



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103898045 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 02

(21) 申请号 201410120990. 2 *C07K 14/47* (2006. 01)
 (22) 申请日 2004. 12. 23 *G01N 33/68* (2006. 01)
 (30) 优先权数据 *C12Q 1/68* (2006. 01)
 60/532, 004 2003. 12. 23 US *C12Q 1/04* (2006. 01)
 60/586, 566 2004. 07. 09 US
 60/587, 942 2004. 07. 14 US

(62) 分案原申请数据
 200480038720. 1 2004. 12. 23

(71) 申请人 维亚希特公司
 地址 美国特拉华州

(72) 发明人 凯文·艾伦·德阿姆尔
 艾兰·D·奥戈尔尼克
 埃马纽埃尔·E·拜特格

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
 利商标事务所 11038
 代理人 林远成

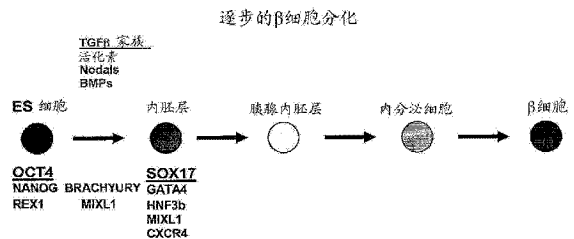
(51) Int. Cl.
C12N 5/071 (2010. 01)
C12N 5/073 (2010. 01)
C12N 15/12 (2006. 01)
C07K 16/18 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书35页
 序列表3页 附图29页

(54) 发明名称
 定形内胚层

(57) 摘要

本发明公开了包括定形内胚层细胞的细胞培养物及其制备方法。本发明也公开了基本纯化的定形内胚层细胞的细胞群及从其它细胞类型中分离、富集及纯化定形内胚层细胞的方法。



1. 细胞培养物,其包含含有 TGF β 超家族生长因子和 Wnt 家族成员的培养基。
2. 权利要求 1 的细胞培养物,其中所述 TGF β 超家族生长因子选自 Nodal、活化素 A 和活化素 B。
3. 权利要求 2 的细胞培养物,其中所述 TGF β 超家族生长因子是活化素 A。
4. 权利要求 2 的细胞培养物,其中所述 TGF β 超家族生长因子是活化素 A 和活化素 B。
5. 权利要求 2 的细胞培养物,其中所述 TGF β 超家族生长因子是活化素 A 和 nodal。
6. 权利要求 1 的细胞培养物,其中所述培养基还包含 BMP 亚组。
7. 权利要求 6 的细胞培养物,其中所述 BMP 亚组是 BMP4。
8. 权利要求 1 的细胞培养物,其中所述 Wnt 家族成员是 Wnt3a。
9. 权利要求 1 的细胞培养物,其中提供至少 100ng/ml 的活化素 A。
10. 权利要求 1 的细胞培养物,其中所述培养基包含 10% (v/v) 的血清。
11. 权利要求 1 的细胞培养物,其中所述培养基包含 2% (v/v) 的血清。
12. 权利要求 1 的细胞培养物,其中所述培养基包含约 0.5% (v/v) 的血清。
13. 细胞培养物,其包含含有活化素 A、活化素 B 和 Wnt3a 的培养基。
14. 权利要求 13 的细胞培养物,其中所述培养基包含约 10% (v/v) 的血清。
15. 权利要求 13 的细胞培养物,其中所述培养基包含约 2% (v/v) 的血清。
16. 权利要求 13 的细胞培养物,其中所述培养基包含约 0.5% (v/v) 的血清。
17. 细胞培养物,其包含含有活化素 A 和活化素 B 的培养基。
18. 权利要求 17 的细胞培养物,其中所述培养基包含约 10% (v/v) 的血清。
19. 权利要求 17 的细胞培养物,其中所述培养基包含约 2% (v/v) 的血清。
20. 权利要求 17 的细胞培养物,其中所述培养基包含约 0.5% (v/v) 的血清。
21. 权利要求 17 的细胞培养物,其中所述培养基还包含 BMP 亚组。
22. 权利要求 17 的细胞培养物,其中所述 BMP 亚组是 BMP4。
23. 权利要求 22 的细胞培养物,其还包含 Nodal。
24. 干细胞培养基,其包含 TGF β 超家族生长因子和 Wnt 家族成员。
25. 权利要求 24 的干细胞培养基,其中所述 TGF β 超家族生长因子选自 Nodal、活化素 A 和活化素 B。
26. 权利要求 25 的干细胞培养基,其中所述 TGF β 超家族生长因子是活化素 A。
27. 权利要求 25 的干细胞培养基,其中所述 TGF β 超家族生长因子是活化素 A 和活化素 B。
28. 权利要求 25 的干细胞培养基,其中所述 TGF β 超家族生长因子是活化素 A 和 nodal。
29. 权利要求 24 的干细胞培养基,其中所述培养基还包含 BMP 亚组。
30. 权利要求 29 的干细胞培养基,其中所述 BMP 亚组是 BMP4。
31. 权利要求 24 的干细胞培养基,其中所述 Wnt 家族成员是 Wnt3a。
32. 权利要求 24 的干细胞培养基,其中提供至少 100ng/ml 的活化素 A。
33. 权利要求 24 的干细胞培养基,其中所述培养基包含 10% (v/v) 的血清。
34. 权利要求 24 的干细胞培养基,其中所述培养基包含 2% (v/v) 的血清。
35. 权利要求 24 的干细胞培养基,其中所述培养基包含约 0.5% (v/v) 的血清。

36. 干细胞培养基,其包含活化素 A、活化素 B 和 Wnt3a。
37. 权利要求 36 的干细胞培养基,其中所述培养基包含约 10% (v/v) 的血清。
38. 权利要求 36 的干细胞培养基,其中所述培养基包含约 2% (v/v) 的血清。
39. 权利要求 36 的干细胞培养基,其中所述培养基包含约 0.5% (v/v) 的血清。
40. 干细胞培养基,其包含活化素 A 和活化素 B。
41. 权利要求 40 的干细胞培养基,其中所述培养基包含约 10% (v/v) 的血清。
42. 权利要求 40 的干细胞培养基,其中所述培养基包含约 2% (v/v) 的血清。
43. 权利要求 40 的干细胞培养基,其中所述培养基包含约 0.5% (v/v) 的血清。
44. 权利要求 40 的干细胞培养基,其中所述培养基还包含 BMP 亚组。
45. 权利要求 40 的干细胞培养基,其中所述 BMP 亚组是 BMP4。
46. 权利要求 45 的干细胞培养基,其还包含 Nodal。
47. 定形内胚层培养基,其包含 TGF β 超家族生长因子和 Wnt 家族成员。
48. 权利要求 47 的定形内胚层培养基,其中所述 TGF β 超家族生长因子选自 Nodal、活化素 A 和活化素 B。
49. 权利要求 48 的定形内胚层培养基,其中所述 TGF β 超家族生长因子是活化素 A。
50. 权利要求 48 的定形内胚层培养基,其中所述 TGF β 超家族生长因子是活化素 A 和活化素 B。
51. 权利要求 48 的定形内胚层培养基,其中所述 TGF β 超家族生长因子是活化素 A 和 nodal。
52. 权利要求 48 的定形内胚层培养基,其中所述培养基还包含 BMP 亚组。
53. 权利要求 52 的定形内胚层培养基,其中所述 BMP 亚组是 BMP4。
54. 权利要求 47 的定形内胚层培养基,其中所述 Wnt 家族成员是 Wnt3a。
55. 权利要求 47 的定形内胚层培养基,其中提供至少 100ng/ml 的活化素 A。
56. 权利要求 47 的定形内胚层培养基,其中所述培养基包含 10% (v/v) 的血清。
57. 权利要求 47 的定形内胚层培养基,其中所述培养基包含 2% (v/v) 的血清。
58. 权利要求 47 的定形内胚层培养基,其中所述培养基包含约 0.5% (v/v) 的血清。
59. 定形内胚层培养基,其包含活化素 A、活化素 B 和 Wnt3a。
60. 权利要求 59 的定形内胚层培养基,其中所述培养基包含约 10% (v/v) 的血清。
61. 权利要求 59 的定形内胚层培养基,其中所述培养基包含约 2% (v/v) 的血清。
62. 权利要求 59 的定形内胚层培养基,其中所述培养基包含约 0.5% (v/v) 的血清。
63. 定形内胚层培养基,其包含活化素 A 和活化素 B。
64. 权利要求 63 的定形内胚层培养基,其中所述培养基包含约 10% (v/v) 的血清。
65. 权利要求 63 的定形内胚层培养基,其中所述培养基包含约 2% (v/v) 的血清。
66. 权利要求 63 的定形内胚层培养基,其中所述培养基包含约 0.5% (v/v) 的血清。
67. 权利要求 63 的定形内胚层培养基,其中所述培养基还包含 BMP 亚组。
68. 权利要求 67 的定形内胚层培养基,其中所述 BMP 亚组是 BMP4。
69. 权利要求 68 的定形内胚层培养基,其还包含 Nodal。
70. 分离的抗体,其结合 SOX17。
71. 权利要求 70 的抗体,其结合 SEQ ID NO:1。

72. 权利要求 71 的抗体,其不结合其最相近的家族成员。
73. 权利要求 72 的抗体,其为抗人 SOX17 蛋白的碳端 242 个氨基酸的抗体。
74. 分离的抗体,其结合 CXCR4 并且能用于纯化定形内胚层细胞。
75. 分离的肽,其为人 SOX17 蛋白的碳端 242 个氨基酸。
76. 定形内胚层细胞表面标志物。
77. 权利要求 76 的定形内胚层细胞表面标志物,其中所述表面标志物是 CXCR4。
78. 权利要求 77 的定形内胚层细胞表面标志物,其中所述表面标志物能用于纯化定形内胚层细胞。
79. 组合物,其包含分离的抗 CXCR4 的抗体和 TGF β 超家族成员。
80. 组合物,其包含分离的抗 SOX17 的抗体和 TGF β 超家族成员。
81. 标志物,其用于检测定形内胚层细胞。
82. 权利要求 81 的标志物,其中所述标志物是 CXCR4。
83. 权利要求 82 的标志物,其中所述标志物不检测中胚层和外胚层。
84. 权利要求 82 的标志物,其中所述标志物不检测内脏内胚层。
85. 定形内胚层标志物,其特征在于结合 CXCR4 抗体或其活性片段。
86. 细胞类型检测子,其鉴定定形内胚层细胞并且表达在细胞表面上。
87. 权利要求 86 的细胞类型检测子,其中所述检测子是 CXCR4 基因。
88. 分子标志物,其用于检测定形内胚层细胞。
89. 权利要求 88 的分子标志物,其中所述分子标志物是选自 SOX17 或 CXCR4 的一个或多个基因的表达产物。
90. 权利要求 89 的分子标志物,其中所述基因的表达产物是 mRNA。
91. 核酸片段,其包含编码 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的核苷酸序列。

定形内胚层

[0001] 本申请是申请日为 2004 年 12 月 23 日、申请号为 200480038720.1 的同名申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请为非临时申请,在 35U. S. C. § 119(e) 项的规定下享有于 2003 年 12 月 23 日提交的美国临时专利申请号 60/532,004、名称为《定形内胚层》的优先权,在 35U. S. C. § 119(e) 项的规定下还享有于 2004 年 7 月 9 日提交的美国临时专利申请号 60/586,566 的名称为《用于分离定形内胚层的化学因子细胞表面受体》项的优先权,以及在 35U. S. C. § 119(e) 项的规定下享有于 2004 年 7 月 14 日提交的美国临时专利申请号 60/587,942,名称为《用于分离定形内胚层的化学因子细胞表面受体》的优先权。本文将上面列出的各优先权申请的公开全部引入,以供参考。

发明领域

[0004] 本发明涉及医药和细胞生物学领域。特别是,本发明涉及组合物,包括哺乳动物定形内胚层细胞及制备、分离及使用这些细胞的方法。

[0005] 发明背景

[0006] 在 1994 年,首次在不具有成纤维细胞滋养物的培养物中分离了人多能干细胞,例如胚胎干 (ES) 细胞和胚胎生殖 (EG) 细胞 (Bongso et al., 1994),然后在具有成纤维细胞滋养物的培养物中分离了这些干细胞 (Hogan, 1997)。后来, Thomson、Reubinoff 和 Shambloott 使用使有丝分裂失活的小鼠滋养层建立了人 ES 和 EG 细胞的连续培养物 (Reubinoff et al., 2000; Shambloott et al., 1998; Thomson et al., 1998)。

[0007] 人 ES 和 EG 细胞 (hESCs) 为研究人的早期发育和对一些诸如糖尿病和帕金森氏病的疾病治疗干预提供了新的机会。例如,使用源于 hESCs 的产生胰岛素的细胞将对目前的利用供体胰腺细胞的细胞治疗方法提供巨大的改善。然而,目前还不了解怎样从 hESCs 产生生成胰岛素的 β 细胞。同样地,目前对糖尿病の利用来自供体胰腺的胰岛细胞的细胞治疗受到了移植所需的高质量胰岛细胞短缺的限制。对一个 I 型糖尿病患者的细胞治疗需要移植大约 8×10^8 的胰腺胰岛细胞 (Shapiro et al., 2000; Shapiro et al., 2001a; Shapiro et al., 2001b)。同样地,就需要至少两个健康供体器官以获得足够的胰岛细胞进行成功的移植。hESCs 提供了一种起始材料的来源,从该材料发展出基本量的高质量的分化细胞用于人细胞治疗。

[0008] 使 hESCs 非常适于细胞治疗应用的两种特性是多能性和在长期的培养中保持这些细胞的能力,不会发生遗传变化的积累。多能性是指 hESCs 分化为所有 3 种原始生殖细胞层 (内胚层、中胚层、外胚层) 的衍生物的能力,随后这些原始生殖细胞层形成成体的所有体细胞类型和胚外组织 (如,胎盘) 以及生殖细胞。虽然多能性赋予了 hESCs 特别的有用性,但这种特性也给研究和操作这些细胞及其衍生物带来了特殊的挑战。由于在分化的 hESC 培养物中可能产生大量细胞类型,因此,绝大多数细胞类型产生的效率很低。此外,成功评价任何既定细胞类型的产生关键依赖于确定合适的标志物。实现高效率的定向分化对

于 hESCs 的治疗应用非常重要。

[0009] 为了将 hESCs 作为起始材料用来产生可用于细胞治疗应用的细胞,克服前述问题是有益的。例如,为了达到胰岛细胞移植治疗需要的细胞材料水平,在分化的最早期,将 hESCs 高效率地定向分化为胰岛 / β 细胞系是有利的。

[0010] 除分化过程的高效定向分化以外,沿着分化途径向胰岛 / β 细胞系分化的中间细胞类型的分离和定性,并且将这种细胞作为合适的谱系前体用于分化中的其它步骤,也是有益的。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明的一些实施方案涉及包括定形内胚层细胞的细胞培养物,其中所述的定形内胚层细胞为多能细胞,能分化成肠管细胞或衍生于肠管的器官。根据一些实施方案,定形内胚层细胞为哺乳动物细胞,以及在优选实施方案中,定形内胚层细胞为人细胞。在本发明的一些实施方案中,定形内胚层细胞表达或不显著表达特定的标志物。在一些实施方案中,定形内胚层细胞表达一或多种标志物,所述标志物选自 SOX17、CXCR4、MIXL1、GATA4、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 及 CRIP1。在其它实施方案中,定形内胚层细胞不显著表达一或多种标志物,该标志物选自 OCT4、 α -胎蛋白 (AFP)、凝血调节蛋白 (TM)、SPARC 及 SOX7。

[0013] 根据本发明的其它实施方案,描述了从多能细胞产生定形内胚层的方法。在一些实施方案中,多能细胞衍生于桑椹胚。在一些实施方案中,多能干细胞为干细胞。用于这些方法的干细胞可包括,但不局限于胚胎干细胞。胚胎干细胞可衍生于胚胎内细胞团或胚胎性腺瘤。胚胎干细胞可起源于各种动物种类,这些种类包括,但不局限于各种哺乳动物种类,包括人。在优选实施方案中,将人胚胎干细胞用于产生定形内胚层。

[0014] 在本发明的一些实施方案中,将一种或多种生长因子用于从多能细胞至定形内胚层细胞的分化过程中。这些用于分化过程的一种或多种生长因子可包括来自 TGF β 超家族的生长因子。在这些实施方案中,所述一种或多种生长因子包括 Nodal/ 活化素和 / 或生长因子 TGF β 超家族的 BMP 亚群。在一些实施方案中,所述一种或多种生长因子选自 Nodal、活化素 A、活化素 B、BMP4、Wnt3a 或任何这些生长因子的组合。

[0015] 本发明实施方案还涉及富集于定形内胚层细胞中的细胞群。在某些实施方案中,将所述定形内胚层细胞分离或基本纯化。在一些实施方案中,所述分离或基本纯化的定形内胚层细胞表达 SOX17 和 / 或 CXCR4 标志物,其表达程度高于 OCT4、AFP、TM、SPARC 和 / 或 SOX7 标志物。

[0016] 还提供了富集具有定形内胚层的细胞群的方法。在一些实施方案中,可将定形内胚层细胞从混合细胞群体中分离或基本纯化,通过将所述细胞与一种试剂接触,该试剂与一种分子结合,该分子位于定形内胚层细胞表面,而不是混合细胞群体中的其它细胞表面,然后分离与试剂结合的细胞。在某些实施方案中,位于所述定形内胚层细胞表面的分子为 CXCR4。

[0017] 本发明的其它实施方案还涉及 CXCR4 抗体, SDF-1 配体或 CXCR4 的其它配体,其用于获得富集的、分离的或基本纯化形式的定形内胚层细胞。例如,可将 CXCR4 抗体、SDF-1 配体或 CXCR4 的另一种配体用作诸如亲和分离或磁分离的方法中的试剂,以富集、分离或基本纯化与所述试剂结合的定形内胚层细胞。

[0018] 本文所述的本发明的其它实施方案涉及诸如细胞培养物的组合物,其包括多能细胞和定形内胚层细胞。在某些实施方案中,细胞培养物同时包括干细胞和定形内胚层细胞。这些培养物中的干细胞数目可大于、等于或小于该培养物中的定形内胚层细胞数目。在一些实施方案中,干细胞为人胚胎干细胞。在某些实施方案中,将 hESCs 保持在滋养层上。在这些实施方案中,所述滋养层细胞可为从人、小鼠或其它合适生物获得的诸如成纤维细胞的细胞。

[0019] 在本发明的一些实施方案中,包括定形内胚层细胞和 hESCs 的所述组合物还包括一种或多种生长因子。这些生长因子可包括来自 TGF β 超家族的生长因子。在这些实施方案中,所述一种或多种生长因子包括 Nodal/ 活化素和 / 或生长因子 TGF β 超家族的 BMP 亚群。在一些实施方案中,所述一种或多种生长因子选自 Nodal、活化素 A、活化素 B、BMP4、Wnt3_a 或任何这些生长因子的组合。

[0020] 本发明的其它实施方案参考下述编号段落进行描述:

[0021] 1. 包括人细胞的细胞培养物,其中至少约 10% 的所述人细胞为定形内胚层细胞,所述的定形内胚层细胞为能分化成肠管细胞或衍生于肠管的器官的多能细胞。

[0022] 2. 段落 1 所述的细胞培养物,其中至少约 50% 的所述人细胞为定形内胚层细胞。

[0023] 3. 段落 1 所述的细胞培养物,其中至少约 80% 的所述人细胞为定形内胚层细胞。

[0024] 4. 段落 1 所述的细胞培养物,其中所述的定形内胚层细胞表达选自 SOX17 和 CXCR4 的标志物。

[0025] 5. 段落 4 所述的细胞培养物,其中在所述定形内胚层细胞中,选自 SOX17 和 CXCR4 的所述标志物的表达高于选自 OCT4、 α -胎蛋白 (AFP)、凝血调节蛋白 (TM)、SPARC 及 SOX7 的标志物的表达。

[0026] 6. 段落 4 所述的细胞培养物,其中所述定形内胚层细胞不表达选自 OCT4、AFP、TM、SPARC 和 SOX7 的标志物。

[0027] 7. 段落 4 所述的细胞培养物,其中所述定形内胚层细胞表达选自 MIXL1、GATA4 和 HNF3b 的标志物。

[0028] 8. 段落 4 所述的细胞培养物,其中所述定形内胚层细胞表达选自 FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 和 CRIP1 的标志物。

[0029] 9. 段落 1 所述的细胞培养物,其中所述定形内胚层细胞表达 SOX17 和 CXCR4。

[0030] 10. 段落 9 所述的细胞培养物,其中在所述的定形内胚层细胞中,所述 SOX17 和 CXCR4 的表达高于 OCT4、AFP、TM、SPARC 和 SOX7 的表达。

[0031] 11. 段落 9 所述的细胞培养物,其中所述定形内胚层细胞不表达 OCT4、AFP、TM、SPARC 和 SOX7。

[0032] 12. 段落 9 所述的细胞培养物,其中所述定形内胚层细胞表达 MIXL1、GATA4 和 HNF3b。

[0033] 13. 段落 9 所述的细胞培养物,其中所述定形内胚层细胞表达选自 FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 和 CRIP1 的标志物。

[0034] 14. 段落 1 所述的细胞培养物,其中在所述的细胞培养物中,对应每一种多能细胞存在至少约 2 个定形内胚层细胞。

[0035] 15. 段落 14 所述的细胞培养物,其中所述多能细胞包括胚胎干细胞。

- [0036] 16. 段落 15 所述的细胞培养物,其中所述的胚胎干细胞衍生于选自自桑椹胚、胚胎的内细胞团(ICM)和胚胎的性腺嵴的组织。
- [0037] 17. 段落 1 所述的细胞培养物进一步包括培养基,该培养基包含少于约 10% 的血清。
- [0038] 18. 段落 1 所述的细胞培养物进一步包括 TGF β 超家族的 Nodal/ 活化素亚群的生长因子。
- [0039] 19. 段落 1 所述的细胞培养物,进一步包括选自 Nodal、活化素 A、活化素 B 及其组合的生长因子。
- [0040] 20. 包括细胞的细胞群,其中至少约 90% 的所述细胞为人定形内胚层细胞,所述的人定形内胚层细胞为多能细胞,该多能细胞能分化成肠管细胞或衍生于肠管的器官。
- [0041] 21. 段落 20 所述的细胞群,其中至少约 95% 的所述细胞为人定形内胚层细胞。
- [0042] 22. 段落 20 所述的细胞群,其中至少约 98% 的所述细胞为人定形内胚层细胞。
- [0043] 23. 段落 20 所述的细胞群,其中所述人定形内胚层细胞表达选自 SOX17 和 CXCR4 的标志物。
- [0044] 24. 段落 23 所述的细胞群,其中在所述人定形内胚层细胞中,选自 SOX17 和 CXCR4 的所述标志物的表达高于选自 OCT4、AFP、TM、SPARC 和 SOX7 的标志物的表达。
- [0045] 25. 段落 23 所述的细胞群,其中所述人定形内胚层细胞不表达选自 OCT4、AFP、TM、SPARC 和 SOX7 的标志物。
- [0046] 26. 段落 23 所述的细胞群,其中所述人定形内胚层细胞表达选自 MIXL1、GATA4 和 HNF3b 的标志物。
- [0047] 27. 段落 23 所述的细胞群,其中所述定形内胚层细胞表达选自 FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 和 CRIP1 的标志物。
- [0048] 28. 段落 20 所述的细胞群,其中所述人定形内胚层细胞表达 SOX17 和 CXCR4。
- [0049] 29. 段落 28 所述的细胞群,其中在所述的人定形内胚层细胞中,SOX17 和 CXCR4 的表达高于 OCT4、AFP、TM、SPARC 和 SOX7 的表达。
- [0050] 30. 段落 28 所述的细胞群,其中所述人定形内胚层细胞不表达 OCT4、AFP、TM、SPARC 和 SOX7。
- [0051] 31. 段落 28 所述的细胞群,其中所述的人定形内胚层细胞表达 MIXL1、GATA4 和 HNF3b。
- [0052] 32. 段落 28 所述的细胞群,其中所述定形内胚层细胞表达选自 FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 和 CRIP1 的标志物。
- [0053] 33. 段落 20 所述的细胞群,其中在所述的细胞群体中,对应每一种多能细胞存在至少约 2 个定形内胚层细胞。
- [0054] 34. 段落 33 所述的细胞群,其中所述多能细胞包括胚胎干细胞。
- [0055] 35. 段落 34 所述的细胞群,其中所述的胚胎干细胞衍生于选自桑椹胚、胚胎的 ICM 和胚胎的性腺嵴的组织。
- [0056] 36. 产生定形内胚层细胞的方法,所述的方法包括下述步骤:
- [0057] 获得包括人多能细胞的细胞群;
- [0058] 为所述的细胞群提供至少一种 TGF β 超家族生长因子,所述生长因子的量足以促

进所述多能细胞分化成定形内胚层细胞,所述的定形内胚层细胞为能分化成肠管细胞或衍生于肠管的器官的多能细胞;以及

[0059] 给予足够的时间来形成定形内胚层细胞,其中所述的形成定形内胚层细胞的足够时间以检测所述细胞群体中定形内胚层细胞的存在来确定。

[0060] 37. 段落 36 所述的方法,其中至少约 10%的所述多能细胞分化成定形内胚层细胞。

[0061] 38. 段落 36 所述的方法,其中至少约 50%的所述多能细胞分化成定形内胚层细胞。

[0062] 39. 段落 36 所述的方法,其中至少约 70%的所述多能细胞分化成定形内胚层细胞。

[0063] 40. 段落 36 所述的方法,其中至少约 80%的所述多能细胞分化成定形内胚层细胞。

[0064] 41. 段落 36 所述的方法,其中检测定形内胚层细胞在所述细胞群体中的存在包括在所述细胞群细胞中检测至少一种选自 SOX17 和 CXCR4 的标志物的表达,以及至少一种选自 OCT4、AFP、TM、SPARC 和 SOX7 的标志物的表达,其中在所述定形内胚层细胞中,选自 SOX17 和 CXCR4 的所述标志物的表达高于选自 OCT4、AFP、TM、SPARC 和 SOX7 的所述标志物的表达。

[0065] 42. 段落 36 所述的方法,其中检测定形内胚层细胞在所述的细胞群中的存在包括在所述细胞群细胞中检测至少一种选自 SOX17 和 CXCR4 的标志物的表达,以及至少一种选自 AFP、TM 和 SOX7 的标志物的表达,其中在所述定形内胚层细胞中,选自 SOX17 和 CXCR4 的所述标志物的表达高于选自 AFP、TM 和 SOX7 的所述标志物的表达。

[0066] 43. 段落 42 所述的方法,其中至少一种所述的标志物的表达以 Q-PCR 来测定。

[0067] 44. 段落 42 所述的方法,其中至少一种所述的标志物的表达以免疫细胞化学来测定。

[0068] 45. 段落 36 所述的方法,其中检测在所述的细胞群体中定形内胚层细胞的存在包括在所述细胞群体细胞中检测至少一种选自 VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 和 CRIP1 的标志物的表达,以及至少一种选自 OCT4、AFP、TM、SPARC 和 SOX7 的标志物的表达,其中在所述的定形内胚层细胞中,选自 FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1 和 CRIP1 的标志物的表达高于选自 OCT4、AFP、TM、SPARC 和 SOX7 的标志物的表达。

[0069] 46. 段落 36 所述的方法,其中所述的至少一种生长因子为 TGF β 超家族的 Nodal/活化素亚群。

[0070] 47. 段落 46 所述的方法,其中所述的至少一种生长因子选自 Nodal、活化素 A、活化素 B 及其组合。

[0071] 48. 段落 47 所述的方法,其中所述的至少一种生长因子为 Nodal。

[0072] 49. 段落 47 所述的方法,其中所述的至少一种生长因子为活化素 A。

[0073] 50. 段落 47 所述的方法,其中所述的至少一种生长因子为活化素 B。

[0074] 51. 段落 36 所述的方法,其中提供了 TGF β 超家族的多种生长因子。

[0075] 52. 段落 51 所述的方法,其中所述的多种生长因子包括 Nodal、活化素 A 及活化素 B。

[0076] 53. 段落 36 所述的方法,其中所述至少一种生长因子的浓度为至少约 10ng/ml。

[0077] 54. 段落 36 所述的方法,其中所述至少一种生长因子的浓度为至少约 100ng/ml。

[0078] 55. 段落 36 所述的方法,其中所述至少一种生长因子的浓度为至少约 500ng/ml。

[0079] 56. 段落 36 所述的方法,其中所述至少一种生长因子的浓度为至少约 1000ng/ml。

[0080] 57. 段落 36 所述的方法,其中所述至少一种生长因子的浓度为至少约 5000ng/ml。

- [0081] 58. 段落 36 所述的方法,其中所述细胞群体生长于包括少于约 10% 血清的培养基中。
- [0082] 59. 段落 36 所述的方法,其中所述多能细胞包括干细胞。
- [0083] 60. 段落 59 所述的方法,其中所述的多能细胞包括胚胎干细胞。
- [0084] 61. 段落 60 所述的方法,其中所述的胚胎干细胞衍生于选自桑椹胚、胚胎的 ICM 和胚胎的性腺嵴的组织。
- [0085] 62. 以段落 36 的方法产生的定形内胚层细胞。
- [0086] 63. 产生富集的定形内胚层细胞的细胞群方法,包括下述步骤:
- [0087] 分化多能人细胞群体中的细胞,以产生定形内胚层细胞,所述的定形内胚层细胞为多能细胞,该多能细胞能分化成肠管细胞或衍生于肠管的器官;
- [0088] 向所述的细胞群提供试剂,所述试剂与标志物结合,所述标志物表达于所述的定形内胚层细胞中而基本上不表达于所述细胞群中的其它细胞类型中;及
- [0089] 将与所述试剂结合的所述定形内胚层细胞与位于所述细胞群中所述其它细胞类型分离,从而产生富集的定形内胚层细胞的细胞群。
- [0090] 64. 段落 63 所述的方法,其中分化步骤进一步包括,
- [0091] 获得包括多能人细胞的细胞群,
- [0092] 向所述细胞群体提供所述至少一种 TGF β 超家族生长因子,该生长因子的量足以促进将所述多能细胞分化成定形内胚层细胞,所述的定形内胚层细胞为多能细胞,该多能细胞能分化成肠管细胞或衍生于肠管的器官,并
- [0093] 给予足够的时间形成定形内胚层细胞,其中所述的形成定形内胚层细胞的足够时间以检测所述细胞群体中定形内胚层细胞的存在来确定。
- [0094] 65. 段落 63 所述的方法,其中检测包括,
- [0095] 在所述细胞群体的细胞中检测至少一种选自 SOX17 和 CXCR4 的标志物的表达,以及至少一种选自 OCT4、AFP、TM、SPARC 和 SOX7 的标志物的表达,其中在所述的定形内胚层细胞中,选自 SOX17 和 CXCR4 的标志物的表达高于选自 OCT4、AFP、TM、SPARC 和 SOX7 的标志物的表达。
- [0096] 66. 段落 63 所述的方法,其中检测包括,在所述细胞群体的细胞中检测至少一种选自 SOX17 和 CXCR4 的标志物的表达,以及至少一种选自 AFP、TM 和 SOX7 的标志物的表达,其中在所述的定形内胚层细胞中,选自 SOX17 和 CXCR4 的标志物的表达高于选自 AFP、TM 和 SOX7 的标志物的表达。
- [0097] 67. 段落 63 所述的方法,其中检测包括,在所述细胞群体的细胞中检测至少一种选自 FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 和 CRIP1 的标志物的表达,以及至少一种选自 OCT4、AFP、TM、SPARC 和 SOX7 的标志物的表达,其中在所述的定形内胚层细胞中,选自 FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 和 CRIP1 的标志物的表达高于选自 OCT4、AFP、TM、SPARC 和 SOX7 的标志物的表达。
- [0098] 68. 段落 63 所述的方法,其中至少约 95% 的所述细胞为定形内胚层细胞。
- [0099] 69. 段落 63 所述的方法,其中至少约 98% 的所述细胞为定形内胚层细胞。
- [0100] 70. 段落 63 所述的方法,其中所述的标志物为 CXCR4。
- [0101] 71. 段落 63 所述的方法,其中所述的试剂为抗体。

[0102] 72. 段落 71 所述方法,其中所述的抗体对 CXCR4 具有亲和性。

[0103] 73. 段落 63 所述的方法产生的富集定形内胚层细胞的细胞群。

[0104] 74. 段落 4 或 9 的任一项所述的细胞培养物,其中所述的定形内胚层细胞不显著表达选自 OCT4、AFP、TM、SPARC 和 SOX7 的标志物。

[0105] 75. 段落 23 或 28 的任一段落的细胞群,其中所述的定形内胚层细胞不显著表达选自 OCT4、AFP、TM、SPARC 和 SOX7 的标志物。

[0106] 应当了解,上述的方法和组合物涉及体外细胞培养。然而,上述的体外分化细胞组合物可于体内应用。

[0107] 本发明的其它实施方案还可发现于下述美国临时专利申请中,即 2003 年 12 月 23 日提交的美国临时专利申请第 60/532,004 号,名为《定形内胚层》;2004 年 7 月 9 日提交的美国临时专利申请第 60/586,566 号,名为《用于分离定形内胚层的趋化因子细胞表面受体》;以及 2004 年 7 月 14 日提交的美国临时专利申请第 60/587,942 号,名为《用于分离定形内胚层的细胞表面受体》,本文将这些公开全部引入,以供参考。

[0108] 附图简述

[0109] 图 1 为提出的从 hESCs 产生 β -细胞的分化途径的示意图。该途径中的第一步为将 ES 细胞转变为定形内胚层细胞系,其代表进一步将 ES 细胞分化为胰腺内胚层、内分泌腺内胚层或胰岛/ β -细胞最早的已知步骤之一。可用于介导此转变的一些因子为 TGF β 家族的成员,这些成员包括,但不局限于活化素、nodals 和 BMPs。确定定形内胚层靶细胞的代表性标志物为 SOX17、GATA4、HNF3b、MIX1 和 CXCR4。

[0110] 图 2 为人 SOX17cDNA 图解,其显示了保守基序的位置并突出了用于 GENOVAC 的免疫方法的区域。

[0111] 图 3 为一种相关性树状图,表明 SOX17 与 SOX7 的相关性最强,与 SOX18 的相关性稍弱。在同源物种中的 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。

[0112] 图 4 为以大鼠抗 SOX17 抗体为探针的蛋白质杂交(Western blot)。该杂交证明了该抗体对成纤维细胞中过量表达的人 SOX17 蛋白质的特异性(泳道 1),以及对 EGFP(泳道 2) 或最相关的 SOX 家族成员 SOX7(泳道 3) 缺少免疫反应性。

[0113] 图 5A-B 为显示 SOX17⁺细胞簇的显微照片,显示大量的共标记的 AFP⁺细胞(A)。这与其它 SOX17⁺细胞簇(B) 观察到少量 AFP⁺细胞或未观察到 AFP⁺细胞形成鲜明对比。

[0114] 图 6A-C 为显示体壁内胚层和 SOX17 的显微照片。嵌图 A 显示对人凝血调节蛋白(TM) 的免疫细胞化学,该蛋白质位于随机分化的 hES 细胞培养物中的体壁内胚层细胞的细胞表面。嵌图 B 为 TM 和 SOX17 双重标志显示的与嵌图 A 相同的区域。嵌图 C 为以 DAPI 标记核的相同区域的相差图像。注意 DAPI 标记核与 SOX17 标记完全相关。

[0115] 图 7A-B 为显示定量 PCR(Q-PCR) 的 SOX17 基因表达和 SOX17 特异性抗体的抗 SOX17 阳性细胞的直方图。相对于非分化的对照培养基(SR20)而言,嵌图 A 显示活化素 A 增加 SOX17 基因表达,而视黄酸(RA) 强烈抑制 SOX17 表达。嵌图 B 表明,相同模式和相似程度的变化反应在 SOX17⁺细胞数目上,表明 SOX17 基因表达的 Q-PCR 测试对单细胞水平的变化是非常敏感的。

[0116] 图 8A 为直方图,显示在活化素 A 存在下分化的 hESCs 培养物保持低水平的 AFP 基

因表达,而在 10% 的胎牛血清 (FBS) 中,细胞随机分化,显示 AFP 严重上调。表达水平上的差异大约为 7 倍。

[0117] 图 8B-C 为两张显微照片图像,显示了活化素 A 对 AFP 表达抑制在单细胞水平也很明显,相对于仅用 10% 的 FBS (顶部) 而言,在活化素 A 处理的条件下 (底部) 观察到的 AFP⁺ 细胞簇很少而且很小。

[0118] 图 9A-B 为对照图,显示使用流式细胞仪定量 AFP⁺ 细胞数。该图表明,在存在 (右嵌图) 或不存在 (左嵌图) 活化素 A 时 AFP 基因表达变化幅度 (图 8A) 与 AFP⁺ 细胞数非常一致,进一步表明 Q-PCR 分析对显示在单细胞水平上出现的变化的实用性。

[0119] 图 10A-F 为显微照片,显示将 hESCs 暴露于 noda1、活化素 A 和活化素 B (NAA),在 5 天时间产生了细胞数的显著增加 (A-C)。通过比较 SOX17⁺ 细胞与该区域存在的细胞总量的相对量,如 DAPI 显色核 (D-F) 所示,可以看出约 30-50% 的所有细胞在以 NAA 处理 5 天后对 SOX17 具有免疫反应性。

[0120] 图 11 为直方图,显示活化素 A (0、10、30 或 100ng/mL) 剂量依赖性地增加分化的 hESCs 的 SOX17 基因表达。在对粘附培养物处理 3 天后,继续再悬浮培养 3 ~ 5 天,表达增加已经很明显。

[0121] 图 12A-C 为直方图,证实了活化素 A 对 MIXL1 (嵌图 A)、GATA4 (嵌图 B) 及 HNF3b (嵌图 C) 表达的作用。在其它三个定形内胚层标志物 MIXL1、GATA4 及 HNF3b 中也观察到了对活化素呈剂量依赖性的增加。对活化素剂量依赖性增加的表达幅度与 SOX17 的极其相似,强烈显示了活化素 A 特异作用于共表达所有四个基因 (SOX17⁺, MIXL1⁺, GATA4⁺ and HNF3b⁺) 的细胞群。

[0122] 图 13A-C 为直方图,证实了活化素 A 对 AFP (嵌图 A)、SOX7 (嵌图 B) 及 SPARC (嵌图 C) 表达中的作用。活化素 A 剂量依赖性地降低内脏内胚层标志物 AFP 的表达。原始内胚层 (SOX7) 及体壁内胚层 (SPARC) 标志物仍然不变或仅在某些点显示抑制,表明活化素 A 并不特异作用于这些胚外内胚层细胞类型。这进一步支持 SOX17、MIXL1、GATA4 及 HNF3b 的表达增加是由于活化素 A 引起定形内胚层细胞数量的增加。

[0123] 图 14A-B 为直方图,表明了活化素 A 对 ZIC1 (嵌图 A) 及 Brachyury (嵌图 B) 表达的作用。神经标志物 ZIC1 的持续表达显示活化素 A 对神经分化无剂量依赖性的效果。从 brachyury 表达降低可以看出,100ng/mL 活化素 A 处理对中胚层的分化有显著的抑制。这可能是来自中内胚层前体的定形内胚层特异性增加的结果。与无处理的空白对照培养物相比,低水平的活化素 A 处理 (10 及 30ng/mL) 在分化后期时间点保持了 brachyury 表达。

[0124] 图 15A-B 为显微照片,活化素处理引起体壁内胚层分化降低。在仅以血清分化的培养物 (A) 内发现 TM^{hi} 体壁内胚层区域,然而当包括活化素 (B) 时很少分化为 TM⁺ 细胞及总免疫反应性的强度较低。

[0125] 图 16A-D 为显微照片,表明活化素 A 及活化素 B 处理引起的标志物表达。连续以活化素 A 及活化素 B 处理 hESCs 4 天,以 SOX17、AFP 及 TM 抗体进行三标记。嵌图 A-SOX17; 嵌图 B-AFP; 嵌图 C-TM; 及嵌图 D-Phase/DAPI。注意当完全无 AFP (B) 及 TM (C) 免疫反应性时可见大量的 SOX17 阳性细胞 (A)。

[0126] 图 17 是显微图片,表明在体外自 hESCs 出现定形内胚层及内脏内胚层。内脏内胚层区域以 AFP^{hi}/SOX17^{10/-} 鉴定,然而定形内胚层显示了完全相反的特征,SOX17^{hi}/AFP^{10/-}。

选择该域是由于这两个区域彼此接近,然而,有多次在完全分离的 AFP^{hi} 细胞区域观察到 SOX17^{hi}/AFP^{lo/-} 区域,表明部分定形内胚层细胞衍生于内脏内胚层细胞。

[0127] 图 18 为描述 TGF β 家族配体及受体的图表。活化 AR-Smads 及 BR-Smads 的因子有利于从人胚胎干细胞产生定形内胚层(参见, J Cell Physiol. 187:265-76)。

[0128] 图 19 为直方图,表明以单一或多种 TGF- β 因子处理诱导的 SOX17 随时间表达。

[0129] 图 20 为直方图,表明以多种 TGF- β 因子处理引起 SOX17⁺ 细胞数量随时间的增加。

[0130] 图 21 为直方图,表明以多种 TGF- β 因子处理诱导的 SOX17 随时间表达。

[0131] 图 22 为直方图,表明活化素 A 剂量依赖性地增加 SOX17⁺ 细胞数量。

[0132] 图 23 为直方图,显示 Wnt3a 加入至活化素 A 及活化素 B 处理的培养物中增加 SOX17 表达,高于活化素 A 及活化素 B 单独使用诱导的水平。

[0133] 图 24A-C 为直方图,表明在低 FBS 条件下,分化为定形内胚层增加。在包括 2%FBS(2AA) 的培养基中以活化素 A 及 B 处理 hESCs 与在 10%FBS(10AA) (嵌图 A) 中同样条件下处理比, SOX17 表达水平高 2-3 倍。定形内胚层标志物 MIXL1 (嵌图 B) 也以相同的方式受到影响,而且 2%FBS 对 AFP (内脏内胚层) (嵌图 C) 的抑制比在 10%FBS 条件下高。

[0134] 图 25A-D 为显微照片,显示培养中的 SOX17⁺ 细胞分裂。SOX17 免疫反应性细胞处于 hESC 克隆分化边缘 (C, D),以增殖细胞细胞核抗原 (PCNA) (嵌图 B) 标记,而不以 OCT4 (嵌图 C) 共标志。此外,以 DAPI 标记核,在 SOX17⁺ 细胞 (箭头) 及 OCT4⁺,未分化的 hESCs (箭头) (D) 中可清晰看见有丝分裂图片。

[0135] 图 26 为直方图,显示在各种培养基中, CXCR4 在正在分化的 hESCs 中的相对表达水平。

[0136] 图 27A-D 为直方图,通过与图 26 相同处理,显示一系列定形内胚层标志物如何具有非常相似的 CXCR4 表达模式。

[0137] 图 28A-E 为直方图,显示中胚层 (BRACHYURY, MOX1)、外胚层 (SOX1, ZIC1) 及内脏内胚层 (SOX7) 标志物如何通过与图 26 相同处理具有相反的 CXCR4 表达。

[0138] 图 29A-F 为显微照片,显示在图 26-28 三种培养基条件下 SOX17 免疫反应性细胞的相对差异。

[0139] 图 30A-C 为流式细胞仪点图,证实随着加入至分化培养基中的活化素 A 的浓度增加, CXCR4⁺ 细胞数量增加。

[0140] 图 31A-D 为直方图,显示高剂量活化素 A 处理 (A100-CX+) 后分离的 CXCR4⁺ 细胞的定形内胚层标志物数量较其母体细胞群 (A100) 更为丰富。

[0141] 图 32 为直方图,显示使用荧光活化细胞分选器 (FACS) 分离的 CXCR4⁺ 及 CXCR4⁻ 细胞及母体细胞群的基因表达。这证实 CXCR4⁺ 细胞基本包括所有的在各母体细胞群上存在的 CXCR4 基因表达, CXCR4⁻ 则包括很少或不包括 CXCR4 基因表达。

[0142] 图 33A-D 为直方图,证实高剂量活化素 A 处理的 CXCR4⁺ 细胞的中胚层 (BRACHYURY, MOX1)、外胚层 (SOX1, ZIC1) 及内脏内胚层 (SOX7) 基因表达缺失,这些非定形内胚层标志物的表达被抑制。

[0143] 图 34A-M 为直方图,表明标志物基因表达模式,其可用于鉴定定形内胚层细胞。定形内胚层标志物 FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 及 CRIP1 的表达分析分别如嵌图 G-L 所示。前述谱系标志基因 SOX17、SOX7、SOX17/SOX7、TM、ZIC1 及 MOX1 分别如嵌图 A-F 所示。

嵌图 M 显示 CXCR4 的表达分析。关于嵌图 A-M, 标记 hESC 一栏显示纯化的人胚胎干细胞基因表达; 2NF 显示以 2%FBS 处理的细胞, 不加活化素; 0.1A100 显示以 0.1%FBS、100ng/ml 活化素 A 处理的细胞; 1A100 显示以 1%FBS、100ng/ml 活化素 A 处理的细胞; 2A100 显示以 2%FBS、100ng/ml 活化素 A 处理的细胞。

[0144] 发明详述

[0145] 人早期发育的一个关键阶段, 即术语原肠胚形成发生在受精 2-3 周后。原肠胚形成极端重要, 因为在此期三个原始胚首先专一化和有序化 (Lu et al., 2001; Schoenwolf and Smith, 2000)。外胚层负责身体外层及全部神经系统的形成, 然而, 心脏、血液、骨骼、骨骼肌及其它结缔组织均衍生于中胚层。定形内胚层定义为负责全部肠管形成的胚层, 该全部的肠管包括食道、胃、小肠及大肠, 以及从肠道衍生的器官, 如肺、肝、胸腺、甲状旁腺及甲状腺、胆囊及胰 (Grapin-Botton and Melton, 2000; Kimelman and Griffin, 2000; Tremblay et al., 2000; Wells and Melton, 1999; Wells and Melton, 2000)。定形内胚层与称为原始内胚层的完全分离的细胞系之间有着非常明显的不同。原始内胚层主要形成胚外组织, 主要是胎盘卵黄囊的体壁及内脏内胚层部分及 Reichert's 膜的细胞外基质材料。

[0146] 在原肠胚形成过程中, 定形内胚层形成过程始于细胞迁徙事件, 其中, 中内胚层细胞 (能够形成中胚层或内胚层的细胞组分) 穿过一个称做原线的结构。定形内胚层衍生于穿过原线前部及结 (一个位于原线最前面部分的特定结构) 的细胞。当迁徙发生时, 定形内胚层首先形成肠管的最前面部分直至形成肠管后端时结束。

[0147] 定形内胚层形成的体内分析, 如 Conlon et al., 1994; Feldman et al., 1998; Zhou et al., 1993; Aoki et al., 2002; Dougan et al., 2003; Tremblay et al., 2000; Vincent et al., 2003; Alexander et al., 1999; Alexander and Stainier, 1999; Kikuchi et al., 2001; Hudson et al., 1997 及小鼠 Kanai-Azuma et al., 2002 进行的斑马鱼及非洲蟾蜍的研究, 这些研究为如何在培养皿中使用人胚胎干细胞完成特定胚层细胞类型的发育奠定了基础。与体外 ESC 培养相关的两个方面构成了在培养皿中重启发育的主要瓶颈。首先, 不会产生有序的胚层或器官结构。在正在分化的 hESC 培养系统中, 大部分胚层及器官的特异遗传标志物会以异源的形式来表达。因此, 由于缺乏器官特异性界限, 很难估计特异性组织或细胞类型的形成。在一个具体胚层的细胞类型或组织类型中表达的几乎所有基因也在其它胚层的细胞类型或组织类型中表达。没有特异的界限, 很难以 1-3 个基因样本赋予基因表达的特异性。因而, 必须仔细检测相当多的基因, 有些基因应当也可在不感兴趣器官或组织的具体细胞类型上表达。其次, 基因表达类型的时机对沿特定通道发育的活动至关重要。

[0148] 至于更复杂的事件, 应当指出, 体外干细胞分化是相当不同步的且可能比体内要显著得多。这样, 一组细胞可能在表达与原肠胚形成有关的基因时, 而另一组可能正在开始最终的分化。而且, 在具有或不具有外源因素参与时, 处理 hESC 单层或胚状体 (EBs) 可能导致全部基因表达模式或分化状态的显著差异。因而, 为了有效地沿特定的分化通道前进, 根据异质细胞混合物的基因表达模式, 外源因子的使用必须进行时间控制。在培养容器里考虑这些细胞的形态学关系也是有益的。与在培养基容器中成长或分化为单层和 / 或 hESC 克隆时能力相比, 均一影响形成所谓胚状体时的 hESCs 的能力远非最理想。

[0149] 作为处理上述异质和不同步的一个有效方法, 本发明的一些实施方案考虑将分化

细胞的方法与富集、分离和 / 或纯化分化通道中的中间细胞类型的方法联合。

[0150] 本发明实施方案涉及在培养物中生成定形内胚层细胞的新的确定方法,其通过将诸如干细胞的多能细胞分化为多能定形内胚层细胞。本文使用的“多能”或“多能细胞”指能产生有限数量的其它具体细胞类型的细胞类型。如上所述,定形内胚层细胞并不分化为源于外胚层或中胚层的组织,然而,可分化为肠管及源于肠管的器官。在一些优选的实施方案中,定形内胚层细胞衍生于hESCs。这些方法提供了有效生成成人内胚层衍生的组织,如胰、肝、肺、胃、肠及甲状腺的基础。例如,定形内胚层的生成第一步可分化干细胞为功能性的产生胰岛素的 β 细胞。为了获得有用量的产生胰岛素的 β 细胞,在达到胰岛/ β 细胞前,期望每个分化步骤都是高效的分化步骤。因为干细胞分化为定形内胚层细胞也许代表着生成功能性胰岛/ β 细胞的最初步骤(如图1所示),特别需要此步分化高效。

[0151] 鉴于分化多能细胞至定形内胚层细胞的需要,本发明一些方面涉及体外方法学,将约50-80%的多能细胞转变为定形内胚层细胞。典型地,这些方法包括已定义及暂时指定的方式使用培养物及生长因子。使用可与定形内胚层细胞特异结合的试剂,从细胞群中将定形内胚层细胞与其它细胞分离和 / 或纯化,可获得定形内胚层细胞群的更多富集。这样,本发明涉及定形内胚层细胞及制备分离和 / 或纯化这些细胞的方法。

[0152] 为了确定细胞培养物或细胞群内定形内胚层细胞的数量,需要从培养物或细胞群中区分这类细胞与其它细胞的方法。因此,本发明实施方案涉及细胞标志物,其存在、缺失和 / 或相对表达水平对定形内胚层是特异的,以及检测确定这些标志物表达的方法。此处使用的“表达”指材料或物质的产生,或者材料或物质产生的水平或含量。因而,确定特异标志物的表达指检测表达的标志物的相对或绝对含量,或仅检测标志物是否存在。此处使用的“标志物”指能够被观察或检测到的任何分子。例如,标志物可包括但不局限于核酸,如特异基因的转录本、基因的多肽产物、非基因多肽产物、糖蛋白、糖、糖脂、脂质、脂蛋白或小分子。

[0153] 在本发明的一些实施方案,标志物表达的存在与否和 / 或其水平由定量PCR(Q-PCR)确定。例如,一些遗传标志物产生的转录本量,例如SOX17、CXCR4、OCT4、AFP、TM、SPARC、SOX7、MIXL1、GATA4、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1、CRIP1及本文所述的其它标志物,由定量Q-PCR确定。在其它实施方案中,Q-PCR及免疫组化技术用于识别及确定这些标志物的量或相对比例。

[0154] 通过使用如上述确定的一种或多种合适的标志物表达的方法,在细胞培养物或细胞群内识别定形内胚层细胞以及确定定形内胚层细胞的比例是可能的。例如,在本发明的一些实施方案中,产生的定形内胚层细胞或细胞群表达SOX17和 / 或CXCR4基因的水平比非定形内胚层细胞类型或细胞群高约2个数量级。在其它实施方案中,产生的定形内胚层细胞或细胞群表达SOX17和 / 或CXCR4基因的水平比非定形内胚层细胞类型或细胞群高2个以上数量级。在另一些其它实施方案中,产生的定形内胚层细胞或细胞群表达一种或多种选自SOX17、CXCR4、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1及CRIP1的标志物,比非定形内胚层细胞类型或细胞群的表达高约2个或2个以上的数量级。

[0155] 本发明涉及细胞培养物,包括具有大量定形内胚层及包含富集的定形内胚层细胞的细胞群。由此,一些实施方案涉及包括定形内胚层细胞的细胞培养物,其中所述培养物中至少约50-80%的细胞为定形内胚层细胞。一个优选实施方案涉及包括人细胞的细胞培养

物,其中培养物中至少约 50-80% 人细胞为定形内胚层细胞。由于分化方法的效果可以通过改变一些参数调节,包括但不限于细胞生长条件、生长因子浓度及培养步骤的时间,本发明所述的分化方法可使约 5%、约 10%、约 15%、约 20%、约 25%、约 30%、约 40%、约 45%、约 50%、约 55%、约 60%、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、或大于 95% 的多能细胞转化为定形内胚层。在本发明其它实施方案中,将诸如干细胞群体的多能细胞群转化为基本纯的定形内胚层细胞。

[0156] 本发明所述的组合物及方法具有几个有用的特征。例如,包括定形内胚层的细胞培养物及细胞群,以及制备这些细胞培养物及细胞群的方法可用于模建人发育的早期阶段。此外,本发明所述的组合物及方法也可用于如糖尿病的疾病的干预治疗。例如,由于定形内胚层仅为有限数量的组织来源,因而其可用于发育纯的组织或细胞类型。

[0157] 从多能细胞制备定形内胚层

[0158] 包括本文所述的定形内胚层细胞的定形内胚层细胞培养物及组合物可自如胚胎干细胞的多能细胞中制备。本文使用的“胚胎”指有机体发育阶段范围,其自单个的受精卵开始至除发育的配子细胞以外不再包含多能或全能细胞的多细胞结构结束。除衍生于配偶子融合的胚胎,术语“胚胎”指衍生于体细胞核转移的胚胎。优选的衍生定形内胚层细胞的方法利用人胚胎干细胞作为制备定形内胚层的起始材料。该方法使用的胚胎干细胞可以是衍生于桑椹胚、胚胎内细胞团或从胚胎性腺嵴获得的细胞。使用现有技术方法,人干细胞可在培养基中保持多能状态而基本不分化。所述的方法,例如,美国专利第 5,670,5,690,9265,843,6,200,806 及 6,251,671 号中公开的方法,本文全部引入,以供参考。

[0159] 在本发明所述方法的一些实施方案中,hESCs 保持在滋养层。在这些实施方案中,任何能够使 hESCs 保持在多能状态的滋养层可用于本发明所述的方法中。一个常用的培养人胚胎干细胞的滋养层为一层小鼠成纤维细胞。最近,人成纤维细胞滋养层也已开发出来用于培养 hESCs (参见美国专利申请号 2002/0072117 中公开的方法,本文全部引入,以供参考)。本发明所述方法的其它实施方案允许不使用滋养层保持多能 hESCs。这些方法如美国专利申请号 2003/0175956 所述,其公开在此全部引入,以供参考。

[0160] 本发明所述的人胚胎干细胞可以保持在具有或不具有血清的培养基中。在一些实施方案中,使用血清替代品。在其它实施方案,无血清的培养基技术,如美国专利申请号 2003/0190748 所述,其公开在此全部引入,以供参考。

[0161] 在培养基中保持多能状态的干细胞按照常规传代,直到分化为定形内胚层。在一些实施方案中,分化至定形内胚层的完成是通过向干细胞培养基中加入 TGF β 超家族生长因子,其加入的量足以促进分化至定形内胚层。用于制备定形内胚层的 TGF β 超家族生长因子选自 Nodal/活化素或 BMP 亚群。在本发明所述分化方法的一些实施方案中,生长因子选自 Nodal、活化素 A、活化素 B 及 BMP4。此外,生长因子 Wnt3a 及其它 Wnt 家族成员可用于制备定形内胚层细胞。在本发明的一些实施方案中,可以使用上述提及的任何生长因子。

[0162] 在本发明所述分化方法的一些实施方案中,向细胞中加入的上述生长因子,其在培养基中的浓度足以促进至少部分干细胞分化至定形内胚。在本发明的一些实施方案中,培养基中上述生长因子的浓度至少约 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 或大于 5000ng/ml。

[0163] 在本发明一些实施方案中,上述生长因子加入培养基后需要从细胞培养物除去。例如,生长因子的除去时间约在加入后 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 8 天、约 9 天或约 10 天。在一个优选实施方案中,生长因子的除去时间约在加入后 4 天。

[0164] 定形内胚层细胞的培养可在包含少量血清或无血清的培养基中。在本发明的一些实施方案中,血清的浓度范围为约 0.05%v/v 至约 20%v/v。例如,在一些实施方案中,培养基中血清的浓度可以低于约 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,定形内胚层细胞在无血清下生长。在其它实施方案中,定形内胚层细胞在血清替代品存在下生长。在其它实施方案中,定形内胚层细胞在 B27 存在下生长。在这些实施方案中,B27 添加物的浓度范围为约 0.2% 至约 20%v/v。

[0165] hESC 培养至定形内胚层可以通过确定定形内胚层的标志物特征表达监测。在一些实施方案中,一些标志物的表达可通过是否存在标志物来确定。可选择地,一些标志物的表达可通过测定标志物在细胞培养物或细胞群细胞中的水平来确定。在这些实施方案中,可以定性或定量测定标志物的表达。定量标志物基因产生的表达标志物的方法可以使用定量 PCR(Q-PCR)。开展 Q-PCR 的方法为现有技术。现有技术的其它方法也可用于定量标志物基因的表达。例如,标志物基因产物的表达可以通过使用针对感兴趣的特异标志物基因产物的抗体来检测。在本发明的一些实施方案中,确定了具有定形内胚层的标志物特征基因的表达,及缺乏显著表达的 hESCs 及其它细胞类型的标志物特征基因的表达。

[0166] 如下述实施例的进一步所述,定形内胚层的一个可靠标志物为 SOX17 基因。这样,本发明所述方法制备的定形内胚层细胞表达 SOX17 标志物基因,由此产生 SOX17 基因产物。其它定形内胚层的标志物为 MIXL1、GATA4、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 和 CRIP1。在本发明的一些实施方案中,定形内胚层细胞表达 SOX17 标志物基因的水平高于 SOX7 标志物基因的水平,其具有原始及内脏内胚层特征(参见表 1)。此外,在一些实施方案中,SOX17 标志物基因表达高于 OCT4 标志物基因的表达,其具有 hESCs 的特征。在本发明其它实施方案中,定形内胚层细胞表达 SOX17 标志物基因的水平高于 AFP、SPARC 或凝血调节蛋白(TM)标志物基因的水平。在本发明的一些实施方案中,根据本发明所述方法表达 SOX17 的定形内胚层细胞不表达显著水平或量的 PDX1(PDX1- 阴性)。

[0167] 定形内胚层的其它标志物为 CXCR4 基因。CXCR4 基因编码细胞表面趋化因子受体,其配体为趋化物 SDF-1。成年人中包含 CXCR4 受体的细胞的主要作用据信为迁移造血细胞至骨髓、运载淋巴细胞、分化各种 B 细胞及巨噬血细胞系 [Kim, C., and Broxmeyer, H. J. *Leukocyte Biol.* 65, 6-15(1999)]。CXCR4 受体也起着 HIV-1 进入 T 细胞中的共受体作用 [Feng, Y., et al. *Science*, 272, 872-877(1996)]。在一系列 [McGrath, K. E. et al. *Dev. Biology* 213, 442-456(1999)] 开展的研究中,描述了在成年小鼠及其早期发育中趋化因子受体 CXCR4 及其独特配体 SDF-1 的表达 [Kim, C., and Broxmeyer, H., J. *Leukocyte*

Biol. 65, 6-15(1999)]。CXCR4/SDF1 在发育中的相互作用已经清楚,在转基因小鼠中,当其中任一基因破坏 [Nagasawa et al. Nature, 382, 635-638(1996)], Ma, Q., et al Immunity, 10, 463-471(1999)] 都导致晚期胚胎死亡。McGrath 等使用核糖核酸酶保护及原位杂交方法证实,在形成原肠胚的早期 (E7.5), CXCR4 为最丰富的趋化因子受体信使 RNA。处于原肠胚阶段, CXCR4/SDF-1 信号似乎主要诱导原线细胞的迁移,并表达在此时存在的定形内胚层、中胚层及外胚层上。在 E7.2-7.8 小鼠胚胎中, CXCR4 及 α 胎蛋白互相排斥,显示在脏内胚层缺乏表达 [McGrath, K. E. et al. Dev. Biology 213, 442-456(1999)]。

[0168] 在本发明的一些实施方案中,根据本发明所述方法制备的定形内胚层细胞表达 CXCR4 标志物基因。其它实施方案中,根据本发明所述方法制备的定形内胚层细胞表达 CXCR4 标志物基因及其它定形内胚层标志物,包括但不限于 SOX17、MIXL1、GATA4、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 及 CRIP1。在本发明一些实施方案中,定形内胚层细胞表达 CXCR4 标志物基因的水平高于 SOX7 标志物基因。此外,在一些实施方案中, CXCR4 标志物基因表达高于 OCT4 标志物基因表达的水平。在本发明其它实施方案中,定形内胚层细胞表达 CXCR4 标志物基因的水平高于 AFP、SPARC 或凝血调节蛋白 (TM) 标志物基因的水平。在本发明一些实施方案中,根据本发明所述的方法制备表达 CXCR4 的定形内胚层细胞不表达显著水平或量的 PDX1 (PDX1- 阴性)。

[0169] 应当理解,在内胚层细胞中 CXCR4 的表达并不排斥 SOX17 的表达。相应地,在本发明一些实施方案中,定形内胚层细胞表达 SOX17 和 CXCR4 标志物基因的水平均高于 SOX7 标志物基因的水平。此外,在一些实施方案中, SOX17 及 CXCR4 标志物基因的表达均高于 OCT4 标志物基因的表达。在本发明的其它实施方案中,定形内胚层细胞表达 SOX17 及 CXCR4 标志物基因的水平高于 AFP、SPARC 或凝血调节蛋白 (TM) 标志物基因的水平。在本发明一些实施方案中,根据本发明所述的方法制备表达 SOX17/CXCR4 的定形内胚层细胞不表达显著水平或量的 PDX1 (PDX1- 阴性)。

[0170] 应当理解,根据分化条件,在定形内胚层细胞内诱导不同水平范围的 SOX17 和 / 或 CXCR4 标志物表达。这样,在本发明一些实施方案中, SOX17 标志物和 / 或 CXCR4 标志物在定形内胚层细胞或细胞群的表达比 SOX17 标志物和 / 或 CXCR4 标志物在诸如多能干细胞的非定形内胚层细胞或细胞群中的表达至少高约 2 倍至至少约 10,000 倍。在本发明其它实施方案中, SOX17 标志物和 / 或 CXCR4 标志物在定形内胚层细胞或细胞群的表达比 SOX17 标志物和 / 或 CXCR4 标志物在诸如多能干细胞的非定形内胚层细胞或细胞群表达高至少约 4 倍、至少约 6 倍、至少约 8 倍、至少约 10 倍、至少约 15 倍、至少约 20 倍、至少约 40 倍、至少约 80 倍、至少约 100 倍、至少约 150 倍、至少约 200 倍、至少约 500 倍、至少约 750 倍、至少约 1000 倍、至少约 2500 倍、至少约 5000 倍、至少约 7500 倍或至少约 10,000 倍。在一些实施方案中, SOX17 标志物和 / 或 CXCR4 标志物在定形内胚层细胞或细胞群的表达无限制地高于 SOX17 标志物和 / 或 CXCR4 标志物在诸如多能干细胞的非定形内胚层细胞或细胞群表达。

[0171] 应当理解,在本发明一些实施方案中,与在非定形内胚层细胞或细胞群中的 GATA4、MIXL1、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 及 CRIP1 标志物的表达相比,在定形内胚层细胞或细胞群体中的 GATA4、MIXL1、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 及 CRIP1 标志物的表达增加。

[0172] 也应当理解,在定形内胚层细胞内,SOX17 标志物的表达水平与 OCT4、SPARC、AFP、TM 和 / 或 SOX7 标志物表达水平存在差异范围。类似地,在定形内胚层细胞内,CXCR4 标志物的表达水平与 OCT4、SPARC、AFP、TM 和 / 或 SOX7 标志物表达水平存在差异范围。类似地,在本发明一些实施方案中,SOX17 标志物或 CXCR4 标志物的表达比 OCT4、SPARC、AFP、TM 和 / 或 SOX7 标志物的表达高至少约 2 倍至至少约 10,000 倍。在本发明其它实施方案中,SOX17 标志物或 CXCR4 标志物的表达比 OCT4、SPARC、AFP、TM 和 / 或 SOX7 标志物的表达高至少约 4 倍、至少约 6 倍、至少约 8 倍、至少约 10 倍、至少约 15 倍、至少约 20 倍、至少约 40 倍、至少约 80 倍、至少约 100 倍、至少约 150 倍、至少约 200 倍、至少约 500 倍、至少约 750 倍、至少约 1000 倍、至少约 2500 倍、至少约 5000 倍、至少约 7500 倍或至少约 10,000 倍。在一些实施方案中,OCT4、SPARC、AFP、TM 和 / 或 SOX7 标志物在定形内胚层细胞表达不显著。

[0173] 应当理解,在本发明一些实施方案中,在定形内胚层细胞内,与 OCT4、SPARC、AFP、TM 和 / 或 SOX7 相比,选自 GATA4、MIXL1、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 及 CRIP1 的标志物的表达增加。

[0174] 包括定形内胚层的组合物

[0175] 本发明一些方面涉及诸如细胞群体及细胞培养物的组合物,其包括诸如干细胞的多能细胞及定形内胚层细胞。例如,使用本发明所述的方法,可以制备包括 hESCs 混合物及定形内胚层细胞的组合物。在一些实施方案中,制备的组合物中每包括 95 个多能细胞就包括至少约 5 个定形内胚层细胞。在其它实施方案中,每包括 5 个多能细胞就包括至少约 95 个定形内胚层细胞。此外,组合物包括其它比例的定形内胚层细胞与多能细胞。例如,在组合物中,每包括 1,000,000 个多能细胞就包括至少约 1 个定形内胚层细胞、每包括 100,000 个多能细胞就包括至少约 1 个定形内胚层细胞、每包括 100,000 个多能细胞就包括至少约 1 个定形内胚层细胞、每包括 10,000 个多能细胞就包括至少约 1 个定形内胚层细胞、每包括 1,000 个多能细胞就包括至少约 1 个定形内胚层细胞、每包括 500 个多能细胞就包括至少约 1 个定形内胚层细胞、每包括 100 个多能细胞就包括至少约 1 个定形内胚层细胞、每包括 10 个多能细胞就包括至少约 1 个定形内胚层细胞、每包括 5 个多能细胞就包括至少约 1 个定形内胚层细胞、每包括 2 个多能细胞就包括至少约 1 个定形内胚层细胞、每包括 1 个多能细胞就包括至少约 5 个定形内胚层细胞、每包括 1 个多能细胞就包括至少约 10 个定形内胚层细胞、每包括 1 个多能细胞就包括至少约 20 个定形内胚层细胞、每包括 1 个多能细胞就包括至少约 50 个定形内胚层细胞、每包括 1 个多能细胞就包括至少约 100 个定形内胚层细胞、每包括 1 个多能细胞就包括至少约 1,000 个定形内胚层细胞、每包括 1 个多能细胞就包括至少约 10,000 个定形内胚层细胞、每包括 1 个多能细胞就包括至少约 100,000 个定形内胚层细胞、每包括 1 个多能细胞就包括至少约 1,000,000 个定形内胚层细胞。在本发明一些实施方案中,多能细胞为人多能干细胞。在一些实施方案中,干细胞衍生于桑椹胚、胚胎内细胞团或胚胎的性腺嵴。在一些其它实施方案中,多能细胞衍生于已经过胚胎阶段发育的多细胞结构的性腺或生殖组织。

[0176] 本发明一些方面涉及细胞培养物或细胞群,包括至少约 5% 定形内胚层细胞至至少约 95% 定形内胚层细胞。在一些实施方案中,细胞培养物或细胞群包括哺乳动物细胞。在优选实施方案中,细胞培养物或细胞群包括人细胞。例如,一些具体实施方案中涉及细胞培

养物,包括人细胞,其中至少约 5% 至至少约 95% 人细胞为定形内胚层细胞。本发明其它实施方案涉及细胞培养物,包括人细胞,其中至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90% 或大于 90% 的人细胞为定形内胚层细胞。

[0177] 本发明其它实施方案涉及诸如细胞培养物或细胞群体的组合物,其包括诸如人定形内胚层细胞的人细胞,其中在至少在约 5% 的人细胞中 SOX17 或 CXCR4 标志物的表达均大于 OCT4、SPARC、 α 胎蛋白 (AFP)、凝血调节蛋白 (TM) 和 / 或 SOX7 标志物的表达。在其它实施方案中,其中在至少在约 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% 人细胞中或大于 95% 人细胞中,SOX17 或 CXCR4 标志物的表达均大于 OCT4、SPARC、AFP、TM 和 / 或 SOX7 标志物的表达。

[0178] 应当理解,本发明一些实施方案涉及诸如细胞培养物或细胞群的组合物,其包括如人定形内胚层细胞的人细胞,其中在至少约 5% 至大于至少约 95% 人细胞中,其中选自 GATA4、MIXL1、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 及 CRIP1 的一种或多种标志物的表达高于 OCT4、SPARC、AFP、TM 和 / 或 SOX7 标志物的表达。

[0179] 本发明其它实施方案涉及如细胞培养物或细胞群的组合物,其包括如人定形内胚层细胞的人细胞,其中在至少约 5% 的人细胞中 SOX17 及 CXCR4 标志物的表达均高于 OCT4、SPARC、AFP、TM 和 / 或 SOX7 标志物表达。在其它实施方案中,在至少约 10% 人细胞中、至少约 15% 的人细胞中、在至少约 20% 人细胞中、在至少约 25% 人细胞中、在至少约 30% 人细胞中、在至少约 40% 人细胞中、在至少约 50% 人细胞中、在至少约 55% 人细胞中、在至少约 60% 人细胞中、在至少约 65% 人细胞中、在至少约 70% 人细胞中、在至少约 75% 人细胞中、在至少约 80% 人细胞中、在至少约 85% 人细胞中、在至少约 90% 人细胞中、在至少约 95% 人细胞中或大于 95% 人细胞中,SOX17 及 CXCR4 标志物的表达均高于 OCT4、SPARC、AFP、TM 和 / 或 SOX7 标志物的表达。

[0180] 应当理解,本发明一些实施方案涉及如细胞培养物或细胞群的组合物,其包括如人定形内胚层细胞的人细胞,在至少约 5% 至大于至少约 95% 人细胞中,其中 GATA4、MIXL1、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 及 CRIP1 的标志物的表达高于 OCT4、SPARC、AFP、TM 和 / 或 SOX7 标志物的表达。

[0181] 本发明其它实施方案涉及诸如细胞培养物或细胞群的组合物,包括诸如人定形内胚层细胞的哺乳动物内胚层细胞,其中在至少在约 5% 的内胚层细胞中 SOX17 或 CXCR4 标志物的表达均大于 OCT4、SPARC、 α 胎蛋白 (AFP)、凝血调节蛋白 (TM) 和 / 或 SOX7 标志物的表达。在其它实施方案中,其中在至少在约 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% 的内胚层细胞中或大于 95% 的内胚层细胞中，SOX17 或 CXCR4 标志物的表达均大于 OCT4、SPARC、AFP、TM 和 / 或 SOX7 标志物的表达。

[0182] 应当明白，本发明一些实施方案涉及如细胞培养物或细胞群的组合物，其包括哺乳动物内胚层细胞，其中在至少约 5% 至大于至少约 95% 所述内胚层细胞中，一种或多种选自 GATA4、MIXL1、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 及 CRIP1 的标志物的表达高于 OCT4、SPARC、AFP、TM 和 / 或 SOX7 标志物的表达。

[0183] 本发明其它进一步实施方案涉及如细胞培养物或细胞群的组合物，包括诸如人定形内胚层细胞的哺乳动物内胚层细胞，其中在至少在约 5% 的所述内胚层细胞中 SOX17 及 CXCR4 标志物的表达均大于 OCT4、SPARC、 α 胎蛋白 (AFP)、凝血调节蛋白 (TM) 和 / 或 SOX7 标志物的表达。在其它实施方案中，其中在至少约 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% 的内胚层细胞中或大于 95% 的内胚层细胞中，SOX17 及 CXCR4 标志物的表达均大于 OCT4、SPARC、AFP、TM 和 / 或 SOX7 标志物的表达。

[0184] 应当理解，本发明一些实施方案涉及诸如细胞培养物或细胞群的组合物，包括哺乳动物内胚层细胞，其中在至少约 5% 至大于至少约 95% 内胚层细胞中，GATA4、MIXL1、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 及 CRIP1 的标志物的表达高于 OCT4、SPARC、AFP、TM 和 / 或 SOX7 标志物的表达。

[0185] 使用本发明所述的方法，可以制备基本不含其它细胞类型的包括定形内胚层细胞的组合物。关于细胞培养物或细胞群里的细胞，术语“基本不含”指在细胞培养物或细胞群里的特定的细胞不存在、或小于细胞培养物或细胞群里总细胞数的约 5%。在本发明的一些实施方案中，使用本发明所述的方法制备的定形内胚层细胞群或细胞培养物基本不含特异显著表达 OCT4、SOX7、AFP、SPARC、TM、ZIC1 或 BRACH 标志物基因的细胞。

[0186] 在本发明一个实施方案中，基于标志物基因的表达，定形内胚层细胞的描述为 SOX17 高、MIXL1 高、AFP 低、SPARC 低、凝血调节蛋白低、SOX7 低、CXCR4 高。

[0187] 定形内胚层的富集、分离和 / 或纯化

[0188] 关于本发明的其它方面，定形内胚层细胞可使用特异针对这些细胞的亲和标记来富集、分离和 / 或纯化。特异针对定形内胚层细胞的亲和标记的实例为抗体、配体或其它特异针对如多肽的标志物分子的结合试剂，该标志物分子存在于细胞定形内胚层细胞的表面，但基本不存在于根据本发明所述的方法制备的细胞培养基中发现的其它细胞类型中。在一些实施方案中，与 CXCR4 结合的抗体用于定形内胚层的富集、分离和 / 或纯化的亲和标记。在其它实施方案中，趋化因子 SDF-1 或其它基于 SDF-1 的分子也可用于亲和标记。这些分子包括，但不限于 SDF-1 片断，SDF-1 融合物或 SDF-1 模拟物。

[0189] 制备抗体及其用于细胞分离的方法在本技术领域已知，这些方法可利用本发明所

述的抗体及细胞来实施。在一个实施方案中,将结合 CXCR4 的抗体与磁珠结合,然后在细胞培养基中与定形内胚层细胞结合,经酶处理后降低了细胞间及与底物的粘附。将细胞 / 抗体 / 磁珠复合物暴露于移动磁场中以将磁珠结合的定形内胚层细胞与未结合的细胞分开。一旦定形内胚层细胞在培养基中与其它细胞物理分开,破坏结合的抗体,将细胞重新置于合适的组织培养基中。

[0190] 本发明实施方案考虑了其它定形内胚层细胞培养物或细胞群的富集、分离和 / 或纯化方法。例如,在一些实施方案中,CXCR4 抗体在包含定形内胚层的细胞培养物中孵育,经处理后降低细胞间及与底物的粘附。然后将细胞洗涤、离心及再悬浮。细胞悬浮物然后再与第二抗体,如能够与第一抗体结合的 FITC 耦联抗体孵育。然后再将细胞洗涤、离心及再悬浮缓冲液中。随后分析细胞悬浮物,使用荧光活化细胞分选器 (FACS) 分选。将 CXCR4⁻ 阴性细胞分离,收集 CXCR4⁺ 阳性细胞,由此分离了该类型细胞。需要时,分离的细胞组合物可进一步使用替代的亲和方法或增加分选数次,使用特异针对定形内胚层的相同或不同标志物。

[0191] 在本发明其它实施方案中,使用与 CXCR4 结合的配体或其它分子富集、分离和 / 或纯化定形内胚层。在一些实施方案中,所述分子为 SDF-1 或其片段、融合物或其模拟物。

[0192] 在优选实施方案中,当干细胞培养物被诱导向定形内胚层系分化后,自其它非定形内胚层细胞中富集、分离和 / 或纯化定形内胚层细胞。应当明白,上述富集、分离和 / 或纯化方法可利用任何分化阶段的这种培养物。

[0193] 除上述的方法,定形内胚层细胞也可以其它细胞分离技术分离。此外,定形内胚层细胞也可以在生长条件下通过一系列再培养的方法富集或分离,该生长条件有利于所述的定形内胚层细胞选择性存活或选择性扩增。

[0194] 使用本发明所述的方法,可体外自至少经过一些分化的如干细胞培养物或细胞群的多能细胞培养物或细胞群中富集、分离和 / 或纯化定形内胚层细胞。在一些实施方案中,所述细胞进行随机分化。然而,在一些优选实施方案,所述细胞主要分化为定形内胚层。一些优选的富集、分离和 / 或纯化方法涉及体外自人胚胎干细胞制备定形内胚层。使用本发明所述的方法,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,定形内胚层中富集的细胞群或细胞培养物为至少约 2 倍至约 1000 倍。在一些实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,富集的定形内胚层至少约 5 倍至约 500 倍。在其它实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,富集的定形内胚层为至少约 10 倍至约 200 倍。在其它实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,富集的定形内胚层为至少约 20 倍至约 100 倍。在其它实施方案中,与未处理的细胞群体或细胞培养物相比,富集的定形内胚层为至少约 40 倍至约 80 倍。在某些实施方案中,与未处理的细胞群体或细胞培养物相比,富集的定形内胚层为至少约 2 倍至约 20 倍。

[0195] 已经对本发明进行了一般性描述,参考一些具体实施例可进一步理解本发明,本发明的这些实施例仅为示例性说明的目的,而非意在限制本发明。

实施例

[0196] 下述许多实施例描述了多能人细胞的使用。制备多能人细胞的方法为本领域一般技术人员熟知,大量科技出版物,包括美国专利号 5,453,357、5,670,372、5,690,926、

6, 090, 622、6, 200, 806 及 6, 251, 671 及美国专利申请公开号 2004/0229350 均有描述, 本文将其全部引入, 作为参考。

[0197] 实施例 1

[0198] 人 ES 细胞

[0199] 为研究内胚层发育, 我们利用人胚胎干细胞, 其为多能干细胞, 在培养基中似乎可以无限分裂, 同时保持正常的染色体组型。ES 细胞衍生于 5 天大小的胚胎内细胞团, 使用免疫学或机械方法分离。特别是, 人胚胎干细胞系 hESCyt-25 来自经患者同意的体外受精周期的额外冰冻胚胎。融化后, 将孵化的囊胚接种于小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 上, 使用 ES 培养基 (DMEM、20%FBS、非必需氨基酸、 β -巯基乙醇、ITS 调节剂)。大约两周后, 胚胎粘附于培养皿中, 将未分化 hESCs 区域转移至 MEFs。转移以机械切割完成, 使用中性蛋白酶简单消化后, 以机械移开细胞簇, 洗涤、再接种。自衍生化后, 连续传代 hESCyt-25 100 次。我们利用 hESCyt-25 人胚胎干细胞系作为起始材料制备定形内胚层。

[0200] 本领域一般技术人员应当明白, 干细胞或其它多能细胞也可用作本发明所述的分化方法的起始材料。例如, 胚胎性腺嗜细胞可以根据本领域已知的方法分离, 用作多能细胞起始材料。

[0201] 实施例 2

[0202] hESCyt-25 的表征

[0203] 人胚胎干细胞系在培养 18 个月中一直保持正常的形态学、染色体组型、生长及自我更新特性。该细胞系对 OCT4、SSEA-4 及 TRA-1-60 抗原显示了强烈的免疫反应性, 上述抗原都是未分化 hESCs 的特征, 并显示其它已建立的 hESC 系相同的碱性磷酸酯活性与形态学。此外, 当人干细胞系 hESCyt-25 悬浮培养时, 也易于形成类胚胎体 (EBs)。由于其多能本质的证明, hESCyt-25 分化为代表三种主要胚层的不同细胞类型。以 Q-PCR 检测 ZIC1 及免疫细胞化学 (ICC) 检测巢蛋白及更多成熟的神经标志物来确证外胚层的生成。 β -III 微管的免疫细胞化学染色可在伸长的细胞簇中观察到, 具有早期神经元的特征。此前, 我们在包含视黄酸的悬浮液中处理 EBs 可诱导多能干细胞分化为一种胚外系的内脏内胚层 (VE)。经过 54 小时的处理, 处理的细胞表达高水平的 α 胎蛋白 (AFP)、SOX7 的两个 VE 标志物。免疫细胞化学染色显示以单层分化的细胞表达 AFP 为零星的片状。如下所述, hESCyt-25 细胞系也可形成定形内胚层, 通过实时定量聚合酶链反应 (Q-PCR) 及检测 SOX17、无 AFP 表达的免疫细胞化学确证。为了证实分化为中胚层, 在几个时间点分析正在分化的 EB 以检测短尾 (Brachyury) 基因表达。在试验过程中, 短尾基因表达进行性增加。如前所述, hESCyt-25 系为多能的, 能够形成代表三个胚层的细胞。

[0204] 实施例 3

[0205] SOX17 抗体的制备

[0206] 在 hESC 培养中识别定形内胚层的主要瓶颈为缺乏适当的工具。我们因而制备抗 SOX17 蛋白的抗体。

[0207] 在原肠胚形成期间形成时, 标志物 SOX17 表达在整个定形内胚层, 且其表达保持在肠管 (尽管表达水平延 A-P 轴有差异) 直至器官开始形成。SOX17 也表达在一系列胚外内胚层细胞上。这种蛋白质在中胚层或外胚层无表达。当与其它标志物结合排除胚外谱系时, 现已发现 SOX17 为定形内胚层谱系的合适的标志物。

[0208] 如本文详述,为了制备 SOX17 阳性的定形内胚层细胞,将 SOX17 抗体用于特异检测各种处理及分化方法的效果。其它与 AFP、SPARC 及凝血调节蛋白反应的抗体也用于排除内脏及体壁内胚层(胚外内胚层)的生成。

[0209] 为了制备抗 SOX17 的抗体,根据抗体制备公司 GENOVAC(Freiberg, Germany)开发的方法,与 SOX17 蛋白(附图 2)的羧端氨基酸 172-414(SEQNO:2)对应的部分人 SOX17cDNA(SEQIDNO:1)用于大鼠的遗传免疫。遗传免疫的方法可见于美国专利号 5,830,876、5,817,637、6,165,993 及 6,261,281 及国际专利申请公开号 W000/29442 及 W099/13915,其公开在此引入,以供参考。

[0210] 遗传免疫的其它方法也可见于非专利文献。例如,Barry 等所述的根据遗传免疫制备单克隆抗体,Biotechniques16:616-620,1994,其公开在此全部引入,以供参考。根据遗传免疫制备抗特异蛋白抗体的具体方法,例如,Costaglia 等(1998)人促甲状腺素受体的遗传免疫引起甲状腺炎及制备识别自身受体的单克隆抗体,J. Immunol. 160:1458-1465; Kilpatrick 等人(1998)基因枪传送的基于 DNA 的免疫介导了 Flt-3 受体的鼠单克隆抗体的快速制备,Hybridoma17:569-576;Schmolke 等人,(1998),在人血清中通过 DNA 免疫产生的 E2-特异性单克隆抗体识别肝炎 G 病毒颗粒 J, Virol. 72:4541-4545;Krasemann 等人,(1999)使用非传统的核酸免疫策略产生针对蛋白的单克隆抗体,J. 73:119-129;及 Ulivieri 等人(1996)通过 DNA 免疫产生幽门螺杆菌空泡毒素确定部分的单克隆抗体,51:191-194,上述公开在此全部引入,以供参考。

[0211] 如图 3 的关系树所示,在 Sox 家族,SOX7 及 SOX18 与 SOX17 最相近。我们利用人 SOX7 多肽作为阴性对照以证实 SOX17 抗体对 SOX17 是特异的,不与最相近的家族成员反应。特别是,为了证明遗传免疫产生的抗体对 SOX17 是特异的,将 SOX7 及其它蛋白表达在人成纤维细胞上,然后通过 Western blot 及 ICC 分析与 SOX17 抗体的总反应活性。例如,使用下述方法制备 SOX17、SOX7 及 EGFP 的表达载体,将其转染入人成纤维细胞并用 Western blot 来分析。用于制备 SOX17、SOX7 及 EGFP 的表达载体分别为 pCMV6(OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD)、pCMV-SPORT6(Invitrogen, Carlsbad, CA) 及 pEGFP-N1(Clontech, Palo Alto, CA)。为制备蛋白,使用 Lipofectamine2000 以超螺旋 DNA 瞬时转染端粒酶永生化的 MDX 人成纤维细胞(Invitrogen, Carlsbad, CA)。转染 36 小时后,收集总细胞裂解物于 50mM TRIS-HCl(pH8)、150mM NaCl、0.1%SDS、0.5%脱氧胆酸及一些蛋白酶抑制剂(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)中。Western blot 分析 100 μ g 的细胞蛋白,以 SDS-PAGE 在 NuPAGE(4-12% 梯度聚丙烯酰胺,Invitrogen, Carlsbad, CA) 分离,通过电印迹转移至 PDVF 膜上(Hercules, CA),以在 10mM TRIS-HCl(pH8)、150mM NaCl、10%BSA、0.05%Tween-20(Sigma, St. Louis, MO) 中稀释至 1/1000 的鼠 SOX17 抗血清进行探测,然后以结合碱性磷酸酯酶的抗大鼠 I_gG 处理(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA),结果以 Vector Black 碱性磷酸酯酶染色显示(Vector Laboratories, Burlingame, CA)。使用的蛋白大小标准为宽范围的彩色标志物(Sigma, St. Louis, MO)。

[0212] 在图 4 中,将来自 SOX17、SOX7 或 EGFP cDNA 瞬时转染的人成纤维细胞的蛋白质提取物,以 SOX17 抗体为探针进行 Western blot。仅 hSOX17 转染的细胞中提取的蛋白质产生了约 51Kda 的带,该带与预测的人 SOX17 蛋白质的 46Kda 分子量最匹配。SOX17 抗体

对来自人 SOX7 或 EGFP 转染细胞的提取物不具有反应性。此外, SOX17 抗体明显地标记了以 hSOX17 表达构建体转染的人成纤维细胞核, 但不标记以 EGFP 单独转染的细胞。同样地, SOX17 抗体显示通过 ICC 检测的特异性。

[0213] 实施例 4

[0214] SOX17 抗体作为定形内胚层标志物的确证

[0215] 根据 SOX17 抗体对人 SOX17 蛋白质具有特异性并进一步标志定形内胚层, 将部分分化的 hESCs 与 SOX17 和 AFP 抗体共同标记。已证明了 SOX17、SOX7 及 AFP 各自表达于内脏内胚层中, SOX7 为 SOX 基因家族 F 亚群密切相关的成员 (图 3)。然而, AFP 及 SOX7 在定形内胚层细胞中的表达不在可被 ICC 检测的水平, 因此, 可将其用作 bonifide 定形内胚层细胞的阴性标志物。据显示, SOX17 抗体标志细胞群体以分散的细胞群存在, 或与 AFP 阳性细胞混合。特别是, 图 5A 显示与 AFP 共同标志的少量 SOX17 细胞; 然而, 也发现了一些区域, 其中在 SOX17⁺ 细胞领域中具有少量或不具有 AFP⁺ 细胞 (图 5B)。类似地, 因为还报道了体壁内胚层表达 SOX17, 可将与 SOX17 共同标志的抗体与体壁标志物 SPARC 和 / 或凝血调节蛋白 (TM) 一起用于鉴别体壁内胚层的 SOX17⁺ 细胞。如附图 6A-C 所示, 通过 hES 细胞的随机分化产生凝血调节蛋白及 SOX17 共同标志的体壁内胚层细胞。

[0216] 根据上述细胞标志试验, 可将定形内胚层细胞的特性通过标志物表达谱 SOX17^{hi}/AFP^{lo}/[TM^{lo} 或 SPARC^{lo}] 建立。换言之, SOX17 标志物的表达高于 AFP 标志物及 TM 或 SPARC 标志物的表达, AFP 标志物为内脏内胚层的一种特征, TM 或 SPARC 标志物为体壁内胚层的特征。因此, 那些对 SOX17 呈阳性而对 AFP 呈阴性并对 TM 或 SPARC 呈阴性的细胞为定形内胚层。

[0217] SOX17^{hi}/AFP^{lo}/TM^{lo}/SPARC^{lo} 标志物表达谱的特异性可作为定形内胚层预测的进一步证据, 将 SOX17 及 AFP 基因表达可定量地与抗体标记细胞的相对数量相当。如图 7A 所示, 以视黄酸 (内脏内胚层诱导物) 或活化素 A (定形内胚层诱导物) 处理的 hESCs 导致了在 SOX17mRNA 表达水平的 10 倍差异。该结果反映出 SOX17 抗体标记的细胞数量的 10 倍差异 (图 7B)。此外, 如图 8A 所示, 与未处理相比, hESCs 的活化素 A 处理抑制了 6.8 倍的 AFP 基因表达。在这些培养物中 AFP 标记的细胞数量的急剧减少从视觉上反映了这种变化, 如图 8B-C 所示。为进一步量化, 以流式细胞仪测定, 证明了 AFP 基因表达的约 7 倍的减少为 AFP 抗体标记的细胞数量约减少 7 倍的结果 (附图 9A-B)。该结果非常重要, 表明了 Q-PCR 中观察到的基因表达的数量变化, 反映了通过抗体染色观察的细胞类型特异化典型的变化。

[0218] hESCs 在 Nodal 家族成员 (Nodal、活化素 A 及活化素 B-NAA) 存在的条件下培养, 导致 SOX17 抗体标志的细胞随着时间明显增加。连续以活化素处理 5 天, 有多于 50% 的细胞被 SOX17 标记 (图 10A-F)。活化素处理 5 天后, 几乎没有细胞以 AFP 标志。

[0219] 总之, 所产生的抗人 SOX17 蛋白质的碳端 242 个氨基酸抗体, 在 Western blots 鉴别了人 SOX17 蛋白质但未识别 SOX7, 其为最近的 Sox 家族的近亲。SOX17 抗体识别了分化的 hESC 培养物中的细胞亚群, 该亚群主要为 SOX17⁺/AFP^{lo/-} (多于 95% 的标志细胞) 以及少量 (<5%) 的 SOX17、AFP 共同标志的细胞 (内脏内胚层)。以活化素处理 hESC 培养物, 产生了 SOX17 基因表达和 SOX17 标记细胞的显著上升, 并显著地抑制了 AFP mRNA 表达及以 AFP 抗体标记的细胞数量。

[0220] 实施例 5

[0221] Q-PCR 基因表达分析

[0222] 在下述试验中,实时定量 RT-PCR (Q-PCR) 为用于筛查各种处理对 hESC 分化作用的主要方法。特别是,在多个时间点以 Q-PCR 实时测定基因表达,分析多个标志基因。评价期望和不期望的细胞类型的标志基因特征,以获得对细胞群体总体动力学的更好了解。Q-PCR 分析的力量包括其极端灵敏以及因基因组序列易于利用而相对容易能够发展必要的标志物。此外,Q-PCR 极高的灵敏度允许在较大的群体中检测相对少量细胞的基因表达。此外,检测极低水平的基因表达的能力提供了群体内的“分化倾向”的指示。在这些细胞表型的明显分化之前,其向具体分化途径的倾向性不能用免疫细胞化学技术识别。因而,Q-PCR 提供了一种分析方法,该方法至少为免疫细胞活性技术的补充,并潜在地更优于免疫细胞活性技术,用于筛查分化处理成功性。此外,Q-PCR 提供了一种机制,该机制通过高通量规模上的定量分析评价分化方法是否成功。

[0223] 此处使用的方法相对定量,在 Rotor Gene3000 instrument (Corbett Research) 上使用 SYBR Green 化学及两步 RT-PCR 操作。该方法允许储存 cDNA 样品,以分析未来的其它标志基因,因此,避免样品间反转录效率的变异性。

[0224] 若可能,设计的引物定位于外显子-外显子边界或横越至少 800bp 的内含子,因为这根经验可消除污染的基因组 DNA 的扩增。当使用不含内含子或不具有假基因的标志基因时,进行 RNA 样品的 DNA 酶 I 处理。

[0225] 我们通常使用 Q-PCR 测定靶标和非靶标细胞类型的多个标志物的基因表达,以提供描述细胞样品基因表达的宽泛表达谱。将 hESC 分化早期(具体地,外胚层、中胚层、定形内胚层及胚外内胚层)相关标志物及可用的验证引物提供于下述表 1 中。也已证明了这些引物组的人特异性。该事实很重要,因为通常将 hESCs 生长于小鼠滋养层上。最常见的是,各条件取 3 个样品,并独立地分析两次,以评价与各种定量检测相关的生物变异性。

[0226] 为制备 PCR 模板,将总 RNA 用 RNeasy (Qiagen) 分离,并用 RiboGreen (Molecular Probes) 定量。用 iScript 反转录试剂盒 (BioRad) 完成 350-500ng 总 RNA 的反转录,该试剂盒包含寡聚 dT 和随机引物的混合物。随后将各 20 μ L 反应物稀释至 100 μ L 总体积,取 3 μ L 用于各 10 μ L Q-PCR 反应,该反应包含 400nM 正向引物和反向引物及 5 μ L 2X SYBR Green master mix (Qiagen)。选用两步循环参数,在 85-94 $^{\circ}$ C 5 秒变性(根据各引物组扩增子的熔解温度进行具体选择),然后在 60 $^{\circ}$ C 退火/延伸 45 秒。在各延伸期的最后 15 秒期间收集荧光数据。将 10 倍稀释系列的三个点用于产生各轮的标准曲线,并基于该标准曲线将循环阈 (Ct's) 转变为定量数值。将各样品的数值以看家基因表征校准,然后计算三个样品的平均及标准差。在结束 PCR 循环时,以熔解曲线分析确定反应的特异性。将单一产物显示在对 PCR 扩增子合适的 T_m 单一峰处。此外,将不具有反转录酶的反应作为阴性对照,不扩增。

[0227] 在建立 Q-PCR 方法学中的第一步为确定试验体系中合适的看家基因 (HGs)。由于 HG 用于样品间 RNA 输入、RNA 完整性及 RT 效率校准,为使校准有意义,HG 在所有样品类型中随时间恒定表达水平是有价值的。我们测定了在分化 hESCs 中 Cyclophilin G、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 1 (HPRT)、 β -2-微球蛋白 (microglobulin)、hydroxymethylbaine 合成酶 (HMBS)、TATA-结合蛋白 (TBP) 及 glucuronidase β (GUS) 的表达水平。我们的结果显示了 β -2-微球蛋白表达水平在分化过程中提高,因此,我们排除了将该基因用于校准。其它基

因表达水平与随时间和整个处理过程一致。我们通常同时使用 Cyclophilin G 及 GUS 来计算所有样品的校准系数。同时使用多个 HGs 减少校准过程固有的变异,增加相对基因表达值的可靠性。

[0228] 在获得用于校准的基因后,将 Q-PCR 用于检测接受不同试验处理后样品,确定许多标志基因的相对基因表达水平。选择使用的标志基因是在早期胚层的代表性特异群体中富集,特别是在定形内胚层和胚外内胚层中有差别表达的多组基因。将这些基因及其相关富集特征突出显示于表 1 中。

[0229] 表 1

[0230]

胚层	基因	表达结构域
内胚层	SO	定形、内脏及体壁内胚层
	X17	
	MI	内胚层和中胚层
	XL1	
	GA	定形及原始内胚层
	TA4	
	HN	定形内胚层和原始内胚层、中胚层、神经板
	F3b	
	GS	内胚层和中胚层
	C	
外胚层	SO	内脏内胚层
	X7	
	AF	内脏内胚层、肝
	P	
	SPA	体壁内胚层
	RC	
	TM	体壁内胚层/滋养外胚层

[0231]	外	ZIC	神经管、神经系统前体
	胚层	1	
	中	BR	初生中胚层
	胚层	ACH	

[0232] 因为许多基因在不只一个胚层中表达,在同一试验中定量比较许多基因的表达水平是有用的。SOX17 在定形内胚层中表达,在内脏及体壁内胚层中较小程度地表达。SOX7 和 AFP 在内脏内胚层中在早期的发育时间点表达。SPARC 和 TM 在体壁内胚层中表达,以及 Brachyury 在早期中胚层中表达。

[0233] 预测定形内胚层细胞高水平表达 SOX17mRNA,低水平表达 AFP 和 SOX7 (内脏内胚层)、SPARC (体壁内胚层) 和 Brachyury (中胚层)。此外,本发明将 ZIC1 用于进一步排除早期外胚层的诱导。最后,GATA4 和 HNF3b 同时在定形及胚外内胚层中表达,因此,与 SOX17 在定形内胚层中的表达相关(表 1)。代表性试验显示于图 11-14 中,证实了表 1 所述的标志物基因如何与各样本彼此相关,因而强调了定形内胚层、胚外内胚层、中胚层以及神经细胞类型的特异分化模式。

[0234] 上述数据清晰表明了活化素剂量增加,导致的 SOX17 基因表达增加。进一步地,该 SOX17 表达主要代表定形内胚层,而不是相反的胚外内胚层。观察的结论为,SOX17 基因表达与 AFP、SOX7 及 SPARC 反相关。

[0235] 实施例 6

[0236] 人 ES 细胞定向分化为定形内胚层

[0237] 若人 ES 细胞培养物在不主动地保持其未分化状态下培养,该培养物将随机分化。不同的分化导致形成胚外内胚层细胞,其包括体壁及内脏内胚层 (AFP、SPARC 及 SOX7 表达) 两者,以及以 ZIC1、Nestin (外胚层) 及 Brachyury (中胚层) 的表达为标志的外胚层、中胚层衍生物。在 ES 细胞培养物中,由于缺乏特异抗体标志物,定形内胚层细胞外观未经传统方法检测或确定。同样地,由于缺乏手段,从 ES 细胞的培养物中产生早期定形内胚层未经仔细研究。由于无良好的、可用的定形内胚层细胞的抗体试剂,绝大多数确证集中在外胚层及胚外内胚层。总之,在随机的分化 ES 细胞培养物中,与 SOX17^{hi} 定形内胚层细胞相比,有显著大量的胚外及神经外胚层细胞类型产生。

[0238] 当将未分化的 hESC 克隆在成纤维细胞滋养物扩充时,克隆的边缘呈现出与克隆内部细胞不同的形态学特征。许多边缘细胞能以其较大的不均一的细胞体型及 OCT4 的高水平表达来区分。已有描述,当 ES 细胞开始分化时,它们表达 OCT4 的水平相对于未分化 ES 细胞的水平呈上下改变。相对于未分化细胞的 OCT4 阈值水平,上下改变显示离开多能状态的初始分化状态。

[0239] 当未分化的克隆以 SOX17 免疫细胞化学检测时,在未分化 ESC 克隆的四周及连接处偶尔可随机检测到 SOX17 阳性细胞的 10-15 个细胞组成的小簇。如上所述,当克隆体积扩增以致变得拥挤时,克隆外缘分布的袋状似乎是从经典的 ESC 形态分化的第一批细胞。在克隆的内部及边缘的年龄较小、体积较小的未分化克隆 (<1mm ;4-5 天大小) 无 SOX17 阳性细胞,然而在一些克隆的周边及边缘以内的年龄较大、体积较大克隆 (1-2mm 直径, >5 天大

小) 含有零星的、游离的片状 SOX17 阳性、AFP 阴性细胞,如上所述,其从经典的 hESC 形态分化而来。鉴于这为有效的 SOX17 抗体的首次开发,在该早期“未分化”ESC 培养物中生成的定形内胚层细胞此前尚未证实。

[0240] 基于 Q-PCR 测定的 SOX17 及 SPARC 基因表达水平的负相关,绝大多数 SOX17 阳性、AFP 阴性细胞将对抗体共标记的体壁标志物呈阴性。如图 15A-B 所示,在表达 TM 的体壁内胚层细胞得到特异证实。与 Nodal 因子活化素 A 及 B 接触导致 TM 表达强度及 TM 阳性细胞的数目的剧降。在活化素处理的培养基上,通过使用 SOX17、AFP 及 TM 抗体的三重标记,观察到对 AFP 及 TM 也呈阴性的 SOX17 阳性细胞(图 16A-D)。这些都是在分化 ESC 的培养物上首次细胞证实 SOX17 阳性定形内胚层细胞(图 16A-D 及 17)。

[0241] 使用上述的 SOX17 抗体及 Q-PCR 工具,我们已经开发一系列能够有效程序化 ESCs 变为 SOX17^{hi}/AFP^{lo}/SPARC/TM^{lo} 定形内胚层细胞的方法。我们应用了一系列的旨在增加这些细胞数量及增殖能力的分化方法,在群体水平上使用 Q-PCR 检测 SOX17 基因表达,在个体细胞上使用 SOX17 蛋白抗体标记。

[0242] 我们首次分析并描述了 TGF β 家族生长因子,如 Nodal/活化素/BMP,用于自体外细胞培养的胚胎干细胞中创建定形内胚层细胞的效果。在典型的试验中,我们将活化素 A、活化素 B、BMP 或其组合加入至未分化的人干细胞系 hESCyt-25 培养物中开始分化过程。

[0243] 如图 19 所示,加入 100ng/ml 浓度的活化素 A 分化 4 天,与未分化的 hESCs 相比,诱导了 19 倍 SOX17 基因表达。与活化素 A 一起加入活化素家族的第二个成员活化素 B 通过 4 天的组合活化素处理,与未分化的 hESCs 相比,诱导了 37 倍 SOX17 基因表达。与活化素 A 及活化素 B 一同加入 TGF β 家族 Nodal/活化素及 BMP 亚群的第三个成员 BMP4,与未分化的 hESCs 相比,诱导了 57 倍 SOX17 基因表达(图 19)。当以活化素及 BMP 诱导 SOX17 时,与不加因子的培养物对照相比,分化 4 天导致 5-、10- 及 15- 倍的诱导。通过 5 天活化素 A、B 及 BMP 的三重处理,SOX17 诱导的倍数比 hESCs 高 70 倍以上。这些数据显示,以 Nodal/活化素 TGF β 家族成员较高剂量、较长的处理时间引起 SOX17 表达增加。

[0244] Nodal 及相关活化素 A、B 及 BMP 分子促进 SOX17 的表达、定形内胚层体内体外的形成。此外,加入 BMP 引起 SOX17 诱导升高,可能是通过 Nodal 共受体 Cripto 的进一步诱导。

[0245] 我们已经证实联合使用活化素 A、B 及 BMP4 引起 SOX17 诱导的增加及进而定形内胚层形成。与活化素 A 及 B 组合,长期加入 BMP4(>4 天)可诱导体壁及内脏内胚层及定形内胚层的 SOX17 增加。因此,在本发明的一些实施方案中,在加入处理的 4 天内除去 BMP4 是重要的。

[0246] 为了在单细胞水平上确定 TGF β 因子处理的效果,使用 SOX17 抗体标记检测加入一个时程的 TGF β 因子的效果。如前图 10A-F 所示,随着时间进行,SOX17 标记的细胞的相对数量出现剧增。相对定量(图 20)显示 SOX17- 标记的细胞增加 20 倍以上。该结果表明,与 TGF β 因子暴露的时间增加,细胞数量及基因表达水平均增加。如图 21 所示,与 Nodal、活化素 A、活化素 B 及 BMP4 接触 4 天后,SOX17 诱导的水平比未分化的 hESCs 高 168 倍。图 22 表明 SOX17 阳性细胞的数量也呈剂量依赖性。100ng/mL 或更高剂量的活化素 A 能够强有力地诱导 SOX17 的基因表达及细胞数量增加。

[0247] 除 TGF β 家族成员,Wnt 家族分子可能在定形内胚层特异性和 / 或保持上起作

用。与单用活化素相比,使用活化素+Wnt3a的样本SOX17基因表达增加,表明Wnt分子对hESCs分化为定形内胚层也有益(图23)。

[0248] 上述所有试验均在含10%血清及添加因子的组织培养基中进行。令人吃惊的是,我们发现在添加的活化素存在下,血清浓度对SOX17表达水平有作用,如图24A-C所示。当血清水平由10%降至2%时,在活化素A及B的存在下,SOX17的表达增加3倍。

[0249] 最后,我们证实活化素诱导SOX17⁺细胞在培养物中分裂,如图25A-D所示。箭头显示以SOX17/PCNA/DAPI标记的细胞处于有丝分裂期,证据是PCNA/DAPI-标记的有丝分裂板模式及时相差有丝分裂特征。

[0250] 实施例7

[0251] 趋化因子受体4(CXCR4)的表达与定形内胚层标志物相关、而与中胚层、外胚层或内脏内胚层标志物不相关

[0252] 如上所述,通过使用TGF β 家族及更特异的活化素/nodal亚族的细胞因子,ESCs可被诱导分化至定形内胚层胚层。此外,我们已经表明胎牛血清(FBS)在分化培养基中的比例影响定形内胚层自ESCs分化的效率。该效果为,在培养基中既定的活化素A浓度的条件下,较高水平的FBS将抑制其最大分化至定形内胚层胚层。缺乏外源活化素A时,ESCs分化至定形内胚层谱系的效率极低,且FBS浓度对ESCs的分化过程有较弱的效果。

[0253] 在这些试验中,hESCs的分化是在RPMI培养基(Invitrogen, Carlsbad, CA; cat#61870-036)中生长6天,该培养基补充有0.5%、2.0%或10%FBS,包含或不含100ng/mL活化素A。此外,在分化的前三天,0.5%-2.0%的梯度FBS也与100ng/mL活化素A联合使用。6天后,自各培养条件中收集复制物样本,以实时定量PCR分析相对基因表达。将剩余细胞混合,以免疫荧光检测SOX17蛋白。

[0254] 在使用的7个培养条件下,CXCR4的表达水平差异巨大(图26)。一般地,CXCR4表达在活化素A处理的培养基(A100)中高,而在无外源活化素A(NF)的培养基中低。此外,在A100处理的培养基中,当FBS浓度最低时,CXCR4表达最高。在10%FBS条件下,CXCR4水平显著降低,以致相对表达更吻合无活化素A(NF)的条件。

[0255] 如上所述,SOX17、GSC、MIXL1、及HNF3 β 基因的表达与定形内胚层细胞的特征相一致。这4个基因在7个分化条件下的相对表达影射了CXCR4(图27A-D)的表达。这也证实了CXCR4也为一种定形内胚层标志物。

[0256] 外胚层及中胚层谱系可通过其表达的各种标志物与定形内胚层区分开。早期中胚层表达Brachyury及MOX1基因,然而,初生神经外胚层表达SOX1及ZIC1。图28A-D证实无外源活化素A的培养物有利于中胚层及外胚层基因表达,在活化素处理的培养物中,10%FBS条件也增加了中胚层及外胚层标志物表达的水平。这些表达模式与CXCR4模式相反,显示在该发育时程,CXCR4并不高表达于衍生于ESCs中胚层或外胚层中。

[0257] 在哺乳动物发育早期,也发生了分化至胚外谱系。内脏内胚层的分化在此具有特异的相关性,其与定形内胚层共同的许多基因,包括SOX17具有相同的表达。为了将定形内胚层与胚外内脏内胚层区分,应当检测两者不同的标志物。SOX7代表表达在内脏内胚层,而不是定形内胚层谱系的标志物。因而,在无SOX7表达的条件下,显示强SOX17基因表达的培养物条件可能包括定形内胚层,而非内脏内胚层。如图28E所示,SOX7在无活化素A培养基中高表达,SOX7甚至在活化素A存在的条件下,当FBS包括10%时,也表达增加。该模

式与 CXCR4 表达模式相反,表明 CXCR4 在内脏内胚层不高表达。

[0258] 还检测了上述各分化条件下 SOX17 免疫活性 (SOX17⁺) 细胞的相对数量。当 hESCs 在高剂量活化素 A 及低 FBS 浓度 (0.5%–2.0%) 下分化时,SOX17⁺ 细胞在培养物中普遍分布。当使用高剂量活化素 A,而 FBS 浓度为 10%(v/v) 时,SOX17⁺ 细胞出现的频率降低,经常以孤立的簇出现,而不是均匀分布在培养物中 (图 29A、C、B 及 E)。当无外源活化素 A 使用时,发现 SOX17⁺ 细胞进一步降低。在这些条件下,SOX17⁺ 细胞也以簇状出现,但这些簇较小且较高活化素 A、低 FBS 处理时少 (图 29C 及 F)。这些结果表明,CXCR4 表达模式不仅在各种条件下符合定形内胚层基因表达,而且符合定形内胚层细胞的数量。

[0259] 实施例 8

[0260] 富集定形内胚层的分化条件增加 CXCR4 阳性细胞的比例

[0261] 活化素 A 的剂量也影响了定形内胚层从 ESCs 衍生的效率。本实施例增加活化素 A 的剂量增加了 CXCR4⁺ 细胞在培养物中的比例。

[0262] 将 hESCs 在添加了 0.5%–2%FBS (在分化的前 3 天,逐渐由 0.5% 增加至 1.0%,再至 2.0%) 及 0、10 或 100ng/mL 活化素 A 的 RPMI 培养基中分化。分化 7 天后,将细胞在不含 Ca²⁺/Mg²⁺、包含 2%FBS 及 2mM(EDTA) 的 PBS 中室温解离 5 分钟。以 35 μm 尼龙过滤器过滤细胞、计数及沉淀。将沉淀再悬浮于 50% 人血清 /50% 正常驴血清,在冰上孵育 2 分钟阻断非特异抗体结合位点。向每 50 μL (包含约 10⁵ 个细胞) 悬液加入 1 μL 小鼠抗 CXCR4 抗体 (Abcam, cat#ab10403-100),再在冰上标记 45 分钟。加入 5mL 包含 2% 人血清 (缓冲液) 的 PBS 洗涤细胞、沉淀。再以 5mL 缓冲液洗涤一次后,将细胞再以 50 μL 缓冲液 /10⁵ 细胞浓度悬浮。加入终浓度为 5 μg/mL 的第二抗体 (结合的 FITC 驴抗小鼠抗体; Jackson Immuno Research, cat#715-096-151),标记 30 分钟后再以上述缓冲液洗涤 2 次。将细胞再以 5x10⁶ 细胞 /mL 悬浮于缓冲液中,由流式细胞仪设备操作人员 (The Scripps Research Institute) 使用 FACS Vantage (Beckton Dickenson) 分析、分选。将细胞直接收集于 RLT 裂解缓冲液 (Qiagen) 供随后的总 RNA 分离,再以实时定量 PCR 进行基因表达分析。

[0263] 当活化素 A 在分化培养基中的剂量 (图 30A–C) 增加时,可观察到流式细胞仪测定的 CXCR4⁺ 细胞也剧增 (图 30A–C)。CXCR4⁺ 细胞落入 R4 门,该门仅使用第二抗体作为对照,R4 门中存在 0.2% 的该对照事件。当活化素 A 的剂量增加时,CXCR4⁺ 细胞数量的剧增与定形内胚层基因表达明显增加相关 (图 31A–D)。

[0264] 实施例 9

[0265] 富集分离 CXCR4 阳性细胞供定形内胚层基因表达、除去表达中胚层、外胚层及内脏内胚层标志物的细胞

[0266] 收集上述实施例 8 识别的 CXCR4⁺ 及 CXCR4⁻ 细胞,分析了其相对基因表达,同时测定了母体细胞群的基因表达。

[0267] 当活化素 A 的剂量增加时,CXCR4⁺ 基因表达的相对水平剧增 (图 32)。这与活化素 A 剂量依赖性增加 CXCR4⁺ 细胞相关良好 (图 30A–C)。也很明显,从各细胞群分离出 CXCR4⁺ 细胞占据了该细胞群中几乎所有的 CXCR4 基因表达细胞。这证实了 FACS 方法收集这些细胞方法的效率。基因表达分析表明,CXCR4⁺ 细胞不仅包括大部分 CXCR4 基因表达,而且也包括其它定形内胚层标志物的基因表达。如图 31A–D 所示,进一步从 SOX17、GSC、HNF3B、及 MIXL1 的母体 A100 细胞群富集 CXCR4⁺ 细胞。此外,CXCR4⁻ 部分包括极少的这些定形内胚

层标志物基因表达。而且, CXCR4⁺ 及 CXCR4⁻ 细胞群显示了中胚层、外胚层及胚外内胚层标志物基因表达相反模式。图 33A-D 表明, 相对于 A100 母体细胞群, 除去 CXCR4⁺ 细胞以进行 Brachyury、MOX1、ZIC1 及 SOX7 基因表达。相对于低或无活化素 A 的条件, 该 A100 母体细胞群表达这些标志物已经很低。这些结果表明, 高剂量活化素 A 存在分化条件下自 hESCs 中分离的 CXCR4⁺ 细胞获得高度富集的基本纯的定形内胚层细胞。

[0268] 实施例 10

[0269] 使用 CXCR4 定量细胞群体中的定形内胚层细胞

[0270] 为了确定细胞培养物或细胞群中定形内胚层细胞的比例定量, 根据前述方法或于 2003 年 12 月 23 日提交的美国临时专利申请第 60/532, 004 号, 题目为“定形内胚层”所述的方法, 其公开在此全部引入以供参考, 以 FACS 分析表达 CXCR4 及其它定形内胚层标志物的细胞。

[0271] 使用诸如上述实施例所述的方法, 将 hESCs 分化产生定形内胚层。特别是, 增加表达在分化细胞培养物的产率及纯度, 培养基中血清浓度严格控制如下: 第一天 0.2%FBS、第二天 1.0%FBS 及第 3-6 天 2.0%FBS。以 FACS 使用三种细胞表面抗原决定簇 E-钙粘蛋白 (Cadherin)、CXCR4 及凝血调节蛋白分选分化的培养物。然后以 Q-PCR 分析分选细胞群以确定定形内胚层、胚外内胚层及其它细胞类型的标志物相对表达水平。从最佳分化培养物获得的 CXCR4 分选细胞产生了 >98% 纯度的定形内胚层细胞的分离。

[0272] 表 2 显示了使用本发明所述的方法自 hESCs 分化的定形内胚层培养物标志物分析的结果

[0273] 表 2

[0274] 定形内胚层培养物的成分

标志物	%培养物	%定形内胚层	%胚外内胚层	%hES 细胞
SOX17	70-80	100		
凝血调节蛋白	<2	0	75	
AFP	<1	0	25	
CXCR4	70-80	100	0	
ECAD	10	0		100
其它(ECAD 阴性)	10-20			
总计	100	100	100	100

[0276] 特别是, 表 2 显示 CXCR4 及 SOX17 阳性细胞 (内胚层) 包括 70%-80% 的细胞培养物中的细胞。在这些表达 SOX17 的细胞中, 低于 2% 表达 TM (体壁内胚层), 低于 1% 表达 AFP (内脏内胚层)。当从 SOX17/CXCR4 阳性细胞比例中减去 TM 阳性及 AFP 阳性细胞 (体壁及内脏内胚层组合; 总计 3%), 可发现约 67%-77% 细胞培养物为定形内胚层。大约 10% 的细胞为 E-钙粘蛋白 (ECAD) 阳性, 其为 hESCs 标志物, 约 10-20% 的细胞为其它细胞类型。

[0277] 我们也发现, 与前述的在整个 5-6 天的分化操作中将 FBS 浓度保持在 <0.5% 的低血清方法相比, 在 FACS 分离前分化细胞培养物中的定形内胚层的纯度可提高。然而, 在整

个 5-6 天的分化操作中将细胞培养物浓度保持在 <0.5%，也导致了产生的定形内胚层细胞总的数量减少。

[0278] 根据本发明所述的方法制备的定形内胚层细胞在活化素存在下的培养物中保持扩增 50 天以上而无明显分化。在这些情况下，培养期间保持 SOX17、CXCR4、MIXL1、GATA4、HNF3 β 的表达。此外，在这些培养物中未检测到 TM、SPARC、OCT4、AFP、SOX7、ZIC1 及 BRACH。将定形内胚层细胞在活化素存在下的培养物中保持扩增基本上 50 天以上而无明显分化是可能的。

[0279] 实施例 11

[0280] 定形内胚层细胞的其它标志物

[0281] 在下述试验中，RNA 分离自纯化的定形内胚层及人胚胎干细胞群。然后以基因芯片分析来自每一纯化细胞群的 RNA。采用 Q-PCR 进一步考察定形内胚层而非胚胎干细胞表达的基因作为定形内胚层标志物的潜力。

[0282] 将人胚胎干细胞 (hESCs) 保持在 DMEM/F12 培养基中，该培养基补充了 20%KnockOut 血清替代品、4ng/mL 重组人基础成纤维生长因子 (bFGF)、0.1mM2-巯基乙醇、L-谷氨酸、非必需氨基酸及青霉素 / 链霉素。将 hESCs 在 RPMI 培养基中培养 5 天分化至定形内胚层，该培养基补充了 100ng/mL 重组人活化素 A、胎牛血清 (FBS) 及青霉素 / 链霉素。FBS 各天的浓度变化为：0.1% (第一天)、0.2% (第二天) 及 2% (第 3-5 天)。

[0283] 为获得细胞 hESCs 及定形内胚层纯的群体进行基因表达分析，以荧光活化细胞分选 (FACS) 分离。使用 SSEA4 抗原 (R&D Systems, cat#FAB1435P) 免疫纯化 hESCs，使用 CXCR4 (R&D Systems, cat#FAB170P) 纯化定形内胚层。细胞解离使用胰蛋白酶 / EDTA (Invitrogen, cat#25300-054)、以含 2% 人血清的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤，重新悬浮于 100% 人血清中并置于冰上 10 分钟阻断非特异性结合。将 200 μ L 的结合藻红蛋白的抗体加入 800 μ L 的人血清中的 5×10^6 细胞中，在冰上染色 30 分钟。以 8mL PBS 缓冲液洗涤细胞两次，再悬浮于 1mL PBS 中。FACS 分离以 Scripps 研究所的核心设备，使用 FACS Vantage (BD Biosciences) 进行。将细胞直接收集于 RLT 裂解缓冲液，根据操作说明 (Qiagen) 以 RNeasy 分离 RNA。

[0284] 将纯化的 RNA 送样两次 (Durham, NC)，使用 Affymetrix 平台的 U133Plus2.0 高密度寡核苷酸阵列生成表达特征数据产生表达谱数据。呈现的数据是一组比较，鉴别 hESCs 与定形内胚层两个细胞群差异表达的基因。将表达水平与 hESCs 发现的基因水平相比强烈升高变化的基因选作新的候选标志物，其具有高度的定形内胚层特征。根据所述的方法使用 Q-PCR 测定选定的基因，以验证基因芯片上发现的基因表达变化，并考察 hESC 分化时程间的这些基因的表达模式。

[0285] 图 34A-M 显示一些标志物基因表达结果。加入 100ng/ml 活化素 A 后，于第 1、3 及 5 天分析细胞培养物，显示分化操作 (CXDE) 5 天结束后表达 CXCR4 的定形内胚层细胞及人胚胎干细胞 (hESC) 的结果。图 34C 及 G-M 比较表明六个标志物基因 FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1 及 CRIP1，显示彼此几乎完全相同的表达模式，其也完全与 CXCR4 及 SOX17/SOX7 表达模式相同。如上所述，SOX17 在定形内胚层及表达 SOX7 的胚外内胚层两者中均表达。由于 SOX7 在定形内胚层不表达，SOX17/SOX7 的比值可靠的估计了整个群体所表明的定形内胚层中 SOX17 表达的贡献。嵌图 G-L 及 M 与嵌图 C 的相似性显示 FGF17、VWF、CALCR、

FOXQ1、CMKOR1 及 CRIP1 可能为定形内胚层的标志物,且表明了其在胚外内胚层细胞中表达不显著。

[0286] 应当理解,本文所述 Q-PCR 结果可进一步以 ICC 确证。

[0287] 本发明所述的方法、组合物及设备是优选实施方案的代表,是示例性的,不能视为对本发明范围的限制。本领域技术人员可对其作出变化及作其它应用,这包含在本发明的精神中并由公开的范围来定义。因此,很明显,本领域技术人员在不偏离本发明范围及精神下,可对本文公开的发明作出替换及变动。

[0288] 如下述权利要求及全部公开所述,短语“基本上由……组成”指包括短语后所列的任何成分,并限于那些对公开中说明的活性或作用不干扰或无贡献的其它成分。因而,短语“基本上由……组成”表明列出的成分是需要或必需的,但是其它成分任选,视是否影响列出成分的活性或作用选用或不用。

[0289] 参考文献

[0290] 在本发明中引用大量的文献及专利参考,本发明引用的各参考文献在此全部引入,以供参考。

[0291] 一些参考已经在正文中完整引用。正文中引用的一些其它仅按照作者及年引用的参考文献,其完整引用如下:

[0292] Alexander, J., Rothenberg, M., Henry, G. L. 及 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的基本作用). Dev Biol 215, 343-357.

[0293] Alexander, J. 及 Stainier, D. Y. (1999). A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish(引起斑马鱼内胚层形成的分子通道). Curr Biol 9, 1147-1157.

[0294] Aoki, T. O., Mathieu, J., Saint-Etienne, L., Rebagliati, M. R., Peyrieras, N. 及 Rosa, F. M. (2002). Regulation of nodal signalling and mesendoderm formation by TARAM-A, a TGFbeta-related type I receptor(以 TARAM-A, 一种 TGF beta 相关的 I 型受体调节 nodal 信号系统及中内胚层形成). Dev Biol 241, 273-288.

[0295] Beck, S., Le Good, J. A., Guzman, M., Ben Haim, N., Roy, K., Beermann, F. 及 Constam, D. B. (2002). Extra-embryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation(在原肠胚形成过程中调节 Nodal 信号的胚外蛋白酶). Nat Cell Biol 4, 981-985.

[0296] Beddington, R. S., Rashbass, P. 及 Wilson, V. (1992). Brachyury--a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis(Brachyury--影响小鼠原肠胚形成及早期器官发生的基因). Dev Suppl, 157-165.

[0297] Bongso, A., Fong, C. Y., Ng, S. C. 及 Ratnam, S. (1994). Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts(人胚泡内细胞团的分离和培养). Hum Reprod 9, 2110-2117).

[0298] Chang, H., Brown, C. W. 及 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 Rev 23, 787-823.

- [0299] Conlon, F. L., Lyons, K. M., Takaesu, N., Barth, K. S., Kispert, A., Herrmann, B. 及 Robertson, E. J. (1994). A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse (形成及保持小鼠原线对 nodal 的首要要求). *Development*120, 1919-1928.
- [0300] Dougan, S. T., Warga, R. M., Kane, D. A., Schier, A. F. 及 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* 及 *cyclops* 在确定中内胚层模式中的作用). *Development*130, 1837-1851.
- [0301] Feldman, B., Gates, M. A., Egan, E. S., Dougan, S. T., Rennebeck, G., Sirotkin, H. I., Schier, A. F. 及 Talbot, W. S. (1998). Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals (斑马鱼形成体发育及胚层形成需要 nodal 相关的信号). *Nature*395, 181-185.
- [0302] Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. 及 Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor (HIV-1 进入共因子: 七次跨膜的 G 蛋白偶联受体的功能性 cDNA 克隆). *Science*272, 872-877.
- [0303] Futaki, S., Hayashi, Y., Yamashita, M., Yagi, K., Bono, H., Hayashizaki, Y., Okazaki, Y. 及 Sekiguchi, K. (2003). Molecular basis of constitutive production of basement membrane components: Gene expression profiles of engelbreth-holm-swarm tumor and F9 embryonal carcinoma cells (基底膜成分的构成产物的分子基础: engelbreth-holm-swarm 肿瘤及 F9 胚胎肿瘤细胞基因表达特征). *J Biol Chem*.
- [0304] Grapin-Botton, A. 及 Melton, D. A. (2000). Endoderm development: from patterning to organogenesis (内胚层发育: 从模式化到器官发生). *Trends Genet*16, 124-130.
- [0305] Harris, T. M. 及 Childs, G. (2002). Global gene expression patterns during differentiation of F9 embryonal carcinoma cells into parietal endoderm (在 F9 胚胎肿瘤细胞分化为体壁内胚层过程中的全基因表达模式). *Funct Integr Genomics*2, 105-119.
- [0306] Hogan, B. L. (1996). Bone morphogenetic proteins in development (发育中的骨形态蛋白). *Curr Opin Genet Dev*6, 432-438.
- [0307] Hogan, B. L. (1997). Pluripotent embryonic cells and methods of making same (多能胚胎细胞及其复制方法) (U. S. A., Vanderbilt University).
- [0308] Howe, C. C., Overton, G. C., Sawicki, J., Solter, D., Stein, P. 及 Strickland, S. (1988). Expression of SPARC/osteonectin transcript in murine embryos and gonads (在鼠胚胎及性腺中 SPARC/骨结合素转录的表达). *Differentiation*37, 20-25.
- [0309] Hudson, C., Clements, D., Friday, R. V., Stott, D. 及 Woodland, H. R. (1997). Xsox17 α and β mediate endoderm formation in *Xenopus* (Xsox17 α 及 β 介导非洲蟾蜍内胚层的形成). *Cell*191, 397-405.
- [0310] Imada, M., Imada, S., Iwasaki, H., Kume, A., Yamaguchi, H. 及 Moore, E. E. (1987).

Fetomodulin:marker surface protein of fetal development which is modulatable by cyclic AMP(胎儿调节素:周期AMP模拟的胎发育的标志物表面蛋白).Dev Biol122, 483-491.

[0311] Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Gad, J. M., Tajima, Y., Taya, C., Kurohmaru, M., Sanai, Y., Yonekawa, H., Yazaki, K., Tam, P. P. 及 Hayashi, Y. (2002). Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice (缺失 Sox17 的变异小鼠定形肠内胚层的缺失). Development129, 2367-2379.

[0312] Katoh, M. (2002). Expression of human SOX7 in normal tissues and tumors(正常组织及肿瘤的人 SOX7 的表达). Int J Mol Med9, 363-368.

[0313] Kikuchi, Y., Agathon, A., Alexander, J., Thisse, C., Waldron, S., Yelon, D., Thisse, B. 及 Stainier, D. Y. (2001). casanova encodes a novel Sox-related protein necessary and sufficient for early endoderm formation in zebrafish (casanova 编码斑马鱼早期内胚层形成充分必要的一种新的 Sox 相关蛋白). Genes Dev15, 1493-1505.

[0314] Kim, C. H. 及 Broxmeyer, H. E. (1999). Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function(趋化因子:运输具有发育及效应器功能的 T 及 B 细胞的信号灯). J Leukoc Biol65, 6-15.

[0315] Kimelman, D. 及 Griffin, K. J. (2000). Vertebrate mesendoderm induction and patterning(脊柱中内胚层诱导及模式化). Curr Opin Genet Dev10, 350-356.

[0316] 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(培养物胚胎干细胞定形内胚层的发育). Development. 131, 1651-62.

[0317] Kumar, A., Novoselov, V., Celeste, A. J., Wolfman, N. M., ten Dijke, P. 及 Kuehn, M. R. (2001). Nodal signaling uses activin and transforming growth factor-beta receptor-regulated Smads(Nodal 信号传导使用活化素及转化生长因子-β 受体调节的 Smads). J Biol Chem276, 656-661.

[0318] Labosky, P. A., Barlow, D. P. 及 Hogan, B. L. (1994a). Embryonic germ cell lines and their derivation from mouse primordial germ cells(胚胎生殖细胞系及其自小鼠多能生殖细胞衍生). Ciba Found Symp182, 157-168 ;discussion168-178.

[0319] Labosky, P. A., Barlow, D. P. 及 Hogan, B. L. (1994b). Mouse embryonic germ(EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor2receptor(Igf2r) gene compared with embryonic stem(ES) cell lines(小鼠胚胎生殖(EG)细胞系:种系的传递及与胚胎干(ES)细胞系相比胰岛素样生长因子2受体(Igf2r)基因甲基化印迹的差异). Development120, 3197-3204.

[0320] Lickert, H., Kutsch, S., Kanzler, B., Tamai, Y., Taketo, M. M. 及 Kemler, R. (2002). Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm(敲除胚胎内胚层 β-连环蛋白小鼠的多心脏的形成). Dev Cell13, 171-181.

[0321] Lu, C. C., Brennan, J. 及 Robertson, E. J. (2001). From fertilization to

gastrulation:axis formation in the mouse embryo(从受精到原肠胚形成:小鼠胚胎轴线形成). *Curr Opin Genet Dev*11, 384-392.

[0322] Ma, Q., Jones, D. 及 Springer, T.A. (1999). The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment(趋化因子受体 CXCR4 需要在骨髓微环境中保留 B 谱系及粒细胞前体). *Immunity*10, 463-471.

[0323] McGrath KE, Koniski AD, Maltby KM, McGann JK, Palis J. (1999) Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4(趋化因子 SDF-1 及其受体, CXCR4 胚胎表达及功能). *Dev Biol.* 213, 442-56.

[0324] Miyazono, K., Kusanagi, K. 及 Inoue, H. (2001). Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling(TGF-beta/BMP 信号系统的辐射与汇聚). *J Cell Physiol*187, 265-276.

[0325] Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H. 及 Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1(缺乏 CXC 趋化因子 PBSF/SDF-1 小鼠 B-细胞淋巴细胞生成及骨髓髓细胞生成缺陷) *Nature*382, 635-638.

[0326] Niwa, H. (2001). Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells(保持 ES 细胞干细胞再生的分子机制). *Cell Struct Funct*26, 137-148.

[0327] Ogura, H., Aruga, J. 及 Mikoshiba, K. (2001). Behavioral abnormalities of *Zic1* and *Zic2* mutant mice: implications as models for human neurological disorders(*Zic1* 及 *Zic2* 突变小鼠的行为异常:潜在的人神经疾病模型). *Behav Genet*31, 317-324.

[0328] Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A. 及 Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro(人胚泡胚胎干细胞系:体外体细胞分化). *Nat Biotechnol*18, 399-404.

[0329] Rodaway, A. 及 Patient, R. (2001). Mesendoderm, an ancient germ layer (中内胚层. 一个古老的胚层)? *Cell*1105, 169-172.

[0330] Rodaway, A., Takeda, H., Koshida, S., Broadbent, J., Price, B., Smith, J. C., Patient, R. 及 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(卵细胞衍生的 TGF-β 家族信号诱导斑马鱼胚环中内胚层及以 FGF 辨别中胚层及内胚层). *Development*126, 3067-3078.

[0331] Rohr, K. B., Schulte-Merker, S. 及 Tautz, D. (1999). Zebrafish *zic1* expression in brain and somites is affected by BMP and hedgehog signalling (BMP 及 hedgehog 信号系统影响斑马鱼 *zic1* 在脑及体节的表达). *Mech Dev*85, 147-159.

[0332] Schier, A. F. (2003). Nodal signaling in vertebrate development(脊椎动物发育中的 Nodal 信号系统). *Annu Rev Cell Dev Biol*19, 589-621.

[0333] Schoenwolf, G. C. 及 Smith, J. L. (2000). Gastrulation and early mesodermal

patterning in vertebrates(脊椎动物原肠胚及早期中胚层的图式发育). *Methods Mol Biol*135, 113-125.

[0334] Shablott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., Blumenthal, P. D., Huggins, G. R. 及 Gearhart, J. D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells(培养的人原始生殖细胞衍生的多能干细胞). *Proc Natl Acad Sci U S A*95, 13726-13731.

[0335] Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., Korbitt, G. S., Toth, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M. 及 Rajotte, R. V. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen(7例I型糖尿病患者不使用糖皮质激素免疫抑制疗法的胰岛移植). *N Engl J Med*343, 230-238.

[0336] Shapiro, A. M., Ryan, E. A. 及 Lakey, J. R. (2001a). Pancreatic islet transplantation in the treatment of diabetes mellitus(糖尿病治疗中的胰岛移植). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*15, 241-264.

[0337] Shapiro, J., Ryan, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M., Lakey, J., Korbitt, G. S. 及 Rajotte, R. V. (2001b). Could fewer islet cells be transplanted in type 1 diabetes? Insulin independence should be dominant force in islet transplantation(I型糖尿病可移植较少的胰岛细胞?胰岛素自主是胰岛移植中的优先考虑). *Bmj*322, 861.

[0338] Shiozawa, M., Hiraoka, Y., Komatsu, N., Ogawa, M., Sakai, Y. 及 Aiso, S. (1996). Cloning and characterization of *Xenopus laevis* xSox7 cDNA(非洲爪蛙 xSox7 cDNA 克隆及确证). *Biochim Biophys Acta*1309, 73-76.

[0339] Smith, J. (1997). Brachyury and the T-box genes(Brachyury 及 T-box 基因). *Curr Opin Genet Dev*7, 474-480.

[0340] Smith, J. C., Armes, N. A., Conlon, F. L., Tada, M., Umbhauer, M. 及 Weston, K. M. (1997). Upstream and downstream from Brachyury, a gene required for vertebrate mesoderm formation(一个脊椎动物中胚层形成必需基因 Brachyury 的上游及下游). *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*62, 337-346.

[0341] Takash, W., Canizares, J., Bonneaud, N., Poulat, F., Mattei, M. G., Jay, P. 及 Berta, P. (2001). SOX7 transcription factor: sequence, chromosomal localisation, expression, transactivation and interference with Wnt signalling (SOX7 转录因子: 测序、染色体定位、表达、转活及对 Wnt 信号系统的干扰). *Nucleic Acids Res*29, 4274-4283.

[0342] Taniguchi, K., Hiraoka, Y., Ogawa, M., Sakai, Y., Kido, S. 及 Aiso, S. (1999). Isolation and characterization of a mouse SRY-related cDNA, mSox7(小鼠 SRY 相关 cDNA, mSox7 的分离及确证). *Biochim Biophys Acta*1445, 225-231.

[0343] Technau, U. (2001). Brachyury, the blastopore and the evolution of the mesoderm(Brachyury、胚孔及中胚层进化). *Bioessays*23, 788-794.

[0344] Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. 及 Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines

derived from human blastocysts(人胚泡胚胎干细胞系). *Science*282, 1145-1147.

[0345] Tremblay, K. D., Hoodless, P. A., Bikoff, E. K. 及 Robertson, E. J. (2000). Formation of the definitive endoderm in mouse is a Smad2-dependent process. (小鼠定形内胚层形成成为 Smad2 依赖过程). *Development*127, 3079-3090.

[0346] Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. 及 Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes(几何平均多个内部控制基因准确校准实时定量 RT-PCR 的数据). *Genome Biol*3, RESEARCH0034.

[0347] Varlet, I., Collignon, J. 及 Robertson, E. J. (1997). nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation(原始内胚层中的 nodal 表达为小鼠原肠胚前轴的特异化所必需). *Development*124, 1033-1044.

[0348] Vincent, S. D., Dunn, N. R., Hayashi, S., Norris, D. P. 及 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分级 Nodal 信号控制). *Genes Dev*17, 1646-1662.

[0349] Weiler-Guettler, H., Aird, W. C., Rayburn, H., Husain, M. 及 Rosenberg, R. D. (1996). Developmentally regulated gene expression of thrombomodulin in postimplantation mouse embryos(植入后小鼠胚胎中凝血调节蛋白的发育调控基因的表达). *Development*122, 2271-2281.

[0350] Weiler-Guettler, H., Yu, K., Soff, G., Gudas, L. J. 及 Rosenberg, R. D. (1992). Thrombomodulin gene regulation by cAMP and retinoic acid in F9 embryonal carcinoma cells(F9 胚胎癌细胞中凝血调节蛋白基因由 cAMP 及视黄酸调控). *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*89, 2155-2159.

[0351] Wells, J. M. 及 Melton, D. A. (1999). Vertebrate endoderm development (脊椎动物内胚层发育). *Annu Rev Cell Dev Biol*15, 393-410.

[0352] Wells, J. M. 及 Melton, D. A. (2000). Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers(早期小鼠内胚层为邻近胚层的可溶因子模式化). *Development*127, 1563-1572.

[0353] Willison, K. (1990). The mouse Brachyury gene and mesoderm formation (小鼠短尾基因及中胚层形成). *Trends Genet*6, 104-105.

[0354] Zhao, G. Q. (2003). Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse(敲除小鼠 BMP 信号系统的结果). *Genesis*35, 43-56.

[0355] Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B. L. 及 Kuehn, M. R. (1993). Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation(Nodal 为一种在原肠胚形成过程中表达在小鼠 node 中的 TGF-β 类新基因). *Nature*361, 543-547.

[0001]

序列表

- <110> ViaCyte, Inc.
D'Amour, Kevin A.
Agulnick, Alan D.
Baetge, Emmanuel E.
- <120> 定形内胚层
- <130> 96183-000242US
- <140> US 14/072, 642
- <141> 2013-11-05
- <150> US 12/710, 300
- <151> 2010-02-22
- <150> US 10/584, 338
- <151> 2007-01-09
- <150> WO PCT/US2004/043696
- <151> 2004-12-23
- <150> US 60/587, 942
- <151> 2004-07-14
- <150> US 60/586, 566
- <151> 2004-07-09
- <150> US 60/532, 004
- <151> 2003-12-23
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 1245
- <212> DNA
- <213> 智人
- <400> 1
atgagcagcc cggatgcggg atacgccagt gacgaccaga gccagaccca gagcgcgctg 60
cccgcggtga tggccgggct gggcccctgc ccttgggcgg agtcgctgag ccccatcggg 120
gacatgaagg tgaaggcgga ggcgccggcg aacagcggag caccggccgg gcccgcgggc 180
cgagccaagg gcgagcccc tatccggcgg ccgatgaac ctttcatggt gtgggctaag 240
gacgagcgca agcggctgge gcagcagaat ccagacctgc acaacgccga gttgagcaag 300
atgctgggca agtcgtgga ggcgctgac ctggcggaga agcggccctt cgtggaggag 360
gcagagcggc tgcgctgca gcacatgcag gaccaccca actacaagta ccggcccgcg 420
cggcgcaagc aggtgaagcg gctgaagcgg gtggaggcgg gcttctctga cggcctgget 480
gagccgcagg cggcccgct gggcccgcag ggcggccgcg tggccatgga cggcctgggc 540
ctccagtcc ccgagcagg cttcccgcgc ggcccgcgc tgcctgcctc gcacatgggc 600
ggccactaac gcgactgcca gactctgggc ggcctccgc tcgacggcta cccgttgcgc 660
acgcccgaca cgtcccgcct ggacggcgtg gaccccgacc cggctttctt cgcgcgcccc 720
atgcccgggg actgcccggc gcccgcacc tacagctac gcaggtctc ggactaagct 780
ggcccccgcg agcctccgc cggctccatg cacccccgac tcggcccaga gcccgcgggt 840
ccctcgatc cgggctccct ggcgccacc agcgccttc acgtglacla cggcgcgatg 900
ggtctgcccg gggcggcgcg cgggcgcggc ttccagatgc agccgcaaca ccagcaccag 960
caccagcacc agcaccaccc cccgggcccc ggacagccgt cgcctccctc ggaggcactg 1020

[0002]

ccctgcccggg acggcacgga ccccagtcag cccgccgagc tctcgggga ggtggaccgc 1080
 acggaatttg aacagtatct gcacttcgtg tgcaagcctg agatgggect cccctaccag 1140
 gggcatgact cccgtgtgaa tctcccgcac agccacgggg ccatttctc ggtggtgtcc 1200
 gacgccagct ccgcggtata ttactgcaac tatcctgacg tgtga 1245

<210> 2
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> 智人

<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

[0003]

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
 305 310 315 320

His Gln His Gln His His Pro Pro Gly Pro Gly Gln Pro Ser 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 Val Val Ser
 385 390 395 400

Asp Ala Ser Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Tyr Pro Asp Val
 405 410

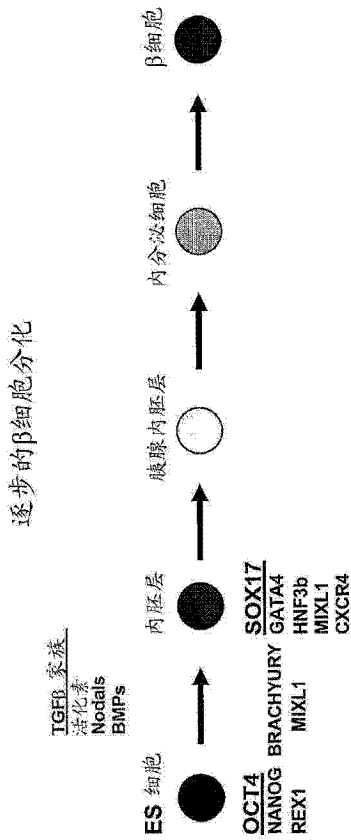


图 1

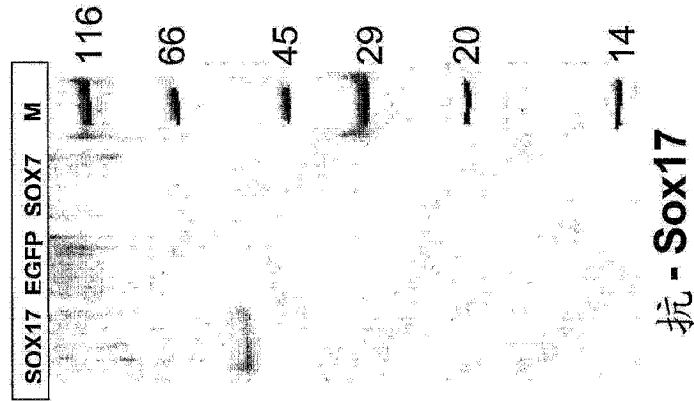


图 4

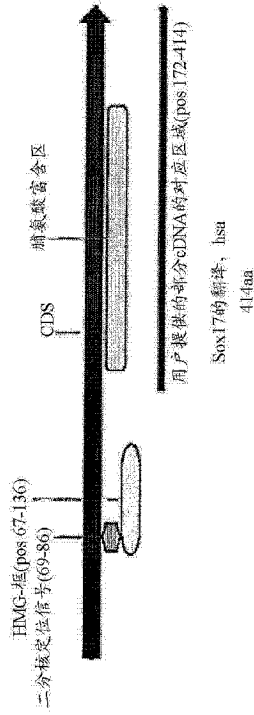


图 2

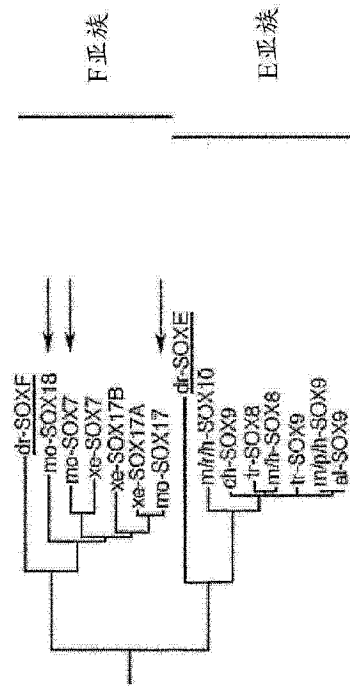


图 3

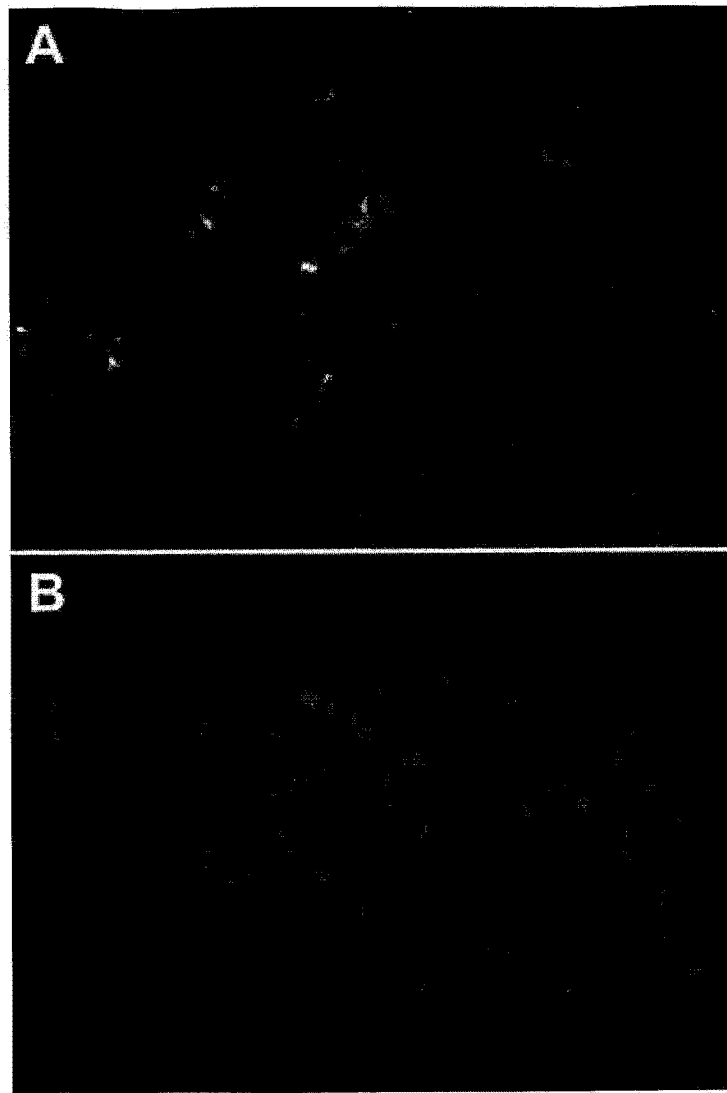


图 5

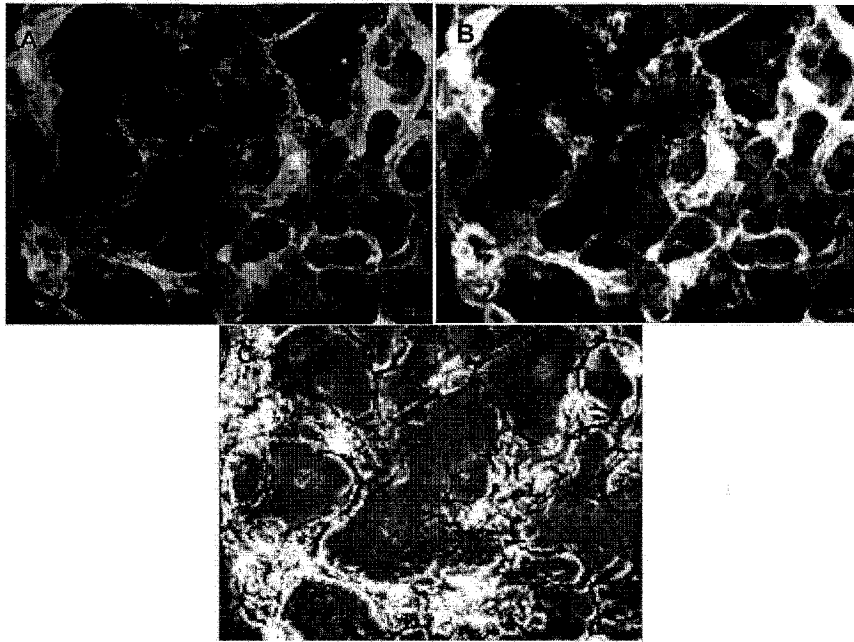


图 6

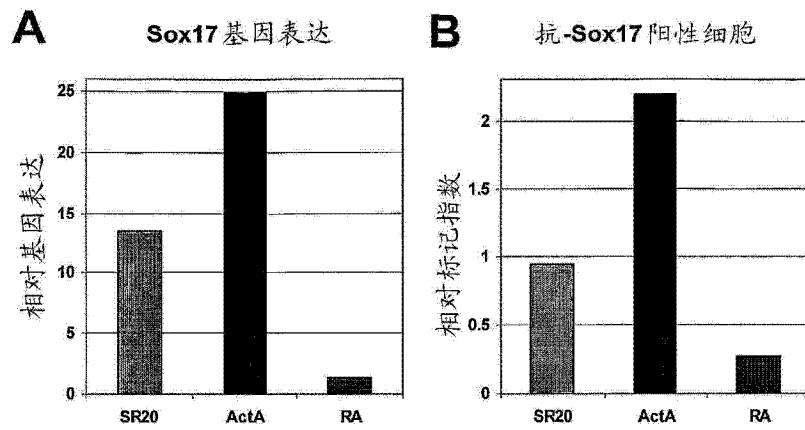


图 7

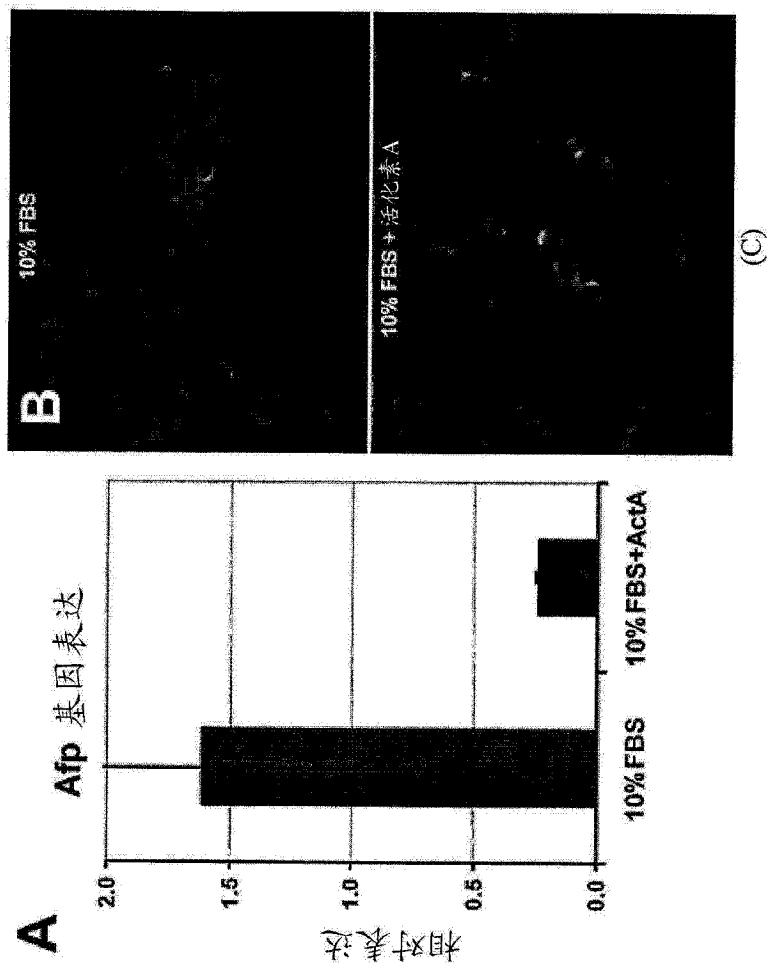


图 8

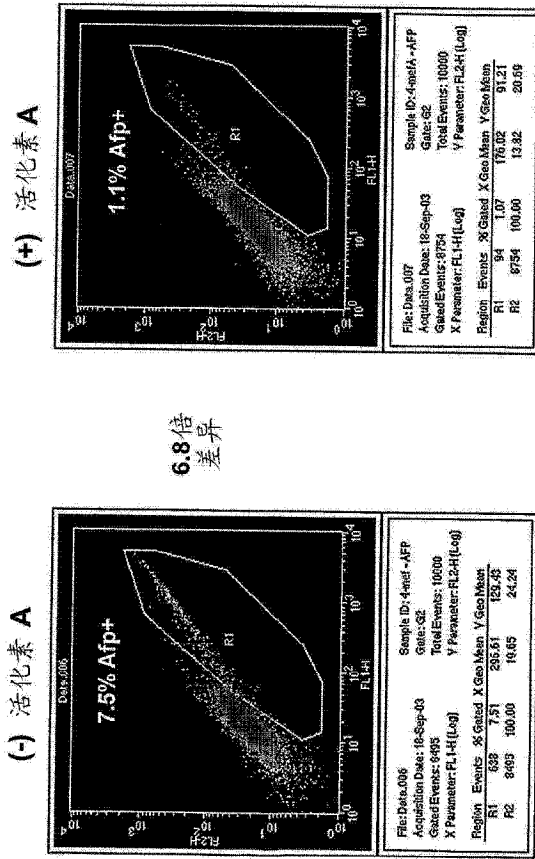


图 9

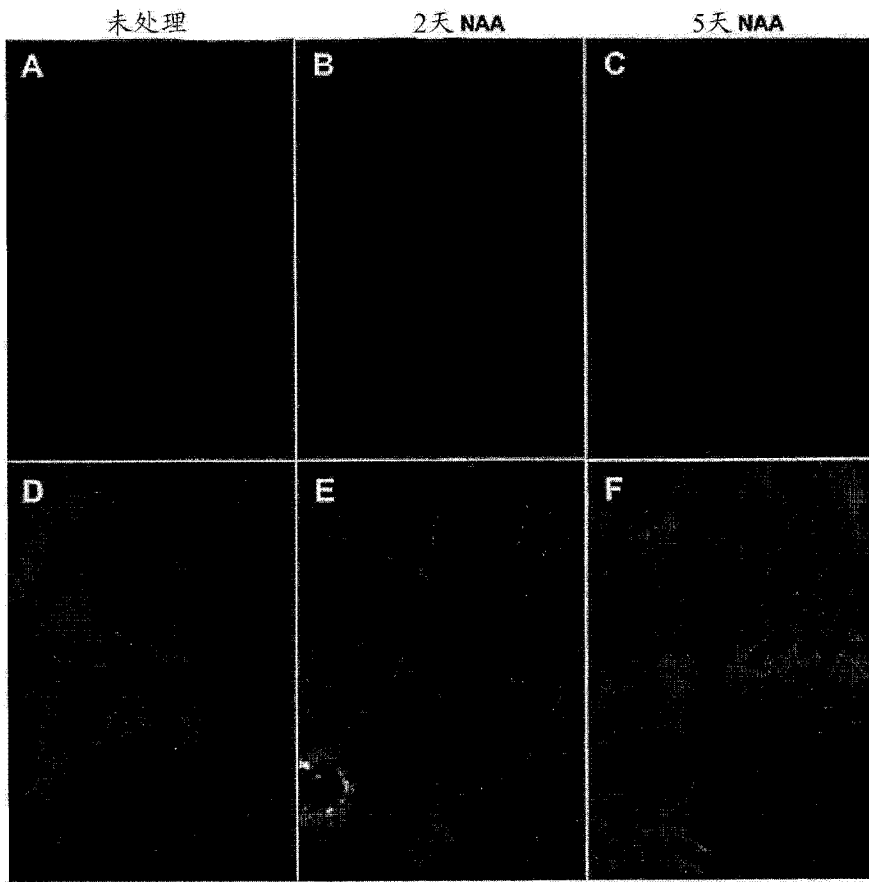


图 10

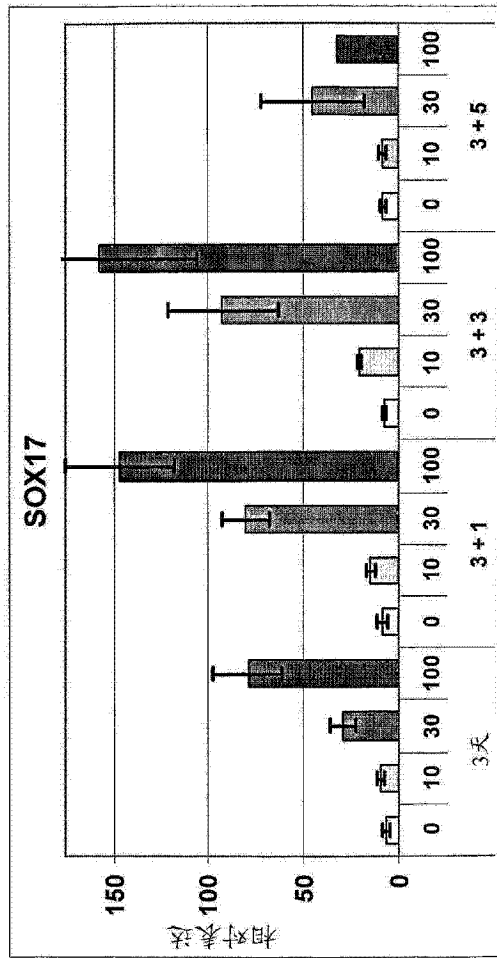
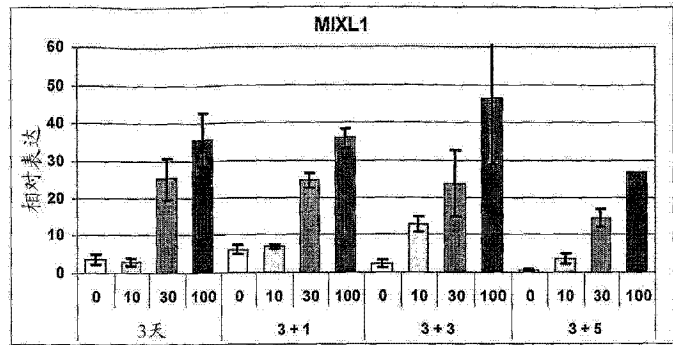
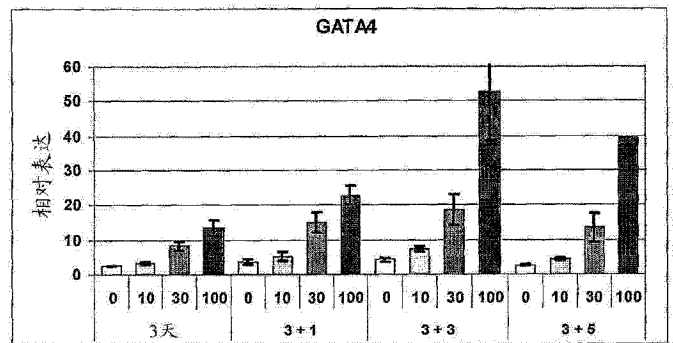


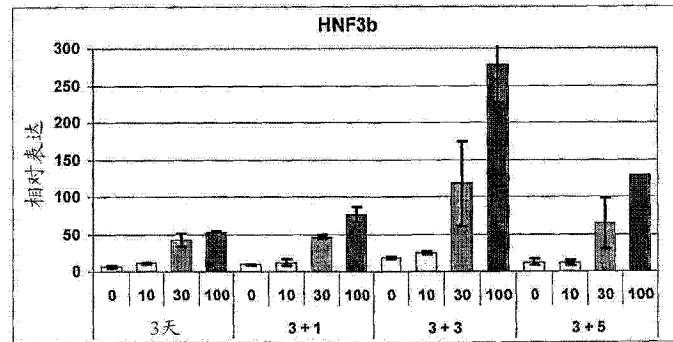
图 11



(A)

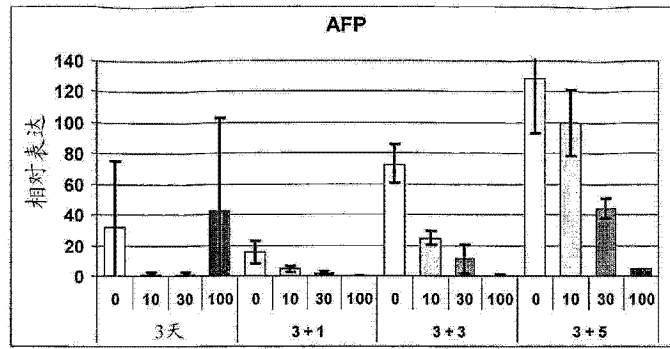


(B)

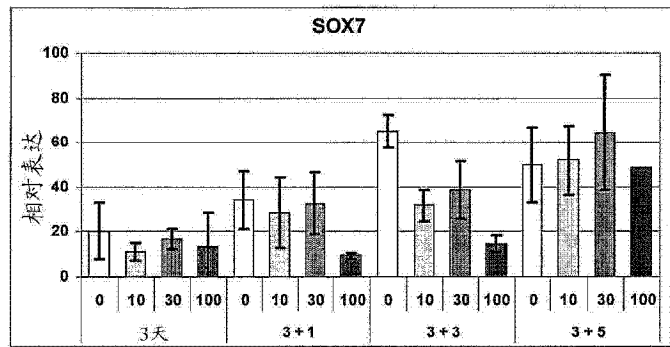


(C)

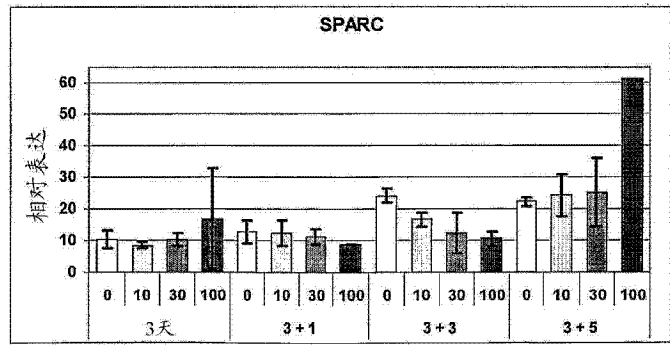
图 12



(A)

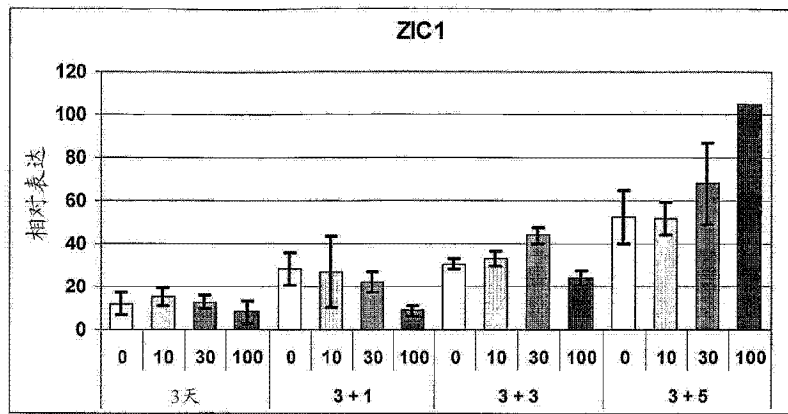


(B)

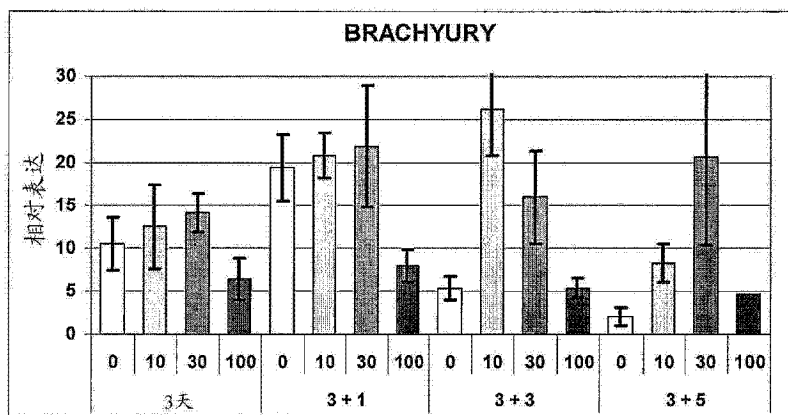


(C)

图 13



(A)



(B)

图 14

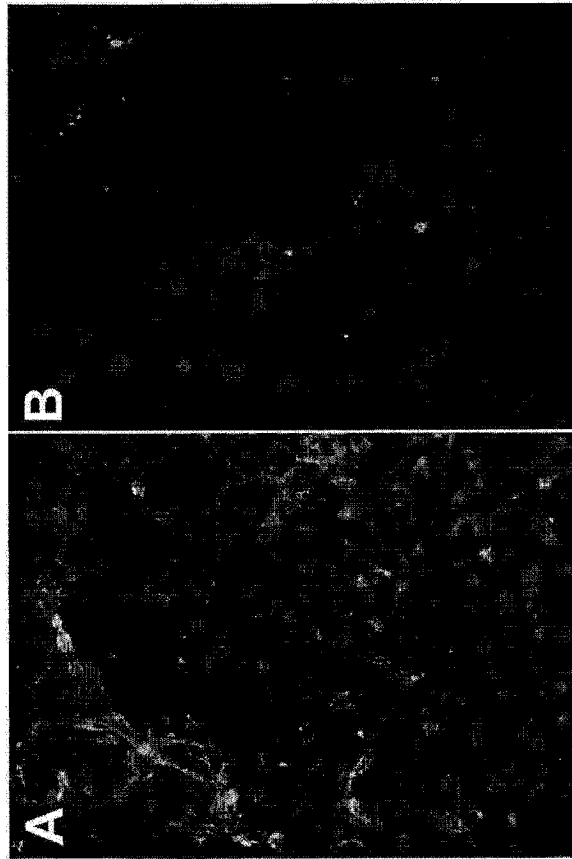


图 15

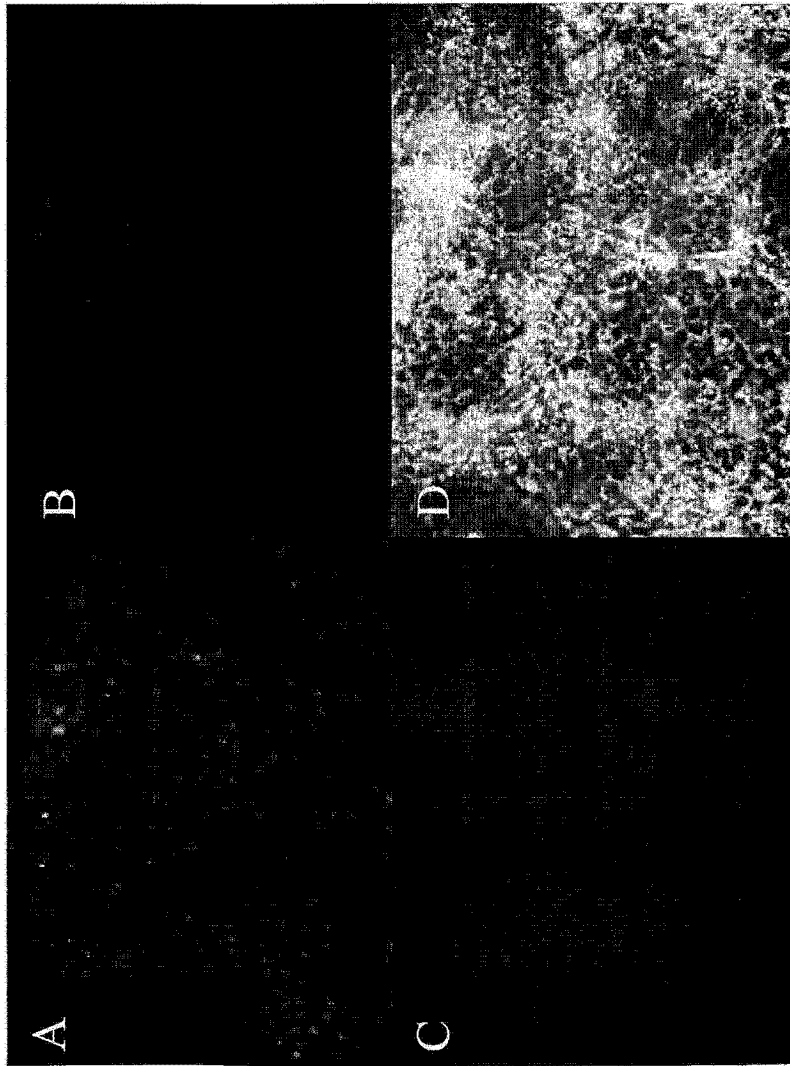


图 16

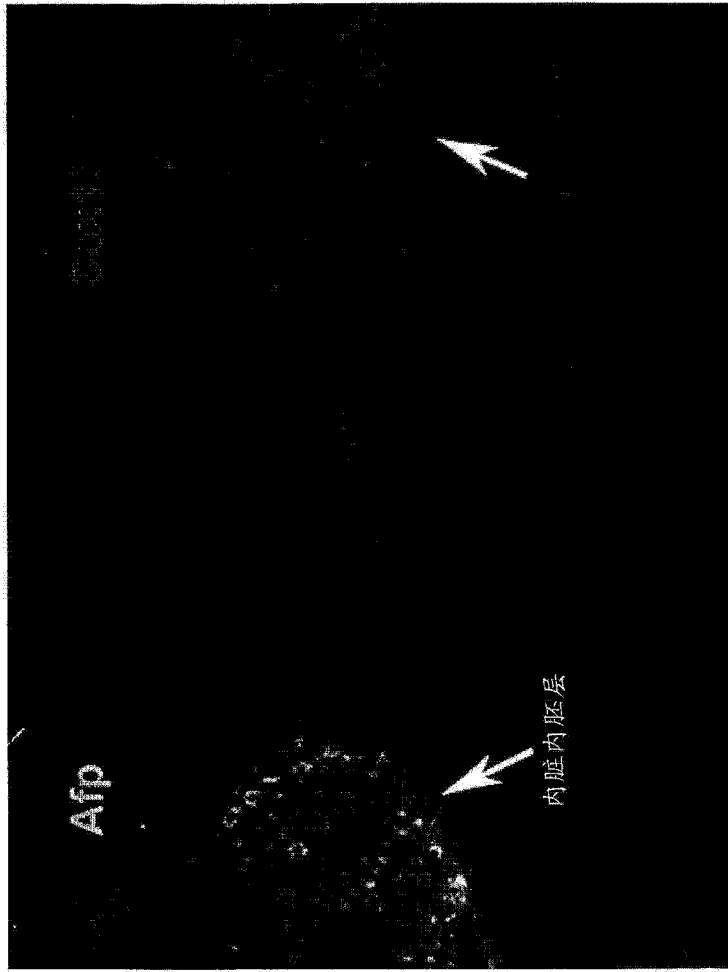


图 17

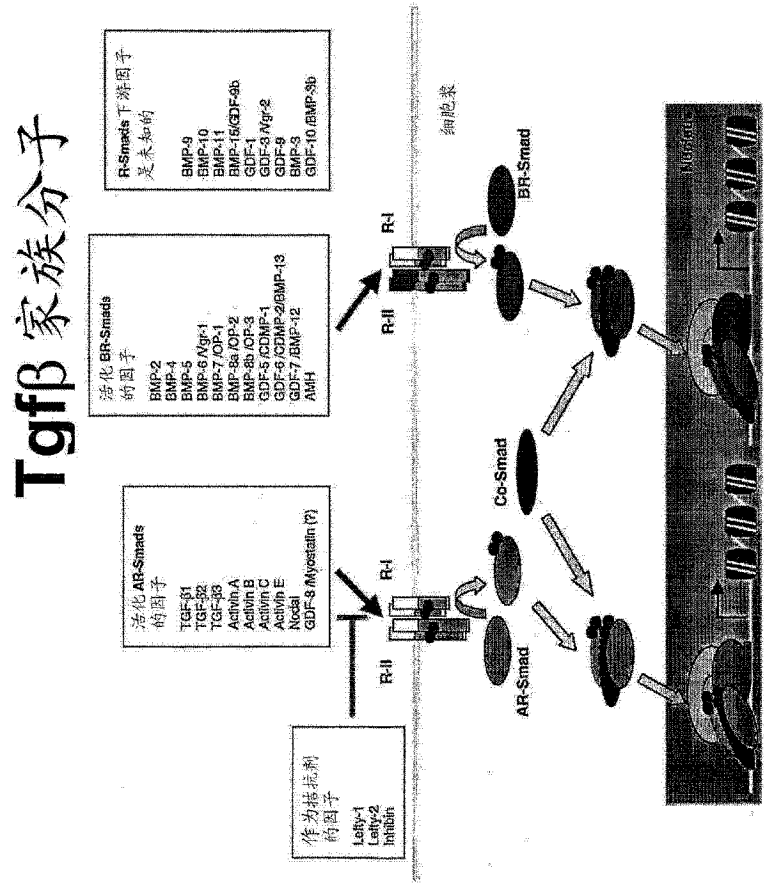


图 18

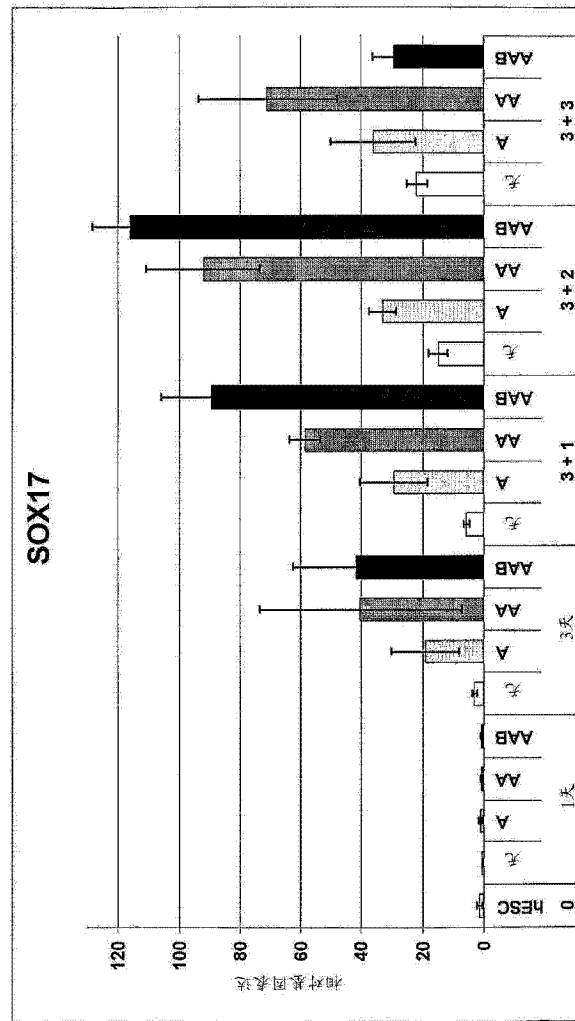


图 19

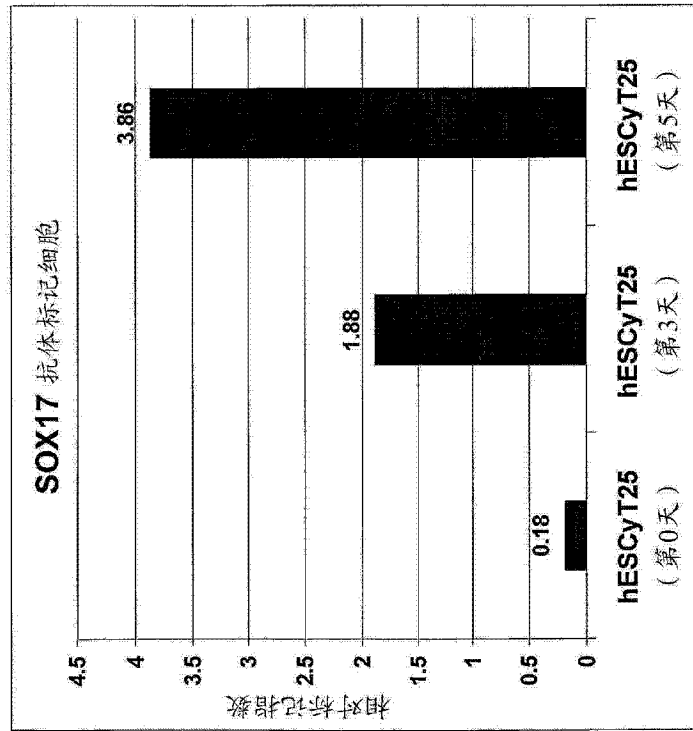


图 20

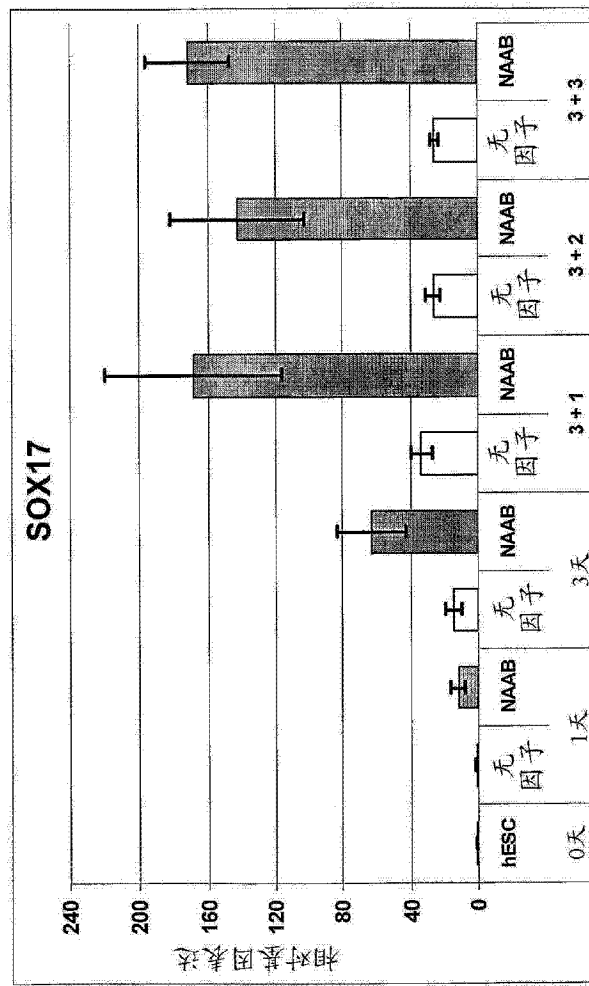


图 21

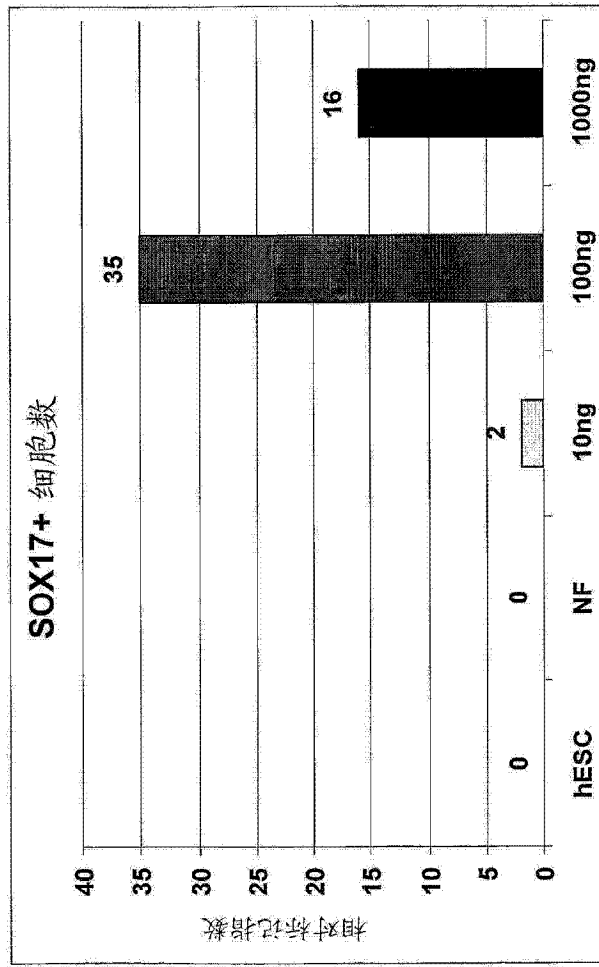


图 22

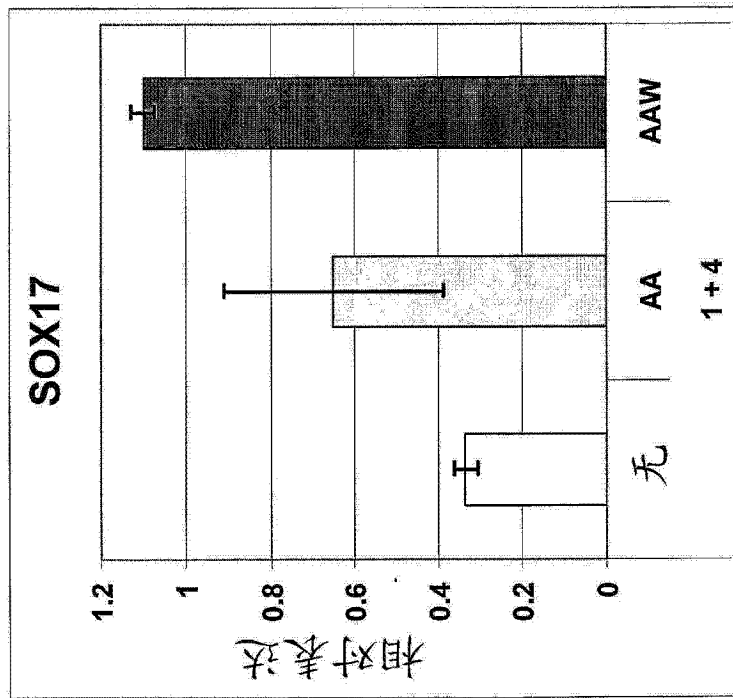
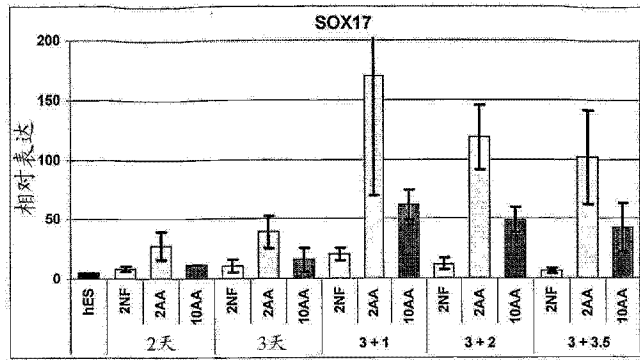
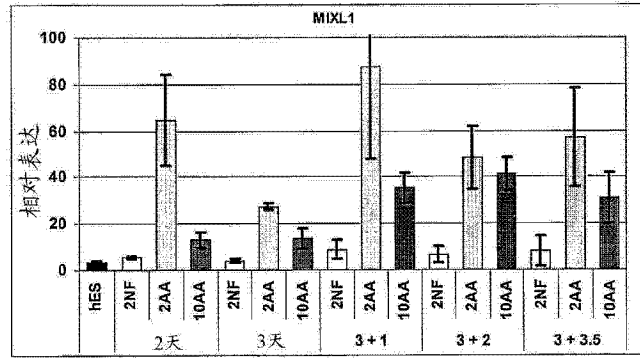


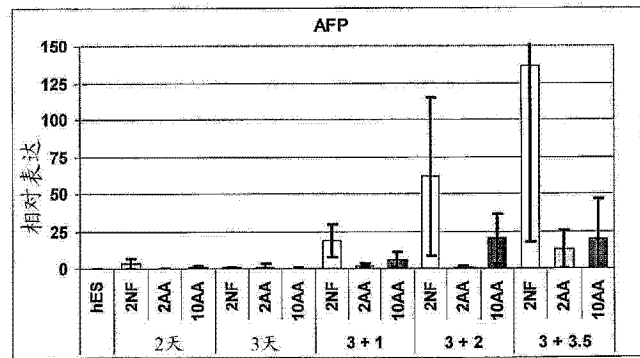
图 23



(A)



(B)



(C)

图 24

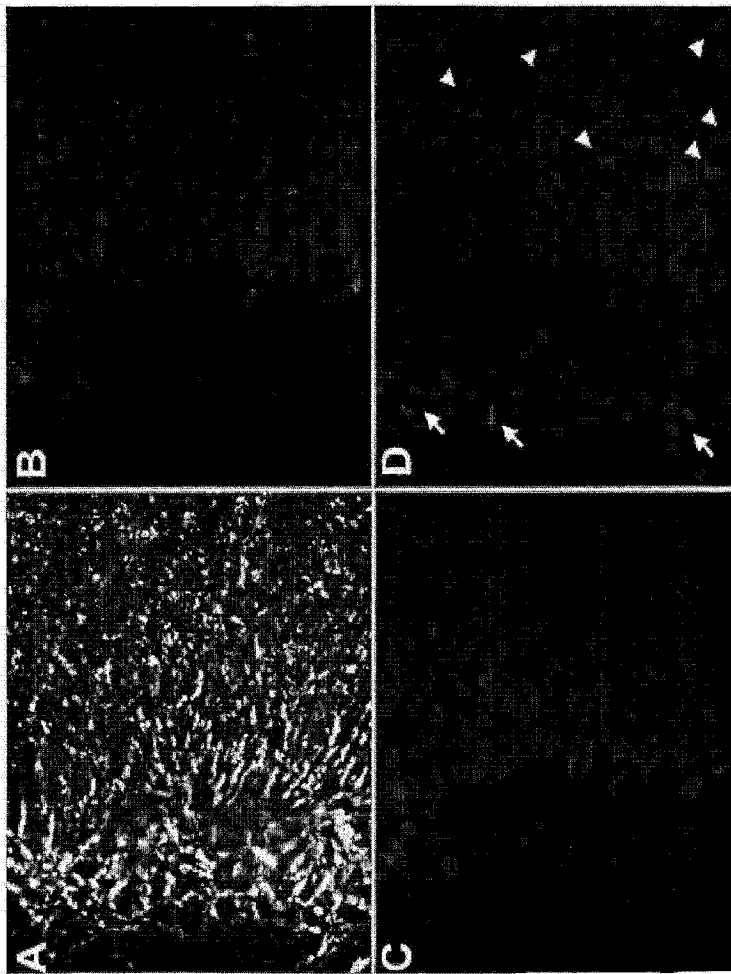


图 25

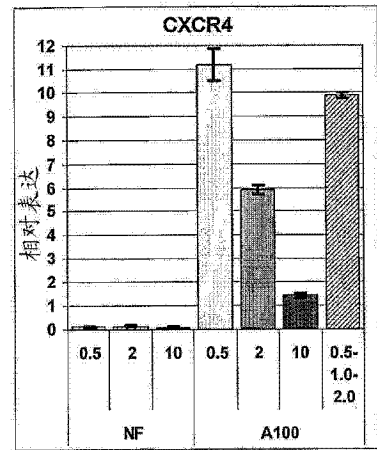


图 26

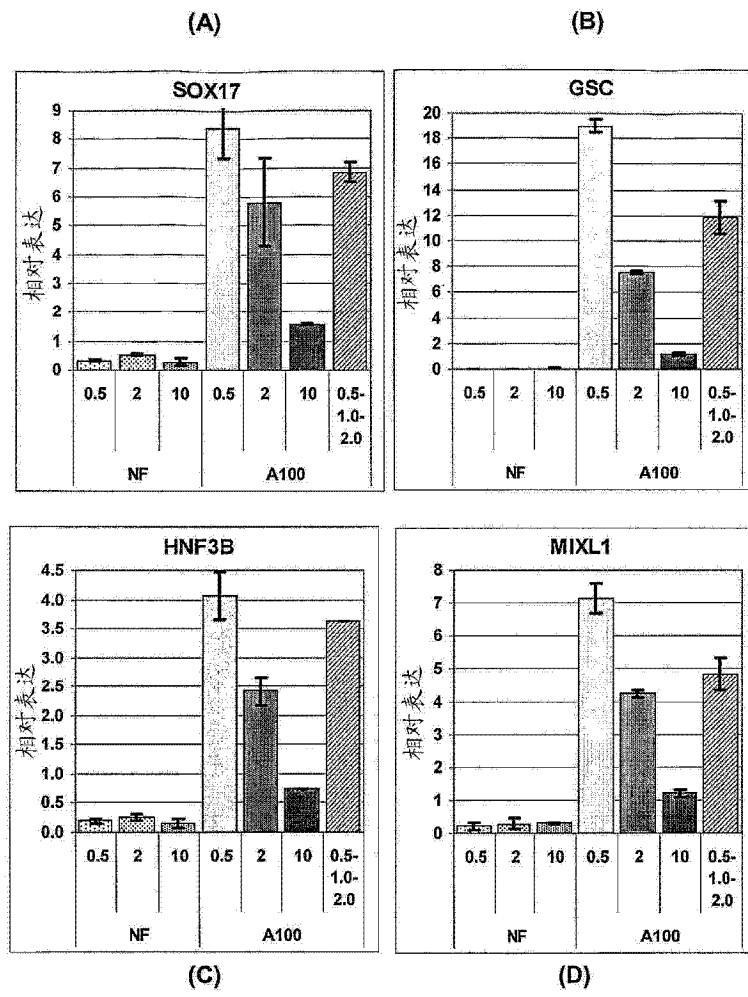


图 27

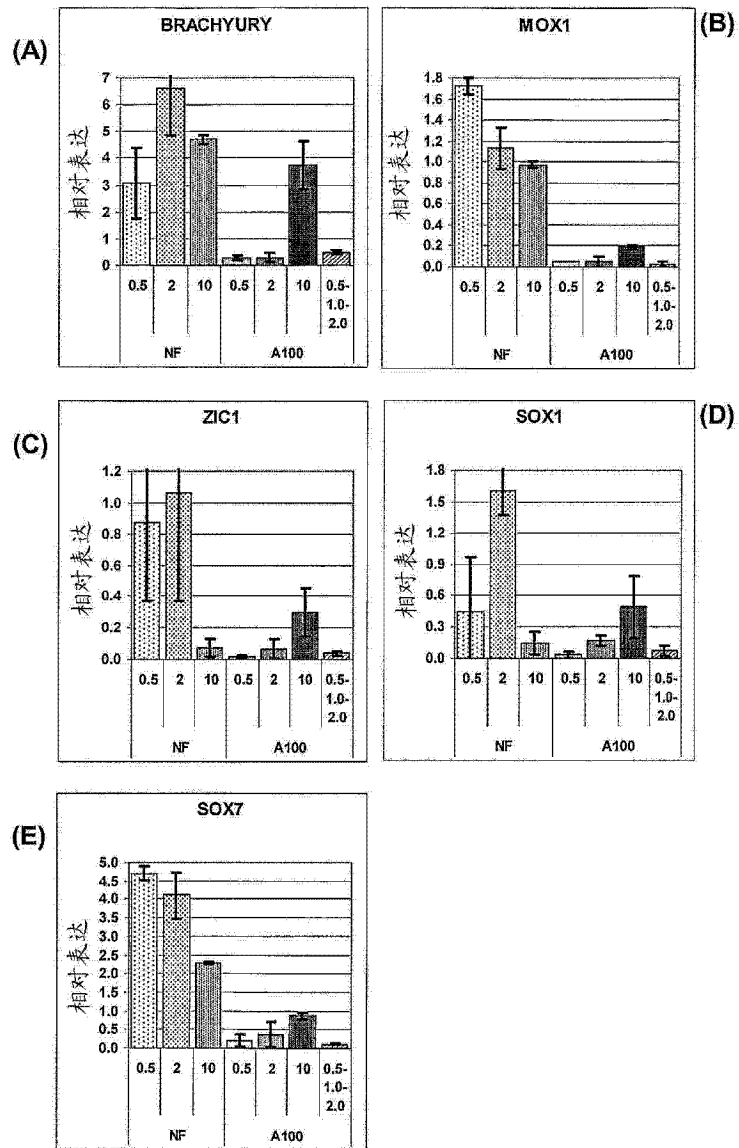


图 28

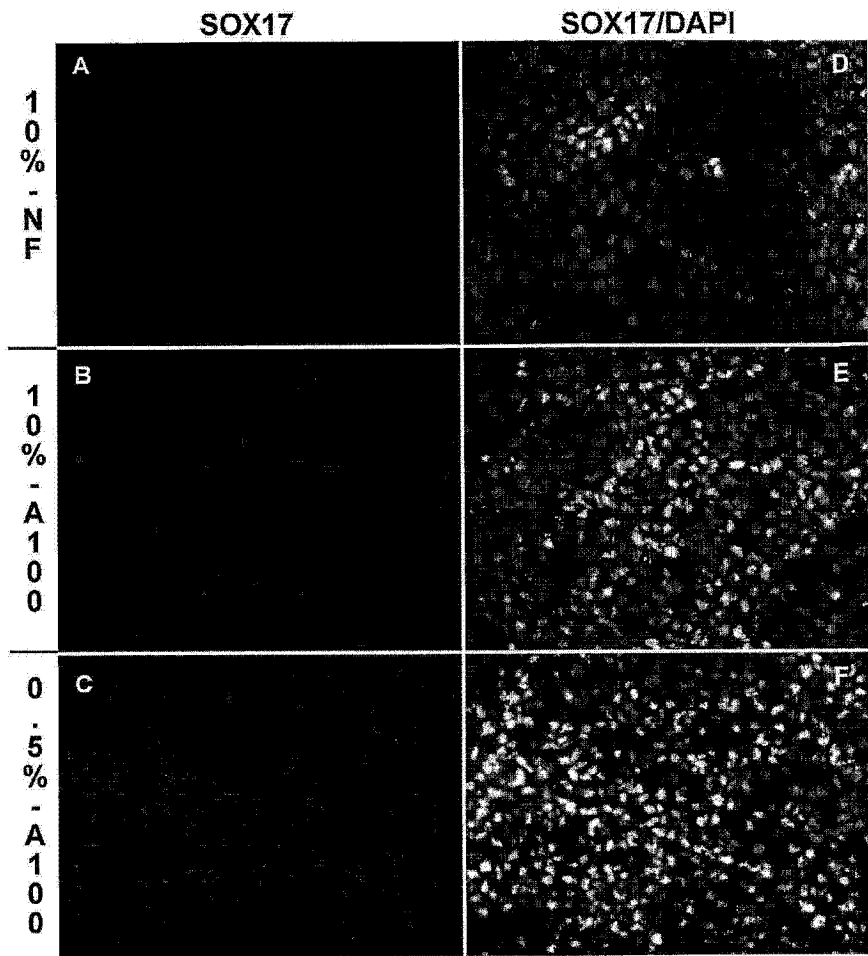


图 29

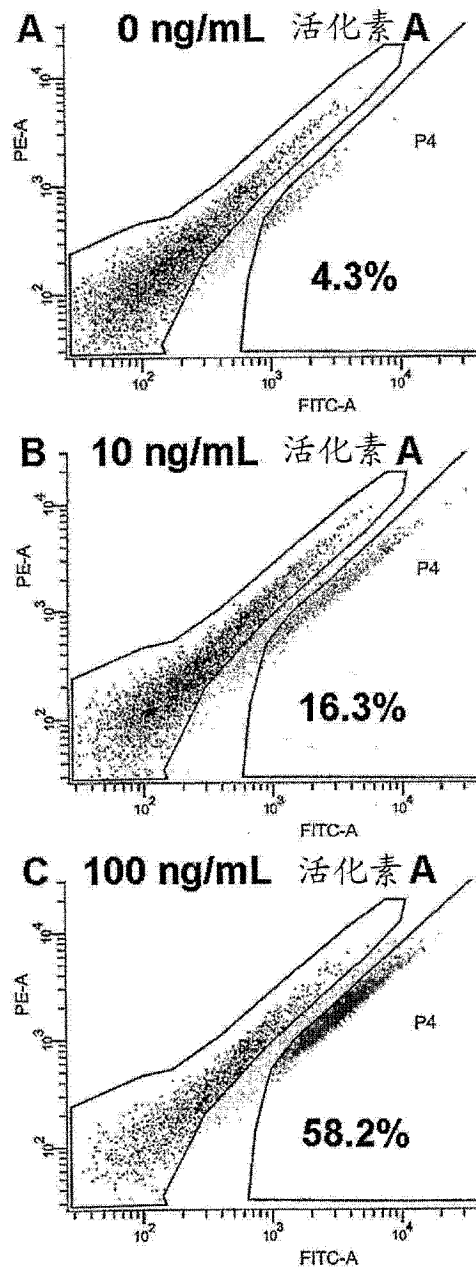


图 30

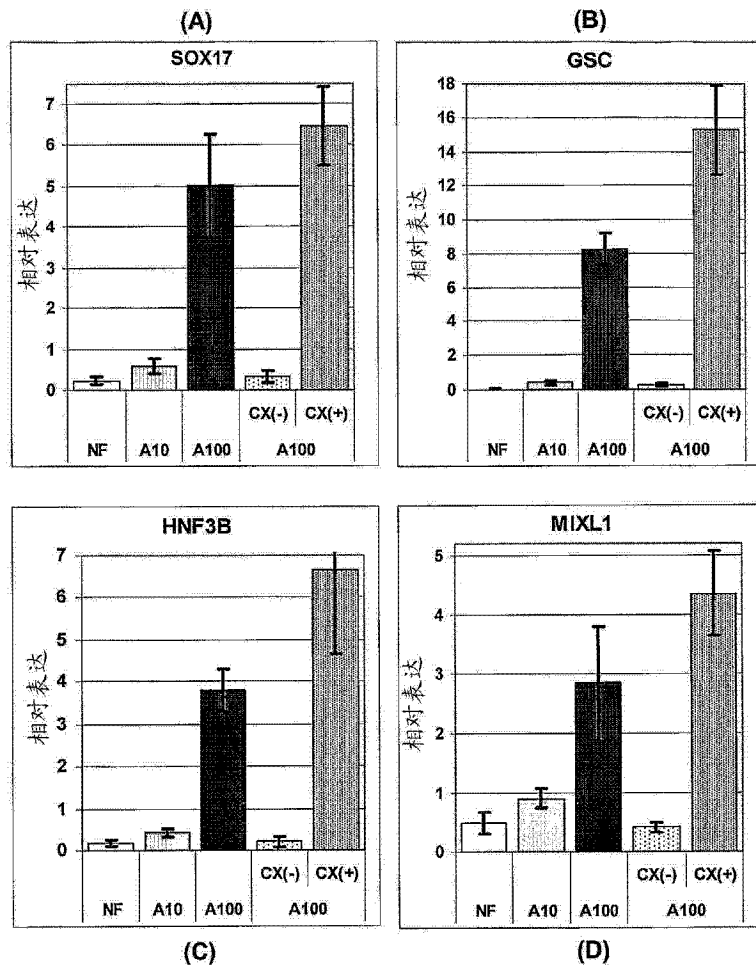


图 31

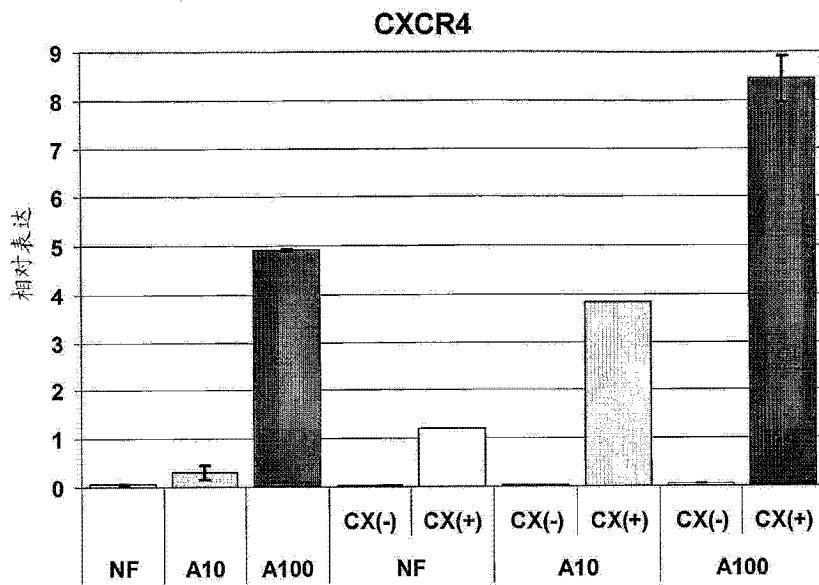


图 32

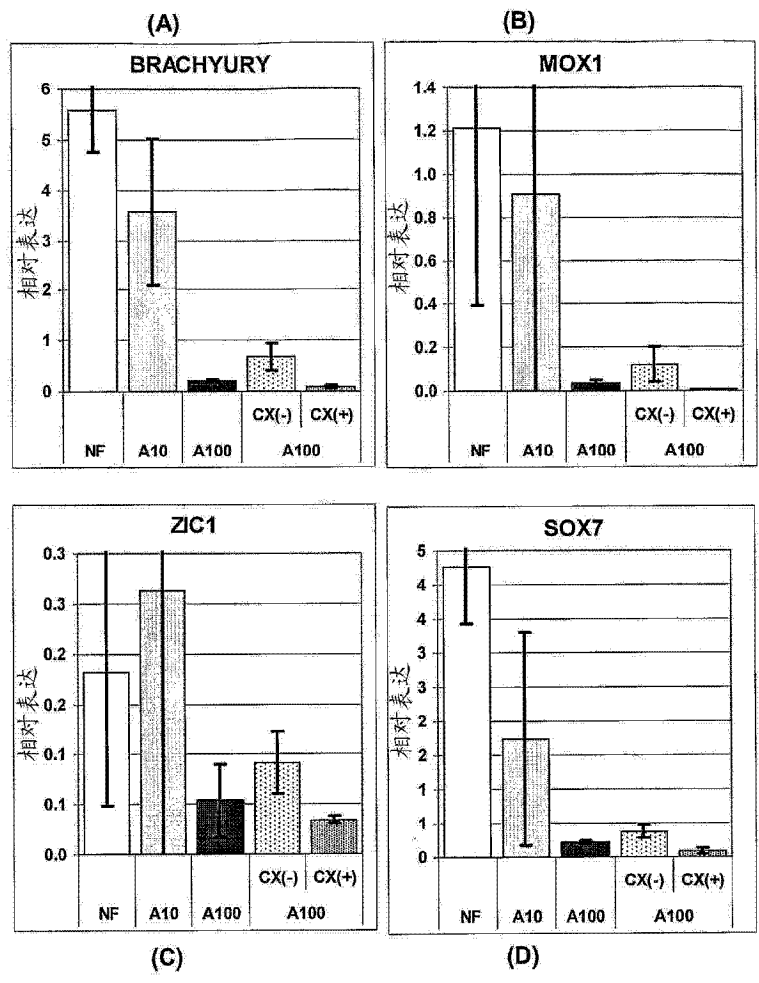


图 33

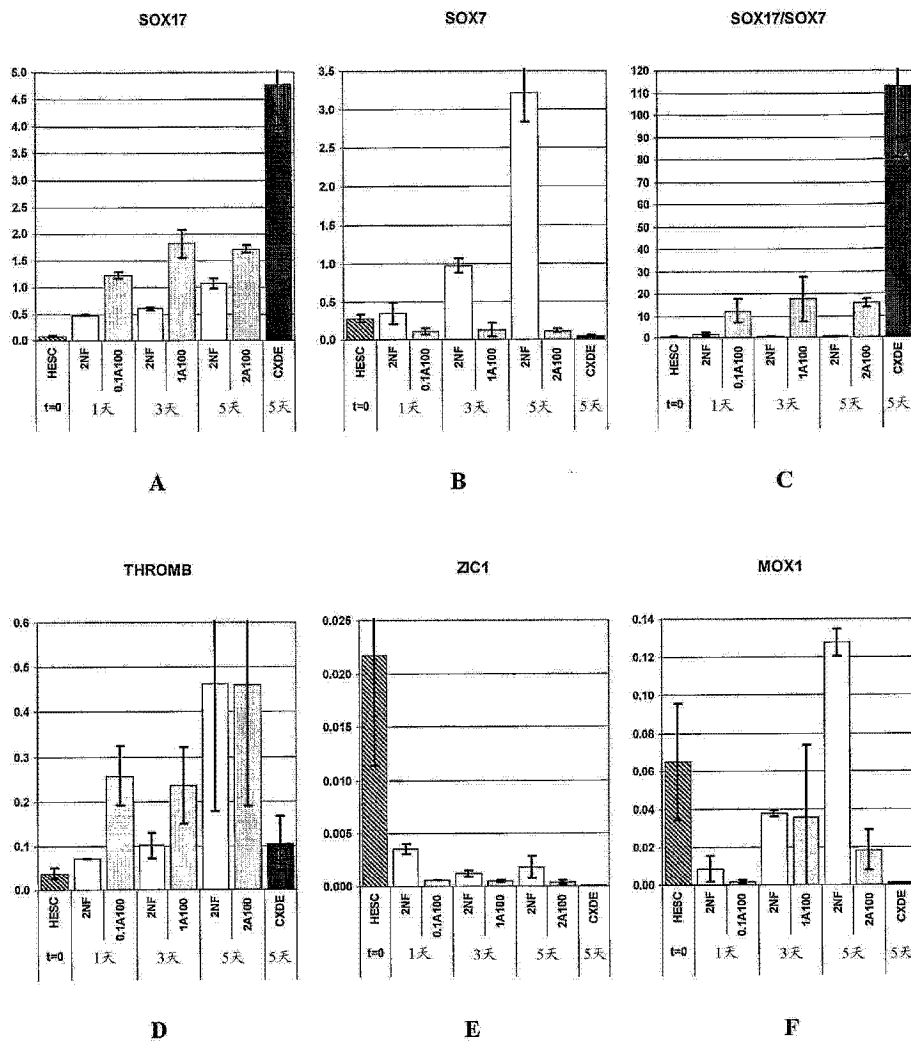


图 34

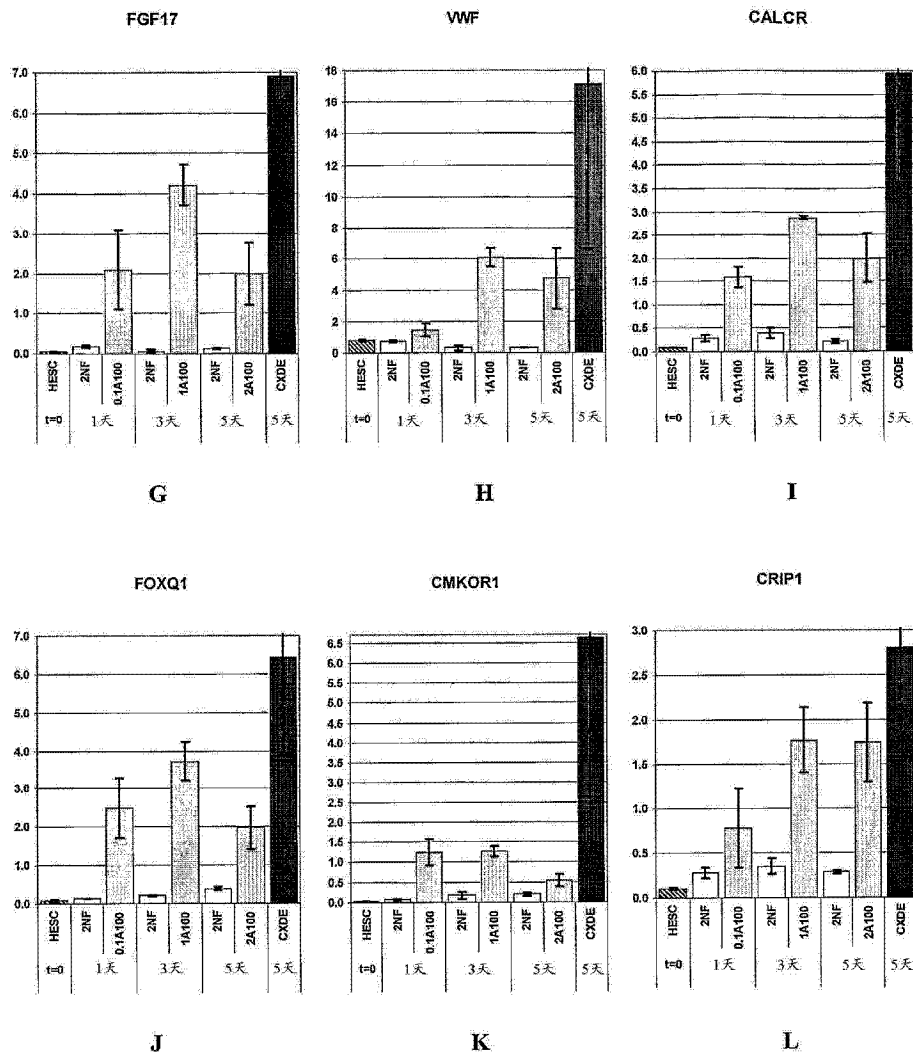
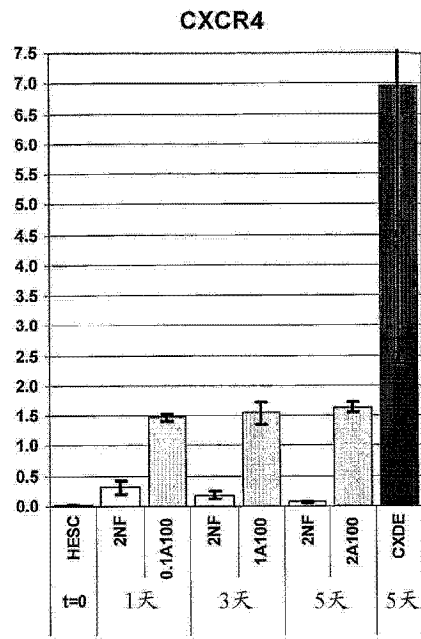


图 34



M

图 34