



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109722414 A

(43)申请公布日 2019.05.07

(21)申请号 201711115779.1

(22)申请日 2017.11.13

(66)本国优先权数据

201711027708.6 2017.10.27 CN

(71)申请人 博雅辑因(北京)生物科技有限公司

地址 100085 北京市海淀区上地信息路12
号1层A区A106室

(72)发明人 方日国 袁鹏飞

(74)专利代理机构 北京彩和律师事务所 11688

代理人 闫桑田

(51)Int.Cl.

C12N 5/078(2010.01)

C12N 5/0789(2010.01)

A61P 7/06(2006.01)

A61P 7/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书11页 附图7页

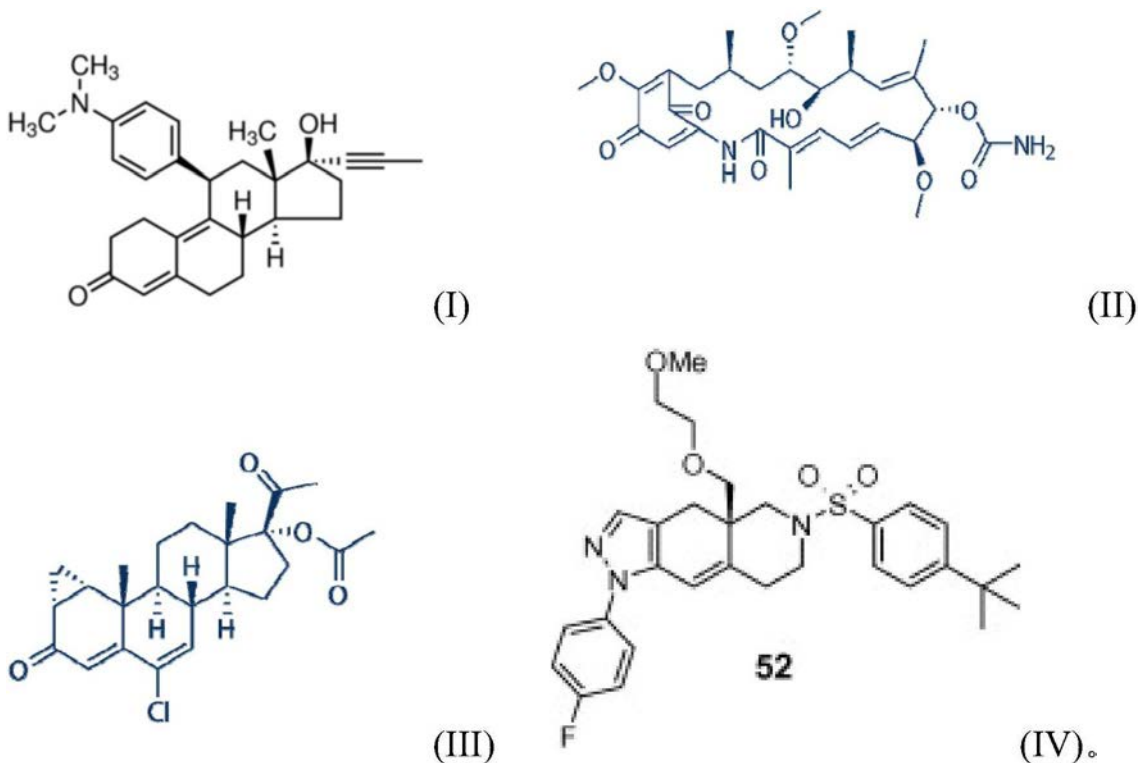
(54)发明名称

一种高效制备成熟红细胞的方法以及用于
制备成熟红细胞的培养基

(57)摘要

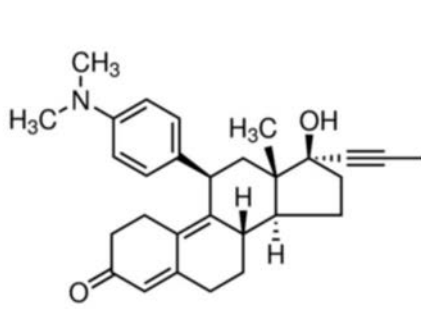
本发明涉及一种高效制备成熟红细胞的方法以及用于制备成熟红细胞的培养基,其中高效诱导造血干细胞/祖细胞分化为成熟红细胞的方法,其包括:造血干细胞/祖细胞红系扩增和分化步骤;以及造血干细胞/祖细胞红系分化脱核步骤。本发明还涉及一种造血干细胞/祖细胞红系扩增和分化培养基,以及一种红系分化脱核培养基。

1. 一种高效诱导造血干细胞/祖细胞分化为成熟红细胞的方法,其包括:
造血干细胞/祖细胞红系扩增和分化步骤;以及
造血干细胞/祖细胞红系分化脱核步骤。
2. 根据权利要求1的方法,其中,所述红系扩增和分化步骤使用造血干细胞红系扩增和分化培养基对造血干细胞进行培养。
3. 根据权利要求1的方法,其中,所述红系分化脱核步骤使用红系分化脱核培养基。
4. 根据权利要求2或3的方法,其中,所述造血干细胞红系扩增和分化培养基包含:基础培养基,以及生长因子的组合物。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中,所述生长因子的组合物包括:
干细胞生长因子,即SCF;
白介素3,即IL-3;以及
促红细胞生成素,即EPO。
6. 根据权利要求2或3的方法,其中所述红系分化脱核培养基包含基础培养基、生长因子、以及孕酮受体和糖皮质激素受体的拮抗剂和/或抑制剂。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述生长因子包括促红细胞生成素,即EPO,所述孕酮受体和糖皮质激素受体的拮抗剂和/或抑制剂为选自下述化合物(I)~(IV)中的任一种或两种及以上:

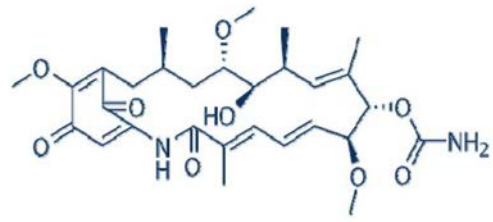


8. 根据权利要求1~7中任一项的方法,其中诱导造血干细胞/祖细胞分化为成熟红细胞的时间为10-18天、11-17天、12-16天、13-15天、10-17天、10-16天、10-15天、10-14天。
9. 根据权利要求8的方法,其中所述的成熟红细胞特异表达细胞膜蛋白GPA和CD71双阳性的比例为90%以上。
10. 根据权利要求8的方法,其中所述的成熟红细胞细胞脱核的效率为20%以上。

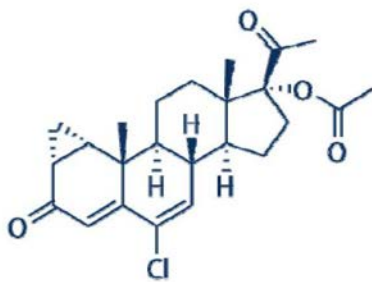
11. 权利要求1-10中任一项所述的方法制备的成熟红细胞。
12. 权利要求11的成熟红细胞,其为GPA和CD71双阳性。
13. 权利要求12的成熟红细胞,其为脱核红细胞。
14. 包含权利要求13的成熟红细胞的血液制品。
15. 权利要求13或14的成熟红细胞或血液制品在制备治疗输血供体短缺及血液疾病的药物中的用途。
16. 一种造血干细胞/祖细胞红系扩增和分化培养基,其包括:
基础培养基,以及
生长因子的组合物,其中,
所述生长因子的组合物包括:
干细胞生长因子,即SCF;
白介素3,即IL-3;以及
促红细胞生成素,即EPO。
17. 根据权利要求16所述的培养基,其中,
所述SCF的浓度为50-200ng/ml,优选50-100ng/ml;
所述IL-3的浓度为10-100ng/ml,优选20-50ng/ml;以及
所述EPO的浓度为1-10U/ml,优选5-10U/ml。
18. 一种红系分化脱核培养基,其包括:
基础培养基;
生长因子;以及
孕酮受体和糖皮质激素受体的拮抗剂和/或抑制剂,其中,
所述生长因子包括促红细胞生成素,即EPO,所述孕酮受体和糖皮质激素受体的拮抗剂和/或抑制剂为选自下述化合物(I)~(IV)中的任一种或两种及以上:



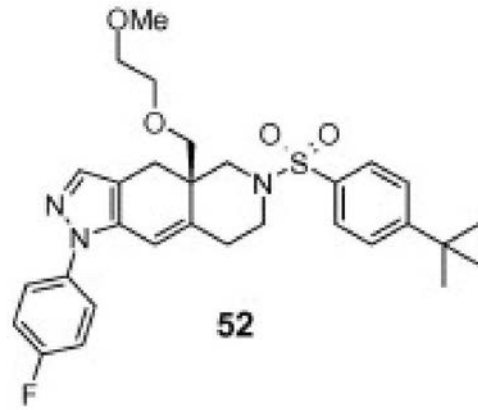
(I)



(II)



(III)



52

(IV)。

19. 根据权利要求18所述的培养基,其中,
 所述生长因子还包括人铁转蛋白,
 所述EPO的浓度为1-10U/ml,优选3-6U/ml,所述孕酮受体和糖皮质激素受体的拮抗剂和/或抑制剂的浓度为0.5-10 μ mol/ml,优选1-5 μ mol/ml。

一种高效制备成熟红细胞的方法以及用于制备成熟红细胞的培养基

技术领域

[0001] 本发明涉及一种体外高效制备成熟红细胞的方法,具体而言,本发明涉及短时间内高效诱导造血干细胞/祖细胞分化为成熟红细胞的方法。本发明还涉及利用所述方法制备的成熟红细胞的用途。

技术背景

[0002] 人体中红细胞的发育过程是非常复杂的。成年人体内,骨髓是红细胞生成的主要发生场所,但是在早期胚胎中,红细胞则是在中胚层包括卵黄囊和主动脉弓等组织生发的。随着胎儿持续发育,红细胞的生成在3个月后转移到脾和肝脏,5个月后则回到骨髓。在人体中,红细胞的主要功能是运输氧、二氧化碳、电解质、葡萄糖及氨基酸等人体新陈代谢所必需的营养物质气各个组织和器官,以上功能都是通过红细胞中的血红蛋白来实现的。成熟的红细胞没有细胞核,富含血红蛋白。血红蛋白是一种含铁的蛋白质,呈红色,它在氧含量高的地方容易与氧结合,在氧含量低的地方又容易与氧分离,血红蛋白的特性是红细胞运输氧气的功能。血红蛋白一旦发生病变,会导致疾病的发生,例如地中海贫血和镰刀形贫血等疾病。

[0003] 红细胞除了基本生物功能外,还在同种异体输血治疗严重缺血患者(如地中海贫血、血友病和镰刀形贫血等疾病)的治疗中承担非常关键的角色。虽然同种异体输血技术发展至今已有100多年历史,但是目前仍存在以下关键的问题,亟待解决。首先,同种异体输血会导致输血感染。虽然在美国和欧洲等发达国家,由于技术成熟和制度规范,通常该种输血方式是安全的,但是依旧存在单次输血导致感染艾滋病和肝病等传染性疾病的风险,据统计在美国,输血感染的风险约在十万分之一。而在发展中国家,例如中国和非洲,由于技术手段落后,无法建立血液供体的严格筛选标准,及血液制品私下贩卖等现象,导致血液性传播疾病严重。其次,每天全球血液需求量极大,血站中储存的血液无法满足大量的输血需求。在中国98%的人口为Rh阳性,如果有大量的Rh阴性用血,问题会更加严重。最后,同种异体输血需要供体和受体具有相匹配的HLA,这也进一步加剧了血液供应的短缺状态。

[0004] 基于此,为了解决输血感染和血液供需矛盾突出等问题,临床医学需要开发出更加安全和高效的生成血红细胞的治疗方法,才有可能满足持续不断的临床输血需求。其中,利用造血干细胞/祖细胞体外培养生产成为成熟的红细胞是一种非常有潜力的治疗方向,也是临床医学界和科学界不断探索的领域。

[0005] 分析当前的研究现状,体外获得成熟的红细胞(red blood cells,RBC)根据起始细胞不同,主要分为两种途径,其一是多潜能干细胞包括胚胎干细胞(embryonic stem cells,ESCs)和诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells,iPSCs),其二是造血干细胞/祖细胞(hematopoietic stem and progenitor cells,HSPC)。虽然多潜能干细胞能无限扩增,有潜力培育出无限量的成熟红细胞,但是多潜能干细胞分化产生的成熟红细胞更近似于人体胎儿期的红细胞,只呈现了部分成年人的红细胞的特征,此外,多潜能干

细胞有致癌的风险,这也进一步限制了其临床应用。因此,HSPCs作为成体干细胞,是更加安全的起始选择。

[0006] 目前,HSPCs可通过磁珠分选的方式由骨髓、脐带血、外周血和肝脏等组织分离获得,而领域内报道的HSPCs向RBC分化的步骤也各有不同。其中Miharada等人建立了一种四步法悬浮培养体系从脐带血的HSPCs扩增成为成熟的红细胞,虽然表达成熟的红细胞的表面蛋白GPA的比例达到90%,但是分化周期需要至少21天才能获得成熟的红细胞(Miharada,et al.Nature Biotechnology.2006)。此外,Harvey Lodish的研究小组也建立了从脐带血中HSPCs获得四步分化体系(包括扩增阶段、分化阶段1、分化阶段2和分化阶段3),虽然结合了糖皮质激素dexamethone和PPAR位点的抑制剂GW7647,提高了burst-forming unit-erythroid(BFU-E)的比例,但是成熟红细胞的膜表面蛋白GPA(CD235a)和CD71双阳性的比例最高为85%,并且分化的周期至少需要21天(Li,et al.Nature.2015)。而另外一个研究小组Xiuli An则建立了脐带血中分离获得HSPCs向红细胞分化的三步法的方案,分化周期至少21天(Hu,et al.Blood.2013)。从目前结果分析,无论是三步法还是四步法的方案,当前的从HSPCs向成熟的红细胞无论从效率还是分化周期都无法满足扩大培养达到GMP生产级别的需求。

[0007] 因此,如何建立高效的、安全的、短时间内从HSPCs中获得成熟的红细胞变为亟待优化和攻克的难题。

发明内容

[0008] 技术问题

[0009] 进行本发明以解决本领域中存在的上述问题,本发明的目的是使用CD34阳性的造血干细胞/祖细胞,分化成为功能成熟的红细胞,以解决临床中同种异体输血供体短缺的问题。

[0010] 然而,通过本发明实现的技术目的不限于上述目的,但本领域的技术人员从如下说明将显而易见地理解其他未提及的目的。

[0011] 技术方案

[0012] 为实现上述目的,本发明一种利用脐带血、骨髓和/或外周血等组织分离获得表达CD34阳性蛋白的造血干细胞/祖细胞,并使该CD34阳性的造血干细胞/祖细胞向成熟的红细胞分化的两步法分化方法。

[0013] 本发明还提供一种造血干细胞/祖细胞红系扩增和分化培养基,利用该培养基,可以通过一步完成造血干细胞/祖细胞的红系扩增和分化,而在现有技术中,该过程通常需要两步、或者三步来完成,通过使用这样的培养基可以大大缩短得到成熟红细胞的时间。

[0014] 本发明还提供一种红系分化脱核培养基,利用该培养基,可以加快红系分化步骤的周期,从而通过使用这样的培养基可以大大缩短得到成熟红细胞的时间。

[0015] 具体来说,本发明涉及如下技术方案:

[0016] 1.一种高效诱导造血干细胞/祖细胞分化为成熟红细胞的方法,其包括:

[0017] 造血干细胞/祖细胞红系扩增和分化步骤;以及

[0018] 造血干细胞/祖细胞红系分化脱核步骤。

[0019] 2.根据项1的方法,其中,所述红系扩增和分化步骤使用造血干细胞红系扩增和分

化培养基对造血干细胞进行培养。

[0020] 3. 根据项1的方法,其中,所述红系分化脱核步骤使用红系分化脱核培养基。

[0021] 4. 根据项2或3的方法,其中,所述造血干细胞红系扩增和分化培养基包含:基础培养基,以及生长因子的组合物。

[0022] 5. 根据项4所述的方法,其中,所述生长因子的组合物包括:

[0023] 干细胞生长因子,即SCF;

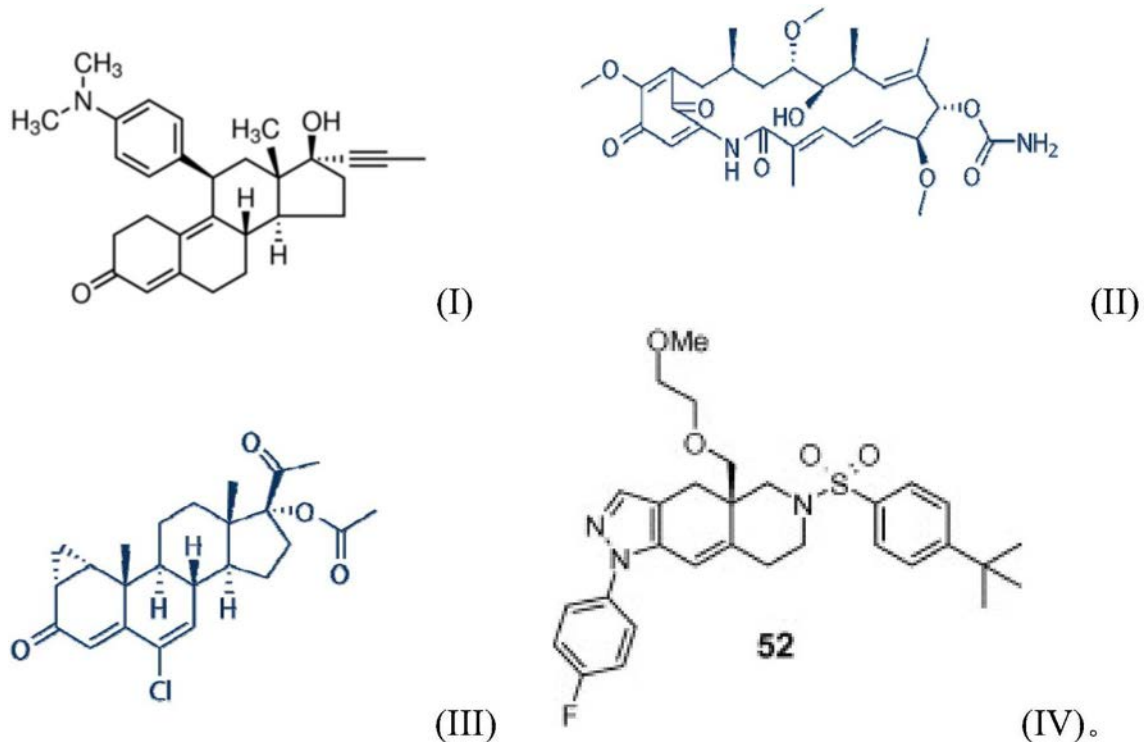
[0024] 白介素3,即IL-3;以及

[0025] 促红细胞生成素,即EPO。

[0026] 6. 根据项2或3的方法,其中所述红系分化脱核培养基包含基础培养基、生长因子、以及孕酮受体和糖皮质激素受体的拮抗剂和/或抑制剂。

[0027] 7. 根据项6所述的方法,其中,所述生长因子包括促红细胞生成素,即EPO,所述孕酮受体和糖皮质激素受体的拮抗剂和/或抑制剂为选自下述化合物(I)~(IV)中的任一种或两种及以上:

[0028]



[0029] 8. 根据项1~7中任一项的方法,其中诱导造血干细胞/祖细胞分化为成熟红细胞的时间为10-18天、11-17天、12-16天、13-15天、10-17天、10-16天、10-15天、10-14天。

[0030] 9. 根据项8的方法,其中所述的成熟红细胞特异表达细胞膜蛋白GPA和CD71双阳性的比例为90%以上。

[0031] 10. 根据项8的方法,其中所述的成熟红细胞细胞脱核的效率为20%以上。

[0032] 11. 项1-10中任一项所述的方法制备的成熟红细胞。

[0033] 12. 项11的成熟红细胞,其为GPA和CD71双阳性。

[0034] 13. 项12的成熟红细胞,其为脱核红细胞。

[0035] 14. 包含项13的成熟红细胞的血液制品。

[0036] 15. 项13或14的成熟红细胞或血液制品在制备治疗输血供体短缺及血液疾病的药物中的用途。

[0037] 16. 一种造血干细胞/祖细胞红系扩增和分化培养基,其包括:

[0038] 基础培养基,以及

[0039] 生长因子的组合物,其中,

[0040] 所述生长因子的组合物包括:

[0041] 干细胞生长因子,即SCF;

[0042] 白介素3,即IL-3;以及

[0043] 促红细胞生成素,即EPO。

[0044] 17. 根据项16所述的培养基,其中,

[0045] 所述SCF的浓度为50-200ng/ml,优选50-100ng/ml;

[0046] 所述IL-3的浓度为10-100ng/ml,优选20-50ng/ml;以及

[0047] 所述EPO的浓度为1-10U/ml,优选5-10U/ml。

[0048] 18. 一种红系分化脱核培养基,其包括:

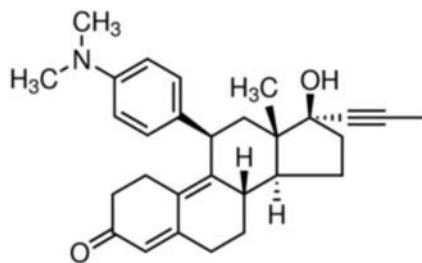
[0049] 基础培养基;

[0050] 生长因子;以及

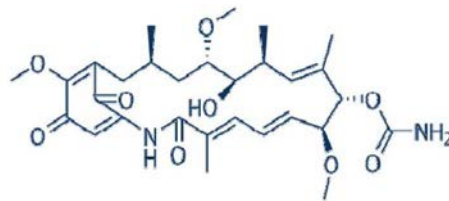
[0051] 孕酮受体和糖皮质激素受体的拮抗剂和/或抑制剂,其中,

[0052] 所述生长因子包括促红细胞生成素,即EPO,所述孕酮受体和糖皮质激素受体的拮抗剂和/或抑制剂为选自下述化合物(I)~(IV)中的任一种或两种及以上:

[0053]

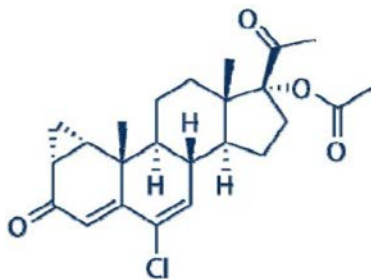


(I)

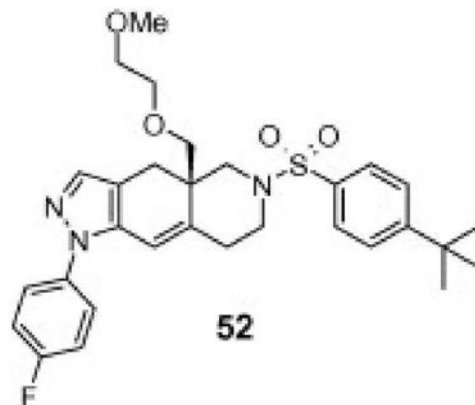


(II)

[0054]



(III)



(IV)。

[0055] 19. 根据项18所述的培养基,其中,

[0056] 所述生长因子还包括人铁转蛋白,

[0057] 所述EPO的浓度为1-10U/ml,优选3-6U/ml,所述孕酮受体和糖皮质激素受体的拮抗剂

和/或抑制剂的浓度为0.5-10 μ mol//ml,优选1-5 μ mol//ml。

[0058] 发明效果

[0059] 本发明中造血干细胞/祖细胞可以从脐带血、骨髓和外周血中通过临床级别的磁珠分选的方式获得,起始细胞是成体干细胞,易获得且无致癌风险;造血干细胞/祖细胞向成熟的红细胞的两步法分化方案,相比较现有的技术,只需14天,时间更短,相比于现有技术中必须要21天以上,该周期被大幅缩短。且红细胞特异表达细胞膜蛋白GPA和CD71双阳性的比例达到90%以上,效率更高,细胞脱核的效率达到20%以上。

[0060] 附图简述

[0061] 图1显示从脐带血中分离获得的造血干细胞流式分析结果。左图为阴性细胞,右图是HSPCs,检测CD34和CD45RA两种膜蛋白的表达情况。纵坐标代表CD45RA,横坐标代表CD34。

[0062] 图2显示从不同的脐带血供体中分离获得HSPCs的CD34和CD45RA两种膜蛋白的效率统计图,效率是基于流式分析的实验结果。

[0063] 图3显示Harvey Lodish四步法诱导HSPCs向成熟的红细胞分化流程,包括四个阶段,分别是细胞扩增阶段(expansion),分化阶段1(differentiation 1),分化阶段2(differentiation 2),成熟阶段(maturation)。

[0064] 图4显示利用Harvey Lodish四步法诱导HSPCs向成熟的红细胞分化,在分化的第9天、第14天、第16天、第19天和第21天的流式分析结果。检测CD71和CD235a两种红细胞特异表达的膜蛋白。纵坐标代表CD71,横坐标代表CD235a。

[0065] 图5显示Harvey Lodish四步法诱导HSPCs向成熟的红细胞分化21天,流式分析Hochest染色脱核效率的结果图。纵坐标代表SSC-H,横坐标代表Hochest。“SSC-H”是侧向角散射,一般代表细胞的颗粒度,值越大代表细胞的颗粒度越大,颗粒度指细胞表面的皱折度,细胞内亚细胞器、颗粒的数目等。“Hochest”是非嵌人性荧光染料,可以特异标记细胞核。具体原理是在活细胞中,DNA聚AT序列富集区域的小沟处与DNA结合。活细胞或固定细胞均可从低浓度溶液中摄取该染料,从而使细胞核着色。

[0066] 图6显示本发明中使用的两步法诱导分化的示意图。

[0067] 图7显示本发明中两步法诱导HSPCs向成熟的红细胞分化,在分化的第7天和14天的流式分析结果。检测CD71和CD235a两种红细胞特异表达的膜蛋白。上图是第一个脐带血供体,下图是第二个脐带血供体。纵坐标代表CD71,横坐标代表CD235a。

[0068] 图8显示本发明中两步法诱导HSPCs向成熟的红细胞分化14天后,流式分析Hochest染色脱核效率的结果图。纵坐标代表SSC-H,横坐标代表Hochest。

[0069] 图9显示利用本发明方法分化14天后获得的成熟红细胞的拍照图。

[0070] 图10利用本发明的两步法诱导两个不同供体的HSPCs向成熟的红细胞分化16天后,流式分析CD71和CD235a两种蛋白的表达情况,以及Hochest染色脱核效率的结果图。左侧两张图是第三个脐带血供体,右侧两张图是第四个脐带血供体。上面两张图是CD71和CD235a的染色情况。下面两张图是Hochest染色情况。

[0071] 图11显示利用本发明两步法分化16天获得的不同实验批次的成熟的红细胞拍照图。

具体实施方式

[0072] 本发明人已从脐带血中获得大量的CD34阳性且CD45RA阴性的HSPCs,并将HSPCs通过两步法在14天内高效分化成为成熟的红细胞,成熟的红细胞表达特异性细胞膜蛋白CD235a和CD71,且发生高比例的脱核现象,由此完成本发明。

[0073] 当然本领域技术人员可以理解,CD34阳性细胞且CD45RA阴性的HSPCs也可以来自骨髓或外周血。

[0074] 以下将对本发明进行详述。

[0075] 在一个实施方案中,所述造血干细胞红系扩增和分化培养基包含基础培养基,所述基础培养例如StemSpanTMSFEM II (STEM CELLS TECHNOLOGY Inc.),IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium),X-VIVO 15,alpha-MEM,RPMI 1640和DF12等。所述生长因子,例如基础培养基若选用StemSpanTMSFEM II,则需要额外添加的生长因子包括50-200ng/mlSCF,10-100ng/ml IL-3,1-10U/ml EPO,其中U的单位定义为:在特定的条件下,1min能转化1 μ mol底物的蛋白量,即1IU=1 μ mol/min。目前国内外大多数临床实验室常省略国际二字,即将IU简写为U。EPO,促红细胞生成素,主要是由肾脏为了响应低氧或者贫血而分泌的糖蛋白,在本实施例中,能促进造血干细胞向红系祖细胞分化。通常发挥作用时间是7天左右。

[0076] 基础培养基若选用StemSpanTMSFEM II外其它的基础培养基,则需要添加有100X ITS (insulin-transferrin-selenium,购自Thermofisher) (其中培养基中ITS中各物质的终浓度是:胰岛素浓度是0.1mg/ml、人转铁蛋白是0.0055mg/ml、硒元素 6.7×10^{-6} mg/ml) (即主要包括胰岛素、人转铁蛋白以及硒元素),10-50 μ g/ml维生素C,0.5-5%BSA (Bovine serum albumin,牛血清白蛋白),生长因子,例如50-200ng/ml SCF,10-100ng/ml IL-3,1-10U/ml EPO。

[0077] 此外,本领域技术人员可以理解,任何常用的基础培养基均可以使用。例如可以列举本领域中常用的基础培养基,例如StemSpanTMSFEM II (购自STEM CELL TECHNOLOGIES);例如购自Thermo Fisher的IMDM、DF12、Knockout DMEM、RPMI 1640、Alpha MEM、DMEM等。

[0078] 此外,可以根据需要进一步在上述培养基中外加一些其他成分,例如可以外加ITS (即主要包括胰岛素、人转铁蛋白以及硒元素)、L-谷氨酰胺、维生素C以及牛血清白蛋白。例如可以在IMDM培养基中外加ITS、外加2mM-L-谷氨酰胺、外加10-50 μ g/ml维生素C以及0.5-5质量%的BSA (牛血清白蛋白)。此外,上述DF12可以外加同样浓度的ITS,L-谷氨酰胺,维生素C和牛血清白蛋白。Knockout DMEM可以外加同样浓度的ITS,L-谷氨酰胺,维生素C和牛血清白蛋白,RPMI 1640可以外加同样浓度的ITS,L-谷氨酰胺,维生素C和牛血清白蛋白,Alpha MEM可以外加同样浓度的ITS,L-谷氨酰胺,维生素C和牛血清白蛋白,DMEM也可以外加同样浓度的ITS,L-谷氨酰胺,维生素C和牛血清白蛋白。在此,各种基础培养基中外加的ITS的浓度可以是:胰岛素浓度是0.1mg/ml、人转铁蛋白是0.0055mg/ml、硒元素 6.7×10^{-6} mg/ml。此外,外加的ITS各成分的浓度也可以根据实际需要来调整。ITS可以从Thermofisher购买,并根据需要调节成合适的最终使用浓度。

[0079] 在一个实施方案中,所述红系分化脱核培养基包含基础培养基、生长因子和孕酮受体和糖皮质激素受体的拮抗剂。

[0080] 在一个实施方案中,所述造血干细胞红系分化脱核培养基包含基础培养基,例如StemSpanTMSFEM II (STEM CELLS TECHNOLOGY Inc.),IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's

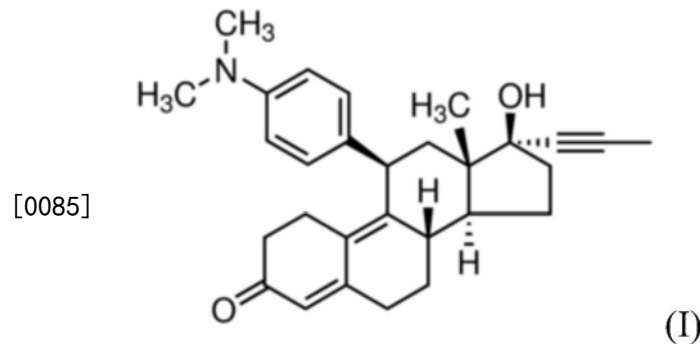
s Medium), X-VIVO 15, alpha-MEM, RPMI 1640和DF12等。还包含生长因子,例如基础培养基若选用StemSpan™SFEM II,则需要额外添加的生长因子包括1-10U/ml EPO,100-1000µg/ml human transferrin(人转铁蛋白),化学小分子为0.5-10µmol//ml mifepristone。

[0081] 基础培养基若选用StemSpan™SFEM II外其它的基础培养基,则需要添加例如ITS (insulin-transferrin-selenium,购自Thermofisher) (其中培养基中ITS中各物质的终浓度是:胰岛素浓度是0.1mg/ml、人转铁蛋白是0.0055mg/ml、硒元素 6.7×10^{-6} mg/ml) (即主要包括胰岛素、人转铁蛋白以及硒元素),10-50ug/ml维生素C,0.5-5%BSA(Bovine serum albumin,牛血清白蛋白),生长因子,例如1-10U/ml EPO,100-1000ug/ml人转铁蛋白,化学小分子例如0.5-10µmol//ml mifepristone。

[0082] 此外,本领域技术人员可以理解,任何常用的基础培养基均可以使用。例如可以列举本领域中常用的基础培养基,例如StemSpan™SFEM II(购自STEM CELL TECHNOLOGIES);例如购自Thermo Fisher的IMDM、DF12、Knockout DMEM、RPMI 1640、Alpha MEM、DMEM等。

[0083] 此外,可以根据需要进一步在上述培养基中外加一些其他成分,例如可以外加ITS(即主要包括胰岛素、人转铁蛋白以及硒元素)、L-谷氨酰胺、维生素C以及牛血清白蛋白。例如可以在IMDM培养基中外加ITS、外加2mL-谷氨酰胺、外加10-50µg/ml维生素C以及0.5-5质量%的BSA(牛血清白蛋白)。此外,上述DF12可以外加同样浓度的ITS,L-谷氨酰胺,维生素C和牛血清白蛋白。Knockout DMEM可以外加同样浓度的ITS,L-谷氨酰胺,维生素C和牛血清白蛋白,RPMI 1640可以外加同样浓度的ITS,L-谷氨酰胺,维生素C和牛血清白蛋白,Alpha MEM可以外加同样浓度的ITS,L-谷氨酰胺,维生素C和牛血清白蛋白,DMEM也可以外加同样浓度的ITS,L-谷氨酰胺,维生素C和牛血清白蛋白。在此,各种基础培养基中外加的ITS的浓度可以是:胰岛素浓度是0.1mg/ml、人转铁蛋白是0.0055mg/ml、硒元素 6.7×10^{-6} mg/ml。此外,外加的ITS各成分的浓度也可以根据实际需要来调整。ITS可以从Thermofisher购买,并根据需要调节成合适的最终使用浓度。

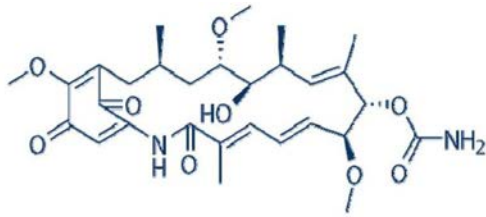
[0084] 本文中使用的mifepristone是一种化学合成的小分子,该小分子是孕酮受体和糖皮质激素受体的拮抗剂,结构式如下:



Mifepristone 化学结构图

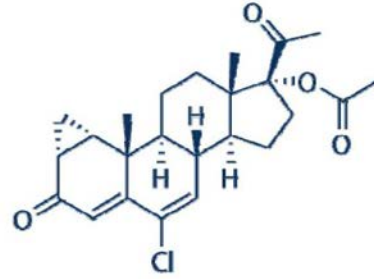
[0086] 其它孕酮受体和糖皮质激素受体的拮抗剂和抑制剂也可应用到本发明中,包括Cyproterone Acetate,Geldanamycin,CORT 108297等。化学结构式如下:

[0087]



(II)

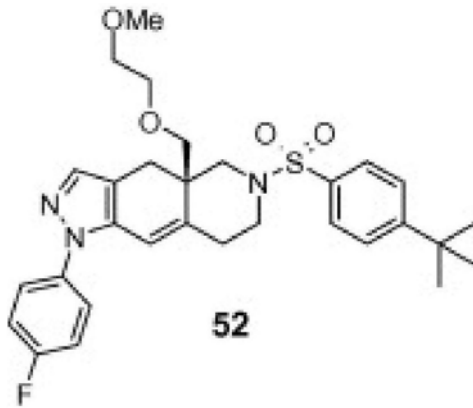
Cyproterone Acetate 化学结构式



(III)

Geldanamycin 化学结构式

[0088]



(IV)

CORT 108297 化学结构式

[0089] 根据本发明的成熟红细胞有效通过包括下列a)-c)步骤的方法产生,但不限于此:
a) 从人脐带血中分离CD34阳性的HSPCs;b) 将HSPCs经过7天扩增和分化后获得红细胞前体细胞,即erythroblasts,c) 将红细胞前体细胞再经过7天的分化处理获得成熟的红细胞。

[0090] 此外,成熟的红细胞获得包括下列步骤a)-c)的方法产生,但不限于此:

[0091] a) 从人脐带血中通过磁珠分选的方法分离CD34阳性的HSPCs;

[0092] b) 在无血清培养基中,Serum-free medium (SFME),添加额外的生长因子,经过7天扩增和分化后,将HSPCs分化成为红细胞前体细胞,该阶段的培养基命名为造血干细胞红系扩增和分化培养基,即HSPCs erythroid expansion and differentiatin medium,缩写为HEEDM;

[0093] c) 在无血清培养基中,Serum-free medium (SFME),添加额外的生长因子,经过7天分化后,即可获得成熟的红细胞,该阶段的培养基命名为:造血干细胞红系分化脱核培养基,即HSPCs erythroid differentiation enucleation medium,缩写为HEDEM。

[0094] 即针对CD34阳性的HSPC,利用本发明的方法可以通过两步就可以获得成熟的红细胞,整个过程的时间可以为10-18天、11-17天、12-16天、13-15天、10-17天、10-16天、10-15天或10-14天,这个时间将现有技术中利用三步或者四步的方法中的至少21天的周期大大缩短。

[0095] 如本文使用,术语“造血干细胞/祖细胞, hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs”指骨髓中的干细胞,它具有自我更新能力并分化成为各种细胞前体细胞,最终生成各种血细胞成分,包括红细胞、白细胞和血小板,它们也可以分化成为各种其他细

胞。造血干细胞包括三级分化水平,即多能干细胞、定向干细胞及成熟的子细胞。造血干细胞的两个重要特征是,可分化成所有类型的血细胞和高度的自我更新或自我复制能力。

[0096] 如本申请使用的,术语“分化”指其中细胞的结构或功能在分裂、增殖和其生长过程中特化的现象,即,生物体细胞或组织的特征和功能改变以实施给予细胞或组织的功能。一般而言,其指其中相对简单的系统分为两种或多种性质不同的部分系统的现象。

[0097] 如本申请使用的,术语“Ficoll液密度梯度离心法”,其基本原理是血液中的不同成分的比重存在差异,在低速密度梯度离心时,可将不同的细胞层粉离开。红细胞和粒细胞密度大于分层液体,并且因红细胞遇到ficoll液之后会迅速凝集成串钱状而积于管底。唯有于分层液体密度相当的单个核细胞富集在血浆层和分层液之间,即白膜层,造血干细胞/祖细胞即存在于此层,通过后续磁珠分选即可获得。在本发明中,单个核细胞是利用商售的淋巴细胞分离管获得。

[0098] 如本申请使用的,术语“成熟红细胞”是指血液中含最多的一类细胞,具有携带氧气、氨基酸、二氧化碳等营养物质的功能。成熟的红细胞没有线粒体和细胞核。

[0099] 如本申请使用的,术语“白介素3, IL-3”是指由激活的CD4和CD8阳性的T淋巴细胞产生的一种细胞因子,其主要生物学功能是参与调控骨髓中造血干细胞的增殖和分化。

[0100] 如本申请使用的,术语“促红细胞生成素, Erythropoietin, EPO”是指erythroblasts即红细胞前体细胞分泌产生的一种生长因子。在成体中,是有肾皮质肾小管周围间质细胞和肝脏分泌产生的糖蛋白。EPO能刺激造血干细胞分化形成erythroblasts。

[0101] 如本申请使用的,术语“干细胞因子, stem cell factor (SCF)”是指又称肥大细胞生长因子 (MGF), Kit配体 (KL) 及Steel因子 (SLF)。它是由骨髓微环境中的基质细胞产生的一种酸性糖蛋白。SCF和其他细胞因子一起诱导干和祖细胞增生、延长其存活期及引起干和祖细胞动员。虽然SCF的受体在祖细胞无显著不同,但SCF诱导红系祖细胞增生比粒-单祖细胞强,可能是其他特异性因素影响祖细胞对SCF的反应性。

[0102] 如本申请使用的,术语“造血干细胞红系扩增和分化培养基”是指帮助HSPCs的细胞大量扩增和向红系祖细胞分化的配演体系。本发明中该培养基包含两种主要成分,分别是基础培养基和生长因子添加剂。基础培养基是无血清体系,可以是StemSpanTMSFEM II (STEM CELLS TECHNOLOGY Inc.),也可以是IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium),外加ITS (Thermofisher) 和L-glutamin (Thermofisher) 和维生素C和牛血清白蛋白。生长因子添加剂为IL-3, SCF, EPO的不同浓度的组合。

[0103] 如本申请使用的,术语“造血干细胞红系分化脱核培养基”是指帮助红系祖细胞进一步扩增分化成为脱核的红细胞培养基。本发明中该培养基包含两种主要成分,分别是基础培养基和生长因子及化学小分子添加剂。基础培养基是吴血清体系,可以是StemSpanTMSFEM II (STEM CELLS TECHNOLOGY Inc.),也可以是IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium),外加ITS (Thermofisher) 和L-glutamin (Thermofisher) 和维生素C和牛血清白蛋白。生长因子及化学小分子添加剂包括EPO和人转铁蛋白,以及化学小分子mifepristone。

[0104] 如本申请使用的,术语“磁珠分选”是指把细胞用超级顺磁性的MACSMicroBeads (MACS微型磁珠) 特异性地标记,磁性标记完后,把这些细胞通过一个放在强而稳定磁场中的分选柱。分选柱里的基质造成一个高梯度磁场。

[0105] 被磁性标记的细胞滞留在柱里而未被标记的细胞则流出。当分选柱移出磁场后，滞留柱内的磁性标记细胞就可以被洗脱出来，这样就完全可以获得标记和未标记的两个细胞组份。

[0106] 实施例

[0107] 此后，本发明将参照实施例进一步说明。对本领域的技术人员显而易见的是这些实施例仅出于说明目的而不理解为本发明保护范围的限制。因此，本发明的实质性保护范围将通过所附权利要求和其等同物限定。

[0108] 实施例1:源自人脐带血的CD34阳性的造血干细胞/祖细胞HSPCs的收集

[0109] 根据本发明的源自人脐带血的HSPCs构建和培养。

[0110] (1) 密度梯度离心

[0111] 本发明是采用商售的淋巴细胞分离管(达科为)通过密度梯度离心的方法从两个供体的脐带血(购买自澳赛尔斯生物技术(上海)有限公司)中分离单核细胞。离心参数为1600rpm,30min。

[0112] (2) 磁珠分选

[0113] 本发明采用的磁珠分选试剂盒是购自德国美天旎公司。将单核细胞磷酸盐缓冲液洗涤,离心,加入CD34的磁珠标记造血干细胞/祖细胞,4度,30min后,再经过磷酸盐缓冲液洗涤,离心,过磁珠分选分离柱子,即可获得高纯度的CD34阳性的造血干细胞/祖细胞。

[0114] 实施例1的结果分别显示在图1和图2中,图1表明实施例1得到的CD34阳性的比例为96.61%,CD34阳性且CD45RA阴性的比例为86.29%,说明通过实施例1的方法从脐带血中高效分离出了造血干细胞/祖细胞。图2表明,实施例1采用的分离方法可重复,在不同批次的脐带血中均能分离出造血干细胞/祖细胞。

[0115] 实施例2:造血干细胞红系扩增和分化培养基(HEEDM)诱导分化为红系祖细胞

[0116] 将实施例1新鲜分离的HSPCs体外培养扩增2天。采用的基础培养基是:StemSpan™SFEM II,生长因子为50-200ng/ml SCF,10-100ng/ml IL-3,1-10U EPO/ml。

[0117] 细胞计数,将 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 细胞接种于培养板中,添加HEEDM培养7天。培养的条件为,在37°C培养箱中(Thermo fisher)。

[0118] 为了与本实施例2的结果进行对照,同时参考Harvey Lodish的文章(Lee HY,Gao X,Barrasa MI,Li H,Elmes RR,Peters LL,Lodish HF.Nature.2015Jun 25;522(7557):474-7.doi:10.1038/nature14326.Epub 2015May 11.)的培养条件,对其中的培养方法和条件进行重复作为对照试验,其培养策略和结果分别如图3和图4所示。

[0119] 选取实施例1中供体1和供体2分离出的HSPCs作为起始细胞,扩增两天后的HSPCs在HEEDM培养基中培养7天后。分析了CD71和CD235a蛋白的表达,双阳性的比例达到分别是68.91%和52.23%,如图7所示。而利用Harvey Lodish的四步法分化策略,在分化16天后,CD71和CD235a双阳性的比例才达到61.31%,如图4所示。

[0120] 上述结果说明,利用本发明的造血干细胞红系扩增和分化培养基能快速诱导HSPCs向下分化,将Harvey Lodish的分化方法的16天缩短为7天。

[0121] 实施例3:造血干细胞红系分化脱核培养基(HEDEM)诱导红系祖细胞分化成为成熟的红细胞

[0122] 将从实施例2的得到的HSPCs分化7天后的红系祖细胞取一部分细胞计数,另取一

部分流式分析抗体染色,分析其GPA和CD71。细胞计数,将 5×10^5 - 2×10^6 细胞接种于培养板中,添加HEDEM培养7天。该培养基成分如下:StemSpan™SFEM II,生长因子为50-200ng/ml SCF, 10-100ng/ml IL-3, 1-10U EPO/ml。

[0123] 选取实施例1中供体1和供体2分离出的HSPCs作为起始细胞,扩增两天后的HSPCs在HEEDM培养基中培养7天后(实施例2),随后在HEDEM中继续分化成熟为红细胞。CD71和CD235a蛋白流式分析结果表明,双阳性的比例达到分别是90.21%和89.41%,并且在脐带血中分离出的造血干细胞分化7天后的效果类似,如图7所示。通过Hochest标记细胞核,流式分析结果,Donor 1的脱核的效率为25.63%,而且有明显的红色细胞产生。如图8,9所示。而利用Harvey Lodish的四步法分化策略,分化19天和21天后,CD71和CD235a双阳性的比例分别为78.53%和73.71%。通过Hochest标记细胞核,流式分析结果,脱核的效率仅为9.89%,如图4和图5所示。

[0124] 由此表明,本发明中的造血干细胞红系分化脱核培养基能够高效促进产生成熟的红细胞,显著好于Harvey Lodish的四步法分化方法。

[0125] 实施例4利用HEEDM培养基和HEDEM培养基

[0126] 选取供体3和供体4(购买自澳赛尔斯生物技术(上海)有限公司)按照与实施例1相同的方法分离出的HSPCs作为起始细胞,扩增两天后的HSPCs在HEEDM培养基中培养7天后,随后在HEDEM中继续分化9天成熟为红细胞,即16天的分化周期。两个供体的CD71和CD235a蛋白流式分析结果表明,双阳性的比例达到分别是95.53%和94.44%,通过Hochest标记细胞核,流式分析结果,脱核的效率分别为17.87%和20.17%。因此,两步法分化16天后也能够获得高表达CD71和CD235a的成熟的脱核的红细胞,如图10和11所示。

[0127] 工业实用性

[0128] 根据本发明,从脐带血中分离得到单核细胞,经过CD34磁珠分选获得造血干细胞/祖细胞。将造血干细胞/祖细胞经过短暂的14天两步法分化,可获得90%GPA和CD71双阳性的脱核的成熟的红细胞。该分化方案时间短、效率高,优于目前报道的三步法和四步法的分化方案,利于大规模GMP车间生产成熟的红细胞,以解决临床输血医学所面临的血液工体严重短缺的问题。

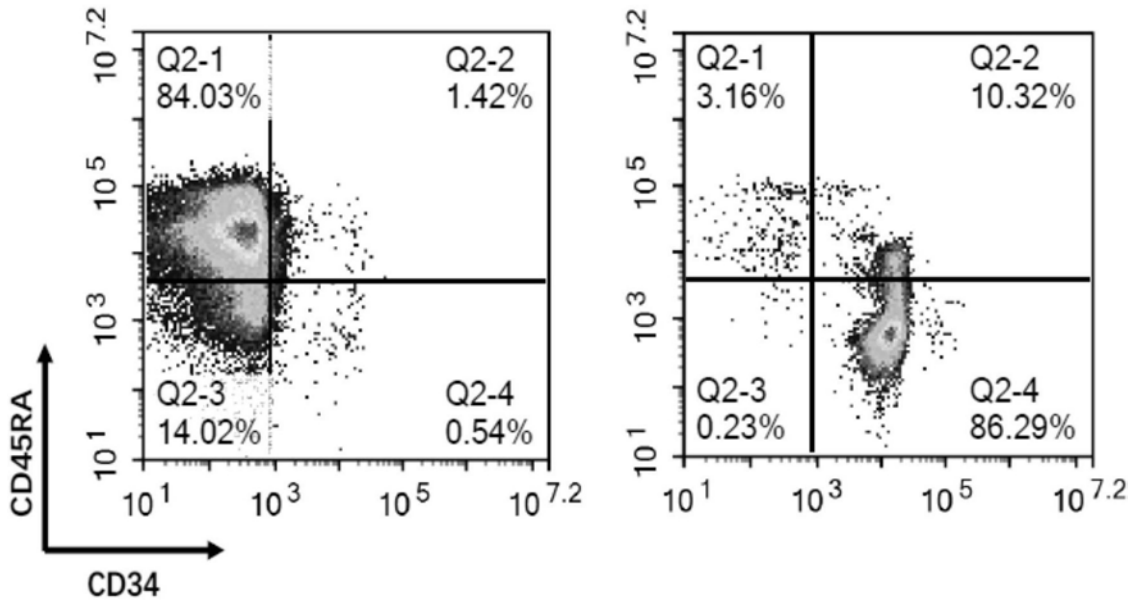


图1

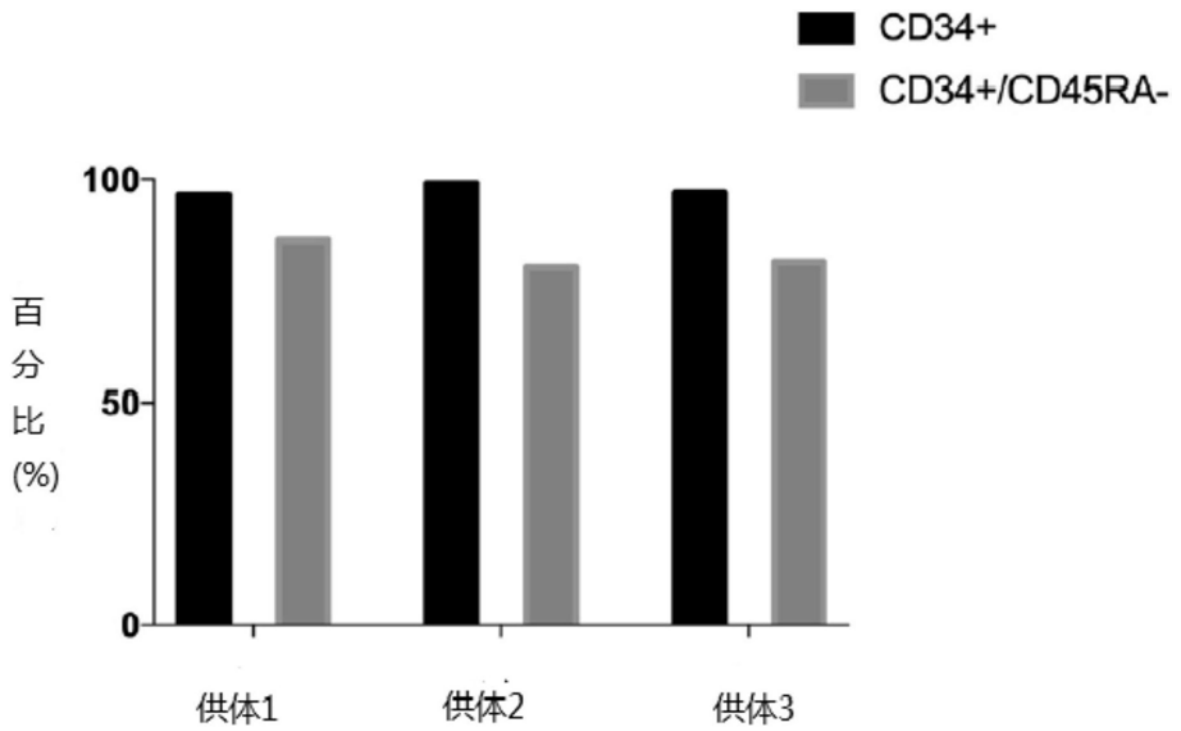


图2

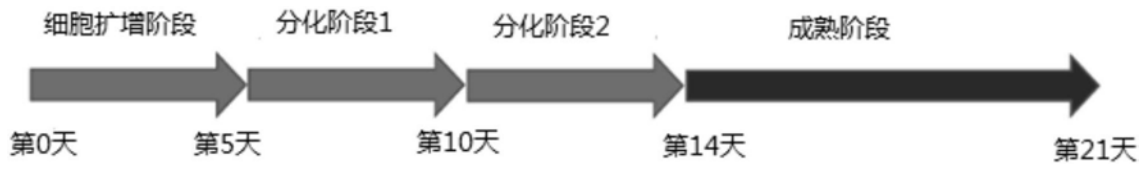


图3

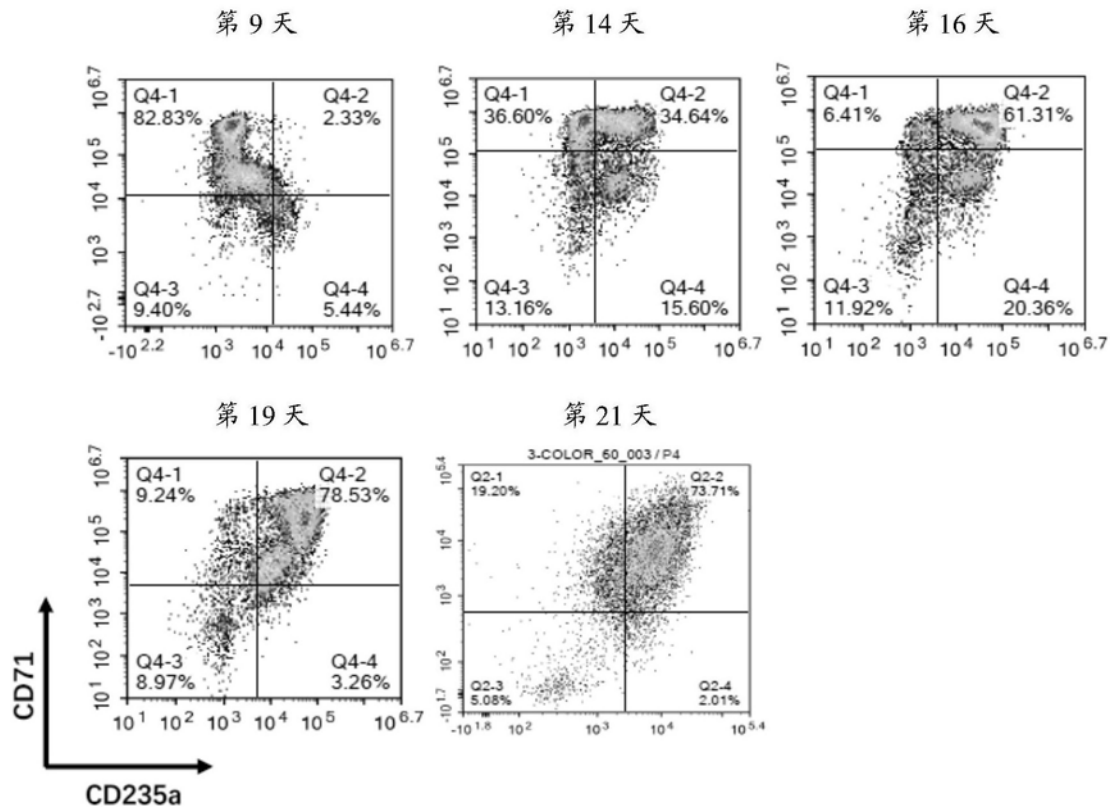


图4

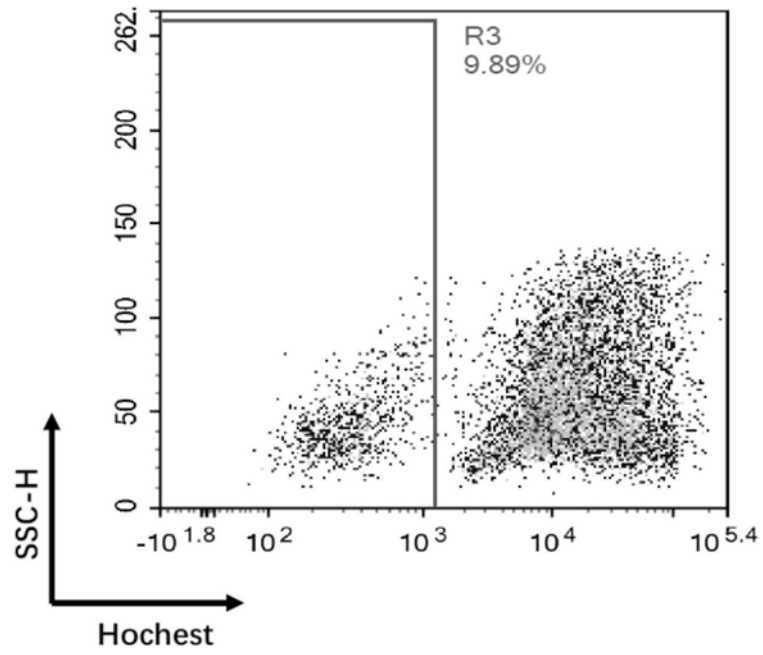


图5

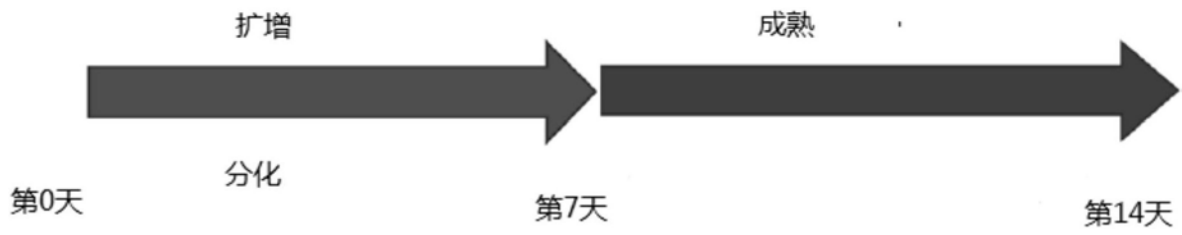


图6

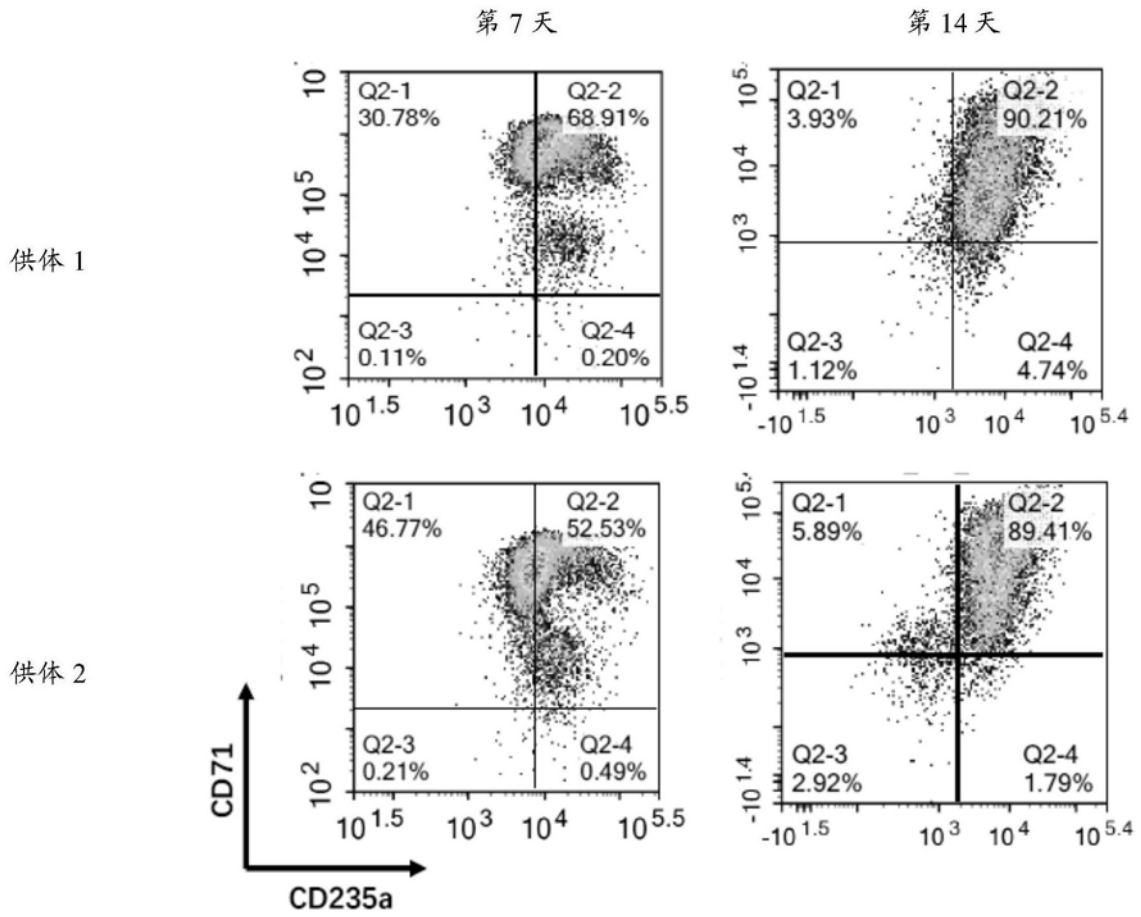


图7

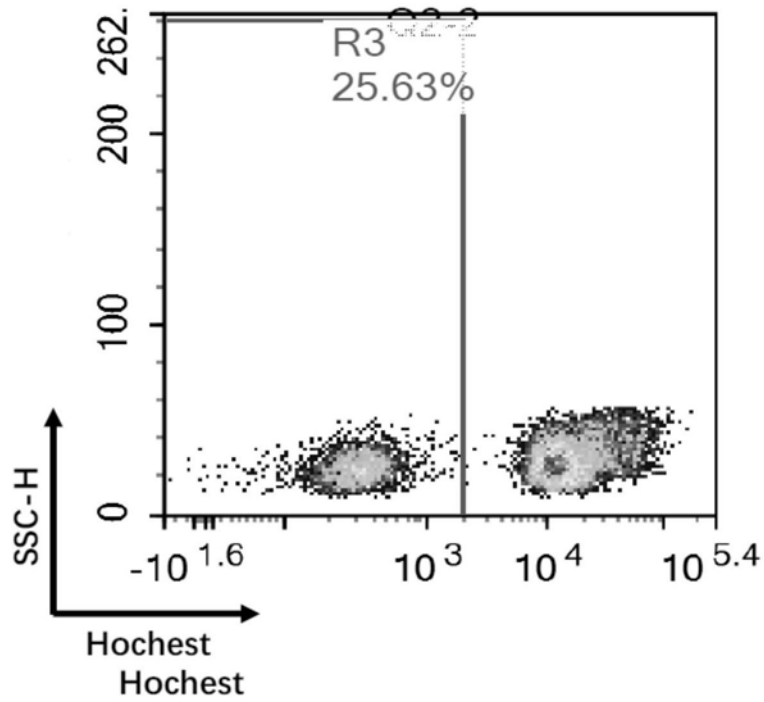


图8

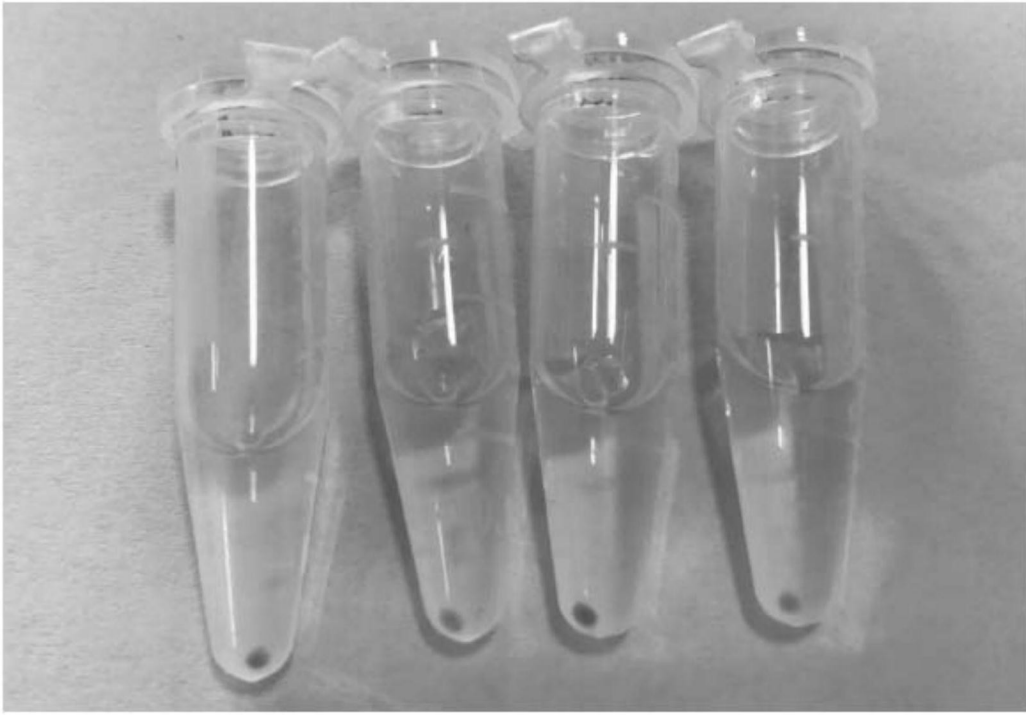


图9

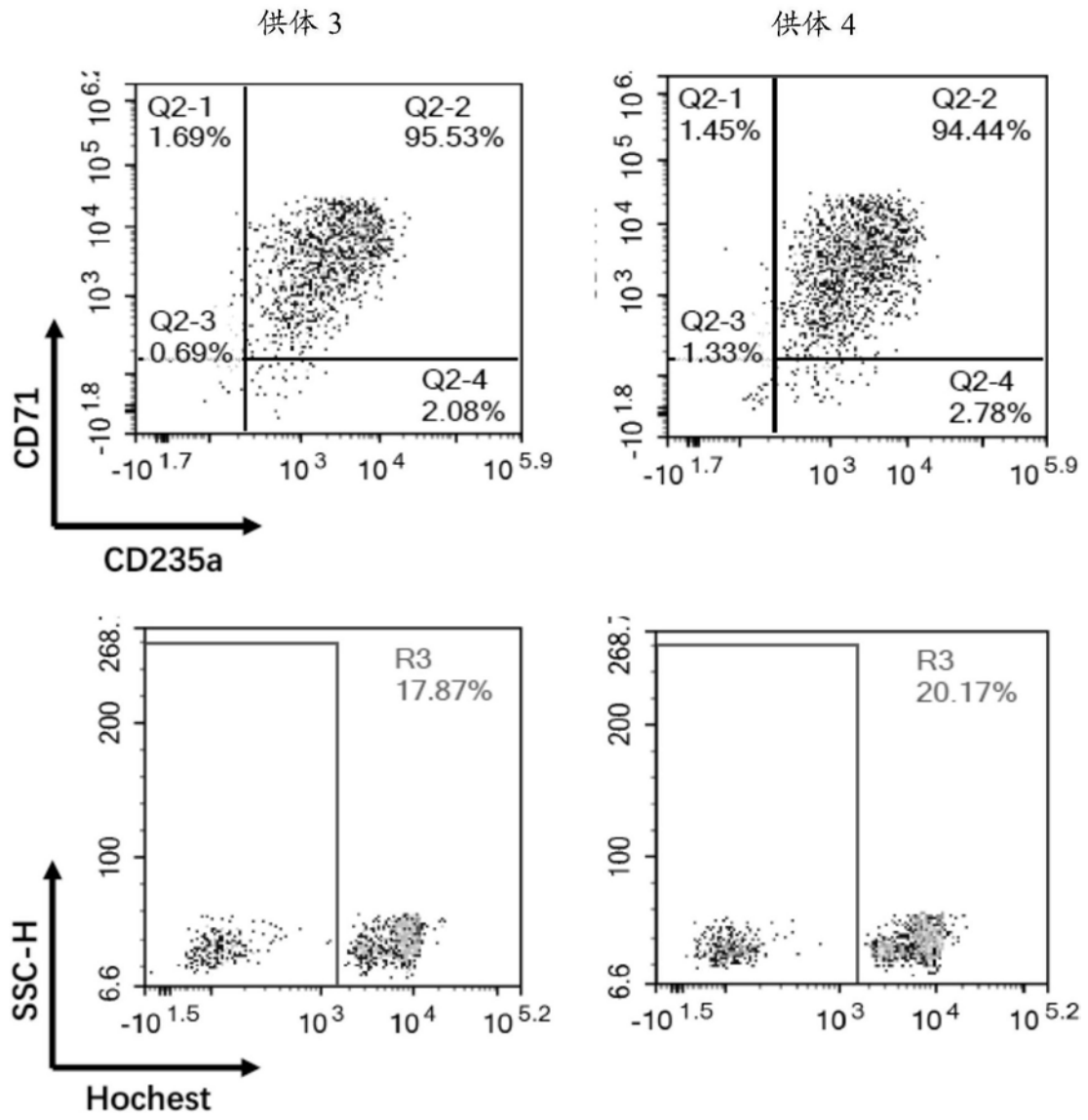


图10



图11