发明的方法来超低温保存且在本文中进一步详述。将约 1ml 人血清白蛋白、约 3ml DPBS 及约 1ml DMSO 添加至约 5ml 阳性溶离份中。或者,可在将细胞准备用于超低温保存的步骤中使用其它培养基,诸如完全培养基、牛血清白蛋白、胎小牛血清、胎牛血清、蛋白血浆溶离份或自体血清。将含有 MSC 的溶液混合且在冰上冷却约 10 分钟。添加约 1ml DMSO 作为超低温保存剂。或者,约 6% HES 羟乙基淀粉与约 5% DMSO 的约 1ml 混合物可用作超低温保存剂。将所得溶液等分至冷冻小瓶中。或者,可将所得溶液等分至适合于超低温保存的任何容器(诸如超低温保存袋)中。接着根据如本文中进一步详述的本发明的控速冷冻器程序将冷冻小瓶超低温保存于控速冷冻器(Cryomed)中。一旦含有 MSC 的溶液达到约 -90℃的目标温度,即将冷冻小瓶转移至长期储存冷冻器中且储存于约 -135℃或更低温度下。或者,可将冷冻小瓶或其它合适的超低温保存容器置于经监控的急降冷冻器中且

冷冻至约 -80°C 且接着转移至长期储存冷冻器中处于约 -135°C 或更低温度下的液氮蒸气相中。

[0217] 或者,阳性溶离份可用于根据本发明的方法接种培养烧瓶且培养细胞。可接着自细胞培养物选择 MSC 且根据本发明的方法进行超低温保存。

[0218] 根据本发明所获得的细胞可在使用 CD117 选择的本发明实施的任何时刻藉由其它合适制程及方法选择或分离。举例而言,并非使用本文所述的 CD117 选择制程及方法,超低温保存前、解冻后或自细胞培养物获得的本发明细胞可藉由血清剥夺使用于培养物中的血清剥夺培养基在合适的温度及条件下浓缩约 2 周至约 4 周或其它合适时段。血清剥夺培养基可在有或无 ES-FBS 的情况下使用。

[0219] 准备细胞培养

[0220] 可将包含根据本发明的方法所收集的月经干细胞的细胞悬浮液进一步培养以为进一步选择步骤、超低温保存或治疗或药妆用途作准备。包含月经干细胞的细胞悬浮液在根据本发明浓缩后或在超低温保存及解冻后可准备细胞培养。适用时,解冻步骤包含对于含有约 5ml 待解冻的超低温保存细胞的各小瓶制备以 Histopaque (Sigma-Aldrich) 购得的密度梯度培养基的约 15ml 等分试样且接着对于含有约 5ml 待解冻的超低温保存细胞的各小瓶制备张氏完全培养基 (Chang' s complete media)、DMEM 完全培养基或 IMDM 完全培养基或其它合适培养基的约 25ml 等分试样。如本文所述,来自处理后、密度梯度及细胞选择的新鲜细胞样本亦可接种于培养物中。

[0221] 张氏完全培养基包含约 325ml 作为产品 12571-063 的 MEM α 培养基 (Gibco), 添加 20% 张氏培养基以包括约 90ml 张氏 B (基础) C110 (18% v/v) (Irvine Scientific)、约 10ml 来自补充 C106 的张氏培养基 C (2% v/v) (Irvine Scientific)、约 5ml 盘尼西林 / 链霉素 (以于 0.85% 生理食盐水中的 10,000 单位 / 毫升盘尼西林 G 钠及 10,000 μg / ml 硫酸链霉素制备的液体) (Gibco-15140-122)、约 5ml L- 麸胺酰胺 200mM (100 $\times$) (Gibco-25030-081) 及约 75ml ES- 胎牛血清 (15% v/v) (Gibco-10439-024)。张氏培养基可以完全培养基 (Irvine Scientific) 形式购得。

[0222] 可使用包括 (但不限于) 完全培养基、DNase (Genentech, Inc. 50242-100-40 号)、TrypLETM Express (Gibco, 12605-010 号) 及 DPBS (Mediatech, MT21-031 CV) 的材料使经超低温保存的细胞解冻。

[0223] 须自于液氮蒸气中的储存中移除经超低温保存的细胞且将其置于 37°C 水浴中。可将细胞在水浴中搅动且不完全解冻。可将部分解冻的细胞转移至具有 DNase 的经冷却张氏完全培养基中且藉由翻转来混合。可以每 100ml 张氏培养基约 10 滴来添加 DNase。可将各约 5ml 的细胞制剂添加至约 25ml 经冷却张氏培养基中。可将悬浮液以约 120g 离心约 5 分钟。可抽吸上清液且使细胞再悬浮于适当培养基中以为细胞培养作准备。

[0224] 或者且若冷冻并非必需,诸如当在无超低温保存步骤的情况下培养包含月经干细胞的细胞悬浮液时,可藉由将约 5ml 等分试样置于含有约 1mg 经 Pulmozyme 购得的 DNase 的经冷却张氏完全培养基的约 25ml 等分试样中来稀释细胞悬浮液。

[0225] 可藉由翻转混合经稀释的细胞悬浮液。将悬浮液以约 840g 离心约 7 分钟。抽吸上清液同时不扰动离心块。使离心块达到约 30ml 张氏完全培养基的总体积。移除少量细胞悬浮液以供分析,该分析包括用血球计进行细胞计数及使用锥虫蓝或其它合适的生存力测

试方法进行生存力测试。将约 30ml 悬浮液铺于以 Histopaque(Sigma-Aldrich) 购得的密度梯度溶液或其它合适的培养基上,且在无制动器的情况下以约 420g 离心约 30 分钟。在不破坏白血球层的情况下自离心机移除管。抽吸上清液且收集白血球层。用张氏完全培养基使白血球层达到约 20ml 且以约 840g 洗涤约 7 分钟。抽吸上清液,且使离心块悬浮于高达约 10ml 的张氏完全培养基中,但亦可高达约 20ml 或约 30ml 或甚至小于约 10ml。移除悬浮液的等分试样(诸如约 100 μ l)以进行细胞计数及生存力分析。

[0226] 经超低温保存的细胞的培养

[0227] 可以约 48 小时继代时间将细胞以约 2000 个细胞/平方公分涂布。若使用较高浓度的细胞,则继代可以约 24 小时时间间隔发生。经非组织培养物处理的 T 75 烧瓶可用于将约 150,000 个细胞涂于约 15ml 完全培养基中。可在 5% CO₂ 恒温箱中培育经涂布的细胞直至亚融合(subconfluent)约 80% 为止。

[0228] 可使细胞经受多次继代。当细胞即将自烧瓶分离时,可自该烧瓶抽吸培养基。可接着用约 5ml 无钙或镁的磷酸盐缓冲溶液(PBS)冲洗烧瓶。将所附着的细胞洗涤一次后可接着移除 PBS。将约 2ml 胰蛋白酶样酶或其它合适的酶溶液添加至 T75 烧瓶中(每 T25 烧瓶 1ml),在约 37°C 下预加温。可搅动烧瓶以用酶样溶液涂覆细胞。可在约 37°C 下于恒温箱中将具有酶样溶液的烧瓶培育约 5 分钟。培育后,可将烧瓶在固体表面上轻扣以驱逐细胞。可用约 2ml 完全培养基稀释烧瓶的内含物以冲洗且终止反应。可将细胞用约 2ml 至约 5ml DPBS 洗涤且转移至 50ml 离心管中以供洗涤。可将该管以约 120g 离心约 5 分钟。离心后可摒弃上清液,且可使所收集的细胞悬浮于张氏完全培养基中。约 7ml 细胞悬浮液可用于在 T25 烧瓶中培养且约 15ml 用于在 T75 烧瓶中培养。

[0229] 用于细胞培养的张氏完全培养基包含约 325ml MEM α 培养基(Gibco 12571-063 号)、约 90ml 张氏 B(基础培养基)(18% v/v)(Irvine Scientific, C110)、约 10ml 张氏 C(2% v/v)(Irvine Scientific, 补充 C106)、约 5ml 盘尼西林/链霉素(10,000 单位/毫升盘尼西林 G 钠与 10,000 μ g/ml 硫酸链霉素(Gibco 15140-122 号))、约 5ml L- 麸胺酰胺 200mM(100 $\times$)(Gibco, 25030-081 号)及约 75ml ES- 胎牛血清(15% v/v)(Gibco 10439-024 号)。

[0230] 解冻及培养方法的替代实施例

[0231] 自液氮蒸气移除细胞后,在 37°C 水浴中搅动冷冻小瓶而不使细胞完全解冻。可将部分解冻的细胞转移至具有 DNase 的经冷却张氏培养基中且藉由翻转轻微混合。对于各 5ml 的细胞悬浮液而言,可使用约 25ml 的经冷却张氏培养基。可以 100ml 经冷却张氏培养基约 10 滴将 DNase 添加至张氏培养基中。可将细胞悬浮液以约 120g 离心约 5 分钟。可抽吸上清液且可将细胞置于先前所讨论的抗生素培养基中。在约 37°C 下培育至少约 12 小时后,可使用张氏完全培养基洗涤细胞。

[0232] 可接着将经洗涤的细胞接种用于细胞培养。在一实施例中,可将经解冻的细胞以约 40,000 个细胞/平方公分或 1,000,000 个细胞/T-25 涂布。可以 48 小时继代时间将细胞以 2000 个细胞/平方公分涂布。若涂布更多细胞,则继代可在约 24 小时时间间隔内发生。经非组织培养物处理的 T75 烧瓶可用于将约 150,000 个细胞涂于约 15ml 完全培养基中。可在 5% CO₂ 恒温箱中培育细胞直至亚融合至 80% 为止。当细胞即将自烧瓶分离时,可自该烧瓶抽吸培养基。可接着用约 5ml 无钙或镁的磷酸盐缓冲溶液冲洗烧瓶。在已将所附

着的细胞洗涤至少一次后可移除 PBS。可将约 2ml 胰蛋白酶样酶添加至 T75 烧瓶中（对于 T25 烧瓶为 1ml），在约 37℃ 下预加温，且可搅动烧瓶以用酶涂覆细胞。可在约 37℃ 下于恒温箱中将具有酶的烧瓶培育约 5 分钟。培育后，可将烧瓶在固体表面上缓缓轻扣以驱逐细胞。可用约 2ml 完全培养基稀释烧瓶的内含物以冲洗且终止反应。用约 2ml 至约 5ml DPBS 洗涤细胞且将再悬浮的细胞转移至 50ml 离心管中以供洗涤。可将该管以约 120g 离心约 5 分钟。离心后可摒弃上清液，且可使所收集的细胞悬浮于张氏完全培养基中且用于下一次继代。约 7ml 可用于 T25 烧瓶且约 15ml 用于 T75 烧瓶。

[0233] 其它细胞培养方法

[0234] 可将悬浮液中的细胞以约 40,000 个细胞 / 平方公分接种至未经处理的培养烧瓶中的张氏完全培养基、DMEM 完全培养基（具有高葡萄糖或低葡萄糖）或其它合适培养基中。可在约 37℃ 的温度下在约 5% CO₂ 中于 CO₂ 恒温箱（Thermo Electron Corp. 或 Bioscience Technologies）中或在任何其它合适的恒温箱系统中培育烧瓶。监测细胞培养物的浊度及 pH 值变化。若 pH 值偏高，则应更换约 50% 培养基。

[0235] 可将烧瓶最初培育约 7 天或直至培养基显着处于如由培养基中的酚红指示剂的颜色所指示的范围外为止。若约 7 天后 pH 值保持稳定，则必要时将培养基用新鲜培养基（本文中亦称作“未用培养基”）更换。更换几乎所有培养基。第 7 天更换培养基后，至第 8 天细胞可开始融合至第 21 天止。一旦达到约 70-80% 融合，即可次培养细胞。使用诸如 TrypLE™ Express (Gibco) 的胰蛋白酶样酶或任何其它合适的酶次培养细胞培养物以提供足够细胞来根据本发明进行细胞选择。举例而言，细胞选择可用约 10,000,000 个细胞来进行。细胞选择亦可用多于或少于约 10,000,000 个细胞来进行。

[0236] 根据本发明，可在合适时间自细胞培养物收集细胞。为收集细胞，附着细胞应自烧瓶分离。为使细胞自烧瓶分离，经由自动移液管抽吸培养基。接着用约 5ml 无钙或镁的磷酸盐缓冲生理食盐水（PBS）冲洗烧瓶。接着自己洗涤至少一次的附着有细胞的烧瓶移除 PBS。应将较佳在约 37℃ 下预加温的约 1ml 胰蛋白酶样重组酶（诸如 TrypLE™ Express (Gibco)）或任何其它合适的酶添加至烧瓶中的细胞培养物中。搅动烧瓶以用酶涂覆细胞。应在约 37℃ 下将具有酶的烧瓶培育约 5 分钟。培育后，应将烧瓶在固体表面上缓缓轻扣以驱逐细胞。应用约 2ml 张氏完全培养基稀释烧瓶且将细胞转移至 15ml 离心管中以用张氏完全培养基、DMEM 完全培养基（具有高葡萄糖或低葡萄糖）或其它合适的培养基洗涤。应将该管以约 100g 离心约 7 分钟。抽吸上清液且将其摒弃。使离心块悬浮于合适体积的张氏完全培养基、DMEM 完全培养基（具有高葡萄糖或低葡萄糖）或其它合适培养基中。

[0237] 此时，可根据本发明的细胞选择方法自细胞培养物选择细胞。一旦选择，即可将细胞涂于皮氏培养皿（Petri dish）上，接种至培养烧瓶中，或根据本发明超低温保存。

[0238] 可使用张氏完全培养基（约 15% FBS）将细胞涂于 9cm² 皮氏培养皿中。或者，可将细胞置于具有通风盖的培养烧瓶中。若培养基的 pH 值变高，则可用张氏完全培养基洗涤细胞。适当生长后，必要时，可使用胰蛋白酶样酶使细胞自皮氏培养皿或培养烧瓶分离且接着使用张氏完全培养基将其置于未经处理的培养烧瓶中。适当生长后，可使用诸如 TrypLE™ Express (Gibco) 的胰蛋白酶样酶使细胞分离且接着接种至新鲜未经处理的培养烧瓶中。可重复此过程以维持所要细胞生长。若培养基的 pH 值偏高，则可用新鲜培养基洗涤细胞，或可将约 50% 培养基或其它合适的量用新鲜培养基置换。此时，可根据本发明的细胞选择方

法自细胞培养物选择细胞。可将所选细胞涂于皮氏培养皿上,接种至培养烧瓶中,或根据本发明超低温保存。

[0239] 在本发明的实施中遵循由美国食品及药品管理局 (United States Food and Drug Administration) 在美国联邦法规 (Code of Federal Regulations) 中所确立的现行药品优良制造规范 (current Good Manufacturing Practices, cGMP) 标准及现行组织优良操作规范 (current Good Tissue Practices, cGTP)。

[0240] 本发明的制程、方法及系统的上述步骤可替代地如图 2 至图 28 中所说明来体现。

[0241] M2-01 细胞

[0242] 在一实例中,根据本发明的实施收集月经干细胞。详言之,在月经周期期间由供体收集约 0.4ml 本文中命名为且称作 M2-01 的月经流样本。将无菌收集装置置于供体的阴道内历时足以收集月经流样本的时间。将约 0.4ml 月经流样本自收集装置倾入收集管中的约 10ml 收集培养基中。收集培养基包含无钙、镁或酚红的 DPBS (Mediatech), 约 100 单位 / 毫升的盘尼西林, 约 100 微克 / 毫升的链霉素, 及处于每毫升 DPBS 约 10 单位至约 20 单位的范围内的无保存剂肝素。将月经流样本及收集培养基密封于收集管中, 于冰上包装于收集容器中, 且藉由运送而输送至处理设施。

[0243] 月经流样本于收集后约 24 小时内到达处理设施。在到达处理设施后即对包含于具有抗生素的收集培养基中的约 10.0ml 月经流样本的收集容器消毒, 将其转移至清洁室中, 且置于冰上。在约 18°C 的温度下将收集容器以约 2000rpm 离心约 7 分钟且接着消毒。抽吸约 5ml 上清液样本且将其用于接种两个 BacT/ALERT 血液培养瓶, 约 4ml 进入好氧培养瓶中且约 1ml 进入厌氧培养瓶中。在约 37°C 下将培养瓶在 BacT/ALERT 系统中培育约 14 天。结果为对好氧及厌氧微生物呈阴性。

[0244] 抽吸剩余上清液且将其摒弃。使离心块悬浮于约 2ml DPBS 中。作为处理后样本收集约 1ml 细胞悬浮液且藉由细胞计数、流动分析及生存力来分析。使用血球计所进行的总细胞计数指示处理后样本中收集约 7,500,000 个细胞。根据本发明的方法使用 FC500 流式细胞仪进行流式细胞仪分析以鉴别存在于处理后样本中的月经干细胞上的某些细胞表面标记。如图 29a 至图 29j 所示, 结果指示以细胞群的约 0.4% 的浓度收集 CD117⁺ 细胞。另外, 结果指示以细胞群的约 58% 的浓度收集 CD45 阴性细胞。结果指示以细胞群的约 17% 的浓度收集 CD44⁺ 细胞, 以细胞群的约 3% 的浓度收集 CD166⁺ 细胞, 以细胞群的约 8.0% 的浓度收集 CD105⁺ 细胞, 以细胞群的约 6.8% 的浓度收集 CD90⁺ 细胞, 以细胞群的约 0.1% 的浓度收集 CD29⁺ 细胞, 且结果指示以细胞群的约 0.1% 的浓度收集 CD34⁺ 细胞。亦使用 7AAD 进行流式细胞仪分析以评估细胞生存力。结果指示月经干细胞有约 95% 存活。

[0245] 根据本发明的方法培养剩余细胞悬浮液。详言之, 将一部分细胞悬浮液铺于 15ml 的 1.083g/ml 密度梯度溶液 (Histopaque, Sigma-Aldrich) 上。在无制动器的情况下将细胞悬浮液以约 420g 离心约 30 分钟。抽吸上清液, 且将白血球层移除且置于管中。将张氏完全培养基添加至白血球层中以使总体积达到约 30ml。将溶液以约 840g 洗涤两次历时约 7 分钟。基于第二次洗涤而离心后, 移除上清液留下离心块, 且将约 15ml 张氏完全培养基添加至管中以使离心块悬浮。移除约 100 μ L 悬浮液以用血球计进行细胞计数分析且使用锥虫蓝进行生存力分析。

[0246] 第 1 天将约 1,000,000 个细胞以约 40,000 个细胞 / 平方公分接种至 T25 未经处

理培养烧瓶中的张氏培养基中。在约 37℃ 温度下,于约 5% CO₂ 中培育烧瓶。第 8 天,细胞经历第 1 代且更换培养基。

[0247] 如本揭示案中所用,继代一般涉及藉由用自动移液管抽吸培养基而使细胞自烧瓶分离。用约 5ml 无钙或镁的磷酸盐缓冲生理食盐水 (PBS) 冲洗烧瓶。接着在已将附着有细胞的烧瓶洗涤一次后,移除 PBS。将约 1ml 于约 37℃ 下预加温的胰蛋白酶样酶 (TrypLE™ Express-Gibco) 添加至烧瓶中且搅动烧瓶以用酶涂覆细胞。在约 37℃ 下于恒温箱中将具有酶的烧瓶培育约 5 分钟。培育后,将烧瓶在固体表面上缓缓轻扣以驱逐细胞。用约 2ml 完全培养基稀释烧瓶的内含物,且将细胞转移至 15ml 离心管中以供洗涤。将该管以约 100g 离心约 7 分钟。离心后摒弃上清液,且使所收集的细胞悬浮于张氏完全培养基中且置于至少一个新的 T25 或 T75 未经处理的细胞培养烧瓶中。

[0248] 细胞培养物的其它继代在第 10 天、第 14 天、第 19 天、第 21 天、第 24 天、第 26 天、第 29 天、第 32 天及第 35 天发生。第 8 天,收集约 165,000 个细胞且根据本发明的培养方法将其接种于未经处理的组织培养烧瓶中的张氏培养基中。第 10 天,收集约 270,000 个细胞且将其接种于未经处理的组织培养烧瓶中的张氏培养基中。第 14 天,收集约 840,000 个细胞且将其接种于未经处理的组织培养烧瓶中的张氏培养基中。第 19 天,收集约 2,200,000 个细胞且将其接种于未经处理的组织培养烧瓶中的张氏培养基中。第 21 天,收集约 5,000,000 个细胞,其中约 3,500,000 个细胞系用于细胞表型。第 24 天,收集约 3,000,000 个细胞且将其接种于未经处理的组织培养烧瓶中的张氏培养基中。第 26 天,收集约 4,900,000 个细胞且将其接种于未经处理的组织培养烧瓶中的张氏培养基中。第 29 天,收集约 14,800,000 个细胞且将其接种于未经处理的组织培养烧瓶中的张氏培养基中,其中约 11,100,000 个细胞系用于阳性选择表现 CD117 的细胞且约 3,500,000 个细胞系用于表型分析,且将约 200,000 个细胞接种至培养物中。第 32 天,收集约 1,300,000 个,其中约 1,000,000 个细胞系用于流动表型且将约 300,000 个细胞接种于未经处理的组织培养烧瓶中的张氏培养基中。

[0249] 第 29 天且如先前所讨论,根据如本文所述的本发明的选择方法对自培养物收集的细胞进行 CD117 选择。CD117 干细胞选择前,移除各细胞培养物的等分试样以供分析,结果展示于表 C 中。

[0250] 详言之,用小鼠抗人 CD-117 抗体标记所收集的细胞。将约 10,000,000 个所收集细胞离心且抽吸上清液。使离心块悬浮于约 100 μ l 含有约 5 μ g 作为产品 104D2 (Santa Cruz) 的经纯化小鼠抗人 CD117 单株抗体 (IgG₁) 的工作缓冲液中。经 BD Biosciences 购得的工作缓冲液含有 pH 值约 7.2 的 PBS、牛血清白蛋白、EDTA 及约 0.09% 迭氮化合物。将含有细胞及抗体的溶液在冰上培育约 20 分钟至约 25 分钟。用工作缓冲液洗涤细胞以移除未结合的抗体,且将含有细胞及抗体的溶液以约 300g 离心约 10 分钟。离心后,抽吸上清液且将其摒弃,且使离心块悬浮于约 80 μ l 工作缓冲液中。

[0251] 用能与小鼠 IgG 的重链及 / 或轻链接合的山羊抗小鼠抗体标记 CD117 干细胞 - 抗体复合物。使磁性微珠附着至山羊抗小鼠抗体上。将山羊抗小鼠 IgG 抗体添加至工作缓冲液中的悬浮离心块中且在冰上培育约 30 分钟至约 35 分钟。培育后,将细胞用约 2ml 工作缓冲液洗涤且以约 300g 离心约 10 分钟。抽吸上清液且使最终细胞悬浮于约 500 μ l 工作缓冲液中。

[0252] 在整个实验中使包含所收集的干细胞及溶液（包括工作缓冲液）的细胞悬浮液保持冷却以防止非特异性标记细胞。

[0253] MS管柱 (Miltenyi Biotec) 系藉由将约 500 μ l 工作缓冲液经该管柱冲洗来制备。经 Miltenyi Biotec 购得的 Minimacs 系用于 CD117 干细胞选择。将管柱置于经 Miltenyi Biotec 购得的 MACS 分离器的磁场中。经由移液管将细胞悬浮液添加至管柱中。未经标记的细胞及工作溶液流经管柱且收集于无菌管中用于表型分析及细胞计数分析。将具有所收集的流出物的管标记为阴性 CD117 细胞溶离份。在添加细胞悬浮液后用工作缓冲液将管柱洗涤 3 次。将无菌管置于管柱下，将该管柱自磁场移除以使阳性溶离份穿过管柱且进入该无菌管中。将约 1ml 工作缓冲液添加至管柱中，且将柱塞推经管柱以释放细胞的阳性溶离份。将具有所收集的流出物的管标记为阳性 CD117 细胞溶离份。

[0254] 用血球计分析阳性及阴性溶离份以获得活细胞的总数。藉由流式细胞仪分析阴性溶离份。在整个处理及培养的各个步骤中分析 M2-01 细胞，结果展示于图 30a 至图 30e 中且如下表 C 中所概述：

[0255] 表 C :M2-01 流式细胞仪及培养

[0256]

继代号	CD117-PE	CD44-FITC (阳性)	CD45-ECD (阴性)	7AAD-TEST	7AAD-ISO	CD166	CD105	CD29	CD34	CD90
M2-01 P0	0.40%	17.70%	58.90%	95.40%	95.10%	3.70%	8.00%	0.10%	0.10%	6.80%
M2-01 P4	40.30%	88.30%	77.10%	97.50%	97.50%	94.70%	16.10%	81.10%	0.10%	84.90%
M2-01 P7	2.10%	89.20%	87.70%	95.20%	95.60%	91.00%	33.00%	82.90%	0.20%	67.90%
M2-01 P8	2.50%	70.80%	94.50%	97.30%	95.30%					
阳性M2-01 FRAC	7.20%	93.60%	83.30%	95.80%	91.90%					
阴性M2-01 FRAC	4.50%	94.10%	86.40%	94.70%	92.80%	92.00%	45.60%	90.40%	0.10%	79.60%

[0257] M2-02C 细胞

[0258] 在另一实例中，根据本发明的实施收集月经干细胞。详言之，在月经周期期间由供体收集约小于 1.0ml 本文中命名为且称作 M2-02C 的月经流样本。将无菌收集装置置于供体的阴道内历时足以收集月经流样本的时间。将月经流样本自收集装置倾入收集管中的约 10ml 收集培养基中。收集培养基包含无钙、镁或酚红的 DPBS (Mediatech)，约 100 单位 / 毫升的盘尼西林，约 100 微克 / 毫升的链霉素，及处于每毫升 DPBS 培养基约 10 单位至约 20 单位的范围内的无保存剂肝素。将月经流样本及收集培养基密封于收集管中，于冰上包装于收集容器中，且藉由运送而输送至处理设施。

[0259] 月经流样本于收集后约小于 24 小时内到达处理设施。在到达处理设施后即对包含约 10.0ml 月经流样本及具有抗生素的收集培养基的收集容器消毒，将其转移至清洁室中，且置于冰上。在约 18℃ 的温度下将收集容器以约 2000rpm 离心约 7 分钟且接着消毒。抽吸约 5ml 上清液样本且将其用于接种两个 BacT/ALERT 血液培养瓶，约 4ml 进入好氧培养瓶中且约 1ml 进入厌氧培养瓶中。在约 37℃ 下将培养瓶在 BacT/ALERT 系统中培育约 14 天。结果为对好氧及厌氧微生物呈阴性。

[0260] 抽吸剩余上清液且将其摒弃。使离心块悬浮于约 2ml 缓冲生理食盐水中。作为处理后样本收集约 1ml 细胞悬浮液且藉由流式细胞仪分析来分析以获得细胞计数、流动分析及生存力。

[0261] 使用血球计进行处理样本的总细胞计数。处理样本中收集约 19,700,000 个细胞。使用 FC500 流式细胞仪进行流式细胞仪分析以鉴别细胞表面标记。如图 31a 至图 31iii 所示,结果指示以细胞群的约 0.2% 的浓度收集 CD117⁺ 细胞。另外,结果指示以细胞群的约 97% 的浓度收集 CD45 阴性细胞。结果指示以细胞群的约 1% 的浓度收集 CD44⁺ 细胞,以细胞群的约 0.1% 的浓度收集 CD166⁺ 细胞,以细胞群的约 1% 的浓度收集 CD105⁺ 细胞,以细胞群的约 0.4% 的浓度收集 CD90⁺ 细胞,以细胞群的约 0.5% 的浓度收集 CD29⁺ 细胞,且结果指示以细胞群的约 0% 的浓度收集 CD34⁺ 细胞。结果亦指示如藉由 7AAD 所测定所收集的约 99% 细胞存活。

[0262] 将所有悬浮细胞转移至一 50ml 锥形收集管中,且使用洗涤溶液使细胞悬浮液的体积达到约 31ml 的总体积。藉由密度梯度离心来浓缩约一半的 30ml 细胞悬浮液。藉由包括密度梯度离心及体积缩减、浓缩及洗涤的方法来处理细胞。使细胞悬浮液达到约 30ml 且用约 15ml 淋巴细胞分离培养基的密度梯度液(于约 20℃ 下密度 1.077-1.080g/ml-Cellgro)铺于下方。在无制动器的情况下于约 20℃ 的温度下对细胞悬浮液及密度梯度液以约 14,000rpm 进行离心历时约 30 分钟。白血球层形成且含有月经干细胞群。抽吸白血球层上方之上清液且将其摒弃。连同一些洗涤溶液及尽可能小的体积的密度梯度液一起移除白血球层。摒弃剩余密度梯度液及含有红血球的离心块。

[0263] 将白血球层置于 50ml 锥形收集管中且用洗涤溶液使体积达到约 30ml。在约 20℃ 的室温下使细胞悬浮液以约 2000rpm 离心历时约 7 分钟。离心后,移除接近锥形收集管顶部的约 1ml 上清液且将其用于接种 BacT/ALERT 血液培养瓶。在约 37℃ 下将血液培养瓶在 BacT/ALERT 系统中培育约 14 天。结果指示上清液及细胞悬浮液不含有任何好氧或厌氧微生物。抽吸剩余上清液,同时小心留下包含月经干细胞的离心块。

[0264] 将约 1,000,000 个细胞以约 40,000 个细胞/平方公分接种至 T25 未经处理培养烧瓶中的 15% 张氏完全培养基中。在 37℃ 温度下于约 5% CO₂ 中培育烧瓶。第 6 天及第 1 代,收集约 80,000 个细胞;第 11 天,324,000 个细胞;第 17 天,600,000 个细胞;第 9 天,2,900,000 个(提供 2,300,000 个用于细胞表型);第 22 天,1,200,000 个;第 24 天,2,600,000 个;第 29 天,26,800,000 个细胞(3,500,000 个用于细胞表型,10,000,000 个用于 CD117 选择,超低温保存 131,000,000 个,接种 200,000 个细胞用于培养)。在细胞培养中收集细胞与培养基的等分试样用于表型分析及有效性评估。根据本文中对于涉及所有细胞株的所有细胞培养实验所述的方法进行表型分析及有效性评估。在细胞培养期间使用涉及所有细胞株的血球计进行细胞计数。自评估所收集的数据显示细胞株 M2-02C 最初对 CD117、CD166、CD105、CD29、CD90 及 CD44 呈阳性且以高百分率的生存力对 CD45 呈阴性。

[0265] 表 D:细胞培养期间 M2-02C 的流式细胞仪结果

[0266]

继代号	CD117-PE	CD44-FITC (阳性)	CD45-ECD (阴性)	7AAD-TEST	CD105	CD29	CD34	CD90	CD166
M2-02A	0.2%	0.6%	96.7%	98.9%	1.1%	0.3%	0.0%	0.0%	0.6%
M2-02B	0.2%	0.9%	93.2%	98.4%	2.3%	1.0%	0.0%	0.5%	1.2%
M2-02C	0.1%	0.5%	98.0%	99.5%	0.9%	0.5%	0.1%	0.4%	0.2%
M202 P3	15.5%	97.1%	99.9%	99.0%	96.0%	97.3%		67.0%	95.8%
M202 P5	5.9%	97.1%	100.0%	91.1%	47.9%	97.7%			
M2-02C P6		96.3%	88.8%	99.5%	86.6%	92.2%	10.3%	81.8%	94.8%
M2-02C P7	14.6%	95.9%	84.3%	99.3%	92.4%	95.1%	18.9%	91.5%	93.4%
M2-02C P8	6.3%	98.1%	97.4%	99.4%	52.2%	90.4%	0.5%	83.2%	98.2%
M2-02C-P9	12.7%	97.5%	90.8%	99.2%					
M2-02C P10	12.7%	97.6%	91.5%	99.0%					
M202C P11	34.9%	97.3%	72.6%	98.7%					
M202C P12	24.6%	96.7%	87.3%	98.9%	93.7%	98.3%	10.7%	90.0%	91.8%
M2-02C P14	21.1%	97.8%	60.5%	98.2%	95.7%	98.0%	21.2%	88.3%	95.7%
M2-02C-P17	35.1%	92.0%	75.0%	95.9%	84.0%	91.0%	37.6%	96.0%	98.8%
M2-02C P18	18.4%	88.8%	70.1%	98.1%					
M2-02C P19	14.9%	92.1%	67.1%	97.1%					
M202C-P21	16.5%	89.5%	70.8%	98.6%					

[0267]

M202C P26	40.1%	82.2%	40.1%	92.9%					
M2-02C P28	14.9%	78.5%	72.7%	94.9%					
解冻M2-02C-P3	37.4%	89.6%	86.6%	97.5%					
解冻M202C P4			100.0%	99.7%	98.4%	98.7%			92.9%
解冻M202C-P6	10.6%	97.6%	99.8%	98.1%	96.4%	97.2%			88.2%
M2-02C FICOL P4	0.0%	90.1%	82.0%	99.1%					
M2-02C FICOL-P8	21.4%	91.6%	84.4%	97.4%	94.2%	91.1%	13.0%	88.8%	94.1%
M2-02C FICOL-P9	9.7%	95.2%	97.2%	98.3%					
M2-02C-FICOL-P10	13.8%	92.3%	89.0%	98.0%					
M2-02C FICOL P12	12.3%	90.5%	94.2%	99.0%					
M2-02C P13 FICOL	5.4%	88.9%	79.1%	94.8%					77.8%
M2-02C FICOL P14	23.3%	94.3%	69.9%	98.6%					
M2-02C P15 FICOL	20.2%	92.3%	73.7%	98.4%	32.0%	95.5%	10.4%	94.9%	85.3%
M2-02C-P18 FICOL	0.0%	89.0%	67.5%	98.5%	28.8%	94.0%	21.3%	95.6%	65.7%
M202C P21 FICOL	4.9%	85.9%	57.0%	96.6%	90.3%	92.3%	28.7%	88.1%	75.4%
M202C FICOL P26	18.0%	67.9%	50.3%	90.1%	20.0%	74.6%	39.7%	57.3%	38.3%
M202C FICOL P28	0.2%	65.7%	69.3%	93.7%					
阴性M2-02C FICOL	17.4%	98.4%	89.8%	99.0%	84.6%	89.5%	19.7%	95.6%	86.4%
阳性M2-02C FICOL	13.7%	89.1%	66.3%	92.2%					78.4%
阳性M2-02C FICOL					97.9%	97.1%	8.0%	90.7%	
阳性M2-02C-FICOL-P5	0.0%	78.0%	98.4%	89.1%					
阳性M2-02C-P9 FICOL	1.7%	87.5%	67.1%	95.9%					
阳性M2-02C-P10 FICOL	14.8%	93.2%	69.7%	98.8%					
阳性M202C-P12 FICOL	29.0%	93.5%	74.0%	97.4%					
阳性M2002C P13-FICOL	2.8%	90.6%	65.5%	98.7%					
阳性M202-P14 FICOL					91.0%	92.7%	13.6%	66.4%	80.3%
阳性M202C FICOL P17	34.4%	82.9%	39.0%	93.5%					
阳性M2-02C-P18 FICOL									
POS FXN	0.0%	69.7%	68.9%	94.8%					
阳性M2-02C-P19 FICOL	14.4%	93.5%	57.8%	99.0%					
阳性M2-02C P2			87.3%	98.8%	86.9%	94.5%	14.3%	87.7%	89.6%
阳性M2-02C-P3	5.1%	82.6%	93.8%	99.0%					92.6%
阳性M2-02C P4		97.6%	99.1%	98.7%					
阳性M2-02C-P5	10.1%	96.0%	74.0%	99.4%	98.0%	97.4%	4.7%	82.6%	89.5%
阳性M2-02C-P7	3.8%	92.3%	79.4%	99.2%					
阳性M2-02C-P8	5.4%	90.0%	66.5%	96.5%	93.2%	91.3%	24.2%	91.6%	76.6%
阳性M202C-P11	23.6%	89.6%	79.1%	97.1%					
阳性M202C-P15 FRAC	12.2%	83.9%	85.8%	95.5%	84.5%	85.7%	16.2%	81.2%	73.6%
阴性M2-02C	17.8%	93.4%	77.3%	97.8%	99.0%	98.3%	96.9%	94.9%	96.1%

[0268] 第4代经培养的M2-02C的流式细胞仪分析的结果系呈现于图32a至图32iii中。经培养的样本包含根据本发明接种的约1,000,000个细胞。结果指示在第4代以细胞群的约0.0%的浓度收集CD117⁺细胞。另外,结果指示以细胞群的约82%的浓度收集CD45⁻细胞。结果指示以细胞群的约93%的浓度收集CD44⁺细胞。结果亦指示如藉由7AAD所测定所收集的约99%细胞存活。对于M2-02C的第8代,结果指示以细胞群的约14%的浓度收集CD117⁺细胞。另外,结果指示以细胞群的约84%的浓度收集CD45⁻细胞。结果指示以细胞群的约93.3%的浓度收集CD44⁺细胞,以细胞群的约93%的浓度收集CD166⁺细胞,以细胞群的约90%的浓度收集CD105⁺细胞,以细胞群的约87%的浓度收集CD90⁺细胞,以细胞群的约85%的浓度收集CD29⁺细胞,且结果指示以细胞群的约0.2%的浓度收集CD34⁺细胞。结果亦指示如藉由7AAD所测定所收集的约97%细胞存活。

[0269] 根据本发明的方法且如本文所述对处于第 4 代的细胞培养物中的细胞进行 CD117 干细胞选择。用小鼠抗人 CD-117 抗体标记所收集的细胞。将约 10,000,000 个所收集细胞离心且抽吸上清液。使离心块悬浮于约 100 μ l 含有约 5 μ g 作为产品 104D2 (Santa Cruz) 的经纯化小鼠抗人 CD117 单株抗体 (IgG₁) 的工作缓冲液中。经 BD Biosciences 购得的工作缓冲液含有 pH 值约 7.2 的 PBS、牛血清白蛋白、EDTA 及约 0.09% 迭氮化合物。将含有细胞及抗体的溶液在冰上培育约 20 分钟至约 25 分钟。用工作缓冲液洗涤细胞以移除未结合的抗体, 且将含有细胞及抗体的溶液以约 300g 离心约 10 分钟。离心后, 抽吸上清液且将其摒弃, 且使离心块悬浮于约 80 μ l 工作缓冲液中。

[0270] 用能与小鼠 IgG 的重链及 / 或轻链接合的山羊抗小鼠抗体标记 CD117 干细胞 - 抗体复合物。使磁性微珠附着至山羊抗小鼠抗体上。添加山羊抗小鼠 IgG 抗体且在冰上培育约 30 分钟至约 35 分钟。培育后, 将细胞用约 2ml 工作缓冲液洗涤且以约 300g 离心约 10 分钟。抽吸上清液且使最终细胞悬浮于约 500 μ l 工作缓冲液中。

[0271] 在整个实验中使包含所收集的干细胞及溶液 (包括工作缓冲液) 的细胞悬浮液保持冷却以防止非特异性标记细胞。

[0272] MS 管柱 (Miltenyi Biotec) 系藉由将约 500 μ l 工作缓冲液经该管柱冲洗来制备。经 Miltenyi Biotec 购得的 Minimacs 系用于 CD117 干细胞选择。将管柱置于经 Miltenyi Biotec 购得的 MACS 分离器的磁场中。经由移液管将细胞悬浮液添加至管柱中。未经标记的细胞及工作溶液流经管柱且于无菌管中收集用于表型分析及细胞计数分析。将具有所收集的流出物的管标记为阴性 CD117 细胞溶离份。在添加细胞悬浮液后用工作缓冲液将管柱洗涤 3 次。将无菌管置于管柱下, 将该管柱自磁场移除以使阳性溶离份穿过管柱且进入该无菌管中。将约 1ml 工作缓冲液添加至管柱中, 且将柱塞推经管柱以释放细胞的阳性溶离份。将具有所收集的流出物的管标记为阳性 CD117 细胞溶离份。

[0273] 在其它以密度梯度液处理、CD117 选择及随后培养的各个步骤中用血球计及流式细胞仪分析阳性及阴性溶离份, 一般对于阳性及阴性溶离份而言结果展示于表 D 中且对于阳性溶离份而言结果展示于下表 E 中。

[0274] M2-03E 细胞

[0275] 在另一实例中, 根据本发明的实施收集月经干细胞。详言之, 在月经周期期间由供体收集本文中命名为且称作 M2-03E 的月经流样本。将无菌收集装置置于供体的阴道内历时足以收集月经流样本的时间。将月经流样本自收集装置倾入收集管中的约 10ml 收集培养基中。收集培养基包含无钙、镁或酚红的 DPBS (Mediatech), 约 100 单位 / 毫升的盘尼西林, 约 100 微克 / 毫升的链霉素, 及处于每毫升 DPBS 培养基约 10 单位至约 20 单位的范围内的无保存剂肝素。将月经流样本及收集培养基密封于收集管中, 于冰上包装于收集容器中, 且藉由运送而输送至处理设施。

[0276] 月经流样本于收集后约小于 24 小时内到达处理设施。在到达处理设施后即对包含约 10.0ml 月经流样本及具有抗生素的收集培养基的收集容器消毒, 将其转移至清洁室中, 且置于冰上。在约 18°C 的温度下将收集容器以约 2000rpm 离心约 7 分钟且接着消毒。抽吸约 5ml 上清液样本且将其用于接种两个 BacT/ALERT 血液培养瓶, 约 4ml 进入好氧培养瓶中且约 1ml 进入厌氧培养瓶中。在约 37°C 下, 将培养瓶在 BacT/ALERT 系统中培育约 14 天。结果为对好氧及厌氧微生物呈阴性。

[0277] 抽吸剩余上清液且将其摒弃。使离心块悬浮于约 2ml 缓冲生理食盐水中。作为处理后样本收集约 1ml 细胞悬浮液且藉由流式细胞仪分析来分析以获得细胞计数、流动分析及生存力。

[0278] 使用血球计进行处理样本的总细胞计数。结果指示根据本发明在处理后的样本中收集约 5,200,000 个细胞。在 FC500 流式细胞仪上进行流式细胞仪分析。结果指示以细胞群的约 0.5% 的浓度收集 CD117⁺ 细胞。另外,结果指示以细胞群的约 88.4% 的浓度收集 CD45 阴性细胞。结果指示以细胞群的约 2.1% 的浓度收集 CD44⁺ 细胞。结果亦指示如藉由 7AAD 所测定所收集的约 97.0% 细胞存活。

[0279] 第 0 天将约 4,000,000 个细胞以约 40,000 个细胞 / 平方公分接种至 T75 未经处理的培养烧瓶中的张氏培养基中。在约 37°C 温度下,于约 5% CO₂ 中培育烧瓶。第 10 天于第 1 代,更换培养基。其它继代系在第 14 天、第 16 天、第 19 天、第 22 天及第 26 天发生。第 26 天于第 5 代,收集细胞用于根据本发明的选择方法进行 CD117 选择。

[0280] 用小鼠抗人 CD-117 抗体标记所收集的细胞。将约 10,000,000 个所收集细胞离心且抽吸上清液。使离心块悬浮于约 100 μ l 含有约 5 μ g 作为产品 104D2 (Santa Cruz) 的经纯化小鼠抗人 CD117 单株抗体 (IgG₁) 的工作缓冲液中。经 BD Biosciences 购得的工作缓冲液含有 pH 值约 7.2 的 PBS、牛血清白蛋白、EDTA 及约 0.09% 迭氮化合物。将含有细胞及抗体的溶液在冰上培育约 20 分钟。用工作缓冲液洗涤细胞以移除未结合的抗体,且将含有细胞及抗体的溶液以约 300g 离心约 10 分钟。离心后,抽吸上清液且将其摒弃,且使离心块悬浮于约 80 μ l 工作缓冲液中。

[0281] 用能与小鼠 IgG 的重链及 / 或轻链接合的山羊抗小鼠抗体标记 CD117 干细胞 - 抗体复合物。使磁性微珠附着至山羊抗小鼠抗体上。添加山羊抗小鼠 IgG 抗体且在冰上培育约 30 分钟。培育后,将细胞用约 2ml 工作缓冲液洗涤且以约 300g 离心约 10 分钟。抽吸上清液且使最终细胞悬浮于约 500 μ l 工作缓冲液中。

[0282] 在整个实验中使包含所收集的干细胞及溶液 (包括工作缓冲液) 的细胞悬浮液保持冷却以防止非特异性标记细胞。

[0283] MS 管柱 (Miltenyi Biotec) 系藉由将约 500 μ l 工作缓冲液经该管柱冲洗来制备。经 Miltenyi Biotec 购得的 Minimacs 用于 CD117 干细胞选择。将管柱置于经 Miltenyi Biotec 购得的 MACS 分离器的磁场中。经由移液管将细胞悬浮液添加至管柱中。未经标记的细胞及工作溶液流经管柱且于无菌管中收集用于表型分析及细胞计数分析。将具有所收集的流出物的管标记为阴性 CD117 细胞溶离份。在添加细胞悬浮液后用工作缓冲液将管柱洗涤 3 次。将无菌管置于管柱下,将该管柱自磁场移除以使阳性溶离份穿过管柱且进入该无菌管中。将约 1ml 工作缓冲液添加至管柱中,且将柱塞推经管柱以释放细胞的阳性溶离份。将具有所收集的流出物的管标记为阳性 CD117 细胞溶离份。

[0284] 用血球计分析阳性及阴性溶离份以获得活细胞的总数。

[0285] 在张氏培养基中培养阳性溶离份。第 0 天将约 900,000,000,000 个细胞以约 3,000 个细胞 / 平方公分接种至 4 个 T 25 未经处理的培养烧瓶中的张氏培养基中。在约 37°C 温度下于约 5% CO₂ 中培育烧瓶。第 3 天,细胞经历第 1 代且更换培养基。其它继代在第 3 天、第 6 天及第 8 天发生。第 8 天于第 3 代,收集约 24,000,000 个细胞且根据本发明的超低温保存方法将约 20,500,000 个细胞超低温保存。将剩余经 CD117 阳性选择的细胞接种至培

养物中且经历若干更多次继代。在经阳性选择的细胞的培养物的第 5 代,细胞呈现如表 E 所列的细胞表面标记。

[0286] 表 E :M2-02C/M2-03E 流式细胞仪分析

[0287]

	阳性	阳性
	阳性M2-02C FRAC P4	阳性M2-03E FRAC P5
	阳性%	阳性%
HLA-I	99.3	95
CD133	0	0
HLA-II	1.8	35.5
CD9	91.7	28.5
CD54	11.5	0
CD45	6.4	0
CCD10	41.9	2
CD59	100	98.6
CD63	95.2	2
CD34	16.8	86.2
CD13	98.9	98.7
CD49e	92.1	93.8
CD49f	93.4	87
CD81	99	55.6
CD44	100	98.6
CD117	35.3	0
CD38	0	0
CD29	100	98
CD105	100	93.3
CD90	73	98.2
CD166	99.1	99.4
NANOG	0	0
SSEA3	0	0
SSEA4	12.5	0
CD3	0	0
CD19	0	0
CD14	0	0
CD56	1.6	0.2
CD41	98.2	98.2

[0288]

[0289] 将经超低温保存的细胞稍后解冻且根据 R. Gonzalez 等人, Pluripotent marker expression and differentiation of human second trimester MSC, Biochem. Biophys, Res. Commun. (2007) 中所述的细胞培养、流式细胞仪方法、核型分析、分化方法及 RNA 提取及 RT-PCR 方法来分析。

[0290] 将经超低温保存的细胞解冻且根据 Gonzalez 的培养技术培养一个继代。第 1 代细胞系藉由 Gonzalez 的流式细胞仪方法、核型方法及分化方法来分析。如图 33 中所示的流式细胞仪结果指示该等细胞对如图 34 中特定展示的 CD117 及 SSEA-4 以及 CD44、CD105、CD166、CD90、CD49f、MHC I、CD29 及 CD9 呈阳性且证实共同定位于经分离细胞上。细胞亦对 CXCR4 呈阳性。细胞对 CD38、CD133、CD45、CD34、MHC II 及 LIN 呈阴性。如图 35a 中所示,细胞在培养物中以约 24 至约 36 小时的速率倍增。亦如图 35b 中所示,初始细胞培养以 50,000 个细胞起始且至培养的第 26 天止生长至 48,000,000 个。亦如图 35b 中所示,RT-PCR 分析显示第 12 代细胞表现多能性标记 Oct-4,而非 SOX-2 或 Nanog。

[0291] 根据 Gonzalez 的方法的核型分析指示细胞显然为正常雌性核型且在无染色体畸

变的情况下维持二倍体细胞。如图 39 中所示,第 12 代细胞显示大于 50%的端粒酶活性。

[0292] RT-PCR 结果系展示于图 35b 中且说明细胞至少表现多能性标记 Oct-4。

[0293] 根据 Gonzalez 方法的分化分析的结果显示细胞具有分化成神经谱系、心脏谱系、成软骨谱系、成骨谱系及成脂谱系的能力。

[0294] 根据神经谱系分化的 Gonzalez 方法的结果,细胞展现藉由表现如图 36 中所示由少突神经胶质细胞所表现的标记 04 及 GalC 而分化成神经组织的能力。神经诱导的细胞亦表现如图 36 中所示由神经元细胞及神经祖细胞所表现的 Tub3、Map2 及波形蛋白。当于含有 FDF 的培养基中培养 4 天,且接着添加 FGF、PDGF 及 EGF 历时约 7 天,接着在不包括 EGF 的 FGF 及 PDGF 中培养 5 天时,细胞表现如图 36 中所示的 04 及 GalC、神经元标记 Map-2、波形蛋白及星形胶质细胞标记 GFAP。RT-PCR 说明细胞在 RNA 水平上表现神经标记,包括巢蛋白 (Nestin)、NC AM 及 Nurr-1。RT-PCR 数据显示细胞具有以 45-50%的比率分化成多个神经表型的潜力。

[0295] 根据心脏谱系分化的 Gonzalez 方法的结果,细胞展现分化成心脏谱系的能力。心脏诱导的细胞表现亦如图 37 中所示由心脏细胞所表现的肌动蛋白及肌钙蛋白。

[0296] 根据成软骨谱系分化的 Gonzalez 方法的结果,如图 38c 及图 38d 中所示,细胞展现分化成成软骨谱系的能力。成软骨分化细胞以艾尔逊蓝染色对由成软骨组织类型所表现的硫酸蛋白聚糖呈阳性。

[0297] 根据成脂谱系分化的 Gonzalez 方法的结果,如图 38e 及图 38f 中所示,细胞展现该等细胞分化成成脂谱系的能力。成脂分化细胞以油红 O 染色对由成脂组织所表现且亦如图 38f 中特定展示的脂肪空泡呈阳性。

[0298] 根据成骨谱系分化的 Gonzalez 方法的结果,如图 38a 及图 38b 中所示,细胞展现以茜素红 S 低染色的成骨组织的典型的钙沉积物。

[0299] 根据心脏谱系分化的 Gonzalez 方法的结果,如图 37 中所示,细胞展现分化成心脏谱系的能力。如图 37 中所示,在使用 8 μ M Aza 或 800 μ M SNAP 使细胞分化后,细胞对心脏标记肌动蛋白、肌钙蛋白及连接蛋白 43 呈阳性染色。RT-PCR 数据证实当细胞过度生长成细胞聚集体时,该等细胞在 RNA 水平上表现心脏标记。数据显示细胞在细胞及分子水平上以约 50%至约 60%的比率表现心源性标记。

[0300] 研究实例

[0301] 进行研究以分析收集月经流样本的替代方法的结果。研究集中于测定根据月经流收集方法使用收集杯及具有及替代地不具有抗生素的收集培养基所收集的月经干细胞的总成核细胞计数及细胞生存力。研究亦集中于在收集后约 4 小时至约 112 小时的间到达处理设施后月经流样本的温度,其中月经流样本系于冰上或另外在室温下输送。共有 161 个根据研究所收集及分析的月经流样本。如下处理全部月经流样本:(a) 皆根据本发明,使用收集装置收集 46 个月经流样本,将其置于包含抗生素的收集培养基中且于冰上输送;(b) 皆根据本发明,使用收集装置收集 34 个月经流样本,将其置于无抗生素的收集培养基中且在室温下运送;及(c) 皆根据本发明,使用收集装置收集 81 个月经流样本,将其置于无抗生素的收集培养基中,且于冰上输送。

[0302] 到达处理设施后即分析各样本以评估到达时的温度及总月经流样本体积。处理后使用血球计评估总成核细胞计数且藉由锥虫蓝排除染料评估细胞生存力。评估总成核细胞

计数及细胞生存力分析之前对各样本进行第 1 阶段处理及可选净化制程及第 2 阶段处理。如图 40 中所示,对所有样本所评估的平均细胞计数为约 7,900,000 个细胞。生存力范围为每个样本约 6%至约 100%。如图 41 中所示,所收集的所有样本的平均细胞生存力为如藉由锥虫蓝染料排除所测定的约 74%。月经流样本到达时所量测的温度对于由研究所分析的所有样本而言处于约 5.8℃至约 25℃的范围内。如图 42 中所示,月经流样本到达时所量测的平均温度为约 15℃。收集培养基中月经流样本的总体积在约 5ml 至约 30ml 的范围内。如图 43 中所示,收集培养基中月经流样本的平均体积为约 11ml。

[0303] 亦评估使用收集装置收集且置于包含抗生素的收集培养基中并于冰上输送的 46 个月经流样本。在约 6.6℃至约 16.9℃的范围内的温度下月经流样本到达处理设施,其中该组到达时的平均温度处于约 10.5℃。此组中的月经流样本在样本收集后约 4 小时至约 112 小时之间到达处理设施,其中该组的平均时间为约 47.9 小时。包含收集培养基中的月经流的月经流样本体积处于约 5ml 至约 30ml 的范围内,其中该组的平均值为 11.5ml。对处理后样本评估该组的细胞生存力且其系处于约 6%至约 100%生存力范围内,其中平均值为约 72%生存力。仅三个样本经评估具有小于 50%的生存力。对处理后样本评估该组的总成核细胞计数且计数系在约 200,000 个细胞至约 9,240,000 个细胞的范围内,具有约 9,240,000 个细胞的平均值。根据本发明的超低温保存方法将处理后月经细胞超低温保存且接着解冻以为额外评估细胞生存力及总成核细胞计数作准备。在所培养的经验解冻样本中,藉由锥虫蓝所评估的细胞生存力指示生存力处于约 60%至约 100%的范围内。在经验解冻样本中,总成核细胞计数处于约 100,000 个细胞至约 13,000,000 个细胞的范围内,其中平均值为约 3,240,000 个细胞。

[0304] 亦评估使用收集装置收集、置于无抗生素的收集培养基中且于室温下输送的 34 个月经流样本。在约 21℃至约 25℃的范围内的温度下月经流样本到达处理设施,其中该组到达时的平均温度为约 22.8℃。此组中的月经流样本在样本收集后约 7 小时至约 94 小时之间到达处理设施,其中该组的平均时间为约 37 小时。包含收集培养基中的月经流的月经流样本体积处于约 7.4ml 至约 17.5ml 的范围内,其中该组的平均值为 10.8ml。对处理后样本评估该组的细胞生存力且其系处于约 12%至约 100%生存力范围内,其中平均值为约 80%的生存力。对处理后样本评估该组的总成核细胞计数且其系处于约 300,000 个细胞至约 50,000,000 个细胞的范围内,具有约 11,600,000 个细胞的平均值。根据本发明的超低温保存方法将处理后月经细胞超低温保存且接着解冻以为额外评估细胞生存力及总成核细胞计数作准备。在经验解冻样本中,藉由锥虫蓝所评估的细胞生存力指示生存力处于约 37%至约 100%的范围内。在经验解冻样本中,总成核细胞计数处于约 100,000 个细胞至约 5,900,000 个细胞的范围内,其中平均值为约 1,620,000 个细胞。

[0305] 亦评估使用收集装置收集、置于无抗生素的收集培养基中且于冰上输送的 81 个月经流样本。在约 5.8℃至约 25.8℃的范围内的温度下月经流样本到达处理设施,其中该组到达时的平均温度为约 15.5℃。此组中的月经流样本在样本收集后约 2.5 小时至约 164 小时之间到达处理设施,其中该组的平均时间为约 54.6 小时。包含收集培养基中的月经流的月经流样本体积处于约 5.1ml 至约 21.5ml 的范围内,其中该组的平均值为 10.8ml。对处理后样本评估该组的细胞生存力且其系处于约 10%至约 100%生存力范围内,其中平均值为约 73%生存力。对处理后样本评估该组的总成核细胞计数且其系处于约 100,000 个

细胞至约 42,000,000 个细胞的范围内,具有约 5,840,000 个细胞的平均值。根据本发明的超低温保存方法将处理后月经细胞超低温保存且接着解冻以为额外评估细胞生存力及总成核细胞计数作准备。在经解冻样本中,藉由锥虫蓝所评估的细胞生存力指示生存力处于约 45%至约 100%的范围内。在经解冻样本中,总成核细胞计数处于约 100,000 个细胞至约 48,300,000 个细胞的范围内,其中平均值为约 8,450,000 个细胞。

[0306] 月经干细胞纯系

[0307] 根据本发明的收集方法自四个不同供体收集月经流样本且自该等月经流样本发展 MSC 纯系。

[0308] 月经干细胞纯系 -M2-014-02

[0309] 根据本发明的实施获得若干不同月经干细胞纯系。详言之,收集约 30ml 本文中命名为且称作 M2-014-02 的月经流样本。在月经周期期间由供体收集包含月经流及收集培养基的月经流样本。将无菌收集装置用肥皂及水清洁且置于供体的阴道内历时足以收集月经流样本的时间。收集培养基包含无钙、镁或酚红的 DPBS (Mediatech), 约 100 单位 / 毫升的盘尼西林, 约 100 微克 / 毫升的链霉素, 及处于每毫升 DPBS 培养基约 10 单位至约 20 单位的范围内的无保存剂肝素。将月经流样本及收集培养基密封于收集管中, 于冰上包装于收集容器中, 且藉由运送而输送至处理设施。

[0310] 自收集起约 17 小时后, 对收集培养基中的约 30ml 月经流样本进行处理以分离及收集月经干细胞。在约 10°C 下月经流样本到达处理设施。到达处理设施后即对月经流样本及具有抗生素的收集培养基消毒, 将其转移至清洁室中, 且置于冰上。在约 18°C 的温度下将收集容器以约 2000rpm 离心约 7 分钟且接着消毒。抽吸约 5ml 上清液样本且将其用于接种两个 BacT/ALERT 血液培养瓶, 约 4ml 进入好氧培养瓶中且约 1ml 进入厌氧培养瓶中。在约 37°C 下将培养瓶在 BacT/ALERT 系统中培育约 14 天。结果为对好氧及厌氧微生物呈阴性。

[0311] 抽吸剩余上清液且将其摒弃。使离心块悬浮于约 2ml DPBS 中。作为处理后样本收集约 1ml 细胞悬浮液且针对细胞计数、流动分析及生存力来分析。使用血球计进行总细胞计数, 其指示处理后样本中收集约 41,000,000 个细胞。所收集的细胞证实超低温保存前约 75% 的生存力。

[0312] 将经超低温保存的月经干细胞解冻, 胰蛋白酶化且培养。培养前, 分析解冻后的月经干细胞。解冻后样本的总细胞计数指示约 7,000,000 个月经细胞以约 66% 生存力存在。

[0313] 培养前, 以两步稀释法用 20% 张氏培养基将细胞稀释至约 2.5 个细胞 / 毫升、约 5.0 个细胞 / 毫升、约 10.0 个细胞 / 毫升及约 15.0 个细胞 / 毫升。将约 0.2ml 各稀释液个别添加至 96 孔盘中的 84 个孔中, 其余 12 个孔系用 DPBS 填充以润湿该盘。约 2.5 个细胞 / 毫升稀释液产生具有 0.5 个细胞 / 孔的盘。约 5.0 个细胞 / 毫升稀释液产生具有 1.0 个细胞 / 孔的盘。约 10.0 个细胞 / 毫升产生具有 2 个细胞 / 孔的盘。约 15.0 个细胞 / 毫升稀释液产生具有 3 个细胞 / 孔的盘。在倒立式显微镜下针对单细胞查核各孔。每隔 4 天至 6 天用新鲜 20% 张氏培养基更换出培养基。使具有单细胞的孔生长至 50% 融合, 此时使细胞胰蛋白酶化且将细胞接种于具有 20% 张氏培养基的 T-25 烧瓶中。自孔移除某些细胞以用于根据本发明的方法进行的细胞培养。

[0314] 细胞培养前, 自盘收集 6 个月经干细胞纯系且根据本文中对于细胞表面特征所揭示的方法藉由流式细胞仪分析各纯系。各纯系的细胞表面特征的概述系展示于表 F 中。

[0315] 表 F : 月经干细胞纯系

[0316]

	M2-014-02 F9 P4	M2-014-02 2.0CW C2 P5	M2-014-02 1.0 G6 P4	M2-014-02 0.5 F9 P6	M2-014-02 3.0 B11 P4	M2-014-02 1.0 E2 P5
	阳性%	阳性%	阳性%	阳性%	阳性%	阳性%
HLA-I	100	99	99	84.4	98.2	95.2
CD133	0	0	0	0	0	0
HLA-II	0	20	0	3.9	3.2	5.1
CD9	50	97	51	79	39.9	69.6
CD54	20	20	0	14.3	1.3	22.4
CD45	10	10	0	30.2	0.8	19.4
CCD10	40	15	50	44.4	95.7	40.9
CD59	98	100	99	80	98.9	97.4
CD63	5	5	2	0	38.1	0
CD34	12	12	14	23	10.3	808
CD13	98	96	99	92.8	98.7	98.7
CD49e	94	93	95	71.1	51.7	55.6
CD49f	95	86	95	84.7	96.8	87.9
CD81	99	95	98	86.2	96.2	88.3
CD44	100	100	99	79.9	99.1	97.3
CD117	0	0	0	0	1.1	2.1
CD38	0	0	0	0	0	0
CD29	100	99	100	79.9	98.9	97.8
CD105	100	96	99	87.4	95.1	95.6
CD90	17	80	1	0.4	0.6	15.3
CD166	100	96	100	88.5	99.4	97.6
NANOG	0	未侦测	未侦测	0	0.2	0
SSEA3	0	未侦测	未侦测	0	0	0
SSEA4	8	未侦测	未侦测	2	22.8	0
CD3	0	0	0	0	0	0
CD19	0	0	0	0	0	0
CD14	5	10	2	0		
CD56	87	30	94	43.5	13.2	88.8
CD41	98	92	98	90.1	81.8	90.8

[0317] 月经干细胞纯系 -M2-015-03

[0318] 根据本发明的实施获得若干不同月经干细胞纯系。详言之,收集约 30ml 本文中命名为且称作 M2-015-03 的月经流样本。在月经周期期间由供体收集包含月经流及收集培养基的月经流样本。将无菌收集装置用肥皂及水清洁且置于供体的阴道内历时足以收集月经流样本的时间。收集培养基包含无钙、镁或酚红的杜氏磷酸盐缓冲生理食盐水 (DPBS) (Mediatech), 约 100 单位 / 毫升的盘尼西林, 约 100 微克 / 毫升的链霉素, 及处于每毫升 DPBS 培养基约 10 单位至约 20 单位的范围内的无保存剂肝素。将月经流样本及收集培养基密封于收集管中, 于冰上包装于收集容器中, 且藉由运送而输送至处理设施。

[0319] 自收集起约 6 小时后, 对收集培养基中的约 23ml 月经流样本进行处理以分离及收集月经干细胞。在约 10°C 下月经流样本到达处理设施。到达处理设施后即对月经流样本及具有抗生素的收集培养基消毒, 将其转移至清洁室中, 且置于冰上。在约 18°C 的温度下将收集容器以约 2000rpm 离心约 7 分钟且接着消毒。抽吸约 5ml 上清液样本且将其用于接种两个 BacT/ALERT 血液培养瓶, 约 4ml 进入好氧培养瓶中且约 1ml 进入厌氧培养瓶中。在约

37℃下将培养瓶在 BacT/ALERT 系统中培育约 14 天。结果为对好氧及厌氧微生物呈阴性。

[0320] 抽吸剩余上清液且将其摒弃。使离心块悬浮于约 2ml DPBS 中。作为处理后样本收集约 1ml 细胞悬浮液且针对细胞计数、流动分析及生存力来分析。使用血球计所进行的总细胞计数指示处理后样本中收集约 1,000,000 个细胞。所收集的细胞证实超低温保存前约 18% 的生存力。

[0321] 将经超低温保存的月经干细胞解冻,胰蛋白酶化且培养。培养前,分析解冻后月经干细胞。解冻后样本的总细胞计数指示约 300,000 个月经细胞以约 60% 的生存力存在。

[0322] 培养前,以用 20% 张氏培养基处理的两步稀释法将细胞稀释至约 2.5 个细胞 / 毫升、约 5.0 个细胞 / 毫升、约 10.0 个细胞 / 毫升及约 15.0 个细胞 / 毫升。将约 0.2ml 各稀释液个别添加至 96 孔盘中的 84 个孔中,其余 12 个孔用 DPBS 填充以润湿该盘。约 2.5 个细胞 / 毫升稀释液产生具有 0.5 个细胞 / 孔的盘。约 5.0 个细胞 / 毫升稀释液产生具有 1.0 个细胞 / 孔的盘。约 10.0 个细胞 / 毫升产生具有 2 个细胞 / 孔的盘。约 15.0 个细胞 / 毫升稀释液产生具有 3 个细胞 / 孔的盘。在倒立式显微镜下针对单细胞查核各孔。每隔 4-6 天用新鲜 20% 张氏培养基更换出培养基。使具有单细胞的孔生长至 50% 融合,此时使细胞胰蛋白酶化且将细胞接种于具有 20% 张氏培养基的 T-25 烧瓶中。自孔移除某些细胞以用于根据本发明的方法进行的细胞培养。

[0323] 在第 2 代,自盘收集两个月经干细胞纯系且培养。根据本文中对于细胞表面特征所揭示的方法藉由流式细胞仪分析各纯系。各纯系的细胞表面特征的概述系展示于表 G 中。

[0324] 表 G : 月经干细胞纯系

[0325]

	M2-015-03 ABi	M2-015-03 ABi
	P2 B10 P6	P2 2.0 B2
	阳性%	阳性%
HLA-I	95.2	100
CD133	0	0
HLA-II	46.8	0
CD9	56.4	70
CD54	47.8	2
CD45	22.4	2
CCD10	10.6	20
CD59	97.4	100
CD63	0	1
CD34	68.1	0
CD13	96.4	100
CD49e	58.7	90
CD49f	46.6	98
CD81	94.7	99
CD44	97.4	100
CD117	0	0
CD38	0	0
CD29	97.1	100
CD105	96.7	100
CD90	1	10
CD166	97.9	100
NANOG	0	0
SSEA3	0	0
SSEA4	9.8	35
CD3	0	0
CD19	0	0
CD14	0	0
CD56	5.7	90
CD41	95.2	98

[0326] 月经干细胞纯系 -M2-017-03

[0327] 根据本发明的实施获得若干不同月经干细胞纯系。详言之,收集约 30ml 本文中命名为且称作 M2-015-03 的月经流样本。在月经周期期间由供体收集包含月经流及收集培养基的月经流样本。将无菌收集装置用肥皂及水清洁且置于供体的阴道内历时足以收集月经流样本的时间。收集培养基包含无钙、镁或酚红的 DPBS (Mediatech), 及处于每毫升 DPBS 培养基约 10 单位至约 20 单位的范围内的无保存剂肝素。将月经流样本及收集培养基密封于收集管中且在无冰的情况下藉由运送而输送至处理设施。

[0328] 自收集起约 28 小时后,对收集培养基中的约 8ml 月经流样本进行处理以分离及收集月经干细胞。在约 23°C 下月经流样本到达处理设施。到达处理设施后即对月经流样本及具有抗生素的收集培养基消毒,将其转移至清洁室中,且置于冰上。在约 18°C 的温度下将收集容器以约 2000rpm 离心约 7 分钟且接着消毒。抽吸约 5ml 上清液样本且将其用于接种两个 BacT/ALERT 血液培养瓶,约 4ml 进入好氧培养瓶中且约 1ml 进入厌氧培养瓶中。在约 37°C 下将培养瓶在 BacT/ALERT 系统中培育约 14 天。结果指示受粪肠球菌 (*E. faecalis*) 污染。

[0329] 抽吸剩余上清液且将其摒弃。使离心块悬浮于约 2ml DPBS 中。作为处理后样本收集约 1ml 细胞悬浮液且针对细胞计数、流动分析及生存力来分析。使用血球计所进行的总细胞计数指示处理后样本中收集约 800,000 个细胞。所收集的细胞证实超低温保存前约 87% 的生存力。

[0330] 将经超低温保存的月经干细胞解冻,胰蛋白酶化且培养。培养前,分析解冻后月经干细胞。解冻后样本的总细胞计数指示约 200,000 个月经细胞以约 63% 的生存力存在。

[0331] 培养前,以两步稀释法用 20% 张氏培养基将细胞稀释至约 2.5 个细胞 / 毫升、约 5.0 个细胞 / 毫升、约 10.0 个细胞 / 毫升及约 15.0 个细胞 / 毫升。将约 0.2ml 各稀释液个别添加至 96 孔盘中的 84 个孔中,其余 12 个孔系用 DPBS 填充以润湿该盘。约 2.5 个细胞 / 毫升稀释液产生具有 0.5 个细胞 / 孔的盘。约 5.0 个细胞 / 毫升稀释液产生具有 1.0 个细胞 / 孔的盘。约 10.0 个细胞 / 毫升产生具有 2 个细胞 / 孔的盘。约 15.0 个细胞 / 毫升稀释液产生具有 3 个细胞 / 孔的盘。在倒立式显微镜下针对单细胞查核各孔。每隔 4 天至 6 天用新鲜 20% 张氏培养基更换出培养基。使具有单细胞的孔生长至 50% 融合,此时使细胞胰蛋白酶化且将细胞接种于具有 20% 张氏培养基的 T-25 烧瓶中。自孔移除某些细胞以用于根据本发明的方法进行的细胞培养。

[0332] 培养至第 1 代期间,两性霉素 B 系与盘尼西林 / 链霉素一起包括于培养基中。在第 3 代,根据本文中对于细胞表面特征所揭示的方法藉由流式细胞仪分析培养物中的各纯系。各纯系的细胞表面特征的概述系展示于表 H 中。

[0333] 表 H: 月经干细胞纯系

[0334]

	M2-017- 03-G2 P3	M2-017- 03 0.5 B2	M2-017- 03 P3 0.5 E1 P4	M2-017- 03 P3 0.5 B2 P5
	阳性%	阳性%	阳性%	阳性%
HLA-I	99	93.8	99	99.1
CD133	0	0	0	0
HLA-II	24	0.2	1.1	1
CD9	98	73.3	61.7	64
CD54	2	27.6	8.8	9.3
CD45	16	8.2	5.9	1
CCD10	98	11.3	10.7	9
CD59	100	94.7	99.3	99.5
CD63	0	1.5	0	1.4
CD34	44	3	1.9	15.4
CD13	100	99.1	99	99.2
CD49e	100	89.8	47.6	68.7
CD49f	100	94.5	97.8	98.8
CD81	100	97.2	96	99.2
CD44	99	94.1	99.4	99.6
CD117	0	0	0	0
CD38	0	0	0	0
CD29	100	94.6	99.2	99.5
CD105	97	98.3	99	99.4
CD90	99	95	98.9	91.1
CD166	99	99.3	99.3	99.6
NANOG	未侦测	0	0	0.3
SSEA3	0	0	0	0
SSEA4	20	38.6	10.4	42.4
CD3	0	0	0	0
CD19	0	0	0	0
CD14	20	0	0	
CD56	0	0	0	0
CD41	99	97.1	98.4	97.6

[0335] 月经干细胞纯系 -M2-54-02

[0336] 根据本发明的实施获得若干不同月经干细胞纯系。详言之,收集约 12ml 本文中命

名为且称作 M 2-54-02 的月经流样本。在月经周期期间由供体收集包含月经流及收集培养基的月经流样本。将无菌收集装置用肥皂及水清洁且置于供体的阴道内历时足以收集月经流样本的时间。收集培养基包含无钙、镁或酚红的 DPBS (Mediatech), 及处于每毫升 DPBS 培养基约 10 单位至约 20 单位的范围内的无保存剂肝素。将月经流样本及收集培养基密封于收集管中, 于冰上包装于收集容器中, 且藉由运送而输送至处理设施。

[0337] 自收集起约 73 小时后, 对收集培养基中的约 12ml 月经流样本进行处理以分离及收集月经干细胞。在约 20℃ 下月经流样本到达处理设施。到达处理设施后即对月经流样本及具有抗生素的收集培养基消毒, 将其转移至清洁室中, 且置放于冰上。在约 18℃ 的温度下将收集容器以约 2000rpm 离心约 7 分钟且接着消毒。抽吸约 5ml 上清液样本且将其用于接种两个 BacT/ALERT 血液培养瓶, 约 4ml 进入好氧培养瓶中且约 1ml 进入厌氧培养瓶中。在约 37℃ 下将培养瓶在 BacT/ALERT 系统中培育约 14 天。结果指示受表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*) 污染。

[0338] 抽吸剩余上清液且将其摒弃。使离心块悬浮于约 2ml DPBS 中。作为处理后样本收集约 1ml 细胞悬浮液且针对细胞计数、流动分析及生存力来分析。使用血球计所进行的总细胞计数指示处理后样本中收集约 800,000 个细胞。所收集的细胞证实超低温保存前约 72% 的生存力。

[0339] 将经超低温保存的月经干细胞解冻且胰蛋白酶化且培养。培养前, 分析解冻后的月经干细胞。解冻后样本的总细胞计数指示约 21,000,000 个月经细胞以约 92% 的生存力存在。

[0340] 培养前, 以两步稀释法用 20% 张氏培养基将细胞稀释至约 2.5 个细胞 / 毫升、约 5.0 个细胞 / 毫升、约 10.0 个细胞 / 毫升及约 15.0 个细胞 / 毫升。将约 0.2ml 各稀释液个别添加至 96 孔盘中的 84 个孔中, 其余 12 个孔用 DPBS 填充以润湿该盘。约 2.5 个细胞 / 毫升稀释液产生具有 0.5 个细胞 / 孔的盘。约 5.0 个细胞 / 毫升稀释液产生具有 1.0 个细胞 / 孔的盘。约 10.0 个细胞 / 毫升产生具有 2 个细胞 / 孔的盘。约 15.0 个细胞 / 毫升稀释液产生具有 3 个细胞 / 孔的盘。在倒立式显微镜下针对单细胞查核各孔。每隔 4-6 天用新鲜 20% 张氏培养基更换出培养基。使具有单细胞的孔生长至 50% 融合, 此时使细胞胰蛋白酶化且将细胞接种于具有 20% 张氏培养基的 T-25 烧瓶中。自孔移除某些细胞以用于根据本发明的方法进行的细胞培养。

[0341] 培养前, 自培养物收集 1 个月经干细胞纯系且根据本文中对于细胞表面特征所揭示的方法藉由流式细胞仪来分析。各纯系的细胞表面特征的概述系展示于表 I 中。

[0342] 表 I : 月经干细胞纯系

[0343]

	M2-054-02H9P5
	阳性 %
HLA-I	99
CD133	0

HLA-II	8
CD9	98
CD54	10
CD45	45
CCD10	80
CD59	99
CD63	0
CD34	41
CD13	99
CD49e	95
CD49f	91
CD81	98
CD44	99
CD117	0
CD38	0
CD29	99
CD105	70
CD90	7
CD166	99
NANOG	未侦测
SSEA3	0
SSEA4	2
CD3	0
CD19	20

CD14	40
CD56	96
CD41	94

[0344] 治疗用途

[0345] 本发明的月经干细胞可藉由将该等细胞与合适的细胞培养基或医药学上可接受的赋形剂组合来制备。举例而言,本发明的月经干细胞可经制备以根据 GMP (药品优良制造规范) 输注或移植。合适的培养基或稀释剂可包括组织培养基 (包括分析证书上所记录的适当测试及结果), 诸如 HBSS、IMDM、RPMI、 α MEM、M199 及 DMEM, 该等组织培养基可需要 HEPES 缓冲液以维持适当 pH 值来供养月经干细胞。可以约 0.2% 的最小值添加蛋白质, 但可以高达约 30% 添加。所使用的蛋白质包括人血清白蛋白、人血浆蛋白溶离份、胎牛血清 (若使用动物产品, 则其须包括如美国食品及药品管理局所需的适当安全测试) 或牛血清白蛋白。若细胞处于凝聚、团簇或凝块的危险下, 则培养基可需要抗凝剂。抗凝剂可包括肝素 (由于保存剂可潜在影响干细胞生长及细胞的增殖能力, 因此无保存剂为较佳)、酸性柠檬酸盐右旋糖、柠檬酸盐磷酸盐右旋糖或可使用对与活细胞组合安全的任何合适抗凝剂。细胞可在于其中扩增的细胞培养基中运送, 只要其对输注或移植安全即可。

[0346] 细胞可在注射器中短距离运送, 例如, 当产品正于医院中制备且亦于该医院中投与时。另外, 产品可在无菌袋中输送, 该等无菌袋可包括或不包括气体交换。短距离运送的产品亦可在细胞将耐受短距离且在该短距离中保持存活的任何其它类型无菌容器中输送, 该无菌容器可包括无菌锥形管或可为圆形或正方形的无菌平底容器。若产品于 4 小时以上长距离运送, 则其可在允许气体交换的袋中发送。该袋亦可以允许空气交换的组态来运送。可将产品袋置于将允许在该产品袋正于其中运送的容器中进行适当气体交换的托架上。包括细胞的容器可针对维持月经干细胞的合适温度而最优化。若细胞需要冷环境, 则可使用冰包或其它冷却装置。若细胞需要约 20℃ 至约 24℃ 的室温, 则可能需要凝胶包以维持此温度。

[0347] 一旦细胞到达设施以供输注或移植, 即可将该等细胞置于所监测的温度环境中。可将储存以供日后使用的细胞以超低温保存方式于干运装置中运送以维持小于或等于 -150℃ 的温度。可将以超低温保存方式运送的细胞用解冻及输注指令发送且潜在地需要培养基以维持供治疗用的最佳活细胞产品。

[0348] 应使用合适的输送机构以将产品输送至输注部位。可使用许多不同类型的输送服务, 诸如医药快递服务、快递服务或诸如 UPS、DHL 或 FedEx 的公司。当快递员了解产品需要 (诸如干运装置历时旅途持续时间须保持竖立) 时, 培养基中的月经干细胞具有更大的安全输送机会。若将运送装置侧放, 则其可能迅速损失液氮负荷且不能保持其有效温度。

[0349] 药妆应用

[0350] 所用术语药妆品系关于包含 (a) 至少一种对产品使用者具有影响的生物活性成份及 (b) 至少一种药妆学上可接受的载剂的调配物或组合物。该生物活性成份可为 (例如) 根据本发明的实施所收集的 MSC, 或由本发明的 MSC、遗传工程化 MSC 或分化 MSC 所产生的生长因子或其它组合物、化学品或蛋白质。进一步举例而言, MSC、分化 MSC 或遗传工程

化 MSC 可于培养物中生长以产生所要细胞产物,诸如能用作药妆品的生长因子或其它生物活性成份。可自 MSC、分化 MSC 或遗传工程化 MSC 所生长的细胞培养基或其它培养基收集生长因子或其它生物活性成份。可经由离心步骤自细胞培养基或其它培养基收集生长因子或其它生物活性成份以收集上清液中的所要成份,可稍后处理所要成份以纯化或浓缩该成份。

[0351] 药妆品可被视为在某些应用中及在适当条件下可提供医学或类药物效益的化妆品。举例而言,在某些应用中,药妆品可影响皮肤的底层结构,减少皱纹深度,或逆转或改善光氧化或老龄化对皮肤的影响。药妆品可尤其适用作护肤产品、护发产品、组织或器官修饰或增益、及防晒产品。在某些实施例,中,药妆组合物包含包括脂质体、环糊精、聚合物系统或玻糖醛酸或相关化合物中的至少一者的传递系统。药妆组合物包含药妆学上可接受的载剂。适合于局部应用的医药学上可接受的载剂或调配物通常亦将为药妆学上可接受的载剂或调配物。

[0352] 局部化妆或药妆软膏、洗剂或凝胶组合物通常含有于诸如医药乳膏基质、水包油乳液、油包水乳液、凝胶或类似物的化妆学上可接受的载剂或药妆学上可接受的载剂中的约 1 至 99%、约 5 至 95%、约 20 至 75%或约 5 至 20%的浓度的包含经调节的培养基或其提取物的活性成份。供局部使用的各种化妆及药妆组合物包括含有经调节的培养基或提取物及适当载剂的滴剂、酏剂、洗剂、乳膏、油膏、血清、溶液及软膏。各组合物中经调节的培养基或提取物的最佳百分率系根据组合物的调配及所要治疗效果而改变。

[0353] 视产品类型、组合物性质、组合物使用的位置、所要效果及类似者而定,药妆品可包含许多化妆学上、药妆学上或医药学上可接受的调配物中的任一者。尽管专有调配在调配技术中常见,但调配师将能够在无不当实验的情况下确定或易于选择用于特定应用的适当调配物。

[0354] 本发明组合物的适当载剂通常将含有成份,诸如通常在化妆及药妆领域中所发现的彼等成份:油、蜡或其它标准脂肪物质;或习知胶凝剂及/或增稠剂;乳化剂;保湿剂;润肤剂;防晒剂;亲水性或亲脂性活性剂,诸如神经酰胺;对抗自由基的试剂;杀菌剂;错隔剂;保存剂;碱化剂或酸化剂;芳香剂;界面活性剂;填充剂;天然产物或天然产物的提取物,诸如芦荟或绿茶提取物;维生素;或着色材料。此等多种成份的量将视组合物的用途及所要化妆或药妆效果而变。

[0355] 化妆学上及药妆学上可接受的成份及调配物的讨论可尤其见于:FDA Cosmetics Handbook, U.S.Food and Drug Administration;Handbook of Cosmetic and Personal Care Additives, Ash and Ash, compilers,1994, Chemical Publishing, New York, N.Y.;Bennett's Cosmetic Formulary,1993, Chemical Publishing Co.;Harry's Cosmeticology, 第 7 版, Wilkinson 及 Moore,1982 及 第 8 版, Rieger,2000, Chemical Publishing;Cosmetic Bench Reference-2001, Allerud Publishing Corp.;CTFA Compendium of Cosmetic Ingredient Composition, Nikitakis 及 McEwen 编,1990, Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Washington, D.C., Surfactant Encyclopedia, 第 2 次修订版, Rieger,1996, Allured Publishing;The Chemistry and Manufacture of Cosmetics, 第 2 版, De Navarre, Van Nostrand, Princeton, N.J.; Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics,

Leung,1996, John Wiley ;A Consumer' s Dictionary of Cosmetic Ingred ients,第5版, Winter,1999, Three Rivers Press, New York, N.Y. ;Cosmeceuticals :Active Skin Treatment,1998,Allured Publishing ;Handbook of Cosmetic Science and Technology, Knowlton 及 Pearce,1993, Elsevier Advanced Technology, Oxford, UK ;Personal-Care Formulas,1997, Allured Publishing ;Beginning Cosmetic Chemistry, Scheuller 及 Romanowski,1999, Allured Publishing ; 及 Skin Permeation ;Fundamentals and Application, Zatz,1993, Allured Publishing。医药学上可接受的成份及调配物的讨论可尤其见于 Remington' s Pharmaceutical Sciences,第18版, Gennaro 编,1990, Mack Publishing 中。

[0356] 定义

[0357] 除非如本文所用的下列术语所使用的情形另外表明,否则该术语应具有下文所陈述的定义。

[0358] DMEM 意谓杜氏最低必需培养基 (Dulbecco' s Minimal Essential Medium)。

[0359] DMSO 意谓二甲亚砷。

[0360] DNase 意谓用于分解非活细胞已溶解后所发现的 DNA 的脱氧核糖核酸酶。

[0361] DPBS 意谓杜氏磷酸盐缓冲生理食盐水。

[0362] HBSS 意谓汉克斯 (Hank' s) 平衡盐溶液。

[0363] 肝素为具有抗凝特性的葡糖胺聚糖。

[0364] HSA 意谓作为可充当转运蛋白的丰富血浆蛋白的人血清白蛋白。

[0365] LSM 意谓用于进行密度梯度细胞分离的淋巴细胞分离培养基。

[0366] μ g 意谓微克。

[0367] μ l 及 μ L 同义使用以意谓微升。

[0368] ml 及 mL 同义使用以意谓毫升。

[0369] $\times$ 意谓乘以,亦即乘以浓度或稀释度。

[0370] 其它合适的替代试剂、产品及制造商可替代本文所提及的特定试剂、产品及制造商而使用。

[0371] 在不脱离其广泛发明概念的情况下可对上述实施例作出修改。在已描述本发明的较佳实施例的情况下,其它实施例、改编、变更、修改及相当配置将为熟习此项技术者所明白。此等及其它实施例应理解为处于随附申请专利范围的范畴内。

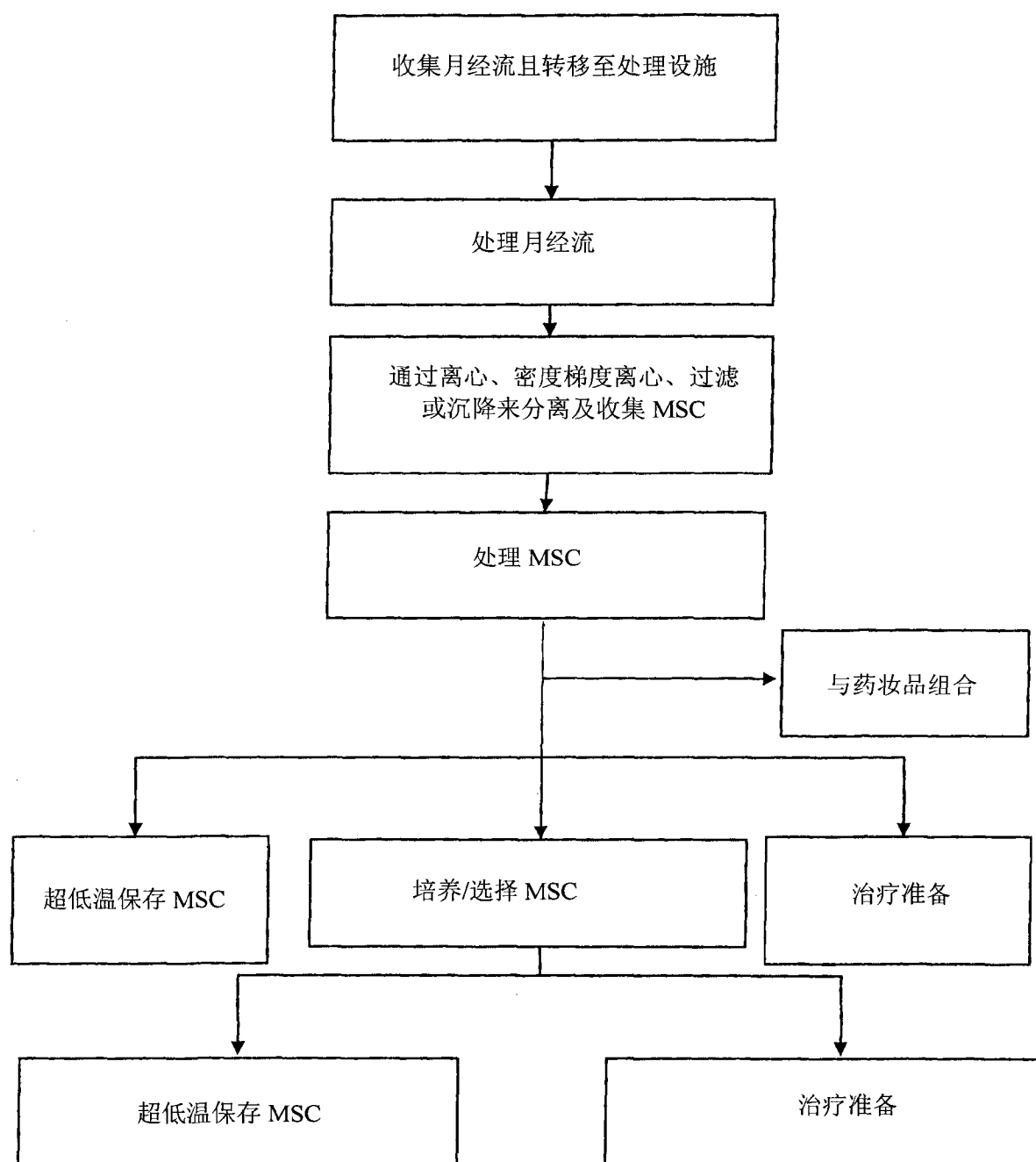


图 1

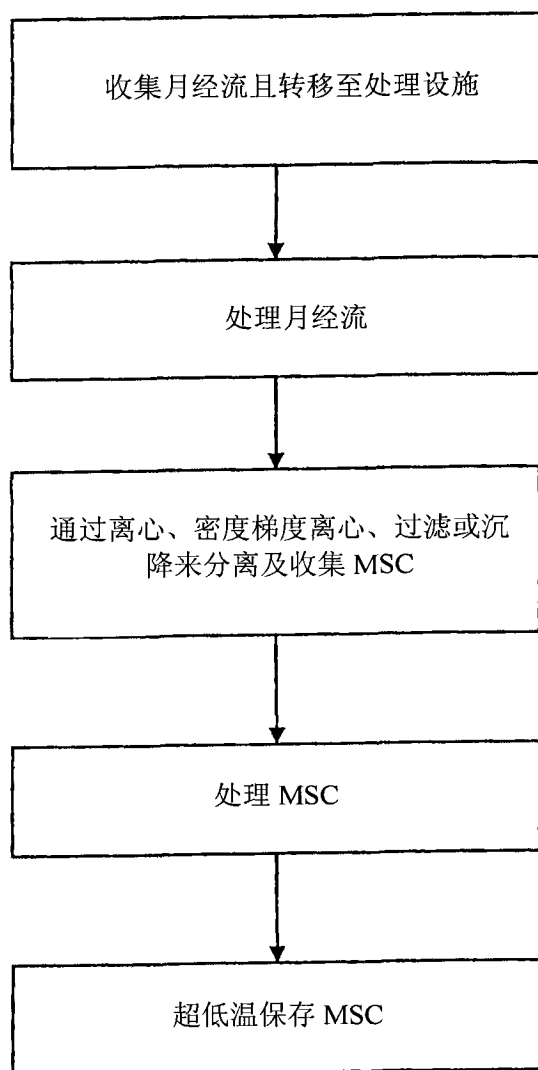


图 2

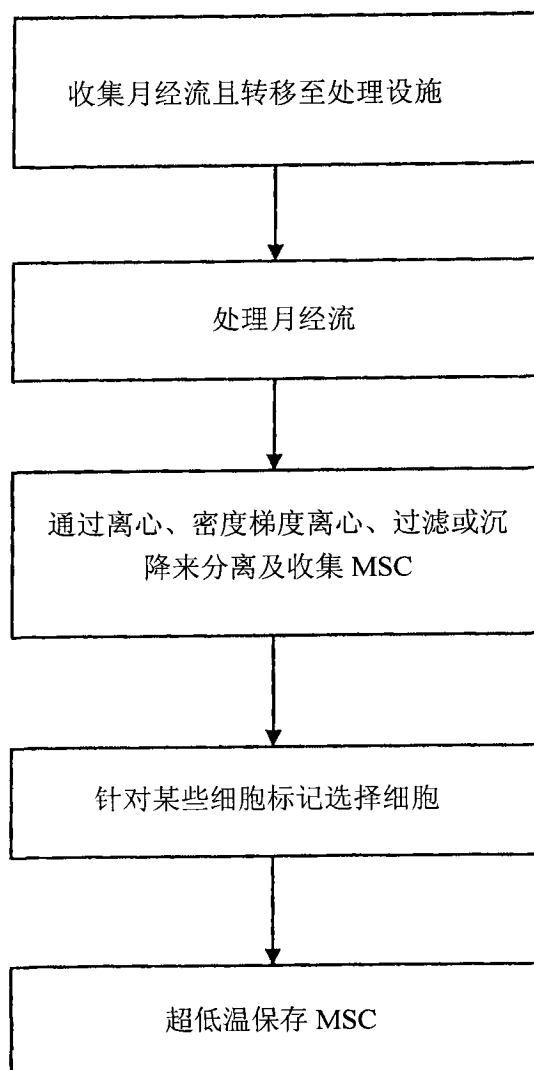


图 3

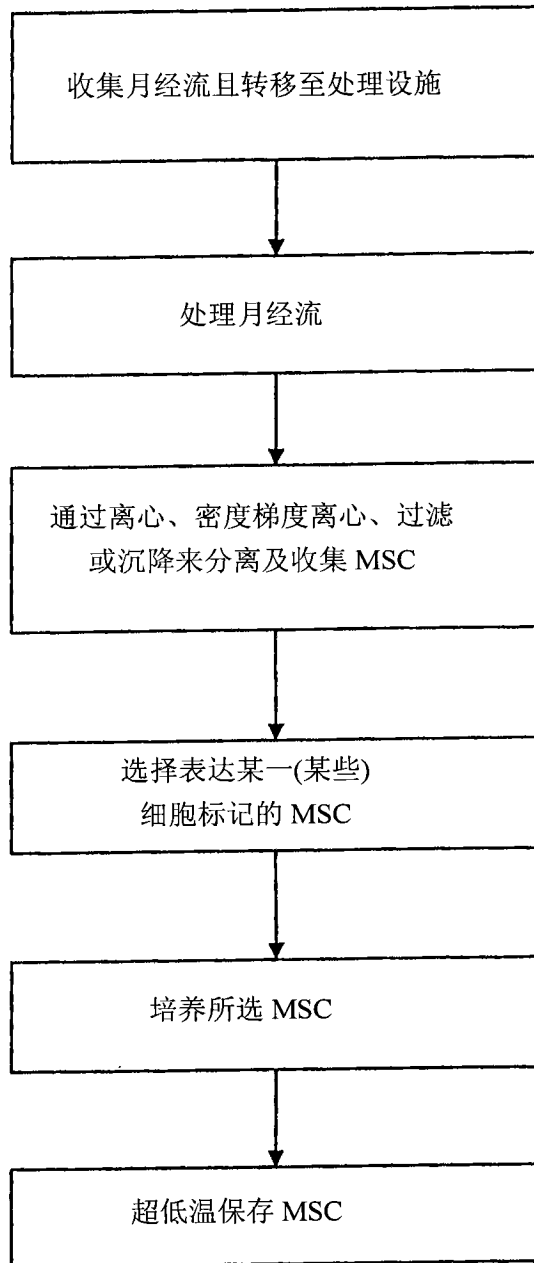


图 4

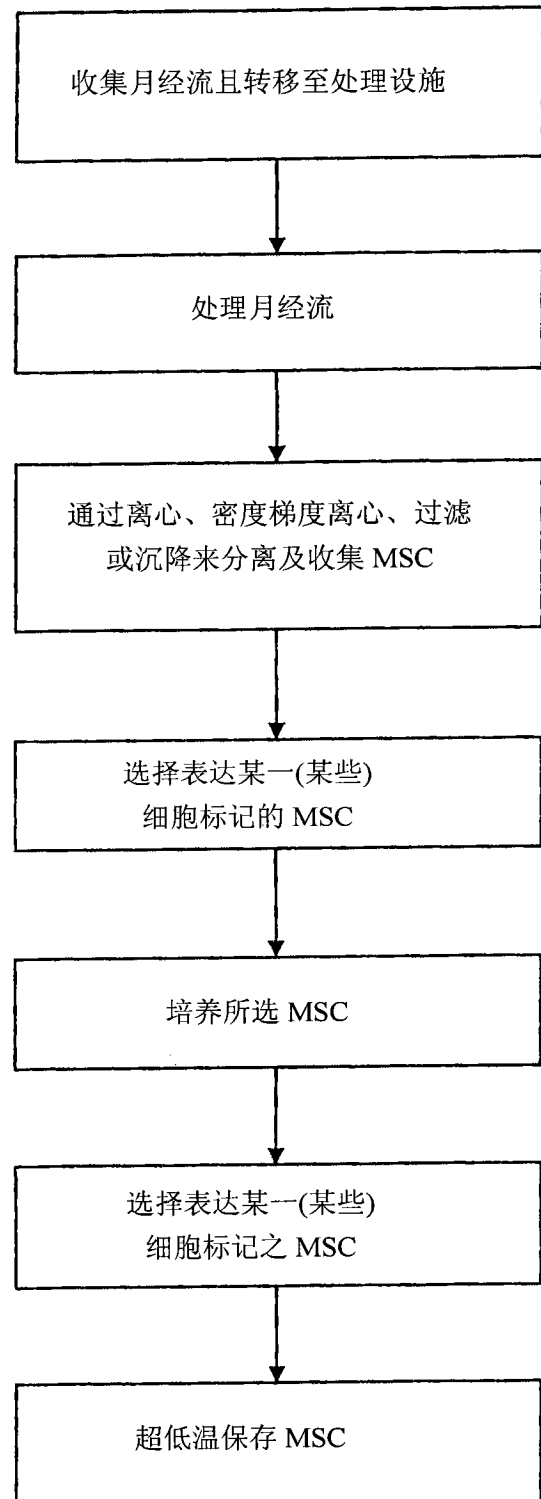


图 5

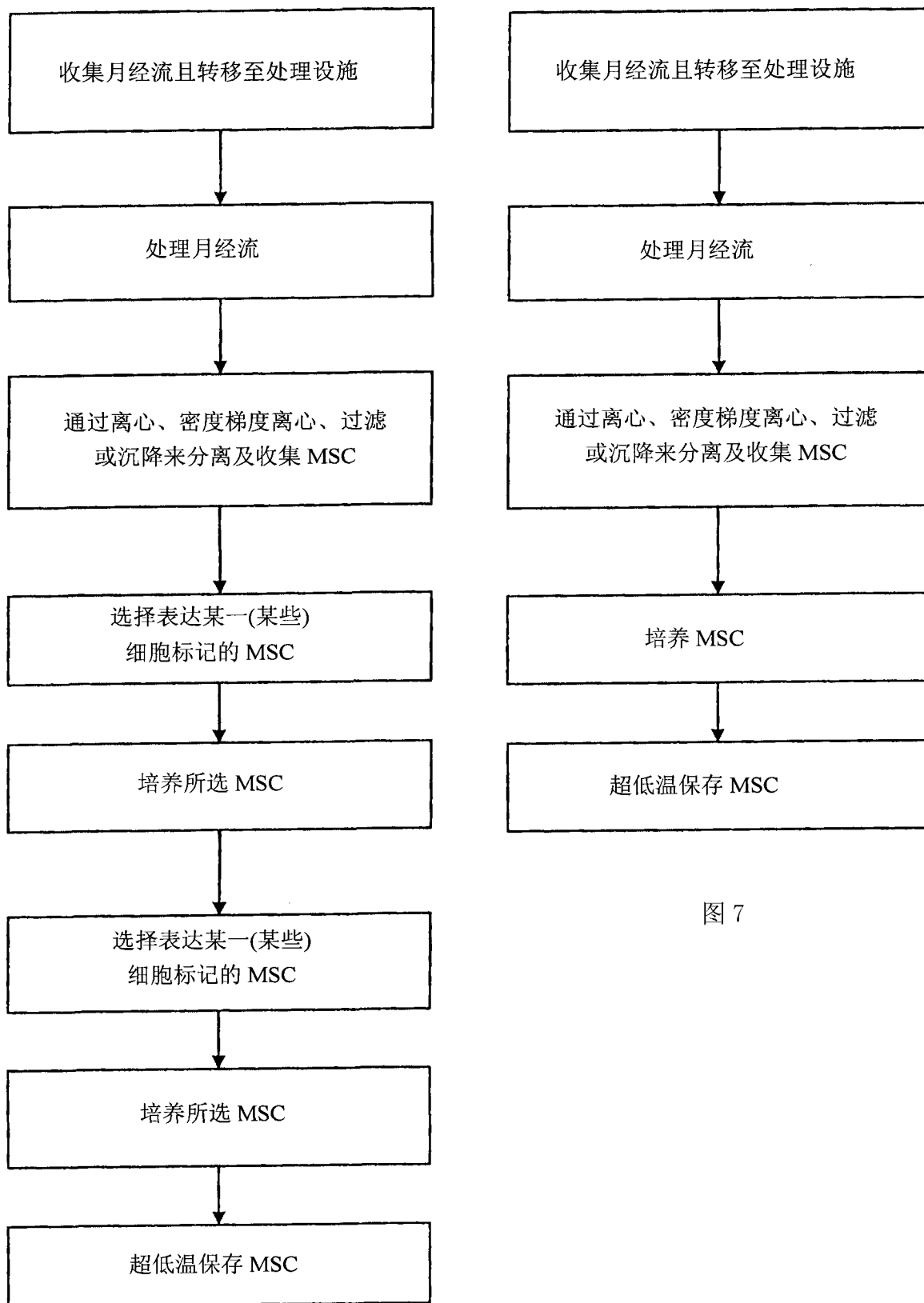


图 7

图 6

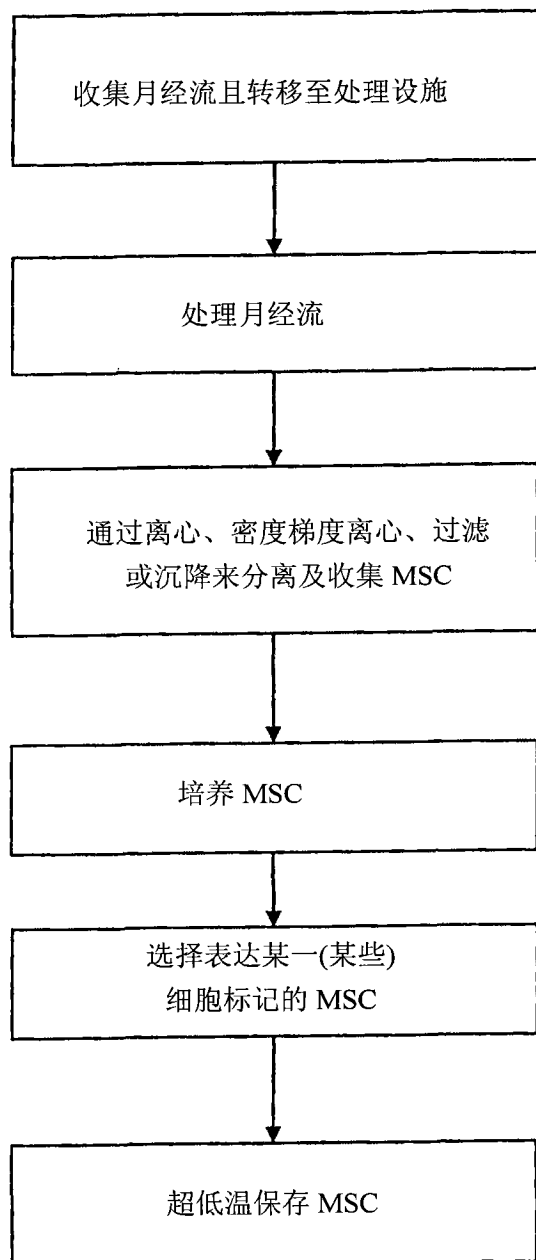


图 8

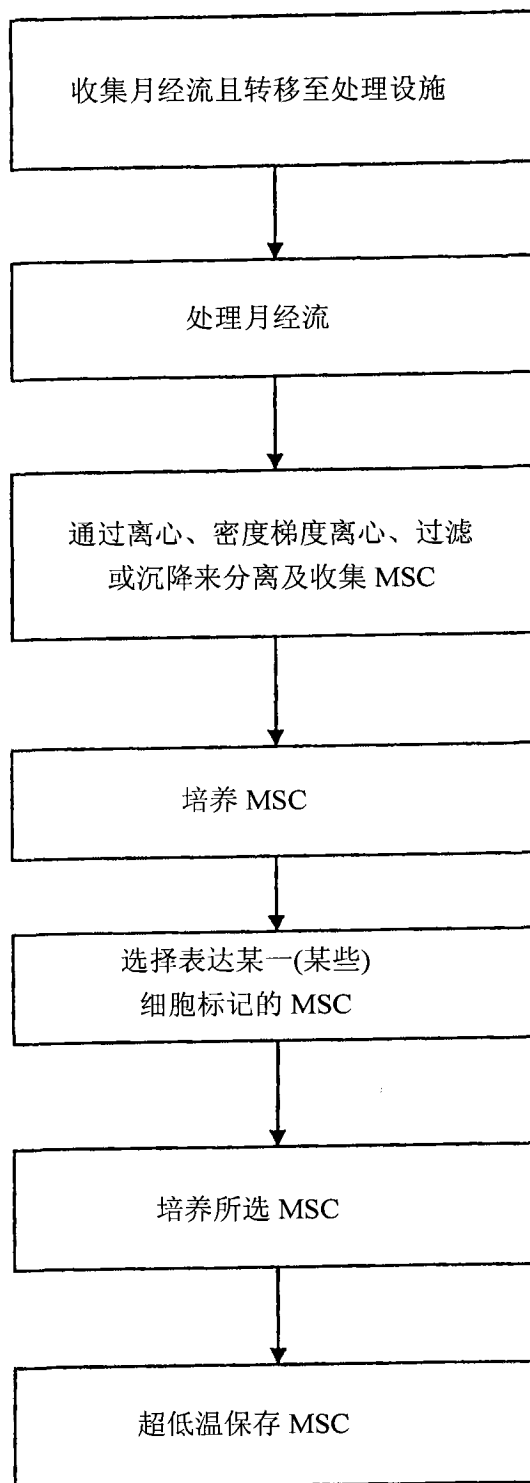


图 9

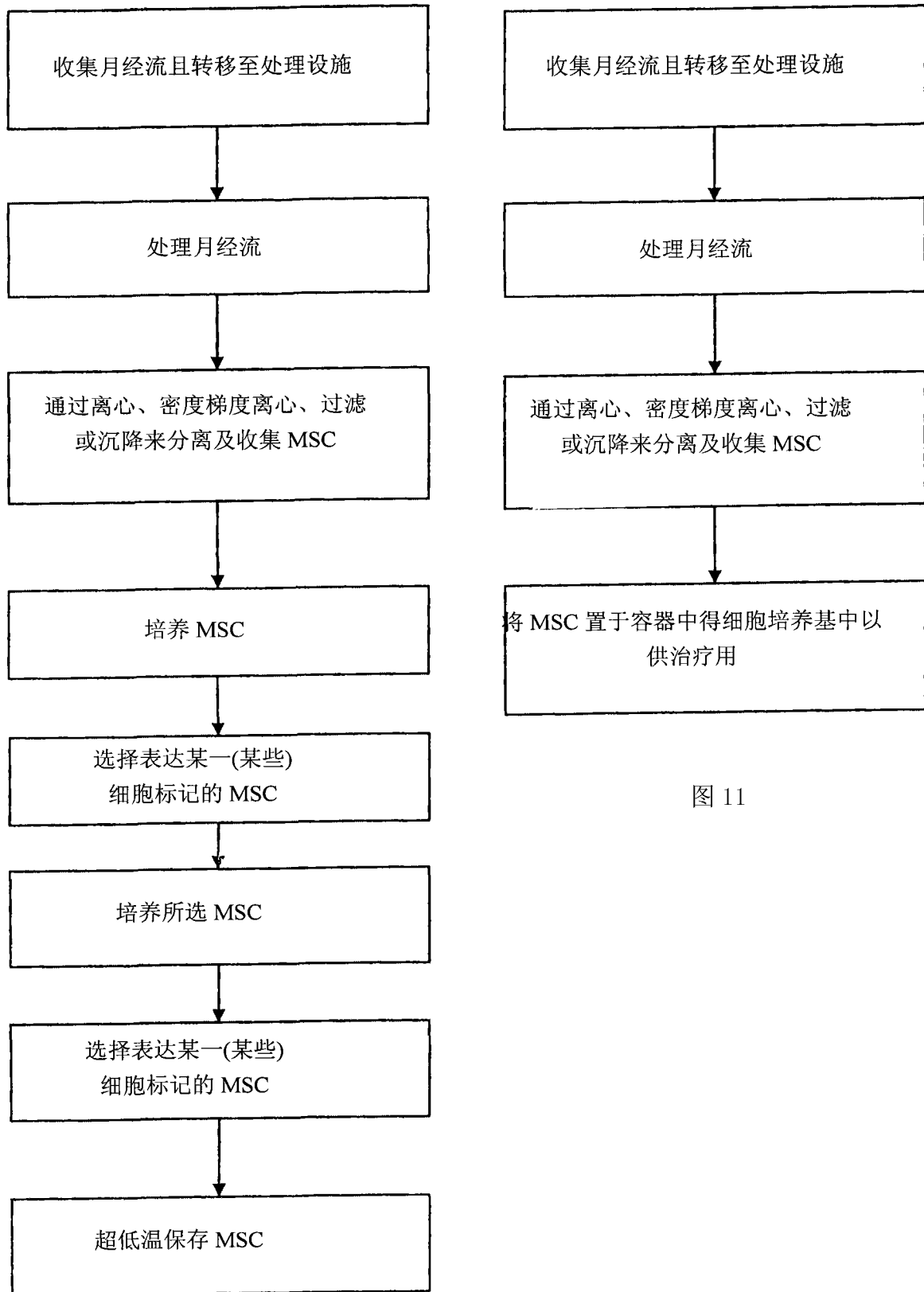


图 11

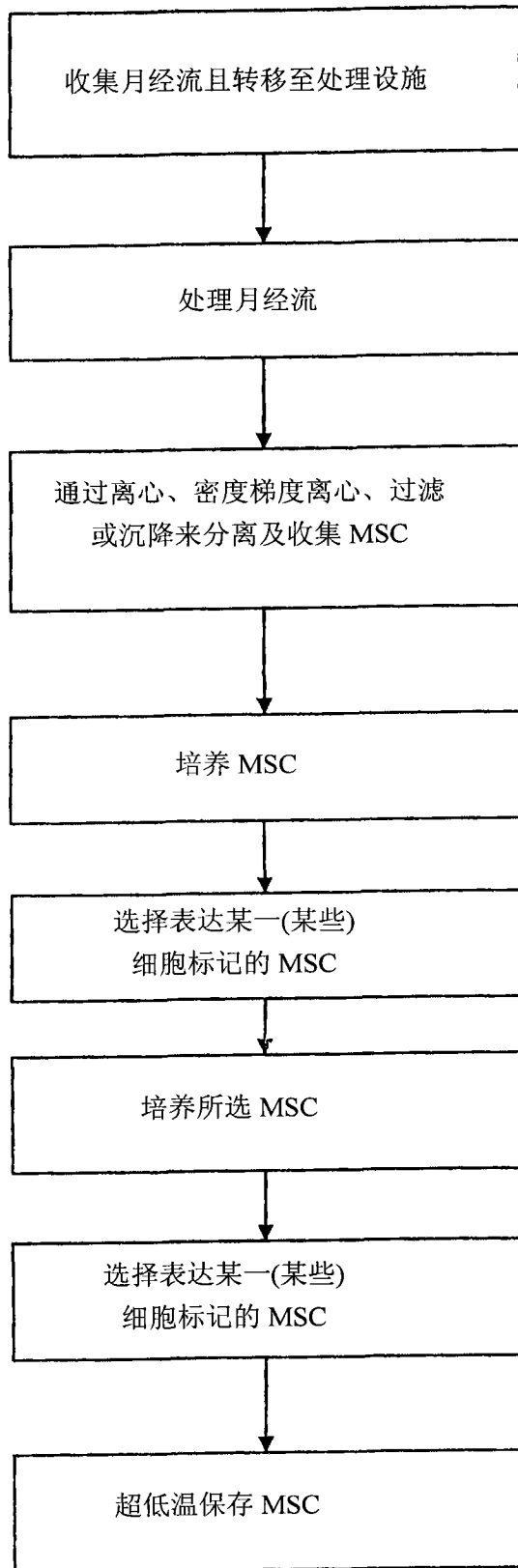


图 10

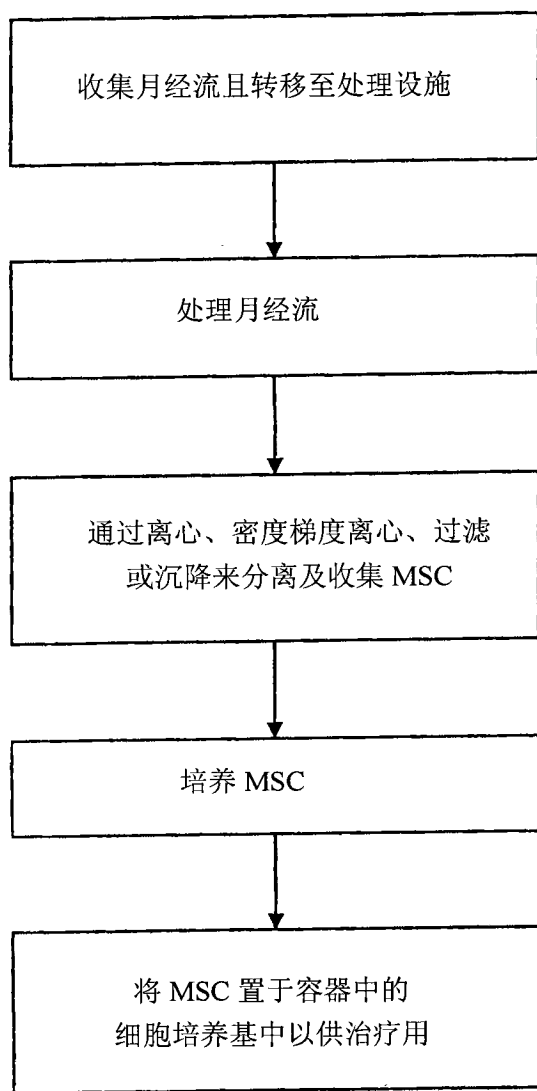


图 12

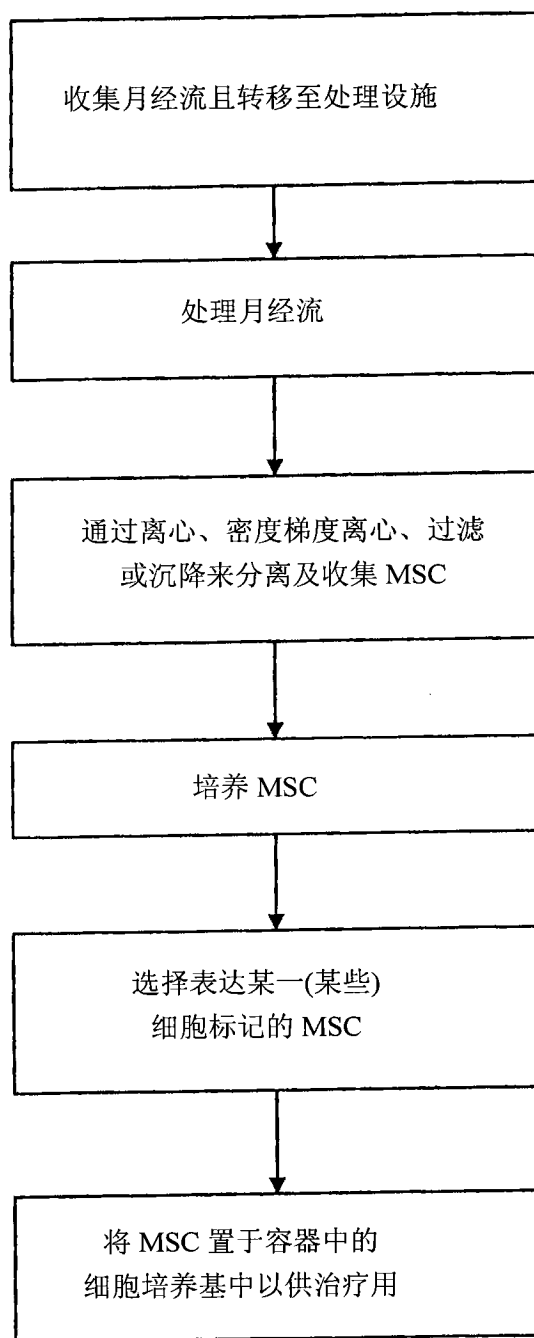


图 13

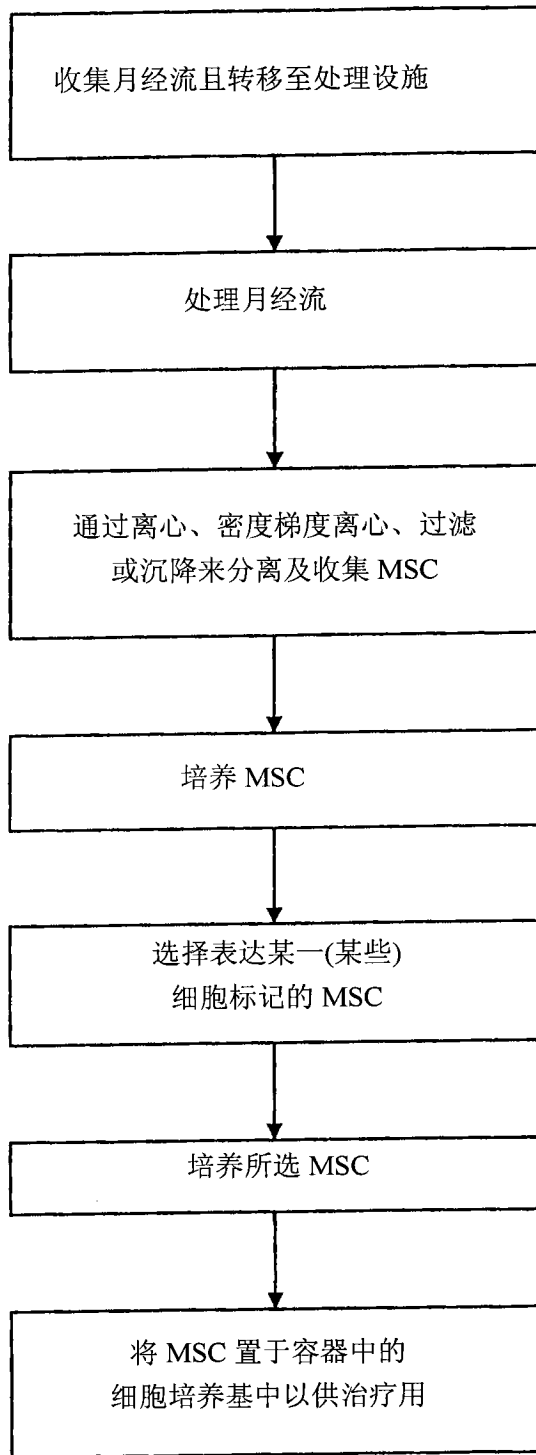


图 14

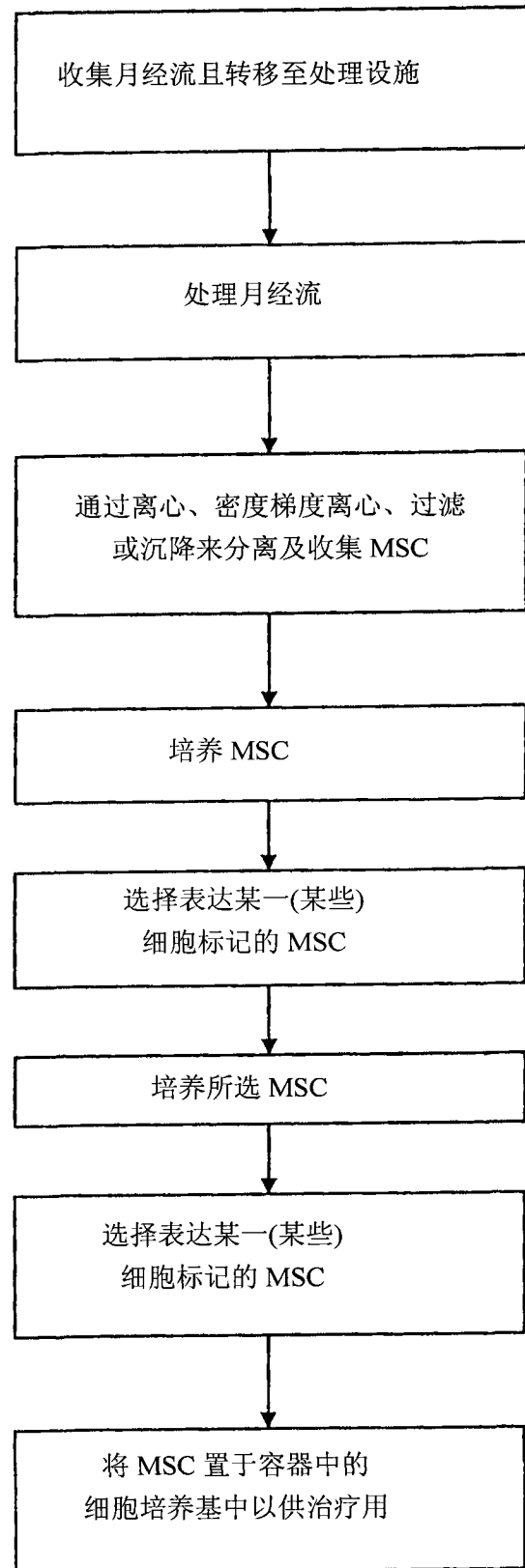


图 15

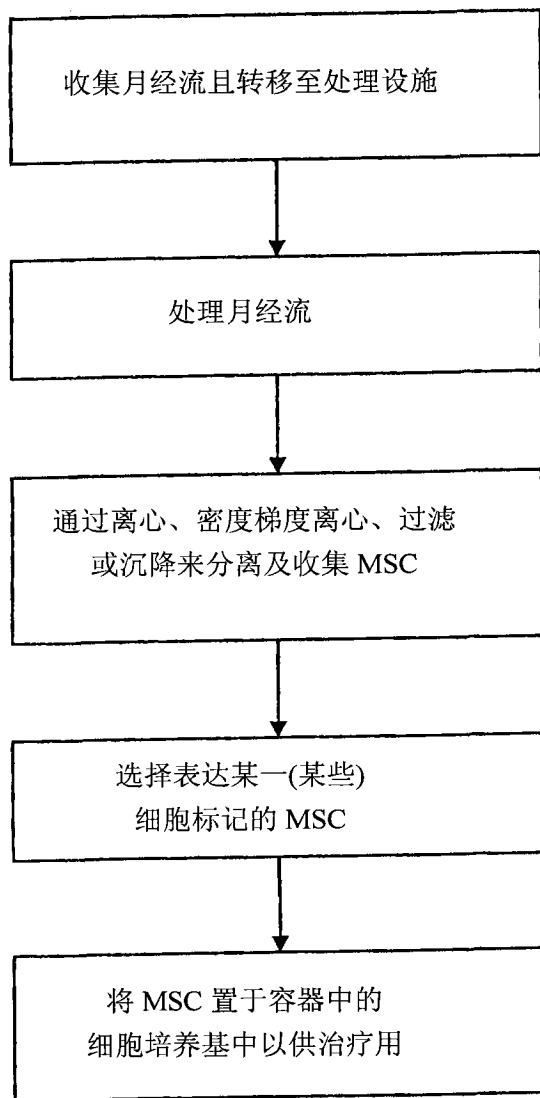


图 16

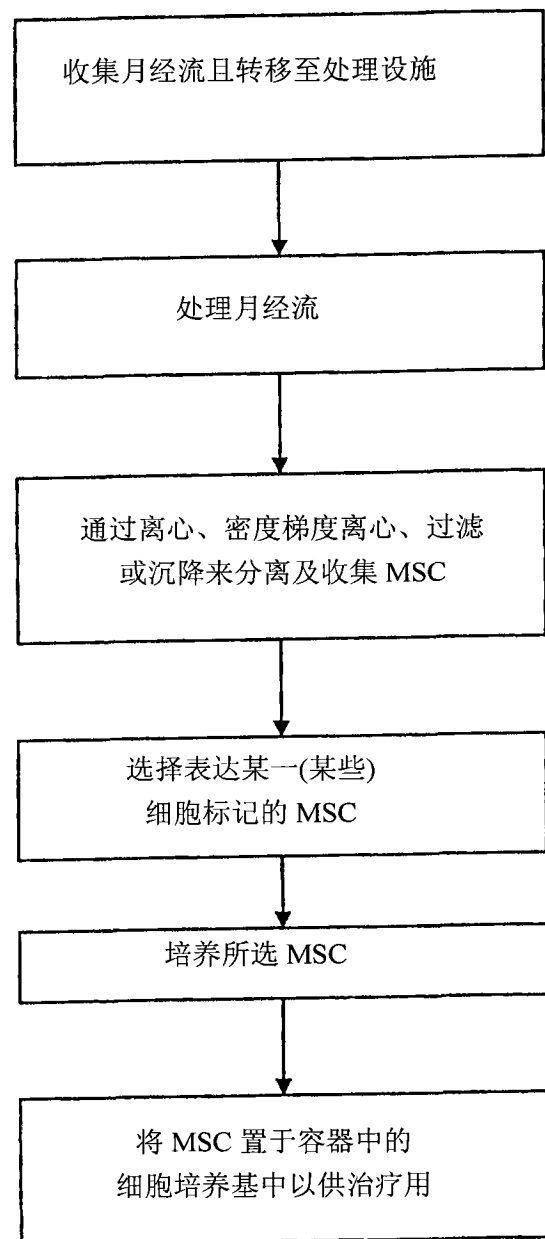


图 17

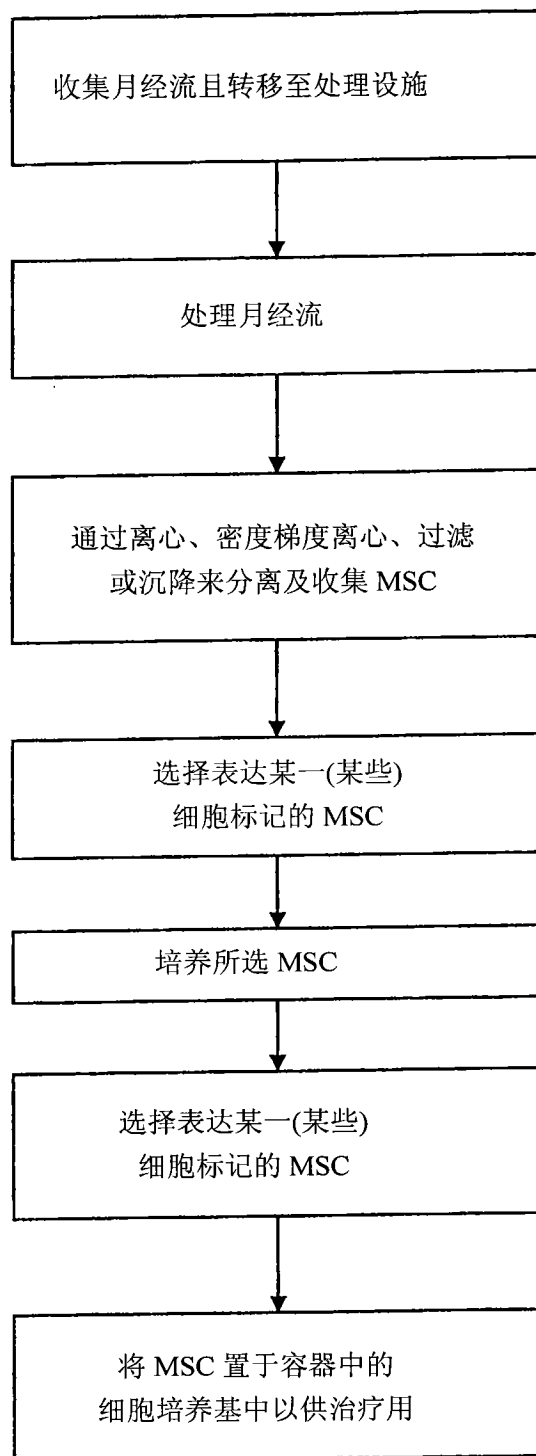


图 18

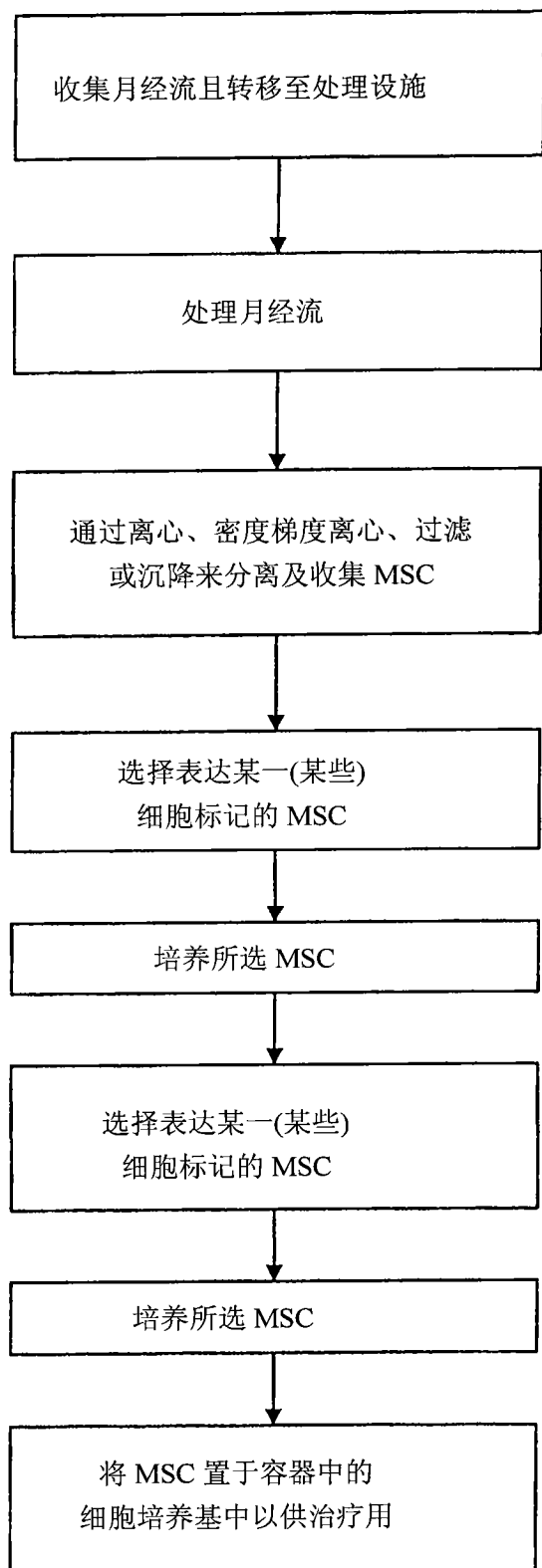


图 19

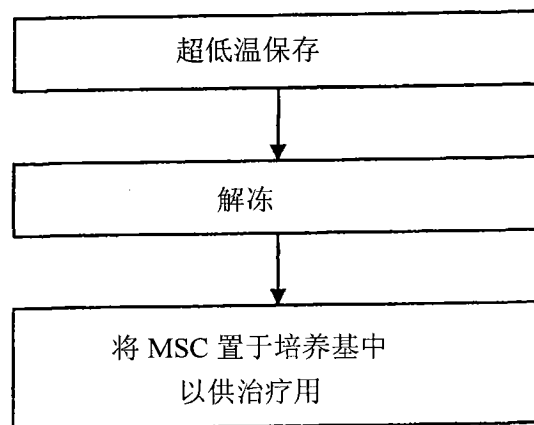


图 20

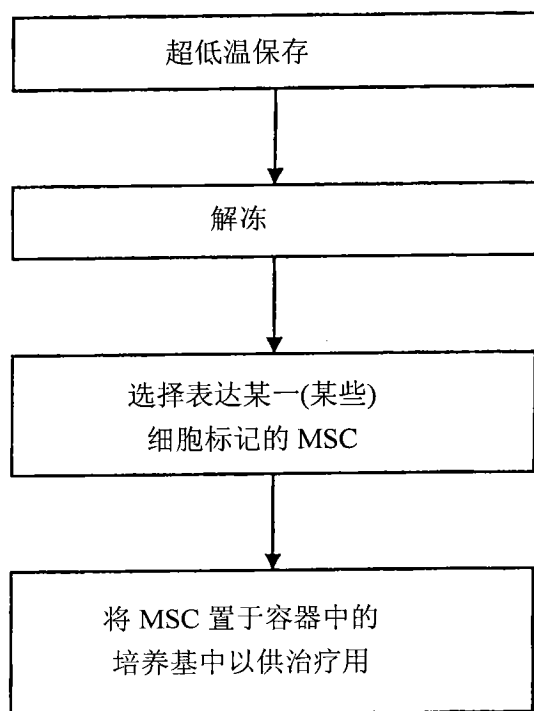


图 21

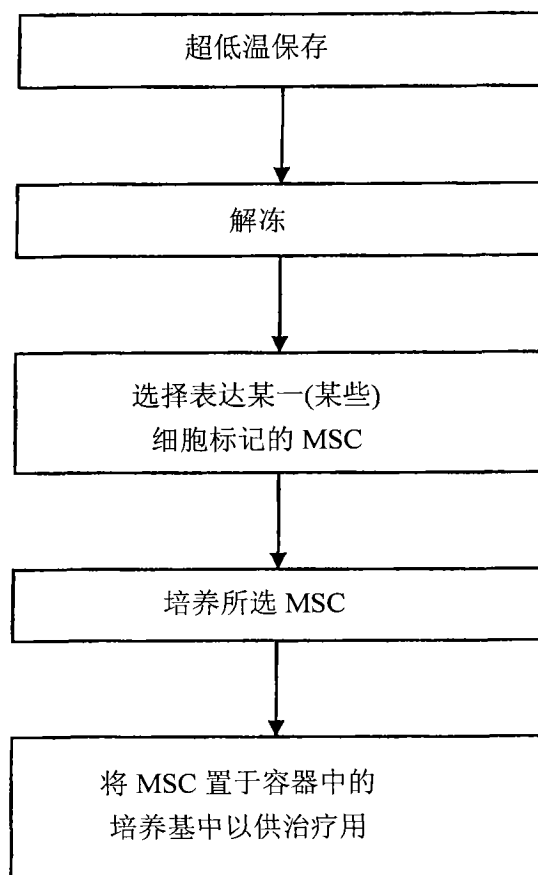


图 22

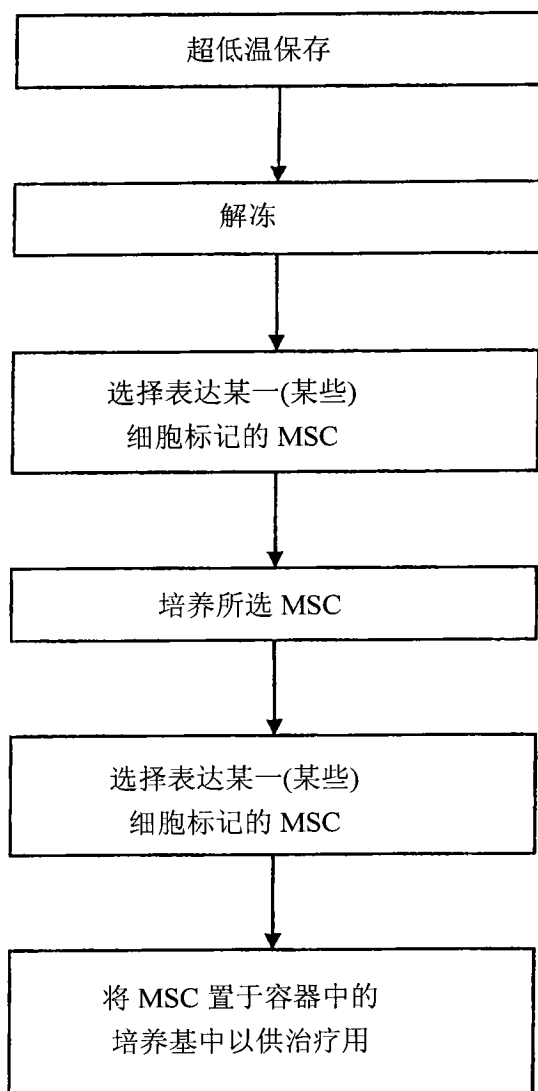


图 23

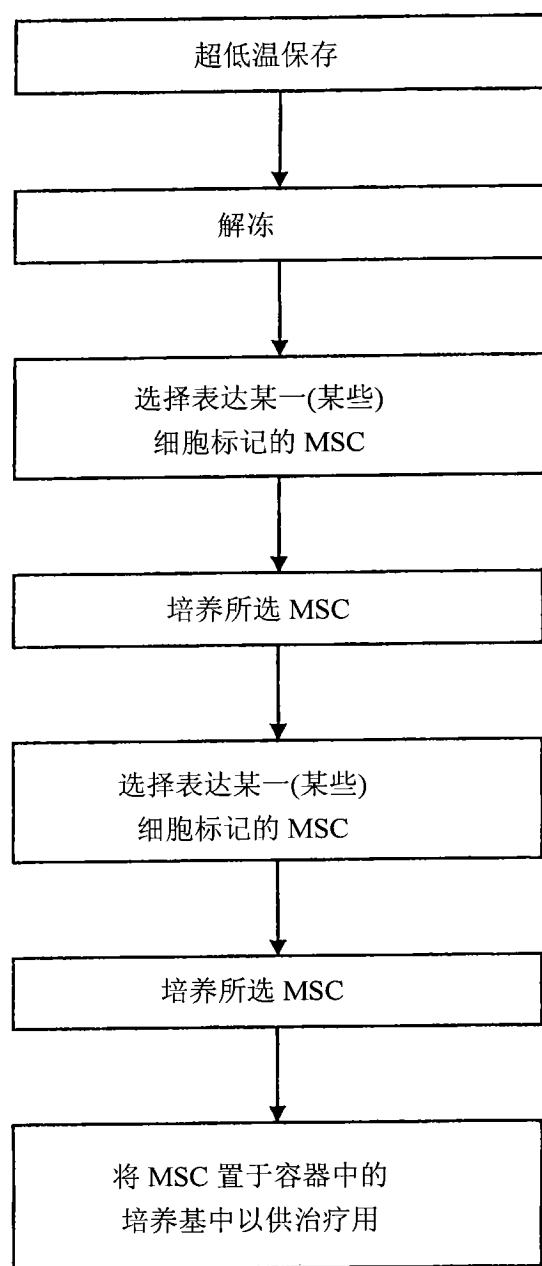


图 24

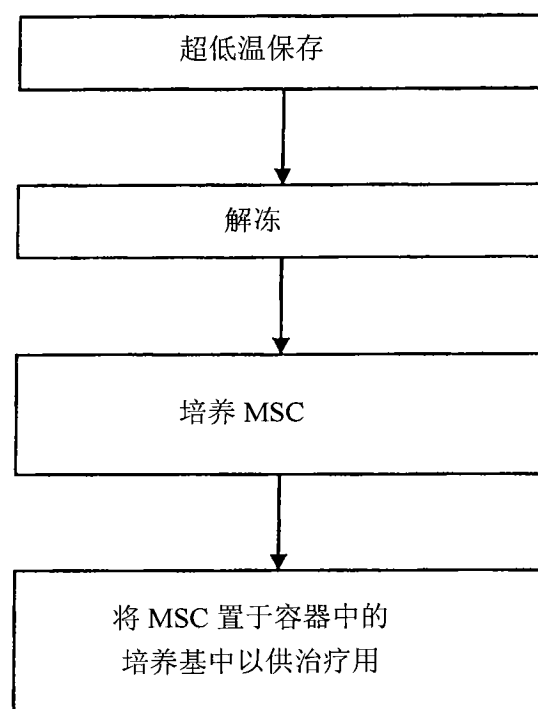


图 25

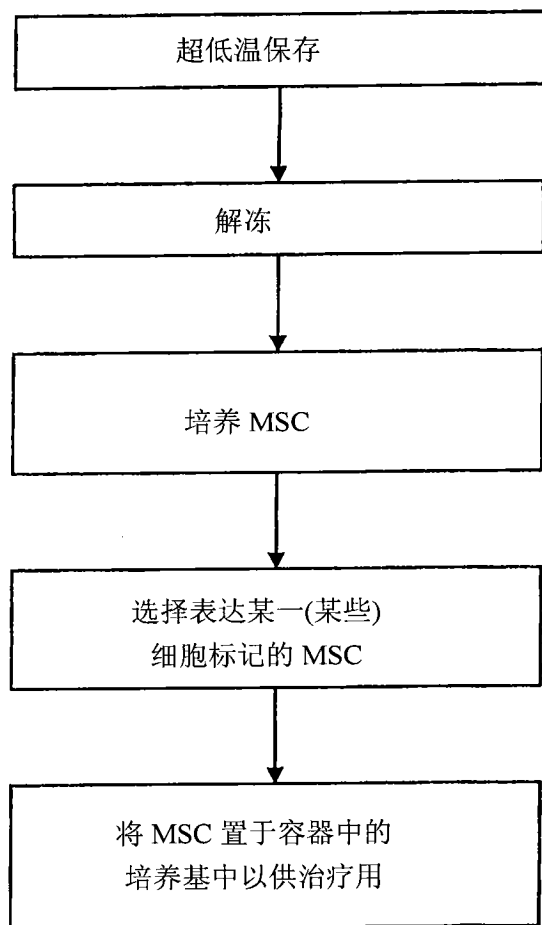


图 26

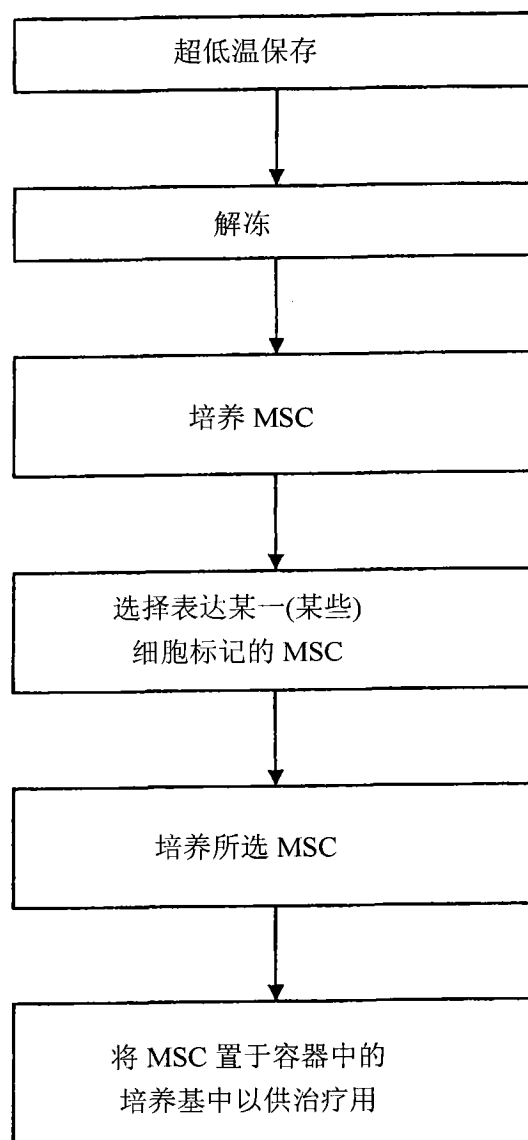


图 27

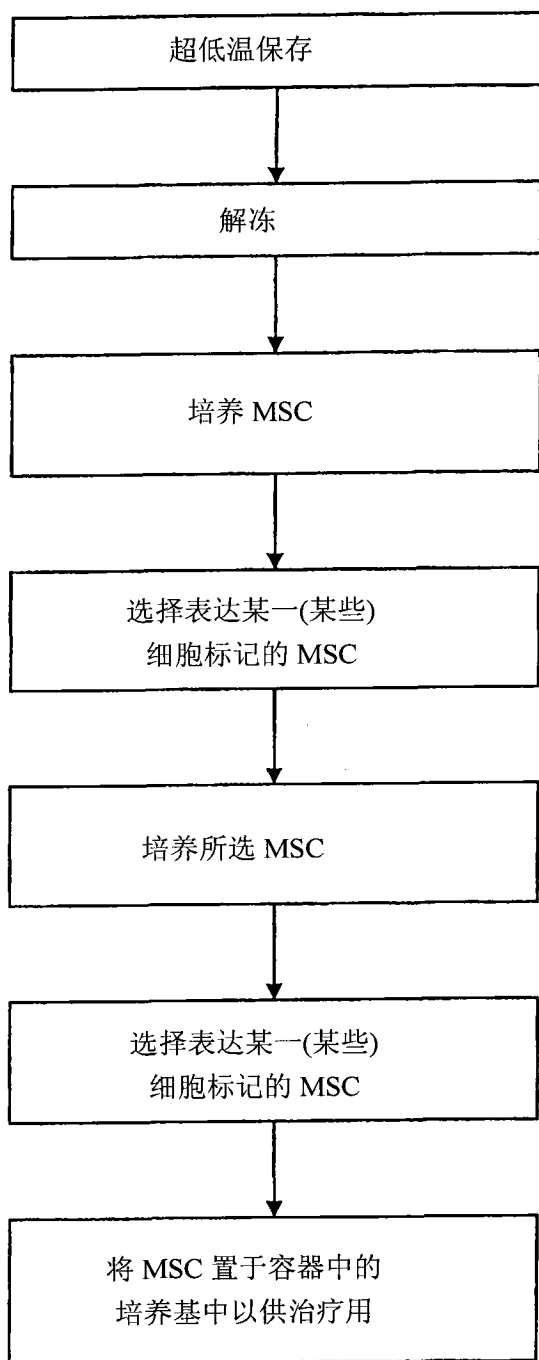


图 28

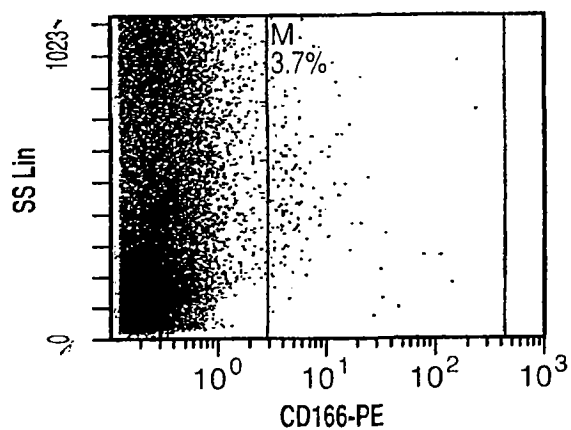


图 29a

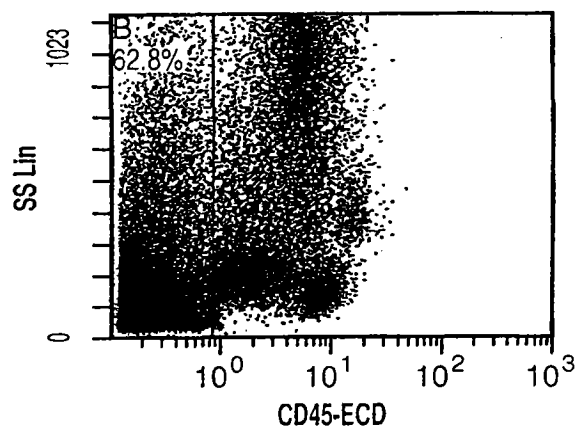


图 29b

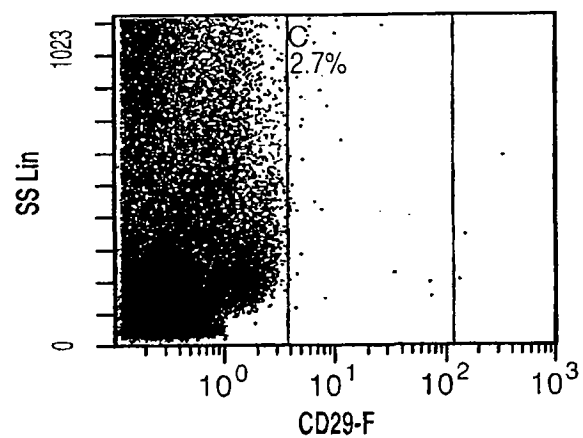


图 29c

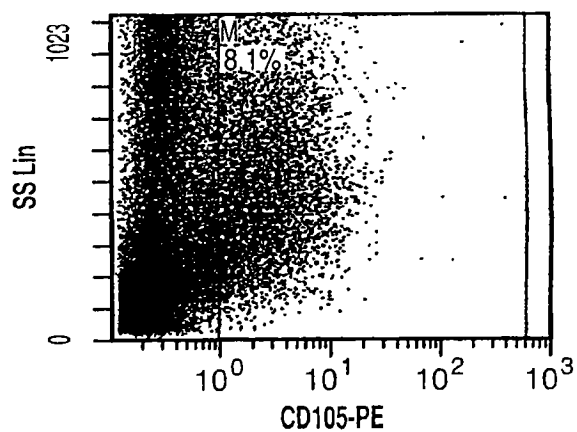


图 29d

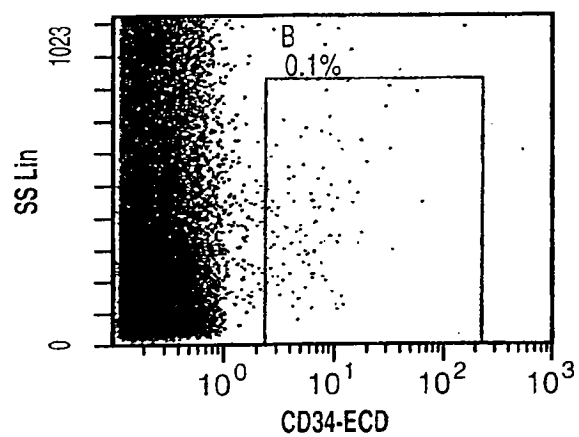


图 29e

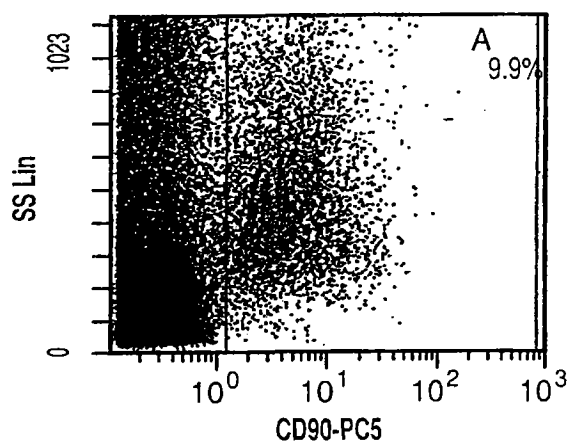


图 29f

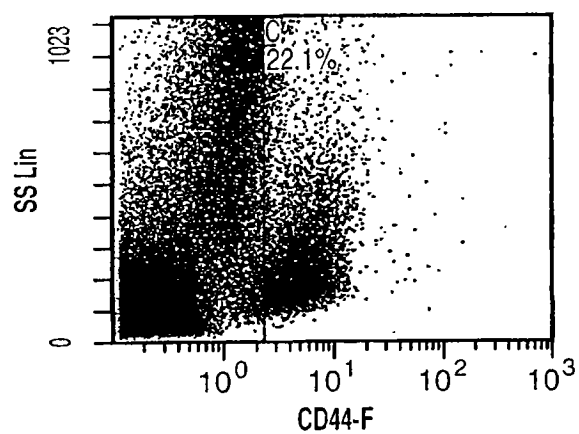


图 29g

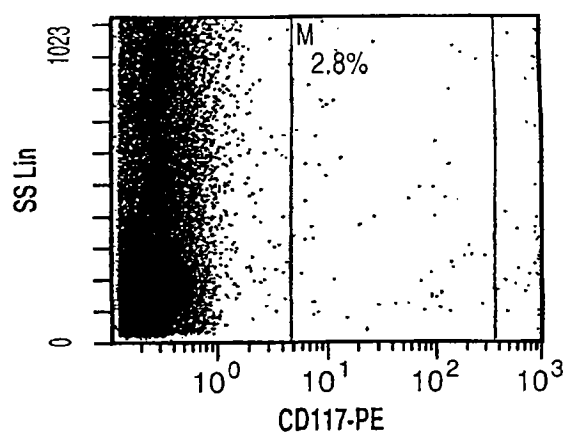


图 29h

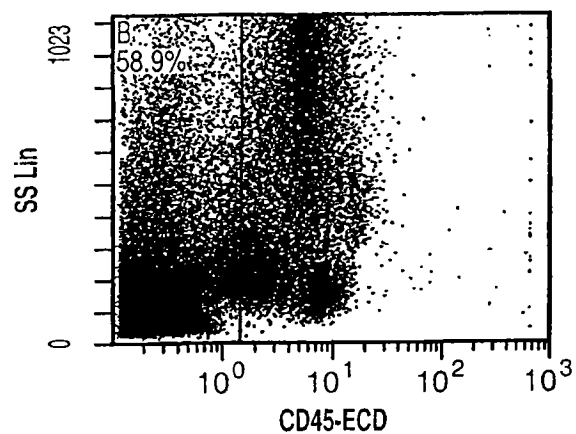


图 29i

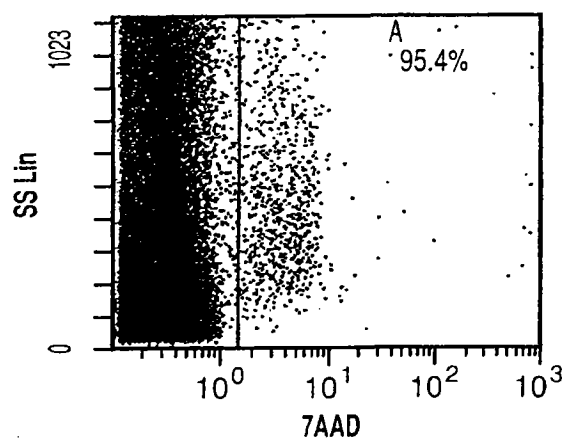


图 29j

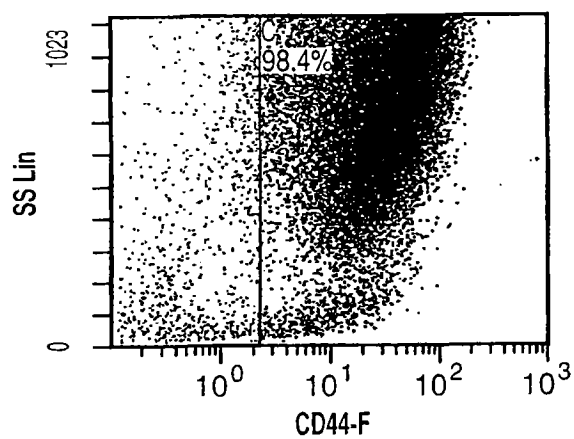


图 30a

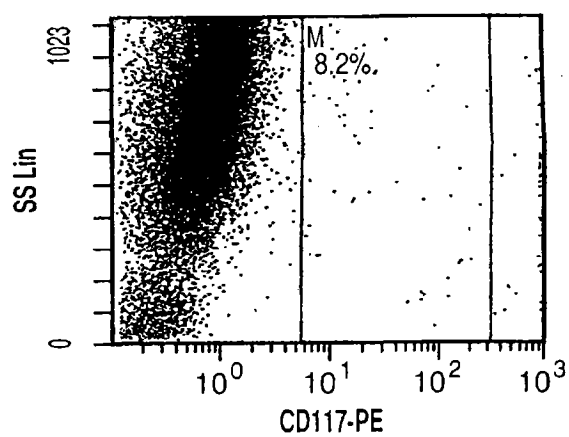


图 30b

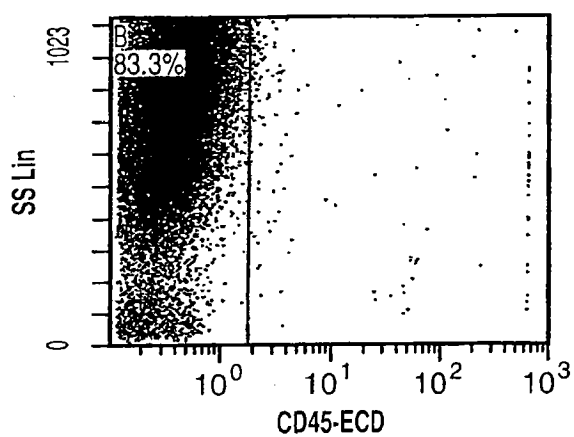


图 30c

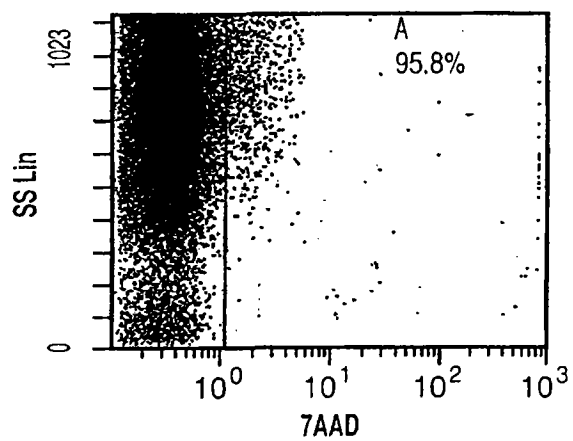


图 30d

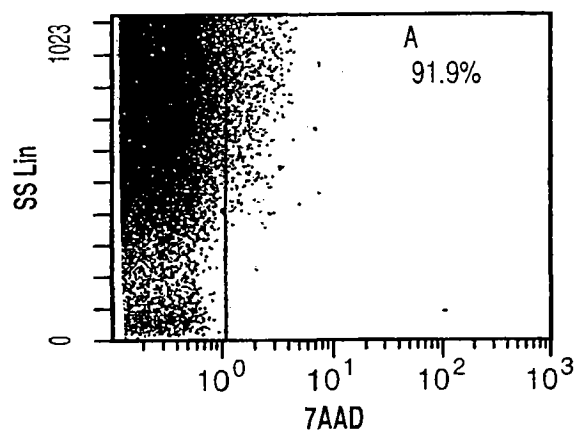


图 30e

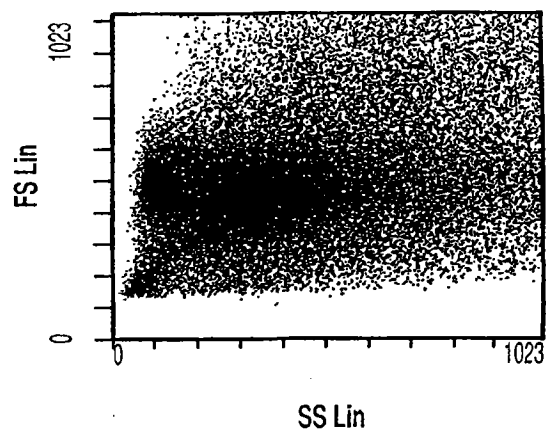


图 31a

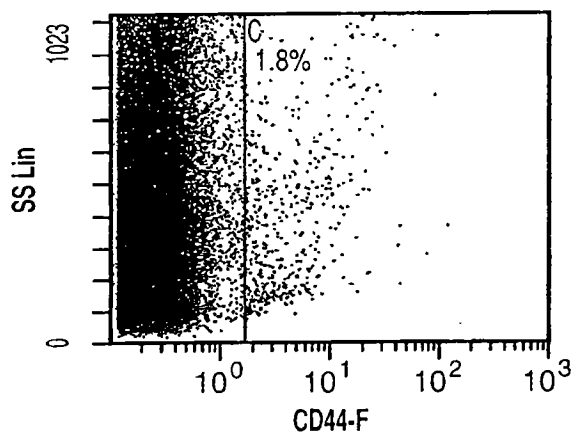


图 31b

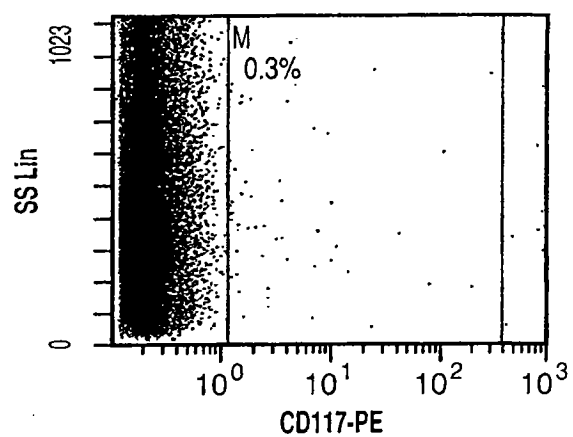


图 31c

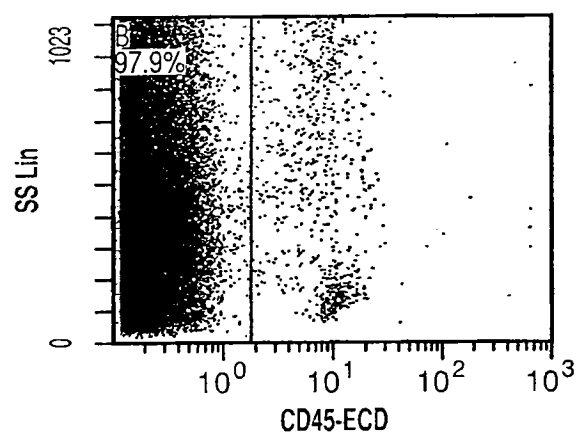


图 31d

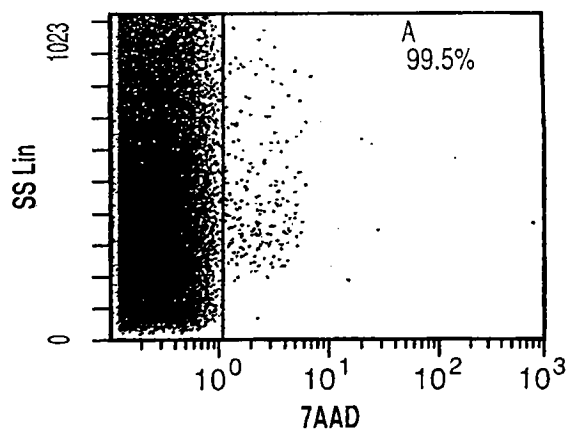


图 31e

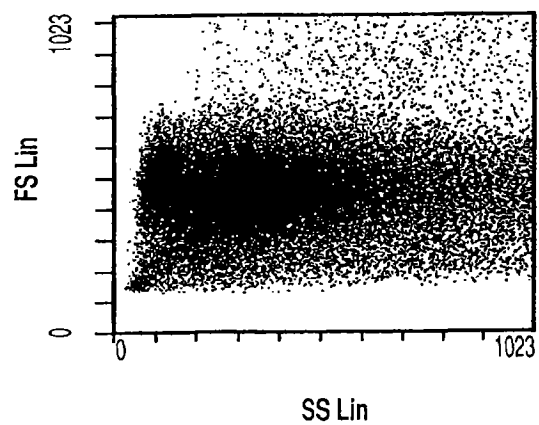


图 31f

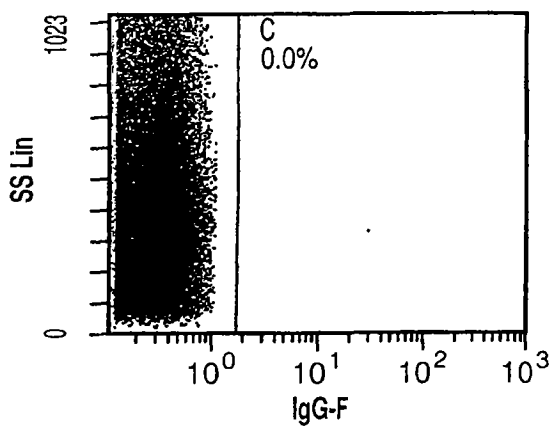


图 31g

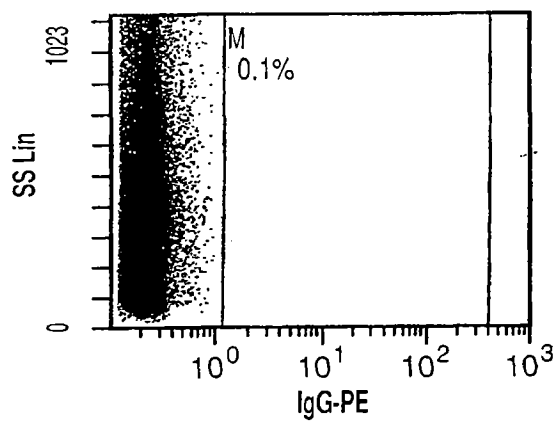


图 31h

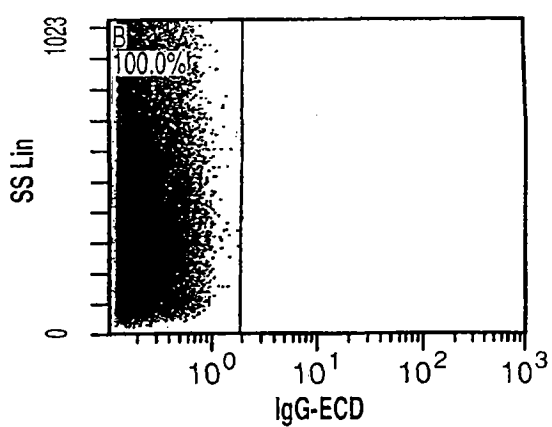


图 31i

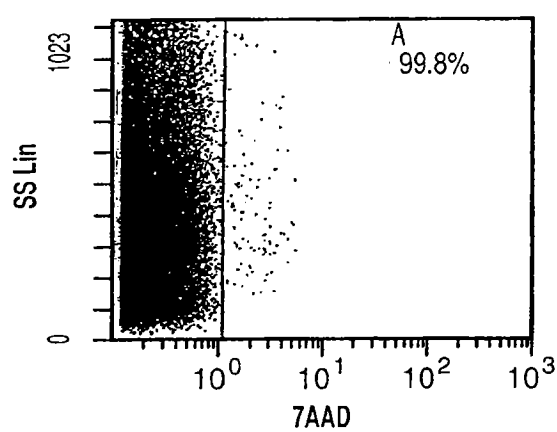


图 31j

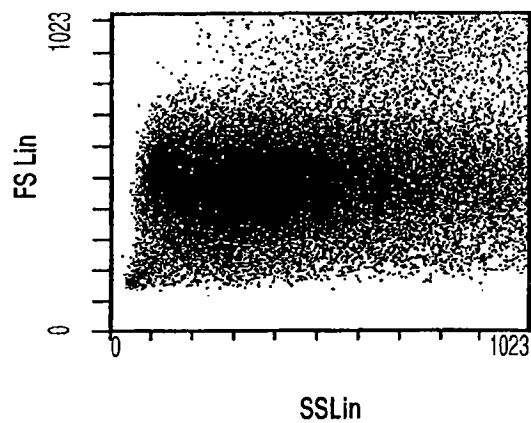


图 31k

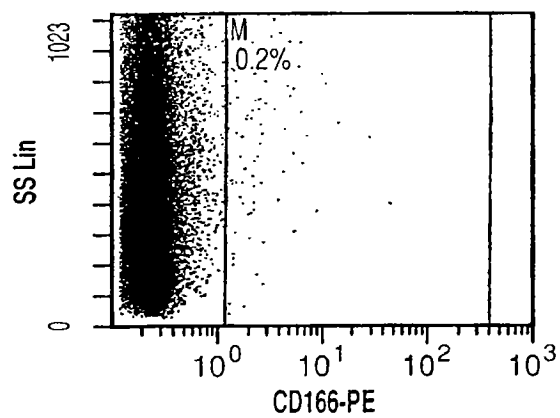


图 31l

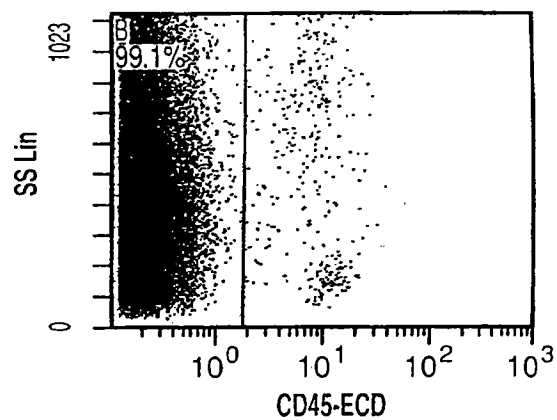


图 31m

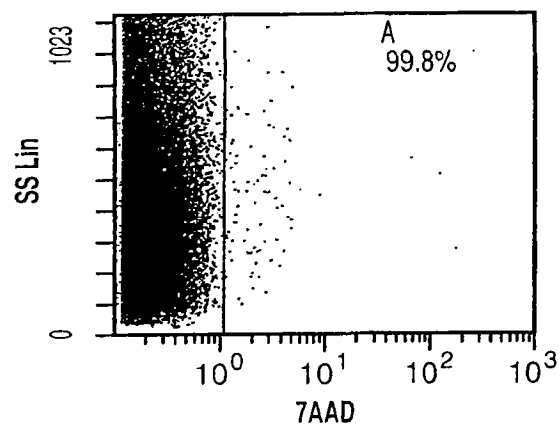


图 31n

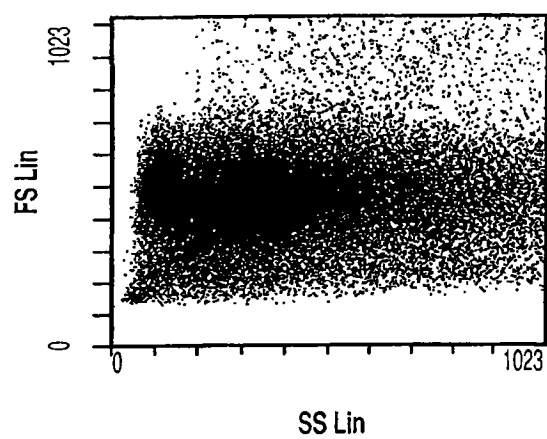


图 31o

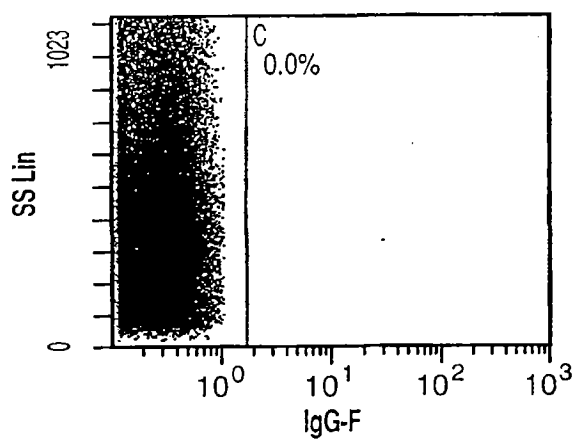


图 31p

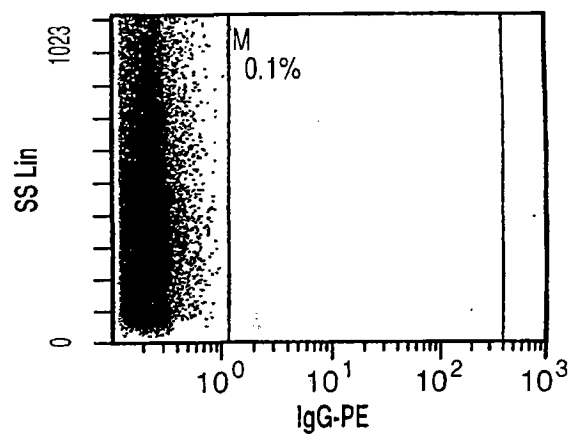


图 31q

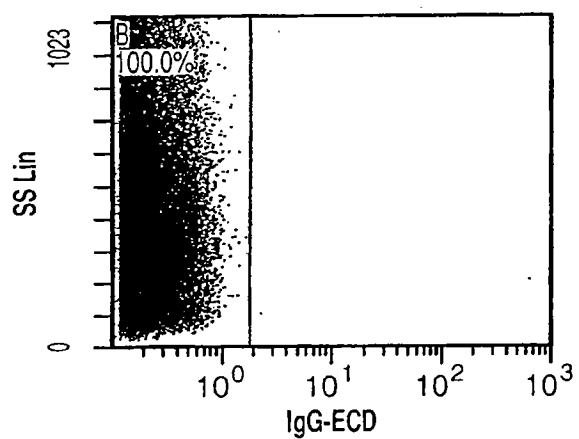


图 31r

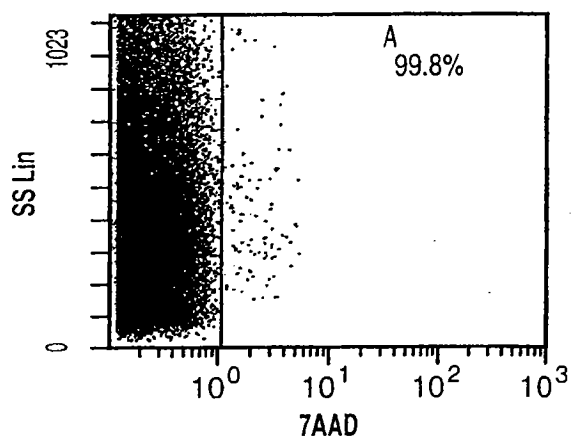


图 31s

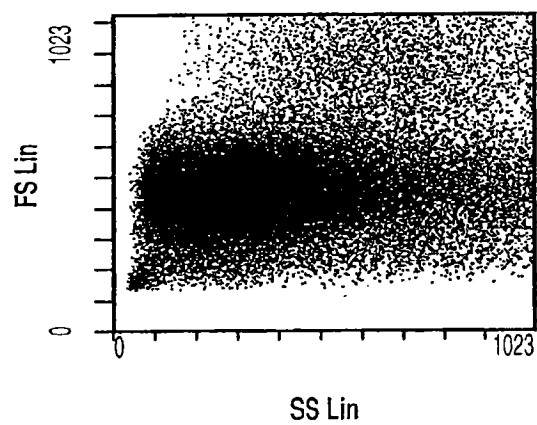


图 31t

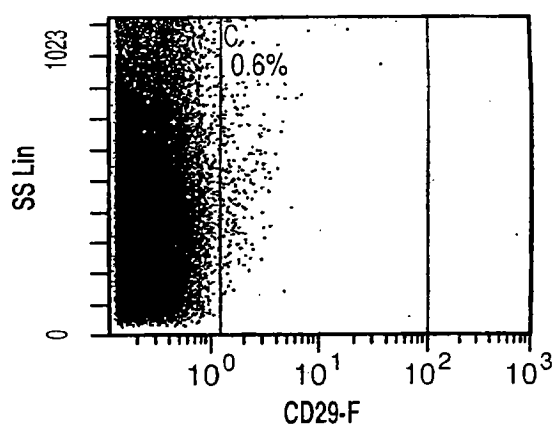


图 31u

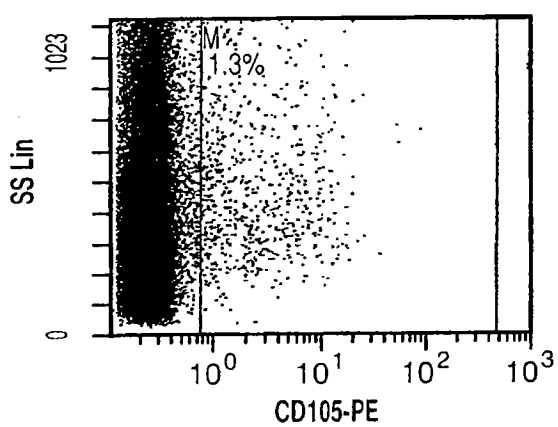


图 31v

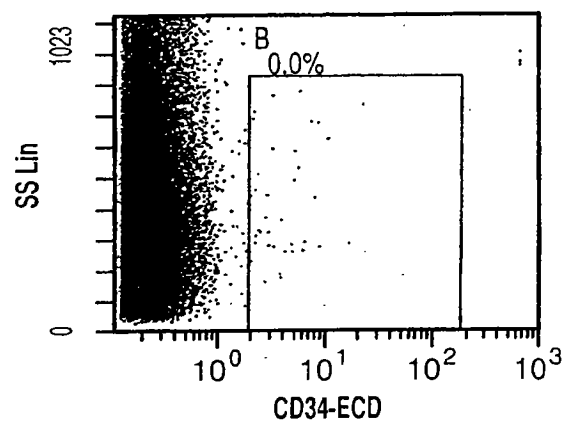


图 31w

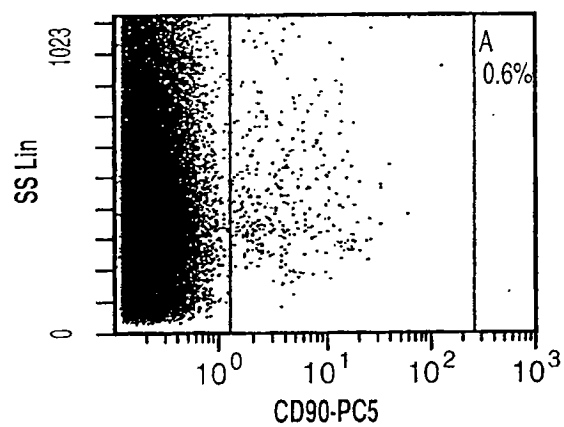


图 31x

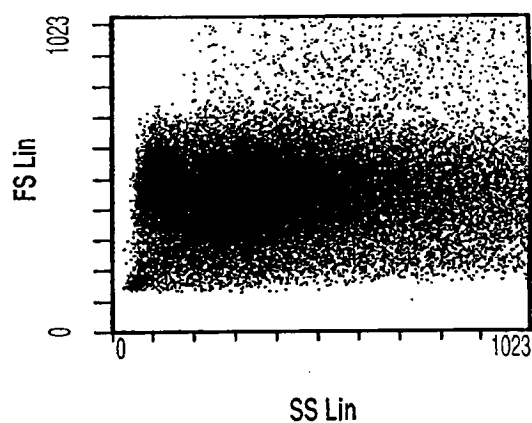


图 31y

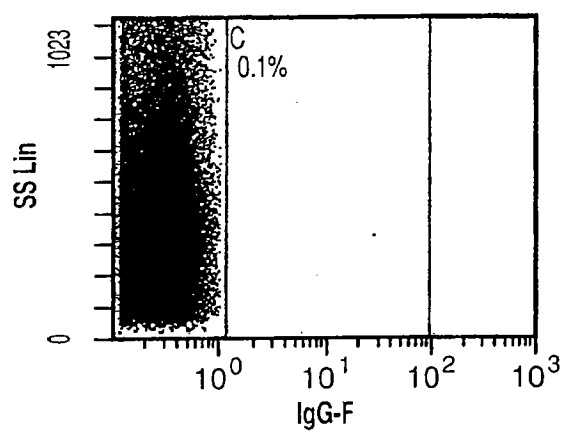


图 31z

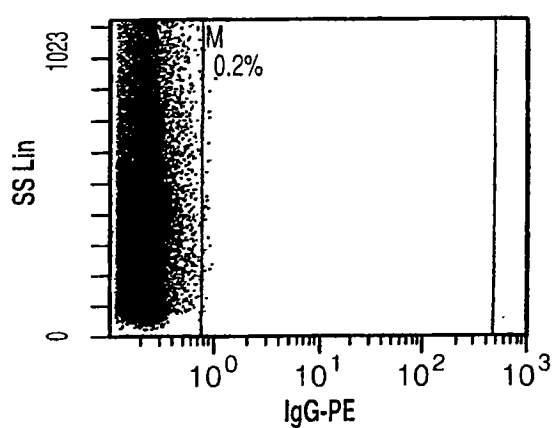


图 31aa

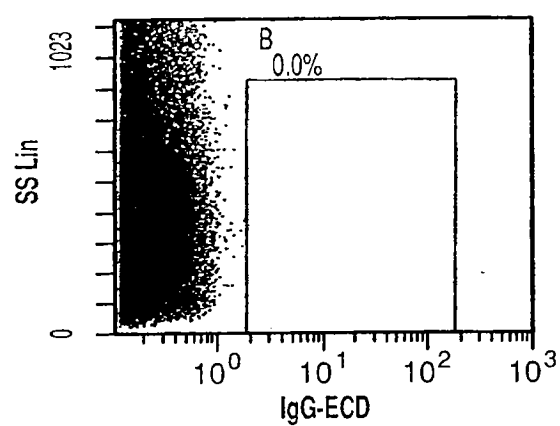


图 31bb

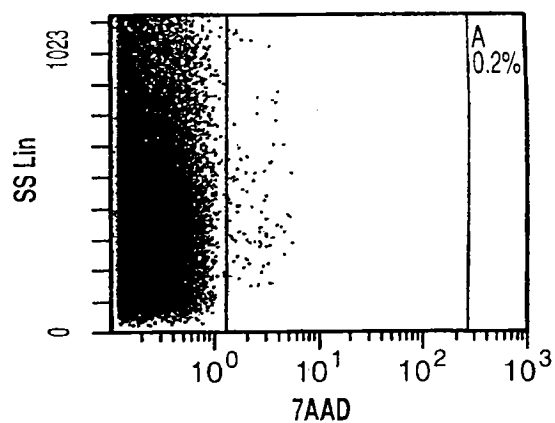


图 31cc

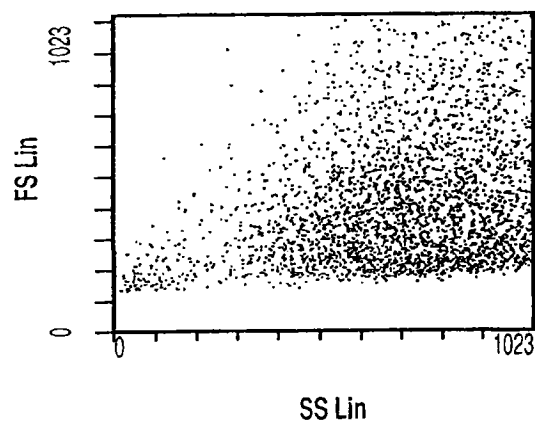


图 32a

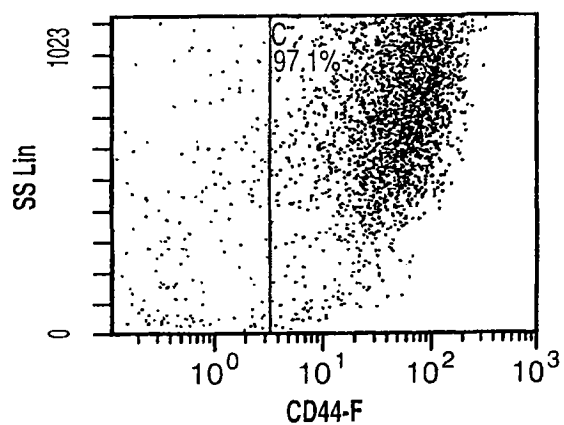


图 32b

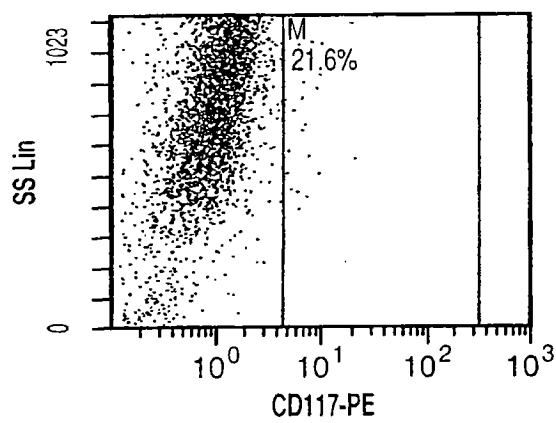


图 32c

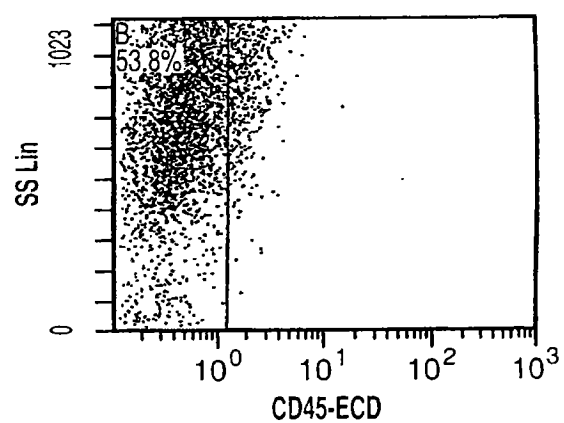


图 32d

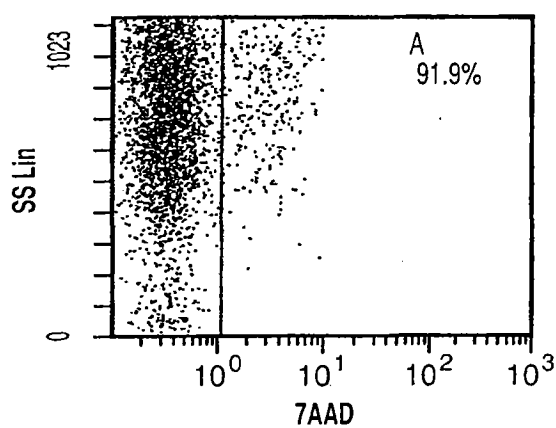


图 32e

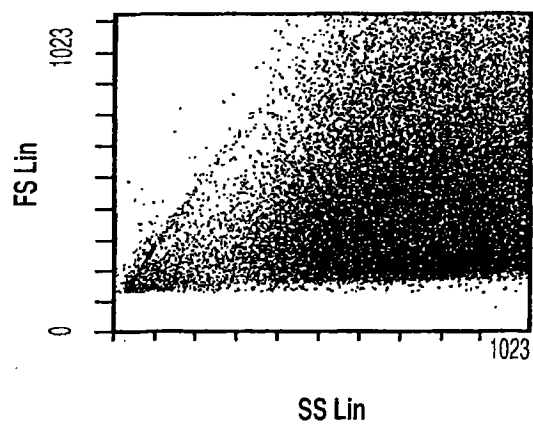


图 32f

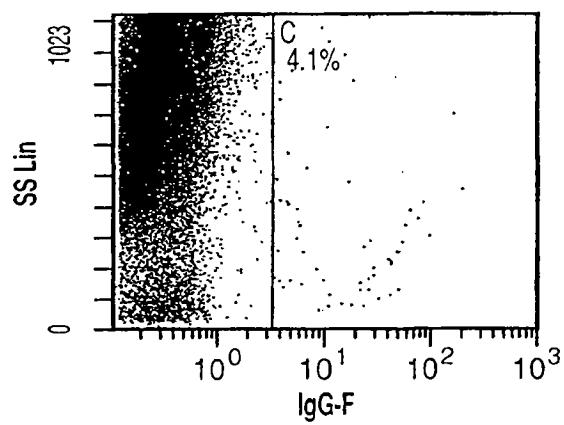


图 32g

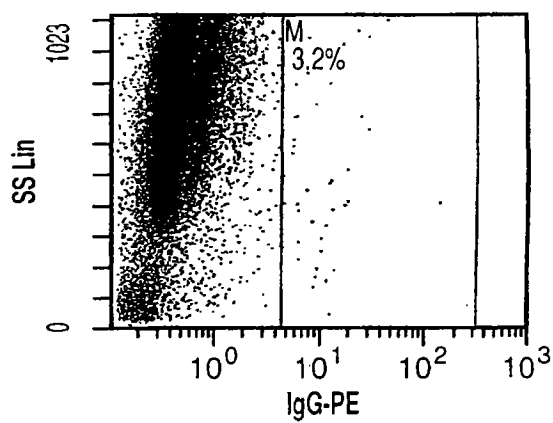


图 32h

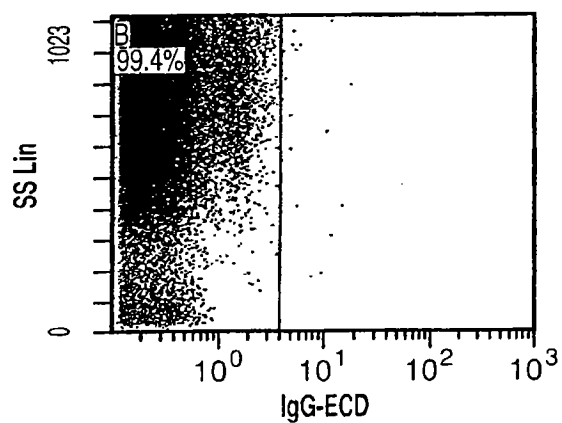


图 32i

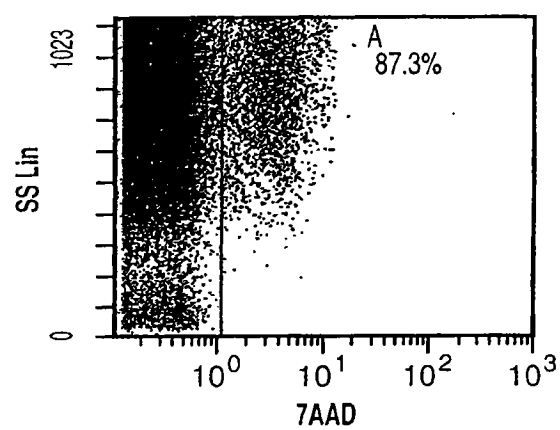


图 32j

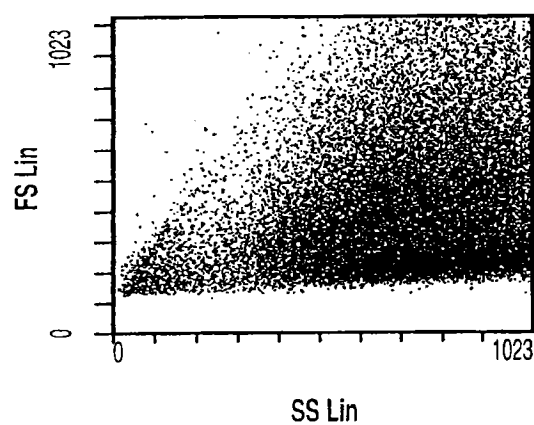


图 32k

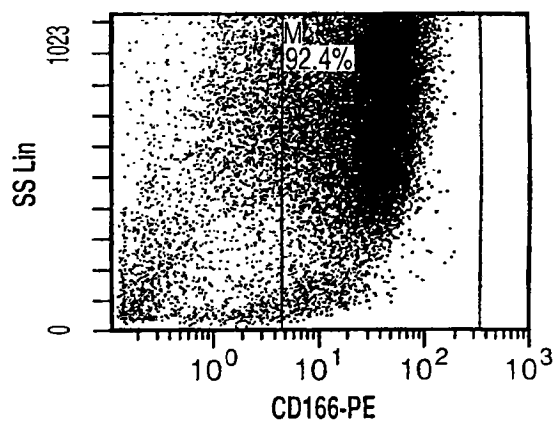


图 32l

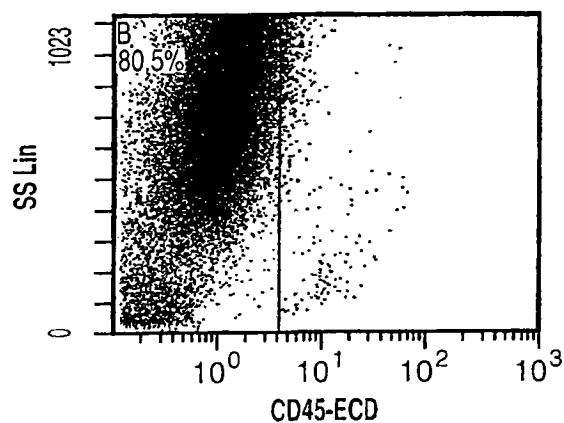


图 32m

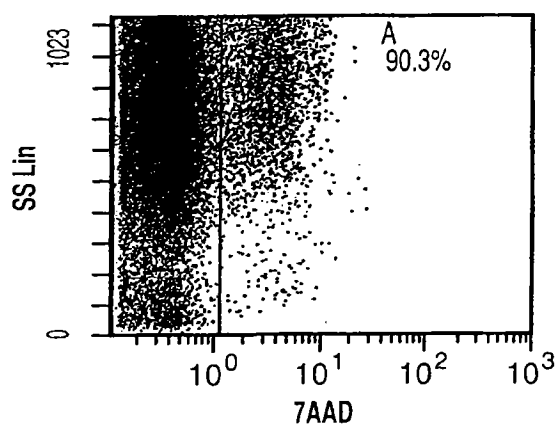


图 32n

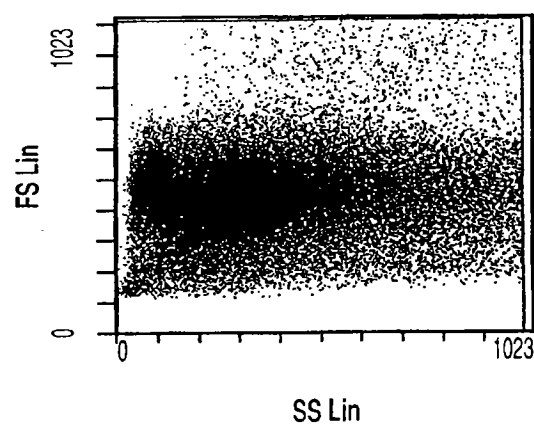


图 32o

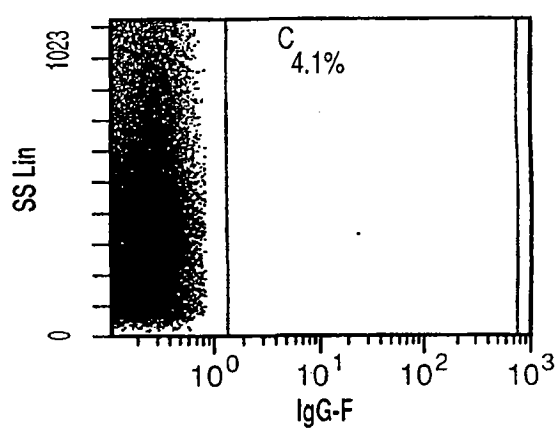


图 32p

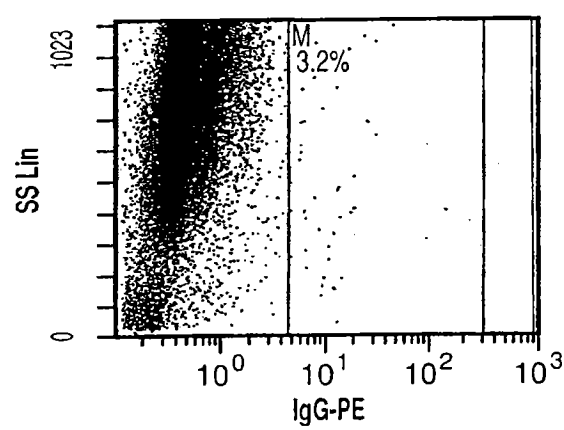


图 32q

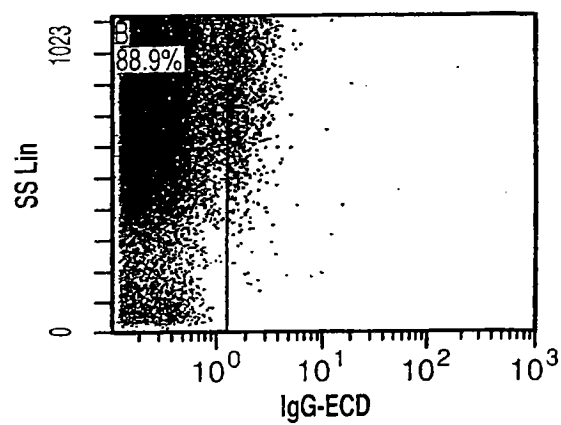


图 32r

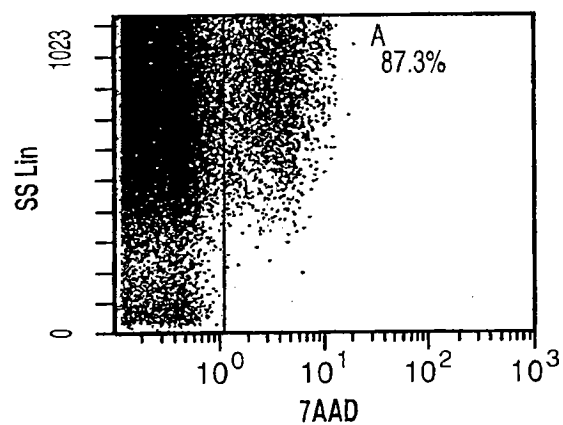


图 32s

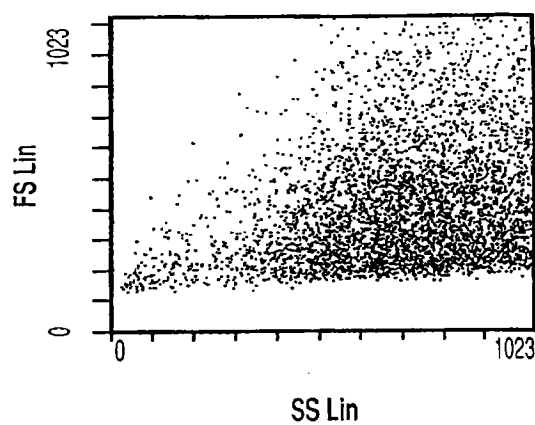


图 32t

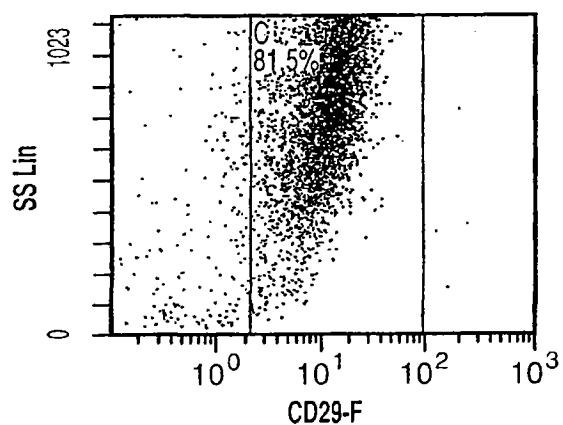


图 32u

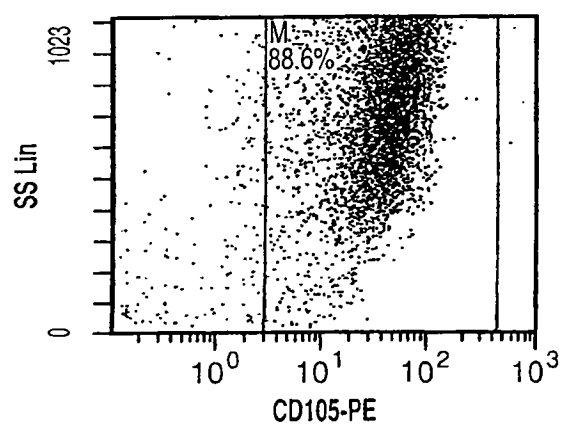


图 32v

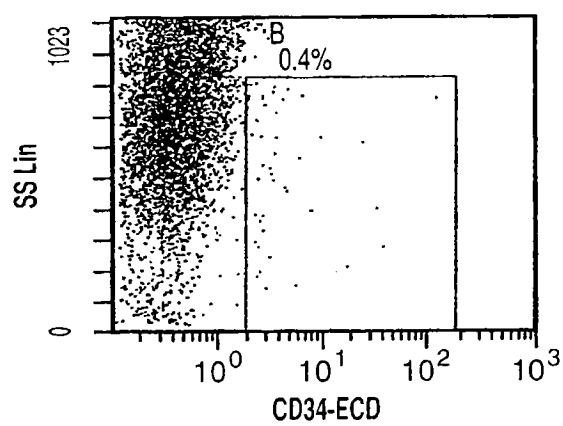


图 32w

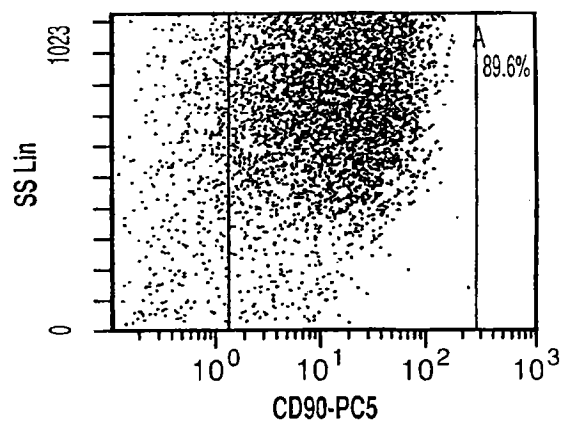


图 32x

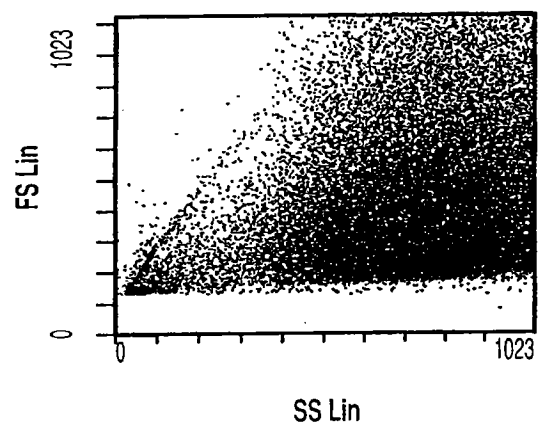


图 32y

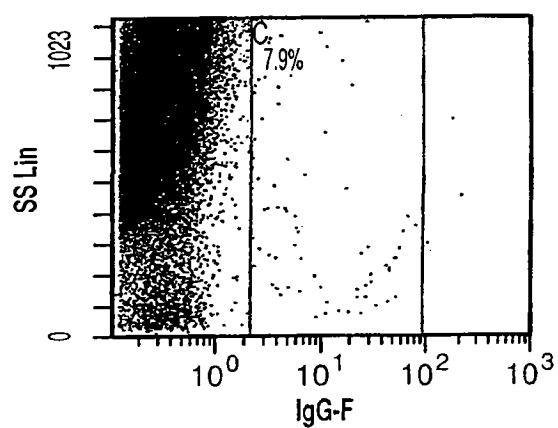


图 32z

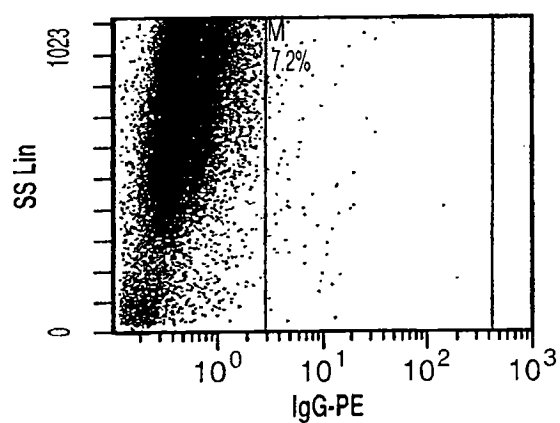


图 32aa

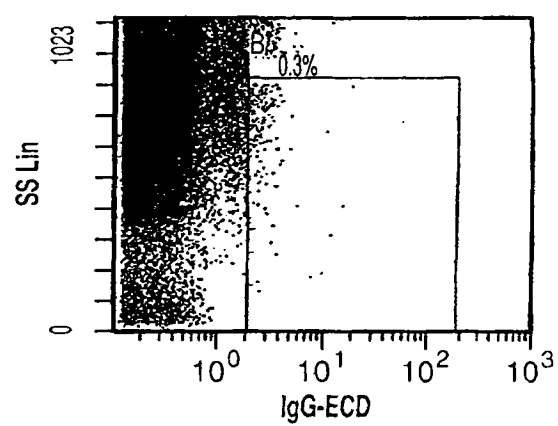


图 32bb

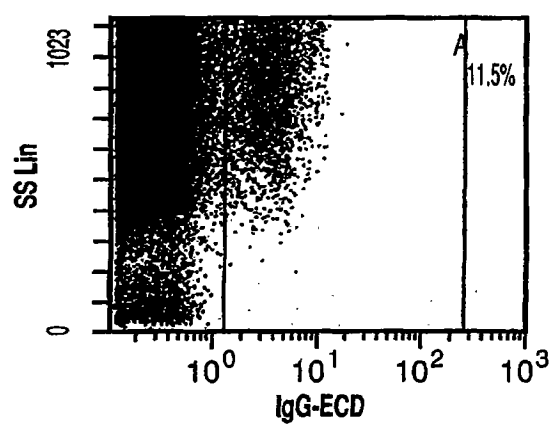


图 32cc

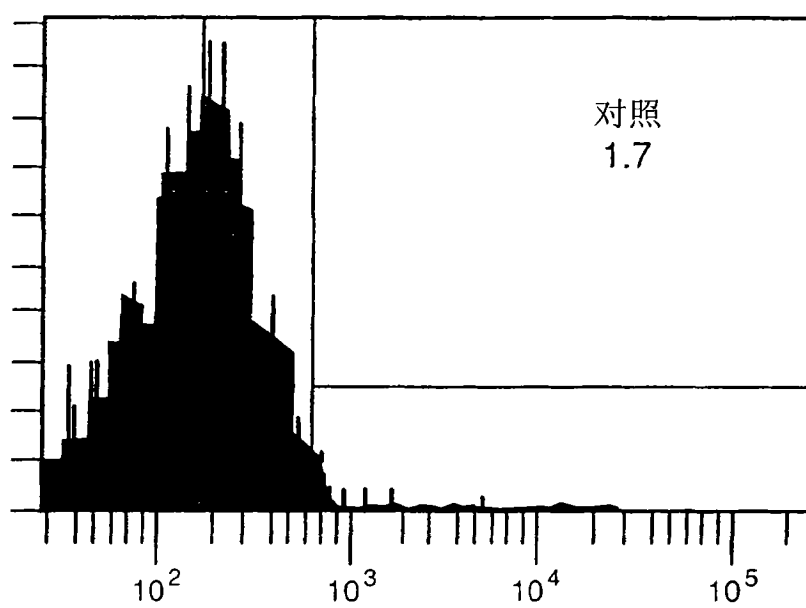


图 33a

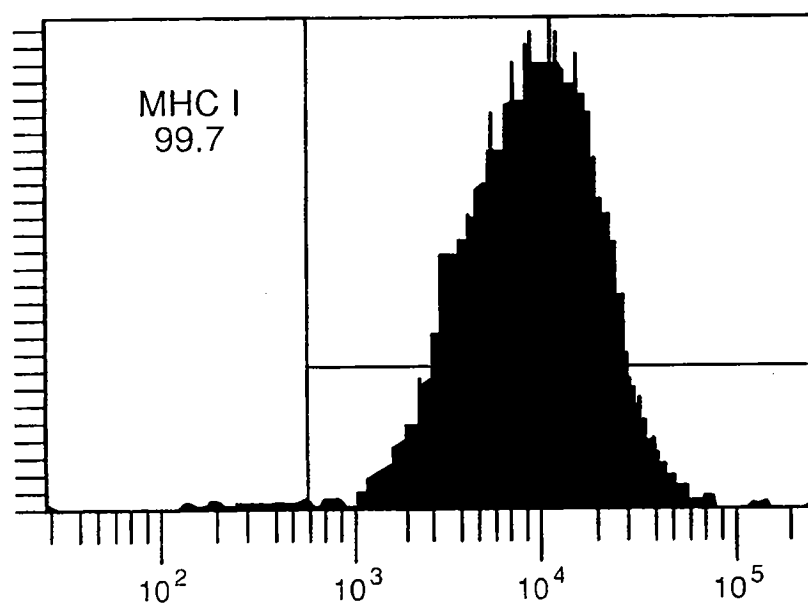


图 33b

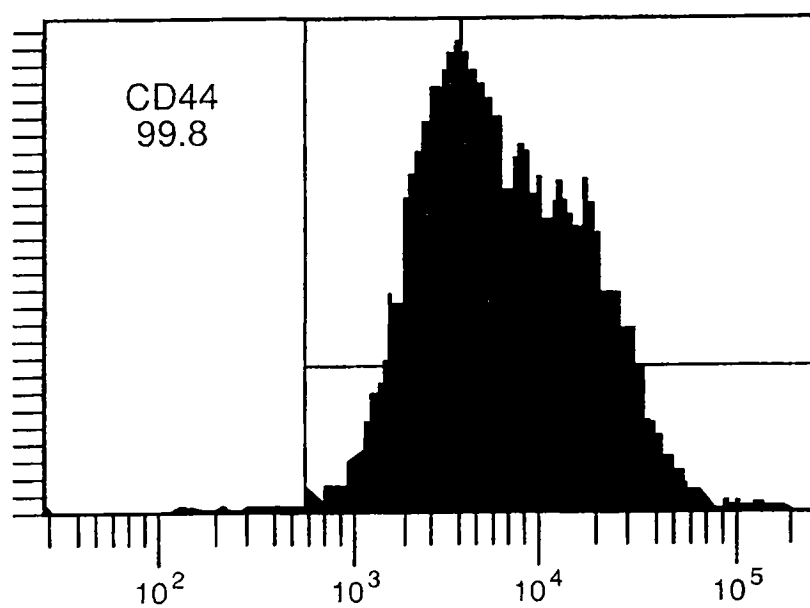


图 33c

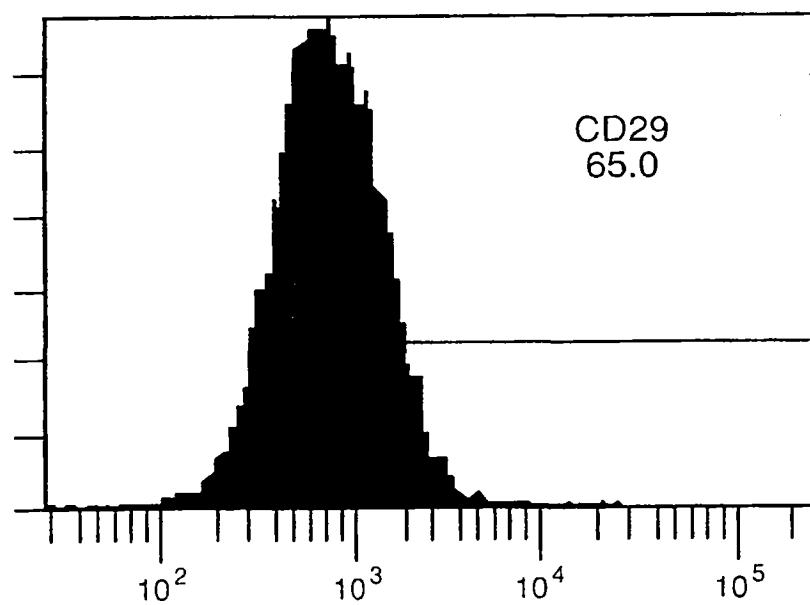


图 33d

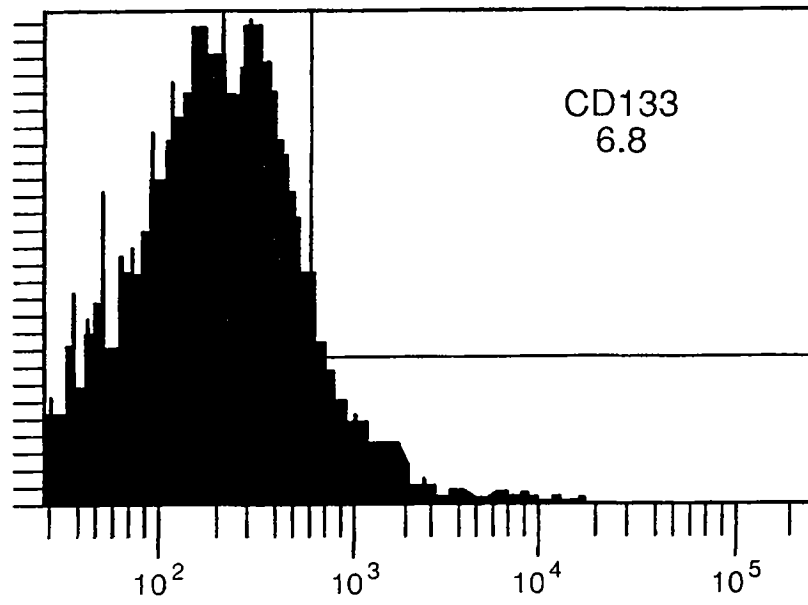


图 33e

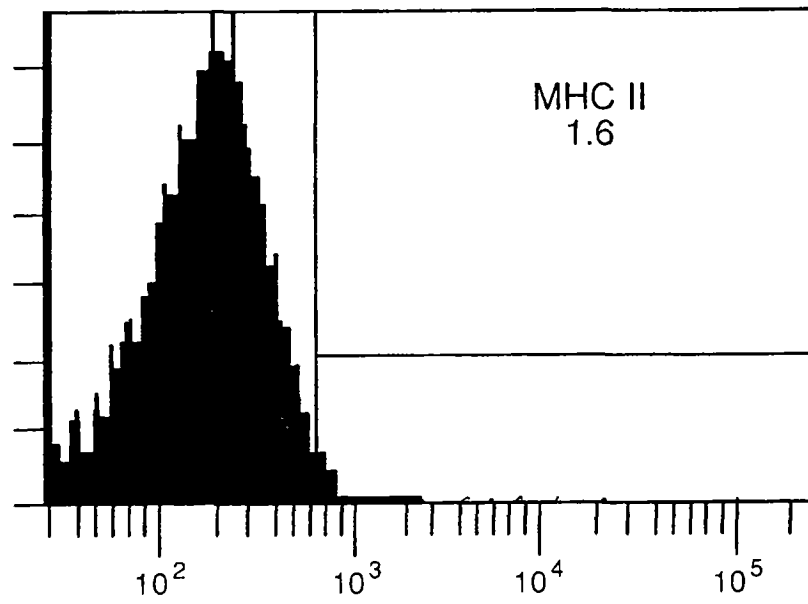


图 33f

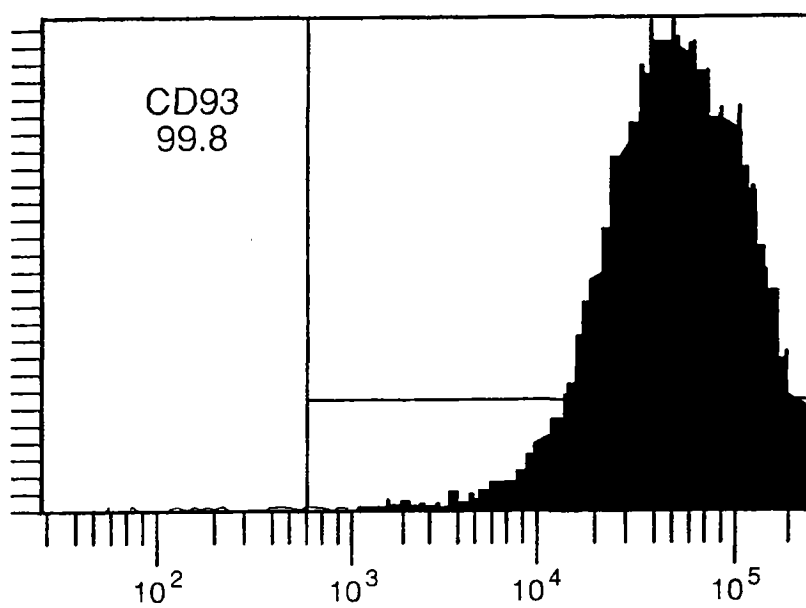


图 33g

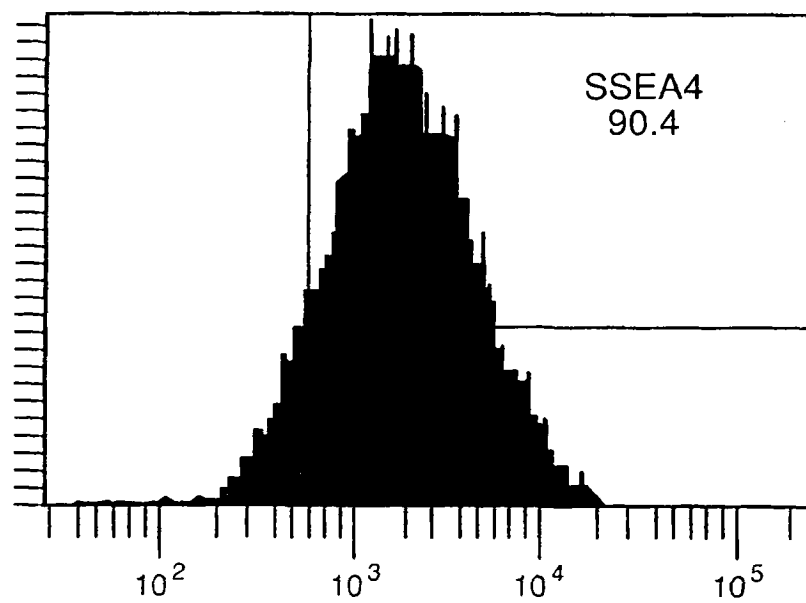


图 33h

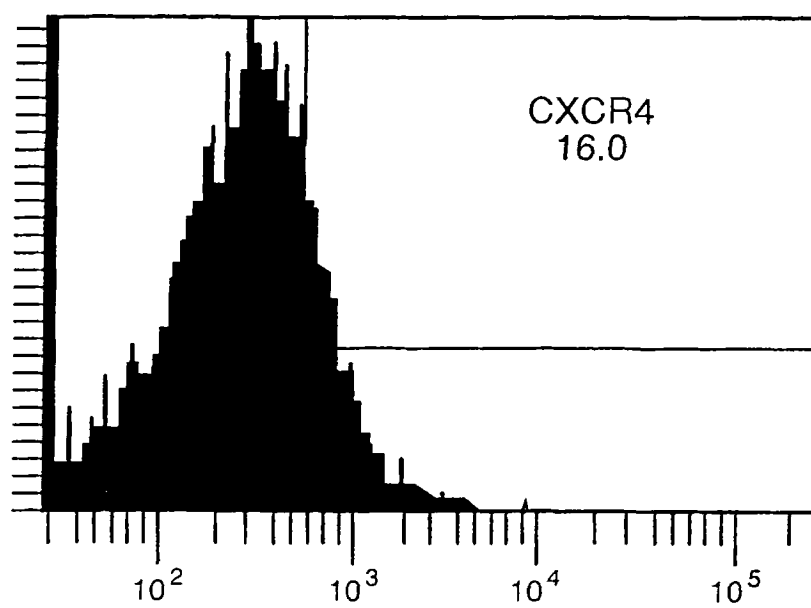


图 33i

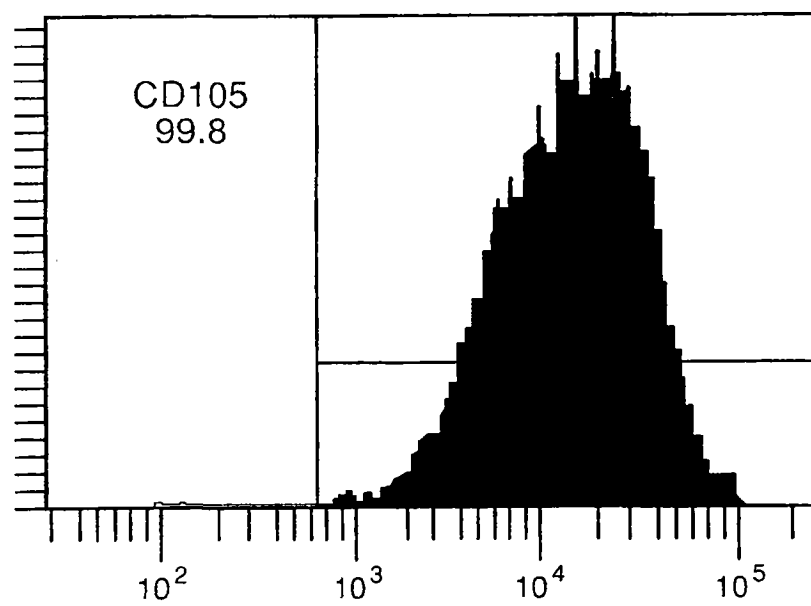


图 33j

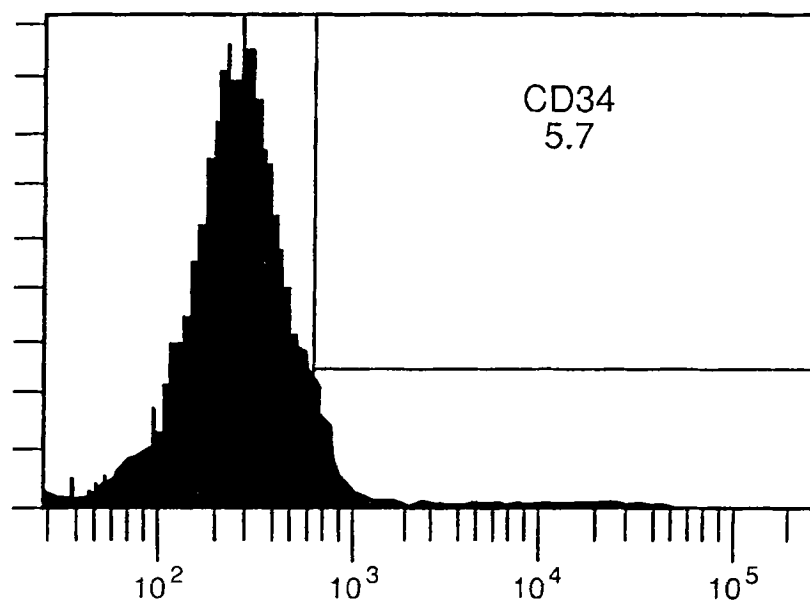


图 33k

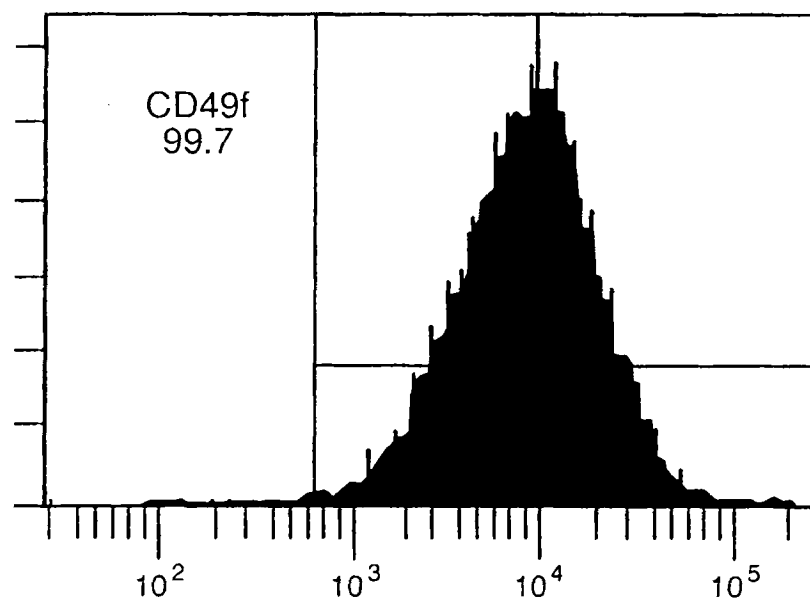


图 33l

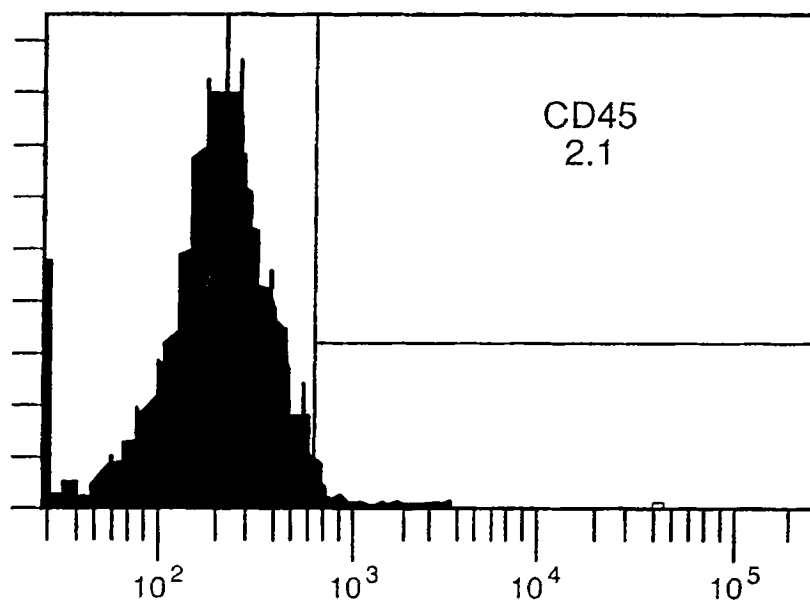


图 33m

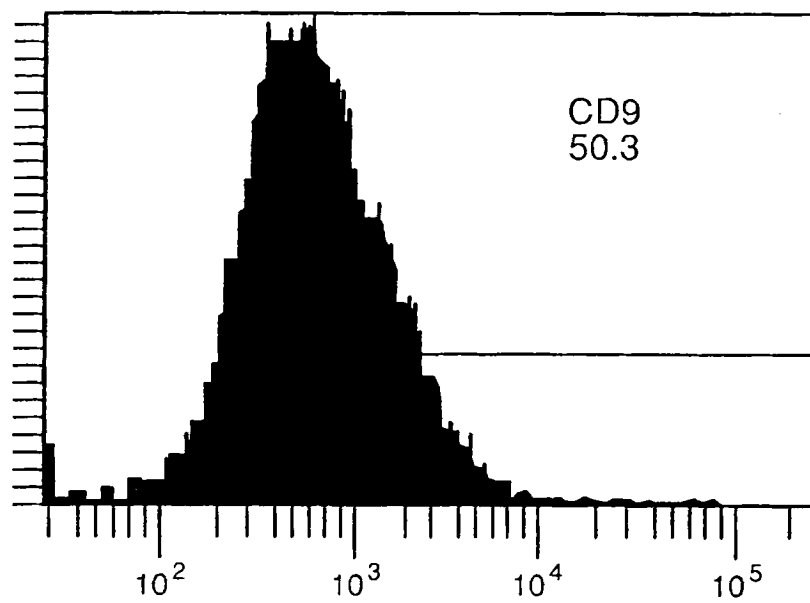


图 33n

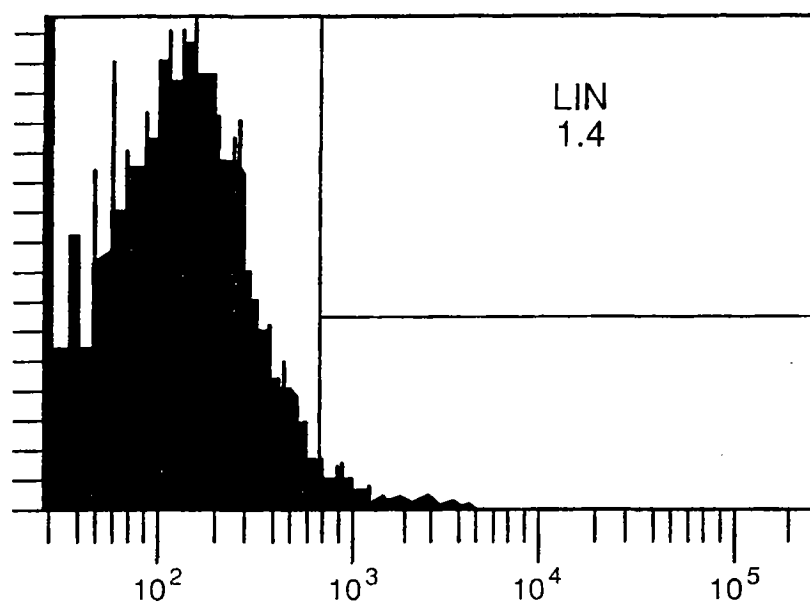


图 33o

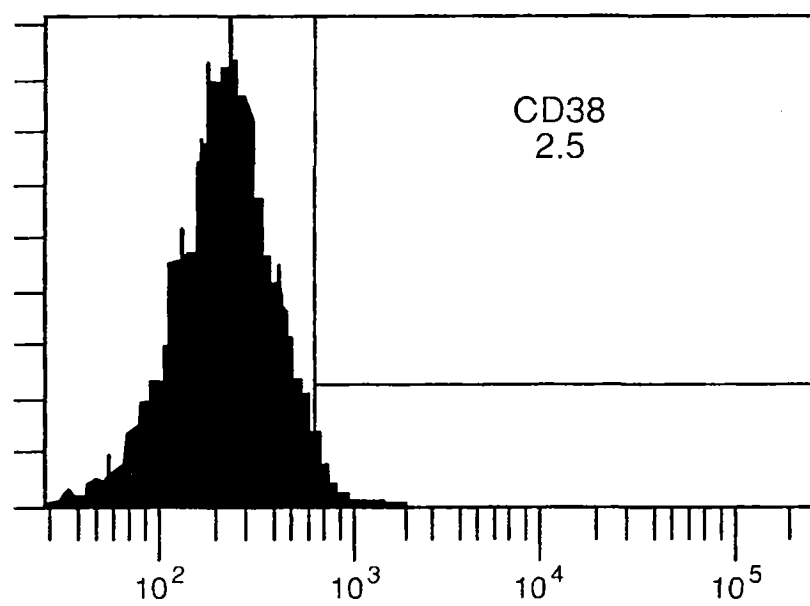


图 33p

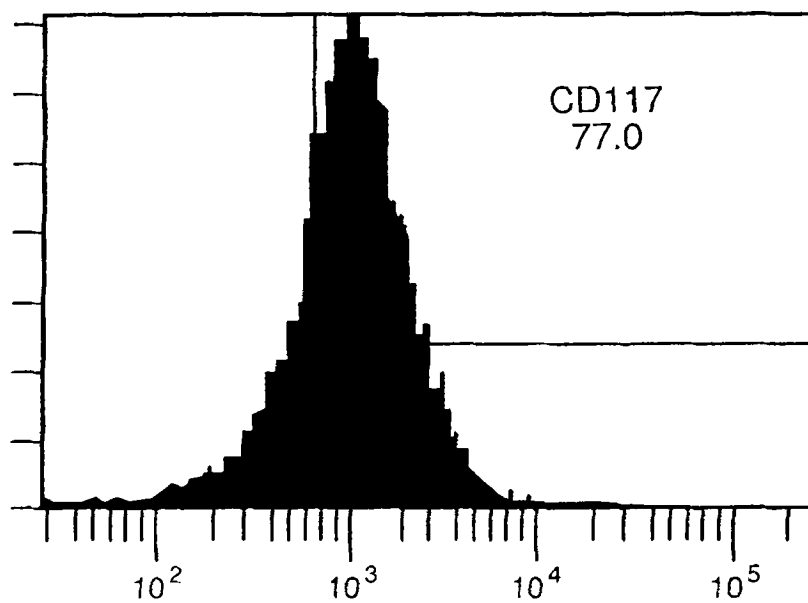


图 33q

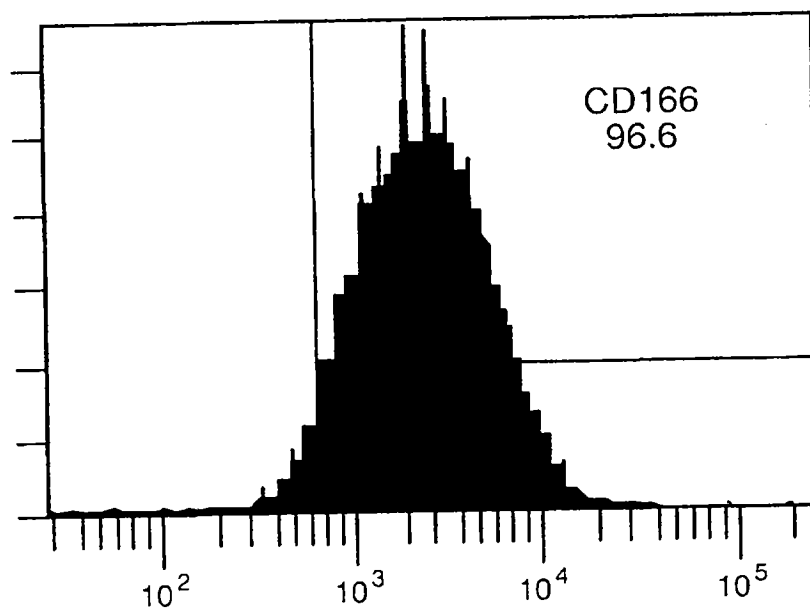


图 33r

染色的



图 34a

IgG 阴性对照

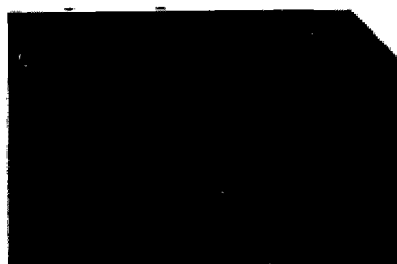


图 34b



图 34c



图 34d



图 34e

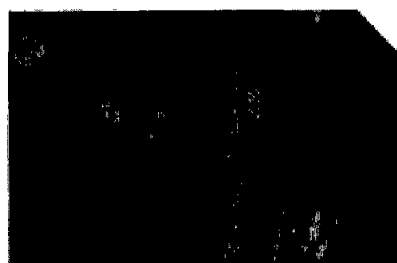


图 34f

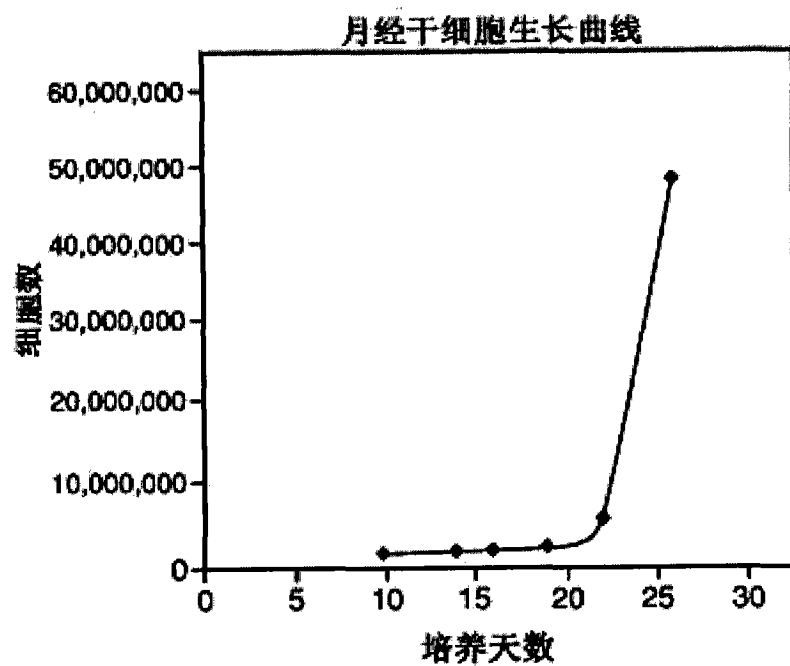


图 35a

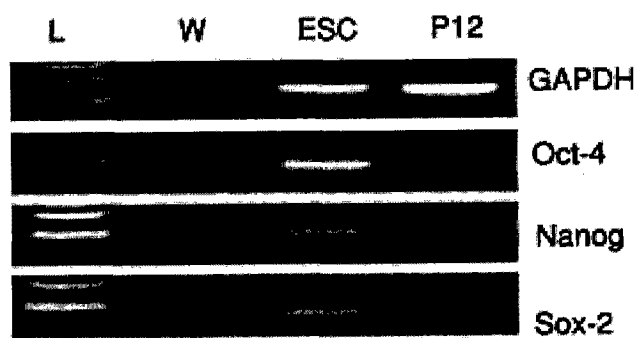


图 35b



图 36a

图 36b

图 36c



图 36d

图 36e

图 36f

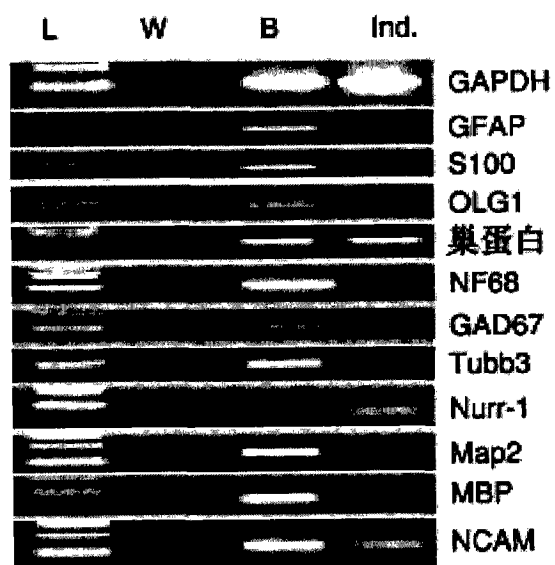


图 36g

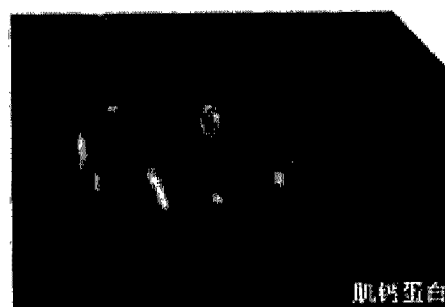


图 37a

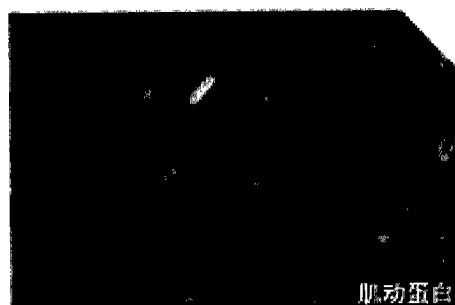


图 37b



图 37c

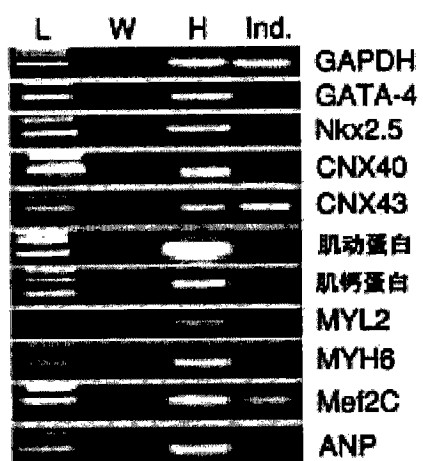


图 37d

对照

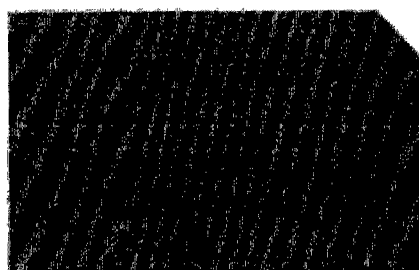


图 38a

经诱导

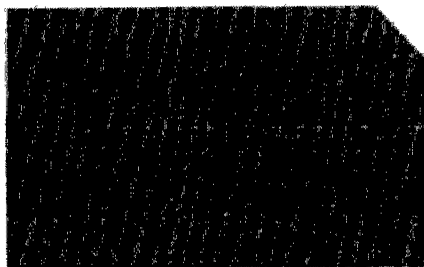


图 38b

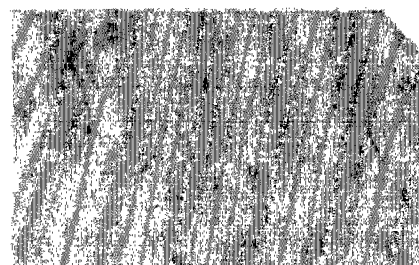


图 38c

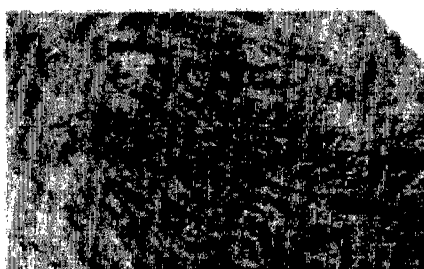


图 38d



图 38e

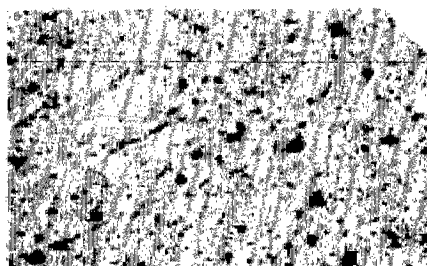


图 38f

端粒酶活性

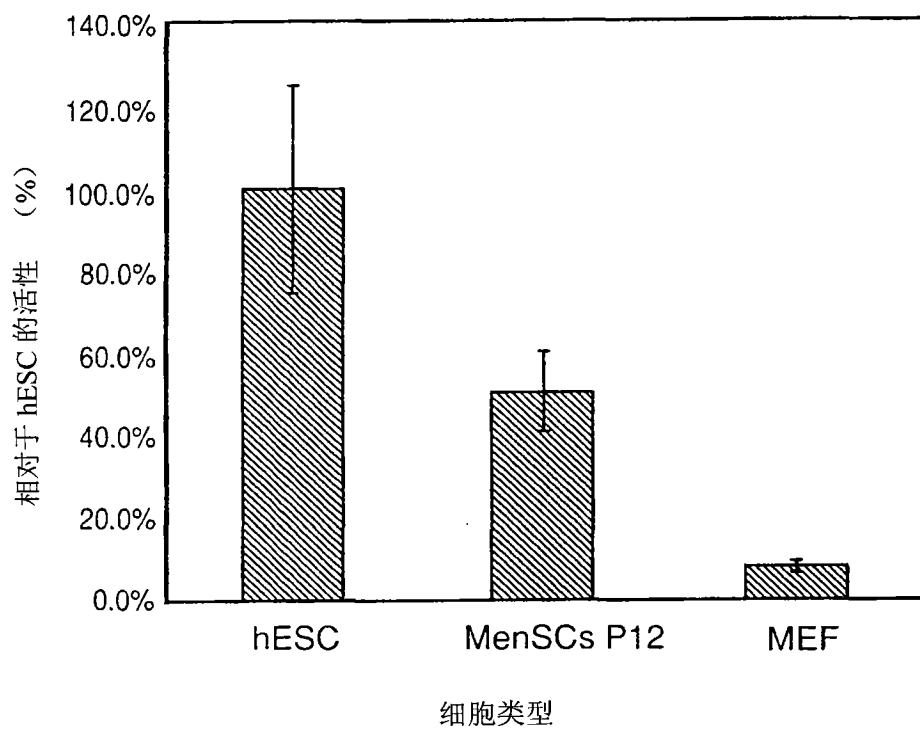


图 39

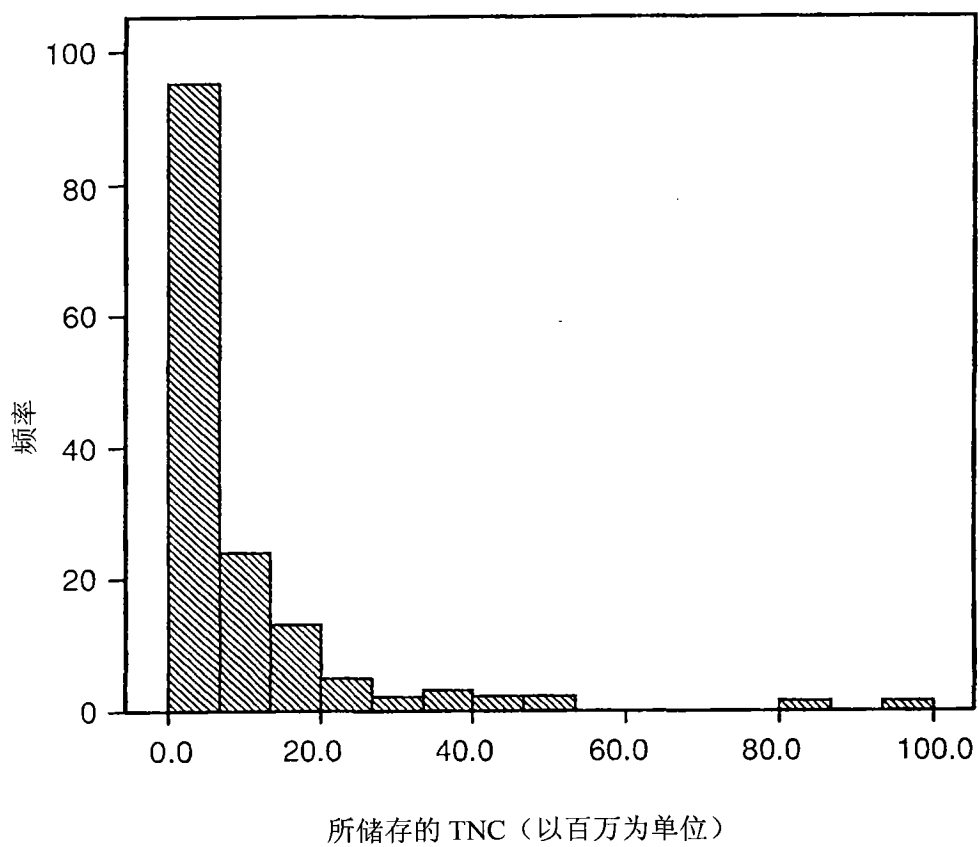


图 40

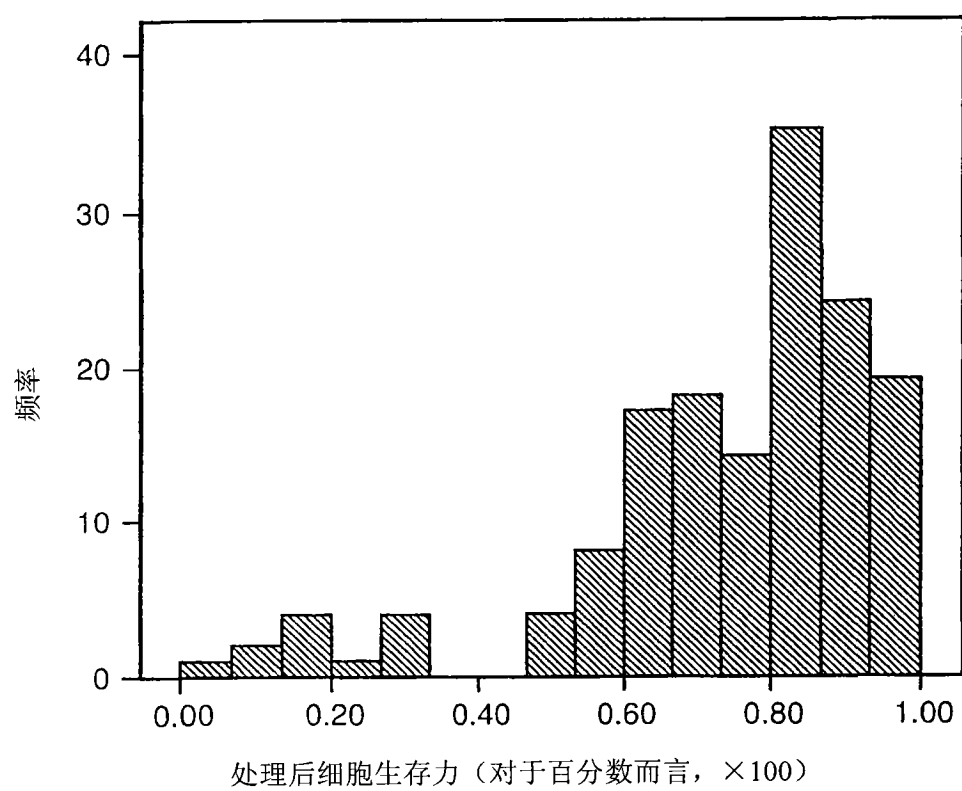


图 41

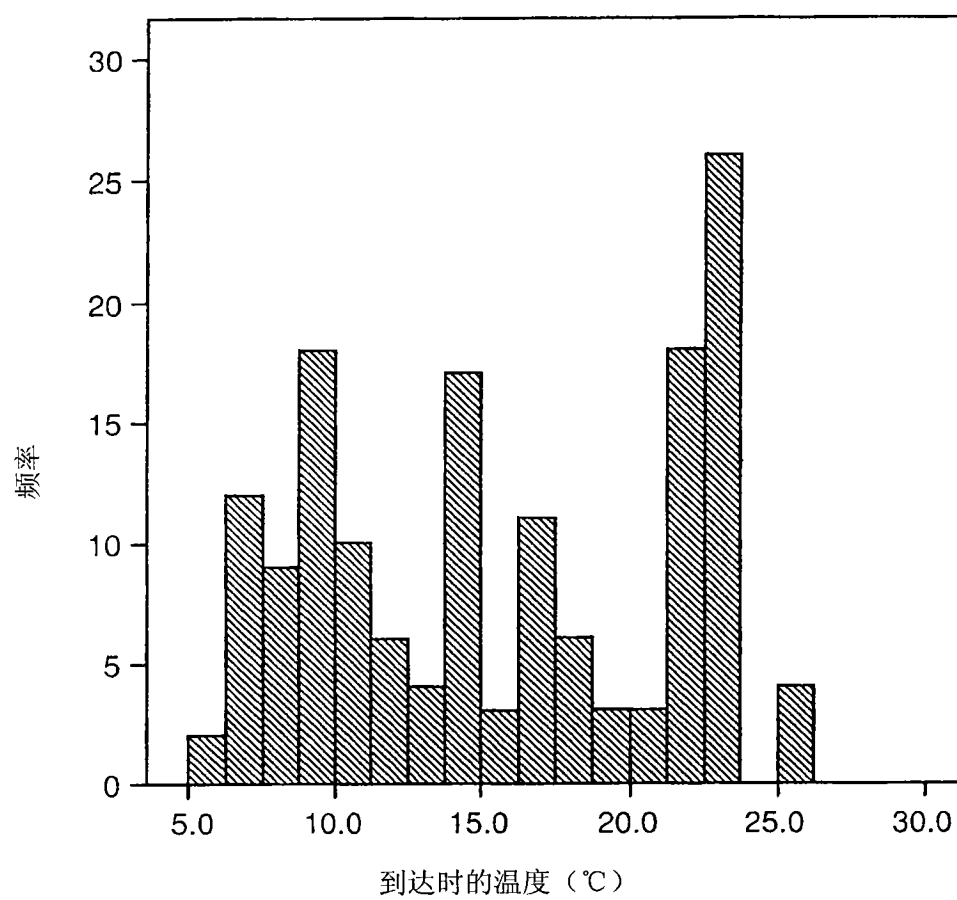


图 42

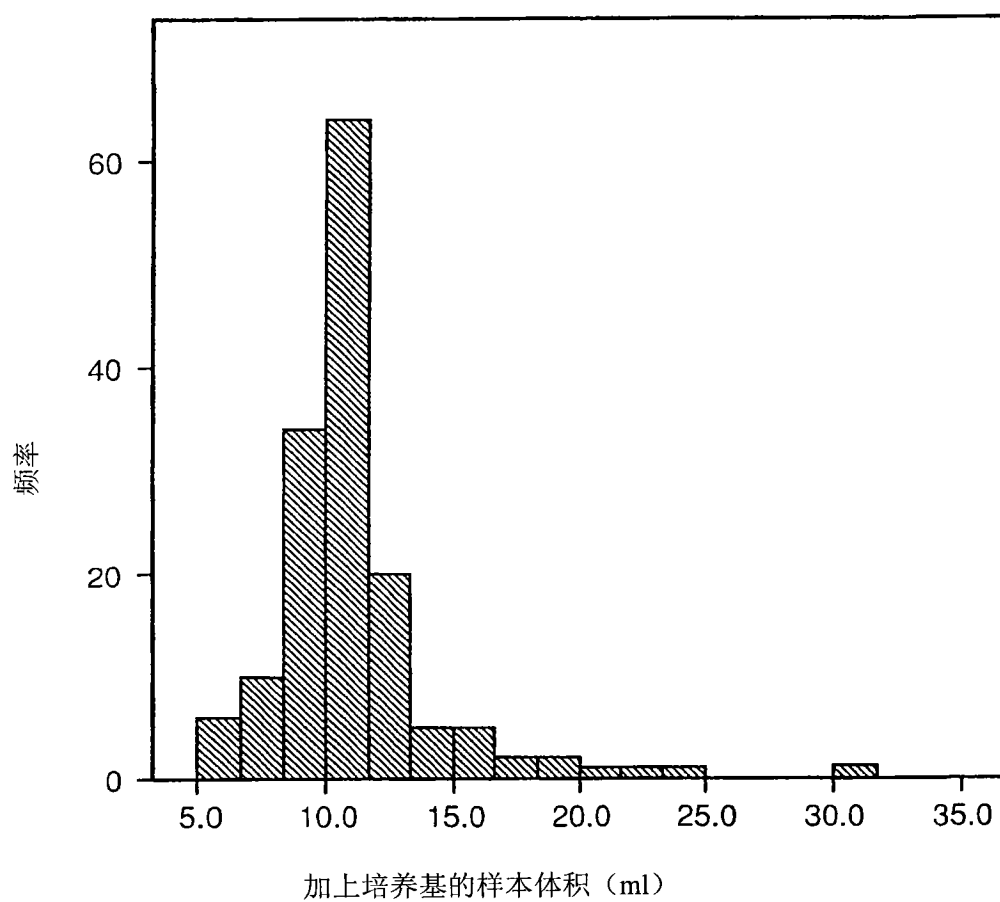


图 43

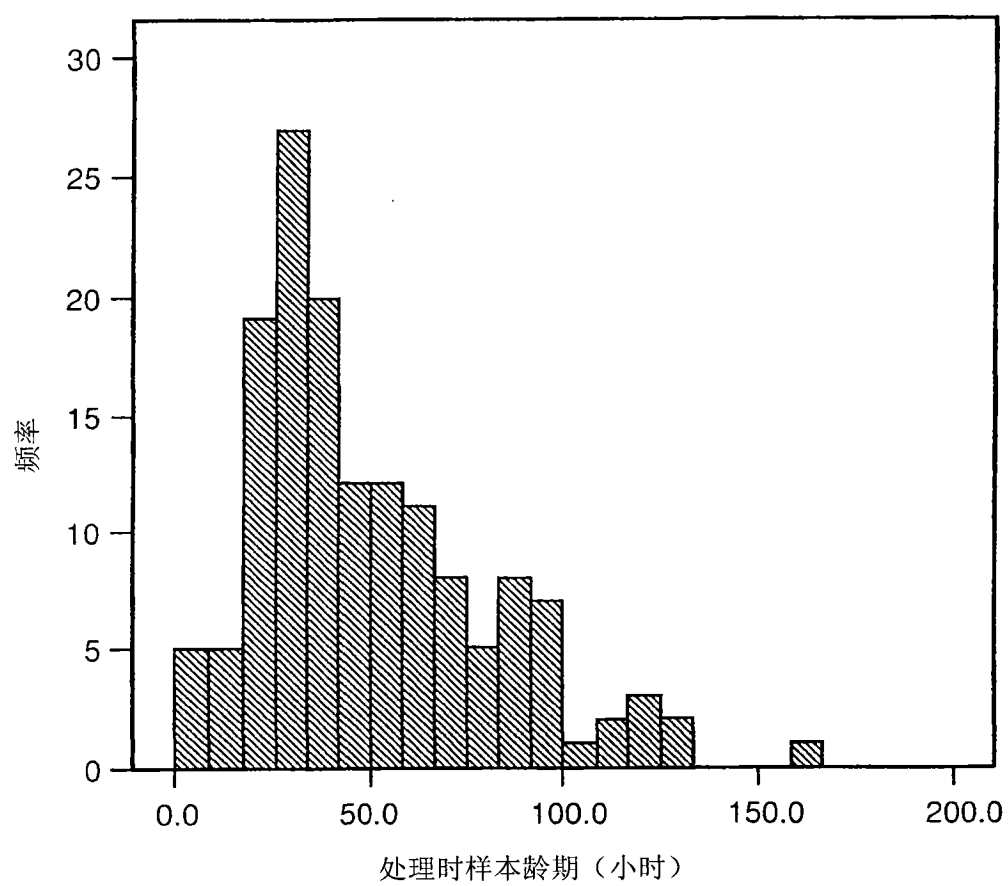


图 44