



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114990063 B

(45) 授权公告日 2023.10.20

(21) 申请号 202210668695.5

A61P 37/02 (2006.01)

(22) 申请日 2022.06.14

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114990063 A

(43) 申请公布日 2022.09.02

(73) 专利权人 中国科学技术大学

地址 230026 安徽省合肥市包河区金寨路  
96号

(72) 发明人 倪芳 吴明明 蒋来 程临钊

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

专利代理师 乔献丽 张莹

(51) Int.Cl.

C12N 5/0789 (2010.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2018172420 A1, 2018.09.27

KR 20190074720 A, 2019.06.28

CN 101310007 A, 2008.11.19

CN 105106938 A, 2015.12.02

IN 201617010273 A, 2016.08.05

罗云等. 造血干细胞归巢机制研究进展.《重庆医学》.2011,第40卷(第30期),第3107-3109+3111页.

Guo B等. Glucocorticoid hormone-induced chromatin remodeling enhances human hematopoietic stem cell homing and engraftment.《Nature medicine》.2017,第23卷(第4期),第424-428页.

审查员 金玥昕

权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

促进造血干祖细胞迁移、归巢和植入的组合物及其应用

(57) 摘要

本发明提供促进造血干祖细胞迁移、归巢和植入的组合物及其应用,所述组合物包含促肾上腺皮质激素释放激素。这对于提高造血干细胞移植效率,尤其对于改善脐血移植植入缓慢具有重要意义。

1. 促进造血干祖细胞迁移、归巢和植入的组合物,其特征在於,所述组合物包含:促肾上腺皮质激素释放激素、干细胞因子、Fms相关酪氨酸激酶3配体和血小板生成素。
2. 促进造血干祖细胞迁移、归巢和植入的培养基,其特征在於,所述培养基包含:基础培养基、促肾上腺皮质激素释放激素、干细胞因子、Fms相关酪氨酸激酶3配体和血小板生成素。
3. 根据权利要求2所述的培养基,其特征在於,所述基础培养基为无血清培养基。
4. 根据权利要求2所述的培养基,其特征在於,所述基础培养基为Stem Span SFEM无血清培养基。
5. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2-4中任一项所述的培养基,其特征在於,干细胞因子:Fms相关酪氨酸激酶3配体:血小板生成素:促肾上腺皮质激素释放激素的含量比为1:1:1:(3-20)。
6. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2-4中任一项所述的培养基,其特征在於,干细胞因子:Fms相关酪氨酸激酶3配体:血小板生成素:促肾上腺皮质激素释放激素的含量比为1:1:1:3、1:1:1:4.8、1:1:1:5、1:1:1:6、1:1:1:7、1:1:1:8、1:1:1:9、1:1:1:10、1:1:1:11、1:1:1:12、1:1:1:13、1:1:1:14、1:1:1:15、1:1:1:16、1:1:1:17、1:1:1:18、1:1:1:19或1:1:1:20。
7. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2-4中任一项所述的培养基,其特征在於,干细胞因子:Fms相关酪氨酸激酶3配体:血小板生成素:促肾上腺皮质激素释放激素的含量比为1:1:1:4.8。
8. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2-4中任一项所述的培养基,其特征在於,所述促肾上腺皮质激素释放激素的含量为140ng/ml-950ng/ml。
9. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2-4中任一项所述的培养基,其特征在於,所述促肾上腺皮质激素释放激素的含量为140ng/ml、200ng/ml、240ng/ml、300ng/ml、400ng/ml、500ng/ml、600ng/ml、700ng/ml、800ng/ml、900ng/ml或950ng/ml。
10. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2-4中任一项所述的培养基,其特征在於,所述促肾上腺皮质激素释放激素的含量为240ng/ml。
11. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2-4中任一项所述的培养基,其特征在於,所述干细胞因子的含量为50ng/ml-100ng/ml。
12. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2-4中任一项所述的培养基,其特征在於,所述干细胞因子的含量为50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml或100ng/ml。
13. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2-4中任一项所述的培养基,其特征在於,所述干细胞因子的含量为50ng/ml。
14. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2-4中任一项所述的培养基,其特征在於,所述Fms相关酪氨酸激酶3配体的含量为50ng/ml-100ng/ml。
15. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2-4中任一项所述的培养基,其特征在於,所述Fms相关酪氨酸激酶3配体的含量为50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml或100ng/ml。
16. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2-4中任一项所述的培养基,其特征在於,所述Fms相关酪氨酸激酶3配体的含量为50ng/ml。

17. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2-4中任一项所述的培养基,其特征  
在于,所述血小板生成素的含量为50ng/ml-100ng/ml。

18. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2-4中任一项所述的培养基,其特征  
在于,所述血小板生成素的含量为50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml、100ng/  
ml。

19. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2-4中任一项所述的培养基,其特征  
在于,所述血小板生成素的含量为50ng/ml。

20. 促肾上腺皮质激素释放激素在制备促进造血干祖细胞迁移、归巢和植入的组合物  
中的用途。

## 促进造血干祖细胞迁移、归巢和植入的组合物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及促进造血干祖细胞迁移、归巢和植入的组合物及其应用,尤其涉及包含多肽激素—促肾上腺皮质激素释放激素(Corticotropin-releasing hormone,CRH)的组合物及其在促进造血干祖细胞迁移、归巢和植入中的应用,这对于提高造血干细胞移植效率,尤其对于改善脐血移植植入缓慢具有重要意义。

### 背景技术

[0002] 植入延缓依然是造血干细胞移植,尤其是脐血造血干细胞移植,当前临床面临的瓶颈难题。目前,改善脐血移植植入延缓的方法有很多,但大多机制复杂,临床应用的可实施性及简便性较低,很难满足临床应用。例如:在2003年由Minnesota团队首先使用氟达拉滨、环磷酰胺和亚致死剂量全身辐射的方案,并注入两份匹配的脐血单元用于移植治疗,他们发现这种方式能够将单份脐血移植治疗后病人的康复率由30%提升到50%<sup>1</sup>。但是,最近的研究数据表明这种方法只能够针对特定的恶性血液疾病,并不具有普适性,且这种方式可能只适用于孩童的移植治疗,对于成年人的数据还待进一步确认。此外,脐血样本的选择也是提升移植效率的常用方式。Barker JN在对1061名成人和儿童脐血移植后的分析中发现,无论细胞剂量如何,和供者人类白细胞抗原(HLA)完全相匹配的受者,都体现出良好的预后<sup>2-4</sup>。然而,这种完全相匹配的难度较高,往往会错过最佳治疗时间导致移植失败。

[0003] 因此,还需要切实可行、简单有效的方法,以提高造血干祖细胞移植效率,解决脐血移植植入延缓。

### 发明内容

[0004] 为了寻找切实可行、简单有效的方法,以提高造血干祖细胞移植效率,解决脐血移植植入延缓,本发明公开了多肽类激素-CRH在促进造血干祖细胞迁移,归巢以及植入中的应用。该激素能够促进造血干祖细胞的运动和迁移,并在体内显著促进造血干祖细胞定向骨髓的归巢和长期定植,从而大大改善脐血移植植入延缓。因此,本发明对造血干祖细胞移植,尤其对促进脐血移植疗效意义重大。

[0005] 具体来说,本发明提供以下技术方案:

[0006] 一方面,本发明提供促进造血干祖细胞迁移、归巢和植入的组合物,其特征在于,所述组合物包含:促肾上腺皮质激素释放激素、干细胞因子、Fms相关酪氨酸激酶3配体和血小板生成素。

[0007] 在一些实施方案中,所述组合物中干细胞因子:Fms相关酪氨酸激酶3配体:血小板生成素:促肾上腺皮质激素释放激素的含量比为1:1:1:(3-20)。

[0008] 在一些实施方案中,所述组合物中干细胞因子:Fms相关酪氨酸激酶3配体:血小板生成素:促肾上腺皮质激素释放激素的含量比为1:1:1:3、1:1:1:4.8、1:1:1:5、1:1:1:6、1:1:1:7、1:1:1:8、1:1:1:9、1:1:1:10、1:1:1:11、1:1:1:12、1:1:1:13、1:1:1:14、1:1:1:15、1:1:1:16、1:1:1:17、1:1:1:18、1:1:1:19、1:1:1:20。

[0009] 在一些实施方案中,所述促肾上腺皮质激素释放激素的含量为140ng/ml-950ng/ml,优选地140ng/ml、200ng/ml、240ng/ml、300ng/ml、400ng/ml、500ng/ml、600ng/ml、700ng/ml、800ng/ml、900ng/ml、950ng/ml,更优选地240ng/ml。

[0010] 在一些实施方案中,所述干细胞因子的含量为50ng/ml-100ng/ml,优选地50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml、100ng/ml,更优选地50ng/ml。

[0011] 在一些实施方案中,所述Fms相关酪氨酸激酶3配体的含量为50ng/ml-100ng/ml,优选地50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml、100ng/ml,更优选地50ng/ml。

[0012] 在一些实施方案中,所述血小板生成素的含量为50ng/ml-100ng/ml,优选地50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml、100ng/ml,更优选地50ng/ml。

[0013] 另一方面,本发明提供促进造血干祖细胞迁移、归巢和植入的培养基,其特征在于,所述培养基包含:基础培养基、促肾上腺皮质激素释放激素、干细胞因子、Fms相关酪氨酸激酶3配体和血小板生成素。

[0014] 在一些实施方案中,所述基础培养基为无血清培养基,优选地Stem Span SFEM无血清培养基。

[0015] 另一方面,本发明提供促肾上腺皮质激素释放激素在用于制备治疗血液系统恶性肿瘤、血液系统非恶性肿瘤、实体瘤、免疫系统疾病、遗传或代谢性疾病的药物中的用途。

[0016] 在一些实施方案中,所述血液系统恶性肿瘤为慢性粒细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、骨髓瘤、多发性骨髓瘤、骨髓纤维化及骨髓增生异常综合征、伯基特淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、浆母细胞性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、原发性巨球蛋白血症、浆细胞白血病、浆母细胞性淋巴瘤、毛细胞白血病、系统性肥大细胞增多症或成胚浆样树突状细胞瘤;

[0017] 血液系统非恶性肿瘤为再生障碍性贫血、范可尼贫血、地中海贫血、镰状细胞贫血、骨髓纤维化、重型阵发性睡眠性血红蛋白尿症或无巨核细胞性血小板减少症;

[0018] 实体瘤为乳腺癌、卵巢癌、睾丸癌、肾癌、神经母细胞瘤、小细胞肺癌、生殖细胞瘤、尤因氏肉瘤、软组织肉瘤、维尔姆斯瘤、骨肉瘤、成神经管细胞瘤或恶性脑瘤;

[0019] 免疫系统疾病为重症联合免疫缺陷症、严重自身免疫性疾病、原发性中枢神经系统淋巴瘤、湿疹血小板减少伴免疫缺陷综合征、慢性肉芽肿, IPEX综合征, AL淀粉变性、POEMS综合征、嗜血细胞综合征、类风湿性关节炎、多发性硬化、系统性硬化、系统性红斑狼疮、克罗恩病、多肌炎或皮炎;以及

[0020] 遗传或代谢性疾病为粘多糖病、先天性角化不良、溶酶体代谢病、球形细胞样脑白质病、异染性脑白质营养不良或X连锁的肾上腺脑白质营养不良。

[0021] 另一方面,本发明提供促进造血干祖细胞迁移、归巢和植入的方法,其特征在于,包括将上述组合物施用至对象进行刺激。

[0022] 在一些实施方案中,所述刺激时间为12-18小时,优选地12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时,更优选地16小时。

[0023] 另一方面,本发明提供促进造血干祖细胞植入效率的方法,其特征在于,包括将上述组合物施用至对象进行刺激。

[0024] 另一方面,本发明提供促肾上腺皮质激素释放激素在制备促进造血干祖细胞迁

移、归巢和植入的组合物中的用途。

[0025] 定义

[0026] 造血干祖细胞迁移:造血干祖细胞上表达特定分子CXCR4,为趋化因子SDF-1的配体,造血干祖细胞通过CXCR4响应SDF-1的诱导进行迁移运动。造血干祖细胞这种迁移能力对于其发挥造血具有至关重要的作用,造血干祖细胞迁移能力发生异常,往往会导致造血受损。

[0027] 造血干祖细胞归巢:传统骨髓移植时造血干细胞经外周静脉输注,输注的造血干细胞随体循环进入骨髓、肝、脾、肺等其他组织,但绝大部分滞留于肺部,仅有少量造血干细胞在细胞因子的影响下穿越血管内皮细胞到达骨髓腔,这一过程称造血干细胞的“归巢”。只有归巢并定居于骨髓微环境的造血干细胞才能进一步增殖、分化并重建造血。

[0028] 造血干祖细胞植入:造血干祖细胞通过归巢作用到达骨髓腔发挥其造血功能,然而并不是所有到达骨髓腔的造血干祖细胞均能发挥造血功能,仅有少部分造血干祖细胞能够定植在骨髓腔中,组成能发挥正常功能的干细胞池,被称为“Stem cell niche”。造血干祖细胞在这种微环境通过和细胞外基质以及微环境细胞相互作用共同维持全能性,保证造血能力。

[0029] 促肾上腺皮质激素释放激素:能够刺激垂体前叶的促肾上腺皮质激素的合成及分泌,是驱动身体对压力做出反应的主要因素。它也存在引起炎症的疾病中,对于调控炎症反应也具有重要作用。

[0030] 脐血移植植入缓慢:脐血移植缓慢与多种因素相关,造血干祖细胞本身以及能发挥功能的数量为主要因素。造血干祖细胞经外周血输送到骨髓腔中发挥造血功能,然而并不是所有到达骨髓腔的造血干祖细胞均具有长期造血的功能。只有具有长期造血功能的造血干祖细胞才能一直发挥造血功能从而达到治疗目的。

[0031] CD34<sup>+</sup>造血干祖细胞:造血干祖细胞是一类成体干细胞,具有干细胞自我更新以及分化潜能特性,它是血液系统中的“种子”,在造血过程中能够形成血液系统中的所有细胞。CD34分子是造血干祖细胞最重要的标志之一,在造血干祖细胞的分离以及鉴定中,该分子是第一个被广泛研究的分子。CD34在人骨髓、外周血以及脐带血中的表达为0.1-4.9%,目前一些其他表面标记分子已经和CD34结合使用用来区分原始细胞群体。

[0032] Stem Span SFEM无血清培养基:该培养基为无血清扩增培养基,已被开发并测试用于人类造血细胞的体外培养和扩增,并添加了适当的生长因子和补充剂。从而可以灵活地制备满足其要求的培养基。当与适当的细胞因子结合使用时,SFEM已用于培养和扩增从其他物种(包括小鼠、非人类灵长类动物和狗)中分离的造血细胞。SFEM也被用于各种其他造血和非造血细胞类型的培养。使用适当的Stem Span公司扩增补充剂,SFEM可用于扩增从人脐带血、动员外周血或骨髓样本中分离的CD34<sup>+</sup>细胞,或扩增和分化谱系定型祖细胞以产生红细胞、骨髓或巨核细胞祖细胞群细胞。

[0033] SCF:干细胞因子,是一种造血生长因子,通过和c-Kit受体相互结合调控造血细胞,对于造血干细胞的存活、增殖和分化具有至关重要的作用。

[0034] Flt3-L:Fms相关酪氨酸激酶3配体,是一种造血生长因子。通过和Fms相关酪氨酸激酶3配体相互结合调控造血祖细胞的凋亡、增殖以及分化。

[0035] TPO:血小板生成素(TPO)是哺乳动物巨核细胞发育和血小板生成的主要调节因

子。人类血小板生成素通过与其同源受体骨髓增殖性白血病蛋白 (MPL) 的相互作用组成性循环并维持血小板生成。血小板生成素还在造血干细胞 (HSC) 的维持和调节中发挥重要作用。

[0036] SDF-1 $\alpha$ : 人基质细胞衍生因子1 $\alpha$ , 对于人造血组细胞在形成伪足、迁移、增殖和细胞间的粘附具有重要的作用。

[0037] hCD45<sup>+</sup>: 为人源白细胞抗原, 用于追踪及表明植入的造血干细胞在NSG小鼠体内重塑情况。

[0038] NSG小鼠: 该小鼠缺失成熟T细胞、B细胞和NK细胞, 可高效地植入人CD34<sup>+</sup>造血干细胞 (HSC)、外周血单核细胞 (PBMC)、细胞系来源的异体移植物 (CDX)、病人来源异种移植物 (PDX) 或成体干细胞及组织, 可以实现人类免疫系统的重建, 是研究人体免疫功能、传染病、糖尿病、肿瘤学和干细胞生物学的重要免疫缺陷小鼠, 是目前国际公认的免疫缺陷程度较高、较适合人源细胞或组织移植的工具小鼠。

[0039] GM-CSF动员: 通过粒细胞集落刺激因子使骨髓中的造血干细胞迁移到外周血液循环中, 使外周血液循环中造血干细胞CD34<sup>+</sup>数显著增加, 再用血细胞分离机分离采集供者外周血单个核细胞, 其中富含大量的造血干细胞, 可满足造血干细胞移植的需要。

## 附图说明

[0040] 从下面结合附图的详细描述中, 本发明的上述特征和优点将更明显, 其中:

[0041] 图1示出CRH能够显著促进体外造血干祖细胞的运动和迁移, 图1a为实验模式图, 将造血干祖细胞铺在Transwell上室中, 下层含有SDF-1 $\alpha$ , 4小时后移走上室收集下室细胞计数, 并将收集的下室细胞进行集落形成实验。图1b、1c结果显示, 相较于未使用CRH处理的对照组, CRH的处理能够明显增强造血干祖细胞对于SDF-1 $\alpha$ 响应的迁移。

[0042] 图2示出CRH能够显著促进体内造血干祖细胞的归巢。造血干祖细胞来源主要有脐带血以及使用GM-CSF动员的外周血, 图2a结果显示, 相较于未使用CRH处理的对照组, CRH的处理能够显著促进脐带血来源的造血干祖细胞的归巢作用, 图2b结果显示, CRH的处理也能够显著促进动员外周血来源的造血干祖细胞的归巢作用。

[0043] 图3示出CRH能够显著促进体内造血干祖细胞初次长期定植。通过每4周采集NSG小鼠外周血, 流式细胞仪检测人白细胞抗原hCD45的比例评估植入效果, 图3a、3b结果显示, 和未使用CRH处理的对照组相比, CRH的处理能够显著促进人造血干祖细胞在初次移植的NSG小鼠植入。进一步在16周时, 牺牲小鼠, 分离骨髓制备成单细胞悬液, 流式细胞仪检测hCD45的比例, 图3c、3d结果显示, 和未使用CRH处理的对照组相比, CRH的处理显著促进了人造血干祖细胞在初次移植的NSG小鼠骨髓中定植。

[0044] 图4示出CRH能够显著促进体内造血干祖细胞二次定植。通过和初次移植相同的检测方式来评估二次移植小鼠移植效果。图4a、4b、4c结果显示, 和未使用CRH处理的对照组相比, CRH的处理能够显著促进造血干祖细胞在NSG小鼠中的二次定植。进一步通过流式细胞仪检测hCD3<sup>+</sup>、hCD19<sup>+</sup>、hCD33<sup>+</sup>等阳性细胞比例来评估造血干祖细胞在体内的分化能力, 图4d、4e结果显示, CRH的处理能够明显调控造血干祖细胞向髓系细胞的分化。

## 具体实施方式

[0045] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白,以下结合具体实施例,并参照附图,对本发明作进一步的详细说明。

[0046] 实施例1CRH能够显著促进体外造血干祖细胞的运动和迁移

[0047] 收集新生儿脐带血(每份约80mL),1-2倍体积PBS溶液稀释血样,充分混匀后;每个50ml离心管中先加入15ml Ficoll分离液,然后再缓慢加入20-30ml PBS血样混合液,室温离心。离心机升降速均调为0,20℃、450g,离心30min,中间层为单个核细胞;用巴斯德吸管小心吸取,之后用1×PBS加满离心管,充分洗涤单个核细胞(400g,离心10min),计数,采用MACS磁珠分选脐带血CD34<sup>+</sup>造血干细胞(Human CD34 Microbead Kit,Miltenyi Biotec,130-046-702,根据磁珠说明书操作方法)。Stem Span SFEM无血清培养基(Stem cell,Cat#09650)重悬,分为两孔,3×10<sup>5</sup>细胞/孔,一孔设置为空白对照组:培养液中加入多细胞因子:SCF(50ng/ml Peprotech,300-70),Flt3-L(50ng/ml Peprotech,300-19),TPO(50ng/ml Peprotech,300-18)。另一孔设置为CRH处理组:培养液中加入多细胞因子:SCF(50ng/ml Peprotech,300-70),Flt3-L(50ng/ml Peprotech,300-19),TPO(50ng/ml Peprotech,300-18)以及CRH(240ng/ml,MCE HY-P0086)。将两组在5%CO<sub>2</sub>和37℃下培养16h。刺激结束后,收集细胞进行计数调整细胞浓度为1×10<sup>6</sup>个/ml,将100μl RPMI 1640含有1×10<sup>5</sup>个细胞的悬液铺在预先准备好的5μm孔径的Transwell(Corning 14331)上室中,下室为600μl RPMI 1640培养基(含SDF-1α,100ng/ml,Peprotech 300-28A),在5%CO<sub>2</sub>和37℃下培养,4小时后收集迁移到下室的细胞计数并将收集的细胞进行集落形成实验用于比较造血干祖细胞对于SDF-1诱导的迁移能力(图1a)。图1b结果显示与对照组相比,CRH的处理能够提高CD34<sup>+</sup>细胞对于SDF-1诱导迁移率,迁移率上调2.08倍。图1c、1d结果显示,迁移至下室的造血干祖细胞数目是对照组的1.74倍。以上结果证明,CRH能够促进造血干祖细胞在体外的迁移以及运动。

[0048] 实施例2CRH能够显著促进体内造血干祖细胞的归巢

[0049] 分离纯化得到CD34<sup>+</sup>造血干祖细胞,Stem Span SFEM无血清培养基重悬,设置两孔,1.5×10<sup>6</sup>细胞/孔,一孔设置为空白对照组:培养液中加入多细胞因子:SCF(50ng/ml Peprotech,300-70),Flt3-L(50ng/ml Peprotech,300-19),TPO(50ng/ml Peprotech,300-18)。另一孔设置为CRH处理组:培养液中加入多细胞因子:SCF(50ng/ml Peprotech,300-70),Flt3-L(50ng/ml Peprotech,300-19),TPO(50ng/ml Peprotech,300-18)以及CRH(240ng/ml,MCE HY-P0086)。在5%CO<sub>2</sub>和37℃下培养16h。刺激结束后,收集细胞进行计数,1×PBS重悬,并调整细胞浓度为1×10<sup>6</sup>/200μl,随后通过尾静脉注射至经过亚致死剂量(250Rad)辐照的NSG小鼠(NM-NSG-001)中,20h后脱颈牺牲小鼠,喷漱75%酒精移入生物安全柜中,使用无菌剪镊解剖摘取股骨,1ml注射器吸取1×PBS溶液冲洗髓腔,收集冲洗液于15ml离心管中,2000rpm,10min,4℃,离心收集细胞。1ml红细胞裂解液(Biosharp EL503B)冰浴裂解红细胞5min~10min后,10ml~15ml 1×PBS溶液终止裂解反应,200目尼龙网过滤,2000rpm,10min,4℃,离心收集细胞,1×PBS溶液再洗1次。调整细胞浓度。加入现配现用的流式抗体,通过流式细胞仪检测小鼠骨髓中人CD45阳性细胞比例,评价造血干祖细胞归巢情况。图2显示,和对照组相比,CRH处理能够将脐血来源的CD34<sup>+</sup>造血干祖细胞在NSG体内归巢效率提升2.17倍(图2a)。同时使用动员外周血来源的造血干祖细胞进行NSG小鼠



体内归巢分析(图2b),结果显示,相较于对照组,CRH的处理能够提升1.54倍。以上结果表明,CRH的处理能够促进造血干祖细胞在体内的归巢效应。

[0050] 实施例3CRH能够显著促进体内造血干祖细胞初次长期定植

[0051] 分离纯化得到CD34<sup>+</sup>造血干祖细胞,Stem Span SFEM无血清培养基重悬,设置两孔,1.5×10<sup>6</sup>细胞/孔,一孔设置为空白对照组:培养液中加入多细胞因子:SCF(50ng/ml Peprotech,300-70),Flt3-L(50ng/ml Peprotech,300-19),TPO(50ng/ml Peprotech,300-18)。另一孔设置为CRH处理组:培养液中加入多细胞因子:SCF(50ng/ml Peprotech,300-70),Flt3-L(50ng/ml Peprotech,300-19),TPO(50ng/ml Peprotech,300-18)以及CRH(240ng/ml,MCE HY-P0086),在5%CO<sub>2</sub>和37℃下培养16h。刺激结束后,收集细胞进行计数,1×PBS重悬,并调整细胞浓度为1×10<sup>5</sup>/200μl,随后通过尾静脉注射至经过亚致死剂量(250Rad)辐照的NSG小鼠中(亚致死剂量辐照之后,会引发小鼠原有的造血系统毁坏,进而促进造血干祖细胞在骨髓中的定植以及分化),每4周通过尾静脉采集小鼠外周血,使用流式细胞仪检测hCD45<sup>+</sup>细胞在单个核细胞中的比例(CD34<sup>+</sup>造血干祖细胞通过归巢作用抵达骨髓,只有抵达骨髓的造血干祖细胞才能够分化发育为人白细胞并动员至外周血中);第16周(12-16周时,移植的造血干祖细胞已经具有成熟的多细胞谱系)时牺牲上述NSG受体鼠,无菌分离小鼠骨髓细胞,部分用来检测小鼠骨髓中人CD45等阳性细胞比例,另一部分重悬用于后续二次移植实验。图3a、3b结果显示,在移植4周后,通过流式检测hCD45在NSG小鼠外周血单个核细胞的比例,在CRH处理组中平均比例为26.06%,而在对照组外周血hCD45平均比例为7.33%。进一步在初次移植后16周,通过流式检测,在CRH处理组的NSG小鼠外周血hCD45平均比例高达46.09%,在对照组NSG小鼠外周血hCD45平均比例为13.53%。随后分析hCD45在16周时所占骨髓单个核细胞的比例,图3c、3d显示,hCD45所占骨髓单个核细胞的平均比例在对照组中为44.84%,在CRH处理组中为83.1%。以上结果显示,无论在外周还是在骨髓中均能够在CRH组检测到更高的人白细胞抗原,表明CRH的处理能够显著促进人造造血干祖细胞在NSG小鼠的定植。

[0052] 实施例4CRH能够显著促进体内造血干祖细胞二次长期定植

[0053] 将无菌分离的初次移植16周NSG小鼠骨髓使用1×PBS(预冷)重悬,调整细胞浓度为5×10<sup>6</sup>/200μl,尾静脉注射至经过亚致死剂量(250Rad)辐照的NSG小鼠中,构建二次移植模型(用于检测造血干祖细胞自我更新能力及分化能力的强弱)。每4周通过流式细胞仪检测人hCD45<sup>+</sup>细胞在NSG小鼠外周血单个核细胞中的比例;第16周牺牲上述二次移植的NSG受体小鼠,流式细胞术检测小鼠骨髓单个核细胞人hCD45等阳性细胞比例,评价造血干祖细胞长期定植能力。图4a、4b、4c结果显示,和对照组相比,CRH处理的增强植入效应在移植的二次NSG受体小鼠中也很明显,即通过流式检测发现人hCD45在对照组骨髓占单个核的平均比例为4.76%,而在CRH处理组平均比例为32.30%,为对照组的6.79倍。在外周血中也显示相同的趋势,即hCD45阳性比例,CRH组为对照组的3.28倍。同时使用流式细胞仪检测各个谱系在初次以及二次移植受体小鼠中的比例,图4d、4e结果显示,CRH处理组能够在体内使HSPC向髓系方向分化发育,hCD33为髓系细胞的代表细胞标志分子,在初次移植NSG受体小鼠中,CRH处理组的hCD33阳性比例为对照组的19.05倍。在二次移植NSG受体小鼠中,CRH处理组的hCD33阳性比例为对照组的5.71倍。以上结果表明,CRH的处理能够明显促进造血干祖细胞在NSG小鼠体内长期定植,提示CRH对于促进体内造血干祖细胞移植具有显著的促进作

用。

[0054] 参考文献

[0055] 1.Barker JN,W.D.,DeFor TE,Blazar BR,Miller JS,Wagner JE.Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reducedintensity conditioning.Blood 102(5): 1915-1919(2003) .

[0056] 2.Ballen KK,S.T.,Yeap BY.Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults.Biol Blood Marrow Transplant13(1):82-89 (2007) .

[0057] 3.Rocha V,M.M.,Gluckman E,Rio B;Eurocord.Reduced-intensity conditioning regimens before unrelated cord blood transplantation in adults with acute leukaemia and other haematological malignancies.Curr Opin Oncol21 (Suppl 1):S31-S34(2009) .

[0058] 4.Cutler C,S.K.,Kim HT.Double umbilical cord blood transplantation with reduced intensity conditioning and sirolimus-based GVHD prophylaxis.Bone Marrow Transplant 46(5):659-667(2011) .

[0059] 以上所述的具体实施例,对本发明的目的、技术方案和有益效果进行了进一步详细说明,应理解的是,以上所述仅为本发明的具体实施例而已,并不用于限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

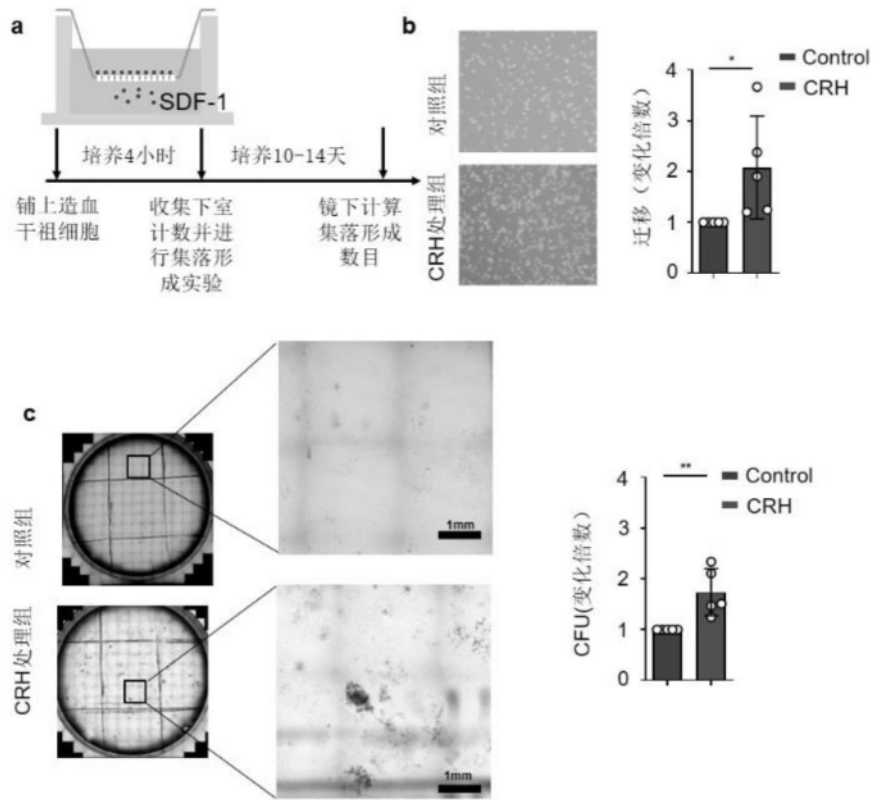


图1

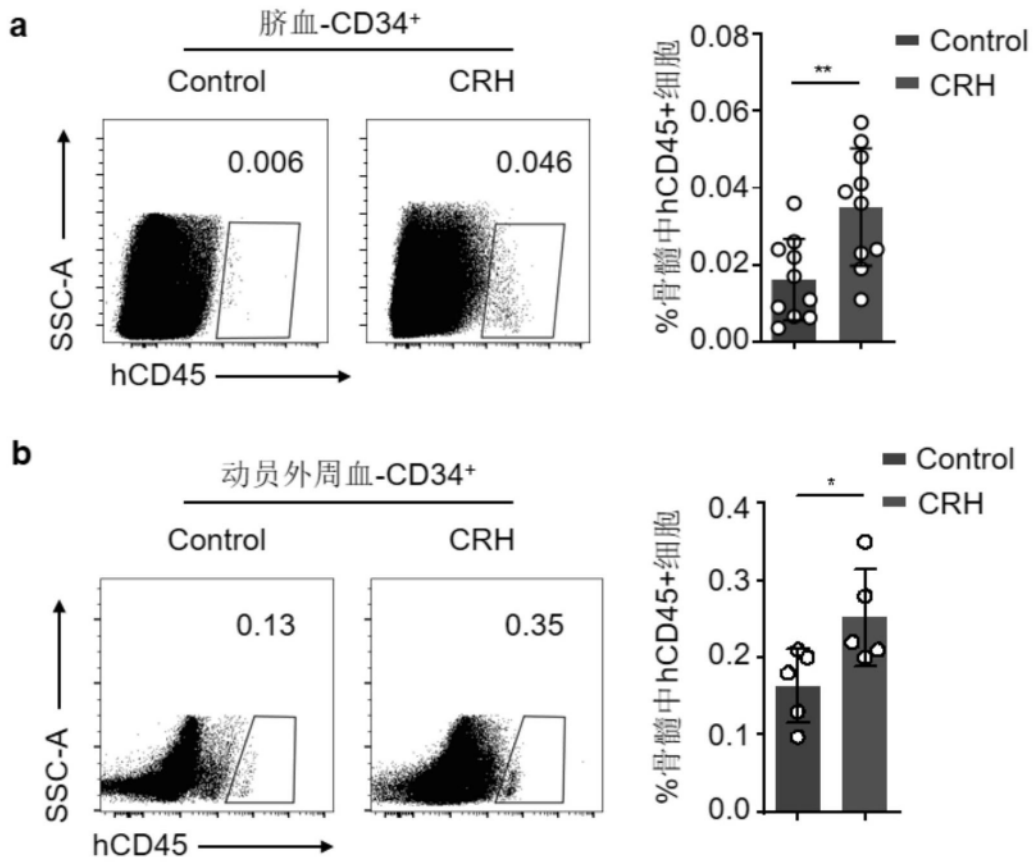


图2

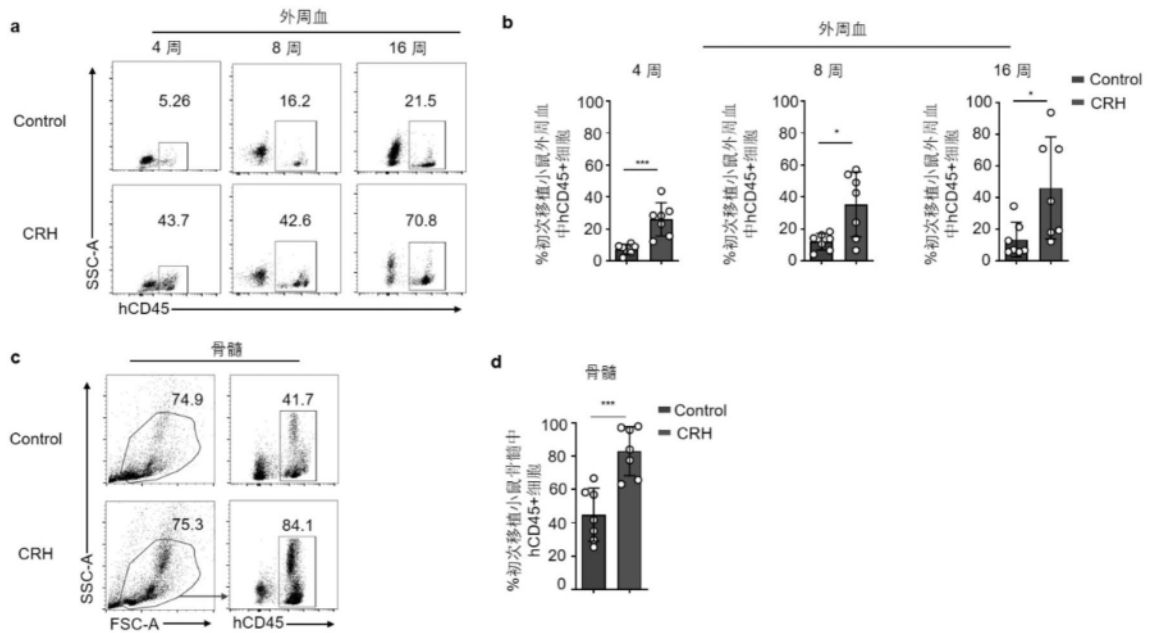


图3

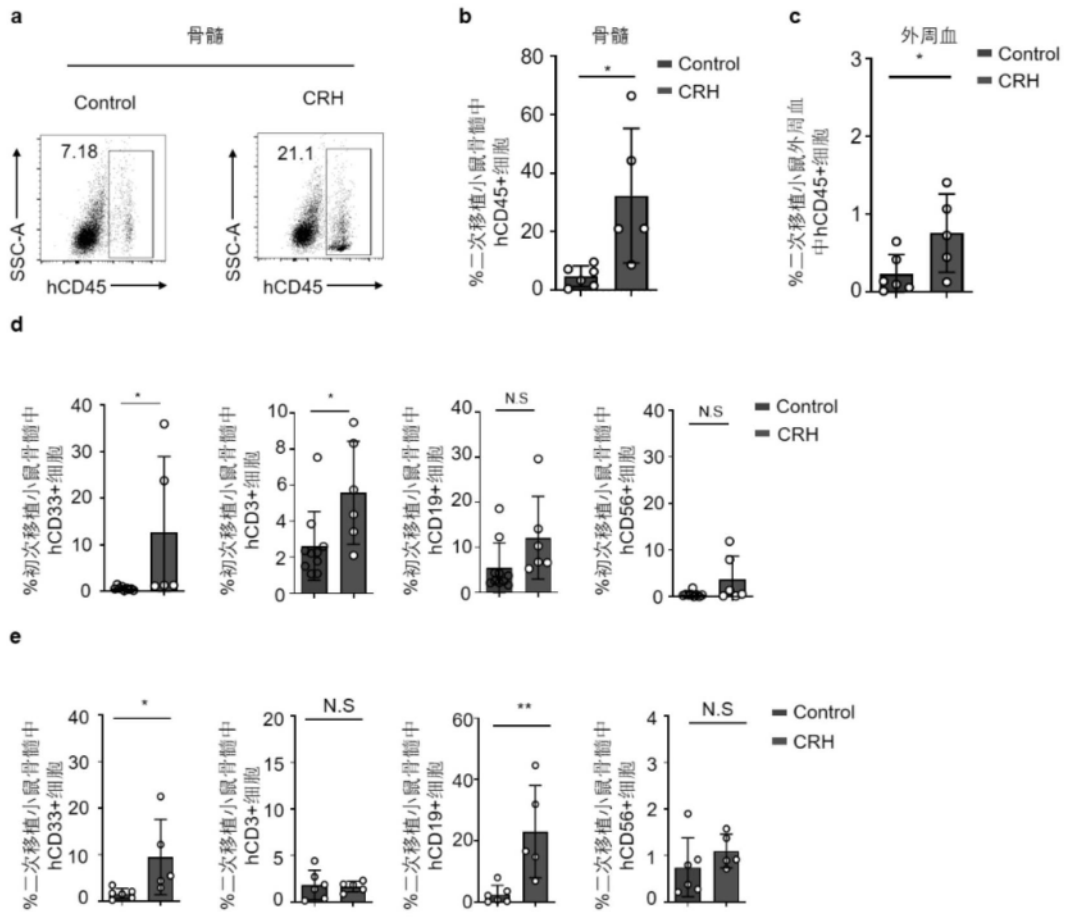


图4