



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107922924 B

(45) 授权公告日 2022.01.11

(21) 申请号 201680047758.8

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2016.07.22

C12N 5/078 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107922924 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2018.04.17

WO 2014138485 A1, 2014.09.12

(30) 优先权数据

1557020 2015.07.23 FR

S Bruno等. In Vitro And In Vivo

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.02.12

Megakaryocyte Differentiation Of Fresh

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/067594 2016.07.22

And Ex-Vivo Expanded Cord Blood Cells:
Rapid And Transient Megakaryocyte
Reconstitution.《Haematologica》.2003, 第88
卷(第4期), 第379-387页.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/013262 EN 2017.01.26

Bing Liu等. A potential activity of
valproic acid in the stimulation of
interleukin-3 mediated megakaryopoiesis
and erythropoiesis.《Experimental
Hematology》.2010, 第38卷(第8期), 第685-695
页.

(73) 专利权人 法国血液编制

LINZHAO CHENG等. Human Mesenchymal
Stem Cells Support Megakaryocyte and Pro-
Platelet Formation From CD341
Hematopoietic Progenitor Cells.《JOURNAL
OF CELLULAR PHYSIOLOGY》.2000, 第184卷第58-
69页.

地址 法国圣但尼

审查员 崔娟娟

专利权人 国家健康与医学研究院
斯特拉斯堡大学

(72) 发明人 卡特琳娜·施特拉塞尔
克里斯蒂安·加谢
弗朗索瓦·兰扎
娜塔莉·布鲁瓦德

(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有
限公司 11270

代理人 王子晔 姚开丽

权利要求书2页 说明书16页 附图12页

(54) 发明名称

巨核细胞祖细胞及其产生带有前血小板的
MK和/或血小板的应用

(57) 摘要

本发明涉及一种产生CD34+CD41^高巨核细胞
(MK)祖细胞的方法, 和通过所述方法获得的巨核
细胞前体细胞基本上纯的细胞群。本发明还涉
及一种使用CD34+CD41^高细胞产生带有前血小板
的MK和/或血小板的方法。

1. 一种离体产生带有前血小板的巨核细胞(MK)和/或血小板的方法,包括:

a) 在芳香烃受体(AhR)拮抗剂的存在下,将MK祖细胞的经分离的CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞群在含血小板生成素(TPO)的无血清培养基中培养足以获得包含带有前血小板的MK和/或血小板的细胞群的时间;和

b) 收集所述包含带有前血小板的MK和/或血小板的细胞群。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,步骤a)中的培养进行5~9天。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述无血清培养基包含20~100ng/ml的TPO。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述方法在步骤a)之前包括:

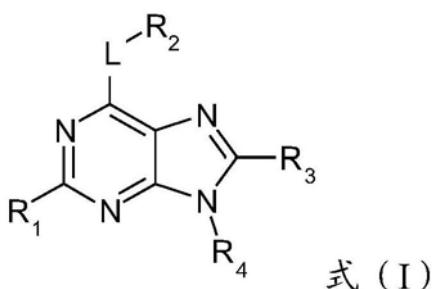
a0) 在芳香烃受体(AhR)拮抗剂的存在下,将造血干细胞(HSC)在含密度脂蛋白(LDL)、干细胞因子(SCF)、TPO、IL-6和IL-9的无血清培养基中培养足以获得包含CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞的细胞群的时间;和

a1) 从所述细胞群中分离出所述CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中,步骤a0)中的无血清培养基包含10~30μg/ml的LDL、25~100ng/ml的SCF、40~50ng/ml的TPO、20~30ng/ml的IL-6和20~30ng/ml的IL-9。

6. 根据权利要求4所述的方法,其中,步骤a0)中的培养进行6~8天。

7. 根据权利要求1或4所述的方法,其中,在步骤a)和步骤a0)中,所述AhR拮抗剂独立地是式(I)的化合物



L选自-NR_{5a}(CH₂)₂₋₃-、-NR_{5a}(CH₂)₂NR_{5b}-、-NR_{5a}(CH₂)₂S-、-NR_{5a}CH₂CH(OH)-或-NR_{5a}CH(CH₃)CH₂-;其中R_{5a}和R_{5b}独立地选自氢或C₁₋₄烷基;

R₁选自噻吩基、呋喃基、苯并咪唑基、异喹啉基、咪唑并吡啶基、苯并噻吩基、嘧啶基、吡唑基、吡啶基、咪唑基、吡咯烷基、吡嗪基、哒嗪基、吡咯基或噻唑基;

R₂选自-S(0)₂NR_{6a}R_{6b}、-NR_{6a}C(O)NR_{6b}R_{6c}、苯基、吡咯并吡啶基、吲哚基、噻吩基、吡啶基、三唑基、2-氧代咪唑烷基、吡唑基或吲唑基;其中

R_{6a}、R_{6b}和R_{6c}独立地选自氢或C₁₋₄烷基;以及

R₃选自氢、C₁₋₄烷基或联苯基;和

R₄选自C₁₋₁₀烷基、C₁₋₄烯基、氧杂环丁基、四氢呋喃基、环己基、(氧代吡咯烷基)乙基、四氢吡喃基、苯基或苄基。

8. 根据权利要求1或4所述的方法,其中,在步骤a)和/或步骤a0)中,所述AhR拮抗剂是StemRegenin 1(SR1)。

9. 根据权利要求1、2和4~6中任一项所述的方法,所述方法进一步包括:从所收集的包含带有前血小板的MK和/或血小板的细胞群中,选择出CD41/CD61+和CD42c+细胞。

10. 根据权利要求1、2和4~6中任一项所述的方法,所述方法进一步包括:洗涤所述带

有前血小板的巨核细胞 (MK) 和/或血小板, 和将经洗涤的细胞悬浮在输注缓冲液中。

11. 根据权利要求7所述的方法, 其中, R_1 的所述噻吩基、呋喃基、苯并咪唑基、异喹啉基、咪唑并吡啶基、苯并噻吩基、嘧啶基、吡唑基、咪唑基、吡咯烷基、吡嗪基、哒嗪基、吡咯基和噻唑基被独立地选自卤素、氰基、 C_{1-4} 烷基、经卤素取代的 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基、-S(0)₀₋₂ R_{8a} 和-C(0)OR_{8a} 中的1~3种基团取代, 其中 R_{8a} 选自氢或 C_{1-4} 烷基。

12. 根据权利要求7所述的方法, R_2 的所述苯基、吡咯并吡啶基、吲哚基、噻吩基、吡啶基、三唑基、氧化咪唑烷基、吡唑基或吲唑基被独立地选自羟基、卤素、甲基、甲氧基、氨基、-O(CH_2)_nNR_{7a}R_{7b}、-OS(0)₂NR_{7a}R_{7b} 和-NR_{7a}S(0)₂R_{7b} 中的1~3种基团取代; 其中R_{7a} 和R_{7b} 独立地选自氢或 C_{1-4} 烷基。

13. 根据权利要求7所述的方法, 其中R₄ 的所述 C_{1-10} 烷基、 C_{1-4} 烯基、氧杂环丁基、四氢呋喃基、环己基、(氧化吡咯烷基)乙基、四氢吡喃基、苯基和苄基被独立地选自羟基、 C_{1-4} 烷基和经卤素取代的 C_{1-4} 烷基中的1~3种基团取代。

14. 一种产生巨核细胞 (MK) 祖细胞的方法, 包括:

a0) 在芳香烃受体 (AhR) 拮抗剂的存在下, 将造血干细胞 (HSC) 在含密度脂蛋白 (LDL)、干细胞因子 (SCF)、TPO、IL-6 和 IL-9 的无血清培养基中培养足以获得包含CD34⁺CD9⁻CD41^暗 细胞的细胞群的时间; 以及

a1) 从所述细胞群中分离出所述CD34⁺CD9⁻CD41^暗 细胞。

15. 根据权利要求14所述的方法, 其中, 步骤a0) 如权利要求4~8和11~13中任一项限定的来执行。

16. 一种含巨核细胞 (MK) 祖细胞的细胞群, 其中, 所述细胞群中的至少80%的细胞是CD34⁺CD9⁻CD41^暗 细胞。

17. 根据权利要求16所述的细胞群, 其中, 所述细胞群包含至少150,000个CD34⁺CD9⁻CD41^暗 细胞。

18. 根据权利要求16~17中任一项所述的细胞群, 其中, 所述细胞群能通过权利要求14~15中任一项所述的方法来获得。

19. 一种供输血应用的组合物, 所述组合物包括带有前血小板的巨核细胞 (MK) 和/或血小板的细胞群和输注缓冲液, 其中, 所述应用包括: 通过权利要求10所述的方法, 制备带有前血小板的巨核细胞 (MK) 和/或血小板。

巨核细胞祖细胞及其产生带有前血小板的MK和/或血小板的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种产生CD34⁺CD41^暗巨核细胞(MK)祖细胞的方法,和通过所述方法获得的巨核细胞前体细胞的基本上纯的细胞群。本发明还涉及一种使用CD34⁺CD41^暗细胞产生带有前血小板的MK和/或血小板的方法。

背景技术

[0002] 血小板在生理学和病理学中都起到关键性作用,因此了解其产生的控制机制是非常重要的。在成年人中,血小板由自身起源于造血干细胞和祖细胞的骨髓巨核细胞(MK)产生。体外产生输血用血小板已经成为近年来很多研究的课题。培养条件的持续改善使得实现这一目标成为可能,如最近一代的可输血用人类红细胞。然而,我们仍然不能有效地重现每一MK能生成超过1000个血小板的天然过程(Reems JA et al., Transfusion medicine reviews. 2010;24:33-43)。

[0003] 改善体外产生血小板的一种方式是分离和扩增成熟至前血小板阶段的能力得到提高的MK祖细胞。在被认可的血细胞生成分级图中,MK不同于常见的双能MK/红系祖细胞(MEP)(Chen L et al., Science. 2014;345:1251033)。即使暗示了存在独立的MK祖细胞,但是尚未从人类的成人造血细胞中明确地鉴定或扩增出这种意义明确的祖细胞。已经观察到少数人群似乎产生带有前血小板的MK的能力是增强的,但这些细胞还没有扩增或评估用来在体外产生血小板(Debili N. et al., Blood. 1992;80:3022-3035; Dercksen MW et al., Blood. 1995;85:3313-3319; Norol F. et al., Blood. 1998;91:830-843)。特别是,已经描述了在从骨髓中直接分离出的或在促MK条件下培养之后分离出的人类CD34⁺细胞中的CD41阳性细胞(Debili N. et al., Blood. 1992;80:3022-3035; Dercksen MW et al., Blood. 1995;86:3771-3782)。但是,这些细胞群是高度多倍体,并且不能增殖(Dercksen MW et al., Blood. 1995;86:3771-3782)。在没有TPO的情况下,骨髓来源的CD34⁺细胞在hMSC上共培养之后,也观察到了CD34⁺CD41⁺细胞,但没有证据证明有明显的CD41^暗亚群(Cheng L. et al., Journal of cellular physiology. 2000;184:58-69)。最近报道了在来源于外周血的培养物中,存在具有代表很小群体的CD34⁺CD41^低表型的细胞,但没有对其进行进一步的表征(Debili et al., Blood, 2001, 97(7), 2023-2030)。

[0004] 典型地,人类MK在来自CD34⁺细胞的培养物中进行分化,其中CD34⁺细胞是含有造血干细胞和具有各种潜能的祖细胞混合物的群体。因为TPO的可用性,已经设计出很多方案以在有或没有基质细胞的情况下,使用细胞因子和生长因子的逐步组合来完善MK的分化(Sullenbarger B. et al., Experimental hematology. 2009;37:101-110; Panuganti S. et al. Tissue engineering Part A. 2013;19:998-1014; Pineault N. et al., Cytotherapy. 2011;13:467-480)。作为结果,报道了在扩大输入CD34⁺细胞的数量并且使MK分化的能力上的改进,如它们的增加的尺寸和倍性,血小板特异性标志物(CD41和CD42)的出现和它们的产生前血小板的能力所证明的。尽管有这样的进展,但到达前血小板阶段

的MK的百分比仍然较低，并且产生的血小板远低于骨髓中原位分化的MK所产生的血小板。

[0005] 转录组学数据库揭示了芳香烃受体(AhR)在通向MK的整个通路中(HSC、CMP、MEP和MK)一直得到很好的表达(Smith BW et al., Blood. 2013;122:376-385)。进一步报道了StemRegenin 1(SR1)，一种最近开发出的高亲和性AhR拮抗剂，促进了造血祖细胞(HPC)的扩增(Boitano AE et al., Science. 2010;329:1345-1348)。

[0006] 已经公开了在体外从造血干细胞产生MK或血小板的方法，该方法包括与AhR调节因子接触的步骤。

[0007] WO 2012/129109公开了用于产生血小板的离体三步法，该离体三步法包括第一步骤：通过在选自29种生长因子或生长因子家族的组中的含SR1的多种生长因子的存在，以及与间充质干细胞的共培养的条件下培养干细胞，生成巨核细胞祖细胞群。该方法进一步包括：在氧浓度升高的条件下并且在多种生长因子的存在下，使扩增的巨核细胞祖细胞成熟；并且，在氧浓度升高的条件下并且在多种生长因子的存在下，在三维基质中培养成熟的巨核细胞，以产生血小板。

[0008] WO 2014/028749公开了制得巨核细胞-红系祖细胞(MEP)的方法，该方法包括：在AhR调节因子的存在下，通过培养，使MEP前体细胞分化成MEP。该方法尤其包括：在AhR拮抗剂的存在下培养MEP前体细胞，然后在AhR激动剂的存在下培养MEP前体细胞。

[0009] WO 2014/138485公开了离体两步法，其包括：第一步骤，通过使用血小板来源的生长因子受体(PDGFR)拮抗剂，和细胞因子TPO、IL-6、Flt3-L和SCF的组合，使造血干细胞和祖细胞(HSPC)定向分化，生成巨核细胞；和，第二步骤，使用AhR拮抗剂与TPO、IL-6、Flt3-L和SCF，或者AhR拮抗剂与TPO，和可选的额外的基质金属蛋白酶(MMP)抑制剂，促进从巨核细胞的血小板生物发生。

发明内容

[0010] 本发明涉及一种产生带有前血小板的巨核细胞(MK)和/或血小板的离体方法，该方法包括：

[0011] a) 在芳香烃受体(AhR)拮抗剂的存在下或者通过与人间充质基质细胞(hMSC)共培养，将MK祖细胞的经分离的CD34⁺CD41^暗细胞群在含血小板生成素(TPO)的无血清培养基中培养足以获得包含带有前血小板的MK和/或血小板的细胞群的时间；以及

[0012] b) 收集所述包含带有前血小板的MK和/或血小板的细胞群。

[0013] 本发明进一步提供了一种产生巨核细胞(MK)祖细胞的方法，该方法包括：

[0014] a0) 在芳香烃受体(AhR)拮抗剂的存在下或者通过与人间充质基质细胞(hMSC)共培养，将造血干细胞(HSC)在含密度脂蛋白(LDL)、干细胞因子(SCF)、TPO、IL-6和IL-9的无血清培养基中培养足以获得包含CD34⁺CD41^暗细胞的细胞群的时间；和

[0015] a1) 从所述细胞群中分离出所述CD34⁺CD41^暗细胞。

[0016] 另一方面，本发明涉及一种巨核细胞(MK)祖细胞的基本上纯的细胞群，其中所述细胞群中至少80%的细胞是CD34⁺CD41^暗细胞。

[0017] 本发明还提供了一种供输血应用的组合物，所述组合物包含带有前血小板的巨核细胞(MK)和/或血小板的细胞群和输注缓冲液(infusion buffer)，其中，所述应用包括：通过本发明所述的方法，制备带有前血小板的巨核细胞(MK)和/或血小板。

[0018] 具体的公开内容

[0019] 本发明人发现在外周血造血干细胞(HSC)的两步培养中,SR1,一种AhR拮抗剂,显著改善了带有前血小板的MK和血小板样物质的产生。更重要得是,使用SR1的培养得到CD34⁺CD41^暗群的富集,该CD34⁺CD41^暗群通过细胞分选显示出成熟至前血小板阶段的前所未有的能力。

[0020] 在与人间充质干细胞(hMSC)共培养的HSC中,观察到示出类似的巨核细胞潜能的CD34⁺CD41^暗细胞的类似富集。如SR1处理一样,与hMSC共培养也导致AhR的抑制。

[0021] 此外,SR1和hMSC的作用均被AhR激动剂阻止,这表明CD34⁺CD41^暗巨核细胞前体细胞的扩增通过抑制AhR通路来进行。

[0022] 巨核细胞(MK)祖细胞的产生

[0023] 本发明提供了一种产生巨核细胞(MK)祖细胞的方法,该方法包括:

[0024] a0) 在芳香烃受体(AhR)拮抗剂的存在下或者通过与人间充质基质细胞(hMSC)共培养,将造血干细胞(HSC)在含密度脂蛋白(LDL)、干细胞因子(SCF)、TPO、IL-6和IL-9的无血清培养基中培养足以获得包含CD34⁺CD41^暗细胞的细胞群的时间;以及

[0025] a1) 从所述细胞群中分离出所述CD34⁺CD41^暗细胞。

[0026] 本文所使用的“造血干细胞”(HSC)指未成熟的血细胞,其具有自我更新,并且分化成包括粒细胞、红细胞、血小板和单核细胞的更成熟的血细胞的能力。在整个说明书中,HSC可互换地被描述为干细胞。在实施方式中,HSC是CD34+细胞。CD34+细胞被认为包括具有上述干细胞特性的细胞亚群。HSC包括多能干细胞(pluripotent stem cell)、多潜能干细胞(multipotent stem cell)(例如淋巴干细胞)和/或定向分化为特定造血谱系的干细胞,这在本领域中是公知的。HSC的来源包括未经分级的骨髓、脐带和外周血。例如,可以用G-CSF[白细胞分离(LK)细胞]使正常的外周血细胞活化,并且通过细胞筛选从LK细胞中分离出CD34+细胞。HSC还包括定向分化为造血谱系的诱导性多能干(iPS)细胞。iPS细胞对于本领域技术人员来说是公知的。举例来说,可以按照Takahashi & Yamanaka (2006) Cell 126: 663-676和Yamanaka et al. (2007) Nature 448:313-317的教导来获得iPS细胞。优选地,HSC是人类细胞。

[0027] 起始的HSC群体优选可以包含至少60%的CD34+细胞,在一些实施方式中,包含高于80%的CD34+细胞,或者甚至高于90%的CD34+细胞。起始的HSC群体可以包含10⁵~10⁹的有核细胞。

[0028] 对于培养,HSC通常以每mL培养基1~10×10⁴,例如2~6×10⁴/ mL的细胞密度来接种。

[0029] 如在本申请全文中所使用的,“培养基”表示补充有以下物质的混合物的“基础培养基”:细胞因子、生长因子和在上述方法的每一步骤中所限定的AhR拮抗剂。优选地,基础培养基没有补充有,即培养基不包含,除了细胞因子、生长因子和每一步骤中所限定的AhR拮抗剂的混合物之外的任何其它组分。优选地,人类细胞因子和生长因子在本发明的框架中使用。

[0030] “基础培养基”是合成的无血清培养基,其通常包含氨基酸、碳源、维生素、血清蛋白(例如白蛋白)、无机盐、二价阳离子、缓冲剂和适用于细胞(特别是HSC)培养的任何其它物质。基础培养基通常可以含有或补充有阻止细胞培养过程中的污染的抗生素,和谷氨酰

胺。生长因子和细胞因子通常不存在于基础培养基中。

[0031] 这样的适用于HSC培养方法的基础培养基的实例包括,但并不限于,StemSpan™ 无血清扩增培养基(SFEM) (StemCell Technologies, 温哥华, 加拿大)、StemSpan® H3000-规定的培养基(StemCell Technologies, 温哥华, 加拿大)、CellGro® SCGM.

[0032] 开发了StemSpan™ 无血清扩增培养基(SFEM)用于人造血细胞的体外培养和扩增。该培养基含有经预先测试的牛血清白蛋白、胰岛素和转铁蛋白,以及Iscove's MDM中的补充物。造血细胞的最佳生长和扩增所需的重组造血生长因子不存在于StemSpan™ SFEM中。

[0033] 为了产生MK祖细胞,基础培养基补充有低密度脂蛋白(LDL)、干细胞因子(SCF)、TPO、IL-6和IL-9。

[0034] 在实施方式中,上述培养基包含SCF、TPO、IL-6和IL-9,各自以1~100 ng/mL、例如25~100 ng/mL,尤其是10~50 ng/mL、40~50 ng/mL或20~30 ng/mL的浓度存在。

[0035] 上述基础培养基优选补充有1~40 μg/mL,例如10~30 μg/mL或15~25 μg/mL的LDL。

[0036] 上述培养基尤其可以包含10~30 μg/mL LDL、25~100 ng/mL SCF、40~50 ng/mL TPO、20~30 ng/mL IL-6和20~30 ng/mL IL-9。

[0037] 在实施方式中,通过添加StemSpan™ 巨核细胞扩增补充剂(以前称为CC220) (StemCell Technologies, 温哥华, 加拿大),将SCF、TPO、IL-6和IL-9添加到基础培养基中。StemSpan™ 巨核细胞扩增补充剂以100×的浓缩物来供应,并且含有重组的人细胞因子(SCF、IL-6、IL-9和TPO)的组合,这些重组的人细胞因子经配制,选择性促进在以CD34+脐带血(CB)细胞或者骨髓(BM)细胞起始的液体培养物中的人巨核细胞祖细胞的扩增和分化。

[0038] 在芳香烃受体(AhR)拮抗剂的存在下或通过与人间充质基质细胞(hMSC)共培养,进一步进行HSC的培养,用于产生含CD34⁺CD41^暗细胞的细胞群。

[0039] 在实施方式中,所述AhR拮抗剂是被添加到基础培养基中的合成的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体,该化合物具有式(I)



[0041] 其中

[0042] L选自-NR_{5a}(CH₂)₂-₃-、-NR_{5a}(CH₂)₂NR_{5b}-、-NR_{5a}(CH₂)₂S-、-NR_{5a}CH₂CH(OH)- 和-NR_{5a}CH(CH₃)CH₂-;其中R_{5a}和R_{5b}独立地选自氢和C₁₋₄烷基;

[0043] R₁选自噻吩基、呋喃基、苯并咪唑基、异喹啉基、咪唑并吡啶基、苯并噻吩基、嘧啶基、吡唑基、吡啶基、咪唑基、吡咯烷基、吡嗪基、哒嗪基、吡咯基和噻唑基;其中R₁的所述噻吩基、呋喃基、苯并咪唑基、异喹啉基、咪唑并吡啶基、苯并噻吩基、嘧啶基、吡唑基、吡啶基、咪唑基、吡咯烷基、吡嗪基、哒嗪基、吡咯基和噻唑基可选地被独立选自卤素、氰基、C₁₋₄烷基、经卤素取代的C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷氧基、-S(O)₀₋₂R_{8a}和-C(O)OR_{8a}的1~3种基团取代,其中R_{8a}选自氢和C₁₋₄烷基;

[0044] R₂选自-S(O)₂NR_{6a}R_{6b}、-NR_{6a}C(O)NR_{6b}R_{6c}、苯基、吡咯并吡啶基、吲哚基、噻吩基、吡啶

基、三唑基、2-氧代咪唑烷基、吡唑基和吲唑基；其中

[0045] R_{6a} 、 R_{6b} 和 R_{6c} 独立地选自氢和 C_{1-4} 烷基；和

[0046] R_2 的所述苯基、吡咯并吡啶基、吲哚基、噻吩基、吡啶基、三唑基、氧代咪唑烷基、吡唑基或吲唑基可选地被独立地选自羟基、卤素、甲基、甲氨基、氨基、 $-O(CH_2)_nNR_{7a}R_{7b}$ 、 $-OS(O)_2NR_{7a}R_{7b}$ 和 $-NR_{7a}S(O)_2R_{7b}$ 的 1~3 种基团取代；其中 R_{7a} 和 R_{7b} 独立地选自氢和 C_{1-4} 烷基；

[0047] R_3 选自氢、 C_{1-4} 烷基和联苯基；和

[0048] R_4 选自 C_{1-10} 烷基、 C_{1-4} 烯基、氧杂环丁基 (oxetanyl)、四氢呋喃基、环己基、(氧代吡咯烷基) 乙基、四氢吡喃基、苯基和苄基，其中 R_4 的所述 C_{1-10} 烷基、 C_{1-4} 烯基、氧杂环丁基、四氢呋喃基、环己基、(氧代吡咯烷基) 乙基、四氢吡喃基、苯基和苄基可以可选地被独立地选自羟基、 C_{1-4} 烷基和经卤素取代的 C_{1-4} 烷基的 1~3 种基团。

[0049] 在实施方式中，式(I)的 AhR 拮抗剂是 StemRegenin 1 (SR1)，即 4-(2-(2-(苯并[b]噻吩-3-基)-9-异丙基-9H-嘌呤-6-基氨基)乙基) 苯酚。

[0050] 在步骤 a0) 的过程中，AhR 拮抗剂通常以 10 nM~10 μ M，例如 100 nM~7.5 μ M，尤其是 1~5 μ M 的浓度存在于培养基中。

[0051] 在另一实施方式中，HSC 在含 LDL、SCF、TPO、IL-6 和 IL-9 的培养基中与人间充质基质细胞 (hMSC) 共培养。如本发明人在以下实施例中所示出的，通过添加 AhR 激动剂 FICZ 逆转了与 hMSC 共培养的效果，并且与 hMSC 共培养大大降低了 AhR 下游靶点 CYP1B1 的转录。因此，这些结果证实，与 hMSC 共培养拮抗了 AhR 通路。

[0052] 根据实施方式，通过包括以下步骤的方法获得所述 hMSC：

[0053] i) 通过 Ficoll 密度梯度，从健康的人类个体中分离出骨髓单个核细胞 (BM-MNC)；

[0054] ii) 将分离出的 BM-MNC 接种到含 5~15% 胎牛血清和 0.5~5 ng/mL 成纤维细胞生长因子 2 (FGF-2)，例如 1 ng/mL FGF-2 的培养基中；

[0055] iii) 将接种的细胞培养两天，丢弃未贴壁的细胞，并且接种所收集的贴壁细胞；

[0056] iv) 将贴壁细胞培养在含 10% 胎牛血清和 0.5~5 ng/mL FGF-2 (例如 4 ng/mL) 的培养基中，培养基用新鲜的培养基每周更换两次直至细胞汇合 (confluence)；和

[0057] v) 收获 hMSC，将收获的细胞接种和培养在含 10% 胎牛血清和 0.5~5 ng/mL FGF-2 的培养基中直至细胞汇合。

[0058] 在步骤 ii) 时，BM-MNC 以例如 10^4 细胞/ cm^2 的细胞密度进行接种。

[0059] 收获 hMSC 通常使用胰蛋白酶来进行。然后，细胞通常以 500 个细胞/ cm^2 的细胞密度来接种，并且培养至细胞汇合 (第一代，P1)。hMSC 显示出缺乏 CD45、CD14、CD34 和 CD31 的表达，同时显示出 CD73、CD90 和 CD105 的强表达。

[0060] hMSC 可以被保持在含 10% 胎牛血清和 0.5~5 ng/mL FGF-2，例如 2 ng/mL FGF2 的培养基中。

[0061] hMSC 以细胞汇合层的方式来使用， $CD34^+$ 细胞通常以上述指定的细胞密度来添加。

[0062] 用于产生和保持 hMSC 的培养基是适于间充质细胞培养的任意培养基，例如 a-MEM。

[0063] 为了产生 MK 祖细胞，在步骤 a0) 中，HSC 培养进行 6~8 天，优选 7 天。

[0064] 培养物通常孵育在 37°C，常氧条件 (即 20~21% O_2) 和 5% CO_2 的条件下。

[0065] 在培养期结束时，培养物包括 $CD34^+CD41^{\text{暗}}$ 细胞，该 $CD34^+CD41^{\text{暗}}$ 细胞通过技术人员已知的任意合适的方法从细胞培养物中分离出来。

[0066] 通常,收获悬浮的细胞,并且使用合适的缓冲液,例如PBS进行洗涤。

[0067] 基于CD34和CD41标志物分离 $CD34^+CD41^-$ 细胞群的方法使用流式细胞术,更具体地使用荧光激活细胞分选(FACS)技术。为了实现这一目标,将从细胞培养物中收获的悬浮的细胞与经标记的抗CD34和抗CD41的抗体混合物孵育。孵育通常可以在4°C进行20~40分钟。然后洗涤细胞,之后通过FACS进行细胞分选。

[0068] 仅从收获的细胞群中选择可存活的 $CD34^+CD41^-$ 细胞。按照本实施方式,经洗涤的细胞进一步与细胞活力的荧光标记物,例如为DNA标记物的7-氨基放线菌素D(7-AAD)或Hoechst孵育。孵育通常在4°C进行20~40分钟。然后洗涤细胞,之后通过FACS进行细胞分选。

[0069] FACS的形态和分选门(gate)通常放置如下:

[0070] - $CD34:10^{0,2}$ 至 $10^{1,2}$;

[0071] - $CD41:\log 10^1$ 至 $\log 10^2$ 。

[0072] 可以容易地将 $CD34^+CD41^-$ 细胞群鉴定为在AhR拮抗剂例如SR1存在下的培养物,产生 $CD34+CD41+$ 细胞群,该 $CD34+CD41+$ 细胞群显示出比对照条件低的平均荧光强度,并且可以如图10中所示的进行鉴定。

[0073] 所选择的 $CD34^+CD41^-$ 细胞具有以下特征中的任一种,或以下特征的组合:

[0074] - 小尺寸,通常FSC :200~400,SSC :200;

[0075] - 低倍性,通常为 $2n\sim 4n$;

[0076] - 成熟为纯MK的高能力,通常一个 $CD34^+CD41^-$ 细胞可以生成2~3个MK。

[0077] 本文所述的方法中,每一接种的HSC,尤其是 $CD34+$ 细胞,产生至少150,000个 $CD34^+CD41^-$ 细胞。

[0078] 本发明进一步涉及MK祖细胞基本上纯的细胞群,其中,该细胞群中的至少80%,优选至少85%、90%、95%的细胞是 $CD34^+CD41^-$ 细胞。

[0079] 在实施方式中,所述MK祖细胞的基本上纯的细胞群包括至少150,000个 $CD34^+CD41^-$ 细胞。

[0080] 所述MK祖细胞的基本上纯的细胞群是可以通过产生巨核细胞(MK)祖细胞的方法获得的,或者是通过该方法获得的。

[0081] 本发明人进一步使用 $CD9^-$ 分选,分离出了 $CD34^+CD41^-$ 细胞亚群,该亚群被称为 $CD34^+CD9^-CD41^+$ 。该亚群 $CD34^+CD9^-CD41^+$ 从在SR1的存在下培养10天的外周血 $CD34^+$ 细胞中获得,从其中通过细胞分选,门选出(gate) $CD34^+CD9^-$ 祖细胞。然后,如在实施例2中进一步解释的,按照FSC/CD41⁺表达,将 $CD34^+CD9^-$ 祖细胞群分级成MK祖细胞。因此,将所得到的亚群鉴定为 $CD34^+CD9^-CD41^+$ 细胞群。

[0082] 本领域技术人员应理解,尤其鉴于图11,门选 $CD9^-$ 细胞排除了 $CD41^+$ 细胞。相应地,剩余的通过FSC/CD41⁺表达所门选的 $CD41^+$ 细胞是 $CD41^-$ 细胞。因此,本领域技术人员将进一步理解,本发明人所鉴定的 $CD34^+CD9^-CD41^+$ 细胞群也可以被称为 $CD34^+CD9^-CD41^-$ 细胞群。

[0083] 相应地,在下文中, $CD34^+CD9^-CD41^+$ 亚群可以被无差别地称为 $CD34^+CD9^-CD41^-$ 。

[0084] 与使用 $CD34^+CD41^-$ 细胞相比,使用该 $CD34^+CD9^-CD41^-$ 细胞亚群允许血小板释放进一步升高1.8倍。

[0085] 根据上文所述,在一个实施方式中,在产生巨核细胞(MK)祖细胞的方法的步骤a0)中,包含 $CD34^+CD41^-$ 细胞的细胞群是包含 $CD34^+CD9^-CD41^-$ 的细胞群,并且在步骤a1)中,分离

出所述CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞群。

[0086] 相应地,在一个实施方式中,本发明涉及一种产生巨核细胞(MK)祖细胞的方法,该方法包括:

[0087] a0) 在芳香烃受体(AhR)拮抗剂的存在下或者通过与人间充质基质细胞(hMSC)共培养,将造血干细胞(HSC)在含密度脂蛋白(LDL)、干细胞因子(SCF)、TPO、IL-6和IL-9的无血清培养基中培养足以获得包含CD34⁺CD9⁻CD41^暗的细胞群的时间;和

[0088] a1) 从所述细胞群中分离出所述CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞。

[0089] 与CD34⁺CD41^暗细胞类似,CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞具有以下特征中的任一种或以下特征的组合:

[0090] - 小尺寸,通常FSC :200~400,SSC :200;

[0091] - 低倍性,通常为2n~4n;

[0092] - 成熟为纯MK的高能力,通常一个CD34⁺CD41^暗细胞可以生成2~3个MK。

[0093] 基于CD34和CD41标志物分离CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞群的方法使用流式细胞术,更具体地使用荧光激活细胞分选(FACS)技术。为了实现这一目标,将从细胞培养物中收获的悬浮的细胞与经标记的抗CD34和抗CD9的抗体混合物孵育。孵育通常可以在4°C进行20~40分钟。然后洗涤细胞,之后通过FACS进行细胞分选。

[0094] 仅从收获的细胞群中选择可存活的CD34⁺CD9⁻细胞。按照本实施方式,经洗涤的细胞进一步与细胞活力的荧光标志物例如为DNA标志物的7-氨基放线菌素D(7-AAD)或Hoechst孵育。孵育通常在4°C进行20~40分钟。然后洗涤细胞,之后通过FACS进行细胞分选。使用用于分选的CD9⁻细胞表面标志物排除了CD41高细胞。然后,根据FSC/CD41⁺表达,将所得到的存活的CD34⁺CD9⁻分选成MK祖细胞,这样能获得CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞群。

[0095] 在一个实施方式中,CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞群占CD34⁺ CD41^暗细胞群的40~80%,优选45~75%,例如50~70%,55~65%,更优选60%。

[0096] 本发明进一步涉及MK祖细胞的基本上纯的细胞群,其中细胞群中的至少50%,优选至少55%、60%,更优选80%例如85%、90%、95%的细胞是CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞。

[0097] 在实施方式中,所述MK祖细胞的基本上纯的细胞群包含至少150,000个CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞。

[0098] 所述MK祖细胞的基本上纯的细胞群可以通过产生巨核细胞(MK)祖细胞的方法获得,或者通过产生巨核细胞(MK)祖细胞的方法获得。

[0099] 带有前血小板的巨核细胞(MK)和/或血小板的产生

[0100] 本发明进一步提供了一种产生带有前血小板的巨核细胞(MK)和/或血小板的方法,该方法包括:

[0101] a) 在芳香烃受体(AhR)拮抗剂的存在下或者通过与人间充质基质细胞(hMSC)共培养,将MK祖细胞的经分离的CD34⁺CD41^暗细胞群在含血小板生成素(TPO)的无血清培养基中培养足以获得包含带有前血小板的MK和/或血小板的细胞群的时间;和

[0102] b) 收集所述包含带有前血小板的MK和/或血小板的细胞群。

[0103] 对于培养,CD34⁺CD41^暗细胞通常以每mL无血清培养基 $1\sim10\times10^4$,例如 $2\sim6\times10^4/\text{mL}$ 的细胞密度接种。

[0104] 对于带有前血小板的MK和/或血小板的产生,基础培养基补充有TPO,并且培养在

AhR 拮抗剂的存在下进行。

[0105] 术语“无血清培养基”、“基础培养基”和“芳香烃受体(AhR)拮抗剂”如前文中定义的。

[0106] 在实施方式中,培养基包含20~100 ng/ml TPO,优选25~65 ng/ml,更优选40~60 ng/ml。

[0107] 在步骤a)中,使用AhR 拮抗剂,尤其是如上文所定义的式(I)的化合物



[0109] 或者与hMSC的共培养,独立于在用于产生CD34⁺CD41^暗细胞的步骤a0)中使用的AhR 拮抗剂或与hMSC的共培养。

[0110] 因此,以下实施方式被同时涵盖在本发明中:

[0111] - 在两个步骤a0)和a)中,使用AhR 拮抗剂,尤其是式(I)的化合物,或者进行与hMSC的共培养;

[0112] - 在步骤a0)中,使用AhR 拮抗剂,尤其是式(I)的化合物,同时在步骤a)中进行与hMSC的共培养;和

[0113] - 在步骤a0)中,进行与hMSC的共培养,并且在步骤a)中,使用AhR 拮抗剂,尤其是式(I)的化合物。

[0114] 培养物通常孵育在37°C,常氧条件(即20~21% O₂)和5% CO₂的条件下。

[0115] 在实施方式中,培养的步骤a)进行5~9天,优选6~8天,更优选约7天。

[0116] 在培养期结束时,从培养物中收获悬浮的细胞,从而收集在细胞培养物中存在的带有前血小板的MK和/或血小板。

[0117] 通过相差显微术检测圆形且带有前血小板的细胞,可以鉴定出带有前血小板的MK。

[0118] 在一个实施方式中,MK祖细胞的CD34⁺CD41^暗细胞群是MK祖细胞的CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞群。

[0119] 相应地,在一个实施方式中,本发明涉及一种产生带有前血小板的巨核细胞(MK)和/或血小板的离体方法,该方法包括:

[0120] a) 在芳香烃受体(AhR)拮抗剂的存在下或者通过与人间充质基质细胞(hMSC)共培养,将MK祖细胞的经分离的CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞群在含血小板生成素(TPO)的无血清培养基中培养,足以获得包含带有前血小板的MK和/或血小板的细胞群的时间;和

[0121] b) 收集所述包含带有前血小板的MK和/或血小板的细胞群。

[0122] 在实施方式中,上述方法进一步包括:从所收集的包含带有前血小板的MK和/或血小板的细胞群中,选择CD41/CD61⁺和CD42c⁺细胞。血小板或血小板样颗粒被鉴定为CD41和CD42c双阳性事件,具有与人类血小板相同的散射特性。

[0123] 在基于CD41和CD42c标志物的细胞分选之后,包含带有前血小板的MK和/或血小板

的细胞群通常包含至少75%，优选80%、85%、90%、92%或95%的带有前血小板的MK和/或血小板。

[0124] 优选地，包含带有前血小板的MK和/或血小板的细胞群包含至少50,000个CD41⁺CD42c⁺细胞，获自20,000个CD34⁺CD41^暗接种的细胞。使用AhR拮抗剂，例如SR1产生的MK的约90%，和使用与hMSC共培养产生的MK的约50%是带有前血小板的MK。

[0125] 因此，本文所述的方法产生至少2，优选至少2.5，例如2.7个带有前血小板的MK/接种的CD34⁺CD41^暗细胞。从20,000个CD34⁺CD41^暗接种的细胞获得约 1.10^6 血小板，由此为约50个血小板/CD34⁺CD41^暗接种的细胞。

[0126] 在一个实施方式中，本文所述的方法产生至少3.6，优选至少4.5，例如4.8个MK/接种的CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞。从20,000个CD34⁺CD9⁻CD41^暗接种的细胞获得 1.8×10^6 个血小板，由此为约90个血小板/CD34⁺CD9⁻CD41^暗接种的细胞。

[0127] 产生带有前血小板的MK和/或血小板的方法可以进一步包括：洗涤所收集的带有前血小板的MK和/或血小板，和将经洗涤的细胞悬浮在输注缓冲液中。

[0128] 这可以容易得通过离心，例如在1000g离心10分钟，使细胞沉淀来实现，并且将细胞以 $10^7 \sim 10^{10}$ 个带有前血小板的MK和/或血小板/ml的浓度重新悬浮在输注缓冲液，例如5% HSA(Baxter)中。

[0129] 本发明的方法可以通过使用HLA相配的CD34⁺细胞，以患者特异性的方式产生血小板。

[0130] 组合物和治疗性处理

[0131] 本发明进一步涉及一种通过本发明的方法获得或可以通过本发明的方法获得的组合物，该组合物包含：带有前血小板的巨核细胞(MK)和/或血小板的细胞群，尤其是CD41和CD42c⁺细胞；和输注缓冲液。

[0132] 本发明还涉及用于其应用的所述组合物，其用于同种异体或自体输血。在实施方式中，在供输血应用的组合物中，所述应用包括通过本发明的方法制备带有前血小板的巨核细胞(MK)和/或血小板。

[0133] 进一步提供了向有需要的患者输血的方法，该方法包括：

[0134] a)通过本发明的方法，制备包含带有前血小板的巨核细胞(MK)和/或血小板的细胞群和输注缓冲液的组合物；

[0135] b)将所述组合物输入有需要的患者。

[0136] 根据本发明的个体是哺乳动物，例如啮齿动物、犬科动物、猫科动物或灵长类动物。所述个体优选是人类。

[0137] 输入的细胞数量通常考虑例如性别、年龄、体重、疾病或失调的类型，失调的阶段，细胞群中所需细胞的百分比，以及产生治疗益处所需的细胞的量等因素。在一个具体的实施方式中，所述组合物通过静脉输注来给药，并且包含至少 10^8 个血小板/kg， $10^9 \sim 10^{10}$ 个血小板/kg，或者如果需要的话，包含更高。输血剂量通常为约 $3 \sim 5 \times 10^{11}$ 个血小板。

[0138] 本发明将参考下面的附图和实施例进行进一步阐述。

附图说明

[0139] 图1：在SR1的存在下培养的MK中CD34表达的保持。(A) MK分化方案。在不存在

(Ctrl)或存在SR1(1 μ M)的情况下,在从第0天至第7天含CC220细胞因子鸡尾酒和从第7天至第14天使用TP0(30 ng/mL)的无血清培养基中,培养外周血CD34⁺细胞。(B)增殖水平。使用自动细胞计数器,在培养的第7天和第10天对存活的细胞进行计数,并且计算相对于第0天CD34⁺细胞输入的增长倍数。(C) CD34⁺细胞的比例。在指定日,用R-PE-Cy5缀合的抗CD34 mAb标记之后,通过流式细胞术确定CD34⁺细胞的比例。实验进行至少三次(平均值 \pm SEM; 双因素方差分析(two-way ANOVA)和邦弗朗尼事后检验(Bonferroni post-test),n.s. $P > 0.05$, *** $P < 0.001$)。

[0140] 图2:在SR1的存在下,前血小板和血小板样物质的产生得到提高。如图1A所示CD34⁺细胞,并且在第14天进行分析。(A)量化延伸出前血小板的MK的百分比(用SR1的34.6 \pm 2.1 %相对于对照的11.5 \pm 4.5 %;3次实验中的平均值 \pm SEM;学生t检验(Student's t-test)* $P < 0.05$)。(B)血小板的释放。多次移取细胞悬浮液,检测血小板样物质并且通过流式细胞术进行计数。基于细胞的前向和侧面散射特性和CD41 / CD42表达的代表性门控策略。(C)在第7天接种的每一个细胞的血小板样物质的数量(对照的7.92 \pm 3.25 vs 用1 μ M SR1的20.72 \pm 5.19 vs 用0.2 μ M AhR 激动剂FICZ 的0.20 \pm 0.04) 3~5次实验中的平均值 \pm SEM;双因素方差分析和邦弗朗尼事后检验,n.s. $P > 0.05$).

[0141] 图3:在SR1的存在下CD34⁺CD41^暗群体的出现。如图1A所示培养CD34⁺细胞,并且在第7天和第10天进行分析。(A)CD34和CD41表达的演变。不存在(Ctrl)或存在SR1的代表性流式细胞点状图。在第7天,观察到三个主要群体CD34⁺CD41⁻(紫色)、CD34⁺CD41⁺(红色)和CD34⁻CD41⁺(蓝色),在对照中分别占总群体的23.1 \pm 1.3 %、59.9 \pm 2.3 %和9.7 \pm 1.1 %,而在SR1的存在下分别为22.4 \pm 1.5 %、68.9 \pm 1.8 %和3.6 \pm 0.3 %。第10天,两个主要群体是CD34⁻CD41⁺和CD34⁺CD41⁺。CD34⁻CD41⁺细胞在对照中相当于细胞的51.6 \pm 4.9 %,相对于在SR1存在下为26.7 \pm 4.5 %。与在对照条件(32.1 \pm 0.7 %)下相比,CD34⁺CD41⁺群体(红色)在经SR1处理的培养物中更丰富(55.1 \pm 4.9 %)。具有中等水平的CD41表达的CD34⁺CD41⁺亚群(区域R2)被定义为CD34⁺CD41^暗,在SR1培养物中占优势。(B)CD34⁺CD41^暗细胞的比例。代表CD34⁺CD41^暗细胞百分比的柱状图门选在R2中,在对照中相当于总细胞的16.8 \pm 1.4 %,相对于SR1处理后的36.8 \pm 1.9 %(8次实验中的平均值 \pm SEM ;学生t检验, *** $P < 0.001$)。(C)前向光散射相对于CD41表达的点状图,示出了来自第10天,经SR1处理的培养物的CD34⁺CD41^暗群体(红色) 和CD34⁻CD41⁺ 群体(蓝色)。

[0142] 图4:来自第10天,经SR1处理的培养物的CD34+CD41暗和CD34-CD41+细胞的倍性分布(学生t检验, * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$)。

[0143] 图5:CD34⁺CD41^暗细胞的产生前血小板和血小板样物质的高能力。(A) 使用FACS Aria II流式细胞仪,按照它们的CD34⁺CD41^暗和CD34⁻CD41⁺表达,分选出如图1A所示的,在SR1的存在下培养10天的CD34⁺细胞,然后在具有或没有SR1(5 μ M)的含TP0的培养基中培养7天。(B) 在接种了CD34⁺CD41^暗细胞之后7天,量化延伸出前血小板的MK的百分比(用SR1的91.0 \pm 2.4 % 相对于对照的10.0 \pm 6.6 %;5次实验中的平均值 \pm SEM;学生t检验, *** $P < 0.001$)。(C) 接种了CD34⁺CD41^暗细胞之后7天的血小板样物质的数量(用SR1的52.1 \pm 8.8相对于对照的7.7 \pm 0.8;5~8次实验中的平均值 \pm SEM;学生t检验, ** $P < 0.005$)。

[0144] 图6:CD34⁺细胞与hMSC的共培养物促进血小板的产生和CD34⁺CD41^暗群体的出现。

(A) 在不存在或存在hMSC汇合层的情况下,如图1A所示的,培养CD34⁺细胞长达14天。(B)增殖的水平。使用自动细胞计数器,在培养的第7天和第10天对存活的细胞进行计数,并且计算相对于CD34⁺细胞输入的增长倍数(3次实验中的平均值± SEM;学生t检验, n.s. P > 0.05)。(C)培养物来源的血小板的量化。在培养第14天,多次移取细胞悬浮液,检测血小板样物质并且通过流式细胞术进行计数(3次实验中的平均值± SEM;学生t检验, *P < 0.05)。

[0145] 图7:(A)FICZ对血小板产生的作用。在存在或不存在AhR激动剂FICZ (0.2 μM)的情况下,如图5A所示在MSC上共培养CD34⁺细胞。在第14天,通过流式细胞术对血小板样物质进行计数(在第7天接种的每一细胞20.6± 1.3 vs 4.5± 1.9,分别有或没有FICZ;在3次实验中的平均值± SEM;学生t检验, *** P< 0.001 (B)CYP1B1表达。在与或不与MSC或SR1共培养的MK中,在有或没有FICZ的情况下,在第10天,对CYP1B1 mRNA进行qPCR分析。数据是3次实验的平均值± SEM。

[0146] 图8:(A)CD34和CD41表达的演变。第10天,细胞悬浮液中的CD34和CD41表达的代表性流式细胞点状图,揭示了MSC共培养物中的CD34⁺CD41^暗群。(B)CD34⁺CD41^暗细胞的比例。代表在CD34⁺CD41^暗区域中的细胞比例的柱状图(3次实验中的平均值± SEM;学生t检验, *P < 0.05)。(C) 来自第10天MSC共培养物的CD34⁺CD41^暗细胞的倍性分布。

[0147] 图9:在用MSC或SR1处理之后获得的CD34⁺CD41^暗细胞的可比特性。(A)在MSC单层的存在下,如图1A所示将CD34⁺细胞培养10天。在第10天对CD34⁺CD41^暗细胞进行分选,并且使用TP0、TP0+5 μM SR1或TP0+MSC.再培养7天。图i:延伸出前血小板的MK百分比的量化。图ii:培养物来源的血小板的量化。(B) 在5 μM SR1的存在下,如图1A所示,将CD34⁺细胞培养10天。在第10天分选CD34⁺CD41^暗细胞,并且使用TP0、TP0+5 μM SR1或TP0+MSC再培养7天。图i:延伸出前血小板的MK百分比的量化。图ii:培养物来源的血小板的量化。3~4次实验中的平均值± SEM。

[0148] 图10:允许可视化细胞群 CD34⁺CD41^暗的密度图。

[0149] 图11:CD41群在CD9群中的可视化。A) 第10天,在细胞悬浮液中的CD34和CD9表达的代表性流式细胞点状图。右下框中的区域代表在实施例2中门选的CD34⁺CD9⁻细胞群。B) 第10天,在细胞悬浮液中的CD41和CD9表达的代表性流式细胞点状图。代表CD34⁺CD9⁻细胞群的A)右下框中的区域对应于为CD9⁻CD41^暗的CD41/CD9点状图的下框。可以得出结论,CD9⁻ 细胞群与CD9⁻CD41^暗细胞群相同。

[0150] 图12:CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞群与CD34⁺CD41^暗细胞群相比的可视化。A) 第10天,在细胞悬浮液中的CD34和CD9表达的代表性流式细胞点状图。右下框代表在实施例2中门选的CD34⁺CD9⁻ 细胞群。B) CD34⁺CD9⁻ 细胞群的FSC/CD41⁺表达的代表性流式细胞点状图。B) 中的框代表CD34⁺CD9⁻CD41⁺ 细胞群。CD9⁻取消选择CD41^高。因此,通过FSC/CD41⁺表达门选的剩余的CD41⁺细胞是CD41^暗。因此,CD34⁺CD9⁻CD41⁺ 细胞群可以被称为CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞群。C) 第10天,在细胞悬浮液中CD34/CD41图表上(如在例如图3中使用来获得CD34⁺CD41^暗细胞群的)转置CD34⁺CD9⁻CD41^暗群。C) 中的圆圈指示所述CD34/CD41图表中的细胞群CD34⁺CD9⁻ CD41⁺。与例如图3A(第10天)相比证明所述CD34⁺CD9⁻CD41⁺细胞群对应于如在图3中区域R2所指定的CD34⁺CD9⁻ 细胞群。

[0151] 实施例1

[0152] 材料和方法

[0153] CD34⁺细胞的分离

[0154] 通过适应性调整由Ivanovic et al (Transfusion. 2006;46:118-125.)所述的程序,从获自Etablissement Francais du Sang-Alsace的白细胞滤器(leukodepletion filter)中回收CD34⁺细胞。简单来讲,在与RosetteSep®人粒细胞耗尽鸡尾酒(StemCell Technologies, 温哥华, 加拿大)孵育15分钟之后,通过Histopaque® -1077 (Sigma-Aldrich)密度梯度分离,在400 g持续30分钟,来分离单个核细胞。然后,使用免疫磁珠细胞分选系统(AutoMacs, Miltenyi, Bergisch Galdbach, 德国),通过阳性选择来分离CD34⁺细胞。常规获得83.30 ± 1.96 %的存活力和82.80 ± 2.25 %的CD34⁺纯度(n= 6)。

[0155] 培养物中的MK分化

[0156] 将CD34⁺细胞以 4×10^4 / mL的密度接种在48孔板中,补充有20 ng/mL人LDL和CC220(1×),含SCF、TPO、IL-6和IL-9(全部来自Stemcell Technologies)的细胞因子结尾酒的StemSpan SFEM培养基中,该培养基添加了或没有添加1 μM SR1(Collagen Technology, San Diego, CA)(图1A)。第7天,收获细胞,经洗涤,以 5×10^4 /mL的密度接种在含30 ng/mL TPO的StemSpan SFEM培养基中再培养7天,该培养基含有或不含1 μM SR1。培养物在常氧和5% CO₂条件下孵育在37°C。在培养的第7天和第10天,在自动细胞计数器(ADAM, Digital-Bio, Korea)中,对细胞进行计数,通过碘化丙啶排除测量它们的存活力,并且在Gallios流式细胞仪中使用Kaluza软件(Beckman Coulter, Villepinte, 法国)分析CD34、CD41和CD42b的表达。在一些实验中,用AhR激动剂FICZ(Enzo life sciences, Villeurbanne, France)替代SR1,其中AhR激动剂FICZ以0.2 μM添加。

[0157] 在第二种方案中,在从人骨髓中分离的间充质基质细胞(MSC)(Guilloton F et al., Blood. 2012;119:2556-2567)的存在下,培养CD34⁺细胞。将MSC保持在补充有10% 胎牛血清(Invitrogen, Cergy Pontoise, 法国)和2 ng/mL重组的人(rh)FGF2(Peprotech, Rocky Hill, NJ)的α-MEM培养基中。将CD34⁺细胞以 4×10^4 /mL的密度添加至48孔板中,在补充有20 ng/mL人LDL和CC220的StemSpan SFEM培养基中的MSC汇合层。第7天,收获细胞悬浮液,经洗涤,并且以 5×10^4 /mL的密度在含30 ng/mL TPO的StemSpan SFEM培养基中的新MSC汇合层上再共培养7天(图5A)。

[0158] 细胞分选

[0159] 将第10天回收的细胞与Alexa-488缀合的抗CD41 mAb(ALMA.17)和PE-Cy7缀合的抗CD34 mAb(BD Biosciences)的混合物,在4°C孵育30分钟。然后,将它们在PBS-EDTA中洗涤,并且在含7-AAD(1/50)的PBS中孵育30分钟,以选择出存活的细胞。通过FMO(荧光减一(fluorescence minus one))分析确定形态和分选门(gate),并且按照它们的CD34/CD41表达,使用FACS Aria II流式细胞仪(Becton Dickinson, Mountain View, CA)以500个细胞/s的速度分选巨核细胞前体,其中FACS Aria II流式细胞仪配备有50 μm喷嘴和两个在500 mW运行且分别调整至488 nm和360 nm的氩激光器(Coherent Radiation, Palo Alto, CA)。然后,对分选的CD34⁺CD41⁻和CD34⁻CD41⁺细胞进行计数,并且以 4×10^4 /mL的密度接种在48孔板中,含TPO的、有或没有SR1的StemSpan培养基中,培养7天(图5A)。

[0160] MK成熟的分析

[0161] 表面标志物。在用抗CD34-PE-Cy7 mAb(Beckman Coulter, Fullerton, CA)、抗

CD41-Alexa-488 mAb(ALMA.17)、抗CD42c-PE(RAM.1)mAb和抗CD42d-Alexa-647(V.1)mAb在4°C标记30分钟之后,通过流式细胞仪(Gallios, Beckman Coulter, France)对细胞进行分析。然后,细胞经洗涤,重新悬浮在含7-AAD(1/50)的PBS中。使用Kaluza软件分析所获得的数据。

[0162] 倍性。细胞用10 μg/mL Hoechst 33342(Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, 法国)在37°C孵育2 h,然后用抗CD34-PE-Cy7 mAb和抗CD41-PE mAb进行染色。将洗涤过的细胞重新悬浮在含7-AAD的PBS中,通过双色流式细胞仪(Fortessa, BD Biosciences, Rungis, 法国)测定CD41⁺群中的倍性分布。使用BD FACSDiva软件(BD Biosciences)分析所获得的数据。

[0163] 超微结构。细胞经含2%蔗糖的0.1 M二甲胂酸缓冲液(pH 7.2)中的2.5%戊二醛固定,并且如之前所述进行处理(Eckly A et al., Blood. 2014;123:921-930)。在Philips CM120 Biotwin透射电子显微镜(FEI, Heindhoven, 荷兰)下,在120 kV,对超薄切片进行检验。

[0164] 带有前血小板的MK的量化

[0165] 通过相差显微术,确定培养孔中延伸出前血小板的MK的百分比。在每一培养物中,分析至少100个MK,并且用具有20×物镜(Marly-le-Roi, 法国)的Zeiss Axio Vert.A1显微镜获取图像。

[0166] 确定每一接种的细胞所产生的血小板的数量

[0167] 在CC220的存在下培养7天的CD34⁺细胞(图1A和图6A)或者CD34/CD41分选的细胞(图5A和图7A)被接种在含TPO的培养基中。在第7天,将1 μM PGE₁和0.02 U/mL三磷酸腺苷双磷酸酶添加至培养基中,并且使细胞轻轻地通过P1000移液器吸头5次。所得到的悬浮液(200 μL)与抗CD41-Alexa-647 mAb和抗CD42c-Alexa-488 mAb在室温孵育15分钟,之后在Gallios流式细胞仪中进行分析。将CD41/CD42c双阳性事件,具有与经洗涤的血小板相同的散射特性,计数为血小板样颗粒,并且测定实验后第7天或第10天,每一接种的细胞的颗粒数量。

[0168] RNA提取

[0169] 使用抗体ALMA.17和磁珠(EasySep ® “自己动手”选择试剂盒(“Do-It-Yourself” Selection Kit), StemCell Technologies),在培养的第7天或第10天获得CD41/61细胞。遵循制造商的说明书,使用RNeasy ® 迷你试剂盒(QIAGEN)提取总RNA。通过测量260nm处的OD评估所有样品的总RNA的量和质量,并且将浓度调整至50 ng/ml。将RNA样品储存在-80°C直至使用。在标准条件下,使用SYBR Green Master Mix试剂盒,在ABI Prism 7900 Sequence Detection System(PerkinElmer-Cetus, Courtaboeuf, 法国)上应用qRT-PCR。在Oligo 6.0程序(National Biosciences, Plymouth, MN)的帮助下选择基因的引物,并且在之前已经对其进行了描述(Bieche I. et al., Pharmacogenetics and genomics. 2007;17:731-742)。

[0170] 统计学

[0171] 利用学生t检验或双因素方差分析,然后通过邦弗朗尼事后检验,来确定统计学显著性。使用Graphpad Prism 5软件来分析数据。

[0172] 结果

[0173] 在从外周血CD34⁺细胞分化的MK中,SR1维持CD34表达

[0174] 我们评估了AhR拮抗剂SR1对MK前体扩增的作用。在第0天和第7天,添加SR1(50 μM),以两步培养方案,其中外周血CD34⁺细胞(Peytour Y et al., Transfusion. 2010;50: 2152-2157)在CC220(SCF, TPO, IL-6和IL-9的优化混合物)存在下首先扩增7天,然后在仅TPO存在下再分化7天(图1A)。

[0175] 使用这种方案,超过90%的对照细胞(无SR1培养)在第12天对血小板标志物CD41和CD42是双阳性的,并且在形态学和表型分析中显示出完全成熟的MK的标志特征。

[0176] 在前血小板延伸发生之前的第7天和第10天估计细胞增殖。在第7天,在不存在和存在SR1的情况下,有核细胞总数(平均值±SEM,n = 8)分别增加了6.7±1.6倍和4.2±1.2倍(图1B)。从第7天到第10天,在未经处理的和经SR1处理的培养物中,细胞数量分别类似地增加了2.3倍和2.5倍。因此,在我们的培养条件下SR1不促进细胞增殖。

[0177] 然后我们通过跟踪CD34表达的演变来评估SR1对祖细胞保持的作用。在扩增步骤期间,对照组和经SR1处理的细胞中保留了CD34阳性,在第7天仅分别有16.8%和8.3%的阳性降低(图1C)。在第10天,在仅存在TPO的情况下进行传代之后,对照培养物中的CD34⁺细胞的比例下降到40.7%,而SR1处理后71.6%保持为阳性。因此,在将细胞转移到仅含添加的TPO的培养基中之后,SR1保持了更加类似祖细胞的表型。

[0178] SR1增加了带有前血小板的MK和血小板样物质的产生

[0179] 在对照培养物中,前血小板延伸首先在第10天观察到,并且当11.5±4.5%的MK显示出前血小板时,在第14天达到顶点(图2A)。值得注意的是,在SR1处理后,这一比例增加了三倍(34.6±2.1%,平均值±SEM,n = 4),这引起了血小板样物质的产生增加。而在对照条件下,计数第7天接种的每一个细胞的7.92±3.25个血小板大小的颗粒(图2B),加入SR1后血小板颗粒数量增加约3倍(20.72±5.19)。这些结果表明SR1不仅能够维持祖细胞的潜能,而且还能大大改善MK的成熟。与此相反,当SR1被强AhR激动剂FICZ替代时,MK的前血小板延伸和血小板样物质的产生急剧下降(0.20±0.04血小板/接种的细胞)。这样的结果强烈表明,在SR1的存在下,AhR阻断是血小板产生增加的起源。如通过qPCR(在对照和经SR1处理的细胞中,分别为579.8±40.8 vs 2.5±0.8任意单位;平均值±SEM,n = 3)测量的,在第7天培养物中,确认了SR1抑制其下游靶点CYP1B1表达的拮抗剂活性。

[0180] SR1促进CD34⁺CD41^暗群的扩增

[0181] 上述发现指出SR1的双重作用,因为它维持了CD34的表达,也改善了MK的成熟。由于CD41是MK的特异性标志物,我们评估了其与CD34平行的演变。在第7天,相似高比例的CD34⁺细胞已经获得了CD41阳性,在对照和经SR1处理的培养物中,分别有60%和69%的细胞是CD34⁺ CD41⁺(图3A)。仅TPO的存在下的传代导致对照培养物中CD34阳性的显著丢失,在第10天仅32%的细胞是CD34⁺CD41⁺。相比之下,在经SR1处理的培养物中,保留了高比例(55%)的CD34和CD41双阳性。值得注意的是,这些细胞的大部分(总细胞的37% vs 对照中的17%)表现出CD41^暗表型(区域R2)(图3B)。如它们的FSC特性(图3C)所证明的,与具有更高水平的CD41(R1)的细胞相比,CD41^暗群(R2)包括尺寸减小的细胞,这表明MK分化程度较低。这得到了倍性分析的证实,因为CD34⁺CD41^暗细胞大部分是2n~4n(图4)。

[0182] CD34⁺CD41^暗细胞具有产生前血小板和血小板样颗粒的高能力

[0183] 在两步培养方案中添加SR1引起带有前血小板的MK和血小板样物质的产生增加

(图2A~图2B)。因此,我们研究了这是否与CD34⁺CD41^暗群的扩增和特定性质有关。通过流式细胞术对来自用SR1培养第10天的CD34⁺CD41^暗细胞进行分选,并在补充有SR1或未补充SR1的含TPO的培养基中培养7天(图5A)。当CD34⁺CD41^暗细胞在SR1存在下生长时,前所未有的高比例的MK达到前血小板阶段(91.0±2.4%) (图5B)。当这些相同的细胞在没有SR1的情况下培养时,观察到了低得多的频率(10.0±6.6%) (图5B)。前血小板产量的增加引起用SR1培养的CD34⁺CD41^暗细胞中的血小板样物质的产生与没有SR1相比提高6.8倍(分别为52.06±8.79 vs 7.68±0.81个血小板/接种的细胞) (图5C)。这些结果表明,在存在SR1的情况下扩增的CD34⁺CD41^暗群具有产生带有前血小板的MK的强大潜力,其中带有前血小板的MK易于释放血小板。

[0184] 与MSC共培养也促进了CD34⁺CD41^暗群的出现

[0185] 骨髓来源的基质细胞可以保持造血干细胞特性,分泌细胞因子并且有利于MK成熟 (Pallotta I et al., PloSone. 2009;4:e8359; Cheng L et al., Journal of cellular physiology. 2000;184:58-69),并且可以为MK前体的出现提供有利的环境。通过两步方案,将CD34⁺细胞培养在从人骨髓中分离的人间充质基质细胞(hMSC)所形成的单层上(图6A)。与hMSC共培养没有显著改变细胞增殖(图6B),但在第14天引起带有前血小板的MK(数据未示出)和血小板样颗粒的产生增加(7.9±4.5 vs 18.2±4.9个血小板/第7天接种的细胞) (图6C)。

[0186] 我们研究了MSC的作用是否可能由AhR下游的通路介导。加入AhR激动剂FICZ (Boitano AE et al., Science. 2010;329:1345-1348)降低了CD34⁺CD41^暗细胞的比例(数据未示出)并阻止了血小板产生的增加(图7A)。此外,CD34⁺细胞与MSC的共培养导致CYP1B1 转录物大大降低(> 90%),这再现了SR1的作用,通过加入FICZ被逆转的作用(图7B)。这些结果表明,类似于SR1, MSC通过作用于AhR促进MK成熟和血小板产生。

[0187] 这种反应与用SR1获得的反应相似,这促使我们确定细胞的CD34 / CD41表型。与没有MSC的对照培养物中为18.95±1.75% (图8B) 相比,在共培养的第10天,具有CD34⁺CD41^暗谱型的群体清晰可见(图8A) 并占总细胞的30.37±1.98%。该群体具有低倍性(图8C)。

[0188] 然后,我们旨于确定i) MSC- 和SR1- 来源的CD34⁺CD41^暗细胞是否具有相同的产生成熟MK的潜力,和ii) 与MSC共培养或在SR1的存在下是否同样有利于这种成熟。将CD34⁺细胞与SR1一起培养或培养在MSC上,并在第10天分选相应的CD34⁺CD41^暗细胞(图9)。然后将这些细胞与TPO,与TPO和SR1,或与TPO和MSC再次培养7天。结果显示, MSC来源的CD34⁺CD41^暗细胞当在SR1存在下培养时,显示出产生带有前血小板的MK的能力增加(图9A中i),但效率低于SR1来源的细胞(图9B中i) (分别为49.5±10.5%和91.0±2.4%, n = 4)。此外,与仅用TPO培养相比,与MSC的共培养增强了MSC来源的(图9A) 和SR1来源的(图9B) CD34⁺CD41^暗细胞的MK成熟(分别为53.3±10.7% vs 67.5±12.6%)。对于释放血小板样颗粒的能力观察到类似的谱型(图9A~图9B中ii)。因此,与MSC共培养表型模拟了通过向细胞培养物添加SR1所获得的反应。

[0189] 总之,其中报道了鉴定和富集准备用于MK分化的离散的成人造血祖细胞群,其可以有效地成熟为带有前血小板的MK。当成人CD34⁺细胞在SR1,一种AhR的拮抗剂,或MSC单层的存在下培养时,使利用其CD34⁺CD41^暗标记鉴定出的这个细胞群扩增。与SR1或MSC一起培养,除了促进这种MK祖细胞出现之外,还大大提高了产生前血小板的MK的产量和血小板样

物质的释放。

[0190] 本文中在人类系统中鉴定出的CD34⁺CD41^暗群的几个特征,例如细胞的小尺寸和低倍性,以及它们成熟为能够有效延伸出前血小板的纯MK的高能力,似乎对应于偏向血小板的祖细胞的定义。它的独特表型组合了CD34⁺祖细胞标记与CD41巨核细胞标志物的中等或低表达。已经描述了,在从骨髓中直接分离的或在促MK条件下培养之后的人CD34⁺细胞中的CD41阳性细胞(Debili N. et al., Blood. 1992;80:3022-3035; Dercksen MW et al., Blood. 1995;86:3771-3782)。然而,这些群体并没有完全重现CD34⁺CD41^暗表型,因为它们似乎表达更高水平的CD41,是高度多倍体,并且不能增殖(Dercksen MW et al., Blood. 1995;86:3771-3782)。在没有TPO的情况下,骨髓来源的CD34⁺细胞在hMSC上共培养之后,也观察到了CD34⁺CD41⁺细胞,但对于为明显的CD41^暗亚群未提供证据(Cheng L. et al., Journal of cellular physiology. 2000;184:58-69)。最近在源自外周血的培养物中报道了代表非常小群体的具有CD34⁺CD41^低表型的细胞,但未进行进一步表征。CD34⁺CD41^暗群在我们的标准培养物中具有相似的低频率(图3A),并且仅在加入SR1或与MSC共培养后才变得明显。最近在三步无血清系统中培养的经重编程的iPS细胞中,观察到与本文所描述的细胞类似的CD31⁺CD34⁺CD41⁺巨核细胞群。该群体似乎表达低水平的CD41,并且是CD42阴性的。

[0191] 实施例2

[0192] 材料和方法

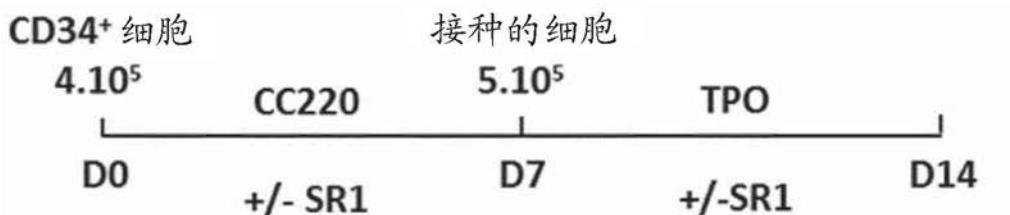
[0193] 如上文在“CD34⁺细胞的分离”部分中所述,分离外周血CD34⁺细胞,并如上文实施例1的“培养物中的MK分化”部分中所述,在SR1(1μM)的存在下培养。

[0194] 将第10天回收的细胞与Alexa-488缀合的抗CD41(ALMA.17)单克隆抗体,藻红蛋白(PE)-Cy7-缀合的抗CD34单克隆抗体和藻红蛋白(PE)-CD9(mAb; BD Biosciences)的混合物在4°C孵育30分钟。然后,将它们在含有7-氨基放线菌素D(2.5μg/ mL)的磷酸盐缓冲盐水中孵育2分钟以选择存活的细胞。

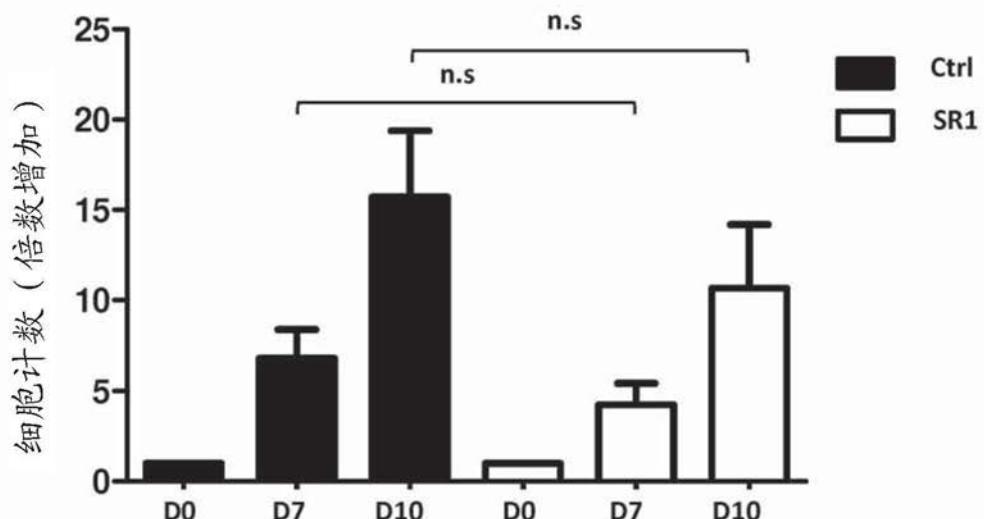
[0195] 细胞首先被细分为CD34⁺CD9⁻祖细胞。使用CD9⁻的细胞分选排除了CD41^高细胞,因为如图11所示,只有CD9⁺细胞是CD41^高。然后按照FSC/CD41⁺表达,将CD34⁺ CD9⁻祖细胞群(因此不包含CD41^高细胞)分级成MK祖细胞。在细胞群中存在的仅有的CD41⁺是CD41^暗,因此允许对感兴趣的CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞群进行门选。然后,使用荧光激活细胞分选仪(FACS)Aria II流式细胞仪(Becton Dickinson, Mountain View, CA)以500细胞/秒来分选巨核细胞前体。然后,对所分选的CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞进行计数,并以4 × 10⁴/mL的密度接种在48孔板中,含有TPO的StemSpan培养基(有或没有SR1)中,培养7天。

[0196] 结果

[0197] 先前描述为CD34⁺CD41^暗的群体也可以被表征为CD34⁺CD9⁻CD41^暗。具体而言,CD34⁺ CD9⁻CD41^暗代表CD34⁺CD41^暗亚群,其中CD34⁺CD9⁻CD41^暗群占CD34⁺CD41^暗细胞总数的60%。与CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞相比,在功能上检测了CD34⁺CD41^暗细胞的分化潜能。与CD34⁺CD41^暗细胞相比,CD34⁺CD9⁻CD41^暗细胞的血小板释放增加了1.8倍。



A



B

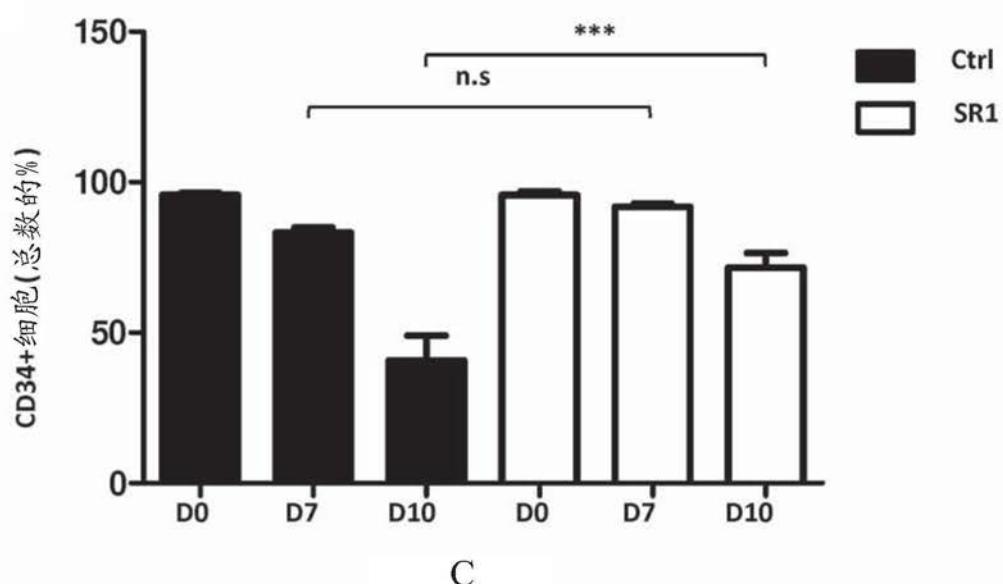


图1

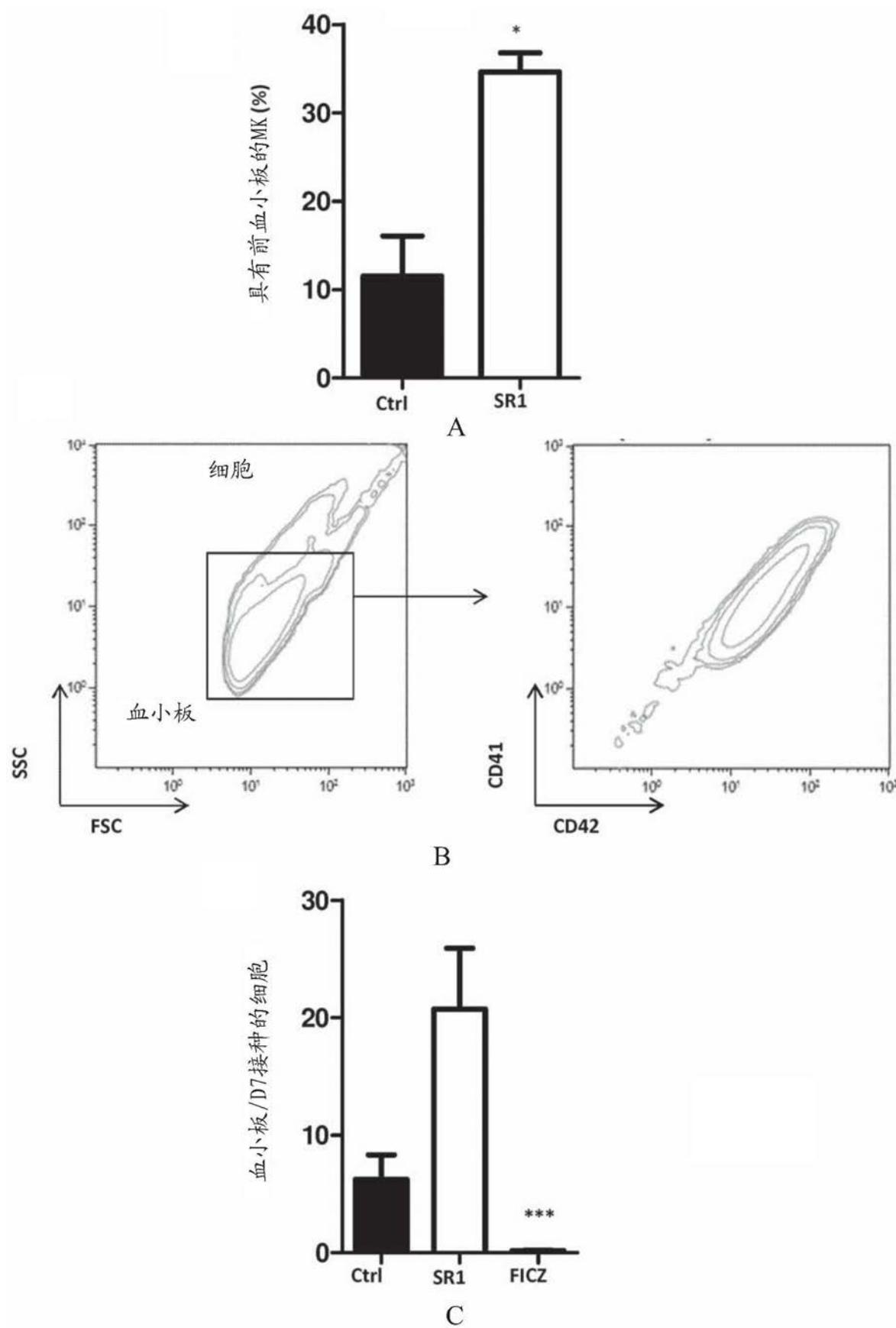
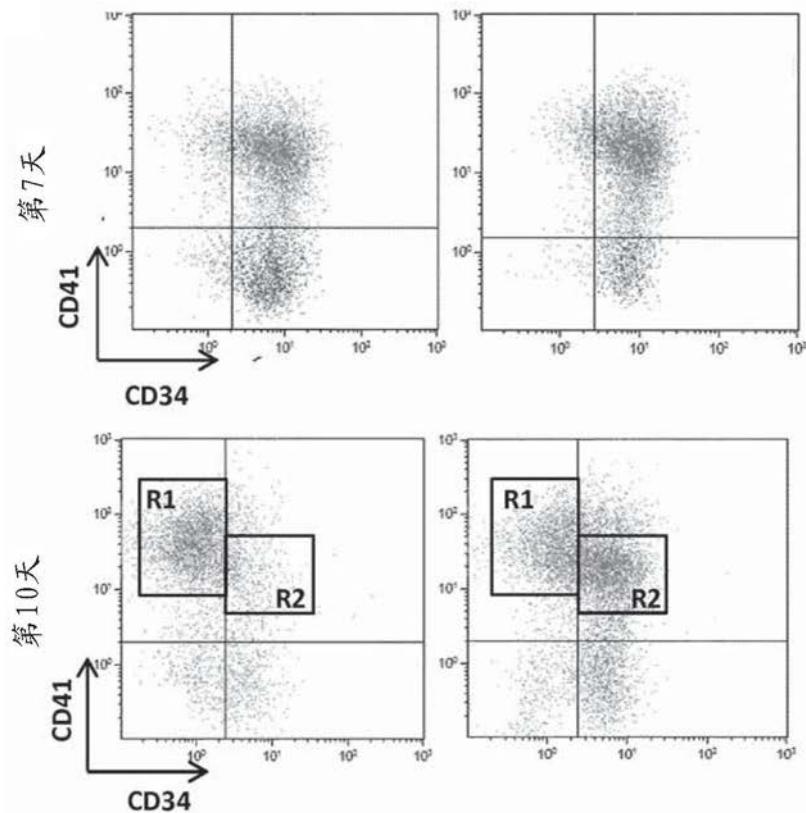


图2



A

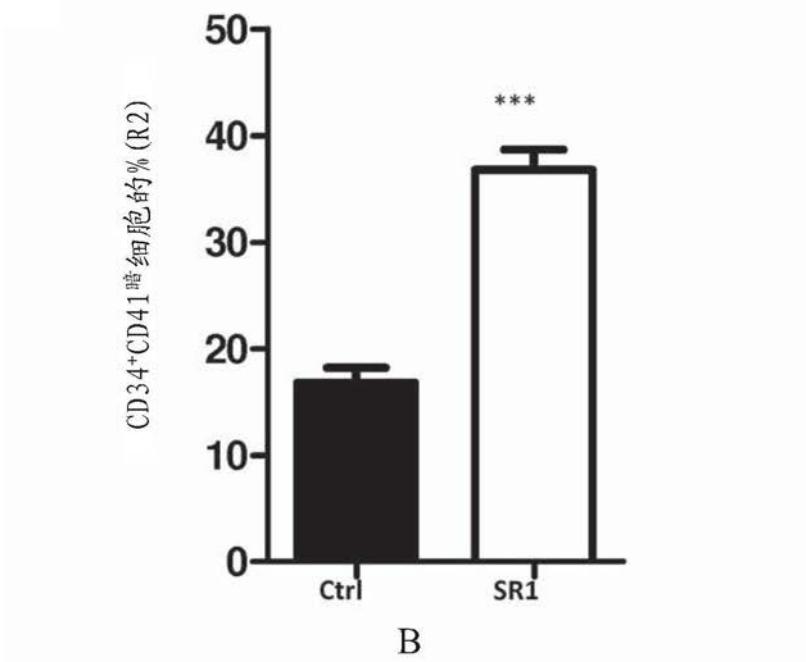


图3(开始)

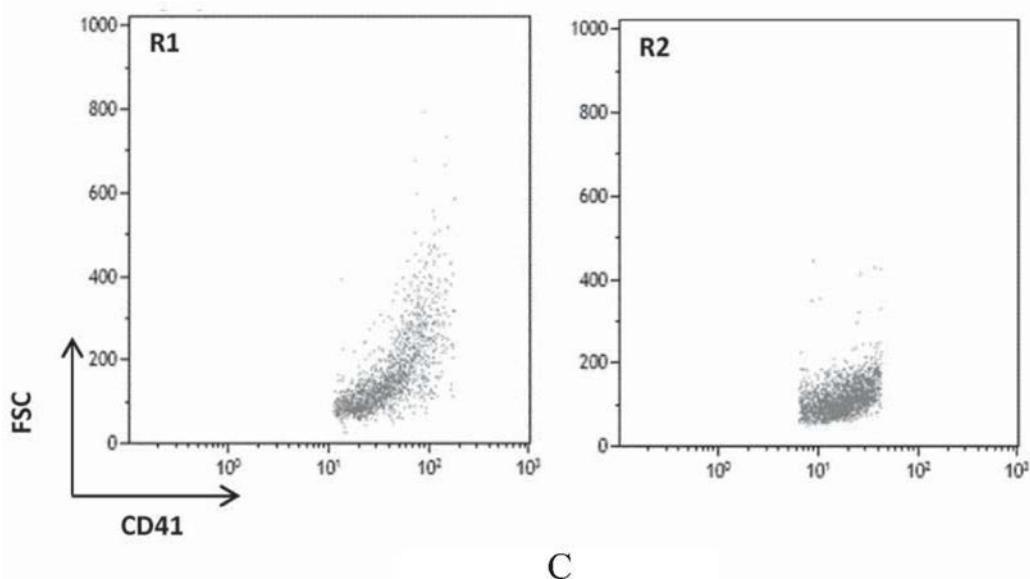


图3(终止)

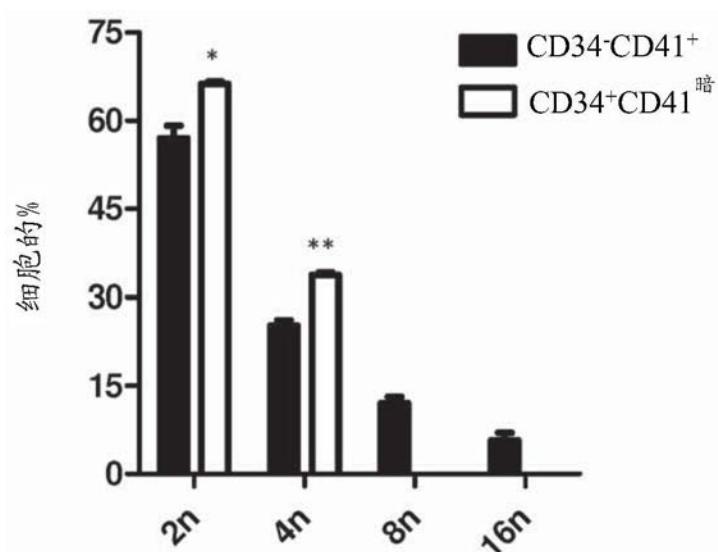


图4

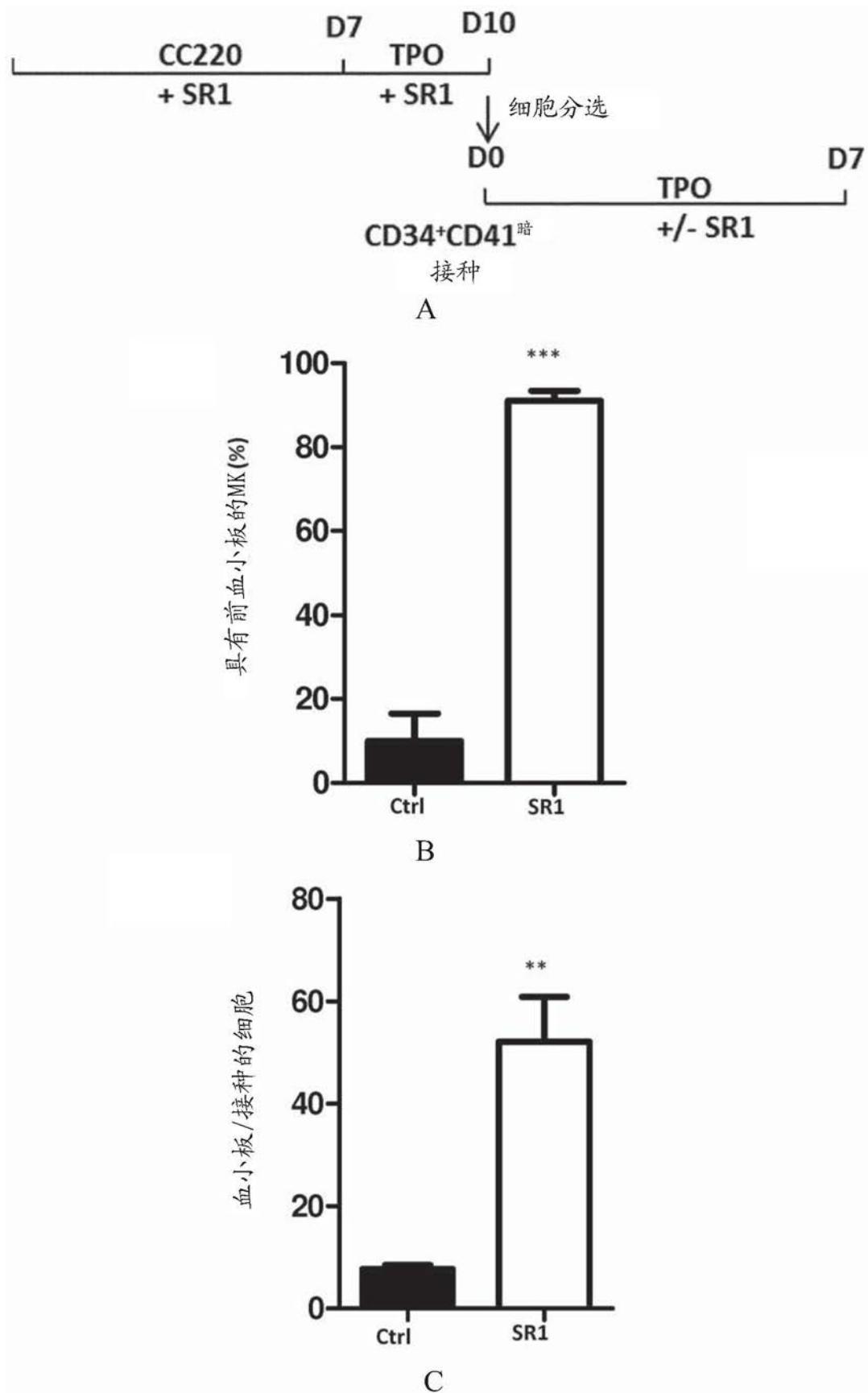


图5

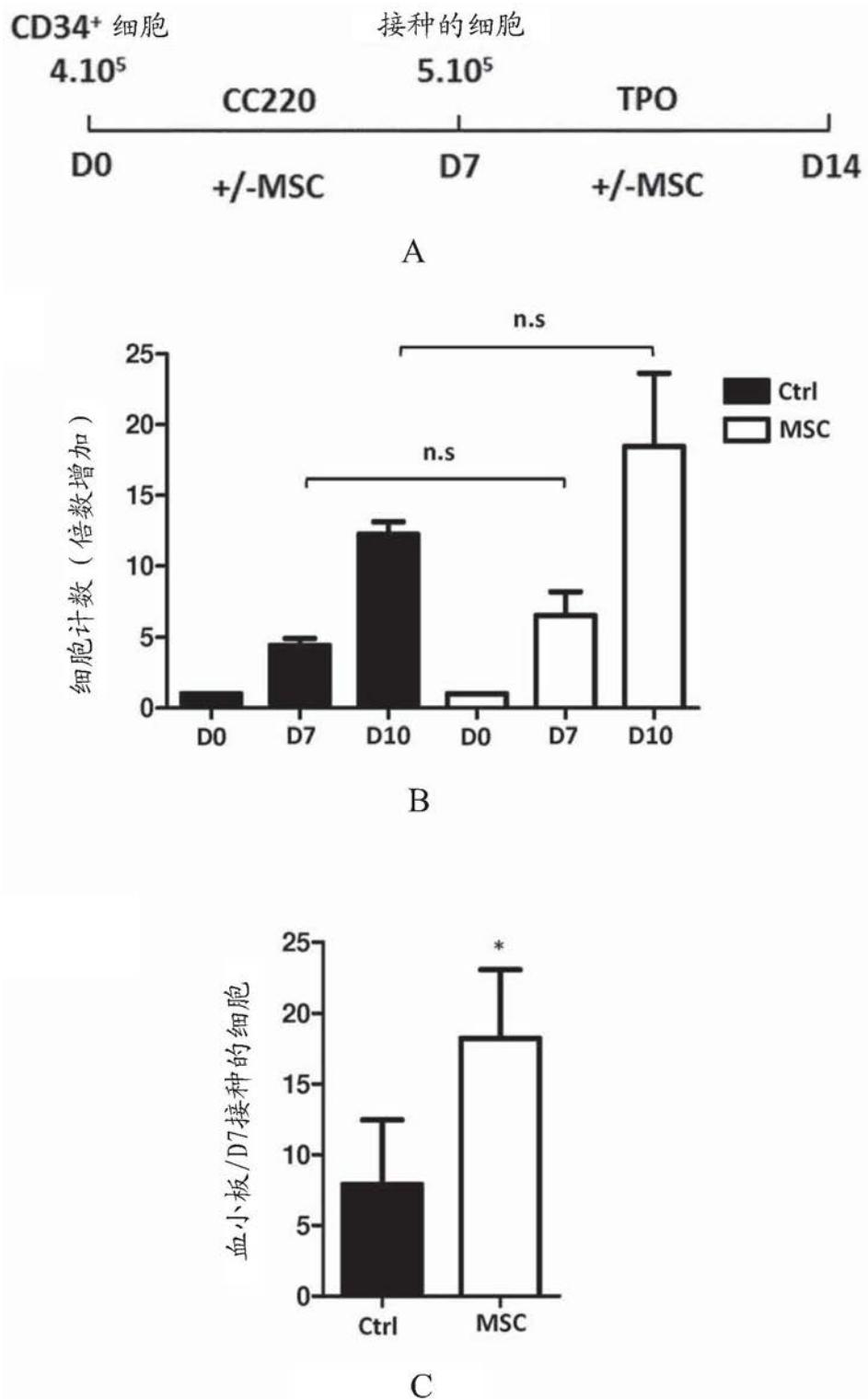


图6

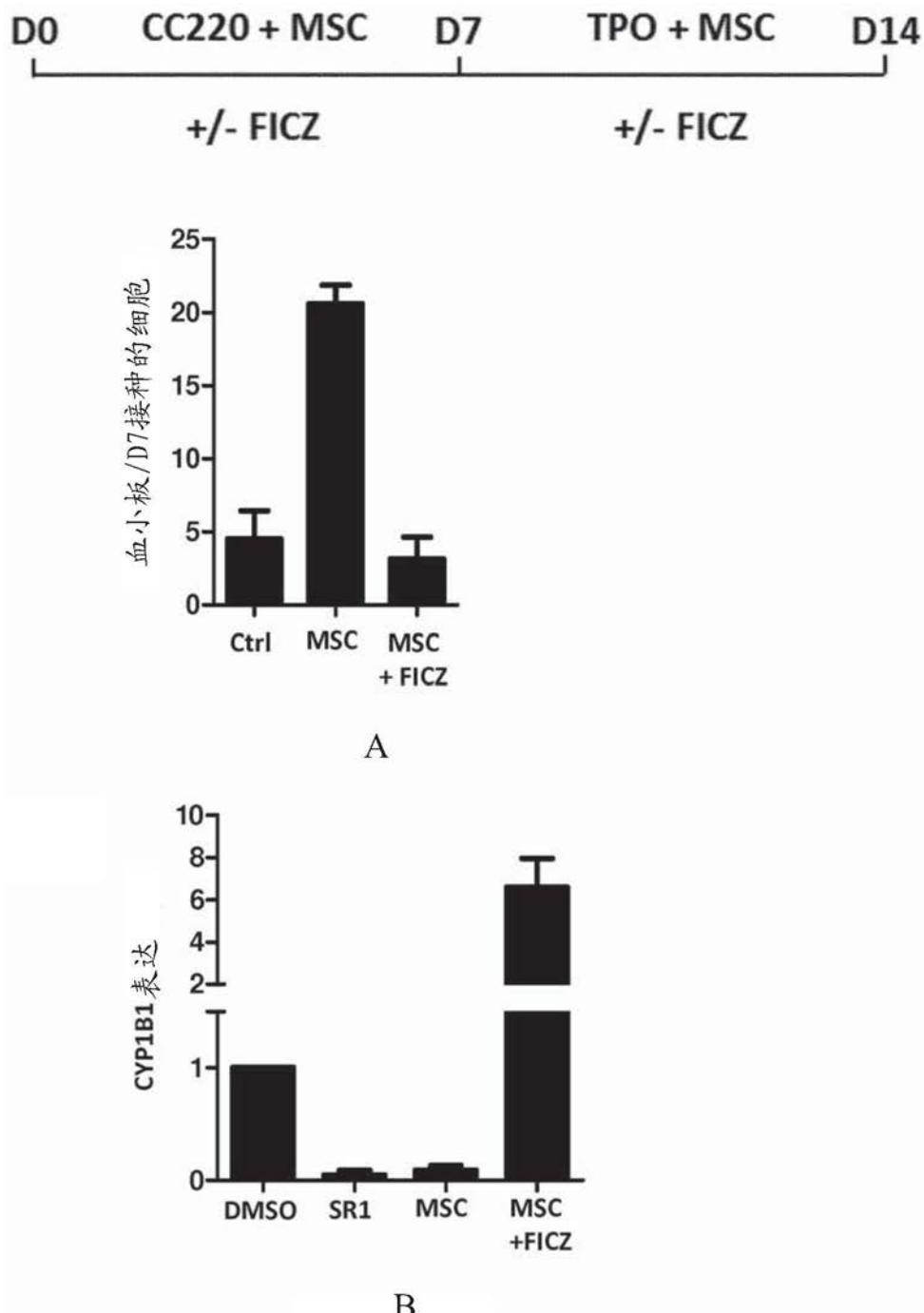


图7

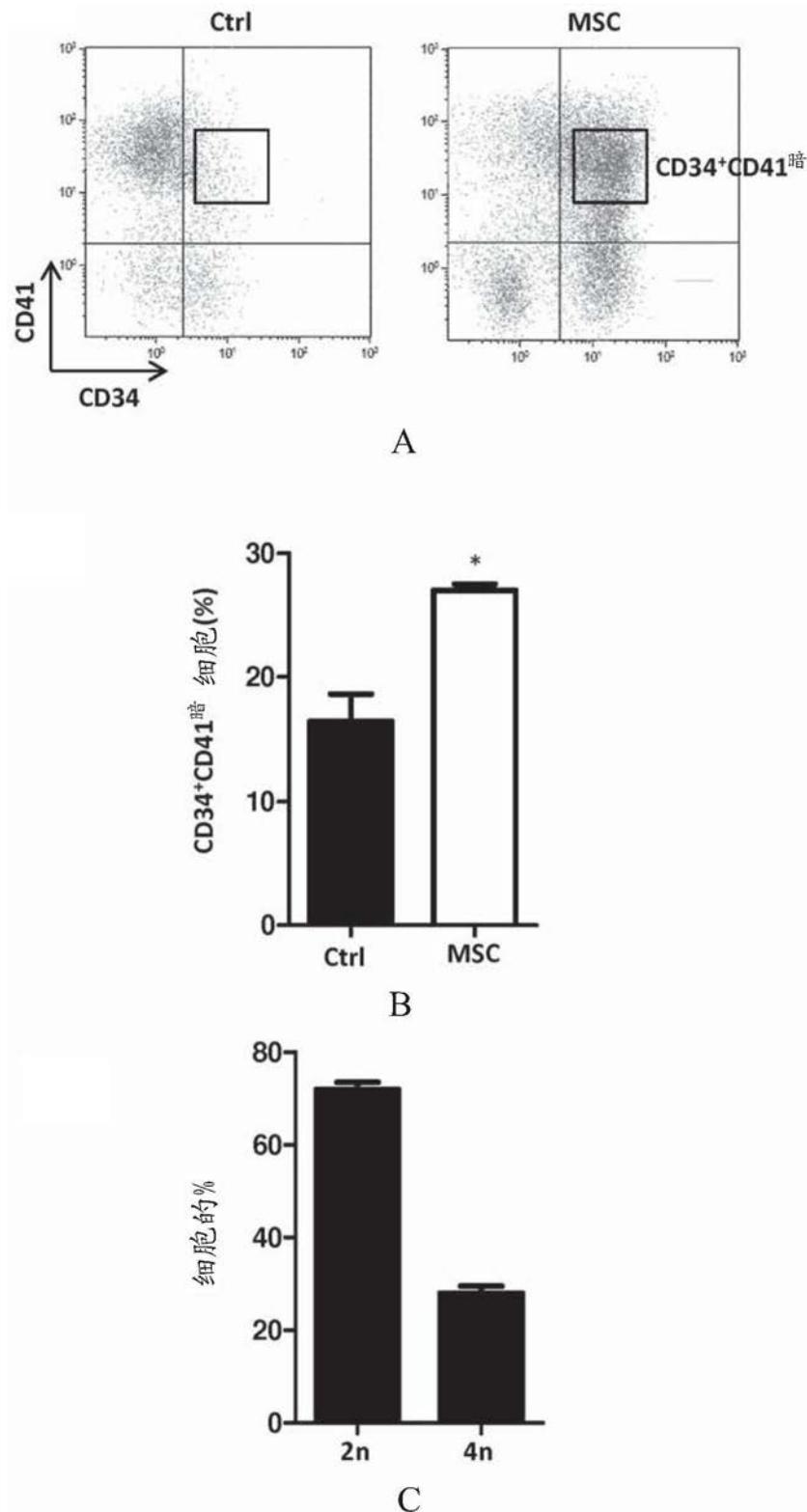


图8

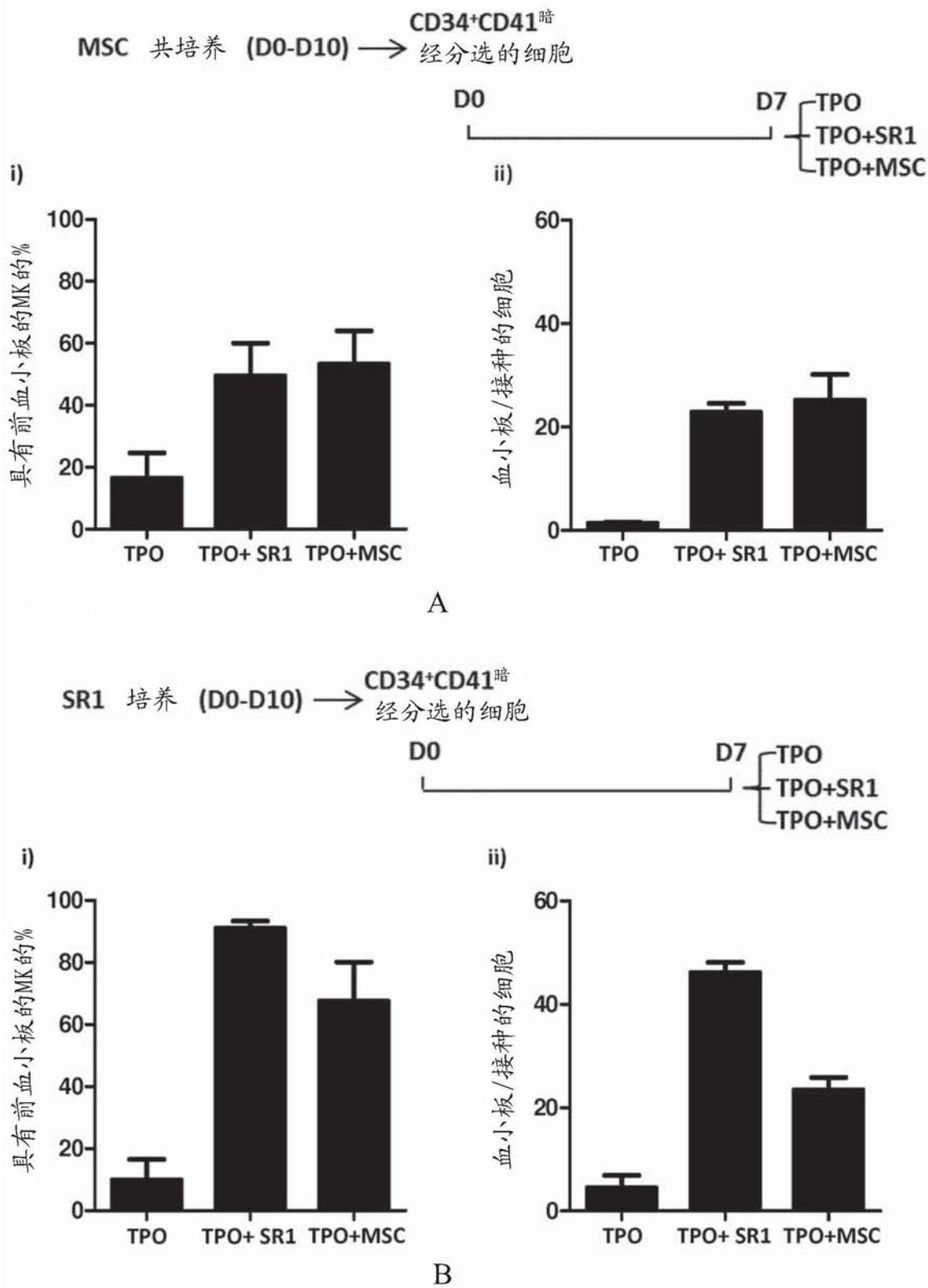


图9

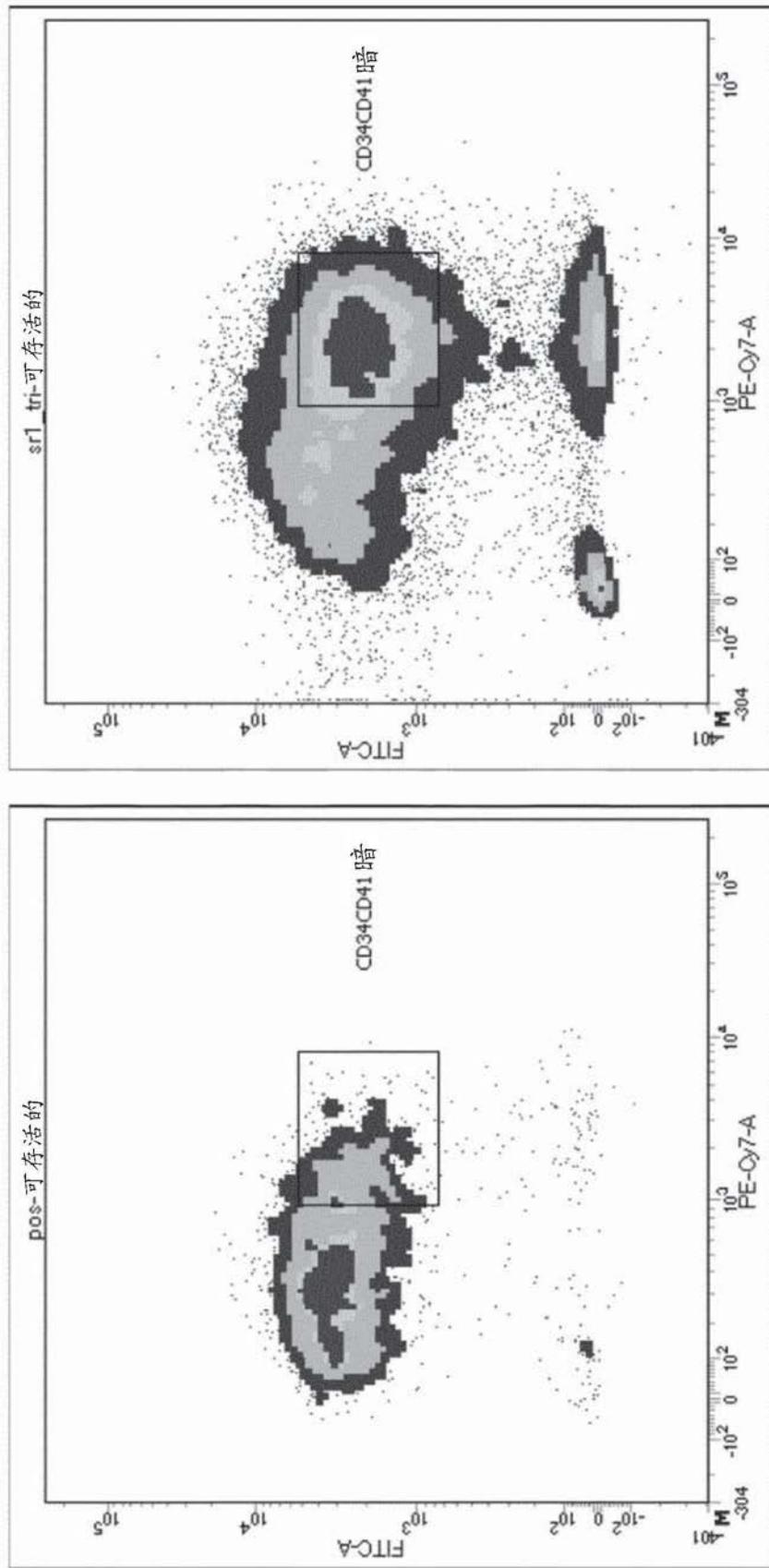


图10

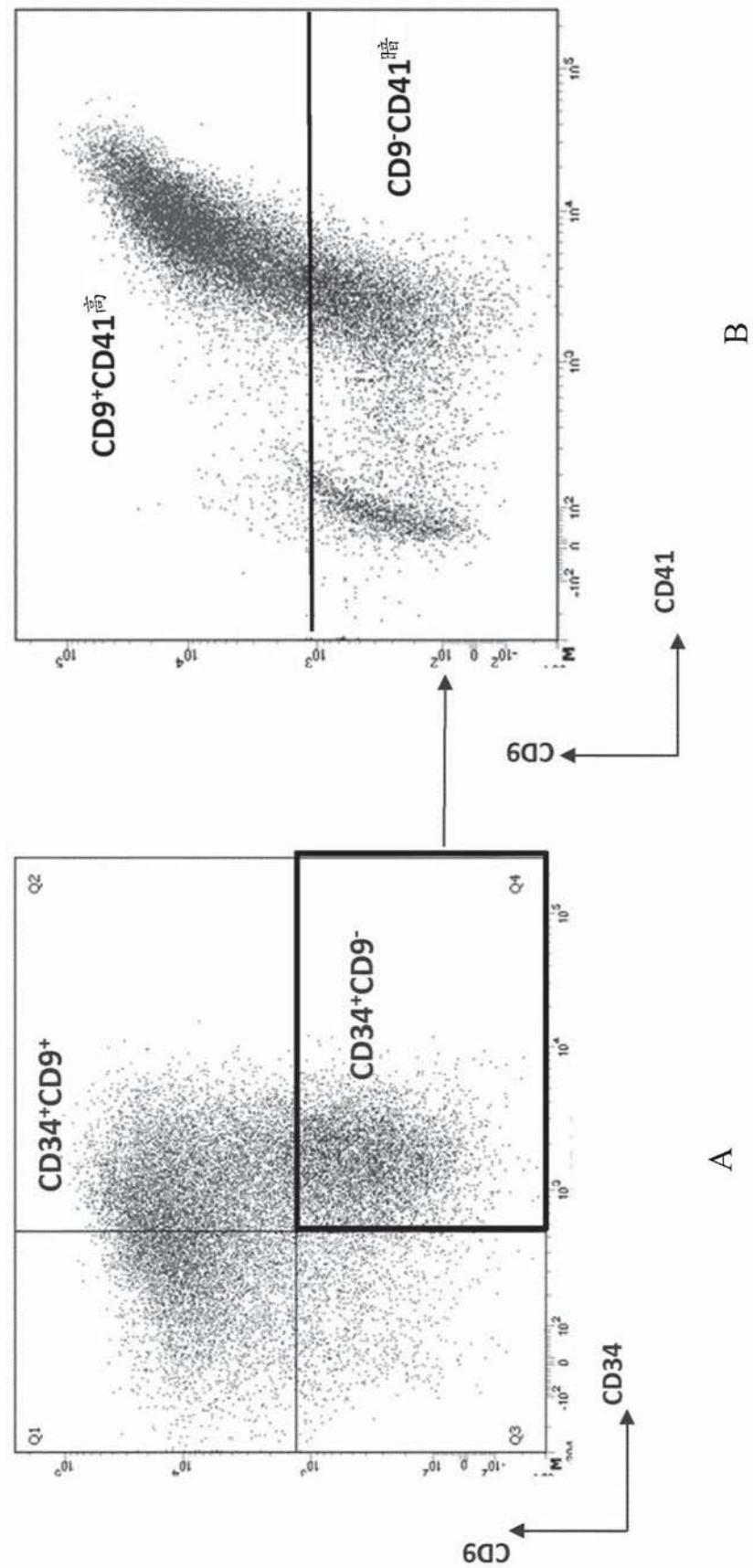


图11

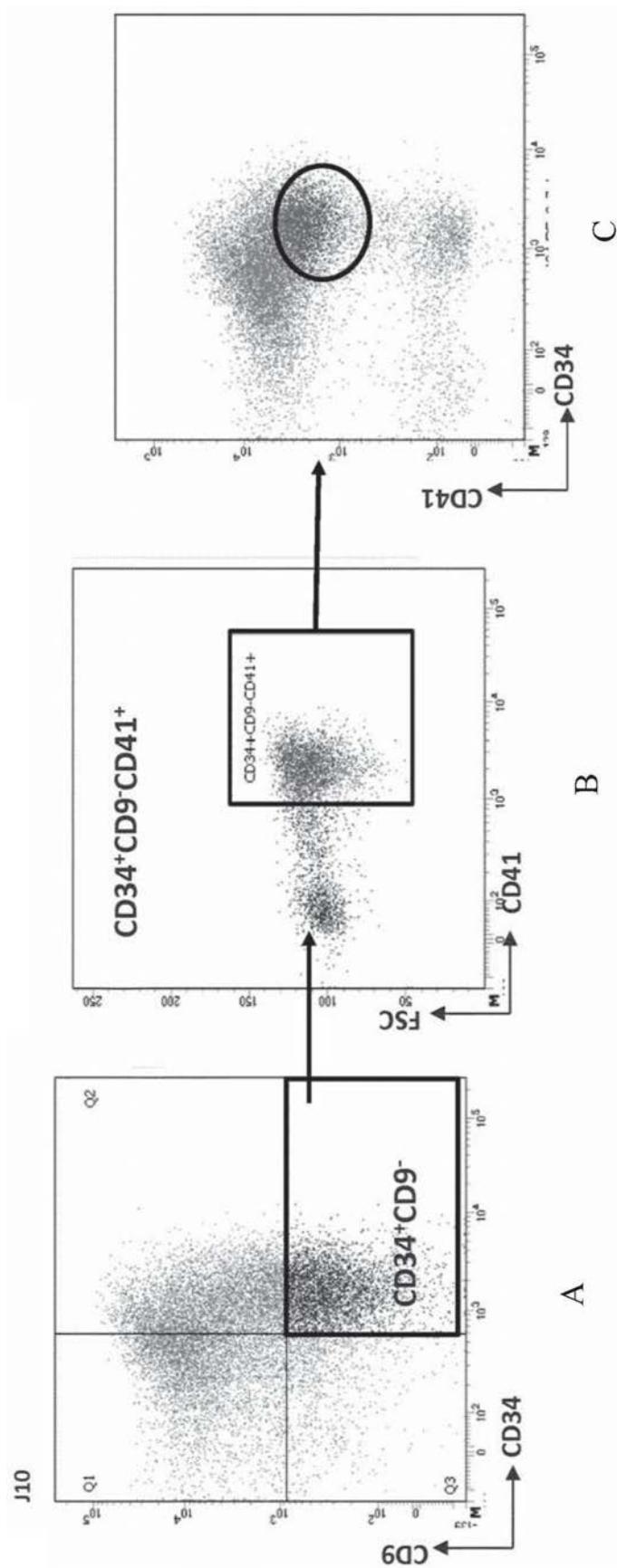


图12