

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023年4月6日 (06.04.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/050325 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 35/36 (2015.01) *C12N 5/073* (2010.01)

A61K 35/50 (2015.01) *C12N 5/071* (2010.01)

A61P 37/06 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/122208

(22) 国际申请日: 2021年9月30日 (30.09.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 北京大学人民医院(Peking University People's Hospital) [CN/CN]; 中国北京市西城区西直门南大街11号, Beijing 100044 (CN)。浙江大学(Zhejiang University) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。上海赛傲生物技术有限公司(SHANGHAI SAIAO BIOTECHNOLOGY CO.,

LTD) [CN/CN]; 中国上海市普陀区中江路879弄2号楼3楼301室, Shanghai 200062 (CN)。

(72) 发明人: 黄晓军(HUANG, Xiaojun); 中国北京市西城区西直门南大街11号, Beijing 100044 (CN)。余路阳(YU, Luyang); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。张传宇(ZHANG, Chuanyu); 中国上海市普陀区中江路879弄2号楼3楼301室, Shanghai 200062 (CN)。杨棚捷(YANG, Pengjie); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。赵翔宇(ZHAO, Xiangyu); 中国北京市西城区西直门南大街11号, Beijing 100044 (CN)。寇耀晖(KOU, Yaohui); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。袁惟芯(YUAN, Weixin); 中国上海市普陀区中江路879弄2号楼3楼301室, Shanghai 200062 (CN)。李金英(LI, Jinying); 中国浙江省杭州市西湖区

(54) Title: USE OF CD90⁺ HUMAN AMNIOTIC EPITHELIAL CELLS IN TREATMENT OF GRAFT VERSUS HOST DISEASE

(54) 发明名称: CD90⁺人羊膜上皮细胞在治疗移植抗宿主病中的用途

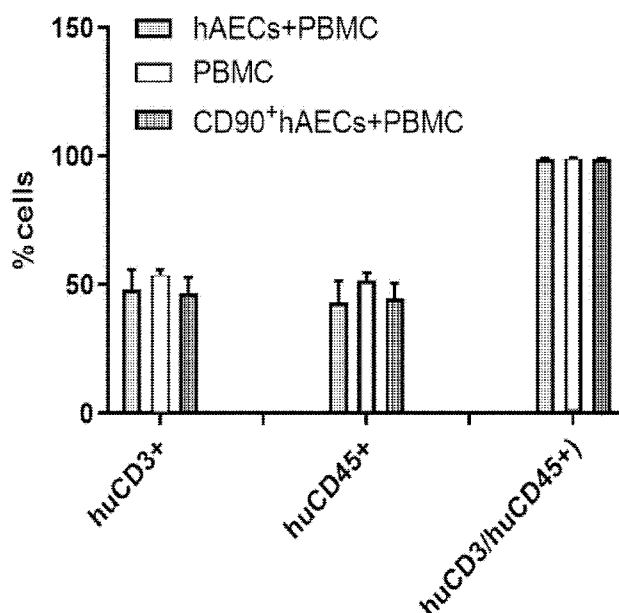


图1

(57) Abstract: A method for treating a subject suffering from a graft versus host disease (GvHD) or with the risk of GvHD, comprising: selecting a CD90⁺hAEC cell population with a stronger immunoregulation capability as a primary therapeutic cell. Research on related action mechanisms finds that the stem cell pluripotent markers SSEA4, OCT4 and NANOG of CD90⁺hAECs are significantly higher than general hAECs, and have better immunomodulatory functions, and therefore, the CD90⁺hAECs cells are used as therapeutic means to obtain better clinical results.

[见续页]



WO 2023/050325 A1

余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。 刘佳 (LIU, Jia); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。

(74) 代理人: 浙江杭州金通专利事务所有限公司 (ZHEJIANG HANGZHOU JINTONG PATENT AGENCY CO., LTD); 中国浙江省杭州市上城区中河中路258号瑞丰国际商务大厦1501室, Zhejiang 310003 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 关于发明人身份(细则4.17(i))
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要: 一种治疗患有移植物抗宿主病(GvHD)的或有罹患移植物抗宿主病风险的受试者的方法, 选取具有更强免疫调节能力的CD90⁺hAEC细胞分群作为主要治疗细胞。相关作用机制研究发现, CD90⁺hAECs的干细胞多能性标志物SSEA4、OCT4和NANOG明显高于一般hAECs, 且具有更好的免疫调节功能, 故以CD90⁺hAECs细胞作为治疗手段, 以获得更好的临床结果。

CD90⁺人羊膜上皮细胞在治疗移植物抗宿主病中的用途

技术背景

造血干细胞移植(Hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)最早由美国科学家Thomas教授于20世纪50年代开始引入临床,经过几十年的发展,HSCT用于治疗大量的恶性血液系统疾病以及代谢先天缺陷等,是现有惟一的血液肿瘤根治手段。

在造血移植中,移植物抗白血病(graft-versus-leukaemia, GVL)或移植物抗肿瘤(graft-versus-tumour, GVT)是其治疗癌症的主要机理。与此相对,造血干细胞移植后的主要并发症移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD),是移植后死亡的最主要原因,据统计,约50%接受造血移植的病人会出现GVHD症状,因此严重限制了这种重要疗法的普遍开展。

GVHD是一类影响多个器官系统的免疫失调症,包括胃肠道,肝,皮肤、肾和肺等,严重威胁到病人移植后的生活质量和生存时间。一般依据临床症状发生时间长短,GVHD可分为两类:急性GVHD(aGVHD)和慢性GVHD(cGVHD)。

GVHD的起因是:捐献者T细胞对接受者细胞上遗传决定性蛋白(主要是HLA人体白细胞抗原,组织相容性抗原)的应答导致的免疫反应,因此普遍的aGVHD的发病频率与HLA的不匹配水平直接相关。而理想的捐献者和接受者是HLA-A/B/C/DRB1全匹配。

GVHD发病可以概括为三个过程:一,抗原呈递细胞(APCs, antigen-presenting cells)的激活;二,捐献者T细胞的激活,增殖,分化以及迁移引起炎症风暴;三,靶器官的损伤。

从动物实验上看,T细胞在GVHD的发病上起核心作用。现有三种去除T细胞的策略:体外去除T细胞后进行移植;体外分选CD34⁺干细胞进行;体内通过抗体特异性去除T细胞。这些策略针对GVHD(无论aGVHD还是cGVHD)都显示了很好疗效,然而,不幸的是这些治疗方案却以高移植失败率,移植后感染,高复发率作为代价。此外防治GVHD的另一一些主要方法是对接受者进行非靶向性的免疫抑制处理,

如环孢菌素A (cyclosporin-A, CsA), 霉酚酸酯/吗替麦考酚酯 (mycophenolate mofetil, MMF), 类固醇 (steroids) 等, 但这些方案也同时减弱了GVL效应, 结果显示增加了癌症复发概率。

近年来, 有报道在实验动物中采用如T调节细胞 (Treg), 调节性 $\gamma \delta$ T细胞 ($\gamma \delta$ Treg)、间充质干细胞 (MSC) 等细胞治疗方案, 显示出一定的疗效。但是, 在临床试验中, MSC被报道有促进肿瘤复发的风险。Treg则因其来源受限且体外扩增困难, 无法在临床应用中得到推广。

CD4⁺T细胞被广泛报道与GVHD密切相关, 其四个主要亚群Th1, Th2, Th17和Treg之间的平衡对GVHD的发病率和病情严重程度的影响极大。在作为一个炎症过程的急性GVHD中, 检测发现CD4⁺往Th1极化。近年来研究新发现一类可以产生IL-17的CD4⁺细胞亚群, 即Th17。后续小鼠疾病模型和临床研究发现其在急性GVHD中, 对炎症起始以及组织损伤起到重要作用。有研究显示, Th2在GVHD中, 与肺损伤以及慢性GVHD相关。而在CD4⁺的4个主要亚群中, 只有Treg从被鉴定之初到发现其与GVHD相关联, 被广泛认为其对GVHD有抑制和改善功效, 同时依然保留GVL的效能。综上, 对CD4⁺亚群极化重塑的研究显得格外重要。

人羊膜上皮细胞 (human amniotic epithelial cells, hAECs) 是从胎盘上最靠近胎儿一侧的羊膜上分离而来的细胞。胎盘属于孕妇生产后的废弃物, 故此来源的细胞不存在伦理问题。胎盘在解剖学上, 从内向外主要可分为三层组织结构: 羊膜上皮层, 绒毛膜 (chorion), 和子宫蜕膜 (decidua), 而每一层组织的起源却截然不同。子宫蜕膜来自母体, 绒毛膜源自滋养层 (trophoblast), 而羊膜上皮层来自受精后八天的上胚层 (epiblast), 即与胚胎干细胞一样 (embryonic stem cells, ESCs), hAECs来源于胚胎内细胞团 (inner cell mass), 。Miki等证实hAECs可以表达多能干细胞 (如胚胎干细胞) 的部分特征性marker, 如Oct4, Sox2, Nanog, SSEA-3, SSEA-4等, 表明它可能具有类似于胚胎干细胞所特有的向三个胚层组织分化的潜能。这一推论被体外分化实验所证实。然而与ESCs不同的是, hAECs体内成畸胎瘤实验却呈阴性, 主要原因是其缺乏端粒酶活性, 因此, hAECs用作细胞治疗没有致瘤 (包括良性瘤、肉瘤和癌) 风险。

此外, hAECs细胞表面几乎不表达MHC II型分子, 因此不会引起炎症、过敏和免疫反应, 移植配型要求也相应降低。hAECs分离过程较为简单, 在刮洗以后的

羊膜上除了少量血液细胞团块几乎不存在其他类型细胞污染,而血液细胞在未受刺激的情况下属于悬浮细胞,因此可以通过细胞培养后,换液去除。根据我们和国外科学家实验统计,每张人的羊膜约有8000万到3亿个hAECs细胞。在EGF存在的条件下,hAECs具有较强的增殖能力,约36小时可以增殖一个代次,并能在前代次(约10代内)保持旺盛的增殖能力。这些优势保证了我们能够获取足够数量的高纯度细胞产品,以满足临床治疗的要求。

除了干性,hAECs还有一类重要的特性就是免疫调节性。早在20世纪初叶,就开始陆续有研究人员尝试将羊膜用作修复患者皮肤损伤的移植材料,取得了很好的疗效。进一步研究发现,羊膜具有抗排斥和抑制伤口细菌滋生的作用,提示羊膜可能具有某种免疫调节性。Ueta等人发现,羊膜具有抑制混合淋巴细胞反应的功能。Li等进一步研究发现,羊膜发挥免疫调节作用的主要功能细胞是hAECs,通过分泌免疫抑制因子,其可抑制中性粒细胞和巨噬细胞的趋化性,并抑制T,B细胞受有丝分裂原刺激后的增殖。另有科学家报道,羊膜还可以诱导IFN γ 激活的巨噬细胞的凋亡。有趣的是,通过一系列体外实验,发现羊膜可以抑制多种实体瘤细胞系增殖。Kang等发现hAECs在体外可以抑制乳腺癌细胞系的增殖,体内可以抑制裸鼠上乳腺癌瘤体的增大并延长小鼠的存活时间。关于抑制肿瘤,现在主要认为hAECs是通过抑制肿瘤血管生成和促进肿瘤细胞凋亡两方面起作用。

本发明人进一步研究发现,根据上述分离培养方法获得的hAECs中,存在一群CD90⁺的hAECs,其干细胞多能性标志物SSEA4,OCT4和NANOG的表达明显高于其他CD90⁺hAECs,且具有更好的免疫调节功能,故以此细胞作为治疗手段,以获得更好的临床效果。

发明简述

本发明提供一种针对患有移植物抗宿主病(GvHD)的或有罹患移植物抗宿主病风险的受试者的治疗方法,通常包括向受试者施用与合适的对照受试者相比有效改善移植物抗宿主病的至少一种症状或临床体征的人羊膜上皮细胞(hAECs)。为进一步提高临床治疗效果,选取具有强大免疫调节能力的CD90⁺hAECs细胞分群作为主要治疗细胞。

在发明的另一实施方案中,本发明涉及由人羊膜上皮细胞或其细胞制剂在制

备治疗和/或改善移植物抗宿主病的药物中的用途，其中所述的人羊膜上皮细胞（hAECs）为 CD90⁺ hAECs 细胞分群。

在发明的另一实施方案中，本发明涉及使用有效剂量的 CD90⁺人羊膜上皮细胞或其细胞制剂可单独或者与其它药物联合使用进行治疗和/或改善移植物抗宿主病。

在发明的另一实施方案中，所述的细胞制剂包括人羊膜上皮细胞和药学可接受的载体。

在发明的另一实施方案中，本发明涉及一种从羊膜组织中分离羊膜上皮细胞的方法，所述方法包括以下步骤：

- （1）从胎盘组织通过机械分离得到羊膜；
- （2）清洗后的羊膜用消化酶进行消化，将消化后的液体进行离心，即可获得人羊膜上皮细胞；
- （3）分选出 CD90 阳性的人羊膜上皮细胞（hAECs）。

本发明研究CD90⁺人羊膜上皮细胞在移植物抗宿主病的治疗中的潜在能力并挖掘其治疗机理。结果显示，CD90⁺hAECs与PBMC共移植的治疗组和未筛选hAECs治疗组对aGVHD均有较好的抑制效果，相比于疾病组显著改善了小鼠的临床表型和病理表型，同时明显提高了小鼠的生存率。利用本发明的动物模型证明该方法能有效减轻aGVHD导致的炎症细胞对靶器官的浸润，同时也明显减轻了靶器官病变，同时还发现hAECs对多个白血病细胞系具有促凋亡作用，能够用于治疗移植物抗宿主病，在临床应用上将具有广泛的前景。

附图说明

图 1 各组别中 CD3 和 CD45 占比图示。CD3 是 T 淋巴细胞表面的一类抗原，CD3⁺是成熟的 T 淋巴细胞；CD45 分子在所有白细胞上都有表达，称为白细胞共同抗原。结果显示，FACS 结果表明在 PBMC 植入 2 周后，aGVHD 模型鼠中人 CD3 和人 CD45 分子在所有白细胞上都有表达并且嵌合率高达 50%以上。而同时植入 CD90⁺hAECs 和植入未筛选 hAECs 都未明显影响 PBMC 的植入。此外我们发现，植入的所有 CD45⁺细胞几乎都共表达 CD3。人源化 aGVHD 模型构建成功，并且不受 CD90⁺hAECs 的影响。

图 2 CD90⁺hAECs 的分离与其免疫调节特性。在分离的 hAEC 中对 CD29、

CD166 和 CD 90 进行流式细胞术检测。hAEC 的免疫调节特性和 CD90⁺群体的功能鉴定。未分选的 hAECs 或分选的 CD90⁺和 CD90⁻hAECs 与 PHA 激活的 PBMCs 共培养 3 天。通过 ELISA 检测培养基中的 TNF α 、IL2、IL17 和 IL10。(A) 用于 CD90⁺和 CD90⁻hAEC 分选的代表性流式细胞术门控。(B-E) hAECs 培养基中细胞因子 TNF α 、IL10、IL17 和 IL2 的 ELISA 检测。

图 3 各组别小鼠外观图示。在 PBMC 植入两周后，单独植入 PBMC 的小鼠开始逐渐出现一系列 aGVHD 典型的临床表征：体重减轻，活动力下降，精神萎靡，严重弓背，脱毛，腹泻等。未筛选 hAECs 治疗组与 CD90⁺hAECs 治疗组都可改善 aGVHD 小鼠临床症状。

图 4 各组别小鼠体重随时间变化图示。hAECs 的植入除了改善了疾病小鼠的生存质量，更重要的是延长了 aGVHD 小鼠的生存时间并明显提高了其生存率，且 CD90⁺hAECs 治疗组的效果优于未筛选 hAECs 治疗组。

图 5 各组别小鼠存活率随时间变化图示。各组别小鼠存活率随时间变化图示。模型组小鼠全部死亡，而相比于未筛选 hAECs 细胞，CD90⁺hAECs 细胞的治疗作用更好，死亡率更低。

图 6 流式细胞术显示各组别小鼠体内 Th1, Th2 及 Treg 占比图示。图 6-1 显示移植后两周，FACS 检测小鼠中人 Th1 (CD4+IFN γ +), Th2 (CD4+IL4+), 及 Treg (CD4+CD25+FOXP3+)) 占 CD4+细胞比率的流式代表图和统计图 (n=5)。结果显示相比于未筛选 hAECs 细胞，CD90⁺hAECs 细胞的免疫调节、降低炎症的效果更好。图 6-2 显示通过流式细胞术来研究 CD90⁺hAECs 转变 T 细胞亚群在体内分群并影响 CD4+T 细胞激活，结果显示 aGVHD 疾病组具有较高比例的 Th1 和较低比例的 Treg。在同时共移植 CD90⁺hAECs 的治疗组显示，其 Th1 比例较为明显下降，重要的是我们检测到 Treg 比例有将近 4 倍的明显提高，而在未筛选 hAECs 治疗组中，我们看到 Th1 比例相较 CD90⁺hAECs 治疗组有更明显的抑制。此外，我们还发现无论 CD90⁺hAECs 治疗组还是未筛选 hAECs 治疗组，其 Th2 亚群比例并未发生明显变化。上述结果显示 CD90⁺hAECs 通过转变 T 细胞各亚群比例而改善 aGVHD。

图7 组织免疫荧光各组别小鼠内皮粘附分子表达图示。结果发现相比阴性对照组(即注射PBS组)，植入PBMC的aGVHD组其血管内皮上粘附分子I-CAM1和V-CAM1

的表达明显升高，而和我们预期的一样，CD90⁺hAECs与PBMC共移植以后明显减弱了内皮I-CAM1和V-CAM1的表达。

图 8 各组别小鼠靶器官切片 HE 染色图示。取发病小鼠(PBMC 注射后 12 天)的 aGVHD 各靶器官：肝脏，肺，小肠，肾脏并切片。HE 染色显示：aGVHD 模型组小鼠肝脏门静脉处出现了大面积内皮炎症病灶。肺部的肺泡出现炎症细胞浸润和内皮周围出现坏死节结。肾脏出现局部水肿。小肠中发现小肠绒毛钝化。而在 PBMC 与 CD90⁺hAECs 同时移植组，我们发现肝脏内皮炎症病灶几乎消失。肺泡炎症细胞浸润明显减少，内皮周围的坏死面积明显减小。而肾脏和小肠未发现明显病变。而未筛选 hAECs 的治疗组我们发现对肝脏、肺脏病变的治疗作用虽不及 CD90⁺hAECs 组，但相比疾病组，仍可观察到明显减轻病变程度的疗效。然而未筛选 hAECs 的治疗组对于肾脏病理改变并无明显影响；而对小肠的改善作用与 CD90⁺hAECs 组一样明显。

图 9 各组别小鼠器官病理评分图示。

图 10 各组别小鼠肺部 masson 染色图示。结果显示，在指示纤维化的 masson 染色上，CD90⁺hAECs 治疗组明显好于未筛选 hAECs 治疗组。

图 11 hAECs 慢病毒感染图示。经带 GFP 标签的慢病毒感染的 hAECs 在明场(11a)与绿色荧光显微镜(11b)下的照片，显示了高感染率。

图12 hAECs在小鼠体内定位图示。结果显示，CD90⁺hAECs主要定位在肾脏，肺，肝脏中。

发明详述

本发明提供一种针对患有移植物抗宿主病(GvHD)的或有罹患移植物抗宿主病风险的受试者的治疗方法，通常包括向受试者施用与合适的对照受试者相比有效改善移植物抗宿主病的至少一种症状或临床体征的人羊膜上皮细胞(hAECs)。为进一步提高临床治疗效果，选取具有强大免疫调节能力的CD90⁺hAECs细胞分群作为主要治疗细胞。

一方面，本发明公开了由人羊膜上皮细胞或其细胞制剂在治疗和/或改善移植物抗宿主病中的用途，其中所述的人羊膜上皮细胞(hAECs)为CD90⁺hAECs细胞分群。使用有效剂量的CD90⁺人羊膜上皮细胞或其细胞制剂可单独或者与其

它药物联合使用进行治疗和/或改善移植物抗宿主病。有效剂量是指足以改善或防止医学疾病的症状或病症的量。对具体受治疗者的有效量可视多种因素而变化,例如待治疗的疾病、患者的整体健康状况、给药的方法途径和剂量及副作用的严重性。有效量可为避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

本发明另一实施方案中,通过流式细胞术研究 CD90⁺hAECs 转变 T 细胞亚群在体内分群并影响 CD4⁺T 细胞激活,结果显示 aGVHD 疾病组具有较高比例的 Th1, Th17 和较低比例的 Treg。在同时共移植 CD90⁺hAECs 的治疗组显示,其 Th1 比例较为明显下降,重要的是我们检测到 Treg 比例有将近 4 倍的明显提高,而在 CD90⁺hAECs 治疗组中,我们看到 Th1 比例相较未筛选 hAECs 治疗组有更明显的抑制。此外,我们还发现无论 CD90⁺hAECs 治疗组还是未筛选 hAECs 治疗组,其 Th2 亚群比例并未发生明显变化。上述结果显示 CD90⁺hAECs 通过转变 T 细胞各亚群比例而改善 aGVHD 且相较于未筛选 hAECs 细胞治疗更具治疗价值。

在本发明另一实施方案中,所述的罹患移植物抗宿主病的动物是指哺乳动物。在更为优选的实施方案中,所述的动物为牛、马、羊、猴子、狗、大鼠、小鼠、兔子或人类。在最优选的实施方案中,所述的罹患移植物抗宿主病的动物是指人类。在本发明一个实施方案中,CD90⁺hAECs 的植入除了改善了疾病小鼠的生存质量,更重要的是延长了 aGVHD 小鼠的生存时间并明显提高了其生存率,同样 CD90⁺hAECs 治疗组的效果要比未筛选 hAECs 治疗组更好。

在发明的另一实施方案中,所述的细胞制剂包括 CD90⁺人羊膜上皮细胞和药学可接受的载体。本发明所述的药学可接受的载体是指适合用于人和/或动物,无过度的不良副作用(如毒性、刺激性和过敏反应)的具有合适的有益/风险率的物质,例如药学可接受的溶剂、悬浮剂或赋形剂,有利于细胞存活,能递送所配制的细胞到人或动物。载体依合适地计划的给药方式而选择。本发明的载体包括但不限于各种生理缓冲液,如生理盐水、磷酸缓冲液、人工脑脊液或是全血清、脐带血清等。

可以采用任意适合的方法将 CD90⁺羊膜上皮细胞给予患者,例如静脉注射或者脊髓腔内注射等。通常这些细胞是包含在药学上可接受的液体培养基中。细胞给予可以重复或连续进行(例如,通过连续灌输注入脑脊液中)。一般而言,多重给药方式通常要间隔至少 7-10 天分别使用。另外一种方法为将细胞种植在生物

可吸收材料如明胶海绵里,采用手术将种有细胞的生物可吸收材料植入所需的部位。上述两种方法可结合应用,可取得更好的疗效。

CD90⁺羊膜上皮细胞的适合用量将根据患者的年龄、性别、体重、健康状况以及其它因素而改变。通常,每次给予的剂量范围为大约 10³-10⁹细胞,典型的是大约 10⁶-10⁸细胞。

在本发明的一些实施方案中,本发明公开了由人羊膜上皮细胞或其细胞制剂在制备治疗和/或改善移植物抗宿主病的药物中的用途,其中所述的人羊膜上皮细胞(hAECs)为 CD90⁺ hAECs 细胞分群。

在本发明的另一实施方案中,本发明公开了由 CD90⁺人羊膜上皮细胞或其细胞制剂与其它药物联合使用进行治疗和/或改善移植物抗宿主病。将 CD90⁺羊膜上皮细胞与一种或多种药物一起施用给患者,所述的药物选自甲基强的松龙、环孢素、他克莫司、麦考酚酸酯、甲氨蝶呤、糖皮质激素、硫唑嘌呤、沙利度胺、抗 T 细胞单克隆抗体(抗 CD3 单抗)、抗白细胞介素-2 受体的抗体等中的一种或其组合。

在发明的另一实施方案中,提供了一种从 CD90⁺羊膜组织中分离羊膜上皮细胞的方法,所述方法包括以下步骤:

- (1) 从胎盘组织通过机械分离得到羊膜;
- (2) 清洗后的羊膜用消化酶进行消化,将消化后的液体进行离心,即可获得人羊膜上皮细胞;
- (3) 分选出 CD90 阳性的人羊膜上皮细胞(CD90⁺hAECs)。

在本发明另一实施方案中,本发明所述的羊膜上皮细胞来源于人类。可从离体的人胎盘分离羊膜,采用生理缓冲液冲洗除去血细胞,机械剔除残留绒毛膜和血管。分离指的是从组织样品中移出细胞且与另外的组织分开。使用任何常规技术或方法从完整人羊膜上皮层组织分离出单细胞,这些技术或方法包括机械力(切碎力或剪切力),用一种或组合的蛋白酶例如胶原酶、胰蛋白酶、脂肪酶、释放酶(liberase)和胃蛋白酶进行酶消化或机械和酶方法的组合。

在本发明另一实施方案中,CD90 阳性的人羊膜上皮细胞的筛选过程为:将 hAEC 用 CD90 一抗染色,然后与荧光偶联的二抗孵育,通过流式细胞仪分析,分

选出 CD90 阳性的人羊膜上皮细胞。更优选的筛选过程为：将 hAEC 用 CD90 (1:20, Millipore) 一抗染色，然后与荧光偶联的二抗孵育。用 FACS Calibur 仪器 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, 美国) 进行流式细胞仪分析，分选出 CD90 阳性的人羊膜上皮细胞。

在本发明一个优选的实施方案中，人羊膜的获取应经产妇授权同意后，取健康产妇剖腹产后的胎盘组织，通过机械分离得到整张羊膜。

在本发明另一个优选的实施方案中，可对步骤 3 中获得 CD90⁺人羊膜上皮细胞继续培养，优选的培养条件为：以 1×10^6 - 1×10^8 个细胞/平板的密度将细胞接种于培养皿中，放置于二氧化碳培养箱中培养，待 CD90⁺人羊膜上皮细胞贴壁后换培养液，待细胞长满平板后将细胞消化下来进行冻存。

本领域技术人员可用已知的其它方法将活性细胞群体浓缩。这些加工后洗涤/浓缩步骤可单独或同时施行。除了上述方法以外，还可在细胞洗涤后或培养后，进一步纯化或富集活性细胞群体，减少杂细胞和死细胞。分离悬浮液中的细胞可通过以下技术来实现：浮力密度沉降离心、有差别的与固相的粘着和从固相上洗脱、免疫磁性珠、荧光激光细胞分选 (FACS) 或其它技术。这些不同技术以及进行这些技术的装置的实例可参见现有技术和上市商品。

对本发明使用的基础培养基的类型没有限制，只要可用于细胞培养的培养基即可。优选的培养基包括 DMEM 培养基和 NPBM 培养基。对上面提到的基础培养基中可能含有的其他组份类型没有限制，优选的成分包括 F-12、FCS 和神经存活因子等。

在本发明的另一个优选实施方案中，向上面提到的基础培养基中添加 bFGF (碱性成纤维细胞生长因子) 或 EGF (表皮生长因子)。在这种情况下，可以加入一种或者两者都加入。上面提到的 bFGF 或 EGF 的举例浓度是 1ng/ml 至 100ng/ml，优选的浓度为 10ng/ml。对添加的时间和方法没有限制。优选地，在将上面提到的羊膜上皮细胞在基础培养基中培养时每天加入试剂。

本发明使用有效剂量的 CD90⁺羊膜上皮细胞或含有 CD90⁺羊膜上皮细胞的细胞制剂单独或者与其它药物联合使用进行治疗和/或改善移植物抗宿主病。本发明研究 CD90⁺人羊膜上皮细胞 (human amniotic epithelial cells, hAECs) 在

移植物抗宿主病的治疗中的潜在能力并挖掘其治疗机理。结果显示，CD90⁺hAECs 与 PBMC 共移植的 CD90⁺hAECs 治疗组和未筛选 hAECs 治疗组对 aGVHD 较好的抑制效果，相比于疾病组显著改善了小鼠的临床表型和病理表型，同时明显提高了小鼠的生存率。利用本发明的动物模型证明该方法能有效减轻 aGVHD 导致的炎症细胞对靶器官的浸润，同时也明显减轻了靶器官病变，同时还发现 hAECs 对多个白血病细胞系具有促凋亡作用，能够用于治疗移植物抗宿主病，在临床应用上将具有广泛的前景。

本发明将 CD90⁺人羊膜上皮细胞用于移植物抗宿主病的治疗，充分发挥了人羊膜上皮细胞的优点，其中人羊膜上皮细胞主要具有以下几个方面的优势：

(1) 能长期保持多潜能性并具有胚胎干细胞所特有的向三个胚层组织分化的潜能；

(2) 细胞表面几乎不表达 MHC II 型分子，因此不会引起炎症、过敏和免疫反应，移植配型要求也相应降低；

(3) 具有调节体内和体外免疫反应的能力，在体外培养时能分泌多种免疫调节因子、抗血管生成蛋白或抗炎因子相关蛋白；

(4) 具有低免疫原性，可以看作是免疫赦免细胞，无抗原呈递的功能，移植后可减少免疫细胞来源，避免免疫排斥反应的发生；

(5) 不表达端粒酶逆转录酶，没有致瘤性(包括良性瘤、肉瘤和癌)；

(6) 具有较强的增殖能力，并能在前代次(约 10 代内)保持旺盛的增殖能力；

(7) 来源广泛，取材容易，没有应用限制，不存在伦理问题。

具体实施方式

实施例 1 原代羊膜上皮细胞分离及培养

1、人羊膜的来源

为了避免产道微生物污染，我们选用了剖腹产胎儿胎盘。由于足月后分娩信号刺激，羊膜会发生凋亡，因此宜用早产胎儿胎盘(38 周以前)。经产妇授权同意后，取健康产妇(HIV、梅毒、甲肝、乙肝、丙肝等血清学反应均显示为阴性)

剖腹产后的胎盘组织，十字刀切割胎盘，通过机械分离得到整张羊膜。

2、CD90⁺hAECs 的分离与分选（全程要求无菌操作）

获取 38 周以前剖腹产婴儿胎盘，从胎盘内面剥离羊膜，将之浸入含有 F12/DMEM(含 1X 青霉素-链霉素和两性霉素)基础培养基的离心管中。4℃冷链运送至实验室细胞间。

将羊膜取出，并将每张羊膜置于 40ml CMF-HBSS(含 1X 青霉素-链霉素和两性霉素)中清洗去粘液，并用镊子刮去贴近绒毛膜层的间充质层及粘液，重复 3 次，每次洗涤均换新容器和新 HBSS 液。

将洗净的羊膜转入新容器，加 10ml 0.05%胰酶/EDTA，颠倒 30s，弃液。

将羊膜转入新容器，加 20ml 0.05%胰酶/EDTA，37℃水浴孵育 10min 弃液。

羊膜转入新容器，25ml 胰酶/EDTA 37℃水浴孵育 40min，保存消化液。

初次消化后羊膜转入新容器，25ml 胰酶/EDTA 37℃水浴孵育 40min，保存消化液。

加入等体积消化终止液（F12/DMEM 含 5%FBS，1xL-谷氨酸，1x β 巯基乙醇，1x 丙酮酸），400g 离心 10min。弃液，用羊膜完全培养基：F12/DMEM 含 5%KSR(KnockOut Serum Replacement)，1xL-谷氨酰胺，1x β 巯基乙醇，1x 丙酮酸，1Xps（Penicillin-Streptomycin），10ng/ml hEGF 重悬沉淀。

加入等体积消化终止液，400g 离心 10min。弃液，完全培养基重悬沉淀。

过 100um 筛，计数。

用 PBS 洗涤。

用 FACS Calibur 仪器（Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, 美国）进行流式细胞仪分析。使用标准方案，用靶向 CD34, CD45, CD31, CD29, CD166, CD90, HLA-DR 和 HLA-DQ 的荧光偶联抗体对 hAEC 进行染色（1:20，均来自 BioLegend）。对于 SSEA4 和 TRA-1-60，将 hAEC 用 SSEA4（1: 20, Millipore）和 TRA-1-60（1: 20, Millipore）一抗染色，然后与荧光偶联的二抗孵育。使用碘化丙啶(PI)染色获得细胞周期分布的测量值。在每个实验中使用同型对照。

设置 FACS Calibur 仪器程序（Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, 美国）进行流式细胞仪分选 CD90 阳性人羊膜上皮干细胞。调整流速和样品浓度，使目标细胞通过样品室的浓度为 100-300 个/秒，筛选并收集 CD90 阳性人羊膜上

皮干细胞。

以 10^5 cells/cm² 接种至培养皿或置于冻存液（90%FBS, 10%DMSO）中液氮冻存备用。

3、hAECs 的接种培养及冻存

细胞计数培养：浓度 = $\frac{4 \text{个大格细胞总数}}{4} \times 10,000 \times \text{稀释倍数}$ （个/ml），一个平板接种 1×10^7 个细胞。待 hAECs 贴壁后换培养液，之后三天换一次培养液。

待细胞长满平板后将细胞消化下来进行冻存：15 cm dish 加 5 ml 胰酶，10 min 后镜下观察，细胞变圆且平面晃动平皿时细胞全变为悬浮状态时加等量消化终止液终止消化。用微量移液器按同一方向将培养皿上的细胞吹下，移入 15 ml 离心管，300 g 离心 3 min 后收集细胞然后进行细胞计数。在冻存管内加入冻存液，标明冻存日期、批次及细胞数量之后将细胞放入冻存管，然后立刻将冻存管放入冻存盒中并将冻存盒放进 -80℃ 冰箱，12 h 后取出冻存盒，将细胞移入液氮罐中保存。

实施例 2 人外周血单个核细胞分离、培养及冻存

无菌抽取捐献者外周血至含抗凝剂的收集带中。

在 50ml 离心管中加入 5ml 的 Ficoll 液，用无菌巴氏吸管吸取血液轻柔滴加于 Ficoll 液上。

无离心加速度，室温 400g 离心 30min，直至血液出现明显分层。

新巴氏吸管小心吸取分层中的白膜层，加入含有 10ml 的 DPBS（含 1xPS）中混合均匀。

室温 300g 离心 5min，弃液。

10ml 的 DPBS（含 1xPS）重悬沉淀，室温 300g 离心 5min，弃液。

用完全培养基（1640, 10%FBS, PS）重悬备用，或用冻存液液重悬后冻存于液氮。

实施例 3 小鼠模型建立及 aGVHD 小鼠评分标准

1、NCG 小鼠急性 GVHD 模型建立

自公司购买 6~8 周龄 NCG 小鼠移送至动物房饲养 1 周以适应环境。饮用水加

入庆大霉素(32×10^4 U/L)和红霉素(250 mg/L)。

将实验小鼠分为GVHD模型组、CD90⁺hAECs治疗组、未筛选hAECs治疗组及对照组, n=5。经尾静脉向GVHD模型组、CD90⁺hAECs治疗组、未筛选hAECs治疗组小鼠注射 10^7 个人外周血单个核细胞(PBMC)/鼠,一周后,向CD90⁺hAECs治疗组小鼠经尾静脉注射CD90⁺hAECs 2×10^6 个/鼠;向未筛选hAECs治疗组小鼠经尾静脉注射未筛选hAECs 2×10^6 个/鼠。对照组则注射对应的体积的PBS。

2、aGVHD小鼠评分标准

aGVHD小鼠临床表型评分标准(依据KR.Cook评分系统,共10分,每隔一天观测一次。)

体重减轻:小鼠体重减轻小于10%认定为正常得0分;体重减轻在10%~25%之间得1分;减轻程度大于25%得2分。

姿态变化:小鼠姿态无异常认定为正常得0分;只在休息时呈弓背状态得1分;严重弓背以致于影响正常活动得2分。

毛发纹理变化:小鼠毛发纹理无异常认定为正常得0分;轻微皱褶得1分;严重皱褶得2分。

活动力:小鼠活动力正常得0分;活动力轻微减弱得1分;若无刺激则不活动得2分。

皮肤完整性:小鼠皮肤无异常认定为正常得0分;尾部或脚掌出现皮肤剥落得1分;皮肤出现明显剥落区域得2分

aGVHD小鼠器官病理评分标准(共4分)

肺:正常无病变认定为正常得0分;血管周有少量白细胞聚集得0.5分;血管周白细胞聚集程度为1-2细胞厚(涉及15%血管周),得1分;血管周白细胞聚集程度为1-2细胞厚(涉及15%血管周),并浸润到实质组织中,得1.5分;血管周白细胞聚集程度为2-3细胞厚(涉及15%血管周),并浸润到实质组织中,得2分;血管周白细胞聚集程度为2-3细胞厚(涉及25%-50%血管周),并浸润到实质组织中,得2.5分;血管周白细胞聚集程度为4-5细胞厚(涉及25%-50%血管周),并浸润到实质组织中,得3分;血管周白细胞聚集程度为6-7细胞厚(涉及50%血管周),并浸润到实质组织中,严重破坏组织正常结构得3.5分;血管周白细胞聚集程度为6-7细胞厚(涉及超过50%血管周),并浸润到实质组织

中，严重破坏组织正常结构得 4 分。

肠：正常无病变认定为正常得 0 分；偶尔出现引窝细胞坏死，极少炎症细胞浸润至粘膜下层及小肠绒毛，得 0.5 分；引窝细胞坏死达到 15%，炎症细胞浸润到 20%粘膜下层及小肠绒毛，得 1 分；引窝细胞坏死达到 15%，炎症细胞浸润到 3 分之 1 粘膜下层及小肠绒毛，得 1.5 分；引窝细胞坏死达到 25%，炎症细胞浸润到 3 分之 1 粘膜下层及小肠绒毛，得 2 分；引窝细胞坏死达到 25%-50%，炎症细胞浸润到 3 分之 1 粘膜下层及小肠绒毛，得 2.5 分；引窝细胞坏死大于 50%，炎症细胞浸润到 3 分之 1 粘膜下层及小肠绒毛，得 3 分；引窝细胞坏死大于 50%，炎症细胞浸润到 50%粘膜下层及小肠绒毛，得 3.5 分；引窝细胞坏死大于 50%，炎症细胞浸润到大于 50%粘膜下层及小肠绒毛，得 4 分。

脾：正常无病变认定为正常得 0 分；每平方毫米组织有 10 个坏死或凋亡细胞得 1 分；每平方毫米组织有 10 个坏死或凋亡细胞并偶有溶血，得 1.5 分；每平方毫米组织有 10-20 个坏死或凋亡细胞，偶有溶血并伴随组织结构损坏，得 2 分；每平方毫米组织有 10-20 个坏死或凋亡细胞，有溶血并伴随 25%以下的组织结构损坏，得 2.5 分；每平方毫米组织有 20-40 个坏死或凋亡细胞，有溶血并伴随 25%-50%的组织结构损坏，同时有低于 25%组织纤维化，得 3 分；每平方毫米组织有 20-40 个坏死或凋亡细胞，有溶血并伴随 50%的组织结构损坏，同时有 25%-50%组织纤维化，得 3.5 分；组织大面积（大于 50%）坏死或凋亡细胞，有溶血并伴随大于 50%的组织结构损坏，同时有大于 50%组织纤维化，得 4 分。

肝：正常无病变认定为正常得 0 分；病灶区实质组织聚集 1-2 个单个核细胞每 0.5cm 组织得 1 分；每 0.5cm 组织存在一条内皮炎血管，每条血管内皮下至少有 2 个炎症细胞浸润得 2 分；每 0.5cm 组织存在 3 条内皮炎血管，每条血管内皮下至少有 3 个炎症细胞深度浸润得 3 分；几乎所有血管均存在内皮炎，每条血管内皮下至少有 3 个炎症细胞深度浸润得 4 分。

实施例 4 aGVHD 小鼠模型实验分组

采用体内无成熟 T 细胞，B 细胞，NK 细胞的 NCG 小鼠作为模型鼠，植入人外周血单个核细胞（PBMC）建立了人源化 aGVHD 小鼠模型。我们将实验分为四组：
1. 以 PBMC 单独移植组作为 aGVHD 疾病模型组；2. CD90⁺hAECs 与 PBMC 同时移植

作为 aGVHD 疾病 CD90⁺hAECs 治疗组; 3. 未筛选 hAECs 与 PBMC 同时移植作为 aGVHD 疾病未筛选 hAECs 治疗组; 4. 注射相应体积的培液作为空白对照组。

Groups	Model Building
aGVHD	PBMC
aGVHD Treating	PBMC & CD90+hAECs
aGVHD Treating	PBMC & hAECs
Control	PBS

结果显示, 在 PBMC 植入 2 周后, FACS 结果表明在 aGVHD 模型鼠中, CD3 和 CD45 (CD45 分子在所有白细胞上都有表达并且嵌合率高达 50% 以上 (图 1)。而同时植入 CD90⁺hAECs 和植入未筛选 hAECs 都未明显影响 PBMC 的植入 (图 1)。此外我们发现, 植入的所有 CD45⁺细胞几乎都共表达 CD3 (图 1)。

在 PBMC 植入两周后, 我们观察到单独植入 PBMC 的小鼠开始逐渐出现一系列 aGVHD 典型的临床表征: 体重减轻, 活动力下降, 精神萎靡, 严重弓背, 脱毛, 腹泻等, 而同时共移植 CD90⁺hAECs (即 CD90⁺hAECs 治疗组) 以后各项疾病表征均有非常明显地改善。而移植未筛选 hAECs 的治疗组虽治疗效果不及 CD90⁺hAECs 治疗组, 但较之疾病组还是有较明显改观。然而在弓背, 腹泻 (这与后面组织染色一致), 活动力上未筛选 hAECs 治疗组与 CD90⁺hAECs 治疗组相差不大 (图 2, 图 3)。我们对此表型进行临床评分, 结果 CD90⁺hAECs 治疗组和未筛选 hAECs 组与疾病组显示了明显差别。

CD90⁺hAECs 的植入除了改善了疾病小鼠的生存质量, 更重要的是延长了 aGVHD 小鼠的生存时间并明显提高了其生存率, 同样 CD90⁺hAECs 治疗组的效果要比未筛选 hAECs 治疗组更好 (图 4)。

实施例 5 流式细胞术

1、细胞表面标志物染色

如果样品为组织或血液细胞需要裂解红细胞。向管中细胞加入 3ml 红细胞裂解液(ACK)重悬细胞，冰上孵育 5~20min。

向管中加入 10ml 细胞染色液（含 2%FBS 的 PBS）以终止 ACK 裂解。350g 室温离心 5 min，弃上清。如有需要，可加入 ACK 重复裂解一遍。

重复步骤 2 洗细胞一遍。

活细胞计数后，加细胞染色液调整细胞数浓度在 $5-10 \times 10^6$ cells/ml，以每管 100ul 的细胞液分装到流式管中。

加入适量的有荧光标记偶联的一抗到备好的细胞悬液里。冰上避光孵育 20-30min。

加入 2ml 的细胞染色液洗 2 次，350g 室温离心，5 min，弃上清。

加入 0.5ml 的 Cell Staining Buffer 重悬细胞，流式细胞仪分析。

2、胞内因子染色

收集刺激活化的细胞，这些细胞可以是体内刺激的组织，也可以是经体外刺激的培养细胞。在刺激过程的最后4-6小时，加入蛋白运输抑制剂 brefeldin A 或monensin，以抑制细胞因子分泌到胞外。根据需要分管染色。

在固定破膜和胞内染色之前，对活细胞进行表面染色。

在进行胞内染色之前，用Fixation Buffer固定细胞，每管0.5ml 固定液，室温避光孵育固定20min。

350g，离心，5 minutes，弃上清。

如果有中止实验的需要，可在此步暂停保存，以备之后继续操作实验。用Cell Staining Buffer洗一遍细胞，350g，离心，5 minutes，弃上清。Cell Staining Buffer重悬细胞，可在4° C短期保存。或者用90% FCS/10% DMSO 在-80度较长期保存。

用Permeabilization Wash Buffer重悬固定的细胞，350 g 离心 5-10 minutes，弃上清。

重复步骤6。

100ul Permeabilization Wash Buffer 重悬固定破膜后的细胞，加入特定的荧光标记抗体（抗体量根据说明书加），室温避光20min。

用 2 ml Permeabilization Wash Buffer 把细胞洗两遍。350 g离心 5 minutes, 弃上清。

用0.5 ml Cell Staining Buffer 重悬固定染色后的细胞, 上流式细胞仪分析。

通过流式细胞术来研究 CD90⁺hAECs 转变 T 细胞亚群在体内分群并影响 CD4⁺T 细胞激活, 结果显示 aGVHD 疾病组具有较高比例的 Th1, Th17 和较低比例的 Treg (图 6)。在同时共移植 CD90⁺hAECs 的治疗组显示, 其 Th1 比例较为明显下降, 重要的是我们检测到 Treg 比例有将近 4 倍的明显提高(图 6), 而在 CD90⁺hAECs 治疗组中, 我们看到 Th1 比例相较未筛选 hAECs 治疗组有更明显的抑制 (图 6)。此外, 我们还发现无论 CD90⁺hAECs 治疗组还是未筛选 hAECs 治疗组, 其 Th2 亚群比例并未发生明显变化 (图 6)。上述结果显示 CD90⁺hAECs 通过转变 T 细胞各亚群比例而改善 aGVHD。

实施例 6 免疫荧光

1、细胞免疫荧光

每孔细胞 (24 孔板) 抽吸取培养液, 加入 1ml PBS 晃洗后弃液。

加入 1ml 4%多聚甲醛 (PBS 稀释), 置于室温孵育 30min。

弃液, 并用 PBS 晃洗 2 次, 弃液。

加入 500ul 0.2%的 Triton X-100 (PBS 稀释) 室温孵育 15min (若抗原为膜蛋白则跳过此步)。

弃液, 并用 PBS 晃洗 2 次, 弃液。

加入 10%FBS (或 3%山羊血清或 2%马血清) 封闭 1~2h。

弃液, 加入 PBS 后, 放置于水平摇床 60rpm 室温洗 5min 重复 3 次

10%FBS 或 3%马血清稀释一抗, 每孔加 250ul。室温孵育 1h (或 4° 过夜)。

弃液, 加入 500ul wash buffer, 放置于水平摇床 60rpm 室温洗 5min, 共洗 3 次。

10%FBS 或 3%马血清稀释荧光偶联二抗, 每孔加 250ul。室温避光孵育 1h。
(此步开始后续所有步骤均避光操作。)

弃液, 加入 500ul wash buffer, 放置于水平摇床 60rpm 室温洗 5min, 共洗

3 次。

加入 PBS 稀释的 DAPI ，每孔加 250ul，室温孵育 5min。

弃液，加入 500ul wash buffer，放置于水平摇床 60rpm 室温洗 5min，共洗 2 次。

弃液，每孔加入 250ul PBS 后镜检。若为细胞爬片，则将封片液滴加至盖玻片上，将爬片取出使细胞面朝向盖玻片放置，此步操作主要尽量不要产生气泡，如果产生气泡则用镊子小心将气泡挤出，镜检。

2、组织免疫荧光

组织自体内取出后，迅速置于用 PBS 中洗去血污，小心将组织切分为合适大小(注意不要用力捏取组织)。将组织置于装有冰冻切片包埋剂(OCT)的包埋盒中。将包埋盒置于干冰预冷的异戊烷中，直至 OCT 和组织完全冻结。

将包埋好的组织固定于冰冻切片机，切为 0.5um 的切片，并将切片贴于粘附性载玻片上。

切片染色前需室温放置 30min，以使切片与玻片充分粘附。

将样品放于丙酮中，-20℃，固定 10min（若组织在包埋前已固定，则直接进行后续操作）。

切片取出，用 PBS 洗 3 次，每次 5min。

组织先用油性笔圈住，后在组织上滴加一抗(一抗用 5%HBS+1%BSA 的 PBS 稀释)，置于湿盒 4℃ 过夜；

切片取出，用 PBS 洗 3 次，每次 5min；

除去切片表明水分，滴加荧光偶联二抗（用 5%HBS+1%BSA 的 PBS 稀释），置于湿盒室温避光孵育 1h。（此步开始的后续操作均避光操作）

切片取出，用 PBS 洗 3 次，每次 5min。

DAPI 用 PBS 稀释后，滴加至切片上，室温孵育 3min，后用 PBS 清洗 2 次，每次 5min；

封片液封片，荧光显微镜镜检。

我们收取了各实验组和对照组小鼠的胸主动脉，对其进行了冰冻切片以及粘附分子的免疫荧光染色。结果发现相比阴性对照组（即注射 PBS 组），植入 PBMC 的 aGVHD 组其血管内皮上粘附分子 I-CAM1 和 V-CAM1 的表达明显升高，而和我们

预期的一样 CD90⁺hAECs 与 PBMC 共移植以后明显减弱了内皮 I-CAM1 和 V-CAM1 的表达（图 7）。因此我们认为 CD90⁺hAECs 可以抑制内皮粘附分子表达从而减轻血管 GVHD

实施例 7 组织石蜡包埋及切片

组织经体内取出后，迅速置于 10%福尔马林中清洗去血污。共清洗 3 次。

将组织置于 10%福尔马林或 4%PFA 中室温固定。

捞出组织，经 PBS 清洗后，用 70%乙醇室温脱水。

经乙醇梯度脱水后，置于二甲苯中透化。

透化好的组织经石蜡包埋，置于 4℃凝固。

将石蜡块于切片机，依据不同实验需要切成 5-10 μm 不等的切片。

经摊片，载玻片捞片，干燥诸步骤，获得石蜡切片成品。

实施例 8 HE 染色

将石蜡切片置于 65℃环境 1h 以便脱蜡。

切片经三次二甲苯溶液脱蜡，依次浸泡 10min, 10min, 5min。

将切片取出经 100%乙醇 5min、100%乙醇 5min 和 95%乙醇 2min 进行水化。

后经流水冲洗 5min。

切片经苏木精染核 5min，后流水冲洗 5min 去除多余染料。

将切片置于盐酸乙醇溶液浸泡 2s 进行分化，经流水冲洗 5min。

稀氨水浸泡 6s，流水冲洗 5min，入 95%乙醇 4min。

切片经伊红染 40s。

过 95%乙醇 2min、95%乙醇 2min、100%乙醇 4min、100%乙醇 4min。

分别过二甲苯溶液，各 5min, 5min, 5min。

用中性树脂封片后镜检。

结果显示，aGVHD 模型组小鼠肝脏门静脉处出现了大面积内皮炎症病灶。肺部可见肺泡被大量炎性细胞浸润，内皮周围出现坏死节结。肾脏出现局部水肿。小肠中发现小肠绒毛钝化。而在 PBMC 与 CD90⁺hAECs 同时移植的治疗组，我们发现肝脏内皮炎症病灶几乎消失。肺泡炎性细胞浸润明显减少，内皮周围的坏死面

积明显减小。而肾脏和小肠未发现明显病变。而在 PBMC 与未筛选 hAECs 同时移植的治疗组我们发现对肝脏，肺部病变的治疗虽不及 CD90⁺hAECs 组，但相比疾病组仍然明显减轻了病变程度，对肾脏病理改变并无明显影响；而对小肠的改善作用与 CD90⁺hAECs 组一样明显，这与我们在临床上观察到的治疗组体重变化小以及无腹泻的症状是一致的（图 8, 图 9）。

实施例 9 Masson 染色

将石蜡切片置于 65℃ 环境 1h 以便脱蜡。

切片经三次二甲苯溶液脱蜡，依次浸泡 10min, 10min, 5min。

将切片取出经 100%乙醇 5min、100%乙醇 5min 和 95%乙醇 2min 进行水化。后经流水冲洗 5min。

试剂 A 染核 5min，流水冲洗 5min。

切片放入 65℃ 烘箱至玻片表面水分蒸发，切片表面发白即可。

切片水平放置在湿盒中，在切片上滴加试剂 B 覆盖标本，室温染 10-20min。

向切片滴加试剂 C，孵育 3min，弃液，重复 2 次。

去除切片表面水分，滴加试剂 D 溶液孵育 3-5min。

吸去试剂 D，加试剂 E 孵育 5-15s。

滴加试剂 C 水溶液，弃液，使染色清晰即可。

切片经乙醇梯度脱水、二甲苯透化、用中性树胶封片后镜检。

结果显示，aGVHD 模型组出现大量阳性染色区域（蓝色），这提示我们疾病组肺部可能出现了纤维化病变，而 CD90⁺hAECs 治疗组阳性染色明显减少。结果显示，在指示纤维化的 masson 染色上，CD90⁺hAECs 治疗组明显好于未筛选 hAECs 治疗组（图 10）。

实施例 10 免疫组织化学染色

将石蜡切片置于 65℃ 环境 1h 以便脱蜡。

切片经三次二甲苯溶液脱蜡，依次浸泡 10min, 10min, 5min。

将切片取出经 100%乙醇 5min、100%乙醇 5min 和 95%乙醇 2min 进行水化。后经流水冲洗 5min。

将切片置于预热至 98°C 的抗原修复液中，98°C 恒温孵育 30min。

冷却至室温，切片经 PBS 室温浸洗 5min。

切片滴加 3% 双氧水孵育 10min。

用 PBS 清洗 2min x 3 次。

甩干切片，滴加一抗，4°C 过夜孵育。用 PBS 清洗 2min x 3 次。

滴加试剂 1，室温孵育 20min，用 PBS 清洗 2min x 3 次。

滴加试剂 2，室温孵育 20min，用 PBS 清洗 2min x 3 次。

滴加 DAB 显色 5-20min。

经流水冲洗 5min、苏木精复染、乙醇梯度脱水、二甲苯透化以及用中性树脂封片后镜检。

实施例 11 MACS 分选

PBMC 用培养液重悬至 10^7 个细胞每 100ul 后装入无菌管，每 100ul 加入 10ul 抗体，冰上孵育 15min。

重悬磁珠使之混匀，每 100ul 加入 10ul 磁珠，冰上孵育 15min。

加入 3ml MojoSort™ Buffer 与细胞混匀。

将细胞放置于磁铁吸附 5min。

将液体倒出至收集管，用同体积培养液混合，350g 离 5min。（如需提高回收率可以重复第 3-5 步）

弃液，用完全培养基重悬后培养或冻存。

实施例 12 CFSE 检测增殖

1ml CFDA SE 标记液重悬 10^6 - 5×10^6 个细胞。

用 CFDA SE 标记液稀释 CFDA SE 储存液（1000X）至 2X。

将 1ml CFDA SE 储存液（2X）加至 1 中，轻柔混匀，37°C 孵育 10min。

加入完全培养基（含血清）以终止反应，颠倒数下混匀。

300g 离心 5min，弃液。

加入 10ml 完全培养基重悬。

300g 离心 5min，弃液。

加入 10ml 完全培养基重悬，37℃ 孵育 5min，以便促进 CFDA SE 在细胞内驻留以及未反应的 CFDA SE 进入完全细胞培养基。

300g 离心 5min，弃液。

根据需要培养标记好的细胞。

收取细胞，FACS 检测细胞内平均荧光强度。

实施例 13 慢病毒感染及 CD90⁺hAECs 在靶器官中的定位

病毒相关各元件质粒以及载体质粒，经 DH5 α 扩繁后，用 endotoxin free 质粒抽提试剂盒进行质粒抽提。

接种 293T 至 10cm 盘长至约 80%左右。

将病毒各质粒混均匀后，与水和钙转试剂混合，室温孵育 2min。

将上述两种溶液摇晃均匀。

37℃ 培养过夜，换液并在合适时间收取病毒。

将病毒与适量 polybrene 混合后，加入目的细胞感染 48-72h 后，检测标签蛋白表达，以确定感染效率。

被病毒感染的 CD90⁺hAECs 形态正常，绿色荧光显微镜照片指示了高的感染效率（图 11）。将带有 GFP 标记的 CD90⁺hAECs 单独或与 PBMC 共同植入到 NCG 小鼠体内，一周后取各小鼠器官，抽提 mRNA 并反转录为 cDNA，以 RT-PCR 检测了 GFP 在各组织的表达情况，以此指示 CD90⁺hAECs 在各组织的定位情况。结果显示 GFP 在肾脏，肺，肝脏中高表达，而在小肠，脾，淋巴结中表达极低，在骨髓中几乎未发现表达。结果表明，CD90⁺hAECs 主要定位在肾脏，肺，肝脏中（图 12）。

本发明研究 CD90⁺人羊膜上皮细胞（human amniotic epithelial cells, hAECs）在移植物抗宿主病的治疗中的潜在能力并挖掘其治疗机理。结果显示，CD90⁺hAECs 与 PBMC 共移植的 CD90⁺hAECs 组和未筛选 hAECs 治疗组对 aGVHD 较好的抑制效果，相比于疾病组显著改善了小鼠的临床表型和病理表型，同时明显提高了小鼠的生存率。

权利要求书

- 1、人羊膜上皮细胞或其细胞制剂在治疗和/或改善移植物抗宿主病中的用途，其中所述的人羊膜上皮细胞（hAECs）为 CD90⁺ hAECs 细胞分群。
- 2、根据权利要求 1 所述的用途，其特征在于：使用有效剂量的 CD90⁺人羊膜上皮细胞或其细胞制剂单独或者与其它药物联合使用进行治疗和/或改善移植物抗宿主病。
- 3、根据权利要求 1 或 2 所述的用途，其特征在于：所述的具有移植物抗宿主病的动物是指哺乳动物。
- 4、根据权利要求 3 所述的用途，其特征在于：所述的动物为牛、马、羊、猴子、狗、大鼠、小鼠、兔子或人类。
- 5、根据权利要求 4 所述的用途，其特征在于：所述的动物是指人类。
- 6、根据权利要求 1 或 2 所述的用途，其特征在于：所述的细胞制剂包括 CD90⁺人羊膜上皮细胞和药学可接受的载体。
- 7、根据权利要求 6 所述的用途，其特征在于：所述的载体包括但不限于各种生理缓冲液，如生理盐水、磷酸缓冲液、人工脑脊液或是全血清、脐带血清等。
- 8、根据权利要求 1 或 2 所述的用途，其特征在于：可以采用任意适合的方法将 CD90⁺羊膜上皮细胞给予患者，所述的方法为静脉注射或者脊髓腔内注射。
- 9、根据权利要求 8 所述的用途，其特征在于：CD90⁺羊膜上皮细胞给予重复或连续进行，多重给药方式要间隔至少 7-10 天分别使用。
- 10、根据权利要求 8 所述的用途，其特征在于：将 CD90⁺羊膜上皮细胞种植在生物可吸收材料里，采用手术将种有细胞的生物可吸收材料植入所需的部位。
- 11、根据权利要求 1 或 2 所述的用途，其特征在于：CD90⁺羊膜上皮细胞的适合用量将根据患者的年龄、性别、体重、健康状况以及其它因素而改变。
- 12、根据权利要求 11 所述的用途，其特征在于：CD90⁺羊膜上皮细胞每次给予的剂量范围为 10³-10⁹细胞。
- 13、根据权利要求 12 所述的用途，其特征在于：CD90⁺羊膜上皮细胞每次给予的剂量范围为 10⁶-10⁸细胞。
- 14、根据权利要求 2 所述的用途，其特征在于：CD90⁺人羊膜上皮细胞或其细胞制剂与其它药物联合使用进行治疗和/或改善移植物抗宿主病，所述的药物选自

甲基强的松龙、环孢素、他克莫司、麦考酚酸酯、甲氨蝶呤、糖皮质激素、硫唑嘌呤、沙利度胺、抗 T 细胞单克隆抗体(抗 CD3 单抗)、抗白细胞介素-2 受体的抗体等中的一种或其组合。

15、一种从羊膜组织中分离 CD90⁺羊膜上皮细胞的方法,所述方法包括以下步骤:

(1) 从胎盘组织通过机械分离得到羊膜;

(2) 清洗后的羊膜用消化酶进行消化,将消化后的液体进行离心,即可获得人羊膜上皮细胞;

(3) 分选出 CD90 阳性的人羊膜上皮细胞 (CD90⁺ hAECs)。

16、根据权利要求 15 所述的用途,其特征在于:所述方法步骤(1)可从离体的人胎盘分离羊膜,采用生理缓冲液冲洗除去血细胞,机械剔除残留绒毛膜和血管。

17、根据权利要求 16 所述的用途,其特征在于:人羊膜的获取应经产妇授权同意后,取健康产妇剖腹产后的胎盘组织,通过机械分离得到整张羊膜。

18、根据权利要求 15 所述的用途,其特征在于:所述方法步骤(2)使用任何常规技术或方法从完整人羊膜上皮层组织分离出单细胞,这些技术或方法包括机械力,用一种或组合的选自胶原酶、胰蛋白酶、脂肪酶、释放酶和胃蛋白酶的蛋白酶进行酶消化或机械和酶方法的组合。

19、根据权利要求 15 所述的用途,其特征在于:所述方法步骤(3)中 CD90 阳性的人羊膜上皮细胞的筛选过程为:将 hAEC 用 CD90 一抗染色,然后与荧光偶联的二抗孵育,通过流式细胞仪分析,分选出 CD90 阳性的人羊膜上皮细胞。

20、根据权利要求 19 所述的用途,其特征在于:所述方法步骤(3)中 CD90 阳性的人羊膜上皮细胞的筛选过程为:将 hAEC 用 CD90 (1:20) 一抗染色,然后与荧光偶联的二抗孵育,用 FACS Calibur 仪器进行流式细胞仪分析,分选出 CD90 阳性的人羊膜上皮细胞。

21、根据权利要求 15 所述的用途,其特征在于:对步骤 3 中获得 CD90⁺人羊膜上皮细胞继续培养,优选的培养条件为:以 1×10^6 - 1×10^8 个细胞/平板的密度将细胞接种于培养皿中,放置于二氧化碳培养箱中培养,待 CD90⁺人羊膜上皮细胞贴壁后换培养液,待细胞长满平板后将细胞消化下来进行冻存。

22、根据权利要求 21 所述的用途,其特征在于:可在细胞洗涤后或培养后,进一步纯化或富集活性细胞群体,减少杂细胞和死细胞;分离悬浮液中的细胞可通

过以下技术来实现：浮力密度沉降离心、有差别的与固相的粘着和从固相上洗脱、免疫磁性珠、荧光激光细胞分选 (FACS) 或其它技术。

23、根据权利要求 21 所述的用途，其特征在于：培养 CD90⁺人羊膜上皮细胞的培养基为 DMEM 培养基或 NPBM 培养基。

24、根据权利要求 23 所述的用途，其特征在于：在基础培养基中添加 F-12、FCS 或神经存活因子。

25、根据权利要求 24 所述的用途，其特征在于：在基础培养基中添加 bFGF (碱性成纤维细胞生长因子) 或 EGF (表皮生长因子)，可以加入一种或者两者都加入。

26、根据权利要求 25 所述的用途，其特征在于：加入 bFGF 或 EGF 的浓度是 1ng/ml 至 100ng/ml。

27、根据权利要求 26 所述的用途，其特征在于：加入 bFGF 或 EGF 的浓度是 10ng/ml。

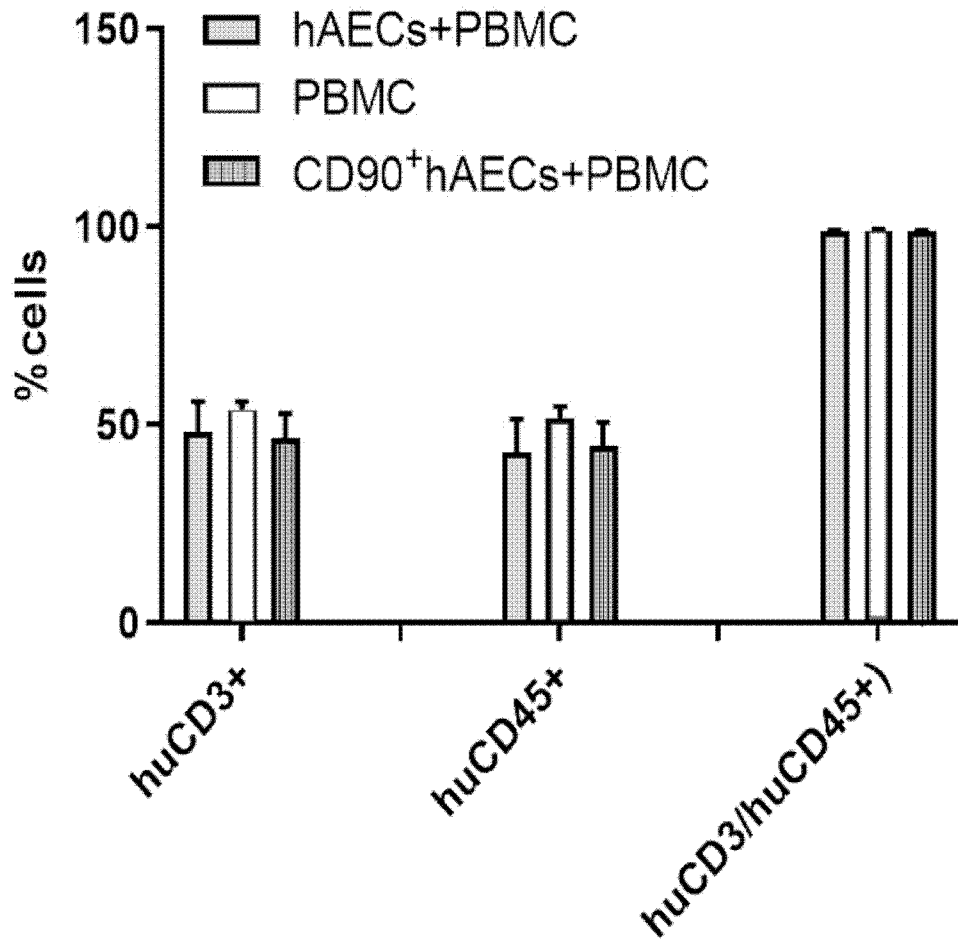


图 1

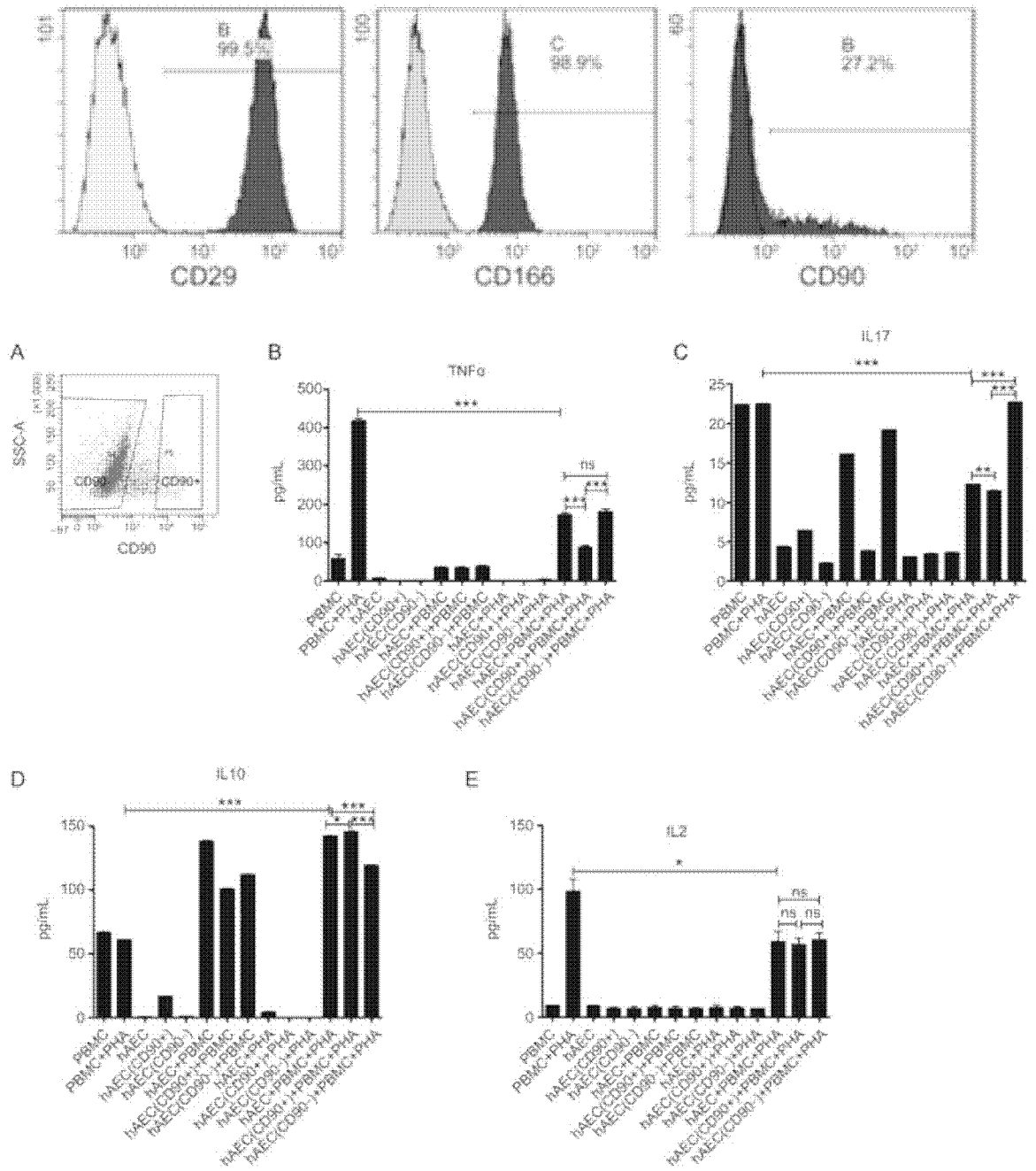


图 2

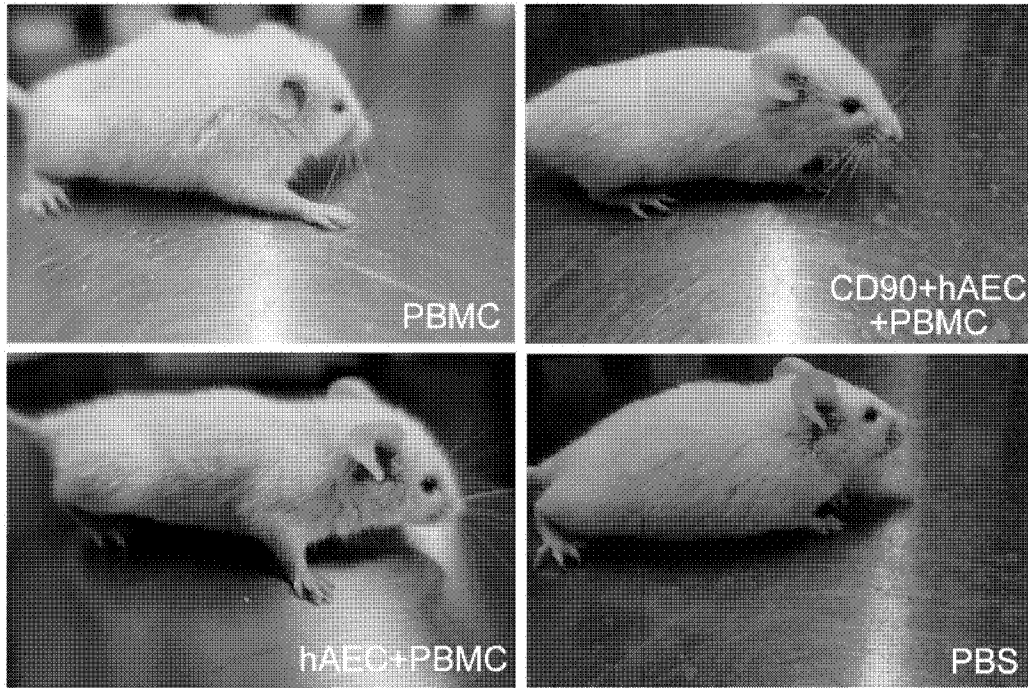


图 3

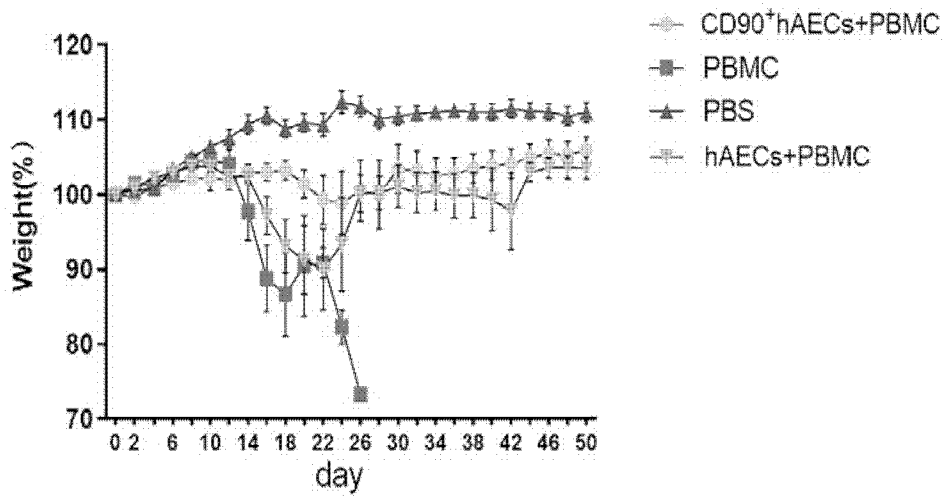


图 4

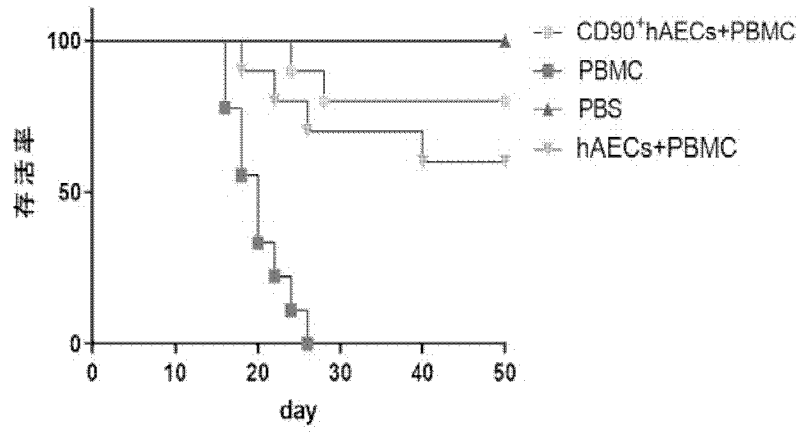


图 5

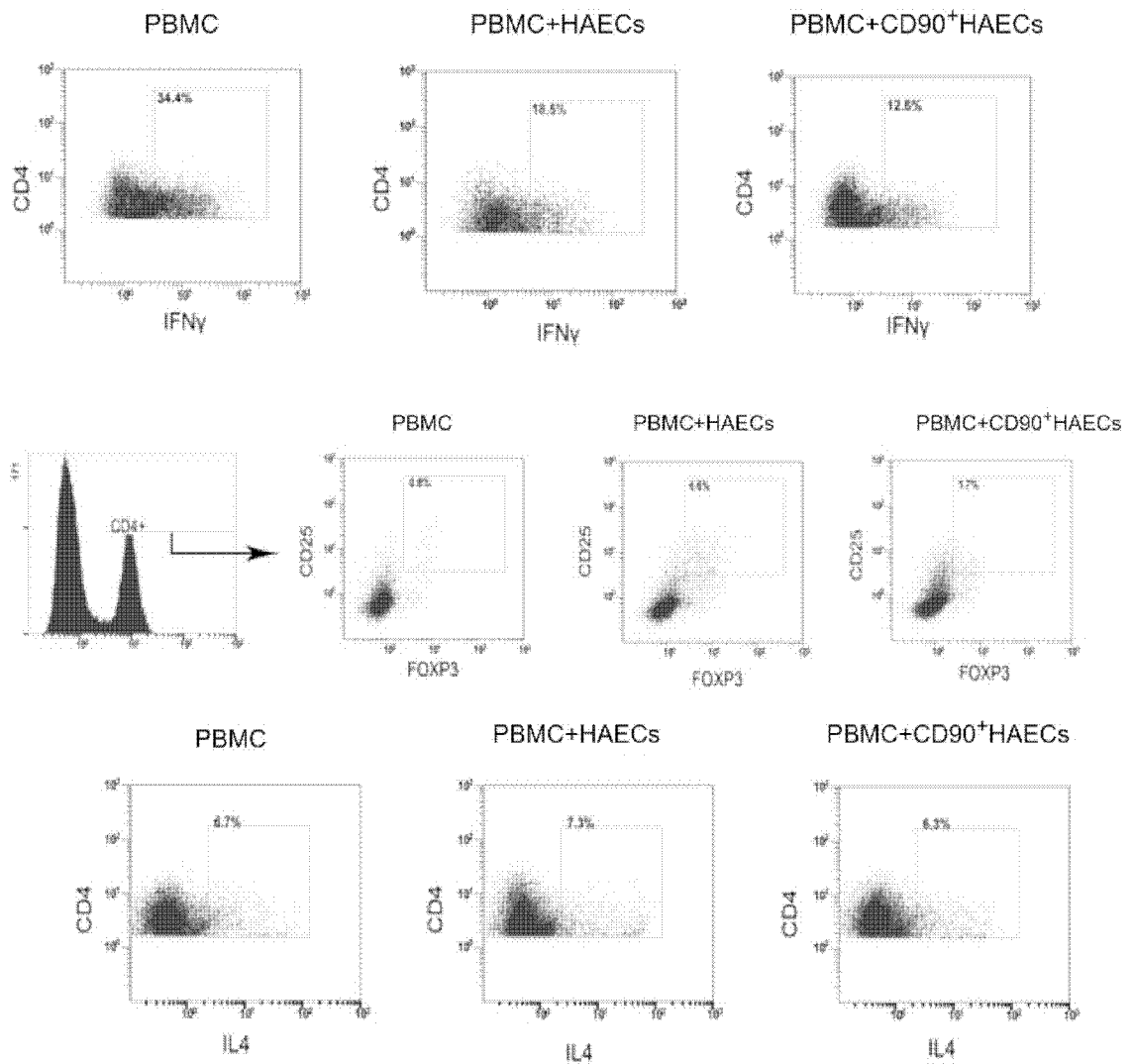


图 6-1

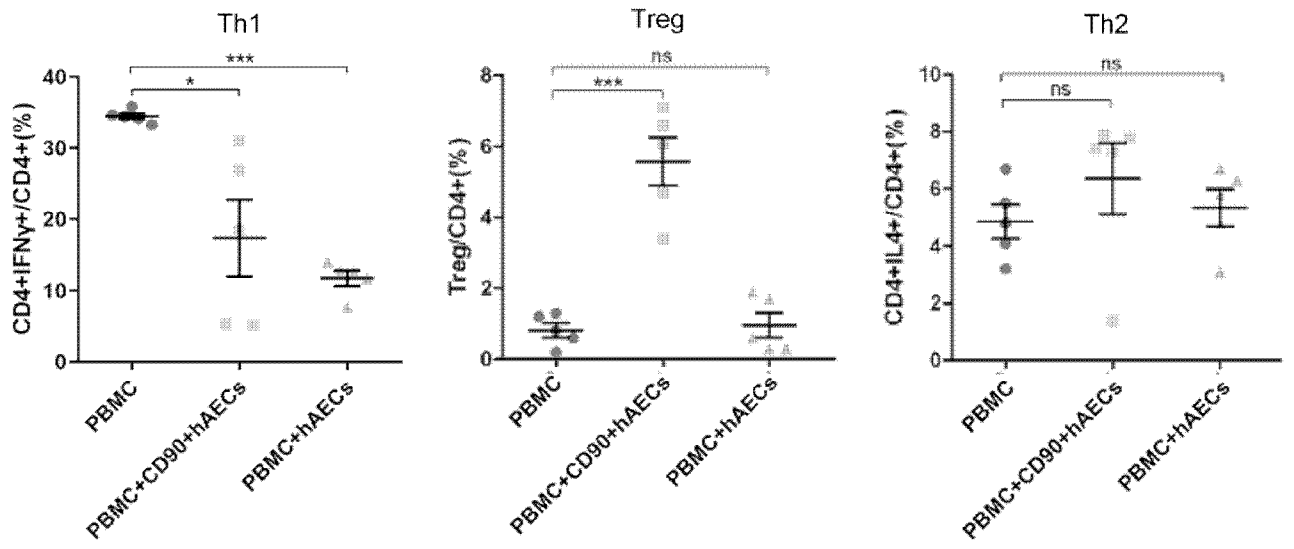


图 6-2

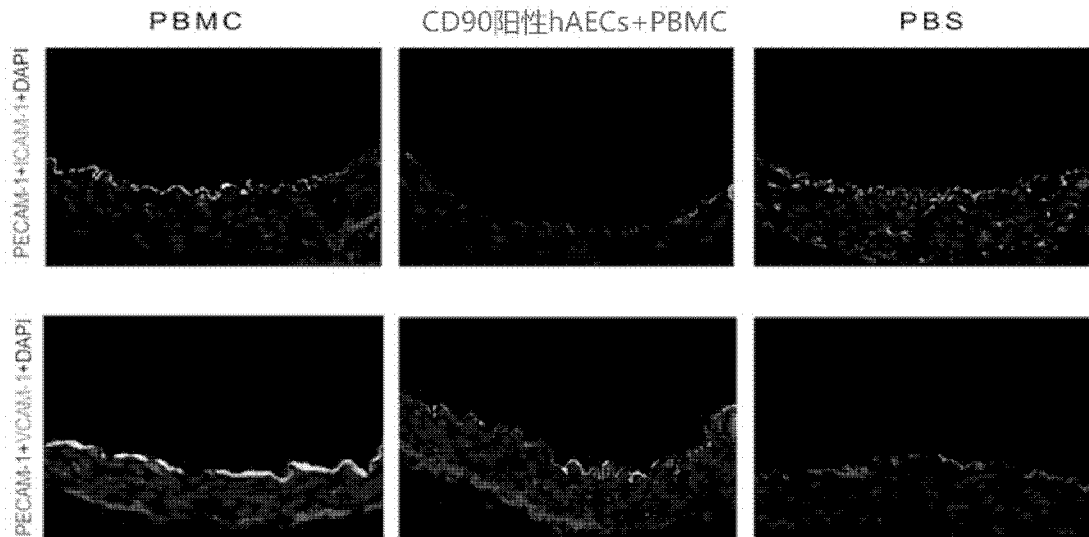
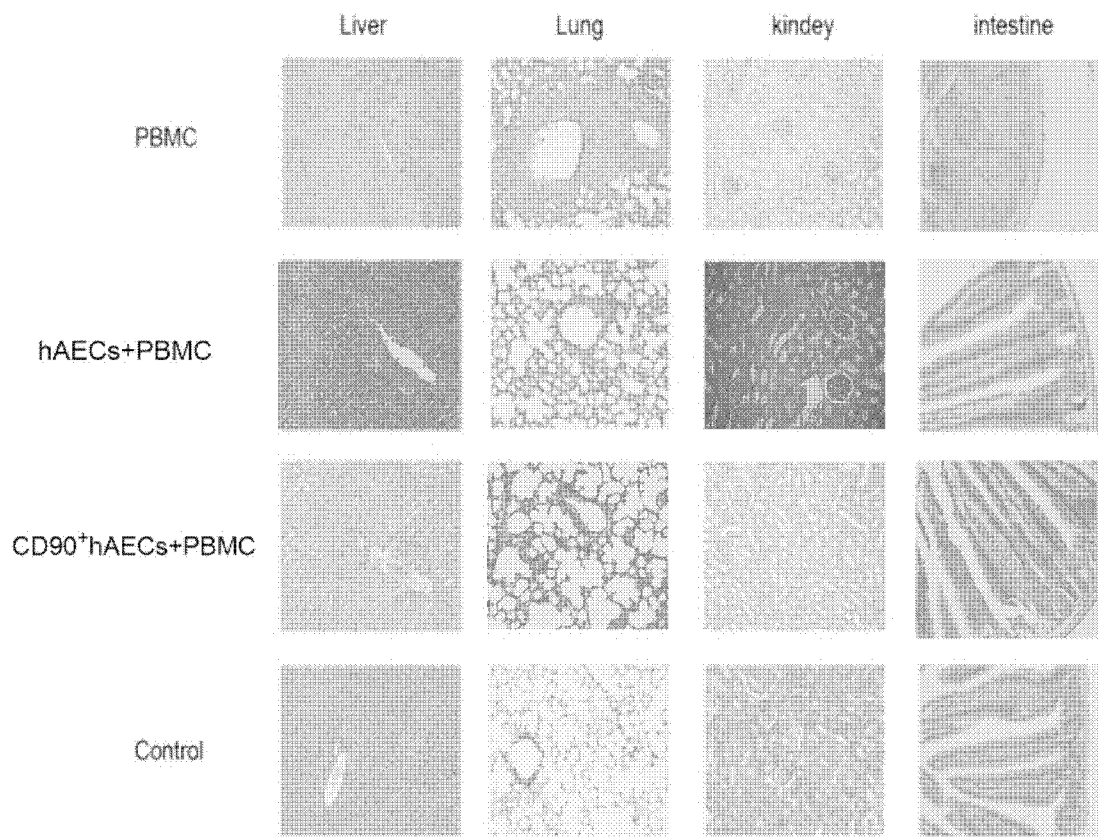


图7



.....
.....

图 8

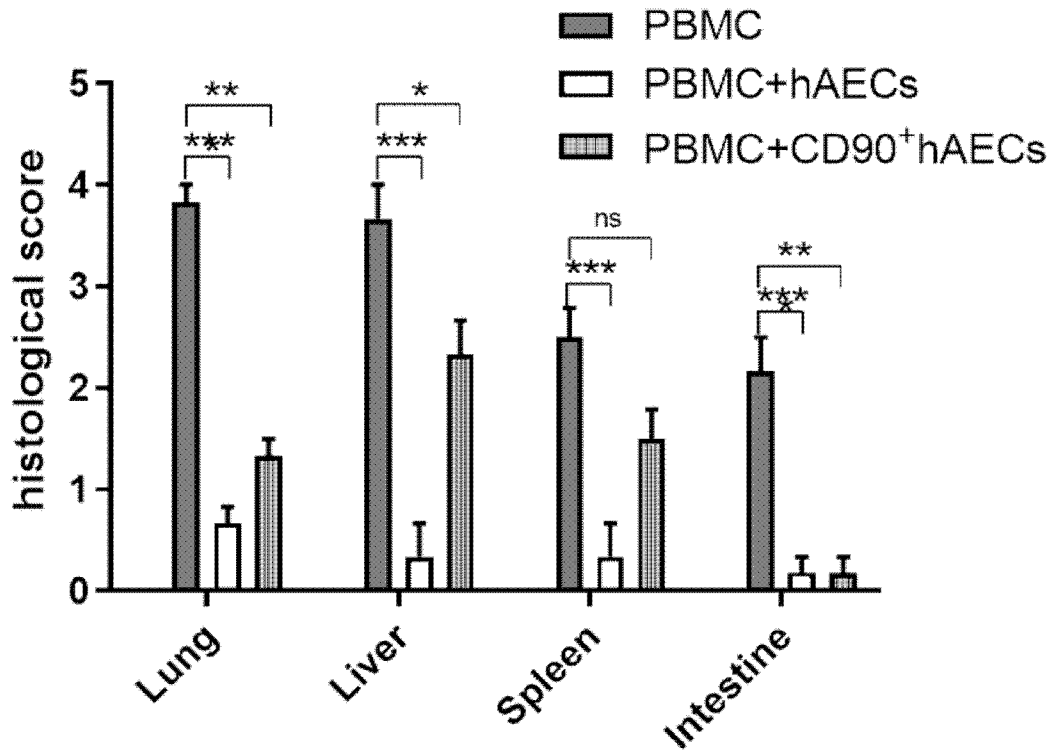


图 9

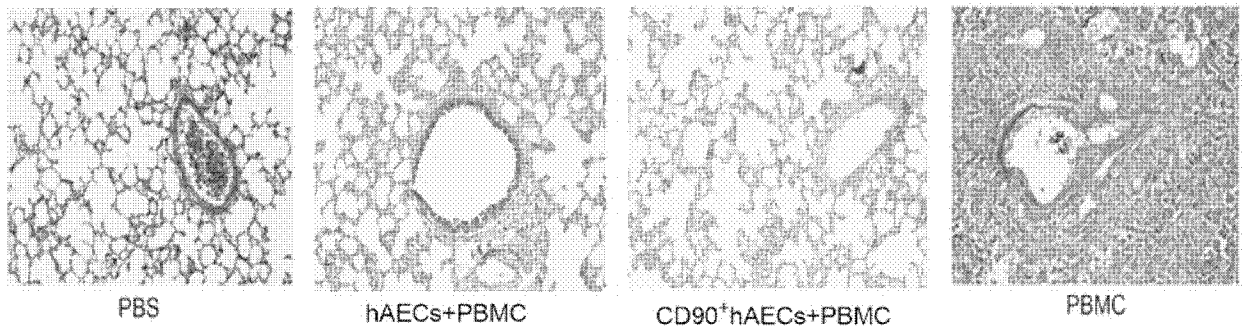


图 10

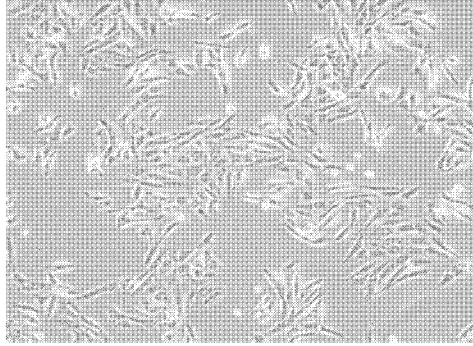


图 11 a

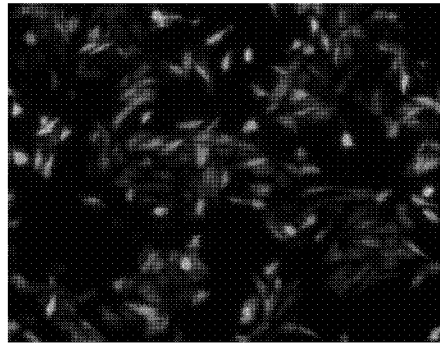


图 11 b

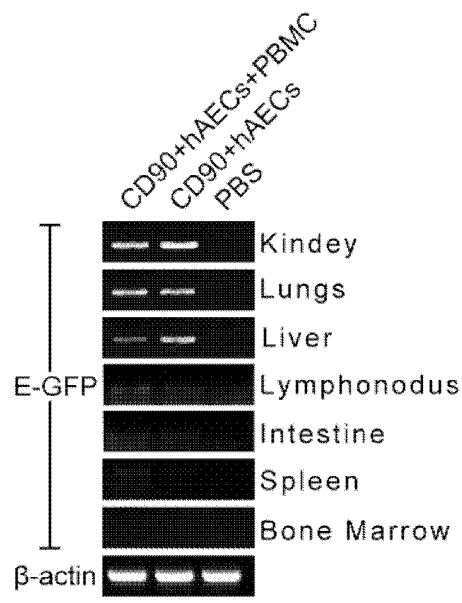


图12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/122208

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 35/36(2015.01)i; A61K 35/50(2015.01)i; A61P 37/06(2006.01)i; C12N 5/073(2010.01)i; C12N 5/071(2010.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K; A61P; C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNABS; CNTXT; CJFD; WPABS; WPABSC; ENTXTC; ENTXT; DWPI; CNKI; 万方, WANFANG; ISI Web of Science: 北京大学人民医院, 浙江大学, 上海赛傲生物技术, 黄晓军, 余路阳, 张传宇, 人羊膜上皮细胞, 移植物抗宿主病, 分选, 流式细胞, Peking University People's Hospital, Zhejiang University, Shanghai Saiao Biotechnology, Huang Xiaojun, Yu Luyang, Zhang Chuanyu, hAECs, human amniotic epithelial cells, CD90, Thy-1, GvHD, graft-versus-host disease, graft rejection transplantation, sort, FACS, Flow cytometry		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YANG, Pengjie et al. "Biological Characterization of Human Amniotic Epithelial Cells in A Serum-Free System and Their Safety Evaluation" <i>Acta Pharmacologica Sinica</i> , Vol. 39, 22 March 2018 (2018-03-22), abstract, page 1306, paragraphs 3-4, and page 1311, paragraph 1	15, 19, 20
Y	CN 110090227 A (ZHEJIANG UNIVERSITY et al.) 06 August 2019 (2019-08-06) description, paragraphs [0008] and [0020]-[0035]	1-14, 16-18, 21-27
Y	YANG, Pengjie et al. "Biological Characterization of Human Amniotic Epithelial Cells in A Serum-Free System and Their Safety Evaluation" <i>Acta Pharmacologica Sinica</i> , Vol. 39, 22 March 2018 (2018-03-22), abstract, page 1306, paragraphs 3-4, and page 1311, paragraph 1	1-14, 16-18, 21-27
Y	CAMPIONI, D. et al. "A Decreased Positivity for CD90 on Human Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) Is Associated with A Loss of Immunosuppressive Activity by MSCs" <i>Cytometry Part B (Clinical Cytometry)</i> , Vol. 76B, 04 November 2008 (2008-11-04), abstract, page 225, left column, paragraph 1, and page 229, the fourth-to-last paragraph	1-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 March 2022		30 March 2022
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **1-14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claims 1-14 relate to a use of human amniotic epithelial cells or cell preparations in the treatment and/or amelioration of graft-versus-host disease, belonging to a method for treating a human or animal body by therapy, and belonging to the subject matter defined in PCT Rule 39.1(iv) that does not warrant a search conducted by the international searching authority. The following amendment is reasonably expected for the subject matter of claims 1-14: a use of human amniotic epithelial cells or cell preparations in the preparation of a drug for treating and/or ameliorating graft-versus-host disease.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/122208

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 110090227 A	06 August 2019	CN 110090227 B	26 March 2021

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/122208

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K 35/36(2015.01)i; A61K 35/50(2015.01)i; A61P 37/06(2006.01)i; C12N 5/073(2010.01)i; C12N 5/071(2010.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>														
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; A61P; C12N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS;CNTXT;CJFD;WPABS;WPABSC;ENTXTC;ENTXT;DWPI;CNKI;万方;ISI Web of Science; 北京大学人民医院, 浙江大学, 上海赛傲生物技术, 黄晓军, 余路阳, 张传宇, 人羊膜上皮细胞, 移植物抗宿主病, 分选, 流式细胞, Peking University People's Hospital, Zhejiang University, Shanghai Saiao Biotechnology, Huang Xiaojun, Yu Luyang, Zhang Chuanyu, hAECs, human amniotic epithelial cells, CD90, Thy-1, GvHD, graft-versus-host disease, graft rejection transplantation, sort, FACS, Flow cytometry</p>														
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>YANG, Pengjie等. "Biological Characterization of Human Amniotic Epithelial Cells in A Serum-Free System and Their Safety Evaluation" Acta Pharmacologica Sinica, 第39卷, 2018年3月22日 (2018-03-22), 摘要, 第1306页第3-4段, 第1311页第1段</td> <td>15, 19, 20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 110090227 A (浙江大学等) 2019年8月6日 (2019-08-06) 说明书第[0008]、[0020]-[0035]段</td> <td>1-14, 16-18, 21-27</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>YANG, Pengjie等. "Biological Characterization of Human Amniotic Epithelial Cells in A Serum-Free System and Their Safety Evaluation" Acta Pharmacologica Sinica, 第39卷, 2018年3月22日 (2018-03-22), 摘要, 第1306页第3-4段, 第1311页第1段</td> <td>1-14, 16-18, 21-27</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	YANG, Pengjie等. "Biological Characterization of Human Amniotic Epithelial Cells in A Serum-Free System and Their Safety Evaluation" Acta Pharmacologica Sinica, 第39卷, 2018年3月22日 (2018-03-22), 摘要, 第1306页第3-4段, 第1311页第1段	15, 19, 20	Y	CN 110090227 A (浙江大学等) 2019年8月6日 (2019-08-06) 说明书第[0008]、[0020]-[0035]段	1-14, 16-18, 21-27	Y	YANG, Pengjie等. "Biological Characterization of Human Amniotic Epithelial Cells in A Serum-Free System and Their Safety Evaluation" Acta Pharmacologica Sinica, 第39卷, 2018年3月22日 (2018-03-22), 摘要, 第1306页第3-4段, 第1311页第1段	1-14, 16-18, 21-27
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
X	YANG, Pengjie等. "Biological Characterization of Human Amniotic Epithelial Cells in A Serum-Free System and Their Safety Evaluation" Acta Pharmacologica Sinica, 第39卷, 2018年3月22日 (2018-03-22), 摘要, 第1306页第3-4段, 第1311页第1段	15, 19, 20												
Y	CN 110090227 A (浙江大学等) 2019年8月6日 (2019-08-06) 说明书第[0008]、[0020]-[0035]段	1-14, 16-18, 21-27												
Y	YANG, Pengjie等. "Biological Characterization of Human Amniotic Epithelial Cells in A Serum-Free System and Their Safety Evaluation" Acta Pharmacologica Sinica, 第39卷, 2018年3月22日 (2018-03-22), 摘要, 第1306页第3-4段, 第1311页第1段	1-14, 16-18, 21-27												
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件</p>														
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年3月10日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年3月30日</p>												
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>邵文博</p> <p>电话号码 (86-512)88996495</p>												

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 1-14
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求1-14涉及人羊膜上皮细胞或其细胞制剂在治疗和/或改善移植物抗宿主病中的用途，为通过治疗对人体或动物体进行处置的方法，属于PCT细则39.1(iv)定义的不要求检索单位检索的主题。针对权利要求1-14的主题合理预期的修改如下：人羊膜上皮细胞或其细胞制剂在制备治疗和/或改善移植物抗宿主病的药物中的用途。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CAMPIONI, D. 等. "A Decreased Positivity for CD90 on Human Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) Is Associated with A Loss of Immunosuppressive Activity by MSCs" Cytometry Part B (Clinical Cytometry), 第76B卷, 2008年11月4日 (2008 - 11 - 04), 摘要, 第225页左栏第1段, 第229页倒数第4段	1-14

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/122208

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 110090227 A	2019年8月6日	CN 110090227 B	2021年3月26日