



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103354835 B

(45) 授权公告日 2016.03.02

(21) 申请号 201080071181.7

(22) 申请日 2010.12.08

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2013.08.07

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2010/059586 2010.12.08

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02012/078153 EN 2012.06.14

(73) 专利权人 韦尔赛特公司  
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 托马斯·斯库尔兹 艾伦·罗宾斯

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理  
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

C12N 5/0735(2006.01)

C12N 5/02(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1541706 A, 2004.11.03,  
CHOO et al. Selection against  
undifferentiated human embryonic stem  
cells by a cytotoxic antibody recognizing

podocalyxin-like protrin-1. 《STEM  
CELLS》. 2008, 第 26 卷 1454-1463.

BIEBEICH et al. Selective apoptosis of  
pluripotent mouse and human stem cells  
by novel ceramide analogues prevents  
teratoma formation and enriches for  
neural precursors in ES cell-derived  
neural transplants. 《THE JOURNAL OF CELL  
BIOLOGY》. 2004, 第 167 卷 723-734.

审查员 滕文静

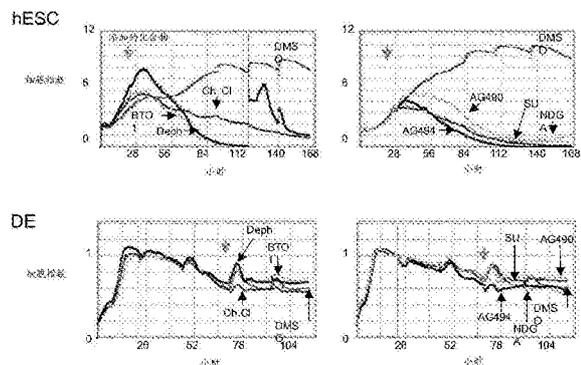
权利要求书6页 说明书68页  
序列表9页 附图32页

(54) 发明名称

抑制人多能干细胞生长的试剂和方法

(57) 摘要

本发明涉及抑制或阻抑分化的或正在分化的  
细胞群或培养物中未分化的或多能干细胞的生长  
和增殖的组合物和方法。



1. 降低细胞群中未分化的多能干细胞的数量或百分比的方法,其包括:  
将包含至少一种未分化的多能干细胞的细胞群与多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂接触,从而降低所述细胞群中未分化的多能干细胞的数量或百分比,其中所述选择性抑制剂或细胞毒性剂是咖啡酸。
2. 降低细胞群中未分化的多能干细胞的数量或百分比的方法,其包括:  
将包含至少一种未分化的多能干细胞和至少一种正在分化的细胞或分化的细胞的细胞群与多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂接触,从而降低所述细胞群中未分化的多能干细胞的数量或百分比,其中所述选择性抑制剂或细胞毒性剂是咖啡酸。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述多能干细胞是灵长类动物的细胞。
4. 如权利要求 3 所述的方法,其中所述灵长类动物的细胞是人类细胞。
5. 如权利要求 1-2 中任一项所述的方法,其中所述多能干细胞是 ES 细胞或 iPS 细胞。
6. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述接触包括在包含有效量的所述干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂的细胞培养基中孵育所述细胞群。
7. 如权利要求 6 所述的方法,其中在包含至少  $1 \mu\text{M}$  咖啡酸的细胞培养基中孵育所述细胞群。
8. 如权利要求 1-2 中任一项所述的方法,其中所述细胞群还包含正在分化的细胞或分化的细胞。
9. 如权利要求 8 所述的方法,其中所述正在分化的细胞或分化的细胞源自所述多能干细胞。
10. 如权利要求 1-2 中任一项所述的方法,其中所述多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂对所述正在分化的细胞或分化的细胞的活力或增殖没有影响。
11. 如权利要求 10 所述的方法,其中通过阻抗分析确定所述活力或增殖。
12. 如权利要求 10 所述的方法,其中通过分析所述细胞群中标志物的存在确定所述活力或增殖。
13. 如权利要求 1-2 中任一项所述的方法,其中所述多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂对所述群体中细胞的分化或分化潜能没有影响。
14. 如权利要求 13 所述的方法,其中通过分析所述细胞群中标志物的存在确定所述群体中细胞的分化或分化潜能。
15. 如权利要求 9 所述的方法,其中所述正在分化的细胞或分化的细胞是内胚层谱系细胞。
16. 如权利要求 15 所述的方法,其中所述内胚层谱系细胞是胰腺谱系细胞。
17. 如权利要求 9 所述的方法,其中所述正在分化的细胞或分化的细胞包括来自以下至少一种的细胞:多能干细胞的 1 期分化、2 期分化、3 期分化、4 期分化或 5 期分化。
18. 如权利要求 9 所述的方法,其中所述正在分化的细胞或分化的细胞包括至少一种选自以下的细胞类型:定形内胚层细胞、PDX1- 阴性前肠内胚层细胞、PDX1- 阳性前肠内胚层细胞、PDX1- 阳性胰腺内胚层细胞、内分泌祖细胞和内分泌前体细胞。
19. 如权利要求 1-2 中任一项所述的方法,其中所述细胞群是细胞培养物。
20. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述细胞培养物是贴壁培养物。
21. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述细胞培养物是悬浮培养物。

22. 如权利要求 21 所述的方法,其中所述悬浮培养物是悬浮细胞聚集体。
23. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述细胞培养物是小规模培养物。
24. 如权利要求 20-22 中任一项所述的方法,其中所述细胞培养物是小规模培养物。
25. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述细胞培养物是大规模培养物。
26. 如权利要求 20-22 中任一项所述的方法,其中所述细胞培养物是大规模培养物。
27. 如权利要求 1-2 中任一项所述的方法,其还包括确认所述细胞群中多能干细胞的数量或百分比的降低。
28. 如权利要求 27 所述的方法,其中确认所述细胞群中多能干细胞的数量或百分比的降低包括分析所述群体中标志物的存在。
29. 如权利要求 28 所述的方法,其中在分析标志物的存在之前,将来自所述群体的细胞样品在支持多能干细胞扩增的条件下培养。
30. 如权利要求 14 或 28 所述的方法,其中所述标志物是选自以下的多能性标志物: OCT4、碱性磷酸酶、NANOG、SSEA-1、SSEA-3、SEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 和 SOX2。
31. 如权利要求 14 或 28 所述的方法,其中所述标志物鉴定正在分化的细胞或分化的细胞。
32. 如权利要求 14 或 28 所述的方法,其中所述标志物选自:FOXA2/HNF3 $\beta$ 、MIXL1、CXCR4、CER、GSC、EOMES、SOX17、HNF4 $\alpha$ 、HNF1 $\beta$ 、HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA1、PDX1、HNF6、SOX9、PROX、PTF1A、NKX6.1、CPA、cMYC、NKX2.2、NGN3、ARX 和 PAX4。
33. 分化未分化的多能干细胞群的方法,其包括:
- a) 将所述多能干细胞群与至少一种分化条件接触,从而产生分化的细胞群,其中至少一些细胞正在分化并且至少一些细胞没有在分化;以及
- b) 用多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂处理所述分化的细胞群,从而分化所述多能干细胞群,其中所述选择性抑制剂或细胞毒性剂是咖啡酸。
34. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述多能干细胞是灵长类动物的细胞。
35. 如权利要求 34 所述的方法,其中所述灵长类动物的细胞是人类细胞。
36. 如权利要求 33-35 中任一项所述的方法,其中所述多能干细胞是 ES 细胞或 iPS 细胞。
37. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述处理包括在包含有效量的所述干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂的细胞培养基中孵育所述分化的细胞群。
38. 如权利要求 37 所述的方法,其中在包含至少 1  $\mu$ M 咖啡酸的细胞培养基中孵育所述分化的细胞群。
39. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述分化的细胞群包含未分化的细胞、正在分化的细胞和分化的细胞。
40. 如权利要求 33 或 39 所述的方法,其中所述多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂对所述正在分化的细胞或分化的细胞的活力或增殖没有影响。
41. 如权利要求 33-35 或 37-39 中任一项所述的方法,其中所述多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂对任何细胞的分化或分化潜能没有影响。
42. 如权利要求 36 所述的方法,其中所述多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂对任何细胞的分化或分化潜能没有影响。

43. 如权利要求 40 所述的方法,其中所述多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂对任何细胞的分化或分化潜能没有影响。

44. 如权利要求 41 所述的方法,其中通过分析所述细胞群中标志物的存在确定所述细胞的分化或分化潜能。

45. 如权利要求 44 所述的方法,其中在分析标志物的存在之前,将来自所述分化的群体的细胞样品在支持多能干细胞扩增的条件下培养。

46. 如权利要求 44 所述的方法,其中所述标志物是选自以下的多能性标志物:OCT4、碱性磷酸酶、NANOG、SSEA-1、SSEA-3、SEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 和 SOX2。

47. 如权利要求 44 所述的方法,其中所述标志物鉴定正在分化的细胞或分化的细胞。

48. 如权利要求 47 所述的方法,其中所述标志物选自:FOXA2/HNF3 $\beta$ 、MIXL1、CXCR4、CER、GSC、EOMES、SOX17、HNF4 $\alpha$ 、HNF1 $\beta$ 、HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA1、PDX1、HNF6、SOX9、PROX、PTF1A、NKX6.1、CPA、cMYC、NKX2.2、NGN3、ARX 和 PAX4。

49. 如权利要求 40 所述的方法,其中所述正在分化的细胞或分化的细胞是内胚层谱系细胞。

50. 如权利要求 49 所述的方法,其中所述内胚层谱系细胞是胰腺谱系细胞。

51. 如权利要求 40 所述的方法,其中所述正在分化的细胞或分化的细胞包括来自以下至少一种的细胞:多能干细胞的 1 期分化、2 期分化、3 期分化、4 期分化或 5 期分化。

52. 如权利要求 40 所述的方法,其中所述正在分化的细胞或分化的细胞包括至少一种选自以下的细胞类型:定形内胚层细胞、PDX1- 阴性前肠内胚层细胞、PDX1- 阳性前肠内胚层细胞、PDX1- 阳性胰腺内胚层细胞、内分泌祖细胞和内分泌前体细胞。

53. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述多能干细胞群与至少两种分化条件依次接触。

54. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述分化条件为细胞培养基、化合物或生长因子。

55. 如权利要求 54 所述的方法,其中所述分化细胞培养基、化合物或生长因子包括以下的至少一种:TGF $\beta$  超家族成员;Wnt 家族成员;Wnt 通路激活剂;ROCK 抑制剂;FGF 家族成员;刺猬通路抑制剂;TGF $\beta$  超家族抑制剂;类视色素;视黄酸类似物;EGF 家族成员;和 $\gamma$  分泌酶抑制剂。

56. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述分化条件包括选自以下的至少一种条件:减少或消除血清;减少或消除胰岛素和胰岛素样生长因子;降低或消除 TGF $\beta$  超家族生长因子信号转导;降低或消除 $\gamma$  分泌酶活性;降低或消除刺猬通路信号转导;激活 TGF $\beta$  超家族生长因子信号转导;激活 FGF 家族生长因子信号转导;激活 EGF 家族生长因子信号转导;激活 Wnt 通路;和激活视黄酸受体家族。

57. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述多能干细胞群是细胞培养物。

58. 如权利要求 57 所述的方法,其中所述细胞培养物是贴壁细胞培养物。

59. 如权利要求 57 所述的方法,其中所述细胞培养物是悬浮培养物。

60. 如权利要求 59 所述的方法,其中所述悬浮培养物包括悬浮细胞聚集体。

61. 如权利要求 57-60 中任一项所述的方法,其中所述细胞培养物是小规模培养物。

62. 如权利要求 57-60 中任一项所述的方法,其中所述细胞培养物是大规模的。

63. 组合物,其包含:

a) 未分化的多能干细胞和至少一种选自以下的细胞:所述多能干细胞的正在分化的衍生物或所述多能干细胞的分化的衍生物;和

b) 多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂,其中所述选择性抑制剂或细胞毒性剂是咖啡酸。

64. 如权利要求 63 所述的组合物,其中 (a) 中的细胞是灵长类动物的细胞。

65. 如权利要求 64 所述的组合物,其中所述灵长类动物的细胞是人类细胞。

66. 如权利要求 63-65 中任一项所述的组合物,其中所述多能干细胞是 ES 细胞或 iPS 细胞。

67. 如权利要求 63 所述的组合物,其中 (a) 中的细胞处于含有至少 1  $\mu$  M 咖啡酸的细胞培养基中。

68. 如权利要求 63 所述的组合物,其中所述多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂对所述正在分化的细胞或分化的细胞的增殖或活力没有影响。

69. 如权利要求 68 所述的组合物,其中通过分析细胞群中标志物的存在确定所述至少一种细胞的增殖或活力。

70. 如权利要求 69 所述的组合物,其中所述标志物选自:OCT4、SSEA-1、SSEA-3、SEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、碱性磷酸酶、NANOG 和 SOX2。

71. 如权利要求 69 所述的组合物,其中所述标志物选自:SOX17、FOXA2/HNF3  $\beta$ 、MIXL1、CXCR4、CER、GSC、EOMES、HNF4  $\alpha$ 、HNF1  $\beta$ 、HNF1  $\alpha$ 、HNF4  $\alpha$ 、FOXA1、PDX1、HNF6、SOX9、PROX、PTF1A、NKX6.1、CPA、cMYC、NKX2.2、NGN3、ARX 和 PAX4。

72. 如权利要求 69 所述的组合物,其中所述标志物选自:AFP、CALCR、CMKOR1、CRIP1、FOXQ1、GATA4、GCG、CHGA、CPA、FGF17、GHRL、INS、MAFA、NFM、PAX3、PAX6、PP、PROX1、SOX1、SOX6、SOX7、SST、SYP、VWF 和 ZIC1。

73. 如权利要求 63 所述的组合物,其中所述正在分化的细胞或所述分化的细胞是内胚层谱系细胞。

74. 如权利要求 73 所述的组合物,其中所述内胚层谱系细胞是胰腺谱系细胞。

75. 如权利要求 74 所述的组合物,其中所述正在分化的细胞或分化的细胞来自:1 期分化、2 期分化、3 期分化、4 期分化和 5 期分化。

76. 如权利要求 75 所述的组合物,其中所述正在分化的细胞或分化的细胞选自:定形内胚层细胞、PDX1- 阴性前肠内胚层细胞、PDX1- 阳性前肠内胚层细胞、PDX1- 阳性胰腺内胚层细胞、内分泌祖细胞和内分泌前体细胞。

77. 如权利要求 63 所述的组合物,其中 (a) 中的细胞是细胞培养物。

78. 如权利要求 77 所述的组合物,其中所述细胞培养物是贴壁培养物。

79. 如权利要求 77 所述的组合物,其中所述细胞培养物是悬浮培养物。

80. 如权利要求 79 所述的组合物,其中所述悬浮培养物是悬浮细胞聚集体。

81. 如权利要求 77-80 中任一项所述的组合物,其中所述细胞培养物是小规模培养物。

82. 如权利要求 77-80 中任一项所述的组合物,其中所述细胞培养物是大规模培养物。

83. 未分化的多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂在制备用于移植或递送入个体的细胞群中的用途,其中所述细胞群包含至少一种未分化的多能干细胞和至少一种正在分化的细胞或分化的细胞,并且其中所述选择性抑制剂或细胞毒性剂是咖啡酸。

84. 如权利要求 83 所述的用途,其中所述多能干细胞是灵长类动物的细胞。
85. 如权利要求 84 所述的用途,其中所述灵长类动物的细胞是人类细胞。
86. 如权利要求 83-85 中任一项所述的用途,其中所述多能干细胞是 ES 细胞或 iPS 细胞。
87. 如权利要求 83-85 中任一项所述的用途,其中在包含至少  $1 \mu\text{M}$  咖啡酸的细胞培养基中孵育所述细胞群。
88. 如权利要求 83-85 中任一项所述的用途,其中所述正在分化的细胞或分化的细胞源自所述多能干细胞。
89. 如权利要求 83-85 中任一项所述的用途,其中所述多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂对所述正在分化的细胞或分化的细胞的活力或增殖没有影响。
90. 如权利要求 89 所述的用途,其中通过阻抗分析确定所述活力或增殖。
91. 如权利要求 89 所述的用途,其中通过分析所述细胞群中标志物的存在确定所述活力或增殖。
92. 如权利要求 83-85 中任一项所述的用途,其中所述多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂对所述群体中细胞的分化或分化潜能没有影响。
93. 如权利要求 92 所述的用途,其中通过分析所述细胞群中标志物的存在确定所述群体中细胞的分化或分化潜能。
94. 如权利要求 88 所述的用途,其中所述正在分化的细胞或分化的细胞是内胚层谱系细胞。
95. 如权利要求 94 所述的用途,其中所述内胚层谱系细胞是胰腺谱系细胞。
96. 如权利要求 88 所述的用途,其中所述正在分化的细胞或分化的细胞包括来自以下至少一种的细胞:多能干细胞的 1 期分化、2 期分化、3 期分化、4 期分化或 5 期分化。
97. 如权利要求 88 所述的用途,其中所述正在分化的细胞或分化的细胞包括至少一种选自以下的细胞类型:定形内胚层细胞、PDX1- 阴性前肠内胚层细胞、PDX1- 阳性前肠内胚层细胞、PDX1- 阳性胰腺内胚层细胞、内分泌祖细胞和内分泌前体细胞。
98. 如权利要求 83-85 中任一项所述的用途,其中所述细胞群是细胞培养物。
99. 如权利要求 98 所述的用途,其中所述细胞培养物是贴壁培养物。
100. 如权利要求 98 所述的用途,其中所述细胞培养物是悬浮培养物。
101. 如权利要求 100 所述的用途,其中所述悬浮培养物是悬浮细胞聚集体。
102. 如权利要求 98 所述的用途,其中所述细胞培养物是小规模培养物。
103. 如权利要求 98 所述的用途,其中所述细胞培养物是大规模培养物。
104. 如权利要求 83-85 中任一项所述的用途,其中在分析标志物的存在之前,将来自所述群体的细胞样品在支持多能干细胞扩增的条件下培养。
105. 如权利要求 93 所述的用途,其中所述标志物是选自以下的多能性标志物:OCT4、碱性磷酸酶、NANOG、SSEA-1、SSEA-3、SEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 和 SOX2。
106. 如权利要求 104 所述的用途,其中所述标志物是选自以下的多能性标志物:OCT4、碱性磷酸酶、NANOG、SSEA-1、SSEA-3、SEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 和 SOX2。
107. 如权利要求 93 所述的用途,其中所述标志物鉴定正在分化的细胞或分化的细胞。
108. 如权利要求 104 所述的用途,其中所述标志物鉴定正在分化的细胞或分化的细

胞。

109. 如权利要求 93 所述的用途,其中所述标志物选自 :FOXA2/HNF3  $\beta$ 、MIXL1、CXCR4、CER、GSC、EOMES、SOX17、HNF4  $\alpha$ 、HNF1  $\beta$ 、HNF1  $\alpha$ 、HNF4  $\alpha$ 、FOXA1、PDX1、HNF6、SOX9、PROX、PTF1A、NKX6. 1、CPA、cMYC、NKX2. 2、NGN3、ARX 和 PAX4。

110. 如权利要求 104 所述的用途,其中所述标志物选自 :FOXA2/HNF3  $\beta$ 、MIXL1、CXCR4、CER、GSC、EOMES、SOX17、HNF4  $\alpha$ 、HNF1  $\beta$ 、HNF1  $\alpha$ 、HNF4  $\alpha$ 、FOXA1、PDX1、HNF6、SOX9、PROX、PTF1A、NKX6. 1、CPA、cMYC、NKX2. 2、NGN3、ARX 和 PAX4。

## 抑制人多能干细胞生长的试剂和方法

### 发明领域

[0001] 本发明涉及体外筛选和鉴定多能干细胞的细胞毒性剂或抑制剂。

[0002] 发明背景

[0003] 发展使用人胚胎干细胞 (hESC 或 hES 细胞) 的细胞替代疗法潜在障碍是分化方法可能不能同质地特化所有 hESC。未分化的 hESC, 部分分化的细胞或祖细胞或未正确特化的细胞可能残留于分化的细胞群中。这类细胞的存在可能导致移植时的“脱靶”生物效应, 意识到的最大的问题是植入物的生长过度或畸胎瘤的产生。尚不清楚畸胎瘤是否单独地由残留的 hESC 导致, 或者部分分化的细胞或祖细胞是否也促进畸胎瘤形成。无论如何, 证明可移植的细胞群是安全的并且不包含导致畸胎瘤的亚群体是重要的。

[0004] 在移植或递送前, 使用多种方法通过消耗、分离、杀死或抑制未分化的细胞以最小化不需要的细胞亚群体或纯化所需群体是可能的, 所述方法涉及靶向试剂, 例如小分子有机化合物, 细胞表面标志物或抗体 (Choo et al. Stem Cells 20082:1454-63)。因此需要鉴定能够用于消除可移植的细胞的潜在的不安全群体的试剂和方法。

[0005] 发明简述

[0006] 本发明提供了鉴定抑制剂和细胞毒性剂的方法, 所述方法通过将多能干细胞 (例如 ES 细胞或 iPS 细胞) 与候选抑制剂或细胞毒性剂接触, 并观察多能干细胞的增殖或活力被抑制。抑制剂或细胞毒性剂的选择可以通过以下确定: 将分化的或正在分化的细胞与候选抑制剂或细胞毒性剂接触, 并观察分化的或正在分化的细胞的增殖和活力不受候选抑制剂或细胞毒性剂的影响。例如, 本发明描述了能够消除正在分化的群体中未定向的 hESC 的多种小分子化合物。鉴定的化合物是将在细胞疗法产品的制造和大规模生产中包括的候选物, 潜在地消除未分化的细胞, 例如多能干细胞, 从而提供对于畸胎瘤形成的安全性改善的量值。

[0007] 本发明的细胞可以是任何种类, 但在某些实施方案中是灵长类动物的细胞, 例如人细胞。

[0008] 增殖和活力可以通过领域内已知的任何方法确定, 但通常使用阻抗分析确定。或者, 本发明的细胞的增殖和活力可以通过碱性磷酸酶染色或通过分析细胞的标志物的存在来确定。

[0009] 本发明的正在分化或分化的细胞通常来自于多能干细胞, 并可包括以下细胞, 例如定形内胚层细胞、PDX1- 阴性前肠内胚层细胞、PDX1- 阳性前肠内胚层细胞、PDX1- 阳性胰腺内胚层细胞、内分泌祖细胞和内分泌前体细胞。

[0010] 正在分化的或分化的细胞可以并行分析, 或可以与多能干细胞一起呈现, 例如在细胞培养物中, 细胞培养物可以是正在经历从多能干细胞向该多能干细胞的更分化的衍生物分化的细胞群。例如, 细胞群可以包括从多能干细胞向胰腺内胚层谱系细胞的 1 期、2 期、3 期、4 期和 5 期分化的细胞。

[0011] 在本发明的某些实施方案中, 细胞培养物是贴壁培养物。在其他实施方案中, 细胞培养物是悬浮培养物, 其可以是细胞团的悬浮液。

[0012] 在一方面,本发明的干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂将对细胞的分化或分化潜能没有影响,尤其是对多能干细胞及其正在分化的和分化的衍生物没有影响。可以通过分析细胞的标志物的存在确定分化和分化潜能。这类标志物可以包括鉴定多能干细胞的那些,例如 OCT4、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、碱性磷酸酶、NANOG 和 SOX2。可用于本发明的标志物也可以鉴定正在分化或分化的细胞,例如鉴定 1 期分化和定形内胚层细胞的那些标志物,包括 SOX17、FOXA2/HNF3  $\beta$ 、CER、MIXL1、EOMES、GSC 和 CXCR4;鉴定 2 期分化和 PDX1- 阴性前肠内胚层细胞的标志物,例如 SOX17、HNF1  $\beta$ 、HNF1  $\alpha$ 、HNF4  $\alpha$  和 FOXA1;鉴定 3 期分化或 PDX1- 阳性前肠内胚层细胞的标志物,例如 PDX1、HNF6、SOX9 和 PROX1;鉴定 4 期分化或 PDX1- 阳性胰腺内胚层祖细胞的标志物,例如 PDX1、NKX6. 1、PTF1A、CPA 和 cMYC;以及鉴定 5 期分化、内分泌前体细胞和 / 或内分泌祖细胞的标志物,例如 NGN3、PAX4、ARX 和 NKX2. 2。

[0013] 在一些方面,可以监测细胞的非所需分化(例如,不是来自定形内胚层细胞的细胞或非胰腺类型的细胞),其中可以使用以下标志物和本领域内已知的其他标志物:AFP、CALCR、CMKOR1、CRIP1、FOXQ1、GATA4、GCG、CHGA、CPA、FGF17、GHRL、INS、MAFA、NFM、PAX3、PAX6、PP、PROX1、SOX1、SOX6、SOX7、SST、SYP、VWF 和 ZIC1。

[0014] 这些和其他标志物可以通过领域内已知的任何方法检测,包括但不限于, Q-PCR、免疫荧光法、免疫组织化学法、细胞分选、ELISA、Northern 印迹和免疫印迹、依赖于基于杂交的捕获和检测技术的多路数字基因表达技术。

[0015] 在一些实施方案中,在分析标志物的存在之前,在支持多能干细胞扩增的条件下,培养用候选抑制剂或细胞毒性剂处理的细胞样品是有利的。以这种方式,可以增强或放大多能干细胞的检测。

[0016] 还预期本发明的筛选方法可以包括在多个时间点分析候选抑制剂或细胞毒性剂的效果。例如,可以在第一时间点将细胞或细胞培养物与候选抑制剂或细胞毒性剂接触,并在随后的第二时间点检测抑制剂或细胞毒性剂的效果。如果细胞或细胞培养物是正在经历分化的细胞群,第一时间点可以是例如 1 期分化,并且第二时间点可以是在 2 期、3 期、4 期或 5 期分化期间。

[0017] 本发明还提供了降低细胞群中多能干细胞的数量或百分比的方法,所述方法通过将所述多能干细胞与多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂接触。在某些实施方案中,多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂选自:咖啡酸、伊维菌素、氯化白屈菜赤碱及其组合。通常,细胞将在含有有效量的干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂,例如至少约 1  $\mu$  M 咖啡酸、至少约 1  $\mu$  M 伊维菌素或至少 5  $\mu$  M 氯化白屈菜赤碱的细胞培养基中接触。

[0018] 本发明预期这些方法将特别有益于在正在分化或分化的细胞的群体(例如来源于多能干细胞的那些群体)中降低多能干细胞的数量或百分比。

[0019] 在某些实施方案中,多能干细胞分化成内胚层谱系细胞,例如胰腺谱系细胞,然后用本发明的多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂处理以在最终分化中或分化过程期间减少未分化的多能干细胞。这类正在分化和分化的细胞包括定形内胚层细胞、PDX1 阴性前肠内胚层细胞、PDX1 阳性前肠内胚层细胞、PDX1 阳性胰腺内胚层祖细胞、内分泌祖细胞和内分泌前体细胞。

[0020] 有利地,本发明的方法可同样应用于小规模培养(例如,高达约  $10^5$  个细胞),例如

在 96 孔板和 6 孔板中；和较大的平板或烧瓶中，例如 60mm<sup>2</sup>、100mm<sup>2</sup>、150mm<sup>2</sup> 培养容器，T25 烧瓶、T75 烧瓶、T175 烧瓶、三合一烧瓶；和小型细胞工厂，例如 2 层、5 层或 10 层细胞工厂；以及至少约  $1 \times 10^9$  个细胞的大规模培养，例如旋转烧瓶、细胞反应器容器或其他容器例如，本领域技术人员公知的 40 层细胞工厂。本领域技术人员将意识到术语“小规模”和“大规模”不是限制性的，并且对于任何研究，细胞的数量并因此培养容器的体积将取决于研究的性质。

[0021] 因此，本发明还提供了分化多能干细胞群的方法，所述方法通过将多能干细胞群与至少一种分化条件接触以产生分化的细胞群，其中至少一些细胞正在分化并且至少一些细胞未在分化（例如保持多能）；然后用多能干细胞特异性抑制剂或细胞毒性剂处理分化的细胞群。根据这类方法，多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂是这样的物质，其在多能干细胞抑制或细胞毒性有效剂量时对多能干细胞或其分化的衍生物的分化或分化潜能没有影响，并同时正在分化或分化的衍生物的活力或增殖没有影响。

[0022] 此外，本发明的方法可以与涉及以下的分化方案一起使用：依次将多能干细胞与两种或更多种分化条件接触，例如多能干细胞通过 1 期（定型内胚层）、2 期（PDX1 阴性前肠内胚层）、3 期（PDX1 阳性前肠内胚层）、4 期（PDX1 阳性胰腺内胚层祖细胞）或 5 期（内分泌祖细胞和内分泌前体细胞）依次分化为胰腺内胚层细胞。用于这种类型的分化系列的分化条件包括培养基，化合物和生长因子，例如含有以下的分化细胞培养基：TGF  $\beta$  超家族成员；Wnt 家族成员；Wnt 通路激活剂；ROCK 抑制剂；FGF 家族成员；刺猬通路抑制剂；TGF  $\beta$  超家族抑制剂；类视色素；视黄酸类似物；EGF 家族成员；和 / 或  $\gamma$  分泌酶抑制剂。还包括以下条件，例如减少或消除血清；减少或消除胰岛素和胰岛素样生长因子；降低或消除 TGF  $\beta$  超家族生长因子信号转导；降低或消除  $\gamma$  分泌酶活性；降低或消除刺猬通路信号转导；激活 TGF  $\beta$  超家族生长因子信号转导；激活 FGF 家族生长因子信号转导；激活 EGF 家族生长因子信号转导；激活 Wnt 通路；和激活视黄酸受体家族成员。用本发明的方法可以容易地达到这些条件。

[0023] 本发明还提供了组合物，其包含多能干细胞和正在分化的衍生物和 / 或分化的衍生物，以及一种或多种本文所述的多能干细胞选择性抑制剂或细胞毒性剂。通常，组合物将被分化，其中需要抑制或移除多能干细胞，例如当细胞将用于向个体中移植时。

[0024] 附图简述

[0025] 图 1 是显示对于多个标志物获得的 Q-PCR 基因表达数据的图表集，其证明 Q-PCR 可以用作混合细胞群中细胞类型的相对丰度的测量手段。图 1A 显示在 100%hESC（最左边的柱）和 100%定型细胞（DE；最右边的柱）中的 SOX17 基因表达。100%hESC 和 100%DE 之间的柱显示来自 hESC:DE 细胞的以下已知稀释混合物（或比例）的 SOX17 基因表达：99:1hESC:DE 细胞（从左边数第 2 个柱），95:5hESC:DE 细胞（从左边数第 3 个柱）和 90:10hESC:DE 细胞（从左边数第 4 个柱）。图 1B 显示以已知比例与人胚胎成纤维细胞（HEF）混合的 hESC（100:0HEF:hESC；99:1HEF:hESC；90:10HEF:hESC；50:50HEF:hESC；和 0:100HEF:hESC）中的 OCT4 基因表达。图 1C 显示了相对胰岛素（INS）基因表达与群体中表达该标志物基因的细胞的数量成正比。

[0026] 图 2 是监测和检测分化的培养物中多能干细胞水平的示例性原理图。

[0027] 图 3A-3D 是追踪在导致细胞阻抗减少或降低的 7 种 LOPAC1280<sup>TM</sup> 化合物的存在下

hES 细胞 (hESC ;图 3A 和 3B) 或定形内胚层细胞 (DE ;图 3C 和 3D) 的实时阻抗分析的图表, 指示 hESC 培养物而不是分化的定形内胚层中的细胞毒性。

[0028] 图 4A-4G 是显示用来自 LOPAC1280™ 亚库 (表 4) 的候选选择性细胞毒性剂处理的 BG02 的贴壁 1 期细胞培养物的 OCT4 (图 4A)、NANOG (图 4B)、FOXA2 (图 4C)、SOX17 (图 4D)、SOX7 (图 4E)、PAX6 (图 4F) 和 ZIC1 (图 4G) 的相对基因表达水平的柱状图。使用三种管家基因 GUSB、CYCG 和 TBP 的几何平均值标准化表达水平。图表显示与 hESC 样品相比的倍数调节。大箭头指示药物处理的时间。D=DMSO (对照);C= 氯化白屈菜赤碱;A=AG490;B=BT0-1;De= 去磷酸化抑制剂 (Dephostatin);S=SU6656。

[0029] 图 5A-5M 是显示用来自 LOPAC1280™ 亚库 (表 4) 的候选选择性细胞毒性剂处理的 1-4 期悬浮聚集细胞培养物的多能细胞或胰腺细胞谱系细胞中表达的以下标志物的相对基因表达水平的柱状图:OCT4 (图 5A)、MIXL (图 5B)、EOMES (图 5C)、CXCR4 (图 5D)、SOX17 (图 5E)、HNF1B (图 5F)、HNF4A (图 5G)、PDX1 (图 5H)、PTF1A (图 5I)、NKX2. 2. (图 5J)、NGN3 (图 5K)、NKX6. 1 (图 5L) 和 PAX4 (图 5M)。表达水平相对于管家基因的平均表达水平标准化。图表显示与 hESC 样品相比的倍数调节。Ch. Cl= 氯化白屈菜赤碱;Deph. = 去磷酸化抑制剂;AG=AG490;SU=SU6656。

[0030] 图 6A-6F 是显示化合物处理的分化中的非胰腺谱系细胞的以下标志物的相对基因表达水平的柱状图:SOX1 (图 6A;例如,至少在胚胎外细胞和神经细胞中观察到), ZIC1 (图 6B;例如,至少在早期神经细胞中观察到), PAX6 (图 6C;例如,至少在神经外胚层细胞中观察到), SOX7 (图 6D;例如,至少在胚胎外细胞中观察到), AFP (图 6E;例如,至少在肝细胞和胚胎外细胞中观察到) 和 CDX2 (图 6F;例如,至少在胚胎外细胞中观察到)。氯化白屈菜赤碱 (Ch. Cl) 和去磷酸化抑制剂 (Deph.) 不促进非胰腺谱系细胞或“脱靶”细胞的分化,而酪氨酸磷酸化抑制剂 (Tyrphostin) AG490 (AG) 和 SU6656 (SU) 似乎分别产生升高的 AFP 和 CDX2 表达,这些是胰腺细胞不典型的标志物,并通常不在胰腺细胞系中表达。

[0031] 图 7A 和 7B 是用 LOPAC1280™ 库筛选的包含 hESC 和 hESC 源性神经祖细胞 (NPC) 的 96 孔板的照片。通过碱性磷酸酶活性染色人 ESC (图 7A) 并用结晶紫染色 NPC (图 7B)。LOPAC 板的左列和右列是空的并用作未处理的对照。圈出显示细胞毒性或生长抑制的孔。

[0032] 图 8 是用 LOPAC1280™ 对 hESC 的二次筛选的照片,用不同浓度的候选化合物并通过碱性磷酸酶活性染色。

[0033] 图 9A-9H 是显示用来自 LOPAC1280™ 亚库 (表 4) 的候选选择性细胞毒性剂处理的 1 期悬浮聚集细胞培养物的以下标志物的相对基因表达水平的柱状图:OCT4 (图 9A 和 9E)、SOX17 (图 9B 和 9F)、PAX6 (图 9C 和 9G) 和 CDX2 (图 9D 和 9H)。培养物分化至 2 期结束。用来自之前验证的 1 期分化的第 2 天样品的平均表达水平 (左格) 标准化表达水平。图表显示与第 2 天样品相比的倍数调节。Cy=CyT49hESC 系;CA= 咖啡酸;C= 卡米达佐;P= 邻苯二酚;N= 萘啶;H= 对羟基苯胺;U=U-73343;M=MG624;P= 戊烷脒;G= 奎吡因;D= 多潘立酮;I= 伊维菌素;AP=A mM. 吡咯烷基;O= 油酰多巴胺;S=SKF96365。

[0034] 图 10A-10I 是显示用 DMSO (对照)、0.1  $\mu$ M 咖啡酸或 0.17  $\mu$ M 伊维菌素试剂处理 1 期悬浮聚集细胞培养物之后, OCT4 (图 10A)、MIXL (图 10B)、HNF1B (图 10C)、HNF4A (图 10D)、PAX4 (图 10E)、NGN3 (图 10F)、NKX2. 2 (图 10G)、NKX6. 1 (图 10H) 和 PTF1A (图 10I) 的相对基因表达水平的柱形图。在 d0 和 d1 收集未处理的对照样品 (左格)。在 d2、d3、

d5、d7、d9、d11 和 d11 收集处理的样品。处理的样品的每天的柱为（从左向右）：DMSO、咖啡酸和伊维菌素。培养物分化至 4 期结束。来自未处理的胰腺内胚层分化的结果在右边示出，在第 0、1、2、5、8、10 和 14 天收集样品。

[0035] 图 11 是显示来自 LOPAC1280™库的对 hESC 有细胞毒性但不影响分化的细胞的细胞活力的三种化合物的名称、作用和结构的表格。

[0036] 图 12A-12E 是接种在 hESC 培养基的贴壁培养物中并用核染色剂 DAPI（左图）和 OCT4（中图）染色的 1 期后悬浮聚集体的图像。OCT4 阳性簇作为实心黑簇以较小的初级簇或较大的次级簇在右图显示。

[0037] 图 13A-13E 是显示与用 DMSO 处理的来自 1 期的对照细胞（图 13A 和 13D）相比，用氯化白屈菜赤碱（ChCl；图 13B）、伊维菌素（图 13C）和咖啡酸（图 13E）处理的 1 期悬浮聚集培养物中 OCT4 阳性细胞的减少的图像。

[0038] 图 14A-14B 是显示与对照、DMSO 处理的培养物（图 A）相比，用咖啡酸（图 14B）处理的 BG02hES 细胞系的 1 期悬浮聚集培养物中 OCT4 阳性细胞的减少的图像。

[0039] 图 15A-15D 是显示从 1 期的第 1 至 2 天使用氯化白屈菜赤碱的 1 期悬浮聚集培养物中 OCT4 阳性细胞的减少的图像。在染色前 24 小时（上图）或 72 小时（下图），将聚集体接种在 hESC 培养基的贴壁培养物中。

[0040] 图 16 是显示从 1 期的第 1 至 2 天使用咖啡酸的 1 期悬浮聚集培养物中 OCT4 阳性细胞的减少的图像。在染色前 24 小时（左图）或 72 小时（右图），将聚集体接种在 hESC 培养基的贴壁培养物中。

[0041] 图 17 是显示在第 2 天接种在 ES 细胞培养基中并再培养 24 或 72 小时之后，伊维菌素或咖啡酸（指示的浓度）对 CyT49hES 细胞的分化的悬浮聚集培养物的影响的图像集。显示的是 OCT4 的免疫细胞化学染色。

[0042] 发明详述

[0043] 参照以下本发明的详细描述和其中包括的实例可以更容易地了解本发明。然而，在公开和描述本发明组合物和方法之前，应了解，本发明不局限于特定核酸、特定多肽、特定细胞类型、特定宿主细胞、特定条件或特定方法等，因此当然可发生变化，而且本领域技术人员将易于了解其中的众多修改和改变。参看 Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning*, 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY; Maniatis et al., (1982) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY; Wu (Ed.) 1993 *Meth. Enzymol.* 218, Part I; Wu (Ed.) 1979 *Meth. Enzymol.* 68; Wu et al., (Eds.) 1983 *Meth. Enzymol.* 100 and 101; Grossman and Moldave (Eds.) 1980 *Meth. Enzymol.* 65; Miller (ed.) 1972 *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; Old and Primrose, 1981 *Principles of Gene Manipulation*, University of California Press, Berkeley; Schleif & Wensink, 1982 *Practical Methods in Molecular Biology*; Glover (Ed.) 1985 *DNA Cloning Vol. I and II*, IRL Press, Oxford, UK; Hames & Higgins (Eds.) 1985 *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, UK; 以及 Setlow & Hollaender 1979 *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Vols. 1-4, Plenum Press, NY。最后，所采用的缩写和命名法被认为是所属领域中以及专业杂志（例如本文引用的专业杂志）中常用的标准缩写和命名法。

[0044] 除非另作说明,否则本文中使用的术语应根据相关领域技术人员的常规用法理解。除下文提供的术语的定义外,分子生物学中常用术语的定义也可见于 Rieger et al,1991, Glossary of genetics: classical and molecular, 第 5 版, Berlin:Springer-Verlag; 和 Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al Eds., Current Protocols, 格里尼出版公司与约翰威立出版公司的合资企业 (a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley&Sons, Inc.), (1998 增补)。应了解,说明书和权利要求书中使用的“一个”或“一种”可根据其使用的上下文而表示一个(种)或多个(种)。因此,例如提到“一个细胞”可表示至少一个细胞、两个细胞或多个细胞。

[0045] 另外,为本说明书和所附权利要求书的目的,除非另作指示,表示成分的量、物质百分比或比例、反应条件以及说明书和权利要求书中所用其它数值的所有数字都应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。因此,除非作相反指示,以下说明书和所附权利要求书中列出的数字参数都是近似值,其可根据本发明意图获得的所需特性而变化。在最低限度上,且不打算将等同原则 (doctrine of equivalent) 的应用局限于权利要求书的范围,各数字参数至少应根据所报导的有效数位的数字并应用常用的舍入技术来解释。

[0046] 如本文所用,“约”或“大约”意指,称为“约”或“大约”的数字包含所述数字加或减所述数字的 1% 至 10%。例如,视情形而定,约 50 个核苷酸可表示 45 至 55 个核苷酸,或少到 49 至 51 个核苷酸。无论何时出现在本文中,数字范围,例如“45 至 55”是指在指定范围内的每一整数;例如“45% 至 55%”是指所述百分比可为 45%、46% 等,最大为 55% 且包括 55%。在本文所述范围包括小数值时,例如“1.2% 至 10.5%”,这一范围是指在指定范围中最小增量的每一小数值;例如“1.2% 至 10.5%”意指所述百分比可为 1.2%、1.3%、1.4%、1.5% 等,最大为 10.5% 且包括 10.5%;而“1.20% 至 10.50%”意指所述百分比可为 1.20%、1.21%、1.22%、1.23% 等,最大为 10.50% 且包括 10.50%。

[0047] 如本文所用,“单细胞悬浮液”或等同的表述是指液体与彼此分离(即,未聚集)的细胞(或更通常说来为多个细胞)的混合物,其可借助任何可用的机械、生物学或化学方式制备。本文所述的单细胞悬浮液通常是悬浮于例如基础盐溶液、生理盐水、细胞培养基等生理溶液中的活 hES 细胞或 hES 源性细胞的制剂。有几种方法可用于解离细胞簇以从初生组织、培养的贴壁细胞和细胞聚集体形成单细胞悬浮液,包括但不限于通过物理力(机械解离,例如细胞刮擦、通过窄孔吸管研磨、细针抽吸、涡旋解聚集和通过细尼龙或不锈钢筛网强制过滤)、酶(即,使用胰蛋白酶、胶原蛋白酶、Accutase™ 等的酶促解离)或其组合解离细胞的方法。此外,能够支持 hES 细胞的单细胞悬浮液生长和存活的方法和培养基条件可用于扩增、细胞分选和适于多孔板分析法的指定接种,并使培养程序和克隆扩增能自动化。因此,本发明一实施方案提供用于产生能够支持长期保持和有效扩增未分化的多能 hES 细胞或分化的 hES 细胞的稳定单细胞酶促解离 hES 细胞或 hES 源性细胞培养系统的方法。

[0048] 如本文所用,术语“接触”(即,使例如可分化的细胞等细胞与化合物接触)意图包括在体外一起孵育化合物和细胞(例如,将化合物添加到培养的细胞中)。术语“接触”不意图包括将细胞在体内暴露于包含某些组分、化合物、生长因子等(例如神经递质、ErbB3 配体、TGF- $\beta$  家族成员等)的确定成分的细胞培养基,或此类组分、化合物、生长因子等,因为这些物质天然存在于个体中(即,暴露可由天然生理过程所引起)。例如,使细胞与含有

神经递质、ErbB3 配体和 TGF- $\beta$  家族成员的确定成分的细胞培养基接触的步骤可以任何适合的方式进行,但应理解为暴露细胞以与上述组分接触。例如,可通过将细胞与贴壁培养或悬浮培养中的组分孵育(培养)来接触细胞。应了解,与确定成分培养基中的组分接触的细胞可进一步用细胞分化环境处理以使细胞稳定,或使细胞分化。

[0049] 本文在有关细胞培养的上下文中使用的“支持”是指足以供细胞培养物实现所需生长、活力、多能性和/或其它特征的培养基组成、其特定组分和培养条件。因此,支持 hES 细胞的未分化扩增的确定成分培养基是当在不含其它因子、化合物、添加剂等的情况下用来培养 hES 细胞时,细胞将生长而不发生分化的培养基。支持 hES 细胞扩增的化合物或因子是当添加到所述培养基条件中时会使 hES 细胞生长的化合物或因子。

[0050] 如本文所用,“确定成分细胞培养基”、“确定成分培养基(defined culture media)”和“确定成分培养基(defined media)”可互换使用,意指含有特定比例、量或活性的无机组分和有机组分(包括生物组分和生物活性组分)的水性组合物,利用基本类似的特性,其能够如实重制。确定成分培养基可含有蛋白质,优选重组蛋白质,条件是这些蛋白质经过制备或纯化,而不具有明显的逐批量或逐批次变化。动物血清固有地具有不确定性和可变性,且因此确定成分培养基中不包括血清。然而,在确定成分培养基中可包括基于质量、摩尔当量或活性(例如可测量的生物活性)的量或比例的个别高度纯化的血清或其它蛋白质、因子等。

[0051] 如本文所用,术语“分化”是指比其来源的细胞类型更特化的细胞类型的产生。因此,本术语涵盖部分分化和终末分化的细胞类型。来源于 hES 细胞的分化的细胞一般称为“hES 源性细胞”、“hES 源性细胞聚集培养物”、“hES 源性单细胞悬浮液”、“hES 源性细胞贴壁培养物”等。

[0052] 如本文所用,术语“基本上”是指很大范围或程度。例如,“基本上类似”在上下文中可用于描述某一方法在很大范围上或程度上类似于另一方法。然而,如本文所用,术语“基本上不含”(例如“基本上不含”,或“基本上不含污染物”,或“基本上不含血清”,或“基本上不含胰岛素或胰岛素样生长因子”或等同的表述)意指,所述溶液、培养基、补充物、赋形剂等至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 或至少约 100% 不含血清、污染物、胰岛素或胰岛素样生长因子。在本发明一个实施方案中,提供的确定成分培养基不含血清,或为 100% 不含血清的,或为基本上不含血清的。相比之下,“基本上类似”的组合物、工艺、方法、溶液、培养基、补充物、赋形剂等与前文所述或在以全文引用方式并入本文中的先前所述工艺或方法中的参考组合物、工艺、方法、溶液、培养基、补充物、赋形剂至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 99% 类似。

[0053] 在本发明某些实施方案中,术语“富含”是指细胞培养物含有超过约 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90% 或 95% 的所需细胞谱系。

[0054] 如本文所用,术语诸如化合物的试剂的“有效量”或等同的表述是指在其余组分和条件的存在下足以实现所需结果(例如抑制多能干细胞生长)的试剂量。在本发明的某些方面,例如,稳定多能干细胞培养物的化合物或生长因子的有效量是指,在不存在饲养层细胞且不存在血清或血清替代品的情况下,将导致多能干细胞培养物稳定例如大于一天、一周、一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、和/或六个月或更久的量。在本发明其它方面中,诸如化合物的试剂的“有效量”或等同的表述可以指,在其余组分存在下,在不存在饲

养层细胞且不存在血清或血清替代品的情况下,足以使多能细胞培养物稳定超过 5、10、15、20、25、30 或 40 代的化合物的浓度。类似地,本领域技术人员易于测定这一浓度。

[0055] 如本文所用,术语“试剂”是指产生效果,例如生物效果,优选所需效果的任何分子、化合物和 / 或物质。在某些实施方案中,本发明的试剂对多能干细胞的生长是细胞毒性或抑制性的。在一方面,与至少一种其他细胞类型(其可以是比多能干细胞更分化的细胞)相比,本发明的细胞毒性剂或抑制剂对多能干细胞是选择性细胞毒性的或细胞生长抑制的。

[0056] 本发明的“候选细胞毒性剂或抑制剂”或“候选试剂”可以是合成的或天然存在的,包括但不限于,生物制品、生物化学制品和包括多种化学类别的化学制品,尽管它们通常是有机化合物。通常,候选试剂是小分子有机化合物,即具有大于约 50Da 但小于约 2500Da,通常小于约 2000Da,通常小于 1500Da,通常小于约 1000Da 和通常约 800Da 或更小的分子量的那些化合物,包括与多肽和 / 或核酸结构上相互作用所需的官能化学基团,并通常至少包含氨基、羰基、羟基或羧基,通常包含至少两个官能化学基团并更通常包含至少三个官能化学基团。候选试剂可包括被一种或多种上述提到的官能基团取代的环状碳架或杂环结构和 / 或芳基或聚芳基结构。候选试剂也可以是生物分子,例如核酸、肽、蛋白、类肽、抗体、核酶、RNAi 构建体(包括 siRNA)、反义 RNA、糖类、脂肪酸、甾醇、类异戊二烯、嘌呤、嘧啶、上述的衍生物或结构类似物或其组合等。当试剂是核酸时,所述试剂通常是 DNA 或 RNA 分子,尽管还涵盖修饰的核酸、变体、类似物等。

[0057] 从多种来源获得候选试剂,包括合成的或天然化合物的库或集合。例如,多种手段可用于随机和定向合成多种有机化合物和生物分子,包括表达随机化的寡核苷酸,合成的有机组合库,随机肽的噬菌体展示库等。或者,以细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物的库也是可用的或容易产生的。此外,天然或合成产生的库和化合物可以通过常规化学、物理和生物化学手段修饰。此外,已知的药理学活性剂可以接受定向的或随机的化学修饰,例如酰化、羟化、酯化、酰胺化和领域内公知的其他方法,以产生试剂的结构类似物。

[0058] 如本文所用,术语“表达”是指细胞中多核苷酸的转录和 / 或多肽的翻译,使得表达分子的细胞中所述分子的水平可测量地高于不表达所述分子的细胞中的水平。本领域技术人员众所周知测量分子表达的方法,包括但不限于,Northern 印迹、RT-PCR、原位杂交法、Western 印迹和免疫染色法。

[0059] 本文中当提到细胞、细胞系、细胞培养物或细胞群时使用的术语“分离的”是指自细胞天然来源基本上分离,由此能够在体外培养所述细胞、细胞系、细胞培养物或细胞群。此外,所用术语“分离”是指从一组两种或更多种细胞中物理分离出一种或多种细胞,其中所述细胞根据诸如细胞形态和 / 或标志物表达的所需特征进行选择。根据本发明的分离的细胞可以是部分地、基本上或完全地从污染物纯化,或者可以为不是部分地、基本上或完全地从污染物纯化。

[0060] 如本文所用,“配体”是指能结合于诸如受体的生物分子的化学物质。如本文所用,“激动剂”是指能结合于细胞受体并触发细胞反应的配体,而“拮抗剂”是指能结合于受体并通过阻断激动剂结合来抑制细胞反应的配体。

[0061] 如本文所用,“标准细胞密度”是指通常已知的在培养物中有活力并能够扩增的多能干细胞的浓度范围。例如, hES 细胞通常是以约 30,000 至约 60,000 个细胞 /cm<sup>2</sup> 的密度

接种,取决于细胞或细胞系的生长周期,并且产生约 150,000 至 350,000 个细胞/cm<sup>2</sup>,例如每个 60mm 盘或约 19.6cm<sup>2</sup>约  $2.5 \times 10^6$  至约  $5 \times 10^7$  个细胞。相比之下,“低细胞密度”是指例如以明显低于标准细胞密度的细胞密度接种多能干细胞。本领域内众所周知,以低于某一临界密度的密度接种的细胞可能会发生细胞分裂延迟,或者无法存活并传代。以每 cm<sup>2</sup> 约 30,000 个或更少细胞接种 hES 细胞的培养物被认为是低细胞密度。

[0062] 在某些实施方案中,在本文所述确定成分培养基中,在不存在和/或存在诸如 MATRIGEL™ 的细胞外基质蛋白 (ECM) 的情况下培养多能干细胞。在不存在 ECM 情况下培养的多能细胞可含有约 0.5% 至 20% 人血清 (hS) 或来自分离点为 300K 和/或 100KMW 的旋转离心柱 (Microcon, Millipore, Billerica, MA) 的 hS 滞留物部分。在 37°C 下,在含有高达 20%hS,例如 0.2%、1%、2%、5%、10%、15%、20%hS 或 hS 滞留物部分的培养基中直接过夜孵育 hES 细胞,可以产生 hES 细胞聚集悬浮液。含 hS 或 hS 滞留物部分的培养基中干细胞的接种效率与 PCT/US2007/062755 所述的 DC-HAIF 中培养的 hES 细胞或使用 MATRIGEL™ 或其它类似基质作为 ECM 在 DC-HAIF 培养基中培养的 hES 细胞所观察的接种效率相当。在确定成分培养基中培养 hES 细胞的方法描述于 2009 年 4 月 23 日公开的标题为“含有人血清的无饲养层多能干细胞培养基的方法和组合物” (METHODS AND COMPOSITIONS FOR FEEDER-FREE PLURIPOTENT STEM CELL MEDIA CONTAINING HUMAN SERUM) 的美国专利公开第 2009/0104696 号中,其全文以引用的方式并入本文中。

[0063] 在其它实施方案中,在基本上不含动物血清 (例如哺乳动物胎儿血清,例如胎牛血清) 且另外在不存在外源添加的成纤维细胞生长因子 (FGF) 的培养基中培养呈单层或呈聚集悬浮液形式的多能干细胞。所述方法与授予托马斯 (Thomson) 的美国专利第 7,005,252 号相区别,所述美国专利中的方法需要在不含动物血清但含有外源添加的生长因子 (包括 FGF) 的培养基中培养 hES 细胞。

[0064] 如本文所用,术语“可分化细胞”用于描述可分化成成熟细胞,或成熟细胞的祖先或前体,或可参与细胞分化 (例如与可分化成成熟细胞的其它细胞融合) 的细胞或细胞群。术语“祖细胞”和“谱系限定的祖细胞”在本文可交换地使用,是指专能细胞,寡能细胞和单能细胞,其沿特定途径定向分化。例如,内胚层谱系祖细胞能够分化成多种内胚层细胞类型,但通常不能发育成外胚层、中胚层或其衍生物。在一实施方案中,本文所述的胰腺内胚层祖细胞或上皮细胞是能够进一步发育成不同类型的胰腺激素分泌细胞的祖细胞,所述胰腺激素分泌细胞例如胰岛素、生长抑素、胰高血糖素、生长激素释放肽和胰腺多肽分泌细胞。某些成体干细胞是祖细胞类型。

[0065] 本发明还涵盖来自动物体内任一来源的可分化细胞,条件是这些细胞如本文所定义的那样是可分化的。例如,可以从以下采集可分化的细胞:胚胎或其中任何原始生殖层、胎盘或绒毛膜组织,或者从较为成熟的组织,例如包含成体干细胞的那些组织,包括但不限于脂肪、骨髓、神经组织、乳房组织、肝组织、胰腺、上皮组织、呼吸组织、生殖腺组织和肌肉组织。在特定实施方案中,可分化的细胞是胚胎干细胞。在其它特定实施方案中,可分化的细胞是成体干细胞或去分化的细胞。在其它特定实施方案中,干细胞是胎盘或绒毛膜源性干细胞。

[0066] 当然,本发明涵盖使用来自能够产生可分化细胞的任何动物的可分化细胞。可采集到可分化细胞的动物可以是脊椎动物或无脊椎动物、哺乳动物或非哺乳动物、人类或非

人类。动物来源的实例包括但不限于灵长类动物、啮齿动物、犬科动物、猫科动物、马科动物、牛科动物和猪科动物。

[0067] 如本文所用,术语“前体细胞”是谱系限定的、部分分化的、通常是单能细胞的类型,其丧失大多数或全部干细胞多能性。前体细胞通常仅能够分化成一种、两种或一些密切相关的终细胞类型。例如,本文所述的内分泌前体细胞能够分化成胰腺激素表达细胞。

[0068] 如本文所用,“定形内胚层”和“DE”可交换地使用,是指专能内胚层谱系细胞,其可以进一步分化成肠道或来源于肠道的器官的细胞。根据某些实施方案,定形内胚层细胞是哺乳动物细胞,在优选实施方案中,定形内胚层细胞是人类细胞。在本发明的一些实施方案中,定形内胚层细胞表达某些标志物和/或不能显著表达某些其他标志物。在一些实施方案中,选自以下的一种或多种标志物在定形内胚层细胞中表达:SOX17、CXCR4、MIXL1、GATA4、HNF3 $\beta$ 、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1、CRIP1和CER。在其他实施方案中,选自以下的一种或多种标志物在定形内胚层细胞中不显著表达:OCT4、 $\alpha$ -胎蛋白(AFP)、血栓调节蛋白(TM)、SPARC、SOX7和HNF4 $\alpha$ 。定形内胚层细胞群及其产生方法也描述于2004年12月23日提交的题为“定型内胚层(DEFINITIVE ENDODERM)”的美国专利申请第11/021,618号(现在是美国专利第7,510,876号),通过引用将其整体并入本文。

[0069] 本发明的其他实施方案涉及称为“PDX1-阴性前肠内胚层细胞”、“前肠内胚层细胞”或其等同表述的细胞培养物和细胞聚集物。PDX1-阴性前肠内胚层细胞是专能的并能产生多种细胞和组织,包括但不限于,胸腺、甲状腺、甲状旁腺、肺/支气管、肝、咽、咽囊、十二指肠和咽鼓管的一部分。在一些实施方案中,前肠内胚层细胞与非前肠内胚层细胞相比,表达增加水平的SOX17、HNF1 $\beta$ 、HNF1 $\alpha$ 、FOXA1,所述非前肠内胚层细胞例如不显著表达这些标志物的定形内胚层或PDX阳性内胚层。PDX1-阴性前肠内胚层细胞还表达低水平至不可检测水平的PDX1、AFP、SOX7和SOX1。PDX1-阴性前肠内胚层细胞群及其产生方法还描述于2006年10月27日提交的题为“表达PDX1的背侧和腹侧前肠内胚层细胞(PDX1-EXPRESSING DORSAL AND VENTRAL FOREGUT ENDODERM)”的美国专利申请第11/588,693号,通过引用将其整体并入本文。

[0070] 本发明的其他实施方案涉及“PDX1阳性胰腺前肠内胚层细胞”或“PDX1阳性前胰腺内胚层细胞”或“PDX1阳性前胰腺内胚层祖细胞”或其等同表述的细胞培养物。PDX1阳性前胰腺内胚层细胞是专能的并可以产生多种细胞和/或组织,包括但不限于,胃、肠和胰腺。在一些实施方案中,PDX1阳性前胰腺内胚层细胞与不明显表达以下标志物的非前胰腺内胚层细胞相比表达增加水平的PDX1、HNF6、SOX9和PROX1。PDX1阳性前胰腺内胚层细胞还表达低水平至不可检测水平的NKX6.1、PTF1A、CPA和cMYC。

[0071] 本发明的其他实施方案涉及“PDX1阳性胰腺内胚层细胞”或“PDX1阳性胰腺内胚层祖细胞”或“胰腺祖细胞”或“胰腺上皮细胞”或“PE”或其等同表述的细胞培养物。PDX1阳性胰腺内胚层祖细胞是专能的并能够产生胰腺内的多种细胞,包括但不限于,腺泡、胰管和内分泌细胞。在一些实施方案中,PDX1阳性胰腺祖细胞与不明显表达PDX1和NKX6.1的非前胰腺内胚层细胞相比表达增加水平的PDX1和NKX6.1。PDX1阳性胰腺祖细胞还表达低水平至不可检测水平的PTF1A、CPA、cMYC、NGN3、PAX4、ARX、NKX2.2、INS、GCG、GHRL、SST和PP。

[0072] 或者,本发明的其他实施方案涉及“PDX1阳性胰腺内胚层端细胞”或其等同描述的

细胞培养物。在一些实施方案中，PDX1 阳性胰腺内胚层端细胞与 PDX1 阳性胰腺祖细胞类似地表达增加水平的 PDX1 和 NKX6.1，但不像 PDX1 阳性胰腺祖细胞那样，PDX1 阳性胰腺内胚层端细胞还表达增加水平的 PTF1A、CPA 和 cMYC。PDX1 阳性胰腺内胚层端细胞还表达低水平至不可检测水平的 NGN3、PAX4、ARX、NKX2.2、INS、GCG、GHRL、SST 和 PP。

[0073] 此外，本发明的其他实施方案涉及“胰腺内分泌前体细胞”、“胰腺内分泌祖细胞”或其等同表述的培养物。胰腺内分泌祖细胞是专能或单能的，并产生成熟的内分泌细胞，包括  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$  和胰腺多肽 (PP) 细胞。在一些实施方案中，胰腺内分泌祖细胞与其他非内分泌祖细胞类型相比表达增加水平的 NGN3、PAX4、ARX 和 NKX2.2。胰腺祖细胞还表达低水平至不可检测水平的 INS、GCG、GHRL、SST 和 PP。

[0074] 本发明的其他实施方案涉及“胰腺内分泌细胞”、“胰腺激素分泌细胞”、“胰岛激素表达细胞”或其等同表述的培养物，其是指源自体外多能干细胞的细胞，例如  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$  和 / 或 PP 细胞或其组合。这些内分泌细胞可以是多激素的或单激素的，例如表达胰岛素、胰高血糖素、生长激素释放肽、生长抑素和胰腺多肽或其组合。因此这些内分泌细胞可以表达一种或多种胰腺激素，并具有人类胰岛细胞的至少一种或一些功能。胰岛激素表达细胞可以是成熟的或不成熟的。不成熟的胰岛激素表达细胞可以与成熟的胰岛激素表达细胞基于某些标志物的差异表达或基于它们的功能能力如体外或体内的葡萄糖响应性而不同。胰腺内分泌细胞也表达低水平至不可检测水平的 NGN3、PAX4、ARX 和 NKX2.2。

[0075] 细胞类型

[0076] 在一些实施方案中，“多能（干）细胞”被用作分化成内胚层谱系或更具体来说分化成胰腺内胚层类型细胞的原料。如本文所用，“多能”、“多能性”、“多能细胞”和等同的表述是指细胞能够在细胞培养中增殖和自我更新，以及分化成为多种细胞群（包括展现专能特性的细胞群）的细胞。例如多能 ES 细胞可产生三种胚胎细胞谱系中的每一种并通常被认为能够产生胚胎的所有细胞类型。然而，多能细胞通常无法产生胚胎外组织，例如羊膜、绒毛膜和其它胎盘组分，而且不能产生整个生物体，即多能细胞与“全能”细胞不同。通过提供稳定发育潜力的证据，以由单一细胞的子代形成全部三种胚胎生殖层的衍生物和在注入免疫抑制小鼠中后产生畸胎瘤，可证实多能性。多能性的其它指标包括已知在多能细胞中表达的基因的表达以及特征性形态，其可由本领域技术人员容易地鉴定。本发明的多能细胞可以使用本领域技术人员已知的任何方法得到。

[0077] 在某些实施方案中，用作本文所述方法的原料的本发明的多能干细胞是干细胞，包括 hES 细胞、人胚胎生殖 (EG) 细胞、人诱导的多能干 (iPS) 细胞，或甚至是孤雌细胞 (parthenogenic cell) 等。

[0078] 在某些实施方案中，当利用多能细胞时，这些多能细胞具有正常核型，例如所检查的分裂中期多能细胞培养物中超过 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90% 或超过 95% 会呈现正常核型。如本文所用，“正常核型”是指正常或野生型染色体数量和 / 或总体形状。

[0079] 如本文所用，“全能”是指细胞能够发育成所有类型细胞，不只是三种胚胎细胞谱系，包括胚胎外组织（例如胎盘）并产生整个生物体（例如小鼠或人类）。

[0080] “自我更新”是指干细胞分裂并形成具有与亲代干细胞相同特性的较多干细胞的能力，由此允许干细胞群无限期的得到补充。

[0081] 如本文所用,“胚胎”是指生物体由单一接合子开始到除了发育的配子细胞外不再包含多能细胞或全能细胞的多细胞结构结束的一系列发育阶段。术语“胚胎”除了指由配子融合得到的胚胎外,还指由体细胞核移植得到的胚胎。

[0082] 在本发明的另一实施方案中,多能干细胞不是来源于胚胎或不是直接来源于胚胎,例如,iPS 细胞是由非多能细胞(例如专能细胞或终末分化的细胞)通过称为“脱分化”或“重编程”的过程得到。如本文所用,“脱分化”或“重编程”是指使分化的细胞恢复特化性较低的前体细胞、祖细胞或干细胞状态的过程。

[0083] 人多能干细胞也可定义为或表征为存在多种转录因子和细胞表面蛋白,包括转录因子 Oct4、Nanog 和 Sox-2,它们形成核心调节复合物,确保导致分化的基因的抑制和维持多能性;和细胞表面抗原,例如糖脂 SSEA3、SSEA4 和硫酸角蛋白抗原 Tra-1-60 和 Tra-1-81。

[0084] 如本文所用,术语“诱导的多能干细胞”、“iPS 细胞”、“iPSC”、“重编程细胞”或等同的表述是指从非多能细胞人工制备的多能干细胞的类型,所述非多能干细胞通常是成体体细胞,或分化的细胞,例如成纤维细胞、造血细胞、肌细胞、神经元、表皮细胞等。通过在细胞中表达称为重编程因子的某些基因或基因产物,可以从体细胞产生 iPS 细胞。参见 Takahashi et al. (2007) Cell 131:861-872; Wernig et al. (2007) Nature 448:318-324; Park et al. (2008) Nature 451:141-146; 美国专利公开第 2009/0047263 号,通过引用将它们整体并入本文。最近,无需添加外源核酸即可产生 iPS 细胞。参见例如, Zhou et al., (2009) Cell Stem Cell. 4:381-4。诱导的多能干细胞在许多方面基本上与天然的人多能干细胞例如 hES 细胞相似,包括某些干细胞基因和蛋白的表达,染色质甲基化模式,加倍时间,胚状体形成,畸胎瘤形成,活性嵌合体形成,以及潜能与可分化能力。人 iPS 细胞提供了多能干细胞的来源而不涉及使用胚胎。

[0085] 如本文所用,“专能性”或“专能细胞”或其等同表述是指可产生有限数量的其它特定细胞类型的细胞类型。也就是说,专能细胞被定向成为一种或多种胚胎细胞命运,且因此,与多能细胞相比,其无法产生三种胚胎细胞谱系中每一种以及胚胎外细胞。相对于多能细胞,专能体细胞是更分化的,但不是终末分化的。因此,多能细胞的潜能高于专能细胞。例如,可重编程体细胞或用于产生 iPS 细胞的潜能决定因子包括但不限于以下因子: Oct-4、Sox2、FoxD3、UTF1、Stella、Rex1、ZNF206、Sox15、Myb12、Lin28、Nanog、DPPA2、ESG1、Otx2 和 / 或其组合。

[0086] 本发明一方面包括多能细胞、祖细胞或前体细胞群,其在适合条件下培养时能够选择性且在一些方面中可逆地选择性发育成不同细胞谱系。如本文所用,术语“群”是指多于一个细胞的集合,通常是细胞培养物。

[0087] 术语“细胞谱系”是指特定细胞类型由胚胎的第一次卵裂发育成完全成熟的细胞(即,特化细胞)的所有阶段。然而,细胞谱系不限于从胚胎直接发育成的细胞,还包括那些例如从多能干细胞沿特定线路分化成的细胞,例如胰腺内胚层细胞系。本文所述的 1-5 期的细胞包括在胰腺谱系中。

[0088] 如本文所用,术语“发育”、“分化”、“成熟”或“由多能细胞产生”、“来源于多能细胞”、“由多能细胞分化”和等同的表述是指在体外或体内例如由多能细胞产生分化或更特化的细胞类型,或在体内由移植的 PDX1 胰腺内胚层细胞成熟变为内分泌细胞的情形,如标

题为产生胰腺激素的方法 (METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES) 的 PCT 国际专利公开号 W02008/013664 中所述,通过引用将其全文并入本文中。所有术语都是指,通过特化和最终发生终末分化,由具有分化潜能阶段的细胞进展成至少两种不同的细胞谱系。为达成本申请的目的,这些术语可互换使用。本发明涵盖允许所述分化可逆使得能选择性恢复多能性或至少分化成多于一种细胞谱系的能力的培养条件。

[0089] 多能细胞的细胞毒性剂和抑制剂

[0090] 如本文所用,术语“细胞毒性剂”、“抑制剂”、“细胞毒性剂和 / 或抑制剂”和等同表述是指杀死、抑制、阻抑、阻止或降低细胞的生长、增殖和 / 或扩增的试剂。在一实施方案中,细胞毒性剂抑制或阻止在培养物中含有相对较小比例的多能细胞的混合的异质的细胞培养物或基本上同质的细胞培养物中未分化的多能干细胞的生长、增殖和 / 或扩增。术语细胞毒性剂和 / 或抑制剂不限于试剂发挥生理作用的特定机制,无论其是压制或阻止另一分子参与反应如阻止或降低反应速率,还是降低、限制或阻断另一试剂或分子如酶或有机物的作用或功能。本文涵盖的细胞毒性剂或抑制剂是导致杀死、阻止、阻断、停止、降低或减缓多能干细胞的生长、增殖和 / 或扩增的那些试剂。本发明考虑,术语细胞生长抑制剂和 / 或抑制剂包括所有以下试剂:导致细胞退化和 / 或死亡的试剂,以及那些“抑制细胞生长”或阻止细胞分裂的试剂,以及降低生长和 / 或细胞分裂而不完全阻断的试剂。不希望受理论限制,本发明考虑,细胞毒性、抑制细胞生长和抑制之间的区别可以是固有的和 / 或不可逆的,或可以与剂量成比例并可逆的。代表性的细胞毒性剂或抑制剂可能包括 LOPAC1280™ 库中描述的那些,优选地表 4 中描述的那些,更优选地表 5 中表述的那些试剂。

[0091] 例如,在候选物中,根据本发明的此类试剂是咖啡酸 (3, 4- 二羟基肉桂酸) 或咖啡酸苯乙醇酯 (CAPE), 类黄酮的结构相关物。这些试剂已经显示具有抗病毒、抗炎和免疫调节特性,并已经显示抑制多种类型的转化细胞的生长。参见 Grunberger et al. (1988) *Experientia* 44:230-32; Burke et al. (1995) *J. Med. Chem.* 38:4171-78; Su et al. (1994) *Cancer Res.* 54:1865-70; Su et al. (1991) *Moi, Carcinog.* 4:231-42; Hlendon et al. (1980) *Arzneim. Forsch.* 30:1847-48; 以及 Guarini et al. (1992) *Cell. Mol. Biol.* 38:513-27。尽管归于咖啡酸的许多活性的分子基础尚未良好确定,由咖啡酸抑制的大多数活性激活核因子  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ )。参见 Natarajan et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9090-95。

[0092] 另一选择性抑制剂是伊维菌素 (22, 23- 二氢阿维菌素 B1a+22, 23- 二氢阿维菌素 B1b), 其是来自阿维菌素的内酯驱虫剂,并分离自阿维链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*) 的发酵产物。其是以商标名 **Stromectol**® (U. S. A.), **Mectizan**® (Canada) 和 **Ivexterm** (Mexico) 出售的广谱抗寄生虫药。报道已经指出,伊维菌素以特异性和高亲和性与存在于神经细胞或肌肉细胞中的谷氨酸盐激活的氯通道结合,通过增加氯离子穿过细胞膜的透过性导致神经细胞或肌肉细胞的超极化。

[0093] 另一选择性抑制剂是氯化白屈菜赤碱,组 A 和 B 蛋白激酶 C (PKC) 异构体的选择性抑制剂。已经报道细胞凋亡是白屈菜赤碱诱导的体外细胞杀伤的主要机制。参见 Chmura et al. (2000) *Clin. Cancer Res.* February 20006:737。Chmura et al. (2000) 的临床前发现,表明白屈菜赤碱或其他类似化合物可以有效针对耐受标准治疗方案的某些人类肿瘤。Chmura et al. (2000) 证明了用白屈菜赤碱处理导致极小的毒性。

[0094] 如本文所用,术语“变体”包括同系物、类似物、直系同源物、和旁系同源物,以及合成的和天然存在的种类,例如嵌合的和融合的多肽。细胞毒性剂或抑制剂的变体,特别是结构类似物,在本发明的范围内。此外,参考蛋白或多肽的变体是其氨基酸序列与参考蛋白或多肽至少约 80% 相同的蛋白或多肽,其包括在术语变体内。在具体实施方案中,变体与参考蛋白或多肽至少约 85%、90%、95%、95%、97%、98%、99% 甚或 100% 相同。

[0095] 本文有关小分子化合物(例如天然存在的神经递质和神经递质受体的合成配体)的上下文中所使用的术语“类似物”是指共有结构和/或功能相似性的化合物。类似物包括“结构类似物”,即具有结构相似性;和“功能类似物”,即呈现类似药理学特性的化学上不同的化合物。例如,如所预期的,LOPAC1280™化合物,或优选的表 4 中的 176 种候选物,或更优选的表 5 中的 10 种候选物,或最优的图 11F 中的候选物的结构和功能类似物适用于本发明的方法。

[0096] 培养基

[0097] 本发明的组合物和方法包含基础盐营养液。如本文所用,“基础盐营养液”是指盐的水溶液,其向细胞提供正常细胞代谢所必需的和维持细胞内和细胞外渗透平衡的水和某些大部分无机离子;作为能源的碳水化合物;以及用以将培养基维持在生理 pH 范围内的缓冲系统。基础盐营养液的实例包括但不限于杜贝卡氏改良型伊格氏培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)、最低必需培养基(Minimal Essential Medium, MEM)、伊格氏基础培养基(Basal Medium Eagle, BME)、RPM11640、Ham's F-10、Ham's F-12、 $\alpha$ -最低必需培养基( $\alpha$  MEM)、格拉斯哥氏最低必需培养基(Glasgow's Minimal Essential Medium, G-MEM)、伊斯科夫氏改良型杜贝卡氏培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium),或经改良以用于多能细胞的通用目的培养基(例如 X-VIVO(龙沙公司(Lonza))造血基础培养基),以及其混合物。在一个特定实施方案中,基础盐营养液是约 50 : 50(vol:vol) 的 DMEM 与 Ham's F12 的混合物。

[0098] 尽管采用本文所述的基础盐营养液来维持多能细胞的细胞生长和活力,但在本发明其他实施方案中,也可以使用替代性多能干细胞培养基来维持多能性或用于多能细胞分化,包括但不限于 KSR(Invitrogen) 或无异源成分的 KSR(Invitrogen)、StemPro<sup>®</sup> hESC SFM(Life Technologies)、mTeSRTM1(StemCell Technologies) 和 HES cellGR0(Millipore)、DMEM 和基于 XVivo™(Lonza) 的培养基等。

[0099] 预期本发明的确定成分培养基可进一步包含微量元素。微量元素可商购,例如从 Mediatech 购买。微量元素的非限制性实例包括但不限于包含以下的盐和化合物:铝、氯、硫酸盐、铁、镉、钴、铬、锗、钠、钾、钙、磷酸盐和镁。含微量元素的盐和化合物的具体实例包括但不限于  $AlCl_3$ 、 $AgNO_3$ 、 $Ba(C_2H_3O_2)_2$ 、 $CdCl_2$ 、 $CdSO_4$ 、 $CoCl_2$ 、 $CrCl_3$ 、 $Cr_2(SO_4)_3$ 、 $CuSO_4$ 、柠檬酸铁、 $GeO_2$ 、KI、KBr、LI、钼酸、 $MnSO_4$ 、 $MnCl_2$ 、NaF、 $Na_2SiO_3$ 、 $NaVO_3$ 、 $NH_4VO_3$ 、 $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 、 $NiSO_4$ 、RbCl、硒、 $Na_2SeO_3$ 、 $H_2SeO_3$ 、亚硒酸二钠、硒代甲硫氨酸、 $SnCl_2$ 、 $ZnSO_4$ 、 $ZrOCl_2$  以及其混合物和盐。如果存在硒、亚硒酸盐或硒代甲硫氨酸,那么其浓度为约 0.002mg/L 至约 0.02mg/L。此外,还可以存在羟磷灰石。

[0100] 预期可以将氨基酸添加到适用于本发明组合物和方法的确定成分培养基中。所述氨基酸的非限制性实例为甘氨酸、L-丙氨酸、L-丙氨酰基-L-谷氨酰胺、L-谷氨酰胺/Glutamax、L-精氨酸盐酸盐、L-天冬酰胺-H<sub>2</sub>O、L-天冬氨酸、L-半胱氨酸盐酸盐-H<sub>2</sub>O、L-胱

氨酸二盐酸盐、L-谷氨酸、L-组氨酸盐酸盐-H<sub>2</sub>O、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸盐酸盐、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟基脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸二钠盐二水合物和L-缬氨酸。在某些实施方案中，氨基酸是L-异亮氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟基脯氨酸、L-缬氨酸和其混合物。

[0101] 还预期确定成分培养基可包含抗坏血酸。当存在时，存在的抗坏血酸的初始浓度通常为约1mg/L至约1000mg/L，或约2mg/L至约500mg/L，或约5mg/L至约100mg/L，或约10mg/L至约100mg/L，或为约50mg/L。

[0102] 此外，本发明的组合物和方法也可包含其它组分，例如血清白蛋白、转铁蛋白、L-谷氨酰胺、脂质、抗生素、β-巯基乙醇、维生素、矿物质、ATP和类似组分。可以存在的维生素的实例包括但不限于维生素A、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>、B<sub>5</sub>、B<sub>6</sub>、B<sub>7</sub>、B<sub>9</sub>、B<sub>12</sub>、C、D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub>、D<sub>4</sub>、D<sub>5</sub>、E、生育三烯酚、K<sub>1</sub>和K<sub>2</sub>。本领域技术人员可以确定适用于指定细胞培养物的矿物质、维生素、ATP、脂质、必需脂肪酸等的最佳浓度。补充物浓度可例如为约0.001 μM至约1mM或更高。所提供补充物的浓度的具体实例包括但不限于约0.005 μM、0.01 μM、0.05 μM、0.1 μM、0.5 μM、1.0 μM、2.0 μM、2.5 μM、3.0 μM、4.0 μM、5.0 μM、10 μM、20 μM、100 μM等。在一个特定实施方案中，组合物和方法包含维生素B<sub>6</sub>和谷氨酰胺。在另一特定实施方案中，组合物和方法包含维生素C和铁补充物。在另一特定实施方案中，组合物和方法包含维生素K<sub>1</sub>和维生素A。在另一特定实施方案中，组合物和方法包含维生素D<sub>3</sub>和ATP。在另一特定实施方案中，组合物和方法包含维生素B<sub>12</sub>和转铁蛋白。在另一特定实施方案中，组合物和方法包含生育三烯酚和β-巯基乙醇。在另一特定实施方案中，组合物和方法包含谷氨酰胺和ATP。在另一特定实施方案中，组合物和方法包含ω-3脂肪酸和谷氨酰胺。在另一特定实施方案中，组合物和方法包含ω-6脂肪酸和维生素B<sub>1</sub>。在另一特定实施方案中，组合物和方法包含α-亚麻酸和B<sub>2</sub>。

[0103] 本发明的某些组合物基本上不含动物血清。如本文所用，“基本上”是指组合物、制剂、方法等根本上或实际上为这样的量或品质，其与允许极少污染物和/或不显著的改变一定的量或品质相同。一般说来，基本上是指至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、至少约99.5%或100%一致。因此，“基本上不含血清”是指本发明溶液中不存在动物血清，如胎儿血清，或者根本上或实际上不存在动物血清。在某些实施方案中，动物血清不是本发明组合物和方法中的必需成分。因此，在基本上不含动物血清的组合物中非人动物血清的存在只应归因于杂质，例如来自原料或来自原代细胞培养物的残留动物血清的杂质。例如，基本上不含动物血清的培养基或环境可含有不到5%、4%、3%、2%、1%或0.5%的动物血清。在本发明特定实施方案中，基本上不含动物血清的组合物不含动物血清或血清替代品，或者只含来自添加到确定成分培养基中的动物血清或血清替代品组分的分离过程的微量动物血清或血清替代品。

[0104] 无血清的确定成分培养基在2007年8月13日提交的标题为“COMPOSITIONS AND METHODS USEFUL FOR CULTURING DIFFERENTIABLE CELLS”美国申请第11/838,054号，以及2008年10月4日提交的标题为“STEM CELL AGGREGATE SUSPENSION COMPOSITIONS AND METHODS OF DIFFERENTIATION THEREOF”的美国申请第12/264,760号中进一步详述，通过引用将其整体并入本文。

[0105] 胰岛素和相关分子

[0106] 在本发明一个实施方案中,所述组合物和方法不含外源胰岛素和胰岛素替代物。短语“外源胰岛素或胰岛素替代物”在本文中用于指有意添加到本发明组合物或方法中的胰岛素或胰岛素替代物。因此,在本发明某些实施方案中,所述方法和组合物不含有意提供的胰岛素或胰岛素替代物。然而,所述组合物或方法未必不含内源胰岛素。如本文所用,“内源胰岛素”是指,当根据本发明方法培养时,培养的细胞自身可相应地产生胰岛素。内源胰岛素也可用于指来自原代细胞培养物的残留杂质或来自原料的杂质。在特定实例中,本发明的组合物和方法含有不到 50  $\mu\text{g/ml}$ 、45  $\mu\text{g/ml}$ 、40  $\mu\text{g/ml}$ 、35  $\mu\text{g/ml}$ 、30  $\mu\text{g/ml}$ 、25  $\mu\text{g/ml}$ 、20  $\mu\text{g/ml}$ 、15  $\mu\text{g/ml}$ 、10  $\mu\text{g/ml}$ 、9  $\mu\text{g/ml}$ 、8  $\mu\text{g/ml}$ 、7  $\mu\text{g/ml}$ 、6  $\mu\text{g/ml}$ 、5  $\mu\text{g/ml}$ 、4  $\mu\text{g/ml}$ 、3  $\mu\text{g/ml}$ 、2  $\mu\text{g/ml}$  或 1  $\mu\text{g/ml}$  胰岛素。

[0107] 如本文所用,术语“胰岛素”是指能结合于标准生理浓度的胰岛素受体并且能通过胰岛素受体诱导信号转导的蛋白质或者其变体或片段。术语“胰岛素”涵盖具有天然人胰岛素或其它哺乳动物胰岛素的多肽序列或这些序列的任何同系物或变体的蛋白质。此外,术语胰岛素涵盖能够结合于胰岛素受体以通过胰岛素受体诱导信号转导的多肽片段(即,功能片段)。术语“胰岛素替代物”是指可用于代替胰岛素得到与胰岛素基本上类似的结果的任何含锌化合物。胰岛素替代物的实例包括但不限于氯化锌、硝酸锌、溴化锌和硫酸锌。

[0108] 为清晰说明,本发明中所涵盖的胰岛素样生长因子不是胰岛素替代物或胰岛素同系物。因此,在另一特定实施方案中,本发明的组合物和方法包含使用至少一种胰岛素样生长因子(IGF)或者其变体或功能片段。在另一实施方案中,本发明的组合物和方法不含或基本上不含任何外源胰岛素样生长因子(IGF)。在特定实施方案中,本发明的组合物和方法含有不到 200ng/ml、150ng/ml、100ng/ml、75ng/ml、50ng/ml、25ng/ml、20ng/ml、15ng/ml、10ng/ml、9ng/ml、8ng/ml、7ng/ml、6ng/ml、5ng/ml、4ng/ml、3ng/ml、2ng/ml 或 1ng/ml IGF-1。

[0109] 如本文所用,术语“IGF-1R 激活剂”是指在调控细胞增殖、分化和细胞凋亡方面起到关键作用的促细胞分裂剂。IGF-1R 激活剂的作用通常是通过 IGF-1R 介导,但其也可通过其它受体介导。IGF-1R 还参与肿瘤病毒蛋白和癌基因产物所诱导的细胞转化,且它们之间的相互作用是通过一组特异性结合蛋白(IGFBP)调控。此外,一大组 IGFBP 蛋白酶水解 IGFBP,使结合的 IGF 释放,随后恢复其与 IGF-1R 相互作用的能力。为达成本发明的目的,配体、受体、结合蛋白和蛋白酶都被视为 IGF-1R 的激活剂。在一个实施方案中,IGF-1R 的激活剂是 IGF-1 或 IGF-2。在另一实施方案中,IGF-1R 的激活剂是 IGF-1 类似物。IGF-1 类似物的非限制性实例包括长型 R3-IGF1 (LongR3-IGF1)、Des(1-3) IGF-1、[Arg<sup>3</sup>] IGF-1、[Ala<sup>31</sup>] IGF-1、Des(2, 3) [Ala<sup>31</sup>] IGF-1、[Leu<sup>24</sup>] IGF-1、Des(2, 3) [Leu<sup>24</sup>] IGF-1、[Leu<sup>60</sup>] IGF-1、[Ala<sup>31</sup>] [Leu<sup>60</sup>] IGF-1、[Leu<sup>24</sup>] [Ala<sup>31</sup>] IGF-1 和其组合。在另一实施方案中,IGF-1 类似物是长型 R3-IGF1,其为人胰岛素生长因子-1 的重组类似物。预期最初提供的长型 R3-IGF1 的浓度为约 1ng/ml 至约 1000ng/ml,更优选为约 5ng/ml 至约 500ng/ml,经常为约 50ng/ml 至约 500ng/ml,更经常为约 100ng/ml 至约 300ng/ml,或最经常为约 100ng/ml 的浓度。

[0110] 生长因子

[0111] 在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ) 或 TGF- $\beta$  家族成员,或者其变体或功能片段,或者是 TGF 受体激活剂的试剂。如本文所用,术语“TGF- $\beta$  家族成员”等是指因与 TGF- $\beta$  家族的已知成员

同源或因功能类似于 TGF- $\beta$  家族的已知成员而常常被本领域技术人员表征为属于 TGF- $\beta$  家族的生长因子。在本发明特定实施方案中,如果存在 TGF- $\beta$  家族成员,那么所述 TGF- $\beta$  家族成员或者其变体或其功能片段将激活 SMAD2 或 SMAD3。在某些实施方案中, TGF- $\beta$  家族成员选自: Nodal、激活素 A、激活素 B、TGF- $\beta$ 、骨形态发生蛋白-2 (BMP2)、GDF-8、GDF-11 和骨形态发生蛋白-4 (BMP4)。在一个实施方案中, TGF- $\beta$  家族成员选自激活素 A、激活素 B、Nodal、GDF-8 和 GDF-11。使用 TGF- $\beta$  家族的生长因子来分化多能细胞描述于 2008 年 6 月 3 日提交的标题为“GROWTH FACTORS FOR PRODUCTION OF DEFINITIVE ENDODERM”的美国申请第 12/132,437 号。

[0112] 在本发明其它实施方案中,本发明的组合物和方法不含 FGF 受体激活剂。如本文所用,术语“FGF 受体激活剂”是指因与 FGF 家族的已知成员同源或因功能类似于 FGF 家族的已知成员而常常被本领域技术人员表征为属于 FGF 家族的生长因子。在某些实施方案中, FGF 受体激活剂是 FGF,例如(但不限于) $\alpha$ -FGF 和 FGF2。在特定实施方案中,所述组合物和方法不含外源 FGF2。短语“外源 FGF2”在本文中用于指成纤维细胞生长因子 2,即,意图添加到本发明的组合物或方法中的基本 FGF。因此,在本发明某些实施方案中,所述方法和组合物不含有意提供的 FGF2。然而,所述组合物或方法未必不含内源 FGF2。如本文所用,“内源 FGF2”是指,当根据本发明方法培养时,培养的细胞自身可相应地产生 FGF2。“内源 FGF2”也可用于指来自原代细胞培养物的残留杂质或来自原料的杂质。在特定实例中,本发明的组合物和方法含有不到 10ng/ml、9ng/ml、8ng/ml、7ng/ml、6ng/ml、5ng/ml、4ng/ml、3ng/ml、2ng/ml 或 1ng/ml FGF2。

[0113] 然而,预期本发明的组合物和方法可包括至少一种 FGF 受体(包括任何 FGF 多肽)激活剂、其功能片段或其变体。预期如果存在 FGF2,那么最初提供的 FGF2 的浓度为约 0.1ng/ml 至约 100ng/ml,通常为约 0.5ng/ml 至约 50ng/ml,更经常为约 1ng/ml 至约 25ng/ml,更经常为约 1ng/ml 至约 12ng/ml,或最经常为约 8ng/ml 的浓度。在另一特定实施方案中,本发明的组合物和方法可包括至少一种不同于 FGF2 的 FGF 受体激活剂。例如,本发明的组合物和方法可包含 FGF-7、FGF-10 或 FGF-22 中至少一种,或者以上的变体或功能片段。在特定实施方案中,存在 FGF-7、FGF-10 和 FGF-22 的至少两者的组合,或以上的变体或功能片段。在另一实施方案中,存在 FGF-7、FGF-10 和 FGF-22 全部三者,或者以上的变体或功能片段。预期如果存在 FGF-7、FGF-10 或 FGF-22 中任一者,或者以上的变体或功能片段,那么最初提供的每一者的浓度为约 0.1ng/ml 至约 100ng/ml,更具体为约 0.5ng/ml 至约 50ng/ml,更具体为约 1ng/ml 至约 25ng/ml,更具体为约 1ng/ml 至约 12ng/ml,或最具体为约 8ng/ml 的浓度。

[0114] 在某些其它实施方案中,本发明的组合物和方法包括血清白蛋白 (serum albumin, SA)。在特定实施方案中,SA 是牛 SA (BSA) 或优选为人 SA (HAS)。在更特定的实施方案中,SA 的浓度以重量体积比 (wt/vol) 计超过约 0.2%,但小于约 10% (wt/vol)。在甚至更特定的实施方案中,SA 的浓度超过约 0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.2%、1.4%、1.6%、1.8%、2.0%、2.2%、2.4%、2.6%、2.8%、3.0%、3.2%、3.4%、3.6%、3.8%、4.0%、4.2%、4.4%、4.6%、4.8%、5.0%、5.2%、5.4%、5.6%、5.8%、6.0%、6.2%、6.4%、6.6%、6.8%、7.0%、7.2%、7.4%、7.6%、7.8%、8.0%、8.2%、8.4%、8.6%、8.8%、9.0%、9.2%、9.4%、9.6% 和 9.8% (wt/vol)。

### [0115] Rho 激酶

[0116] 细胞调节可以通过以下实现：细胞外信号通过膜转导，进而调节细胞内生物化学途径。Rho 激酶是一类酶，如果其被抑制则与人类疾病的治疗相关，所述疾病包括糖尿病、癌症和多种炎性心血管病症和 AIDS。

[0117] 小 GTP 结合蛋白的 Rho 激酶家族包含至少 10 个成员，包括 RhoA-RhoE 和 RhoG、Rac1 和 Rac2、Cdc42 和 TC10。抑制剂经常被称为 ROK 或 ROCK 抑制剂，并且这些名称在本文可交换地使用。RhoA、RhoB 和 RhoC 的效应器结构域具有相同的氨基酸序列并似乎具有类似的细胞内靶标。Rho 激酶作为 Rho 的主要下游介质而操作，并存在两种异构体： $\alpha$  (ROCK2) 和  $\beta$  (ROCK1)。典型的 Rho 激酶家族蛋白在其 N 端结构域具有催化（激酶）结构域、在其中间部分具有卷曲螺旋结构域并在其 C 端结构域具有推定的普列克底物 (pleckstrin) 同源 (PH) 结构域。ROCK 的 Rho 结合结构域位于卷曲螺旋结构域的 C 端部分，并且 Rho 的 GTP 结合形式的结合导致激酶活性的增强。Rho/Rho 激酶介导的途径在有多种激动剂起始的信号转导中起重要作用，所述激动剂包括血管收缩素 II、血清素、凝血酶、内皮缩血管肽 -1、降肾上腺素、源自血小板的生长因子、ATP/ADP 和细胞外核苷酸、以及尾加压素 II。通过其靶效应器 / 底物的调节，Rho 激酶在多种细胞功能中起重要作用，包括平滑肌收缩、肌动蛋白细胞骨架组织、细胞粘附和 / 或迁移、以及基因表达。

[0118] 因此，在本发明的其他实施方案中，促进和 / 或支持细胞存活的试剂被加入到多种细胞培养基中，包括但不限于，例如 Rho 激酶抑制剂 Y-27632、法舒地尔、H-1152P 和 ITS (胰岛素 / 转铁蛋白 / 硒 ;Gibco)。这些细胞存活剂部分地通过促进解离的 hES 细胞或 hES 源性培养物，特别是解离的胰腺内胚层和胰腺组细胞群的重新聚集起作用，所述 hES 源性培养物例如前肠内胚层细胞、胰腺内胚层细胞、胰腺上皮细胞、胰腺内胚层祖细胞群等。hES 或 hES 源性细胞存活增加的实现与细胞是从悬浮的细胞聚集体还是从贴壁培养物产生无关（具有或不具有动物血清，具有或不具有成纤维细胞饲养细胞）。这些细胞群的增加的存活促进和改善纯化（例如使用细胞分选仪）并因此允许改善的细胞回收。使用 Rho 激酶抑制剂例如 Y27632 还可以通过促进解离的单细胞在系列传代过程中或在从低温贮藏恢复的过程中的存活而允许扩增 hES 源性细胞类型。尽管 Rho 激酶抑制剂如 Y27632 已经在 hES 和 hES 源性细胞培养物中测试，Rho 激酶可用于其他细胞类型，例如，通常为上皮类型细胞，包括但不限于，肠、肺、胸腺、肾，以及神经细胞类型如视网膜色素上皮细胞。

### [0119] 细胞培养方法

[0120] 本发明的细胞培养环境和方法包括将细胞接种于贴壁培养中。如本文所用，术语“接种 (plate)”、“接种的 (plated)”和“接种 (plating)”是指使细胞在贴壁培养过程中生长的任何方法。如本文所用，术语“贴壁培养”是指在固体表面（例如培养容器）上培养细胞的细胞培养系统，所述固体表面又可涂有不溶性基底，而所述不溶性基底又可涂有另一基底表面涂层（例如下文所列出的）或使细胞在培养中粘附、增殖和 / 或稳定的任何其它化学或生物材料。细胞可紧密地粘附于固体表面或基底或可以不紧密地粘附于固体表面或基底。

### [0121] 细胞基底、饲养层和条件培养基

[0122] 供贴壁培养的基底可包含聚鸟氨酸、昆布氨酸 (laminin)、聚赖氨酸、纯化的胶原蛋白、明胶、粘连蛋白、肌腱蛋白、玻连蛋白、巢蛋白、硫酸肝素蛋白聚糖、MATRIGEL™、聚乙

醇酸 (poly glycolytic acid, PGA)、聚乳酸 (poly lactic acid, PLA) 和聚乳酸-乙醇酸 (poly lactic-glycolic acid, PLGA) 中任一者或其组合。此外,供贴壁培养的基底可包含铺上饲养层或铺上细胞(如多能人类细胞)或其细胞培养物的基质。如本文所用,术语“细胞外基质”涵盖固体基质,例如(但不限于)上文所述的那些,以及铺上饲养细胞层或细胞(如多能人类细胞)或其细胞培养物的基质、或由裂解的成纤维细胞饲养细胞制成的基质。在一个实施方案中,将细胞接种于涂有 MATRIGEL™ 的平板上。在另一实施方案中,将细胞接种于涂有粘连蛋白的平板上。在另一实施方案中,在生长培养基接触细胞之前,或与生长培养基接触细胞大约同时,或有时在生长培养基接触细胞之后,可将人血清放入培养基中,保持长达 24 小时。参见,例如,2007 年 10 月 19 日提交的标题为“METHODS AND COMPOSITIONS FOR FEEDER-FREE PLURIPOTENT STEM CELL MEDIA CONTAINING HUMAN SERUM”的美国专利公开第 2009-0104696 号,通过引用将其整体并入本文。

[0123] 本发明的组合物和方法涵盖,多能细胞和可分化细胞可以在基本上不含饲养细胞或饲养层的条件中培养。如本文所用,“饲养细胞”或“成纤维细胞饲养细胞”或其等同的表述是在体外生长并与靶细胞或感兴趣的细胞共培养的细胞。如本文所用,“饲养细胞层”可与术语“饲养细胞”、“成纤维细胞饲养细胞”或“成纤维细胞饲养层”或“饲养细胞”或其等同的表述互换使用。如本文所用,术语“基本上不含饲养细胞”是指用于涂布培养容器的组织培养条件特别是多能干细胞(例如 hES 或 iPS 细胞)培养条件(如本文所述的那些条件),其不含任何饲养细胞,或含有最低 (de minimus) 数量的饲养细胞,或从饲养细胞制备的基质或天然的或合成的细胞外基质。在饲养细胞的上下文中,“最低”意指从可在饲养细胞上培养细胞的先前培养条件不经意地或在一些情况下难以避免地带到当前培养条件的饲养细胞的最小数量。

[0124] 在某些方面,本发明的多能干细胞可以培养而无需任何类型的饲养细胞或饲养层(无论是从细胞还是从这些细胞裂解的蛋白产生的),或无需使用诸如涂布人类血清的其它类型的表面涂布。

[0125] 在本发明的一个实施方案中,细胞生长在从饲养细胞获得的条件培养基中,其将细胞稳定在其当前分化状态。在另一实施方案中,本文使用的确定成分培养基是非条件培养基,其不是从饲养细胞获得的培养基。

[0126] 本文在提到细胞或细胞培养物分化状态时使用的术语“稳定”意指,细胞在培养中经过多次传代将继续增殖,且优选在培养中无限期增殖,其中培养物中的大部分细胞(如果不是所有的)都处于相同分化状态。此外,当稳定的细胞分裂时,分裂通常产生相同细胞类型的细胞或产生处于相同分化状态的细胞。如果不改变细胞培养条件,那么稳定的细胞或细胞群一般不会进一步分化或去分化,并且细胞继续传代,且不会过度生长。在一个实施方案中,稳定的细胞能够在稳定状态下无限期增殖,或持续至少 2 代以上。在更特定的实施方案中,细胞稳定超过 3 代、4 代、5 代、6 代、7 代、8 代、9 代、超过 10 代、超过 15 代、超过 20 代、超过 25 代或超过 30 代。在某些实施方案中,细胞稳定连续传代超过约 1 个月、2 个月、3 个月、4 个月、5 个月、6 个月、7 个月、8 个月、9 个月、10 个月或 11 个月。在另一实施方案中,细胞稳定连续传代超过约 1 年。在一个实施方案中,通过在确定成分培养基中进行常规传代,来使多能干细胞在培养中保持多能状态,直到需要其分化为止。如本文所用,术语“增殖”是指在细胞培养物中细胞数量增加。

[0127] 在一个实施方案中,在不存在动物胎儿血清或血清替代品且不存在天然的或合成的饲养细胞层或基质的情况下,使可分化细胞与至少一种本发明的组合物接触,由此使细胞保持未分化状态至少一个月。可通过针对形态学、表面标志物、转录标志物、核型和细胞分化成三种生殖层的能力的细胞特征来测定多能性。这些特征都是本领域技术人员众所周知的。

#### [0128] 悬浮培养

[0129] 如本文所用,术语“拟胚体”、“EB”、或“聚集体”或等同的表述是指在成分不确定的培养基中悬浮培养的分化的细胞类型,或经由并非导向多生殖层组织的方案分化。拟胚体与悬浮状态的多能干细胞聚集体例如根据形态标准而不同。本领域技术人员通常确定在胚胎干细胞培养中何时形成拟胚体。例如,视培养条件而定,具有约 20 个或更多细胞的漂浮物被认为是 EB。例如参见, Schmitt et al. (1991) *Genes Dev.* 5:728-740; Doetschman et al. (1985) *J. Embryol. Exp. Morph.* 87:27-45。此术语也指源自于原始生殖细胞的等同结构,所述原始生殖细胞是从胚胎生殖腺区提取的原始细胞;例如参见, Shambloott, et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13726。原始生殖细胞(本领域内有时又称 EG 细胞或胚胎生殖细胞)当用适当因子处理时将形成多能 ES 细胞,由这些多能 ES 细胞可得到拟胚体;例如参见美国专利第 5,670,372 号;和 Shambloott, et al., 同上文。

[0130] 存在多种制备拟胚体的方法,例如,如 Ng et al. (2008) (*Nature Protocols*, 3:468-776) 所述的旋转拟胚体 (spin embryoid body), 以及如 Bauwens et al. (2008), 同上文,所述通过将单细胞悬浮液接种到微模式化的细胞外基质小岛上得到的 EB。然而,这些方法对于大规模生产(制造)hES 细胞和 hES 源性细胞来说成本过高并且不太有效,因为在其他能够实际上开始扩大生产之前需要过多的步骤。例如, Bauwens 等人的方案需要首先将 hES 细胞接种于低生长因子 MATRIGEL™ (growth factor reduced MATRIGEL™) 上,随后可选择细胞来开始悬浮培养。由于需要专用的微模式化的组织培养板,故这一方法的时间和成本使其变得相当麻烦。此外,对于大规模制造 hES 细胞和 hES 源性细胞来说,恩格 (Ng) 等人所采用的方法也因需要使用离心机来产生较为均匀的 EB 而不具有成本效益。最后,在所有这些方法中,细胞聚集体不是由多能干细胞的单细胞悬浮液制成,如同本文所述的单细胞聚集悬浮液一样。

[0131] 拟胚体也可以通过将未分化的 ES 细胞聚集体暴露于例如 20% 胎牛血清的非定向分化信号来产生。这一非定向方法的结果是众多细胞类型的混合物,预期这种混合物可在体外模拟正常胚胎发育。尽管此方法可在基础研究水平上用于检查胚胎发育,但其不适用于产生细胞疗法的材料的任何大规模制造过程,其中主要考虑细胞产率、群体同一性、群体纯度、批次一致性、安全性、细胞功能和商品成本。此外,不管从拟胚体中纯化指定细胞类型所采用的任何富集策略如何,分化方案都不会提供可产生单一细胞类型的较大的均一群体的定向方法。随后,污染的细胞群总是存在且可以占优势,这将妨碍纯化特定细胞群的任何尝试。

[0132] 先前报导的有关产生和分化多能干细胞聚集体的所有工作在其方法中都具有以下一种或一种以上的组成部分:1) 使用小鼠而非人 ES 细胞;2) 依靠离心来聚集细胞的强制聚集方案而非标准细胞粘附方法;3) 在静态条件下聚集细胞块;4) 非单细胞解离或刮去表面上的细胞以产生聚集体;以及 5) 使用 15% 至 20% 胎牛血清 (FCS) 进行细胞聚集体的

非定向分化,导致形成拟胚体和所有生殖层的细胞类型。据申请人所知,唯一报导的不使用15%至20% FCS 分化拟胚体的研究涉及通过强制聚集形成细胞聚集体,随后立即使用适于中胚层的培养基分化所形成的聚集体的方案 (Ng et al, Blood. (2005)106:1601)。然而,在此项报道中,研究人员在静态聚集体培养10到12天后,将拟胚体转移到非聚集体粘附培养物中,与本申请比较来看,并不相关。

[0133] 相比之下,本文所述的单细胞聚集体通过以下方法制备:1) 将人多能干细胞(如人ES细胞或人IPS细胞)解离成单细胞,随后通过在经优化以改进对聚集体直径和细胞存活率的控制的剪切速率下进行旋转培养,产生聚集体,以及2) 使多能干细胞聚集体直接分化成例如定形内胚层,随后分化成其他内胚层谱系细胞类型。参见美国专利公开第2008/0268534号(2007年2月23日提交,标题为“COMPOSITIONS AND METHODS USEFUL FOR CULTURING DIFFERENTIABLE CELLS”);第2008/0113433号(2007年8月13日提交,标题为“COMPOSITIONS AND METHODS USEFUL FOR CULTURING DIFFERENTIABLE CELLS”);第2010/0112691号(2008年11月4日提交,标题为“STEM CELL AGGREGATE SUSPENSION COMPOSITIONS AND METHODS OF DIFFERENTIATION THEREOF”),通过引用将其全部公开并入本文。这一分化方案以较高效率产生定形内胚层和胰腺谱系群,同时具有极少污染细胞群。此外,这一使多能干细胞聚集和分化的方法不产生拟胚体,与所有其它公开的研究形成直接对比。

[0134] 在一个特定实施方案中,使用本发明的细胞培养基,以悬浮培养方式扩增未分化细胞以及可分化细胞。在另一特定实施方案中,可分化细胞可以保持在悬浮液中并进行扩增,即,这些细胞保持未分化或被阻止进一步分化。在有关细胞培养的上下文中,术语“扩增(expand)”、“扩增的(expanded)”和“扩增(expansion)”与其在本领域内使用时含义相同,意指细胞增殖和细胞数量的增加,优选活细胞数量的增加。在特定实施方案中,通过培养超过约1天,即约24小时,使细胞在悬浮液中扩增。在更特定的实施方案中,通过培养至少1、2、3、4、5、6、7天或更长时间,或培养至少2、3、4、5、6、7、8周或更长时间,使细胞在悬浮液中扩增。

#### [0135] 聚集体悬浮培养

[0136] 本领域内已知多种制备细胞聚集体的方法,例如“悬滴(hanging drop)”法,在这一方法中,在倒转的组织培养基液滴中的细胞下沉到液滴底部,在这里发生聚集;在实验室烧瓶中振荡细胞悬浮液;和这些技术的各种改良方法。例如参见, Timmins et al., (2004)Angiogenesis7:97-103;Dai et al., (1996)Biotechnology and Bioengineering50:349-356;Foty et al., (1996)Development122:1611-1620; Forgacs et al., (2001)J. Biophys. 74:2227-34(1998);Furukawa et al., Cell Transplantation10:441-445;Glicklis et al., (2004)Biotechnology and Bioengineering86:672-680;Carpenedo et al., (2007)Stem Cells25:2224-2234; 和 Korff et al., (2001)FASEB J. 15:447-457,通过引用将其整体并入本文。近来,已经通过以下来形成细胞聚集体:将微模式化的集落刮到悬浮液中;借助离心取出微量滴定板中的集落并加入悬浮液中,或使用吸管移动并悬浮在模式化微孔中生长的集落(Ungrin et al. (2008)PLoS ONE3(2),1-12;Bauwens et al. (2008)Stem Cells,2008年6月26日网络公开)。尽管这些方法都可用来产生本文所述的细胞聚集体,但本文中产生的细胞聚集体进

行同步定向分化优化,如 d'Amour et al., 2006, 同上文中所述的。另外,与这些其它方法不同,本文所述的用于在悬浮液中产生细胞聚集体的方法适用于大规模制造。

[0137] 在有关细胞培养的上下文中使用的术语“悬浮液”与其在本领域内使用时含义相同。也就是说,细胞培养悬浮液是使细胞或细胞聚集体不粘附于表面的细胞培养环境。本领域技术人员应熟知悬浮培养技术,包括但不限于使用这样的设备,例如流净化罩 (flow hood)、恒温箱和 / 或必要时用于使细胞保持匀速运动其它设备 (例如旋转台、振荡器等)。如本文中所使用,如果细胞移动,或者如果相对于细胞,其直接环境移动,那么细胞是“运动”的。如果细胞保持“运动”,那么在一个实施方案中,运动将为经设计以避免或防止细胞暴露于剪切应力的“轻柔运动”或“轻柔搅动”。

[0138] 通常,本发明的细胞培养基组合物应每天更换至少一次,而视培养物的特殊要求和情况以及培养容器的种类 (如闭环生物反应器系统) 而定,可更频繁或不太频繁地更换培养基。在体外,细胞通常是以分批模式生长于培养基中,并且暴露于各种培养基条件。在本发明的一些实施方案中,培养的细胞是以贴壁培养物或悬浮的细胞聚集体形式维持,其与周围的培养基保持接触;且消耗的培养基应定期更换。通常,可约每 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 小时,或每隔其间的时间更换培养基。在其它实例中,可以不太频繁地更换培养基,例如 (但不限于) 每 1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9 天或每 2 天或更长时间,或每隔其间的任何时间范围更换培养基。

[0139] 在本发明另一实施方案中,利用了大规模制造方法,其可以包括采用灌注法来更新培养基以防止生长因子和须频繁更换的其它试剂降解,在大生物反应器中生长、培养和分化细胞。也可以使用灌注法作为经一段时间减少培养基中的废料的方式。例如,美国专利第 5,320,963 号描述一种用于灌注培养悬浮细胞的生物反应器。美国专利第 5,605,822 号描述一种用于通过灌注来使培养中的细胞生长的生物反应器系统,其采用基质细胞来提供生长因子。美国专利第 5,646,043 号描述通过连续定期灌注包括用于生长细胞的培养基组分来使细胞生长。美国专利第 5,155,035 号描述一种通过流体培养基旋转来悬浮培养细胞的生物反应器。通过引用将这些参考文献整体并入本文。

[0140] 通常,在本发明培养基组合物中培养的细胞大约每周进行“分裂”或“传代”,但视悬浮培养物的特殊要求和情形而定,这些细胞可更频繁或不太频繁地分裂。例如,细胞可每 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 天或更长时间,或每隔其间任何时间范围分裂。本文在有关细胞培养的上下文中使用的术语“分裂”或“传代”与其在本领域内使用时含义相同。也就是说,细胞培养物分裂或传代是收集来自前一培养物的细胞,随后将少量收集 (采集) 到的细胞转移 (“接种”) 到新的相同尺寸的细胞培养容器中。本领域技术人员将认识到,“分裂”和“传代”还包括将所有或部分采集的细胞转移至更大的容器,或将它们分进多个培养容器中。通常,细胞传代将使细胞在健康的细胞培养环境中继续生长。本领域技术人员应熟知细胞培养物传代的过程和方法,这些过程和方法可以 (但非必须) 涉及使用酶或非酶方法,来使在生长扩增期间凝集在一起的细胞解聚集。

[0141] 本文所述实施方案提供通过保持低剪切环境,由此保持操纵系统中的细胞密度并使流体剪切应力最小化来大规模制造增殖和 / 或分化的多能干细胞 (如 hES 和 iPS 细胞) 的方法。具体说来,本发明包括通过在 60mm 培养皿、6 孔板、转瓶、生物反应器 (例如大型旋转瓶)、容器、闭环系统 (closed loop system) 等中培养细胞悬浮液而在真核细胞放大制造

系统中保持低剪切环境的方法。或者,用于培养细胞的连续灌注系统需要在生物反应器或容器中进行搅动或移动,以使细胞悬浮、充氧并供应新鲜养分,例如供生长和 / 或分化。为保持细胞悬浮,生物反应容器通常使用一个或多个可移动的机械搅动装置,这些装置也是剪切应力的潜在来源。

[0142] 建立和维持恒定的优化的搅动剪切速率对于维持细胞生长和活力是重要的。例如,增加的剪切速率在以下方面是有害的:(1) 过度的剪切增加能量消耗,(2) 过度的剪切干扰膜表面的扩散,(3) 过度的剪切可以使某些化合物丧失生物活性,和(4) 过度的剪切可以使细胞膜变形超过破裂张力阈值,导致细胞裂解。因此,期望将剪切维持在  $5\text{--}500\text{ s}^{-1}$  的优选范围内,取决于细胞聚集体的直径和特定细胞系对单细胞解离和剪切的敏感性。可用于本发明的方法的由配置产生的示例性的剪切速率示于美国专利申请第 12/264,760 号的实施例 17 中(通过引用将其整体并入本文),对于 6 孔平皿,聚集体直径为  $100\text{--}200\text{ }\mu\text{m}$ ,旋转速度为  $60\text{--}140\text{rpm}$ 。这些值估算在旋转期间大体积流体中发生的时间平均的剪切应力。然而,由于边际效应,预期容器壁上的剪切应力较高。

[0143] 此外,存在用于产生轻柔搅动的细胞悬浮液的工具或装置的其他实例,并且是本领域技术人员公知的,包括产生细胞悬浮液的叶轮,例如螺旋桨或其他机械工具、基于液流或气流的工具、超声波发生器、振荡或旋转平台或其组合。在本发明的方法中,旋转平台是当细胞在 6 孔板中时使细胞在培养基中悬浮的示例性装置,产生小于  $400\text{ s}^{-1}$  的剪切速率。无论产生搅动的混合型流体悬浮液的旋转器类型或机制如何,大体积流体中估测的时间平均剪切速率和剪切应力提供标准化因子,所有流体混合装置可以通过标准化因子相关。尽管装置间的流动方案可以在它们的外形以及层流或湍流的程度上有所变化,剪切计算提供了用于使装置中的流动等同的基础,所述装置通过不同机制产生混合。例如,对于具有  $4\text{cm}$  的叶轮直径、 $6.4\text{cm}$  的容器宽度、 $90^\circ$  的叶轮角度和  $0.1\text{cm}$  的叶轮宽度的  $125\text{mL}$  旋式烧瓶, $135\text{rpm}$  的叶轮旋转速度会在大体积流体中与具有  $5\text{mL}$  培养基的 6 孔平皿产生相同的时间平均的剪切速率和剪切应力,所述 6 孔平皿对于直径为  $100\text{ }\mu\text{m}$  的聚集体以  $100\text{rpm}$  旋转。

[0144] 考虑在与本发明的确定成分培养基接触之前和 / 或之后,可以使用酶促、非酶促或人工解离方法对可分化细胞进行传代。人工传代技术在本领域内已得到充分描述,例如 Schulz et al., (2004), Stem Cells, 22(7):1218–38。尽管机械传代不涉及任何额外物质,但其对于大规模制造多能干细胞或很多多能干细胞来源的细胞无效。例如,在生物反应器或大型烧瓶中,可考虑使用酶,例如使用 GMP- 胶原蛋白酶。酶促解离方法的非限制性实例包括使用蛋白酶,例如胰蛋白酶、胶原蛋白酶、分散酶 (dispase) 和 ACCUTASE™ (Life Technologies, Carlsbad, CA)。在一个实施方案中,使用 ACCUTASE™ 来传代接触的细胞。当使用酶促传代方法时,所得培养物可包含单态细胞、双重态细胞、三重态细胞和细胞块(其尺寸视所用酶而变化)的混合物。非酶促解离方法的非限制性实例是细胞分散缓冲液 (cell dispersal buffer)。传代方法的选择受细胞外基质(如果存在的话)的选择影响,且易于由本领域技术人员确定。

[0145] 本发明方法中使用的解聚措施可以是能够将细胞分解或解聚成单一细胞,同时不会为细胞带来大量毒性的任何解聚措施。解聚措施的实例包括但不限于胰蛋白酶、ACCUTASE™、 $0.25\%$  胰蛋白酶 / EDTA、TrypLE 或 VERSENE™ (EDTA) 和胰蛋白酶。本发明的方

法无需汇合层或悬浮液中的每一细胞都解聚成单一细胞,只要解聚得到至少一些单一细胞并能够进行再培养即可。

[0146] 在培养开始时或在传代后,可以将可分化细胞(包括单一细胞)以任何密度接种于培养室中。接种的细胞的细胞密度可根据多种因素进行调整,这些因素包括但不限于使用贴壁或悬浮培养物、所用细胞培养基的具体配方、所培养细胞的生长条件和预期用途。适用于本发明方法的细胞培养物密度的实例包括但不限于: $0.01 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $0.05 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $0.1 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $0.5 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $1.0 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $1.2 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $1.4 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $1.6 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $1.8 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $2.0 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $3.0 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $4.0 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $5.0 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $6.0 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $7.0 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $8.0 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $9.0 \times 10^5$ 个细胞/mL或 $10.0 \times 10^5$ 个细胞/mL或更高已悬浮培养并具有良好的细胞存活率,或者其间任何值。

[0147] 除上述外,如本文所用,术语“操作细胞密度”或“可操作的细胞密度”或等同的表述是指这样的细胞密度,在该细胞密度下细胞培养方法或制造工艺或系统经操作以产生增殖或分化的hES细胞培养物。所述细胞密度是使供应给系统的例如维生素、矿物质、氨基酸或代谢物的养分以及例如氧张力的环境条件足以保持细胞活力的密度。或者,所述细胞密度是能够以足以保持细胞活力的速率从系统中去除废料的密度。本领域技术人员可容易地确定所述细胞密度。

[0148] 此外,还可以在提供阻抗的实时测量结果的96孔培养装置中培养多能干细胞,这些装置可以使用ACEA Biosciences, Inc. (万维网网站www.aceabio.com)的RT-CES™方法或其他类似的细胞测定研究工具以测量细胞增殖和活力。此类方法能够在无标记的情况下鉴别和定量对可分化细胞的微小或直接影响,并实时测量增殖、细胞凋亡和形态变化。

[0149] 多能干细胞沿内胚层谱系和胰腺内胚层谱系的分化:1期-4期细胞的产生的简述

[0150] 本文提供了产生某些内胚层谱系和胰腺内胚层谱系细胞的方法,并在以下相关申请中讨论,例如2007年7月5日提交的标题为“METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES”的美国专利申请第11/77,944号,其是2007年3月2日提交的标题为“ENDOCRINE PRECURSOR CELLS, PANCREATIC HORMONE-EXPRESSING CELLS AND METHODS OF PRODUCTION”的美国专利申请第11/681,687号的部分连续案,通过引用将其整体并入本文。

[0151] 简而言之,本文所述的多能干细胞(如hES和iPS细胞)的定向分化方法可被分为至少4期或5期。1期是从多能干细胞产生定形内胚层细胞,耗费约2-5天,通常2或3天。多能干细胞首先悬浮在培养基中持续约24小时,所述培养基包含RPMI(没有动物血清或具有极低水平的动物血清,例如0.2%);TGF $\beta$ 超家族成员生长因子,例如激活素A、激活素B、GDF-8或GDF-11(至少100ng/mL);Wnt家族成员或Wnt通路激活剂,例如Wnt3a(至少25ng/mL);和任选地增强生长、存活和增殖以及促进细胞-细胞粘附的Rho激酶或ROCK抑制剂,例如Y-27632(约10 $\mu$ M)。此外,还可以以约1:5000使用少量的ITS(Invitrogen, Carlsbad, CA),同时维持培养基中的低胰岛素和血清含量。还参见,2008年6月3日提交的标题为“GROWTH FACTORS FOR PRODUCTION OF DEFINITIVE ENDODERM”的美国专利申请第12/132,437号,通过引用将其整体并入本文。约24小时后,将培养基更换为包含以下的培养基:具有少量的动物血清,例如0.2%胎牛血清(FBS)的RPMI;TGF $\beta$ 超家族成员生长因子,例如激活素A、激活素B、GDF-8或GDF-11(约100ng/

mL); 任选地 Rho 激酶或 ROCK 抑制剂, 再持续 24 小时 (第 2 天) 至 48 小时 (第 3 天); 以及任选地 1:5000 的 ITS。重要的是, 定形内胚层的产生需要这样的细胞培养条件: 没有动物血清或具有极低浓度的动物血清, 没有胰岛素或胰岛素样生长因子或极低浓度的胰岛素或胰岛素样生长因子, 如少于 0.2  $\mu$ g/mL 胰岛素或胰岛素样生长因子。参见 McLean et al. (2007) *Stem Cells* 25:29-38, 通过引用将其整体并入本文。McLean 等还表明, 在 1 期将 hES 细胞与低至 0.2  $\mu$ g/mL 浓度的胰岛素接触将对定形内胚层的产生有害。本领域技术人员可以修改多能干细胞向定形内胚层的 1 期分化, 基本上如本文所述或 D'Amour et al. (2005) 中所述。参见例如, Agarwal et al. (2008) 26:1117-1127; Ameri et al. (2010) *Stem Cells* 28:45-56; Bingham et al. (2009) *Stem Cells&Development* 18(7):1-10; Borowik et al. (2009) *Cell Stem Cell* 4:348-358; Brolen et al. (2010) *J. Biotechnology* 145(2010) 284-294; Brunner et al. (2009) *Genome Res.* 19:1044-56; Chen et al. (2008) *Nature Chemical Biology* 5(4):258-265; Duan et al. (2010) *Stem Cells*, 28(4):674-86. Hinton et al. (2009) *Stem Cells&Development*, 19(6):797-807; Gibson et al. (2009) *Integr. Biol.* 1, 540-551; Johannesson et al. (2009) *Plos ONE* 4(3):e4794; King, C, "Culture and Preparation of Human Embryonic Stem Cells for Proteomics-Based Applications" Chapter 19 of *Human Embryonic Stem Cell Protocols, Methods in Molecular Biology*, Turksen (ed.) Humana Press; King et al. (2008) *Regenerative Medicine*, 3(2):175-180; Maehr et al. (2009) *Proc Nat'l Aca Sci* 106(37):15768-15773; Synnergren et al. (2009) *Stems Cells&Development* 19(7):961-78; 和 Zhou et al. (2008) *Stem Cells&Development* 17:737-750, 通过引用将它们整体并入本文。定形内胚层细胞的合适的分化、特化、表征和鉴定是必要的, 以便得到其他内胚层谱系细胞。此阶段的定形内胚层细胞共表达 SOX17 和 HNF3 (FOXA2), 并且不明显表达至少 HNF4 $\alpha$ 、HNF6、PDX1、SOX6、PROX1、PTF1A、CPA、cMYC、NKX6.1、NGN3、PAX3、ARX、NKX2.2、INS、GHRL、SST 或 PP。

[0152] 在优选实施方案中, 使用以下所述的一种或多种方法富集、分离和 / 或纯化定形内胚层细胞: 2004 年 12 月 23 日提交的标题为 "DEFINITIVE ENDODERM" 的美国专利申请第 11/021,618 号 (现在的美国专利第 7,510,876 号); 2005 年 11 月 14 日提交的标题为 "MARKERS OF DEFINITIVE ENDODERM" 的美国临时专利申请第 60/736,598 号; 2005 年 12 月 22 日提交的标题为 "EXPANSION OF DEFINITIVE ENDODERM CELLS" 的美国专利申请 11/317,387 号 (现在的美国专利第 7,625,753 号); 2008 年 7 月 21 日提交的标题为 "MARKERS OF DEFINITIVE ENDODERM" 的美国专利申请第 12/093,590 号; 和 2009 年 10 月 20 日提交的标题为 "EXPANSION OF DEFINITIVE ENDODERM CELLS" 的美国专利申请第 12/582,600 号, 通过引用将它们的公开整体并入本文。

[0153] 2 期采用来自 1 期的恰当特化和表征的定形内胚层细胞培养物, 并通过将其悬浮培养物与 RPMI 孵育 24 小时 (第 3 天或第 4 天) 来产生前肠内胚层细胞或具体地为 PDX1-阴性前肠内胚层细胞, 所述 RPMI 具有任选地增加量的非人类动物血清 (例如 0.2%-2%FBS); 1:1000 稀释的 ITS; 25ng/mL KGF (或 FGF7); 任选地用于与增强生长、存活、增殖和促进细胞-细胞粘附的 ROCK 或 Rho 激酶抑制剂; 以及任选地 TGF $\beta$  受体激酶抑制剂例如 SB-431542 或抑制剂 IV。约 24 小时后, 将培养基更换为同样配方的培养基, 但任选地没有 TGF $\beta$  受体激酶抑制剂和 / 或 ROCK 抑制剂, 再持续至少 24 至 48 小时。前肠内胚层细胞恰当

特化的关键步骤是移除 TGF  $\beta$  家族生长因子。因此,在定形内胚层诱导后或 1 期后,可以任选地向 2 期细胞培养物添加 TGF  $\beta$  受体激酶抑制剂,持续约 24 小时,例如 TGF  $\beta$  抑制剂 IV 或 TGF I 型受体 SB431542(激活素受体样激酶 (ALK) 的特异性抑制剂)。在 2 期产生的前肠内胚层细胞或 PDX1- 阴性前肠内胚层细胞共表达 SOX17、HNF1  $\beta$  和 HFN4  $\alpha$ , 并不明显共表达至少 PDX1、HNF6、PDX1、SOX6、PROX1、PTF1A、CPA、cMYC、NKX6. 1、NGN3、PAX3、ARX、NKX2. 2、INS、GSC、GHRL、SST 或 PP, 这些是定形内胚层细胞、PDX1- 阳性前肠内胚层细胞、PDX1- 阳性胰腺内胚层祖细胞或内分泌祖细胞以及单或多激素类型细胞的特征。

[0154] 在另一实施方案中,向定形内胚层细胞培养物或细胞群提供的 FGF 家族生长因子是 FGF10 和 / 或 FGF7。然而,应当意识到代替 FGF10 和 / 或 FGF7 或除了 FGF10 和 / 或 FGF7, 还可以提供其他 FGF 家族生长因子或 FGF 家族生长因子类似物或模拟物。例如,可以提供选自以下的 FGF 家族生长因子: FGF1、FGF2、FGF3 等直到高达并包括 FGF23。

[0155] 在其他实施方案中,刺猬抑制剂是 KAAD- 环杷明。然而,应当意识到可以使用其他刺猬抑制剂。这类抑制剂包括但不限于,KAAD- 环杷明类似物、蒜藜芦碱、蒜藜芦碱类似物、刺猬通路阻断抗体和本领域技术人员已知的刺猬通路功能的任何其他抑制剂。当单独使用或与 FGF 家族生长因子组合使用时,刺猬抑制剂可以以至少约 0.01  $\mu$  M 至约 50  $\mu$  M 的浓度提供。

[0156] 3 期采用来自 2 期的恰当特化的 PDX 阴性前肠内胚层细胞培养物,并通过在 DMEM 或 RPMI 中培养约 24 至 72 小时来产生 PDX1- 阳性前肠内胚层细胞,所述 DMEM 或 RPMI 具有 1% 体积 / 体积的 B27; 25  $\mu$  M KAAD 环杷明; 类视色素,例如约 0.2  $\mu$  M 视黄酸 (RA), 或视黄酸类似物例如约 3nM 的芳维甲酸, 4-[(E)-2-(5, 6, 7, 8- 四氢 -5, 5, 8, 8- 四甲基 -2- 萘基) -1- 丙烯基] 苯甲酸或 TTNPB; 和约 50ng/mL 的 Noggin。同样, ROCK 抑制剂如 Y-27632 可以用于增加生长、存活、增殖和促进细胞 - 细胞粘附。在 3 期产生的 PDX1- 阳性前肠细胞共表达 PDX1 和 HNF6 以及 SOX9 和 PROX1, 并且不明显共表达上文 1 期和 2 期中所述的定形内胚层细胞或 PDX1- 阴性前肠内胚层细胞的特征标志物。2 期和 3 期在 2006 年 10 月 27 日提交的标题为“PDX1-EXPRESSING DORSAL AND VENTRAL FOREGUT ENDODERM”的美国专利申请第 11/588, 693 号中更详细地描述,通过引用将其整体并入本文。

[0157] 4 期采用从 3 期恰当特化的细胞,并将培养基更换为包含 DMEM 的培养基,其具有约 1% 体积 / 体积的 B27 添加物,约 50ng/mL 的 KGF 和 50ng/mL 的 EGF 以及约 50ng/mL 的 Noggin,持续约 24 至 96 小时(约 1-4 天)或更长。同样, ROCK 抑制剂如 Y-27632 可以用于增强生长、存活、增殖和促进细胞 - 细胞粘附。在 4 期产生的 PDX1- 阳性胰腺内胚层祖细胞共表达至少 PDX1 和 Nkx6. 1 以及 PTF1A, 并且不明显表达如上文 1 期、2 期和 3 期所述的定形内胚层或 PDX1- 阴性和 PDX1- 阳性前肠内胚层细胞,或内分泌或内分泌祖细胞的某些其他特征标志物或所有特征标志物。

[0158] 在本发明的另一实施方案中,1-4 期产生由混合的细胞群组成的分化的细胞培养物,例如,4 期分化产生 PDX1- 阳性胰腺内分泌祖细胞(其具有体内发育并成熟为功能性胰岛素分泌细胞的潜力,在功能上与天然人类  $\beta$  细胞生理上相似),但还可以产生其他细胞群。例如,4 期细胞培养物还产生显著的内分泌前体细胞群,或 CHGA- 阳性细胞群。在 4 期分化后这些不同的细胞群描述于 2008 年 6 月 3 日提交的标题为“METHODS FOR PURIFYING ENDODERM AND PANCREATIC ENDODERM CELLS DERIVED FROM HES CELLS”的美国申请第

12/132, 437 号, 通过引用将其整体并入本文。

[0159] 关于一些将多能细胞分化为定形内胚层细胞的方法, 向细胞提供上述生长因子, 使得生长因此足以促进至少一部分多能细胞向定形内胚层细胞分化的浓度存在于培养物中。在一些方法中, 细胞培养物中存在的上述生长因子的浓度为至少 5ng/mL、至少 10ng/mL、至少 25ng/mL、至少 50ng/mL、至少 75ng/mL、至少 100ng/mL、至少 200ng/mL、至少 300ng/mL、至少 400ng/mL、至少 500ng/mL、至少 1000ng/mL、至少 2000ng/mL、至少 3000ng/mL、至少 4000ng/mL、至少 5000ng/mL 或大于 5000ng/mL; 或对于视黄酸 (RA), 如果使用 RA 类似物如 TTNPB, 则向 2 期培养物 (或 PDX1- 阴性前肠内胚层细胞培养物) 提供至少 0.05  $\mu$ M、至少 0.1  $\mu$ M、至少 1.5  $\mu$ M 或至少 2  $\mu$ M 的 RA 或等效浓度。在某些方法中, 为了多能细胞向分化的定形内胚层细胞或内胚层谱系细胞的分化, 在上述生长因子添加之后将它们从细胞培养物中移除。例如, 可以在生长因子添加后约 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 8 天、约 9 天或约 10 天或更多天后将它们移除。在典型方法中, 在生长因子添加后约 1 天、2 天或 3 天将它们移除。

[0160] 在其他实施方案中, 在分化过程开始时 (例如在多能阶段) 提供  $\gamma$  分泌酶抑制剂 (我们上文描述这个了吗?), 并在至胰岛激素表达细胞的整个分化过程中的细胞培养物中保持。在其他实施方案中, 在分化的开始之后但在分化至 PDX1- 阳性前肠内胚层时期之前加入  $\gamma$  分泌酶抑制剂。在优选实施方案中, 与提供促进定形内胚层细胞向 PDX1- 阳性内胚层细胞转化的分化因子在大约相同的时间向细胞培养物或细胞群提供  $\gamma$  分泌酶抑制剂。在其他优选实施方案中, 在细胞培养物或细胞群中大部分细胞已经分化成 PDX1- 阳性前肠内胚层细胞之后向细胞培养物或细胞群提供  $\gamma$  分泌酶抑制剂。

[0161] PDX1- 阳性胰腺内胚层祖细胞的封装

[0162] 从 4 期产生的包含 PDX1- 阳性胰腺内胚层祖细胞的培养物装载在宏观封装装置中并完全包含在其中, 植入患者, 并且 PDX1- 阳性胰腺内胚层祖细胞在体内成熟为生理功能的胰腺激素分泌细胞, 例如胰岛素分泌细胞。PDX1- 阳性胰腺内胚层祖细胞的封装和胰岛素的体内产生在 2009 年 11 月 13 日提交的标题为“ENCAPSULATION OF PANCREATIC LINEAGE CELLS DERIVED FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS”的美国专利申请第 12/618, 659 号中详述, 其要求了 2008 年 11 月 14 日提交的标题为“ENCAPSULATION OF PANCREATIC PROGENITORS DERIVED FROM HES CELLS”的临时专利申请第 61/114, 857 号以及 2008 年 12 月 9 日提交的标题为“ENCAPSULATION OF PANCREATIC ENDODERM CELLS”的美国临时专利申请第 61/121, 084 号的优先权。通过引用将这些申请的公开整体并入本文。

[0163] 本文所述的方法、组合物和装置仅代表优选实施方案, 并且是示例性的, 并不意欲为对本发明的范围的限制。本领域技术人员可以进行其中的改变和其他用途, 这包括在本发明的精神内并且由本发明的范围限定。因此, 本领域技术人员应当了解, 可以对本文公开的发明做出多种替代和修饰而不偏离本发明的范围和精神。

[0164] 例如, 激活素 A (TGF 超家族生长因子或信号转导蛋白的成员) 被用于从多能干细胞 (如 hES 细胞和 iPS 细胞) 产生定形内胚层细胞, 然而, 可以使用其他 TGF 超家族成员 (例如, GDF-8 和 GDF-11) 以产生定形内胚层细胞, 如 2008 年 6 月 3 日提交的标题为“GROWTH FACTORS FOR PRODUCTION OF DEFINITIVE ENDODERM”的 PCT 国际专利公开第 WO2009/154606 号所述, 通过引用将其整体并入本文。

[0165] 视黄酸 (RA) 被用于将 2 期的 PDX1- 阴性前肠内胚层细胞分化成 3 期的 PDX1- 阳性前肠细胞, 然而, 可以使用其他类视色素或视黄酸类似物, 例如 4-[ (E)-2-(5, 6, 7, 8- 四氢 -5, 5, 8, 8- 四甲基 -2- 萘基) -1- 丙烯基 ] 苯甲酸 (TTNPB) 和类似的类似物 (例如, 4-HBTTNPB)。

[0166] 例如, Noggin 是失活 TGF  $\beta$  超家族信号转导蛋白成员 (例如骨形态发生蛋白 -4, BMP4) 的蛋白。然而, 其他 BMP4 抑制剂如 Chordin 和 Twisted Gastrulation (Tsg) 或抗 BMP 中和抗体可以防止 BMP 结合至其细胞表面受体, 从而有效地抑制 BMP 信号转导。例如, 还可以使用小分子如又称为化合物 C 的 dorsomorphin (6-[4-(2- 哌啶基 -1 基 - 乙氧基) 苯基]-3 吡啶基 -4- 基 - 吡唑并 [1, 5-a] 嘧啶) 及其衍生物以失活或抑制 BMP。或者, Noggin 的替代物可以来自于人 Noggin 的基因, 该基因已被克隆并测序。参见美国专利第 6, 075, 007 号, 通过引用将其并入本文。Noggin 序列的分析显示与 Kunitz 型蛋白酶抑制剂具有同源性的羧基末端区域, 指示其他 Kunitz 型蛋白酶抑制剂可能具有类似的抑制 BMP 的效果。此外, 本文和美国专利申请第 12/618, 659 号 (通过引用将其整体并入本文) 所述的宏观封装装置仅是示例性的, 并不意欲限制本发明的范围。具体地, 对装置设计的改变均包括在本发明的精神之内, 例如装置的大小, 装置内多个腔室或亚区室, 多个出口, 或甚至装载和抽出装置的机制。因此, 本领域技术人员将了解, 可以对本文公开的发明做出不仅是对本文公开的分化方法的多种替换和修饰, 还是对封装装置的多种替换和修饰, 而不偏离本发明的范围和精神。

[0167] 监测多能细胞或分化的细胞的产生

[0168] 可以利用细胞分化培养基或环境以部分地、终末地或可逆地分化本发明的可分化细胞。根据本发明, 细胞分化培养基或环境可包含多种组分, 包括例如, KODMEM 培养基 (Knockout Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、DMEM、Ham's F12 培养基、FBS (胎牛血清)、FGF2 (成纤维细胞生长因子 2)、KSR 或 hLIF (人白血病抑制因子)。细胞分化培养基或环境还可包含补充物, 例如 L- 谷氨酰胺、NEAA (非必需氨基酸)、P/S (青霉素 / 链霉素)、N2、B27 和  $\beta$ - 巯基乙醇 ( $\beta$ -ME)。涵盖可以向细胞分化培养基或环境中添加的其他因子, 包括但不限于, 纤连蛋白, 层粘连蛋白, 肝素, 硫酸乙酰肝素, 视黄酸, 表皮生长因子家族的成员 (EGF), 成纤维细胞生长因子家族成员 (FGF) 包括 FGF2, FGF7, FGF8, 和 / 或 FGF10, 血小板源性生长因子家族成员 (PDGF), 转化生长因子 (TGF) / 骨形态发生蛋白 (BMP) / 生长和分化因子 (GDF) 因子家族拮抗剂包括但不限于 Noggin, 卵泡抑素, 髓蛋白, gremLin, cerberus/DAN 家族蛋白, ventropin, 高剂量激活素, 以及无羊膜蛋白或其变体或功能片段。TGF/BMP/GDF 拮抗剂还可以 TGF/BMP/GDF 受体 -Fc 嵌合体的形式添加。可以添加的其他因子包括可以通过 Notch 受体家族激活或失活信号转导的分子, 包括但不限于  $\Delta$  样蛋白和 Jagged 家族蛋白, 以及 Notch 加工或切割的抑制剂, 以及以上的变体或功能片段。其他生长因子可以包括胰岛素样生长因子家族的成员 (IGF)、胰岛素、无翅基因相关 (WNT) 因子家族和刺猬因子家族, 或以上的变体或功能片段。可以添加其他因子以促进中内胚层干细胞 / 祖细胞, 内胚层干细胞 / 祖细胞, 中胚层干细胞 / 祖细胞, 或定形内胚层干细胞 / 祖细胞的增殖和存活, 以及这些祖细胞的衍生物的存活和分化。

[0169] 本文所述的组合物有用于筛选测试化合物, 以确定测试化合物是否调节可分化细胞的多能性、增殖和 / 或分化。本领域技术人员可以容易地确定可分化细胞的多能性、增殖

和 / 或分化。非限制性方法包括检查细胞形态,多种标志物的表达,畸胎瘤形成,细胞计数和阻抗测量结果。

[0170] 可通过测量并定量某些基因标志物的表达水平,例如在添加例如 TGF- $\beta$  信号转导剂的外源试剂之前和之后不同时间点检测特定基因标志物的存在或不存在,来监测多能细胞向专能细胞向更专能的细胞或分化细胞的进展。或者,可以通过测量细胞培养物或细胞群的细胞中存在的标志物的含量,来确定某些标志物的表达。例如,在某些方法中,确定多能细胞特有标志物的表达以及专能细胞或分化细胞特有标志物显著表达的缺乏。

[0171] 在另一实施方案中,监测定形内胚层谱系的其它较少分化的细胞类型的产生的定性或半定量技术,例如转印 (blot transfer) 法和免疫细胞化学 (ICC) 或免疫组织化学 (IHC),可以用来测量标志物表达。或者,可通过例如 Q-PCR 的技术精确定量标志物表达。此外,应理解,在多肽水平上,胰岛激素表达细胞的许多标志物是分泌蛋白。因此,可以利用测量细胞外标志物含量的技术,例如 ELISA。这种和其他检测和筛选方法在 2005 年 6 月 23 日提交的标题为“METHODS FOR IDENTIFYING FACTORS FOR DEFINITIVE ENDODERM”的美国申请第 11/165,305 号(现在的美国专利第 7,541,185 号)中详述,通过引用将其整体并入本文。

[0172] 本文所述多能细胞的发育进程(例如,由 D'Amour 等人 2006(同上文)所述的 1-4 期或步骤或 1-5 步骤产生的细胞)可通过确定每一多能细胞来源的细胞类型沿发育路径特有的标志物的表达来进行监测。例如,在一些方法中,多能细胞来源的细胞类型的鉴别和表征是依据某一标志物的表达或一种以上标志物的不同表达水平和模式进行。也就是说,一种或一种以上标志物的存在或不存在、高或低表达水平将代表并确定细胞类型。另外,某些标志物可瞬时表达,因此标志物在一个发育阶段期间是高表达的,而在另一发育阶段中是低表达的。某些标志物的表达可以通过测量细胞培养物或细胞群的细胞中存在的标志物的水平并与标准化或正规化对照标志物比较来确定。在这些方法中,标志物表达测量可以是定性或定量的。定量标志物基因所产生的标志物的表达的一种方法是使用定量 PCR(Q-PCR)。本领域内众所周知进行 Q-PCR 的方法。

[0173] 在其它实施方案中,Q-PCR 可以与免疫组织化学技术或流式细胞术结合使用,以有效并准确地表征和鉴别细胞类型,并测定相关细胞类型中这些标志物的量和相对比例。在一个实施方案中,Q-PCR 可定量含有混合细胞群的细胞培养物中 RNA 的表达水平。然而,Q-PCR 无法提供或证明相关标志物或蛋白质是否在同一细胞上共表达。在另一实施方案中,Q-PCR 与流式细胞术的方法结合使用以表征和鉴别细胞类型。因此,通过使用本文所述方法与例如上文所述方法的组合,可以实现并证明包括内胚层谱系类型的细胞在内的各种细胞类型的完全表征和鉴别。

[0174] 已被证明,通过 Q-PCR 测量特定基因的表达可以用于精确估算混合细胞群中差异表达该特定基因的细胞的相对量。因此,使用基于 Q-PCR 的基因表达测量结果,可以在多种细胞培养条件下确定某些混合细胞群中多能细胞、分化的专能细胞、分化的单能细胞和 / 或终末分化的细胞的量。例如,将多能细胞和分化的细胞如 1 期(定形内胚层)细胞群以已知比例混合在一起,并测定定形内胚层细胞标志物的基因表达。从总共 10,000 个细胞中分离总 RNA 并每种条件(样品)进行三次重复。然后将三分之一(1/3)的分离的 RNA 用于合成 cDNA,并将四十分之一(1/40<sup>th</sup>)的 cDNA 反应用于每个 Q-PCR 扩增中。因此,每个 PCR

数据点来自约  $1/120^{\text{th}}$  的原始 10,000 个细胞的输入（或相当于总共约 83 个细胞的 RNA）。使用本领域内已建立的方法进行 Q-PCR。参见 D'Amour et al. (2006), 同上。

[0175] 图 1A 提供了从 SOX17 标志物获得的 Q-PCR 基因表达数据的图表示意图, SOX17 在 1 期细胞（定形内胚层细胞, DE）中表达, 但在多能细胞（如 hESC）中表达。图 1A 的第一个柱（最左边）显示通过 Q-PCR 从 100%hESC 产生的信号, 而最右边的柱显示通过 PCR 从 100%DE 细胞产生的信号。100%hESC 和 100%DE 细胞之间的柱显示通过 Q-PCR 从已知稀释混合物（或比例）的 hESC :DE 细胞产生的信号。例如, 柱 2 显示通过 Q-PCR 从 hESC :DE 细胞为 99:1 的混合物产生的信号, 柱 3 显示通过 Q-PCR 从 hESC :DE 细胞为 95:5 的混合物产生的信号, 柱 4 显示通过 Q-PCR 从 hESC :DE 细胞为 90:10 的混合物产生的信号, 如此直到倒数第二个柱, 其显示通过 Q-PCR 从 hESC :DE 细胞为 1:99 的混合物产生的信号。

[0176] 图 1A 中示出的数据证明随着混合群体中人定形内胚层细胞的数量增加, 定形内胚层细胞特异基因的基因表达水平也增加。此外, 当定形内胚层细胞仅构成细胞群的 1% 时, 例如图 A 的柱 2 具有 99:1 的 hESC :DE 比例, 这种 Q-PCR 测定在检测定形内胚层细胞标志物基因的表达时是高度灵敏的。这表明, 这种 Q-PCR 方法甚至能够检测出混合细胞培养物中相当于单个的定形内胚层细胞。此外, Q-PCR 信号反应在大多数细胞浓度范围（1% 至 90% 定形内胚层细胞）内合理地线性。

[0177] 还在样品大小为 50,000 个细胞 / 样品时观察人定形内胚层细胞的量与定形内胚层标志物的表达之间的关系。此外, 分析定形内胚层细胞中存在的其他基因标志物, 结果与从 SOX17 观察到的结果一致。

[0178] 在另一实施方案中, 通过测定多能干细胞标志物基因的相对基因表达值, 可以测量混合细胞群体中存在的多能细胞的相对量。例如, 将未分化的 hESC 以已知比例与人胚胎成纤维细胞 (HEF) 混合, 即 100:0HEF:hESC; 99:1HEF:hESC; 90:10HEF:hESC; 50:50HEF:hESC; 和 0:100HEF:hESC。将包含所述未群集的细胞混合物的每个样品接种在旋转培养中, 以形成基本上如本文所述的悬浮聚集培养物。在培养的第 48 小时取 Q-PCR 样品, 并分析多能标志物基因的表达, 包括表 1 中列出的那些, 例如 OCT4。与上文图 1A 中所述结果类似, 多能细胞标志物基因 OCT4 的相对表达与置于培养中的多能细胞的百分比（比例）成正比。参见图 1B。因此, 本文所述的通过测定特定细胞类型的基因标志物表达的水平而确定相对细胞丰度的方法不依赖于任何特定细胞类型, 相反该方法对于以下细胞是同样可再现的: 多能细胞（如 hESC）和多能细胞来源的细胞, 例如 1 期（定形内胚层细胞或 SOX 和 HNF3 定形内胚层细胞）、2 期（前肠细胞或 PDX1- 阴性前肠内胚层细胞或 SOX17、HNF3 和 HNF4a 前肠内胚层细胞）、3 期（背侧前肠内胚层细胞或 PDX1- 阳性前肠内胚层细胞）、4 期（胰腺祖细胞, 或胰腺内胚层细胞或上皮细胞, 或 PDX1/NKX6.1 共阳性胰腺内胚层细胞）和 5 期（内分泌细胞或内分泌前体细胞, 或 NGN3/NKX2.2 共阳性内分泌前体细胞, 或胰岛素阳性内分泌细胞）。类似地, 可以分析其他多能细胞标志物基因, 例如表 1 中所述的那些, 特别是 SOX2。

[0179] 表 1: 多能细胞标志物

[0180]

标志物名称	小鼠 EC/ES/EG 细胞	猴子 ES 细胞	人多能 ES/iPS 细胞	人 EG 细胞
SSEA-1	+	-	-	-
SSEA-3	-	+	+	+
SSEA-4	-	+	+	+
TRA-1-60	-	+	+	+
TRA-1-81	-	+	+	+
碱性磷酸酶	+	+	+	+
Oct4 (POU5F1)	+	+	+	未知
Nanog	+	+	+	+
SOX2	+	+	+	+
体内畸胎瘤形成	+	+	+	-

#### 关键词

ES 细胞 = 胚胎干细胞  
EG 细胞 = 胚胎生殖细胞  
EC 细胞 = 胚胎癌细胞

TRA = 肿瘤拒绝抗原 1  
SSEA = 时期特异性胚胎抗原  
SOX2 = SRY (性别决定区 Y) 框 2

[0181] 可以使用流式细胞术确认 Q-PCR 结果。人 ESC 分化至 5 期（胰腺内分泌细胞）。参见 D'Amour et al. (2006), 同上。通过流式细胞术使用针对胰岛素的抗体确定已经分化成胰腺内分泌细胞的细胞群的比例。获得约 1%、10% 或 20% 的表达胰岛素的内分泌细胞群。从这三种群体获取信使 RNA 样品并进行 Q-PCR。图 1C 中示出的结果证明相对胰岛素基因表达确实与群体中表达该标志物基因的细胞的数量成正比。这种方法高度可再现, 并进一步证明了标志物基因表达的量与细胞群中表达该标志物基因的细胞比例之间的相关性。此外, 分析其他胰腺内分泌细胞基因标志物, 结果与从胰岛素观察到的结果一致。

[0182] 另外, 也可以使用本领域内已知的其它方法来定量标志物基因的表达。例如, 可通过使用感兴趣的标志物基因产物特异性抗体来检测该标志物基因产物的表达 (例如, 通过 Western 印迹、流式细胞术分析、ELISA、免疫组织化学、免疫荧光等)。在某些方法中, 可以确定多能细胞来源的细胞特有的标志物基因的表达以及多能细胞来源的细胞特有的标志物基因的显著表达的缺乏。用于表征和鉴别多能细胞来源的细胞类型的其它方法描述于上述相关申请中, 这些申请以全文引用的方式并入本文中。

[0183] 适用于扩增分析法中的扩增探针 / 引物组合包括下述: 胰岛素 (INS) (GenBank NM\_000207): 引物 AAGAGGCCATCAAGCAGATCA (SEQ ID NO:1); CAGGAGGCGCATCCACA (SEQ ID NO:2); Nkx6.1 (NM\_006168): 引物 CTGGCCTGTACCCCTCATCA (SEQ ID NO:3); CTTCCCGTCTTTGTCCAACAA (SEQ ID NO:4); Pdx1 (NM\_000209): 引物 AAGTCTACCAAAGCTCACGCG (SEQ ID NO:5); GTAGGCGCCGCTGC (SEQ ID NO:6); Ngn3 (NM\_020999): 引物 GTCATCGCTCTCTATTCTTTTGC (SEQ ID NO:7); GGTTGAGGCGTCATCCTTTCT (SEQ ID NO:8); FOXA2 (HNF3B) (NM\_021784): 引物 GGGAGCGGTGAAGATGGA (SEQ ID NO:9); TCATGTTGCTCACGGAGGAGTA (SEQ ID NO:10);

胰高血糖素 (Glucagon, GCG) (NM\_002054) : 引物 AAGCATTTACTTTGTGGCTGGATT (SEQ ID NO :11) ;TGATCTGGATTTCTCCTCTGTGTCT (SEQ ID NO :12) ;HNF6 (NM\_030712) : 引物 CGCTCCGCTTAGCAGCAT (SEQ ID NO :13) ;GTGTTGCCTCTATCCTTCCCAT (SEQ ID NO :14) ;HNF4  $\alpha$  (NM\_000457) : 引物 GAAGAAGGAAGCCGTCCAGA (SEQ ID NO :15) ;GACCTTCGAGTGCTGATCCG (SEQ ID NO :16) ;Sox17 (NM\_022454) : 引物 GGCGCAGCAGAATCCAGA (SEQ ID NO :17) ;CCACGACTTGCCAGCAT (SEQ ID NO :18) ;HLxB9 (NM\_005515) : 引物 CACCGCGGGCATGATC (SEQ ID NO :19) ;ACTTCCCAGGAGGTTCTGA (SEQ ID NO :20) ;Nkx2.2 (NM\_002509) : 引物 GGCCTTCAGTACTCCCTGCA (SEQ ID NO :21) ;GGGACTTGAGCTTGAGTCCT (SEQ ID NO :22) ;PTF1a (NM\_178161) : 引物 GAAGGTCATCATCTGCCATCG (SEQ ID NO :23) ;GGCCATAATCAGGGTCGCT (SEQ ID NO :24) ;SST (NM\_001048) : 引物 CCCAGACTCCGTCAGTTTC (SEQ ID NO :25) ;TCCGTCTGGTTGGGTTCTAG (SEQ ID NO :26) ;PAX6 (NM\_000280) : 引物 CCAGAAAGGATGCCTCATAAAGG (SEQ ID NO :27) ;TCTGCGCGCCCTAGTTA (SEQ ID NO :28) ;Oct4 引物 :TGGGCTCGAGAAGGATGTG (SEQ ID NO :29) ;GCATAGTCGCTGCTTGATCG (SEQ ID NO :30) ;MIXL1 引物 CCGAGTCCAGGATCCAGGTA (SEQ ID NO :31) ;CTCTGACGCCGAGACTTGG (SEQ ID NO :32) ;GATA4 引物 CCTCTTGCAATGCGGAAAG (SEQ ID NO :33) ;CGGGAGGAAGGCTCTCACT (SEQ ID NO :34) ;GSC 引物 GAGGAGAAAGTGGAGTCTGGTT (SEQ ID NO :35) ;CTCTGATGAGGACCGCTTCTG (SEQ ID NO :36) ;CER 引物 ACAGTGCCCTTCAGCCAGACT (SEQ ID NO :37) ;ACA ACTACTTTTTTTCACAGCCTTCGT (SEQ ID NO :38) ;AFP 引物 GAGAAACCCACTGGAGATGAACA (SEQ ID NO :39) ;CTCATGGCAAAGTCTTCCAGAA (SEQ ID NO :40) ;SOX1 引物 ATGCACCGCTACGACATGG (SEQ ID NO :41) ;CTCATGTAGCCCTGCGAGTTG (SEQ ID NO :42) ;ZIC1 引物 CTGGCTGTGGCAAGGTCTTC (SEQ ID NO :43) ;CAGCCCTCAA ACTCGCACTT (SEQ ID NO :44) ;NFM 引物 ATCGAGGAGCGCCACAAC (SEQ ID NO :45) ;TGCTGGATGGTGTCTGGT (SEQ ID NO :46) 。其它引物可通过 ABI Taqman 得到,包括 FGF17 (Hs00182599\_m1)、VWF (Hs00169795\_m1)、CMKOR1 (Hs00604567\_m1)、CRIP1 (Hs00832816\_g1)、FOXQ1 (Hs00536425\_s1)、CALCR (Hs00156229\_m1) 和 CHGA (Hs00154441\_m1) 。

#### [0184] 监测多能细胞

[0185] 除了监测和确定混合细胞群中表达上述特定基因的多能细胞或多能细胞来源的细胞的相对量的估测的方法,监测和确定至少多能细胞的水平的另一方法是将图 2 所述的分化的细胞培养物重新接种在多能细胞培养条件下。这可以用贴壁细胞培养物或悬浮聚集培养物进行,如 2008 年 11 月 4 日提交的标题为“STEM CELL AGGREGATE SUSPENSION COMPOSITIONS AND METHODS OF DIFFERENTIATION THEREOF”的美国专利申请第 12/264,760 号中所述的,通过引用将其整体并入本文。多能细胞培养条件是促进多能细胞生长和增殖的那些条件,包括在饲养层上或在源自裂解的成纤维细胞饲养细胞的细胞外基质上在无饲养细胞条件下生长,或在合成的表面基质 (Corning) 上生长,或在无饲养细胞的多能细胞培养基中生长,如 2008 年 10 月 20 日提交的标题为“METHODS AND COMPOSITIONS FOR FEEDER-FREE PLURIPOTENT STEM CELL MEDIA CONTAINING HUMAN SERUM”的相关美国专利申请第 11/875,057 号所述,通过引用将其整体并入本文。该方法放大任何培养物中小数量的多能细胞,因为当转移或重新接种并在多能细胞培养条件下培养时,即使小数量的多能细胞也将快速扩增并获得与其他多能细胞在多能培养条件下类似的加倍次数 (例如, hESC

过夜或在约 18-24 小时加倍)。用 Ki67 阳性染色已经确认来自重新接种的培养物的细胞正在增殖。

[0186] 采用多能悬浮聚集培养物的筛选方法

[0187] 在一些实施方案中,采用筛选方法获得包含多能细胞、专能细胞和 / 或分化细胞的某些细胞群。随后向细胞群提供候选分化因子。在第一时间点,即在提供候选分化因子之前或与其大致相同时间,测定标志物的表达。或者,可在提供候选分化因子之后测定标志物的表达。在第二时间点,即在第一时间点之后且在向细胞群提供候选分化因子的步骤之后,再次测定同一标志物的表达。通过将第一时间点时标志物的表达与第二时间点时标志物的表达相比较,来确定候选分化因子是否能够促进胰腺前体细胞的分化。如果与第一时间点时标志物的表达相比较,第二时间点时标志物的表达有所增加或有所降低,那么候选分化因子能够促进胰腺祖细胞的分化。

[0188] 在本文所述筛选方法的实施方案中,使细胞群与候选(测试)分化因子或细胞毒性因子或抑制因子接触,或以其它方式向细胞群提供候选(测试)分化因子或细胞毒性因子或抑制因子。候选分化因子或细胞毒性因子或抑制因子可包含有可能促进上述任何细胞分化或阻止多能干细胞生长或降低多能干细胞增殖或杀死多能干细胞的任何分子。在替代实施方案中,候选分化因子或细胞毒性因子或抑制因子包含已知不会促进细胞分化的分子。在优选实施方案中,候选分化因子或细胞毒性因子或抑制因子包含已知不会促进人胰腺祖细胞分化的分子。

[0189] 在本文所述筛选方法的一些实施方案中,候选分化因子或细胞毒性因子或抑制因子包含小分子。“小分子”在本文中与其在本领域内使用时含义相同,意指低分子量有机化合物,根据定义,其不为聚合物。小分子可以是天然存在(例如内源神经递质)的,或者可通过本领域内已知的合成有机化学方法制备。在某些实施方案中,小分子是分子质量为约 800 道尔顿(dalton)或更小的分子。

[0190] 在本文所述其它实施方案中,候选分化因子或细胞毒性剂或抑制剂包含大分子,例如多肽。多肽可以是任何多肽,包括但不限于糖蛋白、脂蛋白、细胞外基质蛋白、细胞因子、趋化因子、肽激素、白细胞介素或生长因子。优选多肽包括生长因子。

[0191] 在本文所述筛选方法的一些实施方案中,向细胞群提供一种或一种以上浓度的候选分化因子或候选细胞毒性剂或抑制剂。在一些实施方案中,向细胞群提供候选分化因子或候选细胞毒性剂或抑制剂,以致细胞周围培养基中候选分化因子的浓度在约 0.1ng/ml 至约 10mg/ml 范围内。在一些实施方案中,细胞周围培养基中候选分化因子或候选细胞毒性剂或抑制剂的浓度在约 1ng/ml 至约 1mg/ml 范围内。在其它实施方案中,细胞周围培养基中候选分化因子或候选细胞毒性剂或抑制剂的浓度在约 10ng/ml 至约 100  $\mu$ g/ml 范围内。在其它实施方案中,细胞周围培养基中候选分化因子或候选细胞毒性剂或抑制剂的浓度在约 100ng/ml 至约 10  $\mu$ g/ml 范围内。在优选实施方案中,细胞周围培养基中候选分化因子或候选细胞毒性剂或抑制剂的浓度为约 5ng/ml 至 1000  $\mu$ g/ml。

[0192] 在一些实施方案中,本文所述筛选方法的步骤包括在第一时间点和第二时间点测定至少一种标志物的表达。在一些所述实施方案中,第一时间点可以在向细胞群提供候选分化因子或候选细胞毒性剂或抑制剂之前或与其大致相同时间。或者,在一些实施方案中,第一时间点是在向细胞群提供候选分化因子或候选细胞毒性剂或抑制剂之后。在一些实施

方案中,在第一时间点测定多种标志物的表达。

[0193] 上述方法同样适用于筛选对多能干细胞生长、扩增和 / 或增殖有细胞毒性或抑制性,或对于候选分化因子的情况下提高活力、使分化状态稳定、增强生长和维持 hES 细胞多能性的小分子和其它化合物。使本文所述的教导适应所述筛选方法在本领域技术人员的技术范围内。

[0194] 除在第一时间点测定至少一种标志物的表达外,本文所述筛选方法的一些实施方案还涵盖在第二时间点测定至少一种标志物的表达,所述第二时间点是在第一时间点之后且在向细胞群提供候选分化因子或候选细胞毒性剂或抑制剂之后。在所述实施方案中,在第一时间点和第二时间点测定同一标志物的表达。在一些实施方案中,在第一时间点和第二时间点都测定多种标志物的表达。在这些实施方案中,在第一时间点和第二时间点都测定相同的多种标志物的表达。在一些实施方案中,在多个时间点测定标志物的表达,每一时间点都在第一时间点之后,且每一时间点都在向细胞群提供候选分化因子或候选细胞毒性剂或抑制剂之后。在某些实施方案中,借助 Q-PCR 测定标志物表达。在其它实施方案中,借助免疫细胞化学方法测定标志物表达。

[0195] 在本文所述筛选方法的一些实施方案中,使向细胞群提供候选分化因子或候选细胞毒性剂或抑制剂与在第二时间点测定标志物表达之间经历足够时间。在向细胞群提供候选分化因子或候选细胞毒性剂或抑制剂与在第二时间点测定标志物表达之间的足够时间可短至约 1 小时至长达约 10 天。在一些实施方案中,在向细胞群提供候选分化因子或候选细胞毒性剂或抑制剂之后多次测定至少一种标志物的表达。在一些实施方案中,足够时间是至少约 1 小时、至少约 6 小时、至少约 12 小时至数天到数周。

[0196] 在本文所述方法的一些实施方案中,进一步确定在第二时间点时标志物的表达相比在第一时间点时此标志物的表达是有所增加还是有所降低。至少一种标志物的表达增加或降低表明,候选分化因子或候选细胞毒性剂或抑制剂能够促进细胞分化或阻断或抑制细胞。类似地,如果测定多种标志物的表达,就进一步确定在第二时间点时多种标志物的表达相比在第一时间点时所述多种标志物的表达是有所增加还是有所降低。标志物表达增加或降低可通过测量或以其它方式评价在第一时间点和第二时间点时细胞群中标志物的量、水平或活性来确定。所述确定可相对于其它标志物(例如看家基因表达)或是绝对的。在第二时间点时标志物的表达相比第一时间点时有所增加的某些实施方案中,增加量是至少约 2 倍、至少约 5 倍、至少约 10 倍、至少约 20 倍、至少约 30 倍、至少约 40 倍、至少约 50 倍、至少约 60 倍、至少约 70 倍、至少约 80 倍、至少约 90 倍、至少约 100 倍,或至少约 100 倍以上。在一些实施方案中,增加量小于 2 倍。在第二时间点时标志物的表达相比第一时间点时有所降低的实施方案中,降低量是至少约 2 倍、至少约 5 倍、至少约 10 倍、至少约 20 倍、至少约 30 倍、至少约 40 倍、至少约 50 倍、至少约 60 倍、至少约 70 倍、至少约 80 倍、至少约 90 倍、至少约 100 倍,或至少约 100 倍以上。在一些实施方案中,降低量小于 2 倍。

[0197] 在本申请全文中参考多种出版物。通过引用将所有这些出版物的公开内容和这些出版物内引用的参考文献整体并入本申请中,以便更完整地描述本发明相关的现有技术状态。

## 实施例

[0198] 以下实施例中采用的简易确定成分培养基 (DC) 称为 DC-HAIF, 其基本上由以下组成: DMEM/F12; 2mM Glutamax; 1× 非必需氨基酸; 0.5U/mL 青霉素; 0.5U/mL 链霉素; 10 μg/mL 转铁蛋白 (均来自 Invitrogen, Carlsbad, California, USA); 0.1mM β-巯基乙醇 (Sigma); 0.2% 不含脂肪酸的 Cohn's 组分 V BSA (Serologicals); 1× 微量元素混合物 A, B 和 C (Cellgro); 50 μg/mL 抗坏血酸 (Sigma); 10ng/mL HRG-β (H); 10ng/mL 激活素 A (A); 200ng/mL LR-IGF1 (I) 和 8ng/mL FGF2 (F)。DC-HAIF 支持多能 hES 细胞的长期保持, 以及使用 Accutase™ 进行的 hES 细胞的单细胞传代和按比例扩增。参见 Wang, L. et al. (2007) Blood, 110 (12): 4111-4119。分批测试的 DC-HAIF 的商用配制物是从 Invitrogen 获得, 商标名为 StemPro® hESC SFM。

[0199] 在整个背景研究中, 很明显 FGF2 不是确定成分培养基所需的组分。甚至在高浓度生长因子刺激后, 也只观察到 FGF 受体的较弱或中度磷酸化, 并且能够从确定成分培养基中省略 FGF2, 而不会对培养物的增殖、自发分化或多能性保持造成任何可测量的影响。参见 Wang, L. et al. 2007, 同上文。因此, 下文的某些研究是在不添加 FGF2 的情况下进行的, 且在本文和图例中指出。此外, 由于一些分析法需要生长因子的不同组合, 故从 Life Technologies 专门定制和购买不含生长因子批次的 StemPro® hESC SFM 以提供这样的灵活性。

[0200] 为了突显在 hES 细胞培养物中具有关键功能的其它信号转导路径, 采用基本上由具有已知生物活性的小分子化合物库组成的 LOPAC 库, 针对 hES 细胞培养物进行筛选。目的是鉴别对培养物扩增和 / 或多能性具有不利影响的小分子。预期抑制关键路径将导致增殖减慢、细胞毒性、细胞凋亡或分化。重要的是, 这些初次和二次筛选是在上文所述简易确定成分培养基的背景下进行的, 由此降低通常由不确定组分 (例如血清或半富白蛋白) 引入的可变性。为确定化合物的活性, 进行碱性磷酸酶染色分析法。碱性磷酸酶是与未分化的多能干细胞相关的干细胞标志物。使用该分析, 约 50 种小分子化合物关于其对 hES 细胞的负面影响 (包括降低 hES 细胞生长和存活) 的能力显示出某种可测量的量的活性。在这些化合物中鉴别出细胞表面神经递质受体的很多抑制剂, 表明这些受体在自我更新方面至少起到信号转导作用。使用天然存在的配体或药理学相关衍生物, 鉴别出也可充当激素的数类小分子神经递质, 且证实其可支持低密度 hES 细胞生长和存活和 / 或扩增。这些活性对于开发适于 hES 细胞的商业和临床应用的先进技术至关重要, 例如可靠的单细胞克隆、在完全确定的符合 GMP 的条件下有效衍生新 hES 细胞系、hES 细胞的悬浮生长和传代后活力增强。下列研究的目标是类似地鉴定对多能干细胞具有负作用的试剂。更具体地, 本发明的筛选方法被用于鉴定多能干细胞的抑制剂和细胞毒性剂, 这些试剂可以用于在体外定向分化期间减少未分化的细胞群。

[0201] 应了解, 前述内容涉及本发明的示例性实施方案, 并且在不背离本发明范围的情况下可在其中进行多种修改。以下实例将进一步说明本发明, 这些实例不应以任何方式解释为对本发明范围的强加限制。相反, 应清楚地了解, 在阅读了本文的描述后, 在不背离本发明的精神和 / 或所附权利要求书的范围的情况下, 本领域技术人员可采用各种其它实施方案、修改和等同表述。

[0202] 本文所述的方法、组合物和装置是目前的代表性优选实施方案, 并且是示例性的,

且不打算作为对本发明范围的限制。例如,采用某些 hES 细胞系,但本发明涵盖使用任何多能干细胞系,包括人 iPS 细胞系以及其它未提到的 hES 和 iPS 细胞系,例如分别在下表 1 和表 2 中所提到的那些(改编自美国国立卫生研究院干细胞登记处(National Institute of Health's Stem Cell Registry),万维网网址:stemcells.nih.gov/research/registry;以及位于美国马萨诸塞州伍斯特的马萨诸塞州大学医学院(University of Massachusetts Medical School,Worcester,Massachusetts,USA)的人类胚胎干细胞登记处(Human Embryonic Stem Cell Registry)和国际干细胞登记处(International Stem Cell Registry))。随着多种细胞系变得可用且进行登记,这些数据库将定期更新。对于运输 NSCB 干细胞登记处,其中一些细胞系不可用。尽管如此,至少以下 hES 细胞系在本发明日期时是可以购买的。

[0203] 表 2:人类 ES 细胞系

[0204]

机构 (国家)	名称
美国	
位于乔治亚州雅典的布雷萨杰公司 (BresaGen, Inc., Athens, Georgia) (美国)	BG01、BG02、BG03; BG04; BG01v
英杰公司 (Invitrogen) (美国)	BG01v/hOG
位于加利福尼亚州圣地亚哥的塞瑟公司 (CyThera, Inc., San Diego, California) (美国)	CyT49, CyT203, CyT25
位于加利福尼亚州门罗公园的吉罗公司 (Geron Corporation, Menlo Park, California) (美国)	GE01、GE07、GE09、GE13、GE14、GE91、GE92 (H1、H7、H9、H13、H14、H9.1、H9.2)
位于加利福尼亚州旧金山的加利福尼亚大学 (University of California, San Francisco, California) (美国)	UC01、UC06 (HSF-1, HSF-6); UCSFB1、UCSFB2、UCSFB3、UCSFB4、UCSFB5、UCSFB6、UCSFB7、UCSFB8、UCSFB9 和 UCSFB10
位于威斯康辛州麦迪逊的威斯康辛校友研究基金会 (Wisconsin Alumni Research Foundation, Madison, Wisconsin) (美国)	WA01、WA07、WA09、WA13、WA14 (H1、H7、H9、H13、H14)
儿童医院公司 (Children's Hospital Corporation) (美国)	CHB-1、CHB-2、CHB-3、CHB-4、CHB-5、CHB-6、CHB-8、CHB-9、CHB-10、CHB-11 和 CHB-12
洛克菲勒大学 (The Rockefeller University) (美国)	RUES1、RUES2 和 RUES3
哈佛大学 (Harvard University) (美国)	HUES1、HUES2、HUES3、HUES4、HUES5、HUES6、HUES7、HUES8、HUES9、HUES10、HUES11、HUES12、HUES13、HUES14、HUES15、HUES16、HUES17、HUES18、HUES19、HUES20、HUES21、HUES22、HUES23、HUES24、HUES25、HUES26、HUES27、HUES28; HUES48; HUES49; HUES53; HUES55; 和 HUES 56
西奈山医院山缪尔伦菲尔德研究所 (Mt Sinai Hosp-Samuel Lunenfeld Research Institute) (美国)	CA1 和 CA2
儿童纪念医院 (Children's Memorial Hospital) (美国)	CM-1、CM-2、CM-5、CM-6、CM-7、CM-8、CM-11、CM-12、CM-13、CM-14、CM-16

[0205]

机构 (国家)	名称
德克萨斯大学休斯顿健康科学中心 (The University of Texas Health Science Center at Houston) (美国)	CR1 和 CR2
加利福尼亚干细胞公司 (California Stem Cell, Inc.) (美国)	CSC14
康涅狄格大学医学/牙科学院 (University of Connecticut School of Medicine/Dentistry) (美国)	CSC14, CT1、CT2、CT3 和 CT4
广州医学院第三附属医院 (The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College) (美国)	FY-3PN; FY-hES-1; FY-hES-3; FY-hES-5; FY-hES-7; 和 FY-hES-8
先进细胞技术公司 (Advanced Cell Technology, Inc.) (美国)	MA 01; MA 09; MA 42; MA 50; MA135; NED 1; NED 2; NED 3; 和 NED 4
斯坦福大学 (Stanford University) (美国)	MFS5
纽约大学医学院 (New York University School of Medicine) (美国)	NYUES1; NYUES2; NYUES3; NYUES4; NYUES5; NYUES6; 和 NYUES7
雷普吉尼克有限公司 (Reprogenetics, LLC) (美国)	RNJ7
加利福尼亚大学洛杉矶分校 (University of California, Los Angeles) (美国)	UCLA1; UCLA2; 和 UCLA3
东弗吉尼亚医学院 (Eastern Virginia Medical School) (美国)	ES-76; ES-78-1; ES-78-2
生殖遗传医学研究所 (Reproductive Genetics Institute) (美国)	RG-222; RG-230; RG-249; RG-308; RG-313; RG-148; 患有肌营养不良性肌强直症 1 (DYSTROPHIA MYOTONICA 1, DMI), 46,XY; RG-153; 患有肌营养不良性肌强直症 1 (DMI), 46,XX; RG-170; 患有贝克尔型肌营养不良 (MUSCULAR DYSTROPHY, BECKER TYPE, BMD), 46,XY; RG-186; 患有亨廷顿氏病 (HUNTINGTON DISEASE,

[0206]

机构 (国家)	名称
	HD), 46,XX;
	RG-194: 患有亨廷顿氏病 (HD), 46,XY;
	RG-233: 患有血红蛋白 $\beta$ 基因座 (HEMOGLOBIN BETA LOCUS, HBB)(HbS/HbS - 镰状细胞性贫血), 46,XX;
	RG-245: X连锁艾米雷-德福斯型肌营养不良 (EMERY-DREIFUSS MUSCULAR DYSTROPHY, X-LINKED, EDMD), 携带者, 47,XXY;
	RG-246: 患有X连锁艾米雷-德福斯型肌营养不良 (EDMD), 46,XY;
	RG-271: 患有常染色体显性扭转性肌张力障碍 1 (TORSION DYSTONIA 1, DYT1) (N/GAG 缺失), 46,XY;
	RG-283: 患有杜兴型肌营养不良 (MUSCULAR DYSTROPHY, DUCHENNE TYPE, DMD), 46,XY;
	RG-288: 患有囊性纤维化 (CYSTIC FIBROSIS, CF) ( $\delta F508/\delta F508$ ), 46,XY;
	RG-289: 患有囊性纤维化 (CF), ( $\delta F508/\delta F508$ ), 46,XX;
	RG-301: 患有杜兴型肌营养不良 (DMD), 46,XY;
	RG-302: 杜兴型肌营养不良 (DMD), 携带者, 46,XX;
	RG-315: 患有 I 型神经纤维瘤病 (NEUROFIBROMATOSIS, TYPE I, NF1) (R19 47X/N), 46,XY;
	RG-316: 患有 I 型结节性硬化 (TUBEROUS SCLEROSIS, TYPE I, TSC1) (N/IVS7+1 G-A);
	RG-316: 患有 I 型结节性硬化 (TSC1) (N/IVS7+1 G-A);
	RG-320: 患有 I 型结节性硬化 (TSC1) (N/IVS7+1 G-A);
	RG-326: 患有腓翼状胛肉综合症 (POPLITEAL PTERYGIUM SYNDROME, PPS) (R84H/N), 46,XY;
	RG-328: 患有面肩胛型肌营养不良 1A (FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY 1A, FSHD), 46,XY;
	RG-330: 患有面肩胛型肌营养不良 1A (FSHD), 46,XY;
	RG-333: 患有面肩胛型肌营养不良 1A (FSHD), 46,XX;
	RG-356: 患有血红蛋白 $\alpha$ 基因座 (HEMOGLOBIN ALPHA LOCUS, HBA) ( $-\alpha / -$ ), 46,XX;
	RG-357: 患有X连锁艾米雷-德福斯型肌营养不良 (EDMD), 46,XY;

[0207]

机构 (国家)	名称
	RG-358; 患有 X 连锁艾米雷-德福斯型肌营养不良 (EDMD), 46,XY; RG-399; 患有面肩胛型肌营养不良 1A (FSHD), 46,XX; RG-401; 患有面肩胛型肌营养不良 1A (FSHD), 46,XX; RG-402; 患有面肩胛型肌营养不良 1A (FSHD), 46,XX; RG-403; 患有面肩胛型肌营养不良 1A (FSHD); RG-404; 患有 I 型脊髓性肌萎缩症 (SPINAL MUSCULAR ATROPHY, TYPE I, SMA1), 46,XY; RG-406; 患有常染色体显性扭转性肌张力障碍 1 (DYT1) (N/GAG 缺失); RG-413; 患有家族性乳腺癌 (BREAST CANCER, FAMILIAL, BRCA2) (N/IVS7 GT 缺失) 且患有 I 型多发性内分泌瘤 (MULTIPLE ENDOCRINE NEOPLASIA, TYPE I, MEN1) (N/3036 4bp 缺失); RG-414; 患有 I 型多发性内分泌瘤 (MEN1) (N/3036 4bp 缺失); RG-415; 患有亨廷顿氏病 (HD); RG-416; 患有囊性纤维化 (CF), ( $\delta$ F508/1717-1 G-A); RG-417; 患有囊性纤维化 (CF), ( $\delta$ F508/1717-1 G-A); RG-418; 患有血红蛋白 $\beta$ 基因座 (HBB) (cd8+G/619 缺失); RG-420; 患有血红蛋白 $\beta$ 基因座 (HBB) (cd8+G/619 缺失); RG-422; 患有囊性纤维化 (CF), (N1303K/ $\delta$ F508); RG-423; 囊性纤维化 (CF), 携带者 (N/ $\delta$ F508); RG-424; 患有 2 型多发性内分泌瘤 (MEN2B) (M918T/N); RG-426; 患有佩梅病 (PELIZAEUS-MERZBACHER DISEASE, PMLD); RG-428; 患有 1 型结节性硬化 (TSC1) (N/IVS7+1 G-A)
南美	
圣保罗生物科技研究所 (Instituto de Biociências, São Paulo) (巴西)	BR-1
中东	
位于海法的以色列技术工程学院 (Technion-Israel)	TE03、TE04、TE06 (13、14、16)

[0208]

机构 (国家)	名称
Institute of Technology, Haifa) (以色列)	
哈达萨大学医院 (Hadassah University Hospital) (以色列)	HAD 1; HAD 2; HAD 3; HAD 4; HAD 5; HAD 6
耶路撒冷希伯来大学 (Hebrew University of Jerusalem)	HEFX1
以色列技术工程学院	I3; I3.2; I3.3; I4; I6; I6.2; J3; J3.2
罗扬研究院 (Royan Institute) (伊朗)	ARMD.1.H.iPSC.2; BOM.1.H.iPSC.1; CNS.1.H.iPSC.10; CNS.2.H.iPSC.7; FHC.1.H.iPSC.3; GSD.1.H.iPSC.7; HER.1.H.iPSC.1; LCA.1.H.iPSC.1; LHON.1.H.iPSC.5; R.1.H.iPSC.1; R.1.H.iPSC.4; R.1.H.iPSC.9; Royan H1; Royan H10; Royan H2; Royan H3; Royan H4; Royan H5; Royan H6; Royan H7; Royan H8; Royan H9; RP.1.H.iPSC.2; RP2.H.iPSC.3; TYR.1.H.iPSC.1; USH.1.H.iPSC.6
欧洲	
位于格森伯格的塞拉提斯 AB 公司 (Cellartis AB, Gothenberg) (瑞典)	SA001, SA002 (萨赫尔格雷斯卡 1 (Sahlgrenska 1)、萨赫尔格雷斯卡 2); SA002.2; SA003; AS034.1; AS034.1.1; AS034.2; AS038; AS046; FC018; AS085; AS094; SA111; SA121; SA142; SA167; SA181; SA191; SA196; SA202; SA203; SA211; SA218; SA240; SA279; SA348; SA352; SA399; SA461; SA502; SA506; SA521; SA540; SA611
卡洛林斯卡研究所 (Karolinska Institutet) (瑞典)	HS181; HS207; HS235; HS237; HS293; HS306; HS346; HS351; HS356; HS360; HS361; HS362; HS363; HS364; HS366; HS368; HD380; HS382; HS400; HS401; HS402; HS415; HS420; HS422; HS426; HS429; HS429A; HS429B; HS429C; HS429D; HS475; HS480; HS481; HS539
位于哥德堡的哥德堡大学 (Göteborg University, Göteborg) (瑞典)	SA04-SA19 (萨赫尔格雷斯卡 4-萨赫尔格雷斯卡 19)
位于斯德哥尔摩的卡洛林斯卡研究所 (Karolinska Institute, Stockholm) (瑞典)	KA08, KA09, KA40, KA41, KA42, KA43 (hiCM8, hiCM9, hiCM40, hiCM41, hiCM42, hiCM43)
日内瓦大学 (Geneva University) (瑞士)	CH-ES1
巴塞尔大学 (University of Basel) (瑞士)	CH-ES3; CH-ES3; CH-ES5
罗斯林细胞有限公司	RC2; RC3; RC4; RC5

[0209]

机构 (国家)	名称
(Roslin Cells Ltd) (英国)	
纽卡斯尔大学 (University of Newcastle upon Tyne) (英国)	NCL-1; NCL-2; NCL-3; NCL-4; NCL-5; NCL-6; NCL-7; NCL-8; NCL-9
罗斯林研究所 (Roslin Institute) (爱丁堡 (Edinburgh)) 和基隆公司 (Geron Corporation) (英国)	RH1; RH2; RH3; RH4; RH5; RH6; RH7; RH9;
曼彻斯特大学 (University of Manchester) (英国)	Man 2
伦敦大学国王学院 (King's College London) (英国)	KCL-001 (先前称为 WT3)
位于谢菲尔德的谢菲尔德大学 (The University of Sheffield, Sheffield) (英国)	SHEF-1; SHEF-2; SHEF-3; SHEF-4; SHEF-5; SHEF-6; SHEF-7; SHEF-8
爱丁堡大学 (Universities of Edinburgh) 和牛津大学; 剑桥大学 (University of Cambridge) (英国)	Edi-1; Edi-2; Edi-3; Edi-4
罗斯林细胞有限公司、罗斯林研究所、爱丁堡大学和曼彻斯特大学、曼彻斯特和曼彻斯特的中心儿童大学医院 NHS 信托基金 (Central Manchester & Manchester Children's University Hospitals NHS Trust) (英国)	RCM-1; RC-1; RC-2; RC-3; RC-4; RC-5; RC-6; RC-7; RC-8; RC-9; RC-10
盖氏和圣托马斯的伦敦大学国王学院与盖氏医院信托/残疾基金 (King's College London & Guy's Hospital Trust / Charitable Foundation of Guy's & St Thomas) (英国)	KCL-003-CF1 (先前称为 CF1); KCL-005-HD1; KCL008-HD-2; KCL009-trans-1; KCL-001 (WT-3); KCL-001 (WT-4)
澳大利亚干细胞科技有限公司 (Stem Cell Sciences Ltd, Australia; SCS) 和澳大利亚干细胞中心 (Australian Stem Cell Centre, ASCC)	MEL-1; MEL-2; MEL-3; MEL-4

[0210]

机构(国家)	名称
爱丁堡大学(University of Edinburgh)(英国)	CB660
艾瑞达有限公司(Axordia Ltd.)(英国)	Shef-1; Shef-2; Shef-3; Shef-4; Shef-5; Shef-6; Shef-7
诺丁汉大学(University of Nottingham)(英国)	Nott-1; Nott-2
巴塞罗那再生医学中心(Centre of Regenerative Medicine in Barcelona)(西班牙)	ES-2; ES-3; ES-4; ES-5; ES-6; ES-7; ES-8; ES-9; ES-10; ES-11EM; cFA404-KiPS4F-1; cFA404-KiPS4F-3; KiPS3F-7; KiPS4F-1; KiPS4F-8
费利佩王子的实验室研究中心(Principe Felipe Centro de Investigacion)(西班牙)	VAL-3; VAL-4; VAL-5; VAL-6M; VAL-7; VAL-8; VAL-9; VAL-10B
布鲁塞尔自由大学(Université Libre de Bruxelles)(比利时)	ERA-1; ERA2; ERA-3; ERAMUC-1; ERAMUC-1
布鲁塞尔自由大学(Vrije Universiteit Brussel)(比利时)	VUB01; VUB02; VUB06; VUB07; VUB03_DMI; VUB04_CF; VUB05_HD; VUB08_MFS; VUB09_FSHD; VUB10_SCA7; VUB11_FXS; VUB13_FXS; VUB14; VUB19_DMI; VUB20_CMT1A; VUB22_CF; VUB23_OI; VUB24_DMI; VUB26; VUB27; VUB28_HD_MFS
曼彻斯特和曼彻斯特的中心儿童大学医院 NHS(Central Manchester and Manchester Children's University Hospitals NHS)(英国)	Man 1; Man 2
巴黎第十一大学(Université Paris-Sud II)(法国)	CL01; CL02; CL03; PB04; PB05; PB05-1; PB06; PB06-1; PB07; PB08; PB09; PB10
因信美公司(INSERM)(法国)	OSCAR; STR-I-155-HD; STR-I-171-GLA; STR-I-189-FRAXA; STR-I-203-CFTR; STR-I-209-MEN2a; STR-I-211-MEN2a; STR-I-221-Sca2; STR-I-229-MTMX; STR-I-231-MTMX; STR-I-233-FRAXA; STR-I-251-CFTR; STR-I-301-MFS; STR-I-305-APC; STR-I-315-CMT1a; STR-I-347-FRAXA; STR-I-355-APC; STR-I-359-APC
马萨里克大学(Masaryk University)(捷克共和国)	CCTL 6; CCTL 8; CCTL 9; CCTL 10; CCTL 12; CCTL 13; CCRL 14
奥尔堡大学(Aalborg	CLS1; CLS2; CLS3; CLS4

[0211]

机构(国家)	名称
University)(丹麦)	
哥本哈根大学(University of Copenhagen)(丹麦)	LRB001; LRB002; LRB003; LRB004; LRB005; LRB006; LRB007; LRB008; LRB009; LRB010; LRB011; LRB013; LRB014; LRB016; LRB017; LRB018;
南丹麦大学(University of Southern Denmark)	KMEB1; KMEB2; KMEB3; KMEB4; KMEB
赫尔辛基大学(University of Helsinki)(芬兰)	FES21; FES22; FES29; FES30; FES61; FES75
坦佩雷大学(University of Tampere)(芬兰)	Regea 06/015; Regea 06/040; Regea 07/027; Regea 07/046; Regea 08/013; Regea 08/017; Regea 08/023; Regea 08/056
莱顿大学医学中心(Leiden University Medical Center)(荷兰)	HESC-NL1; HESC-NL2; HESC-NL3; HESC-NL4
俄罗斯科学院(Russian Academy of Sciences)(俄罗斯)	ESM01; ESM02; ESM03;
伊斯坦布尔纪念医院(Istanbul Memorial Hospital)(土耳其)	MINE; NS-2; NS-3; NS-4; NS-5; NS-6; NS-7; NS-8; NS-9; NS-10; OZ-1; OZ-2; OZ-3; OZ-4; OZ-5; OZ-6; OZ-7; OZ-8
澳大利亚	
莫纳什大学(Monash University)(澳大利亚)	Envy
位于悉尼的威尔斯亲王医院(Prince of Wales Hospital, Sydney)(澳大利亚)	E1C1; E1C2; E1C3; E1C4; Endeavour 1; Endeavour 2; hES3.1; hES3.2; hES3.3
悉尼 IVF 有限公司(Sydney IVF Limited)(澳大利亚)	SIVF01; SIVF03; SIVF05; SIVF06; SIVF07; SIVF08; SIVF09; SIVF10; SIVF11; SIVF12; SIVF13
亚洲	
京都大学(Kyoto University)(日本)	201B1; 201B2; 201B3; 201B6; 201B7; 243H1; 243H7; 246G1; 246G3; 246G4; 246G5; 246G6; khES-1; khES-2; khES-3;
新加坡干细胞合作联盟(Singapore Stem Cell Consortium)	ESI-013; ESI-014; ESI-017; ESI-027; ESI-035; ESI-049; ESI-051; ESI-053
胚胎干细胞国际公司(ES Cell International Pte Ld)(新加坡)	ES01、ES02、ES03、ES04、ES05、ES06(HES-1、HES-2、HES-3、HES-4、HES-5、HES-6
玛利亚生物科技有限公司(Maria Biotech Co.	MB01、MB02、MB03; MB04; MB05; MB06; MB07; MB08; MB09

[0212]

机构 (国家)	名称
Ltd.) - 位于首尔的玛利亚不孕不育医学研究所 (Maria Infertility Hospital Medical Institute, Seoul) (韩国)	
美滋梅迪医院 (MizMedi Hospital)——位于首尔的首尔国立大学 (Seoul National University, Seoul) (韩国)	MI01 (Miz-hES1); Miz-hES2; Miz-hES3; Miz-hES4; Miz-hES5; Miz-hES6; Miz-hES7; Miz-hES8; Miz-hES9; Miz-hES10; Miz-hES11; Miz-hES12; Miz-hES13; Miz-hES14; Miz-hES15;
抱川中文医科大学医学院 (Pochon CHA University College of Medicine) (韩国)	CHA-hES3; CHA-hES4
首尔国立大学 (韩国)	SNUhES1; SNUhES2; SNUhES3; SNUhES4; SNUhES11; SNUhES16
位于巴尔的摩的国家生物科技中心/塔塔基础研究院 (National Centre for Biological Sciences/Tata Institute of Fundamental Research, Bangalore) (印度)	NC01, NC02, NC03 (FCNCBS1, FCNCBS2, FCNCBS3); BJNI-hem19; BJNI-hem20
位于孟买的瑞莱恩斯生命科学公司 (Reliance Life Sciences, Mumbai) (印度)	RL05, RL07, RL10, RL13, RL15, RL20, RL21 (RLS ES 05, RLS ES 07, RLS ES 10)
国家生殖健康研究院 (National Institute for Research in Reproductive Health) (印度)	KIND-1; KIND-2
塔塔基础研究院 (印度)	FCNCBS1; FCNCBS2; FCNCBS3
高雄医学大学 (Kaohsiung Medical University) (台湾)	T1; T2; T3; T4; T5
中南大学 (Central South University) (中国)	chESC-3 (H3); chESC-8; chESC-20; chESC-22; EBNA1+H9
中国科学院研究生院 (Graduate University of Chinese Academy of Sciences) (中国)	hPES-1; hPES-2
华中科技大学 (Huazhong University of Science and Technology) (中国)	hES-8; hES18
北京大学第三医院	B4; B7; PKU1; PKU2

[0213]

机构（国家）	名称
（Peking University Third Hospital）（中国）	
上海交通大学医学院 （Shanghai Jiao Tong University School of Medicine）（中国）	SHhES1
上海第二医科大学 （Shanghai Second Medical University）（中国）	SH1; SH2; SH4; SH7; SH28; SH35; SH35a; SH38; SH39; SH42
中山大学（Sun Yat-sen University）（中国）	CHES-1; SYSU-1; SYSU-2
中山大学附属第二医院 （Sun Yat-sen University Second Affiliated Hospital）（中国）	CHE-1; CHE-2; CHE-3
广州医学院第三附属医院 （The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College）（中国）	FY-hES-5; FY-hES-9; FY-hES-10; ; FY-hES-11

[0214] 表 3 :人类诱导的多能干 (hIPS) 细胞细胞系的列表

[0215]

<p>位于麦迪逊的威斯康辛大学 (University of Wisconsin - Madison) (美国)</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. IPS(包皮)-1 (正常; 46XY; 余 J. (Yu, J.) 等人, [汤姆逊 (Thomson)] 科学 (Science), 2007, 来源于人类体细胞的诱导性多能干细胞系 (Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells) 318(5858):1917-20。)</li> <li>2. IPS(包皮)-2 (正常; 46XY; 余 J. 等人, [汤姆逊] 科学, 2007, 来源于人类体细胞的诱导性多能干细胞系 318(5858):1917-20。)</li> <li>3. IPS(包皮)-3 (正常; 46XY; 余 J. 等人, [汤姆逊] 科学, 2007, 来源于人类体细胞的诱导性多能干细胞系 318(5858):1917-20。)</li> <li>4. IPS(包皮)-4 (正常; 46XY; 余 J. 等人, [汤姆逊] 科学, 2007, 来源于人类体细胞的诱导性多能干细胞系 318(5858):1917-20。)</li> <li>5. IPS(IMR90)-1 (正常; 46XX; 余 J. 等人, [汤姆逊] 科学, 2007, 来源于人类体细胞的诱导性多能干细胞系 318(5858):1917-20。)</li> <li>6. IPS(IMR90)-2 (正常; 46XX; 余 J. 等人, [汤姆逊] 科学, 2007, 来源于人类体细胞的诱导性多能干细胞系 318(5858):1917-20。)</li> <li>7. IPS(IMR90)-3 (正常; 46XX; 余 J. 等人, [汤姆逊] 科学, 2007, 来源于人类体细胞的诱导性多能干细胞系 318(5858):1917-20。)</li> </ol>
--	--

[0216]

	<p>8. IPS(IMR90)-4 (正常:46XX;余J等人,[汤姆逊]科学,2007,来源于人类体细胞的诱导性多能干细胞系 318(5858):1917-20.)</p> <p>9. IPS-SMA-3.5 (正常:46XY;I型脊髓性肌萎缩症;艾伯特 A. D. (Ebert, A. D.) 等人,2009. 来自脊髓性肌萎缩症患者的诱导性多能干细胞 (Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient), 自然 (Nature), 457:277-80)</p> <p>10. IPS-SMA-3.6 (正常:46XY;I型脊髓性肌萎缩症;艾伯特 A. D. 等人,2009. 来自脊髓性肌萎缩症患者的诱导性多能干细胞, 自然, 457:277-80)</p> <p>11. IPS-WT (正常:46XX;I型脊髓性肌萎缩症;艾伯特 A. D. 等人,2009. 来自脊髓性肌萎缩症患者的诱导性多能干细胞, 自然, 457:277-80)</p>
<p>位于洛杉矶的加利福尼亚大学 (University of California, Los Angeles) (美国)</p>	<p>1. IPS-1 (卡鲁贝雅雷姆 S. (Karumbayaram, S.) 等人,2009. 人诱导的多能干细胞定向分化产生活性运动神经干细胞 (Directed Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells Generates Active Motor Neurons Stem Cells), 27:806-811; 拉瑞 W. E. (Lowry, W. E.) 等人,2008. 来自真皮成纤维细胞的人诱导的多能干细胞的产生 (Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts), 美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci U S A), 105:2883-8)</p> <p>2. IPS-2 (卡鲁贝雅雷姆 S. 等人,2009. 人诱导的多能干细胞定向分化产生活性运动神经干细胞, 27:806-811; 拉瑞 W. E. 等人,2008. 来自真皮成纤维细胞的人诱导的多能干细胞的产生, 美国国家科学院院刊, 105:2883-8)</p> <p>3. IPS-5 (拉瑞 W. E. 等人,2008. 来自真皮成纤维细胞的人诱导的多能干细胞的产生, 美国国家科学院院刊 105:2883-8)</p> <p>4. IPS-7 (拉瑞 W. E. 等人,2008. 来自真皮成纤维细胞的人诱导的多能干细胞的产生, 美国国家科学院院刊 105:2883-8)</p> <p>5. IPS-18 (卡鲁贝雅雷姆 S. 等人,2009. 人诱导的多能干细胞定向分化产生活性运动神经干细胞, 27:806-811; 拉瑞 W. E. 等人,2008. 来自真皮成纤维细胞的人诱导的多能干细胞的产生, 美国国家科学院院刊 105:2883-8)</p> <p>6. IPS-24 (拉瑞 W. E. 等人,2008. 来自真皮成纤维细胞的人诱导的多能干细胞的产生, 美国国家科学院院刊 105:2883-8)</p> <p>7. IPS-29 (拉瑞 W. E. 等人,2008. 来自真皮成纤维细胞的人诱导的多能干细胞的产生, 美国国家科学院院刊 105:2883-8)</p>
<p>西奈山医院 (Mt. Sinai Hospital) (山缪卢伦菲尔德研究所 (Samuel Lunenfeld Research</p>	<p>1. (沃特杰 K. (Woltjen, K.) 等人,2009. PiggyBac 转位将成纤维细胞重新编程为诱导性多能干细胞 (PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells), 自然 (Nature), 458(7239):766-70)</p> <p>2. 61 (沃特杰 K. 等人,2009. PiggyBac 转位将成纤维细胞重新编程为诱导性多能干细胞, 自然, 458(7239):766-70)</p> <p>3. 66 (沃特杰 K. 等人,2009. PiggyBac 转位将成纤维细胞重新</p>

[0217]

Institute); 美国)	<p>编程为诱导性多能干细胞, 自然. 458(7239):766-70)</p> <p>4. 67 (沃特杰 K. 等人, 2009. PiggyBac 转位将成纤维细胞重新编程为诱导性多能干细胞, 自然. 458(7239):766-70)</p> <p>5. HIPSC117 (卡吉 K (Kaji K) 等人, 2009, 不使用病毒诱导多能性且随后切除重新编程的因子 (Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors), 自然 458(7239):771-5)</p> <p>6. HIPSC121 (卡吉 K 等人, 2009, 不使用病毒诱导多能性且随后切除重新编程的因子, 自然 458(7239):771-5)</p> <p>7. HIPSC122 (卡吉 K 等人, 2009, 不使用病毒诱导多能性且随后切除重新编程的因子, 自然 458(7239):771-5)</p>
位于波士顿的儿童医院 (Children's Hospital -Boston)(美国)	<p>1. 551-IPS8 (帕克 IH (Park IH) 等人, 2008. 利用指定因子将人类体细胞重新编程为具有多能性 (Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors). 自然 451:141-6)。</p> <p>2. ADA-IPS2 ((ADA-SCID), 腺苷脱氨酶缺乏相关性重度联合免疫缺陷病 (Adenosine Deaminase Deficiency-related Severe Combined Immunodeficiency) (GGG&gt;AGG, 外显子 7, ADA 基因); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞 (Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells), 细胞 (Cell), 134(5):877-86)</p> <p>3. ADA-IPS3 ((ADA-SCID), 腺苷脱氨酶缺乏相关性重度联合免疫缺陷病(GGG&gt;AGG, 外显子 7, ADA 基因); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>4. BJI-IPS1 (帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>5. BMD-IPS1 (男性; (BMD) 贝克尔型肌营养不良(肌养蛋白中的未鉴别突变 (Unidentified mutation in dystrophin)); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>6. BMD-IPS4 (正常; 46XY; (BMD) 贝克尔型肌营养不良(肌养蛋白中的未鉴别突变); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>7. DHICF16-IPS1 (正常; 46XY; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>8. DHICF32-IPS2 (男性; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>9. DHIF-IPS3-3(正常; 46XY; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>10. DMD-IPS1 ((正常; 46XY; DMD), 杜兴型肌营养不良(缺失外显子 45-52, 肌养蛋白基因; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>11. DMD-IPS2 (男性; (DMD), 杜兴型肌营养不良(缺失外显子 45-52, 肌养蛋白基因; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导</p>

[0218]

- 型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)
12. DS1-IPS4 (男性; 唐氏综合症 (Down syndrome) (21 三体症); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)
13. DS2-IPS1 (男性; 唐氏综合症(21 三体症); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)
14. DS2-IPS10 (男性; 唐氏综合症(21 三体症); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)
15. GD-IPS1(男性; (GD) III 型戈谢病 (Gaucher Disease type III) (AAC > AGC, 外显子 9, cDNA 的核苷酸 84 插入 G<G-insertion, nucleotide 84 of cDNA), GBA 基因; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)
16. GD-IPS3 (男性; (GD) III 型戈谢病(AAC > AGC, 外显子 9, cDNA 的核苷酸 84 插入 G GBA 基因; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)
17. HFIB2-IPS2 (帕克 I. H. 等人, 2008. 人类诱导的多能干细胞的产生 (Generation of human-induced pluripotent stem cells), 自然—实验手册 (Nat Protoc.), 3:1180-6; 帕克 I. H. 等人, 2008. 利用指定因子将人类体细胞重新编程为具有多能性 (Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors), 自然, 451:141-6)
18. HFIB2-IPS4 (帕克 I. H. 等人, 2008. 人类诱导的多能干细胞的产生, 自然—实验手册, 3:1180-6; 帕克 I. H. 等人, 2008. 利用指定因子将人类体细胞重新编程为具有多能性, 自然, 451:141-6)
19. HFIB2-IPS5 (帕克 I. H. 等人, 2008. 人类诱导的多能干细胞的产生, 自然—实验手册 3:1180-6; 帕克 I. H. 等人, 2008. 利用指定因子将人类体细胞重新编程为具有多能性, 自然, 451:141-6)
20. JDM-IPS1 (正常, 46XX; 青少年糖尿病(多因素); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)
21. JDM-IPS1 (正常, 46XX; 青少年糖尿病(多因素); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)
22. JDM-IPS2 (女性; 青少年糖尿病(多因素); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)
23. JDM-IPS3 (女性; 青少年糖尿病(多因素); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)
24. LNSC-IPS2 (女性; 莱施-尼汉综合症 (Lesch-Nyhan syndrome)(携带者, HPRF1 的异型接合性; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)
25. MRC5-IPS7 (男性; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)
26. MRC5-IPS12 (正常; 46XY; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特

[0219]

	<p>异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>27. MRC5-IPS1 (男性; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>28. PD-IPS1 (男性; 帕金森氏病 (Parkinson disease) (多因素); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>29. SBDS-IPS1 (男性; 舒-戴二氏综合症 (Swachman-Bodian-Diamond syndrome) (IV2 + 2T&gt;C 且 IV3 - 1G&gt;A, SBDS 基因; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>30. SBDS-IPS2</p> <p>31. SBDS-IPS3 (正常; 46XY; 舒-戴二氏综合症 (IV2 + 2T&gt;C 且 IV3 - 1G&gt;A, SBDS 基因; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p>
<p>哈佛大学 (Harvard University) (美国)</p>	<p>1. A29a (46XX; (ALS) 肌萎缩性侧索硬化(L144F [Leu144 &gt; Phe] 超氧化物歧化酶(SOD1)基因的显性等位基因; 白种人 (Caucasian); 迪莫斯 J. T. (Dimos, J. T.) 等人, 2008. 由 ALS 患者产生的诱导性多能干细胞可分化成运动神经元 (Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons), 科学, 321:1218-21)</p> <p>2. A29b (46XX; (ALS) 肌萎缩性侧索硬化(L144F [Leu144 &gt; Phe] 显性等位基因超氧化物歧化酶(SOD1)基因; 白种人; 迪莫斯 J. T. 等人, 2008. 由 ALS 患者产生的诱导性多能干细胞可分化成运动神经元, 科学, 321:1218-21)</p> <p>3. A29c (46XX; (ALS) 肌萎缩性侧索硬化(L144F [Leu144 &gt; Phe] 显性等位基因超氧化物歧化酶(SOD1)基因; 白种人; 迪莫斯 J. T. 等人, 2008. 由 ALS 患者产生的诱导性多能干细胞可分化成运动神经元, 科学, 321:1218-21)</p>
<p>索尔克研究院 (Salk Institute) (美国)</p>	<p>1. HAIR-IPS1 (艾森 T. (Aasen, T.) 等人, [贝尔蒙特 J. C. (Belmonte, J. C.)] 2008. 由人角质细胞有效且迅速地产生诱导性多能干细胞 (Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes), 自然—生物技术 (Nat Biotechnol.) 26:1276-84)</p> <p>2. HAIR-IPS2 (艾森 T. 等人, [贝尔蒙特 J. C.] 2008. 由人角质细胞有效且迅速地产生诱导性多能干细胞, 自然—生物技术, 26:1276-84)</p>
<p>罗扬研究院 (伊朗)</p>	<p>1. R.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p> <p>2. BOM.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p> <p>3. FHC.1.H.iPSC.3 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p> <p>4. GSD.1.H.iPSC.7 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p> <p>5. TYR.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p> <p>6. HER.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p> <p>7. R.1.H.iPSC.4 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p> <p>8. R.1.H.iPSC.9 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p>

[0220]

	<p>9. RP2.HiPSC.3 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS 细胞)</p> <p>10. LCA.1.HiPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS 细胞)</p> <p>11. USH.1.HiPSC.6 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p> <p>12. RP.1.HiPSC.2 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p> <p>13. ARMD.1.HiPSC.2 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p> <p>14. LHON.1.HiPSC.5 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS 细胞)</p> <p>15. CNS.1.HiPSC.10 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS 细胞)</p> <p>16. CNS.2.HiPSC.7 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS 细胞)</p>
巴萨罗那再生医学中心 (西班牙)	<p>1. KiPS4F-1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人包皮角质细胞; 46XY)</p> <p>2. KiPS3F-7 (OCT4, Sox2, KLF4); 人包皮角质细胞)</p> <p>3. KiPS4F-8 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc 人包皮角质细胞; 46XY)</p> <p>4. cFA404-KiPS4F-1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 表皮角质细胞; 46XY)</p> <p>5. cFA404-KiPS4F-3 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 表皮角质细胞; 46XY)</p>
巴黎第十一大学 (法国)	<p>1. PB03 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 原代羊膜细胞; 46XX; 慢病毒)</p> <p>2. PB04 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 原代羊膜细胞; 患有乙型地中海贫血; 46XY; 慢病毒)</p> <p>3. PB05-1 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 原代羊膜细胞; 患有乙型地中海贫血; 46XY; 慢病毒)</p> <p>4. PB05 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 原代羊膜细胞; 患有乙型地中海贫血; 46XY; 慢病毒)</p> <p>5. PB06 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 原代羊膜细胞; 唐氏综合症; 47XY, +21; 慢病毒)</p> <p>6. PB06-1 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 原代羊膜细胞; 唐氏综合症; 47XY, +21; 慢病毒)</p> <p>7. PB07 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 原代羊膜细胞; 46XY; 逆转录病毒)</p> <p>8. PB08 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 原代羊膜细胞; 46XY; 逆转录病毒)</p> <p>9. PB09 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 原代羊膜细胞; 46XY; 慢病毒)</p> <p>10. PB10 (Oct4, Sox2; 原代羊膜细胞 46XY, 慢病毒)</p>
京都大学 (日本)	<p>1. 201B1 (人成纤维细胞; 46XX)</p> <p>2. 201B2 (人成纤维细胞; 46XX)</p> <p>3. 201B3 (人成纤维细胞; 46XX)</p> <p>4. 201B6 (人成纤维细胞; 46XX)</p> <p>5. 201B7 (人成纤维细胞; 46XX)</p> <p>6. 243H1 (人成纤维细胞)</p> <p>7. 243H7 (人成纤维细胞)</p>

[0221]

	<p>8. 246B1 (正常, 46XX)</p> <p>9. 246B2 (正常, 46XX)</p> <p>10. 246B3 (正常, 46XX)</p> <p>11. 246B4 (正常, 46XX)</p> <p>12. 246B5 (正常, 46XX)</p> <p>13. 246B6 (正常, 46XX)</p> <p>14. 246G1 (人成纤维细胞; 高桥 K. (Takahashi, K.) 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞 (Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors), 细胞 (Cell), 131:861-72)</p> <p>15. 246G3 (人成纤维细胞; 高桥 K. 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞, 细胞, 131:861-72)</p> <p>16. 246G4 (人成纤维细胞; 高桥 K. 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞, 细胞, 131:861-72)</p> <p>17. 246G5 (人成纤维细胞; 高桥 K. 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞, 细胞, 131:861-72)</p> <p>18. 246G6 (人成纤维细胞; 高桥 K. 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞, 细胞, 131:861-72)</p> <p>19. 253F1 (正常, 46XX; 高桥 K. 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞, 细胞, 131:861-72)</p> <p>20. 253F2 (正常, 46XX; 高桥 K. 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞, 细胞, 131:861-72)</p> <p>21. 253F3 (正常, 46XX; 高桥 K. 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞, 细胞, 131:861-72)</p> <p>22. 253F4 (正常, 46XX; 高桥 K. 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞, 细胞, 131:861-72)</p> <p>23. 253F5 (正常, 46XX; 高桥 K. 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞, 细胞, 131:861-72)</p>
<p>上海生命科学 研究院 (Shanghai Institutes for Biological Sciences) (中 国)</p>	<p>1. HAFDC-IPS-6 (李 C. (Li C.) 等人, 2009. 在人羊水源性细胞中可迅速且有效地诱导多能性 (Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells), 人类分子遗传学 (Hum Mol Genet), 2009 年 11 月 15 日, 18(22):4340-9)</p> <p>2. IPS-S (廖 J. (Liao, J.) 等人, 2008. 利用 6 种转录因子的组合使人类体细胞产生诱导性多能干 (iPS) 细胞的效率增加 (Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors), 细胞研究 (Cell Res), 18:600-3)</p>

[0222] 实施例 1:对 hES 细胞具有细胞毒性但对分化的细胞没有细胞毒性的化合物的鉴定

[0223] 筛选抑制人胚胎干细胞 (hESC) 或对人胚胎干细胞具有细胞毒性的候选化合物。某些化合物选自药理学活性化合物库 (LOPAC), 特别是 LOPAC1280™ 集合 (Sigma-Aldrich, Catalog No. L01280)。LOPAC1280™ 化合物是已知的或具有良好表征

的性质。LOPAC1280™的完整列表可以在万维网网站 [sigmaaldrich.com/chemistry/drug-discovery/validation-libraries/lopac1280-navigator.html](http://sigmaaldrich.com/chemistry/drug-discovery/validation-libraries/lopac1280-navigator.html) 看到。使用由 176 种化合物组成的 LOPAC1280™库的亚集进行最初筛选,选择这些化合物是因为它们是信号转导途径、磷酸化事件或受体等的抑制剂。参见表 4,列出了选择的 176 种化合物。将这些化合物排列在 2 个 96 孔板上,包括含有 DMSO 的对照孔。

[0224] 表 4:176 种选择的 LOPAC1280™化合物

[0225]

序号	化合物	作用
1	乙酰胺	抑制剂
2	O-(羧甲基)羟胺半盐酸盐	抑制剂
3	放线酰胺素	抑制剂
4	S(-)-p-溴四咪唑草酸盐	抑制剂
5	乙酰唑胺	抑制剂
6	4-雄烯-4-醇-3,17-二酮	抑制剂
7	腺苷-3',5'-环状单磷酸盐	激活剂
8	甘油二酯激酶抑制剂 I	抑制剂
9	氟维司群 ( Fulvestrant )	SERD
10	4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟盐酸盐	抑制剂
11	TBBz	抑制剂
12	L-烯丙基甘氨酸	抑制剂
13	甜菜碱盐酸盐	代谢产物
14	SB 202190	抑制剂
15	布地奈德(Budesonide)	
16	BTO-1	抑制剂
17	盐酸苯甲脒	抑制剂
18	ML-9	抑制剂
19	倍他米松(Betamethasone)	
20	盐酸抑氨肽酶 B	抑制剂
21	皮质酮(Corticosterone)	
22	盐酸苄丝肼	抑制剂

	23	DAPH	抑制剂
	24	可的松	
	25	氯化白屈菜赤碱	抑制剂
	26	环孢菌素 A	抑制剂
	27	核抑制剂(Roscovitine)	抑制剂
	28	斑蝥素(Cantharidin)	抑制剂
	29	氯噻嗪	抑制剂
	30	$\beta$ -氯-L-丙氨酸盐酸盐	抑制剂
	31	氯化钙调蛋白抑制剂	抑制剂
	32	4-对氯汞苯甲酸	抑制剂
	33	CGP-74514A 盐酸盐	抑制剂
	34	醋酸环丙氯地孕酮	拮抗剂
	35	钙霉素	
	36	斑蝥酸(Cantharidic Acid)	抑制剂
	37	瑞香素(Daphnetin)	抑制剂
	38	Y-27632 二盐酸盐	抑制剂
[0226]	39	CK2 抑制剂 2	抑制剂
	40	1,4-二脱氧-1,4-亚胺-D-阿拉伯糖醇	抑制剂
	41	甘油二酯激酶抑制剂 II	抑制剂
	42	2,4-二硝基酚-2-氯代-2-脱氧- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷	抑制剂
	43	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 1296	抑制剂
	44	S-(-)-卡比多巴	抑制剂
	45	P1,P4-二(腺苷-5')四磷酸三铵盐	抑制剂
	46	SD-169	抑制剂
	47	PD 169316	抑制剂
	48	去磷酸化抑制剂	抑制剂
	49	2,4-二氨基-6-羟基嘧啶	抑制剂
	50	丹曲林钠(Dantrolene sodium)	抑制剂
	51	二乙烯三胺五乙酸	抑制剂
	52	3,4-二氯异香豆素	抑制剂
	53	1-去氧野苳霉素盐酸盐	抑制剂
	54	7-环戊基-5-(4-苯氧基)苯基-7H-咯[2,3-d]嘧啶-4-基胺基	抑制剂
	55	DL-赤型-二氢鞘氨醇	抑制剂
	56	(R,R)-顺式-二乙基四氢-2,8-屈二醇	拮抗剂

57	表苯丁抑制素盐酸盐	抑制剂
58	2,2'-联吡啶	抑制剂
59	SP600125	抑制剂
60	AC-93253 碘化物	激动剂
61	E-64	抑制剂
62	SB 415286	抑制剂
63	rac-2-乙氧基-3-十八烷酰胺-1-胆碱磷酸	抑制剂
64	毛喉素(Forskolin)	激活剂
65	$\beta$ -雌二醇	
66	GW2974	抑制剂
67	GW5074	抑制剂
68	雌酮	
69	呋格雷酸钠	抑制剂
70	染料木碱(Genistein)	抑制剂
71	茵多杀(Endothal)	抑制剂
72	rac-2-乙氧基-3-十六烷酰胺-1-胆碱磷酸	抑制剂
[0227] 73	大黄素(Emodin)	抑制剂
74	氟他胺	抑制剂
75	17 $\alpha$ -羟基孕酮	代谢产物
76	4-羟基苯甲酰肼	抑制剂
77	碘乙酰胺	抑制剂
78	1,3,5-三(4-羟基苯基)-4-丙基-1H-吡唑	激动剂
79	HA-100	抑制剂
80	HA-1004 盐酸盐	抑制剂
81	氢化可的松	
82	MNS	抑制剂
83	异丁司特(Ibudilast)	抑制剂
84	氮氯噻嗪	抑制剂
85	NSC 95397	抑制剂
86	牛奶树碱(Hispidin)	抑制剂
87	伊马咪啉(Imazodan)	抑制剂
88	ML-7	抑制剂
89	Kenpauillone	抑制剂
90	LFM-A13	抑制剂

91	1-(5-硫代异噻啉)-3-甲基咪嗪二盐酸盐	抑制剂
92	1-(5-硫代异噻啉)-2-甲基咪嗪二盐酸盐	抑制剂
93	金硫葡萄糖	抑制剂
94	L-亮氨酸硫醇, 氧化的二盐酸盐	抑制剂
95	(-)-盐酸噻咪唑	抑制剂
96	K185	拮抗剂
97	LY-294,002 盐酸盐	抑制剂
98	米利酮(Milrinone)	抑制剂
99	杨梅黄酮(Myricetin)	抑制剂
100	8-甲氧基甲基-3-异丁基-1-甲基黄嘌呤	抑制剂
101	BIO	抑制剂
102	MK-886	抑制剂
103	降黑素(Melatonin)	激动剂
104	米非司酮(Mifepristone)	拮抗剂
105	PRL-3 抑制剂 I	抑制剂
106	H-8 二盐酸盐	抑制剂
[0228] 107	去甲斑蝥素(Norcantharidin)	抑制剂
108	ZM 39923 盐酸盐	抑制剂
109	L- $\alpha$ -甲基 DOPA	抑制剂
110	Me-3,4-去磷酸化抑制剂	抑制剂
111	来自极叉开拉瑞阿(石炭酸灌木)的去甲二氢愈创木酸	抑制剂
112	尼鲁米特(Nilutamide)	抑制剂
113	奥罗莫星(Olomoucine)	抑制剂
114	油酸	激活剂
115	黄体酮	
116	白皮杉醇	抑制剂
117	NS 2028	抑制剂
118	SB 216763	抑制剂
119	TBB	抑制剂
120	己酮可可碱(Pentoxifylline)	抑制剂
121	PD 404,182	抑制剂
122	棕榈酰-DL-肉碱氯化物	调节剂
123	ODQ	抑制剂
124	盐酸罂粟碱	抑制剂

	125	原卟啉 IX 二钠	激活剂
	126	SU 6656	抑制剂
	127	1,10-菲罗啉一水合物	抑制剂
	128	IC 261	抑制剂
	129	Bay 11-7082	抑制剂
	130	A3 盐酸盐	抑制剂
	131	PD 98,059	抑制剂
	132	巴豆醇-12-十四烷酸酯-13-乙酸酯	激活剂
	133	脱氧皮醇	前体
	134	IRAK-1/4 抑制剂 I	抑制剂
	135	盐酸雷洛昔芬	调节剂
	136	粗楝柴毒(Rottlerin)	抑制剂
	137	螺内酯(Spirolactone)	拮抗剂
	138	磷酰二肽钠(Phosphoramidon disodium)	抑制剂
	139	PQ401	抑制剂
	140	SU 5416	抑制剂
[0229]	141	DL-氯化硬脂酰肉碱	抑制剂
	142	SU 4312	抑制剂
	143	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 1478	抑制剂
	144	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 528	抑制剂
	145	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 112	抑制剂
	146	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 494	抑制剂
	147	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 537	抑制剂
	148	酪氨酸磷酸化抑制剂 1	抑制剂
	149	N-p-甲苯磺酰基-L-苯丙氨酸氯甲基酮	抑制剂
	150	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 555	抑制剂
	151	酪氨酸磷酸化抑制剂 23	抑制剂
	152	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 490	抑制剂
	153	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 698	抑制剂
	154	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 34	抑制剂
	155	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 879	抑制剂
	156	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 527	抑制剂
	157	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 808	抑制剂
	158	曲安西龙(Triamcinolone)	激动剂

[0230]

159	四异丙基焦磷酸胺(Tetraisopropyl pyrophosphoramide)	抑制剂
160	酪氨酸磷酸化抑制剂 25	抑制剂
161	SQ 22536	抑制剂
162	盐酸噻咪唑	抑制剂
163	甲磺吡庚脒(Tolazamide)	释放剂
164	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 835	抑制剂
165	枸橼酸他莫昔芬	抑制剂
166	U0126	抑制剂
167	酪氨酸磷酸化抑制剂 47	抑制剂
168	YC-1	激活剂
169	酪氨酸磷酸化抑制剂 51	抑制剂
170	来自绳状青霉菌( <i>Penicillium funiculosum</i> )的渥曼青霉素	抑制剂
171	I-OMe-酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 538	抑制剂
172	酪氨酸磷酸化抑制剂 A9	抑制剂
173	CGP 57380	抑制剂
174	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 538	抑制剂
175	毒胡萝卜素(Thapsigargin)	释放剂
176	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 126	抑制剂

[0231] 然后使用实时阻抗分析 (ACEA biosciences RT-CES 系统), 利用来自完整 LOPAC1280™库的前述 176 种选择的化合物筛选人多能干干细胞 (例如 hESC) 和 1 期的正在分化的培养物 (定形内胚层细胞)。RT-CES 系统使用 96 孔板, 所述 96 孔板包含植入的微传感器以监测电阻抗的变化, 其被转化为细胞指数的量值。可以检测细胞培养物内任何明显的改变, 包括但不限于, 细胞增殖、迁移、细胞扩散、细胞凋亡、分化等。之前的实验已经显示 hES 细胞在 RT-CES 板中能有效地附着和扩增。细胞指数的升高指示细胞的增殖, 例如, 未分化的细胞的增殖。通过 Q-PCR 确认增殖。还参见图 1。细胞指数 (阻抗) 的降低或减少指示化合物对细胞具有抑制或细胞毒性效果。相反, 非活性的化合物, 或未发现抑制和 / 或细胞毒性的化合物, 通常具有与 DMSO 对照中所示的细胞指数类似的细胞指数 (阻抗)。“锯齿状 (scallop)”细胞指数是这样的细胞指数, 其由于细胞的汇合培养而维持高位, 但在每日提供营养之间会下降和上升 (锯齿状)。相反地, 正在经历分化的细胞具有特别的模式, 例如细胞指数中的峰和谷, 这可能表明上皮细胞向间叶细胞的转变、平铺、细胞迁移、细胞凋亡或类似的分化和生长相关的改变。

[0232] 抑制剂和细胞毒性剂的阻抗分析。在 Dc-HAIF (基于调蛋白 (heregulin) 的确定成分培养基) 中培养人多能干干细胞, 例如  $2 \times 10^4$  hESC (BG02), 在阻抗监测平板中每日提供营养。约 24 小时之后, 向每个孔中加入  $10 \mu\text{M}$  选择的 LOPAC1280™化合物 (参见图 3A 和 B 中的箭头), 然后再培养约 5 天。鉴定出七种化合物 (BTO-1 (Cmpd. No. 16)、氯化白屈菜赤碱 (Cmpd. No. 25)、去磷酸化抑制剂 (Cmpd. No. 48)、酪氨酸磷酸化抑制剂 AG494 (AGA494; Cmpd.

No. 146)、酪氨酸磷酸化抑制剂 AG490 (AGA490; Cmpd. No. 152)、SU6656 (Cmpd. No. 126) 和去甲二氢愈创木酸 (NDGA; Cmpd. No. 111), 因为它们导致细胞指数 (或阻抗) 相对于 DMSO 对照的显著降低, 指示对 hESC 的抑制或细胞毒性效果; 在这些研究的过程中平行进行上述鉴定。在约 112 小时在去磷酸化抑制剂孔中观察到阻抗的猛减是由于污染, 是人为现象 (图 3A)。

[0233] 使用上文表 4 中的化合物对 hESC 进行阻抗分析给出大于 20 (20) 次击中。然而, 本发明的理想候选化合物不仅应对人多能干干细胞如 hESC 或 hIPSC 具有抑制性或细胞毒性, 同时还应对分化的或正在分化的细胞群包括 1 期、2 期、3 期、4 期和 5 期类型的细胞培养物 (分别为定形内胚层细胞、前肠内胚层细胞、背侧前肠细胞、胰腺内胚层细胞和内分泌细胞) 的细胞活力没有影响。因此, 随后对正在分化的定形内胚层 (DE) 细胞培养物筛选表 4 中的化合物 (图 3C 和 D)。向每孔接种约  $3 \times 10^4$  个 hES 细胞, 然后在 DC-HAIF 确定成分培养基 (即, **StemPro**<sup>®</sup> hESC SFM 培养基 (Life Technologies, Carlsbad, CA)) 中生长 24 小时。然后, 通过更换培养基并在 RPMI、100ng/mL 激活素 A 和 10ng/mL 的 FGF2 中培养, 诱导 1 期或定形内胚层分化。仅在分化的前 24 小时向培养物加入 10nM/mL 的 GSK-3 $\beta$  抑制剂 15 (Calbiochem#361558)。在诱导分化后约 48 小时或 2 天加入 10  $\mu$  M 的每种候选化合物 (参见图 3C 和 D, 大箭头), 再培养细胞 2 天。在表 4 中列出的化合物中, 下文表 5 中的以下化合物显示出对 hESC 生长和增殖的细胞毒性或抑制效果, 而同时没有显著影响正在分化的 hESC 或分化的内胚层细胞的细胞活力。

[0234] 表 5: 选择候选 LOPAC1280<sup>™</sup> 化合物

[0235]

化合物编号(表 4)	化合物名称	活性	靶标	描述	定形内胚层细胞的活力
16	BTO-1	抑制剂	PIK	保罗样激酶(PIK)抑制剂	有活力的
25	氯化白屈菜赤碱	抑制剂	PKC	PKC 抑制剂;影响 PKC 从细胞溶胶向质膜的迁移	有活力的
48	去磷酸化抑制剂	抑制剂	CD45	CD45 蛋白酪氨酸激酶抑制剂	有活力的
111	去甲二氢愈创木酸	抑制剂	脂氧合酶	脂氧合酶抑制剂	
125	原叶啉 IX	激活剂	鸟苷酰	激活可溶性鸟苷酸环化酶	
126	SU 6656	抑制剂	Src 家族	选择性 Src 家族激酶抑制剂	有活力的
142	SU 4312	抑制剂	KDR	VEGFR1/2 和 PDGFR 抑制剂	
146	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 494	抑制剂	EGFR	蛋白酪氨酸激酶抑制剂;抑制 EGF 受体激酶活性	
150	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 555	抑制剂	EGFR	EGFR 蛋白酪氨酸激酶抑制剂	N/D
152	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 490	抑制剂	JAK2	Jak-2 蛋白酪氨酸激酶(PTK)抑制剂	有活力的

[0236] 对选择的化合物的二次筛选。利用表 5 中的 10 种候选化合物中的 9 种,通过如上文所述向正在分化的 1 期培养物(定形内胚层细胞)添加化合物进行二次筛选。对于二次筛选,使用较大的标准 6 孔板代替在利用阻抗分析的初次筛选中所使用的 RT-CEAS96 孔培养板。仅测试了表 5 中的 10 种化合物中的 9 种,因为在进行测试时第 10 种没有获得足够的量。在较大的 6 孔板中,表 5 中列出的 9 种化合物中的 5 种对正在分化的细胞或分化的定形内胚层细胞的活力没有影响。换句话说,定形内胚层细胞能够在以下五种化合物的存在下生长和增殖:氯化白屈菜赤碱(Ch. C1; Cmpd. No. 25)、去磷酸化抑制剂(Deph.; Cmpd. No.)、SU6656(SU; Cmpd. No. 126)和酪氨酸磷酸化抑制剂 AG490(AG490; Cmpd. No. 152)。该分析还确认了正在分化的细胞和分化的定形内胚层细胞的活力明显一致,与测试的细胞的数量或培养容器的尺寸、体积或来源无关。

[0237] 筛选对 1-5 期分化的影响。为进一步确定在 1 期添加的这 5 种候选化合物是否影响其他分化的细胞类型(例如,2-5 期:分别为前肠内胚层细胞、背侧前肠内胚层细胞、胰腺内胚层细胞和内分泌前体细胞),使 hES 在化合物存在或不存在的条件下分化,并在多个阶段采集 RNA 样品用于通过 Q-PCR 进行基因表达分析。

[0238] 在 1 期结束时,相对于 DMSO 处理的对照(图 4)和相对于未分化的 hESC 聚集体(图 5 和 6),对基因表达水平进行绘图。参见图 4、5 和 6 中的“对照”。用氯化白屈菜赤碱(Ch. C1; Cmpd. No. 25);去磷酸化抑制剂(Deph; Cmpd. No. 248);SU6656(SU; Cmpd. No. 126)和

酪氨酸磷酸化抑制剂 AG490 (AG; Cmpd. No. 152) 处理的培养物与 DMSO 对照 (图 4A 和 4B 第 1 柱) 相比表现出 OCT4 和 NANOG 基因表达的略微的相对降低 (图 4A 和 4B, 第 2、3、5 和 6 柱)。氯化白屈菜赤碱、去磷酸化抑制剂、SU6656 和酪氨酸磷酸化抑制剂 AG490 化合物各自导致与 DMSO 对照相比 SOX17 基因表达的增加, 与 1 期定形内胚层细胞培养物的基因表达谱一致 (图 4D)。然而, 酪氨酸磷酸化抑制剂 AG490 (AG) 和 SU6656 (SU) 各自导致与 DMSO 对照相比 FOXA2 (HNF3  $\beta$ ) 表达的降低, 表明这两种化合物对定形内胚层细胞的不利影响 (图 4C)。然而, 没有化合物显示出显著影响非定形内胚层标志物 (包括 SOX7、PAX6 或 ZIC1) 的表达 (图 4E、4F 和 4G), 并因此基于诱导向其他细胞类型的分化而没有被排除。BT0-1 (BT01; Cmpd. No. 16) 没有显示具有任何效果 (图 4A、4B、4C 和 4D) 并因此从后续分析中排除。这种化合物既不降低 OCT4 或 NANOG 的表达也不增加 FOXA2 (HNF3  $\beta$ ) 或 SOX17 的表达, 因此预期是多能干细胞选择性抑制剂 / 细胞毒性剂。

[0239] 候选抑制剂 / 细胞毒性剂在悬浮聚集培养物中的效果。细胞疗法的理想候选抑制剂将是在大规模制造工艺中 (例如, 可以在大生物反应器中繁殖的悬浮聚集培养物) 以及小规模细胞培养 (如 96 孔板或 6 孔板) 中与胰腺细胞谱系活力相容。因此, 其他筛选包括与商业规模工艺中条件类似的条件。如上所示, 因为 BT0-1 没有显示对 OCT4、NANOG、FOXA2 或 SOX17 的任何影响, 它没有包括在本实验中。筛选剩余的 4 种化合物, 氯化白屈菜赤碱 (Ch. C1; Cmpd. No. 25), 酪氨酸磷酸化抑制剂 AG490 (AG; Cmpd. No. 152), 去磷酸化抑制剂 (Deph; Cmpd. No. 48), 和 SU6656 (SU; Cmpd. No. 126) 对悬浮聚集类型培养物中多能干细胞生长的选择性抑制, 悬浮聚集类型培养物适于进行大规模制造工艺。简而言之, 人 ESC 在旋转培养中聚集并通过 1-4 期分化以制备基本上如下所述的胰腺内胚层, 提交于 2007 年 8 月 13 日的美国专利申请第 11/838, 054 号, 标题为“COMPOSITIONS AND METHODS USEFUL FOR CULTURING DIFFERENTIABLE CELLS”, 和提交于 2008 年 11 月 4 日的美国专利申请第 12/264, 760 号, 标题为“STEM CELL AGGREGATE SUSPENSION COMPOSITIONS AND METHODS OF DIFFERENTIATION THEREOF”, 通过引用将其整体并入本文。在上述分化期间在多个时间点从对照和化合物处理的细胞培养物收集 RNA 样品, 用于通过 Q-PCR 分析。图 5A-5M 显示了多能干细胞或 1-5 期中至少一个特有的标志物的表达。图 6A-6F 显示了通常在多能干细胞或 1-5 期中不表达的标志物的表达。每幅图包括 5 部分, QPCR 样品相对于第 0 天 (hESC) 标准化, 第 0 天是图 5A-5M 的每幅图最左边的“对照”部分; 对照部分右边的其他 4 部分对应于用于处理细胞的 4 种化合物 (从左到右分别为: 氯化白屈菜赤碱 (Ch. C1; Cmpd. No. 25); 酪氨酸磷酸化抑制剂 AG490 (AG490; Cmpd. No. 152), 去磷酸化抑制剂 (Deph; Cmpd. No. 48), 和 SU6656 (SU6656; Cmpd. No. 126))。对照包括未处理的细胞 (d0 和 d2) 和 DMSO 处理的细胞 (d3、d5、d7、d9 和 d11 (从左到右))。数据分析显示 4 种化合物中的 3 种, 即氯化白屈菜赤碱、去磷酸化抑制剂和 SU6656, 与对照相比增加 2、3 和 4 期 (分别为前肠、背侧前肠和胰腺内胚层) 的 PDX1 和 NKX6.1 基因表达。参见图 5H 和 5K, 最后 3 个柱。用酪氨酸磷酸化抑制剂 AG490 处理的培养物至少对于 PDX1 和 NKX6.1 具有降低的基因表达, 表明较差的胰腺内胚层分化。参见图 5H 和 5L。此外, 非胰腺内胚层细胞类型的标志物的分析 (图 6A-6F) 指示酪氨酸磷酸化抑制剂 AG490 和 SU6656 分别诱导 AFP 和 CDX2 的提高了的基因表达。参见图 6E 和 6F。

[0240] 上述筛选范例概述了鉴定化合物的方法, 所述化合物对未分化的 hESC 生长和增

殖显示出选择性细胞毒性和 / 或抑制未分化的 hESC 生长和增殖,而同时对分化的 hESC 和 / 或分化的细胞 (包括 1、2、3 和 4 期细胞,分别为定形内胚层、前肠内胚层、背侧前肠内胚层、胰腺祖细胞或胰腺内胚层)基本上没有或没有影响。

[0241] 实施例 2:完整的 LOPAC1290<sup>TM</sup>集合中选择性细胞毒性 / 抑制化合物的鉴定

[0242] 为扩大潜在候选 hESC 细胞毒性化合物和抑制化合物的数量,筛选了完整的 LOPAC1280<sup>TM</sup>集合 (包括 1,280 种化合物)。在初次筛选中,在 16 个标准 96 孔板中,在 DC-HAIF 确定成分培养基中的 1:200 稀释的低生长因子 MATRIGEL<sup>TM</sup> (每日提供)上,测试对未分化的 hESC (约  $3 \times 10^4$  个 BG01 细胞)的细胞毒性 (图 7A)。在接种后 1 天向 hESC 添加  $10 \mu\text{M}$  的每种化合物,再培养细胞 2 天。然后固定平板,并对碱性磷酸酶 (AP) 进行染色以鉴定 hESC 的增殖或生长的相对降低 (降低的 AP 染色),这指示低比例的 hESC。参见图 7A 中圈出的孔。

[0243] 此外,还筛选完整的 LOPAC1280<sup>TM</sup>集合对于来源于 hESC 的神经祖细胞 (NPC) 的效果。将神经祖细胞以  $6 \times 10^4$  个细胞 / 孔接种在无血清 Med11 条件培养基中,并每日提供营养。接种后 2 天,加入  $10 \mu\text{M}$  的每种化合物并再培养细胞 2 天。然后固定平板并用结晶紫染色,这是能够揭示相对增殖或生长活性的通用细胞染料。降低的结晶紫染色指示较低比例的 NPC。参见图 7B 中圈出的孔。分配化合物的 LOPAC1280<sup>TM</sup>板的左列和右列是空的并作为未处理的对照。鉴定那些表现出细胞毒性和 / 或生长抑制 (即,降低的 AP 或结晶紫染色)的 hESC 或 NPC 样品。参见图 7A 和 7B 中圈出的孔。初次筛选鉴定出 41 (41) 种对至少两种不同的细胞类型 (hESC 和 NPC) 表现出一些细胞毒性或抑制效果的不同化合物。参见下文的表 6,列出了在这次筛选中鉴定的每种候选化合物 (除了氯化白屈菜赤碱,其在表 5 中列出)的名称和活性种类。ChC1 未包括在随后的一轮筛选中。因此,仅进一步测试了 40 种化合物。

[0244] 使用 hESC 和 NPC,利用  $0.1-50 \mu\text{M}$  一系列不同浓度的表 6 中的 40 种化合物进行再次筛选 (二次筛选)。有效剂量 (ED) 定义为在二次筛选中引起细胞毒性的化合物的最低浓度。图 8 显示了用 AP 染色包含细胞的孔的结果。深色孔指示孔中正在增殖的或正在生长的多能干细胞的数量或百分比增加。此外,在 96 孔板阻抗分析 (上文所述) 中在正在分化的定形内胚层 (DE) 细胞培养物上筛选这 40 种化合物,以确定哪些化合物在对 hESC 或 NPC 的最低有效浓度下对定形内胚层细胞没有细胞毒性。对正在分化的 DE 培养物没有显示出细胞毒性的化合物被标注为“有活力的”,意指该化合物不影响分化的细胞的存活、生长、

[0245] 增殖或分化。参见表 6 中的“ACEA DE”列。二十 (20) 种化合物,包括之前关注的筛选中鉴定的两种 (2) 化合物 (参见实施例 1),对 hESC 有细胞毒性但同时不明显影响定形内胚层 (DE) 细胞的存活、生长、增殖或分化。

[0246] 表 6:40 种候选 LOPAC1280<sup>TM</sup>化合物的最低有效剂量

[0247]

Cat. No.	MW	名称	类型	ED hESC ( $\mu\text{M}$ )	ED NPC ( $\mu\text{M}$ )	ACEA DE
L 6668	648.20564	盐酸乐卡地平	钙通道	10	10	
A 9809	429.92885	盐酸胺茶吡啶	DNA 修复	1	0.1	
B 7651	280.36728	来自青霉菌的布雷菲德菌素 A	细胞骨架	<0.1	<0.1	
C 8221	284.31467	咖啡酸苯乙醇酯	细胞周期	<0.1	5	有活力的
C 3930	687.71276	氯化白屈菜赤碱	细胞内	5	5	有活力的
C 9510	110.11352	焦儿茶酚	细胞周期	5	5	有活力的
C 5982	256.69363	7-氯代-4-羟基-2-苯基-1,8-茶啉	腺苷	5	5	有活力的
C 7522	523.63474	卡西霉素	细胞内	1	<0.1	
D 3768	527.5861	地喹氯铵水合物	K <sup>+</sup> 通道	5	5	
D 0670	586.68277	二氢乌本	离子泵	1	<0.1	
D 2926	314.55496	二苯基氯化碘盐	一氧化氮	0.1	<0.1	
C-191	376.90842	辣椒平(Capsazepine)	类香草素	5	25	有活力的
D-122	425.92188	多潘立酮	多巴胺	25	0.1	有活力的
E 2375	553.57509	吐根素二盐酸盐水合物	细胞凋亡	<0.1	0.1	
A9605	488.4375	AC-93253 碘化物	激素	5	<0.1	
H 7779	391.55841	视黄酸对羟基苯胺	细胞周期	1	5	有活力的
U 6881	466.66969	U-73343	G-蛋白	10	5	有活力的
N 0287	564.5766	NNC 55-0396	Ca <sup>2+</sup> 通道	25	5	
I-146	510.29433	IB-MECA	腺苷	50	>50	
I 8898	875.11658	伊维菌素	胆碱能药	5	>50	有活力的
L 2037	242.27703	$\beta$ -拉帕醌	细胞凋亡	5	5	
M 6383	302.41727	2-甲氧基雌二醇	激素	10	1	
[0248]						
M 5441	568.56485	米贝拉地尔二盐酸盐	Ca <sup>2+</sup> 通道	25	25	
L-119	598.48582	L-703,606 草酸盐	速激肽	25	>50	
M 3184	437.36781	MG 624	胆碱能药	0.1	5	有活力的
N 5023	302.37364	来自 Larrea 的去甲二氢愈创木酸	白细胞三烯	5	5	有活力的
P 0547	592.69217	羧乙磺酸戊烷脒	谷氨酸盐	1	25	有活力的
P 4405	414.41584	鬼臼毒素	细胞骨架	<0.1	<0.1	有活力的
O 3125	584.66683	乌本苷	离子泵	<0.1	<0.1	
Q 3251	472.88999	二盐酸奎吡因	神经传递	10	25	有活力的
P 8293	562.67448	原叶啉 IX 二钠	环核苷酸	10	>50	有活力的
S 9692	371.46152	SU 6656	磷酸化	25	>50	有活力的
P 8765	164.29279	铵	一氧化氮	10	>50	有活力的
O 2139	417.63751	N-油酰多巴胺	神经传递	5	1	有活力的
S 7809	402.92509	SKF 96365	Ca <sup>2+</sup> 通道	25	5	有活力的
S-009	349.40249	PAPP	5-羟色胺	25	>50	
T 3434	294.31273	酪氨酸磷酸化抑制剂 AG 490	磷酸化	25	10	有活力的
S-201	557.09781	SB 224289 盐酸盐	5-羟色胺	25	50	
T 9652	471.68907	特非那丁	组胺	25	10	
V 1377	909.0741	长春碱硫酸盐	细胞骨架	<0.1	<0.1	

[0249] 然后使用悬浮聚集培养物中的分化的 hESC 筛选上述二十种候选化合物 (表 6: ACEA DE “有活力的”)。培养人 ESC (CyT49 细胞) 并悬浮分化至 1 期 (定形内胚层) 和 2 期 (前肠内胚层)。如上所述确定每种化合物的最低有效剂量并示于表 6, 将正在分化的细胞培养物在第 1 天 (d1) 至第 2 天 (d2) 暴露于该浓度的化合物。然后培养物进一步分化至 2 期结束 (约第 5 天, d5)。在 d2 和 d5 收集 RNA 样品用于通过 Q-PCR 分析标志物基因表

达。将用化合物处理的样品与未处理的对照的正在分化的样品相比，并相对于来自之前定量的定形内胚层分化的 d2 样品标准化。参见图 9 对照。数种化合物从进一步考虑中移除，因为处理的正在分化的聚集体恶化，没有活力或不能通过 Q-PCR 检测。数种其他化合物从进一步考虑中移除，因为他们显示出诱导脱靶分化（非内胚层谱系或非胰腺谱系）和增加的 PAX6 或 CDX2 表达（图 9G 和 9H）。

[0250] 为进一步确定上述化合物的影响（除了诱导脱靶分化的那些化合物），筛选三种化合物（氯化白屈菜赤碱（图 5 和 6）、咖啡酸和伊维菌素）对胰腺分化的后期（例如 2-5 期）的影响。与上文相似，人 ESC 在悬浮聚集培养物中首先分化至 1 期，然后至 2-5 期。基本上如上所述，用 DMSO、咖啡酸或伊维菌素处理 1 期培养物。在 d0 (hESC) 和 d1 (图 10, 左图) 收集未处理的对照样品，而在第 2、3、5、7、9、11 和 13 天收集处理的样品（分别为图 10 的 d2、d3、d5、d7、d9、d11、d13）。使用 Q-PCR 分析收集的样品中基因表达水平并与 d0 (hESC) 样品以及适当的胰腺内胚层（图 10, 右图）比较。适当的胰腺内胚层对照由通过流式细胞术确定的约 50% 胰腺内胚层细胞、约 46% 内分泌细胞和约 4% “其它” 细胞组成。咖啡酸和伊维菌素均不影响胰腺内胚层分化物的存活、生长和 / 或增殖。也就是说，选择的化合物抑制或阻止 hESC 生长和增殖或对 hESC 有细胞毒性，而同时不影响胰腺内胚层的活力。3 期、4 期和 5 期细胞的典型基因表达水平正常，例如观察到在 4 期胰腺内胚层（图 10H 和 10I）NKX6.1 和 PTF1A 表达增加，在 5 期内分泌祖细胞和内分泌细胞（图 10F 和 10G）NGN3 和 NKX2.2 表达增加。

[0251] 简而言之，从初次筛选和二次筛选（实施例 1）和对 LOPAC1280™ 集合的完全筛选鉴定的最终三种 (3) 候选物为氯化白屈菜赤碱、咖啡酸和伊维菌素。图 11 列出了这三种化合物的已知或推断的作用模式，以及它们的结构。使用实时阻抗分析确定各自对在贴壁培养物中生长的未分化的 hESC 的细胞毒性效果的 EC<sub>50</sub> 值。

[0252] 实施例 3：在分化的细胞群中针对多能干细胞的选择

[0253] 为了追踪细胞培养物（例如正在分化的或分化的细胞培养物群体）中未分化的多能干细胞的存在和 / 或消耗，开发测定以改善多能干细胞的检测以及因而的多能干细胞的消耗。尽管可以通过 Q-PCR 测量 mRNA 表达的变化，仅此方法不足以动态检测未分化的多能干细胞的已有低水平的降低。类似地，在 1 期（定形内胚层分化）仅对 OCT4 蛋白的免疫荧光检测（或免疫组织化学）是非确定的，因为在分化的过程中细胞似乎仍然表达低水平的或有时中等水平的这种蛋白，例如正在转变为定形内胚层细胞的 hES 细胞可以对 OCT4<sup>+</sup>/SOX17<sup>+</sup> 是共阳性的。

[0254] 如之前所述，人 ES 细胞悬浮聚集体在旋转培养中形成并分化至 1 期（定形内胚层）。然后将约 20-30 个聚集体接种在 4 孔组织培养盘的每个孔中，并在 hESC 培养基 (DMEM/F12、10%XF-KSR、10ng/mL 激活素 A 和 10ng/mL 调蛋白) 中培养 24 小时，所述组织培养盘用 1:200 稀释的 MATRIGEL™ 涂布。这种方法意图增加未分化的 hESC 和定向分化的细胞之间的 OCT4 表达的对比度。在调蛋白 -ERBB2/3 和胰岛素 - 胰岛素 R/IGF1R 信号转导的存在下，未分化的 hESC 应当表现强列的 OCT4 基因表达，而定向分化的细胞应当表现 OCT4 基因表达的下调。换句话说，hESC 培养基中混合群体细胞培养物将可能支持残余的未分化的 (hESC) 的扩增 / 增殖，从而显示与定向分化的细胞（其具有降低的 OCT4 基因表达）相比的增加的 OCT4 基因表达。接种的聚集体接受对于 OCT4 蛋白的免疫染色并用 DAPI（细胞核染料）复

染色(图12)。接种的细胞聚集体在24小时周期内平铺并分散,而聚集体的中心仍成圆顶。圆顶是可见的,表明它们在仅20-40微米高的级别上。亮染色的OCT4-阳性细胞容易被鉴定并与多数OCT4-阴性细胞可区分。通常发现OCT4-阳性细胞位于集簇中,并最经常位于接种的聚集体的圆顶区域。通常,在最小的接种的聚集体中仅观察到单个OCT4-阳性簇,而较大的聚集体具有2个或更多个集簇。参见,图12A和12B与图12C-E比较。DAPI染色的细胞培养物的分析表明较大的聚集体由较小的聚集体组成,因为当鉴定到多个OCT4-阳性簇时,每个都显示出与较大的聚集体中不同的较小的聚集体或亚区域相关。较小的聚集体位于较大的聚集体中可能是旋转培养或聚集过程的最初阶段的结果,在这个阶段最初形成小集簇(初级聚集体)。两个或更多个初级聚集体的聚集可能导致直径为100-150  $\mu\text{m}$ 的较大的二级聚集体的形成。因此,OCT4-阳性细胞的任何单个集簇存在于初级聚集体的中心,并阻止分化是可能的。这类集簇将保持基本上未分化的并且OCT4-阳性染色。一个假设是相对于初级聚集体在初级或二级聚集体中的定位,初级聚集体被指定分化。例如,图12A至12E显示了代表性的一系列图像,从小(初级)(例如图12A和12B)到较大(二级)(例如图12C-12E)的接种的聚集体包含OCT4-阳性簇(黑圈)的涂板的聚集体。因此,可能的是,改变聚集的方法和/或动力学能提高总的分化效率,还对这些显著抵抗分化或没有分化的细胞有影响。

[0255] 使用本文所述的接种测定检测在1期分化期间OCT-4阳性细胞的消耗。从第1天至第2天,用实施例2所述的候选化合物(氯化白屈菜赤碱、咖啡酸和伊维菌素),以其针对hES细胞的 $EC_{50}$ 浓度,处理hES细胞的1期分化。接种的未处理的和DMSO处理的聚集体难以区分,并均包含OCT4-阳性细胞的不连续集簇。对于DMSO处理的实例,参见图13A上图和下图。用DMSO处理的正在分化的聚集细胞培养物(对照)的OCT4-阳性染色的密度等同于未分化的hES细胞。然而,用1.4  $\mu\text{M}$ 氯化白屈菜赤碱(图13B),0.17  $\mu\text{M}$ 伊维菌素(图13C),或0.1  $\mu\text{M}$ 咖啡酸(图13E)处理的聚集细胞培养物表现显著降低的OCT4染色密度。可观察到OCT4-阳性的细胞簇,但与未处理对照或DMSO对照相比处于显著较低的水平。此外,在另一项研究中,用0.1  $\mu\text{M}$ 咖啡酸处理导致在hESC培养基中接种24小时后存在的OCT4-阳性簇的大小的更显著的降低。参见图14。

[0256] 在染色前24小时或72小时,使用较高浓度的化合物和在hESC培养基的细胞培养物接种的聚集体中具有延长效果的化合物进行其他实验。延长在hESC培养基中培养的时间支持DMSO处理的聚集体的OCT4-阳性簇的大小的普遍扩大,这强有力地表明细胞可以增殖以产生不会定向分化的其它未分化的细胞。另一组1期正在分化的培养物平行处理,但用10  $\mu\text{M}$ 氯化白屈菜赤碱处理。氯化白屈菜赤碱导致接种24小时后基本上较少的OCT4-阳性细胞的数量。经过约72小时,OCT4-阳性细胞显示出已经增殖,但显著低于在对照培养物观察到的OCT4-阳性细胞的程度。类似地,在用5或10  $\mu\text{M}$ 咖啡酸处理的细胞悬浮聚集体中(图16),在第24小时,OCT-阳性细胞集簇在尺寸上比DMSO处理的(或未处理的)对照集簇小,并且在第72小时,与DMSO处理的对照相比基本上不扩大。参见图16。

[0257] 这些数据表明,如果维持并暴露于hESC培养基,未分化的多能细胞可以持续直到2天的1期分化的终末,并如通过OCT4蛋白表达的存在所指示的,能够增殖和维持它们的未分化或多能状态。与未处理的或DMSO对照相比,用候选选择性细胞毒性化合物(至少包括氯化白屈菜赤碱和咖啡酸)的处理降低了OCT4-阳性细胞的比例(或数量),以及降低长期

培养中 OCT4 阳性细胞的持久性。因此,使用选择性多能细胞毒性化合物可以有效降低未分化的细胞或多能细胞的水平,并如果用于细胞疗法植入,可能最终降低体内畸胎瘤的频率。此外,未分化的细胞或多能细胞水平的降低可进一步降低基于细胞的疗法(例如用于治疗 I 型和 II 型糖尿病的疗法)中不期望的脱靶(非内胚层)谱系的可能的过度增殖。

[0258] 实施例 4:其它选择性细胞毒性化合物/抑制化合物的鉴定

[0259] 还意欲鉴定对脱靶或非内胚层细胞类型具有选择性细胞毒性或抑制作用的化合物,以及用于 hESC 至其他细胞类型的分化中的化合物。筛选 hESC 细胞毒性化合物和抑制化合物和/或其它候选细胞毒性化合物和抑制化合物(例如化合物库)的选择性抑制活性或细胞毒活性。在初次筛选中,在 hESC、内胚层谱系细胞(即,非胰腺或胰腺内胚层谱系细胞)、外胚层谱系细胞或中胚层谱系细胞上测试细胞毒性。标准 96 孔板的约  $3 \times 10^4$  个细胞/孔生长于合适的培养基中并每日提供营养。接种后一天向细胞添加  $10 \mu\text{M}$  的每种候选化合物,将细胞再培养 1-2 天至约 2 周。

[0260] 然后固定平板并用结晶紫染色,或另一能够揭示相对增殖或生长活性的通用细胞染料。对包含 hESC 的平板进行碱性磷酸酶染色。减少的染色指示用候选化合物处理的样品中细胞的数量或比例较低。鉴定显示细胞毒性和/或生长抑制的样品。初次筛选鉴定对所分析的细胞类型表现一些细胞毒性或抑制效果的化合物。

[0261] 利用  $0.1-50 \mu\text{M}$  的一系列不同浓度,针对选自 hESC,和非靶标内胚层谱系细胞、外胚层谱系细胞或中胚层谱系细胞的两种或更多种细胞类型再次筛选(二次筛选)在对初次筛选中鉴定的化合物。有效浓度(ED)确定为在二次筛选期间化合物引起细胞毒性的最低浓度。然后将来自二次筛选的化合物在靶正在分化的细胞培养物如定形内胚层(DE)上进行筛选。在某些实验中,使用 96 孔板阻抗分析(上文所述)以确定来自二次筛选的哪些候选化合物在最低有效浓度下对靶正在分化的细胞(target differentiating cell)(例如定形内胚层)没有细胞毒性。对靶正在分化的细胞没有显示出细胞毒性的化合物被标注为“有活力的”,意指该化合物不影响靶分化的细胞的存活、生长、增殖或分化。

[0262] 然后,使用悬浮聚集培养物中分化的 hESC 筛选评为“有活力的”候选化合物。培养人 ESC 并悬浮分化至靶分化的细胞类型。从二次筛选(上文所述)中确定最低有效浓度,将在分化过程中沿靶谱系分化的细胞培养物暴露于此浓度的化合物不同时间。任选地,培养物沿分化过程进一步分化至终末。在处理和分化过程的不同时间点收集 RNA 样品,用于分析靶和脱靶分化特有的标志物的基因表达。用化合物处理的样品与未处理的对照的正在分化的样品相比,并用之前适当的靶分化的样品标准化。由于影响靶细胞类型的分化,或由于靶正在分化的细胞处理后恶化或变得没有活力,则从进一步考虑中移除化合物。由于其它化合物诱导脱靶分化,将它们从进一步考虑中移除。

[0263] 为进一步确定上述鉴定的化合物的效果,筛选选择的化合物对靶分化的后期的影响。人 ESC 首先在悬浮聚集培养物中分化至靶分化的早期至中期。在分化的早期至中期,基本上如上所述用 DMSO 或候选化合物处理培养物。在 d0(hESC)、d1 和在分化过程的间隔收集未处理的、DMSO 处理的和候选化合物处理的样品。分析收集的样品中靶和脱靶分化的标志物的基因表达水平,并与 d0(hESC) 样品以及适当的靶分化相比。在一些实验中,还通过流式细胞术、直接观察或免疫组织化学确定上述收集的样品中存在的细胞类型。当 hESC 或脱靶分化的比例或数量较小时,可以在分析之前在非分化条件下(例如,在 ES 细胞培养

基中) 扩增细胞样品。选择不影响靶分化物的存活、生长和 / 或增殖, 但阻止 hESC 和 / 或脱靶分化的细胞类型的生长和增殖或对其有细胞毒性的候选化合物, 用于进一步研究。

[0264] 因此, 本领域技术人员将易于了解, 在不背离本发明范围和精神的情况下, 可对本文公开的实施方案进行各种替换、修改、优化或组合。

[0265] 所附权利要求书和本公开通篇使用的短语“基本上由……组成”拟包括该短语后所列的任何要素, 且限于不干扰或有助于本公开中指出的有关所列要素的活性或作用的其它要素。因此, 短语“基本上由……组成”表示, 所列要素是必需的或强制的, 而其它要素是任选使用的, 并且这些要素视其是否影响所列要素的活性或作用而存在或不存在。

[0001]

## 序列表

- <110> 韦尔赛特公司  
 托马斯·斯库尔兹  
 艾伦·罗宾斯
- <120> 抑制人多能干细胞生长的试剂和方法  
 <130> 140-01000.WO  
 <160> 46  
 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列
- <220>  
 <223> 合成引物
- <400> 1  
 aagaggccat caagcagatc a 21
- <210> 2  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列
- <220>  
 <223> 合成引物
- <400> 2  
 caggaggcgc atccaca 17
- <210> 3  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列
- <220>  
 <223> CTGGCCCTGTACCECTCATCA
- <400> 3  
 ctggcctgta cccctcatca 20
- <210> 4  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列
- <220>  
 <223> CTTCCCGTCTTTGTCCAACAA
- <400> 4  
 cttcccgctt ttgtccaaca a 21
- <210> 5  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0002]

<220>		
<223>	AAGTCTACCAAAGCTCAGCGG	
<400>	5	
	aagtciacca aagctcagcg g	21
<210>	6	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	GTAGGCGCCGCTGC	
<400>	6	
	gtaggcgcccctgc	15
<210>	7	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	7	
	gctcctcctct ctctattctt ttgc	24
<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	8	
	ggttgaggcg tctctcttct t	21
<210>	9	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	9	
	gggagcggtg aagatgga	18
<210>	10	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	10	
	tcatgttct caocgaggag ta	22
<210>	11	

[0003]

<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	11	
	aagcatttac tttgtggetg gatt	24
<210>	12	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	12	
	tgatctggat ttctctctctg tgtct	25
<210>	13	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	13	
	egctccgctt agcagcat	18
<210>	14	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	14	
	gtgttgctctc tatecttccc at	22
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	15	
	gaugaaggaa gccgtccaga	20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	16	

[0004]

gacettcgag tgctgatecg	20
<210> 17	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 17	
ggcgcagcag aatccaga	18
<210> 18	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 18	
ccacgacttg cccagcat	18
<210> 19	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 19	
caccgctggc atgate	16
<210> 20	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 20	
acttcccag gaggttcga	19
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 21	
ggccttcagt actccctgca	20
<210> 22	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0005]

<220>		
<223>	合成引物	
<400>	22	
	gggacttgga gcttgagtc t	21
<210>	23	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	23	
	gaaggtaate atetgacate g	21
<210>	24	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	24	
	ggccataate aggtcget	19
<210>	25	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	25	
	ccccagactc cgtcagtttc	20
<210>	26	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	26	
	iccgtctggt tgggttcag	19
<210>	27	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	27	
	ccagaaagga tgcctcataa agg	23
<210>	28	

[0006]

<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 28	
tctggcggcgc cctagtta	18
<210> 29	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 29	
tgggctcgag aaggatgtg	19
<210> 30	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 30	
gcatagtcgc tgcctgatcg	20
<210> 31	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 31	
ccgagtcacg gatccaggta	20
<210> 32	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 32	
ctctgacgcc gagacttgg	19
<210> 33	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 33	

[0007]

ectcttgcaaa tgcggaaag	19
<210> 34	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 34	
egggaggaag gctctcaact	19
<210> 35	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 35	
gaggagaaag tggaggtctg gtt	23
<210> 36	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 36	
ctctgatgag gaccgettct g	21
<210> 37	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 37	
acagtgccct tcagccagac t	21
<210> 38	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 38	
acaactacit tttaacagcc ttctg	25
<210> 39	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0008]

<220>		
<223>	合成引物	
<400>	39	
	gagaaacca ctggagatga aca	23
<210>	40	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	40	
	ctcatggcaa agttcttcca gaa	23
<210>	41	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	41	
	atgcacogct acgacatgg	19
<210>	42	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	42	
	ctcatgtagc cctggagatt g	21
<210>	43	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	43	
	ctggctgtgg caaggcttc	20
<210>	44	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	44	
	cagccctcaa actcgaactt	20
<210>	45	

[0009]

---

<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	45	
	atcgaggagc gccacaac	18
<210>	46	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	46	
	tgetggatgg tgtectggt	19

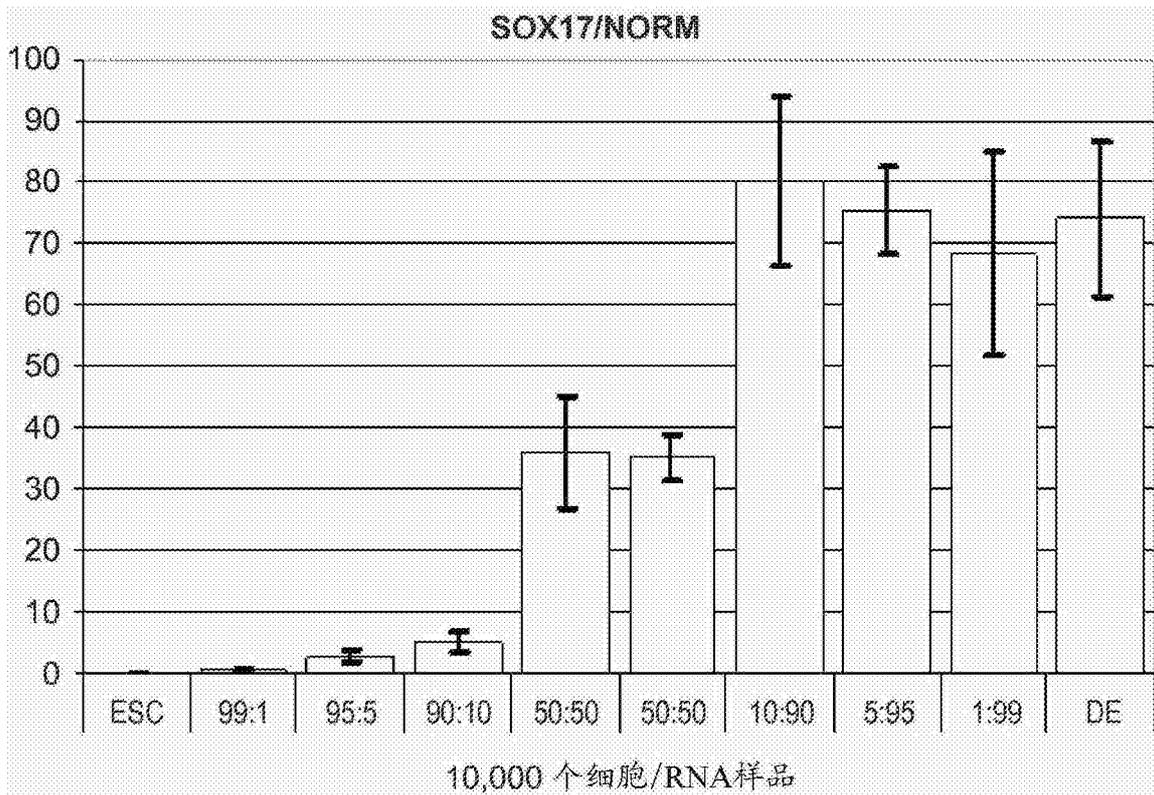


图 1A

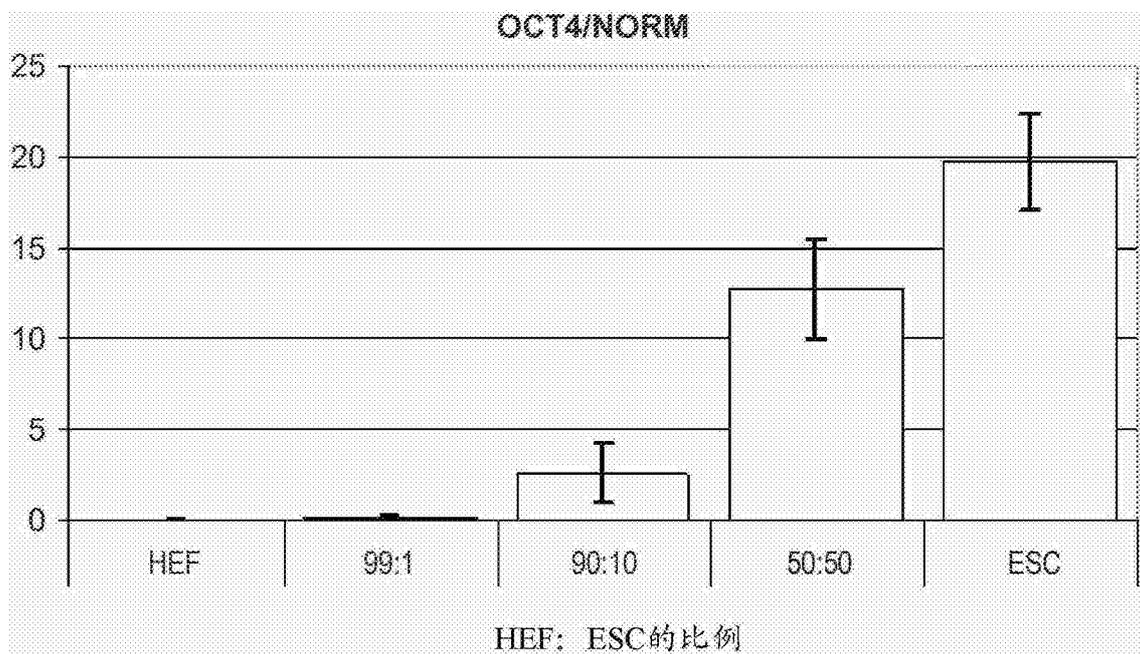


图 1B

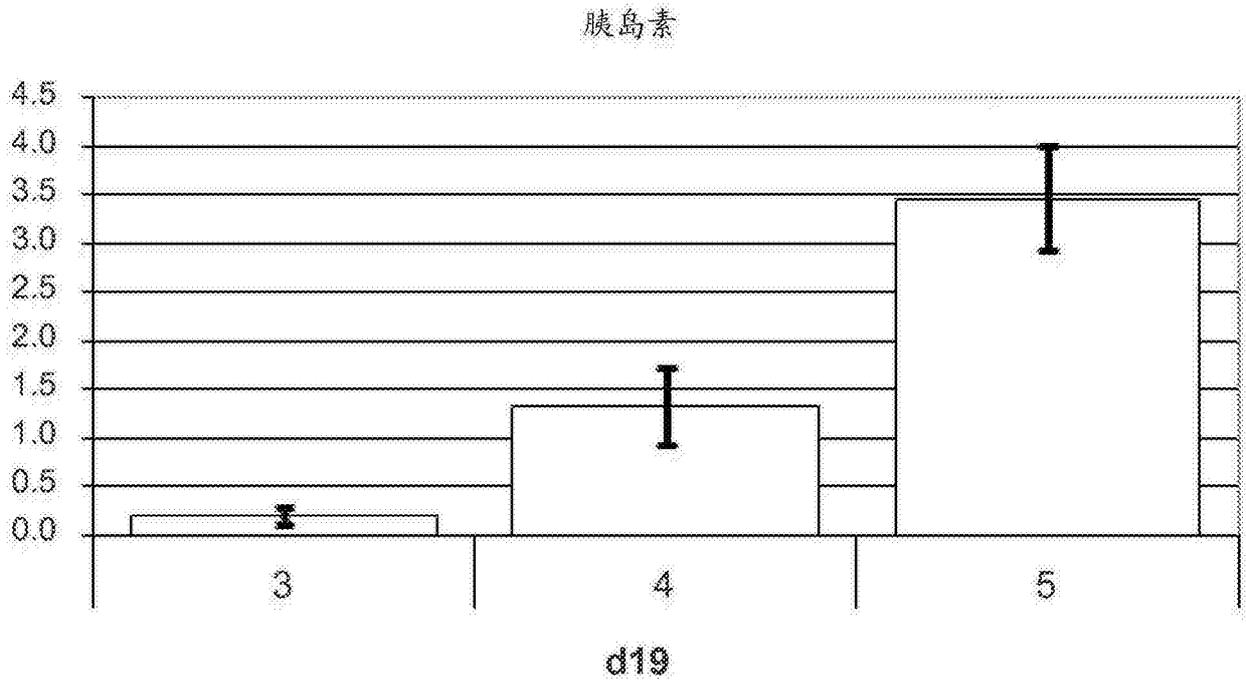


图 1C



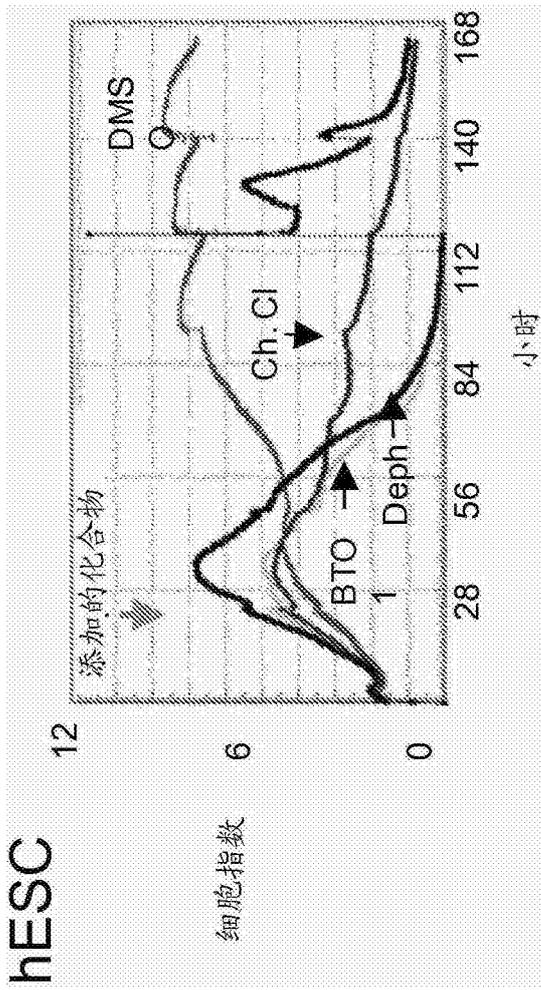


图 3A

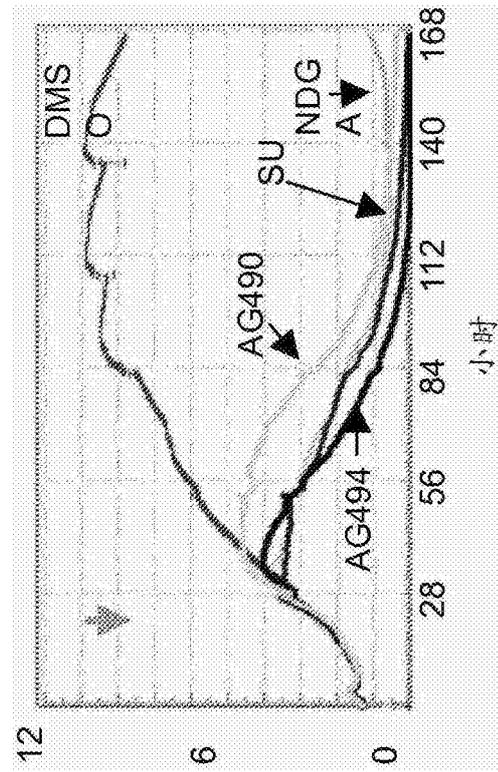


图 3B

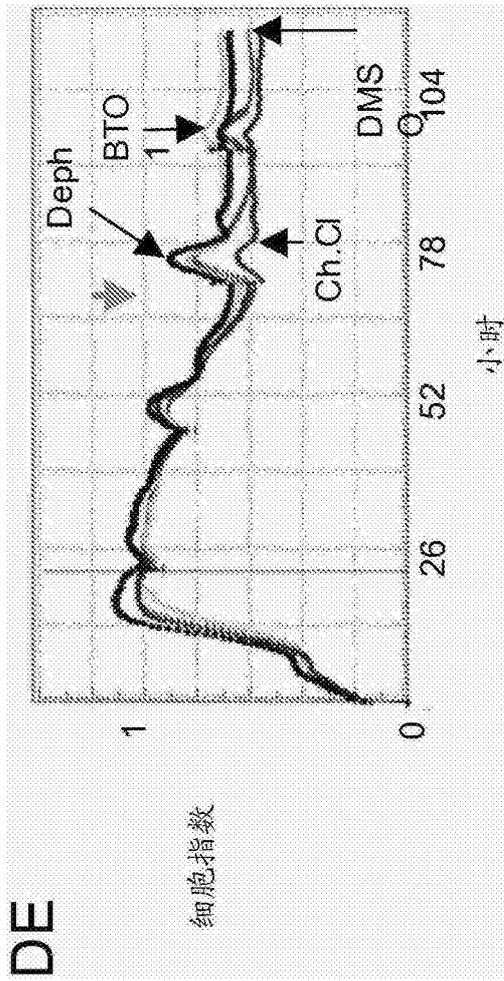


图 3C

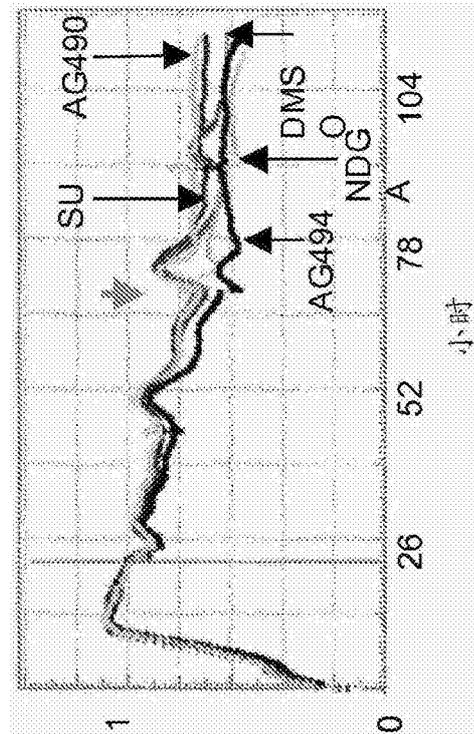


图 3D

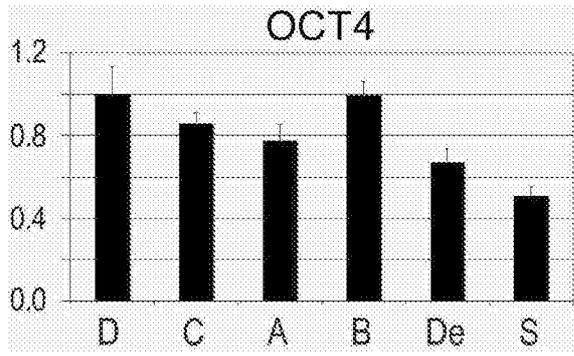


图 4A

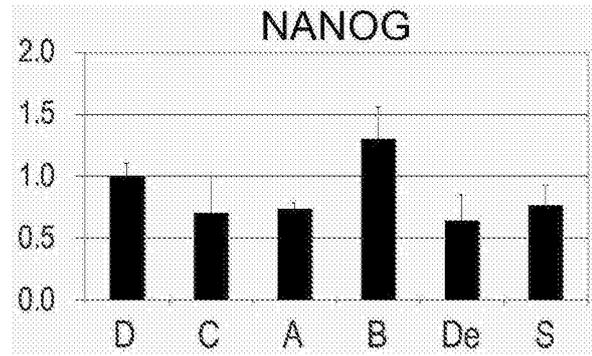


图 4B

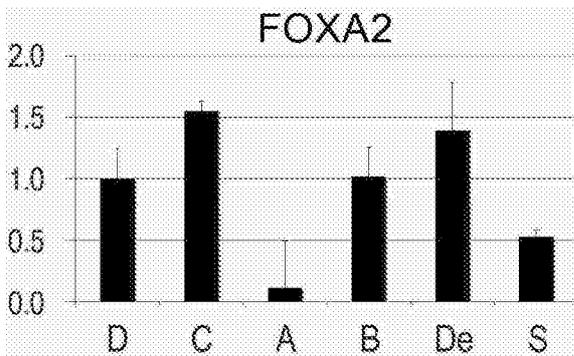


图 4C

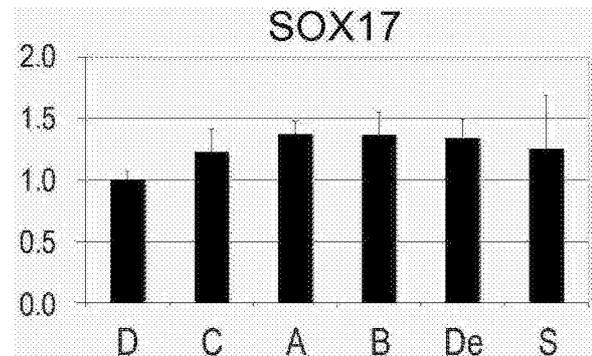


图 4D

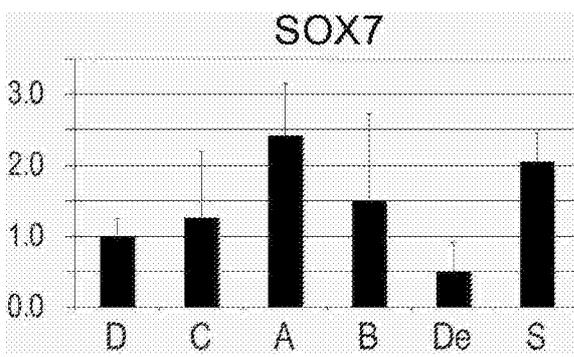


图 4E

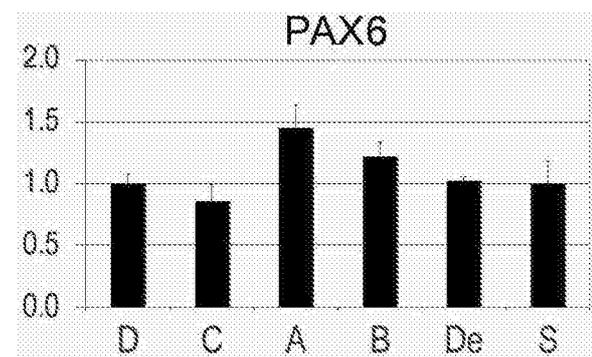


图 4F

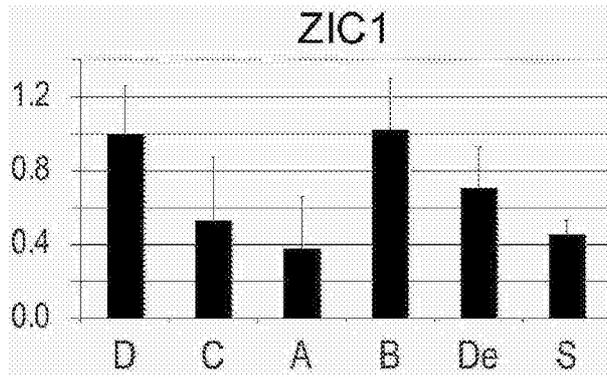


图 4G

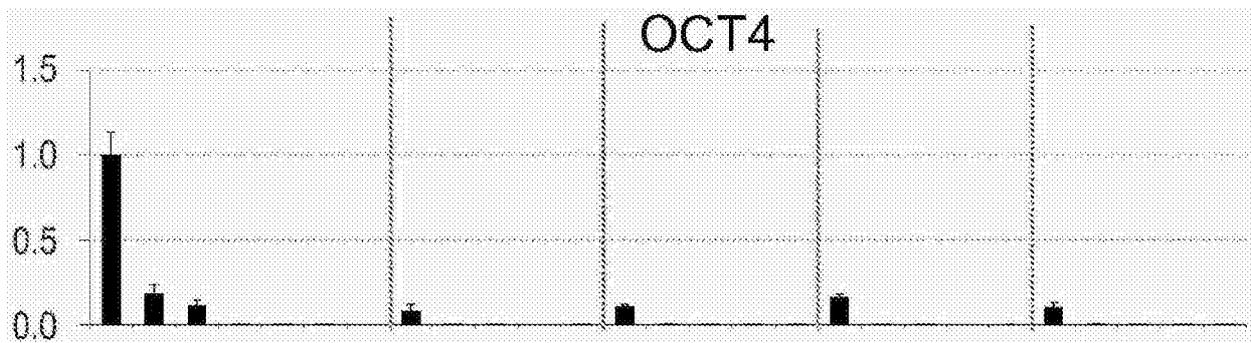


图 5A

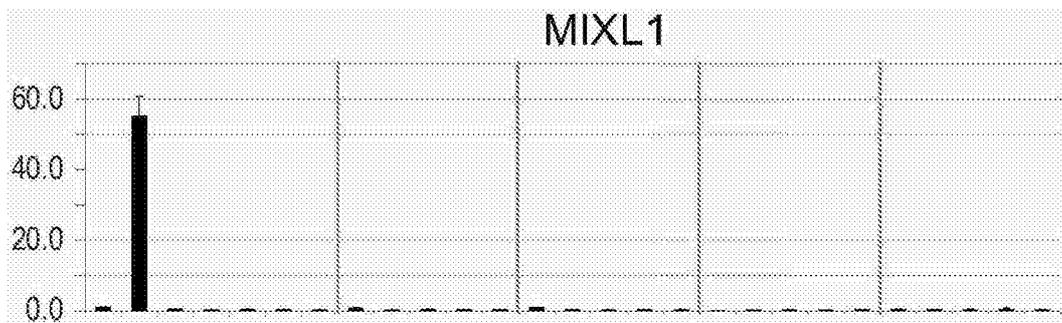


图 5B

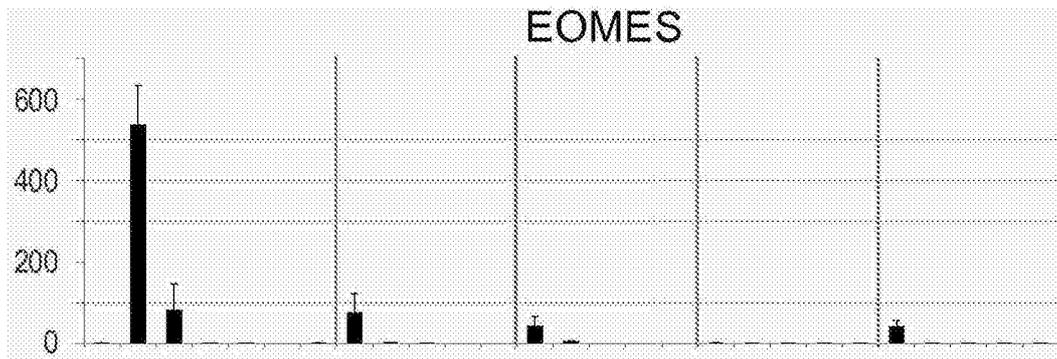


图 5C

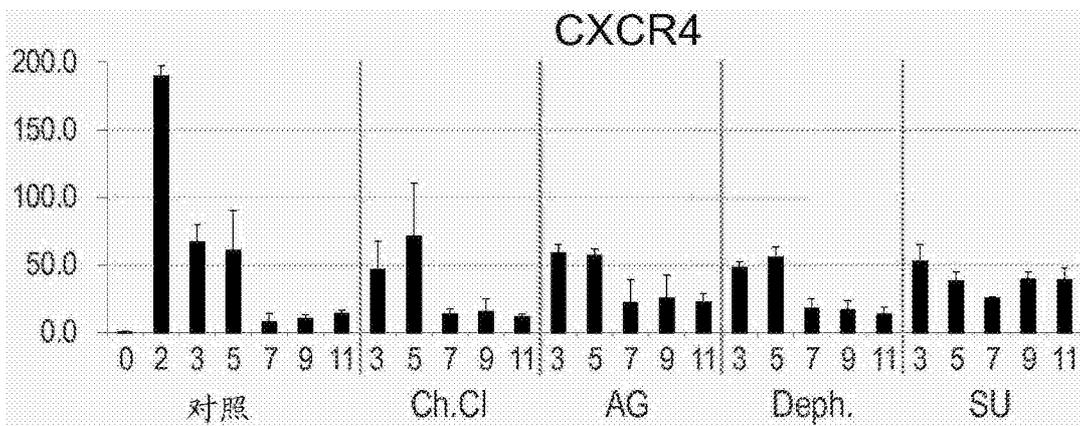


图 5D

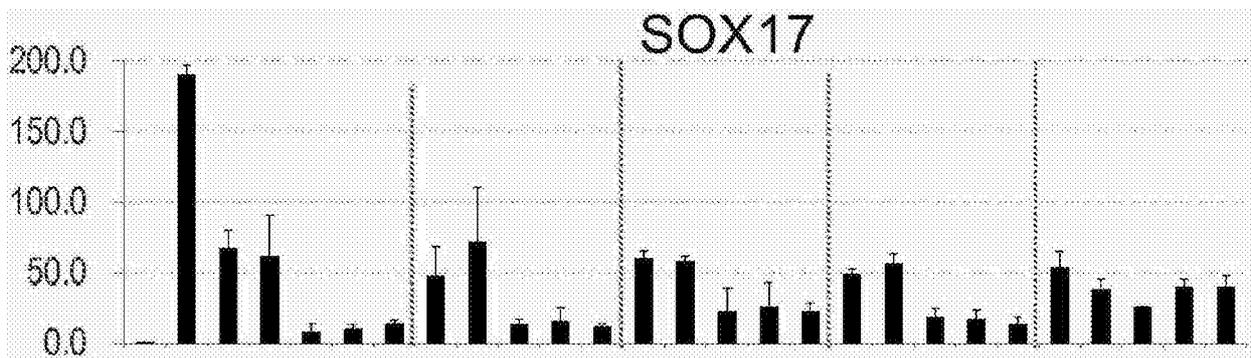


图 5E

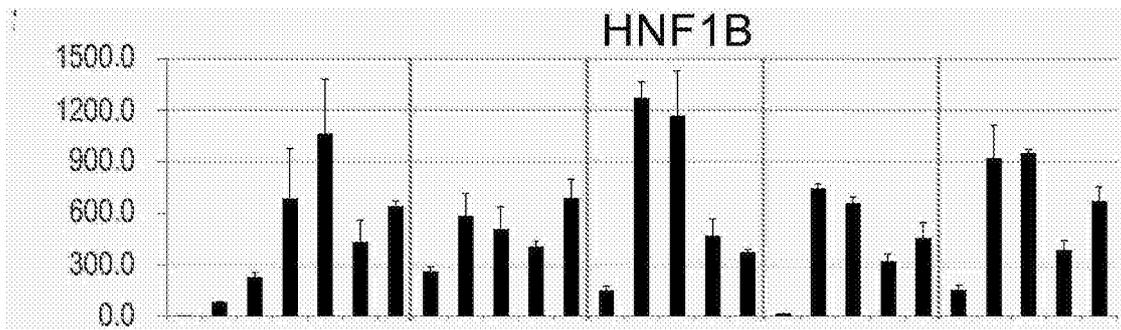


图 5F

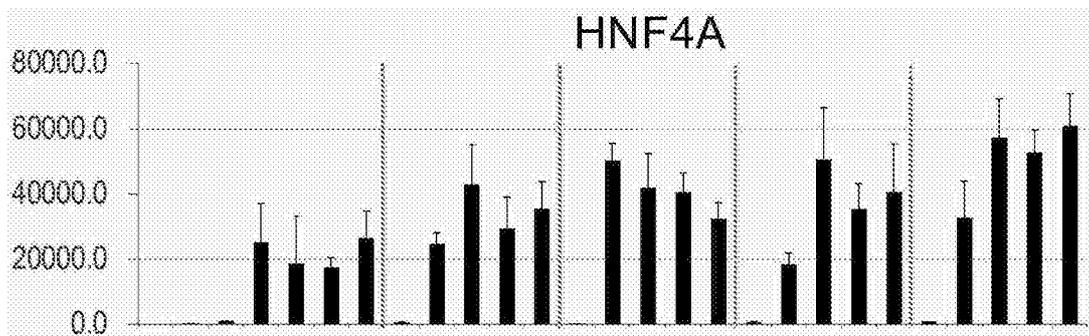


图 5G

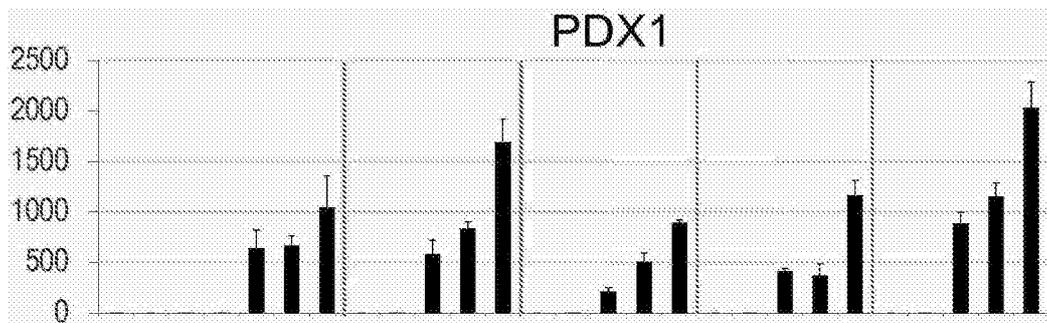


图 5H

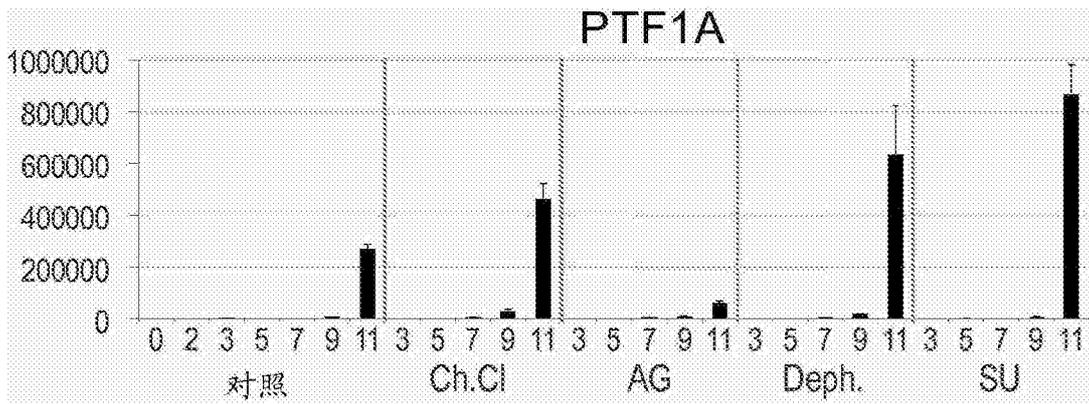


图 5I

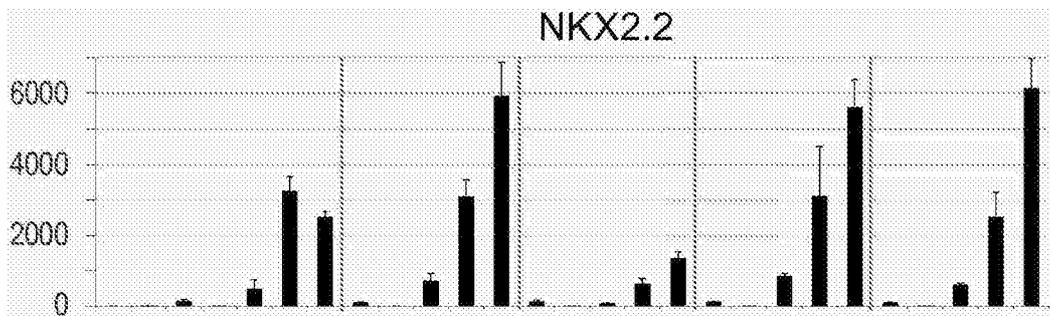


图 5J

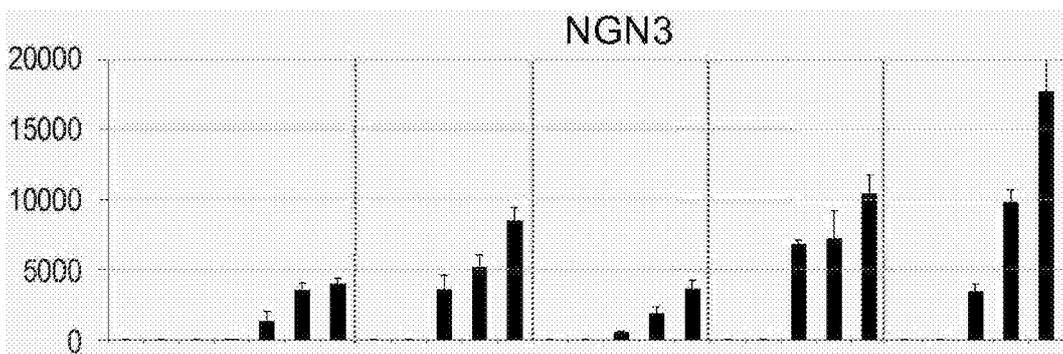


图 5K

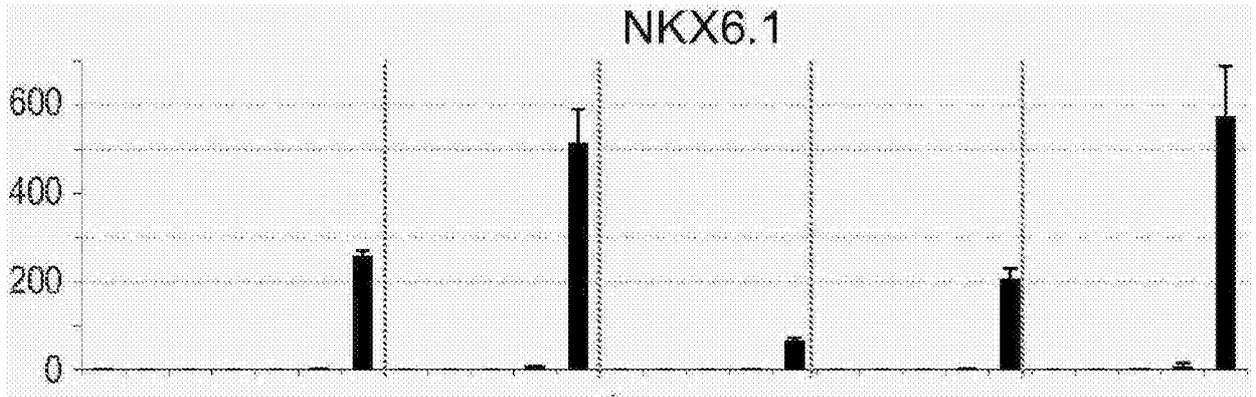


图 5L

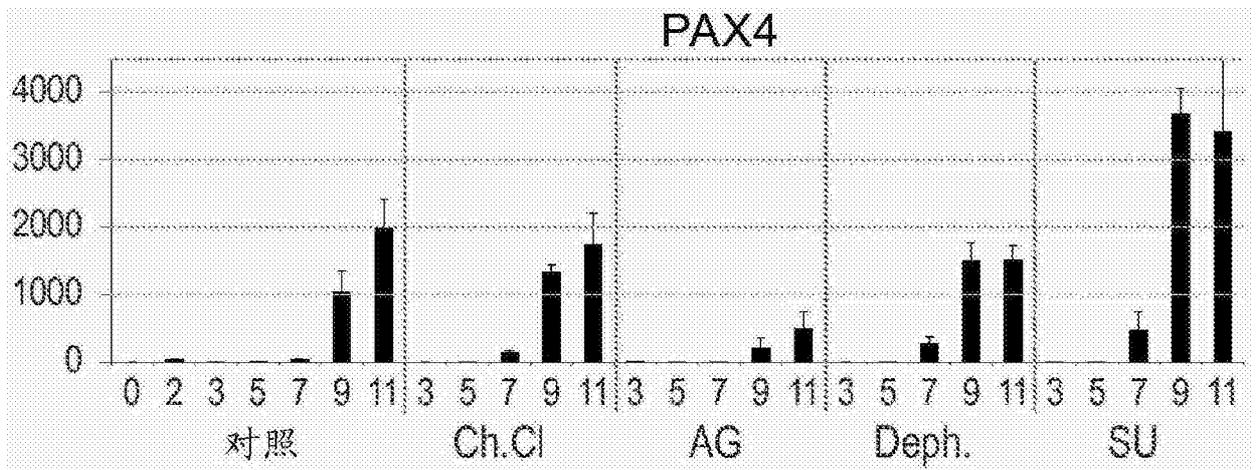


图 5M

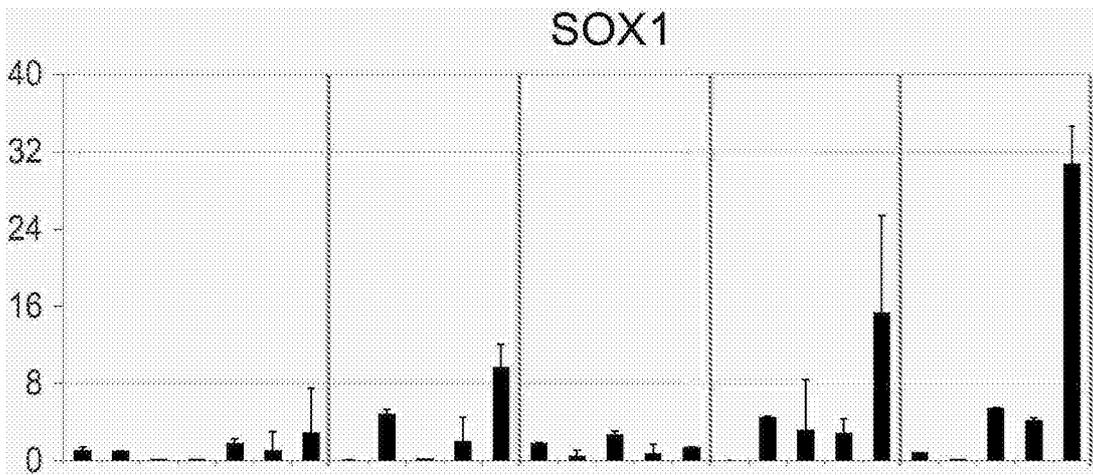


图 6A

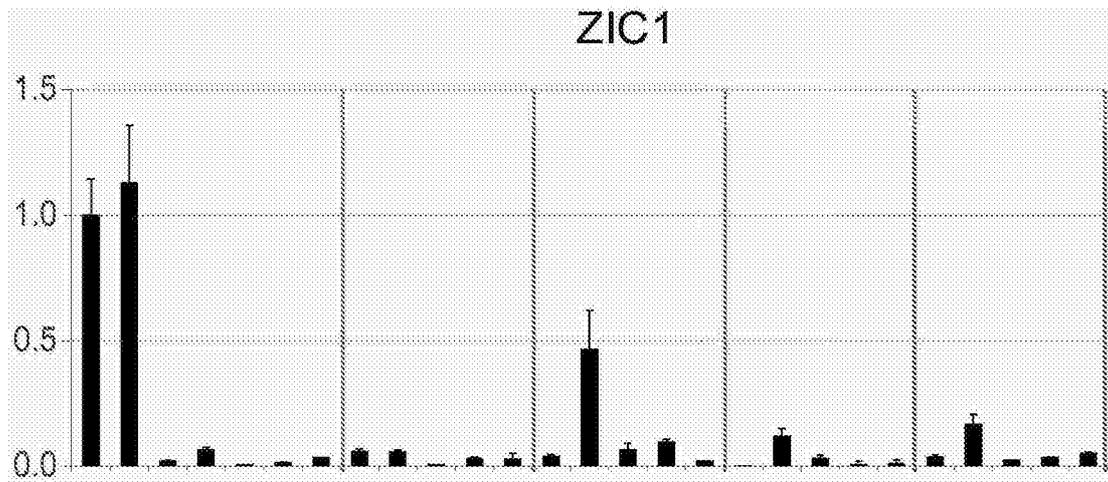


图 6B

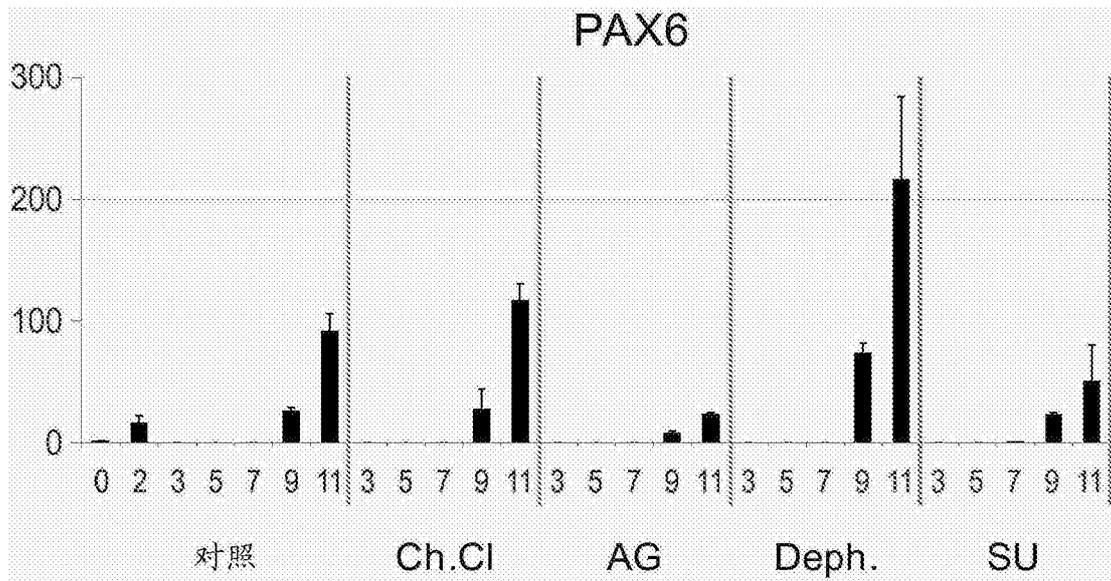


图 6C

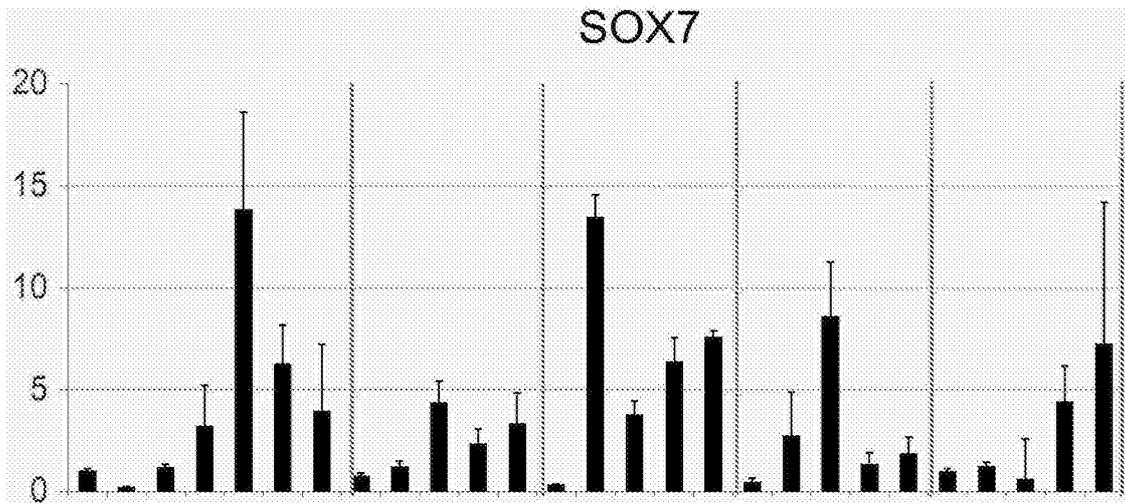


图 6D

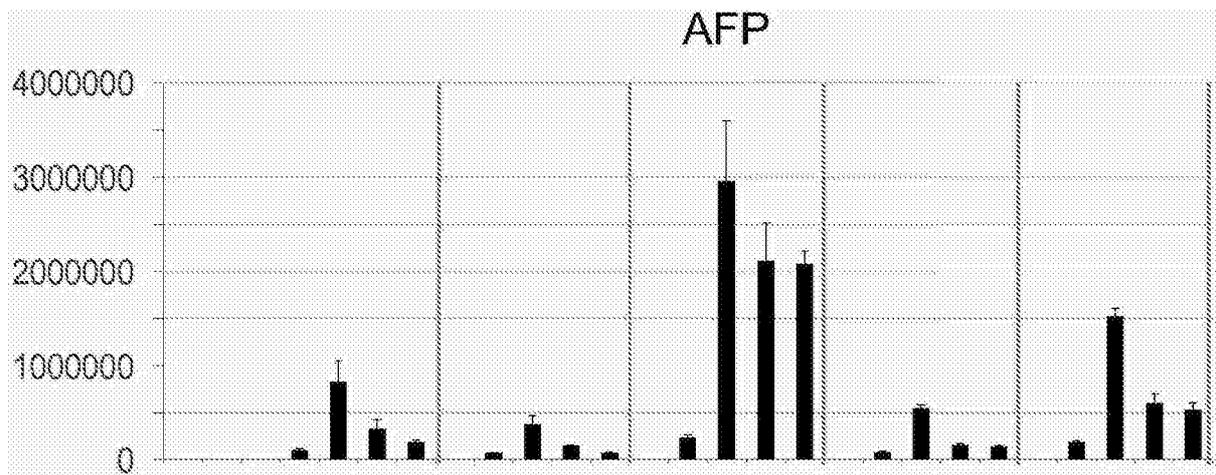


图 6E

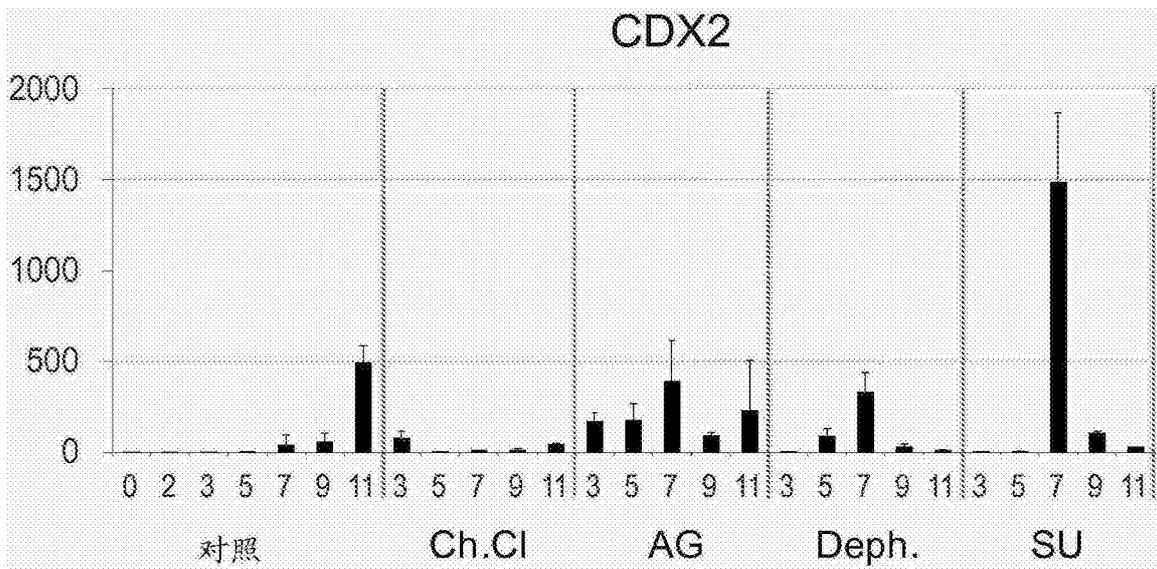


图 6F

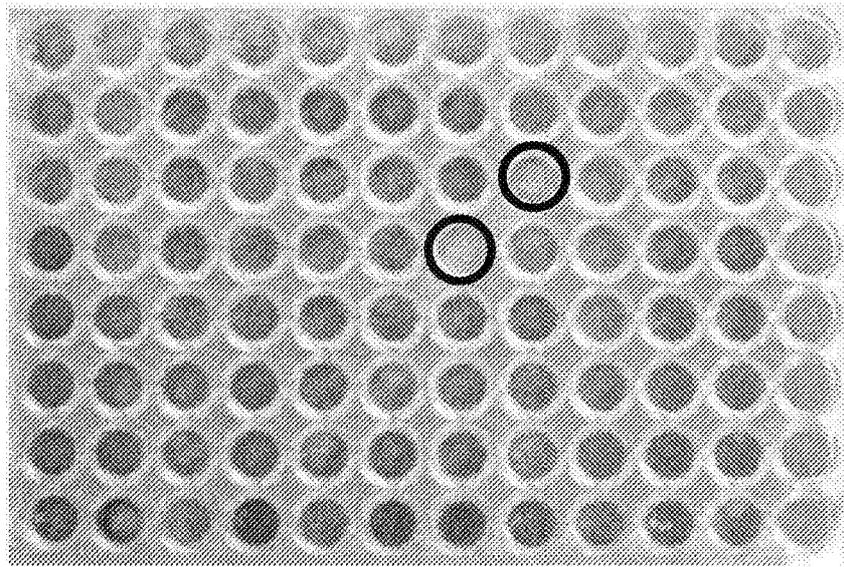


图 7A

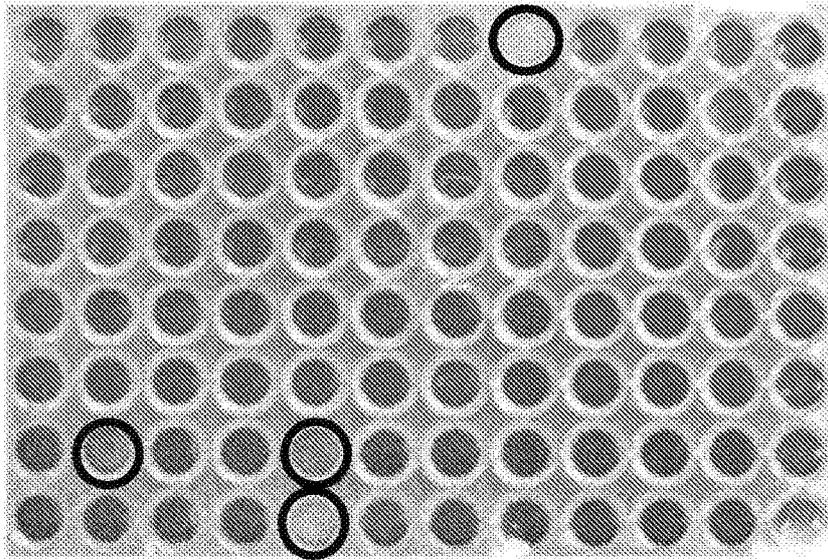


图 7B

50 20 10 5 1 0.1  $\mu\text{M}$

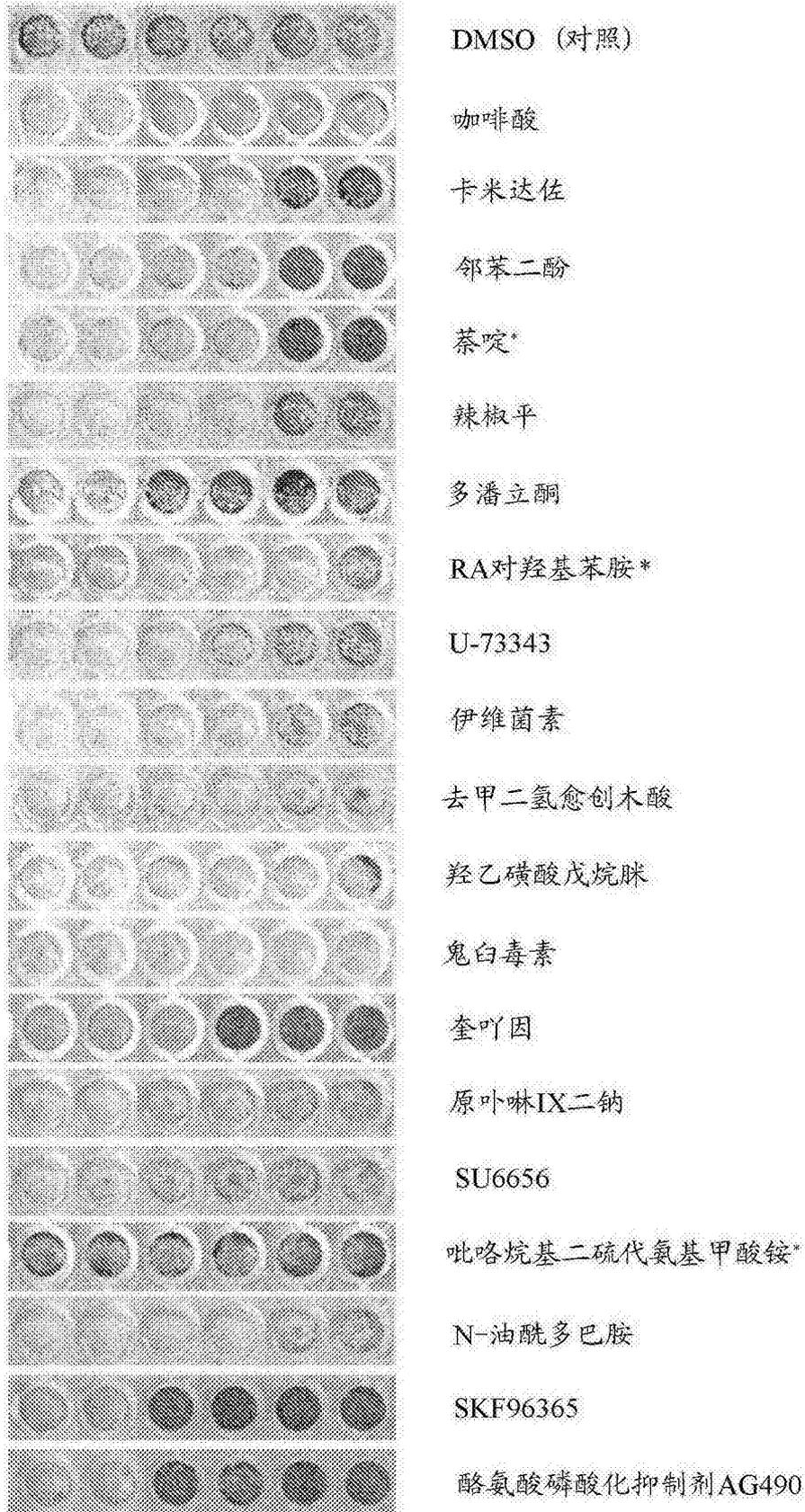


图 8

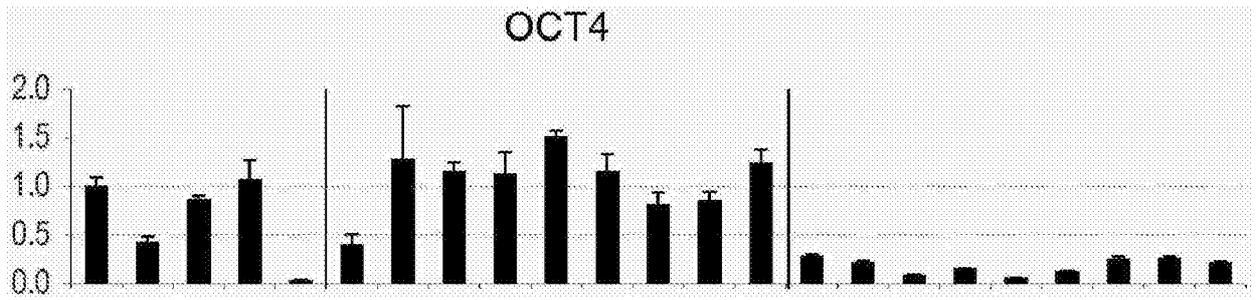


图 9A

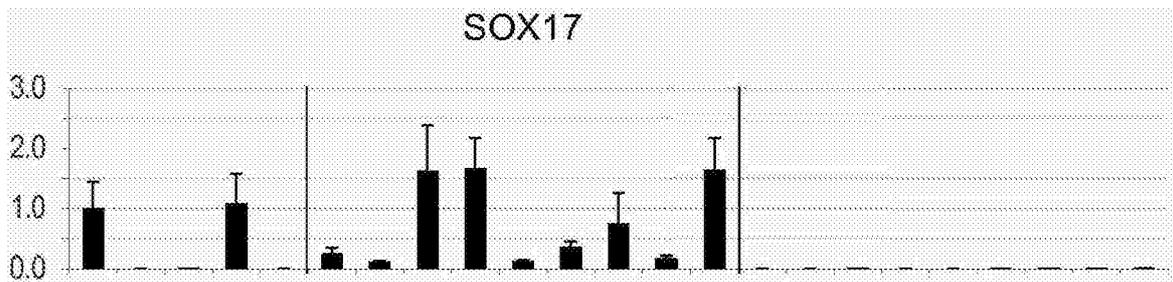


图 9B

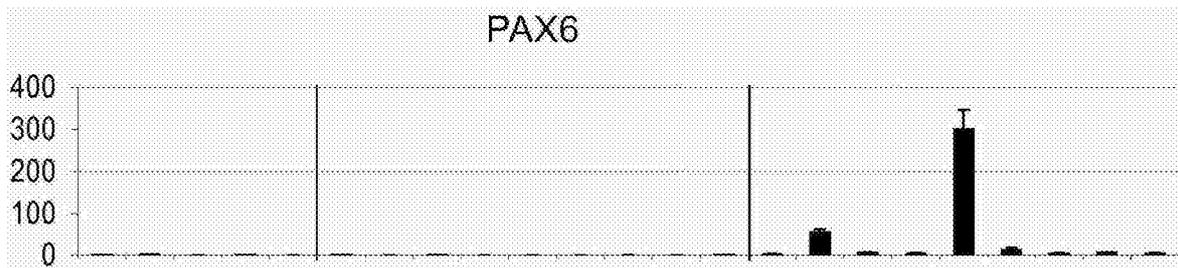


图 9C

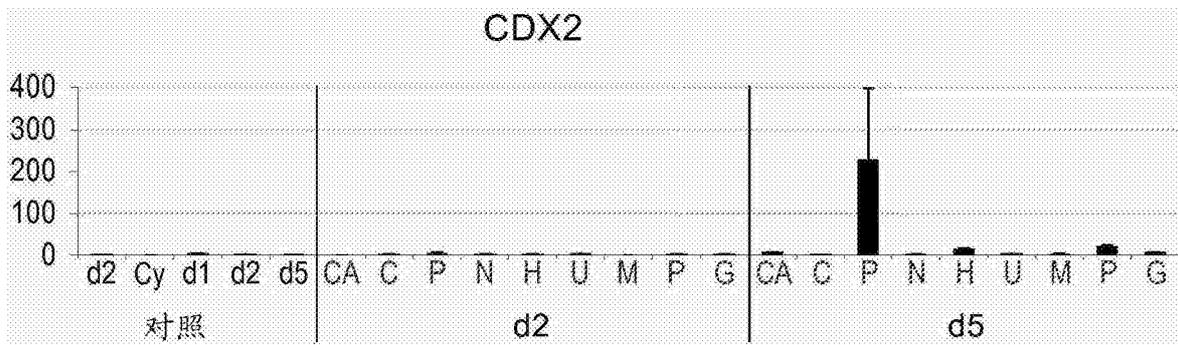


图 9D

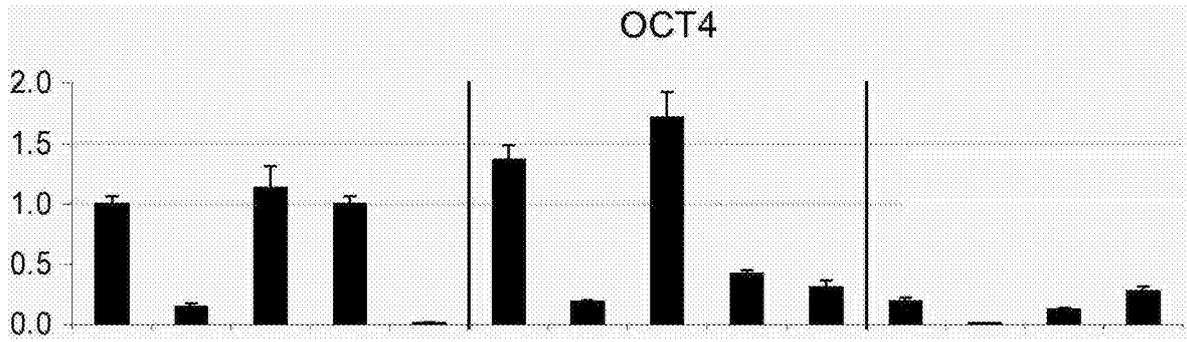


图 9E

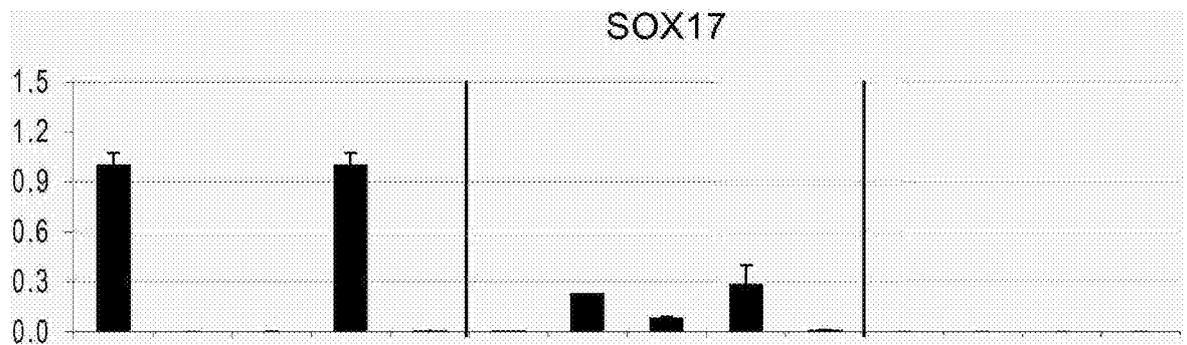


图 9F

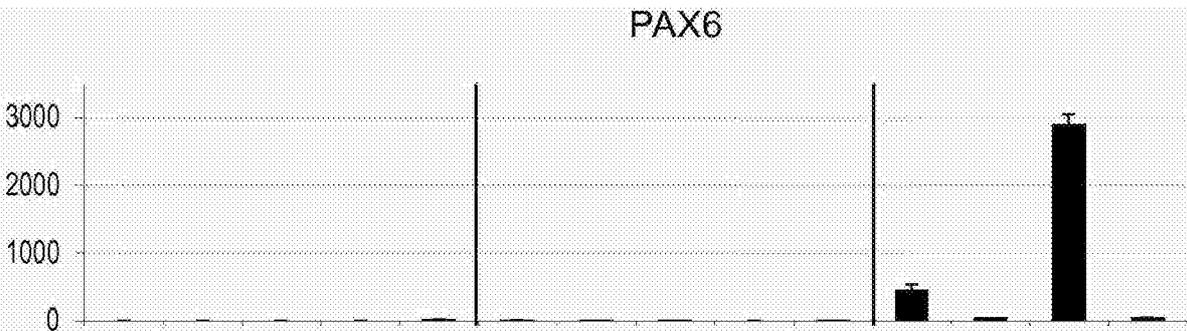


图 9G

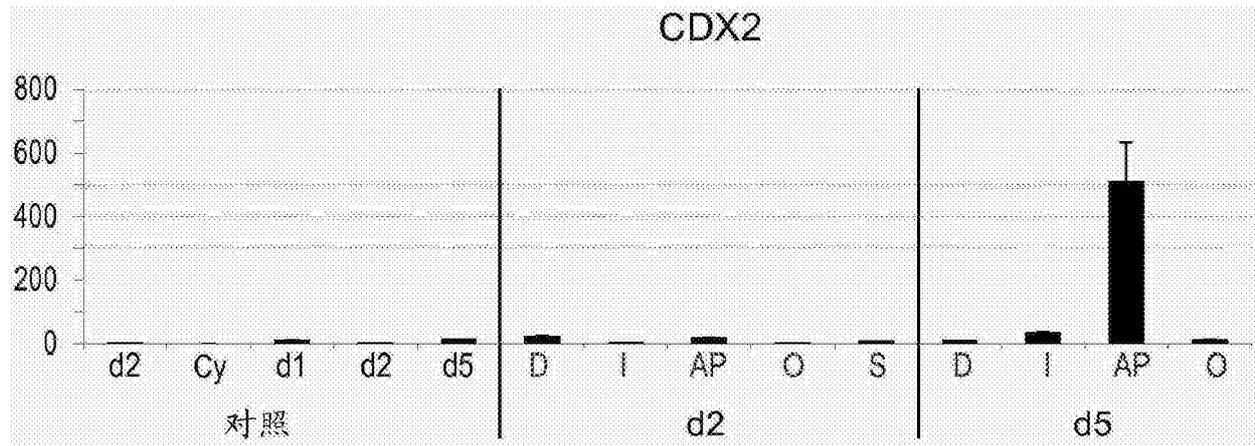


图 9H

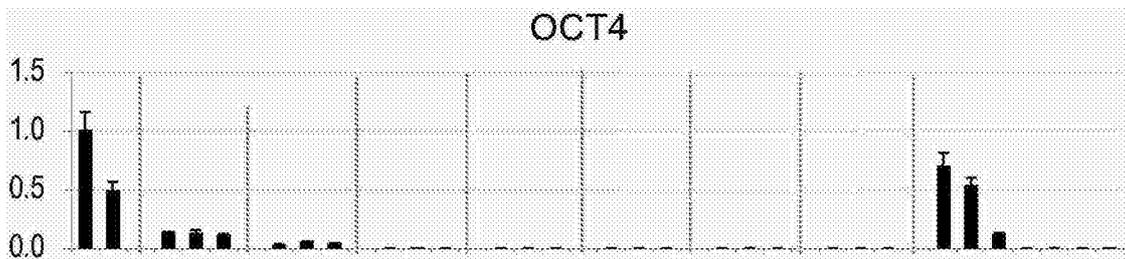


图 10A

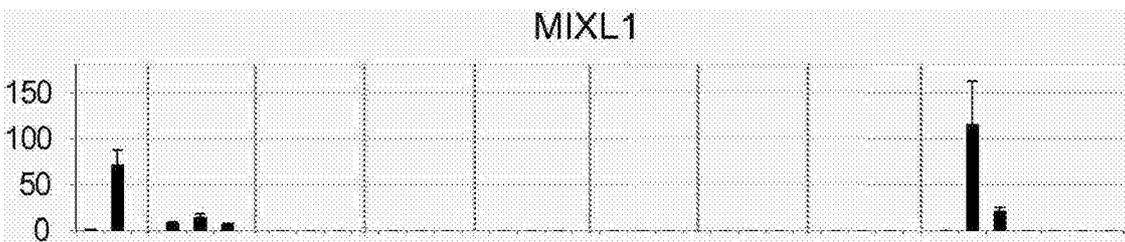


图 10B

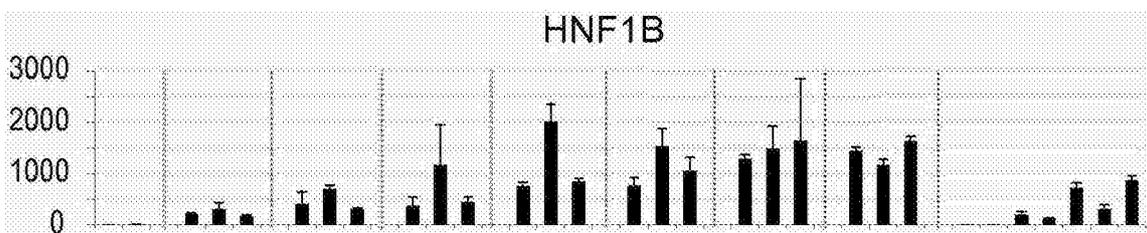


图 10C

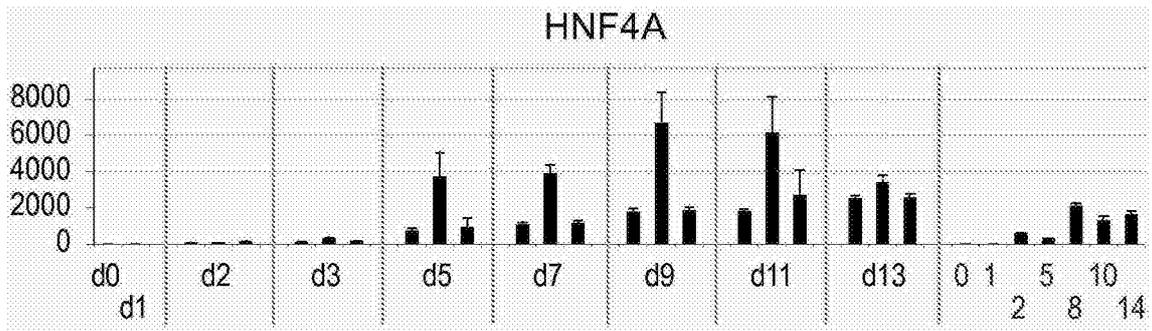


图 10D

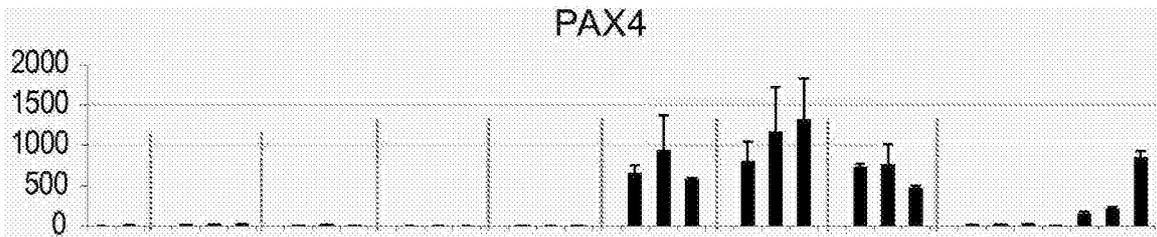


图 10E

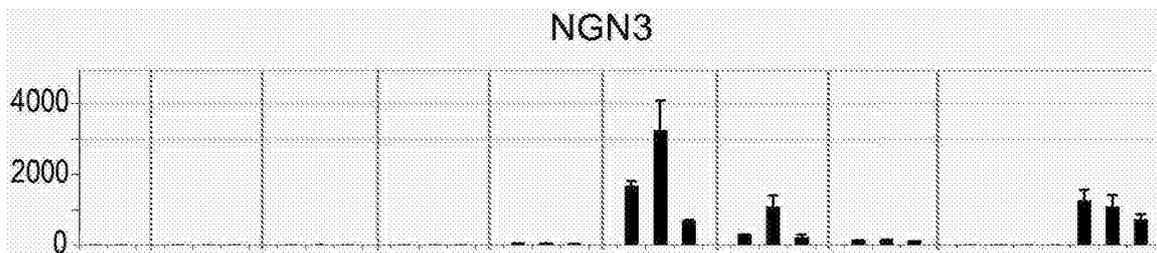


图 10F

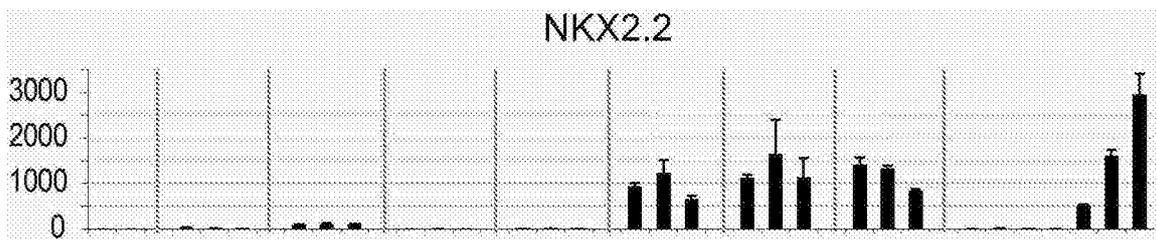


图 10G

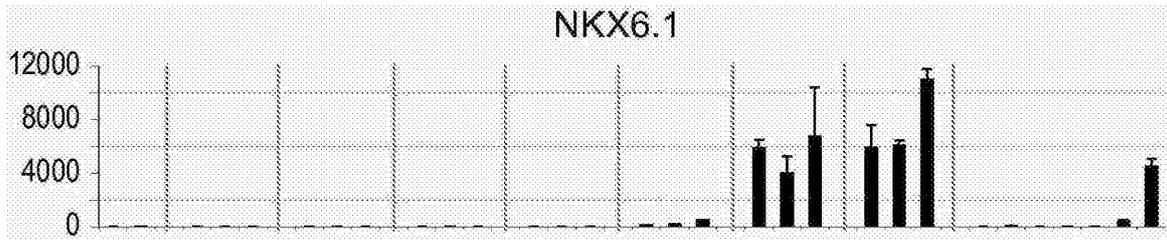


图 10H

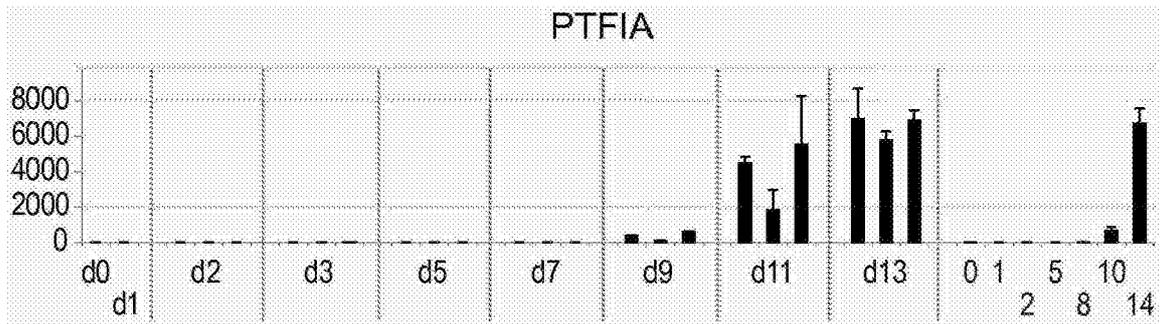


图 10I

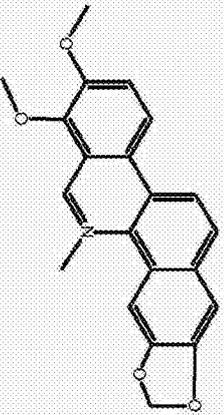
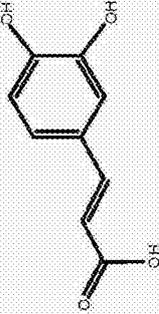
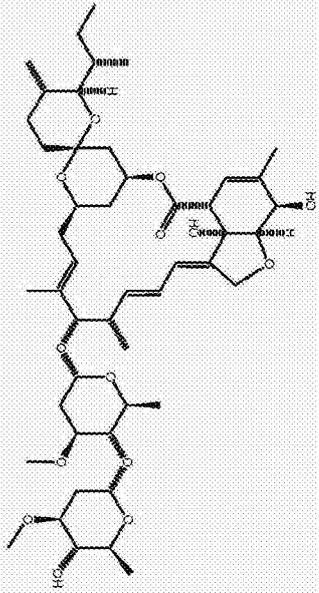
作用	EC50	EC50	结构
<ul style="list-style-type: none"> <li>氯化白屈菜赤碱</li> <li>PKC抑制剂</li> <li>MAPK激活剂</li> </ul>	1.2 $\mu\text{M}$	1.4 $\mu\text{M}$	
<ul style="list-style-type: none"> <li>咖啡酸</li> <li>抗氧化剂</li> </ul>	0.17 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{M}$	
<ul style="list-style-type: none"> <li>伊维菌素</li> <li>谷氨酸门控氯离子通道激活剂</li> </ul>	0.15 $\mu\text{M}$	0.17 $\mu\text{M}$	

图 11

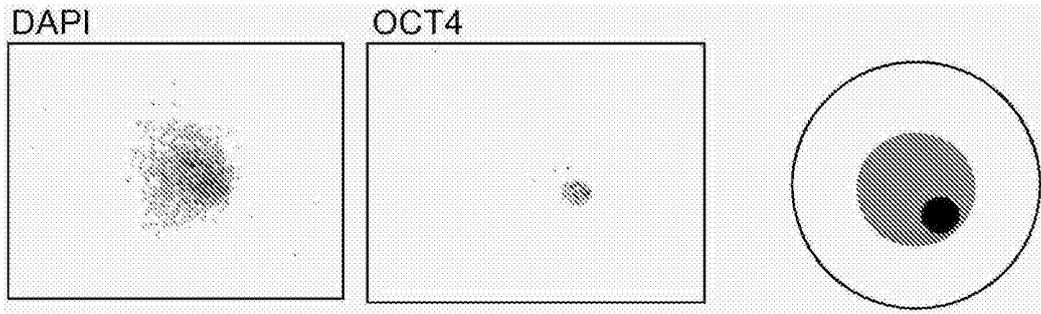


图 12A



图 12B

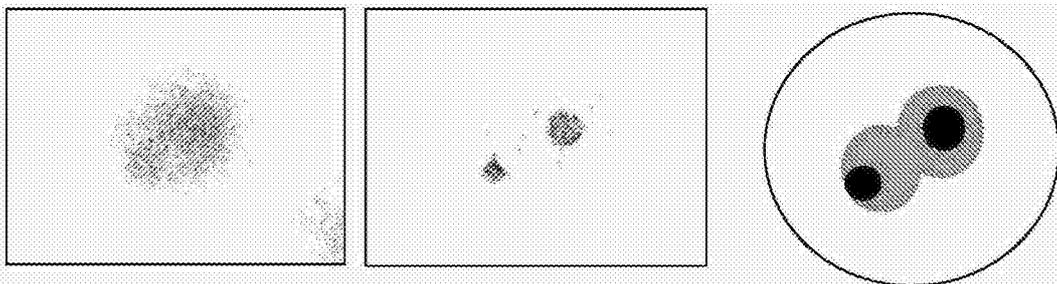


图 12C

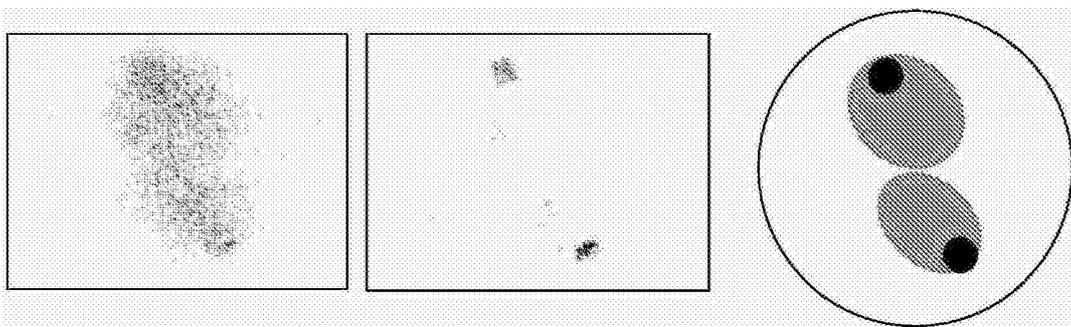


图 12D

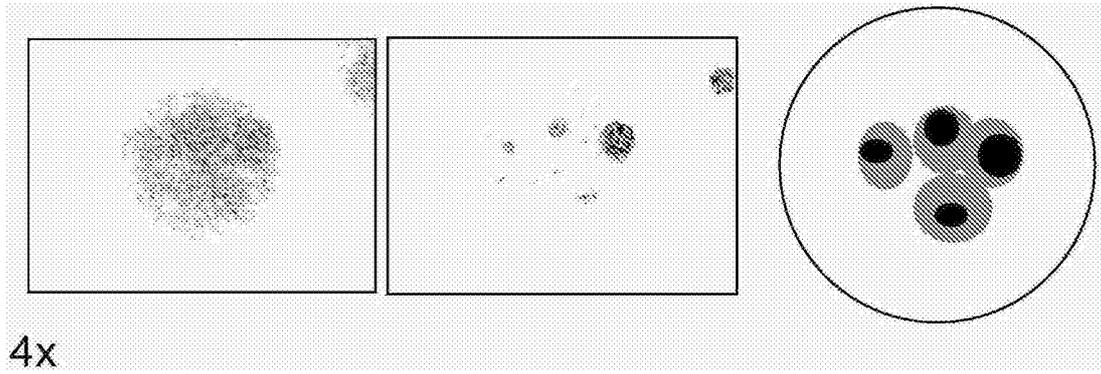
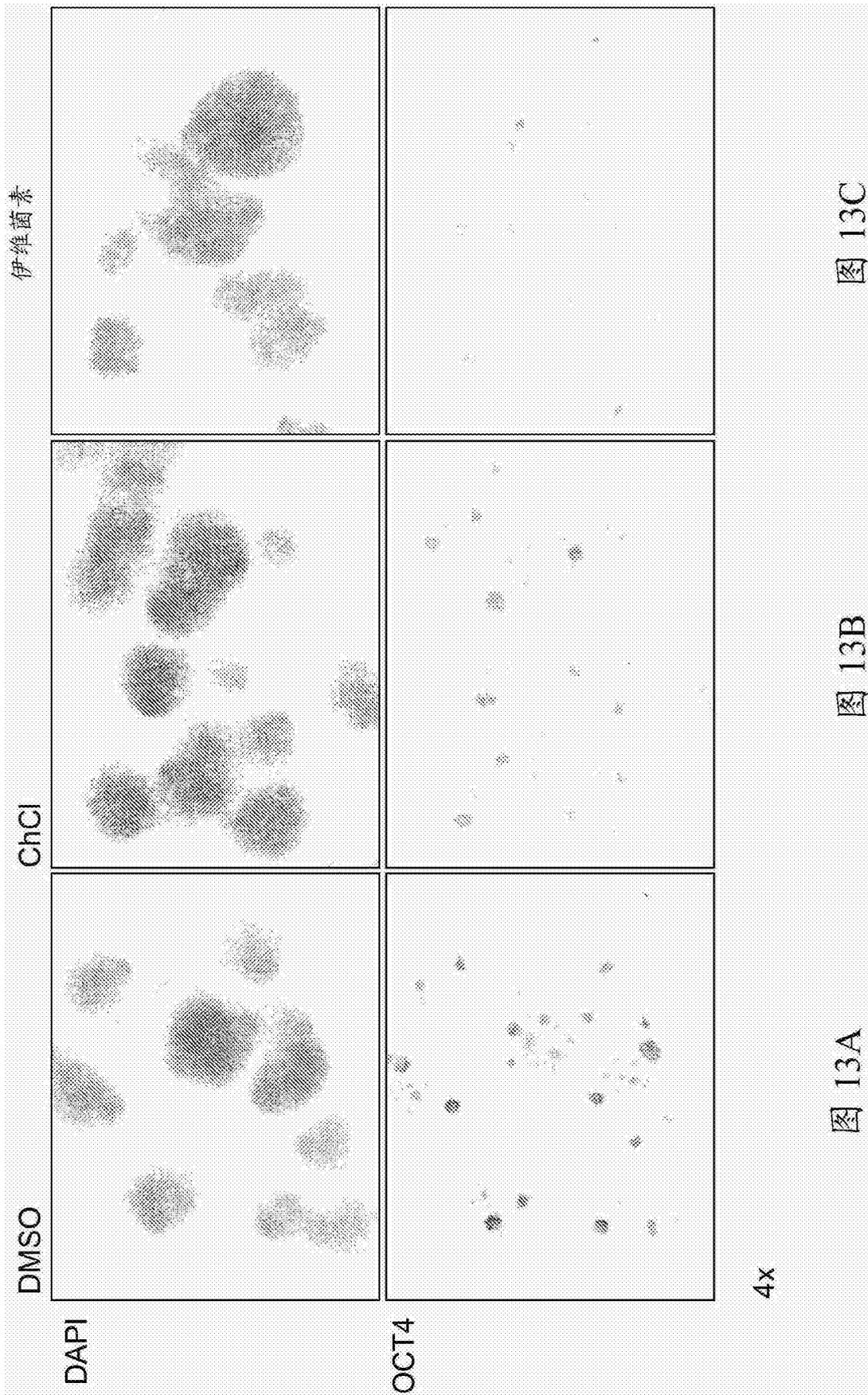


图 12E



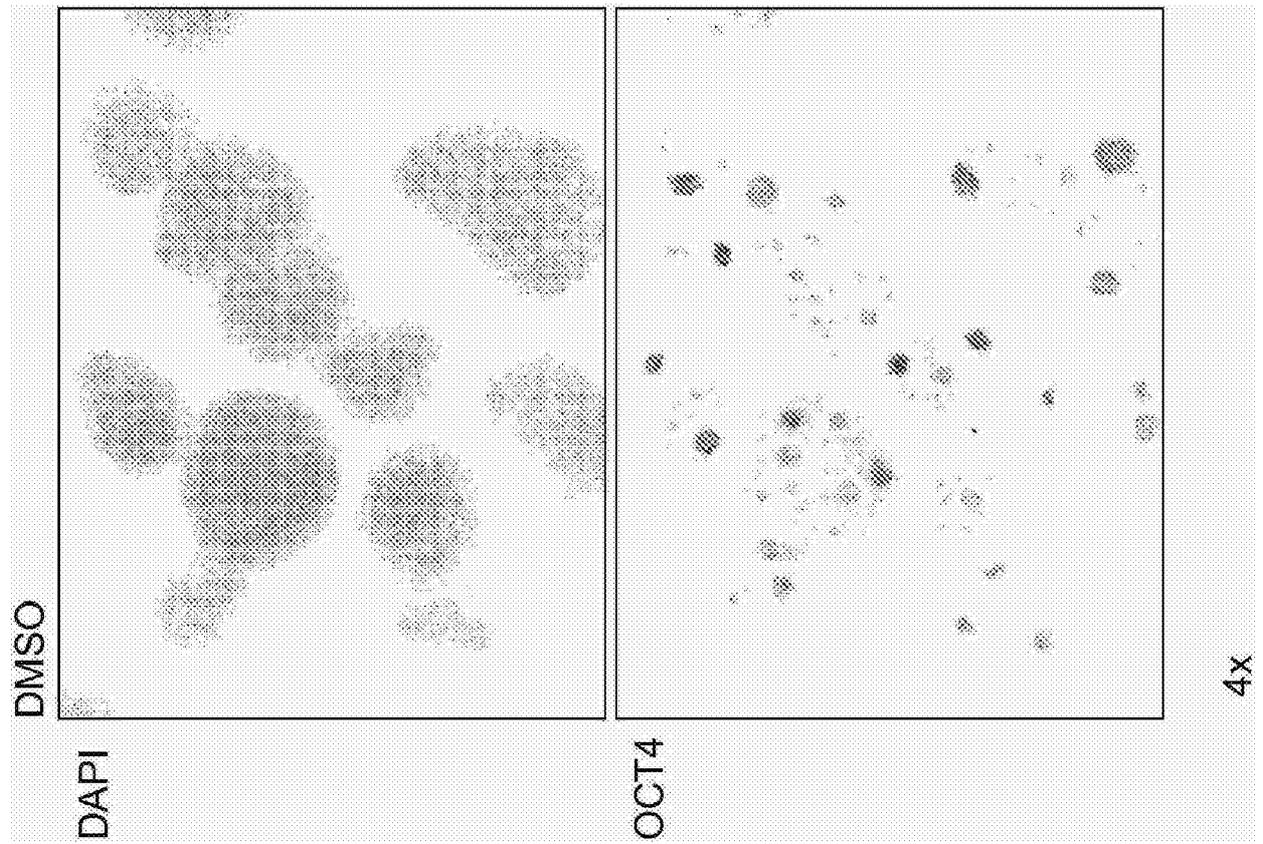


图 13D

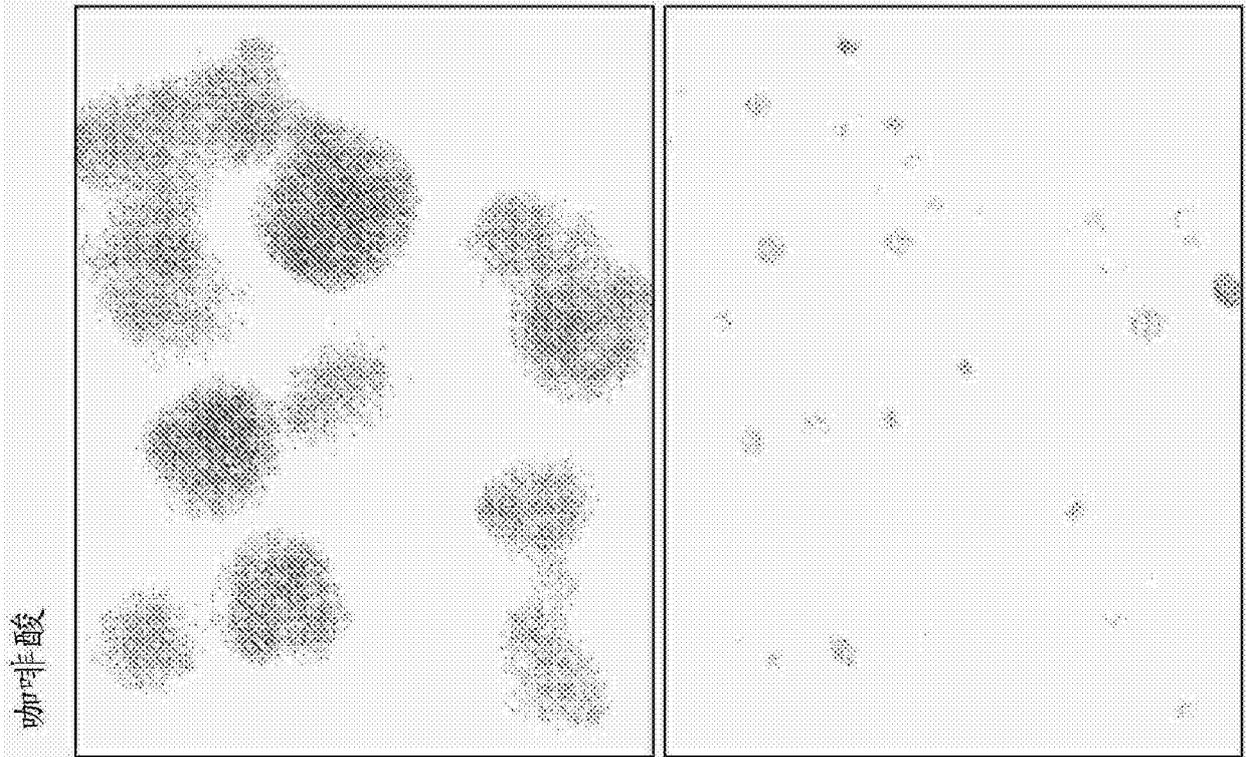


图 13E

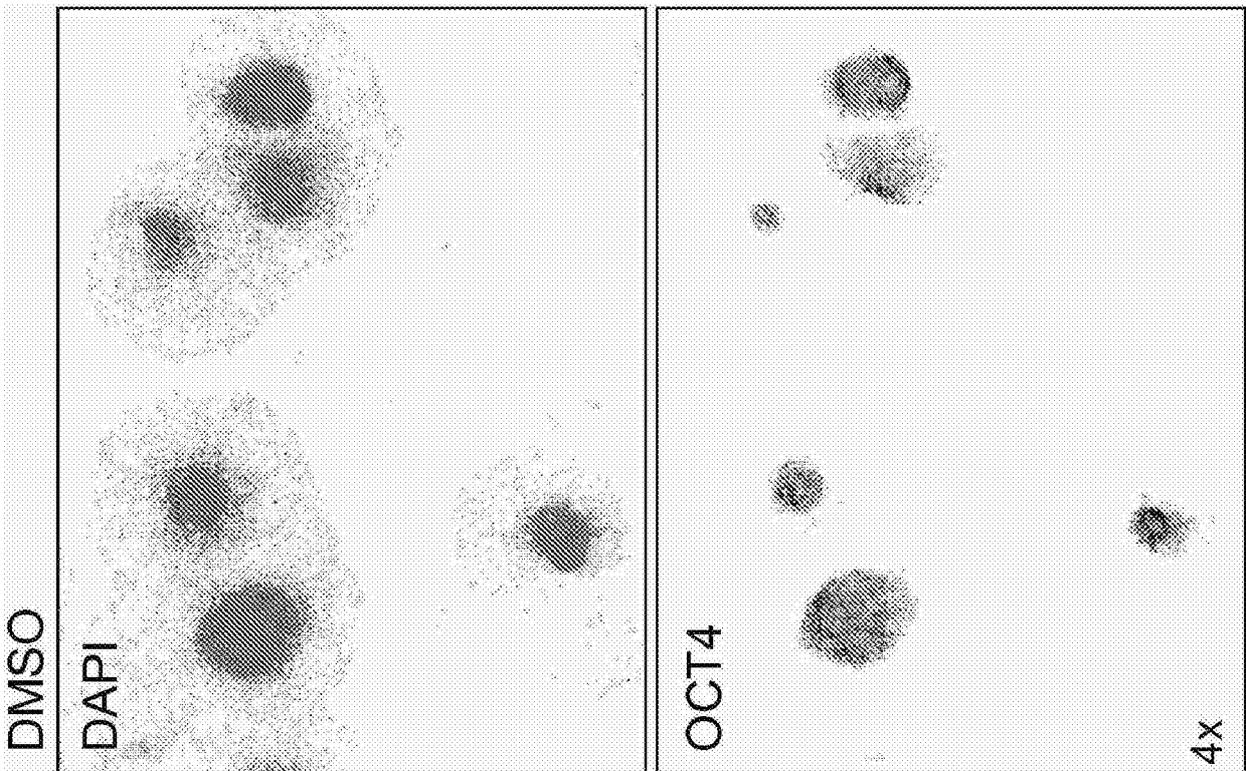


图 14A

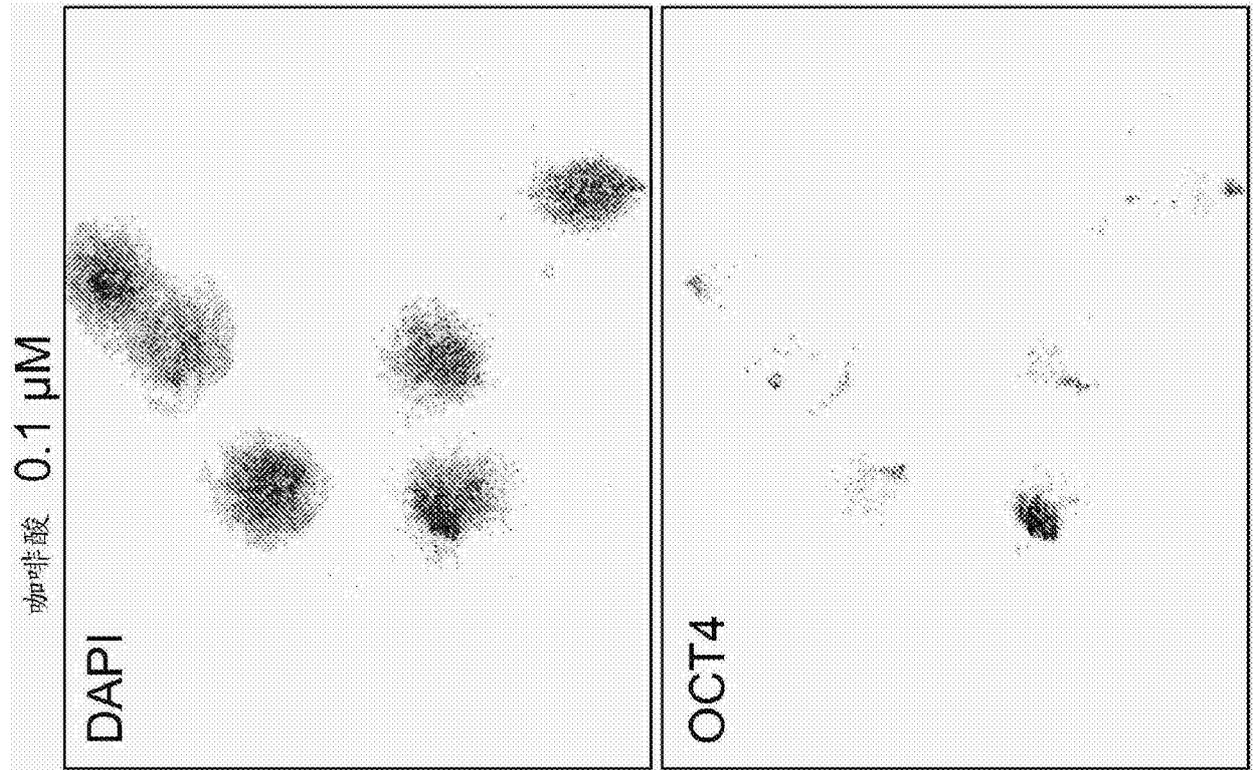


图 14B

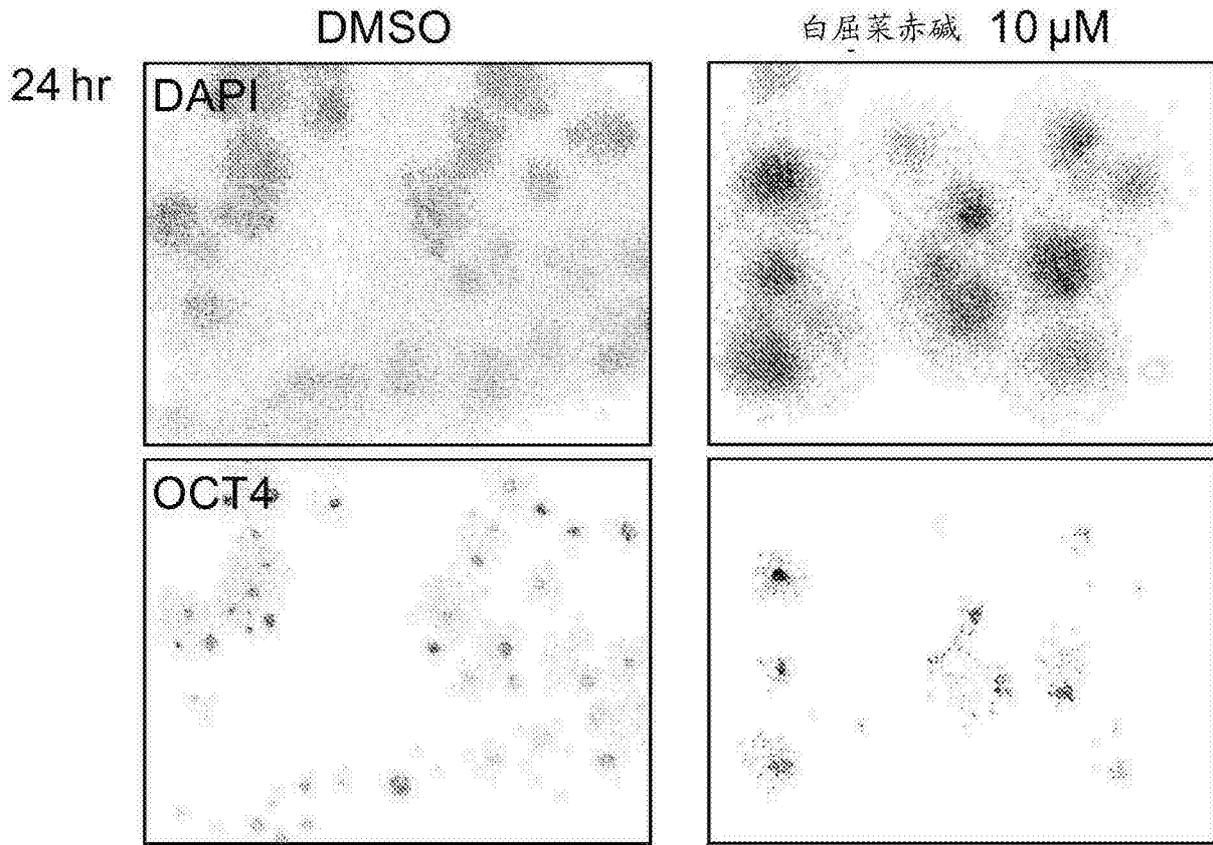


图 15A

图 15B

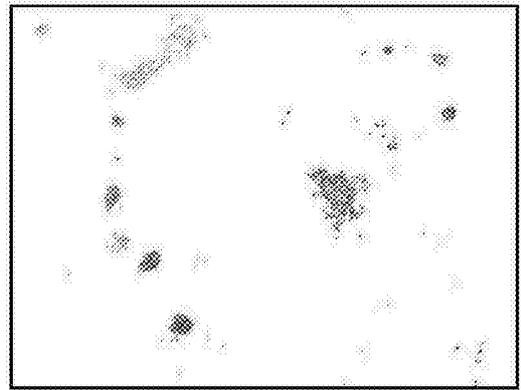
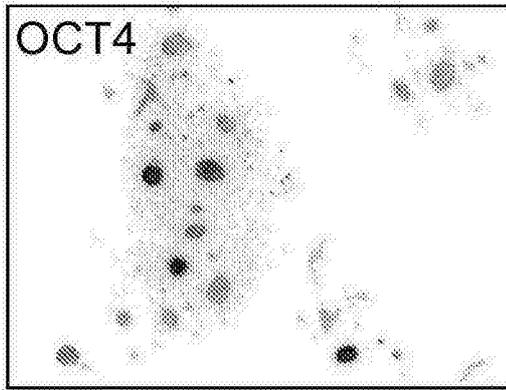
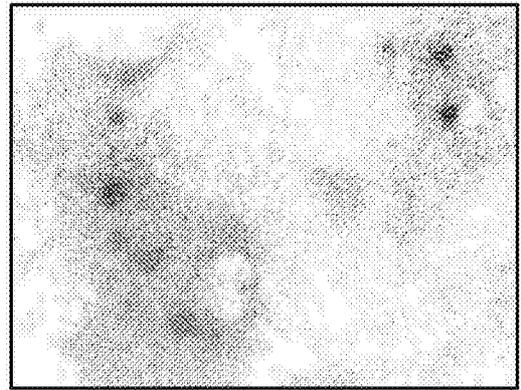
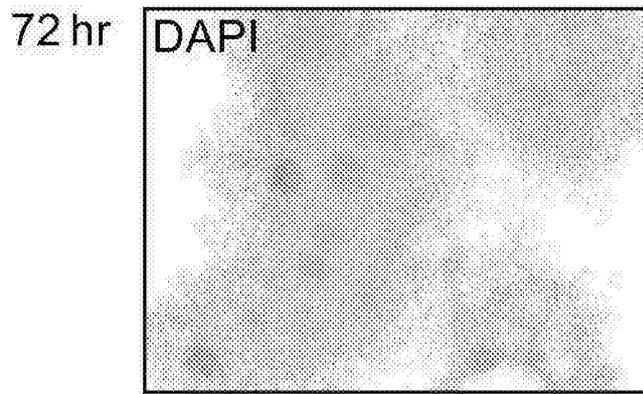


图 15C

图 15D

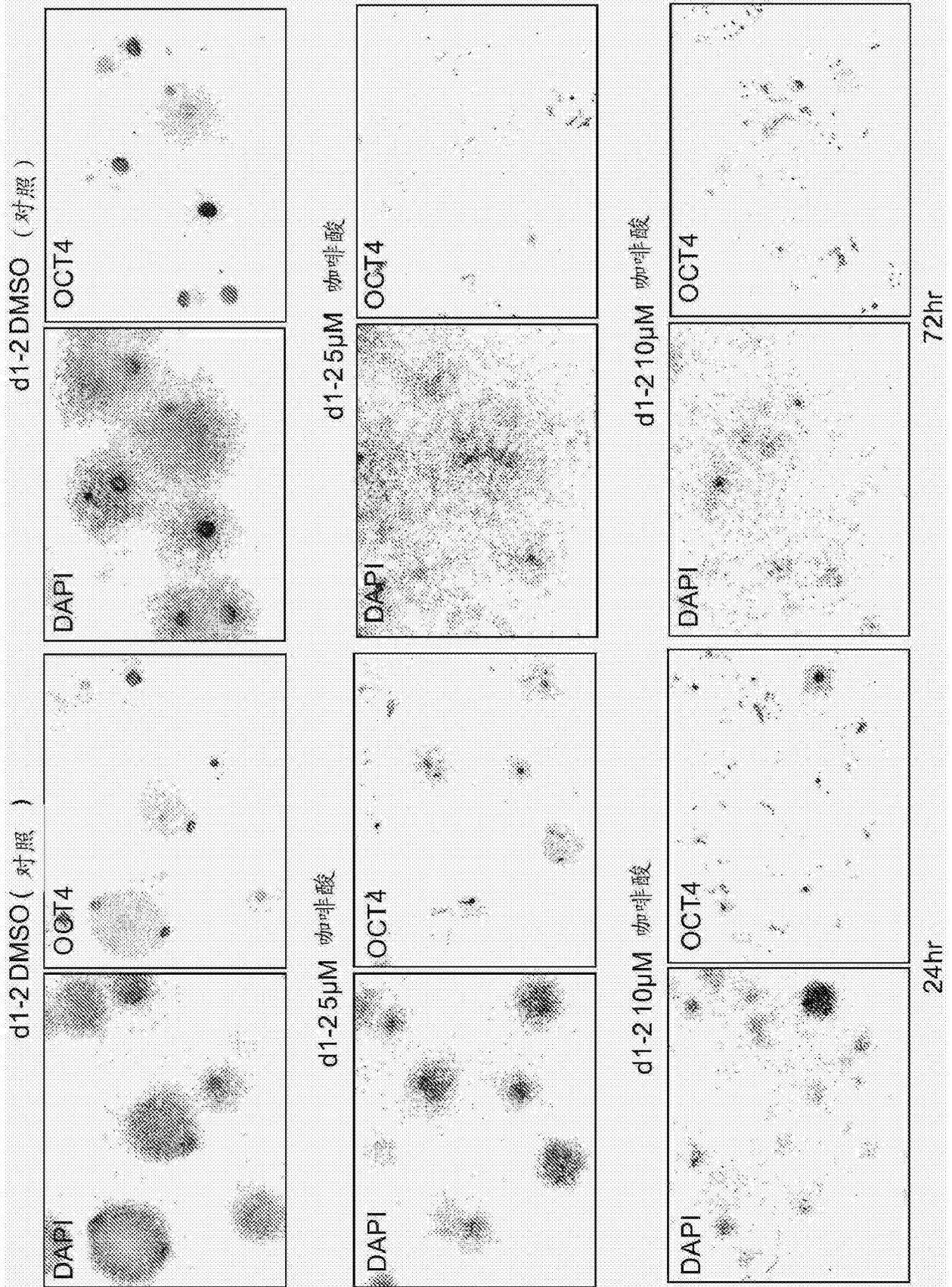


图 16

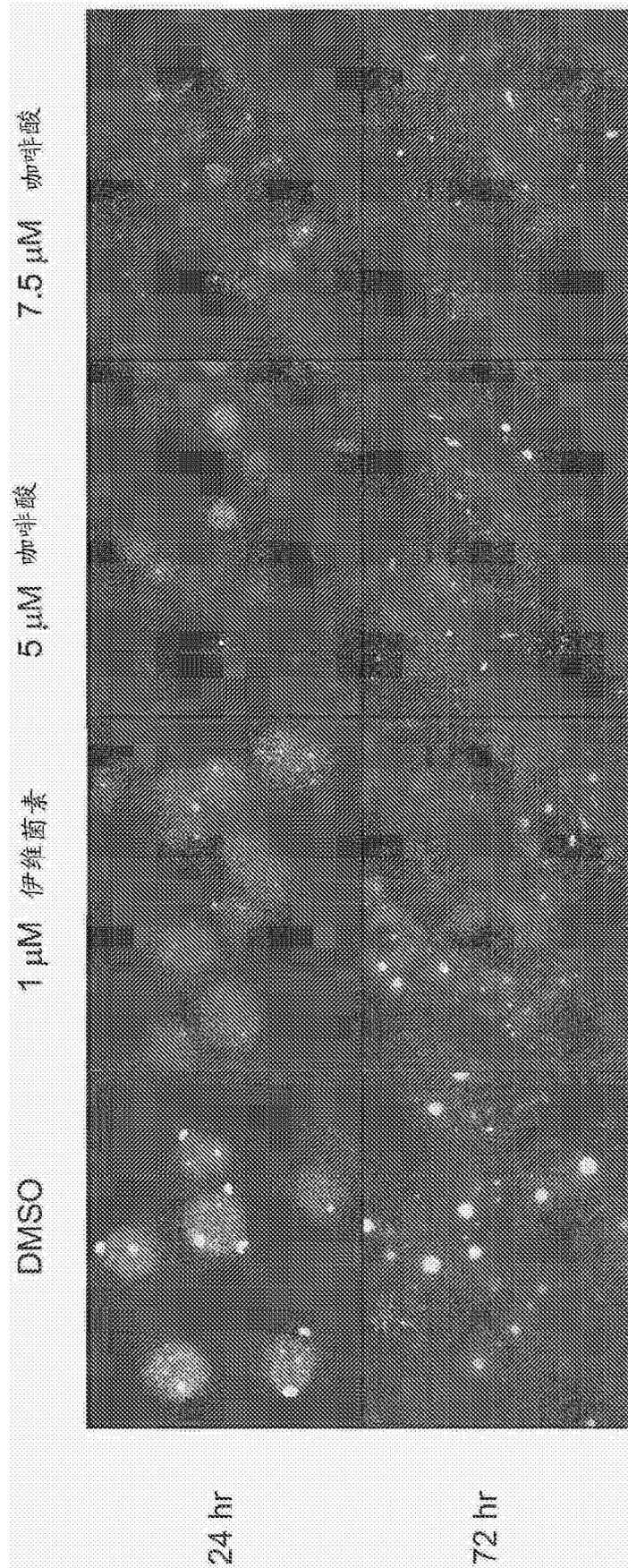


图 17