



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102186971 A

(43) 申请公布日 2011. 09. 14

(21) 申请号 200980141316. X

A61P 25/00(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 08. 20

(30) 优先权数据

61/090, 565 2008. 08. 20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 04. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/004741 2009. 08. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02010/021715 EN 2010. 02. 25

(71) 申请人 人类起源公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 安迪·查特林 阿贾伊·帕尔

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 武晶晶 郑霞

(51) Int. Cl.

C12N 5/073(2006. 01)

A61K 35/50(2006. 01)

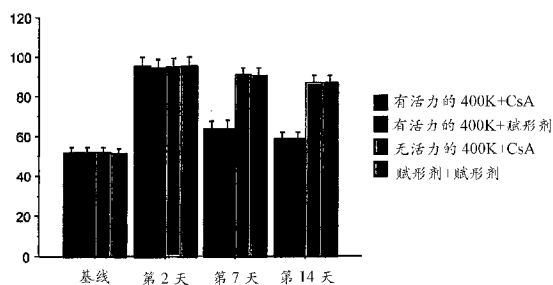
权利要求书 4 页 说明书 57 页 附图 9 页

(54) 发明名称

利用分离的胎盘细胞治疗中风

(57) 摘要

本发明提供了治疗中风的方法,该方法包括给予中风患者胎盘干细胞、含有胎盘干细胞的细胞群、和/或含有胎盘干细胞的组合物。



1. 治疗脑中或脑周围血流破坏的个体的方法,该方法包括给予所述个体有效量的分离的人贴壁胎盘细胞,所述细胞为:

CD10<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>和 CD105<sup>+</sup>;

CD200<sup>+</sup>和 HLA-G<sup>+</sup>;

CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>和 CD200<sup>+</sup>;

CD200<sup>+</sup>和 OCT-4<sup>+</sup>;

CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>和 HLA-G<sup>+</sup>;

CD73<sup>+</sup>和 CD105<sup>+</sup>,并且当所述群在允许形成胚样体的条件下培养时有助于在包含所述干细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个胚样体;或

OCT-4<sup>+</sup>,并且当所述群在允许形成胚样体的条件下培养时有助于在包含所述干细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个胚样体;或

上述的任何组合。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述 CD10<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup>细胞还为 CD200<sup>+</sup>。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述 CD10<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>细胞还为 CD45<sup>-</sup>或 CD90<sup>+</sup>。

4. 权利要求 2 的方法,其中所述 CD10<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>细胞还为 CD45<sup>-</sup>和 CD90<sup>+</sup>。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述治疗有效量为使所述个体表现出的脑中或脑周围血流破坏消除、可检测的改善、严重程度减轻、或一种或多种症状发展变缓的所述细胞量。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述症状为偏瘫或轻偏瘫。

7. 权利要求 5 的方法,其中所述症状为面部肌肉虚弱;麻木;感觉下降;嗅觉、味觉、听力或视力改变;嗅觉、味觉、听力或视力丧失;眼皮耷拉(下垂症);可检测的眼肌肉虚弱;呕吐反射降低;吞咽能力降低;瞳孔光反应性降低;面部知觉降低;平衡降低;眼震症;呼吸速率改变;心率改变;锁骨乳突肌虚弱,转动头至一侧的能力降低或不能;舌虚弱;失语症(不能说或理解语言);失用症(改变的自觉运动);视野缺陷;记忆力缺损;半侧忽视或半侧空间忽视(对病变相对的视野另一侧空间的关注缺乏);思维混乱;意识模糊;纵欲姿态的发展;疾病失认症(持续否认缺陷的存在);难以行走;运动协同作用改变;眩晕;不平衡;意识丧失;头痛或呕吐,其中所述症状由脑中或脑周围血流破坏引起。

8. 权利要求 1 的方法,其中所述分离的人贴壁胎盘细胞为 CD10<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述分离的人贴壁胎盘细胞还为 CD45<sup>-</sup>和 CD90<sup>+</sup>。

10. 权利要求 1 的方法,其中所述分离的人贴壁胎盘细胞为 CD200<sup>+</sup>和 HLA-G<sup>+</sup>。

11. 权利要求 10 的方法,其中所述 CD200<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup>细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD73<sup>+</sup>和 CD105<sup>+</sup>。

12. 权利要求 1 的方法,其中所述分离的人贴壁胎盘细胞为 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>和 HLA-G<sup>+</sup>。

13. 权利要求 11 的方法,其中所述 CD73<sup>+</sup>、CD 105<sup>+</sup>和 HLA-G<sup>+</sup>细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、OCT-4<sup>+</sup>和 CD200<sup>+</sup>。

14. 权利要求 1 的方法,其中所述 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>和 CD200<sup>+</sup>细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>和 HLA-G<sup>+</sup>。

15. 权利要求 1 的方法,其中所述 CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup>细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>和 HLA-G<sup>+</sup>。

16. 权利要求 1 的方法,其中所述 CD73<sup>+</sup>和 CD105<sup>+</sup>细胞还为 OCT-4<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>和

CD45<sup>-</sup>。

17. 权利要求 1 的方法,其中所述 OCT-4<sup>+</sup> 细胞还为 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 和 CD45<sup>-</sup>。

18. 权利要求 1 的方法,其中所述分离的人贴壁胎盘细胞包含在细胞群中,所述细胞群中至少 80% 为分离的人贴壁胎盘细胞。

19. 权利要求 1 的方法,其中所述分离的人贴壁胎盘细胞包含在细胞群中,所述细胞群中至少 90% 为所述分离的人贴壁胎盘细胞。

20. 治疗脑中或脑周围血流破坏的个体的方法,该方法包括给予所述个体有效量的分离的人贴壁胎盘细胞,其中所述细胞以比骨髓来源的间充质干细胞可检测的更高水平表达一种或多种基因,

其中所述一种或多种基因为以下中的一种或多种:ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ARTS-I、B4GALT6、BCHE、C1 Iorf9、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、PKP2、RTN1、SERPINB9、ST3GAL6、ST6GALNAC5、SLC12A8、TCF21、TGFB2、VTN 和 ZC3H12A,并且

其中所述骨髓来源的间充质干细胞已经进行了与所述胎盘细胞相同传代次数的传代培养。

21. 权利要求 1 或权利要求 20 的方法,其中所述血流破坏为中风。

22. 权利要求 21 的方法,其中所述中风为缺血性中风。

23. 权利要求 21 的方法,其中所述中风为出血性中风。

24. 权利要求 1 或权利要求 20 的方法,其中所述破坏为血肿。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述血肿为硬脑膜血肿、硬膜下血肿或蛛网膜下血肿。

26. 权利要求 1 或权利要求 20 的方法,其中所述破坏为血管痉挛。

27. 权利要求 1 或权利要求 20 的方法,其中所述分离的胎盘细胞通过大丸注射给予。

28. 权利要求 1 或权利要求 20 的方法,其中所述分离的胎盘细胞通过静脉内输注给予。

29. 权利要求 1 或权利要求 20 的方法,其中头颅内给予所述分离的胎盘细胞。

30. 权利要求 29 的方法,其中局部缺血区域内给予所述分离的胎盘细胞。

31. 权利要求 29 的方法,其中所述局部缺血区域周围给予分离的胎盘细胞。

32. 权利要求 1 或权利要求 20 的方法,其中经腹膜、肌肉、真皮内或眼内给予所述分离的胎盘细胞。

33. 权利要求 1 或权利要求 20 的方法,其中所述分离的贴壁胎盘细胞通过手术移植包含所述分离的人贴壁胎盘细胞的组合物而给予。

34. 权利要求 33 的方法,其中所述组合物为基质或支架。

35. 权利要求 34 的方法,其中所述基质或支架为水凝胶。

36. 权利要求 34 的方法,其中所述基质或支架为脱细胞组织。

37. 权利要求 34 的方法,其中所述基质或支架为合成的生物可降解组合物。

38. 权利要求 1 或权利要求 20 的方法,其中所述分离的胎盘细胞一次给予所述个体。

39. 权利要求 1 或权利要求 20 的方法,其中所述分离的胎盘细胞分多次给予所述个体。

40. 权利要求 1 或权利要求 20 的方法,其中所述给予包括给予所述个体每千克约

$1 \times 10^4$  至  $1 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞。

41. 权利要求 1 或权利要求 20 的方法,其中所述给予包括给予所述个体每千克约  $1 \times 10^5$  至  $1 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞。

42. 权利要求 1 或权利要求 20 的方法,其中所述给予包括给予所述个体每千克约  $1 \times 10^6$  至  $1 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞。

43. 权利要求 1 或权利要求 20 的方法,其中所述给予包括给予所述个体每千克约  $1 \times 10^7$  至  $1 \times 10^8$  个分离的胎盘细胞。

44. 权利要求 1 或权利要求 20 的方法,其中所述给予包括静脉内给予约  $5 \times 10^7$  至  $3 \times 10^9$  个分离的胎盘细胞。

45. 权利要求 44 的方法,其中所述给予包括给予约  $9 \times 10^8$  个分离的胎盘细胞。

46. 权利要求 44 的方法,其中所述给予包括给予约  $1.8 \times 10^9$  个分离的胎盘细胞。

47. 权利要求 1 或权利要求 20 的方法,其中所述给予包括头颅内给予约  $5 \times 10^7$  至  $1 \times 10^8$  个分离的胎盘细胞。

48. 权利要求 47 的方法,其中所述给予包括给予约  $9 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞。

49. 权利要求 1 或权利要求 20 的方法,包括给予所述个体第二种治疗剂。

50. 权利要求 49 的方法,其中所述第二种治疗剂为神经保护剂。

51. 权利要求 50 的方法,其中所述第二种治疗剂为 NXY-059 (苯基丁基硝酮的二磺酰基衍生物)。

52. 权利要求 49 的方法,其中所述第二种治疗剂为血栓溶解剂。

53. 权利要求 52 的方法,其中所述血栓溶解剂为组织纤溶酶原激活物 (tPA)。

54. 权利要求 1 或权利要求 21 的方法,其中所述分离的胎盘细胞在所述个体脑中或脑周围血流破坏的一种或多种症状发展的 48 小时内给予所述个体。

55. 权利要求 1 或权利要求 21 的方法,其中所述分离的胎盘细胞在所述个体脑中或脑周围血流破坏的一种或多种症状发展的 24 小时内给予所述个体。

56. 权利要求 1 或权利要求 21 的方法,其中所述分离的胎盘细胞在所述个体脑中或脑周围血流破坏的一种或多种症状发展的 12 小时内给予所述个体。

57. 权利要求 1 或权利要求 21 的方法,其中所述分离的胎盘细胞在所述个体脑中或脑周围血流破坏的一种或多种症状发展的 3 小时内给予所述个体。

58. 权利要求 1 或权利要求 21 的方法,其中所述分离的胎盘细胞在所述给予之前冷冻保存。

59. 权利要求 1 或权利要求 20 的方法,其中所述分离的人贴壁胎盘细胞获自胎盘干细胞库。

60. 权利要求 21 的方法,其中所述分离的人贴壁胎盘细胞在培养基中培养约 3 至约 35 个群倍增时表达所述一种或多种基因,培养基包括 60% DMEM-LG 和 40% MCDB-201 ;2% 胎牛血清 ; $1 \times$  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 ; $10^{-4}$ M 抗坏血酸 2- 磷酸盐 ;表皮生长因子 10ng/mL 和血小板来源的生长因子 (PDGF-BB) 10ng/mL。

61. 权利要求 21 的方法,其中所述分离的人贴壁胎盘细胞在培养基中培养约 3 至约 35 个群加倍增时表达所述一种或多种基因,所述培养基包含 60% DMEM-LG (Gibco) 和 40%

MCDB-201(Sigma);2%胎牛血清(Hyclone Labs.);1×胰岛素-转铁蛋白-硒(ITS);1×亚油酸-牛血清白蛋白(LA-BSA); $10^{-9}$ M地塞米松(Sigma); $10^{-4}$ M抗坏血酸2-磷酸盐(Sigma);表皮生长因子10ng/mL(R&D Systems);和血小板来源的生长因子(PDGF-BB)10ng/mL(R&D Systems)。

## 利用分离的胎盘细胞治疗中风

[0001] 本申请要求 2008 年 8 月 20 日提交的美国临时专利申请号 61/090,565 的优先权，其在此通过引用将全文纳入本文。

### 发明领域

[0002] 本发明提供利用分离的胎盘细胞，例如胎盘多能细胞、所述分离的胎盘细胞群、和/或包含所述细胞的组合物治疗具有低氧性损伤、或脑内或脑周围血流破坏的个体的方法，所述个体具有例如归因于脑内或脑周围血流破坏的神经性缺损的症状或缺陷。

### [0003] 发明背景

[0004] 中风亦称“脑中风”、脑血管损伤 (CVA) 或急性局部缺血脑血管综合症，为大脑功能的丧失，通常发展迅速，其病因是供给血液至脑或脑干的血管紊乱。所述紊乱可以由例如血栓或栓塞形成引起的局部缺血（缺乏血液）或由于溢血。根据世界卫生组织，中风为持续超过 24 小时或在 24 小时内死亡而中断的脑血管神经性缺损病因。症状持续超过 24 小时将中风和瞬时的局部缺血损伤 (TIA) 区分开，后者症状持续少于 24 小时。

[0005] 目前，局部缺血性中风的的治疗通常包括抗血小板药物例如阿司匹林、氯吡格雷、双嘧达莫或抗凝剂药物，例如丙酮苄羟香豆素，以降低或减轻引起局部缺血的障碍。此外，尽量保持正常的血糖水平，并且提供给中风患者充足的氧气和静脉注射液。出血性中风的的治疗通常包括给予一种或多种降压药、除了非甾体类抗炎药 (NSAID) 外的疼痛药、钙离子通道阻断剂（例如尼莫地平）、以及如果需要，进行手术以修复导致出血的血管裂口。

[0006] 然而，所述治疗仅试图减轻进行性的神经损伤，而无助于恢复已丧失的功能。已检测了许多非细胞神经保护剂治疗中风的功效，但都失败了，包括 N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂、纳美芬、芦贝鲁唑、氯美噻唑、钙离子通道阻断剂（包括  $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基异唑-4-丙酸拮抗剂、5-羟色胺激动剂（例如瑞匹洛坦），以及跨膜钾通道调节剂）、替拉扎特、抗-ICAM-1 抗体、人抗白细胞抗体 (Hu23F2G)、抗血小板抗体（例如阿昔单抗）、胞磷胆碱（胞苷-5'-二磷酸胆碱的外源形式）和碱性成纤维细胞生长因子。

[0007] 对于中风没有有效的疗法。因此，需要不仅能减轻任何原因导致的神经损伤，且能改善神经功能和预后的疗法。

### [0008] 发明概述

[0009] 一方面，本发明提供了利用分离的胎盘细胞、分离的胎盘细胞群、包含分离的胎盘干细胞的细胞群和包含分离的胎盘细胞的组合物在用于治疗个体中枢神经系统 (CNS) 例如脑内或脊髓内或者脑和脊髓周围血流破坏的个体的方法。所述方法包括，例如治疗个体由于脑内或脑周围血流破坏而导致的神经性缺损症状的治疗，例如低氧损伤、缺氧损伤、中风（例如局部缺血或出血性中风）、非中风性出血或 TIA。如此处考虑的，治疗个体脑内或脑周围血流破坏导致的神经性缺损症状包括治疗个体脑内或脑周围血流破坏所伴随的再灌注损伤导致的神经性缺损症状。本发明对缺血性中风（例如，缺氧损伤或低氧损伤）的成功治疗已在被接收的动物中风模型中被验证。参见实施例 1 和实施例 2。

[0010] 在一个方面，本发明提供了治疗脑内或脑周围血流破坏的个体的方法，例如个体

脑或中枢神经系统 (CNS) 内或周围血流破坏导致的神经性缺损症状,所述方法包括将治疗有效量的分离的塑料贴壁组织培养人胎盘细胞给予所述个体,其中所述分离的胎盘细胞具有多能细胞或干细胞特性。在某些实施方案中,血流破坏导致个体脑或 CNS 的缺氧损伤或低氧损伤。

[0011] 在某些实施方案中,所述分离的胎盘细胞为分离的胎盘干细胞。在某些其它的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为分离的胎盘多能细胞。在一个具体的实施方案中,如流式细胞计检测的,所述分离的胎盘细胞为 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup> 和 CD105<sup>+</sup> 的。在更具体的实施方案中,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞为胎盘干细胞。在另外更具体的实施方案中,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞为多能胎盘细胞。在另外的具体实施方案中,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞具有分化为成骨表型细胞或成软骨表型细胞的潜能。在另一个实施方案中,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞具有分化为神经表型细胞的潜能。在更具体的实施方案中,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD200<sup>+</sup>。在另外更具体的实施方案中,如流式细胞计检测的,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD90<sup>+</sup> 或 CD45<sup>-</sup> 的。在另外更具体的实施方案中,如流式细胞计检测的,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD90<sup>+</sup> 或 CD45<sup>-</sup> 的。在更具体的实施方案中,如流式细胞计检测的,所述 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD90<sup>+</sup> 或 CD45<sup>-</sup> 的。在另外更具体的实施方案中,如流式细胞计检测的,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 细胞还为 CD90<sup>+</sup> 和 CD45<sup>-</sup> 的。在另外更具体的实施方案中,如流式细胞计检测的,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup> 细胞还为 CD80<sup>-</sup> 和 CD86<sup>-</sup> 的。

[0012] 在更具体的实施方案中,所述 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 细胞还为 CD29<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD80<sup>-</sup>、CD86<sup>-</sup>、SH3<sup>+</sup> 或 SH4<sup>+</sup> 中的一种或多种。在更具体的实施方案中,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD44<sup>+</sup>。在另外的具体实施方案中,所述 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD13<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD33<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD62E<sup>-</sup>、CD62L<sup>-</sup>、CD62P<sup>-</sup>、SH3<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>)、SH4<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>)、CD80<sup>-</sup>、CD86<sup>-</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup> (CD105<sup>+</sup>)、CD106/VCAM<sup>+</sup>、CD117<sup>-</sup>、CD144/VE-钙粘蛋白<sup>low</sup>、CD184/CXCR4<sup>-</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>、OCT-4<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup>、SSEA4<sup>-</sup>、ABC-p<sup>+</sup>、KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>)、HLA-A、B、C<sup>+</sup>、HLA-DP、DQ、DR<sup>-</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 或程序性死亡-1 配体 (PDL1)<sup>+</sup> 中的一种或多种,或它们的任何组合。在更具体实施方案中,所述 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD13<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD33<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54/ICAM<sup>+</sup>、CD62E<sup>-</sup>、CD62L<sup>-</sup>、CD62P<sup>-</sup>、SH3<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>)、SH4<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>)、CD80<sup>-</sup>、CD86<sup>-</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup> (CD105<sup>+</sup>)、CD 106/VCAM<sup>+</sup>、CD117<sup>-</sup>、CD 144/VE-钙粘蛋白<sup>low</sup>、CD184/CXCR4<sup>-</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>、OCT-4<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup>、SSEA4<sup>-</sup>、ABC-p<sup>+</sup>、KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>)、HLA-A、B、C<sup>+</sup>、HLA-DP、DQ、DR<sup>-</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 和程序性死亡-1 配体 (PDL1)<sup>+</sup>。

[0013] 在其它的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD200<sup>+</sup> 和 HLA-G<sup>+</sup>; CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 和 CD200<sup>+</sup>; CD200<sup>+</sup> 和 OCT-4<sup>+</sup>; CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 和 HLA-G<sup>+</sup>; CD73<sup>+</sup> 和 CD105<sup>+</sup>, 并且当所述群在允许形成胚样体的条件下培养时,有助于在包含所述分离胎盘细胞的胎盘细胞群中形成一种或多种胚样体;或 OCT-4<sup>+</sup>, 并且当所述群在允许形成胚样体的条件下培养时,有助于在包含所述分离胎盘细胞的胎盘细胞群中形成一种或多种胚样体;或它们的任何组合。其它的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>, 且还为 CD200<sup>+</sup> 和 HLA-G<sup>+</sup>; CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 和 CD200<sup>+</sup>; CD200<sup>+</sup> 和 OCT-4<sup>+</sup>; CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 和 HLA-G<sup>+</sup>; CD73<sup>+</sup> 和 CD105<sup>+</sup>, 并且当所述群在允许形成胚样体的条件下培养时有助于在包含所述分离胎盘细胞的胎盘细胞群中形成一种或

多种胚样体 ;或 OCT-4<sup>+</sup>, 并且当所述群在允许形成胚样体的条件下培养时有助于在包含所述分离胎盘细胞的胎盘细胞群中形成一种或多种胚样体 ;或它们的任何组合。

[0014] 在一个具体的实施方案中,所述 CD200<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD73<sup>+</sup> 和 CD105<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 和 CD200<sup>+</sup> 胎盘细胞为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD73<sup>+</sup> 和 HLA-G<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述 CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 干细胞为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 和 HLA-G<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 和 HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞为 CD34<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 和 CD200<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup> 和 CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞为 OCT-4<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 和 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述细胞为 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 和 CD45<sup>-</sup>。

[0015] 在某些实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup>、SH4<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup>、SSEA4<sup>-</sup>、OCT-4<sup>+</sup>、MHC-I<sup>+</sup> 或 ABC-p<sup>+</sup> 中的一种或多种,其中 ABC-p 为胎盘 - 特异性 ABC 转运蛋白 (亦称乳腺癌耐受性蛋白 (BCRP) 和米托蒽醌耐受性蛋白 (MXR))。在一个具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup>、SH4<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup>、SSEA4<sup>-</sup> 和 OCT-4<sup>+</sup>。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup> 和 SH4<sup>+</sup>。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup>、SH4<sup>+</sup> 和 OCT-4<sup>+</sup>。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、HLA-I<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup>、SH4<sup>+</sup>。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 OCT-4<sup>+</sup> 和 ABC-p<sup>+</sup>。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup>、SH4<sup>+</sup> 和 OCT-4<sup>+</sup>。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 OCT-4<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、SSEA3<sup>-</sup> 和 SSEA4<sup>-</sup>。在一个具体的实施方案中,所述 OCT-4<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、SSEA3<sup>-</sup> 和 SSEA4<sup>-</sup> 细胞还为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup> 和 SH4<sup>+</sup>。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 OCT-4<sup>+</sup> 和 CD34<sup>-</sup>, 并且 SH3<sup>+</sup> 或 SH4<sup>+</sup>。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD34<sup>-</sup>, 并且 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 中任一种。在某些实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD10<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup> 和 CD200<sup>+</sup>。

[0016] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的分离的胎盘细胞为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、ICAM1、CD62-E<sup>-</sup>、CD62-L<sup>-</sup>、CD62-P<sup>-</sup>、CD80<sup>-</sup>、CD86<sup>-</sup>、CD 103<sup>-</sup>、CD 104<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD 106/VCAM<sup>+</sup>、CD144/VE- 钙粘蛋白<sup>low</sup>、CD184/CXCR4<sup>-</sup>、β 2- 微球蛋白<sup>low</sup>、HLA-I<sup>low</sup>、HLA-II<sup>-</sup>、HLA-G<sup>low</sup> 和 / 或 PDL1<sup>low</sup> 中的一种或多种。在一个具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞至少为 CD29<sup>+</sup> 和 CD54<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞至少为 CD44<sup>+</sup> 和 CD106<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞至少为 CD29<sup>+</sup>。

[0017] 在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞以比等量骨髓来源的间充质干细胞可检测的更高水平表达一种或多种基因,其中所述一种或多种基因为 ACTG2、ADARB1、AMIG02、ARTS-I、B4GALT6、BCHE、C11orf9、CD200、COL4A1、COL4A2、CP A4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPRC5B、ICAM1、IER3、IGFBP7、IL1A、IL6、IL18、KRT18、KRT8、LIPG、LRAP、MATN2、MEST、NFE2L3、NUAK1、PCDH7、PDLIM3、PKP2、RTN1、SERPINB9、ST3GAL6、ST6GALNAC5、SLC12A8、TCF21、TGFB2、VTN 和 ZC3H12A 中的一种或多种,并且其中所述骨髓来源的间充质干细胞已经历与所述分离的胎盘细胞相同数量的传代培养。在更具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞在包含 60% DMEM-LG (例如来自 Gibco)



和 40% MCDB-201 (例如来自 Sigma); 2% 胎牛血清 (例如来自 Hyclone Labs.); 1× 胰岛素 - 转铁蛋白 - 硒 (ITS); 1× 亚油酸 - 牛血清白蛋白 (LA-BSA);  $10^{-9}$ M 地塞米松 (例如来自 Sigma);  $10^{-4}$ M 抗坏血酸 2- 磷酸盐 (例如来自 Sigma); 表皮生长因子 10ng/mL (例如来自 R&D Systems); 和血小板来源的生长因子 (PDGF-BB) 10ng/mL (例如来自 R&D Systems) 的培养基中培养约 3 至约 35 个群倍增时表达所述一种或多种基因。在更具体的实施方案中, 所述分离的胎盘细胞在包含 60% DMEM-LG (例如来自 Gibco) 和 40% MCDB-201 (例如来自 Sigma); 2% 胎牛血清 (例如来自 Hyclone Labs.); 1× 胰岛素 - 转铁蛋白 - 硒 (ITS); 1× 亚油酸 - 牛血清白蛋白 (LA-BSA);  $10^{-9}$ M 地塞米松 (例如来自 Sigma);  $10^{-4}$ M 抗坏血酸 2- 磷酸盐 (例如来自 Sigma); 表皮生长因子 10ng/mL (例如来自 R&D Systems); 和血小板来源的生长因子 (PDGF-BB) 10ng/mL (例如来自 R&D Systems) 的培养基中培养约 3 至约 35 个群倍增时表达所述一种或多种基因。

[0018] 在所述治疗方法的另外具体的实施方案中, 所述胎盘干细胞表达神经营养性生长因子胶质细胞来源的神经营养因子 (GDNF)、脑来源的神经营养因子 (BDNF)、肝细胞生长因子 (HGF)、胎盘生长因子 (PGF) 和血管内皮细胞生长因子 (VEGF)。

[0019] 在另外具体的实施方案, 所述分离的胎盘细胞包含在细胞群中, 其中至少 50% 的细胞为所述分离的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中, 所述分离的胎盘细胞包含在细胞群中, 其中至少 70% 的细胞为所述分离的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中, 所述分离的胎盘细胞包含在细胞群中, 其中至少 80% 的细胞为所述分离的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中, 所述分离的胎盘细胞包含在细胞群中, 其中至少 90% 的细胞为所述分离的胎盘细胞。在某些其它的实施方案中, 所述细胞群中的胎盘细胞基本上不包括具有母系基因型的细胞; 例如所述群中至少 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 的胎盘细胞具有胎儿基因型, 即为胎儿来源的。在某些其它的实施方案中, 包含胎盘细胞的所述细胞群基本上不包括具有母系基因型的细胞; 例如所述群中至少 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 的细胞具有胎儿基因型, 即为胎儿来源的。

[0020] 在某些实施方案中, 任何胎盘细胞, 例如此处所述的胎盘干细胞或胎盘多能细胞对受者而言是自体同源的, 例如受者为已患有中风或中风症状的个体。在某些其它的实施方案中, 任何胎盘细胞, 例如此处所述的胎盘干细胞或胎盘多能细胞对受者而言是异源的, 例如受者为已患有中风或中风症状的个体。

[0021] 在所述治疗方法的另外具体的实施方案中, 所述分离的胎盘细胞在给予之前冷藏。在另外具体的实施方案中, 所述分离的胎盘细胞获自胎盘干细胞库。

[0022] 在任何上述分离的胎盘细胞的实施方案中, 所述分离的胎盘细胞在生长培养基 (即配制成促进增殖的培养基, 例如在生长培养基中增殖期间促进增殖) 中培养期间通常不分化。在另外具体的实施方案中, 所述分离的胎盘细胞不需要饲养层来增殖。在另外具体的实施方案中, 由于在不存在饲养细胞层时培养, 所述分离的胎盘细胞在培养时不分化。

[0023] 在另外更具体的实施方案中, 所述分离的胎盘细胞通过灌注产后胎盘获得, 其中所述胎盘已被排干血并被灌注以除去残余血液; 或者所述胎盘已被排干血但未经灌注以除去残余血液; 或者所述胎盘既不没有被排干血也未经灌注以除去残余血液。在另外更具体的实施方案中, 所述分离的胎盘细胞通过物理和 / 或酶促破坏胎盘组织获得。

[0024] 用于此处提供的方法的胎盘细胞的细胞表面、分子和遗传标记在以下 5.4.2 章节详细描述。

[0025] 在另外具体的实施方案中,所述血流破坏为中风。在更具体的实施方案中,所述中风为局部缺血性中风。在另外更具体的实施方案中,所述中风为出血性中风,例如颅内脑溢血或自发蛛网膜下出血。在另外具体的实施方案中,所述破坏为血肿。在更具体的实施方案中,所述血肿为硬脑膜血肿、硬膜下血肿或蛛网膜下血肿。在另外具体的实施方案中,所述血肿由对头骨的外部力量引起,例如头损伤。在另外具体的实施方案中,所述破坏为瞬时的局部缺血损伤(TIA),例如周期性TIA。在另外具体的实施方案中,所述破坏为血管痉挛,例如伴随出血性中风的血管痉挛。

[0026] 在所述方法另外具体的实施方案中,所述治疗有效量为使得所述个体由于脑或CNS内或周围血流破坏的一种或多种症状或血流破坏所引起的神经性缺损(例如缺氧损伤或低氧损伤)消除、可检测的改善、严重程度减轻、或者发展变缓的分离的胎盘细胞的量。在另外具体的实施方案中,所述治疗有效量的分离的胎盘细胞被预防性地给予个体,例如以降低或消除由血流破坏后第二或后续的脑或CNS内或周围血流破坏引起的神经性损伤。

[0027] 在另外具体的实施方案中,所述脑内或脑周围血流破坏的症状例如中风、缺氧损伤或低氧性损伤为以下病症中的一种或多种:偏瘫(身体一侧麻痹);轻偏瘫(身体一侧虚弱);面部肌肉虚弱;麻木;感觉下降;嗅觉、味觉、听力或视力改变;嗅觉、味觉、听力或视力丧失;眼皮耷拉(下垂症);可检测的眼肌肉虚弱;呕吐反射降低;吞咽能力降低;瞳孔光反应性降低;面部知觉降低;平衡降低;眼震症;呼吸速率改变;心率改变;锁骨乳突肌虚弱,转动头至一侧的能力降低或不能;舌虚弱;失语症(不能说或理解语言);失用症(改变的自觉运动);视野缺陷;记忆力缺损;半侧忽视或半侧空间忽视(对病变相对的视野另一侧空间的关注缺乏);思维混乱;意识模糊;纵欲姿态的发展;疾病失认症(持续否认缺陷的存在);难以行走;运动协同作用改变;眩晕;不平衡;意识丧失;头痛或呕吐。

[0028] 在如上所述治疗方法的另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞通过弹丸注射给予。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞通过静脉注射注入给予。在一个具体的实施方案中,所述静脉注射注入超过约1至约8个小时。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞头颅内给予。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞经腹膜给予。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞动脉内给予。在更具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞在局部缺血区域内给予。在另外更具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞在局部缺血外周区域内给予。在所述治疗方法另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为肌内、真皮内、皮下或眼内给予。

[0029] 在如上所述治疗方法的另一实施方案中,所述分离的胎盘细胞通过包含所述分离胎盘细胞的组合物物质手术移植入所述个体而给予。在更具体的实施方案中,所述物质组合物为基质或支架。在另外更具体的实施方案中,所述基质或支架为水凝胶。在另外更具体的实施方案中,所述基质或支架为脱细胞组织。在另外更具体的实施方案中,所述基质或支架为合成的生物可降解组合物。在另外更具体的实施方案中,所述基质或支架为泡沫。

[0030] 在如上所述治疗方法的另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞一次性给予所述个体。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞分两次或两次以上单独给予所

述个体。在另外具体的实施方案中,所述给予包括给予每千克所述个体约  $1 \times 10^4$  至  $1 \times 10^5$  个分离的胎盘细胞,例如胎盘干细胞。在另外具体的实施方案中,所述给予包括给予每千克所述个体约  $1 \times 10^5$  至  $1 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述给予包括给予每千克所述个体约  $1 \times 10^6$  至  $1 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述给予包括给予每千克所述个体约  $1 \times 10^7$  至  $1 \times 10^8$  个分离的胎盘细胞。在其它具体的实施方案中,所述给予包括给予每千克所述个体约  $1 \times 10^6$  至约  $2 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞;每千克所述个体约  $2 \times 10^6$  至约  $3 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞;每千克所述个体约  $3 \times 10^6$  至约  $4 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞;每千克所述个体约  $4 \times 10^6$  至约  $5 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞;每千克所述个体约  $5 \times 10^6$  至约  $6 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞;每千克所述个体约  $6 \times 10^6$  至约  $7 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞;每千克所述个体约  $7 \times 10^6$  至约  $8 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞;每千克所述个体约  $8 \times 10^6$  至约  $9 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞;每千克所述个体约  $9 \times 10^6$  至约  $1 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述给予包括给予个体每千克所述个体约  $1 \times 10^7$  至约  $2 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述给予包括给予个体每千克所述个体约  $1.3 \times 10^7$  至约  $1.5 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述给予包括给予个体每千克所述个体上至约  $3 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞。在一个具体的实施方案中,所述给予包括给予个体约  $5 \times 10^6$  至约  $2 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述给予包括给予个体约 20 毫升溶液中的  $150 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞。

[0031] 在一个具体的实施方案中,所述给予包括给予所述个体约  $5 \times 10^6$  至约  $2 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞,其中所述细胞包含于包含 10% 葡聚糖(例如葡聚糖-40)、5% 人血清白蛋白和任选的免疫抑制剂的溶液中。

[0032] 在另外具体的实施方案中,所述给予包括静脉内给予约  $5 \times 10^7$  至  $3 \times 10^9$  个分离的胎盘细胞。在更具体的实施方案中,所述给予包括静脉内给予约  $9 \times 10^8$  个分离的胎盘细胞或约  $1.8 \times 10^9$  个分离的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述给予包括颅内给予约  $5 \times 10^7$  至  $1 \times 10^8$  个分离的胎盘细胞。在更具体的实施方案中,所述给予包括颅内给予约  $9 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞。

[0033] 在另外具体的实施方案中,如上所述的治疗方法包括给予第二种治疗剂至所述个体。在更具体的实施方案中,所述第二种治疗剂为神经保护剂。在更具体的实施方案中,所述第二种治疗剂为 NXY-059(苯基丁基硝酮的二磺酰基衍生物:二钠 4-((叔-丁基亚胺基)-甲基)苯-1,3-二磺酸盐 N-氧化物,或二钠 4-((氧化-叔-丁基-二甲基亚氮鎓基)甲基)苯-1,3-二磺酸盐;亦称二磺酚)。在另外更具体的实施方案中,第二种治疗剂为血栓溶解剂。在更具体的实施方案中,所述血栓溶解剂为组织纤溶酶原激活物(tPA)。在其中脑内或脑周围血流破坏为出血的实施方案中,第二种治疗剂可以为抗高血压药物,例如  $\beta$  阻断剂或利尿药物,利尿药物和潴钾利尿药物的组合, $\beta$  阻断剂和利尿药物的组合,血管紧张素-转化酶(ACE)抑制剂和利尿剂的组合,血管紧张素-II 拮抗剂和利尿药物,和/或钙离子通道阻断剂和 ACE 抑制剂。在另外更具体的实施方案中,第二种治疗剂为钙离子通道阻断剂、谷氨酸拮抗剂、 $\gamma$  氨基丁酸(GABA)激动剂、抗氧化剂或自由基清除剂。

[0034] 在所述治疗方法另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞在所述个体脑内或脑周围血流破坏的一种或多种症状形成的 21-30 天内,例如第 21 天,例如中风、缺氧损伤或低氧损伤症状形成的 21-30 天内,例如第 21 天,给予所述个体。在所述治疗方法另外具体

的实施方案中,所述分离的胎盘细胞在所述个体脑内或脑周围血流破坏的一种或多种症状形成的 14 天内给予所述个体。在所述治疗方法另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞在所述个体脑内或脑周围血流破坏的一种或多种症状形成的 7 天内给予所述个体。在所述治疗方法另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞在所述个体脑内或脑周围血流破坏的一种或多种症状形成的 48 小时内给予所述个体。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞在所述个体脑内或脑周围血流破坏的一种或多种症状形成的 24 小时内给予所述个体。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞在所述个体脑内或脑周围血流破坏的一种或多种症状形成的 12 小时内给予所述个体。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞在所述个体脑内或脑周围血流破坏的一种或多种症状形成的 3 小时内给予所述个体。

### [0035] 3.1 定义

[0036] 如此处所用的,术语“约”当涉及数值时,表示所述数值的  $\pm 20\%$  内的值。

[0037] 如此处所用的,术语“缺氧损伤”指损伤(例如由脑或 CNS 区域氧的整体缺乏)引起的神经学损伤或症状。

[0038] 如此处所用的,术语“低氧损伤”指损伤(例如由脑或 CNS 区域氧的部分缺乏)引起的神经学损伤或症状。

[0039] 如此处所用的,术语“SH2”指结合细胞标记 CD105 上表位的抗体。因此,被称为 SH2<sup>+</sup> 的细胞为 CD105<sup>+</sup>。

[0040] 如此处所用的,术语“SH3 和 SH4”指结合呈现在细胞标记 CD73 上的表位的抗体。因此,被称为 SH3<sup>+</sup> 和 / 或 SH4<sup>+</sup> 的细胞为 CD73<sup>+</sup>。

[0041] 胎盘具有在其内发育的胎儿的基因型,但在妊娠期间其也与母系组织密切接触。因而如此处所用的,相对于携带胎儿的母体的基因型,术语“胎儿基因型”指胎儿的基因型,例如与胎盘有关的胎儿基因型,如此处所述,特定分离的胎盘细胞获自所述胎盘。如此处所用的,术语“母系基因型”指携带胎儿,例如与胎盘有关的胎儿的母体的基因型,如此处所述,特定分离的胎盘细胞获自所述胎盘。

[0042] 如此处所用的,术语“分离的细胞”,例如“分离的干细胞”指基本上与其它组织(例如所述干细胞来源的胎盘)的不同细胞分开的细胞。如果至少 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或至少 99% 与干细胞存在天然关联的细胞例如非-干细胞、或显示不同标记谱的干细胞在干细胞采集和 / 或培养期间从所述干细胞中除去,则所述干细胞为“分离的”。

[0043] 如此处所用的,“多能”当涉及细胞时,指细胞具有分化为一些而不必然是全部体细胞类型,或分化为具有一些而不是全部体细胞类型特性的细胞的能力。在某些实施方案中,例如具有分化为具有神经形成、软骨形成和 / 或成骨细胞特性的细胞之能力的分离的胎盘细胞为多能。

[0044] 如此处所用的,术语“分离的细胞群”指基本上与其它组织细胞(例如所述细胞群来源的胎盘)分开的细胞群。

[0045] 如此处所用的,不考虑形态、细胞表面标记或原代培养后传代数,术语“胎盘干细胞”指源自哺乳动物胎盘的干细胞或祖细胞。然而,如此处所用的术语“胎盘干细胞”不指以下细胞,即胎盘干细胞不是滋养层细胞、成血管细胞、造血成血管细胞、胚胎生殖细胞、胚胎干细胞、获自胚囊内细胞团的细胞、或获自晚期胚胎生殖腺脊的细胞,例如生殖细胞。如

果细胞显示干细胞属性,例如与一种或多种干细胞类型有关的标记或基因表达谱;培养时复制至少 10-40 次的的能力,以及分化为呈现三个胚层中一层或多层的已分化细胞之特性的细胞的能力,则认为所述细胞为“干细胞”。术语“胎盘干细胞”和“胎盘来源的干细胞”可互换使用。此处除非另作说明,术语“胎盘”包括脐带。在某些实施方案中,此处公开的分离的胎盘细胞在分化环境下体外分化、体内分化或体外体内都分化。

[0046] 如此处所用的,当标记可检测地大于背景时,胎盘细胞就是该特定标记为“阳性”的。例如,由于 CD73 在胎盘干细胞上的量可检测地大于背景(例如,与同型对照相比),因此胎盘干细胞是 CD73 阳性的。当标记可用于将所述细胞与至少一种其它细胞类型区分开时,或当所述标记在细胞中存在或表达时,该标记可用于选择或分离所述细胞,则该细胞也是所述标记阳性的。在例如抗体介导的检测中,当存在特定细胞表面标记时,“阳性”指所述标记可利用抗体检测,例如对该标记特异的荧光-标记抗体;“阳性”也指这样的细胞,其表现出的所述标记的量例如在细胞计数器中产生的信号可检测地大于背景。例如,细胞为“CD200<sup>+</sup>”,其中该细胞可用 CD200 特异性抗体可检测地标记,并且来自该抗体的信号可检测地高于对照(例如背景或同型对照)。相反,相同情景下,“阴性”指相比对照(例如背景或同型对照),利用所述标记特异性抗体检测不到细胞表面标记。例如,细胞为“CD34<sup>-</sup>”,指相比对照(例如背景或同型对照),所述细胞不能以更大程度可重复检测地用 CD34 特异性抗体标记。利用合适的对照,以类似的方式来确定抗体所不能检测到的标记为阳性或阴性的。例如,通过检测 RNA 的方法如 RT-PCR、槽斑点等等所测定的,如果来自细胞或细胞群 RNA 中检测的 OCT-4RNA 的量可检测地大于背景,则所述细胞或细胞群被认为是 OCT-4<sup>+</sup>。此处除非另作说明,利用抗体检测分化(“CD”)标记簇。在某些实施方案中,如果利用 RT-PCR 可检测 OCT-4 时,则确定 OCT-4 存在,并且细胞为“OCT-4<sup>+</sup>”。

[0047] 如此处所用的,“治疗”包含疾病、紊乱或病情或其任何参数或症状的治愈、治疗、改善、严重程度减轻、病程缩短。

[0048] 附图简述

[0049] 图 1:提高身体摆动检测结果。纵轴:摆动活力百分比偏差。横轴:评估摆动活力的天数。基线为诱导局部缺血之前摆动活力的百分比偏差。在梗塞后第 2 天头颅内给予分离的胎盘细胞之前评估了百分比偏差摆动活力,并且在梗塞后第 7 和 14 天再次评估。有活力的 400K:  $4 \times 10^5$  个有活力的分离的胎盘细胞。无活力的:无活力的胎盘干细胞。CsA:环胞素 A。

[0050] 图 2:Bederson 检测结果。纵轴:神经性缺损平均得分。横轴:评估神经性缺损的天数。基线为诱导局部缺血之前的神经性缺损;0 表示不缺损。梗塞后第 2 天给予分离的胎盘细胞时评估平均神经性活力,并且在梗塞后第 7 和 14 天再次评估。有活力的 400K:  $4 \times 10^5$  个有活力的分离的胎盘细胞。无活力的:无活力的胎盘干细胞。CsA:环胞素 A。

[0051] 图 3:提高身体摆动检测结果。纵轴:摆动活力百分比偏差。横轴:评估摆动活力的天数。基线为诱导局部缺血之前摆动活力的百分比偏差。在梗塞后第 2 天给予分离的胎盘细胞静脉内时评估百分比偏差摆动活力,并且在梗塞后第 7 和 14 天再次评估。无活力的:无活力的胎盘干细胞。给予  $4 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $4 \times 10^6$  或  $8 \times 10^6$  个有活力的分离的胎盘细胞(图例)。

[0052] 图 4:Bederson 检测结果。纵轴:神经性缺损平均得分。横轴:评估神经性缺损的

天数。基线为诱导局部缺血之前的神经性缺损；0表示不缺损。在梗塞后第2天给予分离的胎盘细胞静脉内时评估平均神经性活力，并且在梗塞后第7和14天再次评估。无活力的：无活力的胎盘干细胞。给予 $4 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $4 \times 10^6$ 或 $8 \times 10^6$ 个有活力的分离的胎盘细胞（图例）。

[0053] 图5：改进的神经严重程度得分检测结果。Y轴：得分（参见表1计分方法）。X轴：大脑中动脉闭塞（MCAO）手术后的天数。PDA：胎盘干细胞；FBC-对照：成纤维细胞对照；葡聚糖，无细胞对照；1PDA， $1 \times 10^6$ 个细胞；4PDA， $4 \times 10^6$ 个细胞；8PDA， $8 \times 10^6$ 个细胞。Rx：给予细胞或葡聚糖。

[0054] 图6：粘贴物移除体感检测结果。Y轴：移除粘贴测试物的秒数。X轴：大脑中动脉闭塞（MCAO）手术后的天数。PDA：胎盘干细胞；FBC-对照：成纤维细胞对照；葡聚糖，无细胞对照；1PDA， $1 \times 10^6$ 个细胞；4PDA， $4 \times 10^6$ 个细胞；8PDA， $8 \times 10^6$ 个细胞。Rx：给予细胞或葡聚糖。

[0055] 图7：足失误检测结果。Y轴：在金属网格上100步中的足失误百分比。X轴：进行足失误检测的治疗后天数（Rx）。\*：接受 $4 \times 10^6$ 个胎盘干细胞（PDA-4M）的动物对比赋形剂对照动物，足失误检测显著改善（ $p < 0.05$ ）。#：接受 $4 \times 10^6$ 个胎盘干细胞（PDA-4M）的动物对比成纤维细胞对照的动物，足失误检测显著改善（ $p < 0.05$ ）。

[0056] 图8：大脑中动脉闭塞后治疗56天后血管生成的测定。胎盘干细胞治疗显著提高内皮细胞增殖以及局部缺血边界区（IBZ）中的血管密度和血管周长。N = 10/组。图8A：石蜡脑切片的抗-BrdU抗体染色检测。Y轴：局部缺血病变边界中的BrdU-阳性内皮细胞（EC）百分比；X轴：实验条件（MCAo-Dex：大脑中动脉闭塞-葡聚糖（最初的病情预处理）；细胞-对照：给予成纤维细胞；PDA-4M：给予 $4 \times 10^6$ 个胎盘干细胞）。#：PDA-4M条件下对比成纤维细胞对照，内皮细胞增殖显著增加（ $p < 0.05$ ）。\*：PDA-4M条件下对比葡聚糖（赋形剂）对照，内皮细胞增殖的显著增加（ $p < 0.05$ ）。图8B：用胎盘干细胞治疗后局部缺血边界区的血管密度。Y轴：每 $\text{mm}^2$ 血管数；X轴：实验条件（MCAo-Dex：大脑中动脉闭塞-葡聚糖（最初的病情预处理）；细胞-对照：给予成纤维细胞；PDA-4M：给予 $4 \times 10^6$ 个胎盘干细胞）。#：PDA-4M条件下对比成纤维细胞对照，血管密度显著增加（ $p < 0.05$ ）。\*：PDA-4M条件下对比葡聚糖（赋形剂）对照，血管密度显著增加（ $p < 0.05$ ）。图8C：局部缺血边界区周围血管周长的增加。Y轴：血管周长的毫米长度；X轴：实验条件（MCAo-Dex：大脑中动脉闭塞-葡聚糖（最初的病情预处理）；细胞-对照：给予成纤维细胞；PDA-4M：给予 $4 \times 10^6$ 个胎盘干细胞）。#：PDA-4M条件下对比成纤维细胞对照，血管周长长度显著增加（ $p < 0.05$ ）。\*：PDA-4M条件下对比葡聚糖（赋形剂）对照，血管周长长度显著增加（ $p < 0.05$ ）。

[0057] 图9：胎盘干细胞治疗显著提高局部缺血脑的局部缺血边界中突触素的表达。N = 10/组。Y轴：检测石蜡脑切片中检查区域的突触素%；X轴：实验条件。MCAo：大脑中动脉闭塞时突触素的表达；细胞-对照：给予成纤维细胞；PDA-4M：给予 $4 \times 10^6$ 个胎盘干细胞。\*：PDA-4M对比成纤维细胞对照，突触素表达区域的显著增加。

[0058] 发明详述

[0059] 5.1 脑内和脑周围血流破坏的治疗

[0060] 此处提供用于治疗脑内或脑周围血流破坏的个体的方法，例如对个体脑内或脑周围血流破坏的一种或多种症状或血流破坏所引起的神经性缺损的治疗，包括给予个体治疗

有效量的分离的塑料贴壁组织培养人胎盘细胞,其中所述分离的胎盘细胞具有多能细胞或干细胞特性,并且其中所述分离的胎盘细胞不是骨髓来源的间充质细胞、脂肪来源的间充质干细胞或者获自脐带血、胎盘血或外周血的间充质细胞。在某些实施方案中,所述损伤为低氧损伤或缺氧损伤。在此处提供的某些实施方案中,所述治疗有效量为使所述个体表现出的脑内或脑周围血流破坏的一种或多种症状或血流破坏所引起的神经性缺损消除、可检测的改善、严重程度减轻、或者发展变缓的量。

[0061] 在一个具体的实施方案中,一种或多种症状或神经性缺损,例如中风症状、低氧损伤或缺氧损伤,至少在某种程度上或全部归因于血流破坏后的再灌注损伤。如此处所用的,“再灌注损伤”指在局部缺血一段时期中断血液供给后恢复组织血液供给时引起的组织损伤。局部缺血期间血源性氧和营养缺乏产生以下情形,其中循环的恢复通过引起氧化应激而不是通过恢复正常功能而引起炎症和氧化损伤。

[0062] 如此处所用的,所述治疗血流破坏的内容中,术语“脑内或脑周围血流的破坏”包括治疗具有血流所述破坏的个体表现出的一种或多种症状以及血流破坏所引起的个体神经性缺损,例如一种或多种中风症状、低氧损伤或缺氧损伤。在某些实施方案中,所述一种或多种症状为主要或全部归因于局部缺血本身的一种或多种症状。在某些其它的实施方案中,所述一种或多种症状为主要或全部归因于例如与局部缺血有关的再灌注损伤。

[0063] 5.2 中风

[0064] 可通过此处提供的方法治疗的脑内或脑周围血流的破坏可以是在受影响的个体中导致一种或多种可检测症状或神经性缺损的任何血流破坏(见下文)。在某些实施方案中,所述血流破坏为中风,例如局部缺血性中风或出血性中风,例如颅内脑溢血。在某些其它的实施方案中,所述血流的破坏为脑外出血,例如硬脑膜血肿、硬膜下血肿或蛛网膜下血肿。在某些其它的实施方案中,所述血流破坏为瞬时的,例如瞬时局部缺血损伤(TIA)。在某些其它的实施方案中,所述血流破坏为血管痉挛。在一个具体的实施方案中,所述脑中的血流破坏存在于大脑中。在更具体的实施方案中,所述破坏存在于大脑顶叶、额叶、颞叶或枕叶。在另外具体的实施方案中,所述破坏存在于小脑中。在另外具体的实施方案中,所述破坏存在于脑干或脊柱中。在某些实施方案中,所述破坏引起低氧损伤或缺氧损伤。

[0065] 在一个实施方案中,此处提供了治疗患有低氧损伤或缺氧损伤例如中风(例如中风患者)个体的方法,包括给予所述个体例如以下 5.4.2 节所述的治疗有效量的分离的塑料贴壁组织培养人胎盘细胞。在一个具体的实施方案中,所述治疗有效量为使所述个体表现出的中风的一种或多种症状消除、可检测的改善、严重程度减轻或者发展变缓的量。所述分离的胎盘细胞,例如大量分离的胎盘细胞或其分离的群可以是例如以下 5.4.2 节所述的任何分离的胎盘细胞。

[0066] 根据此处提供的方法能治疗的中风可以是任何病因引起的中风。在一个具体的实施方案中,所述中风为局部缺血性中风。在更具体的实施方案中,所述局部缺血性中风为血栓形成引起的中风或栓塞中风。在另外具体的实施方案中,所述中风是由于全身的灌注不足,即流至身体所有部位的血流减少;或静脉血栓形成引起的。在其它具体的实施方案中,所述局部缺血性中风由以下病因引起:心纤维性颤动,例如心房纤维性颤动;突发性心房纤维性颤动;风湿疾病;二尖或主动脉瓣疾病;人造心脏瓣膜;心房或心室的心血栓;病窦综合症;持续的心房扑动;心肌梗塞;射血分数少于 28% 的慢性心肌梗塞;射血分数少于

30%的有症状的充血性心力衰竭；心肌病；心内膜炎，例如 Libman-Sacks 心内膜炎、消耗性心内膜炎或感染性心内膜炎；乳头状弹力纤维瘤；左房粘液瘤；冠状动脉旁路术移植手术；二尖瓣环钙化；卵圆孔未闭；房隔膜动脉瘤、无血栓的左心室动脉瘤、超声心动图显示的无二尖狭窄或心房颤动的单独左房“雾化”；和 / 或升主动脉或主动脉弓近端的复杂动脉粥样化。

[0067] 在另外具体的实施方案中，所述中风为出血性中风。在更具体的实施方案中，所述出血性中风由轴内出血（脑内部血液渗漏）引起。在另外更具体的实施方案中，所述出血性中风由轴外出血（脑外部头骨内部的血液渗漏）引起。在更具体的实施方案中，所述中风由薄壁组织内出血、心室内出血（心室系统中的血液）、硬膜外血肿（硬脑膜和头骨之间流血）、硬膜下血肿（硬膜下空隙流血）或蛛网膜下出血（蜘蛛膜和软脑膜之间）引起。大多数出血性中风综合症具有特定的症状（例如头痛、先前的头部损伤）。在其它更具体的实施方案中，所述出血性中风由高血压、创伤、流血紊乱、淀粉样蛋白血管病、违禁药品的使用（例如安非他明或可卡因）或血管畸形引起或与之有关。

[0068] 在另一个实施方案中，此处提供治疗脑或 CNS 中或周围血流破坏的个体的方法，例如治疗个体脑或 CNS 中或周围血流破坏的一种或多种症状或血流破坏引起的神经性缺损，包括给予所述个体治疗有效量的分离的胎盘细胞，例如胎盘干细胞或胎盘多能细胞，其中所述血流破坏的直接病因不是中风，例如闭合的头损伤或非 - 冲击 - 相关的血肿。在一个具体的实施方案中，所述治疗有效量为使所述个体表现出的所述血流破坏的一种或多种症状消除、可检测的改善、严重程度减轻、或者发展变缓的量。如中风一样，分离的胎盘细胞可以是例如以下 5.4.2 节所述的任何胎盘细胞，例如胎盘干细胞或胎盘多能细胞。

[0069] 如上所述，在某些实施方案中，此处提供的治疗方法使脑或 CNS 中或周围血流破坏的一种或多种症状或血流破坏引起的神经性缺损（例如中风、血肿引起的例如缺氧损伤或低氧损伤）消除、可检测的改善、严重程度减轻、或者发展变缓。在具体的实施方案中，所述症状或神经性缺损包括偏瘫（身体一侧麻痹）；轻偏瘫（身体一侧虚弱）；面部肌肉虚弱；麻木；感觉下降；嗅觉、味觉、听力或视力改变；嗅觉、味觉、听力或视力丧失；眼皮耷拉（下垂症）；眼肌肉虚弱；呕吐反射降低；吞咽能力降低；瞳孔光反应性降低；面部知觉降低；平衡降低；眼震症；呼吸速率改变；心率改变；不能转动头至一侧的锁骨乳突肌虚弱，或能力降低；舌虚弱；失语症（不能说或理解语言）；失用症（改变的自觉运动）；视野缺陷；记忆力缺损；半侧忽视或半侧空间忽视（对病变相对的视野另一侧空间的关注缺乏）；混乱思维；意识模糊；纵欲姿态的发展；疾病失认症（持续否认缺陷的存在）；难以行走；运动协同动作改变；眩晕；不平衡；意识丧失；头痛和 / 或呕吐。

[0070] 脑或 CNS 中或周围血流破坏的严重程度例如中风或中风症状和 / 或中风引起的神经性缺损的严重程度可以利用一种或多种普遍 - 接受的神经学功能评分来评估。

[0071] 例如，在一个实施方案中，此处提供治疗脑或 CNS 中或周围血流破坏的个体的方法，例如患有个体脑内或脑周围血流破坏引起的症状或神经性缺损，例如低氧损伤或缺氧损伤的个体，包括给予所述个体治疗有效量的分离的人贴壁胎盘细胞，其中所述治疗有效量为足以引起个体神经学功能可检测的改善或可检测和持续的改善的胎盘细胞量，所述神经学功能通过一种或多种改进的 Rankin 评分、NIH 中风评分、Canadian 神经病学评分 (CNS)、昏迷评分 (GCS)、Hemispheric 中风评分、Hunt&Hess 评分、Mathew 中风评分、



细微精神状态检查 (MMSE)、Orgogozo 中风评分、Oxfordshire Community 中风计划分类 (Bamford)、Scandinavian 中风评分、日本昏迷评分 (JCS)、Barthel 指数和 / 或日本中风评分 (JSS) 评估。在具体的实施方案中,所述改善在最初的评估以及在一次或多次给予分离的胎盘细胞后的 1、2、3、4、5 或 6 天内,或 1、2、3、4、5、6、8、9、10、11 或 12 周内是可检测到的。在其它具体的实施方案中,所述最初的评估在一次或多次中风症状形成后的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 或 23 小时内,或 1、2、3、4 或 5 天内进行。在其它实施方案中,无论是否测定,所述改善持续例如超过至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个月,或 1、2、3、4、5 年或以上。

### [0072] 5.3 给予分离的胎盘细胞

[0073] 此处提供的治疗方法中使用的分离的胎盘细胞可以通过任何医学上可接受的方法或途径给予表现出脑内或脑周围血流破坏引起的或缘自所述破坏的一种或多种症状或神经性缺损的个体。在一个实施方案中,所述治疗有效量的分离的胎盘细胞经头颅内给予所述个体,例如给至个体受影响的脑或 CNS 中的局部缺血或出血性部位。对于颅内给予,所述中风位置(例如受影响区域)可以例如通过 CT 扫描、核磁共振 (MRI) (例如 T1-、T2-、扩散-和 / 或灌注-加权 MR)、钴-55 正电子放射层析 X 线断层造影或类似技术显现。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞通过静脉内或动脉内给予所述个体。在另外的实施方案中,所述治疗有效量的分离的胎盘细胞通过肌内、腹膜内、真皮内、皮下、眼内或肠胃外给予所述个体。所述分离的胎盘细胞可通过弹丸注射或静脉注射注入给予。在一个具体的实施方案中,所述静脉注射注入为超过约 1 至约 8 个小时的静脉注射注入。在某些实施方案中,所述分离的胎盘细胞通过组合途径,例如头颅内以及通过静脉注射注入给予所述个体。

[0074] 所述治疗有效量的分离的胎盘细胞可根据个体年龄和 / 或体重以及局部缺血区域的大体体积而不同。局部缺血区域的大体体积和位置可例如通过连续核磁共振图像或计算机 X 线断层造影 (CT) 扫描估计。

[0075] 例如单次剂量中给予的分离的胎盘细胞数,可每次给予约为或至少,或超过例如  $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$  或  $5 \times 10^{11}$  个分离的胎盘细胞。Z 具体的实施方案中,患有脑内或脑周围血流的破坏的个体,例如患有中风、缺氧损伤或低氧损伤的个体可静脉内给予约  $5 \times 10^7$  至约  $3 \times 10^9$  个分离的胎盘细胞。在更具体的实施方案中,患有脑内或脑周围血流的破坏的个体,例如患有中风、低氧损伤或缺氧损伤的个体可静脉内给予约  $9 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞、约  $3.6 \times 10^8$  个分离的胎盘细胞、约  $9 \times 10^8$  个分离的胎盘细胞或约  $1.8 \times 10^9$  个分离的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,个体静脉内给予一次剂量约  $2 \times 10^8$  个分离的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,个体静脉内给予一次剂量约  $8 \times 10^8$  个分离的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,个体静脉内给予两次剂量,每次包括约  $2 \times 10^8$  个分离的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,个体静脉内给予两次剂量,每次包括约  $8 \times 10^8$  个分离的胎盘细胞。在其它更具体的实施方案中,患有脑或 CNS 中或周围血流破坏的个体,例如患有中风、低氧损伤或缺氧损伤的个体可头颅内给予约  $5 \times 10^7$  至约  $1 \times 10^8$  个分离的胎盘细胞。在更具体的实施方案中,所述个体头颅内给予约  $9 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞。

[0076] 可在疗程中给予患有脑或 CNS 中或周围血流破坏、所述破坏的症状和 / 或所述破坏引起的神经性缺损的个体一次或一次以上,例如两次或更多次的分离的胎盘细胞。所

述分离的胎盘细胞可以用适合颅内给予的合适体积给予,例如约 100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、300  $\mu$ L、400  $\mu$ L、500  $\mu$ L、600  $\mu$ L、700  $\mu$ L、800  $\mu$ L、900  $\mu$ L、1000  $\mu$ L、1.5mL、2mL、2.5mL、3mL、3.5mL、4mL、4.5mL、5mL、5.5mL、6.0mL、6.5mL、7mL、7.5mL、8mL、8.5mL、9mL、9.5mL、10mL、11mL、12mL、13mL、14mL、15mL、16mL、17mL、18mL、19mL、20mL、21mL、22mL、23mL、24mL、25mL、26mL、27mL、28mL、29mL 或约 30mL 药学可接受溶液。对于静脉注射给予,大量分离的胎盘细胞(例如约  $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$  或  $5 \times 10^{11}$ ) 可以例如约或不超过 100mL、150mL、200mL、250mL、300mL、350mL、400mL、450mL、500mL、550mL、600mL、650mL、700mL、750mL、800mL、850mL、900mL、950mL、1000mL、1.1L、1.2L、1.3L、1.4L 或 1.5L,例如通过静脉注射注入。

[0077] 在其他的实施方案中,给予所述个体约每千克个体(例如具有脑或 CNS 中或周围血流破坏引起的或缘于所述破坏或再灌注损伤的一种或多种症状或神经性缺损的个体)  $1 \times 10^6$  至约  $2 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞;每千克个体约  $2 \times 10^6$  至约  $3 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞;每千克个体约  $3 \times 10^6$  至约  $4 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞;每千克个体约  $4 \times 10^6$  至约  $5 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞;每千克个体约  $5 \times 10^6$  至约  $6 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞;每千克个体约  $6 \times 10^6$  至约  $7 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞;每千克个体约  $7 \times 10^6$  至约  $8 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞;每千克个体约  $8 \times 10^6$  至约  $9 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞;每千克个体约  $9 \times 10^6$  至约  $1 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述给予包括给予个体每千克所述个体约  $1 \times 10^7$  至约  $2 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述给予包括给予个体每千克所述个体约  $1.3 \times 10^7$  至约  $1.5 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述给予包括给予个体每千克所述个体总共约  $3 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述给予包括给予个体约 20 毫升溶液中的  $15 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞。在一个优选的实施方案中,分离的胎盘细胞的给予包括给予不超过约 1 升溶液中的、每千克受者不超过  $7.5 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞。在一个具体的实施方案中,所述给予包括例如头颅内给予个体约  $5 \times 10^6$  至约  $2 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞。在一个具体的实施方案中,所述给予包括头颅内给予所述个体每千克约  $5 \times 10^6$  至约  $3 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞,其中所述细胞包含于含有 10% 葡聚糖,5% 人血清白蛋白和任选的免疫抑制剂,例如环孢素 A 的溶液中。在另外具体的实施方案中,所述给予包括给予所述个体约  $1 \times 10^9$  至约  $3 \times 10^7$  个胎盘多能细胞,其中所述细胞包含于含有 10% 葡聚糖,5% 人血清白蛋白和任选的免疫抑制剂,例如环孢素 A 的溶液中。在另外具体的实施方案中,所述给予包括给予个体约 20 毫升溶液中的  $25 \times 10^7$  个分离的胎盘细胞。在任何上述实施方案中,所述分离的胎盘细胞可静脉内或头颅内给予,例如作为丸剂或滴剂。又一个具体的实施方案中,所述给予包括给予个体约 20 毫升溶液中的  $2 \times 10^8$  个分离的胎盘细胞。

[0078] 所述分离的胎盘细胞可输注任何医学上可接受一段时间。在不同的实施方案中,例如可给予如上所述数目的分离的胎盘细胞,例如在 15、20、25、30、35、40、45、50 或 55 分钟内或不超过上述时间,或者在 1 小时或 1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5 或 6 小时内或不超过上述时间,通过静脉内或头颅内输注。

[0079] 分离的胎盘细胞可在例如低氧损伤或缺氧损伤引起的一种或多种症状或神经性缺损形成后的任何时候给予脑或 CNS 中或周围血流破坏的个体。在不同的实施方案中,分离的胎盘细胞在个体表现出第一种症状或神经性缺损形成后的第 21、20、19、18、17、16、15、

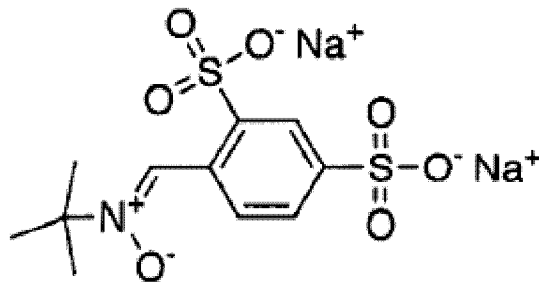
14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3 或 2 天内给予；优选分离的胎盘细胞在所述个体中第一种可检测症状或神经性缺损形成后的第 48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3 或 2 小时内给予，或所述个体中第一种可检测症状或神经性缺损形成后的第一个小时内给予。

[0080] 在其他的实施方案中，所述分离的胎盘细胞例如在脑或 CNS 中或周围血流破坏的一种或多种症状、中风症状、低氧损伤或缺氧损伤显现或可检测之前预防性地给予。

[0081] 对具有脑或 CNS 中或周围血流破坏的个体的治疗，包括给予所述个体分离的胎盘细胞，可进一步包括给予所述个体一种或多种第二种治疗剂。所述第二种治疗剂可在给予分离的胎盘细胞之前、给予所述分离的胎盘细胞期间或给予所述分离的胎盘细胞之后给予。所述第二种治疗剂给予的次数可以少于、多于或等于所给予分离的胎盘细胞的次数。

[0082] 第二种治疗剂可以是对患有脑或 CNS 中或周围血流破坏的个体具有治疗益处的任何制剂。在一个实施方案中，所述治疗剂为制剂，例如药物，其用于治疗中风、低氧损伤或缺氧损伤。在一个具体的实施方案中，第二种治疗剂为神经保护剂。在一个具体的实施方案中，所述神经保护剂为二磺酚钠 (NXY-059；苯基丁基硝酮的二磺酰基衍生物)，其结构如下显示：

[0083]



[0084] 在另一个实施方案中，所述个体患有出血性中风，第二种治疗剂为降低所述个体血压的治疗剂。在另一个实施方案中，第二种治疗剂为血栓溶解剂。在一个具体的实施方案中，所述血栓溶解剂为组织纤溶酶原激活物 (tPA)。tPA 可以是天然来源的或重组的。在更具体的实施方案中，tPA 在所述个体中一种或多种症状或神经性缺损形成后的三个小时内给予。在另外更具体的实施方案中，tPA 在中风患者中中风的一种或多种症状形成三个小时后给予。在某些实施方案中，禁忌使用血栓溶解剂，例如当中风患者具有头部损伤或当中风是由头部损伤引起时。在另外具体的实施方案中，第二种治疗剂为抗凝血剂或抗血小板剂。在脑或 CNS 中或周围血流破坏为出血的实施方案中，第二种治疗剂可以为抗高血压药物，例如  $\beta$  阻断剂或利尿药物、利尿药物和潴钾利尿药物的组合、 $\beta$  阻断剂和利尿药物的组合、血管紧张素 - 转化酶 (ACE) 抑制剂和利尿剂的组合、血管紧张素 - II 拮抗剂和利尿药物，和 / 或钙离子通道阻断剂和 ACE 抑制剂。在另一个实施方案中，给予第二种治疗剂以降低颅内压。在更具体的实施方案中，第二种治疗剂为利尿剂。

[0085] 在给予的分离的胎盘细胞与患有脑或 CNS 中或周围血流破坏个体不是自体同源的实施方案中，第二种治疗剂可以是免疫抑制剂。免疫抑制剂为本领域熟知并且包括，例如抗 -T 细胞受体抗体 (单克隆或多克隆的，或其抗体片段或衍生物，例如莫罗单抗 -CD3)、抗 -IL-2 受体抗体 (例如巴利昔单抗 (SIMULECT®) 或达珠单抗 (ZENAP AX)®)、咪

唑硫嘌呤、皮质甾类、环孢素、他克莫司、麦考酚酸吗啉乙酯、西罗莫司、钙调神经磷酸酶抑制剂等等。在一个具体的实施方案中,所述免疫抑制剂为巨噬细胞炎性蛋白(MIP)-1 $\alpha$ 或MIP-1 $\beta$ 的中和抗体。优选的,给予的所述抗-MIP-1 $\alpha$ 或MIP-1 $\beta$ 抗体的量例如足以引起所述个体中MIP-1 $\alpha$ 和/或MIP-1 $\beta$ 的量可检测地降低。

#### [0086] 5.4 分离的胎盘细胞和分离的胎盘细胞群

[0087] 可用于治疗患有脑或CNS中或周围血流破坏,包括其引起的症状和神经性缺损的个体的分离的胎盘细胞为从胎盘或其部分获得的细胞,其粘附(即,贴壁)于组织培养底物并且具有多能细胞或干细胞特性,但不是滋养层细胞。在某些实施方案中,可用于此处公开的方法的分离的胎盘细胞具有分化为非胎盘细胞类型的能力。可用于此处所公开方法的分离的胎盘细胞可以是胎儿或母体来源的(即,可以分别具有胎儿或母体的基因型)。优选的,所述分离的胎盘细胞和分离的胎盘细胞群为胎儿来源的。如此处所用的,短语“胎儿来源的”或“非母体来源的”表示所述分离的胎盘细胞或分离的胎盘细胞群获自与胎儿有关的脐带或胎盘结构,即具有胎儿基因型。如此处所用的,短语“母体来源的”表示所述细胞或细胞群获自与母体有关的胎盘结构,例如其具有母体基因型。分离的胎盘细胞或包含分离的胎盘细胞的细胞群可包括仅仅为胎儿或母体来源的分离的胎盘细胞,或可包括胎儿和母体来源的混合的分离胎盘细胞群。所述分离的胎盘细胞和包含分离的胎盘细胞的细胞群可通过下述形态学、标记和培养特性进行鉴定和选择。在某些实施方案中,任何胎盘细胞,例如此处所述的胎盘干细胞或胎盘多能细胞为受者自体同源的,例如受者为已患有中风或患有中风症状的个体。在某些其他的实施方案中,任何胎盘细胞,例如此处所述的胎盘干细胞或胎盘多能细胞为受者异源的,例如受者为已患有中风或患有中风症状的个体。

#### [0088] 5.4.1 物理和形态学特性

[0089] 此处所述的分离的胎盘细胞,当在原代培养或细胞培养时,粘附于组织培养底物,例如组织培养容器表面(例如组织培养塑料制品),或粘附于涂有细胞外基质或配体如层粘连蛋白、胶原(例如天然的或变性的)、明胶、纤连蛋白、鸟氨酸、玻连蛋白和胞外膜蛋白(例如MATRIGEL®(BD DiscoveryLabware, Bedford, Mass))的组织培养表面。培养中的所述分离的胎盘细胞呈现常见的成纤维样、星状外形,具有自中心细胞体延伸的许多胞质突起。然而,所述细胞在形态上与相同条件下培养的成纤维细胞可区分,因为所述分离的胎盘细胞具有比成纤维细胞更多的所述突起。分离的胎盘细胞在形态上还可与造血干细胞区分,造血干细胞通常在培养中呈现更圆或鹅卵石状的形态。

[0090] 在某些实施方案中,可用于此处公开的治疗方法的所述分离的胎盘细胞,当在生长培养基中培养时,形成胚样体。胚样体为可在增殖的分离的胎盘细胞贴壁层上生长的非汇合细胞块。使用术语“胚-样”是因为所述细胞块类似胚体,其为生长自胚胎干细胞培养物的细胞块。可供胚样体在增殖的分离的胎盘细胞培养物中发育的生长培养基包含例如DMEM-LG(例如来自Gibco);2%胎牛血清(例如来自HycloneLabs.);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<sup>-9</sup>M地塞米松(例如来自Sigma);10<sup>-4</sup>M抗坏血酸2-磷酸盐(例如来自Sigma);表皮生长因子10ng/mL(例如来自R&D Systems);和血小板来源的生长因子(PDGF-BB)10ng/mL(例如来自R&D Systems)。

#### [0091] 5.4.2 细胞表面的分子和遗传标记

[0092] 可用于此处公开的治疗方法的所述分离的胎盘细胞,例如多能细胞或干细胞以及

分离的胎盘细胞群,为塑料贴壁组织培养人胎盘细胞,其具有多能细胞干细胞的特性,并且表达可用于鉴定和/或分离所述细胞或包括所述干细胞的细胞群的多种标记。此处所述的分离的胎盘细胞和胎盘细胞群(即两种或多种分离的胎盘细胞)包括胎盘细胞和含有直接获自胎盘或其任何部分(例如羊膜、绒毛膜、胎盘绒毛叶等等)的细胞群的胎盘细胞。分离的胎盘细胞群还包括培养中的分离的胎盘细胞群(即两种或多种),和容器例如袋中的细胞群。此处所述的分离的胎盘细胞不是骨髓来源的间充质细胞、脂肪来源的间充质干细胞或获自脐带血、胎盘血或外周血的间充质细胞。

[0093] 在某些实施方案中,所述分离的胎盘细胞为分离的胎盘干细胞。在某些其他的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为分离的胎盘多能细胞。在一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞为如流式细胞计检测的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup> 和 CD105<sup>+</sup>。在具体的实施方案中,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞为胎盘干细胞。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞为多能胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞具有分化为神经表型细胞、成骨表型细胞和/或成软骨表型细胞的潜能。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD200<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD45<sup>-</sup> 或 CD90<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,如流式细胞计检测的,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD45<sup>-</sup> 和 CD90<sup>+</sup>。在更具体的实施方案中,如流式细胞计检测的,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD90<sup>+</sup> 或 CD45<sup>-</sup>。在另外更具体的实施方案中,如流式细胞计检测的,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD90<sup>+</sup> 或 CD45<sup>-</sup>,即所述细胞为 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD90<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 和 CD200<sup>+</sup>。在更具体的实施方案中,所述 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD90<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 细胞还为 CD80<sup>-</sup> 和 CD86<sup>-</sup>。

[0094] 在具体的实施方案中,如上所述的任何 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 细胞还为 CD29<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD54<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup> 或 SH4<sup>+</sup> 中的。在更具体的实施方案中,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD44<sup>+</sup>。以上任何分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞另外具体的实施方案中,所述细胞还为 CD117<sup>-</sup>、CD133<sup>-</sup>、KDR<sup>-</sup>(VEGFR2<sup>-</sup>)、HLA-A、B、C<sup>+</sup>、HLA-DP、DQ、DR<sup>-</sup> 或程序性死亡-1 配体(PDL1)<sup>+</sup> 中的一种或多种,或任何它们的组合。

[0095] 在另一个实施方案中,所述 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 细胞还为 CD13<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD33<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD62E<sup>-</sup>、CD62L<sup>-</sup>、CD62P<sup>-</sup>、SH3<sup>+</sup>(CD73<sup>+</sup>)、SH4<sup>+</sup>(CD73<sup>+</sup>)、CD80<sup>-</sup>、CD86<sup>-</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>(CD105<sup>+</sup>)、CD106/VCAM<sup>+</sup>、CD117<sup>-</sup>、CD144/VE-钙粘蛋白<sup>low</sup>、CD184/CXCR4<sup>-</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>、OCT-4<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup>、SSEA4<sup>-</sup>、ABC-p<sup>+</sup>、KDR<sup>-</sup>(VEGFR2<sup>-</sup>)、HLA-A、B、C<sup>+</sup>、HLA-DP、DQ、DR<sup>-</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 或程序性死亡-1 配体(PDL1)<sup>+</sup> 中的一种或多种,或任何它们的组合。其他实施方案中,所述 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 细胞还为 CD13<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD33<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>/ICAM<sup>+</sup>、CD62E<sup>-</sup>、CD62L<sup>-</sup>、CD62P<sup>-</sup>、SH3<sup>+</sup>(CD73<sup>+</sup>)、SH4<sup>+</sup>(CD73<sup>+</sup>)、CD80<sup>-</sup>、CD86<sup>-</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>(CD105<sup>+</sup>)、CD106/VCAM<sup>+</sup>、CD117<sup>-</sup>、CD144/VE-钙粘蛋白<sup>low</sup>、CD184/CXCR4<sup>-</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>、OCT-4<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup>、SSEA4<sup>-</sup>、ABC-p<sup>+</sup>、KDR<sup>-</sup>(VEGFR2<sup>-</sup>)、HLA-A、B、C<sup>+</sup>、HLA-DP、DQ、DR<sup>-</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 和程序性死亡-1 配体(PDL1)<sup>+</sup>。

[0096] 在某些实施方案中,所述细胞为 SSEA3<sup>-</sup>、SSEA4<sup>-</sup> 或 ABC-p<sup>+</sup> 中的一种或多种。所述分离的胎盘细胞还可以表达 HLA-ABC(MHC-I)。这些标记可以以任何组合使用,以鉴定所述分离的胎盘细胞,例如,分离的胎盘干细胞或分离的多能细胞,并且区分分离的胎盘细胞和其他细胞类型。由于所述分离的胎盘细胞可表达 CD73 和 CD105,其可具有间充质干细胞样

的特性。例如不表达 CD34、CD38 和 / 或 CD45, 则鉴定所述分离的胎盘细胞为非造血干细胞。

[0097] 此处还提供分离的胎盘细胞群或细胞群, 例如包含可用于此处公开的治疗方法的富集的分离胎盘细胞的胎盘细胞群。优选包括所述分离的胎盘细胞的细胞群, 其中所述细胞群可用于此处公开的治疗方法, 所述细胞群包含例如至少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 98% 分离的 CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 和 CD34<sup>-</sup> 胎盘细胞; 即所述群中至少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 98% 的细胞为分离的 CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 和 CD34<sup>-</sup> 胎盘细胞。在具体的实施方案中, 所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD200<sup>+</sup>。在更具体的实施方案中, 如流式细胞计检测的, 所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD90<sup>+</sup> 或 CD45<sup>-</sup>。在另外更具体的实施方案中, 如流式细胞计检测的, 所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD90<sup>+</sup> 和 CD45<sup>-</sup>。在更具体的实施方案中, 如上所述的任何分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD29<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD54<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup> 或 SH4<sup>+</sup> 中的一种或多种。在另外更具体的实施方案中, 所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞或分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD44<sup>+</sup>。包含以上分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞的任何细胞群的具体实施方案中, 所述分离的胎盘细胞还为 CD13<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD33<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD62E<sup>-</sup>、CD62L<sup>-</sup>、CD62P<sup>-</sup>、SH3<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>)、SH4<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>)、CD80<sup>-</sup>、CD86<sup>-</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH2+ (CD105<sup>+</sup>)、CD106/VCAM<sup>+</sup>、CD117<sup>-</sup>、CD144/VE- 钙粘蛋白<sup>low</sup>、CD184/CXCR4<sup>-</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>、OCT-4<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup>、SSEA4<sup>-</sup>、ABC-p<sup>+</sup>、KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>)、HLA-A、B、C<sup>+</sup>、HLA-DP、DQ、DR<sup>-</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 或程序性死亡 -1 配体 (PDL1)<sup>+</sup> 中的一种或多种, 或它们的任何组合。在更具体的实施方案中, 所述 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 细胞还为 CD13<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD33<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54/ICAM<sup>+</sup>、CD62E<sup>-</sup>、CD62L<sup>-</sup>、CD62P<sup>-</sup>、SH3<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>)、SH4<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>)、CD80<sup>-</sup>、CD86<sup>-</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH2+ (CD105<sup>+</sup>)、CD106/VCAM<sup>+</sup>、CD117<sup>-</sup>、CD144/VE- 钙粘蛋白<sup>low</sup>、CD184/CXCR4<sup>-</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>、OCT-4<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup>、SSEA4<sup>-</sup>、ABC-p<sup>+</sup>、KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>)、HLA-A、B、C<sup>+</sup>、HLA-DP、DQ、DR<sup>-</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 和程序性死亡 -1 配体 (PDL1)<sup>+</sup>。

[0098] 在某些实施方案中, 可用于此处所述治疗方法的所述分离的胎盘细胞为分离的胎盘细胞, 其为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH2+、SH3<sup>+</sup>、SH4<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup>、SSEA4<sup>-</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 和 ABC-p<sup>+</sup> 中的一种或多种或全部, 其中所述分离的胎盘细胞通过物理和 / 或酶促破坏胎盘组织获得。在具体的实施方案中, 所述分离的胎盘细胞为 OCT-4<sup>+</sup> 和 ABC-p<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中, 所述分离的胎盘细胞为 OCT-4<sup>+</sup> 和 CD34<sup>-</sup>, 其中所述分离的胎盘细胞具有至少一种下列特性: CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup>、SH4<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup> 和 SSEA4<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中, 所述分离的胎盘细胞为 OCT-4<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup>、SH4<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup> 和 SSEA4<sup>-</sup>。在另一个实施方案中, 所述分离的胎盘细胞为 OCT-4<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、SSEA3<sup>-</sup> 和 SSEA4<sup>-</sup>。在更具体的实施方案中, 所述分离的胎盘细胞为 OCT-4<sup>+</sup> 和 CD34<sup>-</sup>, 并且为 SH2<sup>+</sup> 或 SH3<sup>+</sup>。在更具体的实施方案中, 所述分离的胎盘细胞为 OCT-4<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、SH2<sup>+</sup> 和 SH3<sup>+</sup>。在另外更具体的实施方案中, 所述分离的胎盘细胞为 OCT-4<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、SSEA3<sup>-</sup> 和 SSEA4<sup>-</sup>, 并且为 SH2<sup>+</sup> 或 SH3<sup>+</sup>。在另外更具体的实施方案中, 所述分离的胎盘细胞为 OCT-4<sup>+</sup> 和 CD34<sup>-</sup>, 和 SH2<sup>+</sup> 或 SH3<sup>+</sup>, 并且为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup> 或 SSEA4<sup>-</sup> 中的至少一种。在另外更具体的实施方案中, 所述分离的胎盘细胞为 OCT-4<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup> 和 SSEA4<sup>-</sup>, 并且为 SH2<sup>+</sup> 或

SH3<sup>+</sup>。

[0099] 在另一个实施方案中,可用于此处公开的治疗方法的分离的胎盘细胞为 SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup>、SH4<sup>+</sup> 和 OCT-4<sup>+</sup>。在更具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、SSEA3<sup>-</sup> 或 SSEA4<sup>-</sup>。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup>、SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup> 和 SSEA4<sup>-</sup>。在更具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup>、SH4<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup> 和 SSEA4<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup> 或 CD45<sup>-</sup>。

[0100] 在另一个实施方案中,可用于此处所公开方法的分离的胎盘细胞为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup> 和 SH4<sup>+</sup>;其中所述分离的胎盘细胞还为 OCT-4<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup> 或 SSEA4<sup>-</sup> 中的一种或多种。

[0101] 在某些实施方案中,可用于此处所公开的治疗例如脑或 CNS 中或周围血流破坏、中风的方法的分离的胎盘细胞为 CD200<sup>+</sup> 或 HLA-G<sup>+</sup>。在具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD200<sup>+</sup> 和 HLA-G<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞还为 CD73<sup>+</sup> 和 CD105<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 或 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 和 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述干细胞为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD73<sup>+</sup> 和 CD105<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD200<sup>+</sup> 或 HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞当在允许形成胚样体的条件下时,有利于在包含所述分离胎盘细胞的胎盘细胞群中形成胚样体。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞与不为干细胞或多能细胞的胎盘细胞分离。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞与不显示这些标记的胎盘干细胞分离。

[0102] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的细胞群为包含例如富集 CD200<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 干细胞的细胞群。在具体的实施方案中,所述细胞群为胎盘细胞群。在不同的实施方案中,所述细胞群中至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50% 或至少约 60% 的细胞为分离的 CD200<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞。优选的,所述细胞群中至少约 70% 的细胞为分离的 CD200<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞。更优选的,至少约 90%、95% 或 99% 的所述细胞为分离的 CD200<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞。在所述细胞群的具体实施方案中,所述分离的 CD200<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD73<sup>+</sup> 和 CD105<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD200<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 或 CD45<sup>-</sup>。在更具体的实施方案中,所述分离的 CD200<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD73<sup>+</sup> 和 CD105<sup>+</sup>。在另一个实施方案中,当在允许形成胚样体的条件下培养时,所述细胞群产生一个或多个胚样体。在另外具体的实施方案中,所述细胞群与不是干细胞的胎盘细胞分离。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD200<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞与不显示这些标记的胎盘细胞分离。

[0103] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的分离的胎盘细胞为 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 和 CD200<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 HLA-G<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 或 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 和 CD45<sup>-</sup>。在更具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup> 和 HLA-G<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,当在允许形成胚样体的条件下培养时,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 和 CD200<sup>+</sup> 胎盘细胞促进在包括所述分离的胎盘细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个胚样体。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞与非分离的胎盘细胞分离。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞与不显示这些

标记的胎盘细胞分离。

[0104] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的细胞群为包含例如富集分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 胎盘细胞的细胞群。在不同的实施方案中,所述细胞群中至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50% 或至少约 60% 的细胞为 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 的分离的胎盘细胞。在另一个实施方案中,所述细胞群中至少约 70% 的细胞为 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 的分离的胎盘细胞。在另一个实施方案中,所述细胞群中至少约 90%、95% 或 99% 的细胞为 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 的分离的胎盘细胞。在所述细胞群的具体实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 HLA-G<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 或 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 和 CD45<sup>-</sup>。在更具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup> 和 HLA-G<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,当在允许形成胚样体的条件下培养时,所述细胞群产生一个或多个胚样体。在另外具体的实施方案中,所述胎盘细胞群与非干细胞分离。在另外具体的实施方案中,所述胎盘细胞群与不显示这些特性的胎盘细胞分离。

[0105] 在某些其他的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup>、SH4<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup>、SSEA4<sup>-</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 或 ABC-p<sup>+</sup> 中的一种或多种。在一个具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup>、SH4<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup>、SSEA4<sup>-</sup> 和 OCT-4<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup> 和 SH4<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup>、SH4<sup>+</sup> 和 OCT-4<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup>、SH4<sup>+</sup> 和 OCT-4<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup>、SH4<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 OCT-4<sup>+</sup> 和 ABC-p<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup>、SH4<sup>+</sup> 和 OCT-4<sup>+</sup>。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 OCT-4<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、SSEA3<sup>-</sup> 和 SSEA4<sup>-</sup>。在一个具体的实施方案中,所述分离的 OCT-4<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、SSEA3<sup>-</sup> 和 SSEA4<sup>-</sup> 胎盘细胞还为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup> 和 SH4<sup>+</sup>。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 OCT-4<sup>+</sup> 和 CD34<sup>-</sup>, 或者 SH3<sup>+</sup> 或 SH4<sup>+</sup>。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD34<sup>-</sup>, 并且 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup> 或者 OCT-4<sup>+</sup>。

[0106] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的分离的胎盘细胞为 CD200<sup>+</sup> 和 OCT-4<sup>+</sup>。在具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD73<sup>+</sup> 和 CD105<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 HLA-G<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 或 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 和 CD45<sup>-</sup>。在更具体的实施方案中,所述分离的 CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 和 HLA-G<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,当所述细胞群在允许形成胚样体的条件下培养时,所述分离的 CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞有助于在包含所述分离细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个胚样体。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞与非干细胞的胎盘细胞分离。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞与不显示这些特性的胎盘细胞分离。

[0107] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的细胞群为包含例如富集 CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞的细胞群。在不同的实施方案中,所述细胞群中至少约 10%、至



少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%或至少约 60%的细胞为分离的 CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞。在另一个实施方案中,所述细胞群中至少约 70%的细胞为分离的 CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞。在另一个实施方案中,所述细胞群中至少约 80%、90%、95%或 99%的细胞为所述分离的 CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞。在所述细胞群的具体的实施方案中,所述分离的 CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD73<sup>+</sup> 和 CD105<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 HLA-G<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 和 CD45<sup>-</sup>。在更具体的实施方案中,所述分离的 CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 和 HLA-G<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,当在允许形成胚样体的条件下培养时,所述细胞群产生一个或多个胚样体。在另外具体的实施方案中,所述细胞群与非分离的 CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞的胎盘细胞分离。在另外具体的实施方案中,所述细胞群与不显示这些标记的胎盘细胞分离。

[0108] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的分离的胎盘细胞为 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 和 HLA-G<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 和 HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 或 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 和 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 OCT-4<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD200<sup>+</sup>。在更具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 和 CD200<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,当所述群在允许形成胚样体的条件下培养时,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞有助于在包含所述分离胎盘细胞的胎盘细胞群中形成胚样体。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞与非分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞的胎盘细胞分离。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞与不显示这些标记的胎盘细胞分离。

[0109] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的细胞群为包含例如富集分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 和 HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞的细胞群。在不同的实施方案中,所述细胞群中至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%或至少约 60%的细胞为分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞。在另一个实施方案中,所述细胞群中至少约 70%的细胞为分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞。在另一个实施方案中,所述细胞群中至少约 90%、95%或 99%的细胞为分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞。上述细胞群的具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 或 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 和 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 OCT-4<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD200<sup>+</sup>。在更具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 和 CD200<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述细胞群与非 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞的胎盘细胞分离。另外具体的实施方案中,所述细胞群与不显示这些标记的胎盘细胞分离。

[0110] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的分离的胎盘细胞为 CD73<sup>+</sup> 和 CD105<sup>+</sup>,并且当所述细胞群在允许形成胚样体的条件下培养时,有助于在包含所述分离胎盘细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个胚样体。在另外具体的实施方案中,所述分离的

CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 或 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 和 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 OCT-4<sup>+</sup>。在更具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 OCT-4<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 和 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞与非所述细胞的胎盘细胞分离。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞与不显示这些特性的胎盘细胞分离。

[0111] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的细胞群为包含例如富集 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 的分离的胎盘细胞,且当所述群在允许形成胚样体的条件下培养时,有助于在包括所述细胞的分离的胎盘细胞群中形成一个或多个胚样体的细胞群。在不同的实施方案中,所述细胞群中至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50% 或至少约 60% 的细胞为分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞。在另一个实施方案中,所述细胞群中至少约 70% 的细胞为所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞。在另一个实施方案中,所述细胞群中至少约 90%、95% 或 99% 的细胞为所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞。在上述群的具体实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 或 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 和 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 OCT-4<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD200<sup>+</sup>。在更具体的实施方案中,所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 和 CD200<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述细胞群与非所述分离的 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞的胎盘细胞分离。在另外具体的实施方案中,所述细胞群与不显示这些标记的胎盘细胞分离。

[0112] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的分离的胎盘细胞为 OCT-4<sup>+</sup>,且当在允许形成胚样体的条件下培养时,有助于在包括所述细胞的分离的胎盘细胞群中形成一个或多个胚样体。在一个具体的实施方案中,所述分离的 OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD73<sup>+</sup> 和 CD105<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 或 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD200<sup>+</sup>。在更具体的实施方案中,所述分离的 OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 和 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞与非 OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞的胎盘细胞分离。在另外具体的实施方案中,所述分离的 OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞与不显示这些特性的胎盘细胞分离。

[0113] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的细胞群为包含例如富集 OCT-4<sup>+</sup> 的分离的胎盘细胞,且当所述群在允许形成胚样体的条件下培养时,有助于在包括所述细胞的分离的胎盘细胞群中形成一个或多个胚样体的细胞群。在不同的实施方案中,所述细胞群中至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50% 或至少约 60% 的细胞为分离的 OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞。在另一个实施方案中,所述细胞群中至少约 70% 的细胞为所述分离的 OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞。在另一个实施方案中,所述细胞群中至少约 80%、90%、95% 或 99% 的细胞为所述分离的 OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞。在上述群的具体实施方案中,所述分离的 OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 或 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 和 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD73<sup>+</sup> 和 CD105<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的 OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD200<sup>+</sup>。在更具体的实施方案中,所述分离的 OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>、

CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 和 CD45<sup>-</sup>。在另外具体的实施方案中,所述细胞群与不是所述细胞的胎盘细胞分离。在另外具体的实施方案中,所述细胞群与不显示这些标记的胎盘细胞分离。

[0114] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的分离的胎盘细胞为 HLA-A, B, C<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD133<sup>-</sup> 和 CD34<sup>-</sup> 的分离的胎盘细胞。在另一个实施方案中,可用于脑或 CNS 中或周围血流破坏治疗的细胞群为包含分离的胎盘细胞的细胞群,其中所述分离的细胞群中至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95% 或至少约 99% 的细胞为 HLA-A, B, C<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD133<sup>-</sup> 和 CD34<sup>-</sup> 的分离的胎盘细胞。在一个具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞或分离的胎盘细胞群与非 HLA-A, B, C<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD133<sup>-</sup> 和 CD34<sup>-</sup> 胎盘细胞的胎盘细胞分离。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为非母体来源的。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞群基本上无母体的组分;例如所述分离的胎盘细胞群中至少约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 的细胞为非母体来源的。

[0115] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的分离的胎盘细胞为分离的 CD10<sup>+</sup>、CD13<sup>+</sup>、CD33<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD117<sup>-</sup> 和 CD133<sup>-</sup> 胎盘细胞。在另一个实施方案中,可用于脑或 CNS 中或周围血流破坏治疗的细胞群为包含分离的胎盘细胞的细胞群,其中所述分离的细胞群中至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95% 或至少约 99% 的细胞为 CD10<sup>+</sup>、CD13<sup>+</sup>、CD33<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD117<sup>-</sup> 和 CD133<sup>-</sup> 的分离的胎盘细胞。在一个具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞或分离的胎盘细胞群与非所述分离的胎盘细胞的胎盘细胞分离。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD10<sup>+</sup>、CD13<sup>+</sup>、CD33<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD117<sup>-</sup> 和 CD133<sup>-</sup> 胎盘细胞为非母体来源的,即具有胎儿基因型。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞群中至少约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 的所述细胞为非母体来源的。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞或分离的胎盘细胞群与不显示这些特性的胎盘细胞分离。

[0116] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的分离的胎盘细胞为分离的 CD10<sup>-</sup>、CD33<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup> 和 CD117<sup>-</sup> 胎盘细胞。在另一个实施方案中,可用于脑或 CNS 中或周围血流破坏治疗的细胞群为包含例如富集的分离的胎盘细胞的细胞群,其中所述细胞群中至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95% 或至少约 99% 的细胞为分离的 CD10<sup>-</sup>、CD33<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup> 和 CD117<sup>-</sup> 胎盘细胞。在一个具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞或分离的胎盘细胞群与非所述细胞的胎盘细胞分离。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为非母体来源的。在另外具体的实施方案中,所述细胞群中至少约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 的所述细胞为非母体来源的。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞或分离的胎盘细胞群与不显示这些标记的胎盘细胞分离。

[0117] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的分离的胎盘细胞为分离的 CD10<sup>-</sup>、CD13<sup>-</sup>、CD33<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup> 和 CD117<sup>-</sup> 胎盘细胞。在另一个实施方案中,可用于脑或 CNS 中或周围血流破坏治疗的细胞群为包含例如富集的分离的 CD10<sup>-</sup>、CD13<sup>-</sup>、CD33<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup> 和 CD117<sup>-</sup> 胎盘细胞的细胞群,其中所述细胞群中至少约 70%、至少约 80%、至少约 70%、至少约 95% 或至少约 99% 的细胞为 CD10<sup>-</sup>、CD13<sup>-</sup>、CD33<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup> 和 CD117<sup>-</sup> 胎盘细胞。在一个具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞或分离的胎盘细胞群与非所述细胞的胎盘细胞分离。在另外具

体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为非母体来源的。在另外具体的实施方案中,所述细胞群中至少约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 的所述细胞为非母体来源的。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞或分离的胎盘细胞群与不显示这些特性的胎盘细胞分离。

[0118] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的分离的胎盘细胞为 HLA-A, B, C<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD34<sup>-</sup> 和 CD133<sup>-</sup>, 并且还可为 CD10<sup>+</sup>、CD13<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 和 / 或 HLA-G<sup>+</sup>, 和 / 或 CD117 阴性。在另一个实施方案中,可用于脑或 CNS 中或周围血流破坏治疗的细胞群为包含分离的胎盘细胞的细胞群,其中所述细胞群中至少约 20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或约 99% 的细胞为分离的胎盘细胞,其为 HLA-A, B, C<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD133<sup>-</sup>, 而且还可为 CD10、CD13、CD38、CD44、CD90、CD105、CD200 和 / 或 HLA-G 阳性, 和 / 或 CD117 阴性。在一个具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞或分离的胎盘细胞群与非所述细胞的胎盘细胞分离。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为非母体来源的。在另外具体的实施方案中,所述细胞群中至少约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 的所述细胞为非母体来源的。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞或分离的胎盘细胞群与不显示这些标记的胎盘细胞分离。

[0119] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的分离的胎盘细胞为,例如通过抗体结合测定的 CD200<sup>+</sup> 和 CD10<sup>+</sup> 分离的胎盘细胞,以及例如通过抗体结合和 RT-PCR 测定的 CD117<sup>-</sup> 分离的胎盘细胞。在另一个实施方案中,可用于治疗脑或 CNS 中或周围血流破坏的所述分离的胎盘细胞为分离的胎盘细胞,例如 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup>、HLA 类 I<sup>-</sup> 和  $\beta$ -2<sup>-</sup> 微球蛋白<sup>-</sup> 的胎盘干细胞或胎盘多能细胞。在另一个实施方案中,可用于治疗脑或 CNS 中或周围血流破坏的分离的胎盘细胞为至少一种细胞标记的表达比间充质干细胞(例如骨髓来源的间充质干细胞)至少高两倍的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为非母体来源的。在另外具体的实施方案中,所述细胞群中至少约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 的所述细胞为非母体来源的。

[0120] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的分离的胎盘细胞为分离的胎盘细胞,例如胎盘干细胞或胎盘多能细胞,其为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54/ICAM<sup>-</sup>、CD62E<sup>-</sup>、CD62L<sup>-</sup>、CD62P<sup>-</sup>、CD80<sup>-</sup>、CD86<sup>-</sup>、CD103<sup>-</sup>、CD104<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD106/VCAM<sup>+</sup>、CD144/VE-钙粘蛋白<sup>low</sup>、CD184/CXCR4<sup>-</sup>、 $\beta$  2<sup>-</sup> 微球蛋白<sup>low</sup>、MHC-I<sup>low</sup>、MHC-II<sup>-</sup>、HLA-G<sup>low</sup> 和 / 或 PDL1<sup>low</sup> 中的一种或多种。在具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞至少为 CD29<sup>+</sup> 和 CD54<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞至少为 CD44<sup>+</sup> 和 CD106<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞至少为 CD29<sup>+</sup>。

[0121] 在另一个实施方案中,可用于此处所述治疗方法的细胞群包含分离的胎盘细胞,并且所述细胞群中至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或 99% 的细胞为分离的胎盘细胞,其为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54/ICAM<sup>-</sup>、CD62-E<sup>-</sup>、CD62-L<sup>-</sup>、CD62-P<sup>-</sup>、CD80<sup>-</sup>、CD86<sup>-</sup>、CD103<sup>-</sup>、CD104<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD106/VCAM<sup>+</sup>、CD144/VE-钙粘蛋白<sup>low</sup>、CD184/CXCR4<sup>-</sup>、 $\beta$  2<sup>-</sup> 微球蛋白<sup>low</sup>、HLA-I<sup>low</sup>、HLA-II<sup>-</sup>、HLA-G<sup>low</sup> 和 / 或 PDL1<sup>low</sup> 中的一种或多种。在更具体的实施方案中,所述细胞群中至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或 99% 的细胞为 CD10<sup>+</sup>、

CD29<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54/ICAM<sup>-</sup>、CD62-E<sup>-</sup>、CD62-L<sup>-</sup>、CD62-P<sup>-</sup>、CD80<sup>-</sup>、CD86<sup>-</sup>、CD103<sup>-</sup>、CD104<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD106/VCAM<sup>+</sup>、CD144/VE-钙粘蛋白<sup>low</sup>、CD184/CXCR4<sup>-</sup>、β 2<sup>-</sup>微球蛋白<sup>low</sup>、HLA-I<sup>low</sup>、HLA-II<sup>-</sup>、HLA-G<sup>low</sup>和PDL1<sup>low</sup>。

[0122] 在另一个实施方案中,可用于治疗脑或 CNS 中或周围血流破坏的所述分离的胎盘细胞为分离的胎盘细胞,其为 CD10<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>、SH3<sup>+</sup>、SH4<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup>、SSEA4<sup>-</sup>、OCT-4<sup>+</sup>、和 ABC-p<sup>+</sup>中的一种或多种或全部,其中 ABC-p 为胎盘特异性 ABC 转运蛋白(亦称乳腺癌耐受性蛋白(BCRP)和米托蒽醌耐受性蛋白(MXR)),其中所述分离的胎盘细胞通过灌注已经排干脐带并灌注以除去残余血液的哺乳动物例如人的胎盘的获得。

[0123] 基因谱证实分离的胎盘细胞和分离的胎盘细胞群可与其他细胞,例如间充质干细胞,例如骨髓来源的间充质干细胞区分。此处所述的分离的胎盘细胞可在一种或多种基因表达的基础上与例如间充质干细胞区分,与骨髓来源的间充质干细胞相比,所述基因的表达显著高于分离的胎盘细胞或某些分离的脐带干细胞。特别地,可用于此处提供的治疗方法的分离的胎盘细胞可在一种或多种基因表达的基础上与间充质干细胞区分,当所述细胞在同等条件下培养时,分离的胎盘细胞中所述基因的表达比等量骨髓来源的间充质干细胞明显高(即至少高 2 倍),其中所述一种或多种基因为 ACTG2、ADARB1、AMIG02、ARTS-I、B4GALT6、BCHE、C11orf9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPCR5B、HLA-G、ICAM1、IER3、IGFBP7、IL1A、IL6、IL18、KRT18、KRT8、LIPG、LRAP、MATN2、MEST、NFE2L3、NUAK1、PCDH7、PDLIM3、PKP2、RTN1、SERPINB9、ST3GAL6、ST6GALNAC5、SLC12A8、TCF21、TGFB2、VTN、ZC3H12A 或上述任何基因的组合。参见例如美国专利申请公开号 2007/0275362,其公开内容在此全文引入作为参考。在更具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞在包含 DMEM-LG(例如来自 Gibco);2%胎牛血清(例如来自 Hyclone Labs);1×胰岛素-转铁蛋白-硒(ITS);1×亚油酸-牛血清白蛋白(LA-BSA);10<sup>-9</sup>M 地塞米松(例如来自 Sigma);10<sup>-4</sup>M 抗坏血酸 2-磷酸盐(例如来自 Sigma);表皮生长因子 10ng/mL(例如来自 R&D Systems);和血小板来源的生长因子(PDGF-BB)10ng/mL(例如来自 R&D Systems)的培养基中培养约 3 至约 35 个群倍增时表达所述一种或多种基因。在一个具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞-特异的或分离的脐带细胞-特异的基因为 CD200。

[0124] 这些基因的特定序列可在 GenBank 中找到,登录号为 2008 年 3 月的 NM\_001615(ACTG2)、BC065545(ADARB1)、(NMJ81847(AMIG02)、AY358590(ARTS-I)、BC074884(B4GALT6)、BC008396(BCHE)、BC020196(C11orf9)、BC031103(CD200)、NM\_001845(COL4A1)、NM\_001846(COL4A2)、BC052289(CPA4)、BC094758(DMD)、AF293359(DSC3)、NM\_001943(DSG2)、AF338241(ELOVL2)、AY336105(F2RL1)、NMJ18215(FLJ10781)、AY416799(GATA6)、BC075798(GPR126)、NM\_016235(GPCR5B)、AF340038(ICAM1)、BC000844(IER3)、BC066339(IGFBP7)、BC013142(IL1A)、BT019749(IL6)、BC007461(IL18)、(BC072017)KRT18、BC075839(KRT8)、BC060825(LIPG)、BC065240(LRAP)、BC010444(MATN2)、BC011908(MEST)、BC068455(NFE2L3)、NMJH4840(NUAK1)、AB006755(PCDH7)、NM\_014476(PDLIM3)、BC126199(PKP-2)、BC090862(RTN1)、BC002538(SERPINB9)、BC023312(ST3GAL6)、BC001201(ST6GALNAC5)、BC126160

或 BC065328 (SLC12A8)、BC025697 (TCF21)、BC096235 (TGFB2)、BC005046 (VTN) 和 BC005001 (ZC3H12A)。

[0125] 在更具体的实施方案中,当在同等条件下培养时,所述分离的胎盘细胞以比等量骨髓来源的间充质干细胞以可检测的更高水平表达 ACTG2、ADARB1、ARTS-I、B4GALT6、BCHE、C1Iorf9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPRC5B、ICAM1、IER3、IGFBP7、IL1A、IL6、IL18、KRT18、KRT8、LIPG、LRAP、MATN2、MEST、NFE2L3、NUAK1、PCDH7、PDLIM3、PKP2、RTN1、SERPINB9、ST3GAL6、ST6GALNAC5、SLC12A8、TCF21、TGFB2、VTN 和 ZC3H12A 中的每一种。

[0126] 上述参照基因的表达可通过标准技术评估。例如,可通过常规方法选择和构建基于基因序列的探针。基因表达可例如在包括一种或多种所述基因的探针的微阵列上评估,例如 Affymetrix GENECHIP® Human Genome U133A 2.0 阵列或 Affymetrix GENECHIP® Human Genome U133 Plus 2.0 (Santa Clara, California)。由于所述修正序列的特异性探针可利用熟知的标准技术很容易地得到,因此即使具体 GenBank 登录号的序列被修正也可以评估这些基因的表达。

[0127] 这些基因的表达水平可用于证实分离的胎盘细胞群的同源性,鉴定至少包含多个分离的胎盘细胞的细胞群等等。同源性已经被证实的分离的胎盘细胞群,可以是克隆的,例如扩增自单个分离的胎盘细胞的分离胎盘细胞群,或混合的干细胞群,例如包含扩增自多个分离的胎盘细胞的分离的胎盘细胞的细胞群,或包含此处所述的分离的胎盘细胞和至少一种其他类型细胞的细胞群。

[0128] 这些基因的表达水平可用于选择分离的胎盘细胞群。例如,如果一种或多种上列基因在来自所述细胞群的样品中的表达明显高于等量间充质干细胞群的样品,则可以选择该细胞群,如克隆-扩增的细胞。所述选择可以来自多个分离的胎盘细胞群、来自多个细胞群,其同源性未知等。

[0129] 可在比较一种或多种所述基因的表达水平与例如在间充质干细胞对照中所述一种或多种基因的表达水平,例如在等量骨髓来源的间充质干细胞中所述一种或多种基因的表达水平的基础上选择分离的胎盘细胞。在一个实施方案中,包含等量间充质干细胞的样品中所述一种或多种基因的表达水平用作对照。在另一个实施方案中,对于在一定条件下检测的分离的胎盘细胞,其对照为代表在所述条件下间充质干细胞中所述一种或多种基因表达水平的数值。

[0130] 此处所述的分离的胎盘细胞在原代培养或培养基中增殖期间呈现上述特性(例如细胞表面标记和/或基因表达谱的组合),所述培养基包含,例如 DMEM-LG (Gibco); 2% 胎牛血清(例如来自 Hyclone Labs.); 1× 胰岛素-转铁蛋白-硒 (ITS); 1× 亚油酸-牛血清白蛋白 (LA-BSA);  $10^{-9}$ M 地塞米松 (Sigma);  $10^{-4}$ M 抗坏血酸 2-磷酸盐 (Sigma); 表皮生长因子 10ng/mL (R&D Systems); 和血小板来源的生长因子 (PDGF-BB) 10ng/mL (R&D Systems) 和 100U 青霉素 / 1000U 链霉素。

[0131] 在所述分离的胎盘细胞或包含所述分离的胎盘细胞的细胞群另外具体的实施方案中,所述细胞或群已扩增例如传代至少约或不超过 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 次,或增殖至少约或不超过 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38 或 40 次群倍增。在此处公开的分离的胎盘细胞或

包含分离的胎盘细胞的细胞群另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞为胎儿来源的(即具有胎儿基因型)。

[0132] 在分离的胎盘细胞的某些实施方案中,所述分离的胎盘细胞在生长培养基(即配制以促进增殖的培养基)中的培养期间,例如在生长培养基中的增殖期间通常不分化。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞不需要滋养层以增殖。在另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞仅由于没有饲养细胞层而在培养时不分化。

[0133] 在另一个实施方案中,可用于脑或 CNS 中或周围血流破坏治疗的细胞为分离的胎盘细胞,如通过醛脱氢酶活力测定法评估的,其中多个所述分离的胎盘细胞为醛脱氢酶(ALDH)阳性。所述测定法为本领域已知(参见例如 Bostian 和 Betts, *Biochem. J.*, 173, 787, (1978))。在一个具体的实施方案中,所述 ALDH 测定法利用 ALDEFLUOR® (Aldagen, Inc., Ashland, Oregon) 作为醛脱氢酶活力标记。在一个具体的实施方案中,所述细胞群中的所述多个在约 3% 和约 25% 细胞之间。在另一个实施方案中,此处提供了分离的脐带细胞群,例如多能的分离脐带细胞,如通过利用 ALDEFLUOR® 作为醛脱氢酶活力指标的醛脱氢酶活力测定法评估的,其中多个所述分离的脐带细胞为醛脱氢酶阳性。在一个具体的实施方案中,所述细胞群中的所述多个在约 3% 和约 25% 细胞之间。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞或分离的脐带细胞群显示比具有大致相等量和同样的条件下培养的骨髓来源的间充质干细胞的 ALDH 活力高至少三倍或至少五倍。

[0134] 在包含此处所述分离的胎盘细胞的任何细胞群的某些实施方案中,所述细胞群中的胎盘细胞基本上没有具有母体基因型的细胞;例如所述群中至少 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 的胎盘细胞具有胎儿基因型。在包含此处所述分离的胎盘细胞的任何细胞群的某些其他实施方案中,包含胎盘细胞的所述细胞群基本上没有具有母体基因型的细胞;例如所述群包括至少 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 的细胞具有胎儿基因型。

[0135] 在任何上述分离的胎盘细胞或分离的胎盘细胞细胞群的具体实施方案中,所述细胞的核型或所述群中至少约 95% 或约 99% 的细胞核型是正常的。在任何上述胎盘细胞或细胞群另外具体的实施方案中,所述细胞或所述细胞群中的细胞为非母体来源的。

[0136] 带有任何上述标记组合的分离的胎盘细胞或分离的胎盘细胞群可以任何比例组合。任何两种或多种上述分离的胎盘细胞群可组合形成分离的胎盘细胞群。例如,分离的胎盘细胞群可包含通过如上所述的一种标记组合定义的第一种分离的胎盘细胞群,和通过如上所述的另一种标记组合定义的第二种分离的胎盘细胞群,其中所述第一种细胞群和第二种细胞群以约 1 : 99、2 : 98、3 : 97、4 : 96、5 : 95、10 : 90、20 : 80、30 : 70、40 : 60、50 : 50、60 : 40、70 : 30、80 : 20、90 : 10、95 : 5、96 : 4、97 : 3、98 : 2 或约 99 : 1 的比例组合。以类似的方式,可获得任何三种、四种、五种或以上上述分离的胎盘细胞或分离的胎盘细胞群组合。

[0137] 可用于脑或 CNS 中或周围血流破坏治疗的分离的胎盘细胞可例如通过用或不用酶促消化(参见 5.5.3 章节)或灌流(参见 5.5.4 章节)破坏胎盘组织而获得。例如,分离的胎盘细胞群可以通过以下方法制备,该方法包括包括灌流已排干脐带血且已被灌流以除去残余血液的哺乳动物胎盘;用灌流液灌流所述胎盘;并且收集所述灌流液,其中灌流后所述灌流液包括包含分离的胎盘细胞的胎盘细胞群;并且从所述细胞群分离多个所述分

离的胎盘细胞。在一个具体的实施方案中,所述灌流液通过脐静脉和脐动脉并且在其从所述胎盘缓慢流出后收集。在另外具体的实施方案中,所述灌流液通过脐静脉并且从脐动脉收集,或通过脐动脉并且从脐静脉收集。

[0138] 在不同的实施方案中,含于胎盘灌流获得的细胞群内的所述分离的胎盘细胞为所述胎盘细胞群中的至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%、99% 或至少 99.5%。在另外具体的实施方案中,通过灌流收集的所述分离的胎盘细胞包含胎儿细胞和母体细胞。在另外具体的实施方案中,通过灌流收集的所述分离的胎盘细胞为至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%、99% 或至少 99.5% 的胎儿细胞。

[0139] 在另外具体的实施方案中,此处提供了包含如此处所述通过灌流收集的分离的胎盘细胞群的组合物,其中所述组合物包含至少一部分用于收集所述分离的胎盘细胞的灌流液。

[0140] 此处所述的分离胎盘细胞的分离群可通过以下方法制备:组织-分裂酶消化胎盘组织以获得包含所述细胞的胎盘细胞群,并且从其余胎盘细胞分离或基本上分离多个所述胎盘细胞。可消化整个或胎盘任一部分以获得此处所述的分离的胎盘细胞。在具体的实施方案中,例如所述胎盘组织可以是整个胎盘、羊膜、绒毛膜、羊膜和绒毛膜的组合或任何上述的组合。在其他具体的实施方案中,所述组织-分裂酶为胰蛋白酶或胶原酶。在不同的实施方案中,包含在消化胎盘而获得的细胞群内的所述分离的胎盘细胞为所述胎盘细胞群的至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%、99% 或至少 99.5%。

[0141] 如上所述胎盘细胞的分离群和分离的胎盘细胞群通常可包含大约至少或不超过  $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$  或更多所述分离的胎盘细胞。可用于此处所述治疗方法的分离的胎盘细胞群包含至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 如通过例如台盼蓝排除测定的存活的分离的胎盘细胞。

[0142] 5.4.3 培养生长

[0143] 对于任何哺乳动物细胞,5.4.2 节所述的分离的胎盘细胞的生长在某种程度上取决于选择用于生长的具体培养基。在最佳条件下,所述分离的胎盘细胞通常在约 1 天中数量倍增。在培养期间,此处所述分离的胎盘细胞粘附于培养底物,例如组织培养容器的表面(例如组织培养平皿塑料制品、纤连蛋白-涂布的塑料制品等等)并且形成单细胞层。

[0144] 当包含此处所述分离的胎盘细胞的胎盘细胞群在合适的条件下培养时,可形成胚样体,即在贴壁细胞层顶上的细胞培养物的立体团。胚样体内的细胞表达与早期干细胞有关的标记,例如 OCT-4、Nanog、SSEA3 和 SSEA4。胚样体内的细胞通常不像此处所述的分离的胎盘细胞那样粘附培养底物,但在培养期间仍然附着于贴壁细胞。胚样体细胞依赖于分离的贴壁胎盘细胞而存活,因为在不存在分离的贴壁胎盘细胞时不形成胚样体。分离的贴壁胎盘细胞因此促进包含所述分离的贴壁胎盘细胞的胎盘细胞群中一种或多种胚样体的生长。不希望受理论限制,认为与胚胎干细胞在滋养层细胞上生长一样,胚样体细胞在分离的贴壁胎盘细胞上生长。

[0145] 5.5 获得分离的胎盘细胞的方法

[0146] 5.5.1 干细胞收集组合物

[0147] 此处进一步提供收集和分离胎盘细胞的方法,例如分离以上 5.4.2 节所述的分离



的胎盘细胞的方法。通常,所述细胞利用生理学可接受的溶液,例如细胞收集组合物,从哺乳动物胎盘获得。示例性细胞收集组合物在相关美国专利申请公开号 2007/0190042 中详细描述,名为“Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs”,其公开内容在此全文引入作为参考。

[0148] 所述细胞收集组合物可包含适于例如此处所述分离的胎盘细胞的细胞收集和/或培养的任何生理学可接受的溶液,例如盐溶液(例如磷酸缓冲盐溶液、Kreb' s 溶液、改进的 Kreb' s 溶液、Eagle' s 溶液、0.9% NaCl 等等)、培养基(例如 DMEM、H. DMEM 等等)等。

[0149] 所述细胞收集组合物可包含有助于保存分离的胎盘细胞的一种或多种组分,即在细胞收集至培养期间防止所述分离的胎盘细胞死亡或延缓所述分离的胎盘细胞死亡、减少细胞群中分离的胎盘细胞的死亡数等等。所述组分可以是例如凋亡抑制剂(例如级联抑制剂或 JNK 抑制剂);血管扩张剂(例如硫酸镁、抗高血压药物、心房利钠肽(ANP)、促肾上腺皮质激素、促肾上腺皮质激素-释放因子、硝普钠盐、胍苯哒嗪、腺苷三磷酸盐、腺苷、消炎痛或硫酸镁、磷酸二酯酶抑制剂等等);坏死抑制剂(例如 2-(1H-咪唑-3-基)-3-戊胺基-马来酰亚胺、吡咯烷二硫代氨基甲酸盐或氯硝西洋);TNF- $\alpha$  抑制剂和/或携氧全氟化碳(例如全氟溴辛烷、全氟溴癸烷等等)。

[0150] 所述细胞收集组合物可包含一种或多种组织降解酶,例如金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、中性蛋白酶、核糖核酸酶或脱氧核糖核酸酶等等。所述酶包括,但不限于胶原酶(例如胶原酶 I、II、III 或 IV、来自溶组织梭状芽孢杆菌的胶原酶等等);分散酶、嗜热菌蛋白酶、弹性蛋白酶、胰蛋白酶、释放酶、透明质酸酶等等。

[0151] 所述细胞收集组合物可包含杀菌或抑菌有效量的抗生素。在某些非限制性实施方案中,所述抗生素为大环内酯(例如,托普霉素)、头孢菌素(例如,头孢氨苄、头孢拉定、头孢呋辛、头孢丙烯、头孢克洛、头孢克肟或头孢羟氨苄)、克拉霉素、红霉素、青霉素(例如,青霉素 V)或喹诺酮类(例如,氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星)、四环素、链霉素等等。在具体的实施方案中,所述抗生素对革兰氏(+)和/或革兰氏(-)细菌有效,例如铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌等等。在一个实施方案中,所述抗生素为庆大霉素,例如培养基中约 0.005%至约 0.01% (w/v)。

[0152] 所述细胞收集组合物还可以包含一种或多种下列化合物:腺苷(约 1mM 至约 50mM);右旋葡萄糖(约 20mM 至约 100mM);镁离子(约 1mM 至约 50mM);分子量大于 20,000 道尔顿的大分子,在一个实施方案中,以足以维持内皮完整性和细胞存活力的量存在(例如以约 25g/l 至约 100g/l 或约 40g/l 至约 60g/l 存在的合成或天然存在的胶质、多糖如葡聚糖或聚乙二醇);抗氧化剂(例如以约 25  $\mu$ M 至约 100  $\mu$ M 存在的丁羟基大茴香醚、二丁羟基甲苯、谷胱甘肽、维生素 C 或维生素 E);防止钙进入细胞的制剂(例如以约 2  $\mu$ M 至约 25  $\mu$ M 存在的异搏定);硝酸甘油(例如约 0.05g/L 至约 0.2g/L);抗凝血剂,在一个实施方案中,以足以防止残余血液凝固的量存在(例如以约 1000 单位/l 至约 100,000 单位/l 的浓度存在的肝素或水蛭素);或含有化合物(例如以约 1.0  $\mu$ M 至约 5  $\mu$ M 存在的氨氯吡啶、乙基异丙基氨氯吡啶、环己烷氨氯吡啶、二甲基氨氯吡啶或异丁基氨氯吡啶)的氨氯吡啶。

[0153] 5.5.2 胎盘的收集和处理

[0154] 通常,在出生排出后立即回收人胎盘。在优选的实施方案中,在告知患者同意并采

集与胎盘相关的完整医疗史后,从患者处回收胎盘。优选的,在分娩后继续记录医疗史。此类医疗史可用于调整胎盘或从其收获的干细胞的收获后的应用。例如,根据医疗史,人胎盘干细胞可用于与胎盘相关的婴儿、或用于所述婴儿的父母、兄弟姐妹或其他亲戚的个人化药物。

[0155] 在回收胎盘干细胞之前,优选去除脐带血和胎盘血。在某些实施方案中,在分娩后回收胎盘中的脐带血。所述胎盘可以采用常规的脐带血回收方法。一般使用针头或插管,在重力帮助下,将胎盘放血(参见例如:Anderson,美国专利号 5,372,581;Hessel 等人,美国专利号 5,415,665)。所述针头或插管通常置于脐静脉内,并且可以轻轻地按揉胎盘帮助从胎盘中排出脐带血。可以商业方式来实施此类脐带血回收,例如 LifeBank USA, Cedar Knolls, NJ。优选地,对所述胎盘通过重力来放血而不进行其他操作,从而使脐带血回收过程中的组织破坏最小化。

[0156] 典型地,胎盘从分娩室或初生室转移至另一地点,例如实验室,用于脐带血回收和干细胞收集,例如,通过灌流或组织解离。所述胎盘优选在无菌的、保温的转移装置(维持胎盘温度在 20-28°C)中转移,例如,将脐带近端夹紧的胎盘放置在无菌、夹拉链封闭的塑料袋中,然后将其放置在保温容器内。在另一个实施方案中,所述胎盘在实质上如未决美国专利申请号 7,147,626 中描述的脐带血收集试剂盒中转移,其公开内容在此引入作为参考。优选地,在分娩后 4 至 24 小时将胎盘递送至实验室。在某些实施方案中,在脐带血回收前,夹紧脐带近端,优选在插入胎盘的 4-5cm(厘米)内。在其他实施方案中,在脐带血回收后但是在胎盘的进一步处理前夹紧近端脐带。

[0157] 在收集干细胞前,可以将胎盘储存在无菌条件下,并储存在室温或者 5 至 25°C(摄氏度)的温度下。所述胎盘可以在灌流胎盘以去除任何残留的脐带血前储存 4 至 24 小时,甚至 48 小时或更长时间。在一个实施方案中,在排出脐带血后约 0 小时至约 2 小时内收集所述胎盘。所述胎盘优选在 5 至 25°C 下储存在抗凝剂溶液中。合适的抗凝剂溶液是本领域公知的。例如,可以使用肝素或华法令钠(warfarin sodium)溶液。在优选的实施方案中,所述抗凝剂溶液含有肝素溶液(例如,在 1:1000 溶液中 1% w/w)。在收集胎盘干细胞前,放血的胎盘优选储存不超过 36 小时。

[0158] 一旦按照上述一般性方法收集和制备,哺乳动物胎盘或其部分可以按照本领域已知的任何方法处理,例如,可以被灌流或解离,如用一种或多种组织解离酶来解离,以获得干细胞。

### [0159] 5.5.3 胎盘组织的物理解离和酶促消化

[0160] 在一个实施方案中,通过物理解离部分或全部器官,从哺乳动物胎盘中收集干细胞。例如,可以将胎盘或其部分压碎(crush)、剪碎(shear)、绞碎(mince)、切块(dice)、切细(chop)、浸软(macerate)等。随后可培养所述组织以获得分离的胎盘细胞群。通常,所述胎盘组织利用例如培养基、盐溶液或干细胞收集组合物解离(参见 5.5.1 节及以下)。

[0161] 在物理解离和/或酶促消化和干细胞回收前,所述胎盘可以被分割成多个部分。可以从羊膜、绒毛膜、脐带、胎盘绒毛叶的全部或部分或其任何组合,包括从整个胎盘获得胎盘干细胞。优选地,分离的胎盘细胞获自包含羊膜和绒毛膜的胎盘组织。一般的,分离的胎盘细胞可以通过将胎盘组织解离为小块来获得,例如胎盘组织块的体积是约 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。任何物理解离的方法均可以使用,只要通过如台盼蓝排除测定的,所述解离方法能使所述器官中多数,更优选的大多数,更优选的至少 60%、70%、80%、90%、95%、98%或 99%的细胞存活。

[0162] 所述分离的贴壁胎盘细胞通常可在排出后约三天内,但优选在排出后约 8 小时和约 18 小时内的任何时候从胎盘或其部分收集。

[0163] 在一个具体的实施方案中,所述解离的组织在适于分离的胎盘细胞增殖的组织培养基中培养(参见例如以下 5.6 节,描述胎盘干细胞的培养)。

[0164] 在另外具体的实施方案中,分离的胎盘细胞通过胎盘组织的物理解离收集,其中所述物理解离包括酶促消化,其可通过利用一种或多种组织消化酶来完成。胎盘或其部分还可以被物理的解离,并用一种或多种酶消化,然后将获得的材料浸入细胞收集组合物或与细胞收集组合物混合。

[0165] 优选的细胞收集组合物包含一种或多种组织解离酶。可用于裂解胎盘组织的酶包括木瓜蛋白酶、脱氧核糖核酸酶、丝氨酸蛋白酶如胰蛋白酶、糜蛋白酶、胶原酶、分散酶或弹性蛋白酶。丝氨酸蛋白酶可被血清中的  $\alpha 2$  微球蛋白所抑制,因此用于消化的介质通常是无血清的。在酶促消化过程中通常使用 EDTA 和 DNA 酶来提高细胞回收的效率。消化物优选被稀释从而避免细胞陷入粘稠的消化物中。

[0166] 可使用任何组织酶切酶的组合。胰蛋白酶的酶切消化典型浓度包括 0.1%至约 2%胰蛋白酶,例如约 0.25%胰蛋白酶。可以组合使用蛋白酶,即在同一消化反应中使用两种或多种蛋白酶,或者可以按顺序相继使用两种或多种蛋白酶,从而释放胎盘细胞,例如胎盘干细胞和胎盘多能细胞。例如,在一个实施方案中,胎盘或其部分首先用合适量的 I 型胶原酶按约 1 至约 2mg/ml 消化例如 30 分钟,然后用 0.25%的胰蛋白酶例如在 37°C 消化 10 分钟。丝氨酸蛋白酶优选在使用其它酶后再连续使用。

[0167] 在另一个实施方案中,在从干细胞收集组合物中分离干细胞之前,向含有干细胞的干细胞收集组合物,或者向在其中解离和/或消化组织的溶液中添加螯合剂来进一步解离组织,所述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)。

[0168] 酶切消化后,消化物例如用培养基洗涤三次,并且将洗涤的细胞接种入培养瓶中。随后通过差异粘附分离细胞,并且鉴定其存活力、细胞表面标记、分化等等。

[0169] 可以理解,当整个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叶)时,分离的胎盘干细胞将包含来源于胎儿和母体源的胎盘细胞的混合物。当胎盘的部分不含有或只含有可忽略量的母体细胞(例如,羊膜)时,从其中分离的胎盘细胞将几乎只含有胎儿的胚胎细胞(即具有胎儿基因型的胎盘细胞)。

[0170] 胎盘细胞,例如以上 5.4.2 节所述的胎盘细胞可通过差异胰蛋白酶消化(参见以下 5.5.5 节)从解离的胎盘组织分离,随后在新鲜增殖培养基中在一种或多种新的培养容器中培养,任选随后进行第二次差异胰蛋白酶消化步骤。

[0171] 5.5.4 胎盘灌流

[0172] 胎盘细胞,例如以上 5.4.2 节所述的胎盘细胞还可以通过灌流哺乳动物胎盘而获得。灌流哺乳动物胎盘以获得胎盘细胞的方法公开在例如 Hariri,美国专利号 7,045,148 和 7,255,729 中,和美国专利申请公开号 2007/0275362 和 2007/0190042 中,每篇的公开内

容在此整体引入作为参考。

[0173] 可以利用例如细胞收集组合物作为灌流液,通过灌流例如胎盘脉管系统来收集胎盘细胞。在一个实施方案中,通过使灌流液流经脐动脉和 / 或脐静脉来灌流哺乳动物胎盘。可以利用如重力流入胎盘来实现灌流液在胎盘中的流动。优选地,利用泵,例如蠕动泵,来迫使灌流液流经胎盘。例如,可以用套管,如TEFLON®或塑料套管对脐静脉进行插管,所述套管与无菌的连接装置,如无菌管道相连。无菌的连接装置与灌流歧管相连。

[0174] 在准备灌流中,胎盘优选按脐动脉和脐静脉位于胎盘最高点的方式来定位(如,悬挂)。可以通过使灌流液在胎盘脉管系统或在胎盘脉管系统和相邻组织中的流过来灌流胎盘。所述胎盘还可以通过使灌流液流经脐静脉并从脐动脉收集,或者流经脐动脉并从脐静脉收集而灌流。

[0175] 在一个实施方案中,脐动脉和脐静脉同时连接移液器,所述移液器通过可变的连接管与灌流液的储器相连。所述灌流液流入脐静脉和动脉。所述灌流液渗出和 / 或流经血管壁进入胎盘的周围组织,并从在孕期附着于母体子宫上的胎盘表面合适的开放脉管中收集。所述灌流液还可以通过脐带开口导入,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。通过可称为“盘式”法(pan method)的方法收集的胎盘细胞通常为胎儿和母体细胞的混合物。

[0176] 在另一个实施方案中,所述灌注溶液通过脐静脉并且从脐动脉收集,或通过脐动脉并且从脐静脉收集。通过可称为“闭合回路”法的方法收集的胎盘细胞通常几乎只有胎儿细胞。

[0177] 可以理解,利用盘式法灌流获得的是胎儿和母体细胞的混合物,即通过该方法,灌流液在其从胎盘的母体侧渗出后被收集。结果,通过该方法收集的细胞包含混合的胎儿和母体来源的胎盘细胞,例如胎盘干细胞或胎盘多能细胞群。相反,仅通过紧密回路方法中的胎盘脉管系统灌流,因为灌流液流经一根或两根胎盘血管,并仅通过剩余的血管收集,将导致胎盘细胞群的收集物几乎都是胎儿来源的。

[0178] 在一个实施方案中,可如下进行所述紧密回路灌流方法。在分娩后约 48 小时内获得产后胎盘。夹紧脐带并且在夹子上割断。脐带可丢弃或处理回收例如脐带干细胞和 / 或处理所述脐带膜用于生产生物材料。灌流期间可保留羊膜,或可例如利用手指直接剖开而从绒毛膜分离。如果所述羊膜在灌流之前从绒毛膜分离,其可例如丢弃或通过酶促消化处理以获得干细胞,或生制备例如羊膜生物材料,如美国申请公开号 2004/0048796 中所述的生物材料,其公开内容在此全文引入作为参考。在例如利用无菌纱布清理胎盘全部可见的血块和残余血液后,如通过部分切割脐带膜以暴露脐带横截面而暴露脐带血管。辨别血管,并通过例如推进经过每一血管切割端的闭合弹簧打开血管。装置,例如连接至灌流装置或蠕动泵的塑料管材,随后被插入每一胎盘动脉中。泵可以是适于所述目的的任何泵,例如蠕动泵。连接至无菌收集贮存器的塑料管状物,例如 250mL 收集袋的血袋,随后被插入胎盘静脉中。或者,连接至泵的管状物被插入胎盘静脉中,并且连接至收集贮存器的管被插入一条或两条胎盘动脉中。胎盘随后用大量灌流液灌流,例如约 750mL 灌流液。随后例如通过离心收集灌流液中的细胞。在某些实施方案中,所述胎盘用灌流液灌流,例如 100-300mL 灌流液,以在灌流收集胎盘细胞(如胎盘干细胞和 / 或胎盘多能细胞)之前除去残余血液。在另一个实施方案中,所述胎盘在灌流收集胎盘细胞之前不用灌流液灌流以除去残余血液。

[0179] 在一个实施方案中,在灌流过程中夹紧脐带近端,更优选,在脐带插入胎盘的4-5cm(厘米)内夹紧。

[0180] 在放血过程中从哺乳动物胎盘首先收集的灌流液一般都被脐带血和/或胎盘血残留的血红细胞着色。随着灌流继续和残留的脐带血细胞从胎盘中洗出,灌流液颜色变得越来越浅。一般30至100mL(毫升)灌流液足以初步将胎盘放血,但根据观察的结果可以使用或多或少的灌流液。

[0181] 用于收集胎盘干细胞的灌流液体积可以根据收集的干细胞数量、胎盘大小、对单个胎盘进行的收集次数等变化。在不同的实施方案中,灌流液的体积可以选自50mL至5000mL、50mL至4000mL、50mL至3000mL、100mL至2000mL、250mL至2000mL、500mL至2000mL、或750mL至2000mL。一般的,在放血后用700-800mL灌流液来灌流胎盘。

[0182] 胎盘可以在数小时或数天的过程中进行多次灌流。当胎盘进行多次灌流时,可以在容器或其它合适的器皿中在无菌条件下维持或培养,并用细胞收集组合物或标准灌流液(例如,普通的盐溶液如磷酸盐缓冲液(“PBS”)灌流,其中含有或不含抗凝剂(如,肝素、华法令钠、香豆素、双香豆素),和/或含有或不含抗微生物剂(如, $\beta$ -巯基乙醇(0.1mM);抗生素如链霉素(如40-100 $\mu$ g/ml)、青霉素(如40U/ml)、两性霉素B(如0.5 $\mu$ g/ml))。在一个实施方案中,将分离的胎盘维持或培养一段时间而没有收集灌流液,从而所述胎盘在灌流和收集灌流液前,被维持或培养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个小时,或者2或3或更多天。灌流的胎盘可以被维持用于再进行一次或多次灌流,例如,再维持1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或更多个小时,并用如700-800mL灌流液再灌流第二次。所述胎盘可以灌流1、2、3、4、5或更多次,例如每1、2、3、4、5或6小时一次。在优选的实施方案中,重复灌流胎盘和收集灌流液(如细胞收集组合物),直至回收的有核细胞数低于100细胞/ml。对不同时间点的灌流液可以分别进一步处理,以回收时间依赖性的细胞群,如干细胞。不同时间点的灌流液也可以被混合。在优选的实施方案中,在放血后约8小时和约18个小时之间一次或多次收集胎盘细胞。

[0183] 优选的,灌流导致获得的胎盘干细胞数量显著多于从未用所述溶液灌流或者未经其它处理(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干细胞数量。在本文的上下文中,“显著多于”是指至少多10%。灌流产生的胎盘干细胞显著多于例如,从培养胎盘或一部分胎盘的培养基中可分离的胎盘细胞数量。

[0184] 通过用包含一种或多种蛋白酶或其他组织解离酶的溶液灌流,可以从胎盘中分离胎盘细胞。在具体的实施方案中,将胎盘或其一部分(例如,羊膜、羊膜和绒毛膜、胎盘小叶或绒毛小叶、脐带或任何上述的组合)置于25-37 $^{\circ}$ C,并在200mL培养基中用一种或多种组织解离酶孵育30分钟。收集灌流液中的细胞,降低温度至4 $^{\circ}$ C,并用包含5mM EDTA、2mM 二硫苏糖醇和2mM  $\beta$ -巯基乙醇的冷却抑制剂混合物洗涤。数分钟后,用冷却的(如4 $^{\circ}$ C)干细胞收集组合物洗涤所述胎盘细胞。

[0185] 5.5.5 胎盘细胞的分离、分选和表征

[0186] 分离的胎盘细胞,例如以上5.4.2节所述的细胞,不论是否由灌流或物理解离(如通过酶促消化)获得的,可以通过聚蔗糖(Ficoll)梯度离心从其它细胞中初步纯化(即分离)。此类离心可以遵循任何标准离心方法的速度等。例如,在一个实施方案中,从胎盘收集

的细胞是通过在  $5000 \times g$  室温离心 15 分钟从灌流液中回收的, 其将细胞与例如污染的残渣和血小板分离开。在另一个实施方案中, 胎盘灌流液被浓缩至约 200mL, 轻轻地铺在 Ficol1 上, 在  $22^{\circ}\text{C}$  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。

[0187] 细胞沉淀可重悬于新鲜的干细胞收集组合物中, 或适合维持干细胞的培养基中, 例如含有 2U/ml 肝素和 2mM EDTA 的 IMDM 无血清培养基 (GibcoBRL, NY)。可以利用例如 LYPHOPREP® (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。

[0188] 通过灌流或消化获得的胎盘细胞, 例如, 可以采用, 如含有 0.2% EDTA (Sigma, St. Louis MO) 的 0.05% 胃蛋白酶溶液, 通过差异胰酶消化来进一步或初步地分离。由于分离的胎盘细胞一般在约 5 分钟内从塑料表面脱离, 而其它附着的群一般需要孵育超过 20-30 分钟才从塑料表面脱离, 因此差异胰酶消化是可能的。在胰酶消化和利用例如胰蛋白酶中和溶液 (TNS, Cambrex) 的胰蛋白酶中和后, 可以收获脱离的胎盘细胞。在分离附着细胞的一个实施方案中, 等份的细胞, 如  $5 \times 10^6$  个细胞被放置在每个 T-75 瓶中, 优选纤连蛋白包被的 T75 瓶中。在这样的实施方案中, 所述细胞可以用商购的间充质干细胞生长培养基 (MSCGM) (Cambrex) 培养, 并且置于组织培养箱 ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) 中。在 10-15 天后, 通过用 PBS 洗涤从瓶中去除非附着细胞。然后用 MSCGM 替代 PBS。优选每天检查培养瓶中不同附着细胞类型的存在, 并且特别的鉴别和扩增成纤维样细胞簇。

[0189] 从哺乳动物胎盘中收集的细胞数量和类型可以被监测: 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、免疫细胞化学 (例如, 用组织特异性或细胞标志特异性抗体染色)、荧光活化细胞分选 (FACS)、磁性活化细胞分选 (MACS) 来测量细胞的表面标记和形态学; 通过利用光学或共聚焦显微镜来检测细胞形态学; 和 / 或利用本领域公知的技术, 例如 PCR 和基因表达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  $\text{CD34}^+$ 。同时, 如果细胞产生足够的能被 RT-PCR 所检测的 OCT-4RNA, 或者显著多于成体细胞的 OCT-4RNA, 则该细胞是  $\text{OCT-4}^+$ 。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。

[0190] 胎盘细胞, 特别是已经经过 Ficol1 分离、差别附着, 或两者的结合所分离的细胞可以利用荧光活化细胞分选仪 (FACS) 来分选。荧光活化细胞分选 (FACS) 是基于颗粒的荧光性质来分离颗粒 (包括细胞) 的普遍已知的方法 (Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151:150-165)。激光激发单个颗粒中的荧光部分产生微小的电荷, 从而允许从混合物中电磁分离正电颗粒和负电颗粒。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抗体或配体。细胞经过细胞分选仪处理, 从而可以基于其与所用抗体的结合能力来分离细胞。FACS 分选的颗粒可以直接注入 96-孔或 384-孔板的单个孔中, 从而便于分离和克隆。

[0191] 在一个分选技术方案中, 来源于胎盘的干细胞基于标记 CD34、CD38、CD44、CD45、CD73、CD105、OCT-4 和 / 或 HLA-G 的表达来分选。这可以结合基于细胞在培养中的附着性质来选择细胞的步骤来实现。例如, 可以在基于标记表达的分选之前或之后进行组织培养塑料制品附着选择。例如, 在一个实施方案中, 首先基于 CD34 的表达来分选细胞; 保留  $\text{CD34}^-$  的细胞, 并将  $\text{CD200}^+\text{HLA-G}^+$  的细胞与所有其它  $\text{CD34}^-$  细胞分离。在另一个实施方案

中,基于标记 CD200 和 / 或 HLA-G 的表达来分选来源于胎盘的细胞;例如,表现出任一这些标记的细胞被分离以供进一步使用。在具体实施方案中,表达例如 CD200 和 / 或 HLA-G 的细胞可以进一步被分选,所述分选可以基于 CD73 和 / 或 CD105 的表达,或基于体 SH2、SH3 或 SH4 识别的表位,或基于 CD34、CD38 或 CD45 的表达的缺失。例如,在一个实施方案中,胎盘细胞通过 CD200、HLA-G、CD73、CD105、CD34、CD38 和 CD45 的表达或其缺失来分选,并且将 CD200<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup>、CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup> 和 CD45<sup>-</sup> 的细胞与其它胎盘细胞分离,供进一步使用。

[0192] 在任何上述分选胎盘细胞的实施方案的具体实施方案中,分选后保留的细胞群中至少 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 的细胞为所述分离的胎盘细胞。可通过以上 5.4.2 节所述的一种或多种任何标记分选胎盘细胞。

[0193] 在一个具体的实施方案中,从其他胎盘细胞中分选(即分离)(1)附着于组织培养塑料制品,和(2)CD10<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>和CD105<sup>+</sup>的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,从其他胎盘细胞分选(即分离)(1)附着于组织培养塑料制品,和(2)CD10<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup>和CD200<sup>+</sup>的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,从其他胎盘细胞分选(即分离)(1)附着于组织培养塑料制品,和(2)CD10<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD90<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>和CD200<sup>+</sup>的胎盘细胞。

[0194] 对于抗体-介导的胎盘细胞(例如胎盘干细胞或胎盘多能细胞)的检测和分选,可与适于检测和分选细胞的任何荧光团或其他标记物(例如荧光-活化细胞分选)结合,使用对特定标记特异性的任何抗体。特异性标记的抗体/荧光组合包括,但不限于与荧光素异硫氰酸酯(FITC)偶联的HLA-G(获自Serotec, Raleigh, North Carolina)、CD10(获自BD Immunocytometry Systems, San Jose, California)、CD44(获自BD Biosciences Pharmingen, San Jose, California)和CD 105(获自R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota)单克隆抗体;与藻红蛋白(PE)偶联的CD44、CD200、CD117和CD 13(BD Biosciences Pharmingen)单克隆抗体;与别藻蓝蛋白(APC)偶联的链亲和素和CD38单克隆抗体(BDBiosciences Pharmingen);和生物素化的CD90(BD Biosciences Pharmingen)。可用的其他抗体包括,但不限于,CD133-APC(Miltenyi)、KDR<sup>-</sup>Biotin(CD309, Abeam)、细胞角蛋白K-Fitc(Sigma 或 Dako)、HLA ABC-Fitc(BD)、HLADR, DQ, DP-PE(BD)、β-2-微球蛋白-PE(BD)、CD80-PE(BD)和CD86-APC(BD)。

[0195] 其他可用的抗体/标记组合包括,但不限于CD45-PerCP(苜叶绿素蛋白);CD44-PE;CD19-PE;CD10-F(荧光素);HLA-G-F和7-氨基-放线菌素-D(7-AAD);HLA-ABC-F等等。

[0196] 此处提供的分离的胎盘细胞可利用例如与藻红蛋白-Cy5(PE-Cy5)偶联的链亲和素和与生物素偶联的CD117或CD133单克隆抗体测定CD117或CD133;然而利用本系统,由于背景相对高,所述细胞似乎为CD117或CD133阳性。

[0197] 所述分离的胎盘细胞可用单个标记的抗体标记并且检测和分选。胎盘细胞还可以同时用多个不同标记的抗体标记。

[0198] 在另一个实施方案中,可以使用磁珠来分离细胞。可以利用磁性活化细胞分选(MACS)技术分选细胞,所述技术是基于颗粒结合磁珠(0.5-100 μm 直径)的能力来分选颗粒的方法。对磁微珠可以进行多种有效的修饰,包括共价添加特异性识别特定细胞表面分子或半抗原的抗体。所述磁珠随后与细胞混合,从而结合。然后将细胞通过磁场,以分离出

具有特定细胞表面标记的细胞。在一个实施方案中,可随后分离这些细胞,并与偶联了其它细胞表面标记抗体的磁珠再混合。所述细胞再次通过磁场,分离结合了两种抗体的细胞。然后可以将此类细胞稀释放入不同的培养皿中,例如微滴培养皿中,用于克隆分离。

[0199] 分离的胎盘细胞还可以基于细胞形态学和生长特征来表征和 / 或分选。例如,分离的胎盘细胞可以表征为在培养中具有成纤维细胞样表型,和 / 或基于成纤维细胞样表型来选择。所述分离的胎盘细胞还可以表征为具有形成胚样体的能力,和 / 或基于其形成胚样体的能力来选择。在一个实施方案中,例如,将形状为成纤维细胞样,表达 CD73 和 CD105,并在培养中产生一个或多个胚样体的胎盘细胞与其它胎盘细胞分离。在另一个实施方案中,将培养中产生一个或多个胚样体的 OCT-4<sup>+</sup> 胎盘细胞与其它胎盘细胞分离。

[0200] 在另一个实施方案中,分离的胎盘细胞可以通过集落形成单位试验来鉴别和表征。集落形成单位试验是本领域公知的,例如 MESEN CULT™ 培养基 (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver British Columbia)。

[0201] 利用本领域已知的标准技术,例如台盼蓝排除试验、醋酸荧光素摄取试验、碘化丙锭摄取试验 (评估活力);和胸腺嘧啶核苷摄取试验、MTT 细胞增殖试验 (评估增殖) 来分析分离的胎盘细胞的活力、增殖潜力和寿命。寿命可以通过本领域公知的方法确定,例如通过延长培养中群倍增的最大数来确定。

[0202] 利用本领域已知的其它技术,也可以将分离的胎盘细胞,例如以上 5.4.2 节所述的分离的胎盘细胞,和其它胎盘细胞分开,例如:选择性生长期望的细胞 (阳性分选)、选择性破坏不需要细胞 (阴性选择)、基于混合群与例如大豆凝聚素的差异细胞可凝集性的分离、冻融步骤、过滤、常规离心和区带离心、离心冲洗 (逆流离心)、单位重力分离、逆流分布、电泳等等。

[0203] 5.6 分离的胎盘细胞的培养

[0204] 5.6.1 培养基

[0205] 分离的胎盘细胞、或分离的胎盘细胞群、或从其中生长出胎盘干细胞的细胞或胎盘组织可被用于起始或接种细胞培养物。细胞一般转移到无菌的组织培养容器内,所述容器使用或未使用胞外基质或配体包被,例如层粘连蛋白、胶原 (如天然的或变性的)、明胶、纤连蛋白、鸟氨酸、玻连蛋白和胞外膜蛋白 (例如:MATRIGEL® (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.))。

[0206] 可以在本领域认为适合细胞,例如适合干细胞培养的任何培养基和任何条件下,培养分离的胎盘细胞。优选的,培养基包含血清。分离的胎盘细胞可以培养在例如:DMEM-LG (Dulbecco 改良的必需培养基,低糖) / MCDB201 (鸡成纤维细胞基础培养基),其含有 ITS (胰岛素 - 转铁蛋白 - 硒)、LA+BSA (亚油酸 - 牛血清白蛋白)、右旋糖、L- 抗坏血酸、PDGF、EGF、IGF-1, 和青霉素 / 链霉素;含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM-HG (高糖);含有 15% FBS 的 DMEM-HG;含有 10% FBS、10% 马血清和氢化可的松的 IMDM (Iscove 改良的 Dulbecco 培养基);含有 10% FBS、EGF 和肝素的 M199;含有 10% FBS、GLUTAMAX™ 和庆大霉素的  $\alpha$ -MEM (最低必需培养基);含有 10% FBS、GLUTAMAX™ 和庆大霉素等的 DMEM。

[0207] 可用于培养胎盘细胞的其它培养基包括 DMEM (高糖或低糖)、Eagle 基础培养基、Ham 的 F10 培养基 (F10)、Ham 的 F12 培养基 (F12)、Iscove 的改良 Dulbecco 培养基、间充质干细胞生长培养基 (MSCGM)、Liebovitz 的 L-15 培养基、MCDB、DMEM/F12、RPMI 1640、改



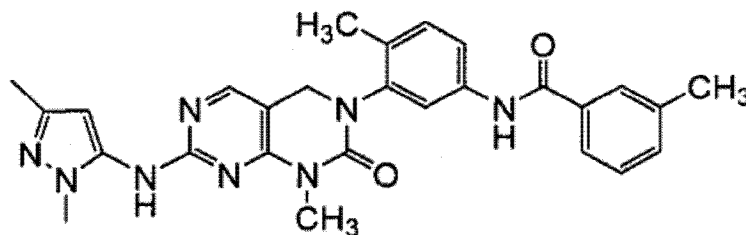
良的 DMEM(Gibco)、DMEM/MCDB201(Sigma) 和 CELL-GRO FREE。

[0208] 培养基中可以添加一种或多种组分,包括例如:血清(如:胎牛血清(FBS),优选约 2-15% (v/v);马血清(ES);人血清(HS)); $\beta$ -巯基乙醇(BME),优选约 0.001% (v/v);一种或多种生长因子,例如,血小板衍生的生长因子(PDGF)、表皮生长因子(EGF)、基础成纤维细胞生长因子(bFGF)、胰岛素-样生长因子-1(IGF-1)、白血病抑制因子(LIF)、血管内皮生长因子(VEGF)、和促红细胞生成素(EPO);氨基酸,包括 L-缬氨酸;和用于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 G、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。

[0209] 所述分离的胎盘细胞可在标准组织培养条件下培养,例如在组织培养皿或多孔平皿中培养。还可以利用悬滴法培养所述分离的胎盘细胞。该方法中,分离的胎盘细胞以约 5mL 培养基中每毫升  $1 \times 10^4$  个细胞悬浮,并且将一滴或多滴培养基置于组织培养容器,例如 100mL 培氏培养皿的盖子内。所述滴可例如单滴落下或例如自多通道移液管多滴落下。小心反转盖子并且置于平皿底部之上,其含有大量液体,例如足以维持平皿空气中含水量的无菌 PBS,然后培养干细胞。

[0210] 在一个实施方案中,分离的胎盘细胞在用于维持分离的胎盘细胞中未分化表型的化合物存在下培养。在一个具体的实施方案中,所述化合物为取代的 3,4-二氢吡啶醇 [4,5-d] 嘧啶。在更具体的实施方案中,所述化合物具有下列化学结构:

[0211]



[0212] 化合物可以以例如约  $1 \mu\text{M}$  至约  $10 \mu\text{M}$  的浓度与分离的胎盘细胞或分离的胎盘细胞群接触。

[0213] 5.6.2 胎盘细胞的扩增和增殖

[0214] 分离的胎盘细胞或分离的胎盘细胞(例如,与至少 50% 的在体内通常与干细胞或干细胞群相伴的胎盘细胞分离的胎盘细胞或胎盘细胞群)群一旦分离,就可以在体外增殖和扩增所述细胞或细胞群。例如,可以在组织培养容器(例如皿、瓶、多孔板等)中培养分离的胎盘细胞群,培养时间足以使细胞增殖至 70-90% 汇合度,即,直到细胞及其后代占据组织培养容器 70-90% 的培养表面区域。

[0215] 分离的胎盘细胞以可以允许细胞生长的密度接种在培养容器内。例如,细胞可以以低密度(例如约 1,000 至约 5,000 细胞/ $\text{cm}^2$ ) 至高密度(例如约 50,000 或更多细胞/ $\text{cm}^2$ ) 接种。在优选的实施方案中,在约 0% 至约 5% 体积  $\text{CO}_2$  的空气中培养细胞。在一些优选的实施方案中,在约 2% 至约 25% 体积  $\text{O}_2$  的空气中培养细胞,优选在约 5% 至约 20% 体积  $\text{O}_2$  的空气中培养。细胞优选在约  $25^\circ\text{C}$  至约  $40^\circ\text{C}$ , 优选  $37^\circ\text{C}$  培养。细胞优选在培养箱中培养。培养基可以是静态的或搅动的,例如,利用生物反应器。胎盘细胞,例如胎盘干细胞或胎盘多能细胞优选生长在低氧化压力下(例如,添加谷胱甘肽、抗坏血酸、过氧化氢酶、生育酚、N-乙酰半胱氨酸等)。

[0216] 一旦获得小于 100%，例如 70%–90% 汇合度，细胞就可以传代。例如，所述细胞可以利用本领域公知的技术进行酶促处理，例如胰蛋白酶消化，从而将其与组织培养表面分离。移液除去细胞和计数细胞后，约 10,000–100,000 细胞/cm<sup>2</sup> 被传代到含有新鲜培养基的新培养容器内。一般的，新培养基与从中去除分离的胎盘细胞的培养基是相同类型的培养基。分离的胎盘细胞可传代约、至少或不超过至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18 或 20 次或更多次。

### [0217] 5.6.3 分离的胎盘细胞群

[0218] 此处还提供分离的胎盘细胞群，例如以上 5.4.2 节所述的分离的胎盘细胞，可用于治疗脑或 CNS 中或周围的血流破坏。分离的胎盘细胞群可以直接分离自一个或多个胎盘；即，所述细胞群可以是包含分离的胎盘细胞的胎盘细胞群，其中所述分离的胎盘细胞获自或包含于灌流液，或者来源于或包含于解离的胎盘组织，例如胎盘组织消化物（即，通过酶促消化胎盘或其部分所获得的细胞收集物）。还可以培养和扩增此处所述的分离的胎盘细胞来产生所述分离的胎盘细胞群。还可以培养和扩增包含分离的胎盘细胞的胎盘细胞群来产生胎盘细胞群。

[0219] 可用于此处提供的治疗方法的胎盘细胞群包含分离的胎盘细胞，例如如此处 5.4.2 节所述的分离的胎盘细胞。在不同的实施方案中，在胎盘细胞群中，至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 99% 的细胞是分离的胎盘细胞。即，分离的胎盘细胞群可以包含例如多至 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 的非分离的胎盘细胞的细胞。

[0220] 可用于治疗脑或 CNS 中或周围血流破坏的分离的胎盘细胞群可例如通过选择来源于酶促消化或灌流的分离的胎盘细胞而制备，所述分离的胎盘细胞表达特定的标记和/或特定的培养或形态特征。例如，在一个实施方案中，细胞群可以通过如下步骤制备：选择胎盘细胞，所述胎盘细胞 (a) 贴壁于底物，和 (b) 表达 CD200 和 HLA-G；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一个实施方案中，细胞群可以通过如下步骤产生：选择胎盘细胞，其中所述胎盘细胞表达 CD200 和 HLA-G；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一个实施方案中，细胞群可以通过如下步骤产生：选择胎盘细胞，所述胎盘细胞 (a) 贴壁于底物，和 (b) 表达 CD73、CD105 和 200200；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一个实施方案中，细胞群可以通过如下步骤产生：鉴定胎盘细胞，其中所述胎盘细胞表达 CD73、CD 105 和 CD200；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一个实施方案中，细胞群可以通过如下步骤产生：选择胎盘细胞，所述胎盘细胞 (a) 贴壁于底物，和 (b) 表达 CD200 和 OCT-4；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一个实施方案中，细胞群可以通过如下步骤产生：选择胎盘细胞，其中所述胎盘细胞表达 CD200 和 OCT-4；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一个实施方案中，细胞群通过如下步骤产生：选择胎盘细胞，其中所述胎盘细胞 (a) 贴壁于底物，(b) 表达 CD73 和 CD105，和 (c) 当包含所述干细胞的胎盘细胞群在允许胚样体形成的条件下培养时，有助于在所述群中形成一个或多个胚样体；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一个实施方案中，细胞群通过如下步骤产生：选择胎盘细胞，其中所述胎盘细胞表达 CD73 和 CD105，和当包含所述干细胞的胎盘细胞群在允许胚样体形成的条件下培养时，有助于在所述群中形成一个或多个胚样体；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一个实施方案中，

细胞群可以通过如下步骤产生：选择胎盘细胞，所述胎盘细胞 (a) 贴壁于底物，和 (b) 表达 CD73、CD105 和 HLA-G；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一个实施方案中，细胞群通过如下步骤产生：选择胎盘细胞，其中所述胎盘细胞表达 CD73、CD105 和 HLA-G；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一个实施方案中，生产细胞群的方法包括选择胎盘细胞，其中所述胎盘细胞 (a) 贴壁于底物；(b) 表达 OCT-4，和 (c) 当包含所述干细胞的胎盘细胞群在允许胚样体形成的条件下培养时，有助于在所述群中形成一个或多个胚样体；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一个实施方案中，细胞群通过如下步骤产生：选择胎盘细胞，其中所述胎盘细胞表达 OCT-4，和当包含所述干细胞的胎盘细胞群在允许胚样体形成的条件下培养时，有助于在所述群中形成一个或多个胚样体；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。

[0221] 在另一个实施方案中，细胞群通过如下步骤产生：选择胎盘细胞，所述胎盘细胞 (a) 贴壁于底物，和 (b) 表达 CD10 和 CD105，不表达 CD34；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一个实施方案中，细胞群通过如下步骤产生：选择胎盘细胞，其中所述胎盘细胞表达 CD10 和 CD105，不表达 CD34；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一个实施方案中，细胞群通过如下步骤产生：选择胎盘细胞，所述胎盘细胞 (a) 贴壁于底物，和 (b) 表达 CD10、CD105 和 CD200，不表达 CD34；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另一个实施方案中，细胞群通过如下步骤产生：选择胎盘细胞，其中所述胎盘细胞表达 CD10、CD105 和 CD200，不表达 CD34；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另外更具体的实施方案中，细胞群通过如下步骤产生：选择胎盘细胞，所述胎盘细胞 (a) 贴壁于底物，和 (b) 表达 CD10、CD90、CD 105 和 CD200，不表达 CD34 和 CD45；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。在另外更具体的实施方案中，细胞群通过如下步骤产生：选择胎盘细胞，其中所述胎盘细胞表达 CD10、CD90、CD 105 和 CD200，不表达 CD34 和 CD45；和从其它细胞中分离所述细胞以形成细胞群。

[0222] 所述细胞群或其组合可用于治疗脑或 CNS 中或周围血流破坏，例如血流破坏的症状或所述血流破坏引起的神经性缺损。

[0223] 在任何上述实施方案中，所述分离的细胞群的选择可另外包括选择表达 ABC-p(一种胎盘特异性 ABC 转运蛋白；参见例如 Allikmets 等, CancerRes. 58(23) : 5337-9(1998)) 的胎盘细胞。所述方法还可以包括选择呈现例如间充质干细胞特异性特征的至少一种细胞，例如表达 CD44，表达 CD90，或表达前述的组合。

[0224] 在上述实施方案中，底物可以是能实现细胞例如分离的胎盘细胞的培养和 / 或选择的任何表面。一般的，底物是塑料制品，例如组织培养皿或多孔板塑料。组织培养塑料制品可以用生物分子例如层粘连蛋白或纤粘连蛋白包被。

[0225] 可以通过细胞选择领域任何已知的方法来选择胎盘细胞群的细胞（例如分离的胎盘细胞）。例如，可以利用抗一种或多种细胞表面标记的抗体来选择细胞，例如，在流式细胞仪或 FACS 中。利用与磁珠连接的抗体可以实现选择。特异性针对某些干细胞相关标记的抗体是本领域已知的。例如，OCT-4 抗体 (Abcam, Cambridge, MA)、CD200 抗体 (Abcam)、HLA-G 抗体 (Abcam)、CD73 抗体 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA)、CD105 抗体 (Abcam; BioDesign International, Saco, ME) 等。其他标记的抗体也是可商购的，例如：可以从如 StemCell Technologies 或 BioDesign International 获得的 CD34、CD38 和 CD45

抗体。

[0226] 分离的胎盘细胞群可以包含不是干细胞的胎盘细胞,或者不是胎盘细胞的细胞。

[0227] 此处提供的分离的胎盘细胞群可以与一个或多个非干细胞或非胎盘细胞的群组合。例如,分离的胎盘细胞群可以组合血液(例如:胎盘血或脐带血)、血液来源的干细胞(例如:来源于胎盘血或脐带血的干细胞)、脐带干细胞、血液来源的有核细胞的群、骨髓来源的间充质干细胞、骨来源的干细胞群、原始骨髓、成人(成体)干细胞、包含在组织内的干细胞群、培养的干细胞、完全分化的细胞的群(例如:软骨细胞、成纤维细胞、羊膜细胞、成骨细胞、肌细胞、心肌细胞等)等。在一个具体的实施方案中,可用于治疗脑或 CNS 中或周围血流破坏的细胞群包含分离的胎盘细胞和分离的脐带细胞。比较每个群中的总有核细胞数量,分离的胎盘细胞群内的细胞可以与大量另一种类型的细胞相组合,组合比例为约 100,000,000 : 1、50,000,000 : 1、20,000,000 : 1、10,000,000 : 1、5,000,000 : 1、2,000,000 : 1、1,000,000 : 1、500,000 : 1、200,000 : 1、100,000 : 1、50,000 : 1、20,000 : 1、10,000 : 1、5,000 : 1、2,000 : 1、1,000 : 1、500 : 1、200 : 1、100 : 1、50 : 1、20 : 1、10 : 1、5 : 1、2 : 1、1 : 1;1 : 2、1 : 5、1 : 10、1 : 100、1 : 200、1 : 500、1 : 1,000、1 : 2,000、1 : 5,000、1 : 10,000、1 : 20,000、1 : 50,000、1 : 100,000、1 : 500,000、1 : 1,000,000、1 : 2,000,000、1 : 5,000,000、1 : 10,000,000、1 : 20,000,000、1 : 50,000,000,或约 1 : 100,000,000。分离的胎盘细胞群中的细胞也可以与多种细胞类型的大量细胞组合。

[0228] 在一个实施方案中,分离的胎盘细胞群与大量造血干细胞组合。此类造血干细胞可以是例如,包含在未处理的胎盘、脐带血或外周血中;在来源于胎盘血、脐带血或外周血的总有核细胞中;在来源于胎盘血、脐带血或外周血的分离的 CD34<sup>+</sup> 细胞群中;在未处理的骨髓中;在来源于骨髓的总有核细胞中;在来源于骨髓的分离的 CD34<sup>+</sup> 细胞群中;等等。

#### [0229] 5.7 胎盘细胞库的制备

[0230] 来自产后胎盘的分离的细胞,例如以上 5.4.2 节所述的分离的胎盘细胞可以以多种不同的方式培养以制备一组批次,例如其中每个批次为多个可单独施用的剂量。这样的批次可例如,获自来自胎盘灌流液的细胞或获自来自酶消化胎盘组织的细胞。获自多个胎盘的胎盘细胞批次组可被安排在分离的胎盘细胞库中以例如长期保存。通常,塑料贴壁组织培养的胎盘细胞获自胎盘材料的原代培养以形成种子培养物,其在受控制的条件下扩增以形成大约相当于倍增量的细胞群。批次优选源自单个胎盘组织,但可源自多个胎盘组织。

[0231] 在一个实施方案中,如下获得胎盘细胞批次。胎盘组织例如通过切碎,用合适的酶,例如胰蛋白酶或胶原酶(参见以上 5.5.3 节)消化而被首次解离。所述胎盘组织优选包括,例如来自单个胎盘的完整的羊膜、完整的绒毛膜或两者,但可仅包括羊膜或绒毛膜的一部分。培养消化组织例如约 1-3 周,优选约 2 周。除去非贴壁细胞后,例如通过胰蛋白酶消化收集形成的高密度克隆。收集这些细胞并重悬浮于合适体积的培养基中,随后用于接种扩大培养。扩大培养可以是单独的细胞培养物装置的任意组合,例如 NUNC® 的 CellFactory。细胞可以细分至任何程度以使用例如  $1 \times 10^3$ 、 $2 \times 10^3$ 、 $3 \times 10^3$ 、 $4 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^3$ 、 $6 \times 10^3$ 、 $7 \times 10^3$ 、 $8 \times 10^3$ 、 $9 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^4$ 、 $4 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $6 \times 10^4$ 、 $7 \times 10^4$ 、 $8 \times 10^4$ 、 $9 \times 10^4$  或  $10 \times 10^4$  细胞/cm<sup>2</sup> 接种扩大培养。优选的,约  $1 \times 10^3$  至约  $1 \times 10^4$  细胞/cm<sup>2</sup> 用于接种每次扩大培养。扩大培养次数在数量上可多可少,取决于从其获得细胞

的具体胎盘。

[0232] 扩大培养物生长至培养的细胞密度达到某个值,例如约  $1 \times 10^5$  个细胞/cm<sup>2</sup>。如上所述此时可以收集并且冷藏细胞,或者传代进入新的扩大培养。使用之前,细胞可以传代例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 次。优选在扩大培养期间记录群倍增的累计数。来自培养物的细胞可以扩增 2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38 或 40 次倍增,或多达 60 次倍增。然而优选在将所述细胞群等分为单次剂量之前群倍增数为约 15 至约 30 次。所述细胞可以在整个扩增过程中连续培养,或可以在扩增期间的一个或多个时间点冷冻。

[0233] 用于单次剂量的细胞可以冷冻,例如冷藏便于以后的使用。单次剂量可以包含,例如每毫升约一百万至约五千万个细胞,并且可以包含约总计约  $10^6$  至约  $10^{10}$  个细胞。

[0234] 因此在一个实施方案中,可以通过如下方法制备胎盘细胞库,其包括:扩增来自人分娩后胎盘的原代培养胎盘细胞,用于第一次大量的群倍增;冷藏所述胎盘细胞以形成主细胞库;扩增来自主细胞库的大量胎盘细胞用于第二次大量的群倍增;冷藏所述胎盘细胞以形成工作细胞库;扩增来自工作细胞库的大量胎盘细胞用于第三次大量的群倍增;和以单次剂量冷藏所述胎盘细胞,其中所述单次剂量共同组成胎盘细胞库。选择性地,来自所述第三次大量群倍增的大量胎盘细胞可以扩增用于第四次大量群倍增并且以单次剂量量冷藏,其中所述单次剂量共同组成胎盘干细胞。

[0235] 在另外具体的实施方案中,所述原代培养胎盘细胞包含来自胎盘灌流液的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述原代培养胎盘细胞包含来自消化的胎盘组织的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述原代培养胎盘细胞包含来自胎盘灌流液和消化的胎盘组织的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述胎盘细胞原代培养中所有所述的胎盘细胞来自同一个胎盘。在另外具体的实施方案中,所述方法进一步包括从来自所述工作细胞库的大量胎盘细胞选择 CD200<sup>+</sup> 或 HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞以形成单次剂量。在另外具体的实施方案中,所述单次剂量包含约  $10^4$  至约  $10^5$  个胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述单次剂量包含约  $10^5$  至约  $10^6$  个胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述单次剂量包含约  $10^6$  至约  $10^7$  个胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述单次剂量包含约  $10^7$  至约  $10^8$  个胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述单次剂量包含约  $10^8$  至约  $10^9$  个胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述单次剂量包含约  $10^9$  至约  $10^{10}$  个胎盘细胞。

[0236] 在一个优选的实施方案中,检测提供胎盘的供者(例如母体)是否存在至少一种病原体。如果所述母体检测为所检测的病原体阳性,则丢弃来自该胎盘的全部批次。所述检验可以在制备胎盘细胞批次期间的任何时候进行,例如扩增培养期间。检测其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、人类免疫缺陷性病毒(I 和 II 型)、巨细胞病毒、疱疹病毒等等。

[0237] 5.8 胎盘细胞的保存

[0238] 分离的胎盘细胞,例如以上 5.4.2 节所述分离的胎盘细胞可以保存,即置于允许长期储存的条件下,或置于抑制例如凋亡或坏死所致的细胞死亡的条件下。

[0239] 如相关美国申请公开号 2007/0190042 中所述,可以利用例如包含凋亡抑制剂、坏死抑制剂和/或携氧全氟化碳的组合物保存胎盘细胞。在一个实施方案中,本发明提供了保存细胞群的方法,所述群可用于治疗脑或 CNS 中或周围的血流破坏,包括将所述细胞群

与含有凋亡抑制剂和携氧全氟化碳的细胞收集组合物相接触,与未接触凋亡抑制剂的细胞群相比,其中所述凋亡抑制剂存在的量和时间可足以降低或预防细胞群中的凋亡。在具体的实施方案中,所述凋亡抑制剂是级联蛋白抑制剂。在另外具体的实施方案中,所述凋亡抑制剂是 JNK 抑制剂。在更具体的实施方案中,所述 JNK 抑制剂不调节所述细胞的分化或增殖。在另一个实施方案中,所述细胞收集组合物包含乳液中的所述凋亡抑制剂和在另外相中的所述携氧全氟化碳。在另一个实施方案中,所述细胞收集组合物包含所述凋亡抑制剂和在乳剂中的所述携氧全氟化碳。在另一个实施方案中,所述细胞收集组合物还包含乳化剂,例如卵磷脂。在另一个实施方案中,在接触细胞时,所述凋亡抑制剂和所述全氟化碳处于约 0°C 和约 25°C 之间。在另外更具体的实施方案中,在接触细胞时,所述凋亡抑制剂和所述全氟化碳处于约 2°C 和约 10°C 之间,或约 2°C 和约 5°C 之间。在另外更具体的实施方案中,所述接触是在转移所述细胞群的过程中进行的。在另外更具体的实施方案中,所述接触是在冷冻和融化所述细胞群的过程中进行的。

[0240] 胎盘细胞群可以例如通过以下方法保存,包括将所述细胞群与凋亡抑制剂和器官防腐化合物相接触,与未接触凋亡抑制剂的细胞群相比,其中所述凋亡抑制剂存在的量和时间可足以降低或预防细胞群中的凋亡。在一个具体的实施方案中,所述器官防腐化合物是 UW 溶液(描述于美国专利号 4,798,824 中;其也被称为 ViaSpan;还参见 Southard 等人, Transplantation 49(2):251-257(1990)) 或者是 Stern 等人的美国专利号 5,552,267 中描述的溶液。在另一个实施方案中,所述器官防腐化合物是羟乙基淀粉、乳糖酸、棉子糖,或其组合。在另一个实施方案中,所述细胞收集组合物还包含位于两相或位于乳液中的携氧全氟化碳。

[0241] 在本方法的另一实施方案中,胎盘细胞在灌流过程中与包含凋亡抑制剂和携氧全氟化碳,器官防腐化合物,或其组合的细胞收集组合物相接触。在另一个实施方案中,在组织破坏(例如,酶促消化)过程中,所述细胞产生接触。在另一个实施方案中,在灌流收集后,或在组织破坏(例如,酶促消化)后,胎盘细胞与所述细胞收集化合物相接触。

[0242] 一般的,在胎盘细胞收集、富集和分离过程中,优选最小化或消除由于缺氧和机械压力导致的细胞应激。因此,在本方法的另一实施方案中,在收集、富集或分离过程中,细胞或细胞群在所述保存中暴露在低氧条件下少于 6 个小时,其中所述低氧条件是氧浓度低于正常的血氧浓度。在更具体的实施方案中,所述细胞群在所述保存中暴露在所述低氧条件下少于 2 个小时。在另外更具体的实施方案中,在收集、富集或分离过程中,所述细胞群暴露在所述低氧条件下少于 1 个小时、或少于 30 分钟、或不暴露于低氧条件下。在另外具体的实施方案中,在收集、富集或分离过程中,所述细胞群不暴露于剪切力下。

[0243] 胎盘细胞可以冷藏,例如置于小容器(如安瓿瓶)中的冷冻保存培养基中。合适的冷冻保存培养基包括但不限于如下培养基,其包括例如生长培养基或细胞冷冻培养基,例如可商购的细胞冷冻培养基,例如 C2695、C2639 或 C6039(Sigma)。冷冻保存培养基优选包含 DMSO(二甲亚砜),其浓度为约 2% 至约 15% (v/v),例如约 10% (v/v)。冷冻保存培养基可以包含其它试剂,例如甲基纤维素和/或甘油。在冷冻保存过程中,胎盘细胞优选以约 1°C / 分钟冷却。优选的冷冻保存温度为约 -80°C 至约 -180°C,优选约 -125°C 至约 -140°C。在解冻使用前,冷冻保存的细胞可以转移到液氮中。在一些实施方案中,例如,一旦安瓿瓶达到约 -90°C,就将其转移至液氮储存区域。还可以利用控制 - 速率的冷冻箱完成冷冻保

存。冷冻保存的细胞优选在温度约 25°C 至约 40°C，优选在温度约 37°C 下解冻。

[0244] 5.9 包含分离的胎盘细胞的组合物

[0245] 此处例如 5.4.2 节所述的胎盘细胞可以与用于治疗脑或 CNS 中或周围血流破坏的任何生理学可接受或医学可接受的化合物、组合物或装置组合。可用于此处提供的治疗方法的组合物可包含任何一种或多种在此所述的胎盘细胞（参见以上 5.4.2 节）。在某些实施方案中，所述组合物为药学可接受的组合物，例如包含在药学可接受载体中的胎盘细胞的组合物。参见以下 5.9.2 节。

[0246] 在某些实施方案中，包含所述分离的胎盘细胞的组合物还包含基质，例如脱细胞基质或合成的基质。在更具体的实施方案中，所述基质为立体支架。在另外更具体的实施方案中，所述基质包含胶原、明胶、层粘连蛋白、纤粘连蛋白、果胶、鸟氨酸或玻连蛋白。在另外更具体的实施方案中，所述基质为羊膜或羊膜来源的生物材料。在另外更具体的实施方案中，所述基质包含胞外膜蛋白。在另外更具体的实施方案中，所述基质包含合成的化合物。在另外更具体的实施方案中，所述基质包含生物活性化合物。在另外更具体的实施方案中，所述生物活性化合物为生长因子、细胞因子、抗体或小于 5,000 道尔顿的有机分子。

[0247] 在另一个实施方案中，可用于此处提供的治疗方法的组合物包含通过任何上述胎盘细胞或任何上述胎盘细胞群条件化的培养基。

[0248] 5.9.1 冷冻保存的分离的胎盘细胞

[0249] 可用于治疗脑或 CNS 中或周围血流破坏的所述分离的胎盘细胞群可以保存，例如冷冻保存供后期使用。冷冻保存细胞，例如干细胞的方法是本领域公知的。胎盘细胞群可以制备成易于向个体施用的形式，例如包含在适合医学使用的容器内的分离的胎盘细胞群。此类容器可以是例如，注射器、无菌的塑料袋、瓶、罐，或其它可以方便配制胎盘细胞群的容器。例如，所述容器可以是适合将液体静脉施用至接受者的血袋或其它塑料的、医学可接受的袋。所述容器优选为允许冷冻保存组合细胞群的容器。

[0250] 冷冻保存的分离的胎盘细胞群可以包括来源于单个供体，或多个供体的分离的胎盘细胞。所述分离的胎盘细胞群可以与目标接受者是完全的 HLA 匹配，或者部分的 HLA- 不匹配、或完全的 HLA- 不匹配。

[0251] 因此，在一个实施方案中，分离的胎盘细胞可以以容器中包含塑料贴壁组织培养胎盘细胞群的组合物形式用于治疗脑或 CNS 中或周围血流破坏。在具体的实施方案中，所述分离的胎盘细胞冷冻保存。在另外具体的实施方案中，所述容器是袋、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、允许或有助于静脉施用所述分离的胎盘细胞群，例如通过静脉注射注入。所述袋可以包括相互连接的多个内腔或隔室，其允许在施用前或施用过程中将分离的胎盘细胞与一种或多种其它溶液，例如药物进行混合。在另外具体的实施方案中，所述组合物包含有助于冷冻保存所述组合细胞群的一种或多种化合物。在另外具体的实施方案中，所述分离的胎盘细胞群包含在生理可接受的水溶液中。在更具体的实施方案中，所述生理可接受的水溶液为 0.9% NaCl 溶液。在另外具体的实施方案中，所述分离的胎盘细胞群包含与所述细胞群的接受者 HLA 匹配的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中，所述组合的细胞群包含与所述细胞群的接受者至少部分 HLA 不匹配的胎盘细胞。在另外具体的实施方案中，所述分离的胎盘细胞来源于多个供体。

[0252] 在某些实施方案中,容器中分离的胎盘细胞为分离的 CD10<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞,其中所述细胞已经被冷冻保存且包含在容器中。在具体的实施方案中,所述 CD10<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD200<sup>+</sup>。在更具体的实施方案中,所述 CD10<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD45<sup>-</sup> 或 CD90<sup>+</sup>。在更具体的实施方案中,所述 CD10<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD45<sup>-</sup> 和 CD90<sup>+</sup>。在另外具体的实施方案中,所述 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为以下的一种或多种:CD13<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD33<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD62E<sup>-</sup>、CD62L<sup>-</sup>、CD62P<sup>-</sup>、SH3<sup>+</sup>(CD73<sup>+</sup>)、SH4<sup>+</sup>(CD73<sup>+</sup>)、CD80<sup>-</sup>、CD86<sup>-</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>(CD105<sup>+</sup>)、CD106/VCAM<sup>+</sup>、CD117<sup>-</sup>、CD 144/VE-钙粘蛋白<sup>1ow</sup>、CD184/CXCR4<sup>-</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>、OCT-4<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup>、SSEA4<sup>-</sup>、ABC-p<sup>+</sup>、KDR<sup>-</sup>(VEGFR2<sup>-</sup>)、HLA-A,B,C<sup>+</sup>、HLA-DP、DQ、DR<sup>-</sup>、HLA-G<sup>+</sup>或程序性死亡-1配体(PDL1)<sup>+</sup>或其任何组合。在更具体的实施方案中,所述 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD13<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD33<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD54/ICAM<sup>+</sup>、CD62E<sup>-</sup>、CD62L<sup>-</sup>、CD62P<sup>-</sup>、SH3<sup>+</sup>(CD73<sup>+</sup>)、SH4<sup>+</sup>(CD73<sup>+</sup>)、CD80<sup>-</sup>、CD86<sup>-</sup>、CD90<sup>+</sup>、SH2<sup>+</sup>(CD105<sup>+</sup>)、CD106/VCAM<sup>+</sup>、CD117<sup>-</sup>、CD 144/VE-钙粘蛋白<sup>1ow</sup>、CD184/CXCR4<sup>-</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>、OCT-4<sup>+</sup>、SSEA3<sup>-</sup>、SSEA4<sup>-</sup>、ABC-p<sup>+</sup>、KDR<sup>-</sup>(VEGFR2<sup>-</sup>)、HLA-A,B,C<sup>+</sup>、HLA-DP、DQ、DR<sup>-</sup>、HLA-G<sup>+</sup>或程序性死亡-1配体(PDL1)<sup>+</sup>。

[0253] 在某些实施方案中,上述引用的分离的胎盘细胞为分离的 CD200<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 胎盘细胞,其中所述细胞已经被冷冻保存且包含在容器中。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 细胞,其已经被冷冻保存且包含在容器中。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup> 干细胞,其已经被冷冻保存且包含在容器中。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 细胞,其已经被冷冻保存且包含在容器中,并且当所述分离的胎盘细胞与胎盘细胞群在允许所述形成胚样体的条件下培养时,有助于形成一个或多个胚样体。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup> 细胞,其已经被冷冻保存且包含在容器中。在另一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞为 OCT-4<sup>+</sup> 细胞,其已经被冷冻保存且包含在容器中,并且当所述分离的胎盘细胞与胎盘细胞群在允许所述形成胚样体的条件下培养时,有助于形成一个或多个胚样体。

[0254] 在另外具体的实施方案中,上述引用的分离的胎盘细胞为胎盘干细胞或如通过流式细胞术检测到的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup> 和 CD105<sup>+</sup> 胎盘多能细胞。在更具体的实施方案中,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞为胎盘干细胞。在另外更具体的实施方案中,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞为多能胎盘细胞。在另外具体的实施方案中,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞具有分化为神经表型细胞、成骨表型细胞或成软骨表型细胞的潜能。在更具体的实施方案中,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD200<sup>+</sup>。在另外更具体的实施方案中,如流式细胞计检测的,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD90<sup>+</sup> 或 CD45<sup>-</sup>。在另外更具体的实施方案中,如流式细胞计检测的,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD90<sup>+</sup> 或 CD45<sup>-</sup>。在另外更具体的实施方案中,如流式细胞计检测的,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD90<sup>+</sup> 或 CD45<sup>-</sup>。在另外更具体的实施方案中,如流式细胞计检测的,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD90<sup>+</sup> 和 CD45<sup>-</sup>。在另外更具体的实施方案中,如流式细胞计检测的,所述 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup> 细胞还为 CD80<sup>-</sup> 和 CD86<sup>-</sup>。在另外更具体的实施方案中,所述 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 细胞还为以下的一种或多种:CD29<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD54<sup>+</sup>、CD80<sup>-</sup>、CD86<sup>-</sup>、SH3<sup>+</sup>或SH4<sup>+</sup>。在更具体的实施方案中,所述分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞还为 CD44<sup>+</sup>。



在以上任何分离的 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘的细胞的具体实施方案中,所述细胞还为以下的一种或多种:CD117<sup>-</sup>、CD133<sup>-</sup>、KDR<sup>-</sup>(VEGFR2<sup>-</sup>)、HLA-A、B、C<sup>+</sup>、HLA-DP、DQ、DR<sup>-</sup>和/或 PDL1<sup>+</sup>。

[0255] 在任何上述冷冻保存的分离的胎盘细胞具体的实施方案中,所述容器为袋。在不同的实施方案中,所述容器包含大约、至少、或不超过  $1 \times 10^6$  所述分离的胎盘细胞、 $5 \times 10^6$  所述分离的胎盘细胞、 $1 \times 10^7$  所述分离的胎盘细胞、 $5 \times 10^7$  所述分离的胎盘细胞、 $1 \times 10^8$  所述分离的胎盘细胞、 $5 \times 10^8$  所述分离的胎盘细胞、 $1 \times 10^9$  所述分离的胎盘细胞、 $5 \times 10^9$  所述分离的胎盘细胞、 $1 \times 10^{10}$  所述分离的胎盘细胞或  $5 \times 10^{10}$  所述分离的胎盘细胞。在任何上述冷冻保存群的其他具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞已传代约、至少或不超过 5 次、不超过 10 次、不超过 15 次或不超过 20 次。在任何上述冷冻保存的分离的胎盘细胞另外具体的实施方案中,所述分离的胎盘细胞已在所述容器内扩增。

#### [0256] 5.9.2 药物组合物

[0257] 分离的胎盘细胞群或包含分离的胎盘细胞的细胞群,可以配制成体内使用的药物组合物,例如用于此处提供的治疗方法中。此类药物组合物在制药可接受的载体(例如用于体内施用的盐溶液或其它生理学可接受的溶液)中包含分离的胎盘细胞群,或包含分离的胎盘细胞的细胞群。包含本发明分离的胎盘细胞的药物组合物可以包含本发明其他部分描述的任何分离的胎盘细胞群或分离的胎盘细胞或任何其组合。所述药物组合物可以包含胎儿的分离的胎盘细胞、母体的分离的胎盘细胞,或同时包括胎儿和母体的分离的胎盘细胞。本发明的药物组合物还可以包含来源于单个个体或胎盘的分离的胎盘细胞,或来源于多个个体或胎盘的分离的胎盘细胞。

[0258] 本发明的药物组合物可以包含任何数量的分离的胎盘细胞。例如,在不同的实施方案中,单个单位剂量的分离的胎盘细胞可以包含约、至少、或不超过  $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$  或更多个分离的胎盘细胞。

[0259] 本发明的药物组合物包含含有 50% 或更多活细胞的细胞群(即,群中至少 50% 的细胞是功能性的或活的)。优选的,群中至少 60% 的细胞是活的。更优选的,药物组合物的群中至少 70%、80%、90%、95% 或 99% 的细胞是活的。

[0260] 本发明提供的药物组合物可以包含一种或多种例如有助于移植的化合物(例如抗 T 细胞受体、免疫抑制剂等等);稳定剂如白蛋白、葡聚糖 40、明胶、羟乙基淀粉、勃脉力等等。

[0261] 在一个实施方案中,当配制为注射溶液时,所述药物组合物包含约 1% 至 1.5% 的 HSA 和约 2.5% 的葡聚糖。在一个优选的实施方案中,所述药物组合物包含每毫升约  $5 \times 10^6$  至约  $2 \times 10^7$  个细胞,其中所述细胞包含于包括 5% HSA 和 10% 葡聚糖,任选包含免疫抑制剂,例如 10mg/kg 环胞素 A 的溶液中。

[0262] 在其他的实施方案中,所述药物组合物例如溶液,包含大量细胞,例如分离的胎盘,如胎盘干细胞或胎盘多能细胞,其中所述药物组合物包含每毫升约  $1.0 \pm 0.3 \times 10^6$  至约  $5.0 \pm 1.5 \times 10^6$  个细胞。在其他的实施方案中,所述药物组合物包含每毫升约  $1.5 \times 10^6$  至约  $3.75 \times 10^6$  个细胞。在其他的实施方案中,所述药物组合物包含约  $1 \times 10^6$  个细胞/mL 至约  $50 \times 10^6$  个细胞/mL、约  $1 \times 10^6$  个细胞/mL 至约  $40 \times 10^6$  个细胞/mL、约  $1 \times 10^6$  个细胞/mL 至约  $30 \times 10^6$  个细胞/mL、约  $1 \times 10^6$  个细胞/mL 至约  $20 \times 10^6$  个细胞/mL、约  $1 \times 10^6$  个细胞/mL

至约  $15 \times 10^6$  个细胞/mL、约  $1 \times 10^6$  个细胞/mL 至约  $10 \times 10^6$  个细胞/mL。在某些实施方案中，所述药物组合物不包含可见的细胞块（即无大的细胞块）或基本上无所述可见的细胞块。如此处所用的，“大的细胞块”指不放大即可见的细胞聚集体，例如肉眼可见的，并且泛指大于约 150 微米的细胞聚集体。在一些实施方案中，所述药物组合物包含约 2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5% 或 10% 的葡聚糖，例如葡聚糖 -40。在一个具体的实施方案中，所述组合物包含约 7.5% 至约 9% 葡聚糖 -40。在一个具体的实施方案中，所述组合物包含约 5.5% 葡聚糖 -40。在某些实施方案中，所述药物组合物包含约 1% 至约 15% 的人血清白蛋白 (HSA)。在具体的实施方案中，所述药物组合物包含约 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14% 或 15% HSA。在一个具体的实施方案中，所述细胞已经被冷冻保存且融解。在另外具体的实施方案中，所述细胞已通过  $70 \mu\text{M}$  至  $100 \mu\text{M}$  过滤器过滤。在另外具体的实施方案中，所述组合物不包含可见的细胞块。在另外具体的实施方案中，所述组合物包含每  $10^6$  个细胞少于约 200 个细胞块，其中所述细胞块仅在显微镜下可见，例如光学显微镜。在另外具体的实施方案中，所述组合物包含每  $10^6$  个细胞少于约 150 个细胞块，其中所述细胞块仅在显微镜下可见，例如光学显微镜。在另外具体的实施方案中，所述组合物包含每  $10^6$  个细胞少于约 100 个细胞块，其中所述细胞块仅在显微镜下可见，例如光学显微镜。

[0263] 在一个具体的实施方案中，所述药物组合物包含每毫升约  $1.0 \pm 0.3 \times 10^6$  个细胞、约 5.5% 葡聚糖 -40 (w/v)、约 10% HSA (w/v) 和约 5% DMSO (v/v)。

[0264] 在其他的实施方案中，所述药物组合物包含大量细胞，例如在包含 10% 葡聚糖 -40 的溶液中的大量分离的胎盘细胞，其中所述药物组合物包含每毫升约  $1.0 \pm 0.3 \times 10^6$  个细胞至每毫升约  $5.0 \pm 1.5 \times 10^6$  个细胞，并且其中所述组合物不包含肉眼可见的细胞块（即不包含大的细胞块）。在一些实施方案中，所述药物组合物包含每毫升约  $1.5 \times 10^6$  至每毫升约  $3.75 \times 10^6$  个细胞。在一个具体的实施方案中，所述细胞已经被冷冻保存且融解。在另外具体的实施方案中，所述细胞已通过  $70 \mu\text{M}$  至  $100 \mu\text{M}$  过滤器过滤。在另外具体的实施方案中，所述组合物包含每  $10^6$  个细胞少于约 200 个微细胞块（即仅放大可见的细胞块）。在另外具体的实施方案中，所述药物组合物包含每  $10^6$  个细胞少于约 150 个微细胞块。在另外具体的实施方案中，所述药物组合物包含每  $10^6$  个细胞少于约 100 个微细胞块。在另外具体的实施方案中，所述药物组合物包含少于 15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3% 或 2% 的 DMSO，或少于 1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2% 或 0.1% 的 DMSO。

[0265] 此处进一步提供包含细胞的组合物，其中所述组合物通过本发明公开的方法制备。例如在一个实施方案中，药物组合物包含细胞，其中所述药物组合物通过以下方法制备，其包括过滤包含胎盘细胞例如胎盘干细胞或胎盘多能细胞的溶液以形成过滤的含有细胞的溶液；例如在冷冻保存之前用第一种溶液稀释所述过滤的含有细胞的溶液至每毫升约  $1$  至  $50 \times 10^6$ 、 $1$  至  $40 \times 10^6$ 、 $1$  至  $30 \times 10^6$ 、 $1$  至  $20 \times 10^6$ 、 $1$  至  $15 \times 10^6$  或  $1$  至  $10 \times 10^6$  个细胞；和用第二种包含葡聚糖而不包含人血清白蛋白 (HSA) 的溶液稀释得到的过滤的含有细胞的溶液以形成所述组合物。在某些实施方案中，所述稀释不超过每毫升约  $15 \times 10^6$  个细胞。在某些实施方案中，所述稀释不超过每毫升约  $10 \pm 3 \times 10^6$  个细胞。在某些实施方案中，所述稀释不超过每毫升约  $7.5 \times 10^6$  个细胞。在其他的某些实施方案中，如果过滤的含有细胞

的溶液在稀释之前包含每毫升少于约  $15 \times 10^6$  个细胞,则过滤为任选的。在其他的某些实施方案中,如果过滤的含有细胞的溶液在稀释之前包含每毫升少于约  $10 \pm 3 \times 10^6$  个细胞,则过滤为任选的。在其他的某些实施方案中,如果过滤的含有细胞的溶液在稀释之前包含每毫升少于约  $7.5 \times 10^6$  个细胞,则过滤为任选的。

[0266] 在一个具体的实施方案中,所述细胞在用第一种稀释溶液稀释和用第二种稀释溶液稀释之间冷冻保存。在另外具体的实施方案中,第一种稀释溶液包含葡聚糖和 HSA。第一种稀释溶液或第二种稀释溶液中的葡聚糖可以是任何分子量的葡聚糖,例如具有约 10kD 至约 150kD 分子量的葡聚糖。在一些实施方案中,第一种稀释溶液或第二种溶液中的葡聚糖为约 2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5% 或 10% 葡聚糖。在另外具体的实施方案中,第一种稀释溶液或第二种稀释溶液中的葡聚糖为葡聚糖 -40。在另外具体的实施方案中,第一种稀释溶液和第二种稀释溶液中的葡聚糖为葡聚糖 -40。在另外具体的实施方案中,第一种稀释溶液中的葡聚糖 -40 为 5.0% 的葡聚糖 -40。在另外具体的实施方案中,第一种稀释溶液中的葡聚糖 -40 为 5.5% 的葡聚糖 -40。在另外具体的实施方案中,第二种稀释溶液中的葡聚糖 -40 为 10% 的葡聚糖 -40。在另外具体的实施方案中,包含 HSA 的溶液中的 HSA 为 1 至 15% 的 HSA。在另外具体的实施方案中,包含 HSA 的所述溶液中的 HSA 为约 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14% 或 15% 的 HSA。在另外具体的实施方案中,包含 HSA 的溶液中的 HSA 为 10% 的 HSA。在另外具体的实施方案中,第一种稀释溶液包含 HSA。在更具体的实施方案中,第一种稀释溶液中的 HSA 为 10% 的 HSA。在另外具体的实施方案中,第一种稀释溶液包含防冻剂。在更具体的实施方案中,所述防冻剂为 DMSO。在另外具体的实施方案中,第二种稀释溶液中的葡聚糖 -40 为约 10% 的葡聚糖 -40。在另外具体的实施方案中,包含细胞的组合物包含约 7.5% 至约 9% 的葡聚糖。在另外具体的实施方案中,所述药物组合物包含每毫升约  $1.0 \pm 0.3 \times 10^6$  个细胞至每毫升约  $5.0 \pm 1.5 \times 10^6$  个细胞。在另外具体的实施方案中,所述药物组合物包含每毫升约  $1.5 \times 10^6$  个细胞至每毫升约  $3.75 \times 10^6$  个细胞。

[0267] 在另一个实施方案中,所述药物组合物通过以下方法制备,其包括 (a) 冷冻保存之前过滤包含胎盘细胞,例如胎盘干细胞或胎盘多能细胞的含有细胞的溶液以产生过滤的含有细胞的溶液;(b) 冷冻保存过滤的含有细胞的溶液中的细胞,其为每毫升约 1 至  $50 \times 10^6$ 、1 至  $40 \times 10^6$ 、1 至  $30 \times 10^6$ 、1 至  $20 \times 10^6$ 、1 至  $15 \times 10^6$  或 1 至  $10 \times 10^6$  个细胞;(c) 解冻所述细胞;和 (d) 用葡聚糖 -40 溶液以约 1 : 1 至约 1 : 11 (v/v) 的比例稀释过滤的含有细胞的溶液。在某些实施方案中,如果步骤 (a) 之前细胞数少于每毫升约  $10 \pm 3 \times 10^6$  个细胞,则过滤为任选的。在更具体的实施方案中,步骤 (b) 中的细胞以每毫升约  $10 \pm 3 \times 10^6$  个细胞冷冻保存。在更具体的实施方案中,步骤 (b) 中的细胞冷冻保存于包含约 5% 至约 10% 葡聚糖 -40 和 HSA 的溶液中。在某些实施方案中,步骤 (b) 中的稀释为不超过每毫升约  $15 \times 10^6$  个细胞。

[0268] 在另一个实施方案中,所述药物组合物通过以下方法制备,其包括:(a) 将胎盘细胞,例如胎盘干细胞或胎盘多能细胞悬浮于包含 10% HSA 的 5.5% 葡聚糖 -40 溶液中以形成含有细胞的溶液;(b) 用  $70 \mu\text{M}$  过滤器过滤所述含有细胞的溶液;(c) 用包含 5.5% 葡聚糖 -40、10% HSA 和 5% DMSO 的溶液稀释含有细胞的溶液至每毫升约 1 至  $50 \times 10^6$ 、1 至

$40 \times 10^6$ 、1 至  $30 \times 10^6$ 、1 至  $20 \times 10^6$ 、1 至  $15 \times 10^6$  或 1 至  $10 \times 10^6$  个细胞；(d) 冷冻保存所述细胞；(e) 解冻所述细胞；和 (d) 用 10% 葡聚糖 -40 以约 1 : 1 至约 1 : 11 (v/v) 的比例稀释所述含有细胞的溶液。在某些实施方案中，步骤 (c) 中的稀释物不超过每毫升约  $15 \times 10^6$  个细胞。在某些实施方案中，步骤 (c) 中的稀释物不超过约  $10 \pm 3 \times 10^6$  个细胞 /mL。在某些实施方案中，步骤 (c) 中的稀释物不超过约  $7.5 \times 10^6$  个细胞 /mL。

[0269] 在另一个实施方案中，包含细胞的所述组合物通过以下方法制备，其包括：(a) 离心大量细胞以收集细胞；(b) 将所述细胞重悬浮于 5.5% 葡聚糖 -40 中；(c) 离心所述细胞以收集细胞；(d) 将所述细胞重悬浮于包含 10% HSA 的 5.5% 葡聚糖 -40 溶液中；(e) 通过  $70 \mu\text{M}$  过滤器过滤所述细胞；(f) 将所述细胞稀释于 5.5% 葡聚糖 -40、10% HSA 和 5% DMSO 中至每毫升约 1 至  $50 \times 10^6$ 、1 至  $40 \times 10^6$ 、1 至  $30 \times 10^6$ 、1 至  $20 \times 10^6$ 、1 至  $15 \times 10^6$  或 1 至  $10 \times 10^6$  个细胞；(g) 冷冻保存所述细胞；(h) 解冻所述细胞；和 (i) 用 10% 葡聚糖 -40 以 1 : 1 至 1 : 11 稀释所述细胞。在某些实施方案中，步骤 (f) 中的稀释物不超过每毫升约  $15 \times 10^6$  个细胞。在某些实施方案中，步骤 (f) 中的稀释物不超过约  $10 \pm 3 \times 10^6$  个细胞 /mL。在某些实施方案中，步骤 (f) 中的稀释物不超过约  $7.5 \times 10^6$  个细胞 /mL。在其他的某些实施方案中，如果细胞数少于每毫升约  $10 \pm 3 \times 10^6$  个细胞，则过滤为任选的。

[0270] 组合物，例如本发明包含分离的胎盘细胞的药物组合物可以包含此处所述的任何分离的胎盘细胞。

[0271] 可以使用其他可注射的制剂，其适于施用细胞产品。

[0272] 在一个实施方案中，药物组合物包含分离的胎盘细胞，即基本上或完全为非母体来源的，即具有胎儿基因型；例如至少约 90%、95%、98%、99% 或约 100% 为非母体来源的。例如在一个实施方案中，药物组合物包含分离的胎盘细胞群，其为  $\text{CD}200^+$  和  $\text{HLA-G}^+$ ； $\text{CD}105^+$  和  $\text{CD}200^+$ ； $\text{CD}200^+$  和  $\text{OCT-4}^+$ ； $\text{CD}73^+$ 、 $\text{CD}105^+$  和  $\text{HLA-G}^+$ ； $\text{CD}73^+$  和  $\text{CD}105^+$ ，并且当所述胎盘细胞群在允许形成胚样体的条件下培养时，有助于在包含所述分离的胎盘细胞群的胎盘细胞群中形成一个或多个胚样体；或  $\text{OCT-4}^+$ ，并且当所述胎盘细胞群在允许形成胚样体的条件下培养时，有助于在包含所述分离的胎盘细胞群的胎盘细胞群中形成一个或多个胚样体；或上述组合，其中至少 70%、80%、90%、95% 或 99% 所述分离的胎盘细胞为非母体来源的。在另一个实施方案中，药物组合物包含分离的胎盘细胞群，其为  $\text{CD}10^+$ 、 $\text{CD}105^+$  和  $\text{CD}34^-$ ； $\text{CD}10^+$ 、 $\text{CD}105^+$ 、 $\text{CD}200^+$  和  $\text{CD}34^-$ ； $\text{CD}10^+$ 、 $\text{CD}105^+$ 、 $\text{CD}200^+$ 、 $\text{CD}34^-$  和  $\text{CD}90^+$  或  $\text{CD}45^-$  中的至少一种； $\text{CD}10^+$ 、 $\text{CD}90^+$ 、 $\text{CD}105^+$ 、 $\text{CD}200^+$ 、 $\text{CD}34^-$  和  $\text{CD}45^-$ ； $\text{CD}10^+$ 、 $\text{CD}90^+$ 、 $\text{CD}105^+$ 、 $\text{CD}200^+$ 、 $\text{CD}34^-$  和  $\text{CD}45^-$ ； $\text{CD}200^+$  和  $\text{HLA-G}^+$ ； $\text{CD}73^+$ 、 $\text{CD}105^+$  和  $\text{CD}200^+$ ； $\text{CD}200^+$  和  $\text{OCT-4}^+$ ； $\text{CD}73^+$ 、 $\text{CD}105^+$  和  $\text{HLA-G}^+$ ； $\text{CD}73^+$  和  $\text{CD}105^+$ ，并且当所述胎盘细胞群在允许所述形成胚样体的条件下培养时，有助于在包含所述分离的胎盘细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个胚样体； $\text{OCT-4}^+$ ，并且当所述胎盘细胞群在允许所述形成胚样体的条件下培养时，有助于在包含所述分离的胎盘细胞的胎盘细胞群中形成一个或多个胚样体；或以下的一种或多种： $\text{CD}117^-$ 、 $\text{CD}133^-$ 、 $\text{KDR}^-$ 、 $\text{CD}80^-$ 、 $\text{CD}86^-$ 、 $\text{HLA-A}$ 、 $\text{B}$ 、 $\text{C}^+$ 、 $\text{HLA-DP}$ 、 $\text{DQ}$ 、 $\text{DR}^-$  和 / 或  $\text{PDL1}^+$ ；或上述组合，其中至少 70%、80%、90%、95% 或 99% 所述分离的胎盘细胞为非母体来源的。在一个具体的实施方案中，药物组合物还包含不获自胎盘的干细胞。

[0273] 此处提供的组合物，例如药物组合物中分离的胎盘细胞可以包含源自单个供体或源自多个供体的胎盘细胞。分离的胎盘细胞可以是与指定接受者完全 HLA- 相配的、或部分

HLA- 不匹配、或完全 HLA- 不匹配的。

[0274] 5.9.3 包含分离的胎盘细胞的基质

[0275] 本发明进一步提供包含基质、水凝胶、支架等的组合物,其中包含胎盘干细胞或分离的胎盘细胞群。所述组合物可用于代替用于治疗脑或 CNS 中或周围血流破坏的液体悬浮液中的细胞,或在用于治疗脑或 CNS 中或周围血流破坏的液体悬浮液中的细胞之外使用。

[0276] 此处所述的分离的胎盘细胞可以接种在天然基质上,例如胎盘生物材料,如羊膜材料。此类羊膜材料可以是例如:直接从哺乳动物胎盘切割的羊膜;固定的或热处理的羊膜、基本干燥(即, $< 20\% H_2O$ )的羊膜、绒毛膜、基本干燥的绒毛膜、基本干燥的羊膜和绒毛膜等。优选的可以接种分离的胎盘细胞的胎盘生物材料在 Hariri, 美国申请公开号 2004/0048796 中描述,其公开内容在此全文引入作为参考。

[0277] 此处所述的分离的胎盘细胞可以悬浮在适合例如注射的水凝胶溶液中。适合此类组合物的水凝胶包括自组装的肽,例如 RAD16。在一个实施方案中,包含细胞的水凝胶溶液可以在例如模具中硬化,从而形成其中分散有细胞的、用于移植的基质。也可以培养此类基质中的分离的胎盘细胞使得细胞在移植前有丝分裂扩增。水凝胶是例如通过共价键、离子键或氢键交联的有机聚合物(天然的或合成的),从而产生三维开放的晶格结构,将水分子陷于其中形成凝胶。水凝胶形成材料包括多糖,例如褐藻胶及其盐,肽、聚膦嗪和离子交联的聚丙烯酸脂,或嵌段聚合物,例如分别通过温度或 pH 交联的聚环氧乙烷-聚丙二醇嵌段共聚物。在一些实施方案中,水凝胶或基质是可生物降解的。

[0278] 在一些实施方案中,所述制剂包含原位可聚合凝胶(参见例如,美国专利申请公开号 2002/0022676,其公开内容在此全文引入作为参考;Anseth 等人, *J. Control Release*, 78(1-3):199-209 (2002); Wang 等人, *Biomaterials*, 24(22):3969-80 (2003))。

[0279] 在一些实施方案中,所述聚合物在水性溶液(例如水、缓冲盐溶液、或乙醇水溶液)中至少是部分溶解的,所述聚合物具有带电的侧基,或其单价离子盐。具有酸性侧基、可以与阳离子反应的聚合物实例是聚(膦嗪)、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸)、丙烯酸和甲基丙烯酸的共聚物、聚(醋酸乙烯酯),以及磺化聚合物,例如磺酸化聚苯乙烯。通过丙烯酸或甲基丙烯酸与乙烯醚单体或聚合物反应形成的具有酸性侧基的共聚物也可以使用。酸性基团的实例是羧酸基、磺酸基、卤代醇基(优选氟代)、酚 OH 基和酸性 OH 基。

[0280] 此处所述的分离的胎盘细胞或其共培养物可以接种在立体框架或支架上,并植入体内。此类框架可以与刺激组织形成的任何一种或多种生长因子、细胞、药物或其它组分联合植入。

[0281] 可以使用的支架的实例包括非织毡(nonwoven mat)、多孔泡沫、或自组装肽。非织毡可以利用含有合成的可吸收的乙醇酸和乳酸共聚物(例如:PGA/PLA)的纤维形成(VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N. J.)。由例如聚( $\epsilon$ -己内酯)/聚(乙醇酸)(PCL/PGA)共聚物组成的泡沫也可作为支架使用,其通过例如冷冻干燥或低压冻干处理形成(参见例如美国专利号 6,355,699)。

[0282] 在另一个实施方案中,分离的胎盘细胞还可以接种在毡上,或与其接触,所述毡可以由生物可吸收材料如 PGA、PLA、PCL 共聚物或掺合物或透明质酸制成的复丝组成。

[0283] 在另一个实施方案中,此处提供的分离的胎盘细胞可以接种在可以是复合结构的泡沫支架上。此类泡沫支架可以模制成有用的形状,例如需要修复、取代或强化的机体特定

结构的一部分。在一些实施方案中,在接种细胞前,用例如 0.1M 乙酸处理框架,再将框架孵育在聚赖氨酸、PBS 和 / 或胶原中,从而增加细胞附着。可以修饰基质的外表面来改善细胞的附着或生长,以及组织的分化,例如通过血浆包被基质,或添加一种或多种蛋白质(例如:胶原、弹性纤维、网状纤维)、糖蛋白、葡萄糖胺聚糖(例如:硫酸肝素、4-硫酸软骨素、6-硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素等)、细胞基质,和 / 或其它材料,例如但不限于明胶、褐藻胶、琼脂、琼脂糖和植物胶等。

[0284] 在一些实施方案中,所述支架包括使其具有非血栓形成性的材料,或用所述材料处理。这类处理和材料还可以促进和维持内皮生长、迁移和胞外基质沉积。这类材料和处理的实例包括但不限于天然材料例如基膜蛋白(如层粘连蛋白和 IV 型胶原)、合成材料例如 EPTFE,和含硅嵌段聚氨酯脲(segmented polyurethaneurea silicones)例如 PURSPANTM(The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.)。所述支架还可以包含抗血栓形成剂例如肝素;所述支架还可以在用分离的胎盘细胞接种之前进行处理以改变表面电荷(例如用血浆包被)。

[0285] 在一个实施方案中,所述分离的胎盘细胞以约  $0.5 \times 10^6$  至约  $8 \times 10^6$  个细胞/mL 接种在合适的支架上或与其接触。

[0286] 5.10 永生化的胎盘细胞系

[0287] 哺乳动物胎盘细胞通过用任何含有生长促进基因的合适的载体转染可以条件性永生,即,编码在适宜条件下促进所转染的细胞生长的蛋白质的基因,从而所述生长促进蛋白质的产量和 / 或活性可通过外部因子调控。在优选的实施方案中,所述生长促进性基因是癌基因,例如但不限于:v-myc、N-myc、c-myc、p53、SV40 大 T 抗原、多瘤病毒大 T 抗原、E1a 腺病毒或人乳头瘤病毒的 E7 蛋白。

[0288] 生长促进性蛋白质的外部调控可以通过将生长促进性基因置于外部可调控启动子的控制之下来实现,例如其活性能够通过例如改变所转染的细胞的温度或者与细胞接触的培养基的组成来控制的启动子,在一个实施方案中,可以采用四环素(tet)控制的基因表达系统(参见 Gossen 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :5547-5551,1992 ;Hoshimaru 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 :1518-1523,1996)。不存在 tet 时,此载体内 tet 控制的转录激活子(tTA)强有力地激活来自  $ph_{CMV^{*1}}$  的转录,其为与操纵子序列融合的来自人巨细胞病毒的最小启动子。tTA 是大肠杆菌(Escherichiacoli)转座子 -10 来源的 tet 抗性操纵子的阻遏蛋白(tetR)和单纯疱疹病毒 VP16 酸性结构域的融合蛋白。无毒低浓度的 tet(例如  $0.01-1.0 \mu g/mL$ )几乎完全消除 tTA 的转录激活作用。

[0289] 在一个实施方案中,载体还含有编码可选择性标记(例如赋予药物抗性的蛋白质)的基因。细菌新霉素抗性基因(neoR)是一种这样的所述方法可以采用的标记。携带 neoR 的细胞可以通过本领域普通技术人员公知的方法来选择,例如向生长培养基中添加例如  $100-200 \mu g/mL$  的 G418。

[0290] 转染可以通过本领域普通技术人员公知的多种方法中的任何一种来实现,包括但不限于逆转录病毒感染。通常,细胞培养物可以通过与从载体生产细胞系收集的条件培养基和含 N2 添加剂的 DMEM/F12 的混合物孵育来转染。例如,如上文所述制备的胎盘细胞培养物可以在例如 5 天后,通过在体外在一体积的条件培养基和两体积的含 N2 添加剂的 DMEM/F12 中孵育大约 20 小时进行感染。携带可选择标记的经转染的细胞可以随之如上文所述进

行选择。

[0291] 在转染之后,培养物在允许增殖的表面上代,例如允许至少 30%的细胞在 24 小时的周期内倍增。优选底物是聚鸟氨酸 / 层粘连蛋白底物 (由包被聚鸟氨酸 (10  $\mu$ g/mL) 和 / 或层粘连蛋白 (10  $\mu$ g/mL) 的组织培养塑料组成)、聚赖氨酸 / 层粘连蛋白底物、或用纤粘连蛋白处理的表面。培养物然后每 3-4 天用生长培养基补料,培养基可以或不添加一种或多种增殖促进因子。当培养物不足 50%汇合度时可以向生长培养基中添加增殖促进因子。

[0292] 条件性永生化的胎盘细胞系可以利用标准技术传代,例如在 80-95%汇合时通过胰酶消化。在一些实施方案中,多达大约第二十几代有益于维持选择 (通过例如,对含新霉素抗性基因的细胞添加 G418)。细胞还可以在液氮中冷冻进行长期储存。

[0293] 可以从如上文所述制备的条件性永生化人胎盘细胞系中分离克隆细胞系。一般而言,所述克隆细胞系可以利用标准技术如通过有限稀释或利用克隆环分离并扩增。克隆细胞系可以大体如上文所述进行补料和传代。

[0294] 条件性永生化的胎盘干细胞系可以是但不必须是克隆的,一般可以通过在有助于分化的培养条件下抑制生长促进性蛋白质的产量和 / 或活性来诱导分化。例如,如果编码生长促进性蛋白质的基因处于外部可调控启动子的控制之下,则可以改变条件例如温度或培养基的组成,以抑制生长促进性基因的转录。对于如上文所讨论的四环素控制的基因表达系统,可以通过添加四环素抑制生长促进基因的转录来实现分化。通常,1  $\mu$ g/mL 四环素在 4-5 天足以启动分化。为促进进一步的分化,生长培养基中可以包含另外的试剂。

[0295] 5.11 试剂盒

[0296] 另一方面,此处提供试剂盒,适于治疗患有 CNS 中或周围血流破坏的个体,例如患有中风的个体,其在不同于装载试剂盒成分的另外容器中包含塑料贴壁组织培养的多能胎盘细胞,例如胎盘干细胞或胎盘多能细胞,和其分离的群,例如以上 5.4.2 节所述的细胞,以及使用说明书。优选的,提供在药学可接受溶液中的胎盘干细胞,例如适于颅内施用的溶液或适于静脉注射施用的溶液。在某些实施方案中,胎盘干细胞或胎盘多能细胞为此处所述的任意 CD10<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup> 胎盘细胞,例如 CD10<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 胎盘细胞。

[0297] 在某些实施方案中,试剂盒包含有助于递送胎盘细胞至个体的一种或多种组分。例如在某些实施方案中,试剂盒包含有助于颅内递送胎盘细胞至个体的组分。在所述实施方案中,试剂盒可包含例如适于递送细胞至个体的注射器和针;能够显象受感染 CNS 组织的放射性或非放射性化合物 (例如钴 55) 等等。在所述实施方案中,胎盘细胞可包含在袋中的试剂盒中或一个或多个小瓶中。在某些其他的实施方案中,试剂盒包含有助于静脉内或动脉内递送胎盘细胞至个体的组分。在所述实施方案中,胎盘细胞可包含在瓶或袋内 (例如血袋或能包含多达约 1.5L 包含所述细胞的溶液的类似袋),并且所述试剂盒另外包含适于递送细胞至个体的管和针。

[0298] 另外,试剂盒可包括减少个体疼痛或炎症的一种或多种化合物 (例如止痛剂、甾体或非-甾体抗炎化合物) 等等。试剂盒还可以包括抗菌或抗病毒化合物 (例如一种或多种抗生素)、减少个体焦虑的化合物 (例如阿普唑仑)、减少个体免疫应答的化合物 (例如环孢素 A)、抗组胺药 (苯海拉明、氯雷他定、地氯雷他定、奎替阿平、非索非那定、西替立嗪、异丙嗪、扑尔敏、左旋西替利嗪、盐酸西咪替丁、法莫替丁、雷尼替丁、尼扎替丁、罗沙替丁、

拉呋替丁等等)。

[0299] 另外,试剂盒可包括一次性用品,例如无菌擦、一次性纸品、手套等等,其有助于准备个体用于递送,或其降低个体中由于胎盘细胞的施用导致感染的可能性。

## [0300] 6. 实施例

### [0301] 6.1 实施例 1:颅内施用分离的胎盘细胞治疗中风

[0302] 本实施例证实了在治疗与脑或 CNS 中或周围血流破坏有关的症状中施用分离的胎盘细胞的功效。

[0303] 通过利用约 1 至约 2mg/ml 的胶原酶 I 酶促消化例如 30 分钟,随后用约 0.25% 浓度的胰蛋白酶 37°C 酶切消化 10 分钟,获得 CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup> 塑料贴壁组织培养的胎盘细胞。Sprague-Dawley 大鼠用作中风模型。大鼠为已建立的模型动物,其用于研究中风的结果和不同疗法对中风症状的效果。参见例如,Chen 等人,“A Model of Focal Ischemic Stroke in the Rat:Reproducible Extensive Cortical Infarction”,*Stroke* 17(4):738-743(1986)。每种条件使用 10 只动物。

[0304] MCA 中风手术:所有手术过程在无菌条件下进行。动物用氯化镁合剂麻醉(300mg/kg,经腹膜)并且检查疼痛反射。对深度麻醉下的动物进行 MCA 闭塞手术。MCA 缝合技术涉及经过颈动脉插入细丝以实现 MCA 的接合,由此阻断来自总颈动脉以及来自 Willis 圆周的血流。确定且通过腹中线颈切口分离右总颈动脉。缝线大小为 4-0,由无菌、非-可吸收缝线制成(Ethicon, Inc., Somerville, NJ),缝线尖端利用橡胶胶水形成直径为 24 至 26-量规大小的锥形。约 15 至 17mm 的细丝从外部和内部颈动脉接合点插入以封闭 MCA。右 MCA 封闭一小时。基于已公开的研究,一小时 MCA 封闭引起最大程度的梗塞。参见 Borlongan, *Neurorep.* 9(16):3615-3621(1998);Borlongan 等., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52(1):225-229(1995);Borlongan 等, *Physiol. Behav.* 58(5):909-917(1995)。加热板和直肠温度计用于维持体温在正常限度内。利用激光多普勒测定成功的封闭和再灌注。激光多普勒探头置于 MCA 远端以测定封闭之前、期间和之后的脑血流量。

[0305] 在局部缺血后 2 天时,颅内直接注射至局部缺血部位而施用胎盘贴壁细胞(大约 5 微升中 400,000 个细胞)。大鼠仅给予赋形剂(10%葡聚糖和 5%人血清白蛋白)、 $4 \times 10^5$  个活细胞、10mg/kg 环胞素 A 与  $4 \times 10^5$  个活细胞、或  $4 \times 10^5$  个无活力的细胞和环胞素 A。

[0306] 在局部缺血后第 7 和 14 天,测定动物中风诱发的运动不平衡。利用提高身体摆动检测(EBST)或 Bederson 检测评估运动不平衡。参见 Borlongan & Sanberg, *J. Neurosci.* 15(7):5372-5378(1995)。EBST 中,通过拎起尾部升高动物,并且记录摆动习性的频率和方向。大鼠放入有机玻璃框中并且允许其适应约 2 分钟。握住大鼠尾根部大约 1 英寸,使得大鼠的鼻子离表面大约 1 英寸。大鼠保持垂直或中线位置,定义为头部向右或左摆动不超过 10°。每当大鼠从垂直移动其头部至右或左时记录摆动;当所述动物的头部从垂直分别向右或左移动 10° 或以上时计数右摆动或左摆动。其中所述大鼠重复努力至特定侧时,仅记录单次摆动。单次摆动后,动物躺于有机玻璃框中放置,且允许在重复试验之前自由移动 30 秒。每只动物反复这些步骤 20 次(每种情形 10 只动物)。

[0307] 计数摆动总数,以及右摆动和左摆动的次数。当摆动次数相等或超过 70% 时摆动习性被认为有偏差。利用二-因子方差分析(ANOVA)分析结果,并且利用 Tukey HSD(honestly 显著差异)检验进行 hoc 后检验。



[0308] 还利用测定感觉运动作业的Bederson Neurological 检验评估大鼠中胎盘细胞诱导的神经性缺损修复。参见 Bederson 等., Stroke 17 :472-6(1986) ;Altumbabic, Stroke 29 :1917-22(1998)。

[0309] 对于 Bederson 检验,利用 4 种检测获得每只大鼠的神经学得分,其包括:(a) 自发同侧绕圈的观察,从 0(不绕圈)至 3(连续绕圈)分级;(b) 对侧后肢缩回,其测定动物横向移动 2 至 3cm 后交替后肢的能力,从 0(立即交替)至 3(数分钟后交替或不交替)分级;(c) 圆木行走能力,从 0(大鼠很容易穿越 2.4cm 宽 80cm 长的圆木)至 3(大鼠不能停留在圆木上 10 秒)分级;和 (d) 双侧前爪紧握,其测定握在 2mm 直径钢杆上的能力,从 0(大鼠具有正常的前爪紧握习性)至 3(大鼠不能用前爪紧握)分级。增加在第 7 和 14 天评估约 15 分钟时间内进行的所有 4 种检测的得分,以给出 0 至 12 的神经性缺损得分,得分越低表示大鼠神经学上越正常。

[0310] 结果

[0311] 第 0 天,就在局部缺血诱导之前进行,所有动物呈现大致正常的(无偏差的)摆动习性(图 1,基线)。局部缺血后第 2 天,给予胎盘细胞,所有动物呈现几乎 100%局部缺血诱发的摆动习性偏差(图 1)。第 7 和 14 天,接受有活力胎盘细胞的动物显示显著的改善,分别表现大致 65%和 60%的摆动偏差(图 1,第 7 和 14 天)。接受无活力胎盘细胞和环胞素 A 或仅赋形剂的动物显示无统计上的显著改善。

[0312] 在局部缺血诱导之前第 0 天评估的大鼠全部为神经学上正常的,并且在 Bederson 检验中缺损得分为零(图 2,基线)。局部缺血诱导后第 2 天,给予分离的胎盘细胞,仅接受赋形剂的大鼠显示总计平均缺损得分为大约 2.5(图 2,第 2 天)。第 7 和 14 天,接受胎盘细胞的大鼠显示神经性缺损得分统计学上显著改善,分别从大约 2.5 的得分改善至约 1.7 和 1.1。正如 EBST 的情况,仅接受赋形剂或无活力胎盘细胞和环胞素 A 的大鼠不显示神经性缺损得分在统计学上的显著改善。

[0313] 总之,通过两种神经性缺损检测表明,在局部缺血动物模型中,局部缺血诱导后第 2 天给予  $4 \times 10^5$  个人胎盘细胞明显改善了所述模式动物的神经学功能。给予环胞素 A 以抑制任何针对所述胎盘细胞的宿主免疫反应并不是胎盘细胞引起神经改善所必需的。

[0314] 6.2 实施例 2:利用静脉内给予的分离的胎盘细胞治疗中风

[0315] 本实施例证实了在治疗与脑或 CNS 中或周围血流破坏有关的症状,例如治疗低氧损伤或缺氧损伤中静脉内给予分离的胎盘细胞的功效。例如,此处呈现的结果表明,相比接受无活力人胎盘细胞的动物,有活力的人胎盘细胞的静脉内给予促进给予了胎盘细胞的动物在运动和神经检测中剂量-依赖性的行为康复。

[0316] 如本发明其它地方所述的,通过酶促消化获得分离的  $CD34^+$ 、 $CD10^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$  塑料贴壁组织培养的胎盘细胞。Sprague-Dawley 大鼠用作中风模型,并且如以上实施例 1 所述封闭中动脉封闭。封闭后第 2 天,受者大鼠给予大约  $5 \mu L$  赋形剂(10%葡聚糖和 5%人血清白蛋白)中的  $4 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $4 \times 10^6$  或  $8 \times 10^6$  个胎盘细胞,或作为对照的赋形剂中无活力的细胞。如以上实施例 1 所述的,在手术之前第 0 天评估大鼠,并且在手术后第 2、14、28、56 和 84 天经过提高的身体摆动检测(EBST)。进行改进的 Bederson 检测,其中受者大鼠评估(1)前肢缩回,其测定动物在横向移动 2 至 3cm 后前肢交替的能力,从 0(立即交替)至 3(数秒后交替或不交替)分级,(2)圆木行走能力,从 0(大鼠很容易穿越 2.4cm 宽,

80cm 长的圆木) 至 3(大鼠不能在所述圆木上停留 10 秒) 分级;和 (3) 双侧前爪紧握,其测定握在 2mm 直径钢杆上的能力,从 0(大鼠具有正常的前爪紧握习性) 至 3(大鼠不能用前爪紧握) 分级。计算在每个评估天约 15 分钟时间内进行的所有 3 种检测的得分之和,以给出神经性缺损得分(最大可能得分,9 分除以 3 种检测=3)。EBST 和 Bederson 检测的结果通过以上实施例 1 所述的二-因子方差分析(ANOVA) Tukey HSD 检验评估。

[0317] 在第 84 天杀死大鼠用于尸检和评估胎盘细胞的移植和分化。简而言之,在 40× 放大倍数下检查 20 μ m 低温恒温器切片组织,并且利用基于 PC 图像工具的计算机程序数字化。脑切片经盲-编码。利用标准的 ABC 方法处理组织切片。利用人特异性抗体 HuNu,其不与啮齿类细胞表面标记或其他啮齿类蛋白质交叉反应,评估人胎盘来源的干细胞移植物存活的细胞移植和分化指数。为了检测细胞移植物中神经元表型的表达,利用使用神经元标记 MAP2 的免疫组织化学分析。处理另外的脑切片用于 GFAP 和 O4,以揭示所移植细胞的神经胶质和少突神经胶质细胞表型的表达。

[0318] 人胎盘来源的细胞静脉内移植不需要免疫抑制。

[0319] 本研究中的所有动物呈现基线的正常习性,并且达到在中风后第 2 天移植之前大脑局部缺血诱导成功的标准。从中风后第 7 天时移植后最早时间点检验开始,行为检验揭示相比接受无活力人胎盘来源细胞的中风动物,接受有活力人胎盘来源细胞的中风动物在运动和神经学功能上呈现剂量-依赖的显著改善。直至中风后第 84 天,在接受有活力人胎盘来源细胞的中风动物中,存在上述两项进一步改善增强的趋势。在任何移植动物中,没有检测到中风诱发的行为缺损加剧,包括那些接受非活细胞移植的动物。在移植成熟期间,在接受非活细胞的动物中存在自发行为康复的一般趋势,但这种非特异性的、非移植介导的功能改善相比移植手术前(即中风后第 2 天)的动物没有达到统计学上的显著性。

[0320] 在移植后早期,接受 800 万高剂量活细胞的中风动物清楚地表现出运动和神经学任务的实际改善。然而随着时间的过去,接受较低剂量活细胞的中风动物也呈现很强的行为缺陷减弱,其大致可与高剂量的 800 万活细胞相比。

[0321] 在局部缺血诱导之前第 0 天评估的大鼠全部为神经学上正常的,并且缺损得分为零(图 3,基线)。局部缺血后第 2 天给予胎盘干细胞,所有动物呈现几乎 100% 局部缺血诱发的摆动习性偏差(图 3)。相比对照,在第 7、14、28、56 和 84 天的 EBST 中,接受有活力的分离胎盘细胞的动物显示显著的、剂量-依赖的改善,并且还显示剂量之间的显著改善( $p < 0.01$ ),但所有天数中  $4 \times 10^6$  对比  $8 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞以及第 7 天  $4 \times 10^5$  对比  $1 \times 10^6$  个分离的胎盘细胞除外。参见图 3。接受无活力的分离胎盘细胞的动物相比对照不显示统计学上显著的改善。

[0322] 对于 Bederson 检验,在局部缺血诱导之前第 0 天评估的大鼠全部为神经学上正常的,并且缺损得分为零(图 4,基线)。局部缺血诱导后第 2 天,给予分离的胎盘细胞,仅接受无活力细胞的大鼠显示总计平均缺损得分为大约 2.5-3.0(图 2,第 2 天)。在第 7、14、28、56 和 84 天,相比接受无活力细胞的大鼠,接受分离的胎盘细胞的大鼠显示统计学上显著的神经性缺损得分的改善(在所有情况下  $p < 0.01$ )。第 7 天 ( $4 \times 10^5$  对比  $8 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$  对比  $8 \times 10^6$ ) 以及第 14 和 28 天 ( $4 \times 10^5$  对比  $4 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^5$  对比  $8 \times 10^6$ ) 的改善呈现特别显著的 ( $p < 0.01$ ) 剂量-依赖性。正如 EBST 的情况,仅接受赋形剂或无活力分离的胎盘细胞和环胞素 A 的大鼠不显示神经性缺损得分在统计学上显著的改善。

[0323] 因此,静脉内给予分离的胎盘细胞促进运动和神经学检验中剂量-依赖性的行为康复。早在给予后第7天功能即有明显改善,并具有在移植后3个月期间更好康复的增加趋势。在任何受者大鼠中没有观察到明显有害的行为副作用。

[0324] 因此,此处呈现的结果表明静脉内给予用于治疗与脑中或周围血流破坏有关的症状的分离的胎盘细胞的安全性和功效。例如,没有移植的动物显示中风诱发的行为异常的加剧。相比接受无活力人胎盘来源的细胞的动物,那些接受活细胞的动物呈现中风诱发的行为缺损的显著改善以及局部缺血边缘部分宿主细胞的显著恢复。此外,在任何移植动物中没有检测到形成肿瘤或异位组织。

[0325] 6.3 实施例3:利用胎盘细胞经静脉内途径治疗中风其他神经学检验评估

[0326] 本实施例证实了利用胎盘干细胞治疗中风的有效性,如通过提高摆动检验和Bederson 检验以外的神经学检验所评估的。

[0327] 6.3.1 神经学检验

[0328] 对Wistar大鼠如下进行大脑中动脉封闭手术。通过将外科尼龙细丝推进雄性Wistar大鼠(270-300g,2-3m)内部颈动脉中(ICA)以阻断MCA来源,诱发的2小时大脑中动脉封闭(MCAo)。简而言之,大鼠用用于预麻醉的瓶中的2%异氟烷麻醉,并且利用与改良的FLUOTEC 3 Vaporizer(Fraser Harlake,Orchard Park,New York)连接且用其调节的面罩在2:1 N<sub>2</sub>O:O<sub>2</sub>混合物的1.5%异氟烷中自主呼吸。利用反馈调节水加热系统在整个手术过程维持直肠温度在37°C(再循环垫和K模块,并且经直肠内T型热电偶监测)。颈中央开1cm的切口,并且在操作显微镜(Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY)下暴露右总颈动脉(CCA)、外颈动脉(ECA)和内颈动脉(ICA)。CCA和ICA利用显微外科手术钳(Codman & Shurtleff, Inc., Randolph, MA)暂时夹住。尖端通过靠近火焰加热而变圆的4-0尼龙缝线经过小的穿刺术插入ECA中。除去显微外科手术钳。根据动物重量确定的尼龙缝线的线段,从ECA温和地推入ICA腔直至所述缝线阻断MCA源头。尼龙细丝保留在ICA内部2小时(h),并且闭合所述颈切口。将所述动物移到笼中苏醒。MCAo 2小时后,用异氟烷再麻醉动物,并且通过撤回细丝直至尖端贯通ECA腔而恢复血流。随后闭合切口。

[0329] 粘附性CD10<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>塑料贴壁组织培养的胎盘细胞通过静脉内途径给予(尾部静脉注射)。经MCAo的动物随机分成五组:MCAo后第1天给予(1)人皮肤成纤维细胞作为细胞对照,(2)葡聚糖对照,(3)1×10<sup>6</sup>个胎盘细胞剂量,(4)4×10<sup>6</sup>个胎盘细胞剂量和(5)8×10<sup>6</sup>个胎盘细胞剂量。行为检验(粘贴物检验,足失误和mNSS检验)在MCAo后第1天研究治疗(基线)之前,以及MCAo后第7、14、21、28、42和56天进行。根据如下所述的三种行为检验,测定胎盘细胞对机能恢复的剂量反应效果。

[0330] 改进的神经学严重程度得分(mNSS表1):按0至18(正常得分0;最大缺陷得分18,表1)的等级分级。一个得分点表示无力完成所述检验或缺乏所检测的反射;因此得分越高损伤越严重。

[0331] 表1:改进的神经学严重程度得分计分标准。

[0332]

[0333]

运动检验	最大的分
<b>通过尾部升高大鼠:</b> 1 前肢弯曲 1 后肢弯曲 1 30秒内头部移动相对垂直轴大于10°	3
<b>在地面行走:</b> 0 正常的行走 1 不能走直线 2 向轻瘫侧绕圈 3 倒向轻瘫侧	3
<b>感官检验:</b> 1 位置检验(视觉和触觉检验) 1 本体感受性检验(深感觉,爪推压桌子边缘以刺激四肢肌肉)	2
<b>圆木平衡检验:</b> 0 以稳定的姿势平衡 1 抓住圆木侧 2 抱住圆木并且一肢从圆木掉下 3 抱住圆木并且二肢从圆木掉下,或在圆木上旋转(>60秒) 4 试图在圆木上平衡但落下(>40秒)	6
<b>反射和异常活动:</b> 1 耳廓反射(当触碰耳道时头摇动) 1 角膜反射(当用棉花稍微触碰角膜时眨眼) 1 惊吓反射(对来自拍手的简短响声的运动响应) 1 癫痫发作、肌阵挛、肌张力障碍	4
<b>最大的分:</b>	18

[0334] 粘贴物移除感觉检验:所有大鼠熟悉测试环境。初期试验中,两小块背面有粘贴物的纸片(一样大小,113.1mm<sup>2</sup>用于一个月内检验;56.6mm<sup>2</sup>用于一个月之后检验)用作双侧触觉刺激物,其覆盖每只前肢腕关节上的桡骨远端区。随后大鼠放回笼中。每天反复5次记录从前肢除去每个刺激物的时间。

[0335] 足失误检验:动物放于抬高的网格面(30cm×45cm),比稳固的基底面高2.5cm,具有2.5cm×2.5cm直径的开口。动物趋向在网格上用置于网架上的爪移动。当动物不正确地放置爪时,前肢落于网格中的一个开口。当爪在铁丝网之间落下或滑倒时,记录为足失误。总共计数100步(每只前肢的运动),记录左前肢的足失误总数,并且确定左爪足失误占全部步数的百分比。结果:

[0336] 改进的神经学严重程度得分(mNSS):用4.0×10<sup>6</sup>个细胞治疗的动物组证实在第

7-56 天相比赋形剂对照 mNSS 得分有改善 ( $p < 0.05$ ) (图 5)。

[0337] 粘贴物移除感觉检验:用  $4.0 \times 10^6$  个细胞治疗的动物组在粘贴物移除感觉检验中治疗后第 14 天显示比赋形剂对照或细胞对照有改善 ( $p < 0.05$ ), 并且改善维持在整个研究期间 (图 6)。另外, 用  $8.0 \times 10^6$  个细胞治疗的动物在治疗后第 42 和 56 天显示改善 ( $p < 0.05$ )。

[0338] 足失误检验:用  $4.0 \times 10^6$  个细胞治疗的动物组在治疗后第 7 天显示比赋形剂对照或细胞对照的改善, 并且改善维持在整个研究期间 (图 7)。

[0339] 基于以上研究, 相比成纤维细胞对照和葡聚糖对照, 可以确定大鼠中风后的治疗呈剂量依赖性地改善了功能结果。本研究中用于大鼠治疗的胎盘干细胞最适量确定为  $4 \times 10^6$ 。

[0340] 6.3.2 增殖和突触可塑性研究

[0341] 为了评估给予胎盘干细胞是否有助于形成新血管, 在 MCAo 后 24 小时开始给实验动物注射 5'-溴基-2'-脱氧尿苷 (BrdU; 0.007N NaOH 生理盐水中 50mg/kg, Sigma, St, Louis MO), 并每天注射共 14 天。处死实验动物并且获得封闭区域的脑组织切片, 用 BrdU 染色。实验动物用氯胺酮 (80mg/kg) 和甲苯噻嗪 (13mg/kg i.p. 注射) 麻醉, 并且通过爪收缩反射监测麻醉深度。麻醉后, 从心脏取出 2mL 血。制备血清并且在  $-20^\circ\text{C}$  存储。随后所述动物用盐水 (大鼠约 200mL) 灌流心脏穿刺, 随后利用 Simon Varistaltic 泵进行 4% 低聚甲醛 (大鼠约 50mL) 灌流。

[0342] 切下脑并且固定在 4% 低聚甲醛中 48-72 小时, 随后石蜡包埋用于免疫染色。利用大鼠脑基质 (Activational Systems Inc., Warren, MI), 每个前脑切成 2mm 厚的冠状块, 每个动物共 7 块。获自最适量胎盘干细胞治疗 ( $4 \times 10^6$  个细胞)、葡聚糖 MCAo 对照和 FBC 对照组的脑切片用于免疫染色。标准的石蜡块获自病变中央 (前囟  $-1\text{mm}$  至  $+1\text{mm}$ )。从所述块切下连续的  $6 \mu\text{m}$  厚切片。三个冠状脑切片用于每次免疫组织化学染色。进行 BrdU 抗体、增殖细胞标记 (1 : 100, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)、冯·威利布兰德因子 (vWF, 1 : 400; Dako, Carpinteria, CA)、双皮层蛋白 (DCX, 迁移成神经细胞的标记) (C-18, 羊多克隆 IgG 抗体, 1 : 200 稀释, Santa Cruz) 和突触素 (Boehringer Mannheim Biochemica, Monoclonal antibody, clone SY 38, 1 : 40) 的免疫染色。BrdU 免疫染色切片用  $40\times$  物镜 (Olympus BX40) 经 MCID 计算机图象分析系统 (Imaging Research, St. Catharines, Canada) 数字化。计数每个切片中位于局部缺血病变边界区域的总共 10 个扩大薄壁血管内的 BrdU 阳性细胞。

[0343] 对于半定量突触素免疫反应, 免疫染色的冠状切片和每个切片中来自局部缺血边缘部分 (皮层和纹状体) 的八个视野在  $20\times$  物镜下数字化。测定阳性区域。数据计算为阳性区域的百分比。

[0344] 结果:

[0345] 如通过提高局部缺血脑中内皮细胞增殖和血管密度所测定的, 相比 FBC 对照和葡聚糖对照, 发现给予  $4 \times 10^6$  个胎盘干细胞明显提高血管生成 (图 8)。此外, 如通过局部缺血脑中提高突触素表达所测定的, 相比 FBC 对照, 给予  $4 \times 10^6$  个胎盘干细胞明显提高突触可塑性。

[0346] 6.4 实施例 4: 利用多能胎盘细胞治疗中风

[0347] 62 岁的个体, 左边偏瘫; 面部左边肌衰弱和身体左边知觉麻木并降低。在所述症状表现出来之前以静发展超过了两个小时。诊断为中风。诊断一小时内所述个体以每毫升约  $1 \times 10^7$  细胞的浓度给予 100-200 毫升多能、塑料贴壁组织培养的胎盘细胞。在某些实施方案中, 测定所给予的多能胎盘细胞中  $> 90\%$  为  $CD34^-$ 、 $CD10^+$ 、 $CD105^+$  和  $CD200^+$ 。在给予后 12 小时、24 小时、48 小时、4 天和 7 天评估所述个体的左侧肌力或麻木的可辨别改善。任选给予第二次。

[0348] 6.5 实施例 5: 治疗中风、低氧损伤或缺氧损伤的胎盘细胞制剂

[0349] 过滤多能  $CD34^-$ 、 $CD10^+$ 、 $CD105^+$  和  $CD200^+$  胎盘细胞除去细胞块, 并且调至每毫升溶液  $10 \pm 3 \times 10^6$  个细胞, 所述水溶液包含 5.5% (w/v) 葡聚糖 -40、10% (w/v) 人血清白蛋白和 5% (v/v) 二甲亚砜 (DMSO)。制剂中细胞总数为约  $4-7 \times 10^9$  个细胞。

[0350] 所述细胞配制为 50mL 冷冻容器中的 20mL 等份并且冷冻。等分细胞用 10% 葡聚糖 -40 氯化钠溶液稀释为 1000mL 的注射袋中。

[0351] 等同:

[0352] 此处公开的组合物和方法不限于此处所述的具体实施方案所述的范围。实际上, 除那些所述的内容之外, 根据上述描述和附图, 组合物和方法的各种改变对本领域技术人员是显而易见的。所述改变意在落入所附权利要求的范围内。

[0353] 此处引用的各种公开出版物、专利和专利申请, 每篇的公开内容整体引入作为参考。

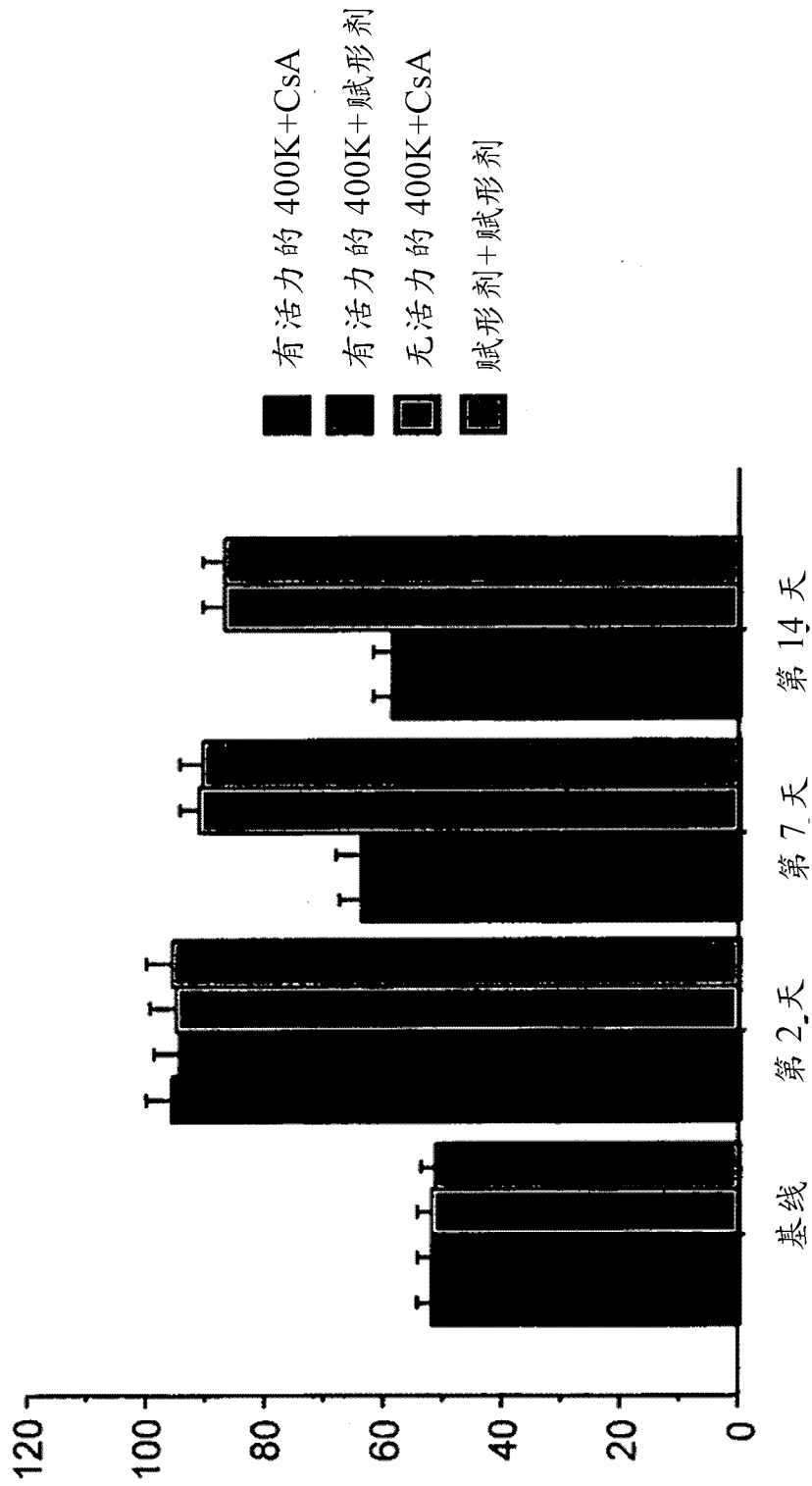


图 1

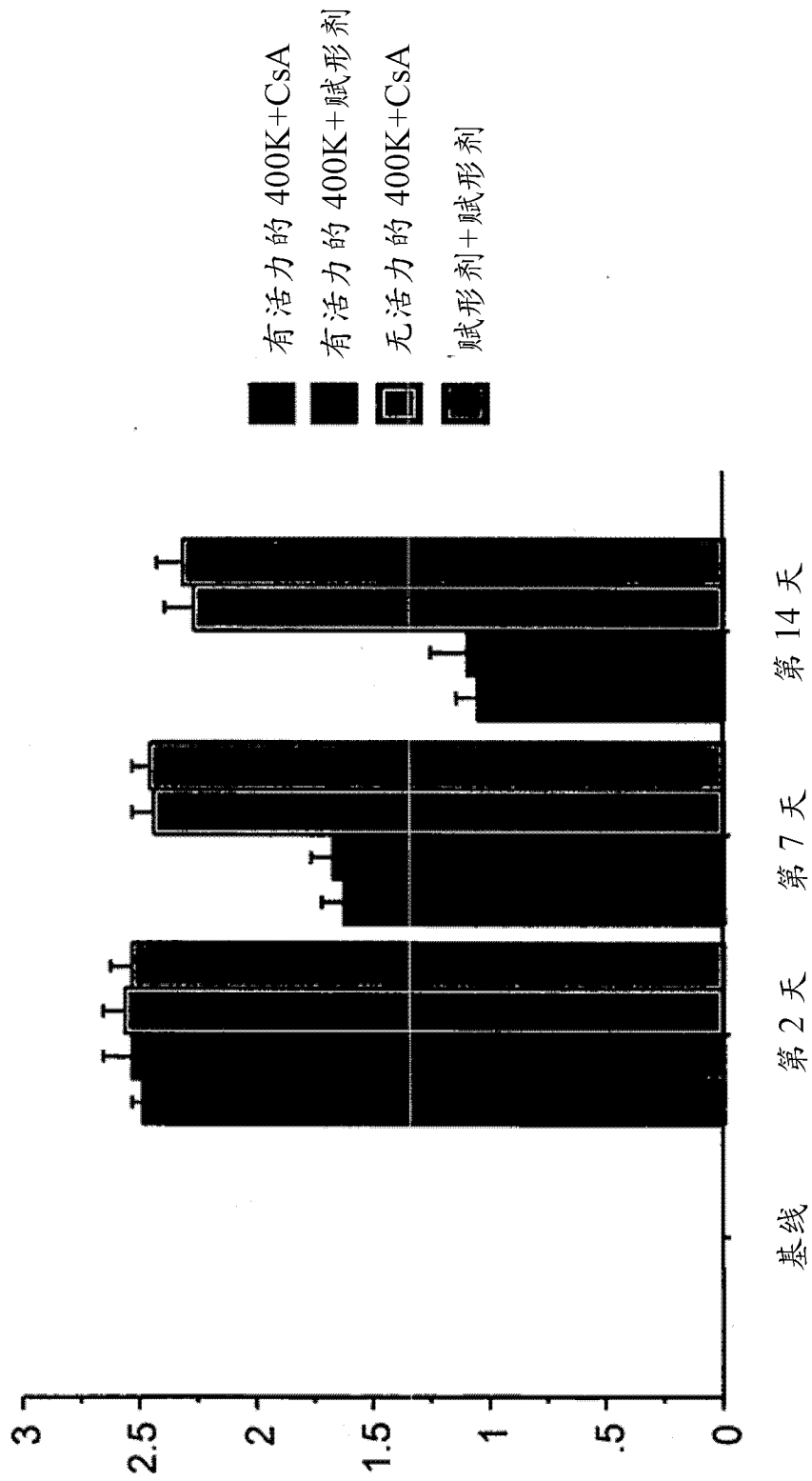


图 2



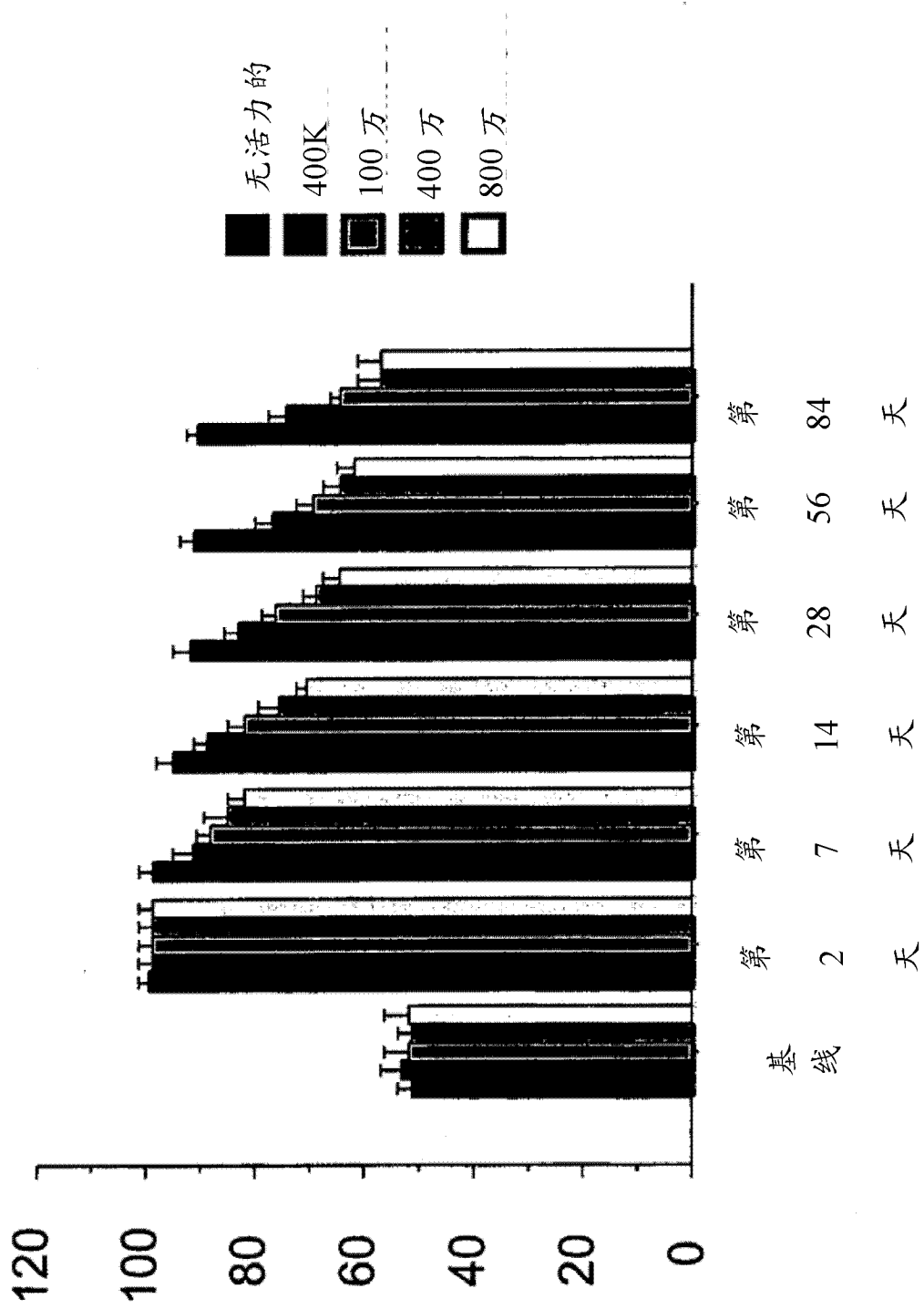


图 3

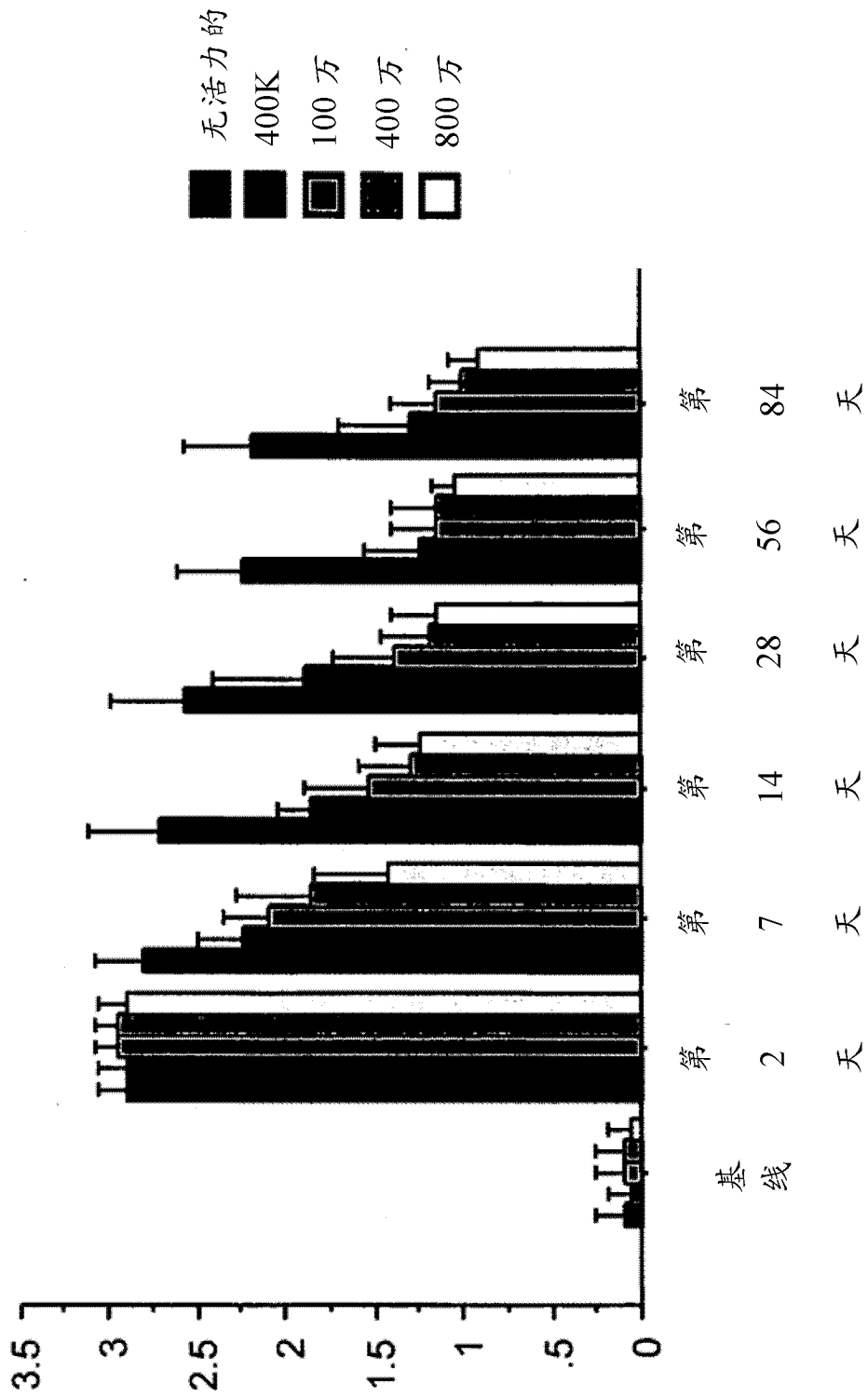


图 4

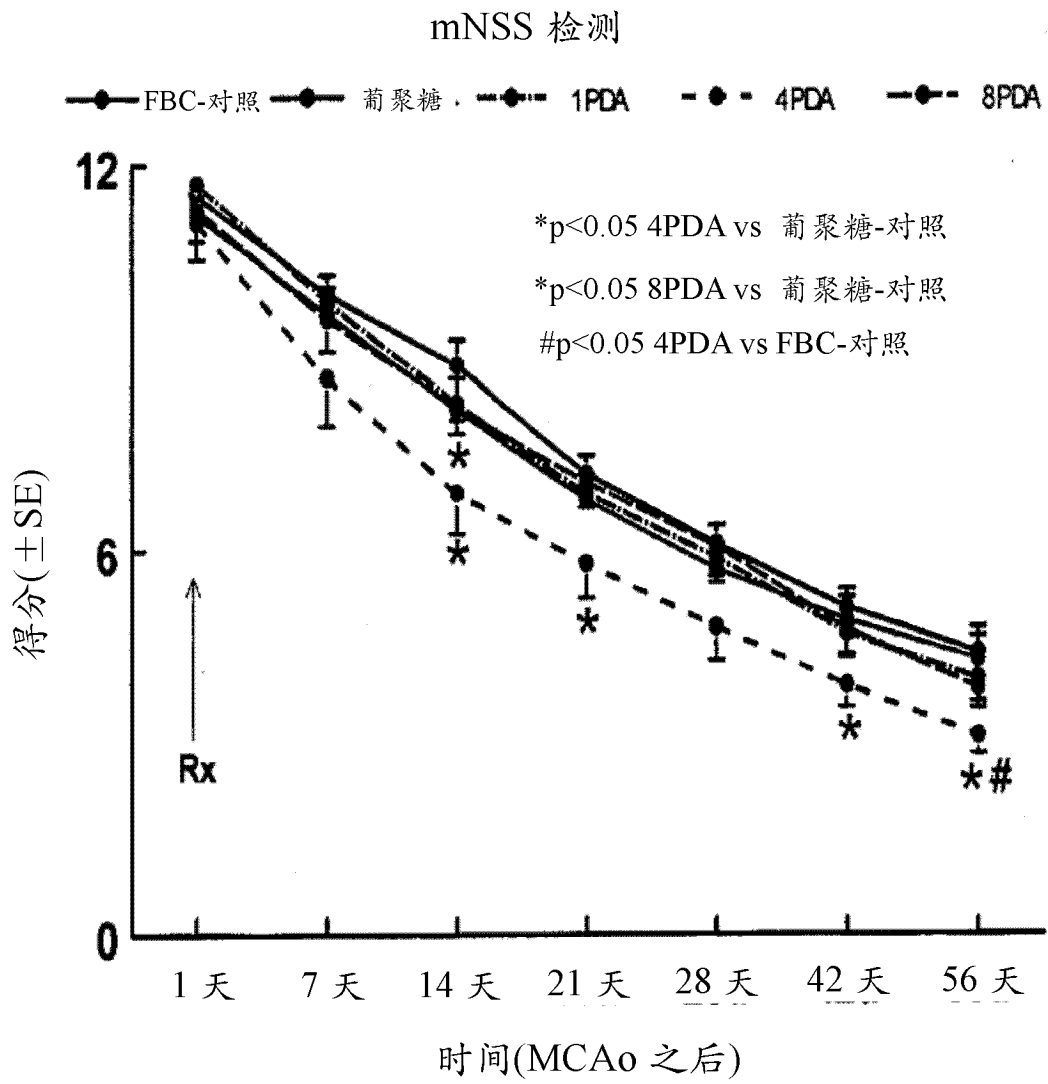


图 5

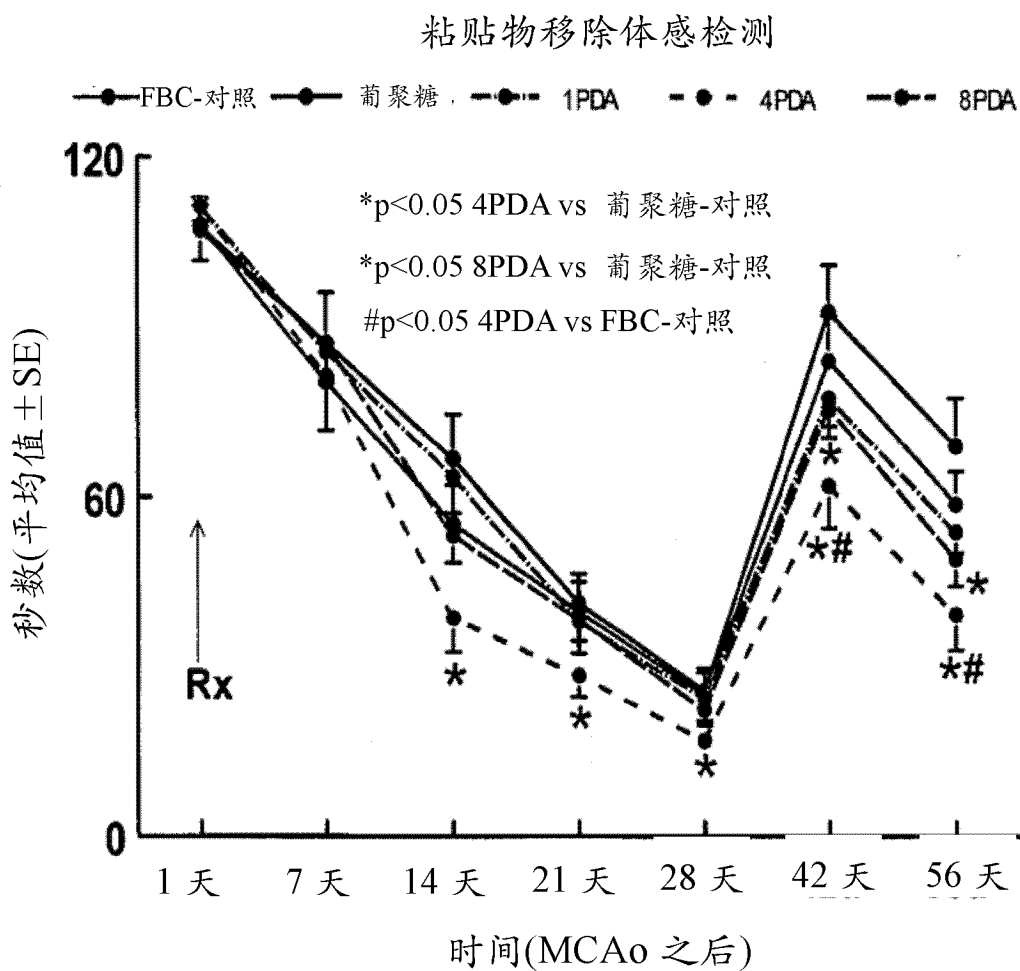


图 6

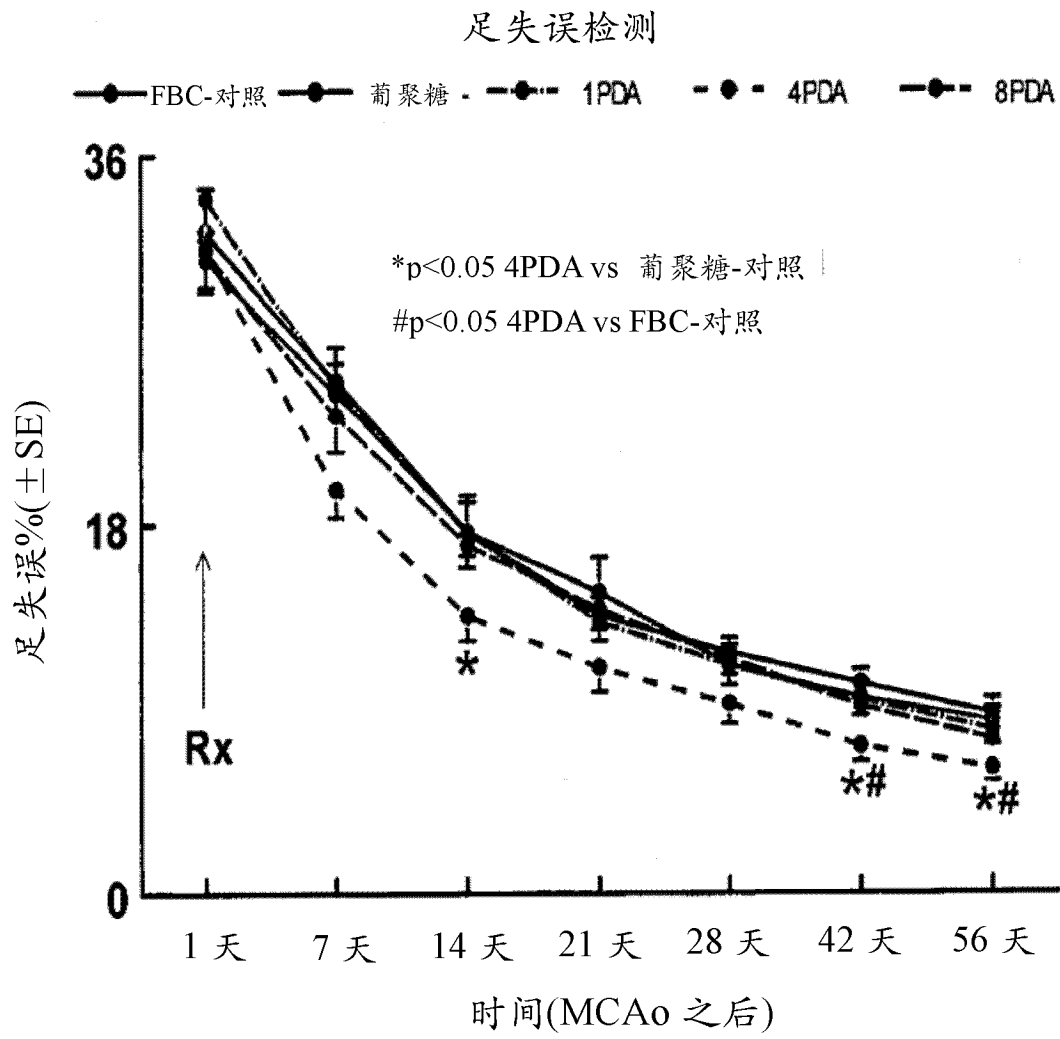


图 7

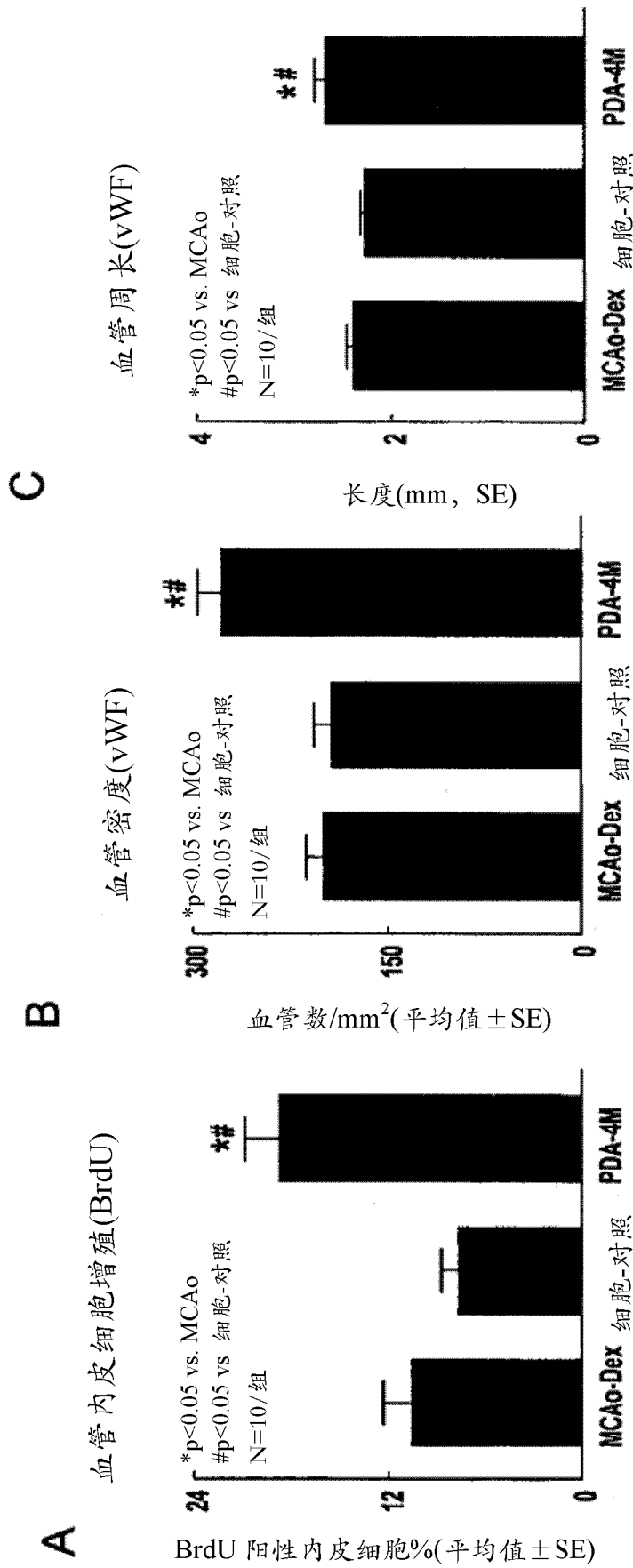


图 8

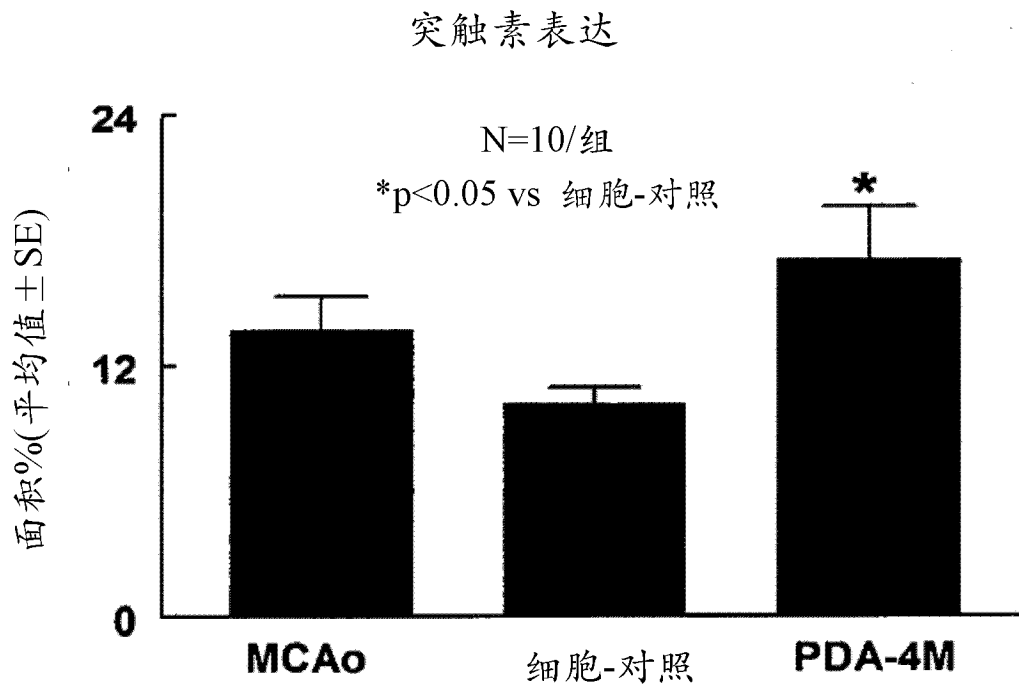


图 9