

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00806007. X

[51] Int. Cl.

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C12N 11/02 (2006.01)

C12N 11/08 (2006.01)

A61F 2/02 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 7 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 100402642C

[51] Int. Cl. (续)

C12M 3/04 (2006.01)

[22] 申请日 2000.2.4 [21] 申请号 00806007. X

[30] 优先权

[32] 1999. 2. 4 [33] US [31] 60/118789

[86] 国际申请 PCT/US2000/002688 2000. 2. 4

[87] 国际公布 WO2000/046349 英 2000. 8. 10

[85] 进入国家阶段日期 2001. 10. 8

[73] 专利权人 技术研究及发展基金有限公司

地址 以色列海法

[72] 发明人 S·梅查夫 S·梅雷特斯基

[56] 参考文献

US5541107A 1996. 7. 30

US5266476A 1993. 11. 30

US5510262A 1996. 4. 23

52664761993. 11. 30 1996. 7. 30

WO9519793A1 1995. 7. 27

审查员 丁慧萍

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

权利要求书 5 页 说明书 31 页 附图 4 页

[54] 发明名称

维持和扩增造血干细胞和/或祖细胞的方法和
仪器

[57] 摘要

通过获得未分化的造血干细胞或祖细胞；和把未分化的造血干细胞或祖细胞接种到静止相活塞流动生物反应器中，或者在从这样的反应器得到的条件培养基中培养未分化的造血干细胞或祖细胞，扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞的方法，其中在以片的形式存在的底物上已预先建立三维基质细胞培养物，底物包括形成生理学上可接受的三维纤维网状物的非编织纤维基质，由此扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞。

1. 一种扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞的方法，该方法包括以下步骤：

(a)获得未分化的造血干细胞或祖细胞；和

(b)将所述未分化的造血干细胞或祖细胞接种到静止相活塞流动生物反应器中，其中三维骨髓基质细胞培养物已被预先建立在以片的形式存在的基材上，所述基材包括形成生理学上可接受的三维纤维网状物的非编织纤维基质，由此扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述未分化的造血干细胞或祖细胞为从选自脐带血、流动的外周血和骨髓的组织中分离的细胞。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述未分化的造血干细胞或祖细胞和所述骨髓基质细胞培养物的骨髓基质细胞共享共同的 HLA 抗原。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述未分化的造血干细胞或祖细胞和所述骨髓基质细胞培养物的骨髓基质细胞来自单一个体。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述未分化的造血干细胞或祖细胞和所述骨髓基质细胞培养物的骨髓基质细胞来自不同的个体。

6. 权利要求 1 的方法，其中所述未分化的造血干细胞或祖细胞和所述骨髓基质细胞培养物的骨髓基质细胞来自相同的物种。

7. 权利要求 1 的方法，其中所述未分化的造血干细胞或祖细胞和所述骨髓基质细胞培养物的骨髓基质细胞来自不同的物种。

8. 权利要求 1 的方法，其中所述骨髓基质细胞培养物的骨髓基质细胞生长到至少每立方厘米所述基材 5×10^6 个细胞的密度。

9. 权利要求 1 的方法，其中所述骨髓基质细胞培养物的骨髓基质细胞生长到至少每立方厘米所述基材 10^7 个细胞的密度。

10. 权利要求 1 的方法，其中所述未分化的造血干细胞或祖细胞接种到所述静止相活塞流动生物反应器中的所述步骤在所述接种

后所述生物反应器中的流动切断至少 10 小时的条件下完成。

11. 权利要求 1 的方法，其中所述纤维形成为总体积百分比 40 至 95%的孔体积和 10 微米至 100 微米的孔径大小。

12. 权利要求 1 的方法，其中所述基质由选自平面、非圆形和中空纤维和它们的混合物的纤维制成，所述纤维直径或宽度为 0.5 微米至 50 微米。

13. 权利要求 1 的方法，其中所述基质由具有 2 微米至 20 微米宽度的纤维形成的带状结构组成，且其中纤维的宽度与厚度的比例为至少 2:1。

14. 权利要求 1 的方法，其中所述基质具有为总体积百分比 60 至 95%的孔体积。

15. 权利要求 1 的方法，其中基质具有 50-1000 μm 的高度。

16. 权利要求 1 的方法，其中基质的材料选自聚酯类、聚烯烃、聚氟氯乙烯类、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚砜类、乙酸纤维素、玻璃纤维和惰性金属纤维。

17. 权利要求 1 的方法，其中基质以选自方形、环形、盘形和十字形的形状存在。

18. 权利要求 1 的方法，其中基质以盘的形式存在。

19. 权利要求 1 的方法，其中基质用聚-D-赖氨酸包衣。

20. 一种扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞的方法，该方法包括以下步骤：

(a) 获得未分化的造血干细胞或祖细胞；和

(b) 在包含骨髓基质细胞的条件培养基的培养基上培养所述未分化的造血干细胞或祖细胞，所述条件培养基得自静止相活塞流动生物反应器，其中在以片的形式存在的基材上建立三维骨髓基质细胞培养物，所述基材包括形成生理学上可接受的三维纤维网状物的非编织纤维基质，由此扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞。

21. 权利要求 20 的方法，其中所述未分化的造血干细胞或祖细

胞为从选自脐带血、流动的外周血和骨髓的组织中分离的细胞。

22. 权利要求 20 的方法，其中所述未分化的造血干细胞或祖细胞和所述骨髓基质细胞培养物的骨髓基质细胞共享共同的 HLA 抗原。

23. 权利要求 20 的方法，其中所述未分化的造血干细胞或祖细胞和所述骨髓基质细胞培养物的骨髓基质细胞来自单一个体。

24. 权利要求 20 的方法，其中所述未分化的造血干细胞或祖细胞和所述骨髓基质细胞培养物的骨髓基质细胞来自不同的个体。

25. 权利要求 20 的方法，其中所述未分化的造血干细胞或祖细胞和所述骨髓基质细胞培养物的骨髓基质细胞来自相同的物种。

26. 权利要求 20 的方法，其中所述未分化的造血干细胞或祖细胞和所述骨髓基质细胞培养物的骨髓基质细胞来自不同的物种。

27. 权利要求 20 的方法，其中所述骨髓基质细胞培养物的骨髓基质细胞生长到至少每立方厘米所述基材 5×10^6 个细胞的密度。

28. 权利要求 20 的方法，其中所述骨髓基质细胞培养物的骨髓基质细胞生长到至少每立方厘米所述基材 10^7 个细胞的密度。

29. 权利要求 20 的方法，其中所述纤维形成为总体积百分比 40 至 95% 的孔体积和 10 微米至 100 微米的孔径大小。

30. 权利要求 20 的方法，其中所述基质由选自平面、非圆形和中空纤维和它们的混合物的纤维制成，所述纤维直径或宽度为 0.5 微米至 50 微米。

31. 权利要求 20 的方法，其中所述基质由具有 2 微米至 20 微米宽度的纤维形成的带状结构组成，且其中纤维的宽度与厚度的比例为至少 2:1。

32. 权利要求 20 的方法，其中所述基质具有为总体积百分比 60 至 95% 的孔体积。

33. 权利要求 20 的方法，其中基质具有 50-1000 μm 的高度。

34. 权利要求 20 的方法，其中基质的材料选自聚酯类、聚烯烃、

聚氟氯乙烯类、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚砜类、乙酸纤维素、玻璃纤维和惰性金属纤维。

35. 权利要求 20 的方法，其中基质以选自方形、环形、盘形和十字形的形状存在。

36. 权利要求 20 的方法，其中基质以盘的形式存在。

37. 权利要求 20 的方法，其中基质用聚-D-赖氨酸包衣。

38. 一种制备用于扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞的骨髓基质细胞的条件培养基的方法，方法包括以下步骤：

(a)在以片的形式存在的基材上于静止相活塞流动生物反应器中建立骨髓基质细胞培养物，所述基材包括形成生理学上可接受的三维纤维网状物的非编织纤维基质，由此扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞；和

(b)当已获得所需的骨髓基质细胞密度时，从所述静止相活塞流动生物反应器上收集培养基，由此获得用于扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞的骨髓基质细胞的条件培养基。

39. 权利要求 38 的方法，其中所述骨髓基质细胞培养物的骨髓基质细胞生长到至少每立方厘米所述基材 5×10^6 个细胞的密度。

40. 权利要求 38 的方法，其中所述骨髓基质细胞培养物的骨髓基质细胞生长到至少每立方厘米所述基材 10^7 个细胞的密度。

41. 权利要求 38 的方法，其中所述纤维形成为总体积百分比 40 至 95% 的孔体积和 10 微米至 100 微米的孔径大小。

42. 权利要求 38 的方法，其中所述基质由选自平面、非圆形和中空纤维和它们的混合物的纤维制成，所述纤维直径或宽度为 0.5 微米至 50 微米。

43. 权利要求 38 的方法，其中所述基质由具有 2 微米至 20 微米宽度的纤维形成的带状结构组成，且其中纤维的宽度与厚度的比例为至少 2:1。

44. 权利要求 38 的方法，其中所述基质具有为总体积百分比 60

至 95%的孔体积。

45. 权利要求 38 的方法，其中基质具有 50-1000 μm 的高度。

46. 权利要求 38 的方法，其中基质的材料选自聚酯类、聚烯烃、聚氟氯乙烯类、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚砜类、乙酸纤维素、玻璃纤维和惰性金属纤维。

47. 权利要求 38 的方法，其中基质以选自方形、环形、盘形和十字形的形状存在。

48. 权利要求 38 的方法，其中基质以盘的形式存在。

49. 权利要求 38 的方法，其中基质用聚-D-赖氨酸包衣。

维持和扩增造血干细胞和/或祖细胞的方法和仪器

发明领域和背景

本发明涉及维持和扩增(expansion)造血干细胞的方法和仪器。更详细的说,本发明涉及用于维持和/或扩增造血干细胞和/或用于产生维持和/或扩增造血干细胞的条件下培养基的三维基质细胞活体流动生物反应器。

哺乳动物中的造血系统由细胞的异质群体组成,其功能的范围从具有有限增殖潜在性的成熟细胞至具有广泛增殖、分化和自身更新能力的多能的干细胞(1-3)。造血干细胞(HSC)唯一需要移植后的造血重组并用作基因治疗的主要目标。尽管干细胞在维持造血系统中起关键作用,它们在造血组织中极低的出现率、以及在来自体内条件下,在延长阶段维持或扩增未分化干细胞的有限的能力,不仅保留这些细胞的基本临床应用的主要缺点,而且反映目前的不可用性,和对新的干细胞调节剂的需求。

人们已广泛接受这样的事实,即干细胞在体内与骨髓内的分散生态位(4-6)紧密相关,借助细胞-细胞接触或近程相互作用,它提供共同介导它们的分化作用和自身更新的分子信号(7)。这些生态位是“造血诱导微环境”(HIM)的一部分,由骨髓基质细胞,例如巨噬细胞、成纤维细胞、脂肪细胞和内皮细胞组成(8)。通过提供细胞外基质(ECM)蛋白质和有利于细胞-细胞接触的基底膜成分,骨髓基质细胞维持HIM的功能完整(9-11)。它们也提供用于可控制的造血细胞分化和增殖需要的多种可溶性或停留细胞因子(12-14)。

鉴于以上事实,开发用于延长维持人HSC的培养系统的努力主要集中在预先建立的原代骨髓基质细胞单细胞层上就不感到奇怪了。这些包括长期培养的未照射(Dexter, 15)或照射(16-19)的人原代

骨髓基质细胞以及人或鼠基质细胞系(16, 19-24), 含有或不含有外源性加入的细胞因子。HSC 输出试验最初依赖于这样的细胞产生骨髓后代(长期培养起始细胞; LTC-IC)的能力或依赖于在这样的基质细胞上延长(5-7 周)培养后生成具有圆石块(cobblestone)形态学(形成细胞的圆石块; CAFC)集落的能力(16, 17)。尽管广泛使用 LTC-IC 和 CAFC 试验, 然而, 它们检测高度原始的祖细胞而非真正种群恢复的造血干细胞(25, 26)变得越来越明显。

最近开发的人干细胞试验检测 SCID 种群恢复的细胞(SRC), 其对非肥胖性糖尿病(NOD)/SCID 小鼠的骨髓提供居所(home) (27), 在那里它产生人的髓细胞、淋巴细胞、红细胞胞样的和 CD34+祖细胞群体(28-30)。在表达 CD34+38-表面抗原(31)的造血细胞部分广泛发现 SRC 且在 CB($1/3 \times 10^5$ 细胞)中它的出现次数与 BM($1/9 \times 10^5$ 细胞)或流动的 PB($1/6 \times 10^6$ 细胞)相比是丰富的。最近研究显示 SRC 残留在 CD34+/38-/CXCR4+细胞的亚种群中(33)。CXCR4, 系因子基质趋化细胞衍化因子 1 的表面受体(SDF-1, 34), 对 NOD/SCID 骨髓中的人造血干细胞返回(homing)和移入显然是必要的(33)。

旨在诱导延长的维持/扩增基质细胞培养物上人 HSC 的研究主要建立在作为终点试验的 CAFC、LTC-IC 或 CD34+38-表型上(16, 19-24)。关于在基质细胞培养物上维持/扩增 SRC 很少的报道没能说明明显的长期支持。例如, 发现同种异体人骨髓诱导短期(7 天)SRC 维持, 随后在活性上迅速、明显下降(6 倍)(26)。支持在基质细胞层上的可移植人干细胞长期维持/扩增的不可能性可归因于与这些细胞的体外培养有关的几个因素。在这些因素当中, 一种因素可包括基质细胞单细胞层的用途, 其并不反映在天然的、三维结构的骨髓上的体内生长条件。这样的条件可减少基质细胞提供最佳的、适宜的支持微环境的能力以及基质细胞定位于特定的生态位和与基质细胞及它们的产物物理相互作用的能力。的确, 通过与它们在这样细胞的单细胞层的增殖相比较的那样, 在 3D 胶原基质上接种的基质细胞的

人造血细胞系的优先生长可提供造血祖细胞生物活性的三维(3D)结构重要性的证据(35)。更重要的是,最近显示与单独或在骨髓基质细胞单细胞层上培养的细胞相比较,3D 钽包衣的多孔生物材料增强猕猴 LTCIC 或 CD34+38-细胞的短期维持(36)。然而,未研究基质细胞包衣的 3D 载体的作用。

最近研究已显示鼠 AFT024 细胞系在支持 2-3 周的人 CB SRC 存活和维持(尽管未扩大培养)中优于人基质(37)。已发现该细胞系表达几种新的编码膜结合蛋白质的 HIM 基因(21, 38, 39),它在干细胞生理学中具有基本作用。在更密切模拟它们的 3D 骨髓微环境的条件下,这些和其它的基因经基质细胞可能的表达(并因此使它们达到最佳的、生理功能活性)能够得以测定。

广泛研究已显示基质非接触培养基(19, 21, 22, 40, 41)或基质条件培养基(SCM)(21, 42-44)单独或与细胞因子一起能够支持体内维持或扩增原生造血祖细胞。也已显示 SCM 改善这样的细胞的恢复和传导效力(45, 46)。当这些发现再次强调可溶性基质细胞因子的重要性时,在这样的试验中 LTC-IC、CAFC 或 CD34+38-的终点的用途不能反映 SCM 在维持/扩增可移植性 HSC 的作用。此外,人们并不知道从基质细胞的单细胞层培养基中得到的这样的 SCM 是否确实包含参与人 HSC 生理学的所有与基质细胞有关的基因产物。

最近针对来自体内扩增的可移植性造血干细胞的注意力已集中在建立细胞因子补充的悬浮培养液(47-53)上面。这些研究已帮助鉴定用于该目的主要相关细胞因子,例如,早期作用的细胞因子如干细胞因子(SCF)、FLT3 配体和血小板生成素(TPO)。然而,已得到变化的结果,指明在培养 2-4 周期间(47, 53)后短期丧失(48, 49)、维持(50-52)、以及一些少有的 SRC 扩增实例。在 3D 生长条件下,这些细胞因子和干细胞支持 SRC 的维持/扩增的内在活性的能力尚未定义。

因此,人们广泛意识到需要具有可移植性造血干细胞来自体内

扩大培养和维持的方法和仪器，且它是高度有利的，这避免以上的局限性，与先有技术相比较具有优越的结果。

发明概述

当减少本发明实践时，一种接近模拟三维骨髓微环境且能够支持基质细胞生长和延长维持的活塞流动生物反应器系统已被开发。后者被接种到聚酯(54)的非编织纤维基质组成的多孔无机载体上(54)，使得在相对小体积中繁殖大的细胞数目。载体的结构和包装在氧和营养转移上以及在局部浓度和释放基质细胞产物上具有主要影响(例如 ECM 蛋白质，细胞因子，55)。另外，已测定在这个系统中培养的基质细胞借助直接的细胞-细胞接触促进可移植人造血干细胞的维持/扩增的能力，其远远优于先有技术的方法。此外，借助与在此包括的与干细胞因子有关的新的基质细胞，在这个系统中培养的基质细胞的条件培养基促进可移植的人造血干细胞的维持/扩增的能力已被测定，其远远优于先有技术的方法。

因此，本发明的一个方面提供扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞的方法，方法包括以下步骤：(a)获得未分化的造血干细胞或祖细胞；和步骤(b)将未分化的造血干细胞或祖细胞接种到静止相活塞流动生物反应器中，其中在以片的形式存在的基材上已预先建立三维基质细胞培养物，基材包括形成生理学上可接受的三维纤维网状物的非编织纤维基质，由此扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞。

按照所描述的优选实施方案中的另一个特征，该方法还包括分离未分化的造血干细胞或祖细胞的步骤。

本发明另一方面提供扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞的方法，方法包括以下步骤：(a)获得未分化的造血干细胞或祖细胞；和(b)在含有基质细胞条件培养基上培养未分化的造血干细胞或祖细胞，基质细胞条件培养基衍生于静止相活塞流动生物反应器，其中

在以片的形式存在的基材上已预先建立三维基质细胞培养物，基材包括形成生理学上可接受的三维纤维网状物的非编织纤维基质，由此扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞。

本发明的另一方面提供制备用于扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞的基质细胞条件培养基的方法，方法包括以下步骤：(a)在以片的形式存在的基材上于静止相活塞流动生物反应器中建立基质细胞培养物，基材包括形成生理学上可接受的三维纤维网状物的非编织纤维基质，由此扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞；和(b)当已获得所需的基质细胞密度时，从静止相活塞流动生物反应器上收集培养基，由此获得用于扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞的基质细胞条件培养基。

本发明的另一方面提供将未分化的造血干细胞或祖细胞移植至受体(recipient)中的方法，方法包括以下步骤：(a)通过以下步骤扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞，包括：(i)获得未分化的造血干细胞或祖细胞和(ii)将未分化的造血干细胞或祖细胞接种到静止相活塞流动生物反应器中，其中在以片的形式存在的基材上，已预先建立三维基质细胞培养物，基材包括形成生理学上可接受的三维纤维网状物的非编织纤维基质，由此扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞；和(b)将从步骤(a)生成的未分化的造血干细胞或祖细胞移植至受体中。

按照所描述的优选实施方案中的另一个特征，该方法还包括在步骤(b)前分离未分化的造血干细胞或祖细胞的步骤。

本发明另一方面提供把未分化的造血干细胞或祖细胞移植至受体中的方法，方法包括以下步骤：(a)通过以下步骤扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞，包括：(i)获得未分化的造血干细胞或祖细胞和(ii)在包含基质细胞条件培养基的培养基上培养未分化的造血干细胞或祖细胞，基质细胞条件培养基衍生于静止相活塞流动生物反应器，其中在以片的形式存在的基材上已预先建立三维基质细胞培养

物，基材包括形成生理学上可接受的三维纤维网状物的非编织纤维基质，由此扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞。

本发明的另一方面提供生物反应器活塞，活塞包括具有一个出口和一个入口的容器，且其中含有以片的形式存在的基材，基材包括形成生理学上可接受的三维纤维网状物的非编织纤维基质，基材支持至少每立方厘米基材 5×10^6 个基质细胞。

本发明的另一方面提供包含以上生物反应器活塞的活塞流动生物反应器。

按照以下描述的本发明优选实施方案中另外的特征，未分化的造血干细胞或祖细胞为从选自脐带血、流动的体循环血和骨髓的组织中分离的细胞。

按照所描述的优选实施方案中的其它特征，未分化的造血干细胞或祖细胞和基质细胞培养物的基质细胞共享共同的 HLA 抗原。

按照所描述的优选实施方案中的其它特征，未分化的造血干细胞或祖细胞和基质细胞培养物的基质细胞来自单一个体。

按照所描述的优选实施方案中的其它特征，未分化的造血干细胞或祖细胞和基质细胞培养物的基质细胞来自不同的个体。

按照所描述的优选实施方案中的其它特征，未分化的造血干细胞或祖细胞和基质细胞培养物的基质细胞来自相同的物种。

按照所描述的优选实施方案中的其它特征，未分化的造血干细胞或祖细胞和基质细胞培养物的基质细胞来自不同的物种。

按照所描述的优选实施方案中的其它特征，基质细胞培养物的基质细胞生长到至少每立方厘米基材 5×10^6 个细胞的密度。

按照所描述的优选实施方案中的其它特征，基质细胞培养物的基质细胞生长到至少每立方厘米基材 10^7 个细胞的密度。

按照所描述的优选实施方案中的其它特征，其中所述未分化的造血干细胞或祖细胞接种到所述静止相活塞流动生物反应器中的所述步骤在所述接种后所述生物反应器中的流动切断至少 10 小时的条

件下完成。

按照所描述的优选实施方案中的其它特征，纤维形成总体积百分比 40 至 95% 的孔体积和 10 微米至 100 微米的孔径大小。

按照所描述的优选实施方案中的其它特征，基质由选自平面、非圆形和中空纤维和它们的混合物的纤维组成，纤维直径或宽度为 0.5 微米至 50 微米。

按照所描述的优选实施方案中的其它特征，所述基质由具有 2 微米宽度的纤维形成的带状结构组成。按照所描述的优选实施方案中的另外特征，纤维的宽度与厚度的比例为至少 2:1。

按照所描述的优选实施方案中的其它特征，基质具有为总体积百分比 60 至 95% 的孔体积。

按照所描述的优选实施方案中的其它特征，基质具有 50-1000 μ m 的高度。

按照所描述的优选实施方案中的其它特征，基质材料选自聚酯类、聚烯烃、聚氟氯乙烯类、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚砜类、乙酸纤维素、玻璃纤维和惰性金属纤维。

按照所描述的优选实施方案中的其它特征，基质以选自方形、环形、盘形和十字形的形状存在。

按照所描述的优选实施方案中的其它特征，基质用聚-D-赖氨酸包衣。

通过提供更有效扩增/维持未分化的造血干细胞的方法，本发明成功克服目前已知构型的缺点。

本发明的方法和生物反应器的实施可包括人工、自动或它们的联合进行或完成选择的任务或步骤。此外，按照本发明的方法和生物反应器的优选实施方案的实际仪器操作和设备，通过在任何固体的任何操作系统的硬件或软件或它们的联合，能够实施几种选择的步骤。例如，作为硬件，本发明选择的步骤能够作为芯片或电路实施。作为软件，作为经使用任何适宜的操作系统的计算机执行大量

软件指令，能够实施本发明选择的步骤。在任何情况下，如由数据处理器进行的那样，例如用于执行大多数指令的计算平台，能够描述本发明的方法和生物反应器选择的步骤。

绘图的简短描述

在此仅借助实施例，并参照附图来描述本发明。目前特别参照详细的图，强调所显示的细节借助实施例来说明并仅用于本发明优选实施方案举例说明的讨论的目的，并在提供的情况下提出确信为最有用的且最易于理解本发明的原理和概念方面的描述的情况下提出。在这个方面，未作尝试来更详细显示基本理解本发明必需的本发明的结构细节，采用作图描述，如何具体实践本发明的几种形式，这对本领域技术人员而言是显而易见。

图中：

图 1 为举例说明的活塞流动生物反应器 20 的图解描述，其当减少本发明实践时被使用；1-培养基库；2-气体混合物容器；3-气体滤膜；4-注射点；5-活塞流动生物反应器 20 的活塞或容器；6-流动监视器；6a-流动阀门；7-条件培养基收集/分离容器；8-用于培养基交换的容器；9-蠕动泵；10-采样点；11-用于培养基交换的容器；12-O₂ 监视器；14-转向装置；PH-PH 探头。

图 2 证实 CAFC 经 14F1.1 细胞维持。在有限稀释下，将脐带血 CD34+ 细胞接种到照射 14F1.1 或原代人骨髓基质上。5 周后，测定圆石的形成。结果表示 2 个独立实验的平均值 ± SD。

图 3 证实 LTC-IC 经 14F1.1 细胞维持。在有限稀释下，将脐带血 CD34+ 细胞接种到照射 14F1.1 或原始人骨髓基质上。7 周后，测定髓细胞样的集落的形成。伴随每周培养基替换，加入 FLT-3 配体(300 ng/ml)、TPO (300 ng/ml)和 SCF(100 ng/ml)。结果表示 2 个实验的平均值 ± SD。

图 4 证实 CD34+38-细胞在 14F1.1 和原始人骨髓基质上的扩增。

在 70 CD34+38-细胞/孔下, 将 CD34+细胞接种到 14F1.1 或原始人骨髓基质上。每周加入细胞因子。7-21 天后, 胰蛋白酶消化培养基。经 FACS 分析测定 CD34+38-。结果表示 2 个独立实验的平均值 \pm SD。

图 5a-b 显示用 14F1.1 基质细胞系接种载体 10 天(图 5a)或 40 天(图 5b)后的扫描电子显微摄影(SEM)。放大倍数: $\times 150$ 。

图 6a-b 证实 3D 对比 2D 的 14F1.1 条件培养基在 CD34+38-扩增上的作用。在来自 14F1.1 和原始人骨髓基质的条件培养基的多种浓度存在下, 于悬浮液培养基上接种 CD34+细胞。经 FACS 分析测定 CD34+38-细胞数目。结果表示 2 个独立实验的平均值 \pm SD。

图 7 证实 CD34+38-细胞在基质细胞包衣载体上的维持。将基质细胞包衣的载体从 3D 系统移至硅酮包衣的 96 孔盘上, 随后加入 1.5×10^4 CD34+细胞。对照组只包含载体和与载体等量的单层(2D)生长的 14F1.1 细胞。在设定的时间下收获细胞并经 FACS 分析。结果表示 2 个独立实验的平均值 \pm SD。

优选实施方案的描述

本发明提供用于造血干细胞扩增/维持的方法和生物反应器, 如同另外在下文中详述的, 其能够用于在受体中的移植或用于其它的目的细的描述。具体的说, 本发明提供用于维持和/或扩增造血干细胞的三维基质细胞活塞流动生物反应器和/或用来产生用于维持和/或扩增造血干细胞的条件培养基, 它能够用于多种应用。

参照图和所附的描述可更好理解本发明的原理和操作。

在详细解释本发明的至少一个优选实施方案之前, 应理解本发明不局限于它在以下描述中或在图中阐明概述的对结构和组件布置细节上的应用。本发明能够以多种方式实践或进行其它的实施方案。也应理解在此使用的用语和术语用于描述目的而不应当看作是限制。

目前策略集中在可移植的人造血干细胞(HSC)的来自体内的长期维持或扩增, 但到目前为止仅获得有限的成功。在此描述接近模拟

骨髓微环境且能够支持骨髓基质细胞的生长和延长维持的新的三维(3D)活塞流动生物反应器系统。后者接种到以玻璃柱包装的由聚酯的非编织纤维基质组成的多孔载体上,因而在相对小的体积中繁殖大量的细胞数。在以下实施例部分提供的实施例部分中,用鼠 14F1.1 基质细胞系或用原始人骨髓基质细胞接种生物反应器。至接种后第 40 天,载体包含增加 100 倍的细胞密度。在多种水平下柱的密度是相同的,说明氧和营养物被均匀转移至细胞。在生物反应器(3D SCM)内,在支持长期维持人脐带血(CB)的 CD34+38-细胞中,经基质细胞调节的培养基优于基质细胞单细胞层(2D)SCM。3D SCM 也能够支持 CD34+38-CXCR4+细胞的扩增,这表示 SCID/NOD 的种群恢复的细胞(SRC)。在细胞因子(FLT3 配体和 TPO)存在下,3D SCM 增强干细胞自身更新且抑制分化,而 2D SCM+细胞因子诱导相反的作用。三维基质干细胞协同培养也呈现出比单细胞层基质细胞上协同培养更优良的 CD34+38-细胞的维持。这些发现证实借助优良的基质干细胞接触且或许借助基质细胞产生已知和/或新的干细胞调节剂,3D 活塞流动生物反应器提供用于来自体内的维持/扩增人 HSC 的适宜的系统。

人 HSC 为移植和基因疗法的基本目标。HSC 高的减少出现次数、以及目前的生长因子能够在缺乏晚期分化下诱导干细胞自身更新的无效性,仍对实施这样的策略以及对 HSC “库”的大规模设置构成主要的障碍。

目前策略集中在长期维持/扩增未分化的人 HSC 上,迄今为止仅获得有限的成功。当最近用细胞因子补充的悬浮液培养基的研究已显示一些 SRC 表达时,通过大量增加初期的造血祖细胞(53, 62)也实现该方法,表明干细胞分化发生的基本程度。例如,一个理想系统就是其中 SRC 扩增,而 LTC-IC 在数量上保留减少的系统。

用于造血细胞扩增的当前系统使用单独的(参见 U.S. 专利 5,646,043 号)或接种在基质细胞单细胞层(参见 U.S. 专利 5,605,822 号)

上的造血细胞的灌流悬浮液培养基。前者系统证实定型(committed)祖细胞大量的产生,后者经历单细胞层基质-干细胞相互作用的非生理性质。用于干细胞扩增的另外的系统描述基质细胞条件培养基(参见 U.S.专利 4,536,151 号和 5,437,994 号)的用途。然而,从基质细胞单细胞层培养基得到后者,其在此清楚显示与 3D SCM 相比较干细胞激活能力的低下和不同(参见实施例部分的表 3)。尽管最近已描述(参见 U.S.专利 5,906,940 号)静止相生物反应器使用基质细胞包衣的玻璃珠,玻璃珠不提供生理的、3D 结构且与减少本发明实践使用的载体相比较,使每 ml10 倍降低数量的基质细胞持续培养。通过在此呈现的结果,3D 衍生的 SCM 或 3D 基质细胞培养物支持维持 CD34+38-细胞的优越能力(参见图 6 和 7),清楚证实 3D 对单细胞层基质细胞培养物的有利条件。3D SCM 的优越作用可归因于已知细胞因子或新的干细胞调节剂的增加的水平。

旨在评价 3D SCM 和多种细胞因子(SCF, FLT3 配体, TPO)在 CD34+38-CXCR4+(或 SRC)扩增/维持(表 3)上的联合作用的实验清楚显示在 FLT3 配体和 TPO 而没有 SCF 存在下的 3D SCM 的有利作用。这些结果能够归因于 3D SCM 对干细胞分化的相对抑制作用。这些结果强烈指明在 3D 条件下,与新的基质细胞有关的因子被产生,或许它们本身没有多少活性,可与这样的细胞因子共同起作用。使用 LTC-IC 和定型祖细胞(GM-CFU)的产量读出试验除 CD34+产量以外,可测试干细胞的分化。

在此描述的生物反应器是独特的,即它将 3D 基质细胞培养物与持续流动系统合并。最近已描述(U.S.专利 5,541,107 号)没有持续培养基流动的 3D 基质-造血细胞系统,在此描述的结果(参见例如图 7)清楚证实在缺乏持续流动的情况下,相对单细胞层的基质细胞培养物的有利条件减少。

在此描述的 3D 活塞流动生物反应器能够支持基质细胞系以及原始骨髓基质细胞的长期生长。基质细胞在生物反应器中的用途不仅

对建立优良的基质-干细胞接触(借助独特的“生态位”和细胞-细胞、细胞-ECM 相互作用)是必需的,而且对已知的和新的可溶性和膜结合细胞因子产生基质细胞也是必需的。基质细胞通过使用基因工程化细胞因子产生的变体,能够有利于用适宜的细胞因子补充这样的生物反应器。

生物反应器基质细胞也能够设计用作逆病毒包装的细胞系,使基因材料有效传导至在生物反应器本身内的干细胞中。各种基质细胞在生物反应器中的用途也能选择最适宜的基材用于驱除 Ph 阳性干细胞,已知后者对基质细胞粘附的能力较低(63)。原始基质细胞具有有利条件,它们能建立“自体的”基质-干细胞生物反应器,在它上面自体的或甚至脐带血干细胞能够被扩增且其在移植前不需要除去基质细胞。

当在生物反应器中的最初的接种试验指明在载体中的相对低收率的 CD34+38-细胞,接种后培养基流动速率以及最初接种至生物反应器中的 CD34+细胞数量可以容易地最优化。在 CD34+38-C×CR4+接种后的早期时间点(1-4 天)分析对这样的优化是必要的。

与先有技术方法存在明显差别,本发明的生物反应器使用基本增加用于粘合基质细胞的可以利用的附着表面的生长基质,以便模拟骨髓的机械基本结构。例如,对高度 0.5 mm 的生长基质,基于生长基质计算,因子增加至少 5 至 30 倍。每单位层的因子这样增加大约 5 至 30 倍,且如果使用经垫片(spacer)等堆积或分离的大量这样的层,每一个这样的结构应用 5 至 30 倍的因子。当基质以片形式、优选非编织纤维片或开孔泡沫聚合物片使用时,优选片的厚度为大约 50 至 1000 μm 或更高,提供用于细胞入口、营养物入口和用于除去来自片的废物的足够的孔隙率。按照优选方案,孔具有 10 μm 至 100 μm 的有效直径。从多种厚度的纤维能够制备这样的片,优选纤维厚度或纤维直径范围在大约 0.5 μm 至 20 μm 之间,更优选纤维直径在 10 μm 至 15 μm 范围内。

可通过或甚至更好地结合于提供用于二维稳定性和物理强度的多孔载片或筛子，可支持本发明的结构。

也可将这样的基质片切割、冲压或破碎以提供具有相同级的厚度(大约 50-1000 μm)的、大约 0.2 mm^2 至大约 10 mm^2 级的投射面积的颗粒。

在 U. S. 专利 5,168,085 号且尤其是 5,266,476 号中，描述用于减少本发明实践的生长基质的制备、用途和/或有利条件有关的其它细节，两者通过引用结合到本文中。

如由技术人员易于意识到的那样，本发明提供扩增的未分化的造血干细胞群，它们能够用于多种应用，例如(但不局限于)：(i) 在受体基质上扩增人干细胞(自体或脐带血来源的)，移植前不需要分离基质干细胞；(ii) 借助基质-干细胞相互作用，在自体沉淀中排除 Ph + CML 干细胞；(iii) 在生物反应器中将基因转移到自身更新干细胞中或随后从生物反应器中收获；(iv) 在悬浮培养基中或在干细胞生物反应器中，产生 3D 基质细胞条件培养基(SCM)，用于体内维持/扩增未分化的造血干细胞；(v) 在缺乏分化下分离诱导干细胞自身更新的新的蛋白质以及具有另外的生物功能的蛋白质；(vi) 分离 3D 基质细胞 RNA，用于克隆与新的基质细胞有关的干细胞调节剂和其它的功能性基质细胞基因产物。

本发明的一个方面是提供扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞的方法。通过实施以下方法步骤，进行根据本发明这个方面的方法。首先，获得未分化的造血干细胞或祖细胞。其次，将未分化的造血干细胞或祖细胞接种到静止相活塞流动生物反应器中，在与参考文献编号一致的图 1 中描述它们的一个实例，其中在以片形式存在的基材上预先建立基质细胞系或原代基质细胞培养物的三维基质细胞培养物，基材包含形成生理学上可接受的三维纤维网状物的非编织纤维基质，由此，如在以上另外描述的那样和在以下实施例部分中举例说明的那样，扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞。

如在以下说明书和在权利要求部分中使用的那样，术语“未分化的造血干细胞”指的是未定型的(uncommitted)造血细胞。

如在以下说明书和在权利要求部分中使用的那样，术语“祖细胞”指的是定型的、然而未成熟的造血细胞。

未分化的造血干细胞和祖细胞两者为 CD34+细胞。因此，术语“获得未分化的造血干细胞或祖细胞”和它的等价术语“未分化的造血干细胞或祖细胞被获得”两者均指获得分离的未分化的造血干细胞和/或祖细胞，或包含未分化的造血干细胞和祖细胞的 CD34+细胞群。

如在以下说明书和在权利要求部分中使用的那样，术语“扩增的”和“扩增”指的是基本未分化的细胞生长，即伴随这样增加未分化的细胞群增加。

如在以下说明书和在权利要求部分中使用的那样，术语“维持的”和“维持”指的是基本未分化的细胞更新，即伴随这样的静止期的未见分化的基本静止的细胞群。

如在此使用的术语“分化”指的是发育期间来自相对归一化到特殊种类的变化。各种细胞系的细胞分化为已得到充分证明的过程，在此不需进一步描述。

如在此使用的术语“来自体内”指的是从生命有机体除去的细胞且在有机体外面繁殖(例如，在试管中)。

扩增后，例如，通过各种亲和力分离/标记技术，例如(但不局限于)荧光活化细胞分选和借助亲和底物的亲和分离，能够分离现在扩增的未分化的造血干细胞或祖细胞。能够用于实施这样分离方法的亲和分子包括例如其结合于 CD34+细胞的抗-CD34 抗体。

本发明另一方面提供扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞的另一种方法。通过实施以下方法步骤，可进行根据本发明这个方法。首先，获得未分化的造血干细胞或祖细胞。其次，在包含作为单一成分或作为添加剂的基质细胞条件培养基的培养基中，培

养未分化的造血干细胞或祖细胞，基质细胞条件培养基衍生于静止相活塞流动生物反应器，其中在以片的形式存在的基材上已建立基质细胞系或原代基质细胞培养物的三维基质细胞培养物，基材包含形成生理学上可接受的三维纤维网状物的非编织纤维基质，因此，如在以上另外描述的那样和在以下实施例部分中举例说明的那样，扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞。

本发明的另一方面提供制备用于扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞的基质细胞条件培养基的方法。通过实施以下方法步骤，进行本发明这个方面的方法。首先，在以片的形式存在的基材上(基材包含形成生理学上可接受的三维纤维网状物的非编织纤维基质)在静止相活塞流动生物反应器中建立基质细胞系或原代基质细胞培养物的基质细胞培养物，由此扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞。其次，当已获得所需的基质细胞密度时，比如说，例如每立方厘米基质大约 5×10^6 或 10^7 个细胞以上，如在以上另外描述的那样和在以下实施例部分中举例说明的那样，从静止相活塞流动生物反应器中收集培养基，获得用于扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞的基质细胞条件培养基。

本发明的另一方面提供将未分化的造血干细胞或祖细胞移植进入到受体中的方法。通过实施以下方法步骤，进行本发明这个方面的方法。首先，经任何以上描述的方法扩增/维持未分化的造血干细胞或祖细胞。其次，将从第一步骤中生成的未分化的造血干细胞或祖细胞移植到受体中。

如在图 1 中所示，本发明的另一方面提供包含容器 5 的生物反应器活塞，一般以具有一个出口和一个入口的柱的形式存在，且其中含有以片的形式存在的基材，基材包含形成生理学上可接受的三维纤维网状物的非编织纤维基质，基材支持每立方厘米基材至少基质细胞系或原代基质细胞培养物的 5×10^6 个基质细胞，优选为至少 10^7 个基质细胞。

本发明的另一方面提供包含以上生物反应器活塞的活塞流动生物反应器。

在这方面，应该意识到基材在理论上可支持最多每立方厘米 5×10^7 个细胞。一旦足够的细胞聚集到基材上，能够采用诸如照射的方法以停止另外的细胞生长，以便控制通过基材支持的准确的细胞数。

能够从组织中纯化或分离用作实施本发明方法的此类细胞来源的未分化的造血干细胞或祖细胞，例如(但不局限于)脐带血、细胞因子移动的体循环血(例如经白细胞提取法(leukapheresis)收集)和骨髓，已知所有它们均包含未分化的造血干细胞或祖细胞。这样的分离方法为本领域熟知的，最经常使用的是荧光活化细胞分选，其中首先用荧光团亲和标记法标记细胞且然后收集。

按照本发明的优选实施方案，未分化的造血干细胞或祖细胞和基质细胞培养物的基质细胞共享共同的 HLA 抗原。按照本发明的另一个优选实施方案，未分化的造血干细胞或祖细胞和基质细胞培养物的基质细胞来自单一的个体。因此，在把它们移植到受体中的情况下，不需要分离细胞。

按照本发明的另一个优选实施方案，未分化的造血干细胞或祖细胞和基质细胞培养物的基质细胞来自不同的个体。例如，未分化的造血干细胞或祖细胞和基质细胞的未来受体用于提供基质细胞，而未分化的造血干细胞或祖细胞和基质细胞来自供给这样的细胞至受体的根据 HLA 相容性选择的供体。因此，移植前不再需要分离细胞。

按照本发明的另一个实施方案，未分化的造血干细胞或祖细胞和基质细胞培养物的基质细胞来自相同的物种。然而，按照本发明的另一个优选实施方案，未分化的造血干细胞或祖细胞和基质细胞培养物的基质细胞来自不同的物种。

按照本发明的优选实施方案，其中所述未分化的造血干细胞或祖细胞接种到所述静止相活塞流动生物反应器中的所述步骤在所述

接种后所述生物反应器中的流动切断至少 10 小时的条件下完成，以致于使细胞能够固定到基质细胞覆盖的基质上。

以下描述提供用于实施本发明关于优选基材的深入了解。

因此，按照一个实施方案，基材纤维形成总体积百分比 40 至 95% 的孔体积和 10 微米至 100 微米的孔径大小。按照另一个实施方案，制备基材的基质由选自平面、非圆形和中空纤维和它们的混合物的纤维组成，纤维直径或宽度为 0.5 微米至 50 微米。按照另一个实施方案，基质由具有 2 微米宽度的纤维形成的带状结构组成。按照另外的实施方案，纤维的宽度与厚度的比例为至少 2:1。按照另外的实施方案，制备基材的基质具有为总体积百分比 60 至 95% 的孔体积。按照另一个实施方案，基质具有 50-1000 μm 的高度，这是就使用它们的堆积而论的。按照另一个实施方案，制备基材的基质材料选自聚酯类、聚烯烃、聚氟氯乙烯类、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚砜类、乙酸纤维素、玻璃纤维和惰性金属纤维。按照另一个实施方案，基质以选自方形、环形、盘形和十字形的形状存在。按照另一个实施方案，基质用聚-D-赖氨酸包衣。

在以下实施例的检验上，本发明另外的目的、优点和新的特征对本领域技术人员将是显而易见的，不打算对其限制。因此，发现如在以上概述的和如在以下权利要求部分中要求的本发明另外的各种实施方案和方面中的每一个得到以下实施例的实验支持。

实施例

现在为以下实施例提供参考文献，它们与以上描述一起，以非限制性方式阐明本发明。

一般在此使用的术语和在本发明中使用的实验室方法包括分子、生物化学、微生物学和重组 DNA 技术。在文献中详尽解释这样的技术。参见例如，“分子克隆：实验室手册”，Sambrook 等，(1989)；

“分子生物学中的通用流程” (Current Protocols in Molecular Biology),

第 I-III 卷, Ausubel, R. M.编辑(1994); Ausubel 等“分子生物学中的通用流程”, John Wiley 和 Sons, Baltimore, Maryland(1989); Perbal, “分子克隆实用指南” John Wiley & Sons, 纽约(1988); Watson 等, “重组 DNA”, Scientific American Books, 纽约; Birren 等(编辑)“基因组分析: 实验室手册系列”, 第 1-4 卷, Cold Spring Harbor 实验室出版社, 纽约(1998); 在 U. S. 专利 4,666,828 号, 4,683, 202 号, 4,801,531 号, 5,192,659 号和 5,272,057 号中阐述的方法学; “细胞生物学: 实验室手册”, 第 I-III 卷, Cellis, J. E.编辑(1994); “免疫学中的通用流程”, 第 I-III 卷, Coligan J. E.编辑(1994); Stites 等(编辑)“基础和临床免疫学”(第 8 版), Appleton & Lange, Norwalk, CT(1994); Mishell 和 Shiigi(编辑)“细胞免疫学中的精选方法”, W. H. Freeman 公司, 纽约(1980); 在专利和科学文献中广泛描述可获得的免疫试验, 参见例如, U. S. 专利 3,791,932 号、3,839,153 号、3,850,752 号、3,850,578 号、3,853,987 号、3,867,517 号、3,879,262、3,901,654 号、3,935,074 号、3,984,533 号、3,996,345 号、4,034,074 号、4,098,876、4,879,219、5,011,771 和 5,281,521; “寡核苷酸合成”, Gait, M. J.编辑(1984); “核酸杂化作用”, Hames, B. D.和 Higgins S. J.编辑(1985); “转录和翻译”, Hames, B. D.和 Higgins S. J.编辑(1984); “动物细胞培养”, Freshney, R. I.编辑(1986); “固定化细胞和酶”(Immobilized Cells and Enzymes), IRL 出版社, (1986); “分子克隆实用指南”, Perbal, B., (1984)和“酶学中的方法”, 第 1-317 卷, Academic 出版社; “PCR 流程: 方法和应用指南”, Academic 出版社, 圣迭戈, CA(1990); 等, “蛋白质纯化和鉴定策略-实验室方法手册”, CSHL 出版社(1996); 所有文献通过引用结合到本文中, 好象在此充分概述的那样。其它的一般参考文献也随该文件一起提供。相信其中的方法是本领域熟知的并为便利读者而提供。包含在那里的所有信息通过引用结合到本文中。

材料和实验方法

生物反应器: 根据本发明技术使用的生物反应器在结构上与在图 1 中描述的设计一致。设计玻璃器皿并在 Technino(以色列)制备, 经硅胶管(silicone tubing)(Degania, 以色列)连接。在不含有 Ca^{+2} 和 Mg^{+2} 的磷酸盐缓冲盐水(PBS; Beit Ha'Emek 工业, 以色列)中, 将载体旋转过夜, 随后除去 PBS 和释放的碎片。每柱用 10 ml 填充载体填充。用 PBS-Ca-Mg 填充生物反应器, 密封所有出口且将系统高压灭菌(120°C , 30 分钟)。借助容器[8]除去 PBS 并在包含有 300 ml 的含有 10% 热灭活的小牛血清(FCS; Beit Ha'Emek 工业, 以色列)和 Pen-Strep-Nystatin 混合物(100 U/ml:100 $\mu\text{g}/\text{ml}$:1.25 $\mu\text{n}/\text{ml}$; Beit Ha'Emek)的 Dulbecco 氏高葡萄糖培养基(DMEM; GIBCO BRL)的 37°C 的孵育器中, 将生物反应器循环 48 小时。用含有以上物质+2 ML-谷氨酰胺(Beit Ha'Emek)的新鲜 DMEM 替代循环培养基。

基质细胞: 于充分润湿的空气 $5\% \text{CO}_2$ 的孵育器中, 在 37°C 下, 在用 10% FCS 补充的 DMEM 中维持基质细胞系。在组织培养烧瓶(Corning)中, 细胞生长并在达到汇合后经胰蛋白酶作用裂解。从经受开放心脏手术的血液学健康供体抽取的胸骨骨髓建立原代人骨髓基质细胞。简言之, 在 Hank 氏平衡盐溶液(HBSS; GIBCO BRL)中, 将骨髓抽吸液稀释 3 倍且经历菲可帕克(Robbins Scientific 公司, Sunnyvale, CA)密度梯度离心。收集骨髓单核细胞($<1.077 \text{ gm}/\text{cm}^3$), 以 HBSS 洗涤 3 次且重悬浮于长期培养基(LTC)中, 培养基由用 12.5% FCS、12.5% 马血清(Beit Ha'Emek)、 10^{-4} M β -巯基乙醇(Merck)和 10^{-6} mol/L 琥珀酸氢化可的松钠(Sigma)补充的 DMEM 组成。在 37°C ($5\% \text{CO}_2$) 下, 将细胞在 25 ml 组织培养烧瓶(Corning)中孵育 3 天且然后在 33°C (同上) 下孵育, 每周重新加入培养基。来自各自供体的基质细胞用于每一个生物反应器。为 3D 和单细胞层研究, 每 10 天经胰蛋白酶消化(0.25% 胰蛋白酶和 EDTA 在 Puck 氏盐水 A 中; Beit Ha'Emek) 分裂原代基质细胞培养物, 以使足够的基质细胞扩增。对 LTC-IC 和

CAFC(参见如下), 使用 ^{137}Cs 源照射(1500 cGy)基质细胞, 在 33°C 下于 LTC 培养基中维持培养物。

基质细胞的接种: 基质细胞系或 5 周原代骨髓基质细胞的汇合培养物经胰蛋白酶消化且以 HBSS 将细胞洗涤 3 次, 重悬浮于生物反应器培养基(参见以上)中, 计数并在 10 ml 体积中借助注射点以 10^6 细胞/ml 接种([4], 图 1)到在生物反应器的玻璃柱中的 10 ml 载体上。接种后立即停止循环 16 小时以使细胞固定于载体上。通过除去载体且经 MTT 方法对细胞计数(56), 监测基质细胞生长。当基质细胞汇合时, 用 LTC 培养基替代培养基, 用于继续研究(制备 SCM, 干细胞接种)。

基质细胞条件培养基(SCM)的制备: 在等价细胞密度下, 用新鲜 LTC 培养基重新载荷单细胞层和生物反应器的基质细胞。孵育细胞过夜后, 收集 SCM。为此目的, 将 3D 培养基中的培养基流动停止 16 小时并在重新开始循环前直接从柱上移去。为分析 CD34+细胞对 SRC 的基质细胞产生的作用, 在把 CD34+细胞接种到 3D 系统中后在各个间隔(2-7 天)停止循环且如上描述的那样从柱收集培养基。将 SCM 离心($1000 \times g$, 10 分钟), 过滤且贮存在 -20°C 下。在生物反应器中, 基质细胞也可在不含有血浆的培养基中生长, 为收集 SCM, 排除不确定的变化。

CD34+细胞的分离: 在菲可帕克上, 将在传递期间于灭菌条件下采集的脐带血样分级培养(fractionated)并收集上浮的(buoyant)($< 1.077 \text{ gr/cm}^3$)单核细胞。将来自各 CB 样品的细胞混合, 用抗 CD34 抗体孵育并经 midi MACS(Miltenyl Biotech)分离。

CD34+细胞的悬浮培养基: 在 0.5 ml 减去或加上单独或联合的 300 ng/ml 每一个 FLT3 配体、SCF 或 TPO 的 0-100% SCM 中, 于 24 孔盘(TPP, 瑞典)上孵育 CB CD34+细胞(5×10^5 /孔)。对照组包含加上或减去细胞因子的 LTC 培养基。在 37°C 下, 于 5% CO_2 的空气中, 孵育细胞。每周交换培养基。接种前及在各个时间(1-3 周), 收获细

胞，经流式细胞计量术计数用于 CD34+/38-/CXCR4+ 试验。输出量试验也可包括 SRC、CAFC 和 LTC-IC。

基质-干细胞协同培养:

在含有等密度的汇合基质细胞的单细胞层或生物反应器上，在同等数目(大约 5×10^5)下接种分离的、混合的 CB CD34+ 细胞。当加入到生物反应器上时，停止培养基流动 16 小时以使与基质细胞接触且在每分钟 0.1-1.0 ml 的速度下重新开始。在缺乏培养基交换下，除去 CD34+ 细胞接种的基质细胞载体以进行对照研究。在含有或不含有细胞因子的 LTC 培养基中，维持协同培养。在多个时间(最多可达 4 周)，从单细胞层上清液或从循环培养基中，借助容器([8]，图 1)收集非粘附细胞。借助顺序胰蛋白酶作用并接触基于 EDTA 的解离缓冲液(GIBCO BRL)，随后温和吸取细胞，收集粘附细胞。为避免在生成的悬浮液中存在基质细胞，将细胞重悬浮于 HBSS + 10% FCS 中并在 37°C 下于塑料组织培养皿(Corning)上经历 60 分钟的粘附过程。将循环的且分离载体的造血细胞洗涤，经流式细胞计量术计数并分开用于 CD34+/38-/CXCR4+ 试验。输出量试验也可包括 SRC、CAFC 和 LTC-IC。

流式细胞计量术: 在 4°C 下，用饱和浓度的单克隆抗-CD34+PerCP (Beckton-Dickinson)、抗-CXCR4-荧光异氰酸酯(FITC, R&D 系统)和藻红蛋白(PE, Beckton-Dickinson)抗体孵育细胞 30 分钟。在含有 5% 热灭活的 FCS 的冰冷却的 PBS 中，洗涤细胞 2 次并重悬浮以用于在 FACS 扫描(Beckton-Dickinson)上的三色流式细胞计量术测定。

LTC-IC 和 CAFC 试验: 如先前描述的那样(16,17)，新鲜分离的 CD34+ 细胞，即从基质-干细胞协同培养或从悬浮培养基分离的细胞，用于 LTC-IC 和 CAFC 测定。将汇合的原代骨髓基质细胞经胰蛋白酶消化，照射(1500 cGy)且以 0.1 ml 铺在 96 孔板(Corning)上(1.5×10^4 孔)。建立 24 平行测定孔/组。用 0.1 ml 含有连续稀释的 CD34+ 细胞

(500-5 细胞/孔)的 LTC 培养基或用从各试验中收获的系列稀释的细胞,覆盖基质细胞。在 33℃下,直接将培养基孵育 5 周,伴随每周交换半数的培养基。如先前描述的那样(57),在 1000 rpm 下,将这些板离心 10 分钟,移去培养基上清液,用甲基纤维素培养基和用于骨髓祖细胞试验的细胞因子覆盖剩余的细胞。14 天后对计数细胞且按照给出 37%阴性培养物(16)的受试细胞浓度的倒数测定 LTC-IC 出现的次数。除缺乏甲基纤维素和细胞因子以外,基本上如以上描述的那样进行 CAFC 试验。在接种系列稀释的受试细胞悬浮液后 6 周,测定具有在基质层下的至少 5 个细胞(圆石区)中的至少一个暗相(phase-dark)造血克隆的孔百分比。

实验结果

减少本发明实践所使用的生物反应器系统在图 1 中描述。它包含四个平行的活塞流动生物反应器单位[5]。每个生物反应器单位包含 1 克由聚酯的非编织纤维基质制成的多孔载体(直径 4 mm)(58)。这些载体使得在相对小的体积中繁殖大量的细胞数目。载体的结构和填充物对氧和营养物的转移以及在局部浓度和释放的基质细胞产物(例如,ECM 蛋白质,细胞因子,59)有很大的影响。生物反应器在 37℃的孵育器中维持。

监测每个生物反应器中的流动[6]且通过阀门调节[6a]。每个生物反应器包含一个进样和注射点[4],使顺序接种基质和造血细胞。在 pH 7.0 下,从贮库[1]中[13]供应培养基。在不同的比例下依生物反应器中的细胞密度而定,以维持 5-40%溶解氧在从柱的出口,经含有空气/CO₂/O₂[2]的过滤[3]气体混合物供应贮库。如由监控器测定的那样[12],O₂的比例适宜于溶解氧在生物反应器出口的水平。借助硅酮试管,将气体混合物供应于贮库。使培养基通过分开的容器[7],该容器能收集循环的、未粘附的细胞。在 0.1-3 ml/分钟的速率下,借助蠕动泵[9]获得培养基循环。生物反应器单位配备另外的进样点[10]和两

个用于以 10-50 ml/天的速率连续交换培养基的容器[8,11]。使用四个平行的生物反应器单位以便于定期拆除，例如细胞除去、扫描电子显微镜、组织学、免疫组织化学、RNA 提取等。

在一个实验中，建立包含其先前显示支持定型的人髓样祖细胞(24)生长的鼠 14F1.1 基质细胞系(24、60、61)的生物反应器系统。该细胞系也同样能够支持人 CB CAFC(图 2)、LTC-IC(图 3)和 CD34+38-细胞(图 4)以及原代人骨髓基质细胞。在这些图中呈现的结果也显示，将 FLT3 配体+TPO 加入到这些培养基中对 LTC-IC 无作用，而这些细胞因子显著增强 CAFC 和 CD34+38-细胞产量。反之，SCF 诱导 LTC-IC 和 CAFC 两者下降。当以 1.5×10^6 个细胞/10 ml 培养物体积接种到生物反应器中时，14F1.1 细胞生长且铺展在载体(图 5)上。接种后第 40 天，载体包含 100 倍增加的细胞密度，即大约 1.5×10^6 个细胞/载体， 1.5×10^7 个细胞/ml(表 1)。

表 1

14F1.1 和原代人骨髓基质在载体上生长的动力学

基质在载体上的时间(天)	10	14	20	30	40
	14F1.1	人基质	14F1.1	14F1.1	14F1.1
顶部	1.5×10^3	1.5×10^3	1×10^5	3.5×10^5	1.3×10^6
中部	1×10^3	1.2×10^3	1.3×10^5	2.0×10^5	1.3×10^6
底部	1×10^3	1×10^3	7×10^4	2.0×10^5	1.5×10^6

MTT 分析包括 5 个载体/测定。2 个独立实验的平均值

在柱的各种水平载体上的细胞密度是相同的，指明氧和营养物均匀转移到细胞上。对这些细胞优化培养条件：培养基(Dulbecco 氏高葡萄糖培养基+10%小牛血清)、流动速率(1 ml/min)、培养基交换

次数(每周一次)、最初接种密度(如上)。未发现胶原或聚 L-赖氨酸载体包衣对 14F1.1 细胞的生长速率和最终密度上的有益作用。用原代人骨髓基质细胞(表 1)初步结果表明 14F1.1 细胞和原代基质细胞在分别接种后在第 10 天和第 14 天具有相似的密度。

为测定基质细胞在生物反应器中的功能活性,测定从生物反应器柱(3D SCM)中获得的基质细胞条件培养基(SCM)对用人 CB CD34+细胞接种的悬浮培养液中的 CD34+38-细胞扩增的作用。该活性可与从包含相同浓度的基质细胞的单细胞层培养物(2D SCM)获得的 SCM 相比较。如在图 6 中显示的那样,发现来自 14F1.1 细胞的 SCM 比来自原代骨髓基质细胞的 SCM 相等地或更能够支持人 CB CD34+38-细胞的维持。在较低的浓度下,始终观察到 14F1.1 细胞 SCM 比原代骨髓 SCM 强的最大作用。此外,在支持人 CB CD34+38-细胞的扩增中,发现 3D SCM 优于两种细胞类型的 2D SCM。在培养期间(14 天对 21 天),2D 和 3D SCM 之间的活性差异更加明显。如与只含有培养基的对照培养液相比较,将 14F1.1 3D SCM 加入到人 CB CD34+细胞的悬浮培养液中也导致 CD34+38-CXCR4+细胞的维持(表 2)。

表 2

3 D 4F1.1 SCM 对 CD34+38-/CD34+38-CXCR4+的产量的作用

细胞表面表型	LTC 培养基	14F1.1 SCM(50%)
CD34+38-	370	1296
CD34+38-CXCR4+	0	38

将人 CB CD34+细胞(8×10^4 /点)接种在含有 LTC 培养基或 50% 3D 14F1.1 SCM 的悬浮培养液中。7 天后收获培养物且经 FACS 分析细胞。CD34+38-和 CD34+38-CXCR4+的产量分别为 2800 和 112。

表 3 证实包含在 2D 与包含在 3D SCM 中的 CD34+的悬浮培养液细胞因子的作用的比较。结果清楚证实在支持维持 CD34+38-且更重要的是在维持 CD34+38-CXCR4+(SRC)亚群两者中 3D SCM 优于 2D

SCM。

表 3

细胞因子对扩增 3 D14F1.1 SCM 中的 CD34+38-/CD34+38-CXCR4+ 细胞的作用

细胞表面表型	2D 14F1.1 SCM(50%)	3D 14F1.1 SCM(50%)
--------	--------------------	--------------------

	单独	FLT ₃ 配体+TPO	SCF	单独	FLT ₃ 配体+TPO	SCF
CD34+38-	1820	140	0	2720	4080	130
CD34+38-CXCR4+	460	70	0	620	930	0
CD34+	37,000	178,000	361,000	17,000	25,000	210,000

入 CB CD34+细胞(2.6×10^5 /点)50% 2D 对 3D 14F1.1 SCM, 在 FLT₃ 配体(300 ng/ml)TPO(300 ng/ml)或 SCF(50 ng/ml)缺乏或存在下的比较。7 天后收获培养物且经 FACS 分析细胞。CD34+38-和 CD34+38-CXCR4+的产量分别为 7900 和 360。

这可涉及到 2D SCM 对细胞分化的更强作用, 如由 CD34+细胞的产率检测的那样。在 2D SCM 存在下 TPO+FLT₃ 配体减少 CD34+38-/CD34+38-CXCR4+的产率, 但增强它们在用 3D SCM 补充的培养物中的产率。如经 CD34+表面标记测定的那样, 这再次归因于 3D 系统中更小程度的分化。在 2D 和 3D SCM 两种培养基中, SCF 诱导干细胞分化的明显增加和在 CD34+38-/CD34+38-CXCR4+细胞的产率上明显的减少。

为测定在我们的生物反应器中基质-干细胞的相互作用, 首先评价 CD34+38-细胞在基质细胞(14F1.1)包衣的载体上的维持/扩增。从生物反应器中移出后者并进入到硅酮包衣的 96 孔盘上, 随后加入 CD34+细胞。对照品仅含有载体和载体-相等数量的单层 14F1.1 细胞。

如在图 7 中显示的那样，通过只存在载体的情况下，增强 CD34+38-细胞的生存，证实 3D 结构对原生祖细胞的生存和维持的有益作用(36)。在促进 7-天的 CD34+38-细胞的生存/维持中，基质-细胞包衣的载体优于单独的载体或优于单细胞层的 14F1.1 细胞。在 14F1.1 单细胞层和 14F1.1 包衣的载体培养基中，延长的培养基(第 14 天)导致 CD34+38-的数目增加。

在随后的实验中，将 6×10^6 混合的 CB CD34+ (3×10^5 CD34+38-) 细胞接种到含有未照射的 4 柱、14F1.1 包衣的载体在 350 ml 循环培养基中的生物反应器中。流动停止培养基 16 小时，之后在正常速率(1 ml/min)下继续进行。协同培养 4 天后，经对收获的活细胞的 FACS 分析测定，循环培养基含有 10%初步接种的 CD34+38-细胞。培养 18 天后，循环培养基包含 0.4% CD34+38-细胞，而载体粘附的细胞包含 3%最初接种的 CD34+38-群体。

尽管结合它们的具体实施方案已描述本发明，事实上许多选择、修饰和变化、对本领域技术人员将是显而易见的。因此，打算包括所有这样的选择、修饰和变化，其均在所附的权利要求书的精神和广义范围内。在此引用的所有出版物通过引用全文结合到本文中。在本申请书中任何参考文献的引用或认证别将不构成一种认可，即不应认为这样的参考文献如同本发明的先有技术一样是可以利用的。

参考文献

1. Turhan, A.G., Humphries, R.K., Phillips, G.L., Eaves, A.C. & Eaves, C.J. *N.Engl. J. Med.* 320:1655, 1989.
2. Morrison, S.J., Uchida, N. & Weissman I.L. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11:35,1995.
3. Ogawa, M. *Blood* 11:2844, 1993.
4. Lord BI, Testa NG, Hendry JH. *Blood* 45:65, 1995.
5. Trentin JJ. in Gordon A (ed): *Regulation of Hematopoiesis Vol I.* New York, N.Y., Appleton-Century-Crafts, p161, 1970.
6. Wolf NS. *Clin. Hematol.* 8:469, 1979.
7. Dorshkind K, *Ann. Rev. Immunol.* 8:11, 1990.
8. Allen TD, Dexter TM. *Exp. Hematol.* 12:517, 1984.
9. Gupta P, McCarthy JB, Verfaillie CM. *Blood* 87:3229, 1996.
10. Liesveld JL, Winslow JM, Kempshi MC, Ryan DH, Brennan JK, Abboud CN. *Exp. Hematol.* 19:63, 1991.
11. Long MW, Briddel R, Walter AW, Bruno E, Hoffman R. *J. Clin. Invest.* 90:251, 1992.
12. Eaves CJ, Cashman JD, Kay RJ, Daugherty GJ, Otsuka T, Gabury LA, Hogge DE, Landsdorp PM, Eaves AC, Humphries RK. *Blood* 78:110, 1991.
13. Moore KA, Pytowski B, Witte L, Hicklin D, Lemischka I. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94:4011, 1997.
14. Li L, Milner LA, Deng Y, Iwata M, Banta A, Graf L, Marcovina S, Friedman C, Trask BJ, Hood L, Torok-Storb B. *Immunity* 8:43, 1998.
15. Allen TD, Dexter TM. *Exp. Hematol.* 12:517, 1984.

16. Sutherland H, Landsdorp PM, Henkelman D, Eaves AC, Eaves CJ. Proc. Nat. Acad. Sci. 87:3584, 1990
17. Breems DA, Blokland EAW, Nben S, Ploemacher RE. Leukemia 8:1095, 1994.
18. Verfaillie C, Blakolmer K, McClare P. J. Exp. Med. 172:509, 1990.
19. Burroughs J, Gupta P, Blazar B, Verfaillie C. Exp. Hematol. 22:1095, 1994.
20. Roecklein BA, Torok-Storb B. Blood 85: 997, 1995.
21. Thiemann FT, Moore KA, Smogorzewska EM, Lemischka IR, Crooks GM. Exp. Hematol. 26:612, 1998.
22. Breems DA, Blokland EAW, Siebel KE, Mayen AEM, Engels LJA, Ploemacher RE. Blood 91:111, 1998.
23. Aiuti A, Friedrich C, Sieff CA, Gutierrez-Ramos JC. Exp. Hematol. 26:143, 1998.
24. Otsuka T, Satoh H, Ogo T, Bairy O, Gluck U, Zipori D, Nakano T, Okamura Y, Niho Y. Int. J. Cell Cloning 10:153, 1992.
25. Larochelle A, Vormoor J, Hahenberg H, Wang JCY, Bhatia M, Lapidot T, Moritz T, Murdoch B, Xiao LX, Kato I, Willimas DA & Dick JE. Nat. Med. 2:1329, 1996.
26. Gan OI, Murdoch B, Larochelle A, Dick JE. Blood 90:641, 1997.
27. Shultz LD, Schweitzer A, Christianson SW, Gott B, Shweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL, Leiter EH. J. Immunol. 154:180, 1995.
28. Larochelle A, Vormoor J, Lapidot T, Sher G, Furukawa T, I Q, Shultz L, Oliveri NF, Stamatoyannopoulos G & Dick JE. Hum. Mol. Genet. 4:163, 1995.

29. Larochelle A, Vormoor J, Hahenberg H, Wang JCY, Bhatia M, Lapidot T, Moritz T, Murdoch B, Xiao LX, Kato I, Willimas DA & Dick JE. *Nat. Med.* 2:1329, 1996.
30. Dick JE. *Sem. Immunol.* 8:197, 1996.
31. Bhatia M, Wang JCY, Kapp U, Bonnet D, Dick JE. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:5320, 1997.
32. Wang JCY, Doedens M, Dick JE. *Blood* 89: 3919, 1997.
33. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Nagler A, Ben-Hur H, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. *Science* 283: 845-8. 1999
34. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. *Nature* 382:833, 1996.
35. Mizuno S, Wang J, Greenberger J, Glowacki J. *Blood* 88:189a (abs), 1996.
36. Rozenzweig M, Pykett M, Marks DF, Johnson RP. *Gene Therapy* 4:928, 1997.
37. Arakawa-Hoyt, Thiemann FT, Dao MA, Barsky L, Crooks GM, Nolte JA. *Blood* 92:581a, 1998 (Abst).
38. Moore KA, Pytowski B, Witte L, Hicklin D, Lemischka I. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94:4011, 1997.
39. Varnum-Finney B, Purton LE, Yu M, Brashem-Stein C, Flowers D, Staats S, Moore KA, Le Roux I, Mann R, Gray G, Artavanis-Tsakonas S, Bernstein ID. *Blood* 91:4084, 1998.
40. Verfaillie CM. *Blood* 79:2821, 1992.
41. Verfaillie CM. *Blood* 82:2045, 1993.
42. Bhatia R, McGlave PB, Miller JS, Wissink S, Lin WN, Verfaillie CM. *Exp. Hematol.* 25:980, 1997.

43. Breems DA, Blokland EAW, Ploemacher RE. *Leukemia* 11:142, 1997.
44. Herman PH, Ferrant A, De Bruyere M, Straetmans N. *Leukemia* 12:735, 1998.
45. Breems DA, Van Driel EM, Hawley RG, Siebel KE, Ploemacher RE. *Leukemia* 12:951, 1998.
46. Aiuti A, Ficara F, Dando J, ZE, Bordignon C. *Blood* 92:145a, 1998 (Abs).
47. Kusadasi N, van Soest PL, Ploemacher RE. *Exp. Hematol.* 25:699, 1998 (Abst).
48. Dorrell C, Gan OI, Pereira DS, Dick JE. *Exp. Hematol.* 25:688, 1998 (Abst).
49. Bhatia M, Bonnet D, Kapp U, Wang JCY, Murdoch B, Dick JE. *J. Exp. Med.* 186:619, 1997.
50. Kollet O, Moore J, Fajerman I, Ben-Hur H, Hagay Z, Nagler A, Feldman M, Lapidot T. *Blood* 90:365a, 1997 (Abs).
51. Bertolini F, Battaglia M, Lanza A, Palermo B, Soligo D, Robustelli della Cuna G. *Blood* 90:365a, 1997 (Abs).
52. Luens KM, Travis MA, Chen BP, Hill BL, Scollay R, Murray LJ. *Blood* 91:1206, 1998.
53. Piacibello W, Sanavio F, Severino A, Dane A, Gammaitoni L, Fagioli F, Perissinotto E, Aglietta M. *Blood.* 93: 3736-49, 1999.
54. Kadouri A. *Colloid and Surface B: Biointerface* , 2:265 , 1994.
55. Kadouri A, Kompier R, Honigwachs-Sha'anani J, Toledo J, Brosh N, Sternberg D, Levy A, Tzehoval E, Zipori D. *Int. J. Cell Cloning* 10:299, 1992.
56. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. *J Immunol Methods* 119:203, 1989.

57. Merchav S., Wagemaker G., Souza L. and Tatarsky I. *Leukemia* 5:344, 1991.
58. Kadouri A. *Colloid and Surface B: Biointerface* 2:265 , 1994.
59. Kadouri A, Kompier R, Honigwachs-Sha'anani J, Toledo J, Brosh N, Sternberg D, Levy A, Tzevoval E, Zipori D. *Int. J. Cell Cloning* 10:299, 1992.
60. Zipori, D., Toledo, J. & von der Mark, K. *Blood* 66:447, 1985.
61. Otsuka T, Ogo T, Nakano t, Niuro H, Kuga S, Satoh H, Furukawa Y, Zipori D, Niho Y. *Stem Cells* 12:409, 1994.
62. Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Bergandi D, Ferrario J, Fagioli F, Berger M, Aglietta M. *Blood* 89: 2644, 1997.
63. Carlo-Stella C, Mangoni L, Piovani G, Garau D, Almici C, Rizzoli V. *Blood* 83:1373, 1994.

图 1

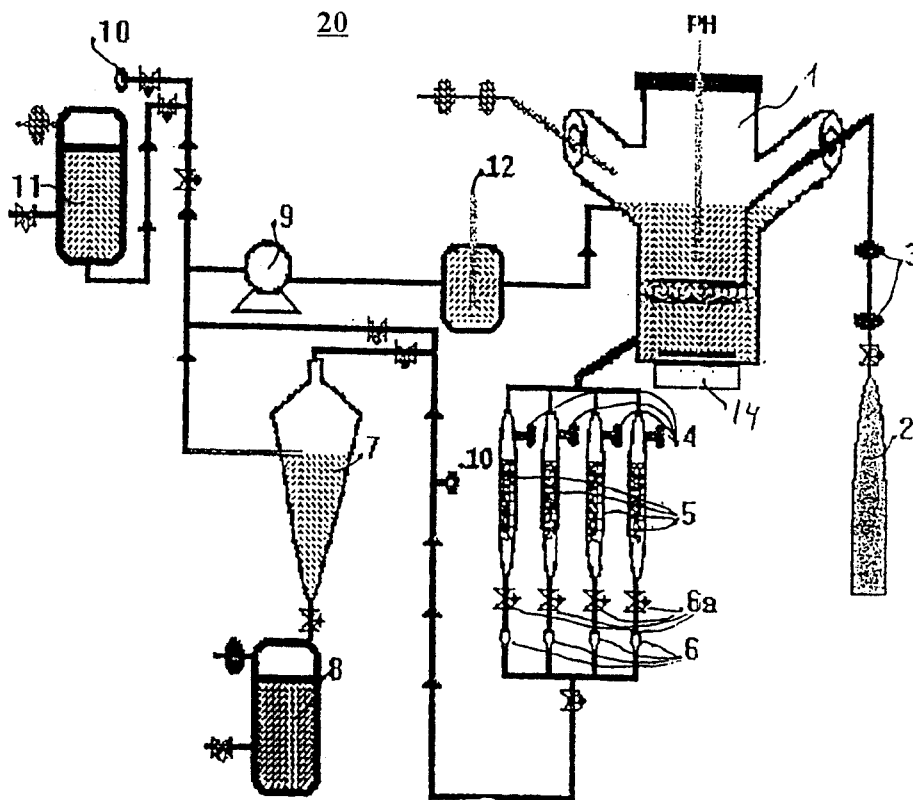


图 2

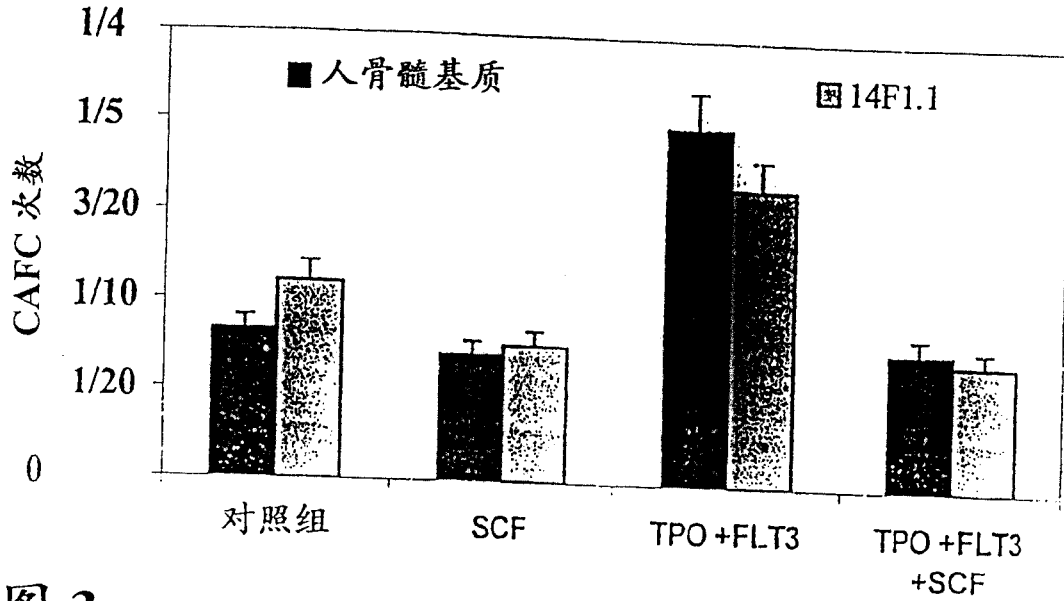


图 3

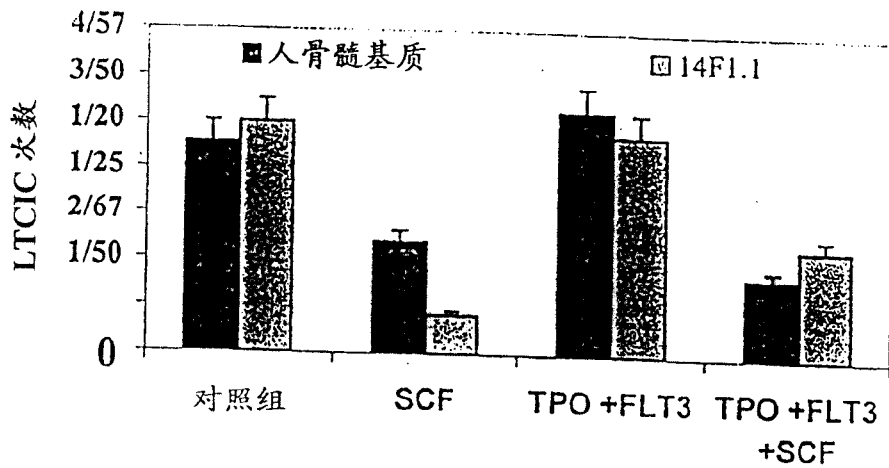


图 4

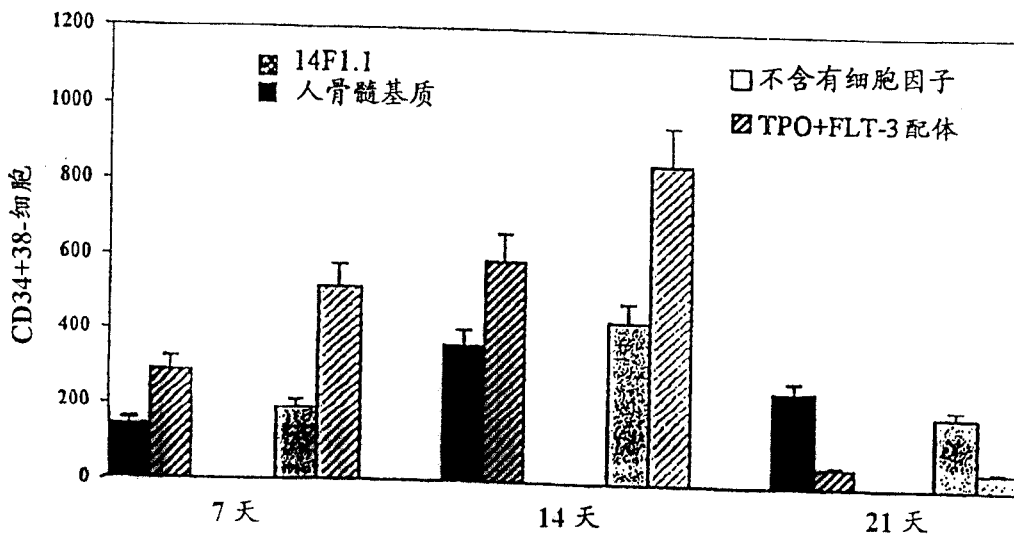


图 5A



图 5B

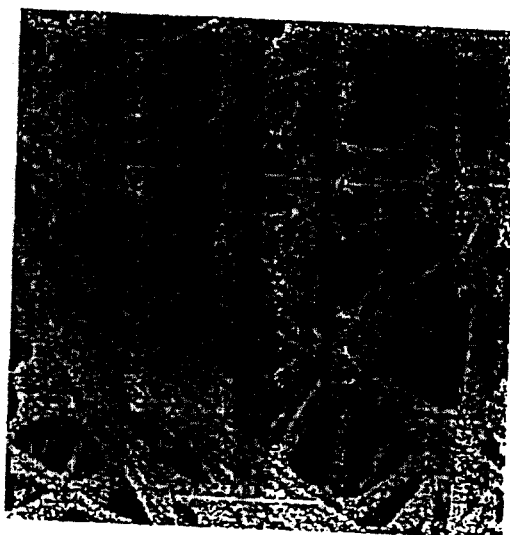


图 6A

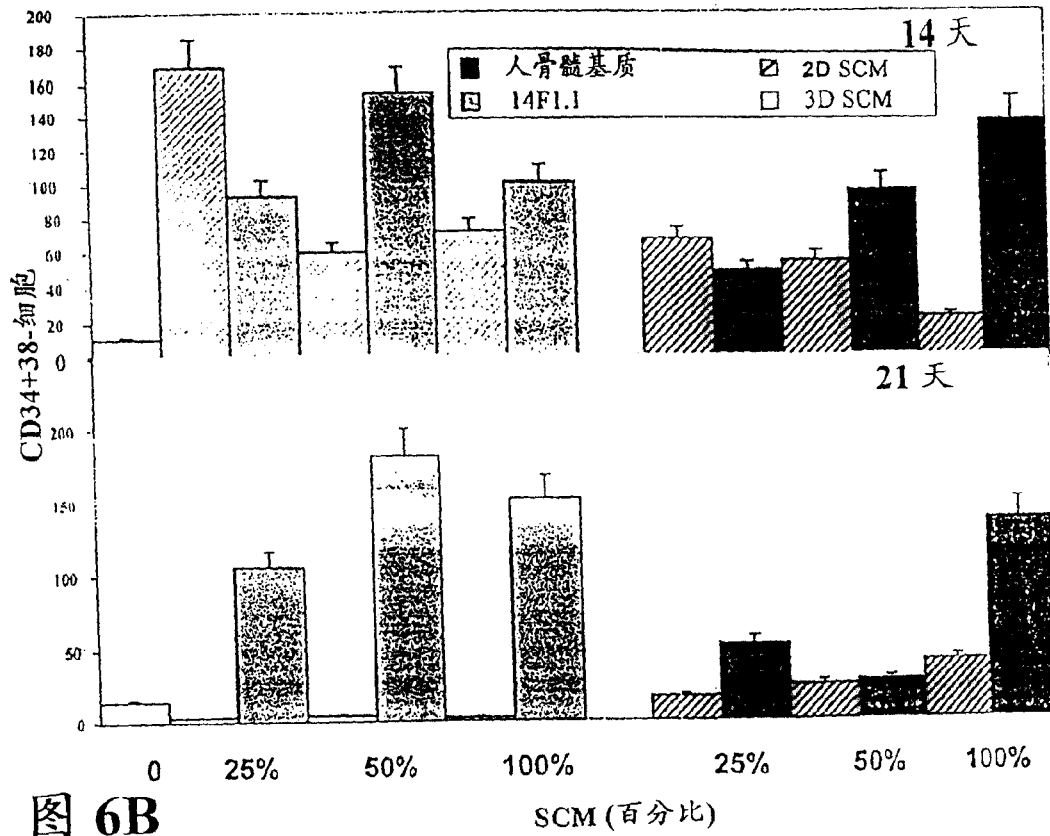


图 6B

