(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108135154 B
(45)授权公告日 2022.12.23

(21)申请号 201680033782.6
(22)申请日 2016.09.09
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108135154 A
(43)申请公布日 2018.06.08
(30)优先权数据
1558409 2015.09.10 FR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.12.08
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/FR2016/052253 2016.09.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/042501 FR 2017.03.16
(73)专利权人 法国血液机构
地址 法国拉普莱纳-圣德尼
专利权人 波尔多大学
法国国家科学研究中心
(72)发明人 佐兰·伊万诺维奇 让·舍瓦莱尔
劳拉·罗德里格斯
埃斯泰·阿特比
(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司 11219
专利代理师 杨青 穆德骏
(51)Int.Cl.
A01N 1/02(2006.01)
(56)对比文件
CN 1477926 A,2004.02.25
WO 95/29230 A1,1995.11.02
WO 97/41848 A1,1997.11.13
CN 1477926 A,2004.02.25
WO 2014/057220 A1,2014.04.17
CN 1772882 A,2006.05.17
审查员 黄荣禄

权利要求书1页 说明书14页 附图6页

(54)发明名称

用于保存来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞的可注射保存培养基

(57)摘要

本发明涉及一种用于保存来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞的溶液，所述溶液是可注射的。

CN 108135154 B

1.一种保存细胞的可注射溶液，其特征在于其包含氯化钠的生理盐水溶液、氯化钾、0.01至3g/L硫酸镁、0.1至4.5g/L碳酸氢钠、至少0.0000255g/L维生素E、至少0.000312g/L维生素C、至少0.0000026g/L维生素A、0.1至3g/L乳酸盐、0.2至0.8g/L谷氨酰胺、至少5g/L人类白蛋白、柠檬酸根离子、甘露糖醇和葡萄糖，并且其中所述溶液在不需要洗涤细胞的情况下可注射到人体中，并且其中所述溶液不包含HEPES、磷酸盐缓冲剂或丙酮酸钠。

2.一种保存细胞的可注射溶液，其特征在于其由氯化钠的生理盐水溶液、氯化钾、0.01至3g/L硫酸镁、0.1至4.5g/L碳酸氢钠、至少0.0000255g/L维生素E、至少0.000312g/L维生素C、至少0.0000026g/L维生素A、0.1至3g/L乳酸盐、0.2至0.8g/L谷氨酰胺、至少5g/L人类白蛋白、柠檬酸根离子、甘露糖醇和葡萄糖组成。

3.根据权利要求1至2中任一项所述的可注射溶液，其特征在于待保存的所述细胞来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血。

4.一种试剂盒，其包含根据权利要求1至3中任一项所述的可注射溶液和旨在接收来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞的无菌容器。

5.根据权利要求1至3中任一项所述的可注射溶液或根据权利要求4所述的试剂盒的用途，其用于保存来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞。

6.根据权利要求5所述的用途，其用于在亚低温下保存细胞。

7.根据权利要求5所述的用途，其用于在4℃下保存细胞。

8.一种用于保存来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞的方法，其包含将来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞与根据权利要求1至3中任一项所述的可注射溶液接触。

9.根据权利要求4所述的试剂盒、根据权利要求5所述的用途或根据权利要求8所述的方法，其特征在于所述细胞包含$CD34^+$细胞。

用于保存来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞的可注射保存培养基

技术领域

[0001] 本发明涉及医学领域，并且特别涉及用于保存来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞的培养基。

背景技术

[0002] 胎盘血干细胞是骨髓移植物的替代物。因此，没有相关或在国家骨髓供体登记册上的相容供体的患者可以受益于移植一个或两个单位的胎盘血。这种替代物的优势在于这些细胞避免了患者和移植细胞之间非常高水平的HLA相容性的需要。

[0003] 在收集胎盘血单位和将其冷冻的步骤之间，当前实施的建议规定只有24小时的时间段，因为干细胞和祖细胞的活力和功能性在4℃下降低。延长这个时间段将使得可以在周末收集胎盘血单位，而且还可以延长收集地点与储存地点之间的距离。

[0004] 此外，在最近这15年中，$CD34^+$细胞、特别是胎盘血的$CD34^+$细胞的离体扩增已经得到发展(Duchez等人,2003,J Hematother Stem Cell Res,12,587-9;Duchez等人,2012,Cell Transplant,21,2517-21;Ivanovic等人,2004,Stem Cells,22,716-24;Ivanovic等人,2006,Transfusion,46,126-31;Ivanovic等人,2011,Cell Transplant,20,1453-63;Polini等人,1997,Hematol Cell Ther,39,49-58;Boiron等人,2006,Transfusion,46,1934-42;Milpied等人,2009,ASH Meeting abstracts,Blood,114,Abst502,第207页)。这使得造血移植物的形成具有两个优势：长期保持移植潜力，并缩短封装后的发育不全期。

[0005] 用于离体扩增胎盘血$CD34^+$细胞的GRAPA方案(扩增的祖细胞的同种异体移植)的临床阶段显示这种技术的治疗优势，其允许骨髓细胞长期再生，同时缩短移植后发育不良期(Milpied等人,同上)。

[0006] 但是，为了制备移植物，洗涤不可注射的保存或培养培养基中含有的细胞，接着将其再悬浮于人白蛋白的4％溶液中来在6小时内注射到患者中，这只允许短距离运输(少于50千米)。较长的时间段与所用的祖细胞和HSC的功能大量损失关联(Duchez等人,2013,Cell Transplant,22,1501-6)。

[0007] 研究显示可以在培养48h的时间段后在+4℃下在不可注射在人体中的保存培养基(HPO2培养基,Macopharma)中适当保存这些细胞(Duchez等人,同上)。据发明者所知，这是目前已知的唯一具有这种能力的培养基。但是，这种培养基是不可注射的，并且移植前需要洗涤。

[0008] 保存人类细胞或器官的大多数溶液都不是可注射的，因为其含有不包括在药典(Codex)中的分子。这些分子没有列出，因为其不具有治疗优势，不吸引药物供应商的兴趣或因为其对患者有毒。例如，这个清单并非详尽的，培养基包含聚乙二醇;Trolox(6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸);异抗坏血酸钠;谷胱甘肽;超氧化物歧化酶;过氧化氢酶;选自乳糖酸盐、蔗糖、棉子糖和海藻糖的多糖苷;磷酸盐缓冲剂(特别是Na_2PO_4、K_2PO_4、$NaHPO_4$或$KHPO_4$);HEPES缓冲剂;和酮戊二酸。

[0009] 用于这类细胞产生和/或储存的合格的区域中心、国家中心或更加进一步的国际化中心的设立要求可以长距离、在欧洲内或甚至在其它大陆上运输这些移植物，这些移植物被适当保存并且能够在不进行预先洗涤的情况下注射。洗涤需要相对较长的处理操作，其需要专用设备和人员。

[0010] 在这种情况下，因此需要有可用的可注射保存培养基。

发明内容

[0011] 本发明提供一种保存溶液，其可注射并且能够良好地保存细胞的品质和其功能至少48h。

[0012] 因此，本发明涉及一种用于保存来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞的可注射溶液，所述溶液包含氯化钠的生理盐水溶液、氯化钾；硫酸镁；碳酸氢钠；维生素E和/或A；和人类白蛋白。优选地，其包含至少5g/L人类白蛋白和至少0.0000255g/L维生素E和/或至少0.0000026g/L的维生素A。

[0013] 任选地，所述溶液还可以包含乳酸盐和维生素C。在这个实施方式中，其含有至少0.0003125g/L维生素C。

[0014] 溶液还可以包含一种或多种选自氨基酸、包括谷氨酰胺，葡萄糖，甘露糖醇和柠檬酸的成分。

[0015] 在一个优选实施方式中，可注射溶液包含以下组分或基本上由以下组分组成：氯化钠的生理盐水溶液；人类白蛋白；维生素E、C和A；包括谷氨酰胺的氨基酸；钾和镁离子；葡萄糖；甘露糖醇；乳酸盐；碳酸氢钠和柠檬酸。

[0016] 本发明还涉及一种试剂盒，其包含根据本发明的可注射保存溶液和旨在接收来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞的无菌容器。

[0017] 本发明还涉及一种旨在接收来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞的无菌容器，其包含本发明的可注射保存培养基。任选地，容器还可以包含来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞。优选地，细胞包含$CD34^+$细胞。

[0018] 本发明涉及根据本发明的可注射溶液、根据本发明的试剂盒或根据本发明的容器的用途，其用于优选在亚低温下、特别是在4℃下保存来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞。优选地，细胞包含$CD34^+$细胞。

[0019] 最后，本发明涉及一种保存来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞的方法，其包含将来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞与根据本发明的可注射溶液接触。优选地，细胞包含$CD34^+$细胞。

具体实施方式

[0020] 因此，本发明涉及一种用于保存来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞的溶液，这种保存溶液是可注射的。来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞可以是天然的(收集后)、经过解冻的或离体扩增的。“用于保存来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞的可注射溶液”意指所述溶液被调整以适用于注射并且被调整以适用于保存所述细胞。

[0021] 在本申请中，“可注射”意指保存溶液被调整以适用于在不预先冲洗细胞的情况下注射(例如静脉内、肌肉内、皮下等...)到人体中。因此，所述溶液仅含有由监管药品安全的

权威机构(如FDA(食品和药物管理局(Food and Drug Administration))、欧洲药品管理局(EMA)或法国国家药品和保健品安全局(Agence nationale de sécuritédu médicament et des produits de santé)(ANSM)公认或批准为“可注射”的成分。因此,其不含FDA(食品和药物管理局)、欧洲药品管理局(EMA)或法国国家药品和保健品安全局(ANSM)未公认或未批准为“可注射”的任何成分。具体地,可以参阅VIDAL®词典(2015版)来确定成分是否被批准或公认为“可注射的”。

[0022] 用于开发本发明的可注射保存溶液的参考培养基是Macopharma的HPO2培养基(也称为MCO1)。此培养基的组成保密。但专利申请WO2014/057220描述了其组成成分(第13页第25行-第14页第4行)。这种培养基显然是不可注射的。具体地,其包含HEPES缓冲剂和丙酮酸钠,其都未被批准为可注射的。

[0023] 本发明的保存培养基具有与此参考培养基HPO2等同的保存功效,同时是可注射的。具体地,其使得可以在4℃下保存至少48h,甚至72h,同时维持与治疗用途相容的干细胞和祖细胞的活力和功能。

[0024] 本发明的保存溶液包含生理盐水溶液(特别是氯化钠)、人类白蛋白和维生素E。或者,本发明的保存溶液包含生理盐水溶液(特别是氯化钠)、人类白蛋白和维生素A,后者的作用接近于维生素E。

[0025] 人类白蛋白起到的主要作用是稳定培养基,特别是在37℃的加速老化条件下。可注射品质的人类白蛋白可商购获得,特别从Baxter或以商品名Albunorm®、Flexbumin®、Vialebex®或Ydralbum®购得。溶液包含至少1g/L白蛋白,优选至少5、10或15g/L。溶液中人类白蛋白的量可以是1至100克/升溶液,优选5至40克/升溶液,更优选5至20克/升并且更优选15克/升溶液。换句话说,溶液包含0.1至10%人类白蛋白,优选0.5至4%、更优选0.5至2%并且更优选1.5%。

[0026] 溶液还包含维生素E和/或维生素A。优选地,溶液至少包含维生素E。最令人惊讶地,发明者实际上发现维生素E(α-生育酚)对细胞保存,特别是对其功能性具有非常重要的作用。维生素E甚至已被发明者鉴别为具有最大作用的成分。溶液包含至少0.0000255g/L维生素E。溶液中维生素E的量可以特别是0.0001至0.01克/升溶液,优选0.001至0.006克/升溶液并且最特别是0.004克/升溶液。可注射品质的这种产品可商购获得,特别是从Nepalm购得。

[0027] 优选地,溶液还包含维生素C。则溶液包含至少0.000312g/L维生素C。溶液中维生素C的量是0.0005至0.15克/升溶液,优选0.001至0.1克/升溶液并且最特别是0.05克/升溶液。可注射品质的这种产品可商购获得,特别是以维生素C Aguettant的形式。

[0028] 优选地,溶液还包含维生素A。则溶液包含至少0.0000026g/L维生素A。溶液中维生素A的量是0.0001至0.001克/升溶液,优选0.0002至0.0008克/升溶液并且最特别是0.0004克/升溶液。可注射品质的这种产品可商购获得,特别是从Nepalm购得。

[0029] 在一个特定实施方式中,溶液包含维生素E和C、维生素E和A或维生素E、C和A。具体地,可以通过添加可商购的并且被调整以适用于注射的维生素混合物将维生素引入本发明的溶液中。例如,这个清单并非详尽的,维生素混合物可以是Baxter的Cervenit®,其包含视黄醇棕榈酸酯、胆钙化醇、α-生育酚、抗坏血酸、硫胺素、核黄素、吡哆醇、氰钴胺素、叶酸、

泛酸、生物素和烟酰胺;或Fresenius Kabi的Vitalipide®,其包含棕榈酸酯、α-生育酚、维生素D2和维生素K1。

[0030] 生理盐水溶液是常规氯化钠溶液,特别是0.9%的氯化钠溶液。其以生理学可接受的量包含在溶液中。优选地,所含氯化钠的量可以为5至7g/L,并且其优选为约6g/L。

[0031] 优选地,本发明的溶液还包含钾离子(K^+)和镁离子(Mg^{2+}),优选为生理量。具体地,溶液包含氯化钾,优选为生理量(即约0.33g/L)。其还包含硫酸镁,其量优选为0.01至3g/L,优选0.05至2.4g/L,特别是约0.1g/L。溶液还可以包含钙离子。

[0032] 本发明的保存溶液还可以包含碳酸氢钠。优选地,其以0.1至4.5g/L、优选0.25至4.15g/L的量包含在溶液中,并且其特别是约0.52g/L。可注射品质的这种产品可商购获得。

[0033] 本发明的保存溶液还可以包含乳酸盐,特别是林格氏乳酸盐(Ringer lactate)。可注射品质的这种产物可商购获得,特别是从Macopharma、Fresenius Kabi或Baxter购得。林格氏乳酸盐包含在溶液中以使得乳酸钠的含量为0.1至3g/L,优选0.2至2.7g/L并且特别是约0.7g/L。

[0034] 本发明的保存溶液还可以包含柠檬酸,特别是ACD A(柠檬酸、柠檬酸盐、右旋糖、溶液A)。

[0035] 优选地,本发明的溶液还包含氨基酸。可以含有1至4g/L、优选1.3至3.3g/L、特别是约2g/L的量的氨基酸。数种可注射品质的氨基酸混合物可商购获得,例如Fresenius Kabi的Vaminolact®。在氨基酸中,受关注的是所述溶液应含有谷氨酰胺,特别是谷氨酰胺量为0.2至0.8g/L,优选0.3至0.7g/L,并且特别是约0.7g/L。谷氨酰胺可以通过使用用于注射的可商购产品(如Fresenius Kabi的Dipeptiven®)来引入。

[0036] 本发明的保存溶液还可以包含葡萄糖。其通常以约1g/L的量使用。

[0037] 本发明的保存溶液还可以包含甘露糖醇。例如,甘露糖醇含量可以是1至25g/L,优选5至20g/L并且特别是约5g/L。

[0038] 因此,在替代实施方式中,本发明的可注射保存溶液包含以下物质或基本上由其组成:

[0039] -氯化钠的生理盐水溶液、氯化钾、硫酸镁、碳酸氢钠、人类白蛋白和维生素E;

[0040] -氯化钠的生理盐水溶液、氯化钾、硫酸镁、碳酸氢钠、人类白蛋白和维生素A;

[0041] -氯化钠的生理盐水溶液、氯化钾、硫酸镁、碳酸氢钠、人类白蛋白以及维生素E和C;

[0042] -氯化钠的生理盐水溶液、氯化钾、硫酸镁、碳酸氢钠、人类白蛋白以及维生素A和C;

[0043] -氯化钠的生理盐水溶液、氯化钾、硫酸镁、碳酸氢钠、人类白蛋白以及维生素E和A;

[0044] -氯化钠的生理盐水溶液、氯化钾、硫酸镁、碳酸氢钠、人类白蛋白以及维生素E、C和A;

[0045] -氯化钠的生理盐水溶液、氯化钾、硫酸镁、碳酸氢钠、人类白蛋白、维生素E以及一种或多种选自由乳酸盐、包括谷氨酰胺的氨基酸、葡萄糖、甘露糖醇和柠檬酸形成的组的组分;

[0046] -氯化钠的生理盐水溶液、氯化钾、硫酸镁、碳酸氢钠、人类白蛋白、维生素A以及一种或多种选自乳酸盐、包括谷氨酰胺的氨基酸、葡萄糖、甘露糖醇和柠檬酸的组分；

[0047] -氯化钠的生理盐水溶液、氯化钾、硫酸镁、碳酸氢钠、人类白蛋白、维生素E和C以及一种或多种选自乳酸盐、包括谷氨酰胺的氨基酸、葡萄糖、甘露糖醇和柠檬酸的组分；

[0048] -氯化钠的生理盐水溶液、氯化钾、硫酸镁、碳酸氢钠、人类白蛋白、维生素A和C以及一种或多种选自乳酸盐、包括谷氨酰胺的氨基酸、葡萄糖、甘露糖醇和柠檬酸的组分；

[0049] -氯化钠的生理盐水溶液、氯化钾、硫酸镁、碳酸氢钠、人类白蛋白、维生素E和A以及一种或多种选自乳酸盐、包括谷氨酰胺的氨基酸、葡萄糖、甘露糖醇和柠檬酸的组分；

[0050] -氯化钠的生理盐水溶液、氯化钾、硫酸镁、碳酸氢钠、人类白蛋白、维生素E、C和A以及一种或多种选自乳酸盐、包括谷氨酰胺的氨基酸、葡萄糖、甘露糖醇和柠檬酸的组分。

[0051] 优选地，各组分以下表中给定的量包含。

[0052] 表1

[0053]

组分/量	(克/升溶液)		
	最小	最大	优选
白蛋白	5	40	15
维生素 E	0.0000255	0.01	0.004
维生素 C	0.0003125	0.1	0.05
维生素 A	0.0000026	0.001	0.0005
葡萄糖	1	1	1
甘露糖醇	1	20	5

[0054]

氨基酸	1	4	1.5-2.5
包括谷氨酰胺	0.1	1	0.4-0.7
碳酸氢钠	0.1	5	0.5-0.6
氯化钾	生理盐水(0.33)		0.33
氯化钠	生理盐水(6)		6
硫酸镁	0.05	2.35	0.1
乳酸钠	0.1	3	0.7
柠檬酸根离子	0.019	0.57	0.057

[0055] “基本上由...组成”意指溶液可以包含除列出的那些之外的组分，但是其量小于10重量%，优选小于5、4、3、2或1%。应了解这些其它组分与注射相容。

[0056] 在一个特别优选实施方式中，本发明的保存溶液包含人类白蛋白；氨基酸；氯化

钾;葡萄糖;谷氨酰胺;硫酸镁;维生素E、C和A;甘露糖醇;乳酸盐,优选林格氏乳酸盐;氯化钠;碳酸氢钠;和柠檬酸,特别是ACD A形式。

[0057] “约”意指±10%,优选地±5%。例如,约10意指9至11,并且优选9.5至10.5。

[0058] 因此,本发明的保存培养基是可注射的,其不含未经药品监督机构、特别是FDA、ANSM和EMA批准的任何成分。具体地,本发明的保存溶液不含一种或多种选自以下的成分:聚乙二醇;Trolox(6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸);异抗坏血酸钠;谷胱甘肽;超氧化物歧化酶;过氧化氢酶;选自乳糖酸盐、蔗糖、棉子糖和海藻糖的多糖苷;磷酸盐缓冲剂(特别是Na_2PO_4、K_2PO_4、$NaHPO_4$或$KHPO_4$);和酮戊二酸。在一个优选实施方式中,溶液不包含这个清单中的任何成分。在一个优选实施方式中,本发明的可注射保存溶液不包含酚红、葡萄糖酸铁、人类胰岛素和/或核苷。在一个优选实施方式中,本发明的保存培养基不包含钒化合物,如氧钒、双(麦芽醇)氧钒和正钒酸盐(orthovanadium)。

[0059] 因此,本发明涉及根据本发明的可注射保存溶液的用途,其用于保存来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞,特别是$CD34^+$细胞。

[0060] 本发明还涉及一种试剂盒,其包含根据本发明的可注射保存溶液和旨在接收来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞、特别是$CD34^+$细胞的无菌容器。本发明还涉及一种旨在接收来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞的无菌容器,其含有本发明的可注射保存溶液。最后,本发明涉及含有本发明的可注射保存溶液的试剂盒或容器的用途,其用于保存来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞,特别是$CD34^+$细胞。

[0061] 无菌容器由空气阻挡膜形成和/或布置在由空气阻挡膜制成的包装中。空气阻挡膜是氧气阻挡膜或氧气和二氧化碳阻挡膜。所述膜可以由PVC(聚氯乙烯)制成。或者,其可以包含乙烯-乙烯醇共聚物(EVOH)、偏二氯乙烯的共聚物、聚乙烯醇、聚丙烯腈、乙烯乙酸乙烯酯共聚物(EVA)或聚酰胺。在一个优选实施方式中,容器由包含EVA或PVC的膜形成。具体地,空气阻挡膜具有多层结构,如三层结构,其中中间层在空气阻挡材料中。所述中间层夹在另一种材料(如聚烯烃,特别是聚乙烯、聚丙烯或乙烯-烯烃共聚物)的两个层之间。例如,所述膜是乙烯-乙酸乙烯酯/乙烯-乙烯醇/乙烯-乙酸乙烯酯(EVA/EVOH/EVA)形式的三层膜。

[0062] 本发明还涉及一种保存来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞的方法,其包含将这些细胞与根据本发明的可注射保存溶液接触。优选地,细胞包含$CD34^+$细胞。本发明还涉及一种保存$CD34^+$细胞的方法,其包含将这些细胞与根据本发明的可注射保存溶液接触。

[0063] 优选地,将保存溶液以1:0.5至1:2的体积比与细胞接触。这个比收率特别适用于收集的胎盘血、骨髓和外周血。另一方面,关于单核细胞、新鲜或冷冻的CD34+细胞、特别是选自收集的胎盘血、骨髓和外周血的细胞以及离体扩增后获得的细胞,将这些细胞依据方案和需要以不同的细胞浓度再悬浮于保存溶液中。

[0064] 优选地,将细胞储存在0℃至10℃、优选约4℃的温度下。

[0065] 本发明还涉及一种旨在接收来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞的无菌容器,其含有本发明的可注射保存溶液和来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞。优选地,细胞包含$CD34^+$细胞。本发明还涉及一种旨在接收$CD34^+$细胞的无菌容器,其含有本发明的可注射保存溶液和$CD34^+$细胞。因此,容器可以任选地被认为含有准备好用于注射的移植

物。

[0066] 优选地，细胞是哺乳动物细胞，并且最特别优选是人类细胞。具体地，细胞不是人类胚胎细胞。

[0067] 待保存的细胞是如下细胞，如收集的细胞或任选地如离体扩增后获得的细胞。特别受关注的细胞是$CD34^+$细胞，并且更具体的是造血干细胞和祖细胞。

[0068] 在一个优选实施方式中，待保存的细胞是胎盘血细胞。

[0069] 待保存的细胞可以是直接收集的细胞，通过离体细胞扩增获得的细胞或已经冷冻的细胞。

[0070] 根据一个优选实施方式，细胞是旨在被移植到宿主中的细胞，并且优选从供体收集。供体和宿主可以是相同的个体(自体移植物)或不同的个体(同种异体移植物)。

[0071] 本发明还涉及包含旨在被移植的细胞和本发明的可注射保存溶液的移植物。优选地，旨在被移植的细胞是来自胎盘血、来自骨髓和来自外周血的细胞。具体地，细胞包含$CD34^+$细胞。

[0072] 本发明还涉及一种治疗患者的方法，其包含注射如上文所定义的移植物。注射可以是静脉内、皮下、肌肉内注射，包括心内注射。

[0073] 本说明书中引用的所有参考文献以引用的方式并入本申请中。在阅读以下实施例后，其它特征和优点将变得更加明显，所述实施例为了说明目的而给出并且是非限制性的。

附图说明

[0074] 图1：在4℃下储存48h的来自胎盘血的扩增的$CD34^+$细胞的保存收率(n＝12)。对于每种条件，左侧的TNC收率(总存活有核细胞)和右侧的CFU(菌落形成单位)使得可以评估克隆形成功能。测试条件如下：D10(培养结束)；4％HSA(包含4％人类血清白蛋白的培养基)；HP02(Macopharma的参考培养基)；配方12组分(如在实施例中在表2中所述)；不含HSA(不含人类血清白蛋白的配方12培养基)；不含Vit C、E、A(Cernevit®)(不含Cernevit®的配方12培养基)；仅Vit C(不含Cernevit®但含有维生素C的配方12培养基)；仅Vit E(不含Cernevit®但含有维生素E的配方12培养基)；和仅Vit A(不含Cernevit®但含有维生素A的配方12培养基)。除D10以外，其它测量在4℃下储存细胞48h后进行。在不透气的容器(2.5ml容量的聚丙烯管，其中含有2.5ml细胞悬液来最大限度地避免存在空气)中进行所述测定。

[0075] 图2：收集后胎盘血单位的保存，CFU(n＝9)。D1、D3和D7分别对应于在4℃下保存1、3或7天。PVC对应于储存在PVC袋中，PVC NaCl包含添加0.9％氯化钠，PVC SEC包含添加SEC培养基，如在实施例中在表2中所述。

[0076] 图3：在4℃下储存72h的来自胎盘血的扩增的$CD34^+$细胞的保存收率(n＝11)。对于每种条件，左侧的TNC收率(总存活有核细胞)和右侧的CFU收率(菌落形成单位)使得可以评估克隆形成功能。测试条件如下：D10(培养结束)；添加或不添加Cernevit®的M8NaCl(包含人类血清白蛋白、氨基酸、氯化钾、葡萄糖、谷氨酰胺、碳酸氢钠、ACD A和0.9％NaCl的培养基)；添加或不添加Cernevit®的M8RL(包含人类血清白蛋白、氨基酸、氯化钾、葡萄糖、谷氨酰胺、碳酸氢钠、ACD A和代替0.9％NaCl的林格氏乳酸盐的培养基)；添加或不添加

Cernevit®的不含HSA的M8NaCl(不含人类血清白蛋白的M8NaCl);添加或不添加Cernevit®的不含AA的M8NaCl(不含氨基酸的M8NaCl);添加或不添加Cernevit®的不含KCl的M8NaCl(不含KCl的M8NaCl);添加或不添加Cernevit®的不含GG的M8NaCl(不含葡萄糖和谷氨酰胺的M8NaCl);添加或不添加Cernevit®的不含AAGG的M8NaCl(不含氨基酸、葡萄糖和谷氨酰胺的M8NaCl);SEC 4NaCl(不含林格氏乳酸盐的配方12培养基的组分);SEC 4RL(不含0.9%NaCl的配方12培养基的组分);HPO2(Macopharma的参考培养基)。在不透气的容器(2.5ml容量的聚丙烯管,其含有2.5ml细胞悬液来最大限度地避免存在空气)中进行所述测定。

[0077] 图4:在4℃下储存72h的来自胎盘血的扩增的$CD34^+$细胞的保存收率(n=9)。对于每种条件,左侧的TNC收率(总存活有核细胞)和右侧的CFU收率(菌落形成单位)使得可以评估克隆形成功能。测试条件如下:D10(培养结束);HPO2(Macopharma的参考培养基);SEC(SEC培养基,如在实施例中在表2中所述);不含Mg和甘露糖醇(SEC培养基,但不含镁和甘露糖醇);不含镁(SEC培养基,但不含镁);不含甘露糖醇(SEC培养基,但不含甘露糖醇)。在不透气的容器(2.5ml容量的聚丙烯管,其含有2.5ml细胞悬液来最大限度地避免存在空气)中进行所述测定。

[0078] 图5:在4℃下储存48h的来自胎盘血的扩增的$CD34^+$细胞的保存收率(n=9)。对于每种条件,左侧的TNC收率(总存活有核细胞)和右侧的CFU收率(菌落形成单位)使得可以评估克隆形成功能。测试条件如下:D10(培养结束);HPO2(Macopharma的参考培养基);标准SEC(0.5%HSA)(SEC培养基,如在实施例中在表2中所述);SEC甘露糖醇(缺少NaCl)(0.9%NaCl被相同体积的4.55%甘露糖醇[300mos]代替的配方12培养基的组分);SEC葡萄糖(缺少NaCl)(0.9%NaCl被相同体积的5%葡萄糖溶液代替的配方12培养基的组分);SEC 3%HSA(SEC培养基,如在实施例中在表2中所述,但含有3%人类血清白蛋白);SEC PVC袋(这里的容器是PVC材质的20ml透气取样袋)。除PVC袋之外,在不透气的容器(2.5ml容量的聚丙烯管,其含有2.5ml细胞悬液来最大限度地避免存在空气)中进行所述测定。

[0079] 图6:在4℃下储存48h的来自胎盘血的扩增的$CD34^+$细胞的保存收率(n=8),其用于研究添加到由11种其它组分构成的"基本"SEC培养基中的一定范围的CERNEVIT®体积(以及因此一定摩尔浓度范围的维生素E)。测试条件如下:人类血清白蛋白(4%HSA);HPO2(Macopharma的参考培养基);不含CERNEVIT®的"基本"SEC;然后补充有减少体积的CERNEVIT®的"基本"SEC,即:每45μM维生素E 10ml/L;每22.5μM维生素E 5ml/L;每9μM维生素E 2ml/L;每4.5μM维生素E 1ml/L;每2.25μM维生素E 0.5ml/L;每0.9μM维生素E 0.2ml/L;每0.45μM维生素E 0.1ml/L;每0.225μM维生素E 0.05ml/L;每0.112μM维生素E 0.025ml/L。在不透气的容器(2.5ml容量的聚丙烯管,其含有2.5ml细胞悬液来最大限度地避免存在空气)中进行所述测定。

[0080] 图7:在4℃下储存48h和储存120h后的动员的外周血的单核细胞(MNC)和$CD34^+$细胞(免疫磁性选择后)的克隆形成性的保存收率(n=1)。将解冻并去除低温保护剂之后的MNC细胞分成2等份,将其中一份再悬浮于SEC培养基(所述配方12的组分)中,另一份通过免疫磁性选择处理来获得纯度高于80%的$CD34^+$细胞,将其悬浮置于相同的SEC培养基(所述配方12的组分)中。在不透气的容器(2.5ml容量的聚丙烯管,其含有2.5ml细胞悬液来最大

限度地避免存在空气)中进行所述测定。

[0081] 图8:在+4℃下在SEC培养基中储存48h,接着在NSG免疫缺陷小鼠中进行初次移植后,扩增的CD34+细胞的克隆形成性(CFU)的保存收率。这个研究的操作包含在不同步骤中:移植物产生:将来自胎盘血的CD34+细胞(通过免疫磁性分选来选择)放置在含有适合的细胞因子的混合物的培养基中培养12天。培养后,收获扩增的细胞并且分成两部分:将一部分移植到一批免疫缺陷小鼠上,每只小鼠接受由培养开始时的1000个$CD34^+$细胞产生的一定量的扩增细胞;将另一部分在相同的定量条件下在+4℃下放置在SEC保存培养基(PVC袋)中48h,接着注射到第二批免疫缺陷小鼠中。移植后8周,处死小鼠,在小鼠的骨髓中分析人类克隆形成祖细胞:这些祖细胞由干细胞产生(图的说明:1个圆圈对应于经过移植和分析的小鼠(CFU/股骨);虚线对应于平均值;实线对应于中位数)。

[0082] 图9:来自骨髓的CD34+细胞(受关注细胞)的克隆形成性的保存收率(n=5)。在几年前(3至6年),已将$CD34^+$细胞库存(banque)在LN2中。解冻后,将$CD34^+$细胞再悬浮于SEC培养基中并且储存在4℃下。在+4℃下储存72h后,进行克隆形成测定。在不透气的容器(2.5ml容量的聚丙烯管,其含有2.5ml细胞悬液来最大限度地避免存在空气)中进行所述测定。

[0083] 图10:来自胎盘血的$CD34^+$细胞的活力和克隆形成潜力的保存收率。将胎盘血$CD34^+$细胞解冻并分成3等份:将$CD34^+$细胞悬浮于SEC培养基、HPO2培养基和4%人类白蛋白血清中,接着储存在4℃下。在+4℃下储存72h后,进行分析(总存活有核细胞的计数和克隆形成功能测试)。在不透气的容器(2.5ml容量的聚丙烯管,其含有2.5ml细胞悬液来最大限度地避免存在空气)中进行所述测定。

[0084] 实施例

[0085] 在药典中发现一定数量的活性成分后,本发明者选择了如下可注射药物制剂,其联合在一起获得基本配方,接着对比HPO2参考培养基(Macopharma)对所述基本配方进行分析。对于两种培养基,在+4℃下储存48h和72h后获得的保存结果实际上相同。

[0086] 因此,本发明者测试了每种产品的优点并着手确定最佳有效浓度。一些组分因为无总体作用(SeNa)或因为可能近来被鉴定为有肾毒性(6%羟基-乙基-淀粉)而被排除在初始配方之外。

[0087] 因此,本发明者证明了维生素E(α-生育酚)以及在较低程度上维生素A(视黄酸)和维生素C(抗坏血酸)、K+、Mg++离子、乳酸盐和人类白蛋白对维持扩增的$CD34^+$细胞的活力并且尤其对其功能(克隆形成性)的重要性。

[0088] 最后,12种药物制剂的组分被包括在细胞保存生物培养基的配方中。保存培养基在无菌条件下在不透气的EVA塑料袋(乙烯乙酸乙烯酯)中制备,以防止进入大气气体,特别是双氧(O2),并且特别是使得在pH调节期间溶解的二氧化碳(CO2)(柠檬酸对碳酸氢钠的作用)保留在培养基中(促进细胞在低温下保存),从而培养基的pH因此保持在所要值几年。这些袋在药学行业中用于包装可注射的制剂,并且由生物试剂的供应商用于尤其保存培养基。

[0089] 本发明者将这种保存培养基称为SEC。

[0090] 保存培养基的描述

[0091] 所用可注射产品

[0092] 产品C1:人类白蛋白20%溶液(组成:人类白蛋白200克;辛酸qs 1升):其对一些分

子有保护作用;在我们的测定期间,其在维持总有核细胞的活力方面展现非常不同的作用;它使得在+4℃下储存扩增的细胞期间在不透气的容器中配制的培养基的pH具有更好的稳定性。(参见图1)

[0093] 产品C2:氨基酸(Vaminolact®(Fresenius Kabi)组合物,qs 100ml:L-丙氨酸630mg;L-精氨酸410mg;L-天冬氨酸410mg;L-半胱氨酸/L-胱氨酸410mg;L-谷氨酸710mg;甘氨酸210mg;L-组氨酸210mg;L-异亮氨酸310mg;L-亮氨酸700mg;L-赖氨酸560mg;L-甲硫氨酸130mg;L-苯丙氨酸270mg;L-脯氨酸560mg;L-丝氨酸380mg;L-牛磺酸30mg;L-苏氨酸360mg;L-色氨酸140mg;L-酪氨酸50mg;L-缬氨酸360mg)。氨基酸对扩增细胞的功能改善没有显着贡献,但是特别受关注的是一些氨基酸可能对细胞具有保护作用。(参见图3)

[0094] 产品C3:KCl(在H_2O中10%的制剂):在我们的整个测定中,其对保存扩增细胞的功能显示显著作用。(参见图3)

[0095] 产品C4:葡萄糖(30%制剂):在我们的整个测定中,其显示不显著但受关注的作用。(参见图3)。

[0096] 产品C5:谷氨酰胺氨基酸(Dipeptiven组合物(Fresenius Kabi):丙氨酰基-谷氨酰胺20g/100ml,即13.2g谷氨酰胺/100ml;对比谷氨酰胺稳定的分子):在我们的整个测定中,其展现不显著但受关注的作用;其似乎对线粒体具有保护作用。(参见图3)

[0097] 产品C6:MgSO4(在H_2O中15%的制剂);在我们的整个测定中,其对保存扩增细胞的功能显示显著作用;其似乎对线粒体具有作用。(参见图4)

[0098] 产品C7:抗氧化剂

[0099] C7.Cernevit®(Baxter)(5ml的组成:视黄醇[维生素A]3500IU,视黄醇棕榈酸酯形式;胆钙化醇[维生素D3]220IU;α-生育酚或[维生素E]11.2IU,即10.2mg;抗坏血酸[维生素C]125mg;硫胺素[维生素B1]3.51mg;核黄素[维生素B2]4.14mg;吡哆醇[维生素B6]4.53mg;氰钴胺素[维生素B12]0.006mg;叶酸[维生素B9];泛酸[维生素B5]17.15mg;生物素[维生素B8]0.069mg;烟酰胺[维生素PP]46mg):在我们的整个测定中,其对在+4℃下储存的细胞的功能展现保存作用。在分别测定的维生素中,维生素E展现最重要的作用;维生素A和维生素C具有较小作用,但维生素C被描述为对维生素E具有保护作用;向培养物上清液中添加Cernevit®显示与配制的培养基对在+4℃下保存扩增的细胞具有相同作用。最后,每种维生素以可注射的药品的形式存在,并且维生素E和维生素C只能用于所述配方中。

[0100] 或C7a.维生素E(2ml的组成:α-生育酚100mg)

[0101] 或C7b.维生素C(5ml的组成:抗坏血酸1000mg)

[0102] 或C7c.维生素A(2ml的组成:视黄醇100000IU)

[0103] 维生素E可以单独使用,或与维生素C或维生素A或两者的组合结合使用,在保存扩增细胞方面的作用接近Cernevit®的作用或与其相同。维生素C似乎保护维生素E。(参见图1、图3和图6)

[0104] 产品C8:甘露糖醇(20%溶液):其具有抗氧化作用(羟基抗自由基),并且在我们的整个测定中其未显示显著作用。(参见图4)

[0105] 产品C9:林格氏乳酸盐(组成:NaCl 6克;KCl 0.4克;$CaCl_2$ $2H_2O$0.27克;乳酸钠5.16克,qs 1升,即Na^+131mmol;K^+5mmol;Ca^{++};乳酸盐29mmol)。其具有较小的抗氧化作用,

培养上清液中存在少量缓冲作用(同上$CO3^{--}$离子);在我们的整个测定中,其对保存扩增细胞的功能显示相对显着的作用。(参见图3)

[0106] 产品C10:NaCl(以0.9%生理盐水的形式):其起溶质作用并且允许维持生理摩尔渗透压浓度。在我们的整个测定中,证明其对于克隆形成潜力特别重要,因为如果其被葡萄糖和甘露糖醇的等渗溶质代替,则在+4℃下储存48h后,尽管能维持总有核细胞的活力,但观察到克隆形成功能大幅下降。(参见图5)

[0107] 产品C11:碳酸氢钠(1.4%$NaHCO_3$制剂)。其可以与ACD A的柠檬酸一起产生假缓冲系统来将培养基的pH值调整到所要值,并且得到溶解的CO_2(在+4℃下对受关注的细胞具有保护作用)。

[0108] 产品C12:ACD A(柠檬酸柠檬酸盐右旋糖溶液A)(一水合右旋糖24.5克;一水合柠檬酸8克;二水合柠檬酸钠22克,qs 1升)。其可以在添加碳酸氢钠后调节pH;柠檬酸根离子被描述为具有抗氧化作用,并且柠檬酸根离子最终与和林格氏乳酸盐一起引入培养基中的部分钙离子复合。ACD A是常规用于输血程序的抗凝剂。

[0109] 下表给出了在优化研究中证明的当前配方以及组分的受关注活性的上限值和下限值。未检查以下组分来进行优化,并且仅考虑了生理值:KCl(最终0.33克/L升,将10%KCL与林格氏乳酸盐中含有的KCl结合)、葡萄糖、NaCl、ACD A。

[0110] 保存溶液的优选pH是6.95±0.05。

[0111] 表2

[0112]

	每升培养基中的体积(ml)			每升培养基中受关注分子的重量(克)		
组分：可注射保存制剂	当前值	上限值	下限值	当前值	上限值	下限值
C1. 20%人类白蛋白	75	200	25	15	40	5
C2. AA (Vaminolact)	30	50	20	1.959	3.265	1.306
C3. 10% KCl	2.74	2.74	2.74	0.274	0.33	0.33
C4. 30%葡萄糖	3.32	3.32	3.32	1	1	1
C5. 谷氨酰胺(Dipeptiven)	5.3	5.3	2.65	0.7	0.7	0.35
C6. 15% $MgSO_4$	0.68	16	0.34	0.1	2.35	0.05
C7. 多种维生素(Cernevit)	2	4	0.0125	Vit E：0.00408 Vit C：0.05 Vit A：0.00042	Vit E：0.00816 Vit C：0.1 Vit A：0.00084	Vit E：0.0000255 Vit C：0.0003125 Vit A：0.0000026
C8. 20%甘露糖醇	25	100	25	5	20	5
C9. 林格氏乳酸盐	140	513	46.7	Na Lact：0.722 KCl：0.056	Na Lact：2.647 KCl：0.205	Na Lact：0.24 KCl：0.0187
C10. 0.9% NaCl	676.46	溶质 ND	溶质 ND	6.09	ND	ND
C11. 1.4% $NaHCO_3$	37	295	18.5	0.518	4.14	0.259
C12. ACD A qs pH 6.95 ± 0.05	约 2.5	ND	ND	ND	ND	ND

[0113] 关于保存培养基的组分的作用的测定

[0114] 1.关于选择并接着离体扩增的胎盘血$CD34^+$细胞。

[0115] 离体扩增后，细胞比原始$CD34^+$细胞脆弱，并且其在+4℃下的保存最关键(Duchez等人,2013,同上)。

[0116] 在所有通向生物保存培养基的配方的研究中，使用来源于细胞库的储存在-196℃下的胎盘血CD34+细胞进行测定。每个测定都使用一个或多个样品进行。

[0117] 用免疫磁性系统分离胎盘血$CD34^+$细胞，接着将其冷冻并且库存在-196℃下。

[0118] 解冻后，在37℃、5％CO_2和85％湿度下，在100ng/ml SCF(干细胞因子)、100ng/ml Flt3(FMS样酪氨酸激酶-3)、10ng/ml G-CSF(粒细胞集落刺激因子)和20ng/ml血小板生成素(TPO)存在下，将胎盘血$CD34^+$细胞(20000/ml)放置在HP01培养基中培养。在培养中期，添加含有细胞因子的HP01培养基(1/5稀释)并且继续培养长达9至12天(通常10天)。

[0119] 培养后，将2.5ml细胞悬液转移到2.5ml不透气的聚丙烯管中，并且在18℃下以430g离心10分钟。将上清液完全去除(细胞残留物上保留约50μl上清液)。接着，将2.45ml待测定的保存培养基(在环境温度下)添加到管中，并且用塞子密封管；在连续的翻转运动中细胞被再次置于悬浮。将样品留在环境温度下1至3小时。最后，将管平放在+4℃下通常48h

至72h的时间。还在用于比较研究的透气的PVC袋中和不透气的EVA袋中进行了测定。

[0120] 对扩增的细胞进行测定:TNC(总有核细胞)的计数和活力;克隆形成测定;有时同时进行CD34+细胞的计数和活力分析。在+4℃下规定时间(48h和72h)后,测定细胞样品:TNC的计数和活力以及克隆形成测定(有时还有CD34+细胞的计数和活力)。

[0121] 将在4℃下储存后剩余的活有核细胞总量与在培养结束时的活有核细胞总量进行比较,获得活细胞的回收收率。类似地,计算CFC(菌落形成细胞)的收率。使用所获得的值来评估配方中一种或多种化合物的优势并鉴别这些化合物的最佳浓度。将所述值与用HPO2保存培养基获得的值进行比较(Duchez等人,2013,同上)。

[0122] 图1中给出结果。

[0123] 将离体扩增的胎盘血CD34+细胞移植到NSG免疫缺陷小鼠上来检查在+4℃下储存在SEC培养基中48h后扩增的CD34+细胞的克隆形成性的保存情况。这个研究涉及不同的操作步骤:移植物产生,其中将胎盘血CD34+细胞(通过免疫磁性分选来选择)放置在含有适合的细胞因子的混合物的培养基中培养12天。培养后,收获扩增的细胞并且分成两部分:将一部分移植到一批免疫缺陷小鼠上,每只小鼠接受由培养开始时的1000个$CD34^+$细胞产生的一定量的扩增细胞;将另一部分在相同的定量条件下在+4℃下储存在SEC培养基(PVC袋)中48h,接着注射到第二批免疫缺陷小鼠中。移植后8周,处死小鼠,并且在小鼠的骨髓中分析人类克隆形成祖细胞:这些祖细胞由干细胞产生(图的说明:1个圆圈对应于经过移植和分析的小鼠(CFU/股骨);虚线对应于平均值;实线对应于中位数)。结果显示在4℃下在SEC培养基中保存48h不改变来源于移植到小鼠上的干细胞的克隆形成祖细胞的数目。

[0124] 图8中给出结果。

[0125] 2.关于收集后的胎盘血细胞

[0126] 将胎盘血收集在含有23ml CPD抗凝剂(柠檬酸盐磷酸盐右旋糖)的塑料袋(PVC聚氯乙烯)中。将胎盘血单位储存在+4℃下等待处理以供库存(在-196℃下低温保存)。该方案要求在36小时内进行库存来防止与储存模式(+4℃)相关以及与不存在保存培养基相关的细胞劣化。为了能够进行满足治疗需要(组织相容性、罕见的HLA表型、法国海外部门和地区的人口等)和需要超过36h的运输时间的远距离位置收集,进行了第一研究来改善收集后胎盘血单位的保存。它包含将不透气袋与将不可注射培养基(Macopharma的HPO2)添加到胎盘血单位中联合。这使得库存前时间获得显著改善(长达72h),同时维持与有效移植相容的活力和功能(WO 2014/057220,Chevaleyre等人,2014,Stem Cells Dev,23,1820-30)。

[0127] 由于HPO2培养基不可注射,所以使用(本发明的)SEC培养基来保存胎盘血单位。在+4℃下储存72h后,添加SEC培养基使得可以维持显著更好的与库存相容的功能(Rodriguez,硕士论文2,Universitéde Bordeaux,2014年6月11日提交)。图2中给出获得的结果。

[0128] 3.关于所选的解冻后的胎盘血$CD34^+$细胞

[0129] 将-196℃下冷冻的胎盘血$CD34^+$细胞解冻,洗涤并且分成3等份:将$CD34^+$细胞悬浮于SEC培养基、HPO2培养基和4%人类白蛋白中,接着储存在4℃下。在+4℃下储存72h后,进行分析(总存活有核细胞的计数和克隆形成功能测定)。在不透气的容器(2.5ml聚丙烯管,其含有2.5ml细胞悬液来最大限度地避免存在空气)中进行所述测定。结果显示与HPO2培养基相比,在+4℃下在SEC培养基中储存72h后,$CD34^+$细胞的定量(活细胞数量)和定性(克隆

形成功能)保存很好。图10中给出获得的结果。

[0130] 4.关于解冻后的骨髓$CD34^+$细胞(n＝5)

[0131] 将库存的骨髓$CD34^+$细胞(在-196℃下冷冻3至6年)解冻,洗涤并再悬浮于2.5ml不透气聚丙烯管中的2.5ml SEC培养基中;将其储存在+4℃下72h。解冻并在4℃下储存72h后进行的克隆形成测定显示良好地保存了这些受关注骨髓细胞的功能(功能的保存收率大于70％)。图9中给出获得的结果。

[0132] 5.关于解冻后动员的外周血细胞(n＝1)

[0133] 将Ficoll梯度离心后的外周血细胞(MNC)冷冻至-196℃。解冻和洗涤后,将其分成2等份:第一份保持原样,对第二份进行免疫磁性分选,获得CD34+细胞的悬液。将单核细胞(MNC)和CD34+细胞悬浮于不透气的2.5ml丙烯管中的SEC培养基(2.5ml)中,并在+4℃下储存48至120h。在解冻MNC和/或纯化CD34+细胞后进行并接着在4℃下储存后进行的克隆形成测定显示良好地保存了这些受关注细胞的功能:在+4℃下48h后功能保存收率为85％(纯化的CD34+细胞)至100％(MNC),以及在4℃下120h后为60％(纯化的CD34+细胞)至80％(MNC)。图7中给出获得的结果。

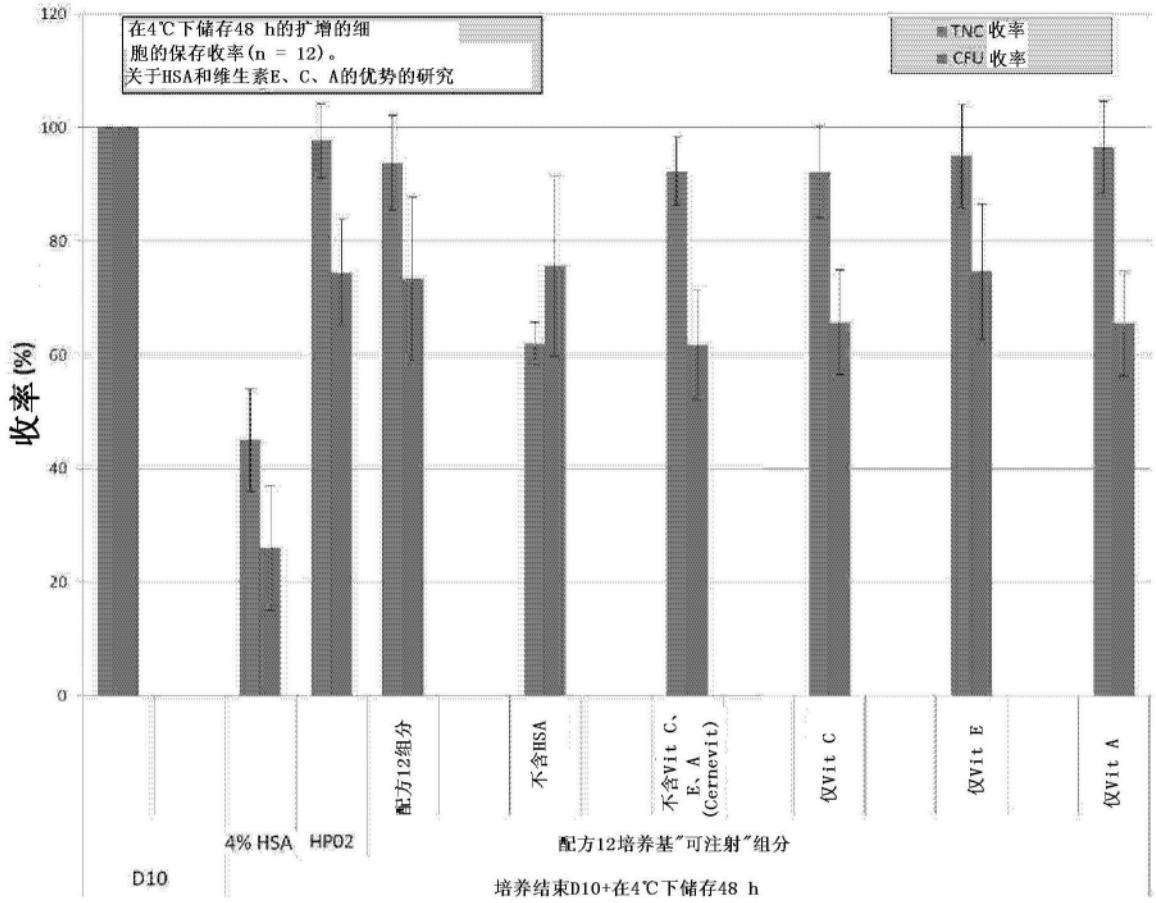
在4℃下储存48 h的扩增的细
胞的保存收率(n = 12)。
关于HSA和维生素E、C、A的优势的研究
TNC 收率
CFU 收率
收率(%)
120
100
80
60
40
20
0
D10
4% HSA
HP02
配方12组分
不含HSA
不含Vit C、E、A (Cernevit)
仅Vit C
仅Vit E
仅Vit A
配方12培养基"可注射"组分
培养结束D10+在4℃下储存48 h

图1

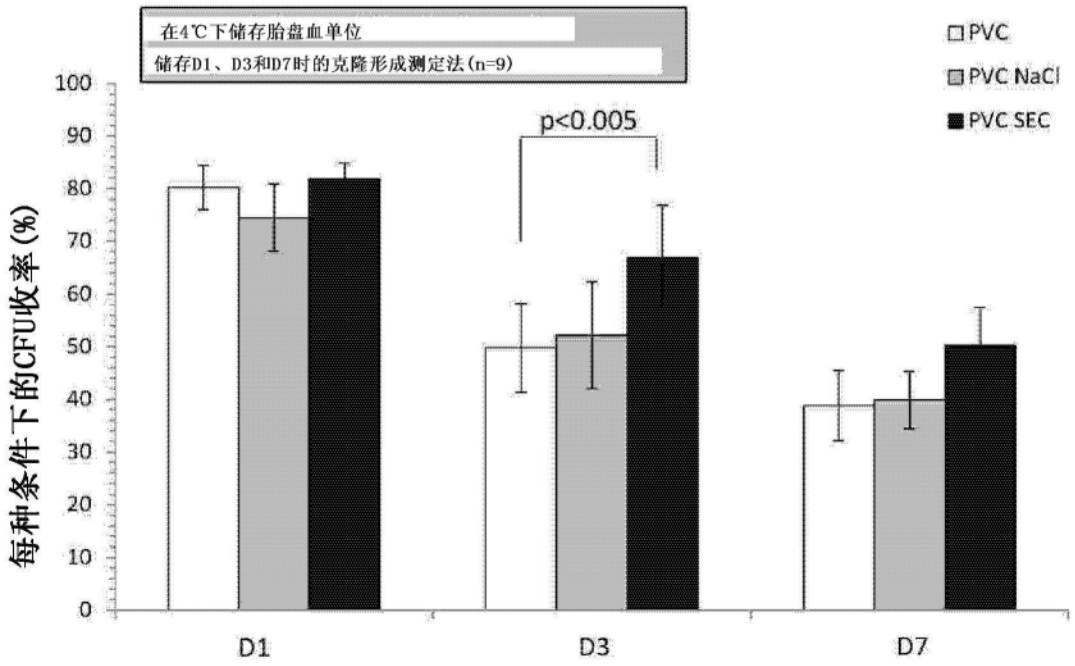
在4℃下储存胎盘血单位
储存D1、D3和D7时的克隆形成测定法(n=9)
PVC
PVC NaCl
PVC SEC
每种条件下的CFU收率(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
p<0.005
D1
D3
D7

图2

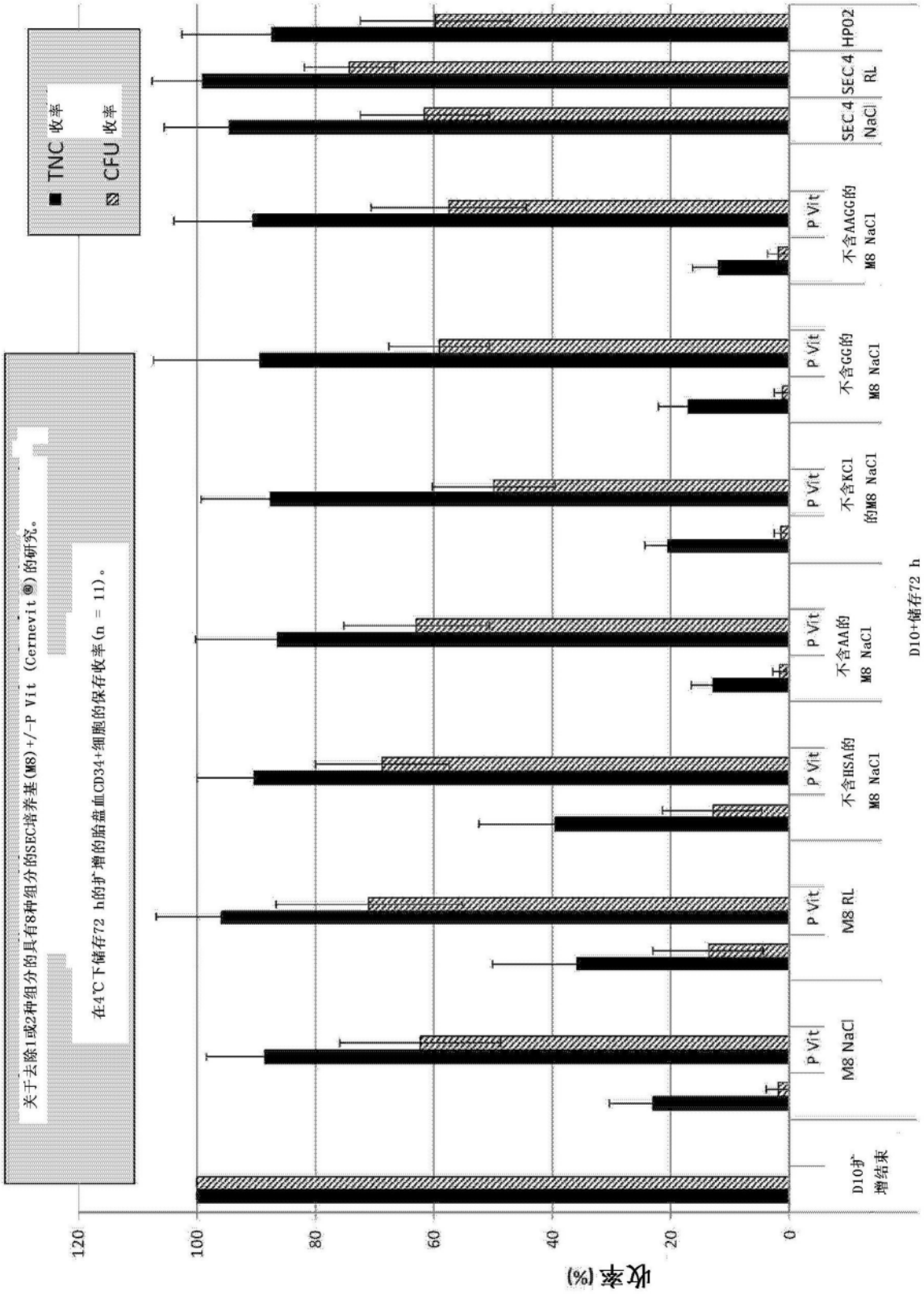
TNC 收率
CFU 收率
关于去除1或2种组分的具有8种组分的SEC培养基(M8)+/-P Vit (Cernevit®)的研究。
在4℃下储存72 h的扩增的脐血CD34+细胞的保存收率(n = 11)。
收率(%)
120
100
80
60
40
20
0
D10扩增结束
P Vit
M8 NaCl
M8 RL
不含HSA的M8 NaCl
不含AA的M8 NaCl
不含KCl的M8 NaCl
不含GG的M8 NaCl
不含AAGG的M8 NaCl
SEC4 NaCl
SEC4 RL
SEC4 HPO2
D10+储存72 h

图3

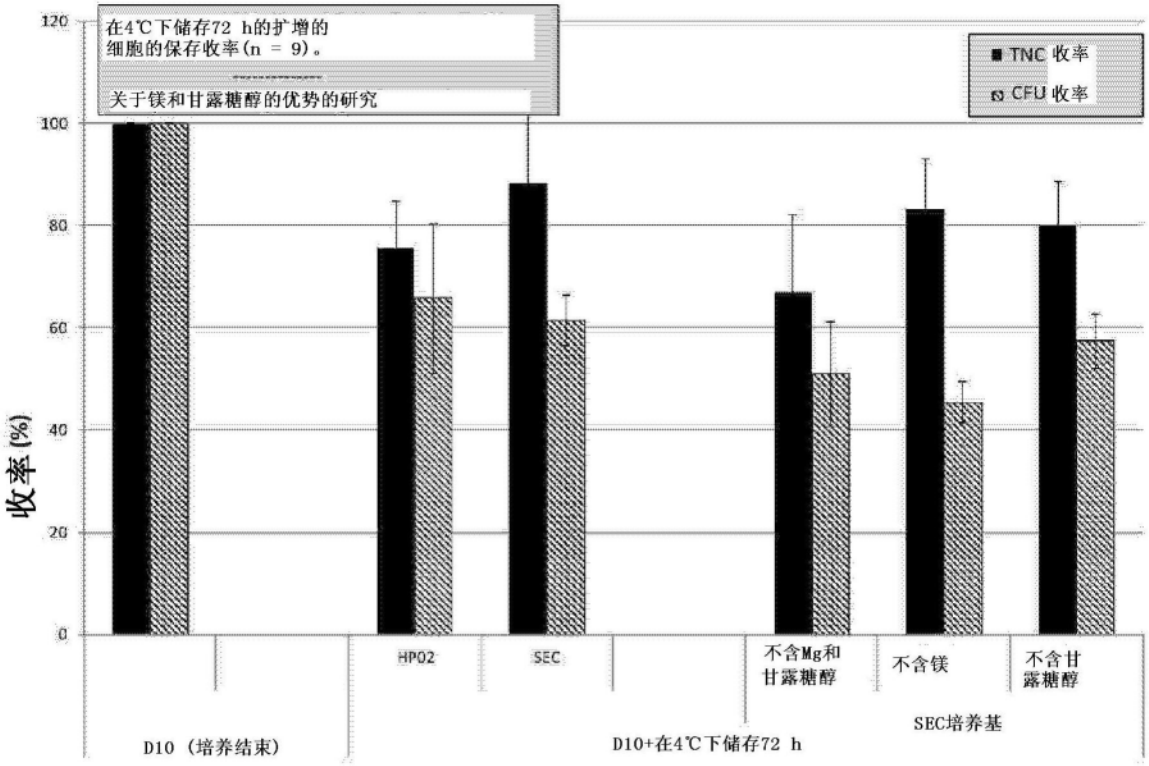
在4℃下储存72 h的扩增的
细胞的保存收率(n = 9)。
关于镁和甘露糖醇的优势的研究
TNC 收率
CFU 收率
收率 (%)
120
100
80
60
40
20
0
HPO2
SEC
不含Mg和
甘露糖醇
不含镁
不含甘
露糖醇
D10 (培养结束)
D10+在4℃下储存72 h
SEC培养基

图4

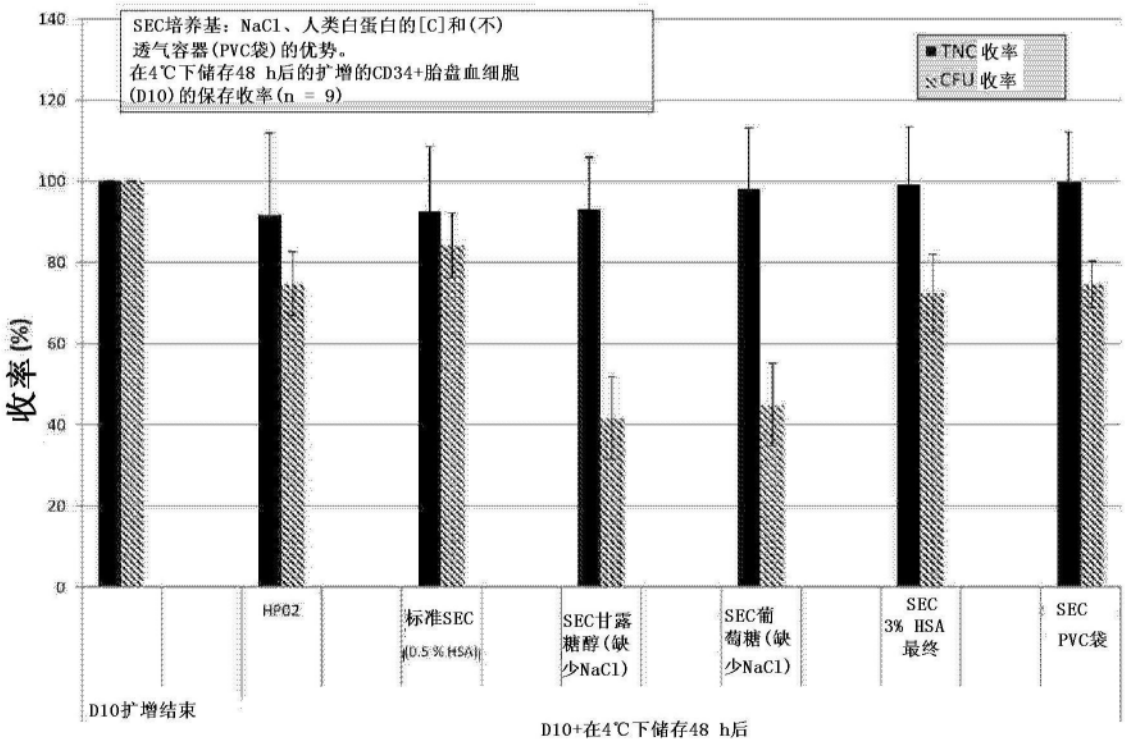
SEC培养基：NaCl、人类白蛋白的[C]和(不)
透气容器(PVC袋)的优势。
在4℃下储存48 h后的扩增的CD34+胎盘血细胞
(D10)的保存收率(n = 9)
TNC 收率
CFU 收率
收率 (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
HPO2
标准SEC
(0.5 % HSA)
SEC甘露
糖醇(缺
少NaCl)
SEC葡
萄糖(缺
少NaCl)
SEC
3% HSA
最终
SEC
PVC袋
D10扩增结束
D10+在4℃下储存48 h后

图5

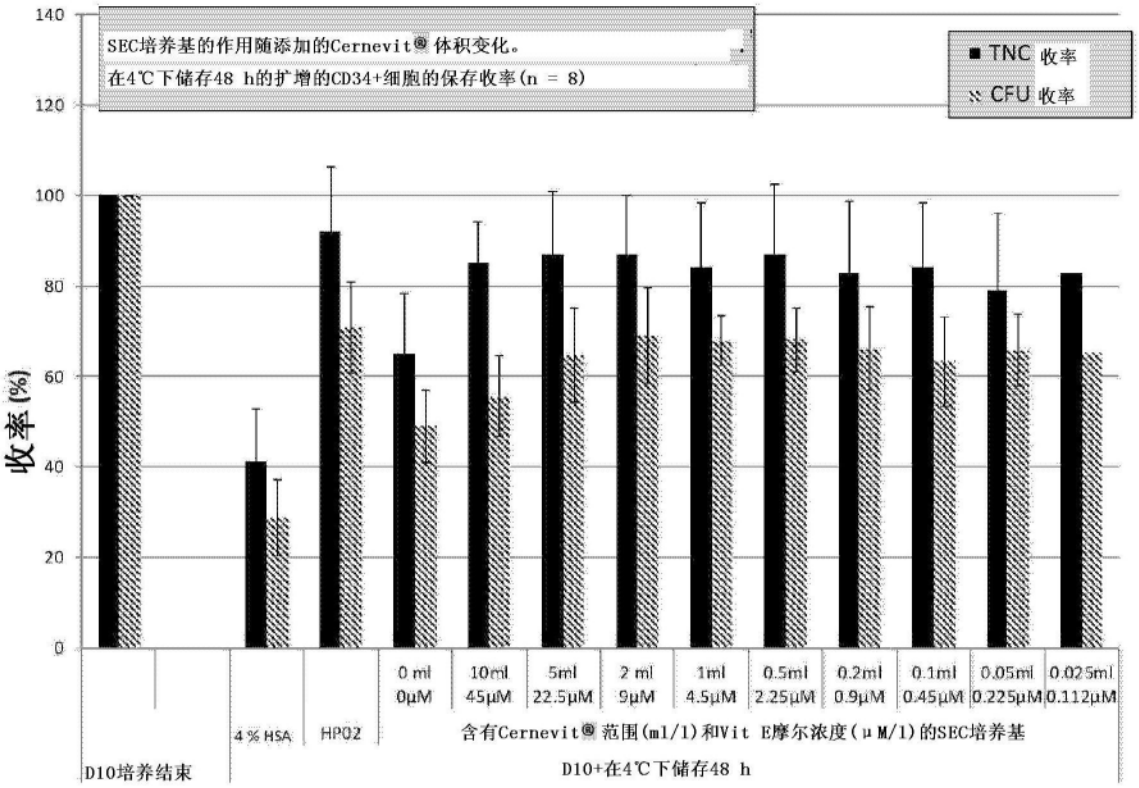
SEC培养基的作用随添加的Cernevit® 体积变化。
在4℃下储存48 h的扩增的CD34+细胞的保存收率(n = 8)
TNC 收率
CFU 收率
收率 (%)
0
20
40
60
80
100
120
140
0 ml 0μM
10ml 45μM
5ml 22.5μM
2 ml 9μM
1ml 4.5μM
0.5ml 2.25μM
0.2ml 0.9μM
0.1ml 0.45μM
0.05ml 0.225μM
0.025ml 0.112μM
4％HSA
HP02
含有Cernevit® 范围(ml/l)和Vit E摩尔浓度(μM/l)的SEC培养基
D10培养结束
D10+在4℃下储存48 h

图6

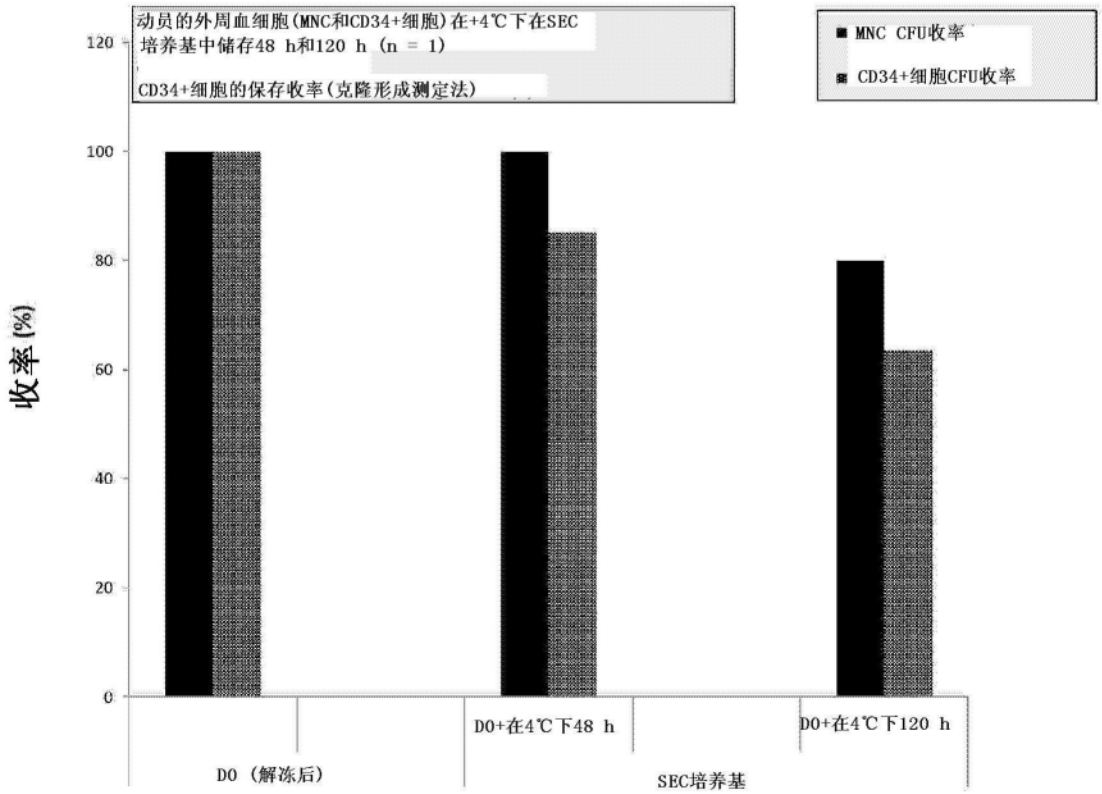
动员的外周血细胞(MNC和CD34+细胞)在+4℃下在SEC
培养基中储存48 h和120 h (n = 1)
CD34+细胞的保存收率(克隆形成测定法)
MNC CFU收率
CD34+细胞CFU收率
收率 (%)
0
20
40
60
80
100
120
D0 (解冻后)
D0+在4℃下48 h
D0+在4℃下120 h
SEC培养基

图7

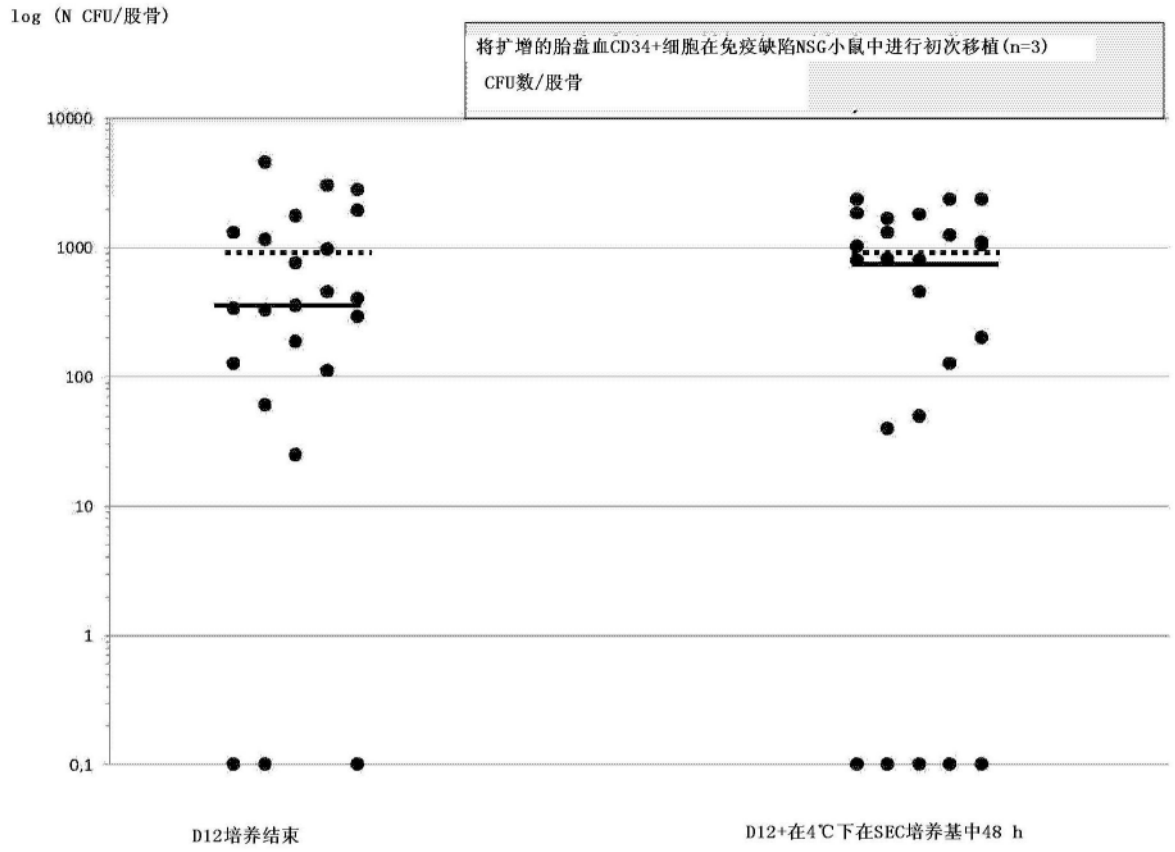
log (N CFU/股骨)
将扩增的胎盘血CD34+细胞在免疫缺陷NSG小鼠中进行初次移植(n=3)
CFU数/股骨
10000
1000
100
10
1
0,1
D12培养结束
D12+在4℃下在SEC培养基中48 h

图8

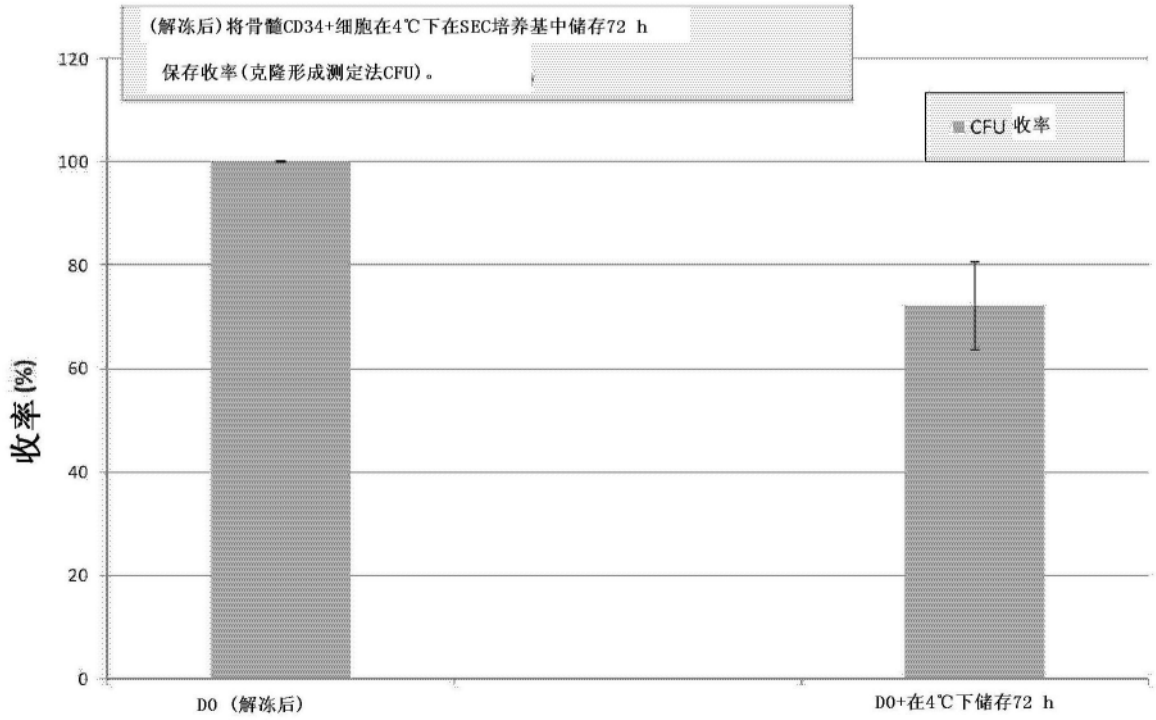
(解冻后)将骨髓CD34+细胞在4℃下在SEC培养基中储存72 h
保存收率(克隆形成测定法CFU)。
CFU 收率
收率(%)
120
100
80
60
40
20
0
D0 (解冻后)
D0+在4℃下储存72 h

图9

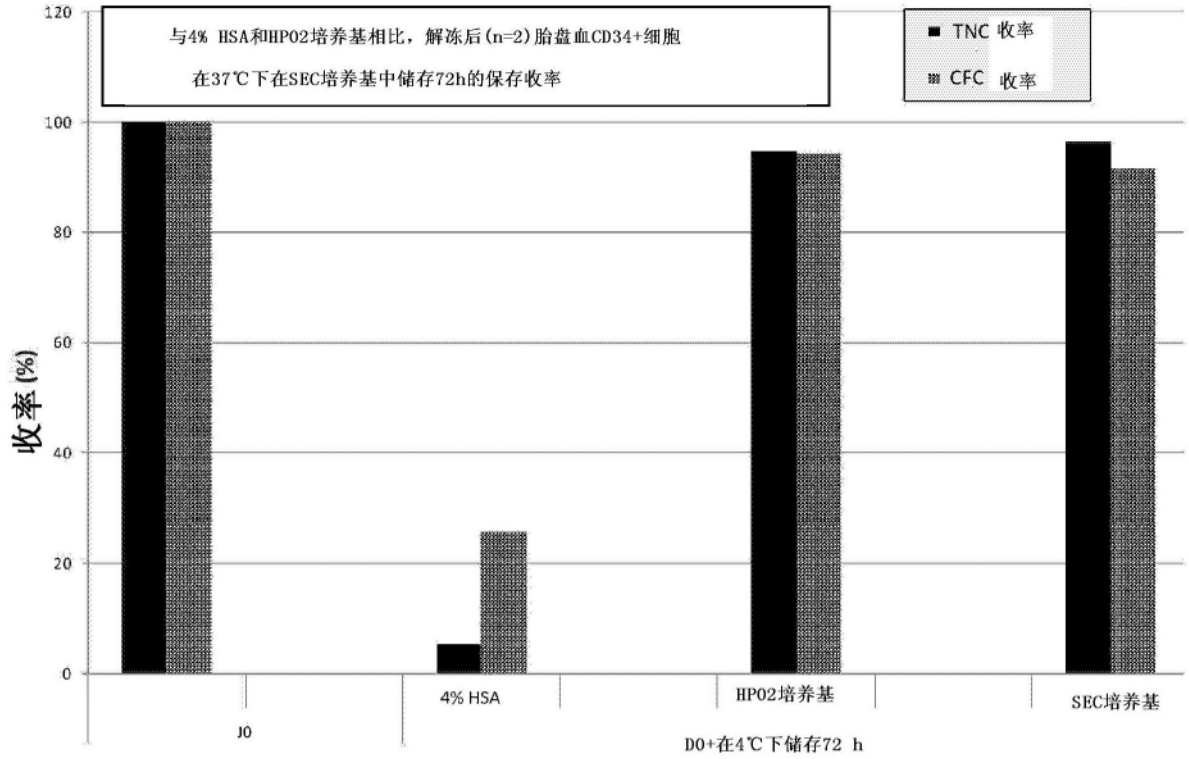
与4% HSA和HPO2培养基相比，解冻后(n=2)胎盘血CD34+细胞
在37℃下在SEC培养基中储存72h的保存收率
TNC 收率
CFC 收率
收率(%)
120
100
80
60
40
20
0
J0
4% HSA
HPO2培养基
SEC培养基
D0+在4℃下储存72 h

图10