



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109804063 B

(45) 授权公告日 2025. 02. 25

(21) 申请号 201780061207.1

(22) 申请日 2017.10.05

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109804063 A

(43) 申请公布日 2019.05.24

(30) 优先权数据
62/404,582 2016.10.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.04.02

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/SG2017/050500 2017.10.05

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/067071 EN 2018.04.12

(73) 专利权人 细胞研究私人有限公司
地址 新加坡新加坡市海滩路

(72) 发明人 T·T·潘

(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理
事务所(普通合伙) 11382
专利代理师 曹津燕 丁磊

(51) Int.Cl.
C12N 5/0775 (2006.01)
A61K 35/51 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 114867347 A, 2022.08.05
CN 105420184 A, 2016.03.23
TW 202002999 A, 2020.01.16
CN 103555655 A, 2014.02.05
CN 101525594 A, 2009.09.09

审查员 陈晋

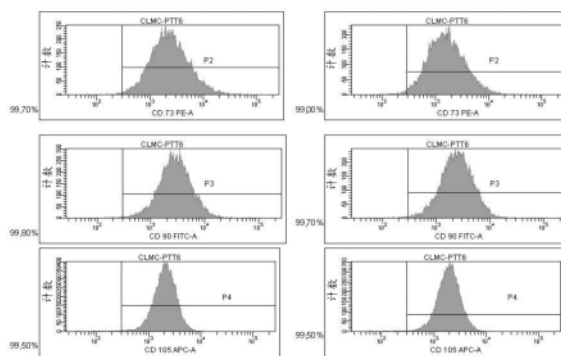
权利要求书4页 说明书22页 附图11页

(54) 发明名称

一种采用细胞培养基自脐带羊膜中分离间充质干细胞的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种自脐带的羊膜中分离间充质干细胞群的方法,所述方法包括在培养基中培养脐带组织,所述培养基包含DMEM(杜尔贝科改良伊格尔培养基)、F12(哈姆F12培养基)、M171(培养基171)和FBS(胎牛血清)。本发明还涉及一种自脐带的羊膜中分离的间充质干细胞群,其中所述干细胞群的至少约90%或更多的细胞表达以下标记物中的每一个:CD73、CD90和CD105,且缺乏以下标记物的表达:CD34、CD45和HLA-DR。本发明还涉及一种该间充质干细胞群的药物组合物。



1. 一种自脐带的羊膜中分离间充质干细胞群的方法,所述方法包括在培养基中培养脐带组织,所述培养基包含DMEM(杜尔贝科改良伊格尔培养基)、F12(哈姆F12培养基)、M171(培养基171)和FBS(胎牛血清),

其中所述培养基包含终浓度为55至65% (v/v)的DMEM,终浓度为5至15% (v/v)的F12,终浓度为15至30% (v/v)的M171和终浓度为1至3.5% (v/v)的FBS。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述培养基包含终浓度为57.5至62.5% (v/v)的DMEM,终浓度为7.5至12.5% (v/v)的F12,终浓度为17.5至25.0% (v/v)的M171和终浓度为1.75至3.5% (v/v)的FBS。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述培养基包含终浓度为61.8% (v/v)的DMEM,终浓度为11.8% (v/v)的F12,终浓度为23.6% (v/v)的M171和终浓度为2.5% (v/v)的FBS。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述培养基进一步包含终浓度为1 ng/ml至20 ng/ml的表皮生长因子(EGF)。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述培养基包含终浓度为10ng/ml的EGF。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述培养基包含终浓度为1 μg/ml至10 μg/ml的胰岛素。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述培养基包含终浓度为5 μg/ml的胰岛素。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述培养基进一步包含以下补充物中的至少一种:腺嘌呤、氢化可的松和3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3)。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述培养基包含腺嘌呤、氢化可的松和3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3)中的全部三种。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述培养基以0.01至0.1 μg/ml的终浓度包含腺嘌呤,以0.1至10 μg/ml的终浓度包含氢化可的松,和/或以0.5至5 ng/ml的终浓度包含3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3)。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其包括培养所述脐带组织直至所述羊膜的间充质干细胞的细胞生长晕达到70-80%融合。

12. 根据权利要求11所述的方法,其包括自用于所述培养的培养容器中移除所述间充质干细胞。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中通过酶处理进行自所述培养容器中移除所述间充质干细胞。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述酶处理包括胰蛋白酶消化。

15. 根据权利要求12至14中任一项所述的方法,其中所述间充质干细胞转移至用于传代培养的培养容器中以传代培养。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述间充质细胞以 1.0×10^6 个细胞/ml的浓度悬浮以传代培养。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中在权利要求1至9中任一项所限定的培养基中传代培养所述间充质干细胞。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中传代培养所述间充质干细胞直至所述间充质干细胞达到70-80%融合。

19. 根据权利要求15所述的方法,其中所述传代培养在自给式生物反应器中进行。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述生物反应器选自平行板生物反应器、中空纤维生物反应器和微流控生物反应器。

21. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述脐带组织为整个脐带的一部分或脐带的羊膜。

22. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中在37°C的温度下于CO₂细胞培养箱中进行培养。

23. 根据权利要求15所述的方法,其包括自用于所述传代培养的培养容器中移除所述间充质干细胞。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中通过酶处理进行自所述培养容器中移除所述间充质干细胞。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述酶处理包括胰蛋白酶消化。

26. 根据权利要求25所述的方法,其进一步包括收集分离的间充质干细胞。

27. 根据权利要求1所述的方法,其中至少90%或更多的所述分离的间充质干细胞表达以下标记物:CD73、CD90和CD105。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中至少90%或更多的所述分离的间充质干细胞缺乏以下标记物的表达:CD34、CD45和HLA-DR(人类白细胞抗原-抗原D相关的)。

29. 根据权利要求27或28所述的方法,其中97%或更多的所述分离的间充质干细胞表达CD73、CD90和CD105且缺乏CD34、CD45和HLA-DR的表达。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中98%或更多的所述分离的间充质干细胞表达CD73、CD90和CD105且缺乏CD34、CD45和HLA-DR的表达。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中99%或更多的所述分离的间充质干细胞表达CD73、CD90和CD105且缺乏CD34、CD45和HLA-DR的表达。

32. 根据权利要求26所述的方法,其进一步包括保存所述分离的间充质干细胞以供进一步使用。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中通过冷冻保存进行保存。

34. 一种制备适用于自脐带的羊膜中分离间充质干细胞群的培养基的方法,所述方法包括将以下混合以获得终体积为500 ml的培养基:

i. 250 ml的DMEM

ii. 118 ml M171

iii. 118 ml DMEM/F12

iv. 12.5 ml胎牛血清(FBS)以得到2.5%的终浓度。

35. 根据权利要求34所述的方法,其进一步包括添加:

v. 1 ml 5 µg/ml EGF储备液以得到10ng/ml的终浓度,

vi. 0.175 ml 14.28 mg/ml胰岛素储备液以得到5µg/ml的终浓度。

36. 根据权利要求34或35所述的方法,其进一步包括向DMEM中添加以下补充物中的一种或多种:腺嘌呤、氢化可的松和3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3),由此得到总体积为500 ml的培养基。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中DMEM中所述补充物的终浓度如下:

0.05至0.1 µg/ml腺嘌呤,

- 1至10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氢化可的松，
0.5至5 ng/ml 3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3)。
- 38.一种通过权利要求34至37中任一项所述的方法能够获得的细胞培养基。
- 39.一种自脐带的羊膜中分离间充质干细胞的方法,所述方法包括在通过权利要求34至37中任一项限定的方法制备的培养基中培养羊膜组织。
- 40.一种细胞培养基,其包含:
- 终浓度为55至65 % (v/v)的DMEM,
 - 终浓度为5至15 % (v/v)的F12,
 - 终浓度为15至30 % (v/v)的M171和
 - 终浓度为1至3.5 % (v/v)的FBS。
- 41.根据权利要求40所述的细胞培养基,其中所述细胞培养基包含终浓度为57.7至62.5 % (v/v)的DMEM,终浓度为7.5至12.5 % (v/v)的F12,终浓度为17.5至25.0 % (v/v)的M171和终浓度为1.75至3.5 % (v/v)的FBS。
- 42.根据权利要求41所述的细胞培养基,其中所述细胞培养基包含终浓度为61.8 % (v/v)的DMEM,终浓度为11.8 % (v/v)的F12,终浓度为23.6 % (v/v)的M171和终浓度为2.5 % (v/v)的FBS。
- 43.根据权利要求40所述的细胞培养基,其中所述培养基进一步包含终浓度为1 ng/ml 至20 ng/ml 的表皮生长因子(EGF)。
- 44.根据权利要求43所述的细胞培养基,其中所述培养基包含终浓度为10 ng/ml 的EGF。
- 45.根据权利要求40所述的细胞培养基,其中所述培养基包含终浓度为1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的胰岛素。
- 46.根据权利要求45所述的细胞培养基,其中所述培养基包含终浓度为5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的胰岛素。
- 47.根据权利要求40所述的细胞培养基,其中所述细胞培养基进一步包含以下补充物中的至少一种:腺嘌呤、氢化可的松和3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3)。
- 48.根据权利要求47所述的细胞培养基,其中所述培养基包含腺嘌呤、氢化可的松和3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3)中的全部三种。
- 49.根据权利要求47所述的细胞培养基,其中所述培养基以0.05至0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的终浓度包含腺嘌呤,以1至10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的终浓度包含氢化可的松,和/或以0.5至5 ng/ml 的终浓度包含3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3)。
- 50.根据权利要求40所述的细胞培养基,其中500 ml的所述细胞培养基包含:
- i. 250 ml的DMEM
 - ii. 118 ml M171
 - iii. 118 ml DMEM/F12
 - iv. 12.5 ml胎牛血清(FBS)。
- 51.根据权利要求50所述的细胞培养基,其进一步包含:
- v. 终浓度为10 ng/ml 的EGF
 - vi. 终浓度为5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的胰岛素

vi. 胰岛素0.175 μg/ml以得到5μg/ml的终浓度。

52. 根据权利要求50或51所述的细胞培养基,其进一步以0.05至0.1 μg/ml的终浓度包含腺嘌呤,以1至10 μg/ml的终浓度包含氢化可的松,和/或以0.5至5 ng/ml的终浓度包含3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3)。

53. 根据权利要求40至52中任一项所限定的细胞培养基用于自脐带的羊膜中分离间充质干细胞的用途。

54. 根据权利要求40至52中任一项所限定的细胞培养基用于培养来自脐带的羊膜的间充质干细胞的用途。

一种采用细胞培养基自脐带羊膜中分离间充质干细胞的方法

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2016年10月5日提交的美国临时申请No.62/404,582的优先权的权益,该申请的内容以引用的方式全文并入本文用于全部目的。

技术领域

[0003] 本发明涉及一种自脐带的羊膜中分离间充质干细胞(或此类干细胞群)的方法,以及一种自脐带的羊膜中分离的间充质干细胞群。本发明还涉及一种用于自脐带的羊膜中分离间充质干细胞的细胞培养基。本发明还涉及该种分离的间充质干细胞群的药物组合物和用途。本发明还涉及治疗疾病或障碍的方法,该方法包括向有此需要的受试者施用本发明的间充质干细胞群或含有此类间充质干细胞群的药物组合物。

背景技术

[0004] 在美国专利申请2006/0078993(得到授权的美国专利9,085,755和9,737,568)及对应的国际专利申请W02006/019357中首次报道了自脐带的羊膜中分离的间充质干细胞。自此,脐带组织作为多能细胞源而备受关注;由于脐带的广泛可获得性,已将脐带,特别是自脐带的羊膜中分离的干细胞(也称为“脐带衬干细胞(cord lining stem cell)”),看作是用于再生医学的细胞的极好替代来源。参见Jeschke等,Umbilical Cord Lining Membrane and Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells:the Similarities and Differences;The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal,2011,4,21-27。

[0005] 随后的一项研究比较了源自脐带的羊膜(脐带衬(CL-MSC)、脐带血(CB-MSC)、胎盘(P-MSC)和华通氏胶(WJ-MSC))的人间充质干细胞(MSC)的表型、增殖率、迁移、免疫原性和免疫调节能力(Stubbendorf等,Immunological Properties of Extraembryonic Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Gestational Tissue,STEM CELLS AND DEVELOPMENT Volume 22,Number 19,2013,2619-2629)。Stubbendorf等的结论是,胚胎外妊娠组织来源的MSC群显示了不同的逃避免疫应答以及发挥免疫调节作用的潜力。作者还发现,由于CL-MSC显示低免疫原性,其显示出最具希望的用于细胞疗法的潜力,但是它们也表现出增强的增殖和迁移潜力,因此未来的研究应集中在可以在其中施用CL-MSC的最佳疾病模型上。

[0006] 尽管采用如美国专利申请2006/0078993和国际专利申请W02006/019357中描述的方案可以容易地获得羊膜的间充质干细胞,对于使用这些脐带衬MSC的临床试验来说,掌握这样一种方法将是有利的,该方法允许分离这些脐带衬MSC的高度同源的群并因此该群能够用于临床试验。

[0007] 因此,本发明的一个目的是提供一种自脐带的羊膜中分离满足该种需求的间充质干细胞群的方法。因此,本发明的还一目的是提供自脐带的羊膜中分离的高度同源的间充质干细胞群。

发明内容

[0008] 本发明的目的通过具有独立权利要求中所述的特征的方法、间充质干细胞群、相应的药物组合物以及细胞培养基来实现。

[0009] 第一方面,本发明提供一种自脐带的羊膜中分离间充质干细胞群的方法,所述方法包括在培养基中培养脐带组织,所述培养基包含DMEM(杜尔贝科改良伊格尔培养基)、F12(哈姆F12培养基)、M171(培养基171)和FBS(胎牛血清)。

[0010] 第二方面,本发明提供一种脐带的羊膜的分离的间充质干细胞群,其中所述干细胞群的至少约90%或更多的细胞表达以下标记物中的每一个:CD73、CD90和CD105。优选地,所述分离的间充质干细胞群缺乏以下标记物的表达:CD34、CD45和HLA-DR。在该第二方面的实施方案中,所述分离的间充质干细胞群的至少约91%或更多、约92%或更多、约92%或更多、约93%或更多、约94%或更多、约95%或更多、约96%或更多、约97%或更多、约98%或更多、约99%或更多的细胞表达CD73、CD90和CD105中的每一个。此外,在所述第二方面的这些实施方案中,所述分离的间充质干细胞群的至少约91%或更多、约92%或更多、约92%或更多、约93%或更多、约94%或更多、约95%或更多、约96%或更多、约97%或更多、约98%或更多、约99%或更多的细胞缺乏标记物CD34、CD45和HLA-DR的表达。通过第一方面的分离间充质干细胞群的方法可以获得所述间充质干细胞群。

[0011] 第三方面,本发明提供一种包含本发明的(第二方面的)哺乳动物细胞的药物组合物。

[0012] 第四方面,本发明提供一种制备用于分离的培养基的方法,所述方法包括将以下混合以获得终体积为500ml的培养基:

[0013] i. 250ml的DMEM

[0014] ii. 118ml M171

[0015] iii. 118ml DMEM/F12

[0016] iv. 12.5ml胎牛血清(FBS),以得到2.5%(v/v)的终浓度。

[0017] 第五方面,本发明提供一种通过第四方面所述的方法可获得的细胞培养基。

[0018] 第六方面,本发明提供一种自脐带的羊膜中分离间充质干细胞的方法,所述方法包括在通过第四方面所述的方法制备的培养基中培养羊膜组织。

[0019] 第七方面,本发明提供一种细胞培养基,其包含:

[0020] -终浓度为约55至65%(v/v)的DMEM,

[0021] -终浓度为约5至15%(v/v)的F12,

[0022] -终浓度为约15至30%(v/v)的M171和

[0023] -终浓度为约1至8%(v/v)的FBS。

[0024] 第八方面,本发明提供第七方面所述的细胞培养基用于自脐带的羊膜中分离间充质干细胞的用途。

[0025] 第九方面,本发明提供第七方面所述的细胞培养基用于培养来自脐带的羊膜的间充质干细胞的用途。

附图说明

[0026] 结合非限制性实施例和附图考虑并参照发明详述将会更好地理解本发明,附图

中:

[0027] 图1示出了Lonza的杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified eagle medium)的技术信息表,其包括用于制备实验部分中的本发明培养基的示例性实例(PTT-6)的DMEM的产品目录号;

[0028] 图2示出了Lonza的哈姆F12培养基(Ham's F12 medium)的技术信息表;

[0029] 图3示出了Lonza的DMEM:F12(1:1)培养基的技术信息表,其包括用于制备实验部分中的本发明培养基的示例性实例(PTT-6)的DMEM:F12(1:1)培养基的产品目录号;

[0030] 图4示出了Life Technologies Corporation的M171培养基的技术信息表,其包括用于制备实验部分中的本发明培养基的示例性实例(PTT-6)的M171培养基的产品目录号;

[0031] 图5示出了成分列表,其包括在实验部分中用于制备PTT-6培养基的各成分的商业供应商和产品目录号;

[0032] 图6示出了流式细胞术实验的结果,在这些实验中分析了自脐带中分离的间充质干细胞的间充质干细胞标记物CD73、CD90和CD105的表达。对于这些实验,通过在三种不同的培养基中培养脐带组织,自所述脐带组织中分离间充质干细胞,然后在相应的培养基中进行所述间充质干细胞的传代培养。在这些实验中,采用了以下三种培养基:a)补充了10% FBS(v/v)的90%(v/v) DMEM, b)在美国专利申请2006/0078993和对应的国际专利申请W02006/019357中描述的PTT-4培养基,其由90%(v/v) CMRL1066和10%(v/v) FBS组成(参见W02006/019357的第[0183]段)和c)本发明的PPT-6培养基,其组成在本文中描述。在该流式细胞术分析中,在所采用的三种培养基的每一种中分析了脐带衬间充质干细胞(CLMC)群的不同样品。结果示于图6a至图6c。更详细地,图6a示出了在自脐带组织中分离并在DMEM/10% FBS中培养后,表达干细胞标记物CD73、CD90和CD105的分离的间充质脐带衬干细胞的百分数,图6b示出了在自脐带组织中分离并在PTT-4中培养后,表达干细胞标记物CD73、CD90和CD105的分离的间充质脐带衬干细胞的百分数,和图6c示出了在自脐带组织中分离并在PTT-6中培养后,表达干细胞标记物CD73、CD90和CD105的分离的间充质脐带衬干细胞的百分数。

[0033] 图7示出了流式细胞术实验的结果,在这些实验中分析了自脐带中分离的间充质干细胞的干细胞标记物(CD73、CD90和CD105, CD34、CD45和HLA-DR(人类白细胞抗原-抗原D相关的)),这些干细胞标记物用于定义多能人间充质干细胞用于细胞疗法的适用性的表达,并将其与骨髓间充质干细胞的这些标记物的表达进行了比较。对于该实验,通过在本发明的PPT-6培养基中培养脐带组织从该脐带组织中分离脐带的羊膜的间充质干细胞,而所述骨髓间充质干细胞采用标准规程自人骨髓中分离。图7a示出了在自脐带组织中分离并在PPT-6培养基中培养后,表达干细胞标记物CD73、CD90和CD105且缺乏CD34、CD45和HLA-DR的表达的分离的间充质脐带衬干细胞的百分数,而图7b示出了表达CD73、CD90和CD105且缺乏CD34、CD45和HLA-DR的表达的分离的骨髓间充质干细胞的百分数。

[0034] 发明详述

[0035] 如上所述,第一方面,本发明涉及一种自脐带的羊膜中分离间充质干细胞群的方法,所述方法包括在培养基中培养脐带组织,所述培养基包含DMEM(杜尔贝科改良伊格尔培养基)、F12(哈姆F12培养基)、M171(培养基171)和FBS(胎牛血清)。本申请中惊奇地发现,采用此类培养基提供了间充质干细胞群自脐带的羊膜中的分离,该间充质干细胞群中大于

90%或甚至99%或更多的细胞对三种间充质干细胞标记物CD73、CD90呈阳性,且同时这些干细胞缺乏CD34、CD45和HLA-DR的表达(参见实验部分),意味着该群的99%或甚至更多的细胞表达干细胞标记物CD73、CD90和CD105而不表达标记物CD34、CD45和HLA-DR。此类高度同源且定义明确的细胞群是临床试验和基于细胞的治疗的理想候选者,因为该细胞群例如完全符合普遍接受的用于细胞疗法的人间充质干细胞的标准,所述标准例如由Dominici等,“Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement”, *Cytotherapy* (2006) Vol. 8, No. 4, 315-317、Sensebe等,“Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review”, *Stem Cell Research & Therapy* 2013, 4: 66、Vonk等, *Stem Cell Research & Therapy* (2015) 6: 94或Kundrotas *Acta Medica Lituanica*. 2012. Vol. 19. No. 2. P. 75-79定义。此外,采用比如Quantum细胞扩增系统(Quantum Cell Expansion System)的生物反应器,能够获得大量间充质干细胞,比如每次运行的3亿至7亿间充质干细胞(同样参见实验部分)。因此,本发明允许以一种低成本的方式提供治疗应用(比如在伤口愈合中使用)所需的干细胞数量。此外,用于制备本发明的培养基的所有组分均是以GMP质量商购获得的。因此,本发明为自脐带的羊膜中GMP地生产此类高度同源的间充质干细胞群开辟了道路。

[0036] 在本文上下文中,注意到本发明的培养基允许在允许间充质干细胞/祖细胞增殖而所述间充质干细胞/祖细胞不分化的条件下自羊膜中分离间充质干细胞群(这里也称为“间充质干细胞”)。因此,按照本文所述自羊膜中分离所述间充质干细胞后,该分离的间充质干细胞/祖细胞群具有分化为多种细胞类型的能力,例如如美国专利申请2006/0078993、美国专利9,085,755、国际专利申请W02006/019357、美国专利8,287,854或W02007/046775中所述。例如如美国专利申请2006/0078993中所述,脐带的羊膜的间充质干细胞具有梭形,表达以下基因:POU5f1、Bmi-1、白血病抑制因子(LIF),并分泌激活素A和卵泡抑素。在本发明中分离的间充质干细胞能够例如分化为任何类型的间充质细胞,比如、但不限于脂肪细胞、皮肤成纤维细胞、软骨细胞、成骨细胞、肌腱细胞、韧带成纤维细胞、心肌细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、脂肪细胞、产生粘蛋白的细胞、源自内分泌腺的细胞比如产生胰岛素的细胞(例如, β -胰岛细胞)或神经外胚层细胞。本发明中分离的干细胞可以体外分化,以便随后将分化的细胞用于医学目的。这种方法的示例性实例是将间充质干细胞分化为产生胰岛素的 β -胰岛细胞,然后可以例如通过植入将其施用于患有胰岛素缺乏症(比如糖尿病)的患者(对于这一方面还参见W02007/046775)。可选地,本发明的间充质干细胞可以其未分化状态用于基于细胞的治疗,例如,用于伤口愈合目的,比如用于治疗烧伤或慢性糖尿病伤口。在这些治疗应用中,本发明的间充质干细胞既可以通过与周围患病组织相互作用来促进伤口愈合,也可以分化成相应的皮肤细胞(例如再次参见W02007/046775)。

[0037] 在本文上下文中,注意到本文所述的间充质干细胞群可以自任何脐带组织中分离并培养(即可以衍生自任何脐带组织),只要该脐带组织含有羊膜(也称为“脐带衬(cord lining)”)。因此,如本申请的实验部分中所述,可以从整个脐带(的一部分)中分离所述间充质干细胞群。因此,除了羊膜之外,该脐带组织可以包含脐带的任何其他组织/组分。例如,如美国专利申请2006/0078993或国际专利申请W02006/019357的图16所示,脐带的羊膜是脐带的最外部,覆盖了脐带。此外,脐带含有一条静脉(其向胎儿输送含氧的、营养丰富的

血液)和两条动脉(其携带脱氧、营养耗尽的血液离开胎儿)。为了保护机械支撑,这三条血管嵌入华通氏胶中,所述华通氏胶是一种主要由粘多糖制成的胶状物质。因此,本发明中使用的脐带组织也可包括该一条静脉、两条动脉和华通氏胶。使用脐带的这种整个(完整)部分具有以下优点:羊膜不需要与脐带的其他组分分离。这减少了分离步骤,并因此使得本发明的方法更简单、更快速、更不易出错并且更经济——这些都是间充质干细胞治疗应用所需的GMP生产的重要方面。因此,间充质干细胞的分离可以通过组织分离块法(tissue explant)开始,如果需要更大量的间充质干细胞,例如用于临床试验,则随后可以进行接下来的传代培养(培养)分离的间充质干细胞。可选地,也可以首先将羊膜与脐带的其他组分分离,然后通过在本发明的培养基中培养羊膜而自羊膜中分离间充质脐带衬干细胞。所述培养也可以通过组织分离块法进行,任选地随后传代培养分离的间充质干细胞。在本文上下文中,术语“组织分离块(法)”或“组织分离块方法”以其在本领域中的常规含义使用,是指一种方法,在该方法中一旦收获了组织,则将组织或组织的一部分放置在含有培养(生长)培养基的细胞培养皿中,随着时间的推移,干细胞自组织迁移出到培养皿的表面。然后通过如本文所述的微体繁殖(传代培养)将这些原代干细胞进一步扩增并转移到新鲜培养皿中。在本文上下文中,注意到就生产用于治疗目的细胞而言,在从脐带中分离羊膜间充质干细胞的第一步中,获得了分离的间充质干细胞的主细胞库,而随后的传代培养可以获得工作细胞库。如果将本发明的间充质干细胞群(特别是这样的间充质干细胞群,其中的至少约98%或99%表达标记物CD73、CD90和CD105中的每一个并且缺少以下标记物中的每一个的表达:CD34、CD45和HLA-DR)用于临床试验或作为批准的治疗剂,则工作细胞库的细胞群通常用于此目的。分离步骤的干细胞群(可构成主细胞库)和传代培养步骤的干细胞群(可构成工作细胞库)均可以例如以冷冻保存的形式储存。

[0038] 如上所述,本发明的自脐带的羊膜中分离间充质干细胞的方法具有以下优点:本发明的培养基中使用的所有组分均为以GMP质量可获得的,因此提供了在GMP条件下分离间充质干细胞用于后续治疗施用的可能性。

[0039] “DMEM”意指1969年开发的杜尔贝科改良伊格尔培养基,其是一种改良的基础Eagle培养基(BME)(参见图1,其示出了自Lonza可获得的数据表)。最初的DMEM配方含有1000mg/L的葡萄糖,并且首先报道用于培养胚胎小鼠细胞。自此,DMEM成为了用于细胞培养的标准培养基,其可以从比如ThermoFisher Scientific(产品目录号11965-084)、Sigma Aldrich(产品目录号D5546)或Lonza的多种来源商购获得,仅列举几个供应商。因此,任何商购可获得的DMEM均可用于本发明。在优选的实施方案中,本文所用的DMEM是可从Lonza以产品目录号12-604F获得的DMEM培养基。此种培养基是补充有4.5g/L葡萄糖和L-谷氨酰胺的DMEM。在另一个优选的实施方案中,本文使用的DMEM是Sigma Aldrich的产品目录号D5546的DMEM培养基,其含有1000mg/L葡萄糖以及碳酸氢钠,但不含L-谷氨酰胺。

[0040] “F12”培养基意指哈姆F12培养基。该培养基也是一种标准的细胞培养基,是一种营养混合物,最初设计为与血清并与激素和转铁蛋白组合使用时培养多种哺乳动物和杂交瘤细胞(参见图2,其示出了来自Lonza的哈姆F12培养基的数据表)。任何商购(例如自ThermoFisher Scientific(产品目录号11765-054)、Sigma Aldrich(产品目录号N4888)或Lonza,仅列举几个供应商)可获得的哈姆F12培养基均可用于本发明。在优选的实施方案中,采用来自Lonza的哈姆F12培养基。

[0041] “DMEM/F12”或“DMEM:F12”意指DMEM与哈姆F12培养基的1:1混合物(参见图3,其示出了来自Lonza的DMEM:F12(1:1)的数据表)。DMEM/F12(1:1)培养基也是用于支持许多不同哺乳动物细胞的生长而广泛采用的基础培养基,可以从比如ThermoFisher Scientific(产品目录号11330057)、Sigma Aldrich(产品目录号D6421)或Lonza的多个供应商商购获得。任何商购可获得的DMEM:F12均可用于本发明。在优选的实施方案中,本文所用的DMEM:F12培养基是可从Lonza以产品目录号12-719F获得的DMEM/F12(1:1)培养基(其为具有L-谷氨酰胺、15mM HEPES和3.151g/L葡萄糖的DMEM:F12)。

[0042] “M171”意指培养基171,其已被开发为用于培养正常人乳腺上皮细胞生长的基础培养基(参见图4,其示出了来自Life Technologies Corporation的M171培养基的数据表)。该基础培养基也是广泛采用的并且可以从比如ThermoFisher Scientific或例如Life Technologies Corporation(产品目录号M171500)商购获得。任何商购可获得的M171培养基均可用于本发明。在优选的实施方案中,本文所用的M171培养基是可从Life Technologies Corporation以产品目录号M171500获得的M171培养基。

[0043] “FBS”意指胎牛血清(其也称为“胎牛(calf)血清”),即在血液自然凝固,然后离心以移除任何剩余的红细胞后而保留的血液部分。胎牛血清是真核细胞体外细胞培养中应用最广泛的血清补剂,因为其具有非常低水平的抗体并含有更多生长因子,使其在许多不同的细胞培养应用中具有通用性。优选地,FBS自国际血清工业协会(ISIA)的成员获得,该协会主要关注通过适当的原产地可追溯性、标签的真实性以及适当的标准化和监督来确保血清和动物源性产品的安全性和安全使用。作为ISIA成员的FBS的供应商包括Abattoir Basics Company、Animal Technologies Inc.、Biomin Biotechnologia LTDA、GE Healthcare、Gibco by Thermo Fisher Scientific和Life Science Production,仅举几个例子。在目前优选的实施方案中,FBS以产品目录号A15-151自GE Healthcare获得。

[0044] 现在谈谈本发明的培养基,该培养基可包含用于间充质脐带衬干细胞的分离或培养的终浓度为约55至65% (v/v)的DMEM,终浓度为约5至15% (v/v)的F12,终浓度为约15至30% (v/v)的M171和终浓度为约1至8% (v/v)的PBS。本文所用的“% (v/v)”的数值是指相对于该培养基的终体积的单一组分的体积。这意味着,例如,如果DMEM在培养基中以约55至65% (v/v)的终浓度存在,则1升的培养基含有约550至650ml DMEM。

[0045] 在其它实施方案中,所述培养基可包含终浓度为约57.5至62.5% (v/v)的DMEM,终浓度为约7.5至12.5% (v/v)的F12,终浓度为约17.5至25.0% (v/v)的M171和终浓度为约1.75至3.5% (v/v)的FBS。在进一步的实施方案中,所述培养基可包含终浓度为约61.8% (v/v)的DMEM,终浓度为约11.8% (v/v)的F12,终浓度为约23.6% (v/v)的M171和终浓度为约2.5% (v/v)的FBS。

[0046] 除了上述组分,所述培养基可包含对培养所述间充质脐带衬干细胞有利的补充物。例如,本发明的培养基可包含表皮生长因子(EGF)。如果存在,则在培养基中EGF可以约1ng/ml至约20ng/ml的终浓度存在。在一些这样的实施方案中,所述培养基可包含终浓度为约10ng/ml的EGF。

[0047] 本发明的培养基还可包含胰岛素。如果存在,则胰岛素可以约1 μ g/ml至10 μ g/ml的终浓度存在。在一些这样的实施方案中,所述培养基可包含终浓度为约5 μ g/ml的胰岛素。

[0048] 所述培养基可进一步包含以下补充物中的至少一种:腺嘌呤、氢化可的松和3,3',

5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3)。在此类实施方案中,所述培养基可包含腺嘌呤、氢化可的松和3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3)中的全部三种。在这些实施方案中,所述培养基可以约0.05至约0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 腺嘌呤的终浓度包含腺嘌呤,以1至约10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氢化可的松的终浓度包含氢化可的松,和/或以约0.5至约5 ng/ml 的终浓度包含3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3)。

[0049] 在本发明的方法中,可以培养脐带组织,直至合适数量的(原代)间充质脐带衬干细胞自所述组织中长。在典型的实施方案中,培养脐带组织直至羊膜的间充质干细胞的细胞生长达到约70%至约80%融合。这里应注意,术语“融合(confluency/confluence)”以其在细胞培养领域中的常规含义使用,并且意在作为培养皿或培养瓶中贴壁细胞的数量估计/指标,指被细胞覆盖的表面的比例。例如,50%融合意指大约一半的表面被覆盖,并且仍有细胞生长的空间。100%融合意指表面完全被细胞覆盖,并且不再留有细胞单层生长的空间。

[0050] 一旦通过组织分离块法自脐带衬组织获得了合适数量的原代细胞(间充质脐带衬干细胞),就从用于培养的培养容器中移除所述间充质干细胞。通过这样做,可以获得含有羊膜的(原代)分离的间充质干细胞的主细胞库。通常,由于间充质干细胞是贴壁细胞,因此使用标准酶处理进行移除。例如,所述酶处理可以包括如国际美国专利申请2006/0078993、国际专利申请W02006/019357或国际专利申请W02007/046775中所述的胰蛋白酶消化,意味着可以通过胰蛋白酶消化(0.125%胰蛋白酶/0.05% EDTA)收获向外生长的细胞以用于进一步扩增。如果将收获的间充质干细胞例如用于产生主细胞库,则也可以将细胞冷冻保存并储存以供进一步使用,如下文所述。

[0051] 一旦收获,则可将间充质干细胞转移至用于传代培养的培养容器中。所述传代培养还可以自冷冻的原代细胞,即自所述主细胞库开始。对于传代培养,可以将任何合适数量的细胞接种在比如细胞培养板的培养容器中。基于此目的,可以将间充质干细胞以例如约 0.5×10^6 个细胞/ml至约 5.0×10^6 个细胞/ml的浓度悬浮于适用于传代培养的培养基(最方便地,本发明的培养基)中。在一个实施方案中,将细胞以约 1.0×10^6 个细胞/ml的浓度悬浮以传代培养。所述传代培养既可以通过在简单的培养瓶中,也可以在例如能够堆放在培养箱中的多层系统中培养进行,所述多层系统比如CellStacks(Corning, Corning, NY, USA)或Cellfactory(Nunc, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA的部分)。可选地,所述传代培养也可以在封闭的自给式系统(比如生物反应器)中进行。不同设计的生物反应器是本领域技术人员已知的,例如,平行板、中空纤维或微流体生物反应器。参见,例如Sensebe等,“Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices:a review”,上文。可商购的中空纤维生物反应器的示例性实例为Quantum[®] Cell Expansion System(Terumo BCT, Inc),其已经例如用于扩增骨髓间充质干细胞以进行临床试验(参见Hanley等, Efficient Manufacturing of Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells Using the Quantum Cell Expansion System, Cytotherapy. 2014 August; 16(8):1048-1058)。可以用于传代培养本发明的间充质干细胞群的商购可获得的生物反应器的另一实例是自GE Healthcare可获得的Xuri Cell Expansion System。如果要在GMP条件下生产用于治疗应用的工作细胞库并且需要大量细胞,则在比如Quantum[®] Cell Expansion System的自动化系统中培养间充质干细胞群是

特别有益的。

[0052] 本发明的间充质脐带衬干细胞的传代培养发生在本发明的培养基中。因此,本发明的培养基可以用于自羊膜中分离间充质干细胞和用于随后的通过传代培养的分离的原代细胞的培养。同样对于传代培养,可以培养间充质干细胞直至生长出合适量的细胞。在说明性实施方案中,将间充质干细胞传代培养直至所述间充质干细胞达到约70%至约80%融合。

[0053] 可以在用于培养哺乳动物细胞的标准条件下进行所述间充质脐带衬干细胞群的分离/培养。通常,本发明的分离间充质脐带衬干细胞群的方法通常在以下条件(温度、气氛)下进行:所述条件一般用于培养所述细胞自其衍生的物种的细胞。例如,人脐带组织和间充质脐带衬干细胞通常分别在37°C下、含5%CO₂的空气气氛中培养。在本文上下文中,注意到在本发明中,间充质细胞可以源自任何哺乳动物物种,比如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、山羊、马、狗、猫、绵羊、猴子或人,其中在一个实施方案中,人源的间充质干细胞是优选的。

[0054] 一旦自传代培养获得了所需/合适数量的间充质脐带衬干细胞,则通过自用于传代培养的培养容器中移除它们来收获所述间充质干细胞。通常通过酶处理,包括细胞的胰蛋白酶消化,来再次进行所述间充质干细胞的收获。随后收集分离的间充质干细胞并将其直接使用或保存以供进一步使用。通常通过冷冻保存进行保存。术语“冷冻保存”在本文中以其常规含义使用,用于描述通过冷却至低的零下温度(比如(通常)-80°C或-196°C(液氮的沸点))来保存间充质干细胞的过程。冷冻保存可以如本领域技术人员已知的进行,且可包括使用比如二甲亚砜(DMSO)或甘油的冷冻保护剂,其减缓脐带细胞中冰晶的形成。

[0055] 通过本发明的分离方法获得的分离的间充质脐带衬干细胞群是高度定义且同源的。在该方法的典型实施方案中,至少约90%或更多、约91%或更多、约92%或更多、约92%或更多、约93%或更多、约94%或更多、约95%或更多、约96%或更多、约97%或更多、约98%或更多、约99%或更多的分离的间充质干细胞表达以下标记物:CD73、CD90和CD105。此外,在这些实施方案中,至少约90%或更多、约91%或更多、约92%或更多、约92%或更多、约93%或更多、约94%或更多、约95%或更多、约96%或更多、约97%或更多、约98%或更多、约99%或更多的分离的间充质干细胞可缺乏以下标记物的表达:CD34、CD45和HLA-DR。在特定实施方案中,约97%或更多、约98%或更多或约99%或更多的分离的间充质干细胞群表达CD73、CD90和CD105,同时缺乏CD34、CD45和HLA-DR的表达。

[0056] 因此,根据上述公开内容,本发明还涉及自脐带的羊膜中分离的间充质干细胞群,其中干细胞群的至少约90%或更多的细胞表达以下标记物中的每一个:CD73、CD90和CD105。在优选的实施方案中,分离的间充质干细胞群的至少约91%或更多、约92%或更多、约92%或更多、约93%或更多、约94%或更多、约95%或更多、约96%或更多、约97%或更多、约98%或更多、约99%或更多的细胞为CD73⁺、CD90⁺和CD105⁺,其含义是分离的细胞群的该百分比表达CD73、CD90和CD105中的每一个(参见本申请的实验部分)。此外,至少约90%或更多、约91%或更多、约92%或更多、约92%或更多、约93%或更多、约94%或更多、约95%或更多、约96%或更多、约97%或更多、约98%或更多、约99%或更多的分离的间充质干细胞可缺乏以下标记物的表达。在特定实施方案中,约97%或更多、约98%或更多或约99%或更多的分离的间充质干细胞群表达CD73、CD90和CD105,同时缺乏CD34、CD45和HLA-DR的表达。本文首次报道了此类高度同源的源自脐带的羊膜的间充质干细胞群,并且该细

胞群满足用于细胞疗法的间充质干细胞的标准(同样参见实验部分和例如, Sensebe等, “Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review”, 上文)。在本文上下文中应注意, 该间充质干细胞群既可通过本发明的分离方法获得, 但如果需要, 也可通过比如细胞分选的不同方法获得。

[0057] 如上所述, 本发明还涉及一种包含自脐带的羊膜中分离的间充质干细胞群的药物组合物, 其中所述干细胞群的至少约90%或更多的细胞表达以下标记物中的每一个: CD73、CD90和CD105, 和任选地缺乏CD34、CD45和HLA-DR的表达。所述药物组合物可包含任何药理学上可接受的赋形剂, 并可被配制用于任何所需的药学的施用途径。所述药物组合物可例如适于全身或局部应用。

[0058] 另一方面, 本发明涉及一种制备用于分离的培养基的方法, 所述方法包括将以下混合以获得终体积为500ml的培养基:

[0059] i. 250ml的DMEM

[0060] ii. 118ml M171

[0061] iii. 118ml DMEM/F12

[0062] iv. 12.5ml胎牛血清(FBS), 以得到2.5% (v/v)的终浓度。

[0063] 如上所述, DMEM/F12培养基为DMEM和哈姆F12培养基的1:1混合物。因此118ml DMEM/F12培养基含有59ml DMEM和59ml F12。因此, 当采用该制备培养基的方法时, 500ml总体积中的终浓度(v/v)如下:

[0064] DMEM: $250\text{ml} + 59\text{ml} = 309\text{ml}$, 对应于 $309/500 = 61.8\%$ (v/v)

[0065] M171: 118ml, 对应于 $118/500 = 23.6\%$ (v/v)

[0066] F12: 59ml, 对应于 $59/500 = 11.8\%$ (v/v)。

[0067] 该制备培养基的方法的实施方案进一步包括添加:

[0068] v. 1ml EGF储备液($5\mu\text{g}/\text{ml}$)以得到 $10\text{ng}/\text{ml}$ 的EGF终浓度, 和

[0069] vi. 胰岛素0.175ml储备液($14.28\text{mg}/\text{ml}$)以得到 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的胰岛素终浓度。

[0070] 此处应注意, 在这些实施方案中, 上述这些组分i至vi的体积得到终体积为499.675ml的培养基。如果不再向培养基中添加其他组分, 则剩余的0.325ml(加至500ml的体积)可以是例如组分i至iv中的任意者, 这意味着可以是DMEM、M171、DMEM/F12或FBS。可选地, 当然可以调节EGF或胰岛素储备液的浓度, 使得培养基的总体积为500ml。此外, 还注意组分i至iv不必按照它们列出的顺序加入, 而是当然可以使用任何顺序使这些组分混合以得到本发明的培养基。这意味着, 例如, 可以将M171和DMEM/F12混合在一起, 然后与DMEM和FBS组合以达到如本文所述的终浓度, 即DMEM的终浓度为约55至65% (v/v), F12的终浓度为约5至15% (v/v), M171的终浓度为约15至30% (v/v)和FBS的终浓度为约1至8% (v/v)。

[0071] 在其它实施方案中, 所述方法进一步包括向DMEM中添加0.325ml体积的以下补充物中的一种或多种: 腺嘌呤、氢化可的松和3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3), 由此得到总体积为500ml的培养基。在该实施方案中, DMEM中这些补充物的终浓度可如下:

[0072] 约0.05至 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 腺嘌呤, 例如约 $0.025\mu\text{g}/\text{ml}$ 腺嘌呤,

[0073] 约1至 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 氢化可的松,

[0074] 约0.5至 $5\text{ng}/\text{ml}$ 3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3), 例如 $1.36\text{ng}/\text{ml}$ 3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3)。

[0075] 根据上述公开内容,本发明还涉及通过本文所述的制备培养基的方法可获得的或获得的细胞培养基。

[0076] 此外,本发明还涉及一种自脐带的羊膜中分离间充质干细胞的方法,其中该方法包括在通过本文所述的方法制备的培养基中培养羊膜组织。

[0077] 因此,本发明还涉及一种细胞培养基,其包含:

[0078] -终浓度为约55至65% (v/v)的DMEM,

[0079] -终浓度为约5至15% (v/v)的F12,

[0080] -终浓度为约15至30% (v/v)的M171和

[0081] -终浓度为约1至8% (v/v)的FBS。

[0082] 在本文所述的培养基的一些实施方案中,所述培养基包含终浓度为约57.7至62.5% (v/v)的DMEM,终浓度为约7.5至12.5% (v/v)的F12,终浓度为约17.5至25.0% (v/v)的M171和终浓度为约1.75至3.5% (v/v)的FBS。在其它实施方案中,所述培养基可包含终浓度为约61.8% (v/v)的DMEM,终浓度为约11.8% (v/v)的F12,终浓度为约23.6% (v/v)的M171和终浓度为约2.5% (v/v)的FBS。

[0083] 此外,所述培养基可进一步包含终浓度为约1ng/ml至约20ng/ml的表皮生长因子(EGF)。在一些实施方案中,所述培养基包含终浓度为约10ng/ml的EGF。本文所述的培养基可进一步包含终浓度为约1 μ g/ml至约10 μ g/ml的胰岛素。在此类实施方案中,所述培养基可包含终浓度为约5 μ g/ml的胰岛素。

[0084] 本发明的细胞培养基可进一步包含以下补充物中的至少一种:腺嘌呤、氢化可的松和3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3)。在一些实施方案中,所述培养基包含腺嘌呤、氢化可的松和3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3)中的全部三种。如果存在,则所述培养基可以约0.01至约0.1 μ g/ml腺嘌呤或约0.05至约0.1 μ g/ml腺嘌呤的终浓度包含腺嘌呤,以约0.1至约10 μ g/ml氢化可的松或约1至约10 μ g/ml氢化可的松的终浓度包含氢化可的松,和/或以约0.5至约5ng/ml的终浓度包含3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3)。

[0085] 在所述细胞培养基的实施方案中,500ml的本发明的细胞培养基包含:

[0086] i. 250ml的DMEM

[0087] ii. 118ml M171

[0088] iii. 118ml DMEM/F12

[0089] iv. 12.5ml胎牛血清(FBS)(终浓度为2.5%)。

[0090] 在进一步的实施方案中,所述细胞培养基可进一步包含:

[0091] v. 终浓度为10ng/ml的EGF,和

[0092] vi. 终浓度为5 μ g/ml的胰岛素。

[0093] 可以使用选择的储备液将胰岛素和EGF加入培养基中,使得培养基的总体积不超过500ml。

[0094] 在特定的实例中,本发明培养基的组分i至vi为图5中所示的组分,意味着这些组分以图5所示的产品目录号自相应的制造商获得。由将图5所示的组分i至vi混合获得的培养基在本文中也称为“PTT-6”。在本文上下文中还注意到,成分i至vi以及任何其它成分(比如任何其它商业供应商的抗生素)均可用于制备本发明的培养基。

[0095] 此外,本发明的细胞培养基可以约0.01至约0.1 μ g/ml腺嘌呤或约0.05至约0.1 μ g/

m1腺嘌呤的终浓度包含腺嘌呤,以约0.1至约10 μ g/ml、约0.5至约10 μ g/ml或约1至约10 μ g/ml氢化可的松的终浓度包含氢化可的松,和/或以约0.1至约5ng/ml或约0.5至约5ng/ml的终浓度包含3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3)。

[0096] 最后,本发明还提供一种治疗患有疾病的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用本文公开的间充质脐带衬干细胞或含有本文公开的干细胞的药物组合物。所述疾病可以是上文所述的任何疾病。为了治疗受试者,可以以任何合适的方式施用本发明的间充质干细胞群,所述方式例如包括、但不限于局部施用,通过植入或通过注射。所述干细胞群可例如直接置于比如烧伤或糖尿病伤口的伤口上(参见国际专利申请W02007/046775)。可选地,也可将所述干细胞群皮下植入,例如直接植入皮肤下、体脂肪或腹膜中。

[0097] 通过以下非限制性实验实例进一步阐明本发明。

[0098] 实验实施例

[0099] 1、间充质干细胞分离前的脐带组织的冷冻保存

[0100] 如下所述,对脐带组织(脐带是经母亲知情同意捐赠的)进行处理,以便随后自脐带的羊膜中分离间充质干细胞。

[0101] 1.1脐带组织样品的洗涤:

[0102] a.从保护罩上取下手术刀。

[0103] b.用镊子夹紧脐带,用手术刀将脐带切成10厘米长的一段。将无法使用的脐带放回原来的组织杯中。

[0104] c.将10厘米长的脐带段转移至新的150mm培养皿中。可以使用150mm培养皿代替所述杯子。

[0105] d.将150mm培养皿的盖子作为放置镊子和手术刀的地方。

[0106] e.用30ml注射器取出25ml Plasmalyte A(Baxter,目录号#2B2543Q)。用一只手使注射器保持45°角,将Plasmalyte A直接分配到脐带组织上。

[0107] f.将培养皿稍微倾斜,用30ml注射器和钝针取出Plasmalyte A。

[0108] g.将用过的Plasmalyte A收集在300ml转移袋中,该转移袋用作垃圾容器并将其丢弃在生物危害箱中。

[0109] h.重复洗涤程序,如有必要,每次洗涤使用新的培养皿。确保已去除表面上的所有血凝块。如果需要清洗组织,可以使用更多的Plasmalyte A。

[0110] i.将组织放入新的标记的组织培养皿中以继续切割组织。向该培养皿中加入20ml Plasmalyte A,从而使所述组织在切割时不会变干。

[0111] j.将脐带切成等长的约1厘米的切块,共计10个切块。

[0112] k.然后将每个1cm的切块切成更小的段,每个切块约0.3cm \times 0.3cm至0.5cm \times 0.5cm。

[0113] l.移除培养皿中的任何Plasmalyte A。

[0114] m.采用30ml注射器自原始Plasmalyte A袋中取出25ml Plasmalyte A,并直接分配到脐带组织块上。

[0115] n.将培养皿成角度保持使用于洗涤组织的全部Plasmalyte A集中于一侧,然后用注射器和钝针将其取出。

[0116] o.再次重复洗涤。不应该留下任何凝块。

[0117] 注意:如果脐带没有立即冷冻,则将该脐带组织保存在Plasmalyte A中,直到准备冷冻。

[0118] 1.2脐带组织的冷冻保存:

[0119] a.制备冷冻保存液:

[0120] i.制备50ml由60%的Plasmalyte A、30%的5%人血清白蛋白和10%的二甲基亚砷(DMSO)组成的冷冻液。

[0121] ii.将一个150ml的转移袋标记上“组织冷冻液”,并使用无菌技术将血浆转移装置连接到端口。

[0122] iii.采用30ml注射器自原始Plasmalyte A袋中取出30ml Plasmalyte A,并将其转移至具有溶液制备日期和时间的标记了“组织冷冻液”的转移袋中。

[0123] iv.用20ml注射器取15ml 5%的人血清白蛋白并将其转移至所述标记的转移袋中。

[0124] v.向该转移袋中加入5ml DMSO。

[0125] vi.混合均匀并记录冷冻液的混合情况。

[0126] b.在加入冷冻液之前自组织中移除Plasmalyte A。

[0127] c.采用60ml注射器,将全部50ml的冷冻液吸入该注射器,将约30ml冷冻液加入含有脐带组织的150mm细胞培养皿中。在注射器上放一根钝针以保持无菌。

[0128] d.每分钟旋转含有组织和冷冻液的培养皿10分钟。

[0129] e.用镊子选择8个随机选择的切块,将其放入4个4ml的冷冻小瓶的每一个中。选择4个随机选择的切块,将其放入一个1.8ml的冷冻小瓶中。这些切块应无血凝块。

[0130] f.向每个包含脐带组织的冷冻小瓶中加入剩余的冷冻液,其中4ml的管加入至3.6ml的灌装线,1.8ml的Nunc小瓶加入至1.8ml的灌装线。

[0131] g.用组织ID标记一个Bactec Lytic/10-Anaerobic/F瓶和一个Bactec Plus Aerobic/F瓶。

[0132] h.用注射器和钝针自培养皿中取出20ml冷冻液,酒精棉签擦拭Bactec小瓶后,将钝针转换成18g针头,并接种有氧和无氧Bactec瓶,每瓶10ml。

[0133] i.启动控制速率冷冻机。

[0134] j.控制速率冷冻完成后,将装置置于连续温度监测的液氮冷冻机中,直到进一步使用。

[0135] 2.自脐带组织中分离间充质脐带衬干细胞

[0136] 2.1制备用于处理来自脐带组织的MSC的培养基:

[0137] a.按照所列顺序将以下混合,以制备500ml PTT6(培养/生长培养基):

[0138] i.DMEM,250ml

[0139] ii.M171 118ml

[0140] iii.DMEM F12 118ml

[0141] iv.FBS12.5ml(终浓度为2.5%)

[0142] v.EGF 1ml(终浓度为10ng/ml)

[0143] vi.胰岛素0.175ml(终浓度为5 μ g/ml)

[0144] 上述组分i至vi的体积得到终体积为499.675ml的培养基。如果不再向培养基中添

加其他组分,则剩余的0.325ml(加至500ml的体积)可以是例如组分i至iv中的任意者,这意味着可以是DMEM、M171、DMEM/F12或FBS。可选地,当然可以调节EGF或胰岛素储备液的浓度,使得培养基的总体积为500ml。可选地,可以加入抗生素(比如青霉素-链霉素-两性霉素)的储备液以得到终体积为500ml。还可以向所述培养基中添加0.325ml体积的以下补充物中的一种或多种:腺嘌呤、氢化可的松和3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(T3),由此得到总体积为500ml的培养基。

[0145] vii.在瓶身上标注“PTT6”、培养基的制备日期、操作人员的首字母,并在短语“到期”后面标注到期日。到期日是指任何组分的最早到期日,或自制备日期起计1个月,以先到者为准。

[0146] b.在50ml离心管中,将2.5ml FBS加入47.5ml HBSS中,以制备漂洗培养基(不含钙或镁、具有5% FBS的Hank's缓冲盐溶液(HBSS))。在管上标注“漂洗培养基”、操作人员的首字母和培养基的制备日期。

[0147] c.采用Bactec Lytic/10-Anaerobic/F(Becton Dickinson&Company)和Bactec Pluc+Aerobic/F(Becton Dickinson&Company)对所有培养基进行无菌检验。向每个瓶中注入20ml制备的培养基。

[0148] 2.2解冻用于MSC收获的脐带组织:

[0149] a.当操作人员准备好在洁净室中处理样品时,开始解冻。除非这些小瓶来自同一捐赠者,否则每次解冻的小瓶不得超过1瓶。

[0150] b.用消毒剂擦拭水浴,然后用70%异丙醇擦拭,并将1L无菌水注入水浴。将水浴加热至36-38°C。

[0151] c.在洁净室中在生物安全柜下准备10mL由70%至90% PlasmaLyte A组成的漂洗培养基。使用连接到10ml注射器的0.2- μ m注射器过滤器对溶液进行无菌过滤,并保持溶液冷藏直至使用。

[0152] d.将处理标签贴在50ml锥形管上。

[0153] e.确认水浴温度为36-38°C。

[0154] f.从液氮储存器中取出组织小瓶,并在装有1L无菌水的37°C水浴中快速解冻。用于Mr.Frosty NalgeneCryo 1°C冷冻容器的小瓶支架与小瓶一起漂浮,可以在解冻样品时用作浮动架。

[0155] g.将小瓶自水浴中取出,并用70%异丙醇溶液喷洒。将小瓶从水浴中取出的良好时机是可以看到小冰漂浮在小瓶中时——建议小瓶的内部温度低于37°C。

[0156] h.将小瓶放入传递通道并提醒洁净室处理技术人员。

[0157] 2.3组织处理的准备:

[0158] a.脐带组织处理应在环境监测(EM)的洁净室中进行。在每个班次结束时,都要对整个房间和安全罩(hood)进行清洁。

[0159] b.准备/清洁生物安全柜。

[0160] c.在生物安全柜中工作时进行存在颗粒计数。

[0161] d.在生物安全柜中组装所有必要的供应品,检查每个供应品的包装破损及到期日。在拿取注射器、血清移液管、无菌镊子、手术刀、组织板和针头时,确保不要接触任何与无菌产品接触的表面。仅注射器筒、管道、柱塞头和/或针帽或护套的外部是可以安全地拿

取的。如果所述表面已被触摸或接触到非无菌表面,则丢弃该供应品。

[0162] e. 记录要使用的所有试剂和供应品的批号和到期日(如果适用)。

[0163] f. 通过用浸有70%酒精的无绒布清洁小瓶,然后转移到生物安全柜中,来接收解冻的小瓶。

[0164] g. 使用带注射器的吸液针,从小瓶中取出尽可能多的液体。避免吸入组织。

[0165] h. 使用无菌镊子,将组织转移到无菌的100mm培养皿中。

[0166] i. 向组织碎片中加入等份的5ml漂洗培养基。

[0167] j. 旋转内容物15-30秒,然后用移液管或带吸液针的注射器取出漂洗培养基。重复此漂洗过程两次

[0168] k. 向组织中加入2mL漂洗培养基以避免组织干燥。

[0169] 2.4开始MSC自组织的向外生长:

[0170] a. 在6孔板底部标记“向外生长1”、MSC批号或脐带组织ID以及开始向外生长的日期。如果采用60mm组织培养皿,则通过在培养皿底部画一个网格将培养板分成4个象限。

[0171] b. 使用无菌一次性镊子,将一个3x 3mm至5x 5mm的组织放入每个孔中。如果使用60mm组织培养皿,则将组织放入每个象限的中间以保持组织分开(彼此相距超过1cm)。

[0172] c. 向每个孔中加入3ml PTT6。

[0173] d. 使用连接到30ml注射器的吸液针,吸取足够的培养基以勉强覆盖组织。不要使板倾斜。不要用吸液针接触孔底。

[0174] e. 使用倒置光学显微镜,每天观察细胞生长晕(24±6小时)。可以使用实时细胞培养成像系统代替光学显微镜。

[0175] f. 每天更换培养基。在使用前务必确保将所述培养基平衡至室温。

[0176] i. 吸掉所述培养基。

[0177] ii. 加入3ml PTT6。

[0178] iii. 抽吸直至组织几乎浸没在培养基中。

[0179] g. 当观察到自组织中的细胞向外生长时,则采用上述如4.a至4.e相同的程序将所述组织移植到一个新的6孔板中,不同的是在板上标记“向外生长2”。通过向每个孔中加入2ml PTT6来维持“向外生长1”板中的细胞生长晕。每天观察融合情况。每2-3天更换培养基(在使用前务必确保将所述培养基平衡至室温)。

[0180] h. 当在“向外生长2”板中观察到细胞生长晕时,重复步骤4.a至4.e,不同的是在板上标记“向外生长3”。通过向每个孔中加入2ml PTT6来维持“向外生长2”板中的细胞生长晕。每天观察融合情况。每2-3天更换培养基(在使用前确保将所述培养基平衡至室温)。

[0181] i. 当在“向外生长3”板中观察到生长晕时,弃去组织。如果组织非常小且似乎不干扰细胞生长,则在传代培养时再处置该组织。

[0182] j. 当细胞达到40-50%融合,每天观察细胞以防止过度扩增。

[0183] k. 当细胞达到70-80%融合,使细胞传代培养。不要让细胞扩增到超过80%融合。

[0184] 组织分离块的尺寸为约1-3mm,并且组织分离块法/细胞培养在175平方毫米的培养皿中进行,因此,从分离块收获的间充质干细胞的平均数量通常为约4,000-6,000个细胞/分离块。由此,当间充质干细胞同时自48个分离块长出时,在收获时可以获得约300,000个细胞。然后,通过将这300,000个细胞按照下文实施例2.5中所述接种在175cm²细胞培养

瓶中(这可以称为第1代),将从分离块收集的这300,000个间充质干细胞用于传代培养。然后可以将从该第1代获得的间充质干细胞再次接种在175cm²细胞培养瓶中(第2代)并按照下文实施例2.5中所述扩增细胞。从第1代和第2代获得的细胞可以通过冷冻保存成为“库”,其中将第2代之后获得的间充质干细胞看作代表主细胞库,其将用于例如在如下实施例2.7中描述的生物反应器中进一步扩增间充质干细胞。

[0185] 2.5. 在细胞培养皿中传代培养MSC

[0186] a. 在生物安全柜中工作时进行存在颗粒计数。在使用前,将全部培养基平衡至室温。

[0187] b. 当细胞生长晕达到约70-80%融合时,传代培养细胞。

[0188] i. 自培养皿中移除PTT6。

[0189] ii. 用不含钙或镁的HBSS漂洗。

[0190] iii. 加入0.2ml 1X TrypLE-EDTA并旋转1-2分钟。

[0191] iv. 将培养皿倾斜30-45°,使细胞通过重力流向下移动。在板的侧面轻轻敲击加速分离。

[0192] v. 加入1ml PTT6。轻轻上下移液,然后将细胞转移到15ml离心管中。每个孔使用干净的移液管头。可以将来自所有6个孔的细胞合并到单个15ml管中。

[0193] vi. 以1200rpm离心10分钟。

[0194] vii. 移除上清液并将细胞重悬浮于5ml PTT6中。

[0195] c. 传代培养MSC。

[0196] i. 等分50μl的细胞悬浮液,并分析TNC和通过台盼蓝拒染测定(Trypan Blue Exclusion Assay)分析存活率。

[0197] ii. 使用血细胞计数器对细胞计数。预计计数20-100个细胞/平方。如果计数高于100,则将原始样品以1:5稀释,并使用血细胞计数器重复台盼蓝法。

[0198] iii. 计算存活细胞/ml以及总存活细胞:

[0199] 1、存活细胞/ml = 存活细胞计数 × 稀释因子 × 10⁴

[0200] 2、总存活细胞 = 存活细胞计数 × 稀释因子 × 总体积 × 10⁴

[0201] iv. 计算%存活率:

[0202] 1、%存活率 = 存活细胞计数 × 100 / (存活细胞计数 + 死亡细胞计数)

[0203] v. 将细胞悬浮液稀释至1.0 × 10⁶个细胞/ml

[0204] 1、“X”体积 = 总存活细胞 / 10⁶个细胞/ml

[0205] 2、例如,如果总存活细胞个数为1.0 × 10⁷;

[0206] 3、“X” = 10⁷ / 10⁶个细胞/ml或10ml,因此,通过向细胞悬浮液(即5ml)中加入5ml,可以使总细胞体积达到10ml。

[0207] vi. 如果细胞悬浮液小于10⁶/ml,则确定每个150mm培养皿或175cm²瓶中接种2 × 10⁶个细胞所需的体积。

[0208] 1、2 × 10⁶个细胞所需的体积 = 2 × 10⁶个细胞 ÷ 存活细胞/ml

[0209] 2、例如,如果存活细胞/ml为8 × 10⁵个细胞/ml,则需要2 × 10⁶个细胞 ÷ 8 × 10⁵个细胞/ml或2.5ml。

[0210] vii. 留出0.5ml用于MSC标记物分析。

- [0211] viii.在具有30ml PTT6的150mm培养皿或175cm²瓶中接种 2×10^6 个细胞。
- [0212] ix.每三天观察细胞的贴壁、集落形成和融合。当细胞达到40-50%融合时,每1-2天观察细胞以防止过度扩增。不要让细胞扩增到超过80%融合。可以使用实时细胞培养监测系统代替光学显微镜。
- [0213] x.每2-3天更换培养基。
- [0214] 2.6冷冻保存MSC细胞
- [0215] a.在生物安全柜中工作时进行存在颗粒计数。
- [0216] b.当细胞达到约70-80%融合时,对每个150mm培养皿或175cm²瓶使用2ml 1X TrypLE-EDTA以分离细胞。
- [0217] i.自培养皿中移除PTT6。
- [0218] ii.用5ml不含钙或镁的HBSS或PBS洗涤。
- [0219] iii.加入2ml 1X TrypLE-EDTA并旋转1-2分钟。
- [0220] iv.将培养皿倾斜30-45°,使细胞通过重力流向移动。在培养皿的侧面轻轻敲击帮助加速分离。
- [0221] v.加入10ml PTT6使TrypLE失活。充分混合使细胞团块分离。
- [0222] vi.采用Pasteur移液管将细胞转移至15ml离心管中。
- [0223] vii.以1200rpm离心10分钟。
- [0224] viii.吸取培养基并用10ml PTT6重悬浮。
- [0225] ix.等分50 μ l,并如上所述测定总存活细胞数和%存活率。由于细胞可能开始出现团块,因此细胞计数需要在15分钟之内完成。
- [0226] c.准备细胞冷冻保存。
- [0227] i.准备细胞悬浮培养基和冷冻保存培养基,并冷冻细胞
- [0228] 2.7.在Quantum生物反应器(Terumo BTC, Inc.)中传代培养(扩增)MSC
- [0229] 也可以采用Quantum生物反应器,其可用于使MSC扩增。在Quantum生物反应器中用于扩增的起始细胞数量应为每次运行2千万至3千万个细胞。收获时通常每次运行的产量为3亿至7亿MSC。按照制造商的说明操作生物反应器。通常将由此获得的间充质干细胞冷冻保存(参见下述)并作为工作细胞库。
- [0230] 材料/试剂:
- [0231] 1、Quantum扩增装置
- [0232] 2、Quantum废物袋
- [0233] 3、Quantum培养基袋
- [0234] 4、Quantum进入袋
- [0235] 5、PTT6
- [0236] 6、PBS
- [0237] 7、纤连蛋白
- [0238] 8、TrypLE
- [0239] 9、3ml注射器
- [0240] 10、葡萄糖试纸
- [0241] 11、乳酸试纸

- [0242] 12、60ml细胞培养板或等同物
- [0243] 13、医疗级5% CO₂气体混合物
- [0244] 14、50ml Combi-tip
- [0245] 设备:
- [0246] 1、生物安全柜
- [0247] 2、血糖仪 (Bayer Healthcare/Ascensia Contour血糖仪)
- [0248] 3、Lactate Plus (Nova Biomedical)
- [0249] 4、带头部的蠕动泵 (Peristaltic pump)
- [0250] 5、离心机, Eppendorf 5810
- [0251] 6、无菌管连接器
- [0252] 7、M4重复移液器
- [0253] 8、RF密封器
- [0254] 过程:
- [0255] 1、准备Quantum生物反应器
- [0256] a) 启动Quantum生物反应器
- [0257] b) 涂布生物反应器:
- [0258] 1) 在生物安全柜中准备纤连蛋白溶液。
- [0259] 1) 使冻干的纤连蛋白适应室温 (在室温下 $\geq 15\text{min}$)
- [0260] 2) 加入5ml无菌蒸馏水; 不要旋转或搅动
- [0261] 3) 使纤连蛋白形成溶液30分钟。
- [0262] 4) 使用连接有18g针头的10ml注射器, 将纤连蛋白溶液转移到含有95ml PBS的细胞进入袋中。
- [0263] 2) 将袋子连接到“试剂”管线
- [0264] 3) 检查气泡 (可通过使用“移除IC空气”或“移除EC空气”并使用“洗涤”作为进入来源去除气泡。
- [0265] 4) 打开或设置涂布生物反应器的程序 (图1, 步骤3-5)。
- [0266] 5) 运行程序
- [0267] 6) 当程序运行以涂布生物反应器时, 准备具有4L PTT6培养基的培养基袋。
- [0268] 7) 使用无菌管连接器将培养基袋连接到IC培养基管线。
- [0269] 8) 当生物反应器涂布步骤完成时, 使用RF密封器分离用于纤连蛋白溶液的细胞进入袋。
- [0270] c) 洗掉过量的纤连蛋白
- [0271] d) 用培养基调节生物反应器。
- [0272] 2、在Quantum生物反应器中培养细胞
- [0273] a) 用均匀悬浮液加载并附着细胞:
- [0274] b) 饲养并培养细胞
- [0275] 1) 选择培养基流速来喂养细胞。
- [0276] 2) 每天进行乳酸和葡萄糖的采样。
- [0277] 3) 随着乳酸水平的增加, 调节培养基的流速。实际最大耐受乳酸浓度将由细胞来

源的培养瓶培养确定。确定培养基袋中是否有足够的PTT6培养基。如有必要,用一个新的PTT6培养基袋替换所述PTT6培养基袋。

[0278] 4) 当流速达到预期值时,每8-12小时测量一次乳酸水平。如果乳酸水平没有下降或如果乳酸水平继续增加,则收获细胞。

[0279] 3、自Quantum生物反应器中收获细胞

[0280] a) 当乳酸浓度没有降低时,最后一次对乳酸和葡萄糖采样后收获细胞。

[0281] b) 收获细胞:

[0282] 1) 使用无菌管连接器将装有100ml TrypLE的细胞进入袋连接到“试剂”管线上。

[0283] 2) 确认PBS袋中有足够的PBS。如果没有,使用无菌管连接器将具有至少1.7升PBS的新袋连接到“洗涤”管线。

[0284] 3) 运行Harvest程序

[0285] 4、冷冻保存细胞

[0286] 1) 一旦收获细胞,将细胞转移到50ml离心管中以沉淀细胞。

[0287] 2) 使用25ml冷细胞悬浮液重悬浮。使用Sysmex或Biorad细胞计数器计数细胞。将细胞计数报告附加到相应的Quantum处理批记录。

[0288] 3) 将细胞浓度调节至 2×10^7 /ml

[0289] 4) 加入等体积的冷冻保存液并充分混合(不要震荡或涡旋)

[0290] 5) 使用重复移液器,向每个1.8ml小瓶中加入1ml在冷冻保存液中的细胞悬浮液。如SOP D6.100 CB Cryopreservation Using Controlled Rate Freezers中所述,使用CRF程序冷冻保存。

[0291] 6) 将小瓶存放在指定的液氮储存空间中。

[0292] 7) 将CRF运行报告附加到相应MSC P3-Quantum处理批记录的表格中。

[0293] 3、采用不同的培养基,分析自脐带组织中分离的间充质脐带衬干细胞群中干细胞标记物的表达

[0294] 进行流式细胞术实验以分析自脐带中分离的间充质干细胞的间充质干细胞标记物CD73、CD90和CD105表达。

[0295] 对于这些实验,通过在三种不同的培养基中培养脐带组织,自所述脐带组织中分离间充质干细胞,然后如实施例2所示,在相应的培养基中使所述间充质干细胞传代培养。

[0296] 在这些实验中,采用了以下三种培养基:a) 补充了10%FBS (v/v) 的90% (v/v) DMEM, b) 在美国专利申请2006/0078993和对应的国际专利申请W02006/019357中描述的PTT-4培养基,其由90% (v/v) CMRL1066和10% (v/v) FBS组成(参见W02006/019357的第[0183]段)和c) 本发明的PPT-6培养基,其组成在本文中描述。在该流式细胞术分析中,在所采用的三种培养基的每一种中分析了脐带衬间充质干细胞(CLMC)群的两种不同样品。

[0297] 所述流式细胞术分析采用以下规程。

[0298] 材料和方法

[0299]

仪器名称	公司名称	系列名称
BD FACS CANDO	BD	V07300367
倒置显微镜,CKX41SF	Olympus	4K40846
离心机,微旋转台面型	Biosan	010213-1201-0003

	试剂清单	公司名称	产品目录号
[0300]	10 X Trypsin	Biowest	X0930-100
	10 X PBS	Lonza	17-517Q
	DMEM	Lonza	12-604F
[0301]	胎牛血清	GE healthcare	A11-151
	抗体清单	公司名称	产品目录号
[0302]	人 CD73 纯化的 AD2 0.1mg	BD	550256
	人 CD90 纯化的 5E10 1mL	BD	550402
	人 CD105 纯化的 266 0.1mg	BD	555690
	Alexa Fluor 647 山羊抗-小鼠 IgG (H+L) *2 mg/mL*	BD	A21235
	试剂名称	组成	
[0303]	1 X PBS (1L)	100ml 的 10 X PBS + 900ml 的无菌蒸馏 H ₂ O	
	1x PBA (50ml)	49.5ml 的 1XPBS + 0.5 ml 的 FBS	

[0304] 过程:

[0305] a) 从脐带衬膜中分离并培养细胞

[0306] 1、将分离块组织样品在细胞培养板中温育并浸没在相应的培养基中,然后如实施例2中所述将其保持在37°C的CO₂培养箱中。

[0307] 2、每3天更换一次培养基。

[0308] 3、在光学显微镜下监测来自组织培养分离块的细胞向外生长。

[0309] 4、在约70%融合时,通过胰蛋白酶消化(0.0125%胰蛋白酶/0.05% EDTA)将细胞自培养皿中分离并用于流式细胞术实验。

[0310] b) 用于实验的细胞的胰蛋白酶消化

[0311] 1、自细胞培养板中移除培养基。

[0312] 2、用无菌1X PBS轻轻冲洗以除去痕量的FBS,因为FBS会干扰胰蛋白酶的酶促作用。

[0313] 3、向细胞培养板中加入1X胰蛋白酶并在37°C下温育3-5min。

[0314] 4、在显微镜下观察细胞并确保细胞脱落。通过添加含有FBS的完全培养基(含10% FBS的DMEM)中和胰蛋白酶。

[0315] 5、采用移液管通过将培养基中的细胞对着培养板壁抽吸来打破细胞团块。收集细胞悬浮液并将其转移到50ml离心管中

[0316] 6、将无菌1X PBS加入板中并漂洗,将细胞悬浮液收集到相同的离心管中。

[0317] 7、以1800rpm离心10分钟。

- [0318] 8、弃去上清液并用PBA培养基使细胞团块重新悬浮。
- [0319] c) 计数细胞
- [0320] 1、确保血细胞计数器及其盖玻片清洁且干燥,优选地,用70%乙醇洗涤并晾干,然后用Kim纸巾(无尘纸)擦拭。
- [0321] 2、将少量悬浮的细胞等分到微量离心管中,并从BSC罩中取出。
- [0322] 3、用等体积的台盼蓝染色悬浮细胞,例如向500 μ l悬浮液中加入500 μ l台盼蓝(稀释因子=2X,得到0.2%台盼蓝溶液)。
- [0323] 4、由于台盼蓝有毒并且会导致非存活细胞增加,从而得到错误的细胞计数,因此避免将细胞暴露于台盼蓝超过30分钟。
- [0324] 5、将20 μ l细胞悬浮液混合物加入血细胞计数器的每个槽中,并在光学显微镜下观察。
- [0325] a. 在血细胞计数器的每个象限中计数存活细胞(明亮细胞;非存活细胞容易吸收台盼蓝,因此呈暗色)的数量,上下槽中总共8个象限。
- [0326] 总细胞数以(平均细胞数量/象限) $\times 10^4$ 个细胞/ml给出。
- [0327] d) 染色细胞
- [0328] i. 染色细胞前的准备
- [0329] • 将细胞悬浮液一式两份地等分到3个试管中(CD73、CD90、CD105)和2个试管(阴性对照),每个试管含有50,000个细胞。
- [0330] ii. 采用一抗(Ab)染色
- [0331] • 向100 μ l细胞悬浮液中加入1 μ l [0.5mg/ml Ab]一抗。在4 $^{\circ}$ C下温育45min。
- [0332] • 使用PBA补充至1ml。
- [0333] • 在4 $^{\circ}$ C下以8000rpm离心5min。
- [0334] • 移除上清液。
- [0335] • 加入1ml PBA并将团块重悬浮。
- [0336] • 在4 $^{\circ}$ C下以8000rpm离心5min。
- [0337] • 移除上清液。
- [0338] • 重悬浮于100 μ l PBA中。
- [0339] iii. 采用二抗Ab染色-在黑暗中
- [0340] • 向100 μ l细胞悬浮液中加入1 μ l [0.5mg/ml ab]二抗。在4 $^{\circ}$ C下温育30min。
- [0341] • 使用PBA补充至1ml。
- [0342] • 在4 $^{\circ}$ C下以8000rpm离心5min。
- [0343] • 移除上清液。
- [0344] • 加入1ml PBA并将团块重悬浮。
- [0345] • 在4 $^{\circ}$ C下以8000rpm离心5min。
- [0346] • 移除上清液。
- [0347] • 重悬浮于200-300 μ l PBA中以用于流式细胞术分析。
- [0348] • 将细胞转移至FACS管中以在BD FACS CANDO流式细胞仪中读取。
- [0349] 流式细胞术分析的结果示于图6a至图6c。图6a示出了在自脐带组织分离并在DMEM/10% FBS中培养后,表达干细胞标记物CD73、CD90和CD105的分离的间充质脐带衬干

细胞的百分数,图6b示出了在自脐带组织中分离并在PTT-4中培养后,表达干细胞标记物CD73、CD90和CD105的分离的间充质脐带衬干细胞的百分数,和图6c示出了在自脐带组织中分离并在PTT-6中培养后,表达干细胞标记物CD73、CD90和CD105的分离的间充质脐带衬干细胞的百分数。从图6a中可以看出,采用DMEM/10% FBS作为培养基培养的分离的细胞群具有约75% CD73+细胞、78% CD90+细胞和80% CD105+细胞(两组实验的平均值),而在采用PPT-4培养基(参见图6b)的脐带组织的分离/培养后,CD73-阳性、CD90-阳性和CD105-阳性的间充质干细胞的数目为约87% (CD73+细胞)、93% (CD90+细胞)和86% (CD105+细胞),为两组实验的平均值。关于全部三种标记物(CD73、CD90、CD105),通过在本发明的PTT-6培养基中的培养手段获得的间充质干细胞群的纯度为至少99.0%,意味着该细胞群的纯度显著高于采用PPT-4培养基或DMEM/10% FBS的培养。此外甚至更重要的,通过在PTT-6中的培养手段获得的间充质干细胞群基本上是100%纯的且定义的干细胞群。这使得本发明的干细胞群成为基于干细胞的疗法的理想候选者。因此,这种间充质脐带衬干细胞群可能成为基于此类干细胞的治疗方法的黄金标准。

[0350] 通过图7a和图7b中所示的流式细胞术分析的结果进一步证实了示于图6中的发现。图7a示出了在自脐带组织中分离并在PPT-6培养基中培养后,表达干细胞标记物CD73、CD90和CD105且缺乏CD34、CD45和HLA-DR的表达的分离的间充质脐带衬干细胞(脐带的羊膜的间充质干细胞)的百分数。如图7a所示,间充质干细胞群含有97.5%的存活细胞,其中100%表达CD73、CD90和CD105中的每一个(参见“CD73+CD90+”和“CD73+CD105+”行),而干细胞群的99.2%不表达CD45,并且干细胞群的100%不表达CD34和HLA-DR(参见“CD34-CD45-”和“CD34-HLA-DR-”行)。因此,通过在PTT-6培养基中培养获得的间充质干细胞群基本上是100%纯的和限定的干细胞群,其满足用于细胞疗法的间充质干细胞的标准(干细胞群的95%或更多表达CD73、CD90和CD105,而干细胞群的98%或更多缺乏CD34、CD45和HLA-DR的表达,参见Sensebe等,“Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices:areview”,上文)。这里应注意,本发明的羊膜的间充质干细胞在标准培养条件下粘附于塑料并在体外分化为成骨细胞、脂肪细胞和成软骨细胞,参见美国专利9,085,755、美国专利8,287,854或W02007/046775,因此符合普遍接受的用于细胞疗法的间充质干细胞的标准。

[0351] 图7b示出了表达CD73、CD90和CD105且缺乏CD34、CD45和HLA-DR的表达的分离的骨髓间充质干细胞的百分数。如图7b所示,所述骨髓间充质干细胞群含有94.3%的存活细胞,其中100%表达CD73、CD90和CD105中的每一个(参见“CD73+CD90+”和“CD73+CD105+”行),而该骨髓干细胞群的仅62.8%缺乏CD45的表达,并且干细胞群的99.9%缺乏CD34和HLA-DR的表达(参见“CD34-CD45-”和“CD34-HLA-DR-”行)。因此,相比于本申请的(脐带的羊膜的)间充质干细胞群,被认为是间充质干细胞的金标准的骨髓间充质干细胞在干细胞标记物方面具有远远更低的同源性/纯度。这一发现也表明本发明的干细胞群可以是基于干细胞的疗法的理想候选者,并且该干细胞群可成为基于干细胞的治疗方法的金标准。

[0352] 在不脱离本发明范围和精神的情况下,可对本文中公开的本发明进行各种替代和修改对于本领域技术人员是显而易见的。

[0353] 本说明书内所提及的所有专利和公开文本代表了本发明所属领域的普通技术人员的水平。所有专利和公开文本以引用的方式并入本文,引用程度如同每个单独公开文本

以引用的方式具体且单独地并入一样。

[0354] 本文中以说明性的方式描述的本发明可在本文中未具体公开的任何一个或多个要素、任何一种或多种限制不存在的情况下实施。因此,例如,术语“包括”、“包含”和“含有”等应广泛地理解,并无限制性。此外,本文采用的术语和表达已用作描述的措辞,并非限制性,并且在使用这些术语和表达时没有排除所示和描述的特征或其部分的任何等同形式的意图,而是认可可以在本发明要求保护的范围内进行各种修改。因而,应该理解,尽管通过优选的实施方案和可选择的特征具体公开了本发明,但是本领域技术人员可对本文公开的其中呈现的发明进行修改和改变,这种修改和改变被认为是在本发明的保护范围内。本文对本发明进行了宽泛和一般性描述。落入一般公开内容内的每一个较窄种类和亚属分组也形成本发明的一部分。在从类别中去除任何主题的前提或负面限制情况下,这包括了本发明的一般性描述,无论删除的内容是否在本文详细说明。此外,在本发明的特征或方面按照马库什组进行描述的情况下,本领域技术人员将认识到,本发明还由此按照马库什组的任何单个成员或成员亚组进行了描述。根据以下的权利要求,本发明的其它实施方案将是显而易见的。

Lonza

www.lonza.com
 U.S. Scientific Support: 800-521-0390
 scientific.support@lonza.com
 EU/ROW Scientific Support: +49-221-99199-400
 scientific.support.eu@lonza.com
 Document # TS-12-604-3 08/11
 © 2011 Lonza Walkersville, Inc.

杜尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)

产品用途

杜尔贝科改良伊格尔培养基开发于 1969 年，其是一种改良的基础伊格尔培养基(BME)，它与 BME 和 MEM 的不同之处在于以下特征：

- 维生素是 MEM 的 4 倍高。维生素和氨基酸大于 BME
- 氨基酸的种类和数量大于 MEM 和 BME
- 铁（硝酸铁）

描述

- 12-604 含有 4.5g/L 葡萄糖，含有 L-谷氨酰胺
 12-614 含有 4.5g/L 葡萄糖，不含 L-谷氨酰胺
 12-707 含有 1.0g/L 葡萄糖，不含 L-谷氨酰胺
 12-708 含有 1.0g/L 葡萄糖和 25mM HEPES 缓冲液，不含 L-谷氨酰胺
 12-709 含有 4.5g/L 葡萄糖和 25mM HEPES 缓冲液，不含 L-谷氨酰胺
 12-733 含有 4.5g/L 葡萄糖，不含 L-谷氨酰胺，不含丙酮酸钠
 12-741 含有 4.5g/L 葡萄糖，含有 L-谷氨酰胺，不含丙酮酸钠
 12-914 含有 4.5g/L 葡萄糖，不含 L-谷氨酰胺，筛选以支持杂交瘤生长
 12-917 含有 4.5g/L 葡萄糖，不含 L-谷氨酰胺或酚红
 15-604 含有 4.5g/L 葡萄糖，含有 L-谷氨酰胺，不含丙酮酸钠，粉末
 15-614 含有 4.5g/L 葡萄糖，不含 L-谷氨酰胺或丙酮酸钠，粉末
 （粉末配方需要添加 49.3 ml/L 的 NaHCO₃）

快速参考图表

	葡萄糖	L-谷氨酰胺	酚红	HEPES 缓冲液	丙酮酸钠
12-604	4.5 g/L	+	+	-	+
12-614	4.5 g/L	-	+	-	+
12-707	1.0 g/L	-	+	-	+
12-708	1.0 g/L	-	+	+	+
12-709	4.5 g/L	-	+	+	+
12-733	4.5 g/L	-	+	-	-
12-741	4.5 g/L	+	+	-	-
12-914	4.5 g/L	-	+	-	+
12-917	4.5 g/L	-	-	-	+

此处的所有商标均为 Lonza Group 或其子公司的商标。

图1



说明

	无菌性	pH	摩尔渗透压浓度 (mOsm)	细胞生长促进 (对照的%)	内毒素 (EU/ml)
12-604	阴性	7.0-7.4	324-352	≥75%	FIO
12-614	阴性	7.0-7.4	324-352	≥75%	FIO
12-707	阴性	7.0-7.4	306-346	≥75%	FIO
12-708	阴性	7.03-7.27	300-326	≥75%	FIO
12-709	阴性	7.0-7.4	321-351	≥75%	FIO
12-733	阴性	7.0-7.4	318-360	≥75%	FIO
12-741	阴性	7.0-7.4	318-360	≥75%	FIO
12-914	阴性	7.0-7.4	324-352	≥85% **	FIO
12-917	阴性	7.0-7.4	329-343	≥75%	FIO
15-604 ***	-	5.5-7.0	235-265	≥75%	≤1.0
15-614 ***	-	5.5-7.0	235-265	≥75%	≤1.0

FIO-仅供参考

** 功能测试结果

*** 水分含量#1.0

贮存

2°C至 8°C

产品使用声明

这些产品仅供研究使用。未经批准用于人或兽用、用于应用至人类或动物或用于临床或体外程序。

此处的所有商标均为 Lonza Group 或其子公司的商标。

订购信息

产品目录号	描述	规格
12-604F	含有 4.5g/L 葡萄糖、含有 L-谷氨酰胺的 DMEM	500ml
12-604Q	含有 4.5g/L 葡萄糖、含有 L-谷氨酰胺的 DMEM	1L
12-614F	含有 4.5g/L 葡萄糖、不含 L-谷氨酰胺的 DMEM	500ml
12-614Q	含有 4.5g/L 葡萄糖、不含 L-谷氨酰胺的 DMEM	1L
12-707F	含有 1.0g/L 葡萄糖、不含 L-谷氨酰胺的 DMEM	500ml
12-708F	含有 1.0g/L 葡萄糖和 25mM HEPES 缓冲液、不含 L-谷氨酰胺的 DMEM	500ml
12-709F	含有 4.5g/L 葡萄糖和 25mM HEPES 缓冲液、不含 L-谷氨酰胺的 DMEM	500ml
12-733F	含有 4.5g/L 葡萄糖、不含 L-谷氨酰胺、不含丙酮酸钠的 DMEM	500ml
12-733Q	含有 4.5g/L 葡萄糖、不含 L-谷氨酰胺、不含丙酮酸钠的 DMEM	1L
12-741F	含有 4.5g/L 葡萄糖、含有 L-谷氨酰胺、不含丙酮酸钠的 DMEM	500ml
12-914F	含有 4.5g/L 葡萄糖、不含 L-谷氨酰胺的 DMEM, 筛选以支持杂交瘤生长	500ml
12-917F	含有 4.5g/L 葡萄糖、不含 L-谷氨酰胺或酚红的 DMEM	500ml
15-604D	含有 4.5g/L 葡萄糖、含有 L-谷氨酰胺、不含丙酮酸钠的 DMEM, 粉末	1×10L
15-604F	含有 4.5g/L 葡萄糖、不含 L-谷氨酰胺或丙酮酸钠的 DMEM, 粉末	1×50L
15-614D	含有 4.5g/L 葡萄糖、不含 L-谷氨酰胺或丙酮酸钠的 DMEM, 粉末	1×10L

图1续

Lonza

Lonza Walkersville, Inc.
www.lonza.com
biotechserv@lonza.com
Tech Service: 800-521-0390
Document # TS 12-615-2 11/08
Walkersville, MD 21793-0127 USA
© 2008 Lonza Walkersville, Inc.

哈姆 F12 培养基

产品用途

哈姆 F12 培养基是一种营养混合物，设计为与血清并与激素和转铁蛋白组合使用时培养多种哺乳动物和杂交瘤细胞。

说明

无菌性	pH	摩尔渗透压 浓度(mOsm)
阴性	7.07-7.40	286-305

细胞生长 生成	内毒素 (EU/ml)
对照的≥75%	FIO

贮存

2°C至 8°C

产品使用声明

这些产品仅供研究使用。未经批准用于人或兽用、用于应用至人类或动物或用于临床或体外程序。

订购信息

产品 目录号	描述	规格
12-615F	具有 L-谷氨酰胺 的哈姆 F12 培养基	500ml

此处的所有商标均为 Lonza Group 或其子公司的商标。

图2

Lonza

www.lonza.com
 U.S. Scientific Support: 800-521-0390
 scientific.support@lonza.com
 EU/ROW Scientific Support: +49-221-99199-400
 scientific.support.eu@lonza.com
 Document # TS-12-719-3 08/11
 © 2011 Lonza Walkersville, Inc.

DMEM:F12 (1:1)培养基**产品用途**

与哈姆 F12 组合的 DMEM 已广泛用于证明各种激素和生长因子对靶组织的影响。

贮存

2°C 至 8°C

描述

- 12-719 含有 L-谷氨酰胺、15mM HEPES 和 3.151 g/L 葡萄糖
- 15-719 粉末——含有 L-谷氨酰胺、15mM HEPES 和 3.151 g/L 葡萄糖
粉末状培养基需要添加 16.0 ml/L 的 NaHCO₃ 7.5% 溶液或 1.2 g/L 的 NaHCO₃ 粉末
- 04-687 含有 3.151 g/L 葡萄糖，含有 L-谷氨酰胺，不含 HEPES

产品使用声明

这些产品仅供研究使用。未经批准用于人或兽用、用于应用至人类或动物或用于临床或体外程序。

订购信息

产品目录号	描述	规格
12-71 9F	含有 L-谷氨酰胺、15mM HEPES 和 3.151g/L 葡萄糖的 DMEM:F12	500ml
12-719Q	含有 L-谷氨酰胺、15mM HEPES 和 3.151g/L 葡萄糖的 DMEM:F12	1L
15-719D	DMEM:F12-粉末——含有 L-谷氨酰胺、15mM HEPES 和 3.151g/L 葡萄糖。 粉末状培养基需要添加 16.0 ml/L 的 NaHCO ₃ 7.5% 溶液或 1.2g/L 的 NaHCO ₃ 粉末	1×10L
04-687Q	含有 3.151g/L 葡萄糖，含有 L-谷氨酰胺、不含 HEPES 的 DMEM:F12	1L

说明

	无菌性	pH	摩尔渗透压浓度 (mOsm)
12-719	阴性	7.0-7.4	286-356
15-719*	阴性	4.5-6.5	260-290
04-687	阴性	FIO	FIO

	细胞生长促进	内毒素 (EU/ml)	水分
12-719	对照的≥75%	FIO	--
15-719*	对照的≥75%	≤1EU/ml	≤2%
04-687	--	FIO	--

* 在不含 NaHCO₃ 下的 pH、摩尔渗透压浓度、内毒素和水分；添加 NaHCO₃ 用于细胞生长试验。

此处的所有商标均为 Lonza Group 或其子公司的商标。

图3

Cascade Biologics™
invitrogen cell culture

GIBCO®
invitrogen cell culture

培养基 171、培养基 171PRF 和 MEGS

培养基 171

M171-500
500ml

培养基 171PRF

(不含酚红)

M171PRF-500
500ml

产品描述

培养基 171 和培养基 171PRF 是无菌的液体组织培养基,其旨在用作正常人乳腺上皮细胞生长的完全培养环境中的一种组分。培养基 171 是含有必需和非必需氨基酸、维生素、其他有机化合物、微量矿物质和无机盐的基础培养基。培养基 171PRF 是一种不含酚红的形式的培养基 171。这些培养基不含抗生素、抗真菌剂、激素、生长因子或蛋白质。这些培养基是 HEPES 和碳酸氢盐缓冲的,并被设计在气氛为 5%CO₂/95%空气的培养箱中使用。为了支持正常人乳腺上皮细胞的铺板和长期增殖,这些培养基必须补充有乳腺上皮生长补充物 (MEGS, 目录号 S-015-5)。

预期用途

培养基 171 旨在用于正常人乳腺上皮细胞的常规培养。培养基 171PRF 旨在由希望在不存在酚红的情况下培养正常人乳腺上皮细胞的研究者使用。当补充 MEGS 时,这些培养基将支持正常人乳腺上皮细胞以 2.5×10^3 个细胞/cm² 至 8×10^4 个细胞/cm² 的密度铺板和增殖。**本产品仅供研究使用。不适用于动物、人类或诊断程序。**

警告: 如果处理不当,本产品的某些组分可能会对健康造成危害。处理本产品时应采取适当的预防措施,包括穿着防护服并佩戴防护眼镜。正确处理。

贮存和稳定性

培养基 171 和培养基 171PRF 于 4°C 下储存在我们的设施中,并在环境温度下运输。收到后,这些培养基应储存在 4°C 下并且不应冷冻。**避光。**这些组织培养基的若干组分是光不稳定的,我们建议不要将培养基长时间暴露在光线下。如果培养基在使用前加热,则不要超过 37°C。当在 4°C 下于黑暗中储存时,本产品在其标签上的到期日之前保持稳定。

补充的培养基 171 的制备

- 1、解冻一瓶 MEGS。从冷藏室取一瓶培养基。确保容器的盖子很紧。
- 2、轻轻旋转该瓶补充物。避免将补充物溅至瓶盖或导致补充物起泡。
- 3、用比如 70%乙醇或异丙醇的消毒溶液擦拭容器外部。
- 4、在层流培养罩中使用无菌技术,将补充物的全部内容物转移到培养基瓶中。
- 5、紧紧盖住补充培养基瓶并旋转内容物以确保溶液均匀。避免使培养基起泡。

补充的培养基 171 的贮存和稳定性

一旦培养基 171 或培养基 171PRF 补充了 MEGS,则该补充培养基应于 4°C 下在黑暗中储存并且**不应**冷冻。当于 4°C 下在黑暗中储存时,该补充培养基可稳定 1 个月。

参考文献

培养基 171 配方基于培养基 MCDB 170,并进行了修改。

Hammond SL, Ham RG, Stampfer MR; PNAS 81: 5435-5439, 1984

仅供研究使用

Life Technologies Corporation • 5791 Van Allen Way • Carlsbad • CA 92008 • Tel: 800.955.6288 • www.invitrogen.com • E-mail: tech_support@invitrogen.com

MAN0001585

修订日期: 2009 年 5 月 30 日

第 1 页, 共 2 页

图4

Cascade Biologics™
invitrogen cell culture

GIBCO®
invitrogen cell culture

MEGS 乳腺上皮生长补充物

目录号 S-015-5

5 ml

产品描述

乳腺上皮生长补充物(MEGS)是一种无菌浓缩(100X)溶液,其旨在用作正常人乳腺上皮细胞生长的完全培养环境中的一种组分。每瓶5ml MEGS含有正常人乳腺上皮细胞培养所需的全部生长因子、激素和组织提取物,并且恰好是一瓶500ml培养基171或培养基171PRF的补充物的量。MEGS是一种含有牛垂体提取物(BPE)、牛胰岛素、氢化可的松和重组人表皮生长因子的离子平衡补充物。当一瓶500ml的培养基171或培养基171PRF瓶补充了MEGS时,补充培养基中组分的终浓度为: BPE, 0.4% v/v; 牛胰岛素, 5µg/ml; 氢化可的松, 0.5µg/ml; 和重组人表皮生长因子, 3ng/ml。

预期用途

MEGS旨在与培养基171或培养基171PRF联合用于正常人乳腺上皮细胞的常规无血清培养。**本产品仅供研究使用。不适用于动物、人类或诊断程序。**

警告: 如果处理不当, 本产品的某些组分可能会对健康造成危害。处理本产品时应采取适当的预防措施, 包括穿着防护服并佩戴防护眼镜。正确处理。

限制使用标签许可证号 5: Invitrogen Technology

本产品的购买向买方传达在买方(无论买方是学术实体还是营利实体)所进行的研究中使用所购买量的产品和产品组分的不可转让的权利。买方不得出售或转让(a)本产品(b)其组分或(c)使用本产品或其组分制造的材料给第三方, 或不得使用本产品或其组分或使用本产品或其组分制造的材料用于商业目的。买方可以将通过使用本产品而获得的信息或材料转让给科学合作者, 前提是此类转让不是出于任何商业目的, 并且该合作者以书面形式同意(a)不将此类材料转让给任何第三方, (b)仅将此类转让的材料和/或信息用于研究而不是用于商业目的。商业目的是指一方考虑的任何活动, 可能包括但不限于: (1)在制造过程中使用本产品或其组分; (2)使用本产品或其组分提供服务、信息或数据; (3)将本产品或其组分用于治疗、诊断或预防目的; 或(4)转售本产品或其组分, 不论本产品或其组分是否转售用于研究。对于受多个限制使用标签许可的产品, 应使用限制性最强的限制使用标签许可的条款。Life Technologies Corporation不会基于买方在其中采用了本产品或其组分的研究中开发的治疗、临床诊断、疫苗或预防产品的制造、使用或销售而对买方提出侵犯由Life Technologies Corporation拥有或控制的涵盖本产品的专利权的索赔, 前提是在制造此类产品中未使用本产品或其任何组分。如果购买者不愿意接受此限制使用声明的限制, Life Technologies愿意接受退回产品并全额退款。关于购买用于研究之外的目的的本产品许可的信息, 联系许可部门, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008. Phone (760) 603-7200. Fax (760) 602-6500. Email: outlicensing@invitrogen.com.

©2009 Life Technologies Corporation. 版权所有。

仅供研究使用。不用于任何动物或人类治疗或诊断用途。

仅供研究使用

Life Technologies Corporation • 5791 Van Allen Way • Carlsbad • CA 92008 • Tel: 800.955.6288 • www.invitrogen.com • E-mail: tech_support@invitrogen.com

MAN0001585

第 2 页, 共 2 页

修订日期: 2009年5月30日

贮存和稳定性

MEGS于-20°C下储存在我们的设施中,并在干冰上运输。收到后,本产品应储存在-20°C的不能自行除霜的冰箱中。当在-20°C下储存时,本产品在标签上的到期日之前保持稳定。在-20°C下长期储存后,MEGS可能含有少量沉淀物。该沉淀物由MEGS的BPE组分中的冷不溶物质形成,不会影响产品的性能。

解冻

解冻时,将产品置于37°C水浴中或在4°C下过夜。如果在水浴中解冻,在产品解冻后,不要将产品置于37°C下。关于将MEGS添加到培养基171的说明,请参阅基础培养基附带的说明。

参考文献

MEGS配方基于已经公开的培养基MCDB 170的补充物,并进行了修改。

Hammond SL, Ham RG, Stampfer MR; PNAS 81: 5435-5439, 1984

图4续

PTT6 培养基成分列表

培养基组成列表	公司名称	产品目录号
基础培养基		
DMEM (本文也称为 PTT6-基础培养基)	Lonza	12-604F
DMEM/F12	Lonza	12-719F
M171	Life technologies	M171500
血清		
胎牛血清	GE Healthcare	A15-151
抗生素		
青霉素-链霉素-两性霉素 B	Lonza	17-745E
补充物		
腺嘌呤 (任选)	Sigma	A8626-25G
氢化可的松 (任选)	Sigma	H-0888
表皮生长因子	Millipore	GF-144
T3 (3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐) (任选)	Sigma	200-223-5
重组人胰岛素 AOF	Life Technologies	A11382IJ

图5

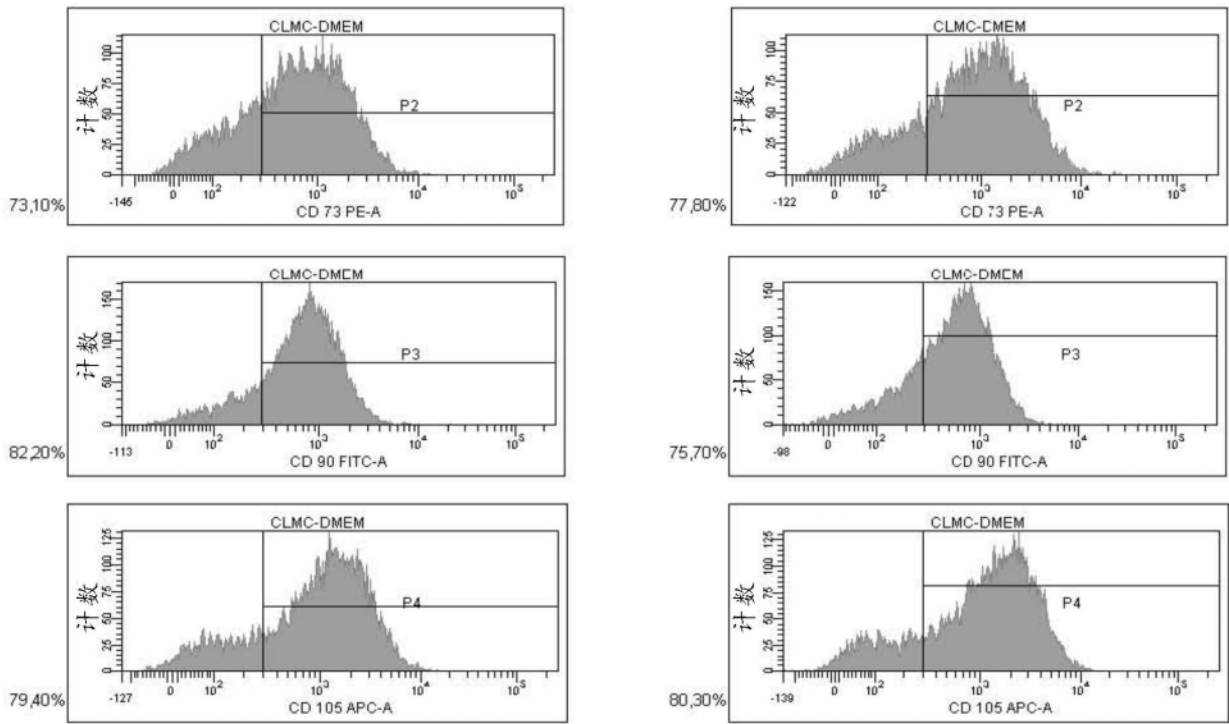


图6a

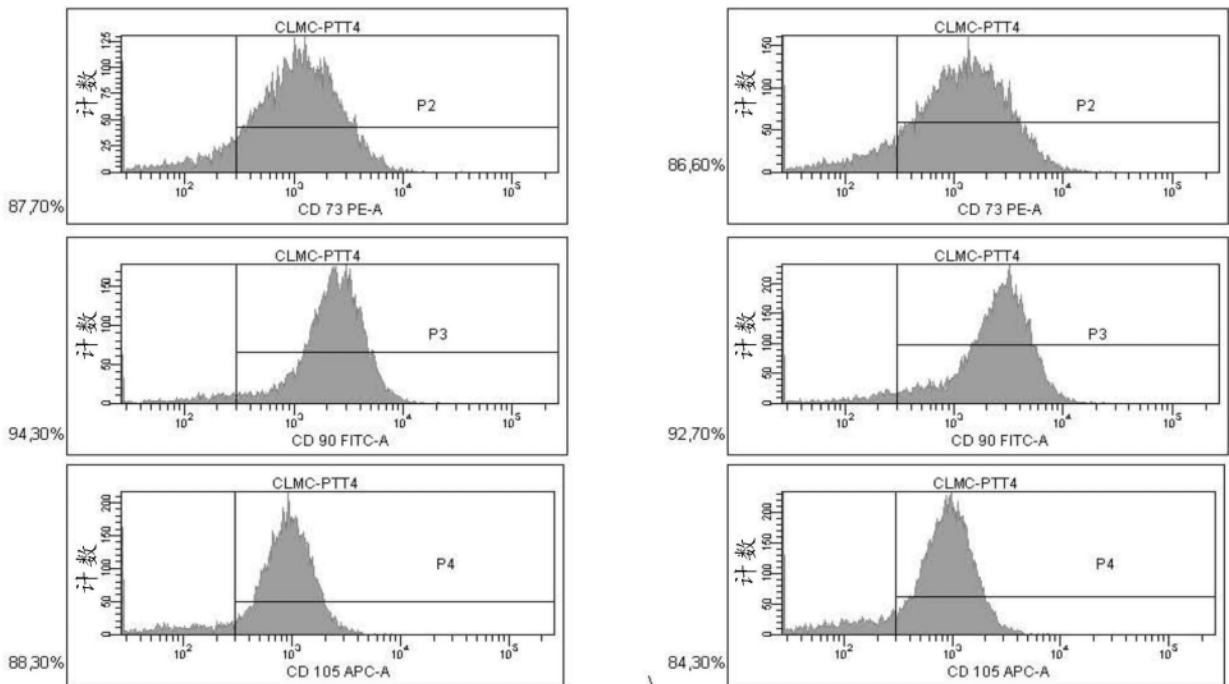


图6b

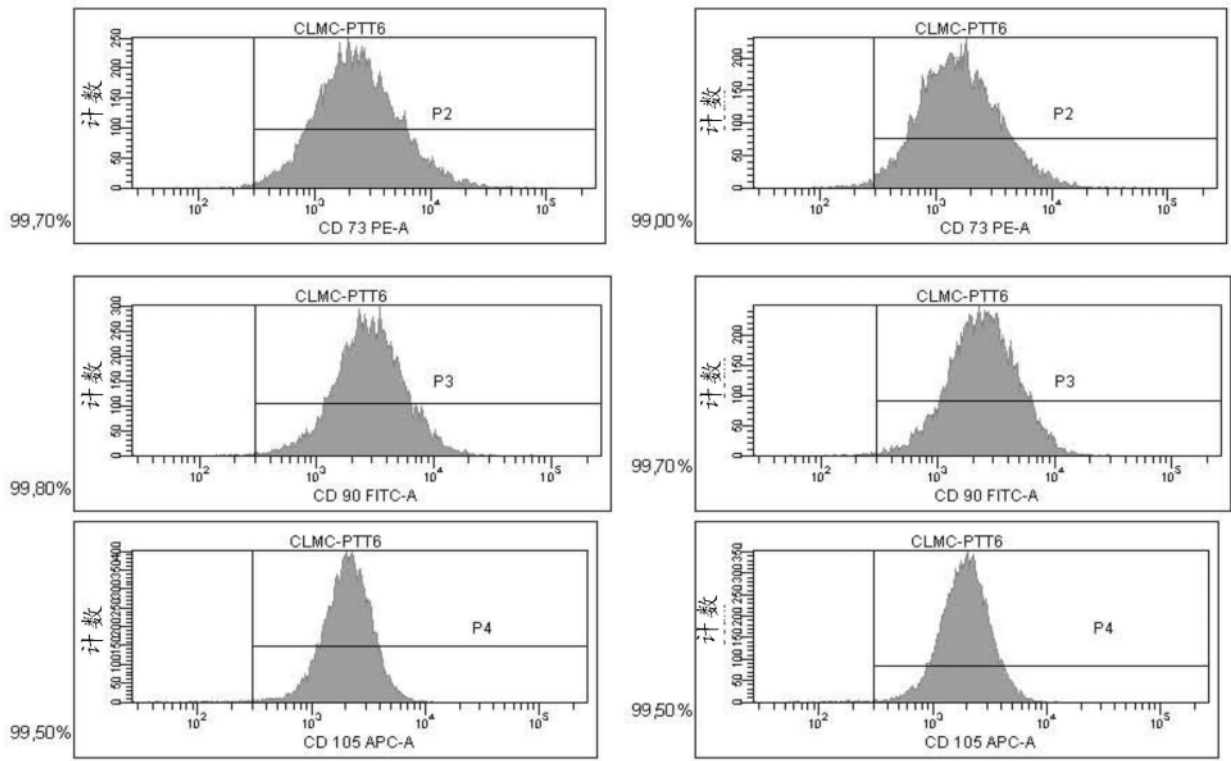


图6c

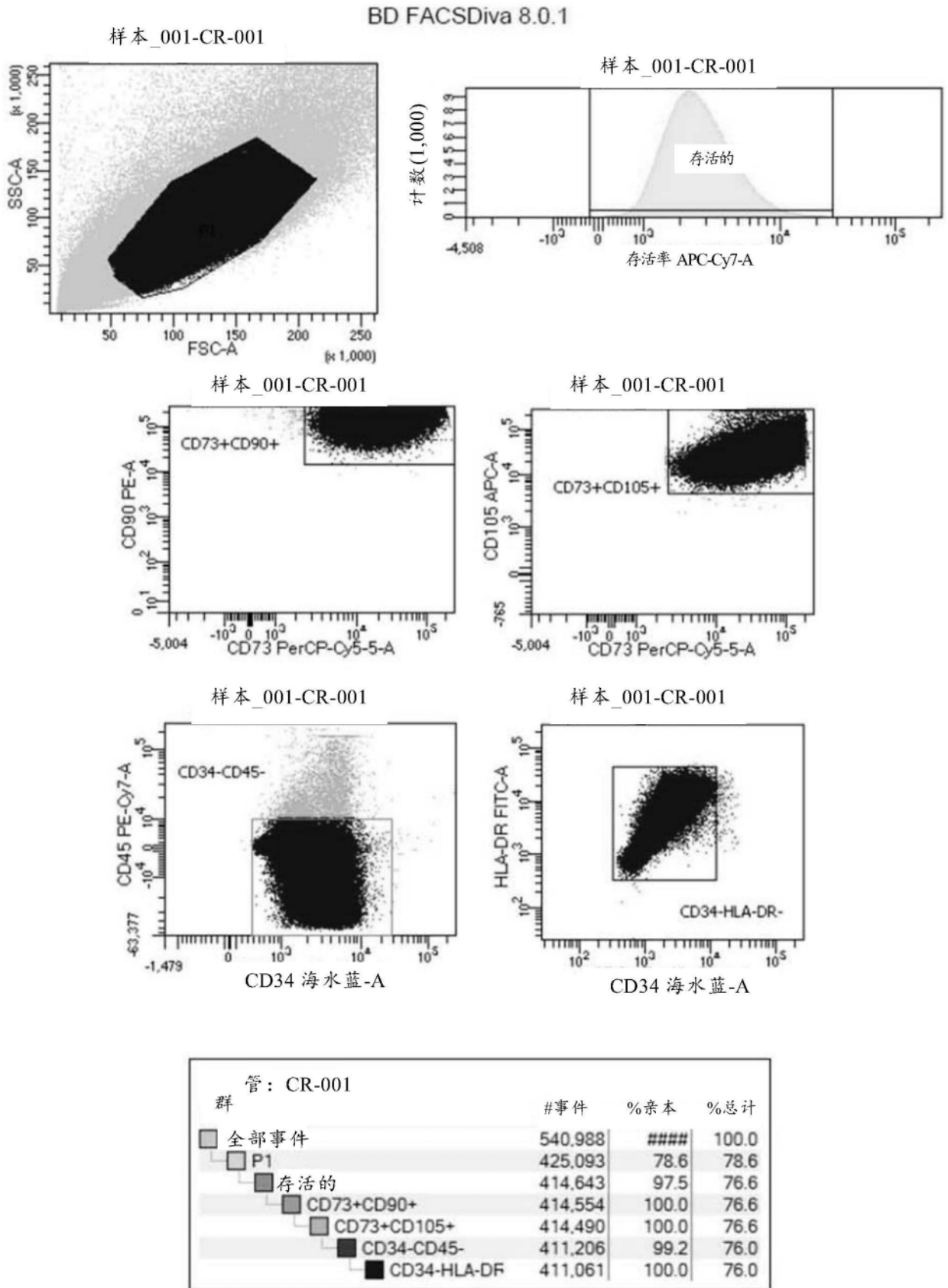


图7a

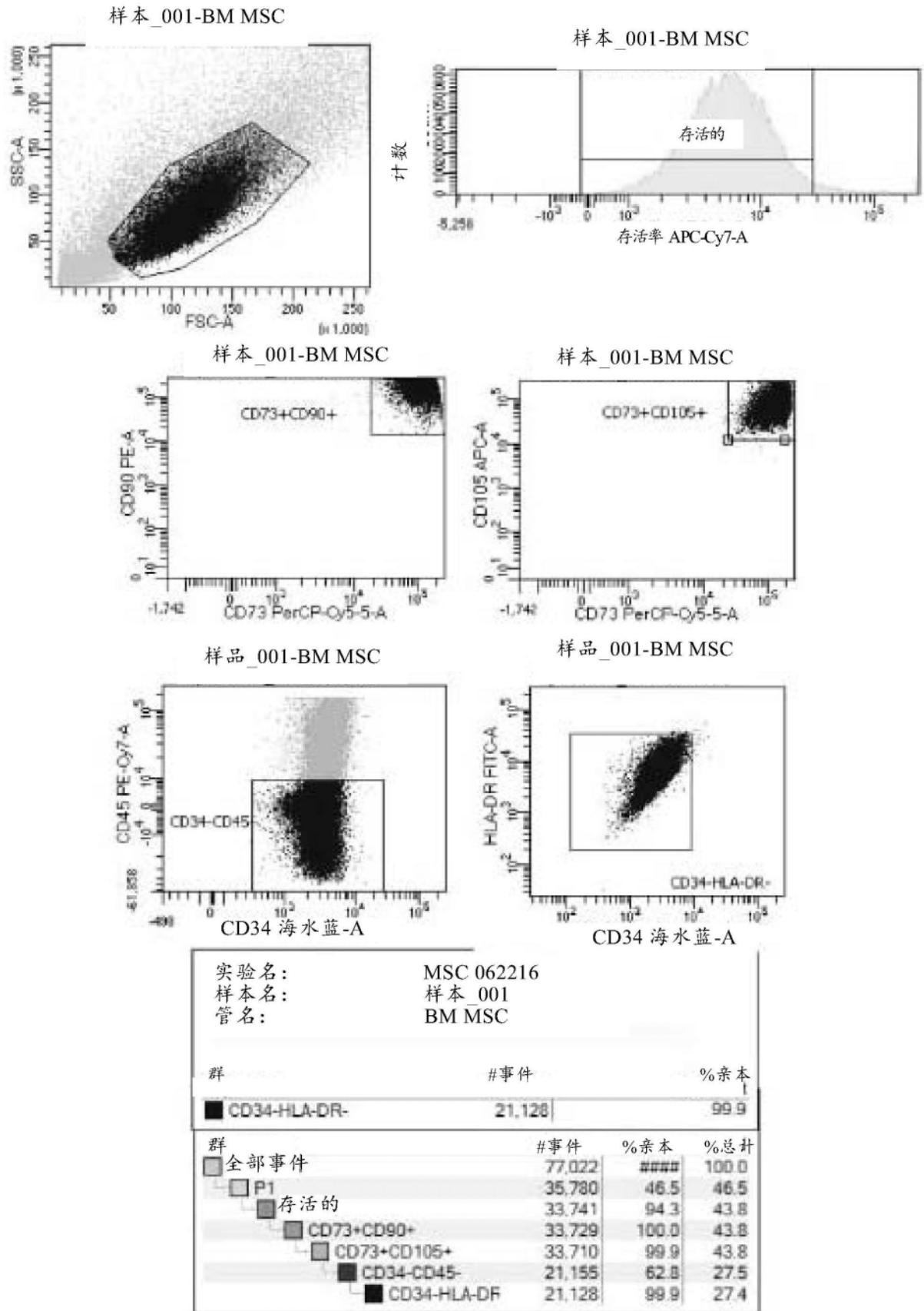


图7b