



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102626517 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 29

(21) 申请号 201210050521. 9

(22) 申请日 2007. 03. 26

(30) 优先权数据

60/785, 968 2006. 03. 24 US

(62) 分案原申请数据

200780018870. X 2007. 03. 26

(73) 专利权人 儿童医疗中心有限公司

地址 美国麻萨诸塞州

专利权人 通用医疗公司

(72) 发明人 L·I·宗 T·E·诺思 W·戈斯林

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理

有限责任公司 11290

代理人 张淑珍 王维玉

(51) Int. Cl.

A61K 45/00(2006. 01)

A61K 35/14(2015. 01)

A61K 35/28(2015. 01)

A61K 35/51(2015. 01)

A61K 35/50(2015. 01)

A61P 7/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2005/0074435 A1, 2005. 04. 07, 摘要, 说明书第 32 段第 161 段.

WO 95/06112 A1, 1995. 03. 02, 权利要求 10-17, 实施例 1-6, 表 1-4.

WO 96/40866 A1, 1996. 12. 19, 说明书第 1 页第 1 段, 第 8 页 - 第 10 页, 第 15 页 - 18 页, 权利要求 1-53 及实施例 1.

US 2005/0074435 A1, 2005. 04. 07, 摘要, 说明书第 32 段第 161 段.

I. FEHER et al.. Prostaglandin E2 as stimulator of haemopoietic stem cell proliferation. 《Nature》. 1972, 第 247 卷 550-551 页.

I. FEHER et al.. Prostaglandin E2 as stimulator of haemopoietic stem cell proliferation. 《Nature》. 1972, 第 247 卷 550-551 页.

审查员 刘东吉

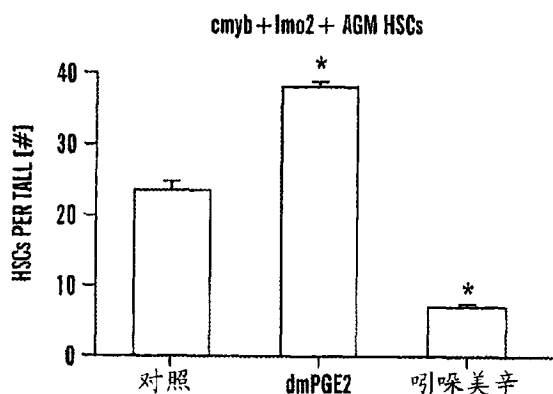
权利要求书2页 说明书34页 附图17页

(54) 发明名称

调节造血干细胞生长的方法

(57) 摘要

本发明提供了通过使用 HSC 调节剂用于调节造血干细胞群体的组合物和方法, 所述 HSC 调节剂是根据由具体适应症所需增加 HSC 数目或减少 HSC 数目的试剂。例如, 发现增加 HSC 数目的 HSC 调节剂包括前列腺素 E2 (PGE2) 和刺激 PGE2 途径的试剂。相反, 阻止 PGE2 合成的 HSC 调节剂减少 HSC 数目。HSC 调节剂可以在体外、体内或先体外后体内使用。



1. 造血干细胞 (HSC) 调节剂用于制备增强受试者内 HSC 重构的药物的用途, 其中, 所述 HSC 调节剂选自自由以下物质组成的组: PGE₂、16, 16- 二甲基 PGE₂、19(R)- 羟基 PGE₂、16, 16- 二甲基 PGE₂p-(p- 乙酰氨基苯甲酰氨基) 苯酯、11- 脱氧 -16, 16- 二甲基 PGE₂、9- 脱氧 -9- 亚甲基 -16, 16- 二甲基 PGE₂、9- 脱氧 -9- 亚甲基 PGE₂、丁环前列素、硫前列酮、PGE₂ 丝氨酸酰胺、PGE₂ 甲酯、16- 苯基四去甲 PGE₂、15(S)-15- 甲基 PGE₂、15(R)-15- 甲基 PGE₂。

2. 造血干细胞 (HSC) 调节剂用于制备增强受试者内 HSC 移入的药物的用途, 其中, 所述 HSC 调节剂选自自由以下物质组成的组: PGE₂、16, 16- 二甲基 PGE₂、19(R)- 羟基 PGE₂、16, 16- 二甲基 PGE₂p-(p- 乙酰氨基苯甲酰氨基) 苯酯、11- 脱氧 -16, 16- 二甲基 PGE₂、9- 脱氧 -9- 亚甲基 -16, 16- 二甲基 PGE₂、9- 脱氧 -9- 亚甲基 PGE₂、丁环前列素、硫前列酮、PGE₂ 丝氨酸酰胺、PGE₂ 甲酯、16- 苯基四去甲 PGE₂、15(S)-15- 甲基 PGE₂、15(R)-15- 甲基 PGE₂。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的用途, 其中, 所述受试者是骨髓或干细胞的捐赠者、骨髓或干细胞移植的候选者、或是接受化学治疗或辐射治疗的受试者。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的用途, 其中, 所述 HSC 调节剂选自自由以下物质组成的组: PGE₂ 以及 16, 16- 二甲基 -PGE₂。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的用途, 其中, 所述 HSC 调节剂是 16, 16- 二甲基 -PGE₂。

6. 含有经处理的人造血干细胞的细胞群体用于制备增强受试者内造血干细胞重构或移入的药物的用途, 其中, 所述造血干细胞群体已用 16, 16- 二甲基 -PGE₂ 离体 (ex vivo) 进行了处理。

7. 如权利要求 6 所述的用途, 其中, 所述细胞群体由外周血、脐带血、骨髓、羊膜液或胎盘血得到。

8. 如权利要求 6 所述的用途, 其中, 所述受试者是骨髓或干细胞的捐赠者、骨髓或干细胞移植的候选者、或是接受化学治疗或辐射治疗的受试者。

9. 如权利要求 6 所述的用途, 其中, 所述含有经处理的人造血干细胞的细胞群体被深低温保藏。

10. 包含经处理的造血干细胞或祖细胞的细胞群体用于制备增强哺乳动物受试者内造血干细胞或祖细胞重构的药物的用途, 其中, 所述造血干细胞或祖细胞已用 HSC 调节剂离体进行了处理, 所述 HSC 调节剂选自自由以下物质组成的组: PGE₂、16, 16- 二甲基 PGE₂、19(R)- 羟基 PGE₂、16, 16- 二甲基 PGE₂p-(p- 乙酰氨基苯甲酰氨基) 苯酯、11- 脱氧 -16, 16- 二甲基 PGE₂、9- 脱氧 -9- 亚甲基 -16, 16- 二甲基 PGE₂、9- 脱氧 -9- 亚甲基 PGE₂、丁环前列素、硫前列酮、PGE₂ 丝氨酸酰胺、PGE₂ 甲酯、16- 苯基四去甲 PGE₂、15(S)-15- 甲基 PGE₂、以及 15(R)-15- 甲基 PGE₂。

11. 包含经处理的造血干细胞或祖细胞的细胞群体用于制备增强哺乳动物受试者内造血干细胞或祖细胞移入的药物的用途, 其中, 所述造血干细胞或祖细胞已用 HSC 调节剂离体进行了处理, 所述 HSC 调节剂选自自由以下物质组成的组: PGE₂、16, 16- 二甲基 PGE₂、19(R)- 羟基 PGE₂、16, 16- 二甲基 PGE₂p-(p- 乙酰氨基苯甲酰氨基) 苯酯、11- 脱氧 -16, 16- 二甲基 PGE₂、9- 脱氧 -9- 亚甲基 -16, 16- 二甲基 PGE₂、9- 脱氧 -9- 亚甲基 PGE₂、丁环前列素、硫前列酮、PGE₂ 丝氨酸酰胺、PGE₂ 甲酯、16- 苯基四去甲 PGE₂、15(S)-15- 甲基 PGE₂、15(R)-15- 甲基 PGE₂。

12. 如权利要求 10 或 11 所述的用途, 其中, 所述受试者是骨髓或干细胞的捐赠者、骨髓

或干细胞移植的候选者、或是接受化学治疗或辐射治疗的受试者。

13. 如权利要求 10 或 11 所述的用途,其中,所述 HSC 调节剂选自以下物质组成的组: PGE2 以及 16, 16- 二甲基 -PGE2。

14. 如权利要求 10 或 11 所述的用途,其中,所述 HSC 调节剂是 16, 16- 二甲基 -PGE2。

15. 如权利要求 10 或 11 所述的用途,其中,所述人造血干细胞或祖细胞由外周血、脐带血、骨髓、羊膜液或胎盘血得到。

16. 如权利要求 10 或 11 所述的用途,其中,所述人造血干细胞或祖细胞由脐带血得到。

17. 如权利要求 10 或 11 所述的用途,其中,所述人造血干细胞或祖细胞由动员外周血得到。

18. 如权利要求 10 或 11 所述的用途,其中,所述人造血干细胞或祖细胞被深低温保藏。

19. 如权利要求 18 所述的用途,其中,所述人造血干细胞或祖细胞在与所述 HSC 调节剂接触前被深低温保藏。

调节造血干细胞生长的方法

[0001] 本申请是申请日为 2007 年 3 月 26 日、发明名称为“调节造血干细胞生长的方法”的申请号为 200780018870.X 专利申请的分案申请。

[0002] 政府支持

[0003] 本发明得到国立卫生研究院(National Institutes of Health)-NIH 拨款号 CA103846-02 支持。美国政府具有关于其的某些权利。

[0004] 与相关申请的交叉参照

[0005] 本申请要求于 2006 年 3 月 24 日由 Leonard I Zon 和 Trista E. North 提交的, 名称为 Method to Modulate Hematopoietic Stem Cell Growth 的, 美国临时专利申请系列号 60/785, 968 的利益, 所述申请整体引入本文作为参考。

发明领域

[0006] 本实施方案提供了在体外、体内和离体(ex vivo) 增加或减少造血干细胞群体的调节剂。

[0007] 背景

[0008] 干细胞研究拥有于开发疗法的非凡潜力, 所述疗法可以改变患有诸如白血病、糖尿病和贫血的疾病的那些人的未来。许多研究集中于干细胞生物学作为关于疾病治疗的关键的探究。通过干细胞在正常发育中的作用的了解, 研究者寻求捕获且指导干细胞的先天能力以治疗许多状况。研究在许多区域中同时进行: 检查驱动胚胎干细胞在各种组织中发育的遗传和分子触发物; 学习如何推动那些细胞分裂且形成特化组织; 培养胚胎干细胞且开发起作用的新系; 寻找通过消除供体需要来消除或控制移植物抗宿主病的方法; 和产生可普遍移植的细胞系。

[0009] 造血干细胞(HSCs)在胚胎发生期间在不同区域中衍生, 其中特异性诱导事件使中胚层转变成血液干细胞和祖先。仍需要阐明特定生物分子、化学试剂和其他因子之间在这些诱导事件中的关联。例如, 仍需要鉴定何种生物分子或化学试剂有希望用于处理 HSC 群体用于所需目的, 例如增加 HSC 群体用于研究或治疗。

[0010] 概述

[0011] 本实施方案的组合物和方法提供了 HSC 调节剂, 其是根据具体适应症所需增加 HSC 数目或减少 HSC 数目的试剂。例如, 发现增加 HSC 数目的 HSC 调节剂包括前列腺素 E₂ (PGE₂) 和刺激 PGE₂ 途径的试剂。相反, 阻止 PGE₂ 合成的 HSC 调节剂减少 HSC 数目。

[0012] 一个实施方案提供了用于促进受试者中的造血干细胞生长的方法, 其包括施用至少一种造血干细胞(HSC) 调节剂和药学上可接受的载体。

[0013] 在另一个实施方案中, HSC 调节剂通过修饰前列腺素途径来增加 HSCs。通过修饰前列腺素途径来增强 HSC 群体的 HSC 调节剂可以是选自下述的至少一种化合物: PGE₂、dmPGE₂、PGI₂、亚油酸、13 (s)-HODE、LY171883、Mead 酸(Mead Acid)、二十碳三烯酸、环氧二十碳三烯酸、ONO-259、Cay1039、PGE₂ 受体激动剂、以及这些试剂中的任何一种的衍生物。在更具体的实施方案中, HSC 调节剂是选自下述的 PGE₂ 衍生物: 16, 16- 二甲基 PGE₂、19

(R)-羟基 PGE₂、16, 16-二甲基 PGE₂p-(p-乙酰氨基苯甲酰氨基)苯酯、11-脱氧-16, 16-二甲基 PGE₂、9-脱氧-9-亚甲基-16, 16-二甲基 PGE₂、9-脱氧-9-亚甲基 PGE₂、丁环前列素、硫前列酮、PGE₂ 丝氨酸酰胺、PGE₂ 甲酯、16-苯基四去甲(tetranor) PGE₂、15 (S)-15-甲基 PGE₂ 和 15 (R)-15-甲基 PGE₂。

[0014] 在另一个实施方案中, HSC 调节剂通过修饰 Wnt 途径来增加 HSCs。通过修饰 Wnt 途径来增强 HSC 群体的 HSC 调节剂可以是选自下述的至少一种化合物: PGE₂、dmPGE₂、BIO、LiCl、以及这些化合物的衍生物。

[0015] 在另外一个实施方案中, HSC 调节剂通过修饰 cAMP/P13K/AKT 第二信使来增加 HSCs。通过修饰 cAMP/P13K/AKT 第二信使来增强 HSC 群体的 HSC 调节剂可以是选自下述的至少一种化合物: 8-溴-cAMP、毛喉素、以及这些试剂的衍生物。

[0016] 在另外一个实施方案中, HSC 调节剂通过修饰 Ca²⁺ 第二信使来增加 HSC 群体。通过修饰 Ca²⁺ 第二信使来增强 HSC 群体的 HSC 调节剂可以是选自下述的至少一种试剂: Bapta-AM、芬地林、尼卡地平、以及这些化合物的衍生物。

[0017] 在另一个实施方案中, HSC 调节剂通过修饰 NO/ 血管紧张素信号传导来增加 HSCs。通过修饰 NO/ 血管紧张素信号传导来增强 HSC 群体的 HSC 调节剂可以是选自下述的至少一种化合物: L-Arg、硝普钠、钒酸钠、缓激肽、及其衍生物。

[0018] 在另外一个实施方案中, 增强 HSC 群体的 HSC 调节剂可以是选自下述的至少一种试剂: 美贝维林、丙酮缩氟氢羟龙、阿替洛尔、吡洛洛尔、加波沙朵(Gaboxadol)、犬尿烯酸、胍屈嗪、噻苯达唑、比枯枯灵碱(Bicuculline)、Vesamicol、黄夹次苷、丙咪嗪、氯磺丙脲、1, 5-亚戊基四唑、4-氨基吡啶、二氮嗪、苯磷硫胺、12-甲氧基十二碳烯酸、N-甲酰基-Met-Leu-Phe、加拉碘铵、IAA94、氯烯雌醚、以及这些化合物的衍生物。

[0019] 另一个实施方案提供了通过使新生干细胞群体与选自下述的至少一种化合物接触来促进 HSC 生长的方法: PGE₂、PGI₂、亚油酸、13 (s)-HODE、LY171883、Mead 酸、二十碳三烯酸、环氧二十碳三烯酸、ONO-259、Cay1039、PGE₂ 受体激动剂、16, 16-二甲基 PGE₂、19 (R)-羟基 PGE₂、16, 16-二甲基 PGE₂p-(p-乙酰氨基苯甲酰氨基)苯酯、11-脱氧-16, 16-二甲基 PGE₂、9-脱氧-9-亚甲基-16, 16-二甲基 PGE₂、9-脱氧-9-亚甲基 PGE₂、丁环前列素、硫前列酮、PGE₂ 丝氨酸酰胺、PGE₂ 甲酯、16-苯基四去甲 PGE₂、15 (S)-15-甲基 PGE₂、15 (R)-15-甲基 PGE₂、BIO、8-溴-cAMP、毛喉素、Bapta-AM、芬地林、尼卡地平、硝苯地平、匹莫齐特、毒毛旋花子苷原、毛花苷、L-Arg、硝普钠、钒酸钠、缓激肽、美贝维林、丙酮缩氟氢羟龙、阿替洛尔、吡洛洛尔、加波沙朵、犬尿烯酸、胍屈嗪、噻苯达唑、比枯枯灵碱、Vesamicol、黄夹次苷、丙咪嗪、氯磺丙脲、1, 5-亚戊基四唑、4-氨基吡啶、二氮嗪、苯磷硫胺、12-甲氧基十二碳烯酸、N-甲酰基-Met-Leu-Phe、加拉碘铵、IAA94、氯烯雌醚、及其衍生物。新生干细胞群体可以从外周血、脐带血、绒毛膜绒毛、羊膜液、胎盘血或骨髓中收集。

[0020] 本发明的另一个实施方案提供了用于促进 HSC 离体扩增的方法, 其包括在至少一种 HSC 调节剂的存在下温育 HSC。本发明的另一个实施方案提供了用于促进 HSC 离体扩增的方法, 其包括收集 HSC 来源样品(例如, 外周血、脐带血、羊膜液、胎盘血、骨髓、绒毛膜绒毛)且在至少一种 HSC 调节剂例如 PGE₂ 的存在下贮藏其。具体实施方案提供了包含适合于 HSC 来源样品贮藏的容器的试剂盒, 其中所述容器预装入增加 HSCs 的至少一种 HSC 调节剂。另外的实施方案提供了试剂盒, 其包含适合于 HSC 来源样品贮藏的容器和包含合适量的增

加 HSCs 的至少一种 HSC 调节剂的小瓶。本发明的进一步实施方案提供了用于促进 HSC 离体扩增的方法,其中使新生 HSC 来源在最初收集时、在加工期间、在贮藏时、在解冻后、或在输液期间与 PGE2 或其衍生物接触。

[0021] 在本发明的另一个实施方案中, HSC 调节剂通过修饰前列腺素途径来抑制 HSCs。通过修饰前列腺素途径来抑制 HSC 群体的 HSC 调节剂可以是选自下述的至少一种化合物: 吲哚美辛、芬布芬、NS398、SC560、舒林酸、琥丁唑酮、阿司匹林、萘普生、布洛芬、塞来昔布、PGJ2、马兜铃酸、AH6809、AH23848、以及这些的衍生物。

[0022] 在另一个实施方案中, HSC 调节剂通过修饰 Wnt 途径来抑制 HSCs。通过修饰 Wnt 途径来抑制 HSC 群体的 HSC 调节剂可以是选自下述的至少一种试剂: 前列腺素抑制剂、Kenpauillone、丙戊酸、或其衍生物。

[0023] 在本发明的另外一个实施方案中, HSC 调节剂通过修饰 cAMP/P13K/AKT 第二信使来抑制 HSCs。通过修饰 cAMP/P13K/AKT 第二信使来抑制 HSC 群体的 HSC 调节剂可以是选自下述的一种或多种化合物: PD98059、KT5720、H89、U0126、渥曼青霉素、及其衍生物。

[0024] 在另一个实施方案中, HSC 调节剂通过修饰 Ca^{2+} 第二信使来抑制 HSCs。通过修饰 Ca^{2+} 第二信使来抑制 HSC 群体的 HSC 调节剂可以是选自下述的至少一种试剂: BayK8644、硫利哒嗪、以及这些试剂的衍生物。

[0025] 在另外一个实施方案中, HSC 调节剂通过修饰 NO/ 血管紧张素信号传导来抑制 HSCs。通过修饰 NO/ 血管紧张素信号传导来抑制 HSC 群体的 HSC 调节剂可以是选自下述的至少一种化合物: L-NAME、依那普利、卡托普利、AcSDKP、氯沙坦、AcSDKP、氯沙坦、Telimasartan、组胺、氨溴索、白杨黄素、环己酰亚胺、亚甲蓝、肾上腺素、地塞米松(Dexamethazone)、普罗地芬、异硫氰酸苄酯、麻黄碱、及其衍生物。

[0026] 在本发明的一个另外实施方案中, 抑制 HSC 群体的 HSC 调节剂是选自下述的至少一种化合物: Paraglyline、普萘洛尔、依他硝唑、甲巯咪唑、西诺沙星、青霉胺、呋塞米、Eburnaminone、阿柔比星、华法林、 γ -氨基丁酸、炔诺酮、鹰爪豆碱、二氢奎尼丁、乙腈苯吡嗪、甲氧明、羟基脲、双氢麦角胺、安他唑林、3-硝基丙酸、N-苯氨基萘酸、非那吡啶、二氯犬尿烯酸、3-雌二醇、L-Leu、酚苄明、美芬丁胺、四氢烟酸、愈创兰油烃、咪唑、 β -胡萝卜素、氯苯丁酯、以及这些化合物的衍生物。

[0027] 另一个实施方案提供了用于抑制受试者中的 HSC 生长的方法, 其包括施用至少一种 HSC 调节剂和药学上可接受的载体。在具体实施方案中, HSC 调节剂是选自下述的一种或多种化合物: 吲哚美辛、塞来昔布、芬布芬、前列腺素(Prostaglandin) J2、琥丁唑酮、舒林酸、及其衍生物。

[0028] 另一个实施方案提供了通过使新生干细胞群体与选自下述的至少一种化合物接触用于减少 HSC 生长的方法: 吲哚美辛、芬布芬、NS398、SC560、舒林酸、琥丁唑酮、阿司匹林、萘普生、布洛芬、塞来昔布、PGJ2、马兜铃酸、AH6809、AH23848、Kenpauillone、丙戊酸、PD98059、KT5720、H89、U0126、渥曼青霉素、BayK8644、硫利哒嗪(Thiridazine)、L-NAME、依那普利、卡托普利、AcSDKP、氯沙坦、AcSDKP、氯沙坦、Telimasartan、组胺、氨溴索、白杨黄素、环己酰亚胺、亚甲蓝、肾上腺素、地塞米松、普罗地芬、异硫氰酸苄酯、麻黄碱、Paraglyline、普萘洛尔、依他硝唑、甲巯咪唑、西诺沙星、青霉胺、呋塞米、Eburnaminone、阿柔比星、华法林、 γ -氨基丁酸、炔诺酮、鹰爪豆碱、二氢奎尼丁、乙腈苯吡嗪、甲氧明、羟基

脲、双氢麦角胺、安他唑林、3- 硝基丙酸、N- 苯氨茴酸、非那吡啶、二氯犬尿烯酸、3- 雌二醇、L-Leu、酚苄明、美芬丁胺、四氢烟酸、愈创兰油烃、咪唑、 β - 胡萝卜素、氯苯丁酯、PGE2 受体拮抗剂、以及这些化合物的衍生物。

附图说明

[0029] 图 1 表示关于使用斑马鱼胚胎影响 AGM 中的干细胞的化学药品的筛选示意。

[0030] 图 2A 和 2B 涉及前列腺素激动剂和拮抗剂,其改变 runx1/cmyb 表达而不影响血管发育。图 2A 显示在原始(gata1 和 lmo2)和永久(lmo2 和 cd41)血细胞生成期间分离的 FACS 分选细胞群体的微阵列表达概况。显示了与 GFP- 细胞相比较,每个 GFP+ 分选级分中的 cox1 (淡灰色)和 cox-2 (深灰色)的相对表达。图 2B 显示与对照相比较(每个三重峰中的第 1 条),在暴露于长效 dmPGE2 (10 μ M,每个三重峰中的第 2 条,深灰色)或非特异性 cox 抑制剂吲哚美辛(10 μ M,每个三重峰中的第 3 条)后的内皮和 HSC 特异性基因表达的 qPCR 概况。2 种处理都导致与关于检查的每种基因的对照相比较统计学上显著的差异(ANOVA, $p < 0.05$, $n=8$)。

[0031] 图 3 描述了指出了前列腺素激动剂和拮抗剂改变 runx1/cmyb 表达的数据,其通过经由共焦显微镜术检测到的双基因(bigenic)斑马鱼胚胎中的 HSC 数目的定量分析: DMSO 23.3 ± 5.0 (平均值 $\pm$ SD), dmPGE2 (10 μ M) 38.0 ± 2.2 , 吲哚美辛(10 μ M) (ANOVA, $p < 0.00001$, $n=10$ / 处理)。

[0032] 图 4A 和 4B 显示用 dmPGE2 处理增强亚致死照射的成年斑马鱼中的造血恢复。执行斑马鱼全 KM 照射恢复实验。星号(*)指示统计学上显著的差异:*=50 μ M 对对照,**=50 μ M 对 10 μ M 和 50 μ M 对对照,***= 所有显著的变量(ANOVA, $p < 0.05$, $n=15$ / 变量)。图 4A 显示了在 DMSO 和 dmPGE2 处理的(50 μ M)斑马鱼中照射恢复的第 0、4、7、10 和 14 天时在 KM 中的造血细胞谱系的代表性 FSC/SSC FACS 概况。图 4B 显示在对照鱼(三角形)和 dmPGE2 处理的鱼(正方形,10 μ M;圆圈,50 μ M)中前体细胞、淋巴样细胞和髓样细胞的 KM 重构的动力学。

[0033] 图 5A 和 5B 描述了改变亚致死照射的成年斑马鱼中的 HSC 相关基因表达和恢复的 PG 途径的调节。图 5A 显示如通过对于照射后第 3 天分离的全 KM 的 qPCR 测量的, dmPGE2 处理对于干细胞和内皮标记的作用。星号(*)指出统计学上显著的差异(双尾 t 检验, $n=15$, runx1 : $p=0.0001$; lmo2 : $p=0.014$; flil1 : $p=0.049$)。图 5B 描述了 cox1 (SC560, 10 μ M) 和 cox2 (NS398, 10 μ M) 抑制对于照射恢复($n=5$ / 处理)的作用。对于用 SC560 或 NS398 处理的鱼,由于在这些处理组中的过量死亡,在第 14 天时无法获得分析。

[0034] 图 6A 和 6B 显示 dmPGE2 调节小鼠 ES 细胞中的集落数目和造血分化。进行 M3434 和 OP9ES 细胞集落形成测定;计数是铺平板的每 100,000 个细胞。条指出对照处理的 ES 细胞和用递增剂量的 dmPGE2 (10 μ M、20 μ M、100 μ M)的处理或吲哚美辛处理的(10 μ M、100 μ M) ES 细胞。星号(*)指出统计学上显著的差异(双尾 t 检验, $n=5$ / 变量)。图 6A,显示了递增剂量的 dmPGE2 和经由吲哚美辛抑制环加氧酶活性对甲基纤维素中的造血分化的作用;终末类红细胞(E)、混合粒细胞/单核细胞(GM)和多能(GEMM)祖先集落的数目(10 μ M dmPGE2 : GM $p=0.005$, GEMM $p=0.017$; 20 μ M dmPGE2 : dE $p=0.04$, GM $p=0.007$, GEMM 0.016; 100 μ M 吲哚美辛 : GM $p=0.024$)。图 6B, dmPGE2 和吲哚美辛对 OP9 造血集落数目的作用(20 μ M :

$p=0.047$)。

[0035] 图 7A 和 7B 描述了 PGE2 对集落数目的影响。更具体而言,图 7A 和 7B 举例说明了在(A) 甲基纤维素和(B) OP9 测定中集落形成的吲哚美辛($100\ \mu\text{M}$)抑制的 dmPGE2 介导的($10\ \mu\text{M}$)援救。

[0036] 图 8A-图 8F 指出鼠 BM 暴露于 dmPGE2 增加 CFU-S 和再增殖 HSCs 的数目。星号(*) 指出统计学上显著的差异。图 8A 和 8B, WBM (在冰上 2 小时)用 EtOH 对照或 dmPGE2 ($1\ \mu\text{M}/106$ 个细胞)的离体处理对 CFU-S8 和 CFU-S12 (60,000 个细胞 / 受体;CFU-S12:双尾 t 检验, $n=10$, $p<0.0001$)的作用。图 8C,在用吲哚美辛($1\ \mu\text{M}/106$ 个细胞)离体处理后对 CFU-S12 的作用(100,000 个细胞 / 受体,双尾 t 检验, $n=10$, $p=0.0002$)。图 8D,ckit+scal+谱系-干细胞在用 dmPGE2 或 EtOH 对照处理后的 CFU-S12 评估(双尾 t 检验,100 个细胞: $n=10$, $p=0.013$;300 个细胞: $p=0.0003$)。图 8E 和 8F,有限稀释竞争再增殖测定。显示了在 12 周时如通过 FACS 分析(e)测定的,与对照(正方形)或 dmPGE2 处理的(圆圈)细胞样品移植的细胞总数目相关的阴性受体数目。在移植后 6、12 和 24 周时通过 Poisson 统计学计算的,在 EtOH 对 dmPGE2 处理的 WBM 的受体中的移入频率(小图 F)(ANOVA, $n=10$ /变量,6 周: $p=0.005$;12 周: $p=0.002$;24 周: $p=0.05$);在每个时间点上对分析存活的受体数目显示于表 6-表 8 中。

[0037] 图 9A-9N 描述了显示鼠 BM 暴露于 dmPGE2 增加脾重量和 1 次 HSC 移入的数据。图 9A 和 9B,在第(a) 8 和(b) 12 天时用 EtOH 对照或 dmPGE2 离体处理 WBM 和分离的 HSCs 对脾重量的作用(双尾 t 检验,CFU-S₈: $n=5$, $p=0.339$;CFU-S₁₂: $n=9$, $p<0.00001$)。图 9C,与对照比较,在吲哚美辛处理(绿色)后的脾重量(双尾 t 检验: $n=10$, $p=0.00026$)。图 9D,在 KSL 细胞的 dmPGE2 处理后的脾集落数目(双尾 t 检验,100 个细胞: $n=4$, $p=0.0013$;300 个细胞: $n=5$, $p=0.009$)。图 9E,举例说明在对照和 dmPGE2 暴露的 BM 细胞的受体中的 CD45.1 移入水平(左上象限)的代表性 FACS 图。图 9F-9J,在 dmPGE2 处理的 WBM (圆圈)对对照(正方形)的受体中的平均嵌合状态(F、H、I)和计算的移入频率(图 9G 和 9J)。图 9K 和 9L,在 CFU-S₁₂测定中用 cox1 (SC560, $10\ \mu\text{M}$)和 cox2 (NS398, $10\ \mu\text{M}$)抑制剂离体处理 WBM 对集落数目(配对 t 检验, $n=10$,SC560 $p=0.00016$,NS398 $p<0.00001$ 和脾重量(配对 t 检验, $n=10$,SC560 $p=0.025$,NS398 $p=0.00075$)的作用。图 9M 和 9N,在 5-FU 骨髓损伤后的外周血(处理后第 14 天)和骨髓(处理后第 16 天)WBC 计数;体内暴露于 SC560 或 NS398 显著抑制 WBC 恢复,而 dmPGE2 增强 WBC 计数。

[0038] 图 10 呈现了 Wnt 信号传导途径的图解。

[0039] 图 11A 和 11B 描述了 wnt 活性的调节影响成体稳态的数据。图 11A 显示了照射测定的示意图;图 11B 呈现了在 wt,hs:wnt8,hs:dkk 和 hs:dnTCF 成体中在照射后第 10 天时整个骨髓的 FACS 分析。

[0040] 图 12 显示了在体内 Top:dGFP 测定中在由前列腺素信号传导引起的发育胚胎中的 wnt 活性中的改变的 qPCR 定量。

[0041] 图 13 呈现了描述 PG 和 wnt 途径的相互作用的潜在点的模型。(1)PGE2 不能援救 dkk、axin、dnTCF;吲哚美辛不能阻断 wnt8。(2)PGE2 援救 dkk,但不援救 axin 和 dnTCF;吲哚美辛可以阻断 wnt8;PGE2 援救 dkk 和 axin,但不援救 dnTCF;吲哚美辛可以阻断 wnt8。(4)PGE2 援救 dkk、axin 和 dnTCF;吲哚美辛可以阻断 wnt8。

[0042] 图 14 显示了在照射以及用 dmPGE2 或吲哚美辛处理后第 3 天时,在 Top :dGFP 成体的骨髓中的 GFP 阳性细胞百分比。

[0043] 详述

[0044] 除非本文另有定义,与本申请结合使用的科学和技术术语应具有由本领域普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另有要求,单数术语应包括复数,且复数术语应包括单数。

[0045] 应当理解本发明不限于本文描述的具体方法、规程和试剂等,并且同样可以改变。本文使用的术语仅用于描述具体实施方案的目的,并且不意欲限制完全由权利要求限定的本发明的范围。

[0046] 除了在操作实施例中或另有说明时,表示本文使用的成分或反应条件的量的所有数目应理解为在所有情况下由术语“约”修饰。术语“约”当与百分比结合使用时可以意指 $\pm 1\%$ 。

[0047] 鉴定的所有专利和其他出版物为了描述和公开例如此种出版物中描述的方法的目的特别引入本文作为参考,所述方法可以与本发明结合使用。这些出版物仅在本申请的提交日期前提供其公开内容。在这点上任何事情不应解释为承认本发明人由于在先发明或由于任何其他原因无权在时间上先于此种公开内容。关于日期的所有声明或关于这些文件内容的陈述基于对于申请人可用的信息,并且不构成关于这些文件的日期或内容的正确性的任何承认。

[0048] 造血干细胞(HSC)稳态受生长因子、信号传导分子和转录因子的紧密控制。在主动脉-生殖腺-中肾(AGM)区中在胚胎发生期间衍生的终末 HSCs 随后定居在胎儿和成体造血器官中的小生境。Dzierzak,12Curr. Opin. Hematol. 197-202 (2004);Galloway & Zon, 53Curr. Top. Devel. Biol. 139-58 (2003)。

[0049] 本发明提供了用于在体外、体内或离体调节 HSC 生长和更新的方法。该方法包括使新生干细胞群体与至少一种 HSC 调节剂接触。这种群体可以包含在外周血、脐带血、骨髓、羊膜液、绒毛膜绒毛、胎盘或其他造血干细胞小生境内。在一个实施方案中,本发明提供了用于促进细胞群体中的造血干细胞生长和更新的方法。在另一个实施方案中,本发明提供了用于抑制细胞群体中的造血干细胞生长和更新的方法。

[0050] 本发明部分基于 PGE2 和增强 PGE2 合成的试剂引起 HSC 数目中的增加的发现。相反,阻断 PGE2 合成的试剂减少 HSCs。在这点上,影响 PGE2 合成的试剂可视为 HSC 调节剂。例如,负责 PGE2 合成的环加氧酶(cox)可能是 HSC 形成所需的。此外,血管舒张剂促进 HSC 扩增,相反,血管收缩剂减少 HSC 数目。例如,胍屈嗪——抗高血压血管舒张剂增加 HSCs,而芬布芬——非类固醇类抗炎药血管收缩剂减少 HSCs。这些试剂因此也视为 HSC 调节剂。

[0051] 如本文所使用的,HSC 调节剂可以促进或抑制 HSC 生长和更新。HSC 调节剂影响细胞群体中的 HSC 数目。HSC 调节剂影响培养中(在体外)、在短期温育期间(离体)或在体内的 HSC 扩增。参见下表 1。增加 HSC 数目的 HSC 调节剂包括上调 PGE2 合成的试剂。HSC 数目中的增加可以是比治疗前由受试者显示出的 HSC 数目多约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、约 100%、约 150%、约 200%或更多的增加。

[0052] 引起 HSC 数目中的减少的 HSC 调节剂下调 PGE2 合成和 / 或促进血管收缩。参见

例如下表 2。HSC 数目中的减少可以是比治疗前由受试者显示出的 HSC 数目少约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、约 100%、约 150%、约 200% 或更多的减少。HSC 数目可以通过疾病症状的减轻进行评估,例如增加的血小板计数、增加的血细胞比容,其中血小板计数或血细胞比容增加约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、约 100%、约 150%、约 200% 或更多。对 HSC 数目的作用可以通过疾病症状的减轻进行评估,例如增加的血小板计数、增加的血细胞比容,其中血小板计数或血细胞比容增加约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、约 100%、约 150%、约 200% 或更多。

[0053] 在一个实施方案中,PGE₂ 或 dmPGE₂ 用作 HSC 调节剂以增加 HSC 群体。

[0054] 本发明的 HSC 调节剂还包括 HSC 调节剂的衍生物。如本文所使用的,衍生物包括化学修饰的化合物,其中所述修饰由熟练的化学家视为常规的,例如另外的化学部分(例如,酸的酯或酰胺,保护基团,例如用于醇或硫醇的苯基、和用于胺的叔丁氧基羰基)。衍生物还包括放射性标记的 HSC 调节剂,HSC 调节剂的缀合物(例如,生物素或抗生物素蛋白、使用酶例如辣根过氧化物酶等、使用生物发光剂、化学发光剂或荧光剂)。此外,可以给 HSC 调节剂或其部分添加部分以增加体内半衰期。如本文所使用的,衍生物还包含类似物,例如包含化学修饰形式的特定化合物或其类别的化合物,和维持所述化合物或类别的药理学和 / 或药理学活性特征的化合物,也包含在本发明中。如本文所使用的,衍生物还包含 HSC 调节剂的前体药物,这已知增强药物的所需性质(例如,可溶性、生物利用率、制备等)。

[0055] HSC 调节剂的直接离体施用可以使造血干细胞能够显著体内扩增,从而使得甚至更小量的造血干细胞随后在移植中可以是足够的。因此,例如,脐带血干细胞移植现在不仅可以应用于儿童还可以应用于成年人。此种干细胞可以从包括例如外周血、脐带血、骨髓、羊膜液或胎盘血的来源进行收集。可替代地,包含 HSC 的来源样品可以进行收获,然后立即在 HSC 调节剂例如 PGE₂ 的存在下进行贮藏,并且在引入受试者内之前在 HSC 调节剂的存在下进行最初温育(在分化前)。

[0056] 此外,一种或多种 HSC 调节剂可以在体内用于增加骨髓或其他来源(例如脐带血)中的干细胞数目。通过增加干细胞的数目,来自受试者的干细胞总收获可以得到显著改善。进一步地,通过增加由受试者收获的干细胞数目,可用于移植回该受试者内或另一个受试者内的干细胞数目也可以得到显著改善,从而有效减少移入的时间,且随后导致受试者在其间具有不足的嗜中性粒细胞和血小板的时间中的减少,从而防止感染、出血或其他并发症。

[0057] 此外,本发明可以减少其否则不能转移足够细胞用于干细胞收获以继续进行关于其最初疾病的治疗的受试者比例,所述治疗例如化学治疗和其他骨髓切除治疗。因此,还可以减少具有延迟的最初移入的受试者数目的比例。此外,本发明还可以通过增加 HSC 数目促进骨髓切除治疗后的恢复。

[0058] HSC 调节剂例如表 1 和本文公开的那些可以在体内用于增加 HSC 生产和离体增加 HSC 数目。这通过将一种或多种化合物施用于受试者或干细胞来完成。

[0059] HSC 调节剂还可以用于给受试者提供自体的 HSCs。一般地,这涉及下述步骤:给有此需要的受试者施用 HSC 调节剂,以增强骨髓内的干细胞群体扩增和 / 或转移外周循环中的干细胞;收获一种或多种骨髓干细胞或外周循环中的一种或多种干细胞;且将一种或多

种收获的干细胞移植回受试者内。

[0060] 此外,得自根据上文描述的本发明方法收获的干细胞可以使用本领域已知用于干细胞深低温保藏的技术进行深低温保藏。因此,使用深低温保藏,干细胞可以这样维持,从而使得一旦确定受试者需要干细胞移植,那么干细胞可以进行解冻且移植回受试者内。如前所述,在深低温保藏技术期间一种或多种 HSC 调节剂例如 PGE2 的使用可以增强 HSC 群体。

[0061] 更具体而言,本发明的另一个实施方案提供了从脐带血或等价新生儿或胎儿干细胞来源收集的 HSCs 的增强,这可以进行深低温保藏用于此种干细胞在解冻后的治疗用途。此种血液可以通过本领域已知的几种方法进行收集。例如,因为脐带血是 HSCs 的丰富来源(参见 Nakahata & Ogawa, 70J. Clin. Invest. 1324-28 (1982); Prindull 等人, 67Acta. Paediatr. Scand. 413-16(1978); Tchernia 等人, 97(3)J. Lab. Clin. Med. 322-31(1981)), 所以关于新生儿血液的极佳来源是脐带和胎盘。新生儿血液可以通过从脐带中直接引流和/或通过在根和扩张静脉处从分娩胎盘中针抽吸来获得。参见例如, 美国专利号 7, 160, 714; 5, 114, 672; 5, 004, 681; 美国专利申请系列号 10/076180, 公开号 20030032179。

[0062] 实际上, 脐带血干细胞已用于重构在用骨髓切除 (myeloablative) 剂量的化学-放射疗法治疗后具有恶性和非恶性疾病的儿童中的血细胞生成。Sirchia & Rebutta, 84Haematologica 738-47(1999)。还参见 Laughlin 27Bone Marrow Transplant. 1-6(2001); 美国专利号 6, 852, 534。此外, 已报道脐带血中的干细胞和祖细胞看起来在培养中比在成体骨髓中的那些具有更大的增殖能力。Salahuddin 等人, 58Blood 931-38(1981); Cappellini 等人, 57Brit. J. Haematol. 61-70 (1984)。

[0063] 可替代地, 胎儿血可以借助于通过超声(Daffos 等人, 153Am. J. Obstet. Gynecol. 655-60 (1985); Daffos 等人, 146Am. J. Obstet. Gynecol. 985-87 (1983), 通过胎盘穿刺 (Valenti, 115Am. J. Obstet. Gynecol. 851-53 (1973); Cao 等人, 19J. Med. Genet. 81-87 (1982)), 通过胎儿镜检查(Rodeck, in PRENATAL DIAGNOSIS, (Rodeck & Nicolaides, 编辑, Royal College of Obstetricians & Gynaecologists, London, 1984)) 指导的针在胎盘根部处从胎儿循环获得。事实上, 除了脐带血和胎盘外, 绒毛膜绒毛和羊膜液也是多潜能胎儿干细胞的来源(参见 W02003042405), 其可以通过本发明的 HSC 调节剂进行处理。

[0064] 用于收集、加工和贮藏脐带血的各种试剂盒和收集设备是已知的。参见, 例如, 美国专利号 7, 147, 626; 7, 131, 958。收集应在无菌条件下进行, 且血液可以用抗凝剂进行处理。此种抗凝剂包括柠檬酸盐-磷酸盐-葡萄糖、酸性柠檬酸盐-葡萄糖、Alsever 氏溶液(Alsever & Ainslie, 41N. Y. St. J. Med. 126-35 (1941)、DeGowin 氏溶液(DeGowin 等人, 114J. A. M. A. 850-55 (1940))、Edglugate-Mg (Smith 等人, 38J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 573-85 (1959))、Rous-Turner 溶液(Rous & Turner 23J. Exp. Med. 219-37 (1916))、其他葡萄糖混合物、肝素或双香豆乙酯(ethyl biscoumacetate)。参见 Hurn Storage of Blood 26-160 (Acad. Press, NY, 1968)。

[0065] 各种程序是本领域已知的且可以用于就 HSCs 富集收集的脐带血。这些包括但不限于单独或组合的平衡密度离心、在单位重力的速度沉降、免疫玫瑰花结(rosetting)和免疫粘连、对流离心淘洗、T 淋巴细胞除尽、和荧光激活细胞分选术。参见例如, 美国专利号 5, 004, 681。

[0066] 一般地,收集的血液通过添加低温防护剂制备用于深低温贮藏,例如 DMSO (Lovelock & Bishop,183Nature1394-95 (1959);Ashwood-Smith190Nature1204-05 (1961)),甘油,聚乙烯吡咯烷酮(Rinfret85Ann. N. Y. Acad. Sci. 576-94 (1960)),聚乙二醇 (Sloviter & Ravdin196Nature899-900 (1962)),清蛋白,葡聚糖,蔗糖,乙二醇,i- 赤藓糖醇,D- 核糖醇,D- 甘露糖醇(Rowe,3 (1)Cryobiology12-18 (1966)),D- 山梨糖醇,i- 肌醇,D- 乳糖,氯化胆碱(Bender 等人,15J. Appl. Physiol. 520-24 (1960)),氨基酸(Phan & Bender,20Exp. Cell Res. 651-54 (1960)),甲醇,乙酰胺,甘油单乙酸酯(Lovelock, 56Biochem. J. 265-70 (1954)),和无机盐(Phan & Bender,104Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1960))。血浆的添加(例如,至 20-25%的浓度)可以增加 DMSO 的保护效应。

[0067] 收集的血液应以受控速率冷却用于深低温贮藏。不同的低温防护剂和不同的细胞类型具有不同的最优冷却率。参见,例如 Rapatz,5 (1)Cryobiology18-25 (1968),Rowe & Rinfret,20Blood636-37 (1962);Rowe,3 (1)Cryobiology12-18 (1966);Lewis 等人,7 (1)Transfusion17-32 (1967);Mazur168Science939-49 (1970)。用于 HSC 来源的操作、深低温保藏和长期贮藏的考虑和程序是本领域已知的。参见,例如,美国专利号 4,199,022 ; 3,753,357 ;4,559,298 ;5,004,681。还存在具有用于血液贮藏的相关规程的各种设备。美国专利号 6,226,997 ;7,179,643。

[0068] HSC 来源的解冻和重构中的考虑也是本领域已知的。美国专利号 7,179,643 ; 5,004,681。HSC 来源血液还可以进行处理以防止凝集(参见 Spitzer,45Cancer3075-85 (1980);Stiff 等人,20Cryobiology17-24 (1983),且去除毒性低温防护剂(美国专利号 5,004,681)。此外,存在测定 HSC 移植单位的移入细胞剂量的各种方法。参见美国专利号 6,852,534 ;Kuchler Biochem. METHODS IN CELL CULTURE & VIROLOGY18-19 (Dowden, Hutchinson & Ross, Strodsburg, PA,1964);10Methods in Medical Research39-47 (Eisen, 等人,编辑,Year Book Med. Pub., Inc., Chicago, IL,1964)。

[0069] 因此,不限于任何具体收集、处理或贮藏规程,本发明的实施方案提供了给新生儿血液添加 HSC 调节剂,例如 PGE2 或 dmPGE2。这可以在收集时,或在准备用于贮藏时、或在解冻后和在输注前完成。

[0070] 例如,从受试者中分离的干细胞,例如用或不用 HSC 调节剂先前处理受试者,可以在 HSC 调节剂例如 HSC 调节剂例如 PGE2 或在表 1 中列出的那些的存在下进行温育,以扩增 HSCs 的数目。扩增的 HSCs 随后可以重新引入它们从中获得的受试者内或可以引入另一个受试者内。

[0071] HSC 调节剂包括表 1 中列出和本文公开的 PGE2 和化合物因而可以特别用于:减少受试者中的干细胞再输注后移入的时间;减少延迟的原始移入的发生率;减少血小板生产的继发性衰竭的发生率;和减少受试者中的干细胞再输注后血小板和 / 或嗜中性粒细胞恢复的时间。这些方法一般包括下述步骤:给有此需要的受试者施用 HSC 调节剂,以增强骨髓内的干细胞群体的扩增和 / 或转移外周循环中的干细胞,和随后收获一种或多种骨髓干细胞或外周循环中的干细胞,并且随后如通过受试者的具体需要确定的,在合适的时间将收获的干细胞移植回受试者内。

[0072] HSC 调节剂,例如引起 HSC 数目增加的 HSC 调节剂可以提供方便的单剂疗法,以改善干细胞移植的效率,允许实体瘤、骨髓瘤和淋巴瘤的更攻击性治疗,和增加用于干细胞移

植的候选者的数目。

[0073] 本发明的方法还可以用于增加来自供体受试者的干细胞数目(包括骨髓细胞或脐带血细胞),其细胞随后用于援救已接受骨髓切除性化学治疗或辐射治疗的受体受试者。

[0074] 如本文所使用的,受试者包括在用于恶性疾病的治疗过程中或作为基因治疗的组分其为用于自体干细胞或骨髓移植的候选者的任何人。其他可能的候选者是其捐赠干细胞或骨髓给受试者用于同种异体移植用于恶性疾病或基因治疗的受试者。受试者可以已经历辐射疗法,例如作为用于除造血外的细胞类型的恶性肿瘤的治疗。受试者可能患有贫血,例如镰状细胞贫血、地中海贫血(thalassemia)、再生障碍性贫血、或 HSC 衍生物的其他缺乏。

[0075] 本发明的方法因此提供了下述利益:(1)允许移植在其否则将由于无法接受的失败的移入的高风险不视为候选者的患者中进行;(2)减少产生最低限度可接受的收获所需的单采血液成分术次数;(3)通过增加可用于移植的 HSCs 数目来减少移入的原发性或继发性衰竭的发生率;和(4)通过增加重要的造血谱系的定型祖先的数目来减少原始移入所需的时间。

[0076] 本发明的 HSC 调节剂可以具有改善单采血液成分术产量和改善单采血液成分术的细胞的移入潜能的干细胞移植中的临床利益。

[0077] 本发明的 HSC 调节剂,例如引起 HSC 数目减少的 HSC 调节剂,还可以在治疗患有造血系统的过度增生病症的受试者中 useful。过度增生病症可以包括但不限于,真性红细胞增多、特发性血小板增多、骨髓样化生的骨髓纤维化、和慢性髓细胞性白血病。

[0078] 本发明的化合物或试剂可以包含在药学上可接受的制剂中。此种药学上可接受的制剂可以包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。如本文所使用的,“药学上可接受的载体”包括生理学相容的任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。例如,载体可以适合于注射到脑脊液内。赋形剂包括药学上可接受的稳定剂。本发明涉及任何药学上可接受的制剂,包括以大分子复合物、纳米胶囊(nanocapsule)、小球体或珠形式的合成或天然聚合物,和基于脂质的制剂,包括水包油乳剂、微胶粒、混合微胶粒、合成人工膜小泡和重新包封的红细胞。

[0079] 当试剂或化合物递送给患者时,它们可以通过任何合适的途径施用,包括例如经口(例如,在胶囊、悬浮液或片剂中)或通过肠胃外施用。肠胃外施用可以包括例如肌内、静脉内、关节内、动脉内、鞘内、皮下或腹膜内施用。试剂还可以经口、经皮、局部或通过吸入(例如,支气管内、鼻内、经口吸入或鼻内滴剂)或直肠施用。如指示的施用可以是局部或全身的。试剂还可以使用本领域技术人员众所周知的病毒载体进行递送。

[0080] 本发明预期局部和全身施用。局部施用的所需特征包括达到有效化合物的有效局部浓度,以及避免来自活性化合物的全身施用的不利副作用。在优选实施方案中,拮抗剂局部施用。局部化的递送技术在例如 51J. Biomed. Mat. Res. 96-106(2000);100(2)J. Control Release 211-19 (2004);103 (3) J. Control Release 541-63 (2005);15 (3) Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 603-22 (1999);1 (1) Semin. Interv. Cardiol. 17-23 (1996) 中得到描述。

[0081] 药学上可接受的制剂可以悬浮于水性载体中并且通过常规皮下针或使用输注泵引入。

[0082] 施用于个体的试剂的量将依赖于个体的特征,例如一般健康、年龄、性别、体重和

对药物的耐受以及排斥的程度、严重性和类型。依赖于这些和其他因子,技术人员将能够决定合适的剂量。

[0083] 在本发明的范围内的 HSC 调节剂可以在各种方法中进行鉴定,例如斑马鱼遗传系统。斑马鱼是用于研究脊椎动物发育和疾病的极佳的遗传系统。参见例如,Hsia & Zon,33(9) Exp. Hematol. 1007-14 (2005);de Jong & Zon;39Ann. Rev. Genet. 481-501 (2005);Paffett-Lugassy & Zon,105Meth. Mol. Med. 171-98(2005);Haffner & Nusslein-Volhard,40Int' l J. Devel. Biol. 221-27 (1996)。外部发育的胚胎是透明的且器官可以容易地显现。斑马鱼和哺乳动物共享许多在发育中相同的基因程序。当斑马鱼交配时,它们产生大量(每周 100-200 个)透明胚胎。许多胚胎可以置于相对小的空间,并且存在短世代时间(约 3 个月)。大规模筛选已产生具有特定缺陷的超过 2000 个遗传突变型,所述特定缺陷影响胚胎发生的基本上每个方面。Driever 等人,123Devel. 37-46 (1996);Eisen,87Cell1969-77 (1996)。许多血液突变型已在描述血细胞生成中的关键事件中有用。Dooley & Zon,10Curr. Op. Genet. Devel. 252-56 (2000)。斑马鱼已用于执行基于完整生物的小分子筛选,因为大量胚胎可以排列到包含来自化学文库的化合物的微量滴定板内。例如,Peterson 和同事测试了关于发育缺陷的 1,100 种化合物。Peterson 等人,97P. N. A. S. USA12965-69 (2000)。根据这个筛选,约 2%的化合物是致死的,且 1%引起特定表型。例如,1 种化合物抑制称为耳石的内耳结构的形成,但不引起其他缺陷。

[0084] 还可能筛选突变表型的化学抑制剂。Peterson 等人,22Nat. Biotech. 595-99 (2004);Stern 等人,1Nat. Chem. Biol. 366-70 (2005)。在一个此种筛选中,发现化学药品援救 gridlock 突变型——主动脉先天性缩窄模型。Peterson 等人,2004。这种援救的机制涉及校正血管发生缺陷的 VEGF 的诱导。这些数据证实高度有效和特异的化合物可以使用斑马鱼进行鉴定。

[0085] 进一步就斑马鱼而言,已构建高密度遗传学图,其包括微卫星标记、基因和表达序列标签(ESTs)。Knapuk 等人,18Nat. Genet. 338-43(1998);Shimoda 等人,58Genomic219-32 (1999);Kelly 等人,10Genome Res. 558-67 (2000);Woods 等人,20Genome Res. 1903-14 (2000)。已着手进行全长 cDNA 计划作为斑马鱼 EST 计划的延伸。已构建密集 RH 图且与 Sanger 中心关于基因组测序计划的数据整合。由 NIH 支持的重要的环球网资源是斑马鱼信息网络(ZFIN),用于团体的焦点。称为斑马鱼国际资源中心(Zebrafish International Resource Center)(ZIRC)的原种中心和支持实验室也极大地帮助该领域。Sanger 中心测序可以在 2007 年完成的斑马鱼基因组。

[0086] 永久血细胞生成的开始已在许多脊椎动物物种中进行研究。在禽类物种中的初期工作中,鸡-鹌鹑嵌合体证实永久造血干细胞不在卵黄囊中出现,而在胚体内出现。Dieterien-Lievre33J. Embryol. Exp. Morphol. 607-19(1975)。在爪蟾属(Xenopus)胚胎中使用二倍体/三倍体嵌合体的类似研究阐明与背外侧板比较,腹侧血岛(卵黄囊等价物)在成体血细胞生成中起较少的作用。Kau & Turpen131J. Immunol. 2262-66 (1983)。基于背外侧板中胚层包含产生永久血细胞生成的推定造血细胞的发现,几个组进一步研究了发育中的主动脉生殖腺中肾(AGM)区。Medvinsky 等人,364Nature64-67 (1993);Godin 等人,364Nature67-70 (1993)。在这个区域内,存在最初在猪中识别的在主动脉的腹侧壁中的细胞簇。Sabin,9Contrib. to Embryol. 213-62(1920)。其他人已暗示这些簇代表衍生自“成

血”内皮细胞的早期造血干细胞。

[0087] AGM 血细胞生成的过程在脊椎动物中是进化上保守的。Galloway & Zon, 53 *Curr. Topics Dev. Biol.* 139–58 (2003)。在小鼠中, 干细胞的开始在 8.5 天至 9 天时发生, 正当循环开始时。在第 11 天时 AGM 区的造血干细胞可以移植, 然而, 在第 10 天时的细胞不导致长期移入。进一步的研究已阐明主动脉是极化的, 且来自腹侧和背侧区域的因子将修饰细胞的行为。例如, 主动脉的背侧区域衍生自体壁 (somatic) 中胚层。它在 TGF α 、BMP 和 sonic hedgehog 信号传导的影响下。Parnaud & Dieterlen-Lievre, 126 *Devel.* 617–27 (1999)。

[0088] 细胞标记研究已证实 AGM 中的推定 HSC 具有侵袭主动脉下间质以及多种组织的潜能。Jaffredo 等人, 125 *Devel.* 4575–83 (1998); Jaffredo 等人, 224 *Devel. Biol.* 204–14 (2000)。这些细胞标记研究使用黑墨 (India ink) 或受输入脉管系统内用 LacZ 标记的逆转录病毒影响的细胞。这些命运作图实验显示组织内的造血细胞的标记。这些研究阐明了在脊椎动物胚胎中的主动脉内的造血干细胞的开始。

[0089] 已发现几种基因是 AGM 血细胞生成所需的。基因 runx1 (以前的 AML1 癌蛋白质) 在其中发现造血细胞的腹侧区域中的主动脉壁中表达; 这种基因功能是 AGM 血细胞生成所需的。Cal 等人, 13 *Immunity* 423–31 (2000)。runx1 突变型小鼠缺乏 AGM 且具有缺陷的血细胞生成。runx1 突变型中的缺陷可以被由 Tie2 启动子驱动的 runx1 转基因援救, 从而证实内皮和造血驱动的 runx1 表达足以调节 AGM 血细胞生成。Miller 等人, 32 *Nature Genet.* 645–49 (2002)。在 runx1 敲入 (knock-in) 中, 存在用 LacZ 标记的主动脉下间充质细胞, 且这个观察已解释为意指一些主动脉下细胞可以产生造血干细胞。North 等人, 126 *Devel.* 2563–75 (1999)。近期研究已证实主动脉下内皮细胞挤过内皮层且形成造血簇。Bertrand 等人, 102 *P. N. A. S. USA* 134–39 (2005); Tavian & Peault, 33 *Exp. Hemat.* 1062–69 (2005); Tavian & Peault, 49 *Int'l J. Devel. Biol.* 243–50 (2005); Tavian 等人, 1044 *Ann. NY Acad. Sci.* 41–50 (2005)。

[0090] 因此, 可能争论成血干细胞还是主动脉下中胚层细胞是 HSCs 的真正前体。一旦造血干细胞芽出内皮壁, 它们就是 CD45⁺ 且表达转录因子 runx1 和 c-myb。AGM 细胞也在通过 notch 信号传导的控制下。notch1 敲除小鼠 AGM 造血干细胞以及 runx1 和 c-myb 的表达在主动脉区域中不存在。Kumano 等人, 18 *Immunity* 699–711 (2003); Robert-Moreno 等人, 132 *Devel.* 1117–26 (2005)。此外, coupTF 转录因子也缺乏 AGM 造血干细胞, 尽管它尚未得到充分研究。You 等人, 435 *Nature* 98–104 (2005)。尽管 runx1、cmyb、notch 和 coup 看起来对于 AGM 血细胞生成是重要的, 但这些因子的相互作用、时间和空间关系、以及其他潜在未知因子的作用是未知的。血细胞生成开始的遗传程序的更好理解明显是必需的。

[0091] 进行化学遗传筛选以鉴定在斑马鱼胚胎发生期间调节永久 HSC 形成的新途径。图 1。在哺乳动物血细胞生成过程中 HSC 发育所需的基因例如 runx1 和 cmyb, 在受精后 36 小时 (hpf) 时在类似于哺乳动物 AGM 的区域中的背主动脉的腹侧壁中表达。North 等人, 16 *Immunity* 661–72 (2002); Mukoyama 等人, 9 *Curr. Biol.* 833–86 (1999); Kalev-Zylinska 等人, 129 *Devel.* 2015–30 (2002); Burns 等人, 30 *Exp. Hematol.* 1381–89 (2002)。野生型胚胎与个别化合物一起从 3 体节阶段温育直至 36hpf。将关于 runx1 和 cmyb 的探针组合且用于通过原位杂交检测 HSCs。大多数化学药品, 2357 种中的 2275 种 (91.7%) 无法改变 runx1/cmyb 表达, 而 35 种 (1.4%) 和 47 种 (1.9%) 分别导致增加或减少的 AGM HSCs。

[0092] 在改变 runx1/cmyb 表达的 82 种物质中,10 种影响前列腺素(PG)途径。PGs 通过 cox1、cox2 和组织特异性异构酶由花生四烯酸形成。至少 5 种 PG 途径化合物增加 HSC 基因表达(表 1),且 5 种减少 HSC 基因表达(表 2)。在 36hpf 时,runx1/cmyb+HSCs 包含在主动脉中的平坦的内皮细胞系和造血簇。亚油酸(10 μ M)——PG 前体增加 runx1/cmyb+HSCs (22 种改变的 / 评分的 30 种),而塞来昔布(20 μ M) ——cox2 的选择抑制剂减少 HSCs (26/31)。血管标记 flk1 保持相对不变。前列腺素 E2 是在斑马鱼中产生的主要效应物前列腺素类(Grosser 等人,99P. N. A. S. USA8418-23 (2002)),并且由 cox1 和 cox2 调节。使斑马鱼胚胎暴露于前列腺素合成的抑制剂以及外源前列腺素。用 PGE2 (25/49) 处理导致比 PGI2 (28/47) 在 20 μ M 时更强的 runx1/cmyb 表达,而用 SC560 (cox1、10 μ M、30/36) 和 NS398 (cox2、20 μ M、35/44) 以及非特异性 cox 抑制剂同种型选择性抑制 cox 活性导致减少的 HSCs。这些发现令人信服地证明了 PGs 在 AGM HSCs 形成中的特定作用。

[0093] 表 1. 增加 HSCs 的示例 HSC 调节剂

[0094]

化合物	鉴定的 次数#	对 HSC 表达的作用 (改变的胚胎#/评分的胚胎#)
Mead 酸	2	增加 (24/32)
亚油酸	1	增加 (22/30)
13 (S) -HODE	1	增加 (15/25)
Ly-171883	1	增加 (17/26)
环氧二十碳三烯酸	1	增加 (17/25)

[0095] 鉴定为调节 runx1/cmyb⁺HSCs 的 PG 途径化合物在列 1 中列出。列 2 指示在其上鉴定具体化合物的频率。第 3 列显示化合物对 HSC 基因表达的作用(# 改变的胚胎 / 评分的胚胎 #)

[0096] 表 2. 减少 HSCs 的示例 HSC 调节剂

[0097]

化合物	鉴定的 次数#	对 HSC 表达的作用 (改变的胚胎#/评分的胚胎#)
塞来昔布	2	减少 (26/31)
芬布芬	1	减少 (20/26)
前列腺素 J2	1	减少 (12/22)
琥丁唑酮	1	减少 (16/30)
舒林酸	1	减少 (18/31)

[0098] 鉴定为调节 runx1/cmyb⁺HSCs 的 PG 途径化合物在列 1 中列出。列 2 指示在其上鉴定具体化合物的频率。第 3 列显示化合物对 HSC 基因表达的作用(# 改变的胚胎 / 评分

的胚胎 #)

[0099] 使用本文描述的斑马鱼筛选技术鉴定了另外的 HSC 前列腺素途径改性剂,例如表 3 中显示的那些:

[0100] 表 3. 示例前列腺素途径改性剂

[0101]

HSC 抑制剂	HSC 增强剂
吲哚美辛	dmPGE2
SC560	PGE2
NS398	PGI2
阿司匹林	二十碳三烯酸
布洛芬	ONO-259
萘普生	Cay10397
马兜铃酸	
AH6809 (EP1/2antag)	
AH23848 (EP4antag)	

[0102] *cox1* 在脉管系统中的表达先前得到描述;*cox1* 活性的击倒抑制主动脉和静脉之间的内皮边界的发展。Cha 等人,282Devel. Biol. 274-83 (2005)。因为 HSCs 源自成血内皮细胞群体,所以 *cox1* 功能的丧失将影响 HSC 发育。通过原位杂交,在 36hpf 时 *cox2* 在包含 AGM 的尾区域中广泛表达。在 FACS 分离的血液和内皮细胞群体中,发现 *cox1* 和 *cox2* 在从原始到永久血细胞生成的转换期间都是上调的。*cox1* 表达的高水平在 *lmo2*⁺ 内皮细胞和 CD41+HSCs 中都检测到,而 *cox2* 仅在 HSC 级分中是上调的(图 2,小图 A)。这些结果暗示 *cox1* 和 *cox2* 通过干细胞小生境以及 HSC 自身的调节来参与 AGM HSCs 的诱导。

[0103] 亚油酸和 Mead 酸可以充当底物用于前列腺素生产并且在筛选中作为上调 HSC 形成的试剂进行分离。为了确定哪种前列腺素介导 AGM 中的 HSCs 中的增加,使斑马鱼从 3 体节到 36hpf 暴露于外源纯化的前列腺素并且如先前所述进行染色。在斑马鱼中,主要生理学活性的前列腺素是 PGE2、PGI2 和 PGF2。Pini 等人,25Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 315-20 (2005);Grosser 等人,2002。这些中的每一个就其对 AGM HSCs 的作用进行测试。发现 PGE2 和 PGI2 都适度地增加 AGM 中的 Runx1+Cmyb⁺ 细胞数目,而 PGE2 无作用。由于在体内前列腺素生产和破坏的紧密调节,还检查了缓慢代谢形式的 PGE2。

[0104] 长效衍生物 16, 16- 二甲基 -PGE2 (dmPGE2, 10 μ M)引起检查的 78%胚胎 (97/124) 中的 runx1/cmyb+AGM HSCs 中的增加。AGM HSCs 通过在分析的 90%胚胎 (92/102) 中的吲哚美辛 (10 μ M)处理得到抑制。PGE2 是通过质谱分析法在 36hpf 胚胎 (18+/-6pg/50 胚胎; n=4) 中测量的最丰富的 PG,且吲哚美辛处理使 PGE2 形成减少在可检测水平以下 (<2pg/50

胚胎 ;n=3)7。用 dmPGE2 的处理通过 f1k1 染色对脉管系统具有最低限度的作用 ;吲哚美辛略微改变检查的 30%胚胎(15/49)中的肌节间脉管。使具有绿色荧光 HSCs 和髓样祖细胞的转基因 cmyb:GFP 斑马鱼与 lmo2 :dsRed 鱼杂交,所述 lmo2 :dsRed 鱼具有红色荧光内皮细胞和 HSCs,以显现体内化学暴露的作用。在 36hpf 时,通过共焦显微镜术成像的活胚胎显示在吲哚美辛处理后沿着主动脉底面显著减少的 HSCs 数目,和在 dmPGE2 暴露后显著增加的 HSCs。图 3。这暗示 PG 影响沿着主动脉的背侧壁形成的 HSCs 的总数目 ;HSCs 在异常位置处的诱导不明显。通过 qPCR, runx1 表达在添加 dmPGE2 后增强 3 倍,而吲哚美辛引起 runx1 表达中明显 50%的减少 ;还观察到 cmyb 表达中的显著改变(图 2,小图 B)。

[0105] 为了证实 PGE2 活性的要求,低剂量(40 μ M)的吗啉代寡核苷酸(MO)用于击倒 cox1 和 cox2 的表达 ;cox1 活性的低剂量抑制允许胚胎前进通过原肠胚形成,而模拟 cox 依赖性发育缺乏。Grosser 等人,(2002)。cox 的 MO 抑制减少 AGM HSCs(cox154/74 ;cox260/71)。质谱法分析证实 PGE2 在这些胚胎中在可检测水平以下,与 MO 介导的内源前列腺素合成的抑制一致(n=4)。对 HSCs 的作用通过使 MO 注射的胚胎与 10 μ M dmPGE2 一起温育得到逆转(cox1/dmPGE229/52 援救的 ;cox2/dmPGE243/60)。PGE2 合酶的 MO 击倒引起 HSCs 的减少(35/50),这通过 dmPGE2 添加得到援救(25/45),从而指出通过 PGE2 信号传导足以调节 HSC 形成。PGE2 通过几种受体 EP1-4 来发信号,所有所述受体都存在于斑马鱼基因组中。Cha 等人,20Genet. Devel. 77-86(2002)。EP2 和 EP4 受体的 MO 击倒导致减少的 runx1/cmyb 表达(EP239/63 ;EP444/67),这不通过暴露于外源 dmPGE2 得到逆转。通过 qPCR 分析证实 36hpf 时,EP2 和 EP4 存在于 CD41+HSC 和 CD41- 非干细胞 FACS 分选的细胞群体中。这些实验证实 PGE2 介导的信号传导调节 AGM 区域中的 HSCs 的形成。

[0106] 为了进一步研究前列腺素和 HSC 生产之间的相互作用,使用本文描述的斑马鱼胚胎技术筛选众多前列腺素衍生物。一般而言,测定指出增强 PGE2 的稳定性的衍生物增加 HSCs。关于其相对于对照未观察到增强的那些往往是与在 HSCs 中无活性的受体优先结合的化合物。这些化合物对 HSC 数目的作用在表 4 中指出 :

[0107] 表 4. 影响 HSC 生产的前列腺素衍生物

[0108]	↑	PGE2
	↑↑	16,16-二甲基 PGE2
		20-羟基 PGE2
	↑↑	19 (R) -羟基 PGE2
	↑↑	16,16-二甲基 PGE2 p- (p-乙酰氨基苯甲酰氨基) 苯酯
	↑	11-脱氧-16,16-二甲基 PGE2
	↑↑	9-脱氧-9-亚甲基-16,16-二甲基 PGE2
	↑↑	9-脱氧-9-亚甲基 PGE2
		9-酮前列腺醇
	↑	丁环前列素
	↑	硫前列酮
	毒性	5-反式 PGE2
		17-苯基三去甲 PGE2
	↑	PGE2 丝氨酸酰胺
	↑↑	PGE2 甲酯
	↑↑↑	16-苯基四去甲 PGE2
	↑↑	15 (S) -15-甲基 PGE2
	↑↑	15 (R) -15-甲基 PGE2
		8-异-15-酮 PGE2
		8-异 PGE2 异丙酯

[0109] ↑指示增加 HSC 生产的相对效力。无箭标指示相对于对照不显著的 HSC 增强。

[0110] 为了检查 PGE2 在成年斑马鱼中的 HSC 稳态中的作用,执行骨髓(KM)照射恢复测定。Burns 等人,19Genes & Devel. 2331-42 (2005)。对野生型鱼进行亚致死照射,暴露于 dmPGE2,并且通过 FACS11 就 KM 恢复的动力学进行评估(图 4A)。与 DMSO 暴露的对照比较,KM 的造血重构速率在暴露于 50 μM dmPGE2 的鱼中显著增强(图 4A,B)。祖先百分比中的升高分别先于髓样和淋巴样群体的恢复。在照射后第 3 天时在 PGE2 处理的 KM 上通过 qPCR 的干细胞、祖细胞和内皮细胞标记的表达水平显示了 runx1 和 lmo2 的显著上调(图 5)。cox 活性经由非选择性和选择性抑制剂的抑制显著减少 KM 恢复和受影响的总体存活(图 5)。结果指出 PGE2 在 KM 稳态中起重要作用。

[0111] 还评估了前列腺素途径对哺乳动物 HSC 和祖先群体的作用。在胚样体扩增期间给 ES 细胞添加 dmPGE2 增加在 OP9 基质细胞层上和甲基纤维素集落形成测定中的造血集落数目(图 6A, B)。Nakano 等人,272Sci. 722-24 (2002)。OP9、终末类红细胞(dE)和粒细胞/单核细胞(GM)集落在暴露于 10 μM (GM p=0.005) 和 20 μM (OP9p=0.047 ;dE p=0.04 ;

GM $p=0.007$)dmPGE2 后以剂量依赖方式增加。多能粒细胞 / 红细胞 / 单核细胞 / 巨噬细胞 (GEMM) 集落的数目在 dmPGE2 处理 ($10 \mu\text{M}$: $p=0.017$; $20 \mu\text{M}$: $p=0.016$) 后增强 2.9 倍。在 $100 \mu\text{M}$ 时, dmPGE2 对 ES 细胞是毒性的。执行 qPCR 以测定 PG 途径组分是否存在于 ES 细胞中 :Cox1、Cox2、PGE2 合酶、和 PGE 受体 1-4 存在于检查的所有阶段。吲哚美辛在 $20 \mu\text{M}$ (OP9 $p=0.047$) 和 $100 \mu\text{M}$ (GM $p=0.024$) 时抑制集落生长(图 6A,B);抑制效应在 2 种集落形成测定中通过外源 dmPGE2 得到援救(图 7A,B)。这些数据暗示前列腺素途径在血细胞生成中的作用在斑马鱼和哺乳动物之间是保守的。

[0112] 可替代地,造血或内皮细胞在 AGM (主动脉 - 生殖腺 - 中肾) 区中的扩增可以通过下述进行研究 :使小鼠交配,随后在胚胎发育的第 8.5 天时开始用 PGE2 在其饮用水中给新妊娠雌性服用。PGE2 水平可以对鼠胚胎的植入有作用 ;等待直至第 8.5 天开始治疗允许植入进行,仍提供了药物影响可以在第 10.5 天时开始在 AGM 区中发现的干细胞群体的时间。妊娠雌性在胚胎发育的第 11.5 天用 CO_2 处死,并且从子宫中分离胚胎且用低聚甲醛进行固定。固定的胚胎可以加工用于关于 HSCs 标记例如 Runx1、c-myb 或 Sca1 的整装制片原位杂交,或实施使用针对 HSCs 的抗体的免疫组织化学,以发现扩增的干细胞群体的证据。可以使用不同剂量,例如 10^{-1} 、 10^{-3} 和 10^{-5} 微克 /g 体重。3 只妊娠雌性小鼠可以用于上文所述的每个剂量,且用于未暴露的对照变量。有效剂量随后在涉及从胚胎的 AGM 区解剖的细胞的移植实验中使用。

[0113] CFU-S 和长期再增殖 HSCs 的扩增也可以在小鼠中进行研究。发现扩增在 AGM 区中的潜在干细胞的单剂 PGE2 可以在植入后 (约 E8.5) 在饮用水中饲喂给妊娠雌性。对照雌性进行平行处理。妊娠雌性在 11.5dpc 时进行安死术。从子宫中收集胚胎,通过显微解剖分离 AGM 区和制备 AGM 细胞用于移植。实验和 / 或对照细胞的 1 胚胎等价物的组合将注射入被照射的受体小鼠的尾静脉内,在其中它们将归巢至脾 (短期) 和骨髓 (长期)。实验细胞对照细胞的贡献可以在移植后 12 天时进行分析,其通过关于处死的受体小鼠的脾集落数目的标准 CFU-S 测定,或在移植后 1 个月时通过骨髓的流式细胞术以测定竞争性长期 HSC 再增殖。

[0114] 因为心血管系统的发育与胚胎发生期间的造血干细胞生产密切关联,所以血压对 PGE2 信号传导和 AGM HSCs 诱导的作用可能是相关的。在任何脊椎动物中关于血细胞生成的最保守位点是主动脉的腹侧壁。主动脉中的细胞在斑马鱼中发育 30 小时时出现,并且在那里发育直至约 46 小时,那时它们进入循环或侵袭组织。AGM HSC 生产可以在第一次心搏后和当脉管系统内的血压达到临界水平时定时发生。在斑马鱼中,第一次心搏在 23 小时时发生。在这时,心搏缓慢和心脏的收缩相对虚弱。在 30 小时时,确立强循环。制备 AGM 干细胞的提示可能是血压中的改变。在斑马鱼筛选中鉴定的几种化学药品调节血压和心肌收缩性。例如,化学药品肼屈嗪,常用的抗高血压药已知增加前列腺素 E2 表达。暴露于肼屈嗪的胚胎的原位分析证实血管发生中的极少改变,但血液干细胞数目中的大量增加。此外,药物毒毛旋花子苷原,强心苷增加心脏的收缩性且还增加 AGM 干细胞。此外, β 阻断剂,阿替洛尔导致血管舒张且还导致 AGM 干细胞提高的生产。扰乱心搏的化学药品例如 BDM 和肾上腺素,以及沉默心脏 (silent heart) 突变型可以改变 AGM 干细胞的生产,并且可以确定循环对于 AGM 生产是否是必需的。为了进一步确定血压和前列腺素途径之间的关联,肼屈嗪、毒毛旋花子苷原和阿替洛尔可以在 COX2 抑制剂的存在下与斑马鱼一起温育。类似研究

可以用 COX2 吗啉代来完成以确定它们是否能够阻断由胍屈嗪介导的干细胞活化。

[0115] 为了研究潜在的体内效应,使鼠全骨髓(WBM)离体暴露于 dmPGE2 ($1 \mu\text{M}/106$ 个细胞),且受照射的受体用 6×10^4 处理的 WBM 细胞进行移植。CFU-S₁₂ 的数目在 dmPGE2 处理的 WBM 的受体中增加 3 倍($p < 0.0001$) (图 8b, 图 9A, 表 6- 表 8);类似地,更成熟的 CFU-S8 集落也得到增强(图 9A, 表 5)。为了评估内源 PGE2 需求,使 WBM 细胞与吲哚美辛($1 \mu\text{M}/106$ 个细胞)一起离体温育。 1×10^5 细胞移植后,在吲哚美辛处理的细胞的受体中观察到 CFU-S₁₂ 数目中 70% 的减少($p = 0.0002$) (图 8C, 图 9C, 表 4- 表 6);用特异性 *cox1* 和 *cox2* 抑制可见类似结果(图 9K, L)。这些结果暗示 PGE2 处理不仅增强造血干细胞形成,也是 CFU-S 活性所需的。

[0116] 表 5. dmPGE2 对 CFU-S₁₂ 的作用

[0117]

离体处理	鼠细胞群体	移植的细胞#	CFU-S ¹² (n+10)	
			重量 mg Ave (SD)	集落数目
EtOH	全骨髓	6000	41.9 (15.8)	5.8 (2.6)
dmPGE2	全骨髓	6000	85.4 (16.5)	15.2 (2.2)
EtOH	全骨髓	100000	71.8 (18.1)	8.8 (2.1)
吲哚美辛	全骨髓	100000	32.7 (8.7)	2.5 (1.4)
EtOH	Kit+Sca+Lin-	100	25.1 (5.9)	3.0 (1.4)
dmPGE2	Kit+Sca+Lin-	100	47.7 (5.6)	6.2 (1.2)
EtOH	Kit+Sca+Lin-	300	46.1 (5.6)	5.0 (1.1)
dmPGE2	Kit+Sca+Lin-	300	88.2 (14.8)	11.0 (1.7)

[0118] 脾重量和 CFU-S 活性在注射 WBM 或 *ckit*+*sca1*+ 谱系 -FACS 分选细胞的受照射受体中在第 12 天时进行评估,所述细胞用 EtOH、dmPGE2 或吲哚美辛进行处理($1 \mu\text{M}/10^6$ 细胞)。

[0119] 表 6. dmPGE2 对辐射防护的竞争性 BM 再增殖的作用

[0120]

离体处理	CD45.1 测试细胞 剂量	CD45.1/2 竞争者细 胞剂量	6 wk CD45.1 移入		CD45.2 受体分 析总数
			具有>5 % CD45.1 的 动物	平均 % CD45.1 嵌合状态 ($\pm$ SD)	
EtOH	15000	200000	3	4.0 $\pm$ 7.8	10
	50000	200000	4	5.8 $\pm$ 5.7	8
	200000	200000	9	32.5 $\pm$ 20.7	10
	2000000	200000	9	52.4 $\pm$ 34.8	9
dmPGE2	15000	200000	7	16.9 $\pm$ 19.5	10
	50000	200000	8	22.7 $\pm$ 24.2	10
	200000	200000	10	41.9 $\pm$ 17.2	10
	2000000	200000	10	85.1 $\pm$ 3.1	10

[0121] WBM (CD45.1) 用 EtOH 载体或 dmPGE2 进行离体处理且移植到亚致死照射的受体 (CD45.2) 内, 所述受体具有列 2 和 3 中所示比的固定数目的 (CD45.1/CD45.2) 竞争者细胞。列 4 举例说明在 6 周时具有超过 5% CD45.1 嵌合状态的动物数目, 且列 5 证实嵌合状态的平均百分比。最后 1 列指示分析的 CD45.2 受体数目。

[0122] 表 7. dmPGE2 对辐射防护的竞争性 BM 再增殖的作用。

[0123]

离体处理	CD45.1 测试细胞 剂量	CD45.1/2 竞争者细 胞剂量	12 wk CD45.1 移入		CD45.2 受体分 析总数
			具有>5 % CD45.1 的动物	平均 % CD45.1 嵌合 状态 ($\pm$ SD)	
EtOH	15000	200000	2	1.9 $\pm$ 2.9	9
	50000	200000	3	5.4 $\pm$ 4.4	8
	200000	200000	10	46.9 $\pm$ 22.9	10
	2000000	200000	10	82.8 $\pm$ 14.1	9
dmPGE2	15000	200000	5	15.1 $\pm$ 22.2	10
	50000	200000	8	18.1 $\pm$ 22.2	10
	200000	200000	10	40.8 $\pm$ 28.7	10
	2000000	200000	10	87.8 $\pm$ 4.0	10

[0124] WBM (CD45.1) 用 EtOH 载体或 dmPGE2 进行离体处理且移植到亚致死照射的受体 (CD45.2) 内, 所述受体具有列 2 和 3 中所示比的固定数目的 (CD45.1/CD45.2) 竞争者细胞。列 4 举例说明在 12 周时具有超过 5% CD45.1 嵌合状态的动物数目, 且列 5 证实嵌合状态的平均百分比。最后 1 列指示分析的 CD45.2 受体数目。

[0125] 表 8. dmPGE2 对辐射防护的竞争性 BM 再增殖的作用。

[0126]

离体处理	CD45.1 测试细胞 剂量	CD45.1/2 竞争者细 胞剂量	24 wk CD45.1 移入		CD45.2 受体分 析总数
			具有>5 % CD45.1 的 动物	平均 % CD45.1 嵌 合状态 ($\pm$ SD)	
EtOH	15000	200000	1	1.9 $\pm$ 2.5	9
	50000	200000	2	4.7 $\pm$ 4.2	7
	200000	200000	10	51.18 $\pm$ 26.3	10
	2000000	200000	9	81.7 $\pm$ 24.4	9
dmPGE2	15000	200000	4	10.2 $\pm$ 10.3	9
	50000	200000	7	14.3 $\pm$ 16.6	10
	200000	200000	10	39.1 $\pm$ 31.0	10
	2000000	200000	10	90.7 $\pm$ 4.0	10

[0127] WBM (CD45.1) 用 EtOH 载体或 dmPGE2 进行离体处理且移植到亚致死照射的受体 (CD45.2) 内, 所述受体具有列 2 和 3 中所示比的固定数目的 (CD45.1/CD45.2) 竞争者细胞。列 4 举例说明在 24 周时具有超过 5% CD45.1 嵌合状态的动物数目, 且列 5 证实嵌合状态的平均百分比。最后 1 列指示分析的 CD45.2 受体数目。

[0128] PG 途径组分存在于小鼠和人中的基质细胞和 HSC 群体中 (普林斯顿干细胞和基质细胞数据库)。Ivanova 等人, 298Sci. 601-04(2002); Nakano 等人, 101Blood383-89(2003)。Cox1、Cox2、PGE2- 合酶以及受体 EP2 和 EP4 存在于在 5- 氟尿嘧啶 (5FU) 损伤后的胎儿肝 HSCs 和 BM HSC 中, 从而暗示 PGE2 信号传导由 HSCs 利用。Venezia 等人, PLoS Biol2, e301 (2004)。为了测定 CFU-S 数目中的增加是否是由于 PGE2 对干细胞群体的直接作用, 使 FACS 分离的 ckit+scal+ 谱系 - (KSL) BM 细胞暴露于 dmPGE2 且以 100 或 300 个细胞 / 受照射的受体进行移植。脾重量 (图 9D) 和 CFU-S12 在 dmPGE2 处理的细胞的受体中显著增加 (图 9D, 表 6- 表 8)。这些结果指出 dmPGE2 可以导致 HSCs 和未成熟的祖先的细胞自主活化。

[0129] 为了确定 dmPGE2 暴露是否可以增强 HSC 重构, 进行有限稀释竞争再增殖分析。Zhang & Lodish, 103Blood2513-21 (2004)。使离体暴露于 dmPGE2 的 WBM (CD45.1) 以各种剂量与固定数目的未处理的竞争者细胞 (CD45.1/CD45.2) 独立混合, 并且注射入同类受

体小鼠(CD45.2)内。外周血在移植后6、12和24周时获得并且通过FACS进行检查,以确定处理的测试细胞对造血再增殖的贡献(图9E-9J)。阳性重构定义为测试细胞多谱系嵌合状态>5%(图9F,H,I)。如通过Poisson统计学分析测定的,在dmPGE2处理的BM中可见再增殖细胞数目中的显著增加(图8E,图9G,9J)。在6周时,在dmPGE2处理的WBM的受体中移入细胞/106个WBM细胞的计算频率增强3.3倍($p=0.005$),且短期再增殖HSCs的频率在移植后12周时高4倍($p=0.002$)(图8E,8F,图9G)。在24周时,在dmPGE2处理的细胞的受体中长期再增殖HSCs的频率增强2.3倍($p=0.05$)(图8F,图9J)。在12和24周分析时,所有受体中的重构都是多谱系的,从而指出瞬时dmPGE2处理增加小鼠中的再增殖HSCs的频率而不损害分化能力。在dmPGE2处理的HSCs对血细胞生成的贡献中未观察到下降。为了测定dmPGE2处理是否增强对BM小生境的归巢,WBM用活体染料CDFA进行标记,随后暴露于dmPGE2且移植。在移植后12小时,在对照和dmPGE2处理细胞之间不存在归巢中的显著差异($p=0.83$)。

[0130] 在更精确地表征干细胞生产中的前列腺素途径的要求的努力中,利用几种另外的商购可得的环加氧酶(COX)抑制剂。一般的COX抑制剂吲哚美辛、萘普生、布洛芬和阿司匹林(asprin)以及Cox2特异性抑制剂NS-398,都经由上文描述的测定就对AGM HSCs的作用进行测试。每种Cox1或Cox2化学抑制剂减少主动脉中的干细胞。Cox通过改变花生四烯酸负责加工PG's。如通过ephrinB2和Flk1染色可见的,血管发生和主动脉规格在处理的胚胎中保持完整,然而,血管发生的一些方面特别是肌节间血管的形态学被一些化学药品扰乱。关于COX1和COX2的吗啉代反义寡核苷酸也个别注射入斑马鱼胚胎内,以证实主动脉中的干细胞的减少是由于Cox抑制。使用任一吗啉代Runx1+Cmyb+细胞在AGM区域中都减少。如先前报道的,极高浓度的Cox1M0引起主动脉和静脉规格中的缺陷,而cox2吗啉代在高浓度时引起原肠胚形成停滞。Cha等人,20Genes & Devel. 77-86 (2006);Cha等人,282Devel. Biol. 274-83 (2005)。在较低浓度的任一M0时观察到HSCs中的减少,且尾部中的脉管结构未严重改变。此外,精确描绘脉管系统的fli1GFP转基因斑马鱼用于评估吗啉代和化学药品对血管发生的作用。Cox1或Cox2的内杂交(Inhybridization)不影响通过化学药品或吗啉代的主动脉的发育。肌节间血管被一些处理改变。

[0131] 前列腺素E2是在斑马鱼胚胎发生期间制备的主要前列腺素且调节脉管组织。Pini等人,25Arterioscler Thromb Vasc Biol. 315-20 (2005);Grosser等人,99P. N. A. S. USA8418-23 (2002)。精确地何种前列腺素受前列腺素途径组分的化学药品和/或吗啉代抑制影响可以通过质谱法分析进行分析。类似地,质谱法可以证实在暴露于前列腺素途径底物例如亚油酸或mead酸后的E2诱导。PGE2在AGM HSCs形成中的作用分析理论上导致何种受体在将前列腺素信号传导传播给下游效应物中有活性的分析。4种PGE2受体已在斑马鱼中得到鉴定。PGE受体的特异性激动剂和拮抗剂帮助这种鉴定。此外,介导HSC诱导的特异性受体可以使用如前所述的吗啉代通过功能击倒进行研究。前列腺素受体各自的表达以及2种环加氧酶可以通过原位杂交进行研究,以评估这些基因产物在发育自始至终的定位,特别是集中于AGM区域。

[0132] 本发明证实PGE2在2种脊椎动物物种斑马鱼和小鼠中增强造血干细胞和多能祖先的数目。先前研究已证实未修饰的PGE2可以影响小鼠中的血细胞成熟(Boer等人,100Blood467-73 (2002);Rocca等人,99P. N. A. S. USA7634-39 (2002)),和刺激CFU-S8祖

先中的细胞周期(Feher & Gidali, 247Nature550-551(1974));然而, PG 介导的细胞信号传导对 HSCs 的作用先前未进行检查。cox1 和 cox2 看起来在 AGM HSC 形成中具有不同功能:cox1 在造血小生境特别是成血内皮的形成中是重要的,而 cox2 可能涉及 HSCs 自身的自我更新和增殖。相反,纯合 Cox1 或 Cox2 敲除小鼠是存活的,在 HSC 形成中没有明显缺陷(Langenbach 等人, 58Biochem. Pharmacol. 1237-46 (1999));认为这是由于 PGE2 的母体和同胞贡献。Cha 等人, 282Devel. Biol. 274-83 (2005);Langenbach 等人, 83Cell1483-92 (1995)。

[0133] 重要的是, Cox2^{-/-}小鼠的分析证实血细胞比容水平中的改变和无法从 5-FU 诱导的 BM 损害中恢复(Lorenz 等人, 27Exp. Hematol. 1494-502 (1999));这些发现暗示在成年 Cox2^{-/-}小鼠中 HSC 缺陷的存在与我们提出的关于 PG 在 HSC 稳态中的作用一致。为了阐明 Cox1 和 Cox2 在调节成体中的 HSC 稳态中的作用,我们使用 cox1 (SC560)或 cox2 (NS398)的选择性化学抑制剂进行 CFUS12 (图 9k, l)和 5-FU 骨髓恢复测定。发现与对照相比较,任一酶的抑制显著改变 CFUS 活性,以及外周血和 BM WBC 数目的恢复(图 9m, n)。此外, dmPGE2 在 5FU 处理后的施用显著增强 BM 恢复。总之,这些数据暗示如在斑马鱼中, Cox1 和 Cox2 维持在成年小鼠中调节 HSC 稳态中的作用,且 PGE2 是这种 HSC 调节的介质。

[0134] 经历 BM 移植的患者显示增加的内源 PGE2 水平。Cayoux 等人, 12Bone Marrow Transplant603-08 (1993)。尽管由于血小板抑制, cox 抑制剂一般不在移植后给予,但我们的研究提高了此种试剂在人 BM 抑制后的施用可能损害 HSC 移入的可能性。PGE2 及其类似物已安全地施用于人。Talosi 等人, 32J. Perinat. Med. 368-74 (2004);Thanopoulos 等人, 146Eur. J. Pediatrics279-82(1987)。这些可能对于 HSCs 的离体或体内扩增是有用的。用于扩增鼠 HSCs 的 dmPGE2 浓度包含在 PGE2 在人血清中的生理范围内。Hertelendy 等人, 3Prostaglandins223-37 (1973)。本公开内容举例说明 PGE2 在脊椎动物中充当 HSCs 的有效调节剂,并且可能证明在治疗具有骨髓衰竭或移植后的患者中 useful。

[0135] 在斑马鱼中的血细胞生成研究先前已集中于命名为原始的第一波血细胞生成,和斑马鱼胚胎的主动脉、生殖腺和中肾(AGM)区中的永久造血干细胞的衍生。关于脊椎动物中的 AGM 干细胞的生产知之甚少,但 runx1 和 notch1 已显示是 AGM HSC 形成所需的。还存在由此 notch 调节 runx1 的遗传关系。使用约 2500 种具有已知作用的化合物文库大规模化学遗传筛选干细胞诱导效应物,指出导致前列腺素(PG)E2 生产的化学药品引起干细胞数目中的增加,而阻止 PGE2 合成的化学药品导致干细胞的减少。还发现其他化学药品例如血管舒张剂和血管收缩剂改变干细胞数目,从而确立胚胎发生期间血管紧张度是干细胞生产的触发物的假设。Wnt 信号传导途径的成员已假定调节造血干细胞数目,尽管迄今为止这些研究已唯一地检查成体骨髓稳态。研究 Wnt 信号传导在胚胎 AGM 生产中的作用,以鉴定与 notch-runx 途径或与前列腺素的潜在遗传相互作用。为了定义参与 AGM 干细胞形成的另外基因,继续在 AGM 生产中具有缺陷的突变型的大规模筛选。至少 12 种突变型已得到分离。鉴定的基因和途径可能对我们的基本干细胞生物学的理解具有显著影响,并且可以导致关于疾病例如镰状细胞贫血、地中海贫血和再生障碍性贫血的新疗法。

[0136] 使用斑马鱼作为模型,表征涉及在胚胎发生期间永久造血干细胞衍生的信号传导途径的方法,包括使用突变型、morphants、转基因和化学药品评估前列腺素调节 AGM 干细胞生产的假设,和检查 wnt 途径在 AGM HSCs 形成中的作用,且研究与已知在 AGM 区域中有

活性的其他信号传导途径的潜在相互作用。斑马鱼遗传学可以用于限定在胚胎发生期间涉及 AGM HSC 形成的新途径,且允许大规模诱变筛选斑马鱼的永久血细胞生成中的缺陷。这允许分离和表征负责正常 AGMHSC 生产的一些突变基因。

[0137] 在限定调节胚胎血细胞生成的产生的新途径中的工作已阐明 CDX-HOX 途径。发现缺陷基因负责突变型斑马鱼 *kugelig* 中减少数目的 HSCs。Davidson 等人,425Nature300-06 (2003)。kkg 突变型在早期胚胎发生期间具有 SCL+ 造血干细胞的缺陷,且缺乏祖先标记 GATA-1 和 *runx1* 的表达。突变胚胎中的脉管系统形成在脉管系统中正常但极少红细胞的循环。突变基因编码 CDX4,尾部家族的成员。哺乳动物具有 3 种 CDX 基因,包括 CDX1、2 和 4。尾部基因已知通过调节 HOX 基因来起作用。较后的 HOX 基因显示在 kkg 突变型中减少的表达。已确定 HOX 基因在血液发育中作用于 CDX4 的下游。*hoxb7* 或 *hoxa9* 的超表达导致 kkg 突变型中的造血缺陷的强援救。为了评估 CDX4 是否足以指定胚胎发生期间的造血干命运,将 CDX4mRNA 注射入斑马鱼胚胎内。许多 SCL 阳性细胞在通常不形成血液的胚胎区域中发现。*cdx4* 足以诱导异位血液干细胞的事实允许这个工作转化到哺乳动物系统内。

[0138] 尽管鼠胚胎干细胞(ESCs)的显著体外血液形成潜能,但获得可以重构受照射小鼠的造血干细胞(HSCs)已证明是挑战性的。研究者已用工程改造为异位表达 *hoxB4* 的 ESCs 成功地移入致死照射的成年小鼠。Kyba 等人,109Cell129-37 (2002)。血液重构显示髓样优势,可能是由于从这些胚胎群体无法完全模仿成体 HSC。CDX4 和 *hoxb4* 的共表达促进造血胚细胞在支持性 OP9 基质培养上的强扩增。当静脉内注射入致死照射的小鼠内时,这些细胞群体提供强辐射防护,和重构高水平淋巴样-髓样供体嵌合状态。Wang 等人,102P. N. A. S. USA1981-86 (2005)。

[0139] 为了探究可能是 *cdx-hox* 途径下游的途径,微阵列分析用于鉴定在 kkg 突变型和野生型胚胎中差异表达的基因。*Raldh2*,视黄酸(RA)生产所需的酶在血液形成的早期阶段期间在 kkg 突变型中超表达。Perz-Edwards 等人,229Devel. Biol. 89-101(2001);Begemann 等人,128Devel. 3081-94 (2001)。这个数据导致 RA 可能作用于抑制血液形成和 CDX-HOX 途径用于限制 RA 生产的假设,从而允许血液形成发生。换言之,*cdx-hox* 途径控制视黄酸信号传导。

[0140] 为了测试这点,野生型斑马鱼胚胎用 RA 进行处理,且事实上它们变得严重贫血。用阻断 *raldh2* 活性的化学药品 DEAB 处理 kkg 胚胎(Perz-Edwards,2001)恢复 kkg 突变型中的血细胞生成。用 DEAB 处理无法援救 *hoxa9a* 的表达,从而指出 RA 作用于 *hox* 基因的下游。DEAB 还在野生型胚胎中诱导类红细胞的扩增。DEAB 和 RA 还影响源自 ES 细胞衍生的胚样体(EBs)的小鼠造血祖先的形成。在发育的第 2 至 3 天之间给 EBs 添加 DEAB 导致‘原始’胚样集落(CFU-Ep)中 5-8 倍增加,类似于斑马鱼中的结果。用 DEAB 可见原始卵黄囊类红细胞的类似刺激。相比之下,RA 处理引起所有集落类型的生长中的一般抑制。总之,这些结果暗示其中 RA 受 CDX-HOX 途径抑制的新模型是卵黄囊血细胞生成发生所需的。还参见 Davidson 等人,425Nature300-06 (2003);Davidson & Zon,292 (2)Devel. Biol. 506-18 (2006)。

[0141] 鉴定的另外基因是 *moonshine*,正常原始和永久红细胞生成所需的基因。突变的基因是 *Tif1 γ* ,染色质的推定调节剂。Ransom 等人,2PloS1188-96 (2004)。这种因子包含 PHD 指、布罗莫结构域、锌指,并且近期已通过 SMAD2 和 SMAD437 相互作用与 BMP 信号传导

联系。Dupont 等人,121Cell187-99(2005)。这种因子在血细胞生成中的作用可以使用阻抑基因增强子筛选进行确定。

[0142] 另外的突变型已命名为 bloodless。这种基因是原始血细胞生成和 AGM 血细胞生成所需的,尽管永久血细胞生成恢复。bloodless 表型看起来是非细胞自主的并且 bloodless 控制 SCL 和 GATA1 表达。在这种突变基因作图中存在困难。Liao 等人,129Devel. 649-59 (2002)。

[0143] 阐明类红细胞至髓样命运转换的机制的工作显示 GATA1 是髓样谱系抑制所需的。Galloway 等人,8 (1)Devel. Cell109-16 (2005)。更具体而言,研究称为 vlad tepes 的 GATA1 缺陷斑马鱼突变型,且揭示整个血岛转化成髓样命运。这种有趣的细胞命运改变举例说明 GATA1 和 PU. 1 拮抗彼此的活性。它们可以形成调节髓样和类红细胞程序的复合物。进一步的工作证实 PU. 1 的击倒使髓样细胞祖先变成类红细胞。39Rhose 等人,8Devel. Cell197-108 (2005)。这项研究提供了关于在造血系统内的可塑性的合理性。研究 GATA1 和 GATA2 的靶基因表达和类红细胞的依赖已显示大多数基因绝对依赖于 GATA1,然而,一些基因需要 GATA1 和 GATA2 用于完全表达。已发现几种新基因是绝对 GATA 不依赖的。

[0144] SCL 缺陷 morphants 的表征指出这种 SCL MO 表型非常类似于哺乳动物生物学中的 SCL 敲除的那种。SCL 是早期造血细胞发育所需的。SCL 的异常调节在正常血细胞生成中有缺陷的 cloche 和 spadetail 突变型中是明显的。Dooley 等人,277(2)Devel. Biol. 522-36 (2005)。

[0145] 在理解血岛发育的努力中,研究者分离了 LM02 启动子,且证实启动子的近侧 163 个碱基对足以诱导在发育中的血岛以及脉管系统中的 GFP 表达。这些转基因鱼系对于移植实验是无价的。DsRed 以及 GFP 都已与 LM02 启动子连接,从而允许构建双重转基因系。原始谱系的这些 LM02 阳性细胞在早期胚胎或成体的移植模型中不赋予长期重构。Zhu 等人,281 (2)Devel. Biol. 256-269 (2005);Mead 等人,128Devel. 2301-08 (2001);Oates 等人,98Blood1792-1801 (2001);Pratt 等人,11Physiological Genomics91-98 (2002);Huber 等人,11Current Biology1456-61 (2001)。

[0146] 主要目标是发展用于斑马鱼系统的造血细胞移植。通过流式细胞术的造血群体测定发现简单的向前散射和侧散射可以分离斑马鱼中的所有造血系统谱系。类红细胞、髓样和淋巴样细胞可以与前体级分一样好地分离。这指导特定细胞群体移植到缺乏血液的突变型胚胎内。将来自供体的 GFP 阳性骨髓注射入一般 bloodless 的这些胚胎内。移植后 6 个月,循环中的所有细胞都是绿色的,从而指出它们是供体衍生的。vlad tepes 和 bloodless 胚胎看起来是极佳宿主。此外,次级移植证实了在骨髓中的长期重构活性。还证实成体骨髓可以用于援救致死照射的成年斑马鱼中的血细胞生成。Traver 等人,104Blood1298-1305 (2004)。这种移植规程对于后续干细胞生物学研究是非常有用的。还参见 Traver 等人,4Nature Immunol. 1238-46 (2003)。

[0147] 斑马鱼全骨髓(WKM)细胞的有限稀释分析可以显示 HSCs 在斑马鱼骨髓中的频率。因为这些研究定量可转移干细胞的数目,所以它们提供了用于比较野生型对突变型斑马鱼中的干细胞功能的功能测定。为此,重构研究通过下述来进行:使用亚致死 γ 辐射剂量切除未标记的受体的造血淋巴系统(hematolymphoid system),然后将 5,000-500,000 个 GFP 标记的 WKM 细胞的稀释物移植到宿主内。外周血用作 WKM 稀释测定中的载体细胞且当单独

注射时充当阴性对照。移植后 3 个月后, WKM 从宿主切开, 并且通过流式细胞术进行分析, 以测量髓样细胞中的 GFP+ 供体细胞的百分比。受体就供体移入评分为“成功”或“失败”。使用二项式最大限制统计学, 测定 HSCs 在斑马鱼 WKM 中的发生率为 61, 910 个细胞中 1 个, 其中 95% 置信区间在 50, 798–79, 244 个细胞之间。这个数目非常类似于小鼠的那种, 其在 50, 000–130, 000 个 HSCs/ 骨髓细胞体积中具有 ~ 1 个。Smith 等人, 88P. N. A. S. USA2788–92 (1991)。因此, 这些数据暗示骨髓群体中的干细胞数目是进化上保守的。

[0148] 工作也已探究斑马鱼 AGM 干细胞生产和 notch 途径。AGM 被认为由早期体节发生 (somitogenesis) 期间存在的侧中胚层形成。该组织表达 flkl。随着其迁移, 它开始表达称为 gridlock 的动脉特异性标记。随后, 不迟于 18 体节时, 细胞表达 tie1 和 tie2, 并且继续内侧迁移且形成固体索 (solid cord)。该索变成空心的并且成为主动脉。在 30 小时时, runx1 转录因子最初腹侧表达。其后不久, c-myb 阳性造血细胞在主动脉的腹侧壁中发现。主动脉的背侧部分表达称为 tbx20 的 T 盒转录因子。斑马鱼中的过程看起来非常类似于其他脊椎动物的那种, 包括人、小鼠、鸡和蛙。Galloway & Zon, 53Curr. Topics Devel. Biol. 139–58 (2002)。

[0149] 还检查了 runx1 在 AGM 发育中的作用。类似于小鼠敲除, runx1 在斑马鱼中的击倒导致 AGM 中表达 c-myb 的细胞数目减少。runx1 的超表达导致主动脉中干细胞数目的扩增, 和 c-myb 在静脉中的异位表达。原始血细胞生成在 runx1morphant 中正常进行。这提供了关于 AGM 形成的 runx1 需求的证据, 并且另外确定 runx1 是足以产生永久干细胞的因子。notch 途径在 AGM 形成中的作用的评估揭示 runx1 作用于 notch 信号传导下游或与之平行。

[0150] 突变型 mindbomb 缺乏用于 δ , notch 受体的配体的 E3 泛蛋白连接酶。同样, mindbomb 突变型完全缺乏 notch 信号传导, 且无法在 AGM 中制备任何造血干细胞。Itoh 等人, 4Devel. Cell 67–82 (2003)。runx1 的超表达在 mindbomb 中援救 AGM 中的 c-myb 阳性细胞数目。这暗示 runx 是 notch 的重要靶。在初步研究中, 给 mindbomb 突变型添加长效前列腺素 E2 无法证实任何类型的援救。这可能是由于细胞响应前列腺素 E2 的能力中的缺陷; notch 信号传导在 AGM 区域发育中可能比前列腺素 E2 更早需要。在 mindbomb 突变型中使用前列腺素 E2 的剂量应答曲线可能阐明了这点。相反, 不迟于 36hpf 时具有增加的干细胞数目的 Notch ICD 胚胎可以与 Cox 抑制剂一起温育, 以察看前列腺素信号传导是否具有介导 AGM HSC 上调的作用。其他造血突变型可以类似研究。

[0151] 独特的转基因系统用于检查 notch 途径。使携带驱动 gal4 的热激 (HS) 启动子的 1 种转基因系与另一种系进行交配, 所述另一种系具有驱动 notch 的细胞内结构域的 UAS 序列 (称为 NICD 的激活型)。Lawson 等人, 128Devel. 3675–83 (2001)。这在热激后提供了针对胚胎的活化 notch 信号。在热激后, 这些胚胎的 AGM 显示 c-myb 和 runx1 以增加的强度并且在现在包括背侧和腹侧主动脉以及静脉的较大区域表达。基于用磷酸 – 组蛋白 H3 抗体的免疫染色或通过 BrdU 标记, 这种异位表达不伴随细胞增殖中的变化。这种命运改变可以被 runx1 吗啉代阻止, 从而形式上证实 runx1 作用于 notch 的下游。

[0152] notch 活化是否在成体血细胞生成中起类似作用, 使用双转基因鱼以条件超表达 notch 来研究。鱼用 2000rads 进行亚致死照射, 然后实施热激, 活化 notch。骨髓血细胞生成通过 FACS 就向前和侧散射进行分析, 以检查髓样、淋巴样和前体级分。不迟于热激后第

7 天时,表达 NICD 的鱼具有增加的髓样和前体级分,并且不迟于第 14 天时,与野生型相比较,存在淋巴样细胞中的增加。照射后的恢复在 notch 活化后更快速。此外,runx1、sc1 和 lmo2 在热激后不久在成体中上调。这证实我们在胚胎中发现的 notch-runx 途径也在成年斑马鱼中起作用。参见 Burns 等人,19 (19) Genes & Devel. 2331-42 (2005)。

[0153] 斑马鱼已证明在疾病的表征中是有用的。已开发了具有人疾病等价物的许多突变鱼。参见,例如,Dooley & Zon,10Curr. Op. Genet. Devel. 252-56 (2000)。例如,在斑马鱼系统中已发现影响红细胞生成的许多膜缺陷。在研究中,鉴定的突变基因是 BAND3、BAND4.1 和血影蛋白。有趣的是,BAND3 突变型看起来具有非常类似于 HEMPAS 或 CDA2 型的缺陷。BAND3 位于分裂类红细胞前体中的纺锤极,在其中它调节先天性;异常红系造血性 (dyserythropoietic) 贫血。参见,例如,Liao 等人,127 (3) Devel. 127 (3):5123-32 (2000);Paw 等人,34 (1) Nature Genet. 59-64 (2003)。

[0154] 近来,grx5 作为 shiraz 突变基因分离。Shaw 等人,440Nature96-100 (2006)。谷氧还蛋白 5 位于线粒体中并且是铁硫簇生产所需的。还分离了 frascati 突变型中的线粒体铁输入基因缺陷,且类似于鱼,frascati 敲除小鼠发展贫血。还参见 Donovan 等人,403Nature776-81 (2000);Donovan 等人,100Blood4655-60 (2002);Wingert 等人,131 (24) Devel. 6225-35 (2004);Fraenkel 等人,115J. Clin. Invest. 1532-41. (2005);Wingert 等人,436Nature1035-39 (2005)。

[0155] 作为 Trans-NIH Zebrafish Genome Initiative 的部分,设计了 Affymetrix 芯片。这涉及通过研究突变型和野生型在不同时间点上的基因表达模式影响斑马鱼血细胞生成的超过 10 种突变型的研究。Weber 等人,106 (2) Blood521-30 (2005)。我们还通过个体原位杂交筛选评估了大规模表达概况分析。这项工作已鉴定了作为血液特异性程序的部分的超过 160 种基因。

[0156] wnt 途径在 AGM HSCs 形成中的作用以及与已知在 AGM 区域中有活性的其他信号传导途径的潜在相互作用也是相关的。基于关于 wnt 途径在成年骨髓中的 HSC 自我更新中的作用的良好的工作,Reya 等人 423Nature409-14(2003)),wnt 途径可以调节 AGM HSC 生产。关于 wnt 信号传导的典型途径涉及 GSK β 的活化和 β -联蛋白随后易位至核,在其中它随后与 2 种相似转录因子 TCF 或 LEF1 之一相互作用,以活化 wnt 调节的基因(图 10)。wnt 途径受 dickkopf 和 APC 负调节。wnt3 的表达刺激小鼠中的 HSCs 扩增 3 倍(Reya,2003;Wilbert 等人,423Nature448-52 (2003)),但令人惊讶地 HSCs 中的 β -联蛋白的敲除不导致自我更新中的缺陷。Cobas 等人,199J. Exp. Med. 221-29(2004)。更近期的研究已证实 GSK3B 抑制剂导致 HSC 分化中的减少。

[0157] 尽管已知关于 wnt 信号传导在干细胞自我更新调节中的作用,但关于 AGM 中的永久干细胞的 wnt 诱导的信息很少。支持 wnt 信号传导在 HSC 诱导中起作用的假设, β -联蛋白通过差异展示 RT-PCR 法鉴定为在小鼠(REF)中 HSC 形成时在 AGM 区域中差异表达。为了定义 wnt 信号传导在 AGM 中的作用,可以研究转基因鱼的 wnt 途径特异性可诱导系。已制备了许多转基因鱼,其中热激启动子驱动 wnt 途径的各种成员的表达。用于研究的示例鱼包括:热激 wnt8,热激 dickkopf,和热激显性失活 TCF 突变型。类似于 notch 研究中利用的那种的单一热脉冲可以用于研究 wnt 信号传导抑制或上调对 AGM HSC 生产的作用。

[0158] 在更好地理解 wnt 信号传导在 AGM 形成中的作用的努力中,可以检查 wnt8 热激

鱼。wnt8 在胚胎的较后方面中在尾芽区域中表达。基于 runx1 和 c-myb 表达,胚胎在 18-22 体节之间的热激导致 AGM 中的干细胞群体的显著上调。wnt8 的活化导致干细胞的扩增,但其他 wnts 可能在这个过程中类似地起作用。测定哪种 wnt 蛋白质在发育中的 AGM 区域中表达可能是相关的。CDX4⁺细胞将通过微阵列分析进行检查。信息学可以用于检查在这些 HSCs 中表达的 wnts 和 wnt 受体的特性。此外,wnt3、wnt5 和 wnt8cDNAs 将通过原位杂交进行研究。由微阵列推导的其他 wnts 将通过 ISH 进行研究。在发育期间热激的完整时间过程可以局限于在其中 wnt 信号传导是 HSC 形成所需的精确时间段。还可以检查抑制 AGM 中的 wnt 信号传导的热激显性失活的 TCF 和热激 dickkopf 系。显性失活的 TCF 消除了经典途径,而 dickkopf 热激构建体抑制经典和非经典 wnt 途径。造血干细胞在这些系的热暴露后完全缺乏。为了进一步分析 wnt 是否是 AGM HSC 形成所需的,几种 wnt 激动剂和拮抗剂化学药品可以例如通过本文描述的方法进行测试。

[0159] 在 HS wnt8、HS dkk 和 HS-DN TCF 转基因胚胎中在热激后的基因表达研究经由表达杂交技术和 Q-PCR 分析进行检查。造血干细胞标记包括 SCL、LMO2、GATA-2、GATA-1、runx1、PU.1 和 ikaros 可能是相关的,以测定 wnt 信号传导对 HSC 群体的作用。同样终末分化的淋巴样(rag1、LCK、免疫球蛋白 T 细胞),髓样(髓过氧化物酶、L- 丝束蛋白)和类红细胞(促红细胞生成素受体, Erb2) 血细胞群体以及内皮(fli1、flk1、tie2 和 tie1) 细胞的标记的表达将在 wnt 诱导和抑制后进行检查。此外,AGM 区域中的 wnt 表达可以使用 TOP-FLASH 斑马鱼系进行直接监控。TOP-FLASH 报道分子鱼在由多聚 LEF1 结合位点构成的诱导型启动子下表达 GFP。Dorsky 等人,241Devel. Biol. 229-37 (2002)。报道分子已知在较后的中胚层形成中是活性的。可能先前描述的 cdx4 由 wnt 模仿。TOP-FLASH 报道分子的表达可以在发育中的 AGM 区域中深入检查。wnt 途径热激鱼用于进一步研究 wnt 信号传导在成年髓稳态中的作用。评估在 HS wnt8 和 HS-DN TCF 转基因鱼中在照射后的骨髓恢复将解释关于 wnt 信号传导在 HSC 增殖和维持中的需求。此外,有限稀释和使用热激诱导的髓与正常髓相比较的竞争性再增殖研究是有用的。

[0160] wnt 和 notch 途径与 AGM 干细胞的前列腺素诱导的关联也可能在血细胞生成中是重要的。notch 功能失去和 wnt 功能失去的胚胎表型是非常相似的,其中两者都导致 AGM 干细胞的显著缺乏。这导致一种途径可以交叉调节另一种的假设。我们计划评估热激 wnt8 构建体是否将援救 mindbomb 突变型,和类似地显性失活的 TCF 突变型是否可以通过活化 notch ICD 得到援救。这种类型的分析应导致这些途径在胚胎发生期间活化的精确定时的更好理解。它还允许我们关于这些途径相互作用理解更多。突变鱼(和 / 或吗啉代注射的鱼)还可以用于与 notch 和 wnt 缺乏以及功能表型获得组合。如果 2 种途径合作以调节干细胞诱导和 / 或干细胞增殖、更新和分化,那么应确立如上所述和关于 Notch 表征的分子标记检查。

[0161] wnt 途径的成员已显示与前列腺素相互作用。例如,对于由 wnt 诱导的结肠癌模型,阻断 Cox1 或 2 的非类固醇类阻止癌形成。如上所述,PGE2 导致 AGM 中的干细胞的增加。PGE2 可以援救 wnt 缺陷胚胎。COX2 抑制剂可以阻断 HS-wnt8 的作用。由本发明包含的其他 HSC 改性剂包括 Wnt 途径改性剂。发现抑制 HSCs 的示例 Wnt 途径改性剂是 Kenpauillone (HDAC 效应,不是 GSK3b),和丙戊酸(HDAC 效应,不是 GSK3b)。发现修饰 Wnt 途径的 HSC 增强剂是氯化锂和 BIO。

[0162] 使用表达 wnt 的激活物或阻遏物的转基因斑马鱼,检查了 wnt 信号传导对主动脉-生殖腺-中肾(AGM)区域中的 HSCs 发育的作用。wnt 信号传导的诱导导致增强的 HSC 形成,而抑制减少 HSC 生产。在成年斑马鱼中,增加的 wnt 活性增强照射后骨髓恢复期间的祖细胞数目。因为(PG)E2 调节脊椎动物中的 HSC 形成和稳态,所以在 HSC 发育期间和髓恢复中的 wnt 和 PG 途径的相互作用通过使 TOP :dGFP 胚胎暴露于调节前列腺素信号传导的药物进行探究。发现二甲基-PGE2(dmPGE2),HSC 形成的有效诱导物增强 wnt 信号传导,而环加氧酶抑制剂吲哚美辛(indo)导致 wnt 活性的事实上缺乏。HSC 形成经由 wnt 阻遏的抑制由 dmPGE2 处理部分援救,而 HSCs 经由 wnt 超表达的诱导由 indo 暴露逆转。Indo 还阻断在成年鱼中照射后 wnt 介导的骨髓祖先中的增加。PGE2 诱导 TOP :gal 小鼠的 AGM 中的 wnt 活性,从而指出 wnt 和 PG 相互作用的分子保守和 wnt 在 HSC 形成中的作用。

[0163] 更具体而言,Wnt 通过其主要转录介质 β -联蛋白的信号传导在许多胚胎背景中控制组织成型、细胞命运决定和增殖中起重要作用,包括器官的发育和分化。参见图 10。Wnt 活性已显示在 HSC 移植到 NOD/SCID 小鼠内后增加成年 HSC 自我更新且增强干细胞再增殖。也发现 β -联蛋白在 e10-12 时在小鼠胚胎中的 AGM 区域中差异表达。wnt 信号传导在斑马鱼中 HSC 形成期间是否有作用使用 wnt 途径的热激可诱导激活物和阻遏物来测定。简言之,收获 wnt 可诱导胚胎且于 38°C 热激 20 分钟。基因型通过 GFP 表达进行分选,且 AGM HSCs 通过 runx1/cmyb 表达进行原位分析。在 5 体节时 wnt8 经由热激的诱导导致在 36hpf 时在 AGM 中增加的 HSC 形成,而 wnt 信号传导经由 dkk 和 dnTCF 诱导的消除显著抑制 runx1/cmyb 表达。这是在任何生物中 wnt 信号传导是 AGM HSC 形成所需的第一个证据。

[0164] 照射恢复测定也用于研究 wnt 信号传导在斑马鱼中造血稳态中的作用。表达 wnt 相关基因的转基因鱼进行亚致死照射,并且热激基因诱导通过在照射后第 2 天时于 38°C 过夜温育来起始。如先前对于前列腺素实验概述的,骨髓在照射后的各个时间点上进行收获。图 11。利用热激 wnt8 鱼证实在照射后第 10 天时与对照相比较,祖先群体中的增加,类似于用 PGE2 可见的那种。wnt 信号传导经由热激 dkk 或 dnTCF 的诱导彻底改变髓恢复的动力学,并且可以导致髓再生的完全衰竭和致死现象。

[0165] 具有 APC 突变的患者中的临床经验已显示前列腺素合成的抑制导致减少的 wnt 介导的息肉形成。此外,在结肠癌细胞系中的近期研究暗示前列腺素和 wnt 信号传导途径之间的相互作用。这些相互作用使用 wnt 报道分子斑马鱼转基因系 TOP :dGFP 进行体内检查。在 50% 外包时,对胚胎不实施任何处理(对照),实施吲哚美辛或 PGE2,且在胚胎中活化的 wnt 信号传导的量通过由 wnt 结合位点驱动 GFP 诱导进行评估。在头中 GFP 表达中的改变的分析通过原位杂交进行分析。与对照相比较,PGE2 处理显著增强 wnt 活性,而吲哚美辛严重减少 GFP 表达。图 12。这些数据包含在胚胎发育期间 wnt 和前列腺素途径的相互作用的首次体内证明。

[0166] 此外,吲哚美辛和 dmPGE2 用于研究在 HSC 发育期间和损害后的髓恢复中的 wnt 和前列腺素途径的相互作用。图 13 反映 PG 和 wnt 途径的相互作用的潜在点。在 5 体节时热激的 wnt8 胚胎中 wnt 介导的 runx1/cmyb 表达的增强可以通过用吲哚美辛处理得到阻断。此外,如通过关于 runx1/cmyb 的原位杂交显示的,dmPGE2 可以援救在 36hpf 时 dkk 活化对 AGM HSCs 形成的抑制作用。然而,初步研究显示 dmPGE2 处理不足以在超表达 dnTCF 的胚胎中援救 HSC 形成。

[0167] 为了测定前列腺素途径操作是否可以改变成体中的肾髓再增殖中的 wnt 活性,在 Top :dGFP 系中进一步检查 dmPGE2 和吲哚美辛的作用。dmPGE2 在照射后第 3 天时显著增强 wnt 活性,而吲哚美辛抑制 GFP 表达。图 14。为了辨别前列腺素信号传导的调节是否可以修饰 wnt 介导的对照射后肾髓恢复的作用, wnt 基因通过在照射后 2 天时于 38℃ 热激和随后在热激后 1 天时暴露于前列腺素途径药物进行活化。使 hs :wnt8-GFP 鱼暴露于吲哚美辛,同时使 dkk1、axin 和 dnTCF 转基因鱼暴露于 dmPGE2。全肾髓在照射后第 10 天时通过 FACS 进行分析。观察到用吲哚美辛处理严重减少在前体细胞群体中 wnt 介导的增强,从而暗示 PGE2 水平可以在体内直接调节 wnt 信号传导。

[0168] 这些实验暗示 wnt 活性通过 PG 信号传导调节的药理学操作将提供用于治疗性调节 HSC 稳态的新方法。

[0169] 现在将通过非限制性例子进一步描述几个实施方案。

实施例

[0170] 实施例 1. 化学筛选设计和证实测试。

[0171] 将野生型年龄匹配的胚胎排列到个别测试化合物的 48 孔板(~5 个胚胎/孔)内,并且从 3 体节暴露直至 36hpf 时。利用 3 个化合物文库:NINDS Custom Collection(1040)、SpecPlus Collection (960)和 BIOMOL ICCB Known Bioactives (480)。5% (123/2480) 的化合物是毒性的,导致死亡或严重形态学异常。进行关于 runx1 和 cmyb 的原位杂交以评估 HSCs。化合物以 10 μ M、20 μ M 和 50 μ M 进行重新测试。干细胞特异性在 36hpf 时使用 f1k1 进行评估。PGE2、PGI2、dmPGE2 和所有 cox 抑制剂(Sigma)以 10 μ M-20 μ M 使用。

[0172] runx1/cmyb 的定性评分(具有改变的 HSCs 的胚胎#/评分的#)使用下述标准来进行:正常的/未改变的=runx1/cmyb⁺内皮细胞的连续系和偶然的造血簇。减少的/缺乏的=runx1/cmyb⁺细胞中的减少,包括在 HSCs 的系中大缺口的存在,分离的阳性细胞,或表达的缺乏。增加的/过量=runx1/cmyb⁺细胞中的增强,包括许多 HSC 簇,HSCs 的增厚系,或异位表达。

[0173] 共焦成像

[0174] 将活的 36hpf 处理的双基因斑马鱼胚胎包埋在包含 0.4mg/ml Tricaine-S 的 1% 低熔点琼脂糖中用于共焦成像。cmyb-GFP 转基因报道分子系由包含 cmyb 启动子基因组序列(Galloway, Zhu, Lin, Zon, 未公开的)的 BAC 生成;lmo2 :DsRed 鱼如所述的进行生成²⁷。对于 HSC 定量,cmyb/lmo2⁺ 阳性细胞在 z- 堆叠(stack)图像的计划中进行计数(n=10/ 处理)。

[0175] 吗啉代击倒

[0176] 将针对斑马鱼 cox1 和 cox2、PGE2 合酶以及 EP2 和 EP4 的吗啉代寡核苷酸(GeneTools)(Grosser 等人,2002;Cha 等人,2006,Pina 等人,25Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 315-20 (2005))注射(40 μ M)入在单细胞期时的斑马鱼胚胎内。对于援救实验,使 3 体节期 MO 注射的胚胎暴露于 10 μ M dmPGE2。

[0177] 微阵列基因表达概况分析

[0178] gata1 :GFP (12 体节)、lmo2 :GFP (12 体节和 35hpf)和 cd41 :GFP (35hpf) 阳性细胞进行 FACS 分选;如前所述总 RNA 进行纯化且使用 Affymetrix 斑马鱼基因芯片进行分

析。Weber 等人,106Blood521-30 (2005)。

[0179] 定量 PCR

[0180] qPCR 使用先前描述的引物组来进行。Burns 等人,19Genet Devel. 2331-42 (2005)。胚胎(n=50)如所述的进行处理。qPCR (60°C退火)使用 SYBR Green Supermix 在 iQ5Multicolor RTPCR Detection System(BioRad)(n=10 次重复)上进行,并且测定相对表达水平。关于 EP2 和 EP4 的引物对通过本领域众所周知的方法进行测定。全 KM RNA(n=15/ 变量)的 qPCR 如所述的在照射后第 3 天时进行。Burns 等人,19Genes Devel. 2331-42(2005)。关于 S 细胞 RNA 的 qPCR (在 Stat-60 中收获的,Tel-Test)使用 Stratagene Sybrgreen 试剂盒在 Stratagene qPCR 机器上进行。PG 引物序列通过本领域众所周知的方法进行测定。

[0181] 质谱法

[0182] PGE₂和稳定的 PGI₂代谢物 6-酮-PGF_{1α}使用 HPLC 串联质谱分析法进行测量。来自匀浆胚胎的乙酸乙酯提取物掺加相应的稳定同位素标记的内标准(d₄-PGE₂和 d₄-6-酮 PGF_{1α}),并且允许与甲氧基胺反应。监控下述质量过渡:m/z384 → 272(PGE),m/z398 → 368 (6-酮 PGF_{1α}和 TxB2)。

[0183] 辐射恢复测定

[0184] 使成年斑马鱼暴露于 23Gy γ-照射。在照射后第 2 天时,使鱼过夜暴露于溶于鱼水的 DMSO 对照、dmPGE2 (10 或 50 μM)、吲哚美辛(10 μM)、SC560 (10 μM)或 NS398 (10 μM)。对在第 0、2、4、7、10、14 天时分离的全 KM 实施 FSC/SSC FACS 分析,以鉴定造血谱系(n=5/ 处理 x3 次重复)。Traver 等人,104Blood12980305 (2004)。

[0185] ES 细胞分化测定

[0186] ES 细胞造血分化测定如先前所述的进行。Kyba 等人 100(1)P. N. A. S. USA11904-10 (2003);Wang 等人,102P. N. A. S. USA19081-86 (2005)。dmPGE2 (10、20 或 100 μM)或吲哚美辛(20、100 μM)在 EB 扩增期间在第 4 天和第 5 天时添加。M3434 甲基纤维素集落形成和 OP9 集落测定在第 6 天时进行,并且分别在第 8 和 5 天时进行分析。集落类型通过形态学分析进行鉴定;求一式两份的化学暴露的平均值以确定报道的集落数目(n=最低限度 3 次重复)。

[0187] 鼠集落形成单位-脾(CFU-S)

[0188] 使来自 8 周龄 C57Bl/6 小鼠的股的 WBM 细胞与(1 μM/106 个细胞)dmPGE2、吲哚美辛、SC560、NS398 或 EtOH 对照一起在冰上离体温育 2 小时。对于每个变量处理 2 个独立的 BM 样品(n=5/ 处理 x2 次重复)。受体小鼠用分离剂量的 10Gy 进行致死照射。将 6x10⁴未分级分离的 dmPGE2 或对照处理的 BM 细胞眶后注射入受照射的受体小鼠内。脾在第 8 或 12 天时解剖,称重并且用 Bouin 氏溶液进行固定;计数造血集落/脾。1x10⁵细胞/受体在用 cox 抑制剂处理后进行移植。FACS 分选的 ckit⁺sca1⁺谱系⁻BM 细胞如上所述进行处理,并且以 100 个细胞/受体或 300 个细胞/受体的剂量进行移植。

[0189] 5-氟尿嘧啶骨髓损害

[0190] 小鼠如所述的用 5-FU (150mg/kg)进行处理。Venezia 等人,2004。SC560、NS398、dmPGE2(1mg/kg)或 EtOH 对照在注射后第 1、5、9、13 和 17 天时通过 IP 注射进行施用。外周血在第 7 天和第 14 天时获得,定量且使用针对 B220/IgM (B-淋巴样)、CD4/8 (T-淋巴样)、Mac1/Gr1 (髓样)、Ter119/CD71 (类红细胞)和 ckit/sca1 (干/祖先)的抗体(eBioscience)

实施多谱系 FACS 分析。小鼠在第 16 天时处死,并且分离骨髓、定量且通过 FACS 进行分析。

[0191] 有限稀释竞争移植

[0192] 使来自 CD45.1C57B1/6 小鼠的 WBM 如所述的与 dmPGE2 或 EtOH 对照一起离体温育。处理的测试细胞以下述比独立地移植到具有未处理的 CD45.1/CD45.2 竞争者的受照射的 CD45.2 受体(n=5/ 变量 x2)内 :15,000 :200,000 (0.075 :1)、50,000 :200,000 (0.25 :1)、200,000 :200,000 (1 :1)、2,000,000 :200,000 (10 :1)。外周血(PB)在移植后 6、12 和 24 周时获得,并且白细胞进行 FACS 分析以测定关于每个系列的处理群体的测试重构。PB 嵌合状态 >5% 的频率用于使用 L-Calc 程序(Stem Cell Technologies)计算再增殖细胞的数目。对于 12 周和 24 周 PB 样品,多谱系重构通过如上文的 FACS 分析进行测量。

[0193] 实施例 2. 另外的 HSC 调节剂。

[0194] 斑马鱼胚胎如上所述进行筛选。通过本文描述的技术鉴定且由本发明包含的另一组 HSC 改性剂是 cAMP/P13K/AKT 第二信使改性剂,这可以是 PG 信号传导的下游。抑制 HSC 的那些包括 PD9805、KT5720、H89、U0126 和渥曼青霉素。增强 HSC 的那些包括 8-溴 -cAMP 和毛喉素。

[0195] 也可能作用于 PG 信号传导下游的另一组 HSC 改性剂是 Ca²⁺ 第二信使改性剂。这些包括表 9 中列出的 HSC 抑制剂和 HSC 增强剂:

[0196] 表 9. 示例 Ca²⁺ 第二信使改性剂

[0197]

HSC 抑制剂	HSC 增强剂
BayK8644	Bapta-AM
硫利哒嗪	芬地林
	尼卡地平
	匹莫齐特
	毒毛旋花子苷原
	毛花苷

[0198] 通过本文描述的筛选技术鉴定且由本发明包含的另一组 HSC 改性剂是 NO/ 血管紧张素信号传导改性剂,这可以与 PG 和 wnt 信号传导相互作用。这些包括表 10 中列出的 HSC 抑制剂和 HSC 增强剂:

[0199] 表 10. 示例 NO/ 血管紧张素信号传导改性剂

[0200]

HSC 抑制剂	HSC 增强剂
L-NAME	L-Arg
依那普利	硝普钠

卡托普利	钒酸钠
AcSDKP	缓激肽
氯沙坦	

[0201]

Telimasartan	
组胺	
氨溴索	
白杨黄素	
环己酰亚胺	
亚甲蓝	
肾上腺素	
地塞米松	
普罗地芬	
异硫氰酸苄酯	
麻黄碱	

[0202] 还应用本发明的斑马鱼筛选方法以鉴定其与 PH 或 wnt 信号传导的相互作用目前不清楚的其他 HSC 调节剂。也由本发明包含的这些化合物包括如表 11 中所示的抑制或增强 HSCs 的那些：

[0203] 表 11. 示例 HSC 调节剂

[0204]

HSC 抑制剂	HSC 增强剂
Paraglyline	美贝维林
普萘洛尔	丙酮缩氟氢羟龙
依地硝唑	阿替洛尔
甲硫咪唑	吲哚洛尔
西诺沙星	加波沙朵

青霉胺	犬尿烯酸
呋塞米	胍屈嗪
Eburnaminone	噻苯达唑
阿柔比星	比枯枯灵碱
华法林	Vesamicol
γ -氨基丁酸	黄夹次苷
炔诺酮	丙咪嗪
鹰爪豆碱	氯磺丙脲
二氢奎尼丁	1, 5- 亚戊基四唑

[0205]

乙胍苯哒嗪	4- 氨基吡啶
甲氧明	二氮嗪
羟基脲	苯磷硫胺
双氢麦角胺	12- 甲氧基十二碳烯酸
安他唑林	N- 甲酰基 -Met-Leu-Phe
3- 硝基丙酸	加拉碘铵
N- 苯氨基萘酸	IAA94
非那吡啶	氯烯雌醚
二氯犬尿烯酸	
3- 雌二醇	
L-Leu	
酚苄明	
美芬丁胺	
四氢烟酸	

愈创兰油烃	
咪唑	
β -胡萝卜素	
氯苯丁酯	

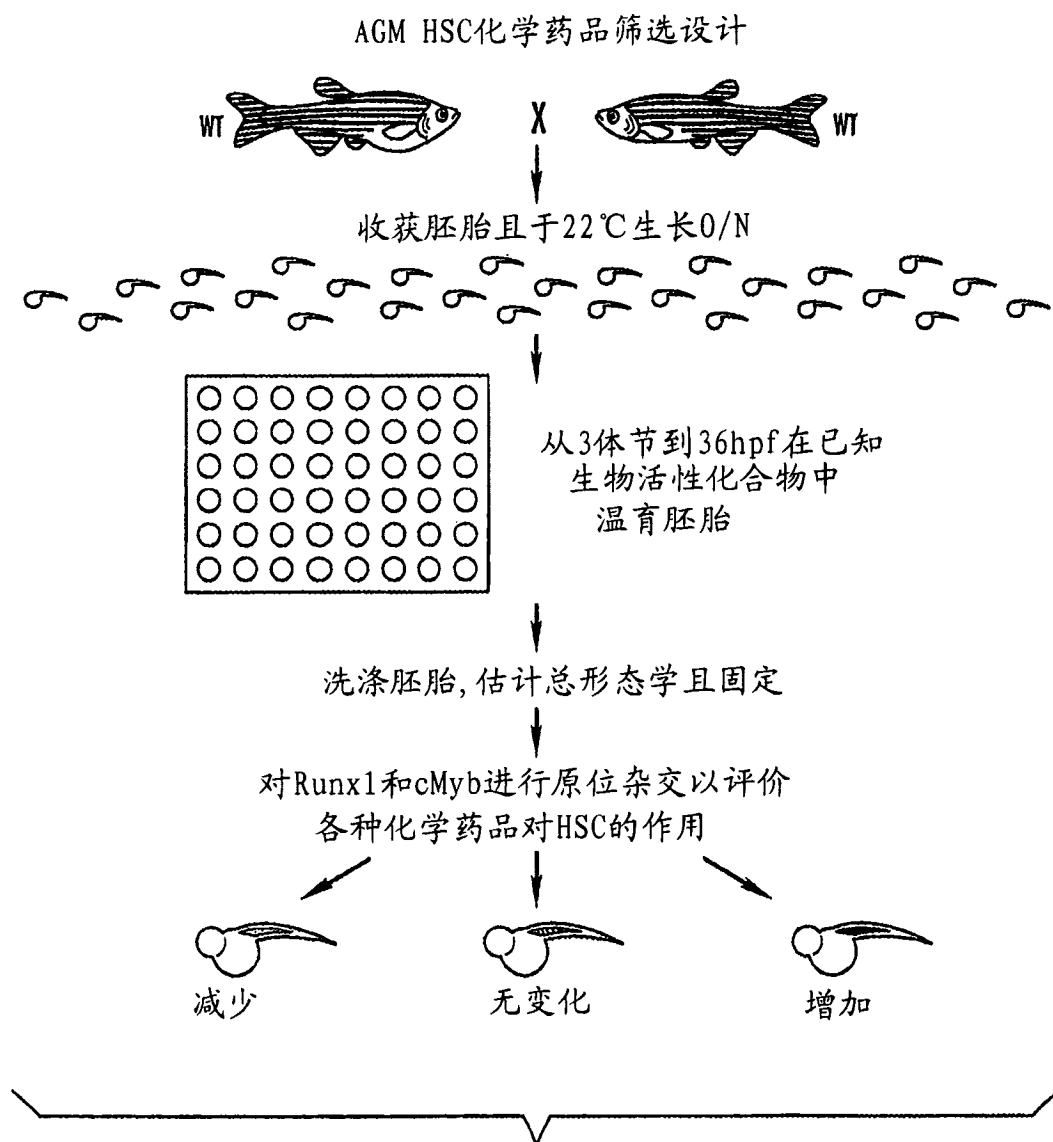


图 1

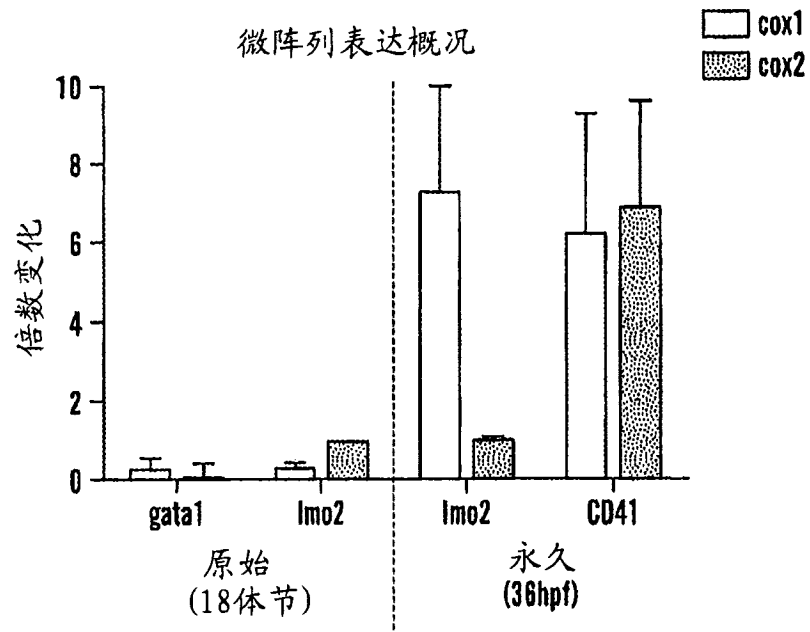


图 2A

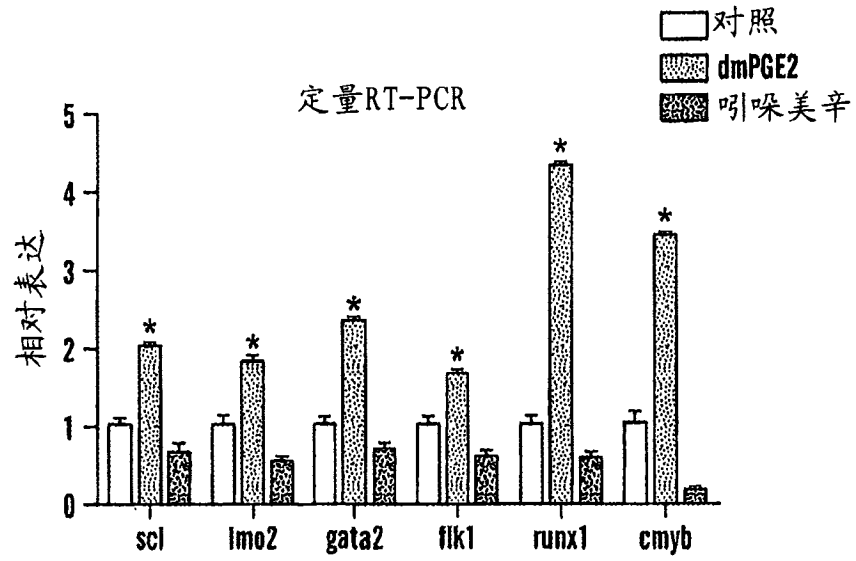


图 2B

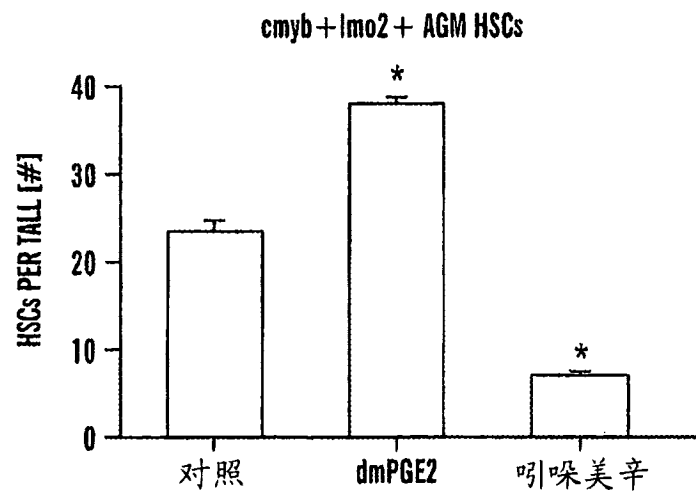


图 3

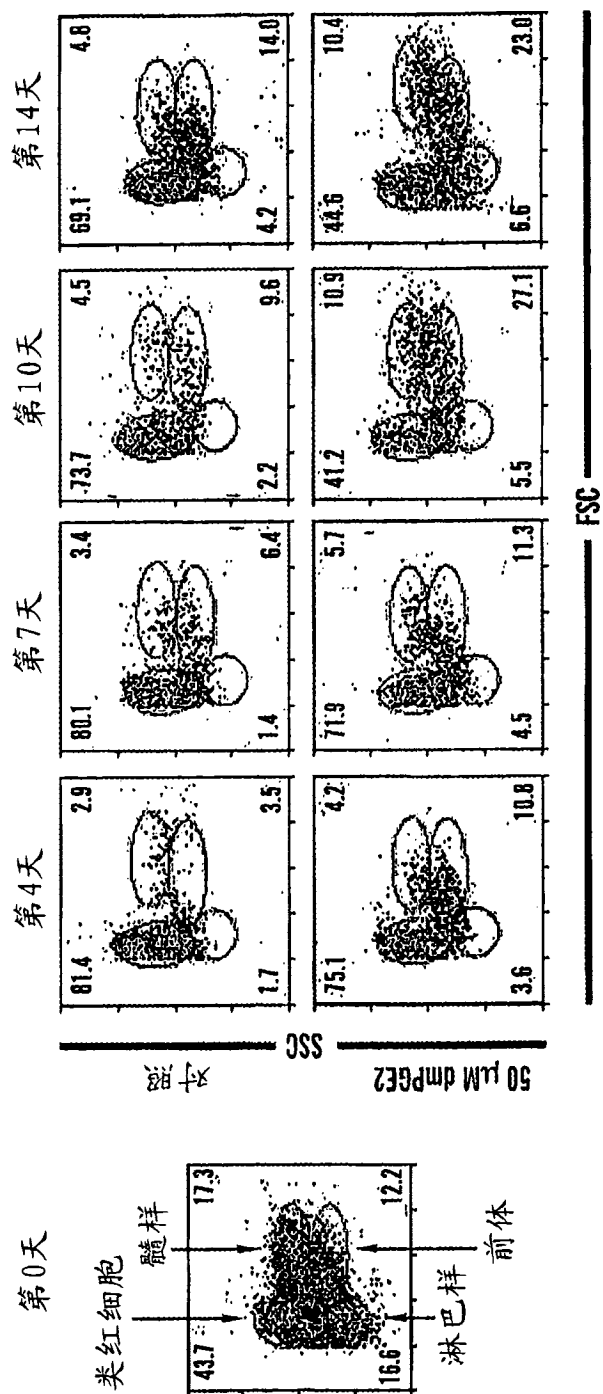


图 4A

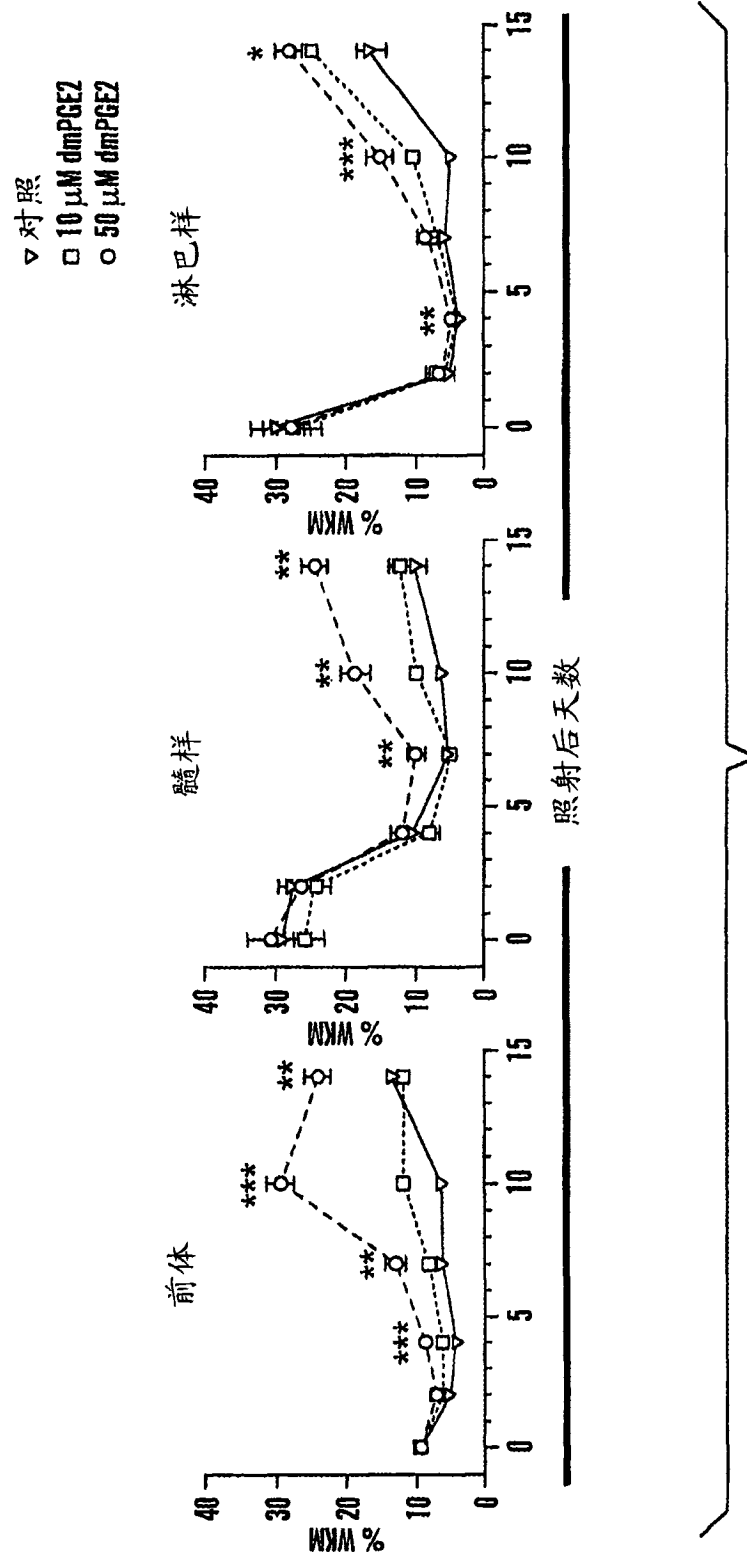


图 4B

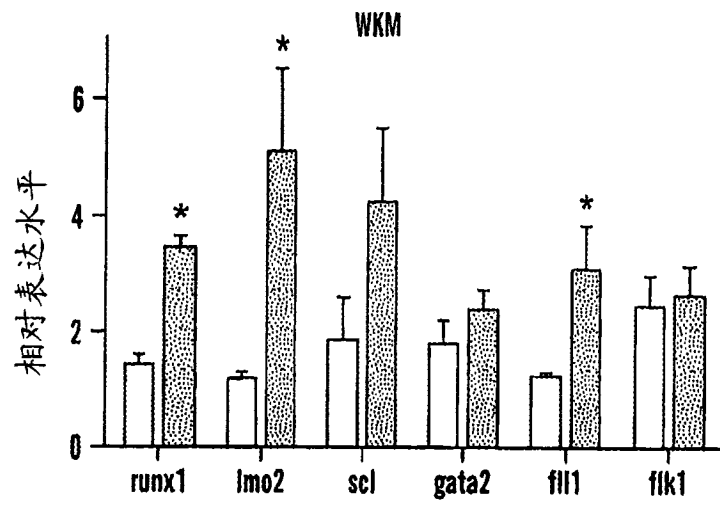


图 5A

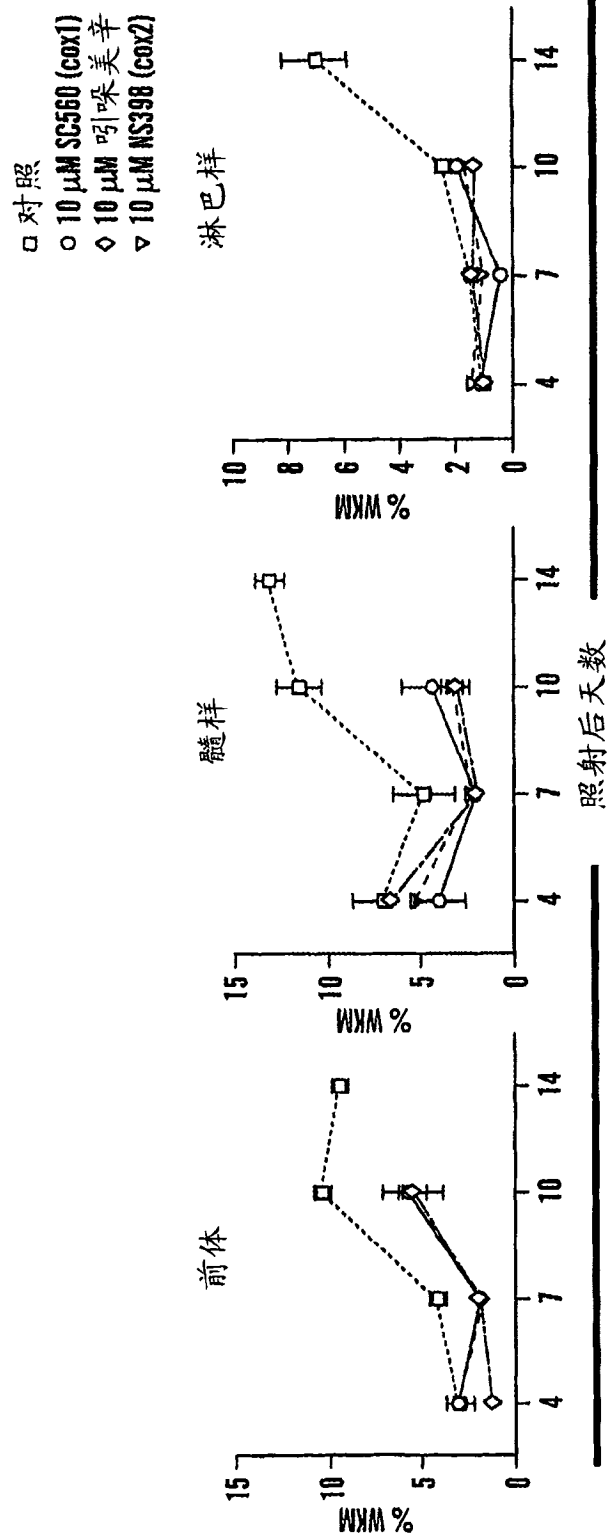


图 5B

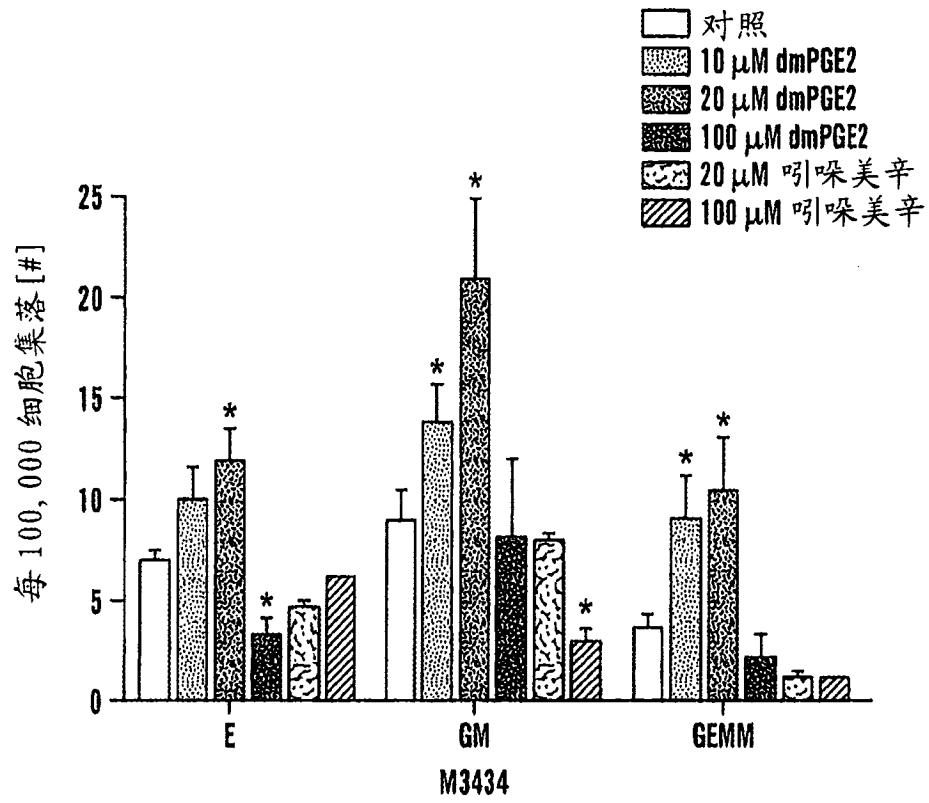


图 6A

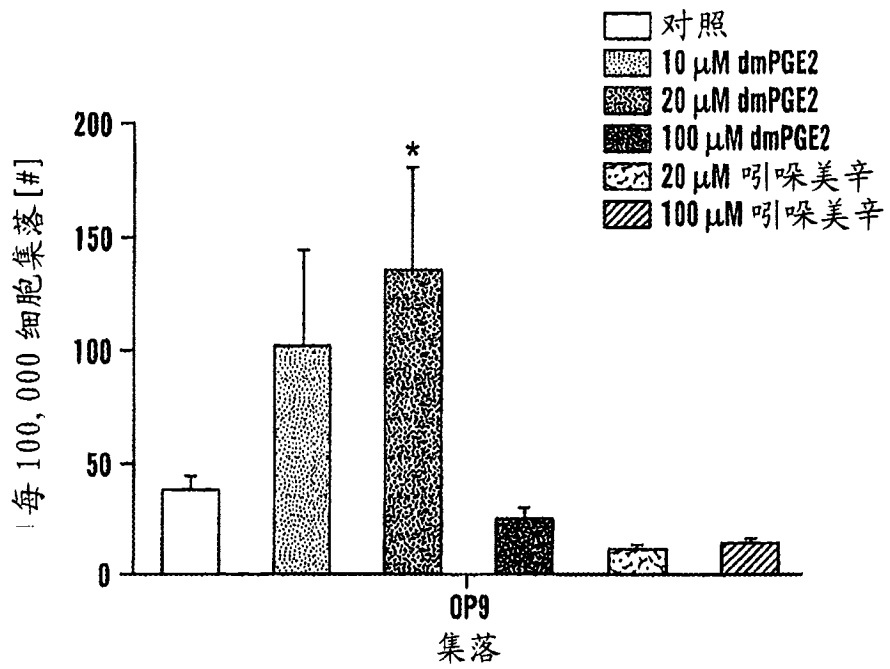


图 6B

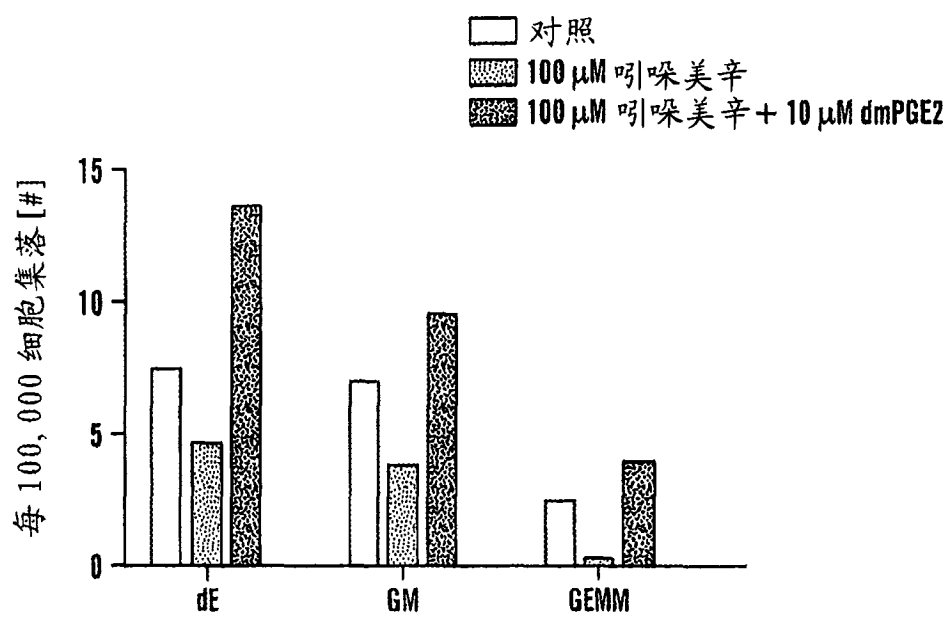


图 7A

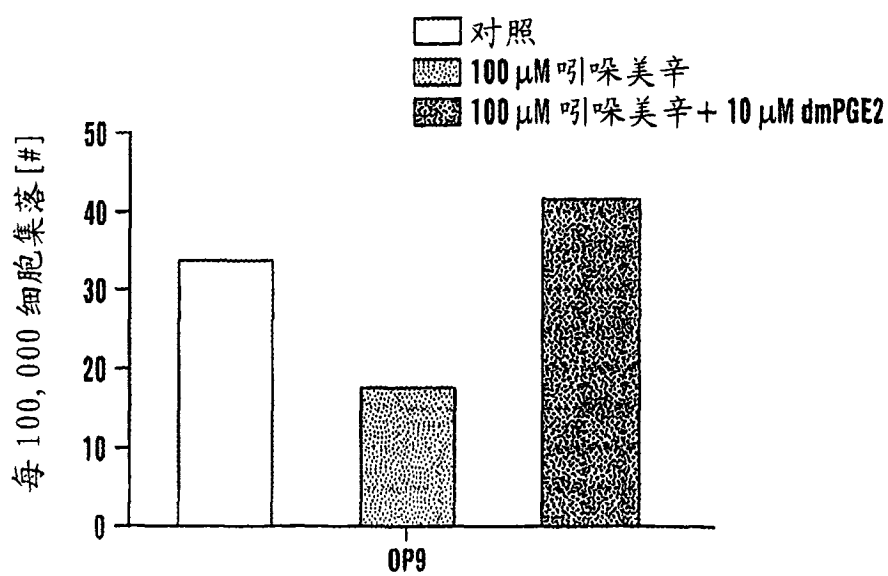


图 7B

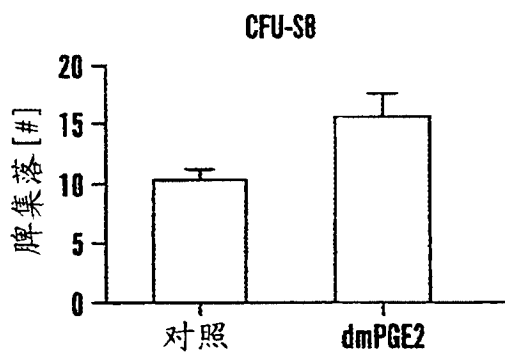


图 8A

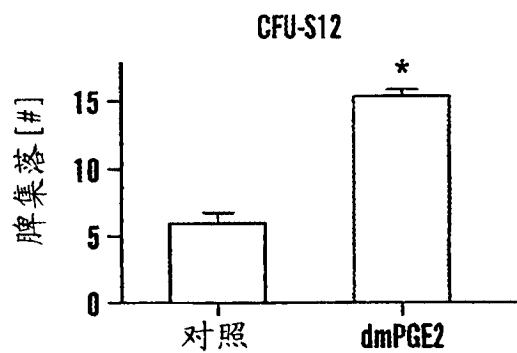


图 8B

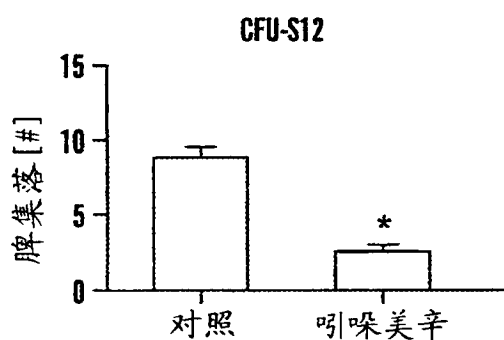


图 8C

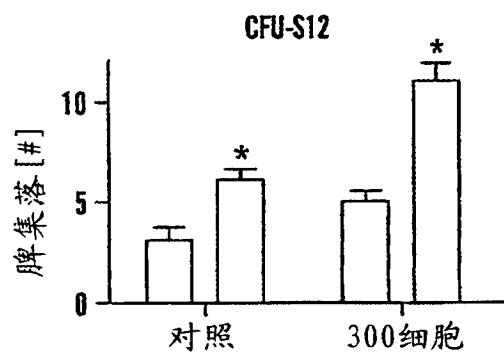


图 8D

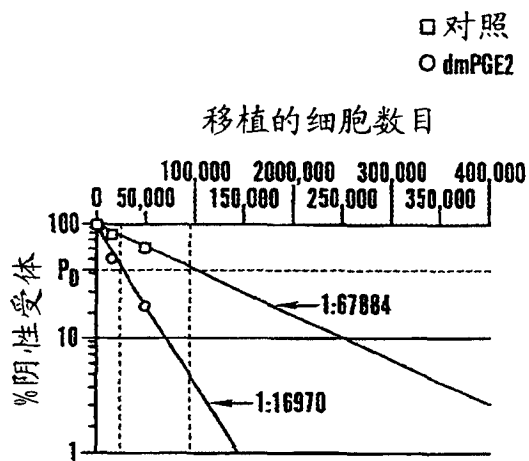


图 8E

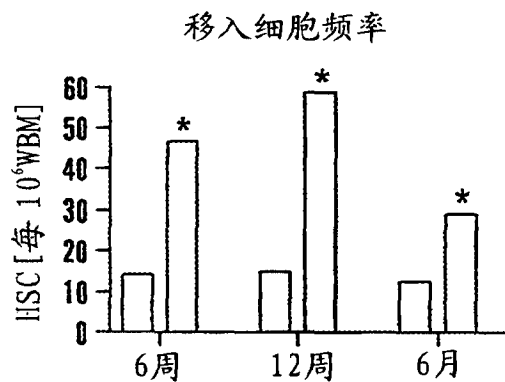


图 8F

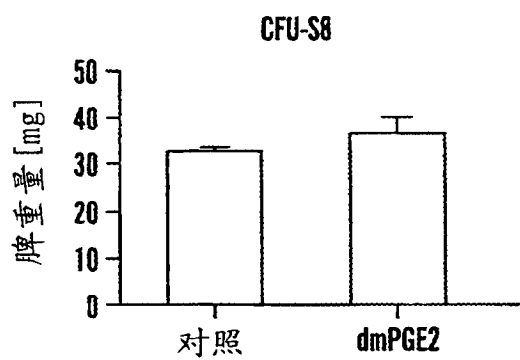


图 9A

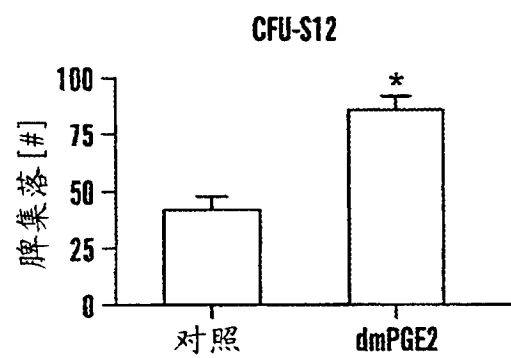


图 9B

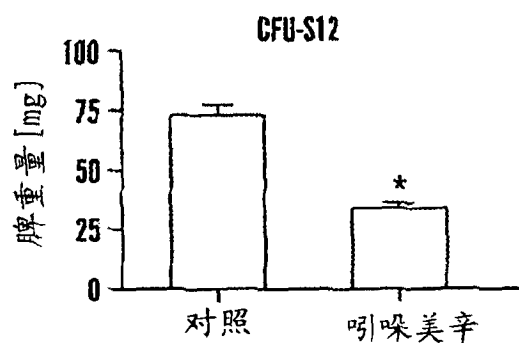


图 9C

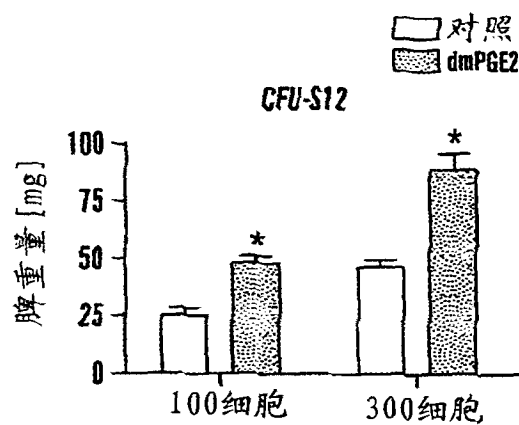


图 9D

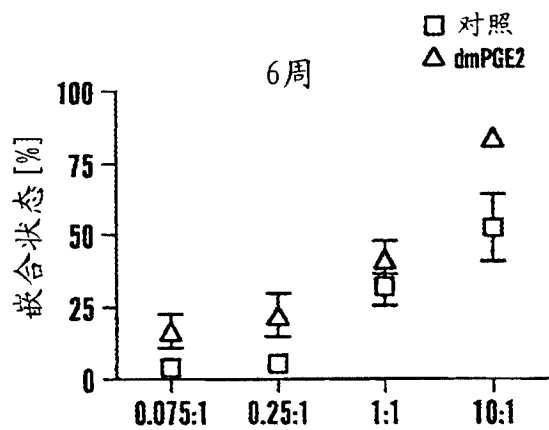


图 9F

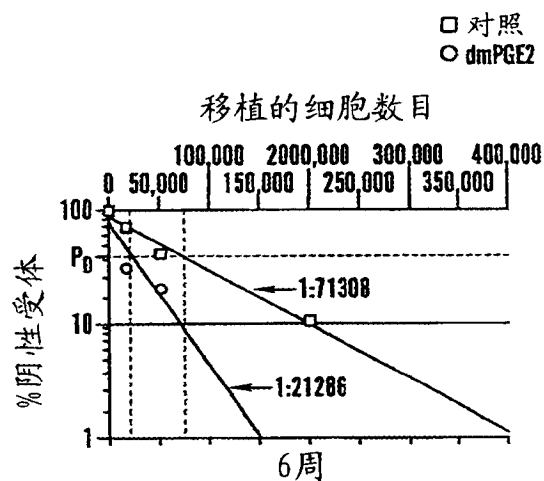


图 9G

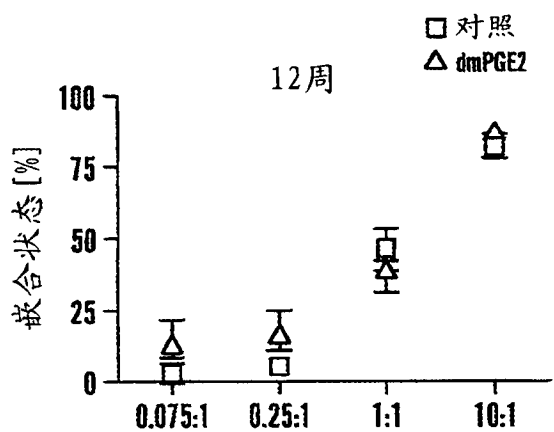


图 9H

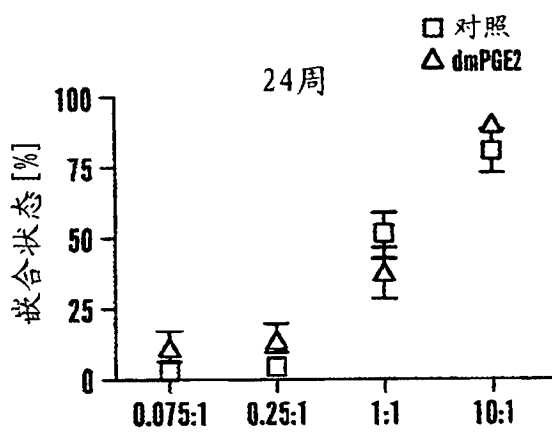


图 9I

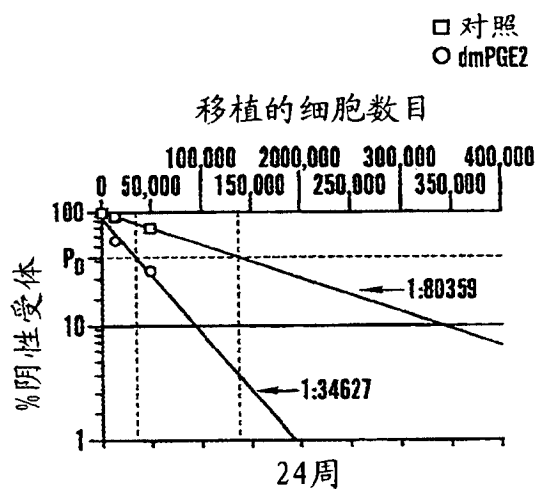


图 9J

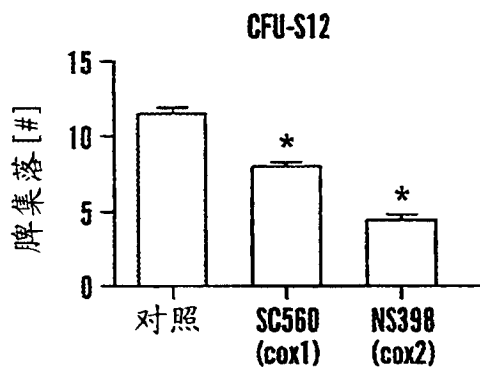


图 9K

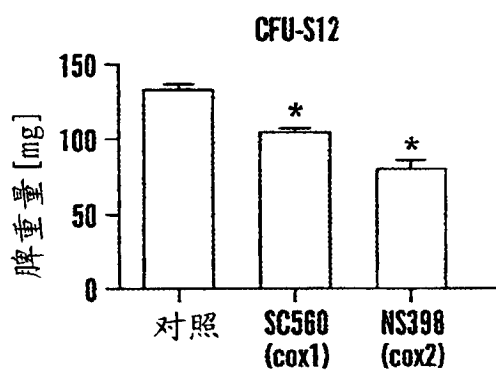


图 9L

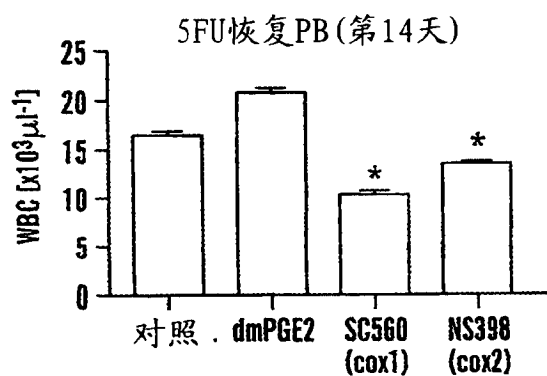


图 9M

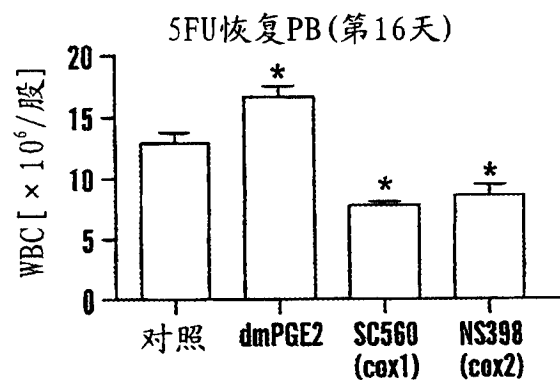


图 9N

Wnt信号传导途径模型

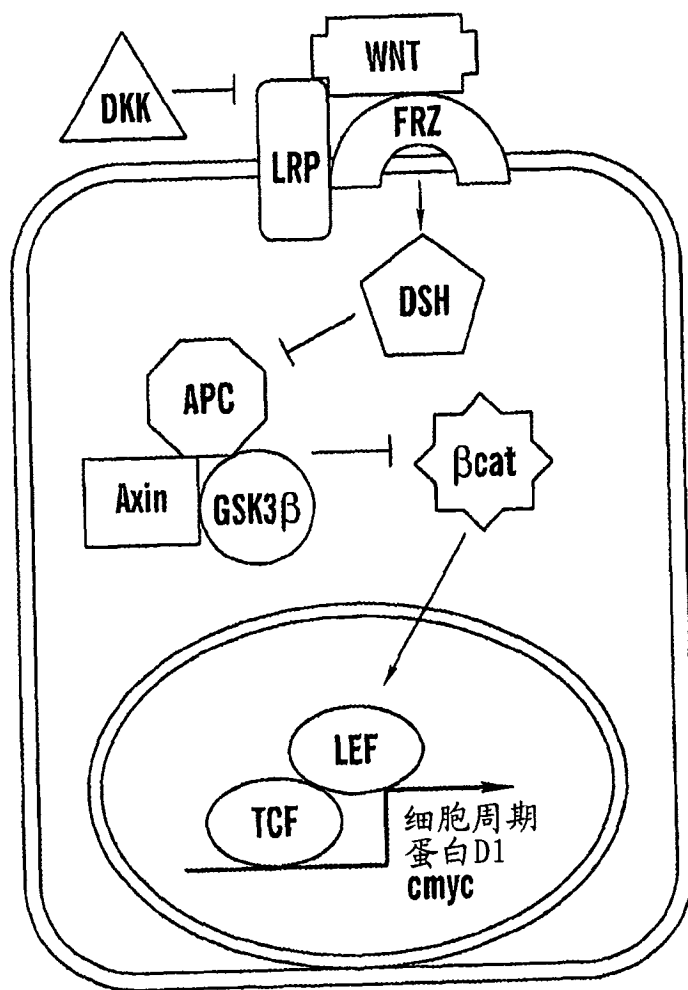


图 10

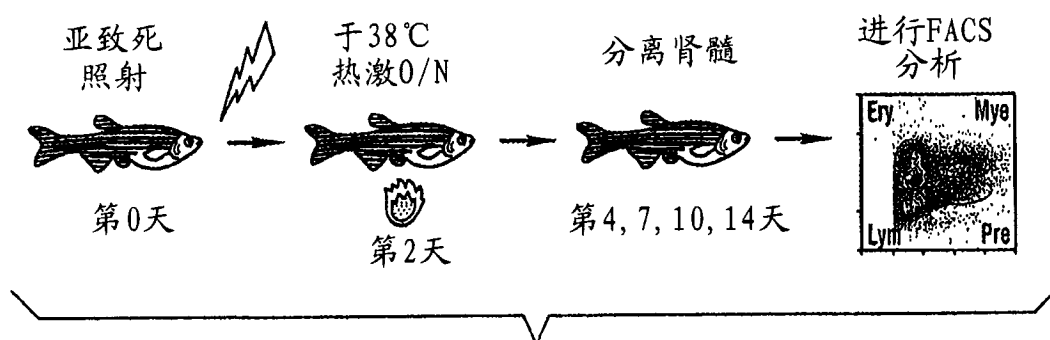


图 11A

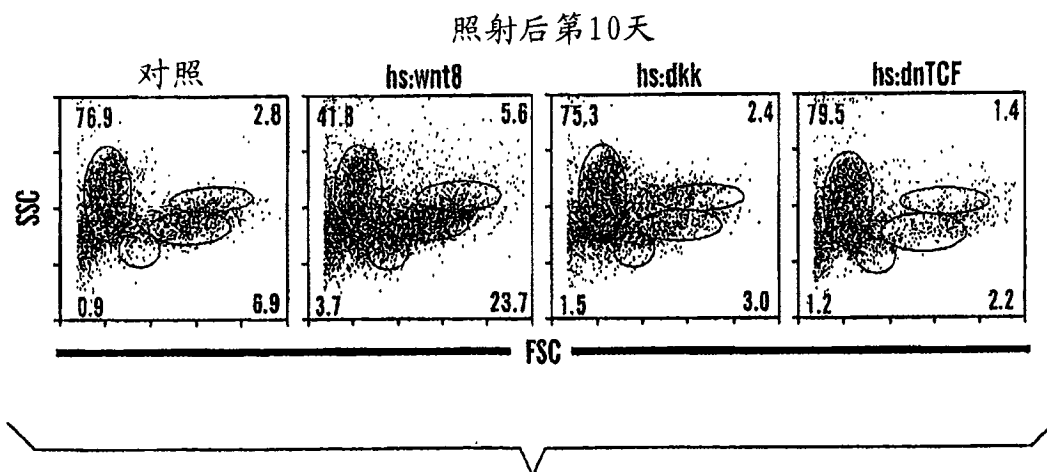


图 11B

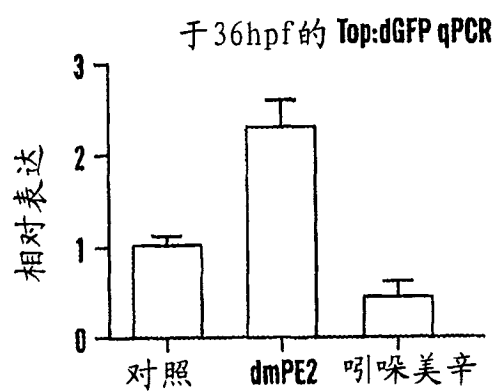


图 12

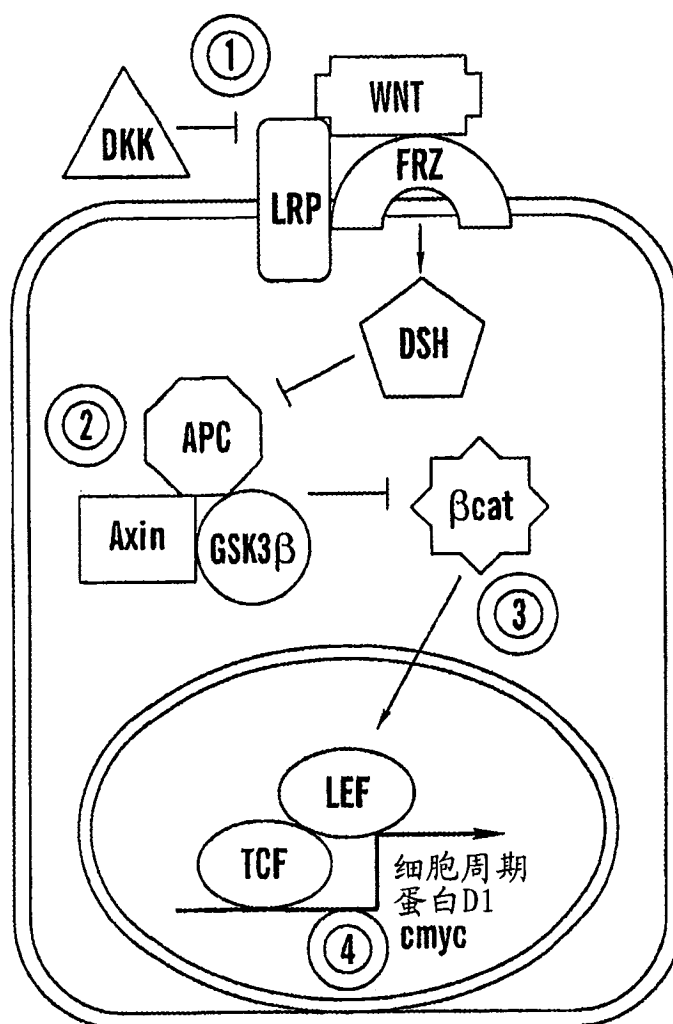


图 13

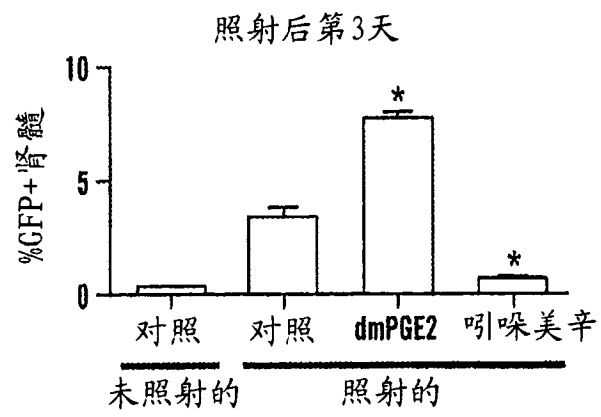


图 14