

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780047519.3

[51] Int. Cl.

C12N 5/08 (2006.01)
A61K 35/50 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61F 2/28 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 1 月 20 日

[11] 公开号 CN 101631852A

[22] 申请日 2007. 10. 23

[21] 申请号 200780047519.3

[30] 优先权

[32] 2006. 10. 23 [33] US [31] 60/853,971

[32] 2006. 10. 30 [33] US [31] 60/855,629

[32] 2007. 9. 28 [33] US [31] 60/997,022

[86] 国际申请 PCT/US2007/022545 2007. 10. 23

[87] 国际公布 WO2008/051568 英 2008. 5. 2

[85] 进入国家阶段日期 2009. 6. 22

[71] 申请人 人类起源公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 詹姆士·W·爱丁格

罗伯特·J·哈黎里 王佳伦

叶倩 克利斯登·S·拉巴左

马里安·佩雷拉

萨沙·道恩·阿布拉门逊

[74] 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司

代理人 武晶晶 郑霞

权利要求书 3 页 说明书 143 页 附图 26 页

[54] 发明名称

用胎盘细胞群治疗骨缺损的方法和组合物

[57] 摘要

本发明提供了使用贴壁胎盘干细胞和胎盘干细胞群的方法，培养、增殖和扩增该胎盘干细胞和胎盘干细胞群的方法。本发明还提供了分化所述胎盘干细胞的方法。本发明还提供了使用所述胎盘干细胞来配制适于给予个体的可移植或可注射组合物的方法。本发明还提供了用干细胞和包含干细胞的组合物治疗骨缺损的方法。

1. 生产具有矿化基质能力的成骨细胞的方法,该方法包括在所述干细胞分化为成骨细胞的条件下培养如权利要求1所述的多种干细胞或如权利要求12所述的分离的干细胞的群,所述培养维持足够时间以使所述成骨细胞产生可检测量的富含钙或磷酸盐的矿化基质。

2. 如权利要求1所述的方法,包括将所述细胞与地塞米松或抗坏血酸接触。

3. 制备基质的方法,该方法包括将非贴壁的 $CD34^{+}$ 和 $CD44^{+}$ 胎盘干细胞的群与可植入的支架底物组合,该可植入的支架底物为 β -磷酸三钙底物、 β -磷酸三钙-胶原蛋白底物、胶原蛋白底物、磷酸钙底物、矿化人胎盘胶原蛋白底物、透明质酸底物或陶瓷底物。

4. 配制可注射组合物的方法,该方法包括将非贴壁的 $CD34^{+}$ 、 $CD44^{+}$ 胎盘干细胞的群与可注射透明质酸或胶原蛋白组合。

5. 治疗个体骨缺损的方法,该方法包括给予有此需要的个体包含非贴壁干细胞群的可植入的或可注射的组合物,从而治疗该个体的骨缺损。

6. 如权利要求5所述的方法,其中所述骨缺损为与癌症有关的溶骨性损伤、骨折或需要融合的脊柱。

7. 如权利要求6所述的方法,其中所述溶骨性损伤与多发性骨髓瘤、骨

癌或转移癌有关。

8. 如权利要求6所述的方法，其中所述骨折为非联合骨折。

9. 如权利要求5所述的方法，其中所述可植入的组合物通过外科手术植入。

10. 如权利要求5所述的方法，其中将包含非贴壁干细胞群的可注射的组合物给予所述个体。

11. 如权利要求5所述的方法，其中所述可注射的组合物通过外科手术给予至骨缺损区域。

12. 如权利要求5所述的方法，其中所述可注射的组合物被系统地给予。

13. 制备基质的方法，该方法包括将干细胞群与可植入的支架底物组合，其中所述干细胞是 CD200⁺或 HLA-G⁺的，或 CD34⁺和 CD44⁻的。

14. 配制可注射的组合物方法，该方法包括将干细胞群与可注射的透明质酸或胶原蛋白组合，其中所述干细胞是 CD200⁺或 HLA-G⁺的，或 CD34⁺和 CD44⁻的。

15. 治疗个体骨缺损的方法，该方法包括给予有此需要的个体包含干细胞群的可植入的或可注射的组合物，其中所述干细胞是 CD200⁺或 HLA-G⁺的，或 CD34⁺和 CD44⁻的，从而治疗该个体的骨缺损。

16. 如权利要求 15 所述的方法, 其中所述骨缺损为与多发性骨髓瘤、骨癌或转移癌有关的溶骨性损伤、骨折或需要融合的脊柱。

17. 如权利要求 15 所述的方法, 其中将包含非贴壁干细胞群的可植入的组合物给予所述个体。

18. 如权利要求 17 所述的方法, 其中所述可植入的组合物通过外科手术植入。

19. 如权利要求 15 所述的方法, 其中将包含非贴壁干细胞群的可注射的组合物给予所述个体。

20. 如权利要求 19 所述的方法, 其中所述可注射的组合物被系统性地给药。

用胎盘细胞群治疗骨缺损的方法和组合物

1. 技术领域

本发明提供了分离的胎盘细胞，例如胎盘灌洗液，贴壁的和非贴壁的胎盘干细胞，胎盘干细胞群，包含该干细胞的组合物，获取该干细胞的方法，配制包含该干细胞的组合物的方法，和用该干细胞和组合物治疗骨缺损的方法。

2. 背景技术

人类干细胞是能够产生多种成熟的人体细胞系的全能或多潜能前体细胞。有证据表明，干细胞可以用来再生许多(如果不是所有)组织，并恢复生理学和解剖学功能。

许多不同类型的哺乳动物干细胞已经得到表征。例如，参见 Caplan 等人，美国专利号 5,486,359(人间充质干细胞)；Boyse 等人，美国专利号 5,004,681(胎儿和新生儿的造血干细胞和祖细胞)；Boyse 等人，U.S.5,192,553(同前)；Beltrami 等人，Cell 114(6):763-766 (2003)(心脏干细胞)；Forbes 等人，J. Pathol. 197(4):510-518 (2002)(肝干细胞)。脐血和取自脐带血的总有核细胞已被用于移植，以部分或全部恢复经历了消融疗法的患者的造血功能。

3. 发明概述

本发明提供了分离的胎盘细胞，例如胎盘灌洗液，贴壁的和非贴壁的胎盘干细胞，胎盘干细胞群，包含该细胞的组合物，获得该胎盘细胞的方法。

法，配制该组合物的方法，和用这些细胞治疗骨缺损的方法。

本发明提供了分离的干细胞和包含这种干细胞的细胞群，其中该干细胞存在于胎盘组织(例如羊膜、绒毛膜、胎盘小叶、脐带等)并可从中分离，它们在修复骨缺陷中 useful。胎盘干细胞表现出干细胞的一个或多个特征(例如表现出与干细胞相关的标记，在培养中以未分化状态复制至少 10-20 次，分化成代表三个胚层的成体细胞等)，并能贴壁到组织培养基质(例如组织培养塑料，如组织培养皿或多孔板的表面)上。

在一实施方案中，本发明提供了分离的非贴壁胎盘干细胞。在某些实施方案中，所述分离的干细胞是 CD34⁺的。在某些实施方案中，该分离的干细胞是 CD44⁻的。在某些实施方案中，该分离的干细胞是 CD34⁺和 CD44⁻的。在某些实施方案中，该分离的干细胞是 CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺或 CD166⁺的。在某些实施方案中，该分离的干细胞是 CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺和 CD166⁺的。在某些实施方案中，该分离的干细胞是 CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺或 CD200⁺的。在某些实施方案中，该分离的干细胞是 CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺和 CD200⁺的。在某些实施方案中，该分离的干细胞已经通过酶消化从人胎盘组织分离。在某些实施方案中，该分离的干细胞已经通过灌洗从人胎盘中分离。在某些实施方案中，当所述胎盘细胞群在允许矿化基质形成的条件下培养时，该分离的干细胞有利于在胎盘细胞群中形成矿化基质。

在另一实施方案中，本发明提供了分离的非贴壁胎盘细胞的群。在某些实施方案中，该细胞群包括 CD34⁺干细胞。在某些实施方案中，该细胞群包括 CD44⁻干细胞。在某些实施方案中，该细胞群包括 CD34⁺和 CD44⁻干细胞。在某些实施方案中，该细胞群包括 CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺或 CD166⁺干细胞。在某些实施方案中，该细胞群包括 CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺和 CD166⁺

干细胞。在某些实施方案中，该细胞群包括 $CD31^+$ 、 $CD117^+$ 、 $CD133^+$ 或 $CD200^+$ 干细胞。在某些实施方案中，该细胞群包括 $CD31^+$ 、 $CD117^+$ 、 $CD133^+$ 和 $CD200^+$ 干细胞。在某些实施方案中，该细胞群包括干细胞，其中至少有大约 70% 的所述细胞是 $CD34^+$ 和 $CD44^-$ 干细胞。在某些实施方案中，该细胞群包括干细胞，其中至少有大约 90% 的所述细胞是 $CD34^+$ 和 $CD44^-$ 干细胞。在某些实施方案中，该细胞群已经被扩增。在某些实施方案中，该细胞群已经被传代至少一次。在某些实施方案中，该细胞群已经被传代至少 5 次。在某些实施方案中，该细胞群已经被传代至少 10 次。在某些实施方案中，该细胞群已经被传代至少 20 次。在某些实施方案中，当所述胎盘细胞群在允许矿化基质形成的条件下培养时，该细胞群在胎盘细胞群中形成或有利于形成矿化基质。

在另一方面，本发明提供了分离的 $CD34^+$ 和 $CD44^-$ 胎盘干细胞的群。在某些实施方案中，该干细胞是 $CD9^+$ 、 $CD54^+$ 、 $CD90^+$ 或 $CD166^+$ 的。在某些实施方案中，该干细胞是 $CD9^+$ 、 $CD54^+$ 、 $CD90^+$ 和 $CD166^+$ 的。在某些实施方案中，该干细胞是 $CD31^+$ 、 $CD117^+$ 、 $CD133^+$ 或 $CD200^+$ 的。在某些实施方案中，干细胞是 $CD31^+$ 、 $CD117^+$ 、 $CD133^+$ 和 $CD200^+$ 的。在某些实施方案中，至少约 70% 的该干细胞是 $CD34^+$ 和 $CD44^-$ 干细胞。在某些实施方案中，至少约 90% 的该干细胞是 $CD34^+$ 和 $CD44^-$ 的干细胞。在某些实施方案中，该细胞群已经被扩增。在某些实施方案中，该细胞群已经被传代至少一次。在某些实施方案中，该细胞群已经被传代至少 5 次。在某些实施方案中，该细胞群已经被传代至少 10 次。在某些实施方案中，该细胞群已经被传代至少 20 次。在某些实施方案中，当所述胎盘细胞群在允许矿化基质形成的条件下培养时，该细胞群在胎盘细胞群中形成或有利于

形成矿化基质。

在一实施方案中，本发明提供了分离的 $CD200^{+}$ 或 $HLA-G^{+}$ 胎盘干细胞。在具体实施方案中，该干细胞是贴壁的。在另一具体实施方案中，所述细胞是 $CD200^{+}$ 和 $HLA-G^{+}$ 的。在具体实施方案中，所述干细胞是 $CD73^{+}$ 和 $CD105^{+}$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 或 $CD45^{-}$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 和 $CD45^{-}$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 、 $CD45^{-}$ 、 $CD73^{+}$ 和 $CD105^{+}$ 的。在另一具体实施方案中，当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时，所述干细胞有利于在包括胎盘干细胞的分离的胎盘细胞的群中形成一个或多个拟胚体。

在另一实施方案中，本发明提供了包括 $CD200^{+}$ 、 $HLA-G^{+}$ 干细胞的分离的胎盘细胞的群。在具体实施方案中，所述干细胞是贴壁的。在各种实施方案中，至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少在 90%、或至少约 95% 或以上的所述分离的胎盘细胞是 $CD200^{+}$ 、 $HLA-G^{+}$ 干细胞。在上述细胞群的一具体实施方案中，所述干细胞是 $CD73^{+}$ 和 $CD105^{+}$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 或 $CD45^{-}$ 的。在更具体的实施方案中，所述干细胞是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 、 $CD45^{-}$ 、 $CD73^{+}$ 和 $CD105^{+}$ 的。在其他具体实施方案中，所述细胞群已经被扩增，例如，传代至少一次、至少 3 次、至少 5 次、至少 10 次、至少 15 次、或至少 20 次。在另一具体实施方案中，所述细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时，形成一个或多个拟胚体。

在另一实施方案中，本发明提供了分离的 $CD73^{+}$ 、 $CD105^{+}$ 和 $CD200^{+}$ 胎盘干细胞。在具体实施方案中，所述干细胞是贴壁的。在另一具体实施方案

中,所述干细胞是 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在更具体的实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻和 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中,当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时,所述干细胞有利于在包括该干细胞的分离的胎盘细胞的群中形成一个或多个拟胚体。

在另一实施方案中,本发明提供了包括 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺干细胞的分离的胎盘细胞的群。在具体实施方案中,所述干细胞是贴壁的。在各种实施方案中,至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少在 90%、或至少约 95% 的所述分离的胎盘细胞为 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺干细胞。在所述细胞群的另一具体实施方案中,所述干细胞是 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在更具体的实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻和 HLA-G⁺的。在其他具体实施方案中,所述细胞群已经被扩增,例如,传代至少一次、至少 3 次、至少 5 次、至少 10 次、至少 15 次、或至少 20 次。在另一具体实施方案中,所述细胞群在允许拟胚体形成的条件下在培养中形成一个或多个拟胚体。

本发明还提供了 CD200⁺和 OCT-4⁺的分离的胎盘干细胞。在具体实施方案中,所述干细胞是贴壁的。在另一具体实施方案中,该干细胞是 CD73⁺和 CD105⁺的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在更具体的实施方案中,所述

干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中，当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时，所述干细胞有利于在包括胎盘干细胞的分离的胎盘细胞的群中形成一个或多个拟胚体。

在另一实施方案中，本发明提供了包括 CD200⁺、OCT-4⁺胎盘干细胞的分离的胎盘细胞的群。在具体实施方案中，所述干细胞是贴壁的。在各种实施方案中，至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、或至少约 95% 的所述分离的胎盘细胞为 CD200⁺、OCT-4⁺干细胞。在上述细胞群的具体实施方案中，所述干细胞是 CD73⁺和 CD105⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 HLA-G⁺。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在更具体的实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺的。在其他具体实施方案中，所述细胞群已经被扩增，例如，已经被传代至少一次、至少 3 次、至少 5 次、至少 10 次、至少 15 次、或至少 20 次。在另一具体实施方案中，所述细胞群在允许拟胚体形成的条件下的培养时形成一个或多个拟胚体。

在另一实施方案中，本发明提供分离的 CD73⁺和 CD105⁺胎盘干细胞，当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时，其有利于在包括所述干细胞的分离的胎盘细胞的群中形成一个或多个拟胚体。在具体实施方案中，所述干细胞是贴壁的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 OCT4⁺的。在更具体的实施方案中，所述干细胞是 OCT4⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。

本发明进一步提供了包括 CD73⁺、CD105⁺胎盘干细胞的分离的胎盘细胞的群，其中，所述细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时形成一个或多个拟胚体。在具体实施方案中，所述干细胞是贴壁的。在各种实施方案中，至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、或至少约 95%的所述分离的胎盘细胞为 CD73⁺、CD105⁺干细胞。在上述细胞群的具体实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 OCT-4⁺的。在更具体的实施方案中，所述干细胞是 OCT-4⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在其他具体实施方案中，所述细胞群已经被扩增，例如，已经被传代至少一次、至少 3 次、至少 5 次、至少 10 次、至少 15 次、或至少 20 次。

本发明还提供了分离的 CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺胎盘干细胞。在具体实施方案中，所述干细胞是贴壁的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 OCT-4⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 CD200⁺的。在另一更具体实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、OCT-4⁺和 CD200⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞在允许拟胚体形成的条件下培养时有利于在包括胎盘干细胞的分离的胎盘细胞的群中形成一个或多个拟胚体。

本发明还提供了 CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺胎盘干细胞的分离的胎盘干细胞的群。在具体实施方案中，该干细胞是贴壁的。在各种实施方案中，至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、或至少约 95%的所述分离的

胎盘细胞为 CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺干细胞。在上述细胞群的具体实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 OCT-4⁺的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD200⁺的。在另一更具体实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、OCT-4⁺和 CD200⁺的。在另一具体实施方案中,所述细胞群已经被扩增,例如,已经被传代至少一次、至少 3 次、至少 5 次、至少 10 次、至少 15 次、或至少 20 次。在另一具体实施方案中,所述细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时形成拟胚体。

本发明还提供了分离的 OCT-4⁺胎盘干细胞,在允许拟胚体形成的条件下培养时,其有利于在包括所述干细胞的分离的胎盘细胞的群中形成一个或多个拟胚体。在具体实施方案中,所述干细胞是贴壁的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD73⁺和 CD105⁺的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD200⁺的。在更具体的实施方案中,所述干细胞是 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。

本发明还提供了包括 OCT-4⁺胎盘干细胞的分离的胎盘细胞的群,其中,所述细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时形成一个或多个拟胚体。在具体实施方案中,所述干细胞是贴壁的。在各种实施方案中,至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、或至少约 95%的所述分离的胎盘细胞为 OCT-4⁺干细胞。在上述细胞群的具体实施方案中,所述干细胞是 CD73⁺和 CD105⁺的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻

的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 CD200⁺的。在更具体的实施方案中，所述干细胞是 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述细胞群已经被扩增，例如，被传代至少一次、至少 3 次、至少 5 次、至少 10 次、至少 15 次、或至少 20 次。

本发明进一步提供了本文所述的贴壁或非贴壁胎盘干细胞的分离群，该细胞群根据如下方法生成，该方法包括：灌洗已经排出了脐血并已经灌洗了的哺乳动物胎盘以除去残余血；用灌洗液灌洗所述胎盘；和收集所述灌洗液，其中灌洗后的所述灌洗液包括包含胎盘干细胞的胎盘细胞群；和从所述细胞群中分离多种所述胎盘干细胞。在具体实施方案中，该灌洗液流过脐静脉和脐动脉，然后在其从胎盘流出后收集。在另一具体实施方案中，所述灌洗液通过脐静脉，而从脐动脉收集，或通过脐动脉，而从脐静脉收集。

本发明进一步提供了分离的胎盘干细胞或分离的胎盘干细胞的群，如本文所述，其根据如下方法生成，该方法包括：用组织裂解酶消化胎盘组织以获得包括胎盘干细胞的胎盘细胞群，并从所述胎盘细胞的残余物中分离多种胎盘干细胞。在具体实施方案中，所述胎盘组织是整个胎盘、羊膜、绒毛膜、羊膜和绒毛膜的组合，或上述任意几项的组合。在其他具体实施方案中，该组织裂解酶是胰蛋白酶或胶原蛋白酶。

在更具体的实施方案中，本发明提供了分离的胎盘干细胞，其中所述干细胞相对于骨髓来源的间充质干细胞以可检测的更高水平表达一个或多个基因，其中所述一个或多个基因为 ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ATRS-1、B4GALT6、BCHE、C11orf9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPCR5B、ICAM1、IER3、IGFBP7、IL1A、IL6、IL18、KRT18、KRT8、LIPG、LRAP、

MATN2、MEST、NFE2L3、NUAK1、PCDH7、PDLIM3、PJP2、RTN1、SERPINB9、ST3GAL6、ST6GALNAC5、SLC12A8、TCF21、TGFB2、VTN 和/或 ZC3H12A，并且其中所述骨髓来源的干细胞已经进行过多次培养传代，其次数相当于所述胎盘干细胞的传代次数。在更具体的实施方案中，所述胎盘干细胞相对于骨髓来源的间充质干细胞以可检测的更高水平表达 ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ATRS-1、B4GALT6、BCHE、C11orf 9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPRC5B、ICAM1、IER3、IGFBP7、IL1A、IL6、IL18、KRT18、KRT8、LIPG、LRAP、MATN2、MEST、NFE2L3、NUAK1、PCDH7、PDLIM3、PJP2、RTN1、SERPINB9、ST3GAL6、ST6GALNAC5、SLC12A8、TCF21、TGFB2、VTN 和 ZC3H12A。

在更具体的实施方案中，本发明还提供了分离的胎盘干细胞的群，其中所述干细胞群相对于骨髓来源的间充质干细胞群以可检测的更高水平表达一个或多个基因，其中所述一个或多个基因为 ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ATRS-1、B4GALT6、BCHE、C11orf 9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPRC5B、ICAM1、IER3、IGFBP7、IL1A、IL6、IL18、KRT18、KRT8、LIPG、LRAP、MATN2、MEST、NFE2L3、NUAK1、PCDH7、PDLIM3、PJP2、RTN1、SERPINB9、ST3GAL6、ST6GALNAC5、SLC12A8、TCF21、TGFB2、VTN 和/或 ZC3H12A，并且其中所述骨髓来源的干细胞的群已经进行过多次培养传代，其次数相当于所述胎盘干细胞的传代次数，其中所述骨髓来源的干细胞的群具有与所述分离的干细胞的群相当的细胞数。在更具体的实施方案中，所述分离的干细胞的群相对于骨髓来源的间充质干细胞群以可检测的更高水

平表达 ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ATRS-1、B4GALT6、BCHE、C11orf9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPRC5B、ICAM1、IER3、IGFBP7、IL1A、IL6、IL18、KRT18、KRT8、LIPG、LRAP、MATN2、MEST、NFE2L3、NUAK1、PCDH7、PDLIM3、PJP2、RTN1、SERPINB9、ST3GAL6、ST6GALNAC5、SLC12A8、TCF21、TGFB2、VTN 和 ZC3H12A。

本发明还提供了包含一种或多种所述胎盘细胞，例如本发明所提供的胎盘灌洗液、胎盘灌洗细胞或胎盘干细胞的组合物，其中所述细胞已从胎盘分离。在优选实施方案中，所述包含胎盘细胞的组合物可用于修复骨缺损。因此，本发明提供了包含胎盘灌洗液，或从胎盘灌洗液中分离的细胞，例如来自胎盘灌洗液的总有核细胞的组合物。

在一方面，本发明提供了包含胎盘灌洗液或胎盘灌洗细胞，例如来自胎盘灌洗液的总有核细胞的组合物。

本发明进一步提供了包含胎盘干细胞的组合物，其中所述干细胞是分离的非贴壁胎盘干细胞。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD34⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD44⁻的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD34⁺和 CD44⁻的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺或 CD166⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺和 CD166⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺或 CD200⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺和 CD200⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞已通过酶消化从人胎盘中分离。在某些实施方案中，所述干细胞已通过灌洗从人胎盘分离。在某些实施方案中，当所述胎盘细胞群在允许矿化基质形成的条件下培养时，所述细胞有

利于在胎盘细胞群中形成矿化基质。

在另一个方面，本发明提供了包含胎盘干细胞的组合物，其中所述干细胞是分离的 $CD34^+$ 和 $CD44^-$ 干细胞。在某些实施方案中，所述干细胞是 $CD9^+$ 、 $CD54^+$ 、 $CD90^+$ 或 $CD166^+$ 的。在某些实施方案中，所述干细胞是 $CD9^+$ 、 $CD54^+$ 、 $CD90^+$ 和 $CD166^+$ 的。在某些实施方案中，所述干细胞是 $CD31^+$ 、 $CD117^+$ 、 $CD133^+$ 或 $CD200^+$ 的。在某些实施方案中，所述干细胞是 $CD31^+$ 、 $CD117^+$ 、 $CD133^+$ 和 $CD200^+$ 的。在某些实施方案中，所述干细胞已通过酶消化从人胎盘中分离。在某些实施方案中，所述干细胞已通过灌洗从人胎盘分离。在某些实施方案中，当所述胎盘细胞群在允许矿化基质形成的条件下培养时，所述细胞有利于在胎盘细胞群中形成矿化基质。

在某些实施方案中，所述组合物包含本发明所提供的分离的干细胞和诱导该干细胞分化成成骨细胞的化合物。在某些实施方案中，该组合物包含本发明所提供的分离的干细胞或分离的干细胞的群，和诱导所述干细胞群中的多种干细胞分化成成骨细胞的化合物。在某些实施方案中，这种化合物是地塞米松或抗坏血酸。

在某些实施方案中，本发明提供了包含分离的胎盘干细胞的组合物，其中所述干细胞是 $CD200^+$ 和 $HLA-G^+$ 的。在具体实施方案中，所述干细胞是贴壁的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $CD73^+$ 和 $CD105^+$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 或 $CD45^-$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的。在更具体的实施方案中，所述干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 、 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 和 $HLA-G^+$ 的。

在另一实施方案中，本发明提供了包含分离的胎盘干细胞的组合物，其

中所述干细胞是 $CD73^{+}$ 、 $CD105^{+}$ 和 $CD200^{+}$ 的。在具体实施方案中，所述干细胞是贴壁的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $HLA-G^{+}$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 或 $CD45^{-}$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 和 $CD45^{-}$ 的。在更具体的实施方案中，所述干细胞是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 、 $CD45^{-}$ 和 $HLA-G^{+}$ 的。

在另一实施方案中，本发明提供了包含分离的胎盘干细胞的组合物，其中所述干细胞是 $CD200^{+}$ 和 $OCT-4^{+}$ 的。在具体实施方案中，所述干细胞是贴壁的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $CD73^{+}$ 和 $CD105^{+}$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $HLA-G^{+}$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 或 $CD45^{-}$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 和 $CD45^{-}$ 的。在另一具体的实施方案中，所述干细胞是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 、 $CD45^{-}$ 、 $CD73^{+}$ 、 $CD105^{+}$ 和 $HLA-G^{+}$ 的。

在另一实施方案中，本发明提供了包含分离的 $CD73^{+}$ 和 $CD105^{+}$ 胎盘干细胞的组合物，其中，在允许拟胚体形成的条件下，所述干细胞有利于在包括所述干细胞的分离的胎盘细胞的群中形成拟胚体。在具体实施方案中，所述干细胞是贴壁的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 或 $CD45^{-}$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $OCT-4^{+}$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $CD200^{+}$ 的。在更具体的实施方案中，所述干细胞是 $OCT-4^{+}$ 、 $CD200^{+}$ 、 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 和 $CD45^{-}$ 的。

在又一实施方案中，本发明提供了包含分离的 $CD73^{+}$ 、 $CD105^{+}$ 和 $HLA-G^{+}$ 胎盘干细胞的组合物。在具体实施方案中，所述干细胞是贴壁的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 或 $CD45^{-}$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $OCT-4^{+}$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是

CD200⁺的。在更具体的实施方案中,所述干细胞是 OCT-4⁺、CD200⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。

在另一实施方案中,本发明提供了包含分离的 OCT-4⁺胎盘干细胞的组合物,其中,在允许拟胚体形成的条件下,所述干细胞有利于在包括所述干细胞的分离的胎盘细胞的群中形成拟胚体。在具体实施方案中,所述干细胞是 CD73⁺和 CD105⁺的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD200⁺的。在更具体的实施方案中,所述干细胞是 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。

本发明还提供了包含胎盘干细胞群的组合物,该干细胞相对于骨髓来源的间充质干细胞群以可检测的更高水平表达一个或多个基因,其中所述一个或多个基因选自: ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ATRS-1、B4GALT6、BCHE、C11orf 9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPC5B、ICAM1、IER3、IGFBP7、IL1A、IL6、IL18、KRT18、KRT8、LIPG、LRAP、MATN2、MEST、NFE2L3、NUAK1、PCDH7、PDLIM3、PJP2、RTN1、SERPINB9、ST3GAL6、ST6GALNAC5、SLC12A8、TCF21、TGFB2、VTN 和 ZC3H12A,并且其中所述骨髓来源的干细胞的群已经进行过多次培养传代,其次数相当于所述胎盘干细胞的传代次数。在上述组合物更具体的实施方案中,所述干细胞相对于骨髓来源的间充质干细胞群以可检测的更高水平表达 ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ATRS-1、B4GALT6、BCHE、C11orf 9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPC5B、ICAM1、IER3、IGFBP7、IL1A、IL6、IL18、KRT18、KRT8、LIPG、

LRAP、MATN2、MEST、NFE2L3、NUAK1、PCDH7、PDLIM3、PJP2、RTN1、SERPINB9、ST3GAL6、ST6GALNAC5、SLC12A8、TCF21、TGFB2、VTN和ZC3H12A,其中所述干细胞群与所述骨髓来源的间充质干细胞群具有相同的细胞数。

在另一具体实施方案中,任何上述组合物均包含基质。在更具体的实施方案中,所述基质是三维支架。在另一更具体的实施方案中,所述基质包括胶原蛋白、明胶、层连蛋白、纤连蛋白、果胶、鸟氨酸或玻连蛋白。在另一更具体的实施方案中,该基质是羊膜或源自羊膜的生物材料。在另一更具体的实施方案中,所述基质包括细胞外膜蛋白。在另一更具体的实施方案中,所述基质包括合成化合物。在另一更具体的实施方案中,所述基质包括生物活性化合物。在另一更具体的实施方案中,所述生物活性化合物是生长因子、细胞因子、抗体或小于5000道尔顿的有机分子。在某些实施方案中,该基体是合成的可降解聚合物,例如,聚乳酸和聚羟基乙酸。在某些实施方案中,该基质是可植入的支架底物。在某些实施方案中,该可植入的支架底物选自: β -磷酸三钙底物、 β -磷酸三钙-胶原蛋白底物、胶原蛋白底物、磷酸钙底物、矿化人胎盘胶原蛋白底物、透明质酸底物以及陶瓷底物。在某些实施方案中,该可植入的支架底物是 β -磷酸三钙底物。在某些实施方案中,该可植入的支架底物是 β -磷酸三钙-胶原蛋白底物。在某些实施方案中,该可植入的支架底物是胶原蛋白底物。在某些实施方案中,该可植入的支架底物是磷酸钙底物。在某些实施方案中,该可植入的支架底物是矿化人胎盘胶原蛋白底物。

在另一实施方案中,本发明还提供了包含由以上任何干细胞或以上任何干细胞群调节的培养基的组合物。在具体实施方案中,任何这样的组合物包含不是来自胎盘的干细胞。在更具体的实施方案中,所述干细胞是胚胎干细

胞。在另一更具体的实施方案中，所述干细胞是间充质干细胞。在另一更具体的实施方案中，所述干细胞是骨髓来源的干细胞。在另一更具体的实施方案中，所述干细胞是造血祖细胞。在另一更具体的实施方案中，所述干细胞是体细胞干细胞。在另一更具体的实施方案中，所述体细胞干细胞是神经干细胞、肝脏干细胞、胰腺干细胞、内皮干细胞、心脏干细胞或肌肉干细胞。

在另一方面，本发明提供了包含由本发明所提供的胎盘干细胞或胎盘干细胞群调节的培养基的组合物。在某些实施方案中，该组合物包含由细胞群，如本发明提供的干细胞群调节的培养基。

本发明还提供了生产细胞群的方法，该方法包括选择不贴壁到底物的细胞，并将所述细胞与其他细胞分离以形成细胞群。在某些实施方案中，该方法还包括选择表达 CD34 而不表达 CD44 的细胞，并增加例如与其他细胞分离的所述细胞的浓度，从而形成细胞群。

在某些实施方案中，本发明提供了生成细胞群的方法，该方法包括选择如下细胞，其(a)不贴壁到底物，(b)表达 CD34 而不表达 CD44，和(c)当所述胎盘细胞群在允许矿化基质形成的条件下培养时有利于在胎盘细胞群中形成矿化基质；和从其他细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在某些实施方案中，所述底物包括纤连蛋白。

在某些实施方案中，所述方法还包括选择表达 CD9、CD29、CD54、CD90、CD166 或上述的组合的细胞。

在某些实施方案中，所述方法还包括选择表达 CD31、CD34、CD117、CD133、CD200 或上述的组合的细胞。

在某些实施方案中，用抗体进行所述选择。在某些实施方案中，用流式细胞仪进行所述选择。在某些实施方案中，用磁性小珠进行所述选择。在某

些实施方案中，用荧光激活细胞分类术进行所述选择。在某些实施方案中，扩增所述细胞群。

在另一方面，本发明提供了非贴壁胎盘干细胞的群，其中，所述细胞已经被冷藏，且所述细胞群被装在容器中。在某些实施方案中，所述干细胞为 $CD34^+$ 和 $CD44^-$ 的。在某些实施方案中，所述细胞被冷藏，且其中所述群被装在容器中，和其中所述干细胞在允许矿化基质形成的条件下培养时形成矿化基质。在某些实施方案中，所述容器是适于静脉内输液的袋。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^6 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 5×10^6 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^7 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 5×10^7 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^8 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 5×10^8 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^9 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 5×10^9 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^{10} 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述干细胞传代不超过 5 次。在某些实施方案中，所述干细胞传代不超过 10 次。在某些实施方案中，所述干细胞传代不超过 15 次。在某些实施方案中，所述干细胞传代不超过 20 次。在某些实施方案中，所述干细胞已经在所述容器内被扩增。在某些实施方案中，所述细胞群被装在 0.9% NaCl 溶液中。

在另一方面，本发明提供了能矿化基质的成骨细胞的生成方法，该方法包括在所述干细胞分化成成骨细胞的条件下，培养本发明所提供的多种干细胞或多种干细胞群，所述培养时间为足以使所述成骨细胞产生或有利于产生可检测量的富含钙和/或磷的矿化基质。在某些实施方案中，所述成骨

细胞生成骨。

在又一方面，本发明提供了制备基质的方法，该方法包括将本发明所提供的干细胞群与可植入的支架底物组合。在某些实施方案中，所述干细胞是非贴壁的。在某些实施方案中，所述干细胞是CD34⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞是CD44⁻的。在某些实施方案中，所述干细胞是CD34⁺和CD44⁻的。在某些实施方案中，所述干细胞是CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺或CD166⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞是CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺和CD166⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞是CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺或CD200⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞是CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺和CD200⁺的。在某些实施方案中，至少大约70%的所述干细胞为CD34⁺和CD44⁻干细胞。在某些实施方案中，至少大约90%的所述干细胞为CD34⁺和CD44⁻干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^6 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 5×10^6 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^7 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 5×10^7 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^8 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 5×10^8 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^9 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 5×10^9 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^{10} 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述干细胞已经被传代至少、大约或不超过5次。在某些实施方案中，所述干细胞已经被传代至少、大约或不超过10次。在某些实施方案中，所述干细胞已经被传代至少、大约或不超过15次。在某些实施方案中，所述干细胞已经被传代至少、大约或不超过20次。在某些实施方案中，所述细胞群已经被扩增。

在某些实施方案中，所述可植入的支架底物选自 β -磷酸三钙底物、 β -磷酸三钙-胶原蛋白底物、胶原蛋白底物、磷酸钙底物、矿化人胎盘胶原蛋白底物、透明质酸底物以及陶瓷底物。在某些实施方案中，所述该可植入的支架底物是 β -磷酸三钙底物。在某些实施方案中，该可植入的支架底物是 β -磷酸三钙-胶原蛋白底物。在某些实施方案中，该可植入的支架底物是胶原蛋白底物。在某些实施方案中，该可植入的支架底物是磷酸钙底物。在某些实施方案中，该可植入的支架底物是矿化人胎盘胶原蛋白底物。

在又一方面，本发明提供了配制可注射组合物的方法，该方法包括将胎盘干细胞群与可注射的透明质酸或胶原蛋白组合。在某些实施方案中，所述干细胞是非贴壁的。在某些实施方案中，所述干细胞是 $CD34^+$ 的。在某些实施方案中，所述干细胞是 $CD44^-$ 的。在某些实施方案中，所述干细胞是 $CD34^+$ 和 $CD44^-$ 的。在某些实施方案中，所述干细胞是 $CD9^+$ 、 $CD54^+$ 、 $CD90^+$ 或 $CD166^+$ 的。在某些实施方案中，所述干细胞是 $CD9^+$ 、 $CD54^+$ 、 $CD90^+$ 和 $CD166^+$ 的。在某些实施方案中，所述干细胞是 $CD31^+$ 、 $CD117^+$ 、 $CD133^+$ 或 $CD200^+$ 的。在某些实施方案中，所述干细胞是 $CD31^+$ 、 $CD117^+$ 、 $CD133^+$ 和 $CD200^+$ 的。在某些实施方案中，至少大约70%的所述干细胞为 $CD34^+$ 和 $CD44^-$ 干细胞。在某些实施方案中，至少大约90%的所述干细胞为 $CD34^+$ 和 $CD44^-$ 干细胞。在某些其他实施方案中，所述胎盘干细胞是贴壁的。在某些具体实施方案中，所述胎盘干细胞是 $CD200^+$ 和 $HLA-G^+$ 的； $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 $CD200^+$ 的； $CD200^+$ 和 $OCT-4^+$ 的； $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 $HLA-G^+$ 的； $CD73^+$ 和 $CD105^+$ 的，且当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时，其有利于在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个拟胚体；或者 $OCT-4^+$ 的且当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时，其有利于

在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个拟胚体；或其任意组合。

在某些非贴壁胎盘干细胞更具体的实施方案中，所述分离的 $CD200^+$ 、 $HLA-G^+$ 干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 、 $CD73^+$ 和 $CD105^+$ 的；所述分离的 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 $CD200^+$ 干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 和 $HLA-G^+$ 的；所述分离的 $CD200^+$ 、 $OCT-4^+$ 干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 、 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 $HLA-G^+$ 的；如权利要求1所述的分离的干细胞，其中所述 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 $HLA-G^+$ 干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD45^-$ 、 $OCT-4^+$ 和 $CD200^+$ 的；有利于一个或多个拟胚体形成的所述分离的 $CD73^+$ 和 $CD105^+$ 干细胞是 $OCT-4^+$ 、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的；和/或所述 $OCT-4^+$ 的且有利于一个或多个拟胚体形成的分离的干细胞是 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的。在某些实施方案中，所述胎盘细胞群已经被扩增。在某些实施方案中，所述组合物包含可注射透明质酸。在某些实施方案中，所述组合物包含可注射胶原蛋白。本发明还提供了包含非贴壁干细胞和可注射透明质酸或可注射胶原蛋白的组合物。

在另一方面，本发明提供了治疗个体骨缺损的方法，该方法包括向有此需要的个体给予包含本发明所提供的干细胞群的可植入或可注射组合物，从而治疗该个体的骨缺损。在某些实施方案中，所述骨缺损是与癌症有关的溶骨性损伤、骨折、或脊柱如需要融合的脊柱。在某些实施方案中，所述溶骨性损伤与多发性骨髓瘤、骨癌或转移性癌有关。在某些实施方案中，所述骨折是非联合性骨折。在某些实施方案中，将包含非贴壁干细胞群的可植入组合物给予所述个体。在某些实施方案中，可植入组合物通过外科手术植入，如植入到骨缺损部位。在某些实施方案中，将包含非贴壁干细胞群的可注射组合物给予所述个体。在某些实施方案中，可注射组合物通过

外科手术给予到骨缺损区域。在某些实施方案中，将可注射组合物系统性给药。

在某些实施方案中，所述干细胞是非贴壁的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD34⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD44⁻的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD34⁺和 CD44⁻的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺或 CD166⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺和 CD166⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺或 CD200⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺和 CD200⁺的。在某些实施方案中，至少大约 70% 的所述干细胞为 CD34⁺和 CD44⁻干细胞。在某些实施方案中，至少大约 90% 的所述干细胞为 CD34⁺和 CD44⁻干细胞。在某些其他实施方案中，所述胎盘干细胞是贴壁的。在某些具体实施方案中，所述胎盘干细胞是 CD200⁺和 HLA-G⁺的；CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺的；CD200⁺和 OCT-4⁺的；CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺的；CD73⁺和 CD105⁺的，且当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时，其有利于在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个拟胚体；或者 OCT-4⁺的且当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时，其有利于在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个拟胚体；或其任意组合。在某些非贴壁胎盘干细胞更具体的实施方案中，所述分离的 CD200⁺、HLA-G⁺干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺和 CD105⁺的；所述分离的 CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻和 HLA-G⁺的；所述分离的 CD200⁺、OCT-4⁺干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺的；如权利要求 1 所述的分离的干细胞，其中所述 CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺干细胞是 CD34⁻、CD45⁻、OCT-4⁺和 CD200⁺

的；有利于一个或多个拟胚体形成的所述分离的 $CD73^+$ 和 $CD105^+$ 干细胞是 $OCT-4^+$ 、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的；和/或所述 $OCT-4^+$ 的且有利于一个或多个拟胚体形成的分离的干细胞是 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的。在某些实施方案中，所述细胞群已经被扩增。

在另一个方面，本发明提供了生成细胞群的方法，该方法包括选择如下细胞，其 a) 贴壁到底物，和 b) 表达 $CD34$ 而不表达 $CD44$ ，和从其他细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在某些实施方案中，该方法还包括从其他细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在某些实施方案中，生成细胞群的该方法包括选择如下细胞，其(a)贴壁到底物，(b)表达 $CD34$ 而不表达 $CD44$ ，和(c)当所述胎盘细胞群在允许矿化基质形成的条件下培养时，有利于在胎盘细胞群中形成矿化基质；和从其他细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在某些实施方案中，所述底物包括纤连蛋白。在某些实施方案中，本发明提供了生成细胞群的方法，该方法包括选择如下细胞，其 a) 不贴壁到底物，和 b) 表达 $CD34$ 而不表达 $CD44$ ，和从其他细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在某些实施方案中，所述方法还包括从其他细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在某些实施方案中，生成细胞群的该方法包括选择如下细胞，其(a)不贴壁到底物，(b)表达 $CD34$ 而不表达 $CD44$ ，和(c)当所述胎盘细胞群在允许矿化基质形成的条件下培养时，有利于在胎盘细胞群中形成矿化基质；和从其他细胞中分离所述细胞形成细胞群。在某些实施方案中，所述底物包括纤连蛋白。在某些实施方案中，所述方法包括选择表达至少以下之一的细胞： $CD9$ 、 $CD29$ 、 $CD54$ 、 $CD90$ 、 $CD166$ 或以上的结合。在某些实施方案中，所述方法包括选择表达至少以下之一的细胞： $CD31$ 、 $CD34$ 、 $CD117$ 、 $CD133$ 、 $CD200$ 或以上的结合。

在某些实施方案中，用抗体进行所述选择。在某些实施方案中，用流式细胞仪进行所述选择。在某些实施方案中，用磁性小珠进行所述选择。在某些实施方案中，用荧光激活细胞分类法进行所述选择。在某些实施方案中，扩增所述细胞群。

在某些实施方案中，所述干细胞为 CD34⁺和 CD44⁻的，其中所述细胞被冷藏，且其中所述细胞群被装在容器中。在某些实施方案中，所述细胞被冷藏，且其中所述细胞群被装在容器中，和其中所述干细胞在允许矿化基质形成的条件下培养时形成矿化基质。

在某些实施方案中，所述容器是适于静脉内输液的袋。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^6 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 5×10^6 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^7 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 5×10^7 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^8 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 5×10^8 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^9 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 5×10^9 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^{10} 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述干细胞传代不超过 5 次。在某些实施方案中，所述干细胞传代不超过 10 次。在某些实施方案中，所述干细胞传代不超过 15 次。在某些实施方案中，所述干细胞传代不超过 20 次。在某些实施方案中，所述干细胞已经在所述容器内被扩增。在某些实施方案中，所述细胞群被装在 0.9% NaCl 溶液中。

在另一方面，本发明提供了生成成骨细胞的方法，该方法包括在所述干细胞分化成成骨细胞的条件下，培养多种胎盘干细胞或多种分离的胎盘干

细胞的群，所述培养时间为足以使所述成骨细胞产生或有利于产生可检测量的矿化基质。

在又一方面，本发明提供制备基质的方法，该方法包括将胎盘干细胞群与可植入的支架底物组合，其中所述干细胞是 $CD34^+$ 和 $CD44^-$ 的。在某些实施方案中，所述干细胞是 $CD9^+$ 、 $CD54^+$ 、 $CD90^+$ 或 $CD166^+$ 的。在某些实施方案中，所述干细胞是 $CD9^+$ 、 $CD54^+$ 、 $CD90^+$ 和 $CD166^+$ 的。在某些实施方案中，所述干细胞是 $CD31^+$ 、 $CD117^+$ 、 $CD133^+$ 或 $CD200^+$ 的。在某些实施方案中，所述干细胞是 $CD31^+$ 、 $CD117^+$ 、 $CD133^+$ 和 $CD200^+$ 的。在某些实施方案中，至少大约 70% 的所述干细胞为 $CD34^+$ 和 $CD44^-$ 干细胞。在某些实施方案中，至少大约 90% 的所述干细胞为 $CD34^+$ 和 $CD44^-$ 干细胞。在某些实施方案中，所述干细胞是贴壁的。在具体实施方案中，所述贴壁胎盘干细胞是 $CD200^+$ 和 $HLA-G^+$ 的； $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 $CD200^+$ 的； $CD200^+$ 和 $OCT-4^+$ 的； $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 $HLA-G^+$ 的； $CD73^+$ 和 $CD105^+$ 的，且当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时，其有利于在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个拟胚体；或者 $OCT-4^+$ 的且当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时，其有利于在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个拟胚体；或其任意组合。在某些非贴壁胎盘干细胞更具体的实施方案中，所述分离的 $CD200^+$ 、 $HLA-G^+$ 干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 、 $CD73^+$ 和 $CD105^+$ 的；所述分离的 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 $CD200^+$ 干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 和 $HLA-G^+$ 的；所述分离的 $CD200^+$ 、 $OCT-4^+$ 干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 、 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 $HLA-G^+$ 的；如权利要求 1 所述的分离的干细胞，其中所述 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 $HLA-G^+$ 干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD45^-$ 、 $OCT-4^+$ 和 $CD200^+$ 的；有利于一个或多个拟胚体形成的所述分离的 $CD73^+$ 和 $CD105^+$ 干

细胞是 OCT-4⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的；和/或所述 OCT-4⁺的且有利于一个或多个拟胚体形成的分离的干细胞是 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^6 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 5×10^6 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^7 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 5×10^7 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^8 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 5×10^8 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^9 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 5×10^9 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^{10} 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述干细胞传代不超过 5 次。在某些实施方案中，所述干细胞传代不超过 10 次。在某些实施方案中，所述干细胞传代不超过 15 次。在某些实施方案中，所述干细胞传代不超过 20 次。在某些实施方案中，所述细胞群已经被扩增。

在某些实施方案中，上述可植入的支架底物选自： β -磷酸三钙底物、 β -磷酸三钙-胶原蛋白底物、胶原蛋白底物、磷酸钙底物、矿化人胎盘胶原蛋白底物和透明质酸底物。在某些实施方案中，该可植入的支架底物是 β -磷酸三钙底物。在某些实施方案中，该可植入的支架底物是 β -磷酸三钙-胶原蛋白底物。在某些实施方案中，该可植入的支架底物是胶原蛋白底物。在某些实施方案中，该可植入的支架底物是磷酸钙底物。在某些实施方案中，该可植入的支架底物是矿化人胎盘胶原蛋白底物和/或支架。

在又一方面，本发明提供了配制可注射组合物的方法，该方法包括将胎盘干细胞群与可注射的透明质酸或胶原蛋白组合，其中所述干细胞是 CD34⁺和 CD44⁻的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺或

CD166⁺的。在某些实施方案中,所述干细胞是 CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺和 CD166⁺的。在某些实施方案中,所述干细胞是 CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺或 CD200⁺的。在某些实施方案中,所述干细胞是 CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺和 CD200⁺的。在某些实施方案中,至少大约 70%的所述干细胞为 CD34⁺和 CD44⁻干细胞。在某些实施方案中,至少大约 90%的所述干细胞为 CD34⁺和 CD44⁻干细胞。在某些实施方案中,所述细胞群已经被扩增。在某些实施方案中,所述干细胞是贴壁的。在某些实施方案中,所述组合物包含可注射的透明质酸。在某些实施方案中,所述组合物包含可注射的胶原蛋白。本发明还提供了包含非贴壁干细胞群和可注射的透明质酸或胶原蛋白的组合物。

在又一方面,本发明还提供了治疗个体骨缺损的方法,其包括向有此需要的个体给予包含干细胞群的可植入或可注射组合物,其中所述干细胞是 CD34⁺和 CD44⁻的,从而治疗个体的骨缺损。在某些实施方案中,所述骨缺损是(a)与癌症有关的溶骨性损伤,(b)骨折,或(c)需要融合的脊柱。在某些实施方案中,所述溶骨性损伤与多发性骨髓瘤、骨癌或转移性癌有关。在某些实施方案中,所述骨折是非联合性骨折。在某些实施方案中,将包含非贴壁干细胞群的可植入组合物给予所述个体。在某些实施方案中,可植入组合物通过外科手术植入。在某些实施方案中,将包含非贴壁干细胞群的可注射组合物给予所述个体。在某些实施方案中,可注射组合物通过外科手术给予到骨缺损区域。在某些实施方案中,将可注射组合物系统性给药。

在某些实施方案中,所述干细胞是 CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺或 CD166⁺的。在某些实施方案中,所述干细胞是 CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺和 CD166⁺的。在某些实施方案中,所述干细胞是 CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺或 CD200⁺的。在某些实施方案中,所述干细胞是 CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺和 CD200⁺的。在

某些实施方案中，至少大约 70% 的所述干细胞为 $CD34^+$ 和 $CD44^-$ 干细胞。在某些实施方案中，至少大约 90% 的所述干细胞为 $CD34^+$ 和 $CD44^-$ 干细胞。在某些实施方案中，所述细胞群已被扩增。

在又一方面，本发明还提供了治疗个体骨缺损的方法，该方法包括向有此需要的个体给予包含干细胞群的可植入或可注射组合物，其中，所述干细胞是 $CD34^-$ 的，从而治疗个体的骨缺损。在某些实施方案中，所述骨缺损是 (a) 与癌症有关的溶骨性损伤，(b) 骨折，或 (c) 需要融合的脊柱。在某些实施方案中，所述溶骨性损伤与多发性骨髓瘤、骨癌或转移性癌有关。在某些实施方案中，所述骨折是非联合性骨折。在某些实施方案中，将包含贴壁干细胞群的可植入组合物给予所述个体。在某些实施方案中，可植入组合物通过外科手术植入。在某些实施方案中，将包含贴壁干细胞群的可注射组合物给予所述个体。在某些实施方案中，可注射组合物通过外科手术给予到骨缺损区域。在某些实施方案中，将可注射组合物系统性给药。

在非贴壁胎盘干细胞的更具体的实施方案中，所述分离的 $CD200^+$ 、HLA-G⁺ 干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 、 $CD73^+$ 和 $CD105^+$ 的；所述分离的 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 $CD200^+$ 干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 和 HLA-G⁺ 的；所述分离的 $CD200^+$ 、OCT-4⁺ 干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 、 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 HLA-G⁺ 的；如权利要求 1 所述的分离的干细胞，其中所述 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 HLA-G⁺ 干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD45^-$ 、OCT-4⁺ 和 $CD200^+$ 的；有利于一个或多个拟胚体形成的所述分离的 $CD73^+$ 和 $CD105^+$ 干细胞是 OCT-4⁺、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的；和/或所述 OCT-4⁺ 的且有利于一个或多个拟胚体形成的分离的干细胞是 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的。在某些实施方案中，所述细胞群包括 1×10^6 个所述干细胞。在某些实施方案中，所述

细胞群包括 5×10^6 个所述干细胞。在某些实施方案中,所述细胞群包括 1×10^7 个所述干细胞。在某些实施方案中,所述细胞群包括 5×10^7 个所述干细胞。在某些实施方案中,所述细胞群包括 1×10^8 个所述干细胞。在某些实施方案中,所述细胞群包括 5×10^8 个所述干细胞。在某些实施方案中,所述细胞群包括 1×10^9 个所述干细胞。在某些实施方案中,所述细胞群包括 5×10^9 个所述干细胞。在某些实施方案中,所述细胞群包括 1×10^{10} 个所述干细胞。在某些实施方案中,所述干细胞传代不超过 5 次。在某些实施方案中,所述干细胞传代不超过 10 次。在某些实施方案中,所述干细胞传代不超过 15 次。在某些实施方案中,所述干细胞传代不超过 20 次。在某些实施方案中,所述细胞群已经被扩增。

本发明还提供了生产哺乳动物胎盘来源的干细胞群的方法。在一实施方案中,例如,本发明提供了生产细胞群的方法,该方法包括选择如下细胞,其 a)贴壁到底物,和 b)表达 CD200 和 HLA-G; 和从其他细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中,本发明提供了生产细胞群的方法,该方法包括选择如下细胞,其(a)贴壁到底物,和(b)表达 CD73、CD105 和 CD200; 和从其他细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中,本发明提供了生产细胞群的方法,该方法包括选择如下细胞,其(a)贴壁到底物,和(b)表达 CD200 和 OCT-4; 和从其他细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中,本发明提供了生产细胞群的方法,该方法包括选择如下细胞,其(a)贴壁到底物,和(b)表达 CD73 和 CD105, 和(c)当在允许拟胚体形成的条件下与胎盘细胞群一起培养时,有利于一个或多个拟胚体的形成; 从其他细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中,本发明提供了生产细胞群的方法,该方法包括选择如下细胞,其(a)贴壁到底物,和(b)表达

CD73、CD105 和 HLA-G；和从其他细胞中分离所述细胞以形成细胞群。本发明还提供了生产细胞群的方法，该方法包括选择如下细胞，其(a)贴壁到底物，(b)表达 OCT-4，和(c)当在允许拟胚体形成的条件下与胎盘细胞群一起培养时，有利于一个或多个拟胚体的形成；和从其他细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在以上任何方法的具体实施方案中，所述底物包括纤连蛋白。在另一具体实施方案中，该方法包括选择表达 ABC-p 的细胞。在另一具体实施方案中，该方法包括选择表现出间充质干细胞特有的至少一种特征的细胞。在更具体的实施方案中，所述间充质干细胞特有的特征是表达 CD29、表达 CD44、表达 CD90、或者以上组合。在所述方法的另一具体实施方案中，用抗体进行所述选择。在另一更具体的实施方案中，用流式细胞仪进行所述选择。在另一具体实施方案中，用磁性小珠进行所述选择。在另一具体实施方案中，用荧光激活细胞分类法进行所述选择。在以上方法的另一具体实施方案中，扩增所述细胞群。

本发明还提供了生产细胞系的方法，该方法包括用编码生长-启动蛋白质的 DNA 序列转化干细胞；和将所述干细胞暴露在促进所述生长-启动蛋白质生成的条件下。在具体实施方案中，所述生长-启动蛋白质是 v-myc、N-myc、c-myc、p53、SV40 大 T 抗原、多瘤病毒大 T 抗原、Ela 腺病毒或人乳头状瘤病毒 E7 蛋白。在更具体的实施方案中，所述 DNA 序列是可调节的。在更具体的实施方案中，所述 DNA 序列可被四环素调节。在另一具体实施方案中，所述生长-启动蛋白质具有可调节活性。在另一具体的实施方案中，所述生长-启动蛋白质是温度敏感型突变体。

本发明还提供了冷藏的干细胞群。例如，本发明提供了 CD200⁺和 HLA-G⁺干细胞群，其中所述细胞已经被冷藏，且其中所述细胞群被装在容器中。本

发明还提供了 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 干细胞群，其中所述干细胞已经被冷藏，且其中所述细胞群被装在容器中。本发明还提供了 $CD200^+$ 、 $OCT-4^+$ 干细胞群，其中所述干细胞已经被冷藏，且其中所述细胞群被装在容器中。本发明还提供了 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 干细胞群，其中所述细胞已经被冷藏，且其中所述细胞群被装在容器中，和其中当所述干细胞在允许拟胚体形成的条件下与胎盘干细胞群一起培养时，有利于一个或多个拟胚体的形成。本发明还提供了 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 、 $HLA-G^+$ 干细胞群，其中所述细胞已经被冷藏，且其中所述细胞群被装在容器中。本发明还提供了 $OCT-4^+$ 干细胞群，其中所述细胞已经被冷藏，且其中所述细胞群被装在容器中，和当所述干细胞在允许拟胚体形成的条件下与胎盘干细胞群一起培养时，有利于一个或多个拟胚体的形成。在任何上述的冷藏细胞群的具体实施方案中，所述容器是袋。在各种具体实施方案中，所述细胞群包括大约、至少或最多 1×10^6 个所述干细胞、 5×10^6 个所述干细胞、 1×10^7 个所述干细胞、 5×10^7 个所述干细胞、 1×10^8 个所述干细胞、 5×10^8 个所述干细胞、 1×10^9 个所述干细胞、 5×10^9 个所述干细胞、或 1×10^{10} 个所述干细胞。在任何上述冷藏细胞群的其他具体实施方案中，所述干细胞已经传代大约、至少或不超过 5 次，不超过 10 次，不超过 15 次，或不超过 20 次。在任何上述冷藏细胞群的另一具体实施方案中，所述干细胞在所述容器中已经被扩增。

本发明还包括制备矿化胶原蛋白基质的方法，该方法包括矿化胶原蛋白并将该矿化的胶原蛋白基质进行交联。在某些实施方案中，所述胶原蛋白是胎盘胶原蛋白。在某些实施方案中，所述胶原蛋白用磷酸钙进行矿化。在某些实施方案中，所述胶原蛋白用丁二醇二缩水甘油醚进行交联。在某些实施方案中，在矿化反应中磷酸钙与胶原蛋白的比例为 5 : 95、10 : 90、15 : 85、

20 : 80、25 : 75、30 : 70、35 : 65、40 : 60、45 : 55、50 : 50、55 : 45、60 : 40、65 : 35、70 : 30、75 : 25、80 : 20、85 : 15、90 : 10 或 95 : 5。

3.1. 定义

如本文所用的术语“SH2”是指结合标记 CD105 上的抗原决定部位的抗体。因此，称作 SH2⁺的细胞是 CD105⁺的。

如本文所用的术语“SH3”和“SH4”是指结合标记 CD73 上的抗原决定部位的抗体。因此，称作 SH3⁺和/或 SH4⁺的细胞是 CD73⁺的。

如本文所用的术语“分离的干细胞”是指基本上与该干细胞所来源的组织如胎盘的其他非干细胞分离的干细胞。如果从所述干细胞中除去，例如在收集和/或培养该干细胞时除去了至少大约 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或至少 99%的与该干细胞天然相关的非干细胞，则该干细胞是“分离的”。

如本文所用的术语“分离的细胞的群”是指基本上与该细胞群所来源的组织如胎盘的其他细胞分离的细胞的群。如果从所述干细胞中除去，例如在收集和/或培养该干细胞时除去了至少大约 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或至少 99%的与所述细胞群或来源于该细胞群的细胞天然相关的细胞，则该干细胞是“分离的”。

如本文所用的术语“胎盘干细胞”是指来源于哺乳动物胎盘的干细胞或祖细胞，不考虑其形态、细胞表面标记或原代培养后的传代次数。然而，如本文所用的术语“胎盘干细胞”并不指滋养母细胞。如果细胞具有干细胞的至少一个特点，则该细胞被认为是“干细胞”，该特点例如与一种或多种干细胞相关的标记或基因表达图谱；在培养中复制至少 10-40 次的的能力，分化成三种胚层细胞的能力；缺少成体(即已分化)细胞的特征等等。术语“胎盘干细胞”和“胎盘来源的干细胞”可互换使用。

如本文所用的术语“胎盘灌洗液”是指已经流过胎盘如人胎盘的至少一部分如脉管系统的灌洗液，其包含在灌洗液流过胎盘的过程中所收集的多种细胞。

如本文所用的术语“胎盘灌洗细胞”是指有核细胞，如从或可从胎盘灌洗液中分离的总有核细胞。

如本文所用，当某个具体标记是可检测的，则干细胞对于该具体标记来说为“阳性的”。例如，胎盘干细胞是例如 CD73 阳性的，因为 CD73 在胎盘干细胞上以可检测的大于背景(与如同型对照相比)的量而可检测。当标记存在于所述细胞或被所述细胞表达且可用于将该细胞与至少另外一种细胞类型区别开或可用于选择或分离该细胞时，该细胞对于该标记来说是阳性的。

如本文所用，“成骨细胞”是能够沉积骨的主要成分羟磷灰石或能够分化成能沉积羟磷灰石的细胞的细胞。具体地，“成骨细胞”预期包括通常称作成骨细胞或骨细胞的细胞。

如本文所用，“基质”是指三维底物，其特征为具有分散在整个底物中的空隙。所述空隙适于在基质内例如生长细胞，如干细胞，胎盘来源的贴壁干细胞和/或成骨细胞。示例性基质包括但不限于 β -磷酸三钙底物、 β -磷酸三钙-胶原蛋白底物、胶原蛋白底物、磷酸钙底物、矿化人胎盘胶原蛋白底物、透明质酸底物以及陶瓷底物。优选地，该基质被基质空隙中存在的成骨细胞矿化。

4. 附图说明

图 1: 来自灌洗液(A)、羊膜(B)、绒毛膜(C)、羊膜-绒毛膜板(D)或脐带(E)的胎盘干细胞的存活力。X 轴上的数字表示得到干细胞的胎盘。

图 2: 通过 FACS Calibur 测得的来自灌洗液(A)、羊膜(B)、绒毛膜(C)、

羊膜-绒毛膜板(D)或脐带(E)的 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺细胞的百分比。X 轴上的数字表示得到干细胞的胎盘。

图 3: 通过 FACS Aria 测得的来自灌洗液(A)、羊膜(B)、绒毛膜(C)、羊膜-绒毛膜板(D)或脐带(E)的 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺细胞百分比。X 轴上的数字表示得到干细胞的胎盘。

图 4: 从胎盘灌洗液得到的干细胞中的 HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200 表达。

图 5: 从羊膜得到的干细胞中的 HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200 表达。

图 6: 从绒毛膜得到的干细胞中的 HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200 表达。

图 7: 从羊膜-绒毛膜板得到的干细胞中的 HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200 表达。

图 8: 从脐带得到的干细胞中的 HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200 表达。

图 9: 从灌洗液(A)、羊膜(B)、绒毛膜(C)、羊膜-绒毛膜板(D)或脐带(E)得到的干细胞中的 HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200 表达的平均表达。

图 10: 本研究使用的羊膜/绒毛膜(AC)、脐带(UC)、骨髓来源的干细胞(BM-MS)和人皮肤纤维母细胞(NHDF)细胞系的培养时间进程。所有培养均使用相同的接种和传代密度进行生长和增殖。圆圈表示培养用于 RNA 分离。在即将老化之前收集后期培养。在 38-倍增时收集两个 UC 培养(UC-38)，以对比胰蛋白酶作用对基因表达的效果。所有其他培养在 RNA 分离之前在其

培养瓶中直接水解。

图 11: 羊膜/绒毛膜(AC)、脐带(UC)、骨髓来源的干细胞(BM-MSC)和人皮肤纤维母细胞(DF)中 8215 个基因的相对表达水平的线图。X 轴上与每个细胞系名称相连的数字是指该细胞系在评估基因表达水平之前的培养天数。图表由 GeneSpring 软件分析的 RNA 表达数据生成。AC-03 用作选择条件。

图 12: 羊膜/绒毛膜(AC)、脐带(UC)、骨髓来源的干细胞(BM-MSC)和人皮肤纤维母细胞(DF)在 AC-03 中显示基因过量表达 ≥ 6 倍的所有基因系列的子集。X 轴上与每个细胞系名称相连的数字是指该细胞系在评估基因表达水平之前的培养天数。图表由 GeneSpring 软件分析的 RNA 表达数据生成。AC-03 用作选择条件。

图 13: 羊膜/绒毛膜(AC)、脐带(UC)、骨髓来源的干细胞(BM-MSC)和人皮肤纤维母细胞(DF)中通过倍数变化过滤发现的胎盘干细胞特异性或脐带干细胞特异性基因。X 轴上与每个细胞系名称相连的数字是指该细胞系在评估基因表达水平之前的培养天数。图表由 GeneSpring 软件分析的 RNA 表达数据生成。AC-03 用作选择条件。

图 14: 在两种不同的培养基配方中培养的胎盘干细胞(图 14A)和间充质干细胞(图 14B)的碱性磷酸酶活性。

图 15: 在两种不同的培养基配方中培养的胎盘干细胞(图 15A)的矿化。

图 16: 在 OS 培养基而不是 Anthro 1B 培养基中诱导的胎盘干细胞产生的矿物质沉积。

图 17: 在两种不同的支架上生长的胎盘干细胞和间充质干细胞的生长时间进程。

图 18: 在 β -磷酸三钙底物上, OS 培养基和 Anthro 1B 培养基中生长的胎

盘干细胞和间充质干细胞的电子扫描显微照相(20×)。

图 19: 在 β -磷酸三钙底物上, OS 培养基和 Anthro 1B 培养基中生长的胎盘干细胞和间充质干细胞电子扫描显微照相 (5000×)。

图 20: 间充质干细胞和从人灌洗胎盘细胞获得的干细胞的茜素红染色, 其显示在 OS 培养基而不是 DMEM 中培养后发生钙矿化

图 21: 在 β -磷酸三钙底物存在的条件下, 在 OS 培养基中培养 10 天后的间充质干细胞和干细胞的 AP 活性。

图 22: 电子显微照片, 其显示了胶原原纤维(A 行)和矿化胶原原纤维(B 行)。

图 23: 示意图, 其显示了交联的矿化胶原蛋白的最终矿物质/胶原比例与所输入的矿物质/胶原蛋白比例接近。

图 24: 移植后 3 周的头盖骨缺损的组织切片。在胎盘干细胞-HEALOS™ 外植体中可看到在缺损内有大量骨沉积。

图 25A-25C: 移植后 7 周的头盖骨缺损的 X 射线分析。图 25A: 箭头所指为阳性对照外植体 BMP-2+HEALOS™。图 25B: 箭头所指为显示出骨沉积的胎盘干细胞+HEALOS™外植体。图 25C: 单独的阴性对照 HEALOS™和无外植体的头盖骨缺损。

图 26: 通过光密度分析法进行骨形成定量。增加的灰度(Y 轴)表示增加的骨密度/沉积。X 轴: 治疗等级。

5. 具体实施方式

5.1. 胎盘干细胞和胎盘干细胞群

胎盘干细胞是可从胎盘或其部分中获得的干细胞, 其贴壁到组织培养的底物并能分化为非胎盘细胞型。胎盘干细胞可以来源于胎儿, 也可以来源于

母体(也就是说,可以具有母亲或胎儿的基因型)。胎盘干细胞群或包括胎盘干细胞的细胞群可包括完全来源于胎儿或母体的胎盘干细胞,也可包括来源于胎儿和母体的混合胎盘干细胞。胎盘干细胞和包括胎盘干细胞的细胞群可通过在下文讨论的形态、标记和培养特征进行识别和挑选。

5.1.1. 物理学和形态学特征

本发明提供的非贴壁的 $CD34^{+}$ 干细胞在原代培养或细胞培养中培养时,通常不贴壁到组织培养底物。培养中的非贴壁干细胞通常呈现圆形,与从骨髓或外周血得到的 $CD34^{+}$ 干细胞类似。

本发明提供的贴壁胎盘干细胞在原代培养或细胞培养中培养时,贴壁到组织培养底物,例如组织培养容器表面(例如组织培养塑料)。培养中的胎盘干细胞通常认为呈成纤维细胞样星状外观,并具有许多从中央细胞体延伸出的细胞质突起。然而,所述胎盘干细胞从形态学与相同条件下培养的成纤维细胞不同,因为该胎盘干细胞比成纤维细胞具有更多的这种突起。胎盘干细胞从胞形态学上也与造血干细胞不同,培养中的造血干细胞通常认为是更圆的或鹅卵石形形态。

5.1.2. 细胞表面、分子和基因标记

非贴壁胎盘干细胞: 在一实施方案中,本发明提供了分离的非贴壁胎盘干细胞。在某些实施方案中,所述分离的干细胞是 $CD34^{+}$ 的。在某些实施方案中,该分离的干细胞是 $CD44^{-}$ 的。在某些实施方案中,该分离的干细胞是 $CD34^{+}$ 和 $CD44^{-}$ 的。在某些实施方案中,该分离的干细胞是 $CD9^{+}$ 、 $CD54^{+}$ 、 $CD90^{+}$ 或 $CD166^{+}$ 的。在某些实施方案中,该分离的干细胞是 $CD9^{+}$ 、 $CD54^{+}$ 、 $CD90^{+}$ 和 $CD166^{+}$ 的。在某些实施方案中,该分离的干细胞是

CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺或CD200⁺的。在某些实施方案中，该分离的干细胞是CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺和CD200⁺的。在某些实施方案中，该分离的干细胞已经通过灌洗，或通过物理或生物化学裂解如酶消化胎盘组织从人胎盘中分离。在某些实施方案中，该分离的干细胞已经通过灌洗从人胎盘中分离。在某些实施方案中，当所述胎盘细胞群在允许矿化基质形成的条件下培养时，该分离的干细胞有利于在胎盘细胞群中形成矿化基质。

在另一实施方案中，本发明提供分离的非贴壁胎盘细胞的群。在某些实施方案中，该细胞群包括CD34⁺干细胞。在某些实施方案中，该细胞群包括CD44⁻干细胞。在某些实施方案中，该细胞群包括CD34⁺和CD44⁻干细胞。在某些实施方案中，该细胞群包括CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺或CD166⁺干细胞。在某些实施方案中，该细胞群包括CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺和CD166⁺干细胞。在某些实施方案中，该细胞群包括CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺或CD200⁺干细胞。在某些实施方案中，该细胞群包括CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺和CD200⁺干细胞。在某些实施方案中，该细胞群包括干细胞，其中至少有大约70%的所述细胞是CD34⁺和CD44⁻干细胞。在某些实施方案中，该细胞群包括干细胞，其中至少有大约90%的所述细胞是CD34⁺和CD44⁻干细胞。

在另一方面，本发明提供了分离的CD34⁺和CD44⁻胎盘干细胞的群。在某些实施方案中，该干细胞是CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺或CD166⁺的。在某些实施方案中，该干细胞是CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺和CD166⁺的。在某些实施方案中，该干细胞是CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺或CD200⁺的。在某些实施方案中，干细胞是CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺和CD200⁺的。在某些实施方案中，至少约70%的该干细胞是CD34⁺和CD44⁻干细胞。在某些实

施方案中，至少约 90% 的该干细胞是 $CD34^{+}$ 和 $CD44^{-}$ 的干细胞。

贴壁胎盘干细胞：本发明提供的贴壁胎盘干细胞和胎盘干细胞群表达多种可用来识别和/或分离所述干细胞或包括所述干细胞的细胞群的标记。本发明提供的贴壁胎盘干细胞和干细胞群(即两个或两个以上的胎盘干细胞)包括直接从胎盘或其任何部分(例如羊膜、绒毛膜、胎盘小叶、脐带等)获得的干细胞和含有干细胞的细胞群。胎盘干细胞群还包括培养中的贴壁胎盘干细胞群(即两个或两个以上)，以及容器如袋中的细胞群。然而，胎盘干细胞不是滋养母细胞。

本发明提供的贴壁胎盘干细胞通常表达标记 $CD73$ 、 $CD105$ 、 $CD200$ 、 $HLA-G$ 和/或 $OCT-4$ ，而不表达 $CD34$ 、 $CD38$ 或 $CD45$ 。胎盘干细胞也表达 $HLA-ABC(MHC-1)$ 和 $HLA-DR$ 。这些标记可用于识别胎盘干细胞，并将胎盘干细胞与其他类型的干细胞区别开来。因为所述胎盘干细胞能表达 $CD73$ 和 $CD105$ ，因此它们可有间充质干细胞样特征。然而，因为所述胎盘干细胞可表达 $CD200$ 和 $HLA-G$ ，胎儿特异性标记，因此它们可与既不表达 $CD200$ 也不表达 $HLA-G$ 的间充质干细胞，如骨髓来源的间充质干细胞区别开来。同样地，因为不表达 $CD34$ 、 $CD38$ 和/或 $CD45$ ，因此将所述胎盘干细胞鉴定为非造血干细胞。然而，胎盘干细胞的某些亚类可表达例如 $CD34$ ，其仍被认为是本发明所提供的胎盘干细胞。

因此，在一实施方案中，本发明提供了分离的 $CD200^{+}$ 或 $HLA-G^{+}$ 贴壁胎盘干细胞。在具体实施方案中，所述干细胞是胎盘干细胞。在具体实施方案中，该干细胞是 $CD200^{+}$ 和 $HLA-G^{+}$ 的。在具体实施方案中，所述干细胞是 $CD73^{+}$ 和 $CD105^{+}$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 或 $CD45^{-}$ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 $CD34^{-}$ 、 $CD38^{-}$ 和 $CD45^{-}$

的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺ 和 CD105⁺ 的。在另一具体实施方案中，所述 CD200⁺ 或 HLA-G⁺ 干细胞在允许拟胚体形成的条件下有利于在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成拟胚体。

在另一实施方案中，本发明还提供从多种胎盘细胞中选择胎盘干细胞的方法，该方法包括选择 CD200 或 HLA-G 胎盘细胞，因而所述细胞为胎盘干细胞。在具体实施方案中，所述选择包括选择 CD200⁺ 和 HLA-G⁺ 的胎盘细胞。在具体实施方案中，所述选择包括也选择 CD73⁺ 和 CD105⁺ 的胎盘细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括还选择 CD34⁻、CD38⁻ 或 CD45⁻ 的胎盘细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括也选择 CD34⁻、CD38⁻ 和 CD45⁻ 的胎盘细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺ 和 CD105⁺ 的胎盘细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择在允许拟胚体形成的条件下还有利于在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成拟胚体的胎盘细胞。

在另一实施方案中，本发明提供包括分离的 CD200⁺、HLA-G⁺ 胎盘干细胞的分离细胞群。在具体实施方案中，所述细胞群是胎盘细胞群。在另一具体实施方案中，该细胞群是分离的 CD200⁺、HLA-G⁺ 胎盘干细胞群。在各种实施方案中，至少大约 10%、至少大约 20%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、或至少大约 60% 的所述细胞为 CD200⁺、HLA-G⁺ 干细胞。优选地，至少大约 70% 的所述细胞为 CD200⁺、HLA-G⁺ 干细胞。更优选地，至少大约 90%、95%、或 99% 的所述细胞为 CD200⁺、HLA-G⁺ 干细胞。在所述分离细胞群的具体实施方案中，所述干细胞还是 CD73⁺ 和 CD105⁺ 的。在另一具体实施方案中，所述干细胞还是 CD34⁻、CD38⁻ 或 CD45⁻ 的。在一更具体

实施方案中,所述干细胞还是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺和 CD105⁺的。在另一实施方案中,所述分离细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时产生一个或多个拟胚体。

在另一实施方案中,本发明提供从多种胎盘细胞中选择胎盘干细胞群的方法,该方法包括选择胎盘细胞群,其中至少大约 10%、至少大约 20%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、至少大约 60%、至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%、或至少大约 95%的所述细胞是 CD200⁺、HLA-G⁺干细胞。在具体实施方案中,所述选择包括选择还是 CD73⁺和 CD105⁺的干细胞。在另一具体实施方案中,所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的干细胞。在另一具体实施方案中,所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺和 CD105⁺的干细胞。在另一具体实施方案中,所述选择还包括选择在允许拟胚体形成的条件下培养时产生一个或多个拟胚体的胎盘干细胞群。

在另一实施方案中,本发明提供了分离的 CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺干细胞。在具体实施方案中,所述分离的干细胞是分离的贴壁胎盘干细胞。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在更具体的实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻和 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中,当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时,所述分离的 CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺干细胞有利于在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个拟胚体。

在另一实施方案中,本发明提供了从多种胎盘细胞中选择胎盘干细胞的方法,该方法包括选择 CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺胎盘细胞,因而所述细胞

是胎盘干细胞。在具体实施方案中,所述选择包括选择还是 HLA-G⁺的胎盘细胞。在另一具体实施方案中,所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的胎盘细胞。在另一具体实施方案中,所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的胎盘细胞。在另一具体实施方案中,所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻和 HLA-G⁺的胎盘细胞。在另一具体实施方案中,所述选择包括选择还是 CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺的干细胞,当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时,其有利于在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个拟胚体。

在另一实施方案中,本发明提供了包括 CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺干细胞的分离细胞群。在具体实施方案中,所述干细胞是胎盘干细胞。在另一具体实施方案中,所述细胞群是分离的 CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺胎盘干细胞的群。在各种实施方案中,至少大约 10%、至少大约 20%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、或至少大约 60%的所述细胞为 CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺干细胞。在另一实施方案中,在所述细胞群中至少大约 70%的所述细胞为 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺干细胞。在另一实施方案中,在所述细胞群中至少大约 90%、95%或 99%的所述细胞为 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺干细胞。在所述细胞群的具体实施方案中,所述干细胞是 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在更具体的实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻和 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中,所述细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时产生一个或多个拟胚体。

在另一实施方案中,本发明提供了从多种胎盘细胞中选择胎盘干细胞群的方法,该方法包括选择胎盘细胞群,其中至少大约 10%、至少大约 20%、

至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、至少大约 60%、至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%、或至少大约 95%的所述细胞是 CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺干细胞。在具体实施方案中,所述选择包括选择还是 HLA-G⁺的干细胞。在另一具体实施方案中,所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的干细胞。在另一具体实施方案中,所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的干细胞。在另一具体实施方案中,所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻和 HLA-G⁺的干细胞。在另一具体实施方案中,所述选择还包括选择在允许拟胚体形成的条件下培养时产生一个或多个拟胚体的胎盘细胞群。

本发明还提供分离的 CD200⁺和 OCT-4⁺干细胞。在具体实施方案中,该干细胞是 CD73⁺和 CD105⁺的。在具体实施方案中,该干细胞是胎盘干细胞。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在更具体的实施方案中,所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中,当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时,该干细胞有利于在包括所述干细胞的胎盘细胞群中产生一个或多个拟胚体。

在另一实施方案中,本发明提供了从多种胎盘细胞中选择胎盘干细胞的方法,该方法包括选择 CD200⁺或 OCT-4⁺胎盘细胞,因而所述细胞为胎盘干细胞。在具体实施方案中,所述选择包括选择还是 HLA-G⁺的胎盘细胞。在另一具体实施方案中,所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的胎盘细胞。在另一具体实施方案中,所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的胎盘细胞。在另一具体实施方案中,所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻、

CD45⁻、CD73⁺、CD105⁺和HLA-G⁺的胎盘细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择在所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时还有利于在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个拟胚体的胎盘干细胞。

本发明还提供了包括 CD200⁺、OCT-4⁺干细胞的分离细胞群。在具体实施方案中，所述干细胞为胎盘干细胞。在另一具体实施方案中，所述细胞群为 CD200⁺、OCT-4⁺干细胞群。在各种实施方案中，至少大约 10%、至少大约 20%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、或至少大约 60%的所述细胞为 CD200⁺、OCT-4⁺干细胞。在另一实施方案中，至少大约 70%的所述细胞为所述 CD200⁺、OCT-4⁺干细胞。在另一实施方案中，至少大约 90%、95%或 99%的所述细胞为所述 CD200⁺、OCT-4⁺干细胞。在所述分离细胞群的具体实施方案中，所述干细胞是 CD73⁺和 CD105⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞为 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞为 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在更具体的实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺的。在另一具体实施方案中，所述细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时产生一个或多个拟胚体。

在另一实施方案中，本发明提供了从多种胎盘细胞中选择胎盘干细胞群的方法，该方法包括选择胎盘细胞群，其中至少大约 10%、至少大约 20%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、至少大约 60%、至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%、或至少大约 95%的所述细胞是 CD200⁺、OCT-4⁺干细胞。在具体实施方案中，所述选择包括选择还是 CD73⁺和 CD105⁺的干细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 HLA-G⁺的胎盘细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的干细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻、

CD45⁻、CD73⁺、CD105⁺和HLA-G⁺的干细胞。

本发明还提供了分离的CD73⁺、CD105⁺和HLA-G⁺干细胞。在具体实施方案中，所述干细胞为胎盘干细胞。在另一具体实施方案中，所述干细胞是CD34⁻、CD38⁻或CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是CD34⁻、CD38⁻和CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是OCT-4⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是CD200⁺的。在更具体的实施方案中，所述干细胞是CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、OCT-4⁺和CD200⁺的。在另一具体实施方案中，当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时，所述干细胞有利于在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成拟胚体。

在另一实施方案中，本发明还提供了从多种胎盘细胞中选择胎盘干细胞的方法，该方法包括选择CD73⁺、CD105⁺和HLA-G⁺的胎盘细胞，因而所述细胞为胎盘干细胞。在具体实施方案中，所述选择包括选择还是CD34⁻、CD38⁻或CD45⁻的胎盘细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是CD34⁻、CD38⁻和CD45⁻的胎盘细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是OCT-4⁺的胎盘细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是CD200⁺的胎盘细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择还是CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、OCT-4⁺和CD200⁺的胎盘细胞。在另一具体实施方案中，所述选择包括选择当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时还有利于在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个拟胚体的胎盘细胞。

本发明还提供了包括CD73⁺、CD105⁺和HLA-G⁺干细胞的分离细胞群。在具体实施方案中，所述干细胞为胎盘干细胞。在另一具体实施方案中，所述细胞群为CD73⁺、CD105⁺和HLA-G⁺干细胞群。在各种实施方案中，至少大约10%、至少大约20%、至少大约30%、至少大约40%、至少大约50%、

或至少大约 60%的所述细胞为 CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺干细胞。在另一实施方案中，至少大约 70%的所述细胞为所述 CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺的。在另一实施方案中，至少大约 90%、95%或 99%的所述细胞为所述 CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺干细胞。在上述细胞群的具体实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述干细胞为 OCT-4⁺的。在另一具体实施方案中，所述干细胞为 CD200⁺的。在更具体的实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、OCT-4⁺和 CD200⁺的。在另一实施方案中，本发明提供了从多种胎盘细胞中选择胎盘干细胞群的方法，该方法包括选择其中大部分所述细胞为 CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺的胎盘细胞群。在具体实施方案中，所述大部分细胞还是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述大部分细胞还是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述大部分细胞还是 CD200⁺的。在另一具体实施方案中，所述大部分细胞还是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、OCT-4⁺和 CD200⁺的。

在另一实施方案中，本发明提供包括分离的 CD73⁺和 CD105⁺干细胞，当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时，其有利于在包括所述干细胞的分离的胎盘细胞的群中形成一个或多个拟胚体。在具体实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在另一具体实施方案中，所述干细胞是 OCT-4⁺的。在更具体的实施方案中，所述干细胞是 OCT-4⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。

本发明还提供了包括 CD73⁺、CD105⁺干细胞的分离的胎盘细胞的群，其中所述细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时形成一个或多个拟胚体。在

具体实施方案中,所述干细胞为胎盘干细胞。在另一具体实施方案中,所述细胞群为 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 胎盘干细胞的群,其中所述细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时形成一个或多个拟胚体。在各种实施方案中,至少大约 10%、至少大约 20%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、至少大约 60%、至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90% 或至少大约 95% 的所述分离的胎盘细胞为 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 干细胞。在上述细胞群的具体实施方案中,所述干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 或 $CD45^-$ 的。在另一具体实施方案中,所述干细胞为 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的。在另一具体实施方案中,所述干细胞为 $OCT-4^+$ 的。在更具体的实施方案中,所述干细胞是 $OCT-4^+$ 、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的。在其它具体实施方案中,所述细胞群已经被扩增,例如已经被传代至少一次、至少三次、至少五次、至少 10 次、至少 15 次或至少 20 次。

本发明还提供分离的 $OCT-4^+$ 干细胞,其在允许拟胚体形成的条件下培养时有利于在包括所述干细胞的分离的胎盘细胞的群中形成一个或多个拟胚体。在具体实施方案中,所述干细胞为 $CD73^+$ 和 $CD105^+$ 的。在另一具体实施方案中,所述干细胞为 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 或 $CD45^-$ 的。在另一具体实施方案中,所述干细胞为 $CD200^+$ 的。在更具体的实施方案中,所述干细胞为 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的。

本发明还提供了包括 $OCT-4^+$ 干细胞的分离的胎盘细胞的群,其中所述细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时形成一个或多个拟胚体。在具体实施方案中,所述干细胞为胎盘干细胞。在另一具体实施方案中,所述细胞群为胎盘干细胞群,该胎盘干细胞是 $OCT-4^+$ 干细胞,其中所述细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时形成一个或多个拟胚体。在各种实施方案中,至少大约 10%、至少大约 20%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、至

少大约 60%、至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%或至少大约 95%的所述分离的胎盘细胞为 OCT-4⁺干细胞。在上述细胞群的具体实施方案中,所述干细胞是 CD73⁺和 CD105⁺的。在另一具体实施方案中,所述干细胞为 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在另一具体实施方案中,所述干细胞为 CD200⁺的。在更具体的实施方案中,所述干细胞是 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在另一具体实施方案中,所述细胞群已经被扩增,例如已经被传代至少一次、至少三次、至少五次、至少 10 次、至少 15 次或至少 20 次。

本发明还提供了通过酶消化(参见第 5.2.3 部分)或灌洗(参见第 5.2.4 部分)而得到的胎盘干细胞。例如,本发明提供根据以下方法产生的胎盘干细胞的分离群,该方法包括:灌洗已经排出了脐血并已经灌洗了的哺乳动物胎盘以除去残余血;用灌洗液灌洗所述胎盘;和收集所述灌洗液,其中灌洗后的所述灌洗液包括包含胎盘干细胞的胎盘细胞群;和从所述细胞群中分离多种所述胎盘干细胞。在具体实施方案中,该灌洗液流过脐静脉和脐动脉,然后在其从胎盘流出后收集。通过这种方法产生的胎盘干细胞群通常包括胎儿和母体细胞的混合。在另一具体实施方案中,所述灌洗液通过脐静脉,而从脐动脉收集,或通过脐动脉,而从脐静脉收集。通过这种方法产生的胎盘干细胞群通常基本上完全来源于胎儿,也就是说,如所述细部群中大于 90%、95%、99%或 99.5%的胎盘干细胞是来源于胎儿。

在各种实施方案中,从胎盘灌洗液中获得的细胞群所包含的胎盘干细胞占所述胎盘细部群的至少大约 50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或至少 99.5%。在另一具体实施方案中,通过灌洗收集的胎盘干细胞包括胎儿和母体细胞。在另一具体实施方案中,通过灌洗收集的胎盘干细胞至少大约

50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或至少 99.5%为胎儿细胞。

在另一具体实施方案中，本发明提供了包括通过灌洗收集的分离的胎盘干细胞的群的组合物，其中所述组合物包括至少部分用于收集所述胎盘干细胞的灌洗液。

本发明还提供了本文所描述的胎盘干细胞的分离群，其根据以下方法产生，该方法包括：用组织裂解酶消化胎盘组织以获得包括胎盘干细胞的胎盘细胞群，并从所述胎盘细胞的残余物中分离多种胎盘干细胞。可消化整个或部分胎盘以获得胎盘干细胞。在具体实施方案中，例如，所述胎盘组织是整个胎盘、羊膜、绒毛膜、羊膜和绒毛膜的组合，或上述任意几项的组合。在其它具体实施方案中，所述组织裂解酶是胰蛋白酶或胶原蛋白酶。在各种实施方案中，从消化的胎盘中获得的细胞群所包含的胎盘干细胞占所述胎盘细胞群的至少大约 50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或至少 99.5%。

基因图谱证实分离的贴壁胎盘干细胞和分离的胎盘干细胞的群可以与其他细胞如间充质干细胞，如骨髓来源的干细胞相区分。本文所述的贴壁胎盘干细胞可以基于一个或多个基因的表达与间充质干细胞相区分，该基因的表达与骨髓来源的间充质干细胞相比特异于胎盘干细胞或脐带干细胞。具体地，贴壁胎盘干细胞可以基于一个或多个基因的表达与间充质干细胞相区分，该基因在胎盘干细胞中的表达显著高于在间充质干细胞中的表达(至少高 2 倍)，其中该一个或多个基因是 ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ATRS-1、B4GALT6、BCHE、C11orf9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPRC5B、ICAM1、IER3、IGFBP7、IL1A、IL6、IL18、KRT18、KRT8、LIPG、LRAP、MATN2、MEST、NFE2L3、NUAK1、PCDH7、PDLIM3、PJP2、RTN1、SERPINB9、ST3GAL6、

ST6GALNAC5、SLC12A8、TCF21、TGFB2、VTN、ZC3H12A 或以上任意组合，其中当所述干细胞在相同条件下生长时，这些基因在胎盘干细胞或脐带干细胞中的表达显著高于在骨髓来源的干细胞中的表达。在具体实施方案中，该胎盘干细胞特异性或脐带干细胞特异性基因是 CD200。

这些基因的表达水平可用于证实胎盘细胞群的身份，以鉴定细胞群包括至少多种胎盘干细胞等。身份得到确认的胎盘干细胞群可以是克隆的，如从单个胎盘干细胞扩增形成的胎盘干细胞群，或者混合的干细胞群，如包括从多个胎盘干细胞扩增的单种胎盘干细胞的细胞群，或包括胎盘干细胞和至少一种其他类型的细胞的细胞群。

这些基因的表达水平可用来选择贴壁胎盘干细胞群。例如，如果细胞群样品中一个或多个这些基因的表达显著高于同等的间质干细胞群，则选择这种细胞群如克隆扩增细胞的细胞群。这种选择可以是针对多种胎盘干细胞群、多种身份未知的细胞群等细胞群。

与所述一个或多个基因在间充质干细胞对照中的表达水平相比，贴壁胎盘干细胞可基于一个或多个这种基因的表达水平进行选择。在一实施方案中，所述一个或多个基因在包括相当量间充质干细胞的样品中的表达水平用作为对照。在另一实施方案中，在一定条件下检测的胎盘干细胞的对照是代表所述一个或多个基因在所述条件下在间充质干细胞中的表达水平的数值。

上述贴壁或非贴壁胎盘干细胞的分离群和胎盘干细胞群一般可包括大约、至少或不超过 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 个或更多个胎盘干细胞。

5.1.3. 生长培养

本文所述的胎盘干细胞的生长，对于任何哺乳动物细胞，在某种程度上

取决于所选择用于生长的特定培养基。在最佳条件下，胎盘干细胞的数量通常在 3-5 天增加一倍。在培养中，本发明提供的胎盘干细胞在培养中贴壁到底物上，例如，组织培养容器的表面(例如，组织培养皿塑料，纤维涂层塑料等)，并形成单层。

包括本发明所提供的胎盘干细胞的分离的贴壁胎盘细胞的群在适当条件下培养时形成拟胚体，也就是在贴壁干细胞层顶部生长出三维细胞集群。拟胚体内的细胞表达与早期干细胞相关的标记，例如 OCT-4、Nanog、SSEA3 和 SSEA4。拟胚体内的细胞通常不贴壁到培养底物上，如本发明所述的胎盘干细胞，但在培养中仍然会附着到贴壁细胞上。拟胚体细胞的生存依赖于贴壁胎盘干细胞，因为在没有贴壁干细胞的情况下就不会形成拟胚体。因此，贴壁胎盘干细胞有利于在包括该贴壁胎盘干细胞的胎盘细胞群中生长出一个或多个拟胚体。不受理论约束，认为拟胚体的细胞在贴壁胎盘干细胞上生长如同胚胎干细胞在饲养层细胞上生长一样。间充质干细胞，如骨髓间充质干细胞在培养中不会形成拟胚体。

5.2. 得到胎盘干细胞的方法

5.2.1. 干细胞收集组合物

本发明还提供了收集和分离胎盘干细胞的方法。一般地，用生理学上可接受的溶液，如干细胞收集组合物从哺乳动物胎盘获得干细胞。干细胞收集组合物在 2005 年 12 月 29 日提交的、题为"收集胎盘干细胞和保存器官的改进培养基"的相关美国临时申请 60/754,969 中有详细描述。

所述干细胞收集组合物可包括适于收集和/或培养干细胞的任何生理学上可接受的溶液，例如盐溶液(例如磷酸盐缓冲液、Kreb's 溶液、改良的 Kreb's 溶液、Eagle's 溶液、0.9%氯化钠等)、培养基(如 DMEM、H.DMEM 等)等等。

所述干细胞收集组合物可包括旨在保存胎盘干细胞,也就是从收集时间到培养时间内防止胎盘干细胞死亡或延迟胎盘干细胞死亡、减少细胞群中胎盘干细胞的死亡数量等的一种或多种成分。这些成分可以是例如细胞凋亡抑制剂(如 Caspase 抑制剂或 JNK 激酶抑制剂)、血管扩张剂(例如硫酸镁、抗高血压药物、心房利钠肽(ANP)、促肾上腺皮质激素、促肾上腺皮质激素释放激素、硝普钠、肼屈嗪、三磷酸腺苷、腺苷、吲哚美辛或硫酸镁、磷酸二酯酶抑制剂等)、坏死抑制剂(如 2-(1H-吲哚-3-基)-3-戊基氨基马来酰亚胺、吡咯烷二硫代氨基甲酸盐、或氯硝西洋)、TNF- α 抑制剂和/或携氧全氟化碳(例如过氟辛基溴化物、过氟辛基溴化物等)。

所述干细胞收集组合物可以包括一种或多种组织降解酶,如金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、中性蛋白酶、RNA 酶或 DNA 酶等。这些酶包括但不限于胶原酶(如胶原酶 I、II、III 或 IV,溶组织梭状芽孢杆菌的胶原酶等)、分散酶、嗜热菌蛋白酶、弹性蛋白酶、胰蛋白酶、LIBERASE、透明质酸酶等。

所述干细胞收集组合物可以包括杀菌或抑菌有效量的抗生素。在某些非限制性实施方案中,该抗生素是大环内酯类抗生素(如妥布霉素)、头孢菌素(如头孢氨苄、头孢拉定、头孢呋辛、头孢丙烯、头孢克罗、头孢克肟或头孢羟氨苄)、克拉霉素、红霉素、青霉素(如青霉素 V)或喹诺酮类药物(如氧氟沙星、环丙沙星或氟哌酸)、四环素、链霉素等。在特定的实施方案中,所述抗生素是对革兰氏(+)和/或革兰氏(-)细菌例如绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌等有活性的。

所述干细胞收集组合物也可以包括一种或多种如下化合物:腺苷(约 1 mM 至约 50 mM); D-葡萄糖(约 20 mM 至约 100 mM); 镁离子(约 1 mM 至约 50 mM); 分子量大于 20,000 道尔顿的大分子,在一实施方案中,以足以维持

内皮完整性和细胞生存的量存在(例如, 合成或天然产生的胶体, 多糖如右旋糖酐或聚乙二醇, 大约 25 g/L 至约 100 g/L 或约 40 g/L 至 60 g/L); 抗氧化剂(如叔丁对甲氧酚、丁基化羟基甲苯、谷胱甘肽、维生素 C 或维生素 E, 大约 25 μ M 至约 100 μ M); 还原剂(例如 N-乙酰半胱氨酸, 约 0.1 mM 至约 5 mM); 防止钙进入细胞的试剂(如维拉帕米, 约 2 μ M 至 25 μ M); 硝酸甘油(例如约 0.05 g/L 至约 0.2g/L); 抗凝血剂, 在一实施方案中, 以足以帮助防止残余血液凝固的量存在(如肝素或水蛭素, 以约 1000 单位/L 至约 100,000 单位/L 的浓度存在); 或含有阿米洛利的化合物(例如阿米洛利、乙基异丙基阿米洛利、环己烷阿米洛利、二甲基阿米洛利或异丁基阿米洛利, 约 1.0 μ M 至约 5 μ M)。

5.2.2. 胎盘收集和处理

一般来说, 在出生排出后立即回收人胎盘。在一个实施方案中, 在知会同意并获取患者的完整病史且将该病史与所述胎盘关联后, 从患者回收胎盘。优选地, 在分娩后继续记录病史。这种病史可用于协调胎盘或从其收集的干细胞的后续使用。例如, 根据病史, 人胎盘干细胞可用作与该胎盘相关联的婴儿, 或该婴儿的父母、兄弟姐妹或其他亲属的个性化药物。

回收胎盘干细胞之前, 除去脐带血和胎盘血。在某些实施方案中, 在分娩后, 回收胎盘中的脐血。可对胎盘进行常规的脐带血回收处理。通常情况下使用针或套管, 在重力的帮助下从胎盘抽血(见例如 Anderson 的美国专利号 5,372,581; Hessel 等人的美国专利号 5,415,665)。该针或套管通常置于脐静脉处, 并轻轻按摩胎盘, 以帮助从胎盘排出脐血。这种脐血回收可进行商业操作, 如 LifeBank USA, Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry and Cryocell。优选地, 胎盘通过重力排干, 而不需要其他操作, 以尽量减少脐血回收期间对组织的损伤。

通常情况下，胎盘会从分娩室或出生室运送到另一位置，例如实验室以通过例如灌洗或组织分离回收脐血和收集干细胞。胎盘最好使用无菌热绝缘运输设备运输(维持胎盘温度在 20-28°C 之间)，例如夹紧胎盘脐带近端，将胎盘置于无菌封口塑料袋中，然后放在绝缘容器中。在另一实施方案中，胎盘用脐带血收集试剂盒运输，该脐带血收集试剂盒基本如 2005 年 9 月 19 号提交的未决美国专利申请 11/230,760 中所述。优选地，胎盘在分娩后四至二十四小时送到实验室。在某些实施方案中，在回收脐带血之前夹紧脐带近端，优选夹紧插入到胎盘盘的 4-5 cm(厘米)处。在其他一些实施方案中，在回收脐血后进一步处理胎盘前夹紧脐带近端。

在干细胞收集之前，可以将所述胎盘保存在无菌条件和室温或 5 至 25°C(摄氏)下。在灌洗胎盘以除去任何剩余脐带血前，胎盘可被保存超过 48 小时，优选四至二十四小时。该胎盘优选 5 至 25°C(摄氏)保存在抗凝血剂溶液中。合适的抗凝血剂溶液是本领域公知的。例如，可以使用肝素或华法林钠溶液。在优选实施方案中，该抗凝血剂溶液包含肝素的溶液(如在 1: 1000 溶液中 1% w/w)。在收集胎盘干细胞之前，抽干血的胎盘优选保存不超过 36 小时。

哺乳动物的胎盘或其部分，一旦如上所述被常规地收集和制备，可以用任何已知的方式处理，例如可以灌洗或裂解，例如用一个或多个组织裂解酶消化，以获取干细胞。

5.2.3. 胎盘组织的物理裂解和酶消化

在一实施方案中，干细胞从哺乳动物胎盘通过物理裂解，如酶消化所述器官收集。例如，该胎盘或其部分可以被如碾、剪、绞、切、剁、浸等，同时与本发明所提供的干细胞收集组合物接触，并随后用一种或多种酶消化该组织。该胎盘或其部分也可被物理裂解，并用一种或多种酶消化，然后将得

到的材料浸泡在或混合到干细胞收集组合物中。任何物理裂解方法都可以使用，只要该裂解方法使多种、优选大多数、更优选所述器官中的至少 60%、70%、80%、90%、95%、98%或 99%的细胞保持存活，这可通过例如台盼蓝不相容法测定。

在物理裂解和/或酶消化和干细胞回收之前，可以将所述胎盘解剖成部分。例如，胎盘干细胞可从羊膜、绒毛、脐带、胎盘小叶、或其任何组合中得到。优选地，胎盘干细胞从包括羊膜和绒毛膜的胎盘组织获得。通常情况下，胎盘干细胞可以通过小块胎盘组织裂解得到，例如，约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900 或约 1000 立方毫米体积的胎盘组织块。

优选的干细胞收集组合物包含一种或多种组织裂解酶。酶消化优选采用酶的组合物，如基质金属蛋白酶和中性蛋白酶的组合物，例如胶原酶和分散酶的组合物。在一实施方案中，胎盘组织的酶消化使用基质金属蛋白酶、中性蛋白酶和消化透明质酸的粘液溶解酶的组合物，如胶原酶、分散酶和透明质酸酶的组合物，或 LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind.)和透明质酸酶的组合物。可以用来裂解胎盘组织的其他酶包括木瓜蛋白酶、去氧核糖核酸酶、丝氨酸蛋白酶如胰蛋白酶、糜蛋白酶、或弹性蛋白酶。丝氨酸蛋白酶可被血清中的 α_2 微球蛋白抑制，因此用于消化的培养基通常不含血清。EDTA 和 DNA 酶常用于酶消化过程中提高细胞回收的效率。消化产物优选被稀释，以避免干细胞陷入粘稠的消化物中。

可以使用组织消化酶的任意组合物。组织消化酶的典型浓度包括例如 50-200 U/mL 的胶原酶 I 和胶原酶 IV、1-10 U/mL 的分散酶和 10-100 U/mL 的弹性蛋白酶。可组合使用蛋白酶，也就是说，可以在相同消化反应中使用

两种或两种以上的蛋白酶，或顺序使用，以释出胎盘干细胞。例如，在一实施方案中，胎盘或其一部分首先用 2 mg/mL 适量的胶原酶 I 消化 30 分钟，接着用 0.25% 的胰蛋白酶 37°C 下消化 10 分钟。优选地在使用其它酶后再使用丝氨酸蛋白酶。

在另一个实施方案中，通过向含有干细胞的干细胞收集组合物中，或者在用干细胞收集组合物分离干细胞前向解离和/或消化组织的溶液中添加螯合剂(例如，乙二醇双(2-氨基乙醚)-N, N, N', N'-四乙酸(EGTA)或乙二胺四乙酸(EDTA))，以进一步解离组织。

可以理解，当整个的胎盘或胎盘的一部分同时含有胎儿和母体细胞(例如，胎盘的一部分包含绒毛膜或绒毛小叶)时，收集的胎盘干细胞将同时包含来源于胎儿和母体的胎盘干细胞的混合物。当胎盘的部分不含有或只含有可忽略量的母体细胞时(例如，羊膜)，收集的胎盘干细胞将几乎只含有胎儿的胚胎干细胞。

5.2.4. 胎盘灌洗

胎盘干细胞也可通过灌洗哺乳动物胎盘得到。灌洗哺乳动物胎盘以获得干细胞的方法在例如 Hariri 的美国申请公开号 2002/0123141，和 2005 年 12 月 29 号提交的、题为“收集胎盘干细胞和保存器官的改进培养基”的相关美国临时申请 60/754,969 中有公开。

胎盘干细胞可使用例如干细胞收集组合物作为灌洗液通过灌洗，如流过胎盘血管收集。在一实施方案中，灌洗哺乳动物胎盘使灌洗液通过脐动脉或/和脐静脉。可以通过例如向胎盘的自流使灌洗液流过胎盘。优选地，用泵，例如蠕动泵向灌洗液施压使其经过胎盘。脐静脉可以被例如插入空心套管，例如 TEFLON® 或塑料套管，该套管与无菌连接装置，如无菌管连接。该无

菌连接器连接到灌洗歧管。

在准备灌洗时，优选地按脐动脉和脐静脉位于胎盘最高点的方式来定位(如，悬挂)胎盘。可以灌洗胎盘以使灌洗液通过胎盘血管和周围组织。还可以灌洗胎盘以使灌洗液进入脐静脉并从脐动脉收集，或使灌洗液进入脐动脉并从脐静脉收集。

在一实施方案中，例如，所述脐动脉和脐静脉同时与例如移液器连接，该移液器通过柔性连接器连接到灌洗液池。灌洗液流进脐静脉和脐动脉。灌洗液流出和/或流过血管壁而进入到胎盘的周围组织，并从孕期附着在母亲子宫上的胎盘表面的合适开放脉管收集。灌洗液也可通过脐带开口导入，并允许从与母体子宫壁接触的胎盘壁中的开口流出或渗出。这种方法收集的胎盘细胞，可称为“盘(pan)”法，通常是胎儿和母体细胞的混合。

在另一实施方案中，所述灌洗液流过脐静脉而从脐动脉收集，或者流过脐动脉而从脐静脉收集。这种方法收集的胎盘细胞，可称为“闭合回路”方法，通常几乎完全是胎儿细胞。

应该意识到，使用盘法进行灌洗，即灌洗液因而在其流出胎盘的母体侧后收集，得到的是胎儿和母体细胞的混合。因此，这种方法收集的细胞包括来源于胎儿和母体的胎盘干细胞的混合群。与此相反，在闭合回路方法中，仅通过胎盘中的血管灌洗，因而灌洗液通过一个或两个胎盘血管并只通过其他血管来收集，因此收集的胎盘干细胞群几乎完全来源于胎儿。

在一实施方案中，所述闭合回路灌洗方法可以如下进行。分娩后约 48 小时内获得产后胎盘。夹紧脐带，并在夹子上方剪断。将脐带丢弃或处理回收如脐带干细胞，和/或处理脐带膜以制备生物材料。在灌洗过程中保留羊膜，或将其与绒毛分离，如用手指进行钝性剥离。如果羊膜在灌洗之前与绒毛分

离, 则可以将其如丢弃, 或处理, 例如通过酶消化处理以获取干细胞, 或制备如羊膜生物材料, 如美国申请公开号 2004/0048796 所描述的生物材料。清洗胎盘的所有可见血凝块和残余血, 如用无菌纱布清洗后, 暴露脐带血管, 例如, 通过部分剪断脐带膜暴露脐带的横截面来暴露脐带血管。确定并打开该血管, 例如通过使封闭的鳄鱼钳推进穿过每根血管的剪断端来打开该血管。然后将所述设备, 例如与灌洗装置或蠕动泵连接的塑料管插入到每个胎盘动脉中。该泵可以是任何适于该目的的泵, 例如蠕动泵。然后将与无菌收集池连接的塑料管如血液袋, 如 250 mL 的收集袋插入胎盘静脉。或者, 将与所述泵连接的管插入到胎盘静脉中, 并将与收集池连接的管插入到胎盘动脉的一或两个中。然后用一定体积的灌洗液, 例如约 750 mL 的灌洗液灌洗胎盘。然后收集, 例如通过离心收集灌洗液中的细胞。

在一实施方案中, 在灌洗过程中夹紧近端脐带, 更优选地, 夹紧脐带插入胎盘盘的 4-5 cm(厘米)以内处。

在排血过程中, 从哺乳动物胎盘第一次收集的灌洗液通常是脐带血和/或胎盘血的残余红血细胞的颜色。随着灌洗的进行和残余脐血细胞从胎盘中洗出, 灌洗液渐渐变成无色。一般地, 30 至 100 ml(毫升)的灌洗液足以初始地排干胎盘血, 但可根据观察结果使用更多或更少的灌洗液。

用于收集胎盘干细胞的灌洗液的体积可以变化, 这取决于待收集的干细胞的量、胎盘大小、从单个胎盘收集的次数等。在各种实施方案中, 灌洗液的体积可以是 50 mL 至 5000 mL, 50 mL 至 4000 mL, 50 mL 至 3000 mL, 100 mL 到 2000 mL, 250 mL 至 2000 mL, 500 mL 至 2000 mL, 或 750 mL 至 2000 mL。在通常情况下, 胎盘在排干血之后要用 700-800 mL 的灌洗液灌洗。

所述胎盘可以在几小时或数天内灌洗多次。当胎盘要被灌洗多次时，可将其在无菌条件下的容器或其他合适的器皿中维持或培养，并用干细胞收集组合物或标准灌洗液(如，普通生理盐水如磷酸盐缓冲液(“PBS”))灌洗，同时使用或不使用抗凝血剂(如肝素、华法林钠、香豆素、双羟香豆素)，和/或使用或不使用抗菌剂(例如， β -巯基乙醇(0.1 mM)；抗生素如链霉素(例如 40-100 $\mu\text{g/ml}$)、青霉素(例如 40 U/ml)、两性霉素 B(例如，0.5 $\mu\text{g/ml}$)。在一实施方案中，维持或培养分离的胎盘一段时间，不收集灌洗液，从而使胎盘在灌洗和收集灌洗液前维持或培养 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 小时，或 2 或 3 或更多天。该灌洗的胎盘可以保持一段或更多额外的时间，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 小时或更多小时，并用如 700-800 mL 灌洗液灌洗第二次。所述胎盘可以灌洗 1、2、3、4、5 次或更多次，例如每 1、2、3、4、5 或 6 个小时一次。在优选的实施方案中，重复灌洗胎盘和收集灌洗液，例如干细胞收集组合物，直到回收的有核细胞数量低于 100 个细胞/mL。在不同时间点的灌洗液可以进一步单独处理，以回收时间依赖性细胞群，例如干细胞。也可以将不同时间点的灌洗液汇集。

不想受任何理论约束，在胎盘排干血并进行足够时间的灌洗后，相信胎盘干细胞迁移到了排干了血并被灌洗的胎盘微循环中，在该处收集胎盘干细胞，优选通过灌洗洗涤到收集容器。灌洗分离的胎盘不仅是为了消除残余的脐血，而且还提供了胎盘适当的营养物质，包括氧。该胎盘可用与去除残余的脐血细胞相类似的溶液培养和灌洗，优选不加抗凝血剂。

根据本发明所提供的方法的灌洗获得的胎盘干细胞显著多于从未用所述溶液灌洗且未经获取干细胞的其它处理(例如, 通过组织解离如酶促消化)的哺乳动物胎盘中可获得的数量。在本文的上下文中, “显著多于”是指多至少 10%。灌洗产生的胎盘干细胞显著多于例如, 从已培养有胎盘或其一部分的培养基中可获得的数量。

干细胞可通过用包含一种或多种蛋白酶或其他组织裂解酶的溶液灌洗从胎盘分离。在具体实施方案中, 将胎盘或其部分(如羊膜、羊膜和绒毛膜、胎盘小叶或子叶、脐带、或上述任何项的组合)置于 25-37°C, 与一种或多种组织裂解酶在 200 mL 的培养基中培养 30 分钟。收集灌洗液中的细胞, 置于 4°C, 并用含有 5 mM EDTA、2 mM 二硫苏糖醇和 2 mM β -巯基乙醇的冷抑制剂组合洗涤。数分钟后, 所述干细胞用本发明提供的冷(如 4°C)干细胞收集组合物洗涤。

5.2.5. 胎盘灌洗液和胎盘灌洗细胞

胎盘灌洗液和胎盘灌洗细胞, 例如从胎盘灌洗液分离出来的总有核细胞包含各种细胞的集合。通常, 胎盘灌洗液和胎盘灌洗细胞在使用之前要去除红细胞。这种去除可通过分离有核血细胞和红细胞的已知方法进行。在某些实施方案中, 低温保存所述胎盘灌洗液和灌洗细胞。在其他一些实施方案中, 胎盘灌洗液仅包括或灌洗细胞仅包括胎儿细胞, 或胎儿细胞和母体细胞的组合。

通常, 从单一胎盘灌洗获得的胎盘灌洗液包括约 1 亿至 5 亿有核细胞。在某些实施方案中, 该胎盘灌洗液和灌洗细胞包括 $CD34^+$ 细胞, 如造血干或祖细胞。在更具体的实施方案中, 这种细胞可以包括 $CD34^+CD45^-$ 干细胞或祖细胞、 $CD34^+CD45^+$ 干细胞或祖细胞、粒细胞系祖细胞、淋巴祖细胞、和/

或红细胞系祖细胞。在其他实施方案中，胎盘灌洗液和胎盘灌洗细胞包括贴壁的胎盘干细胞，例如 CD34⁻干细胞，例如如上文 5.1 节中描述的贴壁的胎盘干细胞。在其他实施方案中，该胎盘灌洗液和胎盘灌洗细胞包括如内皮祖细胞、骨祖细胞和自然杀伤细胞。在某些实施方案中，从胎盘收集并去除了红细胞的胎盘灌洗液或从这种灌洗液分离的灌洗细胞通过流式细胞仪例如通过 FACS 分析测定包括约 6-7%的自然杀伤细胞(CD3⁻、CD56⁺)、约 21-22%的 T 细胞(CD3⁺)、约 6-7%的 B 细胞(CD19⁺)、约 1-2%的内皮祖细胞(CD34⁺、CD31⁺)、约 2-3%的神经祖细胞(巢蛋白⁺)、约 2-5%的造血祖细胞(CD34⁺)、约 0.5-1.5%的贴壁的胎盘干细胞(如 CD34⁻、CD117⁻、CD105⁺和 CD44⁺)。

人胎盘灌洗液中的所述 CD34⁺造血干细胞或祖细胞与从脐血分离的同等量 CD34⁺细胞相比，可检测地表达更高水平的与血管生成有关的标记，如 CD31、VEGR-R 和/或 CXCR4。在某些实施方案中，从单一灌洗中得到的人胎盘灌洗液单核细胞在加入了 VEGF 的 ENDOCULT®中培养(用于生长 CFU-Hill 集落，StemCell Technologies, Inc.)产生多达 20，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个 CFU-Hill 集落(内皮祖细胞)。CFU-Hill 集落在液体培养中的形成可以被证实和评估，例如，通过测定从人胎盘灌洗液获得的内皮祖细胞对二乙酰化低密度脂蛋白(Dil-acLDL)的吸收，如在 ENDOCULT®培养基中的七天培养中的吸收来证实和评估。

此外，从人胎盘灌洗液获得的 CD34⁺CD45⁻细胞比 CD34⁺CD45⁺细胞具有可检测更高的血管生成相关标记 CD31 和/或 VEGFR 表达。

通常，胎盘灌洗液和灌洗细胞相对于脐血细胞具有低水平的 I 类 MHC 表达，并对 II 类 MHC 标记大多为阴性。

5.2.6. 胎盘干细胞的分离、分选与表征

来自哺乳动物胎盘的干细胞,无论是通过灌洗或酶消化得到,均可通过 Ficoll 梯度离心从其他细胞中初步纯化(即分离)。这种离心可以按照离心速度等的任何标准方案进行。在一实施方案中,例如,从胎盘收集的细胞是通过在室温 $5000\times g$ 离心 15 分钟从灌洗液中回收的,该离心将细胞与例如污染性残渣和血小板分开。在另一实施方案中,胎盘灌洗液被浓缩至约 200 ml,轻轻地铺在 Ficoll 上,在 22°C 以约 $1100\times g$ 离心 20 分钟,收集低密度的细胞中间层用于进一步处理。

细胞球可重悬于新鲜的干细胞收集组合物中,或适合干细胞维持的培养基中,例如含有 2 U/ml 肝素和 2 mM EDTA 的 IMDM 无血清培养基 (GibcoBRL, NY) 中。可以利用例如 Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, 挪威), 按照生产商的推荐方法来分离总单核细胞部分。

如本文所使用的,“分离”的胎盘干细胞是指去除了至少约 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 99% 的在完整哺乳动物胎盘中通常与该干细胞相关联的细胞。当其存在的细胞群中包含少于 50% 的在完整器官内通常与该干细胞相关联的细胞时,来源于该器官的干细胞就是“分离的”。

通过灌洗或消化获得的胎盘细胞可以,例如采用如含有 0.2% EDTA 的 0.05% 胰蛋白酶溶液 (Sigma, St. Louis MO) 通过差异胰蛋白酶化作用来进一步或初步地分离。由于胎盘干细胞一般在约 5 分钟内从塑料表面脱离,而其它贴壁的群一般需要超过 20-30 分钟的孵育,因此差异胰蛋白酶化作用是可能的。在胰蛋白酶化作用和利用例如胰蛋白酶中和溶液 (TNS, Cambrex) 的胰蛋白酶中和作用后,可以收获脱离的胎盘干细胞。在分离贴

壁细胞的一实施方案中,将等份的细胞,如 $5-10 \times 10^6$ 个细胞置于几个 T-75 瓶,优选纤连蛋白包被的 T75 瓶的每个中。在这种实施方案中,所述细胞可以用商购的间充质干细胞生长培养基(MSCGM)(Cambrex),并置于组织培养箱(37°C , $5\%\text{CO}_2$)中培养。在 10-15 天后,通过用 PBS 洗涤从瓶中去除非贴壁细胞。然后用 MSCGM 替代 PBS。优选地每天检查培养瓶中不同贴壁细胞类型的存在,并且具体地检查成纤维样细胞簇的形成和扩增。

可以监测从哺乳动物胎盘中收集到的细胞数量和类型,例如通过利用标准的细胞检测技术,如流式细胞仪、细胞分选、免疫组织化学(例如,用组织特异性或细胞标记特异性抗体染色)、荧光活化细胞分选(FACS)、磁性活化细胞分选(MACS)来测定形态学和细胞表面标记的变化;通过利用光学或共聚焦显微镜来检测细胞的形态学;和/或利用本领域公知的技术,例如 PCR 和基因表达图谱来检测基因表达的改变。这些技术也可用于鉴别对于一种或多种特定标记呈阳性的细胞。例如,利用 CD34 的抗体,利用上述技术,可以确定细胞是否含有可检测量的 CD34;如果是,则细胞是 CD34^+ 的。同样,如果细胞产生足够的能被 RT-PCR 所检测的 OCT-4 RNA,或者显著多于成体细胞的 OCT-4 RNA,则该细胞是 OCT-4^+ 的。细胞表面标记(例如 CD 标记如 CD34)的抗体和干细胞特异性基因例如 OCT-4 的序列也是本领域公知的。

利用荧光激发细胞分选(FACS)来分选胎盘细胞,具体地是已经通过 Ficoll 分离、差异贴壁或两者的组合分离过的细胞。荧光激发细胞分选(FACS)是基于颗粒的荧光性质,用于分离颗粒(包括细胞)的普遍已知的方法(Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151:150-165)。单个颗粒中的荧光部分的激光激发产生微小电荷,该电荷使混合物中的阳性和阴性颗粒电磁分

离。在一个实施方案中，用不同的荧光标签来标记细胞表面标记-特异性的抗体或配体。在经过细胞分选仪时处理细胞，使得能够基于他们结合所用抗体的能力来分离细胞。FACS分选的颗粒可以直接放置到96-孔或384-孔板的单个孔中，以方便分离和克隆。

在一个分选技术方案中，基于标记CD34、CD38、CD44、CD45、CD73、CD105、OCT-4和/或HLA-G的表达来分选来自胎盘的干细胞。该方法可以与基于培养中的干细胞的贴壁属性来筛选干细胞的技术方案联合进行。例如，在基于标记表达的分选前或后进行贴壁筛选干细胞。在一个实施方案中，例如，首先基于CD34的表达分选细胞；保留CD34⁺的细胞，再将CD200⁺HLA-G⁺的细胞与所有其它的CD34⁺细胞分开。在另一个实施方案中，基于标记CD200和/或HLA-G的表达分选来自胎盘的细胞；例如，分离展示这些标识物中任一种的细胞用于进一步使用。在特定的实施方案中，表达例如CD200和/或HLA-G的细胞可以基于它们表达CD73和/或CD105，或者基于被抗体SH2、SH3或SH4识别的表位，或者基于缺少CD34、CD38或CD45的表达来进行进一步分选。例如，在一个实施方案中，通过CD200、HLA-G、CD73、CD105、CD34、CD38和CD45的表达或不表达来分选胎盘细胞，将CD200⁺、HLA-G⁺、CD73⁺、CD105⁺、CD34⁺、CD38⁺和CD45⁺的胎盘细胞与其它胎盘细胞分离，用于进一步使用。

在另一个实施方案中，可以使用磁性微珠来分离细胞。可以利用磁激发细胞分选(MACS)技术，一种基于颗粒结合磁珠(0.5-100 μm 直径)的能力来分离颗粒的方法来分选细胞。可以对磁性微珠进行多种有效的修饰，包括共价添加特异性识别具体细胞表面分子或半抗原的抗体。然后将微珠与细胞混合以允许结合。然后将细胞通过磁场，以分离出具有特异的细胞表

面标记的细胞。在一个实施方案中,可以将这些细胞分离并与偶联了其它细胞表面标记的抗体的磁珠再混合。将细胞再次通过磁场,分离结合两种抗体的细胞。然后将此类细胞稀释到不同的皿中,例如用于克隆分离的微滴度皿。

还可以基于细胞形态学和生长特征来表征和/或分选胎盘干细胞。例如,胎盘干细胞可以表征为例如在培养中具有成纤维细胞样外观,和/或基于例如在培养中的成纤维细胞样外观来筛选。胎盘干细胞还可以表征为具有形成拟胚体的能力,和/或基于形成拟胚体的能力来筛选。例如,在一个实施方案中,将形状为成纤维细胞样,表达 CD73 和 CD105,并在培养中产生一种或多种拟胚体的胎盘干细胞与其它胎盘细胞分离。在另一个实施方案中,将在培养中产生一种或多种拟胚体的 OCT-4⁺胎盘细胞与其它胎盘细胞分离。

在另一个实施方案中,通过集落生成单位检测来鉴定和表征胎盘干细胞。集落生成单位检测是本领域公知的,例如 MESEN CULT™培养基 (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver British Columbia)。

可以利用本领域已知的标准技术来评价胎盘干细胞的活力、增殖潜力和寿命,所述标准技术例如台盼蓝不相容检测、醋酸荧光素摄入检测、二碘化丙锭摄入检测(检测活力);和胸苷摄入检测、MTT 细胞增殖检测(检测增殖)。可以通过本领域普遍已知的方法确定寿命,例如确定在延长培养中最大的群体倍增数。

还可以利用本领域已知的其它技术将胎盘干细胞与其它胎盘细胞分离,例如选择性生长目标细胞(阳性选择),选择性破坏不需要的细胞(阴性选择);基于混合群体与例如大豆凝集素的差异细胞可凝集性分离;冻融

过程；过滤；常规和区带离心法；离心冲洗(逆流离心)；单位重力分离；逆流分布；电泳等等。

5.3. 胎盘干细胞培养

5.3.1. 培养基

分离的胎盘干细胞、或胎盘干细胞群、或从中生长出胎盘干细胞的细胞或胎盘组织可以用来启动或接种细胞培养。通常将细胞转移到无菌组织培养皿中，该培养皿用或不用细胞外基质或配体，如层连蛋白、胶原蛋白(例如天然的或变性的)、明胶、纤连蛋白、鸟氨酸、玻连蛋白和细胞外膜蛋白(如MATRIGEL(BD Discovery Labware, Bedford, Mass.))涂布。

胎盘干细胞可以在本领域认可的可用于培养干细胞的任何培养基中和任何条件下培养。优选地，该培养基包含血清。胎盘干细胞培养在例如如下的培养基中：DMEM-LG(杜尔贝科的改良必需培养基，低血糖)/MCDB 201(鸡成纤维细胞基本培养基)，含有 ITS(胰岛素-转铁蛋白-硒)、LA+BSA(亚油酸-牛血清白蛋白)、葡萄糖、L-抗坏血酸、PDGF、EGF、IGF-1 和青霉素/链霉素；DMEM-HG(高糖)，包含 10%胎牛血清(FBS)；DMEM-HG，包含 15%胎牛血清；IMDM(Iscove 的改良杜尔贝科培养基)，包含 10% FBS、10%马血清和氢化可的松；M199，包含 10%FBS、EGF 和肝素； α -MEM(最少必需培养基)，包含 10% FBS、GLUTAMAX™和庆大霉素；DMEM，包含 10% FBS、GLUTAMAX™和庆大霉素等。优选的培养基是 DMEM-LG/MCDB-201，其含有 2% FBS、ITS、LA+BSA、葡萄糖、L-抗坏血酸、PDGF、EGF 和青霉素/链霉素。

可以用来培养胎盘干细胞的其他培养基包括 DMEM(高或低糖)、Eagle's 基础培养基、Ham's F10 培养基(F10)、Ham's F-12 培养基(F12)、Iscove 的改

良杜尔贝科培养基、间质干细胞生长培养基(MSCGM)、Liebovitz 的 L-15 培养基、MCDB、DMEM/F12、RPMI 1640、高等 DMEM(Gibco)、DMEM/MCDB201(Sigma)、以及 CELL-GRO FREE。

所述培养基可以补充一种或多种组分,包括例如血清(如胎牛血清(FBS),优选约 2-15%(v/v);马科(马)血清(ES);人血清(HS)); β -巯基乙醇(BMS),优选约 0.001%(v/v);一种或多种生长因子,例如血小板衍生生长因子(PDGF)、表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、白血病抑制因子(LIF)、血管内皮生长因子(VEGF)和红细胞生成素(EPO);氨基酸,包括 L-缬氨酸;和控制微生物污染的一种或多种抗生素和/或抗真菌剂,例如青霉素、硫酸链霉素、两性霉素 B、庆大霉素和制霉菌素,单独或组合使用。

胎盘干细胞可以在标准组织培养条件下培养,例如在组织培养皿或多孔板中培养。胎盘干细胞还可以用悬滴法培养。在此方法中,胎盘干细胞以约每毫升 1×10^4 个细胞悬浮在约 5 mL 的培养基中,并将一滴或多滴该培养基置于组织培养容器,例如 100 mL 培养皿的盖的里面。该培养基滴可以为例如单滴,或由如多通道移液器产生的多个液滴。小心倒置该盖子并置于培养皿底部的上面,该培养皿中盛有一定体积的液体,如足以保持培养皿中的含水量的无菌 PBS,并培养所述干细胞。

5.3.2. 胎盘干细胞扩增和增殖

一旦分离了胎盘干细胞或干细胞群(例如,干细胞或干细胞群与至少约 50%的在体内通常与该干细胞或干细胞群相关的胎盘细胞分离),就可将该干细胞或干细胞群在体外增殖和扩增。例如,可将胎盘干细胞群培养在组织培养容器,例如培养皿、细颈瓶、多孔板等中足够的时间以使该干细胞增殖到

70-90%汇合，也就是说，直到该干细胞及其后代占据组织培养容器培养面积的 70-90%。

胎盘干细胞可以以允许细胞生长的密度接种到培养容器中。例如，该细胞可以以低密度(例如，大约 1,000 至大约 5,000 个细胞/cm²)至高密度(例如，约 50,000 或更多细胞/cm²)接种。在优选实施方案中，该细胞培养在含有 0-5% 体积 CO₂ 的空气中。在一些优选实施方案中，该细胞培养在含有 2-25%O₂ 的空气中，优选含有 5-20%O₂ 的空气中。该细胞优选在约 25℃至约 40℃，优选 37℃下培养。该细胞优选在孵化器中培养。所述培养基可以是静态的或摇动的，例如使用生物反应器。胎盘干细胞优选在低氧化压力(例如，添加了谷胱甘肽、抗坏血酸、过氧化氢酶、维生素 E、N-乙酰半胱氨酸等)下生长。

一旦获得 70%-90%的汇合，则可将细胞传代。例如，可用本领域熟知的技术酶处理，如胰蛋白酶化该细胞，以使其从组织培养表面分离。在用移液管将所述细胞移出并进行细胞计数后，将约 20,000-100,000 个干细胞，优选约 50,000 个干细胞传代至含有新鲜培养基的新培养容器中。通常，该新培养基与该干细胞从中移出的培养基类型相同。本发明提供的胎盘干细胞群至少已被传代 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18 或 20 次，或更多次。

5.3.3. 胎盘干细胞群

本发明进一步提供了胎盘干细胞群。胎盘干细胞群可以直接从一个或多个胎盘分离，也就是说，该胎盘干细胞群可以是包括胎盘干细胞的胎盘细胞群，获自或包含在灌洗液中，或获自或包含在消化物中(即通过酶消化胎盘或其部分获得的细胞集合)。也可以培养和扩增本发明所提供的分离的胎盘干细胞以产生胎盘干细胞群。也可以培养和扩增包括胎盘干细胞的胎盘细胞群以

产生胎盘干细胞群。

本发明所提供的胎盘干细胞群包括胎盘干细胞，例如本发明所述的胎盘干细胞。在各种实施方案中，在分离的胎盘干细胞的群中至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或 99%的细胞是胎盘干细胞。也就是说，胎盘干细胞群可包括例如多达 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的非干细胞。

本发明提供了通过例如选择来自酶消化或灌洗的表达具体标记和/或具体培养或形态学特征的胎盘干细胞来生产分离的胎盘干细胞的群的方法。在一实施方案中，例如，本发明提供了生产细胞群的方法，该方法包括选择如下胎盘细胞，其 a)贴壁到底物，和 b)表达 CD200 和 HLA-G；和从其他细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中，该生产细胞群的方法包括选择如下胎盘细胞，其(a)贴壁到底物，和(b)表达 CD73、CD105 和 CD200；和从其他细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中，该生产细胞群的方法包括选择如下胎盘细胞，其(a)贴壁到底物，和(b)表达 CD200 和 OCT-4；和从其他细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中，该生产细胞群的方法包括选择如下胎盘细胞，其(a)贴壁到底物，(b)表达 CD73 和 CD105，和(c)当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时，有利于在包括所述干细胞的胎盘细胞的群中形成一个或多个拟胚体；从其他细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中，该生产细胞群的方法包括选择如下胎盘细胞，其(a)贴壁到底物，和(b)表达 CD73、CD105 和 HLA-G；和从其他细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一实施方案中，该生产细胞群的方法包括选择如下胎盘细胞，其(a)贴壁到底物，(b)表达 OCT-4，和(c)当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时，有利

于在包括所述干细胞的胎盘细胞的群中形成一个或多个拟胚体；和从其他细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在上述任何实施方案中，这种方法还可以包括选择表达 ABC-p(胎盘特异性 ABC 转运蛋白；例如参见 Allikmets 等, Cancer Res. 58(23): 5337-9 (1998))的胎盘细胞。该方法还可以包括选择表现出例如间质干细胞所特有的至少一种特征，例如表达 CD29、表达 CD44、表达 CD90、或以上组合的细胞。

在上述实施方案中，所述底物可以是任何在其上细胞如胎盘干细胞的培养/或选择能够完成的表面。一般来说，底物是塑料，例如组织培养皿或多孔塑料板。组织培养塑料可涂布有生物分子，例如层连蛋白或纤连蛋白。

可以通过细胞选择领域熟知的任何方法选择细胞，例如胎盘干细胞用于胎盘干细胞群。例如，可以用一种或多种细胞表面标记的一种或多种抗体选择细胞，例如在流式细胞仪或 FACS 中选择。可用抗体结合磁珠进行选择。针对某些干细胞相关标记有特异性的抗体是本领域熟知的。例如，针对 OCT-4(Abeam, Cambridge, MA)、CD200(Abcam)、HLA-G(Abcam)、CD73(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA)、CD105(Abcam; BioDesign International, Saco, ME)等的抗体。针对其他标记的抗体也可以从商业途径得到，例如针对 CD34、CD38 和 CD45 的抗体可从例如 StemCell Technologies 或 BioDesign International 购得。

所述的分离的胎盘干细胞的群可包括不是干细胞的胎盘细胞，或不是胎盘细胞的细胞。

分离的胎盘干细胞的群可以与非干细胞或非胎盘细胞的一种或多种群组合。例如，胎盘干细胞的分离群可以与血(例如，胎盘血或脐血)、血液来源的干细胞(例如，胎盘血或脐血来源的干细胞)、血液来源的有核细胞的群、

骨髓来源的间充质细胞、骨来源的干细胞群、天然骨髓、成人(体)干细胞、包含在组织中的干细胞的群、培养的干细胞、完全分化的细胞的群(例如软骨细胞、成纤维细胞、羊水细胞、成骨细胞、肌细胞、心肌细胞等)等组合。比较每个细胞群中的总有核细胞数,分离的胎盘干细胞群中的细胞可以与另一种类型的多种细胞以如下比例组合: 约 100,000,000:1、50,000,000:1、20,000,000:1、10,000,000:1、5,000,000:1、2,000,000:1、1,000,000:1、500,000:1、200,000:1、100,000:1、50,000:1、20,000:1、10,000:1、5,000:1、2,000:1、1,000:1、500:1、200:1、100:1、50:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1、1:2、1:5、1:10、1:100、1:200、1:500、1:1,000、1:2,000、1:5,000、1:10,000、1:20,000、1:50,000、1:100,000、1:500,000、1:1,000,000、1:2,000,000、1:5,000,000、1:10,000,000、1:20,000,000、1:50,000,000 或约 1:100,000,000。分离的胎盘干细胞群中的细胞可以与多种细胞类型的多种细胞组合。

在一实施方案中,胎盘干细胞的分离群与多种造血干细胞组合。这些造血干细胞可以是,例如包含在未加工的胎盘、脐血或外周血中;包含在胎盘血、脐血或外周血的总有核细胞中;包含在胎盘血、脐血或外周血的 CD34⁺细胞的分离群中;包含在未处理骨髓中;包含在骨髓的总有核细胞中;包含在来自骨髓的 CD34⁺细胞的分离群中等。

5.4. 胎盘干细胞和胎盘灌洗液或胎盘灌洗细胞的组合

本发明提供了胎盘灌洗液与所提供的分离的胎盘灌洗细胞和/或胎盘干细胞的组合。在此,所述胎盘干细胞可以是 CD34⁺胎盘干细胞、CD34⁻胎盘干细胞或两者的组合。在一实施方案中,例如,本发明提供了一定体积的补充了多种胎盘灌洗细胞和/或多种胎盘干细胞的胎盘灌洗液。在具体的实施方案中,例如,每毫升胎盘灌洗液补充了约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、

5×10^6 或更多的胎盘灌洗细胞或胎盘干细胞。在另一实施方案中,多种胎盘灌洗细胞被补充了胎盘灌洗液和/或胎盘干细胞。在另一实施方案中,多种胎盘干细胞被补充了胎盘灌洗液和/或多种胎盘灌洗细胞。在某些实施方案中,当灌洗液用于补充时,该灌洗液的体积等于、大于或小于细胞(在溶液中)加灌洗液总体积的约 50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2% 或 1%。当胎盘灌洗细胞被用于补充多种胎盘干细胞时,该胎盘灌洗细胞通常包括等于、大于或小于胎盘灌洗细胞加胎盘干细胞总数的约 50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2% 或 1%。同样地,当胎盘干细胞用于补充多种胎盘灌洗细胞时,该胎盘干细胞通常包括等于、大于或小于胎盘灌洗细胞加胎盘干细胞总数的大约 50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2% 或 1%。当胎盘干细胞或胎盘灌洗细胞用于补充胎盘灌洗液时,悬浮细胞的溶液(例如盐溶液、培养基等)体积包括等于、大于或小于灌洗液加细胞总体积的约 50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2% 或 1%,其中,在补充之前,将该胎盘干细胞悬浮成每毫升 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多个细胞。

本发明还提供了从两种或两种以上来源,例如两个或两个以上胎盘获得并组合(如汇集)的汇集的胎盘灌洗液。这种汇集的灌洗液可以包括每种来源的大约相等体积的灌洗液,或可以包括每种来源的不同体积的灌洗液。每种来源的相对体积可以随机选择,或依据例如一种或多种细胞因子,如细胞因子、生长因子、激素等的浓度或数量;每种来源的灌洗液中胎盘细胞的数量;或每种来源的灌洗液的其他特征来选择。同样地可以汇集同一胎盘多次灌洗的灌洗液。

同样地, 本发明提供了从两种或两种以上来源, 例如两个或两个以上胎盘获得并汇集的胎盘灌洗细胞和胎盘干细胞。这种汇集的细胞可以包括两种或两种以上来源的大约相等数量的细胞, 或一种或多种汇集来源的不同数量的细胞。来自每种来源的细胞的相对数量可以根据, 例如被汇集的细胞中一种或多种特定细胞类型的数量, 例如 CD34⁺干细胞的数量等来选择。

汇集可以包括例如补充了胎盘灌洗细胞的胎盘灌洗液、补充了胎盘干细胞的胎盘灌洗液、补充了胎盘灌洗细胞和胎盘干细胞的胎盘灌洗液、补充了胎盘灌洗液的胎盘灌洗细胞、补充了胎盘干细胞的胎盘灌洗细胞、补充了胎盘灌洗液和胎盘干细胞的胎盘灌洗细胞、补充了胎盘灌洗液的胎盘干细胞; 补充胎盘灌洗细胞的胎盘干细胞; 或补充胎盘灌洗细胞和胎盘灌洗液的胎盘干细胞。

在某些实施方案中, 将胎盘灌洗液、胎盘灌洗细胞和胎盘干细胞提供为药物级给药单位。这种单位可以以离散的体积提供, 例如 100 mL、150 mL、200 mL、250 mL、300 mL、350 mL、400 mL、450 mL、500 mL 等。这种单位也可以提供成包含特定量的例如胎盘灌洗细胞、胎盘灌洗液来源的中间自然杀伤细胞、或两者, 例如, 每毫升 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多个细胞, 或每单位 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多个细胞。这种单位可以被提供成包含特定数量的胎盘灌洗液、胎盘灌洗细胞和/或胎盘干细胞中的任意两种或三种。

在上述胎盘灌洗液、胎盘灌洗细胞和/或胎盘干细胞组合中, 胎盘灌洗液、胎盘灌洗细胞和/或胎盘干细胞的任意一种、任意两种或三种可以是受体自体来源的(即来自受体), 或与受体同源的(即从与所述受体不同的另一个体获

得)。

本发明还提供了包括与胎盘灌洗细胞和/或胎盘灌洗液组合的胎盘干细胞的组合物。因此，在另一方面，本发明提供了包括分离的胎盘干细胞的组合物，其中所述胎盘干细胞从胎盘灌洗液中分离，其中所述胎盘干细胞包括该组合物中至少 50% 的细胞。在具体实施方案中，所述胎盘干细胞包括该组合物中至少 80% 的细胞。在另一具体实施方案中，该组合物包括分离的胎盘灌洗液。在更具体的实施方案中，所述胎盘灌洗液与所述胎盘干细胞来自同一个体。在另一更具体的实施方案中，所述胎盘灌洗液与所述胎盘干细胞来自不同个体。在另一具体实施方案中，该组合物包括胎盘灌洗细胞。在更具体的实施方案中，所述胎盘灌洗细胞与所述胎盘干细胞来自同一个体。在另一更具体的实施方案中，所述胎盘灌洗细胞与所述胎盘干细胞来自不同个体。在另一具体实施方案中，该组合物还包括分离的胎盘灌洗液和分离的胎盘灌洗细胞，其中所述分离的灌洗液和所述分离的胎盘灌洗细胞来自不同个体。在包括胎盘灌洗液的任意上述实施方案的更具体实施方案中，所述胎盘灌洗液包括来自至少两个个体的胎盘灌洗液。在包括胎盘灌洗细胞的任意上述实施方案的更具体实施方案中，所述胎盘灌洗细胞来自至少两个个体。

5.5. 胎盘干细胞库的生成

来自产后胎盘的干细胞可以以许多不同的方式培养，以产生胎盘干细胞的一系列批次，如一系列单个给药剂量。这种批次可以，例如从来源于胎盘灌洗液或来源于酶消化的胎盘组织的干细胞中获得。从多种胎盘获得的多种胎盘干细胞批次系列可以制成胎盘干细胞库，以用于例如长期贮存。一般来说，贴壁干细胞从胎盘材料的最初培养物中获得，以形成种子培养物，然后在受控条件下扩增，以从大约相当于倍增的数量形成细胞群。批次优选地来

自单一胎盘组织，但可以从多个胎盘组织获得。

在一实施方案中，干细胞批次按如下方法获得：首先裂解胎盘组织，例如通过切碎，用合适的酶如胶原酶(见上第 5.2.3 部分)消化来裂解。该胎盘组织优选包括例如来自单一胎盘的整个羊膜、整个绒毛或两者，但只可以包括羊膜或绒毛膜的一部分。培养消化后的组织，例如约 1-3 周，优选约 2 周。移出非贴壁细胞后，收集形成的高密度集落，例如通过胰蛋白酶作用收集。收集这些细胞并将其悬浮在合适体积的培养基中，并定义为 0 代细胞。

然后用 0 代细胞接种扩增培养物。扩增培养物可以是独立细胞培养装置的任意设置，例如，NUNC™的细胞工厂。0 代培养的细胞可以细分到任意程度，从而可以以例如 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、 1×10^4 、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 或 10×10^4 个干细胞接种扩增培养物。优选地，用约 2×10^4 或 3×10^4 个 0 代细胞接种每个扩增培养物。扩增培养物的数量取决于 0 代细胞的数量，根据获取所述干细胞的具体胎盘可以更多或更少。

生长扩增培养物直到培养细胞密度达到一定值，例如约 1×10^5 个细胞/ cm^2 。在这时可以收集细胞并将其低温保存，或如上所述传代至新的扩增培养物中。细胞在使用之前可被传代例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 次。优选在扩增培养期间维持细胞群倍增的累计次数记录。0 代培养的细胞可扩增成倍增 2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38 或 40 次，或多达 60 次。但是，在将细胞细胞群分为单独剂量之前，细胞群倍增次数优选为约 15 至约 30 次，优选约 20 次。该细胞可以在整个扩增过程中连续培养，或在扩增过程中在一个或多个点被冷冻。

用于单独剂量的细胞可被冷冻，如低温保存，以供以后使用。单独剂量可以包括例如每毫升约有 100 万至约 1 亿个细胞，和包括总共约 10^6 至 10^9 个细胞。

在所述方法的具体实施方案中，将 0 代细胞培养倍增约 4 次，然后冷冻到第一个细胞库中。来自该第一个细胞库的细胞被冷冻，并用于接种第二细胞库，该第二细胞库的细胞被另外倍增约 8 次。收集此阶段的细胞并将其冷冻，用于接种允许进行另外的约 8 次倍增的新扩增培养物，以使细胞倍增的累积次数达到约 20 次。传代中间点的细胞可以以每毫升约 10 万至约 1,000 万个细胞，优选每毫升约 100 万个细胞为单位冷冻，用于随后的扩增培养。进行了约 20 次倍增的细胞可以以每毫升约 100 万至约 1 亿个细胞的单独剂量冷冻，用于给药或制备含有干细胞的组合物。

在优选实施方案中，获取胎盘的供体(例如母亲)进行至少一种病原体检查。如果在母亲的测试中检测病原呈阳性，则抛弃来自该胎盘的所有批次。这种测试可以在生产胎盘干细胞批次过程中的任何时间，包括建立 0 代细胞之前或之后，或在扩增培养过程中进行。检测存在的病原体可以包括但不限于甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、戊型肝炎、人类免疫缺陷病毒(I 和 II 型)、巨细胞病毒、疱疹病毒等。

5.6. 贴壁胎盘干细胞的分化

5.6.1. 分化成神经元细胞或神经细胞的诱导

胎盘干细胞的神经细胞分化可以例如通过将胎盘干细胞置于诱导分化为神经元的细胞培养条件下来完成。在示例性方法中，神经培养基包含 DMEM/20%FBS 和 1 mM 的 β -巯基乙醇。这种培养基可在培养大约 24 小时后用由 DMEM 和 1-10 mM β -巯基乙醇组成的培养基代替。在另一实施方案

中,使细胞与 DMEM/2% DMSO/200 μ m 丁羟茴醚接触。在具体实施方案中,该分化培养基包含无血清的 DMEM F-12、丁羟茴醚、氯化钾、胰岛素、佛司可林、丙戊酸和氢化可的松。在另一实施方案中,神经细胞分化通过将胎盘干细胞平铺到层连蛋白涂布的平板上的 Neurobasal-A 培养基(Invitrogen, 卡尔斯巴德 CA)中完成,该培养基含有 B27 添加剂和 L-谷氨酰胺,任选补充了 bFGF 和/或 EGF。胎盘干细胞还可以通过与神经细胞共培养或在神经细胞条件培养基中培养来诱导神经分化。

神经分化可以进行评估,例如通过检测神经元样形态(例如,包含延长突起的双极细胞);检测表达,如通过 RT/PCR 检测神经生长因子受体和神经纤维丝重链基因的表达;或检测电活动,例如通过膜片钳检测,进行评估。

5.6.2. 诱导分化成脂肪细胞

胎盘的成脂分化可以例如通过将胎盘干细胞置于诱导分化为脂肪细胞的细胞培养条件下来完成。优选的成脂培养基包括 MSCGM(Cambrex)或补充了 15% 脐血血清的 DMEM。在一实施方案中,将胎盘干细胞维持在脂肪形成诱导培养基(Cambrex)中并培养 3 天(在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂),然后在脂肪形成维持培养基(Cambrex)中培养 1-3 天。经过 3 个完整周期的诱导/维持后,将细胞在脂肪形成维持培养基中再培养 7 天,每 2-3 天更换培养基。

在另一实施方案中,将胎盘干细胞培养在含有 1 μ M 地塞米松、0.2 mM 吲哚美辛、0.01 mg/ml 胰岛素、0.5 mM IBMX、高糖 DMEM、FBS 及抗生素的培养基中。胎盘干细胞还可以通过在含有一种或多种糖皮质激素(如地塞米松、吲哚美沙松(indomethasone)、氢化可的松、可的松)、胰岛素、提高细胞内 cAMP 水平的化合物(如二丁酰-cAMP、8-CPT-cAMP(8-(4)氯苯基硫)-腺苷, 3',5'环单磷酸)、8-溴-cAMP、二辛酰-cAMP、佛司可林)和/或抑制 cAMP 降解

的化合物(如磷酸二酯酶抑制剂如异丁基甲基黄嘌呤(IBMx)、甲基异丁基黄嘌呤、茶碱、咖啡因、吡啶美辛)的培养基中培养而诱导形成脂肪。

脂肪形成的标志是产生多种胞质内脂囊泡,其用亲油性油红 O 染色可以很容易地观察到。在已经开始分化成脂肪细胞的胎盘干细胞中,通过 RT/PCR 确认脂肪酶和/或脂肪酸结合蛋白基因的表达。

5.6.3. 诱导分化成软骨细胞

胎盘干细胞的软骨分化可以例如通过将胎盘干细胞置于诱导分化为软骨细胞的细胞培养条件下来完成。优选的软骨化培养基包括 MSCGM(Cambrex)或补充了 15%脐血血清的 DMEM。在一实施方案中,将胎盘干细胞等份分装到无菌聚丙烯管中,离心(例如,在 $150 \times g$ 5 分钟),并在不完全软骨培养基(Cambrex)中清洗两次。将所述细胞以约 $1-20 \times 10^5$ 个细胞/mL 的浓度悬浮在含有 $0.01 \mu\text{g/ml}$ TGF- β -3 的完全软骨培养基(Cambrex)中。在其他实施方案中,将胎盘干细胞与外源性生长因子,例如 GDF-5 或转化生长因子 β 3(TGF- β 3)接触,使用或不使用抗坏血酸。软骨培养基可以补充有氨基酸包括脯氨酸和谷氨酰胺、丙酮酸钠、地塞米松、抗坏血酸、和胰岛素/转铁蛋白/硒。软骨培养基可以补充有氢氧化钠和/或胶原蛋白。胎盘干细胞可以高或低密度培养。细胞优选无血清培养。

软骨形成可以如下进行评估,例如通过观察嗜伊红基质的生成,葡糖胺聚糖表达的番红-O 染色,苏木精/伊红染色,评估细胞形态和/或用 RT/PCR 验证胶原蛋白 2 和胶原 9 基因的表达。软骨形成还可以通过例如使,例如轻轻离心悬液中的干细胞(例如,在 $800g$ 约 5 分钟)所形成的沉淀小球中的干细胞生长来观察。约 1-28 天后,干细胞球开始形成硬基质并显示出在非诱导的或者非软骨细胞的细胞系中观察不到的结构完整性,非诱导的或非软骨细胞

的球在受到刺激时容易瓦解。软骨形成也可以,例如,在这种细胞球中,通过用对胶原蛋白染色的染料(如天狼星红)、和/或对葡糖胺多糖(GAG)染色的染料(如阿新蓝)染色来证实。

5.6.4 诱导分化成成骨细胞

胎盘干细胞的成骨分化可以,例如通过将胎盘干细胞置于诱导分化为成骨细胞的细胞培养条件下完成。优选的骨细胞培养基包括 MSCGM(Cambrex)或补充了15%脐血血清的DMEM,然后置于含有0.1 μM 的地塞米松、0.05mM抗坏血酸-2-磷酸、10 mM β -磷酸甘油的成骨诱导培养基(Cambrex)中。在另一实施方案中,将胎盘干细胞培养在含有约 10^{-7} 至 10^{-9} M地塞米松、约10-50 μM 抗坏血酸磷酸盐(如抗坏血酸-2-磷酸)和约10 nM至约10 mM的 β -磷酸甘油的培养基(例如,低糖DMEM)中。成骨培养基还可以包括血清、一种或多种抗生素/抗真菌剂、转化生长因子- β (如TGF- β 1)和/或骨形态发生蛋白(例如,BMP-2、BMP-4、或其组合)。

分化可以用钙特异性染色如 von Kossa 染色,和用RT/PCR检测如碱性磷酸酶、骨钙素、骨涎蛋白和/或骨桥蛋白基因表达来测定。

5.6.5. 诱导分化成胰腺细胞

胎盘干细胞分化成产生胰岛素的胰腺细胞可以,例如通过将胎盘干细胞置于诱导分化成胰腺细胞的细胞培养条件下完成。

胰腺形成培养基例子包括DMEM/20%CBS,补充了10 ng/ml碱性成纤维细胞生长因子和2 ng/ml转化生长因子 β -1。将这种培养基与巢蛋白阳性神经细胞培养物的条件培养基以50/50 v/v组合。可用KnockOut血清替代品代替CBS。细胞培养14-28天,每3-4天更换培养基。

分化可通过检测如胰岛素蛋白生成, 或通过 RT/PCR 检测胰岛素基因表达来确定。

5.6.6. 诱导分化成心肌细胞

胎盘干细胞的肌(心肌)分化可以, 例如通过将胎盘干细胞置于诱导分化为心肌细胞的细胞培养条件下完成。优选的心肌细胞培养基包括 DMEM/20%CBS, 补充了 1 μ M 维甲酸、10 ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子、和 2 ng/ml 转化生长因子 β -1、和 100 ng/ml 表皮生长因子。KnockOut 血清替代品(Invitrogen, 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州)可用于代替 CBS。或者, 将胎盘干细胞在补充了 50 ng/ml Cardiotropin-1 的 DMEM/20%CBS 中培养 24 小时。在另一实施方案中, 将胎盘干细胞在无蛋白培养基培养 5-7 天, 然后用人体心肌提取液刺激, 例如, 在补充了 1%脐血血清的 1% HEPES 缓冲液中匀化人心肌生成的提取液。

分化可通过利用例如 RT/PCR 技术检测心肌动蛋白基因表达来证实。

5.7 胎盘干细胞的保存

胎盘干细胞可以被保存, 即置于允许长期保存的条件下, 或抑制细胞死亡例如细胞凋亡或坏死的条件下。

胎盘干细胞可以使用, 例如包含细胞凋亡抑制剂、坏死抑制剂和/或携氧全氟化碳的组合物来保存, 该组合物如 2005 年 12 月 25 号提交的、题为“收集胎盘干细胞和保存器官的改进培养基”的相关美国临时申请号 60/754969 中所述。在一实施方案中, 本发明提供了保存干细胞群的方法, 该方法包括将所述干细胞群与包括细胞凋亡抑制剂和携氧全氟化碳的干细胞收集组合物接触, 其中, 与没有接触细胞凋亡抑制剂的干细胞群相比, 所述细胞凋亡抑制

剂以足以减少或防止干细胞群凋亡的量存在足够的时间。在具体实施方案中,所述细胞凋亡抑制剂是半胱天冬酶抑制剂。在另一具体实施方案中,所述细胞凋亡抑制剂是 JNK 抑制剂。在更具体的实施方案中,所述 JNK 抑制剂不调节所述干细胞的分化或增殖。在另一实施方案中,所述干细胞收集组合物包含在分离相中的所述细胞凋亡抑制剂和所述携氧全氟化碳。在另一实施方案中,所述干细胞收集组合物包含乳液中的所述凋亡抑制和所述携氧全氟化碳。在另一实施方案中,所述干细胞收集组合物还包含乳化剂如卵磷脂。在另一实施方案中,所述细胞凋亡抑制剂和所述携氧全氟化碳与所述干细胞接触的时候在 0°C 至约 25°C 之间。在另一更具体的实施方案中,所述细胞凋亡抑制剂和所述携氧全氟化碳在与干细胞接触的时候约 2°C 至 10°C 之间,或约 2°C 至约 5°C 之间。在另一更具体的实施方案中,所述接触是在干细胞群运输过程中进行。在另一更具体的实施方案中,所述接触是在干细胞群冷冻和解冻期间进行。

在另一实施方案中,本发明提供了保存胎盘干细胞群的方法,该方法包括将所述干细胞群与细胞凋亡抑制剂和器官保存化合物接触,其中,与没有接触细胞凋亡抑制剂的干细胞群相比,所述细胞凋亡抑制剂以足以减少或防止干细胞群凋亡的量存在足够的时间。在具体实施方案中,所述器官保存化合物为 UW 液(如美国专利号 4,798,824 中的描述,也称为 ViaSpan,还可参见 Southard 等, Transplantation 49(2):251-257 (1990)), 或者如 Stern 等的美国专利号 5,552,267 中所描述的溶液。在另一实施方案中,所述器官保存化合物为羟乙基淀粉、乳糖酸、棉子糖、或其两者结合。在另一实施方案中,所述干细胞收集组合物还包含携氧全氟化碳,无论是在两相中或在乳液中。

在所述方法的另一实施方案中,将胎盘干细胞在灌洗过程中与干细胞收

集组合物接触,该组合物包含细胞凋亡抑制剂和携氧全氟化碳、器官保存化合物、或其组合。在另一实施方案中,所述干细胞在组织裂解,如酶消化过程中接触。在另一实施方案中,胎盘干细胞在灌洗收集后,或在组织裂解如酶消化收集后与所述干细胞收集化合物接触。

一般来说,在胎盘细胞收集、富集和分离过程中,优选尽可能降低或消除因缺氧和机械应力所产生的细胞压力。因此,在所述方法的另一实施方案中,干细胞或干细胞群在所述保存过程中在收集、富集或分离时暴露于缺氧条件少于6个小时,其中缺氧条件是氧气的浓度低于正常血氧浓度。在更具体的实施方案中,所述干细胞群在所述保存过程中暴露于所述缺氧条件少于两小时。在另一项更具体的实施方案中,所述干细胞群在收集、富集或分离过程中暴露于所述缺氧条件少于一小时、或少于30分钟,或者不暴露于缺氧条件。在另一具体实施方案中,所述干细胞群在收集、富集或分离过程中未暴露于剪切应力。

本发明所提供的胎盘干细胞可以被低温保存,例如保存在小容器,如安瓿中的低温保存培养基中。适合的低温保存培养基包括但不限于这些培养基,包括例如生长培养基或细胞冷冻培养基,如市售细胞冷冻培养基,如C2695、C2639和C6039(Sigma)。低温保存培养基优选包含DMSO(二甲基亚砷),其浓度为例如约10%(v/v)。低温保存培养基可以包含其他试剂,例如甲基纤维素和/或甘油。在低温保存过程中胎盘干细胞优选以约1°C/分钟的速度冷却。优选的低温保存温度为约-80°C至约-180°C,优选约-125°C至约-140°C。低温保存细胞在解冻使用之前可以被转移到液氮。在一些实施方案中,例如,一旦所述安瓿达到了约-90°C,就将它们转移到液氮储存区。低温保存细胞优选在温度约25°C至约40°C下解冻,优选在约37°C下解冻。

5.8 胎盘干细胞的应用

5.8.1 胎盘灌洗液、干细胞和干细胞群

胎盘干细胞群可以用来治疗适于通过干细胞群给药治疗的任何疾病、病症或病变。如本文所用的“治疗”包括治愈、缓解、改善疾病、病症或病变、或其任意参数或症状、降低其严重性，或减少其时间期间。

胎盘干细胞和胎盘干细胞群可以在体内或体外被诱导分化成特定细胞类型，以预备向需要干细胞或干细胞分化的细胞的个体给药。例如，胎盘干细胞可以被注射到受损器官，用于器官新生和体内损伤的修复。这种损伤可以由包括但不限于骨缺损的病变和病症所引起的，该骨缺损包括由于癌症、骨折、可用如脊柱融合术治疗的脊柱病症所引起的损害。该胎盘干细胞可以被单独注射到受损骨中或可以与本文所述的可植入基质一起导入。在具体实施方案中，胎盘干细胞的分离群可以用来治疗特定疾病或病变，包括但不限于多发性骨髓瘤、癌包括骨癌、神经母细胞瘤、骨肉瘤、尤文氏肉瘤、软骨肉瘤、脊索瘤、骨恶性纤维组织细胞瘤、骨纤维肉瘤、转移癌、多发性骨髓瘤、和任何以骨转移酶为特征的转移癌形式。本领域的普通技术人员应该理解，治疗由癌引起的骨缺损并不必定地会消除癌本身。本发明所提供的骨缺损治疗可在额外的癌疗法之前、之后或同时进行。因此，在一实施方案中，骨缺损治疗在所述癌症用抗癌疗法治疗之前进行。在另一实施方案中，骨缺损治疗在所述癌症用抗癌疗法治疗的同时或接近同时进行。在另一实施方案中，骨缺损治疗在所述癌症用抗癌疗法治疗之后进行。

分离的胎盘灌洗液，胎盘灌洗细胞，和/或胎盘干细胞的分离群也可用于治疗骨折，如非联合性骨折。胎盘干细胞的分离群也可用于融合腰椎，以例如在有此需要的个体中完成融合术。分离的胎盘干细胞群与干或祖细胞群组

合可用于治疗上述疾病。

在上述治疗骨缺损方法的某些实施方案中，胎盘灌洗液，胎盘灌洗细胞和/或胎盘干细胞，例如贴壁或非贴壁胎盘干细胞可以给予患有骨缺损的个体。这种个体可以给予例如从胎盘获得的胎盘灌洗液；已经处理除去了一种或多种细胞类型，如红细胞的胎盘灌洗液；从胎盘灌洗液分离的胎盘灌洗细胞；或任何上述的组合。这种组合还可以包括如本说明书其他部分所述的分离的贴壁胎盘干细胞和/或分离的非贴壁胎盘干细胞。可用于治疗骨缺损或患有骨缺损的个体的胎盘灌洗液、分离的胎盘灌洗细胞和/或胎盘干细胞的组合如上文第 5.4 部分所述。

在所述治疗方法的具体实施方案中，所述胎盘细胞包含在完整的(未处理的)胎盘灌洗液中。在另一具体实施方案中，该胎盘细胞为胎盘灌洗细胞。在另一具体实施方案中，该胎盘细胞为胎盘干细胞。在某些更具体的实施方案中，该干细胞是不贴壁的。在某些实施方案中，该干细胞是 CD34⁺的。在某些实施方案中，该干细胞是 CD44⁻的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD34⁺和 CD44⁻的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺或 CD166⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺和 CD166⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺或 CD200⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺和 CD200⁺的。在某些实施方案中，至少大约 70%的所述细胞为 CD34⁺和 CD44⁻干细胞。在某些实施方案中，至少大约 90%的所述细胞为 CD34⁺和 CD44⁻干细胞。在该方法的某些其他实施方案中，所述胎盘干细胞是贴壁的。在某些具体实施方案中，该胎盘干细胞是 CD200⁺和 HLA-G⁺的；CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺的；CD200⁺和 OCT-4⁺的；CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺的；CD73⁺

和 CD105⁺的, 且当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时, 其有利于在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个拟胚体; 或者 OCT-4⁺的且当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时, 其有利于在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个拟胚体; 或其任意组合。在某些非贴壁胎盘干细胞更具体的实施方案中, 该分离的 CD200⁺、HLA-G⁺干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺和 CD105⁺的; 该分离的 CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻和 HLA-G⁺的; 该分离的 CD200⁺、OCT-4⁺干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺的; 如权利要求1所述的分离的干细胞, 其中所述 CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺干细胞是 CD34⁻、CD45⁻、OCT-4⁺和 CD200⁺的; 有利于一个或多个拟胚体形成的所述分离的 CD73⁺和 CD105⁺干细胞是 OCT-4⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的; 和/或所述 OCT-4⁺的且有利于一个或多个拟胚体形成的分离的干细胞是 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在某些实施方案中, 该胎盘干细胞群已经被扩增。

当胎盘灌洗液、胎盘灌洗细胞或胎盘干细胞以悬浮液或注射液给予时, 所述细胞可静脉给予, 或优选地给予到骨缺损部位如骨折处。

本文也提供了治疗个体骨缺损的方法, 该方法包括给予有此需要的个体包含本发明所提供的干细胞群的可植入或可注射组合物, 从而治疗该个体的骨缺损。在某些实施方案中, 该骨缺损是与癌症有关的溶骨性损伤、骨折、或脊柱如需要融合的脊柱。在某些实施方案中, 该溶骨性损伤与多发性骨髓瘤、骨癌或转移癌相关。在某些实施方案中, 该骨折是非联合性骨折。在某些实施方案中, 将包含非贴壁干细胞群的可植入组合物给予个体。在某些实施方案中, 可植入组合物通过手术植入, 例如, 植入到骨缺损部位。在某

些实施方案中，将包含非贴壁干细胞群的可注射组合物给予个体。在某些实施方案中，该可注射组合物通过手术给予至骨缺损区域。在某些实施方案中，系统性地给予该可注射组合物。

在另一方面，本发明提供了配制可注射组合物的方法，该方法包括将胎盘细胞群与可注射的透明质酸或胶原蛋白组合。在具体实施方案中，该胎盘细胞包含在完整的(未处理)胎盘灌洗液中。在另一具体实施方案中，该胎盘细胞为胎盘灌洗细胞。在另一具体实施方案中，该胎盘细胞为胎盘干细胞。在某些更具体的实施方案中，该干细胞是不贴壁的。在某些实施方案中，该干细胞是 CD34⁺的。在某些实施方案中，该干细胞是 CD44⁻的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD34⁺和 CD44⁻的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺或 CD166⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD9⁺、CD54⁺、CD90⁺和 CD166⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺或 CD200⁺的。在某些实施方案中，所述干细胞是 CD31⁺、CD117⁺、CD133⁺和 CD200⁺的。在某些实施方案中，至少大约 70% 的所述细胞为 CD34⁺和 CD44⁻干细胞。在某些实施方案中，至少大约 90% 的所述细胞为 CD34⁺和 CD44⁻干细胞。在该方法的某些其他实施方案中，所述胎盘干细胞是贴壁的。在具体实施方案中，该贴壁胎盘干细胞是 CD200⁺和 HLA-G⁺的；CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺的；CD200⁺和 OCT-4⁺的；CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺的；CD73⁺和 CD105⁺的，且当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时，其有利于在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个拟胚体；或者 OCT-4⁺的且当所述胎盘细胞群在允许拟胚体形成的条件下培养时，其有利于在包括所述干细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个拟胚体；或其任意组合。在某些非贴壁胎盘干细胞更具体的实施方案中，该分离的

CD200⁺、HLA-G⁺干细胞是CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺和CD105⁺的；该分离的CD73⁺、CD105⁺和CD200⁺干细胞是CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻和HLA-G⁺的；该分离的CD200⁺、OCT-4⁺干细胞是CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺、CD105⁺和HLA-G⁺的；如权利要求1所述的分离的干细胞，其中所述CD73⁺、CD105⁺和HLA-G⁺干细胞是CD34⁻、CD45⁻、OCT-4⁺和CD200⁺的；有利于一个或多个拟胚体形成的所述分离的CD73⁺和CD105⁺干细胞是OCT-4⁺、CD34⁻、CD38⁻和CD45⁻的；和/或所述OCT-4⁺的且有利于一个或多个拟胚体形成的分离的干细胞是CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻、CD38⁻和CD45⁻的。在某些实施方案中，该胎盘细胞群已经被扩增。在某些实施方案中，所述组合物包含可注射的透明质酸。在某些实施方案中，该组合物包含可注射的胶原蛋白。本发明还提供了包含非贴壁干细胞群和可注射的透明质酸或胶原蛋白的组合物。

胎盘干细胞可以不经引起干细胞分化的条件下培养而给予。或者，在给予之前将该干细胞培养在，例如成骨细胞培养基中，例如大约1至20天。或者，可以将胎盘干细胞分离并接种到基质，然后在成骨细胞培养基中培养，如约1-20天。在另一实施方案中，可以将胎盘干细胞培养在，如成骨细胞培养基中，例如大约1至20天，然后接种到基质中，然后如上所述在成骨细胞培养基中培养，例如大约1至20天。

在其他实施方案中，胎盘干细胞的分离群可用于自体或异体组织再生或替代疗法或方法，包括但不限于角膜上皮缺损治疗、软骨修复、面部磨削术、黏膜、鼓膜、肠片、神经学结构(例如视网膜、基底膜的听觉神经元、嗅上皮的嗅觉神经元)、皮肤创伤的烧伤和创伤修复、或用于受损或患病的其他器官或组织的重建。

在某些实施方案中，将胎盘干细胞的分离群用于在遭受过造血干细胞部分或全部损失的个体，如暴露于致命或亚致死剂量的辐射(不论工业、医疗或军事上的辐射)的个体、进行过作为例如癌症治疗的一部分的骨髓肃清(myeloablation)的个体等中进行造血重建。胎盘干细胞的分离群可以用来代替或补充骨髓或骨髓来源的干细胞群。一般来说，在骨髓移植中以每千克患者体重大约 1×10^8 至 2×10^8 个骨髓单核细胞注入以用于植入(即对于 70 千克的捐献者约 70 mL 骨髓)。如果要获取 70 mL，则需要集中捐献并且在捐赠过程中捐献者丧失大量血液。在各种实施方案中，用于造血重建的胎盘干细胞的分离群可包括大约、至少、或不超过 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多个胎盘干细胞。

本发明所提供的胎盘干细胞，单独或与其他干细胞或祖细胞群组合，可用于体内制备组织或器官。本发明所提供的方法包括用从胎盘得到的细胞，例如干细胞或祖细胞接种到基质，并在适当的条件下培养，以使该细胞分化并在基质上扩增。由本发明所提供的方法获得的所述组织和器官可用于各种用途，包括研究和治疗目的。

在优选实施方案中，本发明所提供的贴壁胎盘干细胞和这种干细胞的群可用于自体 and 异体移植，包括匹配和不匹配的 HLA 类型造血移植。在将胎盘干细胞用作异体造血移植物的实施方案中，所述宿主被处理以减少供体细胞的免疫排斥反应，或建立免疫耐受性(例如参见美国专利 5,806,539 和 5,806,529)。在另一实施方案中，该宿主未经处理来减少免疫排斥反应或建立免疫耐受性。

胎盘干细胞，无论是单独或与一种或多种其他干细胞群组合，可用于治疗性移植方案，例如增加或替换肝、胰、肾、肺、神经系统、肌肉系统、骨、

骨髓、胸腺、脾、粘膜组织、生殖腺或头发的干或祖细胞。此外，在通常使用祖细胞的治疗或研究方案中，胎盘干细胞可以用来代替特定类型的祖细胞(如软骨细胞、肝细胞、造血细胞、胰腺实质细胞、神经母细胞、肌肉祖细胞等)。

本发明所提供的胎盘干细胞及其干细胞群可用于扩增、修复或更换软骨、肌腱或韧带。例如，在某些实施方案中，假肢(如髋关节假体)可用由本发明所提供的胎盘干细胞生长成的替代软骨组织结构包被。在其他一些实施方案中，关节(如膝关节)可用由本发明所提供的胎盘干细胞生长成的软骨组织结构重建。软骨组织结构也可以用于不同类型关节的主要重建手术(例如，见 Resnick & Niwayama 合编，1988，*Diagnosis of Bone and Joint Disorders*，第二版，W. B. Saunders Co)。

本发明所提供的贴壁胎盘干细胞可以用来修复由如创伤、代谢性病症、或疾病造成的组织和器官损伤。在这种实施方案中，可以向患者给予胎盘干细胞，单独与其他干或祖细胞群组合，以再生或恢复因疾病而被破坏的组织或器官。

5.8.2. 包含胎盘干细胞的组合物

本发明提供了包含胎盘干细胞或由该干细胞所生成的生物大分子的组合物。本发明所提供的贴壁胎盘干细胞可与任何生理学上可接受的或医学上可接受的化合物、组合物或装置组合，以用于例如研究或治疗。

5.8.2.1. 低温保存的胎盘干细胞

本发明所提供的胎盘干细胞群可以被保存，例如低温保存以供以后使用。细胞例如干细胞的低温保存方法是本领域公知的。胎盘干细胞群可以制备成

易于向个体给药的形式。例如，本发明提供了包含在适于医疗用途的容器中的胎盘干细胞群。这种容器可以是，例如消毒的塑料袋、瓶、罐或胎盘干细胞群易于从其中分散的其他容器。例如，该容器可以是适于向个体静脉给药的血液袋或其他塑料、医疗可接受的袋。该容器优选是允许低温保存所述组合干细胞群的容器。

所述低温保存的胎盘干细胞群可以包括来自于单一捐献者或多个捐献者的胎盘干细胞。该胎盘干细胞群可以是与预期受体完全 HLA 匹配的或部分或完全 HLA 不匹配的。

因此，在一实施方案中，本发明提供了在容器中包含胎盘干细胞群的组合物。在具体实施方案中，该干细胞群是低温保存的。在另一具体实施方案中，该容器是袋、瓶或罐。在更具体的实施方案中，所述袋为无菌塑料袋。在更具体的实施方案中，所述袋适合、允许或有利于所述胎盘干细胞群的静脉内给药。该袋可以包括多个相联的内腔或间隔，以允许该胎盘干细胞在给药之前或期间与一种或多种其他溶液，如药物混合。在另一具体实施方案中，该组合物包含一种或多种有利于所述组合干细胞群低温保存的化合物。在另一具体实施方案中，所述胎盘干细胞群包含在生理学上可接受的水性溶液中。在更具体的实施方案中，所述生理学上可接受的水性溶液是 0.9%NaCl 溶液。在另一具体实施方案中，所述胎盘干细胞群包含与所述干细胞群的受体 HLA 匹配的胎盘细胞。在另一具体实施方案中，所述组合干细胞群包含至少部分与所述干细胞群的受体 HLA 不匹配的胎盘细胞。在另一具体实施方案中，所述胎盘干细胞来自于多个捐献者。

5.8.2.2. 药物组合物

胎盘干细胞群或包括胎盘干细胞的细胞群可以制备成体内使用的药物组

合物。这种药物组合物包含在药学上可接受的载体，例如盐溶液或其他认可的体内使用的生理学上可接受的溶液中的胎盘干细胞群或包括胎盘干细胞的细胞群。本发明所提供的药物组合物可包括本文其它部分所述的任何胎盘干细胞群或胎盘干细胞类型。该药物组合物可以包括胎儿、母体、或胎儿和母体两者的胎盘干细胞。本发明所提供的药物组合物还可包含从单一个体或胎盘，或从多个个体或胎盘获得的胎盘干细胞。

本发明所提供的药物组合物可包含任意数量的胎盘干细胞。例如，在各种实施方案中，胎盘干细胞的单一单位剂型可包含约、至少、或不超过 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多个胎盘干细胞。

本发明所提供的药物组合物可包含细胞群，该细胞群包括 50% 或更多的活细胞(即在该细胞群中至少约 50% 的细胞是有功能的或存活的)。优选地，该细胞群中至少约 60% 的细胞是活的。更优选地，该药物组合物的细胞群中至少约 70%、80%、90%、95% 或 99% 的细胞是活的。

本发明所提供的药物组合物可包含一种或多种有利于例如植入的化合物(如抗 T 细胞受体抗体、免疫抑制剂等)；稳定剂如白蛋白、右旋糖酐 40、明胶、羟乙基淀粉等等。

5.8.2.3. 胎盘干细胞条件培养基

本发明所提供的胎盘干细胞可用于生产条件培养液，也就是包含该干细胞分泌或排泄的一种或多种生物分子的培养基。在各种实施方案中，该条件培养基包括在其中胎盘干细胞已经生长至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 天或更多天的培养基。在其他实施方案中，该条件培养基包括在其中胎盘干细胞已生长到至少约 30%、40%、50%、60%、70%、80%、

90%的汇合或达 100%汇合的培养基。这种条件培养基可用来支持另一胎盘干细胞群或另一种干细胞的培养。在另一实施方案中，该条件培养基包括在其中胎盘干细胞已分化成成熟细胞类型的培养基。在另一实施方案中，本发明所提供的条件培养基包括在其中培养有胎盘干细胞和非胎盘干细胞的培养基。

5.8.2.4. 包含胎盘干细胞的基质

本发明还提供包含胎盘干细胞或胎盘干细胞群的基质、水凝胶、支架等。在某些实施方案中，该基质可以是本领域普通技术人员公知的用于治疗骨缺损的任何底物。例如，该基质可以是 β -磷酸三钙底物、 β -磷酸三钙-胶原蛋白底物、胶原蛋白底物、磷酸钙底物、矿化胶原蛋白底物和透明质酸底物。在一些实施方案中，该基质中的胶原蛋白可为胎盘胶原蛋白。分离和制备胎盘胶原蛋白的方法和组合物被广泛描述，例如，在 2006 年 6 月 9 日提交的美国的专利申请号 11/450,934 中有描述。

胎盘干细胞可以在分化步骤之前或之后接种到基质上进行骨治疗。例如，胎盘干细胞可以在如成骨细胞培养基中培养，例如约 1 至 20 天，然后接种到基质上。或者，胎盘干细胞可以分离和接种到基质上，然后在本文所述的成骨细胞培养基中培养，例如约 1 至 20 天。在另一实施方案中，胎盘干细胞在，例如成骨细胞培养基中培养，如约 1-20 天，然后接种到基质上，然后在本文所述的成骨细胞培养基中培养，例如约 1 至 20 天。

胎盘干细胞可以被接种到天然基质上，例如胎盘生物材料，如羊膜材料。这种羊膜材料可以是，如直接从哺乳动物胎盘解剖得到的羊膜，固定或热处理的羊膜，基本上干(即<20%的水)的羊膜，绒毛膜，基本上干的绒毛膜，基本上干的羊膜和绒毛膜等。可以在其上接种胎盘干细胞的优选胎盘生物材料

如 Hariri 的美国申请公开号 2004/0048796 中所述。

本发明所提供的胎盘干细胞可以悬浮在适于如注射的水凝胶溶液中。适于这种组合物的水凝胶包括自组装肽, 如 RAD16。在一实施方案中, 包含所述细胞的水凝胶溶液允许硬化, 例如在模具中硬化, 以形成有细胞分散在其中的基质, 以用于移植。在这种基质中的胎盘干细胞也可以培养, 以使该细胞在植入之前分裂扩增。该水凝胶是, 例如通过共价键、离子键、或氢键交联形成三维开放晶格结构的有机聚合物(天然或合成), 其捕捉水分子从而形成水凝胶。水凝胶形成材料包括多糖如海藻及其盐、肽、聚磷腓和聚丙烯酸酯, 其均离子化交联; 或嵌段聚合物, 如聚环氧乙烷-聚丙二醇(polyethylene oxide-polypropylene glycol)嵌段共聚物, 其通过温度或 pH 值交联。在一些实施方案中, 该水凝胶或基质是可生物降解的。

在一些实施方案中, 所述制剂包括原位可聚合的凝胶(参见例如美国专利申请公开号 2002/0022676; Anset 等, J. Control Release, 78(1-3): 199-209 (2002); Wang 等, Biomaterials, 24(22):3969-80 (2003)。

在一些实施方案中, 所述聚合物至少部分可溶于水性溶液, 如水、缓冲盐溶液或水性醇溶液中, 其具有带电荷的侧基或其单价离子盐。具有可与阳离子反应的酸性侧基的聚合物的例子有聚(磷腓)、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸)、丙烯酸和甲基丙烯酸的共聚物、聚(醋酸乙烯)、和磺化聚合物如磺化聚苯乙烯。也可以使用由丙烯酸或甲基丙烯酸与乙烯基醚单体或聚合物反应形成的具有酸性侧基的共聚物。酸性基团的例子有羧酸基团、磺酸基团、卤化(优选氟化)醇基团、酚羟基和酸性羟基基团。

所述胎盘干细胞或其共培养物可以被接种到三维框架或支架上并植入到体内。这种框架可以与任何一种或多种生长因子、细胞、药物或刺激组织形

成或以其他方式增强或改善组织修复的其他成分组合植入。

可用的支架的例子包括非纺织垫、多孔泡沫、或自组装肽。非纺织垫可用由羟基乙酸和乳酸的合成可吸收共聚物组成的纤维形成(例如, PGA/PLA)(VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N. J.)。由如聚(ϵ -己内酯)/聚(羟基乙酸)(PCL/PGA)共聚物组成、通过如冷冻干燥过程或冻干法形成(例如, 参美国专利号 6,55,99)的泡沫也可以用作支架。

本发明所提供的胎盘干细胞也可以接种到或接触生理学上可接受的陶瓷材料, 其包括但不限于单、双、三、 α -三、 β -三和四-钙磷酸盐, 羟基磷灰石, 氟磷灰石, 硫酸钙, 氟化钙, 氧化钙, 碳酸钙, 镁钙磷酸盐, 生物活性玻璃如 BIOGLASS®, 及其混合。目前市售的多孔生物相容陶瓷材料包括 SURGIBONE®(CanMedica 公司, 加拿大), ENDOBON®(Merck Biomaterial France, 法国), CEROS®(Mathys AG, Bettlach, 瑞士), 和矿化胶原蛋白骨移植产品如 HEALOS™(DePuy 公司, Raynham, MA)和 VITOSS®, RHAKOSS™和 CORTOSS®(Orthovita, Malvern, Pa.)。所述框架可以是天然和/或合成材料的混合物、掺和物或复合物。

在另一实施方案中, 胎盘干细胞可以接种到或接触毡制品, 其可以由, 例如由生物可吸收材料如 PGA、PLA、PCL 共聚物或共混物, 或透明质酸制成的复丝纱组成。

在另一实施方案中, 本发明所提供的胎盘干细胞可以接种到泡沫支架上, 该泡沫支架可为复合结构。这种泡沫支架可模制成有用的形状, 如身体中待修复、替换或增大的特定结构部分的形状。在一些实施方案中, 在接种所述胎盘干细胞之前处理所述框架, 例如用 0.1 M 乙酸处理, 然后在多聚赖氨酸、磷酸盐缓冲液、和/或胶原蛋白中孵育以提高细胞附着。可以修饰基质外表面

以提高细胞的附着或生长和组织的分化,如通过用血浆涂覆基质或加入一种或多种蛋白质(如胶原蛋白、弹性纤维、网状纤维),糖蛋白,粘多糖(如硫酸肝素、软骨素-4-硫酸、软骨素-6-硫酸、硫酸皮肤素、硫酸角蛋白等),细胞基质和/或其他材料如但不限于明胶、海藻酸盐、琼脂、琼脂糖和植物胶等修饰。

在一些实施方案中,所述支架包括使其非血栓化的材料或用该材料处理。这些处理和材料还可以促进和维持内皮细胞生长、迁移和细胞外基质沉积。这些材料和处理的例子包括但不限于天然材料如基底膜蛋白,如层连蛋白和IV型胶原蛋白;合成材料,如EPTFE;和分段聚脲氨酯硅酮,如PURSPAN™(The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.)。该支架也可以包含抗血栓剂,如肝素。该支架在用胎盘干细胞接种前经处理以改变表面电荷(如用等离子涂覆)。该支架可进一步包含刺激骨骼生长和/或抑制骨吸收的试剂。例如,该支架可以包含骨形态发生蛋白,例如BMP-2和/或BMP-7, WNT抑制剂等。

5.8.3. 永生化胎盘干细胞系

哺乳动物胎盘细胞可以有条件地通过用含有生长促进基因的任何合适载体转染而永生化,该生长促进基因是编码一种蛋白质的基因,该蛋白在适当的条件下会促进转染细胞的生长,从而该生长促进蛋白的生产和/或活性可以通过外部因素调节。在优选实施方案中,该生长促进基因是致癌基因,如但不限于v-myc、N-myc、c-myc、p53、SV40大T抗原、多瘤大T抗原、E1a腺病毒或人类乳头状瘤病毒的E7蛋白。

所述生长促进蛋白的外部调节可以通过将该生长促进基因置于外部可调控启动子,例如活性可通过例如改变转染细胞的温度或与该细胞接触的培养基

的组成来控制的启动子的控制下实现。在一实施方案中,可以使用四环素(tet)控制的基因表达系统(见 Gossen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551, 1992; Hoshimaru 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1518-1523, 1996)。在不存在 tet 时,在这种载体中的四环素控制的反式激活因子(tTA)强烈激活从 ph_{CMV}^{*-1} , 一种与 tet 操纵子序列融合的人巨细胞病毒的最小启动子, 的转录。tTA 是转座子-10-衍生的大肠杆菌 tet 抗性操纵子的阻遏因子(tetR)和单纯疱疹病毒的 VP16 酸性域的融合蛋白。低浓度、无毒浓度的 tet(例如, 0.01-1.0 $\mu\text{g/mL}$)几乎完全地破坏 tTA 的反式激活。

在一实施方案中, 所述载体进一步包含编码可选择性标记, 例如产生抗药性蛋白质的基因。细菌新霉素抗性基因(neo^R)就是这样的可如本文所述使用的标记。带有 neo^R 的细胞可通过本领域普通技术人员已知的方法选择, 如向培养基中加入例如 100-200 $\mu\text{g/mL}$ 的 G418。

转染可以通过本领域普通技术人员已知的任何方法, 包括但不限于逆转录病毒感染来实现。一般来说, 细胞培养可通过与从所述载体的生产细胞系收集到的条件培养基和含有 N_2 补充剂的 DMEM/F12 的混合物一起孵育转染。例如, 如上所述制备的胎盘细胞培养可通过, 如 5 天的体外培养后, 在一体积的条件培养基和两体积的含有氮补充剂的 DMEM/F12 中孵育大约 20 小时感染。然后, 携带可选择性标记的转染细胞可如上所述进行选择。

继转染后, 将培养物传代到允许扩增的表面, 例如允许至少约 30% 的细胞在 24 小时之内倍增的表面。优选地, 所述底物为多鸟氨酸/层连蛋白底物, 其由用多鸟氨酸(10 $\mu\text{g/mL}$)和/或层连蛋白(10 $\mu\text{g/mL}$)涂覆的组织培养塑料、多聚赖氨酸/层连蛋白底物或用纤连蛋白处理的表面组成。然后每 3-4 天用生长培养基饲养培养物, 该培养基可以补充或不补充一种或多种扩增促进因子。

当培养物低于 50%汇合时，向生长培养基中添加扩增促进因子。

当达到 80-95%汇合时，可以将所述条件-永生化胎盘干细胞系用标准技术传代，如通过胰蛋白酶处理。在一些实施方案中，保持选择直至传代至约 20 代是有利的(例如，对于含有新霉素抗性基因的细胞加入 G418)。也可以将细胞冷冻在液氮中长期保存。

克隆细胞系可以从如上所述制备的条件-永生化人胎盘干细胞系中分离。一般来说，这种克隆细胞系可使用标准技术，如通过有限稀释或使用克隆环分离，和扩增。克隆细胞系通常可如上所述进行饲养和传代。

条件-永生人胎盘干细胞系，可以但不一定是克隆的，通常可以在有利于分化的培养条件下通过抑制生长促进蛋白的产生和/或活性来诱导分化。例如，如果该编码生长促进蛋白的基因是在外部可调节的启动子的控制下，则可以改变所述条件，如温度或培养基组成，以抑制生长促进基因的转录。对于上文所述的四环素控制的基因表达系统，可以通过加入四环素来抑制生长促进基因的转录来实现分化。一般来说，加入 1 $\mu\text{g/ml}$ 的四环素并持续 4-5 天足以启动分化。为了促进进一步的分化，可以向培养基中加入更多的试剂。

5.8.4. 测定

本发明所提供的胎盘干细胞可用于测定中，以确定与没有暴露于这些条件的胎盘干细胞相比，培养条件、环境因素、分子(例如，生物大分子、无机小分子等)等对干细胞增殖、扩增和/或分化的影响。

在优选实施方案中，检测本发明所提供的胎盘干细胞，以测定在与分子接触时增殖、扩增或分化方面的改变。例如，可通过监测碱性磷酸酶活性和/或钙矿化来检测成骨分化。

在一实施方案中，例如，本发明提供了鉴定可调节多种胎盘干细胞增殖

的化合物的方法，其包括将所述多种干细胞与所述化合物在允许增殖的条件下接触，其中如果与没有接触所述化合物的多种干细胞相比，所述化合物导致所述多种干细胞的增殖发生可检测变化，则所述化合物被鉴定为调节胎盘干细胞增殖的化合物。在特定实施方案中，所述化合物被鉴定为增殖抑制剂。在另一具体实施方案中，所述化合物被鉴定为增殖促进剂。

在另一实施方案中，本发明提供了鉴定可调节多种胎盘干细胞扩增的化合物的方法，其包括将所述多种干细胞与所述化合物在允许扩增的条件下接触，其中如果与没有接触所述化合物的多种干细胞相比，所述化合物导致所述多种干细胞的扩增发生可检测变化，则所述化合物被鉴定为调节胎盘干细胞扩增的化合物。在具体实施方案中，所述化合物被鉴定为扩增抑制剂。在另一具体实施方案中，所述化合物被鉴定为扩增促进剂。

在另一实施方案中，本发明提供鉴定可调节胎盘干细胞分化的化合物的方法，其包括将所述干细胞与所述化合物在允许分化的条件下接触，其中如果与没有接触所述化合物的多种干细胞相比，所述化合物导致所述多种干细胞的分化发生可检测变化，则所述化合物被鉴定为调节胎盘干细胞分化的化合物。在具体实施方案中，所述化合物被鉴定为分化抑制剂。在另一具体实施方案中，所述化合物被鉴定为分化促进剂。

6. 实施例

以下实施例是为了说明本发明，而不应解释为任何方式的限制。所有参考文件，无论是专利文献、参考文献、或其他均通过引用以各种目的纳入本文。

6.1. 实施例 1：胎盘干细胞的培养

胎盘干细胞从产后哺乳动物胎盘通过灌洗或物理裂解，如酶消化得到。将该细胞培养在培养基中，该培养基包含 60%DMEM-LG (Gibco)、40% MCDB-201 (Sigma)、2%胎牛血清(FCS)的(Hyclone Laboratories)、 $1 \times$ 胰岛素-转铁蛋白-硒(ITS)、 $1 \times$ 亚油酸-牛血清-白蛋白(LA-BSA)、 10^{-9} M 地塞米松 (Sigma)、 10^{-4} M 抗坏血酸 2-磷酸酯(Sigma)、10 ng/ml 表皮生长因子(EGF)(R&D Systems)、10 ng/ml 血小板衍生生长因子(PDGF-BB)(R&D Systems)、以及 100 U 青霉素/1000U 链霉素。

培养细胞的培养烧瓶如下准备。通过向 T75 烧瓶中加入 5 mL 含有 5 ng/ml 人 FN 的 PBS(Sigma F0895)而用纤连蛋白(FN)涂覆该瓶。将含有 FN 溶液的烧瓶置于 37°C 30 分钟。然后在细胞培养之前除去 FN 溶液。处理后不需要干燥烧瓶。或者，将该烧瓶与 FN 溶液在 4°C 下接触过夜或更长时间，培养之前将烧瓶温热并除去 FN 溶液。

通过灌洗分离的胎盘干细胞

从胎盘灌洗液获得的胎盘干细胞的培养物如下建立。将从聚糖体梯度中获得的细胞接种到如上准备的 FN 涂覆的 T75 烧瓶中，以 $50-100 \times 10^6$ 个细胞/瓶置于 15 mL 培养基中。通常情况下，接种 5 至 10 瓶。将该烧瓶在 37°C 下孵育 12-18 小时，使得贴壁细胞附着。向每个烧瓶中加入 10 mL 温磷酸盐缓冲液以移出悬浮细胞，并轻轻混合。然后去除 15 mL 培养基，并用 15 mL 新鲜培养基替代。在开始培养后 3-4 天更换所有培养基。在随后的更换培养基的过程中，去除 50%或 7.5 mL 培养基。

大约从第 12 天开始，在显微镜下检查培养物，以检查贴壁细胞集落的生长。当细胞培养成大约 80%汇合时，通常是在培养开始后的第 13 至 18 天之间，用胰蛋白酶消化收集贴壁细胞。将从这些原代培养物中收集的干细胞称

作 0(零)代。

通过物理裂解和酶消化分离的胎盘干细胞

如下用消化的胎盘组织建立胎盘干细胞培养物。将灌洗的胎盘置于无菌纸上，其母体面朝上。用刀片在胎盘的母体侧上刮下约 0.5 厘米的表层，并且用该刀片移出约为 1×2×1 厘米的胎盘组织块。然后将该胎盘组织切成约 1 mm³ 的碎片。将这些碎片收集到 50 mL Falcon 管中并用胶原酶 IA(2 mg/ml, Sigma)消化 30 分钟，然后用胰蛋白酶-EDTA(0.25%, GIBCO BRL)在 37℃ 水浴 10 分钟。由此得到的溶液在室温下以 400 g 离心 10 分钟，并除去所述消化溶液。所述沉淀小球用 PBS 再悬浮成大约 10 体积(例如，5 mL 的沉淀小球用 45 ml PBS 悬浮)，并将所述管在室温下以 400 g 离心 10 分钟。将组织/细胞小球悬浮在 130 mL 培养基中，并将所述细胞以每个纤连蛋白涂覆的 T75 烧瓶 13 mL 细胞接种。细胞在 37℃ 和 5%CO₂ 的潮湿环境中培养。胎盘干细胞在这个阶段任选地被低温保存。

胎盘干细胞的继代培养和扩增

将低温保存的细胞在 37℃ 水浴中快速解冻。用 10 mL 温培养基将胎盘干细胞迅速从冷冻管中移出并转移到 15 mL 无菌管中。将该细胞在室温下以 400 g 离心 10 分钟。用移液管将细胞轻柔悬浮在 10 mL 温培养基中，用台盼蓝不相容法确定存活的细胞数。然后将细胞以每平方厘米 6000-7000 个细胞接种到如上准备的 FN 涂覆的烧瓶中(每个 T75 烧瓶约 5×10⁵ 个细胞)。所述细胞在 37℃，5%CO₂ 和 90% 的湿度下孵育。当细胞达到 75-85% 汇合时，将所有使用过的培养基从瓶中无菌移出并丢弃。加入 3 mL 0.25% 胰蛋白酶/乙二胺四乙酸(w/v)溶液覆盖细胞层，并将细胞在 37℃，5%CO₂ 和 90% 湿度下孵育 5 分钟。将烧瓶轻敲一次或两次，以加速细胞脱壁。一旦 >95% 的细胞变成圆形

并且脱壁，则向每个 T75 烧瓶中加入 7 mL 温培养基，并通过用移液管在细胞层表面吹吸若干次使该溶液分散。

在如上所述对所述细胞进行计数和确定其存活性后，将该细胞在室温下以 1000 rpm 离心 5 分钟。通过用培养基将获自一个 T75 烧瓶中的细胞沉淀小球轻柔再悬浮，并将该细胞均匀地平铺到两个 FN 涂覆的 T75 烧瓶中来传代细胞。

使用上述方法，鉴别表达标记 CD105、CD117、CD33、CD73、CD29、CD44、CD10、CD90 和 CD133 的贴壁胎盘干细胞的群。这种细胞群不表达 CD34 或 CD45。这些胎盘干细胞的一些但并非所有的培养物表达 HLA-ABC 和/或 HLA-DR。

6.2. 实施例 2：从胎盘结构分离胎盘干细胞

6.2.1. 材料与方法

6.2.1.1. 目标表型的分离

从足月怀孕的正常胎盘获得胎盘细胞的五个不同群。所有捐献者都提供了充分的书面同意书，同意使用其胎盘用于研究目的。检查胎盘细胞的五个群：(1)胎盘灌洗液(获自胎盘血管的灌洗)；和酶消化的(2)羊膜、(3)绒毛、(4)羊膜-绒毛膜板、和(5)脐带。各种胎盘组织用无菌 PBS(Gibco-Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)洗净并置于分开的无菌陪替氏培养皿中。使用无菌手术解剖刀切碎该各组织并将其置于 50 mL 的 Falcon 锥形管中。该切碎的组组织用 1×胶原酶(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)在 37°C 水浴中消化 20 分钟，离心，然后用 0.25 %胰蛋白酶-EDTA (Gibco-Invitrogen Corp)在 37°C 水浴中消化 10 分钟。消化后离心该各组织并用无菌 PBS(Gibco-Invitrogen Corp)冲洗一次。然后过滤该重建细胞两次，一次用 100 μ m 的细胞滤器，一次用 30 μ m 的分

离过滤器，以除去任何残存的细胞外基质或细胞碎片。

6.2.1.2. 细胞存活力评估和细胞计数

在消化后用手工台盼蓝不相容法计算细胞数和评估细胞存活力。将细胞与台盼蓝染料(Sigma-Aldrich 公司)以 1 : 1 混合，并在血细胞计数器上对细胞读数。

6.2.1.3. 细胞表面标记表征

选择 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 细胞进行表征。用两个 Becton-Dickinson 流式细胞仪, FACS Calibur 和 FACS Aria(Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA), 对具有这种表型的细胞进行鉴定、定量和表征。在室温条件下, 以每百万个细胞约 10 μ L 抗体的比例在摇动器上对各种胎盘细胞染色 30 分钟。如下抗人抗体被使用: 结合了抗 HLA-G(Serotec, Raleigh, NC)、CD10(BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA)、CD44(BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA)、和 CD105(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN)的单克隆抗体的异硫氰酸荧光素(FITC), 结合了抗 CD44、CD200、CD117 和 CD13 的单克隆抗体的藻红蛋白(PE)(BD Biosciences Pharmingen), 结合了链霉抗生物素和抗 CD117 的单克隆抗体的藻红蛋白-Cy5(PE Cy5)(BD Biosciences Pharmingen), 结合了抗 CD33 和 CD10 的单克隆抗体的藻红蛋白-Cy7(PE Cy7)(BD Biosciences), 结合了链霉抗生物素和抗 CD38 的单克隆抗体的别藻蓝蛋白(APC)(BD Biosciences Pharmingen), 和生物素化 CD90(BD Biosciences Pharmingen)。孵育后, 将所述细胞被冲洗一次, 以除去未结合的抗体, 并用 4% 甲醛(USB, Cleveland, OH)在 4 $^{\circ}$ C 下固定过夜。第二天, 将所述细胞冲洗两次, 用 30 μ m 分离过滤器过滤, 并在流式细胞仪上运行。

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

6.2.1.4. 细胞分选和培养

将一组胎盘细胞(来自灌洗液、羊膜或绒毛膜)用 7-氨基-放线菌素 D(7AAD; BD Biosciences Pharmingen)和目标表型特异性单克隆抗体染色。以每百万个细胞 10 μ L 抗体的比例给细胞染色，并在室温下在摇动器上孵育 30 分钟。然后在 BD FACS Aria 上从这些细胞中阳性分选出表达目标表型的活细胞，并平铺到培养基中。分选的(目标细胞群)和“全部的”(未经分选的)胎盘细胞群铺板以进行比较。细胞以列于表 1 的细胞密度(细胞/ cm^2)平铺到纤连蛋白(Sigma-Aldrich)涂覆的 96 孔板上。细胞密度，以及是否将细胞类型重复两次或三次铺板，均根据表达目标表型的细胞的数量决定。

表 1：细胞铺板密度

96 孔平板培养			
铺板细胞密度			
条件	分选的	所有的	所有的最大密度
细胞来源	A		
1 组	40.6 K/ cm^2	40.6 K/ cm^2	93.8K/ cm^2
2 组	40.6 K/ cm^2	40.6 K/ cm^2	93.8K/ cm^2
3 组	40.6 K/ cm^2	40.6 K/ cm^2	93.8K/ cm^2
细胞来源	B		
1 组	6.3 K/ cm^2	6.3 K/ cm^2	62.5 K/ cm^2
2 组	6.3 K/ cm^2	6.3 K/ cm^2	62.5 K/ cm^2
细胞来源	C		
1 组	6.3 K/ cm^2	6.3 K/ cm^2	62.5 K/ cm^2
2 组	6.3 K/ cm^2	6.3 K/ cm^2	62.5 K/ cm^2

将完全培养基(60%DMEM-LG(Gibco)和 40%MCDB-201(Sigma)、2%胎牛

血清(Hyclone Labs)、 $1 \times$ 胰岛素-转铁蛋白-硒(ITS)、 $1 \times$ 亚油酸牛血清白蛋白(LA-BSA)、 10^{-9} M 地塞米松(Sigma)、 10^{-4} M 抗坏血酸-2-磷酸酯(Sigma)、10 ng/mL 表皮生长因子(R&D Systems)和 10 ng/mL 血小板衍生生长因子(PDGF-BB)(R&D Systems))添加到 96 孔板的每个孔中并板置于 5%CO₂/37°C 培养箱中。在第 7 天, 将 100 μ L 完全培养基添加到每个孔中。监测 96 孔板大约两个星期, 在第 12 天完成培养的最后评估。

6.2.1.5. 数据分析

使用标准的门控技术在 FlowJo(Tree star, Inc)中分析 FACSCalibur 数据。BD FACS Aria 数据用 FACSDiva 软件(Becton-Dickinson)分析。FACS Aria 数据使用将双联体最小化的双联体辨别门控(doublet discrimination gating)和标准门控技术分析。所有的结果汇编在 Microsoft Excel 中, 在此所有的数值以平均值 $\pm$ 标准偏差(数目, 平均数的标准误差)表示。

6.2.2. 结果

6.2.2.1. 细胞存活力

使用手工台盼蓝不相容法评估消化后的存活力(图 1)。从大多数消化组织(羊膜、绒毛膜或羊膜-绒毛膜板)获得的细胞平均存活力是约 70%。羊膜具有平均存活力 $74.35\% \pm 10.31\%$ ($n=6$, SEM=4.21), 绒毛膜具有平均存活力 $78.18\% \pm 12.65\%$ ($n=4$, SEM=6.32), 羊膜-绒毛膜板具有平均存活力 $69.05\% \pm 10.80\%$ ($n=4$, SEM=5.40), 和脐带具有平均存活力 $63.30\% \pm 20.13\%$ ($n=4$, SEM=10.06)。来自灌洗但没有进行消化的细胞保持了最高的平均存活力, 为 $89.98 \pm 6.39\%$ ($n=5$, SEM=2.86)。

6.2.2.2. 细胞定量

分析胎盘来源细胞的5个不同群,以确定HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺细胞的数目。从BD FACSCalibur 数据分析可观察到羊膜、灌洗液和绒毛膜含有的这些细胞总数最多,分别为 30.72 ± 21.80 个细胞($n=4$, SEM=10.90), 26.92 ± 22.56 个细胞($n=3$, SEM=13.02)和 18.39 ± 6.44 个细胞($n=2$, SEM=4.55)(数据未显示)。羊膜-绒毛膜板和脐带含有的表达目标表型的细胞总数最少,分别为 4.72 ± 4.16 个细胞($n=3$, SEM=2.40)和 3.94 ± 2.58 个细胞($n=3$, SEM=1.49)(数据未显示)。

相似地,当分析表达目标表型的细胞总数百分比时,观察到羊膜和胎盘灌洗液含有的表达此类表型的细胞比例最高,分别为 $0.0319\% \pm 0.0202\%$ ($n=4$, SEM=0.0101)和 $0.0269\% \pm 0.0226\%$ ($n=3$, SEM=0.0130)(图 2)。虽然脐带含有少量表达目标表型的细胞(见图 2),但其含有的表达目标表型的细胞比例第三高,为 $0.020 \pm 0.0226\%$ ($n=3$, SEM=0.0131)(见图 2)。绒毛膜和羊膜-绒毛膜板含有的表达目标表型的细胞百分比最低,分别为 $0.0184 \pm 0.0064\%$ ($n=2$, SEM=0.0046)和 $0.0177 \pm 0.0173\%$ ($n=3$, SEM=0.010)(图 2)。

与BD FACSCalibur 分析结果一致,BD FACS Aria 数据也确定羊膜、灌洗液和绒毛膜相对于其他来源提供更高数量的HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺细胞。羊膜、灌洗液和绒毛膜中表达目标表型的细胞的平均总数分别为 126.47 ± 55.61 个细胞($n=15$, SEM=14.36)、 81.65 ± 34.64 个细胞($n=20$, SEM=7.75)和 51.47 ± 32.41 个细胞($n=15$, SEM=8.37)(数据未显示)。羊膜-绒毛膜板及脐带含有的表达目标表型的细胞总数最少,分别为 44.89 ± 37.43 个细胞($n=9$, SEM=12.48)和 11.00 ± 4.03 个细胞($n=9$, SEM=1.34)(数据未显示)。

BD FACS Aria 数据显示, B 和 A 细胞来源含有的 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺细胞比例最高, 分别为 $0.1523 \pm 0.0227\%$ ($n=15$, SEM=0.0059) 和 $0.0929 \pm 0.0419\%$ ($n=20$, SEM=0.0094)(见图 3)。D 细胞来源含有的表达目标表型的细胞比例第三高, 为 $0.0632 \pm 0.0333\%$ ($n=9$, SEM=0.0111)(见图 3)。C 和 E 的细胞来源含有的表达目标表型的细胞百分比最低, 分别为 $0.0623 \pm 0.0249\%$ ($n=15$, SEM=0.0064) 和 $0.0457 \pm 0.0055\%$ ($n=9$ 例 SEM=0.0018)(图 3)。

在鉴定和定量了每个细胞来源的 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺细胞后, 对其细胞表达细胞表面标记 HLA-G、CD10、CD13、CD33、CD38、CD44、CD90、CD105、CD117、CD200 和 CD105 进行进一步分析和表征。

6.2.2.3. 胎盘灌洗液来源的干细胞

灌洗液来源的细胞均是 HLA-G、CD33、CD117、CD10、CD44、CD200、CD90、CD38、CD105 和 CD13 阳性的(图 4)。灌洗液来源的细胞的每个标记的平均表达值如下: 表达 HLA-G 的细胞 $37.15\% \pm 38.55\%$ ($n=4$, SEM=19.28); 表达 CD33 的细胞 $36.37\% \pm 21.98\%$ ($n=7$, SEM=8.31); 表达 CD117 的细胞 $39.39\% \pm 39.91\%$ ($n=4$, SEM=19.96); 表达 CD10 的细胞 $54.97\% \pm 33.08\%$ ($n=4$, SEM=16.54); 表达 CD44 的细胞 $36.79 \pm 11.42\%$ ($n=4$, SEM=5.71); 表达 CD200 的细胞 $41.83\% \pm 19.42\%$ ($n=3$, SEM=11.21); 表达 CD90 的细胞 $74.25\% \pm 26.74\%$ ($n=3$, SEM=15.44); 表达 CD38 的细胞 $35.10\% \pm 23.10\%$ ($n=3$, SEM=13.34); 表达 CD105 的细胞 $22.87\% \pm 6.87\%$ ($n=3$, SEM=3.97); 和表达 CD13 的细胞 $25.49\% \pm 9.84\%$ ($n=3$, SEM=5.68)。

6.2.2.4. 羊膜来源的干细胞

羊膜来源的细胞均是 HLA-G、CD33、CD117、CD10、CD44、CD200、CD90、CD38、CD105 和 CD13 阳性的(图 5)。每个羊膜来源的标记的平均表达值如下:表达 HLA-G 的细胞 $57.27\% \pm 41.11\%$ ($n=3$, SEM=23.73);表达 CD33 的细胞 $16.23\% \pm 15.81\%$ ($n=6$, SEM=6.46);表达 CD117 的细胞 $62.32\% \pm 37.89\%$ ($n=3$, SEM=21.87);表达 CD10 的细胞 $9.71\% \pm 13.73\%$ ($n=3$, SEM=7.92);表达 CD44 的细胞 $27.03\% \pm 22.65\%$ ($n=3$, SEM=13.08);表达 CD200 的细胞 $6.42\% \pm 0.88\%$ ($n=2$, SEM=0.62);表达 CD90 的细胞 $57.61\% \pm 22.10\%$ ($n=2$, SEM=15.63);表达 CD38 的细胞 $63.76\% \pm 4.40\%$ ($n=2$, SEM=3.11);表达 CD105 的细胞 $20.27\% \pm 5.88\%$ ($n=2$, SEM=4.16);和表达 CD13 的细胞 $54.37\% \pm 13.29\%$ ($n=2$, SEM=9.40)。

6.2.2.5. 绒毛膜来源的干细胞

绒毛膜来源的细胞均是 HLA-G、CD117、CD10、CD44、CD200、CD90、CD38 和 CD13 阳性的,但 CD33 和 CD105 的表达发生变化(图 6)。绒毛膜细胞的每个标记的平均表达值如下:表达 HLA-G 的细胞 $53.25\% \pm 32.87\%$ ($n=3$, SEM=18.98);表达 CD33 的细胞 $15.44\% \pm 11.17\%$ ($n=6$, SEM=4.56);表达 CD117 的细胞 $70.76\% \pm 11.87\%$ ($n=3$, SEM=6.86);表达 CD10 的细胞 $35.84\% \pm 25.96\%$ ($n=3$, SEM=14.99);表达 CD44 的细胞 $28.76\% \pm 6.09\%$ ($n=3$, SEM=3.52);表达 CD200 的细胞 $29.20\% \pm 9.47\%$ ($n=2$, SEM=6.70);表达 CD90 的细胞 $54.88\% \pm 0.17\%$ ($n=2$, SEM=0.12);表达 CD38 的细胞 $68.63\% \pm 44.37\%$ ($n=2$, SEM=31.37);表达 CD105 的细胞 $23.81\% \pm 33.67\%$ ($n=2$, SEM=23.81);和表达 CD13 的细胞 $53.16\% \pm 62.70\%$ ($n=2$, SEM=44.34)。

6.2.2.6. D 来源胎盘细胞

来自羊膜-绒毛膜板的细胞均是 HLA-G、CD33、CD117、CD10、CD44、CD200、CD90、CD38、CD105 和 CD13 阳性的(图 7)。羊膜-绒毛膜板来源的细胞的每个标记的平均表达值如下: HLA 的细胞 $78.52\% \pm 13.13\%$ ($n=2$, $SEM=9.29$);表达 CD33 的细胞 $38.33\% \pm 15.74\%$ ($n=5$, $SEM=7.04$);表达 CD117 的细胞 $69.56\% \pm 26.41\%$ ($n=2$, $SEM=18.67$);表达 CD10 的细胞 $42.44\% \pm 53.12\%$ ($n=2$, $SEM=37.56$);表达 CD44 的细胞 $32.47\% \pm 31.78\%$ ($n=2$, $SEM=22.47$);表达 CD200 的细胞 5.56% ($n=1$);表达 CD90 的细胞 83.33% ($n=1$);表达 CD38 的细胞 83.52% ($n=1$);表达 CD105 细胞 7.25% ($n=1$);和表达 CD13 的细胞 81.16% ($n=1$)。

6.2.2.7. 脐带来源的干细胞

脐带来源的细胞均是 HLA-G、CD33、CD90、CD38、CD105 和 CD13 阳性的, 而 CD117、CD10、CD44 和 CD200 的表达发生变化(图 8)。脐带来源的细胞的每个标记的平均表达值如下: 表达 HLA-G 的细胞 $62.50\% \pm 53.03\%$ ($n=2$, $SEM=37.50$);表达 CD33 的细胞 $25.67\% \pm 11.28\%$ ($n=5$, $SEM=5.04$);表达 CD117 的细胞 $44.45\% \pm 62.85\%$ ($n=2$, $SEM=44.45$);表达 CD10 的细胞 $8.33\% \pm 11.79\%$ ($n=2$, $SEM=8.33$);表达 CD44 的细胞 $21.43\% \pm 30.30\%$ ($n=2$, $SEM=21.43$);表达 CD200 的细胞 0.0% ($n=1$);表达 CD90 的细胞 81.25% ($n=1$);表达 CD38 的细胞 64.29% ($n=1$);表达 CD105 的细胞 6.25% ($n=1$);和表达 CD13 的细胞 50.0% ($n=1$)。

所有标记平均表达值的汇总显示于图 9。

6.2.2.8. BD FACS Aria 分选报告

表达最大百分比 HLA ABC、CD45、CD34 和 CD133 的胎盘细胞的三个

不同群(来自灌洗液、羊膜和绒毛膜的细胞)用 7AAD 和这些标记的抗体进行染色。对这三个细胞群进行阳性分选以挑选出表达目标表型的活细胞。BD FACS Aria 分选结果列于表 2。

表 2:

BD FACS Aria 分选报告			
细胞来源	处理事件	分选事件(目标基因型)	%总数
灌洗液	135540110	51215	0.037786
羊膜	7385933	4019	0.054414
绒毛膜	108498122	4016	0.003701

将阳性分选细胞(“分选的”)的三种不同群和其相应的未分选细胞铺板，并在第 12 天评估培养结果(表 3)。分选的灌洗液来源的细胞以 40,600/cm² 的细胞密度铺平板，得到小的、圆形的非贴壁细胞。三组未分选的灌洗液来源的细胞中的两组，每一组均以细胞密度 40,600/cm² 铺板，得到大部分小的、圆形的非贴壁细胞和几个位于孔边缘的贴壁细胞。未分选的灌洗液来源的细胞以细胞密度 93,800/cm² 铺板，得到大部分小的、圆的非贴壁细胞和几个位于孔的边缘的贴壁细胞。

分选的羊膜来源的细胞以细胞密度 6,300/cm² 铺板，得到小的、圆形的非贴壁细胞。未分选的羊膜来源的细胞以细胞密度 6,300/cm² 铺板，得到小的、圆形的非贴壁细胞。未分选的羊膜来源的细胞以细胞密度 62,500/cm² 铺板，得到小的、圆形的非贴壁细胞。

分选的绒毛膜来源的细胞以细胞密度 6,300/cm² 铺板，得到小的、圆形的非贴壁细胞。未分选的绒毛膜来源的细胞以细胞密度 6,300/cm² 铺板，得到小的、圆形的非贴壁细胞。未分选的绒毛来源的细胞以细胞密度 62,500/cm² 铺板，得到小的、圆形的非贴壁细胞。

如上所述的胎盘干细胞群在组织培养塑料中培养时附着在表面，并呈现

出特征性成纤维样形状。

6.3. 实施例 3：通过闭合回路灌洗收集胎盘干细胞

这个例子说明了通过灌洗收集胎盘干细胞的方法。

在出生后 24 小时内获得产后胎盘。用脐带夹在接近胎盘盘约 3 到 4 英寸处夹住脐带，并在夹子上方剪断脐带。脐带被丢弃，或被加工以回收如脐带干细胞和/或处理脐带膜用于生产生物材料。从胎盘剪掉过剩的羊膜和绒毛膜，在胎盘的边缘周围留下大约 1/4 英寸。丢弃修剪后的材料。

从胎盘膜的边缘开始，用手指将羊膜与绒毛膜钝性剥离。当羊膜与绒毛膜完全分开时，用剪刀在脐带底部剪断羊膜，并使之脱离胎盘。羊膜可被丢弃，或被加工例如以通过酶消化获取干细胞，或生产例如羊膜生物材料。

用无菌纱布清理余下胎盘材料的胎儿侧的所有可见血凝块和残余血，然后用碘拭子而不是用酒精拭子擦拭消毒。然后用消毒止血钳在脐带夹下方交叉夹紧脐带，旋转止血剂，将脐带拉过夹子形成折叠。然后在止血钳的下方部分剪断脐带，以在夹子的支持下暴露脐带横截面。或者，用消毒止血钳夹住脐带。然后将脐带放在无菌纱布上，并用止血钳托住并拉紧。然后在止血钳下方直接剪断脐带，在靠近血管的部位重新夹住脐带边缘。

如上所述暴露血管，通常静脉和两个动脉被确认，并如下打开。使封闭鳄鱼钳前进通过每个血管的剪断端，注意不要让夹子刺穿血管壁。当夹子尖端略高于脐带底部，停止插入。然后稍微打开夹子，慢慢从血管退出以扩张血管。

将与灌洗装置或蠕动泵连接的塑料管插入到每个胎盘动脉。将与 250 mL 收集袋连接的塑料管插入胎盘静脉。将该管置于适当位置。

用小体积的注射级无菌 0.9%NaCl 溶液检查渗漏。如果没有渗漏，增加

泵的速度，泵出约 750 mL 注射级 0.9%NaCl 溶液通过胎盘血管。从外边缘到脐带轻轻按摩胎盘可以帮助灌洗。当收集袋满时，从将所述管与所述袋连接的联结器上移除袋子，然后用新的袋与管连接。

当收集完成后，称重和平衡收集袋用于离心。离心后，将每袋放置在血浆提取器内，而不破坏细胞沉淀小球。然后移出袋内的上清液并丢弃。然后轻轻按摩袋子，以将细胞重新悬浮在剩余的上清液中。使用 1 mL 无菌注射器，通过回输连接器从收集袋回抽约 300-500 μ L 的细胞，并转移至 1.5 mL 离心管中。测定剩余灌洗液的重量和体积，并添加 1/3 体积的羟乙基淀粉到灌洗液中并彻底混合。测定每 mL 细胞的数量。用血浆提取器从灌洗液中去除红血细胞。

然后立即培养胎盘细胞以分离胎盘干细胞，或者将胎盘细胞低温保存供以后使用。

6.4. 实施例 4：胎盘干细胞的分化

6.4.1. 诱导分化为神经元

胎盘干细胞的神经分化还可以如下完成：

1. 将胎盘干细胞在由 DMEM/20%FBS 和 1 mM β -巯基乙醇组成的诱导前培养基中生长 24 小时。

2. 去掉诱导前培养基并用 PBS 洗涤细胞。

3. 将由 DMEM 和 1-10 mM β -巯基乙醇组成的神经诱导培养基添加到细胞中。或者，可使用由 DMEM/2% DMSO/200 μ M 丁基化羟基苯甲醚组成的诱导培养基。

4. 在某些实施方案中，在暴露于无血清培养基和 β -巯基乙醇 60 分钟后可能发生形态学和分子的改变。可以用 RT/PCR 评估如神经生长因子受体和

神经纤维重链基因的表达。

6.4.2 诱导分化为脂肪细胞

将来自酶消化羊膜的胎盘干细胞的几个培养物在 50-70%汇合时在如下培养基中诱导, 该培养基包括(1)含有 2%FCS、0.5%氢化可的松、0.5 mM 异丁基甲基黄嘌呤、60 μ M 的吡啶美辛的 DMEM/MCDB-201;或(2)含有 2% FCS 和 0.5%的亚油酸的 DMEM/MCDB-201。检查细胞形态学改变, 3-7 天后, 出现油滴。还可以通过定量实时 PCR 评估分化, 以检测与脂肪生成有关的特定基因, 即 PPAR- γ 2、aP-2、脂蛋白脂肪酶和骨桥蛋白的表达。胎盘干细胞的两个培养物分别显示出脂肪细胞特异性基因表达有 6.5 倍和 24.3 倍的增加。四个其他培养物在脂肪生成诱导后表现出 PPAR- γ 2 表达的中度增加(1.5-2.0 倍)。

在另一实验中, 来自灌洗液的胎盘干细胞在含有 2% FCS 的 DMEM/MCDB-201(鸡胚成纤维细胞基础培养基)中培养。所述细胞用胰蛋白酶作用并离心。将细胞重悬浮在脂肪诱导培养基(AIM)1 或 2 中。AIM1 包括人类间质干细胞的 MesenCult 基础培养基(StemCell Technologies), 其补充了间质干细胞成脂补充物(StemCell Technologies)。AIM2 包括含 2% FCS 和 LA-BSA(1%)的 DMEM/MCDB-201。将大约 1.25×10^5 个胎盘干细胞生长在 T-25 瓶中的 5mL AIM1 或 AIM2 中。所述细胞在培养箱中培养 7-21 天。通过油红染色证实, 该细胞在细胞质中形成油滴空泡, 这表明所述干细胞分化成了脂肪细胞。

胎盘干细胞的成脂分化还可以如下完成:

1. 将胎盘干细胞生长在 MSCGM(Cambrex)或补充了 15%脐血血清的

DMEM 中。

2. 进行三个周期的诱导/维持。每个周期由以下步骤组成：用脂肪形成诱导培养基(Cambrex)饲养胎盘干细胞，并培养该细胞 3 天(37℃, 5%的 CO₂)，然后用脂肪形成维持培养基培养 1-3 天(Cambrex)。可替换使用的诱导培养基包含 1 μM 地塞米松、0.2 mM 吲哚美辛、0.01 mg/ml 胰岛素、0.5 mM IBMX、高糖 DMEM、FBS 及抗生素。

3. 3 个完整的诱导/维持周期后，将所述细胞在脂肪形成维持培养基中培养另外的 7 天，每 2-3 天更换培养基。

4. 脂肪形成的标志是形成多个细胞质内脂囊泡，其采用亲油性油红 O 染色可以很容易地观察到。在已开始分化成脂肪细胞的胎盘干细胞中，通过 RT/PCR 验证脂肪酶和/或脂肪酸结合蛋白基因的表达。

6.4.3. 诱导分化成成骨细胞

用 185 mL 的 Cambrex 分化基础培养基，即成骨和 SingleQuots 培养基(地塞米松、L-谷氨酰胺、抗坏血酸、青霉素/链霉素、MCGS 和 β-磷酸甘油各一)制备成骨培养基。将来自灌洗液的胎盘干细胞在每 cm² 组织培养区域 0.2-0.3 mL MSCGM 中以每 cm² 组织培养表面积约 3×10³ 个细胞铺板。通常情况下，在 37℃ 在 5%CO₂ 中，在 4-24 小时期间 MSCGM 中的所有细胞贴附到培养表面。通过将培养基更换为成骨分化培养基来诱导成骨分化。细胞形态开始从贴壁胎盘的典型梭形外观变为立方体外观，并伴随矿化。一些细胞在分化过程中从组织培养表面分层。

成骨分化也可以如下完成：

1. 将胎盘干细胞贴壁培养物培养在 MSCGM(Cambrex)或补充 15%脐血清的 DMEM 中。

2. 将培养物在组织培养瓶中培养 24 小时。
3. 用含 0.1 μM 地塞米松、0.05 mM 抗坏血酸-2-磷酸、10 mM β -磷酸甘油的成骨诱导培养基(Cambrex)替换 MSCGM 诱导成骨分化。
4. 每 3-4 天用成骨诱导培养基培养细胞，持续 2-3 周。
5. 用钙特异性染料和检测碱性磷酸酶和骨桥蛋白基因表达的 RT/PCR 测定分化。

6.4.4. 诱导分化成胰腺细胞

胰腺细胞分化如下完成：

1. 将胎盘干细胞培养在补充有 10 ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子和 2 ng/ml 转化生长因子 β -1 的 DMEM/20% CBS 中。可用 KnockOut 血清替代品代替 CBS。
2. 将巢蛋白阳性神经元细胞培养物的条件培养基以 50/50 浓度添加到培养基中。
3. 细胞培养 14-28 天，每 3-4 天更换培养基。
4. 通过用 RT/PCR 测定胰岛素蛋白质或胰岛素基因表达来表征分化。

6.4.5. 诱导分化成心肌细胞

肌(心肌)分化如下完成：

1. 将胎盘干细胞培养在补充了 1 μM 维甲酸、10 ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子、和 2 ng/ml 转化生长因子 β -1、和 100 ng/ml 表皮生长因子的 DMEM/20% CBS 中。可以用 KnockOut 血清替代品(Invitrogen, Carlsbad, California)代替 CBS。
2. 或者，将胎盘干细胞在补充了 50 ng/ml 心调剂素-1 的 DMEM/20%

CBS 中培养 1-24 小时。

3. 或者, 将胎盘干细胞在无蛋白培养基中维持 5-7 天, 然后用人体心肌提取物(递增剂量分析)刺激。心肌提取物通过在补充了 1%脐血血清的 1% HEPES 缓冲液中匀化 1 gm 人心肌产生。将悬浮液孵育 60 分钟, 然后离心, 收集上清液。

4. 细胞培养 10-14 天, 每 3-4 天更换培养基。

5. 通过用 RT/PCR 测定心肌动蛋白基因表达来验证分化。

6.4.6. 诱导分化成软骨细胞

6.4.6.1. 一般方法

胎盘干细胞的软骨分化通常如下完成:

1. 将胎盘干细胞维持在 MSCGM(Cambrex)或补充了 15%脐血血清的 DMEM 中。

2. 将胎盘干细胞等份分装到无菌聚丙烯管中。离心($150\times g$, 5 分钟)该细胞, 并用不完全软骨培养基(Cambrex)清洗两次。

3. 在最后一次清洗后, 将细胞以 5×10^5 个细胞/ml 的浓度重悬在含有 $0.01\text{ }\mu\text{g/ml}$ 的 TGF- β -3 的完全软骨培养基(Cambrex)中。

4. 将 0.5 ml 细胞等份分装在 15 ml 聚丙烯培养管中。以 $150\times g$ 离心该细胞 5 分钟形成沉淀小球。该沉淀小球完整地保留在培养基中。

5. 在 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 下将松散盖住的管孵育 24 小时。

6. 每 2-3 天用新鲜制备的完全软骨培养基饲养所述细胞沉淀小球。

7. 通过使用低速旋涡器每天搅拌而使沉淀小球在培养基中保持悬浮。

8. 在培养 14-28 天后收集软骨细胞沉淀小球。

9. 通过, 例如观察嗜酸性基质的产生、评估细胞形态、和/或 RT/PCR

证实胶原蛋白 2 和/或胶原蛋白 9 基因表达和/或软骨基质酸性粘多糖的产生来表征软骨形成，这可通过阿利辛蓝细胞化学染色来验证。

6.4.6.2. 胎盘和脐带干细胞分化成软骨细胞

该实施例说明了胎盘干细胞向软骨细胞的分化和从这种细胞形成软骨样组织。

软骨无血管、无淋巴组织，并缺乏神经供应。软骨具有较低的软骨细胞密度(<5%)，但是这些细胞令人惊讶地有效维持其周围的细胞外基质。在身体内存在的三种主要类型的软骨：(1)关节软骨，其有利于关节之间的关节润滑；(2)纤维软骨，其在例如半月板和椎间盘中提供缓冲；和(3)弹性软骨，其在例如鼻子和耳朵中提供解剖结构。所有这三种软骨生化结构相似。

关节疼痛是残疾的一个重要原因，因而减缓疼痛在骨科领域有未得到满足的需要。原发性骨关节炎(其会导致关节退化)和创伤是两个常见的疼痛原因。约 9%的美国人有关节或膝关节骨性关节炎，并且每年要进行 200 多万例膝盖手术。不幸的是，目前的治疗更着眼于治疗症状，而不是修复软骨。当成纤维样细胞侵入到所述区域并且有纤维组织填补该区域时发生自然修复，该纤维组织并不象正常组织那样有弹性或伸缩性，因此会造成更大的损害。历史上的治疗方法包括组织移植、软骨下骨钻孔或全关节置换。然而，最近的治疗方法包括 CARTICEL®，一种自体软骨细胞注射液；SYNVISC® 和 ORTHOVISC®，其为用于暂时缓解疼痛的透明质酸注射液；和 CHONDROGEN™，一种用于修复半月板的成熟间质干细胞注射液。一般地，所述趋势似乎更倾向于涉及软骨细胞或干细胞的细胞疗法和/或组织工程产品。

材料与方法

在如下所述研究中使用两种胎盘干细胞系，称作 AC61665, P3(第3代)和 AC63919, P5, 以及两种脐血干细胞系，称作 UC67249, P2 和 UC67477, P3。人骨髓间质干细胞(MSC)作为阳性对照，骨肉瘤细胞系、MC3T3 和人真皮成纤维细胞(HDF)作为阴性对照。

通过酶消化从足月人胎盘中分离和纯化出胎盘和脐带干细胞。人 MSC 细胞和 HDF 细胞均购自 Cambrex, MC3T3 细胞购自美国典型培养物保藏中心。将所有细胞系在聚丙烯离心管中以 800 RPM 离心 5 分钟形成沉淀小球，并在软骨诱导培养基(Cambrex)和非诱导基础 MSC 培养基(Cambrex)中生长。在第 7、14、21 和 28 天收集沉淀小球并通过用阿新蓝对葡糖胺聚糖(GAG)染色和/或用天狼猩红对胶原染色做组织学分析。用免疫染色进一步评估胶原类型。在第 7 和 14 天对软骨特异性基因进行 RNA 分析。

结果

实验 1: 软骨形成研究旨在实现三个主要目标: (1)证明胎盘和脐带干细胞能够分化并形成软骨组织; (2)证明胎盘和脐带干细胞能够功能性分化成软骨细胞; 和(3)通过评价对照细胞系验证用干细胞获得的结果。

对于目标 1, 在初步研究中, 将一种胎盘干细胞系以细胞沉淀小球的形式培养在软骨细胞诱导培养基中, 使用或不使用骨形态发生蛋白(BMP), 终浓度为 500 ng/mL。每周评估沉淀小球诱导形成软骨的证据, 持续 4 周。结果表明, 随着时间的推移该沉淀小球尺寸增大。然而, 在 BMP⁺和 BMP⁻样本间没有可观察到的差异。还通过阿新蓝染色来组织学分析小球的 GAG's, 一种软骨组织中的指示剂。BMP⁺细胞通常表现出更高的代谢活性并有苍白空泡, 而 BMP⁻细胞比较小且具有浓染色的细胞核和较少的细胞质(反映出低代谢活性)。在第 7 天, BMP⁺细胞已经很浓地染为蓝色, 而 BMP⁻仅微弱染色。

通过 28 天的诱导, BMP^+ 和 BMP^- 被细胞阿新蓝大致相当地染色。总之, 细胞密度随着时间的推移降低, 并且基质占据所述沉淀小球。与此相反, 用阿新蓝染色时, MC3T3 阴性细胞系没有表现出任何 GAG 的存在。

实验 2 : 根据实验结果 1, 进行更详细的研究, 以评估两种胎盘干细胞系和两种脐带干细胞系的软骨细胞分化潜能。除了阿新蓝组织学外, 细胞也可以用对 II 型胶原有特异性的天狼猩红染色。每个细胞系制备多个沉淀小球, 使用或不使用诱导培养基。

首先大致观察所述沉淀小球的培养细胞系的肉眼可见的软骨形成。总的来说, 在第 1 天即观察干细胞系形成沉淀小球。这些沉淀小球随着时间生长并形成硬基质, 外观呈白色、发亮和软骨样, 并具有机械硬度。通过目视检查, 胎盘干细胞或脐带干细胞的沉淀小球远大于 MSC 对照。在非诱导培养基中的对照沉淀小球从第 11 天开始瓦解, 并且在第 28 天比在软骨细胞诱导培养基中培养的细胞形成的沉淀小球要小得多。视觉上, 胎盘干细胞或脐带所形成的沉淀小球没有区别。然而, 在无地塞米松的培养基中起始 UC67249 干细胞系形成了较大的沉淀小球。阴性对照 MC3T3 细胞并没有形成沉淀小球, 而 HDF 形成沉淀小球。

然后将所有试验组中的代表性沉淀小球进行 GAG's 和胶原蛋白组织学分析。一般来说, 干细胞在诱导条件下形成的沉淀小球相对于非诱导条件下形成的沉淀小球要大得多, 并且保持得更完好。通过弱阿新蓝染色证明, 诱导条件下形成的沉淀小球显示出随时间, 早在第 7 天产生 GAG 和胶原含量增加, 而在非诱导条件下形成的小球显示出很少或没有胶原生成。一般来说, 通过目视检查, 胎盘干细胞和脐血干细胞相对于 hMSC 看起来产生更硬、更大的沉淀小球, 并看起来随时间产生更多的胶原蛋白。此外, 在研究过程中,

所述胶原看起来增厚,且胶原类型看起来发生改变,这可通过在偏振光(颜色与指示胶原类型的纤维厚度相关)下纤维颜色的改变来证明。与诱导的干细胞相比,非诱导的胎盘干细胞产生少得多(如果有)的II型胶原。在28天的期间内,细胞密度随着基质生成的增加而降低,这是软骨组织的特点。

这些研究证实,胎盘和脐带干细胞可沿软骨通路分化,并可以容易地诱导形成软骨组织。初步观察表明,对于形成软骨组织,这种干细胞比MSC更优选。

6.5. 实施例5: 胎盘干细胞的悬滴培养

将培养中的胎盘贴壁干细胞在37℃胰蛋白酶作用约5分钟,并通过轻敲使其从培养皿释放。向培养物中加入10%胎牛血清停止胰蛋白酶作用。在约5 mL的培养基中将细胞稀释至每mL约 1×10^4 个细胞。将液滴(单滴或用多通道微移液管获得的多滴)置于100 mL培养皿的盖的内侧上。仔细反转盖子并将其置于包含大约25 ml无菌PBS的培养皿的底部上方以维持培养皿中空气的水分含量。细胞生长6-7天。

6.6. 实施例6: 消化胎盘组织以获取胎盘干细胞

这个实施例说明了通过酶消化放大规模分离胎盘干细胞。

获取大约10克胎盘组织(羊膜和绒毛膜),浸渍,并用等体积的胶原酶A(1 mg/ml)(Sigma)和胰蛋白酶-EDTA(0.25%)(Gibco-BRL)在37℃下以总体积约30毫升消化约30分钟。通过消化释放的细胞用培养基洗涤3次,分装到四个T-225烧瓶中并按实施例1所述培养。胎盘干细胞的产量为每10g起始原料约 4×10^8 和 5×10^8 个细胞之间。细胞在第3代的特点主要是CD10⁺、CD90⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻和CD45⁻。

6.7. 实施例 7：低温保存干细胞产品和干细胞库的生产

这个实施例说明了胎盘干细胞的分离和基于冷冻干细胞的产品的生产。

概述：解剖和消化胎盘组织，然后进行原代培养和扩增培养以得到生产许多细胞剂量的扩增细胞产品。将细胞保存在两层细胞库中并分装成冷冻的细胞产品。将来自单一捐献胎盘的所有细胞剂量定义为一个批次，将一个胎盘批次在专门的房间和 100 级层流罩中用无菌技术一次性加工。细胞产品经鉴定是 CD105⁺、CD200⁺、CD10⁺和 CD34⁻的，具有正常核型，且不含有母体细胞内容物。

6.7.1 获取干细胞

组织剥离和消化：分娩后不到 24 小时获得胎盘。胎盘组织从羊膜、羊膜和绒毛膜组合、或绒毛膜获得。将该组织切成碎片，约 1 毫米大小。切碎的組織在 37°C 下在 1 mg/ml 胶原酶 A 中消化 1 小时，然后 37°C 下胰蛋白酶-EDTA 作用 30 分钟。在含 5%胎牛血清的 PBS 中冲洗三次后，将该组织重悬在培养基中。

原代培养：原代培养的目的是从消化的胎盘组织获得细胞。将所述消化的组织悬浮在培养基中，并置于 Corning T 型瓶中，在 37°C 和 5%CO₂ 下的湿润培养室中孵育。培养 5 天后补充一半培养基。培养 2 周形成高密度的细胞集落。用胰蛋白酶-EDTA 收集细胞集落，然后用含 2%胎牛血清的 PBS 淬灭反应。离心细胞并将其重悬在培养基中，以用于接种扩增培养物。这些细胞被定义为倍增 0 次的 0 代细胞。

扩增培养：将从原代培养物收集到的、从扩增培养物中收集到的、或从细胞库中解冻的细胞用于接种扩增培养物。细胞工厂(NUNC™)用 5%CO₂ 的

空气,以 50 毫升/分钟/托盘通过无菌过滤器处理 10 分钟,并在 37℃, 5%CO₂ 的湿润孵化器中保温。接种细胞用台盼蓝在血细胞计数器上计数,并记录细胞数量、存活力、传代数和倍增累积数。将细胞以约 2.3×10^4 个细胞/ml 悬浮在培养基中,并以 110 ml/托盘在细胞工厂接种。经过 3-4 天并再培养 5-6 天后,除去培养基,用新鲜培养基替代,然后用 5%CO₂ 的空气进行另一次处理。当细胞达到大约 10^5 细胞/cm² 时,用胰蛋白酶-EDTA 收集细胞,然后用含 2%FBS 的 PBS 淬灭反应。然后离心细胞,并重悬到培养基中。

低温保存: 从含有胰蛋白酶-EDTA 并用含 2% FBS 的 PBS 淬灭反应的培养基中收集待冷冻的细胞,用血细胞计数仪计数。离心后,用含 10% DMSO 的 FBS 重悬浮细胞至浓度约 100 万细胞/毫升(对于用于组建细胞库的细胞)和 1,000 万细胞/毫升(对于单个冷冻的细胞剂量)。将该细胞溶液转移到冷冻容器,将该容器置于-80℃冰柜中的异丙醇酒精浴中。第二天,将细胞转移到液态氮中。

6.7.2. 设计干细胞库

“批次”的定义是来自单一捐献胎盘的所有细胞剂量。细胞在扩增培养过程中保持正常增长、核型与细胞表面标记表型超过 8 次传代和 30 次倍增。由于这个限制,剂量包括 5 次传代和约 20 次倍增的细胞。为了产生相当量的细胞供应,将单个批次在培养中扩增并在两层细胞库中存储为冷冻剂量。具体来说,将从原代培养物中收集的、经历 0 次倍增的、称为 0 代细胞的细胞用于启动扩增培养。在第一次传代后,大约发生了 4 次倍增,将细胞在主细胞库(MCB)中冷冻。将 MCB 中的小瓶用于接种另外的扩增培养。将从 MCB 解冻的细胞进行另外的两次传代后,将细胞在工作细胞库(WCB)中冷冻,总共进行了大约 12 次倍增。将 WCB 中的小瓶用于接种扩增培养物以进行另外的

2 次传代，产生大约 20 次倍增的 5 次传代细胞，将该细胞冷冻成单个剂量。

6.7.3. 解冻用于培养的细胞

将细胞的冷冻容器置于密封的塑料袋，并浸在 37℃ 水浴中。轻轻转动该容器，直到除了一小块冰外所有的内容物都融化。将容器从密封塑料袋中移出，并将 10 倍体积的培养基缓慢加入到细胞中，轻柔混合。将样本在血细胞计数器上计数并接种在扩增培养物中。

6.7.4. 解冻用于注射的细胞

将细胞的冷冻容器在干燥氮气托运箱中转移至施药地点。在施药之前，将容器放入密封的塑料袋，并浸在 37℃ 水浴中。轻轻转动该容器，直到除了一小块冰外所有的内容物都融化。将容器从密封塑料袋中移出，并添加等量的 2.5% 人血清白蛋白/5% 葡聚糖。细胞不经进一步清洗即注入。

6.7.5. 测试和规格

所有捐献胎盘都伴随有产妇血液样本。筛选该样本的乙型肝炎核心抗体和表面抗原，丙型肝炎病毒抗体和核酸，以及 HIV I 和 II 抗体和核酸。在收到测试结果之前开始处理胎盘和进行原代培养，但仅对与测试对所有病毒呈阴性的产妇血液样本相关的胎盘继续实验。如果捐献者对任何病原体的测试呈阳性，则将这一批次丢弃。此外，针对 MCB、WCB 和来源于 WCB 小瓶的细胞剂量材料样本进行如表 3 所述的测试。只有当所有规格都得到满足时批次才能被放行。

表 3：细胞测试和规格

测试	方法	获得的结果
----	----	-------

不育性	BD BACTEC PEDS PLUS/F 和 BACTEC Myco/F Lytic	阴性
内毒素	LAL 凝胶块	≤ 5 EU/mL*
存活力	苔盼蓝	$>70\%$ 存活
支原体	直接培养, DNA 荧光色素(FDA PTC1993)	阴性
身份	流式细胞仪(见如下)	CD105 ⁺ 、CD200 ⁺ 、CD10 ⁺ 、CD34 ⁺
细胞纯度	微卫星	未测到污染细胞
染色体组型	分裂中期细胞的 G 带和染色体计数	正常

*对于 40 ml 冷冻细胞/剂量和最多 5 EU/ml 的产品, 对于体重超过 40 kg 的接受者来说细胞产品低于 5 EU/kg/剂量的上限。

6.7.6 表面标记表型分析

将细胞置于含有 1%多聚甲醛(PFA)的磷酸缓冲液中 20 分钟, 并保存在冰箱中直至染色(长达一周)。用含 2%胎牛血清、0.05%叠氮化钠的 PBS(染色缓冲液)洗涤细胞, 然后重悬浮在染色缓冲液中。细胞用以下抗体偶联物染色: CD105-FITC、CD200-PE、CD34-PECy7、CD10-APC。细胞也用同型对照染色。经过 30 分钟的孵育后, 用染色缓冲液洗涤和重悬浮细胞, 然后在流式细胞仪上分析。对与同型对照相比荧光增加的细胞计数, 作为标记阳性的细胞。

6.8 实施例 8 : 胎盘干细胞特异性基因鉴定

将来源于羊膜-绒毛膜(AC)和脐带(UC)的胎盘干细胞的基因表达模式与来源于多能骨髓间充质干细胞(BM)和皮肤成纤维细胞(DF)的基因表达模式进行比较, 后者被认为是终末分化的。使细胞生长一代、中等代数、和最多代数(包括直至衰老)。结果表明, 细胞群倍增数对基因表达有重大影响。一组基因在 AC 和 UC 中被鉴定为是上调的, 在 BM 和 DF 中是下调或缺失的, 其表达与代数无关。这组胎盘干细胞或脐带血干细胞特异性基因编码许多与上皮细胞相关的细胞骨架蛋白和细胞间粘附蛋白, 以及与母体-胎儿免疫耐受

有关的免疫球蛋白样表面蛋白 CD200。在这个实施例中胎盘干细胞和脐带干细胞被统称为 AC/UC 干细胞。

6.8.1. 材料与方法

6.8.1.1. 细胞和细胞培养

BM(目录号 PT-2501)和 DF(目录号 CC-2511)均购自 Cambrex。AC 和 UC 源自 0 代组织培养瓶。瓶中的 AC 和 UC 从指定为 2063919 的捐献胎盘消化得到。T-75 培养瓶以 6000 个细胞/cm² 接种并当细胞汇合时传代。通过台盼蓝细胞计数估计细胞群倍增。在 3、11 至 14 和 24-38 次倍增后检测培养物的基因表达。

6.8.1.2. RNA、微阵列和分析

除了一个培养物在裂解之前用胰蛋白酶作用外，细胞在其组织培养瓶中直接裂解。用 QIAGEN 公司的 RNeasy 试剂盒分离总 RNA。用 Agilent 2100 生物分析仪确定 RNA 的完整性和浓度。每个培养的 10 微克总 RNA 在 Affymetrix GENECHIP®平台杂交。根据制造商的方法，总 RNA 转化为标记的 cRNA 并与人类基因组 U133A 2.0 阵列的寡核苷酸杂交。图像文件用 Affymetrix MAS 5.0 软件处理，使之标准化并用 Agilent GeneSpring 7.3 软件分析。

6.8.2. 结果

6.8.2.1. 选择 BM-MSC、AC/UC 干细胞和 DF 的培养时间点用于微阵列分析

为了建立 AC/UC 干细胞特有的基因表达模式，将两个干细胞系 AC(6)

和 UC(6)与 BM-MSK 和 DF 一起平行培养。为了最大限度地确定可归因于细胞来源的基因表达图谱和尽量减少外来影响,所有细胞在同一培养基中生长、接种和用相同的标准继代培养。在 3 次细胞群倍增、11 至 14 次倍增、或 35 次倍增或衰老(无论哪种情况首先出现)后收集细胞。在 AC/UC 干细胞中的表达不随培养时间而改变且相对于 BM 和 DF 上调的基因是候选的 AC/UC 干细胞特异性基因。

图 10 显示了该研究中的四种细胞系的生长情况,圆圈表示收集用于 RNA 分离的培养物。共收集了 12 个样品。在 3 次倍增后收集 BM、AC(6)和 UC(6),这些样本被认为培养了“短”时间。没有收集短时间 DF 样本。收集所有细胞类型的中等时间培养物,即 11 至 14 次倍增的培养物。在约 35 次倍增时或正好在衰老之前(无论哪种情况首先出现)收集所有细胞系的长时间培养物。对于 BM,衰老在 15 次倍增前发生,对于 DC,在 25 次倍增时发生。所购买的 BM 和 DF 细胞在基因分析之前被扩增多次,且不能认为是早期阶段。然而,可操作地,生长三次倍增的 BM(BM-03)被认为是短时间培养物。同样地, BM-11 可操作地被称为中等时间培养物,但因为衰老在 14 次倍增时发生,因此 BM-11 在生物上最有可能是长时间培养物。

6.8.2.2. 层次聚类显示 BM、AC/UC 干细胞和 DF 之间的关系

微阵列分析确定基因表达模式,层次聚类(HC)试图找到两个维度-第一维度的基因和第二维度的不同条件(不同的 RNA 样品)背景下的相似性。在本实验中使用的 GeneChip 包含 22,000 个探针组(称作“全基因系列”),但这些组中的许多查询出在任何条件下均不表达的基因。为了减小该全基因系列,去除了所有样本中的不表达或表达水平低(基本值低于 250)的基因,从而产生 8,215 个基因的系列。

6.8.2.3. 用线图进行基因表达分析

在 GeneSpring(图 11)中用线图显示了所述 8,215 个基因的基因表达模式。X 轴显示 12 个实验条件, y 轴显示标准化探针组的对数级表达值。y 轴涵盖了 10,000 倍的范围, 不表达或表达水平非常低的基因的值设置为 0.01。默认情况下标准化值设置为 1。每条线代表单个基因(实际上是探针组, 有些基因有多个探针组), 并在所有 12 个条件下画作单一颜色。色彩表示相对表达水平, 如热量图一样, 但着色模式通过选择一个条件来确定。图 11 中 AC-03 是选定的条件。相对于标准化值上调的基因由软件显示为红色, 而那些下调的基因显示为蓝色。从 AC-03 到 UC-11 中明显的向上和向下指向的峰表明许多基因在这些条件下表达有差异。AC-03 和 UC-03 之间的颜色模式惊人地相似表明许多相同基因在这两个样品中是上调或下调的。水平线段表明在许多条件下基因的表达水平没有发生变化。这通过比较 UC-36、UC-38 和 UC-38-T 而非常明显。不存在明显的峰, 但存在微妙的趋势, 因为 UC-36 和 UC-38-T 之间的许多红线都低于标准值 1。这表明, 在 AC-03 和 UC-03 中上调的这些基因在右面的培养中下调。UC-38 和 UC-38-T 间的表达模式如此类似的事实表明正好在 RNA 分离前对细胞进行胰蛋白酶作用对基因的表达影响不大。

除了计算密集型 HC 方法外, 通过目视检查, 两个 BM 样本与其他条件下的样本相比互相之间更相似。这同样适用于两个 DF 培养物。尽管大量的差异表达基因存在于 BM 和 DF 样本, 但一般表象表明: 比起 AC/UC 干细胞, 两个 BM 和两个 DF 互相之间更相似。这可通过如上所述的 HC 结果证实。

当上述过程在采用 AC-11 作为选择条件进行时, 很显然 AC-11 和 UC-11 共有许多相同的差异表达基因, 但这两个条件间相同的基因的总数似乎少于 AC-03 和 UC-03 之间差异表达的基因数。图 12 显示了 AC-03 中以相对于基

线的 6 倍或更高水平差异性过表达的基因。在 AC-03 中上调的大多数基因在 UC-03 中也上调，而在 BM 和 DF 中不同。

6.8.2.4. 用于鉴别 AC/UC 干细胞特异性基因的过滤方法

在所有的 AC/UC 样本中保持不变且在 BM 和 DF 中下调的基因被认为具有 AC/UC 干细胞特异性。组合两个过滤方法来建立 58 个 AC/UC 干细胞特异性基因(表 4)的列表。

表 4: 58 个胎盘干细胞或脐带干细胞特异性基因

代号	基因	生物过程、描述和其他注释
ACTG2	肌动蛋白, $\gamma 2$, 平滑肌, 肠内的	肌肉形成, 细胞骨架, 在脐带动脉和前列腺表皮表达
ADARB1	腺苷脱氨酶, RNA 特异性, B1(RED1 同源大鼠)	RNA 加工, 中枢神经系统形成
AMIGO2	Amphoterin 诱导基因 2	同种或异种细胞粘附, 具有 Ig 样结构域 2 的粘附分子
ATRS-1	1 型肿瘤坏死因子受体脱落氨肽酶调控因子	蛋白水解, 抗原加工, 血管生成, 在胎盘表达
B4GALT6	UDP-Gal: β GlcNAc β 1,4-半乳糖转移酶, 多肽 6	碳水化合物新陈代谢, 整合至膜, 可以有细胞内识别和/或粘附功能
BCHE	丁酰基胆碱酯酶	胆碱酯酶活性, 丝氨酸酯酶活性, 水解酶活性
C11orf9	染色体 11 开放阅读框 9	假定蛋白, p53 样转录因子, 在视网膜色素上皮表达
CD200	CD200 抗原	免疫球蛋白样, 表面蛋白, 抑制巨噬细胞
COL4A1	胶原蛋白, IV 型, $\alpha 1$	ECM, 基底膜, 无纤维胶原蛋白, 含有 arresten 结构域
COL4A2	胶原蛋白, IV 型, $\alpha 2$	ECM, 生物发生, 基底膜, 与 COL 4A1 共表达, 在异型增生上皮中下调
CPA4	羧基肽酶 A4	蛋白水解, 组蛋白乙酰化, 母本印记, 在前列腺癌细胞系中高表达
DMD	抗肌萎缩蛋白(肌营养不良, Duchenne 和 Becker 型)	肌肉收缩, 细胞形态和细胞大小控制, 肌肉形成
DSC3	桥粒胶蛋白 3	同种细胞-细胞粘附, 位于桥粒
DSG2	桥粒芯蛋白 2	同种细胞-细胞粘附, 位于桥粒

ELOVL2	极长链脂肪酸(FEN1/Elo2、SUR4/Elo3、酵母)样 2 的延长	脂肪酸生物合成, 脂质生物合成
F2RL1	凝血因子 II(凝血酶)受体样 1	G 蛋白偶联受体蛋白信号通路, 在结肠上皮和神经元素上高表达
FLJ10781	假定蛋白质 FLJ10781	---
GATA6	GATA 结合蛋白 6	转录因子, 肌肉形成
GPR126	G 蛋白偶联受体 126	信号转导, 神经肽信号通路
GPRC5B	G 蛋白偶联受体, C 族, 5 组, 成员 B	G 蛋白偶联受体蛋白信号通路
ICAM1	细胞间粘附分子 1(CD54), 人类鼻病毒受体	细胞间粘附, 细胞粘附, 跨膜受体活性, 在结膜上皮高表达
IER3	即刻早期反应 3	抗凋亡, 胚胎形成和形态发生, 细胞生长和/或维持
IGFBP7	胰岛素样生长因子结合蛋白 7	负调节细胞增殖, 在衰老上皮细胞中过量表达
IL1A	白介素 1, α	免疫反应, 信号转导, 细胞因子活性, 细胞增殖, 分化, 凋亡
IL1B	白介素 1, β	免疫反应, 信号转导, 细胞因子活性, 细胞增殖, 分化, 凋亡
IL6	白介素 6(干扰素, $\beta 2$)	细胞表面受体连接信号转导, 免疫反应
KRT18	角蛋白 18	形态发生, 中间丝, 在胎盘、胎儿和上皮组织中表达
KRT8	角蛋白 8	细胞骨架组织和生物合成, 磷酸化, 中间丝, 与 KRT1B 共表达
LIPG	脂肪酶, 内皮细胞	脂肪新陈代谢, 脂蛋白脂肪酶活性, 脂肪转运因子, 磷酸脂酶活性, 参与血管生物学
LRAP	白细胞来源的精氨酸氨肽酶	抗原加工, 通过 I 类 MHC 的内生抗原; N 末端氨肽酶活性
MATN2	Matrilin 2	在成纤维细胞系或上皮来源的细胞系中广泛表达, 非关节软骨 ECM
MEST	中胚层特异性转录同源物(小鼠)	父本印记基因, 中胚层组织的形成, 在胎儿组织和成纤维细胞中表达
NFE2L3	核因子(红细胞源性 2)-样 3	转录共同因子, 在原代胎盘细胞滋养层而不在胎盘成纤维细胞高表达
NUAK1	NUAK 族, SNF1 样激酶, I	蛋白质氨基酸磷酸化, 蛋白质丝氨酸-苏氨酸激酶活性
PCDH7	BH-原钙粘蛋白(脑-心)	细胞间粘附和识别, 含有 7 个钙粘附蛋白重复单位

PDLIM3	PDZ 和 LIM 结构域 3	α -肌动蛋白-2 相关的 LIM 蛋白, 细胞骨架蛋白结合, 在骨骼肌中表达
PKP2	Plakophilin 2	细胞间粘附, 位于桥粒, 在上皮中发现, 与钙粘着蛋白和中间丝结合
RTN 1	Reticulon 1	信号转导, 神经分化, 神经内分泌分泌物, 在神经内分泌细胞中的膜转运
SERPINB9	丝氨酸蛋白酶抑制剂肽酶抑制剂, ciade 9(卵白蛋白), 成员 9	丝氨酸蛋白酶抑制剂, 凝血, 纤维蛋白溶解, 补体结合, 基质重塑, 在胎盘表达
ST3GAL6	唾液酸转移酶 10	氨基糖新陈代谢, 蛋白质氨基酸糖基化, 糖脂类新陈代谢, 蛋白质脂质化
ST6GALNAC5	唾液酸转移酶 7E	蛋白质氨基酸糖基化, 神经节苷脂生物合成
SLC12A8	溶质载体家族 12(钠/钾/氯转运因子), 成员 8	氨基酸-多氨基转运活性, 阳离子-氯共同转运因子 9, 可能在上皮免疫中起作用(银屑病)
TCF21	转录因子 21	调节转录, 中胚层形成展, 在肾上皮细胞中发现
TGFB2	转化生长因子 β 2	调节细胞周期, 信号转导, 细胞-细胞信号, 细胞增殖, 细胞生长
VTN	玻连蛋白(血清分散因子、生长调节素 B、补体 S-蛋白)	免疫反应, 细胞粘附, 分泌的蛋白质, 结合 ECM
ZC3H12A	含 12A 的锌指 CCM 型	MCPI 处理诱导的蛋白质, 核酸结合, 假定锌指蛋白质

首先, 在 8 个 AC/UC 干细胞条件中的至少 7 个中选择相对于所有 BM 和 DF 样本过表达 ≥ 3 倍的那些基因, 从而鉴定出 58 个基因(图 13)。过滤 8 个 AC/UC 干细胞条件产生类似系列。第二个过滤方法使用 Affymetrix MAS 5.0 软件提供的“缺失”和“存在”命令。通过鉴定在所有 BM 和 DF 条件中缺失而在 AC-03、AC-11、UC-03 和 UC-11 中存在的基因来建立列表。在之后的 AC/UC 干细胞的条件下不规定基因命令。

所述两个列表有大量重叠, 将其合并。通过消除(1)在大多数或所有的 AC/UC 干细胞条件下表达水平很低的几个基因, 和(2)Y 染色体上的基因来进一步缩减合并的系列。用 FISH 分析证实该研究中使用的 AC 和 UC 细胞是男

性细胞，而 BM 和 DF 来自女性捐献者。由此产生的 46 个 AC/UC 干细胞特异性基因列表列于表 5。

表 5. 通过语义(Ontology)列表的 AC/UC 特异性基因

<u>细胞粘附</u>	<u>细胞骨架</u>	<u>发育</u>	<u>ECM</u>	<u>与上皮细胞有关</u>
AMIGO2 B4GALT6 DSC3 DSG2 ICAM1 PCDH7 PKP2 VTN	ACTG2 DMD KRT18 KRT8 PDLIM3	ADARB1 IER3 IGFBP7 IL1A IL1B MEST TGFB2	COL4A1 COL4A2 MATN2 VTN	ACTG2 C11orf9 COL4A1 COL4A2 DSC3 DSG2 F2RL1 ICAM1 IGFBP7
<u>糖基化</u> B4GALT6 ST3GAL6 ST6GALNAC5 <u>转录</u> C11orf9? GATA6 NFE2L3 TCF21	<u>反应免疫</u> ATRS-1 CD200 IL1A IL1B IL6 LRAP SLC12A8 VTN	<u>蛋白水解</u> ATRS-1 CPA4 LRAP	<u>信号</u> F2RL1 GPR126 GPRC5B IL1A IL1B IL6 RTN1 TGFB2	IL6 KRT18 KRT8 MATN2 PKP2 SLC12A8 TCF21

这 46 基因的列表编码代表许多语义组的蛋白质的集合。最高的代表组，即细胞粘附组，包含 8 个基因。没有基因编码参与 DNA 复制或细胞分裂的蛋白质。还列出与上皮特异性相关的 16 个基因。

6.8.3. 讨论

鉴定胎盘干细胞区别于骨髓来源的间充质细胞的特异性表达模式。可操作地，这种模式包括在所有胎盘干细胞样本中相对于所有 BM 和 DF 样本过表达的 46 个基因。

实验设计为比较短时间、中等时间和长时间培养的细胞。对于 AC 和 UC 细胞，每一种培养时间均具有独特组的差异表达基因。在短时间或早期阶段 (AC-03 和 UC-03)，200 个上调基因在 8 次细胞群倍增后回归至平均值。不受

任何理论的约束,可能这一早期阶段的基因表达模式类似于 AC 和 UC 在自然胎盘环境下的基因表达图谱。在胎盘中,这些细胞并不积极分裂,它们代谢营养物质,在它们之间传递信号,并重建外环境以固定他们的位置。

中等时间培养的基因表达定义为快速细胞分裂,此时差异性表达的基因与在早期阶段差异性表达的基因存在相当的不同。在 AC-11 和 UC-11 中以及 BM-03 和 DF-14 中上调的许多基因与染色体复制和细胞分裂有关。根据基因表达, BM-03 在生物上看起来是中时间培养物。在这个中期阶段,细胞型特异性基因表达被细胞增殖所掩盖。此外,几乎每一个在短时间 AC 或 UC 培养物中过量表达的基因在中后期条件中下调。在此高增殖期,143 个基因上调 $\geq$ 五倍,其占表达基因的约 1.7%。

长时间培养物代表了最后阶段或衰老阶段。在这一阶段,细胞已经耗尽其分裂能力,尤其对于 AC 和 UC,差异表达基因的绝对数量明显减少。这可能是由于为了完全适应于其培养环境,因而减少生物合成的负担。令人惊讶的是,后期 BM 和 DF 培养物并没有显示出这种同样的行为,在 BM-11 和的 DF-24 中大量基因相对于 AC 和 UC 和标准化值为 1 差异性表达。在长时间培养物中,AC 和 UC 显著有别于 BM 和 DF。

在此所述的胎盘干细胞特异性基因列表是不同的。COL4A1 和 COL4A2 协调调节, KRT18 和 KRT8 似乎也共同表达。编码参与细胞间接触的蛋白质的 8 个基因中的 3 个(DSC3、DSG2 和 PKP2)定位至桥粒,即锚定至中间纤维细胞骨架蛋白如角蛋白 18 和角蛋白 8 的细胞间接触点。紧密细胞间接触是上皮细胞和内皮细胞的特征,且通常与成纤维细胞无关。表 3 列出了总共 46 个中的 16 个上皮细胞特征性基因。胎盘干细胞通常称为成纤维细胞样小梭形细胞。这种形态典型地与 BM 和 DF 相区别,特别是在较低的细胞密度时。

同样值得注意的是 CD200 的表达模式,其存在于 AC/UC 干细胞中,而在 BM 和 DF 的所有样本中缺失。此外,已经表明 CD200 在胎儿形成过程中与胎盘中的免疫耐受相关(见,例如 Clark 等, *Am. J. Reprod. Immunol.* 50(3): 187-195 (2003))。

此 46 个基因的亚组构成了一组分子生物标记,其将 AC/UC 干细胞与骨髓来源的间充质干细胞或成纤维细胞区别开来。

6.9. 实施例 6.9: 贴壁胎盘干细胞分化为成骨细胞

这个实施例描述了显示胎盘干细胞分化成成骨细胞的能力的实验结果。这个实施例还显示了这种成骨细胞矿化或有助于体外矿化适当的支架的能力。

6.9.1. 通过分化的胎盘干细胞表达成骨标记

首先,通过监测碱性磷酸酶(AP)活性评估胎盘干细胞分化为成骨前体的能力。AP 活性是常用的骨形成的早期标记。例如,见 Kasten 等人, 2005, *Biomaterials* 26:5879- 89。

6.9.1.1. 试剂

DMEM-LG、胰岛素-转铁蛋白-硒-G 补充剂(ITS)、青霉素-链霉素(P/S)、PicoGreen 双链 DNA 荧光测定均购自 Invitrogen 公司(Eugene, OR)。

MCDB201、亚油酸、地塞米松、L-抗坏血酸、和表皮生长因子均购自 Sigma(St. Louis, MO)。胎牛血清(FBS)和血小板衍生生长因子分别获自 Hyclone(Logan, UT)和 R & D 系统(Minneapolis, MN)。低温保存的骨髓来源的间充质干细胞(MSC)、间质干细胞生长培养基(在这个实施例中称为“基础”)

及成骨分化培养基(OS)均购自 Cambrex(East Rutherford, NJ)。亦可参阅上文第 5.5.4 部分。

6.9.1.2. 细胞培养

用几种方法中的一种将贴壁的胎盘干细胞从胎盘中分离, 该方法包括从胎盘的几个不同组织解剖部位物理裂解组织。建立贴壁胎盘干细胞并以 5×10^3 个细胞/cm² 在 Anthro1B 培养基(60%DMEM-LG、40%MCDB201、2%FBS、1×P/S、180ng/mL 亚油酸、0.05μM 地塞米松、0.1mM L-抗坏血酸、10ng/ml 血小板衍生生长因子和 10ng/mL 表皮生长因子)中继代培养。将骨髓-MSC 在基础培养基中以 5×10^3 个细胞/cm² 继代培养。对于在组织培养聚苯乙烯上的实验研究, 将胎盘干细胞和/或间质干细胞在基础或 Anthro 1B 培养基上以 5×10^3 个细胞/cm² 接种, 然后在 Anthro 1B 培养基中维持或用 OS 诱导长达 5 周, 细胞每两周一次地用新鲜培养基饲养。对于在三维支架上的研究, 将体积为 100 μl 的 Anthro 1B 培养基中的胎盘干细胞接种(2.5×10^5 个细胞/支架)到磷酸钙(CaP, BD Biosciences, San Jose CA)或 β-磷酸三钙(TCP, Therics, Akron, OH; VITOSS®, Orthovita, Inc.; Malvern, PA; HEALOSTTMII; DePuy Spine, Inc.; Raynham, MA)支架上。37℃ 孵育 1-2 小时后, 向含有支架的孔补充 180 μl 培养基。3-4 天后, 将一半的样本维持在 Anthro 1B 培养基中, 而另一半样本用 OS 培养基诱导。每两周更换培养基一次。

6.9.1.3. 碱性磷酸酶测定

用测定对硝基苯酚产品形成的比色法(Cell Biolabs, San Diego, CA)测定细胞裂解液中的碱性磷酸酶(AP)活性, 使用 PicoGreen 双链 DNA 荧光法(Invitrogen, Eugene, OR)将 AP 活性标准化至 DNA 微克级(以消除细胞数的任

何差别)。要确定支架上培养的细胞的 AP 活性, 细胞支架结构用 PBS 洗涤, 浸到细胞裂解液中, 用吸管尖粉碎, 以 12,000g 离心。然后如上所述分析上清液的 AP 活性和 DNA 含量。

6.9.1.4. 结果与讨论

将胎盘干细胞和间充质干细胞接种到基础培养基(Cambrex)或 Anthro1B 培养基中, 然后在基础、OS、或 Anthro 1B 培养基中维持 3 周(在基础培养基中接种并在 OS 培养基中诱导的细胞在图 14 中指定为“基础-OS”)。如图 14A 及 14B 中所示, 接种并保持在基础培养基中的细胞显示 AP 活性最低, 这如同预期, 而在基础培养基中接种并用 OS 培养基诱导的细胞表现出相对较高水平的 AP 活性。有趣的是, 接种并保持在 Anthro 1B 中的细胞显示出 AP 最高活性, 甚至超过在 Anthro 1B 培养基中接种并用 OS 培养基诱导的细胞。因此, 本实验表明, 当在适当的培养基中培养时 PDAC 可以分化为成骨前体细胞。

6.9.2. PDAC 分化为成骨细胞的功能性表征

这个实施例描述了对胎盘干细胞分化的成骨细胞的功能性能力进行评估的实验结果。特定地, 评估了成骨细胞沉积矿化基质的能力。如以上实施例 6.9.1 中所述制备和培养胎盘干细胞, 不同之处在于将胎盘干细胞在 Anthro 1B 培养基中接种并培养 3 天, 然后维持在 Anthro 1B 培养基中或用 OS 培养基诱导 3 周。通过 von Kossa 染色、钙测定和可扫描电镜(SEM)观察来评估矿化。

6.9.2.1. von Kossa 染色

通过 von Kossa 方法对标本的矿物质进行染色。具体地, 用 10%福尔马

林固定细胞层 10 分钟, 用 5%硝酸银在紫外线光下孵育 20 分钟, 用去离子水清洗, 用 5%硫代硫酸盐孵育 5 分钟, 并用去离子水彻底清洗。

6.9.2.2. 钙测定

用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞单层两次并在 0.5N 盐酸中从培养皿中刮出。通过在回转式震荡器中在 4°C 孵育过夜, 然后 2000g 离心 10 分钟, 而从细胞组分中抽提出累积的钙。用 Stanbio 实验室(Boerne, TX)提供的钙定量试剂盒测定上清液中的钙。将钙水平标准化成总细胞蛋白, 以消除细胞数量上的任何差异。

6.9.2.3. SEM 分析

将用于 SEM 的样品在 10%福尔马林中固定 15 分钟, 用 PBS 洗涤, 并在梯度系列乙醇(20、40、60、80 和 100%)中脱水。在乙醇脱水后用石蜡包埋支架, 以方便切片。切片后, 将样本孵育在二甲苯中并用如上所述的梯度系列乙醇脱水。然后将所有的标本用金溅射涂覆并使用 JEOL JSM-6400F 场发射 SEM(Evans Analytical Group, East Windsor, NJ)分析。

6.9.2. 结果和讨论

如图 15A 所示, 通过 von Kossa 染色, 用 OS 培养基诱导的贴壁胎盘干细胞显示出钙沉积证据, 这些沉积在用 Anthro 1B 培养基维持的细胞中并没有观察到。为了定量这些矿化基质的水平, 测定与细胞单层相关联的钙。如图 15B 所示, 与培养在 Anthro 1B 培养基中的细胞相比, 用 OS 培养基诱导的细胞层中回收的钙多三倍。结合 Von Kossa 染色数据, 钙抽提结果表明, 用 OS 培养基诱导的胎盘干细胞形成矿化基质。为了以高分辨率使矿化基质

可视化, 将在 Anthro 1B 培养基中维持(图 16A)或用 OS 培养基诱导(图 16B)的胎盘干细胞样本进行 SEM 分析。

矿化的基质沉积在用 OS 培养基诱导的胎盘干细胞中很明显, 而 Anthro 1B 培养基培养的胎盘干细胞中没有看到这种矿化沉积的累积。图 16B 中的沉积通过 X 射线衍射分析形成的元素映射图证实这些结节是由钙、磷组成。

图 14(在存在 Anthro 1B 培养基的情况下 AP 活性增加)与图 15 和 16(在存在 Anthro 1B 培养基的情况下没有矿化)的结果之间明显缺乏相关性可以用如下事实来解释: Anthro 1B 不含有基质矿化所需要的磷酸盐来源 β -磷酸甘油。既存在于 Anthro 1B 培养基中也存在于 OS 培养基中的地塞米松和抗坏血酸是常见的干细胞成骨分化诱导剂。例如, 见 Sun 等人, 2006, *Biomaterials* 27:5651-7。 β -磷酸甘油通常包含在成骨分化培养基中作为磷酸盐来源而使细胞介导的基质矿化能够发生, 一般来说它本身并不被认为是成骨分化诱导剂。AP 活性的数据表明接种并维持在 Anthro 1B 中的胎盘干细胞具有最高的成骨分化潜力, 很可能以因为缺乏 β -磷酸甘油, 所以在 Anthro 1B 培养基中培养的胎盘干细胞没有发现矿化。

6.9.3. PDAC 在三维支架上的分化

这个实施例描述了胎盘干细胞在三维底物上分化为成骨细胞。因为基于磷酸钙和 apatite 的生物材料已被临床上用于治疗骨折和骨缺损, 因此选择这两种市售的陶瓷支架来评价三维(3D)支架上的胎盘干细胞附着和成骨功能性。将胎盘干细胞与间充质干细胞接种到支架上和评价其在长期体外培养中在支架上附着并保持粘附的能力。如图 17 所示, 与磷酸钙(CaP)支架相比, 胎盘干细胞以及间充质干细胞优先附着到 β -磷酸三钙(TCaP)上, 并且胎盘干细胞与间充质干细胞在 TCaP 支架上表现出相似的附着水平。此外, 在整个

过程中,存在于 TCaP 支架上的细胞(胎盘干细胞与间充质干细胞)始终比 CaP 支架上的多。在培养的第二周,在 CaP 支架上不再能检测出贴壁胎盘干细胞与间充质干细胞。这些数据得到了用氧传感器板测定的培养基耗氧量分析的支持。总之,这些结果表明,至少在某些情况下,TCaP 支架比 CaP 支架更能保持 PDAC 生存力。

为了评估支架上的成骨分化,用上文所述的 AP 测定法监测支架上培养的细胞的 AP 活性。将胎盘干细胞和间充质干细胞接种在 Anthro 1B 培养基中,然后在实验过程中维持在 Anthro 1B 培养基中或 OS 培养基中。如图 18 所示,TCaP 支架上的胎盘干细胞显示出相似的 AP 活性,无论培养在 Anthro 1B 培养基中还是培养在 OS 培养基中,而 TCaP 支架上的 MSC 在 Anthro 1B 培养基中显示出比在 OS 培养基中培养的细胞更高的 AP 活性。这些结果与在二维表面获得的 AP 活性数据一致,即在 Anthro 1B 培养基中存在的因子可以刺激 AP 活性到 OS 培养基刺激的相似水平。对于 MSC 和 PDAC,在 CaP 支架上接种的细胞没有检测出 AP 活性。

为了在功能上评估三维支架上的胎盘干细胞骨基质形成,对接种在支架上并在 Anthro 1B 或 OS 培养基中培养 3-5 周的贴壁胎盘干细胞进行 SEM 分析。如图 19 所示,在没有细胞的情况下进行培养的 TCaP 支架的 SEM 表现出高度多孔表面(箭头所示),其存在大量的孔。与胎盘干细胞或间充质干细胞一起培养的支架表现出表面孔隙缺乏,这表明细胞在支架周围正在形成由细胞双层中之一或两者或细胞外基质蛋白组成的单层。

为了澄清支架内的细胞是否发生矿化骨基质形成,将细胞-TCaP 支架结构的截面切片用 SEM 在高分辨率(5000×)下分析。如图 19 所示,在缺乏细胞的情况下培养的支架的特点是组成支架的 TCaP 晶体存在锋利的边缘。然

而用胎盘干细胞或间充质干细胞接种的支架缺乏这些锋利的边缘，取而代之的是装饰有结节结构，与图 17 所观察到结构近似，这表明胎盘干细胞与间充质干细胞 TCaP 支架上形成矿化骨基质。

6.10. 实施例 10：胎盘干细胞分化成成骨前体

这个实施例描述了对灌洗分离的胎盘干细胞分化成成骨祖细胞进行评估的实验结果。根据实施例 6.3 通过灌洗从人胎盘分离细胞。

收集之后，将人胎盘灌洗液(HPP)细胞在含有 10%FBS 或 OS 的 DMEM 中在 VITOSS®(Orthovita, Inc.; Malvern, PA)上培养 10 天。以 1,200rpm 离心 5 分钟使细胞形成沉淀小球。从细胞沉淀小球去除剩下的液体后，将细胞以指定的细胞数(25,000、50,000 或 100,000)重悬浮在 20 μ l 的 PBS-2%胎牛血清中。然后将支架切成 $2 \times 3 \times 5$ mm³ 的块，并置于 96 孔板的孔中。将细胞悬浮液直接加载到支架上并在 37°C，5%CO₂ 下孵育 30 分钟，接着加入 200 μ l 的 Cambrex 成骨分化培养基(目录号 PT-3002)，以浸泡细胞支架。为了进行细胞活力测定，将装载有细胞的支架转移到 BD 氧生物传感器系统(BD Biosciences，目录号 353830)中并用 200 μ l 的 Cambrex 成骨分化培养基浸泡。

然后通过染色和监测 AP 活性来评估成骨潜力。具体地，将细胞用茜素红按照常规技术染色，以测定的钙存在。如图 20 所示，干细胞和 MSC 在 OS 培养基中均有含钙矿化基质沉积，而在 DMEM 中没有。

在 OS 中培养 10 天后进行 AP 测定。要做到这一点，将支架上的 HPP 通过冷冻和解冻 2 次裂解到含 0.2% Triton X-100 的 100 μ l PBS 中。用 5 μ l 的细胞裂解液按照供应商指南的指示使用 BioAssay System 的 QuantiChrom 碱性磷酸酶试剂盒(目录号 DALP-250)测量碱性磷酸酶活性。图 21 所示为分析结果，其表明 MSC 和 HPP 在 OS 培养基中培养 10 天后均有 AP 活性。因此，

这些实验证明了如上所述获得的含有干细胞部分的细胞也能分化成骨前体细胞。

6.11. 实施例 11: 用包括胎盘干细胞的组合物进行骨修复的体内模型

这个实施例描述了对用包含胎盘干细胞的组合物治疗骨缺损进行评估的实验。调整几种骨病模型以评估这些治疗对不同骨疾病的应用。

为了得到颅骨双侧缺损模型, 在雄性无胸腺大鼠颅骨的每一侧手术创建 3 毫米×5 毫米的缺损。采用仅用基质、基质结合 PDAC、和基质结合 HPP 治疗该缺损。改变 PDAC 的量以评估不同治疗的剂量依赖性。还评估不同基质材料以测试基质和干细胞的不同组合的效果。

每个治疗组六只大鼠, 用指定基质和细胞结合填充所述缺损。四周时, 收集血清并处死大鼠。检测血清对植入物的免疫反应。收集大鼠颅骨进行显微放射显影术并置于 10%NBF 中。

处理颅骨以进行石蜡包埋和切片。根据常规技术用苯胺对颅骨冠状组织切片进行染色。分成 0 至 4 级评估缺损中的骨内生和残余的基质载体, 4 是内生量最多。也评估炎症和纤维化。

可以根据 Bauerle 等, 2005, Int. J. Cancer 115: 177-186 所述方法的变型评估转移癌造成的骨损伤的治疗。简要地, 通过向股动脉和髂动脉之间的吻合血管动脉内注入人乳腺癌细胞, 在裸鼠中诱发位点特异性溶骨性损伤。然后用常规抗癌疗法(如化疗、放射疗法、免疫疗法或其他治疗)或手术切除来治疗转移癌。接着, 如上所述用不同的基质组合填充转移癌留下的损伤。在适当的时间之后(这通过 X 光监测动物确定), 处死动物。评估对基质的免疫反应、炎症、纤维化、骨内生的程度、以及基质载体量。

描述可用于或调整来评估包含胎盘干细胞的组合物治疗骨缺损的效果的

骨疾病模型的其他参考资料包括 Mitsiades 等, 2003, *Cancer Res.* 63:6689-96; Chakkalakal 等, 2002, *Alcohol Alcoholism* 37: 13-20; Chiba 等, 2001, *J. Vet. Med. Sci.* 63:603-8; Garrett 等, 1997, *Bone* 20:515-520 和 Miyakawa 等, 2003, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 313:258- 62。

6.12. 实施例 12: 从人胎盘胶原蛋白生产矿化胶原蛋白

将 4°C、~3 mg/ml 的人胎盘胶原蛋白(HPC)溶液与中和缓冲液(200 mM Na_2HPO_4 , pH 值为 9.2)以 85 : 15 的比例组合得到 Na_2HPO_4 终浓度 30 mM 和 pH 值 7.2。搅拌加入 1 N NaOH 或 HCl 稍微调整 pH 值。一旦调整了 pH, 停止搅拌, 将反应物以 1°C/min 加热至 32°C。保温反应物 20-24 小时, 离心分离纤维胶原蛋白。该胶原蛋白用磷酸盐缓冲液(PBS, 20 mM Na_2HPO_4 , 130 mM NaCl, pH7.4)重悬浮 3 次并离心分离胶原蛋白。将最后的冲洗的纤维胶原蛋白以 10 mg/ml 重悬浮到 PBS 中并存放在 4°C 直至使用。HPC 的原纤维形成作用将可溶性胶原蛋白重新构建成如图 22a 所示的短纤维和长纤维。

6.12.1. 胶原纤维的矿化

为了矿化胶原蛋白, 将 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 以 199.9 mmol/L 分散并制备 59.7 mM 的 H_3PO_4 溶液。将该 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 和该 H_3PO_4 以 2 : 1 的比例组合在一起, 并在水套反应管中将 pH 调节至 9。这样产生了 1.67 的 Ca/P 比。剧烈搅拌反应物, 同时通过循环水浴和自动滴定单位分别将温度保持在 40°C 和将 pH 值保持为 9。将含于 PBS 中的纤维胶原蛋白缓慢加入到反应混合物中, 使 pH 值返回到 9。最后得到的矿物对胶原比为 80 : 20。剧烈搅拌该反应物 18 小时并通过离心分离矿化胶原(MC), 用 PBS 洗 3 次。在矿化反应中, 沿着纤维形成的 Ca-P 矿物质在电子显微镜中如图 22B 所显示。最终的反应产率很高(>80%), 用

TGA 测定, 所述材料的最终矿物质/胶原蛋白比例接近于输入的矿物质/胶原蛋白比例(图 23)。

6.12.2. 复合物的交联

将所述矿化胶原(MC)在 PBS 中重悬浮成约 2.5 毫克/毫升胶原并置于水套反应管中。通过自动滴定单位将 pH 值调整为 9.5 并在反应中保持不变, 同时用循环水浴将温度保持在 25°C 不变。加入丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)到终浓度为 50 mM。剧烈搅拌反应物 24 小时, 之后离心分离产品, 用 PBS 清洗一次, 并重悬浮在含有 0.5 M 甘氨酸的 PBS(pH 值 10)中, 以淬灭任何未反应的残余环氧基团。25°C 剧烈搅拌反应物 24 小时, 然后用 PBS 冲洗 3 次。离心分离交联的矿化胶原(CMC)。用光和扫描电子显微镜、热重量分析法(TGA)、差示扫描量热法(DSC)、X 射线衍射仪(XRD)和傅里叶变换红外光谱(FTIR)表征 CMC 制剂。

用 DSC 测定, 胶原变性温度从-50°C 升高至-70°C, 证实了交联。当用立体显微镜和扫描电子显微镜(SEM)检查时, 发现交联材料比非交联材料机械完整性更强, 纤维更多。FTIR 表明存在碳酸化磷酸钙矿物。XRJD 证实所述矿物是结晶很差的羟基磷灰石。

6.13. 实施例 13: PDAC 在矿化的人胎盘胶原基质上的生长

这个实施例描述了对贴壁胎盘干细胞在矿化的 HPC 基质上附着和生长能力进行评估的实验结果。这些实验中, 如上所述制备的 CMC 用抗生素和抗真菌试剂消毒。将湿样品装入套管(transwells), 以使用胎盘干细胞根据制造商的指示在标准乳酸脱氢酶的细胞毒性测定(LDH)中进行非接触细胞毒性研究。释放到培养基中的乳酸脱氢酶与细胞毒性密切相关。

接着,将如上所述制备的 CMC 用于 PDAC 粘附和增殖研究。胎盘干细胞如上所述接种到 CMC。在 1、5 和 7 天用 PicoGreen DNA 检测(Molecular Probes; Eugene, Oregon)分析 PDAC 细胞数量。当暴露于 CMC 时,如同暴露于组织培养聚苯乙烯(TCPS)时一样,PDAC 显示出类似的 LDH 产生,这表明 CMC 毒性低。在所有测试的接种密度下,与非交联矿化胶原相比,附着到 CMC 的 PDAC 数量较多。接种后 7 天后,这一趋势仍在继续,胎盘干细胞在 CMC 上具有最高的细胞数。

6.14. 实施例 14: 用胎盘干细胞和可植入基质修复颅骨缺损

利用干细胞的组织工程正成为组织或器官移植的充满希望的替代方法。从产后胎盘分离的新型干细胞(胎盘来源的贴壁细胞,PDAC)具有多潜能干细胞的特征和表型。PDAC 构成可用作用于修复受损组织或病变组织的治疗选择的干细胞/祖细胞的重要的、无可争议的来源。在本研究中,我们调查了 PDAC 的体外和体内成骨性能。

方法

体外研究:胎盘干细胞通过物理裂解不同解剖部位的组织而从胎盘获得,并接种到基础培养基上,然后如上所述用成骨分化培养基(OS)诱导。通过碱性磷酸酶(AP)活性评估 PDAC 体外成骨活性,和通过茜素红染色检测细胞外基质的矿化。分别用 DNA 检测和 CELLTITER GLO®发光法测定三维支架上的胎盘干细胞负荷和存活力。

体内研究:将胎盘干细胞加载到支架(VITOSS® Orthovita 或 HEALOS™ DePuy)上并体外培养多达 1 小时,以形成用于植入的细胞/支架结构。对于异位模型,将加载有胎盘干细胞的 VITOSS®结构皮下植入到 40 只无胸腺大鼠中并在植入 6 周后收集。用免疫组织化学(IHC)分析外植体。对于骨缺损模型,

在 96 只雄性 Hsd: RH-Foxn^{run} 无胸腺大鼠(Charles River, Wilmington, Massachusetts)中建立双边颅骨缺损(3 mm×5 mm), 并用来比较胎盘干细胞+HEALOS™、用作阳性对照的骨形态发生蛋白-2(BMP-2 型)+HEALOS™、用作阴性对照的单独的支架(HEALOS™)、以及空缺损(不治疗)的成骨/修复潜力。这项研究时大鼠约 6 周大, 每个小组 16 只大鼠。将实验条件下的外植体与 5×10^6 个细胞/mL 的 500 μ L 干细胞悬浮液一起加载。阳性对照每 25 mg 载体包含 5 μ g BMP-2。阴性对照包含 HEALOS 和 500 μ L 细胞培养基。在植入 3 或 7 周后收集外植体, 并用 X 射线显微照相、矿化组织密度(成像软件 ImageJ 1.37v)、Lunar PIXI X 射线密度计和组织学进行分析。用苏木精&伊红、T-蓝和波形蛋白染色对切除的骨组织进行组织学分析。

结果

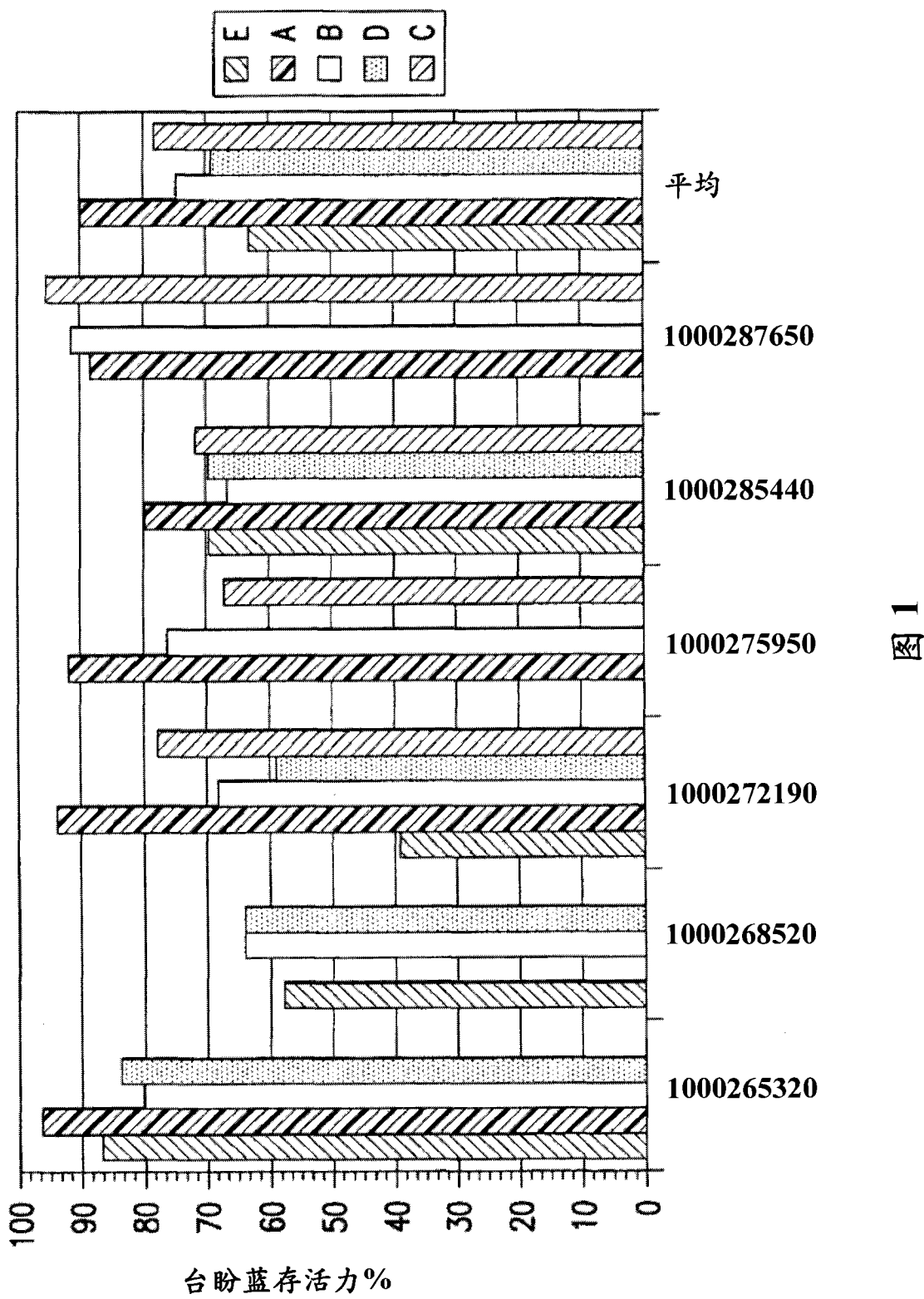
胎盘干细胞的体外成骨属性通过诱导 AP 活性和细胞形成茜素红阳性沉积的能力得到证明。体内结果: 胎盘干细胞+VITOSS®皮下外植体对人骨钙表现出阳性免疫组织化学染色, 这证实了胎盘干细胞的体成骨潜能。在颅骨缺损研究中, 三周龄胎盘干细胞+HEALOS™外植体在组织学分析中表现出相当多的骨形成, 并在 X 射线和 PIXI 分析中表现出高密度矿化, 这些成骨活性在植入后 7 周增加。缺损区域的代表性组织切片、X 射线显微照片和矿化的半定量测定如图 24-26 所述。这些结果显示了胎盘干细胞与支架结合提高骨修复过程的能力。

结论: 如果体外给予适当的刺激, 贴壁胎盘干细胞沿成骨途径功能性地分化, 且与无细胞条件相比表现出显著增强的体内骨修复。因此, 从这些研究中, 我们得出这样的结论: 胎盘干细胞在骨组织工程应用中可以与适当的支架一起用作细胞治疗剂。

等同物

本发明所提供的组合物和方法不受限于上述具体实施方案的范围。事实上，除了所描述的那些外，该实施方案的各种修饰根据上文的描述和附图对于本领域的普通技术人员来说是显而易见的。这些修饰包含在所附权利要求的范围内。

本发明所引用的各出版物、专利和专利申请，均通过引用以全文纳入本文。



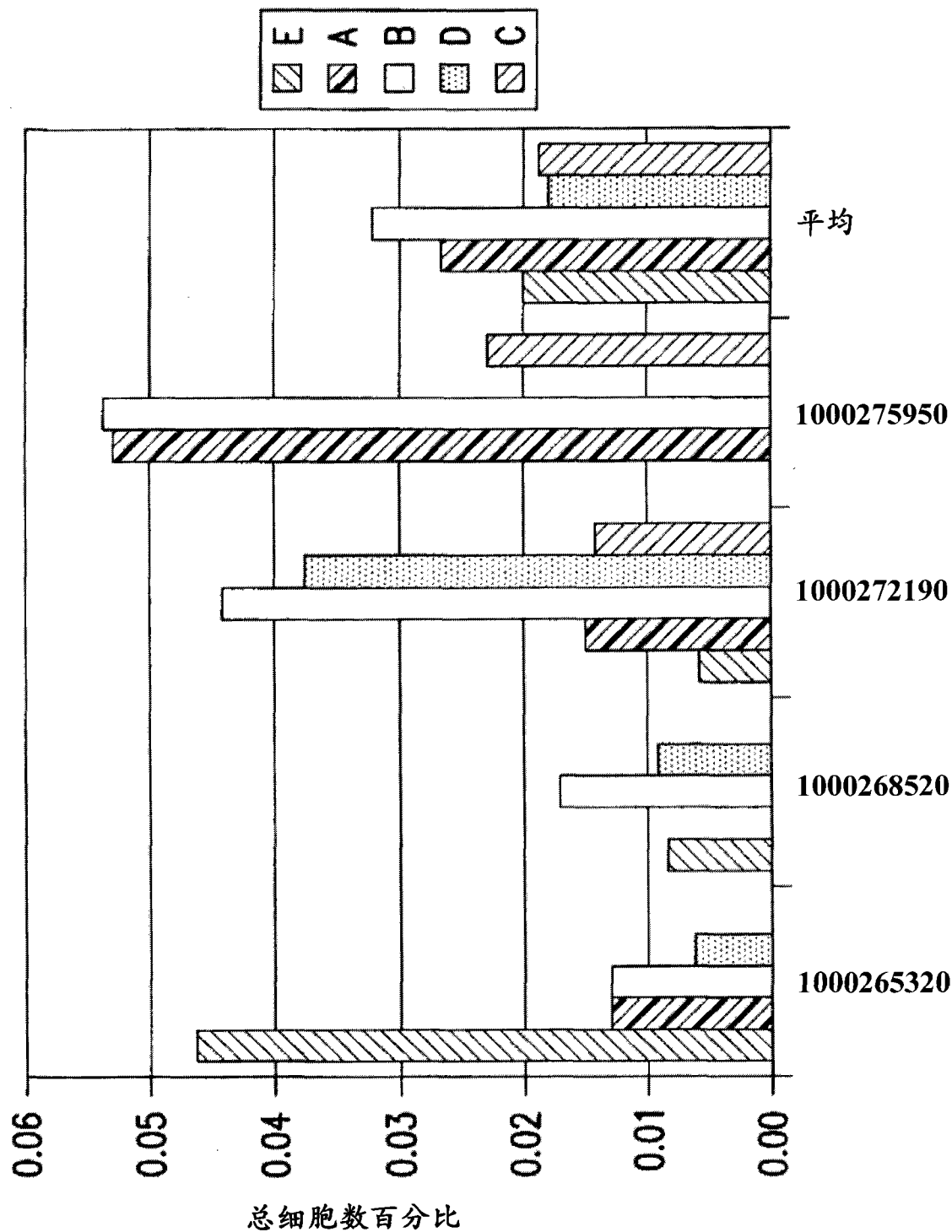


图 2

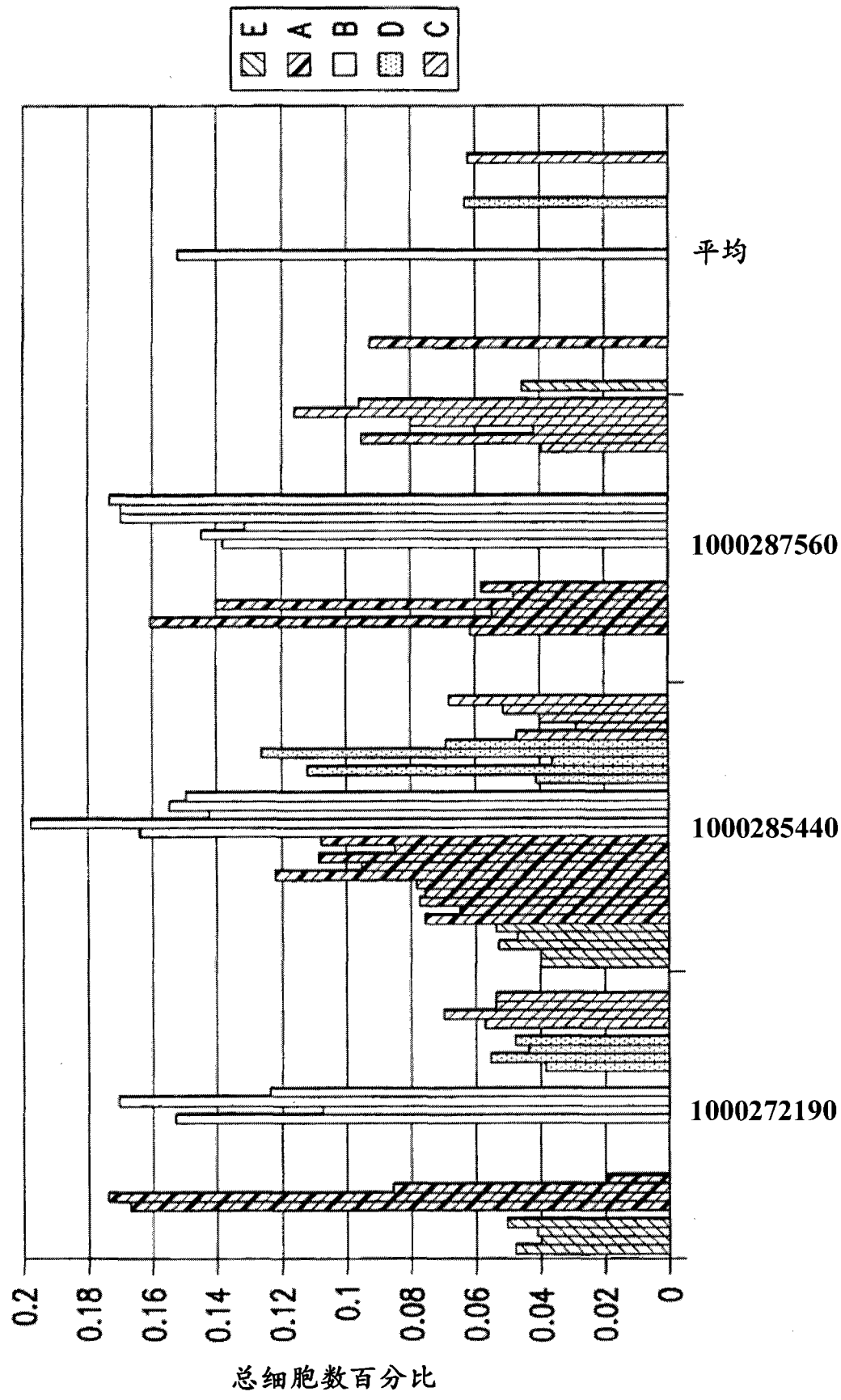


图 3

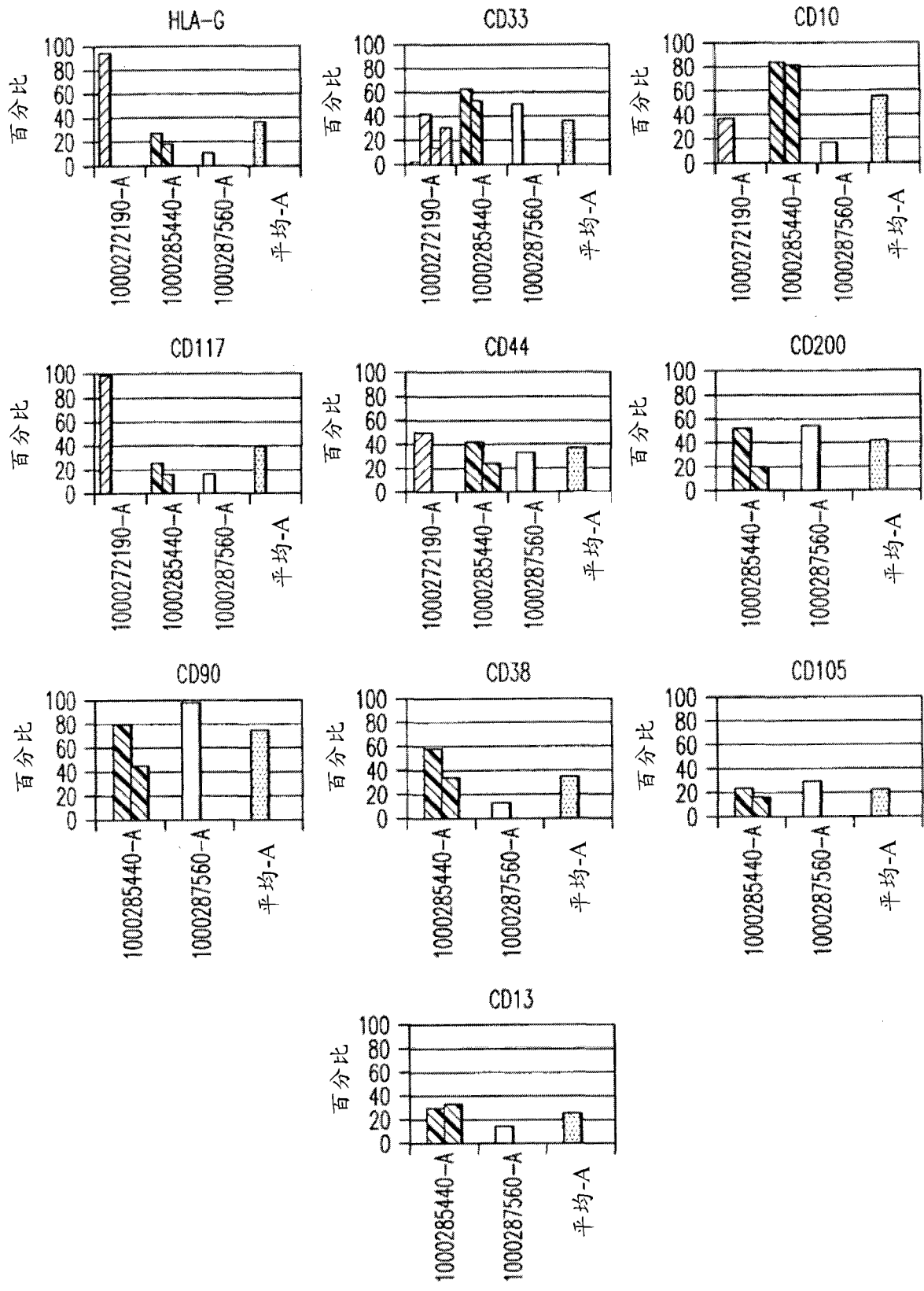


图 4

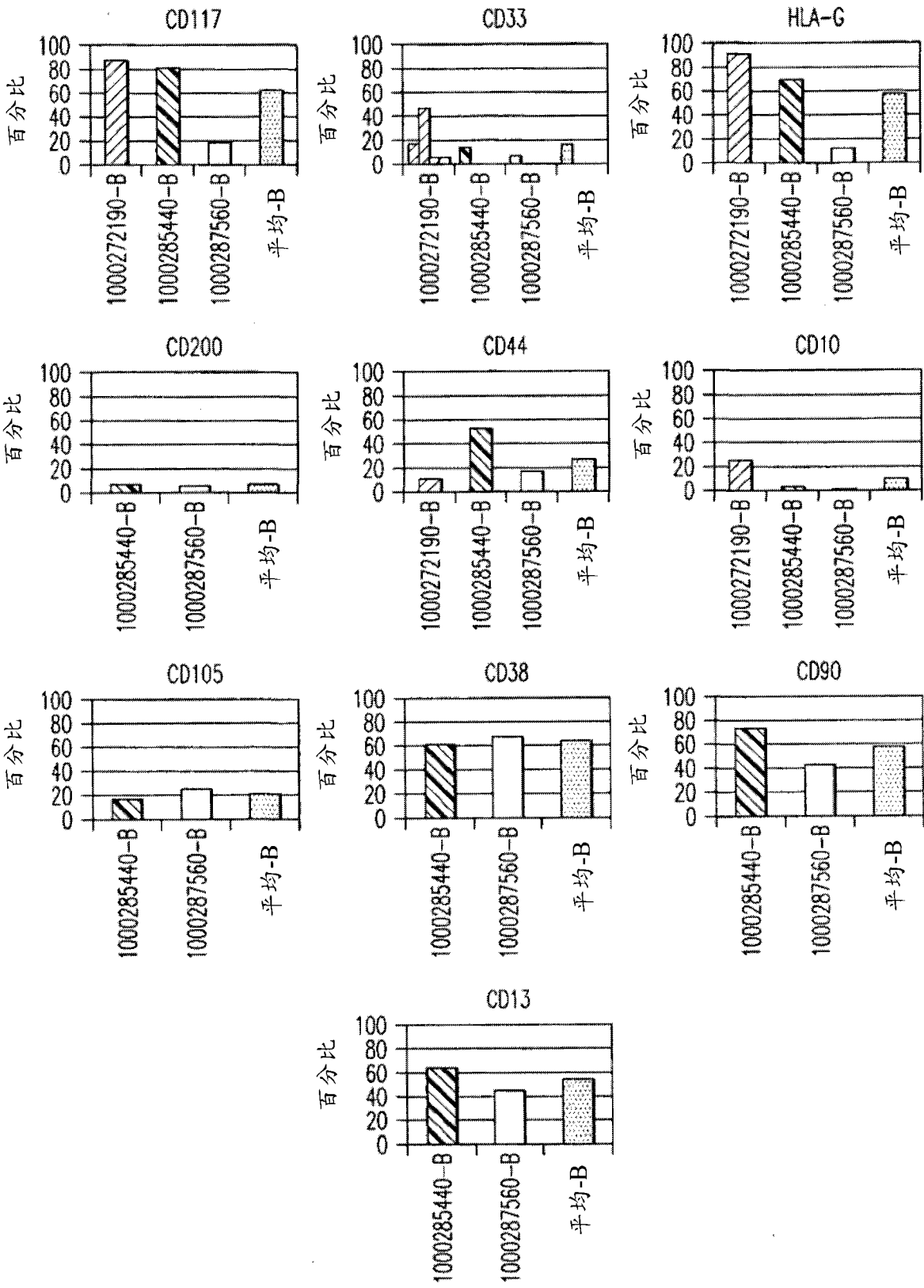


图 5

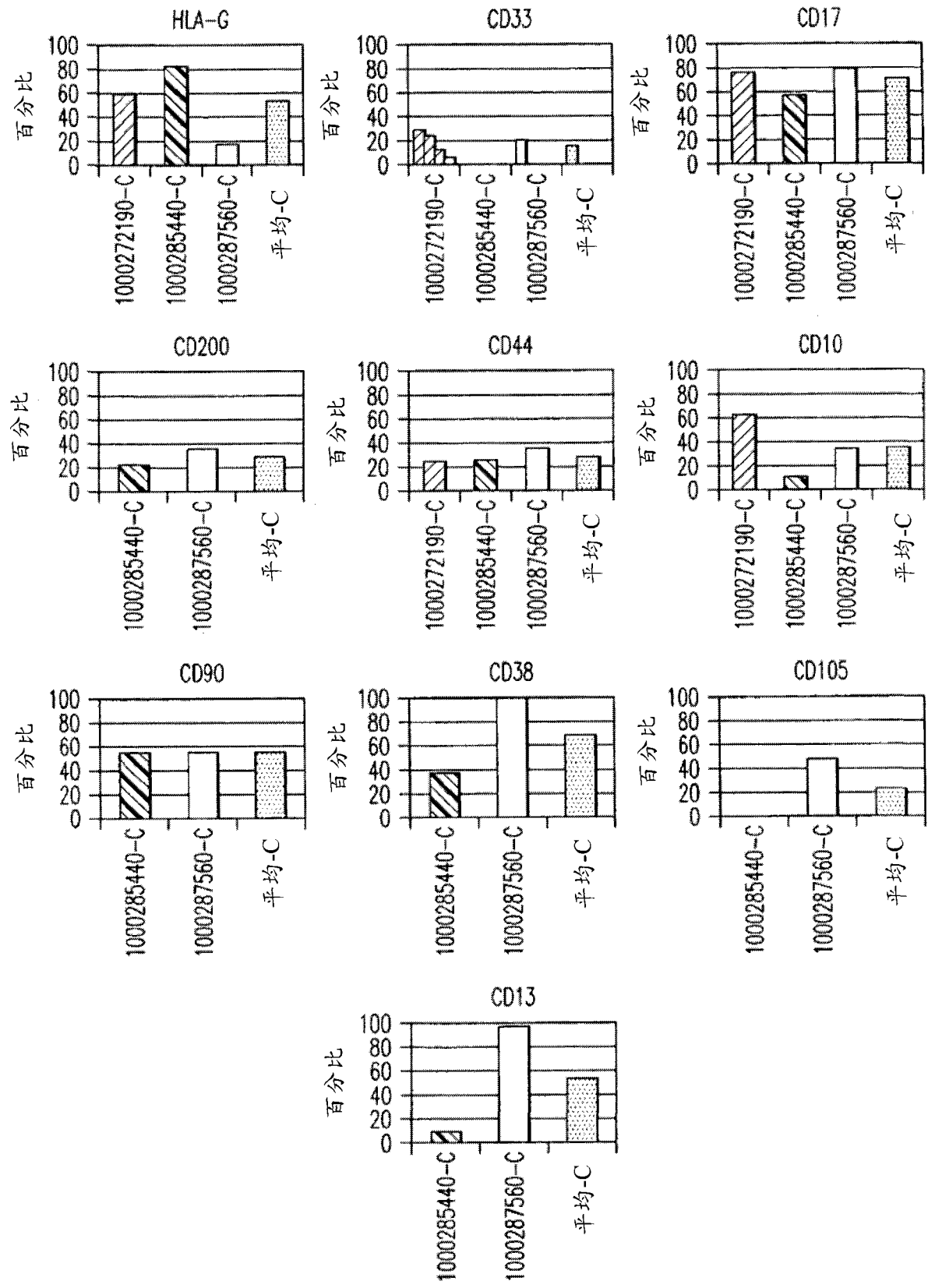


图 6

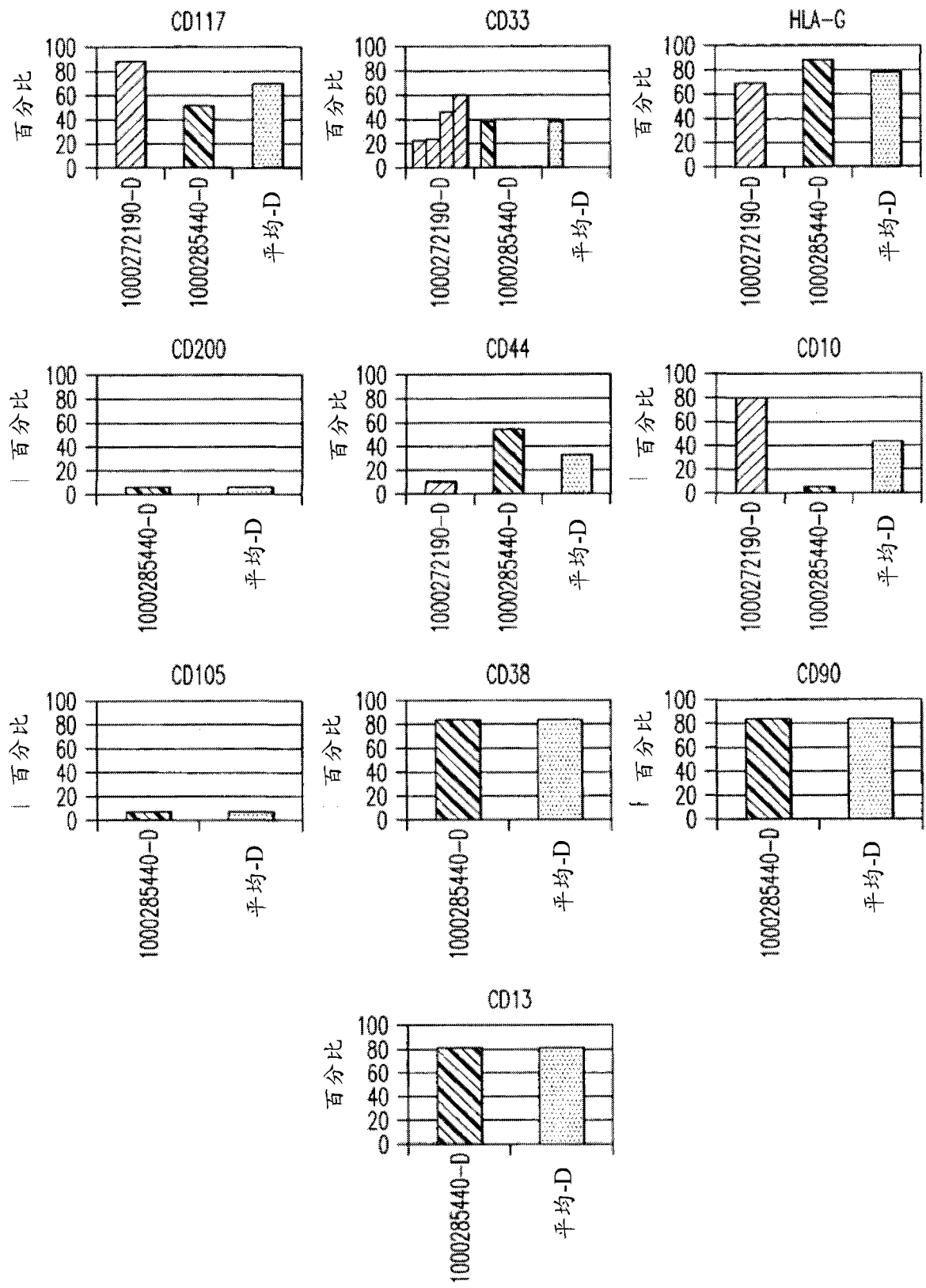


图 7

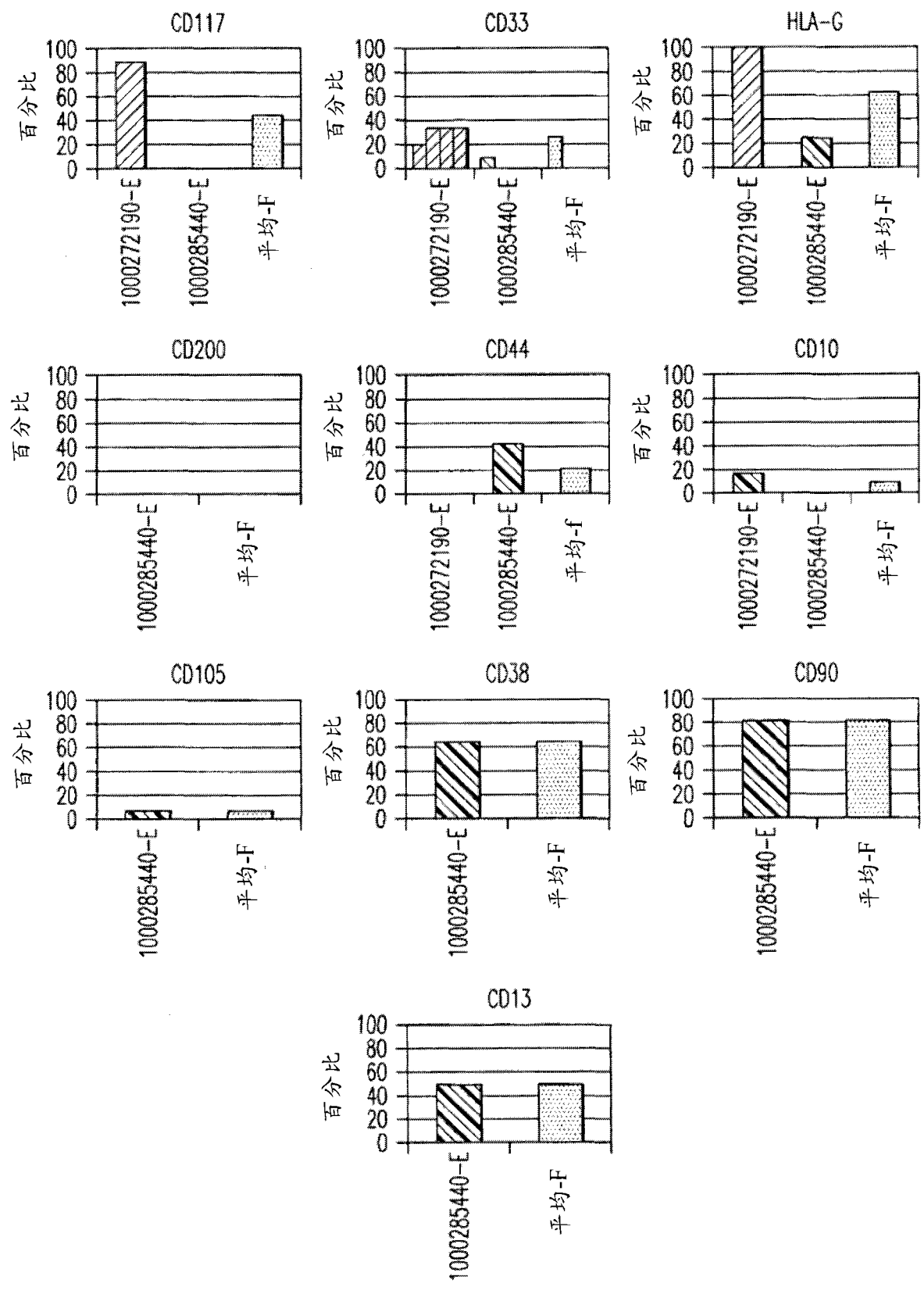


图 8

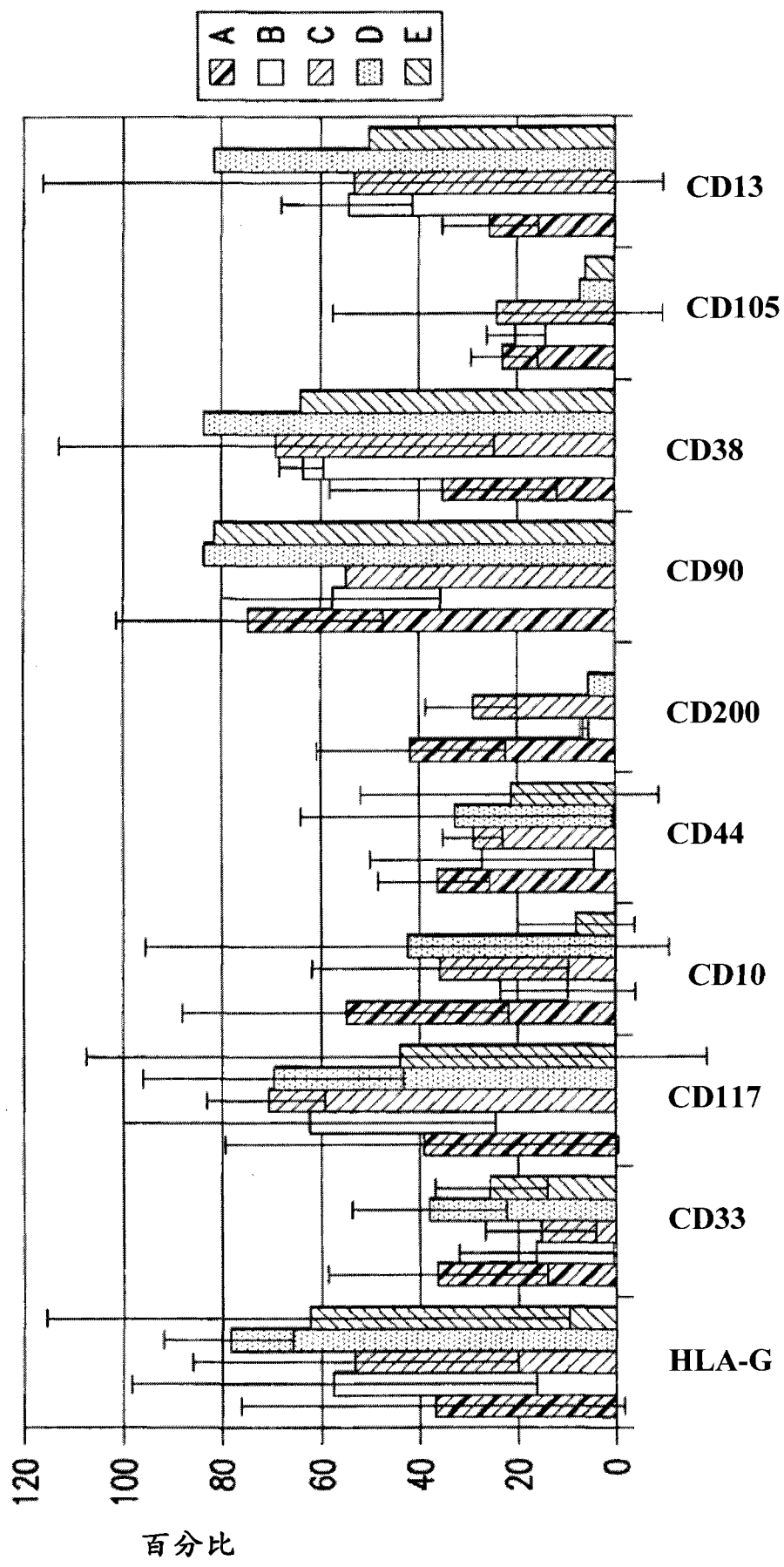
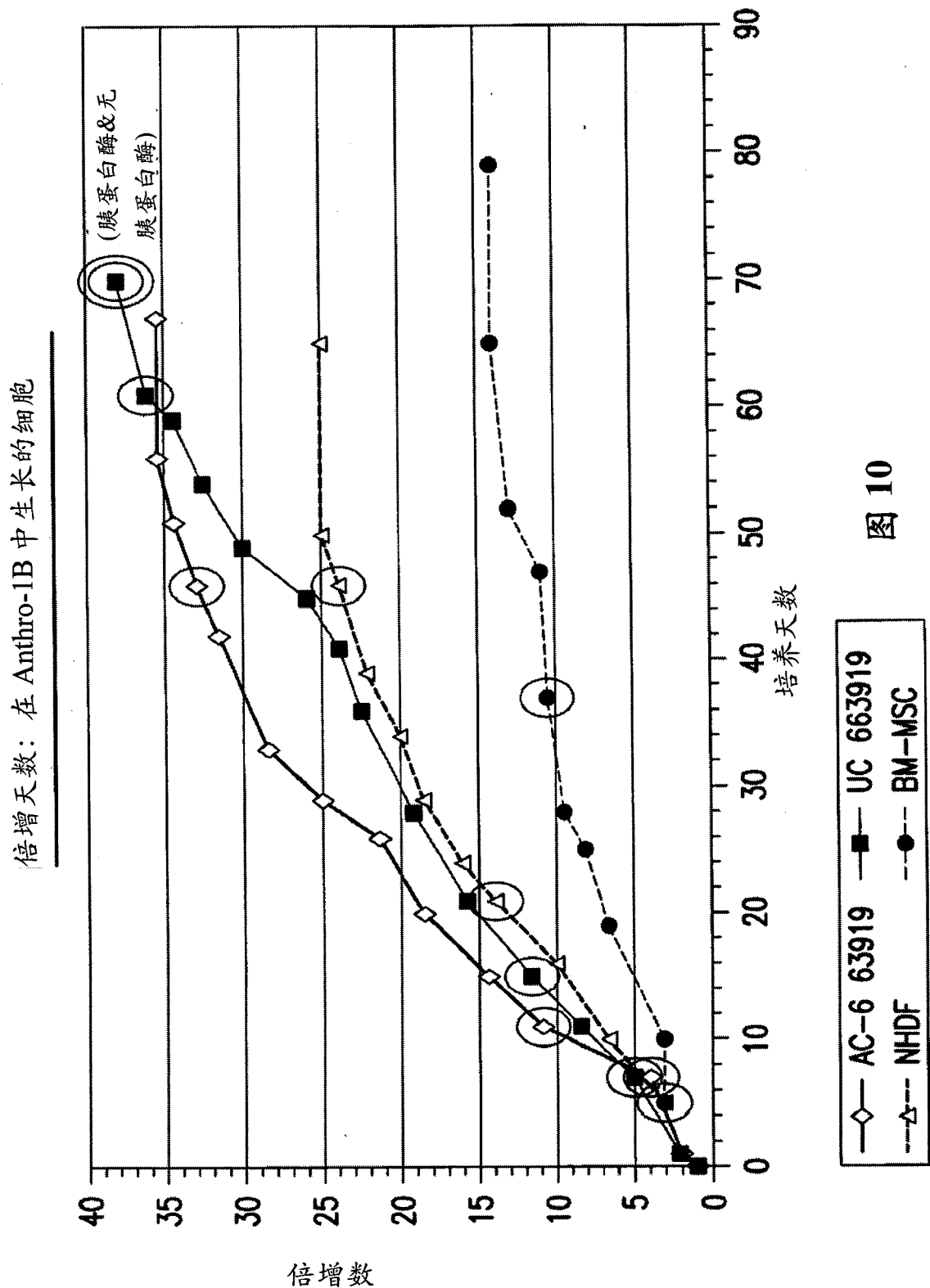


图9



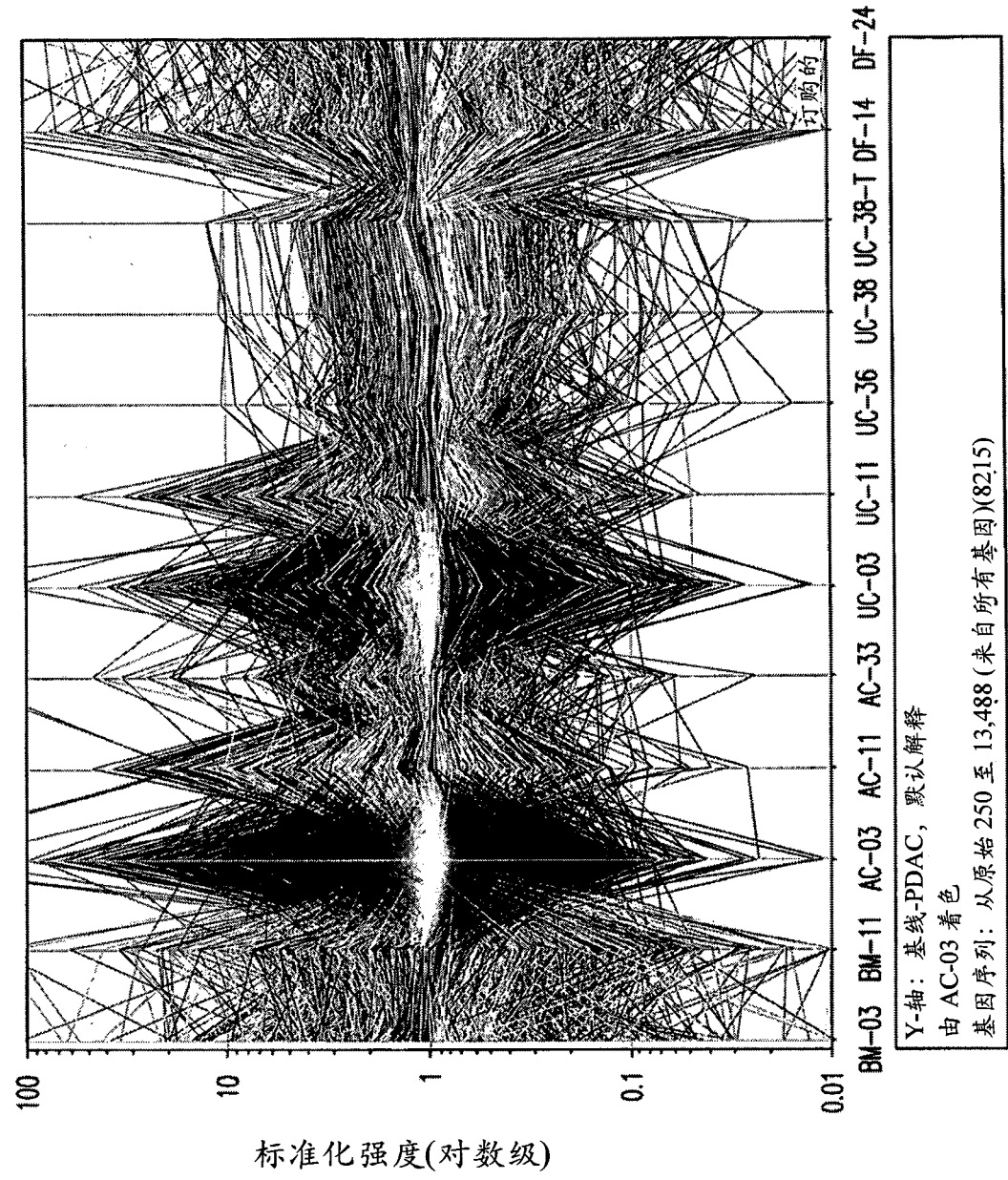


图 11

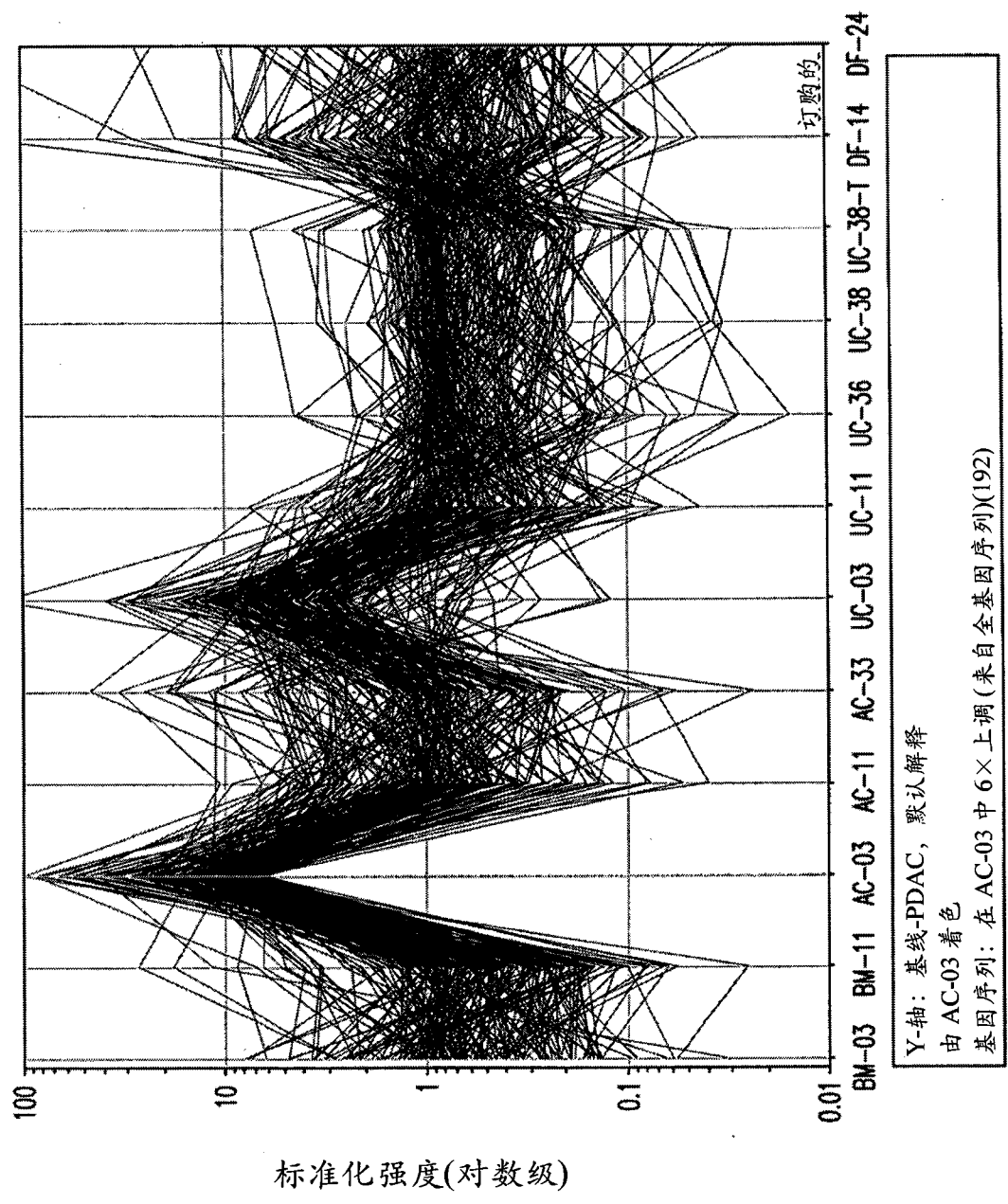


图 12

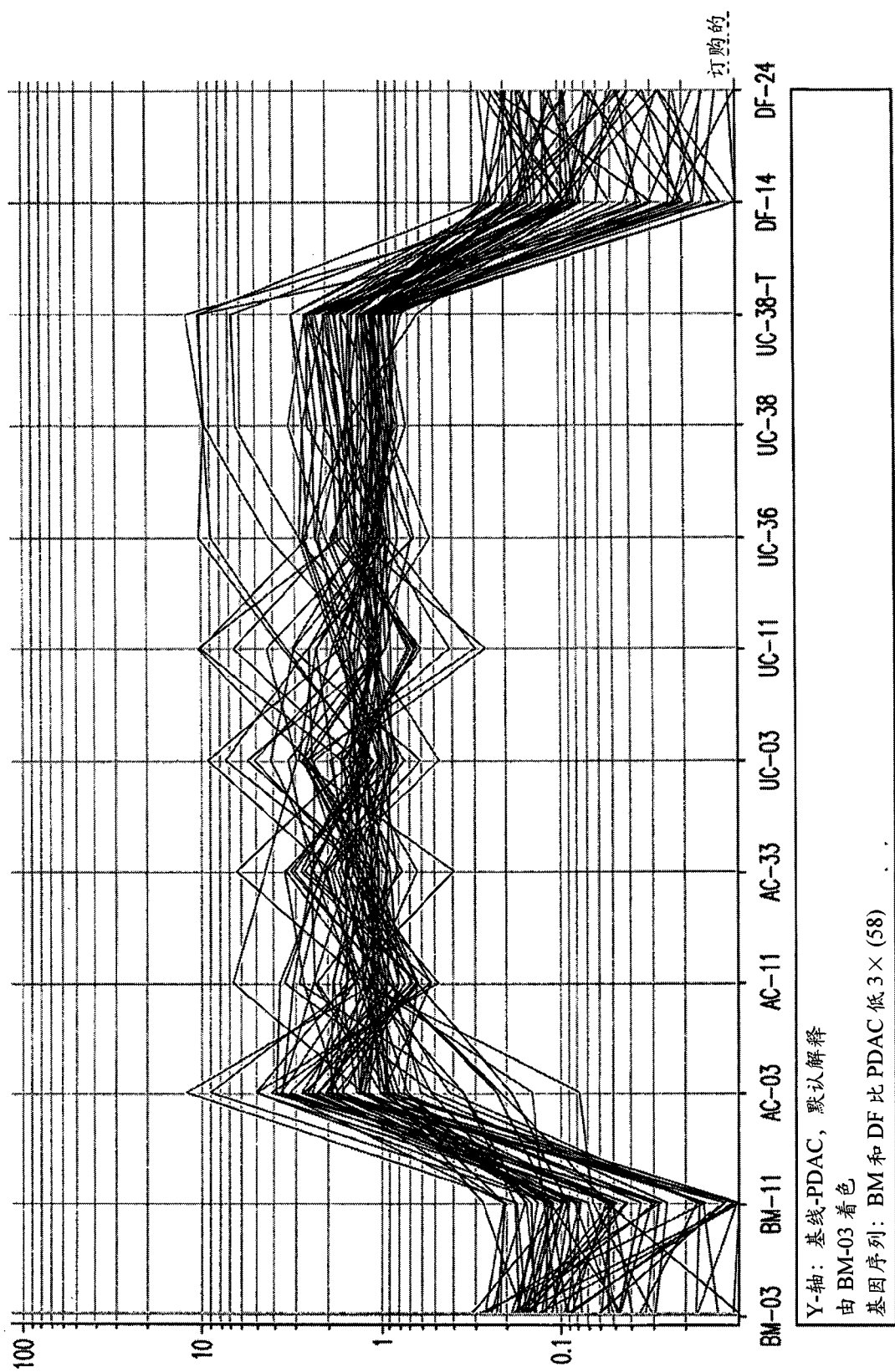


图 13

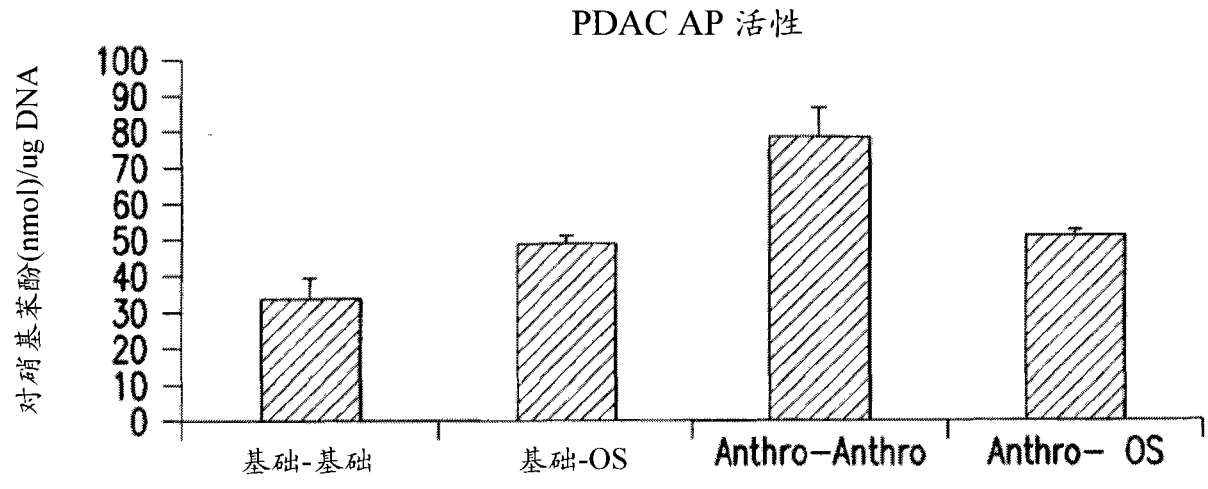


图 14A

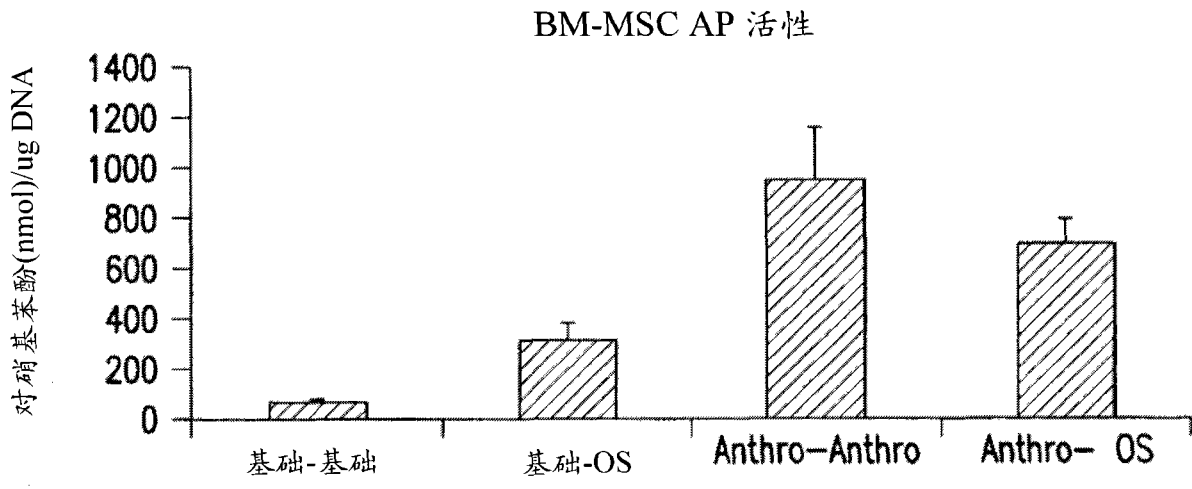


图 14B

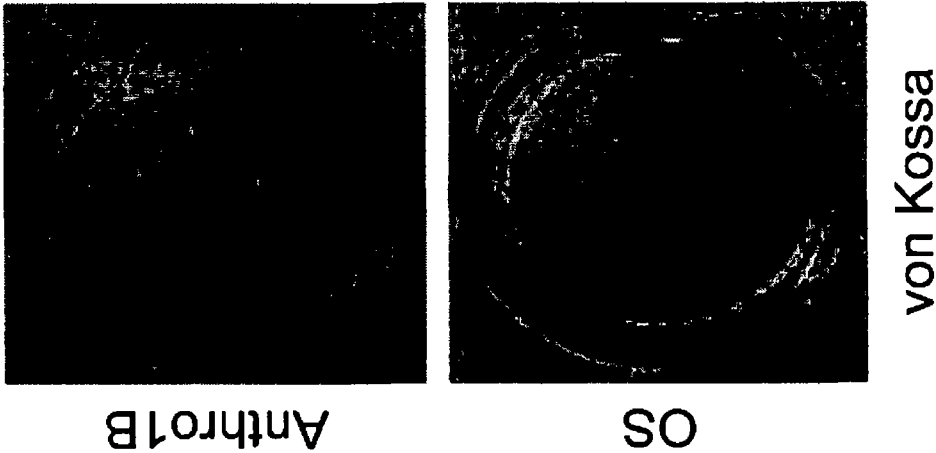


图 15A

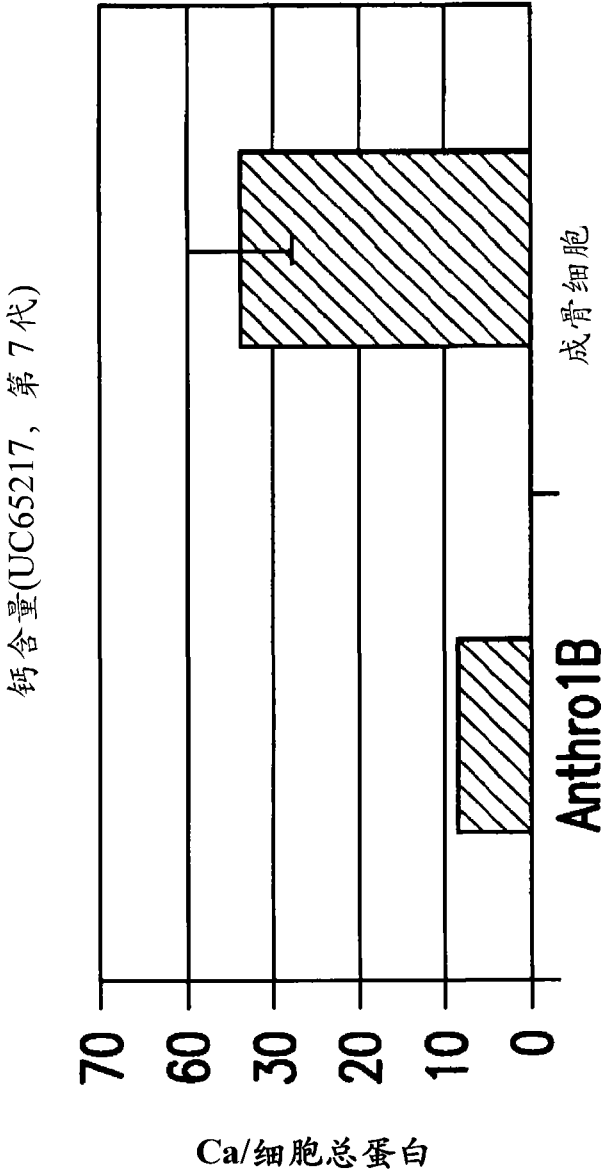


图 15B

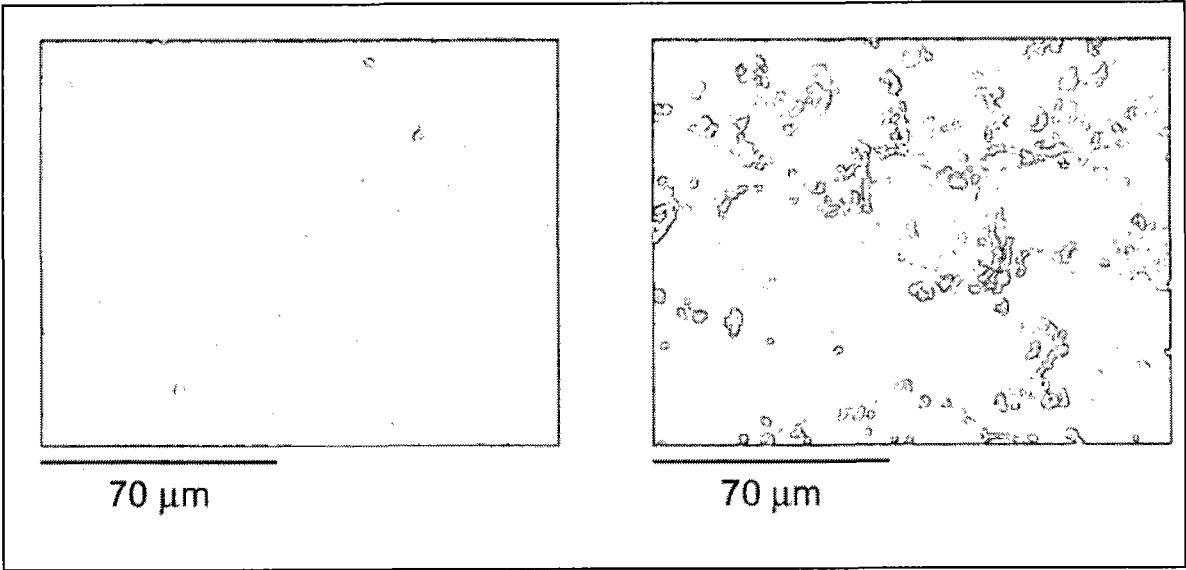


图 16A

图 16B

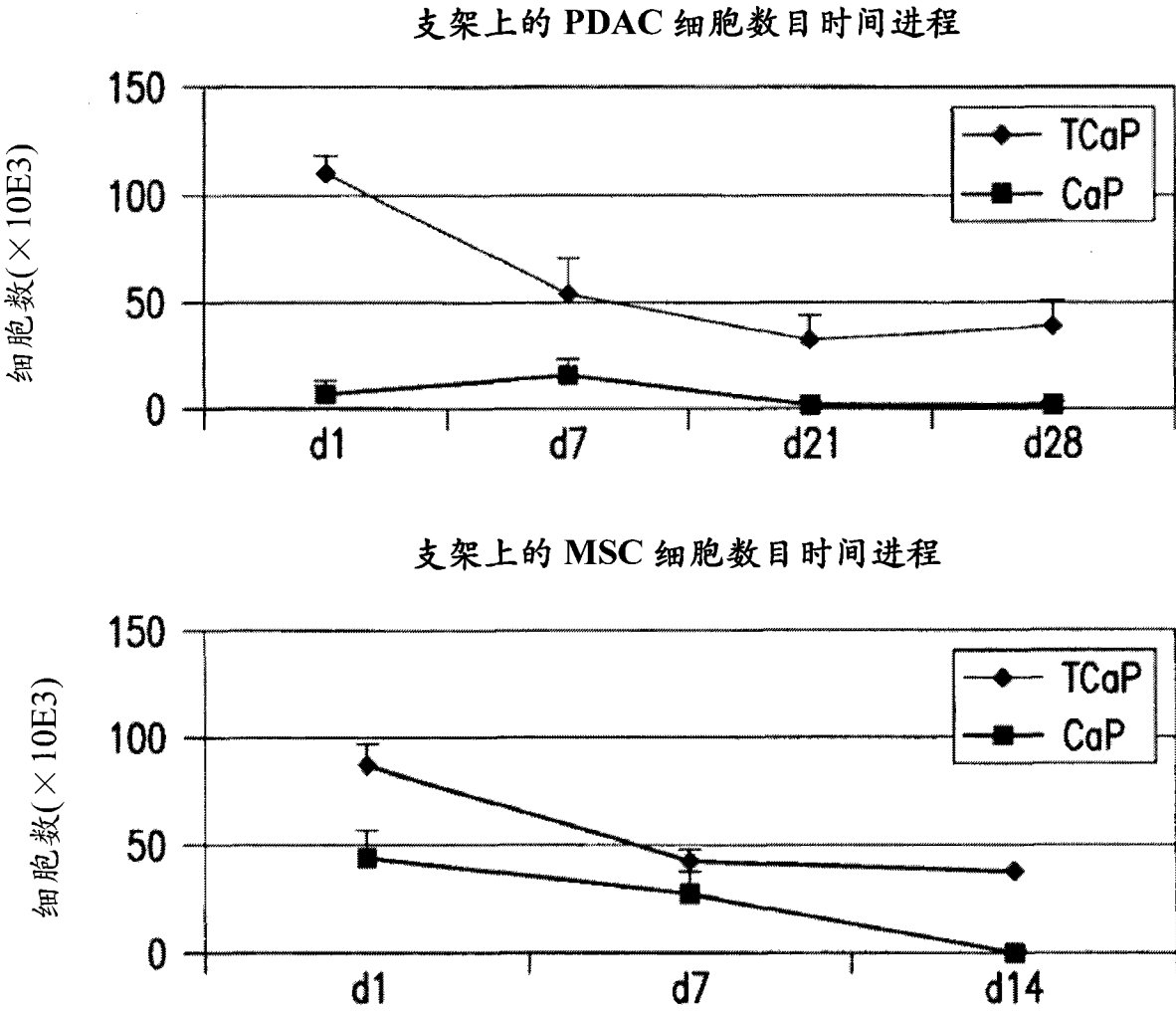


图 17

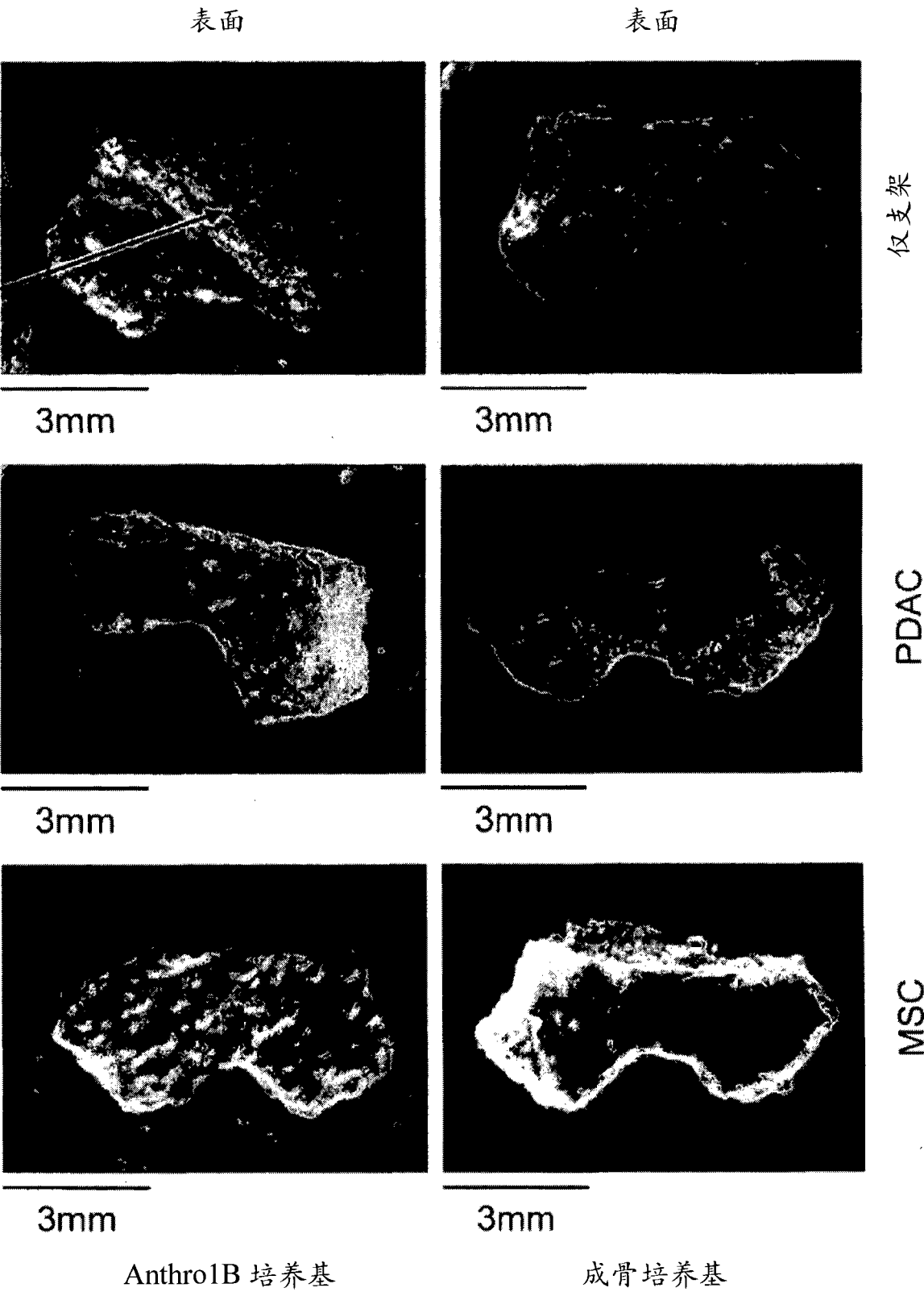


图 18

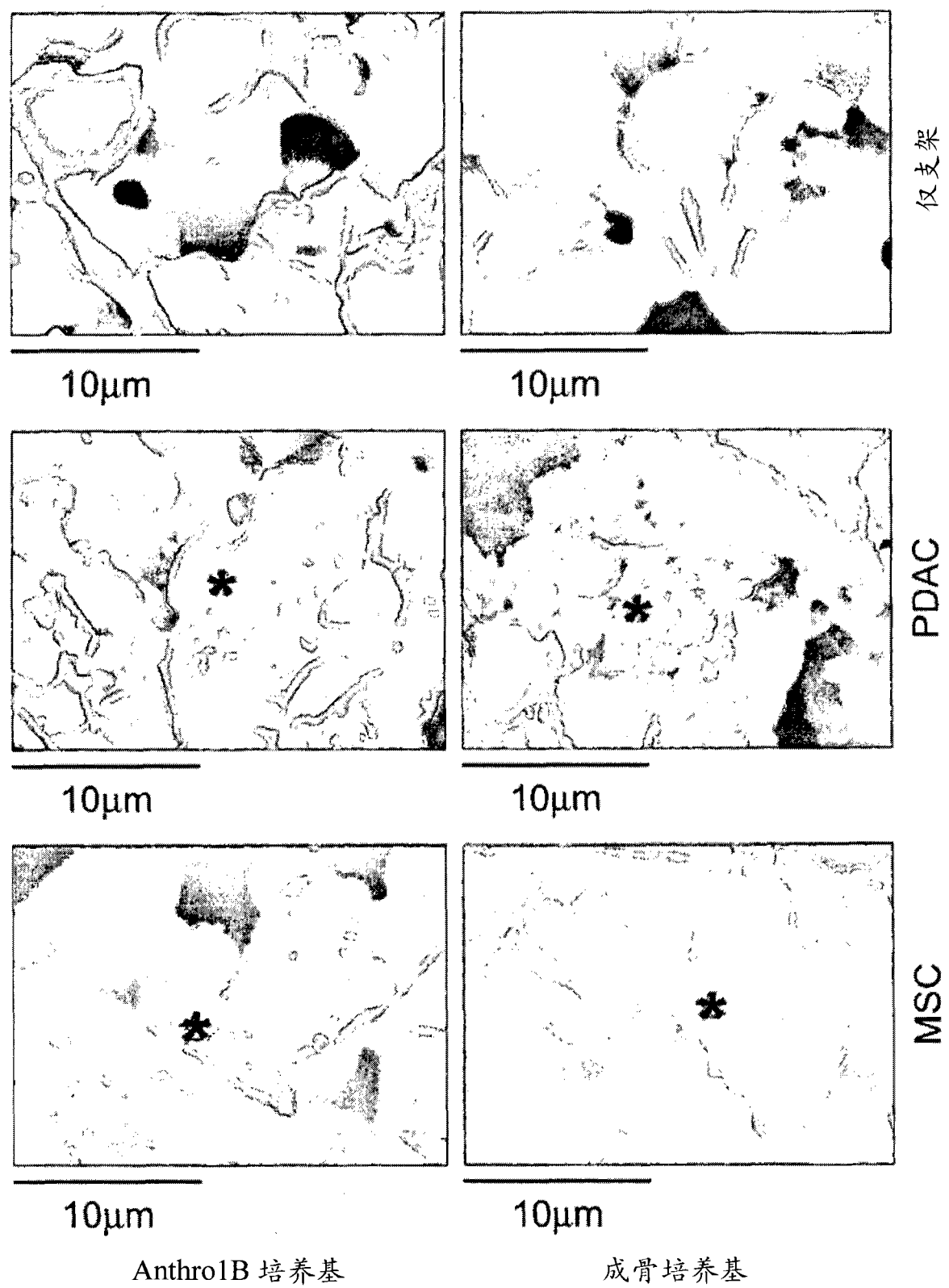
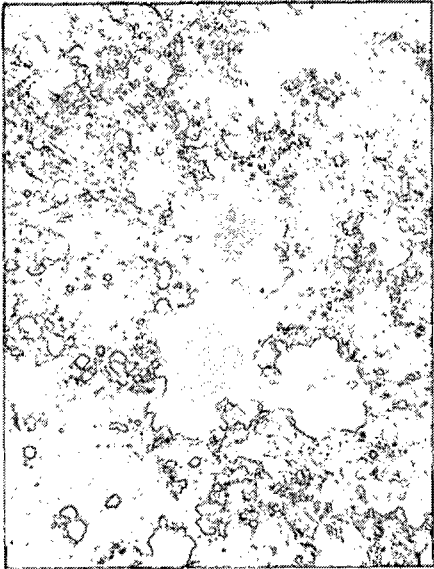
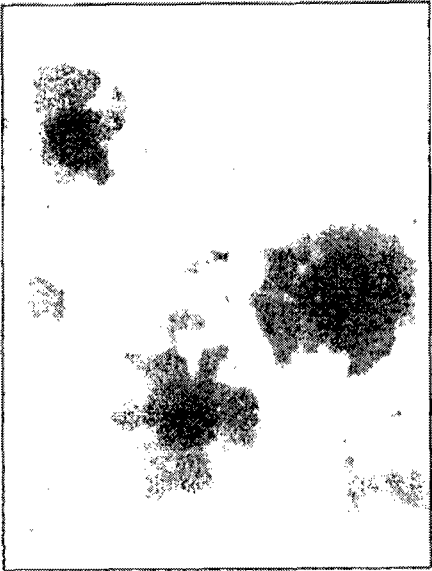


图 19



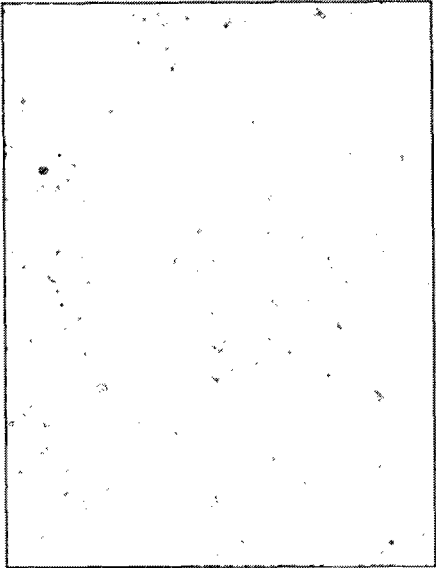
hMSCs

图 20B



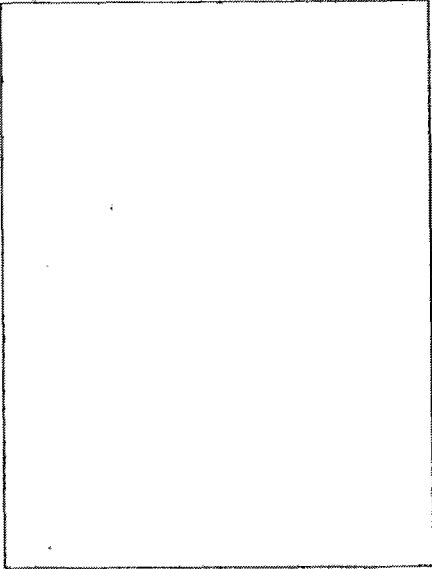
HPPs

图 20D



hMSCs

图 20A



HPPs

图 20C

在 Cambrex 成骨培养基中加入 Vitoss 培养 10 天后的 ALP 活性

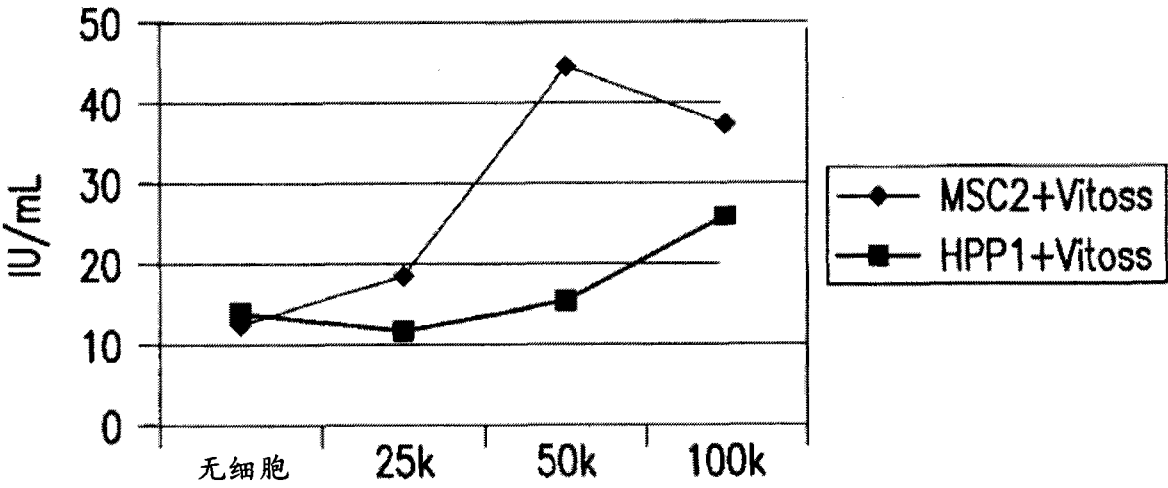


图 21

CS061506-1(collagen)_0hrs_20x_phase001.jpg



图 22A

CS062608-1_2-5hrs_20x_phase002.jpg

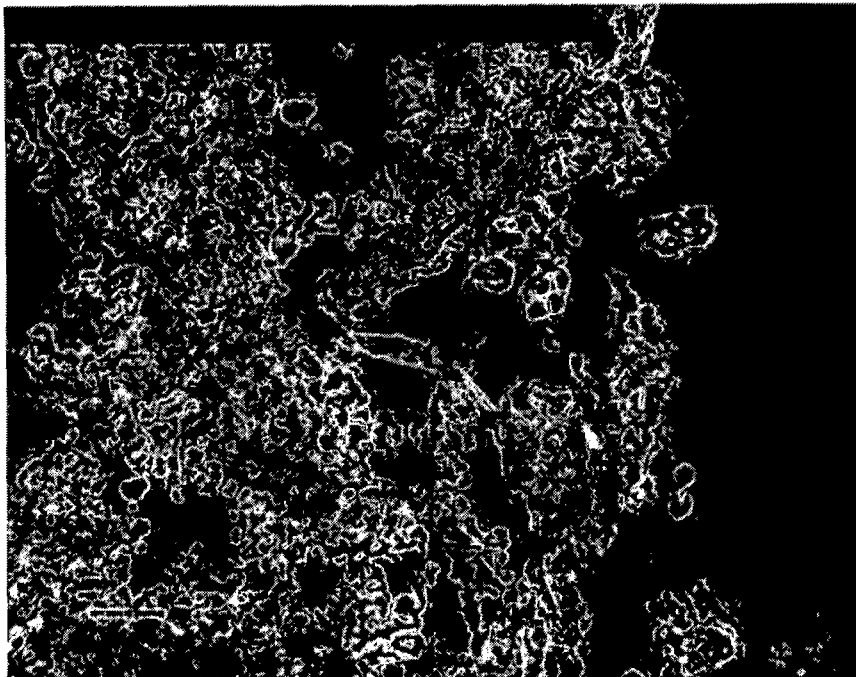


图 22B

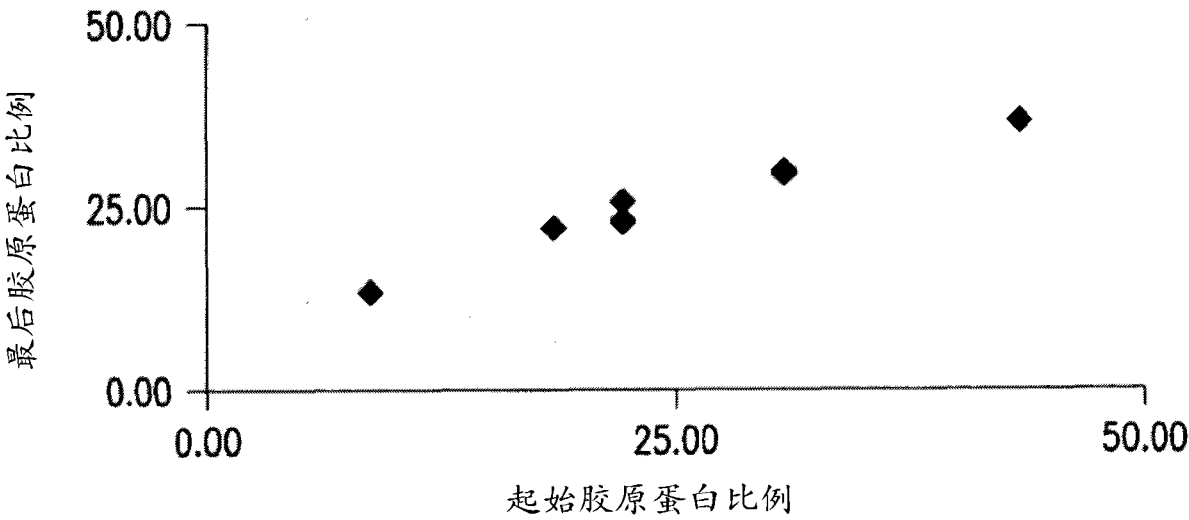


图 23

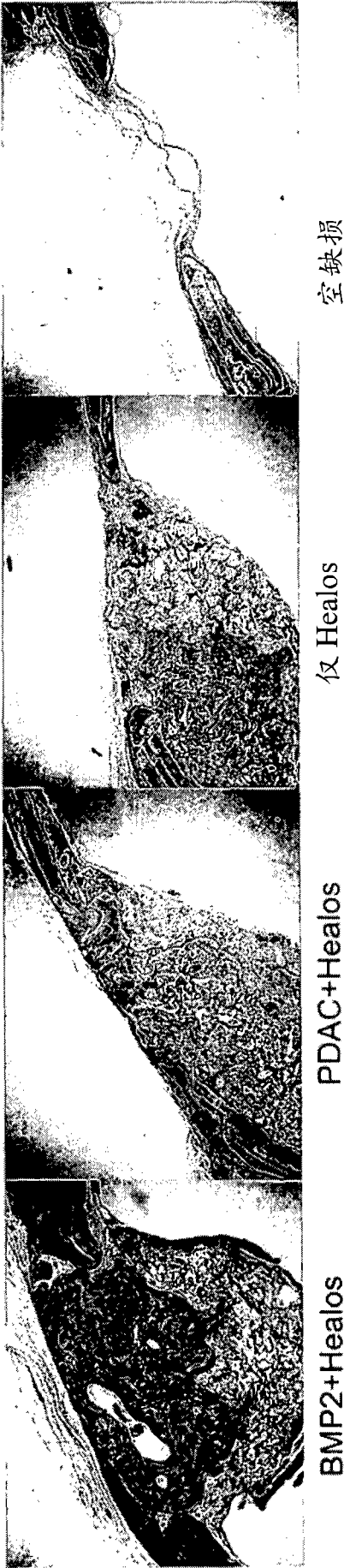


图 24

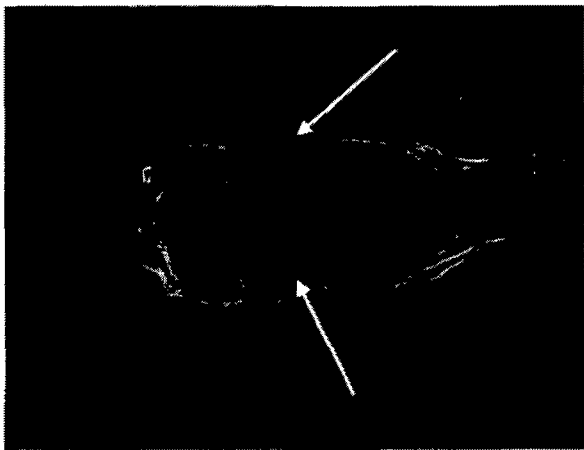


图 25A

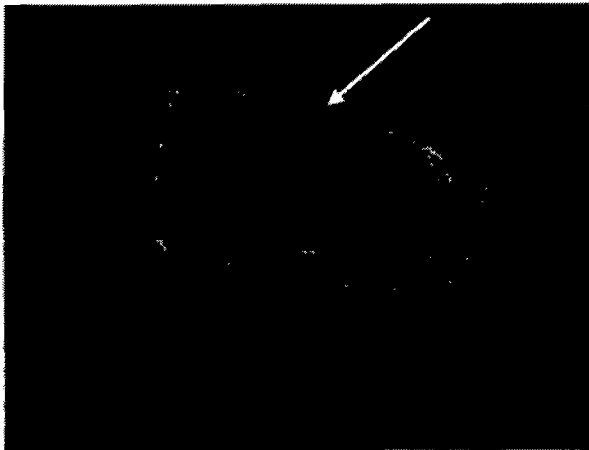


图 25B

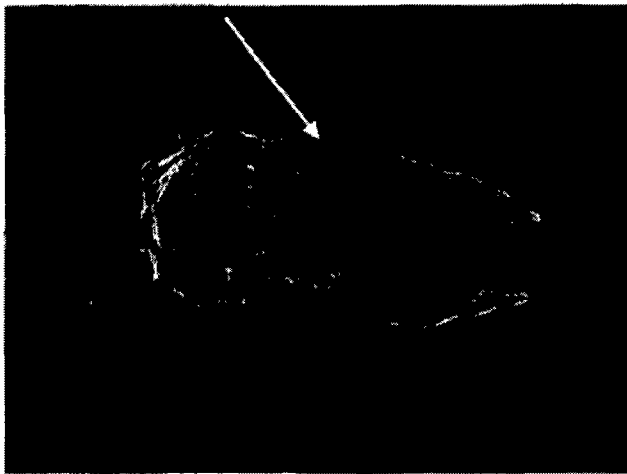


图 25C

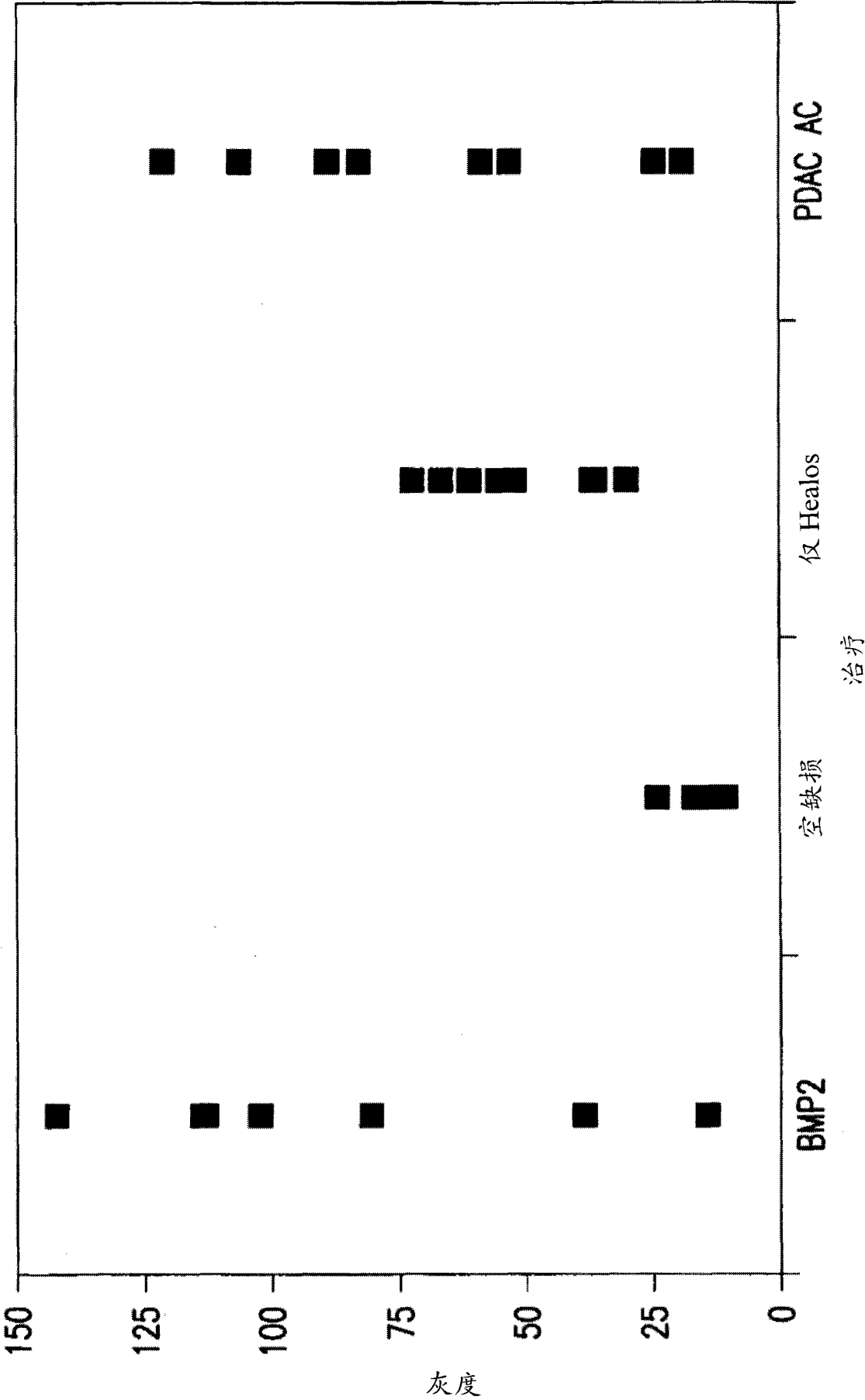


图 26