



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105051184 B

(45)授权公告日 2018.08.10

(21)申请号 201480015604.1

(22)申请日 2014.01.15

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105051184 A

(43)申请公布日 2015.11.11

(30)优先权数据  
61/752,688 2013.01.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.09.15

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2014/011575 2014.01.15

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02014/113415 EN 2014.07.24

(73)专利权人 康奈尔大学  
地址 美国纽约州

(72)发明人 V·M·桑德勒 S·拉菲

(74)专利代理机构 北京市万慧达律师事务所  
11111  
代理人 戈晓美 白华胜

(51)Int.Cl.

C12N 5/02(2006.01)

C12N 5/071(2010.01)

C12N 5/0789(2010.01)

C12N 5/0775(2010.01)

C12N 5/078(2010.01)

A61K 35/14(2015.01)

A61P 7/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

(56)对比文件

US 20120129262 A1,2012.05.24,

Eva Szabo et al..Direct Conversion of Human Fibroblasts to multilineage blood progenitors.《Nature》.2010,第468卷第521-526页.

Kamonnaree Chotinantakul et al..Hematopoietic Stem Cell Development, Niches, and Signaling Pathways.《Bone Marrow Research》.2012,第1页摘要、左栏第1-2段,第6页图4.

审查员 陶冶

权利要求书2页 说明书20页 附图22页

(54)发明名称

通过给定的因子将人内皮细胞重编程为造血多系祖细胞

(57)摘要

本发明涉及通过影响在内皮细胞(EC)中的某些转录因子的强制表达以及在内皮饲养细胞存在下在无血清培养基中培养内皮细胞,来从内皮细胞生成造血多系祖细胞(HMLP)。按照本发明生成的造血多系祖细胞可以产生红系、淋巴、骨髓和巨核细胞。这些生成的造血多系祖细胞可用于对包括造血状况等疾病的治疗性处理中。

1. 一种从人内皮细胞 (EC) 产生人造血多系祖细胞 (HMLP) 的方法, 所述方法包括在有内皮饲养细胞的无血清培养基中培养内皮细胞, 所述内皮细胞表达以下每种转录因子: Finkel-Biskis-Jenkins 鼠骨肉瘤病毒致癌基因同源物 B (FOSB), 生长因子独立 1 转录抑制物 (GFI1), 侏儒相关转录因子 1 (RUNX1), 脾脏病灶形成病毒原病毒整合致癌基因 (SPI1), 所述内皮饲养细胞被转化以表达腺病毒 E4 开放阅读框 1 (E4ORF1) 基因或 Akt 基因之一。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述内皮细胞选自胎儿、新生儿、成人或内皮祖细胞。

3. 根据权利要求 2 所述的方法, 其中所述内皮细胞选自人脐带静脉内皮细胞 (HUVEC) 或成人皮肤微血管内皮细胞 (hDMEC)。

4. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述内皮饲养细胞是人脐带静脉内皮细胞 (HUVEC), 所述人脐带静脉内皮细胞 (HUVEC) 被转化以表达腺病毒 E4 开放阅读框 1 (E4ORF1) 基因或 Akt 基因之一。

5. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述内皮细胞被一个或多个载体转导, 所述载体驱动 FOSB、GFI1、RUNX1 和 SPI1 的表达。

6. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中所述载体中的至少一个还包括可选择的标记物。

7. 根据权利要求 6 所述的方法, 其中所述可选择的标记物是抗生素抗性标记物、酶标记物、表位标记物或可视标记物。

8. 根据权利要求 6 所述的方法, 其中在存在所述内皮饲养细胞的情况下进行培养之前, 通过选择表达至少一种可选择标记物的细胞, 根据 FOSB、GFI1、RUNX1 和/或 SPI1 的表达来富集所述内皮细胞。

9. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中 FOSB、GFI1、RUNX1 和 SPI1 中的一种或多种的所述表达为可诱导的。

10. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中 FOSB、GFI1、RUNX1 和 SPI1 中的一种或多种的所述表达为瞬时的。

11. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述人造血多系祖细胞可产生红系、淋巴、骨髓和巨核细胞。

12. 根据权利要求 1 所述的方法, 所述方法还包括基于 CD45<sup>+</sup> 细胞的选择来分离所述人造血多系祖细胞。

13. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述人造血多系祖细胞是 CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>。

14. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述人造血多系祖细胞包括细胞, 所述细胞是 CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> 或 CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>。

15. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述人造血多系祖细胞在移植进入接受者后分化成造血细胞。

16. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中培养所述内皮细胞至少五天以产生人造血多系祖细胞。

17. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中在内皮饲养细胞存在下在无血清造血培养基中生长所述内皮细胞, 所述培养基包括 bFGF、EGF、SCF、FLT3、TPO 和 IL-6。

18. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中所述培养基还包括 IGF-1、IGF-2 和 IL-3。

19. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中所述培养基是造血干细胞培养基。

20. 一种根据权利要求1所述的方法生产的人造血多系祖细胞群体,其中所述人造血多系祖细胞群体包含编码FOSB、GFI1、RUNX1和SPI1的一个或多个载体。

21. 一种组合物,所述组合物包括在药学上可接受的运载体中的通过根据权利要求1所述的方法生产的人造血多系祖细胞,其中所述人造血多系祖细胞包含编码FOSB、GFI1、RUNX1和SPI1的一个或多个载体。

22. 根据权利要求1所述的方法生产的人造血多系祖细胞在制备用于治疗造血功能疾病的药物中的用途,其中所述人造血多系祖细胞包含编码FOSB、GFI1、RUNX1和SPI1的一个或多个载体。

23. 根据权利要求22所述的用途,其中所述造血功能疾病选自白血病或淋巴瘤。

24. 根据权利要求22所述的用途,其中所述人造血多系祖细胞与接受者自体同源。

25. 根据权利要求22所述的用途,其中所述人造血多系祖细胞不会在接受者中引起恶变。

## 通过给定的因子将人内皮细胞重编程为造血多系祖细胞

### [0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2013年1月15日申请的美国临时申请61/752,688的优先权,其全部内容并入本申请。

### [0003] 本发明的背景

[0004] 通过细胞核移植 (Gurdon, J.B. 等, *Nature* 182:64-65 (1958); Eggan, K. 等, *Nature* 428:44-49 (2004); Noggle, S. 等, *Nature* 478:70-75 (2011)), 细胞融合 (Tada, M. 等, *Curr Biol* 11:1553-1558 (2001); Cowan, C.A. 等, *Science* 309:1369-1373 (2005); Blau, H.M. 等, *Semin Cell Dev Biol* 10:267-272 (1999)) 以及转录因子的强制表达 (Takahashi, K. 等, *Cell* 131:861-872 (2007); Chen, M.J. 等, *Cell Stem Cell* 9:541-552 (2011)) 已将体细胞重编程为寡能状态。体细胞也被重编程为终末分化细胞, 例如成肌细胞 (Davis, R.L. 等, *Cell* 51:987-1000 (1987)), 类巨噬细胞 (Xie, H. 等, *Cell* 117:663-676 (2004)),  $\beta$ 细胞 (Zhou, Q. 等, *Nature* 455:627-632 (2008)), 类肝细胞 (Sekiya, S. 等, *Nature* 475:390-393 (2011)), 神经元 (Vierbuchen, T. 等, *Nature* 463:1035-1041 (2010)) 和内皮细胞 (Ginsberg, M. 等, *Cell* 151:559-575 (2012))。一些研究组最近报道了将纤维原细胞直接重编程为神经干细胞/多系神经祖细胞 (Han, D.W. 等, *Cell Stem Cell* 10:465-472 (2012); Lujan, E. 等, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:2527-2532 (2012); Thier, M. 等, *Cell Stem Cell* 10:473-479 (2012))。但是, 将体细胞直接转换为功能性的可移植的多系造血干细胞和祖细胞 (HSPC) 一直难以实现 (Szabo, E. 等, *Nature* 468:521-526 (2010); Chambers, S.M. 等, *Cell* 145:827-830 (2011); Pereira, C.F. 等, *Cell Stem Cell* 13:205-218 (2013))。

[0005] 在鼠科动物的发育过程中, 给定的造血干细胞 (HSC) 起源于主动脉-性腺-中肾 (AGM) 区域中的背部主动脉 (North, T.E. 等, *Immunity* 16:661-672 (2002); de Bruijn, M.F. 等, *EMBO J* 192:465-2474 (2000); Medvinsky, A. 等, *Cell* 86:897-906 (1996))。在包括斑马鱼、鼠类以及可能人类的脊椎动物中, HSC被认为从内衬背主动脉底部和脐动脉的造血血管细胞的层中出现 (Zovein, A.C. 等, *Cell Stem Cell* 3:625-636 (2008); Boisset, J.C. 等, *Nature* 464:116-120 (2010); Bertrand, J.Y. 等, *Nature* 464:108-111 (2010); Kissa, K. 等, *Nature* 464:112-115 (2010))。这个过程依赖于转录因子 (TF) RUNX1的表达 (Chen, M.J. 等, *Nature* 457:887-891 (2009))。在胚体中内皮细胞 (EC) 和HSPC发育的密切关系引起了造血作用的内皮-造血转化理论 (Zovein, A.C. 等, *Cell Stem Cell* 3:625-636 (2008))。

[0006] 尽管已知HSCs和给定的红系/骨髓祖细胞 (EMP) 来自多个含造血内皮细胞的位置, 但仍然很难表征驱动原始造血内皮细胞向造血祖细胞自发个体发育转变的分子模式 (Chen, M.J. 等, *Nature* 457:887-891 (2009); North, T.E. 等, *Cell* 137:736-748 (2009)), 这是因为关键分子的识别和它们活动的次序仍然难以捉摸 (Orkin, S.H. 等, *Cell* 132:631-644 (2008))。转录因子在造血内皮细胞子代中的差异化表达与早期发育决定相关联以产生给定的HSPC或EC (Chen, M.J. et al. *Cell Stem Cell* 9:541-552 (2011))。然而, 尚不清楚转录因子是否指引这些细胞命运的决定或者只是简单地推进造血内皮细胞中的预定程序。通

过解剖学上不同的生态位提供的微环境线索-如AGM、胎儿肝脏和胎盘中的那些-对原始造血HSCs的生理扩增和有效造血发育而言也同样需要(Gekas,C.等,Dev Cell 8:365-375 (2005))。

[0007] 治疗血液疾病的现代方法依赖于移植健康的HSPC。目前,有两种主要的可生产足够数量的同种异体和自体HSPC的方法,而这两者都具有如下局限性:(1) HSPC(例如,来自脐带血的HSPC)的体外扩增;以及(2) 寡能干细胞定向分化为HSPC。健康的HSPC的体外扩增受限于可使用的供体,并且自体移植时的纯化方法和同种异体移植时的HLA匹配使其复杂化。寡能细胞的定向分化受限于我们对造血系统发育的理解以及稳定的内皮细胞的产生,并且尚未得到足够数量的成人可移植的HSPC。

#### [0008] 发明内容简述

[0009] 本发明涉及通过影响在内皮细胞中的某些转录因子的强制表达以及在内皮饲养细胞存在下在无血清培养基中培养内皮细胞,来从内皮细胞生成造血多系祖细胞(HMLP)。按照本发明生成的HMLP可以产生红系、淋巴、骨髓和巨核细胞。这些生成的HMLP可以移植到小鼠体内,因此可用于对包括造血状况等疾病的治疗性处理中。

[0010] 因此,本发明提供了从人内皮细胞(EC)生成造血多系祖细胞(HMLP)的方法。所述方法包括在有内皮饲养细胞的无血清培养基中培养内皮细胞,所述内皮细胞经转化表达以下每种转录因子:Finkel-Biskis-Jenkins鼠骨肉瘤病毒致癌基因同源物B(FOSB),生长因子独立转录抑制子1(GFI1),侏儒相关转录因子1(RUNX1),脾脏病灶形成病毒原病毒整合致癌基因(SPI1),或其功能同源物或FOSB、GFI1、RUNX1和SPI1的衍生物。

[0011] 内皮细胞可用于产生HMLP,所述内皮细胞包括胎儿、新生儿、成人或内皮祖细胞。在一些实施方式中,所述内皮细胞选自人脐带静脉内皮细胞(HUVEC)或成人皮肤微血管内皮细胞(hDMEC)。

[0012] 在一些实施方式中,通过一种或多种载体转导内皮细胞会影响转录因子的强制表达,所述载体驱动FOSB、GFI1、RUNX1和SPI1的表达。这些载体中的至少一个还包括可选择的标记物,如抗生素抗性标记物、酶标记物、表位标记物或可视标记物。在存在所述内皮饲养细胞的情况下进行培养之前,通过选择表达至少一种可选择标记物的细胞,根据FOSB、GFI1、RUNX1和/或SPI1的表达来富集所述内皮细胞。在一些实施方式中,FOSB、GFI1、RUNX1和SPI1中的一种或多种的所述表达为可诱导的和/或瞬时的。

[0013] 内皮饲养细胞可以从多种内皮细胞中进行选择。在一些实施方式中,所述饲养细胞是人脐带静脉内皮细胞(HUVEC),所述人脐带静脉内皮细胞(HUVEC)被转化以表达选自以下的基因:腺病毒E4开放阅读框1(E4ORF1)基因或Akt基因。

[0014] 内皮细胞可以在内皮饲养细胞存在下,在无血清造血培养基中生长,如无血清造血干细胞培养基。所述无血清造血培养基可以包括生长因子和/或细胞因子,特别是bFGF、EGF、SCF、FLT3、TPO和IL-6。无血清造血培养基也可以包括IGF-1、IGF-2和IL-3。可以培养内皮细胞至少五天,以产生HMLP。可以基于CD45<sup>+</sup>细胞的选择从细胞培养中分离HMLP。在一些实施方式中,通过选择CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>细胞来选择HMLP。生成的HMLP通常是细胞的异质混合物,但在特定实施方式中,HMLP的混合物包括CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>和/或CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>的细胞。

[0015] 本发明还提供了根据本发明所公开的方法产生的HMLP的群体。一种组合物,所述

组合物包括在药学上可接受的运载体中的通过根据权利要求1所述的方法生产的HMLP。

[0016] 本发明还提供了治疗造血功能障碍的方法,包括向给需要治疗的对象给予内皮细胞生成的HMLP。HMLP可以在移植到接受者后分化成造血细胞。所述造血功能障碍可以选自,例如,白血病或淋巴瘤。给予所述对象的HMLP可以是与对象自体同源的,或与对象同种异体。根据所述公开的方法生成的HMLP不会在接受者中引起恶变。

[0017] 附图的简要说明

[0018] 图1A-1E。A.将人脐带静脉内皮细胞(HUVEC)向造血多系祖细胞(rEC-HMLP)重编程的平台技术的图示。从丢弃的脐带中分离HUVEC,分类以得到表型标记为 $CD45^-CD133^-cKit^-CD31^+$ 的内皮细胞(EC)的纯群体,并扩增以用于进一步的实验(-14至0天)。用FGRS转导HUVEC,并使转基因稳定表达(1-3天)。转导的HUVEC以1/6密度铺板(第4天),并在无血清培养基中的E4ORF1<sup>+</sup>HUVEC(E4-HUVEC)的血管生态位样层上生长(12-40天)。在向血管生态位样层上接种转导的细胞两周左右后,观察不同的扁平集落(12-16天)。随着时间的推移(21-29天),一些菌落呈现了代表假定的rEC-HMLP的三维葡萄状结构。一个月后(29-40天)rEC-HMLP大量扩增出现典型的造血集落。重编程的过程细分为两个阶段:阶段I-特异化和阶段II-扩增。常规测定扩增的培养物的形态变化、细胞数量以及全造血标记物CD45的表达。灰线代表将HUVEC重编程为rEC-HMLP的细胞数量动态。黑线说明hES-EC分化成造血祖细胞的低扩增潜力。B.用一组TF(白色箭头)转导HUVEC两至三个星期后出现圆形造血样CD45<sup>+</sup>细胞。比例尺为200 $\mu$ m。C.通过与血管生态位共培养和无血清环境来增强以及通过血清的存在来阻断从FGRS转导的HUVEC产生造血状集簇。D.通过逐一去除TF揭示了在HUVEC培养中能够产生造血状集落的最小的一组因子(FOSB,GFI1,RUNX1和SPI1)。对一组26种TF减去一种TF引起造血状集簇形成(n=3)的能力进行评估。星号表示,与全组转录因子相比,在转导的HUVEC中的造血状集簇的数目在统计学上显著(P<0.05)减少。对照样本代表非转导HUVEC。在无血清造血培养基中在非转导的E4-HUVEC层上培养转导的细胞。E.逐一去除FGRS因子表明,所有四种FGRS因子对长效造血状集落的产生是必要的且充分的。

[0019] 图2A-2E。A.对混合的GFP<sup>-</sup>E4-HUVEC饲养血管单层和GFP<sup>+</sup>FGRS转导的HUVEC的FACS分析表明,GFP<sup>+</sup>新生造血细胞失去CD31的表达(成熟的内皮细胞标记物),并获得CD45<sup>+</sup>和CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>造血表型。在灰色字体的点图中的百分数是指在左上角点图(GFP<sup>+</sup>细胞)的门。在黑色字体的点图中的百分数是指GFP<sup>-</sup>细胞。B.FGRS重编程的HUVEC的免疫表型分析。对形成的造血细胞进行谱系标记物,CD45RA、CD45、CD34、CD90和CD38的表达测试。如图所示,两个群体CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>和CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>细胞,分别满足造血干细胞样细胞或多能祖细胞的表型标准。C.在阶段I结束时,在FGRS转导和血管生态位诱导四周后,对GFPCD45CD34细胞进行分类并进行接种用于CFU测试。在CFU测试(放大倍数 $\times$ 4)、宽视场(左列)和相应的荧光图像(右列)中出现典型造血集落。从上到下依次为:粒细胞-红细胞-单核细胞-巨核细胞(GEMM)、红系细胞/骨髓细胞和粒细胞-巨噬细胞(GM)的集落。下方图像显示血红蛋白化的集落。图表显示了CFU测试的定量结果。D.从CFU测试集落获得的细胞离心涂片的瑞氏-吉姆萨(Wright-Giemsa)染色证实了分化中的rEC-HMLP(放大倍数 $\times$ 60)的谱系特异化。我们发现了具有红细胞、巨噬细胞、粒细胞和巨核细胞前体的典型形态特征的细胞。E.对在CFU试验中生长的细胞的免疫表型分析表明了CD235<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup>、CD83<sup>+</sup>和CD45<sup>+</sup>细胞的存在,这表明rEC-HMLP分化成红细胞、巨噬细胞、单核细胞和树突状

细胞后代。

[0020] 图3A-3G。A. 将重编程的细胞 ( $1.5 \times 10^6$  个  $CD45^+GFP^+$  细胞) 经眼眶后注入到亚致死剂量照射 (275Rad) 的小鼠 ( $n=9$ ; 辐射1天后) 体内。B. 在2、5、12和16周在经注射的小鼠外周血中检测循环的人  $CD45^+$  细胞。在2周 ( $n=7$ ;  $17.38 \pm 7.73\%$ )、5周 ( $n=6$ ;  $15.1 \pm 13.39\%$ )、12周 ( $n=6$ ;  $14.14 \pm 5.44\%$ ) 和22-40周 ( $n=6$ ;  $21.23 \pm 22.27\%$ ) 对循环的人  $CD45^+$  细胞进行检测。将移植22-44周 (最多10个月) 的小鼠用于进一步分析骨髓异常增生和纤维性变化。C. 在移植16周后, 外周血、骨髓和脾的分析表明在所有三种组织中存在人  $CD45^+$  细胞并在外周血中存在  $hCD45^-hCD235^+$  红细胞。BM结果如图所示。BM和脾聚集了  $rEC-HMLP (CD45^+CD33^+)$  的髓系后代和少量但易于检测的量的  $CD41a^+$  细胞 (巨核细胞)。D. 甲基纤维素培养物的FACS分析显示  $CD45^-$  隔室包含  $CD235^+$  (血型糖蛋白A) 和非小鼠  $Ter119^+$  细胞, 这表明在CFU试验中人  $CD45^+CD34^+$  细胞强烈的红细胞分化。E. 骨髓内体内移植的  $rEC-HMLP$  的表型分析显示少数人细胞被表型标记为  $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^-CD34^+$  并且满足多效祖细胞 (MPP) 的定义。F. 在单集落水平上鉴定病毒的整合。将  $Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^-CD34^+$  细胞用于CFU测试。CFU测试开始后十四天检出3个不同的细胞聚集/集落。对每个扩增的集落使用它们的基因组DNA作为模板进行四次PCR反应。它们表明整合了用于重编程的所有四种FGRS病毒载体 (底部图像; 字母F-FOSB、G-GFI1、R-RUNX1、S-SPI1表示在第一个集落中针对这些因素中各个的PCR产物)。G. 在单细胞水平上鉴定病毒的整合。移植22周后将分离自宿主小鼠的21个人  $CD45^+$  细胞进行全基因组扩增 (WGA)。将所述细胞分类到96孔板中, 每孔一个细胞, 直接放入裂解缓冲液中, 进行基于Phi29的WGA。WGA后用CMV启动子和转基因特异的引物进行PCR反应。如图所示为分析的定量。十九个细胞表现出所有四种病毒的整合 (FGRS)。两种细胞呈现三种病毒的整合: FGS (RUNX1未检出) 和GRS (FOSB未检出)。

[0021] 图4A-4F。A. 针对hDMEC来源的  $rEC-HMLP$  的体外和体内功能试验的示意图。在阶段I结束时, FGRS转导四周后, 对  $rEC-HMLP$  进行分类并进行接种用于CFU测试。在CFU测试 (比例尺为  $200\mu m$ ) 和宽视场 (上排) 中出现典型造血集落。下方图像显示血红蛋白化的集落。在最下面一行显示了从CFU测试集落 (放大倍数  $\times 60$ ) 获得的细胞离心涂片的瑞氏-吉姆萨 (Wright-Giemsa) 染色。右侧的图表显示CFU测试的定量化 ( $n=3$ )。B. 在CFU测试中生长的细胞的免疫表型分析。右手图显示从CFU测试获得的在细胞中的表面标记物表达的定量化 ( $n=3$ )。hDMEC分化成几个谱系, 包括红细胞  $CD235^+$ 、巨噬细胞的  $CD11b^+$ 、单核细胞  $CD14^+$ 、骨髓  $CD33^+$ 、内皮  $CD144^+$  和树突  $CD83^+$  细胞后代。C. 用亚致死剂量照射 (100拉德) 两周龄新生免疫缺陷NSG小鼠, 并移植hDMEC来源的  $rEC-HMLP (5 \times 10^4$  个细胞)。在原发性移植4、6和12周后对小鼠的外周血的分析表明存在循环的人  $CD45^+$  以及它们的骨髓和红细胞后代 ( $n=6$ )。D. 在原发性移植14周后对小鼠的脾脏的分析表明存在人  $CD45^+$  以及它们的淋巴细胞 ( $CD19^+$  和  $CD56^+$ ) 和粒细胞 ( $CD11b^+$  和  $CD41a^+$ ) 后代 ( $n=3$ )。最右边的图中: 第一列, 针对左手y轴测量的  $hCD45^+$  (%); 接下来的四列, 针对右手y轴测量的  $\log_2 (hCD45^+$  百分比)。E. 在原发性移植14周后对小鼠骨髓的分析表明存在人  $CD45^+$  细胞与少量的  $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^+CD34^+$  和/或  $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^-CD34^+$  细胞, 其分别满足人HSC和多能祖细胞 (MPP) 的表型定义 ( $n=3$ )。F. 12周后, 将移植了hDMEC来源的  $rEC-HMLP$  的小鼠的整个骨髓进行二次移植, 移植入成年 (6-8周龄) 的NSG小鼠。在二次移植后的3周和5周对小鼠外周血的分析表明存在循环的人  $CD45^+$  以及它们的髓系后代 ( $n=6$ )。最右边的图: 前两列, 针对左手y轴测量的  $hCD45^+$

(%) ;最后一列,针对右手y轴测量的hCD33<sup>+</sup>(%)。

[0022] 图5A-5C。A.全基因转录谱发现移植22周后,在CD45<sup>+</sup>rEC-HLMP以及在体内移植的CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>rEC-HLMP中被开启的造血基因和被沉默的血管基因。将两个群体与HUVEC和CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>的脐带血细胞的基因表达进行比较。数据表示为log<sub>2</sub>(转录水平)。B.将移植22周后的HUVECs、CD45<sup>+</sup>rEC-HLMP、CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>rEC-HLMP和CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>细胞与人胚胎干细胞(hESC)的典型寡能性基因的表达进行比较。相比于hESC和初始HUVEC典型的寡能性基因,如Oct4、Nanog、Sox2和Myc基因在重编程的细胞中没有上调,这表明实现HUVEC重编程成rEC-HMLP未经过由寡能状态的过渡。C.对SPI1和GFI1一起结合的位点和SPI1单独结合的位点分别进行基因本体(GO)分析。每个图显示了指示从EC到rEC-HMLP细胞识别变化的GO基因组。用于重编程因子和可能的候选物的共同DNA结合基序(p<0.01)在各组曲线图下方显示。所有上调或下调基因的值都是|log<sub>2</sub>(rEC-HMLP/HUVEC)|≥2。

[0023] 图6A-6B。A.在没有外源SPI1表达的情况下,rEC-HMLP分化成CD3<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>和CD14<sup>+</sup>造血细胞。将所述重编程的细胞转移到表达δ样4(OP9-DL4)的骨髓基质细胞(OP9)的层上,并在无血清造血培养基存在的条件下生长(见方法),所述培养基补充有IL-7(10ng/ml)、IL-11(在10ng/ml)和IL-2(5ng/ml)并且不存在多西环素。B.从rEC-HMLP分化的巨噬细胞能够起吞噬作用。图像中显示牢固的粘附于塑料的CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞组,所述CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞组具有清晰可见的摄入的小珠。图像从左至右列依次为:GFP荧光;用DAPI、荧光珠染色的细胞核;CD11b染色;左侧四个图的组合图像。比例尺是15μm。

#### [0024] 本发明的具体实施方式

[0025] 本发明提供了用于将内皮细胞(EC)重编程为造血多系祖细胞(HMLP或rEC-HMLP)的方法。所述方法包括用一组转录因子(TF)(包括FOSB、GFI1、RUNX1和SPI1(FGRS))培养EC细胞,所述TF能有效地将EC(如人脐带静脉内皮细胞(HUVEC)和人成年真皮微血管内皮细胞(hDMEC))重编程为HMLP。

[0026] 本申请所述的人造血多系祖细胞(HMLP)是具有产生或分化成多种类型的造血谱系细胞的能力或潜能的细胞。造血谱系以及这些系包括的分化细胞,是骨髓系细胞,其包括红细胞、单核细胞、巨噬细胞、巨核细胞、成髓细胞、树突细胞和粒细胞(嗜碱性粒细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和肥大细胞);和淋巴谱系细胞,包括T淋巴细胞/T细胞,B淋巴细胞/B细胞和自然杀伤细胞。由本发明的方法产生的HMLP具有产生骨髓和淋巴系造血细胞的能力,所述骨髓和淋巴系造血细胞包括T细胞、B细胞、红细胞、单核细胞、巨噬细胞、巨核细胞、成髓细胞、树突细胞和粒细胞。

[0027] 本发明的HMLP能够被移植(建立驻留)并在移植到接受者后提供长期的造血细胞再增殖的能力。在移植后,所公开的HMLP维持其多系潜能,并且还能够在从一个接受者到一个或多个其他的接受者后续移植,同时仍保持多系潜能。对于治疗造血障碍的细胞群体来说非常需要能够进行长期移植(例如,移植后4周、8周、12周、16周或20周或更长时间)、维持多系潜能以及二次移植的能力。

[0028] 可以通过细胞表面标记物的表达来定义HMLP。虽然HMLP代表细胞的异质群体,但是所述细胞部分地以CD45的表达为特征(即,细胞是CD45<sup>+</sup>)。在一个特定的实施方式中,HMLP是CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>。HMLP还可以是CD90<sup>+</sup>和/或CD38<sup>+</sup>。

[0029] 根据本发明生成的HMLP是非均质的并含有不同细胞类型的混合物,其中每种细胞



类型显示不同的细胞标记物、不同形态和/或不同的分化水平。在具体的实施方式中，HMLP含有至少一种能够分化成骨髓和/或淋巴谱系细胞的祖细胞。在一个特定的实施方式中，HMLP群体包含在该群体中的细胞总数的至少0.01%到至少0.4%，或每百万至少10个到至少250个祖细胞，所述祖细胞表达标记物 $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^+CD34^+$ ，和/或所述祖细胞表达标记物 $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^-CD34^+$ 。

[0030] 生成HMLP的方法

[0031] 在本发明公开的方法中，通过重编程内皮细胞 (EC) 产生HMLP以提供重编程的内皮细胞来源的HMLP (rEC-HMLP, 在此也称为HMLP)。如本发明所使用的“重编程”是指一个遗传过程，通过该过程分化的体细胞被转换成去分化细胞，所述去分化细胞比其来源的细胞具有更高的效能。通过强制所述细胞表达特异性转录因子来重编程EC，所述特异性转录因子将所述细胞的分化状态改变为造血祖细胞的类型。

[0032] 可以用于产生HMLP的内皮细胞包括成熟EC (例如，新生儿、胎儿和成年EC) 和内皮祖细胞 (EPC)。EC典型的来源包括来自成人真皮或新生儿包皮的人类真皮微血管EC (HDMEC)、人脐静脉/脐带血EC (HUVEC)，人脐动脉EC (HUAEC)、人主动脉EC (HAoEC)，人冠状动脉EC (HCAEC)、人肺动脉EC (HPAEC)、人隐静脉EC (HSVEC)、人真皮血液EC (HDBEC)、人真皮淋巴EC (HDLEC)、人膀胱微血管EC (HBMEC)、人心脏微血管EC (HCMEC)、人肺微血管EC (HPMEC)、人子宫微血管EC (HUMEC)，人脑微血管EC (HBMEC) 和胎儿胎盘微血管EC (HPMEC)。这些细胞是血管性血友病因子 (Von Willebrand factor, vWF) 阳性、CD31阳性、CD144阳性、平滑肌 $\alpha$ -肌动蛋白 (SMA) 阴性。胎儿微血管EC被进一步限定为具有标记物 $CD34^+CD133^+VEGFR2^+CD45^-$ 的胎儿微血管细胞 (参见, Sölder E. 等, *Microvasc. Res.* 84:65-73 (2012))。内皮祖细胞包括能够分化为成熟内皮细胞并以 $CD34^+VEGFR2^+$ 并且也可能以 $CD133^+CD45^-$ 为特征的那些祖细胞 (Urbich C. 和Dimmeler S., *Circ. Res.* 95:343-353 (2004))。在一个优选的实施方式中，所述EC是HUVEC或hdMEC。

[0033] 在本发明中使用的EC可以是同种异体的 (来自与接受者基因相似但不完全相同的供体，例如同一种物种，所述接受者将接受重编程细胞)，同基因的 (来自与接受者基因相同或密切相关的供体，所述接受者将接受重编程细胞)，或自体 (供体和接受者是相同的个体)。

[0034] 重编程因子

[0035] 本发明鉴定的转录因子 (TF) 的表达 (包括过表达和强制表达) 可以将EC重编程为HMLP。需要至少FOSB、GFI1、RUNX1和SPI1 (这四种因子在本发明中统称为“FGRS”或“重编程因子”) 的表达，或它们各自的功能同源物或功能性衍生物的表达以从EC产生HMLP。

[0036] FOSB (Finkel-Biskis-Jenkins小鼠骨肉瘤病毒致癌基因同源物B) 是一种亮氨酸拉链蛋白，其与JUN家族的蛋白质二聚化以形成转录因子复合物AP-1。FOSB也被称为AP-1、GOS3、GOS3或GOSB。FOSB具有至少六种剪接变体亚型。例如，FOSB亚型1 (特定的人FOSB变体) 的序列列于GenBank登录号CAG46898。

[0037] GFI1 (生长因子独立转录抑制子1) 是核锌指蛋白家族的一员，具有转录抑制子的活性。GFI家族锌指抑制子形成异三聚体复合物，如EHMT2-GFI1-HDAC1、AJUBA-GFI1-HDAC1和RCOR-GFI-KDM1A-HDAC，所述异三聚体复合物通过组蛋白脱乙酰酶抑制对众多负责多系血细胞发育的特异化的基因的召集。GFI1也被称为SCN2、GFI-1、GFI1A和ZNF163。至少有四

种已知的GFI1的剪接变体亚型。例如,亚型1的序列(特定人类GFI1变体)列于GenBank登录号AAH32751。

[0038] RUNX1(侏儒相关转录因子1)是核心结合因子(CBF)的 $\alpha$ 亚单位,所述核心结合因子是结合到许多增强子和启动子的核心元件的异二聚体转录因子。所述RUNX家族包括许多CBF结合TF,例如RUNX2、RUNX3、CBFB、CEBP/Z、NFY/B、NFA/A、NFY/C和RBPJ。至少有三种RUNX1的剪接变体亚型。RUNX1也被称为AML1、AML1-EVI-1、AMLCR1、CBFA2, EVI-1和PEBP2aB。例如,亚型1的序列(特定的人类RUNX1变体)列于GenBank登录号AAI36381。

[0039] SPI1(脾病灶形成病毒(SFFV)前病毒整合致癌基因)是ETS域转录因子。SPI1属于包括SPIB、ETV6、ETS1、ETV2和ERG的ETS域编码转录因子家族。至少有三种SPI1的剪接变体。SPI1也被称为hCG\_25181、OF、PU.1、SFPI1、SPI-1和SPI-A。例如,亚型1的序列(特定人类SPI1变体)列于GenBank登录号EAW67924。

[0040] 进一步考虑将本发明具体引用的所述转录因子的功能衍生物和同源物用于本发明公开的方法。如本发明所用的,“功能性衍生物”是一种分子,所述分子具有进行在此公开的TF的生物学功能的能力,即,能够(例如,在将EC重编程为HMLP的过程中)在功能上代替所公开的TF。功能性衍生物包括片段、部件、部分、等价物、类似物、突变体、天然的模拟物、包括融合蛋白的合成的或重组的来源。衍生物可衍生自氨基酸的插入、缺失或取代。氨基酸插入的衍生物包括氨基和/或羧基末端融合以及单个或多个氨基酸的序列内插入。插入型氨基酸序列变体是其中有一个或多个氨基酸残基被引入到该蛋白质的预定位点的那些变体,虽然也可以随机插入然后对所得到的产物进行适当的筛选。缺失型变体的特征在于从序列中除去一个或多个氨基酸。取代型氨基酸变体是在序列中的至少一个残基被去除并在该位置插入不同残基的那些变体。氨基酸序列的添加包括与其它肽、多肽或蛋白质的融合。

[0041] 分子的变体是指在结构上和功能上与完整分子或它的一个片段实质上相似分子。因此,在此使用术语变体时,即使其中一个分子没有另一个分子的结构或者如果氨基酸残基的序列不相同,如果两个分子具有相似的活性,那么它们仍然互为变体。术语变体包括,例如,基因的剪接变体或亚型。等价物应当理解为包括对可起到功能类似物或拮抗剂作用的分子。等价物可以不必来源于对象分子而是可以具有某些构象相似性。等价物还包括肽模拟物。

[0042] “同源物”是从共同的祖先DNA序列而来的与另一种蛋白相关的蛋白。相同蛋白家族(例如,FOS家族、GFI家族、SPI家庭或RUNX家庭)的成员可以是同源物。“功能性同源物”是能够执行所需基因的生物活性的相关的蛋白或其片段,即能够在功能上取代在将内皮细胞重编程为HMLP中涉及的所公开的转录因子。在本发明中,同源物和功能同源物包括,但不限于,来源于不同物种的蛋白质。

[0043] 功能性衍生物或同源物可与FOSB, GFI1, RUNX1, 或SPI1的已知氨基酸序列具有75%、80%、85%、90%、95%或更高的氨基酸序列同一性,或与FOSB、GFI1、RUNX1或SPI1家族成员或其变体具有75%、80%、85%、90%、95%或更高的氨基酸序列同一性。FOSB功能性衍生物或同源物可以与GenBank登录号CAG46898序列具有,例如,75%、80%、85%、90%、95%或更高的氨基酸序列同一性。GFI1功能性衍生物或同源物可以与GenBank登记号AAH32751具有,例如,75%、80%、85%、90%、95%或更高的氨基酸序列同一性。RUNX1功能性衍生物或同源物可以与GenBank登录号AAI36381序列具有,例如,75%、80%、85%、90%、

95%或更高的氨基酸序列同一性。SPI1功能性衍生物或同源物可以与GenBank登录号EAW67924序列具有,例如,75%、80%、85%、90%、95%或更高的氨基酸序列同一性。

[0044] 除FGRS重编程因子以外可以使用其它转录因子。例如,除FGRS以外,可以使用以下转录因子的任意一种或多种:ZPF36(锌指蛋白tristetraprolin)、FOS(FBJ鼠骨肉瘤病毒致癌基因同源物)、JUNB(jun B原癌基因)、GMFG(神经胶质成熟因子, $\gamma$ )、KLF2(Kruppel样因子2)、NFE2(核因子,红细胞2)、KLF1(Kruppel样因子1)、KLF4(Kruppel-样因子4)、LYL1(淋巴细胞白血病衍生序列1)、LMO2(LIM域特有2)、TAL1(T细胞急性淋巴细胞性白血病1)、GATA1(GATA结合蛋白1)、IKZF1(IKAROS家族锌指1)、GFI1B(生长因子独立转录抑制子1B)、VAV2(vav 2鸟嘌呤核苷酸交换因子)、MEIS1(Meis同源框1)、MYB(v-myb禽成髓细胞白血病病毒致癌基因同源物)、MLLT3(髓/淋巴或混合谱系白血病(trithorax同源物,果蝇);易位到,3),HLF(肝白血病因子)、BEX1(脑表达,X连锁1)、BEX2(脑表达,X-连锁2)和/或PBX1(前B细胞白血病同源框1)或这些转录因子中任意的功能性衍生物或同源物。

[0045] 表达重编程因子的载体

[0046] 所述FGRS重编程因子的表达的实现可以通过将外源核酸引入到内皮细胞以驱动内皮细胞中所需要的因子的表达。可以将每种重新编程因子作为载体中的多核苷酸转基因引入到所述内皮细胞中,所述载体编码可操作地连接至异源启动子的所述重编程因子,所述异源启动子可以驱动所述多核苷酸在内皮细胞中的表达。

[0047] 许多用于将外源基因转移进入目标哺乳动物细胞的载体是可以使用的。所述载体可以是游离型,例如质粒或病毒来源的载体(如巨细胞病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体等等),或者载体可以是整合的,例如,通过同源重组或随机整合将所述重编程基因整合到目标细胞基因组,例如逆转录病毒来源的载体(如MMLV(莫洛尼鼠白血病病毒)、HIV-1、ALV(禽白血病病毒)或慢病毒载体)。在具体的实施方式中,所述载体是慢病毒载体。

[0048] 在一个实施方式中,用于表达重编程因子的载体包含启动子,所述启动子可操作地连接到所述重编程因子基因。如本发明中所使用的短语“可操作地连接”或“在转录控制下”表示所述启动子在相对于多核苷酸正确的位置和方向以控制通过RNA聚合酶启动的转录和多核苷酸的表达。几种启动子均适用于在载体中表达重编程因子,包括但不限于,RNA聚合酶I启动子、RNA聚合酶II启动子、RNA聚合酶III启动子和巨细胞病毒(CMV)启动子。对本领域的普通技术人员而言,其他有用的启动子是可行的。在一些实施方式中,所述启动子是可以控制重编程因子何时表达的诱导型启动子。诱导型启动子的合适实例包括四环素调控的启动子(tet on或tet off)和来源于糖皮质激素或雌激素受体的类固醇调节的启动子。可以通过使用例如具有CMV、CAG(带有CMV增强子的鸡 $\beta$ -肌动蛋白启动子)或PGK(磷酸甘油酸酯激酶1)启动子的表达载体来实现转录因子的组成型表达。可以通过使用例如,四环素应答启动子如TRE3GV(第3代tet应答元件)诱导型启动子(克隆技术实验室,山景城,加利福尼亚)来实现转录因子的诱导型表达。可替代地,可操作地连接到所述转基因的所述启动子可以是在特定的细胞类型和/或在发育的特定点被激活的启动子。

[0049] 根据所使用的启动子,所述FGRS重编程因子中的任一种或全部的表达可以是组成型(所述因子的持续表达)或诱导型(能够被打开和关闭)。表达也可以是瞬时的,即,目的重编程基因在有限的时间跨度内在内皮细胞中暂时性表达。瞬时表达可通过使用非整合载体实现,在这种情况下所述载体随时间从细胞或细胞群体中流失,或通过整合或非整合载

体中使用诱导型启动子来实现,其中所述诱导型启动子可被操纵以在一段时间后停止重编程基因的表达。在一个具体的实施方式中,利用一种或多种瞬时表达的FGRS重编程因子来产生表达,所述表达不超过三天、不超过五天、不超过十天或不超过一、二或三周。

[0050] 合适的载体可包含标记物以识别和/或选择转化的细胞。可选标记物的实例包括可视标记物,例如绿色荧光蛋白(GFP)、红色荧光蛋白(RFP)或荧光素;表位标记物如His、c-myc、GST、Flag或HA标签;酶/营养标记物例如DHFR(二氢叶酸还原酶);或抗生素抗性标记物如新霉素、嘌呤霉素、杀稻瘟菌素或潮霉素。

[0051] 通过重编程因子转化内皮细胞

[0052] 可以使用任何合适的通过重编程因子转染或转导内皮细胞的方法。对于各种转化或转染哺乳动物细胞的技术,可参见Keown等人,1990,酶学方法.185:527-37;Sambrook等人,2001,分子克隆,实验室手册,第三版,冷泉港实验室出版社,纽约。可以使用本领域已知的标准方法将携带FOSB、GFI1、RUNX1和SPI1的载体转染到细胞中,所述方法包括但不限于,脂质体介导的转染、聚凝胺介导的转染、DEAE葡聚糖-介导的转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、显微注射或微粒轰击。同样,可使用病毒递送系统(例如慢病毒、腺病毒、逆转录病毒、腺相关病毒或疱疹病毒递送系统)将FOSB、GFI1、RUNX1和SPI1递送至内皮细胞。在一个优选的实施方式中,内皮细胞是由一个、两个、三个或四个慢病毒载体转染,所述慢病毒载体驱动FOSB, GFI1, RUNX1和SPI1的表达。

[0053] 可以通过选择表达指示被转染细胞的标记物的细胞,以在所述群体中富集表达一种、两种、三种或全部四种所述FGRS重编程因子的内皮细胞。例如,可以将每种重编程因子放置在单独的具有不同选择标记物的载体中(例如,载体可提供针对不同抗生素的抗性、不同可视标记物和/或不同的营养标记物)。通过对不同载体选择代表转化的各种标记物,可增加被所有四种因子转化的内皮细胞的群体。在一个具体的实施例中,不同的载体,其中每种载体编码不同的重编程因子,分别以抗生素抗性或绿色荧光蛋白(GFP)标记。

[0054] EC重编程的培养条件

[0055] 优选地在最小量或无血清的培养基中(“无血清”培养基)培养被FGRS转化的内皮细胞。发明人发现,在培养基中存在血清会降低HMLP的生产。转化的内皮细胞可以在适于培养和扩增造血细胞的无血清培养基中培养。这样的培养基可以基于,例如,Iscove改良的Dulbecco培养基(IMDM)或其它合适的培养基,并且可以包括补充剂,如标准牛血清白蛋白、胰岛素、2-巯基乙醇和/或转铁蛋白(例如,STEMSPAN SFEM,干细胞技术,温哥华,加拿大)。额外的补充剂可包括用于未分化的细胞生长的具有给定制剂的血清替代补充剂,例如,KNOCKOUT替代血清(GIBCO)。内皮细胞可以培养三天、五天、十天、十二天、一周、两周或三周或以上,以将内皮细胞重编程为HMLP。

[0056] 用于实现内皮细胞重编程的附加培养基补充剂可以包括生长因子和/或细胞因子,如2-8纳克/毫升bFGF、5-15纳克/毫升EGF、15-25纳克/毫升SCF、15-25纳克/毫升FLT3、15-25纳克/毫升TPO、15-25纳克/毫升IGF-1、5-15纳克/毫升IGF-2、5-15纳克/毫升IL-3和/或5-15纳克/毫升IL-6。在一个优选实施例中,培养基包括2-8纳克/毫升bFGF、5-15纳克/毫升的EGF、15-25纳克/毫升的SCF、15-25纳克/毫升FLT3、15-25纳克/毫升TPO和5-15纳克/毫升IL-6。

[0057] 内皮饲养细胞

[0058] 至少表达所述FGRS因子的内皮细胞与内皮饲养细胞一起培养。这些饲养细胞提供了AGM-样(主动脉-性腺-中肾状)生态位环境,这类似于发生内皮细胞编程的生理环境。优选地,使内皮饲养细胞生长以在组织培养容器的底部形成汇合单层,然后用转化的内皮细胞接种培养容器。任何内皮细胞都可以用作饲养细胞,如成熟内皮细胞(例如,新生儿、胎儿和成年内皮细胞)和内皮祖细胞(EPC)。内皮细胞示例性的来源包括成人真皮或新生儿包皮来源的人类真皮微血管内皮细胞(hDMEC),人脐静脉/脐带血内皮细胞(HUVEC),和胎儿胎盘微血管内皮细胞(hPMEC)。在一个优选的实施方式中,将HUVEC用作内皮饲养细胞。

[0059] 饲养细胞优选地能够在无血清环境中生长并生存,以能够与内皮细胞在无血清培养基中培养。许多类型的内皮细胞不能在无血清的条件下保持培养。为了用作饲养细胞,对内皮细胞进行修饰以使其在无血清培养基中能够存活并增殖,这样可以克服内皮细胞需要血清的这一障碍。

[0060] 可以修饰内皮细胞,例如,通过基因转化细胞,所述基因在无血清条件下驱动生长和增殖。支持内皮细胞在无血清培养物中生存的基因的实例包括Akt(蛋白激酶B或PKB)基因和腺病毒E4ORF1基因。在一个具体的实施方式中,HUVEC被转化以表达选自Akt或腺病毒E4ORF1基因的基因。美国专利号8,465,732中公开了使用E4ORF1转化HUVEC,其内容在此通过引用并入本发明。以Akt转化内皮细胞在,例如,在Fujio和Walsh, *J. Biol. Chem.* 274: 16349-16354 (1999) 中公开,其内容通过引用并入本发明。

[0061] 可以使用任何合适的使用基因转染或转导内皮细胞的方法,所述基因促进无血清环境下的存活和增殖。例如,可以使用本领域已知的标准方法来将E4ORF1或Akt的基因转染到细胞中,所述方法包括但不限于脂质体介导的转染、聚凝胺介导的转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、显微注射或微粒轰击。同样,可使用病毒递送系统(例如慢病毒、腺病毒、逆转录病毒、腺相关病毒或疱疹病毒递送系统)将E4ORF1或Akt基因递送至内皮细胞。在一个实施方式中,使用慢病毒基因递送系统将E4ORF1或Akt基因递送到内皮细胞。

[0062] 饲养细胞可以在内皮细胞生长培养基中培养(例如,培养基199, Thermo Scientific:#FB-01),所述培养基具有10-30%胎牛血清(Omega Scientific)、15-25微克/毫升内皮细胞补充剂(例如,从Biomedical Technologies:#BT-203获取)、0.5-2X青霉素/链霉素和15-25单位/毫升肝素(例如, Sigma:#H3149-100KU)。可以在培养容器表面上铺一层饲养细胞,并且优选地一旦在培养容器上建立了饲养细胞的汇合层,则用无血清培养基取代内皮细胞生长培养基,并且可将表达重编程因子的内皮细胞在饲养层上方铺板。

[0063] 例如,可用FGRS重编程因子转导成熟HUVEC(或hDMEC),然后在2-3天后洗涤并将成熟HUVEC(或hDMEC)再种植在已形成的E4-HUVEC饲养单层上。在无血清与E4-HUVEC共培养过程中,转导 $5 \times 10^4$ 成熟内皮细胞可以产生多个不同的HMLP的集落。

[0064] 从培养基中分离HMLP

[0065] 可以从培养物中分离HMLP以供进一步使用。在一个实施方式中,通过分离CD45+细胞来分离HMLP。在另一个实施方式中,通过分离CD45+CD34+细胞来分离HMLP。可以通过例如,细胞分选和从HMLP与内皮饲养细胞(即CD45-)的共培养物中分离CD45+,来分离HMLP。

[0066] 可以从培养基中分离出HMLP作为非均相/混合群体(例如,细胞群体,其中群体中的不同细胞除了表达CD45+或CD45+CD34+之外还表达不同标记物),或者作为相对均质/基

本上纯的群体(例如,这样的一种细胞群体,其中大于50%、大于60%、大于70%、大于75%、大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或大于98%的细胞除了表达CD45<sup>+</sup>或CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>还表达一套共同的标记物)。

[0067] 药物组合物和治疗方法

[0068] 本公开还提供了具有药学上可接受的运载体和内皮细胞生成的HMLP的药物组合物。这样的药物组合物除了所述细胞外还可以包含生理上可接受的基质或生理上可接受的赋形剂。基质和/或赋形剂的类型除其他因素以外将取决于预期的给药途径。合适的基质和/或赋形剂是本领域已知的。使用已建立的用于存储干细胞或脐带血细胞的方法可以将这样的组合物冷冻和保存在,例如,液氮中。在一个优选实施例中,药物组合物通过静脉输注到患者体内。

[0069] 本发明进一步提供了治疗方法,所述治疗方法利用本发明公开的所述内皮细胞产生的HMLP和药物组合物。本发明提供的HMLP适合于在受试者中重构造血细胞或用于提供所需的造血细胞类型富集的细胞群。本发明所述的HMLP可用于在经过例如但不限于放射治疗和化学疗法后的免疫功能不全的对象中重构全部类型的造血细胞。给药所公开的HMLP(例如通过输注或移植入对象)可以增加或替换肝、胰、肾、肺、神经系统、肌肉系统、骨骼、骨髓、胸腺或脾脏的干细胞或祖细胞。HMLP移植可以是自体的或同种异体的,包括匹配和不匹配的HLA型造血移植。可以理解,可能有必要对宿主进行处理以降低对供体细胞的免疫排斥反应。

[0070] 所述对象或个体可以是需要基于细胞的治疗的任何动物。在一些实施方式中,所述个体是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于人类、非人灵长类、小鼠、牛、马、狗、猫等。在一个优选的实施方式中,所述哺乳动物是人。

[0071] 对于将本发明提供的扩增的细胞对患者施用,扩增细胞的有效量的范围可以从少至几百个或更少到多达数百万或更多。应该理解的是,用于给药的扩增细胞的数量取决于待治疗的病症的具体情况,包括但不限于待治疗的大小或总体积,以及接受者的需要和状况,以及其它医学专业人士熟悉的因素。在一些实施方式中,以 $10^3$ 至 $10^{10}$ 个细胞每100公斤人的剂量给药或移植入对象或个体体内。给药或移植的方法是本领域熟知的,包括,例如,输注。本发明提供的经扩增的细胞可通过,例如,静脉输注给药。

[0072] 在一个实施方式中,HMLP用于在骨髓移植中增强或替换骨髓细胞。目前将人类自体 and 同种异体骨髓移植用作对疾病(如白血病,淋巴瘤和其它威胁生命的疾病)的治疗方法。但是这些方法的缺点是必须拿走大量的供体的骨髓以确保有足够的细胞用于移植。本发明通过用内皮细胞产生的HMLP替换或补充骨髓捐赠用于输注或移植入接受者体内,从而减少或消除了对大量骨髓捐赠的需求。

[0073] 在一些实施方式中,提供了细胞的单次给药。在其他实施方式中,使用多次给药。在周期性的时间段进行多次给药,例如连续3至7天的初始治疗方案,然后在其他时间重复。

## 实施例

[0074] 细胞培养 按照文献Goldberg, A.D.等, (Cell) 140:678-691 (2010) 中描述的方法获得人脐静脉内皮细胞(HUVEC)。在内皮细胞生长培养基(EM)中培养HUVEC, EM包括培养基199(Thermo Scientific:#FB-01), 20%胎牛血清(Omega Scientific), 20微克/毫升的内

皮细胞补充剂 (Biomedical Technologies:#BT-203), 1X青霉素/链霉素和20单位/毫升肝素 (Sigma:#H3149-100KU)。从ScienCell研究实验室 (目录号2020) 购买成人原发性人真皮微血管内皮细胞 (hDMEC)。由StemSpan SFEM (Stemcell Technologies)、10%的Knockout替代血清 (Invitrogen)、5纳克/毫升bFGF、10纳克/毫升EGF、20纳克/毫升SCF、20纳克/毫升FLT3、20纳克/毫升TPO、20纳克/毫升IGF-1、10纳克/毫升IGF-2、10纳克/毫升IL-3、10纳克/毫升IL-6 (全部来自Invitrogen、eBioscience或Peprotech公司) 制造无血清造血培养基。

[0075] 纯化人类脐带血祖细胞 按照IRB方案“造血干细胞的阶段特异性分化为功能性血管形成组织” (威尔康奈尔医学院IRB#09060010445) 获得人脐带血。使用Ficoll-Paque (GE) 通过密度梯度对脐带血单核细胞进行纯化, 并使用抗CD34微珠 (Miltenyi公司) 磁分离来富集CD34<sup>+</sup>祖细胞。通过使用人祖细胞富集试剂盒 (StemCell Technologies公司) 来阴性选择Lin<sup>+</sup>细胞实现进一步纯化。使用Arcturus PicoPure RNA分离试剂盒 (Applied Biosystems公司; 所述试剂盒被用于所有的RNA提取过程) 从通过FACS分离的Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>细胞中提取RNA。

[0076] 流式细胞仪 在Becton Dickenson LSRII SORP上进行流式细胞仪分析, 在Aria II SORP上进行荧光激活细胞分选 (FACS)。使用针对人CD45、CD34、CD14、CD31、CD43、CD90、CD41a、CD33、CD19、CD3、CD4、CD8、CD235、CD45RA、CD83、CD11b、CD38、LIN混合物、CD117、CD133、CD144 (BD Pharmingen公司, eBioscience公司) 或小鼠CD45 (eBioscience公司) 的抗体。通过CompBeads (BD Pharmingen公司) 进行电压调整和补偿, 并且在荧光扣除 (fluorophore minus one, FMO) 对照和未染色的对照上进行门分选 (gating)。

[0077] 鉴定在内皮细胞和造血祖细胞之间差异表达的转录因子 为了确定造血特化所必需的条件, 我们对新鲜分离的HUVEC和Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>人脐带血造血祖细胞进行RNA-测序, 以确定差异表达的转录因子。确定了26种差异表达的转录因子 (表1)。

[0078] 表1在HUVEC和Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>人脐带血 (CB) 造血祖细胞之间差异表达的转录因子 (TF)。

[0079]

TF	HUVEC	CD34 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup> (CB)
ZFP36	4.81	12.4
FOS	3.82	12.36
JUNB	6.26	12.17
GMFG	5.33	10.3
KLF2	7.7	10.28
FOSB	1.51	10.28
NFE2	0	9.45
KLF1	0	9.29
KLF4	0	9.22
LYL1	8.55	9.03
LMO2	7.24	8.87
TAL1	6.2	8.31
GATA1	0	8.18
SPI1	0	8.04

IKZF1	0	7.83
GFI1B	0	7.7
VAV1	0	7.67

[0080]

MEIS1	3.23	6.75
MYB	0.23	6.47
MLLT3	4.21	6.4
RUNX1	0.21	6.23
GFI1	0	5.54
HLF	0	4.67
BEX1	2.52	4.47
PBX1	4.24	4.88
BEX2	0.03	3.95

[0081] 慢病毒载体 将候选转录因子亚克隆到pLVX-IRES-Zs Green1慢病毒载体 (Clontech)、pLOC慢病毒载体 (OpenBiosystems) 或LV105慢病毒载体 (Genecopoeia) 中。按照文献Sandler, V.M. 等, PLoS One 6:e18265 (2011) 中所描述的方法包装慢病毒颗粒。简言之, 将人胚胎肾 293FT (HEK293FT) 细胞与慢病毒载体和两种辅助质粒, psPAX2和pMD2.G (获自Addgene的Trono实验室) 以等摩尔比进行共转染。转染48-52小时后收集上清液, 过滤并用Lenti-X浓缩器 (Clontech公司) 浓缩。在限制稀释实验中使用HUVEC作为靶细胞确定病毒滴度。我们使用GFP<sup>+</sup>细胞的数量或在存在选择抗生素 (嘌呤霉素) 时形成的集落的数量作为每体积感染性病毒颗粒数量的读取值。我们以MOI 5-10对HUVEC或hES细胞来源的内皮细胞进行感染并以10<sup>-25</sup>对成纤维细胞进行感染。

[0082] 用表达SPI1的慢病毒转导HUVEC和HEF (人胚胎成纤维细胞) 并在嘌呤存在下 (0.5至1微克/毫升) 扩增10-14天, 以获得充足的细胞数量。将所有四种表达FGRS的慢病毒重悬于内皮细胞培养基并施加于饲养细胞。12-24小时后用额外的内皮细胞培养基饲养转导的内皮细胞。2-3天后, 将经转导后的转导内皮细胞重新在饲养细胞上铺板。

[0083] 我们筛选了被识别的26种转录因子的不同组合, 以鉴定能够将HUVEC重编程为造血细胞的转录因子。为避免潜在的起始HUVEC培养物被造血细胞污染, 我们将新鲜分离的HUVEC进行分类, 以获得成熟CD45<sup>-</sup>CD133<sup>-</sup>cKit<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>内皮细胞 (图1A)。在没有外源表达的转录因子下, 这些HUVEC从来没有产生CD45<sup>+</sup>造血细胞。因此, 我们将CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>细胞的出现作为初始读取值, 以鉴定获得造血潜力的细胞。将表达被识别的转录因子并带有绿色荧光蛋白 (GFP) 标记物或嘌呤霉素抗性基因的慢病毒载体用于转导HUVEC (图1A)。然后所述经转导的HUVEC在造血细胞因子 (TPO、KITL、FLT3L; 见“方法”) 存在下无血清增殖。转导后约2周, HUVEC培养物显示圆形GFP<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>细胞的出现 (图1B), 并且圆形葡萄状的GFP<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>细胞集落从内皮单层上开始出现 (图1A, 第12-16天)。

[0084] 鉴定重编程内皮细胞必要的转录因子 如表1所确定, 用25种转录因子同时转化HUVEC, 每个转化缺少一种不同的TF。该对候选转录因子进行的系统的“逐一排除”表明造血重编程需要FOSB、GFI1、RUNX1和SPI1 (这种组合称为“FGRS”) 的强制表达 (图1D, n=3)。不需要其他的候选转录因子。我们发现, 单独的FGRS转录因子足以生成造血样集落 (图1E, n=



3)。除去任一FGRS因子并没有完全消除造血状集簇的形成,但显著降低了集簇数量( $P < 0.05$ ),并且出现的造血细胞样细胞的细胞分裂不积极。

[0085] 设计饲养层以提升和维持FGRS转导的内皮细胞的生长 内皮细胞和HSPC在主动脉-性腺-中肾 (AGM) 区共同发育。因为在发育的胎儿中原始HSC需要一个合适的生态位进行扩增,血管生态位饲养细胞可以提高生存和维持新兴造血细胞样细胞的特化。为了检验这一假设,我们使用了血管生态位的体外模型,如Butler, J.M.等, (Blood) 120:1344-1347 (2012) 文献中所描述的通过腺病毒E4复合物 (E4-HUVEC) 的E4ORF1基因的表达,以实现HUVEC的无血清和无生长因子培养。本研究组和其他人展示了E4-HUVEC保持了其对原始造血细胞 (小鼠 $cKit^+Lin^-Sca1^+CD34^+Flt3^-$ 和人 $Lin^-CD45RA^-CD38^-CD34^+CD49f^+$ HSPC) 的生态位样的支持,其能移植到经致死性辐照的初级和二次接受者。

[0086] 通过使用此血管生态位共培养系统,我们设计了一个无外源物的平台,其中用FGRS重编程因子转导成熟HUVEC (或hDMEC),然后,2-3天后洗涤HUVEC (或hDMEC) 并将其再铺板在已形成的E4-HUVEC单层饲养细胞上。在与E4-HUVEC无血清共培养期间,转导 $5 \times 10^4$ 个成熟内皮细胞产生 $32.3 \pm 10.5$  ( $n=8$ ) 不同的集落,但如果加入血清,则观察不到集落。初始的HUVEC不适合作为血管生态位,因为它们不能在无血清培养基中存活超过1-2周,这使得FGRS-EC在重编程过程中不能受益于血管生态位的支持。事实上,从与初始HUVEC的共培养物中出现GFP<sup>+</sup>造血样集落 (每 $5 \times 10^4$ 个转导的HUVEC有 $3.4 \pm 3.2$ 个集落; $n=5$ ) 并不比在缺少饲养细胞的情况下从FGRS-内皮细胞中长出更为常见。

[0087] E4-HUVEC提供了培养FGRS-EC的必要环境 将FGRS转导的内皮细胞 (FGRS-EC) 与E4-HUVEC共培养显著增加了造血样集落的产率和持久性,这些集落最终表现出rEC-HMLP的形态和分子特征。因此,从FGRS-EC中有效地产生造血细胞需要来自具有生态位样功能的内皮细胞的长期的支持信号。

[0088] 由于这些原因,我们使用了E4-HUVEC血管生态位饲养平台用于进一步表征FGRS转导的内皮细胞的造血重编程。将 $5 \times 10^4$ 个内皮细胞转导2天,随后与E4-HUVEC共培养3周,导致出现了 $32.3 \pm 10.5$  ( $n=8$ ) 个不同的集落 (图1C)。这些数据表明,所述支持性血管细胞对从FGRS转导的内皮细胞中出现造血细胞是必需的。

[0089] 确认FGRS转录因子在培养的细胞中的表达 当不考虑被引入到初始内皮细胞的FGRS的适当化学计量时,重编程的效率非常低,接近于小于0.07%。因此,为了提高重编程的效率,我们制定策略以选择那些FGRS转导的内皮细胞的亚群,这些亚群被适当化学计量的转录因子转导。我们最初专注于用适当化学计量的GFI1、SPI1和FOSB转录因子产生内皮细胞,因为它们在内皮细胞中的天然表达是可以忽略不计的 (见表1)。为了做到这一点,我们用FGRS慢病毒“混合物”转导 $5 \times 10^6$ 个内皮细胞,所述FGRS慢病毒“混合物”被标记了嘌呤霉素抗性 (SPI1) 或GFP (FOSB和GFI1)。然后,我们进行了2天的嘌呤选择以富集表达SPI1的细胞并对它们按GFP表达进行分类来富集SPI1<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> (FOSB/GFI1) 内皮细胞。然后我们将这些GFP<sup>+</sup>细胞接种至12孔板并在无血清培养基中使它们扩增两天 (每板 $10^5$ 个细胞, $n=3$ )。

[0090] 然后,我们将 $10^4$ 个所述GFP<sup>+</sup>嘌呤霉素抗性细胞在造血培养基中的E4-HUVEC饲养层上重新铺板,并且在~20天共培养后量化造血集簇的数目。我们发现,这些GFP<sup>+</sup>、嘌呤霉素抗性细胞每 $10^4$ 个重新铺板的细胞产生 $156.0 \pm 3.6$  ( $n=3$ ) 个造血样集落,这表明重编程的效率至少为1.5%。这种计算假定每个集落源自单个重编程细胞,并且每个所述转导的内皮

细胞——我们知道其表达两种因子 (SPI1 以及, FOSB 或 GFI1 中的一种或两种) ——表达全部四种 FGRS 转录因子。在表达合适的化学计量的每种因子的细胞中, 所述效率可能要高得多。因此, 我们的重编程的方法不太可能是由于存在于所述 HUVEC 单层中的非常稀少的已存在的造血/血管形成内皮细胞群体的自然分化。

[0091] 支持性血管生态位促进 FGRS-内皮细胞重编程为增殖的多系、红系-巨核细胞-骨髓祖细胞 在与 E4-HUVEC 共同培养的三至四个星期, FGRS-内皮细胞开始迅速增殖并形成部分附着于 E4-HUVEC 单层的 GFP<sup>+</sup> 葡萄状集簇。对葡萄状集簇的瑞氏-吉姆萨染色揭示了表示造血祖细胞和它们后代的细胞形态 (图 1B, 右图)。我们偶尔也观察到大的多集落生态位样的结构形成, 这些结构将发育中的造血集落从它们的周围环境中物理分离开来 (n=4)。流式细胞术结果表明, 大多数 FGRS-EC 后代 (GFP<sup>+</sup> 细胞) 失去了成熟内皮细胞标记物 (CD31) 的表达, 但是有些亚群获得了泛造血标记物 CD45 的表达, 有时与 CD34 共同表达 (图 2A, n=9)。与此相反, GFP<sup>-</sup> E4-HUVEC 保持高水平的 CD31 表达并保持 CD34<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup>。GFP<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> FGRS-EC 后代的亚群表达其它造血标志物, 如 CD43<sup>+</sup> (8.96% ± 2.3; n=3), CD90<sup>+</sup> (THY-1<sup>+</sup>) (6.15% ± 1.13; n=3) 和 CD14<sup>+</sup> (40.0% ± 4.95; n=3)。在与 E4-HUVEC 共培养邻近 4 到 5 周结束时, GFP<sup>+</sup> 细胞的增殖增加, 导致产生高达 20 × 10<sup>6</sup> 个 GFP<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> 细胞, 输入的 EC 扩增了接近 400 倍 (图 3A; 17.2 × 10<sup>6</sup> ± 2.4; n=6)。三到五天后, 增殖的速率和存活细胞的数目迅速下降, 虽然 GFP<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> 的产生以降低的速率仍然继续。因此, E4-HUVEC 细胞的支持性血管生态位促进将 FGRS-ECs 重编程为增殖的多系、红系-巨核细胞-骨髓祖细胞 (rEC-HMLP)。

[0092] rEC-HMLP 可以生成红细胞、巨噬细胞、粒细胞和巨核细胞前体细胞 为了评估 rEC-HMLP 的功能, 我们使用标准的甲基纤维素测定法进行了集落形成单位 (CFU) 测定。如果 HUVEC 确实转变成功能性 rEC-HMLP, 那么这些细胞应当能够在 CFU 测定中分化成至少两种不同的造血谱系。在用 FGRS 转导 HUVEC 并和血管生态位共培养四周后, 分选 GFP<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> rEC-HMLP 并以密度为 1200-1600 细胞/平方厘米 (5000-7000 细胞/35 毫米板) 接种, 用于 CFU 测定 (n=3)。14 天内所述细胞产生了在形态上类似 CFU-GM (粒细胞/巨噬细胞集落形成单位)、CFU-GEMM (粒细胞-红细胞-单核细胞-巨核细胞集落形成单位) 和部分血红蛋白化的 BFU-E 型造血集落 (爆裂型集落生成单位-红系细胞, 其为红系祖细胞类型) 的 GFP 细胞聚集 (图 2C)。在 CFU 测定中的谱系特化通过瑞氏-吉姆萨染色集落来验证 (图 2D)。我们能够检测到带有文献 Beutler, E. 等, *Williams Hematology*; McGraw Hill, 公司 (第五版, 1995) 中定义的红细胞、巨噬细胞、粒细胞和巨核细胞前体的典型形态特征的细胞。

[0093] 从甲基纤维素培养物中获得的集落的免疫表型分析表明 CD235、CD11b、CD14、CD83 和 CD45 细胞的存在, 这表明 rEC-HMLP 分化成红细胞、巨噬细胞、单核细胞和树突状细胞的后代。CD235<sup>+</sup> (糖蛋白 A) 细胞也是 CD45<sup>-</sup>, 这表明了红细胞分化 (图 2E)。

[0094] 人类成人真皮微血管内皮细胞能够形成自体 HSC 为了测试我们的方法是否适用于重编程除了 HUVEC 之外的内皮细胞, 我们使用人类成人真皮微血管内皮细胞 (hDMEC)。将 hDMEC 重编程到可移植的 rEC-HMLP 对未来潜在的临床应用更相关, 因为它可能能够产生用于骨髓重建的可移植自体造血祖细胞。另外, 由于成人内皮细胞会含有逐渐减少的低数量造血内皮细胞, 因此这种方法表明, 成熟内皮细胞 (但不是造血或成血管内皮细胞) 被重编程为造血细胞。

[0095] 用 FGRS 因子转导 hDMEC, 并在无血清环境进行血管诱导 (使用与 HUVEC 重编程相同

的流程)。为了评估重编程的hDMEC的体外功能,我们进行了CFU测定。用FGRS转导hDMEC四周后,分选GFP<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>细胞,并以密度为1200-1600细胞/平方厘米接种,用于CFU测定(n=3)。12-14天内,所述细胞产生了在形态上类似CFU-GM、CFU-GEMM、部分红血细胞化的BFU-E的细胞聚集,以及混合集落(图4A)。在CFU测定中的谱系特化通过瑞氏-吉姆萨集落染色来验证。我们能够检测到带有红细胞、巨噬细胞、粒细胞和巨核细胞的前体的典型形态的细胞(图4A)。从甲基纤维素培养获得的集落免疫分析显示,hDMEC来源的rEC-HMLP具有分化成多种谱系的能力,包括红细胞CD235<sup>+</sup>(58.66±3.47%)、巨噬细胞CD11b<sup>+</sup>(10.39±3.05%)、单核细胞CD14<sup>+</sup>(10.87±1.28)和树突CD83<sup>+</sup>(7.94±0.80%)的细胞后代(图4B)。

[0096] HUVEC不能自发地产生rEC-HMLP样细胞 为排除HUVEC可能包含可自发地产生rEC-HMLP样细胞的造血或血管形成细胞的可能性,我们进行了两组实验。

[0097] 首先,我们通过以一个、两个、五个、十个细胞每孔的密度分选表型标记的成熟内皮细胞来产生克隆培养物。为了实现这一点,我们进行多色流式细胞术并以一、两、五和十个细胞分配到96孔板中的形式分选CD144(VE-钙粘蛋白)<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>E-选择素<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>HUVEC。E-选择素(CD62E)仅表达在成熟内皮细胞并且在任何造血或非血管细胞中不存在。这些集落随后扩增成>10000个细胞培养物(对于5和10-细胞克隆)、>5000个细胞(1-细胞克隆#1和2细胞克隆)和>3000个细胞(1-细胞克隆#2)。用FGRS转导单细胞培养物,两细胞,五细胞和十细胞培养物,接着与E4-HUVEC共培养导致出现了类似于在混合的HUVEC培养实验中观察到的集落的造血样集落。由于E-选择素仅在成熟的终末分化的激活的内皮细胞上表达,污染的“造血或血管形成”内皮细胞不太可能存在于FGRS转导的HUVEC的克隆群体中并产生造血细胞。

[0098] 在第二组实验中,我们在无血清培养基中培养用于重编程实验的HUVEC。我们对比了在培养基中去除血清和组合添加造血细胞因子后,引起的HUVEC的增殖以及HUVEC中CD45和CD34的表达。无论是去除血清,还是加入造血细胞因子的最佳混合物,都不会在HUVEC中引起任何可检测的CD45表达。然而,单独去除血清和/或同时联合TGFβ信号抑制都会在HUVEC中引起CD34表达的显著上调,以维持其血管的身份。总的来说,这些数据表明,FGRS不太可能在HUVEC中重编程已存在的造血或血管形成细胞前体细胞,而是FGRS TF+血管诱导方案驱动了终末分化的CD144<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>E-选择素<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>EC转化成造血细胞。

[0099] rEC-HMLP可以生成表型正确的HSPC和多能祖细胞 rEC-HMLP的更详细的表型分析表明小群体的细胞是CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>或CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>,从而分别满足了在文献Chao,M.P.等(Cold Spring Harb Symp Quant Biol)73:439-449(2008)中定义的表型标记的HSPC或多能祖细胞的标准(图2B,n=3)。

[0100] CD45<sup>+</sup>细胞具有扩增潜力 我们比较了CD45<sup>+</sup>和CD45<sup>-</sup>细胞在无血清造血培养基中的扩增潜力。将CD45<sup>+</sup>(12x10<sup>3</sup>)和CD45<sup>-</sup>(60x10<sup>3</sup>)细胞分选到分别的孔中,并扩增两天。我们观察到CD45<sup>+</sup>细胞的5倍扩增(56.6×10<sup>3</sup>±7.9×10<sup>3</sup>;n=3),而CD45<sup>-</sup>细胞的显著减少(4.6×10<sup>3</sup>±1.0×10<sup>3</sup>;n=3)。为测试CD45<sup>+</sup>和CD45<sup>-</sup>细胞克隆扩增的潜力,它们以1或2个细胞/孔的密度被分选至96孔板。培养七天后,我们在6.3±2.1个孔(93.1±14.5细胞/孔)(1-细胞分选)和29.0±4.3个孔(112.1±21.2细胞/孔)(2-细胞分选)(n=3)观察到CD45<sup>+</sup>细胞扩增。1和2-细胞分选在细胞数/孔之间的差异在统计学上不显著(p=0.78),这表明检测到细胞扩增的孔的数量差异是由于分选的细胞的存活,而不是对分选入孔中的细胞数的反映。我们没

有检测到CD45<sup>-</sup>细胞的任何显著扩增。

[0101] 人类胚胎干细胞的分化与尝试的重编程 我们使用了通过荧光报告子特异性鉴定分化的内皮细胞衍生物的转基因hESC报告子谱系,所述荧光报告子由人VE-钙粘蛋白启动子的片段驱动,如在文献Rafii, S.等, Blood 121:770-780 (2013)中所述。为了增加内皮作用,用与血管饲养细胞的共培养启动hESC的分化。简言之,将HUVEC分离并用慢病毒AdE4ORF1转导,如在文献Seandel, M.等, Proc Natl Acad Sci U S A 105:19288-19293 (2008)中所述。在将hESC铺板以开始分化的前一天,将MEF条件培养基更换为没有FGF-2并补充有2纳克/毫升BMP4的hESC培养基。第二天,将hESC直接铺板于在hESC培养基中(无FGF-2,加2纳克/毫升BMP4)的E4ORF1<sup>+</sup>内皮细胞的80%汇合层上,并静置48小时。培养基的这个时间点被认为是分化的第0天。依次用重组细胞因子以如下顺序刺激细胞:第0至7天-补充10纳克/毫升BMP4;第2至14天-补充10纳克/毫升VEGFA;第2至14天-补充5纳克/毫升的FGF-2;第7至14天-补充10微摩尔的SB-431542。在第14天通过FACS收获hESC来源细胞中共表达血管特异报告子和CD31的那部分。用FGRS混合物转导这些细胞,2-3天后将这些细胞铺板在E4ORF1HUVEC层上。重编程的程度通过流式细胞术评估。

[0102] 人类胚胎干细胞缺乏形成高度增殖HSC的能力 目前,寡能干细胞(包括胚胎干细胞(ES)和诱导的寡能干细胞(iPSC))向再生造血细胞的分化的成功很有限。因此,FGRS可能是缺失的能够增强来源于人ES的内皮细胞分化为HSC的因子。为此,我们将hES分化成内皮细胞(hES-EC)<sup>38</sup>。然后,我们纯化VEGFR2阳性hES-EC并用FGRS转导它们。值得注意的是,FGRS转导的hES-EC能产生大量CD45<sup>+</sup>CD144<sup>-</sup>细胞。然而,这些CD45<sup>+</sup>CD144<sup>-</sup>细胞未能形成不同的稳定的造血样集落,并且没有进入高度增殖生长阶段。这些结果表明,hES-EC并不像HUVEC一样能够容易地重编程为rEC-HMPL。

[0103] 从内皮细胞产生的rEC-HMLP可移植并在体内取代造血细胞发挥功能 为确定rEC-HMLP是否能够在体内移植,我们通过眼眶后注射将 $1.5 \times 10^6$ 个CD45<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>rEC-HMLP移植入经致死性辐射(275拉德)的免疫缺陷的NOD-SCID-IL2受体缺陷(NSG)的成年小鼠(n=9;辐射后1天)体内。在移植2、5、12、16和22至44周后,检测经注射的小鼠的外周血中人CD45<sup>+</sup>细胞的存在(图3B)。我们在2(n=7;17.38±7.73%)、5(n=6;15.1±13.39%)、12(n=6;14.14±5.44%)、16(n=6;22.36±17.95%)和22至44(n=6,21.23±22.27%)周检测循环的人CD45<sup>+</sup>细胞。对移植16周后的外周血、骨髓(BM)和脾分析表明人CD45<sup>+</sup>细胞在所有三种组织中存在,并且人CD45<sup>-</sup>CD235<sup>+</sup>红系细胞在外周血中存在。骨髓和脾由rEC-HMLP(CD45<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>)的髓系细胞后代和少量但可检测数量的CD41a<sup>+</sup>(巨核细胞)细胞构成(图3C)。

[0104] 移植的rEC-HMLP保留其生成红细胞、巨核细胞、巨噬细胞、单核细胞和树突状细胞的后代的能力 为了确定从宿主中分离的经移植的rEC-HMLP是否保留其多系潜能,我们进行了二次CFU测试。我们在移植22(n=1)和24(n=4)周后从移植小鼠的骨髓中分离人CD45<sup>+</sup>(hCD45<sup>+</sup>)。这些细胞在体外进行24小时扩增并分选hCD45<sup>+</sup>hCD34<sup>+</sup>细胞用于CFU测试。在14天之内,铺板的细胞产生了具有与CFU-GM、CFU-GEMM和BFU-E相似形态的集落。细胞离心涂片的瑞氏-吉姆萨染色表明了测定细胞的人髓系细胞后代的典型形态。甲基纤维素培养物的免疫分析显示,人CD45<sup>+</sup>隔室含有CD41a<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup>、CD83<sup>+</sup>和CD33<sup>+</sup>细胞,这表明存在巨核细胞、巨噬细胞、单核细胞和树突状细胞后代。CD45<sup>-</sup>隔室含有CD235<sup>+</sup>,且不含有小鼠Ter119<sup>+</sup>细胞,这表明在CFU测试(图3E)中人CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>细胞的强烈红细胞分化。

[0105] 对移植入NSG小鼠骨髓内的rEC-HMLP的分析显示少量满足人类多能祖细胞定义的Lin<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>细胞(图3E)。为了验证这些细胞保持其多系潜能并且来自重编程rEC-HMLP,我们将它们铺板以用于CFU测试并在单个集落中检查病毒的整合。分析从单独的集落分离的基因组DNA中是否存在四种重编程因子。所有测试的集落(n=3)对表达FOSB、GFI1、RUNX1和SPI1的慢病毒载体呈阳性(图3F)。为在单细胞水平量化病毒整合的频率,我们分析了来自宿主骨髓的人CD45<sup>+</sup>细胞。将细胞分选到96孔板(1个细胞/孔)用于全基因组扩增(WGA)。对扩增的基因组DNA进行病毒整合检查。所有细胞(n=21)对病毒载体整合呈阳性。两个细胞呈现出用于重编程的4种病毒中的3种的整合(检测不到RUNX1的FGS和检测不到FOSB的GRS)(图3G)。对单个细胞和单个集落进行病毒整合的结果证实,从宿主小鼠中分离的人造血细胞来自移植入NSG小鼠的rEC-HMLP。

[0106] 移植的rEC-HMLP保持基因组的完整性 为了评估CD45<sup>+</sup>rEC-HMLP(在转导后第35天)和移植在NSG小鼠的骨髓中的CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>rEC-HMLP(移植24周后)的基因组的完整性,我们使用安捷伦的SurePrint G3CGH人类基因芯片(1M探针)进行比较基因组杂交(CGH)分析。该分析没有发现遗传异常,这表明增殖的rEC-HMLP在体外和体内均保持遗传稳定。

[0107] 移植的rEC-HMLP不会导致体内恶变 为了解决移植的rEC-HMLP可能恶变的忧虑(包括对骨髓增生异常综合征(MDS)的易感性),我们在移植之后对接受体小鼠的骨髓、脾和肝脏进行了长达10个月的分析(图3A)。首先分析外周血中是否存在循环的hCD45<sup>+</sup>细胞。将表现出移植的小鼠杀死并针对其脾脏、肝脏和胫骨分析MDS的迹象。没有小鼠表现出任何白血病和淋巴瘤的初步证据,如淋巴结肿大、脾肿大或器官肿大。我们还通过对rEC-HMLP移植小鼠的骨髓、脾脏和肝脏染色进行了全面的分析。我们没有看到任何胶原蛋白或结蛋白过量沉积的迹象。此外,骨髓的微观结构没有表现出骨髓增生异常综合征留下的纤维化重塑的证据。所述成骨细胞、血管和血管周围的区域形态完好。我们得出结论,我们的方法不会诱导具有致白血病潜力的造血细胞。

[0108] 移植的rEC-HMLP产生淋巴细胞 移植的来自HUVEC(在脾,骨髓和外周血)的rEC-HMLP的淋巴后代的数目少到可以忽略,这表明移植的rEC-HMLP不足以在体内促成T-细胞嵌合。为了解决SPI1的组成型残留表达阻止rEC-HMLP分化成T细胞的可能性,我们使用组成型表达的FGR因子和可诱导SPI1(SPI1-Tet-On)的组合。用FGR+SPI1-Tet-On慢病毒转导HUVEC,并使其在多西环素存在下在HUVEC饲养单层的层上生长27天。我们观察到造血样集落的形成和CD45<sup>+</sup>细胞的数量增加。HUVEC饲养细胞耐多西环素并且通过诱导新生造血细胞以保持其血管生态位功能。接着,将重编程的细胞转移到表达δ样4(OP9-DL4)骨髓基质细胞(OP9)层上,并在补充有IL-7(10纳克/毫升)、IL-11(纳克/毫升)和IL-2(纳克/毫升)的无血清造血培养基的存在下生长。对细胞进行CD3、CD19和CD14(3个星期的OP9-DL4共培养;图6A)表达的测试。值得注意的是,我们能够可靠地检测到一小部分的CD3<sup>+</sup>细胞(0.16±0.01%;n=3),大量的CD19<sup>+</sup>(1.17±0.13%;n=3)和非常大量的表达CD14的细胞(16.46±1.02%;n=3),这表示T细胞的产生。

[0109] 移植的rEC-HMLP生成功能巨噬细胞 为进行从rEC-HMLP分化的巨噬细胞的功能评估,我们进行了吞噬分析。在M-CSF(纳克/毫升)、SCF(纳克/毫升)、Flt-3(纳克/毫升)、TPO(纳克/毫升)和10%FBS存在而没有E4-HUVEC饲养层下,培养rEC-HMLP两周。我们观察到培养细胞的尺寸和粒度的增加。将培养物用PBS洗涤两次以除去非粘附细胞。使用混合了1微

升/毫升低浓度的红色荧光微珠的生长培养基,将附着的细胞在37℃培养一小时。培养后的细胞用PBS洗涤两次,用CD11b抗体对活细胞染色。固定细胞并用DAPI染色以使细胞核可视。共聚焦显微镜显示,牢固地附着的CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞的组,带有清晰可见的吞入的小珠(图6B)。因此,rEC-HMLP可以产生功能性巨噬细胞。

[0110] 从hDMEC产生的rEC-HMLP可以被移植并在体内取代造血细胞发挥作用 为了确定从hDMEC产生的rEC-HMLP是否能够在体内移植,我们通过眼眶后注射将 $1 \times 10^5$ 个CD45<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>rEC-HMLP移植入经亚致死性辐射(100拉德)的新生两周龄的NSG小鼠体内。在移植4、6和12周后,检测经注射的小鼠的外周血中的人CD45<sup>+</sup>细胞的存在(图4C)。我们在4( $2.09 \pm 1.27\%$ , n=6)、6( $4.46 \pm 3.66\%$ , n=6)和12( $4.05 \pm 3.50\%$ , n=6)周检测循环的人CD45<sup>+</sup>细胞。分析移植14周后的外周血、骨髓和脾表明,人CD45<sup>+</sup>细胞在所有三种组织中存在并且人CD45<sup>-</sup>CD235<sup>+</sup>红系细胞在外周血中存在(图4C,D,E)。移植14周后对脾的分析显示少量但明显量的CD19<sup>+</sup>( $10.13 \pm 4.98\%$ ;B细胞)和淋巴后代的CD56<sup>+</sup>( $1.62 \pm 0.67\%$ ;NK-细胞)细胞。这些都是除了CD11b<sup>+</sup>( $27.66 \pm 8.92\%$ ;巨噬细胞)和CD41a<sup>+</sup>( $4.90 \pm 1.51\%$ ;巨核细胞)以外的髓系细胞(图4D)。

[0111] 移植的hDMEC-来源的rEC-HMLP还保留在体内产生功能性的HSC-样细胞的能力。为从功能上测试是否移植的hDMEC-来源的rEC-HMLP能够在体内产生功能性HSC样细胞,我们进行二次移植。我们在移植12周后(n=10),从原始移植的小鼠的股骨移植全部骨髓。在原始移植14周后,对供体小鼠骨髓中移植的rEC-HMLP的表型分析,显示了显著量的CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>( $10.37 \pm 2.55\%$ )和CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>( $13.83 \pm 2.14\%$ )细胞,分别满足人类HSPC和多能祖细胞(MPP)的表型定义(图4E)。在移植3周(n=6; $14.61 \pm 15.7\%$ )和5周(n=6; $2.01 \pm 1.5\%$ )后,我们在第二个接受者的PB(外周血)中检测到明显量的髓系细胞后代(n=6; $44.32 \pm 23.21\%$ ) (图4F)。长期的初始移植和成功的二次短期移植证明了HSPC样细胞/自我更新的MPP存在于重编程的hDMEC群体中。

[0112] rEC-HMLP显示造血基因的上调和血管基因的下调 接着,我们将rEC-HMLP全基因组的转录谱与培养的HUVEC和新鲜分离的CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup>脐带血造血细胞的基因表达谱进行对比,以评估在全基因组转录组水平上的重编程的程度(图5A)。分析表明,相对于初始HUVEC和Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CB细胞,在移植前的CD45<sup>+</sup>细胞中、移植22周后的CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>rEC-HMLP中,造血基因上调和血管基因表达沉默。典型的寡能性基因,如Oct4、Nanog、Sox2和Myc基因在重编程的细胞中,相比于人胚胎干细胞(hESC细胞)和初始HUVEC并不上调,这表明不需要通过寡能状态的转换就能实现将HUVEC重编程为rEC-HMPL(图5B)。移植22周后,HUVEC、CD45<sup>+</sup>rEC-HMLP、CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>rEC-HMLP全转录组的层级集簇,以及带有CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>rEC-HMLP和CB细胞的紧密集簇的CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>细胞,说明体内存在额外的rEC-HMLP的“培育(education)/重编程”。

[0113] ChIP-seq和数据分析 如文献Goldberg,A.D.等,Cell140:678-691(2010)的描述进行了ChIP-seq。简言之,将细胞在1%多聚甲醛中交联15分钟,洗涤并裂解。使用Bioruptor剪切染色质至大约150个碱基对片段,洗涤并洗脱。将洗脱的染色质反向交联并过柱纯化(SPI1和GFI抗体购自Santa Cruz Biotechnology;目录号SC-352和SC-8558)。按照标准编制协议(Illumina公司)使用Illumina TruSeq DNA样品制备试剂盒制备用于测序的ChIP样品。根据标准Illumina协议在Illumina HiSeq 2000测序仪上进行测序服务。将

ChIP-seq读数与使用BWA程序的参考人类基因组(hg19,NCBI构建37)做比对(Li,H.等,Bioinformatics 25:1754-1760(2009)),通过Picard(在线购自SourceForge)除去PCR重复。保留映射到单个最佳匹配位置且不超过两个错配的独特读数,并用于产生SPI1和GFI1结合的全基因组分布以及峰鉴定。将软件ChIPseeqer 2.0(Giannopoulou,E.G.等,BMC Bioinformatics 12:277(2011))用于处理ChIP-seq数据和作为参照的来自输入的DNA的测序数据以FDR<0.005识别SPI1和GFI1的ChIP信号的基因组富集。在+/-2kb内从转录起始位点(TSS)的富集被定义为启动子峰。提交选定的基因以用于通过DAVID(可在网上从国家过敏和传染病研究所(NIAID),美国国立卫生研究院获取)进行基因本体(GO)分析和通过HOMER(可在网上从biowhat,美国加州大学圣地亚哥分校获取)进行基序分析。

[0114] SPI1和GFI1的DNA结合位的鉴定 为了阐明转录FGRS介导的内皮细胞重编程为rEC-HMLP的可能机制,我们使用染色质免疫沉淀结合深度测序(ChIP-Seq)比较HUVEC中的SPI1和GFI1的全基因组DNA结合。我们确定了距离转录起始位点(TSS) +/-2kb启动子区的23587个SPI1-结合和10999个GFI1结合的基因组位点。值得注意的是,91.6%的GFI1-结合TSS(10999中的10079)与SPI1-结合TSS重叠。然而,57.3%的SPI1结合启动子没有被GFI1占有。由SPI1、GFI1或SPI1和GFI1一起的结合的基因的转录水平(共同靶点或“CT”)的比较,可知大多数由GFI1单独结合的基因显示出降低的表达水平,而由SPI1单独或SPI1与GFI1组合结合的基因则上调。结合位点的基因本体(GO)分析揭示了一些基因簇,所述基因簇涉及从EC到rEC-HMLP的细胞识别的变化(图5C)。GO表明上调的CT( $\log_2(\text{rEC-HMLP}/\text{HUVEC}) \geq 2$ )属于在造血系统发育和髓系细胞分化中具有已知功能的基因簇,而已知大量的下调CT参与血管发育(图5C)。搜索已知的由SPI1和GFI1 TSS靶点占据的DNA结合基序显示下调的CT( $\log_2(\text{HUVEC}/\text{rEC-HMLP}) \geq 2$ )含有具有GFI1B(72个基因,  $p=0.001$ )和FOSB结合基序(64个基因,  $p=0.0001$ )的基因的亚群。由SPI1结合的上调( $\log_2(\text{rEC-HMLP}/\text{HUVEC}) \geq 2$ )基因的TSS的亚群含有已知的RUNX1(133个基因,  $p=0.0001$ )和FLI1(264个基因,  $p=0.01$ )的DNA结合基序。另外,CT的亚群包含已知的EBF(早期B-细胞因子)的DNA结合基序(130个基因,  $p=0.01$ )。

[0115] SPI1和GFI1的全基因组结合谱结合DNA结合基序检索和全转录组表达分析表明,SPI1单独以及SPI1与GFI1结合上调造血基因的表达。值得注意的是,血管基因的表达被SPI1和GFI1以及可能的FOSB抑制。造血基因的上调取决于与RUNX1和FLI1表达协同的SPI1的表达。值得注意的是,FLI1在移植22周后的初始HUVEC、CD45<sup>+</sup>rEC-HMLP、CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>rEC-HMLP中,以及Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CB细胞中同等表达;归一化的表达分别是7.4、7.9、7.2和7.6。

[0116] 为了确定FGRS诱导的重编程是否触发FGRS转录因子的内源表达,我们用RNA测序确定了5'和3'非翻译区(UTR)的表达。由于用于重编程的慢病毒构建体表达无UTR的FGRS因子的开放阅读框,我们能够通过UTR序列的存在来识别内源表达的转录子。使用全转录组RNA测序分析移植的人rEC-HMLP的5'和3'FGRS因子表明了所有四种FGRS因子的内源性表达的活化。将FGRS转录因子的内源性表达计算为RNA测序读取的分数,所述读取来自UTR,其作为分数(%) = UTR / (UTR+ORF),其中,UTR是与5'和3'UTR比对的RNA测序读取数,ORF是与目的基因的开放阅读框比对的RNA测序读取数。这一分析表明,不仅在体外(CD45<sup>+</sup>rEC-HMLP)而且在经一定时间的体内微环境介导的培育(education)(体内CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>)后,重编程的细胞中的FGRS因子的内源性表达被激活。

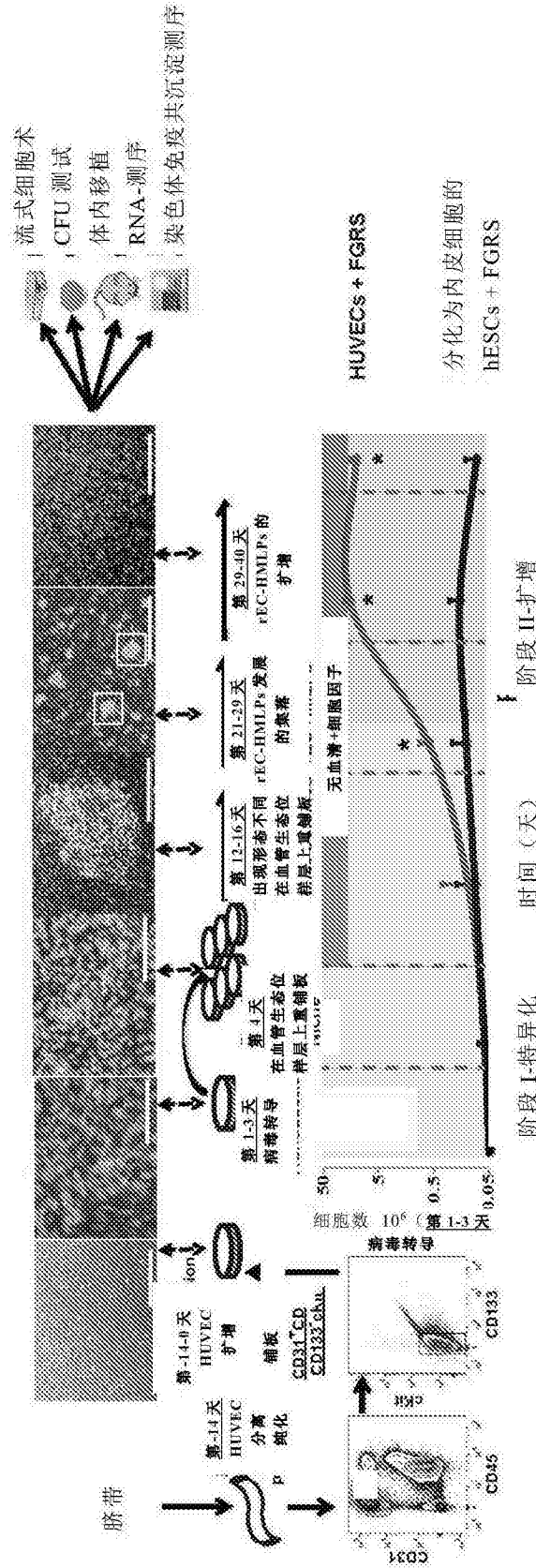


图1A





图1B

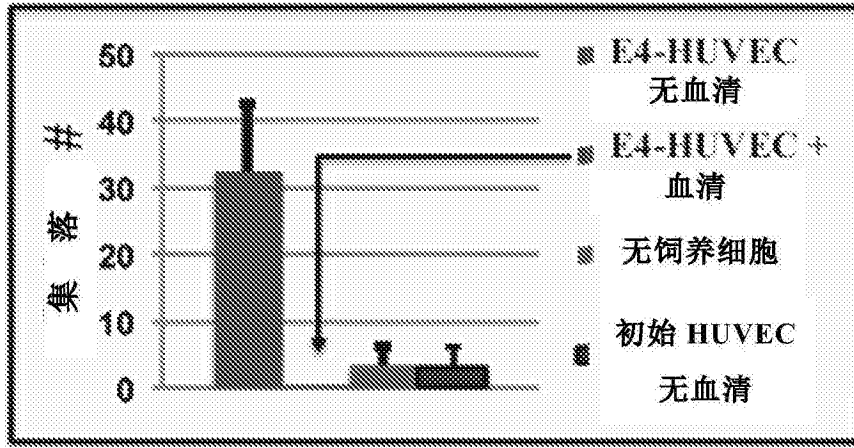


图1C

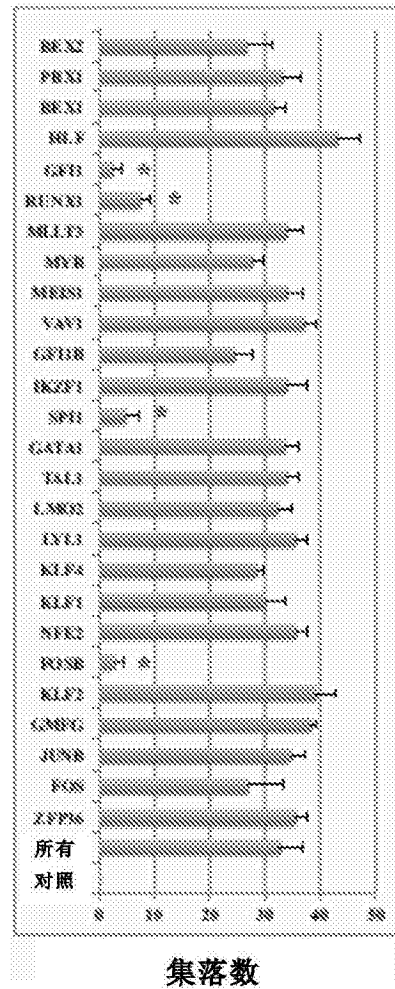


图1D

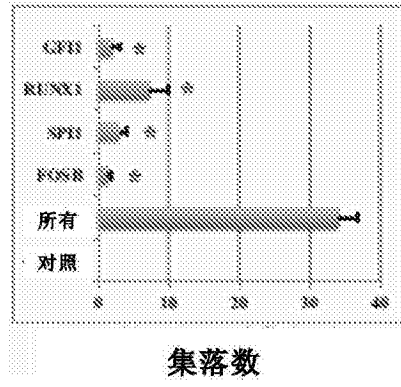


图1E

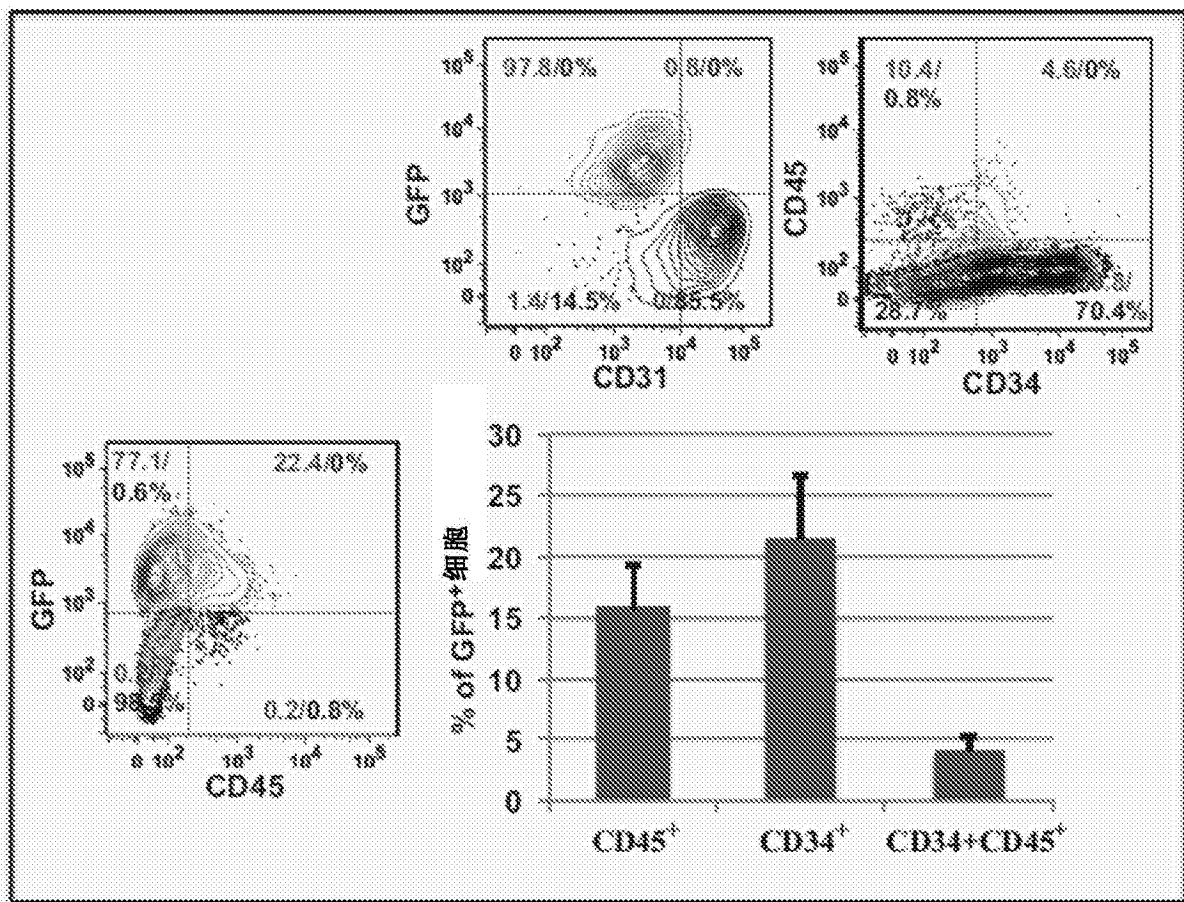


图2A

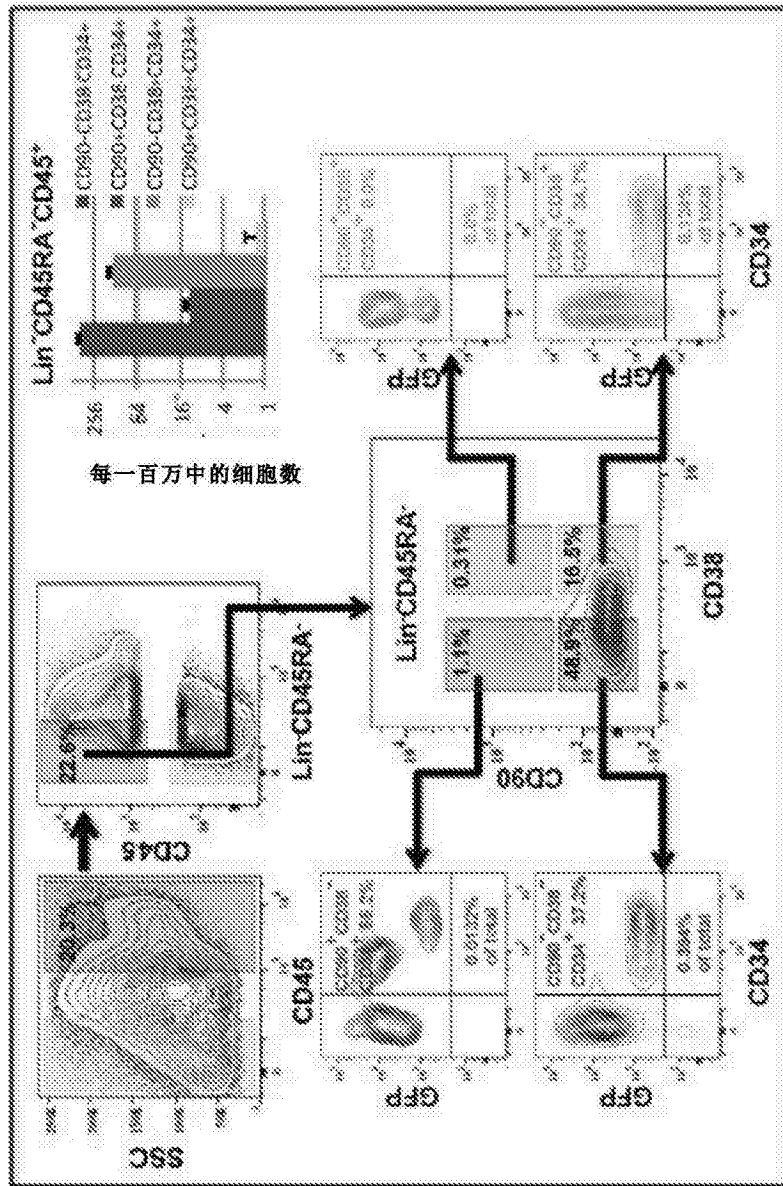


图2B

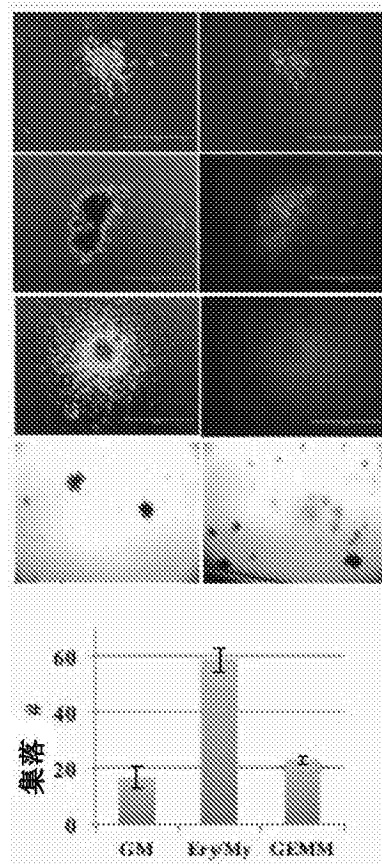


图2C

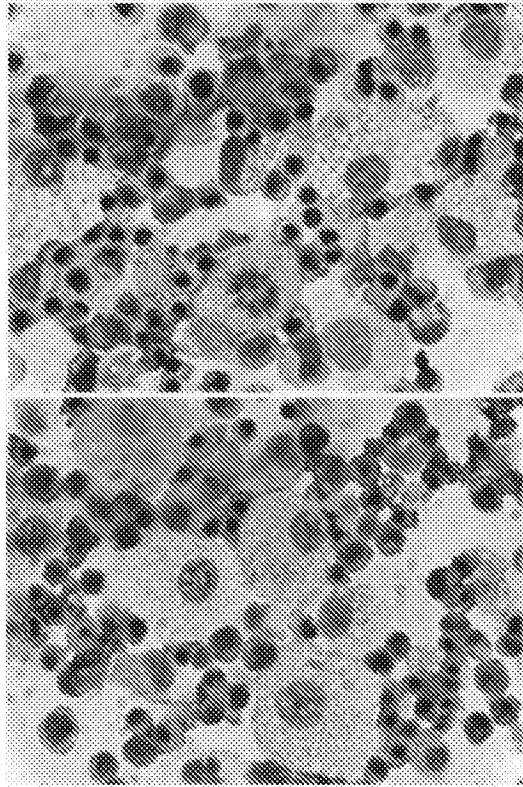


图2D

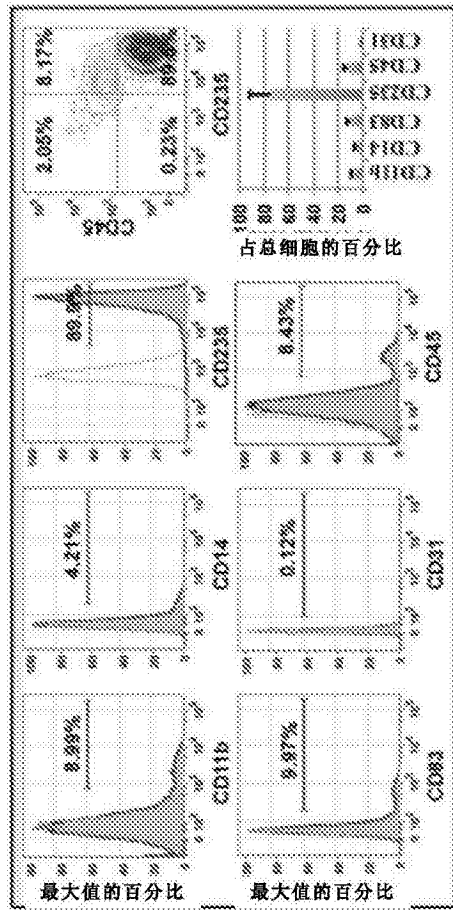


图2E

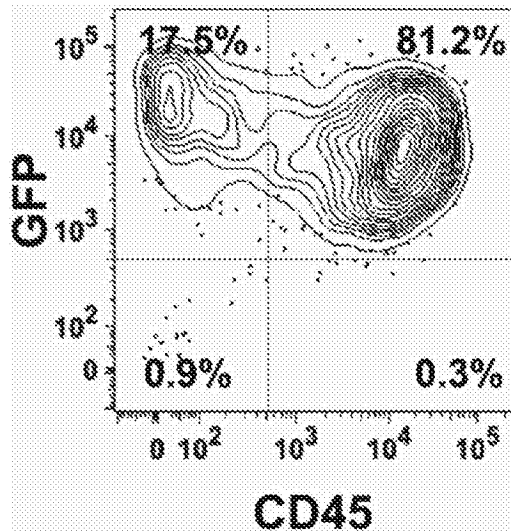


图3A

外周血

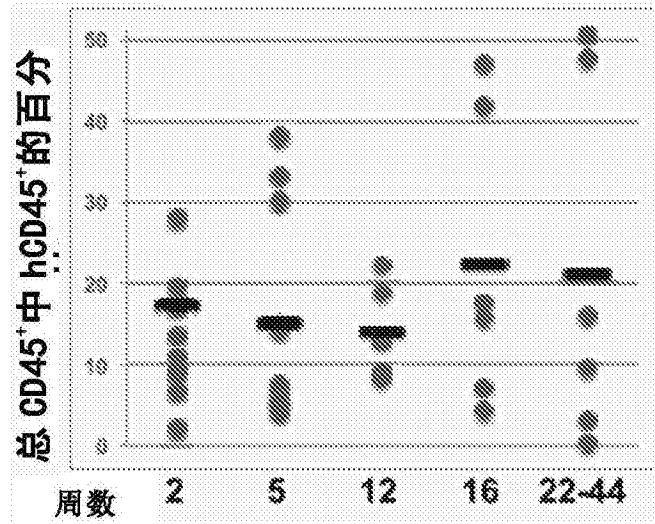


图3B



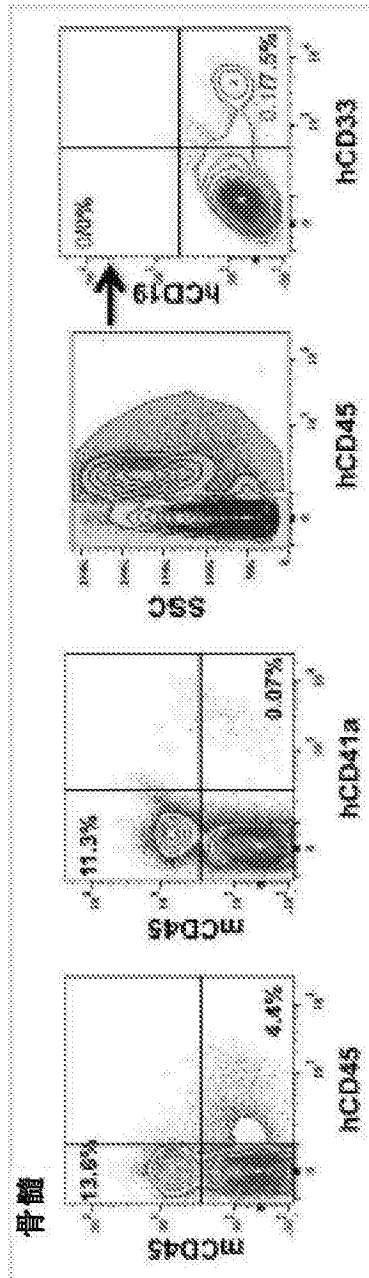


图3C

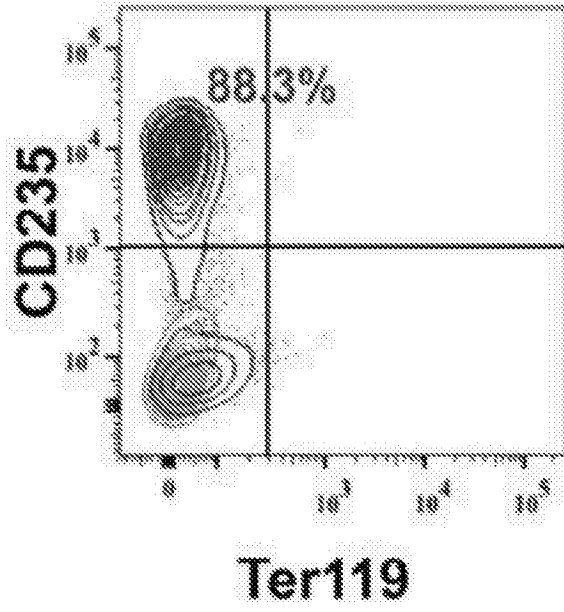


图3D

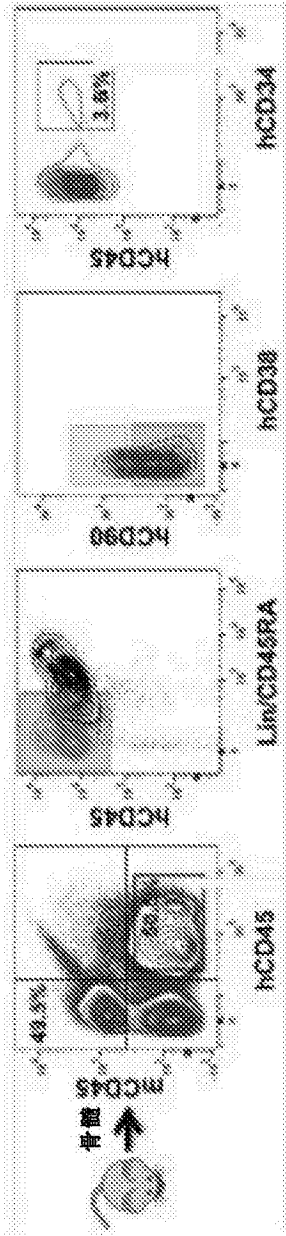


图3E

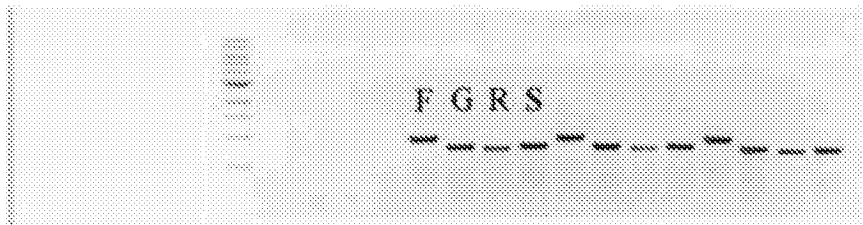


图3F

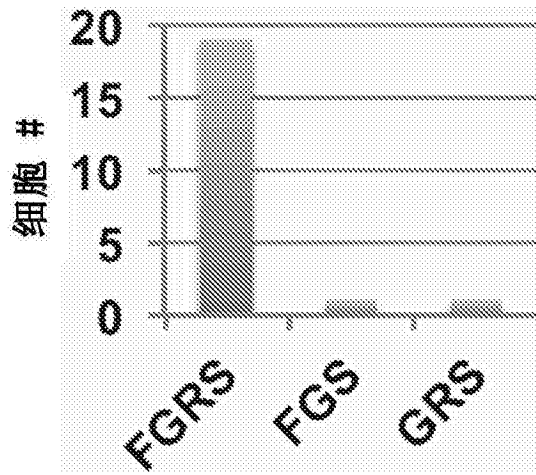


图3G

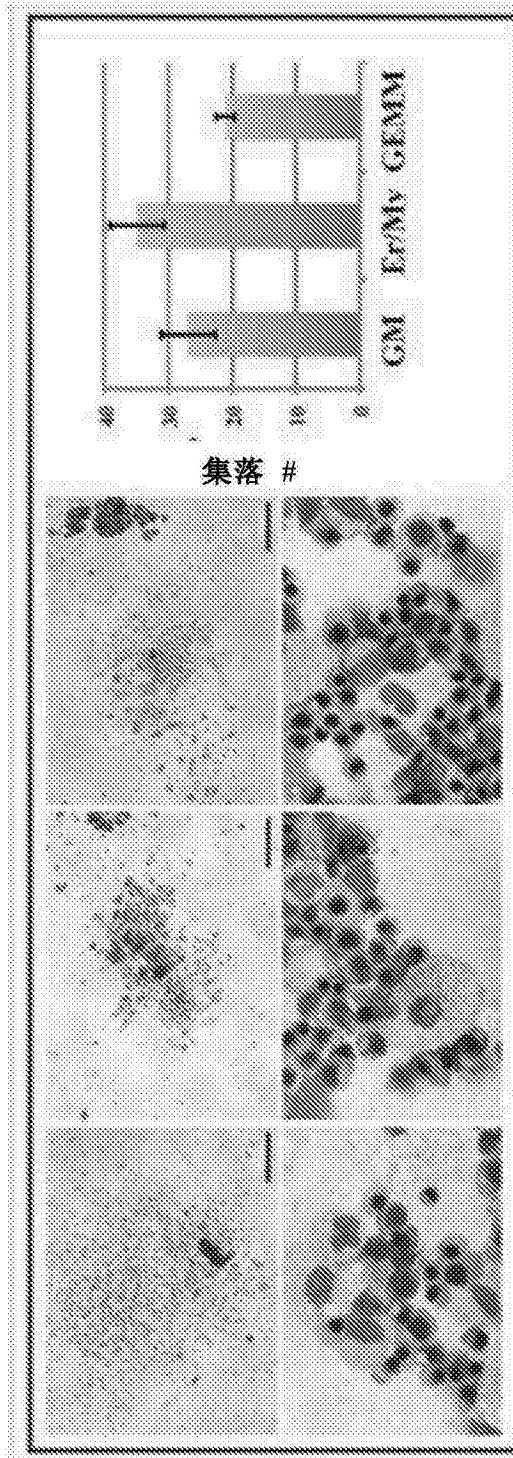


图4A

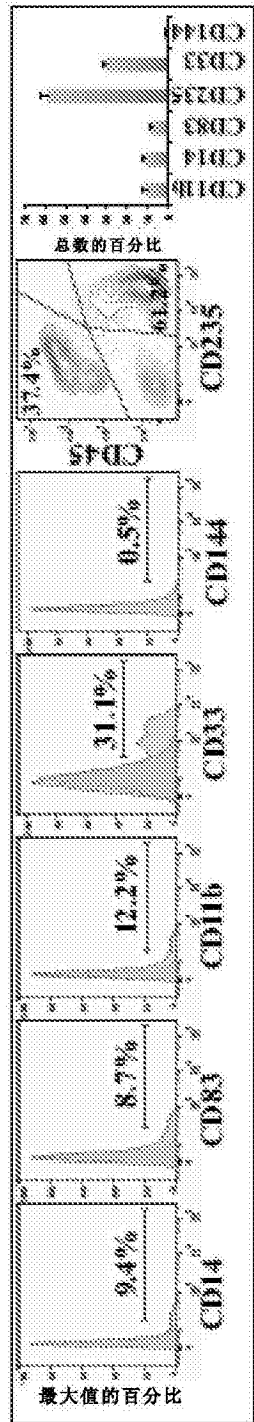


图4B

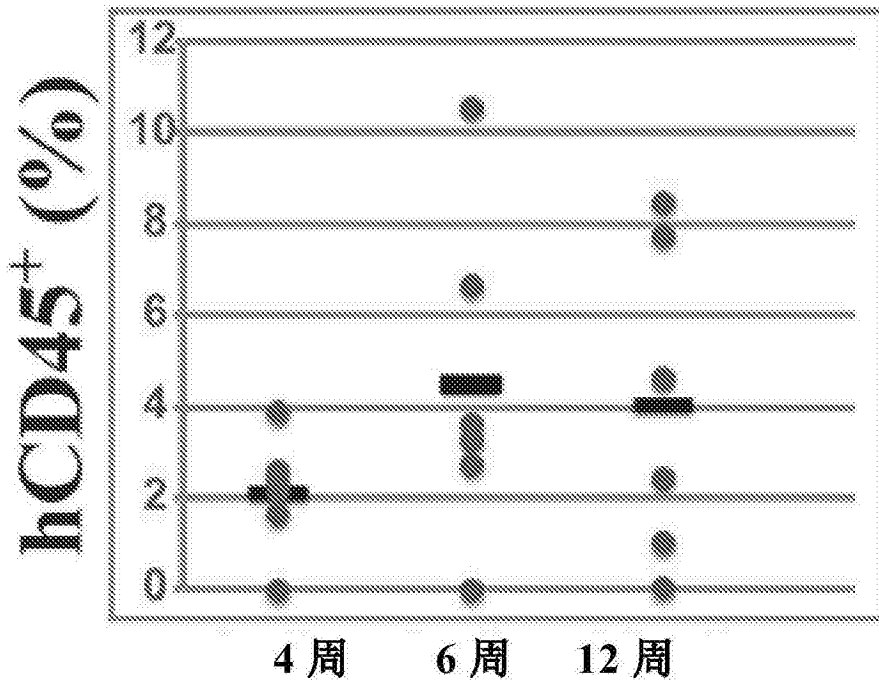


图4C

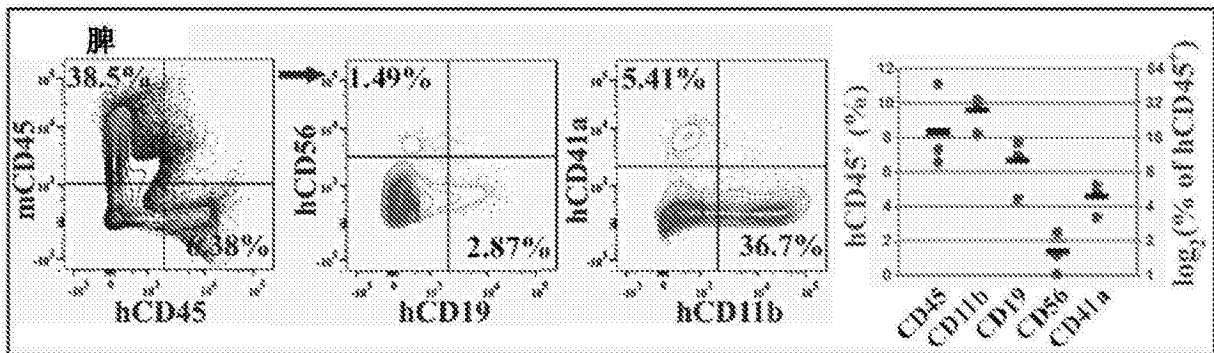


图4D

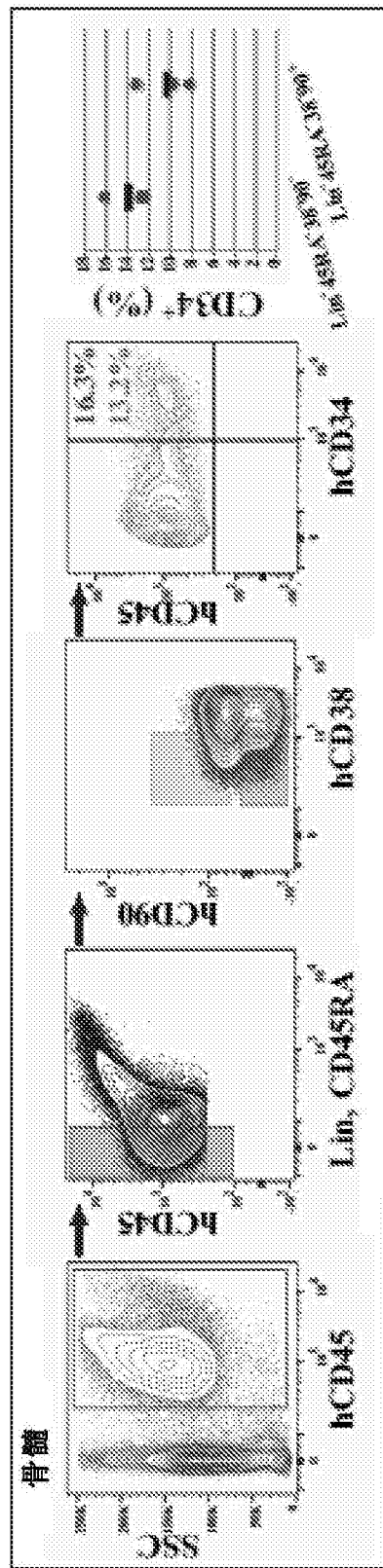


图4E



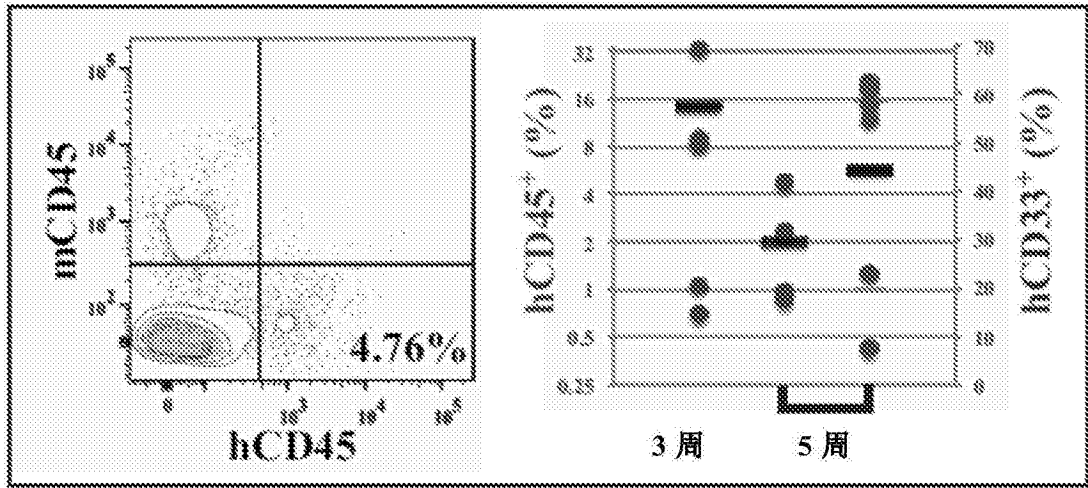


图4F

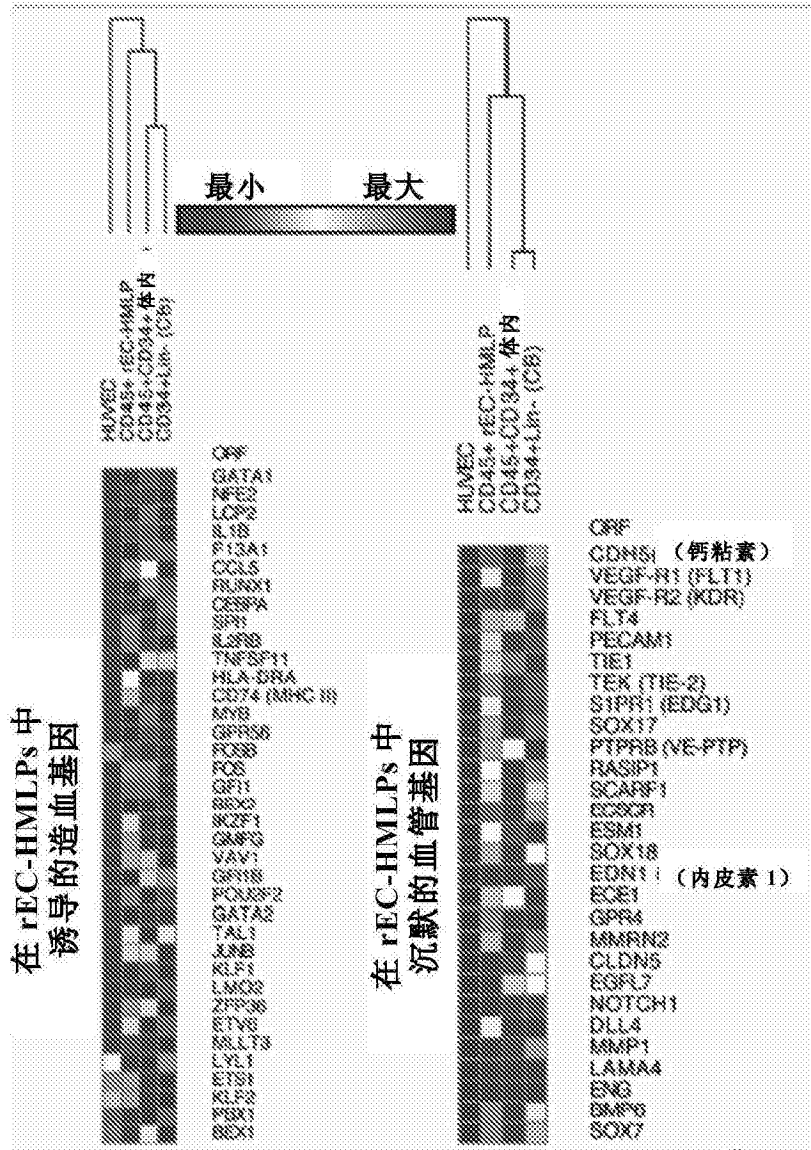


图5A

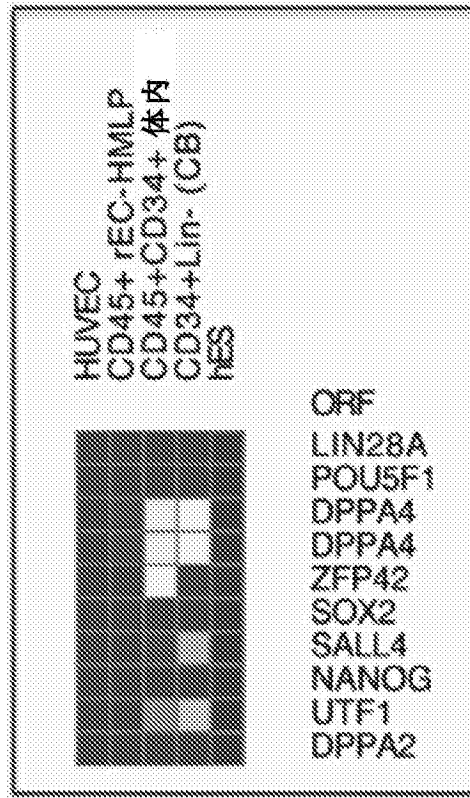


图5B

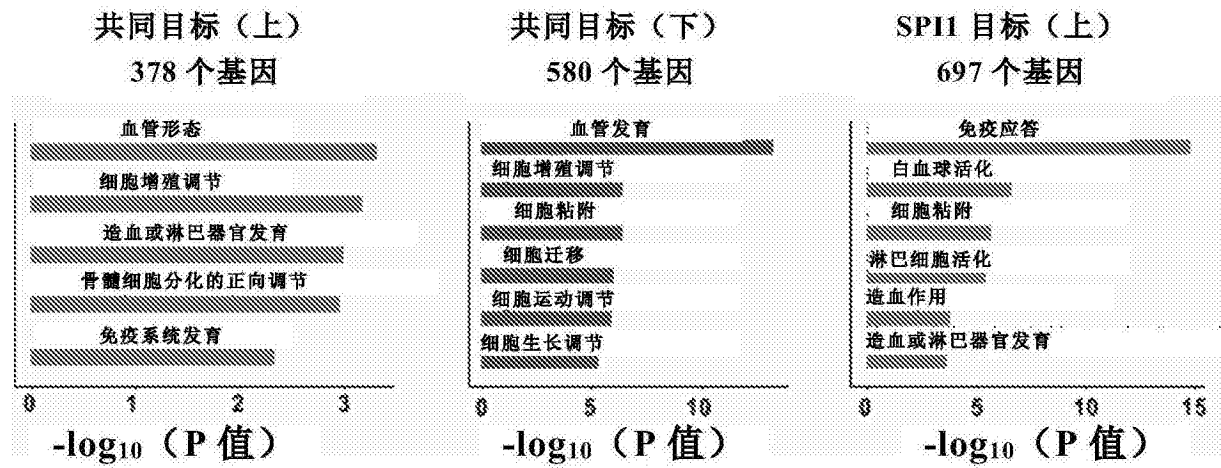


图5C

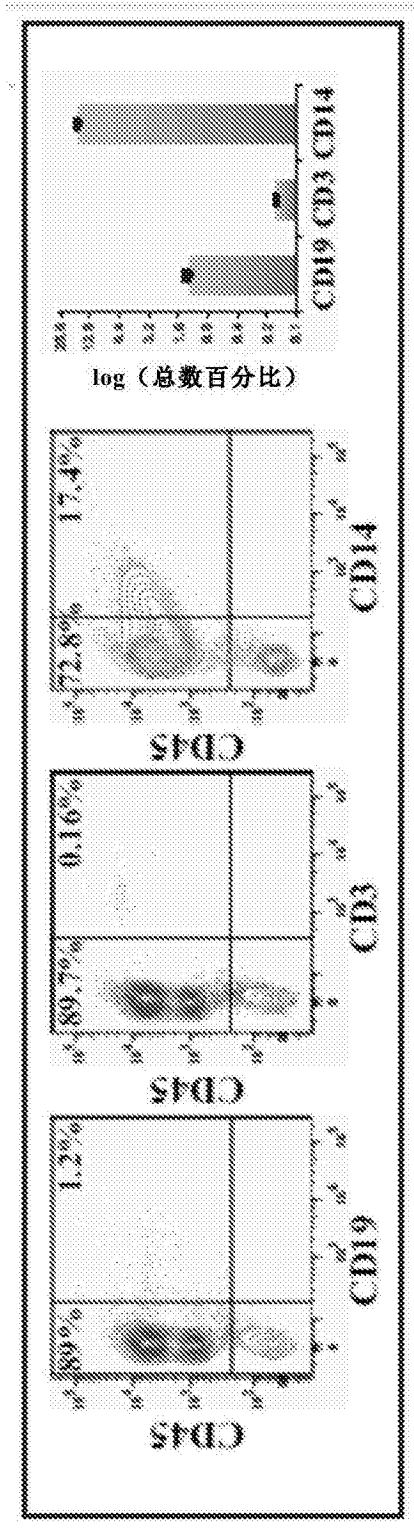


图6A

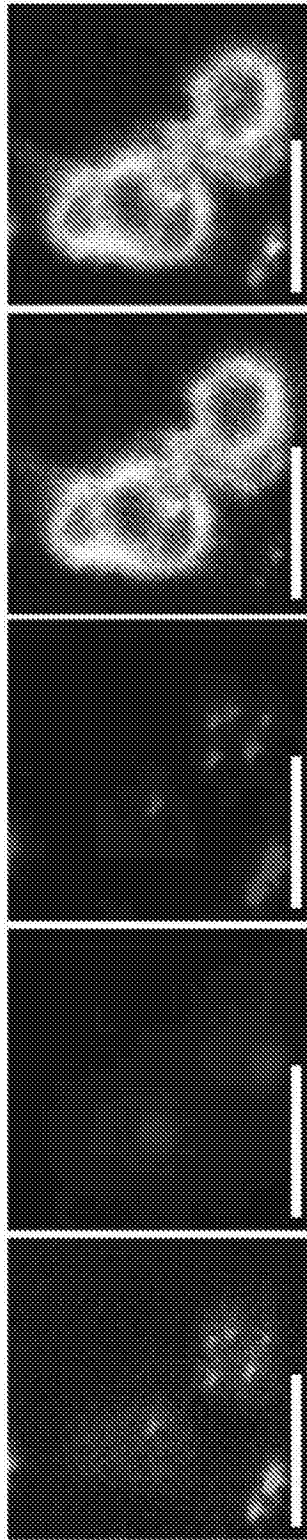


图6B