(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119183473 A
(43)申请公布日 2024.12.24

(21)申请号 202380039114.4
(22)申请日 2023.05.11
(30)优先权数据
10-2022-0058776 2022.05.13 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.11.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2023/006394 2023.05.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/219434 KO 2023.11.16
(71)申请人 株式会社图尔金
地址 韩国
(72)发明人 李宰荣 安昌铉 李康寅 崔有利
(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 高丽娜 张莹
(51)Int.Cl.
C12N 5/071(2010.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/86(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)
C12N 15/113(2010.01)
C12N 15/10(2006.01)
A61K 35/407(2015.01)
A61K 35/39(2015.01)
A61P 1/16(2006.01)
A61P 3/10(2006.01)

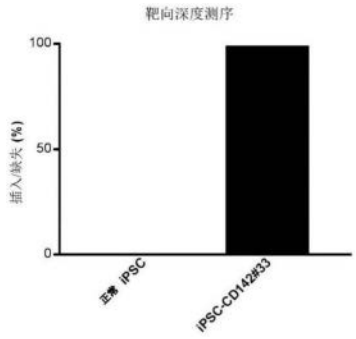
权利要求书3页 说明书19页
序列表（电子公布） 附图5页

(54)发明名称

具有血液相容性的血管内移植用细胞、其制备方法及用途

(57)摘要

本发明提供通过基因编辑技术人工变形编码作为血液凝固的起始因子的CD142的F3基因来减少或抑制CD142的表达或活性，从而抑制血液凝固机制及血栓生成反应的具有血液相容性的血管内移植用细胞、其制备方法及利用其来预防或治疗肝疾病及糖尿病的用途。



CN 119183473 A

1.一种人工改造血管内移植用细胞,其为包含人工改造F3基因的人工改造哺乳动物细胞,其特征在于,

所述人工改造F3基因与野生型哺乳动物细胞的F3基因序列不同,

所述人工改造F3基因在核酸序列内包含一个以上插入/缺失,

在所述人工改造哺乳动物细胞表面的CD142的表达水平与野生型哺乳动物细胞相比减少。

2.根据权利要求1所述的人工改造血管内移植用细胞,其特征在于,

在所述人工改造血管内移植用细胞内,

从所述人工改造F3基因转录的mRNA与从野生型哺乳动物细胞的F3基因转录的mRNA表达水平相比,其mRNA表达水平更低或者序列不同。

3.根据权利要求1所述的人工改造血管内移植用细胞,其特征在于,所述插入/缺失在F3基因的外显子第一区域、第二区域、第三区域、第四区域或第六区域中位于PAM序列内,或者位于与PAM序列的5'末端或3'末端相邻的连续5个至50个核苷酸序列内。

4.根据权利要求1所述的人工改造血管内移植用细胞,其特征在于,所述哺乳动物细胞为原代肝细胞、原代胰腺β细胞、原代胰岛细胞、胰腺祖细胞、多能干细胞来源肝细胞、多能干细胞来源胰腺β细胞、多能干细胞来源胰岛细胞、多能干细胞来源胰腺谱系细胞、多能干细胞来源胰腺祖细胞、多能干细胞来源胰腺类器官、多能干细胞来源胰腺肝类器官、诱导多能干细胞来源肝细胞、诱导多能干细胞来源胰腺β细胞、诱导多能干细胞来源胰岛细胞、诱导多能干细胞来源胰腺谱系细胞、诱导多能干细胞来源胰腺祖细胞、诱导多能干细胞来源胰腺类器官、诱导多能干细胞来源胰腺肝类器官、通过化合物或基因改造从体细胞诱导的肝细胞、通过化合物或基因改造从体细胞诱导的胰岛细胞或通过化合物或基因改造从体细胞诱导的胰腺β细胞。

5.根据权利要求1所述的人工改造血管内移植用细胞,其特征在于,所述人工改造F3基因的序列不包含序列号1的序列。

6.一种人工改造血管内移植用细胞,其为由包含人工改造F3基因的人工改造干细胞分化或来源的细胞,其特征在于,

所述人工改造F3基因与由野生型干细胞分化或来源的细胞的F3基因序列不同,

所述人工改造F3基因在核酸序列内包含一个以上插入/缺失,

在所述由人工改造干细胞分化或来源的细胞表面的CD142的表达水平与由野生型干细胞分化或来源的细胞相比减少。

7.根据权利要求6所述的人工改造血管内移植用细胞,其特征在于,所述干细胞为诱导多能干细胞、胚胎干细胞、体细胞核移植胚胎干细胞或成体干细胞。

8.根据权利要求6所述的人工改造血管内移植用细胞,其特征在于,所述由人工改造干细胞分化或来源的细胞为胰腺β细胞、肝细胞、胰腺祖细胞、胰岛细胞、胰腺谱系细胞、胰腺类器官或胰腺肝类器官。

9.一种用于制备具有血液相容性的血管内移植用细胞的组合物,其特征在于,包含:

向导核酸或编码其的核酸,包含能够靶向哺乳动物细胞或干细胞的F3基因的靶序列的向导序列;以及

编辑蛋白或编码其的核酸。

10.根据权利要求9所述的用于制备具有血液相容性的血管内移植用细胞的组合物,其特征在于,所述组合物以核糖核蛋白形式包含所述编辑蛋白及所述向导核酸。

11.根据权利要求9所述的用于制备具有血液相容性的血管内移植用细胞的组合物,其特征在于,所述组合物以一种以上载体形式包含编码所述编辑蛋白的核酸及编码所述向导核酸的核酸。

12.根据权利要求11所述的用于制备具有血液相容性的血管内移植用细胞的组合物,其特征在于,所述载体选自由质粒、逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、痘苗病毒、痘病毒及单纯疱疹病毒组成的组中。

13.一种具有血液相容性的血管内移植用细胞的制备方法,其特征在于,包括:

步骤(1),向分离的哺乳动物细胞或分离的干细胞导入用于制备具有血液相容性的血管内移植用细胞的组合物,所述组合物包含能够靶向F3基因的靶序列的向导核酸或编码其的核酸以及编辑蛋白或编码其的核酸;以及

步骤(2),通过使位于所述分离的哺乳动物细胞或分离的干细胞的基因组内的F3基因的靶序列发生插入/缺失来编辑F3基因,以减少或抑制CD142的表达或活性。

14.根据权利要求13所述的具有血液相容性的血管内移植用细胞的制备方法,其特征在于,所述组合物以一种以上载体形式包含编码所述编辑蛋白的核酸及编码所述向导核酸的核酸。

15.根据权利要求13所述的具有血液相容性的血管内移植用细胞的制备方法,其特征在于,通过使位于所述分离的哺乳动物细胞的基因组内的F3基因的靶序列与包含酿脓链球菌来源Cas9蛋白及能够靶向F3基因的靶序列的向导RNA的CRISPR/Cas9复合物接触来在所述靶序列内发生插入/缺失。

16.一种血管施用用细胞治疗剂,其特征在于,包含权利要求1至8中任一项所述的人工改造血管内移植用细胞作为有效成分。

17.一种用于预防或治疗肝疾病的药物组合物,其特征在于,包含权利要求1至8中任一项所述的人工改造血管内移植用细胞作为有效成分。

18.根据权利要求17所述的用于预防或治疗肝疾病的药物组合物,其特征在于,所述肝疾病为肝硬化、慢加急性肝衰竭、药物或中毒引起的肝衰竭、先天性代谢性肝疾病、克里格勒-纳贾尔综合征I型、家族性高胆固醇血症、因子VII缺乏症、因子VIII缺乏症、苯丙酮尿症、糖原贮积病I型、婴儿雷夫叙姆病、进行性家族性肝内胆汁淤积症2型、遗传性酪氨酸血症1型、尿素循环障碍、急性肝衰竭、急性药源性肝衰竭、病毒引起的急性肝衰竭、特发性急性肝衰竭、蘑菇中毒引起的急性肝衰竭、术后急性肝衰竭、由妊娠期急性脂肪肝引起的急性肝衰竭、酒精性肝炎或肝性脑病,所述因子VIII缺乏症即A型血友病。

19.根据权利要求17所述的用于预防或治疗肝疾病的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物通过肝门静脉、脐静脉或脾动脉来施用。

20.一种用于预防或治疗糖尿病的药物组合物,其特征在于,包含权利要求1至8中任一项所述的人工改造血管内移植用细胞作为有效成分。

21.根据权利要求20所述的用于预防或治疗糖尿病的药物组合物,其特征在于,所述糖尿病为1型糖尿病。

22.根据权利要求20所述的用于预防或治疗糖尿病的药物组合物,其特征在于,所述药

物组合物通过肝门静脉来施用。

23.一种用于细胞移植或生物组织再生的组合物,其特征在于,包含权利要求1至8中任一项所述的人工改造血管内移植用细胞作为有效成分。

24.根据权利要求23所述的用于细胞移植或生物组织再生的组合物,其特征在于,所述用于细胞移植或生物组织再生的组合物为细胞治疗剂组合物、基因治疗剂组合物、组织工程治疗剂组合物、免疫治疗剂组合物或癌症的预防或治疗剂组合物。

具有血液相容性的血管内移植用细胞、其制备方法及用途

技术领域

[0001] 本发明提供通过减少或抑制作为血液凝固的起始因子的CD142的表达或活性水平来抑制血栓生成反应,由此能够向血管内施用的具有血液相容性的血管内移植用细胞、其制备方法及用途。

背景技术

[0002] 动物体为了使组织损伤引起的血液损失最小化,具有作为防止出血的复杂的生物体工具的血液凝固系统。血液凝固系统为对初始刺激的称为级联反应(cascade reaction)的连续的扩增反应过程,由通过刺激直接诱发的内在途径(intrinsic pathway)和独特的外在途径(extrinsic pathway)构成。其中与多种血液凝固因子相关。

[0003] 其中,CD142为在外在途径凝固过程的初始阶段起作用的细胞膜糖蛋白,在生物体内凝固过程中起到重要的作用。CD142与第VII或VIIa凝固因子结合后,激活第IX及与将凝血酶原激活为凝血酶相关的X凝固因子来在凝固过程中生成凝血酶,凝血酶将纤维蛋白原激活为纤维蛋白来形成血栓。并且,CD142通过激活免疫细胞来激发嗜中性粒细胞、血小板、单核细胞的活性,诱发各种细胞因子的分泌,激活内在的免疫体系。

[0004] 细胞移植(Cell transplantation)作为再生医学中迅速发展的治疗方法,为了恢复细胞和组织的功能,将活的自体(autologous)、同种(allogenic)或异种(xenegenic)的细胞在体外环境(in vitro)中通过培养过程,通过分离、增殖及筛选或改变细胞的生物特性的一系列行为来以治疗、诊断及预防的目的使用。与整个器官的移植相比,基于细胞的治疗为发病率/死亡率低且侵袭性较低的过程。细胞移植显著降低与手术有关的危险,具有即使移植片的功能不足或发生器官间的移植片损失也仍保存原有器官的优点。

[0005] 用于治疗1型糖尿病的最为理想的方法为胰岛细胞移植,但因急性血液介导炎性反应(Instant blood mediated inflammatory reaction,IBMIR)等炎性反应而限制移植的胰岛细胞(islets)的存活,因此,在临床应用上还存在问题。由胰岛移植诱发的门脉血栓是广为人知的严重并发症。为了防止上述并发症,使用肝素等抗凝剂。急性血液介导炎性反应为在通过肝门静脉移植胰岛细胞的情况下,移植的胰岛细胞直接暴露于血液中,因血小板、补体等血液凝固系统的激活而在胰岛细胞周围引起血液凝固,从而使胰岛细胞急剧破坏,这是由保有CD142(tissue factor,TF,factor III,组织因子,血液凝固第三因子)的胰岛细胞或由细胞引起的血液凝固及补体通路的双重激活引起的。

[0006] 肝细胞移植(Hepatocyte transplantation)是对于特定基于肝的代谢疾病及急性肝衰竭患者的有关肝移植的替代方案。为了移植,利用胶原酶灌注技术从供体肝组织中分离人肝细胞并使用离心来纯化。移植的细胞数量以正常肝质量的约5%为目标,通常通过肝门静脉或脾脏来施用。对于该疗法持续成功的主要障碍之一为初期的细胞损失,灌注后肝细胞的损失马上可达最高70%。已知这是由急性血液介导炎性反应(IBMIR)引起的。移植的肝细胞通过产生和释放激活凝固途径的CD142(tissue factor,TF,factor III,组织因子,血液凝固第三因子)来形成凝血酶及纤维蛋白凝固。凝血酶通过激活多种补体蛋白来激

活攻膜复合物(MAC,membrane attack complex)并引起后续肝细胞的凋亡。

发明内容

[0007] 发明要解决的课题

[0008] 本发明的目的在于,提供向血管内施用时可由施用的细胞诱发的血栓生成反应被抑制的具有血液相容性的血管内移植用细胞、其制备方法及利用其的细胞治疗剂。

[0009] 用于解决课题的手段

[0010] 为了实现上述目的,本发明提供通过减少或抑制作为血液凝固的起始因子的CD142的表达或活性水平来抑制血栓生成反应,由此能够向血管内施用的具有血液相容性的血管内移植用细胞。

[0011] 并且,本发明提供一种人工改造血管内移植用细胞,其为包含人工改造F3基因的人工改造哺乳动物细胞,其特征在于,上述人工改造F3基因与野生型哺乳动物细胞的F3基因序列不同,上述人工改造F3基因在核酸序列内包含一个以上插入/缺失(indel),在上述人工改造哺乳动物细胞表面的CD142的表达水平与野生型哺乳动物细胞相比减少。

[0012] 并且,本发明提供一种人工改造血管内移植用细胞,其为由包含人工改造F3基因的人工改造干细胞分化或来源的细胞,其特征在于,上述人工改造F3基因与由野生型干细胞分化或来源的细胞的F3基因序列不同,上述人工改造F3基因在核酸序列内包含一个以上插入/缺失,在上述由人工改造干细胞分化或来源的细胞表面的CD142的表达水平与由野生型干细胞分化或来源的细胞相比减少。

[0013] 并且,本发明提供用于制备具有血液相容性的血管内移植用细胞的组合物,其包含:向导核酸或编码其的核酸,包含能够靶向哺乳动物细胞或干细胞的F3基因的靶序列的向导序列;以及编辑蛋白或编码其的核酸。

[0014] 并且,本发明提供具有血液相容性的血管内移植用细胞的制备方法,其包括:步骤(1),向分离的哺乳动物细胞或分离的干细胞导入用于制备具有血液相容性的血管内移植用细胞的组合物,上述组合物包含能够靶向F3基因的靶序列的向导核酸或编码其的核酸以及编辑蛋白或编码其的核酸;以及步骤(2),通过使位于上述分离的哺乳动物细胞或分离的干细胞的基因组内的F3基因的靶序列发生插入/缺失来编辑F3基因,以减少或抑制CD142的表达或活性。

[0015] 并且,本发明提供一种血管施用用细胞治疗剂,包含人工改造血管内移植用细胞作为有效成分,以具有上述血液相容性。

[0016] 并且,本发明提供一种用于预防或治疗肝疾病的药物组合物,包含人工改造血管内移植用细胞作为有效成分,以具有上述血液相容性。

[0017] 并且,本发明提供提供一种用于预防或治疗糖尿病的药物组合物,包含人工改造血管内移植用细胞作为有效成分,以具有上述血液相容性。

[0018] 发明效果

[0019] 本发明的人工改造血管内移植用细胞使用基因编辑技术人工地使编码作为血液凝固起始因子的CD142的F3基因变形,从而减少或抑制CD142的表达或活性,由此可以抑制血液凝固机制。因此,使因细胞表面的CD142过表达引起急性血液介导炎性反应等炎性反应导致的移植后损失而无法示出治疗效果的移植用细胞的血管内施用成为可能,可以通过防

止移植细胞的损失来提高治疗效果。

[0020] 附图简单说明

[0021] 图1为示出正常(normal)iPSC和基因编辑CD142#33的靶序列(序列号1)的iPSC的靶向深度测序结果的图表。

[0022] 图2示出通过qRT-PCR确认作为正常iPSC来源胰腺谱系细胞(Pancreatic lineage cells)的对照组(normal iPSC)、作为敲除(Knock-out)CD142基因的iPSC来源胰腺谱系细胞的实验组(iPSC-CD142#33)的胰腺谱系细胞的分化标记物PDX-1、NKX6.1、SOX9的结果。

[0023] 图3示出通过qRT-PCR确认作为正常iPSC来源肝细胞的对照组(normal iPSC)、作为敲除CD142基因的iPSC来源肝细胞的实验组(iPSC-CD142#33)的肝细胞的分化标记物HNF4α、ALB(白蛋白(Albumin))、AFP的结果。

[0024] 图4示出通过ELISA分析作为正常iPSC来源肝细胞的对照组(normal iPSC)、作为敲除CD142基因的iPSC来源肝细胞的实验组(iPSC-CD142#33)的肝细胞的分化标记物ALB(白蛋白)的结果。

[0025] 图5示出通过qRT-PCR确认作为正常iPSC来源胰腺谱系细胞的对照组(normal iPSC)、作为敲除CD142基因的iPSC来源胰腺谱系细胞的实验组(iPSC-CD142#33)的CD142 mRNA水平的结果。

[0026] 图6示出通过FACS测定作为正常iPSC来源胰腺谱系细胞的对照组(normal iPSC)、作为敲除CD142基因的iPSC来源胰腺谱系细胞的实验组(iPSC-CD142#33)中示出CD142表达的细胞比例(CD142 positive cell population,%)的结果。

[0027] 图7示出通过qRT-PCR确认作为正常iPSC来源肝细胞的对照组(normal iPSC)、作为敲除CD142基因的iPSC来源肝细胞的实验组(iPSC-CD142#33)的CD142 mRNA水平的结果。

[0028] 图8为示出通过FACS测定作为正常iPSC来源肝细胞的对照组(normal iPSC)、作为敲除CD142基因的iPSC来源肝细胞的实验组(iPSC-CD142#33)中示出CD142表达的细胞比例的结果的图表。

[0029] 图9示出通过ELISA分析作为正常iPSC来源胰腺谱系细胞的对照组(normal iPSC)、作为敲除CD142基因的iPSC来源胰腺谱系细胞的实验组(iPSC-CD142#33)的细胞裂解物的CD142蛋白量的结果。

[0030] 图10示出通过ELISA分析作为正常iPSC来源肝细胞的对照组(normal iPSC)、作为敲除CD142基因的iPSC来源肝细胞的实验组(iPSC-CD142#33)的细胞裂解物的CD142蛋白量的结果。

[0031] 发明的具体实施方式

[0032] 以下,详细说明本发明。

[0033] 在本说明书中,“干细胞(stem cell)”是指总称具有能够分化为多种身体组织细胞的能力,即,具有干细胞性(stemness)的未分化细胞的广义的概念。在此情况下,上述干细胞可以为诱导性多能干细胞、胚胎干细胞(Somatic cell nuclear transfer-PSC)及成体干细胞。并且,上述细胞可以为人源性,但不限定于此。

[0034] 在本说明书中,“分化”是指细胞通过分裂来增殖,整个个体在生长的过程中细胞的结构或功能特殊化的现象。即,是指生物的细胞、组织等为发挥各自的作用而变化为适当的形态及功能的过程,例如,不仅包括多能干细胞变为外胚层(大脑皮质、中脑、下丘脑等)、

中胚层(卵黄囊等)及内胚叶细胞的过程,还包括造血干细胞变为红细胞、白细胞、血小板等的过程,即,前体细胞表达为特定分化性状的都可以包括在分化中。

[0035] 本说明书中使用的术语“约”是指相对于参照量、水平、值、数、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度变化30、25、20、25、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1左右的量、水平、值、数、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度。

[0036] 本说明书中使用的术语“人工改造”是为与具有自然界中已存在的结构的物质、分子等区分而使用的术语,是指向上述物质、分子等施加人工变形。例如,“人工改造基因”是指向自然界存在的基因的结构施加人工变形的基因。并且,上述术语包括本领域技术人员可认知的所有含义,可以根据上下文适当地理解。

[0037] 本说明书中使用的“野生型”是指包含自然产生的碱基序列的基因及从该基因表达的蛋白带有正常功能特性。野生型基因具有自然或未发生人工突变的形态,可以在集团中最为频繁地观察到。在本说明书中,如果术语“野生型”与人工改造基因和/或人工改造细胞相对比来使用,则应解释为与人工改造基因和/或人工改造细胞相对应的同种的“未人工改造”的包含自然发生的碱基序列的基因及具有其的细胞的含义。并且,上述术语包括本领域技术人员可认知的所有含义,可以根据上下文适当地理解。

[0038] 本说明书中使用的所谓“敲除(knock-out)”或“敲除的基因”的表述是指在野生型基因中发生突变或人工变形,其结果野生型基因所表达的蛋白无法通过转录和/翻译过程生成。例如,包含敲除的基因A的细胞可能无法表达通过野生型基因A表达的mRNA和/或蛋白。所谓包含敲除的A基因的细胞,可以为仅敲除细胞内存在的基因A中的一个的细胞,也可以为敲除两个以上的细胞。并且,上述术语包括本领域技术人员可认知的所有含义,可以根据上下文适当地理解。

[0039] 本说明书中使用的“敲低(knock-down)”或“敲低的基因”的表述是指在野生型基因中发生突变或人工变形,其结果以比野生型基因少的量来表达物质。例如,包含敲低的基因A的细胞可以表达比通过野生型基因A表达的mRNA少量的mRNA。另举一例,包含敲低的基因A的细胞可以表达比通过野生型基因A表达的蛋白少量的蛋白。所谓A基因被敲低的细胞,可以是仅敲低细胞内存在的基因A中的一个的细胞,也可以是敲低两个以上的细胞。并且,上述术语包括本领域技术人员可认知的所有含义,可以根据上下文适当地理解。

[0040] 在本说明书中,“表达减少”是指表现出比在野生型中测定的mRNA和/或蛋白的表达水平低的表达。上述减少可以为与不具有遗传变形的细胞或野生型细胞相比减少约5%以上、约10%以上、约15%以上、约20%以上、约30%以上、约50%以上、约60%以上、约70%以上或约100%以上。

[0041] 本说明书中使用的术语“活性减少”或“减少的活性”可以是指在测定蛋白或酶的活性时,相对活性的减少。具体地,“活性减少”或“减少的活性”是指比所给的祖细胞或野生型细胞更低水平的蛋白或酶的活性。

[0042] 本说明书中使用的“血液相容性(Hemocompatibility)”是指与血液接触时不诱发溶血(haemolysis)、血小板附着、基于血小板激活及补体(complement)激活的纤维蛋白形成、血栓形成反应或栓塞症。

[0043] 本发明提供减少或抑制CD142(tissue factor,TF,factor III,组织因子,血液凝固第三因子)的表达或活性的血管内移植用细胞。

[0044] 上述减少或抑制CD142的表达或活性的血管内移植用细胞是通过减少或抑制作为在外因性凝固过程的起始阶段起作用的细胞膜糖蛋白在生物体内血液凝固过程中起重要作用的CD142的表达或活性来抑制血栓凝固机制的哺乳动物细胞,上述减少或抑制CD142的表达或活性的哺乳动物细胞在作为细胞治疗剂通过血管施用来施用时,可以表现出比野生型哺乳动物细胞、用现有技术人工改造的哺乳动物细胞或抗体、通过细胞分选装置或磁珠等筛选的CD142低表达哺乳动物细胞更为改善的血液相容性。

[0045] 具体地,本发明提供具有血液相容性的人工改造血管内移植用细胞,其特征在于,通过人工改造哺乳动物细胞的F3基因来减少或抑制F3mRNA和/或CD142的表达或活性,由此在血管内施用时减少血液凝固反应。

[0046] 本发明的哺乳动物可以为例如:人、猴、恒河猴、食蟹猴、狨猴、猩猩、黑猩猩等灵长类;小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠等等啮齿类;兔等兔形目;猪、牛、山羊、马、羊等有蹄目;狗、猫等猫形目。其中,可以适当例举小鼠、猪、人。

[0047] 根据本发明的一实例,本发明的移植用细胞为移植用同种(Allogenic)或自体(Autologous)细胞,更具体地,为移植用同种细胞。

[0048] 根据本发明的一实例,本发明的哺乳动物细胞可以为原代肝细胞(primary hepatocyte)、原代胰腺β细胞(primary pancreatic beta cell)、原代胰岛细胞(primary pancreatic islet cell)、胰腺祖细胞、多能干细胞来源肝细胞(pluripotent stem cell (PSC)derived hepatocyte)、多能干细胞来源胰腺β细胞(PSC derived pancreatic beta cell)、多能干细胞来源胰岛细胞(PSC derived pancreatic islet cell)、多能干细胞来源胰腺谱系细胞、多能干细胞来源胰腺祖细胞、多能干细胞来源胰腺类器官、多能干细胞来源胰腺肝类器官、诱导多能干细胞来源肝细胞(iPSC derived hepatocyte)、诱导多能干细胞来源胰腺β细胞(iPSC derived pancreatic beta cell)、诱导多能干细胞来源胰岛细胞(iPSC derived pancreatic islet cell)、诱导多能干细胞来源胰腺谱系细胞、诱导多能干细胞来源胰腺祖细胞、诱导多能干细胞来源胰腺类器官、诱导多能干细胞来源胰腺肝类器官、通过化合物或基因改造从体细胞(somatic cell)诱导的肝细胞(induced hepatocytes,iHeps)、通过化合物或基因改造从体细胞(somatic cell)诱导的胰岛细胞或通过化合物或基因改造从体细胞(somatic cell)诱导的胰腺β细胞。

[0049] 根据本发明的一实例,本发明的移植用细胞为由包含人工改造F3基因的人工改造干细胞分化或来源的细胞,上述人工改造F3基因与由野生型干细胞分化或来源的细胞的F3基因序列不同,上述人工改造F3基因在核酸序列内包含一个以上插入/缺失,CD142在上述从人工改造干细胞分化或来源的细胞表面的表达水平比与由野生型干细胞分化或来源的细胞相比减少。

[0050] 根据本发明的一实例,上述干细胞为诱导多能干细胞(iPSC)、胚胎干细胞、体细胞核移植胚胎干细胞或成体干细胞。

[0051] 根据本发明的一实例,上述由人工改造干细胞分化或来源的细胞为胰腺β细胞、肝细胞、胰腺祖细胞、胰岛细胞、胰腺谱系细胞、胰腺类器官或胰腺肝类器官。

[0052] 本发明提供包含人工变形的F3基因的核酸序列的人工改造血管内移植用细胞。

[0053] 在本发明中,基因核酸序列的“人工变形”或“人工改造”可以通过构成基因的核酸序列的变形或单个碱基的化学变形来实现。这可以通过基因的一部分或全部的变异、取代、

删除或向上述基因插入一个以上的碱基来实现,可以通过CRISPR酶系统(CRISPR-enzyme system)等基因编辑技术来实现。作为一例,上述基因核酸序列的人工变形可以通过非同源性末端接合(non-homologous end joining,NHEJ)或同源定向修复(homology directed repair,HDR)机制来实现。

[0054] 例如,上述人工改造血管内移植用细胞可以为F3基因被敲除(knock out)的人工改造血管内移植用细胞。

[0055] 在本说明书中,“非同源性末端接合(non-homologous end joining,NHEJ)”为通过切割的双链或单链的两末端相互结合来修复或修缮DNA内双链破损的方法,通常,使因双链的破损(例如,切割)形成的两个兼容性末端反复频繁的接触来使两个末端完全结合,在此情况下,恢复破损的双链。

[0056] 在上述利用非同源性末端接合(NHEJ)的损伤的基因或核酸的修复过程中,可以在NHEJ修缮部位发生核酸序列的一部分“插入(insertion)和/或缺失(deletion)”(或者“插入/缺失”,InDel),发生插入/缺失的基因不具有与野生型基因相同的序列。这样的插入和/或缺失变更基因的阅读框,制造被移码的转录体mRNA,结果为,经过无义介导的降解(nonsense mediated decay)或在合成正常蛋白中失败而丧失原本的功能。或者追加地,虽然保持阅读框,但会引起使相当量的序列插入或缺失的突变而破坏蛋白的功能性。另举一例,在基因的启动子区域或增强子区域等转录调节区域发生插入/缺失的情况下,mRNA不转录或转录量减少,因此可能使蛋白不表达或表达量减少。或者利用NHEJ的突变发生机制,在不需要特异性最终序列的生成的情况下,可以仅在一部分序列基序的缺失中使用。例如,利用分别靶向特定外显子的5’及3′部分的内含子部位的两个以上向导RNA在各内含子部分引起双链切割,通过NHEJ,若仅缺失基因的外显子一部分,则可以因其他部分正常表达而保持蛋白的主要功能性。

[0057] 在利用这样的NHEJ的情况下,可以利用基因编辑技术来特异性地敲除或敲低所靶向的基因。

[0058] 例如,可以利用基因剪刀之一的Cas9或Cpf1等CRISPR酶来剪切靶向基因或靶向核酸的双链或两个单链,破损的靶向基因或破损的靶向核酸的双链或两个单链可以通过NHEJ生成插入/缺失,由此可以诱导靶向基因或核酸的特异性敲除或敲低。

[0059] 例如,上述人工改造血管内移植用细胞可以为F3基因被敲低(knock-down)的人工改造血管内移植用细胞。

[0060] 在本发明的一实例中,上述人工改造血管内移植用细胞的F3基因可以在核酸序列内包含一个以上插入/缺失。

[0061] 在本发明的一实例中,上述人工改造血管内移植用细胞可以不发生F3mRNA的表达。

[0062] 在本发明的一实例中,与从野生型细胞的F3基因转录的mRNA水平相比,从上述人工改造血管内移植用细胞的人工改造F3基因转录的mRNA表达水平可以更低。

[0063] 在本发明的一实例中,与野生型细胞相比,上述人工改造血管内移植用细胞的F3 mRNA序列可以不同。

[0064] 在本发明的一实例中,与野生型细胞相比,上述人工改造血管内移植用细胞表面的CD142的表达或活性可以减少。本发明的人工改造血管内移植用细胞可以通过此使CD142

的功能降低或丧失。

[0065] 即,在上述人工改造血管内移植用细胞中,CD142的表达或活性可以比野生型细胞的表达或活性减少约20%以上、约30%以上、约40%以上、约50%以上、约55%以上、约60%以上、约70%以上、约75%以上、约80%以上、约85%以上、约90%以上、约95%以上或约100%。

[0066] 本发明提供具有血液相容性的人工改造血管内移植用细胞的制备方法,包括减少哺乳动物细胞的CD142的表达或活性的步骤。

[0067] 上述CD142的表达或活性的增加、减少可以通过F3基因的人工变形来实现,作为一例,可以利用基因编辑技术。

[0068] 作为一例,上述基因编辑技术可以利用转录激活因子样效应物(transcription activator-like effector或TALE)结构域与切割结构域融合的转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN,transcription activator like effctor nuclease)、锌指核酸酶(zinc-finger nuclease)或作为微生物免疫体系的规律间隔成簇短会文重复序列(CRISPR,Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)来源的CRISPR酶系统,但不限定于此。

[0069] 与上述TALEN相关地,国际公开专利第WO2012/093833号或美国公开专利第2013-0217131号全文作为参考资料包括在本说明书中。与上述锌指核酸酶(ZFN)相关地,Beerli et al.(2002)Nature Biotechnol.20:135-141;Pabo et al.(2001)Ann.Rev.Biochem.70:313-340;Isalan et al,(2001)Nature Biotechnol.19:656-660;Segal et al.(2001)Curr.Opin.Biotechnol.12:632-637;Choo et al.(2000)Curr.Opin.Struct.Biol.10:411-416,美国专利授权号7,888,121、8,409,861、6,479,626、6,903,185、7,153,949作为参考资料包括在本说明书中。

[0070] 上述“CRISPR酶系统”由向导核酸和/或编辑蛋白构成。

[0071] “向导核酸”是指识别靶向核酸、靶向基因或靶向染色体并可以与编辑蛋白相互作用的核酸。在此情况下,上述向导核酸可以与靶向核酸、靶向基因或靶向染色体的一部分核苷酸形成互补的结合。

[0072] 上述向导核酸可以为靶向DNA特异性向导RNA、编码上述向导RNA的DNA或DNA/RNA混合的形态。

[0073] 上述向导核酸可以为向导RNA。作为一例,“向导RNA”可以为在生物体外(in vitro)转录而来的,尤其可以为从寡核苷酸双链或质粒模板转录而来的。另举一例,上述向导RNA可以被编码为载体的形态,可以在生物体外(ex vivo)或生物体内(in vivo)环境中向细胞内传递并从载体转录,但不限定于此。

[0074] 上述向导RNA的设计及结构为本领域技术人员所公知的,在韩国授权专利第10-1656236号、第10-1656237号、第10-1706085号、第10-2052286号、第10-2182847号中有详细说明,上述授权专利全文作为本发明的参考资料包括在本说明书中。

[0075] 上述向导核酸可以包含骨架序列部分和向导序列部分。上述骨架序列部分为与Cas蛋白相互作用的部分,可以通过使Cas蛋白与向导核酸结合来形成复合物(核糖核蛋白(ribonucleoprotein,RNP))。通常,上述骨架序列部分包含tracrRNA和crRNA的一部分序列部分,上述骨架序列可以根据使用何种Cas蛋白来确定。

[0076] 上述向导序列部分为能够与靶向基因或核酸的双链中的任一链的一部分序列互补结合的核苷酸序列部分,作为能够人工变形的核苷酸序列部分,取决于所希望的靶向核苷酸序列。在此情况下,上述向导序列可以为与靶向基因或靶向核酸的向导核酸结合序列具有最少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%以上的互补性或者具有完全的互补性的核苷酸序列。上述向导序列可以为包含在向导核酸的向导结构域的序列。

[0077] 上述向导序列部分可以包含在crRNA中。作为一例,上述向导核酸可以为包含两个RNA,即,包含crRNA(CRISPR RNA)及tracrRNA(反式激活crRNA(trans-activating crRNA))作为结构要素的双重RNA(dual RNA)。

[0078] 作为另一例,上述向导核酸可以为crRNA与tracrRNA的主要部分连接的形态的sgRNA(single-chain guide RNA)。

[0079] 上述靶序列为存在于靶向基因或靶向核酸内的具有规定长度的核苷酸序列,具体地,可以是区分为靶向基因的调节区域(regulatory region)、编码区域(coding region或CDS,coding sequence)或非编码区域(non-coding region或UTR,untranslated region)的靶向区域内的一部分核苷酸序列,或者可以是选自上述靶向区域的组合中的一个以上的一部分核苷酸序列。上述靶序列可以成为向导核酸-编辑蛋白复合物(RNP)的靶。

[0080] 在本发明的一实例中,上述靶序列可以为包含在野生型F3基因的外显子第一区域、第二区域、第三区域、第四区域或第六区域的序列。

[0081] 在本发明的一实例中,上述靶序列可以为序列号1的序列。

[0082] 上述靶序列为与编辑蛋白识别的原间隔序列临近基序(protospacer-adjacent motif,PAM)序列相邻的周围的核苷酸序列,可包含PAM的全部或一部分,但不限定于此。

[0083] 靶序列能够以同时表示两种核苷酸序列信息的术语来使用。例如,在靶向基因的情况下,靶序列可以表示靶向基因DNA的转录链(transcribed strand)的序列信息,或者可以表示非转录链(non-transcribed strand)的核苷酸序列信息。

[0084] 靶序列包含向导核酸结合序列或向导核酸非结合序列。向导核酸结合序列为与向导核酸的向导结构域所包含的向导序列具有一部分或完全的互补性的核苷酸序列,可以与向导核酸的向导结构域所包含的向导序列进行互补性的结合。靶序列及向导核酸结合序列可以为随靶向基因或核酸,即,随基因操作或编辑的对象的不同而不同的核苷酸序列,向导核酸可以根据靶向基因或靶向核酸多种多样地设计。

[0085] 向导核酸非结合序列为与向导核酸的向导结构域所包含的向导序列具有一部分或完全的同源性的核苷酸序列,可以与向导核酸的向导结构域所包含的向导序列进行互补性的结合。并且,向导核酸非结合序列作为与向导核酸结合序列具有互补性的核苷酸序列,可以与向导核酸结合序列进行互补性的结合。向导核酸结合序列作为靶序列中的一部分核苷酸序列,可以为靶序列中具有两种互不相同的序列顺序的核苷酸序列,即,能够进行互补性的结合的两种核苷酸序列中的一种核苷酸序列。在此情况下,向导核酸非结合序列可以为靶序列中除向导核酸结合序列以外的剩余核苷酸序列。

[0086] 向导核酸结合序列可以为靶序列,即,可以为选自与转录链相同的核苷酸序列及与非转录链相同的核苷酸序列中的一个核苷酸序列。在此情况下,向导核酸非结合序列可以为靶序列中除向导核酸结合序列以外的核苷酸序列,即,可以为除选自与转录链相同的

核苷酸序列及与非转录链相同的核苷酸序列中的一个核苷酸序列以外的剩余的核苷酸序列。

[0087] 向导核酸结合序列的长度可以与靶序列的长度相同。向导核酸非结合序列的长度可以与靶序列或向导核酸结合序列的长度相同。向导核酸结合序列可以为5个至50个核苷酸序列。

[0088] 作为一具体例,上述向导核酸结合序列可以为16个核苷酸序列、17个核苷酸序列、18个核苷酸序列、19个核苷酸序列、20个核苷酸序列、21个核苷酸序列、22个核苷酸序列、23个核苷酸序列、24个核苷酸序列或25个核苷酸序列。向导核酸非结合序列可以为5个至50个核苷酸序列。

[0089] 作为一具体例,上述向导核酸非结合序列可以为16个核苷酸序列、17个核苷酸序列、18个核苷酸序列、19个核苷酸序列、20个核苷酸序列、21个核苷酸序列、22个核苷酸序列、23个核苷酸序列、24个核苷酸序列或25个核苷酸序列。

[0090] 向导核酸结合序列可以与向导核酸的向导结构域所包含的向导序列进行一部分或完全的互补性结合,上述向导核酸结合序列的长度可以与向导序列的长度相同。

[0091] 上述向导核酸结合序列可以为与向导核酸的向导结构域所包含的向导序列互补的核苷酸序列,例如,可以为具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%以上的互补性或完全的互补性的核苷酸序列。

[0092] 作为一例,上述向导核酸结合序列可以具有或包含与向导核酸的向导结构域所包含的向导序列非互补的1个至8个核苷酸序列。

[0093] 向导核酸非结合序列可以与向导核酸的向导结构域所包含的向导序列具有一部分或完全的同源性,上述向导核酸非结合序列的长度可以与向导序列的长度相同。作为一例,上述向导序列可以基于与向导核酸非结合序列具有同源性的序列来设计。

[0094] 上述向导核酸非结合序列可以为与向导核酸的向导结构域所包含的向导序列具有同源性的核苷酸序列,例如,可以为具有最少70%、75%、80%、85%、90%或95%以上的同源性或者具有完全的同源性的核苷酸序列。

[0095] 作为一例,上述向导核酸非结合序列可以具有或包含与向导核酸的向导结构域所包含的向导序列不具有同源性的1个至8个核苷酸序列。向导核酸非结合序列可以与向导核酸结合序列进行互补性的结合,上述向导核酸非结合序列的长度可以与向导核酸结合序列的长度相同。

[0096] 上述向导核酸非结合序列可以为与向导核酸结合序列互补的核苷酸序列,例如,可以为具有最少90%或95%以上的互补性或完全的互补性的核苷酸序列。

[0097] 作为一例,上述向导核酸非结合序列可以具有或包含与向导核酸结合序列非互补的1个至2个核苷酸序列。并且,上述向导核酸结合序列可以为与编辑蛋白能够识别的核苷酸序列(PAM序列)互补的序列相邻位置的核苷酸序列。

[0098] 作为一例,上述向导核酸结合序列可以为位于与编辑蛋白能够识别的核苷酸序列(PAM序列)互补的序列的5'末端和/或3'末端相邻位置的连续的5个至50个核苷酸序列。

[0099] 并且,上述向导核酸非结合序列可以为与编辑蛋白能够识别的核苷酸序列(PAM序列)相邻位置的核苷酸序列。

[0100] 作为一例,上述向导核酸非结合序列可以为位于与编辑蛋白能够识别的核苷酸序

列(PAM序列)互补的序列的5'末端和/或3'末端相邻位置的连续的5个至50个核苷酸序列。

[0101] “编辑蛋白”是指与核酸直接结合或者虽然不直接结合但可以相互作用的肽、多肽或蛋白。对于上述编辑蛋白,也概念性地称为“人工改造核酸酶”或RGEN(RNA-Guided Endonuclease)。

[0102] 在一具体例中,上述编辑蛋白可以为CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)酶。“CRISPR酶”作为CRISPR酶(CRISPR-enzyme)系统中的主要结构要素,也称为“Cas蛋白(CRISPR相关蛋白(CRISPR associated protein))”,是指可以通过与向导RNA形成混合物或复合物来识别靶序列并切割DNA的核酸酶。

[0103] CRISPR酶在本领域中是公知的,参考韩国授权专利第10-1656236号、第10-1656237号、第10-1706085号、第10-2052286号、第10-2182847。在本说明书中,除天然型蛋白以外,上述CRISPR酶还以包括能够以与向导RNA协同来激活的核酸内切酶(endonuclease)或切口酶(nickase)起作用的所有变异体的概念来使用。在作为激活的核酸内切酶或切口酶的情况下,可以带来靶向DNA的切割,可以利用其带来基因组编辑。并且,在作为非激活的变异体的情况下,可以利用其带来转录调节或所靶向的DNA的分离。

[0104] 上述CRISPR酶作为具有编码CRISPR酶的序列的核酸或多肽(或者蛋白),代表性地多使用II型(Type II)CRISPR酶或V型(Type V)CRISPR酶,上述II型CRISPR酶有Cas9(CRISPR相关蛋白9(CRISPR associated protein 9))蛋白。

[0105] 上述Cas9蛋白可以源自酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)、嗜热链球菌(Streptococcus thermophilus)、链球菌属(Streptococcus sp.)、空肠弯曲菌(Campylobacter jejuni)、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、耳葡萄球菌(Staphylococcus Auricularis)、脑膜炎奈瑟菌(Neisseria meningitidis)等多种微生物。

[0106] 为了诱导双链DNA的切割(double stranded DNA break),Cas9蛋白应识别作为具有规定长度的核苷酸序列的PAM序列,向导RNA的一部分(上述向导序列部分)应与靶序列所位于的DNA单链(上述向导核酸非结合序列)的互补性的链互补结合。

[0107] 该PAM序列为根据Cas9蛋白的种类或起源来决定的序列,例如,酿脓链球菌来源Cas9蛋白(SpCas9)可以识别靶向核酸内的5′-NGG-3'序列(互补序列:5'-CCN-3')。在此情况下,上述N为腺苷(A)、胸苷(T)、胞苷(C)、鸟苷(G)中的一种。并且,上述SpCas9能够以低活性识别靶向核酸内的5'-NAG-3'序列(互补序列:5'-CTN-3')。

[0108] 并且,上述V型CRISPR酶为Cpf1,上述Cpf1可以为源自链球菌属(Streptococcus)、弯曲杆菌属(Campylobacter)、硝酸盐裂解菌属(Nitratifractor)、葡萄球菌属(Staphylococcus)、细小棒菌属(Parvibaculum)、罗斯伯里氏菌属(Roseburia)、奈瑟菌属(Neisseria)、葡糖酸醋杆菌属(Gluconacetobacter)、固氮螺菌属(Azospirillum)、鳞球菌属(Sphaerochaeta)、乳杆菌属(Lactobacillus)、真杆菌属(Eubacterium)、棒状杆菌属(Corynebacter)、肉食杆菌属(Carnobacterium)、红细菌属(Rhodobacter)、李斯特菌(Listeria)、帕鲁迪菌(Paludibacter)、梭菌属(Clostridium)、毛螺菌科(Lachnospiraceae)、梭菌属(Clostridiaridium)、纤毛菌属(Leptotrichia)、弗朗西斯氏菌属(Francisella)、军团菌属(Legionella)、脂环酸芽孢杆菌(Alicyclobacillus)、噬甲基菌属(Methanomethyophilus)、卟啉单胞菌属(Porphyromonas)、普雷沃菌属

(Prevotella)、拟杆菌属(Bacteroidetes)、创伤球菌属(Helcococcus)、钩端螺旋体属(Letospira)、脱硫弧菌属(Desulfovibrio)、脱硫弯曲杆菌属(Desulfonatronum)、丰佑菌科(Opitutaceae)、肿块芽胞杆菌属(Tuberibacillus)、芽孢杆菌属(Bacillus)、短芽孢杆菌属(Brevibacilus)、甲基杆菌属(Methylobacterium)或氨基酸球菌属(Acidaminococcus)的Cpf1。

[0109] 上述Cas9或Cpf1蛋白等CRISPR酶可以为从自然状态下存在的微生物中分离的或者通过重组方法或合成方法非自然生产的。并且,上述Cas蛋白可以为易于导入细胞内的形态。例如,Cas蛋白可以与细胞穿透肽或蛋白转导结构域(protein transduction domain)连接。上述蛋白转导结构域可以为聚精氨酸或获得性免疫缺陷病毒(HIV)来源的TAT蛋白,但不限定于此。除上述记述的例以外,细胞穿透肽或蛋白转导结构域的多个种类在本领域中是公知的,本领域技术人员可以将不限于上述例的多种例采用在本说明书中。并且,上述Cas蛋白可以与核定位序列或信号(NLS,nuclear localization sequence or signal)等功能型结构域融合。并且,上述Cas9蛋白可以编码为载体的形态来在细胞内表达。

[0110] 本发明提供用于制备具有血液相容性的血管内移植用细胞的组合物,其包含:向导核酸或编码其的核酸,包含能够靶向哺乳动物细胞或干细胞的F3基因的靶序列的向导序列;以及编辑蛋白或编码其的核酸。

[0111] 并且,上述组合物还可以选择性地包含供体或编码其的核酸,上述供体包含希望插入的特定核苷酸序列。

[0112] 上述供体(donor)是指能够表达特定肽或蛋白的外源性核苷酸序列(exogenous nucleotide sequences),可以通过同源定向修复(homology directed repair,HDR)向基因组DNA插入。

[0113] 上述供体可以为双链核酸或单链核酸。上述供体可以为线型或圆型。

[0114] 上述供体可以为病毒载体或非病毒载体(例如,质粒)的形态。

[0115] 上述病毒可以为DNA病毒或RNA病毒。在此情况下,上述DNA病毒可以为双链DNA(dsDNA)病毒或单链DNA(ssDNA)病毒。在此情况下,上述RNA病毒可以为单链RNA(ssRNA)病毒。

[0116] 上述病毒载体可以为选自由逆转录病毒(Retrovirus)、慢病毒(Lentivirus)、腺病毒(Adenovirus)、腺相关病毒(Adeno-associated virus,AAV)、痘苗病毒(Vaccinia virus)、痘病毒(Poxvirus)及单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus,HSV)组成的组中的一种以上病毒载体。

[0117] 上述靶序列可以成为向导核酸-编辑蛋白复合物的靶,上述靶序列可以包含编辑蛋白识别的PAM序列,但不限定于此。

[0118] 上述向导核酸可以包含能够靶向F3基因的靶序列的向导结构域。

[0119] 在本说明书中,向导核酸、编辑蛋白或向导核酸-编辑蛋白复合物(核糖核蛋白,RNP)和/或供体能够以多种形态传递或导入到对象内。

[0120] 在此情况下,“对象”是指:导入向导核酸、编辑蛋白或向导核酸-编辑蛋白复合物的有机体;向导核酸、编辑蛋白或向导核酸-编辑蛋白复合物工作的有机体;或者从有机体获得的被检体或试样。

[0121] 上述对象可以为包含向导核酸-编辑蛋白复合物的靶向基因、靶向核酸或靶向染

色体的有机体。

[0122] 上述有机体可以为动物、动物的组织或动物细胞。在此情况下,上述组织可以为眼球、皮肤、肝、肾脏、心脏、肺、脑、肌肉或血液。

[0123] 上述细胞可以为哺乳动物细胞。

[0124] 本发明的哺乳动物可以为例如:人、猴、恒河猴、食蟹猴、狨猴、猩猩、黑猩猩等灵长类;小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠等等啮齿类;兔等兔形目;猪、牛、山羊、马、羊等有蹄目;狗、猫等猫形目。其中,可以适当例举小鼠、猪、人。

[0125] 根据本发明的一实例,本发明的人工改造血管内移植用细胞为同种或自体细胞,更具体地,可以为移植用同种细胞。

[0126] 根据本发明的一实例,本发明的哺乳动物细胞可以为原代肝细胞(primary hepatocyte)、原代胰腺β细胞、原代胰岛细胞、胰腺祖细胞、多能干细胞来源肝细胞、多能干细胞来源胰腺β细胞、多能干细胞来源胰岛细胞、多能干细胞来源胰腺谱系细胞、多能干细胞来源胰腺祖细胞、多能干细胞来源胰腺类器官、多能干细胞来源胰腺肝类器官、诱导多能干细胞来源肝细胞、诱导多能干细胞来源胰腺β细胞、诱导多能干细胞来源胰岛细胞、诱导多能干细胞来源胰腺谱系细胞、诱导多能干细胞来源胰腺祖细胞、诱导多能干细胞来源胰腺类器官、诱导多能干细胞来源胰腺肝类器官、通过化合物或基因改造从体细胞诱导的肝细胞、通过化合物或基因改造从体细胞诱导的胰岛细胞或通过化合物或基因改造从体细胞诱导的胰腺β细胞。

[0127] 上述被检体或试样可以为唾液、血液、肝组织、脑组织、肝细胞、神经细胞、噬菌体、巨噬细胞、T细胞、B细胞、星形胶质细胞、癌细胞或干细胞等从包含靶向基因、靶向核酸或靶向染色体的有机体中获得的。

[0128] 上述向导核酸、编辑蛋白或向导核酸-编辑蛋白复合物能够以DNA、RNA或它们的混合形态来向对象内传递或导入。

[0129] 在此情况下,编码向导核酸和/或编辑蛋白的DNA、RNA或它们的混合形态可以通过本领域中公知的方法向对象内传递或导入。

[0130] 或者,编码向导核酸和/或编辑蛋白的DNA、RNA或它们的混合形态可以通过载体、非载体或它们的组合来向对象内传递或导入。

[0131] 上述载体可以为病毒载体或非病毒载体(例如,质粒)。

[0132] 上述病毒可以为DNA病毒或RNA病毒。在此情况下,上述DNA病毒可以为双链DNA病毒或单链DNA病毒。在此情况下,上述RNA病毒可以为单链RNA病毒。

[0133] 上述病毒载体可以为选自由逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)、痘苗病毒、痘病毒及单纯疱疹病毒组成的组的一种以上。

[0134] 上述非载体可以为向导DNA、DNA复合物或mRNA。

[0135] 作为本发明的一实例,编码上述向导核酸和/或编辑蛋白的核酸能够以一种以上载体的形态向对象内传递或导入。

[0136] 上述载体可以包含编码向导核酸和/或编辑蛋白的核酸。作为一例,上述载体可以同时包含编码向导核酸和编辑蛋白的核酸。作为再一例,上述载体可以包含编码向导核酸的核酸。例如,编码上述向导核酸的核酸可以都包含在一个载体中,或者编码向导核酸的核酸被分割而包含在多个载体中。作为另一例,上述载体可以包含编码编辑蛋白的核酸。例

如,在上述编辑蛋白的情况下,编码编辑蛋白的核酸可以包含在一个载体中,或者编码编辑蛋白的核酸被分割而包含在多个载体中。

[0137] 上述编辑蛋白能够以肽、多肽或蛋白的形态向对象内传递或导入。

[0138] 上述编辑蛋白能够以肽、多肽或蛋白的形态通过本领域中公知的方法向对象内传递或导入。

[0139] 上述向导核酸及编辑蛋白能够以核酸-蛋白混合的形态向对象内传递或导入。

[0140] 上述向导核酸及编辑蛋白能够以向导核酸-编辑蛋白复合物的形态向对象内传递或导入。例如,上述向导核酸可以为DNA、RNA或它们的混合形态。上述编辑蛋白可以为肽、多肽或蛋白的形态。作为一例,向导核酸及编辑蛋白能够以RNA形态的向导核酸与蛋白形态的编辑蛋白的向导核酸-编辑蛋白复合物,即,核糖核蛋白(RNP)的形态向对象内传递或导入。

[0141] 并且,本发明提供具有血液相容性的血管内移植用细胞的制备方法,其包括:步骤(1),向分离的哺乳动物细胞或分离的干细胞导入上述用于制备具有血液相容性的血管内移植用细胞的组合物;以及步骤(2),通过使位于上述分离的哺乳动物细胞或分离的干细胞的基因组内的F3基因的靶序列发生插入/缺失来编辑F3基因,以减少或抑制CD142的表达或活性。

[0142] 在此情况下,上述“导入”可以通过选自电穿孔法(Electroporation)、脂质转染(lipofection)、微型注入法、基因枪、脂质体、两性脂质体、质粒、病毒载体、纳米颗粒(nanoparticles)、蛋白转导结构域(PTD,Protein translocation domain)融合蛋白方法、免疫脂质体、各种离子或脂质、核酸结合物、裸DNA、人工病毒粒子及DNA的制剂增强吸收方法中的一种以上方法来进行,但不限定于此。

[0143] 作为本发明的一实例,可以通过电穿孔法向分离的哺乳动物细胞或分离的干细胞导入上述用于制备具有血液相容性的血管内移植用细胞的组合物来制备具有血液相容性的间血管内移植用细胞。

[0144] 作为本发明的一实例,可以通过使位于上述哺乳动物细胞的基因组内的F3基因与包含酿脓链球菌来源Cas9蛋白及能够靶向F3基因的靶序列的向导RNA的CRISPR/Cas9复合物接触来发生插入/缺失。

[0145] 在本发明的一实例中,上述靶序列可以为序列号1的序列。

[0146] 本发明的具有血液相容性的人工改造血管内移植用细胞可以用作血管施用用细胞治疗剂来在多种疾病的治疗中使用。例如,可以在心脏疾病、胃十二指肠疾病、小肠大肠疾病、肝疾病、胆管疾病、胰腺疾病、肾脏疾病、肝疾病、肺疾病、纵膈膜疾病、横膈膜疾病、胸膜疾病、腹膜疾病、神经系统疾病、中枢神经系统(CNS)障碍、外周动脉疾病、外周静脉疾病中使用。例如,具体的疾病可以为:自身免疫性肝炎、爆发性肝炎、慢性肝炎、病毒性肝炎、酒精性肝炎、非酒精性脂肪性肝疾病(nonalcoholic fatty liver disease(NAFLD))、非酒精性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis(NASH))、非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver(NAFL))、肝纤维症、肝硬变、肝癌、脂肪肝、药物引起的过敏性肝病、血色素沉积症、血色素症、威尔逊氏症、原发性胆汁性肝硬变(PBC)、原发性硬化性胆管炎(PSC)、胆道闭锁症、肝脓疡、慢性活动性肝炎、慢性持续性肝炎等肝疾病;心肌梗塞、心功能衰竭、心律失常、心悸、心肌病症、缺血性心肌病、心绞痛、先天性心脏疾病、心脏瓣膜疾病、心肌炎、家族性肥厚型心肌病、扩张型心肌病、急性冠状动脉综合征、动脉硬化症、再狭窄等心脏疾病;

急性胃炎、慢性胃炎、胃十二指肠溃疡、胃癌、十二指肠癌等胃十二指肠疾病;缺血性肠炎、炎症性肠疾病、溃疡性大肠炎、克罗恩病、单纯性溃疡、肠道白塞氏病、小肠癌、大肠癌等小肠大肠疾病;急性胆囊炎、急性胆管炎、慢性胆囊炎、胆管癌、胆囊癌等胆管疾病;急性胰腺炎、慢性胰腺炎、胰腺癌等胰腺疾病;急性肾炎、慢性肾炎、急性肾功能衰竭、慢性肾功能衰竭等肾脏疾病;肺炎、肺气肿、肺纤维症、间质性肺炎、特发性间质性肺炎、脱屑性间质性肺炎、急性间质性肺炎、非特异性间质性肺炎、药物诱发的肺疾病、嗜酸性粒细胞性肺疾病、肺动脉高压、肺结核、肺结核后遗症、急性呼吸窘迫综合征、囊性纤维化、慢性闭塞性肺疾病、肺栓塞、肺脓疡、尘肺病、吸入性肺炎、肺炎、肺纤维症、急性上呼吸道感染、慢性下呼吸道感染、气胸、肺泡上皮损伤疾病、淋巴管平滑肌瘤、淋巴性间质性肺炎、肺泡蛋白沉积症等肺疾病;纵膈肿瘤、纵膈囊泡性疾病、纵膈炎等纵膈疾病;横膈疝等横膈膜疾病;胸膜炎、脓胸、胸膜肿瘤、癌性胸膜炎、胸膜间皮瘤等胸膜疾病;腹膜炎、腹膜肿瘤等腹膜疾病;包括小儿脑性瘫痪在内的脑性瘫痪综合征、无菌性脑膜炎、格林-巴利综合征、肌萎缩侧索硬化(ALS)、重症肌无力、单神经病、多发性神经病、脊髓性肌萎缩症、脊髓障碍、急性横贯性脊髓炎、脊髓梗塞(缺血性骨髓病症)、颅内肿瘤、脊髓肿瘤等神经疾病;阿尔茨海默病、认知障碍、脑卒中、多发性硬化症、帕金森病等中枢神经系统障碍、纤维肌性发育不良、外周动脉疾病(PAD)、闭塞性血栓性脉管炎(伯格氏病)、川崎病(KD)等外周动脉疾病;深静脉血栓症、慢性静脉功能不全、静脉炎后综合征、浅静脉血栓症等外周静脉疾病;移植物抗宿主病(GVHD)、继发性免疫缺陷、原发性免疫缺陷疾病、B细胞的缺失、T细胞的缺失、B细胞及T细胞的复合缺失、噬菌体缺失、补体缺损等免疫缺陷疾病。

[0147] 上述“血管施用用”的术语是指向患者的血管系统内的传递。作为一例,可以向视为静脉的血管内施用,可以向视为动脉的血管内施用。静脉包括颈内静脉(internal jugular vein)、外周静脉、冠状静脉、肝静脉、门静脉、大隐静脉(great saphenous vein)、肺静脉、上腔静脉、下腔静脉、胃静脉、脾静脉、肠系膜下静脉(inferior mesenteric vein)、肠系膜上静脉(superior mesenteric vein)、头部静脉和/或股静脉,但不限定于此。动脉包括冠状动脉、肺动脉、脾动脉、肱动脉(brachial artery)、颈内动脉(internal carotid artery)、主动脉弓(aortic arch)、股动脉、外周动脉和/或睫状动脉(ciliary artery),但不限定于此。可以通过肝门静脉、脐静脉、小动脉或毛细血管传递,或者向小动脉或毛细血管传递。

[0148] 在本发明的一实例中,本发明的人工改造血管内移植用细胞可以用作用来恢复受损的细胞或组织的用于细胞移植或生物组织再生的组合物。

[0149] 在本发明的一实例中,上述生物组织可以为选自形成溃疡或褥疮的组织、因细胞的变性受损的脑组织、因手术操作受损的脑组织、因外伤性脑疾病受损的脑组织、因炎性脑疾病受损的脑组织、受损的骨组织、受损的牙周组织、因中枢神经系统肌病受损的组织以及因难治性皮肤炎受损的组织中的受损组织,生物组织再生可以为上述受损组织的恢复、表皮再生、分泌腺或毛囊的再现、真皮组织的毛细血管形成、伤口愈合、软组织的缺陷补偿、骨愈合或骨再生、软骨再生等,但不限定于此。

[0150] 在本发明的一实例中,上述用于细胞移植或生物组织再生的组合物可以为细胞治疗剂组合物、基因治疗剂组合物、组织工程治疗剂组合物、免疫治疗剂组合物或癌症的预防或治疗剂组合物。

[0151] 在本说明书中,“细胞治疗剂”为使用通过从个体分离、培养和特殊操作制备的细胞及组织用于治疗、诊断及预防的药品(美国食品药品监督管理局(FDA)规定),是指为了恢复细胞或组织的功能而通过在体外增殖筛选自体、同种或异种细胞或者使用其他方法改变细胞的生物特性等一系列行为来以治疗、诊断及预防的目的使用的药品。

[0152] 在本说明书中,“基因治疗剂”为给遗传物质的表达带来影响而施用,是指包含遗传物质变形、导入的细胞的药品。

[0153] 本发明的用于细胞移植或生物组织再生的组合物可以通过能够到达目标组织的任意通常的途径来施用。可以为非口服施用,例如,腹腔内施用、静脉内施用、肌肉内施用、皮下施用、皮内施用,但不限定于此。

[0154] 上述用于细胞移植或生物组织再生的组合物可以与细胞治疗中通常使用的药学上可接受的载体一同配制为适当的形态。“药学上可接受的”是指在生理学上可接受并在向人类施用时通常不引起胃肠障碍、头晕症等过敏反应或与之类似的反应的组合物。作为药学上可接受的载体,有例如水、适当的油、生理盐水、水性葡萄糖及乙二醇等非口服施用用载体等,还可以包含稳定剂及保存剂。适当的稳定剂有亚硫酸氢钠、亚硫酸钠或抗坏血酸等抗氧化剂。适当的保存剂有苯扎氯铵、对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯以及三氯丁醇。此外的药学上可接受的载体可以参考如下文献中记载的内容:Remington’s Pharmaceutical Sciences,19th ed.,Mack Publishing Company,Easton,PA,1995。并且,上述组合物还可以通过细胞治疗剂能够移动至靶细胞的任何装置施用。

[0155] 为了疾病的治疗,本发明的用于细胞移植或生物组织再生的组合物可以包含治疗有效量的细胞。“治疗有效量(therapeutically effective amount)”是指研究人员、兽医、医生或其他临床上认为的在组织系统、动物或人类中诱导生物学或医学反应的有效成分或药物组合物的量,包括诱导所治疗的疾病或障碍的症状的缓解的量。

[0156] 本领域技术人员应该理解,本发明的组合物所包含的细胞根据所希望的效果的不同而变化。因此,通过本领域技术人员可以轻松确定最佳的细胞治疗剂含量,可以根据包括疾病的种类、疾病的严重程度、组合物中含有的其他成分的含量、剂型的种类及患者的年龄、体重、一般健康状态、性别及饮食、施用时间、施用途径及组合物的分泌率、治疗期间、同时使用的药物在内的多种因素来调节。考虑所有上述因素后,重要的是包含如下量,即,在不引起副作用的情况下,以最小的量来获得最大效果的量。例如,本发明的干细胞的一日施用量为1.0×10^{5}细胞/kg体重至1.0×10^{30}细胞/kg体重,优选地,可以将1.0×10^{10}细胞/kg体重至1.0×10^{20}细胞/kg体重一次或分为数次来施用。然而,应理解有效成分的实际施用量是参照所要治疗的疾病、疾病的严重程度、施用途径、患者的体重、年龄及性别等多个相关因素来确定,因此,无论从哪个层面来说,上述施用量都不限定本发明的范围。

[0157] 本发明提供一种治疗方法,其包括向哺乳动物施用治疗有效量的上述人工改造血管内移植用细胞的步骤。这里使用的术语“哺乳动物”是指作为治疗、观察或实验的对象的哺乳动物,优选地,是指人。

[0158] 并且,本发明包括包含治疗有效量的上述人工改造血管内移植用细胞作为有效成分的用于预防或治疗肝疾病的药物组合物。

[0159] 本发明的组合物可以口服施用,或者通过包括吸入、血管内、腹腔内、皮下、直肠及局部施用在内的非口服途径来施用。在本发明的一实例中,上述组合物可以通过肝门静脉、

脐静脉或脾动脉来施用。

[0160] 并且,本发明提供预防或治疗肝疾病的方法,其包括向哺乳动物施用治疗有效量的上述人工改造血管内移植用细胞的步骤。这里使用的术语“哺乳动物”是指作为治疗、观察或实验的对象的哺乳动物,优选地,是指人。

[0161] 本发明提供上述人工改造血管内移植用细胞用来制备用于在哺乳动物中预防或治疗肝疾病的药剂的用途。

[0162] 在本发明的一实例中,上述肝疾病包括肝硬化、慢加急性肝衰竭(ACLF:acute-on-chronic liver failure)、药物或中毒引起的肝衰竭、先天性代谢性肝疾病、克里格勒-纳贾尔综合征I型、家族性高胆固醇血症、因子VII缺乏症、因子VIII缺乏症(A型血友病)、苯丙酮尿症(PKU)、糖原贮积病I型、婴儿雷夫叙姆病、进行性家族性肝内胆汁淤积症2型、遗传性酪氨酸血症1型、尿素循环障碍、急性肝衰竭、急性药源性肝衰竭、病毒引起的急性肝衰竭、特发性急性肝衰竭、蘑菇中毒引起的急性肝衰竭、术后急性肝衰竭、由妊娠期急性脂肪肝引起的急性肝衰竭、酒精性肝炎或肝性脑病。

[0163] 并且,本发明提供包含药学上有效量的上述人工改造血管内移植用细胞作为有效成分的用于预防或治疗糖尿病的药物组合物。

[0164] 本发明的组合物可以口服施用,或者通过包括吸入、血管内、腹腔内、皮下、直肠及局部施用在内的非口服途径来施用。在本发明的一实例中,上述组合物可以通过肝门静脉来施用。

[0165] 并且,本发明提供预防或治疗糖尿病的方法,其包括向哺乳动物施用治疗有效量的上述人工改造血管内移植用细胞的步骤。

[0166] 并且,本发明提供上述人工改造血管内移植用细胞用来制备用于在哺乳动物中预防或治疗糖尿病的药剂的用途。

[0167] 在本发明的一实例中,上述糖尿病包括1型糖尿病。

[0168] 以下,通过实施例更为详细地说明本发明。本领域技术人员应该理解,这些实施例仅用于更为具体地说明本发明,本发明的范围不受这些实施例的限制。

[0169] 实施例1:制备敲除F3的细胞

[0170] 细胞培养(Cell culture)

[0171] 根据制造公司的说明书培养iPSC。在利用Vitronectin XF™(STEMCELL Technology)在室温(RT,room temperature)下包被1小时的培养皿中利用TeSR™-E8™(STEMCELL Technology)培养基进行培养。

[0172] 制备CD142基因编辑细胞

[0173] 利用4D-Nucleofector(Lonza)收获培养的细胞,通过电穿孔法导入RNP复合物。具体地,通过混合4μg的Cas9蛋白与4μg的体外转录的(in vitro transcribed)sgRNA(利用T7聚合酶(New England BioLabs),根据制造公司的说明书制备)来合成RNP复合物,在室温下孵育混合物10分钟。上述RNP复合物与被20ul的Primary P3缓冲液处理过的1×10^6iPSC一同使用核转染程序(nucleofector program)CA-137进行电穿孔。结果,获得敲除CD142基因的iPSC(CD142#33KO iPSC)。在此情况下,合成能够靶向CD142#33的靶序列5’-TCTGGGGAGTTCTCATACAGAGG-3’(下划线:PAM序列)(序列号1)的向导RNA并向iPSC导入后利用靶向深度测序方法确认靶序列的插入/缺失效率。

[0174] 靶向深度测序(Targeted deep sequencing)

[0175] 在获得的CD142#33KO iPSC中使用血液基因组DNA提取试剂盒(Blood Genomic DNA Extraction Kit)(Favorgen)根据制造公司的说明书提取基因组DNA(genomic DNA,gDNA)。为了扩增靶向部位,使用Phusion高保真DNA聚合酶PCR聚合酶(High-Fidelity DNA Polymerase PCR Polymerase)(NEB)来扩增100ng的基因组DNA(gDNA)。为了生成深度测序文库,使用TruSeq HT双标签引物(Dual Index Primers)(Illumina,圣迭戈(San Diego),加利福尼亚州(CA),美国(USA))再扩增一次扩增子。利用Illumina Miniseq系统进行双端测序(Paired-end sequencing),在"http://www.rgenome.net/"中计算插入/缺失频率。靶向深度测序中使用的靶序列的引物序列如表1所示。

[0176] 表1

[0177]

区分	正向引物（Forward primer）（5'-3'）	反向引物（Reverse primer）（5'-3'）
sgCD142#33	gcactaagtcaggagattgg（序列号2）	gttcagacgtttctaacaag（序列号3）

[0178] 图1为示出正常iPSC和基因编辑CD142#33的靶序列(序列号1)的iPSC的靶向深度测序结果的图表。如图1的靶向深度测序结果所示,在基因编辑CD142#33的靶序列(序列号1)的iPSC中确认到98%的插入/缺失。

[0179] 胰腺谱系细胞分化 (Pancreatic lineage cells differentiation)

[0180] 将上述获得的敲除CD142基因的iPSC(CD142#33KO iPSC)分化为胰腺谱系细胞。在此情况下,胰腺谱系细胞根据STEMCELL Technology™方案(目录#05120)来进行(https://www.stemcell.com/products/stemdiff-pancreaticprogenitor-kit.html#se ction-protocols-and-documentation),其通过如下四个阶段来分化:1)终末内胚层(terminal endoderm);2)原肠(primitive intestine);3)后部全长内胚层(posterior full-length endoderm);以及4)胰腺谱系细胞。分化的细胞通过胰腺谱系细胞的主要标记物的表达来确认。

[0181] 肝细胞分化(Hepatocyte differentiation)

[0182] 将上述获得的敲除CD142基因的iPSC(CD142#33KO iPSC)分化为肝细胞。在此情况下,肝细胞分化根据Takara Bio方案(目录Y30050)来进行(https://www.takarabio.com/products/stem-cell-research/media-and-supplemen ts/stem-cell-differentiation-media-and-kits/hepatocyte-differentiation-kit)。分化的细胞通过肝细胞的主要标记物的表达来确认。

[0183] 实验例1:确认iPSC(诱导多能干细胞(Induced pluripotent stem cell))来源胰腺谱系细胞的分化标记物

[0184] 为了确认iPSC细胞是否很好地分化为胰腺谱系细胞,通过qRT-PCR确认分化时在胰腺谱系细胞中表达尤其多的标记物。实验中使用的标记物为PDX-1(胰腺和十二指肠同源盒1(pancreatic and duodenal homeobox 1))、NKX6.1(NK6同源盒(Homeobox)1)、SOX9(SRY-Box转录因子(Transcription Factor)9)。

[0185] 利用RNeasy微型试剂盒(mini kit)(Qiagen)根据制造公司的说明书从iPSC提取

mRNA。然后,1μg的mRNA利用cDNA逆转录试剂盒(reverse transcription kit)(Thermo Fisher Scientific)进行逆转录。qRT-PCR利用QuantStudio 3(Thermo Fisher Scientific)根据制造公司的说明书使用PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix来进行。基因表达水平利用CT值来计算,使用GAPDH作为内因性对照组(endogenous control)。结果如图2所示。作为正常iPSC来源胰腺谱系细胞的对照组(normal iPSC)、作为敲除CD142基因的iPSC来源胰腺谱系细胞的实验组(iPSC-CD142#33)的标记物表达均在分化第14天(D14)增加,从而确认很好地分化为胰腺谱系细胞(N=4)。

[0186] 实验例2:确认iPSC细胞来源肝细胞的分化标记物

[0187] 为了确认iPSC细胞是否很好地分化为肝细胞,以与上述实施例1相同的方法通过qRT-PCR分析分化时在肝细胞中的表达尤其多的标记物。实验中使用的标记物(marker)为HNF4α(肝细胞核因子4α(Hepatocyte nuclear factor 4alpha))、ALB(白蛋白)、AFP(甲胎蛋白(Alpha-Fetoprotein))。结果如图3所示。如图3所示,作为正常iPSC来源肝细胞的对照组(normal iPSC)、作为敲除CD142基因的iPSC来源肝细胞的实验组(iPSC-CD142#33)的标记物的表达均在分化第40天(D40)增加,从而确认很好地分化为肝细胞。

[0188] 酶联免疫吸附测定(ELSIA,Enzyme-linked immunosorbent assay)

[0189] 为了确认iPSC细胞是否很好地分化为肝细胞,通过ELISA确认作为分化时在肝细胞中的表达尤其多的标记物的ALB。

[0190] 利用iPSC来源肝细胞的细胞裂解物(cell lysate)和细胞培养上清液(cell culture supernatant)通过人白蛋白酶联免疫吸附测定试剂盒(Human Albumin EIA Kit)(TaKaRa(MK132))测定白蛋白。根据试剂盒(Kit)制造公司提供的说明书进行实验。使用Multiskan™ FC酶标仪(Microplate Photometer)(Thermo Scientific™(51119000))在405nm波长中测量吸光度。结果如图4所示。

[0191] 如图4所示,作为正常iPSC来源肝细胞的对照组(normal iPSC)、作为敲除CD142基因的iPSC来源肝细胞的实验组(iPSC-CD142#33)的标记物表达均在分化第40天(D40)增加,从而确认很好地分化为肝细胞。

[0192] 实验例3:确认在iPSC来源胰腺谱系细胞中CD142基因敲除

[0193] qRT-PCR

[0194] 通过qRT-PCR分析CD142基因的mRNA水平来确认在iPSC细胞来源胰腺谱系细胞中CD142被敲除(KO)。

[0195] 利用RNeasy微型试剂盒(Qiagen)根据制造公司的说明书从iPSC细胞来源胰腺谱系细胞中提取mRNA。然后,1μg的mRNA利用cDNA逆转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific)进行逆转录。qRT-PCR利用QuantStudio 3(Thermo Fisher Scientific)根据制造公司的说明书使用PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix来进行。基因表达水平利用CT值来计算,使用GAPDH作为内因性对照组。结果如图5所示。如图5所示,在分化第14天(D14),与作为正常iPSC来源胰腺谱系细胞的对照组(normal iPSC)相比,作为敲除CD142基因的iPSC来源胰腺谱系细胞的实验组(iPSC-CD142#33)中的CD142 mRNA水平减少(N=4)。

[0196] 流式细胞分析 (FACS,Flow cytometry analysis)

[0197] 通过FACS分析CD142表达细胞水平(cell level)来确认在iPSC细胞来源胰腺谱系细胞中CD142被敲除。使用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline,PBS)洗涤培养的细

胞2次后,使用0.05%的胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(trypsin-EDTA)摘下细胞并在1000rpm的条件下离心5分钟。使用100ul的FACS染色缓冲液(staining buffer)使细胞(cell)悬浮(suspension)并混合抗体(antibody)在4摄氏度下反应1小时后,使用PBS洗涤(washing)2次,使用500ul的PBS再悬浮后进行流式细胞分析。结果如图6所示。

[0198] 参照图6,在分化第40天(D40),与作为正常iPSC来源胰腺谱系细胞的对照组(normal iPSC)相比,在作为敲除CD142基因的iPSC来源胰腺谱系细胞的实验组(iPSC-CD142#33)中示出CD142表达的细胞比例(CD142 positive cell population,%)减少。

[0199] 实验例4:确认在iPSC来源肝细胞中CD142基因敲除

[0200] qRT-PCR

[0201] 以如上所述的方法通过qRT-PCR分析CD142基因的mRNA水平来确认在iPSC细胞来源肝细胞中CD142被敲除。结果如图7所示。如图7所示,在分化第40天(D40),与作为正常iPSC来源肝细胞的对照组(normal iPSC)相比,作为敲除CD142基因的iPSC来源肝细胞的实验组(iPSC-CD142#33)中的CD142 mRNA水平减少。

[0202] 流式细胞分析

[0203] 以与上述记载的相同的方法通过FACS分析CD142的表达细胞水平来确认在iPSC细胞来源肝细胞中CD142被敲除。结果如图8所示。

[0204] 参照图8,在分化第40天(D40),与作为正常iPSC来源肝细胞的对照组(normal iPSC)相比,作为敲除CD142基因的iPSC来源肝细胞的实验组(iPSC-CD142#33)中示出CD142表达的细胞比例减少。

[0205] 实施例5:确认在iPSC来源胰腺谱系细胞及肝细胞中CD142蛋白水平

[0206] 酶联免疫吸附测定

[0207] 利用细胞裂解物通过ELISA试验方法分析CD142的蛋白量来确认在iPSC细胞来源胰腺谱系细胞和iPSC细胞来源肝细胞中随着CD142被敲除而生成的蛋白量的减少。

[0208] 利用iPSC来源胰腺谱系细胞和肝细胞的细胞裂解物以及细胞培养上清液通过组织因子活性分析试剂盒(Tissue Factor Activity Assay Kit)(人类(Human),比色法(Colorimetric),abcam(ab108906))测定CD142。根据试剂盒制造公司提供的说明书进行实验。使用Multiskan™ FC酶标仪(Thermo Scientific™(51119000))在405nm波长中测量吸光度。结果如图9及图10所示。

[0209] 如图9所示,在分化第14天(D14),可以确认到与作为正常iPSC来源胰腺谱系细胞的对照组(normal iPSC)相比,作为敲除CD142基因的iPSC来源胰腺谱系细胞的实验组(iPSC-CD142#33)的CD142蛋白量在细胞裂解物中减少(N=4)。

[0210] 并且,参照图10,在分化第40天(D40),可以确认与作为正常iPSC来源肝细胞的对照组(normal iPSC)相比,作为敲除CD142基因的iPSC来源肝细胞的实验组(iPSC-CD142#33)的CD142蛋白量在细胞裂解物中减少(N=4)。

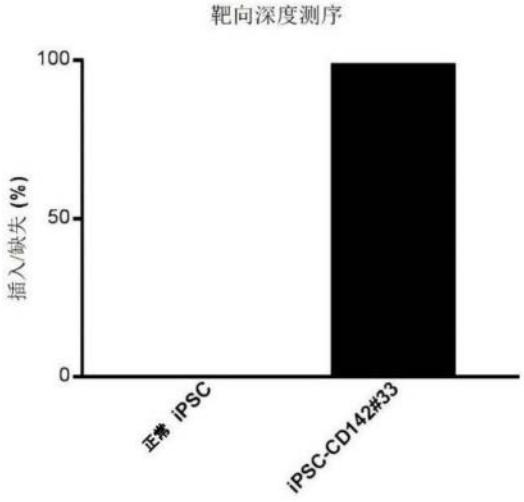

靶向深度测序
插入/缺失 (%)
100
50
0
正常 iPSC
iPSC-CD142#33

图1

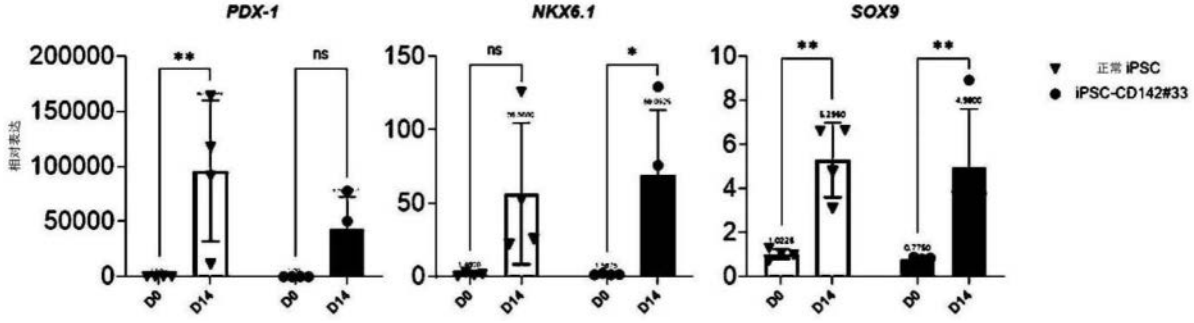

PDX-1
NKX6.1
SOX9
相对表达
D0
D14
ns
正常 iPSC
iPSC-CD142#33

图2

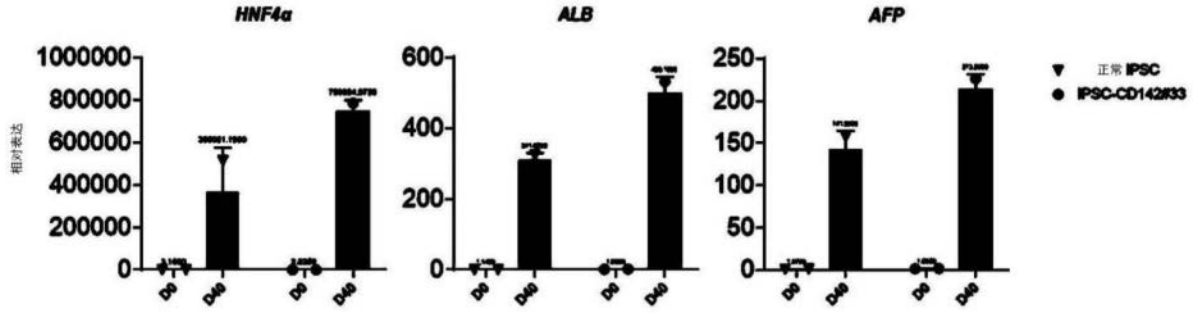

HNF4a
ALB
AFP
相对表达
D0
D40
正常 iPSC
iPSC-CD142#33

图3

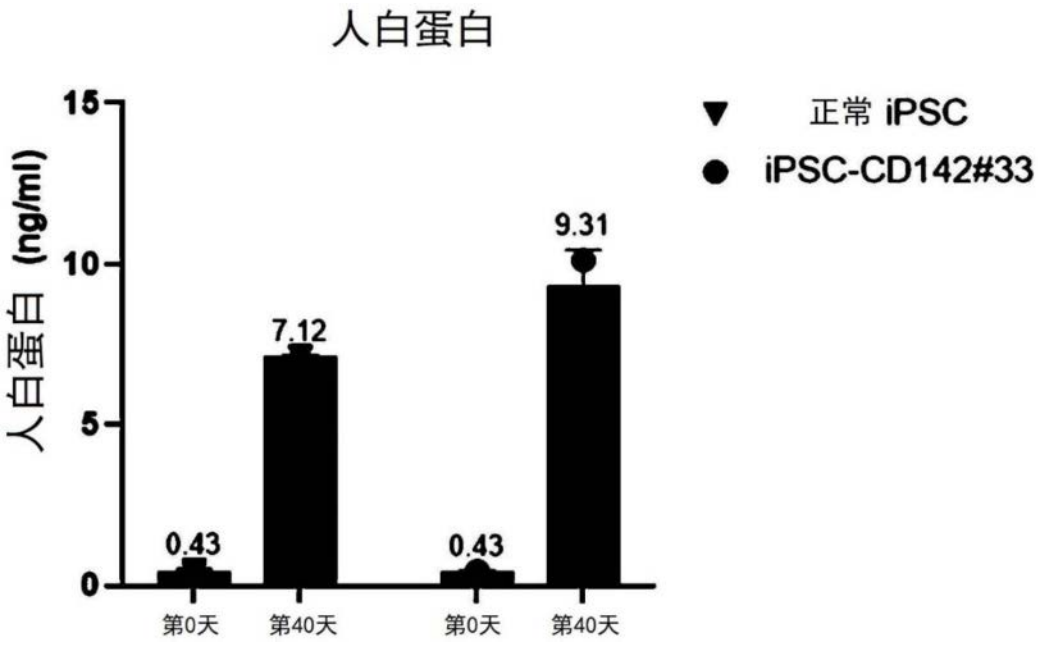

人白蛋白
人白蛋白 (ng/ml)
15
10
5
0
0.43
7.12
0.43
9.31
第0天
第40天
第0天
第40天
正常 iPSC
iPSC-CD142#33

图4

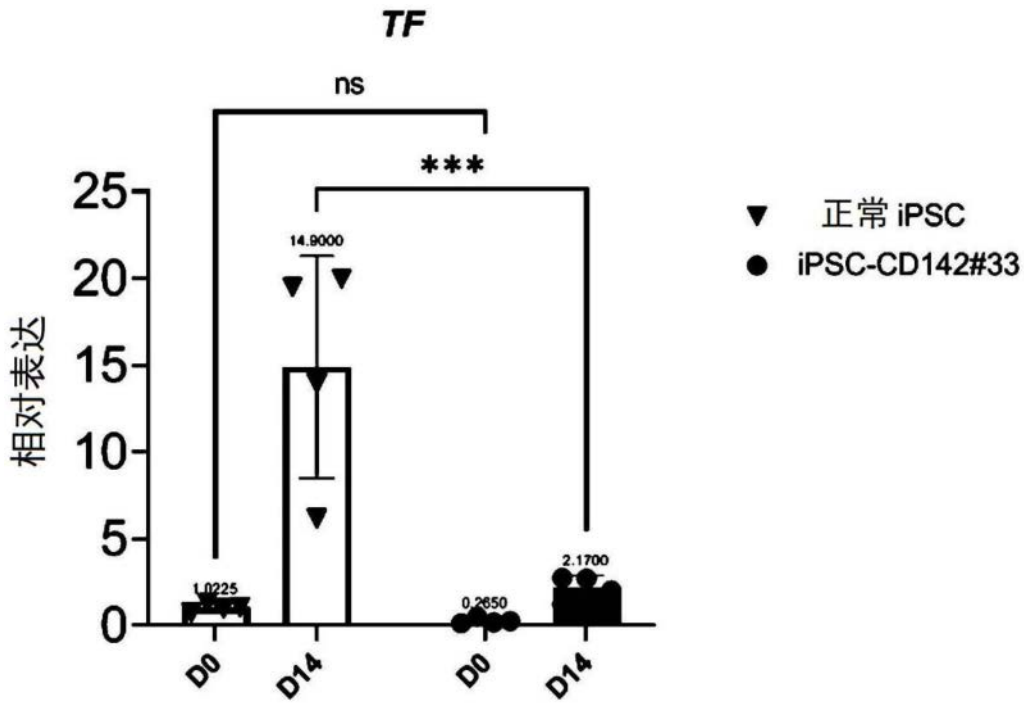

TF
ns
***
相对表达
25
20
15
10
5
0
14.9000
1.0225
0.2650
2.1700
D0
D14
D0
D14
正常 iPSC
iPSC-CD142#33

图5

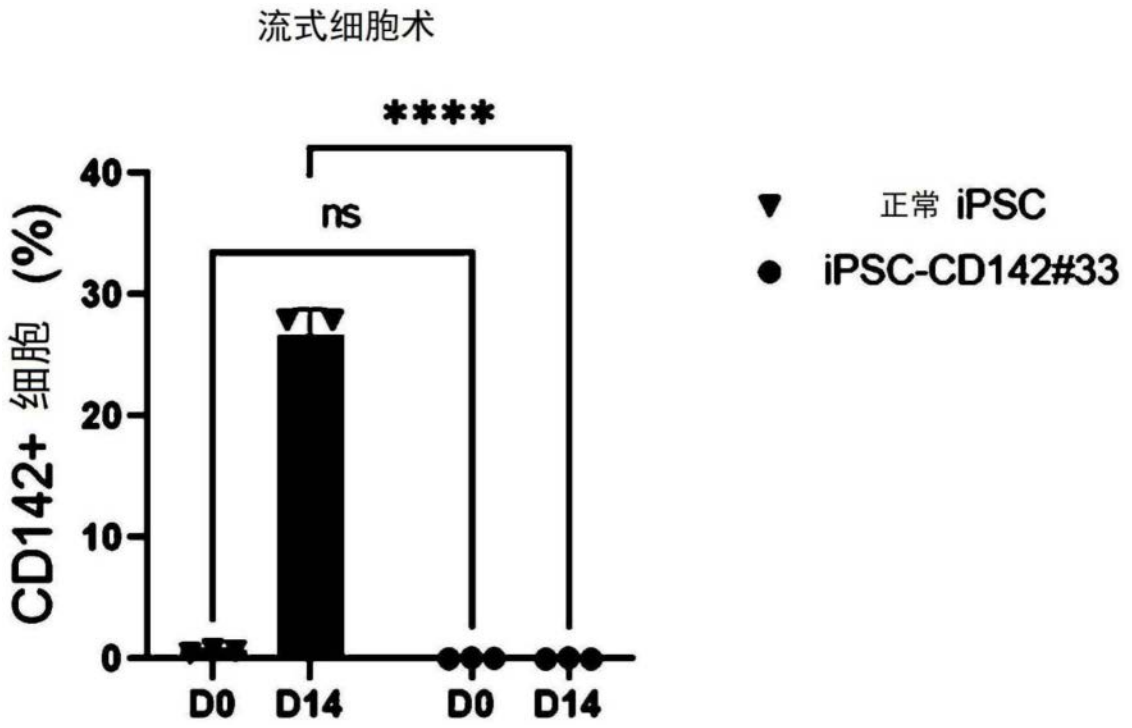

流式细胞术
****
ns
CD142+ 细胞 (%)
40
30
20
10
0
D0
D14
D0
D14
正常 iPSC
iPSC-CD142#33

图6

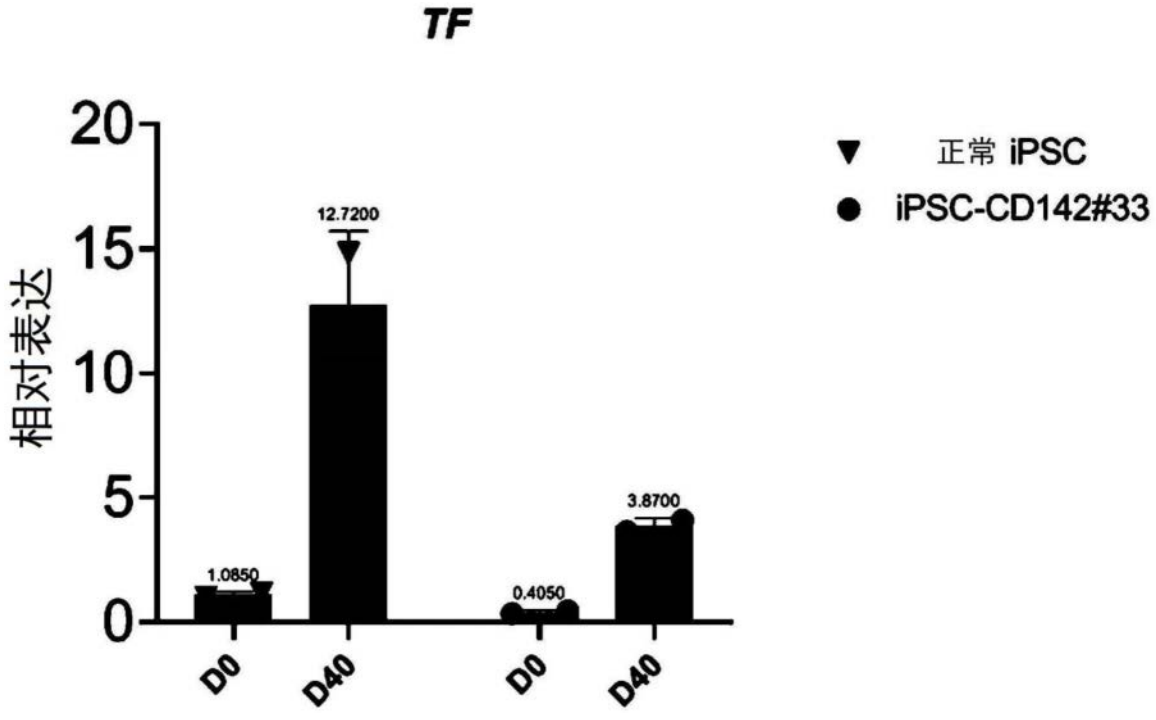

TF
相对表达
20
15
10
5
0
12.7200
3.8700
1.0850
0.4050
D0
D40
D0
D40
正常 iPSC
iPSC-CD142#33

图7

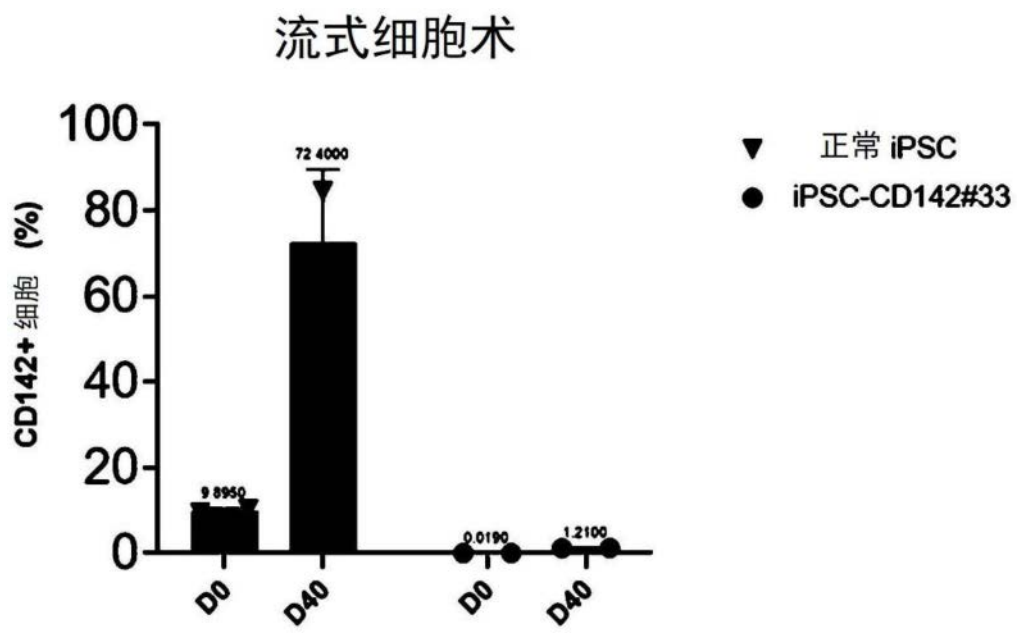

流式细胞术
CD142+细胞 (%)
100
80
60
40
20
0
72.4000
9.8950
0.0190
1.2100
D0
D40
D0
D40
正常 iPSC
iPSC-CD142#33

图8

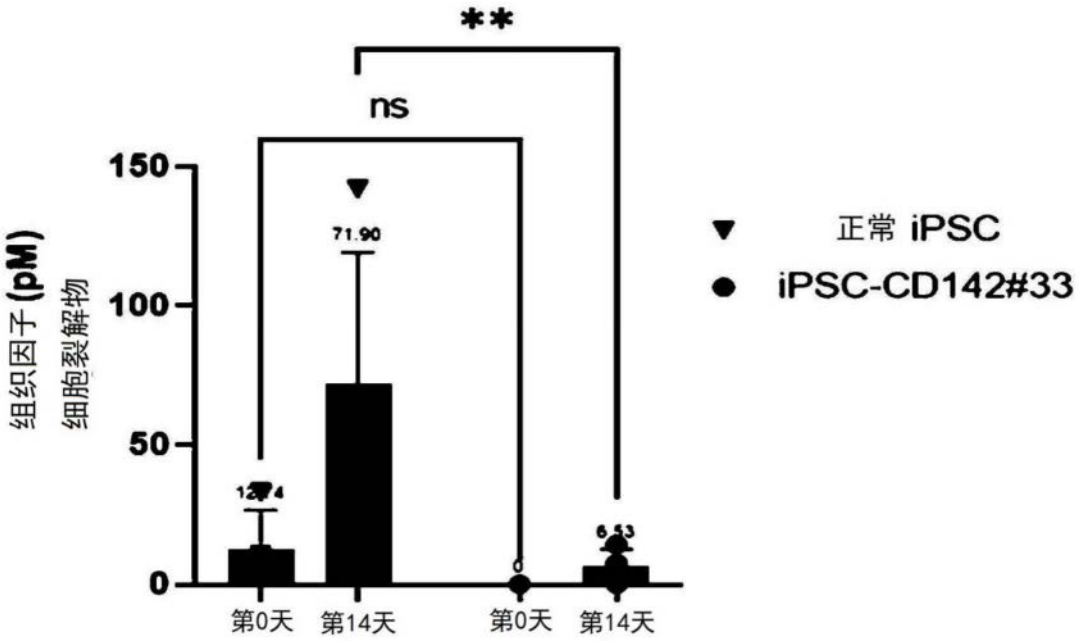

**
ns
组织因子 (pM)
细胞裂解物
150
100
50
0
71.90
第0天
第14天
第0天
第14天
正常 iPSC
iPSC-CD142#33

图9

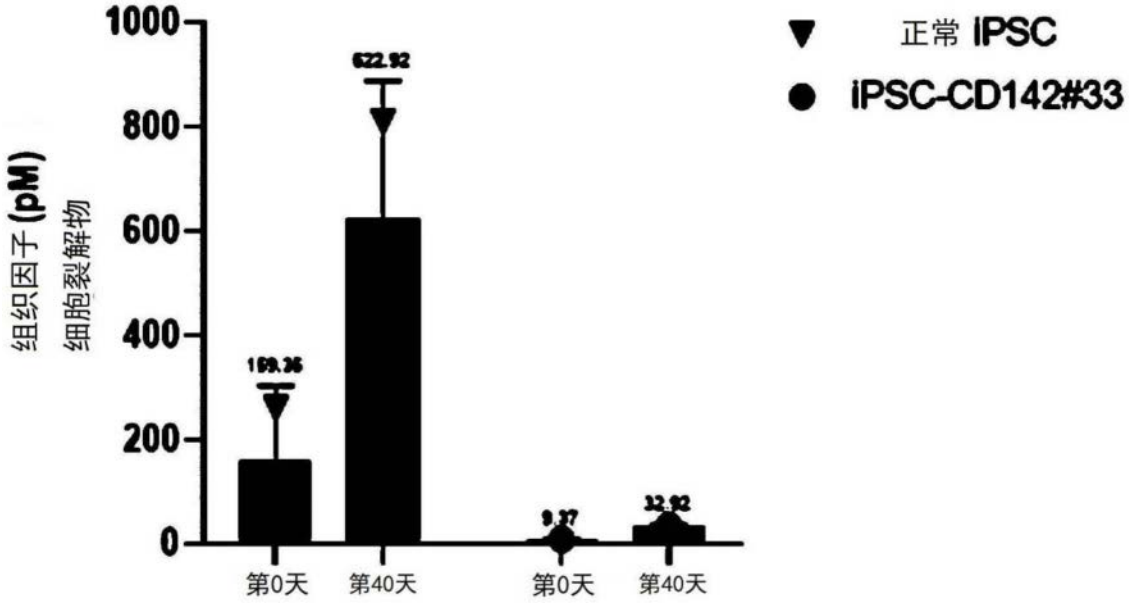

1000
800
600
400
200
0
组织因子(pM)
细胞裂解物
622.92
159.26
9.27
32.92
第0天
第40天
第0天
第40天
正常 IPSC
iPSC-CD142#33

图10