



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104651299 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201510018547. 9 *C12N 5/07*(2010. 01)
(22) 申请日 2008. 04. 07 *A61K 35/44*(2015. 01)
(30) 优先权数据 *A61P 25/16*(2006. 01)
60/922, 244 2007. 04. 06 US *A61P 25/14*(2006. 01)
(62) 分案原申请数据 *A61P 37/02*(2006. 01)
200880018767. X 2008. 04. 07 *A61P 25/00*(2006. 01)
(71) 申请人 国际干细胞公司 *A61P 3/10*(2006. 01)
地址 美国加利福尼亚州 *A61P 9/00*(2006. 01)
(72) 发明人 E·S·列瓦泽瓦 N·A·图罗文茨 *A61P 27/02*(2006. 01)
L·N·库兹米切夫 J·D·贾纳斯 *A61P 35/00*(2006. 01)
(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 *A61P 31/18*(2006. 01)
公司 11245 *A61P 17/02*(2006. 01)
代理人 赵蓉民

(51) Int. Cl.
C12N 5/0735(2010. 01)
C12N 5/0793(2010. 01)
C12N 5/071(2010. 01)
C12N 5/077(2010. 01)

权利要求书2页 说明书67页 附图12页

(54) 发明名称

源于人单性生殖胚泡的患者特异性干细胞系

(57) 摘要

本发明公开从 HLA 纯合和 HLA 杂合供体产生 HLA 纯合单性生殖人干细胞 (hpSC-Hhom) 系的方法。这些 hpSC-Hhom 系显示典型的人胚胎干细胞形态学,表达适当的干细胞标记物并具有高水平的碱性磷酸酶和端粒酶活性。另外,将这些细胞系注射到免疫缺陷动物导致畸胎瘤形成。而且,在 HLA 杂合供体的情况下, hpSC-Hhom 系只从供体亲本之一遗传单元型。SNP 数据分析表明:通过单核苷酸多态性 (SNP) 分析评估,源于 HLA 杂合卵母细胞供体的 hpSC-Hhom 系是整个基因组纯合的。本发明公开的方法将源自动物的组分的应用减到最少,其使干细胞可更实际地进行临床应用。

1. 分离的多能人干细胞系,其源于单性生殖胚泡,其中所述胚泡和所述干细胞系缺少父系印记,其中构成所述细胞系的至少一个细胞是:

- a) 一个或更多个单核苷酸多态性 (SNPs) 杂合的 ;或
- b) 一个或更多个 HLA 等位基因纯合的 ;或
- c) (a) 和 (b) 的组合。

2. 权利要求 1 所述的分离的细胞系,其中所述至少一个细胞是 HLA 等位基因纯合的。

3. 权利要求 1 所述的分离的细胞系,其中当被移植到无免疫应答小鼠中时,所述至少一个细胞形成畸胎瘤。

4. 权利要求 1 所述的分离的细胞系,其中所述至少一个细胞与未受精的卵母细胞供体是 MHC 相容的。

5. 权利要求 4 所述的分离的细胞系,其中所述至少一个细胞与胚泡供体的一级血亲是 MHC 相容的。

6. 权利要求 1 所述的分离的细胞系,其中所述至少一个细胞根据供体来源被实质上遗传印记。

7. 权利要求 1 所述的分离的细胞系,其中所述至少一个细胞 (i) 会在体外培养中增殖一年以上, (ii) 在整个培养中保持分化为内胚层、中胚层和外胚层组织衍生物的潜能,以及 (iii) 当在成纤维细胞饲养层上培养时被抑制分化。

8. 权利要求 7 所述的分离的细胞系,其中所述至少一个细胞分化成下列细胞,选自:神经元细胞、心脏细胞、平滑肌细胞、横纹肌细胞、内皮细胞、成骨细胞、以及少突胶质细胞、造血细胞、脂肪细胞、基质细胞、软骨细胞、星形胶质细胞、角化细胞、胰岛细胞、淋巴前体细胞、肥大细胞、中胚层细胞以及内胚层细胞。

9. 权利要求 1 所述的分离的细胞系,其中所述至少一个细胞由于缺少父系印记而不具有形成可存活生物体的能力。

10. 权利要求 1 所述的分离的细胞系,其中所述至少一个细胞表达一个或更多个选自 SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 以及 OCT-4 的标记物。

11. 包括分化细胞的细胞组合物在制备用于治疗下列疾病的药物中的应用:帕金森氏症、亨廷顿氏症、阿尔茨海默氏症、ALS、脊髓缺陷或损伤、多发性硬化症、肌肉萎缩症、囊性纤维化、肝病、糖尿病、心脏病、黄斑变性、软骨缺陷或损伤、烧伤、足部溃疡、血管疾病、尿路疾病、AIDS 以及癌症,其中所述分化的细胞源于权利要求 1 所述的干细胞系。

12. 多能干细胞库,其包括自体或同种异体干细胞,其中所述干细胞源于来自一个或更多个人供体的单性生殖活化的卵母细胞,以及其中所述干细胞是 HLA 纯合干细胞并且缺少父系印记。

13. 权利要求 12 所述的库,其中根据单核苷酸多态性 (SNP) 标记物,每个库成员被鉴定为全同胞、半同胞或不相关。

14. 权利要求 12 所述的库,其中所述卵母细胞供体与所述库中的成员是组织相容的。

15. 权利要求 12 所述的库,其中所述库的成员根据所述卵母细胞供体来源被基因组印记。

16. 权利要求 12 所述的库,其中干细胞源于 HLA 杂合或 HLA- 纯合的卵母细胞供体。

17. 权利要求 12 所述的库,其中每个成员对于不同于其它库成员的 MHC/HLA 等位基因

组合而言是纯合的。

18. 权利要求 12 所述的库,其中每个成员是至少一个或更多个 HLA I 类基因和 HLA II 类基因纯合的。

19. 权利要求 12 所述的库,其中所述 HLA I 类基因选自 HLA A*、HLA B*、HLA 以及 Cw* 单元型组合。

20. 权利要求 12 所述的库,其中所述 HLA II 类基因选自 HLA DRB1*、DRB3*、DRB4*、DRB5*、DQA1* 以及 DQB1* 单元型组合。

21. 权利要求 12 所述的库,其中每个成员 (i) 会在体外培养中增殖一年以上, (ii) 在整个培养中保持分化为内胚层、中胚层和外胚层组织之一或全部的衍生物的潜能,以及 (iii) 当在成纤维细胞饲养层上培养时被抑制分化。

22. 权利要求 21 所述的库,其中每个成员保持这样的核型,其中染色体是整倍体并且在延长培养中不改变。

23. 权利要求 12 所述的库,其中每个成员可分化成外胚层、中胚层和内胚层生殖系细胞。

24. 权利要求 12 所述的库,其中每个库成员根据 HLA- 型表征,并且每个成员与潜在受体是 HLA- 匹配的。

25. 细胞库,其包括 HLA- 纯合多能干细胞,其中所述干细胞源于来自 HLA- 纯合或 HLA- 杂合人卵母细胞供体的单性生殖活化的卵母细胞并且其中所述干细胞缺少父系印记。

26. 权利要求 25 所述的细胞库,其中所述干细胞通过与给定群体中常见的 HLA- 单元型的同一性来分选。

27. 权利要求 25 所述的细胞库,其中所述细胞库包括冷藏的自体或同种异体干细胞。

源于人单性生殖胚泡的患者特异性干细胞系

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请日为2008年04月07日,申请号为200880018767.X(PCT/US2008/004529),发明名称为“源于人单性生殖胚泡的患者特异性干细胞系”。

技术领域

[0002] 本发明一般性地涉及胚胎干细胞,以及更具体地涉及获得HLA纯合单性生殖人干细胞系进行基于细胞的治疗的方法。

背景技术

[0003] 最初的人胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)源于获自受精卵母细胞的胚泡内细胞团(inner cell mass, ICM),其能够无限分裂并分化成所有组织类型的细胞。胚胎干细胞是多能细胞的潜在的无限来源,所述多能细胞用于基于移植的细胞治疗。

[0004] 人胚胎干细胞(ES)细胞是多能细胞,其可分化成大量细胞类型。当注射到免疫缺陷鼠中时,胚胎干细胞形成分化的肿瘤(畸胎瘤)。但是,被体外诱导以形成胚状体(embryoid bodies, EBs)的胚胎干细胞提供了胚胎干细胞系的来源,其在某些生长条件下被控制分化成表征几种组织的多种细胞类型。例如,在神经生长因子和视黄酸存在的条件下,ES细胞分化成神经元。

[0005] 如果免疫排斥的问题可以解决,则人胚胎干细胞具有给予患者显著治疗益处的潜能。与受体(recipient)遗传相关的胚胎干细胞可克服这些排斥问题。目前,人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hES)源于三种来源:不育治疗后剩余的并捐赠用于研究的胚泡,从捐赠的配子(卵母细胞和精子)产生的胚泡,以及核移植(nuclear transfer, NT)的产物。死胎组织是人胚胎生殖细胞(human embryonic germ cells, hEG)的唯一来源。hES和hEG细胞提供显著的科学和治疗可能性,其涉及产生更专一化的细胞或组织的潜能。但是,有关hES和hEG细胞的来源的伦理关注,以及用NT进行研究会导致用NT产生人类的担心,已引发了大量的公众讨论和辩论。

[0006] 哺乳动物卵母细胞的单性生殖活化(parthenogeneic activation)可作为对通过精子受精/NT的替代而应用,以便制备用于胚胎干细胞产生的卵母细胞。单性生殖活化是在缺乏来自雄性配子的任何贡献的情况下,从雌性配子产生胚胎细胞,其最终发育为成体或不最终发育为成体。

[0007] 与SCNT相比,卵母细胞的单性生殖活化是产生组织相容性干细胞的相对简单的方法,原因在于它不需要显微操作卵母细胞所需的复杂设备。单性生殖干细胞从未受精的卵母细胞产生并且含有卵母细胞供体(潜在患者)专有的遗传物质。进一步,在定向细胞分化后,自体细胞可被移植而没有免疫排斥的威胁。单性生殖小鼠MHC-纯合干细胞系和一种单性生殖灵长类动物杂合胚胎干细胞系(Cyno-1)已被得到并且在这些细胞系中已表明细胞多能性。

[0008] 如上所述,同种异体组织和器官移植造成的最大风险是免疫排斥。风险的程度与

供体和受体细胞表面抗原递呈蛋白之间的差异程度成比例。在理想的移植中,在主要组织相容性复合物 (MHC) 方面,供体组织与受体是组织相容的。人白细胞抗原 (HLA) 系统是命名人 MHC 的术语,并且代表对移植重要的抗原。HLA 抗原匹配的供体和受体组织降低在受体中细胞毒性 T- 细胞应答的机会,以及因此大大增加移植存活的可能性。

[0009] MHC I 类和 II 类 HLA 单元型是共同遗传自亲本的特定组的 HLA-A、-B、-DR 基因座等位基因。尽管存在高度 HLA 多态性,但是在美国高加索人群中仅存在 200 个共有 HLA 单元型。这种 HLA 多样性与杂合选择系数组合,意味着发现供体 - 受体匹配的机率范围是一千分之一至几百万分之一,其原因在于在杂合个体中由这些等位基因变体的组合提供的独特的组织类型。

[0010] 基于移植的干细胞治疗面临相同的 HLA 匹配问题,所述问题由于免疫排斥而限制了实体器官同种异体移植。HLA- 匹配干细胞系可克服免疫排斥的风险。对于单性生殖来源的细胞,HLA 杂合细胞系通过使用 A23187 和 6-DMAP 的组合激活卵母细胞而得自 HLA 杂合供体。由于这些细胞与卵母细胞供体是 HLA- 匹配的,它们提供组织 - 匹配衍生物的能力受到限制。

[0011] 如果供体细胞是 HLA 纯合的,即,含有相同的每种抗原递呈蛋白的等位基因,则供体和受体之间的 MHC 相容性显著增加。而且,如果纯合供体细胞具有在群体中被高频率发现的单元型,则这些细胞在大量个体的基于移植的干细胞治疗中可具有用途。

发明内容

[0012] 本发明公开从 HLA 纯合和 HLA 杂合供体产生 HLA 纯合单性生殖人干细胞 (hpSC-Hhom) 系的方法。这些 hpSC-Hhom 系显示人胚胎干细胞形态学,表达典型的干细胞标记物 (即, SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 以及 OCT-4) 并具有高水平的碱性磷酸酶和端粒酶活性。另外,将这些细胞系注射到免疫缺陷动物中导致畸胎瘤形成。SNP 数据分析表明,源于 HLA 杂合卵母细胞供体的 hpSC-Hhom 系的整个基因组是纯合的。所公开的方案将源自动物组分的应用减到最少,其使这些干细胞理想地适合于临床用途。

[0013] 在一个实施方式中,公开了源于单性生殖胚泡的分离的人干细胞系,其中构成该细胞系的至少一个细胞对于一个或多个单核苷酸多态性 (SNPs) 而言是杂合的,对于一个或多个 HLA 等位基因而言是纯合的,或包括纯合和杂合 SNPs 的组合。

[0014] 一方面,至少一个细胞对于 HLA 等位基因而言是纯合的。另一方面,至少一个细胞在被移植到无免疫应答小鼠中时形成畸胎瘤。在进一步的方面,至少一个细胞与胚泡供体是 MHC 相容的。

[0015] 在一个相关方面,至少一个细胞与胚泡供体的一级血亲是 MHC 相容的,其包括至少一个细胞按照供体来源被实质上遗传印记。

[0016] 一方面,至少一个细胞 (i) 将在体外培养中增殖一年以上, (ii) 在整个培养中保持分化为内胚层、中胚层和外胚层组织衍生物的潜能,以及 (iii) 当在成纤维细胞饲养层上培养时被抑制分化。

[0017] 另一方面,至少一个细胞分化成下列细胞,包括:神经元细胞、心脏细胞、平滑肌细胞、横纹肌细胞、内皮细胞、成骨细胞、以及少突胶质细胞、造血细胞、脂肪细胞、基质细胞、软骨细胞、星形胶质细胞、角化细胞、胰岛细胞、淋巴前体细胞、肥大细胞、中胚层细胞以及

内胚层细胞。在一个相关方面,至少一个细胞不具有形成存活生物体的能力。

[0018] 在另一个实施方式中,公开了治疗需要该治疗的对象的方法,其包括施用包括分化细胞的细胞组合物,其中所述分化的细胞得自源于单性生殖胚泡的干细胞系,其中构成所述细胞系的至少一个细胞对于一个或多个单核苷酸多态性 (SNPs) 而言是杂合的,对于一个或多个 HLA 等位基因而言是纯合的,或包括纯合和杂合 SNPs 的组合。

[0019] 一方面,对象患有疾病,所述疾病包括:帕金森氏症、亨廷顿氏症、阿尔茨海默氏症、ALS、脊髓缺陷或损伤、多发性硬化症、肌肉萎缩症、囊性纤维化、肝病、糖尿病、心脏病、黄斑变性、软骨缺陷或损伤、烧伤、足部溃疡、血管疾病、尿路疾病、AIDS 以及癌症。

[0020] 在一个实施方式中,公开了干细胞库,其包括自体或同种异体 (allogenic) 干细胞,其中所述干细胞源于来自一个或多个个人供体的单性生殖活化的卵母细胞,以及其中所述干细胞是 HLA 纯合干细胞。一方面,根据单核苷酸多态性 (SNP) 标记物,每个库成员被鉴定为全同胞、半同胞或不相关。另一方面,每个库成员根据 HLA- 型进行表征,并且所述库成员与用于治疗用途的潜在受体是 HLA- 匹配的。

[0021] 另一方面,卵母细胞供体与库成员是组织相容的。在一个相关方面,库成员根据卵母细胞供体来源被基因组印记,其包括库的干细胞可源于 HLA 杂合卵母细胞供体。在进一步的方面,库中的每个成员对于不同于其它库成员的 MHC/HLA 等位基因组合而言是纯合的。

[0022] 一方面,库中的每个成员是至少一个或多个 HLA I 类基因和 HLA II 类基因纯合的。在一个相关方面,HLA I 类基因包括 HLA A*、HLA B*、HLA 以及 Cw* 单元型组合。在另一个相关方面,HLA II 类基因包括 HLA DRB1*、DRB3*、DRB4*、DRB5*、DQA1* 以及 DQB1* 单元型组合。

[0023] 在另一个实施方式中,公开了产生 HLA 纯合干细胞的方法,其包括:筛选卵母细胞供体,寻找在给定群体中常见的 HLA- 单元型;在体外受精 (IVF) 培养基中温育人中期 II 卵母细胞;在包括离子载体的 IVF 培养基中温育细胞;在包括嘌呤霉素的 IVF 培养基中温育细胞;以及在新鲜的 IVF 培养基中温育细胞,其中一个或多个温育在不同 O₂ 张力下进行,并且其中获自细胞的内细胞团 (ICM) 产生可培养的干细胞。

[0024] 根据本发明的示例性方法和组合物在下文更详细地描述。

附图说明

[0025] 图 1 显示 phESC 系的特征性特异性标记物。在人饲养层细胞上 phESC 的未分化集落 (A-F), SSEA-1 阴性染色 (G-L), 细胞表面标记物 SSEA-3 (M-R)、SSEA-4 (S-X) 的表达。放大倍数:(A) 至 (E) 100 倍, (F) 200 倍, (G) 至 (X) 400 倍。在饲养细胞上 phESC 集落的碱性磷酸酶阳性染色 (A-F)、OCT-4 (G-L)、TRA-1-60 (K-R) 和 TRA-1-81 (S-X)。放大倍数:(A、B、O、R) 100 倍, (C-F、M、S、X) 200 倍, (G-L、N、P、Q、T-W) 400 倍。

[0026] 图 2 显示, phESC 表明与阳性对照细胞相比高水平的端粒酶活性:“+”- 来自 500 个细胞的提取物;“-”- 热处理的细胞提取物,端粒酶失活;“对照 +”- 端粒酶阳性细胞提取物 (应用 TRAPEZE 试剂盒);“B”-CHAPS 裂解缓冲液,引物-二聚体 /PCR 污染对照;TSR8- 端粒酶定量对照模板 (0.1 和 0.2 amole/ μ l);“M”- 标记, DNA 梯形条带。

[0027] 图 3 显示 phESC 系的 G- 带核型分析。phESC-1 (A)、phESC-3 (B)、phESC-4 (C)、

phESC-5(D) 和 phESC-6(E) 系具有正常的 46, XX 核型。phESC-7 系具有 47, XXX 核型 (F)。

[0028] 图 4 显示将 phESC 体外分化为所有三个胚层的衍生物。外胚层分化通过神经元特异性标记物神经丝 68(A)、NCAM(B)、 β III 微管蛋白 (C) 和神经胶质细胞标记物 GFAP(D, M) 的阳性免疫细胞化学染色来显示。分化的细胞对于下列中胚层标记物是阳性的: 肌肉特异性 α -辅肌动蛋白 (G) 和结蛋白 (J)、内皮标记物 PECAM-1(E) 和 VE-钙粘蛋白 (F)。内胚层分化通过 α -胎蛋白 (H, L) 阳性染色来显示。phESC 产生色素上皮-样细胞 (I, K)。放大倍数: (I) 100 倍, (A-H, J-M) 400 倍。

[0029] 图 5 显示在 SCID 小鼠中 phESC 的体内分化和畸胎瘤形成。对三个胚层的标记物进行免疫荧光染色。中胚层细胞标记物肌肉肌动蛋白围绕其它成分进行组织并且可清晰鉴别 (A)。纤维连接蛋白以较高量存在对于中胚层来源的结缔组织具有特异性 (B)。神经分化细胞 (外胚层来源) 区域是广泛的并用 β 微管蛋白抗体进行强烈标记 (C)。不成熟的内胚层细胞标记物 α -胎蛋白可在腺体外观的区域找到 (D)。用 DAPI 对细胞核染色 (A)、(D)。放大倍数: (A)、(C)、(D), 100 倍; (B) 200 倍。

[0030] 图 6 显示印记基因表达的 RT-PCR 分析。来自丢弃 IVF 胚胎的两个 hESC 系 hES1 和 hES2 用作在下列 phESC 系中父本表达的基因 SNRPN 和 PEG1_2 以及母本表达的基因 TSSC5 和 H19 的表达分析的阳性对照: phESC-1; phESC-3; phESC-4; phESC-5; phESC-6 和 phESC-7 (分别为 1、3、4、5、6 以及 7)。PEG1_1 基因是双等位基因表达的并用作另外的对照。包括 GAPDH 作为 mRNA 定量对照。RT- 数据表明 RT 样本没有基因组污染。

[0031] 图 7 显示 hpSC-Hhom 系的特异性标记物特征。来自所有四种 hpSC-Hhom 系的细胞表明 SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、OCT-4 (用 DAPI 进行细胞核染色)、碱性磷酸酶阳性染色, 以及 SSEA-1 阴性染色。小鼠胚胎干细胞 (ESC) 用作 SSAE-1 染色的阳性对照。

[0032] 图 8 显示, hpSC-Hhom 系表明与阳性对照细胞相比高水平的端粒酶活性: “K1+”- 端粒酶阳性细胞提取物 (应用 TRAPEZE 试剂盒); “K2+”- 来自 500 个细胞的提取物; “K-”或“-”- 热处理的细胞提取物, 端粒酶失活; Buf-CHAPS 裂解缓冲液, 引物-二聚体/PCR 污染对照; TSR- 端粒酶定量对照模板 (0.1 和 0.2 amole/ μ l); “M”- 标记物, DNA 梯形条带。

[0033] 图 9 显示人 HLA 纯合单性生殖干细胞系的 G-带核型分析: hpSC-Hhom-1 (A) 和 hpSC-Hhom-4 (B) 系具有正常的 46, XX 核型; hpSC-Hhom-2 (C) 系的 15% 细胞具有 47, XX, +8 核型-染色体 8 的非整倍性; hpSC-Hhom-3 (D) 系的 4.2% 细胞具有 47, XX, +1 核型-染色体 1 的非整倍性。

[0034] 图 10 显示 hpSC-Hhom-4 体外分化成来自所有三个胚层的衍生物: 外胚层分化是明显的, 因为神经元特异性标记物神经丝 68 (A) 和 NCAM (B) 是免疫细胞化学染色阳性的; 内胚层分化是明显的, 因为 α -胎蛋白 (C) 的染色是阳性的; 分化的细胞是中胚层标记物肌肉特异性结蛋白 (D) 和 α -辅肌动蛋白 (E) 阳性的; 放大倍数 200 倍 (A-E)。

[0035] 图 11 显示 hpSC-Hhom-4 的体内分化。SCID 小鼠中的畸胎瘤形成。来自所有三个胚层 (外胚层、内胚层和中胚层) 的衍生物: 由间充质细胞包绕的充分形成的呼吸型腺体, 苏木精/伊红 (h/e) 染色, 放大倍数 140 倍 (A); 可能的具有单层细胞的神经管, 右侧为内胚层腺体和底部为软骨-分化, h/e 染色, 放大倍数 70 倍 (B); 由间充质细胞包绕的骨骼, 中心是具有立方上皮的管状腺, picrofucsin 染色, 放大倍数 140 倍 (C); 充分形成的由间充质

细胞包绕的骨骼和脂肪组织, h/e 染色, 放大倍数 140 倍 (D); 左侧是内胚层腺体、中胚层和脂肪组织、胶原, 骨骼见于右侧和底部, Kraberg 染色, 放大倍数 70 倍 (E); 由间充质细胞包围的内胚层腺体结构, 胶原纤维大量产生, Van Gieson 染色, 放大倍数 280 倍 (F); 复层上皮, 中心为角化过度的珠状物 (pearl), 左侧为另一个腺体, h/e 染色, 放大倍数 140 倍 (G); 腺体集落, h/e 染色, 放大倍数 70 倍 (H); 含有产生褐色色素——可能为胆汁色素——的细胞的腺体, 由脂肪组织和间充质细胞包绕, h/e 染色, 放大倍数 140 倍 (I)。

具体实施方式

[0036] 在描述本发明的组合物、方法以及培养方法学之前, 应理解的是, 本发明不限于所描述的具体组合物、方法以及实验条件, 因为这些组合物、方法以及条件可变化。还应理解的是, 本文所使用的术语目的仅在于描述具体实施方式, 而不意图进行限制, 因为本发明的范围将仅由所附权利要求书来限制。

[0037] 如本说明书和所附权利要求书中所用, 除非上下文另外明确指出, 单数形式“一 (a)”, “一 (an)”和“该 (the)”包括复数指代物。因此, 例如, 提及“该方法”包括一种或更多种方法, 和 / 或本文描述类型的步骤, 其在本领域技术人员阅读本公开内容等时将成为显而易见的。

[0038] 本发明公开用于获得人 HLA 纯合单性生殖干细胞系的至少两种不同方法, 所述细胞系用于基于移植的干细胞治疗。

[0039] 在一个实施方式中, 一个细胞系源于 HLA 纯合供体, 其包括在卵母细胞活化过程中使用 A23187 和 6-DMAP, 阻止第二极体的挤出, 从而保留 MII 卵母细胞的所有遗传物质。源于这些卵母细胞的干细胞的 HLA 基因型与供体的 HLA 基因型匹配 (Revazova 等, Cloning Stem Cells (2007) 9 (3): 432-449)。在一个相关方面, 也可获得来自 HLA 纯合供体的二倍体 hpSC-Hhom-1 系。

[0040] 在另一个实施方式中, HLA 纯合胚胎干细胞可源于 HLA 杂合卵母细胞供体, 其包括使用 A23187 和嘌呤霉素的组合将卵母细胞单性生殖活化, 其允许第二极体挤出。因此, 活化的卵母细胞只含有一套中期 II 染色体的一半, 其允许形成纯合基因型。例如, 由钙离子载体和嘌呤霉素的组合活化的人卵母细胞的 80% 显示前核, 第二极体挤出。进一步, 细胞遗传分析表明, 78% 含有一套正常单倍染色体 (Yamano S. 等, J Med Investigation (2000) 47 (1-2): 1-8)。此外, 用 A23187 和嘌呤霉素活化的人卵母细胞显示一个前核和两个极体, 具有一套单倍染色体 (Nakagawa K. 等, Zygote (2001) 9: 83-88)。这种具有一套正常单倍染色体的前核单性生殖体已在小鼠模型中发育 (Nakasaka H. 等, Zygote (2000) 8: 203-208)。

[0041] 使用这种方法从分离自 HLA 杂合供体的卵母细胞产生多个二倍体细胞系 (例如但不限于 hpSC-Hhom-2、hpSC-Hhom-3、hpSC-Hhom-4)。

[0042] 尽管不被理论所束缚, 但 HLA 基因型分型数据表明, HLA 单元型排他性地从供体亲本之一遗传。SNP 分析数据表明, 这三种细胞系是整个基因组纯合的, 如 SNP 分析所评估。例如, 本发明中公开的示例性细胞系 (参见实施例 1) 具有二倍体核型, 这对应于其中二倍体干细胞系源于单倍体小鼠胚胎的早期工作 (Kaufman 等, J Embryol Exp Morphol (1983) 73: 249-261)。

[0043] 卵母细胞活化后单倍体遗传物质复制的准确机制和时间是不清楚的,但是,尽管不被理论所束缚,DNA 复制看起来在不存在细胞卵裂或分裂的情况下发生。在先研究表明,80%的单性生殖活化的小鼠卵母细胞保持它们的单倍体状态直到桑椹胚期,随后的源于这些胚胎的干细胞系成为二倍体 (Kaufman M. H. 等,1983, 上文)。

[0044] 除了替代疗法之外,源于 hpSC-Hhom 系的细胞和组织的储存在遗传疾病治疗中可具有无法衡量的价值。根据约翰霍普金斯大学 (John Hopkins University) 在线人类孟德尔遗传数据库 (the Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM) 和美国国立生物技术信息中心 (the National Center for Biotechnology Information, NCBI),存在多于 100 种遗传疾病,这一目录持续扩展。实例包括阿尔茨海默氏症、糖尿病、Graves 症 (突眼性甲状腺肿)、血友病、亨廷顿氏症、肌肉萎缩症、帕金森氏症、镰状细胞贫血症、苯丙酮尿症 -PKU 和重度联合免疫缺陷病 (SCID)。在这些情况中,使用获自不携带相同遗传缺陷的供体的细胞系会是重要的。

[0045] “分化”是指发生在细胞中的变化,所述变化使那些细胞呈现某些特化的功能以及失去变化成某些其它特化的功能单元的能力。能够分化的细胞可以是全能细胞、多能 (pluripotent) 细胞或多能性 (multipotent) 细胞中的任意。分化相对于成熟的成体细胞可以是部分的或完全的。

[0046] “单雌生殖 (Gynogenesis)”是指在细胞活化后导致产生包含可辨别的滋养外胚层和内细胞团的胚胎,所述细胞例如卵母细胞或其它胚胎细胞类型,包括全部雌性来源的哺乳动物 DNA,优选人类雌性来源,例如人类或非人类灵长动物卵母细胞 DNA。这种雌性哺乳动物 DNA 可以通过例如至少一个 DNA 序列的插入、缺失或取代被遗传修饰,或可以未被修饰。例如,DNA 可以通过插入或缺失期望的编码序列,或促进或抑制胚胎发生的序列被修饰。一般地,这样的胚胎将通过体外激活包含全部雌性来源 DNA 的卵母细胞而获得。单雌生殖包含在下面所定义的单性生殖中。它还包括其中精子的 DNA 没有贡献于被激活卵母细胞中的 DNA 的激活方法。

[0047] 在一个相关的方面,卵母细胞从制备用于 IVF 的超排卵 (superovulating) 对象获得。用于 IVF 中的“超排卵”技术,如用激素处理雌性对象,被设计成刺激卵巢产生几个卵 (卵母细胞),而不是如在自然周期中通常的一个卵。

[0048] 促进卵产生所需要的药物治疗可包括但不限于下列:醋酸亮丙瑞林 (Lupron) (促性腺素释放激素激动剂)、Orgalutran、Antagon 或西曲肽 (Cetrotide) (促性腺素释放激素拮抗剂)、Follistim、Bravelle 或果纳芬 (Gonal-F) (FSH, 促卵泡激素)、Repronex (FSH 和 LH 的组合,促黄体激素)、和波热尼乐 (Pregnyl) 或 Novarel (hCG, 人绒毛膜促性腺素)。

[0049] 在一个相关方面,在经阴道超声指引下可以进行卵的收集。为完成这一过程,应用超声将针通过阴道壁插入 (例如,在 IV 镇静下) 到卵巢中以定位每一个卵泡。卵泡液被抽到试管中以取得卵。

[0050] 通过“单性生殖 (Parthenogenesis)” (“单性生殖激活 (parthenogenically activated)”和“单性生殖激活 (parthenogenetically activated)”被交换使用) 过程,卵母细胞的激活在缺少精子穿入下发生,并且其是指包含滋养外胚层和内细胞团的早期阶段胚胎的发育,所述胚胎通过激活包含全部雌性来源 DNA 的卵母细胞或胚胎细胞例如卵裂球而获得。在一个相关方面,“单性生殖体”是指通过这种激活得到的所得细胞。在另一相

关方面，“胚泡”是指分裂阶段的受精或激活的卵母细胞，其包含由外滋养层细胞和内细胞团（ICM）组成的中空细胞球。在又一相关方面，“胚泡形成”是指在卵母细胞受精或激活之后的过程，其中随后卵母细胞在培养基中被培养一段时间，所述时间能够使其发育成由外滋养层细胞和 ICM 组成的中空细胞球（例如，5 到 6 天）。

[0051] 在一个实施方式中，公开了通过单性生殖激活的卵母细胞产生克隆人类胚胎干细胞系的方法。虽然单性生殖在自然界中不是罕见的繁殖形式，但不知道哺乳动物能够进行这种繁殖形式。然而，在雌性近交系小鼠 LT/Sv 的卵母细胞中，可以发现比例为 10% 的自发单性生殖 (Hoppe 和 Illmensee, Proc Natl Acad Sci USA (1982) 79:1912-1916)，并且自发单性生殖也解释了人类葡萄胎的形成 (Berkowitz 和 Goldstein, New Eng J Med (1990) 335 (23):1740-1748)。有胎盘哺乳动物的卵母细胞能够被诱导进行体外单性生殖；但是，胚胎发育是不成功的。

[0052] 单性生殖激活哺乳动物卵母细胞和将激活的卵母细胞转移进入代理母亲之后，具有有限的胚胎存活：小鼠为 10 天；羊为 21 天；猪为 29 天；兔为 11.5 天 (Kure-bayashi 等, Theriogenology (2000) 53:1105-1119; Hagemann 等, Mol Reprod dev (1998) 50:154-162; Ozil 和 Huneru, Development (2001) 128:917-928; Surani 和 Barton, Science (1983) 222:1034-1036)。这种发育停滞的原因可能是由于遗传印记 (genetic imprinting)。已经显示，母亲与父亲的基因组是表观遗传上不同的 (epigenetically different) 并且这两组对于成功的胚胎发育都是必需的 (Surani, Cell (1998) 93:309-312; Sasaki 等, (1992) 6:1843-1856)。虽然不限于理论，但在单性生殖体中，所有的遗传物质应该是母系来源，因此应当缺少父系印记。父系印记被认为负责胚外 (extra-embryo) 组织发育，因此负责去核卵母细胞受精之后滋养层组织发育 (Surani 和 Barton, (1983)，见上文)。因此，在动物中，去核的受精卵对于核转移和随后的单性生殖激活可以是有益的。

[0053] 哺乳动物单性生殖体仅仅经历有限的发育，胚胎最终死亡。在食蟹猴 (*Macac fascicularis*) 中，体外单性生殖激活之后的中期 II 阶段卵母细胞中的仅仅 14% 在培养 8 天之后发育到胚泡阶段 (Vrana 等, Proc Natl Acad Sci USA (2003) 100 (Suppl 1):11911-11916)。

[0054] 在 LT/Sv 近交系小鼠的未交配雌性中，以自发激活单性生殖体形成的胚胎在几天内死亡。当从包含这些胚胎的内细胞团 (ICM) 的细胞进行核转移到受精的去核 C57BL/6j 小鼠卵母细胞中时，得到具有 LT/Sv 基因组的克隆小鼠 (Hoppe 和 Illmensee, Proc Natl Acad Sci USA (1982) 79:1912-1916)。因此，受精卵母细胞的使用允许单性生殖体的足月发育。在一方面，受精的去核人卵母细胞能够被用于支持包含供体细胞核的单性生殖胚胎的发育，直到胚泡阶段。

[0055] “多能细胞”是指来自通过激活包含全部雌性或雄性来源 DNA 的细胞而产生的胚胎的细胞，其可以在未分化状态下在体外保持长期时期、理论上为无限的时期，其可以产生不同的分化组织类型，即外胚层、中胚层、和内胚层。细胞的多能状态优选地通过在合适条件下培养内细胞团或来自胚胎的内细胞团的细胞而保持，所述胚胎由雄核发育或雌核发育方法产生，所述条件例如，通过在成纤维细胞饲养层或其它饲养层或包含白血病抑制因子 (LIF) 的培养物上培养。这种培养细胞的多能状态可以通过多种方法确认，例如，(i) 确认表征多能细胞的标志物的表达；(ii) 包含表达多能细胞基因型的细胞的嵌合动物的产生；

(iii) 将细胞注入到动物例如 SCID 小鼠中,在体内产生不同的分化细胞类型;以及 (iv) 在体外,观察到细胞分化(例如,当在缺少饲养层或 LIF 下培养时)为胚状体和其它分化细胞类型。

[0056] “二倍体细胞”是指细胞,例如,卵母细胞或卵裂球,其具有全部雄性或雌性来源的二倍 DNA 内容物。

[0057] “单倍体细胞”是指细胞,例如,卵母细胞或卵裂球,其具有单倍 DNA 内容物,其中单倍 DNA 是全部雄性或雌性来源。

[0058] 激活是指一种过程,其中例如——但不限于此,在减数分裂中期 II 中,受精或未受精卵母细胞进行这样的过程:所述过程一般包括染色单体对的分离,第二极体挤出,产生具有单倍数目染色体的卵母细胞,每一染色体具有一条染色单体。激活包括这样的方法,通过该方法,包含全部雄性或雌性来源 DNA 的细胞被诱导发育成具有可辨别的内细胞团和滋养外胚层的胚胎,这对于产生多能细胞是有用的,但其本身可能不能发育成存活的后代。例如,激活可以在下面的一种条件下进行:(i) 不引起第二极体挤出的条件;(ii) 引起极体挤出但其中极体挤出被抑制的条件;或 (iii) 抑制单倍体卵母细胞第一次细胞分裂的条件。

[0059] “中期 II’是指细胞发育的一个阶段,其中细胞的 DNA 内容物由单倍数目染色体组成,每一染色体由二条染色单体表示。对于本发明,人中期 II 卵母细胞单性生殖活化后的第二减数分裂的抑制和二倍体胚胎的产生导致 MHC- 杂合 phESC 的获得。

[0060] 通常,哺乳动物输卵管和子宫中的氧张力远小于在正常大气中发现的氧张力的一半 (Fischer 和 Bavister, *J Reprod Fertil* (1993) 99:673-679 ;Kaufman 等, *Comp. Biochem Physiol Comp Physiol* (1994) 107:673-678)。对于 IVF 后人胚胎的成功培养,已使用 20% 以及 5% 的氧浓度。但是,增加的氧可产生可诱导凋亡的活性氧种类 (Van Soom 等, *Theriogenology* (2002) 57:1453-1465)。已报道,低氧浓度增加植入前胚胎的存活性,帮助它们的正常发育并给予健康胚泡形成的较高发生率,其通过更多细胞数量和内细胞团 (ICM) 的良好形成显示 (Dumoulin 等, *Hum Reprod* (1999) 14:465-469)。在以往的研究中,使用具有高 (20%) 氧含量的气体混合物,人单性生殖胚胎在体外发育 (Lin 等, *Stem Cell* (2003) 21:152-161 ; Cibelli 等, *J Reg Med* (2001) 2:25-31)。

[0061] 在一个实施方式中,ICM 分离和 phESC 培养的方法包括使用人皮肤成纤维细胞,以及细胞用人脐带血清 (HUCBS) 而不是用动物血清繁殖并将它们用做饲养细胞。phESC 系的衍生和培养可在为 hESC 培养设计的 VitroHES 培养基 (Vitolife) 中添加 HUCBS 进行。例如,在 hESCs 产生中使用 HUCBS 具有对 ICM 生长和 phESC 繁殖的正效应(例如,添加 HUCBS 与缺乏 HUCBS 相比,在 VitroHES 培养基中的 phESC 生长更好)。进一步,与免疫外科和胰蛋白酶处理相比,通过从滋养外胚层生长的机械剪切从全胚泡中分离 ICMs 显示为更温和与优选的方法。此外,该方法允许与动物衍生试剂之间相互作用的排除。

[0062] 虽然本发明的 phESC 系显示 hESC 系表现出的一般特征,但是它们也显示独特的特征,其包括实际上与卵母细胞供体的基因型相同的基因型,如见于单性生殖衍生的猴 ES 细胞系 Cyno-1 (Vrana 等, 2003, *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 100:11911-11916)。同样地,与 SCNT 比较,从单性生殖胚胎产生 hESC 系可以是产生 MHC- 匹配的和可能组织相容的胚胎干细胞的较好方法。

[0063] 如小鼠和猴单性生殖干细胞的以往研究已显示的,这些细胞可形成畸胎瘤,其具

有来自所有三个胚层的衍生物 (Lin 等, 2003, 见上文; Vrana 等, 见上文)。在选择性培养条件下, 猴单性生殖胚胎干细胞已分化成神经细胞和功能性的多巴胺能和 5-羟色胺能神经元 (Vrana 等, 2003, 见上文)。本发明的 phESC 也可体外和体内分化成所有三个胚层的衍生物并且是多能性的。此外, 来自 phESC 的胚状体能够产生搏动的心肌细胞样细胞。

[0064] 本发明表明产生单性生殖人胚胎干细胞的方法, 其中实验性数据显示, phESC 可分化成在治疗人类变性疾病中可具有重大价值的功能性细胞。

[0065] 在一个实施方式中, 中期 II 卵母细胞在不同的 O₂ 张力气体环境下通过温育卵母细胞而激活。在一个相关方面, 低 O₂ 张力气体环境由包含大约 2%、3%、4%、或 5% 的 O₂ 浓度的气体混合物产生。在进一步相关的方面, 气体混合物包含大约 5% CO₂。进一步地, 气体混合物包含大约 90% N₂、91% N₂ 或 93% N₂。这种气体混合物区别于含有 5% CO₂ 的空气, 其大约有约 5% CO₂、20% O₂ 和 75% N₂。

[0066] “O₂ 张力”是指在流体 (例如, 液体或气体) 中的氧气的分压 (气体混合物的单一成分施加的压力)。低张力是当氧分压 (pO₂) 低时的情况, 高张力是当 pO₂ 高时的情况。

[0067] “确定成分培养基条件”是指培养细胞的环境, 其中详细描述了最佳成长所需要的其中成分的浓度。例如, 取决于细胞的用途 (例如, 治疗应用), 从包含异种蛋白质的条件中取出细胞是重要的; 即, 培养条件是无动物条件或无非人动物蛋白质。在一个相关方面, “体外受精 (IVF) 培养基”是指包含受精卵母细胞能够在其中或其上成长的化学限定物质的营养系统。

[0068] “胞外基质 (ECM) 基底 (Extracellular matrix substrate)”是指支撑最佳生长的细胞下的表面。例如, 这种 ECM 基底包括但不限于: Matrigel、层粘连蛋白、明胶和纤连蛋白基底。在一个相关方面, 这样的基底可以包括胶原蛋白 IV、巢蛋白, 肝素硫酸盐蛋白聚糖, 包括不同的生长因子 (例如, bFGF、表皮生长因子、胰岛素样生长因子-1、血小板衍生生长因子、神经生长因子和 TGF- β -1)。

[0069] “胚胎 (Embryo)”是指细胞激活产生的胚胎, 所述细胞例如, 卵母细胞或包含所有雄性或雌性来源 DNA 的其它胚胎细胞, 其可以任选地被修饰, 其包括可辨别的滋养外胚层和内细胞团, 其不能产生存活的后代并且其中 DNA 为全部雄性或雌性来源。内细胞团或其中包含的细胞对于如前面所定义的多能细胞的产生是有用的。

[0070] “内细胞团 (ICM)”是指产生胎儿组织的胚胎内部部分。在本文中, 这些细胞被用于在体外提供多能细胞的持续来源。而且, ICM 包括从雄核发育或雌核发育得到的胚胎的内部部分, 即, 包含所有雄性或雌性来源 DNA 的细胞激活后得到的胚胎。例如, 这种 DNA 将是人 DNA, 例如, 人类卵母细胞或精子 DNA, 其可以被遗传修饰或可以不被遗传修饰。

[0071] “滋养外胚层”是指产生胎盘组织的早期胚胎的另一部分, 包括从雄核发育或雌核发育得到的胚胎的组织, 即, 包含所有雄性或雌性来源例如人类卵巢或精子的 DNA 的细胞激活得到的胚胎。

[0072] “分化细胞”是指具有特定分化状态即非胚胎状态的非胚胎细胞。三种最早分化的细胞类型是内胚层、中胚层和外胚层。

[0073] “实质上相同的”指关于特定特征的性质相同, 其如此相近以至于在测量差异 (例如, 通过 HLA 分型、SNP 分析和类似方法) 能力内基本上相同。

[0074] “组织相容的”是指生物体耐受外来组织移植的程度。

[0075] “基因组印记”是指这样的机制,通过该机制,基因组中的许多基因根据它们的亲本来源被单等位基因地表达。

[0076] “同型异源性”,包括其语法上的变化,是指在细胞或个体中存在相同类型的线粒体 DNA (mtDNA)。

[0077] “异质性”,包括其语法的变化,是指在细胞或个体中存在一种以上类型的线粒体 DNA (mtDNA) 的混合物。

[0078] “单亲的”是指一个或更多个细胞或个体,另一细胞或个体从其中产生并且对其保持次生性 (subsidiary)。

[0079] “机械地分离”是指通过物理力分离细胞集合体的过程。例如,这种过程将排除可能含有非人物质的酶 (或其它细胞分裂产品) 的应用。

[0080] 在天然环境中,来自卵巢的未成熟卵母细胞 (卵) 经历成熟过程,其导致通过减数分裂进展到减数分裂中期 II。随后卵母细胞停滞在中期 II。在中期 II 中,细胞的 DNA 内容物由单倍数目的染色体组成,每个染色体由二条染色单体表示。

[0081] 这样的卵母细胞可以通过冷藏被无限保存,例如通过用糖显微注射,但不限于此。

[0082] 在一个实施方式中,提供了从冷藏的卵母细胞或单性生殖体产生人类干细胞的方法,包括:向卵母细胞或单性生殖体的细胞质中显微注射冷藏剂,冷冻卵母细胞或单性生殖体到低温温度使它进入休眠状态,在休眠状态下储存卵母细胞或单性生殖体,解冻卵母细胞或单性生殖体,在高 O_2 张力下在离子载体存在下单性生殖激活卵母细胞,随后在低 O_2 张力下使卵母细胞与丝氨酸 - 苏氨酸激酶抑制剂接触,培养激活的卵母细胞或单性生殖体直到胚泡形成,从胚泡分离内细胞团 (ICM),和在饲养细胞层上培养 ICM 细胞,其中培养 ICM 细胞在高 O_2 张力下进行。

[0083] 在一方面,如所述取得的卵母细胞被转移到改良型、等张的 IVF——其被胚胎测试矿物油 (Sigma) 覆盖,或任何其它适合的培养基中。如果期望,卵母细胞可以用与计划进行显微注射的量浓度相同的细胞外糖温育。例如,为注入 0.1M 糖,卵母细胞可以在 DMEM/F-12 中用 0.1M 糖平衡。在一方面,冷藏剂包含比标准 DMEM 低的 Na^+ 浓度 (即,低 Na^+ 介质 (media))。在一相关方面,冷藏剂包含比标准 DMEM 更高的 K^+ 浓度 (即,高 K^+)。在另一相关方面,冷藏剂包含比标准 DMEM 更低的 Na^+ 和更高的 K^+ 浓度 (即,低 Na^+ / 高 K^+ 介质)。在一方面,冷藏剂包括有机缓冲剂,包括但不限于 HEPES。在另一方面,冷藏剂包括抑制凋亡蛋白 (例如,胱天蛋白酶) 的部分。

[0084] 可选地,卵母细胞可以任选地用任何其它实质上不可渗透的溶质例如 NaCl 平衡,以在显微注射之前降低它们的细胞体积。相对于在显微注射之前没有在高渗介质中温育的卵母细胞,细胞体积的这种最初的降低可以导致较小最终体积的显微注射卵母细胞。这种较小最终体积可以最小化卵母细胞膨胀引起的任何可能的负面影响。用于制备显微注射的细胞的这种一般程序也可以用于其它细胞类型 (例如,激活的卵母细胞、hES 细胞和类似细胞)。

[0085] 随后卵母细胞用冷藏剂显微注射。显微注射设备和程序在本领域被充分表征,并且已知用于注射小分子到细胞中的显微注射设备可以在本发明中使用。在示例性显微注射步骤中,卵母细胞可以在 10psi 压力下被显微注射 30 毫秒。另一个标准显微注射技术的实例为由 Nakayama 和 Yanagimachi 描述的方法 (Nature Biotech. 16:639-642, 1998)。

[0086] 可用于该方法的冷藏剂包括具有低温保护性质和一般不可渗透的任何化学物质。具体地,冷藏剂可以包括单独的糖或糖与其它传统冷藏剂混合在一起。碳水化合物糖例如海藻糖、蔗糖、果糖和蜜三糖可以被显微注射为浓度少于或等于大约 1.0M,更优选地,少于或等于约 0.4M。在一方面,浓度为 0.05 到 0.20M 之间,包括 0.05 和 0.20M。此外,细胞外糖或传统冷藏剂可以在储存之前被加入。如果细胞在显微注射之前在高渗溶液中被温育,在显微注射之后实质上不可渗透的溶质可以允许保持在介质中,或可以通过用含有更低浓度的这种溶质或不含这种溶质的介质洗涤细胞而从培养基中去除。

[0087] 一些糖或多糖——其通常不透过细胞膜,因为它们太大以至于不能穿过细胞膜——对于冷藏目的具有优良的物理化学和生物学性质。虽然这些糖通常自身不渗透细胞膜,但利用所描述的方法,这些通常非渗透性的糖可以被细胞内显微注射,产生有利效果。

[0088] 非渗透性糖——其对细胞具有稳定或保存作用,在本方法中特别用作冷藏剂——包括:蔗糖、海藻糖、果糖、葡聚糖和蜜三糖。在这些糖中,海藻糖——葡萄糖的非还原二糖——已经显示了在低浓度下在稳定细胞结构方面的优异效应。细胞外糖脂或糖蛋白的加入也可以稳定细胞膜。

[0089] 在冷藏剂显微注射之后,细胞被制备用于储存。多种冷冻和/或干燥方法可以被用于制备储存用细胞。具体地,本文描述三种方法:真空或风干、冷冻干燥和冻融方法。干燥方法具有稳定的生物材料可以在环境温度下被运输和储存的优点。

[0090] 通常地,在投入液氮进行储存之前,加载有 1 到 2M DMSO 的卵母细胞以非常慢的冷却速率(0.3 到 0.5°C / 分钟)被冷却到中间温度(-60°C 到 -80°C)。然后样品可以在此温度下被保存。

[0091] 随后悬浮材料可以在冷藏温度下被保存所希望的时间,例如,通过使小瓶留在液氮(LN₂)中。

[0092] 真空或风干或冷冻干燥蛋白质的方案在本领域中被充分表征(Frank 等,“Materials Science and the Production of Shelf-Stable Biologicals”BioPharm, October 1991, p. 39; Shalaev 等,“Changes in the Physical State of Model Mixture during Freezing and Drying: Impact on Product Quality,”Cryobiol. 33, 14-26(1996)),并且这些方案可以被用于制备使用描述的方法储存的细胞悬浮液。除风干之外,可以用来从细胞悬浮液中去除水的其它对流干燥方法包括氮气或其它气体的对流。

[0093] 对本发明方法有用的示例性蒸发真空干燥方法可以包括在 12 孔板上的孔中各放置 20 μ l 并且在环境温度下真空干燥 2 小时。当然,可以使用其它的干燥方法,包括干燥小瓶中的细胞。以这种方式制备的细胞可以被干燥保存,并且通过在 DMEM 中或任何其它适合培养基中稀释而再水合。

[0094] 使用冷冻干燥制备用于储存的细胞的本发明的方法由冷冻细胞悬浮液开始。虽然本领域已知的冷冻方法可以被使用,但本文针对冻融方法所描述的简单投入冷冻(plunge freezing)方法也可以被用于冷冻干燥方案中的冷冻步骤。

[0095] 冷冻之后,可以应用二阶段干燥过程。在第一阶段,升华作用能被加入以便蒸发冷冻水。在样品中的纯晶体冰已经被升华之后,进行第二干燥。冷冻干燥的细胞能够被保存并且以如上面针对真空干燥所述的相同方式被水合。随后存活细胞可以被恢复。

[0096] 细胞从冷冻或干燥状态恢复之后,任何外部的冷藏剂可以任选地从培养基中去除。例如,可以通过加入具有较低浓度冷藏剂的相应培养基来稀释培养基。例如,恢复细胞可以在含有比用于细胞储存的糖浓度低的糖的培养基中温育大约五分钟。对于这一温育,培养基可以包含与用作冷藏剂的糖相同的糖;不同冷藏剂,例如半乳糖;或任何其它实质上不可渗透的溶质。为了最小化由培养基渗透性降低而诱发的任何渗透扰动,细胞外冷藏剂的浓度可以通过进行多次这种稀释步骤而缓慢地降低,每次稀释使用更低浓度的冷藏剂。这些稀释步骤可以重复,直到不存在细胞外冷藏剂或直到冷藏剂的浓度或培养基的渗透性降低到所期望的水平。

[0097] 单性生殖激活的卵母细胞、胚泡、ICM、自体干细胞和源自它们的分化细胞可以允许细胞应将来需要而复苏的方式被储存或“库存(banked)”。单性生殖激活的卵母细胞和自体或同种异体干细胞的等分试样可以在任何时间被移出,成长为许多未分化细胞的培养物和随后分化成特定的细胞类型或组织类型,并且随后可以被用于治疗疾病或替代对象中的功能异常组织。一方面,细胞从供体单性生殖得到,所述细胞能够被保存,使得个体或近亲能够长时期地得到细胞。另一方面,细胞从人群中常见的HLA-单元型纯合供体单性生殖得到,所述细胞可被储存以使具有相同或几乎相同HLA-单元型的个体可在延长的时间段得到细胞。一方面,细胞从人群中常见的具有HLA-单元型的供体单性生殖得到,以及细胞可被储存以使具有相同或几乎相同的HLA-单元型的个体可在延长的时间段得到细胞。

[0098] 在一个实施方式中,提供用于储存单性生殖激活的卵母细胞、胚泡、ICM和/或自体或同种异体干细胞样品和其分化衍生物的细胞库。在另一个实施方式中,提供了施用这种细胞库的方法。美国专利申请公开号20030215942在此引入全文作为参考,其提供了干细胞库系统的实例。

[0099] 使用如上面所描述的方法,单性生殖激活的卵母细胞、胚泡、ICM和/或自体或同种异体干细胞样品和其分化衍生物的分离和体外繁殖以及它们的冷藏帮助建立可移植人干细胞“库”。因为有可能储存较小的细胞等分试样,建库过程可以占据相对小的空间。因此,许多个体的细胞可以以短期或长期基础、以相对少的费用被储存或“库存”。

[0100] 在一个实施方式中,在加工和储存之前或之后,使一部分样品可用于测试。

[0101] 本发明还提供记录或指示(indexing)单性生殖激活的卵母细胞、胚泡、ICM和/或自体或同种异体干细胞样品和其分化衍生物的方法,以便当需要定位样品时,它可以容易地被找回(retrieved)。任何指示和检索系统(indexing and retrieval system)都可以被用于实施此目的。任何合适的储存系统类型都可以被应用,以便能够储存单性生殖激活的卵母细胞、胚泡、ICM和/或自体同种异体干细胞和其分化衍生物。样品可以被设计以储存单独的样品,或可以被设计以储存数百、数千、甚至数百万的不同细胞样品。

[0102] 储存的单性生殖激活的卵母细胞、胚泡、ICM、和/或自体或同种异体干细胞样品和其分化衍生物可以被指示,以便可靠和准确地找回。例如,每一样品可以以字母数字编码、条形码、或任何其它方法或它们的组合来标记。还可以有可得到的和可读的信息列表,其能够识别每一单性生殖激活的卵母细胞、胚泡、ICM、和/或自体同种异体干细胞样品和其分化衍生物和它们在库中的位置以及能够识别库外的细胞样品的来源和/或类型。这种指示系统可以以本领域任何熟知的方式操作,例如,手工地或非手工地操作,例如,可以应用计算机和常规软件。

[0103] 在一个实施方式中,使用指示系统组织细胞样品,以便对于供体的使用,无论什么时间需要,样品都将是可得到的。在其它实施方式中,细胞样品可以被与起初供体相关的个体使用。在可选的实施方式中,细胞样品可以被具有与细胞样品的 HLA- 单元型匹配的 HLA- 单元型的个体使用。一旦被记录到指示系统中,细胞样品可以用于匹配目的,例如,匹配程序将确定具有匹配类型信息的个体以及个体将具有被提供匹配样品的选择。

[0104] 储存库系统 (storage banking system) 可以包括用于储存多个记录的系统,所述记录与多个个体和多个细胞样品有关。每条记录可包含类型信息,与细胞样品或具体个体相关的基因型信息或表型信息。在一个实施方式中,系统将包括交叉匹配表 (cross-match table), 其将样品类型与想接受样品的个体的类型相匹配。

[0105] 在一个实施方式中,数据库系统储存库中的每一单性生殖激活的卵母细胞、胚胎、ICM、和 / 或自体或同种异体干细胞样品或其分化衍生物的信息。某些信息与每一样品关联储存。信息可以与具体供体,例如,供体的身份和供体的医疗史相关。例如,每一样品可以是 HLA 分型的并且 HLA 类型信息可以与每一样品关联储存。储存的信息还可以是可利用信息。每一样品储存的信息是可搜索的,并且以样品可以被定位和立即提供给客户这样的方式确定样品。

[0106] 因此,本发明的实施方式使用基于计算机的系统,所述系统包含信息例如供体、提交日期、提交细胞的类型、存在的细胞表面标志物类型、细胞的 HLA 类型、关于供体的遗传信息、或其它相关的信息、以及例如保藏记录和储存样品的位置的储存细节、和其它有用的信息。

[0107] 术语“基于计算机的系统”是指硬件,软件,和任何用于储存、搜索和检索关于储存细胞的信息的数据库。基于计算机的系统优选地包括上面所描述的存储介质,和用于存取和操作数据的处理器。这种实施方式的基于计算机系统的硬件包括中央处理单元 (CPU) 和数据库。技术人员可以容易地知道,任何一种目前可用的基于计算机系统都是适合的。

[0108] 在一个实施方式中,计算机系统包括与总线 (bus) 相连的处理器,母线与主存储器 (优选地执行为 RAM) 和许多辅助存储设备例如硬盘驱动器和可移动介质存储设备相连。可移动介质存储设备可以表现为,例如,软盘驱动器、DVD 驱动器、光盘驱动器、只读光盘驱动器 (compact disk drive)、磁带驱动器等。可移动存储介质例如软盘、只读光盘、磁带等可以被插入到可移动储存设备中,所述可移动存储介质包含记录在其中的控制逻辑和 / 或数据。计算机系统包括合适的软件,用于在插入可移动介质存储设备中时阅读来自可移动介质存储设备的控制逻辑和 / 或数据。关于单性生殖激活的卵母细胞、胚胎、ICM 和 / 或自体干细胞的信息可以以众所周知的方式存储在主存储器、任何辅助存储设备、和 / 或可移动存储介质中。在运行期间,用于存取和处理这些数据的软件 (例如搜索工具、比较工具等) 保留在主存储器中。

[0109] 如本文所用,“数据库”是指存储器,其能够存储与单性生殖激活的卵母细胞集合和 / 或自体或同种异体干细胞集合——包括其分化衍生物——和供体相关的任何有用信息。

[0110] 与存储的单性生殖激活的卵母细胞、胚胎、ICM 和 / 或自体或同种异体干细胞和其分化衍生物相关的数据可以以多种格式在多种数据处理程序中被存储和操作。例如,数据可以作为文本存储在文字处理文件中,如 Microsoft WORD 或 WORDPERFECT, ASCII 文件,

html 文件,或以本领域技术人员熟悉的多种数据库程序如 DB2、SYBASE、或 ORACLE 存储在 pdf 文件中。

[0111] “搜索程序 (search program)”是指一个或多个程序,其在基于计算机的系统上执行,以便搜索与数据库中的冷藏样品有关的细节或比较与数据库中的冷藏样品有关的信息。“检索程序 (retrieval program)”是指一个或多个程序,其可在基于计算机的系统上执行,以便识别数据库中的感兴趣参数。例如,检索程序可以用于发现适合具体特征的样品,具有特定标志物或 DNA 序列的样品,或用于发现对应于具体个体的样品位置。

[0112] 能够被储存于一个细胞库中的细胞样品的数目没有上限。在一个实施方式中,来自不同个体的数百个产品会被储存在一个库或储存设备 (storage facility) 中。在另一个实施方式中,多达数百万的产品可被储存在一个储存设备中。单个储存设备可以被用于储存单性生殖激活的卵母细胞和 / 或自体干细胞样品,或多个储存设备可以被应用。

[0113] 在本发明的一些实施方式中,储存设备可以具有用于组织和指示储存的细胞样品的任何方法的手段,诸如,例如,自动机器人检索机构和细胞样品操作机构。设备可以包括用于处理细胞样品的微操作装置。已知的常规技术可以被用于有效储存和找回细胞样品。示例性技术包括但不限于:机器视觉 (Machine Vision)、机器人、自动引导车系统 (Automated Guided Vehicle System)、自动储存和检索系统、计算机集成制造、计算机辅助工艺设计、统计过程控制等。

[0114] 与需要样品的个体有关的类型信息或其它信息可以被记录在系统中,其可以被用于鉴定合适的匹配产品,诸如,例如,数据库系统,指示系统等。一旦在系统中被记录,则个体与供体细胞样品的类型之间可以进行匹配。在优选的实施方式中,供体样品来自与需要样品的个体相同的个体。然而,也可以使用相似但不相同的供体 / 受体匹配。对于具有匹配类型标识符的个体,匹配样品是可得的。在本发明的一个实施方式中,个体的识别信息与细胞样品关联储存。在一些实施方式中,匹配过程发生在大约收获样品的时间,或可以发生在处理、存储期间的任何时间,或在出现需求时。因此,在本发明的一些实施方式中,匹配过程发生在个体实际需要细胞样品之前。

[0115] 当个体需要单性生殖激活的卵母细胞、胚泡、ICM、和 / 或自体干细胞样品——包括其分化衍生物——时,如果期望,可以在几分钟内找到它并且使其可用于研究、移植或其它目的。也可以进一步处理样品以便制备样品用于移植或其它需求。

[0116] 通常地,被阻止在中期 II 的卵母细胞排卵和经过精子受精。精子在所谓的激活过程中开始完成减数分裂。在激活过程中,染色单体对分离,第二极体被挤出,以及卵母细胞保留单倍数目的染色体,每一个染色体具有一条染色单体。精子贡献染色体的另一单倍体互补物,以便形成具有单个染色单体的完整的二倍体细胞。随后染色体在第一次细胞周期期间经过 DNA 合成而发展。这些细胞随后发育成为胚胎。

[0117] 与之对照,本文所描述的胚胎通过细胞的人工激活而发育,所述细胞一般为包含所有雄性或雌性来源 DNA 的哺乳动物卵母细胞或卵裂球。如背景技术中讨论的,在文献中已经报道了未受精卵母细胞的人工激活方法。这样的方法包括物理方法,例如,机械方法如刺破、操作培养中的卵母细胞;热方法例如冷却和加热;反复电脉冲;酶处理例如胰蛋白酶、链霉菌蛋白酶、透明质酸酶;渗透处理;离子处理例如利用二价阳离子和钙离子载体,例如离子霉素和 A23187;麻醉剂的使用例如醚、乙醇、丁卡因、利诺卡因、普鲁卡因、吩噻嗪;

镇定剂例如甲硫哒嗪、三氟啦嗪、氟奋乃静、氯丙嗪；蛋白质合成抑制剂的使用，例如环己酰亚胺（放线菌酮）、嘌呤霉素；磷酸化作用抑制剂的使用，例如蛋白激酶抑制剂，如星形孢菌素、2-氨基嘌呤、鞘氨醇和 DMAP；它们的组合；以及其它方法。

[0118] 这些激活方法是本领域熟知的，并且在例如美国专利第 5,945,577 号中讨论。

[0119] 在一个实施方式中，在中期 II 的人细胞，一般是包括所有雄性或雌性来源 DNA 的卵母细胞或卵裂球，被人工激活用于引起卵母细胞的人工激活。

[0120] 在一个相关的方面，激活的细胞，例如，卵母细胞——其为二倍体，被允许发育成为包含滋养外胚层和内细胞团的胚胎。这可以使用已知的方法和帮助胚泡发育的培养基来实现。

[0121] 在单雌生殖胚胎已经被培养产生可辨别的滋养外胚层和内细胞团之后，内细胞团的细胞随后被用于产生希望的多能细胞系。这可以通过将来自内细胞团的细胞或整个内细胞团转移到抑制分化的培养物上而完成。这可以通过将内细胞团细胞转移到抑制分化的饲养层上而完成，例如成纤维细胞或上皮细胞，诸如从出生后人类组织得到的成纤维细胞等，或产生 LIF 的其它细胞。为将细胞保持在未分化状态，可以使用其它的因子 / 成分以提供合适的培养条件，包括但不限于：加入条件培养基 (Amit 等, *Developmental Biol*(2000) 227:271-278)、bFGF 和 TGF- β 1 (含有或不含有 LIF) (Amit 等, *Biol Reprod*(2004) 70:837-845)、激活 gp130/STAT3 途径的因子 (Hoffman 和 Carpenter, *Nature Biotech*(2005) 23(6):699-708)、激活 PI3K/Akt, PKB 途径的因子 (Kim 等, *FEBS Lett*(2005) 579:534-540)、为骨形成蛋白 (BMP) 超家族成员的因子 (Hoffman 和 Carpenter(2005), 见上文)、以及激活规范 / β -联蛋白 (canonical/ β -catenin) Wnt 信号途径的因子 (例如, GSK-3-特异性抑制剂; Sato 等, *Nat Med*(2004) 10:55-63)。在一相关方面, 这些因子可以包含含有饲养细胞和 / 或 ECM 基底的培养条件 (Hoffman 和 Carpenter(2005), 见上文)。

[0122] 在一方面, 内细胞团细胞在人出生后包皮或皮肤成纤维细胞或产生白血病抑制因子的其它细胞上, 或在白血病抑制因子存在的情况下被培养。在一相关的方面, 在 ICM 种植之前, 饲养细胞被失活。例如, 饲养细胞可以使用抗生素被有丝分裂失活。在一个相关方面, 抗生素可以是但不限于丝裂霉素 C。在一个相关方面, 饲养细胞可使用辐射而失活。

[0123] 培养将在这样的条件下实现, 所述条件将细胞维持在未分化的多能状态下达延长的时期, 理论上无限期。在一个实施方式中, 卵母细胞在高 O_2 张力下用钙离子载体被单性生殖激活, 随后使卵母细胞在低 O_2 张力下与丝氨酸 - 苏氨酸激酶抑制剂接触。从单性生殖激活的卵母细胞得到的 ICM 在高 O_2 张力下被培养, 其中例如使用含有 20% O_2 的气体混合物维持细胞。在一方面, 可培养是指能够或适于被培养。在一相关方面, 在胚泡培养四天之后, 机械地进行 ICM 分离, 其中培养在饲养细胞上进行。这样的培养, 例如, 消除了使用来自动物来源的材料的需求——如免疫外科的情况。

[0124] 在一相关的方面, 用于 ICM 的培养基补充有非动物血清, 包括但不限于人脐带血清, 其中血清在确定成分培养基中存在 (例如, IVF, 可从 MediCultA/S, Denmark; Vitrolife, Sweden; 或 Zander IVF, Inc, Vero Beach, FL 获得)。另一方面, 所提供的培养基和过程不含动物产品。在一相关方面, 动物产品是那些来自非人来源的产品, 包括血清、干扰素、趋化因子、细胞因子、激素以及生长因子。

[0125] 本发明产生细胞的多能状态可以通过多种方法确认。例如,可以测试细胞中特征性 ES 细胞标志物的存在或不存在。在人类 ES 细胞的情况下,这种标志物的实例如上述被鉴定,并且包括 SSEA-4、SSEA-3、TRA-1-60、TRA-1-81 和 OCT4,它们在本领域中是已知的。

[0126] 而且,可以通过将细胞注射到合适的动物例如 SCID 小鼠中和观察分化细胞和组织的产生来确认多能性。确认多能性的又一方法是,使用对象多能细胞产生嵌合动物以及观察引入细胞对不同细胞类型的贡献。生产嵌合动物的方法在本领域中是公知的,并且在美国专利第 6,642,433 号中描述。

[0127] 确认多能性的又一方法是,在有利于分化的条件下(例如,成纤维细胞饲养层的移除)培养时,观察到 ES 细胞分化为胚状体和其它分化细胞类型。这一方法已经被使用,并且已经确认,对象多能细胞在组织培养中产生胚状体和不同的分化细胞类型。

[0128] 得到的多能细胞和细胞系,优选人多能细胞和细胞系——其来自全部雌性来源的 DNA,具有多种治疗和诊断应用。在多种疾病状态的治疗中,这种多能细胞可以被用于细胞移植治疗或基因治疗(如果被遗传修饰)。

[0129] 就此而言,已知小鼠胚胎干(embryonic stem,ES)细胞能分化成几乎任何细胞类型。因此,根据本发明产生的人多能(ES)细胞应当具有类似的分化能力。根据本发明的多能细胞将根据已知方法被诱导分化而得到期望的细胞类型。例如,根据本发明产生的人 ES 细胞可以被诱导分化成造血干细胞、肌细胞、心肌细胞、肝细胞、胰岛细胞、视网膜细胞、软骨细胞、上皮细胞、尿路细胞等,这是通过在分化培养基中和在提供进行细胞分化的条件下培养这些细胞来实施的。引起 ES 细胞分化的培养基和方法与合适的培养条件一样,是本领域已知的。

[0130] 例如,Palacios 等,Proc. Natl. Acad. USA, 92 :7530-7537 (1995) 教导了造血干细胞从胚细胞系的产生,其通过使干细胞接受诱导过程实施,所述诱导过程包括:最初,在缺乏视黄酸的悬浮培养基中,培养这种细胞的聚集体,随后,在包含视黄酸的相同培养基中进行培养,随后,将细胞聚集体转移到提供用于细胞粘附的基底上。

[0131] 而且, Pedersen, J., Reprod. Fertil. Dev., 6:543-552 (1994) 是综述性论文,其引用了公开体外分化胚胎干细胞产生多种分化细胞类型的方法的许多论文,所述细胞类型包括造血细胞、肌细胞、心肌细胞、神经细胞等。

[0132] 并且, Bain 等, Dev. Biol., 168 :342-357 (1995) 教导了体外分化胚胎干细胞产生具有神经元特性的神经细胞。这些参考文献是用于从胚细胞或干细胞获得分化细胞的示例性的已报道方法。因此,使用已知的方法和培养基,本领域技术人员可以培养对象 ES 细胞,包括基因工程化的或转基因的 ES 细胞,以获得希望的分化细胞类型,例如,神经细胞、肌细胞、造血细胞等。通过本文所描述的方法产生的多能细胞可被用于获得任何希望的分化细胞类型。

[0133] 例如, hpSC-Hhom 系的主要组织相容性复合物(MHC) 纯合性可独特地适于治疗应用。根据卵母细胞供体的 HLA 单元型和供体的生物亲本的 HLA- 单元型对卵母细胞供体进行适当的选择,并采用 FDA 批准的制造方法,有可能产生这样的细胞系库,其组织衍生物可共同地与相当数量的个体进行 MHC- 匹配。已表明,针对常见类型选择的仅十个 HLA 纯合人胚胎干细胞系的一组可对 37.7% 的英国受体提供完全的 HLA-A、HLA-B 和 HLA-DR 匹配,以及对 67.4% 提供有益匹配(Taylor C. J. 等, Lancet (2005) 366 (9502):2019-2025)。使

用美国人群计算表明,每个种群存在接近 200 个常见单元型 (Mori M. 等, *Transplantation* (1997) 64:1017-1027)。HpSC-Hhom-4 系携带最常见的单元型,可能对这些人群中接近 5% 个体提供 MHC 匹配。因此, hpSC-Hhom 系理想地适合于建立与该人群 HLA- 匹配的分化细胞和组织储存库 (repository), 其可用于即时临床应用。可能的关注是造血衍生物, 其可潜在地在杂合受体中引起移植物抗宿主病 (Billingham, RE., *Harv Led* (1966) 62:21-78), 在这种情况下, 患者特异性单性生殖干细胞可提供解决方法。

[0134] 分化的人类细胞的治疗用途是空前的。例如, 人造血干细胞可以被用于需要骨髓移植的医学治疗中。这种过程被用于治疗许多疾病, 例如, 晚期癌症如卵巢癌和白血病, 和损害免疫系统的疾病如 AIDS。造血干细胞可以如下取得, 例如, 通过将来自雄性或雌性癌症或 AIDS 患者的雄性或雌性 DNA 与去核卵母细胞整合, 得到如上述的多能细胞, 和在有利于分化的条件下培养这样的细胞, 直到得到造血干细胞。这样的造血细胞可以被用在包括癌症和 AIDS 的疾病的治疗中。

[0135] 可选地, 通过在产生神经细胞系的分化条件下培养对象多能细胞 (the subject pluripotent cells), 所述多能细胞可以被用于治疗患有神经疾病的患者。能够通过移植这样的人神经细胞治疗的具体疾病示例性地包括: 帕金森氏症、阿尔茨海默氏症、ALS 和脑性麻痹等。在帕金森氏症的具体情况下, 已经证实, 移植的胎儿脑神经细胞与周围细胞正确连接并且产生多巴胺。这可以使得帕金森氏症的症状长期逆转。在一个相关的方面, 神经前体可以用于恢复 (reanneal) 切断的 / 受伤的神经纤维, 以便在手、腿和脊髓损伤后恢复运动。

[0136] 本发明的一个目标是提供多能人细胞的基本上无限的供给, 所述细胞可用于产生适合于卵母细胞供体自体移植或 HLA- 匹配受体同种异体移植的分化细胞。当用于同种异体细胞移植治疗时, 源于不育治疗后剩余的胚泡或使用 NT 产生的人胚胎干细胞和它们的分化后代可能被受体的免疫系统排斥。单性生殖衍生的干细胞应产生分化的细胞, 所述分化的细胞会减轻与目前移植方法相关的显著问题, 即, 可由于卵母细胞供体相关的宿主 - 对 - 移植物或移植物 - 对 - 宿主排斥而发生被移植组织的排斥。常规地, 通过施用抗排斥药物例如环孢霉素来防止或减轻排斥。但是, 这些药物具有明显不利的副作用, 例如免疫抑制、致癌性质, 并且非常昂贵。如公开的方法产生的细胞在某些情况下应消除, 并在其它情况下应至少大大降低卵母细胞供体相关的对抗排斥药物的需求。

[0137] 本发明的另一个目标是提供基本上无限的多能人细胞供应, 所述细胞可以被用于产生适合于卵母细胞供体家族成员 (例如, 同胞) 的同种异体移植的分化细胞。这种细胞与卵母细胞供体的直系家族成员的细胞在免疫和遗传方面将是相似的, 因此被供体的家族成员排斥的可能性低。

[0138] 本方法的另一个目标是, 与 SCNT 比较时, 哺乳动物卵母细胞的单性生殖激活是相对简单的方法, 并且使得用更少的细胞操作产生干细胞。

[0139] 已经显示, 在干细胞产生方面, 哺乳动物卵母细胞的单性生殖激活比需要用机械操作卵母细胞的方法 (例如, SCNT) 更有效。

[0140] SCNT 的一个缺点是, 线粒体呼吸链活性不足的对象表现出与通常在 SCNT 胎儿和子代中遇到的表现型异常惊人相似的表现型 (Hiendleder 等, *Repro Fertil Dev* (2005) 17(1-2):69-83)。细胞通常仅仅含有一种类型的线粒体 DNA (mtDNA), 其被称

为同型异源性,但是,异质性确实存在,通常作为突变和野生型 mtDNA 分子的组合或形成野生型变体的组合 (Spikings 等, Hum Repro Update (2006) 12(4):401-415)。因为异质性可以导致线粒体疾病,因此存在多种机制以确保仅仅母系的传送 (maternal-only transmission)。但是,随着绕过用于维持同型异源性的正常机制的方案 (例如,胞浆运输 (CT) 和 SCNT) 越来越多的应用,扰乱的线粒体功能对于来自这些来源的干细胞可以是固有的。

[0141] 在一方面,因为单性生殖体是单亲的,异质性的可能性被最小化。

[0142] 可以由细胞疗法治病的其它疾病和状况示例性地包括:脊髓损伤,多发性硬化症,肌肉萎缩症,糖尿病,肝病——包括急性疾病 (病毒性肝炎、药物过量 (对乙酰氨基酚) 和其它)、慢性疾病 (慢性肝炎和其它 (通常导致肝硬化))、遗传性肝脏疾病 (血友病 B、因子 IX 缺乏、胆红素代谢缺陷、尿素循环缺陷、溶酶体贮积病、 α 1-抗胰蛋白酶缺陷和其它),心脏疾病,软骨替代 (cartilage replacement)、烧伤、足部溃疡、胃肠疾病、脉管疾病、肾病、视网膜疾病、尿路疾病以及衰老相关疾病和状况。

[0143] 这种方法可以被用于替代缺陷的基因,例如,缺陷的免疫系统基因、囊性纤维化基因,或被用于引入引起治疗有利的蛋白质表达的基因,所述蛋白质例如生长因子、淋巴因子、细胞因子、酶等。

[0144] 例如,编码脑衍生生长因子的基因可以被引入根据本发明产生的人多能细胞中,该细胞分化成神经细胞并且该细胞被移植进入帕金森患者体内以延缓这种病期间神经细胞的丢失。

[0145] 并且,对象多能人 ES 细胞可用作体外分化模型,尤其用于涉及临床和生物学研究中的基因的研究。这种研究包括但不限于早期发育调控、再生医学或药物开发。例如,与感兴趣基因一起转录的报告基因 (例如,绿色荧光蛋白 (gfp), 荧光素酶等) 的插入可用于研究疾病、发育生物学、再生医学或药物开发。而且,使用对象 ES 细胞产生的分化的细胞组织和器官可用于药物研究。

[0146] 进一步,对象 ES 细胞或由其得到的分化细胞可以被用作产生其它 ES 细胞和细胞集落的核供体。

[0147] 更进一步地,根据本公开内容得到的多能细胞可以用于鉴定参与胚胎发生的蛋白质和基因。这可以通过例如差异表达实施,即,通过比较根据本发明提供的多能细胞中表达的 mRNAs 和当这些细胞分化成不同的细胞类型例如神经细胞、心肌细胞、其它肌细胞、皮肤细胞等时所表达的 mRNA。因此,有可能确定哪种基因参与特定细胞类型的分化。

[0148] 进一步地,具有特定遗传缺陷如导致杜兴肌营养不良 (Duchene's Muscular Dystrophy) 的遗传缺陷的 ES 细胞和 / 或它们的分化后代,可以被用作研究与该遗传缺陷相关的特定疾病的模型。

[0149] 并且,本公开内容的另一个目标是,以不同浓度以及在不同细胞培养条件下,例如,在不同细胞基质中或在不同的气体分压下培养,使根据所述方法产生的多能细胞系暴露于不同生长因子的混合物,以便确定诱导期望的分化细胞类型产生和繁殖的条件。

[0150] 下述的实施示意图说明本发明而不是限制本发明。

[0151] 实施例

[0152] 人单性生殖胚胎发生干细胞的产生

[0153] 材料和方法

[0154] 供体选择和知情同意方法

[0155] 供体从女性集合中征集,其首先被提供至 IVF 中心,并且查明其符合根据临床指导的 IVF 方法。

[0156] 每个可能的供体由她的医生接洽并被告知该研究并提供咨询。如果供体选择参加,则向供体提供以俄语起草的全面知情同意文件(由独立的基于美国 ESCRO 委员会审查和批准),其概述了研究目的和过程。如果可能的供体有疑问,可由医生进行处理。只有签署知情同意文件的可能的供体参加该研究。

[0157] 供体自愿地捐献卵母细胞而没有支付金钱。供体签署知情同意文件,其陈述,所有的捐献材料被用于研究而不是用于生殖目的,即,衍生人 ES 细胞和它们的分化后代的方法的发展。

[0158] 根据针对人类细胞、组织以及基于细胞和组织的产品的 FDA 合格测定指南 (FDA HCT/PS, 2004) 和俄罗斯公共卫生部第 67 号 (02. 26. 2003), 确定研究合格性。其包括全面的医学检测,具有 X-射线、血液(包括肝功能检测)和尿液分析。供体还被筛查沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、梅毒、HIV、HBV 和 HCV。

[0159] 根据 HLA 型进一步筛选参加研究的可能的供体和亲本。

[0160] 在该方法中,收获卵母细胞的优先选择是成功的 IVF 方法。选择最佳的完全发育成熟的卵丘卵母细胞复合体进行 IVF。如果收获的卵母细胞总数小于 11,则将该女性从用于研究目的的捐赠中自动去除。

[0161] 供体超排卵

[0162] 每一供体在她们月经周期的第 3 天到第 13 天经受应用 FSH(Gonal-F, Lab. Serono, Switzerland) 的卵巢刺激。总计给予 1500IU。在供体月经周期的第 10 天到第 14 天,以 0.25mg/天注射促性腺素释放激素拮抗剂 Orgalutran (Organon, Holland)。在供体月经周期的第 12 天到第 14 天,每天提供注射 75IU FSH+75IU LH (Menopur, Ferring GmbH, Germany)。如果超声波检查显示卵泡直径为 18mm 到 20mm 之间,则在供体月经周期的第 14 天施用单剂量的 8000IU hCG (Choragon, Ferring GmbH, Germany)。在大约第 16 天, hCG 注射之后 35 小时,进行经阴道穿刺。通过超声波引导的针抽吸,将来自麻醉供体囊状卵泡的卵泡液收集到无菌试管中。

[0163] 卵母细胞活化和单性生殖胚胎的培养

[0164] 从卵泡液中选出卵丘卵母细胞复合体 (COCs), 在冲洗培养基 (MediCult) 中冲洗,随后在 20% O₂、5% CO₂, 37°C 潮湿气氛下,在通用 IVF 培养基 (Universal IVF medium) (MediCult) 中孵育 2 小时,用液体石蜡 (MediCult) 覆盖。在激活之前, COCs 用 SynVibro Hyadase (MediCult) 处理而去除卵丘细胞,随后在的通用 IVF 培养基中孵育 30 分钟,用石蜡覆盖。除了 A23187 处理外,在湿润的环境下在 37°C 使用减少 O₂ 的气体混合物 (90% N₂+5% O₂+5% CO₂) 进行卵母细胞和胚胎的进一步培养,其在 COCs 培养所述的条件下进行。通过将卵母细胞连续暴露于 5 μM A23187 (Sigma) 五分钟以及 10 μg/ml 嘌呤霉素 (Sigma) 或 ImM6-DMAP (Sigma) 四小时,在通用 IVF 培养基中进行活化,用石蜡覆盖,然后在通用 IVF 培养基中谨慎地洗涤卵母细胞。然后,将卵母细胞置于新鲜的 IVF 培养基中,培养后用石蜡覆盖。次日(第一天),使用顺序的 BlastAssist 系统培养基 (MediCult), 根据厂商的建议,

将单性生殖活化的卵母细胞培养至胚泡期。从衍生的胚泡中,在第五天从六个培养物中分离内细胞团(ICM)。

[0165] 胚泡内细胞团的分离和 hpSC-Hhom 的培养

[0166] 用 0.5% 链霉蛋白酶 (Sigma) 处理去除透明带。将全胚泡置于丝裂霉素 C 有丝分裂失活的人新生皮肤成纤维细胞 (NSF) 的饲养层上 (Revazova 等, 2007, 上文), 在为 hpSC-Hhom 培养设计的培养基中培养。当胚泡粘附后滋养层细胞铺展时, ICM 成为可见。另外培养三至四天后, 使用精细拉长的玻璃移液管通过从滋养外胚层生长物中机械剪切 ICM 来分离 ICM。分离的 ICM 置于新鲜的饲养层上并另外培养三至四天。将第一个集落机械地切出, 并在培养五天后重新铺板。在培养五至六天后, 得到所有的传代细胞。较早传代集落被机械地分成块并重新铺板。用胶原酶 IV 处理和机械分离进行 hpSC-Hhom 的进一步传代。在湿润气氛下在 37°C、5% CO₂ 下进行 hpSC-Hhom 繁殖。

[0167] 对于 ICM 和 hpSC-Hhom 的培养, 我们使用 VitroHES (Vitrolife), 其补充有 4ng/ml hrbFGF (Chemicon)、5ng/ml hrLIF (Chemicon) 和 10% 人脐带血清。用于 NSF 培养的培养基由 90% DMEM (高葡萄糖, 具有 L-谷氨酰胺) (Invitrogen)、10% 人脐带血清和青霉素-链霉素 (100U/100 μg) (Invitrogen) 组成。在培养基制备前, 对人脐带血清进行梅毒、HIV、HBV 和 HCV 筛选。

[0168] hpSC-Hhom 的表征

[0169] 为了免疫染色胚胎干细胞标记物, 用 4% 多聚甲醛将 hpSC-Hhom 集落在室温固定 20 分钟, 以鉴定 SSEA-1、SSEA-3 和 SSEA-4, 在 -20°C 用 100% 甲醇固定 5 分钟以鉴定其余标记物。所用单克隆抗体包括: 来自 Chemicon 的 SSEA-1 (MAB4301)、SSEA-3 (MAB4303)、SSEA-4 (MAB4304)、TRA-1-60 (MAB4360) 和 TRA-1-81 (MAB4381), 以及来自 Santa Cruz Biotechnology 的 OCT-4 (sc-9081)。第二抗体包括: 来自 Molecular Probes (Invitrogen) 的 Alexa Fluor 546 (橙色-荧光) 和 488 (绿色-荧光), 用 DAPI 染核 (Sigma)。用 AP 试剂盒和 TRAPEZE 试剂盒 (Chemicon) 检测碱性磷酸酶和端粒酶活性。用常规方法制备染色体切片。根据胰蛋白酶-Giemsa 技术进行 G-带分析, 并且在每种情况下对 30-100 个中期染色体进行核型分析。

[0170] 胚状体形成和神经分化

[0171] 将 HpSC-Hhom 集落机械地分成块和置于用 2% 琼脂糖 (Sigma) 预包被的 24-孔簇集板 (cluster plate) 中, 在含有 85% Knockout DMEM、15% 人脐带血清、1×MEM NEAA、1mM Glutamax、0.055mM P-巯基乙醇、青霉素-链霉素 (50U/50 μg) (除血清外均来自 Invitrogen) 的培养基中。在悬浮液中培养胚状体 14 天, 然后铺板进行生长发育或在悬浮液中另外培养一周。

[0172] 在一周时间内, 在分化培养基 DMEM/F12、B27、2mM Glutamax、青霉素-链霉素 (100U/100 μg) 和 20ng/ml hrbFGF (均来自 Invitrogen) 中, 通过培养附着至培养皿表面的两周大的胚状体, 诱导神经分化。一些胚状体产生具有神经形态的分化细胞, 其它被分开并另外培养产生神经球。

[0173] 在与用于产生胚状体的相同培养基中, 在铺至粘附表面上培养五天后, 搏动胚状体 (beating embryoid bodies) 自发出现。

[0174] hpSC-Hhom 分化衍生物的免疫细胞化学

[0175] 胚状体、神经球或收缩胚状体被铺在聚-D-赖氨酸 (Sigma) 处理的小盖玻片 (VWR Scientific Inc.) 上并在适当的分化培养基中培养约一周。对于免疫染色,在 -20°C 用 100% 甲醇固定分化细胞 5 分钟。

[0176] 对于检测外胚层标记物,我们使用单克隆小鼠抗神经丝 68 抗体 (Sigma)、抗人 CD56 (NCAM) 抗体 (Chemicon) 和抗 β III 微管蛋白抗体 (Chemicon) 来显示神经元标记物。抗神经胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 抗体 (Chemicon) 用于检测神经胶质细胞标记物。

[0177] 对于检测三周大的胚状体或收缩胚状体中的中胚层标记物,将单克隆小鼠抗结蛋白抗体 (Chemicon)、抗人 α 辅肌动蛋白抗体 (Chemicon) 用作肌肉特异性标记物,将抗人 CD31/PECAM-1 抗体 (R&D Systems)、抗人 VE-钙粘蛋白 (CD 144) 抗体 (R&D Systems) 用作内皮标记物。

[0178] 对于检测胚状体中的内胚层标记物,使用单克隆小鼠抗人 α -胎蛋白抗体 (R&D Systems)。第二抗体 Alexa Fluor 546 (橙色荧光) 和 488 (绿色荧光) 来自 Molecular Probes (Invitrogen)。用 DAPI 染核 (Sigma)。HLA 基因型分型

[0179] 对供体和它们的亲本进行 HLA 单元型和 HLA 基因型分型的研究。用来自 Dynal (Invitrogen) 的 Dynabeads DNA Direct Blood 从血液、卵丘细胞、hpSC-Hhom 和 NSF 中提取基因组 DNA。用等位基因特异性测序引物 (PCR-SSP, Protrans) 通过 PCR 进行 HLA 基因型分型。所有测试根据厂商推荐进行。

[0180] Affimetrix SNP 微阵列分析

[0181] 通过酚/氯仿提取方法,从血液、卵丘细胞、hpSC-Hhom 和 NSF 分离基因组 DNA。用 Affimetrix Mapping 250K Nsp Arrays 对从三个供体、四个 hpSC-Hhom 系和 NSF 获得的 DNA 样品进行基因型分型。由于包含 252,973 个二进制 (binary) SNP 标记物的原始数据组超过确定基因组样品等价性 (equivalency) 所需的数目,其被减少以简化计算。

[0182] 下列标准用于选择基于遗传考虑的标记物:1) 标记物中的杂合性程度越高,它们提供的鉴定 SNP 样本来源的信息越多。二进制 SNP 标记物的杂合性最大值设为 0.5 (is capped at a maximum of 0.5)。只选择杂合性大于 0.375 的 SNP 标记物 (即在高加索人群中,没有等位基因具有小于 0.25 或大于 0.75 的频率);2) 使用所有 22 对常染色体;3) 去除可靠性低的标记物,因为普通来源样品的鉴定是对基因型分型误差高度敏感的。在 Affymetrix 数据组中,高置信度得分相对应于低可靠性,因此去除这些具有高置信度得分的标记物。在默认设置中,如果它的置信度得分超过 0.25,则对标记物不进行呼叫 (call)。通过对所有 12 个样本只选择那些置信度得分小于或等于 0.02 的标记物,对可靠性应用甚至更为严格的要求。

[0183] 应用这些标准,SNP 标记物的数量从 252,973 个降至 4,444 个。采取一个最终步骤来降低标记物数量 (不进行随机采样),其通过只选择那些标记物间距为至少 0.1cM (1Mbp = 1cM) 的标记物而实施,因为相互距离很近的标记物提供较少的信息,原因在于在它们之间存在紧密连锁。这些步骤产生 3,993 个标记物的最终选择。

[0184] 因此,用 Relcheck (版本 0.67, copyright (C) 2000 Karl W. Broman, Johns Hopkins University, 得到 GNU General Public License version 2 许可 (1991 年 6 月)) 分析所选择的 3,993 个标记物。Relcheck 提供测定一对 SNP 样本之间关系的方法。这基于计算似然比,用于观察根据样本之间的遗传关系的标记物的给定构型。使用 Relcheck 基于的知

识是由于同卵双生双胞胎具有相同 DNA,所以两个样本之间的等价性测试可通过检测是否那些样本可能来自同卵双生双胞胎来进行。运行 Relcheck,假定基因型分型误差率为大约 0.4%。Relcheck 程序鉴定五种类型的关系:同卵双生双胞胎、父母/子女对、全同胞 (full siblings, full sibs)、半同胞 (half siblings, half sibs) 和不相关 (Boehnke M. 等, Am J Hum Genet(1997)61:423-429;Broman K. W. 等, Am J Hum Genet(1998)63:1563-1563)。

[0185] 为了测定供体和干细胞样本 15 条染色体中杂合 SNPs 的比例,对 6 个干细胞系、4 个供体以及 1 个对照样本分析用于早期分析的 1495 个随机取样的 SNP 标记物。

[0186] 通过对染色体 1-12 中的每一条取最后一个可用的 p 标记物 (短臂) 和第一个可用的 q 标记物 (长臂) 之间的中点来测定每条染色体着丝粒的定位。对于近端着丝粒染色体 13-15,在 p 臂上没有 SNP 标记物,因此假定着丝粒在位置 0 (q 臂的起点)。

[0187] 下列数值用作 chr 1-15 的着丝粒定位 (以距 p 臂末端的 Mbp 计):

[0188] 染色体 # Mbp

[0189] chr1 = 131.5051

[0190] chr2 = 92.7926

[0191] chr3 = 93.1514

[0192] chr4 = 51.0889

[0193] chr5 = 46.8726

[0194] chr6 = 60.5099

[0195] chr7 = 57.8019

[0196] chr8 = 45.3089

[0197] chr9 = 54.6881

[0198] chr10 = 39.0399

[0199] chr11 = 52.7549

[0200] chr12 = 35.6473

[0201] chr13 = 0

[0202] chr14 = 0

[0203] chr15 = 0

[0204] 对于每一个 SNP 标记物,计算在具体染色体上距着丝粒的绝对距离 (即,从着丝粒的两个方向被等同处理,所有“负”距离被转换为正距离)。为了计算杂合子的比例,染色体距离 (距着丝粒) 被分为 15 个间隔 (在输出中称为“bins”)。每个间隔在长度上为 10Mbps。分配给每个“bin”的数字相当于那个间隔在染色体距离上的上限。所有单位都以百万碱基对 (Mbp) 表示。例如:

[0205] Bins = 10 相当于距着丝粒的间隔 [0, 10]Mbp。

[0206] Bins = 70 相当于距着丝粒的间隔 [60, 70]Mbp。

[0207] Bins = 150 相当于距着丝粒的间隔 [140, 150]Mbp。

[0208] 原始 Affymetrix SNP 数据组提供的碱基对距离用于保持与之前数据分析的一致性。对于每个间隔,通过在那个间隔中所有 SNPs 的杂合性指示变量的平均值来评估杂合性的比例。

[0209] 对于供体和干细胞,杂合性变量储存供体 (2、12、10、11) 和干细胞样本 (3、4、5、9、

6、7、8) 在每个 SNP 标记物位置的杂合性指示变量的平均值。纯合性比例的相应值可通过从 1 中减去杂合子值而容易地得到。

[0210] 内部对照正确地鉴定了源于作为“同卵双生双胞胎”的相同 hpSC-Hhom 系的分裂培养物之间的配对的基因型关联。

[0211] 印记基因分析

[0212] 如所述提取总 RNA (Chomcznski 和 Sacchi, *Anal Biochem* (1987) 162:156-159) 并用异丙醇沉淀。使用无 RNase 的 DNase 处理 (Promega) 去除剩余的基因组 DNA。在 20 μ l 的反应体积中, 使用 RevertAid M-MuLV 逆转录酶 (Fermentas) 从 1 μ g 总 RNA 合成 cDNA。使用 Taq DNA 聚合酶 (Fermentas) 用 1 μ l cDNA 进行 PCR 反应。根据厂商说明书进行所有反应。

[0213] 引物序列和 PCR 条件如下: TSSC5 (Lee 等, *Cancer Res* (1998) 58:4155-4159) 正向引物 5' -GCTCTTCATGGTCATGTTCTCCA-3' (SEQ ID NO:1) 和反向引物 5' -GGAGCAGTGGTTGTACAGAGG-3' (SEQ ID NO:2), 在 94 °C 4min 条件下进行 1 个循环; 94 °C 1min、55 °C 1min 和 72 °C 1min 进行 33 个循环。产物大小为 364bp。H19 (Hashimoto 等, *NatGenet* (1995) 9:109-110) 正向引物 5' -TACAACCACTGCACTACCTG-3' (SEQ ID NO:3) 和反向引物 5' -TGGCCATGAAGATGGAGTCG-3' (SEQ ID NO:4), 在 94 °C 4min 条件下进行 1 个循环; 94 °C 1min、52 °C 1min 和 72 °C 1min 进行 38 个循环。产物大小为 148bp。PEG1_1 (Li 等, *J Biol Chem* (2002) 277:13518-13527) 正向引物 5' -GAG TCC TGT AGG CAA GGT CTT ACC T-3' (SEQ ID NO:5) 和反向引物 5' -CTT GCC TGA AGA CTT CCA TGA GTG A-3' (SEQ ID NO:6), 在 94 °C 4min 条件下进行 1 个循环; 94 °C 1min、55 °C 1min 和 72 °C 1min 进行 35 个循环。产物大小为 155bp。PEG1_2 (Li 等, 2002, 见上文) 正向引物 5' -GCT GCT GGC CAG CTC TGC ACG GCT G-3' (SEQ ID NO:7) 和反向引物 5' -CTT GCC TGA AGA CTT CCA TGA GTG A-3' (SEQ ID NO:8), 在 94 °C 4min 条件下进行 1 个循环; 94 °C 1min、65 °C 1min 和 72 °C 1min 进行 39 个循环。产物大小为 230bp。SNRPN (Glenn 等, *Hum Mol Genet* (1993) 2:2001-2005) 正向引物 5' -CTTAGCTGAGACACCAAGAGG-3' (SEQ ID NO:9) 和反向引物 5' -GCAGCATCTTGCTACTCTTGC-3' (SEQ ID NO:10), 在 94 °C 4min 条件下进行 1 个循环; 94 °C 1min、55 °C 1min 和 72 °C 1min 进行 33 个循环。产物大小为 246bp。GAPDH (Adjaye 等, *Gene* (1999) 237:373-383) 正向引物 5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (SEQ ID NO:11) 和反向引物 5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO:12), 在 94 °C 4min 条件下进行 1 个循环; 94 °C 1min、55 °C 1min 和 72 °C 1min 进行 21 个循环。产物大小为 450bp。

[0214] 用 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (5 μ l / 道) 分析 PCR 产物, 用溴化乙锭染色, 并使用 Biolumaging 系统 (UVP) 记录。重复进行 RT-PCR 实验, 结果可重复。GAPDH 用作遍在表达对照。通过在每个 PCT 组中包括 RT- 阴性样本 (在逆转录步骤不含逆转录酶) 作为对照, 排除基因组污染。

[0215] 畸胎瘤形成和评价

[0216] 所有动物操作由实验动物保护国际评估和认证联合会 (the Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, AAALAC) 认证的俄罗斯科学院俄罗斯生物有机化学协会的分支——生物学实验室 (the Biological Testing Laboratory-Branch of Shemyakin&Ovchinnikov Institute of Bioorganic

Chemistry of the Russian Academy of Sciences) (Pushchino, Moscow Region, Russia) 进行。

[0217] 由获自 Charles River laboratories Research Model and Services (德国) 的 CB17/ICR-PRKDC-SCID CRL 鼠繁殖的免疫缺陷 SCID- 米色小鼠用于畸胎瘤形成。为了注射至小鼠中, 使用 IV 型胶原酶将 hpSC-Hhom 从培养皿上酶分离, 然后和重悬为小块。将大约两百万至五百万 hpSC-Hhom 细胞注射至后肢上部皮下空间。大约两个月后, 取出已形成的畸胎瘤并用 4% 多聚甲醛固定。将一半的组织在蔗糖中低温防护并将另一半置于 5% 琼脂-琼脂中, 然后使用振动切片机将其切成 60 μ m 的切片。将切片置于载玻片之上并用苏木精/伊红、Kraberg、Van Gieson 和 picrofuchsin 染色。

[0218] 注射约两百万至五百万丝裂霉素 C 处理的用作 phES 细胞饲养层的人成纤维细胞作为对照。在对照动物中未观察到畸胎瘤生长。

[0219] 实施例 1. 单性生殖体的产生

[0220] 年龄均超过 31 岁的五个卵母细胞供体参与该研究。使用激素刺激获得卵母细胞, 其最初意图是体外受精 (IVF)。从五个供体获得总共 46 个卵泡卵母细胞复合体 (COCs) 并用于该研究 (表 1)。

[0221] 表 1. 单性生殖体和单性生殖胚胎干细胞系的产生。

[0222]

供体	得到的卵母细胞	捐赠的卵母细胞	激活的卵母细胞	产生的单性生殖体 ⁵	得到的胚泡 ⁶		产生的系	供体命运
					具有 ICM	没有可见的 ICM		
1	8	4	4	4	2	-	phESC-1 免疫外科	怀孕
2	15	8	8	8	3	3	phESC-3 phESC-4 phESC-5 均来自全胚泡	怀孕 双胞胎
3	27	14	14 ^{1,a}	11	3	2	phESC-6 来自全胚泡	怀孕
4	22	11	11 ³	10	2	3	phESC-7 来自全胚泡	怀孕
5	20	9 ⁴	7	7	1	4	没有产生细胞系	未怀孕

[0223] ¹- 两个卵母细胞未被激活; ²- 一个卵母细胞在激活后退化; ³- 一个卵母细胞未被激活; ⁴- 两个卵母细胞处于中期 I 期并被弃除; ⁵- 单性生殖的活化的卵母细胞总数 = 40; ⁶- 得到的胚泡总数 = 23

[0224] 在卵母细胞活化前, 将 COCs 维持在环境氧张力下。在去除卵丘细胞后, 只将具有明显的第一极体的正常中期 II 卵母细胞用于活化操作。用 5 μ M 离子霉素活化卵母细胞五分钟, 然后用 6-DAMP 温育四小时以防止挤出第二极体并产生二倍体胚胎。根据厂商的建议使用标准 IVF 方法和在减少的氧 (90% N₂+5% O₂+5% CO₂) 下, 在 Medical 培养基中进行卵母细胞和胚胎的操作和培养。在单性生殖活化后, 只有 40 个卵母细胞能够卵裂。这些方法使得在胚胎培养的第五天或第六天产生 23 个胚泡。其中 11 个胚泡具有可见的 ICMs (表 1)。

[0225] 单性生殖 hESC 系的衍生

[0226] 在用于临床应用的 hESCs 的衍生和培养中,如果不能消除动物来源的组分,将其减到最少是十分重要的。为了这个目的,一些研究者不使用免疫外科进行 ICM 分离,而使用机械方法从全胚泡分离 ICMs(Kim 等, *Stem Cells*(2005)23:1228-1233)。培养基和饲养细胞也可能含有动物病原体。为了消除可能的污染,研究者已使用人细胞作为饲养细胞来代替小鼠成纤维细胞(Cheng 等, *Stem Cells*(2003)21:131-142;Hovatta 等, *Hum Repro*(2003)18:1404-1429;Stojkovic 等, *Stem Cells*(2005)23:306-314)或已在无饲养细胞和无血清条件下培养 hESCs(Amit 等, 2004;Klimanskaya 等, *Lancet*(2005)365:1636-1641)。考虑到这些以往的研究,修改用于 ICM 和 phESC 分离的培养条件。

[0227] 对于 phESC 的衍生和培养,将丝裂霉素 C 有丝分裂失活的人新生皮肤成纤维细胞(NSF)用作饲养细胞。这些细胞最初用含有人脐带血清代替动物血清的培养基来衍生和繁殖。phESC 培养基由补充源于脐带血的人血清、hrbFGF 和 hrLIF 的 VitroHES 培养基(Vitrolife)组成。在 37°C、5% CO₂、湿润气氛下繁殖 phESC。

[0228] 所有衍生的单性生殖胚泡最初用 0.5% 链霉蛋白酶处理以去除透明带。使用胰蛋白酶处理(Li 等, *Mol Reprod Dev*(2003)65:429-434)和常规免疫外科(Solter 和 Knowles, *Proc Natl Acad Sci USA*(1975)72:5099-5102)从第一卵母细胞供体获得来自两个胚泡的良好形成的 ICMs。进一步,在所述产生 phESC 的条件下将 ICMs 置于人饲养细胞上。来自胰蛋白酶处理胚泡的 ICM 不产生活细胞。衍生自免疫外科后的 ICM 显示细胞生长,引起 phESC-1 细胞系的产生。其它 21 个全胚泡最初在所述条件下置于饲养细胞上。从铺展的滋养层细胞上通过机械剪切分离 ICMs 并将其重置于新鲜的饲养细胞上。以这种方式,产生五个 phESC 系(phESC-3 至 phESC-7)(表 1)。

[0229] phESC 系的表征

[0230] phESC 系显示在 hESCs 中期待的形态并且形成集落,其具有紧密叠集的细胞、明显的核仁和小的细胞质与核的比例(图 1)。这些细胞表达常规 hES 细胞标记物 SSEA-3、SSEA-4、(图 1)TRA-1-60、TRA-1-81 和 OCT-4、(图 1 续)并不表达 SSEA-1——未分化的小鼠胚胎干细胞的阳性标记物(图 1)。源于所有系的细胞均表明高水平的碱性磷酸酶(图 1 续)和端粒酶活性(图 2)。

[0231] G-带核型分析显示,除了 phESC-7 系之外,phESC 系具有正常人 46, XX 核型(图 3)。大约 91% 来自 phESC-7 系的细胞具有 47, XXX 核型并且 9% 的细胞具有 48, XXX, +6 核型。通过细胞系中 100 个中期细胞的分析,观察到不同程度的 X 染色体异型性:大约 12% 的 phESC-1 和 phESC-6 系细胞显示 X 染色体异型性;42% 的 phESC-5 系细胞以及分别为 70%、80% 和 86% 的 phESC-7、phESC-3 和 phESC-4 细胞系显示 X 染色体异型性(图 3)。

[0232] phESC 的分化能力

[0233] 在经历 35 代的十个月培养过程中,phESC-1 系保持未分化。其它细胞系成功地培养超过至少 21 代。来自所有 phESC 系的细胞在悬浮液培养中形成囊胚状体,并在体外分化后产生所有三个胚层——外胚层、中胚层和内胚层——的衍生物(图 4)。大约 5% 的来自 phESC-1 系的胚状体在铺板后五天产生搏动细胞。phESC-6 系产生色素上皮样细胞(图 4L、K)。外胚层分化由神经元特异性标记物神经丝 68(图 4A)、NCAM(图 4B)、 β III-微管蛋白(图 4C)和神经胶质细胞标记物 GFAP(图 4D、M)的阳性免疫细胞化学染色显示。分化的细

胞是中胚层标记物阳性的,其包括肌肉特异性标记物 α -辅肌动蛋白(图 4G)和结蛋白(图 4J),以及内皮标记物 PEC AM-1(图 4E)和 VE-钙粘蛋白(图 4F)。内胚层分化由分化的衍生物的 α -胎蛋白阳性染色显示(图 4H, L)。phESC 系形成所有三个胚层衍生物的能力通过皮下注射 phESC 至免疫缺陷小鼠和大鼠来进行体内研究(图 5)。在注射后大约两个月,来自所有 phESC 系的细胞能够形成畸胎瘤。组织学检测表明存在有组织的结构,包括:上皮;囊;平滑肌;脂肪组织;造血组织;神经管和腺上皮。免疫组织化学分析显示, β -微管蛋白(图 5C)——外胚层标记物、纤维连接蛋白(图 5B)和肌肉肌动蛋白(图 5A)——中胚层标记物、以及 α -胎蛋白(图 5D)——内胚层标记物染色阳性。这些数据表明,phESC 可在体内分化为三个胚层,其产生人体内发现的所有细胞类型。

[0234] phESC 系的 DNA-序型分析

[0235] 进行所有 phESC 系、供体体细胞和饲养细胞的比较 DNA-序型分析。这些研究使用 Affymetrix 单核苷酸多态性(SNP)微阵列(Mapping 50K Hind 240Arrays)以确定 phESC 与供体体细胞的遗传相似性。选择 15 条常染色体(染色体 1-15)上的总计 1459 个 SNP 标记物,标记物间距离中值为 1.12Mbp。phESC 系和它们的关联供体体细胞之间的全配对基因型关联被鉴定为“全同胞”(遗传匹配),并且所有的其它组合对被鉴定为“不相关”。内部对照鉴定了源于作为“同卵双生双胞胎”的相同 phESC 系的分裂培养物之间的配对基因型关系(表 2)。

[0236] 表 2. 鉴定来自 phESC 和相关供体的 DNA 样本。

[0237]

基因型 1	基因型 2	假定 (putative) 关联	推断 (inferred) 关联	IBS			检测的数量	LOD				
				0	1	2		同卵双生	父母/子女	全同胞	半同胞	不相关
1	2	不相关	不相关	166	662	631	1459	-1503.03	-300.45	-23.15	-8.41	0
1	3	不相关	不相关	241	616	602	1459	-1560.65	-434.85	-28.04	-12.22	0
1	4	不相关	不相关	225	623	611	1459	-1535.94	-400.61	-31.39	-14.39	0
1	5	不相关	不相关	225	623	611	1459	-1535.94	-400.61	-31.39	-14.39	0
1	6	不相关	不相关	243	644	572	1459	-1642.35	-445.78	-31.74	-14.54	0
1	7	不相关	不相关	252	638	569	1459	-1641.11	-453.5	-29.25	-12.86	0
1	8	不相关	不相关	250	643	566	1459	-1656.02	-460.02	-32.86	-15.32	0
1	9	不相关	不相关	219	657	583	1459	-1605.31	-382.39	-27.37	-11.58	0
1	10	不相关	不相关	158	707	594	1459	-1591.43	-279.21	-26.37	-10.89	0
1	11	不相关	不相关	193	668	598	1459	-1584.71	-354.76	-29.65	-13.31	0
1	12	不相关	不相关	166	671	622	1459	-1523.1	-300.5	-30.53	-13.92	0
2	3	不相关	全同胞	0	282	1177	1459	-440.02	-146.3	0	-167.42	-363.63
2	4	不相关	不相关	233	627	599	1459	-1569.66	-423.24	-28.24	-12.91	0
2	5	不相关	不相关	233	627	599	1459	-1569.66	-423.24	-28.24	-12.91	0
2	6	不相关	不相关	217	650	592	1459	-1584.75	-388.44	-22.62	-8.53	0
2	7	不相关	不相关	243	650	566	1459	-1645.94	-437.91	-23.23	-8.72	0
2	8	不相关	不相关	225	649	585	1459	-1603.18	-404.41	-27.04	-11.97	0
2	9	不相关	不相关	210	639	610	1459	-1532.75	-360.46	-24.72	-9.89	0
2	10	不相关	不相关	144	683	632	1459	-1491.18	-243.56	-16.82	-4.51	0
2	11	不相关	不相关	172	680	607	1459	-1556.46	-310.03	-23.5	-9.7	0
2	12	不相关	不相关	176	667	616	1459	-1538.57	-327.95	-27.31	-12.06	0
3	4	不相关	不相关	336	457	666	1459	-1391.57	-599.92	-30.6	-14.62	0
3	5	不相关	不相关	336	457	666	1459	-1391.57	-599.92	-30.6	-14.62	0
3	6	不相关	不相关	322	482	655	1459	-1415.98	-571.23	-26.08	-11.86	0
3	7	不相关	不相关	369	442	648	1459	-1432.05	-664.95	-27.39	-11.93	0
3	8	不相关	不相关	334	483	642	1459	-1449.86	-597.75	-31.68	-15.14	0
3	9	不相关	不相关	307	493	659	1459	-1395.19	-530.45	-24.56	-10	0
3	10	不相关	不相关	215	623	621	1459	-1503.92	-364.97	-17.26	-4.43	0
3	11	不相关	不相关	264	582	613	1459	-1531.91	-473.48	-28.41	-12.81	0
3	12	不相关	不相关	254	595	610	1459	-1544.73	-460.57	-29.92	-13.88	0
4	5	不相关	同卵双生	0	0	1459	1459	0	-379.58	-45.47	-401.67	-677.74
4	6	不相关	不相关	334	475	650	1459	-1436.59	-599.55	-32.73	-15.19	0
4	7	不相关	不相关	365	439	655	1459	-1418.34	-656.01	-31.6	-14.56	0
4	8	不相关	不相关	329	486	644	1459	-1450.75	-586.4	-32.06	-14.88	0
4	9	不相关	不相关	332	466	661	1459	-1395.18	-590.12	-28.69	-12.94	0
4	10	不相关	不相关	245	606	608	1459	-1542.32	-438.93	-28.75	-12.74	0
4	11	不相关	不相关	273	569	617	1459	-1530.97	-492.84	-29.03	-12.34	0
4	12	不相关	全同胞	0	224	1235	1459	-326.17	-162.34	0	-183.44	-393.46
5	6	不相关	不相关	334	475	650	1459	-1436.59	-599.55	-32.73	-15.19	0
5	7	不相关	不相关	365	439	655	1459	-1418.34	-656.01	-31.6	-14.56	0
5	8	不相关	不相关	329	486	644	1459	-1450.75	-586.4	-32.06	-14.88	0

[0238]

5	9	不相关	不相关	332	466	661	1459	-1395.18	-590.12	-28.69	-12.94	0
5	10	不相关	不相关	245	606	608	1459	-1542.32	-438.93	-28.75	-12..74	0
5	11	不相关	不相关	273	569	617	1459	-1530.97	-492.84	-29.03	-12..34	0
5	12	不相关	全同胞	0	224	1235	1459	-326.17	-162.34	0	-183.44	-393.46
6	7	不相关	全同胞	45	176	1238	1459	-277.78	-217.21	0	-165.72	-390.62
6	8	不相关	全同胞	44	187	1228	1459	-289.8	-201.32	0	-153.75	-365.51
6	9	不相关	不相关	333	481	645	1459	-1436.5	-595.4	-30.3	-13.77	0
6	10	不相关	不相关	240	601	618	1459	-1518.17	-425.03	-27.11	-11..53	0
6	11	不相关	全同胞	0	164	1295	1459	-209.27	-191.66	0	-213.25	-440.56
6	12	不相关	不相关	234	615	610	1459	-1547.15	-416.14	-30.21	-13..64	0
7	8	不相关	全同胞	38	225	1196	1459	-326.62	-150.16	0	-121.55	-334.09
7	9	不相关	不相关	359	473	627	1459	-1479.28	-642.41	-30.61	-14.47	0
7	10	不相关	不相关	252	623	584	1459	-1598.35	-443.81	-28.88	-13..09	0
7	11	不相关	全同胞	0	230	1229	1459	-318.49	-137.93	0	-159.55	-389.58
7	12	不相关	不相关	265	583	611	1459	-1539.33	-472.91	-30.55	-13..87	0
8	9	不相关	不相关	347	480	632	1459	-1472.41	-625.68	-30.93	-14.31	0
8	10	不相关	不相关	244	614	601	1459	-1561.3	-434	-28.07	-12..37	0
8	11	不相关	全同胞	0	175	1284	1459	-223.73	-178.56	0	-200.12	-428.04
8	12	不相关	不相关	236	610	613	1459	-1539.08	-417.14	-29.32	-13..14	0
9	10	不相关	全同胞	0	228	1231	1459	-315.15	-152.88	0	-174.27	-392.91
9	11	不相关	不相关	269	567	623	1459	-1502.69	-479.57	-28.47	-12..55	0
9	12	不相关	不相关	245	612	602	1459	-1557.25	-438.53	-26.07	-11..15	0
10	11	不相关	不相关	187	635	637	1459	-1478.7	-328.06	-25.52	-10.6	0
10	12	不相关	不相关	181	662	616	1459	-1534.36	-329	-25.2	-10.6	0
11	12	不相关	不相关	189	645	625	1459	-1520.01	-337.88	-27.33	-11.72	0

[0239] DNA 样本分析的编号如下:1- 人新生皮肤成纤维细胞、2-phESC-7 系供体、3-phESC-7 系、4-phESC-1 系、5-phESC-1 系、6-phESC-3 系、7-phESC-4 系、8-phESC-5 系、9-phESC-6 系、10-phESC-6 系供体、11-phESC-3 至 phESC-5 系供体、12-phESC-1 系供体。

[0240] 输出中的 IBS 列显示标记物数目, 其中一对都被测定并具有所陈述的相同的 0、1 或 2 个等位基因。(对于在没有基因型分型误差的理想条件下的同卵双生双胞胎, 所有标记物必须均为 IBS = 2。) 该输出未直接显示 P(观察的标记物 1, 给定关联), 但其显示 LOD 得分 = $\log_{10}\{P(\text{观察的标记物 1, 假定关联})/P(\text{观察的标记物 1 关联, 其获得最大可能性并因此进行呼叫})\}$ 作为相似性的度量。该 LOD 得分越小, 两个样本之间假定关联的可能越小。

[0241] SNP 标记物的对比分析显示, 整体上看, 在距着丝粒的距离上, 供体细胞似乎不显示杂合性趋势的清晰模式, 但是, 与中部的杂合性比例比较, 由于可能的染色体组合, 干细胞显示接近着丝粒和端粒的杂合性比例有些低 (表 A-I)。

[0242] 表 A. 杂合供体 / 干细胞染色体 Bins。

[0243] 杂合供体干细胞染色体 bin

[0244]

染色体	Bins	频率	供体杂合	干细胞杂合
		1459	0.37	0.207
	10	91	0.407	0.053

	20	135	0.33	0.111
	30	185	0.358	0.19
	40	169	0.408	0.285
	50	157	0.385	0.268
	60	153	0.353	0.204
	70	123	0.354	0.188

[0245] 杂合供体干细胞染色体 bin

[0246]

染色体	Bins	频率	供体杂合	干细胞杂合
	80	113	0.345	0.239
	90	118	0.371	0.228
	100	88	0.398	0.24
	110	49	0.393	0.233
	120	29	0.302	0.222
	130	26	0.365	0.231
	140	20	0.4	0.193
	150	3	0.5	0.048
1		142	0.373	0.198
2		150	0.327	0.187
3		111	0.41	0.229
4		133	0.346	0.179
5		121	0.39	0.263
6		115	0.387	0.205
7		103	0.379	0.205

8		93	0.401	0.187
9		66	0.314	0.171
10		88	0.375	0.273
11		78	0.385	0.19
12		77	0.403	0.161
13		78	0.324	0.192
14		62	0.379	0.279
15		42	0.345	0.194
1	20	9	0.361	0.063
1	30	14	0.357	0.153
1	40	12	0.354	0.214
1	50	15	0.35	0.229
1	60	21	0.369	0.211
1	70	19	0.461	0.211
1	80	9	0.333	0.175
1	90	13	0.288	0.176
1	100	13	0.327	0.198
1	110	8	0.469	0.214
1	120	6	0.333	0.19
1	130	3	0.667	0.571
2	10	3	0.333	0
2	20	11	0.386	0.182
2	30	13	0.269	0.176
2	40	6	0.25	0.167

2	50	19	0.303	0.263
2	60	13	0.423	0.308
2	70	10	0.275	0.171
2	80	13	0.327	0.176
2	90	19	0.342	0.226
2	100	7	0.214	0.082
2	110	4	0.375	0.143
2	120	7	0.25	0.122
2	130	11	0.318	0.143
2	140	11	0.386	0.156
2	150	3	0.5	0.048
3	10	9	0.417	0.016
3	20	.15	0.333	0.057
3	30	12	0.354	0.167

[0247] 杂合供体干细胞染色体 bin

[0248]

染色体	Bins	频率	供体杂合	干细胞杂合
3	40	11	0.455	0.351
3	50	3	0.083	0.143
3	60	12	0.438	0.286
3	70	12	0.458	0.202
3	80	14	0.5	0.347
3	90	12	0.375	0.25
3	100	9	0.472	0.429

3	110	2	0.375	0.286
4	10	13	0.423	0.121
4	20	9	0.25	0.143
4	30	15	0.283	0.152
4	40	15	0.367	0.2
4	50	11	0.409	0.195
4	60	8	0.375	0.179
4	70	7	0.286	0.163
4	80	9	0.278	0.206
4	90	9	0.389	0.222
4	100	7	0.321	0.204
4	110	8	0.375	0.196
4	120	7	0.321	0.184
4	130	8	0.313	0.179
4	140	7	0.429	0.204
5	10	12	0.417	0.083
5	20	12	0.292	0.119
5	30	11	0.409	0.325
5	40	14	0.411	0.306
5	50	10	0.45	0.257
5	60	8	0.219	0.107
5	70	8	0.344	0.25
5	80	8	0.406	0.339
5	90	8	0.375	0.214

5	100	7	0.536	0.286
5	110	9	0.5	0.508
5	120	8	0.344	0.393
5	130	4	0.375	0.321
5	140	2	0.375	0.357
6	10	13	0.404	0.022
6	20	14	0.286	0.082
6	30	11	0.364	0.208
6	40	12	0.542	0.488
6	50	10	0.4	0.329
6	60	18	0.347	0.19
6	70	8	0.344	0.161
6	80	8	0.25	0.179
6	90	7	0.429	0.245
6	100	10	0.55	0.229
6	110	4	0.313	0.143
7	10	6	0.292	0.024
7	20	12	0.333	0.071
7	30	16	0.313	0.143
7	40	14	0.429	0.337
7	50	16	0.484	0.402
7	60	15	0.433	0.171

[0249] 杂合供体干细胞染色体 bin

[0250]

染色体	Bins	频率	供体杂合	干细胞杂合
7	70	9	0.389	0.19
7	80	5	0.3	0.171
7	90	7	0.214	0.061
7	100	3	0.5	0.381
8	10	8	0.313	0.036
8	20	10	0.425	0.129
8	30	15	0.483	0.162
8	40	13	0.346	0.253
8	50	11	0.364	0.208
8	60	4	0.25	0.143
8	70	10	0.45	0.314
8	80	6	0.375	0.167
8	90	11	0.455	0.169
8	100	5	0.4	0.257
9	20	9	0.25	0.016
9	30	15	0.35	0.133
9	40	10	0.45	0.229
9	50	13	0.269	0.209
9	60	9	0.278	0.254
9	70	6	0.25	0.167
9	80	4	0.313	0.214
10	10	7	0.5	0.163
10	20	15	0.367	0.181

10	30	19	0.289	0.248
10	40	12	0.375	0.298
10	50	6	0.5	0.381
10	60	9	0.333	0.349
10	70	2	0.375	0.286
10	80	8	0.406	0.393
10	90	7	0.357	0.286
10	100	3	0.5	0.238
11	10	7	0.357	0.02
11	20	8	0.375	0.161
11	30	15	0.45	0.267
11	40	15	0.4	0.219
11	50	16	0.469	0.268
11	60	7	0.143	0.061
11	70	6	0.333	0.119
11	80	4	0.313	0.179
12	10	13	0.481	0.011
12	20	9	0.306	0.143
12	30	13	0.385	0,132
12	40	12	0.458	0.226
12	50	9	0.5	0.238
12	60	5	0.25	0.114
12	70	7	0.214	0.163
12	80	3	0.333	0.333

12	90	4	0.563	0.393
12	100	2	0.5	0.071
13	20	1	0.25	0
13	30	4	0.375	0.179
13	40	10	0.325	0.214
13	50	7	0.393	0.306

[0251] 杂合供体干细胞染色体 bin

[0252]

染色体	Bins	频率	供体杂合	干细胞杂合
13	60	9	0.25	0.048
13	70	8	0.344	0.143
13	80	9	0.25	0.27
13	90	7	0.464	0.429
13	100	11	0.341	0.208
13	110	11	0.295	0.065
13	120	1	0	0
14	20	1	0.25	0.143
14	30	7	0.429	0.265
14	40	8	0.531	0.518
14	50	8	0.344	0.321
14	60	9	0.444	0.27
14	70	6	0.333	0.119
14	80	8	0.219	0.125
14	90	7	0.286	0.184

14	100	6	0.417	0.333
14	110	2	0.5	0-571
15	30	5	0.3	0.171
15	40	5	0.4	0.286
15	50	3	0.167	0.143
15	60	6	0.5	0.19
15	70	5	0.1	0.086
15	80	5	0.5	0.257
15	90	7	0.429	0.245
15	100	5	0.25	0.171
15	110	1	0.25	0

[0253] 表 B. 染色体 Bins、杂合性 / 频率, 染色体 01。

[0254]

杂合 01 染色体 bin(hetero 01 chr bin)

染色体	bins	频率	杂合 01
		1459	0.402
	10	91	0.429
	20	135	0.393
	30	185	0.357
	40	169	0.438
	50	157	0.376
	60	153	0.425
	70	123	0.407
	80	113	0.442
	90	118	0.373
	100	88	0.42
	110	49	0.449
	120	29	0.448
	130	26	0.346
	140	20	0.25
	150	3	0.333
1		142	0.352
2		150	0.373
3		111	0.45
4		133	0.391
5		121	0.347
6		115	0.435
7		103	0.427
8		93	0.409
9		66	0.439
10		88	0.341
11		78	0.436
12		77	0.39
13		78	0.474
14		62	0.452
15		42	0.405
	20	9	0.333
	30	14	0.429
	40	12	0.167
	50	15	0.067
	60	21	0.333
	70	19	0.579
	80	9	0.333
	90	13	0.538
	100	13	0.308
	110	8	0.5
	120	6	0.333
	130	3	0
2	10	3	0.667
2	20	11	0.273
2	30	13	0.308
2	40	6	0.5
2	50	19	0.421
2	60	13	0.462

杂合 01 染色体 bin(hetero 01 chr bin)

染色体	bins	频率	杂合 01
2	70	10	0.3
2	80	13	0.538
2	90	19	0.263
2	100	7	0.286
2	110	4	0.5
2	120	7	0.429
2	130	11	0.455
2	140	11	0.182
2	150	3	0.333
3	10	9	0.444
3	20	15	0.6
3	30	12	0.333
3	40	11	0.545
3	50	3	0.333
3	60	12	0.333
3	70	12	0.417
3	80	14	0.357
3	90	12	0.5
3	100	9	0.667
3	110	2	0
4	10	13	0.385
4	20	9	0.333
4	30	15	0.333
4	40	15	0.467
4	50	11	0.273
4	60	8	0.5
4	70	7	0.286
4	80	9	0.556
4	90	9	0.111
4	100	7	0.571
4	110	8	0.625
4	120	7	0.429
4	130	8	0.375
4	140	7	0.286
5	10	12	0.417
5	20	12	0.25
5	30	11	0.182
5	40	14	0.357
5	50	10	0.1
5	60	8	0.625
5	70	8	0.25
5	80	8	0.625
5	90	8	0.375
5	100	7	0
5	110	9	0.556
5	120	8	0.5
5	130	4	0.25
5	140	2	0.5
6	10	13	0.385

[0255]

杂合 01 染色体 bin(hetero 01 chr bin)			
染色体	bins	频率	杂合 01
6	20	14	0.214
6	30	11	0.636
6	40	12	0.5
6	50	10	0.3
6	60	18	0.444
6	70	8	0.75
6	80	8	0.5
6	90	7	0.429
6	100	10	0.3
6	110	4	0.5
7	10	6	0.833
7	20	12	0.417
7	30	16	0.188
7	40	14	0.429
7	50	16	0.5
7	60	15	0.467
7	70	9	0.333
7	80	5	0.4
7	90	7	0.429
7	100	3	0.667
8	10	8	0.25
8	20	10	0.5
8	30	15	0.333
8	40	13	0.385
8	50	11	0.364
8	60	4	0.5
8	70	10	0.5
8	80	6	0.5
8	90	11	0.364
8	100	5	0.6
9	20	9	0.444
9	30	15	0.4
9	40	10	0.7
9	50	13	0.385
9	60	9	0.444
9	70	6	0.333
9	80	4	0.25
10	10	7	0.429
10	20	15	0.4
10	30	19	0.316
10	40	12	0.333
10	50	6	0.333
10	60	9	0.444
10	70	2	0
10	80	8	0.25
10	90	7	0.286
10	100	3	0.333
11	10	7	0.429
11	20	8	0.375
11	30	15	0.533

杂合 01 染色体 bin(hetero 01 chr bin)			
染色体	bins	频率	杂合 01
11	40	15	0.467
11	50	16	0.438
11	60	7	0.286
11	70	6	0.5
11	80	4	0.25
12	10	13	0.385
12	20	9	0.556
12	30	13	0.231
12	40	12	0.5
12	50	9	0.444
12	60	5	0.4
12	70	7	0.429
12	80	3	0
12	90	4	0.25
12	100	2	0.5
13	20	1	1
13	30	4	0.5
13	40	10	0.5
13	50	7	0.714
13	60	9	0.333
13	70	8	0.125
13	80	9	0.667
13	90	7	0.571
13	100	11	0.545
13	110	11	0.273
13	120	1	1
14	20	1	0
14	30	7	0.571
14	40	8	0.25
14	50	8	0.5
14	60	9	0.556
14	70	6	0.333
14	80	8	0.5
14	90	7	0.429
14	100	6	0.5
14	110	2	0.5
15	30	5	0.2
15	40	5	0.6
15	50	3	1
15	60	6	0.333
15	70	5	0.4
15	80	5	0.4
15	90	7	0.286
15	100	5	0.4
15	110	1	0

[0256] 表 C. 染色体 Bins、杂合 / 频率, 染色体 02 和 03。

[0257]

杂合 02 03 染色体 bin				
染色体	bins	频率	杂合 02	杂合 03
		1459	0.408	0.215
	10	91	0.407	0
	20	135	0.37	0.096
	30	185	0.389	0.141
	40	169	0.444	0.26
	50	157	0.484	0.35
	60	153	0.366	0.235
	70	123	0.423	0.26
	80	113	0.381	0.265
	90	118	0.458	0.314
	100	88	0.352	0.239
	110	49	0.449	0.224
	120	29	0.31	0.138
	130	26	0.346	0.038
	140	20	0.4	0.15
	150	3	0.333	0
1		142	0.423	0.07
2		150	0.38	0.18
3		111	0.486	0.261
4		133	0.398	0.173
5		121	0.405	0.306
6		115	0.443	0.278
7		103	0.447	0.165
8		93	0.43	0.28
9		66	0.333	0.076
10		88	0.375	0.295
11		78	0.423	0.218
12		77	0.403	0.234
13		78	0.282	0.218
14		62	0.452	0.452
15		42	0.381	0.024
1	20	9	0.222	0
1	30	14	0.429	0
1	40	12	0.417	0
1	50	15	0.4	0
1	60	21	0.381	0
1	70	19	0.684	0
1	80	9	0.556	0.111
1	90	13	0.462	0.231
1	100	13	0.154	0.077
1	110	8	0.5	0.375
1	120	6	0.333	0.333
1	130	3	0.333	0
2	10	3	0.667	0
2	20	11	0.364	0.273
2	30	13	0.231	0.154
2	40	6	0.667	0.5
2	50	19	0.316	0.316
2	60	13	0.231	0.231
2	70	10	0.4	0.4
2	80	13	0.385	0.077
2	90	19	0.421	0.263

杂合 02 03 染色体 bin				
染色体	bins	频率	杂合 02	杂合 03
2	100	7	0.286	0
2	110	4	1	0
2	120	7	0.286	0
2	130	11	0.364	0
2	140	11	0.455	0
2	150	3	0.333	0
3	10	9	0.556	0
3	20	15	0.4	0
3	30	12	0.333	0
3	40	11	0.455	0.364
3	50	3	0	0
3	60	12	0.667	0.583
3	70	12	0.583	0.25
3	80	14	0.5	0.357
3	90	12	0.583	0.417
3	100	9	0.444	0.444
3	110	2	0.5	0.5
4	10	13	0.385	0
4	20	9	0.333	0.111
4	30	15	0.333	0.133
4	40	15	0.4	0.267
4	50	11	0.364	0.273
4	60	8	0.375	0.375
4	70	7	0.857	0.857
4	80	9	0.222	0.222
4	90	9	0.444	0
4	100	7	0.429	0
4	110	8	0.5	0
4	120	7	0.429	0
4	130	8	0.375	0
4	140	7	0.286	0.286
5	10	12	0.417	0
5	20	12	0.5	0.167
5	30	11	0.455	0.364
5	40	14	0.429	0.286
5	50	10	0.5	0.5
5	60	8	0.125	0.125
5	70	8	0.375	0.375
5	80	8	0.5	0.5
5	90	8	0.625	0.625
5	100	7	0.286	0.286
5	110	9	0.333	0.333
5	120	8	0.25	0.25
5	130	4	0.25	0.25
5	140	2	0.5	0.5
6	10	13	0.538	0
6	20	14	0.5	0
6	30	11	0.455	0
6	40	12	0.5	0.5
6	50	10	0.5	0.5
6	60	18	0.389	0.389
6	70	8	0.375	0.375

[0258]

染色体	bins	频率	杂合 02	杂合 03
6	80	8	0.25	0.25
6	90	7	0.429	0.429
6	100	10	0.4	0.4
6	110	4	0.5	0.5
7	10	6	0.167	0
7	20	12	0.333	0
7	30	16	0.438	0.25
7	40	14	0.429	0.143
7	50	16	0.688	0.438
7	60	15	0.533	0.133
7	70	9	0.333	0
7	80	5	0.2	0
7	90	7	0.286	0
7	100	3	1	0.667
8	10	8	0.25	0
8	20	10	0.4	0.2
8	30	15	0.467	0.267
8	40	13	0.462	0.231
8	50	11	0.636	0.273
8	60	4	0.25	0.25
8	70	10	0.4	0.4
8	80	6	0.5	0.5
8	90	11	0.455	0.455
8	100	5	0.2	0.2
9	20	9	0.333	0
9	30	15	0.467	0
9	40	10	0.5	0
9	50	13	0.231	0.077
9	60	-9	0.222	0.222
9	70	6	0.167	0.167
9	80	4	0.25	0.25
10	10	7	0.286	0
10	20	15	0.333	0.2
10	30	19	0.158	0.053
10	40	12	0.5	0.417
10	50	6	0.667	0.667
10	60	9	0.333	0.333
10	70	2	0.5	0.5
10	80	8	0.5	0.5
10	90	7	0.286	0.286
10	100	3	1	1
11	10	7	0.143	0
11	20	8	0.25	0.125
11	30	15	0.6	0.2
11	40	15	0.6	0.267
11	50	16	0.625	0.438
11	60	7	0.143	0.143

染色体	bins	频率	杂合 02	杂合 03
11	70	6	0	0
11	80	4	0.25	0.25
12	10	13	0.538	0
12	20	9	0.333	0
12	30	13	0.462	0.231
12	40	12	0.167	0.167
12	50	9	0.778	0.778
12	60	5	0.2	0.2
12	70	7	0.286	0.286
12	80	3	0.333	0.333
12	90	4	0.5	0.5
12	100	2	0	0
13	20	1	0	0
13	30	4	0.5	0.25
13	40	10	0.4	0.4
13	50	7	0.429	0.429
13	60	9	0	0
13	70	8	0.25	0.25
13	80	9	0.222	0.222
13	90	7	0.571	0.571
13	100	11	0.273	0.091
13	110	11	0.182	0
13	120	1	0	0
14	20	1	1	1
14	30	7	0.286	0.286
14	40	8	0.375	0.375
14	50	8	0.5	0.5
14	60	9	0.556	0.556
14	70	6	0.5	0.5
14	80	8	0.375	0.375
14	90	7	0.429	0.429
14	100	6	0.333	0.333
14	110	2	1	1
15	30	5	0.2	0
15	40	5	0.4	0
15	50	3	0.333	0
15	60	6	0.833	0
15	70	5	0	0
15	80	5	0.4	0
15	90	7	0.429	0
15	100	5	0.4	0.2
15	110	1	0	0

[0259] 表 D. 染色体 Bins、杂合 / 频率, 染色体 12 和 04。

[0260]

杂合 12 04 染色体 bin				
染色体	Bins	频率	杂合 12	杂合 04
		1459	0.367	0.214
	10	91	0.418	0.066
	20	135	0.311	0.081
	30	185	0.384	0.2
	40	169	0.355	0.314
	50	157	0.357	0.35
	60	153	0.346	0.209
	70	123	0.358	0.163
	80	113	0.292	0.195
	90	118	0.398	0.254
	100	88	0.477	0.273
	110	49	0.388	0.224
	120	29	0.241	0.172
	130	26	0.385	0.192
	140	20	0.6	0.05
	150	3	0.667	0
1		142	0.366	0.324
2		150	0.3	0.193
3		111	0.459	0.261
4		133	0.301	0.211
5		121	0.388	0.273
6		115	0.443	0.217
7		103	0.369	0.136
8		93	0.43	0.172
9		66	0.273	0.167
10		88	0.352	0.284
11		78	0.372	0.154
12		77	0.39	0.143
13		78	0.346	0.167
14		62	0.403	0.274
15		42	0.286	0.071
1	20	9	0.333	0.111
1	30	14	0.214	0.214
1	40	12	0.333	0.333
1	50	15	0.4	0.4
1	60	21	0.381	0.381
1	70	19	0.421	0.421
1	80	9	0.333	0.333
1	90	13	0.385	0.385
1	100	13	0.308	0.231
1	110	8	0.5	0.25
1	120	6	0.167	0
1	130	3	1	1
2	10	3	0.333J	0
2	20	11	0.364	0.182
2	30	13	0.231	0.231
2	40	6	0.333	0.333
2	50	19	0.421	0.421
2	60	13	0.385	0.385
2	70	10	0.2	0.2
2	80	13	0.154	0.154
2	90	19	0.158	0.158

杂合 12 04 染色体 bin				
染色体	Bins	频率	杂合 12	杂合 04
2	100	7	0	0
2	110	4	0.25	0.25
2	120	7	0.286	0.143
2	130	11	0.364	0
2	140	11	0.545	0
2	150	3	0.667	0
3	10	9	0.444	0
3	20	15	0.467	0.133
3	30	12	0.5	0.25
3	40	11	0.182	0
3	50	3	0	0
3	60	12	0.583	0.333
3	70	12	0.5	0.083
3	80	14	0.429	0.429
3	90	12	0.5	0.5
3	100	9	0.667	0.667
3	110	2	0.5	0.5
4	10	13	0.385	0.231
4	20	9	0.333	0.222
4	30	15	0.267	0.133
4	40	15	0.333	0.267
4	50	11	0.455	0.455
4	60	8	0.25	0.25
4	70	7	0	0
4	80	9	0.333	0.333
4	90	9	0.333	0.333
4	100	7	0.286	0.286
4	110	8	0.25	0.25
4	120	7	0	0
4	130	8	0.125	0
4	140	7	0.714	0
5	10	12	0.5	0.167
5	20	12	0.333	0.167
5	30	11	0.273	0.273
5	40	14	0.429	0.429
5	50	10	0.1	0.1
5	60	8	0.25	0.25
5	70	8	0.375	0.375
5	80	8	0.375	0.25
5	90	8	0.25	0
5	100	7	0.714	0
5	110	9	0.556	0.556
5	120	8	0.5	0.5
5	130	4	0.5	0.5
5	140	2	0.5	0.5
6	10	13	0.385	0
6	20	14	0.214	0
6	30	11	0.455	0.364
6	40	12	0.75	0.75
6	50	10	0.5	0.5
6	60	18	0.389	0.111
6	70	8	0.5	0

[0261]

杂合 12 04 染色体 bin

染色体	Bins	频率	杂合 12	杂合 04
6	80	8	0.125	0
6	90	7	0.429	0.429
6	100	10	0.7	0.2
6	110	4	0.5	0
7	10	6	0.333	0
7	20	12	0.5	0
7	30	16	0.25	0
7	40	14	0.357	0.357
7	50	16	0.438	0.438
7	60	15	0.267	0
7	70	9	0.333	0
7	80	5	0.4	0
7	90	7	0.429	0
7	100	3	0.667	0.667
8	10	8	0.25	0
8	20	10	0.2	0
8	30	15	0.667	0
8	40	13	0.385	0.385
8	50	11	0.273	0.273
8	60	4	0.25	0.25
8	70	10	0.5	0.5
8	80	6	0.333	0.167
8	90	11	0.636	0
8	100	5	0.6	0.2
9	20	9	0.111	0
9	30	15	0.4	0.2
9	40	10	0.1	0.1
9	50	13	0.385	0.385
9	60	9	0.222	0.222
9	70	6	0.333	0
9	80	4	0.25	0
10	10	7	0.571	0.143
10	20	15	0.267	0.133
10	30	19	0.368	0.368
10	40	12	0.167	0.167
10	50	6	0.333	0.333
10	60	9	0.333	0.333
10	70	2	0.5	0.5
10	80	8	0.375	0.375
10	90	7	0.571	0.571
10	100	3	0.333	0
11	10	7	0.286	0
11	20	8	0.375	0
11	30	15	0.4	0.2
11	40	15	0.467	0.2
11	50	16	0.313	0.313
11	60	7	0.143	0.143

杂合 12 04 染色体 bin

染色体	Bins	频率	杂合 12	杂合 04
11	70	6	0.5	0
11	80	4	0.5	0
12	10	13	0.538	0
12	20	9	0.222	0
12	30	13	0.462	0.077
12	40	12	0.333	0.333
12	50	9	0.444	0.444
12	60	5	0.2	0.2
12	70	7	0	0
12	80	3	0.333	0.333
12	90	4	0.75	0
12	100	2	1	0
13	20	1	0	0
13	30	4	0.5	0.5
13	40	10	0.2	0.2
13	50	7	0.286	0.143
13	60	9	0.444	0
13	70	8	0.5	0
13	80	9	0.111	0.111
13	90	7	0.429	0.429
13	100	11	0.455	0.364
13	110	11	0.364	0
13	120	1	0	0
14	20	1	0	0
14	30	7	0.714	0.429
14	40	8	0.625	0.625
14	50	8	0.375	0.375
14	60	9	0.333	0.111
14	70	6	0.333	0
14	80	8	0.125	0
14	90	7	0.286	0.286
14	100	6	0.667	0.5
14	110	2	0	0
15	30	5	0.2	0
15	40	5	0.2	0.2
15	50	3	0	0
15	60	6	0.5	0
15	70	5	0.2	0
15	80	5	0.4	0
15	90	7	0.429	0.143
15	100	5	0.2	0.2
15	110	1	0	0

[0262] 表 E. 染色体 Bins、杂合 / 频率, 染色体 12 和 05。

[0263]

杂合 12 05 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 12	杂合 05
		1459	0.367	0.214
	10	91	0.418	0.066

杂合 12 05 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 12	杂合 05
	20	135	0.311	0.081
	30	185	0.384	0.2

[0264]

杂合 12 05 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 12	杂合 05
	40	169	0.355	0.314
	50	157	0.357	0.35
	60	153	0.346	0.209
	70	123	0.358	0.163
	80	113	0.292	0.195
	90	118	0.398	0.254
	100	88	0.477	0.273
	110	49	0.388	0.224
	120	29	0.241	0.172
	130	26	0.385	0.192
	140	20	0.6	0.05
	150	3	0.667	0
1		142	0.366	0.324
2		150	0.3	0.193
3		111	0.459	0.261
4		133	0.301	0.211
5		121	0.388	0.273
6		115	0.443	0.217
7		103	0.369	0.136
8		93	0.43	0.172
9		66	0.273	0.167
10		88	0.352	0.284
11		78	0.372	0.154
12		77	0.39	0.143
13		78	0.346	0.167
14		62	0.403	0.274
15		42	0.286	0.071
1	20	9	0.333	0.111
1	30	14	0.214	0.214
1	40	12	0.333	0.333
1	50	15	0.4	0.4
1	60	21	0.381	0.381
1	70	19	0.421	0.421
1	80	9	0.333	0.333
1	90	13	0.385	0.385
1	100	13	0.308	0.231
1	110	8	0.5	0.25
1	120	6	0.167	0
1	130	3	1	1
2	10	3	0.333	0
2	20	11	0.364	0.182
2	30	13	0.231	0.231
2	40	6	0.333	0.333
2	50	19	0.421	0.421
2	60	13	0.385	0.385
2	70	10	0.2	0.2
2	80	13	0.154	0.154
2	90	19	0.158	0.158
2	100	7	0	0
2	110	4	0.25	0.25
2	120	7	0.286	0.143
2	130	11	0.364	0
2	140	11	0.545	0
2	150	3	0.667	0

杂合 12 05 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 12	杂合 05
3	10	9	0.444	0
3	20	15	0.467	0.133
3	30	12	0.5	0.25
3	40	11	0.182	0
3	50	3	0	0
3	60	12	0.583	0.333
3	70	12	0.5	0.083
3	80	14	0.429	0.429
3	90	12	0.5	0.5
3	100	9	0.667	0.667
3	110	2	0.5	0.5
4	10	13	0.385	0.231
4	20	9	0.333	0.222
4	30	15	0.267	0.133
4	40	15	0.333	0.267
4	50	11	0.455	0.455
4	60	8	0.25	0.25
4	70	7	0	0
4	80	9	0.333	0.333
4	90	9	0.333	0.333
4	100	7	0.286	0.286
4	110	8	0.25	0.25
4	120	7	0	0
4	130	8	0.125	0
4	140	7	0.714	0
5	10	12	0.5	0.167
5	20	12	0.333	0.167
5	30	11	0.273	0.273
5	40	14	0.429	0.429
5	50	10	0.1	0.1
5	60	8	0.25	0.25
5	70	8	0.375	0.375
5	80	8	0.375	0.25
5	90	8	0.25	0
5	100	7	0.714	0
5	110	9	0.556	0.556
5	120	8	0.5	0.5
5	130	4	0.5	0.5
5	140	2	0.5	0.5
6	10	13	0.385	0
6	20	14	0.214	0
6	30	11	0.455	0.364
6	40	12	0.75	0.75
6	50	10	0.5	0.5
6	60	18	0.389	0.111
6	70	8	0.5	0
6	80	8	0.125	0
6	90	7	0.429	0.429
6	100	10	0.7	0.2
6	110	4	0.5	0
7	10	6	0.333	0
7	20	12	0.5	0
7	30	16	0.25	0
7	40	14	0.357	0.357

[0265]

杂合 12 05 染色体 bin				
染色体	bins	频率	杂合 12	杂合 05
7	50	16	0.438	0.438
7	60	15	0.267	0
7	70	9	0.333	0
7	80	5	0.4	0
7	90	7	0.429	0
7	100	3	0.667	0.667
8	10	8	0.25	0
8	20	10	0.2	0
8	30	15	0.667	0
8	40	13	0.385	0.385
8	50	11	0.273	0.273
8	60	4	0.25	0.25
8	70	10	0.5	0.5
8	80	6	0.333	0.167
8	90	11	0.636	0
8	100	5	0.6	0.2
9	20	9	0.111	0
9	30	15	0.4	0.2
9	40	10	0.1	0.1
9	50	13	0.385	0.385
9	60	9	0.222	0.222
9	70	6	0.333	0
9	80	4	0.25	0
10	10	7	0.571	0.143
10	20	15	0.267	0.133
10	30	19	0.368	0.368
10	40	12	0.167	0.167
10	50	6	0.333	0.333
10	60	9	0.333	0.333
10	70	2	0.5	0.5
10	80	8	0.375	0.375
10	90	7	0.571	0.571
10	100	3	0.333	0
11	10	7	0.286	0
11	20	8	0.375	0
11	30	15	0.4	0.2
11	40	15	0.467	0.2
11	50	16	0.313	0.313
11	60	7	0.143	0.143
11	70	6	0.5	0
11	80	4	0.5	0
12	10	13	0.538	0
12	20	9	0.222	0

杂合 12 05 染色体 bin				
染色体	bins	频率	杂合 12	杂合 05
12	30	13	0.462	0.077
12	40	12	0.333	0.333
12	50	9	0.444	0.444
12	60	5	0.2	0.2
12	70	7	0	0
12	80	3	0.333	0.333
12	90	4	0.75	0
12	100	2	1	0
13	20	1	0	0
13	30	4	0.5	0.5
13	40	10	0.2	0.2
13	50	7	0.286	0.143
13	60	9	0.444	0
13	70	8	0.5	0
13	80	9	0.111	0.111
13	90	7	0.429	0.429
13	100	11	0.455	0.364
13	110	11	0.364	0
13	120	1	0	0
14	20	1	0	0
14	30	7	0.714	0.429
14	40	8	0.625	0.625
14	50	8	0.375	0.375
14	60	9	0.333	0.111
14	70	6	0.333	0
14	80	8	0.125	0
14	90	7	0.286	0.286
14	100	6	0.667	0.5
14	110	2	0	0
15	30	5	0.2	0
15	40	5	0.2	0.2
15	50	3	0	0
15	60	6	0.5	0
15	70	5	0.2	0
15	80	5	0.4	0
15	90	7	0.429	0.143
15	100	5	0.2	0.2
15	110	1	0	0

[0266] 表 F. 染色体 Bins、杂合 / 频率, 染色体 11 和 16。

[0267]

杂合 11 06 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 11	杂合 06
		1459	0.326	0.213
	10	91	0.33	0.077
	20	135	0.319	0.096
	30	185	0.346	0.2
	40	169	0.367	0.243
	50	157	0.344	0.223

杂合 11 06 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 11	杂合 06
	60	153	0.294	0.222
	70	123	0.276	0.252
	80	113	0.345	0.292
	90	118	0.254	0.212
	100	88	0.33	0.193
	110	49	0.327	0.245

[0268]

杂合 11 06 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 11	杂合 06
	120	29	0.345	0.345
	130	26	0.423	0.346
	140	20	0.4	0.35
	150	3	0	0
1		142	0.317	0.197
2		150	0.273	0.207
3		111	0.288	0.234
4		133	0.338	0.173
5		121	0.355	0.331
6		115	0.252	0.096
7		103	0.34	0.204
8		93	0.344	0.204
9		66	0.318	0.167
10		88	0.432	0.307
11		78	0.372	0.167
12		77	0.39	0.169
13		78	0.244	0.154
14		62	0.323	0.323
15		42	0.381	0.381
1	20	9	0.333	0
1	30	14	0.429	0.286
1	40	12	0.333	0.167
1	50	15	0.333	0.267
1	60	21	0.286	0.286
1	70	19	0.211	0.211
1	80	9	0.222	0.111
1	90	13	0.231	0
1	100	13	0.462	0.308
1	110	8	0.25	0.125
1	120	6	0.333	0.333
1	130	3	0.667	0
2	10	3	0	0
2	20	11	0.455	0
2	30	13	0.308	0
2	40	6	0	0
2	50	19	0.211	0.211
2	60	13	0.462	0.462
2	70	10	0.2	0.2
2	80	13	0.231	0.231
2	90	19	0.368	0.316
2	100	7	0	0
2	110	4	0.25	0.25
2	120	7	0.143	0.143
2	130	11	0.364	0.364
2	140	11	0.364	0.364
2	150	3	0	0
3	10	9	0.333	0
3	20	15	0.067	0
3	30	12	0.25	0.083
3	40	11	0.545	0.545
3	50	3	0.333	0.333
3	60	12	0.167	0.167
3	70	12	0.333	0.333
3	80	14	0.5	0.5

杂合 11 06 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 11	杂合 06
3	90	12	0.167	0.167
3	100	9	0.333	0.333
3	110	2	0	0
4	10	13	0.308	0.154
4	20	9	0.222	0.111
4	30	15	0.333	0.267
4	40	15	0.467	0.2
4	50	11	0.273	0
4	60	8	0.5	0
4	70	7	0.286	0
4	80	9	0.333	0
4	90	9	0.111	0
4	100	7	0.286	0.286
4	110	8	0.25	0.25
4	120	7	0.429	0.429
4	130	8	0.5	0.5
4	140	7	0.429	0.286
5	10	12	0.333	0.083
5	20	12	0.083	0.083
5	30	11	0.455	0.455
5	40	14	0.286	0.286
5	50	10	0.5	0.5
5	60	8	0.125	0.125
5	70	8	0.375	0.375
5	80	8	0.375	0.375
5	90	8	0.125	0.125
5	100	7	0.571	0.571
5	110	9	0.667	0.667
5	120	8	0.5	0.5
5	130	4	0.25	0.25
5	140	2	0.5	0.5
6	10	13	0.231	0
6	20	14	0.143	0.143
6	30	11	0.182	0.091
6	40	12	0.333	0.167
6	50	10	0.3	0.1
6	60	18	0.333	0.056
6	70	8	0.125	0.125
6	80	8	0.25	0.25
6	90	7	0.143	0.143
6	100	10	0.4	0
6	110	4	0.25	0
7	10	6	0.167	0
7	20	12	0.25	0
7	30	16	0.25	0.063
7	40	14	0.357	0.286
7	50	16	0.563	0.313
7	60	15	0.333	0.2
7	70	9	0.444	0.444
7	80	5	0.4	0.4
7	90	7	0.143	0.143
7	100	3	0.333	0.333
8	10	8	0.5	0
8	20	10	0.7	0.1

[0269]

杂合 11 06 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 11	杂合 06
8	30	15	0.333	0.333
8	40	13	0.231	0.231
8	50	11	0.182	0.182
8	60	4	0	0
8	70	10	0.4	0.4
8	80	6	0.167	0.167
8	90	11	0.273	0.273
8	100	5	0.6	0
9	20	9	0.222	0
9	30	15	0.4	0.067
9	40	10	0.6	0.3
9	50	13	0.077	0.077
9	60	9	0.333	0.333
9	70	6	0.333	0.333
9	80	4	0.25	0.25
10	10	7	0.571	0.571
10	20	15	0.6	0.267
10	30	19	0.368	0.316
10	40	12	0.417	0.25
10	50	6	0.833	0.333
10	60	9	0.444	0.444
10	70	2	0	0
10	80	8	0.375	0.375
10	90	7	0	0
10	100	3	0.333	0.333
11	10	7	0.429	0
11	20	8	0.625	0.125
11	30	15	0.467	0.267
11	40	15	0.267	0.2
11	50	16	0.375	0.25
11	60	7	0	0
11	70	6	0.333	0.167
11	80	4	0.5	0
12	10	13	0.308	0
12	20	9	0.333	0.333
12	30	13	0.462	0.154
12	40	12	0.583	0.083
12	50	9	0.333	0

杂合 11 06 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 11	杂合 06
12	60	5	0.2	0.2
12	70	7	0.286	0.286
12	80	3	0.333	0.333
12	90	4	0.75	0.75
12	100	2	0	0
13	20	1	0	0
13	30	4	0.25	0
13	40	10	0	0
13	50	7	0.429	0.286
13	60	9	0.111	0.111
13	70	8	0.25	0.25
13	80	9	0.444	0.444
13	90	7	0.429	0.429
13	100	11	0.273	0
13	110	11	0.182	0
13	120	1	0	0
14	20	1	0	0
14	30	7	0.143	0.143
14	40	8	0.625	0.625
14	50	8	0.375	0.375
14	60	9	0.444	0.444
14	70	6	0.167	0.167
14	80	8	0.25	0.25
14	90	7	0.143	0.143
14	100	6	0.167	0.167
14	110	2	1	1
15	30	5	0.4	0.4
15	40	5	0.4	0.4
15	50	3	0.333	0.333
15	60	6	0.333	0.333
15	70	5	0.2	0.2
15	80	5	0.6	0.6
15	90	7	0.571	0.571
15	100	5	0.2	0.2
15	110	1	0	0

[0270] 表 G. 染色体 Bins、杂合 / 频率, 染色体 11 和 07。

[0271]

杂合 11 07 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 11	杂合 07
		1459	0.326	0.168
	10	91	0.33	0.033
	20	135	0.319	0.081
	30	185	0.346	0.092
	40	169	0.367	0.16
	50	157	0.344	0.185
	60	153	0.294	0.176
	70	123	0.276	0.154
	80	113	0.345	0.274
	90	118	0.254	0.186
	100	88	0.33	0.239

杂合 11 07 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 11	杂合 07
	110	49	0.327	0.265
	120	29	0.345	0.276
	130	26	0.423	0.346
	140	20	0.4	0.4
	150	3	0	0
1		142	0.317	0.085
2		150	0.273	0.093
3		111	0.288	0.189
4		133	0.338	0.12
5		121	0.355	0.215
6		115	0.252	0.217

[0272]

杂合 11 07 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 11	杂合 07
7		103	0.34	0.282
8		93	0.344	0.097
9		66	0.318	0.061
10		88	0.432	0.239
11		78	0.372	0.218
12		77	0.39	0.091
13		78	0.244	0.154
14		62	0.323	0.258
15		42	0.381	0.381
1	20	9	0.333	0
1	30	14	0.429	0
1	40	12	0.333	0
1	50	15	0.333	0
1	60	21	0.286	0
1	70	19	0.211	0.053
1	80	9	0.222	0.111
1	90	13	0.231	0.231
1	100	13	0.462	0.154
1	110	8	0.25	0.25
1	120	6	0.333	0.167
1	130	3	0.667	0.667
2	10	3	0	0
2	20	11	0.455	0
2	30	13	0.308	0
2	40	6	0	0
2	50	19	0.211	0
2	60	13	0.462	0.231
2	70	10	0.2	0
2	80	13	0.231	0.154
2	90	19	0.368	0.158
2	100	7	0	0
2	110	4	0.25	0
2	120	7	0.143	0
2	130	11	0.364	0.182
2	140	11	0.364	0.364
2	150	3	0	0
3	10	9	0.333	0.111
3	20	15	0.067	0
3	30	12	0.25	0.083
3	40	11	0.545	0.364
3	50	3	0.333	0.333
3	60	12	0.167	0.167
3	70	12	0.333	0.333
3	80	14	0.5	0.357
3	90	12	0.167	0
3	100	9	0.333	0.333
3	110	2	0	0
4	10	13	0.308	0
4	20	9	0.222	0
4	30	15	0.333	0
4	40	15	0.467	0.067
4	50	11	0.273	0
4	60	8	0.5	0
4	70	7	0.286	0

杂合 11 07 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 11	杂合 07
4	80	9	0.333	0
4	90	9	0.111	0.111
4	100	7	0.286	0.286
4	110	8	0.25	0.25
4	120	7	0.429	0.429
4	130	8	0.5	0.5
4	140	7	0.429	0.429
5	10	12	0.333	0
5	20	12	0.083	0
5	30	11	0.455	0
5	40	14	0.286	0.071
5	50	10	0.5	0.3
5	60	8	0.125	0
5	70	8	0.375	0.25
5	80	8	0.375	0.375
5	90	8	0.125	0.125
5	100	7	0.571	0.571
5	110	9	0.667	0.667
5	120	8	0.5	0.5
5	130	4	0.25	0.25
5	140	2	0.5	0.5
6	10	13	0.231	0
6	20	14	0.143	0.143
6	30	11	0.182	0.091
6	40	12	0.333	0.333
6	50	10	0.3	0.3
6	60	18	0.333	0.333
6	70	8	0.125	0.125
6	80	8	0.25	0.25
6	90	7	0.143	0.143
6	100	10	0.4	0.4
6	110	4	0.25	0.25
7	10	6	0.167	0
7	20	12	0.25	0.083
7	30	16	0.25	0.125
7	40	14	0.357	0.286
7	50	16	0.563	0.563
7	60	15	0.333	0.333
7	70	9	0.444	0.444
7	80	5	0.4	0.4
7	90	7	0.143	0.143
7	100	3	0.333	0.333
8	10	8	0.5	0
8	20	10	0.7	0
8	30	15	0.333	0
8	40	13	0.231	0.154
8	50	11	0.182	0.182
8	60	4	0	0
8	70	10	0.4	0
8	80	6	0.167	0
8	90	11	0.273	0.182
8	100	5	0.6	0.6
9	20	9	0.222	0
9	30	15	0.4	0

[0273]

杂合 11 07 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 11	杂合 07
9	40	10	0.6	0
9	50	13	0.077	0.077
9	60	9	0.333	0.111
9	70	6	0.333	0.167
9	80	4	0.25	0.25
10	10	7	0.571	0.286
10	20	15	0.6	0.267
10	30	19	0.368	0.316
10	40	12	0.417	0.25
10	50	6	0.833	0
10	60	9	0.444	0.333
10	70	2	0	0
10	80	8	0.375	0.375
10	90	7	0	0
10	100	3	0.333	0
11	10	7	0.429	0
11	20	8	0.625	0.5
11	30	15	0.467	0.2
11	40	15	0.267	0.2
11	50	16	0.375	0.188
11	60	7	0	0
11	70	6	0.333	0.333
11	80	4	0.5	0.5
12	10	13	0.308	0
12	20	9	0.333	0
12	30	13	0.462	0.154
12	40	12	0.583	0.083
12	50	9	0.333	0
12	60	5	0.2	0
12	70	7	0.286	0
12	80	3	0.333	0.333
12	90	4	0.75	0.75
12	100	2	0	0

杂合 11 07 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 11	杂合 07
13	20	1	0	0
13	30	4	0.25	0
13	40	10	0	0
13	50	7	0.429	0.429
13	60	9	0.111	0.111
13	70	8	0.25	0.25
13	80	9	0.444	0.444
13	90	7	0.429	0.286
13	100	11	0.273	0
13	110	11	0.182	0
13	120	1	0	0
14	20	1	0	0
14	30	7	0.143	0
14	40	8	0.625	0.25
14	50	8	0.375	0.375
14	60	9	0.444	0.444
14	70	6	0.167	0.167
14	80	8	0.25	0.25
14	90	7	0.143	0.143
14	100	6	0.167	0.167
14	110	2	1	1
15	30	5	0.4	0.4
15	40	5	0.4	0.4
15	50	3	0.333	0.333
15	60	6	0.333	0.333
15	70	5	0.2	0.2
15	80	5	0.6	0.6
15	90	7	0.571	0.571
15	100	5	0.2	0.2
15	110	1	0	0

[0274] 表 H. 染色体 Bins、杂合 / 频率, 染色体 11 和 08。

[0275]

杂合 11 08 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 11	杂合 08
		1459	0.326	0.206
	10	91	0.33	0.066
	20	135	0.319	0.163
	30	185	0.346	0.27
	40	169	0.367	0.302
	50	157	0.344	0.21
	60	153	0.294	0.157
	70	123	0.276	0.187
	80	113	0.345	0.195
	90	118	0.254	0.136
	100	88	0.33	0.25
	110	49	0.327	0.265
	120	29	0.345	0.241
	130	26	0.423	0.231
	140	20	0.4	0.25
	150	3	0	0

杂合 11 08 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 11	杂合 08
1		142	0.317	0.169
2		150	0.273	0.187
3		111	0.288	0.153
4		133	0.338	0.15
5		121	0.355	0.248
6		115	0.252	0.165
7		103	0.34	0.282
8		93	0.344	0.269
9		66	0.318	0.288
10		88	0.432	0.227
11		78	0.372	0.256
12		77	0.39	0.169
13		78	0.244	0.231
14		62	0.323	0.145
15		42	0.381	0.214
1	20	9	0.333	0

[0276]

杂合 11 08 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 11	杂合 08
1	30	14	0.429	0.286
1	40	12	0.333	0.333
1	50	15	0.333	0.333
1	60	21	0.286	0.143
1	70	19	0.211	0.105
1	80	9	0.222	0
1	90	13	0.231	0
1	100	13	0.462	0.077
1	110	8	0.25	0.125
1	120	6	0.333	0.333
1	130	3	0.667	0.667
2	10	3	0	0
2	20	11	0.455	0.273
2	30	13	0.308	0.308
2	40	6	0	0
2	50	19	0.211	0.211
2	60	13	0.462	0.231
2	70	10	0.2	0
2	80	13	0.231	0.077
2	90	19	0.368	0.158
2	100	7	0	0
2	110	4	0.25	0.25
2	120	7	0.143	0.143
2	130	11	0.364	0.364
2	140	11	0.364	0.364
2	150	3	0	0
3	10	9	0.333	0
3	20	15	0.067	0.067
3	30	12	0.25	0.25
3	40	11	0.545	0.545
3	50	3	0.333	0.333
3	60	12	0.167	0.167
3	70	12	0.333	0.083
3	80	14	0.5	0
3	90	12	0.167	0
3	100	9	0.333	0.333
3	110	2	0	0
4	10	13	0.308	0.077
4	20	9	0.222	0.222
4	30	15	0.333	0.333
4	40	15	0.467	0.2
4	50	11	0.273	0
4	60	8	0.5	0
4	70	7	0.286	0.286
4	80	9	0.333	0.333
4	90	9	0.111	0.111
4	100	7	0.286	0.286
4	110	8	0.25	0
4	120	7	0.429	0
4	130	8	0.5	0
4	140	7	0.429	0.143
5	10	12	0.333	0.167
5	20	12	0.083	0.083
5	30	11	0.455	0.455

杂合 11 08 染色体 bin

染色体	bins	频率	杂合 11	杂合 08
5	40	14	0.286	0.286
5	50	10	0.5	0.1
5	60	8	0.125	0
5	70	8	0.375	0
5	80	8	0.375	0.25
5	90	8	0.125	0.125
5	100	7	0.571	0.571
5	110	9	0.667	0.667
5	120	8	0.5	0.5
5	130	4	0.25	0
5	140	2	0.5	0
6	10	13	0.231	0
6	20	14	0.143	0.143
6	30	11	0.182	0.182
6	40	12	0.333	0.333
6	50	10	0.3	0.1
6	60	18	0.333	0.056
6	70	8	0.125	0.125
6	80	8	0.25	0.25
6	90	7	0.143	0.143
6	100	10	0.4	0.4
6	110	4	0.25	0.25
7	10	6	0.167	0
7	20	12	0.25	0.167
7	30	16	0.25	0.25
7	40	14	0.357	0.357
7	50	16	0.563	0.375
7	60	15	0.333	0.333
7	70	9	0.444	0.444
7	80	5	0.4	0.4
7	90	7	0.143	0.143
7	100	3	0.333	0
8	10	8	0.5	0.25
8	20	10	0.7	0.3
8	30	15	0.333	0.333
8	40	13	0.231	0.231
8	50	11	0.182	0.091
8	60	4	0	0
8	70	10	0.4	0.4
8	80	6	0.167	0.167
8	90	11	0.273	0.273
8	100	5	0.6	0.6
9	20	9	0.222	0
9	30	15	0.4	0.4
9	40	10	0.6	0.6
9	50	13	0.077	0.077
9	60	9	0.333	0.333
9	70	6	0.333	0.333
9	80	4	0.25	0.25
10	10	7	0.571	0
10	20	15	0.6	0.133
10	30	19	0.368	0.053
10	40	12	0.417	0.417
10	50	6	0.833	0.833

[0277]

染色体	bins	频率	杂合 11	杂合 08
10	60	9	0.444	0.444
10	70	2	0	0
10	80	8	0.375	0.375
10	90	7	0	0
10	100	3	0.333	0
11	10	7	0.429	0
11	20	8	0.625	0.375
11	30	15	0.467	0.467
11	40	15	0.267	0.2
11	50	16	0.375	0.188
11	60	7	0	0
11	70	6	0.333	0.333
11	80	4	0.5	0.5
12	10	13	0.308	0.077
12	20	9	0.333	0.333
12	30	13	0.462	0.154
12	40	12	0.583	0.083
12	50	9	0.333	0
12	60	5	0.2	0
12	70	7	0.286	0.286
12	80	3	0.333	0.333
12	90	4	0.75	0.75
12	100	2	0	0
13	20	1	0	0
13	30	4	0.25	0
13	40	10	0	0
13	50	7	0.429	0.429

染色体	bins	频率	杂合 11	杂合 08
13	60	9	0.111	0.111
13	70	8	0.25	0.25
13	80	9	0.444	0.444
13	90	7	0.429	0.429
13	100	11	0.273	0.273
13	110	11	0.182	0.182
13	120	1	0	0
14	20	1	0	0
14	30	7	0.143	0
14	40	8	0.625	0.625
14	50	8	0.375	0.125
14	60	9	0.444	0
14	70	6	0.167	0
14	80	8	0.25	0
14	90	7	0.143	0
14	100	6	0.167	0.167
14	110	2	1	1
15	30	5	0.4	0.4
15	40	5	0.4	0.4
15	50	3	0.333	0.333
15	60	6	0.333	0.333
15	70	5	0.2	0.2
15	80	5	0.6	0
15	90	7	0.571	0
15	100	5	0.2	0.2
15	110	1	0	0

[0278] 表 I. 染色体 Bins、杂合 / 频率, 染色体 10 和 09。

[0279] 杂合 10 09 染色体 bin

[0280]

染色体	bins	频率	杂合 10	杂合 09
		1459	0.378	0.222
	10	91	0.473	0.066
	20	135	0.319	0.178
	30	185	0.314	0.227
	40	169	0.467	0.402
	50	157	0.357	0.21
	60	153	0.405	0.216
	70	123	0.358	0.138

	80	113	0.363	0.257
	90	118	0.373	0.237
	100	88	0.432	0.216
	110	49	0.408	0.184
	120	29	0.31	0.207
	130	26	0.308	0.269
	140	20	0.2	0.1
	150	3	1	0.333
1		142	0.387	0.218
2		150	0.353	0.253
3		111	0.405	0.243
4		133	0.346	0.218
5		121	0.413	0.198
6		115	0.409	0.243
7		103	0.359	0.233
8		93	0.398	0:118
9		66	0.333	0.273
10		88	0.341	0.273
11		78	0.372	0.167
12		77	0.429	0.182
13		78	0.423	0.256
14		62	0.339	0.226
15		42	0.333	0.214
1	20	9	0.556	0.222

1	30	14	0.357	0.071
1	40	12	0.333	0.333
1	50	15	0.267	0.2
1	60	21	0.429	0.286
1	70	19	0.526	0.263
1	80	9	0.222	0.222
1	90	13	0.077	0
1	100	13	0.385	0.308
1	110	8	0.625	0.125
1	120	6	0.5	0.167
1	130	3	0.667	0.667
2	10	3	0.333	0
2	20	11	0.364	0.364
2	30	13	0.308	0.308
2	40	6	0	0
2	50	19	0.263	0.263
2	60	13	0.615	0.231
2	70	10	0.3	0.2
2	80	13	0.538	0.385
2	90	19	0.421	0.368
2	100	7	0.571	0.571

[0281] 杂合 10 09 染色体 bin

[0282]

染色体	bins	频率	杂合 10	杂合 09
-----	------	----	-------	-------

2	110	4	0	0
2	120	7	0.286	0.286
2	130	11	0.182	0.091
2	140	11	0.182	0
2	150	3	1	0.333
3	10	9	0.333	0
3	20	15	0.4	0.067
3	30	12	0.333	0.25
3	40	11	0.636	0.636
3	50	3	0	0
3	60	12	0.333	0.25
3	70	12	0.417	0.25
3	80	14	0.571	0.357
3	90	12	0.25	0.167
3	100	9	0.444	0.222
3	110	2	0.5	0.5
4	10	13	0.615	0.154
4	20	9	0.111	0.111
4	30	15	0.2	0.067
4	40	15	0.267	0.133
4	50	11	0.545	0.182
4	60	8	0.375	0.375
4	70	7	0	0
4	80	9	0.222	0.222

4	90	9	0.667	0.667
4	100	7	0.286	0
4	110	8	0.5	0.375
4	120	7	0.429	0.429
4	130	8	0.25	0.25
4	140	7	0.286	0.286
5	10	12	0.417	0
5	20	12	0.25	0.167
5	30	11	0.455	0.455
5	40	14	0.5	0.357
5	50	10	0.7	0.2
5	60	8	0.375	0
5	70	8	0.25	0
5	80	8	0.375	0.375
5	90	8	0.5	0.5
5	100	7	0.571	0
5	110	9	0.444	0.111
5	120	8	0.125	0
5	130	4	0.5	0.5
5	140	2	0	0
6	10	13	0.462	0.154
6	20	14	0.286	0.143
6	30	11	0.364	0.364
6	40	12	0.583	0.583

6	50	10	0.3	0.3
6	60	18	0.278	0.278
6	70	8	0.375	0.375
6	80	8	0.375	0.25
6	90	7	0.714	0

[0283] 杂合 10 09 染色体 bin

[0284]

染色体	bins	频率	杂合 10	杂合 09
6	100	10	0.7	0
6	110	4	0	0
7	10	6	0.5	0.167
7	20	12	0.25	0.25
7	30	16	0.313	0.313
7	40	14	0.571	0.571
7	50	16	0.25	0.25
7	60	15	0.6	0.2
7	70	9	0.444	0
7	80	5	0.2	0
7	90	7	0	0
7	100	3	0	0
8	10	8	0.25	0
8	20	10	0.4	0.3
8	30	15	0.467	0.2
8	40	13	0.308	0.154

8	50	11	0.364	0.182
8	60	4	0.5	0.25
8	70	10	0.5	0
8	80	6	0.5	0
8	90	11	0.455	0
8	100	5	0.2	0
9	20	9	0.333	0.111
9	30	15	0.133	0.067
9	40	10	0.6	0.5
9	50	13	0.385	0.385
9	60	9	0.333	0.333
9	70	6	0.167	0.167
9	80	4	0.5	0.5
10	10	7	0.571	0
10	20	15	0.267	0.133
10	30	19	0.263	0.263
10	40	12	0.417	0.417
10	50	6	0.167	0.167
10	60	9	0.222	0.222
10	70	2	0.5	0.5
10	80	8	0.375	0.375
10	90	7	0.571	0.571
10	100	3	0.333	0.333
11	10	7	0.571	0.143

11	20	8	0.25	0
11	30	15	0.333	0.333
11	40	15	0.267	0.267
11	50	16	0.563	0.188
11	60	7	0.286	0
11	70	6	0.5	0
11	80	4	0	0
12	10	13	0.538	0
12	20	9	0.333	0.333
12	30	13	0.154	0.077
12	40	12	0.75	0.5
12	50	9	0.444	0
12	60	5	0.4	0

[0285] 杂合 10 09 染色体 bin

[0286]

染色体	bins	频率	杂合 10	杂合 09
12	70	7	0.286	0.286
12	80	3	0.333	0.333
12	90	4	0.25	0
12	100	2	1	0.5
13	20	1	1	0
13	30	4	0.25	0
13	40	10	0.7	0.7
13	50	7	0.429	0.286

13	60	9	0.444	0
13	70	8	0.375	0
13	80	9	0.222	0.111
13	90	7	0.429	0.429
13	100	11	0.364	0.364
13	110	11	0.455	0.273
13	120	1	0	0
14	20	1	0	0
14	30	7	0.571	0.571
14	40	8	0.5	0.5
14	50	8	0.125	0.125
14	60	9	0.444	0.222
14	70	6	0.333	0
14	80	8	0.125	0
14	90	7	0.286	0
14	100	6	0.5	0.5
14	110	2	0	0
15	30	5	0.4	0
15	40	5	0.6	0.4
15	50	3	0	0
15	60	6	0.333	0.333
15	70	5	0	0
15	80	5	0.6	0.6
15	90	7	0.286	0.286

15	100	5	0.2	0
15	110	1	1	0

[0287] 染色体 = 所考虑的染色体编号 ; Bins = 具体间隔, 具有距着丝粒的 10Mbp 间隔的给定上限数字 ; 频率 = 所考虑染色体和间隔的每个组合的 SNP 标记物的数量 ; 其它列是所考虑染色体和间隔的每个组合的杂合性比例 ; 染色体 = . , bins = .

[0288] 行 : 在样本中所有 1459 个标记物的全部累加 ; 染色体 = . , bins = ** 系 : 间隔 - 与 - 间隔累加, 所有染色体总和 ; 染色体 = ** , bins = .

[0289] 行 : 染色体 - 与 - 染色体累加, 所有间隔总和 ; 染色体 = ** , bins = ** 系 : 染色体和间隔的每个组合的累加。

[0290] 在所有 7 对中, 干细胞显示比它们的供体细胞对应物低的杂合性比例。整体上看, 在距着丝粒的距离上, 供体细胞似乎不显示杂合性趋势的清晰模式, 但是干细胞显示与中部的杂合性比例比较, 接近着丝粒和端粒的杂合性比例有些低。

[0291] 基于 HLA- 分型结果, 衍生自所有 phESC 系的干细胞显示与卵母细胞供体是 MHC- 匹配的, 使其成为产生用于治疗用途的细胞的可能方法 (表 3)。用作饲养细胞的人成纤维细胞的遗传物质 HLA- 分析显示, 没有来自人成纤维细胞的物质污染 phESC 系 (表 3)。

[0292] 表 3. HLA- 分型结果。

[0293]

	MHCI			MHCH		
	HLA-A	HLA-B	HLA-C	DRB1	DQB1	DQA1
phESC-1	A*01 A*02	B*15(63)B *35	Cw*04 Cw*0708	DRB1*12 DRB1*13	DQB1*06 DQB1*03	DQA1*01 DQA1*0505
phESC-1 供体	A*01 A*02	B*15(63)B *35	Cw*04 Cw*0708	DRB1*12 DRBP*13	DQB1*06 DQB1*03	DQA1*01 DQA1*0505
phESC-3, 4, 5	A*02 A*03	B*52 B*22	Cw*03 Cw*04	DRB1*01 DRB1*03	DQB1*05 DQB1*02	DQA1*0101 DQA1*05
phESC-3, 4,5 供体	A*02 A*03	B*52 B*22	Cw*03 Cw*04	DRB1*01 DRB1*03	DQB1*05 DQB1*02	DQA1*0101 DQA1*05
phESC-6	A*02 A*03	B*07 B*27	Cw*04 Cw*07	DRB1*04 DRB1*15	DQB1*06 DQB1*03	DQA1*01 DQA1*03
phESC-6 供体	A*02 A*03	B*07 B*27	Cw*04 Cw*07	DRBP*04 DRB1*15	DQB1*06 DQB1*03	DQA1*01 DQA1*03
phESC-7	A*01 A*02	B*38 B*57	Cw*06 Cw*12	DRB1*13 DRB1*14	DQB1*06 DQB1*06	DQA1*0106 DQA1*0103
phESC-7 供体	A*01 A*02	B*38 B*57	Cw*06 Cw*12	DRB1*13 DRB1*14	DQB1*06 DQB1*06	DQA1*0106 DQA1*0103
NSF	A*25 A*32	B*15(62)B *18	Cw*12 Cw*12	DRB1*04 DRB1*15	DQB1*06 DQB1*03	DQA1*01 DQA1*03

[0294] 印记基因分析

[0295] 人胚胎中基因印记的变化可归因于与母本或父本表达的基因连锁的疾病的发生 (Gabriel 等, Proc Natl Acad Sci USA (1998) 95:14857-14862)。phESC 中印记的研究需要详细的调查, 因为可能影响 phESC 分化和它们衍生物的功能性。作为预备研究, 在未分化的 phESC 中进行人印记基因 TSSC5、H19、PEG1 和 SNRPN 的表达分析 (Morison 等, Trends Genet (2005) 21:457-465) (图 6)。源于丢弃的 IVF 胚胎的两个 hESC 系用作对照。在所有 phESC 系以及也在对照系中观察到母本表达基因 TSSC5 (Morison 等, 2005, 上文) 和 H19 (Morison 等, 2005, 上文) 的转录物。人 PEG1 基因从两个可选的启动子转录 (Li 等, 2002, 上文)。来自第一启动子的基因区是双等位基因表达的, 以及来自第二启动子的基因区 (同工型 1) 是父本表达的 (Li 等, 2002, 上文)。来自第一启动子的 PEG1 基因表达在 phESC 系中不受影响。PEG1 基因父本表达区和父本表达的 SNRPN 基因的分析 (Morison 等, 2005, 上文) 表明, 与对照 hESC 系相比, 这些基因的表达在 phESC 系中明显下调 (图 6FP)。这些结果提供所述 phESC 系单性生殖来源的进一步的证据。

[0296] 实施例 2. 来自 HLA 纯合供体的 hpSC-Hhom 系的衍生。

[0297] 对于分离 HLA 纯合单性生殖干细胞系的最初目的,使用来自 HLA 纯合供体的卵母细胞。供体(供体 1)和她的亲本的 HLA 基因型分型表明两个亲本均是杂合的。相同单元型 A*25、B*18、DRB1*15 从每个亲本遗传,供体具有 HLA 纯合基因型 A*25、A*25、B*18、B*18、DRB1*15、DRB1*15(表 5,例 1)。

[0298] 从供体 1 获得十九个卵泡卵母细胞复合体(COCs),其中七个用于研究(表 4)。

[0299] 表 4. 单性生殖体和 HLA 纯合单性生殖干细胞系的来源。

[0300]

供体编号	收获的卵母细胞	捐赠的卵母细胞	胚胎	细胞系	IVF 结果
1	19	7	4	hpSC-Hhom-1	成功
2	18	7	3	hpSC-Hhom-2 hpSC-Hhom-3	成功 (怀双胞胎)
3	20	10	0	0	不成功
4	27	14	2	hpSC-Hhom-4	成功
总计	84	38	9	4	NA

[0301] 使用前述方案用 A23187 和 6-DMAP 处理进行单性生殖活化(Revazova 等,2007,上文)。四个单性生殖胚胎到达胚胎期,其中一个可进行 hpSC-Hhom-1 系分离。

[0302] 通过 SNP 分析, hpSC-Hhom-1 系细胞和供体 1 体细胞之间的基因型关联鉴定为“全同胞”(遗传匹配)。SNP 标记物比较显示,供体 1 细胞显示出表现杂合性模式,而 hpSC-Hhom-1 细胞显示较低的杂合性比例。

[0303] HLA 基因型分型表明, hpSC-Hhom-1 系是 HLA 纯合的 :A*25、A*25、B*18、B*18、DRB1*15、DRB1*15,并且与供体完全 HLA 匹配(表 5,例 1)。

[0304] 表 5. HLA 基因型分型。

[0305]

例		HLA-A	HLA-B	DRB1
1	供体的母本	A*25 A*26	B*18 B*44	DRB1*15 DRB1*11
	供体的父本	<u>A*25</u> A*03	<u>B*18</u> B*07	<u>DRB1*15</u> DRB1*15
	供体	A*25 A*25	B*18 B*18	DRB1*15 DRB1*15
	hpSC-Hhom -1	A*25 <u>A*25</u>	B*18 <u>B*18</u>	DRB1*15 <u>DRB1*15</u>
2	供体的母本	A*02 A*33	B*13 B*14	DRB1*07 DRB1*01
	供体的父本	<u>A*68</u> A*03	<u>B*18</u> B*40	<u>DRB1*13</u> DRB1*03
	供体	A*02 <u>A*68</u>	B*13 <u>B*18</u>	DRB1*07 <u>DRB1*13</u>
	hpSC-Hhom -2	<u>A*68</u> <u>A*68</u>	<u>B*18</u> <u>B*18</u>	<u>DRB1*13</u> <u>DRB1*13</u>
	hpSC-Hhom -3	A*02 A*02	B*13 B*13	DRB1*07 DRB1*07
3	供体的母本	A*02 A*01	B*08 B*15	DRB1*03 DRB1*01
	供体的父本	A*01 A*33	B*51 B*15	DRB1*11 DRB1*04
	供体	A*02 A*01	B*08 B*51	DRB1*03 DRB1*11
	HLA 单元型 N10: A*02 B*08 DRB1*03			没有系
	供体的母本	A*02 A*02	B*07 B*40	DRB1*13 DRB1*16

[0306]

例		HLA-A	HLA-B	DRB1
4	供体的父本	<u>A*01</u> A*24	<u>B*08</u> B*44	<u>DRB1*03</u> DRB1*01
	供体	A*02 <u>A*01</u>	B*40 <u>B*08</u>	DRB1*13 <u>DRB1*03</u>
	hpSC-Hhom -4	<u>A*01</u> <u>A*01</u>	<u>B*08</u> <u>B*08</u>	<u>DRB1*03</u> <u>DRB1*03</u>
	HLA 单元型 N1			
饲养细胞	NSF	A*25 A*32	B*15(62) B*18	DRB1*04 DRB1*15

[0307] 粗体强调供体母本的 HLA 单元型；下划线强调供体父本的 HLA 单元型，每个由供体然后由 hpSC-Hhom 系遗传。

[0308] 来自 HLA 杂合供体的 hpSC-Hhom 系的衍生

[0309] 由于 HLA 纯合卵母细胞供体很少发生,从获自 HLA 杂合供体的卵母细胞分离 HLA 纯合细胞系被寻求。总计,十八个 COCs 获自供体 2,其中七个捐赠用于研究(表 4)。使用不同的方案用 A23187 和嘌呤霉素处理将这些卵母细胞进行单性生殖活化。18 小时后,在活化的卵母细胞中观察到第二极体挤出和一个前核的形成。从这些合子产生三个胚泡,允许两个 hpSC-Hhom 系的分离:hpSC-Hhom-2 和 hpSC-Hhom-3。

[0310] 卵母细胞供体 2 的体细胞与 hpSC-Hhom-2 和 hpSC-Hhom-3 系之间进行的 SNP 分析显示为“父母/子女对”的关系。另外,与供体的杂合体细胞不同,这两个细胞系均显示整个基因组(所评估的 SNP 标记物)为纯合的。

[0311] 基于 HLA- 基因型分型结果,来自这两个系的细胞显示 HLA 纯合:hpSC-Hhom-2 系显示 HLA 基因型 A*68、A*68、B*18、B*18、DRB1*13、DRB1*13, hpSC-Hhom-3 系显示 HLA 基因型 A*02、A*02、B*13、B*13、DRB1*07、DRB1*07(在所研究的基因座)。而且,每个 hpSC-Hhom 系遗传不同的 HLA 单元型,一个来自供体的父本,另一个来自供体的母本。在 hpSC-Hhom-2 系纯合状态中发现供体父本的 HLA 单元型(A*68、B*18、DRB1*13),在 hpSC-Hhom-3 系纯合状态中发现供体母本的 HLA 单元型(A*02、B*13、DRB1*07)(表 5,例 2)。

[0312] 从 HLA 杂合供体卵母细胞分离 hpSC-Hhom 系,根据 HLA 单元型进行选择。

[0313] 作为最终步骤,进行具有中人群中已知高频率的 HLA 单元型的 hpSC-Hhom 系的分离。IVF 候选物的 HLA 单元型筛选产生两个 HLA 杂合卵母细胞供体,其携带常见单元型。根据出版的 HLA 单元型频率表(Mori M. 等, Transplantation(1997)64:1017-1027),供体 3(HLA 单元型 A*02、B*08、DRB1*03)和供体 4(HLA 单元型 A*01、B*08、DRB1*03)(表 5,例 3 和例 4)携带美国人群中发现的常见单元型。但是,对于杂合 HLA 基因型,每个供体不但携带常见单元型,而且也携带一个较少见的单元型。因此,不可能完全准确地预测在分离的 hpSC-Hhom 系中会存在哪种单元型。

[0314] A23187 和嘌呤霉素用于供体卵母细胞的单性生殖活化。从供体 3 的卵母细胞分离 hpSC-Hhom 系不成功,其中获得二十个 COCs,10 个卵母细胞捐赠用于研究。这些都没有达到胚泡期。而且,用于该供体的 IVF 方法在实现怀孕方面不成功。总之,这些发现可反映出来自这一特定供体的卵母细胞的较差质量(表 4)。

[0315] 从供体 4 获得 27 个 COCs,十四 个卵母细胞被捐赠用于研究。卵母细胞单性生殖活化后,获得两个胚泡,从其中分离 hpSC-Hhom-4 系(表 4)。

[0316] 通过 SNP 分析, hpSC-Hhom-4 和供体 4 体细胞之间的基因型关联被鉴定为“父母/子女对”,与例 2 相似。与供体的杂合体细胞比较(1,174 个杂合 SNP 标记物),HpSC-Hhom-4 系显示整个基因组(所评估的 SNP 标记物)为纯合的。

[0317] 根据 HLA 基因型分型, hpSC-Hhom-4 系是 HLA 纯合的(在所评估的基因座)并且具有美国人群中最常见的许多种群所共有的 HLA 单元型(表 6):A*01、B*08、DRB1*03(表 5,例 4)。

[0318] 表 6. 在美国人群中根据种群的 HLA 单元型 A*01, B*08, DRB1*03 的频率和等级(改编自 Mori M. 等,1997, 上文)。

[0319]

种群 ^a	频率 (%) ^b	等级 ^c
CAU	5.1812	1
NAT	4.7439	1
AFR	1.2491	2
LAT	1.6733	3
ASI	0.3195	54

[0320]

[0321] ^a高加索美国人 (Caucasian American, CAU), 土著美国人 (Native American, NAT),

[0322] 非洲裔美国人 (African-American, AFR), 拉丁裔美国人 (Latin American, LAT)

[0323] 和亚洲裔美国人 (Asian-American, ASI)。

[0324] ^bHLA-A, -B, -DR 单元型频率

[0325] ^c在每个种群中的各自等级

[0326] IVF 操作引起四个供体中的三个怀孕 (供体 1、2 和 4)。高 IVF 成功率很大程度上归因于选择具有 IVF 怀孕的良好预后的供体。有趣的是, 从供体 2 分离两个 hpSC-Hhom 系, 其中供体由她的 IVF 操作怀了双胞胎。

[0327] hpSC-Hhom 系的表征

[0328] 来自所有 hpSC-Hhom 系的细胞显示所期望的人胚胎干细胞的形态学, 形成致密叠集的集落, 以及显示明显的核仁, 具有小的细胞质核比。所有细胞表达常见的人胚胎干细胞标记物 SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 和 OCT-4, 而不表达 SSEA-1——未分化的小鼠胚胎干细胞的阳性标记物 (图 7)。所有系显示高水平的碱性磷酸酶 (图 7) 和端粒酶活性 (图 8)。

[0329] G-带核型分析表明, hpSC-Hhom-1 和 hpSC-Hhom-4 系具有正常人 46, XX 核型 (图 9, A 和 B)。HpSC-Hhom-2 和 hpSC-Hhom-3 系均源于单一供体, 其显示核型异常。大约 15% 来自 hpSC-Hhom-2 系的细胞显示非整倍的染色体 8:47, XX, +8 核型 (图 9, C); 4.2% 来自 hpSC-Hhom-3 系的细胞显示非整倍的染色体 1:47, XX, +1 核型 (图 9, D)。在对 100 个中期细胞分析时, 在任何细胞系中都没有观察到 X 染色体异型 (图 9)。

[0330] HpSC-Hhom-4 系保持未分化未分化超过 27 代。其它细胞系成功地培养超过至少 21 代。来自 hpSC-Hhom-4 系的细胞在悬浮培养中形成囊胚状体, 并在体外分化后产生所有三胚层——外胚层、中胚层和内胚层——的衍生物 (图 10)。外胚层分化由神经元特异性标记物神经丝 68 (图 10A) 和 NCAM (图 10B) 的阳性免疫细胞化学染色证实。分化的细胞对中胚层肌肉特异性标记物结蛋白 (图 10C) 和 α -辅肌动蛋白 (图 10D) 也是阳性的。内胚层分化由 α -胎蛋白的阳性染色证实 (图 10E)。

[0331] 所有 hpSC-Hhom 系形成所有三胚层衍生物的能力通过皮下注射 hpSC-Hhom 细胞至

免疫缺陷小鼠中而被进一步体内研究（图 11）。在注射后大约两个月，所有 hpSC-Hhom 系能够形成畸胎瘤。未观察到畸胎瘤的形成。也注射约四百万丝裂霉素 C 处理的用作 phSC-Hhom 细胞饲养层的人成纤维细胞作为对照，并且未显示畸胎瘤生长。

[0332] 细胞移植物的组织学检测表明存在组织化的结构，包括：各种腺体类型（一些产生褐色色素，可能是胆汁色素）、软骨分化、良好形成的骨、间充质细胞、胶原纤维的高产量、脂肪组织、神经管和具有角化不全珠 (pearls) 的复层扁平上皮（图 11）。这些发现表明，hpSC-Hhom 在体内会分化成源于所有三胚层的组织。

[0333] 虽然本发明已经参考上述实施例进行了描述，但是应理解，修改和变化包括在本发明的精神和范围之内。因此，本发明仅由所附权利要求书所限定。

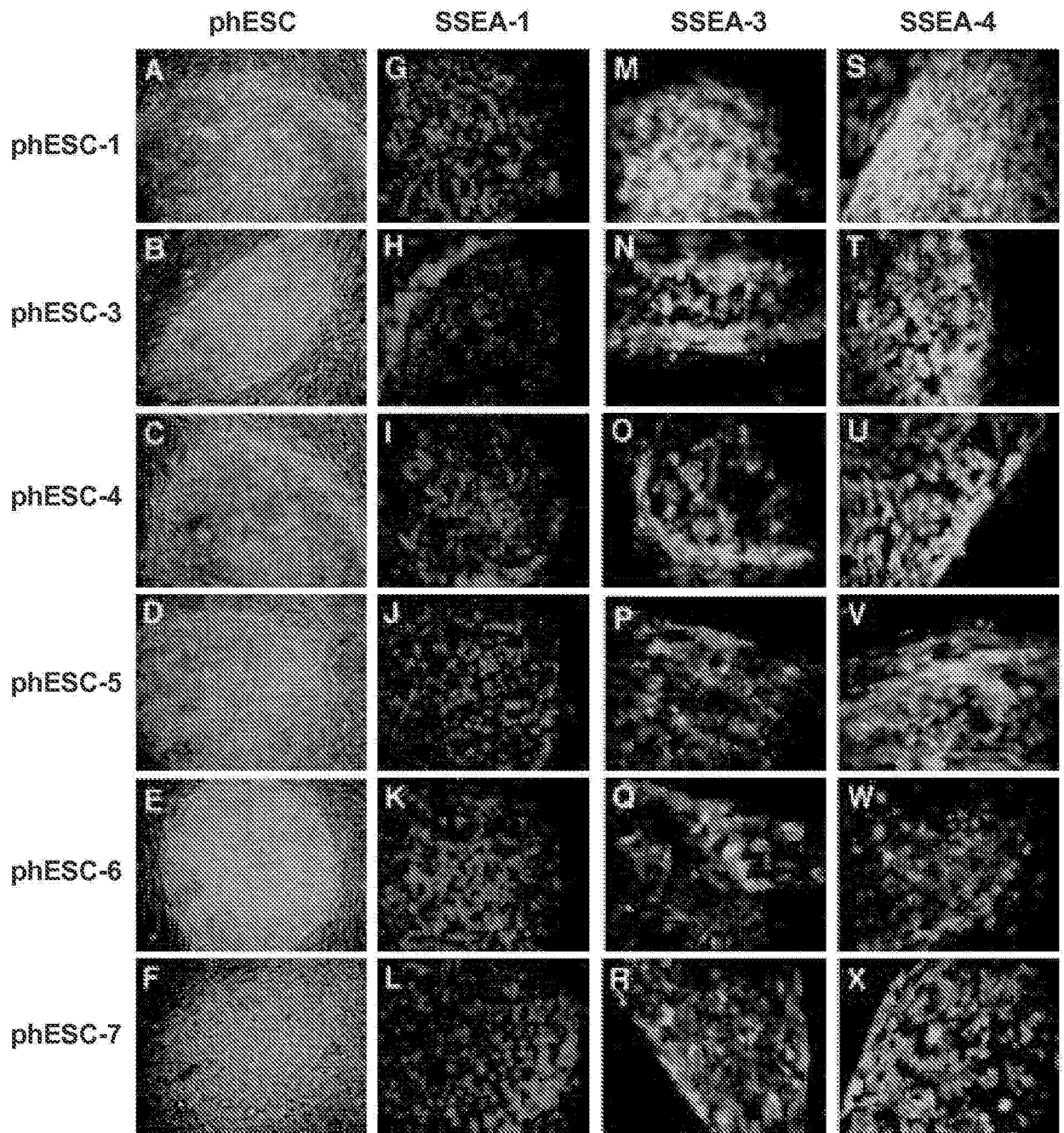


图 1

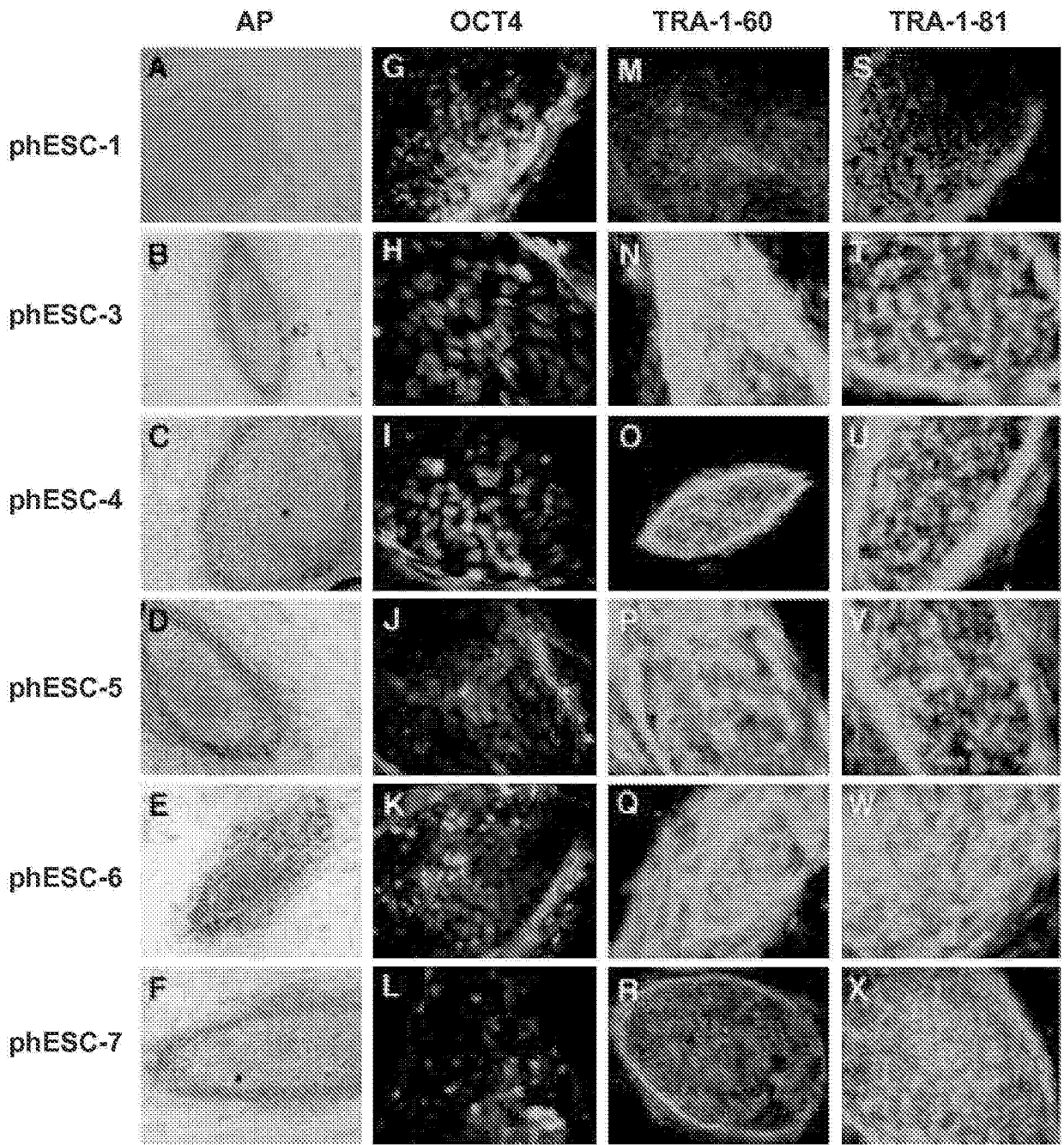


图 1(续)

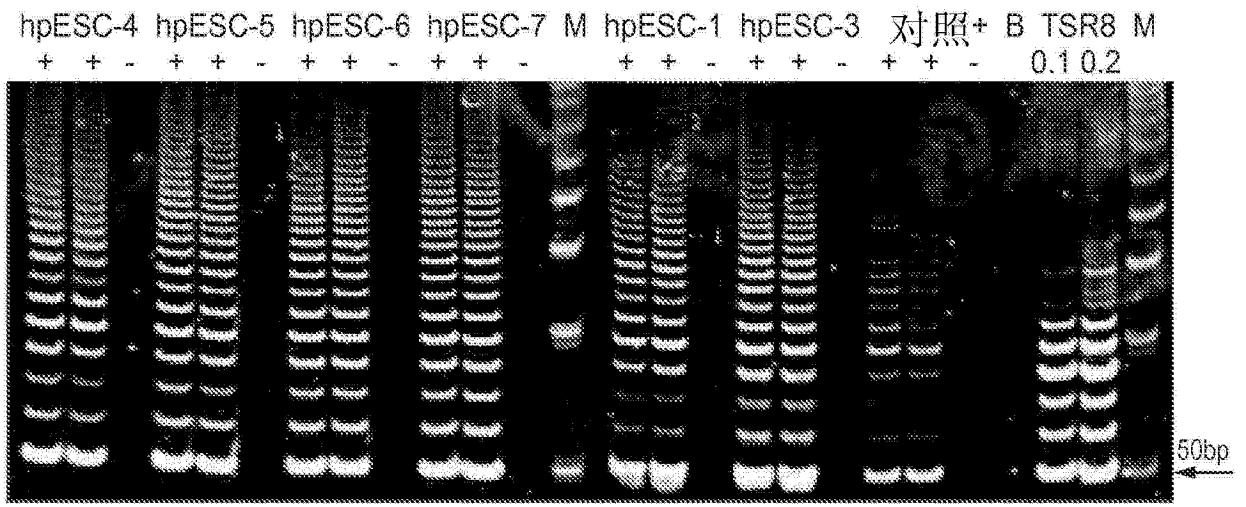


图 2

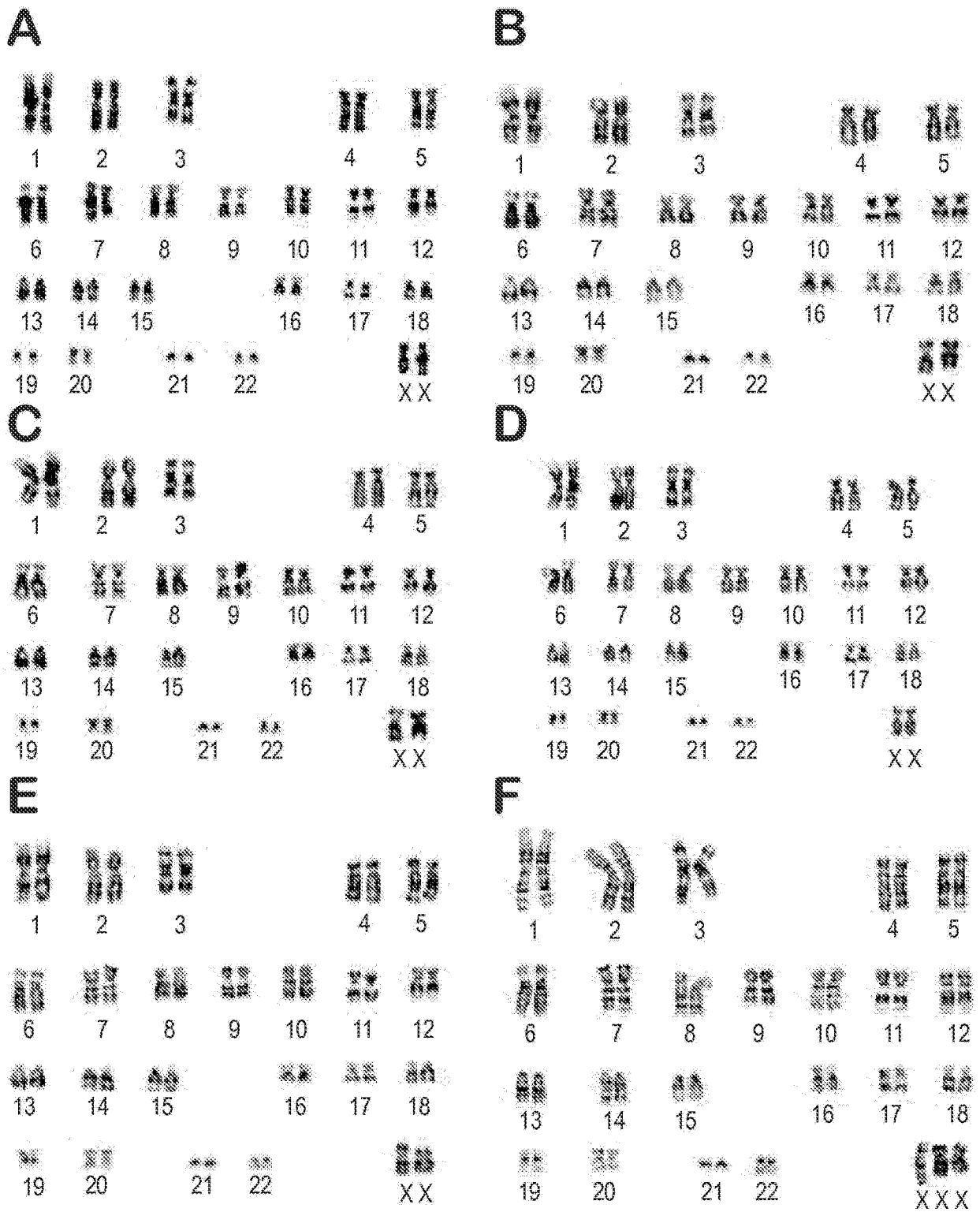


图 3

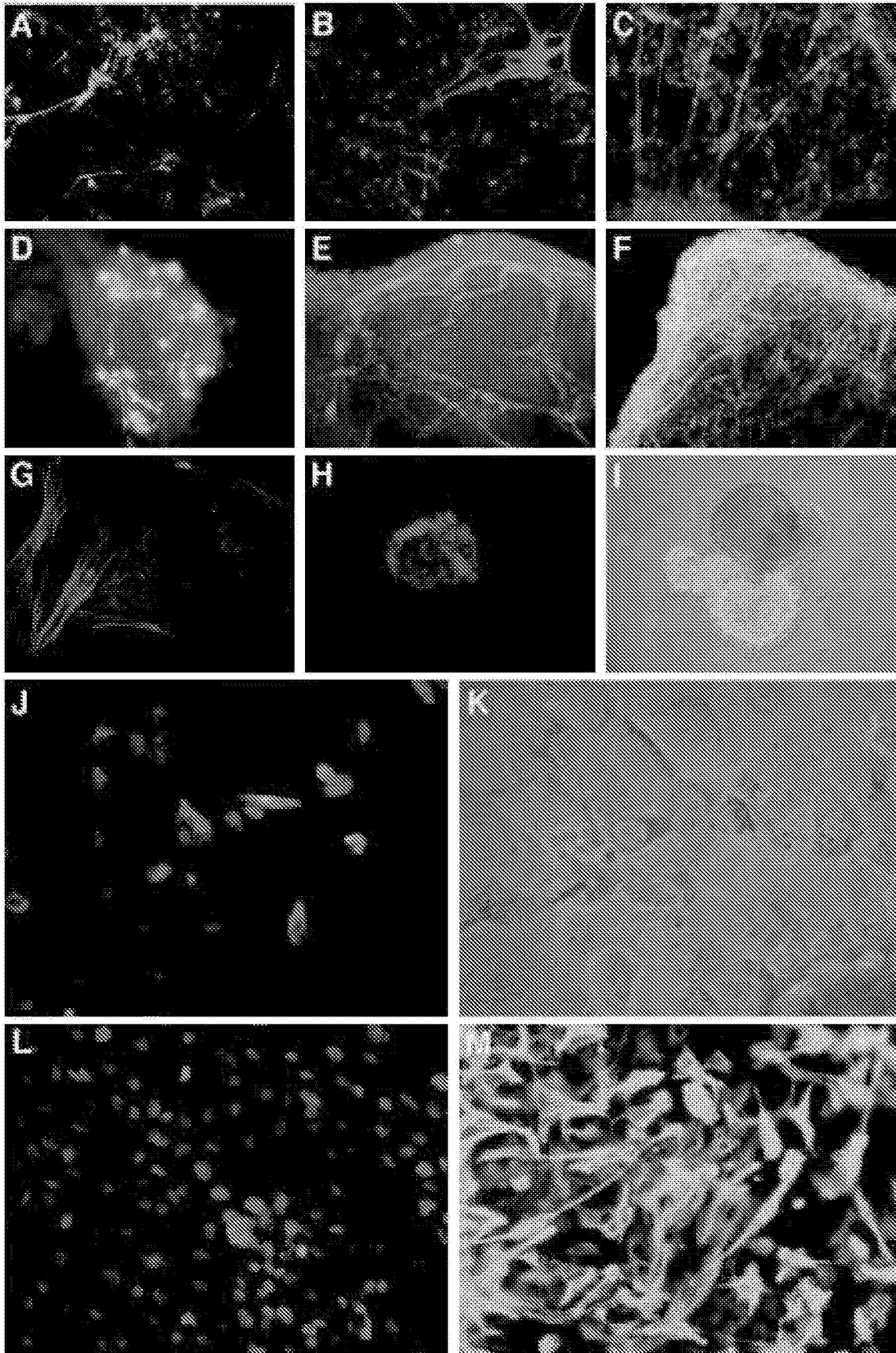


图 4

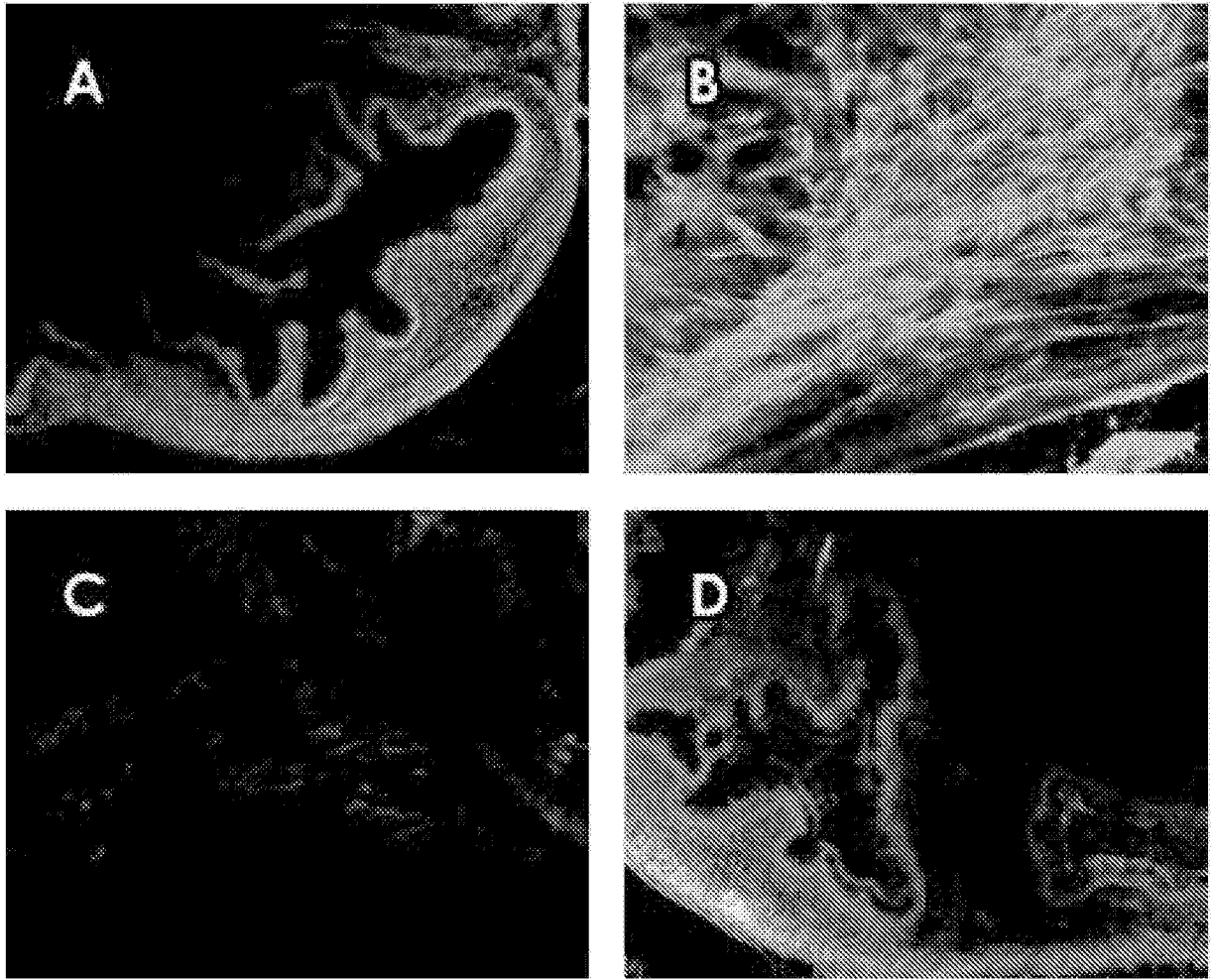


图 5

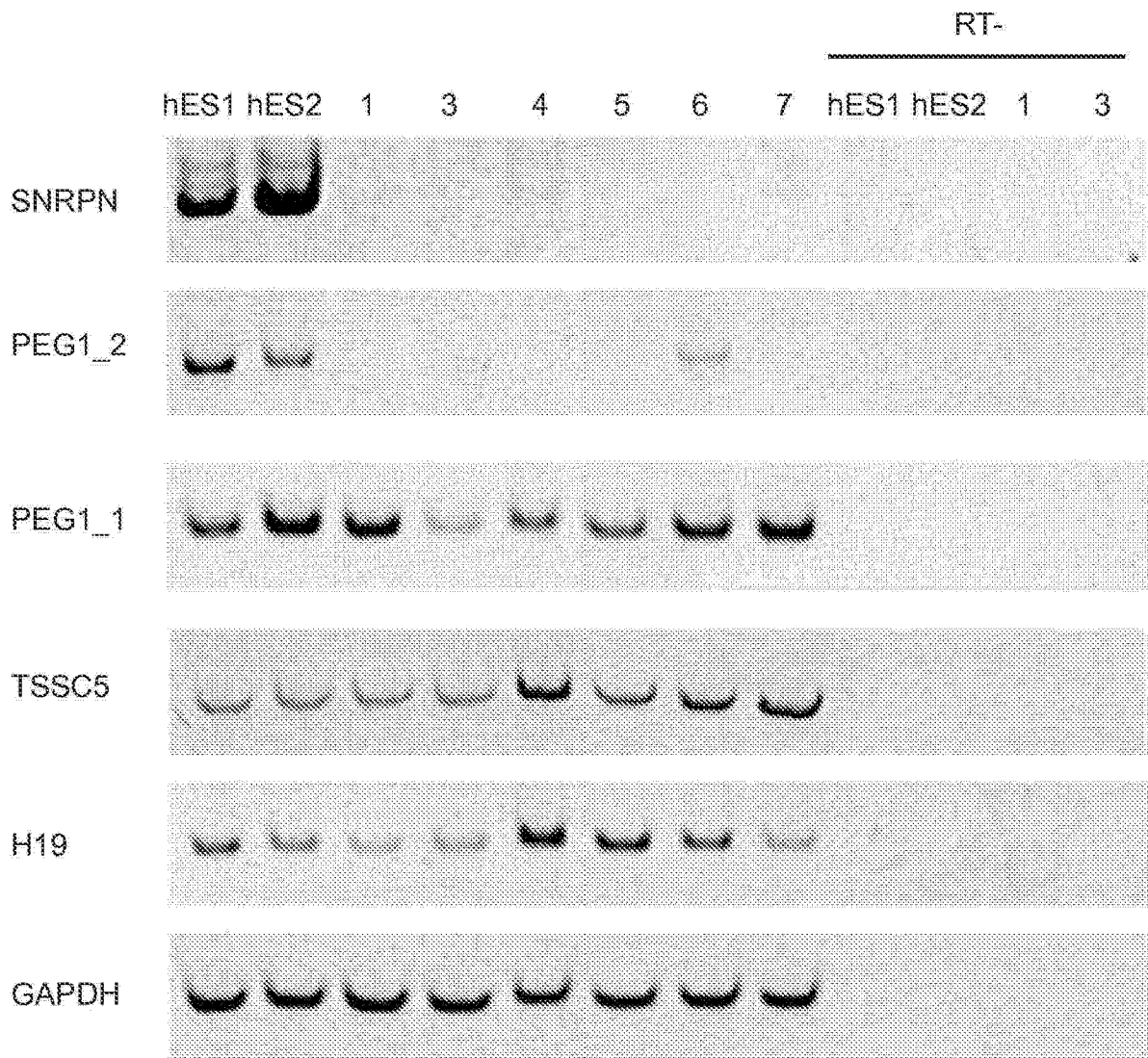


图6

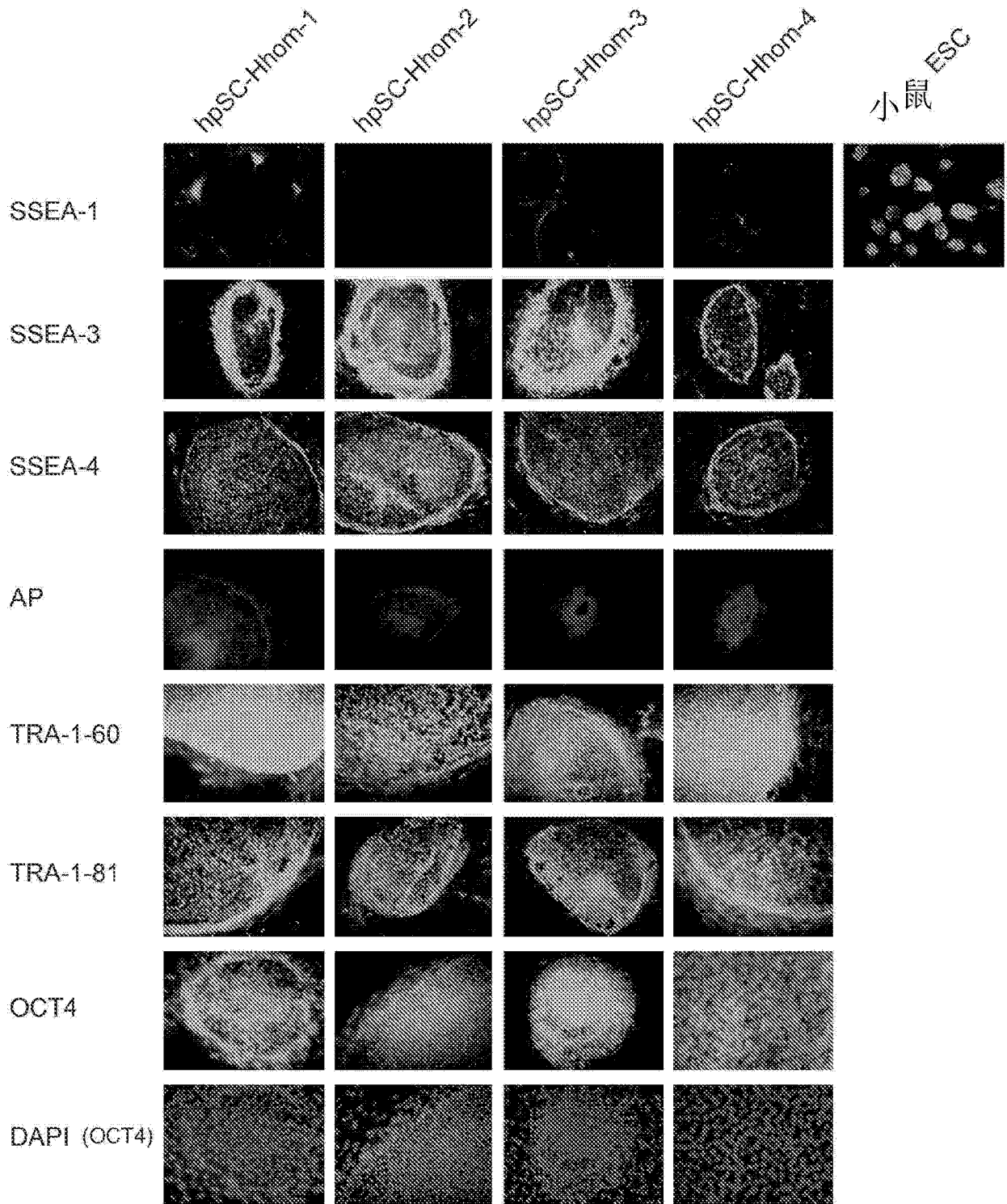


图 7

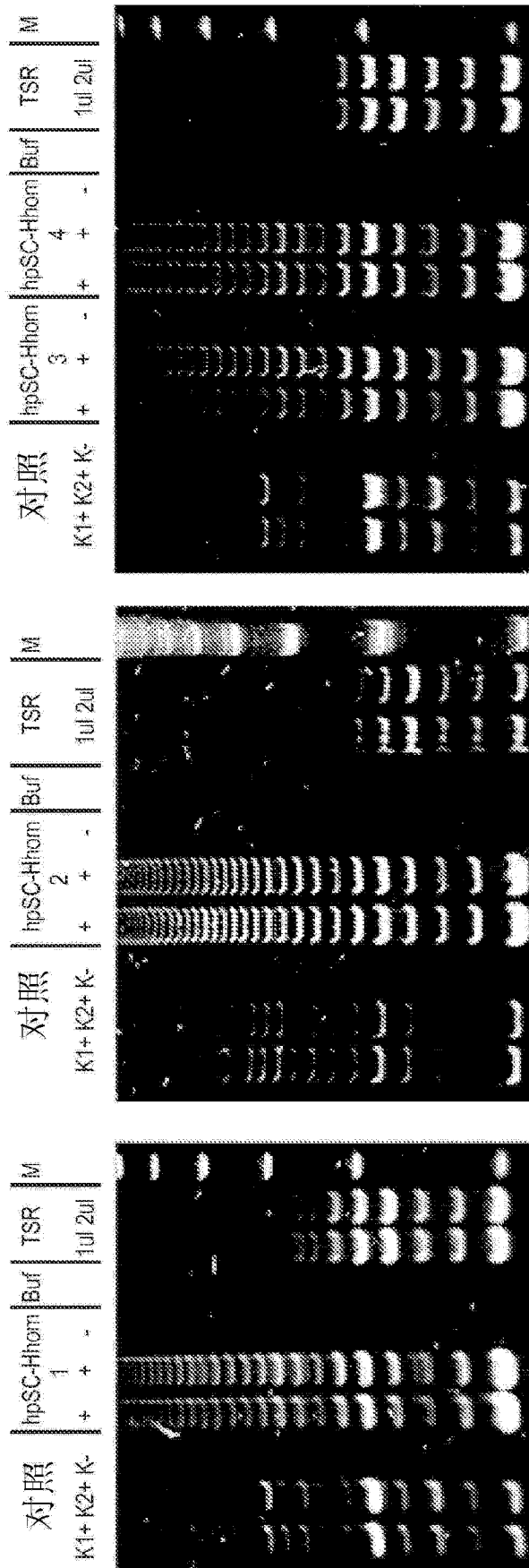


图 8

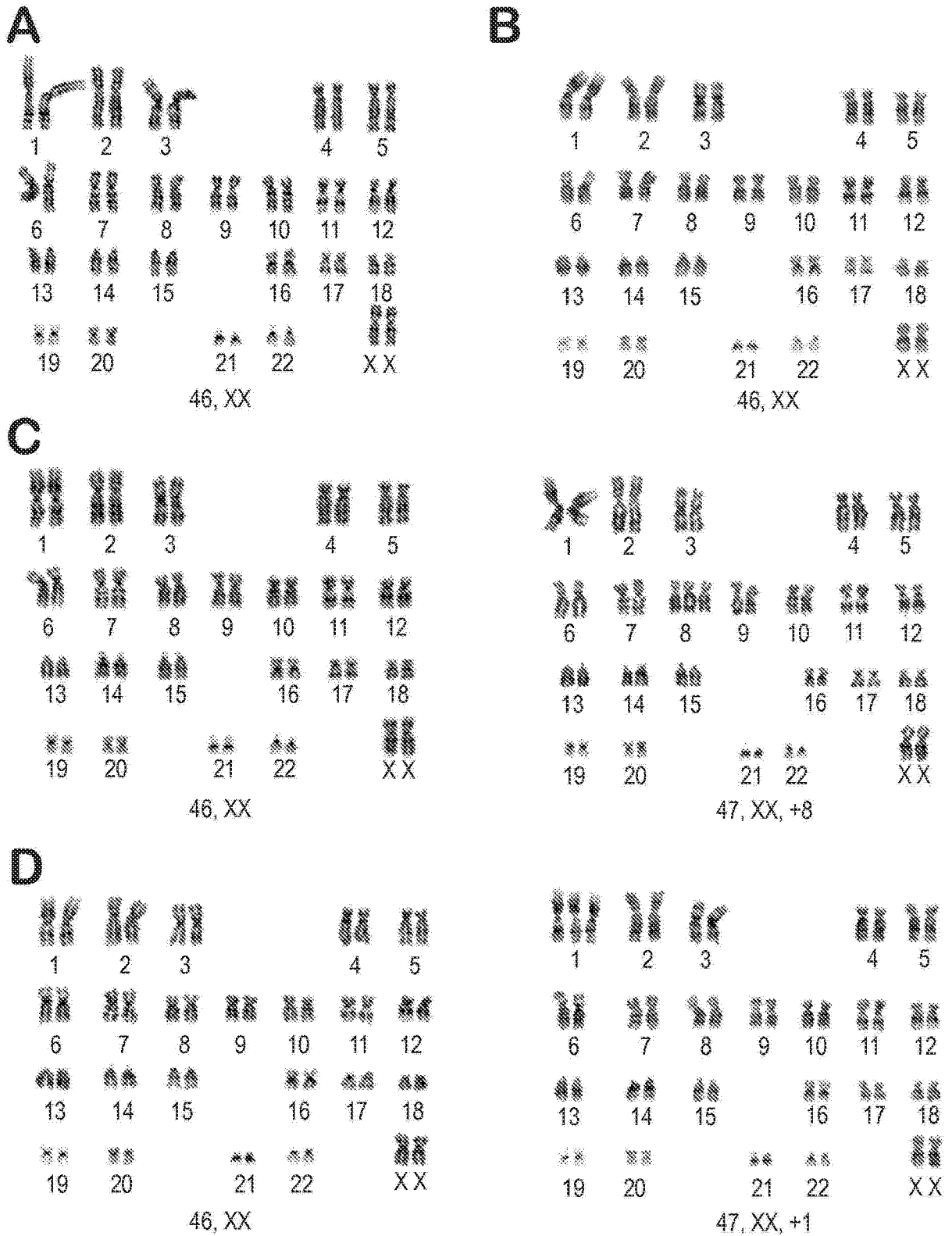


图 9

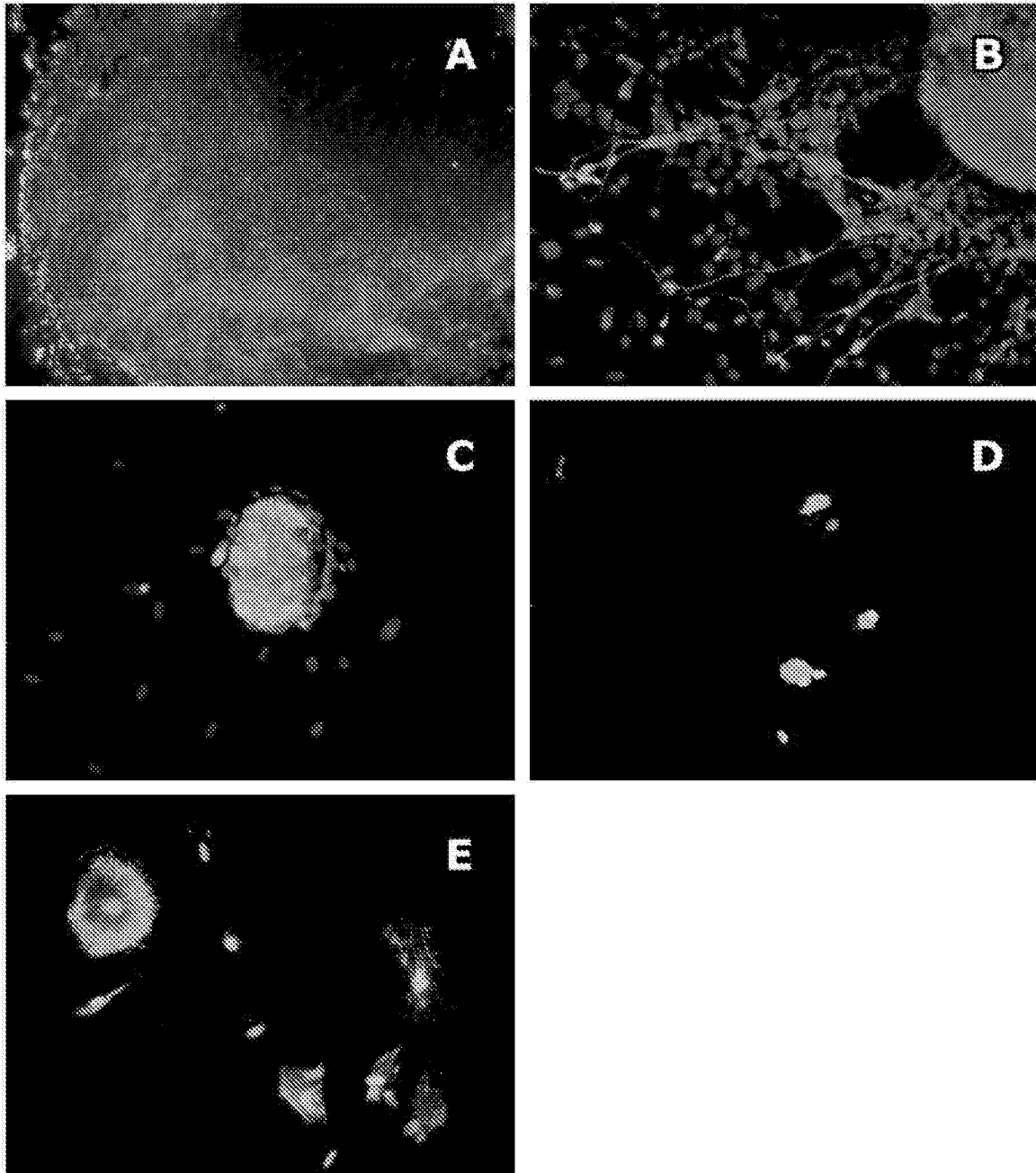


图 10

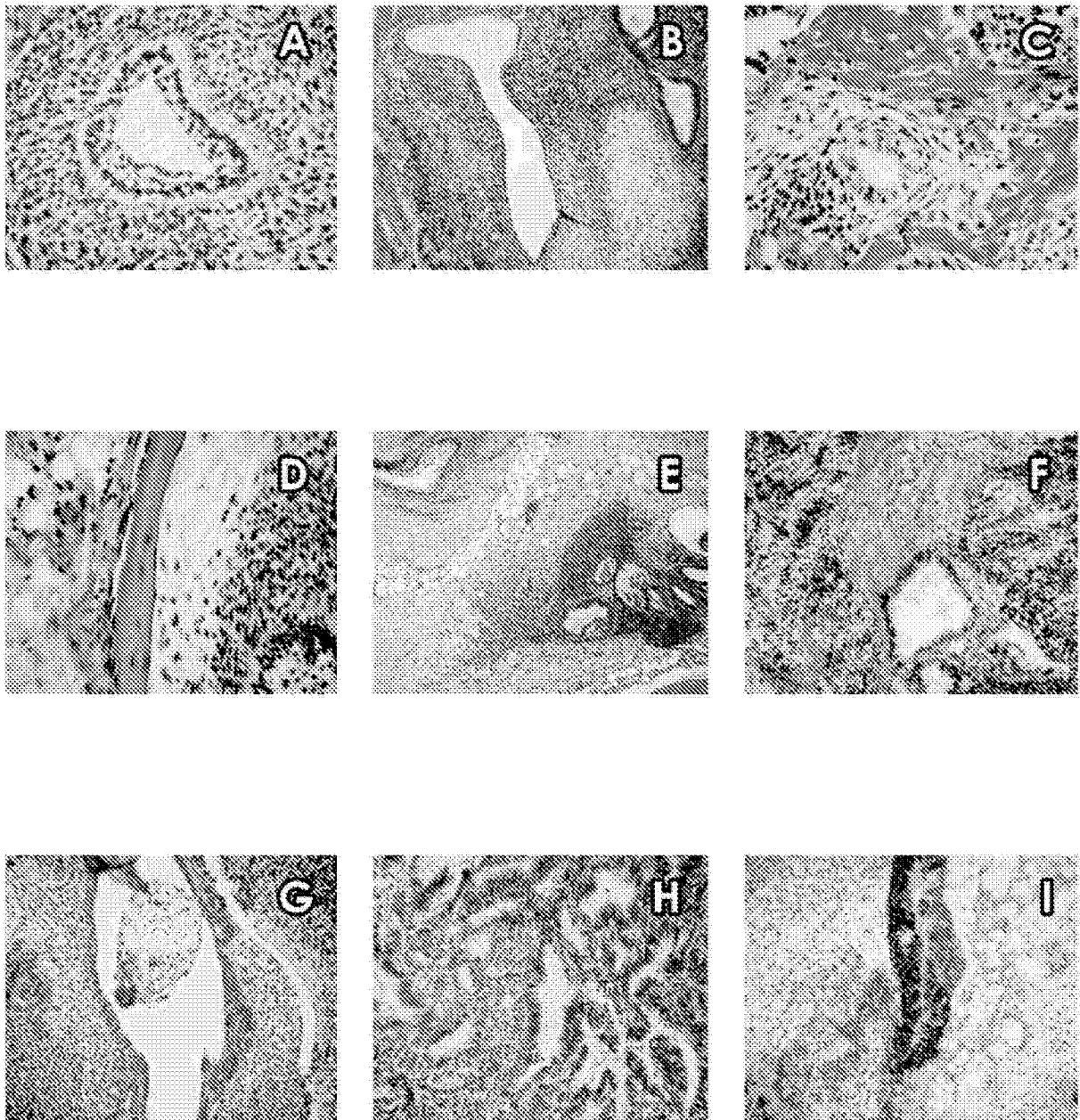


图 11