



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112280739 A

(43) 申请公布日 2021.01.29

(21) 申请号 202010783311.5

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2009.05.06

C12N 5/0789 (2010.01)

(30) 优先权数据

C12N 5/078 (2010.01)

61/126,803 2008.05.06 US

C12N 5/071 (2010.01)

61/189,491 2008.08.19 US

61/190,282 2008.08.26 US

(62) 分案原申请数据

200980125862.4 2009.05.06

(71) 申请人 安斯泰来再生医药协会

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 R·兰加 卢世江

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

代理人 张小勇

权利要求书1页 说明书70页

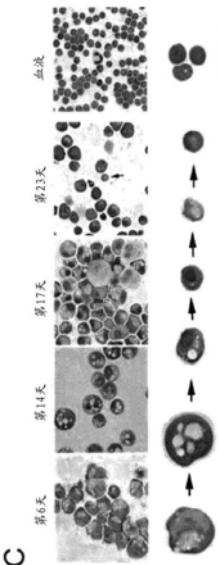
序列表11页 附图29页

(54) 发明名称

用于制备衍生自多能干细胞的去核类红细胞的方法

(57) 摘要

提供了使用多能干细胞产生去核类红细胞的方法。所述方法允许大量生产大量细胞。通过所述公开方法获得的细胞可用于各种研究、临床和治疗应用。还提供了用于产生巨核细胞和血小板的方法。



1. 一种产生多能干细胞衍生的去核类红细胞的方法,包括:
提供多能干细胞;和
通过将所述多能干细胞与OP9小鼠基质细胞或人间质干细胞(MSC)一起培养而使所述多能干细胞分化为去核类红细胞。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多能干细胞是胚胎干细胞或胚胎衍生细胞。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多能干细胞是诱导的多能干细胞。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多能干细胞是人细胞。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多能干细胞在分化之前经过遗传操作。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中使所述多能干细胞分化为去核类红细胞包括使所述多能干细胞分化为成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞在被分化为所述去核类红细胞之前被扩增。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞在含有Epo、IL-3和SCF的Stemline II培养基中被扩增。
9. 根据权利要求6所述的方法,其中所述多能干细胞是人多能干细胞,并且使所述人多能干细胞分化为所述成血成血管细胞通过包括以下的方法在体外进行:
 - (a) 将包含人多能干细胞的细胞培养物在存在足以诱导所述人多能干细胞分化为胚状体的量的至少一种生长因子的无血清培养基中培养;和
 - (b) 向包含胚状体的所述培养物添加至少两种生长因子并继续在无血清培养基中培养所述培养物,其中所述生长因子的量足以在所述胚状体培养物中扩增所述人成血成血管细胞,其中所述人多能干细胞、胚状体和成血成血管细胞在所述方法的步骤(a)和(b)的无血清培养基中生长,并且其中步骤(b)中所述至少两种生长因子包括BMP4和VEGF。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中使所述人多能干细胞分化为成血成血管细胞还包括:
 - (c) 使所述胚状体解聚成单细胞;和
 - (d) 向包含所述单细胞的所述培养物添加至少一种生长因子并继续在无血清培养基中培养所述培养物,其中所述生长因子的量足以在包含所述单细胞的所述培养物中扩增人成血成血管细胞,并且其中所述人多能干细胞、胚状体和血管瘤集落形成细胞在所述方法的步骤(a)-(d)的无血清培养基中生长。

用于制备衍生自多能干细胞的去核类红细胞的方法

[0001] 本申请是申请号为200980125862.4、申请日为2009年5月6日的中国发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及从多能干细胞制备人去核类红细胞。

背景技术

[0003] 本文所引用的所有出版物均以援引的方式纳入本文,其引用程度如同每一篇出版物或专利申请分别地和具体地被引用。说明书下文其中包括可能有助于理解本发明的信息。但是这并不表示承认本文所提供的任何信息为现有技术或者与所要求保护的发明相关,也不表示承认所引用的任何出版物为现有技术。

[0004] 急需用途是用于输血的血液。红十字会及其他血液供应单位报道几乎经常血液短缺。这种情况在血型独特的患者,Rh+患者,或者事故或灾难导致的大量伤亡中尤甚。另外,战时军队急需用于治疗战争相关的创伤的可用血液。本发明提供用于血液库存和输血的改善的方法和组合物。本发明的细胞和方法将更安全可靠,优点在于无需传统的对献血者的依赖,并将有助于预防可用血液的严重短缺。

[0005] 发明概述

[0006] 下述各实施方案及其各方面均结合组合物与方法进行描述和说明,意图在于示例和说明,并不意欲限制范围。

[0007] 本发明提供了制备和使用从多能干细胞衍生的类红细胞和去核类红细胞的方法。

[0008] 在某些实施方案,本发明提供了一种制备多能干细胞衍生的去核类红细胞的方法,包括:提供多能干细胞;和通过将所述多能干细胞与OP9小鼠基质细胞或人间质干细胞(MSC)一起培养而使所述多能干细胞分化为去核类红细胞。

[0009] 在某些实施方案,使所述多能干细胞分化为去核类红细胞包括使所述多能干细胞分化为成血成血管细胞(hemangioblast)、非移植血管瘤细胞或胚细胞。在某些实施方案,所述成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞在被分化为所述去核类红细胞之前被扩增。在某些实施方案,所述成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞在含有Epo、IL-3和SCF的Stemline II培养基中被扩增。

[0010] 在某些实施方案,所述多能干细胞是人多能干细胞,并且使所述人多能干细胞分化为所述成血成血管细胞通过包括以下的方法在体外进行:(a)将包含人多能干细胞的细胞培养物在存在足以诱导所述人多能干细胞分化为胚状体的量的至少一种生长因子的无血清培养基中培养;和(b)向包含胚状体的所述培养物添加至少两种生长因子并继续在无血清培养基中培养所述培养物,其中所述生长因子的量足以在所述胚状体培养物中扩增所述人成血成血管细胞,其中所述人多能干细胞、胚状体和成血成血管细胞在所述方法的步骤(a)和(b)的无血清培养基中生长,并且其中步骤(b)中所述至少两种生长因子包括BMP4和VEGF。在某些实施方案,使所述人多能干细胞分化为成血成血管细胞还包括:(c)使所述

胚状体解聚成单细胞；和(d)向包含所述单细胞的所述培养物添加至少一种生长因子并继续在无血清培养基中培养所述培养物，其中所述生长因子的量足以在包含所述单细胞的所述培养物中扩增人成血成血管细胞，并且其中所述人多能干细胞、胚状体和血管瘤集落形成细胞在所述方法的步骤(a)-(d)的无血清培养基中生长。

[0011] 在某些实施方案，所述多能干细胞是人多能干细胞，并且使所述人多能干细胞分化为所述非移植血管瘤细胞通过包括以下的方法在体外进行：(a)将包含所述人多能干细胞的细胞培养物在存在足以诱导所述人多能干细胞分化为胚状体的量的至少一种生长因子的无血清培养基中培养；和(b)向包含胚状体的所述培养物添加至少一种生长因子并继续在无血清培养基中培养所述培养物，其中所述生长因子的量足以在所述胚状体培养物中扩增所述人非移植血管瘤细胞，其中所述胚状体被培养10-13天，并且其中所述人多能干细胞、胚状体和非移植血管瘤细胞在所述方法的步骤(a)和(b)的无血清培养基中生长。在某些实施方案，使所述多能干细胞分化为所述非移植血管瘤细胞还包括：(c)使所述胚状体解聚成单细胞；和(d)向包含所述单细胞的所述培养物添加至少一种生长因子并继续在无血清培养基中培养所述培养物，其中所述生长因子的量足以在包含所述单细胞的所述培养物中扩增所述人非移植血管瘤细胞，其中所述胚胎衍生细胞、胚状体和非移植血管瘤细胞在所述方法的步骤(a)-(d)的无血清培养基中生长。

[0012] 在某些实施方案，使所述多能干细胞分化为所述去核类红细胞还包括在包含EPO的培养基中培养所述多能干细胞。在某些实施方案，使所述多能干细胞分化为所述去核类红细胞还包括：在包含选自由以下组成的组的补充剂的培养基中培养所述多能干细胞：肌醇、叶酸、一硫代甘油、运铁蛋白、胰岛素、硝酸亚铁、硫酸亚铁、BSA、L-谷氨酰胺、青霉素-链霉素及其组合；和在所述培养基中培养所述所述多能干细胞，其中所述培养基还包含选自由氢化可的松、SCF、IL3、Epo及其组合组成的组的物质。

[0013] 在某些实施方案，本发明使用的所述多能干细胞是胚胎干细胞或胚胎衍生细胞。在某些实施方案，所述多能干细胞是诱导的多能干细胞。在某些实施方案，所述多能干细胞是人细胞。在某些实施方案，所述多能干细胞在分化之前经过遗传操作。

[0014] 在某些实施方案，本发明使用的所述生长因子是包括HOXB4和蛋白转导结构域(PTD)的融合蛋白。在某些实施方案，所述HOXB4是哺乳动物HOXB4。在某些实施方案，所述哺乳动物HOXB4是小鼠或人的HOXB4。

[0015] 在某些实施方案，本发明使用的所述生长因子选自由以下组成的组：血管内皮生长因子(VEGF)、骨形态发生蛋白(BMP)、干细胞因子(SCF)、Flt-3L(FL)、血小板生成素(TPO)和促红细胞生成素(EPO)。在某些实施方案所述血管内皮生长因子(VEGF)、骨形态发生蛋白(BMP)或两者在细胞培养的0-48小时内被添加至步骤(a)。在某些实施方案，所述干细胞因子(SCF)、Flt-3L(FL)或血小板生成素(TPO)或其任何组合在步骤(a)开始后48-72小时内被添加至所述培养物。

[0016] 在某些实施方案，所述方法还包括向步骤(a)添加红细胞生成素(EPO)的步骤，或者还包括向步骤(a)或(d)添加促红细胞生成素(EPO)的步骤。

[0017] 在某些实施方案，本发明提供了由上述方法制备的去核类红细胞。

[0018] 在本发明的其他实施方案中，本发明还提供了一种制备多能干细胞衍生的类红细胞的方法，包括：提供多能干细胞；和通过在包含EPO的培养基中培养所述多能干细胞而使

所述多能干细胞分化为类红细胞。

[0019] 在某些实施方案，使所述多能干细胞分化为类红细胞包括使所述多能干细胞分化为成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞。在某些实施方案，所述成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞在被分化为所述类红细胞之前被扩增。在某些实施方案，所述成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞在含有Epo、IL-3和SCF的Stemline II培养基中被扩增。

[0020] 在某些实施方案，所述多能干细胞是人多能干细胞，并且使所述人多能干细胞分化为所述成血成血管细胞通过包括以下的方法在体外进行：(a) 将包含人多能干细胞的细胞培养物在存在足以诱导所述人多能干细胞分化为胚状体的量的至少一种生长因子的无血清培养基中培养；和 (b) 向包含胚状体的所述培养物添加至少两种生长因子并继续在无血清培养基中培养所述培养物，其中所述生长因子的量足以在所述胚状体培养物中扩增所述人成血成血管细胞，其中所述人多能干细胞、胚状体和成血成血管细胞在所述方法的步骤(a) 和 (b) 的无血清培养基中生长，并且其中步骤(b) 中所述至少两种生长因子包括BMP4 和VEGF。

[0021] 在某些实施方案，使所述人多能干细胞分化为所述成血成血管细胞还包括：(c) 使所述胚状体解聚成单细胞；和 (d) 向包含所述单细胞的所述培养物添加至少一种生长因子并继续在无血清培养基中培养所述培养物，其中所述生长因子的量足以在包含所述单细胞的所述培养物中扩增人成血成血管细胞，并且其中所述多能干细胞、胚状体和血管瘤集落形成细胞在所述方法的步骤(a) – (d) 的无血清培养基中生长。

[0022] 在某些实施方案，所述多能干细胞是人多能干细胞，并且使所述多能干细胞分化为所述非移植血管瘤细胞通过包括以下的方法在体外进行：(a) 将包含人多能干细胞的细胞培养物在存在足以诱导所述人多能干细胞分化为胚状体的量的至少一种生长因子的无血清培养基中培养；和 (b) 向包含胚状体的所述培养物添加至少一种生长因子并继续在无血清培养基中培养所述培养物，其中所述生长因子的量足以在所述胚状体培养物中扩增所述人非移植血管瘤细胞，其中所述胚状体被培养10–13天，并且其中所述人多能干细胞、胚状体和非移植血管瘤细胞在所述方法的步骤(a) 和 (b) 的无血清培养基中生长。

[0023] 在某些实施方案，使所述多能干细胞分化为所述非移植血管瘤细胞还包括：(c) 使所述胚状体解聚成单细胞；和 (d) 向包含所述单细胞的所述培养物添加至少一种生长因子并继续在无血清培养基中培养所述培养物，其中所述生长因子的量足以在包含所述单细胞的所述培养物中扩增人非移植血管瘤细胞，其中所述人多能干细胞、胚状体和非移植血管瘤细胞在所述方法的步骤(a) – (d) 的无血清培养基中生长。

[0024] 在某些实施方案，本发明使用的所述多能干细胞是胚胎干细胞或胚胎衍生细胞。在某些实施方案，所述多能干细胞是诱导的多能干细胞。在某些实施方案，所述多能干细胞是人细胞。在某些实施方案，所述多能干细胞在分化之前经过遗传操作。

[0025] 在某些实施方案，本发明使用的所述生长因子是包括HOXB4和蛋白转导结构域(PTD)的融合蛋白。在某些实施方案，所述HOXB4是哺乳动物HOXB4。在某些实施方案，所述哺乳动物HOXB4是小鼠或人的HOXB4。

[0026] 在某些实施方案，本发明使用的所述生长因子选自由以下组成的组：血管内皮生长因子(VEGF)、骨形态发生蛋白(BMP)、干细胞因子(SCF)、Flt-3L(FL)、血小板生成素(TPO)

和促红细胞生成素(EPO)。在某些实施方案，所述血管内皮生长因子(VEGF)、骨形态发生蛋白(BMP)或两者在细胞培养的0-48小时内被添加至步骤(a)。在某些实施方案，所述干细胞因子(SCF)、Flt-3L(FL)或血小板生成素(TPO)或其任何组合在步骤(a)开始后48-72小时内被添加至所述培养物。

[0027] 在某些实施方案，所述方法还包括向步骤(a)添加红细胞生成素(EPO)的步骤，或者还包括向步骤(a)或(d)添加促红细胞生成素(EPO)的步骤。

[0028] 在某些实施方案，本发明提供了通过上述方法制备的类红细胞。

[0029] 在本发明的其他实施方案中，本发明提供了一种制备巨核细胞或血小板的方法，包括：提供多能干细胞；使所述多能干细胞分化为成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞；和通过在包含TPO的巨核细胞(MK)培养基中培养而使所述成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞分化为所述巨核细胞或所述血小板。

[0030] 在某些实施方案，本发明使用的所述多能干细胞是胚胎干细胞或胚胎衍生细胞。在某些实施方案，所述多能干细胞是诱导的多能干细胞。在某些实施方案，所述多能干细胞是人细胞。在某些实施方案，所述多能干细胞在分化之前经过遗传操作。

[0031] 在某些实施方案，所述成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞在被分化为所述巨核细胞或所述血小板之前被扩增。

[0032] 在某些实施方案，所述成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞在含有Epo、IL-3和SCF的Stemline II培养基中被扩增。

[0033] 在某些实施方案，所述多能干细胞是人多能干细胞，并且使所述人多能干细胞分化为所述成血成血管细胞通过包括以下的方法在体外进行：(a)将包含人多能干细胞的细胞培养物在存在足以诱导所述人多能干细胞分化为胚状体的量的至少一种生长因子的无血清培养基中培养；和(b)向包含胚状体的所述培养物添加至少两种生长因子并继续在无血清培养基中培养所述培养物，其中所述生长因子的量足以在所述胚状体培养物中扩增所述人成血成血管细胞，其中所述人多能干细胞、胚状体和成血成血管细胞在所述方法的步骤(a)和(b)的无血清培养基中生长，并且其中步骤(b)中所述至少两种生长因子包括BMP4和VEGF。

[0034] 在某些实施方案，使所述人多能干细胞分化为所述成血成血管细胞还包括：(c)使所述胚状体解聚成单细胞；和(d)向包含所述单细胞的所述培养物添加至少一种生长因子并继续在无血清培养基中培养所述培养物，其中所述生长因子的量足以在包含所述单细胞的所述培养物中扩增人成血成血管细胞，并且其中所述人多能干细胞、胚状体和血管瘤集落形成细胞在所述方法的步骤(a)-(d)的无血清培养基中生长。

[0035] 在某些实施方案，使所述成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞分化为所述巨核细胞或所述血小板在成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞培养约6至8天后进行。

[0036] 在某些实施方案，所述多能干细胞是人多能干细胞，并且使所述多能干细胞分化为所述非移植血管瘤细胞通过包括以下的方法在体外进行：(a)将包含所述人多能干细胞的细胞培养物在存在足以诱导所述人多能干细胞分化为胚状体的量的至少一种生长因子的无血清培养基中培养；和(b)向包含胚状体的所述培养物添加至少一种生长因子并继续在无血清培养基中培养所述培养物，其中所述生长因子的量足以在所述胚状体培养物中扩

增所述人非移植血管瘤细胞，其中所述胚状体被培养10-13天，并且其中所述人多能干细胞、胚状体和非移植血管瘤细胞在所述方法的步骤(a)和(b)的无血清培养基中生长。

[0037] 在某些实施方案，使所述多能干细胞分化为所述非移植血管瘤细胞还包括：(c)使所述胚状体解聚成单细胞；和(d)向包含所述单细胞的所述培养物添加至少一种生长因子并继续在无血清培养基中培养所述培养物，其中所述生长因子的量足以在包含所述单细胞的所述培养物中扩增所述人非移植血管瘤细胞，其中所述胚胎衍生细胞、胚状体和非移植血管瘤细胞在所述方法的步骤(a)-(d)的无血清培养基中生长。

[0038] 在某些实施方案，本发明使用的所述生长因子是包括HOXB4和蛋白转导结构域(PTD)的融合蛋白。在某些实施方案，所述HOXB4是哺乳动物HOXB4。在某些实施方案，所述哺乳动物HOXB4是小鼠或人的HOXB4。

[0039] 在某些实施方案，本发明使用的所述生长因子选自由以下组成的组：血管内皮生长因子(VEGF)、骨形态发生蛋白(BMP)、干细胞因子(SCF)、Flt-3L(FL)、血小板生成素(TPO)和促红细胞生成素(EPO)。在某些实施方案，所述血管内皮生长因子(VEGF)、骨形态发生蛋白(BMP)或两者在细胞培养的0-48小时内被添加至步骤(a)。在某些实施方案，所述干细胞因子(SCF)、Flt-3L(FL)或血小板生成素(TPO)或其任何组合在步骤(a)开始后48-72小时内被添加至所述培养物。

[0040] 本发明还提供了通过上述方法任何一个制备的巨核细胞或血小板。

[0041] 在其他实施方案中，本发明提供了制备去核类红细胞的方法，包括如下步骤：(a)提供多能干细胞；和(b)使所述多能干细胞分化为去核类红细胞。在某些实施方案，所述多能干细胞是胚胎干细胞或胚胎衍生细胞。在某些实施方案，所述多能干细胞多能干细胞。在某些实施方案，所述多能干细胞是人细胞。在某些实施方案，所述多能干细胞在分化之前经过遗传操作。在某些实施方案，所述多能干细胞在步骤(b)之前被分化为成血成血管细胞(例如，成血成血管细胞、血管瘤集落形成细胞、血管瘤细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞)。在某些实施方案，所述成血成血管细胞或胚细胞在步骤(b)之前被扩增。在某些实施方案，成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞在约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15天被扩增。在某些实施方案，成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞在约第3.5天至约第10天被扩增。在某些实施方案，所述成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞在含有Epo、IL-3和SCF的Stemline II培养基中扩增。在某些实施方案，成血成血管细胞或胚细胞被分化约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15天。在某些实施方案，成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞在约第11天至约第20天被扩增。在某些实施方案，所述去核类红细胞与OP9或MSC细胞一起培养。在某些实施方案，所述培养物补充了Epo。本发明包括本发明前述或下述方面和实施方案的任何的所有适合组合。

[0042] 在某些实施方案，本发明提供了通过上述方法制备的去核类红细胞。

[0043] 通过下文的详细描述，并参考附图，本发明的其他特征和优势将显而易见，下文的详细描述和附图以示例的方式说明了本发明的实施方案的多个特征。

[0044] 附图简述

[0045] 参照附图说明示例性的实施方案。本文公开的实施方案和附图意欲被理解为说明性的而非限制性的。

[0046] 图1描述了根据本发明实施方案从hESC大规模制备类红细胞。(A)衍生自 2×10^6 人

ESC的类红细胞(沉淀物)。(B)来自图1A的类红细胞被悬浮于等血细胞比容的人全血中;(C、D)衍生自人ESC的类红细胞的形态(C、原始200×和D、原始1000×)。(E)来自hESC衍生的类红细胞的血红蛋白的球蛋白链的电喷雾电离质谱,证实了 α 、 ζ 、 ϵ 和G γ 球蛋白的存在。显示了每个球蛋白所观察到的分子量。(F)hESC衍生的类红细胞的流式细胞仪分析。衍生自hESC的类红细胞用与PE结合的特异性抗体标记并用CellQuest程序在FacScan流式细胞仪(Becton Dickinson)上分析。与相同染料结合的相应的非特异性同种型抗体被用作阴性对照。

[0047] 图2描述了根据本发明实施方案的hESC衍生的类红细胞的功能鉴定。(A)正常人RBC和人ESC衍生的类红细胞的氧平衡曲线。注意,两条曲线在其中点是右眼不可区分的,而人ESC衍生的类红细胞以低(箭)和高(箭头)氧饱和百分比向左移动。(B)Bohr效应。(C)2,3-DPG缺失的效应。实线代表正常RBC对照,而虚线代表人ESC衍生的类红细胞。对于每对,右侧的线代表新鲜细胞,而左侧的线是缺失2,3-DPG的细胞的曲线。

[0048] 图3描绘根据本发明实施方案通过PCR鉴定hESC系的Rh(D)和ABO基因型。(A)RhD基因座的基因分型:设计Rh基因座的特异性引物,当使用Rh(D)阳性DNA时,扩增1,200-bp(弱)和600-bp PCR产物;而来自RhD阴性细胞的DNA仅制备1,200-bp片段。(B、C)ABO基因座的基因分型:设计两对引物以扩增ABO基因座的两个区域。PCR产物用限制酶消化以区分ABO类型。ABO和Rh(D)基因型如下:WA01, O (+); MA99, B (-); MA133, A (-); WA07和MA09, B (+); 以及WA09和MA01, A (+)。(D)通过FACS对衍生自MA01和MA99 hESC的类红细胞进行RhD抗原表达分析。从MA01和MA99 hESC制备的类红细胞用PE标记的单克隆抗-RhD抗体染色,并通过FACS分析。(E)hESC衍生的类红细胞的ABO类型鉴定。图A(原始400×),细胞用针对A抗原的单克隆抗体染色;图B(原始400×),细胞用针对B抗原的单克隆抗体染色。

[0049] 图4描述了根据本发明实施方案在体外对hESC衍生的类红细胞去核。(A)直径随培养时间而降低。每天的数据代表去核细胞的直径,除了“27e”代表第27天的去核细胞的直径。去核细胞在第8天降低至小于原始直径的一半。(B)核质比随培养时间降低。显著不同于第8天的样品用*=P<0.05, **=P<0.001, # = P<0.002指示。(C、E)衍生自人ESC的类红细胞在含有补充剂的Stemline II培养基中体外培养4周,并在第36天与OP9基质细胞共培养。在第42天,细胞经细胞离心涂片并用Wright-Giemsa染料染色。(C、原始200×和E、原始1000×);(D、F)来自人血的红细胞也被细胞离心涂片并用Wright-Giemsa染色,并与hESC衍生的类红细胞对比。(D、原始200×和F、原始1000×)。比例尺=10μm。

[0050] 图5描述了根据本发明实施方案模拟类红细胞发育的hESC衍生的类红细胞的成熟。(A)(一种成熟的红细胞标志物)的表达随时间增加,并且CD71(一种未成熟红细胞标志物)显示出表达随时间的降低。(B)hESC衍生的类红细胞中β-球蛋白链的表达。从第17天和第18天分化和成熟培养物收集的hESC衍生的类红细胞的细胞离心涂片样品用人β-球蛋白链特异性抗体染色。(C)hESC衍生的类红细胞在体外逐渐成熟。从胚细胞至成红血细胞逐渐形态变化,并且最终成熟的红细胞伴随血红蛋白的显著增加和在其体外分化和成熟过程中尺寸的减小。细胞用Wright-Giemsa和联苯胺(A和B、原始200×)染色。

[0051] 图6描述了根据本发明实施方案的hESC衍生的类红细胞中血型糖蛋白A的表达。从第28天分化和成熟培养物收集的hESC衍生的类红细胞的细胞离心涂片样品用人CD235a抗体染色。几乎100%的细胞对于CD235a染色呈阳性。(原始200×)。

[0052] 图7描述了根据本发明实施方案的hESC衍生的类红细胞中 β -球蛋白链的表达。从第28天分化和成熟培养物收集的hESC衍生的类红细胞的细胞离心涂片样品用人 β -球蛋白链特异性抗体染色。(原始200 \times)。

[0053] 图8描述了根据本发明实施方案通过RT-PCR分析 β -球蛋白基因簇的表达。在不同阶段分化的类红细胞被收集并使用球蛋白链特异性引物通过RT-PCR分析 β -、 γ -和 ϵ -球蛋白基因的表达。成人骨髓细胞的RNA用作 β -球蛋白基因的阳性对照和 ϵ -球蛋白基因的阴性对照。第28a天和第28b天是来自两个单独实验的类红细胞。BM, 骨髓。

[0054] 根据本发明的一个实施方案,图9示出了BMP和VEGF₁₆₅对于胚细胞(blast)集落发育的影响。A:在含有50ng/ml的VEGF₁₆₅的EB培养基中加入不同剂量的BMP-4,观察到BMP-4对于胚细胞集落发育的剂量依赖性效应。B:在含有50ng/ml的BMP-4和VEGF₁₆₅的EB培养基中加入不同剂量(0、10和20ng/ml)的BMP-2和BMP-7。BMP-2和BMP-7没有表现出对于胚细胞集落发育的促进效果。C:在含有50ng/ml的BMP-4的EB培养基中加入不同剂量的VEGF₁₆₅。VEGF₁₆₅对于胚细胞集落发育呈现剂量依赖性效应。**P<0.01,n=3。每孔中铺1×10⁵个来自第3.5天时的EB的细胞。

[0055] 根据本发明的一个实施方案,图10示出了在不同阶段加入的bFGF对于胚细胞集落发育的影响。(a) 在EB培养基中加入不同剂量的bFGF;(b) 在胚细胞集落生长培养基(BGM)中加入不同剂量的bFGF;(c) 在EB培养基和BGM均加入不同剂量的bFGF。**P<0.01,n=3。B和C:在存在bFGF(B)和不存在bFGF(C)的条件下,在BGM中由BC细胞发育衍生的内皮细胞形成网络状结构。两种来源的内皮细胞均形成网络状结构,并没有明显的差异。

[0056] 根据本发明的一个实施方案,图11示出了bFGF对于衍生自三种hESC细胞系的胚细胞集落发育的影响。斜条纹:在BGM中加入不同剂量的bFGF。水平条纹:在EB培养基中加入不同剂量的bFGF。*P<0.05; **P<0.01,n=3。

[0057] 根据本发明的一个实施方案,图12示出了在无饲养细胞的条件下生长的hESC保留了多能标记并能够稳定地分化为成血成血管细胞。在无饲养细胞的条件下传代4-5代之后,对WA01细胞染色以观察hESC标记Oct-4(A-C分别示出DAPI、Oct-4和两者合并的结果)和Tra-1-60(D-F分别示出DAPI、TRA-1-60和两者合并的结果)的表达,小图G和H显示了hESC在基质胶(G)和MEF(H)中培养而形成的集落形态学上的差异。放大倍数:原始效果×100。在小图I中,hESC分别在MEF或基质胶中生长,并在本文所述的优化条件下分化。与在MEF中培养的hESC相比,在基质胶中培养的hESC具有显著增多的成血成血管细胞的扩增。*P<0.03,n=3。

[0058] 根据本发明的一个实施方案,图13示出了在不同条件下的EB培养基中培养的基因表达的定量RT-PCR分析结果。在EB培养基中存在或不存在BMP-4或VEGF₁₆₅或其组合的条件下,分析了与成血成血管细胞的发育相关的各种基因的表达水平。使用 β -肌动蛋白作为内标,以标准化基因的表达。基因的相对表达表示为未分化hESC细胞中的平均表达水平的倍数差异。**P<0.002; ***P<0.0004,n=3。

[0059] 根据本发明的一个实施方案,图14示出了对成血管祖细胞的表面标记的鉴定。使用EasySep试剂盒,用不同的抗体富集EB细胞,然后铺板观察胚细胞集落的发育。**P<0.01,n=3。

[0060] 图15示出了根据本发明的一个实施方案的HOXB4蛋白的野生型核酸序列。

- [0061] 图16示出了根据本发明的一个实施方案的HOXB4蛋白的野生型核酸序列。
- [0062] 图17示出了根据本发明的一个实施方案的HOXB4蛋白的野生型氨基酸序列。
- [0063] 图18示出了根据本发明的一个实施方案的HOXB4蛋白的野生型氨基酸序列。
- [0064] 根据本发明的一个实施方案,图19示出了在无饲养细胞条件下生长的iPSCs (IMR90-1)保留了多能标记。在无饲养细胞的条件下传代4-5代之后,对iPS (IMR90)-1细胞进行染色以观察多能标记的表达。a:亮视场; b:Nanog; c:Oct-4; d:SSEA-4; 和e:TRA-1-60。放大倍数:原始效果×200。
- [0065] 根据本发明的一个实施方案,图20示出了ROCK抑制剂对于iPSC成血成血管细胞分化的影响。示出了:由iPS (IMR90)-1细胞在铺板24hr后制备的EB细胞:a——不存在ROCK抑制剂(原始效果100×),和b——存在ROCK抑制剂(原始效果100×);在EB形成过程中由iPS (IMR90)-1细胞衍生的胚细胞集落:c——不存在ROCK抑制剂(原始效果200×),d——存在ROCK抑制剂(原始效果200×),e:存在ROCK抑制剂和Art途径抑制剂(原始效果200×);图f-j显示了衍生自iPSC的成血成血管细胞分化成的造血细胞和内皮细胞:f——CFU-E(原始效果200×);g——CFU-M(原始效果100×);h——CFU-G(原始效果40×);i——经钙依赖性粘附素(VE-Cadherin)染色的内皮细胞(绿色)对Ac-LDL(红色)的摄取(原始效果400×);j——将内皮细胞在基质胶上铺板后形成的管状网络(原始效果40×)。
- [0066] 图21描述了根据本发明实施方案的hESC衍生的巨核细胞的鉴定。A.来自第4天巨核细胞成熟培养物的细胞的FACS分析。细胞用巨核细胞标志物CD41a、CD42b和类红细胞系标志物CD235a染色。B.来自第6天成熟培养物的门控CD41a+巨核细胞的DNA含量(碘化丙啶染色)的FACS分析。PI染色强度以对数标度显示。C. May-grunwald giemsa染色的成熟多倍体巨核细胞。D.从第6天巨核细胞成熟培养物的细胞离心涂片制备用CD41(绿色)和VWF(红色)对成熟多倍体巨核细胞免疫-荧光染色。E.相差图像显示血小板原形成巨核细胞(红色箭)在第7天液体成熟培养物中。
- [0067] 图22描述根据本发明的体外hESC衍生血小板的FACS分析。人外周血液血小板用作对照。衍生自hESC的CD41a+颗粒具有与外周血液血小板类似的FSC和SSC特征。
- [0068] 发明详述
- [0069] 本文所引用的所有参考文献均以援引的方式全部纳入本文。除非另外指明,本文所用的技术术语和科学术语具有本发明所属技术领域的普通技术人员通常所理解的含义。Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed., J.Wiley&Sons (New York, NY 2001); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5th ed., J.Wiley&Sons (New York, NY 2001); 和Sambrook and Russel, Molecular Cloning:A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001) 等文献为本领域技术人员提供了本申请所用的许多术语的一般性指导。
- [0070] 本领域技术人员应该知道许多与本文所述的方法和材料相似或等同的方法和材料,它们也可以用于实施本发明。事实上,本发明也没有理由被限制于所记载的方法和材料。出于本发明的目的,下文对以下术语进行定义。
- [0071] 除非上下文中明确指明,否则本说明书和后附的权利要求书所使用的术语“一”、“一个”和“所述”的含义包含其复数形式。此外,除非上下文中明确指明,在本说明书中,

“在……内”的含义包括“在……内”和“在……上”。

[0072] 本说明书中通篇使用的术语“包含”或其变化形式例如“包括”和“含有”应被理解为表示包含一定的整数或整数群,但并不排除任何其他整数或整数群。

[0073] 本文使用的术语“胚胎干细胞”(ES细胞)与本领域使用的一样,指的是衍生自胚胎的细胞。所述术语包括衍生自人胚泡或桑椹胚的内细胞团,包括那些可以作为细胞系连续传代的细胞。当要表示来源于人类的细胞时,可使用术语“人类胚胎干细胞”(hES)。所述ES细胞可源于卵细胞与精子的受精以及使用DNA,核移植,单性生殖,或通过使HLA区域纯合的方法制备ES细胞。ES细胞也源于合子,卵裂球,或胚泡阶段的哺乳动物胚胎,可通过精子和卵细胞融合,核移植,单性生殖,单雄生殖或染色质重编程及随后将所述重编程的染色质融合到质膜而制备细胞来制备所述人ES细胞。无论所述胚胎干细胞的来源如何或用于制备它们的具体方法如何,均可基于下述标准来识别:(i)能够分化为所有三个胚层的细胞,(ii)至少能够表达Oct-4和碱性磷酸酶,以及(iii)在被移植入免疫缺陷动物体内时能够制备畸胎瘤。

[0074] 本文所使用的术语“多能干细胞”包括胚胎干细胞、胚胎衍生干细胞和诱导的多能干细胞,不考虑衍生所述多能干细胞的方法如何。在功能上被定义为多能干细胞的干细胞具有以下属性:(a)在被移植入免疫缺陷(SCID)小鼠体内时能够诱导畸胎瘤;(b)能够分化为所有三个胚层的细胞类型(例如能够分化为外胚层、中胚层和内胚层的细胞类型);以及(c)表示一种或多种胚胎干细胞的标记(例如Oct 4、碱性磷酸酶、SSEA-3表面抗原、SSEA-4表面抗原、nanog、TRA-1-60、TRA-1-81、SOX2、REX1等等)。示例性的多能干细胞可以使用例如本领域已知的方法制备。示例性的多能干细胞包括衍生自胚泡期胚胎的ICM的胚胎干细胞,以及衍生自分裂期的一个或多个卵裂球或桑葚期胚胎的胚胎干细胞(任选地,可不必损坏胚胎的其余部分)。这类胚胎干细胞可以通过受精或无性手段制备的胚胎材料而制备,所述手段包括体细胞核转移(SCNT)、单性生殖和单雄生殖。其他示例性的多能干细胞包括诱导的多能干细胞(iPS细胞),所述iPS细胞通过表达一些因子的组合(在本文中被称为重编程因子)而对体细胞重编程而制备。可以使用胚胎期、出生后、幼年、青少年或成年的体细胞来制备iPS细胞。在某些实施方案中,可用于对体细胞重编程制备多能干细胞的因子包括例如:Oct4(有时也被称为Oct3/4)、Sox2、c-Myc和Klf4的组合。在另一些实施方案中,可用于对体细胞重编程制备多能干细胞的因子包括例如:Oct 4、Sox2、Nanog和Lin28的组合。在另一些实施方案中,通过表达至少两种重编程因子、至少三种重编程因子或四种重编程因子来对体细胞进行重编程。在另一些实施方案中,识别其他的编程因子,并将其单独或与已知的编程因子相组合来对体细胞进行编程。诱导的多能干细胞通过功能进行定义,包括使用多种方法(整合载体、非整合载体、化学手段等等)中的任意一种进行编程的细胞。

[0075] 所述多能干细胞可来源于任何物种。已从例如下列的物种中成功地衍生出了胚胎干细胞:小鼠、多种非人类灵长动物和人类,并且还从其他多种物种中制备了类似胚胎干细胞的细胞。因此,本领域技术人员能够从任何物种中制备胚胎干细胞和类似胚胎干细胞的细胞,所述物种包括但不限于:人类、非人类灵长动物、啮齿类(小鼠、大鼠)、有蹄类动物(牛、羊等)、犬类(家养犬及野生犬)、猫科动物(家养的和野生猫科动物,例如狮子、老虎、猎豹)、兔子、仓鼠、沙鼠、松鼠、豚鼠、山羊、大象、熊猫(包括大熊猫)、猪、浣熊、马、斑马、海洋哺乳动物(海豚,鲸鱼等)等等。在某些实施方案中,所述物种是濒危物种。在某些实施方案

中,所述物种为目前已经灭绝的物种。

[0076] 类似地,iPS细胞可来源于任何物种。已经使用小鼠和人类细胞成功地制备了iPS细胞。可以使用胚胎期、出生后、幼年或成年的组织来制备iPS细胞。因此,本领域技术人员能够从任何物种中制备iPS细胞,所述物种包括但不限于:人类、非人类灵长动物、啮齿类(小鼠、大鼠)、有蹄类动物(牛、羊等)、犬类(家养犬及野生犬)、猫科动物(家养的和野生猫科动物,例如狮子、老虎、猎豹)、兔子、仓鼠、沙鼠、松鼠、豚鼠、山羊、大象、熊猫(包括大熊猫)、猪、浣熊、马、斑马、海洋哺乳动物(海豚,鲸鱼等)等等。在某些实施方案中,所述物种是濒危物种。在某些实施方案中,所述物种为目前已经灭绝的物种。

[0077] 事实上,可以使用任何发育阶段的任何体细胞为起点来制备诱导的多能干细胞。例如,所述细胞可以来自胚胎的、胎儿的、新生的、青少年或成年供体。可以使用的示例性体细胞包括:成纤维细胞(例如通过皮肤样本或活检获得的真皮成纤维细胞)、来自滑膜组织的滑膜细胞、包皮细胞、颊细胞或肺成纤维细胞。虽然皮肤和颊是可用的且容易获得的合适细胞的来源,但是实际上任何细胞均可以使用。在某些实施方案中,所述体细胞不是成纤维细胞。

[0078] 应当注意所述多能干细胞可为例如ES细胞或诱导的多能干细胞。诱导的多能干细胞可以通过在体细胞中表达重编程因子的组合而制备。在某些实施方案中,在体细胞中表达至少两种重编程因子从而成功地对体细胞进行重编程。在另一些实施方案中,在体细胞中表达至少三种重编程因子从而成功地对体细胞进行重编程。在另一些实施方案中,在体细胞中表达至少四种重编程因子从而成功地对体细胞进行重编程

[0079] 术语“蛋白转导域”(“PTD”)指可穿过细胞膜进入细胞,或者可协调或增加例如有PTD附着的另一个分子(例如蛋白结构域)穿过细胞膜进入细胞的速度的任何氨基酸序列。所述蛋白转导域可以是天然存在的大蛋白的一部分(例如病毒蛋白(例如HIV TAT)的PTD)的结构域或序列,或者是合成或人造的氨基酸序列。

[0080] 术语“成血成血管细胞”和“血管瘤集落形成细胞”在本申请中可互换使用。所述细胞具有多种结构和功能特征。其中一种特征是这些细胞在被给予宿主时能够移植入骨髓。这些细胞可以基于多种结构和功能特征进行描述,包括但不限于,一种或多种标记物的表达(RNA或蛋白)或不表达(RNA或蛋白)。血管瘤集落形成细胞至少能够分化成造血细胞类型或内皮细胞类型。血管瘤集落形成细胞优选有双重潜能,至少能够分化成造血细胞类型和内皮细胞类型。同样地,本发明的血管瘤集落形成细胞至少有一种潜能,优选有双重潜能。然而此外,血管瘤集落形成细胞可具有更大程度的发育潜力,并在某些实施方案中,可分化形成其他谱系的细胞类型。在某些实施方案中,所述血管瘤集落形成细胞能够分化形成其他中胚层衍生物,如心脏细胞(例如心肌细胞)和/或平滑肌细胞。

[0081] 在本申请通篇中使用的术语“非移植成血成血管细胞”指的是一种新的细胞群,所述细胞群具有一些与血管瘤集落形成细胞相同的特征。但是,非移植成血成血管细胞与血管瘤集落形成细胞的区别在于它们在被给予免疫缺陷宿主时不会移植入骨髓。除了这一区别之外,非移植成血成血管细胞可以具有一个以上的(2、3、4、5、6、7、8、9、10个)与血管瘤集落形成细胞相同的功能或结构特征。例如,在某些实施方案中,所述非移植成血成血管细胞彼此之间松散粘连。在另一些实施方案中,所述非移植成血成血管细胞不表达下列蛋白中的一种或多种(2、3、4种):CD34、KDR、CD133、CD31。不拘囿于理论,非移植成血成血管细胞可

以提供一种不同的干细胞群,所述干细胞群比血管瘤集落形成细胞在某种程度上更具可靠性,并且仍然能够制备多种造血细胞类型。

[0082] 去核类红细胞

[0083] 本发明的实施方案大体上涉及用于使人多能干细胞分化为去核类红细胞的方法。本发明的类红细胞在体外和体内具有多种用途。本发明的红细胞将用于各种治疗应用。而且,通过本发明衍生的扩增数目的红细胞可以在治疗造血障碍的新型治疗策略或血库建立中使用。

[0084] 在本申请的某些实施方案中,多能干细胞是成血成血管细胞(例如,成血成血管细胞、血管瘤集落形成细胞、非移植血管瘤细胞、血管瘤细胞或胚细胞,参见例如美国专利申请2008/0014180,其在此通过引用整体并入)。

[0085] 在某些实施方案,本申请的红细胞可用于输注。制备大量输注细胞的能力将缓解全国血库和医院面临的长期血液短缺。在某些实施方案,本发明方法允许制备用于输注的万能细胞。具体说,0型和Rh型红细胞可被容易地制备并且将用作输注的万能血源。

[0086] 本发明方法允许在体外扩增多能干细胞至可用于多种商业和临床应用的大量。在某些实施方案,细胞制品包括至少 1×10^6 个细胞。在其他实施方案中,细胞制品包括至少 2×10^6 个人多能干细胞,而在其他实施方案中包括至少 3×10^6 人多能干细胞。在其他实施方案中,细胞制品包括至少 4×10^6 个人多能干细胞。

[0087] 本发明涉及包括10,000至四百万或更多哺乳动物(例如人)成血成血管细胞的溶液、制品和组合物。在此类溶液、制品和组合物中成血成血管细胞的数目可以是10,000至四百万或更多的范围内的任何数目。该数目可以例如是20,000、50,000、100,000、500,000、一百万等。

[0088] 类似地,本发明涉及红细胞的制品。本发明还涉及制备、贮存和分配多能干细胞和/或红细胞的方法。

[0089] 本发明还提供了适合输注进入人或动物患者的方法和溶液。在特定实施方案中,本发明提供了制备红细胞的方法。在某些实施方案,本发明适合用于血库和医院以提供外伤后输血或者治疗血液相关疾病或疾患。在某些实施方案,本发明提供作为万能供体细胞的红细胞。在某些实施方案,红细胞是功能性的并且在输注之前表达血红蛋白F。

[0090] 在某些实施方案,红细胞被输注以治疗外伤、手术中的血液损失或血液疾病,例如贫血、镰刀状细胞贫血或溶血性疾病。在某些实施方案,分化的红细胞被输注以治疗外伤、手术中的血液损失或血液疾病,例如贫血、镰刀状细胞贫血或溶血性疾病。在某些实施方案,混合的红细胞群被输注。应该注意,许多分化的造血细胞类型,特别是红细胞,通常作为混合群在体内存在。具体说,在体内存在各种年龄和分化水平的循环红细胞。此外,红细胞随时间成熟以表达较少胎儿血红蛋白和较多成年血红蛋白。本发明包括纯化的红细胞群或具有各种年龄水平和分化水平的混合红细胞群的输注。在特定实施方案中,本发明包括表达胎儿血红蛋白(血红蛋白F)的红细胞的输注。表达胎儿血红蛋白的红细胞的输注可以特别用于治疗镰刀状细胞贫血。制备大量输注细胞的能力将缓解全国血库和医院面临的长期血液短缺。

[0091] 在某些实施方案,本发明方法允许制备用于输注的万能细胞。具体说,是0型和Rh型的红细胞可以被容易地制备并且用作万能的输注血源。在某些实施方案,通过本申请方

法制备的红细胞是功能性的。在某些实施方案，红细胞在输注之前表达血红蛋白F。在某些实施方案，红细胞携带氧。在某些实施方案，红细胞的寿命与天然衍生的红细胞相等。在某些实施方案，红细胞的寿命是天然衍生的红细胞寿命的75%。在某些实施方案，红细胞的寿命是天然衍生的红细胞寿命的50%。在某些实施方案，红细胞的寿命是天然衍生的红细胞寿命的25%。

[0092] 干细胞分化为成熟红细胞是目前的挑战。该成就的影响是巨大的，因为存在持续的血液供体短缺，不一致的供给与高需求，特别是在预料不到的危机情况时期。胚胎干细胞(ESC)是潜在一致且可靠的红细胞源，具有无限供应0-万能血液的益处，避免了针对每次捐献进行疾病筛选和血型检定的额外花费。成熟红细胞的标志是缺少核，以及制备成熟血红蛋白。许多研究人员，包括我们实验室，已经实现了ESC分化为成红血细胞，成红血细胞依然含有它们的核，并且表达未成熟的血红蛋白。迄今，还未实现对人胚胎干细胞的去核。

[0093] 相反，已经对CD34+骨髓细胞和脐带血干细胞实现了去核，其在发育中进一步发展，因此可能有助于它们的去核能力。Malik在用Epo处理CD34+骨髓细胞19天后实现了10-40%去核(Malik 1998)。Miharada通过生长因子和细胞因子(包括SCF、Epo、IL-3、VEGF、IGF-II和米非司酮)20天处理而实现了CD34+脐带血干细胞的77%去核(Miharada 2006)。使用在骨髓环境中发现的因子混合物(SCF、IL-3、Epo、氢化可的松)的18天方案，并增加细胞与MS-5小鼠基质细胞系或间质干细胞(MSC)的共培养，Douay在CD34+脐带血干细胞中实现了90-100%的更高去核率(Douay 2005)。尽管使用生长因子来模拟成红血细胞在其中成熟的骨髓生态位的环境，但细胞接触对于信号去核也是必要的，如当脐带血和基质细胞从物理接触被分开但在相同培养基中生长时去核消除。尽管对于脐带血干细胞是成功的，但是这些方案未能制备ESC的去核。

[0094] 在某些实施方案，本发明方法使用OP9细胞在与临床治疗相关的完全体外系统中诱导人ESC的分化。在某些实施方案，第一步骤由以下组成：使ESC分化为成血成血管细胞、血管瘤集落形成细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞。在某些实施方案，第二步骤是在含有Epo、IL-3、SCF和Douay在脐带血去核中使用的各种补充剂(Douay 2005)的Stemline II培养基(Sigma)中扩增这些细胞。在某些实施方案，第三步骤将OP9细胞引入ESC衍生的成红血细胞，以及添加Epo。

[0095] 在某些实施方案，使ESC分化为成血成血管细胞、血管瘤集落形成细胞和非移植血管瘤细胞根据本文所述方法制备并扩增。

[0096] 在某些实施方案，胚细胞如Lu 2006所述被培养。在某些实施方案，来自第3.25天-第4.25天胚状体的第6-8天胚细胞被挑取或过滤并铺板于含有Epo、IL-3、SCF、氢化可的松、肌醇、叶酸、一硫代甘油、运铁蛋白、胰岛素、硝酸亚铁、硫酸亚铁和牛血清白蛋白的Stemline II培养基，持续12-30天。在某些实施方案，胚细胞然后与OP9小鼠基质细胞或人间质干细胞(MSC)在无氢化可的松的与上列相同的培养基中共培养。在某些实施方案，细胞在第12天至第29天开始共培养。在某些实施方案，细胞在去核发生之前被进一步培养12-18天。在某些实施方案，OP9细胞引发的去核可以在基质生长后短如3天发生。在某些实施方案，去核在含有氢化可的松、肌醇、叶酸、一硫代甘油、运铁蛋白、胰岛素、硝酸亚铁、硫酸亚铁和牛血清白蛋白的Stempro34培养基中被诱导。在某些实施方案，细胞每3-4天被喂食并每周在新基质层上培养。

[0097] 本发明包括本发明前述或下述方面和实施方案的任何的所有适合组合。

[0098] 巨核细胞和血小板

[0099] 本发明还提供了制备巨核细胞或血小板的方法,包括:提供多能干细胞;使所述多能干细胞分化为成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞;并通过在包含TPO的巨核细胞(MK)培养基中培养而使所述成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞分化为所述巨核细胞或所述血小板。

[0100] 本发明还提供了制备巨核细胞或血小板的方法,包括:提供成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞;并通过在包含TPO的巨核细胞(MK)培养基中培养而使所述成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞分化为所述巨核细胞或所述血小板。

[0101] 成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞可通过本文所述方法获得或制备。

[0102] 在某些实施方案,本发明使用的所述多能干细胞是胚胎干细胞或胚胎衍生细胞。在某些实施方案,所述多能干细胞是诱导的多能干细胞。在某些实施方案,所述多能干细胞是人细胞。在某些实施方案,所述多能干细胞在分化之前经过遗传操作。

[0103] 在某些实施方案,所述成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞在被分化为所述巨核细胞或所述血小板之前被扩增。在某些实施方案,所述成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞在含有Epo、IL-3和SCF的Stemline II培养基中扩增。

[0104] 在某些实施方案,使所述成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞分化为所述巨核细胞或所述血小板在成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或胚细胞培养约6至8天后进行。

[0105] 本发明还提供通过本文所述方法任何一个制备的巨核细胞或血小板。

[0106] 在随后实施例中更详细描述了制备巨核细胞或血小板的方法。

[0107] 血管瘤集落形成细胞

[0108] 本发明提供了由人类多能干细胞制备和扩增人类血管瘤集落形成细胞的方法,含有人类血管瘤集落形成细胞的制剂和组合物,制备由血管瘤集落形成细胞部分分化或完全分化而成的多种细胞类型的方法,将血管瘤集落形成细胞用于治疗的方法,以及将由血管瘤集落形成细胞部分分化或完全分化而成的多种细胞类型用于治疗的方法。

[0109] 本文中,发明人报道了一种更简单和更有效的用于稳定地制备成血管祖细胞的方法。除了省去一些不必要的昂贵的因子以外,证实了在分化的早期阶段,骨形态发生蛋白-4(BMP-4)和血管内皮生长因子(VEGF)对于诱导多能干细胞发育为成血成血管细胞而言是必需的和足够的。BMP-4和VEGF显著上调了T-brachyury、KDR、CD31和LM02基因的表达,同时显著下调Oct-4的表达。发现在生长和扩增过程中加入碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)能够进一步增强BC发育,能够稳定地在一个含hESC的六孔板中制备约 1×10^8 个BC。

[0110] 本发明还提供扩增从任何来源或通过本领域已知的任何其他方法获得的哺乳动物血管瘤集落形成细胞的方法,所述任何来源的哺乳动物血管瘤集落形成细胞包括ES细胞,胚泡或卵裂球,胎盘或脐带组织的脐带血,外周血,骨髓,或其他组织。人类血管瘤集落形成细胞还可以制备自人多能干细胞。人多能干细胞可以是基本上同质种群的细胞,异质种群细胞,或胚胎组织的全部或部分。作为可用于本发明方法的多能干细胞的例子的人类血管瘤集落形成细胞可以制备自人胚胎干细胞。这样的胚胎干细胞包括胚胎干细胞,来源于或利用如无论是否由受精、体细胞核移植(SCNT)、单性生殖、雄核发育、或其他有性或无

性方法制备的胚泡,平板培养的ICM,一个或多个卵裂球,或其他前移植阶段的胚胎或胚胎样结构部分。

[0111] 在某些实施方案中,成血成血管细胞还可分化成造血细胞,包括但不限于血小板和红细胞。这样的细胞可用于输血。能够制备大量用于输血的细胞将缓解全国血库和医院的血液长期存储不足。在某些实施方案中,本发明的方法使制备用于输血的通用细胞。具体可容易得到O型和Rh-型红细胞,并可以将它们作为输血的通用血液来源。

[0112] 本发明的方法使体外大量扩增成血成血管细胞,用于各种商业和临床应用。成血成血管细胞的体外扩增指成血成血管细胞的增殖。当本发明的方法能将人类成血成血管细胞细胞扩增到商业上有用的数量时,本发明还涉及大量的成血成血管细胞和包含大量人类成血成血管细胞(例如至少10,000、100,000或500,000个细胞)的细胞制剂。在某些实施方案中,所述细胞制剂包含至少 1×10^6 个细胞。在其他实施方案中,所述细胞制剂包含至少 2×10^6 个人类成血成血管细胞,在再一个实施方案中至少 3×10^6 个人类成血成血管细胞。仍在其他的实施方案中,所述细胞制剂包含至少 4×10^6 个人类成血成血管细胞。

[0113] 本发明涉及包含10,000到四百万或更多哺乳动物(例如人)成血成血管细胞的溶液,制剂,以及组合物。在所述溶液、制剂和组合物中的成血成血管细胞数目可以是10,000到四百万,或以上中的任意值。所述数目可以是,例如20,000、50,000、100,000、500,000、一百万等等。

[0114] 类似地,本发明涉及人类成血成血管细胞后代细胞(例如人造血细胞,包括人造血干细胞和内皮细胞)的制剂。本发明还涉及制备、贮存和分配成血成血管细胞和/或成血成血管细胞谱系细胞的方法。

[0115] 本发明还提供适于给人或动物患者输血的方法和溶液。在特定实施方案中,本发明提供制备红细胞和/或血小板,和/或其他用于输血的造血细胞类型的方法。在某些实施方案中,本发明适用于向血库和医院提供用于在外伤或在血液相关疾病和病症的治疗中输血的血液。在某些实施方案中,本发明提供通用供血细胞红细胞。在某些实施方案中,所述红细胞在输血之前有功能,且表达血红蛋白F。

[0116] 本发明还提供人类血管瘤集落形成细胞,含基本上纯化的人类血管瘤集落形成细胞群的细胞培养物,含人类血管瘤集落形成细胞的药物制剂和所述血管瘤集落形成细胞的冷藏制剂。在某些实施方案中,本发明提供所述人类血管瘤集落形成细胞在制备用于治疗有此需要的患者病况的药物中的用途。此外,本发明还提供所述细胞培养物在制备用于治疗有此需要的患者病况的药物中的用途。本发明还提供所述药物制剂在制备用于治疗有此需要的患者病况的药物中的用途。

[0117] 可以根据所述血管瘤集落形成细胞的结构特性对其进行识别和表征。在某些实施方案中,这些细胞具体是独特的,因为它们相互之间松散粘连(与其他的血管瘤集落形成细胞松散粘连)。因为这些细胞仅仅相互松散粘连,可以只利用机械解离技术(而无需酶解技术)即可将血管瘤集落形成细胞的培养物或集落解离成单细胞。这些细胞相互粘连足够松散,仅仅只需要机械解离(而非酶解或者机械和酶解结合)就足以将培养物或集落解聚,基本上不会损害细胞活力。换句话说,相比用酶解细胞团块后观察到的实质损伤和死亡,机械解离不需要可导致细胞实质损伤和死亡的力度。

[0118] 此外,可以通过一种或多种标记物的表达或不表达(在基因水平或蛋白水平上估

计)来识别或表征血管瘤集落形成细胞。例如在某些实施方案中,可以根据一种或多种下列细胞表面标记物的不表达(例如可以根据至少一种,至少两种,至少三种或四种下列标记物不表达来表征所述细胞)来识别或表征血管瘤集落形成细胞:CD34、KDR、CD133或CD31。此外,也可以根据GATA2和/或LM02的表达来识别或表征血管瘤集落形成细胞。此外,也可以通过标记物的表达或不表达来识别或表征血管瘤集落形成细胞。

[0119] 可以根据这些结构或功能特点中的一点或任意组合识别或表征本发明的血管瘤集落形成细胞。需知,虽然这些细胞可以有任意种来源,例如胚胎组织、产前组织、围产期组织,所述术语“血管瘤集落形成细胞”适用于至少能够分化形成造血细胞类型和/或内皮细胞类型,并且具有一种或多种前述结构或功能特点的无论任何的来源的细胞。

[0120] 在某些实施方案中,可以使用BC祖细胞的标记在初始培养后筛选BC。

[0121] 在某些实施方案中,从多能细胞制备血管瘤集落的过程中不形成胚状体。

[0122] 体外分化多能干细胞以获得胚状体和成血成血管细胞

[0123] 本发明提供制备和扩增衍生自人多能干细胞,或人胚泡或卵裂球的人类成血成血管细胞的方法。可纯化和/或分离如此制备的所述成血成血管细胞。

[0124] 人类血管瘤集落形成细胞还可以制备自人多能干细胞。人多能干细胞可以是基本上同质种群的细胞,异质种群细胞,或胚胎组织的全部或部分。作为可用于本发明方法的多能干细胞的例子的人类血管瘤集落形成细胞可以制备自人胚胎干细胞。这样的胚胎干细胞包括衍生自或利用无论是否由受精、体细胞核移植(SCNT)、单性生殖、雄核发育、或其他有性或无性方法制备的如胚泡,培养的ICM,一个或多个卵裂球,或其他前移植阶段的胚胎或胚胎样结构部分的胚胎干细胞。

[0125] 此外,血管瘤集落形成细胞还可以制备自其他多能干细胞。例如,血管瘤集落形成细胞可以制备自(无需经历胚胎干细胞衍化步骤)或利用无论是否由受精、体细胞核移植(SCNT)、单性生殖、雄核发育、或其他有性或无性方法制备的平板培养的胚胎,ICM,胚泡,滋养层/滋养外胚层细胞,一个或多个卵裂球,滋养层干细胞,胚胎生殖细胞,或移植前阶段的胚胎或胚胎样结构的其他部分。血管瘤集落形成细胞还可以类似利用部分分化自多能干细胞的细胞或细胞系制备。例如如果将人胚胎干细胞系用于制备比血管瘤集落形成细胞处于更早发育阶段的细胞,根据发展潜力和可塑性,则可将这样的多能干细胞用于制备血管瘤集落形成细胞。

[0126] 此外,血管瘤集落形成细胞也可制备自其他产前或出生前后来源,包括但不限于脐带、脐带血、羊水、羊膜干细胞和胎盘。

[0127] 注意,当血管瘤集落形成细胞制备自人胚胎组织时,可能需要形成胚状体的步骤。然而,假设胚状体的形成至少部分有助于重演发育早期胚层的三维空间相互作用,当多能干细胞已经具有实现与胚状体形成步骤实质上相同目的的结构或组织时,这一步骤不是必需的。举例来说,当血管瘤集落形成细胞制备自平板培养的胚泡时,所述胚泡的细胞中间已经存在三维空间组织水平。同样地,无需胚状体形成步骤来提供细胞间的信号,诱导的线索,或三维结构。

[0128] 可将本发明的方法和用途用于制备源于多能干细胞或胚胎衍生细胞的血管瘤集落形成细胞。在某些实施方案中,所述胚胎衍生细胞是胚胎干细胞。在某些其他实施方案中,所述胚胎衍生细胞是平板培养的胚胎,ICM,胚泡,滋养层/滋养外胚层细胞,一个或多个

卵裂球,滋养层干细胞,或早期移植前胚胎的其他部分。对于任何前述事项,所述胚胎衍生细胞可以来自自由受精,体细胞核移植(SCNT),单性生殖,雄核发育,或其他有性或无性方式制备的胚胎。

[0129] 在本申请通篇中,当描述具体涉及从胚胎干细胞制备血管瘤集落形成细胞的方法时,本发明类似地考虑到来自或使用其他多能干细胞或胚胎衍生细胞而制备血管瘤集落形成细胞,以及利用制备的细胞实施任何相同的治疗用途。

[0130] 在本发明的某些方面,所述人胚胎干细胞可以是本方法的起始材料。可以用本领域已知的任何方法培养所述胚胎干细胞,例如在有无饲养细胞的情况下。

[0131] 胚胎干细胞可以在含血清培养基中形成悬浮的胚状体(“EB”)(Wang et al., 2005 J Exp Med (201):1603-1614; Wang et al., 2004 Immunity (21):31-41; Chadwick et al., 2003 Blood (102):906-915)。然而血清的加入引入一些挑战,包括实验的可变性,成本,潜在感染物和有限的供应。进一步,对于临床和某些商业应用,血清的使用需要额外遵照美国政府和国际社会的关于生物制剂的规定。

[0132] 本发明提供不使用血清从多能干细胞制备和扩增人类成血成血管细胞的方法。相对于需要血清的条件,所述无血清条件更有助于在好的生产工艺(GMP)指导下进行规模化制备。此外,无血清条件延长加入到培养基的某些因子的半衰期(例如无血清培养基中蛋白质(包括生长因子、细胞因子和HOXB4)的半衰期增加)。在某些实施方案中,所述培养基中添加BMP4和VEGF。在某些实施方案中,在本发明的所有方法中使用无血清培养基制备和扩增人类成血成血管细胞。

[0133] 在所述制备和扩增人类成血成血管细胞的方法的第一步中,使人干细胞在无血清培养基中生长,并将其诱导分化成胚状体。为了诱导胚状体形成,可将胚胎干细胞沉淀并重悬浮在无血清培养基(例如,在干细胞系I或II培养基(SigmaTM),培养基中补充有一种或多种形态因子和细胞因子,然后平板接种于附着性差(例如附着性超差)的培养皿上。形态因子和细胞因子可以包括但不限于,骨形态生成蛋白(例如BMP2、BMP-4、BMP-7,但非BMP-3)和VEGF、SCF和FL。可将骨形态生成蛋白和VEGF单独使用,或与其他因子联合使用。可在细胞培养的0—48小时内将形态因子和细胞因子加入到培养基。于这些条件下在存在早期造血扩增细胞因子(包括但不限于促血小板生成素(TPO)、Flt-3配体和干细胞因子(SCF))的情况下进行温育,使所述平板培养的ES细胞形成EB。除TPO、Flt-3配体和SCF外,还可将VEGF、BMP-4和HoxB4加入到培养基。在一个实施方案中,使人ES细胞首先在BMP-4和VEGF₁₆₅(例如25—100ng/ml)存在的条件下生长,然后在BMP-4、VEGF₁₆₅、SCF、TPO和FLT3配体(例如10—50ng/ml)和HoxB4(例如1.5—5μg/ml的本文公开的三重蛋白质转导域-HoxB4融合蛋白)存在的条件下生长。可以在平板接种后48—72小时时加入所述额外因子。

[0134] 在本发明的方法中,人类成血成血管细胞分离自早期胚状体(“EB”)。从早期EB分离成血成血管细胞支持这些细胞的体外扩增。对于人细胞,可以从生长短于10天的EB中获得成血成血管细胞。在本发明的某些实施方案中,成血成血管细胞细胞出现在生长2—6天的人EB中。根据一个实施方案,可从生长4—6天的人EB中鉴定和分离成血成血管细胞。在其他的实施方案中,使人EB生长2—5天,然后分离成血成血管细胞。在某些实施方案中,使人EB生长3—4.5天,然后分离成血成血管细胞。

[0135] 在某些实施方案中,洗脱并解离早期EB(例如,使用胰蛋白酶/EDTA或胶原酶B)。将

选定数量的细胞(例如 $2-5 \times 10^5$ 个细胞)随后与优化成适于成血成血管细胞生长的无血清甲基纤维素培养基(例如BL-CFU培养基,如干细胞技术目录H4436,或成血成血管细胞细胞扩增培养基(HGM),或含1.0%甲基纤维素于MDM,1-2%牛血清白蛋白,0.1mM 2-巯基乙醇,10 μ g/ml rh-胰岛素,200 μ g/ml饱和铁人转铁蛋白,20ng/ml rh-GM-CSF,20ng/ml rh-IL-3,20ng/ml rh-IL-6,20ng/ml rh-G-CSF(“rh”代表“重组的人”)的任何培养基)混合。可向所述培养基补充早期细胞因子(包括但不限于,EPO、TPO、SCF、FL、FLt-3、VEGF、BMP(例如BMP2、BMP4和BMP7,但不是BMP3))和HOXB4(或另一个同源异型盒蛋白)。在某些实施方案中,将促红细胞生成素(EPO)加入到培养基。在再一个实施方案中,将EPO、SCF、VEGF、BMP-4和HoxB4加入到培养基。在另一个实施方案中,使所述细胞在EPO、TPO和FL存在的条件下生长。在某些H9是起始人ES细胞系的实施方案中,将EPO、TPO和FL加入到培养基。除EPO、TPO和FL外,源于H9或其他ES细胞的细胞培养基还可包含VEGF、BMP-4和HoxB4。

[0136] 将通过所述方法获得的细胞(细胞可能在BL-CFU培养基中)(包括成血成血管细胞)平板接种于附着性超差的培养皿上,并在CO₂恒温箱中温育直到长出成血成血管细胞集落。一些细胞可能形成次级EB。大约3-6天(且在一些情况下是3-4.5天)后观察到成血成血管细胞集落。可根据成血成血管细胞集落特殊的葡萄状形态和/或小尺寸将其与其他细胞如(如次级EB)区分开。另外,可通过某些标记物的表达(例如,早期造血细胞和内皮细胞标记物的表达),以及至少能分化成造血细胞和内皮细胞的能力(见下文,衍生为成血成血管细胞谱系细胞)鉴定成血成血管细胞。例如当成血成血管细胞缺乏成熟内皮细胞或造血细胞的某些特征时,可通过某些标记物的存在(例如CD71+)和其他标记物的不存在(例如CD34-)鉴定这些细胞。成血成血管细胞也可表达GATA-1和GATA-2蛋白,CXCR-4和TPO和EPO受体。另外,成血成血管细胞可通过其他标记物(例如CD31、CD34、KDR或其他粘附分子)不表达或低表达来表征。而且,成血成血管细胞的可通过某些基因(例如与成血成血管细胞和早期成红血细胞发育相关的基因(如SCL、LM02、FLT-1、胚胎胎儿球蛋白基因、NF-E2、GATA-1、EKLF、ICAM-4、血型糖蛋白(glycophoriuns)和EPO受体)的表达进行表征。

[0137] 因此,成血成血管细胞可按大小分离(小于其他细胞)或用抗CD71+抗体纯化,例如通过免疫亲合柱层析。

[0138] 成血成血管细胞细胞可以按大小和/或形态分离,过程如下。生长6到7天后,细胞混合物包含EB(圆形且呈多细胞团)盒成血成血管细胞(葡萄状,小于EB,且是单细胞)。因此,成血成血管细胞可根据它们的形态和大小进行分离。成血成血管细胞可以人工挑选,例如当在显微镜下观察细胞混合物的时候。所述细胞接着可以生长成集落,每个集落具有100-150个细胞。

[0139] 可挑选如上所述衍生的人类成血成血管细胞集落,并重平板接种于甲基纤维素CFU培养基上,以形成造血CFU。在某些实施方案中,CFU培养基包括StemCell Technologies H4436。在再一个实施方案中,将成血成血管细胞平板接种于补充有细胞因子及其他因子的干细胞系II培养基上。例如可以人工挑选单个BL-CFC集落,并将其转移到平板接种有纤维连接蛋白的含干细胞系II和重组人SCF(例如20ng/ml)、TPO(例如20ng/ml)、FL(例如20ng/ml)、IL-3(例如20ng/ml)、VEGF(例如20ng/ml)、G-CSF(例如20ng/ml)、BMP-4(例如15ng/ml)、IL-6(例如10ng/ml)、IGF-1(例如10ng/ml)、内皮细胞生长补充因子(ECGS,例如100 μ g/ml)、Epo(例如3U/ml)的培养皿上。体外生长一周后,可通过温和移液移走非粘连的造血细

胞，并直接用于造血CFU试验。移去非粘附细胞后，可使粘附的细胞群在EGM-2内皮细胞培养基(CambrexTM)中再生长一周，然后检验vWF的表达。

[0140] 成血成血管细胞的体外扩增

[0141] 本发明的某些方面涉及成血成血管细胞的体外扩增。在某些实施方案中，如上所述，通过本发明方法扩增的成血成血管细胞获自源于人胚胎干细胞的早期胚状体。

[0142] 除了来自人胚胎干细胞(hES细胞)的衍生成血成血管细胞以外，待扩增的成血成血管细胞液可以分离自其他哺乳动物来源，例如哺乳动物胚胎(Ogawa et al., 2001 Int Rev Immunol (20) :21-44，美国专利公开号2004/0052771)，胎盘和脐带组织的脐带血(Pelosi et al., 2002 Blood (100) :3203-3208; Cogle et al., 2004 Blood (103) :133-5)，外周血和骨髓(Pelosiet al., 2002 Hematopoiesis (100) :3203-3208)。在某些实施方案中，待扩增的非人类成血成血管细胞可制备自非人(例如小鼠和非人灵长类)胚胎干细胞。在某些实施方案中，可通过例如磁珠阳性筛选或纯化技术(例如MACS柱)等方法从脐带血(UCB)或骨髓获得成血成血管细胞。细胞可基于它们的CD71+进行筛选，及通过CD34-进行确认。而且还可以测试分离的成血成血管细胞制备造血细胞和内皮细胞谱系的潜力。在某些实施方案中，分离或纯化及任选富集自胚胎、脐带血、外周血、骨髓或其他组织的成血成血管细胞被的纯度超过95%。

[0143] 骨髓衍生细胞可获自供者个体的任何发育阶段，包括出生以前的(例如胚胎或胎儿)、婴儿(例如人类从出生到大约三岁)，儿童(例如人类从大约三岁到大约13岁)，青少年(例如人类从大约13岁到大约18岁)，青年(例如人类从大约18岁到大约35岁)，成人(人类从大约35岁到大约55岁)或老年(例如人类从大约55岁及以上)。

[0144] 例如，人骨髓可刮自手术中的患者的分裂的胸骨。然后将骨髓保存在0.1到1mm³体积的组织块中，并随即使其在小鼠胚胎饲养细胞层(例如经丝裂霉素C处理或照射过的饲养细胞层)上生长。骨髓细胞将附着在培养皿上，经过1—2周的培养，可根据形态特征和/或细胞标记物鉴定及分离成血成血管细胞(参见美国专利公开号2004/0052771)。接着可以按照本文公开的方法，在无血清培养基中培养和扩增细胞。

[0145] 另外，可以分级分离骨髓细胞和来自血液或其他组织的细胞，以获得成血成血管细胞。本领域已知分级分离的方法，通常涉及阳性选择(即根据特性保留细胞)和阴性选择(即根据特性除去细胞)。分级分离和富集骨髓衍生细胞的方法最佳表征了人和小鼠细胞。

[0146] 本领域已知多种方法用于分级分离和富集骨髓衍生细胞或其他细胞。可以使用阳性选择法，如富集表达CD71的细胞。阴性选择法除去或减少表达CD3、CD10、CD11b、CD14、CD16、CD15、CD16、CD19、CD20、CD32、CD45、CD45R/B220或Ly6G的细胞，阴性选择法可单独使用，也可同阳性选择技术联合使用。就骨髓细胞而言，如果供者骨髓衍生细胞不是自体同源的，可以对细胞制剂进行阴性选择以减少或除去分化的T细胞。

[0147] 通常，用于衍生骨髓、血液或其他细胞的筛选/富集方法将用到免疫亲合技术，尽管也会用到密度离心方法。如本领域众所周知，免疫亲合技术可以有多种形式，但通常利用一种抗体或抗体衍生物，结合一些分离技术。分离技术通常导致结合有抗体的细胞和未结合有抗体的细胞之间的物理分离，尽管在有些情况下分离技术会杀死结合有抗体的细胞，可用于阴性选择。

[0148] 可使用任何适当的免疫亲合技术从衍生骨髓、血液或其他细胞中筛选/富集成血

成血管细胞,所述技术包括荧光激活细胞分选术(FACS)、淘洗(panning)、免疫磁性测定分离、免疫亲合层析、抗体介导的补体结合、免疫毒素、密度梯度分离,等等。免疫亲合步骤之后,收集需要的细胞(阳性选择下结合免疫亲合剂的细胞,阴性选择下没有结合免疫亲合剂的细胞),并可使其经过下一论免疫亲合筛选/富集。

[0149] 一般通过温育包含骨髓衍生细胞和抗体或衍生自抗体的亲合剂(例如特定表面标记的特异性抗体)的细胞制剂进行免疫亲合筛选/富集,然后利用所述结合亲合剂筛选结合有或未结合抗体的细胞。筛选步骤通常涉及物理分离,如可根据结合亲合剂(FACS)的有无,利用结合(直接或间接)到固相底物(淘洗、免疫亲合层析)的抗体,或利用磁场收集经由亲合剂结合到磁颗粒上的细胞(免疫磁性分离),而将含单个细胞的小滴导入不同的容器。此外,也可利用将细胞毒素损伤导向结合有亲合剂的细胞的亲合剂从骨髓衍生细胞制剂中除去不需要的细胞。细胞毒素损伤可由亲合剂激活(例如补体结合),或由亲合剂定位于靶细胞(例如,免疫毒素如蓖麻毒B链)。

[0150] 虽然上述方法涉及从骨髓衍生细胞制剂或血细胞制剂中富集细胞,本领域技术人员将认识到相似的阳性和阴性选择技术可以用于来自其他组织的细胞制剂。

[0151] 本发明的某些方面涉及成血成血管细胞的体外扩增。在某些实施方案中,如上所述,用本发明方法扩增的成血成血管细胞获自源于人胚胎干细胞的早期胚状体。在其他实施方案中,所述成血成血管细胞分离或富集自人组织(例如胎盘或脐带血、外周血、骨髓等等)。

[0152] 在某些实施方案中,在同源结构域蛋白(本文也称为同源异型盒蛋白)存在的情况下扩增所述成血成血管细胞。在再一个实施方案中,在HOXB4的存在下扩增所述成血成血管细胞。在某些实施方案中,在扩增成血成血管细胞的整个方法中向所述成血成血管细胞中加入HOXB4。

[0153] HOXB4是同源结构域转录因子(也称为HOX2F、HOX2、HOX-2.6,在大鼠中是HOXA5),它在体内表达于骨髓的干细胞部分,然后在分化期间被负调控。HOXB4基因的表达与初始干细胞表型的维持相关联(Sauvageau et al., 1995Genes Dev 9:1753-1765; Buske et al., 2002Blood 100:862-868; Thorsteinsdottir et al., 1999Blood 94:2605-2612; Antonchuk et al., 2001Exp Hematol 29:1125-1134)。

[0154] 本发明的制备和扩增成血成血管细胞的方法中用到的HOXB4包括但不限于,全长HOXB4(例如HOXB4多肽,具体为公共登录号GI:13273315(图17),GI:29351568(图18),以及其任何功能变体和活性片段。野生型HOXB4蛋白可由氨基酸序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或这种蛋白的任何其它可选等位基因形式编码。所述序列可得自公用数据库,例如Genbank。HOXB4也可以在细胞内异位表达,或在培养基中提供。可将异位表达的HOXB4可操作连接到可诱导启动子。在培养基中提供的HOXB4可由另一种细胞类型(例如饲养细胞层)分泌,或直接加入到培养基。

[0155] 本发明还涉及包含HOXB4的融合蛋白(包括含全长HOXB4或HOXB4功能变体或活性片段的融合蛋白)。除HOXB4外,所述融合蛋白也可包含任何附加蛋白、蛋白结构域或肽。在某些实施方案中,可将HOXB4连接到蛋白转导域(PTD),以使所述蛋白从培养基转位到细胞中,并随后进入到核区域。融合蛋白可以包含或不包含一种或多种位于蛋白结构域之间的接头序列。

[0156] HOXB4的功能变体包括HOXB4突变体和等位基因变体，及其活性片段。HOXB4的功能变体包括任何能按照本发明的方法扩增成血成血管细胞的HOXB4多肽及其活性片段。HOXB4功能变体也包括转录活性强于天然HOXB4蛋白的HOXB4多肽。HOXB4变体包括具有涉及野生型HOXB4的一个或多个氨基酸取代、添加、和/或缺失的蛋白。HOXB4变体也包括但不限于与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3序列至少75%类似的多肽。相应的，HOXB4变体包括与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3氨基酸序列80%、85%、90%、95%、和99%类似的多肽。

[0157] HOXB4变体也包括由与编码其互补体(例如，野生型HOXB4蛋白可由核酸序列SEQ ID NO:2(GI:85376187;图15)或SEQ ID NO:4(GI:29351567;图16)编码)的核酸序列至少80%一致的核酸序列编码的多肽。因此，HOXB4变体包括由与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4或其互补体的序列具有85%、90%、95%和99%的一致性的核酸序列编码的HOXB4多肽。

[0158] 编码HOXB4的核酸序列也包括，但是不限于，任何能在严格条件下与核酸序列SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4，或它们的互补体，或它们的片段杂交的核酸序列。同样地，与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4由于遗传密码的简并性而不同的核酸序列也在本发明的范畴内。HOXB4变体多肽也包括剪接变体或其他天然发生的HOXB4蛋白或核酸序列。

[0159] HOXB4的活性片段包括但不限于能按照本发明的方法维持成血成血管细胞的全长HOXB4多肽的任何片段。因此，在一个实施方案中，本发明的HOXB4蛋白是缺少部分N-末端(如全长HOXB4的N-末端31、32或33个氨基酸)的HOXB4蛋白。

[0160] 任何HOXB4蛋白可以融合其他蛋白或蛋白结构域。例如可将HOXB4与蛋白转导域(PTD)连接。

[0161] 蛋白转导域与HOXB4共价或非共价相连，使HOXB4横跨细胞膜，最终到达细胞的核区域。

[0162] 同HOXB4蛋白融合的PTD包括HIV反式活化蛋白(TAT)(Tat47—57)(Schwarze和Dowdy,2000Trends Pharmacol.Sci.21:45-48;Krosl et al.,2003Nature Medicine (9):1428-1432)的PTD。对于HIV TAT蛋白而言，具有转膜功能的氨基酸序列相应在残基47—57(YGRKKRRQRRR,SEQ ID NO:5)(Ho et al.,2001,Cancer Research61:473-477;Vives et al.,1997,J.Biol.Chem.272:16010-16017)。单独的这个序列能赋予蛋白转位活性。TAT PTD也可以是九个氨基酸肽序列RKRRQRRR(SEQ ID NO:6)(Park et al.,Mol Cells 2002 (30):202-8)。TAT PTD序列可以是任何公开在Ho et al.,2001,Cancer Research 61:473-477(通过引用并入本文)的包括YARKARRQARR(SEQ ID NO:7)、YARAARQARA(SEQ ID NO:8)、YARAARRAARR(SEQ ID NO:9)和RARAARRAARA(SEQ ID NO:10)的肽序列。

[0163] 包含能与本发明的HOXB4蛋白融合的PTD的其他蛋白包括单纯疱疹病毒1(HSV-1)DNA结合蛋白VP22和果蝇控制触角基因(Antp)同源异型转录因子(Schwarze et al.,2000Trends Cell Biol.(10):290-295)。对于Antp而言，43—58位氨基酸(RQIKIWFQNRRMKWKK,SEQ ID NO:11)表示蛋白转导域，而对于HSV VP22而言，PTD表示为残基DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASPRRRPVE(SEQ ID NO:12)。此外，也可将HeptaARG(RRRRRRR,SEQ ID NO:13)或赋予转导活性的人工肽用于本发明的PTD。

[0164] 在另一个实施方案中，PTD可以是二聚或多聚的PTD肽。在某些实施方案中，所述PTD是一个或多个TAT PTD肽YARAARQARA(SEQ ID NO:14)。在某些实施方案中，所述PTD是由三个TAT PTD肽YARAARQARA(SEQ ID NO:15)构成的多聚物。与多聚PTD融合或连接的

HOXB4蛋白(例如三重合成蛋白转导域(tPTD))可以在细胞中表现出不稳定性降低和稳定性升高。这样的HOXB4构建体也能在存在hES细胞的无血清培养基中稳定。

[0165] 制备编码融合蛋白的融合基因的技术在本领域众所周知。基本上，编码不同多肽序列的多种DNA片段的连接按照常规方法进行。在另一个实施方案中，融合基因可通过常规方法合成，包括自动DNA合成仪。此外，也可使用能在连续的基因片段之间形成互补突起的锚定引物进行基因片段的PCR扩增，然后退火产生嵌合基因序列(参见例如Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley&Sons: 1992)。

[0166] 在某些实施方案中，融合基因编码纯化的前导顺序，如多(His)序列，融合基因可以连接到HOXB4多肽或HOXB4融合蛋白需要部分的N-末端，使融合蛋白可使用Ni²⁺金属树脂通过亲和层析而纯化。接着通过肠激酶处理，除去纯化的前导顺序，从而提供纯化的HOXB4多肽(例如参见Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411:177; 和Janknecht et al., PNAS USA 88:8972)。

[0167] 在某些实施方案中，HOXB4蛋白或其功能变体或活性结构域连接到第二个蛋白或蛋白结构域的C-末端或N-末端(例如PTD)，有或没有插入的接头序列。接头的确切长度和序列，以及相对于连接的序列的方向可以变化。接头可以包含，例如2、10、20、30个或以上的氨基酸，可以基于需要的特性(如溶解度、长度、空间距离等)进行筛选。在特定实施方案中，所述接头可以包含用于所述融合蛋白的纯化、检测或修饰的功能序列。在某些实施方案中，所述接头包括含有两个或更多甘氨酸的多肽。

[0168] 可通过修饰蛋白结构域和/或融合这些结构域的接头来改变HOXB4的功效、稳定性和/或功能特征。

[0169] 在某些实施方案中，HOXB4在成血成血管细胞内异位表达，或在培养基中提供。将异位表达的HOXB4可操作连接到调控序列。调控序列是本领域公知的，它们被选来指导HOXB4多肽的表达。

[0170] 在培养基中提供的HOXB4可以由另一种细胞类型分泌。另一种细胞类型可以是饲养细胞层，如转导以表达可分泌的HOXB4的小鼠间质细胞层。例如HOXB4可以进行融合或构建成包含信号肽，或能促进所述蛋白的排出和分泌疏水序列。此外，也可直接将HOXB4(如共价或非共价连接到PTD的融合蛋白)加入到培养基。另外，HOXB4可附在病毒载体上，例如逆转录病毒载体或腺病毒载体。可用所述载体转导培养中的成血成血管细胞或其他细胞。

[0171] 根据使用的HOXB4，在特定实施方案中，在成血成血管细胞扩增期间，将HOXB4在选定时间加入到培养基。因为在无血清培养基中扩增所述成血成血管细胞，HOXB4相对稳定。因此，在某些实施方案中，将HOXB4蛋白或融合蛋白每日加入到人类成血成血管细胞中。在其他实施方案中，隔日加入HOXB4蛋白或融合蛋白，而在其他实施方案中，每2日加入HOXB4蛋白或融合蛋白。在一个实施方案中，每2日将HOXB4融合蛋白、HOXB4-PTD加入到培养基。

[0172] 在某些实施方案中，可以在存在足以扩增成血成血管细胞的量的任何其他生长因子或蛋白存在的条件下扩增所述细胞。

[0173] 任何来源的成血成血管细胞，包括人或非人ES细胞、骨髓、胎盘或脐带血、外周血或其他组织，可按上述方法进行扩增。因此，在某些实施方案中，将筛选的一定量的纯化成血成血管细胞或富集细胞与无血清甲基纤维素培养基混合，培养基进行优化以适合成血成血管细胞生长(例如BL-CFU培养基)。培养基可以补充有早期细胞因子(包括但不限于EP0、

TPO、FL、VGF、BMP (如BMP2、BMP4和BMP7,但不是BMP3) 和HOXB4。在某些实施方案中,将促红细胞生成素(EPO)加入到培养基。在某些实施方案中,将EPO、TPO和FL加入到培养基。随后将这些细胞平板接种于附着性超差的培养皿上,并使在CO₂恒温箱中生长。如上所述,成血成血管细胞集落显示特殊的葡萄状形态,并较其他细胞小,因此可以同其他细胞类型区别开。也可检测成血成血管细胞的标记物,以及其进一步分化成造血细胞或者内皮细胞谱系的能力。接着分离成血成血管细胞,并进行体外扩增。用于扩增的培养基包括无血清甲基纤维素培养基,所述培养基经优化以适合成血成血管细胞生长(例如BL-CFU),它还补充有早期细胞因子和HOXB4。早期细胞因子包括但不限于EPO、TPO、FL、VEGF、BMP (如BMP2、BMP4和BMP7,但不是BMP3)。在某些实施方案中,将促红细胞生成素(EPO)加入到培养基。在再一个实施方案中,将EPO、TPO和FL加入到培养基。

[0174] 因此,扩增成血成血管细胞的培养基可以包含VEGF、SCF、EPO、BMP-4和HoxB4;在某些实施方案中,培养基还可以包含TPO和FL。例如收集从培养约3.5天的EB培养物中制备的单个细胞,并用0.05%胰蛋白酶-0.53mM EDTA (Invitrogen) 解离2—5分钟,使通过22G针3—5次而制备单细胞悬液。通过在1,000rpm,5分钟,离心收集细胞。将细胞沉淀重悬于50—200μl的干细胞系I培养基中。为了扩增成血成血管细胞,将衍生自 2×10^5 — 5×10^5 个hES细胞分化的单细胞悬液与2ml成血成血管细胞扩增培养基(HGM)混合,所述培养基包含1.0%甲基纤维素于Isocve MDM,1—2%牛血清白蛋白,0.1mM 2-巯基乙醇,10μg/ml rh-胰岛素,200μg/ml饱和铁人转铁蛋白,20ng/ml rh-GM-CSF,20ng/ml rh-IL-3,20ng/ml rh-IL-6,20ng/ml rh-G-CSF,3到6个单位/ml rh-Epo,50ng/ml rh-SCF,50ng/ml rh-VEGF和50ng/ml rh-BMP-4,和1.5μg/ml tPTD-HoxB4,含或不含50ng/ml Tpo和FL。将所述细胞混合物平板接种于附着性超差的培养皿上,并于37°C,5%CO₂中培养4—6天。

[0175] 在某些情况,需要从患者或患者亲属处获得成血成血管细胞,并体外扩增所述成血成血管细胞。这样的情况包括,例如一个患者计划开始化学疗法或放射疗法,或者其他可以使用自体同源HSC移植(利用患者自身的干细胞)的情况。因此,本发明提供治疗需要细胞治疗的患者的方法(例如患者需要造血细胞再生或治疗,或者血管生长或治疗血管伤害,包括缺血,见下文),所述方法使用本发明的扩增的成血成血管细胞或成血成血管细胞谱系细胞,其中所述成血成血管细胞获自患者或其亲属的骨髓、血液或其他组织。因此,在某些实施方案中,治疗需要成血成血管细胞(或成血成血管细胞谱系细胞)的方法可以包括从患者或其亲属分离成血成血管细胞的步骤。可以根据本发明的方法体外扩增分离自患者或患者亲属的成血成血管细胞,并随后给予患者。此外,也可在治疗患者之前进一步培养扩增的成血成血管细胞以制备造血细胞或内皮细胞。

[0176] 也可以通过本领域已知的任何方法(例如体细胞核移植)从患者处获得人ES细胞。然后可以使用本发明的方法,从患者自身的ES细胞中制备和扩增他的成血成血管细胞。可将这些成血成血管细胞或谱系衍生物给予患者或其亲属。

[0177] 使用本发明的方法扩增的人类成血成血管细胞能到达商业批量,然后在多种治疗和临幊上应用。此外,还可进一步分化通过本文公开的方法获得的成血成血管细胞以制备供临幊应用的造血细胞或内皮细胞谱系。

[0178] 通过本发明的制备和扩增人类成血成血管细胞的方法从人ES细胞获得的成血成血管细胞至少有潜能分化成内皮细胞或造血细胞(即它们至少是双重潜能的)。其他的成血

成血管细胞也可能是双重潜能的。然而其他的成血成血管细胞也许能分化成除造血细胞和内皮细胞以外的其他细胞(即它们是多重潜能或多能的)。

[0179] 在人胚胎干细胞中加工MHC基因以获得复合性降低的成血成血管细胞

[0180] 用作本发明的制备和扩增人类成血成血管细胞的方法的起始的人胚胎干细胞也可以源于人胚胎干细胞文库,每个都是人群中至少一种MHC等位基因的半合子或纯合子。在某些实施方案中,所述干细胞文库的每个成员是与文库中其余成员相比具有不同的MHC等位基因的半合子或纯合子。在某些实施方案中,干细胞文库是人群中所有MHC等位基因的半合子或纯合子。本发明中,一种或多种组织相容性抗原基因纯合的干细胞包括一种或多种(在一些实施方案中是全部)所述基因缺合的(nullizygous)的细胞。基因位点缺合指基因在该位点无效,即所述基因的两个等位基因缺失或失活。可通过本领域已知的方法(例如基因靶向和/或杂合性丢失(LOH))制备所有MHC基因缺合的干细胞。参见例如美国专利出版物US 20040091936、US 20030217374和US 20030232430,以及美国临时申请号60/729,173,将它们全部的公开内容均通过引用并入本文。

[0181] 因此,本发明涉及获得成血成血管细胞的方法,包括MHC复合性降低的成血成血管细胞文库。MHC复合性降低的成血成血管细胞和成血成血管细胞谱系细胞会增加用于治疗的细胞的供应量,因为它将会消除涉及患者匹配的困难。这样的细胞可来源于经加工为MHC复合物基因是半合子或纯合子的干细胞。

[0182] 人ES细胞可以包括对细胞MHC复合物的姐妹染色体的一个等位基因进行修饰。可使用各种制备基因修饰的方法修饰MHC复合物中的基因,例如基因定靶。进一步地,可将经修饰的细胞MHC复合物等位基因进一步加工成纯合子,使得姐妹染色体存在相同的等位基因。可使用例如杂合性丢失(LOH)的方法加工细胞,使所述细胞的MHC复合物中具有纯合的等位基因。例如,可定靶来自亲本等位基因的一组MHC基因中的一种或多种基因,以制备半合子的细胞。可通过基因定靶或LOH除去另一组MHC基因,以制造空线(null line)。还可将这个空线用作胚细胞线,以除去一系列HLA基因或个体基因,从而制造具有另一种统一遗传背景的半合子或纯合子文库。

[0183] 一方面,ES细胞系文库的每个成员是至少一个HLA基因的纯合子,按照本发明的方法,将所述文库用于衍生成血成血管细胞。另一个方面,本发明提供成血成血管细胞文库(和/或成血成血管细胞谱系细胞),其中筛选ES细胞的几个谱系,并分化为成血成血管细胞。可将这些成血成血管细胞和/或成血成血管细胞谱系细胞用于需要细胞治疗的患者。

[0184] 因此,本发明的某些实施方案有关向有需要的患者施用来源于复合性降低的胚胎干细胞的人类成血成血管细胞、造血干细胞或人类内皮细胞的方法。在某些实施方案中,所述方法包括步骤:(a)鉴定需要涉及向患者施用人类成血成血管细胞、造血干细胞或人类内皮细胞的治疗的患者;(b)鉴定在所述患者细胞表面表达的MHC蛋白;(c)提供根据本发明的体外产生和扩增人类成血成血管细胞方法制得的MHC复合性降低的人类成血成血管细胞细胞文库;(d)从文库中筛选匹配患者细胞上的MHC蛋白的人类成血成血管细胞;(e)将步骤(d)中鉴定的人类成血成血管细胞任选分化成人造血干细胞、内皮细胞或两者,或根据需要将这两个谱系中的任一个或两者进一步分化的细胞;(f)将步骤(d)和/或(e)中得到的任何细胞给予所述患者。本方法可以在区域中心实施,例如医院、诊所、医师室,以及其他卫生机构。进一步地,经筛选匹配所述患者的成血成血管细胞如果以少量细胞数量保存,可以在治

疗患者之前扩增。

[0185] 人类血管瘤集落形成细胞/成血成血管细胞

[0186] 在某些方面,本发明提供人类血管瘤集落形成细胞。这种细胞是独特的原始细胞类型,具有多种治疗及其他用途。并且,这种细胞类型至少为研究造血和/或内皮谱系的发育提供了重要工具。同样的,本发明关注含有血管瘤集落形成细胞的不同制剂(包括药物制剂)和组合物,以及含一种或多种从血管瘤集落形成细胞部分或最终分化而来细胞类型的制剂(包括药物制剂)和组合物。

[0187] 本发明的人类血管瘤集落形成细胞具有至少一种如下结构特征:(a)可至少分化成造血细胞类型或内皮细胞类型;(b)可分化成至少造血细胞类型和内皮细胞类型;(c)(与其它血管瘤集落形成细胞)松散的相互粘连;(d)不表达CD34蛋白;(e)不表达CD31蛋白;(f)不表达KDR蛋白;(g)不表达CD133蛋白;(h)表达GATA2蛋白;(i)表达LM02蛋白。在某些实施方案中,人类血管瘤集落形成细胞有至少二种、三种、四种、五种、六种、七种、八种或至少九种本文详述的结构或功能特征。

[0188] 本发明提供人类血管瘤集落形成细胞。所述细胞可分化而产生至少造血细胞和/或内皮细胞类型。在某些实施方案中,所述细胞的特征是松散粘连于其它人类血管瘤集落形成细胞。此外,这些细胞也可根据特定标记物的表达或缺乏表达来描述。例如,这些细胞也可根据缺乏表达至少一种下列蛋白来描述:CD34、KDR、CD133和CD31。

[0189] 如上所述,人类血管瘤集落形成细胞的一种受关注的属性是它们松散的相互粘连。由于这些细胞只是松散的相互粘连,血管瘤集落形成细胞的培养物或集落可以仅用机械解离使之解离成单细胞,而不必使用酶解技术。这些细胞相互间足够松散以至仅用机械解离而不用酶解或两者的组合就足以在不实质上削弱细胞生存能力的情况下使培养物或集落解聚。换而言之,机械解离不需要可导致细胞实质性损伤或死亡的力度。

[0190] 这种性质不只用于描述细胞,从表型上区分它们和其它细胞类型,它也具有重大的治疗意义。例如,可将相对大量(大于 1×10^6 或甚至大于 1×10^7 或甚至大于 1×10^8)的血管瘤集落形成细胞注射入人体或其它动物体内,能够显著减小引起血块、血栓或肺部梗阻的危险。这是细胞疗法的重大进步。安全递送相对大量的细胞的能力使细胞疗法更具实用性,并能够有效治疗越来越多的疾病和病症。

[0191] 术语“松散粘连”已在上文作了定性描述,是指人类血管瘤集落形成细胞相互之间的行为。可以仅用机械解离技术而不必用酶解技术将人类血管瘤集落形成细胞的培养物或集落解离为单细胞。这些细胞足够松散的相互粘连,以至只用机械解离,而不用酶解或两者的组合,就足以在不实质性削弱细胞生存能力的情况下使培养物或集落解聚。换而言之,机械解离不需要可导致细胞实质性损伤或死亡的力度。

[0192] 所述术语也可以更量化的描述。例如在某些实施方案中,术语“松散粘连”用于指培养物中至少50%的细胞只用机械解离技术而不必用酶解技术即可解离为单细胞的人类血管瘤集落形成细胞的培养物或集落。在另外的实施方案中,所述术语指培养物中至少60%,65%,70%或75%的细胞只用机械解离技术而不必用酶解技术即可解离为单细胞的培养物。在再一个实施方案中,所述术语指培养物中至少80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%,或甚至100%的细胞只用机械解离技术而不必用酶解技术即可解离为单细胞的培养物。

[0193] 可依据机械解离后的细胞的健康和生存能力进一步定量只用机械解离技术而不必用酶解技术解离血管瘤集落形成细胞的能力。换而言之，如果不使用酶解技术的解离需要大至可破坏或杀死非常大量的细胞的机械力，则如本文定义，细胞未松散粘连。例如在某些实施方案中，术语“松散粘连”指与使用酶解技术解离细胞时观察到的结果相比，只用机械解离技术而不必用酶解技术就可在不实质性削弱所述细胞的健康或生存能力的情况下将其解离成单细胞的细胞培养物。例如，与使用酶解技术解离细胞时观察到的结果相比，所述细胞的健康或生存能力下降少于15%，10%，9%，8%，7%，6%，5%，4%，3%，2%，或甚至少于1%。

[0194] 示例性的酶解技术包括但不限于用胰蛋白酶、胶原酶或其它破坏细胞间或细胞与基质间相互作用的酶进行处理。机械解离技术的例子包括但不限于，用移液管抽吸转移一次或数次。

[0195] 通过结构和功能定义本发明的人类血管瘤集落形成细胞。所述细胞能产自多种来源中的任一种，包括来自胚胎组织，产前组织，围产期组织，和甚至来自成人组织。作为实例，人类血管瘤集落形成细胞可以产生自人胚胎干细胞，其它胚胎衍生细胞(胚泡、卵裂球、内细胞团、胚胎、滋养细胞层/滋养外胚层细胞、滋养层干细胞、原始生殖细胞、胚胎生殖细胞等)，羊水、羊膜干细胞、胎盘、胎盘干细胞和脐带血。

[0196] 本发明提供人类血管瘤集落形成细胞，包含人类血管瘤集落形成细胞的组合物和包含人类血管瘤集落形成细胞的制剂(包括药物制剂)。以下详细描述本发明的这些方面的某些特征。本发明涉及本发明任意下述方面和实施方案的组合。

[0197] 本发明一方面提供人类血管瘤集落形成细胞。所述细胞可分化产生至少造血和/或内皮细胞类型。在某些实施方案中，所述细胞与其它人类血管瘤集落形成细胞松散粘连。在某些实施方案中，所述细胞不表达CD34蛋白。在某些其它实施方案中，所述细胞不表达一种或多种(例如，细胞不表达至少一种，至少两种，至少三种，至少四种下列蛋白)下列蛋白：CD34、CD31、CD133、KDR。在某些其它实施方案中，所述细胞表达GATA2和/或LM02蛋白。

[0198] 本发明另一方面提供人类血管瘤集落形成细胞。所述细胞可分化产生至少造血细胞和/或内皮细胞类型，且所述细胞不表达任何下列蛋白：CD34、CD31、KDR和CD133。在某些实施方案中，所述细胞松散粘连于其它人类血管瘤集落形成细胞。在其它实施方案中，所述细胞表达GATA2和/或LM02蛋白。

[0199] 本发明另一方面提供包含基本纯化的人类血管瘤集落形成细胞群的细胞培养物。所述细胞可分化产生至少造血细胞和内皮细胞类型，且所述细胞相互松散粘连。在某些实施方案中，所述细胞不表达CD34蛋白。在某些其它实施方案中，所述细胞不表达一种或多种(例如，所述细胞不表达至少一种、至少两种、至少三种或至少四种下列蛋白)下列蛋白：CD34、CD31、CD133、KDR。在某些其它实施方案中，所述细胞表达GATA2和/或LM02蛋白。

[0200] 本发明另一方面提供包含由胚胎组织分化而来的人类血管瘤集落形成细胞的细胞培养物。在某些实施方案中，所述血管瘤集落形成细胞相互松散粘连。在某些实施方案中，所述细胞可分化产生至少造血细胞和/或内皮细胞类型，且所述细胞相互松散粘连。在某些实施方案中，所述细胞不表达CD34蛋白。在某些其它实施方案中，所述细胞不表达一种或多种(例如，所述细胞不表达至少一种、至少两种、至少三种或至少四种下列蛋白)下列蛋白：CD34、CD31、CD133、KDR。在其它某些实施方案中，所述细胞表达GATA2和/或LM02蛋白。

[0201] 本发明另一方面提供包含人类血管瘤集落形成细胞的细胞培养物，其细胞可分化产生至少造血细胞和/或内皮细胞类型。在某些实施方案中，所述细胞相互松散粘连。在某些实施方案中，所述细胞不表达CD34蛋白。在某些其它实施方案中，所述细胞不表达一种或多种(例如，所述细胞不表达至少一种、至少两种、至少三种或至少四种下列蛋白)下列蛋白：CD34、CD31、CD133、KDR。在某些其它实施方案中，所述细胞表达GATA2和/或LM02蛋白。

[0202] 本发明另一方面提供包含人类血管瘤集落形成细胞的药物制剂，其细胞可分化产生至少造血细胞和/或内皮细胞类型。在某些实施方案中，所述血管瘤集落形成细胞相互松散粘连。在某些实施方案中，所述细胞不表达CD34蛋白。在其它某些实施方案中，所述细胞不表达一种或多种(例如，细胞不表达至少一种、至少两种、至少三种或至少四种下列蛋白)下列蛋白：CD34、CD31、CD133、KDR。在某些其它实施方案中，所述细胞表达GATA2和/或LM02蛋白。可用任何药学可接受的载体或赋形剂制备所述药物制剂。

[0203] 本发明另一方面提供包含人类血管瘤集落形成细胞的药物制剂，其中所述血管瘤集落形成细胞不表达任何下列蛋白：CD34、CD31、KDR和CD133。在某些实施方案中，所述血管瘤集落形成细胞可分化产生至少造血细胞和/或内皮细胞类型。在某些实施方案中，所述血管瘤集落形成细胞相互松散粘连。在某些其它实施方案中，所述细胞表达GATA2和/或LM02蛋白。可用任何药学可接受的载体或赋形剂制备所述药物制剂。

[0204] 在上述任意的某些实施方案中，所述组合物或药物制剂包含至少 1×10^5 个人类血管瘤集落形成细胞。在上述任意的某些其他实施方案中，所述组合物或药物制剂包含至少 1×10^6 至少 5×10^6 、至少 1×10^7 、或大于 1×10^7 个人类血管瘤集落形成细胞。

[0205] 另外的细胞、组合物核制剂包含由人类血管瘤集落形成细胞部分或最终分化而来的细胞。例如，本发明涉及包含一种或多种分化自血管瘤集落形成细胞的造血细胞和/或内皮细胞类型的组合物和制剂。造血细胞类型的例子包括造血干细胞、血小板、红细胞、淋巴细胞、巨核细胞等等。更进一步的例子，本发明涉及包含一种或多种其它细胞类型的组合物或制剂，例如一种或多种由血管瘤形成细胞部分或最终分化而来的中胚层细胞类型。

[0206] 在上述任意的某些实施方案中，本发明提供人类血管瘤集落形成细胞或由其部分或最终分化而来的细胞的冷藏制剂。

[0207] 在上述任意的某些实施方案中，本发明提供人类血管瘤集落形成细胞或人类血管瘤集落形成细胞的组合物或制剂的治疗性用途。这样的细胞和制剂可用于治疗说明书通篇详细描述的任何病况或疾病，也可以用于血库工业。并且，分化自人类血管瘤集落形成细胞的细胞，或人类血管瘤集成细胞的组合物或制剂可被用于治疗说明书通篇详述的任何病况或疾病，也可用于血库工业。

[0208] 可治疗性使用本发明的人类血管瘤集落形成细胞。此外，也可将人类血管瘤集落形成细胞用于研究内皮细胞或造血细胞谱系的发育，或用于鉴定可被用于如下用途的因子的筛选试验，例如，(i)维持人类血管瘤集落形成细胞，或(ii)促进人类血管瘤集落形成细胞分化为一种或多种部分或最终分化的细胞类型。并且，人类血管瘤集落形成细胞可被用于产生具有体外或体内用途的一种或多种部分或最终分化的细胞类型。

[0209] 本发明的人类血管瘤集落形成细胞可被用于本发明描述的任何方法或应用中，包括但不限于，本文描述的疾病或病况的治疗。

[0210] 包含体外扩增的成血成血管细胞的细胞制剂

[0211] 在本发明的某些实施方案中,将哺乳动物(包括人)成血成血管细胞扩增到商业数量并用于多种治疗或临床应用。在特定的实施方案中,将成血成血管细胞扩增达10,000到四百万(或更多)数量。可在起始制备的3—4天内达到这样的细胞数量。相应的,本发明涉及包含大量成血成血管细胞的制剂,所述制剂包含至少10,000、50,000、100,000、500,000、一百万、两百万、三百万或四百万的细胞。

[0212] 本发明还提供了包含大量成血成血管细胞的溶液、组合物和制剂。所述溶液、所述组合物和所述制剂包含至少10,000、50,000、100,000、500,000、一百万、两百万、三百万或四百万个细胞。所述成血成血管细胞可以是人的。

[0213] 本发明的其它方面涉及将通过本文公开的方法得到的成血成血管细胞分化成造血细胞或内皮细胞谱系,或分化成两者,并随后将其用于临幊上。因此,本发明还涉及包含大量造血或内皮细胞的细胞制剂。本发明还涉及将通过本文公开的方法得到的成血成血管细胞分化成除造血或内皮细胞以外的其它细胞谱系。因此,本发明还涉及包含大量其它由成血成血管细胞衍生来的细胞的细胞制剂。

[0214] 可通过扩增依上述方法得到的成血成血管细胞而得到包含大量(例如,数千或数百万)成血成血管细胞的组合物和制剂。相应的,本发明涉及包含大量通过扩增ES细胞(例如人ES细胞)得到的成血成血管细胞或由脐带血,外周血或骨髓的得到的成血成血管细胞的组合物和制剂。进一步的,由于所述扩增方法可用于,例如,小鼠、大鼠、牛或非人灵长类来源的成血成血管细胞,本发明还涉及包含大量人以外其它物种的成血成血管细胞的组合物或制剂。通过本发明的方法扩增得到的成血成血管细胞可以是双潜能的,例如,可以分化成内皮或造血干细胞两者之一。在某些实施方案中,产生并扩增自人ES细胞的人类成血成血管细胞是双潜能的。血管瘤集落形成细胞能分化产生至少造血细胞类型或内皮细胞类型。血管瘤集落形成细胞优选是双潜能的,并能分化产生至少造血细胞类型或内皮细胞类型。因此,本发明的血管瘤集落形成细胞是至少单潜能的,且优选是双潜能的。但是,血管瘤集落形成细胞也可有更高程度的分化潜能,并在某些实施方案中能分化产生其它谱系细胞类型。在某些实施方案中,所述血管瘤集落形成细胞能分化产生其它中胚层衍生物,例如心细胞(如,心肌细胞)和/或平滑肌细胞。

[0215] 哺乳动物成血成血管细胞标记物

[0216] 如上所述,所述血管瘤集落形成细胞缺乏成熟内皮细胞或造血细胞的某些特征。但是,可以通过多种标记物鉴别这些血管瘤集落形成细胞或成血成血管细胞,例如,CD71+、GATA-1和GATA-2蛋白、CXCR-4和TP0和EPO受体。在其它实施方案中,所述成血成血管细胞表达LM0-2。此外,也可以通过其它标记物的缺失或低表达来表征成血成血管细胞。相应的,成血成血管细胞可是CD34-、CD31-和KDR-。在再一个实施方案中,所述成血成血管细胞可以是CD34-、CD31-、KDR-和CD133-。

[0217] 相应的,在某些实施方案中,通过本发明的方法产生和扩增的成血成血管细胞的特征是存在或缺失一种或多种如国际申请W02007/120811的表2中列举的标记物。例如,可检测到成血成血管细胞的任何一种或多种列于表2“BL-CFC”下被标记为“-”的标记物的表达呈阴性。相应的,在一些实施方案中,所述成血成血管细胞可呈CD34表达阴性。此外,所述细胞也可呈CD31、CD133和/或KDR表达阴性。在再一个实施方案中,所述成血成血管细胞可表达任何表2中被标记为“+”的标记物。例如,所述细胞可表达一种或多种标记物LM0-2和

GATA-2。标记物的表达可通过任何方法评估,例如,免疫组织化学或免疫印迹检测蛋白表达,或mRNA分析检测RNA水平的表达。

[0218] 衍生成血成血管细胞系细胞

[0219] 本发明的方法或细胞制剂还涉及成血成血管细胞衍生细胞。通过本发明的方法产生和扩增的人类成血成血管细胞和通过本发明的方法扩增的哺乳动物成血成血管细胞可被体外分化得到造血细胞(包括造血干细胞(HSC))或内皮细胞,也可得到由这两个谱系进一步分化的细胞。这些细胞随后可用于下述治疗或商业应用。

[0220] 在某些实施方案中,通过在无血清BL-CFU中培养成血成血管细胞3—10天得到造血细胞。在其它实施方案中,培养hES-衍生BL-CFC细胞的单细胞悬液10—14天。就无血清环境有助于规模化生产、并符合规范及降低成本而言,保持无血清环境是最佳的。本发明的成血成血管细胞也可以在无血清Hem培养基(Bhatia et al. 1997 J Exp Med (186) :619-624)中生长,所述培养基可以维持人造血干细胞并包含BSA(如,1%BSA),胰岛素(如,5 μ g/ml人胰岛素),转铁蛋白培养基或转铁蛋白(如,100 μ g/ml人转铁蛋白),L-谷胺酰胺, β -巯基乙醇(如,10⁻⁴M),和生长因子。所述生长因子包括SCF(如,300ng/ml),粒细胞-集落-刺激因子(G-CSF)(如,50ng/ml),Flt-3(如,300ng/ml),IL-3(如,10ng/ml)和IL-6(如,10ng/ml)。其它用于由成血成血管细胞获得造血细胞的因子包括血小板生成素(TPO)和VEGF(如,见Wang et al. 2005 Ann NY Acad Sci (1044) :29-40)和BMP-4。成血成血管细胞也可以在补充了多谱系造血生长因子混合剂的无血清甲基纤维素培养基中生长。因此,所述成血成血管细胞可生长于Iscoive改良的Dulbecco培养基(IMDM)的甲基纤维素中,所述培养基包含BSA、饱和人转铁蛋白、人LDL、并补充了早期作用生长因子(如,c-kit配体、flt3配体)、多谱系生长因子(如,IL-3,粒细胞巨噬细胞-CSF(GM-CSF))、和单谱系生长因子(如,G-CSF、M-CSF、EPO、TPO)、VEGF、和bFGF。另外,所述成血成血管细胞也可生长于包含单谱系生长因子来支持一种类型的造血细胞(如,红细胞、巨噬细胞或粒细胞)生长的培养基中。

[0221] 在一个实施方案中,将成血成血管细胞集落重悬于干细胞系I培养基中。随后将细胞与补入1.5 μ g/ml tPTD-HoxB4和0.5%EX-CYTE(Serologicals Proteins Inc.TM)的1ml无血清造血CFU培养基(H4436,Stem Cell TechnologiesTM)混合。然后将细胞混合物平板接种于未处理的平板上,并于37°C培养10—14天。可对初始平板接种后10—14天后出现的造血CFU可进行形态学表征,如,通过用Wright-Giemsa染料染色。

[0222] 也可以利用其它本领域熟知的条件(如,在包含IMDM,30%胎牛血清(FCS),1%牛血清白蛋白(BSA),10⁻⁴M β -巯基乙醇和2mM L-谷胺酰胺的培养基中)由成血成血管细胞衍生出造血细胞。而且,在其它实施方案中,也可使用碱性成纤维细胞生长因子促进EB内的两个BL-CFC频率和促进造血分化(Faloon et al. 2000 Development (127) :1931-1941)。在另外一些实施方案中,使用所述生长因子血管促血细胞生成素(HAPO)促进成血成血管细胞的生长和向造血细胞分化(Liu et al. 2004 Blood (103) :4449-4456)。例如,可用CD45状态(CD45+)和CFU测定评价向造血细胞的分化。

[0223] 为形成造血细胞,可将人类成血成血管细胞在CFU-培养基中培养3—10天,或任选培养更长时期(如,10—14天)。本发明的人类成血成血管细胞能形成包含粒细胞、红细胞、巨噬细胞、巨核细胞(CFU-GEMM/mix)及只含有后者细胞类型中的一种的集落形成单位(如,CFU-G,CFU-E,CFU-M,和CFU-GM)的CFU或形成。在某些实施方案中,使hES-衍生BL-CFC细胞

的单细胞悬液生长10—14天以衍生造血细胞,例如,红细胞、骨髓细胞、巨噬细胞和多谱系造血细胞。

[0224] 本发明的其它方面涉及衍生自通过本文描述的方法得到并扩增的人类成血成血管细胞或扩增的哺乳动物成血成血管细胞的内皮细胞。可使所述成血成血管细胞在有利于内皮细胞成熟的条件下生长。

[0225] 在本发明的某些实施方案中,为获得内皮细胞,首先将成血成血管细胞首先被平板接种于包被有纤维连接蛋白的平板表面,3—5天(或在其它实施方案中3—7天)后,重新平板接种于一厚层基质胶上以支持向内皮细胞的分化。这些条件维持了成血成血管细胞发育过程中建立的无血清状态。或者,也可使成血成血管细胞在已知支持向内皮细胞分化的培养基中生长。这些条件包括,例如,包含20%胎牛血清(FBS),50ng/ml内皮细胞生长添加物(即垂体提取物),10IU/ml肝素和5ng/ml人VEGF-A₁₆₅(Terramani et al. 2000 *In Vitro Cell Dev Biol Anim* (36): 125–132)的内培养。其它本领域已知的条件包括添加25%FCS/马血清,和在某些实施方案中添加肝素(如10U/ml),胰岛素样生长因子(IGF1)(如2ng),和EC生长添加物(ECGS,如100μg)的培养基。也可将生长因子VEGF和EGF与HAPO联合用于支持内皮细胞分化(Liu et al. 2004)。例如,也可将成血成血管细胞接种于包被有胶原和纤维连接蛋白的平板上,以促进向内皮细胞的分化。可以对细胞的von Willebrand因子(vWF)和内皮细胞一氧化氮合酶(eNOS)和体外形成内皮细胞网络的能力进行分析。

[0226] 相应的,为形成内皮细胞,挑选通过上述方法衍生而来的成血成血管细胞集落,并重平板接种于包被有纤维连接蛋白的培养平板上作为最佳的向内皮细胞分化的第一步。可将细胞平板接种于EGM-2或EGM-2MV完全培养基(CambrexTM)中。3—5天后,在可替换的实施方案中3—7天后,将所述细胞重平板接种于支持内皮细胞分化的表面,例如一层基质胶。经过16—24小时的培养,分支管-索(如见图8)的形成揭示了典型的内皮细胞行为。也可将诸如LDL-吸收的内皮细胞特异性检测用于证实这些细胞本质上是内皮细胞。

[0227] 在本发明的其它方面,可将依本发明的方法产生和扩增的人类成血成血管细胞和依本发明的方法扩增的哺乳动物成血成血管细胞在体外分化而得到其它细胞,也可得到由这些细胞谱系进一步分化的细胞。这些更多的细胞谱系可源于依本发明的方法产生和扩增的人类成血成血管细胞和依本发明的方法扩增的哺乳动物成血成血管细胞,因为所述成血成血管细胞可具有除分化成造血细胞和内皮细胞外的甚至更大程度的发育潜能。

[0228] 非移植血管瘤细胞

[0229] 本发明提供了新的细胞群,所述细胞群与先前鉴定的成血成血管细胞和血管瘤集落形成细胞具有一些相同的特征。但是,本文所述的新细胞群的区别特征在于它在被给予至免疫缺陷动物时不会移植入骨髓。这种新的祖细胞群可用于干细胞生物学和基础发育的研究;可用于在体外和体内产生部分分化或完全分化的细胞类型;以及可用于治疗手段的开发。此外,这些细胞可用于筛选测定以鉴定例如:(i)能够促进非移植血管瘤细胞的扩增的因子或条件;和(ii)能够促进由非移植血管瘤细胞分化为一种或多种分化的细胞类型的因子或条件。鉴定到的因子和条件可被用于产生基于细胞或不基于细胞的治疗方法,用于制备培养基和制剂,以及用于干细胞生物学和基础发育的研究。

[0230] 综述

[0231] 本发明提供了非移植血管瘤细胞,含有非移植血管瘤细胞的组合物和制剂,产生

和扩增非移植血管瘤细胞的方法，产生由非移植血管瘤细胞分化的分化细胞类型的方法，以及将非移植血管瘤细胞由其衍生的细胞用于治疗的方法。

[0232] 本文所述的方法可以用于产生人类非移植血管瘤细胞。然而，细胞可从其他物种获得，所述物种包括但不限于：小鼠、大鼠、兔、牛、狗、猫、羊、猪和非人类的灵长类动物。

[0233] 本发明提供了一种扩增任何来源的哺乳动物非移植血管瘤细胞的方法，所述来源包括ES细胞、囊胚或卵裂球，以及从胎盘或脐带组织、外周血、骨髓或其他组织获得的脐带血，或通过本领域已知的其他任何手段获得的细胞。在某些实施方案中，人类非移植血管瘤细胞由胚胎干细胞或其他多能干细胞产生。作为实例，人类非移植血管瘤细胞可以产生于胚胎干细胞和来自iPS细胞。在其它实施方案中，非移植血管瘤细胞由人类胚胎衍生干细胞产生。人类胚胎衍生细胞可为一种基本同质的细胞群，或为异质性的细胞群，或为全部或部分的胚胎组织。作为可用于本发明方法的胚胎衍生细胞的一个实例，人体非移植血管瘤细胞可以由人类胚胎干细胞产生。这些胚胎干细胞包括来源于或使用囊胚、培养的ICM、一个或多个卵裂球、或胚胎植入前阶段的胚胎或胚胎状结构的其他部分的胚胎干细胞，并不论上述组织是通过受精产生还是通过体细胞核转移(SCNT)、单雌生殖、单雄生殖或其他有性或无性手段产生。在某些实施方案中，非移植血管瘤细胞由多能干细胞产生。示例性的多能干细胞包括但不限于胚胎干细胞和iPS细胞。在某些实施方案中，人类非移植血管瘤细胞由非多能干细胞产生。非多能干细胞可以包括体细胞，例如来源于皮肤、骨骼、血液、结缔组织、心、肾、肺、肝或任何其他内部器官的细胞。在某些实施方案中，非多能干细胞可以由结缔组织例如成纤维细胞产生。在某些实施方案中，非多能干细胞来源于成熟组织。

[0234] 在某些实施方案中，非移植血管瘤细胞可进一步分化为造血干细胞和/或造血细胞类型，包括但不限于血小板和红细胞。这类细胞可用于输血或其他疗法。虽然这类细胞具有多种用途，一个特别重要的用途改进了用于输血的血液供应。在某些实施方案中，本发明提供了由非移植血管瘤细胞分化的血红细胞。这种分化的血红细胞可用于输血。

[0235] 本发明的另一些方面涉及从非移植血管瘤细胞产生分化的造血细胞，以用于向那些有需要的患者输血的方法。在某些实施方案中，使用分化的造血细胞进行输血，以治疗创伤、手术过程中的失血，血液病(如贫血，镰状细胞性贫血)或溶血性疾病或恶性疾病。在某些实施方案中，使用血红细胞进行输血，以治疗创伤、手术过程中的失血，血液病(如贫血，镰状细胞性贫血)或溶血性疾病。在某些实施方案中，使用混合的血红细胞群进行输血。应当注意的是，许多分化的造血细胞类型，尤其是血红细胞，通常在体内以混合群的形式存在。具体来说，在体内的血液循环中存在不同年龄和分化水平的血红细胞。此外，血红细胞随着时间推移而成熟的，逐渐减少胎儿血红蛋白的表达和增加成人血红蛋白的表达。本发明考虑到了使用纯的血红细胞群进行输血，或者使用具有不同的年龄和分化水平血红细胞混合群进行输血。在具体的实施方案中，本发明考虑了使用表达胎儿血红蛋白(血红蛋白F)的血红细胞进行输血。使用表达胎儿血红蛋白的血红细胞进行输血可能对于治疗镰状细胞性贫血特别有用。能够产生大量用于输血的细胞将缓解全国范围内的血库和医院长期面临的血液短缺的现状。

[0236] 在某些实施方案，本发明的方法能够产生用于输血的通用细胞。具体来说，可以很容易地成熟O型和Rh-血型的红血细胞，并能够作为一个通用的输血血源。在某些实施方案中，用本申请的方法产生的血红细胞为功能性的。在某些实施方案中，所述血红细胞在输血

之前表达血红蛋白F。在某些实施方案中，所述血红细胞携带氧。在某些实施方案中，所述血红细胞的寿命与天然衍生的血红细胞相同。在某些实施方案中，所述血红细胞的寿命为天然衍生的血红细胞的75%。在某些实施方案中，所述血红细胞的寿命为天然衍生的血红细胞的50%。在某些实施方案中，所述血红细胞的寿命为天然衍生的血红细胞的25%。

[0237] 在某些实施方案中，非移植血管瘤细胞可能具有更大的发育潜能，并能够分化产生内皮细胞类型、平滑肌细胞类型或心肌细胞类型。

[0238] 本发明的方法使得可以在体外大量扩增非移植血管瘤细胞，从而可用于各种商业和临床的应用。体外扩增非移植血管瘤细胞指的是非移植血管瘤细胞的增殖。而本发明的方法能够使人类非移植血管瘤细胞扩增至商业规模的数量，本发明还涉及到大量的非移植血管瘤细胞和含有大量人类非移植血管瘤细胞（例如至少10,000、100,000或500,000个细胞）的细胞制剂。在某些实施方案中，所述细胞制剂含有至少 1×10^6 个细胞。在另一些实施方案中，所述细胞制剂含有至少 2×10^6 个人类非移植血管瘤细胞，在另一些实施方案中，所述细胞制剂含有至少 3×10^6 个人类非移植血管瘤细胞。在又另一些实施方案中，所述细胞制剂含有至少 4×10^6 个人类非移植血管瘤细胞。应当注意的是，这些细胞制剂可为纯化形式或基本纯化形式。然而，在某些实施方案中，合适的细胞制剂含有非移植血管瘤细胞和血管瘤集落形成细胞的混合物。所述混合物可为任何比例，其中包括含有较多非移植血管瘤细胞的混合物和含有较多血管瘤集落形成细胞的混合物。

[0239] 本发明涉及含有10,000至四百万个或更多的哺乳动物（例如人类）非移植血管瘤细胞的溶液、制剂或组合物。在这样的溶液、制剂或组合物中，非移植血管瘤细胞的数量可分为10,000至四百万个或更多的范围内的任何数量。这一数量可以为例如20,000、50,000、100,000、500,000、一百万等等。

[0240] 类似地，本发明涉及到人类非移植血管瘤后代细胞（例如人类造血细胞包括人类造血干细胞）的制剂。本发明还涉及到生产、储存、分装所述非移植血管瘤细胞和/或非移植血管瘤后代细胞的方法。

[0241] 本发明还提供了适于为人类或动物患者进行输血的方法和溶液。在具体的实施方案中，本发明提供了制备用于输血的血红细胞和/或血小板和/或其他造血细胞类型的方法。在某些实施方案中，本发明适于为血库和医院提供用于创伤后输血或治疗血液相关疾病或障碍的血液。在某些实施方案中，本发明提供了能够作为通用供体细胞的血红细胞。在某些实施方案中，所述血红细胞为功能性的并能够在输血前表达血红蛋白F。

[0242] 本发明还提供了人类非移植血管瘤细胞，含有基本纯化的人类非移植血管瘤细胞群的细胞培养物，含有人类非移植血管瘤细胞的药物制剂和含有所述非移植血管瘤细胞的冷藏制剂。在某些实施方案中，本发明提供了所述人类非移植血管瘤细胞用于制备治疗需要该药物的患者的病症的药物中的用途。另外，本发明提供了所述细胞培养物用于制备治疗需要该药物的患者的病症的药物中的用途。本发明还提供了所述药物制剂用于制备治疗需要该药物的患者的病症的药物中的用途。

[0243] 可以基于非移植血管瘤细胞的结构属性和/或功能属性来识别和表征所述非移植血管瘤细胞。这类祖细胞在被给予至免疫缺陷宿主时不会发生移植。在某些实施方案中，这些细胞的独特之处在于它们彼此之间仅仅松散粘连（与其他非移植血管瘤细胞松散粘连）。在细胞松散粘连的实施方案中，可以仅使用机械分离技术而无需适于酶解技术就能将非移

植血管瘤细胞的培养物或集落解聚为单细胞。在某些实施方案中,这些细胞相互粘连足够松散,仅仅只需要机械解离(而非酶解或者机械和酶解结合)就足以将培养物或集落解聚,基本上不会损害细胞活力。换而言之,相比用酶解细胞团块后观察到的实质损伤和死亡,机械解离不需要可导致细胞实质损伤和死亡的力度。

[0244] 在某些实施方案中,还可以通过一种或多种标记物的表达或不表达(在基因水平或蛋白水平上估计)来识别或表征所述非移植血管瘤细胞。在某些实施方案中,所述非移植血管瘤细胞具有人类血管瘤集落形成细胞的一个或多个特征。例如在某些实施方案中,可以根据一种或多种下列细胞表面标记物的不表达(例如可以根据至少一种,至少两种,至少三种或四种下列标记物不表达来表征所述细胞)来识别或表征非移植血管瘤细胞:CD34、KDR、CD133或CD31。此外,也可以根据GATA2和/或LM02的表达来识别或表征非移植血管瘤细胞。

[0245] 人类非移植血管瘤细胞

[0246] 在某些方面,本发明提供了人类非移植血管瘤细胞。这些细胞为独特而原始的细胞类型,具有多种治疗用途和其他用途。此外,这种细胞类型至少为研究造血细胞谱系的发育提供了一种重要工具。因此,本发明考虑到了含有非移植血管瘤细胞的各种制剂(包括药物制剂)和组合物,以及含有由非移植血管瘤细胞分化而成的部分分化或完全分化的一种或多种细胞类型的制剂(包括药物制剂)和组合物。不拘泥于任何特定的理论,这些细胞代表一个独特的、在某种程度上(比血管瘤集落形成细胞)更可靠的干细胞群,它们保留了产生多种造血细胞类型的能力。

[0247] 可以基于上述血管瘤集落形成细胞的结构或功能特征中的一种或其组合来识别或表征本发明的非移植血管瘤细胞。应当注意的是,由于这些细胞可以来源于多种来源(例如胚胎组织、产前组织或围产期组织)的任意一种,因此术语“非移植血管瘤细胞”适用于任何来源的细胞,只要它们不会移植并且能够分化产生至少一种造血细胞类型即可,任选地它们还具有一种或多种上述结构或功能属性。

[0248] 为了说明,本发明的人类非移植血管瘤细胞在被给予至免疫缺陷宿主时不会发生移植,并且具有至少一种如下结构特征:(a)可分化成至少一种造血细胞类型;(b)可分化成至少造血细胞类型和内皮细胞类型;(c)(与其它血管瘤集落形成细胞)松散的相互粘连;(d)不表达CD34蛋白;(e)不表达CD31蛋白;(f)不表达KDR蛋白;(g)不表达CD133蛋白;(h)表达GATA2蛋白;(i)表达LM02蛋白。在某些实施方案中,人类非移植血管瘤细胞具有至少二种、三种、四种、五种、六种、七种、八种或至少九种本文详述的结构或功能特征。

[0249] 如上所述,人类非移植血管瘤细胞的一种受关注的属性是它们松散的相互粘连。由于这些细胞只是松散的相互粘连,非移植血管瘤细胞的培养物或集落可以仅用机械解离使之解离成单细胞,而不必使用酶解技术。这些细胞相互间足够松散以至仅用机械解离而不用酶解或两者的组合就足以在不实质上削弱细胞生存能力的情况下使培养物或集落解聚。换而言之,机械解离不需要可导致细胞实质损伤或死亡的力度。

[0250] 这种性质不只用于描述细胞,从表型上区分它们和其它细胞类型,它也具有重大的治疗意义。例如,可将相对大量(大于 1×10^6 或甚至大于 1×10^7 或甚至大于 1×10^8 个)的非移植血管瘤细胞注射入人体或其它动物体内,能够显著减小引起血块、血栓或肺部梗阻的危险。这是细胞疗法的重大进步。安全递送相对大量的细胞的能力使细胞疗法更具实用性,

并能够有效治疗越来越多的疾病和病症。

[0251] 术语“松散粘连”已在上文作了定性描述,是指人类非移植血管瘤细胞相互之间的行为。可以仅用机械解离技术而不必用酶解技术将非移植血管瘤细胞的培养物或集落解离为单细胞。这些细胞足够松散的相互粘连,以至只用机械解离,而不用酶解或两者的组合,就足以在不实质性削弱细胞生存能力的情况下使培养物或集落解聚。换而言之,机械解离不需要可导致细胞实质性损伤或死亡的力度。

[0252] 所述术语也可以更量化的描述。例如在某些实施方案中,术语“松散粘连”用于指培养物中至少50%的细胞只用机械解离技术而不必用酶解技术即可解离为单细胞的非移植血管瘤细胞的培养物或集落。在另外的实施方案中,所述术语指培养物中至少60%、65%、70%或75%的细胞只用机械解离技术而不必用酶解技术即可解离为单细胞的培养物。在再一个实施方案中,所述术语指培养物中至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或甚至100%的细胞只用机械解离技术而不必用酶解技术即可解离为单细胞的培养物。

[0253] 可依据机械解离后的细胞的健康和生存能力进一步定量只用机械解离技术而不必用酶解技术解离非移植血管瘤细胞的能力。换而言之,如果不使用酶解技术的解离需要大至可破坏或杀死非常大量的细胞的机械力,则如本文定义,细胞未松散粘连。例如在某些实施方案中,术语“松散粘连”指与使用酶解技术解离细胞时观察到的结果相比,只用机械解离技术而不必用酶解技术就可在不实质性削弱所述细胞的健康或生存能力的情况下将其解离成单细胞的细胞培养物。例如,与使用酶解技术解离细胞时观察到的结果相比,所述细胞的健康或生存能力下降少于15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或甚至少于1%。

[0254] 示例性的酶解技术包括,但不限于,用胰蛋白酶,胶原酶或其它破坏细胞间或细胞与基质间相互作用的酶进行处理。机械解离技术的例子包括但不限于,用移液管抽吸转移一次或数次。

[0255] 通过结构和功能定义本发明的人类非移植血管瘤细胞。所述细胞能产自多种来源中的任一种,包括来自胚胎组织,产前组织,围产期组织,和甚至来自成人组织。作为实例,人类非移植血管瘤细胞可以产生自人胚胎干细胞,其它胚胎衍生细胞(胚泡、卵裂球、内细胞团、胚胎、滋养层/滋养外胚层细胞、滋养层干细胞、原始生殖细胞、胚胎生殖细胞等),羊水、羊膜干细胞、胎盘、胎盘干细胞和脐带血。更通常地,非移植血管瘤细胞可以产生自多能细胞,例如胚胎干细胞或多能干细胞。示例性的多能干细胞包括但不限于胚胎干细胞和诱导的多能干细胞(iPS cell)。人类非移植血管瘤细胞也可以由非多能干细胞产生,所述非多能干细胞例如体细胞,包括但不限于来源于皮肤、骨骼、血液、结缔组织、心、肾、肺、肝或任何其他内部器官的细胞。在某些实施方案中,非多能干细胞可以由结缔组织例如成纤维细胞产生。在某些实施方案中,非多能干细胞来源于成熟组织。

[0256] 本发明提供了非移植血管瘤细胞(例如人类细胞),含有人类非移植血管瘤细胞的组合物,以及含有人类非移植血管瘤细胞的制剂(包括药物制剂)。本发明这些方面的某些特征将在下文详述。本发明考虑到了本发明下述方面和实施方案的任意组合,以及它们与美国专利申请号11/787,262中公开内容的组合,该专利文献的全部内容通过援引的方式纳入本文。

[0257] 如上所述,血管瘤集落形成细胞和/或非移植血管瘤细胞可由多种细胞产生,包括但不限于多能细胞(胚胎干细胞、胚胎衍生细胞和诱导的多能干细胞)。

[0258] 在一个方面,本发明提供了一种非移植血管瘤细胞(例如人类细胞)。所述细胞能够分化产生至少一种造血细胞类型。在某些实施方案中,所述细胞与其他人类非移植血管瘤细胞松散粘连。在某些实施方案中,所述细胞不表达CD34蛋白。在其它某些实施方案中,所述细胞不表达一种或多种(例如,细胞不表达至少一种、至少两种、至少三种或至少四种下列蛋白)下列蛋白:CD34、CD31、CD133、KDR。在某些其它实施方案中,所述细胞表达GATA2和/或LM02蛋白。在另一些实施方案中,所述细胞具有与人类血管瘤集落形成细胞相同的一种或多种(2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种)功能或结构特征。

[0259] 在另一方面,本发明提供了含有基本纯化的非移植血管瘤细胞(例如人类细胞)群的细胞培养物。所述细胞能够分化产生至少一种造血细胞类型。在某些实施方案中,所述细胞与其他人类非移植血管瘤细胞松散粘连。在某些实施方案中,所述细胞不表达CD34蛋白。在其它某些实施方案中,所述细胞不表达一种或多种(例如,细胞不表达至少一种、至少两种、至少三种或至少四种下列蛋白)下列蛋白:CD34、CD31、CD133、KDR。在某些其它实施方案中,所述细胞表达GATA2和/或LM02蛋白。在另一些实施方案中,所述细胞具有与人类血管瘤集落形成细胞相同的一种或多种(2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种)功能或结构特征。

[0260] 在另一方面,本发明提供了含有由胚胎组织分化而成的非移植血管瘤细胞的细胞培养物。在某些实施方案中,本发明提供含有由多能细胞(多能干细胞)分化而成的非移植血管瘤细胞的细胞培养物。在某些实施方案中,所述非移植血管瘤细胞彼此松散粘连。在某些实施方案中,所述细胞能够分化产生至少一种造血细胞类型,并且所述细胞彼此松散粘连。在某些实施方案中,所述细胞不表达CD34蛋白。在另一些实施方案中,所述细胞不表达一种或多种(例如,细胞不表达至少一种、至少两种、至少三种或至少四种下列蛋白)下列蛋白:CD34、CD31、CD133、KDR。在某些其它实施方案中,所述细胞表达GATA2和/或LM02蛋白。在另一些实施方案中,所述细胞具有与人类血管瘤集落形成细胞相同的一种或多种(2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种)功能或结构特征。

[0261] 在另一方面,本发明提供了含有能够分化产生至少一种造血细胞类型的人类非移植血管瘤细胞的细胞培养物。在某些实施方案中,所述细胞彼此松散粘连。在某些实施方案中,所述细胞不表达CD34蛋白。在另一些实施方案中,所述细胞不表达一种或多种(例如,细胞不表达至少一种、至少两种、至少三种或至少四种下列蛋白)下列蛋白:CD34、CD31、CD133、KDR。在某些其它实施方案中,所述细胞表达GATA2和/或LM02蛋白。在另一些实施方案中,所述细胞具有与人类血管瘤集落形成细胞相同的一种或多种(2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种)功能或结构特征。

[0262] 在另一方面,本发明提供了含有能够分化产生至少一种造血细胞类型的人类非移植血管瘤细胞的药物制剂。在某些实施方案中,所述非移植血管瘤细胞彼此松散粘连。在某些实施方案中,所述细胞不表达CD34蛋白。在另一些实施方案中,所述细胞不表达一种或多种(例如,细胞不表达至少一种、至少两种、至少三种或至少四种下列蛋白)下列蛋白:CD34、CD31、CD133、KDR。在其它某些实施方案中,所述细胞表达GATA2和/或LM02蛋白。在另一些实施方案中,所述细胞具有与人类血管瘤集落形成细胞相同的一种或多种(2种、3种、4种、5

种、6种、7种、8种、9种、10种)功能或结构特征。可用任何药学可接受的载体或赋形剂来制备所述药物制剂。

[0263] 在另一方面,本发明提供了含有人类非移植血管瘤细胞的药物制剂。可用任何药学可接受的载体或赋形剂来制备所述药物制剂。

[0264] 在上述任一方面的某些实施方案中,所述组合物或药物制剂含有至少 1×10^5 个人类非移植血管瘤细胞。在上述任一方面的其他某些实施方案中,所述组合物或药物制剂含有至少 1×10^6 、至少 5×10^6 、至少 1×10^7 或多于 1×10^7 个人类非移植血管瘤细胞。在某些实施方案中,所述制剂为纯化的或基本纯化的制剂。在另一些实施方案中,所述制剂包括非移植血管瘤细胞和其他细胞类型的混合物,例如非移植血管瘤细胞和血管瘤集落形成细胞的混合物。

[0265] 另外的细胞、组合物和制剂包括由人类非移植血管瘤细胞分化而成的部分分化或完全分化的细胞。例如,本发明考虑到了含有一种或多种由非移植血管瘤细胞分化而成的造血细胞和/或内皮细胞类型的组合物和制剂。示例性的造血细胞类型包括造血干细胞、血小板、RBC、淋巴细胞、巨核细胞等等。作为进一步的举例,本发明考虑到了含有一种或多种由非移植血管瘤细胞分化而成的其他细胞类型的组合物和制剂,所述其他细胞类型例如部分分化或完全分化的中胚层细胞类型。

[0266] 在上述任一方面的某些实施方案中,本发明提供了人类非移植血管瘤细胞或由其分化而成的部分分化或完全分化的细胞的冷藏制剂

[0267] 在上述任一方面的某些实施方案中,本发明提供了用于治疗用途的人类非移植血管瘤细胞或人类非移植血管瘤细胞的组合物或制剂。这类细胞和制剂可用于治疗本申请说明书通篇详述的任何病症或疾病,也可以用于血库产业。此外,由人类非移植血管瘤细胞分化而成的细胞或人类非移植血管瘤细胞的组合或制剂可用于治疗本申请说明书通篇详述的任何病症或疾病。

[0268] 本发明的人类非移植血管瘤细胞可用于治疗目的。此外,人类非移植血管瘤细胞可用于研究内皮细胞谱系和造血细胞谱系的发育,或用于筛选测定以识别可以用于下述用途的因子:例如,(i)维持人类非移植血管瘤细胞,或(ii)促进人类非移植血管瘤细胞分化为一种或多种部分分化或完全分化的细胞类型。此外,人类非移植血管瘤细胞可用于产生一种或多种部分分化或完全分化的细胞类型以用于体外或体内应用。

[0269] 本发明的人类非移植血管瘤细胞可用于本申请所述的任何方法或应用,包括但不限于治疗本文所述的任何疾病或病症。示例性的疾病和病症在美国专利申请号11/787,262中有所详述,该专利文献的全部内容通过援引的方式纳入本文。此外,人类血管瘤集落形成细胞和非移植血管瘤细胞可用于产生分化的造血细胞类型,包括功能性的血红细胞。

[0270] 含有体外扩增的成血成血管细胞的细胞制剂

[0271] 在本发明的某些实施方案中,哺乳动物(包括人类)的非移植血管瘤细胞的数量被扩增达到商业规模,并用于多种治疗和临床应用。在具体的实施方案中,非移植血管瘤细胞的数量被扩增至10,000至四百万(或更多)的量级。在初始制剂开始培养的3-4天之内就能够达到这一数量。因此,本发明涉及含有大量非移植血管瘤细胞的制剂,所述制剂含有至少10,000、50,000、100,000、500,000、一百万、二百万、三百万或四百万个细胞。

[0272] 本发明还提供了含有大量非移植血管瘤细胞的溶液、组合物和制剂,所述溶液、组

合物和制剂含有至少10,000、50,000、100,000、500,000、一百万、二百万、三百万或四百万个细胞。所述非移植血管瘤细胞可为人类细胞。所述溶液可为纯化溶液、基本纯化的溶液或其他祖细胞类型(包括但不限于血管瘤集落形成细胞)的混合物。

[0273] 本发明的其他方面涉及将通过本文公开的方法获得的非移植血管瘤细胞分化为造血细胞或内皮细胞谱系或两者,并将其随后用于临床应用。因此,本发明还涉及含有大量部分分化或完全分化的细胞类型的细胞制剂。

[0274] 含有大量(几千至几百万)非移植血管瘤细胞的组合物和制剂可以通过扩增通过上述方法获得的非移植血管瘤细胞而获得。因此,本发明涉及含有大量非移植血管瘤细胞的组合物和制剂,所述非移植血管瘤细胞通过扩增ES细胞(例如人类ES细胞)或来源于脐带血、外周血或骨髓的非移植血管瘤细胞而获得。另外,由于所述扩增方法也可应用于来源于小鼠、大鼠、牛或非人类灵长类动物的非移植血管瘤细胞,例如本发明还涉及含有大量除人之外的其他物种的非移植血管瘤细胞的组合物和制剂。将通过本发明的方法进行扩增的非移植血管瘤细胞可为双潜能的,即能够分化为内皮细胞或造血干细胞。在某些实施方案中,由ES细胞产生和扩增的所述人类非移植血管瘤细胞为双潜能的。非移植血管瘤细胞至少能够分化产生造血细胞类型。在某些实施方案中,非移植血管瘤细胞为双潜能的,至少能够分化产生造血细胞类型和内皮细胞类型。因此,本发明的非移植血管瘤细胞至少为单潜能的,并可为双潜能的。而且,非移植血管瘤细胞可以具有更高程度的发育潜能,并且在某些实施方案中能够分化产生其他谱系的细胞类型。在某些实施方案中,所述非移植血管瘤细胞能够分化产生其他的中胚层衍生细胞,例如心细胞(例如心肌细胞)和/或平滑肌细胞。

[0275] 另外,非移植血管瘤细胞可用于筛选测定,以识别可用于例如下述用途的试剂:(i)促进细胞分化为一种或多种造血细胞类型,或(ii)促进细胞的增殖和/或存活,以便于细胞的入库和储存。所述非移植血管瘤细胞还可用于发育生物学的基础研究,或用于与血管瘤集落形成细胞相比较,以确定两种相关的干细胞群的发育差异。

[0276] 人类成血成血管细胞,非移植血管瘤细胞,成血成血管细胞谱系细胞和非移植血管瘤谱系细胞的临床和商业实施方案

[0277] 基于细胞的治疗

[0278] 虽然人类成血成血管细胞和非移植血管瘤细胞有体内分化成造血细胞或内皮细胞的潜能,可将它们用于基于细胞的治疗中,其中需要这两种细胞类型之任一,或用其可改善治疗。进一步,患者可接受包含成血成血管细胞谱系细胞或非移植血管瘤谱系细胞(如造血细胞和/或内皮细胞)的任何治疗或处理。下面的部分描述利用依本发明的方法产生和扩增的或依本发明的方法扩增的本发明的人类成血成血管细胞和非移植血管瘤细胞的方法。

[0279] 在本发明的某些实施方案中涉及增加或处理造血细胞的方法或增加血管生长和/或促进血管修复的方法。相应的,在某些方面,本发明涉及治疗需要造血细胞或需要血管生长或修复的患者的方法和组合物。可将成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞注射入受试者的血管或通过手术向血管给药。患者或受试者可以是人。

[0280] 在本发明的某些实施方案中,人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞被用于移植,其中也可以另外采用HSC移植。例如,可以将这样的移植用于治疗患急性或慢性白血病、再生障碍性贫血和多种免疫缺陷综合症、多种非血液恶性肿瘤和自身免疫病变的患者的造血细胞重建中,并从高剂量化疗和/或放疗后治疗诱导的发育不全中挽救患者。这样的移植

可在体内或离体完成(如骨髓移植)。

[0281] 在本发明的其它实施方案中,人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞被用于治疗需要造血细胞重建或造血细胞治疗的患者。这样的患者包括,例如,患地中海贫血、镰状细胞性贫血、再生障碍性贫血(亦称再生不良性贫血)、血球减少、骨髓发育不良、血小板缺陷、诸如白血球过多症的造血恶性肿瘤、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)和ADA(如脱氨酶(ADA)缺陷重度联合免疫缺陷症(SCID))的患者。

[0282] 本发明特定实施方案涉及治疗需要利用本发明的成血成血管细胞进行造血细胞重建或造血细胞治疗的患者的方法。相应的,本发明涉及治疗需要进行造血细胞重建或治疗的患者的方法,所述治疗包括选择需要根据本发明的方法产生和扩增或扩增的人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞的患者,并将人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞给予所述患者。另外,所述方法也可包括将产生和扩增或扩增的人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞分化成人造血细胞,并随后将所述造血细胞给予患者。

[0283] 替代性实施方案包括大规模生产人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞并在选择有此需要的患者前保存的方法。因此,本发明的其它实施方案涉及治疗需要造血细胞重建或治疗的患者的方法,所述治疗包括选择有需要的患者,定购已经根据上述方法分离和扩增的人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞,并将所述人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞给予患者。同时,所述方法可包括将所述人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞分化为人造血细胞,并将所述造血细胞给予患者。在另外的实施方案中,培养至少一种MHC等位基因半合子的或纯合子成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞,优选培养至商业化数量,并优选通过商业实体贮存。当出现患者对上述细胞,成血成血管细胞谱系细胞或非移植血管瘤谱系细胞的需求时,临床医师或医院就定购这样的细胞。

[0284] 由于本发明的人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞在血管原性的微环境下将扩增并分化成内皮细胞,所述人类成血成血管细胞可被用于在患者受伤部位提供新血管或诱导受损血管修复的治疗手段。因此在某些方面,本发明涉及促进新血管生长或修复受损血管系统的方法。本发明的人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞可被用于治疗内皮细胞损伤,如心肌梗塞,中风和脑缺血,四肢缺血和包含四肢缺血的皮肤创伤和发生于糖尿病动物或患者的创伤,和视网膜缺血再灌注损伤。其它可用本发明的成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞治疗的局部缺血病况包括肾缺血,肺缺血,缺血性心脏病。也可将成血成血管细胞用于在气囊血管成形术后或展开血管内支架后帮助修复损伤血管。另外,成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞还可被用于组织移植、外科手术还有放疗后。进一步的,成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞可被用于治疗和/或阻止动脉粥样硬化的进程,也可用于修复系统性硬化病和雷诺氏现象(RP)(Blann et al. 1993 J Rheumatol. (20):1325-30)中发生的内皮细胞损伤。

[0285] 相应的,本发明提供涉及为有需要的患者提供血管生长或修复的多种方法。在一个实施例中,本发明提供在有需要的患者的缺血组织诱导新血管形成的方法,其包括将有效量的上述人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞的纯化制剂给予所述患者以在所述缺血组织诱导新血管形成。因此本发明的某些方面提供在有需要的患者体内增强血管形成方法,其包括选择有需要的患者,分离上述人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞,并将所述成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞给予患者。在另一方面,本发明提供治疗有需要

的患者的受损血管的方法,其包括选择有需要的患者,扩增或产生并扩增上述人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞,并将所述成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞给予患者。除上面提到的实施例外,可大规模生产所述成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞,并在选择需要成血成血管细胞的患者之前贮存。再一个实施例中,培养至少一种MHC等位基因的半合子的或纯合子的成血成血管细胞,任选培养至商业化的数量,并任选在选择进行成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞治疗的患者之前贮存。可将上面提到的任何成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或所述细胞的制剂直接施用于循环系统(静脉内)。在某些实施方案中,(如,需要进行眼部血管修复,如在视网膜局部缺血/再灌注损伤的治疗中),可通过玻璃体内注射施用所述成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞或所述细胞的制剂。

[0286] 可通过任何途径施用成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞及其衍生细胞的溶液或制剂,并可根据具体病例决定。这些待施用的成血成血管细胞或其衍生细胞的溶液或制剂的有效量也是治疗上有效的量,且决定于具体病例。

[0287] 再一个方面,成血成血管细胞谱系细胞或非移植血管瘤谱系细胞被用于治疗应用,例如,包括用于上述适应症的治疗。相应的,将通过本文描述的方法产生和扩增的或扩增的成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞先在体外分化成造血细胞和/或内皮细胞,然后得到由这两个谱系中进一步分化的细胞。这些细胞随后可被给予受试者或患者以治疗造血病症或进行造血重建,或治疗诸如局部缺血或血管损伤。

[0288] 使衍生自通过本文描述的方法获得的人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞的HSC进一步生长以扩增HSC和/或衍生出其它造血谱系细胞类型。本发明的某些方面涉及将衍生自成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞的HSC用于移植。在另外的实施方案中,分化的造血细胞(如,粒细胞、红细胞、骨髓细胞、巨核细胞、血小板、巨噬细胞、肥大细胞和中性白细胞(Wiles and Keller 1991 Development (111) :259))被用于各种治疗,例如输血治疗或治疗感染。相应的,本发明的其它实施方案涉及对需要造血细胞重建或用HSC或衍生自本发明的成血成血管细胞的造血谱系细胞进行治疗的患者进行治疗的方法。

[0289] 因此,在某些方面,本发明涉及对需要造血细胞或需要治疗的患者进行治疗方法,所述治疗包括选择有需求的患者,根据本发明的方法扩增或分离和扩增人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞,将所述成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞分化成造血干细胞和/或成熟造血细胞,并将所述造血细胞给予患者。

[0290] 在本发明的其它方面,根据本文公开的方法培养所述成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞而产生内皮细胞。内皮细胞随后可被用于提供新血管或诱导患者受伤部位受损血管的修复。因此在某些实施方案中,本发明涉及促进新血管生长或修复受损血管系统的方法,其中衍生自成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞的内皮细胞被用于治疗。所述内皮细胞可用于治疗内皮损伤,如心肌梗塞和肺缺血、中风和脑缺血、四肢缺血和包括四肢缺血的皮肤创伤和发生于糖尿病动物或患者的创伤、视网膜缺血性灌注损伤,肾缺血。内皮细胞也可以用于在气囊血管成形术或展开血管内支架后以及移植、手术时和放疗后帮助修复受损血管。进一步的,内皮细胞也可以用于治疗和/或防止动脉粥样硬化的进程以及修复发生于系统性硬化病和雷诺氏现象中的内皮细胞受损。

[0291] 内皮细胞可进一步分化,并且如果合适的话,那些细胞可被用于治疗一种或多种“内皮细胞”疾病或病况,例如列于前述段落中的病况。

[0292] 相应的,本发明的某些方面涉及治疗内皮细胞或血管受损或需要血管生长或修复的患者的方法,其包括选择有需求的患者,根据本发明的方法扩增或分离并扩增人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞,将所述成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞分化为内皮细胞,并将所述内皮细胞给予患者。

[0293] 血库

[0294] 本发明的另一方面提供制备适于输血的成血成血管细胞方法。虽然这样的细胞和方法有众多用途,尤其重要的用途在于提高输血用血液的有效性。在本发明的某些优选实施方案中,本发明提供由成血成血管细胞/血管瘤集落形成单位或非移植血管瘤细胞分化而来的红细胞。这样的分化的红细胞可用于输血。

[0295] 本发明还涉及从成血成血管细胞/血管瘤集落形成单位或非移植血管瘤细胞制备用于为需要者进行输血的分化的造血细胞的方法。在某些实施方案中,输入分化的造血细胞以治疗外伤,手术中失血,诸如贫血、镰状细胞性贫血、溶血性疾病或恶性的血液疾病。在某些实施方案中,红细胞输入体内以治疗外伤,手术中失血,诸如贫血、镰状细胞性贫血、溶血性疾病的血液疾病。在某些实施方案中,血小板被输入体内以治疗先天性血小板异常或恶性疾病。在某些实施方案中,用红细胞和血小板的混合群进行输血。

[0296] 应该注意的是许多分化的造血细胞类型,尤其是红细胞,一般以混合群的形式存在于体内。尤其发现体内存在不同年龄和分化水平的循环的红细胞。并且,红细胞随时间而成熟使得其表达更少的胎儿血红蛋白和更多成人血红蛋白。本发明关注用纯化的红细胞群或具有不同年龄水平或分化水平的红细胞的混合群进行输血。在特定实施方案中,本发明关注用表达胎儿血红蛋白(血红蛋白F)的红细胞进行输血。

[0297] 本发明提供由人类血管瘤集落形成细胞和非移植血管瘤细胞在体外制备分化的造血细胞的方法,所述方法包括以下步骤:

[0298] (a) 提供人类血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞;和

[0299] (b) 将所述血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞分化成分化的造血细胞。

[0300] 本发明还提供使用由人类血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞体外分化成的造血细胞进行输血的方法,所述方法包括以下步骤:

[0301] (a) 提供人类血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞;

[0302] (b) 将所述血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞分化成分化的造血细胞;和

[0303] (c) 用所述分化的造血细胞进行输血。

[0304] 本发明还提供使用由人类血管瘤集落形成细胞体外分化成的造血细胞进行输血的方法,所述方法包括以下步骤:

[0305] (a) 在无血清培养基中,在存在至少一种足够将胚胎干细胞诱导分化成胚状体的量的生长因子的情况下,培养包含所述人胚胎干细胞的细胞培养物;

[0306] (b) 向所述包含胚状体的培养物中加入至少一种生长因子,并在无血清培养基中继续培养所述培养物,其中所述生长因子的量足以在所述胚状体培养物中扩增人类血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞;

[0307] (c) 将所述血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞分化成分化的造血细胞;和

[0308] (d) 用所述的分化的造血细胞进行输血。

[0309] 在某些实施方案中,在所述方法步骤(a)和(b)的整个过程中使所述干细胞,胚状

体和血管瘤集落形成细胞在无血清培养基中生长。

[0310] 本发明还提供使用由人类血管瘤集落形成细胞体外分化成的造血细胞进行输血的方法,所述方法包括以下步骤:

[0311] (a) 在无血清培养基中,在存在至少一种足够将多能干细胞诱导分化成胚状体的量的生长因子的情况下,培养包含所述人多能干细胞的细胞培养物;

[0312] (b) 向所述包含胚状体的培养物中加入至少一种生长因子,并在无血清培养基中继续培养所述培养物,其中所述生长因子的量足以在所述胚状体培养物中扩增人类血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞;

[0313] (c) 将所述胚状体解聚为单细胞;

[0314] (d) 向所述包含单细胞的培养物中加入至少一种生长因子,并在无血清培养基中继续培养所述培养物,其中所述生长因子的量足以在所述包含所述单细胞的培养物中扩增人类血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞;

[0315] (e) 将所述血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞分化成分化的造血细胞;和

[0316] (f) 用所述分化的造血细胞进行输血。

[0317] 在某些实施方案中,在所述方法步骤(a) — (d) 的整个过程中使所述多能干细胞,胚状体,血管瘤集落形成细胞,非移植血管瘤细胞和单细胞在无血清培养基中生长。

[0318] 在某些实施方案中,所述多能干细胞是胚胎干细胞。

[0319] 在某些实施方案中,生长因子是包括同源异形盒蛋白,或其功能性变体或其活性片段的蛋白。在某些实施方案中,所述同源异形盒蛋白包括HOXB4蛋白,或其功能性变体或其活性片段。

[0320] 在某些实施方案中,所述分化的造血细胞被作为诸如红细胞、血小板或吞噬细胞的单细胞类型产生。但值得注意的是,当产生单细胞类型时,所述细胞类型可在特定细胞类型的成熟和分化水平上是不同的。例如,分化的红细胞可在成熟水平和细胞年龄水平方面是不同的。不受理论束缚,这种红细胞的不同将是有益的,因为其模拟了体内发现的红细胞。

[0321] 在某些实施方案中,以与血液中发现的分化细胞类型的比例相同的比例混合所述单细胞类型。在某些实施方案中,通过同样的步骤产生多种分化的造血细胞类型。在某些实施方案中,所述吞噬细胞选自:粒细胞、中性白细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞;淋巴细胞或单核细胞。在某些实施方案中,以与血液中发现的分化的造血细胞类型的比例(96%红细胞、1%血小板和3%吞噬细胞)相同的比例产生所述造血细胞类型。在某些实施方案中,输血前将血浆加入分化的造血细胞。在某些实施方案中,在无血浆或基本无血浆的情况下输入浓集细胞(例如浓集红细胞)。

[0322] 在某些实施方案中,依本申请的方法制备的分化的造血细胞是有功能的。在某些实施方案中,依本申请的方法制备的血小板是有功能的。在某些实施方案中,依本申请的方法制备的吞噬细胞是有功能的。在某些实施方案中,依本申请的方法制备的红细胞是有功能的。在某些实施方案中,所述红细胞在输血前表达血红蛋白F。在某些实施方案中,所述红细胞携带氧。在某些实施方案中,所述红细胞的寿命与天然来源的红细胞相同。在某些实施方案中,所述红细胞的寿命是天然来源红细胞的75%。在某些实施方案中,所述红细胞的寿命是天然来源红细胞的50%。在某些实施方案中,所述红细胞的寿命是天然来源红细胞的25%。

[0323] 在某些实施方案中，本发明的方法每100mm培养皿制备 1×10^6 个细胞。在某些实施方案中，每100mm培养皿制备 2×10^6 个细胞。在某些实施方案中，每100mm培养皿制备 3×10^6 个细胞。在某些实施方案中，每100mm培养皿制备 4×10^6 个细胞。在某些实施方案中，每100mm培养皿制备 5×10^6 个细胞。在某些实施方案中，每100mm培养皿制备 6×10^6 个细胞。在某些实施方案中，每100mm培养皿制备 7×10^6 个细胞。在某些实施方案中，每100mm培养皿制备 8×10^6 个细胞。在某些实施方案中，每100mm培养皿制备 9×10^6 个细胞。在某些实施方案中，每100mm培养皿制备 1×10^7 个细胞。在某些实施方案中，每100mm培养皿制备 5×10^7 个细胞。在某些实施方案中，每100mm培养皿制备 1×10^8 个细胞。

[0324] 在某些实施方案中，所述分化步骤通过上面讨论的本领域技术人员熟知的条件实施。在某些实施方案中，所述分化步骤通过专用于将细胞分化成红细胞的方法（见WO2005/118780，通过引用并入本文）实施。在某些实施方案中，所述分化步骤通过专用于将细胞分化成血小板的方法实施。在某些实施方案中，所述分化步骤通过专用于将细胞分化成白细胞的方法实施。

[0325] 本发明可以使用的分化剂包括细胞因子，如 α 干扰素A、 α 干扰素A/D、 β 干扰素、 γ 干扰素、 γ 干扰素诱导蛋白-10、白细胞介素-1、白细胞介素-2、白细胞介素-3、白细胞介素-4、白细胞介素-5、白细胞介素-6、白细胞介素-7、白细胞介素-8、白细胞介素-9、白细胞介素-10、白细胞介素-11、白细胞介素-12、白细胞介素-13、白细胞介素-15、白细胞介素-17、角质化细胞生长因子、瘦素、白血病抑制因子、巨噬细胞集落刺激因子和巨噬细胞炎性蛋白-1 α 。

[0326] 根据本发明的分化剂也包括生长因子，如6Ckine（重组）、激活素A、 α A-干扰素、 α -干扰素、双向调节因子、血管生成素、B-内皮细胞生长因子、 β 动物纤维素、B-干扰素、脑源神经营养因子、C10（重组）、心脏营养素-1、睫状神经营养因子、细胞因子诱导的嗜中性细胞化学引诱物-1、内皮细胞生长添加物、嗜酸细胞活化趋化因子、表皮生长因子、上皮嗜中性细胞激活肽-78、促红细胞生成素、雌激素受体- α 、雌激素受体- β 、成纤维细胞生长因子（酸性/碱性的、肝素稳定的、重组的）、FLT-3/FLK-2配体（FLT-3配体）、 γ 干扰素、胶质细胞系衍生神经营养因子、Gly-His-Lys、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、GRO- α /MGSA、GRO- β 、GRO- γ 、HCC-1、肝素结合性表皮生长因子样生长因子、肝细胞生长因子、调蛋白- α （EGF域）、胰岛素生长因子结合蛋白-1、胰岛素样生长因子结合蛋白-1/IGF-1混合物、胰岛素样生长因子、胰岛素样生长因子II、2.5S神经生长因子（NGF）、7S-NGF、巨噬细胞炎性蛋白-1B、巨噬细胞炎性蛋白-2、巨噬细胞炎性蛋白-3 α 、巨噬细胞炎性蛋白-3B、单核细胞趋化蛋白-1、单核细胞趋化蛋白-2、单核细胞趋化蛋白-3、神经营养因子-3、神经营养因子-4、NGF- β （人或鼠的重组的）、制瘤素M（人或鼠的重组的）、垂体提取物、胎盘生长因子、血小板衍生内皮细胞生长因子、血小板衍生生长因子、多营养因子、rantes、干细胞因子、间质细胞衍生因子1B/前 β 细胞生长刺激因子、血小板生成素、转化生长因子 α 、转化生长因子B1、转化生长因子B2、转化生长因子B3、转化生长因子B5、肿瘤坏死因子（ α 和 β ）和血管内皮生长因子。

[0327] 根据本发明的分化剂也包括激素和激素拮抗剂，如17B-雌二醇、促肾上腺皮质激素、肾上腺髓质激素、 α -促黑素细胞激素、绒毛膜促性腺激素、皮质类固醇结合球蛋白、肾上腺酮、地塞米松、雌三醇、卵泡刺激激素、胃泌素1、胰高血糖素、促性腺素、氢化可的松、胰岛素、胰岛素样生长因子结合蛋白、L-3,3',5'-三碘甲状腺原氨酸、L-3,3',5-三碘甲状腺原

氨酸、瘦素、黄体化激素、L-甲状腺素、退黑激素、MZ-4、催产素、甲状旁腺激素、PEC-60、垂体生长激素、孕酮、催乳素、肠促胰液素、性激素结合球蛋白、促甲状腺激素、促甲状腺激素释放因子、甲状腺结合球蛋白和加压素。

[0328] 此外,本发明的分化剂也包括细胞外基质成分,例如纤维连接蛋白、纤维连接蛋白的蛋白水解片段、层粘连蛋白、凝血酶敏感素、聚集蛋白聚糖和syndezan。

[0329] 本发明的分化剂也包括抗不同因子的抗体,如抗低密度脂蛋白受体抗体、抗孕酮受体内部抗体、抗 α 干扰素受体第2链抗体、抗c-c趋化因子受体1抗体、抗CD118抗体、抗CD119抗体、抗集落刺激因子-1抗体、抗CSF-1受体/c-fins抗体、抗表皮生长因子(AB-3)抗体、抗表皮生长因子受体抗体、抗表皮生长因子受体磷酸特异性抗体、抗表皮生长因子(AB-1)抗体、抗促红细胞生成素受体抗体、抗雌激素受体抗体、抗雌激素受体、C末端抗体、抗雌激素受体 β 抗体、抗成纤维细胞生长因子受体抗体、抗成纤维细胞生长因子碱性抗体、抗 γ 干扰素受体链抗体、抗 γ 干扰素人重组抗体、抗GFR α 1C末端抗体、抗GFR α 2C末端抗体、抗粒细胞集落刺激因子(AB-1)抗体、抗粒细胞集落刺激因子受体抗体、抗胰岛素受体抗体、抗胰岛素样生长因子-1受体抗体、抗白细胞介素-6人重组抗体、抗白细胞介素-1人重组抗体、抗白细胞介素-2人重组抗体、抗瘦素小鼠重组抗体、抗神经生长因子受体抗体、抗p60鸡抗体、抗甲状腺旁腺激素样蛋白抗体、抗血小板衍生生长因子受体抗体、抗血小板衍生生长因子受体 β 抗体、抗血小板衍生生长因子受体 α 抗体、抗孕酮受体抗体、抗视黄酸受体 α 抗体、抗甲状腺激素核受体抗体、抗甲状腺激素核受体 α 1/B β 1抗体、抗转铁蛋白受体/CD71抗体、抗转化生长因子 α 抗体、抗转化生长因子B3抗体、抗肿瘤坏死因子 α 抗体、和抗血管内皮生长因子抗体。

[0330] 本发明还提供上述给潜在的患者受者提供匹配的细胞的分化的造血细胞文库。在某些实施方案中,冷藏所述细胞。相应的,在一个实施方案中,本发明提供进行制药的方法,包括提供至少一种组织相容性抗原纯合的分化造血细胞的制剂的步骤,其中细胞选自包含可用本文公开的方法扩增的人类血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞的文库,其中每一种人类血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞制剂是在人类种群中至少一种MHC等位基因半合子或纯合子,其中所述血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞的文库包括相对于所述细胞文库的其它成员来说就不同的一套MHC等位基因而言每个都是半合子的或纯合子的细胞。如上所述,基因打靶或杂合性消失可用于制备用于衍生血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞的MHC等位基因半合子的或纯合的干细胞。在某些实施方案中,所述文库包括了所有血型的血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞。在某些实施方案中,血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞与患者匹配以保证制备出患者自身血型的分化的造血细胞。在某些实施方案中,血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞对于抗原因子A、B、Rh或它们的任意组合呈阴性。在某些实施方案中,所述分化造血细胞是通用供血者的细胞。例如,0型且Rh阴性的造血细胞能被普遍应用于输血。在某些实施方案中,本发明提供制备用于通用输血的0型、Rh阴性红细胞的方法。

[0331] 在某些实施方案中,分化自血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞的红细胞表达胎儿血红蛋白。使用表达胎儿血红蛋白的红细胞进行输血在治疗镰状细胞性贫血中特别有用。因此,本发明提供治疗镰状细胞性贫血的改进方法。

[0332] 在一个实施方案中,在选定适于患者的特定血管瘤集落形成细胞制剂或非移植血

管瘤细胞制剂后,然后对其进行扩增达到适于患者治疗的合适的量并在将细胞施用于受者前分化得到分化的造血细胞。进行制药的方法还可以包括建立用于分布代售制剂的分配系统,或可包括建立用于销售所述药物制剂的销售团体。

[0333] 在上述任何一种情况中,血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞可直接分化或可被冷冻备用。在某些实施方案中,本发明提供血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞的冷冻培养物,其适于随后的解冻和扩增,也适于分化成造血细胞或内皮细胞谱系。

[0334] 人类血管瘤集落形成细胞或非移植血管瘤细胞可被用于制备实质量的可用于输血的造血细胞类型。例如,可由人类血管瘤集落形成细胞制备实质量的相同或不同种群的RBC和/或血小板。血管瘤集落形成细胞,非移植血管瘤细胞和由其分化成的造血细胞类型可以被建库,正如目前用捐赠的血液制剂建库,并用于输血和其它治疗。将这些产品建成库将有助于缓解关键性的捐赠血液制剂短缺。此外,可以对血管瘤集落形成细胞,非移植血管瘤细胞和衍生产品进行体外遗传操作以提供通用的捐赠血液制剂。

[0335] 因此,在本发明的某些方面提供建立血库的方法。所述建立血库涉及血管瘤集落形成细胞,非移植血管瘤细胞和/或由其制备的造血细胞类型(如RBC,血小板,淋巴细胞等)的衍生和存储(长期或短期)。细胞可被冷藏实现长期保存,或在培养基中保存相对短的时间。细胞能通过与目前可得的血液制剂分型方法一样的方法分型和交叉匹配,且细胞可根据类型被贮存。此外在某些实施方案中,细胞可被修饰并特异性制备A阴性和/或B阴性和/或Rh阴性细胞以制备对于给任何患者输血来说通用或几乎通用的细胞。

[0336] 值得注意的是,血管瘤集落形成细胞,非移植血管瘤细胞和/或分化的造血细胞类型可通过本发明说明书通篇中详述的任何方法产生。

[0337] 在建立血库的方法的某些实施方案中,所述细胞(血管瘤集落形成细胞,非移植血管瘤细胞和/或分化的造血细胞类型)在一个或更多中心机构中产生和贮存。细胞随后可被转移到,例如,医院或治疗机构用于治疗患者。在某些其它实施方案中,细胞被保存在冷冻状态并特异性的解冻,依据医院或其它医疗机构的指令制备以用于输血。这种指令可能是常规指令(如产生并提供特定量的特定单元数量的细胞)。

[0338] 在某些实施方案中,所述方法包括对医院或保险公司关于血库中产品的费用进行记帐的系统。

[0339] 在上述任何一种情况的某些实施方案中,细胞的分配可根据数量、体积或任何用户可用于量化施用于患者的剂量和/或可用于将这种剂量与在标准输血中施用的剂量相比的任何单元。

[0340] 在某些实施方案中,细胞以混合细胞群的形式产生、贮存和施用。例如,所述制剂可包括不同发育阶段的细胞,以及不同的细胞类型。在其它实施方案中,细胞被作为单一细胞类型的基本纯化的制剂产生、贮存和/或施用。

[0341] 在某些实施方案中,对所述细胞的制剂进行防止一种或多种传染性疾病的筛选。筛选可发生在产生或贮存之前或之后。例如,可以筛选细胞制剂来鉴定肝炎、HIV或其它可以通过这些产品传递给受者的血源性传染病。

[0342] 诱导移植植物受者的耐受

[0343] 可将通过本发明的方法产生和扩增的或根据本发明的方法扩增的人类成血成血管细胞用于诱导免疫耐受。免疫耐受是指抑制移植受者的免疫应答,其另外也可以由如向

受者引入非自身的MHC抗原(如移植物和耐受性成血成血管细胞共有的抗原)而引发。因此,耐受是指抑制由特异性供者抗原引发的免疫应答,以区别于使用免疫抑制剂可以引发的广谱免疫抑制。耐受可包括体液的、细胞的或体液和细胞同时的反应。耐受可包括消除和/或灭活预先存在的成熟供者反应性T细胞以及长期(如终生)消除和/或灭活新发育成的供者反应性T细胞。

[0344] 本发明描述的产生和扩增人类成血成血管细胞的方法提供了诱导耐受的许多优势。本发明的方法可导致大量先前难以得到数量的人类成血成血管细胞的产生。大量人类成血成血管细胞使得通过具有较低毒性的预处理方案即可在移植受者内诱导耐受。进一步的,本发明的方法提供人类成血成血管细胞文库的产生,每个都是至少一个人群中的MHC等位基因是半合子的或纯合的,其中所述文库里的每个成员相对于其它成员对于不同的一套MHC等位基因来说是半合子的或纯合的。这样的人类成血成血管细胞文库可用于筛选具有耐受能力的人类成血成血管细胞以使细胞能被筛选以与任何可得到的供者移植物匹配。

[0345] 在先前已显示骨髓移植和随后的造血或混合嵌合现象的建立诱导鼠和人模型中对源于造血干细胞的新组织类型的特异性耐受。造血或混合嵌合现象是指在受者内制备来源于供者或受者干细胞的造血细胞。因此,如果一个受者出现了造血嵌合现象,则所述受者将耐受供者特异性抗原。在许多诱导耐受的方案中,施用于受者的耐受供者细胞被植入所述受者的骨髓。为在受者骨髓内为供者细胞建立造血空间,一些方案需要建立造血空间的步骤(如通过全身照射),且这样的步骤是一般对受者有毒或有害的。但是,如果可以得到非常大量供者耐受细胞,来自啮齿动物模型的证据显示可以完全消除辐射,从而实现造血或混合嵌合现象,其好处是具有更少的毒性预处理措施。因此,例如可以使用特异性非清髓性的受者的调节来实现混合嵌合现象。

[0346] 相应的,由于本文描述的新方法使大量制备人类成血成血管细胞成为可能,本发明提供了使用较不严格的或毒性较低的预处理方案诱导免疫耐受的好处。例如,如果使用足量的耐受供者细胞,则可除去建立造血空间的步骤。

[0347] 相应的,在本发明的某些实施方案中,通过本文描述的方法制备和扩增或扩增的人类成血成血管细胞可用于诱导免疫耐受。虽然不希望受任何机理方面的限制,所述人类成血成血管细胞可通过寻靶至受者骨髓并植入受者骨髓以产生混合嵌合现象来诱导免疫耐受。

[0348] 在某些实施方案中,供者人类成血成血管细胞在将移植物植入或将来自供者的器官、组织或细胞移植入受者患者前被施用于患者受者(如通过静脉注射)。在某些实施方案中,施用人类成血成血管细胞以诱导有需要的患者(如移植物或移植受者)的耐受。相应的,在某些实施方案中,诱导人类受者患者的耐受的方法包括步骤:(a)选择需要移植或细胞治疗的患者;(b)将来源于供者或与供者相匹配的人类成血成血管细胞施用于所述患者,其中所述成血成血管细胞根据本发明的方法产生和扩增或扩增;和(c)将供者器官、组织或细胞移植入受者患者,其中所述成血成血管细胞诱导对供者抗原的耐受。在某些实施方案中,所述患者将接受器官、组织或细胞治疗,其中所述器官、组织或细胞得自供者或供者细胞源。例如,来自供者的成血成血管细胞能被(1)根据本文描述的方法扩增以产生大量供者耐受细胞,和(2)体外扩增和分化以获得随后可被植入受者患者的造血或内皮细胞或组织。在其它实施方案中,所述器官、组织或细胞治疗不是源自供者成血成血管细胞而是和供

者成血成血管细胞匹配。

[0349] 本文使用的术语“匹配”意指HLA分型在供者和受者(如移植植物)之间的相似程度。在一个实施方案中,关于供者成血成血管细胞和移植植物的术语“匹配”意指I类MHC和/或II类MHC等位基因匹配以不发生排斥现象的程度。在另一个实施方案中,关于供者成血成血管细胞和移植植物的术语“匹配”意指I类MHC和/或II类MHC等位基因匹配以使供者移植植物被其匹配的供者成血成血管细胞所耐受的程度。在另一个实施方案中,关于供者成血成血管细胞和移植植物的术语“匹配”意指I类MHC和/或II类MHC等位基因匹配以致不需要免疫抑制的程度。

[0350] 本文描述的诱导对同种异体抗原或同种异体移植耐受的方法可被用在MHC位点或其它位点有一定程度的错配以致引起移植排斥结果的供者和受者之间。相应的,例如,在某些实施方案中,至少一个MHC位点或至少一个介导识别和排斥的其它位点可以是错配的,如次要抗原位点。例如在某些实施方案中,受者和供者的HLA等位基因不匹配并导致产生一个或更多的错配抗原。对于I类和II类MHC位点,供者和受者可以是,例如:对I类匹配而对II类不匹配;对I类不匹配而对II类匹配;对I类不匹配并对II类不匹配;对I类匹配并对II类匹配。在任何这些组合中,其它控制识别和排斥的位点,如次要抗原位点,可以是匹配的或不匹配的。在I类MHC不匹配意味着一个或更多I类MHC位点不匹配,如HLA-A, HLA-B或HLA-C中的一个或更多不匹配。II类MHC不匹配意味着一个或更多II类MHC位点不匹配,如DPA、DPB、DQA、DQB、DRA或DRB中的一个或更多不匹配。例如,成血成血管细胞和移植可在II类HLA-DRB1和DQB1等位基因上匹配。所述成血成血管细胞和移植可还在I类HLA-A、B或C等位基因中的两个或更多上(在DRB1和DQB1等位基因已经匹配的基础上)匹配。

[0351] 在其它实施方案中,所述耐受供者细胞是源自通过本文描述的方法产生和扩增的或扩增的成血成血管细胞。根据所述实施方案,供者人类成血成血管细胞体外分化形成供者造血干细胞,供者造血干细胞随后被施用于受者患者以诱导耐受。在上述任何方法中,供者成血成血管细胞或源自其并施用于受者的造血干细胞通过在所述受者体内诱导耐受为受者患者准备了匹配的移植或移植植物。

[0352] 在其它实施方案中,诱导耐受的方法还包括建立造血空间(促进成血成血管细胞或源自其的造血干细胞的植入)的步骤。在另一个实施方案中,所述诱导耐受的方法还包括暂时抑制供者成血成血管细胞或源自其的造血干细胞的排斥的步骤,其通过例如消除和/或灭活先前存在的供者反应性T细胞实现。为建立造血空间,所述方法可包括照射(如全身的,淋巴的或选择性胸腺照射)。为阻止供者细胞的排斥,所述方法可还包括药物或抗体(如细胞增殖抑制剂、抗代谢物、抗T细胞或抗CD8或抗CD4抗体)的施用,和/或其它促进供者细胞生存和植入和促进混合嵌合现象的治疗(例如,向所述受试者施用间质细胞或生长因子、细胞因子等,或其他消除或灭活受者天然抗体的制剂)。在某些实施方案中,照射、抗体、药物、和/或其它经施用以建立造血空间和/或在受者体内促进供者细胞生存的制剂足够灭活受者体内的胸腺细胞和/T细胞。例如,在将供者成血成血管细胞引入所述受者前,可以实施这样的建立造血空间和/或暂时抑制供者细胞排斥的步骤。另外,所述患者在接受供者耐受细胞的同时,也可接受阻断、消除或灭活T细胞的制剂。

[0353] 在某些实施方案中,可以联合使用造血空间建立方法和免疫抑制方法。例如,受者可接受抗T细胞抗体并伴随低剂量全身照射和/或胸腺照射。在一个实施方案中,所述受者

可接受抗CD4和抗CD8抗体，随后进行温和的非清髓性剂量的全身照射（如可消除一部分受者骨髓而不导致骨髓不可恢复的剂量）和选择性胸腺照射，或可替换的，额外剂量的T细胞灭活抗体或共刺激阻断剂（如CTLA4-Ig和/或抗CD40L抗体）。照射后，可将供者成血成血管细胞或源自其的造血干细胞施用于受者（如通过静脉注射）。在这个实施方案中，促进供者细胞植入的全身照射可被施用大量供者人类成血成血管细胞或源自其的造血干细胞取代。获得如此大量的供者人细胞可通过本文描述的方法完成。

[0354] 在另一个实施方案中，消除或灭活受者T细胞的处理方法有助于阻止移植植物移入的抑制或促进所施用的供者耐受人类成血成血管细胞的存活。在另一个实施方案中，所述方法包括受者患者内供者反应性T细胞克隆排除。例如，患者可接受温和剂量的全身照射，随后施用供者人类成血成血管细胞和T细胞共刺激阻断剂。另外，患者也可接受T细胞共刺激阻断剂和施用大量供者人类成血成血管细胞而不接受照射。

[0355] 在另一个实施方案中，耐受的完成不需要对受者进行清髓处理。在一个实施方案中，受者接受供者人类成血成血管细胞及抗CD40L以便于供者成血成血管细胞的植入。例如，受者接受大量供者成血成血管细胞及抗CD40L单克隆抗体，随后的几天中施加一定剂量的CTLA4-Ig。这样的方法消除了供者反应性T细胞并阻断CD40-CD40L相互作用。本文描述的体外产生和扩增人类成血成血管细胞新方法使产生如此温和耐受的方案具有可行性。

[0356] 受者调节和/或供者反应性T细胞的消除或阻断之后,通过本发明的方法产生的供者耐受人类成血成血管细胞被施用于受者。供者人类成血成血管细胞源自由供者组织或细胞源得到的成血成血管细胞。另外,供者人类成血成血管细胞也得自不同的非供者的并与供者匹配的来源。

[0357] 在某些实施方案中,通过多重给药的方式(如2、3、4或更多重供者细胞给药)施用供者人类成血成血管细胞可诱导受者患者的耐受。相应的,可通过包含多重施用供者耐受细胞的方式诱导耐受,其中对受者进行多重给药在1周或更短的时间范围内进行。

[0358] 在某些实施方案中,本发明的人类成血成血管细胞诱导免疫耐受的能力可通过不同试验模型系统进行评价。例如,在SCID鼠中建立人免疫系统的能力被用于在实验模型中研究人免疫应答。以前的研究已显示,人胎肝和胸腺组织可用于在没有免疫活性的鼠受者内重建功能性人免疫系统。类似的,本发明的人类成血成血管细胞的功能性可使用类似地实验模型系统进行评价。例如,可通过上述实验模型评价人类成血成血管细胞在鼠中建立功能性人免疫系统的方面取代人胎肝的能力。并且,在具有人免疫系统的小鼠中(如人胎肝和胸腺组织用于在SCID鼠体内建立人免疫系统以产生人-SCID鼠),根据上述任何方法,将人“供者”成血成血管细胞(与用于建立人-SCID鼠的胎肝和胸腺组织不匹配)施用于人-SCID鼠,以实现混合嵌合现象。对供者抗原的耐受在随后根据与供者成血成血管细胞匹配的同种异体移植植物向这些动物的植入进行检测。

[0359] 在某些实施方案中，本发明涉及细胞组合物。有效的细胞组合物包括2种成分：第一种细胞类型用于诱导免疫耐受，第二种细胞类型用于再生需要的功能。两种细胞类型都通过本发明的方法产生并得自相同的供者。例如，来自供者的人类成血成血管细胞可被用作耐受供者细胞。来自供者的细胞（如胚胎干细胞、多能干细胞或早期祖细胞或成血成血管细胞）也可用于产生，例如造血细胞或内皮细胞（如本文所述）、诸如少突胶质细胞的神经细胞、干细胞、心肌细胞或心肌细胞前体或成骨细胞及其祖细胞。相应的，供者人类成血成血管

管细胞可用于在受者体内诱导耐受以使受者对来自所述供者成血成血管细胞或来自所述供者胚胎或多能干细胞的细胞或组织具有耐受。

[0360] 在另一个实施方案中,本发明细胞组合的两种细胞成分得自不同来源或供者,其中所述两种来源或供者是匹配的。例如,成血成血管细胞产生于胚胎干细胞来源,而移植植物细胞或组织可得自不同于产生所述人类成血成血管细胞的胚胎干细胞来源的来源。在这些实施方案中,两种来源是匹配的。

[0361] 对于任何本文描述的治疗目的,用作免疫耐受的人类成血成血管细胞或源自其的造血细胞以药物组合物的形式提供,包括在充分无菌环境下制备的等渗赋形剂以用于向人类给药。

[0362] 基因治疗中的成血成血管细胞

[0363] 本发明的其它方面涉及成血成血管细胞、非移植血管瘤细胞、或源自它们的造血细胞或内皮细胞、或由这些细胞依次分化得到的细胞在基因治疗中的用途。本发明的哺乳动物成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞制剂可用于将治疗性基因递送至患者,所述患者的病况适合使用治疗性基因的基因产品进行治疗。成血成血管细胞在递送治疗性基因方面是非常有用的,其中治疗性基因参与或影响血管发生(如在局部缺血的组织中诱导络脉形成的VEGF),血细胞生成(如诱导红细胞产生的促红细胞生成素),血管功能(如诱导血管平滑肌扩增以修复动脉瘤的生长因子)或血细胞功能(如减少出血的凝血因子)或编码如生长激素的分泌性蛋白。基因治疗的方法是本领域已知的。参见实例,Anderson等人的美国专利号5,399,346。Baetge等人的PCT公开文献WO 95/05452描述了用于递送遗传物质的生物相容的胶囊。基因转移至骨髓来源的细胞的方法也曾经被报道过(参见Gordon等人的美国专利号6,410,015)。治疗性基因可以是任何具有临床用途的基因,如编码涉及疾病预防和治疗的基因产物或蛋白的基因,或在疾病预防和治疗中具有细胞调节作用的基因。基因产物可代替患者缺陷或缺失的基因产物,蛋白,或细胞调节作用,因而能够预防或治疗患者的疾病和病况。

[0364] 相应的,本发明还提供向适用于基因治疗的患者递送治疗性基因的方法,包括,选择有需要的患者,修饰成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞制剂以使细胞携带治疗性基因,将修饰后的制剂施用于患者。可用本领域熟知的技术修饰所述制剂。修饰可涉及在哺乳动物成血成血管细胞内插入编码基因产物的DNA或RNA片段,其中所述基因增强成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞的治疗效果。所述基因以这样一种方式插入,以使修饰的成血成血管细胞产生治疗性基因产物或在患者体内具有期望的治疗效果。在一个实施方案中,所述成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞由最初来自患者的细胞制备,例如来自骨髓。所述基因可通过任何基因转移操作插入成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞,例如,裸DNA整合、DNA直接注射、受体介导DNA摄取、逆转录病毒介导转染、病毒介导转染、非病毒转染、脂质体介导的转染、电转移、电穿孔、磷酸钙介导转染、显微注射或脂蛋白体,上述这些都涉及使用基因治疗载体。除逆转录载体外还可以使用其它载体,包括源自DNA病毒和其它RNA病毒的载体。显而易见的,当使用RNA病毒时,所述病毒包括编码期望制剂的RNA,以便使被所述RNA病毒转染的成血成血管细胞能提供编码治疗性基因产物的DNA。将基因导入细胞的方法是本领域熟知的(参见例如Ausube1,同上)。

[0365] 本发明的另一方面,提供容器中或商业包装的人类成血成血管细胞或非移植血管

瘤细胞的纯化制剂,其中所述细胞被修饰而携带治疗性基因,所述容器或商业包装还包括用于说明所述制剂在基因治疗中通过递送治疗性基因而预防和/或治疗疾病的说明书。相应的,本发明还提供商业包装(如试剂盒),其包含本发明的哺乳动物成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞的制剂,所述制剂被修饰以使所述制剂的细胞携带治疗性基因,也包含其治疗患适于基因治疗的疾病的患者的说明书。

[0366] 其它商业应用和方法

[0367] 本发明的某些方面涉及将人类成血成血管细胞和非移植血管瘤细胞扩增至商业数量。在特定实施方案中,人类成血成血管细胞和非移植血管瘤细胞被大规模生产,根据需要储存,并供给医院或临床医师或其它医疗机构。如果患者表现出下述适应症,例如,局部缺血或血管损伤,或需要造血重建,则可及时定购并提供人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞。相应的,本发明涉及产生和扩增人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞以使细胞达到商业规模的方法,包含用所述方法产生的类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞的细胞制剂,以及向医院和临床医师提供(如生产、任选贮存、销售)人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞的方法。而且,成血成血管细胞谱系细胞或非移植血管瘤谱系细胞可在体外产生,可任选贮藏以及售往医院或临床医师。

[0368] 本发明相应的某些方面涉及生产、贮存和分配通过本文公开的方法扩增的成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞的方法。在体外产生和扩增人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞后,可收获人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞,纯化以及任选在治疗患者前贮存。另外,在需要成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞谱系细胞的情况下,人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞在治疗患者前也可在体外进一步分化。因此在某些实施方案中,本发明提供向医院,医疗中心和临床医师供应成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞的方法,其中用本文公开的方法产生的成血成血管细胞,非移植血管瘤细胞,成血成血管细胞谱系细胞或非移植血管瘤谱系细胞被贮存并根据医院、医疗中心或临床医师根据需要定购,并施用于需要成血成血管细胞,非移植血管瘤细胞,成血成血管细胞谱系细胞或非移植血管瘤谱系细胞治疗的患者。在替代性实施方案中,医院、医疗中心或临床医师根据患者的特定数据定购人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞,人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞根据患者的具体情况生产并随后提供给下定单的医院或临床医师。

[0369] 本发明进一步的方面涉及成血成血管细胞,非移植血管瘤细胞,成血成血管细胞谱系细胞和/或非移植血管瘤谱系细胞的文库,其能为可能的患病受者提供匹配的细胞。相应的,在一个实施方案中,本发明提供进行制药的方法,包括提供至少一种组织相容性抗原纯合的成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞制剂的步骤,其中细胞选自包含由可通过本文公开的方法扩增的人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞组成的文库,其中每种成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞制剂对至少一个存在于人类种群的MHC等位基因是半合子的或纯合的,并且其中所述成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞文库包含每个都对相对于细胞文库中其它成员不同的一组MHC等位基因是半合子的或纯合的细胞。如上所述,基因打靶或杂合子丢失可用于产生MHC等位基因半合子的或纯合的用于产生成血成血管细胞的干细胞。在一个实施方案中,在选择了适合患者的特定成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞制剂后,将其扩增至适合于治疗患者的量。所述方法进一步包括使成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞分化以在对受者施用细胞之前得到造血和/或内皮细胞。进行制药的方法也包

括建立分配系统以分配待售制剂或包括建立销售药物制剂的销售团队。

[0370] 本发明的其它方面涉及将本发明的人类成血成血管细胞和非移植血管瘤细胞用作单位的研究工具,所述单位诸如医药、化学或生物公司,医院,学术机构或研究所。例如,人类成血成血管细胞,非移植血管瘤细胞及其衍生细胞(如内皮细胞)可用于筛选和评价血管原性的和抗血管原性的因子,或可用于组织工程。此外,由于通过本文公开的方法获得和扩增的成血成血管细胞和非移植血管瘤细胞具有分化成造血细胞和内皮细胞的双重潜能,其可用于造血作用和血管发生的细胞和分子生物学研究。并且,所述人类成血成血管细胞和非移植血管瘤细胞可用于发现这些在造血作用和血管发生中发挥作用的细胞新靶标、基因、生长因子和分化因子,或用于寻药和发展对可能的毒性剂或保护剂进行筛选检测的技术。

[0371] 在本发明的其它实施方案中,成血成血管细胞和非移植血管瘤细胞谱系细胞(如血细胞)也用于商业。造血细胞可用于产生血液制剂,如可临床和研究应用的血红蛋白和生长因子,

[0372] 本发明也包括从患者身上获得人ES细胞和随后产生和扩增来源于ES细胞人类成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞的方法。这些成血成血管细胞和非移植血管瘤细胞可以贮存。此外,这些成血成血管细胞和非移植血管瘤细胞可用于治疗所述ES细胞所来源的患者或所述患者的亲属。

[0373] 由于上述方法和应用涉及成血成血管细胞或非移植血管瘤细胞的治疗、药物制剂和贮存,本发明还涉及适于这类用途的成血成血管细胞和非移植血管瘤细胞的溶液。本发明相应的涉及适于注射给患者的成血成血管细胞和非移植血管瘤细胞的溶液。所述溶液包含在生理可接受的溶液(如生理盐水、缓冲盐水或平衡盐溶液)中制成的细胞。溶液任选包含有助细胞体内分化的因子。依照骨髓移植运用的技术条件允许的方法,溶液可通过血管给药(如静脉输注)施用于患者。在一些实施方案中,将所述细胞溶液施用于外周静脉,表面外周静脉,或替代性地,通过中心静脉给药(如中心静脉导管)。溶液中细胞的数量是至少约 10^2 且少于约 10^9 。在其它实施方案中,溶液中细胞数量范围是大约 10^1 、 10^2 、 5×10^2 、 10^3 、 5×10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 到大约 5×10^2 、 10^3 、 5×10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、或 10^9 个,其中上限和下限独立选择,并且下限始终小于上限。此外,所述细胞可以用单独给药或多重给药的方式施用。

[0374] 现参考以下的实施例对本发明做更加完整的描述,这些实施例只是说明性的,不被看作是对上述发明的限制。

实施例

[0375] 提供下述实施例以更好地说明要求保护的发明,并不应被解释为限制本发明的范围。对于所提及的具体材料,仅仅是处于说明的目的,并不是为了限制本发明。在不背离本发明范围的前提下,本领域技术人员不必付出创造性劳动就能够开发出等同的手段和试剂。

[0376] 实施例1

[0377] 材料和方法

[0378] 经由成血成血管细胞从hESC产生并扩增类红细胞

[0379] 四种人ESC细胞系用于本研究:H1(National Institutes of Health,登记为WA01)、MA01和MA99(以高级细胞技术衍生)和HuES-3(由Cowan等建立(N. Engl. J. Med. 2004; 350:1353-1356)并获自Harvard Stem Cell Institute)。hESC在完全hESC培养基中生长在丝裂霉素C处理的小鼠胎盘成纤维细胞(MEF)上,直至它们达到80%融合。四步程序用于从hESC产生和扩增类红细胞。

[0380] 第1步,EB形成和成血成血管细胞前体诱导(第[-]3.5-0天):为了诱导成血成血管细胞前体(中胚层)形成,通过在3-4ml含有BMP-4、VEGF165(各自50ng/ml,R&D Systems)和基本FGF(20ng/ml,Invitrogen)的无血清Stemline培养基(Sigma)中每EB培养孔(超低六孔板,Corning)涂布一孔hESC而形成EB。48小时后更换一半培养基,并添加SCF、Tpo和FLT3配体(各自20ng/ml R&D Systems)。

[0381] 第2步,成血成血管细胞扩增(第0-10天):3.5天后,EB被收集并胰蛋白酶分解。通过使细胞通过G21针头三次并经40μm滤器过滤而获得单细胞悬液。在Stemline II培养基中重悬浮之后,细胞与胚胎细胞集落生长培养基(BGM)混合(5×10^5 混合/ml)并涂布于100mm超低皿(10ml/皿)。培养物在BGM中扩增9-10天。发现向BGM添加20ng/ml bFGF和2ug/ml重组tPTD-HOXB4融合蛋白显著增强了造血细胞增殖。已经显示HOXB4蛋白在小鼠和人ESC分化系统两者中促进造血发展(Helgason等人,Blood 1996;87:2740-2749;Kyba等人,Cell 2002; 109:29-37;Wang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2005;102:19081-19086;Bowles等人,Stem Cells 2006;24:1359-1369;Pilat等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2005;102: 12101-12106;Lu等人,Stem Cells Dev.2007;16:547-560)。葡萄样胚胎细胞集落通常在4-6天后通过显微镜可见,并快速向外扩增。添加额外的BGM以保持胚胎细胞密度在 $1-2 \times 10^6$ 个细胞/ml。

[0382] 第3步,类红细胞分化和扩增(第11-20天):在第2步结束时,细胞密度通常很高($\geq 2 \times 10^6$ /ml)。添加等体积的含有3单位/ml Epo(总Epo是6单位/ml)而无HOXB4的BGM以补充现存的BGM。胚胎细胞被进一步扩增和分化为类红细胞,持续额外5天。为了进一步扩增,类红细胞被转移入150mm培养皿,每2-3天添加含有SCF(100ng/ml)、Epo(3单位/ml)和0.5%甲基纤维素的基于Stemline II的培养基。(当细胞达到融合时,将细胞以1:3的比例分开是非常重要的,以允许最大扩增持续额外7天[细胞密度 $2-4 \times 10^6$ /ml])。

[0383] 第4步,类红细胞的富集(第21天):从第3步获得的类红细胞在5体积IMDM+0.5%BSA培养基中稀释,并通过在1000rpm离心5分钟而被收集。细胞沉淀用含有0.5%BSA的IMDM培养基洗涤两次,并在组织培养瓶中涂布过夜以允许非类红细胞(通常是较大的细胞)附着。然后通过快速离心收集非附着细胞。

[0384] 在3.5天EB解离步骤之后涂布于BGM被指示为类红细胞培养第0天。完整程序的时间段是自从在BGM培养基中涂布EB细胞开始19-21天, $5-6 \times 10^6$ MA01 hESC的最终培养物体积为3-4升。观察到,从MA99、H1和HuES-3产生RBC的效率比从MA01 hESC低大约5-6倍(相应地,较低的最终培养物体积)。该程序获得的RBC(在使培养物进一步成熟和去核之后)用于功能鉴定、流式细胞术和血红蛋白分析。使用hESC细胞系MA01(n=6)、H1(n=2)、HuES-3(n=2)和MA99(n=1)进行大规模培养实验。

[0385] 为了进一步成熟,在第18-19天收集的细胞(第3步)用含有0.5%BSA的IMDM稀释(1:5稀释)并在450g离心10分钟。为了针对RBC来部分富集细胞,使用带有细长末端的移液

管去除细胞沉淀的上层白色部分。然后将RBC涂布于含有SCF(100ng/ml)和Epo(3单位/ml)的StemPro-34 SCF(Invitrogen)培养基中,密度为 2×10^6 个细胞/ml。细胞被培养6天,每2天更换培养基,然后转移至含有Epo(3单位/ml)的StemPro-34,持续另外4-5天。这些细胞用于 β -球蛋白链和联苯胺染色分析。

[0386] 类红细胞的FACS分析

[0387] 所有结合抗体和相应同种型对照购自Pharmingen/BD Biosciences,除了RhD和HbF测定(ComDF)购自Chemicon。使用的抗体是HLAabc、Duffy group、CD14、CD15、CD34、CD35、CD36、CD41、CD44、CD45、CD71、CD133、CD184(CXCR4)、GPA、RhD和HbF。类红细胞在19-21天收集并用含有0.1%BSA的PBS洗涤两次,并根据生产商建议的结合抗体浓度在4℃染色30分钟。染色的细胞然后用PBS+0.1%BSA洗涤两次,并用补充了1%低聚甲醛的洗涤缓冲液固定。RhD和HbF测定按照生产商方案进行,包括在染色之前含有0.5%戊二醛/0.1%BSA的PBS预固定处理和含有0.1%Triton X/0.1%BSA的PBS透化步骤。

[0388] 用ComDF试剂在室温下染色15分钟后,细胞用含有0.1%BSA的PBS洗涤一次,并在补充有1%低聚甲醛的洗涤缓冲液中固定。然后使用流式细胞仪(FacScan,Becton Dickinson)分析样品。使用CellQuest程序(Becton Dickinson)分析细胞群。

[0389] 血红蛋白的功能分析

[0390] 在19-21天收集的细胞用0.9%NaCl洗涤3次,然后悬浮于9体积水中,用皂草昔裂解,并通过 $600\times g$ 离心而澄清。然后通过乙酸纤维素电泳分离血红蛋白。使用Hemox-Analyzer,Model B(TCS Scientific Corp.,New Hope,PA)确定氧平衡曲线。使用氮和室内空气获得气相梯度,以两个方向运行曲线。仅使用来自现实可忽略滞后的运行的数据,如前所述(Honig等人,Am.J.Hematol.1990;34:199-203;Honig等人,J.Biol.Chem.1990;265:126-132)。使用Voyager-DE Pro MALDI-TOF质谱仪(Applied Biosystems,Foster City,CA)获得球蛋白质谱,如Lee等所述(Rapid Commun.Mass Spectrom.2005;19:2629-2635)。简言之,使用填充了C18和C4树脂的ZipTips(Millipore,Billerica,MA)来制备溶液,分别用于肽和蛋白的分析。氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)和芥子酸(SA)分别用作肽和蛋白的基质。使用小份(1.3ml)的基质溶液(3-10mg CHCA或SA,于1ml含有0.1%TFA的50%乙腈水溶液中)从ZipTips洗脱肽/蛋白并印迹到MALDI-TOF(基质辅助激光解吸/电离飞行时间)靶。使用配有337nm脉冲氮激光的Voyager-DE PRO质谱仪(Applied Biosystems)分析样品。使用正离子线性模式测量蛋白质量。使用细胞色素c(马的)m/z 12362、去铁肌红蛋白(马的)m/z 16952和组织醛缩酶(兔肌肉)m/z 39212的混合物峰进行外部质量校准。

[0391] RhD和ABO基因分型

[0392] Arce等人(Blood 1993;82:651-655)和Simsek等人(Blood 1995;85:2975-2980)报道了通过PCR对hES细胞系进行RhD基因分型,有较小的调整。因为所有hES细胞保持在MEF上,本发明人设计了一对人DNA特异性PCR引物,其仅扩增人DNA序列。ABO血型的基因分型是基于ABO血型个体中糖基转移酶的多态性而发展的(Yamamoto等人,Nature 1990;345:229-233)。

[0393] hESC衍生的类红细胞的鉴定

[0394] 在不同时间点收集的细胞以低速(<1000rpm)细胞离心涂片在superfrost plus载玻片(VWR)上。载玻片被干燥并用Wright-Giemsa燃料染色5分钟,并用蒸馏水洗涤三次。对

于免疫荧光染色,细胞离心载玻片在4%低聚甲醛中固定15分钟,在1%BSA中孵育30分钟,并在4℃下于1:200 CD235a/血型糖蛋白A(Dako)、CD71(BD Biosciences)一级抗体或人 β -球蛋白链特异性抗体(Santa Cruz Biotechnology)孵育过夜。然后细胞在与若丹明或FITC(Jackson ImmunoResearch Lab)结合的1:200二抗小鼠IgG中孵育1小时。对于总血红蛋白染色,使用上述类红细胞扩增成熟方案分化的不同阶段的细胞被收集并细胞离心涂片于载玻片上。空气干燥的细胞离心涂片样品在100%甲醇中固定10分钟。用PBS洗涤10分钟之后,细胞根据生产商的说明用3'-3-二氨基联苯胺试剂(Sigma)染色。使用Wright-Giemsa,含有血红蛋白的细胞(如所有RBC)染色为棕色,并且细胞核染色为蓝色。

[0395] 对于免疫学血型鉴定,类红细胞在19-21天收集,细胞离心涂片于载玻片上,并用单克隆抗人血型A和B抗体(Virogen, MA)4℃染色过夜。然后载玻片与用若丹明或FITC(Jackson ImmunoResearch Lab)标记的相应二抗孵育30-60分钟。最终洗涤之后,细胞通过荧光显微术检查。

[0396] RT-PCR分析

[0397] 使用上述类红细胞扩增方案的不同阶段分化的类红细胞被收集,通过RT-PCR分析 β -、 γ -和 ϵ -球蛋白基因的表达。简言之,总RNA使用RNAeasy Micro Kit(Qiagen)分离,cDNA库使用SMART cDNA合成试剂盒(Clontech)构建,如先前所报道(Lu等人,Blood 2004;103:4134-4141)。如之前所报道(Qiu等人,Blood 2008;111:2400-2408), β -、 γ -和 ϵ -球蛋白基因的特异性引物被用于放大相应的信息。PCR产物在2.5%琼脂糖凝胶上分离并通过溴化乙锭荧光显现。

[0398] hESC衍生的类红细胞在体外去核

[0399] 胚细胞如上所述被培养直至第7天。

[0400] 第1步:第7天,BGM中胚细胞被过滤并涂布于含有补充剂的Stemline II(Sigma),基于Giarratana等人(Nat.Biotechnol.2005;23:69-74)。这些包括40 μ g/ml肌醇、10 μ g/ml叶酸、160 μ M一硫代甘油、120 μ g/ml运铁蛋白、10 μ g/ml胰岛素、90ng/ml硝酸亚铁、900ng/ml硫酸亚铁、10mg/ml BSA(Stem Cell Technologies)、4mM L-谷氨酰胺(Gibco)和1%青霉素-链霉素(Gibco)。除非另外指出,否则所有试剂来自Sigma。

[0401] 第2步:对于在该培养基中的前7天(第7-14天),细胞在1 μ M氢化可的松、100ng/ml SCF(Invitrogen)、5ng/ml IL3(Invitrogen)和3IU/ml Epo(Cell Sciences)中培养并维持在 1×10^6 个细胞/ml。

[0402] 第3步:从第14天开始,SCF和IL3被中止,Epo被继续。细胞被维持在 2×10^6 个细胞/ml的密度。每几天更换一次培养基。

[0403] 第4步:细胞与人间质干细胞(MSC,Lonza)或OP9小鼠基质细胞在不同时间点(第19至36天)在含有上述补充剂和Epo的Stemline II中共培养。在共培养之前,MS在MSC生长培养基(MSCGM,Lonza)中扩增,而OP9细胞在含有20%FBS(Atlas)、4mM L-谷氨酰胺和1%青霉素-链霉素(Gibco)的 α -MEM(Invitrogen)中扩增。

[0404] 细胞尺寸的统计学分析

[0405] 使用Scion Image在去核方案中测量细胞离心涂片的Wright-Giemsa染色载玻片上细胞和细胞核的面积。细胞质的面积被计算为总细胞面积与细胞核面积之差和核质比(N/C)。直径根据细胞核面积计算。每个时间点的直径和N/C之间的差异通过方差分析

(ANOVA)、随后Holm's检验来测量。数据表示为平均值+/-标准偏差,显著性至少P<0.05。

[0406] 实施例2

[0407] hESC分化为血细胞

[0408] 胚细胞(BC)如之前所述从hESC产生(Lu等人,Nat.Methods 2007;4:501-509)。采用四步方案使BC分化为类红细胞系,包括[1]从未分化hESC形成EB,[2]BC形成和扩增,[3]类红细胞分化和扩增为大量红细胞群,和[4]富集红细胞。早期EB从在补充了形态发生素和早期造血细胞因子组合的无血清培养基中培养的hESC产生。然后解离EB,单个细胞涂布于无血清半固体胚细胞集落生长培养基(BGM)以便BC的生长和扩增。葡萄样胚细胞集落在3天开始出现,并从第4天开始快速扩增。然后通过持续几天添加BGM和Epo而诱导BC增殖和分化为红细胞。为了进一步扩增类红细胞,持续一周每2天或3天添加含有SCF、Epo和甲基纤维素的基于Stemline II的培养基。然后细胞在添加了BSA的IMDM中稀释,通过快速离心收集并涂布于组织培养瓶中过夜以允许非类红细胞附着。收集剩余的非附着细胞(代表了超过95%的类红细胞)(图1A、1B、1C和1D)。使用该优化的(19-21天)扩增和分化方案,在BGM培养基中添加bFGF(20ng/ml)和HOXB4蛋白(2μg/ml), $3.86 \pm 1.19 \times 10^{10}$ 个(平均值±SD,n=6)RBC从MA01 hESC($\approx 1.2 \times 10^7$ 个细胞)的一个6孔板产生。RBC也以高效率从H1(n=2)、HuES-3(n=2)和MA99(n=1)hESC产生,但是收率比从MA01 hESC获得的低5-6倍。发明人发现,hESC的品质是高效产生RBC的最重要因素;高品质hESC(即,应该包括如下集落的hESC培养物:在显微镜下发现具有紧密边缘,最小的分化迹象,约80%融合但不彼此接触;以1:3的调整速率生长分裂,在3-5天达到融合;对几乎每个细胞的多能标志物染色呈阳性;以及在重涂布之后24小时形成均一的EB)通常产生高数目的EB细胞(例如, 2×10^6 个高品质hESC将在3.5天后产生 $\approx 2-3 \times 10^6$ 个EB细胞)。还注意,分化和扩增培养基中0.2-0.5%甲基纤维素的存在防止细胞聚集,导致增强的扩增。

[0409] 实施例3

[0410] hESC衍生的RBC的鉴定

[0411] 形态学上,使用上述(19-21天)方案获得的RBC被去核(>95%)并明显大于平均直径大约10μm的最终红细胞。Giemsa-Wright染色显示,细胞质中血红蛋白丰富(图1C和1D)。细胞身份通过免疫学鉴定来确认(表1和图1F)。超过65%的细胞表达了胎儿血红蛋白(HbF),>75%的细胞是CD71阳性,并且30%的细胞表达了CD235a,而大部分细胞没有表达髓单核细胞或巨核细胞抗原(所有细胞是CD14阴性,而0.4%的细胞表达CD15;8.6%的细胞表达CD41)和祖细胞抗原(0.3%细胞是CD34阳性;10%细胞表达CD35,且5%细胞是CD36阳性)(表1)。发明人之前显示,BC表达趋化因子受体CXCR413。然而,发明人未检测hESC衍生的RBC表面CXCR4或CD133的表达,这与从脐带血祖细胞体外扩增的类红细胞的结果一致(Giarratana等人,Nat.Biotechnol.2005;23:69-74;Miharada等人,Nat.Biotechnol.2006;24:1255-1256)。有趣的是,很少或没有细胞表达HLA(<5%)或Duffy(0%)群抗原,对于从hESC衍生的CD34+CD38-造血祖细胞也发现了这一结果(Lu等人,Blood 2004;103:4134-4141)。

[0412] 质谱分析显示,在第19-21天从MA01和H1 hESC获得的RBC中发现的主要球蛋白类型包括胚胎ζ-和ε-链和胎儿G γ -链(图1E)。还存在大量的α-链,但是没有检测到A γ -或成年β-球蛋白链。然而,这些结果证明,这些细胞中血红蛋白合成对应于胚胎和早期胎儿发育

阶段，并且与最近报道一致，最近报道显示，甚至从hESC衍生的最终类红细胞共表达高水平的胚胎和胎儿球蛋白，很少或没有成年球蛋白 (Lu等人, Blood 2004;103:4134–4141; Chang等人, Blood 2006;108:1515–1523; Qiu等人, Blood 2008;111:2400–2408; Lu等人, Stem Cells Dev. 2007;16:547–560)。

[0413] 实施例4

[0414] 功能分析

[0415] 在六个单独实验中，相对于正常成年RBC的氧平衡曲线，hESC衍生的类红细胞(第19–21天培养物)的氧平衡曲线非常类似(图2A)或者在一定程度上右移。图2A中说明的氧平衡曲线具有双相外观。在氧饱和的低端，其曲线至正常的左侧，并且形状是双曲线(箭)。在其中点，两条曲线实际上相同，在较高的饱和水平，ESC衍生的类红细胞的曲线再次略微向正常的左侧移位(箭头)。希尔系数也类似于正常对照(图2C)。ESC衍生的类红细胞显示在生理和较高pH值下相当的Bohr效应，但是在较低pH下较小的改变(图2B)。这些细胞对2,3-二磷酸甘油酸(2,3-DPG)缺失的相应显著小于正常对照(图2C)，与已知Hb F和2,3-DPG之间相互作用的缺乏一致(Maurer等人, Nature 1970;227:388–390)。这些结果说明，hESC衍生的RBC具有与正常成年红细胞相当的携氧性质。

[0416] 实施例5

[0417] 从hESC产生RhD(-) RBC

[0418] O/RhD(-) RBC的生产将明显帮助预防当输注至RhD(-)错配患者时的异源免疫。西方国家对万能供体RBC(0-)的迫切需求大于亚洲国家，例如韩国、日本和中国，在这些国家RhD(-)型较不流行(分别是<0.5%与15%)。PCR的基因型分析显示，在研究的20种hESC细胞系中仅两个，MA99和MA133，是RhD(-)(图3A)。来自19–21天培养物的类红细胞被用于FACS和免疫学分析。FACS分析说明，从MA01产生的RBC在其表面表达RhD抗原，而衍生自MA99的细胞缺乏RhD抗原的表达(图3D)，证实了基因组DNA PCR分析的结果(图3A)。使用针对A和B抗原的单克隆抗体的免疫细胞化学分析显示，大约5%的从MA01细胞产生的RBC表达A抗原而不是B抗原(图3E)，说明MA01细胞具有A(+)表型；约5%的衍生自MA99细胞的RBC表达B抗原而不是A抗原(图3E)，表明MA99细胞具有B(-)表型，而衍生自WA01细胞的RBC既不表达A抗原也不表达B抗原，证实WA01细胞是O型，与基因组PCR分析的结果一致(图3B和3C)。然而，值得注意的是，不是所有的类红细胞都表达A抗原或B抗原，这可能反映细胞的早期发育阶段(Wada等人, Blood 1990;75:505–511; Hosoi等人, Transfusion 2003;43:65–71)。

[0419] 实施例6

[0420] hESC衍生的类红细胞体外去核和成熟

[0421] 重要的科学和临床问题是hESC衍生的类红细胞是否可以在体外成熟以产生去核红细胞。为了考察这个问题，研究了几种不同的策略和培养条件。发现Giarratana等(Nat. Biotechnol. 2005;23:69–74)报道的造血干细胞扩增培养基+补充剂和细胞因子支持hESC衍生的类红细胞以比其他测试条件显著更高的效率生长、扩增、成熟和去核。无基质层的该条件下培养的胚细胞导致10–30%去核，而在MSC基质细胞上的培养导致大约30%去核，并且OP9基质细胞层进一步增强了去核过程。当类红细胞从非基质五周培养物转移至OP9基质层时，大约30–65%类红细胞($40 \pm 17\%$ [平均值±SD, n=4])被去核，并从第36–42天开始共培养(图4C和4E)。去核的红细胞(图4C和4E)显示与来自正常人血液的成熟RBC类

似的染色模式和尺寸(图4D和4F)。这些成红血细胞衍生自使用BD Matrigel系统无MEF生长的hESC。保持在非基质条件下的成红血细胞(未转移至MSC或OP9)可以去核10–30%的事实表明,去核可以完全无饲养层而被实现。

[0422] 使用hESC细胞系H1(n=3)、MA01(n=2)和huES-3(n=1)进行总共六个实验,所有都表现出不同水平的去核和30–50倍的扩增。与非基质条件相比,基质细胞,特别是OP9,能够在长期培养之后增强细胞存活。

[0423] 为了进一步考察与去核相关的事件,示例了与红细胞成熟过程相关的多个特征。发现在去核发生之前,细胞尺寸和核质(N/C)比逐渐减小。在转移至OP9基质层之前,这些细胞的尺寸和N/C显著减小,直径从第8天的18.3 μm 减小至第27天的12.9 μm (有核细胞)(p<0.001)和7.5 μm (去核细胞),并且N/C比从第8天的0.82减小至第27天的0.30(p<0.001,图4A和4B),表明在该过程中明显的细胞核浓缩。Wright-Giemsa染色说明从蓝色到紫色到粉色染色的逐步进展,表明从原红细胞至中幼红细胞至晚幼红细胞的转变。这些细胞在第8天表现出高水平的CD71(一种早幼红细胞标志物),并且它们的表达随时间降低;而它们在开始显示出低至可忽略水平的CD235a(血型糖蛋白A)蛋白(一种成熟红细胞标志物),但它们的表达随它们的成熟而急剧降低(图5A和图6)。联苯胺染色还显示出这些细胞中血红蛋白的逐渐累积和细胞尺寸随时间的减小(图5C)。

[0424] 初步试验证实,未成熟的去核类红细胞主要表达胚胎 ζ -和 ϵ -球蛋白链和胎儿 γ -球蛋白链(图1E)。尽管这些细胞中存在大量 α -链,但是未检测到成年 β -球蛋白链。随后进行研究以确定类红细胞在体外进一步分化和成熟后是否具有表达成年最终 β -球蛋白链的能力。球蛋白链特异性免疫荧光分析显示,细胞增加了成年 β -球蛋白链的表达(第7天为0%,图5B)至体外培养28天后约16.37%(一些细胞表达了非常高水平的 β -球蛋白链,图5B和图7)。这些细胞中 β -球蛋白链基因的表达通过球蛋白链特异性RT-PCR分析来确认(Qiu等人,Blood 2008;111:2400–2408)(图8)。与最近报道一致(Zambidis等人,[摘要].6th ISSCR Annual Meeting 2008;357),本发明人还发现,所有细胞表达胎儿 γ -球蛋白链而不论 β -球蛋白链表达状态。

[0425] 表1.通过FACS分析鉴定hESC衍生的类红细胞

抗体	阳性范围 (% , n = 5)	平均 (平均值± SE)
HbF	40.03 – 96.60	66.79 ± 9.88
CD47	95.00 – 99.21	97.51 ± 0.85
GPA	21.31 – 41.93	30.10 ± 3.79
CD71	59.40 – 83.39	76.07 ± 4.33
CD44	18.61 – 44.56	30.72 ± 4.55
CD45	10.06 – 40.21	22.23 ± 5.45
CD41	4.44 – 20.16	8.61 ± 2.98
CD14	0	0
CD15	0.20 – 0.60	0.38 ± 0.08
CD34	0 – 1.62	0.34 ± 0.32
CD35	5.82 – 17.46	9.79 ± 2.00
CD36	1.08 – 13.30	4.99 ± 2.14
CD133	0	0
CD184 (CXCR-4)	0	0
Duffy	0	0
HLAabc	0.75 – 6.25	4.15 ± 1.14

[0426]

[0427] 实施例7

[0428] RhD和ABO基因分型

[0429] Arce等和Simsek等报道了通过PCR对hES细胞系进行RhD分型(Arce等人,Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative individuals.Blood1993;82:651-655;Simsek等人,Rapid Rh D genotyping by polymerase chain reaction-based amplification of DNA.Blood1995;85:2975-2980),有较小的调整。因为所有hES细胞保持在MEF上,发明人设计了一对仅扩增人DNA序列的人DNA特异性PCR引物,PCR引物是:RhD-F,5'-tgaccctgagatggctgtcacc-3'(SEQ ID NO:34)和RhD-R,5'-agcaacgataccagttgtct-3'(SEQ ID NO:35),其扩增外显子4和5之间的内含子4,并且使用来自RhD阴性个体的DNA仅产生1,200bp片段,而在RhD阳性个体中,产生100bp和1,200bp(其由于扩增片段尺寸是弱的)。该策略已经被证实完全符合血清学确定的表型(Simsek等人,Blood 1995)。简言之,使用QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA)从hES细胞分离基因组DNA,并且PCR扩增使用每50μl反应200ng DNA。PCR条件:94°C 45sec, 60°C 1.5min, 和72°C 2.0min, 35个循环, 最后在72°C延伸7min。PCR产物在1.2%琼脂糖凝胶上分离,并通过溴化乙锭染色来显示。来自RhD阳性个体和阴性个体的正常人血的单核细胞的DNA被用作阳性对照和阴性对照。

[0430] ABO血型的基因分型是基于ABO血型个体中糖基转移酶的多态性而发展的(Yamamoto等人,Molecular genetic basis of the histo-blood group AB0 system.Nature 1990;345:229-233.)。首先,设计人特异性PCR引物来扩增围绕核苷酸258的DNA片段,其中O等位基因在该位点具有一个核苷酸(G)缺失,并且产生限制酶Kpn I的切割位点,但是消除了限制酶Bst EII的切割位点。然后使PCR产物经受Kpn I和Bst EII的限制酶消化:O/O基因型的PCR产物仅可通过Kpn I消化以产生两个新的短片段,但是对Bst EII消化有抗性;而A/A、B/B和A/B基因型的PCR产物对Kpn I消化有抗性,并且仅由Bst EII消化;而A/O或B/O基因型的PCR产物可以通过两种酶部分消化。因此,第一次PCR扩增和限制酶消化能够区分O血型和非O血型。基于这些结果,第二组PCR引物被设计为扩增核苷酸700区域,其中A和O等位基因都含有可被Msp I消化的G核苷酸,而B等位基因在该位置具有可产生Alu I切割位点的A核苷酸。在糖基转移酶的两个诊断位置的两次单独PCR扩增以及四次限制酶消化的组合可以清楚区分A、B或O等位基因。简言之,使用扩增核苷酸258区域的一组引物进行PCR反应(引物:O-型-F,5'-gccgtgtgccagaggcgcatgt-3'(SEQ ID NO:36),O-型-R,5'-aatgtccacagtcaactcgccac-3'(SEQ ID NO:37),PCR产物,268bp),PCR产物通过Qiagen Kit纯化,通过Kpn I和Bst EII消化,并在2%琼脂糖凝胶上分离,并通过溴化乙锭染色显示。对于O/O基因型,Kpn I产生174bp和93bp片段,而Bst EII不切割PCR产物;对于A/A、B/B和A/B基因型,Kpn I不切割PCR产物,Bst EII产生174bp和93bp片段;对于A/O或B/O基因型,Kpn I和Bst EII都不切割PCR产物并产生267bp(原始)、174bp和93bp片段。使用扩增核苷酸700区域的引物进行第二次PCR扩增(引物:AB-型-F,5'-tgctggaggtgcgcgcctacaag-3'(SEQ ID NO:38),AB-型-R,5'-gtagaaatcgccctcgcccttg-3'(SEQ ID NO:39),PCR产物,278bp),PCR产物被纯化,通过Alu I和Msp I消化,并如上分离。对于B/B基因型,Alu I消化产生187bp+91bp片段,并且Msp I消化产生206bp+47bp。对于A/A、A/O和O/O基因型,Alu I不切割PCR产物,Msp I产生187bp+47bp片段。对于A/B或B/O基因型,Alu I产生278bp(无切割)

+187bp+91bp片段；并且MspI产生206bp和187bp+47bp片段。

[0431] 实施例8

[0432] 材料和方法

[0433] hESC的培养

[0434] 使用hESC细胞系WA01(H1)、HUES3和MA01并在先前描述过的条件下⁽⁶⁾维持。简而言之，hESC在完全hESC培养基中在经过丝裂霉素C处理的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)上生长。每3-5天使用含0.05%胰蛋白酶的0.53mM EDTA培养基对所述hESC传代一次，直至生长至汇合。对于无饲养细胞的培养，使细胞在含有hESC合格基质胶基质(hESC-qualified Matrigel matrix)(BD Biosciences)的完全Modified TeSR™ 1(mTeSR™1)培养基(Stem Cell Technologies, Inc)上生长，该培养基基于Ludwig等人^(7,8)的配方配制。按照生产厂商建议的说明书维持细胞。简而言之，对细胞进行传代时直至约90%汇合，通常每5-7天以1:3至1:6的比例分份。将细胞用分散酶(disperse)(1mg/ml, BD Biosciences)处理并在37℃培养3-5分钟以使集落脱离。将集落用DMEM/F12(Mediatech)洗涤以除去分散酶溶液。为使集落从组织培养塑料上脱离，使用DMEM/F12包被各孔并轻刮直至所有集落均脱离为止。然后将集落转移至锥形管中，用DMEM/F12洗涤各孔并将细胞混合以收集孔中任何残留的细胞。将细胞以1000rpm离心5分钟。然后在mTeSR™1培养基中重悬细胞沉淀，并转移至被基质胶包被的六孔板中，每孔置2ml的mTeSR™1培养基。将细胞置于37℃和5%CO₂的条件下培养并每天补充mTeSR™1培养基。

[0435] 免疫荧光细胞化学分析

[0436] 使用免疫荧光测定无饲养细胞的hESC集落，以测定Oct-4和Tra-1-60的表达。将细胞使用4%多聚甲醛(PFA)固定，用PBS洗涤，并用含5%正常山羊血清(Vector Labs)、1%BSA(Sigma)和0.2%Triton-X-100(Sigma)的PBS在室温下封闭30分钟。将细胞在含抗Oct-4一抗(Santa Cruz Biotechnology)或抗Tra-1-60一抗(Millipore/Chemicon)的封闭液中在4℃培养过夜，用PBS洗涤，再在含生物素偶联的二抗(Jackson ImmunoResearch Labs)的封闭液中室温下培养45分钟。在再次洗涤后，将细胞与Alexa 954偶联的链亲和素(Invitrogen/Molecular probes)一起在室温下培养15分钟，然后在PBS中进行最后较长时间的洗涤。使用含DAPI的Prolong Gold(Invitrogen/Molecular Probes)固定细胞。

[0437] 由hESC分化为成血成血管细胞

[0438] 为了诱导在MEF中培养的hESC分化为成血成血管细胞，使用0.05%胰蛋白酶消化来解离达到80-90%汇合度的培养皿。为了使无饲养细胞的hESC分化为成血成血管细胞，按照上文所述的步骤使达到85-90%汇合度的细胞从基质胶上脱离。将上述两种条件获得的细胞均置于含有干细胞系II(Sigma)培养基的Ultra-Low培养皿(Corning, NY)中，如前所述并加入不同剂量的BMP-4、VEGF和bFGF⁽²⁾。在48小时后，根据实验条件，使用含有同样细胞因子的培养基或添加有SCF、FLT3配体(FL)和Tpo(20ng/ml, R&D System)的相同培养基置换培养皿中一半的培养基。在3.5天后，收集EB并用0.05%的胰蛋白酶进行解离。使细胞通过22号枕头和40μm的细胞滤器，从而获得单细胞悬液，然后离心收集并在50-100μl的干细胞系II培养基中重悬。如前人所述(2)，将(0.75×10^5 至 1×10^5 个)细胞与2.5ml的胚细胞集落生长培养基(BGM)相混合，铺板于Ultra-Low培养皿中并在37℃进行培养。在铺板后3-4天时观察由MEF培养条件和无饲养细胞条件下的hESC衍生的胚细胞集落，随后很快进行快速扩增。

在本研究中,胚细胞(BC)被定义为在第6天时从胚细胞集落获得的细胞。

[0439] 成血成血管细胞前体的富集

[0440] 选择较强的BC前体表面标记物CD31、CD34、KDR、CXCR-4、CD133、ACE、PCLP1、PDGFR α 、Tie-2、Nrp-2、Tpo-R和bFGFR-1用于细胞的富集。使用的所有抗体均为小鼠单克隆IgG同种型,它们是:CD31和CD34(Dako Cytomation)、KDR和Tpo-R(R&D Systems, Inc.)、CXCR-4(Abcam Inc.)、Nrp-2、ACE、PCLP1和PDGFR α (Santa Cruz Biotechnology)、Tie-2(Cell Signaling Technology, Inc.)、bFGFR-1(Zymed Laboratories),以及CD133(Miltenyi Biotech)。用EasySep“Do-it-Yourself”Selection Kit(Stem Cell Technologies)制备各种混合抗体。将来源于EB的细胞悬液以1200rpm离心4分钟并在含2%FBS/1mM EDTA的PBS中以 $1-2 \times 10^6$ 个细胞/100 μ l的浓度重悬。将细胞与不同的混合抗体相混合并在室温下培养15分钟,然后再与EasySep纳米颗粒在室温下培养10分钟。将含有细胞的小管置于磁力装置上,倒去上清液即可分离筛选结果呈阳性的细胞。将经抗体筛选成阳性的细胞与BGM相混合(1×10^5 个细胞/2.5ml BGM),然后铺板使得胚细胞集落发育。

[0441] 实时RT-PCR和数据分析

[0442] 使用RNeasy Micro Kits(Qiagen),根据厂商的使用手册,从EB或未分化的hESC中提取总RNA。使用BD SMART PCR cDNA Synthesis Kit(BD Biosciences),按照说明书合成cDNA。使用FullVelocity SYBR Green QPCR Master Mix(Stratagene)试剂盒进行实时RT-PCR(qRT-PCR)。反应设置三个平行样,每个反应体系中的组分如下:50ng模板、0.2 μ l的每种引物和1X Master混合物。所用引物的基因特异性序列列于表2,所有引物的退火温度均为55°C。使用Stratagene Mx3005P和MxPro 3.0版软件进行扩增和数据的获取。使用下述循环条件:95°C × 10分钟,(95°C × 30秒,55°C × 1分钟,72°C × 30秒) × 40个循环,最后95°C × 1分钟,55°C × 30秒,和95°C × 30秒。使用 $\Delta\Delta CT$ 方法⁽⁹⁾,基于循环阈值(CT)对 β -肌动蛋白(ΔCT)进行标准化,从而对每种靶基因的相对量进行定量分析。使用实时定量PCR和 $2(\Delta\Delta C(T))$ 方法⁽⁹⁾,分析了相对基因表达,在实验中每种检测基因的 ΔCT 都与未分化hESC对照样本中该每种基因的平均 ΔCT 进行比较($\Delta\Delta CT$)。然后将表达的变化倍数计算为 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。使用下述公式将降低的倍数差异数据转化为线性的“表达倍数变化”值:线性表达倍数变化 $=-(1/\text{表达倍数变化})$ 。

[0443] 统计学分析

[0444] 将所有数据表示为平均值±SEM。使用GraphPad Prism第4版软件(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)通过不成对Student's t-检验进行组内比较。p<0.05时认为具有统计学显著性。

[0445] 实施例9

[0446] BMP-4和VEGF均是成血成血管细胞发育中必需的

[0447] 用于诱导hESC分化为成血成血管细胞和造血细胞谱系的无血清培养基如前人所述^(2,10)。使用了BMP-4、VEGF和早期造血细胞因子的混合物,但是并没有检验每种因子的绝对需要量和最优浓度。为了降低产生成血成血管细胞所必需的财力和人力以便用于未来的研究和临床用途,本发明人特意检测了VEGF、BMP和三种造血细胞因子(TPO、FL和SCF)对于hESC发育为胚细胞集落的影响和所必需的最低浓度。发现BMP-4是胚细胞集落在无血清条件下发育所绝对必需的。在EB形成过程中,如果在培养基中未添加BMP-4,则不会获得胚细

胞集落，并且BMP-4对于从hESC形成胚细胞集落有明显的剂量依赖效应(图9A)。此外，不能用BMP家族中的其他成员替代BMP-4。BMP-2和BMP-7无论是单独使用还是组合使用，均不能促进BC发育。此外，在含有BMP-4的EB培养基中添加BMP-2和BMP-7时，发现它们对于胚细胞集落的发育没有效果(10ng/ml)或呈现抑制效果(20ng/ml)(图9B)。然而，在胚细胞集落生长培养基(BGM)中加入BMP-4和BMP-2和/或BMP-7都对于胚细胞集落的发育没有任何效果，这表明BMP-4仅能在中胚层/成血成血管细胞的形成阶段起促进作用，而对于BC的生长和扩增没有作用。类似地，当从EB形成培养基中除去VEGF₁₆₅时，不会发育为胚细胞集落。发现VEGF₁₆₅以剂量依赖的方式促进胚细胞集落的形成(图9C)。VEGF₁₂₁是一种仅结合KDR和FLT1受体的VEGF成员亚型(11)，它可用于替代VEGF₁₆₅而促进hESC发育为胚细胞集落；当在EB培养基中加入50ng/ml(该浓度是无血清条件下的最佳浓度)的VEGF₁₆₅或VEGF₁₂₁时，发育得到的胚细胞集落的数量基本相同(68±5对67±12)。然而，与BMP-4不同的是，如果在BGM中缺少VEGF，也不会发育为胚细胞集落，这表明VEGF在中胚层/成血成血管细胞的形成的早期阶段和BC的生长和扩增阶段均起了关键作用。

[0448] 在本发明人最初的报道⁽²⁾中，为了进一步促进早期造血祖细胞的生长和扩增，在将hESC铺板于EB培养基中48小时后，加入了TPO、FL和SCF。在本文中，检测了TPO、FL和SCF是否在hESC形成中胚层/成血成血管细胞谱系的阶段起作用。通过下述方式形成EB：将hESC铺于含50ng/ml的BMP-4和VEGF的干细胞系II培养基中，在48小时后分为两孔：向其中一孔中加入20ng/ml的TPO、FL和SCF，另一孔中不加入上述因子，然后继续培养EB 36小时。然后收集EB并获得单细胞悬液，铺板以使其形成胚细胞集落。我们的结果显示：在EB形成阶段，TPO、FL和SCF对于胚细胞集落的形成没有效果，使用TPO、FL和SCF处理的EB和没有使用TPO、FL和SCF处理的EB相比较，每 1×10^5 个细胞发育出的胚细胞集落的数量分别为242±16对287±33。

[0449] 实施例10

[0450] bFGF能够促进由hESC向成血成血管细胞的生长，但是并不够可靠

[0451] 先前的研究表明，在早期分化阶段，添加bFGF能够促进鼠类和人类ESC向造血细胞的发育^(12, 13, 14, 5)。因此，我们研究了在EB分化阶段加入bFGF是否能够促进hESC发育为胚细胞集落。在EB形成阶段加入bFGF对于胚细胞集落的发育没有作用，而且实际上，当剂量较高(40ng/ml)时，还会抑制多种hESC细胞系形成胚细胞集落(图10A和图11)。于此相反，在BGM中加入bFGF能够显著增强胚细胞集落的发育(图10A, 图11)。与未添加bFGF的BGM相比，添加了bFGF的BGM中获得的胚细胞集落的数量($p < 0.001$)和BC的总数量均显著提高。当bFGF在BGM中的含量为最佳剂量(20ng/ml)时，形成的胚细胞集落更大而且更健康，我们在一块高质量的WA01 hESC(约 1.2×10^7 个细胞)的六孔板上，在生长6天以后稳定地收获了约 1×10^8 个BC细胞，这比未添加bFGF的BGM培养基中所获得的产率提高了8±1倍。

[0452] 为了研究在添加或不添加bFGF时产生的BC细胞的谱系分化潜能，如前所述⁽²⁾地将等数量的混合的BC铺板以使其向造血细胞和内皮细胞谱系分化。在添加(20ng/ml) bFGF和未添加bFGF的BGM所衍生的BC中，所形成的造血细胞CFU数量分别为129±9和86±22CFU/ 10^4 个BC。此外，两组中形成的CFU中，不同CFU(CFU-mix、CFU-G、CFU-M和CFU-E)的发育没有差异(数据未示出)。对于内皮细胞谱系分化，在添加(20ng/ml) bFGF的BGM比未添加bFGF的BGM中所衍生的BC分化为内皮细胞的比例更高，分别为62±3%对55±3%。由两种来源获得

的内皮细胞在铺于基质胶之后均能有效地形成毛细血管状结构(图10B和2C)。这些结构表明bFGF能够促进BC的生长,但不能导致有优先性的谱系分化。

[0453] 实施例11

[0454] 使无饲养细胞条件下培养的hESC稳定地产生成血成血管细胞

[0455] 据报道,在MEF饲养细胞上培养的hESC含有非人类唾液酸——N-羟乙基神经氨酸(Neu5Gc)^(15, 7, 8),并且这种动物来源的Neu5Gc会对人类补体产生潜在的免疫原性反应。在MEF饲养细胞层上培养hESC将使得无法完全清除动物Neu5Gc,从而导致在这样的条件下培养的hESC细胞系所产生的成血成血管细胞在用于潜在临床应用时会产生问题。因此,我们研究了在不使用MEF饲养细胞的条件下培养的hESC能否产生成血成血管细胞。如“材料和方法”一节中所述,使用经过hESC合格基质胶基质包被的培养板,将三种hESC细胞系用分散酶传代并在mTeSR培养基中培养。通过免疫荧光染色,根据Oct-4和Tra-1-60抗原的表达以及集落的形态确认未分化状态(图12A-12H)。收集这些细胞并用于在上述优化条件下的BC发育。值得注意的是,在铺板的EB细胞数量相同的情况下,无饲养细胞条件下培养的hESC与MEF饲养细胞上培养的hESC相比,观察到显著提高的BC数量(图12I, p<0.05)。对于所测试的全部三种hESC细胞系WA01、MA01和HUES-3,均观察到类似的上述结果(数据未示出)。

[0456] 实施例12

[0457] BMP-4和VEGF对成血成血管细胞发育的作用的潜在机理

[0458] 为了探求BMP-4和VEGF对hESC发育为成血成血管细胞的作用的潜在机理,本发明人比较了在存在和不存在BMP-4或VEGF或者两者的条件下,在干细胞系II培养基中形成3.5天时间的EB中,与成血成血管细胞发育相关的各种基因的表达。提高实时RT-PCR(qRT-PCR)来分析基因表达,并与它们在未分化hESC中的水平进行比较。不添加任何因子条件下形成的EB与未分化的hESC相比,一种的标记物OCT-4的表达水平更高。在EB培养基中添加VEGF导致中等程度的OCT-4表达的下调;而加入BMP-4或BMP-4+VEGF则导致OCT-4表达水平的显著下降(p<0.0005,图13)。BMP-4和VEGF对于OCT-4表达没有加和的效果。在中胚层细胞表达的最早标记物T-brachyury基因的表达在所有样本中均上调,唯一的例外是同时含有BMP-4和VEGF的培养基中衍生的EB(该样本显示出该基因表达的显著提高(p<0.0005))。类似的表达特征还见于CD31和LM02基因;仅在同时接触BMP-4和VEGF的EB中监测到显著提高(p<0.0005)。KDR是一种研究得最为透彻的VEGF受体,它在所有hESC细胞系中均有表达^(4, 5);在单独添加BMP-4或VEGF而不添加其他外源因子的培养基所衍生的EB中,该基因的表达显著下调。然而,在存在BMP-4和VEGF的条件下(该条件是能够有效促进hESC发育为成血成血管细胞的条件),KDR的表达呈现中等程度但也是有统计学意义的提高(p<0.002)。出人意料的是,与最近的报道⁽¹⁴⁾不同,在所有条件下形成的EB中,MixL和SCL/TAL-1基因的表达均有实质性的下降。一种可能的解释是:在不同的无血清培养基中的生长导致了上述基因不同的表达图谱。不过,上述结果总之是表明hESC要可靠地发育为中胚层/成血成血管细胞就必须需要同时存在BMP-4和VEGF,这与胚细胞集落发育的结果(图9)相一致。

[0459] 实施例13

[0460] 胚细胞祖细胞的表面标记的识别

[0461] 在我们最初的方法⁽²⁾中,是通过将3.5天的EB细胞重新铺于添加有确定因子的1%甲基纤维素中来产生BC。这一策略在识别具有形成造血细胞和内皮细胞潜能的BC时非常重

要，并且它在由hESC产生BC时也是可重复的。然而，这一方法使用的是标准组织培养箱中的培养皿，因此难以调整适用于扩大规模之后的旋转式生物反应器。这一局限主要是由于来源于3.5天的EB的细胞是异质的，其中含有未分化的hESC(即仅有一部分细胞是BC祖细胞)。因此，将这种异质的细胞群重新铺于液体培养基中时，会导致所有细胞继续生长，包括会由未分化的hESC形成次级EB细胞，这就使得它们不能够用于临床应用。但是，如果能够识别BC祖细胞的标记物，就能够将纯化的祖细胞接种在适用于旋转式生物反应器的液体培养基中，从而进行BC的扩大规模的生产。因此，我们选择了12种与中胚层衍生物相关的细胞表面分子。使用对应的抗体从3.5天的EB中富集细胞，然后测定所富集的细胞形成胚细胞集落的能力。如图14所示，来源于3.5天的EB的KDR+细胞产生的胚细胞集落比未分离的对照细胞多三倍($p<0.01$)，这与先前的研究结果⁽⁵⁾相一致。虽然我们还发现，经CD31+和CD34+富集的细胞群在铺板后所产生的胚细胞集落也有中等程度的提高(约1.5倍)，但是这一提高量没有达到统计学的显著水平。所有根据其他标记富集的细胞群与未分离的对照细胞相比，所产生的胚细胞集落均相似甚或更少，表明BC祖细胞不表达这些分子。不结合上述任何抗体的细胞(流过的细胞)所形成的胚细胞集落与未分离的对照细胞也相似，这表明即使是KDR+、CD34+和CD31+细胞也仅代表了能够形成胚细胞集落的细胞中的很小一部分。

[0462] 表2:qRT-PCR中所用的基因特异性引物的序列

基因	正向引物, 5' - 3'	SEQ ID NO	反向引物, 5' - 3'	SEQ ID NO	参考文献
OCT-4	GAAGGTATTCAGCCAAACGC	16	GTTACAGAACACACTCGGA	17	NA
BRACH	TGCTTCCCTGAGACCCAGTT	18	GATCACTTCTTCCTTGCATCAAG	19	(33)
MixL1	CCGAGTCCAGGATCCAGGTA	20	CTCTGACGCCGAGACTTGG	21	(33)
KDR/F1k1	CCAGCCAAGCTGTCTCAGT	22	CTGCATGTCAGGTTGCAAAG	23	(4)
CD31	GAGTCCTGCTGACCCTTCTG	24	ATTTTGACCGTCCAGTCC	25	(4)
Sc1/TAL1	ATGAGATGGAGATTACTGATG	26	GCCCCGTTCACATTCTGCT	27	(4)
LM02	AACTGGGCCGGAAGCTCT	28	CTTGAAACATTCCAGGTGATA	29	(4)
GAPDH	CGATGCTGGCGCTGAGTAC	30	CCACCACTGACACGTTGGC	31	NA
β-肌动蛋白	GCGGGAAATCGTGCCTGACA	32	GATGGAGTTGAAGGTAGTTCG	33	NA

[0464] 实施例14

[0465] 由人类ES细胞产生人类血管瘤集落形成细胞

[0466] 人ES细胞培养。本研究使用的hES细胞系先前被描述为H1和H9(NIH-注册为WA01和WA09)和四个来自Advanced Cell Technology的细胞系(MA01、MA03、MA40和MA09)。未分化的人ES细胞培养于完全hES培养基的灭活(丝裂霉素C处理的)鼠胚胎成纤维细胞(MEF)上，并直至达到80%汇合。(Klimanskaya&McMahon,-Approaches of derivation and maintenance of human ES cells:*Detailed procedures and alternatives,于Handbook of Stem Cells.VOLUME 1:Embryonic Stem Cells,ed.Lanza,R.et al.Elsevier/Academic Press,San Diego,2004)。然后用0.05%胰蛋白酶-0.53mM EDTA

(InvitrogenTM) 对未分化hES细胞解离2—5分钟，并通过1,000rpm离心5分钟收集细胞。

[0467] EB的形成。为诱导成血成血管细胞前体(中胚层)的形成，hES细胞(2—5×10⁵个细胞/ml)被平板接种于超浅层附着培养皿(CorningTM)中加入了BMP-4和VEGF165(50ng/ml,R&D SystemsTM)的无血清干细胞系培养基中(如干细胞系I或II,SigmaTM)，并在5%CO₂中培养。大约48h后，补充EB培养基并加入早期造血/内皮细胞生长因子。例如，移去半数培养基并加入新鲜培养基并保持同样的BMP-4和VEGF以及SCF,TPO和FLT3配体(20ng/ml,R&D Systems)的终浓度。在48—72h间向培养基加入三重蛋白转导域(tPTD)-HoxB4融合蛋白(1.5μg/ml)以扩增成血成血管细胞及其前体。

[0468] 成血成血管细胞扩增。经过3.5—5天，收集EB并用0.05%胰蛋白酶-0.53mM EDTA(InvitrogenTM)解离2—5分钟，过3—5次22G针头从而制备单细胞悬液。1,000rpm离心5分钟收集细胞并计数。将细胞沉淀再悬浮于50—200μl无血清干细胞系培养基中。为扩增成血成血管细胞，来自由2—5×10⁵个hES细胞分化而来的EB的单细胞悬液与2ml BL-CFC/成血成血管细胞扩增培养基(BGM)混合，所述培养基包括含1.0%甲基纤维素的Iscove's MDM,1—2%牛血清白蛋白,0.1mM 2-巯基乙醇并加入生长因子。例如，加入10μg/ml rh-胰岛素,200μg/ml饱和铁人转铁蛋白,20ng/ml rh-GM-CSF,20ng/ml rh-IL-3,20ng/ml rh-IL-6,20ng/ml rh-G-CSF,3—6单位/ml rh-EPO,50ng/ml rh-SCF,50ng/ml rh-FLt3配体,50ng/ml rh-VEGF和50ng/ml rh-BMP-4(“rh”代表“重组的人的”)和1.5μg/ml的tPTD-HoxB4融合蛋白，加入或不加入50ng/ml的TPO和FL。细胞混合物被平板接种于超浅层附着培养皿上，并于37℃在5%CO₂中培养4—7天。4—6天后，在显微镜下可见葡萄状成血成血管细胞胚细胞集落(称之为BL-CFC或BC)。hES源胚细胞集落的细胞离心涂片制备和Wright-Giemsa染色证实了未成熟胚细胞的形态特征。为将这些结果扩展到其它hES细胞系(WA09[H9]、MA01、MA03、MA40和MA09)，需要加入FL和Tpo以使BC集落的持续生长(不加入FL和Tpo，获得了小(10—20个细胞)hES-BC，其在4—8天后死亡)。Epo对于在所有测试的hES细胞系中BC的形成和生长是必需的。在上述充分确定和可重复的条件下很容易扩增这些细胞(一块六孔板的hES能够产生约6.1±0.66[平均值±SD]百万个成血成血管细胞)。

[0469] 为进行BL-CFC免疫细胞化学分析，纯化的BL-CFC在多聚赖氨酸处理过的载玻片上离心涂片，并用4%的多聚甲醛固定。为检测大部分基因的表达，于4℃温育一抗过夜，随后温育荧光染料标记的二抗，最后在荧光显微镜下镜检。用正常人BM细胞、K562细胞和HUVEC作为对照。

[0470] 免疫细胞化学分析揭示了hES细胞来源的BL-CFC或BC表达GATA-1和GATA-2蛋白、LM02蛋白、CXCR-4、TPO和EPO受体，并且容易与特异性针对CD71(转铁蛋白受体)的抗体反应(表1和美国专利申请号11/787,262的图16d-v)。所述细胞很少表达或不表达CD31、CD34和KDR或其他粘附分子。如美国专利申请号11/787,262中更详细地描述的那样，所述细胞为血管瘤集落形成细胞。

[0471] 实施例15

[0472] 特殊的细胞系——非移植血管瘤细胞——的扩增

[0473] 如上文及美国专利申请号11/787,262中所述，在扩增约4-7天后产生血管瘤集落形成细胞。在某种条件下，在7天后继续培养EB将产生大量的一种特殊的细胞类型。如本文通篇所述，这种独特的祖细胞类型被称为非移植血管瘤细胞。

[0474] 如上所述地培养EB。在扩增过程的第7天，在形成葡萄状集簇(表明形成血管瘤集落形成细胞)之后，在这些葡萄状的集簇细胞的培养物顶部加入5ml的BL培养基。所述培养物为半固体状，并含有10mL甲基纤维素培养基。当加入新鲜培养基之后，继续培养细胞3-6天，这样在EB形成后总共培养10-13天。

[0475] 新鲜培养基的加入显著增强了细胞在上述延长的培养期间的继续增殖和存活。在培养10-13天后，从集簇中纯化细胞。与血管瘤集落形成细胞相类似，这种非移植血管瘤细胞也形成葡萄状集簇，并且彼此之间松散粘连。然而如下文所详述，这些细胞与先前识别的血管瘤集落形成细胞并不相同。

[0476] 当在第10天从集簇中分离细胞时，我们观察到：这些细胞的产率与在第7天时收集的血管瘤集落形成细胞的通常产率相比在数量上要多得多。具体而言，在第10天所纯化得到的细胞比第7天时多了5倍以上。因此，可以容易地产生更多量的非移植血管瘤细胞并将其用于例如产生更多量的分化细胞类型。

[0477] 在扩增培养10-13天之后识别到的细胞在很多方面都与先前识别的血管瘤集落形成细胞相类似。例如，这些细胞通常彼此之间松散粘连(与血管瘤集落形成细胞类似)。此外，在扩增培养10-13天之后识别到的细胞在体外分化产生造血细胞类型。具体而言，非移植血管瘤细胞保留了形成造血细胞CFU的能力。在培养10-13天后将细胞从葡萄状集簇中分离并铺于含有支持造血细胞CFU生长的细胞因子的半固体积甲基纤维素培养基中。在培养10-12天后，可以观察到红细胞CFU、粒细胞CFU、巨噬细胞CFU和混合造血细胞CFU，因此表明它具有产生造血细胞类型的潜能。

[0478] 尽管本文所述的非移植血管瘤细胞与血管瘤集落形成细胞具有一些相似之处，但是它们并不具有相同的分化潜能。不希望拘囿于任何特定的理论，所述非移植血管瘤细胞可能代表了一种在发育学上独特的细胞类型，它们与血管瘤集落形成细胞不同的是在被送递至免疫缺陷动物体内时不再能够移植入骨髓。具体而言，将 $1-5 \times 10^6$ 个人类非移植血管瘤细胞(例如在EB形成后培养10-13天的细胞)给予NOD/SCID小鼠。对24只小鼠进行检测均未发现该人类细胞移植入骨髓或脾脏。与此相反的是，将类似数量的人类血管瘤集落形成细胞(例如培养6-8天的细胞)给予NOD/SCID小鼠后，所检测的全部12只小鼠的骨髓中均发生了人类细胞的移植。

[0479] 本发明的其他说明性方法、组合物、制剂和特征记载于2007年4月13日提交的名称为“血管瘤集落形成细胞”的美国专利申请号11/787,262中。这一申请中的全部教导通过引用并入本文。

[0480] 应当注意的是，申请人考虑到了所公开的实施方案中能够作为专利主题的全部可行的组合，包括美国专利申请号11/787,262中公开的主题的组合。例如，本文提供的非移植血管瘤细胞：(i)可能具有美国专利申请号11/787,262中记载的细胞的一种或多种属性，(ii)可被配制为如美国专利申请号11/787,262所述的组合物、制剂、冷藏制剂或纯化或混合的溶液形式，(iii)可以具有如美国专利申请号11/787,262所述的治疗用途和用于血库，以及(iv)如美国专利申请号11/787,262所述可用于产生部分分化或完全分化的细胞类型，以用于体外或体内用途。此外，所述非移植血管瘤细胞可以使用本文或美国专利申请号11/787,262中所述的任何方法，衍生自ES细胞、ED细胞、多能干细胞(包括iPS细胞)等细胞。

[0481] 实施例16

[0482] 由人类iPSC有效地产生生成血成血管细胞

[0483] 基于本文所述的能够有效地和可重复地由多种hESC细胞系产生大量成血成血管细胞的方法(还参见Lu等人,Nat Methods 2007;4:501-509;Lu等人,Regen Med 2008;3:693-704),本发明人还使用了成血成血管细胞平台,以便大规模地使hESC经过成血管祖细胞分化为红系细胞(大约 10^{10} 至 10^{11} 个细胞/六孔板hESC),这一方法比先前报道的方法的效率提高了几千倍。如上讨论的,细胞具有与正常RBC相当的氧运输能力,并且响应于pH(Bohr效应)和2,3-二磷酸甘油酯(DPG)的变化(还参见,Lu等人,Blood 2008;112:4475-4484)。重要的是,类红细胞在体外经历多个成熟事件,包括尺寸的逐渐增加和血型糖蛋白A表达的增加、染色质和细胞核浓缩、以及最终成年β-球蛋白链的表达增加。球蛋白链特异性免疫荧光分析显示,细胞增加了成年β-球蛋白链的表达(第7天为0%)至体外培养28天后16.37%。该过程导致30-60%的细胞中浓缩核的挤出,产生直径大约6-8μm的RBC。该结果显示,大规模地使hESC衍生的成血成血管细胞分化和成熟为功能性携氧红细胞是可行的。

[0484] 人iPSC与hESC共有许多特征,并且代表重要的干细胞新来源。具有O(-)基因型的iPSC细胞系的鉴定将允许产生ABO和RhD相容性(和无病原体)“万能供体”RBC,并且使用患者的特异性iPSC细胞系将允许在体外产生患者自身的血小板用于输注。然而,有关iPSC经历直接分化,特别是分化为成血成血管细胞的能力的报道很少。Choi等人最近的报道(STEM CELLS 2009;27 (3):559-567)记载了使用人类iPSC的研究,其中使用基于OP9饲养细胞的培养体系,实现了造血细胞和内皮细胞的分化,证实了人类iPSC的潜能。类似地,Zhang等人(Circ Res 2009;104:e30-e41.)报道了由人类iPSC衍生出功能性的心肌细胞,但是与使用EB方法的hESC相比效率很低。因此,本文描述了从人iPSC有效地产生生成血成血管细胞。本发明人描述了根据对于hESC体系的经验而发现的能够有效地由人类iPSC产生生成血成血管细胞的条件。

[0485] 高质量iPSC的制备

[0486] 在本发明人的一些预备性研究中,他们能够使用优化的hESC分化条件由人类IMR90(图20c)和Adult4-3 iPSC(数据未示出)产生生成血成血管细胞集落。虽然其效率比hESC低得多,但是他们明确地证实了人类iPSC具有分化为成血成血管细胞的潜能。所观察到的低效率可能是由于多种因素,其中之一就是iPSC的质量。本发明人认为这是关系到能否高效率地产生生成血成血管细胞的最重要的因素之一。高质量的hESC培养物中的集落具有如下特征:具有致密的边界,在显微镜下观察仅具有最小化的分化指征,汇合度约为80%但彼此并不接触。以中等比例1:3的分份传代的hESC将在3-5天后达到汇合,并且其中几乎每个细胞的多能标记物的染色均呈阳性。高质量的hESC通常产生高数量的EB细胞(例如 2×10^6 个高质量的hESC将在3.5天后产生约 $2-3 \times 10^6$ 个EB细胞)。获得高质量iPSC的关键步骤包括:(1)使用胰蛋白酶而不是胶原酶进行传代:发明人证实,在初始适应了所进行的机械传代培养后,可以使用胰蛋白酶/EDTA进行hESC的常规传代(Klimanskaya等人,Approaches of derivation and maintenance of human ES cells:Detailed procedures and alternatives.于Lanza Rea,ed.Handbook of Stem Cells.VOLUME1:Embryonic Stem Cells.New York,USA:Elsevier/Academic Press,2004:437-449.)。根据发明人的经验,胰蛋白酶比广泛使用的胶原酶IV的效果要好,因为胰蛋白酶能够产生更小的细胞团(2-5个细胞),由此单细胞能形成更均匀分布和更小的集落,这使得集落在成熟之前不会彼此接触并

限制了自发的分化,而胶原酶传代会产生较大的集落,它们会表现出更普遍的分化,因此必须使用更低的分份比例或者在培养物达到所需的密度之前进行传代。总之,使用胰蛋白酶/EDTA进行传代能够使扩大培养规模的速度比使用胶原酶快3-4倍,并且能获得均质的细胞群。上述观察结果也适用于人类iPSC。发明人的实验表明胰蛋白酶消化也可调整适用于人类iPSC,所述细胞可以在传代20次以上时仍保持未分化状态;(2)使用小鼠胚胎成纤维细胞(MEF饲养细胞)或无饲养细胞的条件维持:长时间维持hESC和iPSC需要MEF饲养细胞。在MEF饲养细胞上培养hESC和iPSC使得不能完全除去动物组分,并使得在上述条件下维持的hESC和iPSC所衍生的衍生物在用于潜在的临床用途时产生问题。因此,所采取的第一步就是确定在含基质胶基质的mTeSR培养基中维持的hESC能否产生成血成血管细胞。发明人已经证实:对于所测试的全部三种hESC细胞系WA01、MA01和HUES-3,在铺板的EB细胞数量相同的前提下,无饲养细胞条件下培养的hESC与MEF饲养细胞上培养的hESC相比,产生的成血成血管细胞的数量限制提高(提高3倍,p<0.05)(Lu等人,Regen Med 2008;3:693-704.)。然后发明人开始试验在上述无饲养细胞的体系中培养人类iPSC,在无饲养细胞的条件下维持的人类iPSC表达多能标记物Nanog、Oct-4、SSEA-4和Tra-1-60(图19)。还将测试在无饲养细胞的条件下维持的人类iPSC是否能够高效率地分化为成血成血管细胞。

[0487] 胚状体(EB)形成和分化的优化

[0488] 人类iPSC在细胞解离之后再EB形成过程中的存活力很低,hESC亦是如此。已经表明在无血清EB形成培养基中加入选择性Rho相关激酶(ROCK)抑制剂Y-27632能够防止hESC的凋亡、增强EB形成和促进分化(Watanabe等人,Nat Biotechnol 2007;25:681-686)。这一实验表明在无血清EB形成和分化培养基中添加Y-27632可以使人类iPS(IMR90)-1细胞比在对照培养基中更好地形成EB:在仅添加细胞因子的干细胞系II培养基中形成的EB通常较小,并且在24小时后有许多细胞死亡;而在添加了Y-27632的培养基中形成的EB大而光滑,其周围的死细胞少得多(图20a和20b),表明形成了更健康的EB。在铺板以便形成胚细胞集落后,来自经过Y-27632处理的EB的细胞与来自未经Y-27632处理的EB的细胞相比,所发育出的胚细胞集落要多得多,也健康得多(图20c和20d),能够产生两倍多的成血成血管细胞,先前的研究也表明胰岛素(一种在几乎所有细胞培养基包括本文所述的干细胞系II培养基中均含有的组分)可能通过PI3K/Akt信号途径强有力地抑制hESC向中胚层分化.PI3K/Akt信号途径的抑制增强了hESC在无血清条件下向中胚层的分化(Freund等人,Stem Cells 2008;26:724-733.)。上述结果表明在EB形成和分化培养基中添加PI3K/Akt信号途径抑制剂能够显著促进MA09 hESC形成成血成血管细胞。经过PI3K/Akt抑制剂处理的培养皿与对照培养皿相比,能够使获得的成血成血管细胞的数量增加2.5倍以上。类似地,在EB形成过程中单独添加PI3K/Akt信号途径抑制剂或再加入也可以使iPS(IMR90)-1细胞形成比对照更多更健康的胚细胞集落(图20e),经过PI3K/Akt抑制剂处理的EB多产生2.1倍的成血成血管细胞,经过PI3K/Akt抑制剂加上ROCK抑制剂处理的EB多产生2.6倍的成血成血管细胞。然后纯化所述成血成血管细胞并铺于适于分化为造血细胞或内皮细胞的条件下。如图20f-20j所示,在铺于合适的条件之后,这些细胞分化为造血细胞和内皮细胞。

[0489] 实施例17

[0490] hESC直接分化为巨核细胞和血小板

[0491] 多能人胚胎干细胞(hESC)和iPS细胞是用于输注疗法的血细胞的潜在替代来源。

此外, hESC直接分化为血液可以提供研究血细胞生成的发生学的有用工具。hESC有效且直接分化为可输注巨核细胞/血小板具有极大的临床意义。然而,之前报道的从人ES产生巨核细胞和血小板的方法对于潜在临床应用而言是有问题的,因为1)从hESC产生巨核细胞/血小板的收率非常低,2)它们需要不确定的动物基质细胞(例如,OP9),并且3)这些方法将难以放大用于大量生产(Gaur等人,J Thromb Haemost 2006;4:436-442;Takayama等人,Blood 2008;111:5298-5306.)。本文描述了可使用完全确定的条件有效地从多种hESC细胞系产生大量成血成血管细胞(胚细胞,BC)的强大模型系统(还参见Lu等人,Nat Methods 2007;4:501-509;Lu等人,Regen Med 2008;3:693-704)。如本文所述,这些BC可被进一步诱导以大规模产生功能性RBC(还参见Lu等人,Blood 2008;112:4475-4484)。因为RBC和巨核细胞来自常见祖细胞,考察了从我们的hESC衍生的成血成血管细胞产生巨核细胞和血小板的可能性。

[0492] 用于产生巨核细胞的培养方法的图表

[0493] 无血清hES细胞→胚状体第3.5-4天→胚细胞培养物第6天→巨核细胞培养物第7天

[0494] 迄今测试三种hESC细胞系的MK产生:H1、H7和HuES-3。使用标准方案产生成血成血管细胞(还参见Lu等人,Nat Methods 2007;4:501-509;Lu等人,Regen Med 2008;3:693-704)。简言之,人ES细胞在无血清培养基中培养并收获胚状体(EB)培养物。第3至4天,收集EB细胞并制备为单细胞悬液。 5×10^5 个EB细胞重悬于1ml胚细胞生长培养基以产生成血成血管细胞。收集来自第8天成血成血管细胞培养物的细胞,用于建立悬浮的MK培养物悬液。总之,已经成功适应成血成血管细胞模型系统以有效地从hESC产生巨核细胞和血小板。使用改进的胚细胞培养方法,发明人现在可以在成血成血管细胞培养6-8天后从一百万个hESC常规地产生一千万个胚细胞(还参见Lu等人,Regen Med 2008;3:693-704)。为了直接分化为巨核细胞系,这些胚细胞被收集并涂布于补充了包括TP0在内的确定生长因子的无血清培养基中的液体巨核细胞成熟培养。在该培养早期通常获得1.5-2倍的细胞数目增加。在目前条件下的有限扩增可能是由于转化为其他细胞系的细胞死亡和巨核细胞核内有丝分裂的开始。在液体成熟培养的第4天,可以获得超过90%CD41a+巨核细胞,而无需纯化(图21A)。这些CD41a+巨核细胞的大部分共表达CD42b,巨核细胞的额外标志物。结果,在14至15天内可以从一百万个hESC产生八至九百万个CD41+巨核细胞。比较而言,Takayama等人的最近文章报道,使用与OP9基质细胞和胎牛血清的共培养系统从一百万个hESC产生两百万个CD41a+巨核细胞(总数的50%)(Takayama等人,Blood 2008;111:5298-5306)。显然,本文描述的成血成血管细胞系统代表了从hESC体外产生巨核细胞的显著提高。

[0495] 除了细胞表面标志物,Giemsa染色显示,成熟培养物中巨核细胞的细胞尺寸增加,经历核内有丝分裂并变为多倍体(图21C)。而且,细胞颗粒中von Willebrand因子(VWF)的特异性免疫染色表明,在这些细胞中发生细胞质成熟过程(图21D)。在液体成熟培养的第6天,通过FACS分析发现超过50%的CD41a+细胞显示>4n DNA含量(图21B)。重要的是,这些体外衍生的巨核细胞通过显示血小板原形成经历终末分化,血小板生成的必要步骤(图21E)。使用本文描述的目前条件,早在液体培养第3天发现了血小板原形成细胞,通常在第7至8天达到2-3%存活细胞的峰值。

[0496] 通过离心去除细胞之后,巨核细胞成熟培养物的上清液被检查血小板产生。实际

上,检测了CD41a+颗粒,并且它们的前向和侧向散射特征与我们的FACS分析中使用的人外周血液血小板对照非常相似(图22)。

[0497] 参考文献

[0498] 1.Wagner RC:Endothelial cell embryology and growth.Adv.Microcirc.9, 45–75 (1980) .

[0499] 2.Lu SJ,Feng Q,Caballero S et al:Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells.Nat.Methods 4 (6) ,501–509 (2007) .

[0500] 3.Wang L,Li L,Shojaei F et al:Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties.Immunity.21 (1) ,31–41 (2004) .

[0501] 4.Zambidis ET,Peault B,Park TS,Bunz F,Civin CI:Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial,primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development.Blood 106 (3) ,860–870 (2005) .

[0502] 5.Kennedy M,D’Souza SL,Lynch-Kattman M,Schwartz S,Keller G:Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures.Blood 109 (7) ,2679–2687 (2007) .

[0503] 6.Klimanskaya I,McMahon J.Approaches of derivation and maintenance of human ES cells:Detailed procedures and alternatives.In:Handbook of Stem Cells.VOLUME 1:Embryonic Stem Cells.Lanza Rea (Eds.) .Elsevier/Academic Press, 2004)

[0504] 7.Ludwig TE,Bergendahl V,Levenstein ME,Yu J,Probasco MD,Thomson JA:Feeder-independent culture of human embryonic stem cells.Nat.Methods 3 (8) , 637–646 (2006) .

[0505] 8.Ludwig TE,Levenstein ME,Jones JM et al:Derivation of human embryonic stemcells in defined conditions.Nat.Biotechnol.24 (2) ,185–187 (2006) .

[0506] 9.Livak KJ,Schmittgen TD:Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.Methods 25 (4) ,402–408 (2001) .

[0507] 10.Lu SJ,Feng Q,Ivanova Y et al:Recombinant HoxB4 Fusion Proteins Enhance Hematopoietic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells.Stem Cells Dev.16 (4) ,547–560 (2007) .

[0508] 11.Soker S,Takashima S,Miao HQ,Neufeld G,Klagsbrun M:Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor.Cell 92 (6) ,735–745 (1998) .

[0509] 12.Faloon P,Arentson E,Kazarov A et al:Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development.Development 127 (9) ,1931–1941 (2000) .

- [0510] 13. Pearson S, Sroczynska P, Lacaud G, Kouskoff V: The stepwise specification of embryonic stem cells to hematopoietic fate is driven by sequential exposure to Bmp4, activin A, bFGF and VEGF. *Development* 135(8), 1525-1535 (2008).
- [0511] 14. Pick M, Azzola L, Mossman A, Stanley EG, Elefanty AG: Differentiation of human embryonic stem cells in serum-free medium reveals distinct roles for bone morphogenetic protein 4, vascular endothelial growth factor, stem cell factor, and fibroblast growth factor 2 in hematopoiesis. *Stem Cells* 25(9), 2206-2214 (2007).
- [0512] 15. Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A: Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat. Med.* 11(2), 228-232 (2005).
- [0513] 16. Huber TL, Zhou Y, Mead PE, Zon LI: Cooperative effects of growth factors involved in the induction of hematopoietic mesoderm. *Blood* 92(11), 4128-4137 (1998).
- [0514] 17. Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL: Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* 9(17), 2105-2116 (1995).
- [0515] 18. Johansson BM, Wiles MV: Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. *Mol. Cell Biol.* 15(1), 141-151 (1995).
- [0516] 19. Wiles MV, Johansson BM: Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. *Exp. Cell Res.* 247(1), 241-248 (1999).
- [0517] 20. Nakayama N, Lee J, Chiu L: Vascular endothelial growth factor synergistically enhances bone morphogenetic protein-4-dependent lymphohematopoietic cell generation from embryonic stem cells in vitro. *Blood* 95(7), 2275-2283 (2000).
- [0518] 21. Li F, Lu S-J, Vida L, Thomson JA, Honig GR: Bone morphogenetic protein-4 induces efficient hematopoietic differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells in vitro. *Blood* 98(2), 335-342 (2001).
- [0519] 22. Tian X, Morris JK, Linehan JL, Kaufman DS: Cytokine requirements differ for stroma and embryoid body-mediated hematopoiesis from human embryonic stem cells. *Exp. Hematol.* 32(10), 1000-1009 (2004).
- [0520] 23. Chadwick K, Wang L, Li L et al: Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* 2003 102(3), 906-915 (2003).
- [0521] 24. Cerdan C, Rouleau A, Bhatia M: VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells. *Blood* 103(7), 2504-2512 (2004).
- [0522] 25. Park C, Afrikanova I, Chung YS et al: A hierarchical order of factors in the generation of FLK-and SCL-expressing hematopoietic and endothelial

progenitors from embryonic stem cells. Development 131 (11), 2749–2762 (2004).

[0523] 26. Xu C, Rosler E, Jiang J et al: Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. Stem Cells 23 (3), 315–323 (2005).

[0524] 27. Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA: Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. Nat. Methods 2 (3), 185–190 (2005).

[0525] 28. Levenstein ME, Ludwig TE, Xu RH et al: Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. Stem Cells 24 (3), 568–574 (2006).

[0526] 29. Yeoh JS, van Oosterom A, Weersing E et al: Fibroblast growth factor-1 and -2 preserve long-term repopulating ability of hematopoietic stem cells in serum-free cultures. Stem Cells 24 (6), 1564–1572 (2006).

[0527] 30. Dell'Era P, Ronca R, Coco L, Nicoli S, Metra M, Presta M: Fibroblast growth factor receptor-1 is essential for in vitro cardiomyocyte development. Circ. Res. 93 (5), 414–420 (2003).

[0528] 31. de Hemptinne HG, Weersing E, Dontje B et al: In vitro generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by fibroblast growth factor-1. Dev. Cell 4 (2), 241–251 (2003).

[0529] 32. Ginis I, Luo Y, Miura T et al: Differences between human and mouse embryonic stem cells. Dev. Biol. 269 (2), 360–380 (2004).

[0530] 33. D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazer S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE: Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. Nat. Biotechnol. 23 (12), 1534–1541 (2005).

[0531] 在上文的具体实施方式部分描述了本发明的各种实施方案。虽然这些描述直接描述的是上述实施方案,但是应当理解,本领域技术人员可以对本文所描述和展示的实施方案进行修改和/或变化。任何这样的修改或变化方案也落入本说明书的范围并意图被包括在本发明的范围内。除非特别注明,本发明人的意图是:说明书和权利要求书中的单词和短语具有所述技术领域的普通技术人员所通常理解的和惯用的含义。

[0532] 提供了在本申请提交时发明人所知的本发明的各种实施方案的上述描述,并且这些描述意在说明和解释。本说明书并不意欲穷举,亦不意欲将本发明限制在所公开的具体形式上,由上述教导能够得出多种可能的修改和变化方案。所记载的实施方案及其实际应用都是为了使本领域技术人员能够根据所考虑的具体用途来合适地应用本发明的各种实施方案及其修改方案。因此,本发明并不意欲局限于为实施本发明而公开的具体实施方案。

[0533] 虽然已经展示和描述了本发明的具体实施方案,但是对于本领域技术人员显而易见的是,给予本文的教导,在不背离本发明及其更宽泛方面的前提下可以做出改变和修改,因此后附的权利要求书的范围将涵盖所有这类的修改,权利要求书才体现了本发明的真实精神和范围。本领域技术人员能够理解的是,总体而言,本文所使用的术语通常为“开放式”的术语(例如,术语“包括”应被解释为“包括但不限于”,术语“具有”应被解释为“具有至少

一个”，术语“包括”应被解释为“包括但不限于”等等)。

序列表

<110> 安斯泰来再生医药协会

<120> 用于制备衍生自多能干细胞的去核类红细胞的方法

<130> 83179-5-21

<150> 61/126,803

<151> 2008-05-06

<150> 61/189,491

<151> 2008-08-19

<150> 61/190,282

<151> 2008-08-26

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 251

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Ala Met Ser Ser Phe Leu Ile Asn Ser Asn Tyr Val Asp Pro Lys

1 5 10 15

Phe Pro Pro Cys Glu Glu Tyr Ser Gln Ser Asp Tyr Leu Pro Ser Asp

20 25 30

His Ser Pro Gly Tyr Tyr Ala Gly Gly Gln Arg Arg Glu Ser Ser Phe

35 40 45

Gln Pro Glu Ala Gly Phe Gly Arg Arg Ala Ala Cys Thr Val Gln Arg

50 55 60

Tyr Ala Ala Cys Arg Asp Pro Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro

65 70 75 80

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gly Leu Ser Pro Arg Ala Pro Ala Pro

85 90 95

Pro Pro Ala Gly Ala Leu Leu Pro Glu Pro Gly Gln Arg Cys Glu Ala

100 105 110

Val Ser Ser Ser Pro Pro Pro Pro Cys Ala Gln Asn Pro Leu His

115 120 125

Pro Ser Pro Ser His Ser Ala Cys Lys Glu Pro Val Val Tyr Pro Trp

130 135 140

Met Arg Lys Val His Val Ser Thr Val Asn Pro Asn Tyr Ala Gly Gly

145 150 155 160

Glu Pro Lys Arg Ser Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Gln Gln Val Leu Glu

165	170	175
Leu Glu Lys Glu Phe His Tyr Asn Arg Tyr Leu Thr Arg Arg Arg Arg		
180	185	190
Val Glu Ile Ala His Ala Leu Cys Leu Ser Glu Arg Gln Ile Lys Ile		
195	200	205
Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Asp His Lys Leu Pro		
210	215	220
Asn Thr Lys Ile Arg Ser Gly Gly Ala Ala Gly Ser Ala Gly Gly Pro		
225	230	235
Pro Gly Arg Pro Asn Gly Gly Pro Arg Ala Leu		
245	250	
<210> 2		
<211> 2042		
<212> DNA		
<213> 智人		
<400> 2		
ggaaaacgag tcaggggtcg gaataaaattt tagtatattt tgtggcaat tcccaaaaaat 60		
taatggctat gagttctttt ttgatcaact caaactatgt cgaccccaag ttccctccat 120		
gcgaggaata ttcacagagc gattacctac ccagcgaacca ctcgcccggg tactacgccc 180		
gcggccagag gcgagagagc agcttccagc cggaggcggg cttcggcgg cgcgccgcgt 240		
gcaccgtgca ggcgtacgcg gcctgcccgg accctgggcc cccgcgcct cgcgcaccac 300		
ccccgcccgc cccgccaccgc cccggctctgt cccctcgggc tcctgcgcgc ccacccgcg 360		
ggccctcctt cccggagccc ggccagcgct gcgaggcggt cagcagcagc ccccccggc 420		
ctccctgcgc ccagaacccc ctgcacaccca gcccgtccca ctccgcgtgc aaagagcccg 480		
tcgtctaccc ctggatgcgc aaagttcacg tgagcacggt aaaccccaat tacgcggcg 540		
gggagccaa ggcgtctcg accgcctaca cgcgcacgca ggtttggag ctggagaagg 600		
aatttacta caaccgctac ctgacacggc gccggagggt ggagatgcgc cacgcgtct 660		
gcctctccga ggcgcagatc aagatctggt tccagaaccg ggcgcataag tggaaaaaaag 720		
accacaagtt gccaacacc aagatccgct cgggtggtgc ggcaggctca gccggaggc 780		
ccctggccg gccaatgga ggccccggc cgctctagtgc ccccgacg cgggagccac 840		
gaacctcggt gtgggggtgg gcagttagtg cagggatgg ggtgggggaa caggagggg 900		
ccctggggcc tggcccccgg aaaaatctat ctgcctccc ccacactta tatacgaata 960		
aacgcagaag agggggaggg gaagctttat ttatagaaat gacaatagag ggccacgggg 1020		
aggccccccc agaagcaaga ttcaaatttc ttgctttctt tcttaaaaaaa aagaaaaaaga 1080		
aaaagcaaga agaaggaaga aagaaaaaga cagaaagaga aataggagga ggctgcagct 1140		
cctcgtttc agcttggcg aagatggatc cacgttcat ctttaatcac gccaggtcca 1200		
ggcccatctg tcttggcc tctggcagg agaagacggg cctcggtggc gaccattacc 1260		
tcgacacccg ctaacaaatg aggccggct cggccgcctc cgcctctgactgcccgtg 1320		
ctgaaagaca gcctggattt ctttcttgc tccccactc ccgataacca gcgaaagcac 1380		

cctctgactg ccagatagt cagttttg gtcacggtaa cacacacaca ctccctca 1440
tcttcgtgc ccattcactg agggccagaa tgactgctca cccacttcca ccgtgggtt 1500
gggggtggc aacagaggag gggagcaagt aggaaagggg gtggccttga caactcagga 1560
gtgagcagga aaatttgcgtc caaggaaaaa gagagactca gagaccggg agggccttcc 1620
tctgaaaggc caagccaagc catgcttggc agggtgaggg gccagtttag ttctggagc 1680
tggcactac tctgccatc cagagttgtc cagcagaagc ctcttccta gactgaaaat 1740
aatgtgaaa ctaggaata aaatgtccc ctcccagtct gggaggagga tggcagag 1800
ccctctcca tagtttata tggcatcg tttatttata ttattgataa tattattatt 1860
actattttt tgtgtcatgt gagtcctctc tcctttctc tttctgacat tccaaaacca 1920
ggcccttcc tacctctgg gctgctttag tctagaaccc ttcttatgtg tgaatatctg 1980
tgtgctgtac agagtgacaa tagaaataaa tgggggtt cttgtgacca gcaaaaaaaaaa 2040
aa 2042
<210> 3
<211> 251
<212> PRT
<213> 智人
<400> 3

Met	Ala	Met	Ser	Ser	Phe	Leu	Ile	Asn	Ser	Asn	Tyr	Val	Asp	Pro	Lys
1					5						10				15
Phe	Pro	Pro	Cys	Glu	Glu	Tyr	Ser	Gln	Ser	Asp	Tyr	Leu	Pro	Ser	Asp
					20					25					30
His	Ser	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Arg	Glu	Ser	Ser	Phe
					35				40			45			
Gln	Pro	Glu	Ala	Gly	Phe	Gly	Arg	Arg	Ala	Ala	Cys	Thr	Val	Gln	Arg
					50				55			60			
Tyr	Ala	Ala	Cys	Arg	Asp	Pro	Gly	Pro							
					65				70			75			80
Pro	Gly	Leu	Ser	Pro	Arg	Ala	Pro	Ala	Pro						
									85			90			95
Pro	Pro	Ala	Gly	Ala	Leu	Leu	Pro	Glu	Pro	Gly	Gln	Arg	Cys	Glu	Ala
									100			105			110
Val	Ser	Ser	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Cys	Ala	Gln	Asn	Pro	Leu	His	
									115			120			125
Pro	Ser	Pro	Ser	His	Ser	Ala	Cys	Lys	Glu	Pro	Val	Val	Tyr	Pro	Trp
									130			135			140
Met	Arg	Lys	Val	His	Val	Ser	Thr	Val	Asn	Pro	Asn	Tyr	Ala	Gly	Gly
									145			150			160
Glu	Pro	Lys	Arg	Ser	Arg	Thr	Ala	Tyr	Thr	Arg	Gln	Gln	Val	Leu	Glu
									165			170			175

Leu Glu Lys Glu Phe His Tyr Asn Arg Tyr Leu Thr Arg Arg Arg Arg
180 185 190
Val Glu Ile Ala His Ala Leu Cys Leu Ser Glu Arg Gln Ile Lys Ile
195 200 205
Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Asp His Lys Leu Pro
210 215 220
Asn Thr Lys Ile Arg Ser Gly Gly Ala Ala Gly Ser Ala Gly Gly Pro
225 230 235 240
Pro Gly Arg Pro Asn Gly Gly Pro Arg Ala Leu
245 250
<210> 4
<211> 2040
<212> DNA
<213> 智人
<400> 4
ggaaaacgag tcaggggtcg gaataaaattt tagtatattt tgtggcaat tcccagaaat 60
taatggctat gagttctttt ttgatcaact caaactatgt cgaccccaag ttccctccat 120
gcgaggaata ttcacagagc gattacctac ccagcgacca ctcgcccggg tactacgccg 180
gcggccagag gcgagagagc agcttccagc cggaggcggg ctgcggcgg cgcgcggcgt 240
gcaccgtgca ggcgtacgca gcctgccggg accctgggcc cccgccccct cgcaccac 300
ccccgcccccc cccgcccaccg cccggctgt cccctcggc tcctgcgcgg ccacccgccc 360
ggccctcct cccggagccc ggccagcgct gcgaggcgg cagcagcagc ccccccgcgc 420
ctccctgcgc ccagaacccc ctgcacccca gcccgatccca ctccgcgtgc aaagagcccg 480
tcgtctaccc ctggatgcgc aaagttcacg tgtagcacgg aaacccaaat tacgcggcgc 540
gggagcccaa ggcgtctcg accgcctaca cgcgcagca ggtctggag ctggagaagg 600
aatttcacta caaccgctac ctgacacggc gccggagggt ggagatgcgc cacgcgtct 660
gcctctccga gcgcagatc aagatctggt tccagaaccg gcgcataaag tggaaaaaaag 720
accacaagtt gcccaacacc aagatccgct cgggtggtgc ggcaggctca gccggaggcc 780
ccctggccg gccaaatgga ggcccccgcg cgctctagtg ccccccgcacg cgggagccac 840
gaacctcggt gtgggggtgg gcagttagtg cagggatgg ggtgggggaa caggaggggg 900
ccctggggcc tggccccgg aaaaatctat ctgcacccccc ccacacttta tatacgaata 960
aacgcagaag agggggaggg gaagctttat ttatagaaat gacaatagag ggccacgggg 1020
aggccccccc agaagcaaga ttcaaatttc ttgcattttct tcttaaaaaaa aagaaaaaaga 1080
aaaagcaaga agaaggaaga aagaaaaaga cagaaagaga aataggagga ggctgcagct 1140
cctcgtttc agcttggcg aagatggatc cacgttcat cttaatcac gccaggtcca 1200
ggcccatctg tctgtttcc tctgcccagg agaagacggg cctcggtggc gaccattacc 1260
tcgacaccccg ctaacaaatg aggccggct cggccgcctc cgcctctgct actgcccgtg 1320
ctggaagaca gcctggattt ctttttttgc tccccactc ccgataacca gcgaaagcac 1380
cctctgactg ccagatagtg cagtgttttgc gtcacggtaa cacacacaca ctctccctca 1440

tcttcgtgc ccattcactg agggccagaa tgactgctca cccacttcca ccgtgggtt 1500
 ggggtggc aacagaggag gggagcaagt aggaaagggg gtggccttga caactcagga 1560
 gtgagcaggg aaattgagtc caaggaaaaa gagagactca gagaccggg agggcttcc 1620
 tctgaaaggc caagccaagc catgcttggc agggtgaggg gccagtttag ttctggagc 1680
 tggcactac tctgccatgc cagagttgtc cagcagaagc ctcttccta gactgaaaat 1740
 gaatgtgaaa ctaggaaata aaatgtgccc ctcccagtct gggaggagga tggtgcagag 1800
 ccctctccca tagtttatta tggtgcattcg tttatttatta ttattgataa tattattatt 1860
 actattttt tgtgtcatgt gagtcctctc tcctttctc tttctgacat tccaaaacca 1920
 ggccccttcc tacctctggg gctgctttag tctagaaccc ttcttatgtg tgaatatctg 1980
 tgtgctgtac agagtgacaa tagaaataaa tgtttggtt cttgtaaaaa aaaaaaaaaa 2040
 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒
 <400> 5
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒
 <400> 6
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5
 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 合成的构建体
 <400> 7
 Tyr Ala Arg Lys Ala Arg Arg Gln Ala Arg Arg
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 合成的构建体

<400> 8

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
1 5 10

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 9

Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg
1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 10

Arg Ala Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ala
1 5 10

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> 果蝇控制触角基因

<400> 11

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 12

<211> 34

<212> PRT

<213> 单纯疱疹病毒 1

<400> 12

Asp Ala Ala Thr Ala Thr Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr
1 5 10 15

Glu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Pro
20 25 30

Val Glu

<210> 13

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 13
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5
<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 14
Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
1 5 10
<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 15
Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
1 5 10
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人
<400> 16
gaaggatttc agccaaacgc 20
<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人
<400> 17
gttacagaac cacactcgga 20
<210> 18

<211> 20
<212> DNA
<213> 智人
<400> 18
tgcttccctg agaccagg 20
<210> 19
<211> 25
<212> DNA
<213> 智人
<400> 19
gatcacttct ttccttgca tcaag 25
<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人
<400> 20
ccgagtcagg gatccaggta 20
<210> 21
<211> 19
<212> DNA
<213> 智人
<400> 21
ctctgacgcc gagacttgg 19
<210> 22
<211> 19
<212> DNA
<213> 智人
<400> 22
ccagccaagg tgtctcagt 19
<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人
<400> 23
ctgcatgtca ggttgcaaag 20
<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 24
gagtcctgct gacccttctg 20
<210> 25
<211> 19
<212> DNA
<213> 智人
<400> 25
attttgcacc gtccagtc 19
<210> 26
<211> 21
<212> DNA
<213> 智人
<400> 26
atgagatgga gattactgat g 21
<210> 27
<211> 19
<212> DNA
<213> 智人
<400> 27
gccccgttca cattctgct 19
<210> 28
<211> 18
<212> DNA
<213> 智人
<400> 28
aactgggccg gaagctct 18
<210> 29
<211> 23
<212> DNA
<213> 智人
<400> 29
cttcaaacat tccaggtat aca 23
<210> 30
<211> 19
<212> DNA
<213> 智人
<400> 30
cgatgctggc gctgagttac 19
<210> 31

<211> 19
<212> DNA
<213> 智人
<400> 31
ccaccactga cacgttggc 19
<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人
<400> 32
gcgggaaatc gtgcgtgaca 20
<210> 33
<211> 22
<212> DNA
<213> 智人
<400> 33
gatggagttg aaggtagttt cg 22
<210> 34
<211> 22
<212> DNA
<213> 智人
<400> 34
tgacccttag atggctgtca cc 22
<210> 35
<211> 22
<212> DNA
<213> 智人
<400> 35
agcaacgata cccagtttgt ct 22
<210> 36
<211> 22
<212> DNA
<213> 智人
<400> 36
gccgtgtgcc agaggcgcat gt 22
<210> 37
<211> 22
<212> DNA
<213> 智人

<400> 37
aatgtccaca gtcactcgcc ac 22
<210> 38
<211> 23
<212> DNA
<213> 智人
<400> 38
tgctggaggt gcgcgcctac aag 23
<210> 39
<211> 22
<212> DNA
<213> 智人
<400> 39
gtagaaatcg ccctcgtcct tg 22

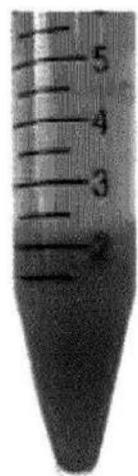


图1A



图1B

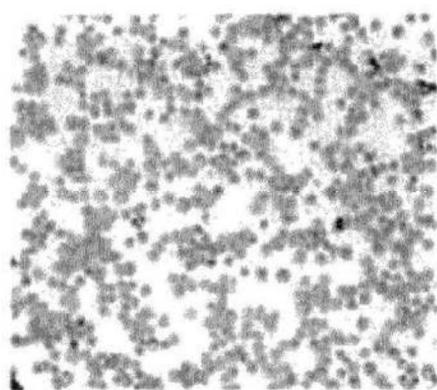


图1C

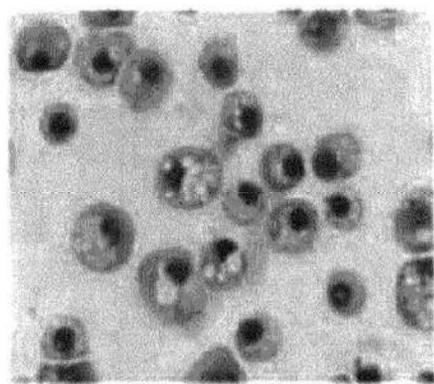


图1D

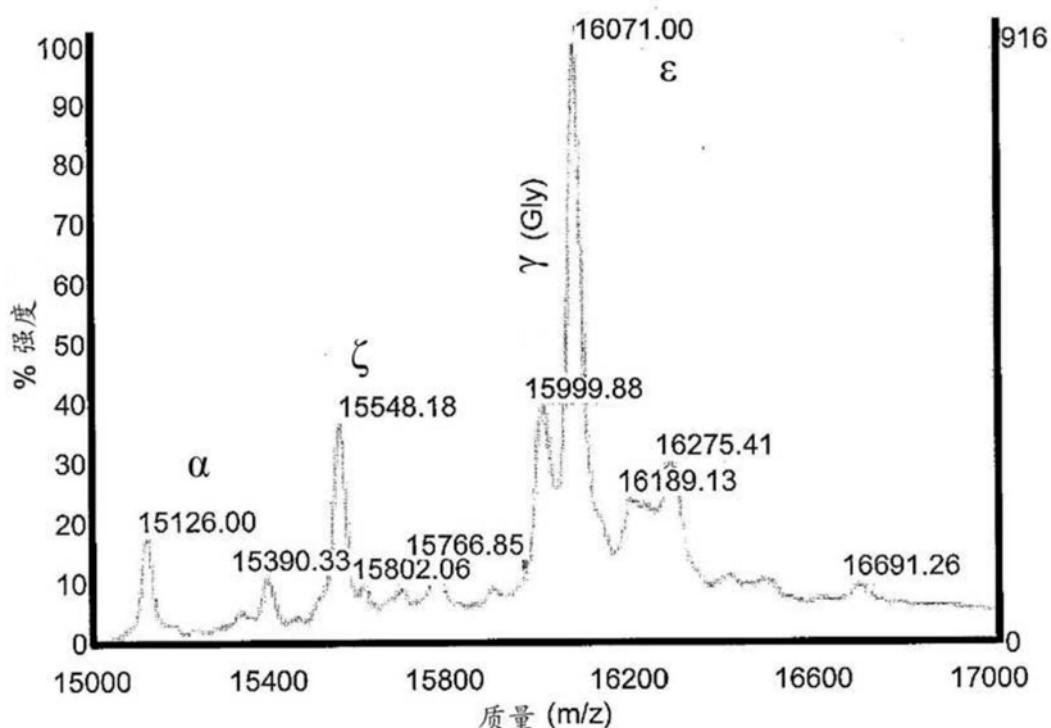


图1E

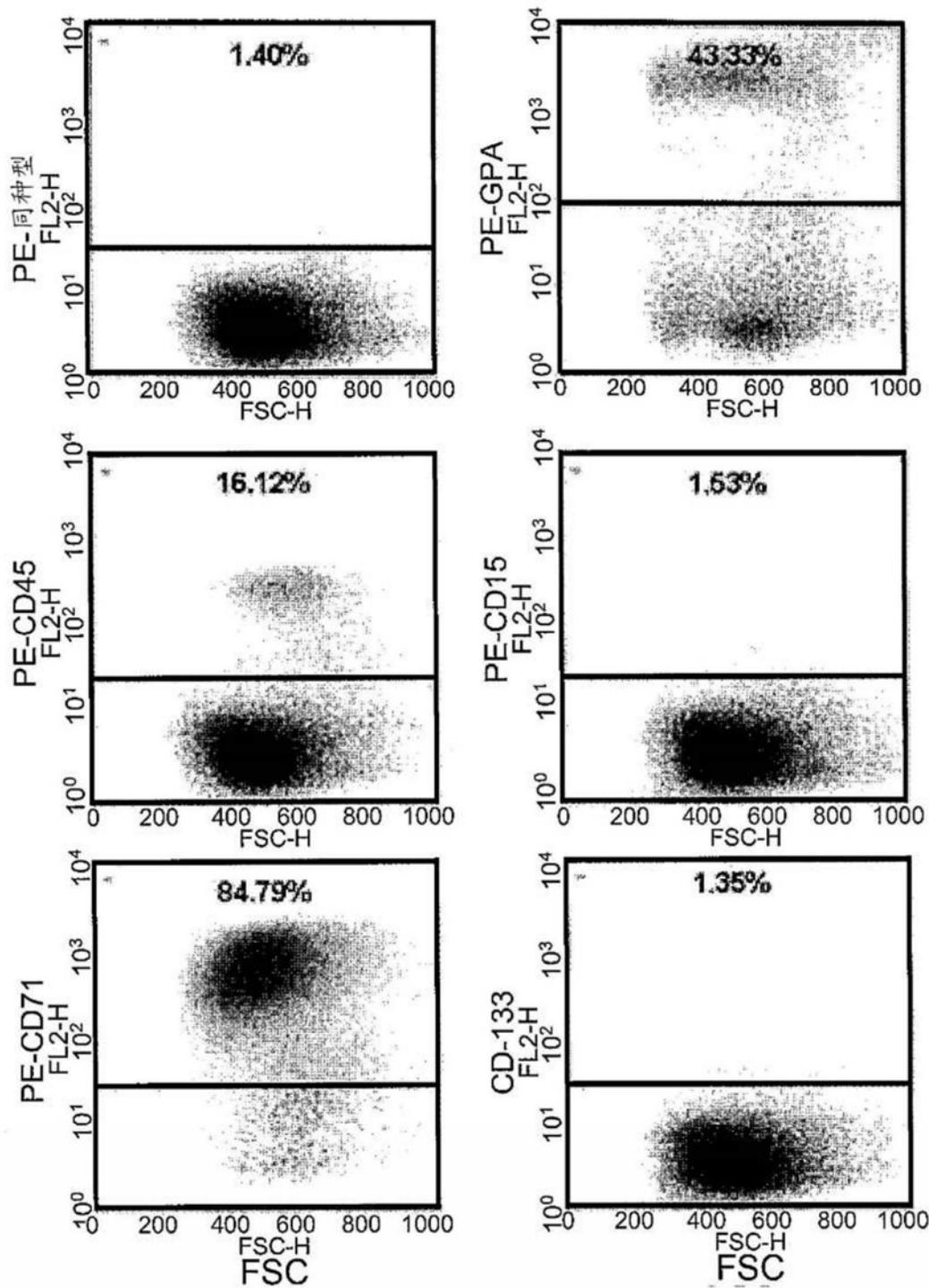


图1F

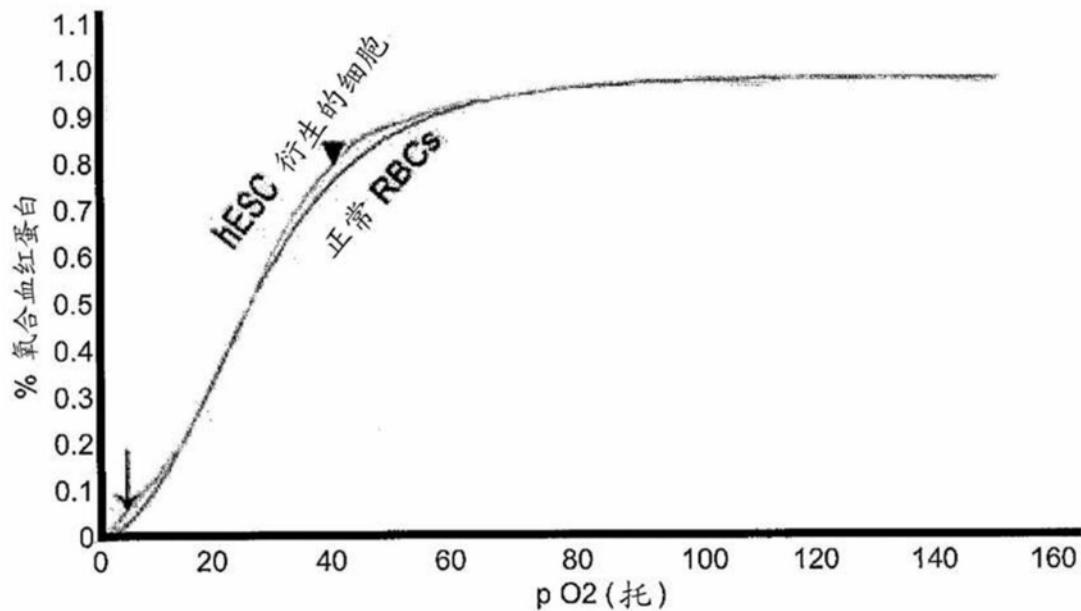


图2A

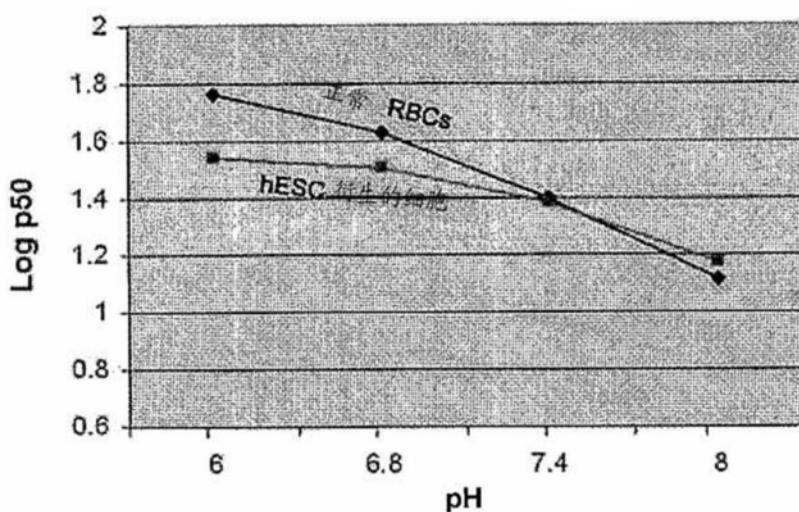


图2B

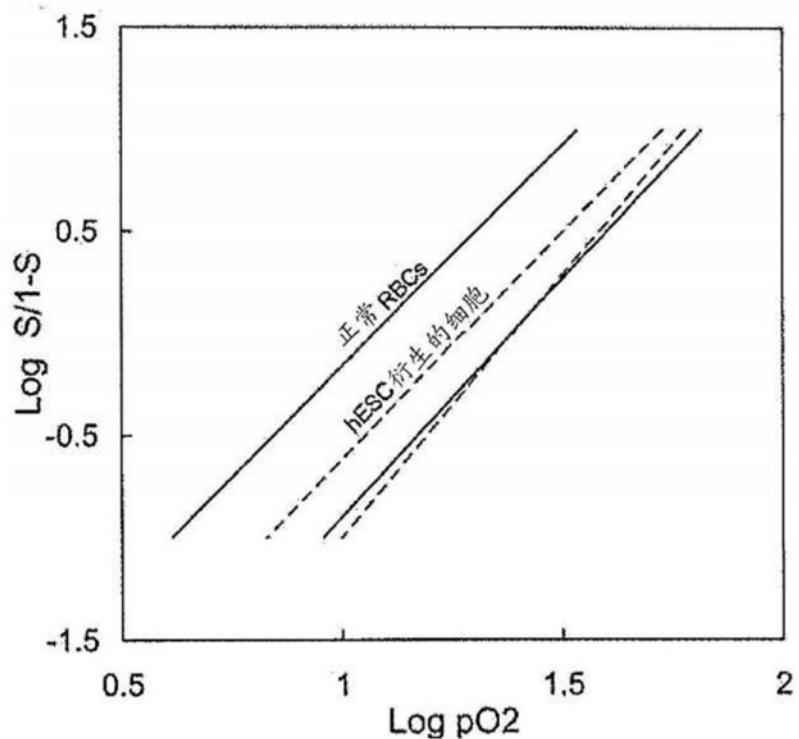


图2C

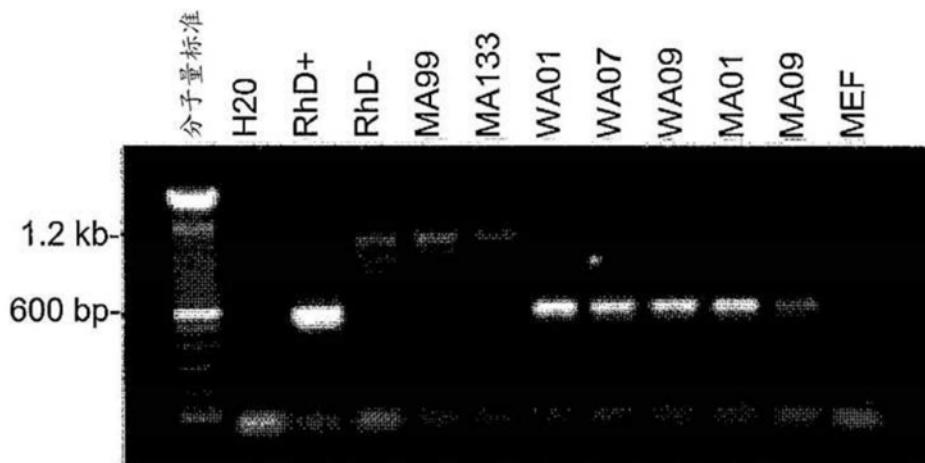


图3A



图3B

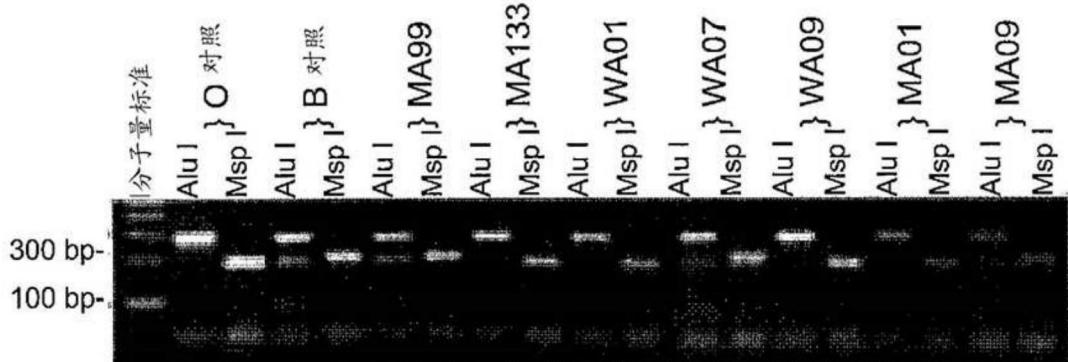


图3C

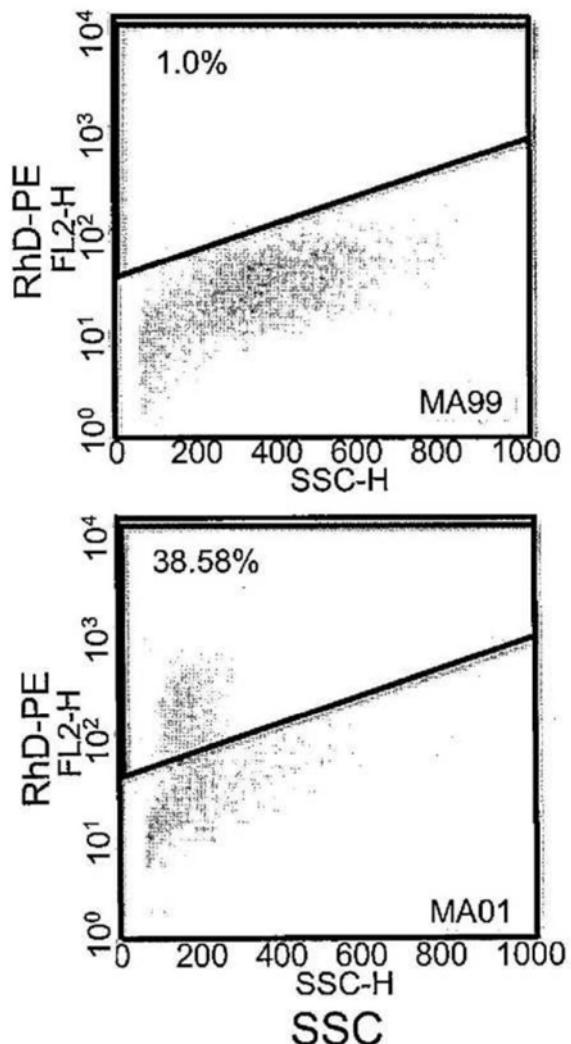


图3D

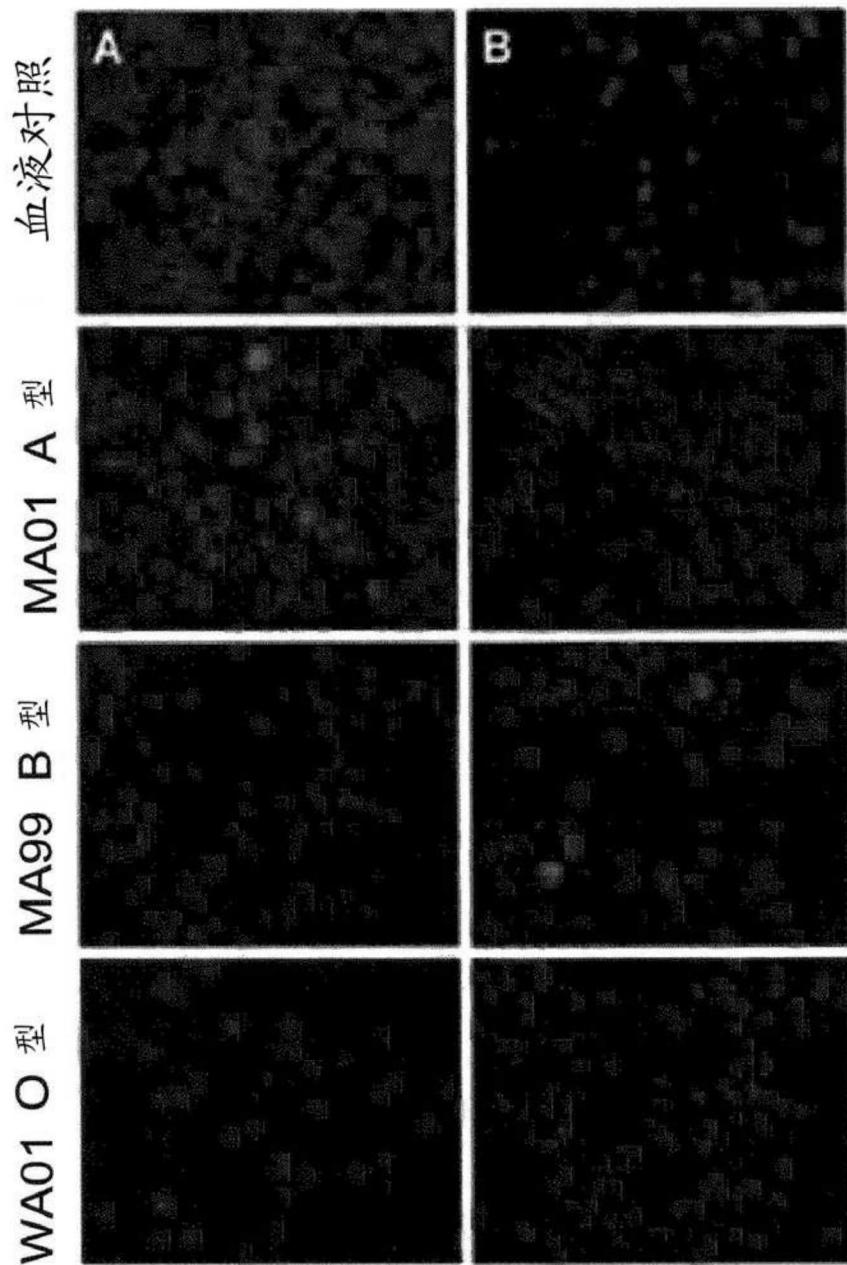


图3E

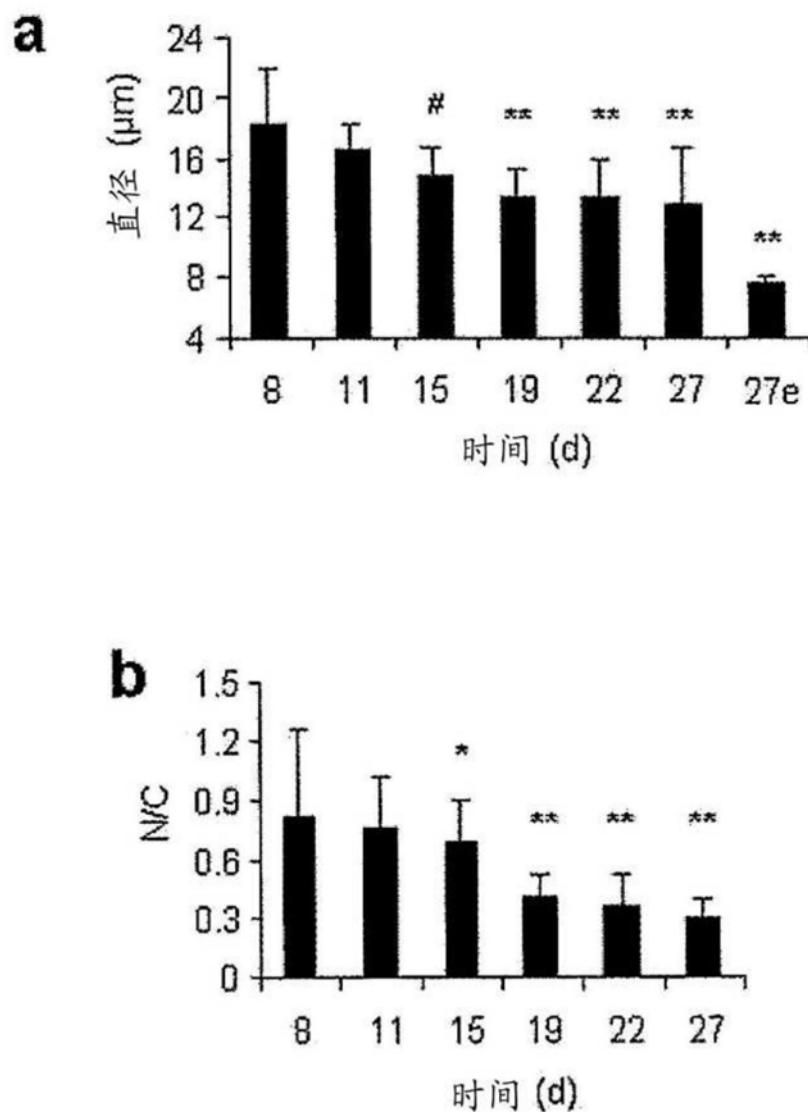


图4

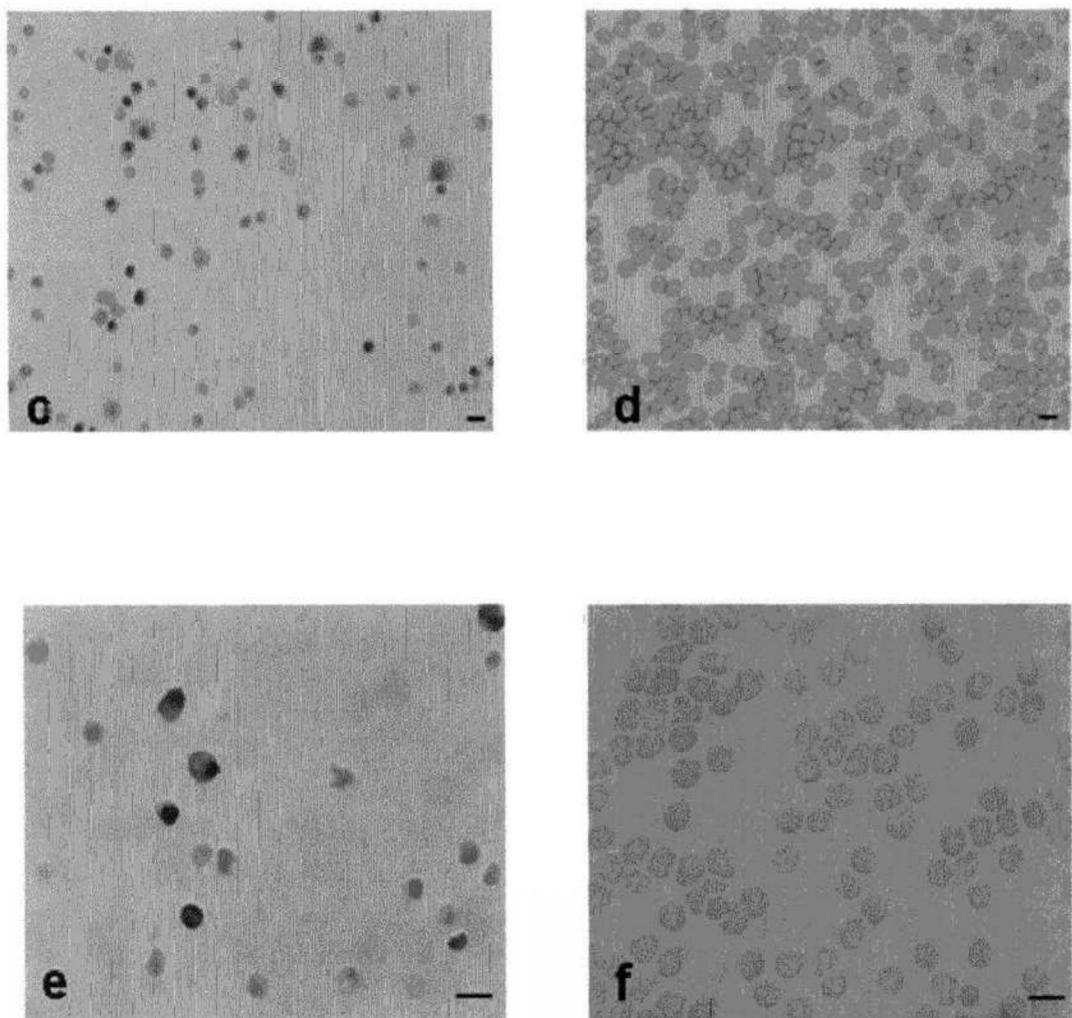


图4(续)

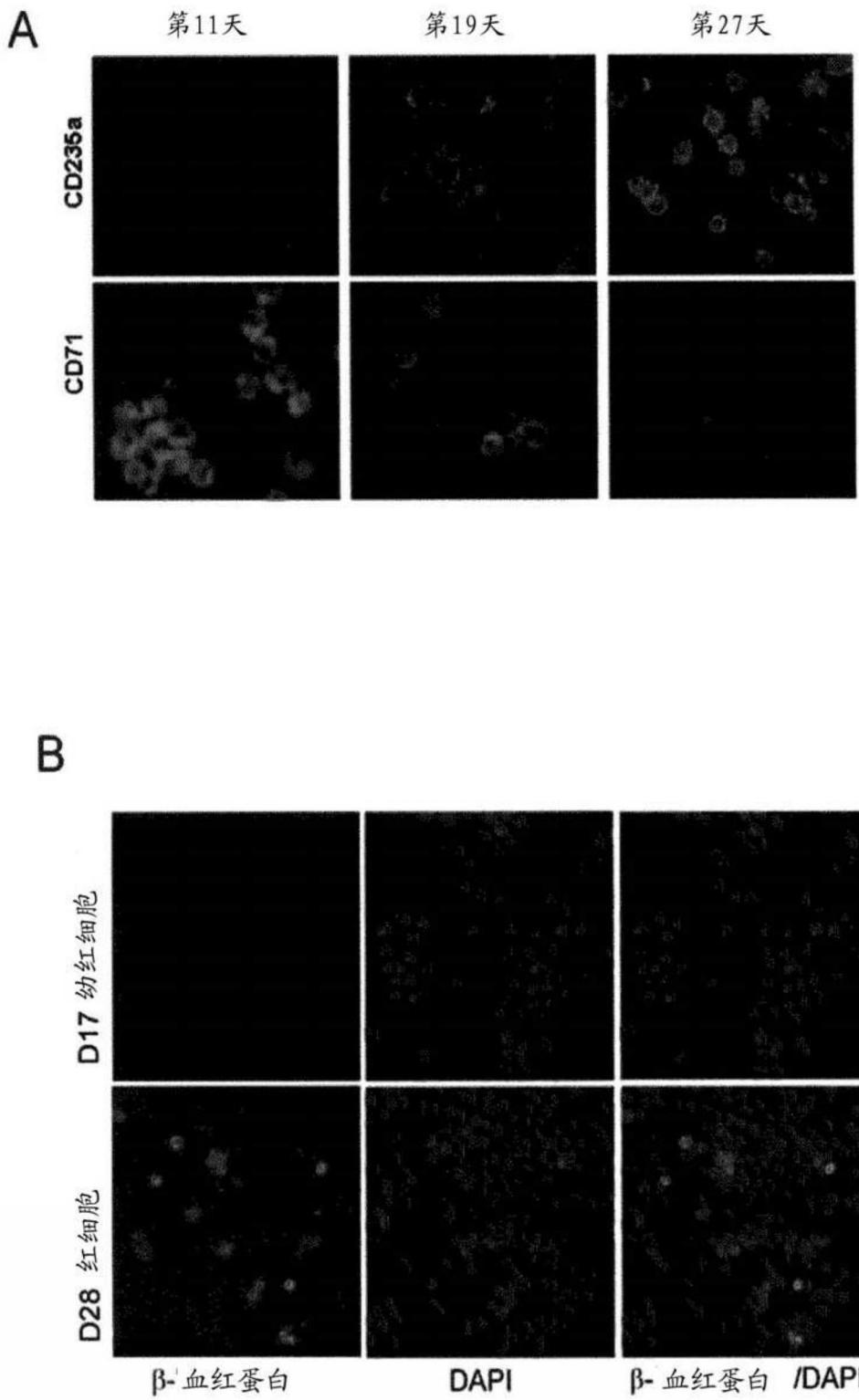


图5

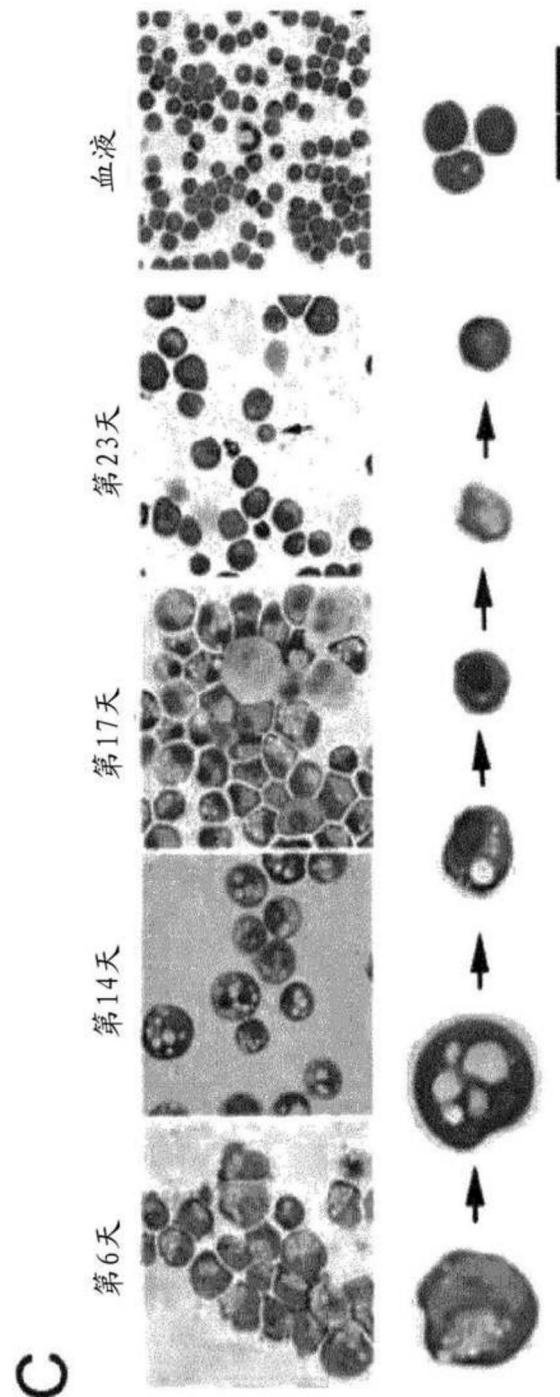


图5C

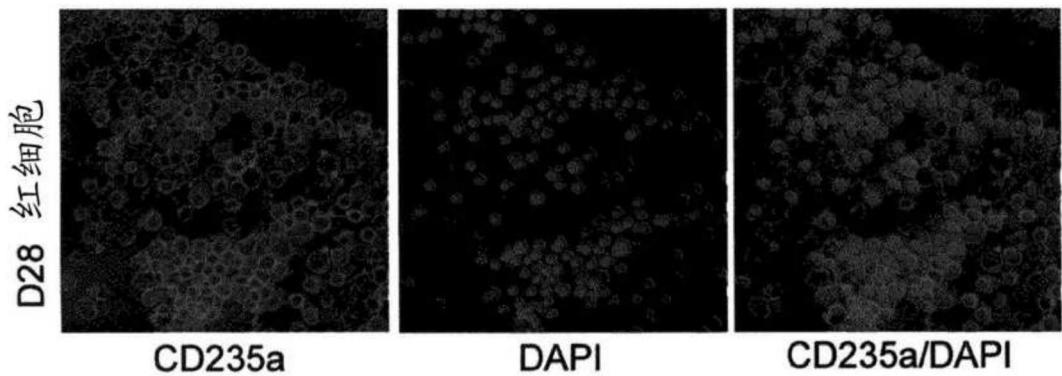


图6

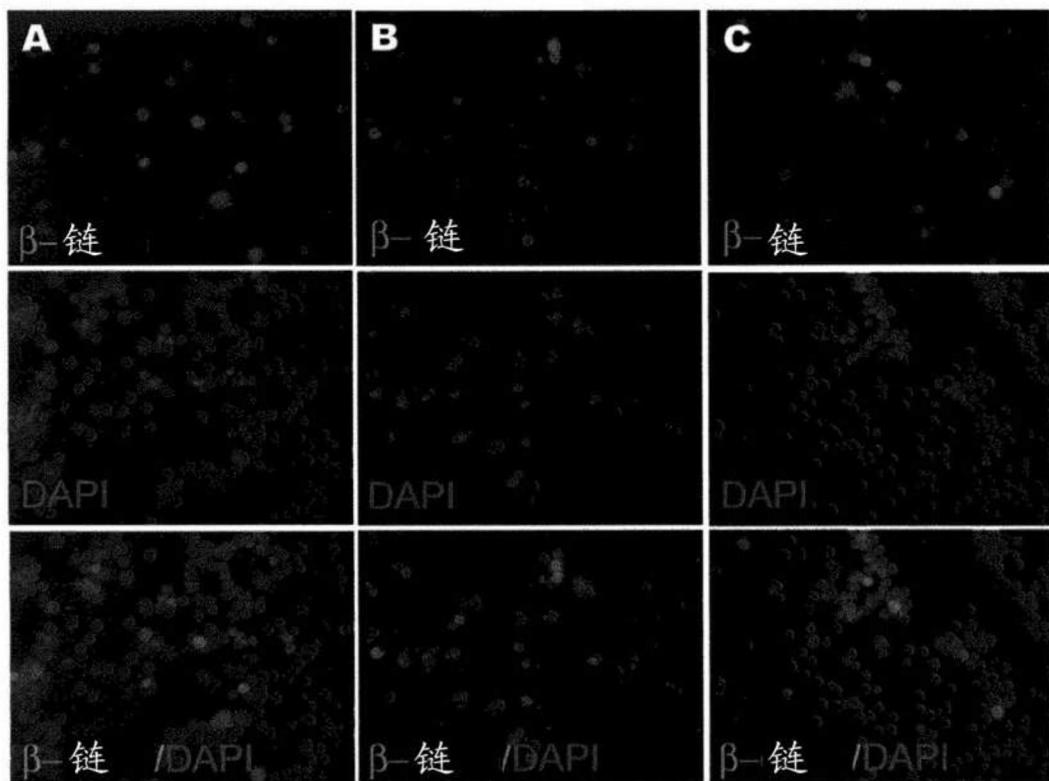


图7

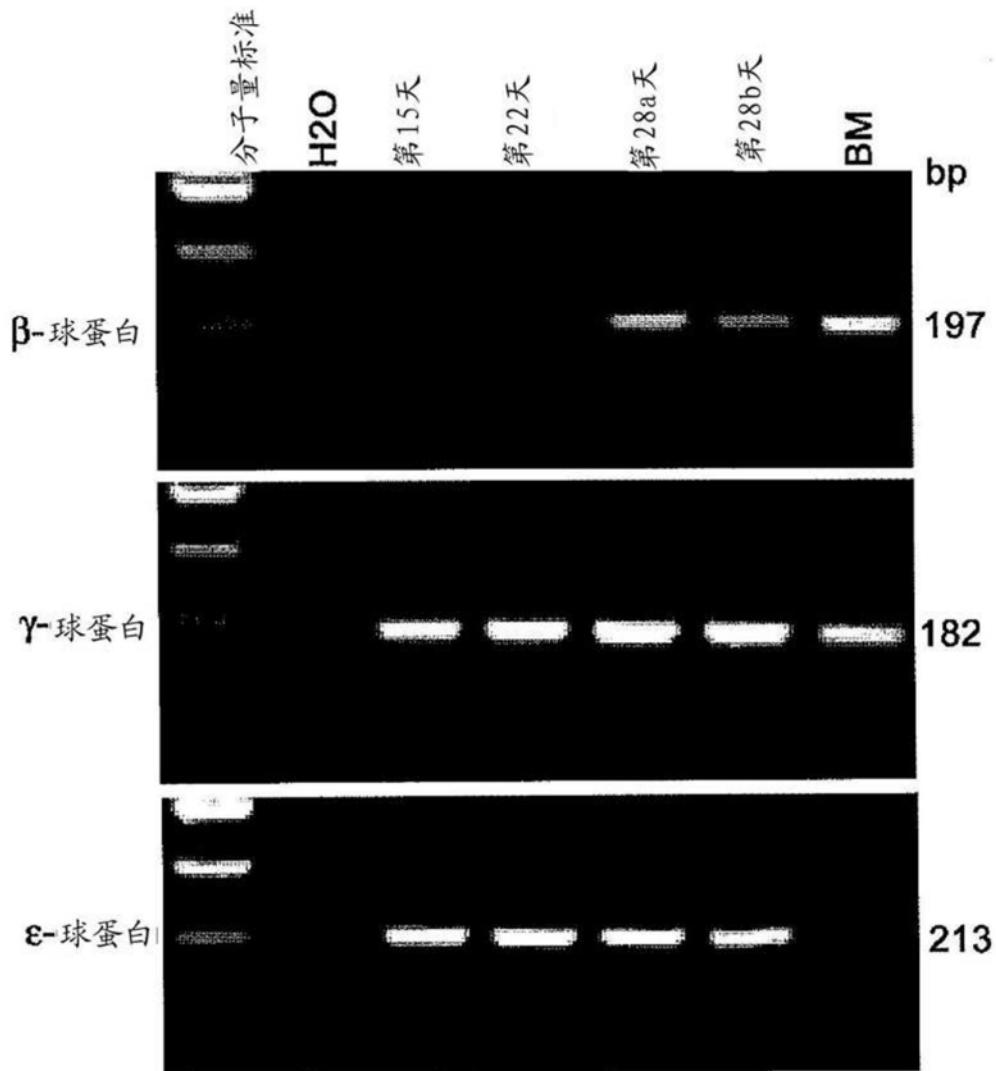


图8

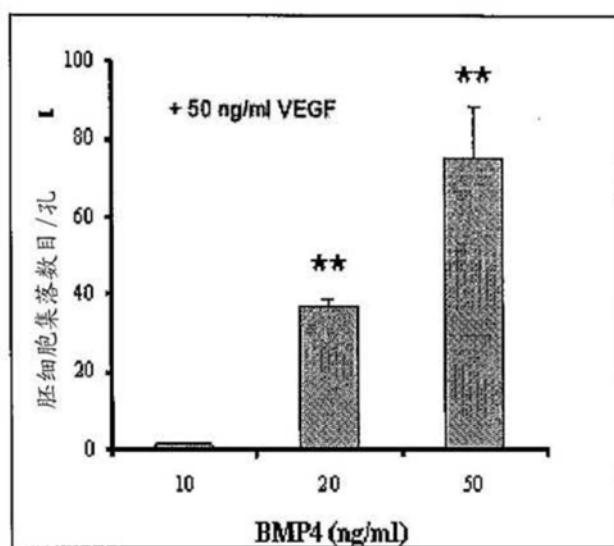


图9A

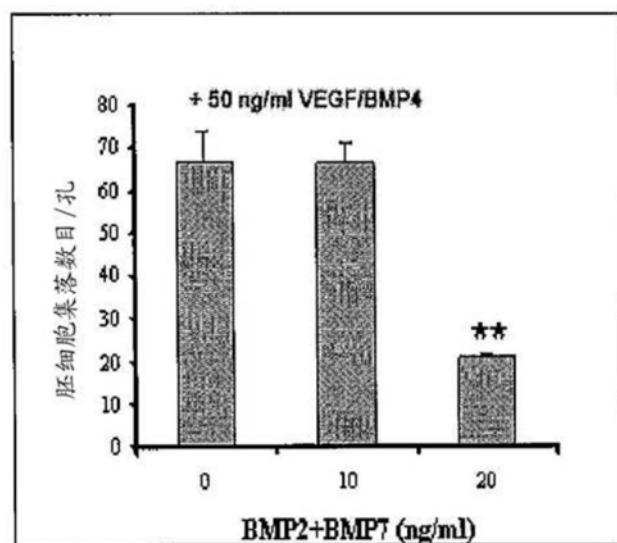


图9B

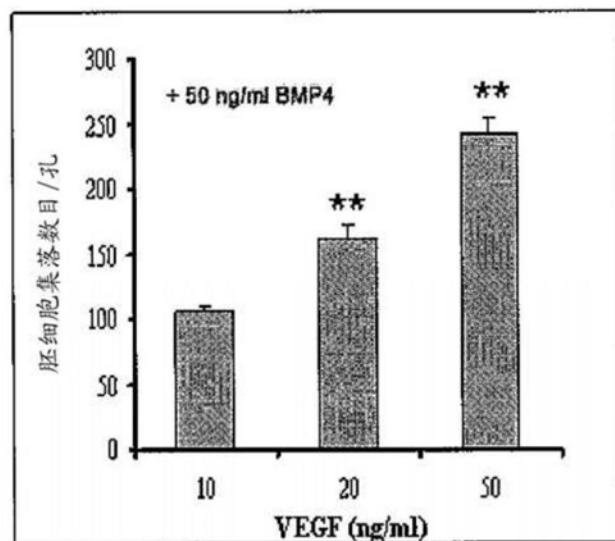


图9C

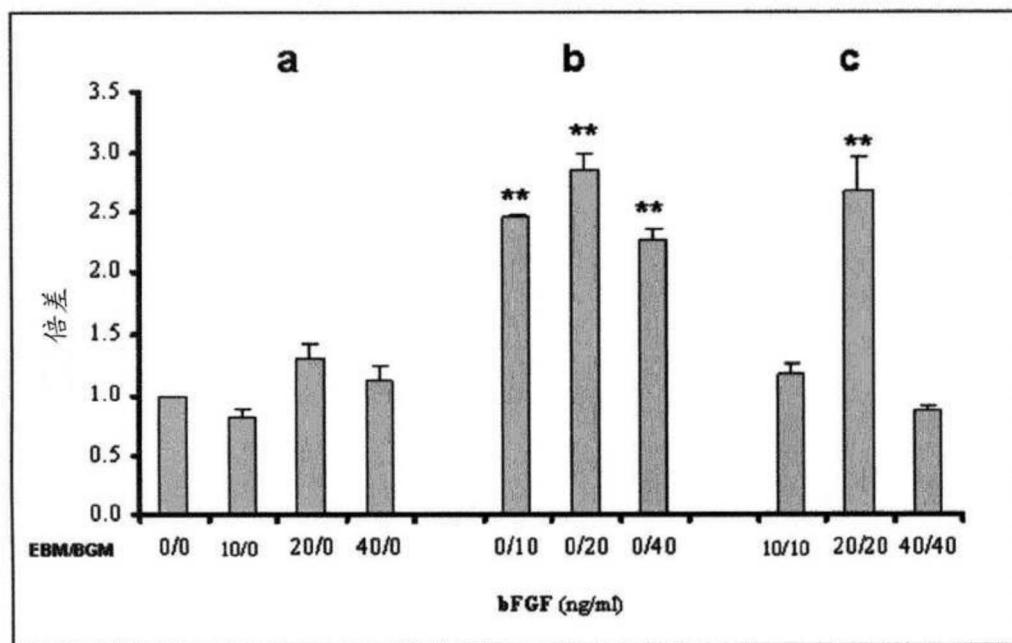


图10A

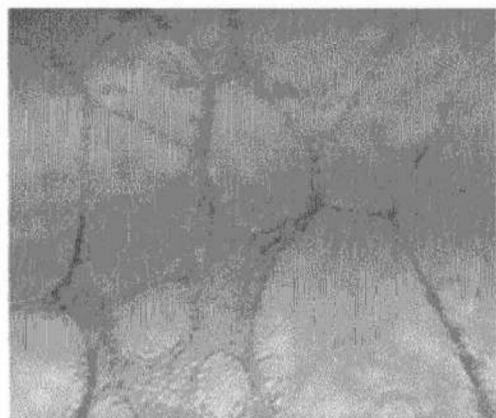


图10B

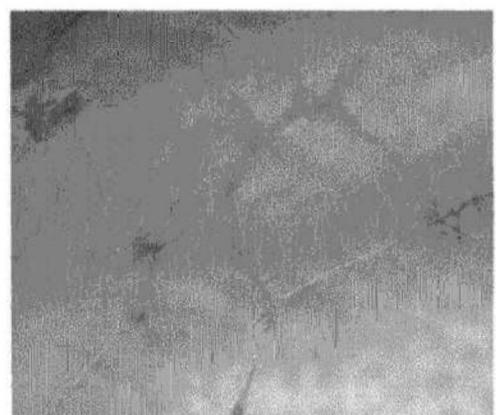


图10C

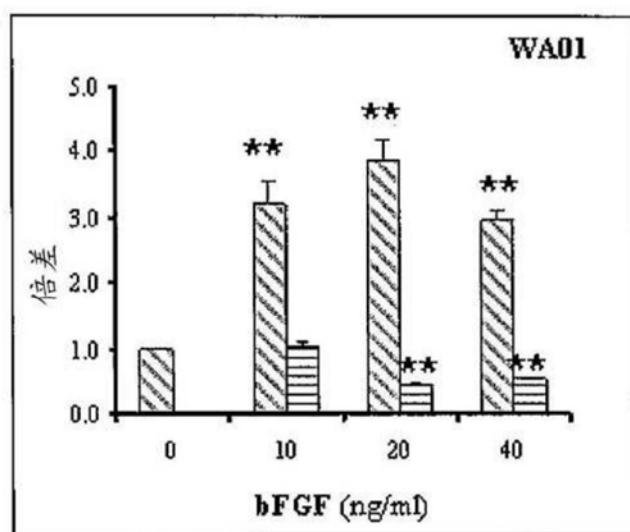


图11A

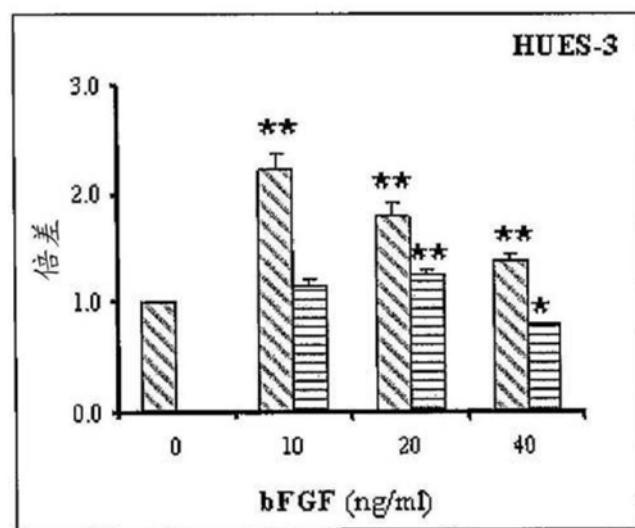


图11B

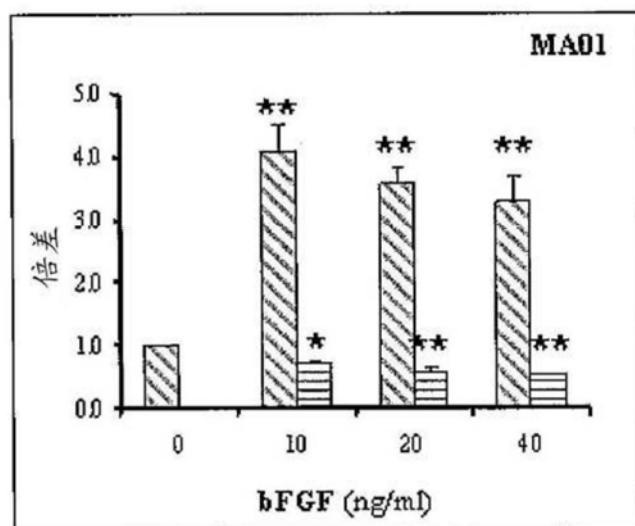


图11C

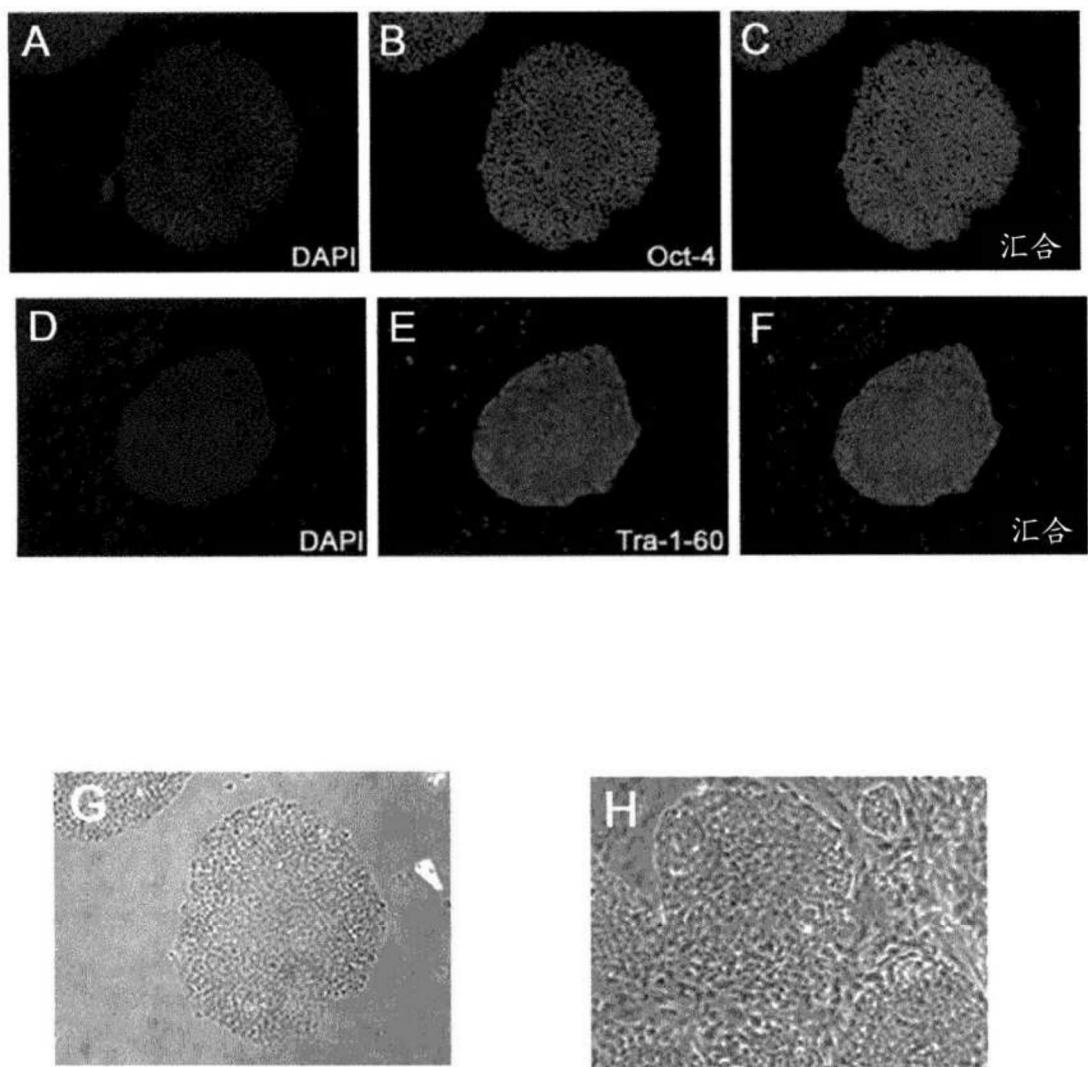


图12

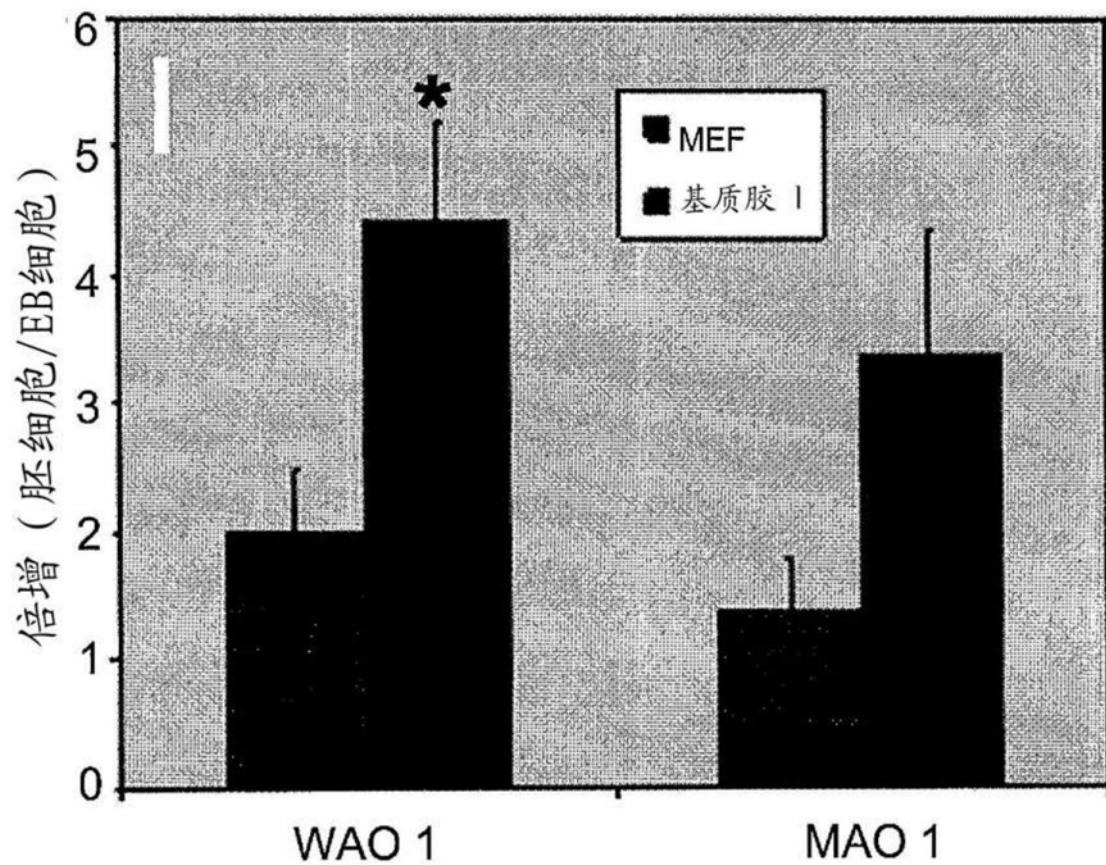


图12(续)

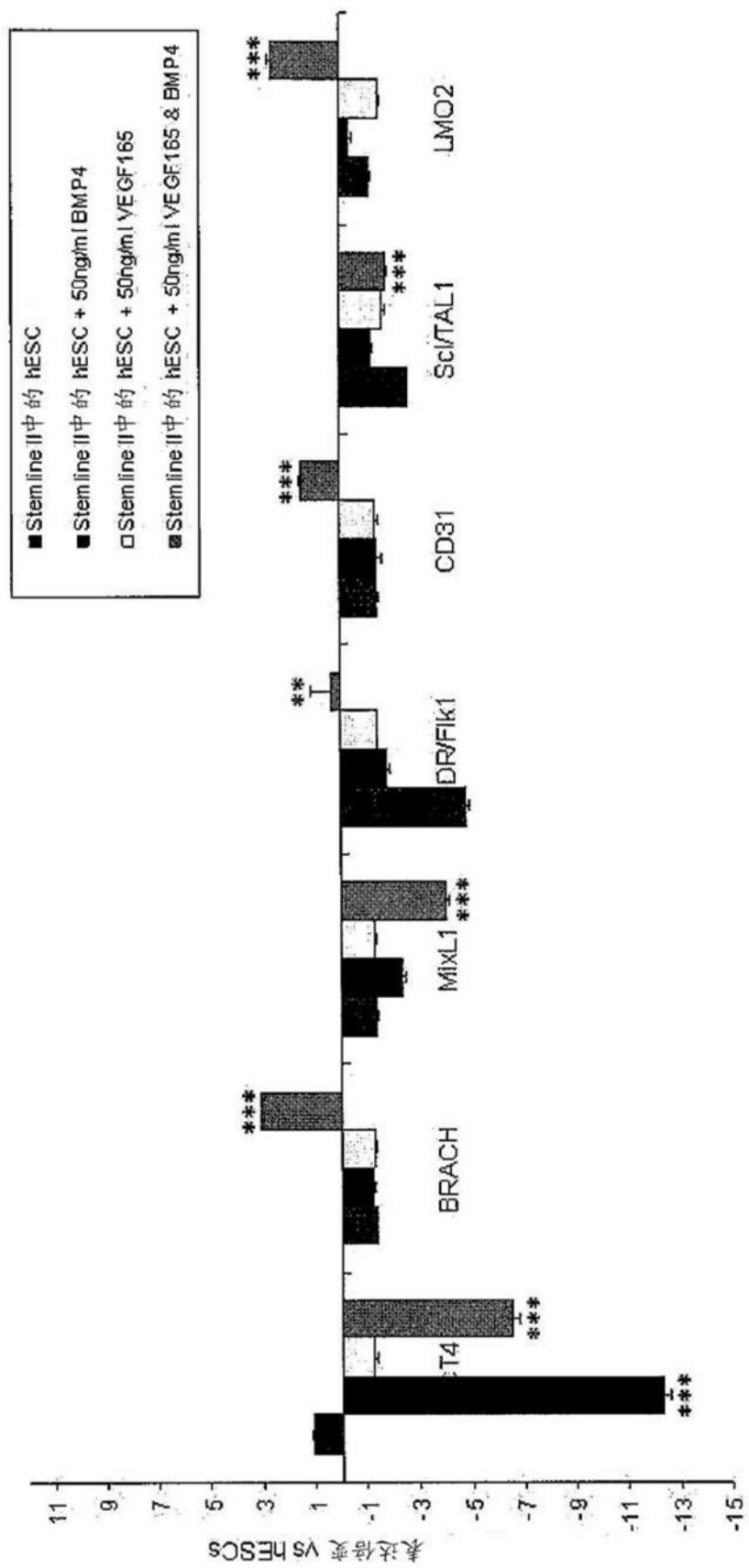


图13

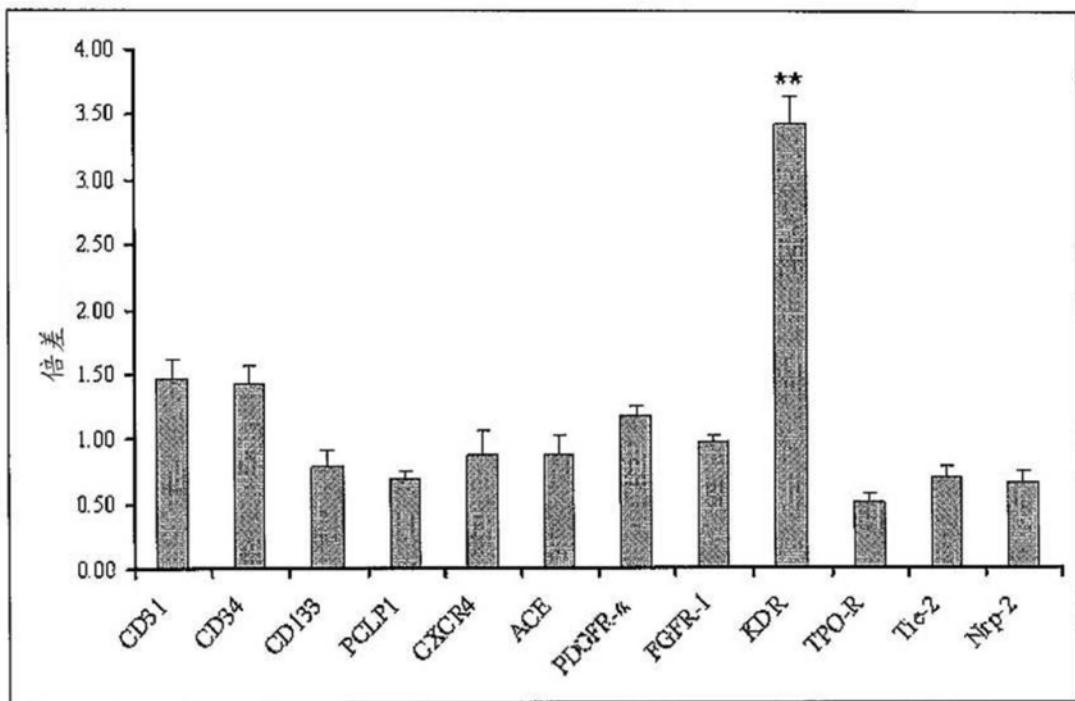


图14

(SEQ ID NO: 2)

1	ggaaaacgag	tcaggggtcg	gaataaaattt	tagtatattt	tgtgggcaat	tcccagaaaa
61	taatggctat	gagttctttt	ttgatcaact	caaactatgt	cgaccccaag	ttccctccat
121	gcgaggaata	ttcacagagc	gattacctac	ccagcgacca	ctcgccccgg	tactacgccc
181	gcccgcagag	gcfagagagc	agcttccagc	cgaggcgggg	cttcggccgg	cgcggccgt
241	gcaccgtgca	gcgtacgag	gcctggccgg	accctggcc	cccgccgcct	ccgcacccac
301	ccccggccgc	cccgccaccc	ccgggtctgt	ccccctggggc	tcctgcggcg	ccacccggcg
361	gggccttcct	cccgagccc	ggccagcgct	gcfaggcgggt	cagcagcagc	ccccccggcc
421	ctccctgcgc	ccagaacccc	ctgcacccca	gcccgtcccc	ctccgcgtgc	aaagagcccg
481	tctgttaccc	ctggatgcgc	aaagtctacg	tgagcacggt	aaaccccaat	tacgcggcgc
541	gggagcccaa	gcgcctctcg	accgcctaca	cgcgccagca	ggtcttggag	ctggagaagg
601	aatttcaacta	caaccgcgtac	ctgacacggc	gcgggagggt	ggagatgcgc	cacgcgtct
661	gcctctccga	gcgcagatc	aaagatctgtt	tcagaacccg	gcfcatgaag	tggaaaaaaag
721	accacaagg	gccccaaaccc	aaagatccgc	cggggtgggtc	ggcaggctca	gcgggagggc
781	ccccctggccg	gccccatgg	ggccccccgc	cgctctatgt	cccccgccacg	cgggagccac
841	gaacctcgcc	gtgggggtgg	gcagttagtgc	caggggatgg	ggtgggggg	caggaggggg
901	ccctggggcc	tggggccccc	aaaaatctat	ctggccctccc	ccacactta	tatacataata
961	aacgcagaag	agggggaggg	gaagctttat	ttatagaaat	gacaatagag	ggccacgggg
1021	aggccccccc	agaagcaaga	ttcaaatctc	ttgtttttctt	tctaaaaaa	aagaaaaaaa
1081	aaaagcaaga	agaaggaaga	aagaaaaaga	cagaaagaga	aataggagga	ggctcgacgt
1141	cctcgtttc	agcttggcg	aaagatggatc	cacgtttcat	cttaatcac	gccaggtcca
1201	ggcccatctg	tcttgtttcc	tctgcccagg	agaagacggg	cctcggtggc	gaccattacc
1261	tcgacacccg	ctaacaatg	aggcccgct	cgccgcctc	cgcctctgt	actggcgctg
1321	ctggaagaca	gcctggatt	cttttttttg	tcccccaactc	ccgataccca	gcgaaagcac
1381	cctctgactg	ccagatagt	cagtgttttg	gtcacggtaa	cacacacaca	ctctccctca
1441	tcttcgtgca	ccattcaactg	agggccagaa	tgactgtca	cccaacttca	ccgtgggggtt
1501	gggggtgggc	aacagaggag	gggagcaagt	agggaaagggg	gtggccttga	caactcaggaa
1561	gtgagcagg	aaatttgagtc	caagggaaaa	gagagactca	gagacccccc	agggccttcc
1621	tctgaaaggc	caagccaagc	catgttggc	agggtgaggg	gccagttgag	ttctgggagc
1681	tgggcactac	tctgcgtc	cagagtgtta	cagcagaagc	ctcttcctta	gactgaaaat
1741	gaatgtgaaa	cttagaaata	aaatgtgccc	ctccccagtct	gggaggagga	tgttgcagag
1801	ccctctccca	tagtttata	tgttgcatcg	tttatttata	ttattgataa	tatttattt
1861	actatttttt	tgtgtcatgt	gagtcccttc	tccttttctc	tttctgcacat	tccaaaaccca
1921	ggcccttc	tacccctggg	gctgctttag	tctagaaccc	ttcgatgt	tgaatatctg
1981	tgtgtgtac	agagtgacaa	tagaaataaa	tgtttggttt	cttgcacca	gcaaaaaaaaa
2041	aa					

图15

(SEQ ID NO: 4)

```

1 gggaaaacgag tcaggggtcg gaataaaattt tagtatattt tgtgggcaat tccagaaaat
61 taatggctat gagttcttt ttgatcaact caaactatgt cgaccccaag ttccctccat
121 gcgaggaata ttcacagagc gattacctac ccagcgacca ctgcggggg tactacccg
181 gcggccagag gcgagagagc agcttccagc cggaggcggg ctteggggg cgccggcgt
241 gcaccgtca ggcgtacgag ggctggggg accctggcc cccggccct cgcaccac
301 cccggccccc cccggccaccc cccggctgt ccctcgggc ttctgcgeeg ccacccgeeg
361 gggccctctt cccggagcccc ggccagegtc gcgaggeggt cagcagecage ccccccgeeg
421 ctccctgcgc ccagaacccc ctgcacccca gcccgtccca ctccgcgtgc aaagagcccg
481 tcgtctaccc ctggatgcgc aaagtacg tgagcacggt aaaccccaat tacccggcg
541 gggagccaa ggcgtctcgg accgcctaca cgcgcagca ggtcttgag ctggagaagg
601 aatttacta caaccgtac ctgacacggc gccggagggt ggagatcgc caccgcgtct
661 gcctctccga ggcgcagatc aagatctgtt ccagaacccg ggcgcgtgaag tggaaaaaaag
721 accacaagtt gcccaacacc aagatccgc cggtgtgtc ggcaggctca gccggaggggc
781 cccctggccg gcccaatggg ggcccccgcg cgctctatg ccccccgcac cgggagccac
841 gaacctcggg gtgggggtgg gcatgtggatgg ggtgggggga caggagggggg
901 ccctggggcc tggggccccc aaaaatctat ctgcctccca ccacactta tatacgaata
961 aacgcagaag agggggaggg gaaatggat ttatagaaat gacaatagag ggccacgggg
1021 agggccccc agaagcaaga ttcaaatttc ttgtttttt tctttttttt aagaaaaaaa
1081 aaaagcaaga agaaggaaga aagaaaaaga cagaaagaga aataggagga ggctgcagct
1141 cctgttttc agctttggcg aagatggatc cacgtttcat cttaatcac gccagggtcca
1201 gcccacatctg tcttgggttcc tctgcggagg agaagacggg ctcgggtggc gaccattacc
1261 tcgacaccccg ctaacaaatg agggccggc cggccgcctc egccctgtactgcgact
1321 ctggaagaca gcctggatt ctttttttgc tccccactc ccgataccca gcaaaagcac
1381 cctctgactg ccagatagtg cagtgtttt gtcacggtaa cacacacaca ctctccctca
1441 tcttcgtgc ccattcactg agggccagaa tgactgctca cccacttcca cctgggggtt
1501 ggggggtggc aacagaggag gggagcaagt agggaaagggg gtggccttga caactcagga
1561 gtgagcaggg aaatttgagtc caaggaaaaa gagagactca gagaccgggg agggccttcc
1621 tctgaaaggc caagccaaac catgttggc agggtgaggg gccagtttag ttctggggc
1681 tgggactac tctgcccactc cagatgtta cagcagaagc ctctcttca gactgaaaat
1741 gaatgtgaaa cttagaaata aaatgtggcc ctcccactc gggaggagga tggcagag
1801 ccctctccca tagttttt tggatgttcatgt ttatttttca ttattgtataa tattattttt
1861 actattttt tggatgttcatgt gggatgttcatgt ttatttttca ttatgtacat tccaaaacca
1921 gggccctcc tacctctggg gctgttggag tctagaaccc ttcgtatgtg tgaatatctg
1981 tggatgttcatgt gggatgttcatgt tggatgttcatgt tggatgttcatgt tggatgttcatgt

```

图16

(SEQ ID NO: 1)

```

1 MAMSSFLINS NYVDPKFPPC EEYSQSDYLP SDHSPGYYAG GQRRESSFQP EAGFGRRAAC
61 TVQRYAACRD PGPPPPPPPPP PPPPPPPGLS PRAPAPPPAG ALLPEPGQRC EAVSSSSPPPP
121 PCAQNPLHPS PSHSACKEPV VYPWMRKVHV STVNPNYAGG EPKRSRTAYT RQQVLELEKE
181 FHYNRYLTRR RRVEIAHALC LSERQIKIWF QNRRMKWKD HKLPNTKIRS GGAAGSAGGP
241 PGRPNNGGPRAL

```

图17

(SEQ ID NO: 3)

```

1 MAMSSFLINS NYVDPKFPPC EEYSQSDYLP SDHSPGYYAG GQRRESSFQP EAGFGRRAAC
61 TVQRYAACRD PGPPPPPPPPP PPPPPPPGLS PRAPAPPPAG ALLPEPGQRC EAVSSSSPPPP
121 PCAQNPLHPS PSHSACKEPV VYPWMRKVHV STVNPNYAGG EPKRSRTAYT RQQVLELEKE
181 FHYNRYLTRR RRVEIAHALC LSERQIKIWF QNRRMKWKD HKLPNTKIRS GGAAGSAGGP
241 PGRPNNGGPRAL

```

图18

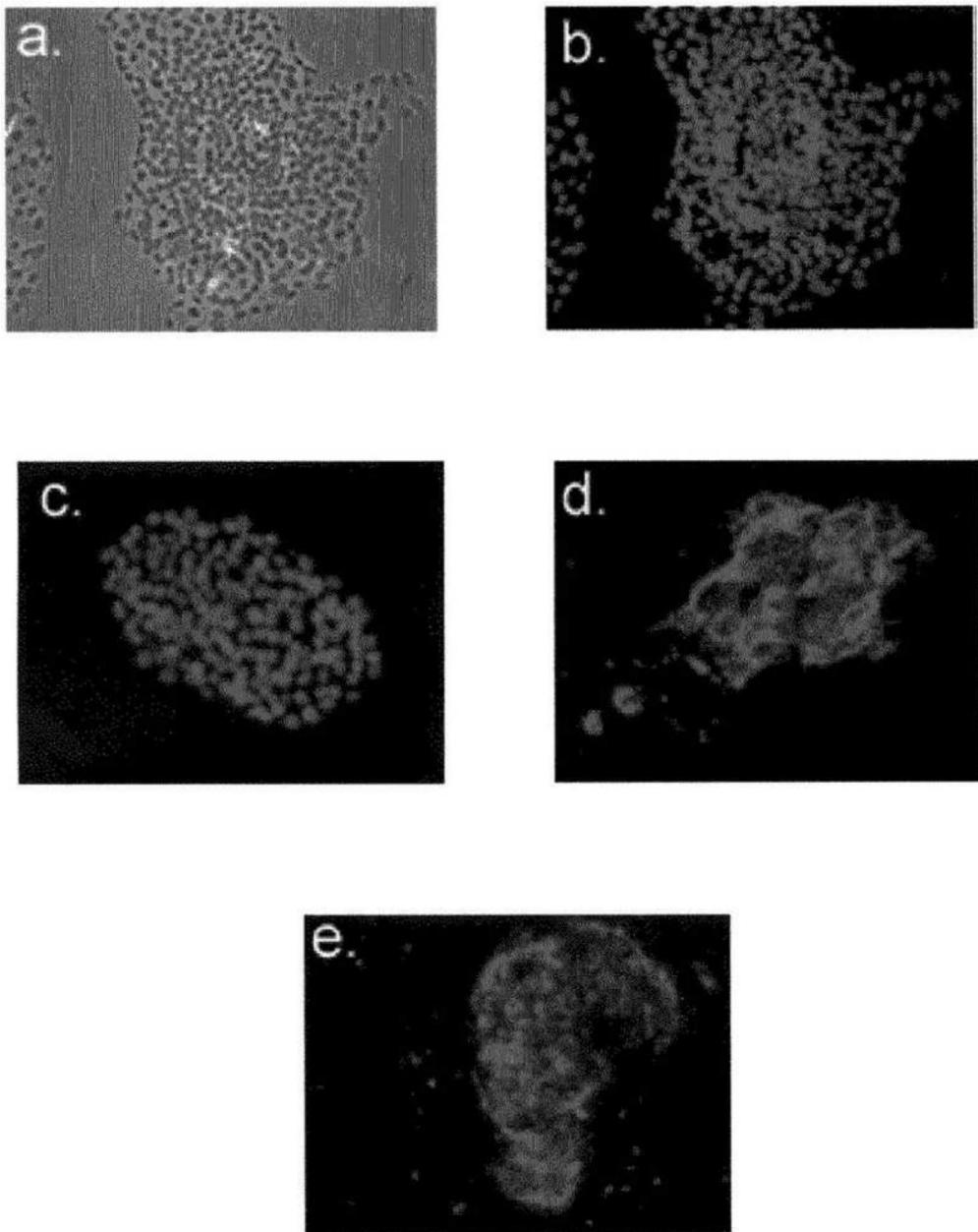


图19

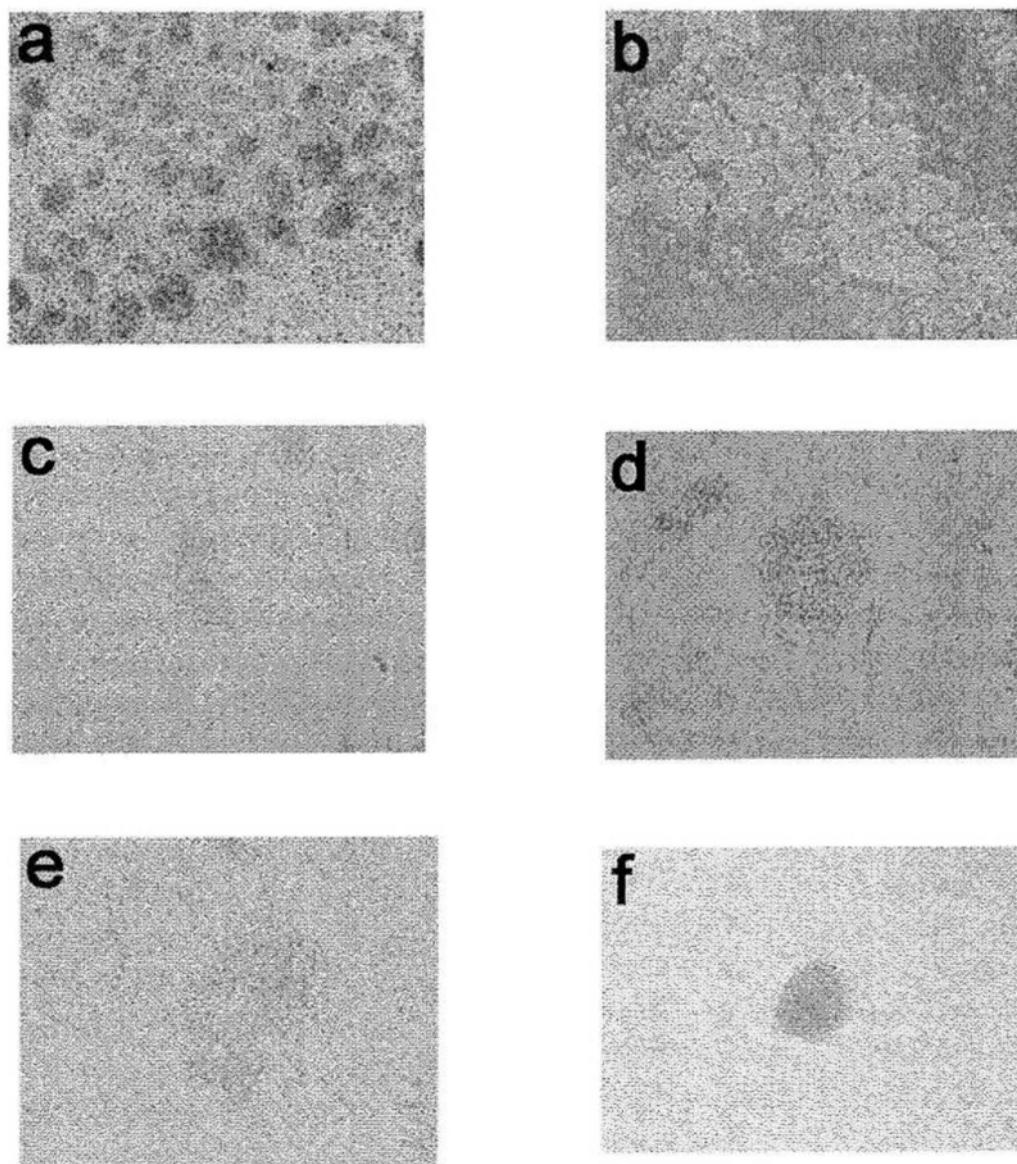


图20

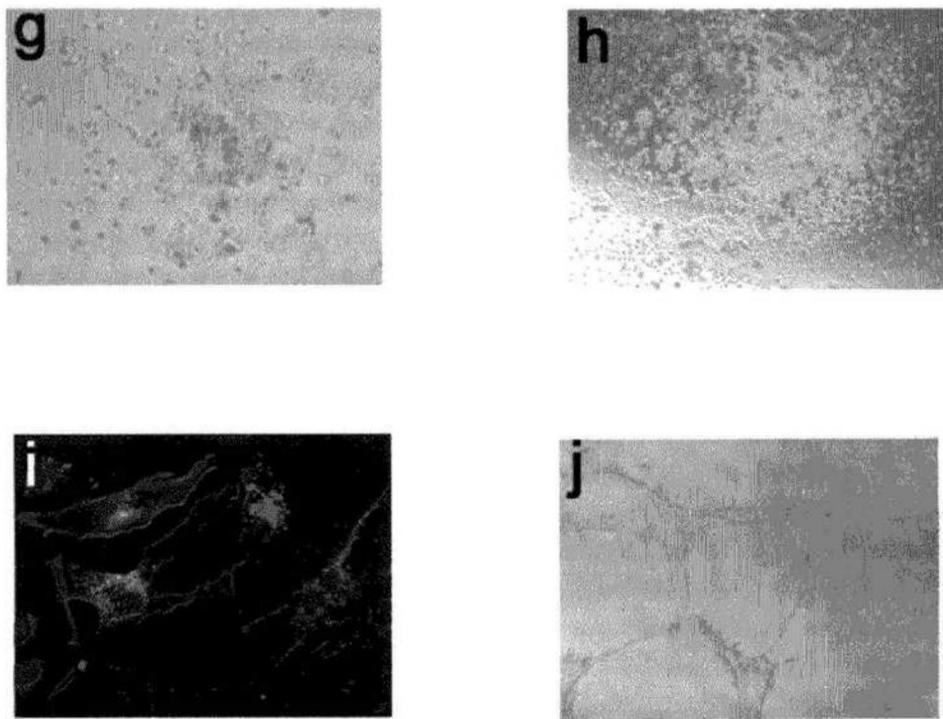


图20 (续)

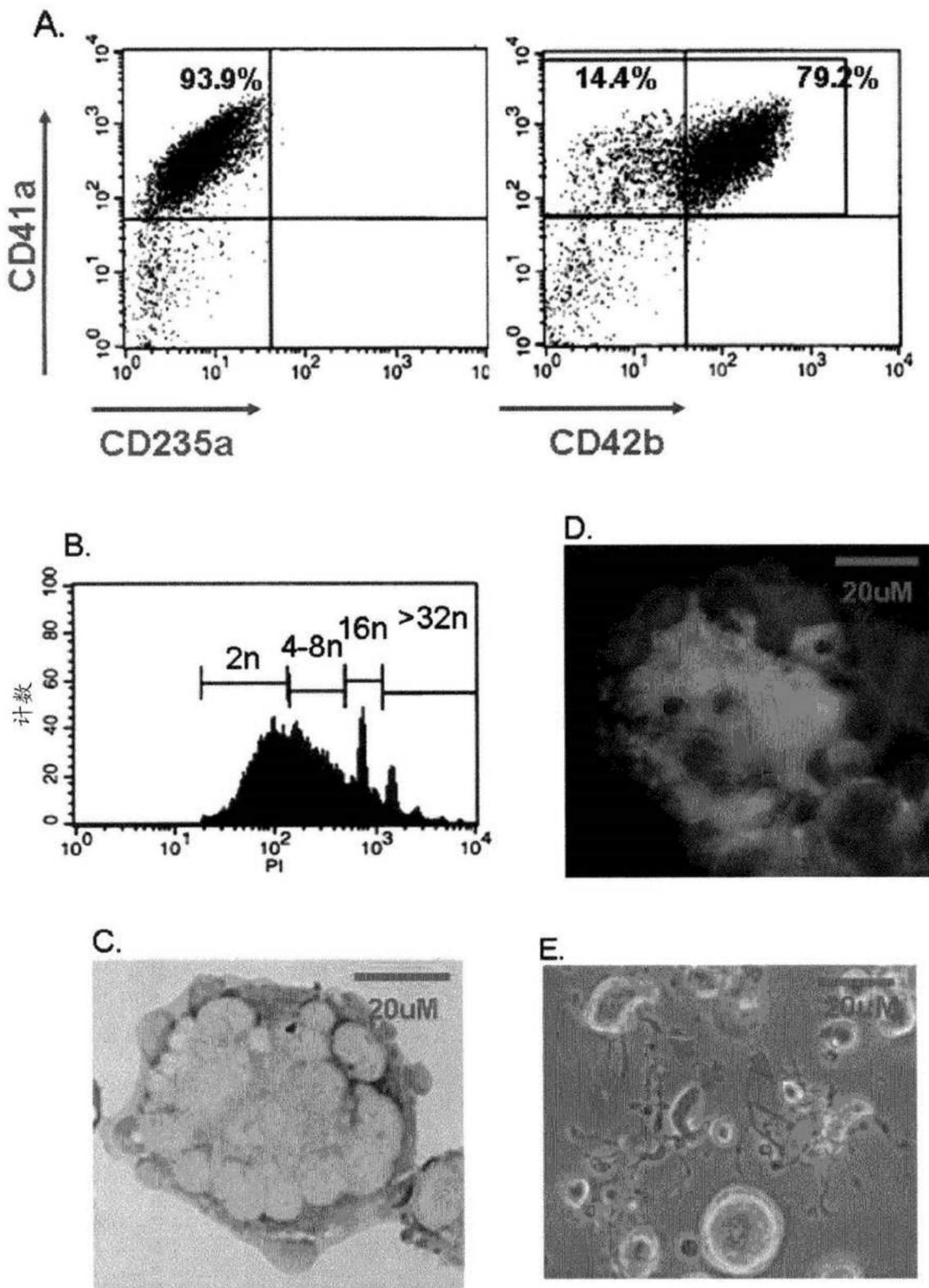


图21

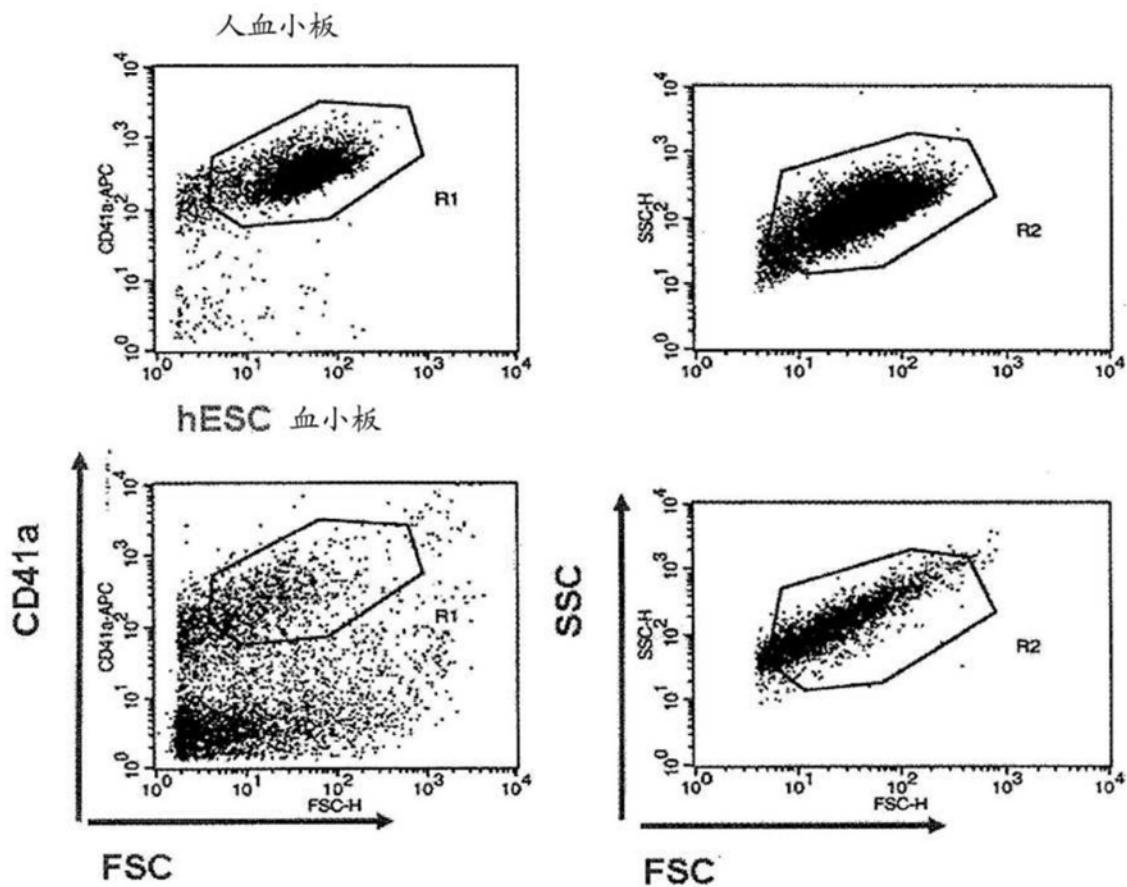


图22