



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103103158 B

(45)授权公告日 2016.08.03

(21)申请号 201210431212.6

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2005.04.26

C12N 5/071(2010.01)

(30)优先权数据

60/566,293 2004.04.27 US

60/586,566 2004.07.09 US

60/587,942 2004.07.14 US

11/021,618 2004.12.23 US

(56)对比文件

WO 02059278 A3,2003.07.10,

EP 1516925 A1,2005.03.23,

王波 等.胚胎干细胞向胰岛细胞诱导分化的研究.《国外医学生物医学工程分册》.2004, 119-123.

Matthew W. Kelley et al.Retinoic acid promotes differentiation of photoreceptors in vitro.《Development》.1994,2091-2102.

(62)分案原申请数据

200580020638.0 2005.04.26

(73)专利权人 韦尔赛特公司

地址 美国加利福尼亚州

审查员 李有朝

(72)发明人 凯文·艾伦·达穆尔

艾伦·D·阿古尼克

苏珊·埃利泽

伊曼纽尔·E·贝特格

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

权利要求书1页 说明书50页

序列表3页 附图48页

(54)发明名称

细胞培养基

(57)摘要

本文公开了一种培养基,其包含第一培养基和第二培养基,所述第一培养基包含血清和至少一种生长因子,所述生长因子选自TGFB超家族的Nodal/活化素亚族、TGFB超家族的BMP亚族或Wnt家族成员,其中所述第一培养基从培养皿中移出时,将所述第二培养基加入到培养皿中,所述第二培养基含有类视黄醇。

1. 培养基, 包含第一培养基和第二培养基, 其中所述第一培养基在培养皿中, 并包含至少一种生长因子, 所述生长因子选自活化素A、活化素B、BMP4、Nodal和WNT3a, 所述第一培养基中的血清浓度低于10%(v/v), 其中所述第一培养基从所述培养皿中移出时, 将所述第二培养基加入到所述培养皿中, 所述第二培养基含有类视黄醇, 其中所述类视黄醇为视黄酸(RA)。

2. 如权利要求1所述的培养基, 其中所述第二培养基还含有FGF家族生长因子。

3. 如权利要求2所述的培养基, 其中所述FGF家族生长因子与类视黄醇在相同的时间加入到所述培养皿中。

4. 如权利要求2所述的培养基, 其中所述FGF家族生长因子包含FGF-10。

5. 如权利要求1所述的培养基, 其中所述视黄酸以0.01 μ M至50 μ M的浓度提供。

6. 如权利要求1所述的培养基, 其中所述视黄酸以0.1 μ M至10 μ M的浓度提供。

7. 如权利要求1所述的培养基, 其中所述视黄酸以1 μ M或2 μ M的浓度提供。

8. 如权利要求4所述的培养基, 其中所述视黄酸以1 μ M的浓度提供, 且FGF-10以50ng/ml的浓度提供。

9. 如权利要求1所述的培养基, 其中所述第二培养基还含有B27。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的培养基, 其中所述生长因子以至少500ng/ml的浓度提供。

11. 如权利要求10所述的培养基, 其中所述生长因子以至少1000ng/ml的浓度提供。

12. 如权利要求10所述的培养基, 其中所述生长因子以至少5000ng/ml的浓度提供。

13. 如权利要求1所述的培养基, 其中所述第一培养基的血清浓度低于2%(v/v)。

14. 如权利要求1-9和11-13中任一项所述的培养基, 其中所述第一培养基还包含0.5%(v/v)的胎牛血清(FBS)。

15. 如权利要求1-9和11-13中任一项所述的培养基, 其中所述第一培养基还包含2.0%(v/v)的胎牛血清。

16. 如权利要求1-9和11-13中任一项所述的培养基, 其中所述第一培养基还包含10%(v/v)的胎牛血清。

细胞培养基

[0001] 相关申请

[0002] 本专利申请是2004年12月23日提交的第11/021,618号美国专利申请的部分继续申请,标题为“定形内胚层(definitive endoderm)”,该申请基于35 U.S.C. §119(e)要求享有以下三个临时专利申请的优先权:2004年4月27日提交的第60/566,293号美国临时专利申请,标题为“表达PDX1的内胚层”;2004年7月14日提交的第60/587,942号美国临时专利申请,标题为“用于分离定形内胚层的趋化因子细胞表面受体”;2004年7月9日提交的第60/586,566号美国临时专利申请,标题为“用于分离定形内胚层的趋化因子细胞表面受体”。

技术领域

[0003] 本发明涉及医学和细胞生物学领域,尤其是包含哺乳动物PDX1-阳性内胚层细胞的组合物及其产生、分离和使用此类细胞的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 人多能性干细胞(pluripotent stem cell),如胚胎干细胞(ES)和胚胎生殖细胞(EG),于1994年首先从无成纤维细胞饲养层的培养物中分离(Bongso et al.,1994),1997年从含成纤维细胞饲养层的培养物中分离(Hogan,1997)。随后Thomson、Reubinoff和Shamblott建立了采用有丝分裂失活的小鼠饲养层连续培养人ES和EG细胞的方法(Reubinoff et al.,2000;Shamblott et al.,1998;Thomson et al.,1998)。

[0006] 人ES和EG细胞(hESC)为研究人类早期发育和为治疗性干预一些疾病状态(如糖尿病和帕金森氏症)提供了极难得的机会。例如,在采用细胞疗法治疗糖尿病的过程中,使用衍生自hSEC的产生胰岛素的 β 细胞会比目前利用来自供者胰腺的细胞治疗糖尿病有很大进步。但目前还不知道如何从hSEC得到产生胰岛素的 β 细胞。因此,目前利用来自供者胰腺的胰岛细胞治疗糖尿病的细胞疗法受限于缺乏移植所需的高质量胰岛细胞。对单一I型糖尿病人的细胞治疗需要移植大约 8×10^8 胰岛细胞(Shapiro et al.,2000;Shapiro et al.,2001a;Shapiro et al.,2001b)。一次成功移植所需的胰岛细胞至少需要两个健康供者的器官提供。而人胚胎干细胞为开发用于人类细胞治疗的大量的的高质量分化细胞提供了起始材料的来源。

[0007] 多能性和能够维持hSEC细胞较长时间培养这两个性质使其特别适合用于细胞治疗。多能性是指hESC能够分化为所有3种主要胚层(内胚层,中胚层和外胚层)的衍生物,进而在除胚胎外组织(如胎盘)和生殖细胞外还形成成熟器官的所有体细胞类型的能力。尽管多能性赋予了hSEC特殊的用途,但这个性质也给这些细胞及其衍生物的研究和控制带来挑战。由于在分化hSEC培养基中会产生大量细胞类型,所以大部分细胞类型产生效率很低。而且,成功评价任一指定细胞类型的产生关键取决于定义合适的标志物。高效、定向的分化对hESCs的治疗应用非常重要。

[0008] 解决上述问题对利用hSEC作为起始材料产生用于细胞治疗的细胞非常有利。例如,为获得胰岛细胞移植治疗所需的细胞材料的水平,有利的是在分化的最早期高效地使hESC定向为胰岛/ β 细胞系。

[0009] 除了分化过程的高效定向,另外还利的是在向胰岛/ β 细胞系分化过程中分离和鉴定中间细胞类型,并利用这些细胞作为进一步分化的合适的前体细胞系。

发明概要

[0010] 本发明的实施方案涉及包含表达PDX1(PDX1-阳性)的内胚层细胞的组合物及产生该组合物的方法。其他实施方案涉及富含PDX1-阳性内胚层细胞的细胞群以及产生该细胞群的方法。其它实施方案涉及增强内胚层细胞PDX1的表达以及鉴别用于进一步分化PDX1阴性和/或PDX1-阳性内胚层的因子的方法。在贯串本申请描述的组合物和方法的一些实施方案中,PDX1-阳性内胚层细胞是PDX1-阳性前肠/中肠内胚层细胞。在贯串本申请描述的组合物和方法的一些优选实施方案中,PDX1-阳性内胚层细胞是PDX1-阳性前肠内胚层细胞。在其他优选实施方案中,PDX1-阳性内胚层细胞是前肠末端的PDX1-阳性内胚层细胞。

[0011] 本发明的一些实施方案涉及包含PDX1-阳性前肠内胚层细胞的细胞培养物,其中PDX1-阳性前肠内胚层细胞是专能细胞(multipotent cell),可以分化为衍生自肠管前部的细胞、组织或器官。在一些实施方案中,所述细胞培养物包含人细胞。在此人细胞培养物中,PDX1-阳性前肠内胚层细胞包含占培养物中人细胞的至少约2%、至少约5%、至少约10%或至少约25%。在一些实施方案中,计算所述至少约2%、至少约5%、至少约10%或至少约25%时没有考虑所述培养物中的饲养细胞。在此处描述的一些细胞培养物的实施方案中,PDX1-阳性前肠内胚层细胞可表达选自同源框A13(HOXA13)基因、同源框C6(HOXC6)基因和SOX17的标志物。在其他实施方案中,包含PDX1-阳性前肠内胚层细胞的细胞培养物基本上不含内脏内胚层细胞、体壁内胚层细胞和/或神经细胞。在一些实施方案中,细胞培养物还包含以下物质的一种或几种:类视黄醇化合物,如视黄酸(RA),FGF-10或B27。

[0012] 本发明其他实施方案涉及富集的、分离的或基本上纯的PDX1-阳性前肠内胚层细胞群,其中PDX1-阳性前肠内胚层细胞是专能细胞,可以分化为衍生自肠管前部的细胞、组织或器官。在一些实施方案中,PDX1-阳性前肠内胚层细胞衍生自多能性细胞,如人胚胎干细胞。本发明的其他实施方案涉及包含细胞的细胞群,其中至少约90%的细胞是PDX1-阳性前肠内胚层细胞,其中PDX1-阳性前肠内胚层细胞是专能细胞,可以分化为衍生自肠管前部的细胞、组织或器官。在优选实施方案中,细胞群中至少约95%的细胞是PDX1-阳性前肠内胚层细胞。更优选的实施方案中,PDX1-阳性前肠内胚层细胞在细胞群中的比例为至少约98%。

[0013] 本发明其它的实施方案涉及产生PDX1-阳性前肠内胚层细胞的方法,此方法通过为包含基本上不表达PDX1的定形内胚层细胞(PDX1-阴性定形内胚层细胞)的细胞培养物或细胞群提供前肠分化因子(例如类视黄醇)来进行。类视黄醇(例如视黄酸)可以约0.01至50 μ M的浓度添加。在一些实施方案中,通过为细胞培养物或细胞群提供FGF-10和/或B27增加PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性细胞的分化。FGF-10可以约5ng/ml至约1000ng/ml的浓度添加。在一些实施方案中,B27以约0.1%至约20%的浓度添加到细胞培养物或细胞群中。FGF-10和/或B27可以与类视黄醇大致同时加到细胞培养物或细胞群中,或者每种因子也可以间隔几小时分别添加。在一些实施方案中,类视黄醇添加至大约培养4天的PDX1-阴性定形内胚层细胞培养物中。在一些实施方案中,类视黄醇添加至大约培养5天的PDX1-阴性定形内胚层细胞培养物中。

[0014] 其它实施方案还涉及利用前肠分化因子进一步促进细胞培养物或细胞群中PDX1-阳性前肠内胚层细胞产生的方法,所述细胞培养物或细胞群已经与类视黄醇(如视黄酸)接触。在这些实施方案中,为所述细胞培养物或细胞群提供活化素A和/或活化素B可促进PDX1-阴性定形内胚层向PDX1-阳性前肠内胚层的分化。活化素A和/或活化素B可以5ng/ml至1000ng/ml的浓度提供。其他实施方案涉及增加细胞培养物或细胞群中PDX1-阳性前肠内胚层细胞产生的方法,其通过在含有类视黄醇的培养基中分化PDX1阴性细胞来进行,其中所述培养基之前被某些细胞类型的维持或生长条件化。这些细胞类型包括但不限于胚胎干细胞或其他多能性细胞,这些细胞已在含血清或生长因子TGF β 超家族成员(如活化素A、活化素B、Nodal和/或骨形态发生蛋白BMP)的培养基中分化。在一些实施方案中,条件培养基以全部培养基的约1%至约100%添加到细胞培养物或细胞群中。TGF β 超家族生长因子和/或条件培养基可以和类视黄醇大致同时添加到细胞培养物或细胞群中,或者每种因子也可以几小时的间隔分别添加。

[0015] 本发明的实施方案涉及产生富含PDX1-阳性前肠内胚层细胞的细胞群的方法。在一些实施方案中,这些方法包括获得多能性细胞群的步骤,其中多能性细胞群中至少一个细胞包含至少一个受PDX1启动子控制的核酸拷贝。在一些实施方案中,所述核酸包含编码绿色荧光蛋白或其生物学活性片段的序列。在其它实施方案中,该方法另外的步骤包括使所述多能性细胞分化以便产生PDX1-阳性前肠内胚层细胞,以及使PDX1-阳性细胞与PDX1阴性细胞分离,其中该PDX1-阳性前肠内胚层细胞是专能细胞,可以分化为衍生自肠管前部的细胞、组织或器官。此处所述方法的一些实施方案中,分化步骤还包括为所述多能性细胞群提供至少一种TGF β 超家族的生长因子,其量足以促进所述多能性细胞向PDX1-阴性定形内胚层细胞的分化,以及为该PDX1-阴性定形内胚层细胞提供前肠分化因子,其量足以促进该PDX1-阴性定形内胚层细胞向前肠的PDX1-阳性内胚层细胞分化。

[0016] 本发明的一些实施方案涉及促进表达SOX-17(SOX-17阳性)的定形内胚层细胞中PDX1基因产物表达的方法,其通过使这些细胞与足以促进PDX1基因产物表达的量的分化因子接触。在一些实施方案中,所述分化因子选自RA、FGF-10和B27。

[0017] 本发明的其它实施方案涉及鉴定能够促进PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化的分化因子的方法。在这些方法中,使PDX1-阴性定形内胚层细胞与候选分化因子接触,并确定与在与候选分化因子接触前细胞群中PDX1的表达相比,在与候选分化因子接触后细胞群中PDX1的表达是否增加。细胞群中PDX1表达的增加表明候选分化因子能够促进PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞的分化。在一些实施方案中,PDX1的表达由定量聚合酶链式反应(Q-PCR)确定。上述方法的一些实施方案还包括确定在与候选分化因子接触前后细胞群中HOXA13和/或HOXC6基因的表达。在一些实施方案中,候选分化因子是小分子,例如类视黄醇,如视黄酸。其它实施方案中,候选分化因子是多肽,例如生长因子,如FGF-10。

[0018] 本发明的其它实施方案涉及鉴定能够促进PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化的分化因子。在这些方法中,在使PDX1-阳性前肠内胚层细胞与候选分化因子接触,并确定与在与候选分化因子接触前细胞群中标志物的表达相比,在与候选分化因子接触后细胞群中标志物的表达是增加还是降低。标志物表达的增加或降低表明候选分化因子能够促进PDX1-阳性前肠内胚层细胞的分化。在一些实施方案中,标志物表达通过Q-PCR检测。在一些实施方

案中,候选分化因子是小分子,例如类视黄醇,如视黄酸。其它实施方案中,候选分化因子是多肽,例如生长因子,如FGF-10。

[0019] 一些权限中,术语“包含”可能不具有任何通常所接受的定义。此处使用的术语“包含”是开放式的,可以包括任何其他元素。考虑到这一点,本发明的其他实施方案参考以下编号的段落进行描述:

[0020] 1.包含人细胞的细胞培养物,其中至少约2%的所述人细胞是胰-十二指肠同源框因子-1(PDX1)阳性前肠内胚层细胞,所述PDX1-阳性前肠内胚层细胞是能够分化为衍生自肠管前部的细胞、组织或器官的专能细胞。

[0021] 2.段落1的细胞培养物,其中至少约5%的所述人细胞是PDX1-阳性前肠内胚层细胞。

[0022] 3.段落1的细胞培养物,其中至少约10%的所述人细胞是PDX1-阳性前肠内胚层细胞。

[0023] 4.段落1的细胞培养物,其中至少约25%的所述人细胞是PDX1-阳性前肠内胚层细胞。

[0024] 5.段落1的细胞培养物,其中在所述培养物中存在人饲养细胞,其中除了所述人饲养细胞以外,至少约2%的人细胞是PDX1-阳性前肠内胚层细胞。

[0025] 6.段落1的细胞培养物,其中所述PDX1-阳性前肠内胚层细胞表达同源框A13(HOXA13)基因。

[0026] 7.段落1的细胞培养物,其中所述PDX1-阳性前肠内胚层细胞表达同源框C6(HOXC6)基因。

[0027] 8.段落1的细胞培养物,其中所述PDX1-阳性前肠内胚层细胞表达SOX17。

[0028] 9.段落1的细胞培养物,其中在所述PDX1-阳性前肠内胚层细胞中PDX1的表达高于选自 α -胎蛋白(AFP)、SOX7、SOX1、ZIC1和NFM的标志物的表达。

[0029] 10.段落1的细胞培养物,其中所述细胞培养物基本上不含选自内脏内胚层细胞、体壁内胚层细胞和神经细胞的细胞。

[0030] 11.段落1的细胞培养物,其中所述细胞培养物中约每10个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约一个PDX1-阳性前肠内胚层细胞。

[0031] 12.段落1的细胞培养物,其中所述细胞培养物中约每5个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约一个PDX1-阳性前肠内胚层细胞。

[0032] 13.段落1的细胞培养物,其中所述细胞培养物中约每4个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约一个PDX1-阳性前肠内胚层细胞。

[0033] 14.段落1的细胞培养物,还包含胚胎干细胞。

[0034] 15.段落14的细胞培养物,其中所述胚胎干细胞衍生自选自桑椹胚、胚胎内细胞团(ICM)和胚胎生殖嵴的组织。

[0035] 16.段落1的细胞培养物,还包含类视黄醇。

[0036] 17.段落16的细胞培养物,其中所述类视黄醇是视黄酸(RA)。

[0037] 18.段落1的细胞培养物,还包含FGF-10。

[0038] 19.段落1的细胞培养物,还包含B27。

[0039] 20.段落1的细胞培养物,还包含RA和FGF-10。

- [0040] 21.段落20的细胞培养物,还包含B27。
- [0041] 22.包含细胞的细胞群,其中至少约90%的所述细胞是人PDX1-阳性前肠内胚层细胞,所述PDX1-阳性前肠内胚层细胞是能够分化为衍生自肠管前部的细胞、组织或器官的专能细胞。
- [0042] 23.段落22的细胞群,其中至少约95%的所述细胞是PDX1-阳性前肠内胚层细胞。
- [0043] 24.段落22的细胞群,其中至少约98%的所述细胞是PDX1-阳性前肠内胚层细胞。
- [0044] 25.段落22的细胞群,其中所述PDX1-阳性前肠内胚层细胞表达H0XA13基因。
- [0045] 26.段落22的细胞群,其中所述PDX1-阳性前肠内胚层细胞表达H0XC6基因。
- [0046] 27.段落22的细胞群,其中所述PDX1-阳性前肠内胚层细胞表达S0X17。
- [0047] 28.段落22的细胞群,其中在所述PDX1-阳性前肠内胚层细胞中PDX1的表达高于选自AFP、S0X7、S0X1、ZIC1和NFM的标志物的表达。
- [0048] 29.产生PDX1-阳性前肠内胚层细胞的方法,所述方法包含以下步骤:获得包含PDX1-阴性定形内胚层细胞的细胞群;为所述细胞群提供足以促进至少部分所述PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化的量的类视黄醇,其中所述PDX1-阳性前肠内胚层细胞是能够分化为衍生自肠管前部的细胞、组织或器官的专能细胞。
- [0049] 30.段落29的方法,还包括给予足够时间供PDX1-阳性前肠内胚层细胞形成的步骤,其中所述供PDX1-阳性前肠内胚层细胞形成的足够时间通过检测所述细胞群中PDX1-阳性前肠内胚层细胞的存在来确定。
- [0050] 31.段落29的方法,其中至少约2%的所述PDX1-阴性定形内胚层细胞分化为PDX1-阳性前肠内胚层细胞。
- [0051] 32.段落29的方法,其中至少约5%的所述PDX1-阴性定形内胚层细胞分化为PDX1-阳性前肠内胚层细胞。
- [0052] 33.段落29的方法,其中至少约10%的所述PDX1-阴性定形内胚层细胞分化为PDX1-阳性前肠内胚层细胞。
- [0053] 34.段落29的方法,其中至少约25%的所述PDX1-阴性定形内胚层细胞分化为PDX1-阳性前肠内胚层细胞。
- [0054] 35.段落29的方法,其中在所述细胞群中检测PDX1-阳性前肠内胚层细胞的存在包括检测PDX1的表达。
- [0055] 36.段落35的方法,其中在所述PDX1-阳性前肠内胚层细胞中PDX1的表达高于选自 α -胎蛋白(AFP)、S0X7、S0X1、ZIC1和NFM的标志物的表达。
- [0056] 37.段落35的方法,其中所述PDX1的表达通过定量聚合酶链式反应(Q-PCR)来测定。
- [0057] 38.段落35的方法,其中所述PDX1的表达通过免疫细胞化学来测定。
- [0058] 39.段落29的方法,其中所述类视黄醇是RA。
- [0059] 40.段落39的方法,其中RA以约0.01 μ M至约50 μ M的浓度范围提供。
- [0060] 41.段落39的方法,其中RA以约0.04 μ M至约20 μ M的浓度范围提供。
- [0061] 42.段落39的方法,其中RA以约0.1 μ M至约10 μ M的浓度范围提供。
- [0062] 43.段落39的方法,其中RA以约0.2 μ M至约2.5 μ M的浓度范围提供。
- [0063] 44.段落39的方法,其中RA以是约0.5 μ M至约1.5 μ M的浓度范围提供。

- [0064] 45.段落39的方法,其中RA以约1 μ M的浓度提供。
- [0065] 46.段落39的方法,其中RA在所述培养进行约4天时提供。
- [0066] 47.段落29的方法,还包括向所述培养物中提供足以增强PDX1-阳性前肠内胚层细胞的产生的量的因子,所述因子选自FGF-10、FGF-4、活化素A、活化素B、B27、条件培养基和所述因子的组合。
- [0067] 48.段落47的方法,其中所述因子选自FGF-10、FGF-4、活化素A和活化素B。
- [0068] 49.段落48的方法,其中所述因子以约10ng/ml至约500ng/ml的浓度范围提供。
- [0069] 50.段落48的方法,其中所述因子以约20ng/ml至约200ng/ml的浓度范围提供。
- [0070] 51.段落48的方法,其中所述因子以约25ng/ml至约75ng/ml的浓度范围提供。
- [0071] 52.段落48的方法,其中所述因子约50ng/ml的浓度提供。
- [0072] 53.段落48的方法,其中所述因子与所述类视黄醇大致同时提供。
- [0073] 54.段落47的方法,其中所述因子是B27。
- [0074] 55.段落54的方法,其中B27以全部培养基的约0.1%至约20%的浓度范围提供。
- [0075] 56.段落54的方法,其中B27以全部培养基的约0.2%至约5%的浓度范围提供。
- [0076] 57.段落54的方法,其中B27以全部培养基的约0.5%至约2%的浓度范围提供。
- [0077] 58.段落54的方法,其中B27以全部培养基的约1%的浓度提供。
- [0078] 59.段落54的方法,其中B27与所述类视黄醇大致同时提供。
- [0079] 60.段落47的方法,其中所述因子是条件培养基。
- [0080] 61.段落60的方法,其中条件培养基以全部培养基的约10%至约100%的浓度范围提供。
- [0081] 62.段落60的方法,其中条件培养基以全部培养基的约20%至约80%的浓度范围提供。
- [0082] 63.段落60的方法,其中条件培养基以全部培养基的约40%至约60%的浓度范围提供。
- [0083] 64.段落60的方法,其中条件培养基以全部培养基的约50%的浓度提供。
- [0084] 65.段落60的方法,其中条件培养基与所述类视黄醇大致同时提供。
- [0085] 66.段落60的方法,其中条件培养基通过使分化的人胚胎干细胞(hESC)与细胞培养基接触约24小时来制备。
- [0086] 67.段落66的方法,其中所述hESC在选自补加3%血清的RPMI、补加活化素A的低血清RPMI和补加BMP4的低血清RPMI的培养基中分化约5天。
- [0087] 68.段落29的方法产生的PDX1-阳性前肠内胚层细胞。
- [0088] 69.产生富集PDX1-阳性前肠内胚层细胞的细胞群的方法,所述方法包括以下步骤:获得多能性细胞群,其中所述多能性细胞群中至少一个细胞包含至少一个拷贝的受PDX1启动子控制的核酸,所述核酸包含编码绿色荧光蛋白(GFP)或其生物学活性片段的序列;分化所述多能性细胞以便产生PDX1-阳性前肠内胚层细胞,所述PDX1-阳性前肠内胚层细胞是能够分化为衍生自肠管前部的细胞、组织或器官的专能细胞;以及使所述PDX1-阳性前肠内胚层细胞与PDX1-阴性细胞分离。
- [0089] 70.段落69的方法,其中所述富集的细胞群包含至少约95%的PDX1-阳性前肠内胚层细胞。

[0090] 71.段落69的方法,其中所述富集的细胞群包含至少约98%的PDX1-阳性前肠内胚层细胞。

[0091] 72.段落69的方法,其中所述分化步骤还包括为所述多能性细胞群中提供足以促进所述多能性细胞向PDX1-阴性定形内胚层细胞分化的量的至少一种TGF β 超家族的生长因子,以及为所述PDX1-阴性定形内胚层细胞提供足以促进所述PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化的量的类视黄醇。

[0092] 73.段落72的方法,其中所述类视黄醇是RA。

[0093] 74.段落69的方法产生的PDX1-阳性前肠内胚层细胞的富集群。

[0094] 75.在表达SOX17的定形内胚层细胞中增加PDX1基因产物的表达的方法,所述方法包括使所述定形内胚层细胞与足以增加所述PDX1基因产物表达的量的分化因子接触。

[0095] 76.段落75的方法,其中所述分化因子是类视黄醇。

[0096] 77.段落76的方法,其中所述分化因子是RA。

[0097] 78.段落75的方法,其中所述分化因子选自FGF-10、FGF-4、活化素A、活化素B、B27、条件培养基和所述因子的组合。

[0098] 79.鉴定能够促进PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化的分化因子的方法,所述方法包括以下步骤:获得包含PDX1-阴性定形内胚层细胞的群;使所述包含PDX1-阴性定形内胚层细胞的群与候选分化因子接触;以及与在与所述候选分化因子接触之前所述细胞群中PDX1的表达比较,确定在与所述候选分化因子接触之后所述细胞群中PDX1的表达是否增加,其中在所述细胞群中所述PDX1表达的增加表明所述候选分化因子能够促进所述PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化,所述PDX1-阳性前肠内胚层细胞是能够分化为衍生自肠管前部的细胞、组织或器官的专能细胞。

[0099] 80.段落79的方法,其中所述PDX1表达通过Q-PCR检测。

[0100] 81.段落79的方法,还包括在与所述候选分化因子接触前后测定所述细胞群中HOXA13基因的表达的步骤。

[0101] 82.段落79的方法还包含在添加所述候选分化因子前后检测所述细胞群中HOXC6基因的表达的方法。

[0102] 83.段落79的方法,其中所述候选分化因子是小分子。

[0103] 84.段落83的方法,其中所述小分子是类视黄醇。

[0104] 85.段落84的方法,其中所述类视黄醇是RA。

[0105] 86.段落79的方法,其中所述候选分化因子是多肽。

[0106] 87.段落79的方法,其中所述候选分化因子是生长因子。

[0107] 88.段落79的方法,其中所述候选分化因子是FGF-10。

[0108] 89.鉴定能够促进PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化的分化因子的方法,所述方法包括以下步骤:获得包含PDX1-阳性前肠内胚层细胞的群;使所述包含PDX1-阳性前肠内胚层细胞的群与候选分化因子接触;以及与在与所述候选分化因子接触之前所述细胞群中标志物的表达比较,确定在于所述候选分化因子接触之后所述细胞群中相同标志物的表达是增加还是降低,其中在所述细胞群中所述标志物表达的增加或降低表明所述候选分化因子能够促进PDX1-阳性前肠内胚层细胞的分化。

[0109] 90.段落81的方法,其中所述标志物表达通过Q-PCR测定。

- [0110] 91.段落81的方法,其中所述候选分化因子是小分子。
- [0111] 92.段落81的方法,其中所述候选分化因子是多肽。
- [0112] 93.段落81的方法,其中所述候选分化因子是生长因子。
- [0113] 94.包含可操作地连接到PDX1控制区的报告基因的载体。
- [0114] 95.段落94的载体,其中所述报告基因是EGFP。
- [0115] 96.段落94的载体的细胞。
- [0116] 97.包含可操作地连接到PDX1控制区的报告基因的细胞。
- [0117] 98.段落97的细胞,其中所述可操作地连接到所述PDX1控制区的报告基因整合入染色体。
- [0118] 99.段落97的细胞,其中所述报告基因是EGFP。
- [0119] 100.段落97的细胞,其中所述细胞是多能的。
- [0120] 101.段落100的细胞,其中所述细胞是hESC。
- [0121] 102.段落97的细胞,其中所述细胞是定形内胚层细胞。
- [0122] 103.段落97的细胞,其中所述细胞是PDX1-阳性前肠内胚层细胞。
- [0123] 104.通过以下步骤制备的条件培养基:使新鲜细胞培养基与分化的hESC群接触约24小时,其中所述hESC已经在选自补加3%血清的RPMI、补加活化素A的低血清RPMI和补加BMP4的低血清RPMI的细胞培养基中分化约5天;以及从所述培养基中去除所述分化的hESC群。
- [0124] 105.段落104的条件培养基,其中所述新鲜细胞培养基是RPMI。
- [0125] 106.段落105的条件培养基,其中所述RPMI是低血清RPMI。
- [0126] 107.条件化培养基的方法,所述方法包括以下步骤:使新鲜细胞培养基与分化的hESC群接触约24小时,其中所述hESC已经在选自补加3%血清的RPMI、补加活化素A的低血清RPMI和补加BMP4的低血清RPMI的细胞培养基中分化约5天;以及从所述培养基中去除所述分化的hESC群。
- [0127] 108.段落107的方法,其中所述新鲜细胞培养基是RPMI。
- [0128] 109.段落108的条件培养基,其中所述RPMI是低血清RPMI。
- [0129] 应了解上述的方法和组合物与体外培养的细胞有关。但是,上述体外分化的细胞组合物可用于体内用途。
- [0130] 本发明的其他实施方案可参见以下专利申请:2003年12月23日提交的第60/532,004号美国临时专利申请,标题为“定形内胚层”;2004年4月27日提交的第60/566,293号美国临时专利申请,标题为“表达PDX1的内胚层”;2004年7月9日提交的第60/586,566号美国临时专利申请,标题为“用于分离定形内胚层的趋化因子细胞表面受体”;2004年12月23日提交的第11/021,618号美国专利申请,标题为“定形内胚层”。

附图说明

[0131] 图1是从hESC产生 β -细胞的假想的分化途径示意图。途径的第一步负责ES细胞至定形内胚层系,也代表向胰内胚层、内分泌内胚层或胰岛/ β -细胞的进一步分化事件前的第一步。途径的第二步显示SOX17-阳性/PDX1-阴性的定形内胚层向PDX1-阳性前肠内胚层的转化。在介导这些转化中起作用的因子用斜体字表示。定义靶细胞的相关标志物用下划线

表示。

[0132] 图2是人SOX17cDNA的示意图,显示了保守区的位置并突出显示了用于通过GENOVAC的免疫步骤的区域。

[0133] 图3是关系树状图,显示SOX17与SOX7关系最近,与SOX18关系稍远。在同源物种中SOX17蛋白质比相同物种中的SOX群F亚族的其它成员的相关性强得多

[0134] 图4是用兔抗SOX17抗体作探针的Western印迹,该印迹证明这个抗体对成纤维细胞(1道)中过表达的SOX17有特异性,而缺乏与EGFP(2道)或最接近的SOX家族成员SOX7(3道)的免疫反应性。

[0135] 图5A-B是显示大量AFP⁺共标记细胞的SOX17⁺细胞簇的显微照片。这与其他SOX17⁺簇(B)形成显著对比,因为在其他SOX17⁺簇中只能观察到很少或者就根本没有AFP⁺细胞。

[0136] 图6A-C是显示体壁内胚层和SOX17的显微照片。图A显示随机分化的hES细胞培养物中体壁内胚层细胞表面的人血栓调节蛋白(TM)的免疫细胞化学检测。图B显示与图A相同的区域,对TM和SOX17双标记。图C是用DAPI标记核的相同区域的相差图。注意:DAPI标记的核和SOX17标记的完全对应。

[0137] 图7A-B是显示定量PCR(Q-PCR)检测的SOX17基因表达和SOX17-特异性抗体检测的抗SOX17阳性细胞的条形图。图A显示相对于未分化的对照培养基(SR20)活化素A增加SOX17基因表达,而视黄酸(RA)强烈抑制SOX17表达。图B显示在SOX17⁺细胞数量上反映了相似的模式以及这些变化的相似倍数,表明Q-PCR检测SOX17基因表达可以在单个细胞水平反映出变化。

[0138] 图8A是条形图,显示活化素A存在下正在分化的hESC培养物保持低水平的AFP基因表达,而在10%小牛血清(FBS)中随机分化的细胞显示AFP的强烈上调。表达水平的差异大约是7倍。

[0139] 图8B-C是两张显微图片,显示活化素A对AFP表达的抑制在单个细胞水平也很显著,因为相对于单用10%FBS(顶部),在活化素A处理的条件(底部)下只能观察到非常少和小的AFP⁺细胞簇。

[0140] 图9A-B是显示使用流式细胞仪定量的AFP⁺细胞数的对比图片。这个图证明在活化素A存在(左图)或缺失(右图)的条件下,AFP基因表达(图8A)的改变倍数完全对应于AFP⁺细胞的数量,进一步支持了使用Q-PCR分析来指示单个细胞水平上发生的变化。

[0141] 图10A-F是显示使hESC暴露于nodal、活化素A和活化素B(NAA)5天后SOX17⁺细胞数目显著增加(A-C)的显微图片。通过比较每个区域SOX17⁺细胞占全部细胞数目(如DAPI染色的核(D-F)所示)的相对丰度,可以看出在用NAA处理5天后约30-50%的细胞对SOX17显示免疫反应性。

[0142] 图11是证明活化素A(0,10,30或100ng/ml)剂量依赖的增加正在分化的hESC中SOX17基因表达的条形图。在粘附培养时处理3天后增加的表达已经很高,并一直持续到随后悬浮培养的1、3和5天。

[0143] 图12A-C是证明活化素A对MIXL1(图A)、GATA4(图B)和HNF3b(图C)的表达的影响的条形图。也观察到活化素A剂量依赖的增加定形内胚层3种其他标志物:MIXL1、GATA4和HNF3b。与活化素剂量对应的表达增加的倍数与对SOX17所观察到的非常相似,表明活化素A特异化共表达所有4种基因(SOX17⁺、MIXL1⁺、GATA4⁺和HNF3b⁺)的细胞群。

[0144] 图13A-C是证明活化素A对AFP(图A)、SOX7(图B)和SPARC(图C)的表达的影响的条形图。内脏内胚层标志物AFP的表达对活化素A显示剂量依赖性的降低。原始内胚层标志物(SOX7)和体壁内胚层标志物(SPARC)保持不变或在一些时间点显示抑制,表明活化素A不起特异化这些胚外内胚层细胞类型的作用。这进一步支持了以下事实:SOX17、MIXL1、GATA4和HNF3b表达的增加归因于对应活化素A的定形内胚层细胞数目的增加。

[0145] 图14A-B是显示活化素A对ZIC1(图A)和Brachyury(图B)的表达的影响的条形图。神经标志物ZIC1稳定的表达证明活化素A对神经分化没有剂量依赖效应。Brachyury的表达降低显示100ng/ml活化素A处理显著抑制了中胚层分化。这可能是从中内胚层前体向定形内胚层特异化增加的结果。相对于未处理的对照培养物,低水平的活化素A(10和30ng/ml)处理在分化的较后期保持brachyury的表达。

[0146] 图15A-B是显示响应活化素处理的体壁内胚层分化降低的显微图片。在只有血清的条件下分化时,体壁内胚层 Tm^{hi} 区域存在于所有培养物中(A),而包含活化素A时,向 TM^{+} 细胞的分化非常少,TM免疫反应性的总强度较低。

[0147] 图16A-D是显示响应活化素A和活化素B处理的标志物表达的显微图片。hESC用活化素A和活化素B连续处理4天,用SOX17、AFP和TM抗体三重标记。图A-SOX17;图B-AFP;图C-TM;图DPhase/DAPI。注意到许多SOX17阳性细胞伴随着AFP(B)和TM(C)免疫反应性的完全缺失。

[0148] 图17是显示在体外从hESC出现定形内胚层和内脏内胚层的显微图片。通过 $AFP^{hi}/SOX17^{lo/-}$ 鉴定内脏内胚层区域,而定形内胚层显示完全相反的模式 $SOX17^{hi}/AFP^{lo/-}$ 。因为这两个区域互相靠近,所以选择了这个区域。但是,在从 AFP^{hi} 细胞的任意区域的完全分离物中经常会观察到 $SOX17^{hi}/AFP^{lo/-}$ 区域,表明来自内脏内胚层的定形内胚层的单独起源。

[0149] 图18是描述TGF β 家族的配体和受体的图表。激活AR Smads和BR Smads的因子可以在从人胚胎干细胞产生定形内胚层的过程中起作用(参见:J Cell Physiol.187:265-76)。

[0150] 图19是显示作为经单一或组合的TGF β 因子处理结果的SOX17表达的诱导随时间变化的条形图。

[0151] 图20是显示作为经组合的TGF β 因子处理结果的SOX17 $^{+}$ 细胞数目随时间变化的条形图。

[0152] 图21是显示作为经组合的TGF β 因子处理结果的SOX17表达的诱导随时间变化的条形图。

[0153] 图22是显示活化素A剂量依赖性地诱导SOX17 $^{+}$ 细胞数目增加的条形图。

[0154] 图23是条形图,显示向活化素A和活化素B处理的培养物中添加Wnt3a促使SOX17的表达水平高于只用活化素A和活化素B诱导的表达水平。

[0155] 图24A-C是显示低FBS条件增强向定形内胚层分化的条形图。在含2%FBS的培养基中用活化素A和活化素B处理(2AA)hESC,可导致SOX17的表达水平比在含10%FBS的培养基中经相同处理(10AA)的SOX17的表达水平高2至3倍(图A)。定形内胚层标志物MIXL1(图B)的诱导也以相同方式受影响,在2%FBS中对AFP(内脏内胚层)的抑制比在10%FBS条件下更强(图C)。

[0156] 图25A-D是显示培养物中SOX17 $^{+}$ 细胞分裂的显微图片。SOX17免疫反应性细胞存在于hESC克隆的分化边缘(C,D),被增殖细胞核抗原(PCNA)标记(图B),但不被OCT4共标记(图

C)。此外,在SOX17⁺细胞(箭头)以及OCT4⁺细胞,未分化的hESCs(箭头头部)中用DAPI标记核均可看到清晰的有丝分裂图(D)。

[0157] 图26是显示在不同培养基条件下正在分化的hESC中CXCR4的相对表达水平的条形图。

[0158] 图27A-D是显示一组定形内胚层标志物在如同图26显示的相同分化处理下如何与CXCR4共享非常相似的表达模式的条形图。

[0159] 图28A-E是条形图,显示中胚层标志物(BRACHYURY,MOX1)、外胚层标志物(SOX1,ZIC1)和内脏内胚层标志物(SOX7)在如同图26显示的相同处理下如何表现出与CXCR4表达相反的关系。

[0160] 图29A-F是显示在图26-28中展示的三种培养基条件下SOX17免疫反应性细胞的相对差异的显微图片。

[0161] 图30A-C是流式细胞点图,证明CXCR4⁺细胞数目随添加至分化培养基的活化素A的浓度的增加而增加。

[0162] 图31A-D是条形图,显示从高剂量活化素A处理(A100-CX+)分离的CXCR4⁺细胞比亲代群(A100)进一步富集定形内胚层标志物。

[0163] 图32是条形图,显示使用荧光激活细胞分选术(FACS)分离的CXCR4⁺和CXCR4⁻细胞的基因表达以及亲代群中的基因表达。这证明CXCR4⁺细胞基本包含了每个亲代细胞群中所有的CXCR4基因表达,CXCR4⁻细胞群包含很少或没有CXCR4基因表达。

[0164] 图33A-D是条形图,证明从高剂量活化素A处理分离的CXCR4⁺细胞中中胚层(BRACHYURY,MOX1)、外胚层(SOX1,ZIC1)和内脏内胚层(SOX7)基因表达的缺失,这些非定形内胚层标志物的表达已经受到抑制。

[0165] 图34A-M是显示可用于鉴定定形内胚层细胞的标志物基因的表达模式的条形图。图G-L分别显示了定形内胚层标志物FGF 17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1和CRIP1的表达分析。图A-F分别显示了前面描述的细胞系标记基因SOX17、SOX7、SOX17/SOX7、TM、ZIC1和MOX1)的表达分析。图M显示了CXCR4的表达分析。对于图A-M的每一图,标注hESC的列表示来自纯化的人胚胎干细胞的基因表达;2NF表示细胞经过2%FBS处理,不添加活化素;0.1A100表示细胞经0.1%FBS和100ng/ml活化素A处理;1A100表示细胞经过1%FBS和100ng/ml活化素A处理;2A100表示细胞经过2%FBS和100ng/ml活化素A处理。

[0166] 图35是显示在含有或不含活化素的条件下培养4天和6天的hESC培养物中PDX1基因相对表达的图表,其中在第4天添加视黄酸(RA)和成纤维生长因子(FGF-10)。

[0167] 图36A-F是显示在含有或不含活化素的条件下培养4天和6天的hESCs培养物中标志物基因相对表达的图表,其中在第4天添加视黄酸(RA)和成纤维生长因子(FGF-10)。各图显示了下列标志物基因表达的相对水平:(A)SOX17;(B)SOX7;(C)AFP;(D)SOX1;(E)ZIC1;和(F)NFM。

[0168] 图37A-C是显示在含有或不含活化素的条件下培养4天和8天的hESC培养物中标志物基因相对表达的图表,其中在第4天添加视黄酸(RA)、成纤维生长因子(FGF-10)和成纤维生长因子(FGF-4)的组合。各图显示了下列标志物基因表达的相对水平:(A)PDX1;(B)SOX7和(C)NFM。

[0169] 图38A-G是显示在与50ng/ml FGF-10接触的定形内胚层细胞培养物中标志物基因

的相对表达的图表,其中在第4天添加1 μ M、0.2 μ M或0.04 μ M视黄酸(RA)与50ng/ml FGF-10联合使用。各图显示了下列标志物基因表达的相对水平:(A)PDX1;(B)HOXA3;(C)HOXC6;(D)HOXA13;(E)CDX1;(F)SOX1和(G)NFM。

[0170] 图39A-E显示在含有或不含活化素,存在视黄酸(RA)、成纤维细胞生长因子(FGF-10)和下列中的一种:血清替代物(SR),小牛血清(FBS)或B27构成的组合的条件下培养4天和8天的hESC培养物中标志物基因的相对表达。各栏显示了下列标志物基因表达的相对水平:(A)PDX1;(B)SOX7;(C)AFP;(D)ZIC1和(E)NFM。

[0171] 图40A-B是显示6天(刚好在添加RA之前)后和9天(暴露于RA 3天后)时hESC培养物中胰(PDX1、HNF6)和肝(HNF6)的标志物基因的相对表达的图表。包括了不同的条件的比较,在25ng/ml(A25)或50ng/ml(A50)的条件下添加了10ng/ml(a10)、25ng/ml(a25)或50ng/ml(a50)的活化素B。不含任何活化素A和活化素B(NF)的条件作为产生定形内胚层和PDX1-阴性内胚层的阴性对照。各图显示了下列标志物基因表达的相对水平:(A)PDX1和(B)HNF6。

[0172] 图41A-C显示在含有100ng/ml(A100)、50ng/ml(A50)或不含(NF)活化素A的条件下培养5天(刚好在添加视黄酸之前)时和添加RA后2、4和6天(分别是第7、9和11天)的hESCs培养物中标志物基因的相对表达。每个柱图下直接标记的百分比表明分化3至5天期间的FBS剂量。从第7天开始,用RA处理(R)的细胞在包含0.5%FBS的RPMI培养基中生长。RA的浓度在第7天是2 μ M,第9天是1 μ M,第11天是0.2 μ M。各图显示了下列标志物基因表达的相对水平:(A)PDX1;(B)ZIC1和(C)SOX7。

[0173] 图42A-B显示首先在低FBS中用活化素A处理诱导定形内胚层(第5天),然后用包含25ng/ml活化素A和RA或各种条件培养基(MEFCM、CM#2、CM#3和CM#4)和RA的新鲜(A25R)培养基诱导PDX1-表达内胚层。在第5、6、7、8和9天检测标志物表达。各图显示了下列标志物基因表达的相对水平:(A)PDX1和(B)CDX1。

[0174] 图43显示了首先在低FBS中用活化素A处理诱导定形内胚层,然后用新鲜培养基处理,该新鲜培养基在以新鲜培养基稀释的条件培养基中包含活化素A和视黄酸(A25R)或者不同量的RA。培养基的总体积均是5ml。

[0175] 图44是Western印迹,显示PDX1在添加RA和50ng/ml活化素A后3天(d8)和4天(d9)时RA-处理的定形内胚层细胞的免疫沉淀。

[0176] 图45是一个概要图表,显示遗传标记了在PDX1启动子控制下的EGFP报告基因的PDX1-阳性前肠内胚层细胞荧光激活细胞分选术(FACS)的结果。

[0177] 图46为显示分选的活细胞(Live)、EGFP-阴性细胞(Neg)和EGFP-阳性细胞(GFP+)的群在相对于管家基因校正后的相对PDX1表达水平的图表。

[0178] 图47为显示分选的活细胞(Live)、EGFP-阴性细胞(Neg)、一半带有最低EGFP信号强度(Lo)的EGFP-阳性细胞群和一半带有最高EGFP信号强度(Hi)的EGFP-阳性细胞群的群相对于管家基因校正后的相对PDX1表达水平。

[0179] 图48A-E显示分选的活细胞(Live)、EGFP-阴性细胞(Neg)和EGFP-阳性细胞(GFP+)的群相对于管家基因校正后5种胰内胚层标志物的相对表达水平。各图:A-NKX2.2;B-GLUT2;C-HNF3 β ;D-KRT19和E-HNF4 α 。

[0180] 图49是显示分选的活细胞(Live)、EGFP-阴性细胞(Neg)和EGFP-阳性细胞(GFP+)的群在相对管家基因校正后两种非胰内胚层标志物的相对表达水平。各图:A-ZIC1和B-

GFAP。

[0181] 详细描述

[0182] 称为原肠胚形成的早期人发育中的重要阶段发生于受精后2~3周。原肠胚形成非常重要,因为在这个阶段三种主要胚层第一次特异化和组织化(Lu et al., 2001; Schoenwolf和Smith, 2000)。外胚层负责身体外表和整个神经系统的最终形成,而中胚层衍生出心、血、骨、骨骼肌和其他结缔组织。确定的内胚层被定义为负责整个肠管(包括食道、胃、小肠和大肠)以及肠管衍生的器官(如肺、肝、胸腺、甲状旁腺、甲状腺、胆囊和胰腺)形成的胚层(Grapin-Botton和Melton, 2000; Kimelman和Griffin, 2000; Tremblay et al., 2000; Wells和Melton, 1999; Wells和Melton, 2000)。定形内胚层与称为原始内胚层的完全分离细胞系有重要区别。原始内胚层主要负责胚外组织的形成,主要是胎盘卵黄囊的腔壁和内脏内胚层部分和Reichert's膜的胞外基质物质。

[0183] 在原肠胚形成期,定形内胚层形成过程起始于细胞迁移,其中中内胚层细胞(有形成中胚层或内胚层能力的细胞)迁移穿过称为原条的结构。定形内胚层衍生自一些迁移穿过原条前部及节(在原条最前部区域的特化结构)的细胞。当迁移发生时,定形内胚层首先集中于最前部肠管,随后以肠管后端的形成而终止。

[0184] 发育过程中PDX1基因表达

[0185] PDX1(也称为STF-1、IDX-1和IPF-1)是胰和喙十二指肠(rostral duodenum)发育必需的转录因子。PDX1首先在胰内胚层表达,胰内胚层来自后部前肠内胚层,产生外分泌和内分泌细胞,在小鼠中开始于E8.5。其后,PDX1限定于 β -细胞和一些 δ -细胞。这种表达模式在成年后也保持。发育早期PDX1也在邻近形成中的胰的十二指肠内胚层表达,然后在十二指肠的肠细胞和肠内分泌细胞、胃窦及胆总管、胆囊和胆管中表达。在胰表达受限时,这个表达区域主要限于喙十二指肠。

[0186] PDX1阳性细胞和与其相关的步骤

[0187] 本发明的实施方案涉及产生PDX1-阳性内胚层细胞的新的确定方法,其中PDX1-阳性内胚层细胞是专能细胞,能够分化为衍生自肠管的前肠/中肠区域(PDX1-阳性前肠/中肠内胚层)的细胞、组织或器官。此处使用的“专能”或“专能细胞”涉及这样的细胞类型,其可产生有限数量的其他细胞类型。此处使用的“前肠/中肠”指肠管前部及中部细胞,包括前肠/中肠连接部的细胞。

[0188] 本发明一些优选的实施方案涉及产生PDX1-阳性前肠内胚层细胞的方法。在一些实施方案中,这些PDX1阳性内胚层细胞是专能细胞,能够分化为衍生自肠管前部(PDX1-阳性前肠内胚层)的细胞、组织或器官。

[0189] 其他优选的实施方案涉及产生肠管后部的PDX1-阳性内胚层细胞的方法。在一些实施方案中,这些PDX1阳性内胚层细胞是专能细胞,能够分化为衍生自肠管的前肠区域的后部的细胞、组织或器官。

[0190] PDX1-阳性前肠内胚层细胞,例如那些根据此处描述的方法产生的细胞,可用于产生完全分化的产生胰岛素的 β 细胞。本发明的一些实施方案中,通过分化基本上不表达PDX1的定形内胚层细胞(PDX1-阴性定形内胚层细胞;此处也指定形内胚层)产生PDX1-阳性前肠内胚层细胞。可使用此处描述的方法或其他任何已知方法分化多能性细胞(如胚胎干细胞)来制备PDX1-阴性定形内胚层细胞。2004年12月23日提交的标题为“定形内胚层”的第11/

021,618号美国专利申请描述了一种从多能性细胞方便高效产生PDX1-阴性定形内胚层的方法。

[0191] 产生PDX1-阳性前肠内胚层细胞的方法为从多能性细胞高效产生胰腺组织(如腺泡细胞、导管细胞和胰岛细胞)提供了基础。在某些优选实施方案中,人PDX1-阳性前肠内胚层细胞衍生自人PDX1-阴性定形内胚层细胞,而这些细胞又衍生自hESC。然后这些人PDX1-阳性前肠内胚层细胞被用于产生功能性的产生胰岛素的 β -细胞。为得到有效量的产生的胰岛素 β 细胞,希望在分化为胰岛/ β -细胞终点前每个分化步骤都有高分化效率。因为PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞的分化代表产生功能性胰岛/ β -细胞的一个早期步骤(如图1所示),尤其希望在这一步具有高分化效率。

[0192] 考虑到需要PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞的有效分化,本发明的一些方面涉及体外方法学,它会导致约2%~25%的PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞转化。典型地,该方法包括以确定的和短暂特定的方式使用培养基和生长因子条件。通过使用与PDX1-阳性前肠内胚层细胞特异结合的试剂从细胞群中的其他细胞中分离和/或纯化PDX1-阳性前肠内胚层细胞,可进一步在细胞群中富集PDX1-阳性前肠内胚层细胞。或者,PDX1-阳性前肠内胚层细胞可用诸如绿色荧光蛋白(GFP)的报告基因标记,以使得能够检测PDX1表达。这种荧光标记的细胞可用荧光激活细胞分选术(FACS)纯化。本发明更深入的方面涉及细胞培养物和包含PDX1-阳性前肠内胚层细胞的富集的细胞群,以及鉴定在向PDX1-阳性前肠内胚层和从PDX1-阳性前肠内胚层分化中有用的因子。

[0193] 为测定细胞培养物或细胞群中PDX1-阳性前肠内胚层细胞的数量,需要一种在培养物或细胞群中从其他细胞区分这种细胞类型的方法。相应地,本发明的某些实施方案涉及细胞标志物及检测和确定这些标志物表达的方法,这些标志物的存在、缺失和/或相对表达水平是PDX1-阳性前肠内胚层细胞的指示。此处使用的“表达”指材料或物质的产生以及材料或物质产生的水平或数量。因此,检测特定标志物的表达指测定表达标志物的相对或绝对量,或仅仅检测标志物的存在或缺失。此处使用的“标志物”指任何可被观察或检测的分子。例如,标志物包括但不限于、核苷酸(如特定基因的转录产物)、基因的多肽产物、非基因产物多肽、糖蛋白、糖类、糖脂、脂、脂蛋白或小分子(如分子量小于10,000amu的分子)。

[0194] 本发明的一些实施方案中,用定量PCR(Q-PCR)测定标志物的存在、缺失和/或表达水平。例如,某些遗传标志物,如PDX1、SOX17、SOX7、SOX1、ZIC1、NFM、 α -胎蛋白(AFP)、同源框A13(HOXA13)、同源框C6(HOXC6)和/或此处描述的其他标志物产生的转录产物的量用Q-PCR确定。其他实施方案中,用免疫组化方法检测上述基因表达的蛋白。在其他实施方案中,使用Q-PCR和免疫组化两种方法鉴定和检测这些标志物的量和相对比例。

[0195] 使用此处描述的分化和检测方法就可能在细胞培养物或细胞群中鉴定PDX1-阳性前肠内胚层细胞以及确定这些细胞的比例。例如,本发明一些实施方案中,产生的PDX1-阳性前肠内胚层细胞或细胞群表达PDX1基因的水平比PDX1-阴性细胞或细胞群高至少约2个数量级。其他实施方案中,产生的PDX1-阳性前肠内胚层细胞和细胞群表达PDX1基因的水平比PDX1-阴性细胞或细胞群高2个以上数量级。在其他实施方案中,产生的PDX1-阳性前肠内胚层细胞或细胞群表达一种或多种选自PDX1、SOX17、HOXA13或HOXC6的标志物的水平比PDX1-阴性定形内胚层细胞高约2个或2个以上数量级。

[0196] 此处描述的组合物和方法有几个有用的特性。例如,包含PDX1-阳性内胚层的细胞培养物和细胞群以及产生该细胞培养物和细胞群的方法有利于模拟人发育的早期阶段。此外,此处描述的组合物与方法也可用于疾病状态(如糖尿病)的治疗性干预。例如,因为PDX1-阳性前肠内胚层用作有限数量组织的来源,它可被用于纯组织或细胞类型的开发。

[0197] 从多能性细胞产生PDX1-阴性定形内胚层(定形内胚层)

[0198] 从多能性细胞产生包含PDX1-阳性前肠内胚层细胞的细胞培养物和/或细胞群,首先要产生PDX1-阴性定形内胚层(也称为“定形内胚层”)。下面简单描述了分化多能性细胞以产生包含定形内胚层的细胞培养物和富集的细胞群的方法,详细步骤见2004年12月23日提交的标题为“定形内胚层”的第11/021,618号美国专利申请。在一些方法中,作为起始材料的多能性细胞是干细胞。某些方法中,定形内胚层细胞培养物和包含定形内胚层细胞的富集的细胞群产自胚胎干细胞。此处使用的“胚胎的”指有机体的一系列发育阶段,开始于单一受精卵,结束于多细胞结构,这种多细胞结构除了发育的配子生殖细胞外不再包含多能或全能细胞。除了来自配子融合的胚胎,术语“胚胎的”也指来自体细胞核转移的胚胎。优选的获得定形内胚层细胞的方法利用人胚胎干细胞作为起始材料产生定形内胚层。该多能性细胞可以是源自桑椹胚、胚胎内细胞团或胚胎生殖嵴的细胞。可使用本领域公知的方法在培养基中维持人胚胎干细胞基本未分化的多能状态。在如第5,453,357、5,670,372、5,690,926、5,843,780、6,200,806和6,251,671号美国专利中描述了这些方法。

[0199] 在产生定形内胚层细胞的一些方法中,hESC维持在饲养层上。该方法中,可使用任何能使得hESC维持在多能状态的饲养层。一种常用的培养人胚胎干细胞的饲养层是小鼠成纤维细胞层。最近,人成纤维细胞饲养层已用于培养hESC(参见第2002/0072117号美国专利申请)。产生定形内胚层的被选方法允许不用饲养层就可维持多能hESC。在第2003/0175956号美国专利申请中描述了无饲养层条件下维持多能hESC的方法。

[0200] 此处使用的人胚胎干细胞可在含或不含血清的培养基中维持。在一些胚胎干细胞维持步骤中,使用血清替代物。在其他步骤中,使用例如第2003/0190748号美国专利申请描述的无血清培养技术。

[0201] 干细胞在培养基中通过常规传代保持多能状态,直到需要分化为定形内胚层。一些方法中,通过向干细胞培养物中添加有效量的促进向定形内胚层分化的TGF β 超家族的生长因子以获得向定形内胚层的分化。对产生定形内胚层有用的TGF β 超家族的生长因子选自Nodal/活化素(activin)或BMP亚组。在一些优选的分化方法中,生长因子选自Nodal、活化素A、活化素B和BMP4。此外,生长因子Wnt3a和其他Wnt家族成员有利于定形内胚层细胞的产生。某些分化步骤中,可使用任意上述生长因子的组合。

[0202] 对于多能干细胞向定形内胚层细胞分化的一些方法,添加上述生长因子到细胞中使培养基中生长因子的浓度足以促使至少一部分干细胞向定形内胚层细胞分化。一些方法中,细胞培养基中上述生长因子的浓度是至少约5ng/ml、至少约10ng/ml、至少约25ng/ml、至少约50ng/ml、至少约75ng/ml、至少约100ng/ml、至少约200ng/ml、至少约300ng/ml、至少约400ng/ml、至少约500ng/ml、至少约1000ng/ml、至少约2000ng/ml、至少约3000ng/ml、至少约4000ng/ml、至少约5000ng/ml或多于约5000ng/ml。

[0203] 在多能干细胞向定形内胚层细胞分化的某些方法中,先添加上述生长因子,然后再从细胞培养物中去除。例如,生长因子可在添加约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约5

天、约6天、约7天、约8天、约9天或约10天后去除。在一个优选的方法中,生长因子在添加约4天后去除。

[0204] 定形内胚层的培养物可在含减少的血清或无血清的培养基中生长。在某些培养条件下,血清浓度范围从约0.05% (v/v) 至约20% (v/v)。例如,在一些分化步骤中,培养基中血清浓度可低于约0.05% (v/v)、低于约0.1% (v/v)、低于约0.2% (v/v)、低于约0.3% (v/v)、低于约0.4% (v/v)、低于约0.5% (v/v)、低于约0.6% (v/v)、低于约0.7% (v/v)、低于约0.8% (v/v)、低于约0.9% (v/v)、低于约1% (v/v)、低于约2% (v/v)、低于约3% (v/v)、低于约4% (v/v)、低于约5% (v/v)、低于约6% (v/v)、低于约7% (v/v)、低于约8% (v/v)、低于约9% (v/v)、低于约10% (v/v)、低于约15% (v/v) 或低于约20% (v/v)。一些方法中,定形内胚层在无血清或在血清替代物的条件下生长。其他方法中,定形内胚层细胞在含B27的条件下生长。该方法中,B27添加物的浓度范围从约0.1% (v/v) 至约20% (v/v)。

[0205] 监控多能性细胞向PDX1-阴性定形内胚层(定形内胚层)的分化

[0206] 通过测定定形内胚层特异标志物的表达可监控hESC培养物向定形内胚层的分化进程。在一些方法中,通过检测标志物的存在或缺失确定某种标志物的表达。或者,某些标志物的表达通过测定细胞培养物或细胞群中细胞的标志物的水平来确定。在该方法中,标志物表达的检测可以是定性的,也可以是定量的。使用定量PCR(Q-PCR)是对标志物基因产生的标志物的表达进行定量的一种方法。进行Q-PCR的方法在本领域是公知的。也可用本领域公知的其他方法对标志物基因的表达进行定量。例如,使用针对感兴趣的标志物基因产物特异的抗体,检测标志物基因产物的表达。某些方法中,确定定形内胚层特异标志物基因的表达及缺乏hECS和其他细胞类型特异标志物基因的显著表达。

[0207] 如以下实施例进一步描述的,定形内胚层可靠的标志物是SOX17基因。因此,用此处描述的方法产生的定形内胚层细胞表达SOX17标志物基因,从而产生SOX17基因产物。定形内胚层其他的标志物是MIXL1、GATA4、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1和CRIP1。因为定形内胚层细胞表达SOX17标志物基因的水平高于表达SOX7标志物基因的水平,而这是原始和内脏内胚层的特征(见表1),所以在一些步骤中,SOX17和SOX7的表达均被监控。其他步骤中,监控了hESC特异的SOX17和OCT4标志物基因的表达。此外,因为定形内胚层细胞中SOX17标志物基因的表达水平比AFP、SPARC或血栓调节蛋白(TM)标志物基因的表达水平高,所以这些基因的表达也被监控。

[0208] 定形内胚层另一个标志物是CXCR4基因。CXCR4基因编码细胞表面趋化因子受体,这个受体的配体是化学引诱物SDF-1。在成体中含CXCR4受体的细胞的主要作用被认为是造血细胞向骨髓的迁移、淋巴细胞运输以及各种B细胞和巨噬血细胞系的分化[Kim,C.和Broxmeyer,H.J. *Leukocyte Biol.* 65,6-15(1999)]。CXCR4受体还作为HIV-1进入T细胞的共受体[Feng,Y., et al. *Science*, 272,872-877(1996)]。在[McGrath,K.E. et al. *Dev. Biology* 213,442-456(1999)]进行的一系列广泛的研究中,描绘了在小鼠的早期发育和成年时期趋化因子受体CXCR4和它唯一的配体SDF-1[Kim,C.和Broxmeyer,H., J. *Leukocyte Biol.* 65,6-15(1999)]的表达。在发育中CXCR4/SDF1的相互作用非常明显,因为已证实,在转基因小鼠中破坏CXCR4和SDF1中任一基因[Nagasawa et al. *Nature*, 382, 635-638(1996); Ma,Q., et al. *Immunity*, 10,463-471(1999)],均会导致小鼠在胚胎晚期死亡。McGrath等人利用RNase保护和原位杂交结合的方法证明在原肠形成胚胎早期(E7.5)

CXCR4使检测到的最丰富的趋化因子受体信使RNA。在原肠形成胚胎期,CXCR4/SDF-1信号可能主要参与诱导原条胚层细胞的迁移,并在此时的定形内胚层、中胚层和胚外中胚层表达。在E7.2-7.8小鼠胚胎中,CXCR4和 α -胎蛋白是互斥的,表明内脏内胚层中表达的缺失[McGrath,K.E.et al.Dev.Biology 213,442-456(1999)]。

[0209] 因为通过分化多能性细胞产生的定形内胚层细胞表达CXCR4标志物基因,所以可通过监控CXCR4的表达以追踪定形内胚层细胞的产生。此外,用此处描述的方法产生的定形内胚层细胞还表达定形内胚层的其他标志物,这些标志物包括但不限于SOX17、MIXL1、GATA4、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1和CRIP1。因为定形内胚层表达CXCR4标志物基因的水平高于表达SOX7基因的水平,所以可监控CXCR4和SOX7两种基因的表达。其他方法中,CXCR4标志物基因和OCT4标志物基因的表达均被监控。此外,因为定形内胚层细胞表达CXCR4标志物基因的水平高于表达AFP、SPARC或血栓调节蛋白(TM)标志物基因的水平,也可以监控这些基因的表达。

[0210] 应了解内胚层细胞中CXCR4的表达不妨碍SOX17的表达。用此处描述的方法产生的定形内胚层细胞将大量表达SOX17和CXCR4,但不大量表达AFP、TM、SPARC或PDX1。

[0211] 定形内胚层的富集、分离和/或纯化

[0212] 用任意上述方法产生的定形内胚层细胞,可通过利用对这些细胞特异的亲和标签进行富集、分离和/或纯化。对定形内胚层细胞特异的亲和标签的例子是抗体、配体或其他对标志物分子特异的结合试剂,例如多肽,其中所述标志物分子存在于定形内胚层细胞表面上,而基本上不存在于在用此处描述的方法产生的细胞培养物中可以找到的其他细胞类型上。一些方法中,使用与CXCR4结合的抗体作为亲和标签,以富集、分离或纯化定形内胚层细胞。在其他方法中,使用趋化因子SDF-1或基于SDF-1的其他分子作为亲和标签。这些分子包括但不限于SDF-1片段、SDF-1融合物或SDF-1模拟物。

[0213] 制备抗体和利用抗体进行细胞分离的方法在本领域是公知的,这些方法可用于此处描述的抗体和定形内胚层细胞。在一个方法中,将结合CXCR4的抗体偶联到磁珠上,然后与细胞培养物中的定形内胚层细胞结合,其中该细胞培养物经过酶处理以减少细胞间和底物的粘附。随后将细胞/抗体/磁珠混合物置于可动磁场中,用于分离与磁珠结合的定形内胚层细胞和未结合的细胞。当培养物中定形内胚层细胞与其他细胞进行了物理分离后,抗体结合被破坏,细胞重新种于合适的组织培养基中。

[0214] 也可用其他方法获得富集的、分离的或纯化的定形内胚层细胞培养物或群。例如,在一些实施方案中,使CXCR4抗体与含定形内胚层的细胞培养物孵育,其中该培养物经过处理以减少细胞间和底物的粘附。洗涤、离心和重悬细胞。细胞悬浮物与二抗(例如能够与一抗结合的FITC偶联的抗体)孵育。洗涤、离心并在缓冲液中重悬细胞。然后用荧光激活细胞分选术(FACS)对细胞悬浮物进行分析和分选。收集于CXCR4-阴性细胞分离后的CXCR4-阳性细胞,从而分离了这种细胞类型。如果需要,可使用另一亲和方法或增加分选次数对分离的细胞组分进一步纯化,利用的是特异于定形内胚层细胞的相同或不同的标志物。

[0215] 在其他方法中,利用与CXCR4结合的配体或其他分子富集、分离和/或纯化定形内胚层细胞。一些方法中,这种分子是SDF-1或其片段、融合物或模拟物。

[0216] 优选方法中,在诱导干细胞培养物向定形内胚层系分化后,从其他非定形内胚层细胞富集、分离和/或纯化定形内胚层细胞。应了解上述富集、分离和纯化步骤可用于该培

养物分化的任意阶段。

[0217] 除了刚刚描述的步骤外,还可以用其他细胞分离技术分离定形内胚层细胞。此外,通过在促进定形内胚层细胞选择性存活或选择性扩增的生长条件下进行系列传代培养的方法富集或分离定形内胚层细胞。

[0218] 使用此处描述的方法,富集的、分离的和/或纯化的定形内胚层细胞群和/或组织可在体外从多能性细胞培养物或细胞群产生,例如已经进行了至少部分分化的干细胞培养物或群。在一些方法中,细胞进行随机分化。但在优选方法中,细胞主要定向分化为定形内胚层。一些优选的富集、分离和/或纯化方法涉及在体外从人胚胎干细胞产生定形内胚层。使用此处描述的方法,细胞群或细胞培养物中的定形内胚层含量与未处理的细胞群或细胞培养物相比,至少富集了约2至约1000倍。

[0219] 包含PDX1-阴性定形内胚层(定形内胚层)的组合物

[0220] 上述方法产生的细胞组合物包括包含定形内胚层的细胞培养物和富集定形内胚层的细胞群。例如,能够产生包含定形内胚层细胞的细胞培养物,其中培养物中至少约50~80%的细胞是定形内胚层细胞。因为分化方法的效率可通过改变某些参数(这些参数包括但不限于,细胞生长条件、生长因子浓度和培养步骤的时间控制)来调整,此处描述的分化方法可导致约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或超过约95%的多能性细胞向定形内胚层的转化。在采用分离定形内胚层细胞的方法中,例如,通过使用结合CXCR4受体的亲和试剂,可获得基本上纯的定形内胚层细胞群。

[0221] 从PDX1-阴性定形内胚层产生PDX1-阳性前肠内胚层

[0222] 此处描述的包含PDX1-阳性前肠内胚层细胞的PDX1-阳性前肠内胚层细胞培养物和群由PDX1-阴性定形内胚层产生,其中该PDX1-阴性定形内胚层如上所述由多能性细胞产生。一个优选的方法利用人胚胎干细胞作为起始材料。在一个实施方案中,hESC首先转化为PDX1-阴性定形内胚层细胞,然后转化为PDX1-阳性前肠内胚层细胞。但应了解用于PDX1-阳性前肠内胚层细胞产生的起始材料并不限于用多能性细胞分化方法产生的定形内胚层细胞。而且,任何PDX1-阴性定形内胚层细胞都可用于此处描述的方法,与它们的来源无关。

[0223] 本发明一些实施方案中,包含PDX1-阴性定形内胚层细胞的细胞培养物或细胞群可用于进一步向包含PDX1-阳性前肠内胚层细胞的细胞培养物和/或富集的细胞群分化。例如,可使用包含人PDX1-阴性、SOX17-阳性的定形内胚层细胞的细胞培养物或细胞群。在一些实施方案中,细胞培养物或细胞群可能包含从前面分化步骤(即分化多能性细胞为定形内胚层细胞的步骤)保留的分化因子,如活化素、nodal和/或BMP。其他实施方案中,在添加用于PDX1-阴性、SOX17-阳性定形内胚层细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化的因子前,从细胞培养物或细胞群中去除前面分化步骤中的因子。其他实施方案中,用富集PDX1-阴性、SOX17-阳性定形内胚层细胞的细胞群作为产生PDX1-阳性前肠内胚层细胞的来源。

[0224] 通过向包含PDX1-阴性、SOX17-阳性定形内胚层细胞的细胞培养物中添加促进细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化的分化因子(前肠分化因子),培养基中的PDX1-阴性定形内胚层细胞可分化为PDX1-阳性内胚层细胞。本发明一些实施方案中,前肠分化因子是类视黄醇,例如视黄酸(RA)。一些实施方案中,类视黄醇与成纤维细胞生长因子(例如FGF-4和FGF-10)联用。其他实施方案中,类视黄醇与生长因子TGF β 超家族成员和/或条件培养基联

用。

[0225] “条件培养基”是指与基本培养基比较发生了改变的培养基。例如,培养基的条件化可能造成从培养基的初始水平添加或去除分子,例如营养物和/或生长因子。在一些实施方案中,通过在一定条件下使一定类型的细胞在培养基中生长或维持一定时间段而使培养基条件化。例如,通过使hESC在一定温度、一定组成的培养基中扩增、分化或维持一定的时间而使培养基条件化。本领域技术人员应了解的是,细胞、培养基类型、持续时间和环境条件的众多组合可用于产生接近无穷排列的条件培养基。本发明的一些实施方案中,通过在包含约1%至约20%血清浓度的培养基中生长或维持分化的多能性细胞来条件化培养基。在其他实施方案中,通过使分化的多能性细胞在包含约1ng/ml至约1000ng/ml活化素A的培养基中的生长或维持来条件化培养基。在其他实施方案中,通过使分化的多能性细胞在包含约1ng/ml至约1000ng/ml BMP4的培养基中生长或维持来条件化培养基。在优选的实施方案中,通过使分化的hESC在包含约25ng/ml活化素A和约2 μ M RA的培养基(如RPMI)中生长或维持来制备条件培养基。

[0226] 本发明的一些实施方案中,用于条件化培养基(这些培养基用于增强PDX1-阴性定形内胚层向PDX1-阳性前肠内胚层的分化)的细胞是在含约0%至约20%血清和/或一种或多种TGF β 超家族生长/分化因子的培养基(方案如RPMI)中从多能性细胞(如hESC)分化超过5天的细胞。添加分化因子(例如活化素A和BMP4)的浓度范围从约1ng/ml至约1000ng/ml。本发明的某些实施方案中,用于条件化培养基的细胞在低血清RPMI中从hESC分化超过5天。根据一些实施方案,低血清RPMI指含有低血清的培养基,其中血清浓度在一定时间段内逐渐增加。例如,在一个实施方案中,低血清RPMI在细胞生长第一天包含浓度约0.2%的胎牛血清(FBS),细胞生长第二天约0.5%FBS,细胞生长第3至5天约2%FBS。在另一个实施方案中,低血清RPMI第一天包含血清浓度约0%,第二天约0.2%,第3~6天约2%。在某些优选的实施方案中,低血清RPMI中添加一种或多种分化因子,方案如活化素A和BMP4。除了制备用于条件化培养基的细胞,低血清RPMI也可用作PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化的培养基。

[0227] 本领域的普通技术人员应了解用于制备条件培养基的培养基不只是RPMI,前提是这种培养基不干扰PDX1-阳性前肠内胚层细胞的生长或维持。还应了解用于条件化培养基的细胞可以是不同的类型。在使用新鲜分化的细胞来条件化培养基的实施方案中,这种细胞可以在不同于RPMI的培养基中分化,前提是这种培养基不会抑制这种细胞的生长或维持。此外,技术人员应了解条件化的持续时间或制备用于条件化的细胞的持续时间不是分别必须是24小时或5天,因为其他的时间长度也足以获得此处报道的效果。

[0228] 通常,类视黄醇与成纤维细胞生长因子(生长因子TGF β 超家族的成员)、条件培养基或任意这些前肠分化因子的组合联用,都可以造成比单用类视黄醇更强的PDX1-阴性定形内胚层向PDX1-阳性前肠内胚层的分化。在优选的实施方案中,添加RA和FGF-10到PDX1-阴性定形内胚层细胞培养物中。在另一个优选的实施方案中,PDX1-阴性定形内胚层细胞在含有条件培养基、活化素A、活化素B和RA的培养基中分化。

[0229] 就此处描述的分化方法的一些实施方案而论,将上述前肠分化因子添加到细胞中,使细胞培养物或细胞群中前肠分化因子的浓度足以促进至少部分PDX1-阴性定形内胚层细胞培养物或细胞群向PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化。当涉及细胞培养物和/或细胞群

时,术语“部分”表示细胞培养物或细胞群任意不为零的数量,范围从单个细胞到整个细胞培养物或细胞群。

[0230] 本发明的一些实施方案中,向培养物的细胞中添加类视黄醇使其浓度至少约0.01 μM 、至少约0.02 μM 、至少约0.04 μM 、至少约0.08 μM 、至少约0.1 μM 、至少约0.2 μM 、至少约0.3 μM 、至少约0.4 μM 、至少约0.5 μM 、至少约0.6 μM 、至少约0.7 μM 、至少约0.8 μM 、至少约0.9 μM 、至少约1 μM 、至少约1.1 μM 、至少约1.2 μM 、至少约1.3 μM 、至少约1.4 μM 、至少约1.5 μM 、至少约1.6 μM 、至少约1.7 μM 、至少约1.8 μM 、至少约1.9 μM 、至少约2 μM 、至少约2.1 μM 、至少约2.2 μM 、至少约2.3 μM 、至少约2.4 μM 、至少约2.5 μM 、至少约2.6 μM 、至少约2.7 μM 、至少约2.8 μM 、至少约2.9 μM 、至少约3 μM 、至少约3.5 μM 、至少约4 μM 、至少约4.5 μM 、至少约5 μM 、至少约10 μM 、至少约20 μM 、至少约30 μM 、至少约40 μM 或至少约50 μM 。此处使用的“类视黄醇(retinoid)”指视黄醇、视黄醛或视黄酸以及这些化合物的任何衍生物。在优选的实施方案中,类视黄醇是视黄酸。

[0231] 本发明其他实施方案中,细胞培养物中存在一种或多种成纤维细胞生长因子家族的分化因子。例如,在一些实施方案中,细胞培养物中FGF-4的浓度至少约10 ng/ml、至少约25 ng/ml、至少约50 ng/ml、至少约75 ng/ml、至少约100 ng/ml、至少约200 ng/ml、至少约300 ng/ml、至少约400 ng/ml、至少约500 ng/ml或至少约1000 ng/ml。本发明进一步实施方案中,细胞培养物中FGF-10的浓度至少约10 ng/ml、至少约25 ng/ml、至少约50 ng/ml、至少约75 ng/ml、至少约100 ng/ml、至少约200 ng/ml、至少约300 ng/ml、至少约400 ng/ml、至少约500 ng/ml、或至少约1000 ng/ml。在一些实施方案中,从FGF-4和FGF-10中选择一个与RA一起添加到细胞培养物中。优选的实施方案中,细胞培养物中RA浓度为1 μM , FGF-10浓度为50 ng/ml。

[0232] 本发明一些实施方案中,在细胞培养物中存在TGF β 超家族的生长因子和/或条件培养基。这些分化因子可与RA和/或其它中前肠分化因子(包括但不限于FGF-4和FGF-10)联用。例如,在一些实施方案中,细胞培养物中可存在活化素A和/或活化素B,其浓度为至少约5 ng/ml、至少约10 ng/ml、至少约25 ng/ml、至少约50 ng/ml、至少约75 ng/ml、至少约100 ng/ml、至少约200 ng/ml、至少约300 ng/ml、至少约400 ng/ml、至少约500 ng/ml或至少约1000 ng/ml。本发明的另一实施方案中,细胞培养物中存在条件培养基,其浓度是总培养基的至少约1%、至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%。一些实施方案中,细胞培养物中添加有活化素A、活化素B以及条件培养基和RA。在优选实施方案中,在包含1 μM RA、约25 ng/ml活化素A和低血清RPMI培养基(该培养基已被分化的hESC条件化约24小时,其中分化的hESC已在包含100 ng/ml活化素A的低血清RPMI中分化约5天)的培养物中PDX1-阴性定形内胚层细胞分化为PDX1-阳性前肠内胚层细胞。在另一优选实施方案中,培养物中还存在活化素B和/或FGF-10,其浓度分别是25 ng/ml和50 ng/ml。

[0233] 本发明的某些实施方案中,上述前肠分化因子在添加后从细胞培养物去除。例如,前肠分化因子可以在添加后约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天或约10天内去除。

[0234] PDX1-阳性前肠内胚层细胞可在含有降低血清浓度的培养基中生长。血清浓度范围可从约0.05%(v/v)至约20%(v/v)。在一些实施方案中,PDX1-阳性前肠内胚层细胞生长

在含血清替代物的条件下。例如,在某些实施方案中,培养基的血清浓度可低于约0.05% (v/v)、低于约0.1% (v/v)、低于约0.2% (v/v)、低于约0.3% (v/v)、低于约0.4% (v/v)、低于约0.5% (v/v)、低于约0.6% (v/v)、低于约0.7% (v/v)、低于约0.8% (v/v)、低于约0.9% (v/v)、低于约1% (v/v)、低于约2% (v/v)、低于约3% (v/v)、低于约4% (v/v)、低于约5% (v/v)、低于约6% (v/v)、低于约7% (v/v)、低于约8% (v/v)、低于约9% (v/v)、低于约10% (v/v)、低于约15% (v/v)或低于约20% (v/v)。在一些实施方案中,PDX1-阳性前肠内胚层细胞可以在无血清的条件下生长。在其他实施方案中,PDX1-阳性前肠内胚层细胞在含血清替代物的条件下生长。

[0235] 在其他实施方案中,PDX1-阳性前肠内胚层细胞在B27存在下生长。在这些实施方案中,B27可以从约0.1% (v/v)至约20% (v/v)的浓度范围或者大于20% (v/v)的浓度添加到培养基中。在某些实施方案中,培养基中B27的浓度约0.1% (v/v)、约0.2% (v/v)、约0.3% (v/v)、约0.4% (v/v)、约0.5% (v/v)、约0.6% (v/v)、约0.7% (v/v)、约0.8% (v/v)、约0.9% (v/v)、约1% (v/v)、约2% (v/v)、约3% (v/v)、约4% (v/v)、约5% (v/v)、约6% (v/v)、约7% (v/v)、约8% (v/v)、约9% (v/v)、约10% (v/v)、约15% (v/v)或约20% (v/v)。或者,添加的B27添加物的浓度可根据商品化的B27存储液浓度的倍数来计算。例如,Invitrogen(Carlsbad,CA)提供50×的B27存储液。向足够体积的生长培养基中添加足量这种存储液可以产生含所需量B27的培养基。例如,向90ml生长培养基中添加10ml 50×B27存储液将得到添加了5×B27的生长培养基。培养基中B27添加物的浓度可以是约0.1×、约0.2×、约0.3×、约0.4×、约0.5×、约0.6×、约0.7×、约0.8×、约0.9×、约1×、约1.1×、约1.2×、约1.3×、约1.4×、约1.5×、约1.6×、约1.7×、约1.8×、约1.9×、约2×、约2.5×、约3×、约3.5×、约4×、约4.5×、约5×、约6×、约7×、约8×、约9×、约10×、约11×、约12×、约13×、约14×、约15×、约16×、约17×、约18×、约19×、约20×和高于约20×。

[0236] 监控PDX1-阴性定形内胚层向PDX1-阳性前肠内胚层的分化

[0237] 如同多能性细胞向定形内胚层细胞分化的情况,PDX1-阴性、SOX17-阳性定形内胚层向PDX1-阳性前肠内胚层分化的进程可通过测定这些细胞类型特征性的标志物的表达来监控。这种监控使得能决定在不同条件下(例如一种或多种分化因子浓度和环境条件)足以产生所需量PDX1-阳性前肠内胚层需要的时间。优选的实施方案中,通过检测PDX1的表达来决定足以产生所需量PDX1-阳性前肠内胚层所需的时间。本发明的一些实施方案中,通过检测标志物的存在或缺失来测定某些标志物的表达。或者,通过测定细胞培养物或细胞群的细胞中标志物存在的水平来测定某些标志物的表达。在这些实施方案中,标志物表达的量可以是定性或定量的。如上所述,优选的定量检测由标志物基因产生的标志物表达的方法是使用Q-PCR。在具体实施方案中,Q-PCR被用于通过定量检测PDX1-阳性前肠内胚层特征性的标志物基因的表达和其他细胞类型特征性的标志物基因表达的缺失,来监控PDX1-阴性、SOX17-阳性定形内胚层培养物向PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化的进程。也可以用本领域其他公知的方法定量检测标志物基因表达。例如,可利用对感兴趣的标志物基因产物特异的抗体来检测标志物基因产物的表达。本发明一些实施方案中,测定了PDX1-阳性前肠内胚层特征性的标志物基因的表达以及PDX1-阴性定形内胚层、hESC和其他细胞类型特征性的标志物基因的显著表达的缺失。

[0238] 如以下实施方案的进一步描述,PDX1是与PDX1-阳性前肠内胚层相关的标志物基

因。因此,在本发明的一些实施方案中测定了PDX1的表达。在其他实施方案中,也测定了在PDX1-阳性前肠内胚层表达的其他标志物的表达,这些标志物包括但不限于SOX17、HOXA13和/或HOXC6。因为某些其他细胞类型(即内脏内胚层和某些神经外胚层)也表达PDX1,所以本发明一些实施方案涉及证明与内脏内胚层和/或神经外胚层有关的基因表达的缺失或基本上缺失。例如,在一些实施方案中,在内脏内胚层和/或神经外胚层表达的标志物(包括但不限于SOX7、AFP、SOX1、ZIC1和/或NFM)的表达被测定。

[0239] 在一些实施方案中,用此处所述方法产生的PDX1-阳性前肠内胚层细胞培养物基本上不含表达SOX7、AFP、SOX1、ZIC1或NFM标志物基因的细胞。在某些实施方案中,用此处所述步骤产生的PDX1-阳性前肠内胚层细胞培养物基本上不含内脏内胚层、体壁内胚层和/或神经细胞。

[0240] PDX1-阳性前肠内胚层的富集,分离和/或纯化

[0241] 根据本发明的其他方面,PDX1-阳性前肠内胚层细胞可以被富集、分离和/或纯化。本发明的一些实施方案中,富集PDX1-阳性前肠内胚层细胞的细胞群通过从细胞培养物中分离这种细胞来产生。

[0242] 本发明的一些实施方案中,PDX1-阳性前肠内胚层细胞用荧光标记,然后用荧光激活细胞分选术(FACS)来与未标记细胞分离。在这类实施方案中,用编码绿色荧光蛋白(GFP)的核苷酸或另一编码可表达荧光标志物基因的核苷酸标记PDX1-阳性细胞。例如,在一些实施方案中,至少一个拷贝的编码GFP或其生物学活性片段的核苷酸被导入多能性细胞(优选的是人胚胎干细胞)PDX1启动子的下游,以便GFP基因产物或其生物学活性片段的表达受PDX1启动子的控制。在一些实施方案中,编码PDX1的核苷酸的整个编码区域被编码GFP或其生物学活性片段的核苷酸替换。在其他实施方案中,编码GFP或其生物学活性片段的核苷酸与编码PDX1的核苷酸的至少一部分进行框内(in frame)融合,从而产生融合蛋白。在这类实施方案中,融合蛋白保留与GFP相似的荧光能力。

[0243] 如前所述,荧光标记的细胞(例如上述的多能性细胞)分化为定形内胚层,然后是PDX1-阳性前肠内胚层。因为PDX1-阳性前肠内胚层细胞表达荧光标志物基因,而PDX1-阴性细胞不表达,这两种细胞类型可被分离。在一些实施方案中,用FACS分选包含荧光标记的PDX1-阳性细胞和未标记的PDX1-阴性细胞的混合物的细胞悬浮物。PDX1阳性细胞从PDX1-阴性细胞分离后收集,从而分离这种细胞类型。如果需要,可使用相同的或不同的对PDX1-阳性前肠内胚层特异的标志物增加分选次数,以进一步纯化分离的细胞组合物。

[0244] 除了刚刚描述的步骤,PDX1-阳性前肠内胚层细胞也可用细胞分离的其他技术进行分离。此外,PDX1-阳性前肠内胚层细胞也可使用在促进上述PDX1-阳性前肠内胚层细胞选择性存活或选择性扩增的生长条件下进行系列传代培养的方法富集或分离定形内胚层细胞。

[0245] 应了解上述富集、分离和纯化步骤可用于这类培养物的任意分化阶段。

[0246] 使用此处描述的方法,富集的、分离的和/或纯化的PDX1-阳性前肠内胚层细胞的群和/或组织可在体外从已经进行至少部分分化的PDX1-阴性、SOX17-阳性定形内胚层细胞培养物或细胞群得到。在一些实施方案中,细胞进行随机分化。但在优选的实施方案中,细胞主要定向分化为PDX1-阳性前肠内胚层细胞。一些优选的富集、分离和/或纯化方法涉及在体外从人胚胎干细胞产生PDX1-阳性前肠内胚层细胞。

[0247] 使用此处描述的方法,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,细胞群或细胞培养物中的PDX1-阳性前肠内胚层细胞含量可被富集至少约2至约1000倍。一些实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,PDX1-阳性前肠内胚层细胞可被富集至少约5至约500倍。其他实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,PDX1-阳性前肠内胚层细胞可被富集至少约10至约200倍。其他实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,PDX1-阳性前肠内胚层细胞可被富集至少约20至约100倍。其他实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,PDX1-阳性前肠内胚层细胞可被富集至少约40至约80倍。某些实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,PDX1-阳性前肠内胚层细胞可被富集至少约2至约20倍。

[0248] 包含PDX1-阳性前肠内胚层的组合物

[0249] 本发明的一些实施方案涉及包含PDX1-阳性前肠内胚层细胞的细胞组合物,例如细胞培养物或细胞群,其中PDX1-阳性前肠内胚层细胞是专能细胞(PDX1-阳性前肠内胚层),可以分化为衍生自肠管前部的细胞、组织或器官。根据某些实施方案,PDX1-阳性前肠内胚层是哺乳动物细胞,在优选实施方案中,定形内胚层细胞是人细胞。

[0250] 本发明的其他实施方案涉及包含一种或多种选自hESC、PDX1-阴性定形内胚层细胞、PDX1-阳性前肠内胚层细胞和中胚层细胞的细胞类型的细胞的组合物,例如细胞培养物或细胞群。一些实施方案中,培养物中hESC少于约5%、少于约4%、少于约3%、少于约2%或少于约1%的全部细胞。其他实施方案中,培养物中PDX1-阴性定形内胚层细胞少于约90%、少于约85%、少于约80%、少于约75%、少于约70%、少于约65%、少于约60%、少于约55%、少于约50%、少于约45%、少于约40%、少于约35%、少于约30%、少于约25%、少于约20%、少于约15%、少于约12%、少于约10%、少于约8%、少于约6%、少于约5%、少于约4%、少于约3%、少于约2%或少于约1%的全部细胞。其他实施方案中,培养物中中胚层细胞少于约90%、少于约85%、少于约80%、少于约75%、少于约70%、少于约65%、少于约60%、少于约55%、少于约50%、少于约45%、少于约40%、少于约35%、少于约30%、少于约25%、少于约20%、少于约15%、少于约12%、少于约10%、少于约8%、少于约6%、少于约5%、少于约4%、少于约3%、少于约2%或少于约1%的占全部细胞。

[0251] 本发明的其他实施方案涉及用此处描述的方法产生的包含PDX1-阳性前肠内胚层作为主要细胞类型的组合物、例如细胞培养物或细胞群。一些实施方案中,用此处描述的方法产生包含至少约99%、至少约98%、至少约97%、至少约96%、至少约95%、至少约94%、至少约93%、至少约92%、至少约91%、至少约90%、至少约85%、至少约80%、至少约75%、至少约70%、至少约65%、至少约60%、至少约55%、至少约54%、至少约53%、至少约52%或至少约51%的PDX1-阳性前肠内胚层细胞的细胞培养物和/或细胞群。优选的实施方案中、细胞培养物或细胞群的细胞包含人细胞。其他实施方案中,用此处描述的方法产生包含至少约50%、至少约45%、至少约40%、至少约35%、至少约30%、至少约25%、至少约24%、至少约23%、至少约22%、至少约21%、至少约20%、至少约19%、至少约18%、至少约17%、至少约16%、至少约15%、至少约14%、至少约13%、至少约12%、至少约11%、至少约10%、至少约9%、至少约8%、至少约7%、至少约6%、至少约5%、至少约4%、至少约3%、至少约2%或至少约1%的PDX1-阳性前肠内胚层细胞的细胞培养物和/或细胞群。优选实施方案中,细胞培养物或细胞群的细胞包含人类细胞。一些实施方案中,计算细胞培养物或细胞群

中PDX1-阳性前肠内胚层细胞的比例时不考虑残留在培养物中的饲养细胞。

[0252] 本发明的其他实施方案涉及包含PDX1-阳性前肠内胚层细胞和PDX1-阴性定形内胚层细胞的混合物的组合物,例如细胞培养物或细胞群。例如,能够产生包含约每95个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约5个PDX1-阳性前肠内胚层细胞的细胞培养物或细胞群。其他实施方案中,能够产生包含约每5个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约95个PDX1-阳性前肠内胚层细胞的细胞培养物或细胞群。此外,预期可以得到包含PDX1-阳性前肠内胚层细胞和PDX1-阴性定形内胚层其他比例的细胞培养物或细胞群。例如,预期可以得到包含约每1,000,000个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约1个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每100,000个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约1个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每10,000个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约1个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每1000个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约1个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每500个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约1个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每100个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约1个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每10个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约1个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每5个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约1个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每4个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约1个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每2个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约1个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每1个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约1个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每1个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约2个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每1个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约4个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每1个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约5个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每1个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约10个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每1个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约20个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每1个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约50个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每1个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约100个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每1个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约1000个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每1个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约10,000个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、约每1个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约100,000个PDX1-阳性前肠内胚层细胞、和约每1个PDX1-阴性定形内胚层细胞对应至少约1,000,000个PDX1-阳性前肠内胚层细胞的组合物。

[0253] 本发明一些实施方案中,用于产生PDX1-阳性前肠内胚层细胞的PDX1-阴性定形内胚层细胞衍生自人多能性细胞,例如人多能干细胞。某些实施方案中,人多能性细胞衍生自桑椹胚、胚胎内细胞团或胚胎生殖嵴。某些其他实施方案中,人多能性细胞衍生自发育已经越过胚胎期的多细胞结构的性腺组织或生殖组织。

[0254] 本发明的进一步实施方案涉及包含人细胞(包括人PDX1-阳性前肠内胚层)的组合物,例如细胞培养物或细胞群,其中至少约2%的人细胞中PDX1标志物的表达高于AFP、SOX7、SOX1、ZIC1和/或NFM标志物的表达。其他实施方案中,至少5%的人细胞中、至少10%的人细胞中、至少15%的人细胞中、至少20%的人细胞中、至少25%的人细胞中、至少30%的人细胞中、至少35%的人细胞中、至少40%的人细胞中、至少45%的人细胞中、至少50%的人细胞中、至少55%的人细胞中、至少60%的人细胞中、至少65%的人细胞中、至少70%的人细胞中、至少75%的人细胞中、至少80%的人细胞中、至少85%的人细胞中、至少90%

的人细胞中、至少95%的人细胞中或至少98%的人细胞中、PDX1标志物的表达高于AFP、SOX7、SOX1、ZIC1和/或NFM标志物的表达。一些实施方案中,计算细胞培养物或群中人细胞(其中PDX1的表达高于AFP、SOX7、SOX1、ZIC1和/或NFM的表达)的比例时不考虑饲养细胞。

[0255] 应了解本发明的一些实施方案涉及包含人PDX1-阳性前肠内胚层细胞的组合物,例如细胞培养物或细胞群,其中从至少约2%到超过约98%的人细胞中一种或多种选自SOX17、HOXA13或HOXC6的表达高于AFP、SOX7、SOX1、ZIC1和/或NFM标志物的表达。一些实施方案中,至少约5%的人细胞中、至少约10%的人细胞中、至少约15%的人细胞中、至少约20%的人细胞中、至少约25%的人细胞中、至少约30%的人细胞中、至少约35%的人细胞中、至少约40%的人细胞中、至少约45%的人细胞中、至少约50%的人细胞中、至少约55%的人细胞中、至少约60%的人细胞中、至少约65%的人细胞中、至少约70%的人细胞中、至少约75%的人细胞中、至少约80%的人细胞中、至少约85%的人细胞中、至少约90%的人细胞中、至少约95%的人细胞中或至少约98%的细胞中,一种或多种选自SOX17、HOXA13或HOXC6的表达高于AFP、SOX7、SOX1、ZIC1和/或NFM的表达。一些实施方案中,计算细胞培养物或群中人细胞(一种或多种选自SOX17、HOXA13或HOXC6的表达高于AFP、SOX7、SOX1、ZIC1和/或NFM的表达)的比例时不考虑饲养细胞。

[0256] 本发明的其他实施方案涉及包含哺乳动物内胚层细胞(例如人内胚层细胞)的组合物,例如细胞培养物或细胞群,其中至少约2%的内胚层细胞中PDX1标志物的表达高于AFP、SOX7、SOX1、ZIC1和/或NFM标志物的表达。其他实施方案中,至少约5%的内胚层细胞中、至少约10%的内胚层细胞中、至少约15%的内胚层细胞中、至少约20%的内胚层细胞中、至少约25%的内胚层细胞中、至少约30%的内胚层细胞中、至少约35%的内胚层细胞中、至少约40%的内胚层细胞中、至少约45%的内胚层细胞中、至少约50%的内胚层细胞中、至少约55%的内胚层细胞中、至少约60%的内胚层细胞中、至少约65%的内胚层细胞中、至少约70%的内胚层细胞中、至少约75%的内胚层细胞中、至少约80%的内胚层细胞中、至少约85%的内胚层细胞中、至少约90%的内胚层细胞中、至少约95%的内胚层细胞中或至少约98%的内胚层细胞中、PDX1标志物的表达高于AFP、SOX7、SOX1、ZIC1和/或NFM标志物的表达。

[0257] 本发明的其他实施方案涉及包含哺乳动物内胚层细胞(例如人内胚层细胞)的组合物,例如细胞培养物或细胞群,其中至少约2%的胚胎细胞中一种或多种选自SOX17、HOXA13和HOXC6的标志物的表达高于AFP、SOX7、SOX1、ZIC1和/或NFM标志物的表达。其他实施方案中,至少约5%的内胚层细胞中、至少约10%的内胚层细胞中、至少约15%的内胚层细胞中、至少约20%的内胚层细胞中、至少约25%的内胚层细胞中、至少约30%的内胚层细胞中、至少约35%的内胚层细胞中、至少约40%的内胚层细胞中、至少约45%的内胚层细胞中、至少约50%的内胚层细胞中、至少约55%的内胚层细胞中、至少约60%的内胚层细胞中、至少约65%的内胚层细胞中、至少约70%的内胚层细胞中、至少约75%的内胚层细胞中、至少约80%的内胚层细胞中、至少约85%的内胚层细胞中、至少约90%的内胚层细胞中、至少约95%的内胚层细胞中或至少约98%的内胚层细胞中,一种或多种选自SOX17、HOXA13和HOXC6的标志物的表达高于AFP、SOX7、SOX1、ZIC1和/或NFM标志物的表达。

[0258] 使用此处描述的方法,可产生基本上不含其他细胞类型的包含PDX1-阳性前肠内胚层细胞的组合物。关于细胞培养物或细胞群中的细胞,术语“基本上不含”表示细胞培养

物或细胞群不含的特异细胞类型在细胞培养物或细胞群的所有细胞中占有的比例少于5%。本发明的一些实施方案中,用此处描述的方法产生的PDX1-阳性前肠内胚层细胞群或细胞培养物基本上不含显著表达AFP、SOX7、SOX1、ZIC1和/或NFM标志物基因的细胞。

[0259] 本发明的一个实施方案中,根据标志物基因的表达对PDX1-阳性前肠内胚层细胞的描述如下:PDX1高、AFP低、SOX7低、SOX1低、ZIC1低和NFM低。

[0260] 增加SOX17-阳性定形内胚层细胞中PDX1的表达

[0261] 本发明的一些方面涉及增加包含SOX17-阳性定形内胚层细胞的细胞培养物或细胞群中表达PDX1基因产物的方法。在这类实施方案中,向SOX17-阳性定形内胚层细胞中添加足以增加PDX1基因产物表达量的分化因子。与分化因子接触的SOX17-阳性定形内胚层细胞可以是PDX1-阴性或PDX1-阳性。在一些实施方案中,分化因子可以是类视黄醇。某些实施例中,使SOX17-阳性定形内胚层细胞与浓度范围约0.01 μ M至约50 μ M的类视黄醇接触。在优选的实施方案中,所述类视黄醇是RA。

[0262] 在本发明的其他实施方案中,通过使SOX17-阳性定形内胚层细胞与成纤维细胞生长因子家族的分化因子接触来增加包含SOX17-阳性定形内胚层细胞的细胞培养物或细胞群中PDX1基因产物的表达。这类分化因子可单独使用或与RA联用。一些实施方案中,使SOX17-阳性定形内胚层细胞与浓度范围约10ng/ml至约1000ng/ml的成纤维细胞生长因子接触。一个优选实施方案中,FGF生长因子是FGF-10。

[0263] 本发明的一些实施方案中,通过使SOX17-阳性细胞与B27接触来增加包含SOX17-阳性定形内胚层细胞的细胞培养物或细胞群中PDX1基因产物的表达。这类分化因子可以单独使用或与FGF家族分化因子和类视黄醇中的一种或两种联用。一些实施方案中,使SOX17-阳性定形内胚层细胞与浓度范围约0.1%(v/v)至约20%(v/v)的B27接触。在优选的实施方案中,使SOX17-阳性定形内胚层细胞与RA、FGF-10和B27接触。

[0264] 增加包含SOX17-阳性定形内胚层细胞的细胞培养物或细胞群中PDX1基因产物表达的方法可在降低血清浓度或无血清的生长培养基中进行。一些实施方案中,血清浓度范围从约0.05%(v/v)至约20%(v/v)。一些实施方案中,SOX17-阳性定形内胚层细胞在含血清替代物的条件下生长。

[0265] 能够促进PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化的因子的鉴定

[0266] 本发明的其他方面涉及鉴定一种或多种能够促进PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化的分化因子的方法。在这类方法中,获得包含PDX1-阴性定形内胚层细胞的细胞培养物或细胞群,并测定细胞培养物或细胞群中PDX1的表达。在测定PDX1表达后,使细胞培养物或细胞群的细胞与候选分化因子接触。在一些实施方案中,在使细胞与候选分化因子接触时或与候选分化因子接触后不久检测PDX1的表达。然后在使细胞与候选分化因子接触后的一个或多个时间点检测PDX1表达。与接触候选分化因子前的PDX1的表达相比,如果在接触候选分化因子后PDX1的表达增加,候选分化因子可被鉴定为能够促进PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞的分化。

[0267] 一些实施方案中,上述鉴定能够促进PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化的分化因子的方法还包括测定细胞培养物或细胞群中HOXA13和/或HOXC6基因的表达。在这类实施方案中,在使细胞与候选分化因子接触前后分别测定HOXA13和/或

HOXC6基因的表达。与接触分化因子前PDX1和HOXA13的表达相比,如果在接触候选分化因子后,PDX1和HOXA13的表达增加,就可鉴定候选分化因子能够促进PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞的分化。相似地,与接触分化因子前比较,如果在接触候选分化因子后,PDX1和HOXC6的表达增加,就可鉴定候选分化因子能够促进PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞的分化。在优选的实施方案中,通过在使细胞培养物或细胞群的细胞与候选分化因子接触前后分别测定PDX1、HOXA13和HOXC6的表达来鉴定可以促进PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化的候选分化因子。优选实施方案中,用Q-PCR检测PDX1、HOXA13和HOXC6的表达。

[0268] 应了解在一些实施方案中,在使细胞培养物或细胞群中的细胞与候选分化因子接触时或在接触候选分化因子后不久检测PDX1、HOXA13和HOXC6中一种或多种的表达,而不是在细胞接触候选分化因子之前检测。在这类实施方案中,将在使细胞与候选分化因子接触时或在接触候选分化因子后不久PDX1、HOXA13和HOXC6中的一种或多种的表达与在细胞接触候选分化因子后的一个或多个时间点的PDX1、HOXA13和HOXC6中的一个或多个表达进行比较。

[0269] 在上述方法的一些实施方案中,在细胞与候选分化因子接触后检测PDX1表达的一个或多个时间点的范围可以从约1小时至约10天。例如,可以在细胞与候选分化因子接触后约1小时、细胞与候选分化因子接触后约2小时、细胞与候选分化因子接触后约4小时、细胞与候选分化因子接触后约6小时、细胞与候选分化因子接触后约8小时、细胞与候选分化因子接触后约10小时、细胞与候选分化因子接触后约12小时、细胞与候选分化因子接触后约16小时、细胞与候选分化因子接触后约24小时,细胞与候选分化因子接触后约2天、细胞与候选分化因子接触后约3天、细胞与候选分化因子接触后约4天、细胞与候选分化因子接触后约5天、细胞与候选分化因子接触后约6天、细胞与候选分化因子接触后约7天、细胞与候选分化因子接触后约8天、细胞与候选分化因子接触后约9天、细胞与候选分化因子接触后约10天或细胞与候选分化因子接触后超过10天检测PDX1的表达。

[0270] 用于此处描述的方法的候选分化因子可以选自化合物,例如多肽和小分子。例如,候选多肽包括但不限于生长因子、细胞因子、趋化因子、胞外基质蛋白和合成肽。在优选的实施方案中,生长因子来自FGF家族,例如FGF-10。候选小分子包括但不限于从组合化学合成的化合物和天然产物,例如类固醇、类异戊二烯、萜类化合物、类苯基丙烷(phenylpropanoid)、生物碱类和类黄酮。本领域技术人员应了解有数千种天然和合成的小分子可以利用,预期可用于此处描述的方法的小分子不限于以上举例的种类。代表性地,小分子的分子量低于10,000amu。在优选的实施方案中,小分子是类视黄醇,例如RA。

[0271] 能够促进PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化的因子的鉴定

[0272] 本发明的其他方面涉及鉴定一种或多种能够促进PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化的分化因子的方法。在这类方法中,获得包含PDX1-阳性前肠内胚层细胞的细胞培养物或细胞群,并测定细胞培养物或细胞群中标志物的表达。在测定标志物的表达后,使细胞培养物或细胞群的细胞与候选分化因子接触。在一些实施方案中,在使细胞与候选分化因子接触时或在接触候选分化因子后不久检测标志物的表达。然后在细胞与候选分化因子接触后的一个或多个时间点检测相同标志物的表达。与接触分化因子前比较,如果在接触候选分化因子后,标志物的表达增加或降低,就可鉴定候选分化因子能够促进PDX1-阳性前肠内胚层

细胞的分化。在优选的实施方案中,用Q-PCR检测标志物的表达。

[0273] 在上述方法的一些实施方案中,在使细胞与候选分化因子接触后检测标志物表达的一个或多个时间点的范围可以从约1小时至约10天。例如,可以在使细胞与候选分化因子接触后约1小时、使细胞与候选分化因子接触后约2小时,使细胞与候选分化因子接触后约4小时,使细胞与候选分化因子接触后约6小时,使细胞与候选分化因子接触后约8小时,使细胞与候选分化因子接触后约10小时,使细胞与候选分化因子接触后约12小时,使细胞与候选分化因子接触后约16小时,使细胞与候选分化因子接触后约24小时,使细胞与候选分化因子接触后约2天,使细胞与候选分化因子接触后约3天,使细胞与候选分化因子接触后约4天,使细胞与候选分化因子接触后约5天,使细胞与候选分化因子接触后约6天,使细胞与候选分化因子接触后约7天,使细胞与候选分化因子接触后约8天,使细胞与候选分化因子接触后约9天,使细胞与候选分化因子接触后约10天或使细胞与候选分化因子接触后超过10天检测标志物的表达。

[0274] 如前面所述,用于此处描述的方法的候选分化因子可以选自例如多肽或小分子的化合物。

[0275] 尽管此处公开的每种方法都关于PDX1-阳性前肠内胚层细胞,应了解在某些实施方案中,该方法可用于产生包含此处描述的PDX1-阳性前肠/中肠内胚层细胞和/或此处描述的前肠后部的PDX1-阳性内胚层细胞的组合物。此外,本说明书中公开的任何PDX1-阳性内胚层细胞类型都可用在此处描述的筛选方法中。

[0276] 以上概括描述了本发明,可通过参照此处提供的某些具体实施例进一步理解本发明,这些实施例仅是为了说明而不是限制本发明。

实施例

[0277] 以下很多实施例描述了人多能性细胞的使用。产生人多能性细胞的方法在现有技术中是公知的,在许多科学出版物中都有描述,包括第5,453,357、5,670,372、5,690,926、6,090,622、6,200,806和6,251,671号美国专利及公开号为2004/0229350的美国专利申请。

[0278] 实施例1

[0279] 人ES细胞

[0280] 我们利用人胚胎干细胞系hESCyt-25作为产生定形内胚层的起始材料。

[0281] 所述领域技术人员应了解干细胞或其他多能性细胞也可用作此处描述的分化步骤的起始材料。

[0282] 实施例2

[0283] hESCyt-25的特征

[0284] 人胚胎干细胞系hESCyt-25在培养基中培养18个月后仍保持正常的形态、核型、生长和自我更新性质。此细胞系对OCT4、SSEA-4和TRA-1-60抗原均显示很强的免疫反应性(这几个抗原都是未分化hESC的特征性抗原)、显示碱性磷酸酶活性以及与其它已建立的hESC系相似的形态。此外,人胚胎干细胞系hESCyt-25在悬浮培养时容易形成胚状体(EB)。hESCyt-25可以分化为代表三种主要胚层的不同细胞类型,这表明hESCyt-25了多能性。对ZIC1的Q-PCR检测以及对nestin和更多成熟神经标志物的免疫细胞化学(ICC)鉴定证明了外胚层的产生。在延伸细胞簇中观察到了 β -III微管蛋白的免疫细胞化学染色,这是早期神

经元的特征。之前,我们以视黄酸处理悬浮液中的EB,以诱导多能干细胞向内脏内胚层(VE)、胚外细胞系分化。经54小时处理后,经处理的细胞大量表达VE的标志物: α -胎蛋白(AFP)和SOX7。免疫细胞化学染色表明细胞在零星块中表达AFP的单细胞层中分化。下面将描述,在无AFP表达时,SOX-17的实时定量聚合酶链式反应(Q-PCR)和免疫细胞化学检测证明hESCyt-25细胞系还可以形成定形内胚层。在不同时间点检测了分化的EB中Brachyury基因的表达以证明向中胚层的分化。在实验过程中Brachyury表达逐渐提高。综上所述,hESCyt-25细胞系具有形成代表三种胚层的细胞的能力,因此是多能的。

[0285] 实施例3

[0286] SOX17抗体的制备

[0287] 在hESC培养物中鉴定定形内胚层的主要障碍就是缺乏合适的工具,因此我们制备了抗人SOX17蛋白的抗体。

[0288] 定形内胚层在原肠胚形成期产生后,所有定形内胚层都表达标志物SOX17,它的表达在肠管中继续(尽管表达水平沿A-P轴变化)直至器官发生的开始。SOX17还在胚外内胚层细胞亚型中表达。在中胚层或外胚层中未发现此蛋白的表达。现在发现当与排除胚外细胞系的标志物联用时,SOX17是定形内胚层细胞系的合适标志物。

[0289] 如此处详细描述,SOX17抗体用于特异检测目的是产生SOX17阳性定形内胚层细胞的不同处理方法和分化步骤的效果。与AFP、SPARC和血栓调节蛋白反应的其他抗体被用来排除内脏和体壁内胚层(胚外内胚层)的产生。

[0290] 为了产生抗SOX17的抗体,在抗体制备公司GENOVAC(弗赖贝格,德国)根据其开发的步骤,与SOX17蛋白羧基端氨基酸172-414(SEQ ID NO:2)对应的部分人SOX17cDNA(SEQ ID NO:1)被用于大鼠的遗传免疫。遗传免疫步骤可参见第5,830,876、5,817,637、6,165,993和6,261,281号美国专利,及公开号为WO 00/29442和WO 99/13915的国际专利申请。

[0291] 遗传免疫的其他适用方法在非专利文献中也有描述。例如,Barry等人在Biotechniques 16:616-620,1994中描述了用遗传免疫方法产生单克隆抗体。以下是用遗传免疫方法制备特异蛋白抗体的具体实例:如Costaglia等人,(1998)Genetic immunization against the human thyrotropin receptor causes thyroiditis and allows production of monoclonal antibodies recognizing the native receptor(抗人促甲状腺激素受体的遗传免疫导致甲状腺炎,并能产生识别天然受体的单克隆抗体),J.Immunol.160:1458-1465;Kilpatrick等人,(1998)Gene gun delivered DNA-based immunizations mediate rapid production of murine monoclonal antibodies to the Flt-3receptor(基因枪输送的基于DNA的免疫作用调节针对抗Flt-3受体的小鼠单克隆抗体的快速产生),Hybridoma 17:569-576;Schmolke等人(1998)Identification of hepatitis G virus particles in human serum by E2-specific monoclonal antibodies generated by DNA immunization(DNA免疫产生的E2-特异单克隆抗体鉴定人血清中庚型肝炎病毒颗粒),J.Virol.72:4541-4545;Krasemann等人(1999)Generation of monoclonal antibodies against proteins with an unconventional nucleic acid-based immunization strategy(利用非常规的基于核苷酸的免疫策略产生针对蛋白的单克隆抗体),J.Biotechnol.73:119-129;和Ulivieri等人(1996)Generation of a monoclonal antibody to a defined portion of the Helicobacter pylori

vacuolating cytotoxin by DNA immunization(通过DNA免疫产生抗Heliobacter pylorivacuolating内毒素指定部分的单克隆抗体)J.Biotechnol.51:191-194。

[0292] 如图3关系树状图所示,在Sox家族中SOX7和SOX18是与SOX17关系最近的家族成员。我们利用人SOX7多肽作为阴性对照证明遗传免疫产生的SOX17抗体对SOX17特异,而不与它关系最近的家族成员反应。具体地,使SOX7和其他蛋白在人成纤维细胞中表达,然后通过Western印迹和ICC方法分析与SOX17抗体的交叉反应性。例如,以下方法用来产生SOX17、SOX7和EGFP表达载体,将载体转染人成纤维细胞,然后进行Western印迹分析。用于产生SOX17、SOX7和EGFP的表达载体分别是pCMV6(OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD)、pCMV-SPORT6(Invitrogen, Carlsbad, CA)和pEGFP-N1(Clontech, Palo Alto, CA)。为制备蛋白,超螺旋DNA采用Lipofectamine 2000(Invitrogen, Carlsbad, CA)瞬时转染端粒酶永生化的MDX人成纤维细胞。转染36小时后在50mM TRIS-HCl(pH 8)、150mM NaCl、0.1% SDS、0.5%脱氧胆酸、含有蛋白酶抑制剂的混合物(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)中收集全部溶胞产物。Western印迹分析步骤如下:100 μ g细胞蛋白在NuPAGE(4-12%梯度聚丙烯酰胺, Invitrogen, Carlsbad, CA)上SDS-PAGE分离,电转到PDVF膜(Hercules, CA),大鼠SOX17抗血清用10mM TRIS-HCl(pH8)、150mM NaCl、10%BSA、0.05% Tween-20(Sigma, St. Louis, MO)1/1000稀释作为探针,然后用碱性磷酸酶偶联的抗大鼠IgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)孵育,最后用Vector Black碱性磷酸酶染色(Vector Laboratories, Burlingame, CA)显现。所用的蛋白分子量标准为宽范围的颜色标志物(Sigma, St. Louis, MO)。

[0293] 图4中,从瞬时转染了SOX17、SOX7或EGFP cDNA的人成纤维细胞的蛋白提取物用SOX17抗体进行Western印迹检测。只有转染了hSOX17的细胞的蛋白提取物在~51Kda产生一个条带,与预测人SOX17蛋白的分子量46Kda非常接近。SOX17抗体与来自转染了人SOX7或EGFP的细胞的提取物没有反应性。此外,SOX17抗体清楚地标记了转染hSOX17表达构件的人成纤维细胞的细胞核,但没有标记只转染了EGFP的细胞。同样,ICC检测也显示了SOX17抗体的特异性。

[0294] 实施例4

[0295] SOX17抗体作为定形内胚层标志物的证实

[0296] 部分分化的hESC用SOX17和AFP抗体同时标记,以表明SOX17抗体特异于SOX17蛋白,并进一步标记定形内胚层。已证明SOX17、SOX7(SOX基因家族亚群F的关系最近的成员)和AFP在内脏内胚层中均有表达。但是,在ICC检测水平在定形内胚层细胞中未发现AFP和SOX7的表达,因此,它们可作为bonifide定形内胚层细胞的阴性标志物。显示SOX17抗体标记作为离散的细胞簇形式存在或是与AFP阳性细胞混合的细胞群。具体地,图5A显示少数SOX17细胞被AFP共同标记;但是,在SOX17⁺细胞范围内也发现了几乎没有或者根本没有AFP⁺细胞的区域(图5B)。相似地,因为据报道体壁内胚层表达SOX17,用体壁标志物SPARC和/或血栓调节蛋白(TM)与SOX-17抗体共标记可鉴定属于体壁内胚层的SOX17⁺细胞。如图6A-C所示,血栓调节蛋白和SOX-17共标记的体壁内胚层细胞通过hES细胞的随机分化产生。

[0297] 综上细胞标记实验所述,由标志物特征SOX17^{hi}/AFP^{lo}/[TM^{lo}或SPARC^{lo}]可建立鉴定定形内胚层细胞的方法。换言之,SOX17标志物的表达高于AFP标志物的表达,这是内脏内胚层的特征,而TM或SPARC标志物是体壁内胚层的特征。因此,那些SOX17阳性,而AFP阴性和TM

或SPARC阴性的细胞是定形内胚层细胞。

[0298] 为了获得进一步证据证实标志物特征SOX17^{hi}/AFP^{lo}/TM^{lo} SPARC^{lo}可以预测定形内胚层,使SOX17和AFP基因的表达与相应数量的抗体标记的细胞进行了定量比较。如图7A所示,经视黄酸(内脏内胚层诱导剂)或活化素A(定形内胚层诱导剂)处理的hESC,在SOX17mRNA表达水平上有10倍差异。这个结果反映了SOX17抗体标记细胞数目的10倍差异(图7B)。此外,如图8A所示,hESC经活化素A处理,与未经处理的比较,可抑制AFP基因表达6.8倍。图8B-C所示培养物中AFP标记细胞的数量显著减少直观反映了这点。为进一步定量,经流式细胞检测(图9A-B)证实AFP基因表达降低约7倍是AFP抗体标记细胞数目减少大约7倍的结果。这个结果非常重要,因为它表明Q-PCR显示的基因表达量的改变反映了细胞类型的变化,这可通过抗体染色观察到。

[0299] hESC与Nodal家族成员(Nodal,活化素A和活化素B-NAA)孵育后随时间推移导致SOX17抗体标记细胞的显著增加。经过活化素连续5天的处理后超过50%细胞可以标记为SOX17(图10A-F)。而经活化素处理5天后几乎很少或没有细胞标记为AFP。

[0300] 简而言之,产生的抗人SOX17蛋白羧基端242个氨基酸的抗体在Western印迹中鉴定了人SOX17蛋白,但不识别SOX17在Sox家族中最接近的成员SOX7。SOX17抗体识别正在分化的hESC培养物中的亚群,它们主要是SOX17⁺/AFP^{lo/-}(超过95%的标记细胞)以及少部分(<5%)共标记SOX17和AFP的细胞(内脏内胚层)。用活化素处理hESC培养物导致SOX17基因表达的显著升高以及SOX17标记细胞的明显增加,并显著抑制AFP mRNA的表达,减少AFP抗体标记细胞的数目。

[0301] 实施例5

[0302] Q-PCR基因表达分析

[0303] 在以下实验中,实时定量RT-PCR(Q-PCR)是对hESC分化进行不同处理后检测效果的主要分析方法。尤其是,基因表达的实时检测是以Q-PCR在不同时间点分析多种标志物基因。对期望的以及不期望的细胞类型的特征性标志物进行评估,以便更好的理解细胞群的整体动态。Q-PCR分析的优点在于它的极端灵敏性以及新增必须标志物时的相对便捷,因为基因组序列已经可以得到。此外,Q-PCR的极高灵敏性可以检测到非常大的细胞群中相对少数目的细胞的基因表达。而且,检测极低水平基因表达的能力为细胞群的“分化偏向”提供了指征。在细胞表型明显的分化之前,向特定分化途径的偏向用免疫细胞化学技术是检测不出的。为此,Q-PCR提供了一种分析方法,这种方法对用于筛选成功的分化处理来说至少是免疫细胞化学技术的补充,而且可能更优于它。此外,Q-PCR提供了一种机制,这种机制可以利用半高通量定量分析评价分化实验设计是否成功。

[0304] 此处采用的方法为在Rotor Gene 3000装置(Corbett Research)上利用SYBR Green化学和两步RT-PCR模式进行相对定量。这种方法允许保存cDNA样品用于将来分析其他标志物的基因,避免了样品间逆转录效率的差异。

[0305] 根据去除从污染的基因组DNA扩增产物的经验,设计的引物应位于外显子-外显子边界,或者如有可能跨越至少800bp的内含子。当使用的标志物基因不含内含子或者具有假基因时,RNA样品应用DNaseI进行处理。

[0306] 我们通常用Q-PCR检测靶细胞和非靶细胞类型的多种标志物的基因表达,从而产生细胞样品中的基因表达谱。表1列出了与hESC分化早期(特别是外胚层、中胚层、定形内胚

层和胚外内胚层)相关的标志物以及已确认的可用引物对。已经证明这些引物对的人特异性,这非常重要,因为hESC通常在鼠饲养层上生长。最具代表性的是,每种条件取三个样品,然后独立进行两次分析,以评估与每次定量测定有关的生物学差异。

[0307] 为产生PCR模板,用RNeasy(Qiagen)分离总RNA并用RiboGreen(Molecular Probes)定量。350~500ng总RNA的逆转录使用iScript逆转录酶试剂盒(BioRad)进行,试剂盒含有oligo-dT和随机引物的混合物。每20 μ L反应液稀释到总体积100 μ L,然后3 μ L用于每10 μ L Q-PCR反应(含400nM正向和反向引物及5 μ L 2 $\times$ SYBR Green master mix(Qiagen))中。两步循环参数如下:85-94 $^{\circ}$ C变性5秒(具体根据每种引物对扩增子的融解温度选择);60 $^{\circ}$ C退火/延伸45秒。在每个延伸期的后15秒收集荧光数据。每个点重复三次,以10倍梯度稀释系列产生每次运行的标准曲线,然后基于该标准曲线将循环阈值(Ct's)转化为定量值。每个样品的定量值用管家基因结果校正,计算三份样品的平均和标准偏差。当PCR循环完成时,进行融解曲线分析确定反应的特异性。单一特异产物由适于PCR扩增子的 T_m 处的单一峰表示。此外,以不含逆转录酶的反应作为阴性对照,不发生扩增。

[0308] 建立Q-PCR方法的第一步是在实验系统中确证合适的管家基因(HG)。HG贯穿于样品RNA添加、RNA完整性和RT效率的校正,因此重要的是所有样品类型中HG保持稳定水平的表达,这样的话校正才有意义。我们检测了正在分化的hESC中亲环素G(Cyclophilin G)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1(HPRT)、 β -2-微球蛋白、hydroxymethylbaine synthase(HMBS)、TATA-结合蛋白(TBP)和葡糖醛酸糖苷酶 β (GUS)的表达。我们的结果表明在分化过程中 β -2-微球蛋白的表达水平增高,因此我们排除这种基因用于校正。其他基因在分化期和处理期的表达水平均保持稳定。我们通常用亲环素G和GUS计算所有样品的校正因子。同时使用多种HG降低了校正过程自身的波动,从而提高了相对基因表达数值的可靠性。

[0309] 获得用于校正的基因后,用Q-PCR确定经过不同实验处理的样品的标志物基因的相对基因表达水平。选择这些标志物基因是因为它们在代表早期胚层的细胞群中含量高,尤其关注的是那些在定形内胚层和胚外内胚层差异表达的基因集合。这些基因及它们的相对富集情况已在表1中指出。

[0310] 表1

[0311]

胚层	基因	表达范围
内胚层	SOX17	定形、内脏和体壁内胚层
	MIXL1	内胚层和中胚层
	GATA4	定形和原始内胚层
	HNF3b	定形内胚层和原始内胚层、中胚层、神经板
	GSC	内胚层和中胚层
胚外	SOX7	内脏内胚层
	AFP	内脏内胚层，肝
	SPARC	体壁内胚层

[0312]

	TM	体壁内胚层/滋养外胚层
外胚层	ZIC1	神经管，神经前体
中胚层	BRACH	新生中胚层

[0313] 因为许多基因在不止一个胚层上表达，所以有必要在相同实验中定量比较多种基因的表达水平。SOX17在定形内胚层中表达，在内脏和体壁内胚层中表达要低一些。SOX7和AFP在发育早期的内脏内胚层中表达。SPARC和TM在体壁内胚层表达，Brauchyury在早期中胚层表达。

[0314] 定形内胚层据预测表达高水平的SOX17mRNA和低水平的AFP和SOX7(内脏内胚层)、SPARC(体壁内胚层)和Brachyury(中胚层)。此外，此处用ZIC1进一步排除早期外胚层的诱导。最后，GATA4和HNF3b在定形内胚层和胚外内胚层均表达，因此与SOX17在定形内胚层的表达有联系(表1)。一个代表性的实验如图11-14所示，它证明了表1描述的标志物基因在不同样品中如何相互联系，从而突出了向定形内胚层和胚外内胚层以及向中胚层和神经细胞类型的特定分化模式。

[0315] 综合以上数据可以清楚得出活化素的剂量增加导致SOX17基因表达提高。而且这种SOX17表达主要代表定形内胚层而不是胚外内胚层。这个结论源自观察到SOX17基因表达与AFP、SOX7和SPARC的基因表达负相关。

[0316] 实施例6

[0317] 人ES细胞向定形内胚层的定向分化

[0318] 如果不是在有效维持细胞未分化状态的条件下培养，人ES细胞将发生随机分化。

这种异质分化产生包含体壁和内脏内胚层(表达AFP、SPARC和SOX7)的胚外内胚层细胞,以及以ZIC1和Nestin(外胚层)和Brachyury(中胚层)表达为标记的早期外胚层和中胚层衍生物。因为在ES细胞培养物中缺乏特异抗体标志物,定形内胚层细胞形态没有被检测或详细说明。同样地,由于缺乏手段,对ES细胞培养物中早期定形内胚层的产生没有进行深入研究。因为没有可用的合适的抗定形内胚层细胞的抗体试剂,大部分鉴定集中于外胚层和胚外内胚层。总的说来,在随机分化的ES细胞培养物中,胚外和神经外胚层细胞类型的数目远大于SOX17^{hi}定形内胚层细胞的数目。

[0319] 当未分化的hESC克隆在成纤维饲养层上扩增时,克隆边缘的细胞表现出与克隆内部细胞不同的另一种形态。这些外层细胞因为不均一、较大的形态并且OCT4的表达更高所以易被区分。已有描述,当ES细胞开始分化时,OCT4的表达水平相对未分化的ES细胞上升或下降。OCT4水平上升或下降的改变如果超过未分化阈值可能表明从多能状态向分化初始阶段的转变。

[0320] 当用SOX17免疫细胞化学检测未分化的克隆时,有时在未分化的hESC克隆的边缘和交界处的随机位置可发现小的含10-15个SOX17阳性细胞的细胞簇。如上所述,这些外围克隆边缘的分散细胞团可能是从经典ES细胞形态分化的第一批细胞,此时克隆尺寸增加、变得更加稠密。更早期、更小的完全未分化的克隆(<1mm;4-5天龄)在克隆内部或边缘不含SOX17阳性细胞,而更晚期、更大的克隆(直径1-2mm,>5天龄)在一些克隆外围或上述不显示典型hESC形态的边缘内部有零星SOX17阳性、AFP阴性细胞分布。因为这是第一次研制出有效的SOX17抗体,在早期“未分化”ES细胞培养物中产生定形内胚层细胞以前从未被证实。

[0321] 因为Q-PCR确定SOX17与SPARC基因表达负相关,大部分的SOX17阳性、AFP阴性细胞将对体壁内胚层标志物的抗体共标记呈阴性反应。这在表达TM的体壁内胚层细胞得到特异证明(图15A-B)。与Nodal因子活化素A和B接触会减少TM表达和TM阳性细胞的数目。对活化素处理的培养物用SOX17、AFP和TM抗体标记后,如图16A-D所示,观察到AFP和TM阴性的SOX17阳性细胞簇。这是首次在细胞水平上证明在分化hESC培养物中的SOX17阳性定形内胚层细胞。

[0322] 用上述SOX17抗体和Q-PCR方法我们设计了一些步骤可以有效的将hESC分化为SOX17^{hi}/AFP^{lo}/SPARC/TM^{lo}的定形内胚层细胞。我们采用不同的分化方法以提高这些细胞的数目和增殖能力,这通过在群水平用Q-PCR测定SOX17基因表达和在单个细胞水平用抗体标记SOX17来检测。

[0323] 我们首次对TGFβ家族生长因子(如Nodal/活化素/BMP)在体外培养物中从胚胎干细胞产生定形内胚层细胞的应用中的效果进行了分析和描述。在代表性实验中,活化素A、活化素B、BMP或这些因子的组合被添加至未分化人干细胞系hESCyt-25中以起始分化过程。

[0324] 如图19所示,添加100ng/ml活化素A在分化到第4天时导致相对未分化的hESC诱导了19倍的SOX17基因表达。同时添加活化素B(活化素家族第二个成员)和活化素A在混合活化素处理后第4天时导致相对未分化hESC37倍的诱导。最后,添加来自Nodal/活化素和BMP亚族的TGFβ家族的第三个成员BMP4,与活化素A和活化素B联用,导致相对未分化hESC增加57倍的诱导(图19)。当以活化素和BMP诱导SOX17与无因子培养基对照比较时,4天时出现5、10和15倍的诱导。当用活化素A、B和BMP三重处理5天后,SOX17被诱导的水平比未分化hESC高70倍。这些数据表明用高剂量和长时间的Nodal/活化素TGFβ家族成员处理会增加SOX17

表达。

[0325] 在体内或体外Nodal和相关分子活化素A、B和BMP促进SOX17表达和定形内胚层形成。此外,添加BMP会促进SOX17诱导表达,可能是因为进一步诱导了Nodal受体Cripto。

[0326] 我们已经证明BMP4与活化素A和B的联用导致SOX17的额外增加以及定形内胚层的形成。在活化素A和B混合物中添加BMP4较长时间(>4天)可以在体壁和内脏内胚层及定形内胚层诱导SOX17。因此本发明的一些实施例中,在添加BMP4处理4天内有必要去除BMP4。

[0327] 为在单个细胞水平检测TGF β 因子处理的效果,用SOX17抗体标记检测了TGF β 因子添加的时程。如之前在图10A-F中所示,随时间延长SOX17标记细胞的相对数目显著增加。相对定量(图20)显示SOX17标记细胞增加超过20倍。这个结果表明细胞数目及SOX17基因表达水平随TGF β 因子处理时间增加。如图21所示,在用Nodal,活化素A、活化素B和BMP处理4天后,SOX17诱导水平达到未分化hESC的168倍。图22显示SOX17阳性细胞的相对数目也与剂量有关。100ng/ml或更多的剂量能够有效诱导SOX17基因表达,增加细胞数目。

[0328] 除了TGF β 家族成员,Wnt家族分子可能在定形内胚层的特异分化和/或保持中起作用。Wnt分子的使用也有利于hESC向定形内胚层的分化,如图23所示,与单独使用活化素相比,用活化素加Wnt3a处理后样品中SOX17基因的表达增高。

[0329] 所有上述实验均使用包含10%血清和添加的因子的组织培养基。令人惊讶的是,我们发现在添加活化素的情况下血清浓度对SOX17的表达水平有影响。当血清水平从10%降到2%时,在含有活化素A和B的条件下,SOX17的表达增加3倍。

[0330] 最后,如图25A-D所示我们证明活化素诱导的SOX17⁺细胞在培养基中分裂。箭头显示处于有丝分裂期的SOX17/PCNA/DAPI标记的细胞,这是通过PCNA/DAPI标记的有丝分裂板模式和相差有丝分裂特征证实。

[0331] 实施例7

[0332] 趋化因子受体4(CXCR4)表达与定形内胚层的标志物有关,而与中胚层、外胚层或内脏内胚层的标志物无关

[0333] 如上所述,使用TGF β 家族、尤其是活化素/nodal亚族的细胞因子可诱导hESC分化为定形内胚层。此外,我们显示分化培养基的胎牛血清(FBS)水平影响hESC分化为定形内胚层的效率。这种影响是在培养基中活化素A为给定浓度下,高水平的FBS会抑制向定形内胚层的最大程度分化。如缺少外源的活化素A,hESC向定形内胚层系的分化效率非常低,FBS在hESCs分化过程中的影响也减小。

[0334] 在这些实验中,hESC在含有0.5%、2.0%或10%FBS的RPMI培养基(Invitrogen, Carlsbad, CA; cat#61870-036)中生长分化,其中添加或不添加100ng/ml活化素A培养6天。此外,在分化的前3天以0.5%-2.0%的FBS梯度与100ng/ml活化素A联用。6天后,每种培养条件收集双份样品,用实时定量PCR分析相对基因表达。剩余细胞进行固定用于SOX17蛋白的免疫荧光检测。

[0335] 根据使用的7种培养条件,CXCR4的表达水平变化非常大(图26)。一般来说,活化素A处理的培养物(A100)中CXCR4表达较高,而如果不含外源活化素A(NF)则CXCR4表达较低。此外,在A100处理的培养基中,当FBS浓度最低的时候CXCR4表达最高。在10%FBS条件下CXCR4水平有显著降低,因此相对表达更加符合不含活化素A(NF)的条件。

[0336] 如上所述,SOX17、GSC、MIXL1和HNF3 β 基因的表达与定形内胚层细胞的特征一致。7

种分化条件下这4种基因的相对表达与CXCR4的一致(图27A-D)。这证明CXCR4也是定形内胚层的标志物。

[0337] 根据不同标志物的表达外胚层和中胚层系可区别于定形内胚层。早期中胚层表达Brachyury和MOX1基因,而新生神经外胚层表达SOX1和ZIC1。图28A-d证明不含外源活化素A的培养物中更倾向于中胚层和外胚层基因的表达,而在活化素A处理的培养物中,10%FBS的条件也增加中胚层和外胚层标志物表达的水平。这些表达模式与CXCR4的相反,表明在该发育阶段分化自hESC的中胚层或外胚层的CXCR4表达不高。

[0338] 在哺乳动物发育早期,也发生向胚外细胞系的分化。此处尤其相关的是内脏内胚层的分化,它与定形内胚层许多基因的表达相同,如SOX17。为区分定形内胚层和胚外内脏内胚层,应该检测它们之间不同的标志物。SOX7代表了一种在内脏内胚层而不在定形内胚层系表达的标志物。因此,显示SOX17基因高表达而无SOX7表达的培养条件可能包含定形内胚层而不是内脏内胚层。如图28E所示,在不含活化素A的培养物中SOX7高表达,当FBS浓度为10%时即使含有活化素A,SOX7也显示表达增加。这与CXCR4的表达模式相反,表明CXCR4在内脏内胚层中表达不高。

[0339] 还测定了存在于上述每种分化条件下的有SOX17免疫反应性(SOX17⁺)的细胞的相对数目。当hESC在高剂量活化素A和FBS低浓度(0.5%-0.2%)条件下分化时,SOX17⁺细胞分布于整个培养物中。当使用高剂量活化素A和10%FBS(v/v)时,SOX17⁺细胞出现频率降低,一般出现在孤立的细胞簇中而不是在整个培养物中平均分布(图29A和C以及B和E)。当无外源活化素A时SOX17⁺细胞数目进一步减少。在这些条件下SOX17⁺细胞也在细胞簇中出现,这些细胞簇比用高剂量活化素A和低浓度FBS处理得到的细胞簇更小更少。这些结果证明在每种条件下CXCR4表达模式不仅对应定形内胚层基因表达,而且对应定形内胚层细胞的数目。

[0340] 实施例8

[0341] 富集定形内胚层的分化条件增加CXCR4阳性细胞的比例

[0342] 活化素A的剂量也影响hESC向定形内胚层分化的效率。这个实施例证明增加活化素A的剂量会提高培养物中CXCR4⁺细胞的比例。

[0343] hESC在补加了0.5%-2%FBS(在分化前3天从0.5%增加到1.0%到2.0%)和0、10或100ng/ml活化素A的RPMI培养基中分化。分化7天后用含有2%FBS和2mM(EDTA)、不含Ca²⁺/Mg²⁺的PBS室温解离细胞5分钟。细胞用35μm尼龙筛过滤,计数并沉淀。沉淀用小体积50%人血清/50%正常驴血清重新悬浮,冰浴2分钟以封闭非特异性抗体结合位点。50μl细胞悬液(含有约10⁵细胞)中添加1μl小鼠抗CXCR4抗体(Abcam, cat#ab10403-100),在冰上进行标记45分钟。用5ml含有2%人血清的PBS(缓冲液)洗涤细胞,然后沉淀。用5ml缓冲液进行第二次洗涤后以每10⁵细胞在50μl缓冲液中重新悬浮。以终浓度5μg/ml添加二抗(FITC偶联的驴抗小鼠;Jackson ImmunoResearch, cat#715-096-151),孵育30分钟,然后用上述缓冲液洗涤2次。细胞以5×10⁶细胞/ml浓度在缓冲液中重新悬浮,在流式细胞仪中心(The Scripps Research Institute)用FACS Vantage(Beckton Dickenson)进行分析和分选。细胞直接用RLT裂解缓冲液(Qiagen)收集,然后分离总RNA,用实时定量PCR分析基因表达。

[0344] 当分化培养基中活化素A的剂量增加时,流式细胞仪观测到CXCR4⁺细胞数目显著增加(图30A-C)。CXCR4⁺细胞是那些落入R4门(gate)的细胞,这个门仅使用二抗作为对照来设置,对于该对照来说,0.2%的事件位于R4门。当活化素A剂量提高时,CXCR4⁺细胞数目的

显著增加对应定形内胚层基因表达的增强(图31A-D)。

[0345] 实施例9

[0346] 分离富集定形内胚层基因表达的CXCR4阳性细胞并去除表达中胚层、外胚层和内脏内胚层标志物的细胞

[0347] 收集实施例8中鉴定的CXCR4⁺和CXCR4⁻细胞,分析相对基因表达,同时确定亲代细胞群的基因表达。

[0348] 随活化素A剂量的增加CXCR4基因表达的相对水平显著增加(图32)。这与依赖活化素A的剂量的CXCR4⁺细胞的增加非常相符(图30A-C)。而且从细胞群分离CXCR4⁺细胞相当于分离了细胞群中几乎所有CXCR4基因表达。这证明了FACS方法收集细胞的效率。

[0349] 基因表达分析显示CXCR4⁺细胞不仅包含大部分CXCR4基因表达,而且包含了其他定形内胚层标志物的基因表达。如图31A-D所示,相对亲代A100细胞群CXCR4⁺细胞进一步富集了SOX17、GSC、HNF3B和MIXL1的表达。此外,CXCR4⁻部分几乎不含这些定形内胚层标志物的基因表达。而且CXCR4⁺和CXCR4⁻细胞群对中胚层、外胚层和胚外内胚层显示了相反的基因表达模式。图33A-D显示相对A100亲代细胞群,CXCR4⁺细胞消除了Brachyury、MOX1、ZIC1和SOX7的基因表达。与低剂量或无活化素A的条件相比,A100亲代细胞群中这些标志物的表达已经较低。这些结果显示在高剂量活化素A分化条件下从hESCs分离CXCR4⁺细胞得到了高度富集、相当纯的定形内胚层细胞群。

[0350] 实施例10

[0351] 用CXCR4定量细胞群中定形内胚层细胞

[0352] 为了证实如此处前面所述和2003年21月23日提交的第60/532,004号美国临时专利申请(标题为“定形内胚层”)确定细胞培养物或细胞群中定形内胚层细胞比例的方法,FACS被用来分析表达CXCR4和其他定形内胚层标志物的细胞,。

[0353] 使用上述实施例中的方法,hESC被分化以产生定形内胚层。具体地,为增加正在分化的细胞培养物的产量和纯度,控制培养基中血清浓度如下:第一天0.2%FBS,第二天1.0%FBS,第3-6天2.0%FBS。FACS利用三种细胞表面表位E-钙粘蛋白(ECAD)、CXCR4和血栓调节蛋白对分化的培养物进行分类。然后用Q-PCR分析分类的细胞群以检测定形和胚外内胚层及其他细胞类型标志物的相对表达水平。从最佳分化培养物中获得的CXCR4分选的细胞,可使分离的定形内胚层细胞纯度大于98%。

[0354] 表2显示了用此处所述方法分化自hESC的定形内胚层培养物的标志物分析的结果

[0355] 表2定形内胚层培养物的组成

[0356]

标志物	培养物的百分比	定形内胚层百分比	胚外内胚层百分比	hES 细胞百分比
SOX17	70-80	100		
血栓调节蛋白	<2	0	75	
AFP	<1	0	25	
CXCR4	70-80	100	0	
ECAD	10	0		100
其他(ECAD 阴性)	10-20			
合计	100	100	100	100

[0357] 具体地,表2表明CXCR4和SOX17阳性细胞(内胚层)占细胞培养物的70%至80%。在这些表达SOX17的细胞中,少于2%表达TM(体壁内胚层),少于1%表达AFP(内脏内胚层)。从SOX17/CXCR4阳性细胞部分去除TM阳性和AFP阳性细胞(腔壁和内脏内胚层混合物;总计3%)后,可看出大约67%-77%的细胞培养物是定形内胚层。大约10%细胞是ECAD阳性,这是hESC的标志物,大约10-20%的细胞是其他细胞类型。

[0358] 我们发现与上述低血清步骤相比,通过在整个5-6天的分化步骤中保持FBS浓度 $\leq 0.5\%$ 可以提高在FACS分离前获得的分化细胞培养物中定形内胚层的纯度。但是,在整个5-6天的分化步骤中保持FBS浓度 $\leq 0.5\%$ 也导致产生的定形内胚层细胞数目减少。

[0359] 用此处描述的方法产生的定形内胚层细胞在含有活化素的条件下保持和扩增,超过50天也没有观察到明显地分化。在这些例子中,在培养期间SOX17、CXCR4、MIXL1、GATA4和HNF3 β 维持表达。此外,这些培养物中未检测到TM、SPARC、OCT4、AFP,SOX7、ZIC1和BRACH。可能这类细胞可以在培养基中维持和扩增超过50天而观察不到明显分化。

[0360] 实施例11

[0361] 定形内胚层细胞的其他标志物

[0362] 在以下实验中,从纯化的定形内胚层和人胚胎干细胞群中分离RNA。然后在每种纯化的细胞群中用RNA的基因芯片分析检测基因表达。再用Q-PCR进一步分析在定形内胚层而不在胚胎干细胞表达的可能基因,以作为定形内胚层的标志物。

[0363] 人胚胎干细胞(hESC)被维持在添加20%KnockOut血清替代物、4ng/ml重组人基本成纤维细胞生长因子(bFGF)、0.1mM β -巯基乙醇、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸和青霉素/链霉素的DMEM/F12培养基中。通过在添加100ng/ml重组人活化素A、FBS和青霉素/链霉素的RPMI培养基中培养5天后hESC分化为定形内胚层。FBS浓度每天按照以下变化:0.1%(第一天),0.2%(第二天),2%(3-5天)。

[0364] 用FACS分离细胞获得纯化的hESC和定形内胚层细胞群,以用于基因表达分析。用SSEA4抗原(R&D Systems,cat#FAB1435P)免疫纯化hESC,用CXCR4(R&D Systems,cat#FAB170P)纯化定形内胚层。细胞用胰蛋白酶/EDTA(Invitrogen,cat#25300-054)解离,用含2%人血清的磷酸缓冲盐水(PBS)洗涤,然后在100%人血清中冰浴重悬10分钟以封闭非特异性结合。向含 5×10^6 细胞的800 μ l人血清中添加200 μ l藻红蛋白偶联抗体在冰上染色30分钟。细胞用8ml PBS洗涤两次,在1ml PBS中重悬。FACS分离是在The Scripps Research Institute的核心实验室用FACS Vantage(BD Bioscience)进行的。细胞直接用RLT裂解缓冲液(Qiagen)收集,然后按照使用说明书(Qiagen)用RNeasy分离RNA。

[0365] 提交双份纯化的RNA给Expression Analysis(Durham,NC),以便采用Affymetrix平台和U133Plus 2.0高密度多核苷酸阵列产生表达谱。获得的数据是一组比较,其鉴定在hESC和定形内胚层细胞群中差异表达的基因。选择在表达水平上与hESC中相比有明显上调变化的基因作为定形内胚层最具特征性的新的候选标志物。选择的基因用上述Q-PCR检测以证实基因芯片发现的基因表达变化,并研究hESC分化过程中这些基因的表达模式。

[0366] 图34A-M显示一些标志物的基因表达结果。显示了添加100ng/ml活化素A 1、3和5天后分析的细胞培养物,5天分化步骤(CXDE)结束后纯化的表达CXCR4的定形内胚层细胞和纯化的hESC中的结果。图34C和GM的比较证明六个标志物基因,FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1和CRIP1显示了几乎相同的表达模式,并且也与CXCR4的表达模式和SOX17/SOX7的比例也相似。如前所述,在定形内胚层和表达SOX7的胚外内胚层中SOX17均有表达。因为在定形内胚层SOX7不表达,根据SOX17/SOX7的比例可以可靠估计定形内胚层对整个细胞群中观察到的SOX17的表达的贡献。图G-L和图M与图C的相似性表明FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1和CRIP1可能是定形内胚层的标志物,它们在胚外内胚层细胞中表达不高。

[0367] 应该了解的是此处描述的Q-PCR结果可进一步被ICC证实。

[0368] 实施例12

[0369] 视黄酸和FGF-10特异地在定形内胚层培养物中诱导PDX1

[0370] 以下实验证明RA和FGF-10在定形内胚层细胞中诱导PDX1的表达。

[0371] 人胚胎干细胞在含有或不含活化素的条件下培养4天。在第4天,向培养基中添加1 μ M RA和50ng/ml FGF-10。在添加RA/FGF-1048小时后,用Q-PCR定量PDX1标志物基因和对前肠内胚层非特异的其他标志物基因的表达。

[0372] 用RA处理定形内胚层细胞导致PDX1基因表达的显著增加(参见图35),但不增加内脏内胚层(SOX7、AFP)、神经的(SOX1、ZIC1)或神经元的(NFM)基因表达标志物的表达(图36A-F)。与定形内胚层中观察到的相比,在暴露于1 μ M RA和50ng/ml FGF-1048小时后,PDX1基因表达水平约诱导至增加约500倍。此外,这些结果显示与那些在RA处理前未使用活化素的细胞培养物相比,活化素处理的细胞培养物中PDX1表达提高160倍,表明较高的PDX1诱导只存在于已分化为定形内胚层(SOX17)的细胞培养物中。

[0373] 实施例13

[0374] 与单用RA相比FGF-10促进PDX1更高表达

[0375] 这个实施例显示与单独使用RA相比,RA和FGF-10联用诱导更高的PDX1表达。

[0376] 如同在前面实施例中,使hESC在含或不含活化素的条件下培养4天。在第4天,细胞用下述物质之一处理:单独的1 μ M RA;1 μ M RA与FGF-4或FGF-10联用;或1 μ M RA与FGF-4和

FGF-10联用。RA或RA/FGF处理96小时后,以Q-PCR定量PDX1、SOX7和NFM的表达。

[0377] 先用活化素然后用视黄酸处理hESC培养物可诱导PDX1基因表达增加60倍。RA处理时添加FGF-4可轻微增加PDX1表达(约是单独使用RA的3倍)。但是,同时添加FGF-10和视黄酸,对PDX1的诱导比单独使用RA增强60倍(见图37A)。这种非常强的PDX1诱导比未用活化素或RA/FGF处理高约1400倍。有趣的是,同时添加FGF-4和FGF-10抵消了FGF-10的有益效果,只产生了归结于FGF-4的添加的有限的PDX1增强。

[0378] 与未经RA/FGF处理的细胞相比,联用RA/FGF-4或RA/FGF-10不增加与前肠内胚层无关的标志物基因表达(图37B-C)。

[0379] 实施例14

[0380] 在体外视黄酸剂量影响前后(Anterior-Posterior,A-P)位置

[0381] 进行以下实验以确定视黄酸剂量是否影响体外细胞培养物中A-P位置。

[0382] 人胚胎干细胞在含或不含活化素的条件下培养4天。在第4天,培养基中添加50ng/ml FGF-10和0.04 μ M、0.2 μ M或1.0 μ M RA。通过Q-PCR定量PDX1标志物基因及其他前肠内胚层非特异标志物的表达。

[0383] 添加不同剂量的视黄酸与50ng/ml FGF-10联用,诱导与特异的前后位置模式相关的差别基因表达模式。最高剂量的RA(1 μ M)优先的诱导前部内胚层标志物(HOXA3)的表达,并产生PDX1的最强增加(图38A-B)。中等剂量RA(0.2 μ M)诱导中肠内胚层标志物(CDX1、HOXC6)(见图38C和41E)的表达,而最低剂量RA(0.04 μ M)优先的诱导后肠内胚层标志物(HOXA13)(见图38D)的表达。RA剂量对神经(SOX1)或神经元(NFM)标志物的相对表达没有实质影响(见图38F-G)。这个实施例突出了在体外使用RA作为形态发生素的用途,尤其作为衍生自hESC的内胚层衍生物的形态发生素。

[0384] 实施例15

[0385] 添加B27增强PDX1的表达

[0386] 通过使用一些因子和细胞生长/分化条件可影响定形内胚层中PDX1表达。在以下实验中,我们显示添加B27会增强定形内胚层细胞中PDX1表达。

[0387] 用高剂量的活化素A(100-200ng/ml,溶于0.5-2%FBS/DMEM/F12中)处理在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上培养的未分化hES细胞4天,以诱导人胚胎干细胞分化为定形内胚层。无活化素A对照在没有活化素A的0.5-2%FBS/DMEM/F12中培养。第4天,细胞培养物用以下培养基处理:2%FBS中无活化素A(无),2%血清替代物中无活化素A(SR),或含有50ng/ml活化素A以及2 μ M RA和50ng/ml FGF-10的2%FBS/DMEM/F12(无,+FBS,+B27)和相似的在2%血清替代物中(SR)。B27(Gibco/BRL)经1/50稀释后直接添加至2%FBS/DMEM/F12(+B27)。每点取双份细胞样品,如上分离总RNA和进行Q-PCR分析。

[0388] 图39A-E显示与无血清培养的细胞相比,无血清添加物B27可进一步诱导PDX1基因表达,但不诱导前肠非特异标志物表达的增加。

[0389] 实施例16

[0390] 使用活化素B增强PDX1诱导

[0391] 本实施例显示在体外细胞培养中活化素B增强PDX1阴性细胞向PDX1-阳性细胞的分化。

[0392] 在低血清/RPMI中用高剂量活化素A(50ng/ml)处理在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层

上培养的未分化hES细胞6天,以诱导人胚胎干细胞分化为定形内胚层。FBS剂量第一天为0%,第二天0.2%,3-6天2%。用于定形内胚层的阴性对照(NF)在不添加活化素A的2%FBS/RPMI中培养。为诱导PDX1表达,在第6天每种培养物接受含2 μ M视黄酸的2%FBS/RPMI。1-5天用活化素A处理的培养物中添加不同剂量组合的活化素A和活化素B或仍保持单独使用50ng/ml活化素A。无活化素A的对照培养物(NF)中不加活化素A和活化素B。这种RA/活化素处理进行3天,然后用Q-PCR检测双份细胞样品的PDX1基因表达。

[0393] 图40A显示在25ng/ml(A25)或50ng/ml(A50)活化素A存在的条件下,添加剂量范围10-50ng/ml(a10、a25和a50)的活化素B比单独使用50ng/ml活化素A的培养物提高PDX1表达至少2倍。作为添加活化素B结果的PDX1增加不伴随HNF6的增加(图40B),它是在发育的这个时间段肝及胰的标志物。这个结果表明相对于肝,分化为胰的细胞比例增加。

[0394] 实施例17

[0395] 使用血清剂量增强PDX1诱导

[0396] 在整个分化过程中,细胞培养物的血清量影响定形内胚层细胞的PDX1表达。以下实验显示在hESC向PDX1-阴性定形内胚层的分化过程中培养物中的血清水平影响这些细胞向PDX1-阳性内胚层进一步分化过程中的PDX1表达。

[0397] 在低血清/RPMI中用高剂量活化素A(100ng/ml)处理在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上培养的未分化hESC 5天,以诱导人胚胎干细胞分化为定形内胚层。FBS剂量第一天为0.1%、第二天0.5%、第3-5天0.5%、2%或10%。无活化素A对照(NF)接受不含活化素A的同样FBS/RPMI剂量。在第6天通过添加RA诱导PDX1表达。在6-7天,培养物在含2 μ M视黄酸的0.5%FBS/RPMI中培养,第8天1 μ M,9-11天0.2 μ M。在视黄酸处理期间活化素A降低到50ng/ml,无活化素A对照(NF)仍不加活化素A。

[0398] 图41A显示在定形内胚层诱导的3天期间(第3、4和5天),FBS剂量具有持续改变视黄酸处理期间诱导PDX1基因表达的能力。这不伴随ZIC1(图41B)或SOX7(图41C)基因表达模式的明显改变。

[0399] 实施例18

[0400] 使用条件培养基增强PDX1诱导

[0401] 我们还研究了影响定形内胚层细胞PDX1表达的其他因子和生长条件。以下实验显示条件培养基对PDX1-阴性定形内胚层细胞向PDX1-阳性内胚层细胞分化的影响。

[0402] 在低血清/RPMI中用高剂量活化素A(100ng/ml)处理在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上培养的未分化hESC 5天,以诱导人胚胎干细胞分化为定形内胚层。FBS剂量第一天为0.1%,第二天0.5%,第3-5天2%。

[0403] 在活化素A处理5天后产生的定形内胚层培养物中添加RA(溶于含有25ng/ml活化素A的2%FBS/RPMI)4天以诱导向PDX1表达内胚层的分化。前两天添加2 μ M RA,第3天1 μ M,第4天0.5 μ M。用于PDX1诱导的基本培养基是新鲜培养基(2A25R)或被四种不同细胞群之一条件化24小时后的培养基。条件化的培养基(CM)由小鼠胚胎成纤维细胞(MEF-CM)或用以下三种条件之一分化5天的hESC产生:i)3%FBS/RPMI(CM2),ii)活化素A(CM3)或iii)成骨蛋白4(BMP4)(CM4)。在上述相同的FBS剂量方案(0.2%、0.5%、2%)下添加活化素A或BMP4的浓度为100ng/ml。这三种不同的分化范例产生三种非常不同的人细胞群,通过它们可进行PDX1诱导培养基的条件化。不加生长因子的3%FBS(NF)产生主要由胚外内胚层、外胚层和中胚

层细胞组成的异质细胞群。活化素A处理的培养物(A100)产生高比例的定形内胚层为,BMP4处理的培养物(B100)主要产生滋养外胚层和一些胚外内胚层。

[0404] 图42A显示在RA处理的前两天新鲜和条件培养基中PDX1诱导相同。但是,到第3天在新鲜培养基和MEF条件培养基处理中PDX1表达开始降低。分化的hESC产生的条件培养基可维持或进一步提高PDX1基因表达,与新鲜培养基相比可提高3-4倍。hESC-条件培养基维持PDX1高表达的效果在RA处理第4天进一步加强,比新鲜培养基高约6-7倍。图42B显示条件培养基处理导致大大降低的CDX1基因表达,这个基因不在表达PDX1的内胚层部分表达。这表明用来自分化的hESC培养物的条件培养基处理定形内胚层,可显著提高PDX1表达内胚层总的纯度。

[0405] 图43显示PDX1基因表达对用于定形内胚层细胞的培养基的量呈正剂量反应。添加每个培养皿的培养基总体积为5ml,将指定体积(如图43所示)的条件培养基稀释到新鲜培养基中(A25R)。应当注意在4ml新鲜培养基中仅添加1ml条件培养基就可诱导和保持比单用5ml新鲜培养基更高的PDX1表达水平。这表明条件培养基诱导PDX1表达内胚层的有益效果依赖于某种或某些细胞的物质在条件培养基中的释放,这种或这些物质剂量依赖地增强PDX1表达内胚层的产生。

[0406] 实施例19

[0407] 结合PDX1抗体的证实

[0408] 与PDX1结合的抗体有利于监控细胞群中PDX1表达的诱导。这个实施例显示PDX1的兔多克隆IgY抗体可用于检测该蛋白的存在。

[0409] 在第一个实验中,Western印迹分析证实IgY抗-PDX1(IgY α -PDX1)抗体与细胞裂解物中的PDX1结合。在本分析中,比较了IgY α -PDX1抗体与50 μ g来自MDX12人成纤维细胞或转染PDX1表达载体24小时后的MDX12细胞的总裂解物的结合。细胞裂解物用SDS-PAGE分离,电转到膜上,以IgY α -PDX1一抗抗血清及随后的碱性磷酸酶偶联的兔抗-IgY(Rb α -IgY)二抗检测。不同稀释度的一抗和二抗按下述组合用于不同的条状膜:A(一抗500 $\times$ 稀释,二抗10,000 $\times$ 稀释),B(2,000 $\times$,10,000 $\times$),C(500 $\times$,40,000 $\times$),D(2,000 $\times$,40,000 $\times$),E(8,000 $\times$,40,000 $\times$)。

[0410] 在所有抗体组合中,转染PDX1表达载体的细胞均检出结合。在未转染(PDX1-阴性)的成纤维细胞中只在同时使用最高浓度的一抗、二抗(组合A)时才检测到结合。这是非特异性结合,因为在转染和未转染的成纤维细胞中均检测到一个分子量略大于PDX1的额外条带。

[0411] 在第二个实验中,用免疫细胞化学检测兔抗-PDX1(Rb α -PDX1)多克隆抗体与PDX1的结合。为给本实验产生一种PDX1表达细胞,MS1-V细胞(ATCC#CRL-2460)被瞬时转染PDX1-EGFP表达载体(用pEGFP-N1构建,Clontech)。转染的细胞然后用Rb α -PDX1和 α -EGFP抗血清标记。用EGFP荧光以及使用Cy5偶联的二抗的 α -EGFP免疫细胞化学可观察到转染的细胞。使用 α -Rb Cy3-偶联的二抗可看到PDX1免疫荧光。

[0412] Rb α -PDX1和 α -EGFP抗体的结合对GFP表达共定位。

[0413] 实施例20

[0414] 人胰组织的免疫细胞化学

[0415] 这个实施例显示PDX1特异抗体可用于免疫细胞化学鉴定人PDX1-阳性细胞。

[0416] 在第一个实验中,对石蜡包埋的人胰切片进行染色以检测胰岛素,通过先用1/200稀释的豚鼠抗胰岛素(Gp α -Ins)一抗,然后用1/100稀释的Cy2偶联的狗抗豚鼠(D α -Gp)二抗进行。在第二个实验中,对相同的石蜡包埋的人胰切片染色以检测PDX1,通过先用1/4000稀释的IgY α -PDX1一抗,然后用1/300稀释的AF555偶联的Rb α -IgY二抗进行。将从第一个和第二个实验中收集的图片进行整合。在第三个实验中,经IgY α -PDX1染色的细胞也用DAPI染色。

[0417] 对人胰切片的分析显示胰岛染色较深。尽管胰岛(胰岛素阳性)显示最强的PDX1信号,腺泡组织(胰岛素阴性)也显示微弱染色。DAPI和PDX1共染色显示PDX1主要但不是完全定位于核。

[0418] 实施例21

[0419] 经视黄酸处理的细胞的PDX1免疫沉淀

[0420] 为进一步证实已在RA存在下分化的定形内胚层细胞中存在PDX1表达,以及未在RA条件下分化的定形内胚层细胞无PDX1表达,用兔抗-PDX1(Rb α -PDX1)的抗体免疫沉淀来自RA分化的和未分化的定形内胚层细胞的PDX1。使用IgY α -PDX1抗体通过Western印迹检测免疫沉淀的RA。

[0421] 为获得用于免疫沉淀的未分化和分化的定形内胚层细胞,hESC用含100ng/ml活化素A的低血清处理5天,然后以50ng/ml活化素A和2 μ M全反式RA处理2天,1 μ M 1天,0.2 μ M 1天(PDX1-阳性前肠内胚层)。制备转染了PDX1表达载体的MS1-V细胞(ATCC#CRL-2460)的细胞裂解物作为阳性对照。向每一裂解物中添加Rb α -PDX1和兔特异性二抗以免疫沉淀PDX1。离心收集沉淀。免疫沉淀物溶于含SDS的缓冲液中,经聚丙烯酰胺凝胶分离,将蛋白电转到膜上,用IgY α -PDX1一抗和随后的偶联的Rb α -IgY二抗检测。

[0422] 收集来自MS1-V阳性对照细胞及第8天(d8泳道,开始RA处理后3天)和第9天(d9泳道,开始RA处理后4天)的细胞的免疫沉淀物PDX1蛋白均显示阳性(图44)。来自未分化的定形内胚层细胞(活化素A处理第5天的细胞-图44中标为(A))和未分化的hESC(未经处理的第5天的细胞-图44中标为(NF))的沉淀物对PDX1显示阴性。

[0423] 实施例22

[0424] PDX1启动子-EGFP转基因hESC系的产生

[0425] 为使用PDX1标志物分离细胞,我们用可表达的报告基因遗传标记PDX1-阳性前肠内胚层细胞。本实施例描述构建包含报告盒的载体,该报告盒包括受PDX1调节区控制的报告基因。本实施例还描述了制备转染了这种载体的细胞(例如人胚胎干细胞)以及该报告盒整合到基因组的细胞。

[0426] 通过使GFP报告基因置于PDX1基因调节区(启动子)的控制下,构建了用报告基因遗传标记的表达PDX1的定形内胚层细胞系。首先,用人PDX1调控区(Genebank登记号AF192496)替换pEGFP-N1(Clontech)载体的CMV启动子,构建一个EGFP表达由人PDX1基因启动子起始的载体,其中人PDX1调控区包含从PDX1转录起始位点上游约4.4kb(千碱基对)到下游85碱基对(bp)的核苷酸序列。这个区域包括PDX1基因的特征性调控元件,足以在转基因小鼠中显示正常的PDX1表达模式。在构建的载体中,PDX1启动子起始EGFP表达。在一些实验中,这个载体被转染进hESC。

[0427] 从以上载体切除PDX1启动子/EGFP盒,亚克隆入一个选择载体,该载体包括受磷酸

甘油酸激酶-1启动子控制的新霉素磷酸转移酶基因。选择盒两侧是flp重组酶识别位点,以去除该盒。使这个选择载体线性化,染后用标准脂质体方法导入hESC。G418筛选10-14天后,分离扩增未分化的转基因hESC克隆。

[0428] 实施例23

[0429] PDX1-阳性前肠内胚层的分离

[0430] 以下实施例证明包含PDX1启动子/EGFP盒的hESC能够分化为PDX1-阳性内胚层细胞,然后用荧光激活细胞分类术(FACS)分离。

[0431] PDX1启动子/EGFP转基因hESC在含活化素A的培养基中分化5天,然后在含活化素A和RA的培养基中分化2天。分化的细胞用胰酶消化收集,在Becton Dickinson FACS Diva分选后直接加到RNA裂解缓冲液或PBS中。取出单一活细胞样品,而不以EGFP(Live)圈选(gating),以及单一活细胞圈选进EGFP阳性(GFP)和GFP阴性(Neg)群。在一个实验中,根据荧光强度(Hi和Lo)将EGFP阳性部分分到两个相同大小的群中。

[0432] 分选后,用Q-PCR和免疫细胞化学分析细胞群。用Qiagen RNeasy柱制备RNA然后转为cDNA用于Q-PCR分析。Q-PCR按前述方法进行。为进行免疫细胞化学分析,细胞分选后加到PBS中,在4%多聚甲醛中固定10分钟,用细胞离心涂片器离心使细胞黏附于载玻片。细胞角蛋白19(KRT19)的一抗来自Chemicon;肝细胞核因子3 β (HNF3 β)的一抗来自Santa Cruz;葡萄糖载体2(GLUT2)来自R&D系统。使用合适的偶联FITC(绿色)或罗丹明(红色)的二抗检测一抗的结合。

[0433] 分化细胞的代表性FACS分选如图45所示。这个实施例中分离的PDX1-阳性细胞比例约为7%,根据分化效率在1-20%之间变化。

[0434] 分选的细胞进一步用于Q-PCR分析。分化的细胞显示EGFP荧光与内源PDX1基因表达有关。与无荧光细胞相比,EGFP阳性细胞的PDX1表达水平增加约20倍以上(图46)。高和低EGFP强度细胞的分离表明EGFP表达水平与PDX1表达水平相关(图47)。除了PDX1标志物分析,在分选的细胞中利用Q-PCR分析几种在胰内胚层表达的基因。这些标志物基因(NKX2.2、GLUT2、KRT19、HNF4 α 和HNF3 β)的产物在EGFP阳性部分得到富集(图48A-E)。相反地,神经标志物ZIC1和GFAP在分选的EGFP表达细胞中不富集(图49A和B)。

[0435] 使用免疫细胞化学可看出,实际上所有分离的PDX1-阳性细胞都表达KRT19和GLUT2。这个结果预示胰内胚层系细胞。经抗体染色许多这种细胞也是HNF3 β 阳性的。

[0436] 此处描述的方法、组合物和装置是目前优选实施例的代表,起示范作用,不是为了限制本发明的范围。在包括在本发明精神的范围内,本领域技术人员可以对其作出改动或作为其他用途,这些改动和其他用途也在本发明的公开范围内。相应地,对本领域技术人员显而易见的是,在不脱离本发明的范围和精神下,可对此处公开的发明作出不同替换和修改。

[0437] 用在所附权利要求书和整个公开内容中的短语“主要由...组成”的含义是包括短语后的任意要素和限于其他对公开所列要素特异的活性或功能不起干扰或促成作用的要素。因此,短语“主要由...组成”表明所列要素是必需或强制的,但其他要素是可选的,它们的存在与否依赖于其是否影响所列要素的活性或功能。

[0438] 参考文献

[0439] 本专利申请引用了大量文献和专利。

[0440] 文中给出了一些文献的完整引用,其他文献引用时只列出了作者和年代,其完整引用如下:

[0441] Alexander,J.,Rothenberg,M.,Henry,G.L.,and Stainier,D.Y.(1999).Casanova plays an early and essential role in endoderm formation in zebrafish(Casanova在斑马鱼内胚层形成中起着早期和重要的作用).Dev Biol 215,343-357.

[0442] Alexander,J.,and Stainier,D.Y.(1999).A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish(斑马鱼中导致内胚层形成的分子途径).Curr Biol 9,1147-1157.

[0443] Aoki,T.O.,Mathieu,J.,Saint-Etienne,L.,Rebagliati,M.R.,Peyrieras,N.,and Rosa,F.M.(2002).Regulation of nodal signalling and mesendoderm formation by TARAM-A,a TGFbeta-related type I receptor(用TGFβ-相关类型I受体TARAM-A调节nodal信号和中内胚层形成).Dev Biol 241,273-288.

[0444] Beck,S.,Le Good,J.A.,Guzman,M.,Ben Haim,N.,Roy,K.,Beermann,F.,and Constam,D.B.(2002).Extra-embryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation(胚外蛋白酶在原肠胚形成期调节Nodal信号).Nat Cell Biol 4,981-985.

[0445] Beddington,R.S.,Rashbass,P.,and Wilson,V.(1992).Brachyury-a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis(Brachyury-一种影响小鼠原肠胚形成和器官发生的基因).Dev Suppl,157-165.

[0446] Bongso,A.,Fong,C.Y.,Ng,S.C,and Ratnam,S.(1994).Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts(从人胚泡分离和培养内细胞团细胞).Hum Reprod 9,2110-2117.

[0447] Chang,H.,Brown,C.W.,and Matzuk,M.M.(2002).Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily(哺乳动物转化生长因子-β超家族的遗传分析).Endocr Rev23,787-823.

[0448] Conlon,F.L.,Lyons,K.M.,Takaesu,N.,Barth,K.S.,Kispert,A.,Herrmann,B.,and Robertson,E.J.(1994).A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse(小鼠原条形成和保持中主要需要nodal).Development 120,1919-1928.

[0449] Dougan,S.T.,Warga,R.M.,Kane,D.A.,Schier,A.F.,and Talbot,W.S.(2003).The role of the zebrafish nodal-related genes squint and cyclops in patterning of mesendoderm(斑马鱼nodal-相关基因squint和cyclops在中内胚层形成中的作用).Development 130,1837-1851.

[0450] Feldman,B.,Gates,M.A.,Egan,E.S.,Dougan,S.T.,Rennebeck,G.,Sirotkin,H.L,Schier,A.F.,and Talbot,W.S.(1998).Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals(斑马鱼组织发育和胚层形成需要nodal-相关的信号).Nature 395,181-185.

[0451] Feng,Y.,Broder,C.C,Kennedy,P.E.,and Berger,E.A.(1996).HIV-I entry cofactor:functional cDNA cloning of a seven-transmembrane,G protein-coupled

receptor(HIV-1进入辅助因子:七次跨膜结构,G蛋白偶联受体的功能性cDNA克隆).*Science* 272,872-877.

[0452] Futaki,S.,Hayashi,Y.,Yamashita,M.,Yagi,K.,Bono,H.,Hayashizaki,Y.,Okazaki,Y.,and Sekiguchi,K.(2003).Molecular basis of constitutive production of basement membrane components:Gene expression profiles of engelbreth-holm-swarm tumor and F9embryonal carcinoma cells(基底膜成分持续形成的分子基础:engelbreth-holm-swarm肿瘤和F9胚胎癌细胞的基因表达模式).*J Biol Chem*.

[0453] Grapin-Botton,A.,and Melton,D.A.(2000).Endoderm development:from patterning to organogenesis(内胚层发育:从模式形成到组织发生).*Trends Genet* 16, 124-130.

[0454] Harris,T.M.,and Childs,G.(2002).Global gene expression patterns during differentiation of F9embryonal carcinoma cells into parietal endoderm (F9胚胎癌细胞向体壁内胚层分化过程中总体基因表达模式).*Funct Integr Genomics* 2, 105-119.

[0455] Hogan,B.L.(1996).Bone morphogenetic proteins in development(发育中的骨形成蛋白).*Curr Opin Genet Dev* 6,432-438.

[0456] Hogan,B.L.(1997).Pluripotent embryonic cells and methods of making same(多能胚胎细胞和制备多能胚胎细胞的方法)(U.S.A.,Vanderbilt University).

[0457] Howe,C.C,Overton,G.C,Sawicki,J.,Solter,D.,Stein,P.,and Strickland,S.(1988).Expression of SPARC/osteonectin transcript in murine embryos and gonads(小鼠胚胎和生殖腺中SPARC/骨连接素转录物的表达).*Differentiation* 37,20-25.

[0458] Hudson,C,Clements,D.,Friday,R.V.,Stott,D.,and Woodland,H.R.(1997).Xsox17alpha and-beta mediate endoderm formation in *Xenopus*(非洲蟾蜍中Xsox17α和-β调节内胚层形成).*Cell* 91,397-405.

[0459] Imada,M.,Imada,S.,Iwasaki,H.,Kume,A.,Yamaguchi,H.,and Moore,E.E.(1987).Fetomodulin:marker surface protein of fetal development which is modulatable by cyclic AMP(胎儿调节素:胎儿发育的标志物表面蛋白,受环状AMP调节).*Dev Biol* 122,483-491.

[0460] Kanai-Azuma,M.,Kanai,Y.,Gad,J.M.,Tajima,Y.,Taya,C,Kurohmaru,M.,Sanai,Y.,Yonekawa,H.,Yazaki,K.,Tam,P.P.,and Hayashi,Y.(2002).Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice(无Sox17突变小鼠中定形肠内胚层的缺失).*Development*129,2367-2379.

[0461] Katoh,M.(2002).Expression of human SOX7in normal tissues and tumors (正常组织和肿瘤中人SOX7的表达).*Int J Mol Med* 9,363-368.

[0462] Kikuchi,Y.,Agathon,A.,Alexander,J.,Thisse,C,Waldron,S.,Yelon,D.,Thisse,B.,and Stainier,D.Y.(2001).casanova encodes a novel Sox-related protein necessary and sufficient for early endoderm formation in zebrafish (casanova编码一个新的Sox相关的斑马鱼中早期内胚层形成所需的蛋白).*Genes Dev* 15,

1493-1505.

[0463] Kim,C.H.,and Broxmeyer,H.E.(1999).Chemokines:signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function(趋化因子:发育和效应功能的T和B细胞运输的信号灯).J Leukoc Biol 65,6-15.

[0464] Kimelman,D.,and Griffin,K.J.(2000).Vertebrate mesendoderm induction and patterning(脊椎动物中内胚层的诱导和形成).Curr Opin Genet Dev 10,350-356.

[0465] Kubo A,Shinozaki K,Shannon JM,Kouskoff V,Kennedy M,Woo S,Fehling HJ,Keller G.(2004)Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture(培养物中来自胚胎干细胞的定形内胚层的发育).Development.131,1651-62.

[0466] Kumar,A.,Novoselov,V.,Celeste,A.J.,Wolfman,N.M.,ten Dijke,P.,and Kuehn,M.R.(2001).Nodal signaling uses activin and transforming growth factor-beta receptor-regulated Smads(Nodal信号使用活化素和转化生长因子β受体调节的Smad).J Biol Chem 276,656-661.

[0467] Labosky,P.A.,Barlow,D.P.,and Hogan,B.L.(1994a).Embryonic germ cell lines and their derivation from mouse primordial germ cells(胚胎生殖细胞系和源自小鼠原始生殖细胞的衍生).Ciba Found Symp 182,157-168;discussion 168-178.

[0468] Labosky,P.A.,Barlow,D.P.,and Hogan,B.L.(1994b).Mouse embryonic germ (EG)cell lines:transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2receptor(Igf2r)gene compared with embryonic stem(ES)cell lines(小鼠胚胎生殖(EG)细胞系:通过种系传递和胰岛素样生长因子2受体(Igf2r)基因与胚胎干细胞(ES)系甲基化标记的差异).Development 120,3197-3204.

[0469] Lickert,H.,Kutsch,S.,Kanzler,B.,Tamai,Y.,Taketo,M.M.,and Kemler,R.(2002).Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm(小鼠胚胎内胚层中β连环蛋白去除后多重心脏的形成).Dev Cell 3,171-181.

[0470] Lu,C.C,Brennan,J.,and Robertson,E.J.(2001).From fertilization to gastrulation:axis formation in the mouse embryo(从受精到原肠胚形成:小鼠胚胎中轴的形成).Curr Opin Genet Dev 11,384-392.

[0471] Ma,Q.,Jones,D.,and Springer,T.A.(1999).The chemokine receptor CXCR4is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment(骨髓微环境中B系和粒细胞前体的维持需要趋化因子受体CXCR4).Immunity 10,463-471.

[0472] McGrath KE,Koniski AD,Maltby KM,McGann JK,Palis J.(1999)Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1and its receptor,CXCR4(趋化因子SDF-1和其受体CXCR4的胚胎表达和功能).Dev Biol.213,442-56.

[0473] Miyazono,K.,Kusanagi,K.,and Inoue,H.(2001).Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling(TGF-β/BMP信号的多样性和趋同性).J Cell Physiol 187, 265-276.

- [0474] Nagasawa,T.,Hirota,S.,Tachibana,K.,Takakura,N.,Nishikawa,S.,Kitamura,Y.,Yoshida,N.,Kikutani,H.,and Kishimoto,T.(1996).Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1(CXC趋化因子PBSF/SDF-1缺失的小鼠中B-细胞淋巴细胞生成和骨髓髓细胞生成的缺陷).Nature382,635-638.
- [0475] Niwa,H.(2001).Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells(保持ES细胞的干细胞更新的分子机理).Cell Struct Funct 26,137-148.
- [0476] Ogura,H.,Aruga,J.,and Mikoshiba,K.(2001).Behavioral abnormalities of Zic1 and Zic2mutant mice:implications as models for human neurological disorders(Zic1和Zic2突变小鼠的行为异常:作为人神经功能紊乱的模型).Behav Genet 31,317-324.
- [0477] Reubinoff,B.E.,Pera,M.F.,Fong,C.Y.,Trounson,A.,and Bongso,A.(2000).Embryonic stem cell lines from human blastocysts:somatic differentiation in vitro(来自人胚泡的胚胎干细胞系:体外体细胞分化).Nat Biotechnol 18,399-404.
- [0478] Rodaway,A.,and Patient,R.(2001).Mesendoderm.an ancient germ layer?(中内胚层,一个古老的胚层?)Cell 105,169-172.
- [0479] Rodaway,A.,Takeda,H.,Koshida,S.,Broadbent,J.,Price,B.,Smith,J.C.,Patient,R.,and Holder,N.(1999).Induction of the mesendoderm in the zebrafish germ ring by yolk cell-derived TGF-beta family signals and discrimination of mesoderm and endoderm by FGF(卵黄细胞衍生的TGF-beta家族信号对斑马鱼胚环中内胚层的诱导和用FGF对中胚层和内胚层的鉴别).Development 126,3067-3078.
- [0480] Rohr,K.B.,Schulte-Merker,S.,and Tautz,D.(1999).Zebrafish zic1 expression in brain and somites is affected by BMP and hedgehog signalling(斑马鱼脑和体节中的zic1表达受BMP和hedgehog信号影响).Mech Dev 85,147-159.
- [0481] Schier,A.F.(2003).Nodal signaling in vertebrate development(脊椎动物发育中的Nodal信号).Annu Rev Cell Dev Biol 19,589-621.
- [0482] Schoenwolf,G.C.,and Smith,J.L.(2000).Gastrulation and early mesodermal patterning in vertebrates(脊椎动物中原肠胚形成和早期中胚层形成模式).Methods Mol Biol 135,113-125.
- [0483] Shamblott,M.J.,Axelman,J.,Wang,S.,Bugg,E.M.,Littlefield,J.W.,Donovan,P.J.,Blumenthal,P.D.,Huggins,G.R.,and Gearhart,J.D.(1998).Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells(来自培养的人原始生殖细胞的多能干细胞的衍化).Proc Natl Acad Sci U S A 95,13726-13731.
- [0484] Shapiro,A.M.,Lakey,J.R.,Ryan,E.A.,Korbitt,G.S.,Toth,E.,Warnock,G.L.,Kneteman,N.M.,and Rajotte,R.V.(2000).Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen(7例1型糖尿病病人中使用不含糖皮质激素免疫抑制疗法的胰岛移植).N Engl J Med 343,230-238.
- [0485] Shapiro,A.M.,Ryan,E.A.,and Lakey,J.R.(2001a).Pancreatic islet

transplantation in the treatment of diabetes mellitus(在糖尿病治疗中的胰岛移植).Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 15,241-264.

[0486] Shapiro,J.,Ryan,E.,Warnock,G.L.,Kneteman,N.M.,Lakey,J.,Korbutt,G.S.,and Rajotte,R.V.(2001b).Could fewer islet cells be transplanted in type 1 diabetes?Insulin independence should be dominant force in islet transplantation(1型糖尿病中少量胰岛细胞能否移植?胰岛素非依赖性为胰岛移植中的主要因素).Bmj 322,861.

[0487] Shiozawa,M.,Hiraoka,Y.,Komatsu,N.,Ogawa,M.,Sakai,Y.,and Aiso,S.(1996).Cloning and characterization of *Xenopus laevis* xSox7 cDNA(非洲蟾蜍 *laevis* xSox7 cDNA的克隆和鉴定).Biochim Biophys Acta 1309,13-76.

[0488] Smith,J.(1997).Brachyury and the T-box genes(Brachyury和T-box基因).Curr Opin Genet Dev 7,474-480.

[0489] Smith,J.C.,Armes,N.A.,Conlon,F.L.,Tada,M.,Umbhauer,M.,and Weston,K.M.(1997).Upstream and downstream from Brachyury,a gene required for vertebrate mesoderm formation(Brachyury的上游和下游,一种脊椎动物中胚层形成需要的基因).Cold Spring Harb Symp Quant Biol 62,337-346.

[0490] Takash,W.,Canizares,J.,Bonneaud,N.,Poulat,F.,Mattei,M.G.,Jay,P.,and Berta,P.(2001).SOX7 transcription factor:sequence,chromosomal localisation,expression,transactivation and interference with Wnt signalling(SOX7转录因子:序列,染色体定位,表达,Wnt信号的转活和干扰).Nucleic Acids Res 29,4274-4283.

[0491] Taniguchi,K.,Hiraoka,Y.,Ogawa,M.,Sakai,Y.,Kido,S.,and Aiso,S.(1999).Isolation and characterization of a mouse SRY-related cDNA,mSox7(小鼠SRY相关的cDNA,mSox7的分离和鉴定).Biochim Biophys Acta 1445,225-231.

[0492] Technau,U.(2001).Brachyury,the blastopore and the evolution of the mesoderm(Brachyury,胚孔和中胚层的进化).Bioessays 23,788-794.

[0493] Thomson,J.A.,Itskovitz-Eldor,J.,Shapiro,S.S.,Waknitz,M.A.,Swiergiel,J.J.,Marshall,V.S.,and Jones,J.M.(1998).Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts(衍生自人胚泡的胚胎干细胞系).Science 282,1145-1147.

[0494] Tremblay,K.D.,Hoodless,P.A.,Bikoff,E.K.,and Robertson,E.J.(2000).Formation of the definitive endoderm in mouse is a Smad2-dependent process(小鼠定形内胚层的形成是一个Smad2依赖的过程).Development 127,3079-3090.

[0495] Vandesompele,J.,De Preter,K.,Pattyn,F.,Poppe,B.,Van Roy,N.,De Paepe,A.,and Speleman,F.(2002).Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes(通过多种内在对照基因的几何平均准确校正实时定量RT-PCR).Genome Biol 3,RESEARCH0034.

[0496] Varlet,I.,Collignon,J.,and Robertson,E.J.(1997).nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation(小鼠原肠胚形成期前轴特异性化需要nodal在原始内胚层中的表达).Development 124,1033-1044.

- [0497] Vincent, S.D., Dunn, N.R., Hayashi, S., Norris, D.P., and Robertson, E.J. (2003). Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals(小鼠形成体中细胞命运决定受梯度Nodal信号控制). *Genes Dev* 17, 1646-1662.
- [0498] Weiler-Guettler, H., Aird, W.C., Rayburn, H., Husain, M., and Rosenberg, R.D. (1996). Developmentally regulated gene expression of thrombomodulin in postimplantation mouse embryos(移植后小鼠胚胎中发育调节的血栓调节蛋白的基因表达). *Development* 122, 2271-2281.
- [0499] Weiler-Guettler, H., Yu, K., Soff, G., Gudas, L.J., and Rosenberg, R.D. (1992). Thrombomodulin gene regulation by cAMP and retinoic acid in F9 embryonal carcinoma cells(cAMP和视黄酸在F9胚胎癌细胞中调节血栓调节蛋白基因). *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 89, 2155-2159.
- [0500] Wells, J.M., and Melton, D.A. (1999). Vertebrate endoderm development(脊椎动物内胚层发育). *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 393-410.
- [0501] Wells, J.M., and Melton, D.A. (2000). Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers(早期小鼠内胚层由来自邻近胚层的可溶因子模式化). *Development* 127, 1563-1572.
- [0502] Willison, K. (1990). The mouse Brachyury gene and mesoderm formation(小鼠Brachyury基因和中胚层形成). *Trends Genet* 6, 104-105.
- [0503] Zhao, G.Q. (2003). Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse(小鼠中敲除BMP信号的结果). *Genesis* 35, 43-56.
- [0504] Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B.L., and Kuehn, M.R. (1993). Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation (nodal是原肠胚形成期在小鼠节表达的新的TGFβ样基因). *Nature* 361, 543-547.

序 列 表

<110> 韦尔赛特公司

凯文·艾伦·达穆尔(D'Amour, Kevin Allen)

艾伦·D·阿古尼克(Agulnick, Alan D.)

苏珊·埃利泽(Eliazer, Susan)

伊曼纽尔·E·贝特格(Baetge, Emmanuel E.)

<120> 细胞培养基

<130> D12C11033CN

<150> US 11/021618

<151> 2004-12-23

<150> US 60/587942

<151> 2004-07-11

<150> US 60/586566

<151> 2004-07-09

<150> US 60/566293

<151> 2004-04-24

[0001]

<160> 2

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1245

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atgagcagcc cggatgcggg atacgccagt gacgaccaga gccagaccca gagcgcgctg 60
ccgcgcgtga tggccgggct ggcccctgc cctggggcgg agtcgctgag ccccatcggg 120
gacatgaagg tgaaggcgga gccgcggcgg aacagcggag caccggccgg gccgcgggga 180
cgagccaagg gcgagtcctg tatccggcgg ccgatgaacg ctttcattgt gtgggctaag 240
gacgagcgca agcgcgttgc gcagcagaat ccagacctgc acaacgccga gttgagcaag 300
atgcctggga agtcctggaa ggcgcgag ctggcggaga agcggccctt cgtggaggag 360
gcagagcggc tgcgcgtgca gcaatgcag gaccaccca actacaagta ccggccggcg 420
cgccgcaagg aggtgaagcg gctgaagcgg gtggaggcgg gcttctgca cggcctggct 480
gagccgcagg ccgcgcgctt ggccccgag gccggccggc tggccatgga ccgcctgggc 540
ctccagtcc ccgagcagg cttccccgc gccccgcgc tgcctgcctc gcacaaggc 600
ggcactacc gcgactgcca gactctgggc gccctccgc tcgaaggcta cccgttgccc 660
acgcgcgaca cgtccccctt ggacggcgtg gaccgcgacc cggtttctt cgcgcgcccg 720
atgcgcgggg actgccggc gcccggcacc tacagctaag ccgaggtctc ggactacgct 780
ggcccccgga agctccccc cgtcccatg ccccccgac tcggcccgga gcccgcggtt 840
ccttcgattc eggccctctt ggccacccc agcgccttc acgtgtacta cggcgcgatg 900

```

```

ggctegcccg gggcggggcg cgggcgggcg ttcagatgc agcgcgaaca ccagcaccag 960
caccagcacc agcaccaccc cccgggcccc ggacagccgt cgccectcc ggaggcaetg 1020
ccctgcgggg acggcaccga cccagtcag cccgcgagc tctcgggga ggtggaccgc 1080
acggaatttg aacagtatct gcaattcgtg tgaagcctg agatgggctt cccctaccag 1140
gggeatgaet cgggtgtgaa tctcccgac agccaagggg ccatttcctc ggtggtgtcc 1200
gacgcagct cccgggtata ttactgcaac tatctgacg tgtga 1245

```

<210> 2

<211> 414

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Ser Ser Pro Asp Ala Gly Tyr Ala Ser Asp Asp Gln Ser Gln Thr
  1          5          10          15
Gln Ser Ala Leu Pro Ala Val Met Ala Gly Leu Gly Pro Cys Pro Trp
      20          25          30
Ala Glu Ser Leu Ser Pro Ile Gly Asp Met Lys Val Lys Gly Glu Ala
      35          40          45
Pro Ala Asn Ser Gly Ala Pro Ala Gly Ala Ala Gly Arg Ala Lys Gly
      50          55          60
Glu Ser Arg Ile Arg Arg Pro Met Asn Ala Phe Met Val Trp Ala Lys
      65          70          75          80
Asp Glu Arg Lys Arg Leu Ala Gln Gln Asn Pro Asp Leu His Asn Ala
      85          90          95
Glu Leu Ser Lys Met Leu Gly Lys Ser Trp Lys Ala Leu Thr Leu Ala
      100         105         110
Glu Lys Arg Pro Phe Val Glu Glu Ala Glu Arg Leu Arg Val Gln His
      115         120         125
Met Gln Asp His Pro Asn Tyr Lys Tyr Arg Pro Arg Arg Arg Lys Gln
      130         135         140
Val Lys Arg Leu Lys Arg Val Glu Gly Gly Phe Leu His Gly Leu Ala
      145         150         155         160
Glu Pro Gln Ala Ala Ala Leu Gly Pro Glu Gly Gly Arg Val Ala Met
      165         170         175
Asp Gly Leu Gly Leu Gln Phe Pro Glu Gln Gly Phe Pro Ala Gly Pro
      180         185         190
Pro Leu Leu Pro Pro His Met Gly Gly His Tyr Arg Asp Cys Gln Ser
      195         200         205
Leu Gly Ala Pro Pro Leu Asp Gly Tyr Pro Leu Pro Thr Pro Asp Thr
      210         215         220
Ser Pro Leu Asp Gly Val Asp Pro Asp Pro Ala Phe Phe Ala Ala Pro
      225         230         235         240
Met Pro Gly Asp Cys Pro Ala Ala Gly Thr Tyr Ser Tyr Ala Gln Val
      245         250         255
Ser Asp Tyr Ala Gly Pro Pro Glu Pro Pro Ala Gly Pro Met His Pro
      260         265         270
Arg Leu Gly Pro Glu Pro Ala Gly Pro Ser Ile Pro Gly Leu Leu Ala
      275         280         285
Pro Pro Ser Ala Leu His Val Tyr Tyr Gly Ala Met Gly Ser Pro Gly
      290         295         300
Ala Gly Gly Gly Arg Gly Phe Gln Met Gln Pro Gln His Gln His Gln

```

[0002]

	305		310		315		320
	His	Gln	His	Gln	His	His	Pro
					Pro	Pro	Gly
					Pro	Gly	Gln
					Pro	Ser	Pro
					Pro	Pro	
					325		330
							335
					Pro	Glu	Ala
					Leu	Pro	Cys
					Arg	Asp	Gly
					Thr	Asp	Pro
					Ser	Gln	Pro
					Ala		
					340		345
							350
					Glu	Leu	Leu
					Gly	Glu	Val
					Asp	Arg	Thr
					Glu	Phe	Glu
					Gln	Tyr	Leu
					His		
					355		360
							365
					Phe	Val	Cys
					Lys	Pro	Glu
					Met	Gly	Leu
					Pro	Tyr	Gln
					Gly	His	Asp
					Ser		
					370		375
							380
					Gly	Val	Asn
					Leu	Pro	Asp
					Ser	His	Gly
					Ala	Ile	Ser
					Ser	Ser	Val
					Val	Ser	
					385		390
							395
					Asp	Ala	Ser
					Ser	Ala	Val
					Tyr	Tyr	Cys
					Asn	Tyr	Pro
					Asp	Val	
					405		410

[0003]

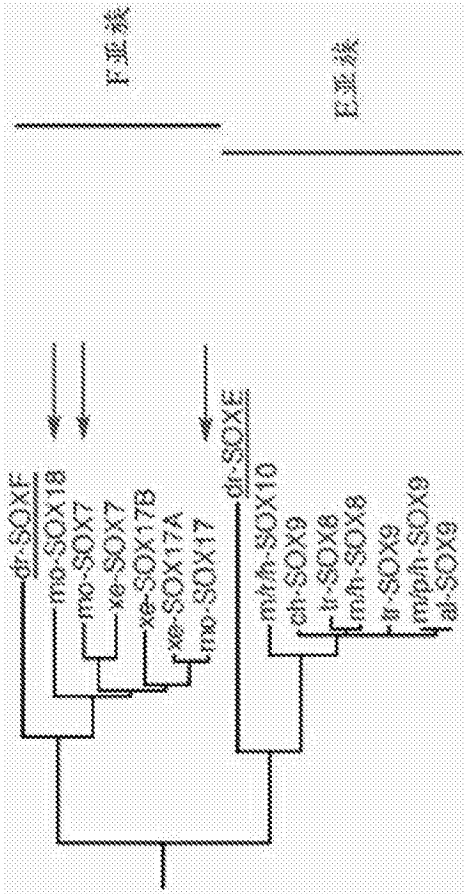


图3

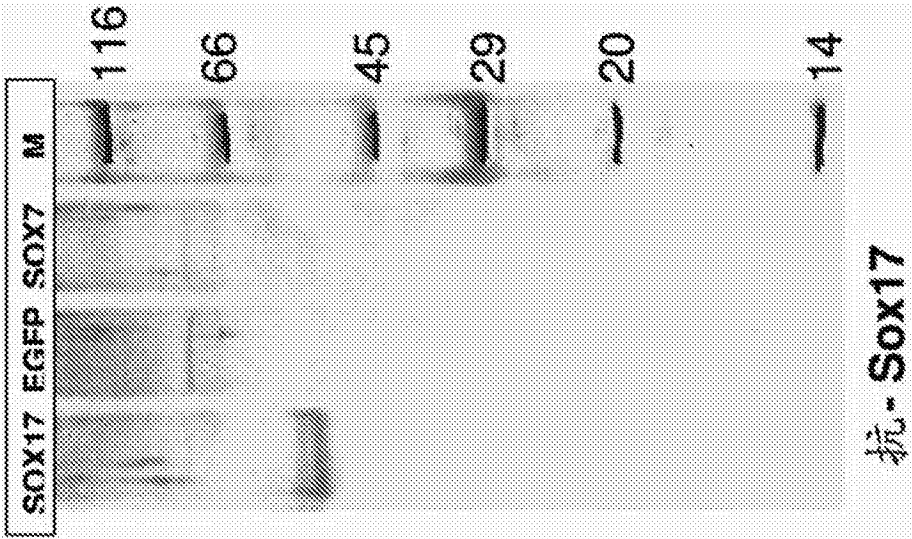


图4

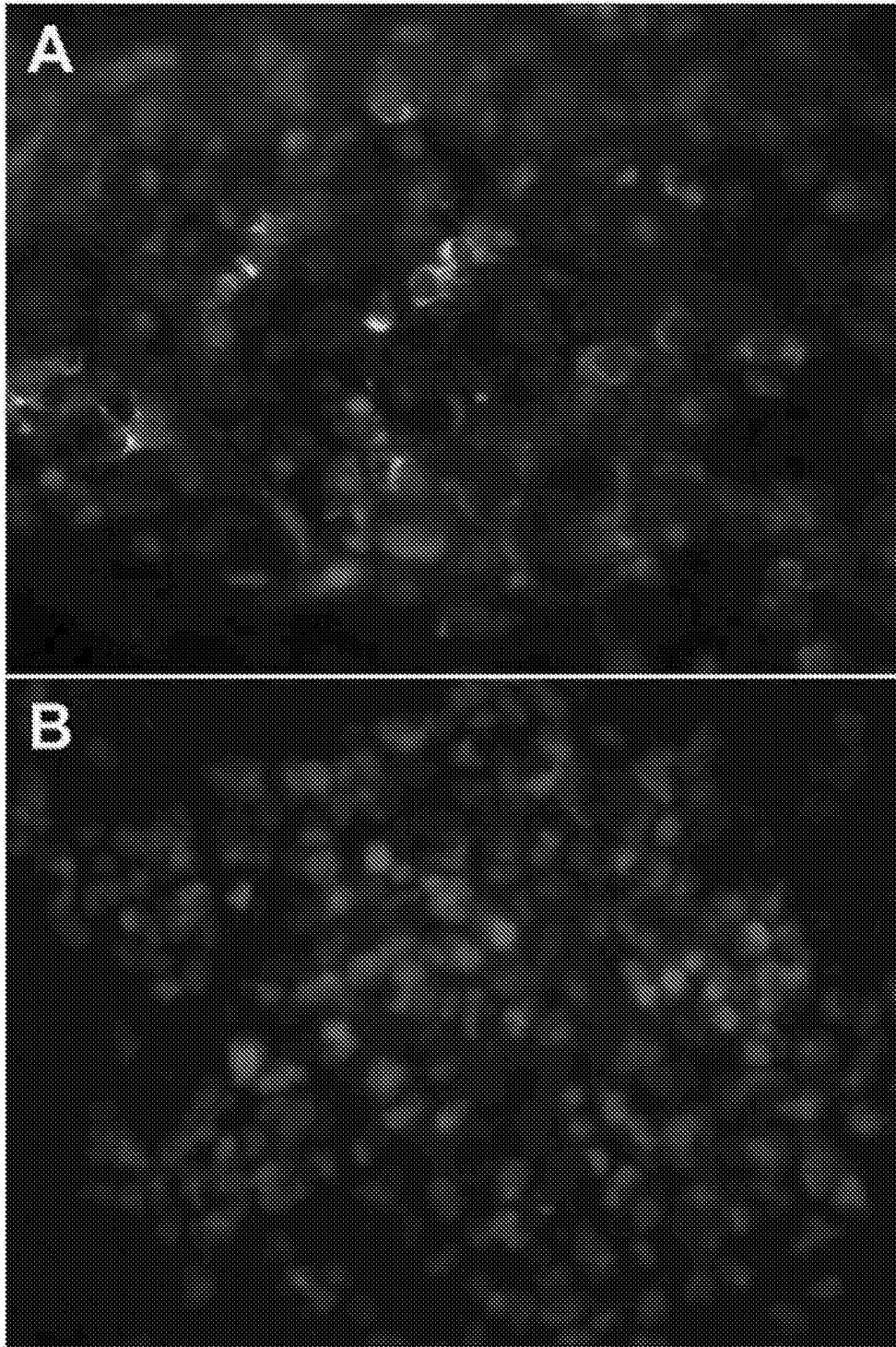


图5

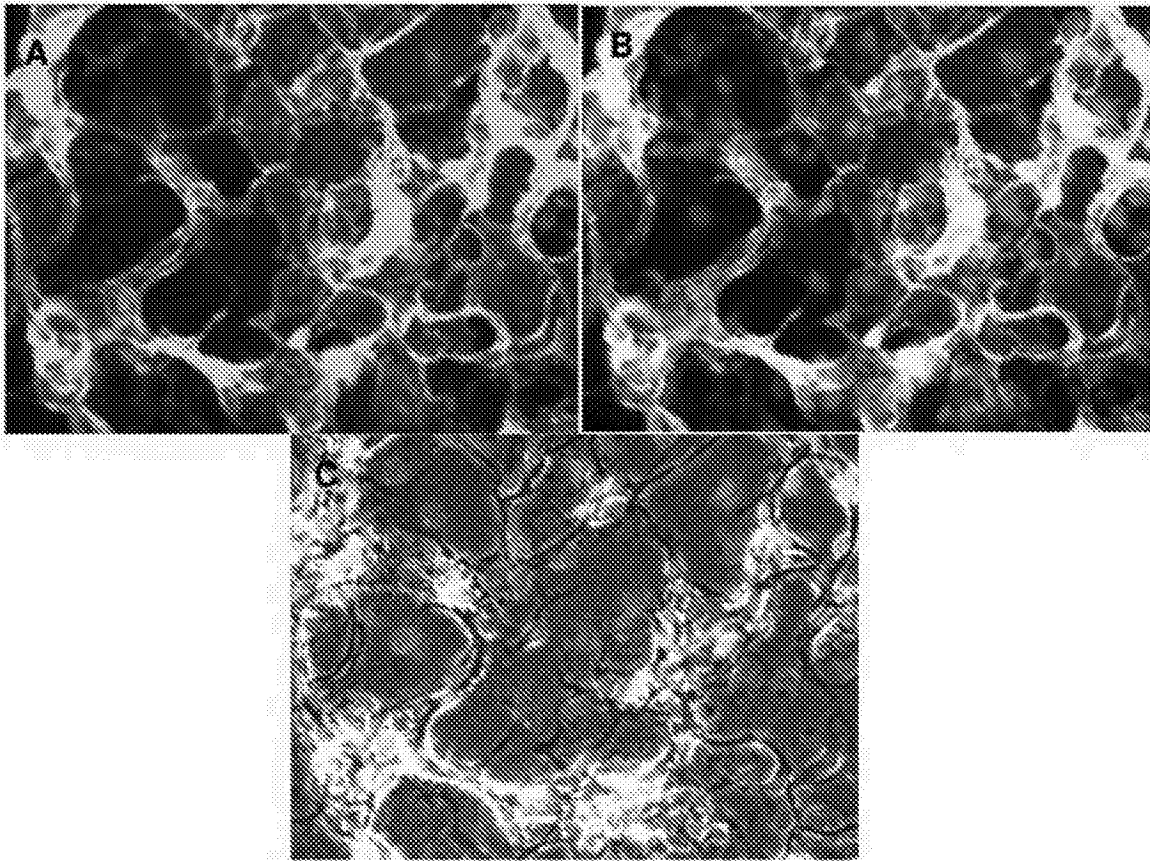


图6

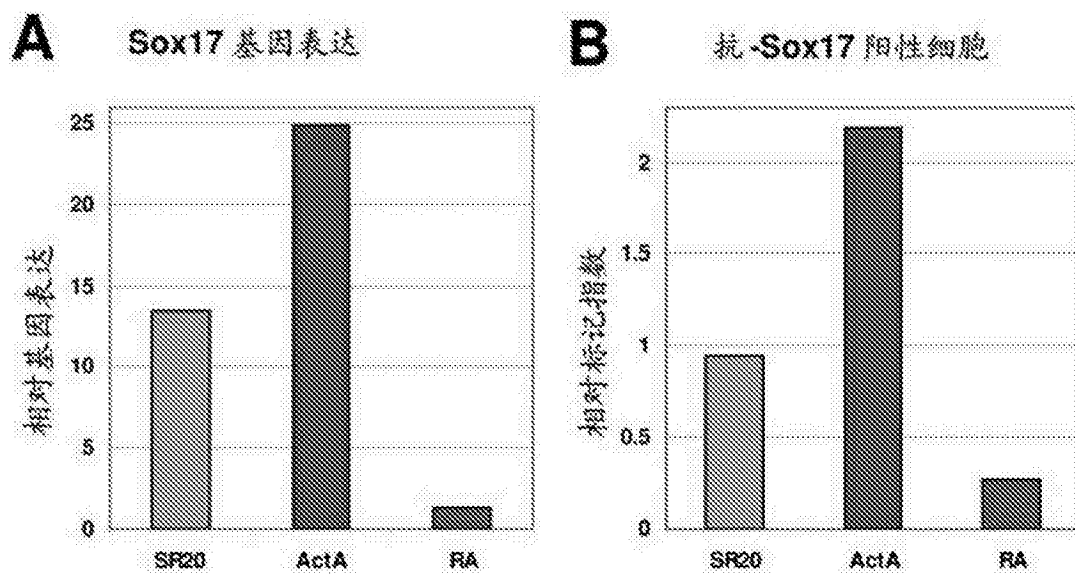


图7

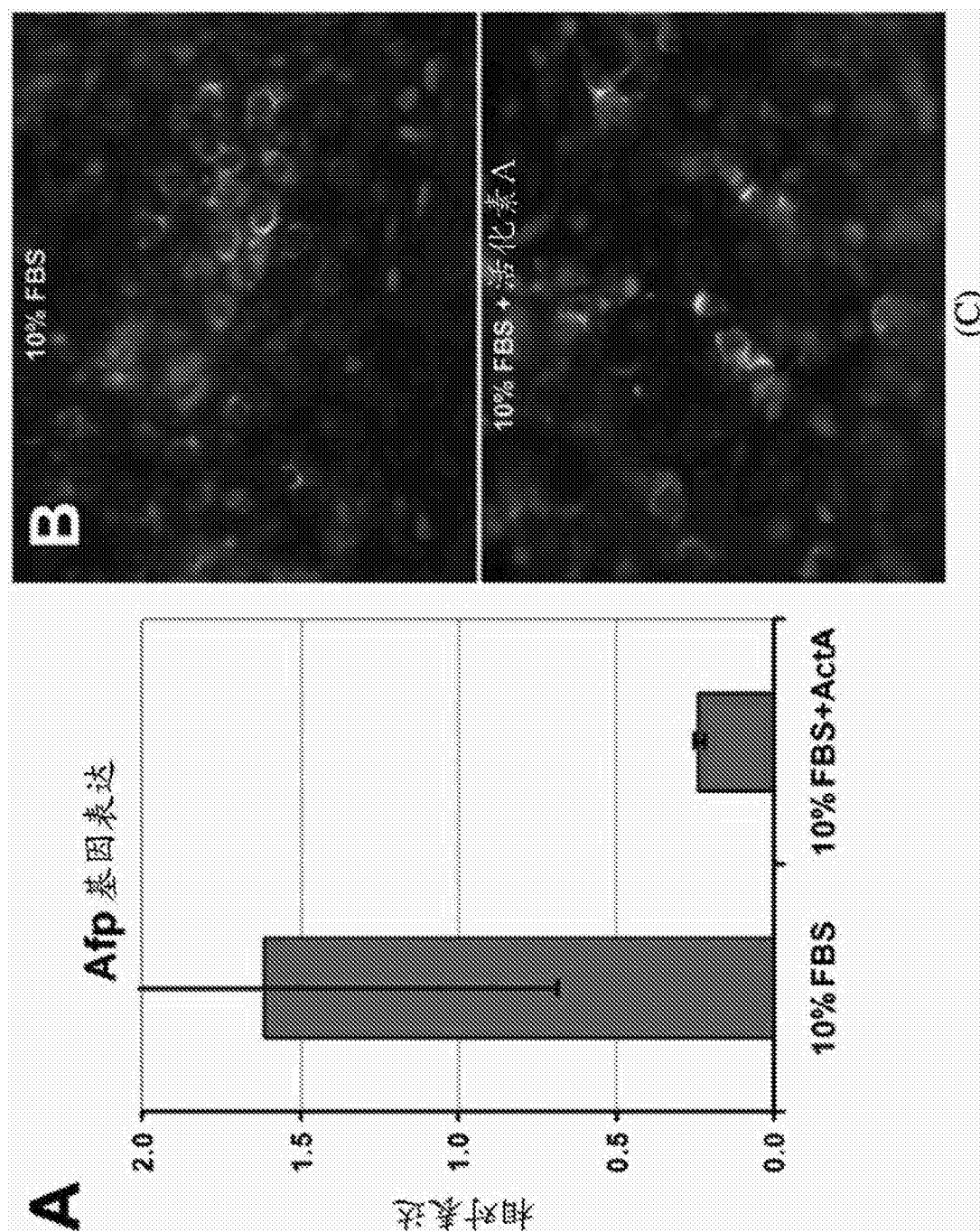


图8

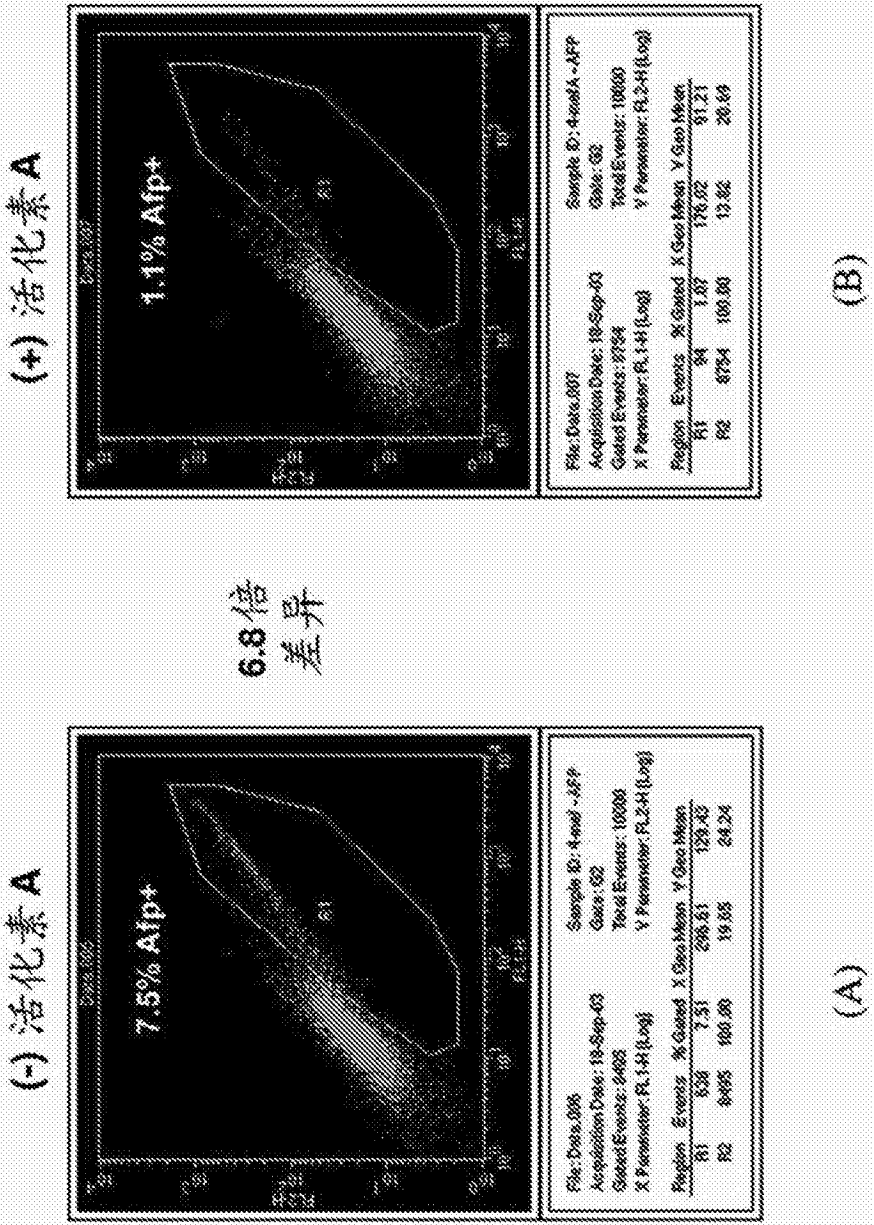


图9

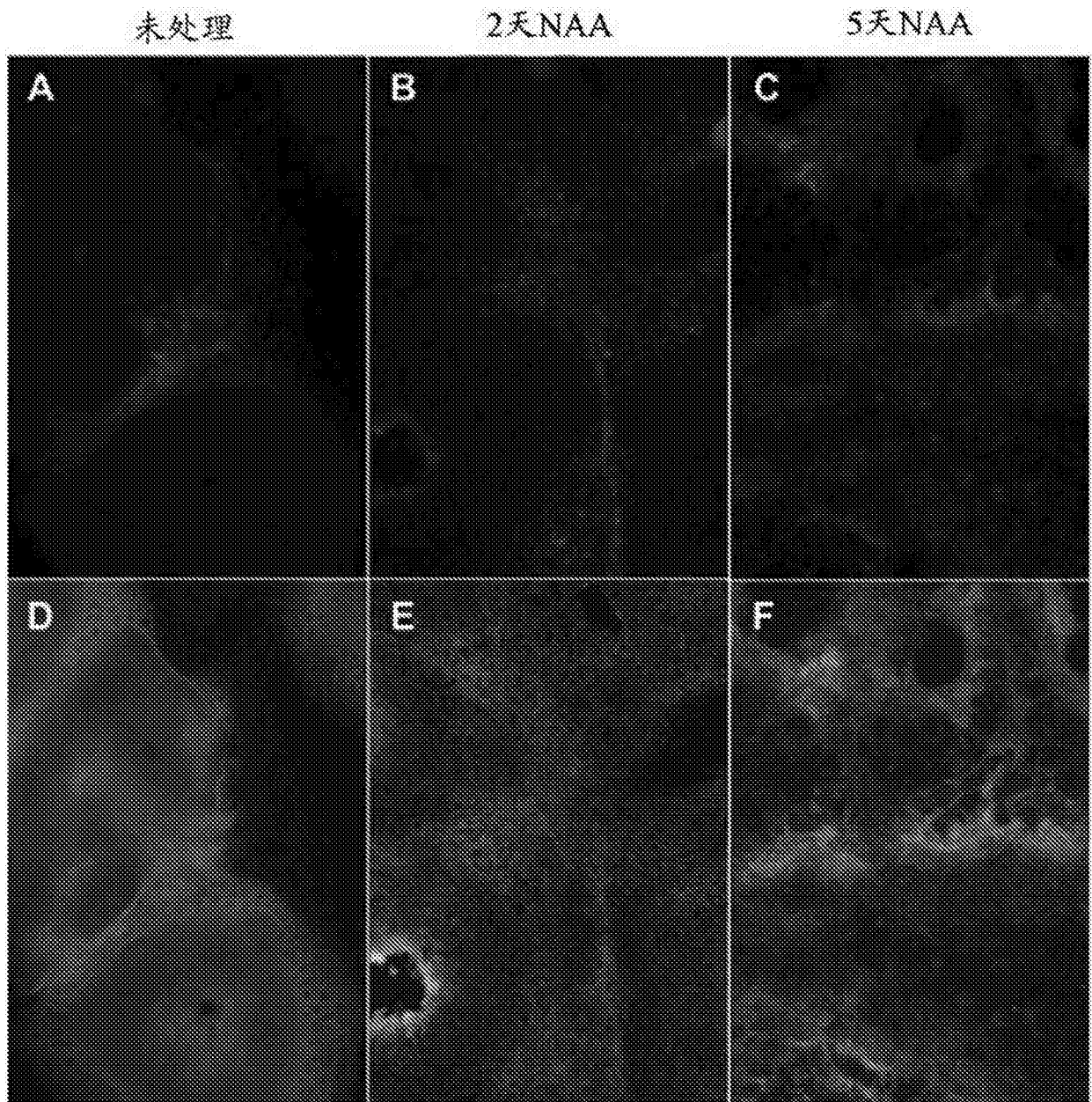


图10

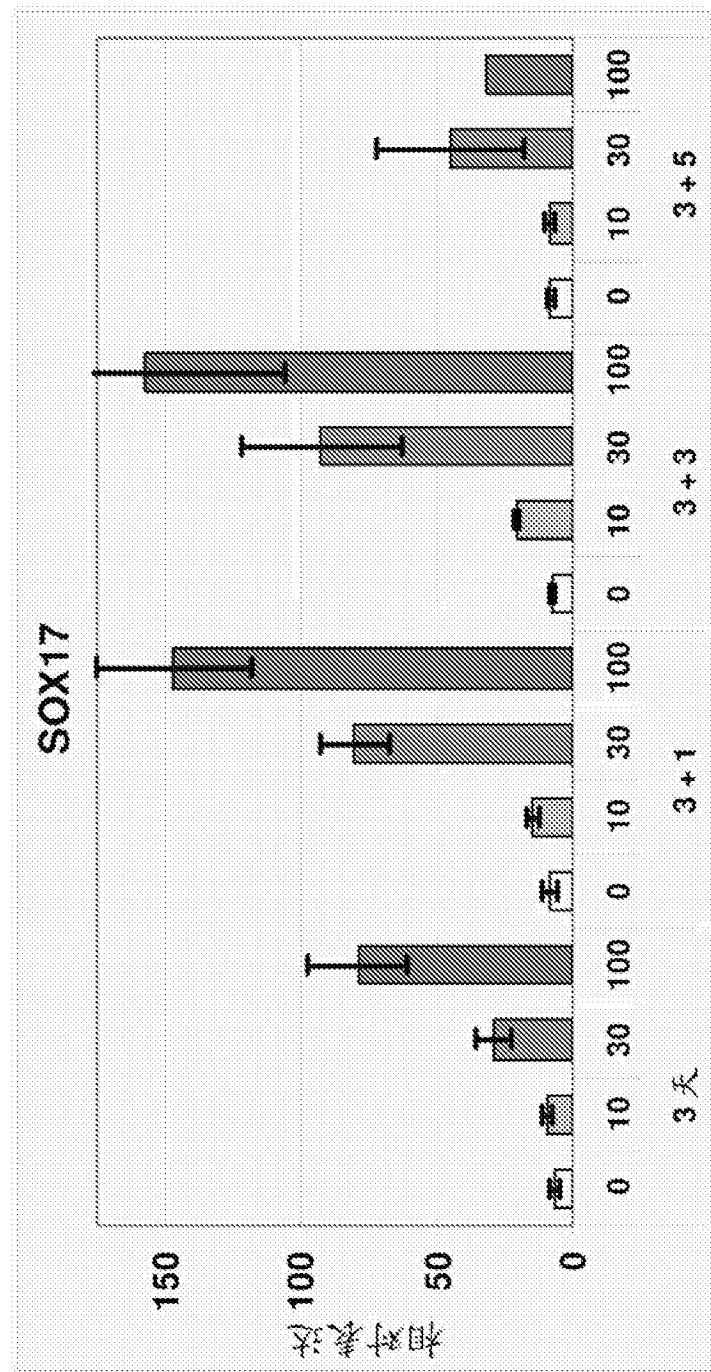


图11

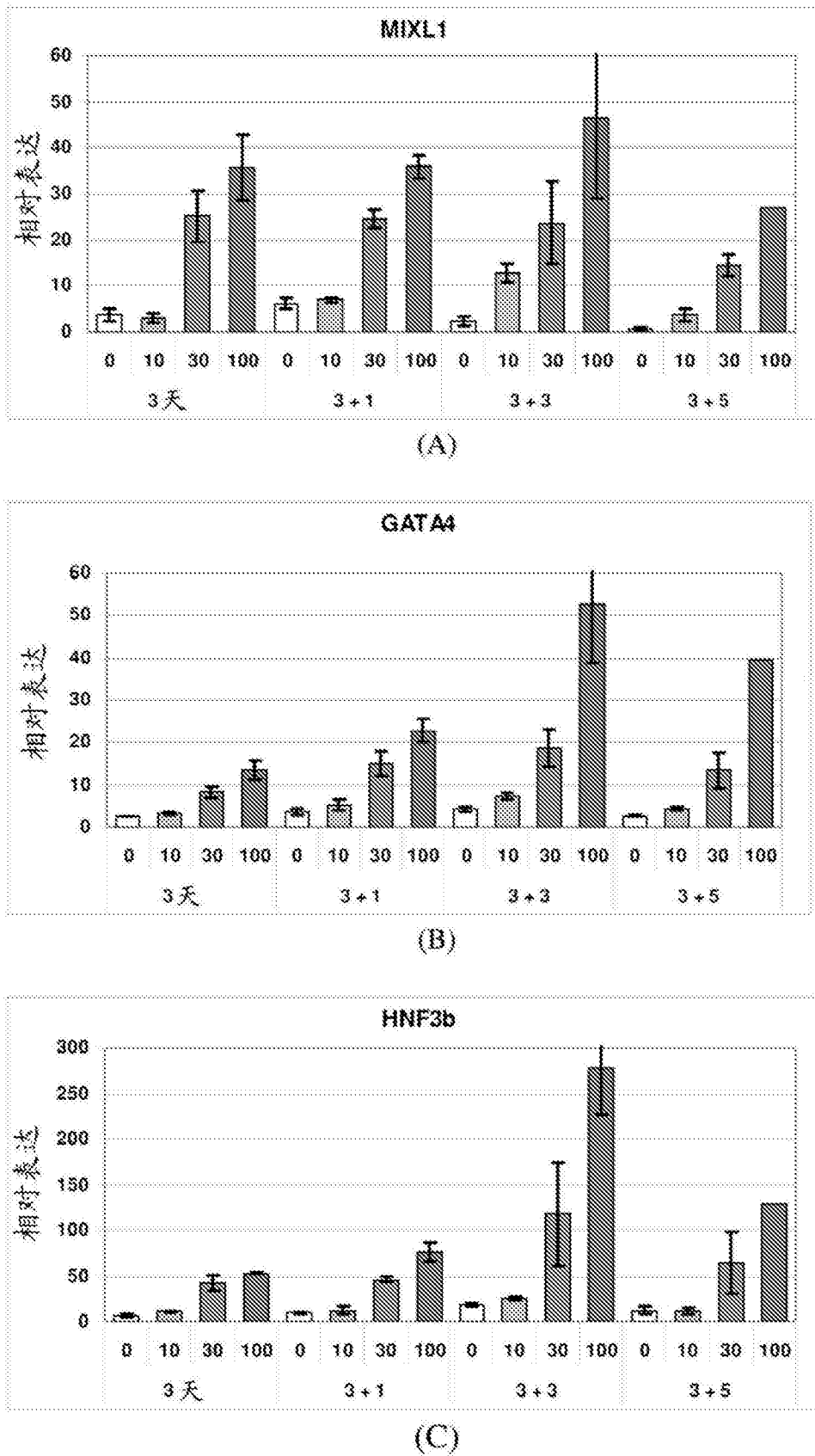


图12

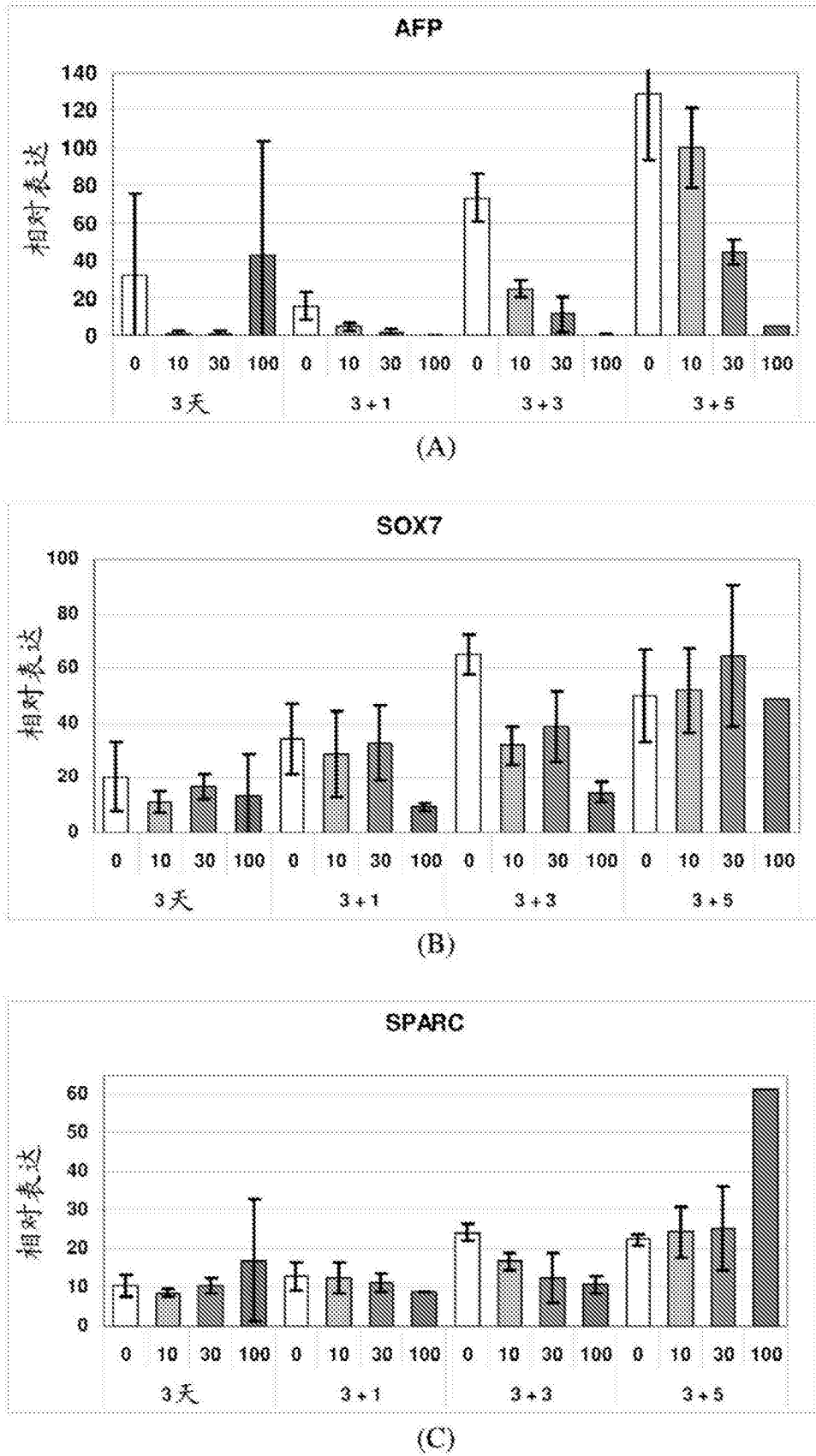
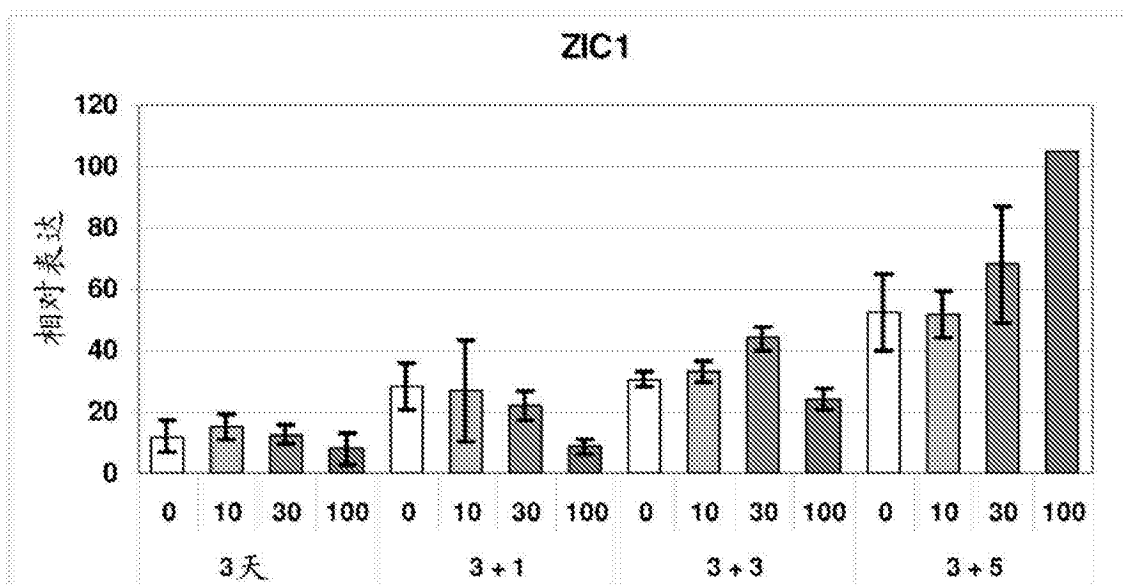
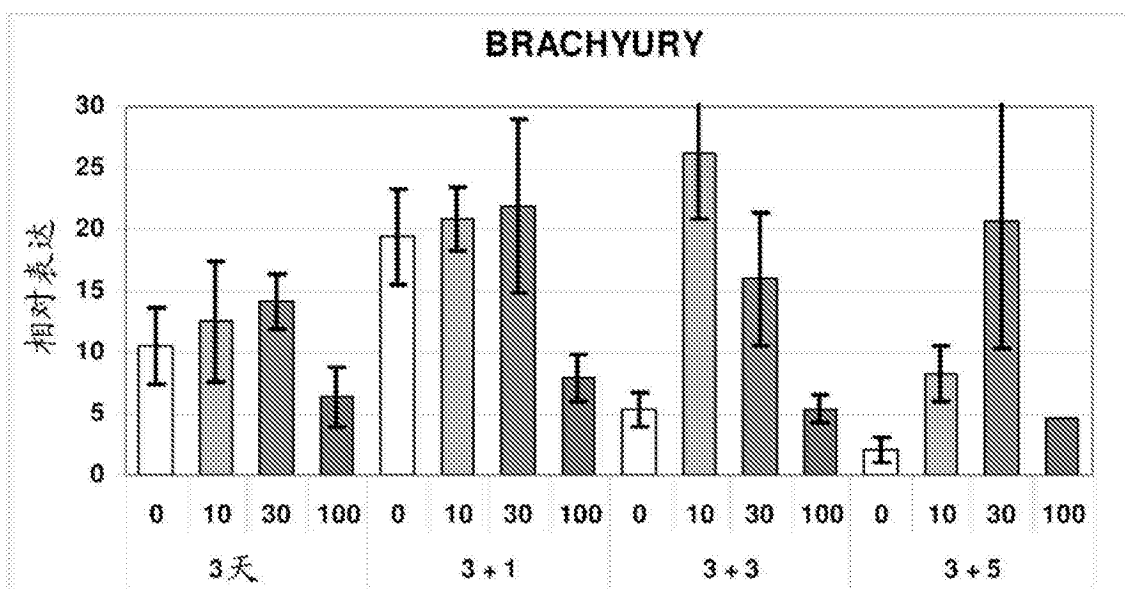


图13



(A)



(B)

图14

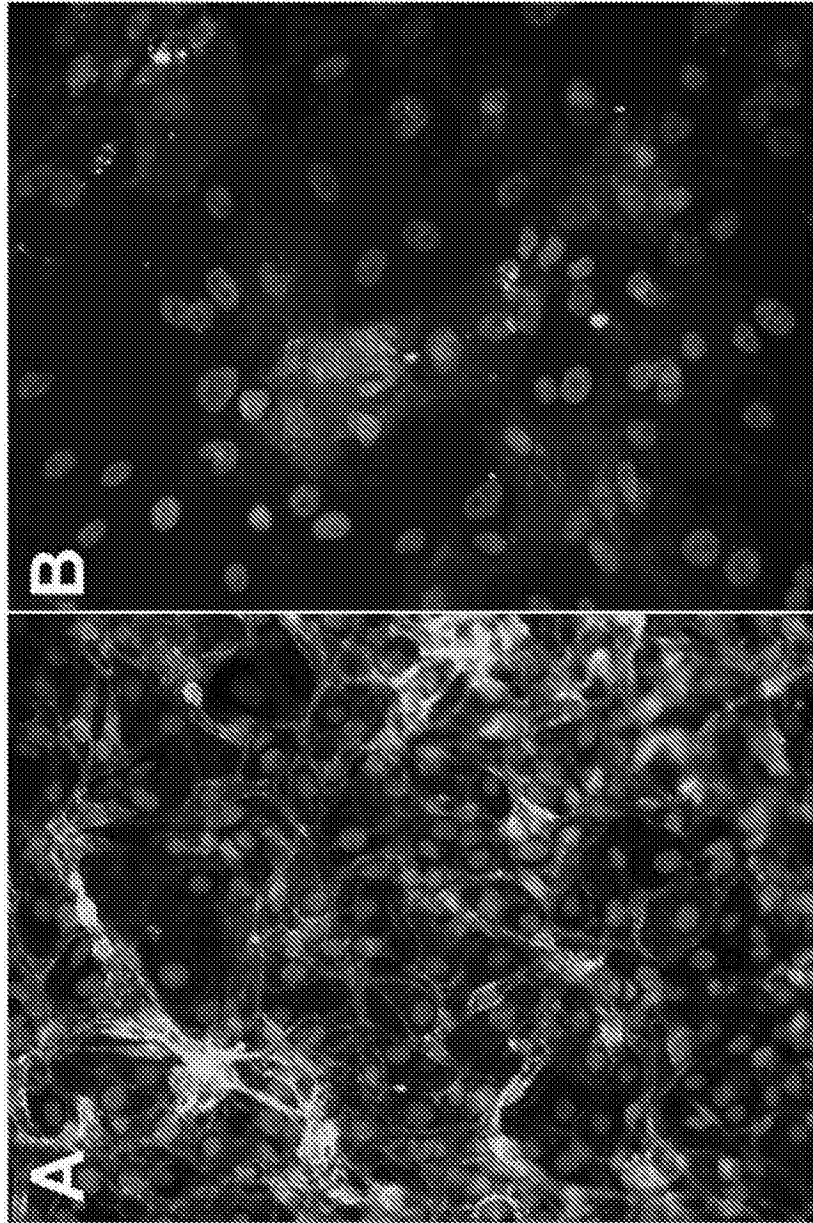


图15

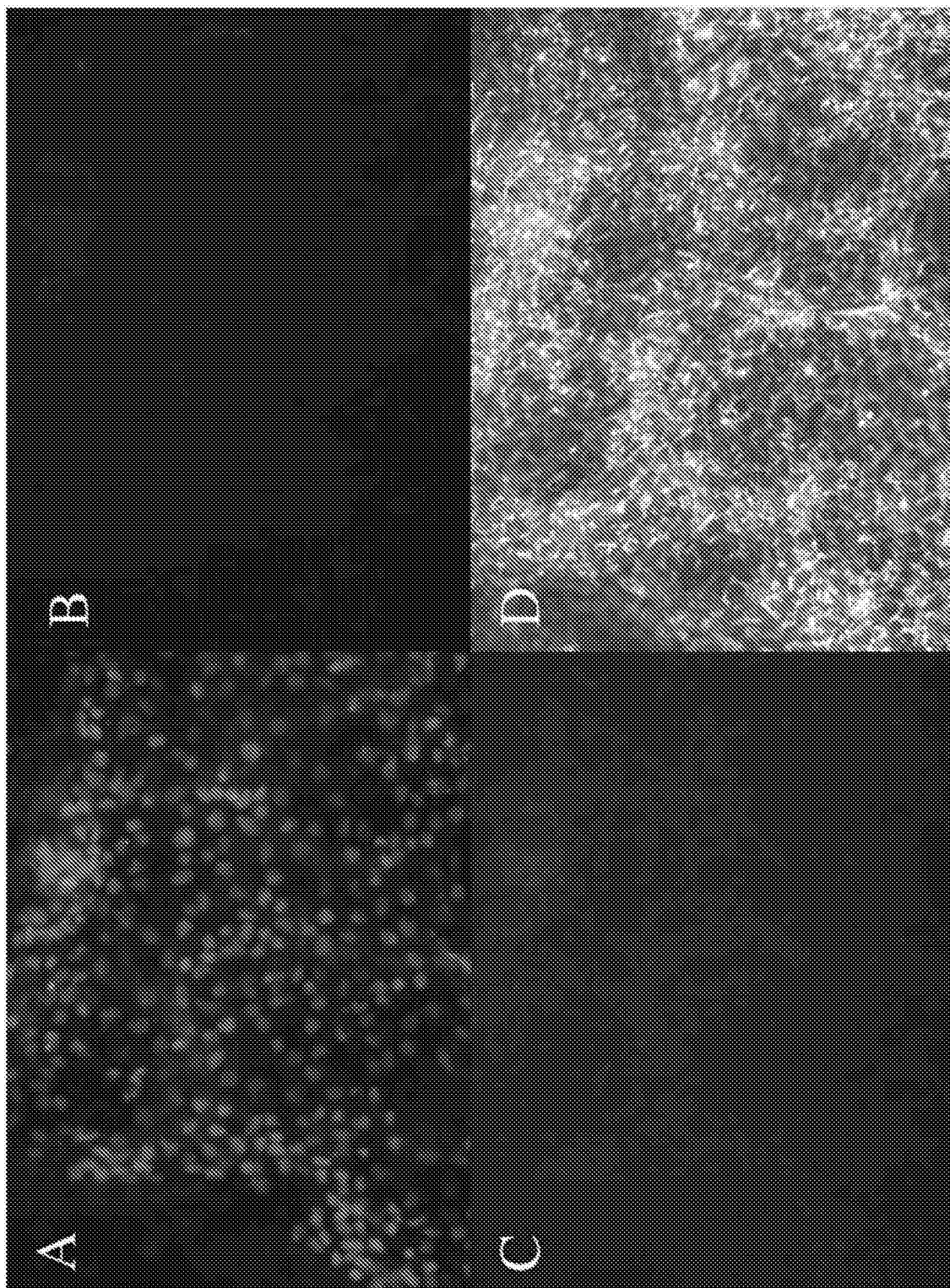


图16

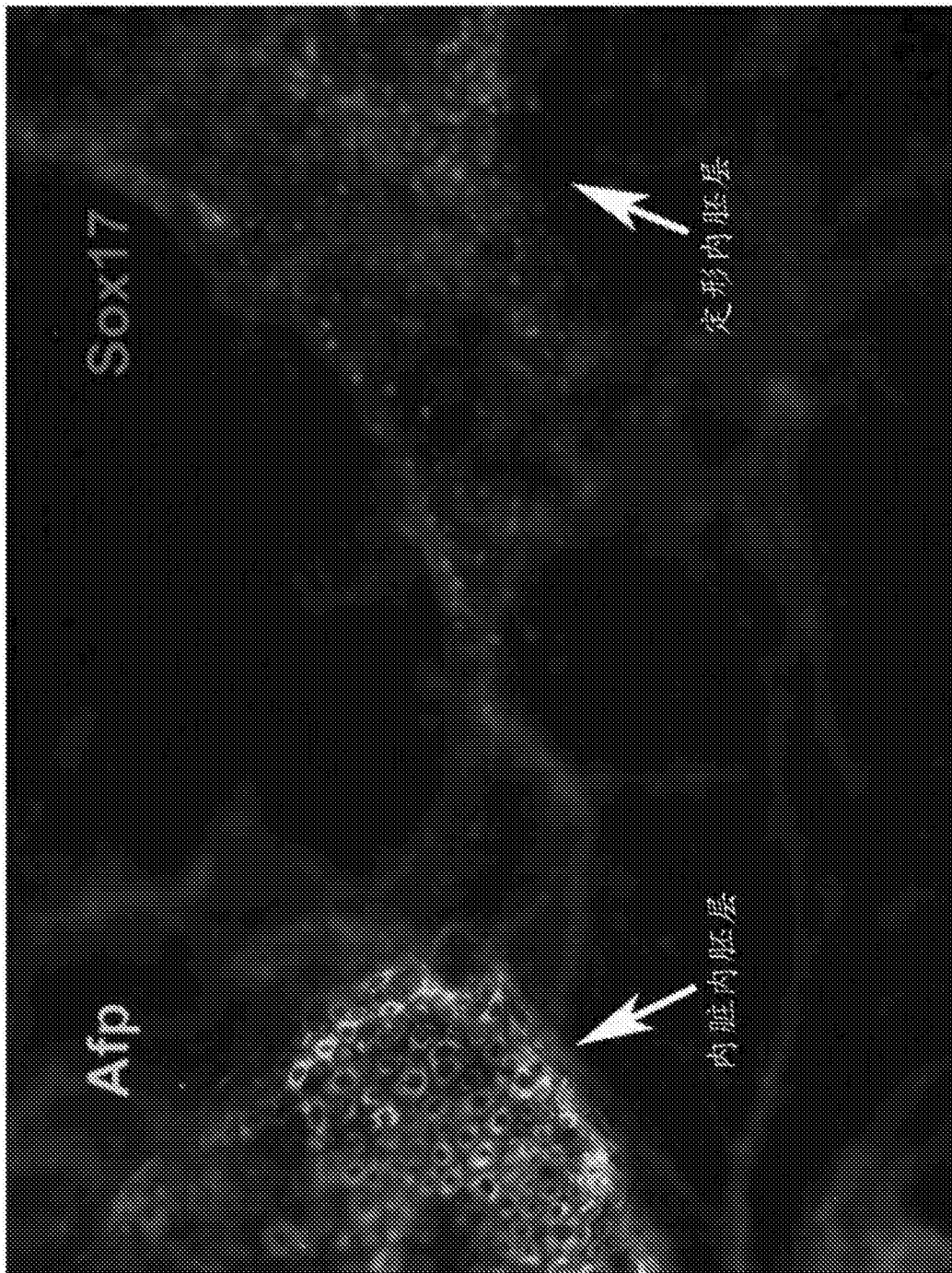


图17

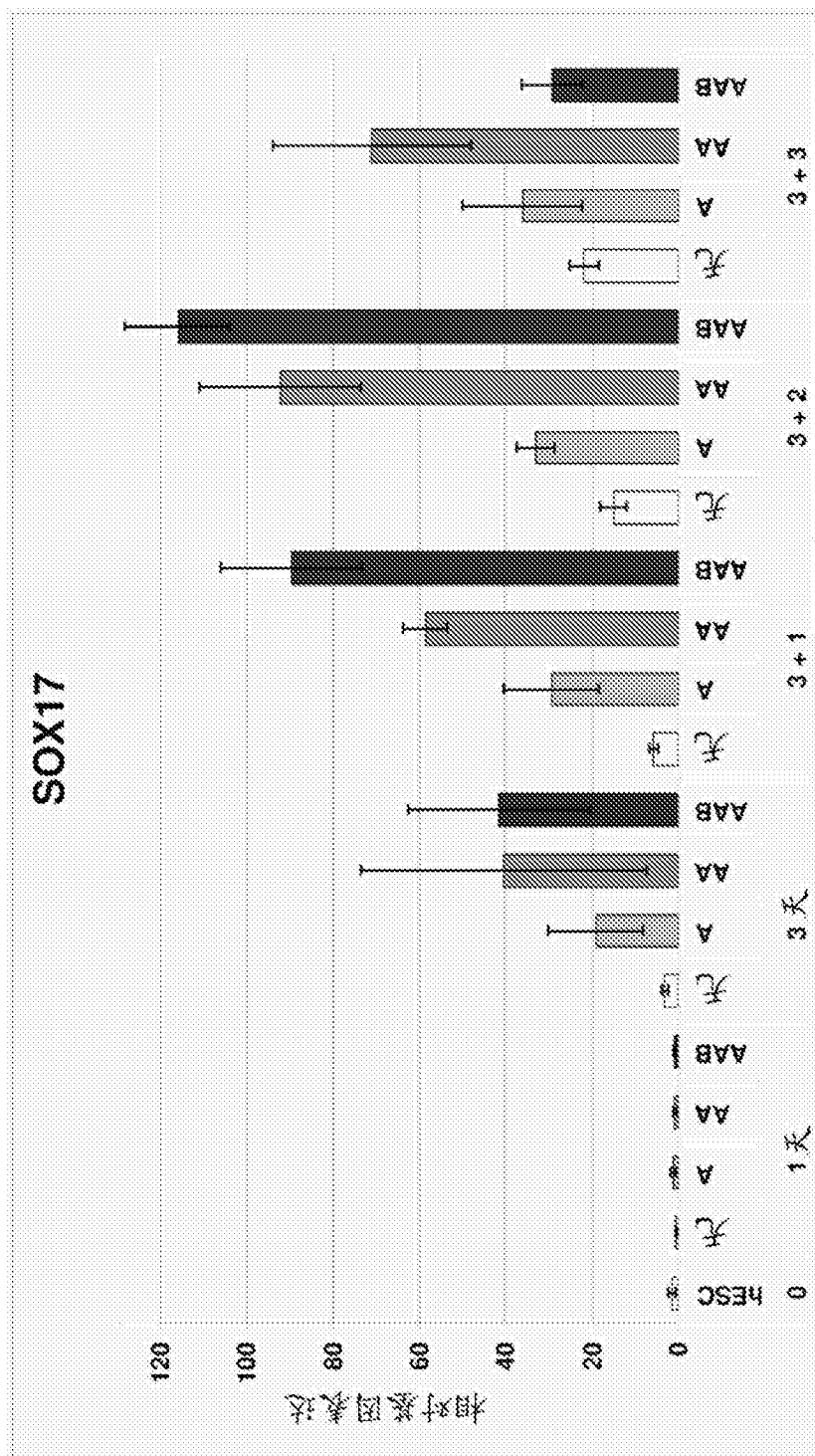


图19

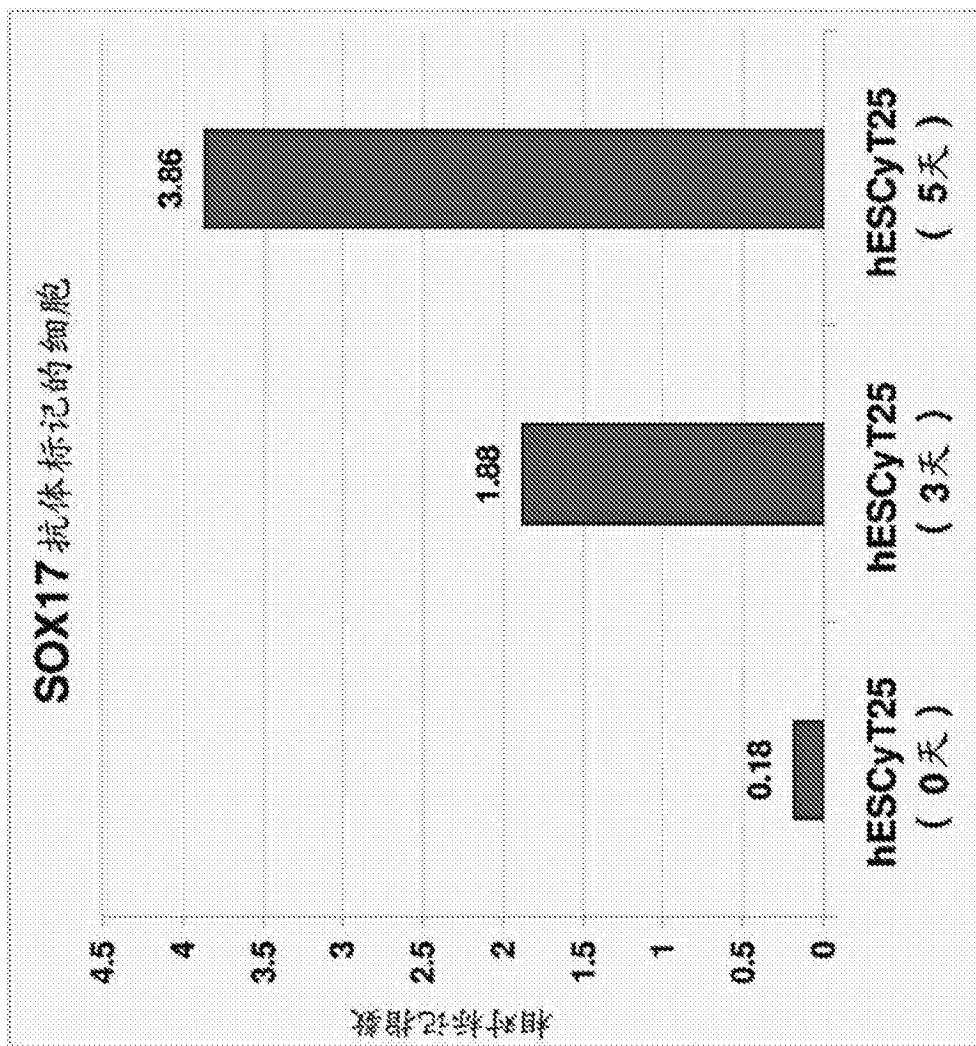


图20

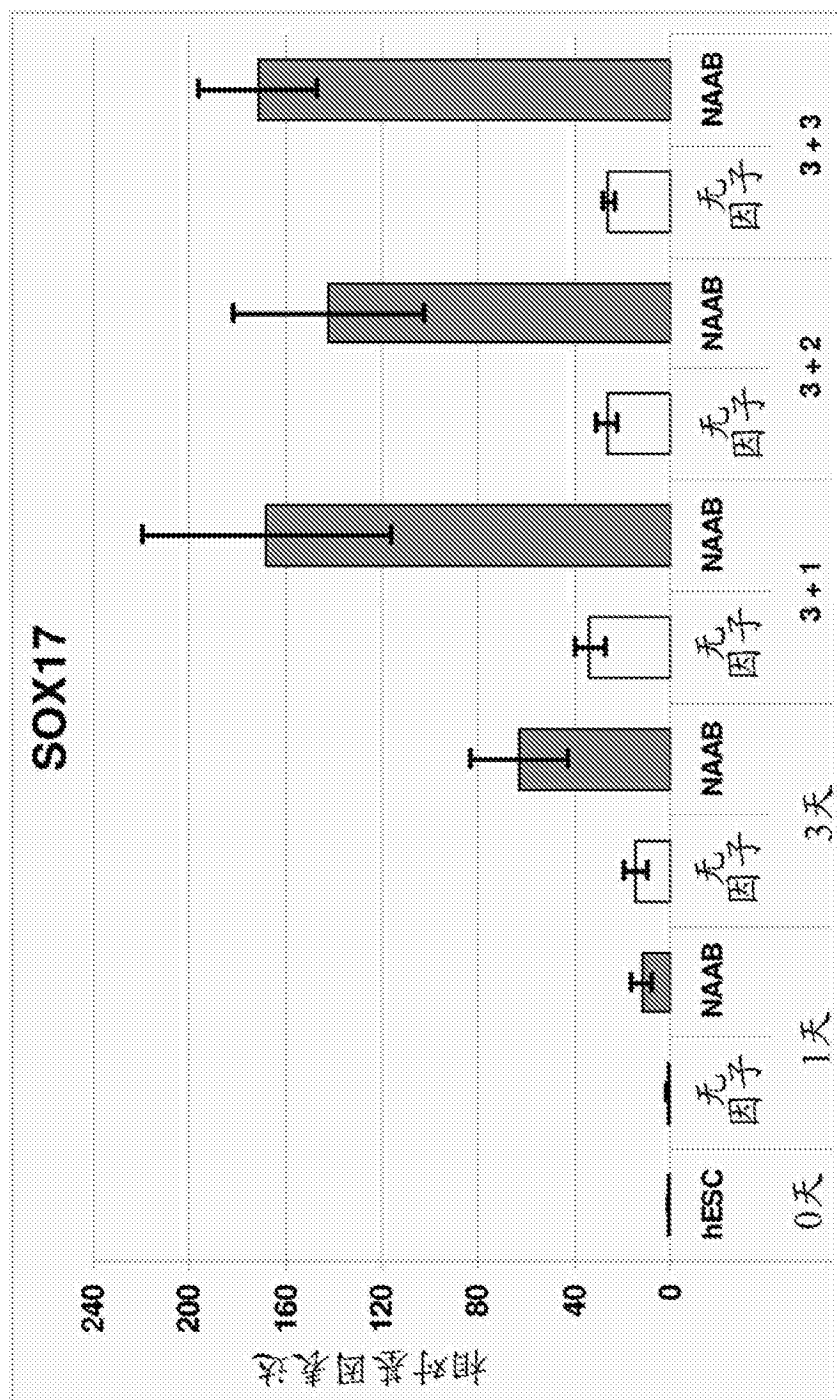


图21

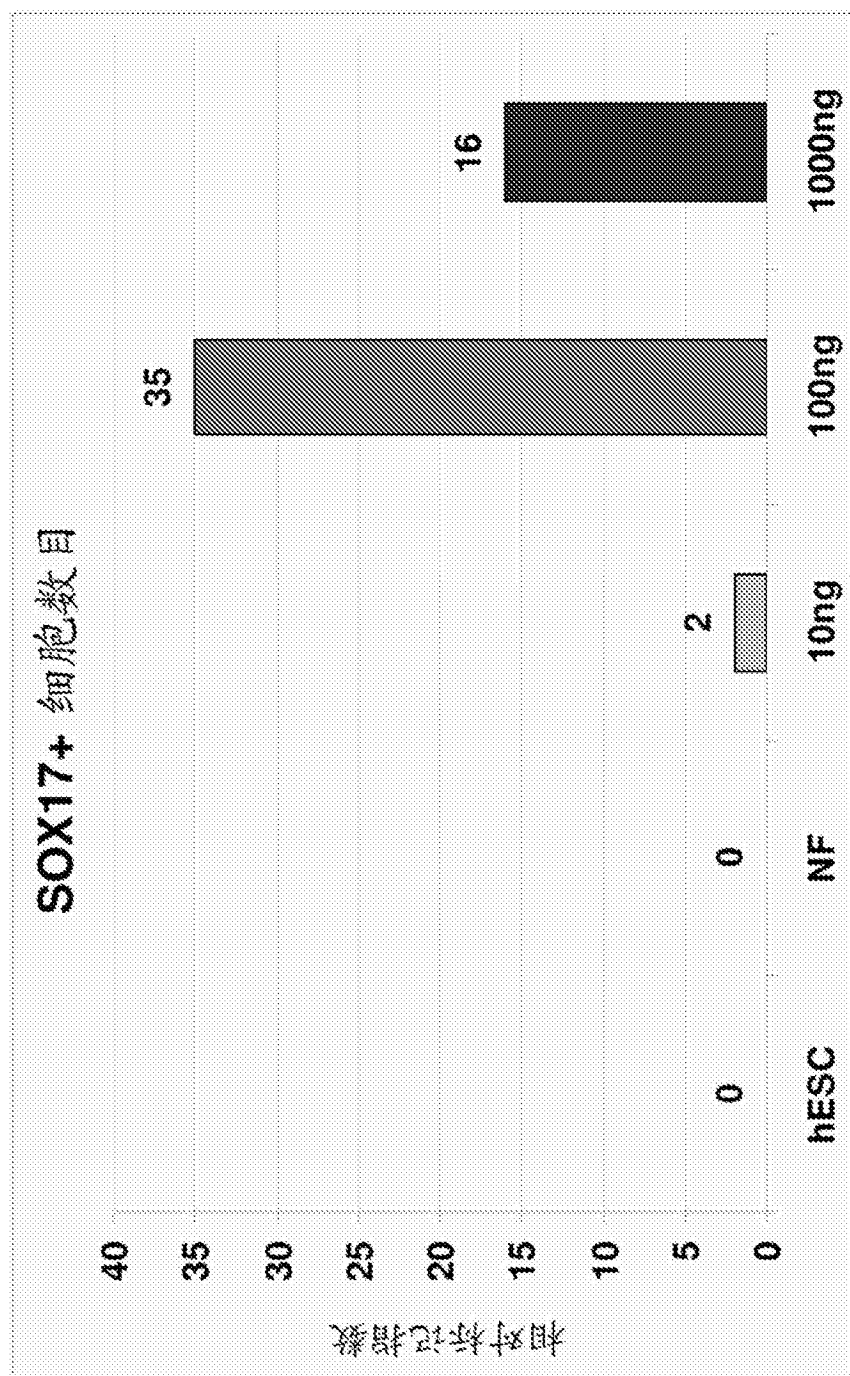


图22

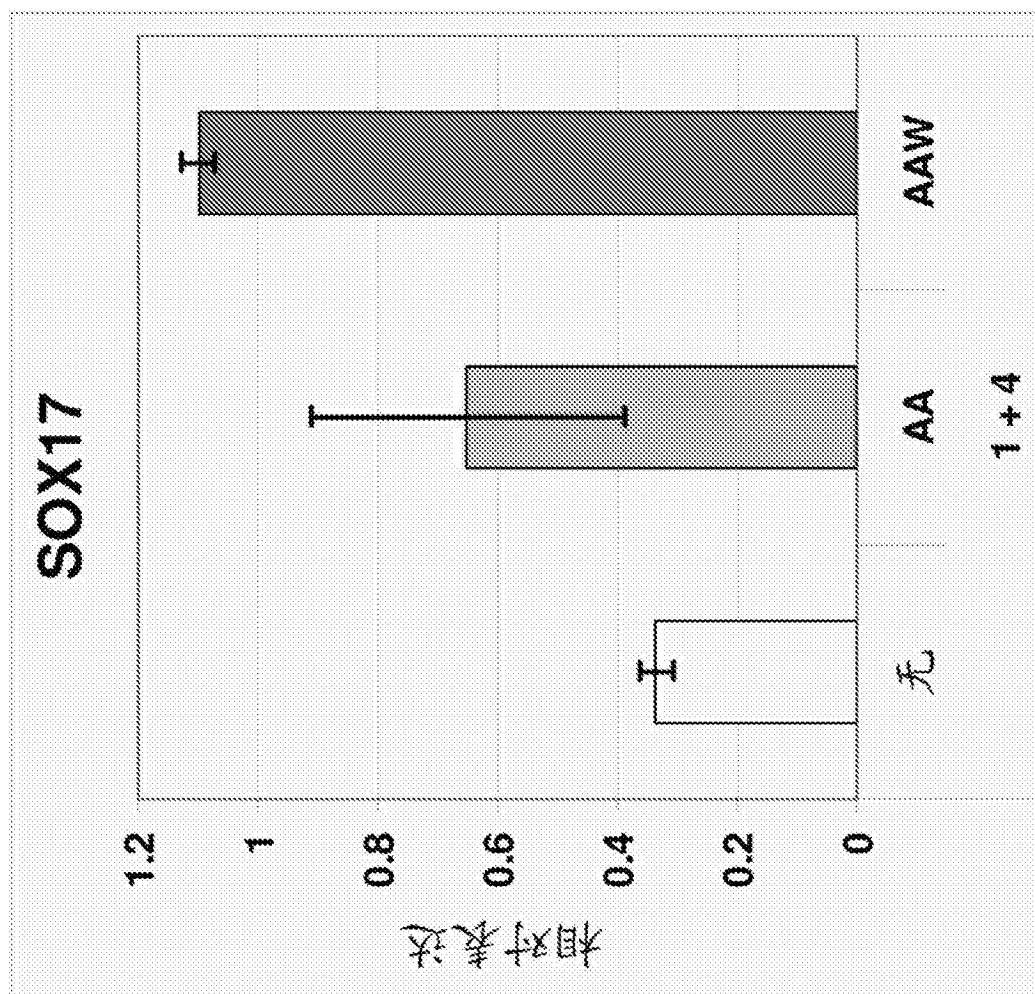


图23

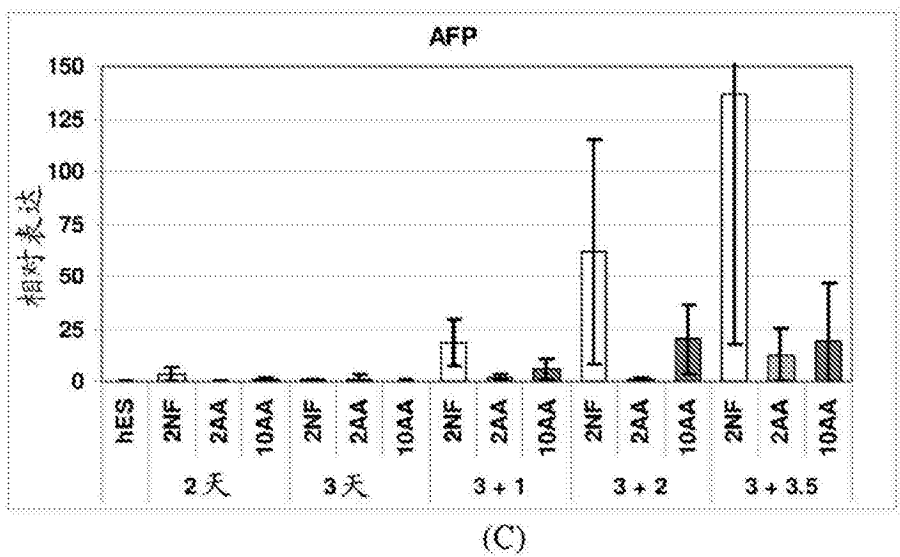
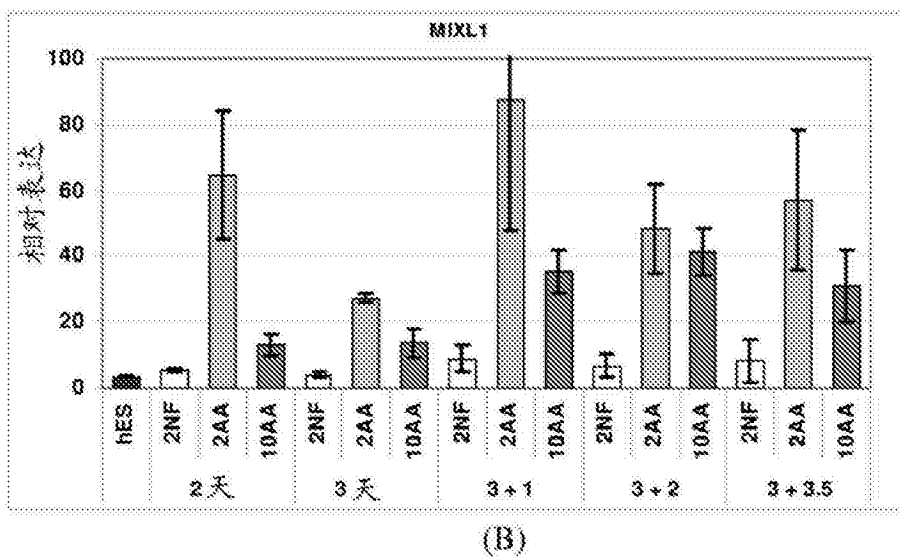
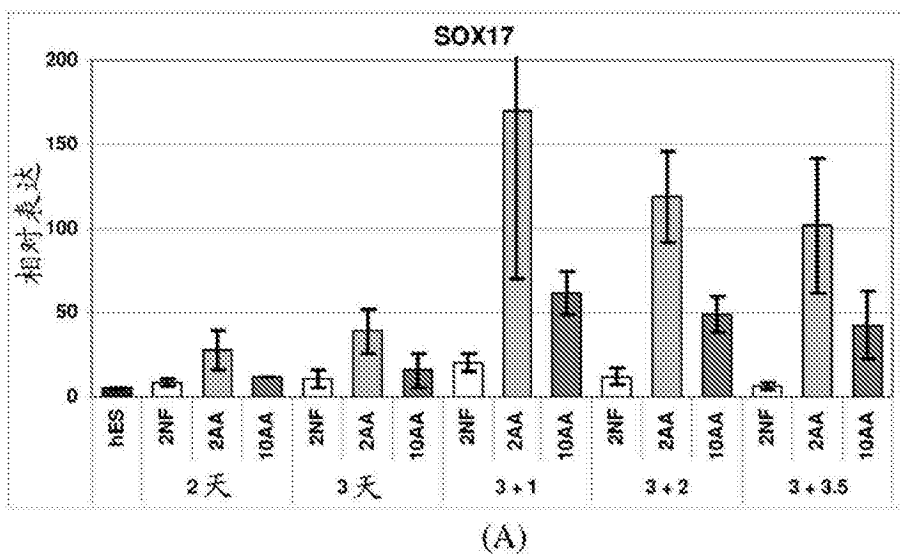


图24

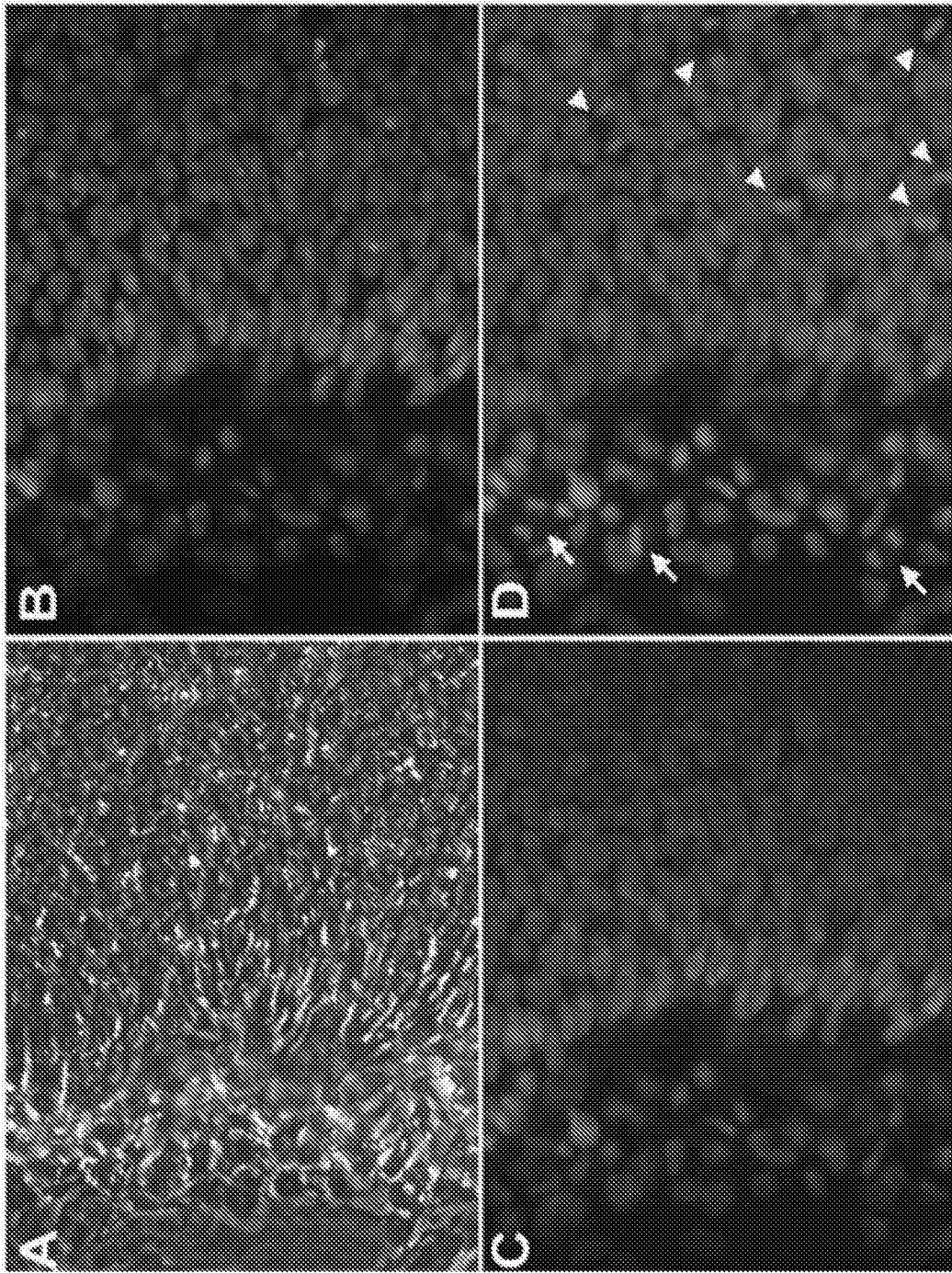


图25

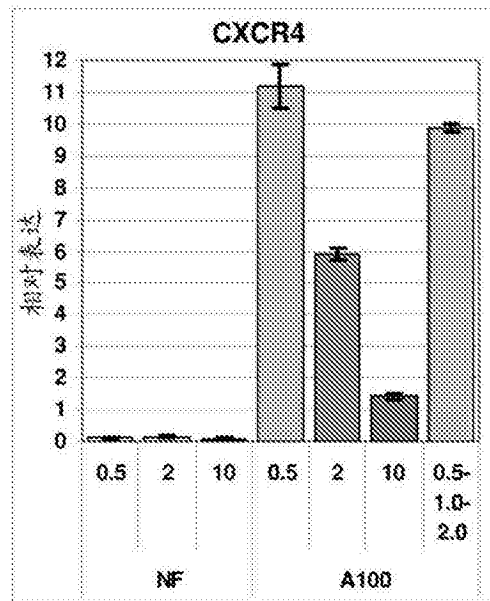


图26

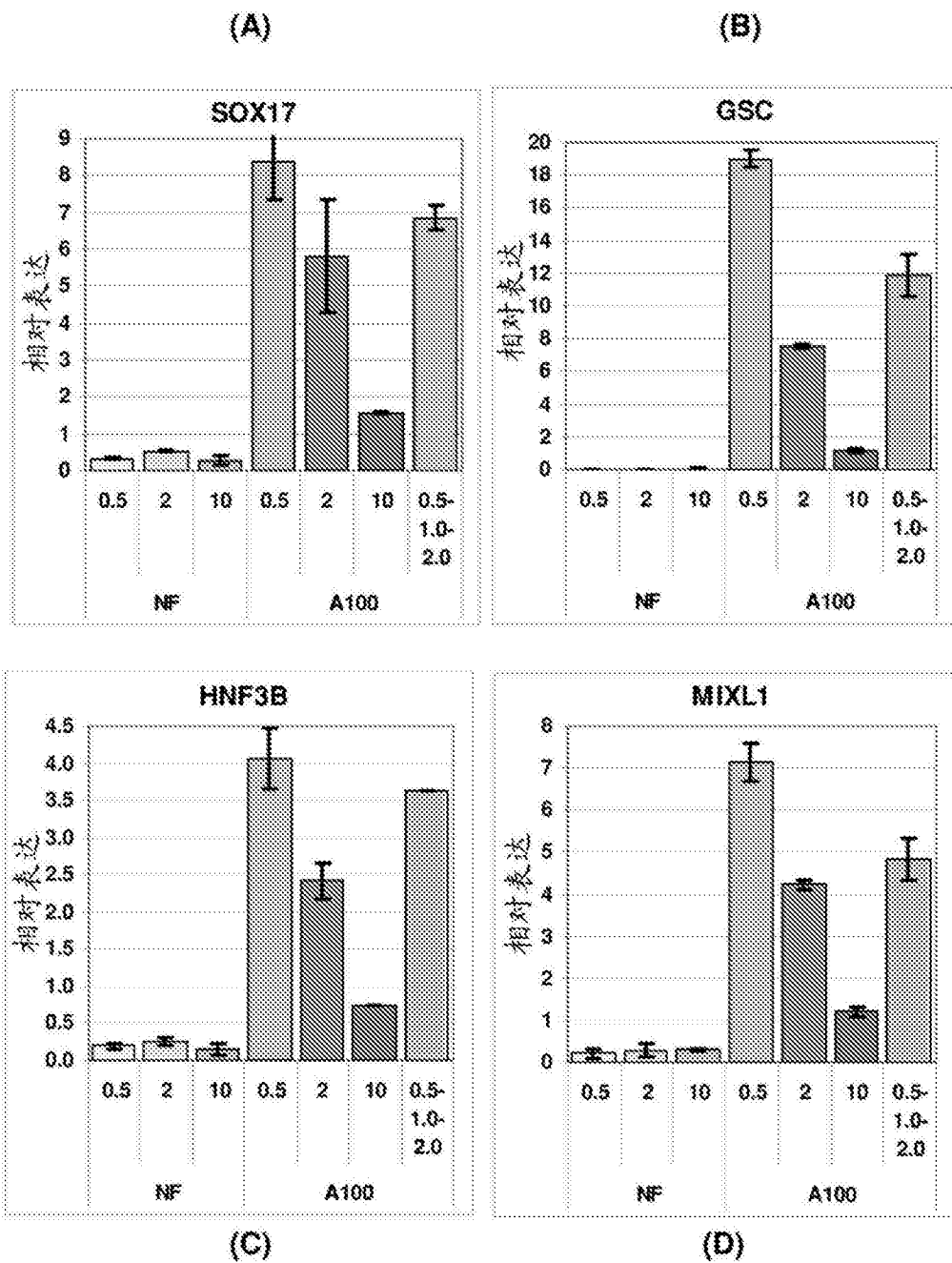


图27

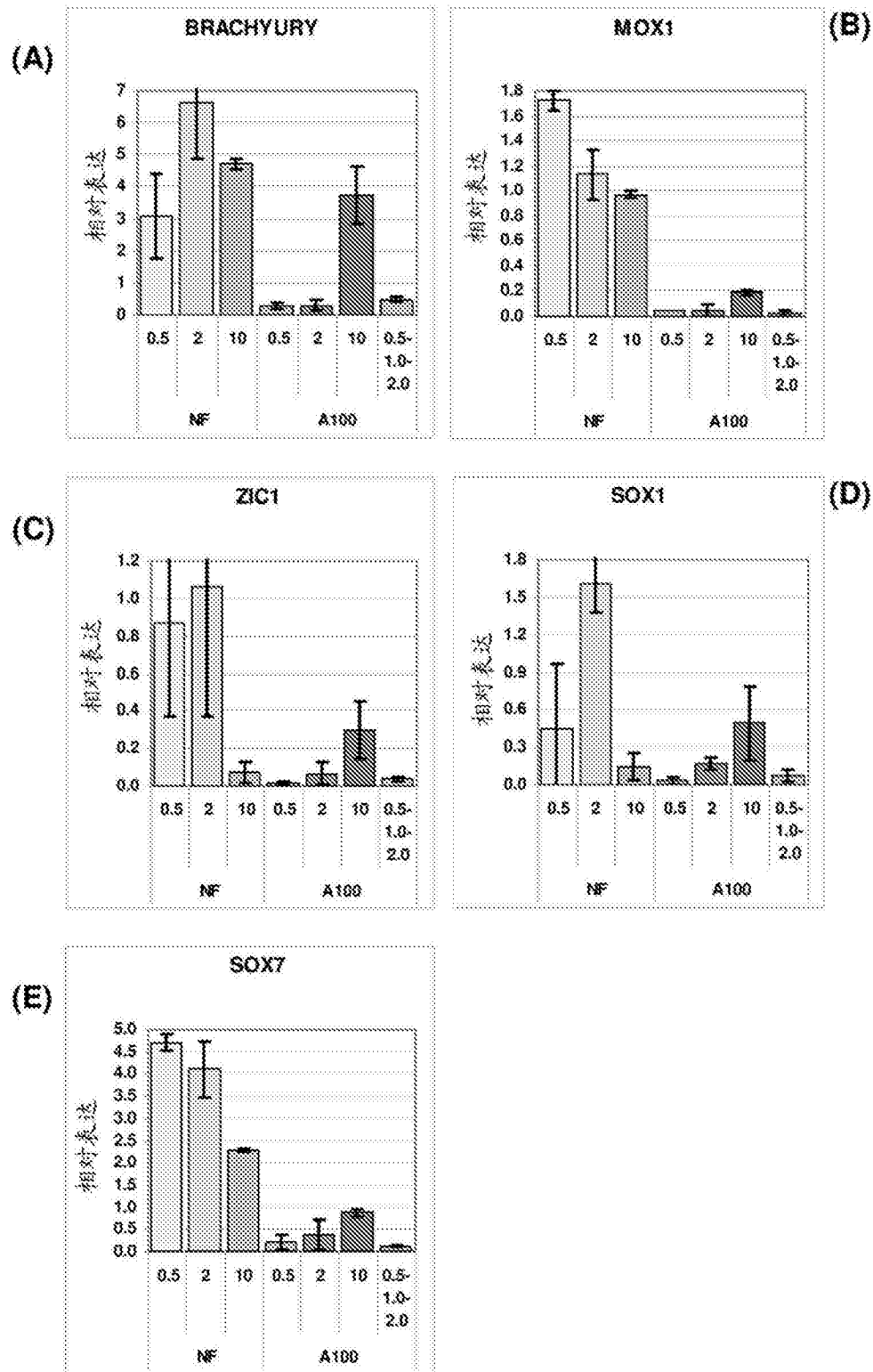


图28

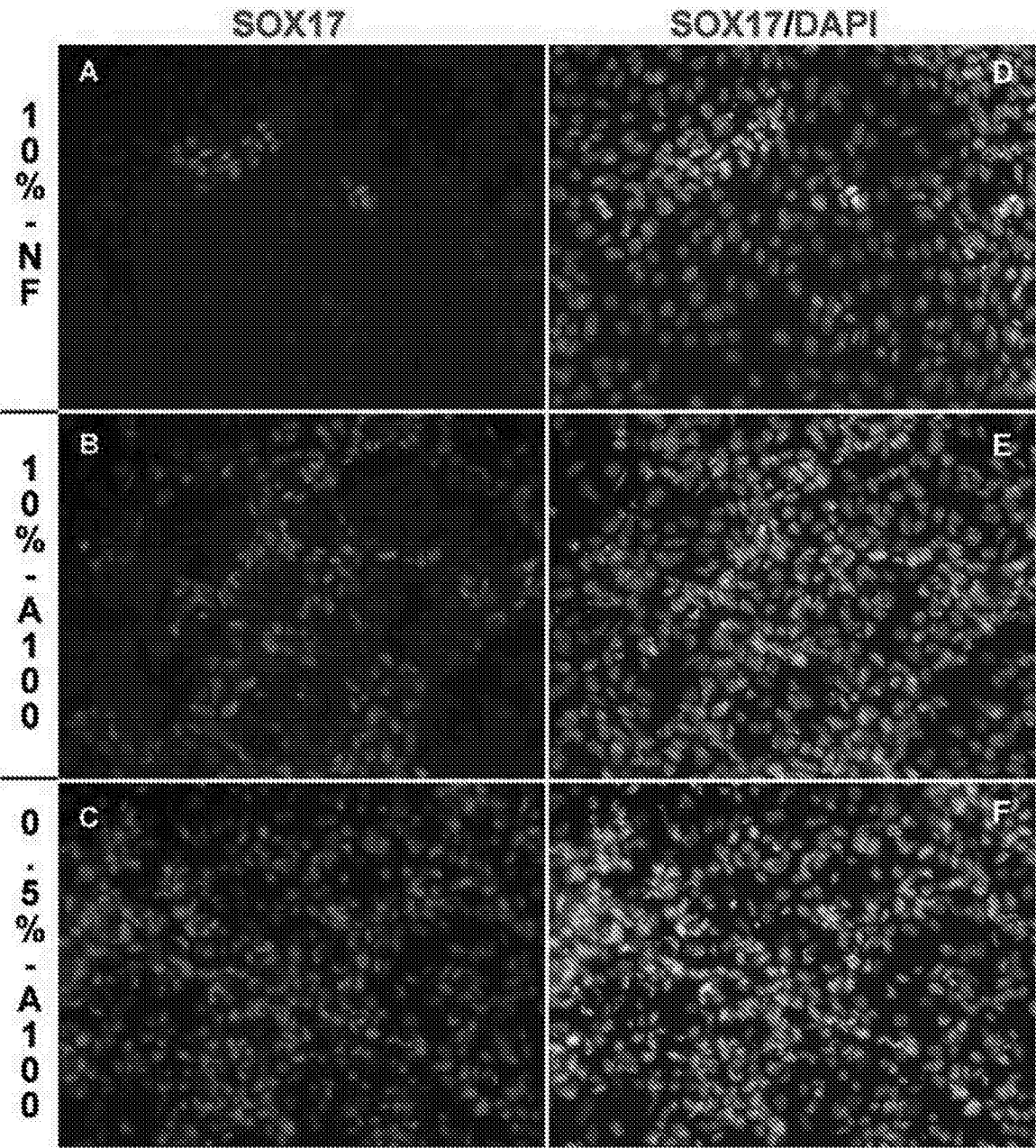


图29

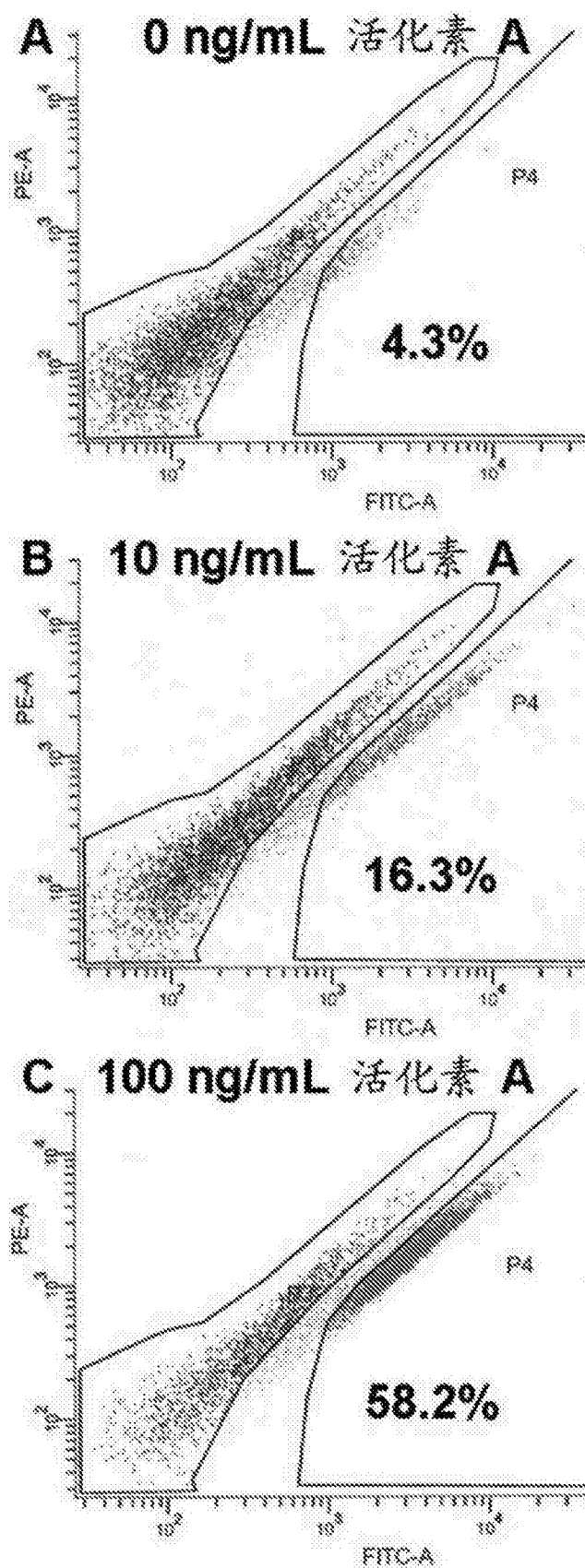


图30

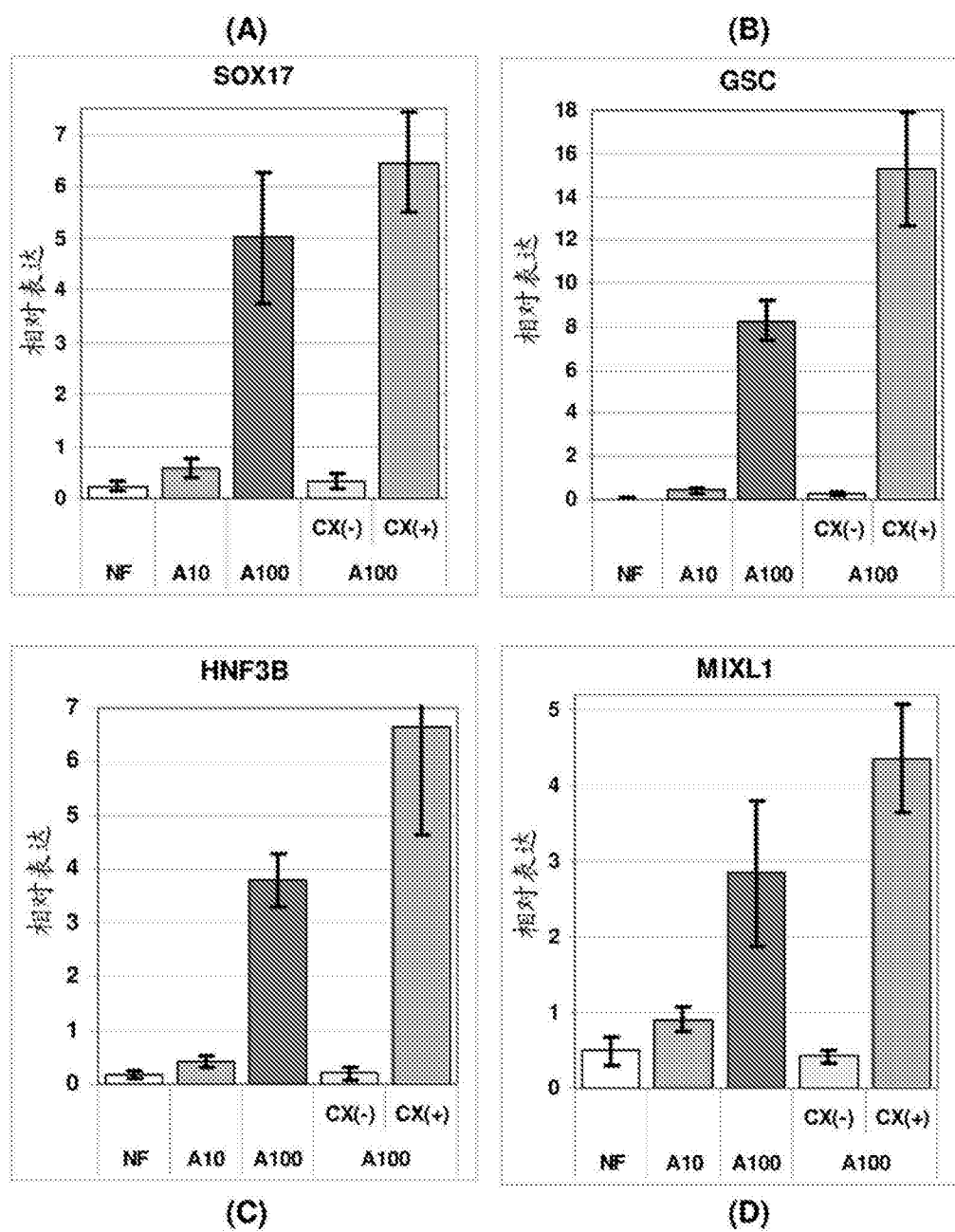


图31

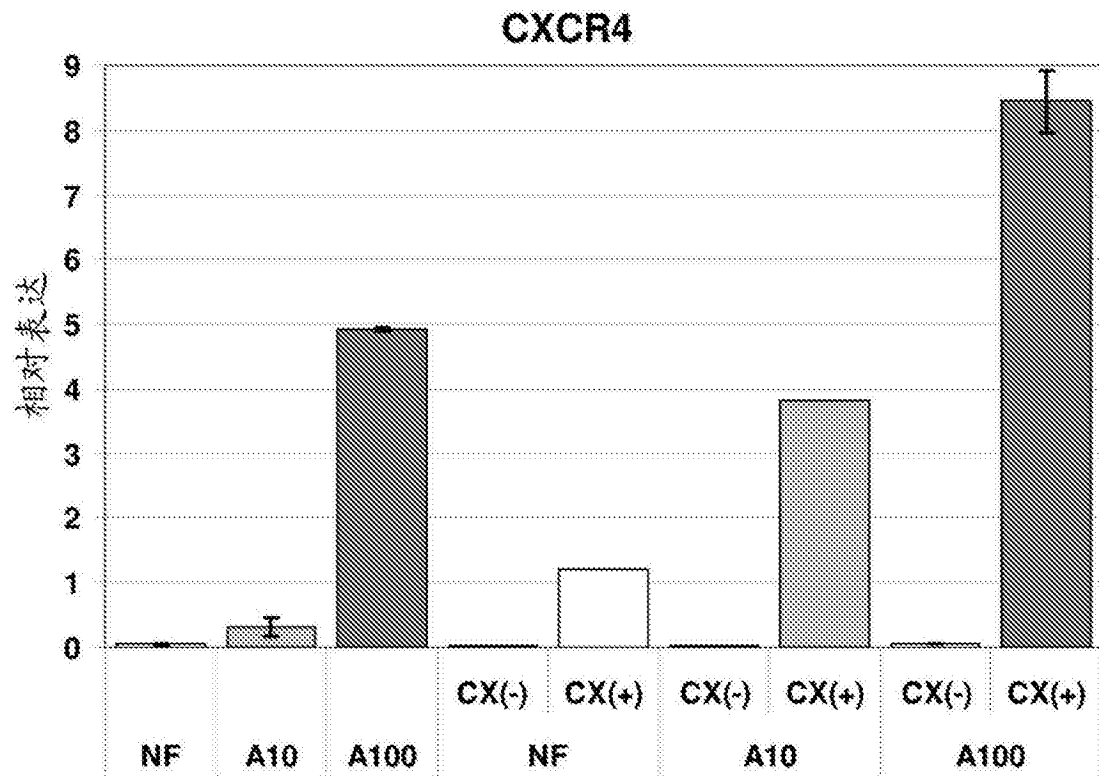


图32

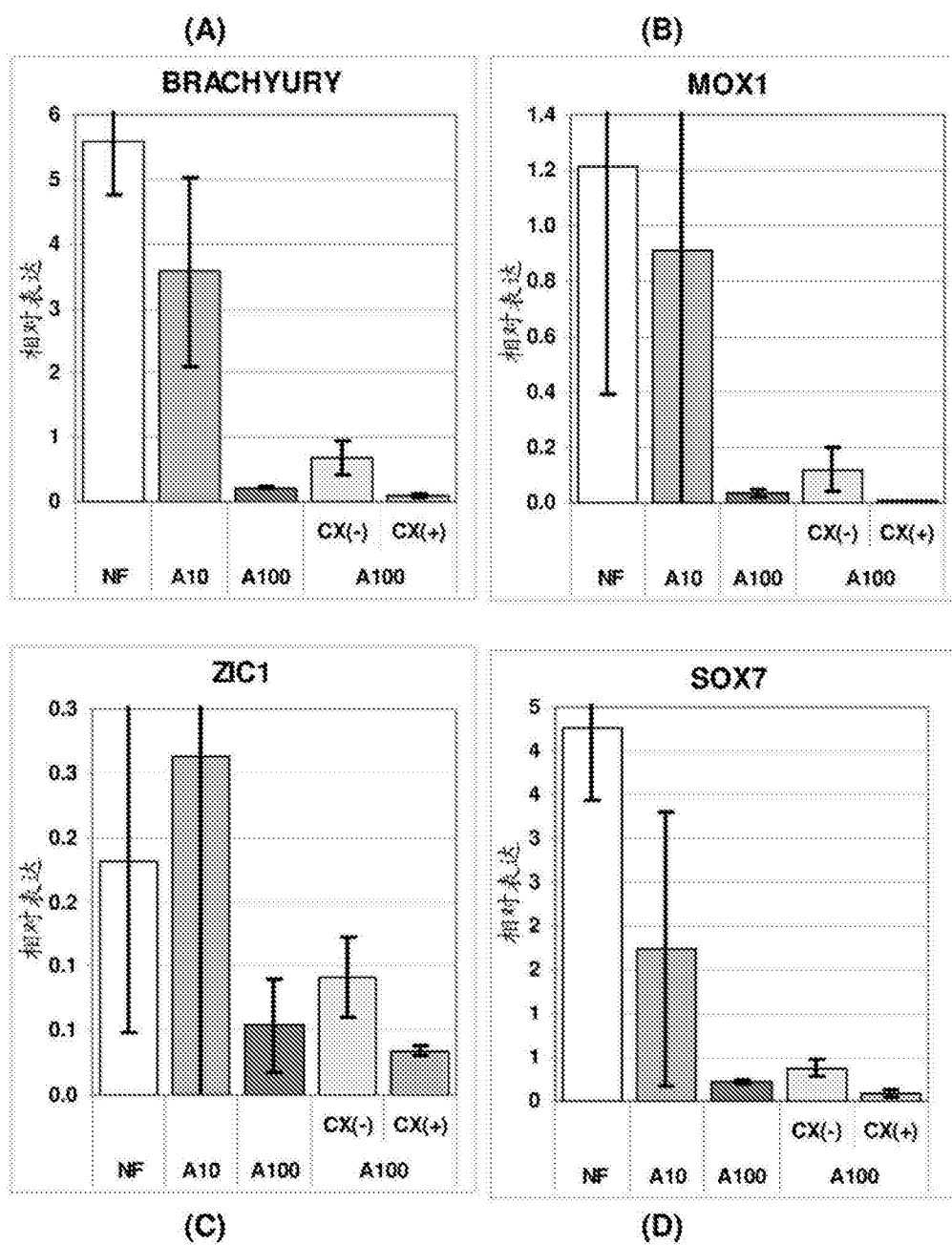


图33

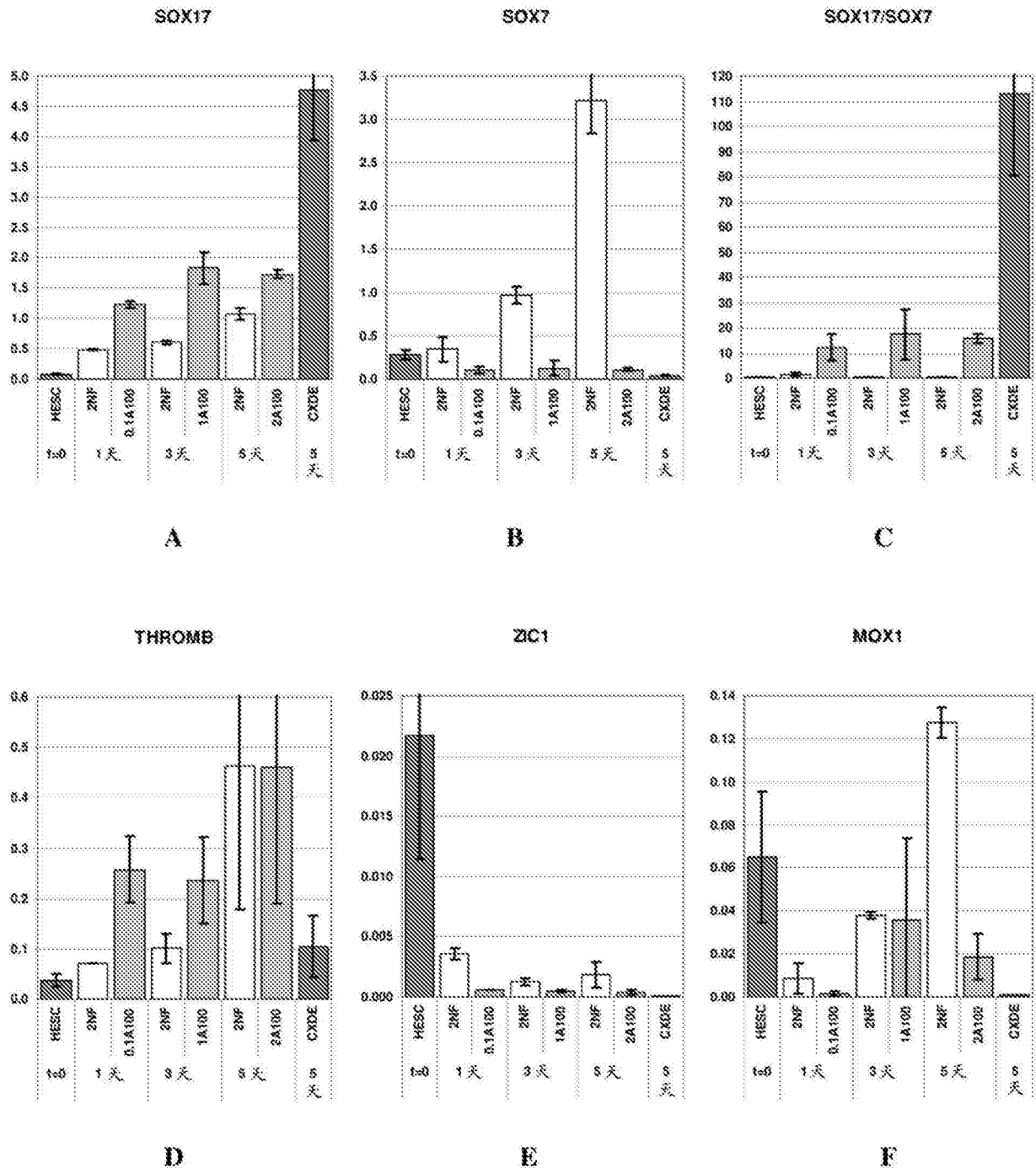


图34

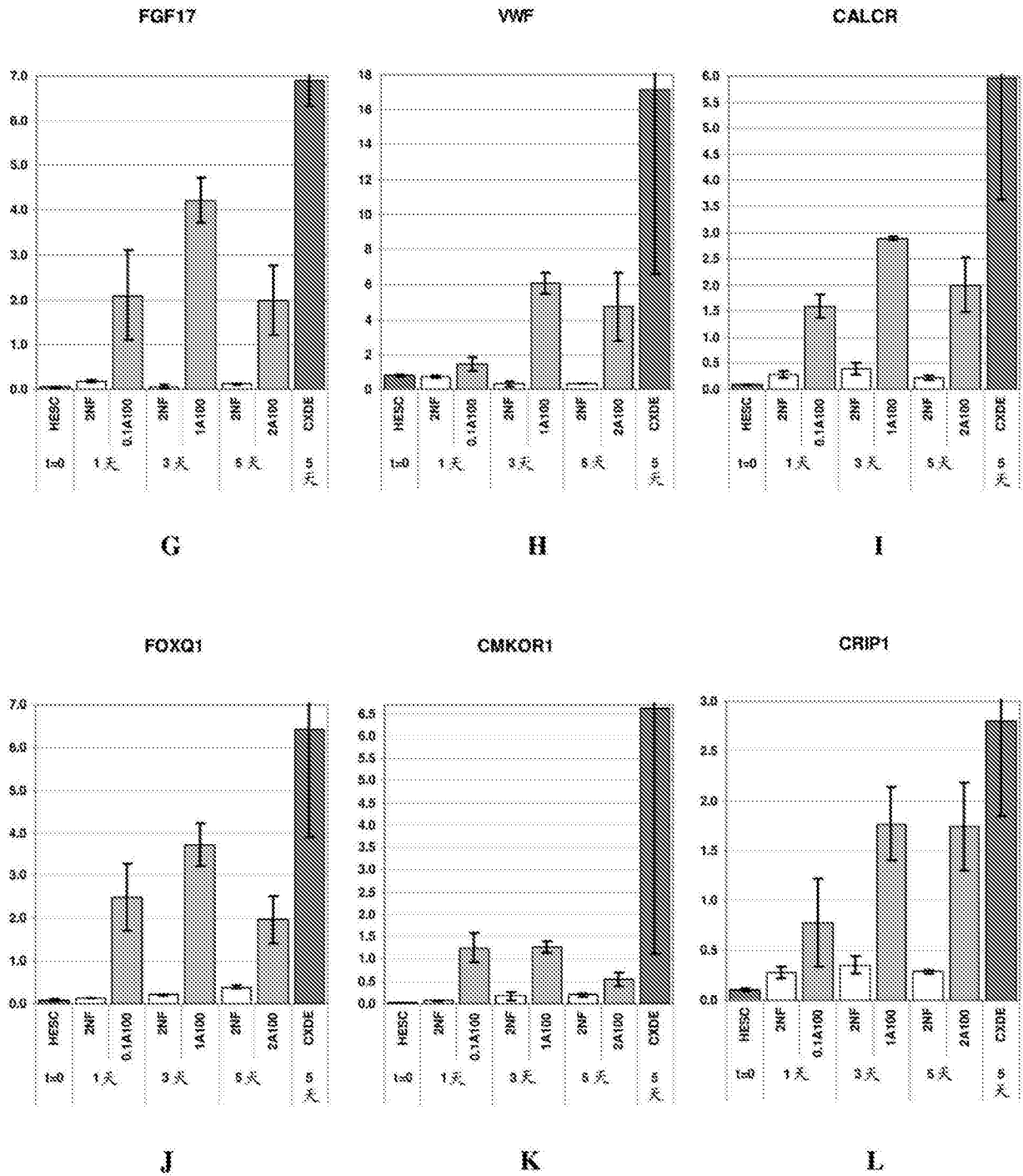


图34

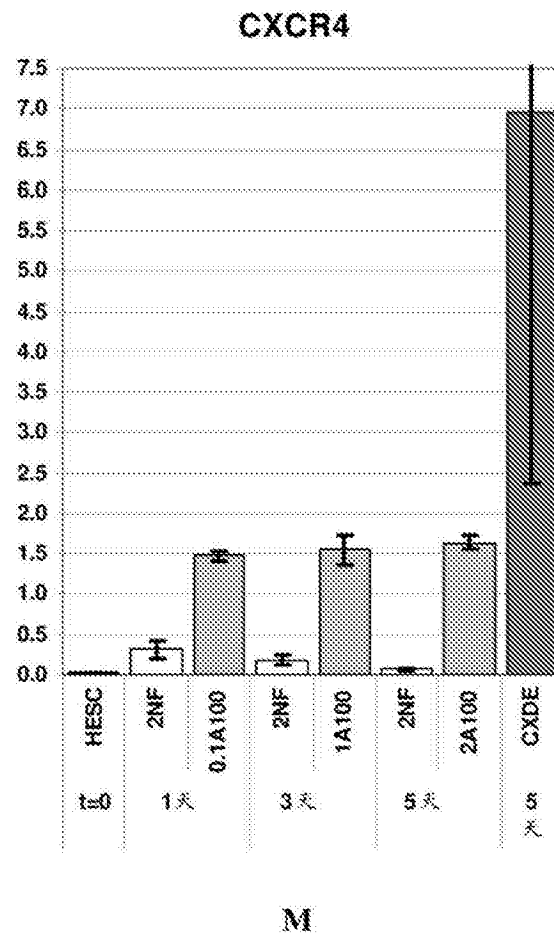


图34

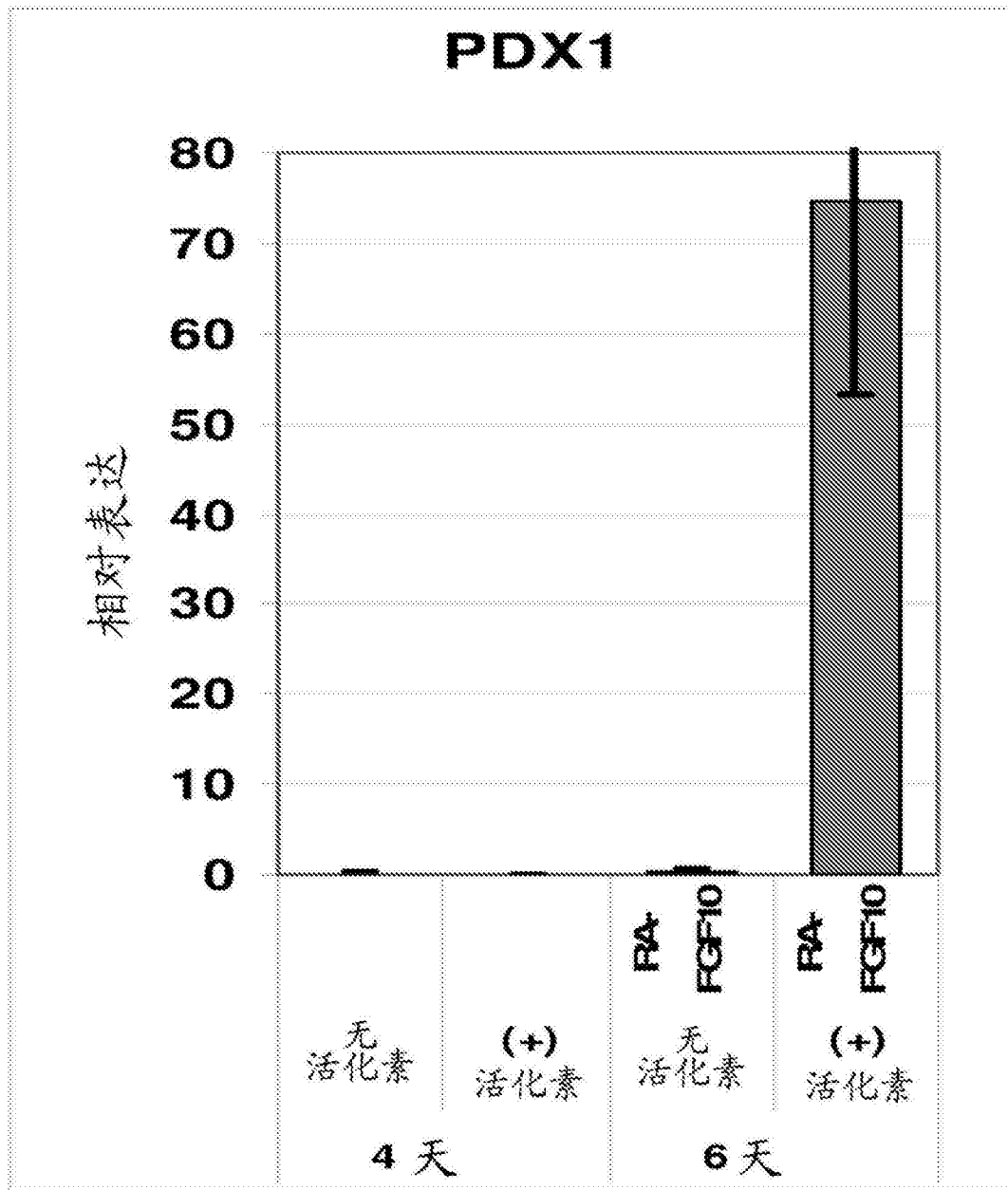


图35

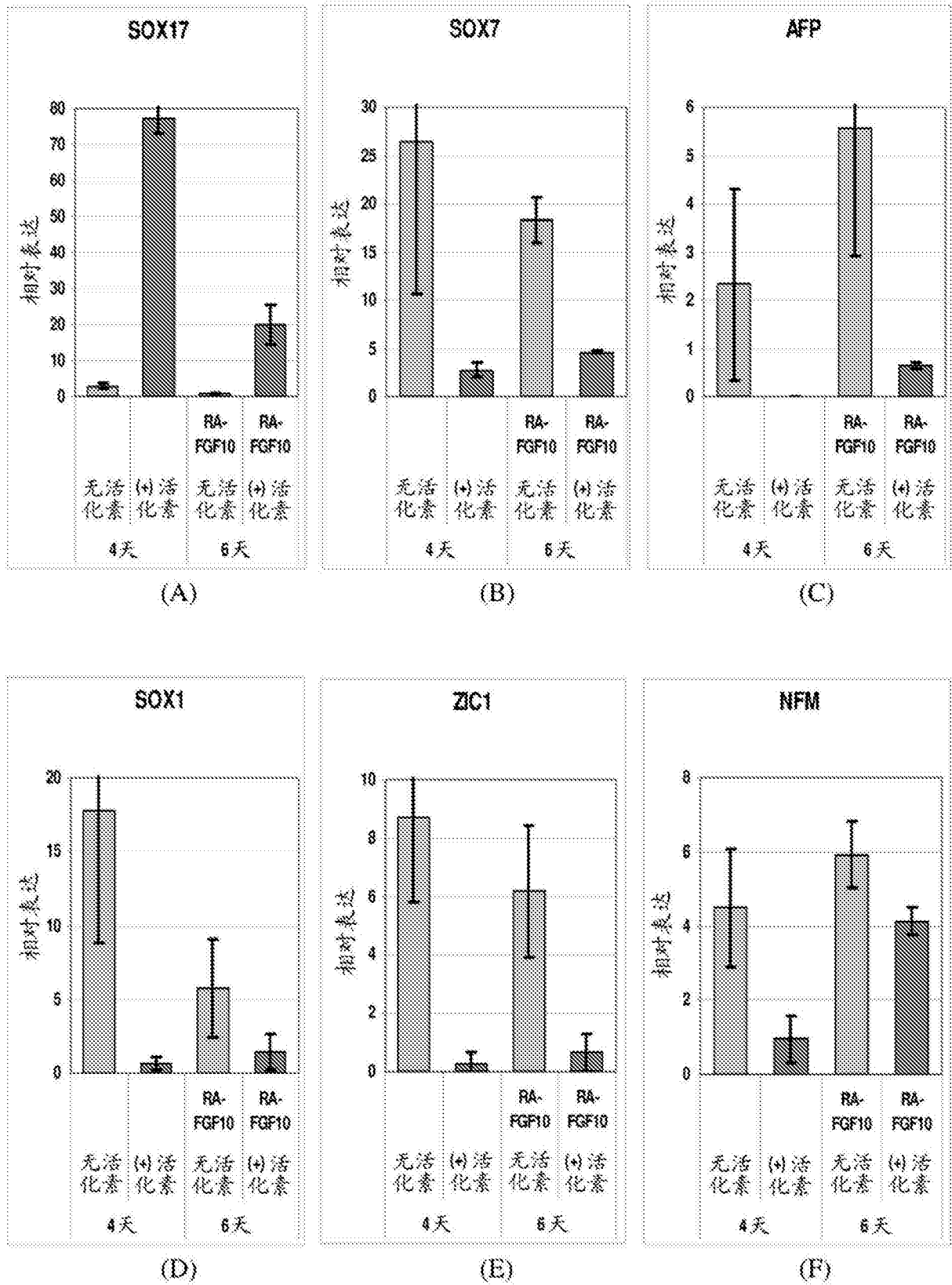


图36

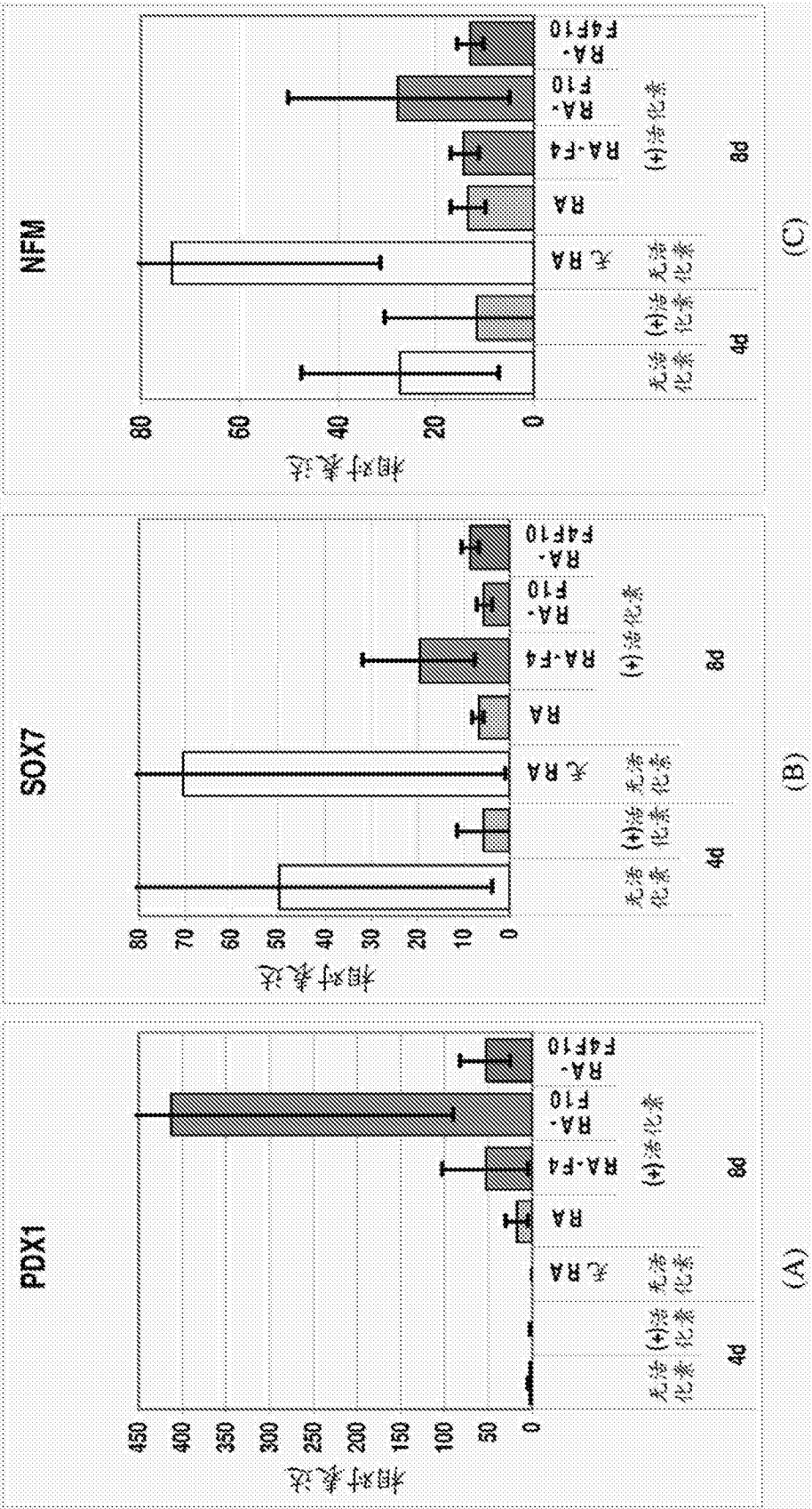


图37

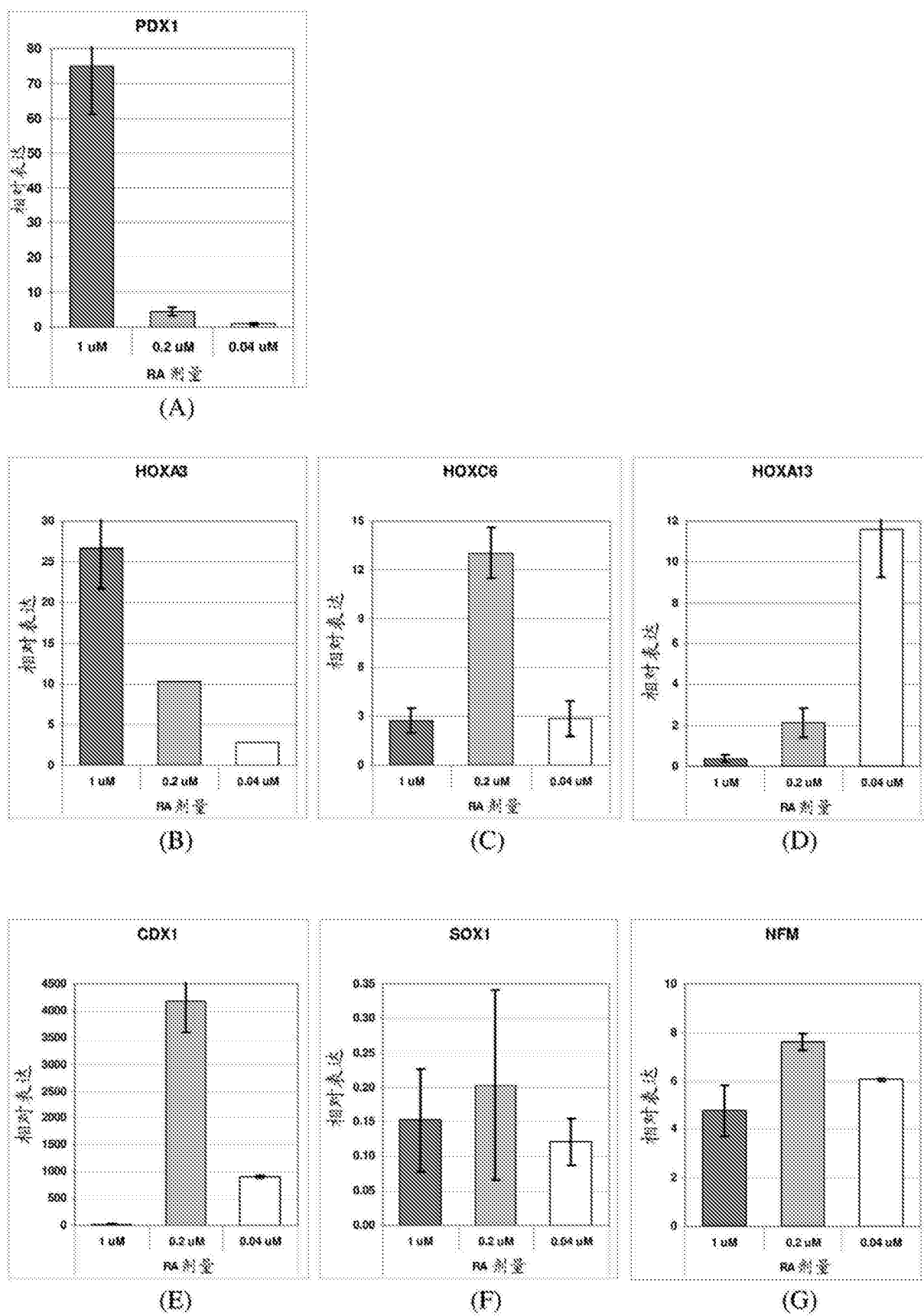


图38

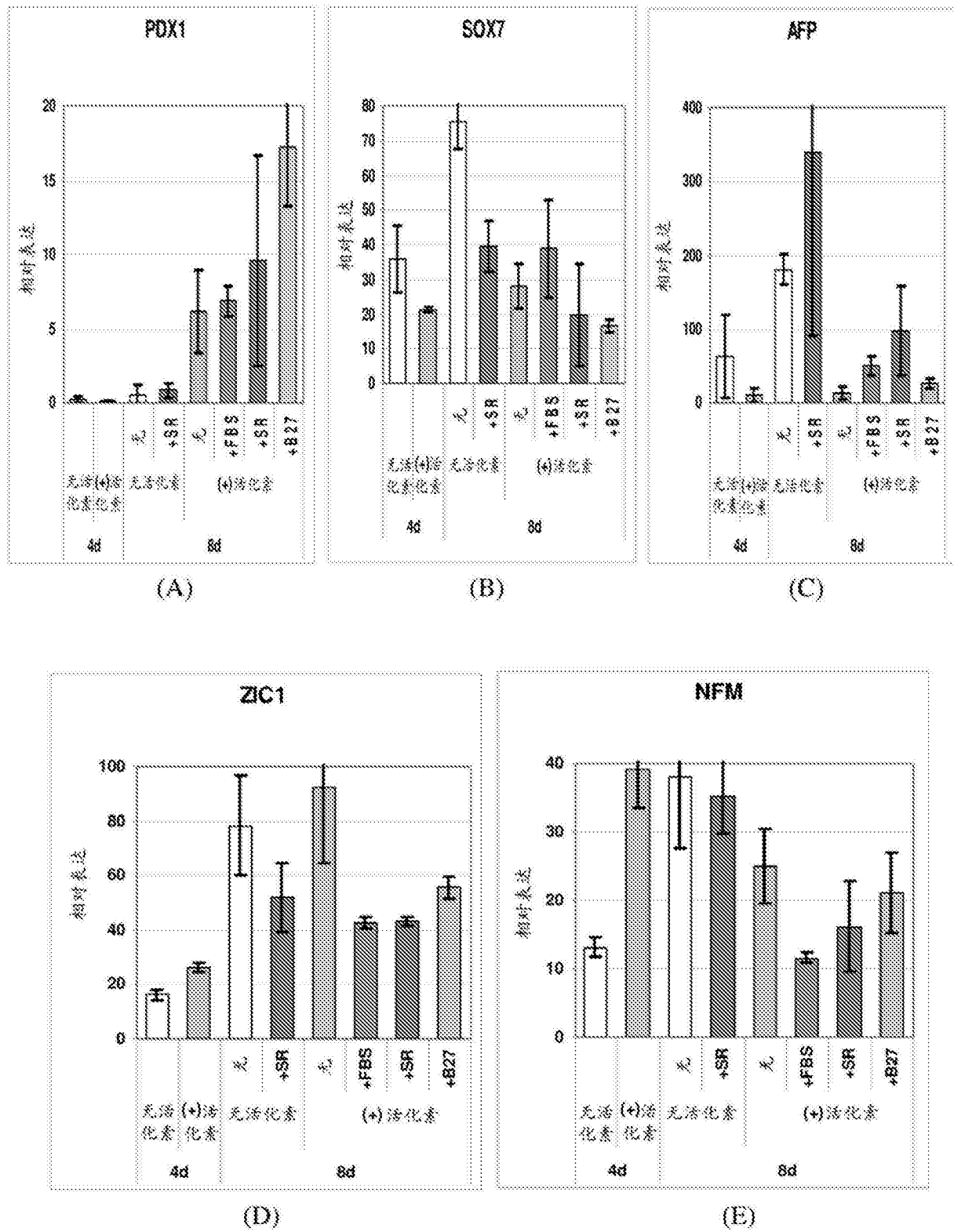
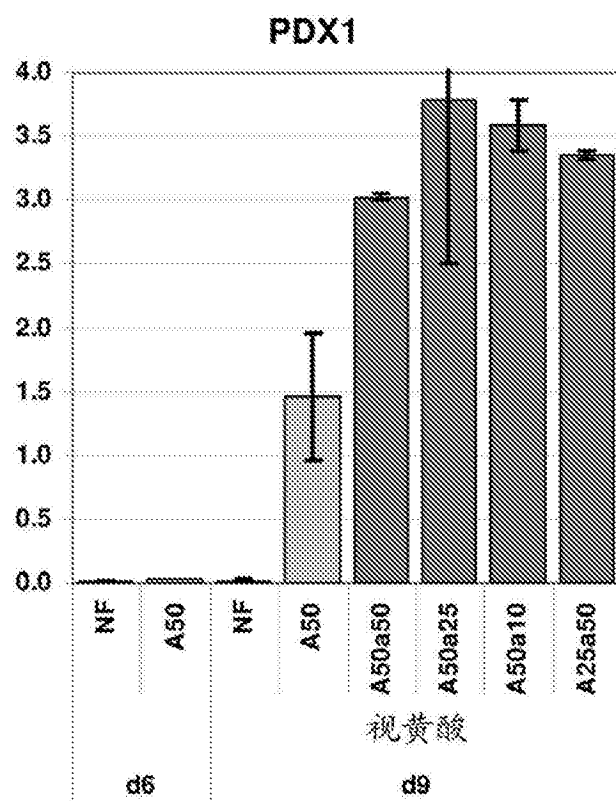
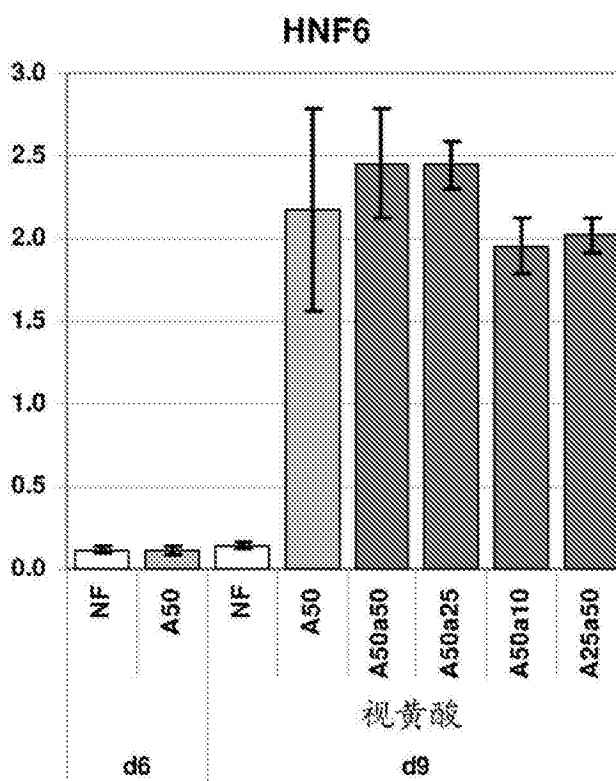


图39



(A)



(B)

图40

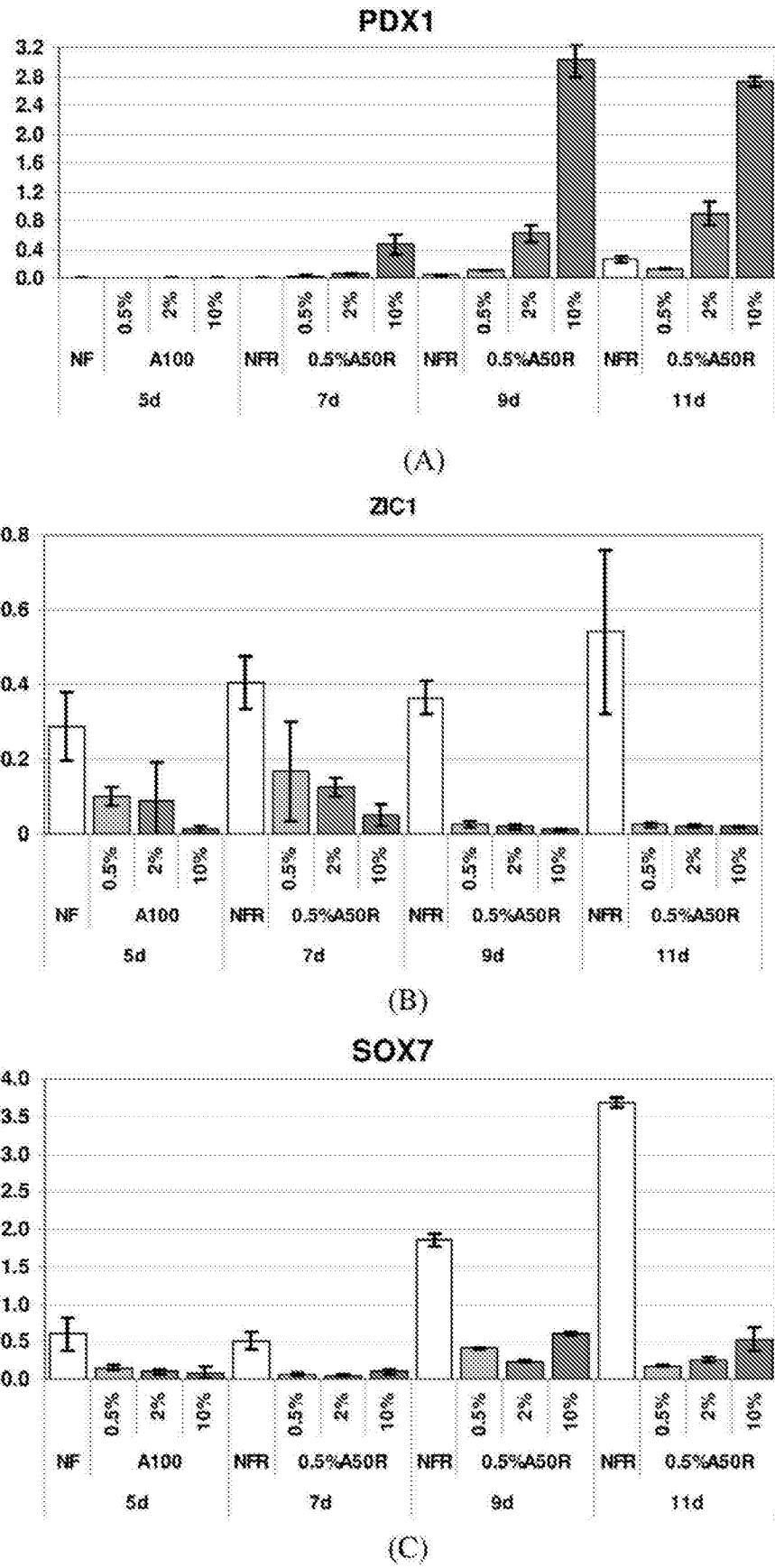
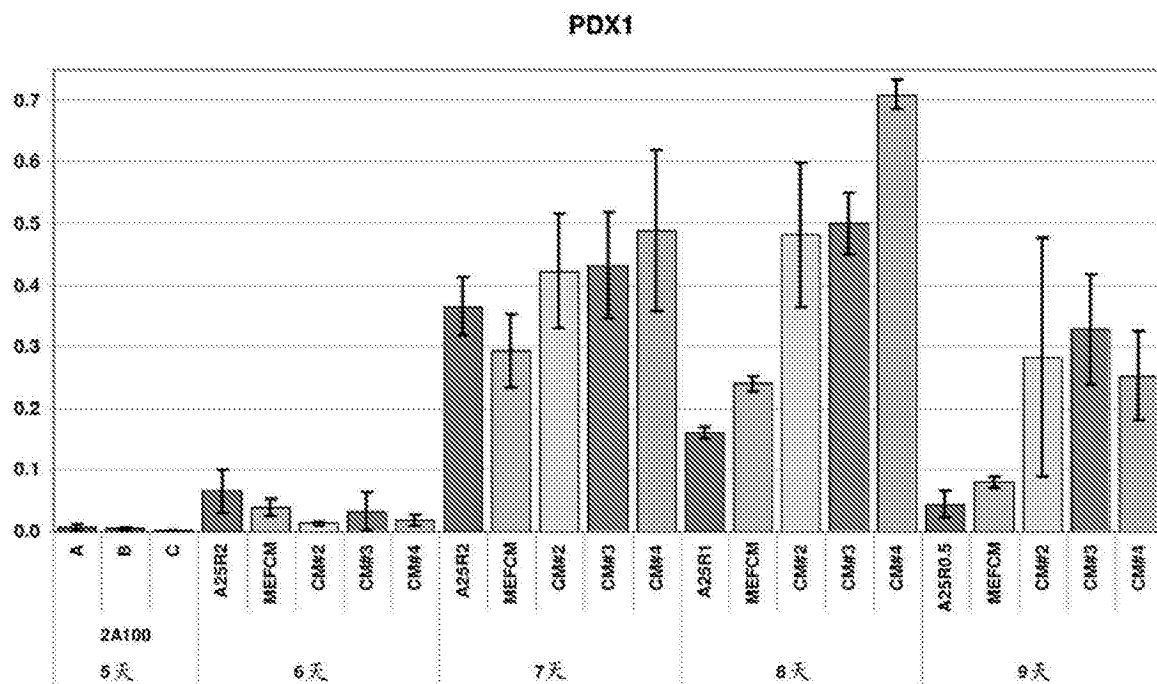
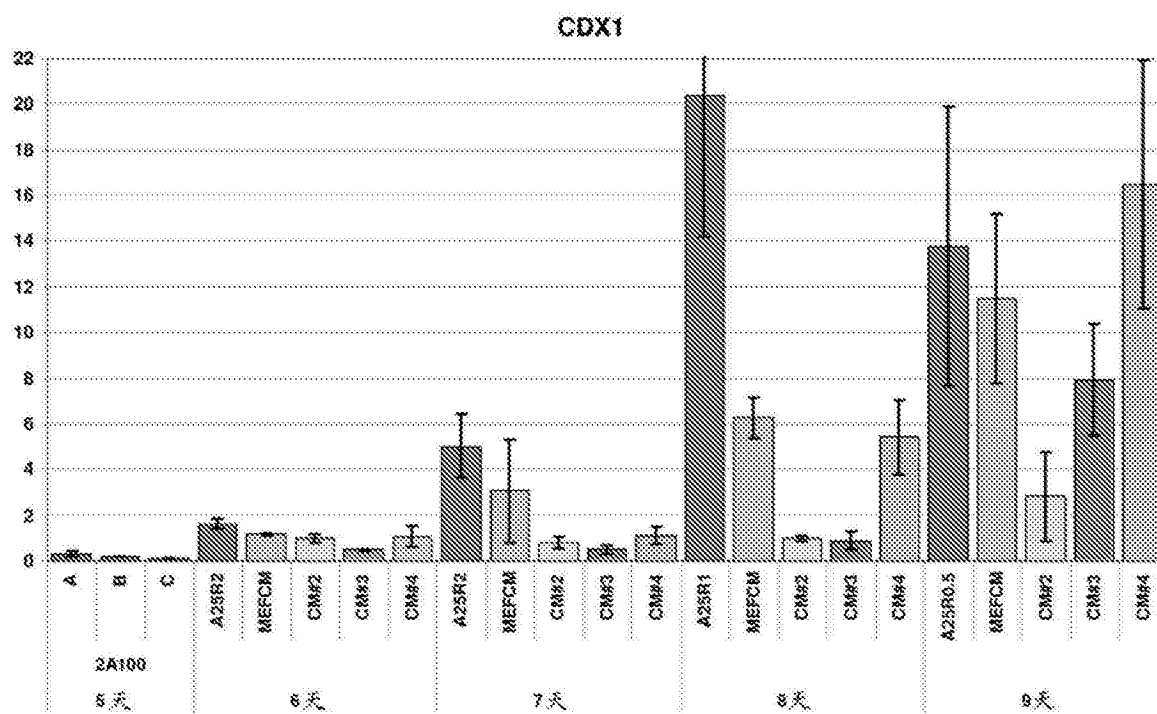


图41



(A)



(B)

图42

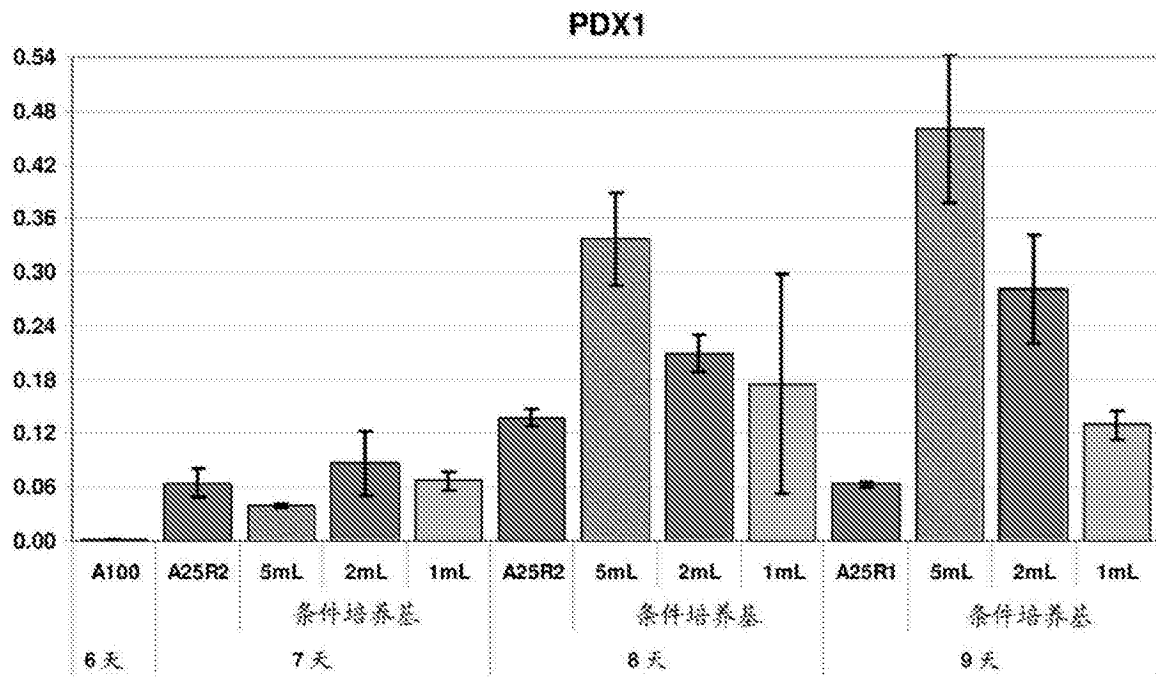


图43

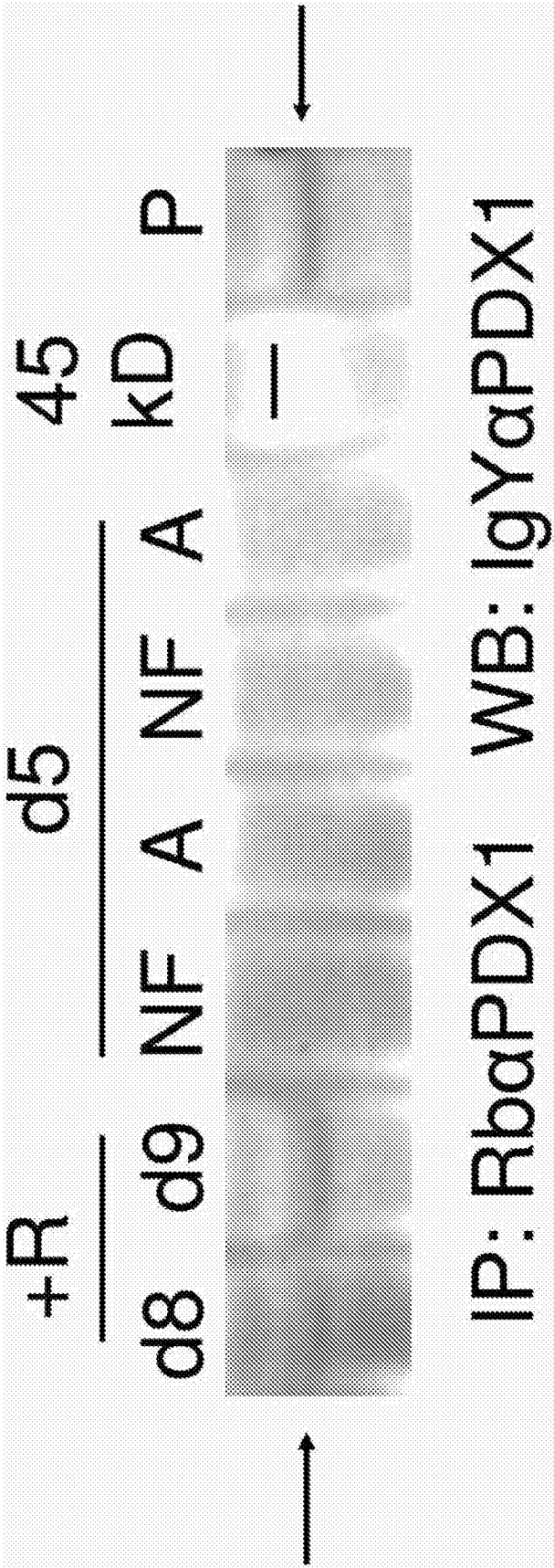


图44

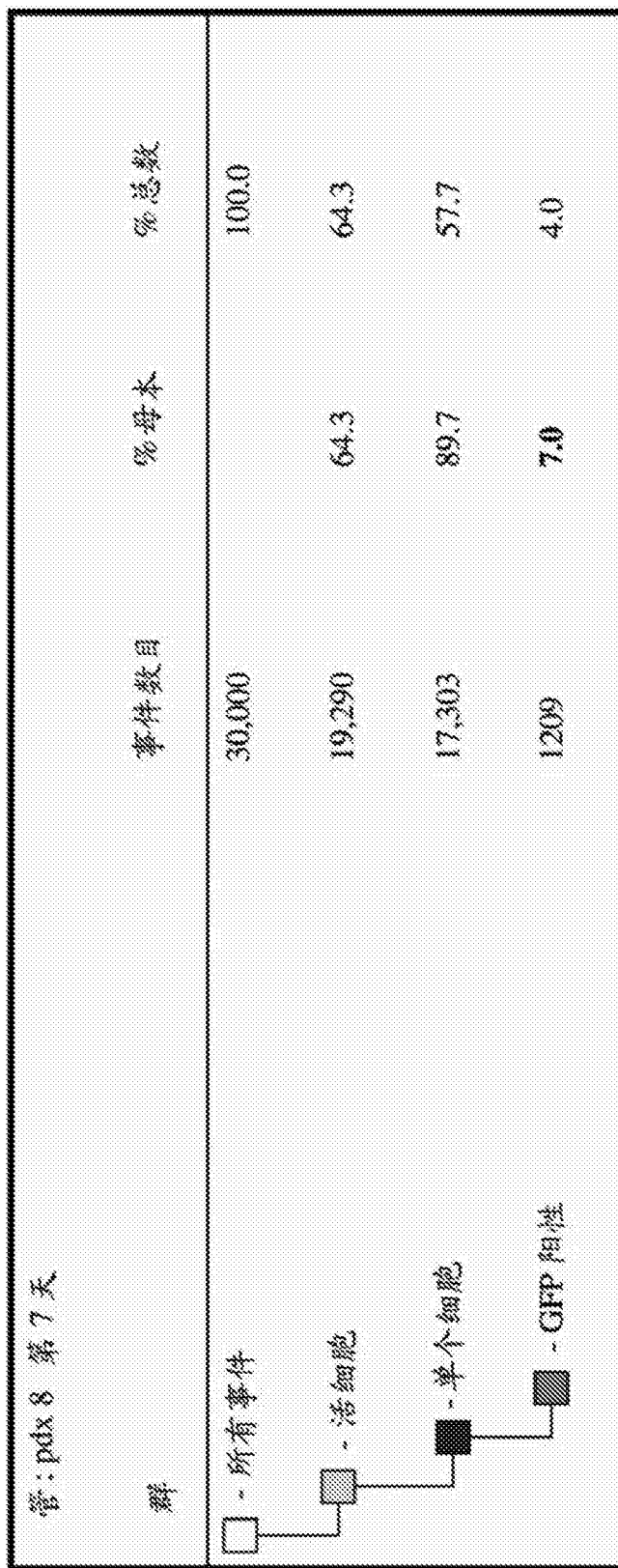


图45

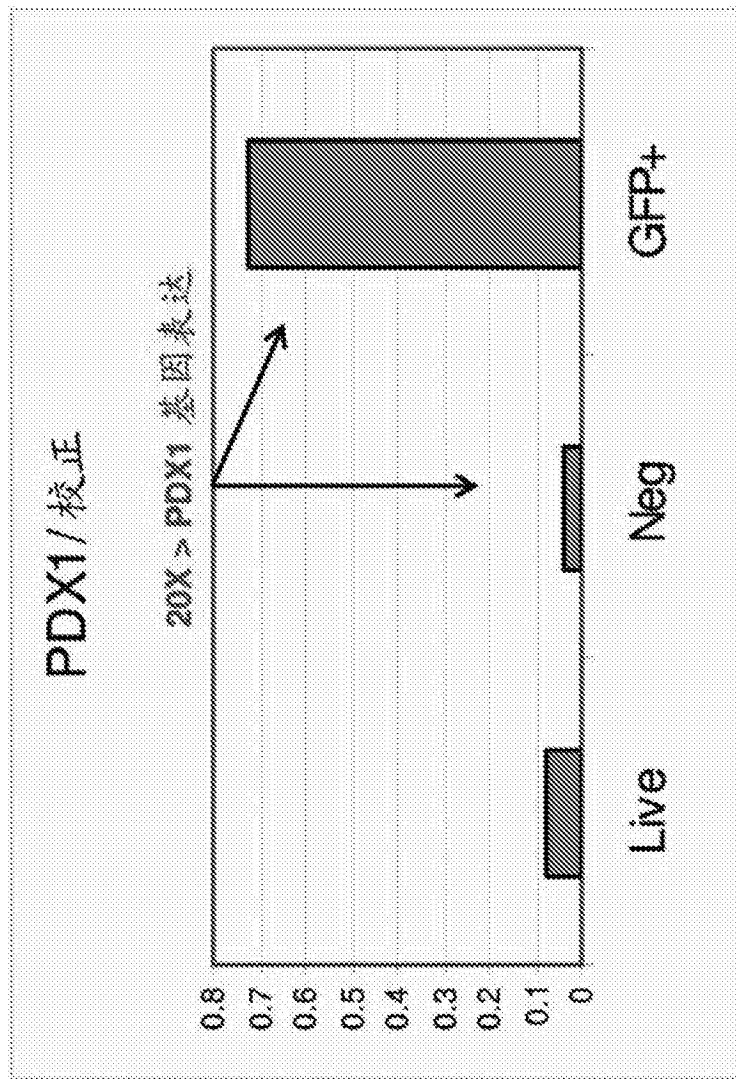


图46

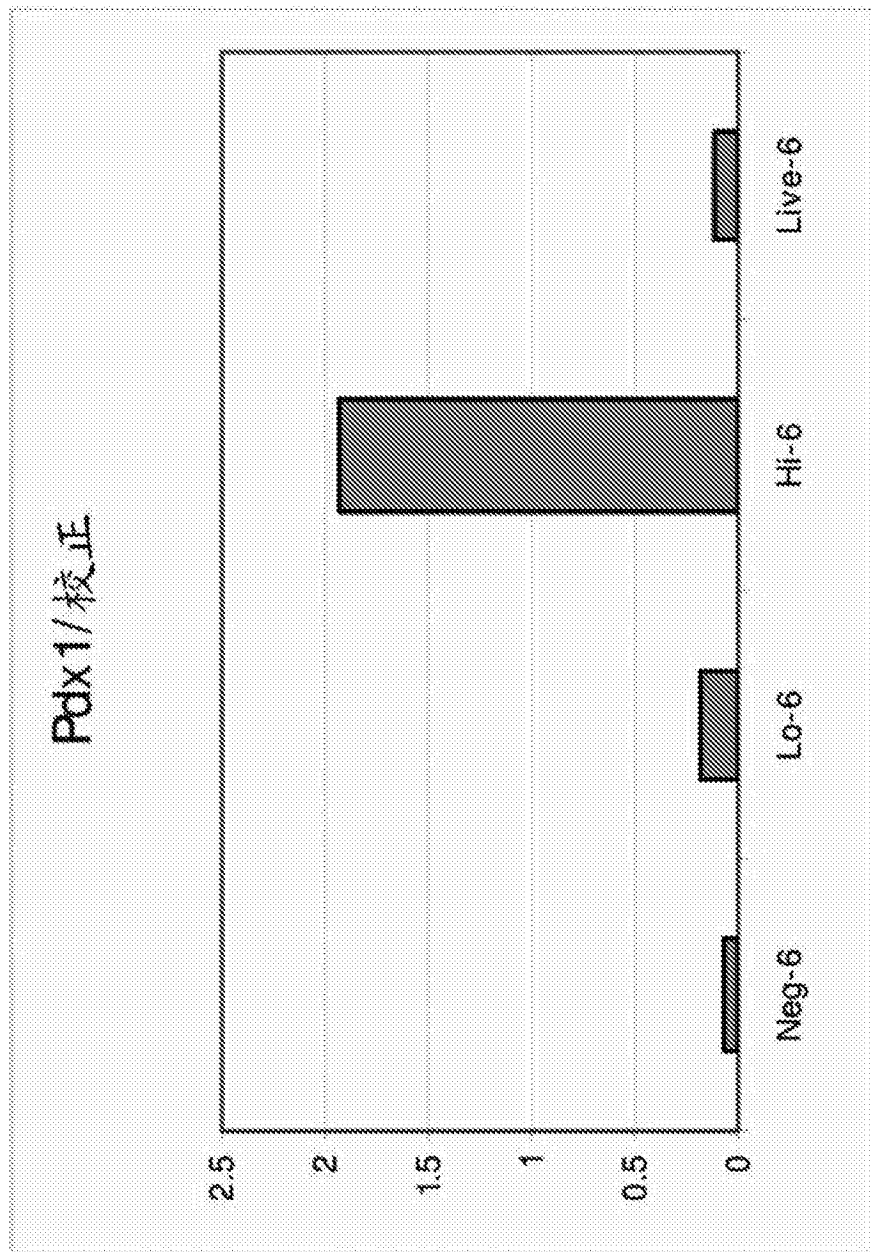


图47

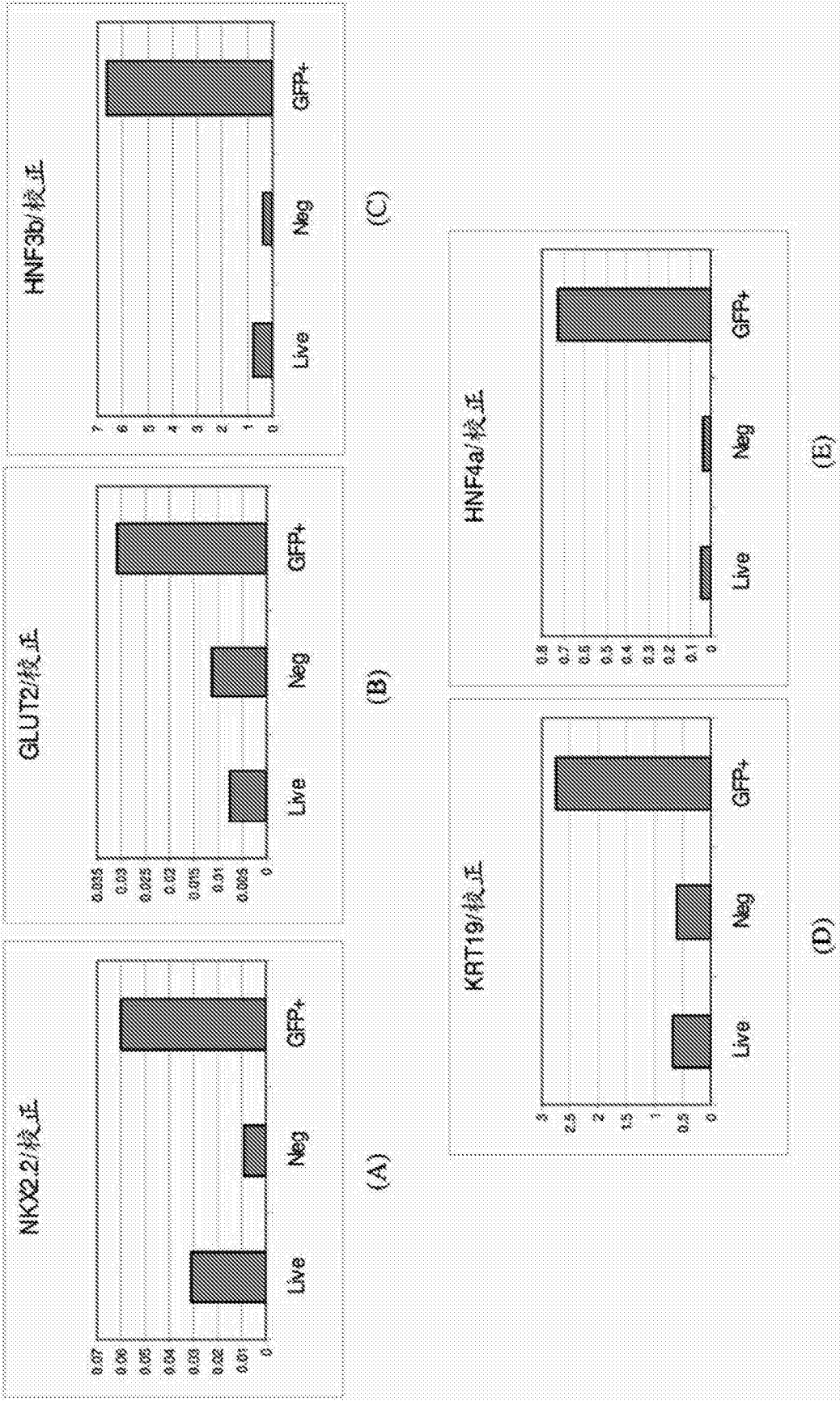


图48

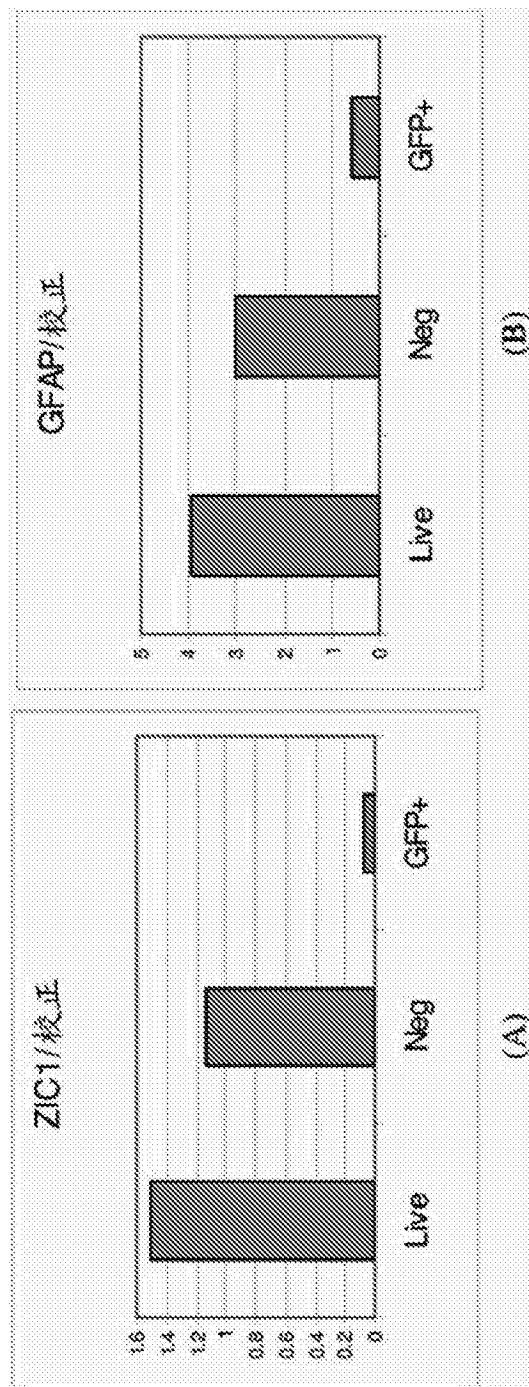


图49