

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580044715.6

[51] Int. Cl.

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 12 月 12 日

[11] 公开号 CN 101087874A

[22] 申请日 2005.10.25

[21] 申请号 200580044715.6

[30] 优先权

[32] 2004.10.25 [33] US [31] 60/622,318

[86] 国际申请 PCT/US2005/038500 2005.10.25

[87] 国际公布 WO2006/047569 英 2006.5.4

[85] 进入国家阶段日期 2007.6.25

[71] 申请人 塞勒兰特治疗公司

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 T·C·方 A·G·W·多门

J·L·克里斯坦森

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 罗菊华

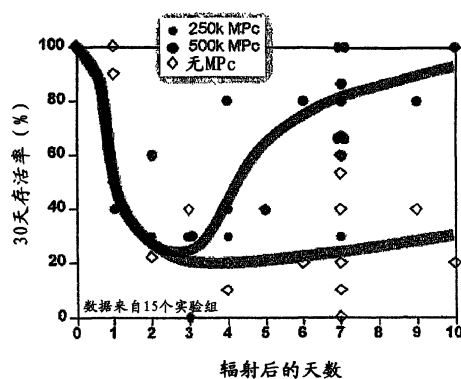
权利要求书 4 页 说明书 77 页 附图 23 页

[54] 发明名称

增殖骨髓细胞群体的方法及其应用

[57] 摘要

本发明涉及增殖骨髓祖细胞的方法，所述方法通过在含有细胞因子和生长因子混合物的培养基中培养起始群体的细胞，其中所述细胞因子和生长因子促进骨髓祖细胞的生长和增殖。该增殖的细胞群体提供了用于作为治疗患有因为接受骨髓破坏治疗和造血干细胞移植而发生嗜中性白细胞减少症和/或血小板减少症的患者治疗制剂的细胞来源。



1. 制备用于在哺乳动物宿主中暂时重建造血功能的治疗性组合物的方法, 包括:

a) 在包含细胞因子和生长因子混合物的培养基中离体培养包括造血干细胞的起始细胞群体以增殖所述细胞群体中的骨髓祖细胞, 和

b) 在适合于对哺乳动物宿主施用的药学上可接受的培养基中重新悬浮所述骨髓祖细胞。

2. 根据权利要求 1 的方法, 进一步包括在所述重新悬浮步骤之前冻存所述增殖的骨髓祖细胞。

3. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述起始细胞群体以前被冻存。

4. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述起始细胞群体是富集的造血干细胞。

5. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述起始细胞群体是纯化的造血干细胞。

6. 根据权利要求 5 的方法, 其中所述纯化的造血干细胞是分离的 CD34⁺ CD90⁺ 细胞。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项的方法, 其中所述造血干细胞来自同种异体供体。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项的方法, 其中所述造血干细胞来自多个同种异体供体。

9. 根据权利要求 8 的方法, 其中同种异体供体彼此之间在 MHC 上至少部分不匹配。

10. 根据权利要求 8 的方法, 其中同种异体供体彼此之间在 MHC 上全部不匹配。

11. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述培养基是化学上确定的。

12. 根据权利要求 1 的方法, 在该方法中细胞因子和生长因子混合物含有 SCF、FL 和 TPO 成分。

13. 根据权利要求 12 的方法, 在该方法中细胞因子和生长因子混

合物含有选自 IL-3、IL-6 或者 IL-11 或者其组合的额外的因子。

14. 根据权利要求 12 的方法, 在该方法中细胞因子和生长因子混合物含有 SCF、FL、TPO 和 IL-3 成分。

15. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述的骨髓祖细胞在所述重新悬浮步骤前分离自增殖的细胞群体。

16. 根据权利要求 15 的方法, 该方法中分离的骨髓祖细胞是普通的骨髓祖细胞。

17. 根据权利要求 15 的方法, 该方法中分离的骨髓祖细胞是粒细胞/巨噬细胞祖细胞。

18. 根据权利要求 15 的方法, 该方法中分离的骨髓祖细胞是巨核细胞/红细胞祖细胞。

19. 制备包括基本上纯的非骨髓细胞群体的治疗性组合物的方法, 所述方法包括:

通过根据权利要求 1 的方法增殖骨髓祖细胞, 从增殖的细胞群体中去除所述骨髓祖细胞, 和

在适于对哺乳动物宿主施用的在药理学上可接受的培养基中重新悬浮剩下的非骨髓细胞。

20. 根据权利要求 19 的方法, 其中分离的非骨髓细胞包含短期造血干细胞。

21. 治疗性组合物, 包含通过权利要求 1-20 任一项的方法获得的增殖的骨髓祖细胞。

22. 权利要求 21 的治疗性组合物, 其中所述骨髓祖细胞包含至少增殖培养物中的总细胞的大约 75%。

23. 权利要求 21 的治疗性组合物, 其中所述骨髓祖细胞包含至少增殖培养物中的总细胞的大约 85%。

24. 权利要求 21 的治疗性组合物, 其中所述骨髓祖细胞包含至少增殖培养物中的总细胞的大约 95%。

25. 权利要求 21 的治疗性组合物, 其中细胞是人细胞。

26. 治疗性组合物, 含有离体增殖的骨髓祖细胞, 其中所述骨髓祖

细胞是同种异体骨髓祖细胞的混合物。

27. 权利要求 26 的治疗性组合物, 其中所述增殖的骨髓祖细胞被冻存于冻存培养基中。

28. 权利要求 26 的治疗性组合物, 其中所述增殖的骨髓祖细胞悬浮于药学上可接受的载体中。

29. 权利要求 26 的治疗性组合物, 其中同种异体骨髓祖细胞在 MHC 上至少部分不匹配。

30. 权利要求 26 的治疗性组合物, 其中同种异体骨髓祖细胞在 MHC 上完全不匹配。

31. 权利要求 26 的治疗性组合物, 其中同种异体骨髓祖细胞是分离的普通骨髓祖细胞。

32. 权利要求 26 的治疗性组合物, 其中同种异体骨髓祖细胞是分离的粒细胞/巨噬细胞祖细胞。

33. 权利要求 26 的治疗性组合物, 其中同种异体骨髓祖细胞是分离的巨核细胞/红细胞祖细胞。

34. 治疗患有造血功能受损的人类患者的方法, 包括向所述患者施用权利要求 21-33 中任一项的治疗性组合物。

35. 根据权利要求 34 的方法, 进一步包括共施用分离的 HSC 细胞。

36. 根据权利要求 34 的方法, 进一步包括向所述患者施用抗病毒化合物、抗真菌化合物、抗细菌化合物、细胞因子或者生长因子中的至少一种。

37. 根据权利要求 34-36 中任一项的方法, 其中所述人类患者正在接受造血干细胞(HSC)移植。

38. 根据权利要求 37 的方法, 其中在 HSC 移植后施用增殖的骨髓祖细胞。

39. 根据权利要求 37 的方法, 其中施用增殖的骨髓祖细胞与 HSC 移植同时进行。

40. 根据权利要求 34 的方法, 其中所述人类患者患有中性粒细胞减少症。

41. 根据权利要求 40 的方法, 其中所述增殖的骨髓祖细胞被与用于治疗与中性粒细胞减少症相关的并发症的治疗性组合物一起施用。

42. 根据权利要求 41 的方法, 其中治疗性组合物包含抗病毒化合物、抗真菌化合物和抗细菌化合物中的至少一种。

43. 根据权利要求 41 的方法, 其中治疗性组合物包含 G-CSF。

44. 根据权利要求 41 的方法, 其中治疗性组合物包含 GM-CSF。

45. 根据权利要求 34 的方法, 其中所述人类患者患有血小板减少症。

46. 根据权利要求 45 的方法, 其中所述增殖的骨髓祖细胞辅助性地与用于治疗与血小板减少症相关的并发症的治疗性组合物一起施用。

47. 根据权利要求 46 的方法, 其中治疗性组合物含有抗病毒化合物、抗真菌化合物和抗细菌化合物中的至少一种。

48. 根据权利要求 46 的方法, 其中治疗性组合物含有血小板制剂。

49. 根据权利要求 46 的方法, 其中治疗性组合物含有 EP0。

增殖骨髓细胞群体的方法及其应用

与本发明有关的交叉参考文献

[0001] 根据 35 U.S.C. § 119(e), 本发明要求获得申请系列号 60/622318 的权利, 该申请名为“增殖骨髓细胞群体的方法及其应用”, 已在 2004 年 10 月 25 日提交, 这里引入该公开内容, 其全部用做参考。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于短期重建造血系统的组合物和方法, 和其在用于治疗与造血功能受损或缺失相关的病症中的应用

背景技术

[0003] 造血干细胞移植 (HSCT) 是各种血液学恶性疾病的标准治疗手段, 在有些情况下是唯一能挽救患者的选择。特别是当疾病发展到化疗也难以治疗的阶段。作为造血干细胞 (HSCS) 的典型来源有骨髓、外周血或者脐带血, 不过来自外周血的细胞显示出更快的移植特性, 而且可被对供体所做的用细胞因子 G-CSF, GM-CSF 或者细胞还原性药物进行的处理所动员。脐带血可容易地获得, 并且显示较低的移植物对宿主疾病的发生率, 但是它的特点是推迟植入 (delayed engraftment)。在移植之前, 给予受体可起到骨髓破坏剂量的化疗和/或放疗来处理所患的疾病, 并且使受体适合供体 HSC 的植入。

[0004] 通常, 有两种类型的造血干细胞移植: 自体同源移植和同种异体移植。自体同源移植涉及骨髓破坏处理后的受体自体细胞的输入 (infusion)。自体同源细胞移植使移植物对宿主疾病 (graft versus host disease, GVHD) 的风险降到最小, 并且使并发症减少。因为以骨髓破坏性药物化疗清除了造血干细胞制剂中的恶性细胞, 如果疾病对化疗不响应, 那么自体同源移植是有问题的。同种异体移植涉及

供体干细胞的输入，典型地用与受体主要组织相容性抗原（MHC）相匹配的供体。同型异体移植的优点是伴随发生的细胞介导的移植物对宿主反应可能会发展至对抗恶性细胞。然而，匹配的不相关供体（matched unrelated donor, MUD）移植也与强烈的移植物对宿主反应有关，并且会导致较高的死亡率。

[0005]另外有几种与骨髓破坏的治疗和造血干细胞移植相关的并发症，非常引人注意的是嗜中性白细胞减少症和血小板减少症，这两种病症都起源于造血功能受损和造血系统不能充足地补充与每种疾病相关的终极分化的骨髓细胞。嗜中性白细胞减少症和血小板减少症也可能起源于其他造血系统受损，例如无意暴露于致死剂量的离子辐射，遗传性免疫缺陷，影响到骨髓的病毒感染以及代谢紊乱（例如，维生素缺乏）。

[0006]嗜中性白细胞减少症的特征是不正常的低数量的白细胞，特别是嗜中性粒细胞，这种细胞寿命短，在外周血中代表了丰富的白细胞。嗜中性粒细胞和其它多形核白细胞迁移到感染部位通过各种细胞因子的作用提供关键的免疫应答来对抗感染性制剂。在移植后造血系统恢复所需的时期内，移植受体只有低水平的循环中性粒细胞，并且对细菌和真菌感染很敏感，尤其是对常见微生物造成的偶发性感染，例如绿脓假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）和烟曲霉菌（*Aspergillus fumigatus*）很敏感。延长的嗜中性白细胞减少症，尤其是那些由供体造血干细胞移植的推迟植入导致的减少症，增加了感染的可能性和与之相关的高死亡率。

[0007]嗜中性白细胞减少症的标准治疗是施用 G-CSF。这种细胞因子促进粒细胞发育，并还能提高免疫效应分子对嗜中性粒细胞的应答。G-CSF 加速造血干细胞移植后的恢复，但是它可能对没有进行造血干细胞移植的接受高剂量化疗的患者没有效果，因为患者体内只有低数量的应答性造血干细胞。

[0008]另外的治疗方法涉及用嗜中性粒细胞的输入（粒细胞输注）作为对抗感染的临时措施。对供体用 G-CSF 或 GM-CSF 处理后，用白细

胞去除术从外周血收集细胞，然后施用给受体以提高循环的嗜中性粒细胞的水平。（见，例如，Lin, Y-W 等, J. Clin. Microbiol. 41 (10): 4892-4893 (2003)）。用该方法处理的患者存活率增加，但是这种方法的临床效率不确定，这也许是由于分化的嗜中性粒细胞在移植后寿命跨度短的缘故，或者是由于储存对嗜中性粒细胞活性起了不良反应 (McCullough, J. 等, Transfusion 23(1): 20 (1983))。而且，嗜中性粒细胞输注 (transfusion) 的效率与施用的细胞数量有关，有限的可得到的供体细胞通常来自相匹配的兄弟姐妹或者有血缘关系的父母亲，无法储存这些细胞可能限制了这种方法的广泛应用。

[0009] 血小板减少症是与骨髓谱系的另外一种终末分化细胞 - 巨核细胞相关的一种疾病，其特征是异常低水平的血小板。血小板对于血液凝固过程是必需的，并且是限制红细胞漏出血管所需要的。低于正常水平的血小板导致出血的风险增加，而且当血小板水平降低到一个临界水平时可能导致自发性出血，血小板减少症可能源于血小板生成受损和/或清除率增加。在造血干细胞移植中发生的血小板减少症源于巨核细胞发育受损，并且会被造血干细胞的推迟植入、感染导致的并发症和 GVHD 的发生所加强，与中性粒细胞减少症一样，为了最小化威胁生命的并发症，在任何骨髓破坏性处理后对血小板减少症的控制是很关键的。

[0010] 血小板输注是血小板减少症的常规治疗方法，并且该疗法能有效地减少伴随低水平血小板发生的严重的出血问题。用来自主要组织相容性抗原相匹配的供体的血小板能最小化针对供体血小板的任何不良的免疫反应。然而，感染和血小板减少症之间的关系提示中性粒细胞减少症可能并发血小板减少症，这种患者需要更频繁的输注。另外，用 G-CSF 治疗中性粒细胞减少症与血小板减少症治疗是冲突的，因为血小板的加速破坏与 G-CSF 施用有关。

[0011] 尽管用于中性粒细胞减少症免疫保护性细胞的输入以及用于血小板减少症中血小板的输注仍是用于治疗这些病症的有希望的方法，但是还是有希望增加保护的持续时间，而且对于中性粒细胞减少

症来说就是希望能获得稳定的细胞供应以用于施用。而且，还希望通过能同时治疗这两种疾病而不是分别治疗的方法提高对造血功能受损的这些并发症的管理。

发明内容

[0012]本发明公开了对源于造血功能受损引起的并发症的治疗有用的组合物和方法。造血功能不足的患者无法产生骨髓谱系的终末分化细胞，导致产生大量威胁生命的病症，其中最值得注意的是中性粒细胞减少症和血小板减少症。通过提供暂时的代替与这些病症相关的细胞群体，能减轻或者防止由分化的骨髓细胞缺乏导致的并发症，直到患者内源性的或者重建的造血系统能够再生为止。

[0013]相应地，一方面，本发明提供了制备用于在哺乳动物宿主中重建造血功能（reconstituting hemopoiesis）的治疗性骨髓祖细胞组合物（compositions of myeloid progenitor cells）的方法，该方法包括 a）在合适的培养基中离体培养包括造血干细胞在内的起始细胞群体以增殖所述的细胞群体，并且增加在所述的群体中的骨髓祖细胞的数量；b）在药理上可接受的培养基中重新悬浮所述的骨髓祖细胞，这种培养基适于对哺乳动物施用。有利的是，如此处所阐明的，细胞的起始群体可能来源于同种异体供体或者更优选地来源于多个同种异体供体，这使离体增殖的同种异体骨髓祖细胞获自一个或者多个供体。供体彼此之间可能相关或不相关，并且在移植配置（transplant setting）上与受体相关或不相关。

[0014]令人惊奇的是，如在这里进一步阐明的，本发明人认为本发明所增殖的骨髓祖细胞在增殖后能冷冻保存。并且在包括粒细胞/巨核细胞祖细胞的治疗设定（therapeuttic setting）上能在造血功能的重建中保留它们的功能性，尽管已知造血干细胞能够在冷冻保存后保持它们的功能性，见例如，美国专利号 5004681，不过它们的进一步分化的后代的冷冻保存并没有一样地成功，因此使得它们作为临床上一种基于细胞的治疗方法在实际实施中很复杂。这里提供的增殖的

骨髓祖细胞具有这种优点，并在优选的实施方案中，在重新悬浮和给患者施用之前冷冻保存。

[0015]用于增殖的起始细胞群体可以来自外周血，动员的外周血，脐带血，骨髓和/或已知的含有造血干细胞的其他器官，例如胎儿肝脏。当细胞群体获自一个来源或者分离的细胞，特别是当一个富集的或者基本上纯的群体（这种纯是基于期望的细胞标志物表型细胞群体可以是多种细胞的混合物，例如 CD34+和/或 CD90+和/或 AC133+和/或 ALDH+ 细胞），优选的是，起始细胞群体是基于细胞标志物 CD34+或 CD90+的存在而被富集的造血干细胞，还有，更优选的是，起始细胞群体是纯化的造血干细胞，也就是既包含 CD34+也包含 CD90+的造血干细胞，尤其是用于人骨髓祖细胞的增殖。在进一步的实施方案中，细胞可以还具有细胞标志物表型 $\text{Lin}^{\text{neg/low}}$ 。

[0016]另一方面，本发明提供了治疗性组合物，其中含有来自本发明的方法所增殖得到的骨髓祖细胞。在一个实施方案中，治疗性组合物包含或基本含在药理上可接受的载体中的增殖的骨髓祖细胞。在一个实施方案中，治疗性组合物含有或基本上含有在冷冻保存的培养基中的增殖的骨髓祖细胞。在优选的实施方案中，增殖的骨髓祖细胞是同种异体的，更优选的是，增殖的骨髓祖细胞是同种异体骨髓祖细胞的混合物。该同种异体骨髓祖细胞的混合物可以包含至少部分在 MHC 上不匹配，其中 MHC 不匹配是在不同供体之间或者受体和供体之间的 MHC 的不匹配，或者是完全或者彻底的 MHC 不匹配。相应地，这种同种异体细胞的混合物可以含有一部分在一些细胞之间的在 MHC 上的不匹配和在群体中的其他细胞之间的完全不匹配。在一个具体的实施方案中，进行短期植入的祖细胞选择在 MHC 上匹配或者部分不匹配（例如在骨髓谱系早期的祖细胞群体）的祖细胞和在 MHC 水平上部分或者全部不匹配的更分化的祖细胞。

[0017]在进一步的实施方案中，同种异体骨髓祖细胞的混合物是分离的细胞的混合物。这些包括分离的 CMP，分离的 GMP，分离的 MEP，或者它们的组合。混合物的细胞可以获自未增殖的祖细胞或者获自这

里描述的来自离体增殖的细胞培养物。对于同种异体增殖细胞的混合物，同种异体细胞的混和可发生在增殖之前或者之后。

[0018] 另一方面，本发明提供了通过它们在培养中的离体增殖产生骨髓祖细胞的方法，在该方法中，能产生祖细胞的细胞，例如造血干细胞（HSC）与含有细胞因子和生长因子的混合物的培养基接触，所述混合物支持祖细胞的增殖，然后细胞在适合条件下培养，以便于它们的增殖。适合离体增殖目的的细胞因子选自 IL-1（即，IL-1B），IL-3，IL-6，IL-11，G-CSF，GM-CSF 以及它们的类似物。适合离体增殖目的的生长因子选自 c-kit 配体（SCF 或者 SF）、FLT-3 配体（FL）、促血小板生成素（TPO）、促红细胞生成素（EPO）以及它们的类似物。此处使用的类似物包括各种各样的细胞因子和生长因子的变体，这些变体具有它们天然存在的形式所特有的生物学活性。

[0019] 在一个优选的实施方案中，培养基是化学上确定的（chemically-defined）培养基，没有不确定（质量或者数量上）的成分，包括基于细胞的增殖物质，例如基质细胞或者其它饲养细胞。很明显，这些物质的内容可能是有问题的，问题来自生产和调节方面，化学上确定的能适当增殖所期望的细胞类型的化学上确定的替代物的选择和开发是本发明的另一显著贡献。

[0020] 在一个实施方案中，在它的基本组合物中的细胞因子和生长因子混合物具有干细胞因子（SCF）、FLT-3 配体（FL）和红细胞生成素（TPO）。在优选的实施方案中，细胞因子和生长因子混合物具有选自 IL-3，IL-6，IL-11，G-CSF，GM-CSF 及其组合的额外的细胞因子，特别是选自 IL-3，IL-6，IL-11 及其组合。因此，在一个实施方案中，细胞因子和生长因子混合物含有成分 SCF，FL，TPO 和 IL-3，而另一个实施方案中，混合物含有成分 SCF，FL，TPO 和 IL-6。一种其它的细胞因子的组合是 IL-6 和 IL-11，因此细胞因子和生长因子混合物含有成分 SCF，FL，TPO，IL-6 和 IL-11。

[0021] 细胞因子和生长因子的形式是它们的天然存在的产物、重组产物、变异体或者类似物，或者具有与天然存在的产物相似生物学

活性的修饰形式。选择对用于增殖的细胞有活性的细胞因子，因此它们的来源通常反映用于增殖的起始细胞的来源，尽管细胞因子形式和细胞起源的这种对应性不要求严格，因为多种细胞因子和生长因子各形式之间的交叉反应都可以很容地测试。因此，在一个实施方案中使用的细胞因子是重组(rhu) rhuIL-1，(例如 rhuIL-1 β)， rhuIL-3， rhuIL-6， rhuIL-11， rhuG-CSF， rhuGM-CSF 或者它们的类似物。相似地，使用的生长因子是重组人 rhuSCF， rhuFL， rhuTP0， rhuEP0 及其类似物。

[0022] 起始细胞的群体在支持骨髓祖细胞增殖的条件下培养以确定水平。根据本发明获得的增殖的骨髓祖细胞通常包含常见的骨髓祖细胞(CMP)、粒细胞/巨嗜细胞祖细胞(GMP)和巨核细胞/红细胞系祖细胞(MEP)。因此，一方面，离体增殖的培养物包含增殖的CMP，其中CMP细胞群体被增殖了至少大约5倍，大约10倍，大约20倍，或者至少大约30倍。在最终的细胞培养物制备时(例如收获细胞的时候)增殖的培养物包含CMP群体，至少占培养物中所有细胞的大约0.5%，至少大约1%，至少大约2%，至少大约5%和至少大约10%。

[0023] 另一方面，离体增殖的培养物包含增殖的GMP，其中GMP细胞群体被增殖了至少10倍，约20倍，约40倍，更优选至少约约80倍。在最终的细胞培养制备物中，增殖的培养物包含GMP群体，分别占培养物中总细胞的至少约10%，至少约20%，至少约30%和优选至少约50%。培养物中MEP细胞群体被增殖了至少约0.1倍，约2倍，约5倍和至少约10倍。在最终细胞培养制备物中，增殖的培养物包含MEP细胞群体，其占培养物中总细胞的至少约0.5%，约1%，约2%和至少约5%。

[0024] 总之，在最终细胞培养制备物中合并后的骨髓祖细胞总量占增殖的培养物中细胞总量的至少约25%，至少约40%，更优选要高于约50%，更加优选地要至少约60%或者70%，最优选是至少占80%或者90%，理想的是占至少约95%。

[0025] 离体增殖制备的细胞可以重新悬浮在药理上可接受的载体

中，并且可以直接使用，或者备选地可以经过本领域的技术人员通过各种细胞纯化技术处理，例如流式细胞分选，磁力亲和分离和免疫亲和柱。增殖的培养物分离得到的细胞群体包括，分离的骨髓祖细胞，分离的 CMP，分离的 GMP 和分离的 MEP。更优选的是，分离的细胞群体基本上是纯的细胞群体。

[0026]这里描述的细胞在治疗和非治疗性情况下有多种用途。在治疗性应用中，这些细胞被用于治疗造血功能受损或者缺失(ablated)的患者。细胞被注射入患者体内，例如静脉注射，用足够多的量来提供治疗效果，或者是预防性地施用以减轻与造血功能受损有关的副反应症状的发生，或者来治疗患有造血功能受损而引发的并发症的患者。在进一步的方面，细胞被用于治疗在造血干细胞移植情况下的患者，可能是移植的同时，也可能是之后。

[0027]中性粒细胞减少症和血小板减少症与造血功能受损有关，特别是患者接受骨髓破坏的治疗，尽管在其他情形下也可能发生这种情况。这里描述的细胞可以用于这些情况的治疗或者当患者已经患有这些病症时作为预防性方法来减少这些情况的发生。在其他治疗应用中，治疗形式的细胞包括增殖或者未增殖的骨髓祖细胞。既然中性粒细胞减少症和血小板减少症与特异的骨髓细胞类型缺乏相关，选择的细胞群体可以为治疗的特殊症状而特制。在一个实施方案中细胞是 CMP，这可以对这两种情况中的任何一种都有用，因为 CMP 最终发育为中性粒细胞和巨核细胞。在中性粒细胞减少症中，细胞可以是 GMP，因为 GMP 最终发育为中性粒细胞。在血小板减少症中，细胞可以是 MEP，因为 MEP 最终发育为巨核细胞。细胞群体的组合在治疗这些症状中的应用对于本领域中的技术人员来说是很明显的，同样也适用于上面所述的情况。分离的 GMP 和 MEP 的组合对于治疗同时发生的中性粒细胞减少症和血小板减少症是很有用的。在组合中加入 CMP 应该能提供更持久的保护，这种保护来自 CMP 临时性的植入和随后产生的中性粒细胞和巨核细胞。如果中性粒细胞减少症是治疗的主要焦点其它的组合包括 CMP 和 GMP，而如果治疗的主要焦点是血小板减少症时，组合

就是 CMP 和 MEP。

[0028]用本领域熟知的方法给药细胞。在一个实施方案中，通过静脉注射施用。细胞的给药可以通过一次性单一给药，也可以连续给药。如果用连续给药，每次给药不同的细胞数量和/或者不同的细胞群体。因此在一个实施方案中，第一次给药的是一种细胞群体或者是细胞群体的组合，这样提供了立即治疗效果也提供了更加持久的效果（CMP+GMP+中性粒细胞），第二次给药包括能提供持久效果的细胞（例如 CMP），来延长第一次给药的治疗效果。这些和其他的策略对本领域的技术人员是很明显的。

[0029]在进一步的实施方案中，这里描述的骨髓祖细胞用于与治疗与造血功能受损相关的疾病和/或者中性粒细胞减少症和血小板减少症并发症的其它治疗化合物联合使用。在一个实施方案中，辅助性治疗是用抗细菌，抗真菌或者抗病毒化合物以防止偶发性感染或者已经在患者体内发生的感染。

[0030]在另外一个实施方案中，辅助性治疗采用治疗性化合物来增强骨髓祖细胞在骨髓通路中的分化。这些辅助性治疗具有诱导分化的效应和动员骨髓祖细胞的功能，所述的骨髓祖细胞可以是内源性的或者作为治疗的一部分给药到患者体内的。在一个实施方案中，特别是治疗或者预防嗜中性粒细胞减少症中，在细胞给药同时或者给药后 G-CSF 或者 GM-CSF 也被给药。另外一个辅助性治疗涉及给药 EPO 或者 TPO。特别是作为血小板减少症的辅助性治疗，因为 EPO 能诱导 MEK 分化为前成红细胞和成熟的红细胞，而 TPO 表现出可以诱导造血干细胞的生长和分化，和早期骨髓祖细胞成为巨核细胞和成熟的血小板。

[0031]最后一个方面，本发明提供了包含细胞因子和生长因子混合物、用于增殖的起始细胞、培养基和进行离体培养所需的其他必需成分的试剂盒。提供了在治疗用途中，例如中性粒细胞减少症和血小板减少症的治疗中，指向细胞群体（增殖或者未增殖的）的使用的试剂盒。该试剂盒还包括（仅是举例并非用于限制）缓冲液，标签，试剂和使用该试剂盒方法的说明书。

附图说明

[0032]图 1 是实验设计的示意图，(A)表示分选和分析的细胞群体。(B)表示来自培养中的 HSC 的骨髓祖细胞的衍生，培养的衍生的 MP 细胞可以新鲜或者冷冻保存使用。(C)使用骨髓祖细胞以保护患有嗜中性白血球减少症的小鼠免受真菌感染。

[0033]图 2 显示来自培养的 HSC 的骨髓祖细胞的衍生。

[0034]图 3 显示用同种异源性培养 - 衍生的骨髓祖细胞对患有嗜中性白血球减少症的小鼠的保护。

[0035]图 4 显示新鲜和冷冻保存的骨髓祖细胞的比较。

[0036]图 5 显示在小鼠中用骨髓祖细胞重建。

[0037]图 6 显示培养 - 衍生的骨髓祖细胞的保护作用的剂量响应。

[0038]图 7 显示在小鼠中用骨髓祖细胞的有效保护的时间。

[0039]图 8 显示用混合的同种异体培养 - 衍生的骨髓祖细胞对患有嗜中性白细胞减少症小鼠的保护。

[0040]图 9A 显示 MHC 完全不匹配的同种异体培养的祖细胞的辐射防护能力和可检测的供体嵌合性 (图 9B)。

[0041]图 10 显示致死剂量辐射的小鼠用新鲜和冷冻的 MHC 完全不匹配的同种异体骨髓祖细胞移植后 30 天的辐射防护。

[0042]图 11A-B 显示在 7 毫升 AFC 袋和瓶中的增殖数据。

[0043]图 12 显示来自人骨髓祖细胞培养的细胞和用生长因子处理的照片。

[0044]图 13 显示在 7 毫升 AFC 袋中人骨髓祖细胞的增殖数据。

[0045]图 14 显示在 72 毫升 AFC 袋中人骨髓祖细胞的增殖数据。

[0046]图 15 显示人骨髓祖细胞克隆形成。

[0047]图 16 显示为干细胞和祖细胞群体进行的人骨髓祖细胞培养物的 FACS 分析。

[0048]图 17 显示 IL-3 和 IL-6 单独或者组合使用对人骨髓祖细胞

的效果。

[0049]图 18 显示与 IL-3, IL-6 或者其组合一起培养的骨髓祖细胞的集落形成实验的结果。

[0050]图 19 显示与 IL-3, IL-6 或者其组合一起培养的骨髓祖细胞中的 CFU 的绝对数量。

[0051]图 20 显示人骨髓祖细胞对 G-CSF 的反应性。

[0052]图 21 概要地显示了人骨髓祖细胞在体外对 G-CSF 的反应。

[0053]图 22 显示在移植一周后人 MP 植入的小鼠骨髓和脾的 FACS 分析和它们对 G-CSF 的反应。

[0054]图 23 是在 NOD/SCID 小鼠中人培养衍生的骨髓祖细胞的 FACS 表型。

具体实施方式

[0055] 本发明公开了生成对治疗造血系统缺乏或者受损相关的病症有用的细胞的方法,例如在骨髓破坏性治疗和造血干细胞移植,恶性疾病的化疗,或者是无意中暴露于高剂量的离子辐射之后发生的嗜中性粒细胞减少症和血小板减少症。这里描述的增殖细胞包含用确定的细胞因子和生长因子接触起始干细胞群和祖细胞而产生的定型的骨髓祖细胞(MP),以允许定型的骨髓祖细胞发育。在确定的培养条件下,骨髓祖细胞优先增殖到确定的水平。增殖的细胞被作为整体使用,或者接受纯化以提供据具有特定细胞标志物表型和特征性分化潜能的分离的细胞。分离的细胞群体包括常见的骨髓祖细胞(CMP),粒细胞/巨噬细胞祖细胞(GMP),巨核细胞/红细胞祖细胞(MEP)及其组合。这些定型的骨髓祖细胞输入到免疫缺陷患者中导致短期灌输和/或者产生骨髓谱系终末分化细胞。这样就提供了暂时但不是持久的终末分化细胞的补充,特别是中性粒细胞和巨核细胞,因此补偿了造血功能不足的时期。

[0056]在造血干细胞移植领域,增殖技术主要指向增加用于移植和永久性恢复造血功能的造血干细胞的群体(Devine, S. M. 等,骨髓

移植 31:241-252 (2003); Henschler, R. 等, Blood 84(9): 2898-2903 (1994); Bhatia, M. 等, J. Exp. Med. 186:619-624 (1997)). 细胞因子和生长因子的组合通常用于试图引起 HSC 的优先增殖, 同时限制它们分化成骨髓谱系和淋巴谱系的定型细胞。因为输入细胞的植入特性和移植受体的存活与所输入的 HSC 增长数量有关, 所以在造血干细胞移植中增殖的 HSC 的数量尤其相关, 尤其是当供体和受体中存在 MHC 不匹配时 (Ketterer N. 等, Blood 91:3148-3155 (1998)). 不期望在诱导干细胞分化的培养条件下, 因为这样就产生了较低数量的 HSC。由于 HSC 具有自我更新能力, 所以在一些情况下用长期的培养来选择能自我补充的 HSC 群体 (Piacibillo, W. 等, Blood 93(11): 3736-3749 (1999))。

[0057]与之相反, 定型的骨髓祖细胞只有有限的或者没有自我更新能力, 因此适合 HSC 增殖的培养条件不适合增殖这些细胞。另一方面, 不期望存在能促进培养细胞快速发育为终末分化细胞 (例如嗜中性粒细胞和巨核细胞) 的细胞因子, 因为这样增殖得到的细胞群体不可能提供骨髓分化途径中起始阶段发现的低分化的祖细胞所能提供的延长的保护。 (Reichle, A. 等, 骨髓移植 32:299-305 (2003); Zimmerman, T. M. 等, 骨髓移植 26:505-510 (2000); Reiffers, J. 等, Lancet 354:1092-1093 (1999)). 因此, 这里描述的增殖方法是限制 HSC 的产生, 而增加 MP 的数量的, 尤其是 CMP 和 GMP 细胞的数量。出现在增殖的细胞群体中的 HSC 主要是短期再增殖性造血干细胞 (ST-HSC), 通常少于增殖细胞的 10%, 更优选少于 5%, 典型的是在增殖细胞群体的 2% - 5% 范围内。增殖的方法也适用于在自体同源或者同种异体移植情况下使用的细胞。

[0058]有利的是, 为了进一步增加可用于增殖和/或者治疗的细胞数量, 为了使之在广泛的临床应用在商业上切实可行, 这里描述的细胞群体优先地包括同种异体骨髓祖细胞的混合物, 典型地同种异体细胞是不能用于造血干细胞移植 (HSCT) 的, 因为可能的 GVHD 和宿主对移植物反应这两种情况都能推迟 HSC 在移植受体中的植入。也就是,

在 MHC 水平上具有完全或者部分匹配的单一供体通常被作为 HSC 的来源。不过不像在 HSCT 中，因为本发明的目的既不是永久地植入也不是利用这些分化细胞的输入所产生的效果，所以在本发明中与宿主 MHC 不匹配的同种异体的定型的骨髓祖细胞的使用对于它们的治疗效果不会有不利作用。因为定型的骨髓祖细胞提供了对抗嗜中性粒细胞减少症和/或血小板减少症的临时保护，所以 HSC 的缺失，特别是长期再增殖性的 HSC 的缺失，对治疗效果也不是决定性的。同种异体骨髓细胞的混合物可以用增殖或者未增殖的细胞来制备。

定义

[0059]在该公开内容的参考文献中，在这里描述使用的技术和科学术语除非特别说明，具有本领域中任何一个普通技术人员所通常理解的意思。相应地，下列术语有下列意思。

[0060]“同种异体的 (Allogeneic)”，指来自、起源于、或者是同一种属的成员，其中成员之间在遗传上相关或者不相关，但是遗传上相似。“同种异体移植”指细胞或者器官从供体移植到受体上，其中受体与供体属于同一种属。

[0061]“自体同源的 (Autologous)”指获自或者来自同一受试者或者患者。“自体同源移植”指收获和再输入或者移植患者自己的细胞或者器官，只使用或者补充使用自体细胞能消除或者减少很多细胞输回到宿主的副作用，特别是外体对宿主的反应。

[0062]“化学上确定的 (Chemically-defined)”在这里是指知道化学成分的培养基，从定性和定量两方面都是，没有故意添加的不确定的补充物，不过即使这样的培养基也可能在其成分里含有痕量的污染。化学上确定的培养基必须没有动物血清、饲养细胞例如基质细胞和衍生自基于细胞的细胞外基质，例如成纤维细胞等。

[0063]“定型的骨髓祖细胞 (Committed myeloid progenitor cell)”或者“骨髓祖细胞”指多能的或者单能的祖细胞，最终能发育为骨髓谱系的任何终末分化细胞，但是不分化为淋巴谱系的细胞。因此，骨髓祖细胞指任何在骨髓谱系里的祖细胞。骨髓谱系的定型祖

细胞不仅包括此处所定义的寡能的 (oligopotent) CMP、GMP 和 MEP, 还包括单能的红细胞祖细胞, 巨核细胞祖细胞, 粒细胞祖细胞和巨噬细胞祖细胞。骨髓祖细胞不同的细胞群体与其他细胞的区别在于它们的分化潜能和存在一组有特征的细胞标志物。

[0064] “定型淋巴祖细胞”或者“淋巴祖细胞”指寡能的或者单能的祖细胞, 最终能够发育成淋巴谱系的终末分化细胞, 例如 T 细胞, B 细胞, 自然杀伤细胞或者淋巴树突状细胞, 但是不发育成骨髓谱系的细胞。骨髓谱系的细胞, 淋巴祖细胞不同细胞群体与其他细胞能通过分化潜能和一组有特征的细胞标志物加以区分。

[0065] “普通的淋巴祖细胞”或者“CLP”指寡能细胞, 这些细胞的特征是能产生 B 细胞祖细胞 (BCP), T 细胞祖细胞 (TCP), NK 细胞和树突状细胞。这些祖细胞只有很少或者没有自我更新能力, 但是能产生 T 淋巴细胞, B 淋巴细胞, NK 细胞和淋巴树突状细胞。

[0066] “普通的骨髓祖细胞”或者“CMP”指一些细胞, 其特征是能产生粒细胞/单核细胞 (GMP) 祖细胞和巨核细胞/红细胞祖细胞 (MEP) 这些祖细胞只有很有限的或者没有自我更新的能力, 但是能产生骨髓树突细胞, 骨髓红细胞, 红细胞, 巨核细胞, 粒细胞/巨噬细胞, 粒细胞和巨噬细胞。

[0067] “同基因系 (Congenic)”指来自或者起源于或者是同一种属的成员, 其中成员间除了一个小遗传区域外, 在遗传上是相同的, 通常是单一遗传 (例如一个基因)。“同基因系移植”指从供体将细胞或者器官转移给受体, 这里供体和受体之间除了一个单一基因位点以外, 在遗传上是相同的。

[0068] “细胞因子”指在自然状态下由细胞产生并影响产生细胞因子的细胞 (自身) 或者其他细胞的生理状态的化合物或者成分 (例如, 自体免疫因子)。细胞因子还包括由重组或者合成加工产生的任何化合物或者成分, 这些加工的产物与天然存在形式具有相似的结构和生物学活性。淋巴因子指自然的, 合成的或者由淋巴细胞天然产生的细胞因子的重组形式, 包括 IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-11 等,

但是不局限于此。

[0069] 细胞的“增殖”指从一个起始群体的细胞增加一个特定细胞类型或者多个类型的细胞数量，所述细胞群体可以是不同的也可以是相同的。用于增殖的起始细胞不需要与增殖产生的细胞相同。例如，增殖的细胞可以产生自细胞起始群体的生长和分化。从术语增殖中排除的是用于表征细胞的分化潜能的有限稀释实验。

[0070] “功能性的”细胞指细胞能执行或者保留了与特定细胞类型相关的调节功能或者活性，所述的功能或活性可通过特定的功能实验来确定。例如，“功能性的 GMP 细胞”是能最终分化为粒细胞和巨噬细胞的祖细胞，而终分化的细胞功能是作为正常的粒细胞和巨噬细胞。

[0071] “外体对宿主反应” (Graft-versus-host response) 或者“GVH”或者“GVHD”指当不同 MHC 分类的淋巴细胞被导入到宿主体内而发生的细胞反应，导致供体淋巴细胞对抗宿主反应。

[0072] “粒细胞/巨噬细胞祖细胞”或者“GMP”指由通常的骨髓祖细胞衍生来的细胞，其特征是能产生粒细胞和巨噬细胞，但是不能产生骨髓谱系的红细胞或者巨核细胞。

[0073] “生长因子”指在自然状态下能影响细胞增殖，细胞生存，和/或者分化的化合物或者成分。生长因子对细胞有确定的效应，同时也可能影响其它生理过程，例如分泌，粘附，对外部刺激产生应答等。尽管多种生长因子由细胞产生，这里所述的生长因子还包括由重组或者合成加工产生的化合物或者成分，这些加工的产物与天然存在的生长因子有相同或者相似的结构和生物学活性。生长因子的例子包括表皮生长因子 (EGF)，成纤维细胞生长因子 (FGF)，促红细胞生成素 (EPO) 和促血小板生成因子 (TPO)，干细胞因子 (SCF) 和 flt-3 配体 (FL) 及其类似物。

[0074] “分离的”指从至少一种其他的产物、化合物、成分中分离到的产物、化合物或者成分，与其天然存在的状态相关，不管是天然的还是合成的。

[0075] “造血干细胞”或者“HSC”指促克隆形成的、能自我更新的多能细胞，能最终分化成造血系统中的所有细胞类型，包括B细胞，T细胞，NK细胞，淋巴树突状细胞，骨髓树突状细胞，粒细胞，巨噬细胞，巨核细胞和红细胞。对于造血系统中的其他细胞，用一组特有的细胞标志物来定义HSC。在HSC领域中的富集，指用基于单一细胞标志物的出现来选择的细胞群体，这些标志物通常是CD34+，而“纯化的”是指用HSC基于两个或者更多个标志物的选择得到的一个细胞群体，优先选择CD34+ CD90+。

[0076] “标志物表型 (Marker phenotyping)”，指鉴定细胞上的标志物或者抗原的以确定它们的表型（例如分化状态和/或细胞类型）。这可以用免疫表型分类法，该法用抗体来识别呈现在细胞上的抗原。抗体可以是单克隆的也可以是多克隆的，但是通常选择与其他细胞标志交叉反应最小的。需要理解的是确定的细胞分化或者表面标志物对于衍生所述细胞的动物种属来说是唯一的，而其他细胞标志物在种属间是通用的。在种属间确定相同细胞类型的这些标志物被给予相同标志物鉴定，尽管在种属间在结构上有差异（例如氨基酸序列）细胞标志物包括细胞表面分子在特定的情况下也指细胞分（CD）化标志物和基因表达标志物。基因表达标志物是一些能指示细胞类型或者分化状态的表达基因。在某种程度上，基因表达谱将反应细胞表面标志物，尽管它们可能包括非细胞表面分子。

[0077] “巨核细胞/红细胞祖细胞”或者“MEP”指来自常见骨髓祖细胞的一类细胞，其特征是能产生红细和巨核细胞，但是不能产生粒细胞，巨噬细胞或者骨髓树突状细胞。

[0078] “错配的同种异体的”指来自或者起源于或者是同一种属但是具有不同主要组织相容性抗原（MHC）（例如蛋白质）的成员，这由该行业使用的标准测试来决定，例如对MHC抗原确定的数量用血清学或者分子的分析。部分不匹配指成员之间被测的MHC抗原部分匹配，典型的是在供体与受体之间。例如，半匹配指在两个成员之间，被测

MHC 抗原的 50% 显示不同的 MHC 抗原类型，完全或者彻底不匹配指在两个长远之间所有被测的 MHC 抗原不同。

[0079] “骨髓破坏性的 (Myeloablative)” 或者 “骨髓破坏 (myeloablation)” 指造血系统的损坏或者破坏，特别是暴露于细胞毒剂或者辐射。骨髓破坏包括由高剂量毒剂导致的彻底的骨髓破坏，或者整体辐射破坏了造血系统。它也包括由非骨髓破坏性条件引起的不太彻底的骨髓破坏性状态。因此非骨髓破坏性条件就成为治疗手段，因为它不彻底破坏患者的造血系统。

[0080] “嗜中性粒细胞减少症”，指在外周血中中性粒细胞和其他多形核淋巴细胞低于正常数量。通常，嗜中性粒细胞减少症的诊断是基于绝对中性粒细胞计数 (ANC)，这是通过总白细胞数量乘以带的百分比和中性粒细胞微分，临床上异常的 ANC 是每毫升外周血少于 1500 个细胞。ANC 为每毫升血中 1000-1500 时，中性粒细胞减少症的严重程度被分为轻度，ANC 为每毫升 500-1000 个细胞为中度，ANC 为每毫升少于 500 个细胞为重度。

[0081] “自我更新”指一个细胞能分裂和产生至少一个与母细胞具有相同特征的子细胞。第二个子细胞可能进入一个特定的分化途径。例如，一个自我再生的造血干细胞分裂并形成一个子代干细胞和另一个在骨髓或者淋巴途径中进行分化的子细胞。定型祖细胞典型的失去了自我更新的能力，分裂后产生两个呈现出更高分化表型 (即限制性) 的子细胞。

[0082] “短期再增殖干细胞”或者 “ST-HSC” 指具有有限的短期自我更新能力的干细胞，其特征是能分化为骨髓和淋巴谱系的细胞。ST-HSC 与长期的再增殖 (LT) 的 HSC 不同之处在于它们再培养实验中有限长度的自我更新能力 (例如, Christensen, J. L. 和 Weissman, I. L, 美国国家科学院院刊 (2001))。

[0083] 指细胞的时候, “分选”指基于物理特性 (例如 elutriation 或者基于大小的技术) 或者标志物的出现 (例如用标记的抗体侧面散射 (SSC) 或者前面散射 (FSC), 或者荧光激活细胞筛选 (FACS)), 或

者基于细胞标志物出现的分析，例如不进行分选的 FACS；也包括免疫吸收技术，例如磁性细胞分离系统。

[0084] “基本上纯的细胞群体”指具有的特定标准物特征和分化潜能的细胞群体占总细胞群体的至少约 50%，优选地至少大约 75% - 80%，更优选地至少大约 85% - 90%，并且最优选地至少大约 95%。因此，“基本上纯的细胞群体”指一个群体的细胞包含少于大约 50%，优选地少于大约 20 - 25%，更优选地大约 10 - 15%，最优选地少于 5% 的细胞在指定的试验条件下不展示特异的分子标志物特征和分化潜能。

[0085] “受试者(subject)”或者“患者”可以替换使用，除非特别指出，是指哺乳动物例如人，非人灵长类，也可以是兔，大鼠，小鼠，山羊，猪和其他哺乳类。

[0086] “同系基因型的(Syngeneic)”指来自或者起源于或者是同一种属的成员。它们在遗传上是相同的，特别是对于抗原或者免疫学反应。这些包括具有相配的 MHC 类型的相同的双胞胎。因此，同系基因型移植指细胞或者器官从供体转移给与供体在遗传上相同的受体。

[0087] “血小板减少症”指低于正常血小板数，通常少于大约 100×10^9 /升，这将导致凝血时间延长和自发性出血增加。尤其是当血小板水平大约在 $10-50 \times 10^9$ /升或者更低的时候。当血小板从循环系统中丢失的速度大于巨核细胞补充的速度时，这种情况就发生血小板减少症可能起源于血小板合成失败和/或血小板降解速度增加。

[0088] “异种的(xenogeneic)”指来自或者起源于或者是不同种属的成员，例如人和啮齿类，人和猪等。“异种移植”指细胞和器官从供体转移到受体，这里受体与供体属于不同种属。

细胞类型和增殖细胞的来源

[0089] 本申请所述的细胞类型是那些造血系统，尤其是造血干细胞和骨髓谱系细胞。这里描述的细胞将用本领域技术人员所熟知的，可以理解为这些描述反映目前本领域里知识的状态，本发明也不仅仅限于这里描述的表型标志物。

[0090]造血干细胞(HSC)是多能的干细胞,能自我更新其特征是在允许的条件下能产生造血系统的所有类型的细胞。造血干细胞自我更新指HSC细胞能分裂和产生至少一个同样有自我更新能力的子细胞和HSC分化潜能也就是说细胞分裂产生了额外的HSC。自我更新提供了未分化干细胞的连续来源来补充造血系统。对HSC有用的标志物表型的鉴定是本领域所熟知的。对于人类HSC,细胞标志物表型优先地包括 $CD34^+ CD38^- CD90 (苏氨酸1)^+ Lin^-$ 。对于小鼠HSC有代表性的细胞标志物表型是 $Sca-1^+ CD90^+$ (见例如, Spangrude, G. J. 等, *Science* 1: 661-673 (1988)) 或者 $c-kit^+ Thy^{10} Lin^- Sca-1^+$ (see, Uchida, N. 等, *J. Clin. Invest.* 101 (5): 961-966 (1998))。其他HSC标志物例如乙醛脱氢酶也可以发现有利的用途(见 Storms 等美国国家科学院院刊 96: 9118-23 (1999)和 AC133 (见 Yin 等, *血液* 90: 5002-12 (1997))。

[0091]HSC产生定型淋巴或者骨髓祖细胞。这里用的定型的骨髓祖细胞指能分化成任何一种骨髓谱系终末分化细胞的细胞群体。包括在骨髓祖细胞中的是常见的骨髓祖细胞(CMP),其特征是只有有限的或者没有自我更新的能力,但是能分裂形成粒细胞/巨噬细胞祖细胞(GMP)和巨核细胞/红细胞祖细胞(MEP)。不能自我更新的细胞指细胞分裂产生子细胞,子细胞没有母细胞类型的分化潜能但是相反产生分化的子细胞。用于鉴定CMP的有用的这些标志物表型包括被本领域熟知的那些。对于鼠起源的CMP细胞群体的特征是标志物表型 $c-Kit^{high} (CD117) CD16^{low} CD34^{low} Sca-1^{neg} Lin^{neg}$ 进一步的特征是标志物表型 $Fc\gamma R^{10} IL-7R\alpha^{neg} (CD127)$ 。鼠CMP细胞群体的特征还有标志物表达缺乏,包括 B220, CD4, CD8, CD3, Ter119, Gr-1 和 Mac-1。对于人源的CMP细胞群体的特征是 $CD34^+ CD38^+$ 和进一步的特征是标志物表型 $CD123^+ (IL-3R\alpha) CD45RA^{neg}$ 。人CMP细胞群体的特征还有细胞标志物 CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56, 和 CD234a 的缺失。对各种骨髓祖细胞标志物表型的描述,例如 U. S. Patent Nos. 6,465,247 和 6,761,883; Akashi, *Nature* 404: 193-197 (2000),

所有出版物在这里作为参考文献整体引入。

[0092] 另外一种淋巴谱系的定型祖细胞是粒细胞/巨噬细胞祖细胞 (GMP)。这个祖细胞群体的细胞的特征是能产生粒细胞 (嗜碱性细胞, eosinophils 和嗜中性粒细胞) 和巨噬细胞。与其定型祖细胞相似的是, GMP 缺乏自我更新能力。鼠 GMP 的特征是标志物表型 $c\text{-Kit}^{\text{hi}}$ (CD117) $\text{Sca-1}^{\text{neg}}$ FcDR^{hi} (CD16) $\text{IL-7R } \gamma^{\text{neg}}$ CD34^{pos} 。鼠 GMP 也缺乏标志物 B220, CD4, CD8, CD3, Gr-1, Mac-1, 和 CD90 的表达。人 GMP 的特征是标志物表型 CD34^+ CD38^+ CD123^+ CD45RA^+ 。人 GMP 细胞群体的特征是缺乏标志物 CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56 和 CD235a。

[0093] 与讨论相关的是, 来自 CMP 的巨核细胞/红细胞系祖细胞 (MEP) 的特征是能分化成定型巨核细胞祖细胞和红细胞祖细胞。成熟的巨核细胞是多倍体细胞是血小板形成的前提, 这个发育过程受促血小板生成素的调节。红细胞系细胞通过一个受促红细胞生成素调节的过程由定型红细胞系祖细胞生成, 最终分化为成熟的红细胞。鼠 MEP 的特征是细胞标志物表型 $c\text{-Kit}^{\text{hi}}$ 和 $\text{IL-7RD}^{\text{neg}}$ 和进一步的特征是细胞标志物表型 FcGR^{lo} 和 CD34^{low} 。鼠 MEP 细胞群体的特征也是缺乏标志物 B220, CD4, CD8, CD3, Gr-1 和 CD90。鼠 MEP 另外一个有代表性的标志物表型是 $c\text{-ki}^{\text{thigh}}$ $\text{Sca-1}^{\text{neg}}$ $\text{Lin}^{\text{neg/low}}$ CD16^{low} CD34^{low} 。人 MEP 的特征是细胞标志物表型 CD34^+ CD38^+ $\text{CD123}^{\text{neg}}$ $\text{CD45RA}^{\text{neg}}$ 。人 MEP 细胞群体的特征也是缺乏标志物 CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56 和 CD235a。

[0094] 在骨髓谱系中更加严格的祖细胞是粒细胞祖细胞, 巨噬细胞祖细胞, 巨核细胞祖细胞和红细胞祖细胞。粒细胞祖细胞的特征是能分化为终分化的粒细胞, 包括嗜碱性细胞, 嗜酸性细胞和嗜中性粒细胞。GP 通常并不分化成骨髓谱系的其他细胞。关于巨核细胞祖细胞 (MKP), 这些细胞的特征是能分化成终分化的巨核细胞而不是骨髓谱系的其他细胞 (见例如 WO 2004/024875)。

[0095] 对于淋巴谱系, “定型淋巴祖细胞” 指能分化成淋巴谱系

的任何终末分化细胞。包含在淋巴谱系祖细胞中的是常见的淋巴祖细胞 (CLP)，这是一个具有有限或者不具有自我更新能力的细胞群体，但是能进行细胞分裂形成 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞祖细胞，NK 细胞和淋巴树突细胞。用于鉴定 CLP 的标志物表型为本领域所熟知的那些。对于小鼠 CLP 细胞，细胞群体的特征是出现在 Kondo, M. 等, Cell 191: 661-672 (1997) 里描述的标志物，而对于人类 CLP 可能会用 CD34⁺ CD38⁺ CD¹⁰⁺ IL7R⁺ 作为标志物表型 (Galy, A 等, 免疫, 3: 459-473 (1995); Akashi, K. 等, Int. J. Hematol. 69 (4): 217-226 (1999)), 这里引入的出版物供参考。

[0096] 下面的表 1 提供了优选的鼠细胞表面标志物的概述, 这里表格中细胞颜色显示了大致染色水平。白色显示没有染色, 浅灰色显示低水平的染色, 深灰色显示中度或者高度染色。

表 1

HSC	CD117	CD90.1	Lin1	Sca-1		
CLP	CD117	CD90.1	Lin1	Sca-1	CD127	
MP	CD117	Sca-1	Lin2			
CMP	CD117	Sca-1	Lin2	CD16/32	CD34	CD9
GMP	CD117	Sca-1	Lin2	CD16/32	CD34	CD9
MEP	CD117	Sca-1	Lin2	CD16/32	CD34	CD9
MKP	CD117	Sca-1	Lin2	CD16/32	CD34	CD9

Lin1: CD3, CD4, CD5, CD8, B220, Gr-1, CD11b, TER119

Lin2: CD3, CD4, CD5, CD8, B220, Gr-1, CD90.1, CD127, TER119

[0097] 下面的表 2 提供了优选的人细胞标志物的概述, 这里表格中细胞颜色大致显示了染色水平, 白色表示没有染色, 浅灰表示低水平染色, 深灰色表示中度或者高度染色。

表 2

HSC	CD34	CD90	Lin1		
CLP	CD34	CD127	CD10	CD38/CD90	Lin
MP	CD34	CD90	Lin2		
CMP	CD34	CD90	Lin2	CD45RA	CD123
GMP	CD34	CD90	Lin2	CD45RA	CD123
MEP	CD34	CD90	Lin2	CD45RA	CD123

Lin 1: CD2, CD3, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD56, CD235a

Lin2a: CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56, CD235a

Lin 2b: CD10, CD11b, CD14, CD19, CD235a

[0098]大量的其他合适的细胞表面标志物目前为熟练人员所熟知或者能及时地被定性或者鉴定，这些标志物可以用于在这里描述的方法和组合物中，例如，最近基于 mRNA 表达的微阵列分析对于多种骨髓祖细胞群体鉴定出来几个另外的鼠标志物，见例如，Iwasaki-Arai, 等 J. Exp. Med. 197:1311-1322 (2003); Akashi, 等 Nature 404:193-197 (2000); Miyamoto, 等 Dev. Cell 3:137-147 (2002); Traver, 等 Blood 98:627-635 (2001); Akashi, 等 Blood 101:383-390 (2003); Terskikh, A., 等 Blood 102:102:94-101 (2003)。基于同样类型的 mRNA 表达分析，另外的细胞表面标志物例如 CD110, CD114, CD116, CD117, CD127, 和 CD135 可以用于人的分离的一个或者多个已经鉴定的骨髓祖细胞亚群中，正如美国国家科学院院刊 99:11872-11877 (2002)描述的那样。

[0099]对于这里描述的方法，用于增殖的细胞可以是能最终分化为骨髓谱系的细胞例如粒细胞，巨噬细胞，巨核细胞类红细胞和/或骨髓树突细胞。这些包括 HSC 和定型的骨髓祖细胞 CMP, GMP 和 MEP, 这些细胞具有相关特征，特别是分化潜能和上述的细胞标志物特征。在一个实施方案中，用于增殖的起始细胞包括具有标志物表型 CD34⁺的细胞。因为在不同的祖细胞类型中发现有 CD34 标志物，用于增殖的起始细胞群体可以是表达 CD34 的祖细胞的混合物。在另外一个实施方案中，细胞是包括细胞标志物表型 Sca-1^{pos} 的细胞，这个细胞标志物在小鼠和其他啮齿类中发现。对 Sca-1^{pos} 细胞的选择也会导致展示该细

胞标志物表型的细胞的混和物，尽管它主要选择 HSC，因为小鼠定型的骨髓祖细胞是 Sca-1^{neg}。因此在增殖啮齿类骨髓细胞的其他实施方案中使用细胞标志物表型 Lin^{neg/low}，这包括 HSC，CMP 和 GMP。

[00100] 在进一步方面，用于增殖的起始细胞是分离的细胞，这包括分离的 HSC，在所述的细胞因子和生长因子混合物存在时发育成 CMPs，然后由 CMP 进一步增殖成其他淋巴谱系祖细胞。在另外一个实施方案中，用于增殖的起始细胞是 CMP，其特有的分化潜能和上述的细胞标志物表型。CMP 可能具有有限的自我更新能力，因此能增殖用于为有限数量的细胞分裂产生额外的 CMP，也能分化成 GMP 和 MEP。

[00101] 用于增殖的细胞有很多来源，包括骨髓外周血，脐血和含有造血和骨髓祖细胞的其他来源包括肝脏，尤其是胚胎肝脏。外周血和脐带血是 HSC 和祖细胞的丰富来源，用本领域中熟知的和通常实践的方法来获得细胞。例如，在 Sutherland 等人的，骨髓加工和纯化：实用手册 (Gee, A.P.ed.), CRC Press Inc. (1991)) 中描述了制备骨髓细胞的方法。脐带血或者胎盘脐带血通常是在胎盘脱离前或者脱离后通过挤压脐带静脉来获得的 (见，例如，Turner, C. W. 等，骨髓移植 10:89 (1992); Bertolini, F. 等，J. Hematother. 4:29 (1995))。HSC 和骨髓祖细胞也可以通过白细胞去除法从外周血获得，白细胞去除法是取自合适研究受试者的血液经过连续离心 (例如，Cobe BCT Spectra blood cell separators) 来去除白细胞的过程，而其他血液成分能回到供体。另外一种分离程序是通过浓度变化的介质离心，例如 Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)。

[00102] 细胞来自具有造血系统的任何动物种属，正如这里通常描述的。优选的是，适合的动物是哺乳动物，包括，举例没有限制，啮齿类，兔，犬类，猫，猪，马，牛，灵长类 (例如人) 等。用于增殖的细胞可能来自单个受试者，或者多个受试者，“多个”是指至少两个 (例如多于一个) 供体。当细胞来自多个供体时，它们的关系可能是这里定义的同系基因型的，同种异体的，或者异种的。目前发明优

选的实施方案被指向通过这里的增殖方法得到的同种异体骨髓祖细胞的混合物，正如下面进一步的描述，同种异体细胞能被分别增殖，增殖后混合，或者增殖前混合，如下进一步加以讨论。

[00103] 这里可以应用的，干细胞和祖细胞可被通过事先向患者给予细胞因子或者药物从骨髓动员到外周血（见例如，Lapidot, T. 等, *Exp. Hematol.* 30:973-981 (2002)）。能够用于诱导动员的细胞因子和趋化因子，举例但不限于，粒细胞克隆刺激因子（G-CSF），粒细胞巨噬细胞克隆刺激因子（GM-CSF），促红细胞生成素（Kiessinger, A. 等, *Exp. Hematol.* 23:609-612 (1995)）如，干细胞因子（SCF），AMD3100（AnorMed, Vancouver, Canada），白细胞介素 8（IL-8）以及这些因子的突变体（例如 pegfilgrastim, darbopoietin）。细胞因子和趋化因子的组合，例如，G-CSF 和 SCF，或者 GM-CSF 和 G-CSF，能协同作用促进动员和增加外周血中 HSC 和祖细胞的数量，尤其是对于单一细胞因子或者趋化因子不显示有效动员的患者（Morris, C. 等, *J. Haematol.* 120:413-423 (2003)）。

[00104] 使用诱导剂量（例如细胞还原剂的剂量）下的细胞破坏剂（cytoablative agent）还能动员 HSC 和祖细胞，细胞破坏剂单独或者与细胞因子组合都是有用的。当患者接受骨髓破坏性治疗时可以在高剂量的化疗之前使用这种动员模式。用于动员的细胞还原性药物，包括环磷酰胺，异环磷酰胺，依托泊苷，胞嘧啶阿拉伯糖苷和卡铂（Montillo, M. 等, *Leukemia* 18:57-62 (2004)；Dasgupta, A. 等, *J. Infusional Chemother.* 6:12 (1996)；Wright, D.E. 等, *Blood* 97: (8):2278-2285 (2001)）。

[00105] 用于增殖的细胞可以再接受进一步的选择和纯化，包括阳性和阴性两种选择方法，以获得基本上纯的细胞群体。一方面，荧光激活的细胞分选（FACS），也叫流式细胞术被用于分选和分析不同细胞群体。具有 HSC 或者祖细胞群体特异细胞标志物的细胞用能结合细胞标志物的抗体通常是抗体的混合物进行标记。指向不同的标志物的每个抗体与可被检测的分子，特别是荧光染料缀合，这种染料能与缀

合到其他抗体上的其他荧光区分开来。一束标记的或者“染色的”细胞通过光源，激发了荧光物质，来自被测细胞的发射光谱决定特定标记抗体的存在。通过同时检测不同荧光物质，在本领域中也指多色荧光细胞分选呈现不同细胞标志物的细胞能从群体里的其他细胞里鉴定和分离出来。其他 FACS 参数，包括，有限举例如，侧散光（SSC），前散光（FSC），活性染料（例如碘化丙啶）能基于细胞大小和活性选择细胞。其中，U.S. 专利号 5,137,809, 5,750,397, 5,840,580; 6,465,249; Manz, M.G. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:11872-11877 (2002) 和 Akashi, K. 等, Nature 404(6774):193-197 (2000) 中描述了 FACS 分选和分析 HSC 和祖细胞。荧光激活的细胞分选例如在 Shapiro, H. M., Practical Flow Cytometry, 4th Ed., Wiley-Liss (2003) 和 Ormerod, M. G., Flow Cytometry: A Practical Approach, 3rd Ed., Oxford University Press (2000) 中描述了荧光激活的细胞分选的一般性指导。

[00106] 分离起始细胞群体的另外一种方法是使用结合有与特异的细胞表面标志物相互作用的抗体和配体的固体或者不溶性物质，。在免疫吸附技术中，细胞与含有抗体的基质（例如球珠柱子，瓶子，磁性颗粒）相接触，然后除去的没有结合的细胞。免疫吸附技术能规模化用于直接处理临床收集的大量细胞，合适的基质，举例但不限于，塑料，纤维素，葡聚糖，聚丙烯酰胺，琼脂糖和本领域里知道的其他物质（例如法玛西亚葡聚糖 6MB 巨球珠）。当使用包含磁性或者顺磁性珠子的固体基质时，结合于珠子上的细胞能用磁性分离很容易地分离 (Radbruch, A., Cytometry 14(4):384-92 (1993); CD34⁺ direct isolation kit, Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach, Germany)。亲和层析细胞分离通常涉及将悬浮细胞通过表面固定有选择性配体的支持物，配体与细胞表面特异性的靶分子相互作用，被捕获在细胞基质上。在柱子的通过缓冲液中加入洗脱试剂可以释放结合的细胞。自由细胞被洗脱通过柱子并作为均一群体收集。很明显对于本领域的技术人员来说，吸附技术不仅仅限于用特异性抗体的那些方法，也可以

使用非特异性的吸附。例如，硅石吸附就是一个用于从细胞制备物中除去巨噬细胞的简单方法。

[00107] FACS 和大多数分批免疫吸附技术可用作阳性或者阴性筛选方法（见例如美国专利号 5,877,299）。在阳性筛选中，用抗体标记期望的细胞，从剩余的未标记/不需要的细胞中分离出来。在阴性选择中，不需要的细胞被标记和除去。也可以用另外一种阴性选择，就是用抗体/补充处理或者免疫毒性来除去不需要的细胞。

[00108]可以理解的是上述描述的细胞的纯化方法还包括上述方法的组合。常见的组合可以包含能有效地除去大量的不需要的细胞和细胞材料的起始程序，例如白细胞清除术。第二步可以包括表达标志物的细胞的分离，这个标志物对于结合于基质上的抗体免疫吸附的一个或者多个祖细胞群体来说很常见。例如，包含抗 CD34 抗体的磁性珠能结合和捕获通常表达 CD34 抗原的 HSC, CMP 和 GMP 细胞。一个额外的步骤对于不同的细胞类型提供了更好的解决办法，例如用抗一系列细胞标志物的抗体进 FACS 分选，这能得到基本上纯的所需要的细胞群体。另外一种组合可能涉及先用结合抗 CD34 抗体的磁性珠的起始分离，然后加上一轮 FACS 纯化。

[00109]测定细胞的分化潜能合干细胞和分离的祖细胞的类型通常是通过将细胞暴露于允许发育成各种终末分化细胞的条件之下。这些条件通常在培养基中包括细胞因子和生长因子的混合物，以允许骨髓或者淋巴谱系发育。克隆形成培养实验根据通过有限稀释体外培养细胞，然后对连续发育而来的细胞类型进行评价，如，常见的类型测试实验是在补充有细胞因子的甲基纤维素培养基上进行的（例如 MethoCult, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada; Kennedy, M. 等, Nature 386: 488-493 (1997)）。Manz 等, Proc. Natl Acad. Sci. USA 99(18): 11872-11877 (2002); U.S. Patent No. 6,465,249; 和 Akashi, K. 等, Nature 404(6774): 193-197 (2000) 描述了细胞因子和生长因子制剂允许造血途径中的分化。细胞因子包括 SCF, FLT-3 配体, GM-CSF, IL-3, TPO, 和 EP0。另外一种体外实验是长期

培养起始细胞实验(LTC-IC),通常使用基质细胞来支持造血作用(见例如, Ploemacher, R.E. 等, Blood. 74:2755-2763 (1989))和 Sutherland, H.J. 等, 美国国家科学院院刊 87:3745 (1995))。

[00110]另外一种类型的适合于决定分离细胞的分化潜能实验是根据将细胞的体内施用, 将其施用到宿主动物后对造血系统重新构造的评价。受体是免疫妥协的或者免疫缺陷的, 以此来限制排斥和使之接受同种异体或者异源性细胞移植。可用的这类动物系统是 NOD/SCID (Pflumio, F. 等, Blood 88:3731 (1996); Szilvassym S.J. 等, "Hematopoietic Stem Cell Protocol," in Methods in Molecular Medicine, Humana Press (2002); Greiner, D. L. 等, Stem Cells 16(3):166-177 (1998); Piacibello, W. 等, Blood 93: (11): 3736-3749 (1999)) or Rag2 deficient mouse (Shinkai, Y. 等, Cell 68:855-867 (1992))。通过从骨髓、脾或者宿主动物的血液中回收细胞来评价起源于输入细胞的细胞和测定展示特异性细胞标志物(例如, 标志物表型)的细胞的存在, 通常是通过 FACS 分析。检测移植细胞特异的标志物可以对内源细胞和移植细胞加以区分。例如, 当将人细胞移植到合适的免疫缺陷的小鼠中(见例如, Piacibello. W. 等, supra)时, 使用对细胞标记的人形式(例如 HLA 抗原)特异的特异性抗体鉴定人类细胞。

[00111]用上述方法获得的细胞的起始群体直接用于增殖或者冷冻以备他日之需。本领域中有很多培养基和冻存细胞的操作步骤。通常, 冻存培养基将包含 5%-10% 的 DMSO, 10%-90% 牛血清, 和 50%-90% 培养基。有利于保存细胞的其他添加物包括, 列举但不限于, 二糖例如海藻糖 (Scheinkonig, C. 等, 骨髓移植. 34(6):531-6 (2004)), 或者血浆体积扩展剂, 例如: hetastarch (也就是, 羟乙基淀粉代血浆)。在一些实施方案中, 可以用等渗的缓冲液, 例如磷酸盐缓冲液。一个可参考的冻存成分有 4% HAS 的细胞培养基, 7.5% 二甲基亚砷 (DMSO), 和 2% 的羟乙基淀粉。用于冻存的其他组合物和方法是众所周知的, 而且也在领域内有所描述(见, 如 Broxmeyer, H. E.

等, 美国科学院院刊 100(2):645-650 (2003))。细胞被保存在低于-135℃的最终温度下。

骨髓祖细胞的离体增殖

[00112] 以上获得的细胞的起始群体在包含细胞因子和生长因子混合物的培养基中离体增殖允许骨髓祖细胞增殖。在自然状态下的细胞因子通常是由细胞产生的能调节细胞生理状态的蛋白质, 不管细胞是另外的细胞还是产生细胞因子的细胞自身。淋巴细胞产生的细胞因子通常被描述为淋巴因子(IL), 但是这里定义为细胞因子。细胞因子通常通过细胞因子调节的细胞上的细胞受体作用。与之类似, 生长因子在其自然状态下也是由细胞产生的化合物, 影响细胞的增殖和分化, 不管细胞是另外的细胞还是产生生长因子的细胞。像细胞因子一样, 生长因子通常通过受体作用于细胞。本公开内容中的细胞因子和生长因子的参考, 然而并不意味着绝对, 因为某些细胞因子对增殖和分化作用与生长因子相似。因此这里仅仅描述特异的细胞因子和生长因子在本领域的状态, 并不意味着限制这个发明的范围。

[00113] 对于增殖的方法, 选择细胞因子和生长因子用于增殖定型的骨髓祖细胞的群体, 例如 CMP, GMP 和 MEP 细胞。因为这些细胞具有有限的或者不具有自我更新的能力, 选择培养条件来支持细胞分裂发育成这些骨髓细胞, 而限制或者最小化不属于定型的骨髓祖细胞的其他类型细胞的增殖。

[00114] 相应地, 用于作为增殖条件的细胞因子通常选择自 IL-1 (Ae, IL-1 β), IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF, CM-CSF 及其类似物。细胞因子的形式是自然产生的产物, 重组产物, 突变体或者与天然存在的形式具有相似的生物活性的修饰形式, 例如模拟肽。细胞因子也可以是选自一组融合蛋白或者工程化的细胞因子。合适的但不限于此的例子包括 PIXY321 (Curtis, B. M., 等 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1991 88. 5809-5813) 一个 GM-CSF 和 IL-3, Epo-IL-3 人工合成的混合物 (Lu, L., 等 Exp. Hematol. 1995 23. 1130-1134), IL-2-IL-6 (Zhao. C., 等干细胞 1994. 12. 1130-1134)。

[00115]细胞因子的来源选择能对用于增殖的细胞有活性的,由此通常反映了用于增殖的起始细胞的来源。例如,假如祖细胞是人源的,就用人形式的细胞因子,不论是天然的或者重组的。相应地,在一个实施方案中细胞因子是重组的人 rhuIL-1, (i.e., rhuIL-1 β), rhuIL-3, rhuIL-6, rhuIL-11, rhuG-CSF, rhuGM-CSF, 及其类似物,然而细胞因子的形式与细胞的起源之间的关联不需要严格限定。例如,人 IL-6 能在小鼠和大鼠细胞中起作用,尽管小鼠 IL-6 对人细胞没有效应。这种交叉反应性对于本领域的技术人员来说是很明显的,也很容易用已知的方法检测。下面对特定的细胞因子的结构和功能进行描述,这反映了本领域的知识状态。

[00116] IL-1 是一组细胞因子,在急性炎症中上调和下调(例如激活内皮细胞和淋巴细胞)、骨形成和重构、胰岛素分泌和发热诱导中起重要作用。IL-1 家族的细胞因子具有整体结构上的相似性,包括一个伪三折轴的 β 片层(见例如, Priestle J. P. 等, 美国科学院院刊 86, 9667-71 (1989))。与本发明的方法有关的是 IL-1 β , 其通常是与 IL-1 α 一起由巨噬细胞分泌的。这两个拮抗者由前体蛋白(pro-IL-1 α 和 pro-IL-1 β)经过酶水解得到,并通过结合 IL-1 受体发挥生理效应。IL- β 的氨基酸序列和对应的核苷酸序列能通过各种来源获得,包括,例如但不限于,鼠类(Telford, J. L. 等, Nucleic Acids, Res. 14(24):9955-9963 (1986));兔(Young PR 和 Sylvester D., Protein Eng. 2(7):545-51 (1989));rat (Accession No. NP 113700 [gi: 13928692]);猪(Huether, M. J, 等, Gene 129(2):285-289 (1993));牛(Leong S. R., Nucleic Acids Res. 16:9054-9054(1988));猫(Daniel, S. L. 等, Anim. Biotechnol. 3:117-121 (1992));马(Howard, R. D. 等, Am. J. Vet. Res. 59:704-711(1998));人(March, C. J. 等, Nature 315:641 (1985);和重组人(Meyers, C. 等, J. Biol. Chem. 262(23):11176-11181 (1987))。Boraschi, D. 等, Frontiers in Bioscience 1:270-308 (1995))描述了 IL-1 β 突变体。各种重组形式也可以购得(参见,例如, human IL-1 β , Promega, Madison, WI,

USA; murine IL-1 β , Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada; 和 rat IL-1 β , Chemicon Int., Temacula, CA, USA). Gronenborn, A.M. 等, Eur. J. Biochem. 161(1):37-43 (1986); Antoni, Ge 等, J. Immunol. 137(10):3201-4 (1986); Palaszynski, E.W., Biochem. Biophys. Res. Commun. 147(1):204-11 (1987); 和 Huang, J.J. 等, FEBS Lett. 223(2):294-8 (1987))中描述了 IL-1 β 的突变体。

[00117] IL-3 也叫 multi-CSF, 是一个由淋巴细胞, 上皮细胞和星状细胞分泌的多谱系细胞因子/生长因子, 能刺激各种血细胞和组织细胞的克隆性增殖和分化, 尤其是粒细胞和巨噬细胞的分化和功能。被认为是造血系统克隆刺激因子之一 (见例如, Wagemaker, G. 等, Biotherapy 2(4):337-45 (1990))。已经从各种生物中鉴定出 IL-3 的氨基酸序列和核酸序列, 其中包括小鼠 (Fung M.-C. 等, Nature 307:233-237(1984)); 大鼠 (Cohen, D.R. 等 Nucleic Acids Res. 14:3641-3658(1986); 绵羊 (McInnes CJ. 等, Gene 139:289-290 (1994)); 牛 (Mwangi S.M. 等, Gene 162:309-312(1995)); 猩猩/猴 (Burger H. 等, Biochim. Biophys. Acta 1217:195-198(1994)); 和人 (Yang Y.-C. 等, Cell 47:3-10 (1986); Otsuka T. 等, J. Immunol. 140:2288-2295(1988)). Lopez, A.F. 等, 美国国家科学院院刊 89(24):11842-6 (1992); Barry, S.C. 等, J Biol Chem. 269(11):8488-92 (1994); 和 Olins, P.O. 等, J Biol Chem. 270(40):23754-60 (1995))中描述了各种 IL-3 的突变体。

[00118] IL-6 被认为是 B-细胞刺激因子 2 (BSF-2) 和干扰素 β 2, 参与调节 B 细胞分化成免疫球蛋白分泌细胞、骨髓瘤/浆细胞瘤生长的诱导和神经细胞分化。IL-6 结合于 IL-6 受体上诱导包含 GP130 的多亚单位复合体的形成, GP130 对于 I 型细胞因子受体超家族是常见的。IL-6 看来具有包括四个螺旋束的共同结构, 螺旋面与受体相互作用。IL-6 氨基酸序列和核酸序列已经被鉴定, 其中小鼠 (Chiu, C.P. 等, 美国国家科学院院刊. 85(19):7099-103 (1988); 大鼠

(Northemann, W. 等, J. Biol. Chem. 264(27): 16072-82 (1989); 兔 (Perkins, H.D. 等, Cytokine 12(6):555-65 (2000)); 绵羊 (Ebrahimi, B. 等, Cytokine. 7(3):232-236 (1995)); 牛 (Droogmans, L. 等, DNA Seq. 2(6):411-3 (1992)); 马 (Swiderski, C.E. 等, Vet Immunol Immunopathol. 77(3-4):213-20 (2000)); 和人 (Hirano T. 等, Nature 324: 73-76 (1986)). Dagan, S. 等, Protein Expr. Purif. 3(4):290-4 (1992); Zhang, J.G. 等, Eur J Biochem. 207(3):903-13 (1992); 和 Skelly, S.M. 等, J Biotechnol. 34(1):79-86 (1994) 描述了 IL-6 突变体。Stoyan, T. 等, Eur J Biochem. 216(1):239-45 (1993); Orita, T. 等, J Biochem (Tokyo) 115(2):345-50 (1994)) 描述了重组形式, 重组形式也能购得。

[00119] IL-11 属于结构和功能上相关的 IL-6 组细胞因子, 正如以上提到的, 用跨膜糖蛋白 gp130 来发挥其生理活性。IL-11 也被认为是脂肪发生的抑制因子 (AGIF) 和 oprelvekin。IL-11 与其他细胞因子和生长因子协同作用, 刺激干细胞增殖和分化成定型祖细胞、促进巨核细胞发生和血栓形成。IL-11 在体内和体外有相反的效应, 在体内它能促进输入, 而在体外能维持干细胞的原始群体。作为 1 类细胞因子, IL-11 也被认为包含一个四螺旋束结构, 已经鉴定了 IL-11 的氨基酸序列和核苷酸序列, 其中有鼠 (Morris, J. C. 等, Exp. Hematol. 24:1369 (1996); 灵长类 (Paul, S.R. 等, 美国国家科学院院刊. 87(19):7512-6 (1990); 和人 (Ohsumi, J. 等, FEBS Lett. 288:13 (1991)) Miyadai, K. 等, Biosci. Biotechnol. Biochem. 60(3):541-2 (1996); Tacken, I. 等, Eur J Biochem. 265(2):645-55 (1999)) 描述了 IL-11 的重组形式和突变体。

[00120] G-CSF 或者粒细胞集落刺激因子能诱导骨髓产生粒细胞和促进中性粒细胞祖细胞和成熟的中性粒细胞的存活, 增殖, 分化和功能。它由不同类型的细胞产生, 例如内皮细胞和巨噬细胞。尽管自然状态下是作为糖蛋白, 重组技术产生的 G-CSF 非糖蛋白形式具有完全活性。结构上, G-CSF 与 1 型细胞因子家族相关, 因为它存在一个

四 α 螺旋束(Hill, C. 等, Proc Natl Acad Sci USA 90(11):5167-71 (1993); Lovejoy, B. 等, J Mol Biol. 234(3):640-53 (1993)。G-CSF的氨基酸和核苷酸序列已经得到鉴定, 其中有鼠类 (Tsuchiya, M. 等, Proc Natl Acad Sci USA. 3(20):7633-7 (1986); 大鼠 (Han, S.W. 等, Gene 175(1-2):101-4 (1996)); 牛 (Heidari, M. 和 Kehrli, M. E., Vet. Immunol. Immunopathol. 73(2):183-91 (2000); 绵羊 (O'Brien, P.M., DNA Seq. 4(5):339-42 (1994)); 猫 (Dunham, S.P. 和 Onions, D.E., Cytokine 14(6):347-51 (2001)); 猪 (Kulmburg, P. 等, Gene 197(1-2):361-5 (1997)); 和人 (Nagata, S. 等, EMBO J. 5:575-581 (1986)). Lu, H.S. 等, Arch Biochem Biophys. 268(1):81-92 (1989); Kuga, T. 等, Biochem Biophys Res Commun. 159(1):103-11 (1989)中描述了G-CSF的重组形式和突变体; 和 Fujii, I. 等, FEBS Lett. 410(2-3):131-5 (1997)), 可商购得到商品名为 filgrastim; lenograstim; pluripoietin, Neupogen®, granulokine (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) 和 granulocyte (Rhone-Poulenc) 的 G-CSF。

[00121] GM-CSF 或者粒细胞巨噬细胞集落刺激因子也叫集落刺激因子 2, 可刺激来自各种谱系的造血前体细胞的生长和分化, 包括粒细胞, 巨噬细胞, 嗜曙红细胞和红细胞。它也是 1 型细胞因子家族的成员, 具有一个四螺旋束结构, 通过结合粒细胞巨噬细胞集落刺激因子受体发挥自己的生理效应。已知的 GM-CSF 的氨基酸和核苷酸序列包括, 其中小鼠 (Gough, N. M. 等, Nature 309:763-767 (1984); 绵羊 (McInnes, C.J. 和 Haig, M.C.K., Gene 105:275-279 (1991); 牛 (Maliszewski, C.R., Mol. Immunol. 25:843-850 (1988)); 和人 (Cantrell, M.A. 等, 美国国家科学院院刊 82:6250-6254 (1985); Lee, F. 等, 美国国家科学院院刊 82(13):4360-4 (1985)). DeLamarter, J. F. 等, EMBO J. 4(10):2575-81 (1985); Shanafelt A.B. 和 Kastelein, R.A., 美国国家科学院院刊. 86(13):4872-6 (1989), 描述了 GM-CSF 的重组形式和突变体, 它们可以购得, 其商品名为 molgramostin 和

sargramostim。

[00122]用于增殖的生长因子选自干细胞因子 (SCF 或者 SF)、FLT-3 配体 (FL)、促血小板生成素 (TPO)、促红细胞生成素 (EPO) 及其类似物。与细胞因子一样,生长因子形式可以是天然产物或者是与天然存在的因子具有相似生物学活性的重组形式。相应地,在一个实施方案中,生长因子是重组的 rhuSCF, rhuFL, rhuTPO, rhuEPO 及其类似物与细胞因子选择一样,选择对增殖的细胞有活性的生长因子,因此将大体上反映起始细胞的起源。如上所述这种关联不需要严格。例如,大鼠和小鼠 SCF 对人细胞有活性,但是人蛋白对大鼠或者小鼠的活性就少很多。这种交叉反应对于技术人员来说是很明显的也很容易通过现有方法测定。特异的生长因子的结构和功能可参考后面的描述,这体现本领域知识的状态,但不意味着仅限于此。

[00123] SCF 也叫 c-kit 配体,主细胞生长因子,或者 Steel factor,与其他细胞因子组合作用于多水平的造血体系来促进细胞存活、增殖、分化粘附和功能性激活,它在骨髓谱系中尤其重要,尤其是在 mast 细胞的发育中,但是也作用于多能干细胞和祖细胞,巨核细胞和一些淋巴祖细胞。(Broudy, V.C., 血液 90(4):1345-1364 (1997))。SCF 通过结合其受体 C-KIT 来发挥生物学效应,天然存在的 SCF 由骨髓基质细胞合成,可能是跨膜形式或者可溶性形式,都具有生物活性。SCF 总体结构具有一个反向平行的四螺旋束折叠(Zhang, Z. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(14):7732-7 (2000))。已知的 SCF 的氨基酸和核苷酸序列包括,其中有小鼠(Lyman, S. D. 等, Cell 75(6):1157-67 (1993)),大鼠(Martin, F.H. 等, Cell 63(1):203-11 (1990)); 猫(Dunham, S.P. 和 Onions, D. E., DNA Seq. 6(4):233-7 (1996)); 绵羊(McInnes, C. J. 等, Cytokine 11(4):249-56 (1999)); 犬(Shin, I. S. 等, J Vet Sci. 2(3):159-66 (2001)); 和人(Martin, F.H. 等, supra)。M. D. 等, 生物化学杂志. 271:11301 (1996); Lu, H. S. 等, 生物化学杂志 271:11309 (1996); Langley, K.E. 等, Arch. Biochem. Biophys. 295:21 (1992); Lev, S. 等, Mol Cell Biol.

13(4):2224-34 (1993); 和 Langley, K.E. 等, Arch. Biochem. Biophys. 311: (1):55-61 (1994)描述了重组的 SCF 和突变体。

[00124] “FLT-3 配体”, 也叫“FL”或者“SL 细胞因子”或者“FMS 相关酪氨酸激酶 3 配体”是一个结合在 flt-3 受体(也叫“ACD135”或者“Aflk2”)上的因子, 一个酪氨酸激酶受体分子, 通常发现于造血干细胞和原始祖细胞, 包括 CD34+细胞。它与其他因子如 CD117(c-kit)协同作用刺激造血干细胞体外增殖, 在体内刺激祖细胞的增殖和动员(Lyman, S. D. 和 Williams, D.E., Curr. Opin. Hematol. 2(3):177-81(1995))。全长的 FLT-3 配体(包含一个细胞外结构域, 一个跨膜结构域和细胞内结构域)和可溶的细胞外结构域都具有生物活性。(Lyman, S. D. 等, Cell 75:1157 (1993); Lyman, S. D. 等, 血液 83:2795(1994))。优先选择的是, FLT-3 配体是可溶性形式的, 包括全长细胞外结构域的氨基酸序列。可溶性的 FLT-3 的结构揭示了两个短链螺旋束的存在, 这与 SCF 和 G-CSF 相似。(Savvides, S.N. 等, Nat. Struct. Biol. 7(6):486-91 (2000))。已经鉴定了 FL 的氨基酸和核苷酸序列, 其中, 小鼠(Rosnet, O. 等, Oncogene. 6(9):1641-50 (1991); 猫 (Yang S. 和 Sim, G. K., DNA Seq. 11(1-2):163-6 (2000); 狗 (Yang, S., supra); 和人 (Rosnet, O. 等, 血液. 82(4):1110-9 (1993))。Sudo, Y. 等, 血液 89:3186 (1997) 和 McClanahan, T. 等, 血液 88:3371 -3382 (1996))描述了 FLT-3 配体的重组形式和突变体。

[00125] “促血小板生成素”或者“TPO”也叫巨核细胞生长和分化因子(MGDF)或者 c-Mpl 配体刺激巨核细胞的增殖和分化, 因而在体内和体外增进血小板的生成。(见, 例如, Lok, S. 等, Stem Cells 12(6):586-98 (1994)), TPO 通过结合特异的由原癌基因 c-mpl 编码的细胞表面受体来发挥效应。与其他细胞因子和生长因子一样, TPO 也是以出现一个反平行的四螺旋束折叠为特征 (Feese, M. D. 等, 美国国家科学院院刊. 101(7):1816-21 (2004))。已知的促血小板生成素氨基酸和核苷酸序列, 其中小鼠 (Lok.S., Nature

369(6481):565-568 (1994)); 大鼠 (Ogami, K. 等, *Gene* 158(2):309-10 (1995)); 和人 (Foster, D.C. 等, 美国国家科学院院刊 91(26):13023-13027 (1994); Bartley, T.D. 等, *Cell* 77(7):1117-1124 (1994)). Souryi, M. 等, *Cell* 63:1137-1147 (1990); Gurney, A.L. 等, *血液* 85(4):981-8 (1995); Wada, T. 等, *Biochem Biophys Res Commun.* 213(3):1091-8 (1995); Park, H. 等, *J Biol Chem.* 273(1):256-61 (1998); 和 Jagerschmidt, A. 等, *Biochem. J.* 333 (Pt 3):729-34 (1998)描述了TPO的重组形式和突变体。

[00126]促红细胞生成素或者 EPO 通过刺激不成熟的红细胞增殖和成熟来调节红细胞生成和巨核细胞发育。(see, 例如, Fisher, J.W., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 216(3):358-69 (1997))。它通过结合 EPO 受体发挥它的效应。尽管 EPO 合成的最初地点是肾脏皮质, 肝脏和骨髓里的巨噬细胞也能合成低水平的 EPO。EPO 结构上与 TPO 相似, 也以存在一个四螺旋束的为特征 (Feese, M. D. 等, 美国国家科学院院刊 101(7):1816-21 (2004))。EPO 的氨基酸和核苷酸序列已知, 其中, 小鼠 (Shoemaker, C.B. 和 Mitsock, L.D. 等, *Mol Cell Biol.* 6(3):849-58 (1986)); 大鼠 (Nagao, M. 等, *Biochim. Biophys. Acta.* 1171(1):99-102 (1992)); 绵羊 (Fu, P. 等, *Mol Cell Endocrinol.* 93(2):107-16 (1993); 狗 (Wen, D. 等, *血液* 82(5):1507-16 (1993)); 牛 (Suliman, H.B. 等, *Gene* 171(2):275-80 (1996)); 兔 (Vilalta A. 等, *Biochem Biophys Res Commun.* 284(3):823-7 (2001)); 猪 (Wen, D. 等, *supra*; David, R.B. 等, *Domest Anim. Endocrinol.* 20(2):137-47 (2001); 猴 (Lin, F.K. 等, *Gene.* 44(2-3):201-9 (1986;)); 和人 (Lin, F.K. 等, 美国国家科学院院刊 82 (22):7580-7584 (1985); Gasson, J.C. 等, *Nature* 315(6022):768-71 (1985))。Barbone, F.P. 等, *Nephrol Dial Transplant.* 14 Suppl 2:80-4 (1999); Boissel, J.P. 等, *生物化学杂志* 268(21):15983-93 (1993)。描述了 EPO 的重组形式和突变体。EPO 可以用商品名 Epogen® (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA),

Epogin (Chugai Pharmaceuticals, JAPAN), Eprex (Janssen -Cilag, Saunderton, UK), Recormon (Roche, Basel, Switzerland) 和 Procrit (Ortho Biotech., Bridgewater, NJ, USA) 购得。

[00127] 这里使用的突变体包括在细胞因子或者生长因子序列中取代, 缺失, 插入氨基酸序列, 而突变体保留了与每种细胞因子或者生长因子相关的生物学活性。一个或者多个氨基酸残基的可以被替换而保留生物学活性, 通常涉及用一个同源氨基酸替换一个氨基酸, 这里也指“保守替换”在一些情况下也可以做非保守替换。同源氨基酸基于侧链的大小和极化的程度分类, 包括小的非极性(例如半胱氨酸、脯氨酸、丙氨酸、苏氨酸)和小极性(例如, 丝氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺)中度极性(例如, 酪氨酸, 组氨酸, 色氨酸), 大非极性(例如苯丙氨酸, 蛋氨酸, 亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸)。同源氨基酸也可以分为: 不带电极性 R 组(甘氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 半胱氨酸, 酪氨酸, 天冬氨酸、谷氨酰胺)酸性氨基酸(例如天冬氨酸, 谷氨酸)和碱性氨基酸(赖氨酸, 精氨酸和组氨酸)保守突变体的例子包括一个疏水残基之间的替换, 如异亮氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸或者蛋氨酸一个极性氨基酸换成另外一个极性氨基酸的替换, 例如精氨酸换成赖氨酸, 谷氨酸换成天冬氨酸, 或者谷氨酸换成天冬氨酸, 一个羟基氨基酸丝氨酸或者苏氨酸换成另一个。

[00128] 1 到 20 个残基的缺失, 尽管在有些情况下, 缺失可能会更大, 尤其是当细胞因子或者生长因子有在物理上分开的结构或者/和功能结构域。例如, 一个 FL 突变体是截短的细胞外结构域, 如上所述, 当从包含跨膜和细胞质结构域的序列中分离出来时保留了生物活性。另外, 可能在氨基端或者羧基端加上氨基酸, 或者在氨基酸序列中插入结构域, 例如在一段肽区域中加入在细胞因子或者生长因子中出现的 α 螺旋和 β 折叠, 每个细胞因子和生长因子的突变体对于本领域重的技术人员来说将是很明显的, 上面给出了有代表性的文献。

[00129] 细胞因子和生长因子组合物用于增殖定型的骨髓祖细胞而限制了 HSC 增殖和限制了骨髓谱系终末分化细胞的产生。在一个实

施方案中,细胞因子和生长因子的混合物的基本成分是 SCF, FL 和 TP0。这种细胞因子和生长因子的混合物允许 HSC 的有限增殖和允许 HSC 和其他祖细胞分化成 MP, 其中包括 CMP, GMP 和 MEP。

[00130] 在进一步的方面, 在基本成分中加入细胞因子, 包括 IL-3, IL-6 或者 IL-11, 或者是它们的组合。因此在一个实施方案中, 细胞因子和生长因子混合物的成分是 SCF、FL、TP0 和 IL-3, 一种能有效增殖人祖细胞的细胞因子混合物。在另外一个实施方案中, 细胞因子和生长因子的混合物的混合物成分是 SCF、FL、TP0 和 IL-6, 一种能有效增殖小鼠骨髓祖细胞的细胞因子混合物。然而在另外一个实施方案中细胞因子和生长因子混和的成分是 SCF、FL、TP0、IL-6 和 IL-11。

[00131] 在需要骨髓谱系的更多成熟细胞增进立即保护来对抗中性粒细胞减少症和/或血小板减少症的情况下, 在前述的细胞因子混合物中加入细胞因子 G-CSF 或者 GM-CSF。在缺乏 G-CSF 或者 GM-CSF 培养基中生长的起始阶段之后可以做这件事情, 以允许更加原始的骨髓祖细胞在促进分化成骨髓谱系中的进一步的祖细胞之前增殖。

[00132] 可以理解为以上不同的细胞因子和生长因子的混合物, 可以用于有选择性地增殖特异的祖细胞。如果细胞用于治疗单一情况或者多种情况的组合(例如中性粒细胞减少症和血小板减少症)需要优先增殖特定的细胞群体, 需要持续的治疗效果。例如, CMP 的出现将对中性粒细胞减少症和血小板减少症提供延长的改善, 因为 CMP 能分化成粒细胞, 巨噬细胞, 巨核细胞和红细胞。另一方面, 与 CMP 和 MEP 相比一个细胞群体有显著比例的 GMP, 将提供中性粒细胞减少症改善, 但是对于血小板减少症具有较少的治疗效果, 因为 GMP 分化为粒细胞和巨核细胞但是不分化成巨核细胞。与此相反的是, 与 CMP 和 GMP 相比, 一个细胞群体有显著比例的 MEP, 将对血小板减少症提供改善, 但是对中性粒细胞减少症只有较少的治疗效果, 因为 MEP 分化为红细胞和和巨核细胞但是不分化为粒细胞和巨噬细胞。

[00133] 在增殖培养基中细胞因子和生长因子的量足以支持骨髓

祖细胞增殖的量到在细胞培养物中特异的水平。有代表性的实施方案，足以支持增殖的 SCF 的量，通常用至少大约 1 到大约 1000ng/ml 的量，优先选择大约 50 到大约 100ng/ml。足以支持增殖的 FL 量，通常用至少大约 1 到大约 1000ng/ml 的量，优先选择大约 30 到大约 100ng/ml。足以支持增殖的 TPO 的量，通常用至少大约 0.5 到大约 500ng/ml，优先选择大约 5 到大约 50ng/ml 的量。足以支持增殖的 IL-1 的量，通常用大约 1 到大约 100ng/ml 的量，优先选择大约 10 到大约 50ng/ml 的量。足以支持增殖的 IL-3 的量，通常用至少大约 1 到大约 100ng/ml，优先选择大约 10 到大约 50ng/ml 足以支持增殖的 IL-11 的量，通常用至少大约 1 到大约 100ng/ml，优先选择大约 10 到大约 50ng/ml。足以支持增殖的 G-CSF 的量，通常用至少大约 1 到大约 1000ng/ml，优先选择大约 10 到大约 100ng/ml 的量。足以用于支持增殖的 GM-CSF 的量，通常用至少大约 1 到大约 100ng/ml，优先选择大约 10 到大约 100ng/ml 的量。当使用足以支持增殖的 EPO 的量，通常至少大约 1 到大约 30U/ml，优先选择大约 3 到大约 10U/ml。作为一个一般性的指导，细胞因子和生长因子的混合物将加强骨髓祖细胞的生长，而限制造血细胞的增殖。

[00134]在基础培养基上实行骨髓祖细胞的增殖，补充上述的细胞因子和生长因子的混合物，足以支持骨髓祖细胞的增殖。基础培养基将包括氨基酸，碳源（例如丙酮酸盐，葡萄糖）维生素，血清蛋白（例如白蛋白），无机盐，而价阳离子，抗生素，缓冲液和其他优选的能支持骨髓祖细胞增殖的确定的成分适合的基础培养基，例如但不仅限于此，RPMI 培养基，Iscove's 培养基，最少基本培养基，Dulbeccos Modified Eagles 培养基，和其他本领域已知的培养基。（见，如 U.S. Patent No. 6,733,746）。市售的基础培养基包括，举例但不限于，Stemline™ (Sigma Aldrich)，StemSpan™ (StemCell Technologies, 温哥华，加拿大)，Stempro™ (Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, 美国) HPGM™ ((Cambrex, Walkersville, MD, 美国)，QBSF™ (Quality Biological, Gaithersburg, MD, 美国)，

X-VIVO (Cambrex Corp., Walkersville, MD, 美国) 和 Mesencult™ (StemCell Technologies, 温哥华, 加拿大)。这些形式和其他培养基对于本领域中的技术人员来说很明显。

[00135] 细胞的最初群体与细胞因子和生长因子的混合物在基础培养基中接触, 培养用于增殖骨髓祖细胞的群体。增殖从大约 2 到大约 14 天, 优选的是大约 4 到大约 10 天, 更优选的是大约 4 到大约 8 天和/或者直到获得指示的倍数增殖和特征性的细胞群体。

[00136] 在一个实施方案中, 最终的细胞培养制备物以 CMP 细胞群体为特征至少被增殖了大约 0.5 倍, 大约 1 倍, 大约 5 倍, 大约 10 倍, 大约 20 倍, 或者优选的是至少大约 30 倍。在最终培养物中, 骨髓细胞群体中包含的 CMP 将占培养物中总细胞数量的至少大约 0.5%, 至少大约 1%, 至少大约 2%, 至少大约 5%, 至少大约 10%。

[00137] 在另外一个实施方案中, 最终细胞培养制备物以 GMP 细胞群体为特征被增殖了至少大约 10 倍, 大约 20 倍, 大约 40 倍, 优选的是至少大约 80 倍。在最终培养物中, 骨髓细胞群体包含的 GMP 将占培养物总细胞的至少大约 10%, 至少大约 20%, 至少大约 30% 和优选的是至少大约 50%。因此在优选的实施方案中, 被扩增的细胞群体优先富集 GMP 细胞。

[00138] 然而在进一步的实施方案中, 最终细胞培养制备物以 MEP 细胞群体为特征被扩增了至少大约 0.1 倍, 大约 1 倍, 大约 2 倍, 大约 5 倍, 优选的是大约 10 倍。在最终培养物中, 骨髓细胞群体中包含的 MEP 将至少占培养物中总细胞的至少大约 0.5%, 大约 1%, 大约 2%, 优选的是至少大约 5%。

[00139] 通常, 在最终培养物中以 HSC 为特征的细胞增殖将被限制到少于大约 25 倍, 优选的是少于大约 15 倍, 更优选的是少于大约 10 倍, 最优选的是少于大约 5 倍。通常, HSC 细胞的数量将少于培养物中骨髓祖细胞的总数 (例如, CMP, GMP 和 MEP)。

[00140] 尽管因为实际的原因而较少优选, 在一些情况下, 会采用更不确定的包括饲养细胞的培养基以接近发生造血作用的骨髓的微

环境骨髓基细胞, 内皮细胞和间叶细胞能产生支持发育的因子和在培养中维持造血细胞能用于骨髓祖细胞的增殖。也可以在营养细胞培养中添加上述的细胞因子和生长因子的混合物以促进细胞增殖和特异的骨髓祖细胞发育。基于营养细胞的培养在美国专利号 5,879,940 中有描述见 Dexter, T.M. 等, *J. Cell Physiol.* 91:335-344 (1976); Okubo, T. et. al., *Cell Structure and Function* 25:133-139 (2000); Shapiro, F. 等, *J Hematother* 5(6):655-62 (1996)); Coutinho, L. H. 等, "Clonal and long term bone marrow cultures using human bone marrow," in *Haematology: A Practical Approach*, Testa, N. G. 和 Molineux, G. eds., 牛津大学, 牛津, 英国 (1992); 引入的所有出版物用作参考)。通常是, 来自骨髓的单核细胞在合适的培养基中培养(例如 Iscove's Modified Dulbecco's Medium)直到基质细胞形成。培养物然后接受辐射并与用于增殖的细胞群体一起播种。

[00141] Feugier, P. 等, *J Hematother Stem Cell Res* 11 (1):127-38 (2002))描述了另外一种基于营养细胞培养物的方法。这种技术用永生化的骨髓内皮细胞修饰, 来表达足以支持 HSC 和/或祖细胞生长的细胞因子和生长因子, 将编码特异细胞因子和生长因子的重组表达载体导入到永生化的细胞系中, 培养细胞以产生能生成因子的内皮细胞层。细胞然后接受辐射并且培养物与用于增殖的细胞一起播种。通常 HSC 和祖细胞在这种培养条件下弱贴壁或者不贴壁, 这就允许增殖的细胞从内皮细胞中洗出来。为了其中所述的目的, 导入永生化细胞的细胞因子和生长因子的基因将反应足以支持定型的骨髓祖细胞增殖的组合。相应地, 在一个实施方案中, 细胞因子基因选自那些编码 IL-1 (例如 IL-1 β), IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF 或者 CM-CSF 的基因。相似的是, 生长因子基因选择那些编码 SCF, FL, TPO 和 EPO 的基因。

[00142]与上述相应的是, 在一个实施方案中, 将包含编码 SCF, FL 和 TPO 的表达载体导入营养细胞。在进一步的实施方案中包含编码另外的细胞因子, 包括 IL-3, IL-6 或者 IL-11 的基因或者及其组合的基因的表达载体与生长因子组合一起使用。因此在一个实施方案中导入

到营养细胞的基因编码 SCF, FL, TP0 和 IL-3。在进一步的实施方案中, 导入细胞的基因编码 SCF, FL, TP0 和 IL-6。在进一步的实施方案中基因编码 SCF, FL, TP0, IL-6 和 IL-11。选择表达细胞因子和生长因子形式的基因序列, 这些形式对用于增殖的细胞是有活性的, 因此将通常反应用于增殖的起始细胞的来源。例如, 如果祖细胞是人源的, 就用编码人形式的细胞因子的核苷酸序列, 当用于增殖的细胞是鼠源的, 则用编码鼠或者其他啮齿类形式的细胞因子的核苷酸序列。可以用的核苷酸序列包括那些本领域已知的编码重组形式或者突变体的序列。足以支持骨髓祖细胞增殖的各种其他的基因组合对于本领域的技术人员来说是明显的。

[00143] 用上述方法增殖的细胞不进行纯化可以使用, 或者用各种本领域已知的技术分离成不同的细胞群体, 例如免疫亲和层析免疫吸附, 流式细胞分选, 或者其他上述的过程。优选的是, 用 FACS 分选或者免疫吸附。例如, 一种 FACS 策略对于活细胞有初步选择作用, 这是基于特征性的前散光 (细胞大小) 和侧散光 (细胞密度) 参数, 对于骨髓祖细胞或者非骨髓细胞 (例如 Sca-1^{neg} c-kit^{hi}) 的第二种选择是细胞标志物的表达。

[00144] 分离的细胞群体可能包括分离的定型的骨髓祖细胞, 分离的 CMP, 分离的 GMP, 分离的 MEP, 正如这里描述的。在一些情况下分离的非骨髓细胞群体通过从增殖培养物种除去定型骨髓细胞来制备。分离的细胞基本上是纯的细胞群体, 通常有至少大约 50%, 优选的是至少大约 75-80%, 更优选的是至少大约 85-90%, 最优选的是至少大约 95% 的指明的细胞, 这些细胞有特征性的细胞标志物表型和分化潜能。

骨髓祖细胞的同种异体混合物

[00145] 正如上面所讨论的, 为了提供足够数量的细胞以用于治疗能生产商业上可行的临床产品, 细胞群体优选地是来自多个同种异体供体的同种异体骨髓祖细胞尽管存在对抗与受体 MHC 不匹配的治疗细胞的免疫反应的可能性目前的治疗旨在提供临时的保护, 这与通过

HSC 的造血作用的重建提供的更为永久的保护相反。

[00146]显著地，正如这里描述的，通过使用成熟淋巴细胞所没有的分离的定型的骨髓祖细胞大大减少了 GVHD 的可能性。在一个实施方案中，这是通过在治疗之前从增殖的细胞群体中除去这些细胞来实现的。在一个可替换的优选的实施方案中，这是通过从基本上纯的 CD34+ CD90+ HSC 细胞群体开始来实现的。

[00147] 同种异体细胞的混合物包括骨髓祖细胞的同种异体混合物分离的 CMP 混合物、分离的 GMP 混合物、分离的 MEP 混合物及其组合。对于移植受体的 MHC 来说，在混合物中的细胞可能是彻底匹配的异源，部分错配的同种异体或者彻底错配的同种异体细胞，可能来自相关的供体，通常是有同样父系等位基因的兄弟姐妹或者是不相关的供体。决定 MHC 错配的程度将用本领域中已知的标准测试。

[00148]例如，在人中至少有 6 种主要的 MHC 基因类别，在移植生物学种很重要。HLA-A, HLA-B, HLA-C 编码 HLA I 型蛋白质，而 HLA-DR, HLA-DQ, 和 HLA-DP 编码 HLA II 型蛋白质。这两类种的每一类基因是高度多态的，在人群种发现的大量的 HLA 等位基因或者突变体反映了这一情况。群体之间这些组的不同与对抗移植细胞的免疫反应的强度有关。确定 MHC 匹配程度的标准方法是检测在 HLA-B 和 HLA-DR，或者 HLA-A, HLA-B 和 HLA-DR 组内的等位基因。因此在 2 个或者 3 个 HLA 组内的测试分别由至少 4，优选地至少 6 个 MHC 抗原组成。

[00149]在血清学 MHC 测试中，抗每个 HLA 抗原类型的抗体与来自一个被测受试者（例如供体）的细胞反应来确定与抗体反应的一定 MHC 抗原的出现与否，这与其他被测受试者（例如受体）的反应谱相比较。抗体与 MHC 抗原的反应通常通过与细胞一起孵育抗体来确定，然后加入补充物来诱导细胞裂解（例如淋巴细胞毒性测试）根据在反应中裂解的细胞数量来测定反应和评级（Mickelson, E. 和 Petersdorf, E. W., Hematopoietic Cell Transplantation, Thomas, E. D. 等 eds., pg 28-37, Blackwell Scientific, Malden, MA (1999)。其他基于细胞的方法包括用标记的抗体的流式细胞术或者酶联免疫技术

(ELISA)。

[00150]确定 MHC 类型的分子方法通常使用合成的探针和/或者引物来检测编码 HLA 蛋白质的特异的基因序列，合成的寡核苷酸可以用于作为杂交探针来检测与特定 HLA 类型相关的限制性片段长度多态性 (Vaughn, R.W., *Methods in Molecular Biology: MHC Protocols* 210: 45-60 (2002))。或者，可以用引物以增殖 HLA 序列（例如通过聚合酶链式反应或者连接反应）其产物可以通过直接 DNA 测序，限制性片段长度多态性分析 (RFLP) 或者与一系列序列特异的寡核苷酸引物杂交来进一步检测 (SSOP)。(Petersdorf, E.W. 等, *Blood* 92(10): 3515-20 (1998); Morishima, Y. 等, *Blood* 99(11): 4200-6 (2002); 和 Middleton, D. 和 Williams, F., *Methods in Molecular Biology: MHC Protocols* 210: 67-112 (2002))。

[00151]“匹配的同种异体的”或者“不匹配的同种异源体”描述用于人 MHC 可以理解为对于各种动物物种的 MHC 进行相似的分析这些包括，举例但不仅限于此，小鼠，大鼠 (Gill, T.J. 等, *Transplant Proc.* 27(2): 1495-500 (1995))，奶牛 (Lewin, H.A. 等, *Immunol Rev.* 167: 145-58 (1999))，狗 (Wagner, J. L. 等, *J. Hered.* 90(1): 35-8 (1999))，猫 (O'Brien, S.J. 和 Yuhki, N., *Immunol Rev.* 167: 133-44 (1999))，猪 (Chardon, P. 等, *Genet Sel Evol.* 32(2): 109-28 (2000))，马 (Kydd, J. 等, *Vet Immunol Immunopathol.* 42(1): 3-60 (1994))，和灵长类 (Heise, E. R. 等, *Genetica* 73(1-2): 53-68 (1987))。

[00152]骨髓祖细胞的同种异体混合物可能在 MHC 上有各种程度的匹配，因此在一个实施方案中，临时输入和分化的祖细胞被从一个供体中分离出来，与用于提供更立即治疗益处的细胞相比，这个供体与受体在 MHC 上具有更高匹配程度。例如 CMP 可能来自一个与受体的 MHC 彻底或者部分匹配的供体，而 GMP 和 MEP 可能来自不匹配的供体。其他组合对于本领域中的技术人员来说是很明显的。

[00153]细胞的同种异体混合物可能用各种方式制备。在一个实施

方案中，细胞来自不同的供体并在培养基中增殖之前混合。在另外一个实施方案中，来自不同供体的骨髓祖细胞被分别增殖，在增殖之后混合以产生异源祖细胞的混合物。在另一方面，异源细胞的混合物通过从不同供体获得由骨髓祖细胞制备而来的未增殖细胞，在输入受体之前混合细胞。是否使用增殖的或者不增殖的细胞，这在这里的实施方案中有显示，异源的骨髓祖细胞在保护造血作用受损的哺乳动物受试者免受潜在致死的中性粒细胞减少症和/或者血小板减少症是有效的。

冻存骨髓祖细胞

[00154]令人奇怪的是，正像这里第一次显示的那样，这里描述的增殖的细胞群体能冻存以备将来使用并仍然能保持它们的功能。如上所述，在本领域中有很多培养基和方法用于冷冻细胞。通常细胞被浓缩，悬浮于加有冷冻保护剂和/或稳定剂培养基中，冷冻并保存在0℃或者零度以下。在有的实施方案中，细胞被保存在-70℃或者更低例如-80℃或者液氮中或者液氮的蒸汽相中。可以将细胞保存在本领域中已知的任何冷冻保护剂中。例如冷冻保护剂可以是二甲基亚砜（DMSO）或者甘油。在一些实施方案中，冷冻培养基包括大约5-10%的DMSO，10-90%血清白蛋白，和50-90%的培养基。在一些实施方案中，冻存培养基将包含7.5%的DMSO，大约42.5%的血清白蛋白，和大约50%的培养基。可以将细胞保存在本领域中已知的任何稳定剂中。例如，稳定剂可以是甲基纤维素或者血清。

[00155] 在冷冻之前，将细胞分到几个分开的容器中以创建细胞库。这些细胞可以保存在，例如玻璃或者塑料的小管或者试管或者袋子中。将来当需要使用细胞的时候，从细胞库中选择一部分冻存的细胞（来自一个或者多个容器）融解并使用。

治疗

[00156]用这里描述的方法制备的细胞用于治疗各种与疾病导致的造血缺陷有关的疾病或者骨髓破坏性治疗。这里使用的治疗指治疗或者预防疾病的处理或者对疾病，不适或者不想要的情况的抑制性措

施。治疗包括以合适的形式在疾病症状发生之前或者/和在临床表现或者疾病或情况的其他表现之后给予患者细胞来减少疾病的严重性，遏制疾病的发展或者消灭疾病。阻止疾病包括拖延或者推迟不适或者疾病症状的发生，优选的是在那些对该疾病有增加的易感性的患者。

[00157] 适合用这里描述的细胞治疗的病症包括中性粒细胞减少症，一种以循环的中性粒细胞减少位特征的病症和血小板减少症，一种以在外周血中有低于正常水平的血小板为特征的症状。这两种情况可能是获得性或者遗传性的疾病的结果。

[00158] 有缺陷的造血干细胞发育已知产生低的中性粒数量其中包括，网状细胞发育不全，Fanconis's 氏贫血，Chediak-Higashi 综合症和循环性中性粒细胞减少症。对于血小板减少症低的小血小板水平出现于，其中 Wiskott-Aldrich 综合症，半径减少的血小板减少症 (TAR)，系统性红斑狼疮。中性粒细胞减少症和血小板减少症的获得性形式发生于相似的情况下例如有血液系统恶性疾病、维生素缺乏、暴露于离子辐射、病毒感染（例如单核血球增多症，CMV, HIV, 等）、和各种细胞毒性药物处理后。

[00159] 为了本目的，可以预防性使用这些细胞来减少中性粒细胞减少症和血小板减少症的发生，和它们的相关并发症。尤其是减轻用骨髓破坏性试剂治疗的患者或者接受 HSCT 的患者种偶发性病原体的感染，在移植的情况下，骨髓细胞与干细胞移植同时使用或者移植后使用直到受体拥有 HSC 或者 HSC 开始恢复造血功能并足够提升中性粒和血小板的水平。骨髓祖细胞的输入增加了治疗患者体内的中性粒细胞和巨核细胞的数量。因此在中性粒细胞减少症和血小板减少症期间提供了临时但是需要的保护。骨髓祖细胞群体的使用，与更加分化的中性粒细胞和血小板相比，提供了持续的保护，因为骨髓祖细胞临时的输入和它们在体内的分化。

[00160] 进一步，包括 CMP, GMP, 和 MEP 混合物的细胞比任何一种单一细胞群体的输入能产生更广的治疗效果。这来自于在细胞群体中更加分化的祖细胞对中性粒细胞和/或者血小板水平产生的快速效

应，而更加原始的定型的骨髓祖细胞随着时间推移输入和发育，在分化的细胞变少后来提供需要的中性粒细胞和巨核细胞。用包括祖细胞混合物的细胞群体来输入可能对于已经患有中性粒细胞减少症和血小板减少症的患者来说是适合的，而输入分离的细胞群体可能适合于中性粒细胞和血小板水平还没有降到临界水平的患者的预防，需要指出的是治疗可能提供一个在外周血细胞数量或者 ANC 上能检测到的增加，这个增加并不是成功的暂时的输入或者效率的可靠的指示。因此其他测量方法，例如感染率减少和/或者生存率的增加可以用于确定治疗的效果。

[00161]达到治疗效果所需的细胞数量通过经验和为特定目的制定的传统程序来确定。通常，为治疗目的的细胞输入，给予药理上有效的细胞剂量。药理上有限的数量或者药理上有效的剂量是足以产生所需生理效应的数量，或者能达到所需结果的数量，特别是用于治疗不适或者疾病情况，包括减少或者消除一种或者多种症状或者不适或者疾病的表现作为例子，给患有中性粒细胞减少症的患者输入细胞不仅对当下面的情况被根除或者改善时提供治疗好处，而且对当患者报告与疾病相关的症状的严重性或者持续性减轻时也提供治疗好处。治疗好处还包括阻止或者减慢下列疾病或者不适的发展，不管改进是否实现。药理上有效的剂量，正如上面定义的那样，也将适用于与细胞一起用的化合物，这在下面会做进一步的描述。

[00162]用于输入的细胞包括增殖后没有纯化的细胞群体或者分离的细胞群体，这些群体具有确定的细胞标志物表型和特有的分化潜能，如上所述。增殖的细胞来自单一受试者而对于受体来说细胞是自体的或者异源的。相应地，在一个实施方案中，治疗细胞包括分离的定型的骨髓祖细胞。在另外一个实施方案中细胞包括分离的 CMP，分离的 GMP，分离的 MEP，或者其组合物。在其他实施方案中，用于输入的细胞包括如这里描述的那样制备的非骨髓细胞。

[00163]需要理解的是直接从供体受试者分离而没有在培养中增殖的细胞可以像增殖的细胞一样用于同样的治疗目的。优选的是分离

的细胞是基本上纯的细胞群体。这些未增殖的细胞可能是自体的，这里用于输入的细胞获得自受体，例如用细胞缓释剂处理之前。在另一个实施方案中，未增殖的细胞是受体的异源性细胞，这里细胞与受体的 MHC 具有彻底匹配或者部分匹配的或者完全不匹配。如上所述，分离的未增殖细胞优选地来自不同供体，以提供同种异体骨髓细胞的混合物。

[00164]将细胞移植到合适的宿主中通常本领域中通常使用的方法完成。优选的输入方法是静脉输入。输入细胞的数量将考虑的因素例如性别，年龄，体重，疾病或者不适的类型不适的阶段，需要的细胞在细胞群体中的比例（例如细胞群体的纯度）和能产生治疗好处所学的数量。通常输入的增殖后的细胞从每千克大约 1×10^4 到大约 1×10^5 个细胞，从每千克大约 1×10^5 到大约 10×10^6 个细胞，优选的是每千克体重 1×10^6 到大约 5×10^6 个细胞，或者需要的化更多。在一些实施方案中，细胞是在药理上可接受的载体中大约 1×10^9 到 5×10^9 个细胞。可以一次性输入细胞或者通过连续输入超过一个确定的时间段以产生治疗效果，当治疗涉及连续输入时可能会输入不同的细胞群体。一个在药理上可接受的载体，正如下面进一步描述的那样，可能被用于将细胞输入到患者体内。这些将通常包括，例如缓冲盐（例如磷酸缓冲盐）或者不加补充物的基本细胞培养基或者是本领域已知的其他培养基。

辅助治疗

[00165]可以用细胞，增殖的或者未增殖的进行很多辅助性治疗，如上所述。对于治疗中性粒细胞减少症和相关情况，增殖的细胞与其他试剂和化合物组合使用，这些试剂和化合物能够增强输入细胞的治疗效应或者由中性粒细胞减少症引起的治疗并发症，一方面，辅助治疗包括，其中，抗真菌药物，抗细菌药物，抗病毒药物。这些药物的使用也适用于血小板减少症，或者预防以减少感染的发生，或者对付即将发生的能导致血小板破坏的感染。

[00166]一方面，辅助性地给予的药物是抗真菌药物。真菌感染是患中性粒细胞减少症患者的主要死因之一，是接受骨髓破坏性治疗和

HSCT 的患者的显著问题。推迟输入的受体患有 GVHD 的患者通常中性粒细胞减少症延长。因此，真菌感染的风险很高。真菌感染的类型多变，其中包括，假丝酵母病（例如，克鲁斯假丝酵母、光滑假丝酵母、白色假丝酵母、热带假丝酵母）曲霉菌病（例如，烟曲霉菌、黄曲霉菌），毛霉菌病（例如 rhizobium、arrhizus、absidia corymbifera、rhizomucor pusillus），隐球菌病，荚膜组织胞浆菌和粗球孢子菌。

[00167] 用于辅助治疗的抗真菌药物通常是合成的抗真菌药物。这种类型的一个有用的抗真菌药物是来自多烯大环内酯物抗生素的两性霉素 B，各种形式的两性霉素 B 均可获得，包括与脱氧胆酸盐形成化合物，与胆甾醇磺酸盐形成的胶体状悬浮物，包裹在由大豆蛋黄素制成的脂质体中，胆固醇和 DSPG (distearoylphosphatidylglycerol)。本领域知道的其他形式。

[00168] 另一种抗真菌药物是氟胞嘧啶，是一种氟化嘌呤嘧啶。氟胞嘧啶被真菌脱氨产生 5-氟尿嘧啶，一种抗代谢和 DNA 合成移植剂。氟胞嘧啶通常用于感染隐球菌和假丝酵母尽管也单独使用，氟胞嘧啶通常用于与两性霉素 B 组合使用。

[00169] 咪唑类和三唑类代表了一个广范围的基于唑类的抗真菌药物。

据信咪唑和三唑类抑制固醇 14- β -去甲基酶，导致麦角固醇合成受损和基于细胞膜活性的紊乱，例如电荷转运。基于唑类的抗真菌能有效对抗特定类型的念球菌，例如白色假丝酵母，光滑念珠菌和新型假丝酵母。列举的适合系统给药的唑类抗真菌药物包括，其中，酮康唑、依他康唑、氟康唑、宜康唑、伏立康唑和特康唑。

[00170] 除真菌感染外，患有中性粒细胞减少症的患者也易患多种细菌病原体感染，接受骨髓破坏性治疗和 HSCT 的患者具有高细菌感染率，包括格兰氏阳性菌（例如链球菌和金黄色葡萄球菌和格兰氏阴性菌（例如大肠杆菌和假单胞菌）Septecemia 是一种常发生的情况。另外，输入推迟和对抗包裹的细菌的免疫反应的恢复受损例如肺炎链球菌或者嗜血杆菌流感增加了患有 GVHD 的移植受体的死亡率。

[00171]辅助性抗细菌治疗能用任何已知的适用于特定细菌病原体的抗生素。这些包括广谱抗生素和更加靶向性的抗菌化合物。各种类型的抗菌药物适合于增殖的祖细胞，包括，举例但不仅限于，喹诺酮类和氟喹诺酮类， β -内酰胺抗生素类、氨基糖苷类、四环素类、大环内酯类、和各种它们的 congeners。有代表性的喹诺酮类化合物包括环丙沙星、氧氟沙星、司帕沙星、洛美沙星、和莫西沙星。有代表性的 β -内酰胺抗生素包括青霉素（例如青霉素 G、青霉素 V）、氨苄青霉素、羧苄青霉素、甲氧西林，青霉烯类、和头孢霉素（例如，先锋霉素、头孢孟多、头孢克洛、头孢尼西、头孢替坦、头孢塞肟、头孢他啶、头孢唑肟、头孢吡肟）。有代表性的氨基糖苷类包括新霉素，链霉素，卡那霉素，庆大霉素，托普霉素，氨基丁卡霉素，乙基西梭霉素。有代表性的大环内酯物包含红霉素，克拉霉素和阿齐霉素。其他抗生素对于本领域中的技术人员来说是很明显的。

[00172]在重度骨髓抑制的患者和 HSCT 中病毒感染也是问题。通常，病毒感染危险增加来源于骨髓破坏性治疗带来的细胞介导的免疫受损，很多这样的感染由存在于血清阳性患者或来自血清阳性供体的细胞中的潜伏病毒激活引起。常见的病毒包括，其中巨细胞病毒，单纯疱疹病毒，带状疱疹病毒，疱疹病毒-6、埃-巴二氏病毒，腺病毒等。作为细胞输入的辅助治疗，选择的抗病毒化合物是那些适合于患者常见病毒的化合物。有用的抗病毒化合物包括，举例但不仅限于此如，无环鸟苷、西多福韦、更昔洛韦、碘苷、喷昔洛韦、缬更昔洛韦、伐昔洛韦、阿糖腺苷、金刚烷胺、金刚乙胺、扎那米韦、福米韦生、咪喹莫特、和利巴韦林。对抗反转录病毒的治疗法包括，其中核苷反转录酶抑制剂（例如齐多夫定、去羟肌苷、司他夫定、扎西他滨、lamivudine），非核苷反转录酶抑制剂（例如 nevirapine、efavirenz、delvirudine）和蛋白酶抑制剂（例如 saquinavir、茚地那韦、利托那韦、奈非那韦、安瑞那韦和利托那韦）。

[00173]抗真菌，抗细菌和抗病毒药物可以用做预防措施以减少感染的发生，或者在疾病出现时使用。预防通常用于免疫抑制患者中常

见的真菌感染和血清阳性患者中的病毒感染或者血清阳性移植供体。相应地，用于治疗目的的实施方案包括组合增殖的或者分离的骨髓祖细胞和抗真菌，抗细菌和抗病毒化合物。

[00174]血小板减少症和相关情况的另外一种辅助治疗包括输入血小板作为临时措施来恢复血小板数量到安全水平，输入进行到输入的细胞恢复血小板产生。

[00175]在进一步的实施方案中，辅助性给予的药物是细胞因子或者生长因子，这些因子能促进分化和终分化的骨髓细胞动员。尤其是粒细胞，巨噬细胞，巨核细胞和红细胞样细胞。为了增进粒细胞发育，可以用细胞因子 C-CSF 和 GM-CSF。G-CSF 能有效加速输入和 HSCT 中中性粒细胞的产生。在另外一个实施方案中细胞因子或者生长因子是促血小板生成素。输入 TPO 能促进移植祖细胞的输入和促进巨核细胞和血小板的发育 (Fox, N 等, J. Clin. Invest. 110: 389-394 (2002); Akahori, .H. 等, Stem Cells 14 (6): 678-689 (1996))。

[00176]多种载体和赋形剂给药途径可以用于辅助性治疗。这对于本领域中技术人员是明显的。代表性的公式化技术被教授，其中，治疗：药物科学和实践，第 19 版, Mack Publishing Co., Easton, PA (1995) 和药学赋形剂手册，第三版, Kibbe, A.H. ed., 华盛顿特区，美国药学会 (2000)；因此以它们的完全形式插入供参考。

[00177]药物成分通常包含一个药学上可接受的载体，一个药理上有效数量的化合物或者其混合物或者是它们合适的盐。药物成分的形式可以是粉末、颗粒溶液、混悬剂、气雾剂、固体、丸剂、片剂、胶囊、凝胶、局部用乳剂、栓剂、透皮的药膏和本领域已知的其他形式。

[00178]这里使用的药学上可接受的载体包括在形成药物成分中任何标准的为本领域中普通技术人员知道的药学上可接受的载体。因此，化合物从它们本身来说，例如作为药学上可接受的盐出现，或者作为耦合物，可以制备为药学上可接受的稀释药形式，例如，盐、磷酸盐缓冲液 (PBS)、无水乙醇、或者葡萄糖溶液、甘露醇、葡聚糖、丙二醇、油（例如植物油、动物油、合成油等），微晶纤维素、羟乙

基纤维素、羟丙基纤维素、甲基纤维素、硬酯酸镁、磷酸钙、胶、聚山梨醇酯 80 等在合适的赋形体中以油的形式。

[00179] 药物成份通常进一步包括一种或者多种缓冲液（例如中性缓冲盐或者磷酸缓冲盐），碳水化合物（例如，葡萄糖，甘露糖，蔗糖或者葡聚糖），甘露醇，蛋白质，多肽或者氨基酸，例如胍氨酸，抗氧化剂（例如抗坏血酸，焦亚硫酸钠，丁基羟基甲苯，丁基羟基苯甲醚等）抑菌剂，螯合剂例如 EDTA 或者谷胱甘肽，能形成等渗，低渗或者与受体血液微弱低渗的溶质、悬浮剂，增稠剂，保护剂，增味剂，甜味剂和合适的颜色成分。

[00180] 在成分中可能使用本领域中的普通技术人员已知的任何合适的载体。载体的类型通常依赖于输入的模式而变化。可以为任何合适的给药方式形成治疗成分例如包括，口，鼻，粘膜，直肠，阴道，局部，静脉，腹膜内的，皮层内的，皮下和肌肉注射。

[00181] 对于注射给药，可以将成分以可注射剂量的溶于生理上可接受的稀释液中的物质的溶液或者悬浮液与药物载体给药。载体可以是无菌液体例如无菌的自来水热源、油、盐、甘油、聚乙二醇或者乙醇。另外，辅助物质，例如加湿或者乳化剂、表面活性剂、pH 缓冲液物质等可以出现在成分里。药物组分的成分是那些石油、动物、蔬菜或者合成来源的，例如花生油的无水成分、大豆油、玉米油、棉籽油、油酸乙酯和十四烷酸异丙酯。

[00182] 这里描述的药物成分可能出现在单剂或者多剂容器中，例如密封的安瓶或者小管。这种容器通常用一些方法密封以保持无菌和制剂直到使用时稳定。通常，形成物可以以悬浮液或者溶液或者或者乳状液储存于油的或者无水的容器中，如上所述。或者，药物成分可以储存在冻干条件下，这样只需要在使用前加入无菌液体载体。在优选的实施方案中，提供的药物成分包括冻存于一个合适的冻存培养基中的患者增殖的骨髓祖细胞，如果需要输入患者体内则融解和悬浮细胞。

[00183] 输入宿主的数量依赖于给药的是什么，给药的目的，例如

预防或者治疗，宿主的状态，给药的方式，给药的数量、给药的间隔等因素而变动。这些可以由本领域中的技术人员根据经验确定。可能要根据治疗反应的程度做调整。确定合适的剂量需要考虑的因子包括，但不仅仅限于受试者的大小和体重，年龄和性别，症状的严重性，疾病的阶段，传递药物的方式，药物的半衰期和药物的有效性。要考虑的疾病的阶段包括疾病是极性的还是慢性的，复发还是缓和阶段和疾病的进程。

[00184]为治疗上有效的总量确定剂量和给药的时间是本领域中的普通人所熟练掌握的。例如，可以从细胞培养或者其他体外实验来估计起始有效剂量，在动物模型中建立了剂量以产生循环浓度或者组织浓度，包括用细胞培养实验确定的 IC_{50} 。

[00185]另外，通常通过细胞培养实验和/或者实验动物来确定毒性或者治疗效果通常通过确定 LD_{50} （被测群体 50% 的致死剂量）和 ED_{50} （对被测群体 50% 的治疗有效性），在标准的参考工作里可以发现指导，例如 Goodman & Gilman's 治疗的药理学基础，第十版。（Hardman, J.G. 等，eds.）McGraw-Hill，纽约，NY（2001）。

[00186] 这项发明的目的，选择给药的方法依赖于被治疗的情况，受试者抗体的形式和药物组成。很多途径可以做到治疗组分的输入，包括但不限于、皮下、静脉、腹腔内、肌肉和可能直接注射到特定的器官，例如，脾或者骨髓，尽管优选系统的注射。药物组分的输入可以通过单一途径，或者经常是多种途径。

[00187]可以每天输入成分一次，或每天几次，或者一天多次，这取决于，其中，治疗的迹象和开药方内科医生的判断。

试剂盒

[00188]这里描述的成分的其他实施方案是试剂盒，包括增殖或者/和分离的骨髓祖细胞，细胞因子和生长因子（例如，G-CSF，GM-CSF，TPO）和/或者辅助形的治疗化合物。试剂盒通常伴有商标，包括任何文字或者记录材料，可以是电子或者计算机可读形式的（例如，盘，光盘，记忆芯片或者磁带）提供了试剂盒内容使用的指导或者其他信

息。

实施例

实施例 1. 实验方法

[00188] 由小鼠制备 HSC 细胞。为了获得小鼠骨髓细胞,麻醉动物,取出股骨/胫骨,去除肌肉。用钵和杵将骨头研磨成浆,骨髓用尼龙筛过滤,然后用 1200 转/分钟离心 5 分钟。细胞悬浮于 1ml 的 ACK 溶液 (0.3M NH_4Cl , 0.2M KHCO_3 , MilliQ 过滤水) 中,冰上放置 3-4 分钟,然后加满染色介质 (包含 2% FCS 和 2mM EDTA 的 HANKs 盐缓冲液, w/o 钙, w/o 镁, w/o 酚红) 洗涤,离心、过滤细胞,悬浮于染色介质中,加入小鼠 IgG (1: 50 稀释 1mg/ml 储液, Sigma, St Louis MO)。冰上孵育 10-15 分钟后,与按照终体积为 100 μl 体积/小鼠染色介质中的 10 μl 体积/小鼠的 CD117 微珠 (Miltenyi Biotech, Auburn CA) 混合,冰上孵育 25 分钟。洗涤细胞,以每只小鼠 ~1ml 的终体积悬浮于染色介质中,然后通过尼龙筛子过滤。根据生产商的指导用预先设定的程序以 AutoMACs (Miltenyi, Auburn, CA) 富集细胞。

[00189] 富集后,细胞以 $1 \times 10^8/\text{ml}$ 悬浮于染色介质中,以合适的浓度加入下列直接缀合的抗体 (eBioscience, San Diego, CA) Sca-1 别藻蓝蛋白 (APC), c-kit R-藻红蛋白-cyanine 7 tandem (PE-Cy7), Thy-1.1 异硫氰酸荧光素 (FITC), 谱系 (CD3, CD4, CD5, CD8, B220, mac-1, Gr-1 和 Ter119) R-藻红蛋白 (PE)。

[00190] 冰上孵育细胞 25 分钟,洗涤,离心重新悬浮在染色介质中。加入碘化丙啶 (PI) 以排除死细胞。通过 FACS 分离小鼠 KTLS-HSC, $\text{c-kit}^{\text{high}}\text{Thy}^{\text{low}}\text{Sca-1}^{\text{pos}}\text{lineage}^{\text{neg}}$ 。

[00191] 细胞培养和增殖。从 BA (H2kb) 小鼠中筛选 $\text{Lin}^{\text{neg/Low}}$ KTLS-HSC, 并以每孔 500 μl 包含下列细胞因子和生长因子组合的无血清培养基: c-KitL, FL, TPO 和 IL-6 (X-Vivo15 基础培养基 (Cambrex Bioscience, MD); penstrep (100x), glutamax (100x), 2-mercaptoethanol ($5 \times 10^{-5}\text{M}$), c-KitL (50ng/ml), FL (30ng/ml),

TPO (5ng/ml), 和 IL-6 (10ng/ml) (Biosource, Camarillo, CA 和 R & D Systems, Minneapolis, MN)。将细胞以每孔 10000 个细胞种于 24 孔板中。培养细胞 7 天以获得 MP。(培养衍生的 MP), 在第二天每孔加 500ul 培养基, 第 4 天的时候用新鲜培养基置换一半的培养基。第 5 天, 细胞被转移到 6 孔板里, 加入 1ml 新鲜培养基。第 7 天, 收集培养的细胞取出两小份细胞分析。细胞等份与 30000 个珠子混合并染色以分析 MP (CMP/GMP/MEP) 和 HSC 含量。另外, 用苔盼兰染色并在血球计数板上计数。分析结果为计算增殖倍数和 HSC 和 MP (CMP/GMP/MEP) 总细胞数提供信息。

[00192] 分析体外培养物以确定骨髓细胞的类型。通过在 1ml 染色培养基 (SM) 中加入 4-5 滴珠子 (Spherotech, Libertyville, IL) 来制备 $6.7 \mu\text{M}$ 珠子的悬浮液。用血球计数板和苔盼兰 (1: 10 稀释) 对珠子计数。当使用该悬浮液历时多天时, 将珠子以每毫升 $>2 \times 10^6$ 个珠子/ml 的浓度储存并在使用前每天计数, 用移液器向每个孔中将要分析的细胞加入 20K 珠子。在将珠子加入孔前在每个样品之间涡旋珠子悬浮液, 如果孔要被分成多个样品, 例如 3 个样品, 加入合适数量的珠子 (即, 对于正常样品 = 60K/孔, $3 \times 20\text{K}$ 个珠子), 因此每个样品将大约有 20K 个珠子的终点量用于分析。

[00193] 用 IL7R 染色在增殖细胞群体中的小鼠 HSC。从每个孔中移出细胞, 洗涤, 然后转移到相应的圆锥形的 FACS 管中。每分钟 1100 转, 离心细胞 5 分钟, 除去上清。加入 50ul 的封闭抗体 (大鼠 IgG 和小鼠 IgG 1: 50), 孵育 10 分钟, 然后向每个管中加入 50-100 μl 的 CD117-生物素 (2 倍浓度的)。然后在冰上避光孵育 20 分钟, 用 2-3ml 的 SM 洗涤, 离心, 用 50-100ul 的下列合适浓度的抗体溶液重新悬浮 (eBioscience, 圣地亚哥, 加利福尼亚州) 链霉亲和素瀑布蓝 (Molecular Probes, Eugene, OR), Sca-1 别藻蓝蛋白 (APC), Thy-1.1 异硫氰酸荧光素 (FITC), IL-7RD R-藻红蛋白 (PE) 和 B220, Mac-1, GR-1 R-藻红蛋白-cyanine 7 tandem (PE-Cy7)。接着在冰上孵育 25 分钟, 洗涤细胞, 离心并在包含 PI 的染色培养基中悬浮。

用 FACS 分析细胞中的 HSC。

[00194] 染色增殖的细胞群体中的 mHSC, 不用 IL7R 染色。从每个孔中移出细胞, 洗涤然后转移到相应的圆锥形的 FACS 管中, 在 1100 转/分钟离心细胞 5 分钟, 除去上清。加入 50 μ l 封闭抗体 (大鼠 IgG 和小鼠 IgG 1: 50) 然后加入 50-100 μ l 抗体溶液, 用合适浓度的下列抗体 (eBioscience, San Diego, CA): Sca-1 别藻蓝蛋白 (APC), Thy-1.1 异硫氰酸荧光素 (FITC), c-kit 藻红蛋白-cyanine 7 tandem (PE-Cy7), B220, Mac-1, GR-1 R-藻红蛋白。接着冰上孵育 25 分钟, 洗涤细胞, 离心, 用包含 PI 的染色培养基悬浮。用 FACS 分析细胞中的 HSC。

[00195] 染色在培养增殖的细胞群体中的骨髓祖细胞: 用如上所述的染 HSC 细胞的方法制备细胞。在用 50u1 的封闭抗体孵育后 (大鼠 IgG 和小鼠 IgG 1: 50), 向每管中加入 50-100u1 的 CD-117 生物素 (2 倍浓度), 接着在冰上避光孵育 20 分钟。用 2-3ml SM 洗涤细胞, 离心, 然后用 50-100 μ l 的合适浓度的抗体溶液悬浮链霉亲和素瀑布蓝 (Molecular Probes, Eugene, OR), Sca-1 别藻蓝蛋白 (APC), CD34 异硫氰酸荧光素 (FITC), 2.4G2 (FcDR) R-藻红蛋白, 和 B220, Mac-1, GR-1 藻红蛋白-cyanine 7 tandem (PE-Cy7)。(eBioscience, San Diego, CA)。像 HSC 分析那样制备细胞进行 FACS 分析。

[00196] 染色培养的增殖的细胞以确定成熟的祖细胞群体亚组: 用如上所述的方法处理细胞。用封闭抗体孵育以后, 向每管中加入 50-100u1 的 CD3 生物素, CD4 生物素, 和 CD8 生物素 (2 倍浓度的) 在冰上避光孵育 20 分钟。用 2-3ml 染色培养基洗涤细胞, 离心然后用 50-100u1 抗体溶液悬浮细胞: 链霉亲和素瀑布蓝 (Molecular Probes, Eugene, OR), B220 (FITC), Ter119 R-藻红蛋白 (PE) 和 Mac-1, GR-1 R-藻红蛋白-cyanine 7 tandem (PE-Cy7) (eBioscience, San Diego, CA))。在冰上孵育 25 分钟后, 用如前所述的方法制备细胞做 FACS 分析。

[00197] 小鼠骨髓祖细胞分离-谱系排除。用上面所述的方法处理

股骨和胫骨，用 1ml 染色介质悬浮细胞。加入用于封闭的大鼠和小时免疫球蛋白 IgG (1: 50)，将混合物在冰上孵育 10-15 分钟，计数细胞并以每毫升染色介质中培养 10^8 个细胞，染色介质中具有预先确定稀释倍数的下列生物素标记的抗体：D3, CD4, CD5, CD8, CD 127, Ter119, Thy-1.1, 和 GR-1。在冰上孵育细胞 25 分钟，洗涤，离心，然后以每只小鼠 40ul 链霉生物素珠子的量悬浮细胞。(Miltenyi, Auburn, CA)。加入染色介质到终浓度到每只小鼠 100D1, 冰上孵育 20 分钟，洗涤细胞两次然后以每毫升染色介质含 10^8 个细胞悬浮细胞，然后通过尼龙膜过滤。用 AutoMacs (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) 排除谱系阳性细胞，因为每个生产商的说明书用敏感的排除方式。计数后，以每毫升包括适合浓度的下列抗体的染色介质中 1×10^8 个细胞悬浮细胞 streptavidin 藻红蛋白-cyanine 5 tandem (PE-Cy5), Sca-1 别藻蓝蛋白 (APC), CD34 异硫氰酸荧光素 (FITC), 2.4G2 R-藻红蛋白 (PE) 和 c-kit R-藻红蛋白-cyanine 7 tandem (PE-Cy7) (Pharmingen and eBioscience, San Diego, CA)。细胞与抗体在冰上孵育 25 分钟后洗涤，离心并用包含 PI 的染色介质悬浮。使用下列 FACS 分选策略：CMP 是基于 lineage^{neg/lo}c-kit^{pos}Sca-1^{neg}CD34^{pos}2.4G2^{low} 分选的；GMP 是基于 lineage^{neg/lo}c-kit^{pos}Sca-1^{neg}CD34^{pos}2.4G2^{pos} 分选的；和 MEP 是基于 lineage^{neg/lo}c-kit^{pos}Sca-1^{neg}CD34^{low}2.4G2^{low} 分选的。

[00198] 烟曲霉分生孢子的生长和嫁接和真菌负荷分析: 将冻存的孢子储备物中的一环孢子放在萨布罗葡萄糖琼脂 (SDA) 培养皿的中间，密封培养皿在 37℃ 孵育 2-3 天，定期检查任何污染的标志。2-3 天后在培养皿上形成一层黑色孢子。用 5ml 包含 0.05% Tween80 的 PBS 轻轻冲洗培养皿，轻轻刮培养皿直到孢子分散到溶液中。用无菌的金属网过滤分生孢子悬浮物制备孢子储备物以除去菌丝。溶液因为孢子而呈黑色。每毫升中能包括多达 10^8 个分生孢子。孢子种储存于 4℃。为了测定孢子滴度，在 SDA 培养皿上用 PBS/Tween80 进行系列稀释。过夜孵育之后，检查培养皿上的克隆数。为了长期保存孢子，一体积的收获的孢子储存物与一体积的 50% 甘油混合并储存于 -80℃。

[00199]用每毫升包含 1000 个分生孢子的孢子溶液将孢子注入小鼠（像在萨布罗葡萄糖琼脂培养皿上稀释一样）工作孢子溶液（100 μ l）通过尾静脉注射法注射到感兴趣的小鼠中，在预防研究中一般是在致死辐射和 HSC 和/或者 MP 重建后 8 天。给药后，100 μ l 小份的剩余孢子溶液被涂在萨布罗葡萄糖琼脂培养皿上，在 37℃ 下孵育。第二天计数克隆以证实在注射中有要求数量的活性分生孢子。

[00200] 真菌负荷分析。用吸入异氟烷麻醉后，通过尾静脉注射曲霉菌。处死小鼠收集肺供检查。在萨布罗葡聚糖琼脂培养皿上培养肺以检测真菌的生长。

[00201] 筛选重建的小鼠以确定供体细胞的存在。通过室温下在 0.5ml 5mM EDTA PBS 中收集大约 10-15 滴血以筛选用 mHSC 和/或 mMP 移植的小鼠的供体细胞群体，在 PBS 中加入 1 毫升葡聚糖 - 500，混合，并在 37℃ 孵育 30 - 45 分钟。大多数红细胞将沉淀下来，产生的上清液转移到新管中，用离心收集细胞（1000 转/分钟，5 分钟），红细胞用 1.0ml 的 1xACK 在冰上裂解 5 - 6 分钟，然后洗涤和在 1200 转/分钟离心 5 分钟。如果沉淀块仍然是红色的，重复洗涤步骤。在 50ul 管中用大鼠免疫球蛋白和小鼠免疫球蛋白（1: 50）在冰上封闭细胞 10-15 分钟。加入合适浓度的生物素标记的 Mac - 1 和 GR-1（eBioscience, San Diego, CA）在冰上避光孵育 20 分钟。洗涤细胞，在 1200 转/分钟离心 5 分钟。以合适的浓度加入下列抗体：链霉亲和素瀑布蓝（Molecular Probes, Eugene, OR），CD45.1 别藻蓝蛋白（APC），CD45.2 异硫氰酸荧光素（FITC），B220 R-藻红蛋白 cyanine tandem（PE-Cy7）和 CD3，CD4，CD8 R-藻红蛋白（PE）（eBioscience, San Diego, CA）在冰上孵育 25 分钟后，细胞经洗涤，离心，并用包含 PI 的 SM 悬浮。用 FACS 分析细胞。

[00202] 用 H2 标志物为供体细胞筛选重建小鼠。室温下大约 10 - 15 滴血被收集在 0.5ml 5mM EDTA 的 PBS 中，加入包含 1 毫升 2% 的葡聚糖 - 500（室温）的 PBS，混合物在 37℃ 孵育 30-45 分钟。大多数红细胞将固定下来。上清被转移到新管中，用离心收集细胞（1000 转

/分钟, 5 分钟)。用 1.0 毫升的 1xACK (0.3M NH_4Cl , 0.2M KHCO_3) 在冰上裂解红细胞 5-6 分钟, 洗涤并再 1200 转/分钟离心 5 分钟。如果沉淀块仍然是红色的, 重复第 4-5 步。在 50ul 管中用大鼠和小鼠免疫球蛋白 (1: 50) 冰上封闭抗体 10-15 分钟。细胞用下列抗体染色 20 分钟: Mac-1 和 GR-1 藻红蛋白-cyanine 7 tandem (PE-Cy7), B220 别藻蓝蛋白 (APC), CD3, CD4 和 CD8 生物素 (eBioscience, San Diego, CA)。

[00203] 另外的抗体用于标记 MHC 标志物决定于用于移植的配对使用的小鼠。H2Kd-PE (Ba1b/c) 和 H2Kb-FITC (C57/B6) 或 H2Db-PE (C57/B6) 和 H2Dk-Fitc (AKR)。1200 转/分钟离心 5 分钟制备细胞, 然后用链霉亲和素瀑布蓝 (Molecular Probes, Eugene, OR) 染色。在冰上孵育 20 分钟后, 细胞经洗涤, 1200 转/分钟离心 5 分钟, 然后用 PI 染色。用 FACS 分析细胞。

实施例 2. 离体冻存增殖的同种异体髓系祖细胞可保护白细胞降低症小鼠免受致死性真菌感染。

[00204] 本研究着眼于两方面: HSC (造血干细胞) 在离体条件下是否可以增殖产生大量功能性髓系祖细胞, 以及相比于从 BM (骨髓) 中分离的髓系祖细胞, 前者是否可以保护白细胞降低症小鼠免受致命真菌感染。同时, 研究证明了冻存髓系祖细胞活性不会丧失。

[00205] 规范的实验设计见图 1。图 1A 所示的是分离分析的细胞群, 不同的组合标志物区分造血干细胞 (HSC) 和祖细胞。以 CD117^+ , $\text{CD90.1}^{\text{lo}}$, $\text{Lin}^{\text{neg/lo}}$, Sca-1^+ 作为 HSC 组合标志物。 CD117^+ , $\text{Lin}^{\text{neg/lo}}$, $\text{Sca-1}^{\text{neg/lo}}$ 可作为混合髓系祖细胞群的标志物, 而 CD16/CD34 表达谱可区分其中的 CMP, GMP 和 MEP 亚群。图 1.B 所示的是由 HSC 培养产生髓系祖细胞。髓系祖细胞克隆 (MP) 可即时使用或冻存。图 1.C 所示的是使用髓系祖细胞保护白细胞减低症小鼠免受真菌感染。每组实验中使用不同的相关参数, 包括所用的克隆株, 感染真菌的时间和使用的细胞数。代表性实验采用 BALB/c 宿主小鼠和 C57BL/Ka MP 供体小鼠。

[00206] 小鼠: C57BL/6 Ka, Thy-1.1, CD45.2 小鼠由 Reasearch

Animal Facility of Stem Cell Inc, Palo Alto, CA 培育。BALB/c 小鼠购于 Charles River Laboratories。使用的供体小鼠和宿主小鼠分别是 6-8 周龄和 8-16 周龄。

[00207] Cs 辐射器辐射受体小鼠。辐射 BALB/c 宿主小鼠两次，间隔至少 3 小时，总剂量为 9.2 Gy。所有小鼠在辐射期间喂养酸化水，四周后，喂养抗体液（106 U/L 硫酸多粘菌素 B 和 1.1 g/L 硫酸锌霉素）以降低可能的感染。

[00208] 感染真菌。使用临床上隔离的烟曲霉感染小鼠 (BitMansour A, 等, 血液 100, 4660-4667)。烟曲霉种子沙氏葡萄糖琼脂 (BD Biosciences, Cockeysville, MD), 37°C 培养 48 小时以上。然后用 10ml PBS+0.05% Tween80 冲洗菌台收集分生孢子，温和地刮下孢子液并过滤去除菌丝，收集的孢子液置于 4°C。接着将孢子液梯度稀释铺板以鉴定孢子浓度。宿主小鼠尾静脉注射溶有 100-200 个烟曲霉分生孢子的盐水 150 μ l。

[00209] 流式细胞术。分别从股骨和胫骨提取骨髓，氯化铵裂解红细胞后收集 KTLS HSC。将制得的细胞悬浮液通过自动磁性细胞分选器和 CD117 微珠 (Miltenyi Biotec) 以收集 CD117⁺ 细胞。浓缩的细胞进行以下标记：CD117PE-Cy7 (2B8), CD90.1^{FITC} (HIS51), LinPE (CD3 (145-2C11)), CD4 (L3T4), CD5 (53-7.3), CD8 (53-6.7), CD19 (ID3), B220 (RA3-6B2), CD11b (M1/70), Gr-1 (8C5) TER119 (TER119), Sca-1APC (D7) (EBioscience, San Diego, CA)。然后用 Becton 和 Dickinson 的流式细胞分选术 (FACS Aria) 对 CD117⁺, CD90.1^{lo}, Lin^{neg/lo}, Sca-1⁺ 细胞进行双选 (分别保证产量和纯度)。从 CD90.2 种系 (如 BALB/c) 分离 CD90 染色阴性的 HSC 作为 KLS 细胞。

[00210] 骨髓衍生的髓系祖细胞，即 CMP, GMP 和 MEP 的混合亚细胞群，是从浓缩骨髓中的 CD117⁺ 细胞分选得到的 (如前所述)。标记这些细胞后，分选得到 CD117⁺, Lin^{neg/lo}, Sca-1^{neg} 阳性的细胞。

[00211] 组织培养。从骨髓中分离出 10,000 个 Lin^{neg/lo} KTLS HSC，铺于 24 孔板，加入 0.5 ml X-vivo15 (Cambrex)。其中含有 1% 青霉

素/链霉素 (Biosource), 1% 谷氨酰胺 (Invitrogen) 和 50ng/ml c-KitL, 5ng/ml Tpo, 10ng/ml IL-6 (Biosource), 30ng/ml Flt3L (R&D Systems)。所有生长因子都是鼠源重组产物。每隔一天添加培养基, 培养第 4 天更换一半的培养基, 并且将细胞另铺于一个六孔板。培养第 7 天体系体积可达到 2 ml, 细胞量达到 $2-7 \times 10^6$ 个。然后分析其中的成熟祖细胞 (方法如前所述), 这批细胞可即时使用或用含 7.5% DMSO, 42.5% FBS 和 50% Xvivo15 的溶液冻存。若选用冻存过的细胞, 则在注入辐射小鼠之前, 需要通过台盼蓝活细胞计数及流式细胞术对细胞进行质控, 以确保冻融过程不会影响祖细胞图谱。

[00212] HSC 离体增殖成为功能性髓系祖细胞。要实现临床治疗, 就需要大量的髓系祖细胞。高度纯化 KTLS HSC, 然后置于无血清 X-vivo15 培液中培养, HSC 同时添加生长因子。然后组合 KitL, Flt3L, Tpo 和 IL-6 诱导 HSC 快速增值和缓慢分化。经过一个周期 (一个星期), C57BL/Ka 衍生 HSC 细胞量平均增殖 500 倍。7 天末对细胞进行流式细胞术分析, 表明其中包含了一群重要细胞, 其细胞表面不仅带有 HSC 表型, 还带有多数的髓系祖细胞 (CMP, GMP 和 MEP) 表型 (如图 2 B)。图 2 B 所示的是 C57BL/Ka 衍生 HSC 细胞平均增殖的数量, 其它 HSC 细胞株 (AKR, FVB 和 SJL) 也有相似程度的增殖。移植实验显示培养 5 天的 HSC 在移植后仍大量存活; 但 C57BL/Ka HSC 培养 7 天移植后, 只有少量功能性 HSC 存活。

[00213] 带有 $CD117^+Lin^{neg/lo}$ 标志物的祖细胞亚群平均增殖的数量约是 KTLS-HSC 的 100 倍。与直接从骨髓中分离纯化的方法相比, 离体培养明显能得到更多的髓系祖细胞 (MP)。此外, 利用甲基纤维素平板培养单种细胞, 不同分子表型鉴定的祖细胞亚群具有预期的谱系分化潜能 (数据未提供)。

[00214] 除了已被确定的多种髓系祖细胞, 培养体系中还包含更分化的细胞, 如少量相对成熟的巨核细胞。如图 2A 所示, 大多数带有髓性来源特征的细胞, 并未达到终末分化, 仍保留着干细胞和祖细胞这类原始细胞的特征。图 2A 显示了培养 7 天的细胞经 MGG (伊红美蓝/

姬姆萨)染色制成免疫细胞化学离心涂片,可以看出大多数细胞未成熟,带有髓性特征,只有极少数量的相对成熟的巨核细胞。图 2B 显示了无血清培养基培养 7 天后由表面标记谱确定的 HSC 衍生的不同类型的祖细胞。

[00215] 离体增殖的髓系祖细胞保护同种异体的白细胞降低症小鼠免受致命曲霉的感染,骨髓来源的髓系祖细胞也有这个作用。这说明培养的髓系祖细胞在保护病理小鼠免受真菌感染方面与骨髓来源的髓系祖细胞相似。

[00216] 将经过致死性辐射的小鼠 (BALB/c, CD90.2, CD45.2, H-2^d) 进行重建,输入 200 个同系基因型的 BALB/c HSC (CD117⁺, Lin^{neg/lo}, Sca-1^{neg}, KLS) 和 8×10^4 个骨髓 MP (从 C57BL/Ka, H-2^b 骨髓中分选出的 CD117⁺, Lin^{neg/lo}, Sca-1^{neg} 细胞), 后者也可以替换成 5×10^5 个离体培养的 MP 细胞。7 天后,通过尾静脉注射,打入 150 个临床上分离的烟曲霉分生孢子来感染小鼠。设立重复组,每组 15 只小鼠 (数据未提供)。如图 3 汇总的数据显示,2/15 只辐射对照组小鼠存活时间超过 30 天,证明所使用的致死性辐射剂量较低。在第 0 天注射 200 KLS HSC 的辐射后小鼠 (HSC-拯救组) 可以被全部拯救,但注射 150A 烟曲霉分生孢子后,这些只有 17/44 只小鼠存活下来。与之相反,接受骨髓 MP 的小鼠面对真菌感染有 34/45 (76%) 的存活率;接受培养的衍生的 MP 细胞的小鼠面对真菌感染有 32/45 (71%) 的存活率。当与单独用造血干细胞的实验组相比时,统计学分析 (logrank) 的结果表明骨髓 MP 实验组 ($p < 0.0001$) 和培养的衍生的 MP 实验组 (p 值 = 0.0014) 有显著的保护作用。但在接受骨髓 MP 实验组和培养的衍生的 MP 实验组的 30 天存活率两者之间并无显著差异 ($p=0.5164$)。因此,离体增殖的髓系祖细胞和骨髓衍生的祖细胞都可以保护白细胞降低症小鼠免受致死性曲霉的感染。

[00217] 冻存的离体增殖的同种异体髓系祖细胞可保护白细胞降低症小鼠免受曲霉侵染。与输注成熟的粒细胞相比,髓系祖细胞的优势在于可以在使用前冻存。当需要时,冷冻 MP 细胞能够作为种子并且

解冻。

[00218] 本研究是基于使用标准化的鼠类 MP 真菌感染实验。标准实验设计如下：在补充有 KitL, Flt3L, Tpo 和 IL-6 的 Xvivo15 中培养 C57BL/Ka HSC 7 天。第 0 天，宿主小鼠 (BALB/c) 接受致死性辐射 ($2 \times 4.4\text{Gy}$, 分成每次 4 小时)，并在同一天注射 5×10^5 个来自培养物的 MP 细胞和 200 个 BALB/c 的 HSC (KLS)。第 7 天，静脉注射 150 个烟曲霉分生孢子。每天观察小鼠，并测定 30 天存活情况。

[00219] 这里提到的实验不同之处在于：(i) MP 在不同的环境中培养，(i i) 早期的培养物冷冻并保存于液氮中，(i i i) 将新鲜的 MP 和冷冻的 MP 进行比较，(iv) 在冷冻之前和解冻之后对 MP 的组合物进行流式细胞术分析。

[00220] 小鼠细胞可冷冻于无血清或有的混合含有血清的冻存培养基中。对于全部研究实验均使用含有血清的冻存培养基。含有血清的混合物：(总共 150 ml)，含 37.5 ml 血清和 22.5ml DMSO。

1. 沉淀细胞
2. 在无血清培养基 (IMDM 或 Xvivo) 中重新悬浮细胞
3. 准备装有冰和水的金属碗
4. 将装有悬浮细胞的试管插入冰水中，边从上慢慢滴加等体积的冻存混合液边温和地混匀。
5. 将混合物移至瓶中，置于 -80°C 过夜
6. 将瓶移至 -180°C 长期保存。

[00221] 解冻培养的小鼠细胞

1. 将瓶 (vial) 置于 37°C 水浴中，直到内容物大部分融解。细胞在无血清培养基 (IMDM 或 Xvivo) 中重新悬浮
2. 将细胞缓慢移至含有 DNase 的瓶中，取出少量对初始瓶中的细胞量进行计数。
3. 逐滴加入 10ml 培养基 (IMDM/DMEM+10% NCS)，并小心振荡摇动管以使培养基和细胞缓慢混合。
4. 将细胞离心下去，将细胞重悬于染色培养基 (HBSS/2%NCS) 中。

5. 计数。

[00222]

12/1/2004	第 14 天,分选 BSBA HSC 到起始 MP 培养物中(冷冻的 MP)
12/8/2004	第 7 天,收集 MP,通过流式分析细胞并且冷冻细胞(将 CD117+细胞铺在 MCM/Terasaki 平板中)
12/9/2004	第 14 天,分选 BSBA HSC 到起始 MP 培养物中(新鲜的 MP)
12/16/2004	第 0 天,分选 BALB/c HSC,收集 MP 培养物,辐射 65 只 BALB/c 小鼠并且用 MP(冷冻的或者新鲜的)和 HSC 注射 60 只 BALB/c 小鼠
12/23/2004	第 7 天,用烟曲霉真菌的 150 个分生孢子注射 50 只重建的小鼠
	第 5 天到第 30 天,每天记录存活和死亡的小鼠
2005	在第 4 周开始检测小鼠的重建水平

组	n	HSC	MP	生长因子	真菌(分生孢子)	天
G1: 新鲜的 MP	15	200	新鲜的, 500000	无	150	7
G2: 冷冻的 11/29 的 MP	15	200	冷冻的, 500000	无	150	7
G3: 冷冻的 12/8 的 MP	15	200	冷冻的, 500000	无	150	7
G4: 无 MP	10	200	0	无	150	7
G5: 辐射对照	5		0	无		7
总共	60	11000	3*7500000	无	8250	

[00223] MP 培养。从带 CD117- 标记的 BS 中分选出带 CD117⁺CD90.1^{low} Lin^{neg/low} Sca-1⁺标志物的 HSC。HSC 分离直接通过 c-kit 微珠分离。采集股骨和胫骨, 去除肌肉组织。用研磨棒和研钵捣碎, 尼龙膜过滤, 每管 5 只鼠的量(10 条腿骨和 10 只手臂)。1200rpm 离心 5 分钟。在冰上用 1mlACK 重悬细胞~ 3-4 分钟。用染色培养基冲洗。离心。计数。用约~ 50-60 μ l 染色培养基重悬细胞, 过滤, 洗

涤管顶，过滤得到 40-50ul，加入兔 IgG (1: 50)+鼠 IgG (1: 50) 保持 10-15 分钟。去掉 10ulBM，进行染色。每只鼠的量加入 10 μ l 鼠 anti c-kit 微珠 (CD117)，(lot# 5040428046)。注意：如果有肱骨，则对应 12 μ l 微珠/鼠的量。在冰上孵育 25 分钟。洗涤两次。重悬细胞，并经尼龙膜过滤，终体积约为 ~ 0.5-1.0 ml/ 鼠，洗涤管顶过滤又得到 0.5ml。用自动磁性细胞分选器浓缩细胞。另外也可以将 3-4ml 的染色培养基过 Midi 柱来浓缩。经尼龙过滤网过滤后上柱。重复过柱三次，(柱体积不能超过 10 只鼠的量)。用 5-10ml 染色培养基洗柱。用磁铁分开柱与细胞，重复两次。(注意：10 只鼠相当于 midi，五只鼠相当于 mini)。计数。离心。以 1×10^8 个细胞/ml 将细胞悬浮于含抗体的染色培养基中。

[00224]

抗体	Lot #	滴度	
c-kit (2B8) 生物素	E000225	1: 400	Ore-kit
(2B8) PE-Cy7	E009158	1: 400	
Sca-1 APC	E007871	1: 200	
Thy-1.1 FITC	E008124	1: 400	
谱系 PE:			
Ter 119	E005015	1: 400	
CD3	E009288	1: 100	
CD5	E004526	1: 1600	
CD8	E009271	1: 200	
B220	E007026	1: 800	
CD4	E008789	1: 3200	
Mac-1	E005858	1: 6400	
GR-1	E008723	1: 3200	

[00225] 冰上孵育 25 分钟，洗涤，离心。若使用 c-kit bio，细胞悬浮于 SM (1×10^8 个细胞/ml)。在冰上用 streptavidin Cy7-PE (Lot # E006330) 1: 800 染色 25 分钟，洗涤，离心，悬浮于染色培养

基中已加 PI (1:1000)。流式细胞分选前先过滤。根据颜色选择管子。

[00226]

抗体	Lot #	滴度
B220 -PE Cy7	E009142	1:400
B220-Bio	E004692	1:800
Cascade-Blue	65A1-1	1:400
B220-PE	E007026	1:400
B220-FITC	E005965	1:200
B220-APC	E011511	1:200
B220-Cy5PE	E004592	1:800
PI		1:1000
无染色		

[00227] BM 完全染色：离心细胞。悬浮于 100 μ l SM 中(已加抗体)。冰上孵育 25 分钟。洗涤，离心。（若使用 2B8-biotin，则悬浮于 100 μ l (10^7 个细胞 / 100 μ l)，并用 streptavidin Cy7-PE 1:800 冰上染色 25 分钟）。洗涤，离心，重悬于 SM(以 1:1000 加入 P1)，流式细胞分选前过滤。

[00228] 大约 3×10^4 个 HSC 用于培养产生 MP。以含有 Xvivo15+2ME+Pen/Strep+50ng/ml KitL+30ng/ml Flt3L+5ng/ml Tpo+10ng/ml IL-6 的培养基培养 7 天，具体如下。

[00229]大规模培养 HSC 得到髓系祖细胞：从骨髓中提取 Lin^{neg/low} KTLS-HSC，铺于有 Xvivo15 的孔中，每孔 500 μ l。Xvivo15 中另加 Pen/Strep，谷氨酰胺(Glutamax)， β -巯基乙醇以及 KitL, Flt-3L, Tpo, IL-6。细胞培养 7 天，收集 MP_c(培养得到的 MP)。C57BL/Ka 细胞的增殖程度比总增殖程度高 200-700 倍，其中 10-35%的细胞带有 CD117⁺Lin⁻标记。分离细胞两次，第一次注重产量，第二次注重纯度。从 100000 个细胞中分选，最初可以得到约 300000 个细胞。在 24 孔板中，10000 个 KTLS-HSC 直接从 500 μ l 培养基中分离。无菌水添加到

板上外围的孔中以防止过度蒸发。第二天, 每孔加入 2, 500 μ l 的新鲜培养基。第 4 天, 吸去一半的培养基(500 μ l) (用移液枪从上端吸, 避免吸走细胞)。悬浮细胞(用 P1000 上下吹打), 然后移至六孔板, 孔中含有 500 μ l 新鲜培养液。之前的孔用 500 μ l 新鲜培养基冲洗并移至对应的同一孔。总体积达到 1.5ml 每孔。忽略仍遗留的细胞。第六天, 添加 500 μ l 新鲜培养基。第 7 天, 收集细胞分析。另外, 细胞用台盼蓝染色后用血细胞计数计计数, 以估计增殖倍数和 HSC, MP (CMP/GMP/MEP) 细胞的总数量。

[00230] 细胞增殖 HSC 中使用的试剂: X-vivo15 (Cambrex Bioscience 04-744Q), 并添加青霉素/链霉素 (100x) Biosource International Inc, 谷氨酰胺(100x) Invitrogen, β -巯基乙醇(1000x) Sigma Aldrich Fluka 公司, 生长因子。

[00231] 培养 100,000 个细胞(500ul/孔)使用的培养基的配方是: 5ml 完全 Xvivo 工作液, 5 μ l IL6, 2.5 μ l TPO, 10 μ l KiiL, 6 μ l Flt3L。100ml 完全 Xvivo 工作液中包含 100 μ l β -巯基乙醇, 1ML Pen/Strep, 1ML 谷氨酰胺。

[00232] 培养 7 天, 收集细胞并计数。简述如下: 在 1ml 染色培养基(SM)中加入 4-5 个 spherotck (6.7uM) 珠分析 HSC/MP。珠与台盼蓝 1:10 稀释, 用血球计数计计数。珠必须达到一定浓度(大于 2×10^6 珠/ml)。分析前对珠计数。每个样本加入 30000 个珠。移小量的细胞到分析管。用 rIgG (1:50) 和 mIgG (1:50) 在冰上封闭 10min。装 MP 的管中加入 CD117-BIOTIN (1:200)。在冰上避光孵育 20 分钟。准备 HSC 和 MP 各自的抗体混合液。HSC 的抗体混合液是: Ckit cy7-pE 于 1:400, Sca-1 APC 于 1:200, Thy-1.1 FITC 于 1:200, B220 PE 于 1:800, Mac-1 PE 于 1:800 和 GR-1 PE 于 1:800。MP 的抗体混合液是: SA-cascade blue 于 1:400, Sca-1 APC 于 1:200, CD34 FITC 于 1:25, 2.4G2 于 1:50, B220 Cy7-PE 于 1:800, GR-1 Cy7-PE 于 1:800。用 2ml sm 洗涤管子, 1100rpm 离心 5 分钟。管子与抗体混合液在冰上避光孵育 20 分钟。重复洗涤和离心。用 PI 培养基悬浮细胞 (PI 培养基

(1:1000) 10ml 种子液: 10 μ l PI 10ml sm)。

[00233] 简言之, 流式细胞术分析 HSC, CMP, GMP, MEP 和更多的成熟细胞(CD11b⁺, Gr-1⁺, Ter119⁺)。制作细胞离心涂片, 用 MGG 染色。注射需要大约 $3 \times 7.5 \times 10^7$ 的培养细胞, 包括新鲜的 (1x) 和冻存的 (2x)。

[00234] 冰冻 MP。MP 由 HSC 培养而来。冰冻之前用流式细胞仪分析。另外, 带单一 CD117⁺Lin⁻标志物的细胞铺于 Terasaki 板, 用前述的 MP 培养基(Xvivo+KitL, Flt3L, TPO 和 IL-6)。一周后确认细胞形成集落的比率。冰冻细胞的步骤如下: 细胞在冻存培养基中冷冻, 该培养基不含血清或含有混合物的血清。本实验中使用的是含血清的冻存培养基。配方是: (共 159ml) 37.5ml 血清, 90ml 羟乙基淀粉, 22.5ml DMSO。将细胞团聚后再悬浮于无血清培养基(IMDM 或者 Xvivo)中。准备一金属器具装上冰水。将装有悬浮细胞的管子置于冰水中, 从上缓慢滴加等体积的冻存培养基, 同时温和混匀。将混合物移入小瓶中, -80℃过夜。之后放入-180℃长期保存。

[00235] 解冻 MP。解冻 MP 如下: 将储藏瓶置于 37℃水浴中, 直到内容物基本融解。细胞在无血清培养基(IMDM 或 Xvivo)中重新悬浮。将细胞缓慢移至有 DNase 的瓶中, 取出少量计数。逐滴加入 10ml 培养基(IMDM/DMEM+10% NCS), 并小心振荡混匀。约以 1ml/分钟的速度滴加。离心取下层, 将细胞重悬于染色培养基(HBSS/2%NCS)中。将“静息”细胞置于室温半小时。对染色细胞或板上细胞计数。

[00236] 本实验中, 解冻的细胞放置约 1h, 然后用 (i) 台盼蓝/血球计数计和(ii)P1 流式细胞仪来评价其细胞活性。另外, CD117⁺Lin⁻MPc 铺板培养。

[00237] 分离 BALB/c HSC。从 5 只 BALB/c 小鼠中提取 CD117⁺Lin^{neg/low}Sca-1^{pos} HSC。实验需要 10,000 个 HSC(每个宿主小鼠需要 200 个 HSC)。分离的 5 BALB/c HSC 和培养的 BS 混合培养。直到 BA MP 达到理想比率, 输入辐射的 5 BALB/c 的小鼠。

[00238] 真菌注射。第 7 天, 小鼠尾静脉注射 150 个烟曲霉分生

孢子，注射前用沙氏葡萄糖琼脂来确定活孢子数。同时确定孢子的浓度。每只小鼠注射 $150\ \mu\text{l}$ 的注射液（无菌 $1\times\text{PBS}+0.05\%\text{tween}+\text{分生孢子}$ ）。注射液置于冰上，注射前漩涡振荡。用注射器往 SDA 板注入 $150\ \mu\text{l}$ ， 37°C 孵育。第二天，计数集落数以确定注射的分生孢子数。

[00239] 如上所述，将 HSC 铺板培养，证实培养的髓系祖细胞能保护白细胞降低症小鼠免受烟曲霉侵染。7 天后，收集细胞并进行流式细胞术分析。然后将细胞冻存在液氮气相，如前所述。至少在 7 天后，用 37°C 水浴将冻存瓶快速解冻，用培养基洗涤两次。一部分用于流式细胞术分析，一部分输入辐射的同种异体的宿主小鼠体内。图 4A 比较了新鲜 MP 和冻存过的 MP 输入病理小鼠体内后小鼠的生存相关数据。辐射后的小鼠在 7 天后输入 200 个同系基因型 HSC 和 500000 同源异种的培养 MP 重塑。这里可以用新鲜 MP 或已冻存过的 MP。4 个实验组（每组 15 只小鼠），在接受 500000 新鲜 MP 细胞和只接受 HSC 之间，其生存效果具有显著差异（ $p=0.009$, $t\text{-test}$ ）。在另外 3 个实验组中（每组 15 只小鼠），使用 500,000 冻存过的 MP，和 HSC 组相比，结论也是如此（ $p=0.0329$ ）。而在新鲜 MP 组和冻存过的 MP 组之间没有显著差异（ $p=0.7205$ ），并且两个 HSC 组之间没有显著差异（ $p=0.5058$ ）。图 4B 比较了冷冻前和解冻后 MP 细胞 CD117 Lin 染色谱，结果显示冷冻解冻过程并不影响 CD117 和 Lin 染色谱。通过分析其标志物也可以得到这个结果（数据未提供）。

[00240] 髓系祖细胞重建通常导致短期移植。图 5 显示的是将培养 5 天（ 2.25×10^5 个细胞/鼠）或培养 7 天（ 8×10^5 个细胞/鼠）或直接从骨髓中提取的髓系祖细胞（ 4×10^4 个细胞/鼠）输入小鼠体内，四周后外周血中同系基因型 MP 的水平即移植水平。如图 5 所示，饲养小鼠一月后，只有极少 MP 衍生细胞（5%）存留在循环血液中。MP 衍生细胞逐渐消失，8 周后比 4 周后更少（数据未提供）。存留的细胞大部分是 B 淋巴细胞。相比之下，将 HSC 在诱导产生 MP 的环境下培养 5 天再移植，则在重塑形式上表现出巨大差异。在这种情况下，培养 4 周，大多数循环细胞是 MP 衍生细胞，其中包括三种髓系祖细胞，骨髓

样细胞，B细胞和T细胞，因此可以说功能性HSC成功重塑移植体。8周后，MP衍生细胞的数量还是显著下降，表明移植的HSC主受制于ST-HSC。培养8天的细胞，与纯化的髓系祖细胞相似，表现出移植效应。只能看到极少的MP衍生细胞，大多数是生存期较长的B细胞。因此，供体小鼠来源的细胞的数量和类型与培养时间相关，并且培养7天会使后面输入宿主小鼠8周后，只能检测到极少的MP衍生细胞。

[00241] 图6显示了培养的髓系祖细胞剂量反应的保护作用。结合10个独立的实验提供的数据。总细胞数量（图6A）或者MP中的CD117⁺Lin⁻细胞（图6B）作为剂量作图。相关实验如图5。BALB/c小鼠接受致死性辐射，并在感染烟曲霉分生孢子7天后，输入BALB/cHSC和C57BL/Ka MP。

[00242] 培养的髓系祖细胞很快具有有效的保护作用。图7显示了15个独立的实验组在接受了致死性辐射后用200个同型基因型HSC和250000或者500000个培养MP重塑，然后分别在不同的时间点注射真菌，得到一批生存数据，并将其整理。图7显示受体小鼠在接受辐射后的最初两天是能够抵抗真菌感染。到第三天，小鼠则对其感染完全敏感。

[00243] 混合的同种异体髓系祖细胞。该实验是用于确定混合的同种异体MP(i)与单独的供体MP(ii)对受体小鼠最有相同程度的保护作用。该实验证实了混合的MP以及冻存的部分具有相关的临床的治疗价值。

[00244] 本研究基于标准的MP真菌实验。标准的设计是用Xvivo15工作液（包含KitL, Flt3L, Tpo和IL-6）培养C57BL/Ka HSC7天。第0天宿主小鼠（BALB/c）接受致死性辐射（2x4.4Gy, 每次4h），并在同一天输入 5×10^5 个培养的MP细胞和200 BALB/c HSC(KLS)。第7天，静脉注射150个烟曲霉分生孢子到小鼠体内。每天观察小鼠状况，并记录30天存活情况。

[00245] 在此提及的实验与之前的不同之处在于：(i)从BS中分

选 HSC 并加以培养。选择 BA, AKR, FVB 和 SJL 小鼠, (ii) 这里已给出减少的 MP 的数量, (iii) 辐射后, 短期内快速注射真菌。

1/6/2005	第 7 天, 分选 BSBA AKR, FVB 和 SJL HSC 以开始 4 个分开的 MP 培养
1/13/2005	第 0 天, 分选 BALB/c HSC, 收集 MP 培养物, 辐射 51 只 BALB/c 小鼠, 并且用 MP 和/或 HSC 注射 45BALB/c 小鼠。
1/20/2005	第 7 天, 用 200 个烟曲霉分生孢子注射 45 只重建的小鼠。
1/21/2004 到 2/13/2005	第 8 天到第 30 天, 每天记录存活的和死亡的小鼠
2005	在第 4 周开始检测小鼠的重建水平

组	n	HSC	MP	生长因子	真菌	天
HSC 无 MP	15	200	0	无	200 个分生孢子	7
BS. BA MP	15	200	500000	无	200 个分生孢子	7
混合的 MP	15	200	125000	无	200 个分生孢子	7
辐射对照	5	0	无	无	0	n/a
总共	60	9000	1875000	无	9000	

[00246] 宿主: BALB/c, H-2^d, CD90.2, CD45.2 (Charles Rivers Laboratories)。需要约 56 只小鼠, 其中有 51 只宿主小鼠和 5 只 HSC 供体小鼠。MP 的株系有: C57BL/Ka, H-2^b, CD90.1, CD45.1 (BS. BA, bred in house); MPc AKR, H-2^k, CD90.1, CD45.2 (CRL); MPc SJL, H-2^s, CD90.2, CD45.1 (CRL); MPc FVB, H-2^q, CD90.1, CD45.2 (CRL)。每个株系大约要 5-10 只小鼠, 才足以产生的 $8-10 \times 10^4$ 个 HSC, 另外需要更多的 BS. BA 细胞。

[00247] MP 培养。从浓缩了 CD117-标志细胞的 BS. BA 中分选 CD117⁺CD90.1^{low}Lin^{neg/low}Sca-1⁺ HSC。使用的如前所述的 AKR, FVB 骨髓。SJL HSC 细胞是带有 CD117⁺Lin^{neg/low}Sca-1⁺标志物的细胞。大约需要 3×10^4 HSC 细胞培养 MP。细胞置于特定的培养基 (Xvivo15 + 2ME +

Pen/Strep + 50ng/ml KitL+30ng / ml Flt3L +5ng/ml Tpo + 10ng/ml IL-6) 中培养 7 天, 如前所述。7 天后, 收集细胞并计数。取部分细胞进行分析, 如流式细胞术确认 HSC, CMP, GMP, MEP 和其他成熟细胞 ($CD11b^+$, $Gr-1^+$, $Ter119^+$)。制备细胞离心涂片, 用 MGG 染色。细胞注射量大约需要 1.5×10^7 个。剩余的细胞冻存起来, 以备将来使用。

[00248] 分选 BALB/c HSC。从 5BALB/c 小鼠体内分选带有 $CD117^+Lin^{neg/low}Sca-1^{pos}$ 标志物的 HSC。至少需要 10,000 个 HSC, 每个受体小鼠需要 200 个 HSC。分选出的 BALB/c HSC 与培养得到的 BS 混合在一起。BA MP 保持在理想的比率, 用于注射辐射 BALB/c 小鼠。

[00249] 真菌注射。通过尾静脉注射向小鼠体内导入 150 个烟曲霉分生孢子, 如前所述。注射的方式和前面不同。通常是第 7 天, 但这里选择第 4 天感染小鼠。其它过程, 包括用沙氏葡萄糖琼脂来确定注射的分生孢子数量, 剩余照旧。

[00250] 图 8 显示混合的同种异体的培养 MP 对白细胞降低症小鼠的保护效果。实验中使用的 4 个株系的 MP 细胞, 它们的主要抗原和次要抗原不同。解冻的 3 个株系 (C57BL/Ka, AKR 和 FVB) 混合, 一半的细胞量就能起到保护的作用, 但重建效果不持久 (数据未提供)。

[00251] 各种同种异体培养来源的祖细胞具有防辐射的功能。本实验是用 AKR MP 供体和 C57/B6Ka 受体。可以直接从骨髓中提取 MP, 也可以从培养体系中提取 HSC。在 X-Vivo 培养基中培养 7 天, 培养基中是含有 KitL, Flt3L, TPO 和 IL-6。之后, 用流式细胞术确定其 $c-kit^+$ 祖细胞的比率。用于移植的量需要达到 200000 或 500000 个 $c-kit^+$ lineage-细胞。图 9A 显示的是辐射小鼠移植 MHC 不同的同种异体 MP 后 30 天的辐射防护数据。并未检测到存活的小鼠出现供体嵌合状态 (图 9B)。

[00252] 新鲜的和冻存祖细胞系比较辐射防护能力比较。使用 AKR MP 供体和 C57/B6Ka 受体, MP 来源与离体培养的 HSC。将 MP 置于 X-Vivo 培养基培养 7 天, 培养基中同时含有 KitL, Flt3L, TPO 和 IL-6。之后, 收集细胞并用流式细胞术分析其 $c-kit^+$ 祖细胞的比率。输入小鼠体内

的细胞可以是新鲜的也可以是冻存过的。移植的细胞量要达到 200000 个 c-kit+lineage-细胞。图 10 显示辐射小鼠移植 MHC 不同的同种异体 MP 后 30 天的辐射防护数据。冻存过的 MP 和收获时的 MP 可以达到同样的防护效果。

实施例 3 在培养瓶或者袋中骨髓祖细胞从人造血干细胞的起始。

[00253]人 hpHSC (来自动员外周血(MPB)的 CD34+CD90+ 细胞) 取自健康的志愿者。用 Baxter Isolex 从 MPB 中富集 CD34+细胞。CD34 富集的细胞用改良的常规的 BD FACS aria 的 Dakocytomation MoFlo 进一步染色和分选以获得 CD34+CD90+ 细胞 (“hpHSC”)。使用的细胞可以是新鲜的或者冻存后的, 或者是经 Isolex CD34 富集的或者在 MoFlo 上经 CD34+CD90+筛选。

[00254]人细胞冷冻。细胞可以被冷冻在冻存培养基中即无血清或者包含血清的混合物。对于所有研究实验, 我们用包含血清的冻存培养基。包含血清的混合物: (共 150 毫升)。37.5 毫升血清, 90 毫升羟乙基淀粉, 22.5 毫升 DMSO。沉淀细胞并用无血清培养基(IMDM or Xvivo)悬浮细胞。准备一个盛有冰水混合物的金属碗。将装有悬浮细胞的管子放在冰水里, 缓慢从悬浮细胞上方滴入等体积的冻存混合物, 同时轻轻混合管子。吸出管中的混合物冰将冷冻装置置于-80 度过夜, 并将管转移到-180 度长期保存。

[00255]人细胞的融化。在 37℃ 水浴中温热管子, 直到管子里的内容物大部分融化。用无血清培养基 (IMDM or Xvivo) 悬浮细胞。缓慢吸出小管中的细胞包括 DNase 取出一小份来做起始细胞计数。向细胞中逐滴加入 10 毫升培养基(IMDM/DMEM etc with 10% NCS)同时轻轻晃动小管以允许培养基和细胞缓慢混合。以大约每分钟 1 毫升的速度加培养基。将细胞离心下来并用染色培养基 (HBSS/2%NCS) 悬浮细胞, 在室温下将细胞静置半小时。染色或者计数或者相应地铺细胞。

[00256]除非说明, 否则在孔, 瓶或者袋子里用 Xvivo15 + 1% 青霉素/链霉素, 1% Glutamax 和 100ng/ml KITL, 100ng/ml FLT3L, 50ng/ml TPO 和 10ng/ml IL-3 培养 hpHSC。基于细胞因子的混合物是

rhKITL 100ng/ml (Amgen) 母液: 100 μ g/ml; rhTP0 50ng/ml (Biosource) 母液: 10 μ g/ml; rhFLT3L 100ng/ml (Amgen) 母液: 100 μ g/ml; rhIL-3 10ng/ml (Biosource) 母液: 10 μ g/ml。在有些情况下,测定了下列细胞因子的副作用。rhIL-6 10ng/ml, rhIL-11 10ng/ml, rhGM-CSF 10ng/ml, rhG-CSF 100ng/ml。包括细胞计数实验(苔盼兰)和通常是在第5,8,和11天,流式细胞术。(CD34, CD90, CD45RA, CD123, CD15, CD33, CD41, CD19)。

[00257]袋: 用7毫升 Vuelife 袋 (American Fluoroseal, catalog # 1PF-0007), 32毫升 (#2P-0032)或者72毫升 (#2P-0072)。

[00258]袋子的处理: 用标准注意事项操作人细胞。袋子有一个(7毫升袋)或者两个口用于填满和抽出样品。口有 luer 锁允许样品线和注射器接触。7毫升袋一旦充满大约4毫升以上压力就足够大,一旦打开就会泄漏,在打开 luer 锁之前需要紧紧关住。用注射填充袋子或者加入更多培养基,重力作用流不足。大袋子很容易用重力作用流填满,当用常规的移液器加培养基或者细胞时,没有活塞的注射器可以作为漏斗连接。这些袋子在打开锁之前没有必要夹紧,只需要向上拿。

[00259]培养: 袋子通常培养在 Sanyo 培养箱里, 37°C, 5% CO₂, 和 1-20% 的氧气。培养箱充分潮湿, 尽管对于用袋子培养来说并不必须。袋子是透气的, 但是不透水。细胞浓度通常是每毫升 10⁵, (范围: 每毫升 10⁶ 个细胞到每毫升 10⁴ 个细胞)。可以将袋子放在 petri 盘中(直径15厘米, 能盛7或者30毫升的袋子)或者方盘里(大袋), 这样便于操作和保持无菌。

[00260]取样: 常规细胞样品能用1毫升注射器从装备有 luer 锁的袋子中吸出混合袋子的内容物(细胞倾向于在折痕处聚集, 见上图中的灰色沉淀), 如果需要(7毫升袋)则夹紧并从口上除去塞子, 连接1毫升注射器并倒转袋子(注射器向下)。除去夹子, 如果有的话。抽吸注射器几次以混合在连接管内的细胞。排空注射器(塞子始终向下), 倒转袋子(注射器向上)。让空气向上走并封闭样品口的硬塑料管(即使部分充满它), 然后吸入样品到管子里。整个样品管

包含大约 0.2 毫升。如果需要的话重新夹紧并除去注射器并盖好盖子。

[00261]在 7 毫升袋子里在包含 GF 的培养基里有 2 毫升细胞，第三或者四天的时候加入培养基（2-3 毫升）以补充培养基。在一些实验中，在 72 毫升袋子里在大约 4×10^6 个细胞在 20 毫升培养基中（细胞浓度是每毫升 2×10^5 个细胞）。一旦细胞浓度达到每毫升 10^6 个（大约在第 4 天）稀释细胞，以保持细胞浓度在每毫升 3×10^5 到 2×10^6 之间。在第 4 天和第 6 天加入培养基（到总量 72 毫升）在第 8 天收获和冻细胞。细胞在 8 天的时间里增殖到了大约 1.5×10^8 个。计划表可以开始在 15 毫升中有 3 百万个细胞，在第 4 天加入 15 毫升培养基，在第 6 天加入 40 毫升培养基。

[00262]分析：用上述的方法除去细胞样品。通常在第 5，8 和 12 天对培养物进行全面分析。这包括流式细胞分析，在甲基纤维素和伊红美蓝/姬姆萨染色的细胞涂片中在 35 毫米培养皿中铺 500 个细胞。每天用血球计数板和苔盼兰计数细胞。

[00263]增殖数据来自 5 个独立的供体。图 11 显示了来自 1319 号供体的袋子和瓶子的增殖数据。图 11A 显示了总增殖，图 11B 显示了来自供体的细胞 (CD34+CD90+) 的细胞密度数据，在同样的培养基/生长因子 (Xvivo15 补以 Glutamax, PenStrep, KITL, FLT3L, TPO 和 IL-3) 中培养，在不同的袋子和培养瓶中以不同的浓度培养细胞。起始浓度在每毫升 1×10^5 和 1×10^6 之间都是在 7 毫升 AFC 袋子中。破折号线意味着没有再接受培养基的培养。但是随后看能达到什么样的最大浓度。在 AFC 袋子中生长的培养物和和组织培养瓶中生长的培养物的增值率相似，一部分细胞松散地贴在塑料培养瓶壁上。聚四氟乙烯袋子就不适这样。生长在培养瓶和袋子中 1319 号供体培养物在种细胞后第 8 天的细胞的相差显微图显示，在袋子里的细胞倾向于聚集增加。这就解释了更大的表观密度（数据没有显示）。

[00264]图 12 是来自人 MP 培养的细胞用生长因子处理的图。供体：1319 号，细胞在培养瓶里培养 8 天 (Xvivo15+PenStrep, Glutamax, 100ng/ml KITL, 100ng/ml FLT3L, 50ng/ml TPO 和 10ng/ml IL-3, 转

移到 T25 培养瓶种用不同的生长因子 (100ng/ml KITL, 20ng/ml IL-3 和 300ng/ml G-CSF)。图 12 显示在转移后在不同的时间点 (4 到 19 天)。粒细胞峰出现在第 12 天, 到第 19 天时, 只有巨噬细胞出现。人 MP 培养物能分化成多形态成熟的嗜中性粒细胞和巨噬细胞和巨核细胞。

[00265]从供体 1198 和 1202 种在袋子种的增殖数据。来自这两个供体的细胞经过 Isolex 富集用 Dakocytomation MoFlo 和冻存后筛选 hpHSC 表型 ($CD34^+CD90^+$), 细胞解冻后被种到 7 毫升 AFC 袋子中, 如图所示培养基: Xvivo15 补以 Glutamax, PenStrep, KITL, FLT3L, TPO 和 IL-3。图 13A 显示总增殖和图 13B 显示细胞密度数据。开放标志显示同时种在较大袋子里的细胞 (见下)。以每毫升 2×10^4 种的细胞和以每毫升 2×10^5 种的细胞之间没有明显区别, 或者种在 7 毫升 AFC 袋子里和在 72 毫升袋子里的细胞也没有明显区别。

[00266]来自供体 1176, 1198, 1202 在袋中和供体 1207 在 72 毫升 AFC 袋的增殖数据。来自这四个供体的细胞经过 Isolex 富集, 用 Dakocytomation MoFlo 选择 hpHSC 表型 ($CD34^+CD90^+$), 并在分选后冻存。细胞被融解并按指示种在 72 毫升 AFC 袋中。培养基: Xvivo15 补以 Glutamax, PenStrep, KITL, FLT3L, TPO 和 IL-3。图 14A 显示总增殖, 和图 14B 显示细胞的细胞密度数据。起始种植体积: 在 20 毫升种大约 4×10^6 各细胞, 每个袋子培养物终体积 70 毫升, 在四个袋子中共种植了 15.6×10^6 个细胞, 8 天后收获 (和冻存) 细胞总数为 6.14×10^8 个, 平均增殖 40 倍 (范围是 30 - 60 倍)。

7.4 实施例 4. 人骨髓祖细胞克隆形成和在体外对 G-CSF 的反应

[00267]人骨髓祖细胞培养始于 2×10^6 个纯化的人 HSC (融化的 hpHSC), 培养在装有无血的 ExVivo-15 和 SCF, Flt3L, TPO, IL-3 静态的 AFC 袋子中, 如上所述, 在第 5, 8, 11, 13 和 15 天收集 MP 细胞并分三份种于甲基纤维素中以评价它们在体外形成克隆的潜能。图 15A 显示种植效率 (获得的克隆数/种的细胞数) 分成不同类型的克隆 (E: 红细胞; M: 巨噬细胞; G: 粒细胞; GM: 混合的粒细胞/巨噬

细胞; GEM: 混合的骨髓/红细胞系), 指示在培养物中有多少祖细胞。

[00268] 图 15B 显示 CFU 总数量的增加(克隆形成单位)。这等于种植效率乘以总细胞数。尽管 CFU 的相对数量因为总细胞数相对强的增加而下降, 但是 CFU 还是随着时间而增加。

[00269] 培养的 MP 的 FACS 分析和干/祖细胞群体随时间的改变如图 16 所示。图显示的是活着的和谱系阴性细胞的预分门(pregated), 第 0 天的起始群体是 CD34+CD90+ (右上门) 和这个群体随时间下降, 骨髓祖细胞主要在 CD34+CD90- 门(左上), 另外的数据显示 CD34^{low}/- 细胞形成克隆(尽管程度低) 因此也对总的祖细胞库有贡献(数据未显示)。经时测定了 CD34+CD90- 细胞的相对数量对相对种植效率(数据未显示) 以测定 CD34+ 细胞%和 CFUs 的相关性。密切相关性(数据未显示) 提示 CD34 FACS 染色可以用作在培养物中祖细胞数量的一个指征。

[00270] 图 17 显示了 IL-3 和 IL-6 单独或者组合对人 MP 细胞的效果, 图 17A 显示了细胞密度和每毫升中的细胞计数, 图 17B 显示了总细胞数量。在包含 SCF/F1t3L/TPO 和 IL-3 或者 IL-6 (10-20ng/ml) 被单独或者组合加入(10-20ng/ml) 的 Xvivo 中培养人细胞。细胞计数显示 IL-3 在培养中作为增殖因子。

[00271] 图 18 显示与 IL-3, IL-6 或者二者组合培养的 MP 细胞的集落形成实验的结果。图 47A (第 5 天), 图 47A (第 8 天), 和图 47C (第 11 天) 显示加入 IL-6 增加 CFU 的数量, 有助于维持 MP 细胞的祖细胞潜能。

[00272] 图 19 显示 CFU 在含有 IL-3, IL-6 或者是二者的组合的 MP 培养物中的绝对数量, 比较来自对 IL-3 和/或 IL-6 的反应的 MP 的 CFU 总数量。IL-3 的增殖效应和 IL-6 的维持祖细胞的效应, 这两个细胞因子组合增加了在培养物中起始细胞的克隆数。

[00273] 在标准条件下培养 5 (图 20A) 或者 8 天 (图 21B) MP, 在第 5 或者 8 天向培养基中加入 300ng/ml 的 G-CSF(在曲线上的零天) MP, 随着时间的过去监测细胞生长并与没有接受 G-CSF (w/o) 的培养比

较。数据显示当在培养的晚期阶段加入后, 经过一段时间 G-CSF 可以增加细胞数量。它还显示我们的 MP 对 G-CSF 反应有可能指向粒细胞/中性粒细胞的祖细胞, 并且提示 G-CSF 与 MP 组合移植能增加在患者体内的中性粒细胞数量。

[00274] 图 21 是概要地显示了在体内人 MP 细胞对 G-CSF 的反应性。概要地显示 MP 移植到 NOD/SCID 小鼠中移植实验的第 8 天以评价它们移植的潜能, 发育潜能和在体内对 G-CSF 的反应。

[00275] 图 22 是骨髓和脾的 FACS 分析以寻找移植后一周人 MP 的输入和它们对 G-CSF 的反应。用抗人 CD45 抗体染色样品来检测供体细胞, 对没有或者有 G-CSF 的每种组织显示的是两个独立的样品, 骨髓显示最高程度的重建, 这能够通过注射 G-CSF 而增加。

[00276] 图 23 是在 NOD/SCID 小鼠中人 MP 衍生细胞的 FACS 表型图。显示的是在活的或者 huCD45⁺ 细胞预分门。CD33 是早期骨髓细胞的标志物, 大多数或者人细胞是 CD33⁺ 细胞, 显示大多数细胞定型于那个谱系, CD14 和 CD15 染更加成熟的骨髓细胞, 不均一染色显示定型和成熟成为骨髓谱系。同时未检测到人 B 细胞 (CD19) 或者 T 细胞 (CD3, 未显示)。

[00277] 前面对于本发明的特定实施方案的描述用于说明和描述目的。他们并不旨在排除或者限制发明于所公开的精确的形式, 显然可以根据上述教导得到很多改良和变化改变的启示。选择和描述的实施方案是为了最好地解释发明的原理及其实际应用, 因而使得本领域中的其他技术人员能最好地利用发明和有各种改良的各种实施方案, 这些方案适用于所设想的具体用途。

[00278] 所有专利、专利应用、出版物和这里引用的参考文献被清楚地插入以供参考到同样的程度, 就像每个单独的出版物或者专利应用被特别地和单独地指示插入以供参考。

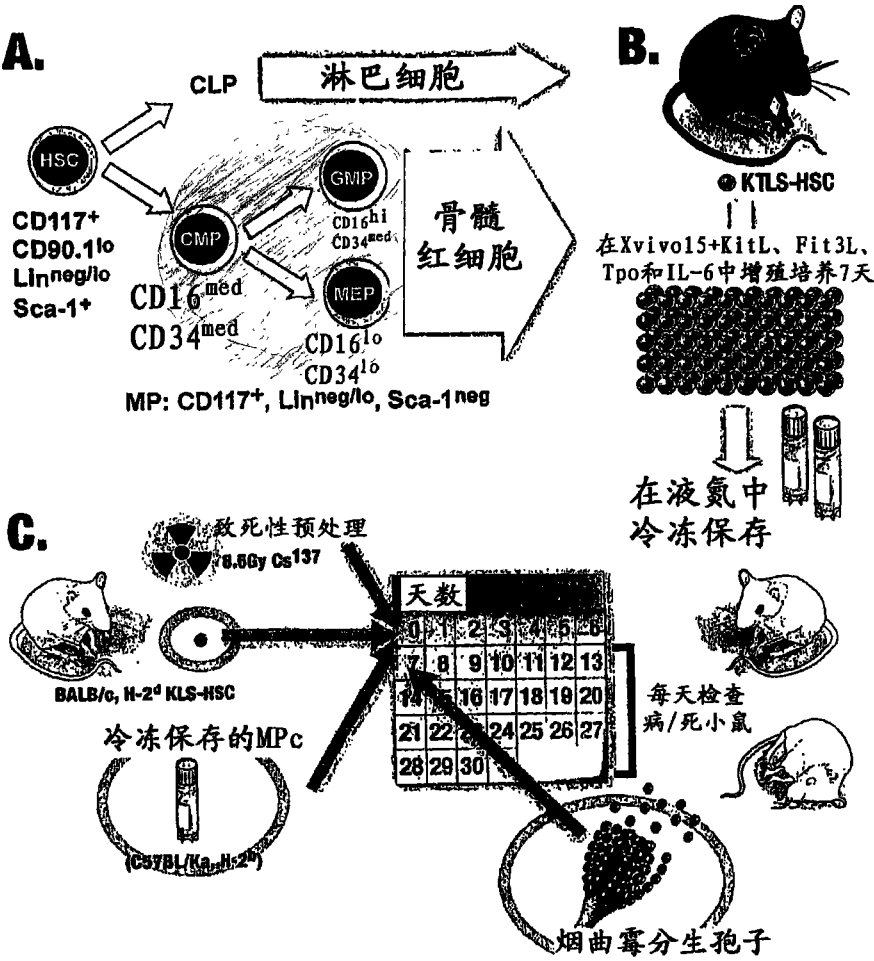


图1

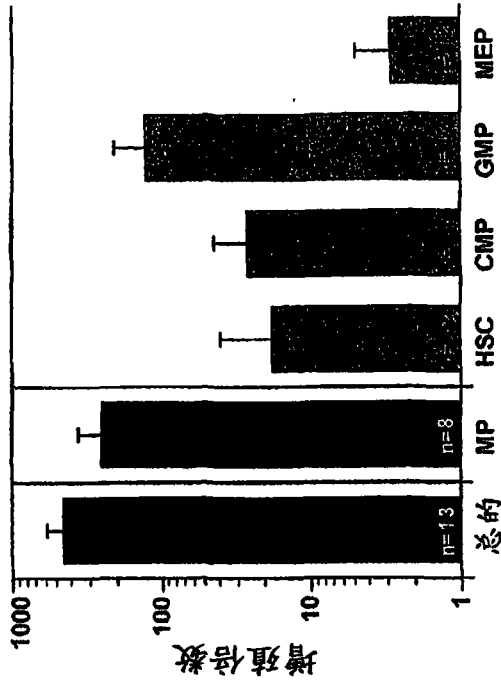


图2B

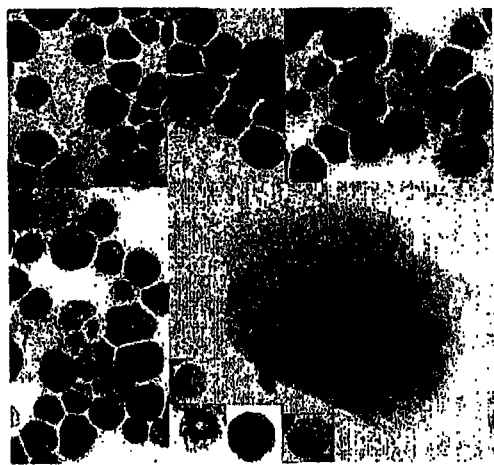


图2A

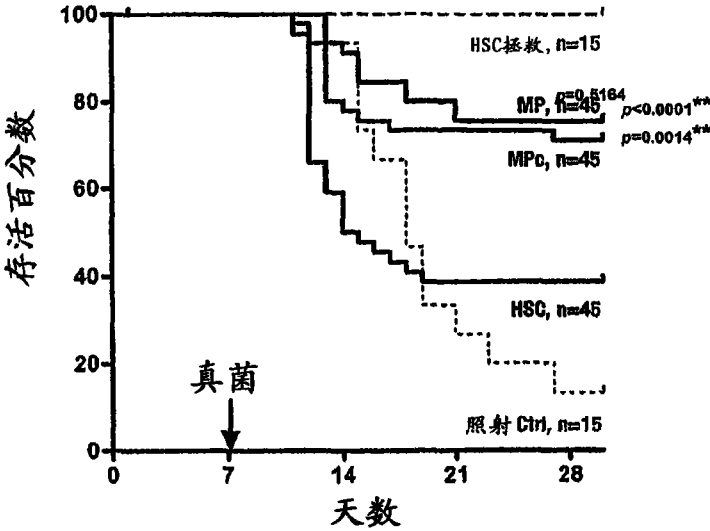


图 3

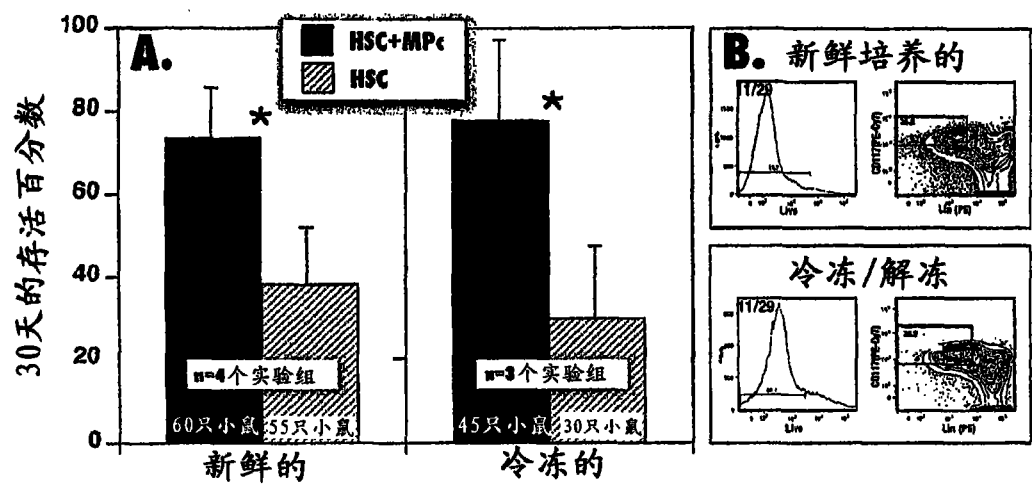


图 4

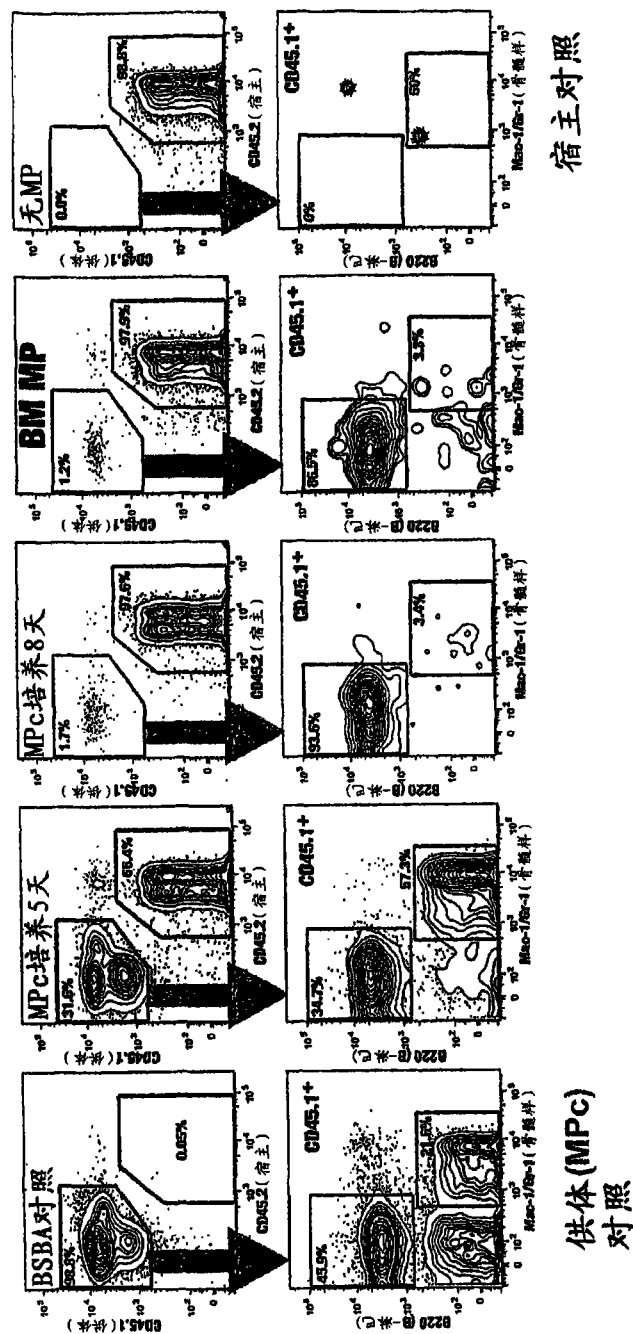


图5

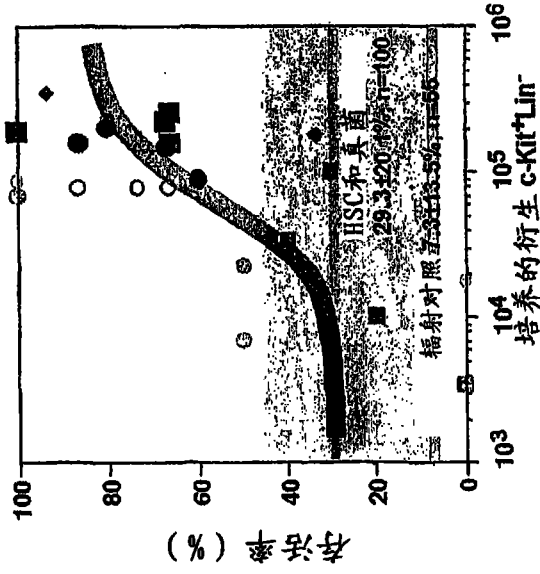
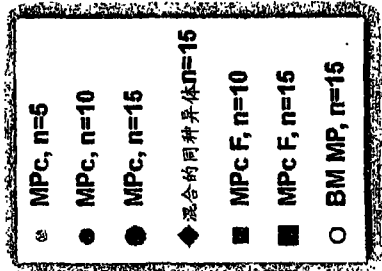
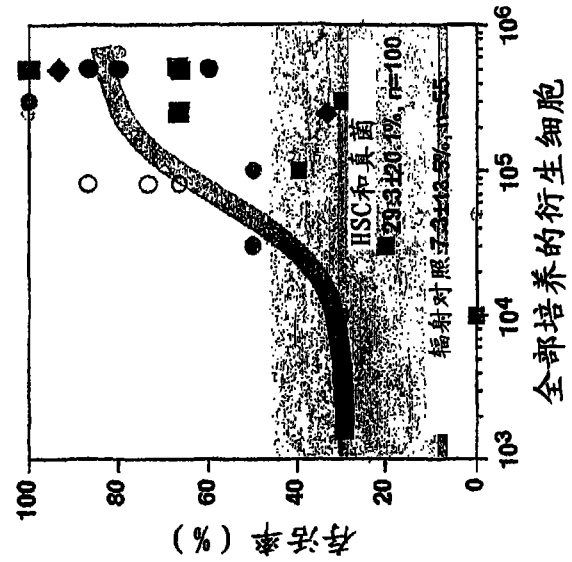


图6A

图6B

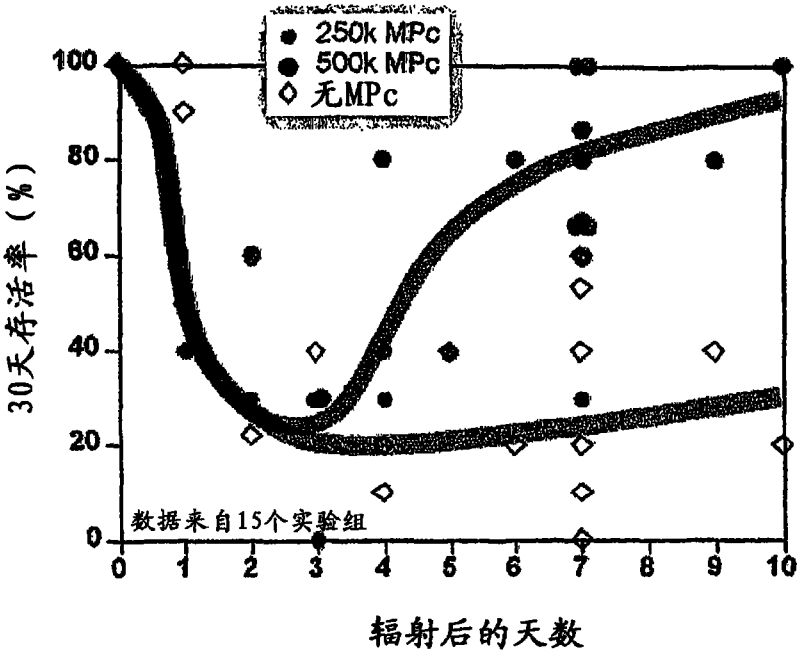


图7

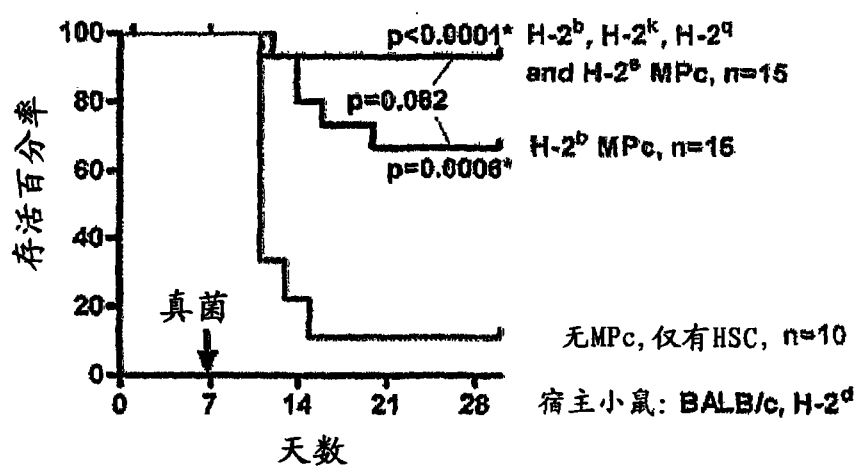


图 8

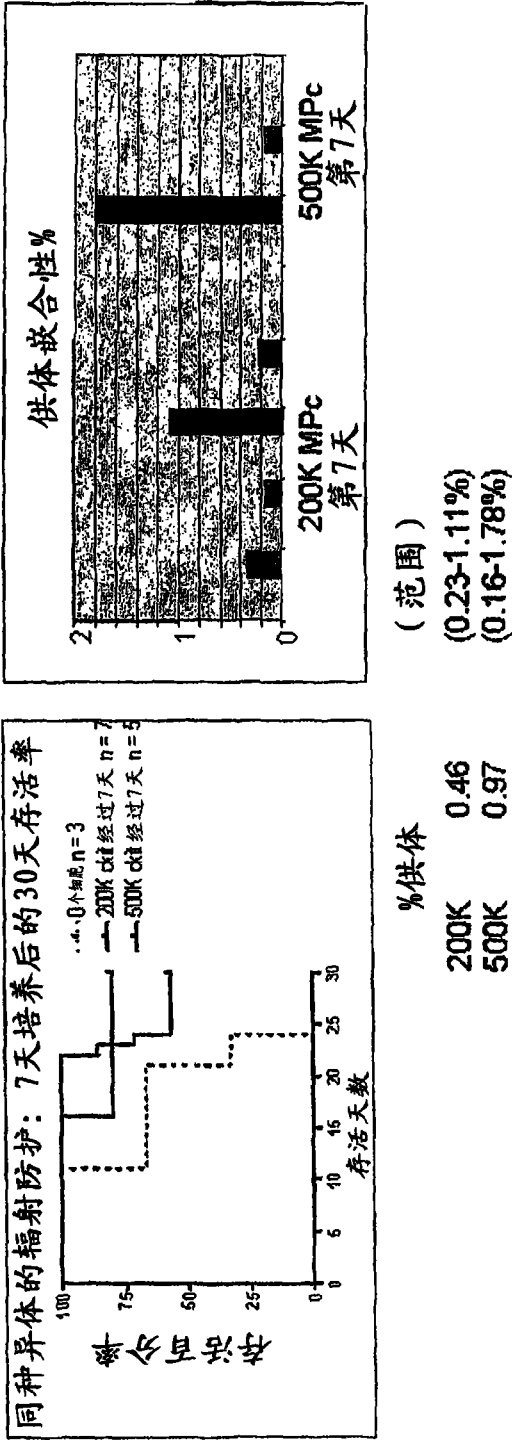


图9B

图9A

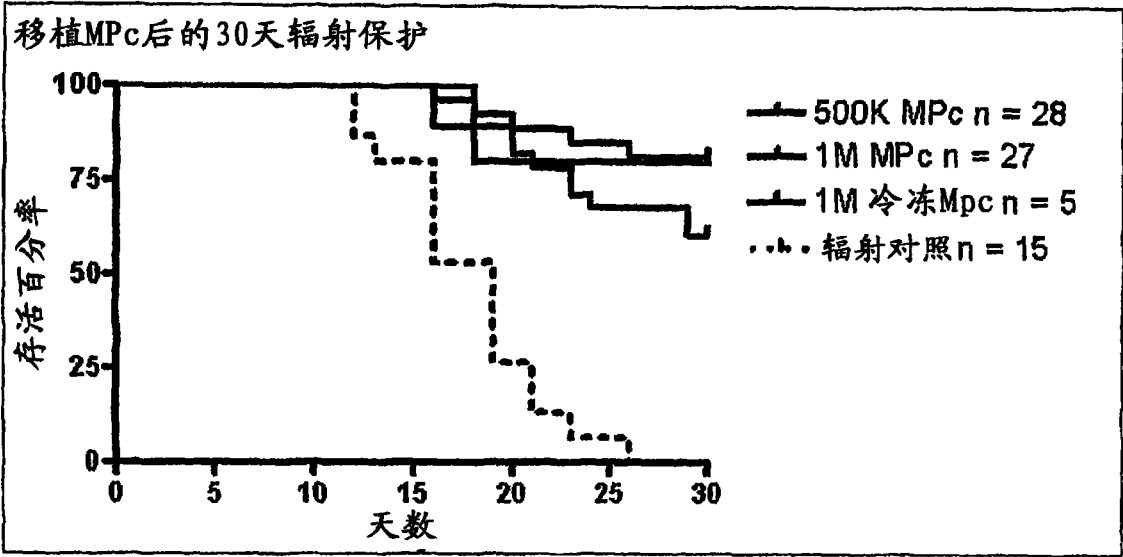


图10

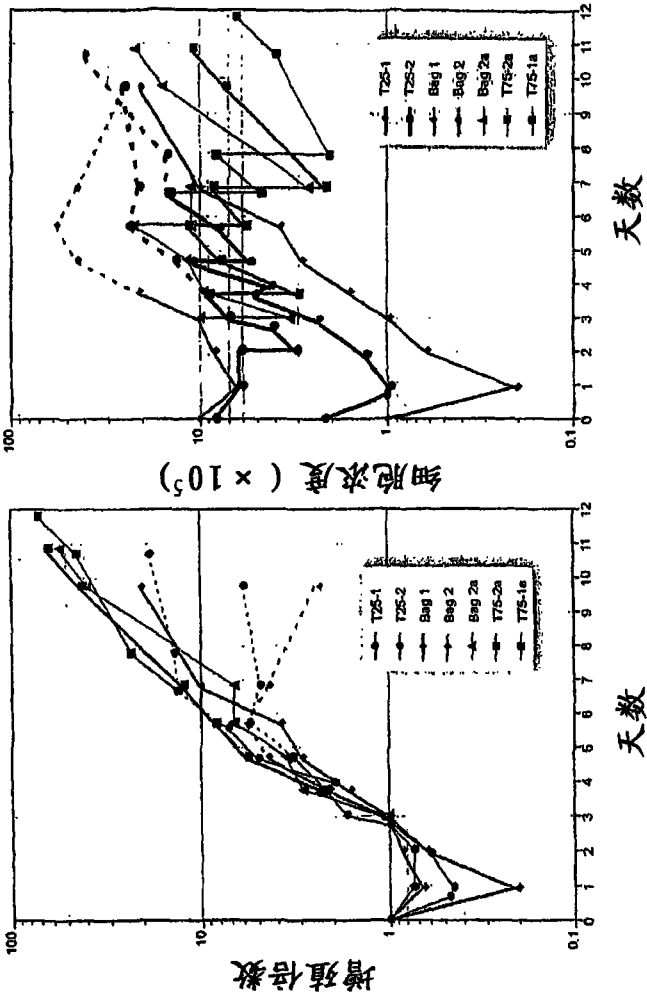


图11B

图11A

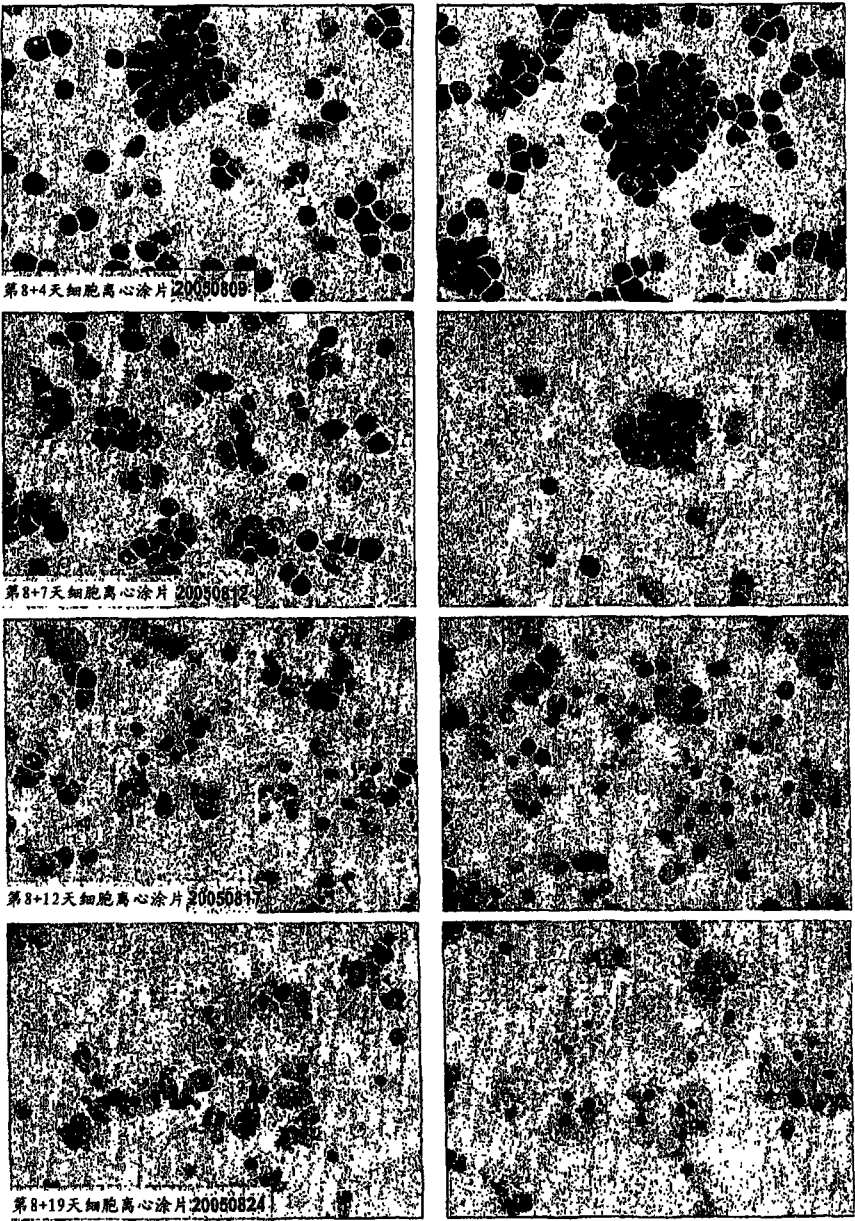


图12

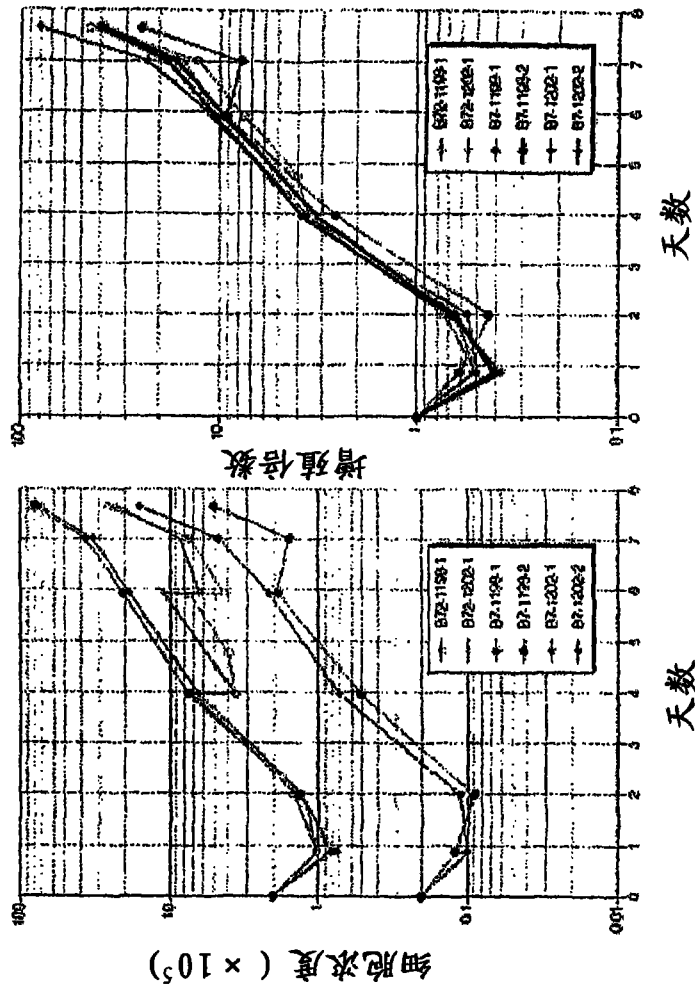


图13B

图13A

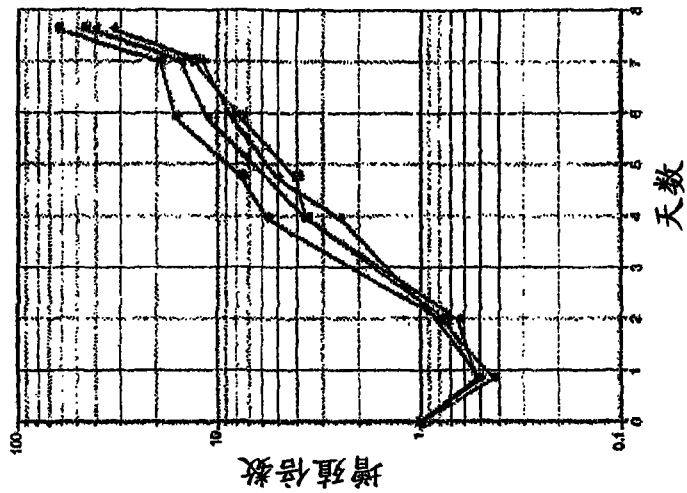


图14B

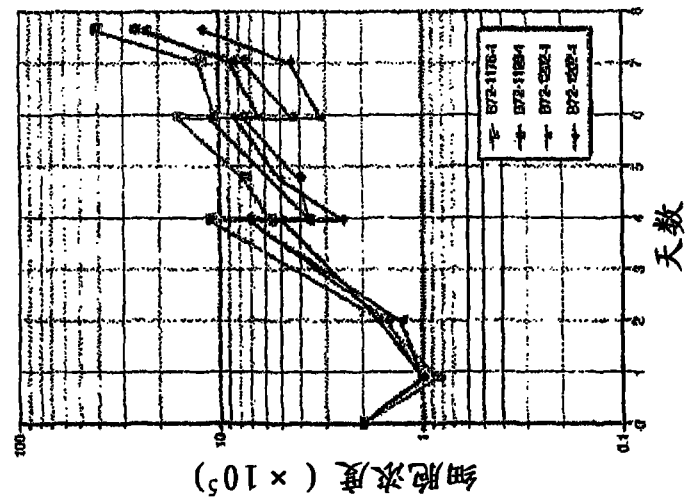


图14A

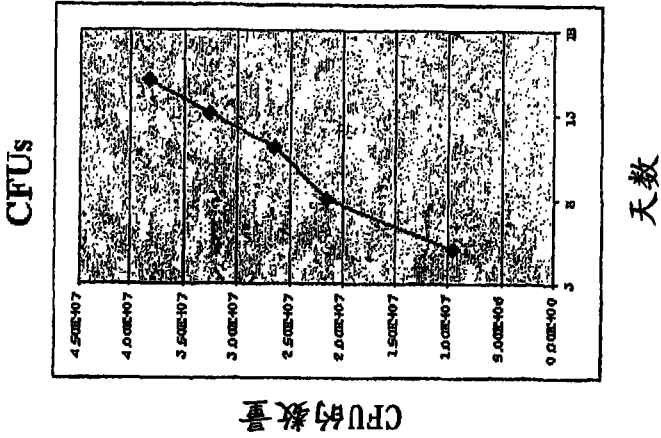


图15B

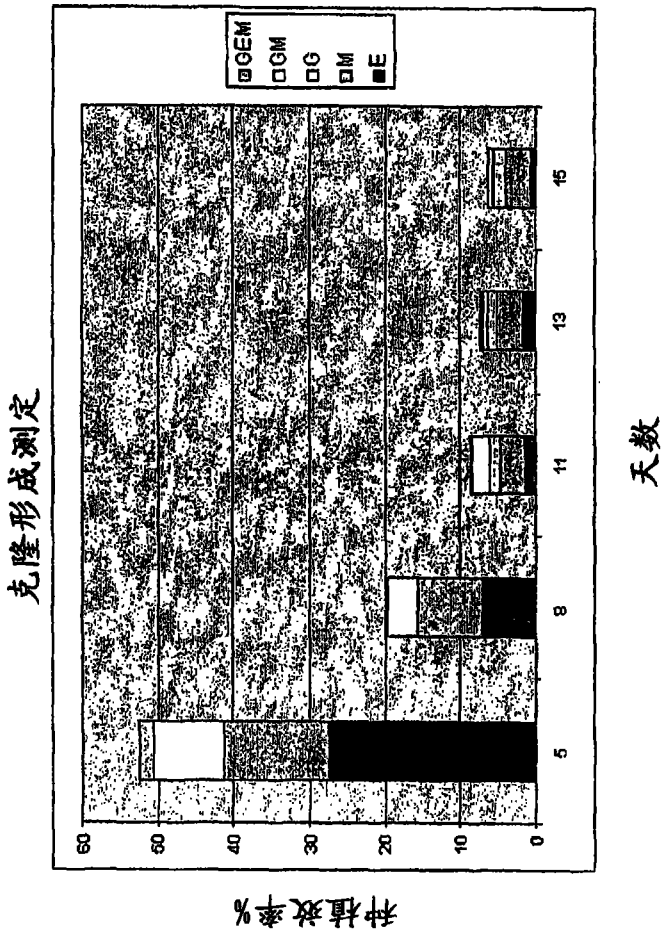


图15A

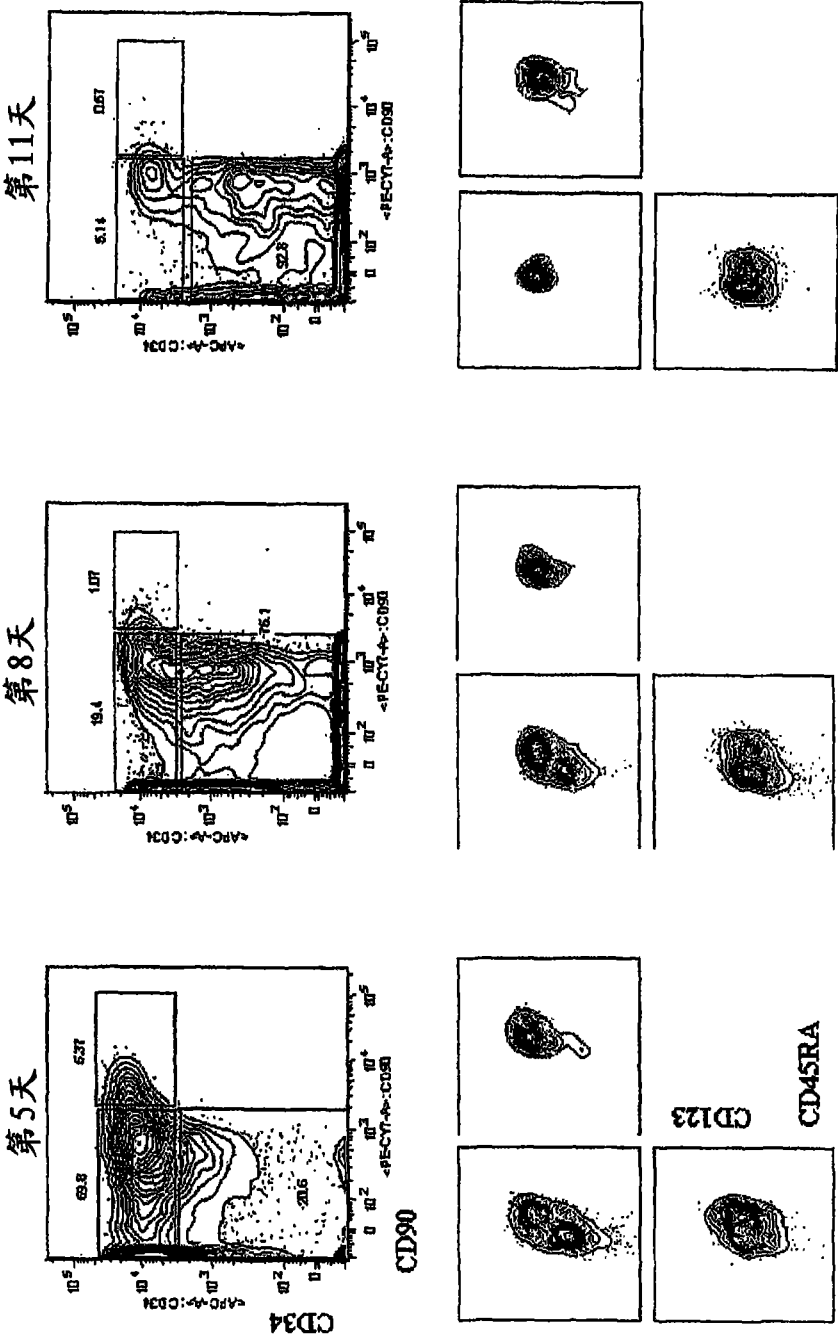


图16

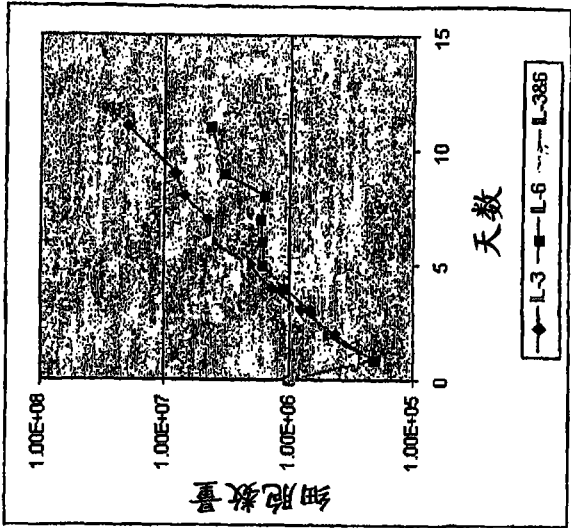


图17B

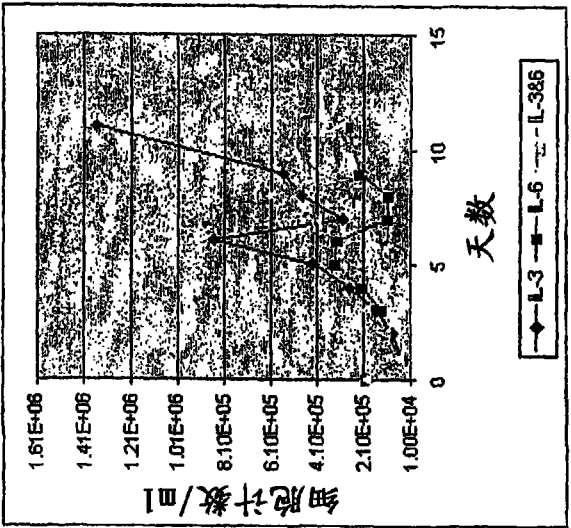


图17A

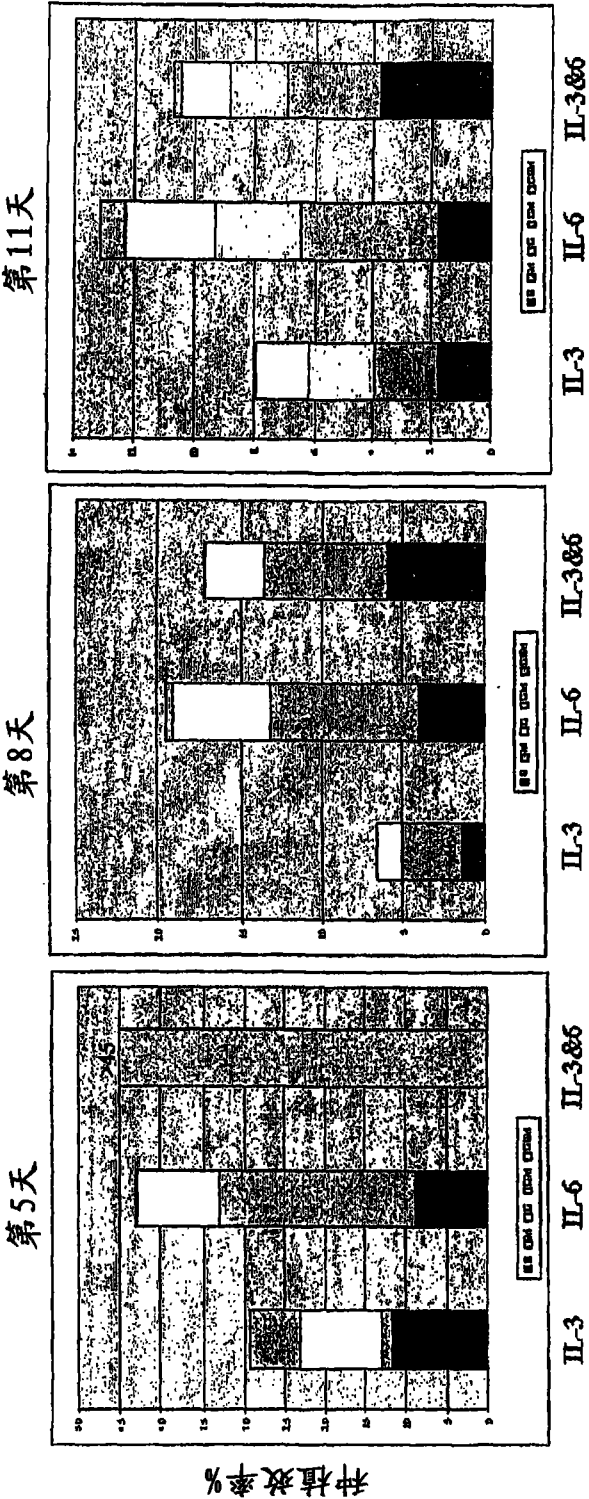


图18C

图18B

图18A

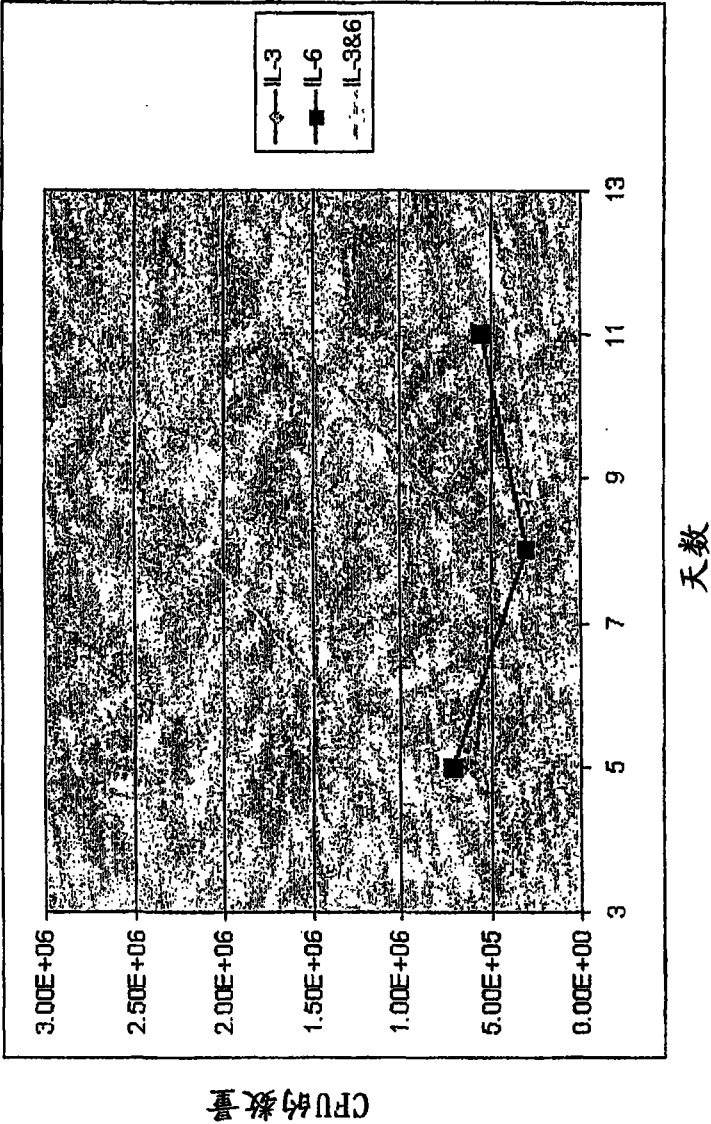


图19

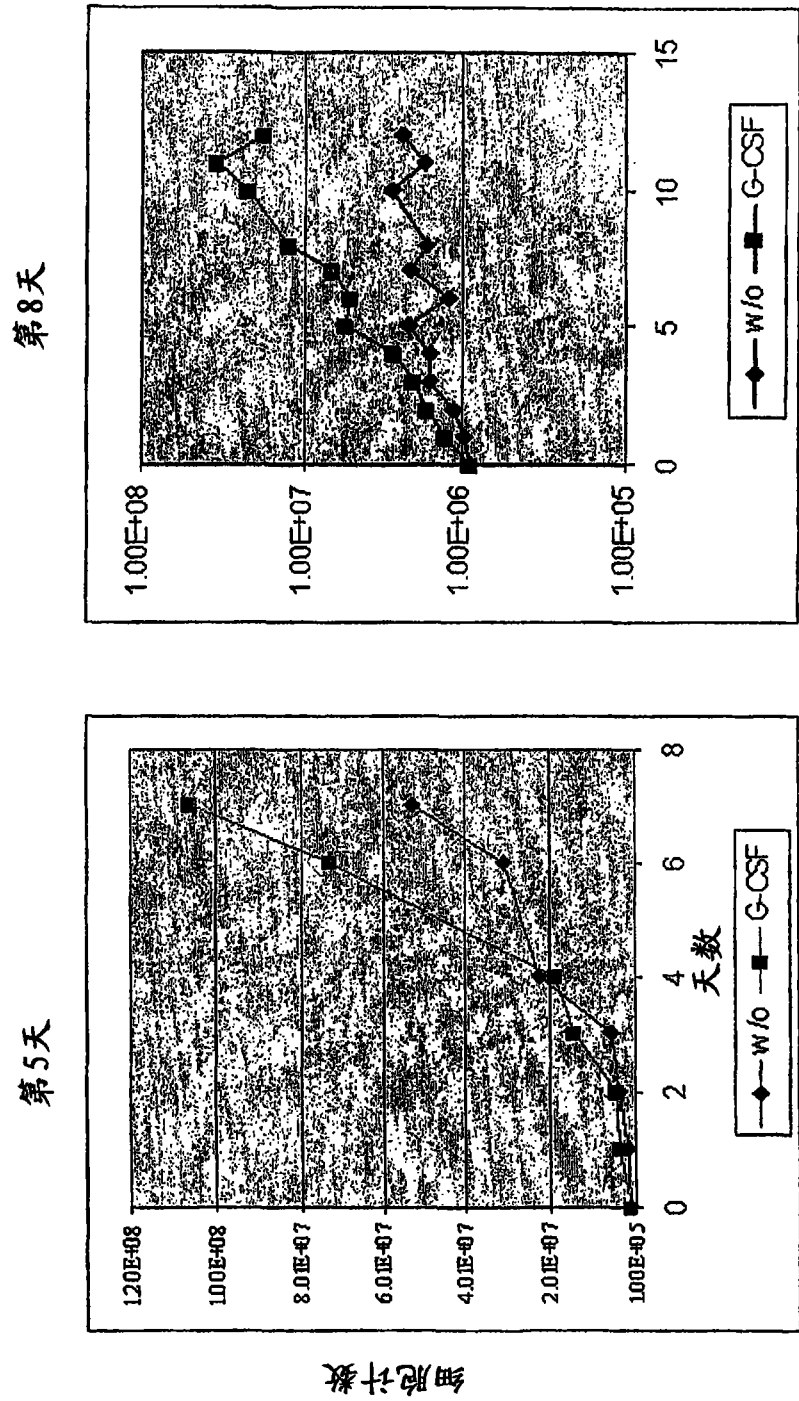


图 20B

图 20A

时间表
体内实验:

d8 MPc
1.5E+07个细胞/小鼠 i.v.
125 µg G-CSF /小鼠 s.c.
50 µl 抗无唾液酸基 i.p.

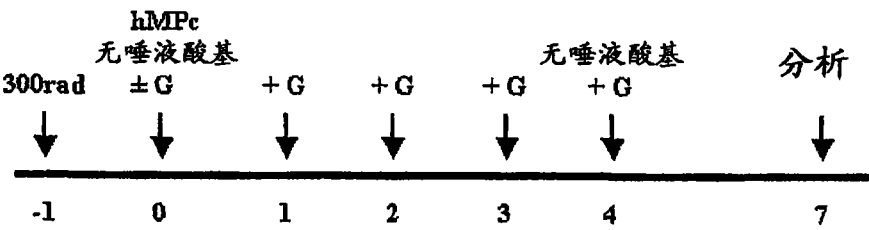


图 21

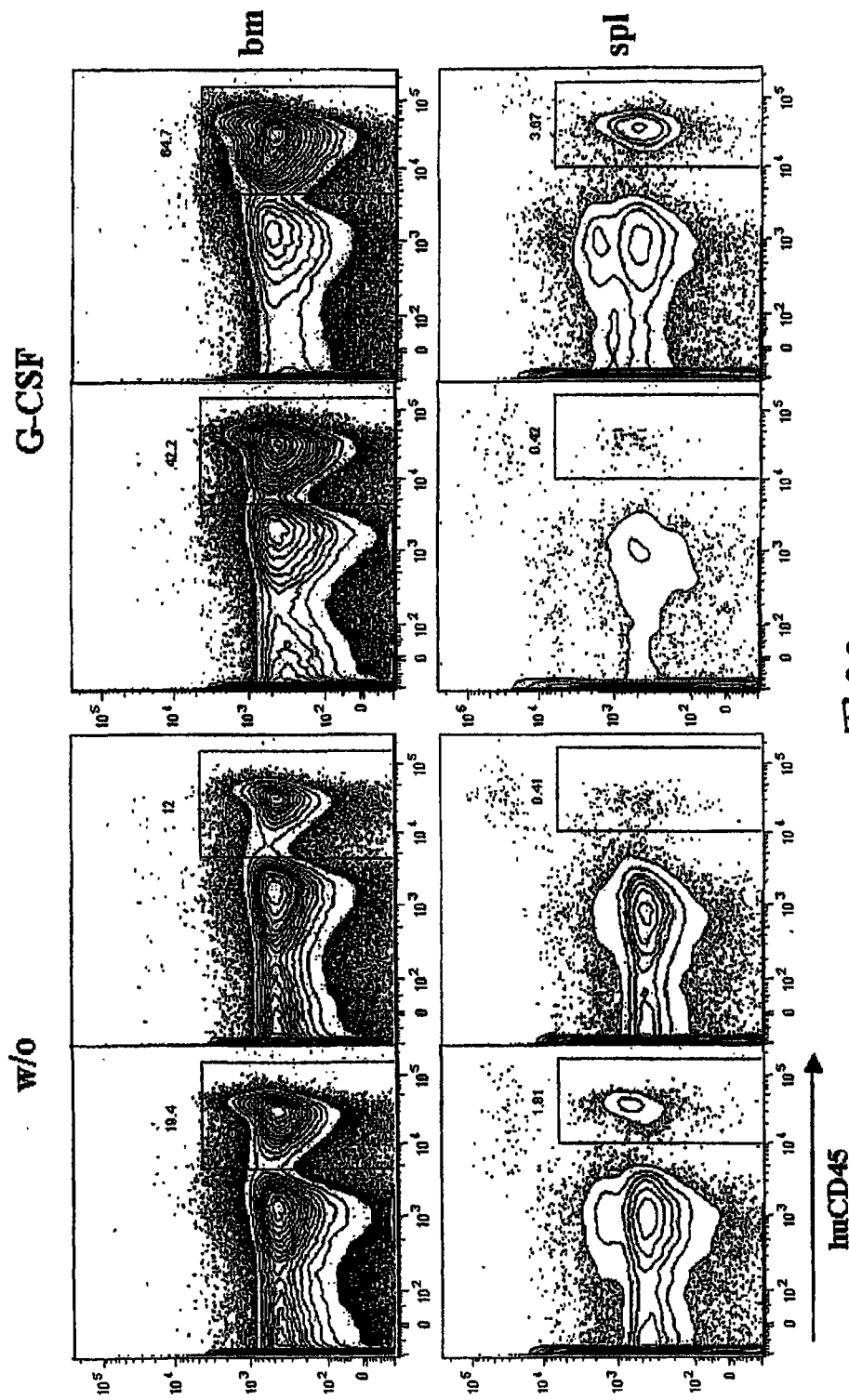


图 22

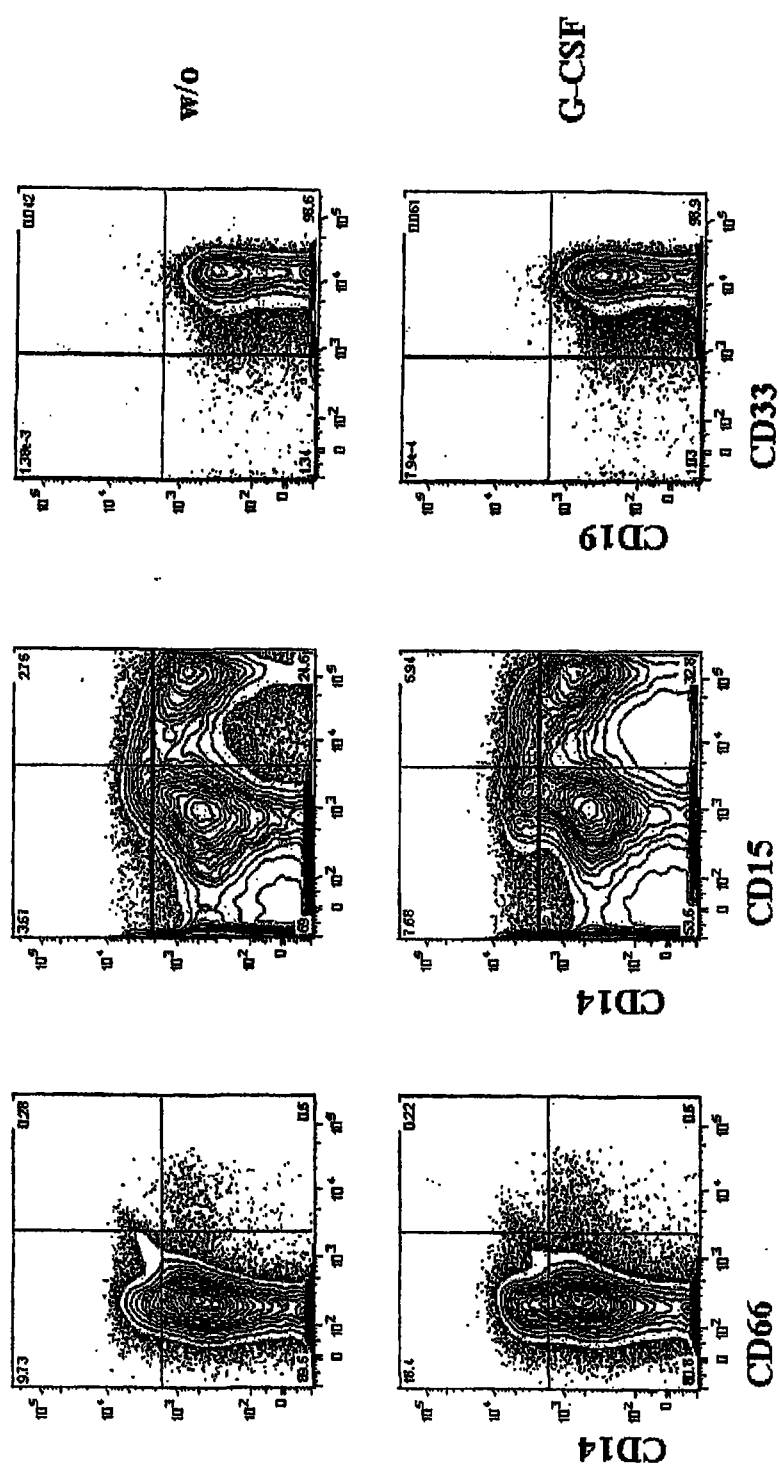


图 23