



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103415615 A

(43) 申请公布日 2013. 11. 27

(21) 申请号 201180056428. 2

C12N 15/113(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 11. 23

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/417, 193 2010. 11. 24 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 05. 23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/062044 2011. 11. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02012/071513 EN 2012. 05. 31

(71) 申请人 高红

地址 美国马萨诸塞州

申请人 朱正仑

(72) 发明人 高红 朱正仑

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 吴小明

(51) Int. Cl.

C12N 5/0789(2006. 01)

权利要求书1页 说明书14页

(54) 发明名称

扩增造血干细胞

(57) 摘要

一种扩增造血干细胞的方法。本发明还公开了一种诊断原发性或继发性骨髓衰竭综合征的方法。本发明还包括了治疗原发性或继发性骨髓衰竭综合征的方法。

1. 一种扩增造血干细胞的方法,所述方法包括:
从受试者中分离造血干细胞,和
使所述细胞与抑制 VentX 多肽的表达或活性的试剂接触,从而增加所述造血干细胞的扩增。
2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述试剂是 iRNA 试剂,反义寡核苷酸,核酶或抗体。
3. 权利要求 2 所述的方法,其中所述试剂是 iRNA 试剂。
4. 权利要求 3 所述的方法,其中所述 iRNA 试剂选自由 SEQ ID NOs :5-18 和 29-67 组成的组。
5. 权利要求 1 所述的方法,其中所述试剂是免疫抑制剂。
6. 权利要求 5 所述的方法,其中所述免疫抑制剂是依木兰、甲氨蝶呤、泼尼松或骁悉。
7. 权利要求 1 所述的方法,其中所述分离步骤是通过从所述受试者的骨髓、外周血或脐带血中获得所述造血干细胞来进行的。
8. 一种诊断受试者中原发性或继发性骨髓衰竭综合征的方法,所述方法包括:
从所述受试者中获得包含造血干细胞的生物样品,和
确定编码 VentX 的基因在造血干细胞中的表达水平,
其中如果所述表达水平高于在不具有原发性或继发性骨髓衰竭综合征的对照中的表达水平,则确定所述受试者具有原发性或继发性骨髓衰竭综合征。
9. 权利要求 8 所述的方法,其中所述生物样品是骨髓或外周血。
10. 一种治疗原发性或继发性骨髓衰竭综合征的方法,所述方法包括:
从具有原发性或继发性骨髓衰竭综合征的受试者中分离造血干细胞,
使所述造血干细胞与抑制 VentX 多肽的表达或活性的试剂接触,从而增加所述造血干细胞的扩增,和
向所述受试者施用有效量的已经经过扩增的所述造血干细胞。
11. 权利要求 10 所述的方法,其中所述试剂是 iRNA 试剂,反义寡核苷酸,核酶或抗体。
12. 权利要求 11 所述的方法,其中所述试剂是 iRNA 试剂。
13. 权利要求 12 所述的方法,其中所述 iRNA 试剂选自由 SEQ ID NOs :5-18 和 29-67 组成的组。
14. 权利要求 10 所述的方法,其中所述试剂是免疫抑制剂。
15. 权利要求 14 所述的方法,其中所述免疫抑制剂是依木兰、甲氨蝶呤、泼尼松或骁悉。
16. 权利要求 10 所述的方法,其中所述分离步骤是通过从所述受试者的骨髓、外周血或脐带血中获得所述造血干细胞来进行的。
17. 权利要求 10 所述的方法,其中原发性或继发性骨髓衰竭综合征是贫血、脊髓发育不良综合征、或者化学疗法或放射疗法的并发症。
18. 权利要求 17 所述的方法,其中原发性或继发性骨髓衰竭综合征是贫血。
19. 权利要求 17 所述的方法,其中原发性或继发性骨髓衰竭综合征是脊髓发育不良综合征。
20. 权利要求 17 所述的方法,其中原发性或继发性骨髓衰竭综合征是化学疗法的并发症。

扩增造血干细胞

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2010 年 11 月 24 日提交的美国临时申请 61/417,193 的优先权。将该优先权申请全部内容并入本文作为参考。

[0003] 发明背景

[0004] 血细胞生成 (hematopoiesis) 包括造血干细胞 (HSC) 的增殖和它们向祖细胞 (例如红系祖细胞 (erythroprogenitor cell)) 的分化。HSC 产生血液和免疫系统的所有谱系的成熟细胞。

[0005] 在数十年间,多个谱系特异性转录因子,如 GATA-1 和 EKLF 已经显示在血细胞生成/红细胞生成中具有重要作用。然而,尚未完全了解允许扩展血细胞生成和红细胞生成的细胞-内在的因子。已经显示一些细胞-内在的因子(如 WNT3a, β -联蛋白和 HOXB4) 的过表达导致 HSC 在小鼠中的显著扩增。然而,它们对人 HSC 的扩增的效果有限。

[0006] 离体 (ex vivo) 扩增人 HSC 的困难成为基于人 HSC 的治疗应用,例如造血系统的重建中的主要挑战。存在开发有效扩增人 HSC 的方法的需要。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明基于 VentX 的下调导致人 HSC 的离体扩增的出人意料的结果,所述人 HSC 是 CD34+, 在体外 (in vitro) 和体内 (in vivo) 都是如此。

[0009] 本发明的一个方面涉及扩增 HSC 的方法。所述方法包括两个步骤:(1) 从受试者(例如人和非人哺乳动物)分离 HSC, 和 (2) 使 HSC 与抑制 VentX 多肽的表达或活性的试剂接触, 由此增加 HSC 的扩增。分离步骤可以通过从所述受试者获得包含 HSC 的生物样品(例如,骨髓、外周血和脐带血) 并且从所述生物样品中收集 HSC 来进行。

[0010] 在一个实例中,试剂是免疫抑制剂,例如依木兰 (Imuran)、甲氨蝶呤 (methotrexate)、泼尼松 (prednisone) 或骁悉 (Cellcept)。所述试剂也可以是干扰 RNA (iRNA) 试剂、反义寡核苷酸、核酶或抗体。

[0011] 所述 iRNA 试剂具有第一链,所述第一链具有与编码 VentX 蛋白的基因的区域同源的第一核苷酸序列。所述 iRNA 试剂靶向从该基因转录的 mRNA, 包括其 5' 非翻译区。

[0012] 第一核苷酸序列可以是 RNA 形式,例如

[0013] UUCAGAAUCGCCGCAUGAAACACAAACGG (SEQ ID NO :5),

[0014] UCUACUCAACGUCUUCUGGCCUUGCCAAU (SEQ ID NO :6),

[0015] CAAAUCUGCCUGCGCCGGAGAGGACCAUG (SEQ ID NO :7),

[0016] GGUUGAGUAAGGAGCCAAAUACCUUGCGG (SEQ ID NO :8),

[0017] CGGGUUGAGUAAGGAGCCAAAUA (SEQ ID NO :9),

[0018] CCGCAUGAAACACAAACGGCAAA (SEQ ID NO :10),

[0019] CCCCAGCUUUCUACUCAACGUCU (SEQ ID NO :11),

[0020] GGGUUGAGUAAGGAGCCAA (SEQ ID NO :29),

[0021] GGUUGAGUAAGGAGCCAAA (SEQ ID NO :30),

[0022] GCUCUCAGAGGUCCAGUA (SEQ ID NO :31),

- [0023] GGUUUCAGAAUCGCCGCAU (SEQ ID NO :32),
[0024] UCAGAAUCGCCGCAUGAAA (SEQ ID NO :33),
[0025] UCGCCGCAUGAAACACAAA (SEQ ID NO :34),
[0026] GCCGCAUGAAACACAAACG (SEQ ID NO :35),
[0027] GCAUGAAACACAAACGGCA (SEQ ID NO :36),
[0028] GCUUUCUACUCAACGUCUU (SEQ ID NO :37),
[0029] UCUCUGCCAAGUGGCACAA (SEQ ID NO :38),
[0030] GGACUCAGUUGUUCUGUUU (SEQ ID NO :39),
[0031] CCCGGCCUGAGAAUUAUU (SEQ ID NO :40),
[0032] CCGGCCUGAGAAUUAUUU (SEQ ID NO :41),
[0033] GGUCAGUGAACAGAGUCA (SEQ ID NO :42),
[0034] GCAGAAGUGGGCUUGUCAU (SEQ ID NO :43),
[0035] GCAGGUGUGUUUAUAGCGU (SEQ ID NO :44),
[0036] GGAAAGCAGGAGGGAACAA (SEQ ID NO :45),
[0037] GCGUUGAUGGACCGUUCUU (SEQ ID NO :46),
[0038] CCUGACUGCGUGCAUGAAA (SEQ ID NO :47), 或
[0039] GCCUGGACAGCACUGAUUU (SEQ ID NO :48) 或
[0040] 其对应的 DNA 形式, 即
[0041] TTCAGAATCGCCGCATGAAACACAAACGG (SEQ ID NO :12),
[0042] TCTACTCAACGTCTTCTGGCCTTGCCAAT (SEQ ID NO :13),
[0043] CAAATCTGCCTGCGCCGAGAGGACCATG (SEQ ID NO :14),
[0044] GGTGAGTAAGGAGCCAAATACCTTGCGG (SEQ ID NO :15),
[0045] CGGGTTGAGTAAGGAGCCAAATA (SEQ ID NO :16),
[0046] CCGCATGAAACACAAACGGCAAA (SEQ ID NO :17),
[0047] CCCCAGCTTTCTACTCAACGTCT (SEQ ID NO :18),
[0048] GGGTTGAGTAAGGAGCCAA (SEQ ID NO :49),
[0049] GGTGAGTAAGGAGCCAAA (SEQ ID NO :50),
[0050] GCTCTCAGAGGTCCAGATA (SEQ ID NO :51),
[0051] GGTTTCAGAATCGCCGCAT (SEQ ID NO :52),
[0052] TCAGAATCGCCGCATGAAA (SEQ ID NO :53),
[0053] TCGCCGCATGAAACACAAA (SEQ ID NO :54),
[0054] GCCGCATGAAACACAAACG (SEQ ID NO :55),
[0055] GCATGAAACACAAACGGCA (SEQ ID NO :56),
[0056] GCTTTCTACTCAACGTCTT (SEQ ID NO :57),
[0057] TCTCTGCCAAGTGGCACAA (SEQ ID NO :58),
[0058] GGACTCAGTTGTTCTGTTT (SEQ ID NO :59),
[0059] CCCGGCCCTGAGAATATAT (SEQ ID NO :60),
[0060] CCGGCCCTGAGAATATATT (SEQ ID NO :61),
[0061] GGTCAGTGAACAGAGTCAA (SEQ ID NO :62),

[0062] GCAGAAGTGGGCTTGTCAT (SEQ ID NO :63),

[0063] GCAGGTGTGTTTATAGCGT (SEQ ID NO :64),

[0064] GGAAAGCAGGAGGGAACAA (SEQ ID NO :45),

[0065] GCGTTGATGGACCGTTCTT (SEQ ID NO :65),

[0066] CCTGACTGCGTGCATGAAA (SEQ ID NO :66), 或

[0067] GCCTGGACAGCACTGATTT (SEQ ID NO :67)。

[0068] 所述 iRNA 试剂还可以包含第二链, 所述第二链具有与所述第一序列互补的第二核苷酸序列。

[0069] 本发明的另一个方面涉及诊断受试者中原发性或继发性骨髓衰竭综合征 (bone marrow failure syndrome) (BMFS) 的方法。所述方法包括两个步骤: (1) 从受试者中获得包含 HSC 的生物样品, 和 (2) 确定在 HSC 中编码 VentX 的基因的表达水平。如果该表达水平高于不具有 BMFS 的对照中的表达水平, 则确定所述受试者具有 BMFS。原发性或继发性 BMFS 可以是贫血, 脊髓发育不良综合征, 通过生物方式 (例如, 由病毒)、通过物理方式 (例如通过辐射)、通过化学方式 (例如, 通过毒素和化疗剂) 或通过环境 (例如, 通过污染) 导致的骨髓损伤。

[0070] 在又一个方面, 本发明涉及治疗原发性或继发性骨髓衰竭综合征的方法。所述方法包括三个步骤: (1) 从患有原发性或继发性骨髓衰竭综合征的受试者中分离 HSC, (2) 使 HSC 与抑制 VentX 多肽表达或活性的试剂接触, 由此增加 HSC 的扩增, 和 (3) 向所述受试者施用有效量的已经经过扩增的 HSC。所述分离步骤可以通过从受试者中获得包含 HSC 的生物样品并且从所述生物样品中收集 HSC 来进行。原发性或继发性骨髓衰竭综合征可以是贫血、脊髓发育不良综合征, 或化学疗法或放射疗法的并发症。

[0071] 在下面阐述本发明的一个或多个实例的细节。本发明的其他特征或优势将通过下面一些实施方案的详细描述以及后附的权利要求而变得明显。

[0072] 发明详述

[0073] VentX, 一种人同源异型框转录因子, 是经典 Wnt 信号传导的一种新的拮抗剂。VentX 分别具有 SEQ ID NO :1 和 4 的氨基酸和核苷酸序列 (下面显示)。

[0074] VentX 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :1) :

[0075] mrlsspprg pqlssfgsv dwlsqsscsg pthtprpadf slgslpgpgq tsgareppqa vsikeaagss nlpapertma glskepntlr aprvrtaftm eqvrtlegvf qhhqylsple rkr laremql sevqi ktwfq nrrmkhkrqm qdpqlhspfs gslhappafy stssglangl qllepwapls gpqalmlppg sfwglcqvaa ealasagasc cgqplashpp tgrprslgpa lstgprglca mpqtgdaf (Underlined : aa. 91-151/homeodomain, SEQ ID NO :3)

[0076] VentX 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :4) :

[0077] acctggccgc catgcgcctc tectectccc cacctcgtgg cccgcagcag ctctccagct

[0078] ttggctccgt ggactggctc tccagagca gctgctcagg gccgaccac acccccagge

[0079] ctgccgactt ctccctgggg agcctccctg gccagggcca gacatccggc gcccgggagc

[0080] cccctcagge cgtcagcacc aaggaggccg ccgggtcctc aaatctgcct gcgccggaga

[0081] ggaccatggc cgggttgagt aaggagccaa ataccttgcg ggccccccgt gtccgcacag

[0082] ccttcacat ggagcaggtc cgcaccttgg agggcgtctt ccagcaccac cagtacctga

[0083] gccctctgga gcggaagagg ctggccaggg agatgcagct ctcagaggte cagataaaaa
[0084] cctggtttca gaategccgc atgaaacaca aacggcaaat gcaggacccc cagctgcaca
[0085] gccccttctc ggggtctctc catgcgcccc cagctttcta ctcaacgtct tctggccttg
[0086] ccaatggcct gcagctgctg tgcccttggg caccctgtc cgggccccag gctctgatgc
[0087] tgccccctgg ctcttctgg ggtctctgcc aagtggcaca agaggccctg gcctctgcgg
[0088] gagcttcctg ctgcgggcag cctctggcgt cccaccccc taccacaggc cggccttcgc
[0089] tgggaccagc cctgtccacg gggccccggg gcctgtgtgc tatgccacag acgggggatg
[0090] cattttgagg aggcacctct gactcccaca ctgcgggtct tgctgatcgc acctggctcc
[0091] tacctggagg actcagttgt tctgtttaca tcttgggtgc acctctcacc ctgaccaca
[0092] caaagttct ggagattact ggagaatata tataaatata tatatgtacg tatatatgta
[0093] aatacacata tacgtatata taaatatata tatacatatg tgttgtata tatatatata
[0094] tttttttttt tttttttttt tttgagacgg agtgttctc tgtaaccag gctggagtgc
[0095] aatgacgcaa tctcggtca ctgcaacctc cgcctcctgg gttcaagcga ttctccagcc
[0096] tcagcctccc gagtagctgg gattacagac acccgccc accgcccggct aatttttct
[0097] atttttagta gaaatggggt ttcacatgt tagccaggct ggtctcaaac tctgacct
[0098] gtgatccgcc cgcctcgccc tcccaagtgc ctgggattac aggcatgagc cactgcaccc
[0099] ggccctgaga atatatttat taaagccacc tcttactga aagttaccga aagagtcggt
[0100] ttaggaagga aacgaagggt cagtgaacag agtcaaatgc agaagtgggc ttgtcatggg
[0101] tagggcttcc ggcgtacgat aaaaggatca tttgtttttt aaaaggggtt ggaaaaactg
[0102] gttttccagt tggaaacagt aaaggttgta agctttgtgt gtacaaaaga aacagggaa
[0103] tgcaggtgtg tttatagcgt tgtggttcaa gtccctctta acaagaactc caaagctgga
[0104] aagcaggagg gaacaaaggt gaacatgaag gcgaggatgc tggggccctg cagtgcgctc
[0105] taggctgtgc gtgagccggg actgtaccca cagcttgctg agggtgctc ttcttgggcc
[0106] agggaaagca gggcagccgg gacctgcggc tgtgcctgga ctgaagctgt cccgcagtc
[0107] cccacctcc aacacgtgct cacctgtccc cctcctcga gcagcctcgg gacaaaacaa
[0108] tgactcaagg acagcacttc tcgagaagg tctggaagtg cccagaatgg gaggcacgga
[0109] agccccccc ggggaggact cccgcgttga tggaccgttc ttggtgcaga ctctgactg
[0110] cgtgcatgaa acctgagaca agtgaattc cttccatgtc gccccagagt gccagggagg
[0111] caggcagtgc ggggtgccc ggcagacggg ttcagcctgc agaactggag gcgacctgtg
[0112] aaaccaccc gggcaccca acaggaacag aagcgtggc ctgcggctgc gtccccagcg
[0113] agtttactt tccccttgcgt cgtttctccc ttgttgtaag tgtttacaac tgcatgtgc
[0114] ttttaaacgt caggtaagag gggaacagct gctgtacatc gtccctggcga gtgacaatgt
[0115] gacagaagcc tgggcgagc cctcggagg cagcagctgg acaggggcta ctgggtttgg
[0116] cctggacagc actgatttgt ggatgtggat gggggcacgt tgtccgtgat aaaagtacaa
[0117] gtgccctca caaaaaaaaa aaaaaaaaa(带下划线部分:编码序列 nt12至788,SEQ ID
NO.:2)

[0118] VentX 是脊椎动物非洲爪蟾 (*Xenopus*) 的 BMP4 信号传导途径的同源异型框蛋白 Xom 的人同源物。其是一种新的 LEF/TCF- 相关的 Wnt 阻遏物和推定的肿瘤阻抑物。而且, 其控制参与细胞增殖和分化的关键基因, 如 p53/p16 和 c-myc 的表达。

[0119] VentX 在造血细胞的所有谱系中在调节下表达,并且其表达出人意料地以相反方式与 HSC 的克隆发生和扩增相关。因此,增加 HSC 的扩增的方法在本发明的范围之内,所述方法包括离体瞬时抑制人 HSC 中的 VentX 的步骤。

[0120] VentX 的抑制剂包括 iRNA 试剂、反义 RNA (asRNA)、核酶和抗体。

[0121] iRNA 试剂,例如双链短-干扰 RNA (siRNA),短的发夹 RNA (shRNA),或单链微小 RNA (miRNA),导致特异性 mRNAs 的催化降解。其可以用于降低或抑制基因表达。其具有与靶 RNA 充分的序列互补性从而通过 RNA 干扰 (RNAi) 诱导靶 RNA 的降解,所述 RNA 干扰是一种序列-特异性或选择性方法,通过所述方法靶分子(例如,靶基因,蛋白或 RNA)被下调。iRNA 试剂也可以是可转录为 RNA 的 DNA。

[0122] 也可以使用通过与 RNAi 相关的机制发挥功能的其他这样的分子,包括化学修饰的 siRNAs 和载体驱动的发夹 RNA 的表达,所述发夹 RNA 被切割为 siRNA。

[0123] 在本文中使用的核酸分子或构建体包括 dsRNA(例如, siRNA)分子,其在每条链中包括 16-30 个核苷酸,其中一条链与 VentX 的 mRNA 中的靶标区域基本上相同,例如至少 80%(或更多,例如 85%,90%,95%,或 100%)相同,例如具有 3,2,1,或 0 个错配的核苷酸,具有 SEQ ID NO:4 的互补 DNA 序列,并且另一条链与第一条链互补。dsRNA 分子可以是化学合成的,可以在体外从 DNA 模板转录,或可以在体内从例如 shRNA 转录。

[0124] 反义核酸用于抑制 VentX。所述反义核酸分子是这样的核酸分子,其核苷酸序列与编码 VentX 的 mRNA 的全部或部分互补。反义核酸分子可以对编码本发明的多肽的核苷酸序列的编码链的非编码区的全部或部分为反义的。非编码区("5' 和 3' 非翻译区")是侧邻编码区的 5' 和 3' 序列并且不被翻译为氨基酸。

[0125] 术语"RNA"或"RNA 分子"或"核糖核酸分子"指核糖核苷酸的聚合物。术语"DNA"或"DNA 分子"或"脱氧核糖核酸分子"指脱氧核糖核苷酸的聚合物。DNA 和 RNA 可以是天然合成的(例如,分别通过 DNA 复制或 DNA 转录)。RNA 可以是转录后修饰的。DNA 和 RNA 也可以是化学合成的。DNA 和 RNA 可以是单链的(即,分别是 ssRNA 和 ssDNA)或多链的(例如双链,即分别是 dsRNA 和 dsDNA)。

[0126] 多核苷酸可以通过下述方式进行施用:直接注射"裸"核酸分子(美国专利 5,679,647)或与一种或多种其他试剂一起配制在组合物中的核酸分子,所述试剂促进细胞对核酸分子的摄取,如皂苷类(见,例如美国专利 5,739,118)或阳离子多胺(见,例如美国专利 5,837,533);微粒轰击(例如,通过使用"基因枪";BioListic, Dupont);用脂质,细胞表面受体或转染剂包被核酸分子;在脂质体、微粒或微胶囊中包封核酸分子;施用与已知进入细胞核的肽连接的核酸分子;或施用与经受体-介导的内吞作用的配体相连的核酸分子,其可以用于靶向特异性表达所述受体的细胞类型。备选地,可以制备分子缀合物,所述分子缀合物由与聚-L-赖氨酸通过静电力或共价力连接的质粒或其他载体组成。聚-L-赖氨酸与配体结合,所述配体可以与靶细胞上的受体结合(Cristiano, et al., 1995, J. Mol. Med. 73:479)。

[0127] 可以形成核酸-配体复合物,其中所述配体包括融合病毒肽以破坏内体,允许核酸避免溶菌酶降解;或核酸分子可以被靶向以进行细胞特异性摄取并通过靶向特异性受体而在体内表达。此外,在美国专利 6,265,167 中描述在细胞核中引入、表达和聚集反义寡核苷酸的有效方法,其允许反义寡核苷酸与细胞核中的有义 mRNA 杂交并由此阻止反义寡核

苷酸被加工或转运到细胞质中。本发明还预期在细胞内引入核酸分子并且随后整合到宿主细胞 DNA 中,从而通过本领域已知的同源重组进行表达。

[0128] 多核苷酸也可以整合到适合的表达载体中。本领域中已知许多适合于基因治疗应用的载体(见,例如,病毒载体:基础科学和基因治疗(Viral Vectors:Basic Science and Gene Therapy),Eaton Publishing Co.(2000))。

[0129] 表达载体可以是质粒载体。产生和纯化质粒 DNA 的方法是快速和直接的。此外,质粒 DNA 典型地不整合到宿主细胞的基因组中,而是作为分离的实体维持在游离位置中,消除了染色体整合可能引起的基因毒性问题。许多质粒是目前容易商购的并且包括从大肠杆菌(*Escherichia coli*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)衍生的那些,其中有许多特别被设计用于哺乳动物系统。可以用在本发明中的质粒的实例包括,但不限于,真核表达载体 pRc/CMV(Invitrogen)、pCR2.1(Invitrogen)、pAd/CMV 和 pAd/TR5/GFPq(Massie 等,1998Cytotechnology 28:53-64)。在示例性实施方案中,质粒是 pRc/CMV、pRc/CMV2(Invitrogen)、pAdCMV5(IRB-NRC)、pcDNA3(Invitrogen)、pAdMLP5(IRB-NRC)、或 PVAX(Invitrogen)。

[0130] 表达载体可以是基于病毒的载体。基于病毒的载体的实例包括,但不限于,从复制缺陷型逆转录病毒、慢病毒、腺病毒和腺伴随病毒衍生的那些。逆转录病毒载体和腺伴随病毒载体目前是由于体内转移外源寡核苷酸或基因到特别是人中的选择的重组基因递送系统。这些载体提供基因向细胞的有效递送,并且转移的核酸被稳定地整合到宿主的染色体 DNA 中。应用逆转录病毒的主要前提条件是确保它们应用的安全性,特别是关于野生型病毒在细胞群体中传播的可能性。可以自其衍生逆转录病毒载体的逆转录病毒包括,但不限于,莫洛尼鼠白血病病毒、脾脏坏死病毒、劳斯肉瘤病毒、Harvey 肉瘤病毒、禽类白血病病毒、长臂猿白血病病毒、人免疫缺陷病毒、腺病毒、骨髓组织增生性肉瘤病毒和乳癌病毒。具体的逆转录病毒包括 pLJ, pZIP, pWE 和 pEM,这是本领域技术人员众所周知的。

[0131] siRNA, miRNA, 和 asRNA 分子可以通过本领域众所周知的方法设计。可以使用本领域已知的程序设计这些 RNA 分子,其同源性足以提供专门降解任何 RNA 所需要的序列特异性,所述程序包括在 Ambion, Inc. 和 Dharmacon, Inc(见, siDESIGN CENTER) 的网站上维护的那些和可在 mpibpc.gwdg.de/abteilungen/100/105/sirna.html 互联网上获得的“*The siRNA User Guide*(siRNA 使用者指南)”。用于优化 siRNA、miRNA 和 asRNA 序列的一些设计的种类的系统测试可以由本领域技术人员常规进行。设计短干扰核酸分子时的考虑因素包括生物物理、热力学和结构考虑因素,在有义链的特定位置的碱基偏好,和同源性。

[0132] 对 VentX 核酸序列具有特异性的核酶也可以用于抑制 VentX 表达。核酶是具有核糖核酸酶活性的催化 RNA 分子,其能够裂解单链核酸,如 mRNA,核酶对于所述单链核酸具有互补区。因此,核酶(例如,锤头核酶(在 Haselhoff 等,1988, Nature, 334:585-591)中描述)可以用于催化裂解 mRNA 转录物从而抑制所述 mRNA 编码的蛋白的翻译。本领域中已知设计并产生核酶的方法(见,例如 Scanlon,1999,核酶的治疗应用(Therapeutic Applications of Ribozymes), Humana Press)。可以基于 VentX cDNA 的核苷酸序列设计对于 VentX 核酸分子或其片段具有特异性的核酶。

[0133] 可以通过用 VentX 多肽作为免疫原免疫适合的受试者来制备抗体(多克隆和单克隆抗体)。另外,本文提供重组抗体,如嵌合和人源化单克隆抗体,包括人和非人部分,

其可以使用标准重组 DNA 技术进行制备。可以通过本领域已知的重组 DNA 技术制备这些嵌合的和人源化的单克隆抗体,例如使用在下述文献中描述的方法:W087/02671;欧洲专利申请 184,187;欧洲专利申请 171,496;欧洲专利申请 173,494;W086/01533;美国专利号 4,816,567;欧洲专利申请 125,023;Better 等, *Science* (科学), 240:1041-1043, 1988;Liu 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (美国国家科学院学报) 84:3439-3443, 1987;Liu 等, *J. Immunol.* (免疫学杂志), 139:3521-3526, 1987;Sun 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (美国国家科学院学报), 84:214-218, 1987;Nishimura 等, *Canc. Res.* (癌症研究), 47:999-1005, 1987;Wood 等, *Nature* (自然), 314:446-449, 1985;和 Shaw 等, *J. Natl. Cancer Inst.*, 80:1553-1559, 1988;Morrison, *Science* (科学), 229:1202-1207, 1985;Oi 等, *Bio/Techniques*, 4:214, 1986;美国专利号 5,225,539;Jones 等, *Nature* (自然), 321:552-525, 1986;Verhoeyan 等, *Science* (科学), 239:1534, 1988;和 Beidler 等, *J. Immunol.* (免疫学杂志), 141:4053-4060, 1988。

[0134] 诊断受试者中原发性或继发性 BMFS 的方法和在经过对应治疗的受试者中评估原发性或继发性 BMFS 的预后的方法也在本发明的范围内。两种方法都包括两个步骤:(1) 从受试者中获得生物样品,和 (2) 确定编码 VentX 的基因在生物样品中的表达水平。如果该表达水平高于不具有 BMFS 的对照中的表达水平,则确定所述受试者具有 BMFS。如果在治疗后所述表达水平降低,则确定受试者具有良好的预后,或如果在治疗后所述表达水平没有降低,那么受试者具有较差的预后。

[0135] 可以通过从测试的受试者中获得测试样品并且使所述测试样品与能够检测 VentX 多肽或核酸的化合物或试剂(例如, mRNA 或基因组 DNA 探针)接触来评估 VentX 多肽或核酸在测试样品中的水平。“测试样品”包括从受试者中分离的组织、细胞和生物学流体以及受试者中存在的组织、细胞和流体。VentX 基因的表达水平可以通过许多方法进行测量,所述方法包括:测量由 VentX 基因编码的 mRNA;测量由 VentX 基因编码的多肽的量;或测量由 VentX 基因编码的多肽的活性。

[0136] 可以通过原位和通过体外形式确定细胞中对应于 VentX 基因的 mRNA 的水平。可以将测试样品中分离的 mRNA 用于杂交或扩增测定法,包括 Southern 分析或 Northern 分析, PCR 分析和探针测定法。用于检测 mRNA 水平的一种优选的诊断方法包括将分离的 mRNA 与核酸探针接触,所述核酸探针可以与由 VentX 基因编码的 mRNA 杂交。所述探针可以是全长 VentX 核酸,如 SEQ ID NO:4 的核酸或其部分,如长度为至少 10 个核苷酸并且足以在严格条件下与 VentX mRNA 或基因组 DNA 特异性杂交的寡核苷酸。

[0137] 在一种形式中,例如通过在琼脂糖凝胶上将分离的 mRNA 跑胶(run)并将来自所述凝胶的 mRNA 转移到膜上(如硝酸纤维素膜),将 mRNA(或由其制备的 cDNA)固定在表面上并且与探针接触。在另一种形式中,将所述探针固定在表面并使所述 mRNA(或 cDNA)与探针(例如在基因芯片阵列中)接触。技术人员可以采取已知的 mRNA 检测方法用于检测由 VentX 基因编码的 mRNA 的水平。

[0138] 可以利用核酸扩增,例如通过标准 PCR(美国专利号 4,683,202), RT-PCR(Bustin S. *J. Mol. Endocrinol.* 25:169-93, 2000), 定量 PCR(Ong Y. 等 *Hematology.* 7:59-67, 2002), 实时 PCR(Ginzinger D. *Exp. Hematol.* 30:503-12, 2002), 和原位 PCR(Thaker V. *Methods Mol. Biol.* 115:379-402, 1999), 或任何其它核酸扩增方法,随后使用本领域已知的技术检

测扩增的分子来评估由 VentX 基因编码的样品中的 mRNA (或由其制备的 cDNA) 的水平。如本文中使用的, 将扩增引物定义为一对核酸分子, 其可以与基因 (分别地, 正链和负链或反之亦然) 的 5' 或 3' 区域退火并且包含两者之间的短区域。在适合的条件并且使用适合的试剂, 所述引物允许扩增包含引物侧邻的核苷酸序列的核酸分子。

[0139] 对于原位方法, 细胞或组织样品可以在载体 (如玻璃载玻片) 上制备和固定, 并且接着与探针接触, 所述探针可以与编码 VentX 多肽的染色体上的基因组 DNA 或 mRNA 接触。

[0140] 在另一个实施方案中, 本发明的方法还包括使对照样品与能够检测 VentX mRNA, 或基因组 DNA 的化合物或试剂接触, 并且对 VentX mRNA 或基因组 DNA 在对照样品中的存在和 VentX mRNA 或基因组 DNA 在测试样品中的存在进行比较。

[0141] 上述基于核酸的诊断方法可以提供定性和定量信息以确定受试者是否具有或易于患有与异常 VentX 基因表达相关的疾病, 例如 BMFS。

[0142] 可以使用许多方法来确定 VentX 多肽的水平。一般地, 这些方法包括接触选择性结合于所述多肽的试剂, 如抗体, 以评估样品中多肽的水平。抗体可以是多克隆抗体, 或更优选地单克隆抗体。也可以使用完整的抗体, 或其片段 (例如, Fab 或 F(ab')₂)。在优选的实施方案中, 抗体具有可检测的标记。关于探针或抗体, 术语“标记的”意欲包括通过将可检测的物质物理上连接于探针或抗体来直接标记探针或抗体, 以及通过与可检测物质的反应性间接标记探针或抗体。例如, 可以使用针对兔 Fc 区域的第二抗体来间接标记具有兔 Fc 区域的抗体, 其中所述第二抗体与可检测的物质偶联。本文提供可检测物质的实例。适合的可检测物质或标记包括放射性同位素 (例如, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ³H, 或 ³²P), 酶 (例如, 碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光素酶或 β-半乳糖苷酶), 荧光结构部分或蛋白 (例如, 荧光素、罗丹明、藻红蛋白、GFP 或 BFP), 或发光结构部分 (例如, 由 Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA 提供的 Qdot™ 纳米颗粒)。

[0143] 检测方法可以用于在体外以及体内检测生物样品中的 VentX 多肽。用于检测 VentX 多肽的体外技术包括 ELISAs、免疫沉淀、免疫荧光、EIA、RIA 和蛋白质印迹分析。用于检测 VentX 多肽的体内技术包括将标记的抗-VentX 抗体引入受试者。例如, 可以用上述可检测的物质标记抗体。可以通过标准的成像技术检测可检测物质在受试者中的存在和定位。

[0144] 本文所述的诊断方法可以鉴定具有或有风险发展与异常 VentX 表达或活性相关的疾病或病症的受试者。

[0145] 本文所述的预后测定法可以用于确定是否适合给受试者施用试剂 (例如, 激动剂、拮抗剂、肽模拟物、蛋白、肽、核酸、小分子或其他候选药物) 以治疗 BMFS。

[0146] 本发明还涉及监视受试者中的 BMFS 治疗的方法。为此目的, 可以在进行治疗之前、过程中或之后确定受试者的测试样品中的 VentX 的基因表达水平。在治疗后 VentX 的表达水平的增加说明受试者可以进一步通过相同的治疗进行治疗。

[0147] 从上述诊断测定法的实践中获得的信息可用于预测影响个体健康状况的疾病和其他有害病症、鉴定影响个体健康状况的疾病和其他有害病症的进展和对其进行临床管理。在优选的实施方案中, 前述诊断测定法提供用于预测特征在于高水平的 VentX 表达的 BMFS、鉴定特征在于高水平的 VentX 表达的 BMFS 的进展和对其进行管理的信息。

[0148] “受试者”指人和非人动物。可以从其中获得上述 HSC 的非人的实例包括, 但不限

于,灵长类动物、狗、啮齿类动物、豚鼠、猫、马、牛、羊和猪。事实上,考虑所有宠物动物、农场动物、实验动物和疾病模型动物。在优选的实施方案中,受试者是人。在另一个实施方案中,受试者是实验动物或疾病模型动物。

[0149] 本发明还涉及用有效量以上述方式制备的扩增的HSC或有效量的抑制VentX多肽的表达或活性的试剂治疗与HSC中的异常高水平的VentX多肽相关的疾病的方法。这些疾病包括原发性或继发性BMSF,贫血(例如,难治性贫血)、脊髓发育不良综合征(例如,细胞减少的脊髓发育不良综合征)、造血系统的恶性肿瘤(例如白血病和淋巴瘤),和通过生物方式(例如,通过病毒),通过物理方式(例如,通过辐射),通过化学方式(例如,通过毒素和抗癌化疗剂)或通过环境(例如,通过污染)导致的骨髓损伤。

[0150] “治疗(treating)”或“治疗(treatment)”指向患有疾病(例如,贫血和脊髓发育不良综合征)的受试者施用包含试剂(其抑制VentX的表达或活性)的组合物或包含用所述试剂预处理的HSC的组合物,其目的是治愈疾病、减轻疾病、缓解疾病、治疗疾病、延缓疾病的发作,或改善疾病、疾病的症状,疾病继发的疾病状态或对于所述疾病的倾向。

[0151] “有效量”指在治疗的受试者中能够产生医疗上合乎需要的结果(例如如上所述)的组合物。治疗可以单独地或与其他药物或疗法一起组合地在体内或离体进行。实际的药物有效量可以根据使用的具体药物或其组合,配制的特定组合物,给药方式,和患者的年龄、体重、疾病和待治疗的症状或疾病的严重性而变化。可以使用常规考虑因素(例如通过适合的常规药物手册)由本领域普通技术人员确定关于具体患者的剂量。

[0152] 可以将一种或多种上述组合物施用于动物(例如,人)以调节VentX或其同源物的表达或活性。内科医师可以例如首先开出相对低剂量的处方,随后增加所述剂量直到获得适合的反应。此外,要理解对于任何具体的受试者,具体的剂量水平将取决于多种因素,所述因素包括使用的具体试剂的活性,受试者的年龄、体重、一般健康、性别和饮食,给药时间,给药途径,排泄速率,任何药物组合和待调节的表达或活性的程度。

[0153] 治疗的功效可以通过测量靶基因mRNA的量(例如使用实时PCR)或由靶基因mRNA编码的多肽的量(蛋白印迹分析)来监视。如本领域公知,用于患者的剂量取决于上述多种因素。剂量会变化,但是用于施用多核苷酸的优选剂量是约 10^6 - 10^{12} 拷贝的多核苷酸分子。该剂量可以根据需要重复施用。

[0154] 多核苷酸可以在任何水性载体、赋形剂或溶液中制备从而提供药学上适合于体内施用的组合物。制备水溶液的方法是本领域普通技术人员公知的。优选地,水溶液是水、包含盐和/或缓冲剂的生理上可接受的水溶液,如磷酸缓冲盐水(PBS),或适合于施用给动物或人的任何其它水溶液/表面活性剂。所述溶液是本领域技术人员熟知的并且包括,但不限于,蒸馏水、去离子水、纯水或超纯水、盐水、PBS和包含与核酸相容的常用缓冲剂的溶液。所述组合物还可以包含氯化钠和葡萄糖或甘露糖醇以使溶液等渗。所述组合物可以包含适合的辅助成分,如pH、摩尔渗透压浓度和渗透压调节剂。

[0155] 可以使用本领域已知的聚合性生物可降解微粒,或微胶囊递送装置递送多核苷酸。实现多核苷酸摄取的另一方式是使用通过标准方法制备的脂质体。多核苷酸可以单独结合在这些递送赋形剂中或与组织特异性抗体共同结合在这些递送赋形剂中。此外,可以通过使用本领域已知的组织-特异性转录调节元件来获得组织特异性靶向。

[0156] 可以肠胃外施用多核苷酸。术语“肠胃外”用于本文时指注射,如静脉内注射、动

脉内注射、髓内注射、骨内注射和鞘内注射,以及任何适合的输注技术。

[0157] 可以配制扩增的 HSC 用于施用给患者,例如通过解离细胞(例如通过机械解离)并将细胞与药用载体(例如磷酸缓冲盐溶液)紧密混合来进行。可以将它们通过注射或输注施用于个体。

[0158] 可以使用异源和自体 HSC。在前一种情形中,应该进行 HLA- 匹配从而避免或最小化宿主反应。在后一种情形中,从受试者富集并纯化自体细胞并将其贮存以用于随后的应用。可以在存在宿主或移植物 T 细胞时离体培养所述细胞并将其重新引入宿主中。其可以具有宿主将细胞识别为自身细胞并且更好地减少 T 细胞活性的优势。

[0159] 本发明提供包含试剂(其抑制 VentX 的表达或活性)的药物组合物或包含用所述试剂预处理的 HSC 的组合物。可以通过将治疗有效量的活性剂或 HSC 和任选地其他活性剂与药用载体混合来制备药物组合物。所述载体可以具有不同的形式,这取决于给药途径。其他活性剂的实例包括已知扩增 HSC 的活性化合物。

[0160] 可以使用常规药物赋形剂和制备方法来制备上述药物组合物。所有的赋形剂可以与崩解剂、溶剂、成粒剂、湿润剂和粘合剂混合。

[0161] 短语“药用”指所述组合物的分子实体和其他成分,其是可生理耐受的并且典型地当施用于人时不产生不需要的反应。优选地,术语“药用”意为由联邦政府或州政府的管理机构批准或在美国药典或其他公知药典(用于哺乳动物,更具体地人)中列出的。药用盐、酯、酰胺和前药指那些盐(例如羧酸盐,氨基酸加成盐)、酯、酰胺和前药,其在合理医疗判断的范围内,适合用于与患者的组织接触而不会有过度毒性、刺激、变应性反应等,与合理的益处/风险比率相当,并且对于它们的意欲应用是有效的。

[0162] 应用于上述药物组合物中的载体指与化合物一起施用的稀释剂、赋形剂或载体。所述药物载体可以是无菌液体,如水和油。优选地将水或水溶液、盐水溶液和水性右旋糖和甘油溶液用作载体,特别用于注射液的载体。在 E. W. Martin " Remington ' s Pharmaceutical Sciences (雷明顿药物科学)", 第 18 版中描述了适合的药物载体。

[0163] 剂量和给药频率将取决于临床征象,所述临床征象证实缓解期维持,本领域技术人员已知的急性期的至少一种或多种、优选地超过一种的临床征象减少或不存在。更一般地,剂量和频率将部分取决于预期用上述组合物治疗的疾病病症或障碍的病理征象以及临床和亚临床症状的缓解。可以根据被施用者的年龄、性别、身体状况以及缀合物的益处和在待治疗的患者或哺乳动物受试者中的副作用以及医师的判断来调节剂量和给药方案,如本领域技术人员所理解的。

[0164] 最后,本发明涉及递送基因以通过基因疗法治疗免疫或代谢疾病的方法。可以使用本文所述的 HSC 来表达外源重组多肽。因此,包含重组核酸的这样的 HSC 也在本发明的范围内。重组核酸可以编码多肽并且 HSC 可以包含编码所述多肽的 mRNA。

[0165] 因此,本发明涉及在受试者中引入异源核酸的方法。所述方法包括:扩增并且转染 HSC 的步骤,其中至少一种 HSC 包括异源核酸;以及将所述细胞施用到需要其的受试者中。异源核酸编码目的多肽。

[0166] 术语“异源的”是相对术语,当关于核酸部分使用时,其指核酸包含两种以上的子序列,所述子序列在自然界中未发现具有相同的相互关系。例如,重组产生的核酸典型地具有两种以上的来自不相关基因的序列,将其人为 (synthetically) 排列从而产生新的功能

核酸,所述序列是例如来自一种来源的启动子和来自另一种来源的编码区。因此,在这一背景下,这两种核酸是彼此异源的。当被加入细胞时,重组核酸对于细胞的内源基因也是异源的。因此,在染色体中,异源核酸包括整合到染色体中的非天然(非天然存在的)核酸,或非天然(非天然存在的)染色体外核酸。与此相对,染色体的天然易位片段在本专利申请的上下文中不被认为是异源的,因为其包含对于突变的细胞而言是天然的内源核酸序列。类似地,异源蛋白指蛋白包含两种以上的子序列,其在自然界中未发现具有相同的相互关系(例如,“融合蛋白”,其中两个子序列由单个核酸序列编码)。所述蛋白可以通过重组技术产生。

[0167] 当关于例如细胞、核酸、蛋白或载体使用时,术语“重组”指通过引入异源核酸或蛋白或改变天然核酸或蛋白而修饰的细胞、核酸、蛋白或载体,或来自这样修饰的细胞的细胞。因此,例如重组细胞表达未在细胞的天然(天然存在)形式中发现的基因或表达第二拷贝的天然基因,其以另外的方式被正常表达或被异常表达,表达不足或根本不被表达。

[0168] 上述 HSC 和方法可以在本领域已知的多种基因治疗方法中使用。基因疗法包括离体和体内技术。具体地,上述 HSC 可以用寡核苷酸调节剂或编码所述调节剂的核酸分子离体遗传改造,接着将改造的细胞提供给待治疗的患者。可以例如通过解离细胞(例如,通过机械解离)并将所述细胞与药用载体(例如,磷酸缓冲盐水溶液)紧密混合来配制细胞培养物以用于施用于患者。改造的细胞典型地是自体的从而避免异种或同种异型排斥。所述离体方法是本领域众所周知的。

[0169] 可以通过使用上述技术施用多核苷酸来改造细胞。

[0170] 无需进一步阐释,认为本领域技术人员基于上述描述,可以将本发明利用到其最充分的程度。因此,下述具体实施方案仅被解释为是举例说明性的,并且不以任何方式限制本文公开内容余下的部分。

[0171] 将本文引用的所有出版物结合作为参考。

[0172] 实施例 1:在血细胞生成和红细胞生成期间调节 VentX 表达

[0173] 在机构 IRB 批准下,从布利甘-妇女医院(Brigham and Women's Hospital)获得取自在髌关节置换手术后被弃股骨头组织的骨髓(BW)样品。在 Ficoll 分离单核细胞后,使用磁性激活的细胞分选 CD34+ 祖细胞试剂盒(Miltenyi Biotec)来富集 CD34+ 细胞。如通过 Rizo 等,2008 所述的流式细胞术评估,BW CD34+ 细胞的纯度超过 95%。

[0174] 通过 TRIzol 方法分离总 RNA,并且根据生产商手册使用 SuperScript 第一链合成系统(SuperScript First-Strand Synthesis System, Invitrogen)将相同量的 RNA 用于第一链 cDNA 合成。为了确定 VentX mRNA 水平,接着将 cDNA 用于 VentX 的实时 PCR,引物为 5' -CCGTCAGCATCAAGGAGG-3' (SEQ ID NO:19)和 5' -CTGGACCTCTGAGAGCTGC-3' (SEQ ID NO:20)。还使用在 LightCycler® 480 系统上的 SYBR Green (480Real-Time PCR System; Roche) 进行实时 PCR。

[0175] 结果显示在红细胞成熟过程中 VentX 表达升高。更具体地,VentX 表达在 CD34+CD38- 细胞中可以忽略,而在 CD34+CD38+ 细胞中明显上调,并且在髓系的祖细胞(例如,巨核细胞-祖红细胞(MEPs)、粒细胞-巨噬细胞祖细胞(GMs)和常见的髓系祖细胞(CMPs))中进一步升高。在红细胞生成过程中 VentX 的升高的表达模式与其他血细胞生成过程(如淋巴细胞生成过程)中的那些相同。在上述三种不同的髓系子群(即 MEP,GM,和

CMP) 之间的 VentX 表达不存在显著不同。

[0176] **实施例 2**:VentX 离体调节人 HSC 的扩增

[0177] 如在实施例 1 中所述获得人 BW CD34⁺ 细胞。用基于慢病毒的 shRNA 方法敲减在这些细胞中的 VentX 表达。

[0178] 简而言之,将表达靶向 VentX 的 shRNA(pHAGE-shVentX) 的慢病毒载体 pHAGE-CMV-eGFPW 用于转导骨髓 CD34⁺ 细胞。该慢病毒载体包含内部核糖体进入位点 (IRES),其允许同时表达 GFP 以监视转导率或细胞分选。VentX shRNA 的相应 DNA 序列是 SEQ ID NO:12 或 14。

[0179] 将靶向 GFP 的无效序列 (pHAGE-shGFP) 用作对照。在 Dana-Farber/Harvard 癌症中心载体核心机构 (Dana-Farber/Harvard Cancer Center Vector Core Facility) 中进行慢病毒包装并且将病毒上清液以等分试样贮存在 -70°C 直到使用。首先,将 CD34⁺ 细胞在 IMDM 培养基中培养 2 天,接着在存在 4 μg/ml 的 1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物时,以感染复数 (MOI) 为 5 进行转导,所述培养基包含 10% FBS,干细胞因子 (SCF, 100ng/mL), Flt3 配体 (100ng/mL), 血小板生成素 (TPO, 100ng/mL), 白细胞介素 -3 (IL-3, 10ng/mL) 和 IL-6 (10ng/mL) (PeproTech)。在转导后 24 小时,通过 FACS Aria 高速分选仪 (BD Bioscience) 分选 GFP 阳性细胞 (Dana-Farber Cancer Institute Flow Cytometry Core Facility (Dana-Farber 癌症研究所流式细胞术核心机构))。

[0180] 通过将分选的 GFP 阳性 CD34⁺ 细胞 (1×10^4 /皿) 一式三份地接种在完全甲基纤维素培养基 (Methocult GF, H4434; Stem Cell Technologies) 中来进行关于体外集落-形成细胞 (CFCs) 的测定,所述培养基包含重组人细胞因子的混合物 (SCF, IL-3, GM-CSF, 和红细胞生成素)。在 37°C 温育 14 天后计数集落并根据规范的标准进行分类。

[0181] 对于长期培养启动细胞 (LTC-IC) 测定,在 96-孔板中以 30-900 个细胞/孔的有限稀释在 M2-10B4 鼠成纤维母细胞上分选转导的 GFP 阳性细胞。用新培养基每周一次进料给培养物。在培养 5 周后,将来自所述孔的所有细胞转移到 35mm 培养皿中的上述完全甲基纤维素培养基中。再培养 2 周后,将孔评价为阳性或阴性从而产生 LTC-IC 频率。

[0182] 结果显示 pHAGE-shVentX 和 pHAGE-shGFP 的转导率是约 20%。使用定量 PCR 方法,将在 pHAGE-shVentX-转导的 CD34⁺ 细胞中的 VentX 敲减的效率确定为约 30%。将阳性转导的细胞接种在补充有细胞因子的无基质液体培养物中并每周进行细胞数目计数,多达 4 周。从在将细胞培养 4 周后的三个独立实验的半-减少 (demi-depopulate) 培养物的每周细胞计数的绘图显示,在 CD34⁺ 细胞中的 VentX 表达的敲减导致与对照细胞相比细胞总数的 ~5-倍增加。

[0183] 如通过集落形成细胞 (CFC) 测定法确定, VentX 的敲减在形成 BFU-E/CFU-E, CFU-GM 和 CFU-G/CFU-M 集落时导致 ~2-倍增加。基于 CFC 测定法,子代细胞的总数增加约 ~3 倍。这种敲减促进所有谱系的造血细胞的扩增,尤其是红细胞谱系集落形成。一致地,在 shVentX 转导的 CD34⁺ 细胞中, LTC-IC 频率增加 ~3 倍。此外,这种敲减在离体液体培养物中导致 CD34⁺ 细胞百分比 30% 的增加。

[0184] 时程 FACS 分析揭示 VentX 的敲减有助于保持 CD34⁺ 细胞群体长达 4 周。其也增加最原始的 CD34⁺CD38⁻ 细胞的群体。总而言之, VentX 敲减有助于维持 CD34⁺ 细胞池并且促进 CD34⁺ 细胞扩增。

[0185] **实施例 3**:通过短干扰 RNA (siRNA) 瞬时敲减 VentX 促进 HSC 扩增

[0186] 如在实施例 1 中所述获得人 BW CD34⁺ 细胞。使用 siRNA 方法敲减在这些细胞中的 VentX 表达。更具体地,根据生产商的说明书,使用人 CD34⁺ 细胞 Nucleofector 试剂盒 (Lonza),通过电穿孔,将靶向 VentX 的短寡核苷酸,siVentX 转染到上述 BW CD34⁺ 细胞中。

[0187] 简言之,将 1×10^6 CD34⁺ 细胞分散到 100 μ l 含有 0.5nmol VentX siRNA (SEQ ID NO:5) 或无效 GFP siRNA 的 nucleofector 溶液中。使用 nucleofectorII 装置 (Lonza) 进行这些细胞的电穿孔。用 1ml 包含 10% FBS 和上述细胞因子的预温热的 IMDM 培养基将所述电穿孔的细胞温育过夜。

[0188] 基于定量 RT-PCR 的结果显示通过 siRNA 转染在 CD34⁺ 细胞中的 ~70% 的 VentX 敲减。与上述慢病毒-介导的方法的那些一致,在 2 周培养过程中,与 siGFP- 转染的细胞相比,CD34⁺ 细胞中瞬时敲减 VentX 也导致 ~2- 倍的 HSC 的扩增。同样地,siVentX- 转染的细胞显示 CD34⁺ 细胞百分比的增加。CFC 测定法也显示 VentX 的瞬时敲减导致 BFU-E/CFU-E 集落和 CFU-GM 集落形成以及子代细胞总数的 ~2- 倍增加。总而言之,这种 siRNA 方法与上述基于慢病毒的 shRNA 方法一样有效。

[0189] **实施例 4**:过量表达 VentX 阻断 CD34⁺ 细胞扩增

[0190] 如在实施例 1 中所述获得人 BW CD34⁺ 细胞。使用如上所述的人 CD34⁺ 细胞 Nucleofector 试剂盒 (Lonza),用 pCS2-GFP 或 pCS2-GFPVentX 质粒转染这些细胞。在转染 24 小时后,通过 FACS Aria 高速分选仪分选 GFP- 阳性细胞。

[0191] 结果显示 CD34⁺ 细胞的集落形成被 VentX 的加强表达大大消除。此外,通过过量表达 VentX,阻断了 StemRegenin1 (SR1)- 介导的人 CD34⁺ 细胞的扩增。

[0192] 注意 StemRegenin1 (SR1) 是芳烃受体拮抗剂。结果还显示 SR1 在 CD34⁺ 细胞中抑制 VentX 的表达并且增加这些 CD34⁺ 细胞的扩增。因此,需要下调 VentX 来扩增 CD34⁺ 细胞。

[0193] **实施例 5**:VentX 在体内调节 HSC 扩增

[0194] 为了确定 VentX 是否在体内促进 HSC 扩增,从 Jackson Laboratory 购买 8 周龄的 NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ 小鼠 (通常已知为 NOD scid gamma ;NSG),并将其维持在特定的无病原体的条件中。在移植之前,用 100Rads 的亚致死量照射小鼠。将约 1×10^6 CD34⁺ 细胞用 VentX 或 GFP shRNA 慢病毒转导。在转导后 24h,将所有的细胞 (1×10^6 , 具有 ~20% GFP 阳性细胞) 或阳性转导的细胞 (2×10^4 , 所有为 GFP 阳性) 注射到受体小鼠中。用从受体小鼠的骨髓的 FACS 分析人 CD45⁺ 细胞。对于再次移植,将嵌合的原代受体小鼠的骨髓注射到第二受体 NSG 小鼠中,而无需进一步纯化人细胞。

[0195] 结果显示与用 shGFP 转导的 CD34⁺ 细胞相比,人细胞的移植率在 shVentX 转导的 CD34⁺ 细胞中增加约 1.5 ~ 2- 倍。明显地, VentX 的敲减允许所有的造血细胞谱系发育。与其他谱系相比,髓系 (CD14⁺ 细胞) 的发育看上去稍微受损。

[0196] 考虑到 CD34⁺ 细胞的慢病毒转导率仅是约 20%,为了进一步研究 VentX 敲减对 HSC 的扩增的作用,纯化阳性转导的 CD34⁺ 细胞,并接着将其移植到 NSG 小鼠中。移植后第 13 周,通过 FACS 分析确定人 CD45⁺ 细胞的百分比。令人惊奇的是,与用 shGFP 转导的 CD34⁺ 细胞相比,在 shVentX 转导的 CD34⁺ 细胞中,人 CD45⁺ 细胞的百分比增加多达 20 倍。

[0197] 为了检查 VentX 对人 CD34⁺ 细胞长期移植的作用,进行再次移植实验。具有对照

shGFP 转导的 CD34+ 细胞的小鼠没有显示可检测的再次移植,而具有 shVentX 转导的 CD34+ 细胞的两只小鼠显示阳性人细胞移植(分别为 0.25%和 0.28%)

[0198] 实施例 6:VentX 靶向 CD34+ 细胞中的细胞周期调节物

[0199] VentX 是 Wnt 信号传导途径以及细胞周期体系(machinery)的一些成分(如细胞周期蛋白 D1、p21 和 p16^{ink4a})的调节物。用下述引物使用定量 PCR 确定 p21, p16^{ink4a}, C-myc, 和细胞周期蛋白 D1 的水平:

[0200] p21 :5' -AAACTTTGGAGTCCCCTCAC-3' (SEQ ID NO :21) 和

[0201] 5' -AAAGGCTCAACACTGAGACG-3' (SEQ ID NO :22);

[0202] p16 :5' -CTTCCCCACTACCGTAAAT-3' (SEQ ID NO :23) 和

[0203] 5' -TGCTCACTCCAGAAAACCTCC-3' (SEQ ID NO :24);

[0204] C-myc :5' -CAGCTGCTTAGACGCTGGATT-3' (SEQ ID NO :25) 和

[0205] 5' -GTAGAAATACGGCTGCACCGA-3' ;(SEQ ID NO :26) 和

[0206] 细胞周期蛋白 D1 :5' -GTTCGTGGCCTCTAAGATG-3' (SEQ ID NO :27)

[0207] 和 5' -TTGTTCAACAGGAGCAGC-3' (SEQ ID NO :28)。

[0208] 结果显示 VentX 在 CD34+ 细胞中的过表达增加 p21 和 p16^{ink4a} 的表达,但是下调细胞周期蛋白 D1 和 C-myc 的表达。所述结果进一步由功能丧失(loss-of-function)方法证实,其中敲减 VentX 减少 p21 的表达,但是增加细胞周期蛋白 D1 和 C-myc 的表达。也基于 FACS 分析,敲减 VentX 增加细胞周期蛋白 D1 蛋白的水平。

[0209] 其它实施方案

[0210] 在本说明书中公开的所有特征可以以任何组合进行组合。在本说明书中公开的每个特征可以被服务于相同、等价或类似目的的备选特征替代。因此,除非另外特别指出,公开的每个特征仅是一系列等价或类似特征的实例。

[0211] 从上述说明书,本领域技术人员可以容易地确定本发明的基本特征,并且在不背离本发明实质和范围的前提下,可以对本发明做出各种变化和改进从而使其适用于不同的应用和条件。因此,其它实施方案也在权利要求的范围内。

专利名称(译)	扩增造血干细胞		
公开(公告)号	CN103415615A	公开(公告)日	2013-11-27
申请号	CN201180056428.2	申请日	2011-11-23
[标]申请(专利权)人(译)	高红		
申请(专利权)人(译)	高红		
当前申请(专利权)人(译)	高红		
[标]发明人	高红 朱正仑		
发明人	高红 朱正仑		
IPC分类号	C12N5/0789 C12N15/113 G01N33/53 A61K35/28		
CPC分类号	G01N2800/22 A61K31/519 C12N2501/415 G01N33/6893 A61K31/573 A61K31/5377 C12N5/0647 C12N15/113 C12N2501/405 C12N2310/11 C12N2310/14 C12N2501/60 G01N33/5073 G01N33/5091 A61K31/52 A61K35/28 A61P7/00 A61P7/06 A61P43/00 C12Q1/6881		
代理人(译)	吴小明		
优先权	61/417193 2010-11-24 US		
其他公开文献	CN103415615B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种扩增造血干细胞的方法。本发明还公开了一种诊断原发性或继发性骨髓衰竭综合征的方法。本发明还包括了治疗原发性或继发性骨髓衰竭综合征的方法。