

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680008580.2

[51] Int. Cl.

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

[43] 公开日 2008年3月12日

[11] 公开号 CN 101142310A

[22] 申请日 2006.1.26

[21] 申请号 200680008580.2

[30] 优先权

[32] 2005.1.27 [33] US [31] 60/647,588

[86] 国际申请 PCT/US2006/002961 2006.1.26

[87] 国际公布 WO2006/081435 英 2006.8.3

[85] 进入国家阶段日期 2007.9.17

[71] 申请人 雷格内泰克公司

地址 美国得克萨斯州

[72] 发明人 唐尼·拉德

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 刘晓东 顾晋伟

权利要求书 5 页 说明书 29 页 附图 5 页

[54] 发明名称

提供容易获得的源于脐带血的细胞材料的方法及其组合物

[57] 摘要

本发明涉及哺乳动物脐带血干细胞优选 CD34 +/CD38 - 细胞的 TVEMF 扩增, 也涉及来源于 TVEMF 扩增细胞的组合物, 还涉及用所述组合物治疗疾病或修复组织的方法。本文讨论了本发明所述组合物的多种益处和优点。

1. 来自哺乳动物的脐带血干细胞，
其中所述脐带血干细胞每单位体积的数目是天然存在的脐带血的至少7倍；和
其中所述脐带血干细胞具有与天然存在的脐带血干细胞基本相同的三维几何结构和细胞-细胞支持及细胞-细胞几何结构。
2. 包含权利要求1的脐带血干细胞以及可接受载体的组合物。
3. 权利要求2的组合物，其中所述可接受载体是以下至少一种：血浆、血液、白蛋白、细胞培养基、生长因子、铜螯合剂、激素、缓冲剂和低温保存剂。
4. 权利要求3的组合物，其中所述生长因子是G-CSF。
5. 权利要求2的组合物，其中所述组合物处于足以低温保存所述脐带血干细胞的温度。
6. 根据权利要求2的组合物，其中低温保存剂以足以低温保存所述细胞的量存在，并且其中所述组合物处于约-120°C到约-196°C的温度。
7. 根据权利要求6的组合物，其中所述温度是约-130°C到约-150°C。
8. 根据权利要求6的组合物，还包含药用可接受载体。
9. 根据权利要求3的组合物，其中所述组合物包含选自下组的低温保存剂：60到80%氨基酸葡萄糖溶液中的20到40%二甲基亚砷溶液；15到25%的羟乙基淀粉溶液；4到6%的甘油、3到5%葡萄糖和6到10%葡聚糖T10；15到25%聚乙二醇；和75到85%氨基酸葡萄糖溶液。
10. 权利要求2的组合物，其中所述组合物不含有毒物质。
11. 来自哺乳动物的脐带血干细胞，其中所述脐带血干细胞是TVEMF扩增的。
12. 权利要求11的TVEMF扩增的脐带血干细胞，其中单位体积中TVEMF扩增的脐带血干细胞的数量至少是TVEMF扩增的脐带血干细胞所来源的脐带血中每单位体积的干细胞数量的2倍。
13. 权利要求12的TVEMF扩增的脐带血干细胞，其中TVEMF扩

增的脐带血干细胞每单位体积的数量是至少 7 倍。

14. 包含权利要求 13 的脐带血干细胞和可接受载体的组合物。

15. 包含权利要求 13 的 TVEMF 扩增脐带血干细胞的组合物, 其中所述组合物还包含下组中至少一种: 血浆、血液、白蛋白、细胞培养基、生长因子、铜螯合剂、激素、缓冲剂和低温保存剂。

16. 权利要求 15 的组合物, 其中所述生长因子是 G-CSF。

17. 根据权利要求 14 的组合物, 其中所述组合物还包含选自下组的低温保存剂: 60 到 80% 氨基酸葡萄糖溶液中的 20 到 40% 二甲基亚砷溶液; 15 到 25% 的羟乙基淀粉溶液; 4 到 6% 的甘油、3 到 5% 葡萄糖和 6 到 10% 葡聚糖 T10; 15 到 25% 聚乙二醇; 和 75 到 85% 氨基酸葡萄糖溶液。

18. 权利要求 14 的组合物, 其中所述组合物处于足以低温保存所述脐带血干细胞的温度。

19. 根据权利要求 14 的组合物, 其中存在低温保存剂, 并且其中所述组合物处于约-120°C 到约-196°C 的温度。

20. 根据权利要求 14 的组合物, 其中所述温度是从约-130°C 到约-150°C。

21. 权利要求 14 的组合物, 其中所述组合物不含有毒物质。

22. 制备脐带血干细胞组合物的方法, 其包括以下步骤:

- a. 将脐带血混合物置于 TVEMF 生物反应器的培养腔室中; 和
- b. 使脐带血混合物受到 TVEMF, 并对脐带血干细胞进行

TVEMF 扩增以制备脐带血干细胞组合物。

23. 根据权利要求 22 的方法, 其中所述 TVEMF 是约 0.05 到约 6.0 高斯。

24. 根据权利要求 22 的方法, 其中所述 TVEMF 扩增持续进行直到 TVEMF 扩增的脐带血干细胞每单位体积的数量是放置于 TVEMF 生物反应器中脐带血干细胞每单位体积的数量的 7 倍以上。

25. 根据权利要求 22 的方法, 其还包括在将脐带血混合物置于 TVEMF 生物反应器中之前从哺乳动物收集脐带血。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述哺乳动物是人。
27. 根据权利要求 22 的方法，其还包括在将脐带血加到脐带血混合物中之前，从脐带血保存设备中收集解冻的低温保存脐带血。
28. 权利要求 22 的方法，其还包括在 TVEMF 扩增之前从脐带血混合物中除去有毒物质的步骤。
29. 权利要求 22 的方法，其中 TVEMF 生物反应器具有集成的 TVEMF 源。
30. 权利要求 22 的方法，其中 TVEMF 生物反应器具有相邻的 TVEMF 源。
31. 权利要求 22 的方法，其中脐带血混合物包含与其它脐带血组分分离的 CD34+/CD38-脐带血干细胞。
32. 权利要求 22 的方法，其中脐带血混合物包含与其它脐带血组分分离的血沉棕黄层。
33. 权利要求 22 的方法，其中脐带血混合物包含不含红细胞的脐带血。
34. 权利要求 22 的方法，其还包括以下步骤：将脐带血干细胞组合物的 TVEMF 扩增细胞转移到具有一定温度的低温容器，和以受控速率将低温容器的温度降低到约-120°C至约-196°C的温度。
35. 权利要求 34 的方法，其还包括以下步骤：在以受控速率降低温度到约-120°C至约-196°C之前，从脐带血干细胞组合物中除去有毒物质。
36. 权利要求 34 的方法，其还包括，在降温步骤之后，在一段时间内保持低温容器的温度在约-120°C到约-196°C的步骤。
37. 权利要求 36 的方法，其中所述一段时间为至少一年。
38. 权利要求 36 的方法，其还包括，在所述降温和保持温度之后，以受控速率将低温容器升温至适于将脐带血干细胞组合物导入哺乳动物的温度的步骤。
39. 权利要求 38 的方法，其中有毒物质已经从所述升温的脐带血干细胞组合物中被除去。

40. 权利要求 34 的方法, 其还包括将低温保存剂加到脐带血干细胞组合物的 TVEMF 扩增细胞中的步骤。
41. 通过根据权利要求 22 的方法制备的包含脐带血干细胞和可接受载体的组合物。
42. 修复哺乳动物组织的方法, 其包括以下步骤: 将治疗有效量的包含权利要求 1 的脐带血干细胞和药用可接受载体的组合物施加给哺乳动物。
43. 修复哺乳动物组织的方法, 其包括以下步骤: 将治疗有效量的包含权利要求 11 的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞和药用可接受载体的组合物施加给哺乳动物。
44. 权利要求 43 的方法, 其中待修复组织是人体组织。
45. 权利要求 44 的方法, 其中待修复组织是生命关键器官。
46. 权利要求 44 的方法, 其中待修复组织是选自下组中的至少一种: 肝脏组织、心脏组织、造血组织、血管、皮肤组织、肌肉组织、肠组织、胰脏组织、中枢神经系统细胞、骨、软骨组织、结缔组织、肺组织、脾组织和脑组织。
47. 权利要求 43 的方法, 其中待施用给哺乳动物的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞的数量是至少 20 ml 含 10^7 到 10^9 个干细胞/ml 的组合物。
48. 治疗哺乳动物疾病的方法, 其包括将治疗有效量的包含权利要求 1 的脐带血干细胞和药用可接受载体的组合物施加给哺乳动物的步骤。
49. 治疗哺乳动物疾病的方法, 其包括将治疗有效量的包含权利要求 11 的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞和药用可接受载体的组合物施加给哺乳动物的步骤。
50. 权利要求 49 的方法, 其中待修复组织是人体组织。
51. 权利要求 50 的方法, 其中待修复组织是生命关键器官。
52. 权利要求 50 的方法, 其中待修复组织是选自下组中的至少一种: 肝脏组织、心脏组织、造血组织、血管、皮肤组织、肌肉组织、肠组织、胰脏组织、中枢神经系统细胞、骨、软骨组织、结缔组织、肺组织、脾组织和脑组织。

53. 权利要求 49 的方法, 其中待施用给哺乳动物的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞的数量是至少 20 ml 含 10^7 到 10^9 个干细胞/ml 的组合物。

提供容易获得的源于脐带血的细胞材料的方法及其组合物

技术领域

本发明涉及在 TVEMF-生物反应器中制备的脐带血干细胞、以及这种制备方法、其组合物和使用所述细胞或组合物治疗哺乳动物的方法。

技术背景

人体组织的再生长期以来是医学界的理想。迄今，人体组织的修复很大程度上通过移植来自供体的相似组织已经实现。基本上自从双胞胎 Herrick 中一个向另一个的肾脏移植，以及后来南非医生 Christian Barnard 在 1967 年 12 月 3 日完成的从 Denise Darval 向 Louis Washkansky 的全世界著名的心脏移植，组织移植成为了用于延长晚期患者寿命的广泛接受的方法。

人体组织移植从它的最初应用开始就遇到了重大问题，主要是由于身体的自然免疫系统而产生的组织排斥。这通常造成应用组织移植时生命的延长非常有限（Washkansky 手术后只活了 18 天）。

为了克服身体免疫系统的问题，很快开发出了许多抗排斥药（比如 Imuran、环孢霉素）以抑制免疫系统并因此延长组织在排斥之前的应用。但是，排斥问题仍然产生对组织移植替代方法的需求。

骨髓移植也有应用，并且仍是治疗一些疾病比如白血病的所选择疗法，以修复某些组织比如骨髓，但是骨髓移植也存在问题。它需要供体匹配（不到 50% 能找到）；它会引起疼痛，且昂贵并具有风险。因此，骨髓移植的替代方法是非常希望得到的。组织干细胞的移植比如在美国专利 No. 6,129,911 中的肝脏干细胞移植也有类似的限制，使得它们的广泛应用存在疑问。

近年来，研究人员试验了应用多能性胚胎干细胞作为组织移植的替代手段。应用胚胎干细胞背后的理论是它们在理论上能够用于再生身体内几乎任何组织。然而，胚胎干细胞在组织再生上的应用也遇到了问题。在这些问题中较为严重的有，所移植的胚胎干细胞的可控性受到限制，它们有时生长成肿瘤，并且可用于研究的人胚

胎干细胞被患者的免疫系统所排斥 (Nature, June 17, 2002: Pearson, "Stem Cell Hopes Double", news@nature.com, published online: 21 June 2002)。另外, 胚胎干细胞的广泛应用受到伦理、道德、和政治因素的阻碍, 使得它的广泛应用仍然是存在疑问的。

脐带血是近年来一些研究领域的焦点。干细胞的多能性特点是首先在从骨髓中找到的成体干细胞中发现的。Verfaillie, C.M. et al., Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 417, published online 20 June; doi: 10.1038/nature00900, (2002) cited by Pearson, H. Stem cell hopes double. news@nature.com, published online: 21 June 2002; doi: 10.1038/news020617-11. 多能性 CD34+干细胞和寡能性淋巴类祖细胞 (oligopotent lymphoid progenitor cells) 已经在脐带血中发现, 并且表现出分化为多种细胞类型比如淋巴类自然杀伤细胞。Perez S.A. et al., A novel myeloid-like NK cell progenitor in human umbilical cord blood. *Blood* 101(9):3444-50 (May 1, 2003)。另外, 已发现 B 细胞祖细胞不只存在于骨髓, 也存在于脐带血。Sanz E. et al., Human cord blood CD34+Pax-5+ B-cell progenitors: single-cell analyses of their gene expression profiles. *Blood* 101(9):4324-30 (May 1, 2003)。

Boyse et al., 美国专利 No. 6,569,427 B1 公开了低温保存以及低温保存的胎儿和新生儿血液可用于治疗或预防多种疾病与病症比如贫血、恶性肿瘤、自身免疫疾病、和多种免疫功能障碍及缺陷。Boyse 还公开了造血重建在使用异源基因序列的基因疗法中的应用。但是, Boyse 的公开由于缺乏用于治疗的细胞扩增而停止。CorCell, 一个脐带血库, 提供了对脐带血干细胞的扩增、低温保存、和移植的统计。"Expansion of Umbilical Cord Blood Stem Cells", Information Sheet Umbilical Cord Blood, CorCell, Inc. (2003)。一种扩增方法公开了应用一种生物反应器, 该生物反应器带有位于中央的基于胶原蛋白的基质。Research Center Julich: Blood Stem Cells from the Bioreactor. Press release May 17, 2001。另外, 扩增前后冷冻脐带血细胞已显示出对干细胞的扩增能力没有影响。Lazzari, L. et al., Evaluation of the effect of cryopreservation on ex vivo expansion of hematopoietic progenitors from cord blood. *Bone Marrow Trans.*

28:693-698(2001)。

已发现脐带血提供相比于骨髓更好的造血重建。Frassoni F. et al., Cord blood transplantation provides better reconstitution of hematopoietic reservoir as compared to bone marrow transplantation. *Blood* (April 3, 2003)。也见 First Unrelated Stem Cell Transplant Performed in Atlanta December 12, 1998-1 year update. Bone Marrow and Cord Blood Stem Cell Transplant, The Sickle Cell Information Center (1999)。

研究继续致力于阐明有关干细胞扩增的分子机制。例如, CorCell 的文章公开了被命名为 Delta-1 的信号分子有助于脐带血干细胞的发育。Ohishi K. et al., Delta-1 enhances marrow and thymus repopulating ability of human CD34+/CD38- cord blood cells. *Clin. Invest.* 110:1165-1174 (2002)。

在本申请中, 术语“脐带血细胞”意味着从胎儿或新生儿的脐带和/或胎盘而来的血细胞。

尽管脐带血细胞被定义为成体或体细胞干细胞, 一些因素使得脐带血细胞尤其是脐带血干细胞与众不同。

首先, 脐带血是原始的 (primitive)。脐带血干细胞是年轻的; 它们可以比更老的细胞具有更多的可塑性, 就意味着它们可产生更多类型的特化细胞。它们也更有可能是较为健康的细胞, 这是因为它们有更少的机会被可能改变 DNA 的破坏性环境毒素所影响。另外, 因为它们年轻, 脐带血干细胞能更好地整合进入受体患者, 并且较小可能引起移植物抗宿主病 (GvHD) 或者细胞排斥。也是由于它们年轻, 可能认为脐带血干细胞与成年外周血干细胞相比稳定性稍低, 比如因为脐带血干细胞仍然相对较新且处于非常受保护的环境。脐带血干细胞因此相比于成体干细胞可能更容易受损伤, 比如由于低温保存而损伤。

其次, 脐带血富含干细胞。脐带血包含白细胞 (包括单个核细胞; 对于本发明, 单个核细胞指只具有一个细胞核的细胞) 和红细胞。典型地, 大约 1-2% 的脐带血单个核细胞是干细胞。这使得脐带血成为干细胞的最丰富来源之一。从剖宫产中收集的脐带血典型地

甚至比阴道生产后立即收集的脐带血具有更丰富一些的干细胞。在脐带血中分离干细胞相比于其它组织更容易。而成体干细胞可在许多成熟组织中找到，它们的量较少且难以定位。

第三，也是最后，脐带血是可获得的干细胞来源。从身体组织移植成体干细胞比如骨髓，不容易获得。脐带血库提供了容易获得的干细胞来源。在出生后立即从典型人类胎儿中收集脐带血，一般产生 50 到 100 ml 的脐带血。

脐带，其含有脐带血，是连接胎儿和母亲胎盘的带，其提供营养和移去废物。脐带是大约 22 in. (56 cm) 长的带状结构，从胎儿的腹壁延伸到母亲胎盘。

脐带的主要功能是将营养和氧气从胎盘运送给胎儿，并且将废物从胎儿返回到胎盘。基本上，脐带是一端由胎儿的膜、另一端终止于胎盘而构成的带状结构，并且与所述两端形成整体。带内部是粘液样胶状物，其中有一条携带含氧血液通向胎儿的静脉，以及两条携带脱氧血液离开胎儿的动脉。

血液从胎儿出发沿脐带被运送入胎盘。在胎盘内，脐带血被运送至与母体血液非常接近，使得氧气、营养、和抗体从母亲血液扩散进入脐带血。胎儿的废物通过两条脱氧动脉进入母亲血液。富含营养、氧气、以及除去废物的脐带血然后通过静脉被运送回胎儿，该静脉运送含氧血液穿过脐带。

出生以后，脐带被夹住并剪断。在脐带剪掉之后仍连接在婴儿身上的残余部分最终萎缩并脱落，留下的伤痕被称为脐。

由于脐带血尤其富含干细胞，一些父母选择在专门的脐带血库中保存脐带血。其中所含的脐带血干细胞在未来需要时可以替代骨髓用于移植。研究表明，在抵抗白血病和其它癌症中，即使与脐带血供体无亲缘关系（遗传上不匹配）的人也可从脐带血移植中受益，而不引起免疫应答导致排斥脐带血细胞。

有两种典型途径收集脐带血；血袋收集和注射器收集。血袋收集涉及由护理人员将针插入脐静脉，在重力作用下，将血液排入袋中。一旦血液停止流动，由护理人员将袋密封并标记。此方法通常在胎盘娩出之前进行。

注射器收集与血袋收集类似，区别在于脐带血被抽入含有抗凝剂（防止血液凝集的物质）的注射器。血液存储在注射器中而不是血袋中。此方法可在胎盘娩出之前或之后进行。这被认为是比血袋收集更可靠的采血方法。相比于使用血袋收集有可能实现的，它也允许收集更多血液。无论采用哪种方法，或者采用另一种收集脐带血的方法，收集过程可在短至五分钟甚至更少的时间内完成。优选地，在出生后 10 到 15 分钟内收集脐带血。相比于此，等待更长时间会导致收集到的脐带血更少，并且因此收集到的脐带血干细胞更少。

对于脐带血库、或存储库，一旦脐带血到达存储设施，所述脐带血接受检测以确定它不带有任何传染病或遗传病，比如肝炎、HIV/AIDS、白血病、或免疫疾病。如果脐带血有任何这些问题，则或者可认为其不适宜存储，或者在某些情况下，所述血液可以在标注相关风险的情况下仍然保存。如果未来需要所述血液，父母可评价对脐带血干细胞的需要是否超过了脐带血所携带的相关风险。

将保存的脐带血在保存之前典型地经过一系列处理。首先，脐带血被分离成几部分；白细胞、红细胞、和血浆。这或者由离心机（旋转装有血液的容器直至血液发生分离的装置）完成，或者经由沉降（注入沉淀物到血液容器中使得血液发生分离的过程）完成。其次，一旦脐带血发生分离，红细胞（RBC）在底部，白细胞（WBC）在中间，血浆在顶部，则将白细胞移出用于保存。中间层，也称为“血沉棕黄层”，包含感兴趣的脐带血干细胞；血液的其它部分是不需要的。对于一些库来说，处理过程就到此程度。但是，其它库将通过将单个核细胞（在此情况下为白细胞的一个亚类）从 WBC 中移出继续处理血沉棕黄层。尽管不是所有人都同意这一方法，但是这种方法保存细胞时需要保存量较少并且需要低温液氮较少。

优选地从脐带血样品中移去红细胞。虽然人们可能有相同的 HLA 型（对于干细胞移植来说是需要的），但是它们可能不具有相同的血型。通过移去 RBC，可将干细胞移植的有害反应降至最低。因此，通过除去 RBC，干细胞样品有更大的可能性适应于更多的人。当 RBC 解冻时，它们也可能破裂，释放出游离的血红蛋白。这种类型的血红蛋白可严重影响接受移植的人的肾脏。另外，当 RBC 破裂

时，干细胞的存活力降低。

在冷冻所述细胞之前，它们可被扩增（其为数量上的增加，而不是大小）。

一旦 RBC 被除去，所述细胞开始被保藏并冷冻以备长期保存。但是，这必须缓慢和仔细地进行，以免损伤干细胞。在冷冻所述血细胞之前，它们首先在溶液中混匀，以帮助它们防止冷冻过程中的损伤。该溶液被称为低温保存剂、低温保存溶剂或低温保护剂。一旦扩增细胞处于低温保存剂中，它们被缓慢冷冻以保护细胞免受损伤。

一旦冷冻（通常到达约 -196°C ），将所述细胞转移到永久性保存冷冻装置。在此冷冻装置中期间，它们将保持冷冻在液态或蒸气态氮中。通常有不同类型的冷冻装置用于保藏脐带血干细胞。一种类型是“BioArchive”冷冻装置。此机器不但冷冻血液，也对其进行编目，并管理高达 3626 个血袋。它具有机械臂，在需要时将取出特定血液样品。这保证了没有其它样品受到干扰或者暴露于较高温度。目前商业可用的其它类型包括但不限于，Sanyo Model MDF-1155ATN-152C 和 Model MDF-2136 ATN-135C，和 Princeton CryoTech TEC 2000。

脐带血干细胞的扩增可能需要数天。在立即提供脐带血干细胞很重要的情况下，比如生死关头或者外伤的情况，尤其是如果需要在重新导入细胞之前完成研究，可能无法等待数天再扩增脐带血干细胞。因此，在预期每分钟治疗延迟都可能意味着生死区别的紧急情况下，特别期望有刚出生就可用的这种扩增的脐带血干细胞。

因此，需要提供不基于器官移植、骨髓移植、或者胚胎干细胞的修复人体组织的方法和程序，同时还需要提供不太可能引起免疫应答的已扩增脐带血干细胞，以在数小时而不是数天内应用。

发明概述

本发明部分涉及来自哺乳动物优选人的脐带血干细胞，其中所述脐带血干细胞是 TVEMF 扩增的。本发明也涉及来自哺乳动物优选人的脐带血干细胞，其中所述脐带血干细胞在单位体积的数量上至少是天然存在的脐带血的 7 倍；并且其中脐带血干细胞具有与天

然存在的脐带血干细胞基本相同的三维结构和细胞-细胞支持 (cell-to-cell support) 以及细胞-细胞结构 (cell-to-cell geometry)。此种细胞优选由此处所述的 TVEMF 扩增程序来制备。本发明也涉及包含这些细胞的组合物, 其按照需要添加其它成分, 包括药用可接受的载体、低温保存剂、和细胞培养基。

本发明也涉及制备脐带血干细胞和脐带血干细胞组合物的方法, 这是通过以下步骤: 将脐带血混合物置于 TVEMF 生物反应器的培养室中, 对脐带血混合物施加 TVEMF, 以及 TVEMF 扩增脐带血干细胞以制备脐带血干细胞组合物。优选地, 施加在细胞上的 TVEMF 为约 0.05 到约 6.0 高斯。

本发明也涉及使用本发明的脐带血干细胞和脐带血干细胞组合物治疗哺乳动物的方法。此治疗可用于组织修复和再生、以治疗疾病, 或者本申请讨论的任何其它用途。本发明也包括用于治疗此处所定义任何疾病、或者用于修复组织或器官的组合物和方法, 其中包含本发明的脐带血干细胞组合物。本发明还包括本发明的组合物在制备用于治疗本文所讨论任何疾病、或者用于本文所述组织修复或再生的药物中的用途。

附图简述

附图中,

图 1 以示意图方式举例说明生物反应器的培养载体流动回路的一个优选实施方案;

图 2 是本发明的 TVEMF 生物反应器的一个优选实施方案的侧视图;

图 3 是图 2 的 TVEMF 生物反应器的一个优选实施方案的侧面投影图;

图 4 是 TVEMF 生物反应器的一个优选实施方案的俯视截面图;

图 5 是一种 TVEMF 生物反应器的俯视截面图;

图 6 是随时间变化电磁力装置的侧视图, 该装置能容纳生物反应器并向生物反应器提供随时间变化的电磁力;

图 7 是图 6 所示装置的前视图; 以及

图 8 是图 6 所示装置的前视图, 进一步显示其中的生物反应器。

附图详述

用最简单的话来说，旋转式 TVEMF 生物反应器包含细胞培养腔室和随时间变化的电磁力源。在运行中，脐带血混合物被置于细胞培养腔室中。细胞培养腔室旋转一段时间，在此期间，随时间变化电磁力源在腔室内产生随时间变化的电磁力。在时间结束时，将扩增的脐带血混合物从腔室移出。在较复杂的 TVEMF 生物反应器系统中，随时间变化电磁力源可以集成到 TVEMF 生物反应器，如图 2-5 举例所示，但是也可与生物反应器相邻，如在图 6-8 中。另外，向细胞提供支持的流体载体可以周期性更新和移出。在此处描述优选的 TVEMF 生物反应器。

现在参看图 1，其举例说明在一个完整的用于培养哺乳动物细胞的生物反应器培养系统中培养载体流动回路 1 的一个优选实施方案，所述生物反应器培养系统带有细胞培养腔室 19，优选旋转式细胞培养腔室，充氧器 21，辅助培养载体定向流动的装置，优选通过使用主泵 15，以及供应多支管 17，其选择性输入培养载体需求，比如但不限于，营养物 3、缓冲剂 5、新鲜培养基 7、细胞因子 9、生长因子 11、以及激素 13。在此优选实施方案中，主泵 15 提供新鲜流体载体到充氧器 21，流体载体在此被充入氧气并且通过细胞培养腔室 19。来自细胞培养腔室 19 的使用后流体载体中的废物被移去并传送到废物 18，剩下的细胞培养载体返回到多支管 17，在使用泵 15 通过充氧器 21 循环到细胞培养腔室 19 之前，必要时它在此接受新鲜补充。

在培养载体流动回路 1 中，培养载体通过腔室 19 中的活细胞培养物并且围绕如图 1 所示的培养载体流动回路 1。在此回路 1 中，根据化学传感器（未显示）进行调节，以维持细胞培养反应腔室 19 中的恒定条件。控制二氧化碳压力并导入酸或碱以校正 pH 值。氧气、氮气和二氧化碳溶解在气体交换系统（未显示）中，以支持细胞呼吸。闭合回路 1 添加氧气，并从循环气体容量中移去二氧化碳。尽管图 1 是可用于本发明的培养载体流动回路的一个优选实施方案，但是本发明并不限于此。可以手动或者自动或者通过其他控制手段向生物反应器输入培养载体需求比如但不限于氧气、营养物、缓冲剂、新鲜培养基、细胞因子、生长因子、和激素，比如可以类似于

废物和二氧化碳的控制和移除。

图 2 和 3 举例说明带有集成的随时间变化电磁力源的 TVEMF 生物反应器 10 的一个优选实施方案。图 4 是以优选方式用于本发明的一种旋转式 TVEMF 生物反应器 10 的横截面图。图 4 的 TVEMF 生物反应器 10 举例说明带有集成的随时间变化电磁力源。图 5 也举例说明带有集成的随时间变化电磁力源的 TVEMF 生物反应器的一个优选实施方案。图 6-8 显示带有相邻的随时间变化电磁力源的旋转式生物反应器。

现在转到图 2, 图 2 举例说明的是本发明的 TVEMF 生物反应器 10 的一个优选实施方案的侧视图。图 2 包含由基座 112 支撑的马达支架 111。马达 113 位于马达支架 111 内部, 且通过第一线 114 和第二线 115 连接至其内带有控制装置的控制盒 116, 由此通过转动控制钮 117 可对马达 113 的转速进行增量控制。马达支架 111 内部设置有马达 113, 使得马达轴 118 穿过支架 111 延伸, 且马达轴 118 是径向的, 使得轴 118 的中心与在径向腔室 119 位置的地球平面平行, 优选地用包括但不限于塑料的透明材料制成。

在此优选实施方案中, 径向腔室 119 连接到轴 118 使得腔室 119 围绕径向轴旋转, 而径向轴与地球平面平行。腔室 119 被线圈 120 所缠绕。线圈 120 的尺寸和缠绕圈数使得, 当优选为 0.1 mA 到 1000 mA 的方波电流供应在线圈 120 上时, 在腔室 119 内产生优选为 0.05 高斯到 6 高斯的随时间变化的电磁力。线圈 120 在轴 118 的末端通过线 123 和 124 连接至第一环 121 和第二环 122。然后, 环 121 和 122 与第一电磁传送线 125 和第二电磁传送线 128 相接触, 使得腔室 119 可以旋转同时电流恒定地供应到线圈 120 上。电磁发生装置 126 与线 125、128 相连接。通过旋转电磁发生装置钮 127 调节其输出, 从而使得电磁发生装置 126 提供方波到线 125、128 和线圈 120 上。

图 3 是可用于本发明中的图 2 所示 TVEMF 生物反应器 10 的侧面投影图。

现在转到图 4 中举例说明的带有培养腔室 230 的旋转式 TVEMF 生物反应器 10, 该腔室优选是透明的, 并且适于在其内含有脐带血混合物, 另外包含外部支架 220, 其包括第一 290 和第二 291 圆柱形横向末端帽构件, 该构件与第一 228 和第二 229 末端表面相对, 末

端表面设置成接受内部圆柱管状玻璃构件 293 和外部管状玻璃构件 294。提供合适的压力密封。在内部 293 与外部 294 管状构件之间是环形线加热器 296，其用于获得细胞生长的合适的培养温度。所述线加热器 296 也可用作随时间变化的电磁力装置，用以给培养腔室 230 提供随时间变化的电场，或者，如图 5 所述，独立的线圈 144 可用于提供随时间变化的电磁力。第一末端帽构件 290 和第二末端帽构件 291 具有内部弯曲表面，其与末端表面 228、229 相邻，以促进腔室 230 内的混合物流动更平滑。第一末端帽构件 290 和第二末端帽构件 291 分别具有第一中央流体传递轴颈构件 292 和第二中央流体传递轴颈构件 295，其分别旋转式接受在输入轴 223 和输出轴 225 上。每个传递轴颈构件 294、295 具有凸缘以承载在末端帽构件 290、291 中的凹陷沉孔中，并且其上附着第一锁紧垫圈环 297 和第二锁紧垫圈环 298 以防止相对于轴 223、225 的径向运动。每个轴颈构件 294、295 具有中间环形凹陷，其与径向扩展的、沿圆周布置的通道相连。轴颈构件 292、295 上的每个环形凹陷通过末端帽构件 290 和 291 中的第一放射状设置通道 278 和第二放射状设置通道 279 分别与第一输入偶合件 203 和第二输入偶合件 204 相偶合。放射状通道 278 或 279 中的载体流动通过轴颈构件 294 或 295 中的第一环形凹陷和径向通道，以允许载体通过轴颈构件 292、295 进入到轴颈 292、295 的每个末端，在此其进入围绕轴 223、225。

附着在末端帽构件 290 和 291 的是包含滚珠轴承的第一管状轴承支架 205 和第二管状轴承支架 206，该滚珠轴承相对地支撑输入轴 223 和输出轴 225 上的外部支架 220。第一轴承支架 205 具有附着的第一链轮 210，其用于为外部支架 220 提供旋转驱动，其旋转方向围绕输入轴 223 和输出轴 225 以及径向轴 221。第一轴承支架 205 和第二轴承支架 206 也具备从线加热器 296 和任何其它传感器向外供电的功能。

内部滤器装置 235 包括内部管状组件 215 和外部管状组件 216，其沿它们的长度方向具有孔或洞，该装置有带孔的第一 217 和第二 218 内部滤器装置末端帽组件。内部管状组件 215 构建成两部分，其两部分带有互锁的位于中央的偶合部分，其每一部分分别附着于末端帽 217 或 218。外部管状组件 216 设置在第一 217 和第二内部滤器装置末端帽组件之间。

所述末端帽组件 217、218 分别被旋转式支持在输入轴 223 和输出轴 225 之上。内部组件 215 通过钉和中央定位的 (interfitting) 凹槽 219 旋转式附着至输出轴 225。十微米织法的聚酯布 224 布置在外部组件 216 的外表面之上, 并且附着在任一末端的 O 环。因为内部组件 215 被偶合钉附着在输出驱动轴 225 上的槽, 所以输出驱动轴 225 可旋转内部组件 215。所述内部组件 215 与第一 217 和第二 218 末端帽相偶合, 所述帽支持外部组件 216。输出轴 225 延伸通过第一静止支架 240 中的轴承, 并与第一链轮 241 相偶合。如举例所示, 输出轴 225 具有管状孔 222, 其从位于密封之间的第一静止支架 240 中的第一端口或通道 289 延伸至内部组件 215, 使得流体载体的流动可从内部组件 215 中通过静止支架 240 而退出。

内部组件 235 的第一 217 和第二 218 末端帽与外部支架 220 中的轴颈 292、295 之间是叶片组件 50a 和 50b 的第一 227 和第二 226 轂。在输入轴 223 上的第二轂 226 通过钉 231 偶合至输入轴 223, 使得第二轂 226 随输入轴 223 旋转。每个轂 227、226 具有轴向延伸的通道, 用于传送载体使之穿过轂。

输入轴 223 延伸穿过第二静止支架 260 中的轴承, 该支架用于旋转式支持输入轴 223。第二径向通道 267 延伸穿过输入轴 223 到保持垫圈和环的过渡位置, 所述垫圈和环设置在面板与支架 260 之间的第二环状凹陷 232 中。第二末端帽组件 291 中的第三放射状通道 272 允许凹陷中流体载体从第二末端帽组件 291 中退出。尽管没有显示, 第三通道 272 连接穿过管线和 Y 型至通道 278 和 279 的每个。

图 4 中显示样品端口, 其中沿第一轴延伸的第一钻孔 237 与腔室 230 的角 233 相交, 形成受限的开口 234。该钻孔 237 在一端带有沉孔和带螺纹的环, 以螺纹性接受圆柱形阀组件 236。阀组件 236 具有互补成形的顶端, 以接合开口 234 并稍微突出到腔室 230 的内部。阀组件 236 上的 O 环 243 提供密封。沿第二轴的第二钻孔 244 与第一钻孔 237 相交在 O 环 243 与开口 234 之间的位置。弹性体或塑料阻塞物 245 封闭了第二钻孔 244, 并且可用皮下注射器进入用以取样品。为了取样品, 阀组件 236 向后移, 以使得开口 234 和钻孔 244 可以进入。然后可使用注射器提取样品, 开口 234 可被重新封闭。没有外部污染到达 TVEMF 生物反应器 10 的内部。

在运行中，载体输入到第二端口或通道 266，而后到轴通道，由此通过第三放射状通道 272 到达第一放射状设置的通道 278 和第二放射状设置的通道 279。当载体通过轴颈 292、294 中的径向通道进入腔室 230 时，载体撞击在毂 227、226 的末端表面 228、229 上，并放射状以及轴向分散而通过毂 227、226 中的通道。通过毂 227、226 的载体撞击在末端帽组件 217、218 上，并且放射状分散开来。进入流体载体的液流因此放射状向外离开径向轴 221，并以螺旋管形式流动，通过聚酯布 224 以及滤器装置 235 中的开口从每个末端退出，以经过通道 266 和 289 退出。通过控制外部支架 220、腔室 230 和内部滤器装置 235 的旋转速度和旋转方向，可获得任何期望类型的载体动作。然而，重要的是这种事实，可以在连续供应新鲜流体载体的同时获得回转器操作。

如果不使用集成式环形线加热器 296 施加随时间变化的电磁力，可通过另一个优选的随时间变化电磁力源进行施加。例如，图 6-8 举例说明了随时间变化电磁力设备 140，其提供电磁力给生物反应器中的细胞培养物，所述生物反应器不带有集成式随时间变化电磁力、而是带有相邻的随时间变化电磁力装置。具体地，图 6 是随时间变化电磁力装置 140 的一个优选实施方案。图 6 是装置 140 的侧面投影图，其中包含支持基座 145，支持在基座 145 之上的圆柱体线圈支持物 146，其中线圈 147 围绕支持物 146 缠绕。图 7 是图 6 中举例说明的随时间变化电磁力装置 140 的前投影图。图 8 是随时间变化电磁力装置 140 的前投影图，其举例说明在运行中整个生物反应器 148 放入圆柱体线圈支持物 146 中，该支持物 146 由支持基座 145 所支持并由线圈 147 所缠绕。因为随时间变化电磁力装置 140 邻近生物反应器 148，随时间变化电磁力装置 140 可重复使用。另外，因为随时间变化电磁力装置 140 邻近生物反应器 148，装置 140 可用于在所有类型的生物反应器中产生电磁力，优选旋转型。

运行中，在 TVEMF 扩增期间，本发明的 TVEMF 生物反应器 10 在细胞培养腔室中包含脐带血混合物。在 TVEMF 扩增期间，可以评估并调节含有脐带血混合物的腔室的旋转速度，以使得脐带血混合物基本上保持在径向轴处或者在径向轴周围。确保提高转速以防止与壁撞击。例如，如果脐带血混合物中的脐带血干细胞在旋转循环的向下侧时过分向内向下落以及在旋转循环的向上侧时过分向

外并且不充分向上，则优选提高转速。最优情况下，建议用户优选地选择旋转速率以使得壁碰撞频率和强度尽可能小，从而维持脐带血干细胞的三维几何结构以及它们的细胞-细胞支持和细胞-细胞几何结构。本发明优选的速率是从5到120 RPM，更优选从10到30 RPM。

脐带血混合物可优选地通过透明培养腔室优选地在视觉上评价，并手动调节。脐带血混合物的评价和调节也可通过传感器（例如，激光）自动进行，该传感器监测脐带血干细胞在 TVEMF 生物反应器 10 中的位置。指示过多细胞运动的传感器读数将自动引起相应调节转速的机制。

另外，在运行中，本发明预期电磁发生装置被打开并调节，使得方波输出在含有脐带血混合物的腔室中产生期望的电磁场，优选在 0.05 高斯到 6 高斯的范围。

按照本发明所预期，在不偏离本发明范围的情况下，可对受到随时间变化电磁力的旋转式生物反应器作出多种改变，因此上文描述中所含的所有内容应该被理解为举例说明，而不是限制。

本发明优选实施方案的详细说明

下文的定义用于辅助描述和理解本发明内容中所定义的术语。这些定义并不意味将这些术语限制在少于通过本申请所描述的内容。另外，关于 TVEMF 包括几种定义，在此方面的所有定义应被理解为互相补充，而不应理解为互相抵触。

按照贯穿本申请的应用，术语“成体干细胞”指多能性细胞，其是未分化的且能产生多种分化细胞。在本发明中，成体干细胞优选 CD34+/CD38-。

按照贯穿本申请的应用，术语“脐带血”指来自胎儿或婴儿的脐带和/或胎盘的血液。脐带血是已知最丰富的干细胞来源之一。术语“脐带 (cord)”不以任何方式将本发明的术语“脐带血”限制在来自脐带的血；按照贯穿本申请的解释，胎儿或婴儿胎盘的血液与脐带的血液是混合的。为了本发明的目的，没有理由区分位于相同循环回路中不同部分的血液。

按照贯穿本申请的应用，术语“脐带血细胞”指来自脐带血的细

胞。能够复制的脐带血细胞可在 TVEMF 生物反应器中经历 TVEMF 扩增，并且可存在于本发明的组合物中。

按照贯穿本申请的应用，术语“脐带血干细胞”指来自脐带血的成体干细胞。脐带血干细胞是成体干细胞，也称为体细胞干细胞 (somatic stem cell)，而不是直接来自胚胎的胚胎干细胞。优选地，本发明的脐带血干细胞是 CD34+/CD38-细胞。

按照贯穿本申请的应用，术语“脐带血干细胞组合物”指本发明的脐带血细胞，或者每单位体积的数量至少是天然存在的脐带血源的 7 倍并且与天然存在的脐带血细胞具有相同或类似的三维几何结构和细胞-细胞几何结构以及细胞-细胞支持，或者经历 TVEMF 扩增并维持上文提到的几何结构和支持。伴随脐带血干细胞的是某种载体，或者是药用可接受的载体、血浆、血液、白蛋白、细胞培养基、生长因子、铜螯合剂、激素、缓冲剂、低温保存剂、或者一些其它物质。参考天然存在的脐带血，优选比较本发明的脐带血干细胞与它们的原始脐带血来源。但是，如果此比较不可用，那么天然存在的脐带血可指脐带血的平均或典型特征，优选相同哺乳动物物种作为本发明脐带血干细胞的来源。

按照贯穿本申请的应用，术语“脐带血混合物”指脐带血细胞与允许所述细胞扩增的物质的混合物，该物质比如用于细胞生长的培养基，该物质将放置于 TVEMF 生物反应器中（比如在细胞培养腔室中）。所述脐带血细胞可简单地通过将全脐带血与诸如细胞培养基之类的物质相混合而存在于脐带血混合物中。脐带血混合物也可由来自脐带血的细胞制备物制成，该脐带血如本申请所述，含有脐带血干细胞。优选地，脐带血混合物包含 CD34+/CD38-脐带血干细胞以及 Dulbecco's 培养基 (DMEM)。优选的，至少一半的脐带血混合物是细胞培养基比如 DMEM。

按照贯穿本申请的应用，术语“TVEMF”指“随时间变化的电磁力 (Time Varying Electromagnetic Force)”。

按照贯穿本申请的应用，术语“TVEMF 生物反应器”指施加 TVEMF 的旋转式生物反应器，如上文附图说明中所更详细描述。施加到生物反应器上的 TVEMF 优选在 0.05 到 6.0 高斯的范围内，优选 0.05-0.5 高斯。例如如图 2、3、4 和 5，作为 TVEMF 生物反应

器的实例（不意味着限制）。在一个简单的实施方案中，本发明的 TVEMF 生物反应器使得封闭的脐带血混合物在适当的高斯水平下（根据施加的 TVEMF）旋转，并允许其中的脐带血细胞（包括干细胞）扩增。优选地，TVEMF 生物反应器允许交换生长培养基（优选带有添加剂）并允许对脐带血混合物充氧气。所述 TVEMF 生物反应器提供用于细胞生长数天或更多的机制。所述 TVEMF 生物反应器使得反应器中的细胞受到 TVEMF，以使得 TVEMF 穿过细胞，因此使之经历 TVEMF 扩增。

按照贯穿本申请的应用，术语“TVEMF 扩增的脐带血细胞”指在置于 TVEMF 生物反应器中并受到约 0.05 至 6.0 的 TVEMF 之后每单位体积数量（即浓度）增加的脐带血细胞。每单位体积数量上的增加是细胞在 TVEMF 生物反应器中复制的结果，使得生物反应器中细胞总数增加。每单位体积中细胞数量增加明确地不是因为流体体积的简单减少，例如，血液体积从 70 ml 减少到 10 ml 从而每 ml 细胞的数量增加。

按照贯穿本申请的应用，术语“TVEMF 扩增的脐带血干细胞”指在置于 TVEMF 生物反应器并受到约 0.05 至 6.0 高斯的 TVEMF 之后每单位体积数量（即浓度）增加的脐带血干细胞。每单位体积干细胞数量上的增加是细胞在 TVEMF 生物反应器中复制的结果，使得生物反应器中干细胞总数增加。每单位体积中干细胞数量的增加明确地不是因为流体体积的简单减少，例如，血液体积从 70 ml 减少到 10 ml 从而每 ml 干细胞的数量增加。

按照贯穿本申请的应用，术语“TVEMF 扩增”（TVEMF-expanding）指在 TVEMF（旋转）反应器中在 TVEMF 存在下 TVEMF 反应器中细胞进行复制（分裂并生长）的步骤。脐带血干细胞（优选 CD34+/CD38-干细胞）优选复制且不经历进一步分化。

按照贯穿本申请的应用，术语“TVEMF 扩增”（TVEMF-expansion）指 TVEMF 生物反应器中的脐带血细胞，优选脐带血干细胞，通过让细胞受到约 0.05 到约 6.0 高斯的 TVEMF，使之数量增加的过程。优选地，脐带血细胞，优选脐带血干细胞，其数量的增加在每单位体积的数量上（即浓度）至少是原始脐带血来源的 7 倍。根据本发明的 TVEMF 生物反应器中的脐带血干细胞的扩增提供了

维持或具有与 TVEMF 扩增前脐带血干细胞基本相同的三维几何结构和细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构的脐带血干细胞。TVEMF 扩增的其它方面也可提供本发明的脐带血干细胞的异乎寻常的特征。不受到理论的限制，TVEMF 扩增不只提供高浓度的维持三维几何结构和细胞-细胞支持的脐带血干细胞。不受到理论的限制，TVEMF 可以在 TVEMF 扩增期间干细胞的一些性质，例如上调促进生长的基因，或者下调阻止生长的基因。总之，TVEMF 扩增导致了促进生长但是总体上不导致分化。

按照贯穿本申请的应用，术语“TVEMF 扩增的细胞”指经历了 TVEMF 扩增过程的细胞。

按照贯穿本申请的应用，术语“有毒物质”或者相关术语可指对细胞优选脐带血干细胞、或者对患者有毒性的物质。具体地，术语有毒物质指死细胞、巨噬细胞、以及可以是脐带血中特有的或不常见的物质（如镰刀状细胞、母体血液或者母体尿或者其它组织或废物）。其它有毒物质在本申请中有所讨论。从血液中除去这些物质是本领域中公知的。

关于上文所定义术语或其它本申请中所使用术语的其它陈述不意味着受到上述定义的限制，而是可对这些定义作出贡献。在本申请中提供了关于本发明各个方面的信息，这并不意味着只限制在它所包含的部分，而是意味着对从整体上理解本发明作出贡献。

本发明涉及到提供快速可用的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞的来源，用于修复、补充和再生人体组织。本发明可通过如下文描述的优选实施方案进行更完整的描述，但是不应理解为限制于此。

操作方法 - 制备 TVEMF 扩增的脐带血干细胞组合物 以及使用该组合物

在本发明的一个优选实施方案中，描述了用于制备 TVEMF 扩增的脐带血干细胞的方法，所述干细胞可协助身体修复、替换和再生组织或者可用于研究中。

脐带血收集自哺乳动物，优选灵长类哺乳动物，更优选人类，例如通过本申请所描述的，并且优选地根据注射器方法。脐带血也

可在子宫内收集，例如在生命受威胁的情况下或在妊娠的第三个月期中出现明显缺陷（例如耳缺陷）的极端情况下，使得脐带血干细胞可以扩增并且如果在婴儿出生时或出生后不久需要时容易获得。子宫内的脐带血只取出不威胁未出生婴儿的量。根据本发明的脐带血的收集没有限制性含义，还可包括例如直接收集哺乳动物脐带血的其它方法、或者间接收集血液的其它方法例如通过从商业或其它来源获得血液，包括例如来自“血库”的低温保存血液。

优选地，从脐带血中除去红细胞，包括脐带血干细胞的剩余细胞与合适培养基一起置于 TVEMF 生物反应器中（见“脐带血混合物”），比如见此处所描述的。在本发明一个更优选的实施方案中，仅仅将上文所述的“血沉棕黄层”（其包括脐带血干细胞，如本申请所讨论的）置于 TVEMF 生物反应器中。其它实施方案包括移去其他非干细胞以及脐带血成分，以制备不同的脐带血制备物。这种脐带血制备物甚至可含有作为剩下的仅有脐带血组分的 CD34+/CD38-脐带血干细胞。除去脐带血细胞中的非干细胞类型可通过负性分离技术（negative separation techniques）来实现，其比如但不限于沉降和分离。许多负性分离方法是本领域公知的。但是，正性选择技术也可使用，并且在本发明中是优选的。用于除去血液中多种组分和正性选择 CD34+/CD38-的方法是本领域中已知的，只要它们不裂解或者不可逆地损伤所期望的脐带血干细胞就可以使用。例如，可应用对 CD34+/CD38-有选择性的亲和方法。优选地，从脐带血中制备如上文所述的“血沉棕黄层”，然后从“血沉棕黄层”中分离出其中的 CD34+/CD38-细胞用于 TVEMF 扩增。

所收集的脐带血，或者如上文所述的期望细胞部分，必须置于 TVEMF 生物反应器中用于 TVEMF 扩增。如上文所讨论的，术语“脐带血混合物”包含脐带血（或者期望细胞部分，例如没有红细胞的脐带血，或者优选从脐带血中分离出的 CD34+/CD38-脐带血干细胞）与允许这些细胞扩增的物质的混合物，这些物质比如用于细胞生长的介质，其将置于 TVEMF 生物反应器中。细胞培养基、允许细胞生长和扩增的介质是本领域公知的。优选地，允许细胞扩增的物质是细胞培养基，更优选是 Dulbecco's 培养基。细胞培养基的组分显然必须不杀死或损伤细胞。在 TVEMF 扩增之前或期间，其它组分也可添加到脐带血混合物中。例如，脐带血可置于带有 Dulbecco's

培养基的生物反应器中，并且另外添加 5%的（或者其它所需量，比如在约 1%到 10%的范围）人血清白蛋白。脐带血混合物的其它添加物，包括但不限于生长因子、铜螯合剂、细胞因子、激素和其它可增强 TVEMF 扩增的物质，也可在脐带血置于生物反应器中之前，在生物反应器外部或内部加入到脐带血中。优选地，来自一个个体的脐带血收集物的全部体积（优选人脐带血量为约 10 ml 到约 100 ml，更优选 50 ml 到约 100 ml 脐带血）与约 25 ml 到约 100 ml 的 Dulbecco's 培养基（DMEM）相混合，并且添加 5%人血清白蛋白，使得脐带血混合物的总体积在置于生物反应器时为约 75 到约 200 ml。作为一般规则，收集脐带血越多越好；如果从一个个体收集了超过 100 ml，优选使用所有这些宝贵的脐带血。在可获得更大体积的情况下，例如通过合并脐带血，可以优选多于一个剂量。当脐带血收集物合并并一起 TVEMF 扩增时，使用灌注 TVEMF 生物反应器是特别有用的。

术语“置于 TVEMF 生物反应器中”没有限制性含义，脐带血混合物可完全在生物反应器外部制成，然后再将混合物置于生物反应器中。脐带血混合物也可全部在生物反应器内部混合。例如，脐带血可与 Dulbecco's 培养基并且添加 5%人血清白蛋白一起置于生物反应器中，培养基和血清白蛋白或者是已经存在于生物反应器中，或者是同时添加到生物反应器中，或者在脐带血之后加入到生物反应器中。

本发明的优选脐带血混合物包含以下成分：分离自脐带血样品的血沉棕黄层的 CD34+/CD38-干细胞，该脐带血样品收集自剖宫产婴儿；和 Dulbecco's 培养基，其与 CD34+/CD38-细胞一共约 200 ml。更优选地，将 G-CSF（粒细胞集落刺激因子）包括在脐带血混合物中。优选地，G-CSF 的存在量足以刺激脐带血干细胞的 TVEMF 扩增。更优选地，在 TVEMF 扩增之前脐带血混合物中存在的 G-CSF 的量是约 25 到约 200 ng/ml 混合物，更优选约 50 到约 150 ng/ml 混合物，再优选是约 100 ng/ml。

TVEMF 生物反应器容器（含有包括脐带血干细胞的脐带血混合物）以一定速度旋转，该速度使得脐带血干细胞悬浮并维持其三维几何结构和细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构。优选地，旋转速

度是 5-120 rpm; 更优选是 10-30 rpm。在细胞位于 TVEMF 生物反应器期间, 优选向它们供应营养物和新鲜培养基 (DMEM 和 5% 人血清白蛋白), 使其接触到激素、细胞因子、和/或生长因子 (优选 G-CSF); 并除去有毒物质。从 TVEMF 生物反应器中的脐带血细胞中除去的有毒物质包括垂死细胞的有毒颗粒物质以及粒细胞和巨噬细胞的有毒物质。细胞的 TVEMF 扩增受到控制, 使得细胞优选在足够量的时间内扩增 (每单位体积的数量、或浓度增加) 至少七倍。优选地, 脐带血干细胞 (以及其它细胞, 如果存在的话) 经过至少 4 天的 TVEMF 扩增, 优选约 7 到约 14 天, 更优选约 7 到约 10 天, 再优选约 7 天。TVEMF 扩增可在 TVEMF 生物反应器中持续到长达 160 天。尽管 TVEMF 扩增甚至可长于 160 天, 此种长度的扩增不是本发明的一种优选实施方案。

优选地, TVEMF 扩增在 TVEMF 生物反应器中在约 26°C 到约 41°C 的温度实施, 更优选地, 在 37°C 的温度实施。

监测正在经历 TVEMF 扩增的细胞的总体扩增的一个方法是通过视觉检查。脐带血干细胞典型地是暗红色。优选地, 用于形成脐带血混合物的培养基在颜色上是浅色或无色。一旦生物反应器开始旋转并且施加 TVEMF, 细胞优选聚集在生物反应器容器中央, 培养基围绕在有颜色的细胞簇周围。通氧气和添加其它营养物通常不影响通过构建在生物反应器上观察窗 (典型是透明塑料的) 观察细胞簇的能力。簇的形成对于帮助干细胞保持它们的三维几何结构和细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构是重要的; 如果所述簇分散且细胞开始接触到生物反应器容器的壁, 则提高转速 (手动或自动) 使得中央的细胞簇可再次形成。在细胞簇形成后不久测量可观察的细胞簇直径, 其可与此后的簇直径做比较, 以显示出 TVEMF 生物反应器中细胞大概的增长数。在 TVEMF 扩增期间细胞数量增加的测量也可以按照本领域已知的许多方法进行。自动传感器也可包括在 TVEMF 生物反应器中, 以监测和测量簇尺寸的增加。

TVEMF 扩增过程可被仔细监测, 例如由实验室技术人员监测, 其将检查细胞簇的形成以确保细胞在生物反应器中保持成簇状态, 并且当细胞簇开始分散时将增加生物反应器的旋转。用于监测细胞簇和监测生物反应器内脐带血混合物粘性的自动系统也可用于监测

细胞簇。细胞簇粘性的改变在 TVEMF 扩增过程开始约两天后就明显观察到，并且可在该时间附近增加 TVEMF 生物反应器的旋转速度。TVEMF 生物反应器转速在 TVEMF 扩增过程中可以变化。优选地，旋转速度适时改变使得正在经历 TVEMF 扩增的细胞不与 TVEMF 生物反应器容器的侧面接触。

并且，实验室技术人员可以，例如一天一次、或每两天一次，人工（例如使用注射器），如上文所讨论的，往生物反应器中加入新鲜培养基和优选地其它所需的添加物比如营养物和生长因子，并且抽出含有细胞废物和毒素的旧培养基。新鲜培养基和其它添加物也可在 TVEMF 扩增期间自动泵入 TVEMF 生物反应器，废物则自动排出。

在置于 TVEMF 生物反应器并进行 TVEMF 扩增之后约 7 到约 14 天，脐带血干细胞可增加到它们初始数量的至少七倍。优选地，TVEMF 扩增持续约 7 到 10 天，更优选约 7 天。因此不需要在 TVEMF 扩增期间进行干细胞数量的测量。如上文所显示的并贯穿本申请，本发明的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞具有与天然存在的非 TVEMF 扩增的脐带血干细胞基本上相同的三维几何结构和细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构。

本发明的另一个实施方案涉及离体哺乳动物脐带血干细胞组合物，其功能是协助身体系统或组织进行修复、补充和再生组织，例如，贯穿本申请所描述的组织。所述组合物包含 TVEMF 扩增的脐带血干细胞，优选脐带血干细胞的每单位体积数量至少是其来源脐带血中每单位体积数量的七倍。例如，优选地，如果将一定体积中的数量 X 的脐带血干细胞置于 TVEMF 生物反应器，则 TVEMF 扩增之后，从该相同体积的置于 TVEMF 生物反应器的脐带血干细胞中得到的脐带血干细胞的数量将至少是 7X。尽管此至少 7 倍的扩增对于本发明的实施不是必要的，但此扩增对于治疗目的是特别优选的。例如，如果需要的话，TVEMF 扩增的细胞的数量可以只是天然存在的脐带血中的脐带血干细胞数量的两倍。优选地，TVEMF 扩增的细胞是在每单位体积天然存在脐带血中的脐带血干细胞数量的约 4 倍到约 25 倍的范围。本发明也涉及包含来自哺乳动物的脐带血干细胞的组合物，其中所述脐带血干细胞每单位体积中的数量是

来自哺乳动物的天然存在脐带血中脐带血干细胞数量的至少七倍；并且其中脐带血干细胞具有与天然存在的脐带血干细胞基本上相同的三维几何结构和细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构。本发明的组合物可包含药用可接受载体、血浆、血液、白蛋白、细胞培养基、生长因子、铜螯合剂、激素、缓冲剂或者低温保存剂。“药用可接受载体”意思是允许将干细胞导入哺乳动物优选人类的试剂。此载体可包括本文提及的物质，具体包括可用于输血的任何物质，比如血液、血浆、白蛋白，优选来自所述组合物将导入的哺乳动物。术语将组合物“导入”哺乳动物，意思是指向动物“施用”组合物。“可接受载体”通常指本发明脐带血干细胞可在其中存活的任何物质，即无论是 TVEMF 扩增之后、低温保存之前或之后、还是导入（施用）到哺乳动物之前对细胞没有毒性。这种载体是本领域公知的，并且可以包括很宽范围的物质，包括贯穿本申请针对此目的所描述的物质。例如，血浆、血液、白蛋白、细胞培养基、缓冲剂和低温保存剂都是本发明可接受的载体。期望的载体部分取决于期望的用途。

本领域已知的其它扩增方法（不使用 TVEMF）不提供脐带血干细胞在数量至少是天然存在脐带血的至少七倍的扩增并且同时还保持脐带血干细胞三维几何结构和细胞-细胞支持不变。TVEMF 扩增的脐带血干细胞具有与所来源脐带血基本上相同的三维几何结构和细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构，或保持其不变。所述组合物包含 TVEMF 扩增的脐带血干细胞，优选地在 Dulbecco's 培养基悬浮液中或者在准备用于低温保存的溶液中。所述组合物优选没有有毒颗粒物质，例如垂死细胞以及粒细胞和巨噬细胞的有毒物质或内容物。所述组合物可以是包含 TVEMF 扩增的脐带血干细胞的低温保存组合物，这是通过降低组合物到 -120°C 到 -196°C 的温度，并且保持低温保存组合物在此温度范围直到其用于治疗或其它应用。如下文所讨论，优选地，在低温保存之前尽可能多的从组合物中除去有毒物质。

本发明的另一个实施方案涉及使用 TVEMF 脐带血干细胞组合物用于再生组织和/或治疗疾病比如自身免疫疾病（如上文所讨论）的方法，所使用的脐带血干细胞组合物或者是经过低温保存的或者是 TVEMF 扩增完成后不久的。细胞可被导入到哺乳动物身体中，优选人类，例如静脉注射或者直接注射到待修复组织，以允许身体

固有系统修复和再生组织。优选地，导入哺乳动物身体的组合物不含有毒物质以及可造成对所施用 TVEMF 扩增的脐带血干细胞有不利反应的其它物质。该方法（和组合物）可潜在地用于修复哺乳动物优选人的生命关键器官和其它组织，这种潜在应用包括但不限于肝脏组织、心脏组织、造血组织、血管、皮肤组织、肌肉组织、肠组织、胰脏组织、中枢神经系统细胞、骨、软骨组织、结缔组织、肺组织、脾组织、脑组织和其它身体组织。所述细胞容易获得用于治疗或研究，所述治疗或研究需要个体血细胞，尤其是如果已经发生疾病并且需要没有该疾病的细胞。

操作方法 - 低温保存

如上文所提及的，脐带血的收集例如是在哺乳动物幼儿的出生过程中（甚至更优选在剖宫产中），优选人类婴儿。优选从脐带血中除去红细胞。脐带血干细胞（如果需要，以及其它细胞和培养基）置于 TVEMF 生物反应器中，受到随时间变化电磁力，并且扩增。在扩增之后，细胞可低温保存。此处提供关于低温保存 TVEMF 扩增的脐带血干细胞组合物的进一步细节，具体见下文。

在 TVEMF 扩增之后，TVEMF 扩增的细胞，包括 TVEMF 扩增的脐带血干细胞，优选地转移到至少一个含有至少一种低温保护剂的低温保存容器中。TVEMF 扩增的脐带血干细胞优选地首先用溶液（例如，缓冲溶液或所期望的低温保存溶液）进行清洗以除去培养基和 TVEMF 扩增过程中存在的其它组分，接着将其放入允许对细胞低温保存的溶液中。所述细胞被转移到合适的低温容器中，此容器一般降温至 -120°C 到 -196°C ，优选约 -130°C 到约 -150°C ，并且维持在此温度。当需要时，细胞的温度（即低温容器的温度）上升到与导入人体相容的温度（通常从约为室温到约为体温），然后 TVEMF 扩增的细胞被导入哺乳动物体内，优选人类，例如如上文所讨论。

冷冻细胞通常有破坏性。在降温过程中，细胞内的水结冰。然后通过对细胞膜的渗透作用、细胞脱水、溶质浓缩、以及冰晶形成而发生损伤。随着在细胞外部形成冰，有效水从溶液中被除去并从细胞中吸取水分，造成渗透压脱水并提高了溶质浓度，最终破坏了细胞。（作为讨论，见 Mazur, P., 1977, *Cryobiology* 14: 251-272.）

不同物质具有不同的冰点。优选地，备用于低温保存的脐带血干细胞组合物包含尽可能少的污染物质，以尽可能减少在结晶和冷冻过程中对细胞壁的损伤。

这些损伤作用可通过以下来避开：(a) 应用低温保护剂，(b) 控制冷冻速率，以及 (c) 在足够低的温度保存，以尽可能减少降解反应。

在本发明中优选包括低温保存剂。可使用的低温保护剂包括但不限于足量的，二甲基亚砷(DMSO)(Lovelock, J. E. and Bishop, M. W. H., 1959, Nature 183:1394-1395; Ashwood-Smith, M. J., 1961, Nature 190:1204-1205)、甘油、聚乙烯吡咯烷酮(Rinfret, A. P., 1960, Ann. N.Y. Acad. Sci. 85: 576)、聚乙二醇(Sloviter, H. A. and Ravdin, R. G., 1962, Nature 196: 548)、白蛋白、葡聚糖、蔗糖、乙二醇、i-赤鲜醇、D-核糖醇、D-甘露醇(Rowe, A. W., et al., 1962, Fed. Proc. 21:157)、D-山梨醇、i-肌醇、D-乳糖、氯化胆碱(Bender, M. A., et al., 1960, J. Appl. Physiol. 15:520)、氨基酸葡萄糖溶液或者氨基酸(Phan The Tran and Bender, M. A., 1960, Exp. Cell Res. 20:651)、甲醇、乙酰胺、单乙酸甘油酯(Lovelock, J. E., 1954, Biochem. J. 56:265)、和无机盐(Phan The Tran and Bender, M. A., 1960, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104:388; Phan The Tran and Bender, M. A., 1961 in Radiobiology, Proceedings of the Third Australian Conference on Radiobiology, Ilbery, P. L. T., ed., Butterworth, London, p.59)。在一个优选实施方案中，使用DMSO。DMSO，液体，低浓度下对细胞无毒。作为小分子，DMSO可自由穿过细胞并通过与水结合而改变其冷冻性来保护细胞内的细胞器，以及防止形成冰而造成的损害。添加血浆(即，至浓度20-25%)可增加DMSO的保护效果。添加DMSO后，细胞应保持在0℃直到冷冻，因为DMSO约1%浓度在高于4℃的温度是有毒的。与TVEMF扩增的脐带血干细胞相结合，我所选择的优选低温保护剂是在60至80%氨基酸葡萄糖溶液中的20至40%二甲基亚砷溶液，或者15至25%的羟乙基淀粉溶液，或者4至6%的甘油、3至5%葡萄糖、6至10%葡聚糖T10，或者15至25%聚乙二醇或者75至85%氨基酸葡萄糖溶液。

尽管除脐带血细胞和低温保护剂之外的其它物质在本发明中可

以存在, 优选本发明的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞组合物的低温保存带有尽可能少的其它物质, 例如由于如上文讨论的关于冷冻机制的原因。

优选地, 本发明的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞组合物冷却到温度为约-120°C到约-196°C的范围, 优选约-130°C到约-196°C, 更优选为-130°C到约-150°C。

受控的缓慢冷却速率是重要的。不同的低温保护剂 (Rapatz, G., et al., 1968, *Cryobiology* 5(1): 18-25) 和不同的细胞类型有不同的最优冷却速率 (对于降温速度对于外周细胞存活的影响 (以及对于它们移植潜力的影响) 可参见, 例如 Rowe, A. W. and Rinfret, A. P., 1962, *Blood* 20:636; Rowe, A. W., 1966, *Cryobiology* 3(1):12-18; Lewis, J. P., et al., 1967, *Transfusion* 7(1):17-32; and Mazur, P., 1970, *Science* 168:939-949)。水变成冰时的融化热应该尽可能小。冷却过程可通过应用例如可编程冷冻设备或者甲醇浴方法来实施。

可编程冷冻装置允许确定最优冷却速率并促进标准的可重现的冷却。可编程速率控制冷冻装置比如 Cryomed 或 Planar 允许将冷冻方案调整到期望的冷却速率曲线。其它可接受的冷冻装置可以是, 例如, Sanyo Model MDF-1155ATN-152C 和 Model MDF-2136 ATN-135C, Princeton CryoTech TEC 2000。例如, 对于 10% DMSO 和 20%血浆中的外周血细胞或者 CD34+/CD38-细胞, 最优速率为从 0°C到-200°C, 1 到 3°C/分钟。

在一个优选实施方案中, 此冷却速率可用于本发明所述细胞。盛有所述细胞的低温容器必须在低温下稳定, 并且允许快速的热传递, 以便于有效控制冷冻和解冻。密封塑料管 (例如 Nunc、Wheaton cryules) 或玻璃安瓿可用于多个小量 (1-2 ml), 而较大体积 (100-200 ml) 可在聚烯烃袋 (例如 Delmed) 中冷冻, 该聚烯烃袋放在金属板之间以便在冷却期间更好的传递热量。(骨髓细胞袋通过将其置于 -80°C冷冻装置中成功冷冻, 该冷冻装置幸运地提供了约 3°C/分钟的冷却速率)。

在一个替代性实施方案中, 可应用甲醇浴冷却方法。甲醇浴方法特别适合大规模的对多个小物品实施常规低温保存。该方法不需要手动控制冷冻速率也不需要记录器监测速率。在一个优选的方面,

DMSO 处理的细胞预先在冰上冷却并转移到装满冷冻甲醇的盘中，其随后被置于 -130°C 机械冰箱中（例如 Harris 或 Revco）。甲醇浴和样品的热电偶检测显示期望的 1 到 $3^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 的冷却速率。在至少两个小时之后，样品达到 -80°C ，然后可直接将其置于液氮（ -196°C ）中以永久保存。

完全冷冻之后，TVEMF 扩增的脐干细胞可快速转移到长期低温保存容器中。在一个优选实施方案中，样品可低温保存在液氮（ -196°C ）中或者其蒸汽（ -165°C ）中。保存温度应低于 -120°C ，优选低于 -130°C 。高效液氮冰箱的可用性大大方便了这种保存，所述冰箱类似于具有极低真空和内部超绝热的大 Thermos 容器，使得热量泄漏和氮气流失都保持在绝对低值。

用于低温保存细胞的优选的装置和程序由 Thermogenesis Corp., Rancho Cordovo, CA 所制造，利用它们的程序降低细胞温度到低于 -130°C 。在冷冻和保存期间细胞盛放于 Thermogenesis 血浆袋中。

在 TVEMF 扩增的脐带血干细胞组合物的温度降低到低于 -120°C 之后，优选低于 -130°C ，它们可置于装置中，比如 Thermogenesis 冷冻装置。它们的温度保持在 -120°C 到 -196°C ，优选 -130°C 到 -150°C 。本发明的低温保存 TVEMF 扩增的脐带血干细胞组合物的温度不应长时间处于约 -120°C 。

根据本发明的低温保存的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞组合物可冷冻无限长时间，在需要时将其解冻。例如，组合物可冷冻长达 18 年。甚至更长的时间也是可行的，可能甚至长达供体婴儿的一生。

当需要时，其中装有细胞的袋可置于解冻系统中，比如 Thermogenesis Plasma Thawer 或 Thermoline Thawer 系列中的其它装置。低温保存的组合物的温度升至室温。在另一个优选解冻与低温保护剂混合的细胞的方法中，装有本发明的低温保存的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞组合物的袋，其保存在液氮中，可将其置于液氮的气相中 15 分钟，然后暴露在室温环境空气中 5 分钟，最后在 37°C 水浴中尽可能快的解冻。解冻的袋立刻用相同体积的溶液稀释，该溶液是含有 2.5%（重量/体积）人血清白蛋白和 5%（重量/体积）葡聚糖 40（Solplex 40; Sifra, Verona, Italy）的等渗盐溶液，接着 400

g 离心十分钟。除去上清，用新鲜白蛋白/葡聚糖溶液重悬沉降下来的细胞。可参见 Rubinstein, P. et al., Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 10119-1012 (1995) for Removal of Hypertonic Cryoprotectant; 此优选解冻细胞方法的一个变型可见 Lazzari, L. et al., Evaluation of the effect of cryopreservation on ex vivo expansion of hematopoietic progenitors from cord blood. *Bone Marrow Trans.* 28:693-698 (2001)。

在细胞升温到室温后，它们可用于研究或再生治疗。解冻的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞组合物可直接导入哺乳动物体内，优选人类，或者以其解冻形式用于期望的研究中。在导入哺乳动物体内之前，优选在马上将要导入之前，多种添加物可加入到解冻组合物（或者非低温保存的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞组合物）中。此类添加物包括但不限于生长因子、铜螯合剂、细胞因子、激素、适宜的缓冲剂或稀释剂。优选地，添加 G-CSF。更优选地，对于人类，以约 20 到约 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重的量添加 G-CSF，甚至再优选地，以约 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重的量。在导入之前，TVEMF 扩增的脐带血干细胞组合物可与哺乳动物自身或者合适供体的，血浆、血液或白蛋白、或者其它可与输血伴随的物质相混合。解冻的脐带血干细胞可用于，例如检验对期望用于治疗或可用于治疗的药物是否有有害反应。

尽管 FDA 尚未批准在美国将扩增的脐带血干细胞用于组织再生，但是此批准看起来是即将来临的。因为脐带血的收集只可在出生的短时期内完成，如果它们的收集是为了将来的应用，必须将它们收集和扩增以及保存，用于以后的研究以及以后可能的应用。足量的扩增脐带血干细胞的直接注入应能够用于再生生命关键器官，比如心脏、肝脏、胰脏、皮肤、肌肉、肠、脾脏、脑等等。

本发明的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞组合物应以足够实现组织修复或再生或者足够治疗目标疾病或病症的量导入哺乳动物体内，优选人类。优选地，至少 20 ml 每 ml 含 10^7 到 10^9 干细胞的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞组合物用于任何治疗，优选一次全部使用，尤其是当外伤发生需要立即组织修复的情况。此量对 75-80 kg 的人体是特别优选的。待导入其来源哺乳动物的组合物中的 TVEMF 扩增

的脐带血干细胞的数量从根本上与来源脐带血材料中存在的细胞数量（例如存在于一个婴儿脐带血中的干细胞数量）相关。导入患者的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞的优选范围可以是，比如，约 10 ml 到约 50 ml 的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞组合物，其每 ml 含 10^7 到 10^9 干细胞，或者可能更多。尽管我们知道高浓度的任何物质施用给哺乳动物都可以是有毒的或者甚至是致死的，但是导入所有的哺乳动物脐带血干细胞，例如在 TVEMF 扩增后至少 7 倍，不可能造成 TVEMF 扩增的脐带血干细胞过量。在使用来自多个供体的脐带血的情况下，导入哺乳动物的脐带血干细胞的数量可以更高。同样，可导入患者的 TVEMF 细胞的剂量不受从一个个体收集所提供的脐带血数量的限制；多次施用，例如每天一次或两次，或每周一次，或其它施用时间方案，可更容易应用。并且，在准备对组织进行治疗时，此类型的组织可准许使用可提供的尽可能多的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞。例如，肝脏更易于治疗。

应理解的是，尽管上文所描述的实施方案通常涉及低温保存 TVEMF 扩增的脐带血干细胞，但是 TVEMF 扩增也可以在对已经过低温保存的、非扩增、或者非 TVEMF 扩增的脐带血干细胞解冻之后进行。例如，许多脐带血库有低温保存的组合物，其包含处于冷冻保存状态的脐带血干细胞，以备在某时间点的需要。这些组合物可根据传统方法解冻，然后按照此处所述进行 TVEMF 扩增，其包括按照此处所述的 TVEMF 过程的变化形式。此后，如上文所述，此 TVEMF 扩增的脐带血干细胞被认为是本发明的组合物。在低温保存之前进行 TVEMF 扩增是优选的，例如假如发生外伤，已经扩增了患者的脐带血干细胞就不需要再花费宝贵的额外数天来准备。

同样，尽管不是优选，应注意本发明的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞可低温保存，然后解冻，然后如果不使用，再低温保存。

同样，应理解的是，在 TVEMF 扩增后经过或不经低温保存，本申请的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞可导入哺乳动物，优选来源哺乳动物（脐带血来源的哺乳动物）。

解冻的 TVEMF 扩增的脐带血干细胞可用于研究下列疾病的可能疗法：

I. 源于正常血细胞产生与成熟的功能衰竭与功能障碍，过度增殖性

- 干细胞病，再生障碍性贫血，全血细胞减少症，血小板减少症，红细胞再生障碍，由于药物、辐射、或者感染、先天性原因造成的布-戴氏综合征（Blackfan-Diamond syndrome）；
- II. 造血系统恶性肿瘤、急性淋巴母细胞（淋巴细胞）白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性恶性骨髓硬化症、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、不明原因的骨髓化生（agnogenic myelometaplasia）、Waldenstrom's 巨球蛋白血症、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤；
- III. 具有以下疾病的患者中的免疫抑制：恶性、实体肿瘤、恶性黑色素瘤、胃癌、卵巢癌、乳腺癌、小细胞肺癌、视网膜母细胞瘤、睾丸癌、胶质母细胞瘤、横纹肌肉瘤、神经母细胞瘤、尤因肉瘤、淋巴瘤；
- IV. 自身免疫性疾病，类风湿性关节炎、I型糖尿病、慢性肝炎、多发性硬化、和系统性红斑狼疮；
- V. 遗传性（先天性）疾病，贫血、家族性再生障碍性、范科尼氏综合征、布卢姆综合征、纯红细胞再生障碍（PRCA）、先天性角化不良症、布-戴氏综合征、先天性红细胞生成障碍综合征 I-IV、Chwachmann-Diamond 综合征、二氢叶酸还原酶缺乏症、formamino 转移酶缺乏症、莱-尼综合征（Lesch-Nyhan syndrome）、先天性球形细胞增多症、先天性椭圆形细胞增多症、先天性口形红细胞增多、先天性无 Rh 病、突发性夜间血红蛋白尿、G6PD（葡萄糖-6-磷酸脱氢酶）、丙酮酸激酶变体 I、II、III 缺乏症、先天性红细胞生成素敏感、缺乏、镰状细胞病和性状、地中海贫血 α 、 β 、 γ 高铁血红蛋白血症、先天性免疫病、重症联合免疫缺陷病（SCID）、裸淋巴细胞综合征、离子载体反应性联合、免疫缺陷（ionophore-responsive combined immunodeficiency）、加帽异常联合免疫缺陷（combined immunodeficiency with a capping abnormality）、核苷磷酸化酶缺乏症、粒细胞肌动蛋白缺乏症、婴儿粒细胞缺乏症、戈谢病（Gaucher's disease）、腺苷脱氨酶缺乏症、科斯特曼综合征、网状组织发生不全、先天性白细胞功能障碍综合征；以及
- VI. 其它，包括骨硬化症、骨髓硬化症、获得性溶血性贫血、获

得性免疫缺陷、造成原发性或继发性免疫缺陷的传染病、细菌感染（例如布鲁氏菌病、利斯特菌病、肺结核、麻风）、寄生虫感染（例如疟疾、利什曼病）、真菌感染、由于衰老吞噬细胞症造成的涉及淋巴细胞组成比例失衡和免疫功能减退的病症、科斯特曼粒细胞缺乏症、慢性肉芽肿病、谢-希综合征（Chediak-Higachi syndrome）、中性粒细胞肌动蛋白缺乏症、中性粒细胞膜 GP-180 缺乏症、代谢贮积疾病（metabolic storage disease）、粘多糖贮积症、粘脂贮积症、涉及免疫机制的混杂疾病、威-奥综合征（Wiskott-Aldrich syndrome）、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶缺乏症。

在全部扩增、保存、和解冻过程中，本发明的脐带血干细胞维持它们的三维几何结构和它们的细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构。

尽管此处描述了优选的实施方案，本领域技术人员理解本发明包括多种改变与修饰。本发明的范围不限于上文所描述的实施方案。

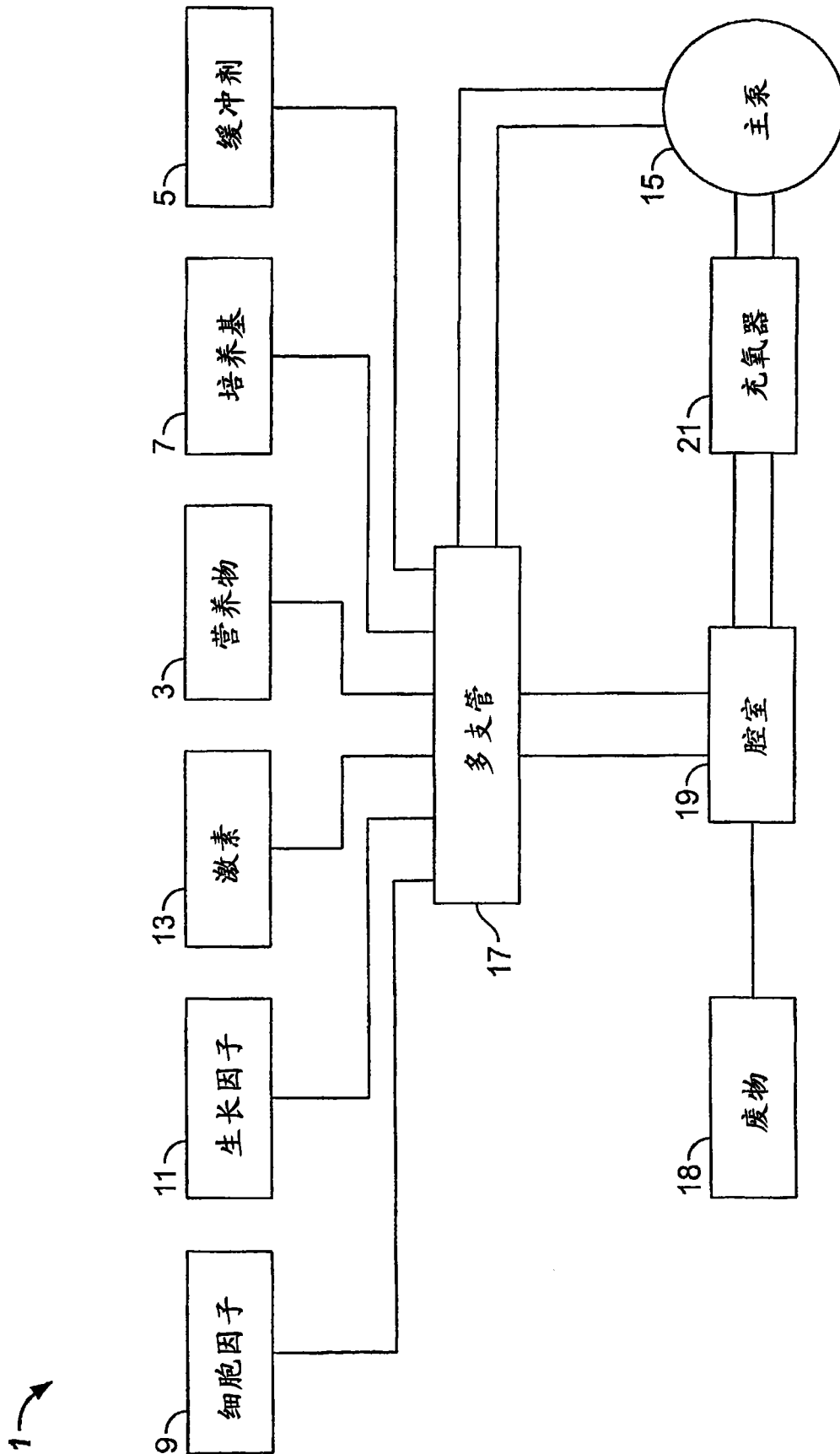


图1

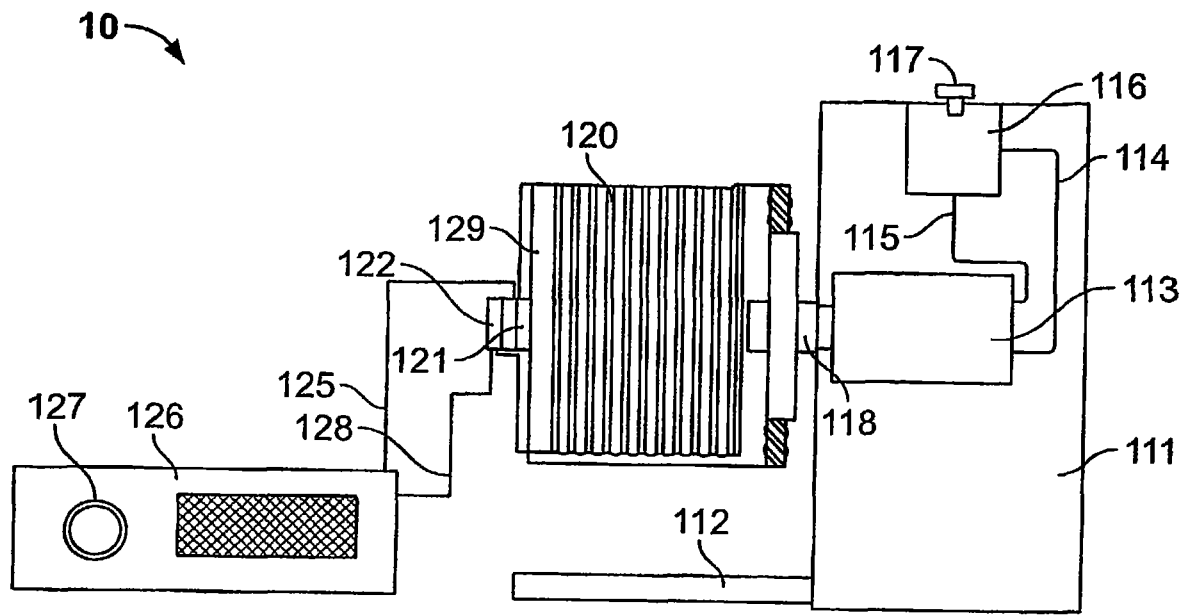


图2

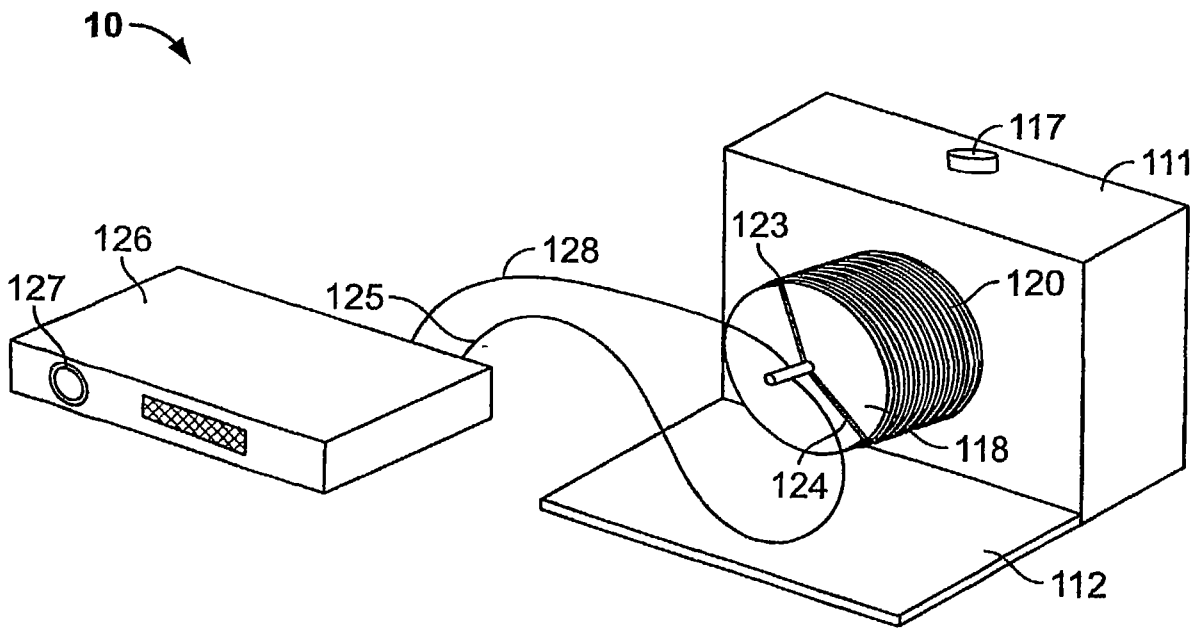


图3

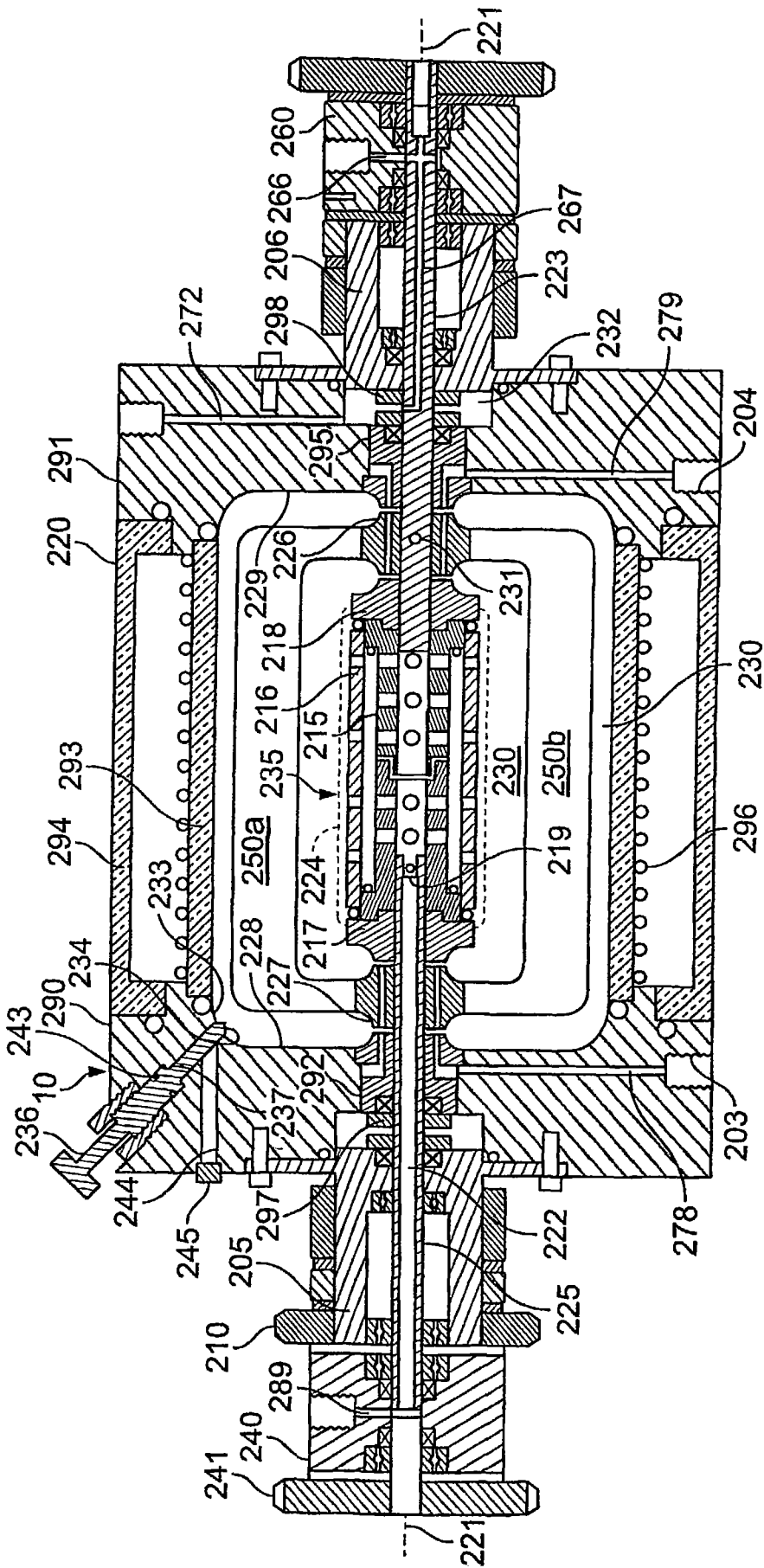


图4

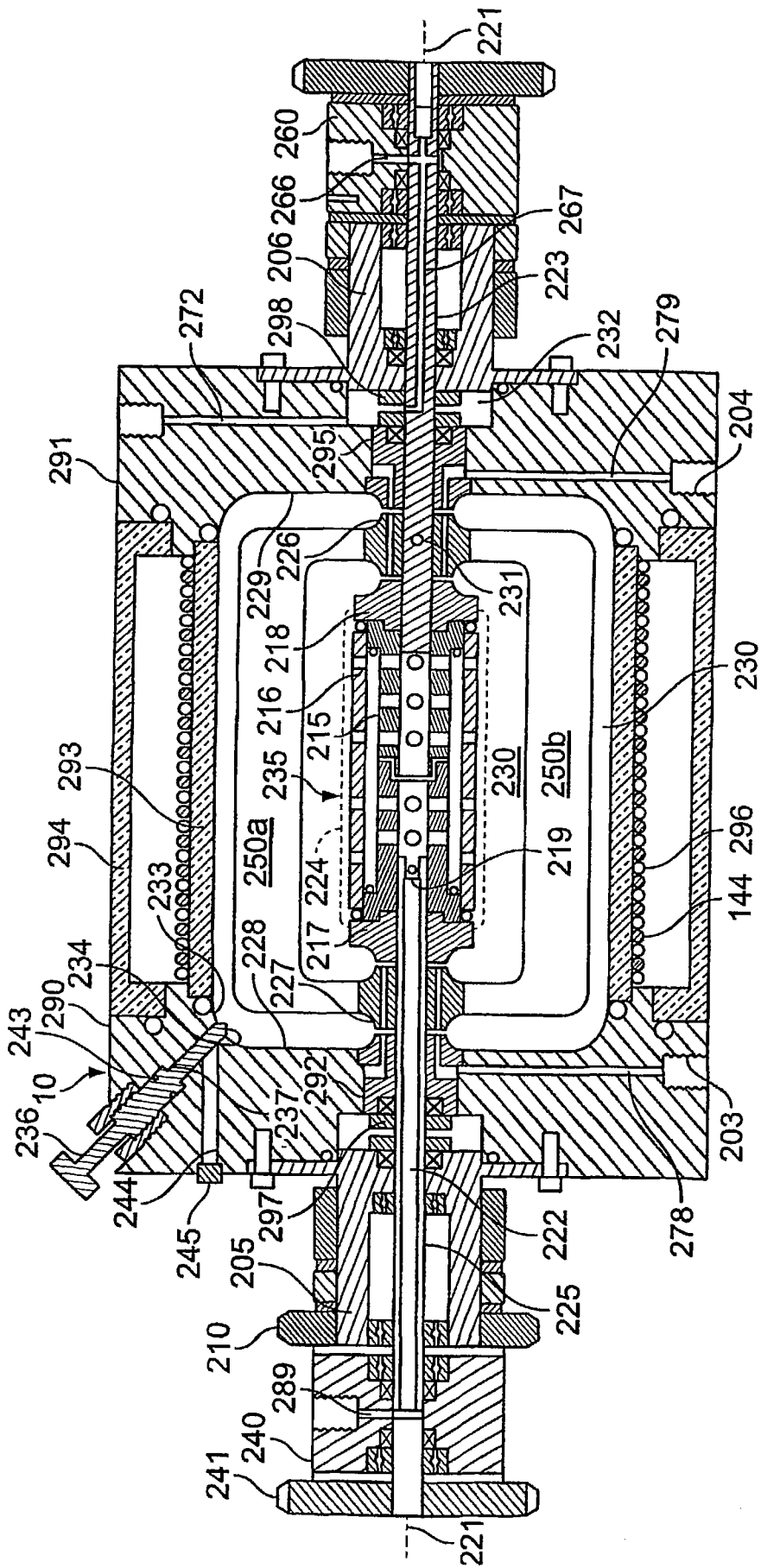


图5

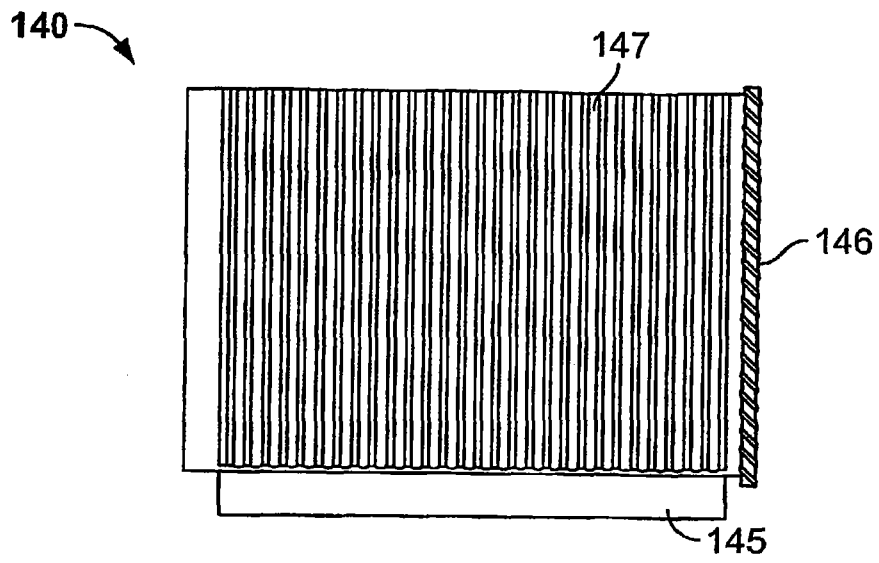


图6

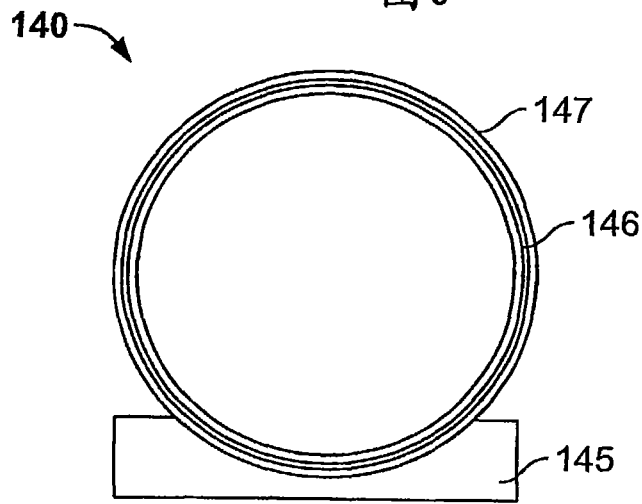


图7

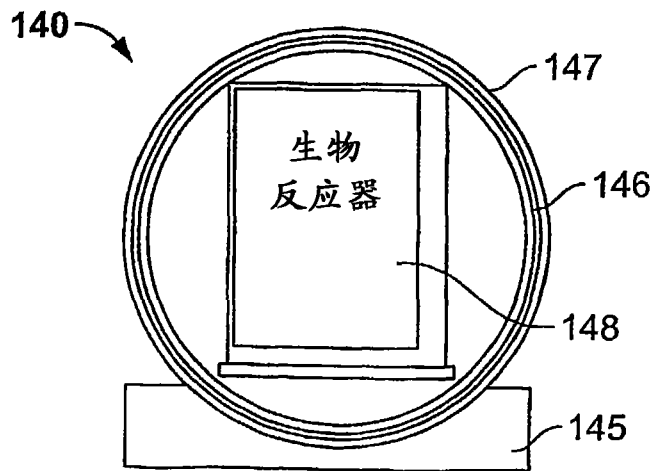


图8