

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 5/06 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780029015.9

[43] 公开日 2009年8月5日

[11] 公开号 CN 101501185A

[22] 申请日 2007.6.8

[21] 申请号 200780029015.9

[30] 优先权

[32] 2006.6.9 [33] US [31] 60/812,366

[86] 国际申请 PCT/US2007/013507 2007.6.8

[87] 国际公布 WO2007/146123 英 2007.12.21

[85] 进入国家阶段日期 2009.2.3

[71] 申请人 人类起源公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 穆罕默德·A·黑德兰

[74] 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司

代理人 陶贻丰 郑霞

权利要求书 11 页 说明书 95 页 附图 1 页

[54] 发明名称

胎盘巢 (PLACENTAL NICHE) 及其培养干细胞的用途

[57] 摘要

本发明提供了培养、扩增和分化干细胞，特别是人胚胎干细胞的方法。该方法包括在胶原生物纤维，特别是来源于哺乳动物胎盘的羊膜、绒毛膜或两者的胶原生物纤维上培养干细胞一段时间。

1. 培养干细胞的方法，该方法包括在含有胶原生物纤维的培养基中培养干细胞，其中所述胶原生物纤维来源于胎盘，且所述干细胞相对于所述胶原生物纤维来说是外源性的。

2. 权利要求1的方法，其中所述胶原生物纤维包括分离自哺乳动物胎盘的羊膜。

3. 权利要求1的方法，其中所述胶原生物纤维包括分离自哺乳动物胎盘的绒毛膜。

4. 权利要求1的方法，其中所述胶原生物纤维包括分离自哺乳动物胎盘的羊膜和绒毛膜。

5. 权利要求1的方法，其中所述胶原生物纤维在所述培养前是基本上干燥的。

6. 权利要求1的方法，其中所述胶原生物纤维在所述培养前是去细胞化的。

7. 权利要求1的方法，其中所述胶原生物纤维在所述培养前是未去细胞化的。

8. 权利要求1的方法，其中所述胶原生物纤维包括衍生该胶原生物纤维的胎盘的內源性细胞。

9. 权利要求1的方法，其中所述胶原生物纤维包括衍生该胶原生物纤维的胎盘的外源性细胞。

10. 权利要求8的方法，其中所述胶原生物纤维是辐射过的。

11. 权利要求9的方法，其中所述胶原生物纤维是辐射过的。

12. 权利要求1的方法，其中所述干细胞是胚胎干细胞。

13. 权利要求1的方法，其中所述干细胞是胎盘干细胞。

14. 权利要求1的方法，其中所述干细胞是间充质干细胞、造血干细胞、胎盘血来源的干细胞或脐带血来源的干细胞、骨髓来源的干细胞或成体干细胞。

15. 权利要求14的方法，其中所述成体干细胞是神经干细胞、肝干细胞、胰腺干细胞、内皮干细胞、心肌干细胞或肌肉干细胞。

16. 权利要求1的方法，其中所述干细胞培养了24小时或更久。

17. 权利要求1的方法，其中所述干细胞培养了2天或更久。

18. 权利要求1的方法，其中所述干细胞培养了7天或更久。

19. 扩增干细胞的方法，该方法包括在含有胶原生物纤维的培养基中培养所述干细胞，从而使干细胞扩增。

20. 权利要求19的方法，其中所述胶原生物纤维包括分离自哺乳动物胎盘的羊膜。

21. 权利要求19的方法，其中所述胶原生物纤维包括分离自哺乳动物胎盘的绒毛膜。

22. 权利要求19的方法，其中所述胶原生物纤维包括分离自哺乳动物胎盘的羊膜和绒毛膜。

23. 权利要求19的方法，其中所述胶原生物纤维在所述扩增前是基本上干燥的。

24. 权利要求19的方法，其中所述胶原生物纤维在所述扩增前是去细胞化的。

25. 权利要求19的方法，其中所述胶原生物纤维在所述扩增前是未去细胞化的。

26. 权利要求19的方法，其中所述胶原生物纤维包括衍生该胶原生物纤维的胎盘的内分泌性细胞。

27. 权利要求 19 的方法，其中所述胶原生物纤维包括衍生该胶原生物纤维的胎盘的外源性细胞。

28. 权利要求 26 的方法，其中所述胶原生物纤维是辐射过的。

29. 权利要求 27 的方法，其中所述胶原生物纤维是辐射过的。

30. 权利要求 19 的方法，其中所述干细胞是胚胎干细胞。

31. 权利要求 19 的方法，其中所述干细胞是胎盘干细胞。

32. 权利要求 19 的方法，其中所述干细胞是间充质干细胞、造血干细胞、胎盘血来源的干细胞或脐带血来源的干细胞、骨髓来源的干细胞或成体干细胞。

33. 权利要求 32 的方法，其中所述成体干细胞是神经干细胞、肝干细胞、胰腺干细胞、内皮干细胞、心肌干细胞或肌肉干细胞。

34. 权利要求 19 的方法，其中所述干细胞扩增了至少 24 小时。

35. 权利要求 19 的方法，其中所述干细胞扩增了至少 2 天。

36. 权利要求 19 的方法，其中所述干细胞扩增了至少 1 周。

37. 分化干细胞的方法，该方法包括在含有胶原生物纤维的培养基中培养所述干细胞一段足以分化该细胞的时间。

38. 权利要求 37 的方法，其中所述胶原生物纤维包括分离自哺乳动物胎盘的羊膜。

39. 权利要求 37 的方法，其中所述胶原生物纤维包括分离自哺乳动物胎盘的绒毛膜。

40. 权利要求 37 的方法，其中所述胶原生物纤维包括分离自哺乳动物胎盘的羊膜和绒毛膜。

41. 权利要求 37 的方法，其中所述胶原生物纤维在所述扩增前是基本上干燥的。

42. 权利要求 37 的方法，其中所述胶原生物纤维在所述扩增前是去细胞化的。

43. 权利要求 37 的方法，其中所述胶原生物纤维在所述扩增前是未去细胞化的。

44. 权利要求 37 的方法，其中所述胶原生物纤维包括衍生该胶原生物纤维的胎盘的内分泌性细胞。

45. 权利要求37的方法，其中所述胶原生物纤维包括衍生该胶原生物纤维的胎盘的外源性细胞。

46. 权利要求44的方法，其中所述胶原生物纤维是辐射过的。

47. 权利要求45的方法，其中所述胶原生物纤维是辐射过的。

48. 权利要求37的方法，其还包括在所述胶原生物纤维上培养体细胞。

49. 权利要求37的方法，其中所述干细胞是胚胎干细胞。

50. 权利要求37的方法，其中所述干细胞是胎盘干细胞。

51. 权利要求37的方法，其中所述干细胞是间充质干细胞、造血干细胞、胎盘血来源的干细胞或脐带血来源的干细胞、骨髓来源的干细胞或成体干细胞。

52. 权利要求51的方法，其中所述成体干细胞是神经干细胞、肝干细胞、胰腺干细胞、内皮干细胞、心肌干细胞或肌肉干细胞。

53. 权利要求37的方法，其中所述细胞分化成神经细胞。

54. 权利要求53的方法，其中所述分化包括将所述细胞与 β -巯基乙醇或丁羟茴醚接触。

55. 权利要求 54 的方法，其中所述胶原生物纤维包含所述 β -巯基乙醇或丁羟茴醚。

56. 权利要求 53 的方法，其中所述神经细胞表现出神经生长因子受体的生成、编码神经生长因子的基因的表达、神经微丝重链的生成、或者编码神经微丝重链的基因的表达。

57. 权利要求 37 的方法，其中所述细胞分化成脂肪细胞。

58. 权利要求 57 的方法，其中所述分化包括将所述细胞与地塞米松、消炎痛、胰岛素和 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤接触。

59. 权利要求 58 的方法，其中所述胶原生物纤维包含所述地塞米松、消炎痛、胰岛素和 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤。

60. 权利要求 57 的方法，其中所述脂肪细胞表现出通过亲脂性染色可检测的胞质内脂囊泡的生成；编码脂肪酶的基因的表达；或者脂肪酶的生成。

61. 权利要求 37 的方法，其中所述细胞分化成软骨细胞。

62. 权利要求 61 的方法，其中所述分化包括将所述细胞与转化生长因子- β -3 接触。

63. 权利要求 62 的方法，其中所述胶原生物纤维包含所述转化生长因子- β -3。

64. 权利要求 61 的方法，其中所述软骨细胞表现出软骨细胞的细胞形态学特征；胶原 2 的生成；编码胶原 2 的基因的表达；胶原 9 的生成；或者编码胶原 9 的基因的表达。

65. 权利要求 37 的方法，其中所述细胞分化成骨细胞。

66. 权利要求 65 的方法，其中所述分化包括将所述细胞与地塞米松、抗坏血酸-2-磷酸和甘油磷酸酯接触。

67. 权利要求 66 的方法，其中所述胶原生物纤维包含所述地塞米松、抗坏血酸-2-磷酸和甘油磷酸酯。

68. 权利要求 65 的方法，其中所述骨细胞表现出骨细胞的钙水平特征；碱性磷酸酶的生成；编码碱性磷酸酶的基因的表达；骨桥蛋白的生成；或者编码骨桥蛋白的基因的表达。

69. 权利要求 37 的方法，其中所述细胞分化成肝细胞。

70. 权利要求 69 的方法，其中所述分化包括将所述细胞与肝细胞生长因子和上皮生长因子接触。

71. 权利要求 70 的方法，其中所述胶原生物纤维包含所述肝细胞生长因子和上皮生长因子。

72. 权利要求 69 的方法，其中所述肝细胞表现出肝细胞特异性基因的表达或者肝细胞特异性蛋白质的生成。

73. 权利要求 37 的方法，其中所述细胞分化成胰腺细胞。

74. 权利要求 73 的方法，其中所述分化包括将所述细胞与碱性成纤维细胞生长因子、转化生长因子 β -1，和由巢蛋白阳性的神经元细胞条件化的培养基接触。

75. 权利要求 74 的方法，其中所述胶原生物纤维包含所述碱性成纤维细胞生长因子和转化生长因子 β -1。

76. 权利要求 73 的方法，其中所述胰腺细胞表现出胰岛素的生成或者编码胰岛素的基因的表达。

77. 权利要求 37 的方法，其中所述细胞分化成心肌细胞。

78. 权利要求 77 的方法，其中所述分化包括将所述细胞与视黄酸、碱性成纤维细胞生长因子和转化生长因子接触。

79. 权利要求 78 的方法，其中所述胶原生物纤维包含所述视黄酸、碱性成纤维细胞生长因子和转化生长因子。

80. 权利要求 77 的方法，其中所述分化包括将所述细胞与心调理素接触。

81. 权利要求 80 的方法，其中所述胶原生物纤维包含所述心调理素。

82. 权利要求 77 的方法，其中所述心肌细胞表现出搏动；心肌肌动蛋白的生成；或编码心肌肌动蛋白的基因的表达。

83. 确定化合物对细胞的毒性的方法，该方法包括在适合所述细胞存活条件下用胶原生物纤维培养该细胞；将所述细胞与该化合物接触；和鉴别所述细胞相对于培养在相同条件但未接触所述化合物的细胞在指示凋亡、坏死或细胞死亡，或者凋亡、坏死或细胞死亡的倾向的代谢参数方面的改变，其中如果鉴别出所述改变，则所述化合物对所述细胞是毒性的。

84. 权利要求 83 的方法，其中所述细胞是体细胞。

85. 权利要求 83 的方法，其中所述细胞是胚胎干细胞、

86. 权利要求 83 的方法，其中所述细胞是胎盘干细胞。

87. 权利要求 83 的方法，其中所述细胞是间充质干细胞、造血干细胞、胎盘血或脐带血来源的干细胞、骨髓来源的干细胞或成体干细胞。

88. 权利要求 87 的方法，其中所述成体干细胞是神经干细胞、肝干细胞、胰腺干细胞、内皮干细胞、心肌干细胞或肌肉干细胞。

89. 培养干细胞的方法，该方法包括用含有多种胎盘干细胞的胶原生物纤维培养干细胞；和在适合该干细胞存活条件下培养所述干细胞。

90. 权利要求 89 的方法，其中所述干细胞是胚胎干细胞、

91. 权利要求 1 的方法，其中所述胶原生物纤维包含透明质酸。

92. 权利要求 91 的方法，其中所述透明质酸交联所述胶原生物纤维。

93. 权利要求 89 的方法，其中所述胶原生物纤维包含透明质酸。

94. 权利要求 93 的方法，其中所述透明质酸交联所述胶原生物纤维。

胎盘巢(PLACENTAL NICHE)及其培养干细胞的用途

1. 发明领域

本发明提供了利用胎盘胶原生物纤维，培养、扩增或分化干细胞，特别是人胚胎干细胞的方法。本发明在例如细胞培养、组织移植、药物发现和基因治疗领域中有用。

2. 发明背景

人胚胎干细胞(HES)是从囊胚期胚胎的内细胞团(ICM)或胚胎的生殖嵴衍生的多能性细胞。HES 细胞具有分化为任何细胞类型以及产生任何类型的组织、器官或机体部分，包括完整生物体的潜力。因此，预期按需求提供正常克隆的 HES 细胞和操纵它们分化的能力将提供有利的工具，该工具能够促进生物医药、工业和科学领域的进步。

然而，HES 细胞的实际利用仍然存在许多障碍。例如，为了维持 ES 细胞在未分化状态，通常将 ES 细胞培养在滋养层细胞上。然而，滋养层-依赖的培养系统的潜在问题包括：(1)病原体从动物滋养层细胞传递到 HES 细胞的潜在风险，以及事实上目前的增殖体系(人/动物或人/人共培养)是作为异种移植建立的，(2)滋养层细胞主要来自原代细胞，其表现出显著的批次-批次差异，难以质量控制；(3)滋养层细胞有限的来源和数量妨碍了 HES 细胞的大规模生产和应用。因此，需要在没有滋养层细胞的条件下维持和增殖未分化的 HES 细胞。

Xu 等人(Nat. Biotechnol., 19 (10): 971-974, (2001). WO 03/020920 和 U.S. 2003/0017589)是第一个在无滋养层培养体系中成功维持未分化 ES 细胞的。在该体系中, ES 细胞在用小鼠胚胎成纤维细胞条件化的培养基中, 培养在来自 Engelbreth Holm Swarm (EHS)肉瘤的 MATRIGEL™或层粘连蛋白上。然而, 此类合成基质和定义的基质大分子不足以模拟由滋养层细胞提供的更复杂的细胞基质相互作用。研究也已经指出此类培养系统只适合一些 ES 细胞系(例如, H1 和 H9), 而不适合其它 ES 细胞系(Hovattal 等人, Hum. Reprod. 18 (7): 1404-1409, 2003)。此外, 目前已经了解滋养层细胞可以是污染源, 例如, 通过病原体或非胚胎的或非人的生物分子, 如唾液酸 Neu5Gc 污染。

此外, 由于对各种来源的干细胞(例如, 胎盘干细胞)的兴趣增长, 本领域需要培养此类细胞的改良方法。

因此, 本领域仍然需要改良的用于干细胞的无滋养层培养系统。本发明提供了利用胎盘来源的胶原生物纤维的此类培养系统。

3. 发明内容

本发明涉及干细胞, 例如人胚胎干细胞、胎盘干细胞(如 CD34⁻或 CD34⁺胎盘干细胞)培养的改良, 包括用胶原生物纤维, 特别是来源于哺乳动物胎盘的羊膜、绒毛膜或两者的胶原生物纤维培养该干细胞一段时间。在一些实施方案中, 胶原生物纤维替代了通常用于在培养中支持干细胞的滋养细胞层。在其它实施方案中, 胶原生物纤维提供了供干细胞附着和增殖的底物。

不受任何理论的约束，预期本发明的胶原生物纤维提供了供细胞附着的基质，并且，在至少一些实施方案中，提供了支持培养中的干细胞生长的合适的生长因子。

在一方面，本发明提供了培养干细胞的方法，该方法包括在有胶原生物纤维的培养基中培养干细胞，其中所述胶原生物纤维来源于胎盘。在优选的实施方案中，所述干细胞对于该胶原生物纤维来说是外源的。该干细胞可以在本领域公知的适于干细胞存活的条件培养一段时间。在优选的实施方案中，该干细胞是胚胎干细胞或胎盘干细胞。在另一个优选的实施方案中，所述培养包括扩增所述干细胞，或所述干细胞群。

在另一方面，本发明提供了分化干细胞的方法，该方法包括步骤：在存在一种或多种有利于或促进该干细胞分化的试剂的情况下，在有胶原生物纤维的培养基中培养干细胞。如本文所述，此类试剂可以是，例如，生长因子、小分子等。在不同的实施方案中，胶原生物纤维包含一种或多种此类试剂，培养干细胞的培养基包含一种或多种此类试剂，或者胶原生物纤维和该培养基都包含一种或多种此类试剂。

可以在本领域技术人员已知的、有利于细胞培养中的干细胞生长的条件下培养干细胞。该干细胞，例如胎盘干细胞(如 CD34⁻或 CD34⁺胎盘干细胞)可以在胶原生物纤维上增殖或者分化成为例如神经细胞、脂肪细胞、软骨细胞、骨细胞、肝细胞、胰腺细胞或心肌细胞，其中使用本领域公知的有利于或促进分化为此类细胞的合适试剂。

可以根据本发明的方法培养、扩增或分化任何干细胞，包括但不限于胚胎干细胞、胎盘干细胞(例如 CD34⁻或 CD34⁺胎盘干细胞)、间充质干细胞、造血干细胞、胎盘血-或脐带血来源的干细胞、骨髓来源的干细胞、成

体干细胞、祖细胞(例如, 造血组细胞), 或定向分化为特定细胞类型的细胞。在一些实施方案中, 该干细胞是胚胎干细胞。在优选的实施方案中, 该干细胞是人胚胎干细胞或胎盘干细胞。在一些实施方案中, 发明还提供了培养干细胞的方法, 其中该干细胞不是角膜缘细胞、角膜缘干细胞或来源于骨髓的间充质干细胞。

本发明使用的胶原生物纤维源自哺乳动物胎盘。优选的胶原生物纤维基本上是干燥的, 即按重量计算水占约 20% 或更少。在特定的实施方案中, 该胶原生物纤维不是蛋白酶处理的。在另一个特定的实施方案中, 所述胶原生物纤维中的蛋白质不是人工化学交联的, 即该胶原生物纤维不是固定的。在另一个特定的实施方案中, 该胶原生物纤维没有胎盘细胞, 例如是去细胞化的。在另一个特定的实施方案中, 该胶原生物纤维包括胎盘细胞, 例如不是去细胞化的。

所述胶原生物纤维包含透明质酸, 例如透明质酸层。在一特定的实施方案中, 该透明质酸是交联的。在更特殊的实施方案中, 该透明质酸与胶原生物纤维交联。

所述胶原生物纤维还可以包含生物活性化合物, 该生物活性化合物不是天然存在于胶原生物纤维中的, 或者以不同于未添加该生物活性化合物的胶原生物纤维中的浓度存在。在更特殊的实施方案中, 所述生物活性化合物是小有机分、抗生素、氨基酸、镇痛药、抗炎性试剂、细胞因子、生长因子、酶抑制剂、激酶抑制剂、抗肿瘤剂、抗真菌剂、抗病毒剂, 或抗感染剂。

在一些实施方案中, 所述胶原生物纤维可以包含一种或多种有利于或促进干细胞分化的试剂。此类试剂是本领域技术人员公知的, 并将在后文

中详细描述。该胶原生物纤维还可以包含该胶原生物纤维所源于的胎盘的
内源性或外源性细胞。本文描述了此类细胞。

本发明可以使用任何本领域技术人员已知的，适于培养、扩增或分化
干细胞的培养基，即在用于特定干细胞的标准培养条件下该干细胞在其中
增殖的培养基，该培养基适于该干细胞所源自的或将分化成的细胞/组织
源。

本发明还包括干细胞、祖细胞或特定细胞类型或其群体的用途，其中
根据本发明的方法培养或分化该细胞。在一些实施方案中，所述细胞是根
据本发明的方法通过分化干细胞所产生的神经细胞、脂肪细胞、软骨细
胞、骨细胞、肝细胞、胰腺细胞或心肌细胞。

在一些实施方案中，本发明提供了移植未分化或分化的干细胞以治疗
或预防疾病或病症，其中使用或不使用根据本发明的方法所产生的胶原生
物纤维。

本发明还提供了确定化合物对细胞的毒性的方法。在一些实施方案
中，该方法包括在干细胞存活(例如，增殖)的条件下用胶原生物纤维培养
细胞。然后将该细胞与化合物接触，并检测该细胞的活性改变，例如，指
示凋亡、坏死或细胞死亡，或者指示凋亡、坏死或细胞死亡倾向的细胞代
谢参数。如果与培养在相同条件下但未接触该化合物的细胞相比检测到改
变，则鉴定所述化合物是对细胞有毒性的。该细胞可以是体细胞或干细
胞。

在另一方面，本发明提供了通过利用发明的胶原生物纤维细胞培养系
统确定化合物对干细胞分化的影响的方法。在一些实施方案中，该方法包
括在适合该细胞分化的条件下用胶原生物纤维培养所述细胞。将该细胞化

合物接触。然后分析在存在或缺少候选化合物的情况下该细胞的分化标识物。该分化标识物可以是细胞表面标识物，细胞形态或一种或多种不同的表达基因。如果鉴别出改变，则鉴定所述化合物对所述细胞的分化有影响。

如本文中所使用的，“胶原生物纤维”是从哺乳动物羊膜和/或绒毛膜衍生或获得的材料，含有基本上平的或层状的胶原。在优选的实施方案中，胶原生物纤维是去细胞化的、脱水的(即，按重量计算水占20%或更少)羊膜、绒毛膜，或羊膜和绒毛膜，其未经蛋白酶处理，或者经过高于60℃的热处理，基本上如Hariri的美国专利申请公开号2004/0048796中所描述的相同。在一些实施方案中，该胶原生物纤维没有引入人工化学交联，即还没有固定。在根据本发明进行培养、扩增和/或分化细胞前，该胶原生物纤维通常用培养基再水合。

4. 附图说明

附图1显示了在胶原生物纤维(羊膜)、胶原、纤粘连蛋白、或玻璃上培养后的胎盘干细胞。

5. 发明的详细说明

本发明提供了利用胶原生物纤维培养、扩增或分化干细胞的方法。

5.1. 干细胞

根据本发明的方法可以用胶原生物纤维培养干细胞，例如胚胎干细胞或成体干细胞。如本文中所使用的，术语“干细胞”包括全能性、多能性和多潜能性细胞、体干细胞或祖细胞等。干细胞可以是，例如胎盘干细胞(例

如 CD34⁻或 CD34⁺胎盘干细胞)、脐带干细胞、间充质干细胞、造血干细胞、胎盘血来源的干细胞或脐带血来源的干细胞、骨髓来源的干细胞、基质干细胞。体干细胞可以是, 例如神经干细胞、肝干细胞、胰腺干细胞、内皮干细胞、心肌干细胞、肌肉干细胞或上皮干细胞、皮肤干细胞、大脑干细胞、皮肤干细胞、内胚层干细胞、外胚层干细胞, 描述在美国专利号 5,486,359、6,261,549 和 6,387,367(间充质干细胞)中和美国专利号 5,962,325(胎儿基质细胞)中的细胞。在一些实施方案中, 该干细胞不是角膜缘干细胞。

本发明中使用的干细胞可以来源于例如胎盘、脐带、骨髓、胚胎、间充质、神经组织、胰腺组织、肌肉组织(例如心肌)、肝、皮肤、肠、鼻上皮、骨、胰脏等。

在一些实施方案中, 本发明使用的干细胞是人胎盘干细胞。此类干细胞描述在例如美国专利申请公开号 2002/0123141、2003/0032179、2003/0180269、2004/0048796 中, 并可以按其中的描述常规地分离, 其各自全文纳入到本申请中作为参考。

在一些实施方案中, 本发明使用的干细胞是胚胎干细胞。可以按例如美国专利号 5,843,780、6,200,806; 和 Thomson 等人, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:7844 中的描述常规地分离胚胎干细胞。在一些实施方案中, 本发明的方法中使用的干细胞是人胚胎干细胞。人胚胎干细胞在例如 Thomson 等人, 1998, Science, 282: 1145 和在美国专利号 6,200,806 中有描述。

本发明还提供了干细胞的培养物, 其中该细胞不是骨髓来源的间充质干细胞或角膜缘细胞(如, 角膜缘干细胞)。

可以利用本领域技术人员已知的方法或材料获得本发明中使用的干细胞。例如，可以自商业服务获得干细胞，例如，自 LifeBank USA (Cedar Knolls, N.J.)、ViaCord (Boston Mass.)、Cord Blood Registry (San Bruno, Calif.)和 Cryocell (Clearwater, Fla.)获得干细胞。还可以使用本领域已知的方法或程序收集干细胞。可以按照例如美国专利号 6,200,806 和 6,800,480 中的描述获得灵长类原干细胞。可以按照例如美国申请公开号 2003/0032179 中描述的获得胎盘干细胞，其全文通过引用纳入本申请中。可以自天然来源获得人胚胎干细胞，例如胚胎、囊胚或内细胞团(ICM)细胞，或自以前或已建立的胚胎干细胞培养物获得。利用 Thomson 等人,(美国专利号 5,843,780; Science 282:1 145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998)和 Reubinoff 等人, 2000, Nature Biotech. 18:399 或美国申请公开号 2003/0032179 等中描述的技术，从人囊泡细胞中制备人胚胎干细胞。还可以从人胚胎的生殖脊(例如，根据 Reubinoff 等人, 2000, Nature, 18:399-404 或美国专利号 6,090,622 (人胚胎种系细胞)和 6,562,619 中描述的)，或者从冷冻的胚胎(例如，根据美国专利号 6,921,632 中描述的)，或者从人胎盘(根据在美国申请公开号 2003/0032179、2002/0123141、2003/0032179、2003/0180269、2004/0048796)中获得人胚胎干细胞，其全文通过引用并入本申请中。

本发明中使用的干细胞可以来自本领域技术人员已知的任何物种。此类干细胞可以是，例如猪、鸟、爬行动物或哺乳动物干细胞。根据本发明的方法可以使用任何哺乳动物干细胞，包括但不限于来自例如小鼠、大鼠、兔、荷兰猪、狗、猫、猪、羊、牛、马、猴子、人等的干细胞。在一些实施方案中，该干细胞是小鼠干细胞。在一些实施方案中，该干细胞是

灵长类干细胞。在优选的实施方案中，该干细胞是人干细胞。在特别优选的实施方案中，该干细胞是人胚胎干细胞。

本发明中使用的干细胞可以以相对不纯的形式使用，例如以脐带血或胎盘血的形式，或以通过分离术(apheresis)获得的外周血单核细胞群的形式使用。本发明可以使用的干细胞可以是相对分离的，即基本上与其它细胞类型分离的。该干细胞可以含有单一类型的干细胞，或多种类型的干细胞。

可以在用胶原生物纤维培养之前或培养过程中，遗传改造本发明使用的干细胞。可以利用本领域技术人员已知的任何技术将多核苷酸引入到干细胞中，例如，通过病毒载体(如腺病毒或逆转录病毒载体)，或通过生物力学方法(如脂质体或化学介导的DNA摄入)，如美国申请公开号2004/0028660中的描述，其全文通过引用并入本申请中。

5.2. 胎盘干细胞

胎盘干细胞，例如CD34⁺胎盘干细胞，在下文简称为“胎盘干细胞”，可以在胶原生物纤维上培养，是可以从胎盘或其部分获得的干细胞，其附着于组织培养基质，并具有分化为非胎盘细胞类型的能力。胎盘干细胞在起源上可以是胎儿的或母体的(即可以具有母体或者胎儿的基因型)。胎盘干细胞群或者含有胎盘干细胞的细胞群可以含有仅胎儿起源或仅母体起源的胎盘干细胞，或者可以含有胎儿和母体起源的胎盘干细胞的混合群体。可以在本发明的方法中使用的胎盘干细胞在例如美国申请公开号2005/0019908和2003/0180269中有描述，其全文纳入到本申请中。通过下

文中讨论的形态学、标识物和培养特征可以鉴别和选择胎盘干细胞，和含有该胎盘干细胞的细胞群。

5.2.1. 物理和形态学特征

当在原代培养基或细胞培养基中培养时，胎盘干细胞附着在组织培养基基质上，例如组织培养容器表面(例如，组织培养塑料制品)。培养中的胎盘干细胞通常呈现出成纤维细胞样的、星状的外观，具有大量从中央细胞体延伸出的细胞质突起。然而，胎盘干细胞与在相同条件下培养的成纤维细胞在形态学上是可区分的，胎盘干细胞比成纤维细胞表现出更大数量的此类突起。形态学上，胎盘干细胞与造血干细胞也是可区分的，后者在培养中一般呈现出更圆的或鹅卵石状的形态，胚胎干细胞或者胚胎种系细胞不论培养在滋养层还是基质(例如，MATRIGEL™)上都呈现圆的形态学。

通常，在培养中，胎盘干细胞发展为细胞簇，称作拟胚体，类似于在胚胎干细胞培养中发展出的胚体。

5.2.2. 细胞表面分子和遗传标识物

胎盘干细胞表达多种可以用于鉴别和/或分离该干细胞的标识物。胎盘干细胞包括来自整个胎盘的，或其任意部分(例如，羊膜、绒毛膜、胎盘绒毛小叶、脐带等)的干细胞。然而，胎盘干细胞不是滋养层。

胎盘干细胞一般表达标识物 CD73、CD105、CD200、HLA-G 和/或 OCT-4，一般不表达 CD34、CD38 或 CD45。胎盘干细胞还可以表达 HLA-ABC(MHC-I)和 HLA-DR。这些标识物可用于鉴别胎盘干细胞，并可用于区分胎盘干细胞和其它的干细胞类型。由于胎盘干细胞可以表达 CD73 和 CD105，因此它们具有间充质干细胞-样特征。然而，由于胎盘干细胞可以

表达胎儿-特异性标识物 CD200 和 HLA-G，因此它们与既不表达 CD200 也不表达 HLA-G 的间充质干细胞(例如，骨髓来源的间充质干细胞)区分开。以相同的方式，将缺少 CD34、CD38 和/或 CD45 表达的胎盘干细胞鉴别为非造血干细胞。在一些实施方案中，胎盘干细胞是 SSEA3 和/或 SSEA4 阴性的。在一些实施方案中，胎盘干细胞是 SSEA3 和/或 SSEA4 阳性的。

因此，在一个实施方案中，胎盘干细胞是 CD200⁺或 HLA-G⁺的。在特定的实施方案中，该干细胞是 CD200⁺和 HLA-G⁺的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞是 CD73⁺和 CD75⁺的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺和 CD105⁺的。在另一个特定的实施方案中，在允许拟胚体形成的条件下，所述 CD200⁺或 HLA-G⁺干细胞有利于在包含该干细胞的胎盘细胞群中形成拟胚体。

通过选择 CD200 或 HLA-G 胎盘细胞，可以从多种胎盘细胞中选择胎盘干细胞，因此所述细胞是胎盘干细胞。在特定的实施方案中，所述选择包括选择是 CD200⁺和 HLA-G⁺的胎盘细胞。在特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD73⁺和 CD105⁺的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺和 CD105⁺的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括在允许拟胚体形成的条件下，选择有利于在包含该干细胞的胎盘细胞群体中形成拟胚体的胎盘细胞。

在另一个实施方案中，胎盘干细胞是 CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺的。在另一个实施方案中，所述干细胞是 HLA-G⁺的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻和 HLA-G⁺的。在另一个特定的实施方案中，当所述群在允许拟胚体形成的条件下培养时，分离的 CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺的干细胞有利于在含有该干细胞的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体。

通过选择 CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺的胎盘细胞，也可以从多种胎盘细胞中选择胎盘干细胞，因此所述细胞是胎盘干细胞。在特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 HLA-G⁺的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻和 HLA-G⁺的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择还包括选择 CD73⁺、CD105⁺和 CD200⁺的干细胞，当所述群在允许拟胚体形成的条件下培养时，所述干细胞有利于在含有该干细胞的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体。

在另一个实施方案中，胎盘干细胞是 CD200⁺和 OCT-4⁺的。在特定的实施方案中，干细胞是 CD73⁺和 CD105⁺的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞是 HLA-G⁺的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在更特定的实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD105⁺和 HLA-G⁺的。在另一个特定的实施方案中，当

所述群在允许拟胚体形成的条件下培养时，该干细胞有利于在含有所述干细胞的胎盘细胞群中产生一种或多种拟胚体。

通过选择 CD200⁺和 OCT-4⁺的胎盘细胞，也可以从多种胎盘细胞中选择胎盘干细胞，因此所述细胞是胎盘干细胞。在特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 HLA-G⁺的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择这样的胎盘干细胞，当所述群在允许拟胚体形成的条件下培养时，所述干细胞有利于在含有所述干细胞的胎盘细胞群中产生一种或多种拟胚体。

在另一个实施方案中，胎盘干细胞是 CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞是 OCT-4⁺的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞是 CD200⁺的。在更特定的实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、OCT-4⁺和 CD200⁺的。在另一个特定的实施方案中，当所述群在允许拟胚体形成的条件下培养时，所述干细胞有利于在含有所述干细胞的胎盘细胞群中形成拟胚体。

通过选择 CD73⁺、CD105⁺和 HLA-G⁺的胎盘细胞，也可以从多种胎盘细胞中选择胎盘干细胞，因此所述细胞是胎盘干细胞。在特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的胎盘细胞。在另一个

特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 OCT-4⁺的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD200⁺的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、OCT-4⁺和 CD200⁺的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择这样的胎盘细胞，当所述群在允许拟胚体形成的条件下培养时，所述胎盘细胞还有利于在含有所述干细胞的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体。

在另一个实施方案中，胎盘干细胞是 CD73⁺和 CD105⁺的，并且当在允许拟胚体形成的条件下培养所述群时有利于在包含所述干细胞的分离的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体。在特定的实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞是 OCT-4⁺的。在更特定的实施方案中，所述干细胞是 OCT-4⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。

通过选择在允许拟胚体形成的条件下培养所述群时有利于在包含所述干细胞的分离的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体的 CD73⁺和 CD105⁺胎盘细胞，也可以从多种胎盘细胞中选择胎盘干细胞，因此所述细胞是胎盘干细胞。在特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 OCT-4⁺的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD200⁺的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，

所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、OCT-4⁺和 CD200⁺的胎盘细胞。

在另一个实施方案中，胎盘干细胞是 OCT-4⁺的，并且当在允许拟胚体形成的条件下培养时有利于在包含所述干细胞的分离的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体。在特定的实施方案中，所述干细胞是 CD73⁺和 CD105⁺的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞是 CD200⁺的。在更特定的实施方案中，所述干细胞是 CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的。

还可以从多种胎盘细胞中选择胎盘干细胞，例如，通过选择在允许拟胚体形成的条件下培养所述群时有利于在包含所述干细胞的分离的胎盘细胞群中形成一种或多种拟胚体的 OCT-4⁺的胎盘细胞来选择胎盘干细胞，因此所述细胞是胎盘干细胞。在特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻或 CD45⁻的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD200⁺的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD200⁺的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD200⁺的胎盘细胞。在另一个特定的实施方案中，所述选择包括选择还是 CD73⁺、CD105⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的胎盘细胞。

在另一个实施方案中，可在胶原生物纤维上培养的或分化的胎盘干细胞是 CD10⁺、CD34⁻、CD105⁺和 CD200⁺的。分离的胎盘干细胞群包含，例如至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%或至少约 99%的所述胎盘干细胞。在上述实施方案的一个特定的实施方案中，所述干细胞

还是 CD90⁺和 CD45⁻的。在特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群是与不是干细胞的胎盘细胞分离的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群是与没有表现出这些特征的胎盘干细胞分离的。在另一个特定的实施方案中，所述分离的胎盘干细胞是非母体起源的。在另一个特定的实施方案中，在所述分离的胎盘干细胞群中，至少约 90%、至少约 95%或至少约 99%的所述细胞是非母体起源的。

在另一个实施方案中，可在胶原生物纤维上培养的或分化的胎盘干细胞是 HLA-A,B,C⁻、CD45⁻、CD133⁻和 CD34⁻的。分离的胎盘干细胞群包含，例如至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%或至少约 99%的所述 HLA-A、B、C⁻、CD45⁻、CD133⁻和 CD34⁻的胎盘干细胞。在特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群是与不是干细胞的胎盘细胞分离的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群是与没有表现出这些特征的胎盘干细胞分离的。在另一个特定的实施方案中，所述分离的胎盘干细胞是非母体起源的。在另一个特定的实施方案中，在所述分离的胎盘干细胞群中，至少约 90%、至少约 95%或至少约 99%的所述细胞是非母体起源的。在另一个实施方案中，胎盘干细胞是从胎盘灌洗液中分离的。

在另一个实施方案中，可在胶原生物纤维上培养的或分化的胎盘干细胞是 CD10⁺、CD13⁺、CD33⁺、CD45⁻、CD117⁻和 CD133⁻的。分离的胎盘干细胞群可以包含，例如至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%或至少约 99%的所述 CD10⁺、CD13⁺、CD33⁺、CD45⁻、CD117⁻和 CD133⁻的胎盘干细胞。在特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群是与不是干细胞的胎盘细胞分离的。在另一个特定的实施方案中，所述分

离的胎盘干细胞是非母体起源的。在另一个特定的实施方案中，在所述分离的胎盘干细胞群中，至少约 90%、至少约 95%或至少约 99%的所述细胞是非母体起源的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群是与没有表现出这些特征的胎盘干细胞分离的。在另一个实施方案中，胎盘干细胞是从胎盘灌洗液中分离的。

在另一个实施方案中，可在胶原生物纤维上培养的或分化的胎盘干细胞是 CD10⁻、CD33⁻、CD44⁺、CD45⁻和 CD117⁻的。分离的胎盘干细胞群可以包含，例如至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%或至少约 99%的所述 CD10⁻、CD33⁻、CD44⁺、CD45⁻和 CD117⁻的胎盘干细胞。在特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群是与不是干细胞的胎盘细胞分离的。在另一个特定的实施方案中，所述分离的胎盘干细胞是非母体起源的。在另一个特定的实施方案中，在所述分离的胎盘干细胞群中，至少约 90%、至少约 95%或至少约 99%的所述细胞是非母体起源的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群是与没有表现出这些特征的胎盘干细胞分离的。在另一个实施方案中，胎盘干细胞是从胎盘灌洗液中分离的。

在另一个实施方案中，可在胶原生物纤维上培养的或分化的胎盘干细胞是 CD10⁻、CD13⁻、CD33⁻、CD45⁻和 CD117⁻的。分离的胎盘干细胞群可以包含，例如至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%或至少约 99%的所述 CD10⁻、CD13⁻、CD33⁻、CD45⁻和 CD117⁻的胎盘干细胞。在特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群是与不是干细胞的胎盘细胞分离的。在另一个特定的实施方案中，所述分离的胎盘干细胞是非母体起源的。在另一个特定的实施方案中，在所述分离的胎盘干细胞群中，至

少约 90%、至少约 95%或至少约 99%的所述细胞是非母体起源的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群是与没有表现出这些特征的胎盘干细胞分离的。在另一个实施方案中，胎盘干细胞是从胎盘灌洗液中分离的。

在另一个实施方案中，可在胶原生物纤维上培养的或分化的胎盘干细胞是 HLA-A,B,C⁻、CD45⁻、CD34⁻和 CD133⁻，CD10、CD13、CD38、CD44、CD90、CD105、CD200 和/或 HLA-G 阳性，和/或 CD117 阴性的。在另一个实施方案中，干细胞或分离的胎盘干细胞群包含是 HLA-A,B,C⁻、CD45⁻、CD34⁻和 CD133⁻的干细胞，且该群体中至少约 20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或约 99%的干细胞是 CD10、CD13、CD38、CD44、CD90、CD105、CD200 和/或 HLA-G 阳性，和/或 CD117 阴性的。在特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群是与不是干细胞的胎盘干细胞分离的。在另一个特定的实施方案中，所述分离的胎盘干细胞是非母体起源的。在另一个特定的实施方案中，在所述分离的胎盘干细胞群中，至少约 90%、至少约 95%或至少约 99%的所述细胞是非母体起源的。在另一个特定的实施方案中，所述干细胞或胎盘干细胞群是与没有表现出这些特征的胎盘干细胞分离的。在另一个实施方案中，本发明提供了获得 HLA-A,B,C⁻、CD45⁻、CD34⁻和 CD133⁻，CD10、CD13、CD38、CD44、CD90、CD105、CD200 和/或 HLA-G 阳性，和/或 CD117 阴性的胎盘干细胞的方法，该方法包括从胎盘灌洗液中分离所述细胞。

在另一个实施方案中，可在胶原生物纤维上培养的或分化的胎盘干细胞是通过抗体结合确定的 CD200⁺和 CD10⁺的，和通过抗体结合以及 RT-

PCR 确定的 CD117 的。在另一个实施方案中，该胎盘干细胞是 CD10⁺、CD29⁻、CD54⁺、CD200⁺、HLA-G⁺、HLA-I 和 β -2 微球蛋白⁻ 的。在另一个实施方案中，该胎盘干细胞表现出至少一种标识物的表达比间充质干细胞高至少两倍(例如，骨髓来源的间充质干细胞)。在另一个特定的实施方案中，所述分离的胎盘干细胞是非母体起源的。在另一个特定的实施方案中，在所述分离的胎盘干细胞群中，至少约 90%、至少约 95% 或至少约 99% 的所述细胞是非母体起源的。

在另一个实施方案中，胎盘干细胞或者分离的胎盘干细胞群包含通过醛脱氢酶活性检测测定的醛脱氢酶(ALDH)阳性的胎盘干细胞。此类检测是本领域已知的(参见例如，Bostian 和 Betts, *Biochem. J.*, 173, 787, (1978))。在特定的实施方案中，所述 ALDH 检测使用 ALDEFLUOR® (Aldagen, Inc., Ashland, Oregon) 作为醛脱氢酶活性的标识物。在特定的实施方案中，所述多种是所述细胞群中的约 3% 至约 25% 的细胞。在另一个实施方案中，本发明提供了脐带干细胞群，其中多种所述脐带干细胞是醛脱氢酶阳性的，这可以使用 ALDEFLUOR® 作为醛脱氢酶活性的指示剂通过醛脱氢酶活性检测来测定。在特定的实施方案中，所述多种是所述细胞群中的约 3% 至约 25% 的细胞。在另一个实施方案中，所述胎盘干细胞或脐带干细胞群与在相同条件下培养的具有相同细胞数量的骨髓来源的间充质干细胞群相比，显示出至少三倍、至少五倍更高的 ALDH 活性。

在任一上述胎盘干细胞或胎盘干细胞群的不同实施方案中，干细胞或胎盘干细胞群已经传代至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18 或 20 代、或者更多代，或扩增了 1、2、3、4、5、6、7、8、9、

10、12、14、16、18、20、24、26、28、30、32、34、36、38 或 40 次群体倍增数，或更多。

在其它实施方案中，上述胎盘干细胞或干细胞与骨髓来源的间充质干细胞相比以可检测的更高水平表达一个或多个基因，其中所述一个或多个基因是一个或多个 ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ARTS-1、B4GALT6、BCHE、C11orf9、CD200、COL4A1、COL4A2、CPA4、DMD、DSC3、DSG2、ELOVL2、F2RL1、FLJ10781、GATA6、GPR126、GPRC5B、HLA-G、ICAM1、IER3、IGFBP7、IL1A、IL6、IL18、KRT18、KRT8、LIPG、LRAP、MATN2、MEST、NFE2L3、NUAK1、PCDH7、PDLIM3、PJP2、RTN1、SERPINB9、ST3GAL6、ST6GALNAC5、SLC12A8、TCF21、TGFB2、VTN 和/或 ZC3H12A，其中所述骨髓来源的干细胞已经在培养中多次传代，该次数与所述胎盘干细胞已经经历的代数相等。相应于这些基因的序列见于 Affymetrix GENECHIP®阵列。这些基因在 2006 年 12 月后还可以在 GenBank 登录号 NM_001615 (ACTG2)、BC065545 (ADARB1)、(NM_181847 (AMIGO2)、AY358590 (ARTS-1)、BC074884 (B4GALT6)、BC008396 (BCHE)、BC020196 (C11orf9)、BC031103 (CD200)、NM_001845 (COL4A1)、NM_001846 (COL4A2)、BC052289 (CPA4)、BC094758 (DMD)、AF293359 (DSC3)、NM_001943 (DSG2)、AF338241 (ELOVL2)、AY336105 (F2RL1)、NM_018215 (FLJ10781)、AY416799 (GATA6)、BC075798 (GPR126)、NM_016235 (GPRC5B)、AF340038 (ICAM1)、BC000844 (IER3)、BC066339 (IGFBP7)、BC013142 (IL1A)、BT019749 (IL6)、BC007461 (IL18)、(BC072017) KRT18、BC075839 (KRT8)、BC060825 (LIPG)、BC065240

(LRAP)、BC010444 (MATN2)、BC011908 (MEST)、BC068455 (NFE2L3)、NM_014840 (NUAK1)、AB006755 (PCDH7)、NM_014476 (PDLIM3)、BC126199 (PKP-2)、BC090862 (RTN1)、BC002538 (SERPINB9)、BC023312 (ST3GAL6)、BC001201 (ST6GALNAC5)、BC126160 或 BC065328 (SLC12A8)、BC025697 (TCF21)、BC096235 (TGFB2)、BC005046 (VTN)和 BC005001 (ZC3H12A)中找到。

在更特殊的实施方案中，胎盘干细胞或干细胞与骨髓来源的间充质干细胞相比以可检测的更高水平表达 ACTG2、ADARB1、AMIGO2、ARTS-1、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 和 ZC3H12A。

通常利用生理学可接受的溶液，例如干细胞收集组合物从哺乳动物胎盘中获得胎盘干细胞。干细胞收集组合物详细描述在 2006 年 12 月 28 日提交的题为“用于收集胎盘干细胞和保存器官的改良培养基(Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs)”的相关美国专利申请号 11/648,812 中。

胎盘干细胞收集组合物包含任何适合干细胞收集和/或培养的生理学可接受的溶液，例如盐溶液(如磷酸盐缓冲液、Kreb 液、改良的 Kreb 液、Eagle 液、0.9% NaCl 等)，培养基(如 DMEM、H.DMEM 等)等。

胎盘干细胞收集组合物包含一种或多种旨在保存胎盘干细胞，即从收集的时间至培养的时间内防止胎盘干细胞死亡、或延迟胎盘干细胞死亡、降低细胞群中胎盘干细胞死亡数量等的组分。此类组分可以是例如：凋亡抑制剂(如，半胱天冬酶抑制剂或 JNK 抑制剂)；血管扩张剂(如，硫酸镁、抗高血压药物、心房利钠肽(ANP)、促肾上腺皮质激素、促肾上腺皮质激素释放激素、硝普化钠、胍酞嗪、三磷酸腺苷、腺苷、消炎痛(indomethacin)或硫酸镁、磷酸二酯酶抑制剂等)；细胞坏死抑制剂(如，2-(1H-吡啶-3-基)-3-正戊氨-马来酰亚胺、二硫代氨基吡咯烷或氯硝西洋)；TNF- α 抑制剂；和/或载氧全氟化碳(如全氟溴辛烷、全氟溴萘烷等)。

胎盘干细胞收集组合物包含一种或多种组织降解酶，例如金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、中性蛋白酶、RNA 酶或 DNA 酶，等。此类酶包括但不限于胶原酶(如 I、II、III 或 IV 型胶原酶，来自溶组织梭状芽胞杆菌的胶原酶等)、分散酶(dispace)、嗜热菌蛋白酶(thermolysin)、弹性蛋白酶、胰蛋白酶、LIBERASE、透明质酸酶等。

胎盘干细胞收集组合物包含杀菌或抑菌有效量的抗生素。在一些非限制性实施方案中，抗生素是大环内酯物(如，妥布霉素)、头孢菌素(如，头孢氨苄、头孢拉定、头孢呋新、头孢罗齐、头孢克洛、头孢克肟或头孢羟氨苄)、克拉仙霉素、红霉素、青霉素(如，青霉素 V)或喹诺酮(如，氧氟沙星、环丙沙星或诺氟沙星)、四环素、链霉素等。在特定的实施方案中，抗生素是抗革兰氏(+)和/或革兰氏(-)性菌，例如，绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色酿脓葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等活性的。

胎盘干细胞收集组合物还包含一种或多种下列化合物：腺苷(约 1 mM 至约 50 mM)；D-葡萄糖(约 20 mM 至约 100 mM)；镁离子(约 1 mM 至约 50 mM)；分子量大于 20,000 道尔顿的大分子，在一个实施方案中，存在的量足以维持内皮完整性和细胞活力(例如，合成的或天然存在的胶体，多糖例如葡聚糖或聚乙二醇，存在约 25 g/l 至约 100 g/l，或约 40 g/l 至约 60 g/l)；抗氧化剂(例如，丁羟茴醚、丁基羟基甲苯、谷胱甘肽、维生素 C 或维生素 E，存在约 25 μ M 至约 100 μ M)；还原剂(例如，N-乙酰半胱氨酸，存在 0.1 mM 至约 5 mM)；防止钙进入细胞的试剂(例如，异搏定，存在约 2 μ M 至约 25 μ M)；硝化甘油(例如，存在约 0.05 g/l 至约 0.2 g/l)；抗凝剂，在一个实施方案中，存在的量足以帮助防止残血凝结(例如，肝素或水蛭素，存在浓度为约 1000 单位/l 至约 100,000 单位/l)；或含有阿米洛利的化合物(例如，阿米洛利、乙基异丙基阿米洛利、环己基阿米洛利、二甲基阿米洛利或异丁基阿米洛利，存在约 1.0 μ M 至约 5 μ M)。

5.2.3. 胎盘的收集和处理

通常地，在出生排出体外后立即内回收人胎盘。在一个实施方案中，在知会同意并获取患者的完整病史且将该病史与所述胎盘关联后，从患者回收胎盘。优选地，在分娩后继续记录病史。此类病史可用于协调胎盘或从其收获的干细胞的后续应用。例如，根据病史，人胎盘干细胞可用于与胎盘相关的婴儿的个人化药物，或用于该婴儿的双亲、兄弟姐妹或其他亲属。

在回收胎盘干细胞前，去除了脐带血和胎盘血。在一些实施方案中，在分娩后去除胎盘中的脐带血。胎盘可用于传统的脐带血回收方法。一般

使用针头或插管在重力的帮助下给胎盘除血(参见例如, Anderson 的美国专利号 5,372,581, Hessel 等人的美国专利号 5,415,665)。针头和插管一般放置在脐静脉, 并可以轻柔的按摩胎盘以帮助从胎盘中排尽脐带血。可以在商业上实施此类脐带血回收, 例如, LifeBank Inc., Cedar Knolls, N. J., ViaCord, Cord Blood Registry and Cryocell。优选地, 在没有其它操作的情况下依靠重力排尽胎盘, 从而使脐带血回收过程中组织损伤最小化。

为了回收脐带血和收集干细胞(例如, 通过灌洗或组织解离收集), 一般要将胎盘从分娩室或初生室转移至另一个地点, 例如实验室。优选地在无菌的、保温的(维持胎盘温度在 20-28°C)转移装置中转移胎盘, 例如, 将脐带近端夹紧的胎盘放置在无菌的、夹拉链封闭的塑料袋中, 然后将其放置在隔热容器内。在另一个实施方案中, 在基本根据未决美国专利申请公开号 2006/0060494 中描述的脐带血收集试剂盒中转移胎盘。优选地, 在分娩后 4 至 24 小时将胎盘递送至实验室。在一些实施方案中, 在脐带血回收前夹紧脐带近端, 优选夹紧插入到胎盘的 4-5 cm(厘米)内。在其它实施方案中, 在脐带血回收后但在胎盘的其它处理前夹紧脐带近端。

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。胎盘可以储存长于 48 小时的时间, 优选储存 4 至 24 小时然后灌洗胎盘去除任何残留的脐带血。胎盘优选在 5 至 25°C(摄氏度)下储存在抗凝剂溶液中。合适的抗凝剂溶液是本领域普遍已知的。例如, 可以使用肝素或华法令钠(warfarin sodium)的溶液。在优选的实施方案中, 抗凝剂溶液包含肝素溶液(例如, 在 1: 1000 溶液中 1% w/w)。在收集胎盘干细胞前, 除血的胎盘优选储存不超过 36 小时。

一旦如上述收集和制备得到哺乳动物胎盘或其部分，可以用任何本领域已知的方法进行处理，例如，可以灌洗或解离(如，用一种或多种组织解离酶来解离)从而获得干细胞。

5.2.4. 胎盘组织的物理解离和酶促消化

在一个实施方案中，通过器官的物理解离，例如酶促消化，从哺乳动物胎盘中收集干细胞。例如，可以在接触本发明的干细胞收集组合物的同时，例如将胎盘或其部分压碎、剪碎、绞碎、切块、切细、浸软等，然后用一种或多种酶消化组织。还可以物理地解离胎盘或其部分，并用一种或多种酶消化，然后将获得的材料浸入发明的干细胞收集组合物或与发明的干细胞收集组合物混合。可以使用任何物理解离的方法，只要该解离方法使所述器官中的多数，更优选大多数，更优选至少 60%、70%、80%、90%、95%、98%或 99%的细胞存活，这可以通过例如台盼蓝不相容法确定。

在物理解离和/或酶促消化和干细胞回收前，可以将胎盘分割成多个组分。例如，可以从羊膜、绒毛膜、脐带、胎盘绒毛叶或其任意组合获得胎盘干细胞。优选地，从包含羊膜和绒毛膜的胎盘组织获得胎盘干细胞。通常可以通过解离小块胎盘组织为获得胎盘干细胞，例如体积为约 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 立方毫米的胎盘组织块。

优选的干细胞试剂组合物包含一种或多种组织解离酶。酶促消化优选使用酶的组合，例如基质金属蛋白酶和中性蛋白酶的组合物(如，胶原酶和分

散酶的组合)。在一个实施方案中，胎盘组织的酶促消化使用基质金属蛋白酶、中性蛋白酶和用于消化透明质酸的粘多糖酶的组合，例如胶原酶、分散酶和透明质酸酶的组合或者 LIBERASE(Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind.)和透明质酸酶的组合。可用于裂解胎盘组织的其它酶包括木瓜蛋白酶、脱氧核糖核酸酶、丝氨酸蛋白酶如胰蛋白酶、糜蛋白酶或弹性蛋白酶。血清中的 α_2 微球蛋白可以抑制丝氨酸蛋白酶，因此用于消化的基质通常是无血清的。在酶促消化过程中通常使用 EDTA 和 DNA 酶来增加细胞回收的效率。优选稀释消化物从而避免干细胞陷入粘稠的消化物中。

可以使用任何组织消化酶的组合。组织消化酶的典型浓度包括例如：50-200 U/ml 的 I 型胶原酶和 IV 型胶原酶，1-10 U/ml 的分散酶，和 10-100 U/ml 的弹性蛋白酶。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相继使用两种或多种蛋白酶以释放胎盘干细胞。例如，在一个实施方案中，首先用合适量的 2 mg/ml 的 I 型胶原酶消化 30 分钟，然后用 0.25% 的胰蛋白酶在 37°C 消化 10 分钟。优选地在 使用其它酶后再使用丝氨酸蛋白酶。

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

可以理解，当完整的胎盘或胎盘的一部分同时含有胎儿和母体细胞(例如，胎盘的一部分包含绒毛膜或绒毛小叶)时，收集的胎盘干细胞将同时包含源自胎儿和母体的胎盘干细胞的混合物。当胎盘的部分不含有或只含有

可忽略量的母体细胞时(例如,羊膜),收集的胎盘干细胞将几乎只含有胎儿的胚胎干细胞。

5.2.5. 胎盘灌洗

还可以通过灌洗哺乳动物胎盘来获得胎盘干细胞。灌洗哺乳动物胎盘获得干细胞的方法在例如 Hariri 的美国申请公开号 2002/0123141, 和于 2005 年 12 月 29 日提交的题为“用于收集胎盘干细胞和保存器官的改良基质(Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs)”的相关美国临时申请号 60/754,969 中有公开。

可以利用例如干细胞收集组合物作为灌洗液,通过灌洗例如胎盘脉管系统收集胎盘干细胞。在一个实施方案中,通过使灌洗液流经脐动脉和/或脐静脉来灌洗哺乳动物胎盘。可以利用如重力流入胎盘来实现灌洗液在整个胎盘的流动。优选地,利用泵(如,蠕动泵)迫使灌洗液流经整个胎盘。例如,可以用套管(如,TEFLON®或塑料套管)对脐静脉插管,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洗歧管相连。

在准备灌洗过程中,优选地按脐动脉和脐静脉位于胎盘最高点的方式来定位(如,悬挂)胎盘。可以通过使灌洗液(例如,本发明的干细胞收集组合物)在整个胎盘脉管系统,或在整个胎盘脉管系统和相邻组织中流通来灌洗胎盘。在一个实施方案中,脐动脉和脐静脉同时连接移液器,该移液器通过柔性的连接管与灌洗液的储器相连。灌洗液流入脐静脉和动脉。灌洗液渗出和/或流经血管壁进入周围的胎盘组织,并从孕期附着在母亲子宫上的胎盘表面合适的开放脉管收集。还可以通过脐带开口导入灌洗液,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。在另一个实施方案

中，灌洗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。

在一个实施方案中，在灌洗过程中夹紧脐带近端，更优选地，加紧脐带插入胎盘 4-5 cm(厘米)。

在除血过程中从哺乳动物胎盘首先收集的灌洗液通常都着色有脐带血和/或胎盘血残留的红血细胞。随着灌洗继续和残留的脐带血细胞从胎盘中洗出，灌洗液变得越来越无色。一般 30 至 100 ml(毫升)灌洗液足以将胎盘初步地除血，但根据观察的结果可以使用或多或少的灌洗液。

用于收集胎盘干细胞的灌洗液体积可以根据收集的干细胞数量、胎盘大小、单个胎盘产生的收集次数等来变化。在不同的实施方案中，灌洗液的体积可以自 50 mL 至 5000 mL，50 mL 至 4000 mL，50 mL 至 3000 mL，100 mL 至 2000 mL，250 mL 至 2000 mL，500 mL 至 2000 mL，或 750 mL 至 2000 mL。一般地，在除血后用 700-800 mL 灌洗液灌洗胎盘。

可以在数小时或数天的过程中多次灌洗胎盘。当多次灌洗胎盘时，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胎盘，并用干细胞收集组合物或标准灌洗液(例如，生理盐水如磷酸盐缓冲液(“PBS”))灌洗，其中有或无抗凝剂(如，肝素、华法令钠、香豆素、双香豆素)，和/或有或无抗微生物剂(如， γ -巯基乙醇(0.1 mM)；抗生素如链霉素(如 40-100 $\mu\text{g/ml}$)、青霉素(如 40U/ml)、两性霉素 B(如 0.5 $\mu\text{g/ml}$)。在一个实施方案中，将分离的胎盘维持或培养一段时间而不收集灌洗液，从而在灌洗和收集灌洗液前，维持或培养胎盘 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 个小时，或者 2 或 3 或更多天。可以维持被灌洗的胎盘一个或多个额外的时间，例如，

1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或更多个小时，并用如 700-800 mL 灌洗液再次灌洗。可以灌洗胎盘 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，重复灌洗胎盘和收集灌洗液(如，干细胞收集组合物)，直到回收的有核细胞数低于 100 细胞/ml。可以分别进一步处理不同时间点的灌洗液，以回收时间依赖性的细胞群体(如，干细胞)。也可以混合不同时间点的灌洗液。

不希望受任何理论约束，在除血并灌洗胎盘足够时间后，相信胎盘干细胞迁移到经除血和灌洗的胎盘的微循环中，在该微环境中根据本发明的方法收集该胎盘干细胞，优选地通过灌洗将其冲洗到收集器皿中。灌洗分离的胎盘不仅用来去除残留的脐带血，而且为胎盘提供了合适的营养，包括氧气。可以用用来去除残留脐带血细胞的相似溶液培养和灌洗胎盘，优选不添加抗凝剂。

根据本发明方法灌洗获得的胎盘干细胞数量明显多于从未用所述溶液灌洗，或未经获取干细胞的其它处理(例如，通过组织解离如酶促消化)的哺乳动物胎盘中获得的胎盘干细胞数量。在本文的上下文中，“明显多于”意指多至少 10%。根据本发明的方法灌洗产生的胎盘干细胞数量明显多于例如从培养胎盘或其一部分的培养基中获得的胎盘干细胞的数目。

通过用包含一种或多种蛋白酶或其它组织解离酶的溶液灌洗，可以从胎盘中分离干细胞。在特定的实施方案中，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)升温至 25-37°C，并在 200 mL 培养基中用一种或多种组织解离酶孵育 30 分钟。收集灌洗液中的细胞，降至 4°C，并用包含 5 mM EDTA、2 mM 二硫苏糖

醇和 2 mM β -巯基乙醇的冷却抑制剂化合物洗涤。数分钟后，用本发明冷却的(如 4°C)干细胞收集组合物洗涤干细胞。

可以理解，利用碾盘法灌洗，即灌洗液在其从胎盘的母体侧渗出后进行收集，因而获得的是胎儿和母体细胞的混合物。因此，通过该方法收集的细胞包含胎儿和母体来源的胎盘干细胞的混合群。相反，仅通过胎盘脉管系统灌洗，因为灌洗液流经一根或两根胎盘血管，并仅通过剩余的血管收集，因此胎盘干细胞群的收集物几乎都是胎儿来源的。

5.2.6. 胎盘干细胞的分离、分类和表征

来自哺乳动物胎盘的干细胞，不论是否通过灌洗或酶促消化获得，都可以通过聚蔗糖梯度离心从其它细胞中初步纯化(即分离)。此类离心可以依据关于离心速度等的任何标准规程进行。在一个实施方案中，例如，通过在室温下 5000 \times g 离心 15 分钟，从灌洗液中回收从胎盘中收集的细胞，所述离心将细胞与如污染的碎片和血小板分离。在另一个实施方案中，将胎盘灌洗液浓缩至约 200 ml，轻柔的分层铺在聚蔗糖上，并在 22°C 下 1100 \times g 离心 20 分钟，收集细胞的低密度界面层用于进一步处理。

将细胞沉淀颗粒重悬在新鲜的干细胞收集组合物中，或重悬在适合干细胞维持的基质中，例如，含有 2 U/ml 肝素和 2 mM EDTA 的 IMDM 无血清培养基(GibcoBRL, NY)。利用例如 LYMPHOPREPTM(Nycomed Pharma, Oslo, Norway)，根据生产商推荐的程序，分离总单核细胞部分。

如本文中使用的，“分离的”胎盘干细胞意指去除了在整个的哺乳动物胎盘中通常与干细胞相关联的至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或 99%的细胞。当其代表的细胞群包含少于 50%的在完

整器官内通常与干细胞相关联的细胞时，则来自器官的干细胞是“分离的”。

通过灌洗或消化获得的胎盘细胞可以，例如通过使用如含 0.2% EDTA 的 0.05% 胰蛋白酶溶液(Sigma, St. Louis MO)差异胰酶消化进一步地或初步地分离。由于胎盘干细胞通常在约五分钟内脱离塑料表面，而其它附着的群体通常需要孵育超过 20-30 分钟，因此差异胰酶消化是可行的。按照下列胰酶消化和胰蛋白酶中和化(利用例如，胰蛋白酶中和溶液(TNS, Cambrex))来收获脱离的胎盘干细胞。在分离附着细胞的一个实施方案中，在每个 T-75 瓶，优选纤粘连蛋白包被的 T75 瓶中，放入等份的例如约 $5 \cdot 10^6$ 个细胞。在一个此类实施方案中，可以用可商购的间充质干细胞生长培养基(MSCGM)(Cambrex)培养细胞，并放置在组织培养箱内(37°C, 5% CO₂)。在 10 至 15 天后，通过用 PBS 洗涤从瓶内去除非附着的细胞。然后用 MSCGM 代替 PBS。优选每天检查瓶子存在的不同附着细胞类型，特别检查成纤维细胞样细胞簇的出现和扩增。

可以监测从哺乳动物胎盘收集的细胞的数量和类型，例如通过使用标准的细胞检测技术，例如流式细胞仪、细胞分选、免疫细胞化学(例如，用组织特异性或细胞标识物特异性的抗体染色)、荧光激发细胞分选(FACS)、磁激发细胞分选(MACS)检测形态学和细胞表面标识物的改变，利用光学显微镜或共聚焦显微镜检查细胞的形态学，和/或通过利用本领域普遍已知的技术(如，PCR 和基因表达谱)检测基因表达的改变来监测。还可以使用这些技术来鉴别一种或多种特定标识物是阳性的细胞。例如，利用 CD34 的抗体，技术人员利用上述技术可以确定细胞是否含有可检测量的 CD34；如果含有，则细胞是 CD34⁺。同样的，如果细胞产生用 RT-PCR

可检测的足够的 OCT-4 RNA, 或产生比成体细胞显著更多的 OCT-4 RNA, 则该细胞是 OCT-4⁺。抗细胞表面标识物(例如, CD 标识物如 CD34)的抗体和干细胞特异性基因的序列, 如 OCT-4, 都是本领域普遍已知的。

利用荧光激发细胞分选仪(FACS)来分选胎盘细胞, 特别是已经通过蔗糖分离、差异附着或两者的组合分离过的细胞。荧光激发细胞分选(FACS)是基于颗粒的荧光性质, 用于分离颗粒(包括细胞)的普遍已知的方法(Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151:150-165)。单个颗粒中的荧光部分的激光激发产生微小电荷, 该电荷使混合物中的阳性和阴性颗粒电磁分离。在一个实施方案中, 用不同的荧光标签来标记细胞表面标识物-特异性的抗体或配基。在经过细胞分选仪时处理细胞, 使得能够基于细胞结合所用抗体的能力而分离细胞。FACS 分选的颗粒可以直接放置到 96-孔或 384-孔板的单个孔中, 以方便分离和克隆。

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

中，通过 CD200、HLA-G、CD73、CD105、CD34、CD38 和 CD45 的表达或不表达来分选胎盘细胞，将 CD200⁺、HLA-G⁺、CD73⁺、CD105⁺、CD34⁻、CD38⁻和 CD45⁻的胎盘细胞与其它胎盘细胞分离，用于进一步使用。

在另一个实施方案中，可以使用磁性微珠来分离细胞。可以利用磁激发细胞分选(MACS)技术，一种基于颗粒结合磁珠(0.5-100 μm 直径)的能力来分离颗粒的方法来分选细胞。可以对磁性微珠进行多种有效的修饰，包括共价添加特异性识别特定细胞表面分子或半抗原的抗体。然后将微珠与细胞混合以允许结合。然后将细胞通过磁场，以分离出具有特异的细胞表面标识物的细胞。在一个实施方案中，可以将这些细胞分离并与偶联了其它细胞表面标识物的抗体的磁珠再混合。将细胞再次通过磁场，分离结合两种抗体的细胞。然后将此类细胞稀释到不同的皿中，例如用于克隆分离的微滴度皿。

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

在另一个实施方案中，通过集落生成单位检测来鉴定和表征胎盘干细胞。集落生成单位检测是本领域普遍已知的，例如 MESENCULT™ 基质 (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver British Columbia)。

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

还可以利用本领域已知的其它技术将胎盘干细胞与其它胎盘细胞分离，例如选择性生长目标细胞(阳性选择)，选择性消灭不需要的细胞(阴性选择)；基于混合群体与例如大豆凝集素的差异细胞可凝集性分离；冻融过程；过滤；低速和区带离心法；离心冲洗(逆流离心)；单位重力分离；逆流分布；电泳等等。

5.3. 利用胶原生物纤维培养干细胞

本发明提供了培养干细胞的方法，特别是培养胚胎干细胞或胎盘干细胞的方法。该方法包括在含有胶原生物纤维的培养基中培养干细胞的步骤。在一个实施方案中，该干细胞相对于胶原生物纤维来说是外源性的，即该干细胞不是来自产生胶原生物纤维的同一胎盘。

在一些实施方案中，所述方法包括用含有多种胎盘干细胞的胶原生物纤维培养干细胞；和在适合该干细胞存活条件下培养所述干细胞。

所述干细胞可以培养本领域技术人员公知的一段时间。在一些实施方案中，在含有胶原生物纤维的培养基中培养该干细胞至少 1、2、5、10、

15、20 或 24 个小时，或更久。在一些实施方案中，该干细胞可以培养至少 2、5、7、10、14、20、25 或 30 天，或更久。在一些实施方案中，该干细胞可以培养从约 2 小时至约 24 小时，从约 2 小时至约 7 天，从约 2 小时至约 14 天，从约 2 小时至约 30 天，从约 24 小时至约 2 天，从约 24 小时至约 7 天，从约 24 小时至约 14 天，从约 24 小时至约 30 天。

所述干细胞可以在本领域技术人员已知的适合干细胞生长的条件下培养。培养干细胞的温度可以是例如，从约 30°C 至约 40°C，从约 30°C 至约 50°C，从约 35°C 至约 40°C，从约 35°C 至约 50°C，从约 35°C 至约 40°C，从约 35°C 至约 45°C，从约 35°C 至约 50°C。培养干细胞的温度可以是例如，约 35°C、约 36°C、约 38°C、约 39°C、约 40°C，优选的约 37°C。培养环境的 CO₂ 水平可以是例如，从约 3% CO₂ 至约 20% CO₂，从约 5% CO₂ 至约 20% CO₂，从约 4% CO₂ 至约 10% CO₂，或约 5% CO₂。

用于实施本发明的培养干细胞的常规技术在例如，美国专利号 6,387,367 和 6,200,806；美国专利申请公开号 2006/0057718 中有公开，还可参见 *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach* (E. J. Robertson 编著, IRL Press Ltd. 1987)；*Guide to Techniques in Mouse Development* (P. M. Wasserman 等人编著, Academic Press 1993)；*Embryonic Stem Cell Differentiation in Vitro* (M. V. Wiles, *Meth. Enzymol.* 225:900, 1993)；*Properties and Uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy* (P. D. Rathjen 等人, *Reprod. Fertil. Dev.* 10:31, 1998)。

在一些实施方案中，所述胶原生物纤维包含衍生该胶原生物纤维的胎盘的內源性细胞。此类细胞包括但不限于胎盘干细胞、祖细胞、多能性细胞和多潜能细胞。在一些实施方案中，该细胞是人胎盘衍生的附着细胞。

在一些实施方案中，所述胶原生物纤维包含衍生胶原生物纤维的胎盘的外源性细胞。此类细胞可以是例如，与本发明的干细胞共培养的滋养层细胞。在一些实施方案中，该培养的干细胞是人干细胞，且滋养细胞是人来源的。滋养细胞可以是本领域技术人员已知的任何滋养细胞，包括但不限于原代小鼠胚胎成纤维细胞(PMEF)、小鼠胚胎成纤维细胞系(MEF)、鼠胎成纤维细胞(MFF)、人胚胎成纤维细胞(HEF)、人胎肌细胞(HFM)、人胎皮肤细胞(HFS)、人成体皮肤细胞、人包皮成纤维细胞(HFF)、人成体输卵管上皮细胞(HAFT)或人骨髓体细胞(hMSC)，例如在 WO 03/02944；WO 03/014313；Park 等人, Biol. Reprod., 69:2007-2017, 2003；Amit 等人, Biol. Reprod., 68(6):2150-2156, 2003；Hovattal 等人, Hum. Reprod., 18 (7): 1404-1409, 2003；Richards 等, Nat Biotechnol, 20(9):933-936, 2002；James 等人, Science, 282(6): 1145-1147, 1998 和 Cheng 等人, Stem Cells, 21 :131-142, 2003 中的描述。

在一些实施方案中，胶原生物纤维包含衍生胶原生物纤维的胎盘的內源性和外源性细胞的组合。

在本发明中，用胶原生物纤维培养的所述干细胞相对于该胶原生物纤维来说是外源性的。在一些实施方案中，处理该胶原生物纤维以去除所有的內源性细胞，从而允许培养外源性干细胞。去除內源性细胞的方法是本领域普遍已知的。例如，可以使用温和去垢剂(如，脱氧胆酸)去除內源性细胞。在另一个实施方案中，在培养干细胞前杀死內源性细胞。杀死细胞

的方法是本领域普遍已知的。例如，可以用电磁、UV、X-射线、 γ -或 β -射线辐射胶原生物纤维，以消除所有残留的活的内源性细胞。在一个实施方案中，可以使用半致死暴露量(例如，500至1500 cGy)的辐射来保存胎盘，但清除不需要的细胞。例如，美国国防部的“电离辐射的生物物理和生物学影响(Biophysical and Biological Effects of Ionizing Radiation)”第5章提供了致死与非致死电离辐射的国际标准。

可以以合适的分布方式并在存在促进细胞存活和生长的培养基的情况下，将干细胞种植在胶原生物纤维上。可以根据本领域技术人员的判断，在任何时间和以任何方式将干细胞种植在胶原生物纤维上。例如，胶原生物纤维可以在细胞传代时沉积到干细胞培养物上，或者作为常规饲养的一部分。或者，可以在分离后将干细胞直接种植到胶原生物纤维上。

种植到胶原生物纤维表面的干细胞或祖细胞数量可以变动，但可至少是 1×10^3 、 3×10^3 、 1×10^4 、 3×10^4 、 1×10^5 、 3×10^5 、 1×10^6 、 3×10^6 、 1×10^7 、 3×10^7 、 1×10^8 、 3×10^8 、 1×10^9 、 3×10^9 、 1×10^{10} 、 3×10^{10} 、 1×10^{11} 、 3×10^{11} 或 1×10^{12} 个干细胞；或者可以不超过 1×10^3 、 3×10^3 、 1×10^4 、 3×10^4 、 1×10^5 、 3×10^5 、 1×10^6 、 3×10^6 、 1×10^7 、 3×10^7 、 1×10^8 、 3×10^8 、 1×10^9 、 3×10^9 、 1×10^{10} 、 3×10^{10} 、 1×10^{11} 、 3×10^{11} 或 1×10^{12} 个干细胞或祖细胞。

在任一个本文中的培养实施方案的实施方案中，将干细胞培养在自脐带衍生的，例如来自脐带膜的胶原生物材料上。在优选的实施方案中，将脐带衍生的生物材料去细胞化并基本上如本文所公开处理，以制备胶原生物纤维。优选地，干细胞培养在脐带生物材料的基本上平的层或片上。

5.3.1 培养基

一旦分离,就将所述干细胞培养在含有胶原生物纤维的培养基中。培养基可以是任何适合培养干细胞的培养基,例如,适合在无滋养细胞条件下培养干细胞的培养基。此类培养基包括但不限于在美国专利号 6,800,480、美国专利公开号 2005/0153445 中描述的培养基。在特定的实施方案中,可用于本发明的培养基包含约 500 mL 蒸馏水; 60 mL DMEM (Gibco-BRL); 溶解在水中的约 40 mL MCDB201 (Sigma), pH 7.2; 约 2 mL FCS (Hyclone); 约 1 mL 100×ITS (胰岛素-转铁蛋白-硒; Sigma); pen&strep; 约 10 ng/mL LA; 牛血清白蛋白; 约 50 nM 地塞米松(Sigma); 约 10 ng/ml PDGF (血小板衍生生长因子; 和约 10 ng/mL EGF (上皮生长因子))。

虽然本领域技术人员认识到使用无血清基质是有利的,因为细胞不会暴露给血清-产生的病原体,但是,使用的基质可以含有或不含有血清。

本领域技术人员应该认识到,根据干细胞初始来源的组织或者其将分化成的组织,可以在培养基中补充一种或多种扩增因子,以利于培养或扩增。例如,对于胚胎干细胞,离体(ex vivo)扩增因子可以包括以下一种或多种: FGFβ、Wnt-3a、胶原、纤粘连蛋白和层粘连蛋白。对于间充质干细胞,离体扩增因子可以包括例如一种或多种 FGFβ、EGF、PDGF 和纤粘连蛋白。对于造血干细胞,离体扩增因子可以包括一种或多种的 IL-3、IL-6、SCF、Flt-3/Flk-2、Tpo、Shh、Wnt-3a 和 Kirre。对于神经干细胞,离体扩增因子可以包括 FGFβ、EGF、纤粘连蛋白和抑半胱氨酸蛋白酶蛋白 C(cystatin C)。

在一些实施方案中，使用含有胶原生物纤维的条件培养基培养干细胞。本文中使用的条件培养基指在其中滋养细胞已经培养了一段时间的培养基。

本领域技术人员应该理解，根据培养目的(培养、扩增或分化干细胞)、衍生干细胞的来源、干细胞被诱导分化成的细胞类型、培养中使用的胶原生物纤维以及干细胞以外的细胞的存在或缺失，可以使用不同的培养基。

5.4. 用胶原生物纤维扩增干细胞

本发明提供了扩增干细胞或干细胞群的方法，该方法包括在允许所述干细胞或干细胞群扩增的条件下，在含有胶原生物纤维的培养基中该培养干细胞或干细胞群。

将干细胞或干细胞群培养在本领域技术人员公知的合适条件下并培养本领域技术人员公知的一段时间。在一些实施方案中，在含有胶原生物纤维的培养基中培养干细胞 24 小时或更久。在一些实施方案中，将干细胞培养 2 天或更久。在一些实施方案中，将干细胞培养 7 天或更久。在一些实施方案中，将干细胞培养 10 天或更久。在一些实施方案中，将干细胞培养 14 天或更久。在一些实施方案中，将干细胞培养 30 天或更久。

在一些实施方案中，在含有胶原生物纤维的培养基中扩增单个干细胞，或约、或至少、或至多 10、20、50、100、200、500、 1×10^3 、 5×10^3 、 1×10^4 或 5×10^4 个干细胞。在其它实施方案中，根据本发明的方法培养和扩增干细胞，与初始培养的干细胞数量相比，干细胞的数量增加了 2、5、10、20、50、100、200、500、 1×10^3 、 5×10^3 、 1×10^4 或 5×10^4 倍。

在其它实施方案中，培养的干细胞的数量增加到约、或增加到至少 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 、 5×10^{11} 或 1×10^{12} 个干细胞；或者可以不超过 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 、 5×10^{11} 或 1×10^{12} 个干细胞。

5.5. 用胶原生物纤维分化干细胞

本发明提供了分化干细胞的方法，该方法包括在含有胶原生物纤维的培养基中培养干细胞一段足够干细胞分化的时间。本发明包括分化干细胞成为特定细胞系，包括但不限于间叶细胞、造血细胞、成脂细胞、生肝细胞、神经原性细胞、神经胶质原性细胞、成软骨细胞、血管原性细胞、肌原性细胞、胰腺原性细胞、成软骨或成骨系细胞的方法。

本领域技术人员应该理解足够干细胞分化的时间可以根据培养的干细胞的类型和干细胞分化成的细胞类型而改变。在一些实施方案中，在含有胶原生物纤维的培养基中培养干细胞至少约，或至多约 1、2、5、10、15、20 或 24 小时或更久。在一些实施方案中，干细胞培养了至少约，或至多约 1、2、5、7、10、14、20、25 或 30 天或更久。在一些实施方案中，干细胞培养了从约 2 小时至约 24 小时，从约 2 小时至约 7 天，从约 2 小时至约 14 天，从约 2 小时至约 30 天，从约 24 小时至约 2 天，从约 24 小时至约 7 天，从约 24 小时至约 14 天，从约 24 小时至约 30 天。

在一些实施方案中，所述方法还包括将干细胞与一种或多种有利于目标分化的试剂接触。例如，该试剂可以诱导或有利于表型的改变，促进具有特定表型的细胞的生长或减缓其它细胞的生长，或者以未知的机制与其

它试剂协同作用。此类试剂可以是小分子或细胞因子，例如美国申请公开号 2003/0235909、2004/0028660(小分子)，美国专利号 6,335,195(存在血管紧张肽原和血管紧张素的情况下的造血干细胞和间充质干细胞)，美国专利号 6,022,743(胰实质细胞-三维培养)，美国专利号 6,613,568(造血系)中公开的试剂。

可以在适合干细胞分化的任何培养基或条件下分化干细胞，例如在美国申请公开号 2005/015344 和 2005/0158855(常规的)，美国专利号 6,833,269 和 6,887,706 以及美国申请公开号 2005/0095706(神经细胞)，美国申请公开号 2005/0170502(肝细胞系)，Kehat, 2003, *Methods in Enzymology* 365:465-473，美国申请公开号 2005/0191744 和 2005/0214939(心肌细胞)，以及 Assady 等人, 2001, *Diabetes*, 50:1691-97(胰腺细胞)中的描述。

可以通过特定细胞表面标识物的存在或缺失来鉴别根据本发明方法获得的干细胞的分化状态情况。例如，可以通过标识物 OCT-4 和 ABC-p，或其在不同哺乳动物物种中的等价体来鉴别胎盘干细胞。还可以通过标识物 CD73 或 CD105 的存在，和/或标识物 CD34、CD38 或 CD45 的缺失，或其在不同哺乳动物物种中的等价体来鉴别胎盘干细胞。在一些实施方案中，胎盘干细胞是 SSEA3 和/或 SSEA4 阳性的。在一些实施方案中，胎盘干细胞是 SSEA3 和/或 SSEA4 阴性的。可以根据本领域普遍已知的方法来常规地确定此类细胞表面标识物的存在或缺失，例如通过流式细胞仪。例如，为了确定 CD34 或 CD38 的存在，可以在 PBS 中洗涤细胞，然后用抗 CD34 藻红蛋白和抗 CD38 异硫氰酸荧光素双重染色(Becton Dickinson, Mountain View, Calif)。

在另一个实施方案中，通过集落形成单位检测来鉴别和表征分化的干细胞，所述方法是本领域普遍已知的，例如 MESENCULT™ 培养基 (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver British Columbia)。

干细胞是否已经分化成为特定的细胞类型可以通过本领域普遍已知的方法确定，例如，利用流式细胞仪或免疫细胞化学(例如，用组织特异性或细胞标识物特异性抗体染色细胞)等技术测量形态学和细胞表面标识物的改变来确定；通过利用光学显微镜或共聚焦显微镜检查细胞的形态学，或者通过利用本领域普遍已知的技术测量基因表达的改变，如 PCR 和基因表达谱来确定。

在一些实施方案中，可以通过表征差异表达的基因来鉴别分化的细胞，例如，通过将未分化的目标干细胞或祖细胞的多个基因的表达水平与祖细胞类型来源的分化细胞中的所述多个基因的表达水平相比较。例如，可以使用核酸扩增方法，如聚合酶链式扩增反应(PCR)或基于转录的扩增方法(例如，体外转录(IVT))来绘制不同细胞群的基因表达谱，如通过使用多聚核苷酸微阵列。此类绘制不同基因表达谱的方法是本领域普遍已知的。参见例如，Wieland 等人, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci USA 87: 2720-2724; Lisitsyn 等人, 1993, Science 259: 946-951; Lisitsyn 等人, 1995, Meth. Enzymol. 254:291-304; 美国专利号 5,436,142; 美国专利号 5,501,964; Lisitsyn 等人, 1994, Nature Genetics 6:57-63; Hubank 和 Schatz, 1994, Nucleic Acids Res. 22: 5640-5648; Zeng 等人, 1994, Nucleic Acids Research 22: 4381-4385; 美国专利号 5,525,471; Linsley 等人的美国专利号 6,271,002; Van Gelder 等人的美国专利号 5,716,785; Stoflet 等人, 1988, Science 239:491-494; Sarkar 和 Sommer, 1989, Science 244:331-334; Mullis

等人的美国专利号 4,683,195; Malek 等人的美国专利号 5,130,238; Kacian 和 Fultz 的美国专利号 5,399,491; Burg 等人的美国专利号 5,437,990; van Gelder 等人, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci USA 87:1663; Lockhart 等人, 1996, Nature Biotechnol 14:1675; Shannon 的美国专利号 6,132,997; Lindemann 等人的美国专利号 6,235,503。

5.5.1. 分化成神经细胞

在一方面, 本发明包括将干细胞分化成神经细胞的方法, 该方法包括在促进干细胞分化成神经细胞的条件下, 在胶原生物纤维上培养干细胞。在一些实施方案中, 该方法包括将干细胞接触有利于干细胞分化成神经细胞的一种或多种试剂的步骤。示例性试剂包括但不限于 β -巯基乙醇 (Woodbury 等人, J. Neurosci. Res., 61:364-370) 或丁羟茴醚。在一些实施方案中, 胶原生物纤维包含一种或多种试剂。本领域已知的任何适合神经分化的培养基都可用于细胞培养。例如, 可以通过将干细胞培养在含有 2% DMSO 和 200 μ M 丁羟茴醚的 DMEM 培养基中来诱导分化, 直到观察到分化。

可以通过本领域已知的任何方法来评价和确定干细胞已经分化为神经细胞类型。例如, 可以使用 RT/PCR 来评价如神经生长因子受体和神经微丝重链基因的表达。在一些实施方案中, 神经细胞表现出神经生长因子受体的生成; 编码神经生长因子的基因的表达; 神经微丝重链的生成; 或者编码神经微丝重链的基因的表达。

5.5.2. 分化成脂肪细胞

在另一方面，本发明包括将干细胞分化成脂肪细胞的方法，该方法包括在促进干细胞分化成脂肪细胞的条件下，在胶原生物纤维上培养干细胞。在一些实施方案中，脂肪细胞表现出通过亲脂性染色可检测到的胞质内脂囊泡的生成；编码脂肪酶的基因的表达；或脂肪酶的生成。在一些实施方案中，分化包括将干细胞与胶原生物纤维和有利于干细胞分化成脂肪细胞的一种或多种试剂相接触。示例性试剂是地塞米松、消炎痛、胰岛素和3-异丁基-1-甲基黄嘌呤。在一些实施方案中，胶原生物纤维包含一种或多种试剂。

本领域已知的任何适合脂肪细胞分化的培养基都可用于细胞培养。例如，可以使用含有1 μ M 地塞米松、0.2 mM 消炎痛、0.01 mg/ml 胰岛素、0.5 mM IBMX、DMEM-高糖、FBS 和抗体的脂肪形成维持培养基(Bio Whittaker)来诱导分化。

可以通过本领域已知的任何方法来确定干细胞已经分化为脂肪细胞类型。例如，通过使用亲脂性染色油红O可以方便地观察到的多个胞质内脂囊泡形成来评价脂肪形成。通过利用例如RT/PCR检测脂肪酶和脂肪酸结合蛋白的表达也可以确定分化作用。

5.5.3. 分化成软骨细胞

在另一方面，本发明包括将干细胞分化成软骨细胞的方法，该方法包括在促进干细胞分化成软骨细胞的条件下，在胶原生物纤维上培养干细胞。在一些实施方案中，软骨细胞表现出软骨细胞的细胞形态学特征；2型胶原的生成；编码2型胶原的基因的表达；9型胶原的生成；或编码9型胶原的基因的表达。在一些实施方案中，分化包括将干细胞单独与胶原

生物纤维接触，和与有利于干细胞分化成软骨细胞的一种或多种试剂接触。示例性试剂是转化生长因子- β -3。在一些实施方案中，胶原生物纤维包含一种或多种试剂。

本领域已知的任何适合软骨细胞分化的培养基都可用于细胞培养。例如，可以使用含有 0.01 $\mu\text{g/ml}$ TGF- β -3 的全软骨形成培养基(Bio Whittaker)来诱导分化。

可以通过本领域已知的任何方法来确定干细胞已经分化为软骨细胞类型。例如，通过如观察嗜酸性基质的产生，软骨细胞形态学的发育，和/或利用 RT-PCR 检测胶原 2 和胶原 9 基因表达可以评价软骨形成。

5.5.4. 分化成骨细胞

在另一方面，本发明包括将干细胞分化成骨细胞的方法，该方法包括在促进干细胞分化成骨细胞的条件下，在胶原生物纤维上培养干细胞。在一些实施方案中，骨细胞表现出骨细胞的钙水平特征；碱性磷酸酶的生成；编码碱性磷酸酶的基因的表达；骨桥蛋白的生成；或编码骨桥蛋白的基因的表达。在一些实施方案中，分化包括将干细胞与胶原生物纤维以及本领域已知有利于干细胞分化成骨细胞的一种或多种试剂相接触。示例性试剂是地塞米松、抗坏血酸-2-磷酸和甘油磷酸酯。在一些实施方案中，胶原生物纤维包含一种或多种试剂。

本领域已知的任何适合骨细胞分化的培养基都可用于细胞培养。例如，可以使用含有 0.01 μM 地塞米松、0.05 mM 抗坏血酸-2-磷酸、10 mM 甘油磷酸酯的骨形成诱导培养基(Bio Whittaker)来诱导分化。

可以通过本领域已知的任何方法来确定干细胞已经分化为骨细胞类型。例如，利用钙特异性染色、和碱性磷酸酶检测、和/或利用如 RT-PCR 检测骨桥蛋白基因表达可以证实分化作用。

5.5.5. 分化肝细胞

在另一方面，本发明包括将干细胞分化成肝细胞的方法，该方法包括在促进干细胞分化成肝细胞的条件下，在胶原生物纤维上培养干细胞。在一些实施方案中，肝细胞表现出肝细胞-特异性基因的表达或肝细胞-特异性蛋白质的生成。此类基因和蛋白质是本领域已知的，可以是白蛋白、原白蛋白、葡萄糖-6-磷酸酶、 α 1-抗胰蛋白酶等，如美国申请公开号 2005/0170502 中的描述。

分化包括将干细胞与胶原生物纤维以及有利于干细胞分化成肝细胞的一种或多种试剂相接触。例如，肝细胞生长因子和/或上皮生长因子。在一些实施方案中，胶原生物纤维包含一种或多种试剂。本领域已知的任何适合肝细胞分化的培养基都可用于所述细胞的培养。例如，可以使用添加了肝细胞生长因子，20 ng/ml；和上皮生长因子，100 ng/ml 的 20% CBS 的 DMEM 培养基来诱导分化。KnockOut 血清替代物也可用于替代 FBS。

可以通过检测白蛋白、原白蛋白、葡萄糖-6-磷酸酶、 α 1-抗胰蛋白酶，或编码上述基因的表达来证实分化成为了肝细胞。

5.5.6. 分化胰腺细胞

在另一方面，本发明包括将干细胞分化成胰腺细胞的方法，该方法包括在促进干细胞分化成胰腺细胞的条件下，在胶原生物纤维上培养干细

胞。在一些实施方案中，胰腺细胞表现出胰岛素的生成或编码胰岛素的基因的表达。

分化可以包括将干细胞与胶原生物纤维以及本领域已知有利于干细胞分化成胰腺细胞的一种或多种试剂相接触。示例性试剂是碱性成纤维细胞生长因子、转化生长因子 β -1，和由巢蛋白阳性的神经元细胞条件化的培养基。在一些实施方案中，胶原生物纤维包含一种或多种试剂。在细胞培养中可以使用本领域已知的任何适合胰腺细胞分化的培养基。例如，可以使用由巢蛋白阳性的神经元细胞培养物条件化的培养基混合 DMEM 培养基。

可以通过本领域已知的任何方法来确定干细胞已经分化为胰腺细胞。例如，通过利用如 RT-PCR 检测胰岛素的产生或胰岛素基因的表达可以证实分化作用。

5.5.7. 分化成心肌细胞

在另一方面，本发明包括将干细胞分化成心肌细胞的方法，该方法包括在促进干细胞分化成心肌细胞的条件下，在胶原生物纤维上培养干细胞。在一些实施方案中，心肌细胞表现出搏动、心脏肌动蛋白的生成、或编码心脏肌动蛋白的基因的表达。

分化可以包括将干细胞与有利于干细胞分化成心肌细胞的一种或多种试剂相接触。示例性试剂包括视黄酸、碱性成纤维细胞生长因子、转化生长因子或心调剂素(cardiotropin)。在一些实施方案中，胶原生物纤维包含一种或多种试剂。

在细胞培养中可以使用本领域已知的任何适合心肌细胞分化的培养基。例如，可以在培养中使用添加了视黄酸，1 μM ；碱性成纤维细胞生长因子，10 ng/ml；转化生长因子 β -1，2 ng/ml；和上皮生长因子，100 ng/ml的含有20% CBS的DMEM培养基。KnockOut血清替代物(Invitrogen, Carlsbad, California)可以用来替代CBS。或者，可以使用添加了50 ng/ml心调剂素-1的含20% CBS的DMEM培养基。此外，可以在无蛋白质的基质中维持干细胞5-7天，然后用人心肌提取物刺激(渐增剂量分析)。通过将1 mg人心肌在添加了1%脐带血清的1% HEPES缓冲液中均质化来产生心肌提取物。孵育悬浮液60分钟，然后离心并收集上清液。

可以通过本领域已知的任何方法来确定干细胞已经分化为了心肌细胞。例如，通过如搏动、心肌动蛋白的产生，或编码心肌动蛋白的基因的表达来证实分化作用。

5.6. 胶原生物纤维

本发明提供了利用胶原生物纤维培养、扩增或分化干细胞的方法。不受任何理论的约束，认为胶原生物纤维为细胞附着提供了基质，并为培养中的干细胞生长提供了合适的生长因子。

可以以干燥的或天然的(即，从胎盘中分割开)形态使用胶原生物纤维，和/或以去细胞化的或非去细胞化的形态使用。

在一些实施方案中，胶原生物纤维包含衍生胶原生物纤维的胎盘的內源性细胞。在其它实施方案中，胶原生物纤维包含衍生胶原生物纤维的胎盘的外源性细胞。在一些实施方案中，胶原生物纤维同时包含衍生胶原生物纤维的胎盘的外源性细胞和內源性细胞。

5.6.1. 说明

本发明中使用的胶原生物纤维可以来源于任何哺乳动物，例如马、牛、猪或狭鼻类动物源的羊膜、绒毛膜或两者，但最优选地还是来源于人胎盘。在优选的实施方案中，胶原生物纤维基本上是干燥的，即按重量计算水占20%或更少。在另一个优选的实施方案中，胶原生物纤维尚未经蛋白酶处理。在另一个优选的实施方案中，胶原生物纤维不含胶原和其它人工交联(如化学交联)的结构蛋白，即优选的胶原生物纤维是未固定的。优选的胶原生物纤维是在Hariri的美国申请公开号2004/0048796中(其以全文纳入到本文中)中描述的干燥的、未固定的、非蛋白酶处理的羊膜材料，以及通过其中所描述的方法和本发明所描述的方法(参见实施例1、2)生产的胶原生物纤维。然而，本发明的方法可以使用通过任何程序生产的任何胎盘胶原材料。

在优选的实施方案中，胶原生物纤维是半透明的。在其它实施方案中，胶原生物纤维是不透明的，或者是着色的或染色的，例如，利用医学可接受的染料或着色剂永久着色或染色的；此类试剂可以被吸收到胶原生物纤维中，或者可以用此类试剂浸透或包被胶原生物纤维。在该实施方案中，可以使用任何已知的无毒、无刺激性的着色剂或染料。

当胶原生物纤维是基本上干燥的时，其为约 0.1 g/cm^2 至约 0.6 g/cm^2 。在特定的实施方案中，单层胶原生物纤维的厚度至少是2微米。在另一个特定的实施方案中，用于修复鼓膜的单层胶原生物纤维的厚度是约10-40微米，但是，在干燥状态，厚度可以是约2-150、2-100微米，5-75微米或7-60微米。

在一个实施方案中，胶原生物纤维主要含有胶原(I、III 和 IV 型；占生物纤维基质的约 90%)、纤维蛋白、纤粘连蛋白、弹性蛋白，还含有糖胺聚糖和蛋白聚糖。在其它实施方案中，生物纤维的非结构组分可以包括例如生长因子，如血小板衍生生长因子(PDGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)和转化生长因子- β 1。因此，胶原生物纤维组合物理想地适于激励成纤维细胞和巨噬细胞迁移，从而促进伤口愈合。

胶原生物纤维可以以单层形式使用，例如作为单层薄片或非层压的膜使用。或者，胶原生物纤维可以以双层或多层形式使用，例如可以层压胶原生物纤维。在愈合过程中，层压物可以提供更大的硬度和持久力。例如，可以按下文所述层压胶原生物纤维。

胶原生物纤维还可以包含来自非胎盘来源的胶原。例如，胶原生物纤维的一层或多层可以用纯化的抽提胶原包被或浸透，或者可以与其层压。可以从例如商业来源获得此类胶原，或者可以根据已知方法生产，例如在美国专利号 4,420,339、5,814,328 和 5,436,135 中公开的方法。

胶原生物纤维可以包含衍生胶原生物纤维的胎盘的內源性细胞。胶原生物纤维也可以包含衍生胶原生物纤维的胎盘的 外源性细胞。在一些实施方案中，胶原生物纤维可以同时包含衍生胶原生物纤维的胎盘的 外源性细胞和內源性细胞。

胶原生物纤维可以包含一种或多种在衍生胶原生物纤维的胎盘材料中不存在的化合物或物质。例如，可以用生物活性化合物浸透胶原生物纤维。此类生物活性化合物包括但不限于有机小分子(例如，药物)、抗体(例如克林霉素、米诺环素、脱氧土霉素、庆大霉素)、激素、生长因子、抗肿

瘤剂、抗真菌剂、抗病毒剂、镇痛药、抗组胺药、抗炎性试剂、抗感染剂包括但不限于银(例如银盐, 包括但不限于硝酸银和磺胺嘧啶银)、元素银、抗生素、杀菌酶(例如溶菌酶)、愈伤剂(例如细胞因子, 包括但不限于PDGF、TGF、胸腺素)、作为愈伤剂的透明质酸、伤口密封剂(例如有或无胸腺素的纤维蛋白)、细胞引诱剂和支架试剂(例如, 添加的纤粘连蛋白)等。在特定的实例中, 可以用至少一种生长因子, 例如成纤维细胞生长因子、上皮细胞生长因子等浸透胶原生物纤维。还可以用有机小分子, 例如特定生物化学过程的特异性抑制剂, 如膜受体抑制剂、激酶抑制剂、生长抑制剂、抗癌药物、抗生素等浸透生物纤维。还可以用生物活性化合物浸透胶原生物纤维, 例如通过如将胶原生物纤维在理想浓度的生物活性化合物溶液中浸泡一段足以使胶原生物纤维充分吸收并与溶液平衡的时间; 通过将溶液喷雾至生物纤维上; 通过用溶液湿润生物纤维等来浸透。

在其它实施方案中, 胶原生物纤维可以与水凝胶结合。本发明包括本领域技术人员已知的任何水凝胶组合物, 例如, 下列综述公开的任何水凝胶组合物: Graham, 1998, *Med. Device Technol.* 9(1): 18-22; Peppas 等人, 2000, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50(1): 27- 46; Nguyen 等人, 2002, *Biomaterials*, 23(22): 4307-14; Henincl 等人, 2002, *Adv. Drug Deliv. Lev* 54(1): 13-36; Skelhorne 等人, 2002, *Med. Device. Technol.* 13(9): 19-23; Schmedlen 等人, 2002, *Biomaterials* 23: 4325-32; 其均通过引用以其全文纳入到本文中。在特定的实施方案中, 将水凝胶组合物用于胶原生物纤维, 即置于胶原生物纤维的表面。例如, 水凝胶组合物可以喷雾在胶原生物纤维上, 或包被在胶原生物纤维的表面, 或者用水凝胶组合物浸泡、水浴或饱和该生物纤维。在另一个特定的实施方案中, 水凝胶夹心在两层或多层

胶原生物纤维之间。在更特定的实施方案中，水凝胶夹心在两层或多层胶原生物纤维之间，其中密封两层生物纤维的边缘以基本上或完全地内含水凝胶。

可以从本领域已知的任何水-相互作用的、或水溶性的聚合物生产可用于本发明的方法和组合物中的水凝胶，该聚合物包括但不限于聚乙烯醇(PVA)、聚甲基丙烯酸羟乙酯、聚乙二醇、聚乙烯吡咯酮、透明质酸、藻酸盐、胶原、明胶、葡聚糖或上述的衍生物和类似物。

在特定的实施方案中，胶原生物纤维包含透明质酸。透明质酸可以是例如，作为溶液(例如，在水、生理学可接受的缓冲液或培养基中的 10 mg/ml 的溶液)用于或添加到胶原生物纤维中。透明质酸优选经过充分的交联，以降低或防止透明质酸在液体环境中的溶解性。在优选的实施方案中，透明质酸与胶原生物纤维交联。用于交联透明质酸或用于交联透明质酸和胶原生物纤维的交联剂可以是任何交联剂，可以是例如 1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸(EDCI)、二乙烯砷、表氯醇(epichlorohydrin)、戊二醛、二环己基碳二亚胺(DCC)等。胶原生物纤维和透明质酸的组合任选地是干燥的，例如，空气干燥的、冻干的等。在一些实施方案中，在添加透明质酸之前或添加过程中，将胶原生物纤维放置在框架或夹持器上，例如，夹持胶原生物纤维的边缘。

本发明还提供了生产含有透明质酸的胶原生物纤维，例如用于培养干细胞或干细胞群(如，附着的、CD34⁺的胎盘干细胞)的方法，该方法包括将胶原生物纤维的至少一部分与透明质酸溶液接触，交联透明质酸和胶原生物纤维，并干燥所获得的胶原生物纤维。在该方法的一个实施方案中，胶原生物纤维在接触透明质酸溶液时是基本上干燥的，例如含有 20%或更少

的水份。在该方法的另一个特定的实施方案中，胶原生物纤维在接触透明质酸溶液之前是去细胞化的。在另一个实施方案中，胶原生物纤维的外观是层状的。在该方法的另一个特定的实施方案中，胶原生物纤维在接触透明质酸溶液之前不是去细胞化的。优选地，在接触透明质酸溶液时，胶原生物纤维的一侧或多侧被夹持，如被夹持在框中，从而在接触过程中降低了胶原生物纤维的卷曲量或防止胶原生物纤维的卷曲。在特定的实施方案中，胶原生物纤维是方形或矩形的薄片，并且在与透明质酸溶液接触的过程中被夹持在与胶原生物纤维的四边都接触的四面框中。

对于上述组合物和方法实施方案，透明质酸溶液可以是任何允许透明质酸在所接触的一部分胶原生物纤维的表面均匀分布的透明质酸溶液。例如，透明质酸溶液可以包含每升溶液至少约，或至多 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100 mg 透明质酸。

在一些实施方案中，胶原生物纤维包含一种或多种生物活性化合物，并与水凝胶结合。例如，可以在与水凝胶结合前用一种或多种生物活性化合物浸透胶原生物纤维。在其它实施方案中，在与本发明的胶原生物纤维结合之前或之后，还用一种或多种生物活性化合物，例如下一节中描述的生物活性化合物进一步浸透水凝胶组合物。

5.6.2. 生物活性化合物

本发明的方法中使用的胶原生物纤维可以包含(例如，浸透或包被)一种或多种生物活性化合物。如本文中使用的，术语“生物活性化合物”意指

在体外或体内对一种或多种生物学系统产生可检测的影响的任何化合物或分子。生物活性化合物的实例包括但不限于有机小分子(例如, 药物)、抗生素、抗病毒剂、抗微生物剂、抗炎性试剂、抗增殖剂、细胞因子、酶或蛋白质抑制剂、抗组胺药等。在不同的实施方案中, 可以用抗生素(例如, 克林霉素、米诺环素、脱氧土霉素、庆大霉素)、激素、生长因子、抗肿瘤剂、抗真菌剂、抗病毒剂、镇痛药(包括 XYLOCAINE®、利多卡因(Lidocaine)、普鲁卡因(Procaine)、奴佛卡因(Novocaine)等)、抗组胺药(例如, 苯海拉明(diphenhydramine)、BENADRYL®等)、抗炎性试剂、抗感染剂包括但不限于银(例如银盐, 包括但不限于硝酸银和磺胺嘧啶银盐)、元素银、抗生素、杀菌酶(例如溶菌酶)、愈伤剂(例如细胞因子, 包括但不限于 PDGF(如 REGRANEX®)、TGF、胸腺素)、作为愈伤剂的透明质酸、伤口密封剂(例如, 有或无胸腺素的纤维蛋白)、细胞引诱剂和支架试剂(例如, 纤粘连蛋白)等, 或者任意上述的组合, 或这上述与未列举的其它化合物的组合包被或浸透胶原生物纤维。可以通过本领域已知的任何方法实现此类浸透或包被, 可以如此包被或浸透胶原生物纤维的一部分或整体。

胶原生物纤维或含有胶原生物纤维的组合物可以不受限制地包含本文中列举的任何单个化合物或其组合。本文中列举的任何生物活性化合物, 以及其它在巩膜或眼睛中有用的化合物, 可以通过已知方法制成即释或缓释剂型。此外, 胶原生物纤维可以以不同的方式包含两种或多种生物活性化合物; 例如, 可以用一种生物活性化合物浸透胶原生物纤维, 并用另一种包被胶原生物纤维。在另一个实施方案中, 胶原生物纤维包含一种缓释剂型的生物活性化合物, 和另一种即释剂型的生物活性化合物。

可以用伤口愈合所需的一种或多种营养物的生理学可获得的形式来浸透或包被胶原生物纤维。优选地，将营养物制成缓释剂型。

胶原生物纤维或含有胶原生物纤维的组合物可以包含抗生素。在一些实施方案中，抗生素是大环内酯(例如，妥布霉素(TOBI[®])、头孢菌素(例如，头孢氨苄(KEFLEX[®])、头孢拉定(VELOSEF[®])、头孢呋辛(CEFTTN[®])、头孢罗齐(CEFZIL[®])、头孢克洛(CECLOR[®])、头孢克肟(SUPRAX[®])或头孢羟氨苄(DURICEF[®])、克拉仙霉素(克拉仙霉素(Biaxin))、红霉素(例如，红霉素(EMYCIN[®])、青霉素(青霉素 V (V-CILLINK[®]或 PEN VEEK[®])或喹诺酮(例如，氧氟沙星(FLOXIN[®])、环丙沙星(CIPRO[®])、ornofloxacin (NOROXIN[®])、氨基糖苷类抗生素(例如，阿普拉霉素(apramycin)、阿贝卡星(arbekacin)、班贝霉素(bambermycins)、布替罗星(butirosin)、地贝卡星(dibekacin)、新霉素、新霉素、十一碳烯酸盐、奈替米星(netilmicin)、巴龙霉素(paromomycin)、核糖霉素(ribostamycin)、西索米星(sisomicin)和大观霉素(spectinomycin))、酰胺醇抗生素(例如，叠氮氯霉素、氯霉素、氟苯尼考(flurfenicol)和甲砒霉素)、安沙霉素抗生素(例如，利福米特(rifamide)和利福平)、碳头孢烯类(例如，洛拉卡比(loracarbef))、碳青霉烯类(例如，比阿培南(biapenem)和亚胺培南(imipenem))、先锋霉素类(例如，头孢克洛、头孢羟氨苄、头孢孟多、头孢曲唑、头孢吡酮、头孢唑兰、头孢咪唑、头孢匹胺和头孢匹罗)、头霉素(例如，头孢布宗、cefinetazole 和头孢克肟)、单环内酰胺类(例如，氨曲南(aztreonam)、卡芦莫南(carumonam)和替吉莫南(tigemonam))、氧头孢烯类(例如，夫洛莫西(Flomoxef)和拉氧头孢(moxalactam))、青霉素(例如，阿姆地诺西林、阿姆地诺西林双酯、阿莫西林、巴氨西林、苄基青霉素、青霉素 G 钠、依匹西林、芬贝西林、氟氯西

林、培那西林、氢碘酸喷沙西林、青霉素 O-苯乙苄胺、青霉素 O、青霉素 V、苄星青霉素 V、哈胺青霉素 V、青哌环酸和 phencihicillin 钾)、林可酰胺类抗生素(例如, 克林霉素和林可霉素)、大环内酯类(例如, 阿齐红霉素、卡波霉素、克拉霉素、地红霉素、乙琥红霉素和红霉素醋硬脂酸盐)、安福霉素、杆菌肽、卷曲霉素、黏菌素、持久霉素、恩维霉素、四环素类(例如, 羟哌羧四环素、金霉素、氯莫环素和地美环素)、2,4-二氨基嘧啶(例如, 溴莫普林)、呋喃类(例如, 呋喃他酮和呋唑氯铵)、喹诺酮类及其类似物(例如, 西诺沙星、环丙沙星、克林沙星、氟甲喹和格雷沙星)、磺胺类(例如, 磺胺乙酰甲氧吡嗪、苄磺胺、诺丙磺胺、息拉米、磺胺柯衣酸和磺胺西汀)、砒类(例如, 地百里砒、葡糖砒钠和苯丙砒)、环丝氨酸、莫匹罗星和薯球蛋白。

在一些实施方案中, 可以用抗真菌剂包被或浸透胶原生物纤维。合适的抗真菌剂包括但不限于两性霉素 B、伊曲康唑、酮康唑、氟康唑、鞘内物质(intrathecal)、氟胞嘧啶、咪康唑、布康唑、克霉唑、制霉菌素、特康唑、噻康唑、环吡司、益康唑、卤普罗近、萘替芬、特比萘芬、十一碳烯酸盐和灰黄霉素。

在一些其它的实施方案中, 用抗炎性试剂包被或浸透了胶原生物纤维或含有胶原生物纤维的组合物。可用的抗炎性试剂包括但不限于非固醇类抗炎药, 例如水杨酸、乙酰水杨酸、水杨酸甲酯、双氟尼酸、水杨酰水杨酸、偶氮水杨酸、柳氮磺胺吡啶、对乙酰氨基酚、消炎痛、舒林酸、依托度酸、甲灭酸、甲氧胺苯酸钠、托美汀、ketorolac、双氯芬酸、布洛芬、萘普生、甲氧萘丙酸钠、非诺洛芬、酮基布洛芬、氟比洛芬、恶丙嗪、吡罗昔康、美洛昔康、安吡昔康、咪昔康、吡罗昔康、替诺昔康、萘丁美

酮、苯丁唑酮、羟基保泰松、安替比林、氨基比林、阿扎丙宗和尼美舒利；白三烯拮抗剂，包括但不限于弃白通(zileuton)、金硫葡萄糖、硫羟苹果酸金钠和金诺芬；以及其它抗炎性试剂，包括但不限于甲氨蝶呤、秋水仙碱、别嘌吟醇、丙磺舒、磺吡酮和苯溴马隆。

在一些实施方案中，用抗病毒剂包被或浸透了胶原生物纤维或含有胶原生物纤维的组合物。可用的抗病毒剂包括但不限于核苷酸类似物，例如叠氮胸苷、阿昔洛韦、gancyclovir、阿糖腺苷、碘苷、三氟胸苷和三氮唑核苷，以及磷甲酸、金刚胺、金刚乙胺、沙奎那韦、印地那韦、利托那韦和 α -干扰素。

还可以用细胞因子受体调节剂包被或浸透了胶原生物纤维或含有胶原生物纤维的组合物。细胞因子受体调节剂的实例包括但不限于可溶性细胞因子受体(例如，TNF- α 受体的胞外结构域或其片段，IL-10受体的胞外结构域或其片段，IL-6受体的胞外结构域或其片段)、细胞因子或其片段(例如，白介素(IL)-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、TNF- α 、TNF- β 、干扰素(IFN)- α 、IFN- β 、IFN- γ 和GM-CSF)、抗细胞因子受体抗体(例如，抗IFN受体抗体、抗IL-2受体抗体(例如，Zenapax (Protein Design Labs))、抗IL-4受体抗体、抗IL-6受体抗体、抗IL-10受体抗体和抗IL-12受体抗体)、抗细胞因子抗体(例如，抗IFN抗体、抗IFN- α 抗体、抗IL-10抗体、抗IL-6抗体、抗IL-8抗体(例如，ABX-IL-8 (Abgenix))和抗IL-12抗体)。在特定的实施方案中，细胞因子受体调节剂是IL-4、IL-10或其片段。在另一个实施方案中，细胞因子受体调节剂是抗IL-1抗体、抗IL-6抗体、抗IL-12受体抗体或抗TNF- α 抗体。在另一个实施方案中，细胞因子受体调节剂是TNF- α 受体的胞外结

构域或其片段。在一些实施方案中，细胞因子受体调节剂不是TNF- α 拮抗剂。

在优选的实施方案中，作为免疫调节剂使用的蛋白质、多肽或肽(包括抗体)来源于与蛋白质、多肽或肽的受体相同的物种，从而降低对这些蛋白质、多肽或肽的免疫应答的可能性。在另一个优选的实施方案中，当对象是人时，作为免疫调节剂使用的蛋白质、多肽或肽是人的或人源化的。

还可以用细胞因子包被或浸透胶原生物纤维或含有胶原生物纤维的组合物。细胞因子的实例包括但不限于：集落刺激因子1(CSF-1)、白介素-2(IL-2)、白介素-3(IL-3)、白介素-4(IL-4)、白介素-5(IL-5)、白介素-6(IL-6)、白介素-7(IL-7)、白介素-9(IL-9)、白介素-10(IL-10)、白介素-12(IL-12)、白介素-15(IL-15)、白介素-18(IL-18)、胰岛素样生长因子1(IGF-1)、血小板衍生生长因子(PDGF)、红细胞生成素(EPO)、上皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)(碱性或酸性)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、肝素结合生长因子(HEGF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、催乳素和干扰素(IFN，如IFN- α 和IFN- γ)、转化生长因子 α (TGF- α)、TGF β 1、TGF β 2、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、血管上皮生长因子(VEGF)、肝细胞生长因子(HGF)等

还可以用激素包被或浸透胶原生物纤维。激素的实例包括但不限于：促黄体激素释放激素(LHRH)、生长激素(GH)、生长激素释放激素、ACTH、生长抑素、生长激素、生长介素、甲状旁腺素、下丘脑释放因子、胰岛素、胰高血糖素、脑啡肽、血管升压素、降钙素、肝素、低分子量肝素、肝素类似物、合成和天然的阿片肽、胰岛素促甲状腺激素和内啡肽。 β -干扰素的实例包括但不限于干扰素 β 1-a和干扰素 β 1-b。

还可以用烷化剂包被或浸透胶原生物纤维或含有胶原生物纤维的组合物。烷化剂的实例包括但不限于：氮芥类、乙烯亚胺、甲基三聚氰胺、烷基磺酸盐、亚硝基脲、三氮烯、氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、苯丙氮氮芥、苯丁酸氮氮芥、六甲密胺、噻替派、白消安(busulfan)、卡莫司汀、链唑霉素、达卡巴嗪和替莫唑胺。

还可以用免疫调节剂包被或浸透胶原生物纤维或含有胶原生物纤维的组合物，所述调节剂包括但不限于：甲氨蝶呤、来氟米特、环磷酰胺、环胞素 A、大环内酯类抗生素(例如，FK506 (他克莫司))、甲泼尼龙(MP)、皮质激素、类固醇、麦考酚酸莫酯、雷帕霉素(西罗莫司)、咪唑立宾、脱氧精胺菌素、布喹那、丙二腈酰胺(例如，来氟米特)、T 细胞受体调节剂和细胞因子受体调节剂、肽模拟物和抗体(例如，人的、人源化的、嵌合的、单克隆的、多克隆的抗体，Fvs、ScFvs、Fab 或 F(ab)₂ 片段或表位结合片段)、核酸分子(例如，反义核酸分子和三螺旋)、小分子、有机化合物和无机化合物。特别地，免疫调节剂包括但不限于：甲氨蝶呤、来氟米特、环磷酰胺、环磷酰胺(Cytoxan)、硫唑嘌呤(Immuran)、环胞素 A、米诺环素、硫唑嘌呤、抗生素(例如，FK506 (他克莫司))、甲泼尼龙(MP)、皮质激素、类固醇、麦考酚酸莫酯、雷帕霉素(西罗莫司)、咪唑立宾、脱氧精胺菌素、布喹那、丙二腈酰胺(例如，来氟米特)、T 细胞受体调节剂和细胞因子受体调节剂。T 细胞受体调节剂的实例包括但不限于：抗 T 细胞受体抗体(例如，抗 CD4 抗体(如，cM-T412(Boehringer)、IDEC-CE9.Is (IDEC 和 SKB)、mAb 4162W94、Orthoclone 和 OKTcdr4a (Janssen-Cilag))、抗 CD3 抗体(如，Nuvion (Product Design Labs)、OKT3 (Johnson & Johnson)或 Rituxan (IDEC))、抗 CD5 抗体(如，抗 CD5 连接蓖麻毒素的免

疫缀合物)、抗 CD7 抗体(如, CHH-380 (Novartis))、抗 CD8 抗体、抗 CD40 配体单克隆抗体(如, IDEC-131(IDEC))、抗 CD52 抗体(如, CAMPATH 1H (Ilex))、抗 CD2 抗体、抗 CD1 1a 抗体(如, Xanelim (Genentech))和抗 B7 抗体(如, IDEC-114) (IDEC)))和 CTLA4-免疫球蛋白。在特定的实施方案中, T 细胞受体调节剂是 CD2 拮抗剂。在其它实施方案中, T 细胞受体调节剂不是 CD2 拮抗剂。在另一个特定的实施方案中, T 细胞受体调节剂是 CD2 结合分子, 优选的是 MEDI-507。在其它实施方案中, T 细胞受体调节剂不是 CD2 结合分子。

还可以用已知为 IMID[®]的一类免疫调节化合物包被或浸透胶原生物纤维或含有胶原生物纤维的组合物。如本文中使用的, 除非另外提示, 术语“IMID[®]”和“IMIDs[®]”(Celgene Corporation)包括显著抑制 TNF- α 、LPS 诱导的单核细胞 IL-1B 和 IL-12, 特别是抑制 IL-6 产生的有机小分子。特殊的免疫调节化合物在下文中讨论。

此类免疫调节化合物的特殊实例包括但不限于: 例如在美国专利号 5,929,117 中公开的取代的苯乙烯的氰基和羧基衍生物; 例如在美国专利号 5,874,448 和 5,955,476 中描述的 1-氧代-2-(2,6-二氧代-3-氟哌啶-3-基)异吲哚啉和 1,3-二氧代-2-(2,6-二氧代-3-氟哌啶-3-基)异吲哚啉; 例如在美国专利号 5,798,358 中描述的四取代的 2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉; 1-氧代和 1,3-双氧代-2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)异吲哚啉(例如, 沙利多胺的 4-甲基衍生物), 包括但不限于在美国专利号 5,635,517、6,476,052、6,555,554 和 6,403,613 中公开的那些; 在美国专利号 6,380,239 中描述的在二氢吲哚环的 4-或 5-位取代的 1-氧代和 1,3-二氧代异吲哚啉(例如, 4-(4-氨基-1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)-4-氨甲酰基丁酸); 在美国专利号 6,458,810

中描述的在第2位用2,6-二氧代-3-羟基哌啶-5-基(例如, 2-(2,6-二氧代-3-羟基-5-氟哌啶-5-基)-4-氨基异吲哚啉-1-酮)取代的异吲哚啉-1-酮和异吲哚啉-1,3-二酮; 在美国专利号 5,698,579 和 5,877,200 中公开的一类非多肽环酰胺; 氨基酞咪哌啶酮, 以及氨基酞咪哌啶酮的类似物、水解产物、代谢物、衍生物和前体, 以及取代的 2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)邻苯二甲酰亚胺取代和 2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚, 例如在美国专利号 6,281,230 和 6,316,471 中描述的那些; 以及异吲哚-亚氮化合物, 例如在 2001 年 10 月 5 日提交的美国专利申请号 09/972,487, 在 2001 年 12 月 21 日提交的美国专利申请号 10/032,286, 和国际申请号 PCT/US01/50401(国际公开号 WO 02/059106)中描述的那些。本文中提及的美国专利和美国专利申请公开文本均通过引用以其全文纳入到本文中。免疫调节化合物不包括沙利度胺。

用于包被或浸透的生物活性化合物的量可以改变, 并优选根据所递送的具体生物活性化合物以及所需要的效果而定。

在不同的实施方案中, 用于包被或浸透胶原生物纤维的生物活性化合物的量可以是至少 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1250、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、10000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、100000、200000、300000、400000、500000、600000、700000、800000、900000 或

至少 1000000 纳克。在另一个实施方案中，用于包被或浸透本发明的眼塞 (ocular plug) 的生物活性化合物的量可以不超过 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1250、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、10000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、100000、200000、300000、400000、500000、600000、700000、800000、900000 或至少 1000000 纳克。

5.6.3. 胶原生物纤维的构型

胶原生物纤维可以制成任何有利于其在本发明方法中应用的形状或构型。例如，胶原生物纤维可以制成有利于培养干细胞的任何形状或构型。在一些实施方案中，胶原生物纤维位于培养板中，因此根据培养板造形。在其它实施方案中，胶原生物纤维位于微孔板的孔中，因此根据微孔板的孔造形。

用于本发明的治疗方法的胶原生物纤维可以以干燥，或在合适的生理相容性医用液体(例如，生理盐水)中预湿润的形式提供给终端用户。在一个实施方案中，所述溶液不受限制地包含一种或多种生物活性化合物，如上文 5.6.2 节中描述的。

5.6.4. 制造胶原生物纤维的方法

可以通过任何方式制造由羊膜、绒毛膜或两者产生的胶原生物纤维，所述方式保存了膜组件——主要是胶原、弹性纤维、层粘连蛋白和纤粘连蛋白——的生物化学特征和结构特征。优选的材料是在 Hariri 的美国申请公开号 US2004/0048796A1，“胶原生物纤维及其制备方法和用途(Collagen Biofabric and Methods of Preparation and Use Therefor)”中描述并根据其中公开的方法生产的胶原生物纤维，其以全文纳入到本文中。

优选地，在干细胞培养中使用的胶原生物纤维来自人胎盘，以用于人个体，虽然可以从来自非人哺乳动物的羊膜制造胶原生物纤维。当胶原生物纤维用于非人动物时，优选的胶原生物纤维是来源于该动物物种的胎盘。

在优选的实施方案中，在本发明方法中使用的胎盘是在分娩新生儿后尽早获取的。胎盘可以立即使用，或者在分娩后储存 2-5 天再进行任何进一步处理。胎盘一般经过除血，即排尽出生后残留的脐带血。优选地，在初生之前，使用本领域技术人员已知的标准技术筛选待产妇的传染性疾病，包括但不限于 HIV、HBV、HCV、HTLV、梅毒、CMV 和其它已知污染胎盘组织的病毒病原体。

制备本发明的胶原生物纤维的一个示例性方法包括下列步骤：

步骤 I: 将脐带与胎盘分离；任选地，将羊膜与绒毛膜分离。在优选的实施方案中，在切割胎盘膜之前将羊膜从绒毛膜上分离。在将羊膜与绒毛膜和胎盘分离后，切断脐带残端(例如，用剪刀)，并与胎盘分离。然后将羊膜储存在无菌的，优选缓冲盐溶液中(例如，0.9%灭菌的 NaCl 溶液)。优选地，将羊膜储存在冰箱中，温度为至少 2°C。

步骤 II: 将羊膜基本上去细胞化; 即基本上去除所有的细胞材料和细胞碎片(例如, 所有可见的细胞材料和细胞碎片)。可以使用本领域技术人员已知的任何去细胞化的方法, 然而, 用于给本发明的羊膜去细胞化的方法一般不会破坏组成该生物纤维的蛋白质的天然构型。羊膜的“基本上去细胞化”优选地去除至少 90% 的细胞, 更优选的去掉至少 95% 的细胞, 最优选的去掉至少 99% 的细胞(例如, 成纤维细胞、羊水细胞和绒毛膜细胞)。根据本发明方法去细胞化的羊膜在外观上是均匀薄的, 在干燥状态下具有约 2 至约 150 微米的内在厚度变化, 是光滑的(通过触摸确定)和清洁的。去细胞化作用可以包括物理刮擦(例如用灭菌的细胞刮板), 结合用无菌溶液漂洗。使用的去细胞化技术不应该导致羊膜解剖学的总体破坏(gross disruption), 或改变羊膜的生物化学性质。优选地, 羊膜的去细胞化作用包括使用含有去垢剂溶液, 例如非离子去垢剂(Triton X-100)、阴离子去垢剂(十二烷基硫酸钠)。任何温和的阴离子去垢剂, 即具有 pH6 至 8、低泡腐蚀性去垢剂都可用于羊膜的去细胞化。在特定的实施方案中, 在羊膜的去细胞化作用中使用 0.01-1% 的脱氧胆酸钠盐一水化物。

在制备生物纤维中限制蛋白酶活性是高度优选的。裂解、漂洗和储存溶液中的添加剂, 例如金属离子螯合剂(如, 1,10-菲咯啉和乙二胺四乙酸(EDTA))产生不利于多数蛋白水解酶的环境。提供蛋白酶例如胶原酶的次优条件有助于在细胞裂解步骤中保护羊膜组分如胶原免于降解。可以配制低渗裂解溶液来消除或限制溶液中可获得的钙离子和锌离子从而实现蛋白酶的次优条件。许多蛋白酶在存在钙和锌离子时是活化的, 而在无钙和锌离子的环境中则丧失了其大部分活性。优选地, 通过选择 pH 条件、降低的钙和锌离子可获得性、存在金属离子螯合剂和使用胶原酶特异性蛋白水

解抑制剂，可以制备低渗裂解溶液，从而使所述溶液在最佳地裂解天然细胞的同时保护下方的羊膜免受不利的蛋白水解降解。例如，低渗裂解溶液可以包含 pH 5.5 至 8，优选的 pH 7 至 8 的缓冲水溶液，不含钙和锌离子，并包含金属离子螯合剂如 EDTA。此外，在用低渗裂解溶液处理羊膜的过程中，还可以控制温度和时间参数来限制蛋白酶活性。

优选地，羊膜的去细胞化处理还会限制新免疫位点的产生。由于相信胶原的酶促降解会导致免疫原性升高，因此本发明包括用酶(例如，核酸酶)处理羊膜，该酶有效地抑制细胞代谢、蛋白质生产和细胞分裂，使羊膜成分的蛋白水解最小化从而保护羊膜的底层结构。根据本发明方法可以使用的核酸酶的实例是那些有效降解天然细胞 DNA 和 RNA 的核酸酶，包括外切核酸酶和内切核酸酶。根据本发明方法可以使用的核酸酶的非限制性实例包括抑制细胞活性的外切核酸酶，例如 DNA 酶 I(SIGMA Chemical Company, St. Louis, Mo.)和 RNA 酶 A(SIGMA Chemical Company, St. Louis, Mo.)，和抑制细胞活性的内切核酸酶，例如 *EcoR1*(SIGMA Chemical Company, St. Louis, Mo.)和 *HindIII*(SIGMA Chemical Company, St. Louis, Mo.)。优选地，在生理缓冲溶液中应用所选择的核酸酶，所述溶液含有最适于核酸酶活性的离子，例如镁、钙。优选地，本领域技术人员通过常规实验来选择缓冲溶液的离子浓度、处理温度和处理长度，从而保证核酸酶活性的理想水平。缓冲液优选是低渗的，以促进核酸酶进入细胞内部。

在上述步骤 I 和 II 的另一个实施方案中，胎盘在初步处理后，在盐水中简单漂洗以从胎盘表面去除血液。然后将胎盘浸没在冷却的浓度为约 0.1% 至约 10% 的脱氧胆酸溶液中，在特定的实施方案中，浓度约 0.1% 至约 2.0%。然后，在约 1°C 至约 8°C 之间，在该溶液中孵育胎盘约 5 天至约

6个月。在特定的实施方案中，浸没胎盘例如约5至约15天、约5至约30天、约5至约60天、或长达约1年。一般地，在孵育期间每2-5天替换脱氧胆酸溶液。在另一个特定的实施方案中，胎盘在约0°C至约8°C下在浓度约1%的脱氧胆酸溶液中浸没约5至约15天。该孵育出于两个目的。第一，为对胎盘材料和血液实施血清学试验提供时间，以便不进一步处理不满足血清学标准的胎盘。第二，延长的孵育促进上皮细胞和成纤维细胞的去除，这显著降低通过物理刮擦使羊膜去细胞化所花费的时间。一般地，刮擦时间从例如约40分钟降低至约20分钟。然后，根据下文所述干燥羊膜。

步骤 III: 在去细胞化作用后，洗涤羊膜以确保去除细胞碎片，细胞碎片可包括细胞蛋白质、细胞脂质和细胞核酸，以及任何胞外碎片，例如胞外可溶性蛋白质、脂类和蛋白聚糖。洗涤溶液可以是去离子水或水性低渗缓冲液。优选地，在去垢剂中轻柔晃动羊膜15-120分钟(例如，在振荡台上)，以帮助去细胞化。在去垢剂去细胞化后，可以再次如上所述将羊膜物理地去细胞化；如果需要，可以重复物理的和去垢剂的去细胞化步骤，只要可以维持羊膜的完整性，直到没有可见的细胞材料和细胞碎片。

在一些实施方案中，在去细胞化和洗涤步骤后立即干燥羊膜(即，在30分钟内)。或者，当不立即进行进一步处理时，可以冷藏羊膜，例如，在干燥前，在温度约1°C至约20°C，优选的从约2°C至约8°C，储存达28天。当去细胞化的羊膜储存超过3天但少于28天时，优选周期性，例如每1-3天更换覆盖羊膜的无菌溶液。

在一些实施方案中，当羊膜在洗涤后没有冷藏时，在进行制备的步骤IV前洗涤羊膜至少3次。在其他实施方案中，当羊膜已经冷藏并且已经更

换过一次无菌溶液时，在进行制备的步骤 IV 前洗涤羊膜至少 2 次。在其它实施方案中，当羊膜已经冷藏并且已经更换过两次或多次无菌溶液时，在进行制备的步骤 IV 前洗涤羊膜至少 1 次。

在进行步骤 IV 前，优选地评价所有的细菌学和血清型测试，保证所有的测试都是阴性的。

步骤 IV: 在该胶原生物纤维生产方法的实施方案中的最后步骤包括干燥本发明的去细胞化的羊膜来产生胶原生物纤维。可以使用任何干燥羊膜的方法从而生产出平的、干燥的胶原层。然而，优选在真空下干燥羊膜。

在特定的实施方案中，干燥本发明的去细胞化的羊膜的示例性方法包括下列步骤：

安装用于干燥的去细胞化羊膜。 从无菌溶液中取出去细胞化的羊膜，并轻柔地挤去多余液体。然后，以胎儿侧朝下位置(例如，置于盘子上)轻柔地拉紧去细胞化的羊膜直到其平坦。然后翻转去细胞化的羊膜，使胎儿侧朝上，并放置在干燥框上，优选塑料网状的干燥框(例如，QUICK COUNT[®] Plastic Canvas, Uniek, Inc., Waunakee, WI)。在其它实施方案中，干燥框可以是任何可以高压蒸气灭菌的材料，包括但不限于不锈钢网。在最优选的实施方案中，约 0.5 厘米的羊膜与干燥框的边缘重叠。在一些实施方案中，延伸超过干燥框的重叠羊膜包住框的顶部，例如，利用夹子或止血钳。一旦羊膜放置在干燥框上，就将灭菌的纱布置于加热干燥器(或干燥器)(例如，Model 583, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)的干燥平台上，从而覆盖比放置在塑料网状干燥框中的羊膜略大的面积。优选地，纱布层的总厚度不超过一块折叠的 4×4 纱布的厚度。可以使用适合干燥片状材料的任何加热干燥设备。将干燥框放置在干燥平台上的纱布的顶部，使

塑料框的边缘延伸超过纱布边缘, 优选超过 0.1-1.0 cm, 更优选 0.5-1.0 cm。在最优选的实施方案中, 具有羊膜的干燥框放置在灭菌纱布的顶部, 羊膜的胎儿侧朝上。在一些实施方案中, 在羊膜的顶部再放置另一个塑料框网。在另一个实施方案中, 在网覆盖的膜的顶部放置一层薄塑料(例如, SW 182, 干净 PVC, AEP Industries Inc., South Hackensack, NJ)或生物相容性硅, 使得膜层在所有边缘都延伸良好。在该实施方案中, 不需要第二个网状框。

在替代的实施方案中, 羊膜放在一层或多层无菌的 TYVEK[®]材料上(例如, 用于医学包装的 TYVEK[®]层, DuPont TYVEK[®], Wilmington, DE), 任选地在膜的顶部具有一层 TYVEK[®](在放置塑料膜之前)。该替代方法将产生更光滑的生物纤维(即沿着或垂直于材料轴线没有不同的纤维挤压区域图案), 这有利于一些应用, 例如作为细胞扩增的基质。

干燥羊膜。在优选的实施方案中, 本发明包括在真空下加热干燥本发明的羊膜。尽管真空下干燥可以在约 0°C 至约 60°C 的任何温度下实现, 但优选在约 35°C 至约 50°C 之间干燥羊膜, 最优选在约 50°C 干燥。应该注意, 在超过 50°C 的温度下预计有一部分胶原会降解。优选地利用使用延长探针的标准数字化温度计来设置和验证干燥温度。优选地, 真空压力设置在约-22 英寸 Hg。持续干燥步骤直到羊膜的胶原基质基本上干燥, 即例如根据湿度分析器确定, 按重量计算含有少于 20% 水, 和优选地, 按重量计算约 3-12% 水。为了实现该目的, 可以加热真空干燥羊膜例如约 60 分钟, 以获得脱水的羊膜。在一些实施方案中, 干燥羊膜约 30 分钟至约 2 小时, 优选约 60 分钟。不希望受任何作用机制的约束, 相信低热设置配合真空压力允许在胶原不变性的条件下实现羊膜的脱水状态。

在完成根据本发明的干燥步骤后，用真空泵运行约2分钟冷却羊膜。

*羊膜的包装和储存。*一旦羊膜被干燥，就从干燥框上轻柔地取下。

“取下”羊膜可以包括以下步骤：当泵仍在运行时，从角落开始轻柔地从羊膜上去除塑料膜，同时保持羊膜朝下；从干燥台上取下具有羊膜的框并以羊膜侧朝上将其放置在切割板上；产生切口，从框的边缘切去边缘1-2 mm；然后从框上剥下羊膜。优选地，用无菌手套完成该阶段的羊膜处理，

可以将羊膜放置在无菌容器(例如密封袋)中，并密封。在另一个实施方案中，将至少一部分胶原生物纤维分成适合放置在培养皿或多孔板中的片。例如，可以将一片或多片环形的胶原生物纤维放置在培养皿或多孔板中，使得胶原生物纤维覆盖培养皿或多孔板的至少一部分底部(例如，培养表面)。在优选的实施方案中，胶原生物纤维完整地覆盖了Petri皿的整个圆形的培养表面，或者多孔板的一个或多个孔的圆形培养表面。

如上所述，根据本发明方法生产的生物纤维，不论单独的还是与一类组织培养皿或多孔板联合，都可以在室温下储存延长的时间。

在替代的实施方案中，胶原生物纤维可以包含绒毛膜，或同时包含绒毛膜和羊膜。上文描述的方法预期也适用于制备包含绒毛膜，或同时包含绒毛膜和羊膜的生物纤维的方法。在一个实施方案中，本发明包括使用如此制备胶原生物纤维：提供包含羊膜和绒毛膜的胎盘；从绒毛膜上分离羊膜；和使绒毛膜去细胞化。在特定的实施方案中，生物纤维的制备还需要洗涤和干燥去细胞化的绒毛膜。在另一个实施方案中，本发明包括使用如此制备胶原生物纤维：提供包含羊膜和绒毛膜的胎盘，和使羊膜和绒毛膜

去细胞化。在特定的实施方案中，该方法还需要洗涤和干燥去细胞化的羊膜和绒毛膜。

5.6.5. 胶原生物纤维的储存和处理

脱水的胶原生物纤维在使用前可以作为例如脱水薄片储存在室温下(如 25°C)。在一些实施方案中，胶原生物纤维可以在温度为至少 10°C、至少 15°C、至少 20°C、至少 25°C 或至少 29°C 下储存。优选地，脱水形式的胶原生物纤维不被冷藏。在一些实施方案中，可以在温度为约 2°C 至约 8°C 下冷藏胶原生物纤维。根据本发明方法生产的所述生物纤维可以在特定温度下储存 12 个月或更久，而不改变该胶原生物纤维的生物化学或结构完整性(例如，无降解)，也不改变其生物化学或生理学性质。所述生物纤维可以储存数年，而不改变该胶原生物纤维的生物化学或结构完整性(例如，无降解)，也不改变其生物化学或生理学性质。该生物纤维可以在任何适合长期储存的容器中储存。优选地，将本发明的胶原生物纤维储存在无菌的双密封袋包装中。

在培养、扩增或分化干细胞(如，胚胎干细胞)前通常将胶原生物纤维水合。可以用例如无菌生理缓冲液使胶原生物纤维再水合。在特定的实施方案中，该无菌的盐溶液是 0.9% NaCl 溶液。在一些实施方案中，该无菌的盐溶液是缓冲的。优选地，在培养、扩增或分化干细胞前，在培养基(例如 DMEM，干细胞培养基或 4.2.1 节中描述的培养基)中使胶原生物纤维再水合。在一些实施方案中，本发明的胶原生物纤维的水合需要至少 2 分钟、至少 5 分钟、至少 10 分钟、至少 15 分钟、或至少 20 分钟。在优选的实施方案中，本发明的胶原生物纤维的水合在 5 分钟内完成。在另一个

优选的实施方案中，本发明的胶原生物纤维的水合在 10 分钟内完成。在另一个优选的实施方案中，本发明的胶原生物纤维的水合需要不超过 10 分钟。一旦水合，胶原生物纤维就可以在溶液(如，无菌的 0.9% NaCl 溶液)中维持长达 6 个月，其中需要更换溶液(如每 3 天更换)。

5.6.6. 灭菌

可以通过任何医学上合适的方法，优选不会显著地使膜蛋白交联或变性的方法完成生物纤维的灭菌。例如可以利用气体(如，二氧化乙烯)完成灭菌。可以利用辐射(如， γ 辐射)完成灭菌，优选利用本领域技术人员已知的方法通过电子束来灭菌，例如 Gorham, D. Byrom (编著), 1991, *Biomaterials*. Stockton Press, New York, 55-122。足以杀死至少 99.9% 的细菌或其它潜在的污染性生物体的任何辐射剂量都在本发明的范围内。在优选的实施方案中，使用至少 18-25kGy 的剂量来实现生物纤维的最终灭菌。

5.6.7. 层压片

本发明还提供了干细胞的培养、扩增或分化，其包括在有胶原生物纤维层压片的培养基中培养细胞。此类层压片可以是基本上平的(例如，适合细胞培养)或三维的。

一般通过将 2 层或多层胶原生物纤维一一堆叠至顶部，并密封或干燥来制片成胶原生物纤维。胶原生物纤维可以层压成干燥的或在再水合后层压。或者，在去除细胞后(例如，通过细胞刮擦步骤(参见下文实施例))初始干燥前，可以将两层或多层例如羊膜制成层压片。如果在初步干燥前层压，可以将 2 层或多层胶原生物纤维层一一堆叠至各自的顶部，然后利用例如冷冻干燥方法，或有无真空下的中热干燥来进行干燥。优选地，应用

的加热不会强烈到导致胶原生物纤维的蛋白质组分，特别是胶原遭到破坏或分解。一般地，应用的加热不超过 70°C，优选不超过 60°C，更优选约 50°C。层压时间随着例如层压的层数而变化，但是对于鼓膜修补使用的胶原生物纤维片的尺寸，一般在 50°C 花费 1-2 小时。

还可以在 2 层或多层的胶原生物纤维或羊膜之间使用胶黏剂来将胶原生物纤维制成层压片。此类胶黏剂优选适合医学用途，可以包含天然的生物胶黏剂(例如，纤维蛋白胶)、合成胶黏剂或其组合。胶黏剂还可以是在层压过程中从前体化学转变的。

5.7. 试剂盒

可用于本发明方法的胶原生物纤维可以作为方便培养、扩增或分化干细胞的试剂盒的一部分在包装材料或容器中提供。

在一个实施方案中，试剂盒包括一个或多个培养皿或微孔板，其中所述皿或板包含胶原生物纤维。在一些实施方案中，在培养皿或微孔板的每一个孔中提供每一片胶原生物纤维。在另一个实施方案中，试剂盒包括两片或多片分别包装或容纳的胶原生物纤维。

在另一个实施方案中，试剂盒包括适合干细胞培养的培养基。在另一个实施方案中，试剂盒包括使干细胞分化成成体细胞的一种或多种化合物。

5.8. 培养在胶原生物纤维上的干细胞的用途

根据本发明培养、扩增、分化的干细胞具有多种用途。干细胞可用于本领域技术人员已知的任何目的，例如在美国申请公开号 2004/0048796 中描述的目的，其内容通过引用而全文并入本申请。例如，干细胞可用于移

植和体外治疗规程，其中机体的组织或器官通过植入、移植或注入目标细胞群而得到增强、修复或替代，所述细胞群例如干细胞或祖细胞群。它们还可用于替代或增强已存在的组织，用于导入新的或改变的组织，或者用于连接生物组织或结构。含有胶原生物纤维的干细胞培养物还可用于手术操作，例如作为手术移植植物。

在胶原生物纤维上培养的干细胞可以不与胶原生物纤维一起使用。也就是说，可以通过本领域技术人员已知的方法从胶原生物纤维上分离干细胞，例如通过胰酶消化和洗涤来去除。然后，将这些干细胞用于进一步的干细胞培养，或用于治疗可用干细胞治疗的疾病、病症或不适。在另一个实施方案中，将干细胞可以和胶原生物纤维一起用于可以使用胶原生物纤维的任何应用，以治疗疾病、病症或不适。参见例如，Hariri 等人的美国申请公开号 20040048796，Hariri & Smiell 于 2005 年 7 月 13 日提交的美国临时申请号 60/699,441；Lin & Ray 于 2005 年 7 月 13 日提交的美国临时申请号 60/699,440；和 Sulner 等人于 2005 年 6 月 30 日提交的美国临时申请号 60/696,197。在另一个实施方案中，在组织-适应性应用(例如，分化成心肌细胞的干细胞可用于修复心肌梗塞中的组织损伤)中，在胶原生物纤维上分化的干细胞不与胶原生物纤维一起使用。在另一个实施方案中，分化的干细胞与在其上分化该干细胞的胶原生物纤维一起用于组织-适应性应用(例如，分化为软骨细胞的干细胞可以和胶原生物纤维一起用于例如修复受损的关节)中。

5.9. 筛选化合物的方法

本发明提供了筛选化合物的方法，所述化合物调节干细胞的扩增或分化，或调节细胞的活性。筛选的化合物可以是小分子、药物、肽、多核苷酸等，或此类候选化合物的文库。细胞可以是体细胞或干细胞。细胞可以是天然发生的细胞或改造的表达重组基因产物的细胞。对于干细胞，因为胶原生物纤维可以在培养中代替滋养细胞，所以所述方法具有测试化合物不被滋养细胞干扰，不会引发次级效应而复杂化的优点。

在一方面，本发明提供了利用本发明的胶原生物纤维细胞培养体系来确定化合物对细胞的毒性的方法。在一些实施方案中，该方法包括在适合所述细胞存活的条件将该细胞与胶原生物纤维一起培养，将该细胞接触化合物，和检测凋亡、坏死或细胞死亡，或者检测凋亡、坏死或细胞死亡的倾向。如果检测到凋亡、坏死或细胞死亡，或者凋亡、坏死或细胞死亡的倾向，则所述化合物对所述细胞是毒性的。在特定的实施方案中，所述细胞是多种所述干细胞的一部分，其中，将每种所述干细胞与多种化合物中的一种接触，以鉴定对凋亡或细胞死亡具有影响的所述多种化合物的子集。

在另一方面，本发明提供了例如使用本发明的胶原生物纤维培养系统来确定化合物对干细胞分化的影响的方法。在一些实施方案中，该方法包括在适合所述细胞存活的条件将该细胞与胶原生物纤维一起培养。使细胞与化合物接触。然后，在存在或缺失候选化合物的情况下，分析细胞的分化标识物。分化标识物是细胞表面标识物、细胞形态学或一种或多种差异表达的基因。如果鉴别出改变，则所述化合物对所述细胞的分化具有影响。在特定的实施方案中，所述细胞是多种所述干细胞的一部分，其中，

使每种所述干细胞与多种化合物中的一种接触，以鉴定对所述干细胞分化作用具有影响的所述多种化合物的子集。

6. 实施例

6.1. 实施例 1: 制造胶原生物纤维的方法

材料

在胶原生物纤维的制备中使用下列材料：

材料/仪器

- 出生记录的复印件
- 材料/家庭健康史/知会同意的复印件
- 源条形码标记(供体 ID 编号)
- 收集号#(指定给新入材料的顺序编号)
- 组织处理记录(文件 ID # ANT-19F)；保存了每批编号处理的详细记录
- 人胎盘(在开始处理时小于 48 小时龄)
- 无菌手术夹/止血钳
- 无菌剪刀
- 无菌手术刀
- 无菌 Steri-Wrap 薄片
- 无菌细胞刮擦器(Nalgene NUNC Int. R0896)
- 无菌纱布(未灭菌的 PSS 4416, 灭菌)
- 无菌漂洗用不锈钢碟
- 消毒的处理用不锈钢碟

- 消毒的塑料筐
- 无菌 0.9% NaCl 溶液(Baxter 2F7124)
- 无菌水(Milli Q plus 09195 或 Baxter 2F711)
- 无菌标本容器(VWR 15704-014)
- 个人防护仪器(包括无菌的和未灭菌的手套)
- 经认证的清洁室
- 预制的去细胞化溶液(D-Cell); 0.01-1%脱氧胆酸钠一水化物
- 消毒的筐
- 振荡台(VWR Model 100)
- 计时器(VWR 21376890)
- 消毒的塑料框网
- PVC 包装膜
- 真空泵(Schuco-Vac 5711-130)
- 干胶器(即加热干燥器; BioRad Model 583)
- 消毒的不锈钢切板
- 用于包装的袋
- 无菌的不锈钢尺(General Tools MFG. Co 1201)
- 可追踪的数字温度计(Model 61161-364, Control Company)
- Accu-Seal 自动封口器(Accu-Seal, Model 630-1B6)

在分娩时筛选待产妇的传染性疾病，例如 HIV、HBV、HCV、HTLV、梅毒、CMV 和其它可能污染所收集的胎盘组织的病毒和细菌病原体。只使用从测试为上述病原体阴性的或与上述病原体不反应的产妇供体中收集的组织所生产胶原生物纤维。

在正常分娩后，从相连的子宫同时排出胎盘、脐带和脐带血。在出生后收集胎盘、脐带和脐带血。将材料转移到实验室，在具有 HEPA 过滤系统的清洁室中，在无菌条件下处理所述材料，所述过滤系统应该在处理之前开启至少一个小时。在处理产品的时候全程都穿戴手套(无菌的或未灭菌的，视情况而定)。所有羊膜/绒毛膜不用的(废弃的)部分和在组织处理过程中产生的污染液体都尽可能地抛弃。

步骤 I:

用无菌的 Steri-Wrap 薄片建立无菌区并将下列仪器和处理用附件置于其上。

- 无菌碟包
- 无菌细胞刮擦器
- 无菌手术刀
- 消毒的处理碟

在处理记录中记录无菌包 ID #。

从转移容器中移出胎盘，并放置在消毒的不锈钢碟上。使用手术夹和剪刀，从离胎盘约 2 英寸处切断脐带。将脐带放置在分离的无菌容器中用于进一步处理。用组织 ID 条形码标记容器；鉴定材料和储存溶液的状况(例如，基质类型)。在一些情况下，如果其它项目不需要可以抛弃脐带。

从胎盘膜的边缘开始，利用手指的钝性分离从绒毛膜上分离羊膜。在切割膜之前进行这项工作。

在从绒毛膜和胎盘的整个表面分离羊膜后，用剪刀沿脐带残端环剪羊膜，并从胎盘中分离。在一些实例中，如果不能在不撕坏组织的情况下分离羊膜和绒毛膜，则将羊膜和绒毛膜从胎盘中切下，然后剥离。

将羊膜放置在分离的标本容器中，以用于其它项目。用组织 ID 条形码标记容器，材料和储存溶液的状况(例如，基质类型)被鉴别、初始化和记录日期。

如果有任何羊膜片仍然附着在胎盘中，就将其从胎盘中剥离并用剪刀沿着脐带环剪。将胎盘放回转移容器中供其它项目使用。

在组织处理记录中记录正确的数据。

在有无菌 0.9% NaCl 溶液的碟中保存羊膜。优选地，在处理的下一个步骤之前，羊膜冷冻储藏最多 72 小时。

步骤 II.

从标本容器中去掉羊膜，每次一块，并放置在消毒的不锈钢碟上。其它片放置在装有无菌水的分离的无菌不锈钢碟中，直到可对它们进行清洁。移动来自处理碟的其它羊膜片，放置在装有无菌水的分离的漂洗不锈钢碟中。

如果被血液材料或胎儿液体/材料整体污染，则用无菌水漂洗羊膜，需要的话更换无菌水。

将羊膜放置在处理碟中，母体一侧朝上。利用无菌的细胞刮擦器，从羊膜的母体侧小心尽可能地去掉可见的污染和细胞材料(注意：该步骤应该使用最小的压力，防止撕坏膜)。使用无菌水帮助去掉细胞和细胞碎片。在分离的无菌不锈钢漂洗碟中用无菌水进一步漂洗羊膜。

翻转羊膜使胎儿一侧朝上，并放回处理碟中用无菌水漂洗。利用细胞刮擦器轻柔地去除可见的细胞材料和碎片(注意：该步骤应该使用最小的压力，防止撕坏膜)。使用无菌水帮助去除细胞和细胞碎片。

在各轮清洁之间，在分离的无菌漂洗碟中用无菌水漂洗羊膜。清洁组织尽可能多次(清洁轮次)，以从膜的两侧去除大部分可见的细胞材料和碎片。各轮次之间更换漂洗碟中的无菌水。

在每个清洁轮次后用无菌水漂洗处理碟。

以相同方式处理所有其它的羊膜片，并放在相同的容器中。贴附组织ID条形码，鉴别材料和储存溶液状况(例如，基质类型)，添加初始日期。

在组织处理记录中记录正确的信息和日期。

步骤 III.

从漂洗碟中(或从储存容器中)移出羊膜，用手指轻柔的挤出多余的液体，将膜放置在无菌的标本容器中。容器装入 150 ml 用 D-Cell 标记的溶液，确保覆盖了所有的羊膜，并密封容器。

将容器放置在振荡台的框中。开启振荡台，在 D-Cell 溶液中摇晃膜，在#6 档摇晃最少 15 分钟，最多 120 分钟。

用新的无菌仪器和消毒碟按步骤 I 相同的方法建立新的无菌区域。在处理记录中记录无菌包 ID #。

在完成摇晃后，关闭振荡台，从容器中移出膜。将膜放置在新的无菌不锈钢处理碟中，加入无菌 0.9% NaCl 溶液覆盖碟底部。

利用新的无菌细胞刮擦器，从组织的两侧去除残留的 D-cell 和细胞材料(如果还有的话)。如果需要重复该步骤多次，以从两侧是整个表面尽可

能地去除可见的残留细胞材料。在清洁轮次之间，在分离的漂洗碟上用无菌 0.9% NaCl 溶液漂洗膜。在各次漂洗之间，更换漂洗碟中的无菌 0.9% NaCl 溶液。

在完成最后的清洁轮次后，用无菌 0.9% NaCl 溶液漂洗膜，并放置在装有无菌 0.9% NaCl 溶液的新的无菌标本容器中。

用几乎完全相同的方法处理所有其它的羊膜片。

当处理完所有的羊膜片并置于装有无菌 0.9% NaCl 溶液的容器中时，将容器置于振荡台上的筐中，在#6 档摇晃最少 5 分钟。在完成摇晃后，从标本容器中移出膜，更换容器中的无菌 0.9% NaCl 溶液，再将膜重新放回标本容器中。

用组织 ID 条形码和检疫标签标记标本容器。将材料和储存溶液状况(例如，基质类型)鉴别、初始化和记录日期。将标本容器放置在清洁的夹拉链袋中，置于冰箱内(2-8°C)。

在组织处理记录中记录所有的正确数据。

当可获得血清学结果时，在检疫标签的顶部放置正确的标签(血清型阴性或供研究使用)，并将上述容器与待检疫的容器分开。

步骤 IV.

在用步骤 IV 处理前，检查组织状态记录以确保所有可用的试验结果都是阴性的。

以与步骤 II 和 III 相同的方法用无菌的 Steri-Wrap 薄片建立无菌区和放置所有的无菌的和消毒的仪器和附件。

从冰箱中移出膜，放置在新的无菌不锈钢处理碟上。添加无菌 0.9% NaCl 溶液覆盖碟底部。

利用新的无菌细胞刮擦器轻柔地去除所有可见的细胞材料和碎片(如果有的话)(注意：该步骤应该使用最小的压力，防止撕坏膜)。使用无菌 0.9% NaCl 溶液帮助去除细胞和细胞碎片。

在装有无菌 0.9% NaCl 溶液的分离的无菌漂洗碟中漂洗膜。在各轮清洁之间更换无菌 0.9% NaCl 溶液。将膜放置在新的无菌标本容器中，容器装有新鲜的无菌 0.9% NaCl 溶液，并置于振荡台上以#6 档摇晃最少 5 分钟。

重复实施前述步骤 3 次，并在各次摇晃之间更换无菌 0.9% NaCl 溶液。在组织处理记录中记录正确数据。

从标本容器中移出膜，一次一片，用手指轻柔的挤出多余液体，将膜放置在无菌的处理碟中。轻柔的拉紧膜直到平坦，确保胎儿侧朝下。

通过用无菌剪刀切割消毒的塑料薄片制备框。框的尺寸比膜片在各个方向上应该小约 0.5 cm。在装有无菌 0.9% NaCl 溶液的漂洗碟中漂洗框。

将框放在轻微拉紧的膜表面，并轻柔的压紧。必须将塑料框的光滑侧面向组织。

利用手术刀绕框切割膜，留下约 0.5 cm 延伸超过框边。多余的膜放回标本容器中。

用夹子或镊子将延伸超过框的膜边缘包住框边缘，放在相同碟子的侧面。

以相同方式处理下一片膜。优选地，干燥的总面积不超过 300 cm²/加热干燥器。当“框出”膜片时，优选没有未框出的片保留在容器的无菌 0.9% NaCl 溶液中。

利用具有延长探针的校准数字化温度计设定和验证干燥器的干燥温度。干燥温度设定为 50°C。在组织处理记录中记录数据。

开启真空泵。

在加热干燥器的干燥台上放置无菌纱布，覆盖比框出的膜的面积略大的区域。重要的是保证纱布层的总厚度不超过一块折叠的 4×4 纱布的厚度。

在纱布顶部放置一片塑料框网。塑料网边缘应该超过纱布边缘约 0.5-1.0 cm。

轻柔的抬起框住的膜，放置在加热干燥器平台的塑料网顶部，膜一侧朝上。重复该操作直到在加热干燥器平台上放置了最大数量的膜(不超过 300 cm²)。(注意：羊膜的胎儿侧朝上)

切下一片足够覆盖加热干燥器的整个加热干燥器平台外加额外的 1 英尺的 PVC 包装膜。

随着真空泵的运行，用塑料膜轻柔地覆盖加热干燥器的整个加热干燥器平台，并在干燥平台边缘的每一侧留下 1/2 英尺的延伸。注意，薄膜紧贴膜和框架(即“抽干”成真空)，且在整个组织区域没有空气泄漏和皱纹。然后盖上盖子。

真空泵设定约-22 英寸 Hg 的真空。在 2-3 分钟的干燥循环后记录泵标尺。加热真空干燥膜约 60 分钟。进入干燥过程约 15-30 分钟后，用新的纱

布替代加热干燥器中的无菌纱布层。纱布层的总厚度必须不超过一块折叠的4×4纱布的厚度。

在更换后，注意塑料薄膜紧贴膜和框架，且在整个膜区域没有空气泄漏和皱纹。

通过检查泵压计周期性地检查真空密封的完整性。在干燥过程完成后，打开加热器，在运行泵的同时冷却膜约2分钟。

用无菌的Steri-Wrap和置于其下的消毒的不锈钢切板建立新的无菌区。此时使用无菌手套。随着泵仍在运行，从角落开始轻柔的从膜上去除塑料薄膜，同时用戴手套的手保持膜片朝下。从干燥台上轻柔的抬起具有膜的框，并以膜侧朝上放置在消毒的不锈钢切板顶部的无菌区域上。利用手术刀沿着距框边缘1-2 mm处切割。用戴手套(无菌手套)的手持膜。轻柔地将膜从框上抬起，缓慢剥离，然后放置在切板的无菌区域。

利用手术刀或尖利的剪刀，将膜片切割成特定尺寸的片段。在包装前在无菌区域切割和放置所有的片。用一只手(无菌的)将单片膜置于内部易剥离的包装袋内，同时另一只手(非灭菌的)持袋。注意不要用“无菌的”手碰触包装袋。在所有的片都位于内袋中后，将其密封。在包装外侧的指定区域贴附具有正确信息的标签(例如，部分#，批次#，等)。以相同方式处理所有的膜片。将标记和密封的易剥离包装袋放在防水的夹拉链袋中储存，直到可运往灭菌设备或分配器。在组织处理记录上记录所有的正确数据。

6.2. 实施例 2: 制造胶原生物纤维的替代方法

利用实施例 1 中的材料，基本上根据该实施例 1 的步骤 I 的描述制备胎盘。在分娩时筛选待产妇的传染性疾病，例如 HIV、HBV、HCV、HTLV、梅毒、CMV 和其它可能污染所收集的胎盘组织的病毒和细菌病原体。只使用从测试为述病原体阴性的或与上述病原体不反应的产妇供体中收集的组织所生产的胶原生物纤维。

用无菌的 Steri-Wrap 薄片建立无菌区并将下列仪器和加工附件置于其上：无菌碟包、漂洗碟、不锈钢杯、夹子/止血钳、镊子、剪刀、纱布。

从转移容器中移出胎盘，放置在消毒的不锈钢碟上。使用手术夹和剪刀，从离胎盘约 2 英寸处切断脐带。

从胎盘膜的边缘开始，利用手指的钝性分离从绒毛膜上分离羊膜。在切割膜之前进行这项工作。在从绒毛膜和胎盘的整个表面分离羊膜后，用剪刀沿脐带残端环剪羊膜，并从胎盘上分离。在一些实例中，如果不能在不撕坏组织的情况下分离羊膜和绒毛膜，则将羊膜和绒毛膜从胎盘上切下，然后剥离。

在组织处理记录中记录正确的数据。

用无菌 0.9% NaCl 溶液漂洗羊膜，去除血液和胎儿液体或材料。在漂洗过程中需要的话更换盐溶液。

然后，将羊膜放在标本容器中的 0.9% 盐溶液、1% 脱氧胆酸溶液中，在 2-8°C 冷藏达 15 天，每 3-5 天更换溶液。在孵育过程中或孵育的最后，评价上述的血清型测试。如果测试提示被一种或多种病原体污染，则抛弃羊膜并停止进一步处理。然而，提示来源于 CMV-阳性供体的组织仍然适合生产生物纤维。

一旦完成孵育，就从标本容器中移出羊膜，置于无菌碟中，用 0.9% NaCl 溶液漂洗三次以降低组织中的脱氧胆酸。将羊膜的母体侧朝上，用细胞刮擦器轻柔刮擦羊膜以尽可能多地去除细胞材料。如果需要，增加额外的生理盐水来帮助去除细胞和细胞碎片。在羊膜的胎儿侧重复该步骤。刮擦后再漂洗，在两侧尽可能多次地重复该操作，以去除细胞和细胞材料。将羊膜放置在独立容器的 0.9% NaCl 溶液中在振荡台上#6 档漂洗膜 5-120 分钟。替换盐溶液，重复振荡漂洗。

在完成漂洗后，任选地将羊膜储存在冰箱内的夹拉链袋中。

然后，将刮擦的膜胎儿侧朝下放置于无菌的处理碟中。用手轻柔抚摸去除多余液体，将膜展平。切割无菌的塑料薄片，使其尺寸比展平的羊膜在各个方向上小约 0.5 cm。用 0.9% NaCl 溶液简单地漂洗塑料薄片。将塑料薄片的光滑侧朝下，放置在展平的羊膜上，留下未覆盖的羊膜边缘。使用手术刀切割羊膜，留下约 0.5 cm 延伸超过薄片边缘。这些延伸的羊膜边缘包住塑料薄片。干燥的总组织区域不超过标准真空加热干燥器 300 cm²。

在真空加热干燥器中放置一层无菌纱布。在纱布顶部放置一薄片塑料网，使其延伸超过纱布边缘约 0.5-10.0 cm。然后，将羊膜和塑料薄片放置在真空加热干燥器内的网顶部，组织一侧朝上，并用一层 PVC 包装膜覆盖羊膜。干燥器设定为 50°C，周期性地检查温度以确保维持在 50±1°C。然后开启真空泵，设定为约-22 英寸 Hg 的真空。干燥进行约 60 分钟。

然后将干燥的羊膜储存在密封的所料容器中以备进一步使用。

6.3. 实施例 3: 胶原生物纤维层压片

通过上述方法生产的胶原生物纤维按下述制成层压片。在一些实例中，将干燥的胶原生物纤维在无菌的 0.9% NaCl 溶液再水合 1 小时、10 分钟至 1 小时、30 分钟。根据上文所述的完整程序(实施例 1)生产干燥的胶原生物纤维，然后层压；湿润的胶原生物纤维制备到步骤 III，然后层压。在切好安装框(mounting frame)后，安放再水合的组织，胎儿侧朝下放置，将安装框放在组织顶部，切割组织，留下绕框约 1 cm 的边缘。用细胞刮擦器将 1 cm 边缘折叠包住框的边缘。重复这些步骤添加其它的湿润胶原生物纤维片。然后将层压的生物纤维放置在干胶器上，干燥至基本干燥(按重量计算水含量<20%)。然后将层压片切成 2×6 cm 的样品。

如下所述评价不同批次的层压片的胶原生物纤维。确定含 2、3、5 或 8 层的层压片的干燥(DT)和湿润(WT)层压胶原生物纤维的维度，如表 1 所示：

表 1：

	厚度(μm)	长度(mm)	宽度(mm)	重量(mg)
DT2	29 \pm 12	20.0 \pm 0.3	5.2 \pm 0.1	0.87 \pm 0.02
DT3	32 \pm 2	20.5 \pm 0.1	5.2 \pm 0.2	1.26 \pm 0.11
WT2	20 \pm 15	20.2 \pm 0.2	5.0 \pm 0.3	0.93 \pm 0.17
WT3	15 \pm 5	19.6 \pm 0.1	5.1 \pm 0.3	0.9 \pm 0.04
WT5	31 \pm 5	19.8 \pm 0.4	5.3 \pm 0.1	2.06 \pm 0.2
WT8	115 \pm 26	20.3 \pm 0.2	5.1 \pm 0.4	4.92 \pm 0.56

当保存在室温干燥的条件下时，标本在层压后的前两天没有表现出分层迹象。当保存在搅拌的 0.9% 盐水、室温下 10 天时，层压的胶原生物纤维也没有表现出分层迹象。

测试了更大的层压胶原生物纤维标本的片层持久性和分层耐受性。将来自上表的 1×2 cm 的标本(即 DT2、DT3、WT2、WT3、WT5 和 WT8)放置在 Petri 培养皿中的 5 ml 磷酸缓冲盐溶液中。标本放在定轨摇床上 95

RPM 约 24 小时。在振荡后或者随后的简单处理过程中，都没有观察到标本的分层。

6.4. 实施例 4：利用胶原生物纤维培养干细胞的试剂盒

该实施例提供了用胶原生物纤维培养、扩增或分化干细胞的试剂盒。

试剂盒在密封的容器中包括多块适合培养、扩增或分化干细胞的微孔板。该微孔板可以包括用于细胞培养的 6、12、24 或 96 孔板。在每个孔中都提供了单层的胶原生物纤维，或胶原生物纤维层压片。根据上文实施例 1-3 中的描述生产和制备胶原生物纤维和胶原生物纤维层压片。

试剂盒还包括一套用于培养、扩增或分化干细胞的说明书。此外，试剂盒包括一个或多个装有适合培养、扩增或分化干细胞的培养基，和一种或多种有利于干细胞生长或分化的试剂的容器。

6.5. 实施例 5：利用胶原生物纤维培养、扩增或分化人胎盘干细胞

该实施例提供了用胶原生物纤维培养、扩增或分化的人胎盘干细胞。

本文中使用的胎盘干细胞描述在美国申请公开号 2003/032179 中。此类细胞是 OCT-4⁺和 ABC-p⁺的。在胎盘从子宫排出后获得胎盘干细胞。简而言之，用合适的水性灌洗液，例如融解了抗凝剂的水性等渗液体将胎盘除血和灌洗。在除血和灌洗胎盘足够时间后，观察到胎盘干细胞迁移到被除血和灌洗的胎盘的微环境中。在胎盘中培养足够的时间后，通过在收集容器中收集流出的灌洗液来收集胎盘干细胞。利用本领域技术人员已知的技术，例如密度梯度离心和流式细胞仪等从流出的灌洗液中回收从胎盘收集的胎盘细胞。

然后，利用实施例4中提供的试剂盒，用胶原生物纤维培养胎盘干细胞。在试剂盒的微孔板的每个孔中，在胶原生物纤维上种植约 $1-5 \times 10^5$ 个细胞。每个孔加入 5 ml 培养基。培养基包含 60% DMEM-LG(Gibco)、40% MCDB-201(Sigma)、2%胎牛血清(FCS)(Hyclone Laboratories)、 $1 \times$ 胰岛素-转铁蛋白-硒(ITS)、 $1 \times$ 亚麻酸-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(Sigma)、上皮生长因子(EGF)10 ng/ml(R&D Systems)、血小板衍生生长因子(PDGF-BB)10 ng/ml(R&D Systems)和 100 U 青霉素/1000 U 链霉素。

37°C 和 5% CO₂ 的湿润空气的条件下在孵育箱中培养微孔板，以回收和附着细胞。每两天更换所有的培养基。

如下诱导人胎盘干细胞分化成神经元。利用实施例4的试剂盒，用胶原生物纤维在预诱导培养基中培养人胎盘干细胞 24 小时，所述预诱导培养基由 DMEM/20% FBS 和 1 mM β -巯基乙醇组成。移去预诱导培养基，用 PBS 洗涤细胞。神经元诱导培养基由 DMEM 和添加的 1-10 mM β -巯基乙醇组成。或者，可用由 DMEM/2% DMSO/200 μ M 丁羟茴醚组成的诱导培养基来提高神经元分化效率。在一些实施方案中，在暴露于无血清培养基和 β -巯基乙醇后 60 分钟就出现形态学和分子的改变(Woodbury 等人, J. Neurosci. Res., 61 :364-370)。使用 RT-PCR 检测神经生长因子受体和神经微丝重链基因的表达，其是神经分化的指示。还检查细胞的神经表型的形成，例如，树突和/或轴突的形成。

如下诱导人胎盘干细胞分化成脂肪细胞。利用实施例4的试剂盒，用胶原生物纤维培养人胎盘干细胞至 50-70% 汇合度，在培养基中诱导，所述培养基包含：(1) DMEM/MCDB-201，具有 2% FCS、0.5% 氢化可的松、

0.5 mM 异丁基甲基黄嘌呤、60 μ M 消炎痛；或(2) DMEM/MCDB-201，具有 2% FCS 和 0.5% 亚麻酸。检查细胞的形态学改变。一般在 3-7 天后出现油滴。使用定量实时 PCR 检查与脂肪形成相关的特定基因，即 PPAR- γ 2、aP-2、脂蛋白脂肪酶和骨桥蛋白的表达来评估分化。

如下完成胎盘干细胞的成软骨分化。利用实施例 4 的试剂盒，用胶原生物纤维在添加了 15% 脐带血清的 DMEM 中培养胎盘干细胞。离心 (150 \times g, 5 分钟) 细胞，在不完全的成软骨培养基(Cambrex)中洗涤两次。在最后一次洗涤后，将细胞以 5×10^5 细胞/ml 的浓度重悬在含有 0.01 μ g/ml TGF- β -3 的完全的成软骨培养基(Cambrex)中。将 0.5 ml 细胞等分到 15 ml 聚丙烯培养管中。细胞在 150 \times g 沉降 5 分钟。将细胞沉淀完整地留在培养基中。在 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 中孵育松散加盖的管 24 小时。每 2-3 天用新鲜制备的完全成软骨培养基饲养细胞沉淀。每天利用低速振荡器摇晃以使细胞沉淀保持悬浮在培养基中。在培养 14-28 天后收获成软骨细胞沉淀。通过例如观察到嗜酸性基质的产生、评估细胞形态学，和/或 RT-PCR 验证胶原 2 和/或胶原 9 基因表达，和/或软骨基质酸性粘多糖类的产生(通过阿利辛蓝(Alcian blue)细胞化学染色验证)来表征成软骨作用。

如下完成胎盘干细胞的成骨分化。利用实施例 4 的试剂盒，用胶原生物纤维在成骨培养基中培养胎盘干细胞。成骨培养基是用 185 mL Cambrex 分化基础培养基——Osteogenic 和 SingleQuots 中制备的(地塞米松、L-谷氨酰胺、抗坏血酸、pen/strep、MCGS 和 β -甘油磷酸各一)。将来自灌洗液的胎盘干细胞以每 cm² 组织培养表面区域约 3×10^3 个细胞接种在每 cm² 0.2-0.3 mL MSCGM 的组织培养区域中。一般地，在 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 中 4-24 小时后，所有的 MSCGM 中的细胞都附着在培养表面上。通过用成骨分化培

培养基替代上述培养基诱导成骨分化。细胞形态学开始改变，从贴壁胎盘干细胞的典型纺锤状外观变成立方体形外观，并伴随着矿化作用。在分化过程中，一些细胞从组织培养表面剥离。

如下完成胎盘干细胞的胰腺分化。利用实施例 4 的试剂盒，用胶原生物纤维在添加了 10 ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子和 2 ng/ml 转化生长因子 β -1 的 DMEM/20% CBS 中培养胎盘干细胞。KnockOut 血清替代物可以替代 CBS 使用。在培养基中以 50/50 浓度添加来自巢蛋白-阳性神经元细胞培养物的条件培养基。细胞培养 14-28 天，每 3-4 天重新饲喂。通过检测胰岛素蛋白质或通过 RT-PCR 检测胰岛素基因表达来表征分化。

如下完成胎盘干细胞的肌原性(心肌原性)分化。利用实施例 4 的试剂盒，用胶原生物纤维在添加了 1 μ M 视黄酸、10 ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子、2 ng/ml 转化生长因子 β -1 和 100 ng/ml 上皮生长因子的 DMEM/20% CBS 中培养胎盘干细胞。KnockOut 血清替代物(Invitrogen, Carlsbad, California)可以替代 CBS 使用。或者，胎盘干细胞在添加了 50 ng/ml 心调剂素 1 的 DMEM/20% CBS 中培养 24 小时。或者，胎盘干细胞在无蛋白质培养基中维持 5-7 天，然后用人心肌提取物刺激(渐增剂量分析)。通过将 1 gm 人心肌在添加了 1% 脐带血清的 1% HEPES 缓冲液中匀浆来制备心肌提取物。孵育悬浮液 60 分钟，然后离心并收集上清液。细胞培养 10-14 天，每 3-4 天重新饲喂。通过 RT-PCR 证实心脏肌动蛋白基因表达来验证分化。

6.6. 实施例 6: 在羊膜上培养胎盘干细胞和成纤维细胞

组织工程的主要目标是再生活组织/器官，用于替代疾病的或缺失的组织/器官。羊膜是优秀的提供供细胞附着和分化的天然微环境的支架。

膜制备. 根据本文中描述制备的羊膜是来自正常的、长期怀孕的胎盘。组合使用去垢剂浸泡和机械刮擦将羊膜产品去细胞化。在中温下将终产品再水合，并最终通过辐射灭菌。

细胞检测. 将根据本文其它部分的描述酶促消化所获得的普通人真皮成纤维细胞(Cambrex)或胎盘干细胞在羊膜、纤粘连蛋白(Sigma)或VITROGEN™(来自连接的牛胶原)包被的表面培养4或24小时。在福尔马林中固定基质上的培养细胞，并对F-肌动蛋白染色。

结果. 在接种4小时后，对应不同的表面观察到不同的形态学。在纤粘连蛋白上的成纤维细胞伸展良好，表现出肌动蛋白张力纤维，具有贴壁细胞表型特征；然而，胶原上的成纤维细胞没有伸展，相反显示出许多丝状突起。在羊膜上的成纤维细胞的形态学外表非常类似于在纤粘连蛋白上培养的细胞。到24小时，在不同基质之间的细胞形态学差异变得较不明显。胎盘干细胞附着在实验基质上，并表现出与成纤维细胞类似的分化的细胞形态学。

在独立的实验中，将在干燥羊膜上的贴壁胎盘干细胞培养物的特征与在纤粘连蛋白、胶原或玻璃上的培养特征相比较。盖玻片表面吸收10 µg/ml 纤粘连蛋白或500 µg/ml VITROGEN™。干燥羊膜用硅树脂环紧固在24孔板的底部。在纤粘连蛋白、VITROGEN™、玻璃或羊膜上以约 1×10^4 细胞/cm²培养胎盘干细胞24小时。然后固定细胞，并染色肌动蛋白细胞骨架。结果显示，在羊膜上伸展的胎盘干细胞与在纤粘连蛋白-包被表面上

的观察结果十分类似。胎盘干细胞也在细胞培养-处理的盖玻片和胶原上伸展，虽然比较起来，胎盘干细胞表现为更薄、延长的细胞，参见附图 1。

结论. 胞内肌动蛋白细胞骨架的动态结构重排是许多细胞活动的基础，例如附着、迁移和增殖，而细胞所处的胞外环境在调节这些细胞行为时发挥作用。在羊膜上培养成纤维细胞和胎盘干细胞表现出细胞伸展动态，与在纤粘连蛋白，一种已知有利于细胞附着和生长的基质蛋白质，上培养的细胞相似。这表明，虽然羊膜主要由胶原组成，但其它少量成分也可以影响细胞贴壁和增殖。这些结果还表明对于在该研究中使用的细胞，包括未分化的或终末分化的，羊膜是供它们附着和实现功能的合适支架。

6.7. 实施例 7: 胎盘干细胞在羊膜上的分化

该实施例证实了在干燥羊膜上的胎盘干细胞的成骨分化作用。

材料:

成骨分化培养基: DMEM 低糖, 添加了 10%胎牛血清(FBS)和 1×P/S + 50 μM 抗坏血酸+100 nM 地塞米松+10mM β 甘油磷酸(BGP)。

基础培养基: 低葡萄糖 DMEM, 添加了 10% FBS 和 1×P/S。

替代性碳源培养基: 低葡萄糖 DMEM, 添加了 10% FBS 和 1×P/S + 10 mM BGP, 用于查看这些细胞是否是磷酸源单独可诱导的。

方法:

从 6×8 cm 的薄片上将无菌脱水羊膜切割成约单个孔的大小(约 1.5 cm 直径)。所述羊膜片由硅树脂 O-环保持原位, 该环也切割成孔的大小(约 1.5 cm 直径)。以约 10000 细胞/cm² 将胎盘干细胞、骨髓来源的干细胞 (BMSC)和普通的人真皮成纤维细胞(NHDF)接种在膜上添加了 10% FBS 和

1×P/S 的 DMEM 中。允许细胞在 37°C, 5% CO₂ 下生长超过 2-3 天。然后, 将培养基更换为分化培养基、基础培养基或含有 β 甘油磷酸(BGP)的基础培养基。允许分化进行 21 天。每 2-3 天更换培养基。

利用 Mallory-Heidenhain 染色技术进行组织染色, 用于评估成骨分化作用。参见 James E. Dennis 等人, "In Vivo Osteogenesis Assay; a Rapid Method for Quantitative Analysis," *Biomaterials* 19:1323-1328 (1998)。简言之, 将干细胞固定在 4%福尔马林中, 并用石蜡包埋。从石蜡包埋块切成 5 μm 厚度的切片至载玻片上。

制备染色溶液: 0.5%酸性品红: 0.5 g 酸性品红溶在 100 mL 蒸馏水中。苯胺蓝溶液: 0.5 g 苯胺蓝、2 g 橙黄 G、1 g 磷钨酸溶解在 100 mL 蒸馏水中。所有试剂均来自 Sigma-Aldrich。

程序: 利用二甲苯将切片脱石蜡, 并通过梯度乙醇恢复水合。然后, 用蒸馏水漂洗切片并染色。切片首先在酸性品红溶液中染色 5 分钟。从载玻片上擦去多余的染料, 并将载玻片浸泡在苯胺蓝溶液中 1 小时。将载玻片转移至 95%乙醇中, 换液数次去除多余的染料。切片脱水透明, 并用合成树脂固定。

6.8. 实施例 8: 制备包含交联的透明质酸的胶原生物纤维

该实施例示范了包含交联的透明质酸的组合胶原生物纤维的生产, 该复合胶原生物纤维涂布用于培养干细胞, 例如胎盘干细胞。

材料和方法:

以脱水的(少于或等于 20%水量)、去细胞化的羊膜来提供胶原生物纤维。以 10 mg/ml 的超纯水溶液来提供透明质酸(Fluka BioChimika)。交联

剂使用 1,4-丁二醇二环氧甘油醚(BDDE; Sigma Aldrich)、1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDCI; Sigma Aldrich)或二乙烯砜(Fluka)。

透明质酸组合物

透明质酸是糖胺聚糖，其可以方便地获得，廉价并且生物相容，并且具有良好的保水性和流变学性质。

评价了两种不同的透明质酸交联方法。利用 BDDE 或二乙烯砜通过溶液交联来交联透明质酸，这包括在溶液中组合透明质酸和不同的交联剂，并搅拌过夜。还利用 EDCI 通过浸泡交联来交联透明质酸，其中透明质酸制备成固体膜或泡沫，然后将组合物浸泡在含有交联剂的溶液中。

利用超纯水制备透明质酸溶液。开始时发现如果 pH 太高就不会发生交联，但是在超纯水中进行交联并没有困难。

制备 2 mL 透明质酸溶液(10 mg/mL)，用 BDDE(溶液; 2 μ L/mg 透明质酸)或 EDCI(通过浸泡技术; 15 mM EDCI 在 80:20 EtOH:水中)交联。两种技术都可以成功生产交联膜。可以观察到，BDDE-交联的膜比 EDCI-交联的膜表现得更膨胀，这表明 EDCI-交联的膜比 EDCI-交联的膜具有更多的交联，通过示差扫描量热法(DSC)检测也证实了这一评价。根据 FTIR 检测，在透明质酸膜中基本上没有交联剂残留。

由于注意到 BDDE 交联的膜具有大量膨胀，因此增加交联密度。于是在溶液中，每毫克透明质酸用 1、2 或 4 μ L 交联剂来制备样品。在 pH 5 或 pH 7 实施交联。在各种情况下，溶液交联过夜，并冻干产生海绵样泡沫。在每毫克透明质酸用 4 μ L BDDE 时生产的泡沫非常脆和轻，当置于水中时碎裂为粥状；而其它组合生产的泡沫都具有可接受的结构，并且在水中显

著膨胀。PH 和 BDDE 的量似乎都没有使平衡水分(93%至 98%)或结构产生差异,这可以通过 FTIR 来测定。

尝试了一些组合透明质酸和干燥羊膜的策略。首先,制备交联的透明质酸溶液,并将 1 mL 放置在置于防止膜移动和溶液泄漏的框架中的干燥羊膜切片上。空气干燥组合物,并注意到有良好的附着。然而,当置于水中时,羊膜和透明质酸相互分离。

在第二个策略中,将 1 mL 透明质酸溶液置于羊膜上,并冻干组合物。在干燥后,将组合物浸泡在溶于 80:20 EtOH:水的 EDCI 溶液中。然而,当重复冻干时,HA 会从羊膜上脱落。当用空气干燥代替第二次冻干时,在羊膜和透明质酸之间形成了紧密的结合。当置于水中时,透明质酸膨胀而不会与膜分离。

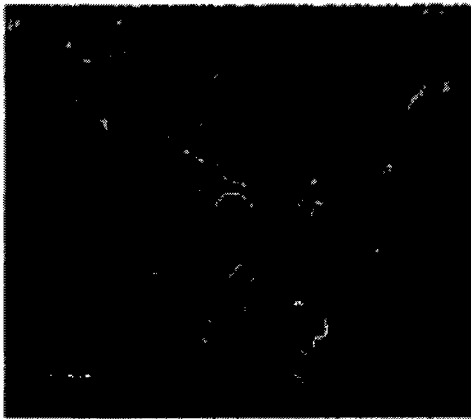
包含透明质酸的胶原生物纤维可以如本文中的描述用于培养干细胞,例如胎盘干细胞,再例如 CD34⁺胎盘干细胞。

等同方案:

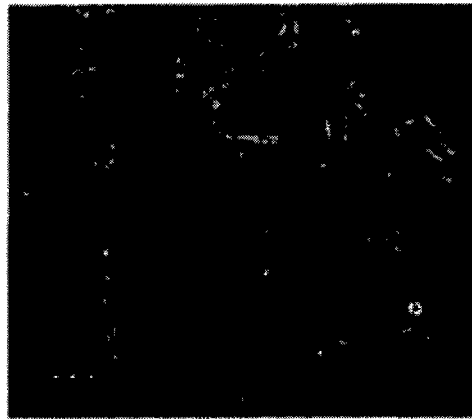
本发明不限于本文所述的特定实施方案的范围。实际上,根据前述说明书和所附图,除了所述过的变化外,本发明的各种变化对本领域技术人员都将是显而易见的。此类变化都意在落入所附权利要求的保护范围内。

本文中引用的各种出版物、专利和专利申请,其公开内容都通过引用全文纳入到本文中。

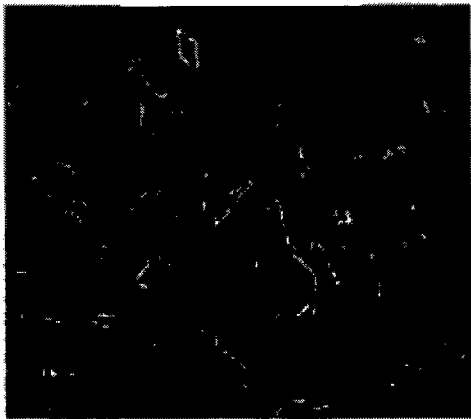
纤粘连蛋白



胶原



玻璃



羊膜

