



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102159703 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 200980134123. 1

(22) 申请日 2009. 06. 30

(30) 优先权数据

61/076908 2008. 06. 30 US

61/076900 2008. 06. 30 US

61/076915 2008. 06. 30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 02. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/049183 2009. 06. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/002846 EN 2010. 01. 07

(73) 专利权人 森托科尔奥索生物科技公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 J·刘 J·戴维斯 C·帕门特

P·G·A·邦尼特

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 李进 刘健

(51) Int. Cl.

C12N 5/06(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2008/048647 A1 , 2008. 04. 24, 全文.

Amanda B. Mclean, et al..Activin A efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. 《STEM CELLS》.2007, 第 25 卷第 29-38 页.

David C. Hay, et al..Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. 《PNAS》.2008, 第 105 卷(第 34 期), 第 12301-12306 页.

审查员 李子东

权利要求书1页 说明书135页 附图65页

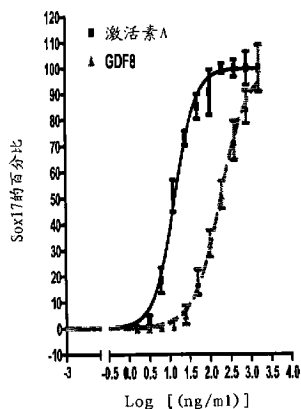
(54) 发明名称

多能干细胞的分化

(57) 摘要

本发明涉及使多能干细胞分化的方法。具体来讲,本发明涉及使多能干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的方法和组合物,所述方法包括在培养基中培养所述多能干细胞,所述培养基包含足够量的 GDF-8 以引起所述多能干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞。

CN 102159703 B



1. 一种使多能干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的方法,所述方法包括用培养基处理所述多能干细胞,持续足以使所述多能干细胞分化为表达所述定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的一段时间,所述培养基缺少激活素 A 且含有 GDF-8,所述多能干细胞为已建立的人胚胎干细胞系,所述定形内胚层谱系特征性标志物包括 SOX17 和 CXCR4 中的至少一种。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述缺少激活素 A 的培养基还含有至少一种其他选自如下的化合物:苯胺-吡啶并三嗪、环苯胺-吡啶并三嗪、N-[[1-(苯基甲基)氮杂环庚烷-4-基]甲基]-2-吡啶-3-基乙酰胺、4-[[4-(4-[[2-(吡啶-2-基氨基)乙基]氨基]-1,3,5-三嗪-2-基)吡啶-2-基]氧基]丁-1-醇、3-((3-[4-((2-[甲基(吡啶-2-基)氨基]乙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)吡啶-2-基]氨基)丙-1-醇、N~4~-[2-(3-氟代苯基)乙基]-N~2~-[3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-2,4-二胺、1-甲基-N-[(4-吡啶-3-基-2-[[3-(三氟甲基)苯基]氨基]-1,3-噁唑-5-基)甲基]哌啶-4-甲酰胺、1,1-二甲乙基{2-[4-((5-[3-(3-羟丙基)苯基]-4H-1,2,4-三唑-3-基)氨基)苯基]乙基}氨基甲酸酯、1,1-二甲乙基{[3-((5-[5-(3-羟丙基)-2-(甲氧基)苯基]-1,3-噁唑-2-基)氨基)苯基]甲基}氨基甲酸酯、1-((5-[6-((4-[(4-甲基哌嗪-1-基)磺酰基]苯基)氨基)吡啶-2-基]噁吩-2-基)甲基)哌啶-4-醇、1-((4-[6-((4-[(4-甲基哌嗪-1-基)磺酰基]苯基)氨基)吡啶-2-基]噁吩-2-基)甲基)哌啶-4-甲酰胺和 2-[[4-(1-甲基乙基)苯基]氨基]-N-(2-噁吩-2-基乙基)-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-甲酰胺。

3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述缺少激活素 A 的培养基还含有至少一种选自以下的其它化合物:EGF、FGF4、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、PDGF-D、VEGF、蝇蕈醇、PD98059、LY294002、U0124、U0126 和丁酸钠。

4. 权利要求 2 的方法,其中所述化合物选自苯胺-吡啶并三嗪和环苯胺-吡啶并三嗪。

5. 权利要求 4 的方法,其中苯胺-吡啶并三嗪是 14-丙-2-烯-1-基-3,5,7,14,17,23,27-七氮杂四环[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]二十七烷-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-壬-16-酮。

6. 权利要求 4 的方法,其中环苯胺-吡啶并三嗪是 5-氯-1,8,10,12,16,22,26,32-八氮杂五环[24.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~]三十三烷-3(33),4,6,9(32),10,12,14(31),15,17-壬-23-酮。

7. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述缺少激活素 A 的培养基还含有 6-[(2-[[4-(2,4-二氯苯基)-5-(4-甲基-1H-咪唑-2-基)嘧啶-2-基]氨基]乙基)氨基]吡啶-3-腈。

8. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述定形内胚层谱系特征性标志物还包括以下标志物中的至少一种:GATA4、HNF-3 $\beta$ 、GSC、CER1、Nodal、FGF8、Brachyury、Mix 样同源盒蛋白、FGF4 CD48、脱中胚蛋白(EOMES)、DKK4、FGF17、GATA6、C-Kit、CD99 或 OTX2。

## 多能干细胞的分化

[0001] 本发明要求于 2008 年 6 月 30 日提交的专利申请序列号 61 / 076, 900、于 2008 年 6 月 30 日提交的专利申请序列号 61 / 076, 908 以及于 2008 年 6 月 30 日提交的专利申请序列号 61 / 076, 915 的优先权。

### 背景技术

[0002] 本发明涉及使多能干细胞分化的方法。具体来讲,本发明涉及使多能干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的方法和组合物,该方法包括在培养基中培养多能干细胞,所述培养基包含足够量的 GDF-8 以引起多能干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞。

### 背景技术

[0003] 用于 I 型糖尿病的细胞替代疗法的进展以及可移植胰岛的缺乏已使得注意力集中在开发适于移植物移入的胰岛素生成细胞或  $\beta$  细胞的来源上。一种方法是从多能干细胞,例如胚胎干细胞产生功能性  $\beta$  细胞。

[0004] 在脊椎动物的胚胎发育中,多能干细胞可在称为原肠胚形成的过程中产生包括三个胚层(外胚层、中胚层和内胚层)的细胞群体。诸如甲状腺、胸腺、胰腺、肠和肝脏之类的组织将从内胚层,经由中间阶段发育而来。该过程中的中间阶段是形成定形内胚层。定形内胚层细胞表达多种标志物,例如, HNF-3 $\beta$ 、GATA4、MIXL1、CXCR4 和 SOX17。

[0005] 定形内胚层分化成胰腺内胚层导致形成胰腺。胰腺内胚层细胞表达胰-十二指肠同源盒基因 Pdx1。在不存在 Pdx1 时,胰腺形成腹胰芽和背胰芽后不再发育。因而,Pdx1 表达标志着胰腺器官发生中的一个关键步骤。除了其他细胞类型,成熟的胰腺还包括外分泌组织和内分泌组织。外分泌和内分泌组织来自胰腺内胚层的分化。

[0006] 据报道,从小鼠的胚胎细胞衍生了带有胰岛细胞特征的细胞。例如,Lumelsky 等人 (Science292:1389,2001) 报道了小鼠胚胎干细胞向类似胰岛的胰岛素分泌结构的分化。Soria 等人 (Diabetes49:157,2000) 报道,衍生自小鼠胚胎干细胞的胰岛素分泌细胞使链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠中的血糖变正常。

[0007] 例如, Hori 等人 (PNAS99:16105,2002) 揭示,用磷酸肌醇 3- 激酶 (LY294002) 的抑制剂处理小鼠胚胎干细胞产生了类似  $\beta$  细胞的细胞。

[0008] 又如,Blyszczuk 等人 (PNAS100:998,2003) 报道,从组成型表达 Pax4 的小鼠胚胎干细胞产生了胰岛素生成细胞。

[0009] Micallef 等人报道说,视黄酸可调节胚胎干细胞定向形成 Pdx1 阳性胰腺内胚层。在对应于胚胎的原肠胚形成末的期间,加入胚胎干细胞分化第 4 天的培养物中时视黄酸是诱导 Pdx1 最有效的 (Diabetes54:301,2005)。

[0010] Miyazaki 等人报道了过表达 Pdx1 的小鼠胚胎干细胞系。他们的结果显示,外源 Pdx1 表达在所得的分化细胞中明显增强了胰岛素、生长抑素、葡萄糖激酶、神经元素 3、P48、Pax6 和 HNF6 基因的表达 (Diabetes53:1030,2004)。

[0011] Skoudy 等人报道说, 激活素 A (TGF- $\beta$  超家族的成员) 能上调小鼠胚胎干细胞中的胰腺外分泌基因 (p48 和淀粉酶) 和内分泌基因 (Pdx1、胰岛素和胰高血糖素) 的表达。

[0012] 使用 1nM 激活素 A 时观察到最大的效果。他们还观察到, 胰岛素和 Pdx1 mRNA 的表达水平不受视黄酸的影响; 然而, 3nM FGF7 处理导致 Pdx1 的转录水平升高 (Biochem. J. 379 :749, 2004)。

[0013] Shiraki 等人研究了能特异性增强胚胎干细胞分化成 Pdx1 阳性细胞的生长因子的作用。他们观察到, TGF  $\beta$  2 可再现地产生更高比例的 Pdx1 阳性细胞 (Genes Cells. 2005 June ;10 (6) :503-16)。

[0014] Gordon 等人阐明了在不存在血清的情况下和在存在激活素连同 Wnt 信号转导抑制剂的情况下从小鼠胚胎干细胞诱导 brachyury [ 阳性 ] / HNF-3  $\beta$  [ 阳性 ] 内胚层细胞 (US2006 / 0003446A1)。

[0015] Gordon 等人 (PNAS, 第 103 卷, 第 16806 页, 2006) 声称: “Wnt 和 TGF- $\beta$  / nodal / 激活素信号转导同时为前原条的产生所必需”。

[0016] 然而, 胚胎干细胞发育的小鼠模型可能不会完全模拟高等哺乳动物 (例如人) 中的发育程序。

[0017] Thomson 等人从人胚泡分离了胚胎干细胞 (Science 282 :114, 1998)。同时, Gearhart 和其同事从胎儿生殖腺组织衍生了人胚胎生殖 (hEG) 细胞系 (Shamblott 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 :13726, 1998)。与可简单通过与白血病抑制因子 (LIF) 一起培养来防止分化的小鼠胚胎干细胞不一样, 人胚胎干细胞必须维持在非常特殊的条件下 (美国专利 No. 6, 200, 806, W099 / 20741, W001 / 51616)。

[0018] D' Amour 等人描述了在高浓度激活素和低血清的存在下生产人胚胎干细胞衍生定形内胚层的富集培养基 (D' Amour K A 等人, 2005)。将这些细胞移植到小鼠的肾囊下, 导致分化成具有某些内胚层器官的特性的更成熟细胞。在加入 FGF-10 之后, 人胚胎干细胞衍生的定形内胚层细胞可进一步分化成 Pdx1 阳性细胞 (US2005 / 0266554A1)。

[0019] D' Amour 等人 (Nature Biotechnology-24, 1392-1401 (2006)) 声称: “我们已开发出使人胚胎干 (hES) 细胞转化成能够合成胰腺激素胰岛素、胰高血糖素、生长抑素、胰多肽和生长激素释放肽的内分泌细胞的分化方法。该方法通过引导细胞经过类似于定形内胚层、肠管内胚层、胰腺内胚层和内分泌前体的阶段转变为表达内分泌激素的细胞来模拟体内胰腺器官发生”。

[0020] 又如, Fisk 等人报道了用于从人胚胎干细胞产生胰岛细胞的系统 (US2006 / 0040387A1)。在该情形中, 分化途径分成三个阶段。首先, 使用正丁酸盐和激活素 A 的组合, 使人胚胎干细胞分化为内胚层。然后将细胞与 TGF- $\beta$  拮抗剂 (例如成头蛋白 (Noggin)) 结合 EGF 或  $\beta$  细胞素一起进行培养, 以产生 Pdx1 阳性细胞。通过烟酰胺诱导终末分化。

[0021] 在一个例子中, Benvenistry 等人声称: “我们得出如下结论: PDX1 的过量表达增强了胰腺富集基因 (pancreatic enriched gene) 的表达, 胰岛素表达的诱导可能需要另外的仅存在于体内的信号” (Benvenistry 等人, Stem Cells 2006 ;24 :1923-1930)。

[0022] 激活素 A 是表现出广泛生物活性的 TGF- $\beta$  家族成员, 所述生物活性包括调控细胞增殖和分化以及促进神经元存活。激活素 A 的分离和纯化通常是复杂的, 通常会导致产率低。例如, Pangas, S. A. 和 Woodruff, T. K 声称: “抑制素和激活素是具有包括调节垂体 FSH

分泌在内的各种生理作用的蛋白质激素”。类似于转化生长因子- $\beta$  基因家族的其他成员，它们经历从较大前体分子加工以及组装成功能性二聚体。从天然来源分离抑制素和激活素仅能生产有限量的生物活性蛋白质 (J. Endocrinol. 172(2002) 199-210)。

[0023] 又如, Arai, K. Y. 等人声称:“激活素是属于转化生长因子- $\beta$  超级族的多功能生长因子。从天然来源分离激活素需要许多步骤并仅产生有限的量。尽管重组制剂已用于近来的研究, 但重组激活素的纯化仍需要多个步骤”(Protein Expression and Purification 49(2006) 78-82)。

[0024] 因此, 仍存在对激活素 A 替代物的巨大需要, 以便于多能干细胞的分化。

### 发明内容

[0025] 在一个实施例中, 本发明提供了使多能干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的方法, 该方法包括在培养基中培养多能干细胞, 所述培养基包含足够量的 GDF-8 以使多能干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞。

[0026] 在一个实施例中, 所述包含足够量 GDF-8 的培养基还含有至少一种其他化合物。在一个实施例中, 所述至少一种其他化合物是苯胺-吡啶并三嗪。在一个替代实施例中, 所述至少一种其他化合物是环苯胺-吡啶并三嗪。

### 附图说明

[0027] 图 1 显示 H1 人胚胎干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞。分化通过使用 IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) 测量细胞数目 (分图 A) 和 SOX17 强度 (分图 B) 来确定。用含有 20ng / ml Wnt3a 加指定浓度的激活素 A (黑色柱条) 的培养基或缺少 Wnt3a 但具有指定浓度 (白色柱条) 的激活素 A 的培养基处理人胚胎干细胞总共四天。

[0028] 图 2 示出了用于使人胚胎干细胞系 H1 的细胞向表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化的激活素 A 和 GDF8 的剂量响应关系。将细胞用所示浓度的激活素 A 或 GDF8 处理总共三天, 结合用 20ng / ml Wnt3a 处理测定法的第一天。分化通过使用荧光抗体探针以及在 GE Healthcare IN Cell Analyzer 上的高内涵分析来测量 SOX17 强度而确定。

[0029] 图 3 示出了根据实例 12 所述方法, 在分化的第一个步骤后细胞中的 CXCR4 表达。将 H1 细胞进行如下处理: 用 100ng / ml 激活素 A 或 200ng / ml GDF-8 处理总共三天, 结合用 20ng / ml Wnt3a 处理第一天或用 2.5  $\mu$ M 化合物 34 或 2.5  $\mu$ M 化合物 56 处理全部三天。CXCR4 表达用荧光抗体探针和流式细胞术来测量, 得到所示的阳性细胞百分比。

[0030] 图 4 示出了在根据实例 12 所述方法向定形内胚层分化三天后细胞中 SOX17 的表达。将 H1 细胞进行如下处理: 用 100ng / ml 激活素 A 或 200ng / ml GDF-8 处理总共三天, 结合用 20ng / ml Wnt3a 处理第一天或用 2.5  $\mu$ M 化合物 34 或 2.5  $\mu$ M 化合物 56 处理全部三天。分化通过用荧光抗体探针和在 GE Healthcare IN Cell Analyzer 上的高内涵分析来测量 SOX17 强度 (黑色柱条) 和所得细胞数 (白色柱条) 而确定。

[0031] 图 5 示出了根据实例 12 所述方法, 在分化的第三个步骤后细胞中的 PDX1 和 CDX2 蛋白表达。将 H1 细胞进行如下处理: 用 100ng / ml 激活素 A 或 200ng / ml GDF-8 处理总共三天, 结合用 20ng / ml Wnt3a 处理第一天或用 2.5  $\mu$ M 化合物 34 或 2.5  $\mu$ M 化合物 56

处理全部三天,接着通过分化的第二个和第三个步骤进行后续分化。对于每个处理组,描述了用荧光抗体探针和高内涵分析法确定的蛋白质表达和细胞数。为了进行比较,将值相对于使用激活素 A / Wnt3a 的处理进行归一化。

[0032] 图 6 示出了根据实例 12 所述方法,在分化的第四个步骤后细胞中 PDX1 蛋白的表达(白色柱条)和细胞数(黑色柱条)。将 H1 细胞进行如下处理:用 100ng / ml 激活素 A 或 200ng / ml GDF-8 处理总共三天,结合用 20ng / ml Wnt3a 处理第一天或结合用 2.5 μM 化合物 34 或 2.5 μM 化合物 56 处理全部三天,接着通过分化的第二个、第三个和第四个步骤进行后续分化。对于每个处理组,描述了用荧光抗体探针和高内涵分析法确定的蛋白质表达和细胞数。为了进行比较,将值相对于使用激活素 A/Wnt3a 的处理进行归一化。

[0033] 图 7 示出了根据实例 12 所述方法分化的细胞中的胰岛素和胰高血糖素的蛋白质表达和细胞数。将 H1 细胞进行如下处理:用 100ng / ml 激活素 A 或 200ng / ml GDF-8 处理总共三天,结合用 20ng / ml Wnt3a 处理第一天或结合用 2.5 μM 化合物 34 或 2.5 μM 化合物 56 处理全部三天,接着通过分化的第二个、第三个、第四个和第五个步骤进行后续分化。对于每个处理组,描述了用荧光抗体探针和高内涵分析法确定的蛋白质表达和细胞数。为了进行比较,将值相对于使用激活素 A/Wnt3a 的处理进行归一化。

[0034] 图 8 示出了根据实例 13 所述方法,在向定形内胚层分化后人胚胎干细胞中的 SOX17 蛋白表达和细胞数。将 H1 细胞进行如下处理:用 100ng / ml 激活素 A 或 100ng / ml GDF- 生长因子处理总共四天,结合用 20ng / ml Wnt3a 处理第一天或结合用 2.5 μM 化合物 34 或 2.5 μM 化合物 56 处理测定法的开始两天。对于各处理组,描述了用荧光抗体探针和高内涵分析确定的 SOX17 蛋白表达(黑色柱条)和细胞数(白色柱条)。为了进行比较,将值相对于使用激活素 A / Wnt3a 的处理进行归一化。分图 8A 示出了在不存在任何生长因子(无)或用激活素 A/Wnt3a 处理(AA / Wnt3a)或单独使用各试剂时进行分化的一系列控制条件。分图 8B 示出了单独用 GDF-3 或其与 Wnt3a、化合物 34 或化合物 56 的多种组合进行的分化。分图 8C 示出了单独用 GDF-5 或其与 Wnt3a、化合物 34 或化合物 56 的多种组合进行的分化。分图 8D 示出了单独用 GDF8 或其与 Wnt3a、化合物 34 或化合物 56 的多种组合进行的分化。分图 8E 示出了单独用 GDF-10 或其与 Wnt3a、化合物 34 或化合物 56 的多种组合进行的分化。分图 8F 示出了单独用 GDF-11 或其与 Wnt3a、化合物 34 或化合物 56 的多种组合进行的分化。分图 8G 示出了单独用 GDF-15 或其与 Wnt3a、化合物 34 或化合物 56 的多种组合进行的分化。

[0035] 图 9 示出了根据实例 14 所述方法,在向定形内胚层分化后人胚胎干细胞中的 SOX17 蛋白表达。将 H1 细胞进行如下处理:用 100ng / ml 的激活素 A 或所示浓度的多种生长因子处理总共三天,结合用 20ng / ml Wnt3a 或结合用 2.5 μM 化合物 34 处理测定法的第一天。对于每个处理组,描述了用荧光抗体探针和高内涵分析确定的 SOX17 蛋白表达(黑色柱条)和细胞数(白色柱条)。为了进行比较,将值相对于使用激活素 A/Wnt3a 的处理进行归一化。分图 9A 示出了用单独的 Wnt3a 或不存在任何生长因子(无)或用激活素 A/Wnt3a 处理(AA / Wnt3a)进行分化的一系列控制条件。分图 9B 示出了用所示浓度的 GDF-8(供货商 PeproTech)结合 20ng / ml Wnt3a 进行的分化。分图 9C 示出了用所示浓度的 GDF-8(供货商 Shenendoah)结合 20ng / ml Wnt3a 进行的分化。分图 9D 示出了用所示浓度的 TGF β 1 与 Wnt3a 或化合物 34 的多种组合进行的分化。分图 9E 示出了用所示浓度

的 BMP2 与 Wnt3a 或化合物 34 的多种组合进行的分化。分图 9F 示出了用所示浓度的 BMP3 与 Wnt3a 或化合物 34 的多种组合进行的分化。分图 9G 示出了用所示浓度的 BMP4 与 Wnt3a 或化合物 34 的多种组合进行的分化。

[0036] 图 10 示出了根据实例 15 所述方法,在向定形内胚层分化后人胚胎干细胞中的 SOX17 蛋白表达。将 H1 细胞在多种定时暴露方案中暴露于如下物质总共处理三天:100ng / ml 激活素 A 或 100ng / ml GDF-8 结合 20ng / ml Wnt3a。用荧光抗体探针和高内涵分析确定的 SOX17 蛋白表达显示为各处理组的总强度值,从而测试没有添加生长因子(无处理)、单独添加 Wnt3a、单独添加激活素 A 或 GDF-8 或采用激活素 A/Wnt3a 处理或 GDF-8 / Wnt3a 处理情况下进行分化的控制条件,其中如所示出的仅在测定法的第一天添加 Wnt3a 或在测定法的全部三天添加 Wnt3a。

[0037] 图 11 示出了根据实例 15 所述方法,在向定形内胚层分化后人胚胎干细胞中的 SOX17 蛋白表达。将 H1 细胞在多种定时暴露方案中暴露于如下物质而总共处理三天:100ng / ml 激活素 A 结合所示浓度的测试化合物(化合物 181(分图 A)、化合物 180(分图 B)、化合物 19(分图 C)、化合物 202(分图 D)、化合物 40(分图 E)、化合物 34(分图 F)或 GSK3 抑制剂 BI0(分图 G)),其中仅在测定法的第一天添加测试化合物。用荧光抗体探针和高内涵分析确定的 SOX17 的蛋白质表达通过总强度值来描述。

[0038] 图 12 示出了根据实例 15 所述方法,在向定形内胚层分化后人胚胎干细胞中的 SOX17 蛋白表达。将 H1 细胞在多种定时暴露方案中暴露于如下物质而总共处理三天:100ng / ml 激活素 A 结合所示浓度的测试化合物(化合物 181(分图 A)、化合物 180(分图 B)、化合物 19(分图 C)、化合物 202(分图 D)、化合物 40(分图 E)、化合物 34(分图 F)或 GSK3 抑制剂 BI0(分图 G)),其中在测定法的全部三天添加测试化合物。用荧光抗体探针和高内涵分析确定的 SOX17 的蛋白质表达通过总强度值来描述。

[0039] 图 13 示出了根据实例 15 所述方法,在向定形内胚层分化后人胚胎干细胞中的 SOX17 蛋白表达。将 H1 细胞在多种定时暴露方案中暴露于如下物质而总共处理三天:100ng / ml 的 GDF-8 结合所示浓度的测试化合物(化合物 181(分图 A)、化合物 180(分图 B)、化合物 19(分图 C)、化合物 202(分图 D)、化合物 40(分图 E)、化合物 34(分图 F)或 GSK3 抑制剂 BI0(分图 G)),其中仅在测定法的第一天添加测试化合物。用荧光抗体探针和高内涵分析确定的 SOX17 的蛋白质表达通过总强度值来描述。

[0040] 图 14 示出了根据实例 15 所述方法,在向定形内胚层分化后人胚胎干细胞中的 SOX17 蛋白表达。将 H1 细胞在多种定时暴露方案中暴露于如下物质而总共处理三天:100ng / ml 的 GDF-8 结合所示浓度的测试化合物(化合物 181(分图 A)、化合物 180(分图 B)、化合物 19(分图 C)、化合物 202(分图 D)、化合物 40(分图 E)、化合物 34(分图 F)或 GSK3 抑制剂 BI0(分图 G)),其中在测定法的全部三天添加测试化合物。用荧光抗体探针和高内涵分析确定的 SOX17 的蛋白质表达通过总强度值来描述。

[0041] 图 15 示出了根据实例 15 所述方法,在人胚胎干细胞向定形内胚层分化后的细胞数产率。将 H1 细胞在多种定时暴露方案中暴露于如下物质而总共处理三天:100ng / ml 激活素 A 或 100ng / ml GDF-8 结合 20ng / ml Wnt3a。显示了各测试组的用荧光抗体探针和高内涵分析确定的细胞数,从而测试没有添加生长因子(无处理)、单独添加 Wnt3a、单独添加激活素 A 或 GDF-8 或采用激活素 A / Wnt3a 处理或 GDF-8 / Wnt3a 处理情况下进行分化

的控制条件,其中如所示出的仅在测定法的第一天或在测定法的全部三天添加 Wnt3a。

[0042] 图 16 示出了根据实例 15 所述方法,在人胚胎干细胞向定形内胚层分化后的细胞数产率。将 H1 细胞在多种定时暴露方案中暴露于如下物质而总共处理三天:100ng / ml 激活素 A 结合所示浓度的测试化合物(化合物 181(分图 A)、化合物 180(分图 B)、化合物 19(分图 C)、化合物 202(分图 D)、化合物 40(分图 E)、化合物 34(分图 F)或 GSK3 抑制剂 BIO(分图 G)),其中仅在测定法的第一天添加测试化合物。示出了用荧光核探针和高内涵分析确定的细胞数产率。

[0043] 图 17 示出了根据实例 15 所述方法,在人胚胎干细胞向定形内胚层分化后的细胞数产率。将 H1 细胞在多种定时暴露方案中暴露于如下物质而总共处理三天:100ng / ml 激活素 A 结合所示浓度的测试化合物(化合物 181(分图 A)、化合物 180(分图 B)、化合物 19(分图 C)、化合物 202(分图 D)、化合物 40(分图 E)、化合物 34(分图 F)或 GSK3 抑制剂 BIO(分图 G)),其中在测定法的全部三天添加测试化合物。示出了用荧光核探针和高内涵分析确定的细胞数产率。

[0044] 图 18 示出了根据实例 15 所述方法,在人胚胎干细胞向定形内胚层分化后的细胞数产率。将 H1 细胞在多种定时暴露方案中暴露于如下物质而总共处理三天:100ng / ml 的 GDF-8 结合所示浓度的测试化合物(化合物 181(分图 A)、化合物 180(分图 B)、化合物 19(分图 C)、化合物 202(分图 D)、化合物 40(分图 E)、化合物 34(分图 F)或 GSK3 抑制剂 BIO(分图 G)),其中仅在测定法的第一天添加测试化合物。示出了用荧光核探针和高内涵分析确定的细胞数产率。

[0045] 图 19 示出了根据实例 15 所述方法,在人胚胎干细胞向定形内胚层分化后的细胞数产率。将 H1 细胞在多种定时暴露方案中暴露于如下物质而总共处理三天:100ng / ml 的 GDF-8 结合所示浓度的测试化合物(化合物 181(分图 A)、化合物 180(分图 B)、化合物 19(分图 C)、化合物 202(分图 D)、化合物 40(分图 E)、化合物 34(分图 F)或 GSK3 抑制剂 BIO(分图 G)),其中在测定法的全部三天添加测试化合物。示出了用荧光核探针和高内涵分析确定的细胞数产率。

[0046] 图 20 示出了根据实例 16 所述方法,在分化的全部多个步骤中细胞中的多种蛋白质标志物表达。将 H1 细胞进行如下处理:用 100ng / ml 激活素 A 或 100ng / ml GDF-8 处理总共三天,结合用 20ng / ml Wnt3a 处理第一天或结合用仅在第一天添加的 2.5  $\mu$ M 多种化合物(化合物 19、化合物 202、化合物 40 或 GSK3 抑制剂 BIO)处理。图 20 分图 A 示出了在分化的第一个步骤后的细胞中,定形内胚层标志物 CXCR4 的 FACS 分析。CXCR4 表达用荧光抗体探针和流式细胞术来测量,得到所示的阳性细胞百分比。图 20 分图 B 示出了由分化的第一个步骤产生的归一化 SOX17 蛋白表达(黑色柱条)和回收细胞数(白色柱条)的高内涵图像分析,从而测试了所示的对应处理。图 20 分图 C 示出了从通过分化步骤 5 处理的培养物回收的相对细胞数的高内涵图像分析。图 20 分图 D 示出了通过分化步骤 5 处理的培养物的胰高血糖素蛋白表达的高内涵图像分析。图 20 分图 E 示出了通过分化步骤 5 处理的培养物的胰岛素蛋白表达的高内涵图像分析。图 20 分图 F 示出了通过分化步骤 5 处理的培养物的细胞中胰高血糖素与胰岛素表达的比率。为了进行比较,分图 B、C、D、E 和 F 中的表达值相对于在步骤 1 期间使用激活素 A 和 Wnt3a 的对照处理进行归一化。

[0047] 图 21 示出了根据实例 17 所述方法,在分化的全部多个步骤中细胞中的多种蛋白



质和 RT-PCR 标志物的表达。将 H1 细胞进行如下处理：用 100ng / ml 激活素 A 或 100ng / ml GDF-8 处理总共三天，结合用 20ng / ml Wnt3a 处理第一天或结合用仅在第一天添加的如下浓度的多种化合物（化合物 181、化合物 180、化合物 19、化合物 202、化合物 40、化合物 56 或 GSK3 抑制剂 BIO）处理。示出了在分化的第一个步骤后细胞中定形内胚层标志物 CXCR4 的 FACS 分析，其中处理包括激活素 A（分图 A）或 GDF-8（分图 B）与 Wnt3a 或多种化合物的组合。CXCR4 表达用荧光抗体探针和流式细胞术来测量，得到所示的阳性细胞百分比。在图 21 的后续分图中，示出了通过在分化的第一个步骤期间使用激活素 A 或 GDF-8 进行的各种处理后多种分化标志物的归一化 RT-PCR 值：结合激活素 A（分图 C）或 GDF-8（分图 D）进行处理的分化的第一个步骤结束时的标志物；结合激活素 A（分图 E）或 GDF-8（分图 F）进行处理的分化的第三个步骤结束时的标志物；结合激活素 A（分图 G）或 GDF-8（分图 H）进行处理的分化的第四个步骤结束时的标志物；结合激活素 A（分图 I）或 GDF-8（分图 J）进行处理的分化的第五个步骤结束时的标志物。在分化的第五个步骤结束时，进行高内涵分析以测量在使用激活素 A（分图 K）或 GDF-8（分图 M）的分化的第一个步骤期间对应处理的回收细胞数。高内涵分析还用于测量在分化的第五个步骤结束时回收细胞群体中的胰高血糖素和胰岛素强度，对应于在分化的第一个步骤期间用激活素 A（分图 A）或 GDF-8（分图 N）进行的处理。

[0048] 图 22 示出了根据实例 18 所述方法处理的细胞中多种蛋白质和 RT-PCR 标志物的表达。将 H1 细胞进行如下处理：用 100ng / ml 激活素 A 或 100ng / ml GDF-8 处理总共三天，结合用 20ng / ml Wnt3a 处理第一天或仅在第一天结合使用 2.5  $\mu$ M 化合物 40 或 2.5  $\mu$ M 化合物 202 处理全部三天。图 22 分图 A 示出了在分化的第一个步骤后的细胞中，定形内胚层标志物 CXCR4 的 FACS 分析。CXCR4 表达用荧光抗体探针和流式细胞术来测量，得到所示的阳性细胞百分比。在图 22 分图 B 中，示出了与在分化的第一个步骤期间使用激活素 A / Wnt3a 或 GDF-8 / 化合物 40 或 GDF-8 / 化合物 202 进行的各种处理相对应的分化的第四个步骤后回收的细胞中多种分化标志物的归一化 RT-PCR 值。

[0049] 图 23 示出了在接受如实例 18 所述分化方案第四个步骤结束时的细胞的 SCID-beige 小鼠中检测到的 C 肽水平。

[0050] 图 24 分图 A 示出了在实例 19 所述分化方案的第一个步骤结束时细胞中由 FACS 确定的 CXCR4 表达。分图 B 示出了在实例 19 所述分化方案的第四个步骤结束时细胞中由 RT-PCR 确定的多种基因的表达。示出了两次不同的实验重复（重复 1 和重复 2），每一者均经历相同的处理方案。分图 C 示出了接受了细胞的 SCID-beige 小鼠中检测到的 C 肽水平，所述细胞是在体外分化的第一个步骤期间用 GDF-8 和 Wnt3a 处理的分化方案的步骤四结束时的细胞。分图 D 示出了接受了细胞的 SCID-beige 小鼠中检测到的 C 肽水平，所述细胞是在体外分化的第一个步骤期间用 GDF-8 和化合物 28 处理的分化方案的步骤四结束时的细胞。

[0051] 图 25 示出了根据实例 22 所述的本发明方法处理过的微载体珠上生长的细胞的细胞数（分图 A）和 CXCR4 表达（分图 B）。将细胞在未处理的 Cytodex3 珠上培养（未分化）或在用 100ng / ml 激活素 A 与 20ng / ml Wnt3a 组合进行处理的 Cytodex3 珠上培养（AA / Wnt3a）或在采用了多种如下的组合 GDF-8 进行的处理的 Cytodex3 珠上培养：50ng / ml GDF-8 与 2.5  $\mu$ M 化合物 34（化合物 34+8）；或 50ng / ml GDF-8 与 2.5  $\mu$ M 化合物 34 和

50ng / ml PDGF(化合物 34+8+D) ;或 50ng / ml GDF-8 与 2.5  $\mu$ M 化合物 34 和 50ng / ml PDGF 及 50ng / ml VEGF(化合物 34+8+D+V) ;或 50ng / ml GDF-8 与 2.5  $\mu$ M 化合物 34 和 50ng / ml PDGF 以及 50ng / ml VEGF 和 20ng / ml 蝇蕈醇(化合物 34+8+D+V+M)。

[0052] 图 26 示出了如实例 23 所述在用本发明化合物处理后细胞的增殖。分图 B 至分图 I 示出了使用化合物结合 GDF-8 的处理并在开始分化测定法后的第 1 天、第 2 天和第 3 天测量 MTS OD 读数的分析结果。

[0053] 图 27 示出了在根据本发明方法处理过的微载体珠上生长细胞的多种蛋白质和基因的表达。分图 A 示出了在实例 24 所述分化方案的步骤一结束时细胞中由 FACS 确定的 CXCR4、CD99 和 CD9 的阳性表达百分比。分图 B 示出了从显示分化通过分化方案步骤三的处理回收的细胞。分图 C 示出了如在步骤中所示地处理并通过该方案的步骤三分化的细胞中表达的多种基因标志物的 ddCT 值。

## 具体实施方式

[0054] 将本发明的具体实施方式部分分成以下几个分部分,来描述或举例说明本发明的某些特征、实施例或应用,这是为了使公开内容清楚起见,并非限制本发明。

### [0055] 定义

[0056] 干细胞是由它们在单细胞水平上既自我更新又分化产生子代细胞的能力来定义的未分化细胞,包括自我更新祖细胞、非更新祖细胞和末端分化细胞。干细胞的特征还在于:其具有在体外由多种胚层(内胚层、中胚层和外胚层)分化成各种细胞谱系的功能细胞以及移植后产生多种胚层的组织和注入胚泡后基本上有助于大部分(如果不是所有的话)组织形成的能力。

[0057] 干细胞根据其发育潜能分为:(1)全能,指能够产生所有的胚胎和胚胎外细胞类型;(2)多能,指能够产生所有的胚胎细胞类型;(3)专能,指能够产生细胞谱系的亚群,但在特定组织、器官或生理系统内能产生所有的细胞(例如造血干细胞(HSC)可产生的后代细胞包括:HSC(自我更新型)、局限于血细胞的寡能祖细胞以及作为血液正常组分的所有细胞类型和成分(如血小板));(4)寡能,指能够产生比多能干细胞更有限的细胞谱系亚群;以及(5)单能干,指能够产生单一细胞谱系(如生精干细胞)。

[0058] 分化是未特化的(“未定向的”)或特化不足的细胞获得特化细胞(如神经细胞或肌肉细胞)的特征的过程。分化的细胞或诱导分化的细胞是已经在细胞谱系中占据更特化的(“定向的”)位置的细胞。术语“定向的”当应用到分化的过程时,指在分化途径中已经进行到这么一种程度的细胞:在正常环境下,它会继续分化成特定的细胞类型或细胞类型子集,且在正常环境下不能分化成另一细胞类型或回复到分化程度较低的细胞类型。去分化指细胞回复到细胞的谱系当中特化(或定向)程度较低的地位的过程。如本文所用,“细胞的谱系”限定细胞的遗传关系,即它来自哪些细胞和它能产生什么细胞。细胞谱系将细胞定位于发育和分化的遗传计划内。谱系特异性标志物是指与所关注谱系的细胞表型特异性相关并能够用于评价非定向细胞向所关注谱系的分化的特征。

[0059] “ $\beta$ -细胞谱系”是指对于转录因子 PDX-1 和下列转录因子中的至少一种具有阳性基因表达的细胞:NGN3、NKX2.2、NKX6.1、NEUROD、ISL1、HNF-3 $\beta$ 、MAFA、PAX4 或 PAX6。表达  $\beta$  细胞谱系特征性标志物的细胞包括  $\beta$  细胞。

[0060] 如本文所用,“表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞”、或“第 1 阶段细胞”或“第 1 阶段”指表达至少一种如下标志物的细胞:SOX17、GATA4、HNF-3 $\beta$ 、GSC、CER1、Nodal、FGF8、Brachyury、Mix 样同源盒蛋白、FGF4CD48、脱中胚蛋白(eomesodernin, EOMES)、DKK4、FGF17、GATA6、CXCR4、C-Kit、CD99 或 OTX2。表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞包括原条前体细胞、原条细胞、中内胚层细胞和定形内胚层细胞。

[0061] 如本文所用,“表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞”是指表达至少一种下列标志物的细胞:PDX1、HNF-1 $\beta$ 、PTF1 $\alpha$ 、HNF6 或 HB9。表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞包括胰腺内胚层细胞、原肠管细胞和后前肠细胞。

[0062] 如本文所用,“表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞”或“第 5 阶段细胞”或“第 5 阶段”指表达至少一种下列标志物的细胞:NGN3、NEUROD、ISL1、PDX1、NKX6.1、PAX4 或 PTF-1 $\alpha$ 。表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞包括胰腺内分泌细胞、胰激素表达细胞、胰激素分泌细胞和 b- 细胞谱系的细胞。

[0063] 如本文所用,“定形内胚层”指具有在原肠胚形成过程中从上胚层产生的细胞的特性并形成胃肠道及其衍生物的细胞。定形内胚层细胞表达下列标志物:HNF-3 $\beta$ 、GATA4、SOX-17、Cerberus、OTX2、goosecoid、C-Kit、CD99 或 MIXL1。

[0064] 如本文所用,“胚胎外内胚层”指表达至少一种下列标志物的细胞群体:SOX7、AFP 或 SPARC。

[0065] 如本文所用的,“标志物”是在所关注细胞中差异表达的核酸或多肽分子。关于这一点,差异表达意指阳性标志物的水平增加,而阴性标志物的水平降低。与其他细胞相比,所关注细胞中的核酸或多肽标志物的可检测水平足够高或足够低,使得可以使用本领域已知的多种方法识别所关注细胞,并将所关注细胞与其他细胞区相区分。

[0066] 如本文所用,“中内胚层细胞”指表达至少一种下列标志物的细胞:CD48、脱中胚蛋白(EOMES)、SOX17、DKK4、HNF-3 $\beta$ 、GSC、FGF17 或 GATA-6。

[0067] 如本文所用的,“胰腺内分泌细胞”或“胰腺激素表达细胞”是指能够表达至少一种下列激素的细胞:胰岛素、胰高血糖素、生长抑素和胰腺多肽。

[0068] 如本文所用,“胰腺内胚层细胞”或“第 4 阶段细胞”或“第 4 阶段”指能够表达至少一种下列标志物的细胞:NGN3、NEUROD、ISL1、PDX1、PAX4 或 NKX2.2。

[0069] 如本文所用,“胰腺激素生成细胞”指能够生成至少一种下列激素的细胞:胰岛素、胰高血糖素、生长抑素和胰多肽。

[0070] 如本文所用,“胰腺激素分泌细胞”指能够分泌至少一种下列激素的细胞:胰岛素、胰高血糖素、促生长素抑制素和胰多肽。

[0071] 如本文所用,“后前肠细胞”或“第 3 阶段细胞”或“阶段 3”指能够分泌至少一种下列标志物的细胞:PDX1、HNF1、PTF-1 $\alpha$ 、HNF6、HB-9 或 PROX-1。

[0072] 如本文所用,“前原条细胞”指表达至少一种下列标志物的细胞:Nodal 或 FGF8。

[0073] 如本文所用,“原肠管细胞”或“第 2 阶段细胞”或“第 2 阶段”指能够分泌至少一种下列标志物的细胞:HNF1、HNF-4 $\alpha$ 。

[0074] 如本文所用,“原条细胞”指表达至少一种下列标志物的细胞:Brachyury、Mix 样同源盒蛋白或 FGF4。

[0075] 多能干细胞的分离、扩增和培养

### [0076] 多能干细胞的特性描述

[0077] 可通过（例如）以下方法来确认多能干细胞的多能性：将细胞注入严重联合免疫缺陷（SCID）小鼠的体内，使用 4% 的多聚甲醛固定所形成的畸胎瘤，然后用组织学方法检查来自三种胚层的细胞类型的证据。或者，可通过产生拟胚体并评估拟胚体的与三个胚层相关的标志物的存在来确定多能性。

[0078] 可以使用标准 G 带技术并比较已公布的相应灵长类物种的核型来分析增殖的多能干细胞系的核型。希望获得具有“正常核型”的细胞，其意指细胞为整倍体，其中所有人染色体都存在并且没有明显的改变。

### [0079] 多能干细胞的来源

[0080] 非限制性的例子是已建立的人胚胎干细胞系或人胚胎生殖细胞系，例如人胚胎干细胞系 H1、H7 和 H9 (WiCell)。另外合适的是取自己在不存在饲养细胞的情况下培养的多能干细胞群体的细胞。同样合适的是突变型人胚胎干细胞系，例如 BG01v (BresaGen, Athens, GA)。

### [0081] 多能干细胞的培养

[0082] 在一个实施例中，通常在饲养细胞层上培养多能干细胞，饲养细胞可以多种方式支持多能干细胞。或者，在培养系统中培养多能干细胞，所述培养系统基本上不含饲养细胞，但同样支持多能干细胞的增殖而不会进行显著的分化。使用通过此前培养另一细胞类型而调理过的培养基来支持多能干细胞在无饲养细胞的培养物中生长而不分化。作为另一种选择，用化学成分确定的培养基来支持多能干细胞在无饲养细胞的培养物中生长而不分化。

[0083] 可将多能干细胞接种至合适的培养基质上。在一个实施例中，合适的培养基质是胞外基质成分，例如源自基底膜的成分，或者可形成黏着分子受体-配体偶联物的一部分的成分。在一个实施例中，合适的培养基材是 **MATRIGEL**<sup>®</sup> (Becton Dickenson)。

**MATRIGEL**<sup>®</sup> 是来自于 Engelbreth-Holm-Swarm 肿瘤细胞的可溶性制剂，其在室温下会发生胶化从而形成重构基底膜。

[0084] 其他的细胞外基质组分和组分混合物适合作为替代物。取决于所扩增的细胞类型，这可包括单独的层粘连蛋白、纤连蛋白、蛋白聚糖、巢蛋白、硫酸乙酰肝素等或者它们的各种组合。

[0085] 可在存在可促进细胞存活、增殖和保持理想特性的培养基存在的情况下，以合适的分布将多能干细胞接种于所述基质上。所有这些特性可得益于对接种分布的认真考虑并可容易地由本领域技术人员确定。

[0086] 合适的培养基可以由下列组分制成，例如为：达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (DMEM), Gibco#11965-092 ; Knockout 达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (KO DMEM), Gibco#10829-018 ; Ham ' s F12 / 50 % DMEM 基础培养基 ; 200mM 的 L- 谷氨酰胺, Gibco#15039-027 ; 非必需氨基酸溶液, Gibco#11140-050 ;  $\beta$  - 巯基乙醇, Sigma#M7522 ; 人重组碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF), Gibco#13256-029。

### [0087] 由多能干细胞形成胰腺激素生成细胞

[0088] 在一个实施例中，本发明提供一种从多能干细胞产生胰腺激素生成细胞的方法，

该方法包括如下步骤：

[0089] a. 培养多能干细胞，

[0090] b. 使多能干细胞分化成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞，

[0091] c. 使表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化成表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞，并且

[0092] d. 使表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。

[0093] 在本发明的一个方面，胰腺内分泌细胞是胰腺激素生成细胞。在一个替代方面，胰腺内分泌细胞是表达  $\beta$ -细胞谱系特征性标志物的细胞。表达  $\beta$ -细胞谱系特征性标志物的细胞可表达 PDX1 和至少一种下列转录因子：NGN3、NKX2.2、NKX6.1、NEUROD、ISL1、HNF-3 $\beta$ 、MAFA、PAX4 或 Pax6。在本发明的一个方面，表达  $\beta$ -细胞谱系特征性标志物的细胞是  $\beta$ -细胞。

[0094] 适用于本发明的多能干细胞包括例如人胚胎干细胞系 H9 (NIH 编码：WA09)、人胚胎干细胞系 H1 (NIH 编码：WA01)、人胚胎干细胞系 H7 (NIH 编码：WA07) 和人胚胎干细胞系 SA002 (Cellartis, 瑞典)。同样适用于本发明的是表达至少一种下列多能细胞特征性标志物的细胞：ABCG2、cripto、CD9、FOXD3、连接蛋白 43、连接蛋白 45、OCT4、SOX2、Nanog、hTERT、UTF-1、ZFP42、SSEA-3、SSEA-4、Tra1-60 或 Tra1-81。

[0095] 可在饲养细胞层上培养多能干细胞。或者，可在细胞外基质上培养多能干细胞。细胞外基质可以是从小鼠肉瘤细胞提取的可溶性基底膜制剂（其可由 BD Biosciences 以商品名 MATRIGEL™ 销售）。或者，细胞外基质可以是低生长因子 MATRIGEL™。或者，细胞外基质可以是纤粘蛋白。在一个替代实施例中，将多能干细胞在包被有人血清的组织培养基质上培养和分化。

[0096] 可在对组织培养基底进行包被前，将细胞外基质进行稀释。用于稀释细胞外基质以及用于包被组织培养基材的合适方法的例子可见于 Kleinman, H. K. 等人, Biochemistry 25 :312 (1986) 和 Hadley, M. A. 等人, J. Cell. Biol. 101 :1511 (1985)。

[0097] 在一个实施例中，细胞外基质是 MATRIGEL™。在一个实施例中，组织培养基材包被有以 1 : 10 稀释的 MATRIGEL™。在一个替代实施例中，组织培养基材包被有以 1 : 15 稀释的 MATRIGEL™。在一个替代实施例中，组织培养基材包被有以 1 : 30 稀释的 MATRIGEL™。在一个替代实施例中，组织培养基材包被有以 1 : 60 稀释的 MATRIGEL™。在一个实施例中，细胞外基质是低生长因子 MATRIGEL™。在一个实施例中，组织培养基材包被有以 1 : 10 稀释的低生长因子 MATRIGEL™。在一个替代实施例中，组织培养基材包被有以 1 : 15 稀释的低生长因子 MATRIGEL™。在一个替代实施例中，组织培养基材包被有以 1 : 30 稀释的低生长因子 MATRIGEL™。在一个替代实施例中，组织培养基材包被有以 1 : 60 稀释的低生长因子 MATRIGEL™。

[0098] 定形内胚层谱系特征性标志物选自 SOX17、GATA4、HNF-3 $\beta$ 、GSC、CER1、Nodal、FGF8、Brachyury、Mix 样同源盒、FGF4CD48、脱中胚蛋白 (EOMES)、DKK4、FGF17、GATA6、CXCR4、C-Kit、CD99 和 OTX2。适用于本发明的是表达至少一种定形内胚层谱系特征性标志物的细胞。在本发明的一个方面，表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞为原条前体细胞。在一个替代方面，表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞为中内胚层细胞。在一个

替代方面,表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞为定形内胚层细胞。

[0099] 胰腺内胚层谱系特征性标志物选自 PDX1、HNF-1 $\beta$ 、PTF1 $\alpha$ 、HNF6、HB9 和 PROX1。适用于本发明的是表达至少一种胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞。在本发明的一个方面,表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞为胰腺内胚层细胞。

[0100] 胰腺内分泌谱系特征性标志物选自 NGN3、NEUROD、ISL1、PDX1、NKX6.1、PAX4 和 PTF-1 $\alpha$ 。在一个实施例中,胰腺内分泌细胞能够表达以下激素中的至少一种:胰岛素、胰高血糖素、生长抑素和胰多肽。适用于本发明的细胞为表达至少一种胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。在本发明的一个方面,表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞为胰腺内分泌细胞。胰腺内分泌细胞可以是胰激素表达细胞。或者,胰腺内分泌细胞可以是胰激素分泌细胞。

[0101] 表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的形成

[0102] 在本发明的一个方面,多能干细胞可通过在培养基中培养多能干细胞而分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞,所述培养基包含足够量的 GDF-8 以引起多能干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞。

[0103] 可在含有足够量的 GDF-8 的培养基中培养多能干细胞约一天至约七天。或者,可在含有足够量 GDF-8 的培养基中培养多能干细胞约一天至约六天。或者,可在含有足够量 GDF-8 的培养基中培养多能干细胞约一天至约五天。或者,可在含有足够量 GDF-8 的培养基中培养多能干细胞约一天至约四天。或者,可在含有足够量 GDF-8 的培养基中培养多能干细胞约一天至约三天。或者,可在含有足够量 GDF-8 的培养基中培养多能干细胞约一天至约二天。或者,可在含有足够量 GDF-8 的培养基中培养多能干细胞约一天。

[0104] 在一个实施例中,使用浓度为约 5ng / ml 至约 500ng / ml 的 GDF-8。在一个替代实施例中,使用浓度为约 5ng / ml 至约 50ng / ml 的 GDF-8。在一个替代实施例中,使用浓度为约 5ng / ml 至约 25ng / ml 的 GDF-8。在一个替代实施例中,使用浓度为约 25ng / ml 的 GDF-8。

[0105] 在一个实施例中,包含足够量 GDF-8 的培养基还含有至少一种其他因子。在一个实施例中,所述至少一种其他因子选自 EGF、FGF4、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、PDGF-D、VEGF、蝇蕈醇、PD98059、LY294002、U0124、U0126 和丁酸钠。

[0106] 在一个实施例中,使用浓度为约 5ng / ml 至约 500ng / ml 的 EGF。在一个替代实施例中,使用浓度为约 5ng/ml 至约 50ng / ml 的 EGF。在一个替代实施例中,使用浓度为约 50ng / ml 的 EGF。

[0107] 在一个实施例中,使用浓度为约 5n/gml 至约 500ng / ml 的 FGF4。在一个替代实施例中,使用浓度为约 5ng/ml 至约 50ng / ml 的 FGF4。在一个替代实施例中,使用浓度为约 50ng / ml 的 FGF4。

[0108] 在一个实施例中,使用浓度为约 5ng / ml 至约 500ng / ml 的 PDGF-A。在一个替代实施例中,使用浓度为约 5ng/ml 至约 50ng / ml 的 PDGF-A。在一个替代实施例中,使用浓度为约 50ng / ml 的 PDGF-A。

[0109] 在一个实施例中,使用浓度为约 5ng / ml 至约 500ng / ml 的 PDGF-B。在一个替代实施例中,使用浓度为约 5ng / ml 至约 50ng / ml 的 PDGF-B。在一个替代实施例中,使用浓度为约 50ng / ml 的 PDGF-B。

[0110] 在一个实施例中,使用浓度为约 5ng / ml 至约 500ng / ml 的 PDGF-C。在一个替代实施例中,使用浓度为约 5ng / ml 至约 50ng / ml 的 PDGF-C。在一个替代实施例中,使用浓度为约 50ng / ml 的 PDGF-C。

[0111] 在一个实施例中,使用浓度为约 5ng/ml 至约 500ng / ml 的 PDGF-D。在一个替代实施例中,使用浓度为约 5ng / ml 至约 50ng / ml 的 PDGF-D。在一个替代实施例中,使用浓度为约 50ng / ml 的 PDGF-D。

[0112] 在一个实施例中,使用浓度为约 5ng / ml 至约 500ng / ml 的 VEGF。在一个替代实施例中,使用浓度为约 5ng / ml 至约 50ng / ml 的 VEGF。在一个替代实施例中,使用浓度为约 50ng / ml 的 VEGF。

[0113] 在一个实施例中,使用浓度为约 1  $\mu$ M 至约 200  $\mu$ M 的蝇蕈醇。在一个替代实施例中,使用浓度为约 1  $\mu$ M 至约 20  $\mu$ M 的蝇蕈醇。在一个替代实施例中,使用浓度为约 20  $\mu$ M 的蝇蕈醇。

[0114] 在一个实施例中,使用浓度为约 0.1  $\mu$ M 至约 10  $\mu$ M 的 PD98059。在一个替代实施例中,使用浓度为约 0.1  $\mu$ M 至约 1  $\mu$ M 的 PD98059。在一个替代实施例中,使用浓度为约 1  $\mu$ M 的 PD98059。

[0115] 在一个实施例中,使用浓度为约 0.25  $\mu$ M 至约 25  $\mu$ M 的 LY294002。在一个替代实施例中,使用浓度为约 0.25  $\mu$ M 至约 2.5  $\mu$ M 的 LY294002。在一个替代实施例中,使用浓度为约 2.5  $\mu$ M 的 LY294002。

[0116] 在一个实施例中,使用浓度为约 0.1  $\mu$ M 至约 10  $\mu$ M 的 U0124。在一个替代实施例中,使用浓度为约 0.1  $\mu$ M 至约 1  $\mu$ M 的 U0124。在一个替代实施例中,使用浓度为约 1  $\mu$ M 的 U0124。

[0117] 在一个实施例中,使用浓度为约 0.1  $\mu$ M 至约 10  $\mu$ M 的 U0126。在一个替代实施例中,使用浓度为约 0.1  $\mu$ M 至约 1  $\mu$ M 的 U0126。在一个替代实施例中,使用浓度为约 1  $\mu$ M 的 U0126。

[0118] 在一个实施例中,使用浓度为约 0.05  $\mu$ M 至约 5  $\mu$ M 的丁酸钠。在一个替代实施例中,使用浓度为约 0.05  $\mu$ M 至约 0.5  $\mu$ M 的丁酸钠。在一个替代实施例中,使用浓度为约 0.5  $\mu$ M 的丁酸钠。

[0119] 在一个替代实施例中,所述至少一种其他因子选自:苯胺-吡啶并三嗪、环苯胺-吡啶并三嗪、N-{{1-(苯基甲基)氮杂环庚烷-4-基}甲基}-2-吡啶-3-基乙酰胺、4-{{4-(4-{{2-(吡啶-2-基氨基)乙基}氨基}-1,3,5-三嗪-2-基)吡啶-2-基}氧基}丁-1-醇、3-{{3-{{4-{{2-[甲基(吡啶-2-基)氨基]乙基}氨基)-1,3,5-三嗪-2-基]吡啶-2-基}氨基}丙-1-醇、N~4~-{{2-(3-氟代苯基)乙基}-N~2~-{{3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙基}吡啶并[2,3-d]噻啶-2,4-二胺、1-甲基-N-{{4-吡啶-3-基-2-{{3-(三氟甲基)苯基}氨基}-1,3-噻唑-5-基}甲基}哌啶-4-甲酰胺、1,1-二甲乙基{{2-{{4-{{5-{{3-(3-羟丙基)苯基}-4H-1,2,4-三唑-3-基}氨基}苯基}乙基}氨基甲酸酯、1,1-二甲乙基{{3-{{5-{{5-(3-羟丙基)-2-(甲氧基)苯基}-1,3-噻唑-2-基}氨基}苯基}甲基}氨基甲酸酯、1-{{5-{{6-{{4-{{4-甲基哌嗪-1-基}磺酰基}苯基}氨基}吡啶-2-基}噻吩-2-基}甲基}哌啶-4-醇、1-{{4-{{6-{{4-{{4-甲基哌嗪-1-基}磺酰基}苯基}氨基}吡啶-2-基}噻吩-2-基}甲基}哌啶-4-甲酰胺和

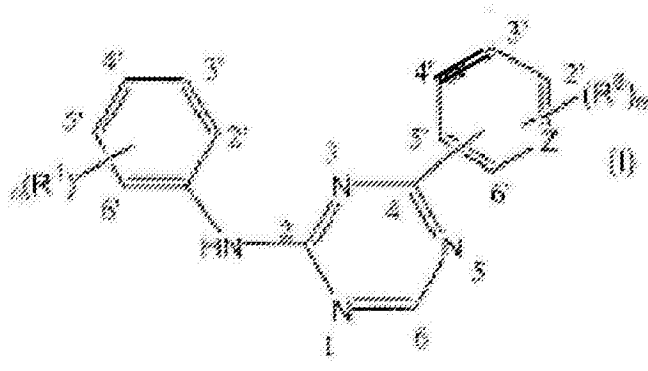
2-[[4-(1-甲基乙基)苯基]氨基]-N-(2-噻吩-2-基乙基)-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-甲酰胺。

[0120] 本发明的化合物

[0121] 本发明提供能够使多能干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物细胞的化合物。

[0122] 在一个实施例中,能够使多能干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物细胞的化合物是式(1)的苯胺-吡啶并三嗪:

[0123]



[0124] N-氧化物形成药用加成盐及其立体异构形式,其中:

[0125] m代表1至4的整数;n代表1至4的整数;Z代表N或C;

[0126] R<sup>1</sup>和R<sup>8</sup>各自独立地代表氢、Het<sup>14</sup>、氰基、卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷氧基-、C<sub>1-6</sub>烷基-、单-或二(C<sub>1-4</sub>烷基)氨基-羰基-、单-或二(C<sub>1-4</sub>烷基)氨基-磺酰基、被卤素取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基或者R<sup>1</sup>代表被一个或可能两个或更多个选自羟基或卤素的取代基取代的C<sub>1-6</sub>烷基;

[0127] R<sup>2</sup>和R<sup>9</sup>各自独立地代表氢、C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>2-4</sub>烯基、Het<sup>3</sup>、Het<sup>4</sup>-C<sub>1-4</sub>烷基-、Het<sup>5</sup>-C<sub>1-4</sub>烷基羰基-、单-或二(C<sub>1-4</sub>烷基)氨基-C<sub>1-4</sub>烷基-羰基-或任选被一个或可能两个或更多个选自氢、羟基、氨基或C<sub>1-4</sub>烷氧基-的取代基取代的苯基;

[0128] R<sup>3</sup>和R<sup>7</sup>各自独立地代表氢、C<sub>1-4</sub>烷基、Het<sup>6</sup>、Het<sup>7</sup>-C<sub>1-4</sub>烷基-、任选被Het<sup>8</sup>-C<sub>1-4</sub>烷基氨基羰基-取代的C<sub>2-4</sub>烯基羰基-、C<sub>2-4</sub>烯基磺酰基-、C<sub>1-4</sub>烷氧基C<sub>1-4</sub>烷基-或任选被一个或可能两个或更多个选自氢、羟基、氨基或C<sub>1-4</sub>烷氧基的取代基取代的苯基;

[0129] R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>和R<sup>10</sup>各自独立地代表氢或任选被羟基取代的C<sub>1-4</sub>烷基、Het<sup>9</sup>或C<sub>1-4</sub>烷氧基;

[0130] Het<sup>1</sup>和Het<sup>2</sup>各自独立地代表选自吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑烷基或吡唑烷基的杂环,其中所述Het<sup>1</sup>和Het<sup>2</sup>任选被氨基、羟基、C<sub>1-4</sub>烷基、羟基-C<sub>1-4</sub>烷基-、苯基、苯基-C<sub>1-4</sub>烷基-、C<sub>1-4</sub>烷基-氧基-C<sub>1-4</sub>烷基-单-或二(C<sub>1-4</sub>烷基)氨基-或氨基-羰基-取代;

[0131] Het<sup>3</sup>和Het<sup>6</sup>各自独立地代表选自吡咯烷基或哌啶基的杂环,其中所述Het<sup>3</sup>和Het<sup>6</sup>任选被一个或可能两个或更多个选自C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>3-6</sub>环烷基、羟基-C<sub>1-4</sub>烷基-、C<sub>1-4</sub>烷氧基C<sub>1-4</sub>烷基或多羟基-C<sub>1-4</sub>烷基-的取代基取代;

[0132] Het<sup>4</sup>、Het<sup>7</sup>和Het<sup>9</sup>各自独立地代表选自吗啉基、吡咯烷基、哌嗪基或哌啶基的杂环,其中所述Het<sup>4</sup>、Het<sup>7</sup>和Het<sup>9</sup>任选被一个或可能两个或更多个选自C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>3-6</sub>环烷基、羟基-C<sub>1-4</sub>烷基-、C<sub>1-4</sub>烷氧基C<sub>1-4</sub>烷基或多羟基-C<sub>1-4</sub>烷基-的取代基取代;



[0133] Het<sup>5</sup>代表选自吗啉基、吡咯烷基、哌嗪基或哌啶基的杂环,其中所述 Het<sup>5</sup>任选被一个或可能两个或更多个选自 C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>3-6</sub>环烷基、羟基 -C<sub>1-4</sub>烷基 -、C<sub>1-4</sub>烷氧基 C<sub>1-4</sub>烷基或多羟基 -C<sub>1-4</sub>烷基 - 的取代基取代;

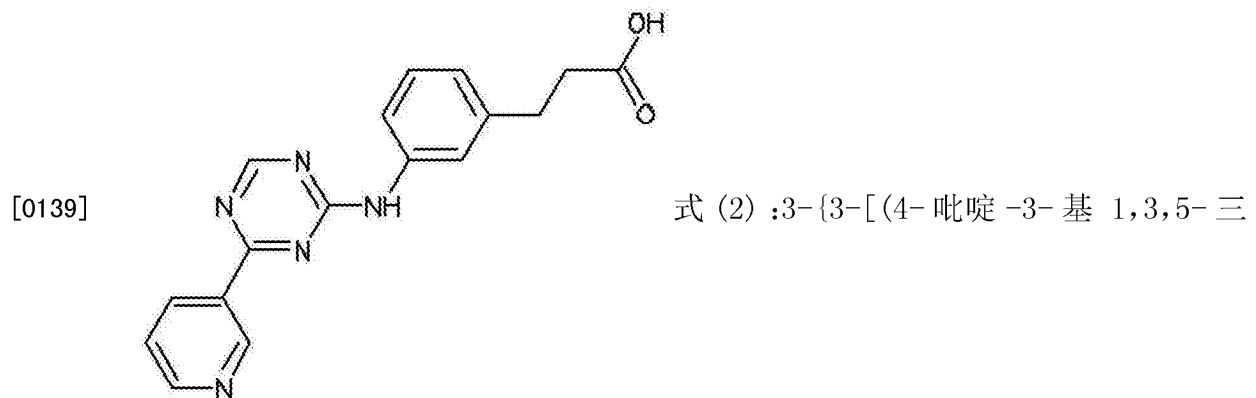
[0134] Het<sup>10</sup>、Het<sup>11</sup>和 Het<sup>13</sup>各自独立地代表选自吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑烷基或吡唑烷基的杂环,其中所述 Het<sup>10</sup>、Het<sup>11</sup>和 Het<sup>13</sup>任选被氨基、羟基、C<sub>1-4</sub>烷基、羟基 -C<sub>1-4</sub>烷基 -、苯基、苯基 -C<sub>1-4</sub>烷基 -、C<sub>1-4</sub>烷基 - 氧基 -C<sub>1-4</sub>烷基 -、氨基 - 羰基 - 或单 - 或二 (C<sub>1-4</sub>烷基) 氨基 - 取代;

[0135] Het<sup>12</sup>代表选自吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑烷基或吡唑烷基的杂环,其中所述 Het<sup>12</sup>任选被氨基、羟基、C<sub>1-4</sub>烷基、羟基 -C<sub>1-4</sub>烷基 -、苯基、苯基 -C<sub>1-4</sub>烷基 -、C<sub>1-4</sub>烷基 - 氧基 -C<sub>1-4</sub>烷基 -、单 - 或二 (C<sub>1-4</sub>烷基) 氨基 - 或氨基 - 羰基 - 取代;

[0136] Het<sup>14</sup>代表选自吗啉基、吡咯烷基、哌嗪基、咪唑基、吡咯基、2,3,4- 三氮杂吡咯基、1,2,3- 三唑基、吡唑基或哌啶基的杂环,其中所述 Het<sup>14</sup>任选被一个或可能两个或更多个选自 C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>3-6</sub>环烷基、羟基 -C<sub>1-4</sub>烷基 -、C<sub>1-4</sub>烷氧基 C<sub>1-4</sub>烷基或多羟基 -C<sub>1-4</sub>烷基 - 的取代基取代;具体来讲, Het<sup>14</sup>代表选自吗啉基、吡咯烷基、吡咯基、2,3,4- 三氮杂吡咯基、哌嗪基或哌啶基的杂环,其中所述 Het<sup>14</sup>任选被一个或可能两个或更多个选自 C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>3-6</sub>环烷基、羟基 -C<sub>1-4</sub>烷基 -、C<sub>1-4</sub>烷氧基 C<sub>1-4</sub>烷基或多羟基 -C<sub>1-4</sub>烷基 - 的取代基取代;更具体来讲, Het<sup>14</sup>代表选自吗啉基、吡咯烷基、哌嗪基或哌啶基的杂环,其中所述 Het<sup>14</sup>任选被一个或可能两个或更多个选自 C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>3-6</sub>环烷基、羟基 -C<sub>1-4</sub>烷基 -、C<sub>1-4</sub>烷氧基 C<sub>1-4</sub>烷基或多羟基 -C<sub>1-4</sub>烷基 - 的取代基取代。

[0137] 在一个实施例中,苯胺 - 吡啶并三嗪是式 (1) 的化合物。

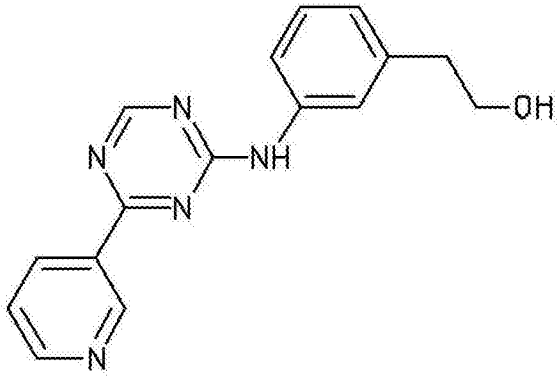
[0138] 在一个实施例中,苯胺 - 吡啶并三嗪是式 (2) 的化合物。



嗪 -2- 基) 氨基] 苯基 } 丙酸。本文称为“化合物 1”。

[0140] 在一个实施例中,苯胺 - 吡啶并三嗪是式 (3) 的化合物。

[0141]

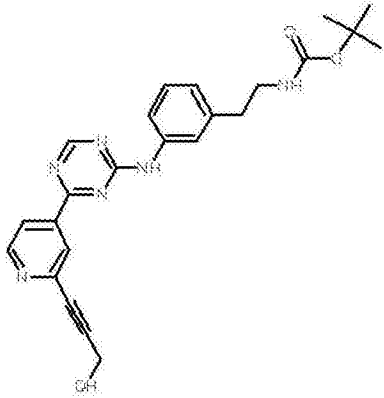


式(3):2-[3-[(4-吡啶-3-基 1,3,5-三

嗪-2-基)氨基]苯基}乙醇。本文称为“化合物2”。

[0142] 在一个实施例中,苯胺-吡啶并三嗪是式(4)的化合物。

[0143]

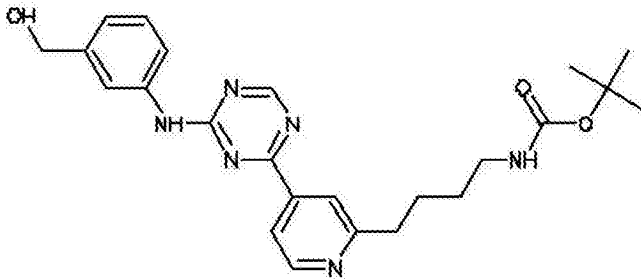


式(4):{2-[3-({4-[2-(3-羟丙-1-炔-1-基)吡

啶-4-基]-1,3,5-三嗪-2-基}氨基)苯基]乙基}氨基甲酸1,1-二甲基乙酯。本文称为“化合物3”。

[0144] 在一个实施例中,苯胺-吡啶并三嗪是式(5)的化合物。

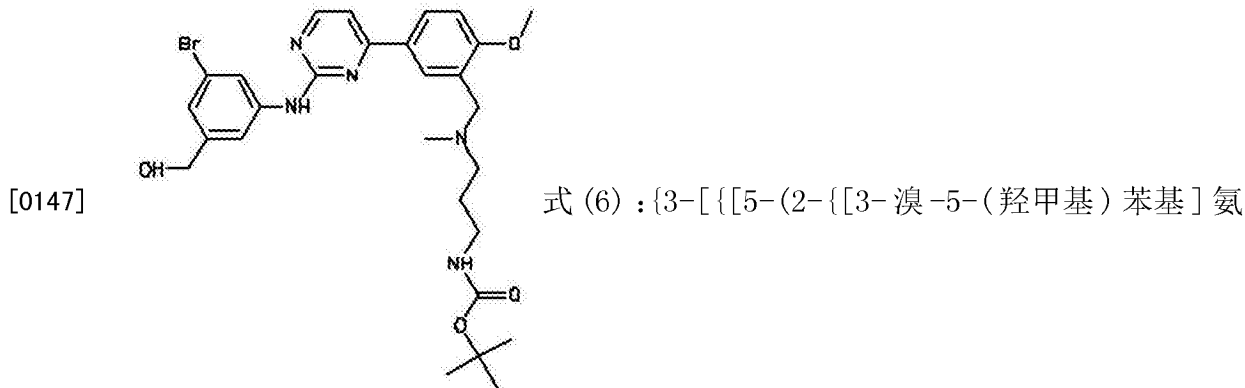
[0145]



式(5):{4-[4-(4-{3-(羟甲基)

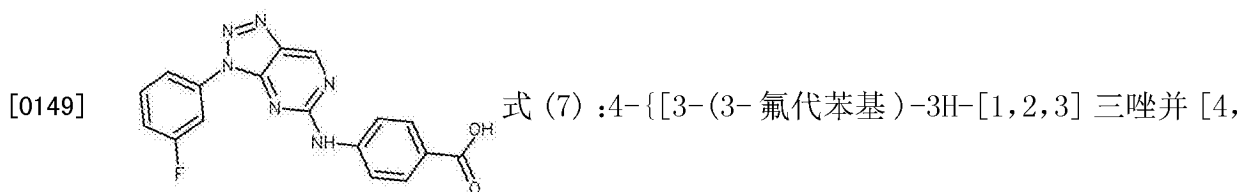
苯基}氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)吡啶-2-基]丁基}氨基甲酸1,1-二甲基乙酯。本文称为“化合物4”。

[0146] 在一个实施例中,苯胺-吡啶并三嗪是式(6)的化合物。



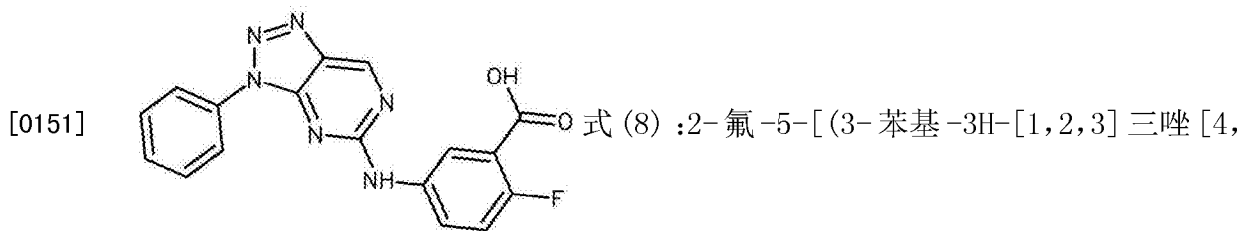
基} 嘧啶-4-基)-2-(甲氧基)苯基]甲基}(甲基)氨基]丙基}氨基甲酸 1,1-二甲基乙酯。本文称为“化合物 5”。

[0148] 在一个实施例中, 苯胺-吡啶并三嗪是式 (7) 的化合物。



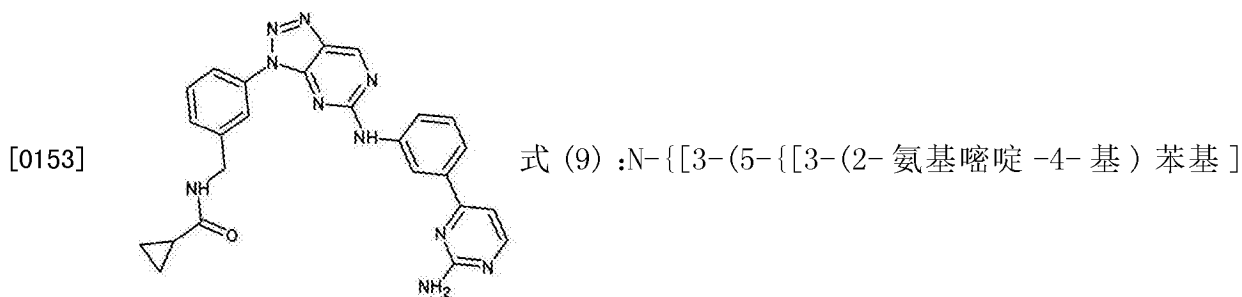
5-d] 嘧啶-5-基]氨基]苯甲酸。本文称为“化合物 6”。

[0150] 在一个实施例中, 苯胺-吡啶并三嗪是式 (8) 的化合物。



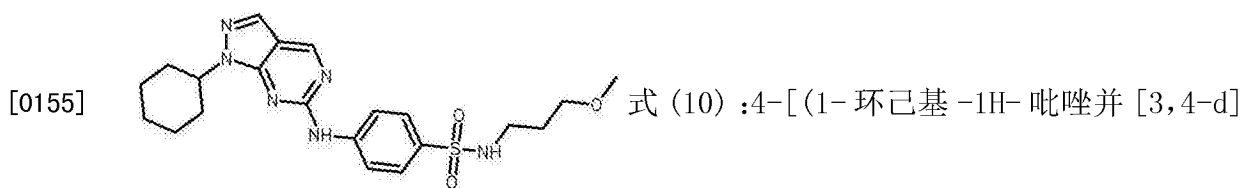
5-d] 嘧啶-5-基)氨基]苯甲酸。本文称为“化合物 7”。

[0152] 在一个实施例中, 苯胺-吡啶并三嗪是式 (9) 的化合物。



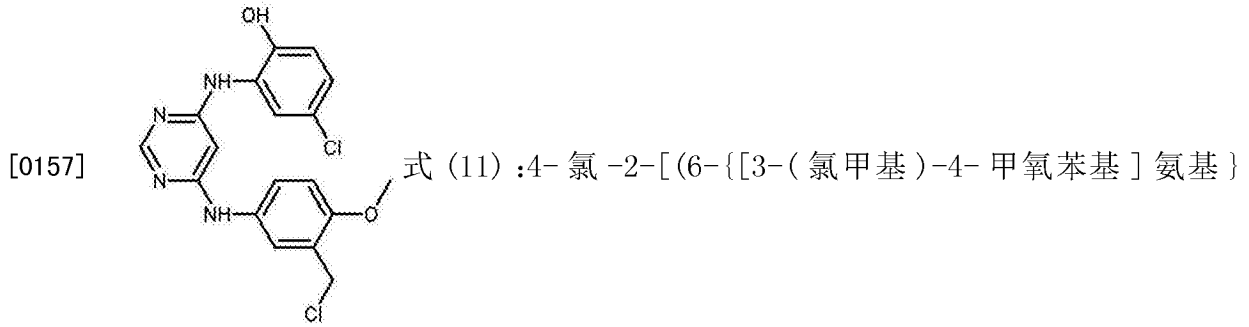
氨基]-3H-[1,2,3]三唑并[4,5-d]嘧啶-3-基)苯基]甲基}环丙酰胺。本文称为“化合物 8”。

[0154] 在一个实施例中, 苯胺-吡啶并三嗪是式 (10) 的化合物。



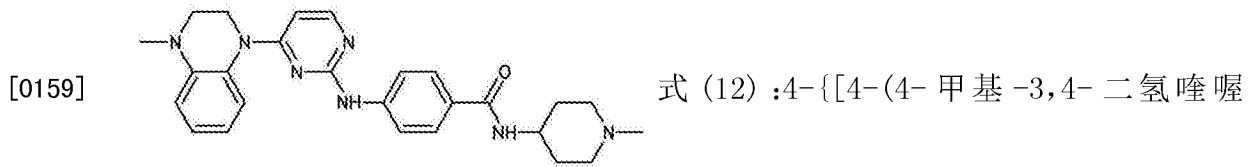
嘧啶-6-基)氨基]-N-[3-(甲氧基)丙基]苯磺酰胺。本文称为“化合物 9”。

[0156] 在一个实施例中,苯胺-吡啶并三嗪是式(11)的化合物。



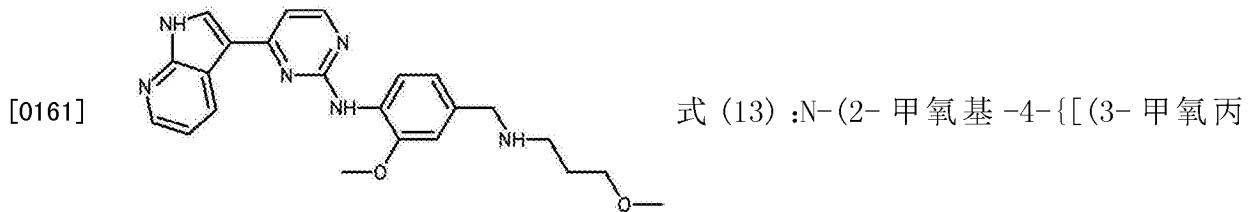
嘧啶-4-基)氨基]苯酚。本文称为“化合物 10”。

[0158] 在一个实施例中,苯胺-吡啶并三嗪是式(12)的化合物。



啉-1(2H)-基)嘧啶-2-基]氨基]-N-(1-甲基哌啶-4-基)苯酰胺。本文称为“化合物 11”。

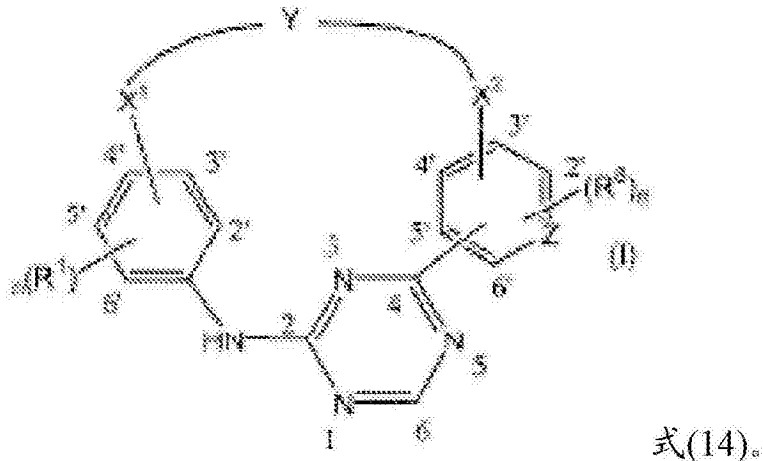
[0160] 在一个实施例中,苯胺-吡啶并三嗪是式(13)的化合物。



基)氨基]甲基}苯基)-4-(1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)嘧啶-2-胺。本文称为“化合物 12”。

[0162] 在一个实施例中,能够使多能干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物细胞的化合物是式(14)的环苯胺-吡啶并三嗪:

[0163]



[0164] N-氧化物形成药用加成盐及其立体异构形式,其中:

[0165] m 代表 1 至 4 的整数 ;n 代表 1 至 4 的整数 ;Z 代表 N 或 C ;

[0166] Y 代表  $-\text{NR}^2-\text{C}_{16}$  烷基  $-\text{CO}-\text{NR}^4-$ 、 $-\text{C}_{14}$  烷基  $-\text{NR}^9-\text{C}_{14}$  烷基  $-$ 、 $\text{C}_{16}$  烷基  $-\text{CO}-\text{Het}^{10}-$ 、 $-\text{Het}^{11}-\text{CO}-\text{C}_{16}$  烷基  $-$ 、 $-\text{Het}^{12}-\text{C}_{16}$  烷基  $-$ 、 $-\text{CO}-\text{Het}^{13}-\text{C}_{16}$  烷基  $-$ 、 $-\text{CO}-\text{NR}^{10}-\text{C}_{16}$  烷基  $-$ 、 $-\text{Het}^1-\text{C}_{16}$  烷基  $-\text{CO}-\text{NR}^5-$  或  $-\text{Het}^2-\text{CO}-\text{NR}^6-$ ，其中  $-\text{NR}^2-\text{C}_{16}$  烷基  $-\text{CO}-\text{NR}^4-$  或  $-\text{Het}^1-\text{C}_{16}$  烷基  $-\text{CO}-\text{NR}^5-$  中的  $-\text{C}_{16}$  烷基连接基任选被一个或可能两个或更多个选自羟基、甲氧基、氨基、卤素、苯基、吡啶基、二甲硫、硫醇、羟苯基、氰基苯基、氨基和羟基羰基的取代基取代；

[0167]  $X^1$  代表直键、 $\text{C}_{14}$  烷基、 $\text{C}_{14}$  烷氧基  $-$ 、 $\text{C}_{14}$  烷基  $-\text{CO}-$ 、 $\text{C}_{24}$  烯基、 $\text{C}_{24}$  炔基、或  $\text{C}_{14}$  烷基  $-\text{NR}^3-$ ，其中所述  $\text{C}_{14}$  烷基或  $\text{C}_{24}$  烯基任选被一个或可能两个或更多个卤素取代基取代；

[0168]  $X^2$  代表直键、 $\text{C}_{14}$  烷基、 $\text{C}_{14}$  烷氧基  $-$ 、 $\text{C}_{14}$  烷基  $-\text{CO}-$ 、 $\text{C}_{24}$  烯基、 $\text{C}_{24}$  炔基或  $\text{C}_{14}$  烷基  $-\text{NR}^7-$ ，其中所述  $\text{C}_{14}$  烷基或  $\text{C}_{24}$  烯基任选被一个或可能两个或更多个卤素取代基取代；

[0169]  $R^1$  和  $R^8$  各自独立地代表氢、 $\text{Het}^{14}$ 、氰基、卤素、羟基、 $\text{C}_{16}$  烷氧基  $-$ 、 $\text{C}_{16}$  烷基  $-$ 、单-或二 ( $\text{C}_{14}$  烷基) 氨基-羰基  $-$ 、单-或二 ( $\text{C}_{14}$  烷基) 氨基-磺酰基、被卤素取代的  $\text{C}_{16}$  烷氧基或者  $R^1$  代表被一个或可能两个或更多个选自羟基或卤素的取代基取代的  $\text{C}_{16}$  烷基；

[0170]  $R^2$  和  $R^9$  各自独立地代表氢、 $\text{C}_{14}$  烷基、 $\text{C}_{24}$  烯基、 $\text{Het}^3$ 、 $\text{Het}^4-\text{C}_{14}$  烷基  $-$ 、 $\text{Het}^5-\text{C}_{14}$  烷基羰基  $-$ 、单-或二 ( $\text{C}_{14}$  烷基) 氨基  $-\text{C}_{14}$  烷基-羰基  $-$  或任选被一个或可能两个或更多个选自氢、羟基、氨基或  $\text{C}_{14}$  烷氧基  $-$  的取代基取代的苯基；

[0171]  $R^3$  和  $R^7$  各自独立地代表氢、 $\text{C}_{14}$  烷基、 $\text{Het}^6$ 、 $\text{Het}^7-\text{C}_{14}$  烷基  $-$ 、任选被  $\text{Het}^8-\text{C}_{14}$  烷基氨基羰基  $-$  取代的  $\text{C}_{24}$  烯基羰基  $-$ 、 $\text{C}_{24}$  烯基磺酰基  $-$ 、 $\text{C}_{14}$  烷氧基  $\text{C}_{14}$  烷基  $-$  或任选被一个或可能两个或更多个选自氢、羟基、氨基或  $\text{C}_{14}$  烷氧基的取代基取代的苯基；

[0172]  $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$  和  $R^{10}$  各自独立地代表氢或任选被羟基取代的  $\text{C}_{14}$  烷基、 $\text{Het}^9$  或  $\text{C}_{14}$  烷氧基；

[0173]  $\text{Het}^1$  和  $\text{Het}^2$  各自独立地代表选自吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑烷基或吡唑烷基的杂环，其中所述  $\text{Het}^1$  和  $\text{Het}^2$  任选被氨基、羟基、 $\text{C}_{14}$  烷基、羟基  $-\text{C}_{14}$  烷基  $-$ 、苯基、苯基  $-\text{C}_{14}$  烷基  $-$ 、 $\text{C}_{14}$  烷基-氧基  $-\text{C}_{14}$  烷基  $-$  单-或二 ( $\text{C}_{14}$  烷基) 氨基  $-$  或氨基-羰基  $-$  取代；

[0174]  $\text{Het}^3$  和  $\text{Het}^6$  各自独立地代表选自吡咯烷基或哌啶基的杂环，其中所述  $\text{Het}^3$  和  $\text{Het}^6$  任选被一个或可能两个或更多个选自  $\text{C}_{14}$  烷基、 $\text{C}_{36}$  环烷基、羟基  $-\text{C}_{14}$  烷基  $-$ 、 $\text{C}_{14}$  烷氧基  $\text{C}_{14}$  烷基或多羟基  $-\text{C}_{14}$  烷基  $-$  的取代基取代；

[0175]  $\text{Het}^4$ 、 $\text{Het}^7$  和  $\text{Het}^9$  各自独立地代表选自吗啉基、吡咯烷基、哌嗪基或哌啶基的杂环，其中所述  $\text{Het}^4$ 、 $\text{Het}^7$  和  $\text{Het}^9$  任选被一个或可能两个或更多个选自  $\text{C}_{14}$  烷基、 $\text{C}_{36}$  环烷基、羟基  $-\text{C}_{14}$  烷基  $-$ 、 $\text{C}_{14}$  烷氧基  $\text{C}_{14}$  烷基或多羟基  $-\text{C}_{14}$  烷基  $-$  的取代基取代；

[0176]  $\text{Het}^5$  代表选自吗啉基、吡咯烷基、哌嗪基或哌啶基的杂环，其中所述  $\text{Het}^5$  任选被一个或可能两个或更多个选自  $\text{C}_{14}$  烷基、 $\text{C}_{36}$  环烷基、羟基  $-\text{C}_{14}$  烷基  $-$ 、 $\text{C}_{14}$  烷氧基  $\text{C}_{14}$  烷基或多羟基  $-\text{C}_{14}$  烷基  $-$  的取代基取代；

[0177]  $\text{Het}^{10}$ 、 $\text{Het}^{11}$  和  $\text{Het}^{13}$  各自独立地代表选自吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑烷基或吡唑烷基的杂环，其中所述  $\text{Het}^{10}$ 、 $\text{Het}^{11}$  和  $\text{Het}^{13}$  任选被氨基、羟基、 $\text{C}_{14}$  烷基、羟基  $-\text{C}_{14}$  烷基  $-$ 、苯基、苯基  $-\text{C}_{14}$  烷基  $-$ 、 $\text{C}_{14}$  烷基-氧基  $-\text{C}_{14}$  烷基  $-$ 、氨基-羰基  $-$  或单-或二 ( $\text{C}_{14}$  烷基) 氨基  $-$  取代；

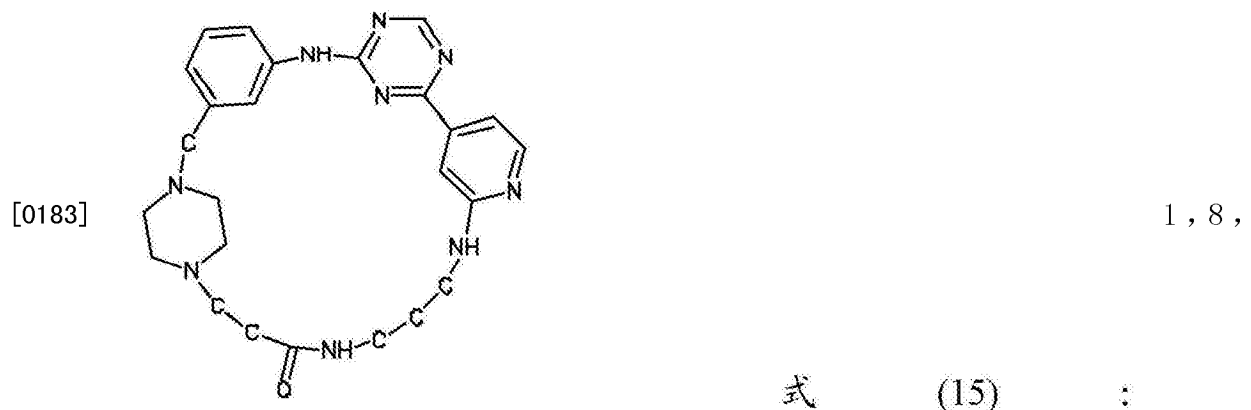
[0178] Het<sup>12</sup>代表选自吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑烷基或吡唑烷基的杂环,其中所述Het<sup>12</sup>任选被氨基、羟基、C<sub>1-4</sub>烷基、羟基-C<sub>1-4</sub>烷基-、苯基、苯基-C<sub>1-4</sub>烷基-、C<sub>1-4</sub>烷基-氧基-C<sub>1-4</sub>烷基-、单-或二(C<sub>1-4</sub>烷基)氨基-或氨基-羰基-取代;

[0179] Het<sup>14</sup>代表选自吗啉基、吡咯烷基、哌嗪基、咪唑基、吡咯基、2,3,4-三氮杂吡咯基、1,2,3-三唑基、吡唑基或哌啶基的杂环,其中所述Het<sup>14</sup>任选被一个或可能两个或更多个选自C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>3-6</sub>环烷基、羟基-C<sub>1-4</sub>烷基-、C<sub>1-4</sub>烷氧基C<sub>1-4</sub>烷基或多羟基-C<sub>1-4</sub>烷基-的取代基取代;具体来讲,Het<sup>14</sup>代表选自吗啉基、吡咯烷基、吡咯基、2,3,4-三氮杂吡咯基、哌嗪基或哌啶基的杂环,其中所述Het<sup>14</sup>任选被一个或可能两个或更多个选自C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>3-6</sub>环烷基、羟基-C<sub>1-4</sub>烷基-、C<sub>1-4</sub>烷氧基C<sub>1-4</sub>烷基或多羟基-C<sub>1-4</sub>烷基-的取代基取代;更具体来讲,Het<sup>14</sup>代表选自吗啉基、吡咯烷基、哌嗪基或哌啶基的杂环,其中所述Het<sup>14</sup>任选被一个或可能两个或更多个选自C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>3-6</sub>环烷基、羟基-C<sub>1-4</sub>烷基-、C<sub>1-4</sub>烷氧基C<sub>1-4</sub>烷基或多羟基-C<sub>1-4</sub>烷基-的取代基取代。

[0180] 式(7)的化合物在转让给 Janssen Pharmaceutica N.V. 的 W02007 / 003525 中公开。

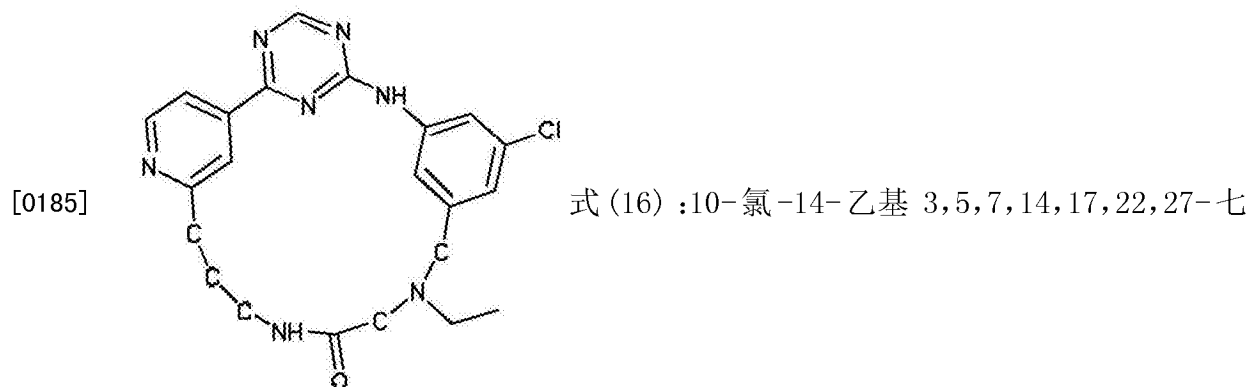
[0181] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式(14)的化合物。

[0182] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式(15)的化合物。



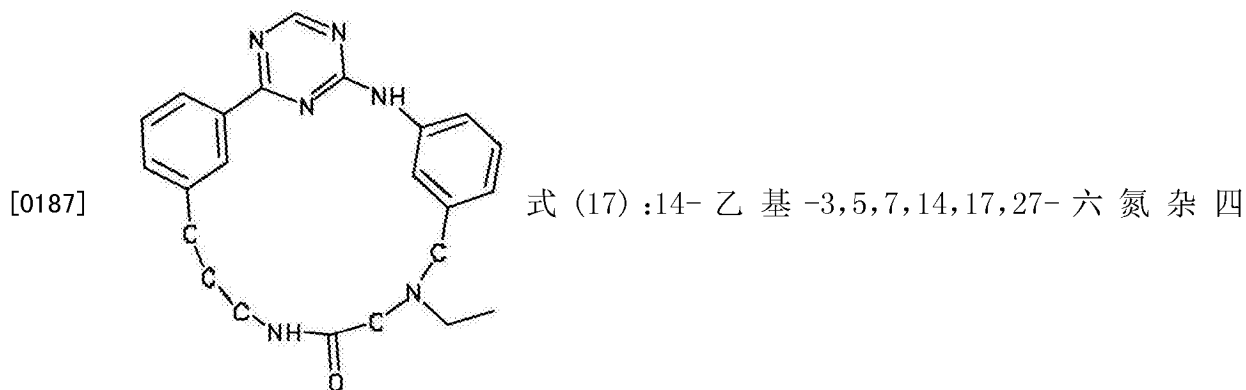
10,12,17,19,23,27,33-九氮杂五环 [25.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~] 三十四烷-3(34),4,6,9(33),10,12,14(32),15,17-壬-24-酮。本文称为“化合物13”。

[0184] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式(16)的化合物。



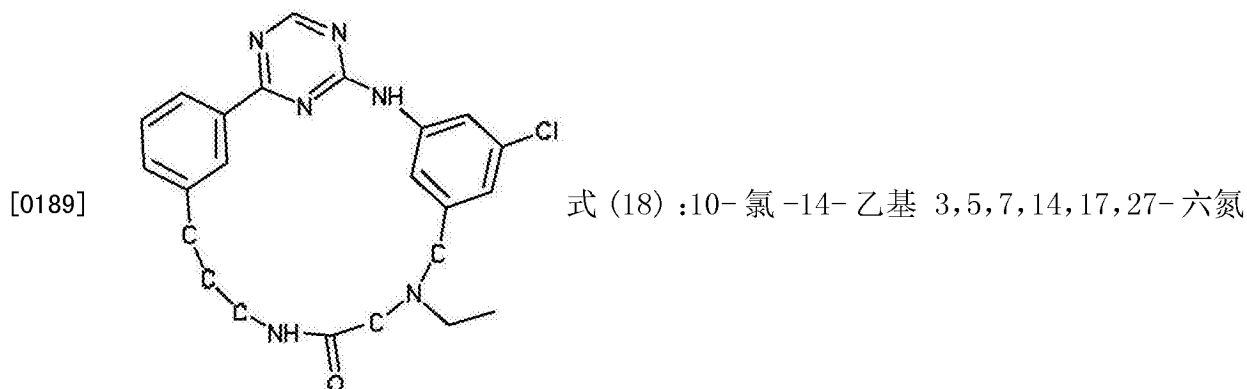
氮杂四环 [19.3.1.1~2,6~.1~8,12~] 二十七烷-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-壬-16-酮。本文称为“化合物14”。

[0186] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式(17)的化合物。



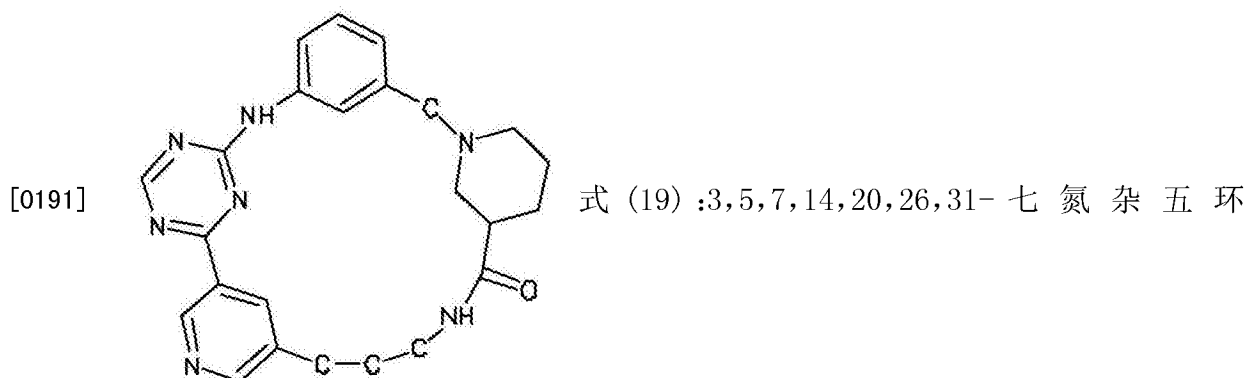
环[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]二十七烷-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-壬-16-酮。本文称为“化合物15”。

[0188] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式(18)的化合物。



杂四环[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]二十七烷-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-壬烷-16-酮。本文称为“化合物16”。

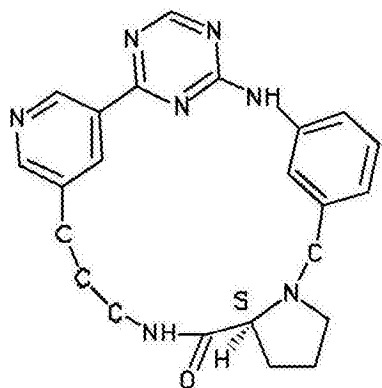
[0190] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式(19)的化合物。



[22.3.1.1~2,6~.1~8,12~.1~14,18~]三十一烷-1(28),2(31),3,5,8(30),9,11,24,26-壬-19-酮。本文称为“化合物17”。

[0192] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式(20)的化合物。

[0193]

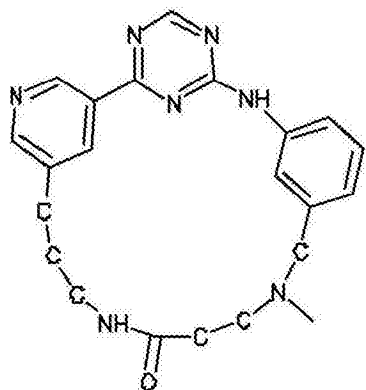


式 (20) : (18S) 3,5,7,14,20,26,30-七氮杂五环

[22.3.1.1 ~ 2,6 ~ .1 ~ 8,12 ~ .0 ~ 14,18 ~] 三十烷-1(28),2(30),3,5,8(29),9,11,24,26-壬-19-酮。本文称为“化合物 18”。

[0194] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式 (21) 的化合物。

[0195]

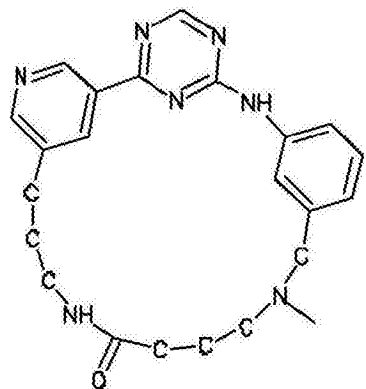


式 (21) : 14-甲基-3,5,7,14,18,24,28-七氮杂四

环 [20.3.1.1 ~ 2,6 ~ .1 ~ 8,12 ~] 二十八烷-1(26),2(28),3,5,8(27),9,11,22,24-壬-17-酮。本文称为“化合物 19”。

[0196] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式 (22) 的化合物。

[0197]



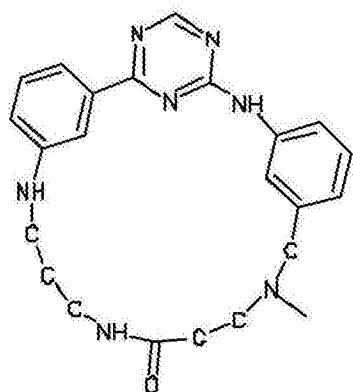
式 (22) : 14-甲基-3,5,7,14,19,25,29-七氮杂四

环 [21.3.1.1 ~ 2,6 ~ .1 ~ 8,12 ~] 二十九烷-1(27),2(29),3,5,8(28),9,11,23,25-壬-18-酮。本文称为“化合物 20”。

[0198] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式 (23) 的化合物。



[0199]

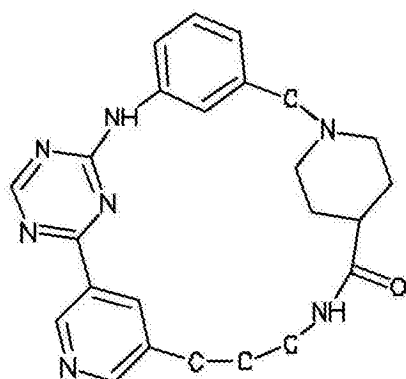


式 (23) :14- 甲基 3,5,7,14,18,22,29- 七氮杂四

环 [21.3.1.1 ~ 2,6 ~ .1 ~ 8,12 ~ ] 二十九烷 -1(27),2(29),3,5,8(28),9,11,23,25- 壬 -17- 酮。本文称为“化合物 21”。

[0200] 在一个实施例中,环苯胺 - 吡啶并三嗪是式 (24) 的化合物。

[0201]

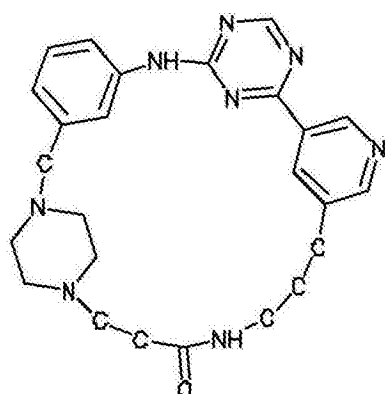


式 (24) :1,8,10,12,16,22,30- 七氮杂五环

[22.2.2.1 ~ 3,7 ~ .1 ~ 9,13 ~ .1 ~ 14,18 ~ ] 三十一烷 -3(31),4,6,9(30),10,12,14(29),15,17- 壬 -23- 酮。本文称为“化合物 22”。

[0202] 在一个实施例中,环苯胺 - 吡啶并三嗪是式 (25) 的化合物。

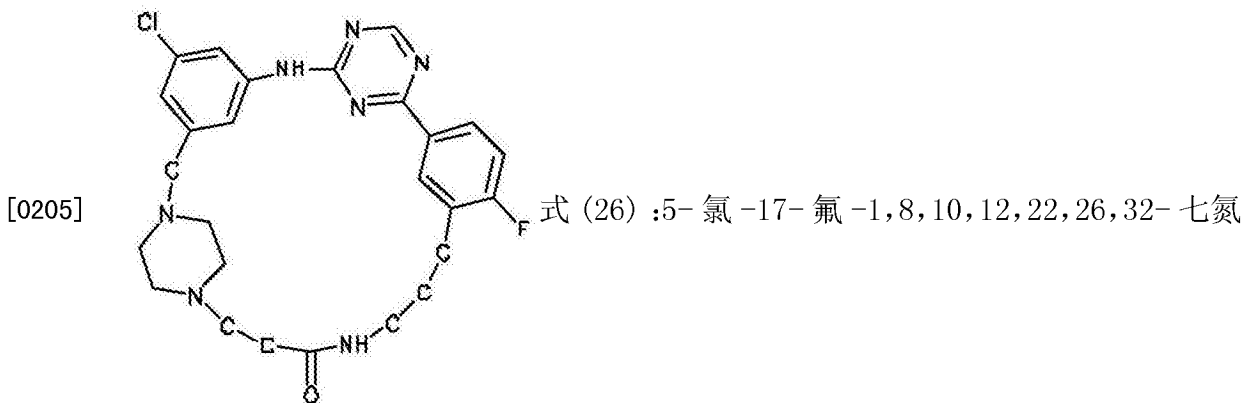
[0203]



式 (25) :1,8,10,12,16,22,26,32- 八氮杂五环

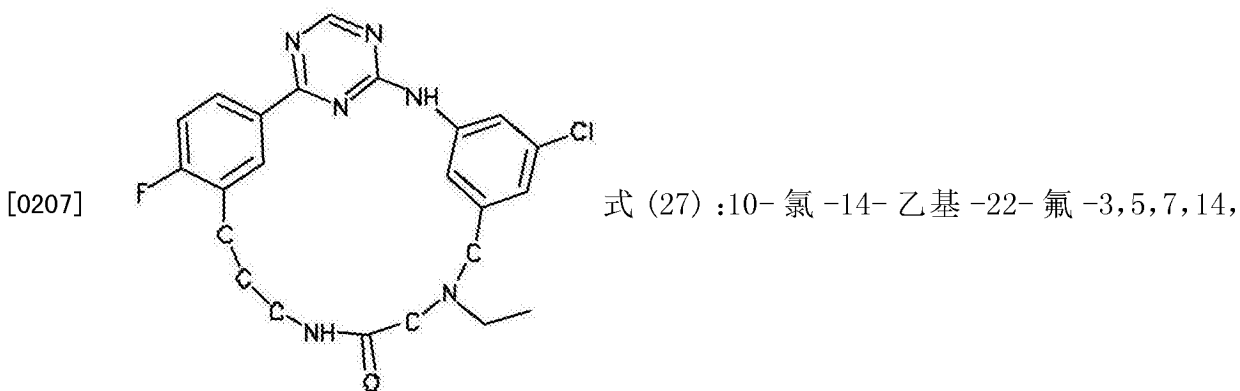
[24.2.2.1 ~ 3,7 ~ .1 ~ 9,13 ~ .1 ~ 14,18 ~ ] 三十三烷 -3(33),4,6,9(32),10,12,14(31),15,17- 壬 -23- 酮。本文称为“化合物 23”。

[0204] 在一个实施例中,环苯胺 - 吡啶并三嗪是式 (26) 的化合物。



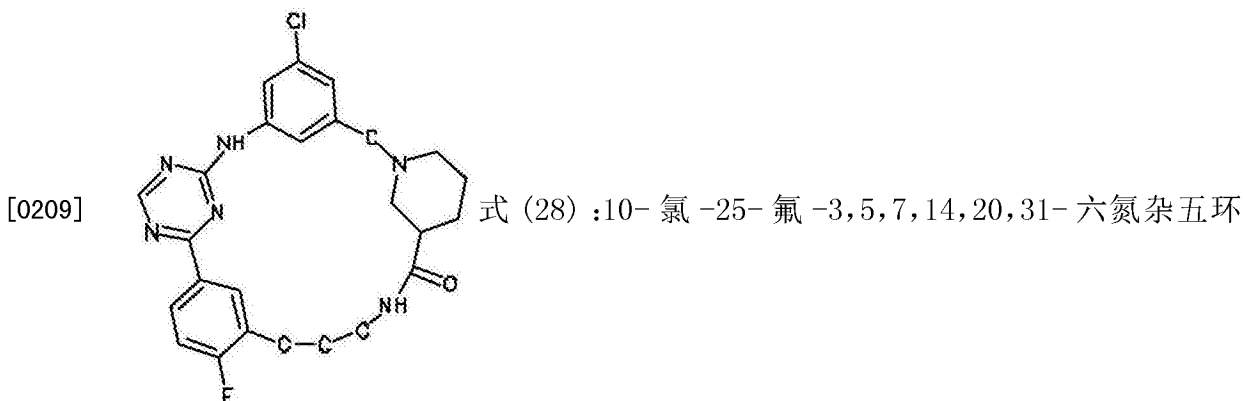
杂五环 [24.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~] 三十三烷-3(33),4,6,9(32),10,12,14(31),15,17-壬-23-酮。本文称为“化合物 24”。

[0206] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式 (27) 的化合物。



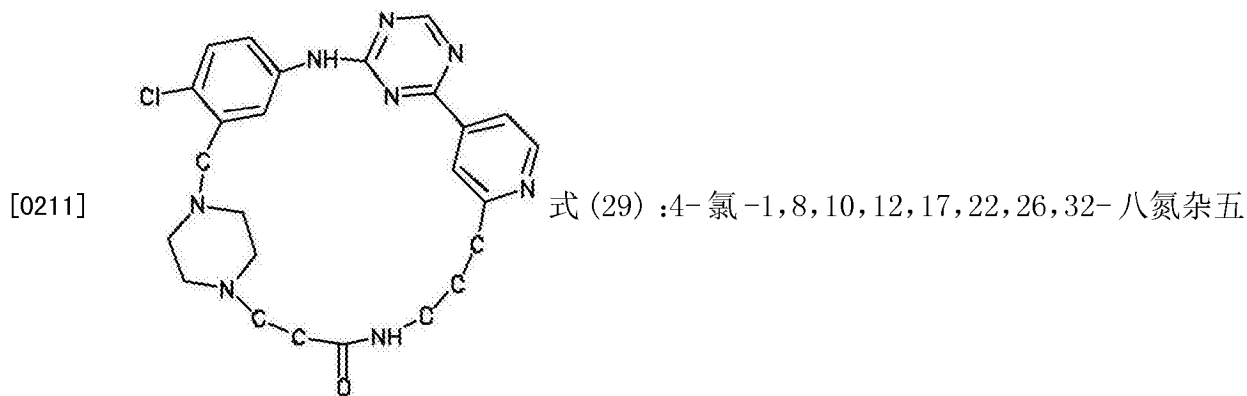
17,27-六氮杂四环 [19.3.1.1~2,6~.1~8,12~] 二十七烷-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-壬-16-酮。本文称为“化合物 25”。

[0208] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式 (28) 的化合物。



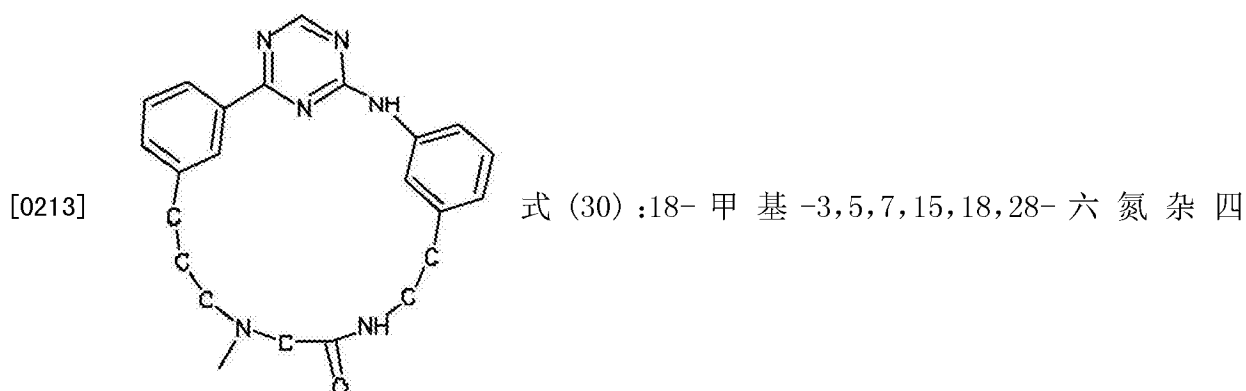
[22.3.1.1~2,6~.1~8,12~.1~14,18~] 三十一烷-1(28),2(31),3,5,8(30),9,11,24,26-壬-19-酮。本文称为“化合物 26”。

[0210] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式 (29) 的化合物。



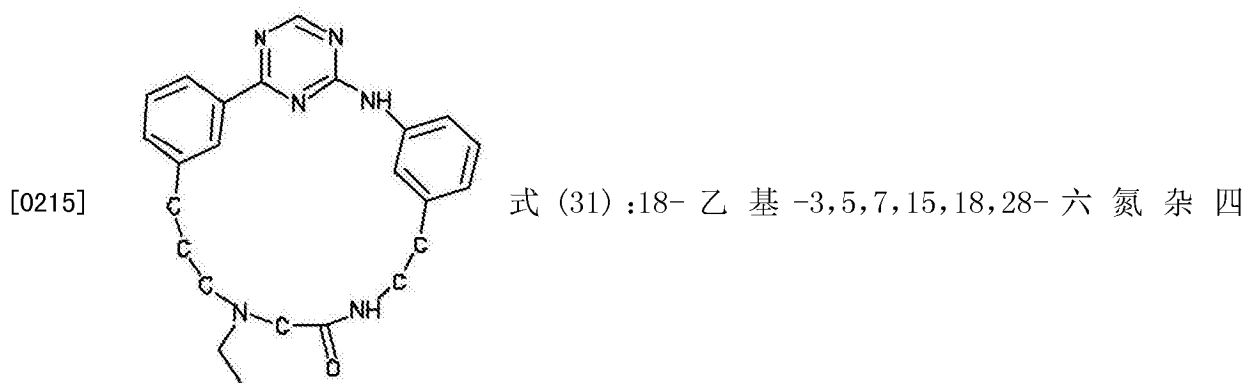
环 [24.2.2.1 ~ 3,7 ~ .1 ~ 9,13 ~ .1 ~ 14,18 ~ ] 三十三烷-3(33),4,6,9(32),10,12,14(31),15,17-壬-23-酮。本文称为“化合物 27”。

[0212] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式 (30) 的化合物。



环 [20.3.1.1 ~ 2,6 ~ .1 ~ 8,12 ~ ] 二十八烷-1(26),2(28),3,5,8(27),9,11,22,24-壬-16-酮。本文称为“化合物 28”。

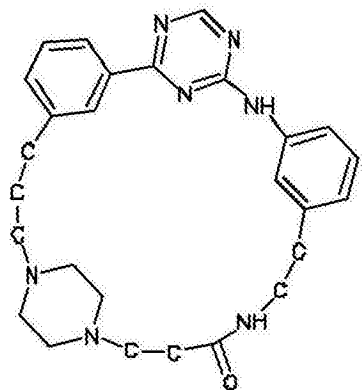
[0214] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式 (31) 的化合物。



环 [20.3.1.1 ~ 2,6 ~ .1 ~ 8,12 ~ ] 二十八烷-1(26),2(28),3,5,8(27),9,11,22,24-壬-16-酮。本文称为“化合物 29”。

[0216] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式 (32) 的化合物。

[0217]

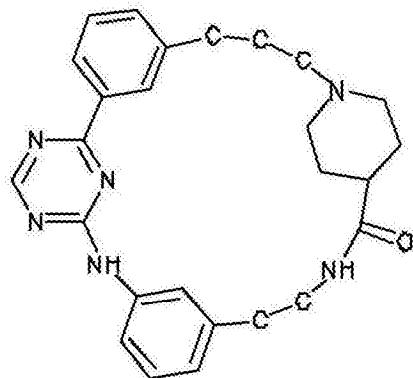


式 (32) :

[0218] 1,8,10,12,17,19,23,27,33- 九氮杂五环 [25. 2. 2. 1 ~ 3,7 ~ . 1 ~ 9,13 ~ . 1 ~ 14,18 ~ ] 三十四烷 -3(34),4,6,9(33),10,12,14(32),15,17- 壬 -24- 酮。本文称为“化合物 30”。

[0219] 在一个实施例中,环苯胺 - 吡啶并三嗪是式 (33) 的化合物。

[0220]

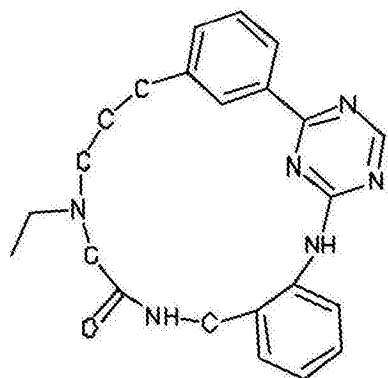


式 (33) :1,11,13,15,23,31- 六 氮 杂 五 环

[23. 2. 2. 1 ~ 5,9 ~ . 1 ~ 10,14 ~ . 1 ~ 16,20 ~ ] 三十二烷 -5(32),6,8,10(31),11,13,16(30),17,19- 壬 -24- 酮。本文称为“化合物 31”。

[0221] 在一个实施例中,环苯胺 - 吡啶并三嗪是式 (34) 的化合物。

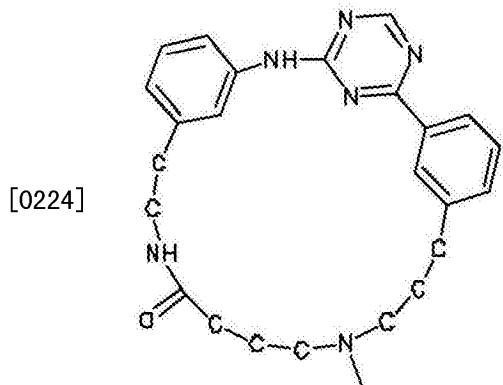
[0222]



式 (34) :15- 乙基 -13,14,15,16,18,19- 六 氢 -1H-6,

2-( 氮 烯 (azeno))-7,11-( 次 甲 基 )-1,3,5,15,18- 苯 并 五 氮 杂 环 二 十 一 碳 (benzopentaazacyclohencicosin)-17(12H)- 酮。本文称为“化合物 32”。

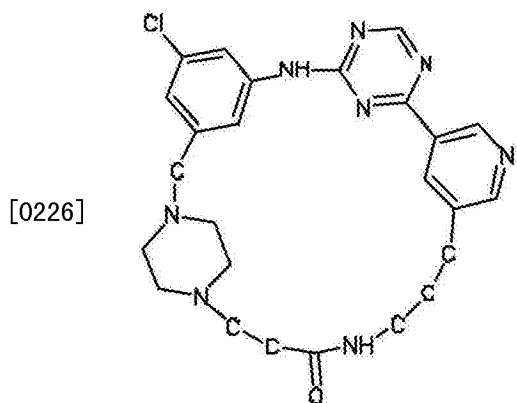
[0223] 在一个实施例中,环苯胺 - 吡啶并三嗪是式 (35) 的化合物。



式 (35) :20- 甲基 -3,5,7,15,20,30- 六氮杂四

环 [22.3.1.1 ~ 2,6 ~ .1 ~ 8,12 ~ ] 三十烷 -1(28),2(30),3,5,8(29),9,11,24,26- 壬 -16- 酮。本文称为“化合物 33”。

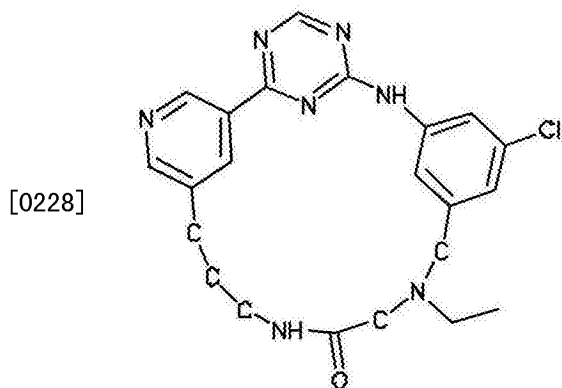
[0225] 在一个实施例中,环苯胺 - 吡啶并三嗪是式 (36) 的化合物。



式 (36) :5- 氯 -1,8,10,12,16,22,26,32- 八氮杂五

环 [24.2.2.1 ~ 3,7 ~ .1 ~ 9,13 ~ .1 ~ 14,18 ~ ] 三十三烷 -3(33),4,6,9(32),10,12,14(31),15,17- 壬 -23- 酮。本文称为“化合物 34”。

[0227] 在一个实施例中,环苯胺 - 吡啶并三嗪是式 (37) 的化合物。

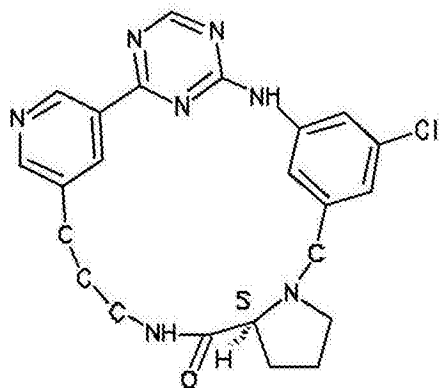


式 (37) :10- 氯 -14- 乙基 -3,5,7,14,17,23,

27- 七氮杂四环 [19.3.1.1 ~ 2,6 ~ .1 ~ 8,12 ~ ] 二十七烷 -1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23- 壬 -16- 酮。本文称为“化合物 35”。

[0229] 在一个实施例中,环苯胺 - 吡啶并三嗪是式 (38) 的化合物。

[0230]

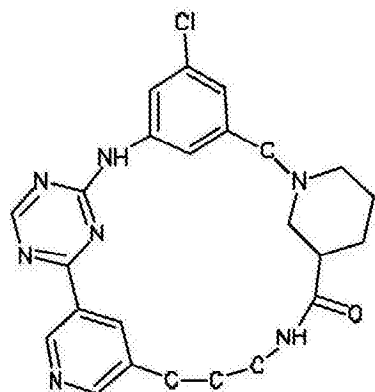


式 (38) : (18S)-10-氯-3,5,7,14,20,26,30-七

氮杂五环 [22.3.1.1~2,6~.1~8,12~.0~14,18~] 三十烷-1(28),2(30),3,5,8(29),9,11,24,26-壬-19-酮。本文称为“化合物 36”。

[0231] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式 (39) 的化合物。

[0232]

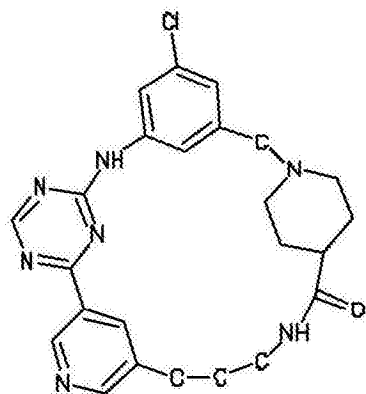


式 (39) : 10-氯-3,5,7,14,20,26,31-七氮杂五环

[22.3.1.1~2,6~.1~8,12~.1~14,18~] 三十一烷-1(28),2(31),3,5,8(30),9,11,24,26-壬-19-酮。本文称为“化合物 37”。

[0233] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式 (40) 的化合物。

[0234]

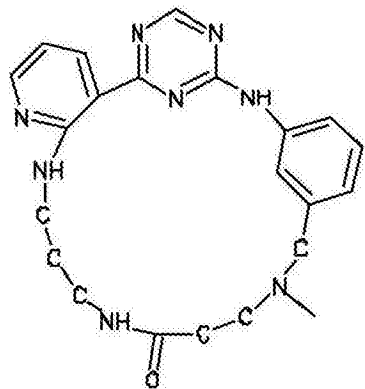


式 (40) : 5-氯-1,8,10,12,16,22,30-七氮杂五环

[22.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~] 三十一烷-3(31),4,6,9(30),10,12,14(29),15,17-壬-23-酮。本文称为“化合物 38”。

[0235] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式 (41) 的化合物。

[0236]

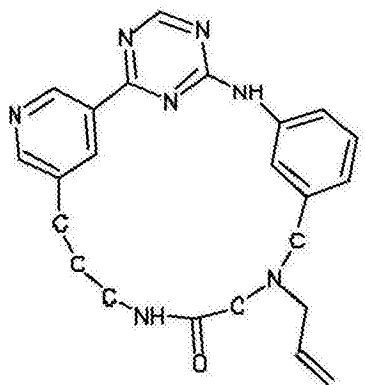


式 (41) :9- 甲基 -2,3,4,5,7,8,9,10- 八氢 -16H-17,

21-(氮烯)-11,15-(次甲基)吡啶 [3,2-g][1,3,5,9,13,17] 六氮杂环二十三烯 -6(1H)- 酮。本文称为“化合物 39”。

[0237] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式 (42) 的化合物。

[0238]

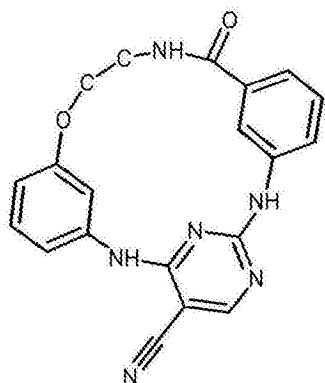


式 (42) :14- 丙 -2- 烯 -1- 基 -3,5,7,14,17,23,27- 七

氮杂四环 [19.3.1.1 ~ 2,6 ~ .1 ~ 8,12 ~ ] 二十七烷 -1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23- 壬 -16- 酮。本文称为“化合物 40”。

[0239] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式 (43) 的化合物。

[0240]

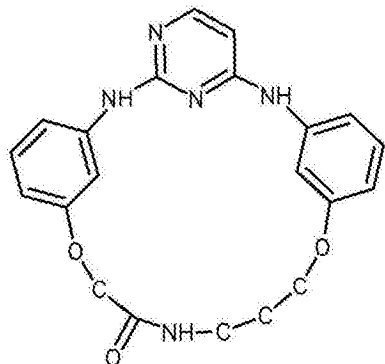


式 (43) :18- 氧代 -14- 氧杂 -2,4,8,17,25- 五氮杂四

环 [17.3.1.1 ~ 3,7 ~ .1 ~ 9,13 ~ ] 二十五烷 -1(23),3(25),4,6,9(24),10,12,19,21- 壬 -6- 腈。本文称为“化合物 41”。

[0241] 在一个实施例中,环苯胺-吡啶并三嗪是式 (44) 的化合物。

[0242]

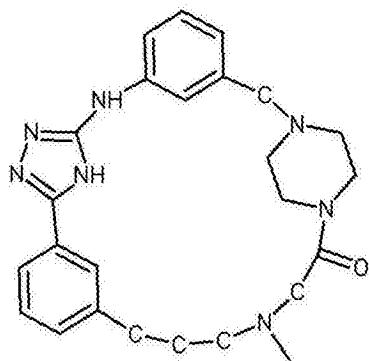


式 (44) :14,21- 二氧杂 -2,4,8,18,28- 五氮杂四

环 [20.3.1.1 ~ 3,7 ~ .1 ~ 9,13 ~ ] 二十八烷 -1(26),3(28),4,6,9(27),10,12,22,24- 壬 -19- 酮。本文称为“化合物 42”。

[0243] 在一个实施例中,环苯胺 - 吡啶并三嗪是式 (45) 的化合物。

[0244]

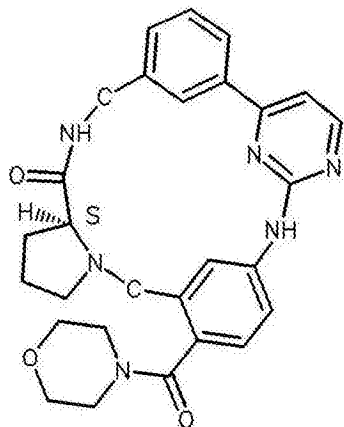


式 (45) :21- 甲基 -1,8,10,11,21,24,30- 七氮杂五环

[22.2.2.1 ~ 3,7 ~ .1 ~ 9,12 ~ .1 ~ 13,17 ~ ] 三十一烷 -3(31),4,6,9,11,13(29),14,16- 辛烷 -23- 酮。本文称为“化合物 43”。

[0245] 在一个实施例中,环苯胺 - 吡啶并三嗪是式 (46) 的化合物。

[0246]



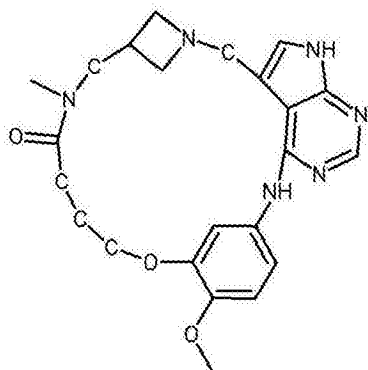
式 (46) :(18S)-11-( 吗啉 -4- 基羰基 )-5,7,14,20,

28- 五氮杂五环 [20.3.1.1 ~ 2,6 ~ .1 ~ 8,12 ~ .0 ~ 14,18 ~ ] 二十八烷 -1(26),2(28),3,5,8(27),9,11,22,24- 壬 -19- 酮。本文称为“化合物 44”。

[0247] 在一个实施例中,环苯胺 - 吡啶并三嗪是式 (47) 的化合物。



[0248]

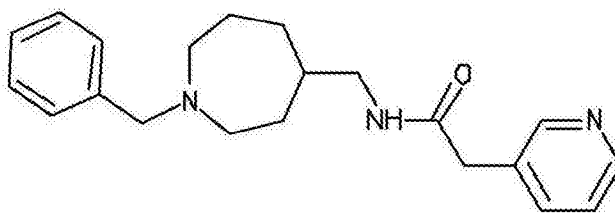


式 (47) : 10- 甲氧基 -17- 甲基 -2, 14, 15, 17, 18, 19,

20, 22- 八氢 -6H-19, 21- 亚甲基 -7, 11-( 次甲基 )-12- 氧杂 -2, 3, 5, 6, 17, 21- 六氮杂环二十碳 [1, 2, 3-cd] 茛 -16 (13H) - 酮。本文称为“化合物 45”。

[0249] 在一个实施例中, 所述至少一种其他因子是式 (48) 的化合物:

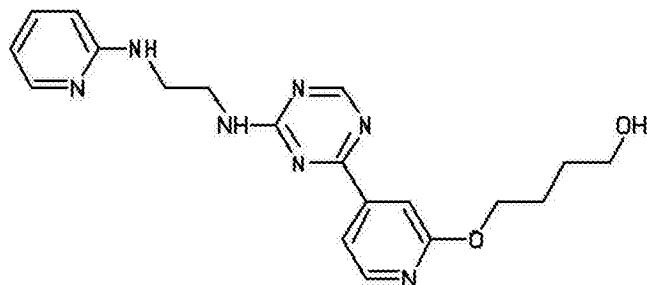
[0250]



[0251] 式 (48)。N-[[1-( 苯甲基 ) 氮杂环庚烷 -4- 基 ] 甲基 ]-2- 吡啶 -3- 基乙酰胺。本文称为“化合物 46”。

[0252] 在一个实施例中, 所述至少一种其他因子是式 (49) 的化合物:

[0253]

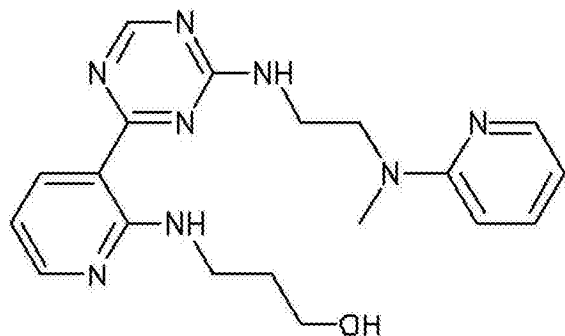


式 (49)。4-[[4-(4-[[2-( 吡

啶 -2- 基氨基 ) 乙基 ] 氨基 ]-1, 3, 5- 三嗪 -2- 基 ) 吡啶 -2- 基 ] 氧基 } 丁 -1- 醇。本文称为“化合物 47”。

[0254] 在一个实施例中, 所述至少一种其他因子是式 (50) 的化合物:

[0255]

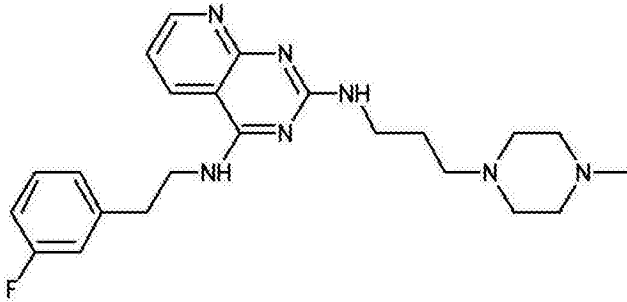


式 (50)。3-((3-[4-((2-[ 甲基 ( 吡

啶 -2- 基 ) 氨基 ] 乙基 ) 氨基 ]-1, 3, 5- 三嗪 -2- 基 ) 吡啶 -2- 基 ) 氨基 ) 丙 -1- 醇。本文称为“化合物 48”。

[0256] 在一个实施例中,所述至少一种其他因子是式 (51) 的化合物:

[0257]

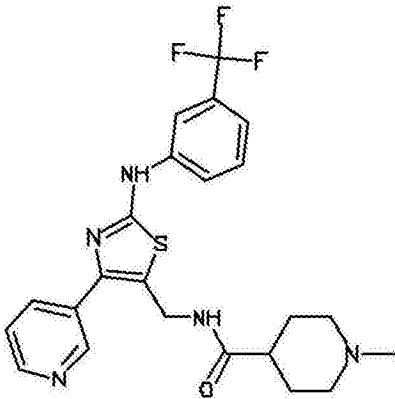


式 (51)。N ~

4 ~ -[2-(3- 氟代苯基) 乙基]-N ~ 2 ~ -[3-(4- 甲基哌嗪 -1- 基) 丙基] 吡啶 [2,3-d] 嘧啶 -2,4- 二胺。本文称为“化合物 49”。

[0258] 在一个实施例中,所述至少一种其他因子是式 (52) 的化合物:

[0259]

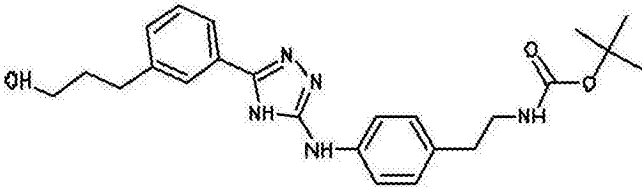


式 (52)。1- 甲基 -N-[ (4- 吡啶 -3- 基 -2- { [3- (三

氟甲基) 苯基] 氨基 } -1,3- 噻唑 -5- 基) 甲基] 哌啶 -4- 甲酰胺。本文称为“化合物 50”。

[0260] 在一个实施例中,所述至少一种其他因子是式 (53) 的化合物:

[0261]

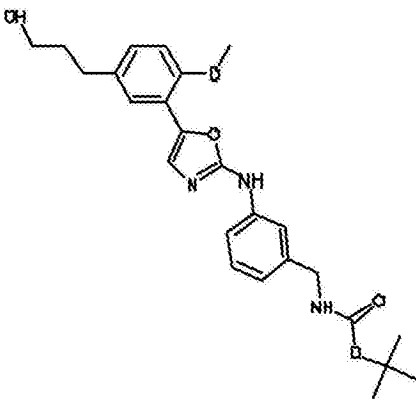


式 (53)。{2-[4-((5-[3-(3- 羟丙

基) 苯基]-4H-1,2,4- 三唑 -3- 基) 氨基) 苯基] 乙基) 氨基甲酸 1,1- 二甲基乙酯。本文称为“化合物 51”。

[0262] 在一个实施例中,所述至少一种其他因子是式 (54) 的化合物:

[0263]

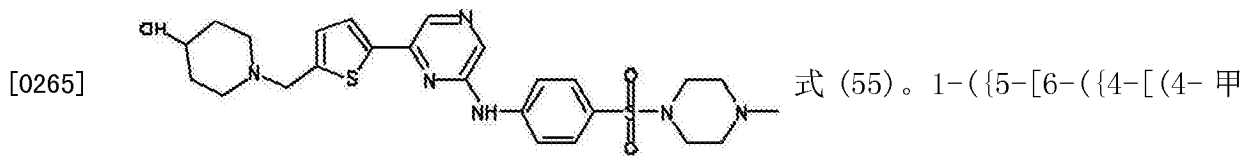


式 (54)。{ [3- ( {5- [5- (3- 羟丙基) -2- (甲氧基)

苯基] -1,3- 噻唑 -2- 基 } 氨基) 苯基] 甲基 } 氨基甲酸 1,1- 二甲基乙酯。本文称为“化

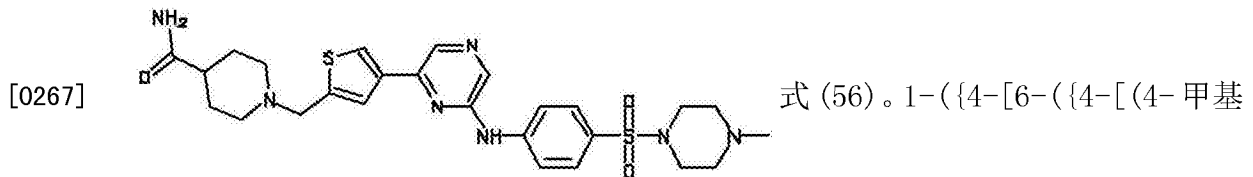
合物 52”。

[0264] 在一个实施例中,所述至少一种其他因子是式 (55) 的化合物:



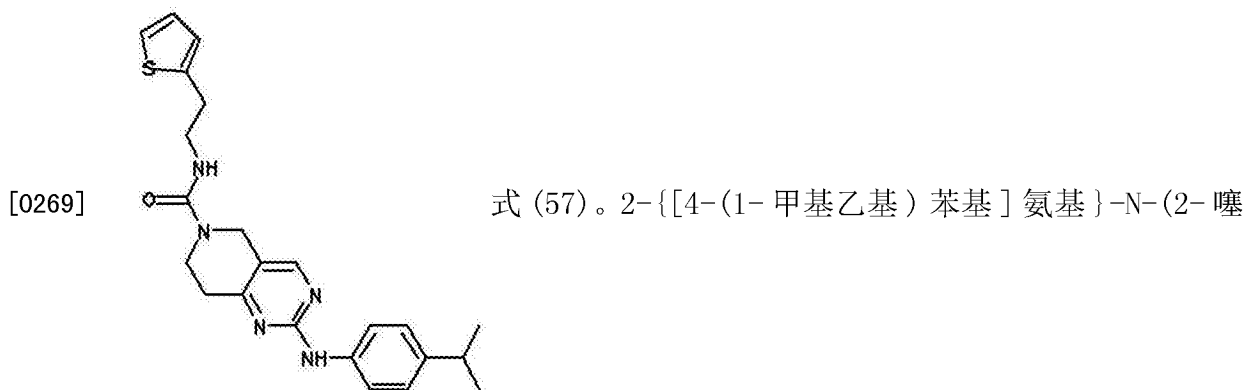
基哌嗪-1-基)磺酰基]苯基}氨基)吡啶-2-基]噻吩-2-基}甲基)哌啶-4-醇。本文称为“化合物 53”。

[0266] 在一个实施例中,所述至少一种其他因子是式 (56) 的化合物:



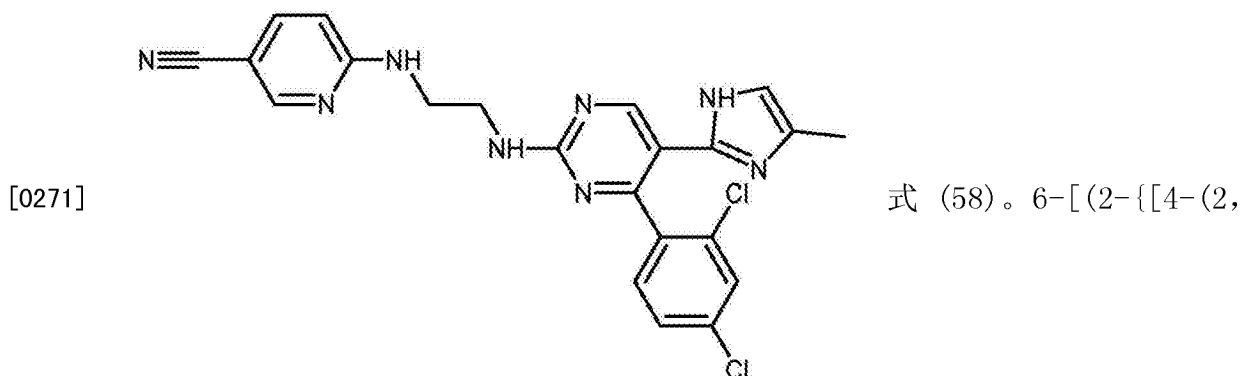
哌嗪-1-基)磺酰基]苯基}氨基)吡啶-2-基]噻吩-2-基}甲基)哌啶-4-甲酰胺。本文称为“化合物 54”。

[0268] 在一个实施例中,所述至少一种其他因子是式 (57) 的化合物:



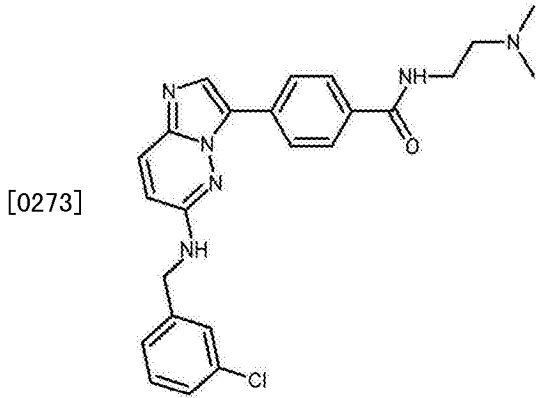
吩-2-基乙基)-7,8-二氢吡啶[4,3-d]嘧啶-6(5H)-甲酰胺。本文称为“化合物 55”。

[0270] 在一个实施例中,所述至少一种其他因子是式 (58) 的化合物:



4-二氯苯基)-5-(4-甲基-1H-咪唑-2-基)嘧啶-2-基]氨基}乙基)氨基]吡啶-3-腈。本文称为“化合物 56”。

[0272] 在一个实施例中,所述至少一种其他因子是式 (59) 的化合物:



[0273]

式 (59)。4-(6-[[3-氯苯基]甲基]氨基)咪唑

并 [1,2-b] 咪唑 -3-基)-N-[2-(二甲氨基)乙基]苯酰胺。本文称为“化合物 57”。

[0274] 表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的检测

[0275] 表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的形成可通过在特定方案前后检测标志物的存在情况来确定。多能干细胞通常不表达这类标志物。因而,当细胞开始表达它们时即检测到多潜能细胞的分化。

[0276] 可通过将处理过的细胞群体暴露于可特异性识别由表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞表达的蛋白质标志物的试剂(例如抗体)来确定分化效率。

[0277] 用于评估蛋白质标志物和核酸标志物在培养的或分离的细胞中的表达的方法是本领域的标准方法。这些方法包括定量逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)、RNA 印记、原位杂交(参见例如, Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel 等人(编辑), 2001 增刊))以及免疫测定法(例如切片材料的免疫组织化学分析)、蛋白印记以及针对完整细胞中可触及的标志物的流式细胞检测分析(FACS)(参见例如, Harlow 和 Lane, Using Antibodies :A Laboratory Manual, New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998))。

[0278] 例如,多能干细胞的特征是本领域技术人员所熟知的,并且多能干细胞的其他特征不断地被鉴别。多能干细胞标志物包括(例如)一种或多种下列标志物的表达:ABC2、cripto、FOXD3、连接蛋白 43、连接蛋白 45、OCT4、SOX2、Nanog、hTERT、UTF-1、ZFP42、SSEA-3、SSEA-4、Tra1-60 或 Tra1-81。

[0279] 在用本发明方法处理多能干细胞后,可通过将处理过的细胞群体暴露于特异性识别由表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞表达的蛋白质标志物(例如 CXCR4)来进行纯化。

[0280] 表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞的形成

[0281] 可通过本领域的任何方法或通过本发明提出的任何方法,使表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化成表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞。

[0282] 例如,可根据 D' Amour 等人, Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006) 中公开的方法,使表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化成表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞。

[0283] 可通过用成纤维细胞生长因子和 hedgehog 信号转导途径抑制剂 KAAD-环巴胺处理表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞,然后移除含有纤维细胞生长因子和 KAAD-环巴胺的培养基,并随后将所述细胞在含有视黄酸、成纤维细胞生长因子和 KAAD-环巴胺的

培养基中进行培养,来使表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞进一步分化成表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞。这个方法的一个例子在 Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006) 中公开。

[0284] 在本发明的一个方面,根据转让给 LifeScan, Inc. 的美国专利申请序列号 11 / 736, 908 中公开的方法,通过用视黄酸和至少一种成纤维细胞生长因子处理表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞一段时间,来使表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞进一步分化成表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞。

[0285] 在本发明的一个方面,根据转让给 LifeScan, Inc. 的美国专利申请序列号 11 / 779, 311 中公开的方法,通过用视黄酸和至少一种成纤维细胞生长因子处理表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞一段时间,来使表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞进一步分化成表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞。

[0286] 在本发明的一个方面,根据序列号为 60 / 990, 529 的美国专利申请中公开的方法,通过处理表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞,来使表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞进一步分化成表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞。

[0287] 可以将表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞用至少一种其他额外的因子进行处理,这些因子可增强表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞的形成。作为另一种选择,所述至少一种其他额外的因子可增强通过本发明方法形成的表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞的增殖。另外,所述至少一种其他额外的因子可增强通过本发明方法形成的表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞形成其他细胞类型的能力,或可改善任意其他额外分化步骤的效率。

[0288] 所述至少一种额外的因子可以是(例如)烟酰胺、TGF- $\beta$  家族的成员(包括 TGF- $\beta$  1、2 和 3)、血清白蛋白、成纤维细胞生长因子家族的成员、血小板衍生生长因子-AA 和 -BB、富血小板血浆、胰岛素生长因子(IGF-I、II)、生长分化因子(例如, GDF-5、-6、-8、-10、-11)、胰高血糖素样肽-I 和 II (GLP-I 和 II)、GLP-1 和 GLP-2 模拟体、毒蜥外泌肽-4、视黄酸、甲状旁腺激素、胰岛素、孕酮、抑酶肽、氢化可的松、乙醇胺、 $\beta$  巯基乙醇、表皮生长因子(EGF)、胃泌素 I 和 II、铜螯合剂(例如,三亚乙基五胺)、毛喉素、丁酸-Na、激活素、 $\beta$  细胞素、ITS、成头蛋白、神经突生长因子、nodal、丙戊酸、曲古抑菌素 A、丁酸钠、肝细胞生长因子(HGF)、鞘氨醇-1、VEGF、MG132 (EMD, CA)、N2 和 B27 添加剂(Gibco, CA)、甾体类生物碱(例如,环巴胺(EMD, CA))、角质细胞生长因子(KGF)、Dickkopf 蛋白家族、牛垂体提取物、胰岛新生相关蛋白(INGAP)、印第安豪猪蛋白、音猬蛋白、蛋白酶体抑制剂、notch 通路抑制剂、音猬蛋白抑制剂或它们的组合。

[0289] 所述至少一种其他额外的因子可由从胰腺细胞系(例如 PANC-1 (ATCC No : CRL-1469)、CAPAN-1 (ATCC No : HTB-79)、BxPC-3 (ATCC No : CRL-1687)、HPAF-II (ATCC No : CRL-1997))、肝细胞系例如 HepG2 (ATCC No : HTB-8065)、肠细胞系例如 FHS74 (ATCC No : CCL-241) 获得的调理培养基提供。

[0290] 表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞的检测

[0291] 胰腺内胚层谱系特征性标志物是本领域技术人员所熟知的,并且其他胰腺内胚层谱系特征性标志物不断被鉴别。这些标志物可用于确定根据本发明处理过的细胞是否已分化而获得胰腺内胚层谱系特征性特性。胰腺内胚层谱系的特异性标志物包括一种或多种转

录因子,例如 Hlx9、PTF-1a、PDX-1、HNF-6、HNF-1 $\beta$  的表达。

[0292] 可通过将处理过的细胞群体暴露于可特异性识别由表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞表达的蛋白质标志物的试剂(例如抗体)来确定分化效率。

[0293] 用于评估蛋白质标志物和核酸标志物在培养的或分离的细胞中的表达的方法是本领域的标准方法。这些方法包括定量逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)、RNA 印记、原位杂交(参见例如,Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel 等人(编辑),2001 增刊))以及免疫测定法(例如切片材料的免疫组织化学分析)、蛋白印记以及针对完整细胞中可触及的标志物的流式细胞检测分析(FACS)(参见例如,Harlow 和 Lane,Using Antibodies:A Laboratory Manual,New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press(1998))。

[0294] 表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞的形成

[0295] 可通过本领域的任何方法或通过本发明公开的任何方法,使表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。

[0296] 例如,可根据 D'Amour 等人,Nature Biotechnology24,1392-1401(2006) 中公开的方法,使表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。

[0297] 例如,可通过将表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞在含有 DAPT 和毒蜥外泌肽-4 的培养基中进行培养,然后移除含有 DAPT 和毒蜥外泌肽-4 的培养基,并随后将所述细胞在含有毒蜥外泌肽 1、IGF-1 和 HGF 的培养基中进行培养,来使表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞进一步分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。这个方法的一个例子在 Nature Biotechnology24,1392-1401(2006) 中公开。

[0298] 例如,可通过将表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞在含有毒蜥外泌肽 4 的培养基中进行培养,然后移除该含有毒蜥外泌肽 4 的培养基,并随后将所述细胞在含有毒蜥外泌肽 1、IGF-1 和 HGF 的培养基中进行培养,来使表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞进一步分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。该方法的一个例子在 D'Amour 等人,NatureBiotechnology,2006 中公开。

[0299] 例如,可通过将表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞在含有 DAPT 和毒蜥外泌肽 4 的培养基中进行培养,来使表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞进一步分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。该方法的一个例子在 D'Amour 等人,NatureBiotechnology,2006 中公开。

[0300] 例如,可通过将表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞在含有毒蜥外泌肽 4 的培养基中进行培养,来使表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞进一步分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。该方法的一个例子在 D'Amour 等人,NatureBiotechnology,2006 中公开。

[0301] 在本发明的一个方面,根据转让给 LifeScan, Inc. 的美国专利申请系列号 11 / 736,908 中公开的方法,通过用可抑制 Notch 信号传导途径的因子处理表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞,来使表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞进一步分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。

[0302] 在本发明的一个方面,根据转让给 LifeScan, Inc. 的美国专利申请系列号 11 /

779, 311 中公开的方法, 通过用可抑制 Notch 信号传导途径的因子处理表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞, 来使表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞进一步分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。

[0303] 在本发明的一个方面, 根据转让给 LifeScan, Inc. 的美国专利申请系列号 60 / 953, 178 中公开的方法, 通过用抑制 Notch 信号传导途径的因子处理表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞, 来使表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞进一步分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。

[0304] 在本发明的一个方面, 通过根据序列号为 60 / 990, 529 的美国专利申请中公开的方法处理表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞, 来使表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞进一步分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。

[0305] 可以将表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞用至少一种其他额外的因子进行处理, 这些因子可增强表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞的形成。作为另一种选择, 所述至少一种其他额外的因子可增强通过本发明方法形成的表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞的增殖。另外, 所述至少一种其他额外的因子可增强通过本发明方法形成的表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞形成其他细胞类型的能力, 或可改善任意其他额外分化步骤的效率。

[0306] 所述至少一种额外的因子可以是 (例如) 烟酰胺、TGF- $\beta$  家族的成员 (包括 TGF- $\beta$  1、2 和 3)、血清白蛋白、成纤维细胞生长因子家族的成员、血小板衍生生长因子 -AA 和 -BB、富血小板血浆、胰岛素生长因子 (IGF-I、II)、生长分化因子 (例如, GDF-5、-6、-8、-10、-11)、胰高血糖素样肽 -I 和 II (GLP-I 和 II)、GLP-1 和 GLP-2 模拟体、毒蜥外泌肽 -4、视黄酸、甲状旁腺激素、胰岛素、孕酮、抑酶肽、氢化可的松、乙醇胺、 $\beta$  巯基乙醇、表皮生长因子 (EGF)、胃泌素 I 和 II、铜螯合剂 (例如, 三亚乙基五胺)、毛喉素、丁酸 -Na、激活素、 $\beta$  细胞素、ITS、成头蛋白、神经突生长因子、noda1、丙戊酸、曲古抑菌素 A、丁酸钠、肝细胞生长因子 (HGF)、鞘氨醇 -1、VEGF、MG132 (EMD, CA)、N2 和 B27 添加剂 (Gibco, CA)、甾体类生物碱 (例如, 环巴胺 (EMD, CA))、角质细胞生长因子 (KGF)、Dickkopf 蛋白家族、牛垂体提取物、胰岛新生相关蛋白 (INGAP)、印第安豪猪蛋白、音猬蛋白、蛋白酶体抑制剂、notch 通路抑制剂、音猬蛋白抑制剂或它们的组合。

[0307] 所述至少一种其他额外的因子可由从胰腺细胞系 (例如 PANC-1 (ATCC No : CRL-1469)、CAPAN-1 (ATCC No : HTB-79)、BxPC-3 (ATCC No : CRL-1687)、HPAF-II (ATCC No : CRL-1997))、肝细胞系例如 HepG2 (ATCC No : HTB-8065)、肠细胞系例如 FHS74 (ATCC No : CCL-241) 获得的调理培养基提供。

[0308] 表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞的检测

[0309] 胰腺内分泌谱系特征性标志物是本领域技术人员所熟知的, 并且其他胰腺内分泌谱系特征性标志物不断被鉴别。这些标志物可用于确定根据本发明处理过的细胞是否已分化而获得胰腺内分泌谱系特征性特性。胰腺内分泌谱系特异性标志物包括一种或多种转录因子例如 NGN3、NEURO 或 ISL1 的表达。

[0310]  $\beta$  细胞谱系特征性标志物是本领域技术人员熟知的, 并且其他的  $\beta$  细胞谱系特征性标志物有待继续鉴别。这些标志物可用于确定根据本发明处理过的细胞是否已分化而获得  $\beta$  细胞谱系特征性特性。除了别的以外,  $\beta$  细胞谱系特异性特征包括一种或多种转录

因子例如 PDX1、NKX2. 2、NKX6. 1、ISL1、PAX6、PAX4、NEUROD、HNF1  $\beta$ 、HNF6、HNF3  $\beta$  或 MAFA 的表达。这些转录因子在内分泌细胞鉴别领域中已得到公认。参见例如 Edlund (Nature Reviews Genetics 3 :524-632 (2002))。

[0311] 可通过将处理过的细胞群体暴露于可特异性识别由表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞表达的蛋白质标志物的试剂 (例如抗体) 来确定分化效率。或者, 可以通过将处理过的细胞群暴露于特别地识别以下蛋白质标志物的试剂 (例如抗体) 来测定分化效率, 该标志物由表达  $\beta$  细胞谱系特征性标志物的细胞表达。

[0312] 用于评估蛋白质标志物和核酸标志物在培养的或分离的细胞中的表达的方法是本领域的标准方法。这些方法包括定量逆转录酶聚合酶链反应 (RT-PCR)、RNA 印记、原位杂交 (参见例如, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel 等人 (编辑), 2001 增刊)) 以及免疫测定法 (例如切片材料的免疫组织化学分析)、蛋白印记以及针对完整细胞中可触及的标志物的流式细胞检测分析 (FACS) (参见例如, Harlow 和 Lane, Using Antibodies :A Laboratory Manual, New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press(1998))。

[0313] 在本发明的一个方面, 通过处理后测定给定细胞培养物中胰岛素阳性细胞的百分比来确定分化的效率。在一个实施例中, 本发明方法在给定培养物中产生约 100% 的胰岛素阳性细胞。在一个替代实施例中, 本发明方法在给定培养物中产生约 90% 的胰岛素阳性细胞。在一个替代实施例中, 本发明方法在给定培养物中产生约 80% 的胰岛素阳性细胞。在一个替代实施例中, 本发明方法在给定培养物中产生约 70% 的胰岛素阳性细胞。在一个替代实施例中, 本发明方法在给定培养物中产生约 60% 的胰岛素阳性细胞。在一个替代实施例中, 本发明方法在给定培养物中产生约 50% 的胰岛素阳性细胞。在一个替代实施例中, 本发明方法在给定培养物中产生约 40% 的胰岛素阳性细胞。在一个替代实施例中, 本发明方法在给定培养物中产生约 30% 的胰岛素阳性细胞。在一个替代实施例中, 本发明方法在给定培养物中产生约 20% 的胰岛素阳性细胞。在一个替代实施例中, 本发明方法在给定培养物中产生约 10% 的胰岛素阳性细胞。在一个替代实施例中, 本发明方法在给定培养物中产生约 5% 的胰岛素阳性细胞。

[0314] 在本发明的一个方面, 通过测定葡萄糖刺激的胰岛素分泌来确定分化的效率, 胰岛素分泌可通过测量由细胞释放的 C-肽的量测定。在一个实施例中, 由本发明方法产生的细胞可产生约 1000ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中, 由本发明方法产生的细胞可产生约 900ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中, 由本发明方法产生的细胞可产生约 800ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中, 由本发明方法产生的细胞可产生约 700ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中, 由本发明方法产生的细胞可产生约 600ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中, 由本发明方法产生的细胞可产生约 500ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中, 由本发明方法产生的细胞可产生约 400ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中, 由本发明方法产生的细胞可产生约 500ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中, 由本发明方法产生的细胞可产生约 400ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中, 由本发明方法产生的细胞可产生约 300ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中, 由本发明方法产生的细胞可产生约 200ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中, 由本发明方法产生的细胞可产生约 100ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中, 由本发明方法产生的细胞可产



生约 90ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中,由本发明方法产生的细胞可产生约 80ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中,由本发明方法产生的细胞可产生约 70ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中,由本发明方法产生的细胞可产生约 60ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中,由本发明方法产生的细胞可产生约 50ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中,由本发明方法产生的细胞可产生约 40ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中,由本发明方法产生的细胞可产生约 30ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中,由本发明方法产生的细胞可产生约 20ng C-肽 / pg DNA。在一个替代实施例中,由本发明方法产生的细胞可产生约 10ng C-肽 / pg DNA。

#### [0315] 疗法

[0316] 在一个方面,本发明提供了一种用于治疗患有 1 型糖尿病,或有发展 1 型糖尿病风险的患者的方法。此方法涉及:培养多能干细胞,在体外将多能干细胞分化成  $\beta$ -细胞谱系,以及将  $\beta$ -细胞谱系的细胞植入患者体内。

[0317] 在另一个方面,本发明提供了一种用于治疗患有 2 型糖尿病,或有发展 2 型糖尿病风险的患者的方法。此方法涉及:培养多能干细胞,在体外将多能干细胞分化成  $\beta$ -细胞谱系,以及将  $\beta$ -细胞谱系的细胞植入患者体内。

[0318] 如果合适,可用有利于该植入细胞存活和功能的药剂或生物活性剂对患者进行进一步处理。除了别的以外,这些试剂可包括(例如)胰岛素、TGF- $\beta$  家族的成员(包括 TGF- $\beta$  1、2 和 3)、骨形态发生蛋白(BMP-2、-3、-4、-5、-6、-7、-11、-12 和 -13)、成纤维细胞生长因子 -1 和 -2、血小板衍生生长因子 -AA 和 -BB、富血小板血浆、胰岛素生长因子(IGF-I、II)、生长分化因子(例如,GDF-5、-6、-7、-8、-10、-15)、血管内皮细胞衍生生长因子(VEGF)、多效蛋白(pleiotrophin)、内皮素。其他药物化合物可包括(例如)烟酰胺、胰高血糖素样肽 -I (GLP-1) 和胰高血糖素样肽 -II、GLP-1 和 2 模拟体、毒蜥外泌肽 -4、视黄酸、甲状旁腺激素、MAPK 抑制剂例如美国已公布的专利申请 2004 / 0209901 和美国已公布的专利申请 2004 / 0132729 中所公开的化合物。

[0319] 可使多能干细胞在移植进接受者前分化成胰岛素生成细胞。在一个具体实施例中,在移植到受体中之前,使多能干细胞完全分化成  $\beta$ -细胞。作为另一种选择,可将多能干细胞以未分化状态或部分分化的状态移植进接受者中。可在该接受者中发生进一步分化。

[0320] 定形内胚层细胞或者胰腺内胚层细胞或者  $\beta$  细胞可作为分散细胞或形成集落,通过输注到肝门静脉中植入。作为另一种选择,可将细胞设置在生物相容性的可降解聚合物型支持物中、多孔的非可降解性装置中或可进行封装以保护其免受宿主免疫应答的破坏。可将细胞移植进接受者中的合适位置内。植入位点包括(例如)肝脏、天然的胰腺、肾包膜下空间、网膜、腹膜、浆膜下空间、肠、胃或皮下袋。

[0321] 为了增强植入细胞的进一步分化、存活率或活性,可在施用细胞之前、与其同时或之后施用额外的因子,例如生长因子、抗氧化剂或抗炎剂。在某些实施例中,利用生长因子使施用的细胞在体内分化。这些因子可由内源性细胞分泌并原位暴露于所施用的细胞。可通过本领域已知的内源生长因子或外源施用的生长因子的任意组合来诱导植入细胞进行分化。

[0322] 移植中所用的量取决于多种因素,包括患者的状况和对该疗法的响应,并且可由

本领域技术人员确定。

[0323] 在一个方面,本发明提供了一种用于治疗患有糖尿病,或有发展糖尿病风险的患者方法。本方法涉及:培养多能干细胞,在体外使培养的细胞分化成 $\beta$ -细胞谱系,以及将细胞掺入三维支撑体中。在移植进患者前,可将该细胞在该支持物上体外维持。作为另一种选择,可将包含该细胞的支持物直接移植进患者中而无需进行额外的体外培养。可任选将至少一种有利于植入细胞的存活和功能的药剂掺入该支持物中。

[0324] 适用于本发明目的的支持材料包括可用于组织修复的组织模板、导管、屏障物和贮器。具体地讲,已经在体外和体内用于生物组织重建或再生,以及用于递送趋化剂来诱导组织生长的泡沫、海绵、凝胶、水凝胶、纺织物和非织造结构形式的合成材料和天然材料适用于实践本发明的方法。参见,例如在美国专利 5,770,417、美国专利 6,022,743、美国专利 5,567,612、美国专利 5,759,830、美国专利 6,626,950、美国专利 6,534,084、美国专利 6,306,424、美国专利 6,365,149、美国专利 6,599,323、美国专利 6,656,488、美国已公布的专利申请 2004 / 0062753A1、美国专利 4,557,264 和美国专利 6,333,029 中所公开的材料。

[0325] 为了形成含有药剂的支撑体,可在形成支撑体前将药剂与聚合物溶液混合。作为另一种选择,可将药剂涂覆于制好的支持物上,优选在存在药物载体的情况下进行。药物可以液体、细分固体或任何其他合适的物理形式存在。作为另一种选择,可将赋形剂加入支持物中以改变药剂的释放速率。在一个替代实施例中,将至少一种为抗炎化合物的药物化合物掺入支持物中,例如在美国专利 6,509,369 中所公开的化合物。

[0326] 可将至少一种为抗凋亡化合物的药物化合物掺入支持物中,例如美国专利 6,793,945 中所公开的化合物。

[0327] 可将至少一种为纤维变性抑制剂的药物化合物掺入支持物中,例如美国专利 6,331,298 中所公开的化合物。

[0328] 支持物还可掺有至少一种能够增强血管生成的药物化合物,例如美国已公布的专利申请 2004 / 0220393 和美国已公布的专利申请 2004 / 0209901 中所公开的化合物。

[0329] 支持物还可掺有至少一种为免疫抑制化合物的药物化合物,例如美国已公布的专利申请 2004 / 0171623 中所公开的化合物。

[0330] 支撑体也可以掺有至少一种为生长因子的药物化合物,例如 TGF- $\beta$  家族的成员(包括 TGF- $\beta$  1、2 和 3)、骨形态发生蛋白(BMP-2、-3、-4、-5、-6、-7、-11、-12 和 -13)、成纤维细胞生长因子-1 和 -2、血小板衍生生长因子-AA 和 -BB、富血小板血浆、胰岛素生长因子(IGF-I、II)、生长分化因子(例如,GDF-5、-6、-8、-10、-15)、血管内皮细胞衍生生长因子(VEGF)、多效蛋白、内皮素等等。其他药物化合物可包括(例如)烟酰胺、缺氧诱导因子 1- $\alpha$ 、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)、GLP-1 和 GLP-2 模拟体、毒蕈外泌肽-4、nodal、成头蛋白、NGF、视黄酸、甲状旁腺激素、腱生蛋白-C、弹性蛋白原、凝血酶衍生的肽、凯萨林菌素(cathelicidin)、防御素(defensin)、层粘连蛋白、含有粘附性细胞外基质蛋白例如纤粘蛋白和玻璃粘连蛋白的细胞结合结构域和肝素结合结构域的生物肽、MAPK 抑制剂(例如在美国已公布的专利申请 2004 / 0209901 和美国已公布的专利申请 2004 / 0132729 中所公开的化合物)。

[0331] 可通过将细胞简单地沉积在该支架上来实现将本发明细胞掺入支架中。细胞可通过简单扩散进入支架中(J. Pediatr. Surg. 23(1Pt2):3-9(1988))。已经发展了若干其

他方法来增强细胞接种的效率。例如,已经将转瓶用于将软骨细胞接种于聚乙醇酸支架上(Biotechnol. Prog. 14(2):193-202(1998))。用于细胞接种另一种方法是利用离心,这种离心产生最小的应力给接种的细胞并增强接种效率。例如, Yang 等人开发了一种细胞接种方法(J. Biomed. Mater. Res. 55(3):379-86(2001)),称为离心细胞固定(Centrifugational Cell Immobilization, CCI)。

[0332] 本发明通过(但不限于)以下实例进一步说明。

[0333] 实例

[0334] 将本发明的具体实施方式部分分成以下几个分部分,来描述或举例说明本发明的某些特征、实施例或应用,这是为了使公开内容清楚起见,并非限制本发明。

[0335] 实例 1

[0336] 人胚胎干细胞培养物

[0337] 从 WiCell Research Institute, Inc., (Madison, WI) 获得人胚胎干细胞系 H1、H7 和 H9,并根据该来源公司提供的说明进行培养。也可将人胚胎干细胞接种于包被有以 1:30 稀释的低生长因子 MATRIGEL™(BD Biosciences; 目录号 356231) 的板上并在补充有 8ng/ml 的 bFGF(R&D Systems; 目录号 233-FB) 的 MEF 调理培养基中培养。用胶原酶 IV(Invitrogen / GIBCO; 目录号 17104-019)、分散酶(Invitrogen; 目录号 17105-041) 或释放酶 C1 酶(Roche; 目录号 11814435001) 将在 MATRIGEL™上培养的细胞作为簇进行常规传代。在某些情况下,用 ACCUTASE(Sigma; 目录号 A6964) 将细胞作为单细胞进行传代。

[0338] 将在这些实例中使用的人胚胎干细胞维持在未分化、多能状态,平均每四天传代一次。传代通过这样进行:使细胞培养物在 37℃ 下暴露于胶原酶溶液(1 或 10mg/ml; Sigma-Aldrich) 10 至 30 分钟,然后用移液管头小心刮擦以回收细胞簇。让细胞簇借重力沉淀下来,然后进行洗涤以除去残余的胶原酶。将细胞簇以 1:3 的比例分传以进行例行维持培养,或以 1:1 比例分传以进行后面的测定。将所有人胚胎干细胞系以小于 50 的传代数进行维持,并例行评估核型表型是否正常和支原体污染是否存在。

[0339] 实例 2

[0340] 表达定形内胚层谱系特征性标志物细胞形成的生物测定法

[0341] 激活素 A 是各种细胞类型分化(包括胚胎干细胞分化成定形内胚层的分化)的重要介体。当用激活素 A 和 Wnt3a 的组合处理人胚胎干细胞时,代表定形内胚层的多种基因上调。测量人胚胎干细胞中的这种分化的生物测定法以小型化设计适于用于筛选目的 96 孔板。利用采用市售激活素 A 和 Wnt3a 重组蛋白的处理并测量被视为定形内胚层的代表性标志物的转录因子 SOX17 的蛋白质表达来完成验证。

[0342] 活细胞分析:简而言之,将 H1 人胚胎干细胞簇在低生长因子 MATRIGEL™(Invitrogen; 目录号 356231) 包被的组织培养塑料上培养。细胞通过以下方式来传代:利用胶原酶(Invitrogen; 目录号 17104-019) 处理并小心刮擦、洗涤以除去残余酶,并以 1:1(表面面积)的比例接种于低生长因子 MATRIGEL™包被的 96 孔黑色板(Packard ViewPlates; Perkin Elmer; 目录号 6005182) 上。让细胞成簇贴附,然后在 1 至 3 天时间内恢复对数期生长,每天用 100 μl / 孔的补充有 8ng/ml 的 bFGF(R&D Systems; 目录号 233-FB) 的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF) 调理培养基饲养。

[0343] 在测定法的最开始将各板的孔在 PBS(Invitrogen; 目录号 14190) 中洗涤两次,

然后将 DMEM :F12 基础培养基 (Invitrogen ; 目录号 11330-032) 中的测试样品的等分试样 (100  $\mu$  l) 添加至各孔。测试条件一式三份进行, 在总共四天测定期间每隔一天通过从各孔抽吸出培养基并用测试样品替换培养基来进行饲养。在测定法的第一天和第二天, 将添加至测定孔的测试样品稀释于具有 0.5% FCS (HyClone ; 目录号 SH30070.03) 和 20ng / ml Wnt3a (R&D Systems ; 目录号 1324-WN) 的 DMEM :F12 中。在测定法的第三天和第四天, 将添加至测定孔的测试样品稀释于具有 2% FCS 但没有任何 Wnt3a 的 DMEM :F12 中。阳性对照样品由如下组成 : 在整个测定法中以 100ng / ml 的浓度加入的重组人激活素 A (PeproTech ; 目录号 120-14) 和在第 1 天和第 2 天加入到 Wnt3a (20ng / ml)。阴性对照样品省略了用激活素 A 和 Wnt3a 两者进行的处理。

[0344] 高内涵分析 : 在四天的培养结束时, 将测试平板用 PBS (Invitrogen ; 目录号 14190) 洗涤两次, 用 4% 多聚甲醛 (Alexis Biochemical ; 目录号 ALX-350-011) 在室温下固定 20 分钟, 然后用 PBS 洗涤三次并用 0.5% Triton X-100 (Sigma ; 目录号 T8760-2) 在室温下透化处理 20 分钟。将细胞再用 PBS 洗涤三次, 然后用 4% 鸡血清 (Invitrogen ; 目录号 16110082) 在 PBS 中于室温下封闭 30 分钟。将一抗 (山羊抗人 SOX17 ; R&D Systems ; 目录号 AF1924) 在 4% 鸡血清中以 1 : 100 稀释, 在室温下加至每个孔保持一小时。将 Alexa Fluor488 缀合的二抗 (鸡抗山羊 IgG ; Molecular Probes ; 目录号 AZ1467) 在 PBS 中以 1 : 200 稀释, 并在用 PBS 洗涤三次后加至每个样品孔。为了对细胞核进行复染, 在室温下加入 4  $\mu$ g / ml Hoechst33342 (Invitrogen ; 目录号 H3570) 保持十分钟。将板用 PBS 洗涤一次, 并保留在 100  $\mu$  l / 孔 PBS 中以进行成像。

[0345] 用 IN Cell Analyzer1000 细胞分析仪 (GE Healthcare) 进行成像, 对于用 Hoechst33342 和 Alexa Fluor488 染色的细胞采用 51008bs 二向分色镜。根据阳性对照孔并根据单独用二抗染色的无处理阴性对照孔来优化曝光时间。每孔获取 15 个视野的图像, 以补偿生物鉴定和后续染色程序中的任何细胞损失。用 IN Cell Developer Toolbox1.7 (GE Healthcare) 软件从每个孔获得总细胞数目和总 SOX17 强度的测量值。基于灰阶水平 (基线范围 100-300) 和核大小确定细胞核的分裂情况。计算每个重复数据集的平均值和标准偏差。总 SOX17 蛋白表达记录为总强度或累积强度, 该强度定义为细胞总荧光乘以细胞面积。基于灰阶范围在 200 至 3500 之间的接受标准来去除背景。通过将每个孔的总强度除以阳性对照的平均总强度, 将总强度数据进行归一化。对于每个重复组, 对归一化的数据计算平均值和标准偏差。

[0346] 图 1 示出了对该筛选测定法的验证, 检验了市售激活素 A (PeproTech) 的两倍稀释曲线并同时测量了细胞数 (图 1A) 和 SOX17 强度 (图 1B) 两者。通常在 100-200ng / ml 范围内观察到激活素 A 对诱导 SOX17 表达的最佳效果, 其中  $EC_{50}$  为 30-50ng / ml。在测定法的第一天和第二天在处理中忽略 Wnt3a 不能产生可测量的 SOX17 表达 (图 1B, 白色柱条)。没有激活素 A 也不能产生 SOX17 表达 (图 1B)。

### [0347] 实例 3

[0348] 初步筛选 : 在没有激活素 A 的情况下本发明化合物对人胚胎干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的作用

[0349] 多能干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞通过一系列受体-配体相互作用来介导, 所述受体-配体相互作用继而激活受体激酶, 从而引起下游底物

的磷酸化和核转运,最终调控特定靶基因的表达。在一些细胞类型中这些信号级联放大的最佳活化可能需要抑制相对的默认通路。在其他情况下,涉及较大激酶家族的备选成员的冗余通路可能部分代替一种或多种信号转导分子。在其他情况下,经典和非经典通路可能因不同引发刺激物而分道,但可能会引起类似的功能结果。

[0350] 基于细胞的功能筛选是一种鉴别新靶点的方法并且是可影响特定细胞响应的方法。一种非常有效的方法涉及一系列的迭代筛选,其中一次筛选的先导物(lead)或命中物(hit)被并入进后续筛选。或者,将一系列的不同变量以组合方式(例如,生长因子与激酶抑制剂组合)并入,以鉴别对细胞分化的新作用。在这种情况下,对包括苯胺-吡啶并三嗪、环苯胺-吡啶并三嗪及其合成中的中间结构的小分子库检验其在人胚胎干细胞的定形内胚层分化期间重要的特性,尤其是检验其在低血清且没有生长因子激活素A的情况下在“第一”分化步骤结束时保持或提高细胞数的作用。

#### [0351] 筛选测定法

[0352] 细胞测定接种:简而言之,将H1人胚胎干细胞簇在低生长因子MATRIGEL™(Invitrogen;目录号356231)包被的组织培养塑料上培养。细胞通过以下方式来传代:利用胶原酶(Invitrogen;目录号17104-019)处理并小心刮擦、洗涤以除去残余酶,并以1:1(表面面积)的比例使用100 μl / 孔的体积在低生长因子MATRIGEL™包被的96孔黑色板(Packard ViewPlates;PerkinElmer;目录号6005182)上均匀分散接种。让细胞成簇贴附,然后在1至3天时间内恢复对数期生长,每天用补充有8ng / ml的bFGF(R&D Systems;目录号233-FB)的MEF调理培养基饲养。在整个测定法期间,将板在加湿箱中维持在37°C、5% CO<sub>2</sub>下。

[0353] 化合物和测定法的准备:将所测试的化合物制备为96孔板形式的5mM母液供用,其溶解于100% DMSO(Sigma;目录号D2650)并保存于-80°C下。将库化合物在50mM HEPES(Invitrogen;目录号15630-080)、20% DMSO中进一步稀释至0.2mM的中间浓度并保存于4°C下。测试条件一式三份进行,在四天测定期间每隔一天供料。如下开始初级筛选测定法:从每个孔抽吸掉培养基,然后在PBS(Invitrogen;目录号14190)中洗涤三次以除去残余的生长因子和血清。在测定法的第一天,重新添加200ml / 孔的测试体积,其含有补充有0.5% FCS(HyClone;目录号SH30070.03)和20ng / ml Wnt3a(R&D Systems;目录号1324-WN)加2.5mM测试化合物的DMEM:F12基础培养基(Invitrogen;目录号11330-032)。在测定法的第三天,重新添加200ml每孔的测试体积,其含有补充有2% FCS加2.5mM测试化合物但没有Wnt3a的DMEM:F12基础培养基。阳性对照样品含有补充有FCS的相同基础培养基,在整个四天的测定法期间用100ng / ml重组人激活素A(PeproTech;目录号120-14)代替测试化合物,以及在仅在第1天和第2天添加Wnt3a(20ng / ml)。阴性对照样品含有补充有FCS的DMEM:F12基础培养基,在第1天和第2天添加Wnt3a,但省去激活素A。

[0354] 高内涵分析:在四天的培养结束时,将测试平板用PBS(Invitrogen;目录号14190)洗涤两次,用4%多聚甲醛(Alexis Biochemical;目录号ALX-350-011)在室温下固定20分钟,然后用PBS洗涤三次并用0.5% Triton X-100(Sigma;目录号T8760-2)在室温下透化处理20分钟。将细胞再用PBS洗涤三次,然后用4%鸡血清(Invitrogen;目录号16110082)在PBS中于室温下封闭30分钟。将一抗(山羊抗人SOX17;R&D Systems;目录号AF1924)在4%鸡血清中以1:100稀释,在室温下加至每个孔保持一小时。将Alexa

Fluor488 缀合的二抗 (鸡抗山羊 IgG ;Molecular Probes ;目录号 AZ1467) 在 PBS 中以 1 : 200 稀释,并在用 PBS 洗涤三次后加至每个样品孔。为了对细胞核进行复染,在室温下加入 4  $\mu$ g / ml Hoechst33342 (Invitrogen ;目录号 H3570) 保持十分钟。将板用 PBS 洗涤一次,并保留在 100  $\mu$ l / 孔 PBS 中以进行成像。

[0355] 用 1N Cell Analyzer1000 细胞分析仪 (GE Healthcare) 进行成像,对于用 Hoechst33342 和 Alexa Fluor488 染色的细胞采用 51008bs 二向分色镜。根据阳性对照孔并根据单独用二抗染色的无处理阴性对照孔来优化曝光时间。每孔获取 15 个视野的图像,以补偿生物鉴定和后续染色程序中的任何细胞损失。用 IN Cell Developer Toolbox1.7 (GE Healthcare) 软件从每个孔获得总细胞数目和总 SOX17 强度的测量值。基于灰阶水平 (基线范围 100-300) 和核大小确定细胞核的分裂情况。计算每个重复数据集的平均值和标准偏差。总 SOX17 蛋白表达记录为总强度或累积强度,该强度定义为细胞总荧光乘以细胞面积。基于灰阶范围在 200 至 3500 之间的接受标准来去除背景。通过将每个孔的总强度除以阳性对照的平均总强度,将总强度数据进行归一化。对于每个重复组,对归一化的数据计算平均值和标准偏差。

[0356] 表 1 示出了对所测化合物的初步筛选的结果,显示其在不存在激活素 A 的情况下对人胚胎干细胞向表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的分化的作用。结果包括对细胞数和 SOX17 强度两者的定量测量,其中对一式三份重复孔的各个数据点求平均值,并使用各孔中相同的视野针对各参数来分析各个数据点。转录因子 SOX17 的表达被视为可指示定形内胚层分化。从八个 96 孔板获得初步筛选结果。板与板的变化性由于在各板上包含单独的阳性和阴性对照而减少。将结果进行归一化并表示为阳性对照的百分比。重点放在测定法结束时细胞数的保持或扩增。

[0357] 表 2 列出了 27 种化合物的子集及其从初步筛选得到的分析结果,其中尽管在筛选测定法中没有激活素 A,但这些命中物似乎将细胞数保持在等于或优于阳性对照的水平。

[0358] 在一些情况下,在没有激活素 A 的情况下诱导了 SOX17 的表达,例如,环苯胺 - 吡啶并三嗪化合物 35 和化合物 22。

[0359] 选择表 2 所示的化合物,用以进一步评估在不存在激活素 A 的情况下对人胚胎干细胞向表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化的作用。

#### [0360] 实例 4

[0361] 二次筛选 : 在没有激活素 A 的情况下本发明化合物与 EGF / FGF4 对人胚胎干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的作用

[0362] 恒定量的 Wnt3a 的情况下激活素 A 的滴定曲线显示在 DE 分化期间的至少两种作用 :1) 维持细胞数或防止细胞损失 ;以及 2) 诱导 DE 的标志物,例如 SOX17 表达 (实例 2)。实例 3 的初步筛选鉴定了相对于单独添加激活素 A/Wnt3a 可在测定法中维持类似的或改善的细胞数的化合物。进行二次筛选测定以评估所鉴定的化合物与其他生长因子 (特别是 EGF 和 FGF4) 组合对定形内胚层生成的作用。

[0363] 细胞测定接种 :将 H1 人胚胎干细胞簇在低生长因子 MATRIGEL™ (Invitrogen ; 目录号 356231) 包被的组织培养塑料上培养。细胞通过以下方式传代 :利用胶原酶 (Invitrogen ;目录号 17104-019) 处理并小心刮擦、洗涤以除去残余酶,并以 1 : 1 (表面积) 的比例使用 100  $\mu$ l / 孔的体积在低生长因子 MATRIGEL™ 包被的 96 孔黑色板 (Packard

ViewPlates ;PerkinElmer ;目录号 6005182) 上均匀分散接种。让细胞成簇贴附,然后在 1 至 3 天时间内恢复对数期生长,每天用补充有 8ng / ml 的 bFGF(R&D Systems ;目录号 233-FB) 的 MEF 调理培养基饲养。在整个测定法期间,将板在加湿箱中维持在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 下。

[0364] 化合物和生长因子的准备:EGF(R&D Systems ;目录号 236-EG) 和 FGF4(R&D Systems ;目录号 235-F4) 的母液浓度为 250ng / ml,各溶于具有 0.1% BSA(Sigma ;目录号 A7888) 的 PBS 中。将化合物制备为 96 孔板形式的 5mM 母液供用,其溶于 100% DMSO(Sigma ;目录号 D2650) 中并保存于 -80℃ 下。将化合物在 50mM HEPES(Invitrogen ;目录号 15630-080)、20% DMSO 中进一步稀释至 0.2mM 的中间浓度并保存于 4℃ 下。所有生长因子和抑制剂在深孔 96 孔聚丙烯板中制备,在测定法开始时在 DMEM :F12 基础培养基中稀释至 5x 中间母液并保存于 4℃ 下。

[0365] 进行二次筛选测定法,重复检验三次并在四天测试时间段内隔天供料。如下开始测定:从每个孔抽吸掉培养基,然后在 PBS 中洗涤三次以除去残余的生长因子和血清。每孔重新添加含有 DMEM :F12 基础培养基 (Invitrogen ;目录号 11330-032) 的 80ml 的测试体积,所述基础培养基补充有 0.625% FCS(HyClone ;目录号 SH30070.03)、25ng / ml Wnt3a(R&D Systems) 和 3.125 μM 化合物加 20 μl 生长因子的 5x 母液,以在该测定法中得到 0.5% FCS、20ng / ml Wnt3a 和 2.5 μM 化合物加 50ng / ml EGF 和 50ng / ml FGF4 的最终浓度。阳性对照孔 (100μl / 孔) 装有补充有 0.5% FCS、20ng / ml Wnt3a 和 100ng / ml 激活素 A 的相同基础培养基。阴性对照孔 (100 μl / 孔) 装有补充有 0.5% FCS 和 20ng / ml Wnt3a 但省去激活素 A 的相同基础培养基。

[0366] 在第 3 天,抽吸孔并每孔供给 80ml DMEM :F12 基础培养基,所述基础培养基补充有 2.5% FCS(HyClone) 和 3.125 μM 化合物加 20 μl 生长因子的 5x 母液,以在该测定法中得到 2% FCS 和 2.5mM 化合物 (省去 Wnt3a) 加 50ng / ml EGF 和 FGF4 的最终浓度。阳性对照孔 (100 μl / 孔) 装有补充有 2% FCS 和 100ng / ml 激活素 A 但省去 Wnt3a 的相同基础培养基。阴性对照孔 (100 μl / 孔) 装有补充有 2% FCS 但省去激活素 A 和 Wnt3a 两者的相同基础培养基。

[0367] 高内涵分析:在四天的培养结束时,用 PBS 洗涤测试平板两次,用 4% 多聚甲醛 (Alexis Biochemical ;目录号 ALX-350-011) 在室温下固定 20 分钟,然后用 PBS 洗涤三次并用 0.5% Triton X-100(Sigma ;目录号 T8760-2) 在室温下透化处理 20 分钟。将细胞再用 PBS 洗涤三次,然后用 4% 鸡血清 (Invitrogen ;目录号 16110082) 在 PBS 中于室温下封闭 30 分钟。将一抗 (山羊抗人 SOX17 ;R&D Systems ;目录号 AF1924) 在 4% 鸡血清中以 1 : 100 稀释,在室温下加至每个孔保持一小时。将 Alexa Fluor488 缀合的二抗 (鸡抗山羊 IgG ;Molecular Probes ;目录号 AZ1467) 在 PBS 中以 1 : 200 稀释,并在用 PBS 洗涤三次后加至每个样品孔。为了对细胞核进行复染,在室温下加入 4 μg / ml Hoechst33342(Invitrogen ;目录号 H3570) 保持十分钟。将板用 PBS 洗涤一次,并保留在 100 μl / 孔 PBS 中以进行成像。

[0368] 用 IN Cell Analyzer1000 细胞分析仪 (GE Healthcare) 进行成像,对于用 Hoechst33342 和 Alexa Fluor488 染色的细胞采用 51008bs 二向分色镜。根据阳性对照孔并根据单独用二抗染色的无处理阴性对照孔来优化曝光时间。每孔获取 15 个视野的图像,以

补偿生物鉴定和后续染色程序中的任何细胞损失。用 IN Cell Developer Toolbox1.7(GE Healthcare) 软件从每个孔获得总细胞数目和总 SOX17 强度的测量值。基于灰阶水平(基线范围 100-300)和核大小确定细胞核的分裂情况。计算每个重复数据集的平均值和标准偏差。总 SOX17 蛋白表达记录为总强度或累积强度,该强度定义为细胞总荧光乘以细胞面积。基于灰阶范围在 200 至 3500 之间的接受标准来去除背景。通过将每个孔的总强度除以阳性对照的平均总强度,将总强度数据进行归一化。对于每个重复组,对归一化的数据计算平均值和标准偏差。

[0369] 表 3A 示出了所检测的两种生长因子 EGF 和 FGF4(各 50ng / ml)与表 2 所示苯胺-吡啶并三嗪化合物结合对人胚胎干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的作用的结果。结果以对 SOX17 表达的最佳效果降序排列。尽管这些化合物对 SOX17 表达的作用被认为相对于激活素 A/Wnt3a 阳性对照较弱,但对这些化合物中一些响应被认为是显著的。例如,在测定期间就保持较高的每孔细胞数目而言,所述化合物的选择看起来具有独特的性质,大概是通过防止细胞凋亡或通过调节细胞周期来实现。另外,这些化合物看起来与 EGF 和 FGF4 协同作用而促进适度的定形内胚层分化,这通过 SOX17 表达测量。最有效的化合物在表 3B 中列出。在该测定法中与 EGF 和 FGF4 结合检验的其他化合物对诱导 SOX17 表达无效,但可在测定中保持细胞数(如,化合物 90:85%细胞数;2% SOX17 表达)。

#### [0370] 实例 5

[0371] 在没有激活素 A 的情况下本发明化合物与其他因子结合对人胚胎干细胞向表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化的作用

[0372] 进行二次测试以评价本发明化合物与其他各种从文献已知可调控定形内胚层分化的生长因子或化合物结合的作用。

[0373] 细胞测定接种:将 H1 人胚胎干细胞簇在低生长因子 MATRIGEL™(Invitrogen; 目录号 356231) 包被的组织培养塑料上培养。细胞通过以下方式来传代:利用胶原酶(Invitrogen; 目录号 17104-019) 处理并小心刮擦、洗涤以除去残余酶,并以 1:1(表面积)的比例使用 100  $\mu$ l / 孔的体积在低生长因子 MATRIGEL™包被的 96 孔黑色板(Packard ViewPlates; PerkinElmer; 目录号 6005182) 上均匀分散接种。让细胞成簇贴附,然后在 1 至 3 天时间内恢复对数期生长,每天用补充有 8ng / ml 的 bFGF(R&D Systems; 目录号 233-FB) 的 MEF 调理培养基饲养。在整个测定法期间,将板在加湿箱中维持在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下。

[0374] 化合物和生长因子的准备:从 R&D Systems 购得的生长因子母液为 EGF(目录号 236-EG)、FGF4(目录号 235-F4)、PDGF-A(目录号 221-AA)、PDGF-B(目录号 220-BB)、PDGF-C(目录号 1687-CC)、PDGF-D(目录号 1159-SB)、PDGF-A / B(目录号 222-AB)、VEGF(目录号 293-VE)、BMP-1(目录号 1927-ZN)、BMP-2(目录号 355-BM)、BMP-4(目录号 314-BP)、BMP-6(目录号 507-BP)、BMP-7(目录号 222-AB)、BMP-2 / 7(目录号 3229-BM)。所检测的其他试剂如下购得:BMP-7(Sigma; 目录号 B1434)、LY294002(Cayman; 目录号 70920)、PD98059、U0126、U0124(EMD Biosciences; 目录号 453710)、蝇蕈醇(Tocris; 目录号 0289)、荷包牡丹碱(biuculline)(Tocris; 目录号 0130)、丁酸钠(Sigma; 目录号 B5887)。将所有生长因子溶于具有 0.1% BSA(Sigma; 目录号 A7888) 的 PBS 中并冷冻保存于 -80°C 下。将



小分子溶于 100% DMSO(Sigma ;目录号 D2650) 中并冷冻保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  下。将化合物制备为 96 孔板形式的 5mM 母液供用,其溶于 100% DMSO 中并保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  下。将本发明的化合物在 50mM HEPES(Invitrogen ;目录号 15630-080)、20% DMSO 中进一步稀释至 0.2mM 的中间浓度并保存于  $4^{\circ}\text{C}$  下。所有生长因子和抑制剂在深孔 96 孔聚丙烯板中制备,在测定法开始时在 DMEM :F12 基础培养基中稀释至 5x 中间母液并保存于  $4^{\circ}\text{C}$  下。

[0375] 进行二次筛选测定法,重复检验三次并在四天测试时间段内隔天供料。如下开始测定:从每个孔抽吸掉培养基,然后在 PBS 中洗涤三次以除去残余的生长因子和血清。每孔重新添加含有 DMEM :F12 基础培养基 (Invitrogen ;目录号 11330-032) 的  $80\ \mu\text{l}$  的测试体积,所述基础培养基补充有 0.625% FCS(HyClone ;目录号 SH30070.03)、25ng / ml Wnt3a(R&D Systems) 和  $3.125\ \mu\text{M}$  化合物加 20ml 生长因子或小分子的 5x 母液,以得到 0.5% FCS、20ng / ml Wnt3a 和  $2.5\ \mu\text{M}$  化合物的最终浓度。所有其余的生长因子以 50ng / ml 的最终测定浓度进行测试 (EGF、FGF4、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、PDGF-D、PDGF-A / B、VEGF、BMP-1、BMP-2、BMP-4、BMP-6、BMP-7、BMP-2 / 7)。所检测的小分子的最终测定浓度如下:蝇蕈醇 ( $20\ \mu\text{M}$ )、PD98059 ( $1\ \mu\text{M}$ )、LY294002 (2.5mM)、U0124 ( $1\ \mu\text{M}$ )、U0126 ( $1\ \mu\text{M}$ )、丁酸钠 (0.5mM)。阳性对照孔 ( $100\ \mu\text{l}$  / 孔) 装有补充有 0.5% FCS、20ng / ml Wnt3a 和 100ng / ml 激活素 A 的相同基础培养基。阴性对照孔 ( $100\ \mu\text{l}$  / 孔) 装有补充有 0.5% FCS 和 20ng / ml Wnt3a 但省去激活素 A 的相同基础培养基。

[0376] 在第 3 天,抽吸孔并每孔供给  $80\ \mu\text{l}$  DMEM :F12 基础培养基,所述基础培养基补充有 2.5% FCS(HyClone) 和  $3.125\ \mu\text{M}$  环苯胺-吡啶并三嗪化合物加 20ml 生长因子或小分子的 5x 母液,以产生 2% FCS 和  $2.5\ \mu\text{M}$  化合物(省去 Wnt3a) 的最终浓度以及在第一天所标明的所有其余生长因子或小分子的最终浓度。阳性对照孔 ( $100\ \mu\text{l}$  / 孔) 装有补充有 2% FCS 和 100ng / ml 激活素 A 但省去 Wnt3a 的相同基础培养基。阴性对照孔 ( $100\ \mu\text{l}$  / 孔) 装有补充有 2% FCS 但省去激活素 A 和 Wnt3a 两者的相同基础培养基。

[0377] 高内涵分析:在四天的培养结束时,用 PBS 洗涤测试平板两次,用 4% 多聚甲醛 (Alexis Biochemical ;目录号 ALX-350-011) 在室温下固定 20 分钟,然后用 PBS 洗涤三次并用 0.5% Triton X-100(Sigma ;目录号 T8760-2) 在室温下透化处理 20 分钟。将细胞再用 PBS 洗涤三次,然后用 4% 鸡血清 (Invitrogen ;目录号 16110082) 在 PBS 中于室温下封闭 30 分钟。将一抗(山羊抗人 SOX17 ;R&D Systems ;目录号 AF1924) 在 4% 鸡血清中以 1 : 100 稀释,在室温下加至每个孔保持一小时。将 Alexa Fluor 488 缀合的二抗(鸡抗山羊 IgG ;Molecular Probes ;目录号 AZ1467) 在 PBS 中以 1 : 200 稀释,并在用 PBS 洗涤三次后加至每个样品孔。为了对细胞核进行复染,在室温下加入  $4\ \mu\text{g}$  / ml Hoechst 33342(Invitrogen ;目录号 H3570) 保持十分钟。将板用 PBS 洗涤一次,并保留在  $100\ \mu\text{l}$  / 孔 PBS 中以进行成像。

[0378] 用 IN Cell Analyzer 1000 细胞分析仪 (GE Healthcare) 进行成像,对于用 Hoechst33342 和 Alexa Fluor488 染色的细胞采用 51008bs 二向分色镜。根据阳性对照孔并根据单独用二抗染色的无处理阴性对照孔来优化曝光时间。每孔获取 15 个视野的图像,以补偿生物鉴定和后续染色程序中的任何细胞损失。用 IN Cell Developer Toolbox1.7 (GE Healthcare) 软件从每个孔获得总细胞数目和总 SOX17 强度的测量值。基于灰阶水平(基线范围 100-300) 和核大小确定细胞核的分裂情况。计算每个重复数据集的平均值和标准

偏差。总 SOX17 蛋白表达记录为总强度或累积强度,该强度定义为细胞总荧光乘以细胞面积。基于灰阶范围在 200 至 3500 之间的接受标准来去除背景。通过将每个孔的总强度除以阳性对照的平均总强度,将总强度数据进行归一化。对于每个重复组,对归一化的数据计算平均值和标准偏差。

[0379] 表 4 示出了在用本发明化合物与各生长因子或其他小分子结合处理后人胚胎干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的结果。通常, BMP 家族 (BMP-1、BMP-2、BMP-4、BMP-6、BMP-7、BMP-2 / 7) 的成员抑制 SOX17 表达或对其作用可忽略不计。在该测定法中检测的大部分小分子酶抑制剂 (LY294002、PD98059、U0126、U0124、丁酸钠) 也是如此。然而, PDGF 家族 (PDGF-A、-AB、-C 和 -D) 的一些成员导致 SOX17 表达增加 (激活素 A/Wnt3a 对照的 10-25%)。显示 SOX17 表达类似增加的其他生长因子包括 EGF (34%)、VEGF (18%) 和 FGF4 (17%), 但 FGF4 不能支持细胞数的保持。与化合物 35 结合检测的小分子蝇蕈醇 (GABA<sub>A</sub>受体激动剂) 也导致 SOX17 表达适度增加; GABA<sub>A</sub>拮抗剂荷包牡丹碱对 SOX17 表达没有作用。选择 EGF、FGF4、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-AB、PDGF-C 和 PDGF-D 及蝇蕈醇用以在定形内胚层分化期间另行评价。

#### [0380] 实例 6

[0381] 在没有激活素 A 的情况下本发明化合物与其他因子结合对人胚胎干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的作用

[0382] 进行二次测定以评价不同化合物与其他各试剂的组合对定形内胚层分化的作用。选择用于本次筛选的其他试剂先前已显示在定形内胚层形成有适度提高, 如用化合物 17 所测试以及如表 5 所指明的。在此筛选中, 更广泛的一组化合物与这些试剂一起以单独成对比较或合并组合来评价。

[0383] 细胞测定接种: 将 H1 人胚胎干细胞簇在低生长因子 MATRIGEL™ (Invitrogen; 目录号 356231) 包被的组织培养塑料上培养。细胞通过以下方式传代: 利用胶原酶 (Invitrogen; 目录号 17104-019) 处理并小心刮擦、洗涤以除去残余酶, 并以 1 : 1 (表面积) 的比例使用 100 μl / 孔的体积在低生长因子 MATRIGEL™ 包被的 96 孔黑色板 (Packard ViewPlates; PerkinElmer; 目录号 6005182) 上均匀分散接种。让细胞成簇贴附, 然后在 1 至 3 天时间内恢复对数期生长, 每天用补充有 8ng / ml 的 bFGF (R&D Systems; 目录号 233-FB) 的 MEF 调理培养基饲养。在整个测定法期间, 将板在加湿箱中维持在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下。

[0384] 化合物和生长因子的准备: 从 R&D Systems 购得的生长因子母液是 EGF (目录号 236-EG)、FGF4 (目录号 235-F4)、PDGF-A (目录号 221-AA)、PDGF-D (目录号 1159-SB)、PDGF-A / B (目录号 222-AB) 和 VEGF (目录号 293-VE)。蝇蕈醇从 Tocris 购得 (目录号 0289)。将所有生长因子溶于具有 0.1% BSA (Sigma; 目录号 A7888) 的 PBS 并冷冻保存于 -80°C 下。将蝇蕈醇溶于 100% DMSO (Sigma; 目录号 D2650), 并冷冻保存于 -80°C 下。将化合物制备为 96 孔板形式的 5mM 母液供用, 其溶于 100% DMSO 中并保存于 -80°C 下。将化合物在 50mM HEPES (Invitrogen; 目录号 15630-080)、20% DMSO 中进一步稀释至 0.21BM 的中间浓度并保存于 4°C 下。所有生长因子和抑制剂在深孔 96 孔聚丙烯板中制备, 在测定法开始时在 DMEM : F12 基础培养基中稀释至 5x 中间母液并保存于 4°C 下。

[0385] 进行二次筛选测定法, 重复检验三次并在四天测试时间段内隔天供料。如下开始

测定：从每个孔抽吸掉培养基，然后在 PBS 中洗涤三次以除去残余的生长因子和血清。每孔重新添加含有 DMEM:F12 基础培养基 (Invitrogen；目录号 11330-032) 的 80  $\mu$ l 的测试体积，所述基础培养基补充有 0.625% FCS (HyClone；目录号 SH30070.03)、25ng/ml Wnt3a (R&D Systems) 和 3.125  $\mu$ M 化合物加 20  $\mu$ l 生长因子或小分子的 5x 母液，以产生 0.5% FCS、20ng/ml Wnt3a 和 2.5  $\mu$ M 的最终浓度。将所有其余的生长因子以 50ng/ml 的最终测定浓度测试 (EGF、FGF4、PDGF-A、PDGF-A / B、VEGF)。蝇蕈醇的最终测定浓度为 20  $\mu$ M。阳性对照孔 (100  $\mu$ l / 孔) 装有补充有 0.5% FCS、20ng/ml Wnt3a 和 100ng/ml 激活素 A 的相同基础培养基。阴性对照孔 (100  $\mu$ l / 孔) 装有补充有 0.5% FCS 和 20ng/ml Wnt3a 但省去激活素 A 的相同基础培养基。

[0386] 在第 3 天，抽吸孔并每孔供给 80  $\mu$ l DMEM:F12 基础培养基饲养，所述基础培养基补充有 2.5% FCS (HyClone) 和 3.125  $\mu$ M 化合物加 20  $\mu$ l 生长因子或小分子的 5x 母液，以产生 2% FCS 和 2.5  $\mu$ M 化合物 (省去 Wnt3a) 的最终浓度以及在第一天所标明的所有其余生长因子或小分子最终浓度。阳性对照孔 (100  $\mu$ l / 孔) 装有补充有 2% FCS 和 100ng/ml 激活素 A 但省去 Wnt3a 的相同基础培养基。阴性对照孔 (100  $\mu$ l / 孔) 装有补充有 2% FCS 但省去激活素 A 和 Wnt3a 两者的相同基础培养基。

[0387] 高内涵分析：在四天的培养结束时，用 PBS 洗涤测试平板两次，用 4% 多聚甲醛 (Alexis Biochemical；目录号 ALX-350-011) 在室温下固定 20 分钟，然后用 PBS 洗涤三次并用 0.5% Triton X-100 (Sigma；目录号 T8760-2) 在室温下透化处理 20 分钟。将细胞再用 PBS 洗涤三次，然后用 4% 鸡血清 (Invitrogen；目录号 16110082) 在 PBS 中于室温下封闭 30 分钟。将一抗 (山羊抗人 SOX17；R&D Systems；目录号 AF1924) 在 4% 鸡血清中以 1 : 100 稀释，在室温下加至每个孔保持一小时。将 Alexa Fluor488 缀合的二抗 (鸡抗山羊 IgG；Molecular Probes；目录号 AZ1467) 在 PBS 中以 1 : 200 稀释，并在用 PBS 洗涤三次后加至每个样品孔。为了对细胞核进行复染，在室温下加入 4  $\mu$ g/ml Hoechst33342 (Invitrogen；目录号 H3570) 保持十分钟。将板用 PBS 洗涤一次，并保留在 100  $\mu$ l / 孔 PBS 中以进行成像。

[0388] 用 IN Cell Analyzer1000 细胞分析仪 (GE Healthcare) 进行成像，对于用 Hoechst33342 和 Alexa Fluor488 染色的细胞采用 51008bs 二向分色镜。根据阳性对照孔并根据单独用二抗染色的无处理阴性对照孔来优化曝光时间。每孔获取 15 个视野的图像，以补偿生物鉴定和后续染色程序中的任何细胞损失。用 IN Cell Developer Toolbox1.7 (GE Healthcare) 软件从每个孔获得总细胞数目和总 SOX17 强度的测量值。基于灰阶水平 (基线范围 100-300) 和核大小确定细胞核的分裂情况。计算每个重复数据集的平均值和标准偏差。总 SOX17 蛋白表达记录为总强度或累积强度，该强度定义为细胞总荧光乘以细胞面积。基于灰阶范围在 200 至 3500 之间的接受标准来去除背景。通过将每个孔的总强度除以阳性对照的平均总强度，将总强度数据进行归一化。对于每个重复组，对归一化的数据计算平均值和标准偏差。

[0389] 表 5 显示先前鉴定为命中物的化合物 (表 2)，其在定形内胚层生物测定法中以与生长因子和蝇蕈醇但没有激活素 A 的多种组合进行了检测。一些化合物与所检测的所有生长因子组合一起对 SOX17 表达具有极微或很弱的作用。然而，一些化合物能够与一些但非所有生长因子组合一起诱导显著的 SOX17 表达。特别是一种化合物 (化合物 34) 在该测定

法中与所检测的所有生长因子具有显著协同反应并介导了细胞数和 SOX17 表达两者的增加:化合物 39 与 1) EGF+FGF4= 阳性对照反应的 77%;或 2) EGF+FGF4+PDGF-AB= 阳性对照反应的 68%;或 3) EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF= 阳性对照反应的 31%。

#### [0390] 实例 7

[0391] 在没有激活素 A 的情况下化合物 34 与其他因子结合对人胚胎干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的作用

[0392] 在该实例中,尝试分析与最佳环苯胺-吡啶并三嗪化合物(化合物 34)结合所需的生长因子的最小数量,以在没有激活素 A 的情况下产生强的 SOX17 反应。同样在该实例中,添加一种新的生长因子 GDF-8 来进行评价。GDF-8 也称为肌生成抑素,是 TGF- $\beta$  家族的成员,并已显示可利用 II 型激活素及 TGF- $\beta$  I 型受体(ALK4 / 5)来诱导 SMAD2 / 3 磷酸化作用。

[0393] 细胞测定接种:将 H1 人胚胎干细胞簇在低生长因子 MATRIGEL™(Invitrogen; 目录号 356231) 包被的组织培养塑料上培养。细胞通过以下方式来进行传代:利用胶原酶(Invitrogen; 目录号 17104-019) 处理并小心刮擦、洗涤以除去残余酶,并以 1 : 1(表面积)的比例使用 100  $\mu$ l / 孔的体积在低生长因子 MATRIGEL™包被的 96 孔黑色板(Packard ViewPlates; PerkinElmer; 目录号 6005182) 上均匀分散接种。让细胞成簇贴附,然后在 1 至 3 天时间内恢复对数期生长,每天用补充有 8ng / ml 的 bFGF(R&D Systems; 目录号 233-FB) 的 MEF 调理培养基饲养。在整个测定法期间,将板在加湿箱中维持在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下。

[0394] 化合物和生长因子的准备:从 R&D Systems 购得的生长因子母液是 EGF(目录号 236-EG)、FGF4(目录号 235-F4)、PDGF-A(目录号 221-AA)、PDGF-D(目录号 1159-SB)、PDGF-A / B(目录号 222-AB)、VEGF(目录号 293-VE) 和 GDF-8(目录号 788-G8)。蝇蕈醇从 Tocris 购得(目录号 0289)。将所有生长因子溶于具有 0.1% BSA(Sigma; 目录号 A7888) 的 PBS 中并冷冻保存于 -80°C 下。将蝇蕈醇溶于 100% DMSO(Sigma; 目录号 D2650), 并冷冻保存于 -80°C 下。将环苯胺-吡啶并三嗪化合物制备为 96 孔板形式的 5mM 母液供用,其溶于 100% DMSO 并保存于 -80°C 下。将化合物 34 在 50mM HEPES(Invitrogen; 目录号 15630-080)、20% DMSO 中进一步稀释至 0.2mM 的中间浓度并保存于 4°C 下。所有生长因子和抑制剂在深孔 96 孔聚丙烯板中制备,在测定法开始时在 DMEM:F12 基础培养基中稀释至 5x 中间母液并保存于 4°C 下。

[0395] 进行二次筛选测定法,重复检验三次并在四天测试时间段内隔天供料。如下开始测定:从每个孔抽吸掉培养基,然后在 PBS 中洗涤三次以除去残余的生长因子和血清。每孔重新添加含有 DMEM:F12 基础培养基(Invitrogen; 目录号 11330-032) 的 80ml 的测试体积,所述基础培养基补充有 0.625% FCS(HyClone; 目录号 SH30070.03)、25ng / ml Wnt3a(R&D Systems) 和 3.125mM 化合物 27 加 20ml 生长因子或小分子的 5x 母液,以得到 0.5% FCS、20ng / ml Wnt3a 和 2.5  $\mu$ M 化合物 34 的最终浓度。除了 GDF-8 以 25ng / ml 测试外,所有其余的生长因子以 50ng / ml 的最终测定浓度进行测试(EGF、FGF4、PDGF-A、PDGF-A / B、VEGF)。蝇蕈醇的最终测定浓度为 20  $\mu$ M。阳性对照孔(100ml / 孔)装有补充有 0.5% FCS、20ng / ml Wnt3a 和 100ng / m 激活素 A 的相同基础培养基。阴性对照孔(100ml / 孔)装有补充有 0.5% FCS 和 20ng / ml Wnt3a 但省去激活素 A 的相同基础培养基。

[0396] 在第 3 天,抽吸孔并每孔供给  $80 \mu\text{l}$  DMEM:F12 基础培养基饲养,所述基础培养基补充有 2.5% FCS(HyClone) 和  $3.125 \mu\text{M}$  化合物 34 加  $20 \mu\text{l}$  生长因子或小分子的 5x 母液,以产生 2% FCS 和  $2.5 \mu\text{M}$  化合物 34(省去 Wnt3a) 以及在第一天所标明的所有其余生长因子或小分子的最终浓度。阳性对照孔 ( $100 \mu\text{l}$  / 孔) 装有补充有 2% FCS 和  $100\text{ng} / \text{ml}$  激活素 A 但省去 Wnt3a 的相同基础培养基。阴性对照孔 ( $100 \mu\text{l}$  / 孔) 装有补充有 2% FCS 但省去激活素 A 和 Wnt3a 两者的相同基础培养基。

[0397] 高内涵分析:在四天的培养结束时,用 PBS 洗涤测试平板两次,用 4% 多聚甲醛(Alexis Biochemical;目录号 ALX-350-011) 在室温下固定 20 分钟,然后用 PBS 洗涤三次并用 0.5% Triton X-100(Sigma;目录号 T8760-2) 在室温下透化处理 20 分钟。将细胞再用 PBS 洗涤三次,然后用 4% 鸡血清(Invitrogen;目录号 16110082) 在 PBS 中于室温下封闭 30 分钟。将一抗(山羊抗人 SOX17;R&D Systems;目录号 AF1924) 在 4% 鸡血清中以 1:100 稀释,在室温下加至每个孔保持一小时。将 Alexa Fluor488 缀合的二抗(鸡抗山羊 IgG;Molecular Probes;目录号 AZ1467) 在 PBS 中以 1:200 稀释,并在用 PBS 洗涤三次后加至每个样品孔。为了对细胞核进行复染,在室温下加入  $4 \mu\text{g} / \text{ml}$  Hoechst33342(Invitrogen;目录号 H3570) 保持十分钟。将板用 PBS 洗涤一次,并保留在  $100 \mu\text{l}$  / 孔 PBS 中以进行成像。

[0398] 用 IN Cell Analyzer1000 细胞分析仪(GE Healthcare) 进行成像,对于用 Hoechst33342 和 Alexa Fluor488 染色的细胞采用 51008bs 二向分色镜。根据阳性对照孔并根据单独用二抗染色的无处理阴性对照孔来优化曝光时间。每孔获取 15 个视野的图像,以补偿生物鉴定和后续染色程序中的任何细胞损失。用 IN Cell Developer Toolbox1.7(GE Healthcare) 软件从每个孔获得总细胞数目和总 SOX17 强度的测量值。基于灰阶水平(基线范围 100-300) 和核大小确定细胞核的分裂情况。计算每个重复数据集的平均值和标准偏差。总 SOX17 蛋白表达记录为总强度或累积强度,该强度定义为细胞总荧光乘以细胞面积。基于灰阶范围在 200 至 3500 之间的接受标准来去除背景。通过将每个孔的总强度除以阳性对照的平均总强度,将总强度数据进行归一化。对于每个重复组,对归一化的数据计算平均值和标准偏差。

[0399] 表 6 示出了该测定法的结果。在 GDF-8 与化合物 34 的任意组合存在时,观察到 SOX17 表达的显著增加。此外,GDF-8 和 Wnt3a 与化合物 34 一起足以产生类似于使用  $100\text{ng} / \text{ml}$  激活素 A / Wnt3a 处理时所见范围内的 SOX17 表达(对照的 88%)。看起来,生长因子 GDF-8 可在人胚胎干细胞的定形内胚层分化期间用作激活素 A 的替代物。

#### [0400] 实例 8

[0401] 对能够使多能干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的化合物的另外筛选

[0402] 基于目前为止辨别的命中物的化合物结构,进行类似物搜索以发现另外的相关化合物以在定形内胚层生物测定中检测。亚结构搜索产生了用于筛选的化合物。设计了用于该测定法的筛选参数,使用已在先前测定法中产生最佳结果的因子的组合,特别是将 EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇和 GDF-8 与小分子化合物组合。

[0403] 细胞测定接种:简而言之,将 H1 人胚胎干细胞簇在低生长因子 MATRIGEL™(Invitrogen;目录号 356231) 包被的组织培养塑料上培养。细胞通过以下方式

来传代:利用胶原酶(Invitrogen;目录号 17104-019)处理并小心刮擦、洗涤以除去残余酶,并以 1:1(表面面积)的比例使用 100  $\mu$ l / 孔的体积在低生长因子 MATRIGEL™包被的 96 孔黑色板(Packard ViewPlates;PerkinElmer;目录号 6005182)上均匀分散接种。让细胞成簇贴附,然后在 1 至 3 天时间内恢复对数期生长,每天用补充有 8ng / ml 的 bFGF(R&D Systems;目录号 233-FB)的 MEF 调理培养基饲养。在整个测定法期间,将板在加湿箱中维持在 37°C、5% CO<sub>2</sub>下。

[0404] 化合物和生长因子的准备:从 R&D Systems 购得的生长因子母液是 EGF(目录号 236-EG)、FGF4(目录号 235-F4)、PDGF-A(目录号 221-AA)、PDGF-D(目录号 1159-SB)、PDGF-A / B(目录号 222-AB)、VEGF(目录号 293-VE)和 GDF-8(目录号 788-G8)。蝇蕈醇从 Tocris 购得(目录号 0289)。使用制备为 96 孔板形式的 5mM 母液供用的化合物的库进行筛选,其溶解于 100% DMSO(Sigma;目录号 D2650)中并保存于 -80°C 下。将化合物在 50mM HEPES(Invitrogen;目录号 15630-080)、20% DMSO 中进一步稀释至 0.2mM 的中间浓度并保存于 4°C 下。测试条件在单个孔中进行,在四天测试期间每隔一天供料。如下开始初级筛选测定法:从每个孔抽吸掉培养基,然后在 PBS(Invitrogen;目录号 14190)中洗涤三次以除去残余的生长因子和血清。在测定法的第一天,重新添加 200 $\mu$ l / 孔的测试体积,其含有补充有 0.5% FCS(HyClone;目录号 SH30070.03)和 20ng / ml Wnt3a(R&D Systems;目录号 1324-WN)加 2.5mM 化合物的 DMEM:F12 基础培养基(Invitrogen;目录号 11330-032)。除了 GDF-8 以 25ng / ml 测试外,所有其余的生长因子以 50ng / ml 的最终测定浓度进行测试(EGF、FGF4、PDGF-A、PDGF-A / B、VEGF)。蝇蕈醇的最终测定浓度为 20  $\mu$ M。阳性对照样品含有补充有 0.5% FCS 加 20ng / ml Wnt3a 和 100ng / ml 重组人激活素 A(PeproTech;目录号 120-14)的相同基础培养基。阴性对照样品含有补充有 0.5% FCS 和 20ng / ml Wnt3a 的 DMEM:F12 基础培养基。在测试的第三天,重新添加 200  $\mu$ l 每孔的测试体积,其含有补充有 2% FCS 加 2.5  $\mu$ M 化合物但没有 Wnt3a 的 DMEM:F12 基础培养基。除了 GDF-8 以 25ng / ml 测试外,所有其余的生长因子以 50ng / ml 的最终测定浓度进行测试(EGF、FGF4、PDGF-A、PDGF-A / B、VEGF)。蝇蕈醇的最终测定浓度为 20  $\mu$ M。阳性对照样品含有补充有 2% FCS 和 100ng / ml 重组人激活素 A(PeproTech;目录号 120-14)的相同基础培养基。阴性对照样品含有补充有 2% FCS 的 DMEM:F12 基础培养基。阳性对照样品含有补充有 FCS 的相同基础培养基,在整个四天的测定法期间用 100ng / ml 重组人激活素 A(PeproTech;目录号 120-14)代替苯胺-吡啶并三嗪化合物,以及在在第 1 天和第 2 天添加 Wnt3a(20ng / ml)。阴性对照样品含有补充有 FCS 的 DMEM:F12 基础培养基,在第 1 天和第 2 天添加 Wnt3a,但省去用激活素 A 处理。

[0405] 高内涵分析:在培养的四天结束时,将测试平板用 PBS(Invitrogen;目录号 14190)洗涤两次,用 4%多聚甲醛(Alexis Biochemical;目录号 ALX-350-011)在室温下固定 20 分钟,然后用 PBS 洗涤三次并用 0.5% Triton X-100(Sigma;目录号 T8760-2)在室温下透化处理 20 分钟。将细胞再用 PBS 洗涤三次,然后用 4%鸡血清(Invitrogen;目录号 16110082)在 PBS 中于室温下封闭 30 分钟。将一抗(山羊抗人 SOX17;R&D Systems;目录号 AF1924)在 4%鸡血清中以 1:100 稀释,在室温下加至每个孔保持一小时。将 Alexa Fluor488 缀合的二抗(鸡抗山羊 IgG;Molecular Probes;目录号 AZ1467)在 PBS 中以 1:200 稀释,并在用 PBS 洗涤三次后加至每个样品孔。为了对细胞核进行复染,在室温下

加入  $4 \mu\text{g} / \text{ml}$  Hoechst33342 (Invitrogen ; 目录号 H3570) 保持十分钟。将板用 PBS 洗涤一次, 并保留在  $100 \mu\text{l} / \text{孔}$  PBS 中以进行成像。

[0406] 用 IN Cell Analyzer1000 细胞分析仪 (GE Healthcare) 进行成像, 对于用 Hoechst33342 和 Alexa Fluor488 染色的细胞采用 51008bs 二向分色镜。根据阳性对照孔并根据单独用二抗染色的无处理阴性对照孔来优化曝光时间。每孔获取 15 个视野的图像, 以补偿生物鉴定和后续染色程序中的任何细胞损失。用 IN Cell Developer Toolbox1.7 (GE Healthcare) 软件从每个孔获得总细胞数目和总 SOX17 强度的测量值。基于灰阶水平 (基线范围 100-300) 和核大小确定细胞核的分裂情况。计算每个重复数据集的平均值和标准偏差。总 Sox17 蛋白表达记述为总强度或累积强度, 该强度定义为细胞总荧光乘以细胞面积。基于灰阶范围在 200 至 3500 之间的接受标准来去除背景。通过将每个孔的总强度除以阳性对照的平均总强度, 将总强度数据进行归一化。对于每个重复组, 对归一化的数据计算平均值和标准偏差。

[0407] 在表 7 中, 测试了 GDF-8 和一组生长因子 / 激动剂 (EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇) 与新的一组苯胺 - 吡啶并三嗪化合物的组合。将该单个实验中两个测试板的结果关于 SOX17 响应 (记录为使用激活素 A 和 Wnt3a 的阳性对照处理的百分比) 来排序。鉴别了显示出与生长因子 / 激动剂组合有显著协同活性的另外的化合物。在没有激活素 A 的情况下这些化合物在人胚胎干细胞分化期间保持测试细胞数以及导致 SOX17 表达两方面均有效。这些大于阳性对照 25% 活性的命中物列表在表 8 中示出。

[0408] 值得注意的是, 最初的初步筛选得到的四个命中物 (表 2) 在类似物库中重复。这些化合物中的两种作为命中物与类似物筛选重复 (化合物 34 和化合物 35 ; 表 8 所框示); 一种是类似物筛选中的弱命中物, 而一种化合物不重复。

#### [0409] 实例 9

[0410] 在存在低浓度激活素 A 的情况下本发明化合物对人胚胎干细胞向表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化的作用

[0411] 确定已在上面定形内胚层生物测定法中鉴定为命中物的化合物是否还可以显示出与非常低剂量的激活素 A 有协同活性是重要的。使用表 3B 所标示的环苯胺 - 吡啶并三嗪化合物的短命中物列表来进行最初的评估。

[0412] 细胞测定接种: 将 H1 人胚胎干细胞簇在低生长因子 MATRIGEL™ (Invitrogen ; 目录号 356231) 包被的组织培养塑料上培养。细胞通过以下方式来传代: 利用胶原酶 (Invitrogen ; 目录号 17104-019) 处理并小心刮擦、洗涤以除去残余酶, 并以 1 : 1 (表面积) 的比例使用  $100 \mu\text{l} / \text{孔}$  的体积在低生长因子 MATRIGEL™ 包被的 96 孔黑色板 (Packard ViewPlates ; PerkinElmer ; 目录号 6005182) 上均匀分散接种。让细胞成簇贴附, 然后在 1 至 3 天时间内恢复对数期生长, 每天用补充有  $8\text{ng} / \text{ml}$  的 bFGF (R&D Systems ; 目录号 233-FB) 的 MEF 调理培养基饲养。在整个测定法期间, 将板在加湿箱中维持在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下。

[0413] 化合物和生长因子的准备: 从 R&D Systems 购得的生长因子母液是 EGF (目录号 236-EG)、FGF4 (目录号 235-F4)、PDGF-A (目录号 221-AA)、PDGF-D (目录号 1159-SB)、PDGF-A / B (目录号 222-AB)、VEGF (目录号 293-VE) 和 GDF-8 (目录号 788-G8)。激活素 A 从 PeproTech (目录号) 购得。蝇蕈醇从 Tocris 购得 (目录号 0289)。将所有生长因子溶于具

有 0.1% BSA(Sigma ;目录号 A7888) 的 PBS 中并冷冻保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  下。将蝇蕈醇溶于 100% DMSO(Sigma ;目录号 D2650), 并冷冻保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  下。将化合物制备为 96 孔板形式的 5mM 母液供用, 其溶于 100% DMSO 中并保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  下。将化合物在 50mM HEPES(Invitrogen ;目录号 15630-080)、20% DMSO 中进一步稀释至 0.2mM 的中间浓度并保存于  $4^{\circ}\text{C}$  下。所有生长因子和抑制剂在深孔 96 孔聚丙烯板中制备, 在测定法开始时在 DMEM :F12 基础培养基中稀释至 5x 中间母液并保存于  $4^{\circ}\text{C}$  下。

[0414] 进行二次筛选测定法, 重复检验三次并在四天测试时间段内隔天供料。如下开始测定 :从每个孔抽吸掉培养基, 然后在 PBS 中洗涤三次以除去残余的生长因子和血清。每孔重新添加含有 DMEM :F12 基础培养基 (Invitrogen ;目录号 11330-032) 的 80ml 的测试体积, 所述基础培养基补充有 0.625% FCS(HyClone ;目录号 SH30070.03)、25ng / ml Wnt3a(R&D Systems)、12.5ng / ml 激活素 A 和 3.125  $\mu\text{M}$  化合物加 20  $\mu\text{l}$  生长因子或小分子的 5x 母液, 以产生 0.5% FCS、20ng/ml Wnt3a、10ng / ml 激活素 A 和 2.5  $\mu\text{M}$  化合物的最终浓度。除了 GDF-8 以 25ng / ml 使用以外, 所有其余的生长因子以 50ng / ml 的最终测定浓度测试 (EGF、FGF4、PDGF-A、PDGF-A / B、VEGF)。蝇蕈醇的最终测定浓度为 20  $\mu\text{M}$ 。阳性对照孔 (100  $\mu\text{l}$  / 孔) 装有补充有 0.5% FCS、20ng / ml Wnt3a 和 10ng / ml (低剂量) 或 100ng / ml (高剂量) 激活素 A 的相同基础培养基。阴性对照孔 (100  $\mu\text{l}$  / 孔) 装有补充有 0.5% FCS 和 20ng / ml Wnt3a 但省去激活素 A 的相同基础培养基。

[0415] 在第 3 天, 抽吸孔并每孔供给 80  $\mu\text{l}$  DMEM :F12 基础培养基饲养, 所述基础培养基补充有 2.5% FCS(HyClone)、12.5ng / ml 激活素 A 和 3.125  $\mu\text{M}$  化合物加 20  $\mu\text{l}$  生长因子或小分子的 5x 母液, 以产生 2% FCS、10ng / ml 激活素 A 和 2.5  $\mu\text{M}$  化合物 (省去 Wnt3a) 的最终浓度以及在第一天所标明的所有其余生长因子或小分子的最终浓度。阳性对照孔 (100  $\mu\text{l}$  / 孔) 装有补充有 2% FCS 和 10ng/ml 或 100ng / ml 激活素 A 但省去 Wnt3a 的相同基础培养基。阴性对照孔 (100  $\mu\text{l}$  / 孔) 装有补充有 2% FCS 但省去激活素 A 和 Wnt3a 两者的相同基础培养基。

[0416] 高内涵分析 :在四天的培养结束时, 用 PBS 洗涤测试平板两次, 用 4% 多聚甲醛 (Alexis Biochemical ;目录号 ALX-350-011) 在室温下固定 20 分钟, 然后用 PBS 洗涤三次并用 0.5% Triton X-100(Sigma ;目录号 T8760-2) 在室温下透化处理 20 分钟。将细胞再用 PBS 洗涤三次, 然后用 4% 鸡血清 (Invitrogen ;目录号 16110082) 在 PBS 中于室温下封闭 30 分钟。将一抗 (山羊抗人 SOX17 ;R&D Systems ;目录号 AF1924) 在 4% 鸡血清中以 1 : 100 稀释, 在室温下加至每个孔保持一小时。将 Alexa Fluor488 缀合的二抗 (鸡抗山羊 IgG ;Molecular Probes ;目录号 AZ1467) 在 PBS 中以 1 : 200 稀释, 并在用 PBS 洗涤三次后加至每个样品孔。为了对细胞核进行复染, 在室温下加入 4  $\mu\text{g}$  / ml Hoechst33342(Invitrogen ;目录号 H3570) 保持十分钟。将板用 PBS 洗涤一次, 并保留在 100  $\mu\text{l}$  / 孔 PBS 中以进行成像。

[0417] 用 IN Cell Analyzer1000 细胞分析仪 (GE Healthcare) 进行成像, 对于用 Hoechst33342 和 Alexa Fluor488 染色的细胞采用 51008bs 二向分色镜。根据阳性对照孔并根据单独用二抗染色的无处理阴性对照孔来优化曝光时间。每孔获取 15 个视野的图像, 以补偿生物鉴定和后续染色程序中的任何细胞损失。用 IN Cell Developer Toolbox1.7 (GE Healthcare) 软件从每个孔获得总细胞数目和总 SOX17 强度的测量值。基于灰阶水平 (基



线范围 100-300) 和核大小确定细胞核的分裂情况。计算每个重复数据集的平均值和标准偏差。总 SOX17 蛋白表达记录为总强度或累积强度, 该强度定义为细胞总荧光乘以细胞面积。基于灰阶范围在 200 至 3500 之间的接受标准来去除背景。通过将每个孔的总强度除以阳性对照的平均总强度, 将总强度数据进行归一化。对于每个重复组, 对归一化的数据计算平均值和标准偏差。

[0418] 表 9 示出了使用多种化合物以及生长因子与低剂量激活素 A 的不同组合的测定法的结果。一些化合物显示出与多种生长因子的强的协同响应。在其他情况下, 协同效应更为适度, 但相对于低剂量激活素 A 对照而言是显著的。其他化合物相对于低剂量激活素 A 对照不具有活性。

#### [0419] 实例 10

[0420] 在没有激活素 A 的情况下本发明化合物对单个人胚胎干细胞向表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化的作用

[0421] 环苯胺 - 吡啶并三嗪化合物还利用通过酶处理分散为单细胞并为测定法而涂布为单层的细胞以筛选形式进行测试。还对该测定法进行改变, 以除去甚至是在低剂量下都可提供生长因子的血清。为了该目的, 改变基础培养基并用无脂肪酸的 BSA 替换血清。该测定法从四天缩短为三天, 以用更窄的时段来测量结果。最后, 该测定法包括先前已显示出在没有激活素 A 的情况下对定形内胚层分化有显著但次最佳作用的两种生长因子 EGF 和 FGF4。

#### [0422] 筛选测定法

[0423] 细胞测定接种: 简而言之, 将 H1 人胚胎干细胞簇在低生长因子 MATRIGEL™ (Invitrogen; 目录号 356231) 包被的组织培养塑料上培养。将培养物每 10cm<sup>2</sup> 表面积用 10ml 等体积 Accutase (Sigma; 目录号 A6964) 在 37°C 下处理 5 分钟, 然后轻轻地再进行再悬浮, 通过离心得到沉淀物, 并再悬浮于 MEF 调理培养基中用以计数。为了进行测定法接种, 将细胞以 50,000 细胞 / cm<sup>2</sup> 使用 100 μl / 孔的体积涂布于低生长因子 MATRIGEL™ 包被的 96 孔黑色板 (Packard ViewPlates; 目录号 6005182) 上。让细胞贴附, 并用 3 至 5 天时间恢复对数期生长, 每天供以补充有 8ng / ml 的 bFGF (R&D Systems; 目录号 233-FB) 的 MEF 调理培养基。在整个测定法期间, 将板在加湿箱中维持在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下。

[0424] 化合物和测定法的准备: 将 EGF 和 FGF4 的母液在 96 孔聚丙烯板 (Coming, Inc.; 目录号 3960) 中制备。化合物 22 作为 5mM 母液待用, 其溶解于 100% DMSO (Sigma; 目录号 D2650) 并保存于 -80°C 下。如下开始测定: 从每个孔抽吸掉培养基, 然后在 PBS 中洗涤三次以除去残余的生长因子和血清。每孔重新添加含有 RPMI1640 基础培养基 (Invitrogen; 目录号 22400-089) 的 80ml 测试体积, 所述基础培养基补充有 2.5% 无脂肪酸 BSA (MP Biomedicals LLC; 目录号 152401)、10ng / ml bFGF (PeproTech Inc; 目录号 100-18B)、25ng / ml Wnt3a (R&D Systems; 目录号 1324-WN) 和 3.125mM 化合物 22 加 20ml 生长因子的 5x 母液, 以产生测试中 2% 无脂肪酸 BSA、8ng / ml bFGF (PeproTech Inc; 目录号 100-18B)、20ng / ml Wnt3a 和 2.5 μM 化合物 22 的最终浓度。阳性对照孔装有补充有 2% 无脂肪酸 BSA、8ng / ml bFGF、20ng / ml Wnt3a 和 100ng / ml 重组人激活素 A (PeproTech; 目录号 120-14) 的相同基础培养基。阴性对照孔装有补充有 2% 无脂肪酸 BSA、8ng / ml bFGF、20ng / ml Wnt3a 但省去用激活素 A 处理的相同基础培养基。

[0425] 在该测定法的第二天,再次抽吸孔并每孔重新供以含有 RPMI1640 基础培养基的 80  $\mu$ l 体积,所述基础培养基补充有 2.5% 无脂肪酸 BSA、10ng / ml bFGF 和 3.125  $\mu$ M 化合物 22 加 20  $\mu$ l 生长因子的 5x 母液,以在测试中产生 2% 无脂肪酸 BSA、8ng / ml bFGF 和 2.5  $\mu$ M 化合物 22 的最终浓度。阳性对照孔装有补充有 2% 无脂肪酸 BSA、8ng / ml bFGF 和 100ng / ml 重组人激活素 A 的相同基础培养基。阴性对照样品装有补充有 2% 无脂肪酸 BSA、8ng / ml bFGF 但省去用激活素 A 处理的相同基础培养基。

[0426] 高内涵分析:在四天的培养结束时,用 PBS 洗涤测试平板两次,用 4% 多聚甲醛 (Alexis Biochemical ;目录号 ALX-350-011) 在室温下固定 20 分钟,然后用 PBS 洗涤三次并用 0.5% Triton X-100 (Sigma ;目录号 T8760-2) 在室温下透化处理 20 分钟。将细胞再用 PBS 洗涤三次,然后用 4% 鸡血清 (Invitrogen ;目录号 16110082) 在 PBS 中于室温下封闭 30 分钟。将一抗 (山羊抗人 SOX17 ;R&D Systems ;目录号 AF1924) 在 4% 鸡血清中以 1 : 100 稀释,在室温下加至每个孔保持一小时。将 Alexa Fluor488 缀合的二抗 (鸡抗山羊 IgG ;Molecular Probes ;目录号 AZ1467) 在 PBS 中以 1 : 200 稀释,并在用 PBS 洗涤三次后加至每个样品孔。为了对细胞核进行复染,在室温下加入 4  $\mu$ g / ml Hoechst33342 (Invitrogen ;目录号 H3570) 保持十分钟。将板用 PBS 洗涤一次,并保留在 100  $\mu$ l / 孔 PBS 中以进行成像。

[0427] 用 IN Cell Analyzer1000 细胞分析仪 (GE Healthcare) 进行成像,对于用 Hoechst33342 和 Alexa Fluor488 染色的细胞采用 51008bs 二向分色镜。根据阳性对照孔并根据单独用二抗染色的无处理阴性对照孔来优化曝光时间。每孔获取 15 个视野的图像,以补偿生物鉴定和后续染色程序中的任何细胞损失。用 IN Cell Developer Toolbox1.7 (GE Healthcare) 软件从每个孔获得总细胞数目和总 SOX17 强度的测量值。基于灰阶水平 (基线范围 100-300) 和核大小确定细胞核的分裂情况。计算每个重复数据集的平均值和标准偏差。总 SOX17 蛋白表达记录为总强度或累积强度,该强度定义为细胞总荧光乘以细胞面积。基于灰阶范围在 200 至 3500 之间的接受标准来去除背景。通过将每个孔的总强度除以阳性对照的平均总强度,将总强度数据进行归一化。对于每个重复组,对归一化的数据计算平均值和标准偏差。

[0428] 表 10 示出了采用化合物 34 的该测定法的结果。具有仅 EGF 和 / 或 FGF4 而没有化合物 34 的对照样品具有低的 SOX17 表达。添加化合物 34 显著增强了 SOX17 的表达。

#### [0429] 实例 11

[0430] 激活素 A 和 GDF-8 使人胚胎干细胞向表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化的能力的比较

[0431] 先前的实例显示, GDF-8 能够替代激活素 A 来使人胚胎干细胞向表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化。了解 GDF-8 和激活素 A 关于其使人胚胎干细胞向表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化的能力的相对效力是重要的。使用当量浓度的各生长因子来进行剂量响应测定法,以比较胚胎干细胞分化期间的结果。

[0432] 用于测定法的细胞准备:将人胚胎干细胞 (H1 人胚胎干细胞系) 的母培养物以未分化、多能状态维持在 MEF 调理培养基中的低生长因子 MATRIGEL 包被的平皿上,平均每四天进行传代。传代通过这样进行:使细胞培养物在 37 $^{\circ}$ C 下暴露于 1mg / ml 分散酶 (Invitrogen, 目录号 :17105-041) 的溶液 5 至 7 分钟,然后用 MEF 调理培养基冲洗该单层

并小心刮擦以回收细胞簇。将细胞簇低速离心以收集细胞沉淀并除去残余的分散酶。将细胞簇以 1:3 或 1:4 的比例分传以进行例行维持培养,或者以 1:1 比例分传以立即进行测试。将所有的人胚胎干细胞系以小于 50 次传代的传代数进行维持,并例行评估核型表型是否正常和支原体污染是否存在。

[0433] 将用于该测定法的细胞簇均匀地再悬浮于补充有 8ng / ml bFGF 的 MEF 调理培养基中,并以 100ml / 孔的体积接种至低生长因子 MATRIGEL™ 包被的 96 孔 Packard VIEWPLATES (PerkinElmer ; 目录号 6005182) 上。补充有 8ng / mL bFGF 的 MEF 调理培养基用于初始接种和扩增。日常饲养是通过从每个孔抽吸掉废培养基并用等体积的新鲜培养基替换来进行。在整个测定法期间,将板在加湿箱中维持在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 下。

[0434] 测定法:如下开始该测定法:从每个孔抽吸掉培养基,并重新添加测试培养基的等分试样 (100 μl)。测试条件在总共三天的测定期间重复进行四次,在第 1 天和第 2 天通过从各孔抽吸培养基并用新鲜测试培养基替换该培养基来饲养。使用两个 12 道聚丙烯移液槽 (Argos technologies, Inc, 目录号 :B3135) 来制备含有不同浓度的激活素 A (PeproTech ; 目录号 120-14) 或 GDF-8 (R&D Systems, 目录号 788-G8) 的测试培养基。各移液槽编号 2 至 12 的槽道包含 1ml 由 RPMI-1640 培养基 (Invitrogen ; 目录号 :22400) 组成的测试培养基,所述 RPMI-1640 培养基补充有 2% 牛血清白蛋白第 V 组分、无脂肪酸 (FAFBSA) (MP Biomedicals, Inc ; 目录号 152401) 和 8ng / ml bFGF (PeproTech Inc. ; 目录号 :100-18B),并在第 1 天添加但在第 2 天和第 3 天省去 20ng / ml Wnt3a (R&D Systems ; 目录号 1324-WN / CF)。各移液槽的 1 号槽道包含 1600ng / ml 激活素 A 或 1600ng / ml GDF-8,其稀释于相同测试培养基中。将一毫升培养基从 1 号槽道转移到 2 号槽道,并完全混合。将新移液管头用于将一毫升培养基从 2 号槽道转移到 3 号槽道,然后彻底混合。相同的步骤在各个单独移液槽依次重复直到 11 号槽道。各移液槽的 12 号槽道包含没有激活素 A 或 GDF-8 的培养基。通过这样做,产生用于添加到各测定孔的一系列两倍测试稀释液,所述稀释液含有浓度范围为 1.6ng / ml 至 1600ng / ml 的激活素 A 或 GDF-8。

[0435] 高内涵分析:在三天的培养结束时,将测试平板用 PBS (Invitrogen ; 目录号 14190) 洗涤一次,用 4% 多聚甲醛 (Alexis Biochemical ; 目录号 ALX-350-011) 在室温下固定 20 分钟,然后用 PBS 洗涤三次并用 0.5% Triton X-100 (Sigma ; 目录号 T8760-2) 在室温下透化处理 20 分钟。将细胞再用 PBS 洗涤三次,然后用 4% 鸡血清 (Invitrogen ; 目录号 16110082) 在 PBS 中于室温下封闭 30 分钟。将一抗 (山羊抗人 SOX17 ; R&D Systems ; 目录号 AF1924) 在 4% 鸡血清中以 1 : 100 稀释,在室温下加至每个孔保持两小时。在用 PBS 洗涤三次后,将以 1 : 200 稀释于 PBS 中的 Alexa Fluor488 缀合的二抗 (鸡抗山羊 IgG ; Invitrogen ; 目录号 A21467) 加至每个孔。为了对细胞核进行复染,在室温下加入 5 μg / ml Hoechst33342 (Invitrogen ; 目录号 H3570) 保持十分钟。将板用 PBS 洗涤一次,并保留在 100 μl / 孔 PBS 中以进行成像。

[0436] 用 IN Cell Analyzer1000 细胞分析仪 (GE Healthcare) 进行成像,对于用 Hoechst33342 和 Alexa Fluor488 染色的细胞采用 51008bs 二向分色镜。从每孔的 25 个视野获得图像。用 IN Cell Developer Toolbox1.7 (GE Healthcare) 软件从每个孔获得总细胞数目和总 SOX17 强度的测量值。基于灰阶水平 (基线范围 100-300) 和核大小确定细胞核的分裂情况。计算每一式四份的数据集的平均值和标准偏差。总 SOX17 蛋白表达记

录为总强度或累积强度,该强度定义为细胞总荧光乘以细胞面积。基于灰阶范围在 200 至 4500 之间的接受标准来去除背景。总 SOX17 强度数据用 GraphPad Prism4.02(GraphPad Software, Inc., Lo Jolla, CA) 来计算。将数据归一化以将各数据集中的最小值和最大值分别定义为 0%和 100%。表 11 示出了激活素 A 和 GDF-8 数据集中每一者的归一化值。在图 2 中示出了用表 11 所示归一化值生成的两条 S 形剂量响应曲线。用 GraphPad Prism 来计算指示曲线拟合度的  $R^2$  值,并确定为对激活素 A 为 0.9944 而对 GDF-8 为 0.9964。各生长因子的  $EC_{50}$  值用 GraphPad Prism 计算,并确定为对激活素 A 为 13.9ng / ml 而对 GDF-8 为 184.8ng / ml。这些数据表明,GDF-8 在关于诱导人胚胎干细胞向表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化方面比激活素 A 效力低。尽管如此,GDF-8 可以代替激活素 A,并且在特定浓度下可诱导等量的定形内胚层细胞群,如 SOX17 表达所指示的。

#### [0437] 实例 12

[0438] 根据本发明方法形成的表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞能够进一步分化为表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞

[0439] 使用 GDF-8 结合化合物 34 或化合物 56 使人胚胎干细胞的平行群体分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞。此后,将分步分化方案应用于处理细胞,以促进向胰腺内胚层和内分泌谱系的分化。在整个分步分化过程中,维持由用激活素 A 和 Wnt3a 处理过的细胞组成的平行对照以用于比较目的。在分化的每个阶段取得样品,以确定代表分化的多个阶段的蛋白质和 mRNA 生物标记的出现。

[0440] 用于测定法的细胞准备:将人胚胎干细胞(H1 人胚胎干细胞系)的母培养物以未分化、多能状态维持在 MEF 调理培养基中的低生长因子 MATRIGEL™包被的平皿上,平均每四天进行传代。传代通过这样来完成:将细胞培养物在 37°C 下暴露于 1mg / ml 分散酶(Invitrogen;目录号 17105-041)溶液 5 至 7 分钟,然后用 MEF 调理培养基冲洗该单层并小心刮擦以回收细胞簇。将细胞簇低速离心以收集细胞沉淀并除去残余分散酶。将细胞簇以 1 : 3 或 1 : 4 的比例分传以进行例行维持培养,或者以 1 : 1 比例分传以立即进行测试。将所有的人 ES 细胞系以小于 50 的传代数进行维持,并例行评估核型是否正常和支原体是否存在。

[0441] 将细胞簇均匀地再悬浮于补充有 8ng / ml bFGF 的 MEF 调理培养基中,并以 0.5ml / 孔的体积接种到低生长因子 MATRIGEL™包被的 24 孔黑壁培养板(Arctic White;目录号 AWLS-303012)上。日常饲养是通过从每个孔抽吸掉废培养基并用等体积的新鲜培养基替换来进行。在整个测定法期间,将板维持在 37°C、5% CO<sub>2</sub>下。

[0442] 测定法:如下开始该测定法:从每个孔抽吸掉培养基,并重新添加测试培养基的等分试样(0.5ml)。在三天的周期内进行分化第一步的测试条件,每天通过从各孔抽吸培养基并用新鲜的测试培养基替换该培养基来饲养。在测定法的第一天,将 100ng / ml 激活素 A(PeproTech;目录号 120-14)或 200ng / ml GDF-8(R&D Systems,目录号 788-G8)添加至各测定孔,其中各生长因子被稀释进具有 1%牛血清白蛋白第 V 组分、无脂肪酸(FAF BSA)(MP Biomedicals, Inc;目录号 152401)、1% Probumin(Millipore;目录号 81-068-3)和 20ng / ml Wnt3a(R&D Systems;目录号 1324-WN / CF)的 RPMI-1640 培养基(Invitrogen;目录号 22400)中。在该测定法的第二天,将 100ng / ml 激活素 A 或 200ng / ml GDF-8 稀释进补充有 2% FAF BSA 但没有 Wnt3a 的 RPMI-1640 培养基中。在一些使用 GDF-8 的测试

样品中, Wnt3a 用  $2.5 \mu\text{M}$  浓度的化合物 34 或化合物 56 替换, 并且在定形内胚层分化的全部三天期间每天添加化合物 34 或化合物 56。在分化的第一步结束时, 从一些孔收获细胞进行流式细胞检测分析, 以评价 CXCR4 (定形内胚层形成的标志物) 的水平。从另外的孔收获样品用于 RT-PCR 分析, 以测量其他分化标志物。

[0443] 在分化的第一步结束时, 各处理组的重复平行孔组经受进一步分步分化。重要的是注意在第一个分化步骤之后, 所有经历连续培养和分化的孔接受相同的处理。这种连续分化的方案在下面描述。

[0444] 用二天进行该分化方案的步骤 2。通过从各孔抽吸培养基并用新鲜等分量 (0.5ml) 的 DMEM:F12 培养基 (Invitrogen; 目录号 11330-032) 替换每天对细胞进行饲养, 所述 DMEM:F12 培养基含有 2% 牛血清白蛋白第 V 组分、无脂肪酸 (FAF BSA) (MP Biomedicals, Inc; 目录号 152401)、50ng / ml FGF7 (PeproTech; 目录号 100-19) 和 250nM 环巴胺 (Calbiochem; 目录号 239804)。

[0445] 用四天进行该分化方案的步骤 3。通过从各孔抽吸培养基并用新鲜等分量 (0.5ml) 的高葡萄糖 DMEM (Invitrogen; 目录号 10569) 替换每天对细胞进行饲养, 所述高葡萄糖 DMEM 补充有 1% B27 (Invitrogen; 目录号 17504-044)、50ng / ml FGF7、100ng / ml 成头蛋白 (R&D Systems; 目录号 3344-NG)、250nM KAAD-- 环巴胺 (Calbiochem; 目录号 239804) 和 2mM 全反式视黄酸 (RA) (Sigma-Aldrich; 目录号 R2625)。在该分化的第三个步骤结束时, 从一些孔收获细胞用于通过 RT-PCR 分析以测量分化的标志物。对其他培养孔进行 Pdx1 (一种与胰腺内胚层相关的转录因子) 和 Cdx2 (一种与肠内胚层相关的转录因子) 的蛋白质表达水平的高内涵图像分析。

[0446] 用三天进行该分化方案的步骤 4。通过从各孔抽吸培养基并用新鲜等分量 (0.5ml) 的高葡萄糖 DMEM 替换每天对细胞进行饲养, 所述高葡萄糖 DMEM 补充有 1% B27、100ng / ml 成头蛋白、100ng / ml 轴突导向因子 -4、 $1 \mu\text{M}$  DAPT (EMD Biosciences; 目录号 565770) 和  $1 \mu\text{M}$  Alk5 抑制剂 (Axxora; 目录号 ALX-270-445)。在该分化的第四个步骤结束时, 从一些孔收获细胞用于通过 RT-PCR 分析以测量分化的标志物。对其他培养孔进行 PDX1 蛋白质表达水平的高内涵图像分析。

[0447] 该分化方案的步骤 5 在具有 1% B27 和  $1 \mu\text{M}$  Alk5 抑制剂的高葡萄糖 DMEM 中进行七天。每天抽吸各孔中的培养基并用新鲜等分试样 (0.5ml) 替换。在该分化的第五个步骤结束时, 从一些孔收获细胞用于通过 RT-PCR 分析以测量分化的标志物。对其他培养孔进行胰岛素和胰高血糖素的蛋白质表达水平的高内涵图像分析。

[0448] 该分化方案的步骤 6 在具有 1% B27 的高葡萄糖 DMEM 中进行七天。隔日抽吸各孔中的培养基并用新鲜等分试样 (0.5ml) 替换。在该分化的第六个步骤结束时, 从一些孔收获细胞用于通过 RT-PCR 分析以测量分化的标志物。

[0449] FACS 分析: 将用于 FACS 分析的细胞于  $4^\circ\text{C}$  下在 PBS (Invitrogen; 目录号 14040-133) 中的 0.5% 人  $\gamma$ -球蛋白 (Sigma; 目录号 G-4386):BD FACS 染色缓冲液-BSA (BD; 目录号 554657) 的 1:5 溶液中封闭 15 分钟。然后将细胞在  $4^\circ\text{C}$  下用 CD9PE (BD; 目录号 555372)、CD99PE (Caltag; 目录号 MHCD9904) 和 CXCR4APC (R&D Systems; 目录号 FAB173A) 的抗体染色 30 分钟。在 BD FACS 染色缓冲液中的一系列洗涤后, 将细胞用 7-AAD (BD; 目录号 559925) 针对生活力进行染色并在 BD FACSArray 上进行。将针对 PE 和

APC 两者的小鼠 IgG1K 同种型对照抗体用于测量阳性细胞百分数。

[0450] RT-PCR 分析:通过在存在含乙醇的高盐缓冲液的情况下与硅胶膜 (Rneasy Mini Kit, Qiagen, CA) 结合,随后通过洗涤来除去污染物来对 RNA 样品进行纯化。用 TURBO DNA-free 试剂盒 (Ambion, INC) 使 RNA 进一步纯化,并随后将高质量的 RNA 在水中稀释。通过在分光光度计上读取 A260 和 A280 读数来评估产率和纯度。用 ABI (ABI, CA) 大容量 cDNA 库试剂盒从纯化的 RNA 制备 cDNA 拷贝。

[0451] 除非另外指明,否则所有试剂均购自 Applied Biosystems。实时 PCR 反应用 ABI PRISM<sup>®</sup> 7900 序列检测系统来进行。将 TAQMAN<sup>®</sup> UNIVERSAL PCR MASTER MIX<sup>®</sup> (ABI, CA) 用于 20ng 的逆转录 RNA,总反应体积为 20  $\mu$ l。每种 cDNA 样品重复运行两次以校正吸量误差。引物和 FAM 标记的 TAQMAN 探针以 200nm 的浓度使用。使用此前由 Applied Biosystems 开发的人 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 内源性对照对每一个靶标基因的表达水平进行归一化。引物和探针组在表 12 中列出。在 50 $^{\circ}$ C 下初始孵育 2 分钟然后 95 $^{\circ}$ C 下孵育 10 分钟后,将样品进行 40 次的两阶段循环:变性步骤,95 $^{\circ}$ C 15 秒,然后退火/延伸步骤,60 $^{\circ}$ C 1 分钟。用 GENEAMP<sup>®</sup> 7000 序列检测系统软件进行数据分析。对于每个引物/探针组,Ct 值确定为荧光强度达到扩增指数区中部中的特定值时的循环数。用比较性 Ct 方法来计算相对基因表达水平。简而言之,对于每种 cDNA 样品,从所关注基因的 Ct 值减去内源对照 Ct 值而得到改变的 Ct 值 ( $\Delta$ Ct)。靶标的归一化量计算为  $2^{-\Delta Ct}$ ,假设扩增为 100% 的效率。最终的数据是相对于校准样品表示的。

[0452] 高内涵分析:在培养结束时,将测试平板用 PBS (Invitrogen; 目录号 14190) 洗涤一次,用 4% 多聚甲醛 (Alexis Biochemical; 目录号 ALX-350-011) 在室温下固定 20 分钟,然后用 PBS 洗涤三次并用 0.5% Triton X-100 (Sigma; 目录号 T8760-2) 在室温下透化处理 20 分钟。将细胞再用 PBS 洗涤三次,然后用 4% 鸡血清 (Invitrogen; 目录号 16110082) 在 PBS 中于室温下封闭 30 分钟。将一抗 (山羊抗人 SOX17; R&D Systems; 目录号 AF1924) 在 4% 鸡血清中以 1 : 100 稀释,在室温下加至每个孔保持两小时。在用 PBS 洗涤三次后,将以 1 : 200 稀释于 PBS 中的 Alexa Fluor488 缀合的二抗 (鸡抗山羊 IgG; Invitrogen; 目录号 A21467) 加至每个孔。为了对细胞核进行复染,在室温下加入 5  $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Invitrogen; 目录号 H3570) 保持十分钟。将板用 PBS 洗涤一次,并保留在 100  $\mu$ l / 孔 PBS 中以进行成像。用于分析的其他一抗包括 1 : 100 稀释的小鼠抗人 CDX2 (Invitrogen; 目录号 397800)、1 : 100 稀释的山羊抗人 Pdx1 (Santa Cruz Biotechnology; 目录号 SC-14664)、1 : 200 稀释的兔抗人胰岛素 (Cell Signaling; 目录号 C27C9) 和 1 : 1500 稀释的小鼠抗人胰高血糖素 (Sigma-Aldrich; 目录号 G2654)。用于分析的二抗包括 1 : 400 稀释的 Alexa Fluor647 鸡抗小鼠 IgG (Invitrogen; 目录号 A-21463)、1 : 200 稀释的 Alexa Fluor488 驴抗山羊 IgG (Invitrogen; 目录号 A11055)、1 : 1000 稀释的 Alexa Fluor 647 鸡抗兔 IgG (Invitrogen; 目录号 A21443) 和 1 : 1000 稀释的 Alexa Fluor 488 鸡抗小鼠 (Invitrogen; 目录号 A21200)。

[0453] 用 IN Cell Analyzer1000 细胞分析仪 (GE Healthcare) 进行成像,对于用 Hoechst33342 和 Alexa Fluor488 染色的细胞采用 51008bs 二向分色镜。从每孔的 25 个视野获得图像。用 INCell Developer Toolbox1.7 (GE Healthcare) 软件从每个孔获得总

强度的测量值。基于灰阶水平（基线范围 100-300）和核大小确定细胞核的分裂情况。计算每个重复数据集的平均值和标准偏差。总蛋白表达记录为总强度或累积强度，该强度定义为细胞总荧光乘以细胞面积。基于灰阶范围在 200 至 4500 之间的接受标准来去除背景。通过将每个孔的总强度除以阳性对照的平均总强度，将总强度数据进行归一化。

[0454] 从分化各步收获的细胞的代表性分化标志物的 PCR 结果在表 13 中示出。用 GDF-8 和 Wnt3a 处理或用 GDF-8 和化合物 34 或化合物 56 处理的样品显示类似的，或在某些情况下，显示出改善的与内胚层和内分泌分化相关的表达标志物的表达水平。

[0455] 图 3 示出了 FACS 分析的结果，显示了在分化的第一个步骤后定形内胚层标志物 CXCR4 的表达。用 GDF-8 和 Wnt3a 处理人胚胎干细胞与用激活素 A 和 Wnt3a 处理相比产生了相等百分比的 CXCR4 阳性细胞。类似地，用 GDF-8 和小分子（化合物 34 或化合物 56）处理人胚胎干细胞也产生相等或稍高百分比的 CXCR4 阳性细胞。图 4 示出了在三天的向定形内胚层分化后人胚胎干细胞中归一化的 SOX17 蛋白表达的高内涵图像分析。使用 GDF-8 与 Wnt3a 或 GDF-8 与小分子的处理组的表达水平类似于用激活素 A 和 Wnt3a 的处理。

[0456] 图 5 示出了在向胰腺内胚层分化的第三个步骤后人胚胎干细胞中归一化的 Pdx1 和 Cdx2 蛋白表达的高内涵图像分析。使用 GDF-8 与 Wnt3a 或 GDF-8 与 Wnt3a 或 GDF-8 与本发明化合物的处理组的表达水平显示出相当水平的 PDX1 和 CDX2。在一些处理组中，在分化后保持的细胞数减少，从而增加了表达 PDX1 的细胞的比例。在分化的第四个步骤后，在所有处理组中获得显示相当的归一化 PDX1 表达的类似结果，如图 6 所示。在图 7 中，示出了胰岛素和胰高血糖素的归一化蛋白质水平，从而说明激活素 A 和 GDF-8 处理组之间的相当表达。

[0457] 这些综合结果说明，GDF-8 与 Wnt3a 或化合物 34 或化合物 56 结合可在定形内胚层分化以及后续的胰腺内胚层和内分泌分化期间替代激活素 A。

#### [0458] 实例 13

##### [0459] 使用 GDF 蛋白家族的其他成员形成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞

[0460] 确定用其他 GDF 家族成员处理人胚胎干细胞是否可以形成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞是重要的。在人胚胎干细胞上测试了与化合物 34 或化合物 56 结合的 Wnt3a 与六种不同 GDF 生长因子 [GDF-3、GDF-5、GDF-8、GDF-10、GDF-11 和 GDF-15] 的结合，以确定 GDF 蛋白家族的成员使人胚胎干细胞向表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化的能力。维持用激活素 A 和 Wnt3a 处理过的细胞的平行对照以用于比较目的。

[0461] 用于测定法的细胞准备：将人胚胎干细胞（H1 人胚胎干细胞系）的母培养物以未分化、多能状态维持在 MEF 调理培养基中的低生长因子 MATRIGEL™ (BD Biosciences；目录号 356231) 包被的平皿上，平均每四天传代。传代通过这样来完成：将细胞培养物在 37°C 下暴露于 1mg / ml 分散酶 (Invitrogen；目录号 17105-041) 溶液 5 至 7 分钟，然后用 MEF 调理培养基冲洗该单层并小心刮擦以回收细胞簇。将细胞簇低速离心以收集细胞沉淀并除去残余分散酶。将细胞簇以 1 : 3 或 1 : 4 的比例分传以进行例行维持培养，或者以 1 : 1 比例分传以立即进行测试。将所有的人 ES 细胞系以小于 50 的传代数进行维持，并例行评估核型是否正常和支原体是否存在。

[0462] 将细胞簇均匀地再悬浮于补充有 8ng / ml bFGF 的 MEF 调理培养基中，并以 0.1ml / 孔的体积接种至低生长因子 MATRIGEL™ 包被的 96 孔 Packard

VIEWPLATES(PerkinElmer;目录号 6005182) 上。日常饲养是通过从每个孔抽吸掉废培养基并用等体积的新鲜培养基替换来进行。在整个测定法期间,将板维持在 37°C、5% CO<sub>2</sub>下。

[0463] 测定法:如下开始该测定法:从每个孔抽吸掉培养基,并重新添加测试培养基的等分试样(100 μl)。测试条件在总共四天的测定期间重复进行三次,在第 1 天和第 3 天通过从各孔抽吸培养基并用新鲜测试培养基替换该培养基来饲养。获得 GDF 蛋白家族的多个成员用于如下测试:GDF-3(PeproTech;目录号 120-22);GDF-5(DePuy Orthopaedics, Inc., Johnson&Johnson 的公司);GDF-8(R&D Systems;目录号 788-G8);GDF-10(R&D Systems;目录号 1543-BP);GDF11(PeproTech;目录号 120-11);GDF-15(R&D Systems;目录号 957-GD)。在测定的第一天,所有孔均接受等分量(80 μl)的补充有 0.5%胎牛血清(Hyclone;目录号 SH30070.03)的基础培养基 DMEM:F12 培养基(Invitrogen;目录号 11330-032)。产生一系列五个不同的对照或实验测试样品来评价激活素 A 或多种 GDF 与 Wnt3a 或化合物 34 或化合物 56 的结合。这些测试样品以 20 μl 等分试样(5x 浓缩液)添加到经适当匹配的测定孔,以在所指示的最终测定条件下在各孔中产生 100 μl 的最终测定体积。在第一组对照样品中,测试下面的条件:1) 没有添加剂(即,没有补充的生长因子或小分子);2) 100ng/ml 激活素 A(PeproTech;目录号 120-14) 结合 20ng/ml Wnt3a(R&D Systems;目录号 1324-WN/CF);3) 仅 20ng/ml Wnt3a;4) 仅化合物 34(2.5 μM) 而无任何生长因子或小分子;5) 仅化合物 56(2.5 μM) 而无任何生长因子或小分子。在第二组测试样品中,测试了与 100ng/ml GDF3 结合的如下条件:1) 没有添加剂(即,仅 GDF-3);2) 20ng/ml Wnt3a;3) 20ng/ml Wnt3a 与化合物 34(2.5 μM);4) 化合物 34(2.5 μM);5) 化合物 56(2.5 μM) 和 6) 20ng/ml Wnt3a 与化合物 56(2.5 μM)。在第三组测试样品中,将六种条件中的每一种与 100ng/ml GDF-5 组合。在第四组测试样品中,将六种条件中的每一种与 100ng/ml GDF-8 组合。在第五组测试样品中,将六种条件中的每一种与 100ng/ml GDF-10 组合。在第六组测试样品中,将六种条件中的每一种与 100ng/ml GDF-11 组合。在第七组测试样品中,将六种条件中的每一种与 100ng/ml GDF-15 组合。在测定法的第三天,所有测试样品的所有孔均接受稀释进补充有 2% FBS 的 DMEM:F12 培养基中的 100ng/ml 激活素 A 或 100ng/ml 各 GDF 生长因子,而没有 Wnt3a 或化合物 34 或化合物 56。

[0464] 高内涵分析:在培养结束时,将测试平板用 PBS(Invitrogen;目录号 14190) 洗涤一次,用 4%多聚甲醛(Alexis Biochemical;目录号 ALX-350-011) 在室温下固定 20 分钟,然后用 PBS 洗涤三次并用 0.5% Triton X-100(Sigma;目录号 T8760-2) 在室温下透化处理 20 分钟。将细胞再用 PBS 洗涤三次,然后用 4%鸡血清(Invitrogen;目录号 16110082) 在 PBS 中于室温下封闭 30 分钟。将一抗(山羊抗人 SOX17;R&D Systems;目录号 AF1924) 在 4%鸡血清中以 1:100 稀释,在室温下加至每个孔保持两小时。在用 PBS 洗涤三次后,将以 1:200 稀释于 PBS 中的 Alexa Fluor488 缀合的二抗(鸡抗山羊 IgG;Invitrogen;目录号 A21467) 加至每个孔。为了对细胞核进行复染,在室温下加入 5 μg/ml Hoechst33342(Invitrogen;目录号 H3570) 保持十分钟。将板用 PBS 洗涤一次,并保留在 100 μl / 孔 PBS 中以进行成像。

[0465] 用 IN Cell Analyzer1000 细胞分析仪(GE Healthcare) 进行成像,对于用 Hoechst33342 和 Alexa Fluor488 染色的细胞采用 51008bs 二向分色镜。从每孔的 25 个



视野获得图像。用 IN Cell Developer Toolbox1.7(GE Healthcare) 软件从每个孔获得总强度的测量值。基于灰阶水平(基线范围 100-300)和核大小确定细胞核的分裂情况。计算每个重复数据集的平均值和标准偏差。总蛋白表达记录为总强度或累积强度,该强度定义为细胞总荧光乘以细胞面积。基于灰阶范围在 200 至 4500 之间的接受标准来去除背景。通过将每个孔的总强度除以阳性对照的平均总强度,将总强度数据进行归一化。

[0466] 图 8 示出了在四天的向定形内胚层分化后人胚胎干细胞中 SOX17 蛋白表达的高内涵图像分析。在每种情况下,将结果相对于使用激活素 A 和 Wnt3a 的阳性对照处理进行归一化。在图 8A 中,仅阳性对照处理产生显著的 SOX17 表达,而单独用 Wnt3a 或单独用化合物 34 或化合物 56 的处理不能诱导 SOX17 表达。在图 8 的分图 B 至分图 G 中,示出了在各个处理中替代激活素 A 的各 GDF 生长因子的归一化 SOX17 表达水平。GDF-3(图 8B)和 GDF-5(图 8C)诱导了较弱的 SOX17 表达,并且仅在存在其中一种本发明化合物的测试样品。GDF10(图 8D)、GDF11(图 8E)和 GDF15(图 8G)诱导了显著水平的 SOX17 表达,其超过采用 GDF3 或 5 处理所观察到的,但少于采用激活素 A 和 Wnt3a 处理所观察到的。通常,SOX17 表达在 GDF-10、GDF-11 或 GDF-15 与 Wnt3a 结合时可忽略不计,但在与其中一种本发明化合物结合时尤其是在与化合物 34 结合时得到改善。图 8D 示出了使用 GDF-8 的处理组的结果,其中 GDF-8 与化合物 34 或化合物 56 结合导致强的 SOX17 诱导,超过了采用激活素 A/Wnt3a 阳性对照所观察到的结果。在这些实例的一些中,与 GDF 生长因子组合的化合物 34 或化合物 56 的存在也在分化期间引起细胞数的增加。

[0467] 这些综合结果说明,在与化合物 34 或化合物 56 结合使用时 GDF-8 优于所检测的所有其他 GDF 家族成员,并可在定形内胚层分化期间替代激活素 A。

#### [0468] 实例 14

##### [0469] 使用 TGF 蛋白超家族的其他成员形成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞

[0470] 确定用其他 TGF 超级族成员处理人胚胎干细胞是否可促进形成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞是重要的。在人胚胎干细胞上测试了与 TGF13-1、BMP2、BMP3 或 BMP4 相结合的化合物 34 和 Wnt3a,以确定 TGF 蛋白超家族的成员使人胚胎干细胞向表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化的能力。同时,将两种不同商业来源的 GDF-8 与 Wnt3a 一起进行测试,以测试其使人胚胎干细胞向表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化的能力。维持使用激活素 A 与 Wnt3a 的阳性对照以用于比较目的。

[0471] 用于测定法的细胞的准备:将人胚胎干细胞(H1 人胚胎干细胞系)的母培养物以未分化、多能状态维持在 MEF 调理培养基中的低生长因子 MATRIGEL™(BD Biosciences;目录号 356231) 包被的平皿上,平均每四天进行传代。传代通过如下来完成:将细胞培养物在 37°C 下暴露于 1mg / ml 分散酶(Invitrogen;目录号 17105-041) 溶液 5 至 7 分钟,然后用 MEF 调理培养基冲洗该单层并小心刮擦以回收细胞簇。将细胞簇低速离心以收集细胞沉淀并除去残余分散酶。将细胞簇以 1:3 或 1:4 的比例分传以进行例行维持培养,或者以 1:1 比例分传以立即进行测试。将所有的人胚胎干细胞系以小于 50 的传代数进行维持,并例行评价核型是否正常和支原体是否存在。

[0472] 将细胞簇均匀地再悬浮于补充有 8ng / ml bFGF 的 MEF 调理培养基中,并以 0.1ml / 孔的体积接种至低生长因子 MATRIGEL™包被的 96 孔 Packard VIEWPLATES(PerkinElmer;目录号 6005182) 上。日常饲养是通过从每个孔抽吸掉废培养基

并用等体积的新鲜培养基替换来进行。在整个测定法期间,将板维持在 37°C、5% CO<sub>2</sub>下。

[0473] 测定法:如下开始该测定法:从每个孔抽吸掉培养基,并重新添加测试培养基的等分试样(100 μl)。测试条件在总共三天的测定期间重复进行三次,在第 1 天和第 2 天通过从各孔抽吸培养基并用新鲜测试培养基替换该培养基来饲养。获得多种生长因子蛋白用于如下测试:BMP-2(R&D Systems;目录号 355-BM);BMP-3(R&D Systems;目录号 113-BP);BMP-4(R&D Systems;目录号 314-BP);TGF β-1(R&D Systems;目录号 240-B);GDF-8(PeproTech;目录号 120-00);GDF-8(Shenandoah;目录号 100-22)和激活素 A(PeproTech;目录号 120-14)。在测定法的第一天,各孔用 80 μl 的生长培养基[含有 2.5%牛血清白蛋白第 V 组分、无脂肪酸(FAF)BSA(MP Biomedicals, Inc;目录号 152401)和 10ng/ml bFGF 的 RPMI-1640(Invitrogen;目录号:22400)]处理。在一些孔中,将 25ng/ml Wnt3a(R&D Systems;目录号 1324-WN / CF)添加至生长培养基以产生 20ng/ml 的最终测定浓度。在一些孔中,将激活素 A 添加至生长培养基以产生 100ng/ml 的最终测定浓度。在一些孔中,将 3.125 μM 化合物 34 添加至生长培养基以产生 2.5 μM 的最终测定浓度。生长因子(5x 浓缩物,稀释于 RPMI-1640 中)的剂量滴定也添加至各测定孔以对所有测试条件在各孔中产生 100 μl 的最终测试体积。在测定法的第二天,Wnt3a 和化合物 34 从该测定法中省去。所有孔均接受 80 μl 的生长培养基[含有 2.5% FAF BSA 和 10ng/ml bFGF 的 RPMI-1640]和 20 μl 的各生长因子稀释液(5x 浓缩物,稀释于 RPMI-1640 中)。用于该测定法的比较对照包括:1) 无添加的生长因子;2) 仅 Wnt3a;以及 3) 激活素 A 与 Wnt3a。测试了与 Wnt3a 相结合的每种市售 GDF-8。将 BMP 生长因子的每一种以及 TGF β-1 与 Wnt3a 结合、与化合物 34 结合以及与 Wnt3a 和化合物 34 两者结合来测试。

[0474] 高内涵分析:在培养结束时,将测试平板用 PBS(Invitrogen;目录号 14190)洗涤一次,用 4%多聚甲醛(Alexis Biochemical;目录号 ALX-350-011)在室温下固定 20 分钟,然后用 PBS 洗涤三次并用 0.5% Triton X-100(Sigma;目录号 T8760-2)在室温下透化处理 20 分钟。将细胞再用 PBS 洗涤三次,然后用 4%鸡血清(Invitrogen;目录号 16110082)在 PBS 中于室温下封闭 30 分钟。将一抗(山羊抗人 SOX17;R&D Systems;目录号 AF1924)在 4%鸡血清中以 1:100 稀释,在室温下加至每个孔保持两小时。在用 PBS 洗涤三次后,将以 1:200 稀释于 PBS 中的 Alexa Fluor488 缀合的二抗(鸡抗山羊 IgG;Invitrogen;目录号 A21467)加至每个孔。为了对细胞核进行复染,在室温下加入 5 μg/ml Hoechst33342(Invitrogen;目录号 H3570)保持十分钟。将板用 PBS 洗涤一次,并保留在 100 μl / 孔 PBS 中以进行成像。

[0475] 用 IN Cell Analyzer1000 细胞分析仪(GE Healthcare)进行成像,对于用 Hoechst33342 和 Alexa Fluor488 染色的细胞采用 51008bs 二向分色镜。从每孔的 25 个视野获得图像。用 IN Cell Developer Toolbox1.7(GE Healthcare)软件从每个孔获得总强度的测量值。基于灰阶水平(基线范围 100-300)和核大小确定细胞核的分裂情况。计算每个重复数据集的平均值和标准偏差。总蛋白表达记录为总强度或累积强度,该强度定义为细胞总荧光乘以细胞面积。基于灰阶范围在 200 至 4500 之间的接受标准来去除背景。通过将每个孔的总强度除以阳性对照的平均总强度,将总强度数据进行归一化。

[0476] 图 9 示出了在三天的向定形内胚层分化后人胚胎干细胞中 SOX17 蛋白表达的高内涵图像分析。在每种情况下,将结果相对于采用激活素 A 与 Wnt3a 的阳性对照处理进行归

一化。图 9A 中的结果显示,仅使用生长因子或仅使用 Wnt3a 的处理不能诱导 SOX17 表达;只有添加激活素 A 才引起强的 SOX17 表达。在图 9 的分图 B 和分图 C 中,描述了所述市售 GDF-8 中每一者的结果,其显示两供应商之间的效力差别。尽管比激活素 A 效力低,但是在用 GDF-8 结合 Wnt3a 处理的细胞中有显著的 SOX17 表达诱导。在图 9 的分图 D、E、F 和 G 中,示出了使用 BMP2、BMP3、BMP4 和 TGF  $\beta$  -1,掺入各生长因子的剂量滴定,结合 Wnt3a 或化合物 34 或结合 Wnt3a 和化合物 34 两者的定形内胚层分化的结果。尽管一些处理在测定法结束时对细胞数具有显著影响(如,BMP2 和 BMP4),但由这些生长因子和处理组合中任一者引起 SOX17 表达的诱导与单独 Wnt3a 处理相比是微弱或可忽略不计的。

#### [0477] 实例 15

#### [0478] 对用所选择的本发明化合物形成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的剂量范围研究

[0479] 了解将介导表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞形成的化合物 181、化合物 180、化合物 19、化合物 202、化合物 40 和化合物 34 的最佳工作浓度是重要的。与之相结合,在定形内胚层测定法中针对与激活素 A 或 GDF-8 结合的各化合物滴定进行并列比较。最后,在测定法中测试了各化合物的暴露持续时间,同样是与激活素 A 或 GDF-8 相结合,仅在测定法的第一天或在整个定形内胚层形成的全部三天期间添加化合物。

[0480] 用于测定法的细胞的准备:将人胚胎干细胞(H1 人胚胎干细胞系)的母培养物以未分化、多能状态维持在补充有 8ng / ml bFGF(PeproTech Inc.;目录号 100-18B)的 MEF 调理培养基中的低生长因子 MATRIGEL™(BD Biosciences;目录号 356231)包被的平皿上,平均每四天进行传代。传代通过如下来进行:使细胞培养物在 37°C 下暴露于 1mg / ml 分散酶(Invitrogen;目录号 17105-041)溶液 5 至 7 分钟,然后用 MEF 调理培养基冲洗该单层并小心刮擦以回收细胞簇。将细胞簇低速离心以收集细胞沉淀并除去残余分散酶。将细胞簇以 1:3 或 1:4 的比例分传以进行例行维持培养,或者以 1:1 比例分传以立即进行测试。将所有的人胚胎干细胞系以小于 50 的传代数进行维持,并例行评价核型是否正常和支原体是否存在。

[0481] 将细胞簇均匀地再悬浮于补充有 8ng / ml bFGF 的 MEF 调理培养基中,并以 0.1ml / 孔的体积接种至低生长因子 MATRIGEL™包被的 96 孔 Packard VIEWPLATES(PerkinElmer;目录号 6005182)上。日常饲养是通过从每个孔抽吸掉废培养基并用等体积的新鲜培养基替换来进行。在整个测定法期间,将板维持在 37°C、5% CO<sub>2</sub>下。

[0482] 测定法:如下开始该测定法:从每个孔抽吸掉培养基,并重新添加测试培养基的等分试样(100  $\mu$ l)。测试条件在总共四天测试期间重复进行四次,每天通过从各孔抽吸培养基并用新鲜测试培养基替换该培养基来饲养。各孔用 80  $\mu$ l 的生长培养基[含有 2.5% 牛血清白蛋白第 V 组分、无脂肪酸(FAF)BSA(MP Biomedicals, Inc.;目录号 152401)、10ng / ml bFGF 和另外的生长因子(1.25x 浓缩物)的 RPMI-1640(Invitrogen;目录号:22400)]以及 20  $\mu$ l 的测试化合物(5x 浓缩物,稀释于 RPMI-1640 中)处理,以在各孔中产生 100u1 的最终测定浓度。在本测定法中的测试化合物包括六种本发明的化合物:化合物 181、化合物 180、化合物 19、化合物 202、化合物 40 和化合物 34,以及市售的 GSK3i 抑制剂 BIO(EMD Chemicals, Inc.;目录号 361550)。在测定法的第一天,将孔用多种对照或实验条件处理。具有所指示的最终测定浓度的对照条件如下:1)仅生长培养基;2)仅 20ng / ml Wnt3a(R&D

Systems ; 目录号 1324-WN / CF) ;3) 100ng / ml 激活素 A (PeproTech ; 目录号 120-14) ; 4) 100ng / ml 激活素 A 和 20ng / ml Wnt3a ;5) 100ng / ml GDF-8 (R&D Systems, 目录号 788-G8) ;6) 100ng / ml GDF-8 和 20ng / ml Wnt3a。将测试化合物进行系列两倍稀释, 以在最终测定法中产生 78nM 至 10  $\mu$ M 的浓度范围。实验测试样品组合了各单独的化合物系列稀释物与 100ng / ml 激活素 A 或 100ng / ml GDF-8, 两种处理组均无 Wnt3a。在测定法的第二天和第三天, 将一些孔继续用 20ng / ml Wnt3a 或稀释的测试化合物与激活素 A 或 GDF-8 结合来处理。在其他孔中, 激活素 A 或 GDF-8 处理在测定法的第二天和第三天继续进行, 但移除了 Wnt3a 或稀释的测试化合物。

[0483] 高内涵分析: 在培养结束时, 将测试平板用 PBS (Invitrogen ; 目录号 14190) 洗涤一次, 用 4% 多聚甲醛 (Alexis Biochemical ; 目录号 ALX-350-011) 在室温下固定 20 分钟, 然后用 PBS 洗涤三次并用 0.5% Triton X-100 (Sigma ; 目录号 T8760-2) 在室温下透化处理 20 分钟。将细胞再用 PBS 洗涤三次, 然后用 4% 鸡血清 (Invitrogen ; 目录号 16110082) 在 PBS 中于室温下封闭 30 分钟。将一抗 (山羊抗人 SOX17 ; R&D Systems ; 目录号 AF1924) 在 4% 鸡血清中以 1 : 100 稀释, 在室温下加至每个孔保持两小时。在用 PBS 洗涤三次后, 将以 1 : 200 稀释于 PBS 中的 Alexa Fluor488 缀合的二抗 (鸡抗山羊 IgG ; Invitrogen ; 目录号 A21467) 加至每个孔。为了对细胞核进行复染, 在室温下加入 5  $\mu$ g/ml Hoechst33342 (Invitrogen ; 目录号 H3570) 保持十分钟。将板用 PBS 洗涤一次, 并保留在 100  $\mu$ l / 孔 PBS 中以进行成像。

[0484] 用 IN Cell Analyzer1000 细胞分析仪 (GE Healthcare) 进行成像, 对于用 Hoechst33342 和 Alexa Fluor488 染色的细胞采用 51008bs 二向分色镜。从每孔的 25 个视野获得图像。用 IN Cell Developer Toolbox1.7 (GE Healthcare) 软件从每个孔获得总强度的测量值。基于灰阶水平 (基线范围 100-300) 和核大小确定细胞核的分裂情况。计算每个重复数据集的平均值和标准偏差。总蛋白表达记录为总强度或累积强度, 该强度定义为细胞总荧光乘以细胞面积。基于灰阶范围在 200 至 4500 之间的接受标准来去除背景。通过将每个孔的总强度除以阳性对照的平均总强度, 将总强度数据进行归一化。

[0485] 结果: SOX17 表达的高内涵分析结果在图 10-14 中示出, 在测定结束时所得的细胞数在图 15-19 中示出。在图 10 中, 示出了由单独或与 Wnt3a 结合使用激活素 A 或 GDF-8 的对照处理产生的 SOX17 表达的结果。激活素 A 处理导致比用 GDF-8 处理所观察到的明显更高的 SOX17 表达。类似地, 如图 15 所示, 不论测定期间 Wnt3a 存在一天或三天, 激活素 A 处理导致在测定法结束时比用 GDF-8 处理所观察到的更高的细胞数。不论化合物在测定开始时存在一天还是在整个测定期间存在三天, 激活素 A 处理添加化合物 181、化合物 180、化合物 19、化合物 202、化合物 40 或化合物 34 中任一者不会增强 SOX17 表达 (图 11-12) 或增加细胞数 (图 17-18)。然而, 使用化合物 181、化合物 180、化合物 19、化合物 202、化合物 40 或化合物 34 结合 GDF-8 的处理显著改善了 SOX17 表达 (图 13-14) 并且也提高了测定法结束时的细胞数 (图 18-19)。当化合物 181、化合物 180、化合物 19、化合物 202、化合物 40 或化合物 34 以及 GDF-8 结合使用时, 在许多情况下对 SOX17 表达和细胞数的改善与使用激活素 A 处理所观察到的结果相当。尽管有时在最高浓度下观察到毒性, 但结合 GDF-8 的改善分化对许多化合物的剂量滴定效果明显。在大部分情况下, 仅在测定法开始时暴露于化合物一天, 通过化合物和 GDF-8 处理获得的最佳有益效果是明显的。在一些情况下, 在整个

测定法期间化合物的存在没有不利的效果或具有略微有益的效果。根据这些综合结果,与 GDF8 处理相结合的每种化合物的最佳工作浓度范围得以确定。如本测定法所测试的,结果是化合物特异性的,通常在 1-10  $\mu\text{M}$  的范围内。

[0486] 实例 16

[0487] 不根据本发明方法形成的表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞能够进一步分化为表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞

[0488] 就定形内胚层分化对另外的小分子与 GDF-8 相结合进行了测试。这些包括市售的 GSK3 抑制剂以及本发明的化合物。将分步分化方案应用到用 GDF-8 结合多种小分子处理过的细胞。通过代表胰腺内胚层或胰腺内分泌谱系的生物标志物的基因表达来确定分化的效力。在整个分步分化过程中,维持用激活素 A 和 Wnt3a 处理的细胞的平行对照样品以用于比较目的。

[0489] 用于测定法的细胞准备:将人胚胎干细胞(H1 人胚胎干细胞系)的母培养物以未分化、多能状态维持在 MEF 调理培养基中的低生长因子 MATRIGEL™(BD Biosciences; 目录号 356231) 包被的平皿上,平均每四天传代。传代通过这样进行:使细胞培养物在 37°C 下暴露于 1mg / ml 分散酶(Invitrogen, 目录号:17105-041) 的溶液 5 至 7 分钟,然后用 MEF 调理培养基冲洗该单层并小心刮擦以回收细胞簇。将细胞簇低速离心以收集细胞沉淀并除去残余的分散酶。将细胞簇以 1 : 3 或 1 : 4 的比例分传以进行例行维持培养,或者以 1 : 1 比例分传以立即进行测试。将所有的人胚胎干细胞系以小于 50 的传代数进行维持,并例行评价核型是否正常和支原体是否存在。

[0490] 将细胞簇均匀地再悬浮于补充有 8ng / ml bFGF 的 MEF 调理培养基中,并以 0.5ml / 孔的体积接种到低生长因子 MATRIGEL 包被的 24 孔黑壁培养板(Arctic White; 目录号 AWLS-303012) 上。日常饲养是通过从每个孔抽吸掉废培养基并用等体积的新鲜培养基替换来进行。在整个测定法期间,将板维持在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下。

[0491] 测定法:如下开始该测定法:从每个孔抽吸掉培养基,并重新添加测试培养基的等分试样(0.5ml)。在三天的周期内进行分化第一步的测试条件,每天通过从各孔抽吸培养基并用新鲜的测试培养基替换该培养基来饲养。在测定法的第一天,将 100ng / ml 激活素 A(PeproTech; 目录号 120-14) 或 100ng / ml GDF-8(R&D Systems, 目录号 788-G8) 添加至各测定孔,其中各生长因子被稀释进具有 2% 牛血清白蛋白第 V 组分、无脂肪酸(FAF BSA)(Proliant Inc., 目录号:SKU68700) 和 20ng / ml Wnt3a(R&D Systems; 目录号 1324-WN / CF) 的 RPMI-1640 培养基(Invitrogen; 目录号:22400) 中。在该测定法的第二天,将 100ng / ml 激活素 A 或 100ng / ml GDF-8 稀释进补充有 2% FAF BSA 但没有 Wnt3a 的 RPMI-1640 培养基中。在一些使用 GDF-8 的测试样品中,用小分子化合物代替 Wnt3a,其仅在定形内胚层分化的第一天添加。这些小分子包括化合物 19(在测定法中为 2.5  $\mu\text{M}$ )、化合物 202(在测定法中为 2.5  $\mu\text{M}$ )、化合物 40(在测定法中为 2.5  $\mu\text{M}$ ) 或市售的 GSK3 抑制剂 BIO(在测定法中为 0.5  $\mu\text{M}$ ) (EMD Chemicals, Inc.; 目录号 361550)。在分化的第一步结束时,从一些孔收获细胞进行流式细胞检测分析,以评价 CXCR4(定形内胚层形成的标志物)的水平。从另外的孔收获样品用于 RT-PCR 分析,以测量其他分化标志物。

[0492] 在定形内胚层分化第一步结束时,使各处理组的重复平行孔组进行进一步分步分化。重要的是注意在第一个分化步骤之后,所有经历后续培养和分化的孔均接受相同的处

理。这种连续分化的方案在下面描述。

[0493] 用二天进行该分化方案的步骤 2。通过从各孔抽吸培养基并用新鲜等分量 (0.5ml) 的 DMEM:F12 培养基 (Invitrogen; 目录号 11330-032) 替换每天对细胞进行饲养, 所述 DMEM:F12 培养基含有 2% FAF BSA、50ng / ml FGF7 (PeproTech; 目录号 100-19) 和 250nM 环巴胺-KAAD (Calbiochem; 目录号 239804)。

[0494] 用七天进行该分化方案的步骤 3。通过从各孔抽吸培养基并用新鲜等分量 (0.5ml) 的高葡萄糖 DMEM (Invitrogen; 目录号 10569) 替换每天对细胞进行饲养, 所述高葡萄糖 DMEM 补充有 0.1% Albumax (Invitrogen; 目录号: 11020-021)、0.5x 胰岛素-转铁蛋白-硒 (ITS-X; Invitrogen; 目录号 51500056)、50ng / ml FGF7、100ng / ml 成头蛋白 (R&D Systems; 目录号 3344-NG)、250nM KAAD-环巴胺和 2mM 全反式视黄酸 (RA) (Sigma-Aldrich; 目录号 R2625)。在该分化的第三个步骤结束时, 从一些孔收获细胞用于通过 RT-PCR 分析以测量分化的标志物。对其他培养孔进行 Pdx1 和 Cdx2 的蛋白质表达水平的高内涵图像分析。

[0495] 用三天进行该分化方案的步骤 4。通过从各孔抽吸培养基并用新鲜等分量 (0.5ml) 的高 DMEM 葡萄糖替换每天对细胞进行饲养, 所述高葡萄糖 DMEM 补充有 0.1% Albumax、0.5x 胰岛素-转铁蛋白-硒、100ng / ml 成头蛋白和 1  $\mu$ M Alk5 抑制剂 (Axxora; 目录号 ALX-270-445)。在该分化的第四个步骤结束时, 从一些孔收获细胞用于通过 RT-PCR 分析以测量分化的标志物。对其他培养孔进行 Pdx1 蛋白质表达水平的高内涵图像分析。

[0496] 该分化方案的步骤 5 在具有 0.1% Albumax、0.5x 胰岛素-转铁蛋白-硒和 1  $\mu$ M Alk5 抑制剂的高葡萄糖 DMEM 中进行七天。每天抽吸各孔中的培养基并用新鲜等分试样 (0.5ml) 替换。在该分化的第五个步骤结束时, 从一些孔收获细胞用于通过 RT-PCR 分析以测量分化的标志物。对其他培养孔进行胰岛素和胰高血糖素的蛋白质表达水平的高内涵图像分析。

[0497] FACS 分析: 将用于 FACS 分析的细胞于 4  $^{\circ}$ C 下在 PBS (Invitrogen; 目录号 14040-133) 中的 0.5% 人  $\gamma$ -球蛋白 (Sigma; 目录号 G-4386):BD FACS 染色缓冲液-BSA (BD; 目录号 554657) 的 1:5 溶液中封闭 15 分钟。然后将细胞在 4  $^{\circ}$ C 下用 CD9PE (BD; 目录号 555372)、CD99PE (Caltag; 目录号 MHCD9904) 和 CXCR4APC (R&D Systems; 目录号 FAB173A) 的抗体染色 30 分钟。在 BD FACS 染色缓冲液中的一系列洗涤后, 将细胞用 7-AAD (BD; 目录号 559925) 针对生活力进行染色并在 BDFACSArray 上进行。将针对 PE 和 APC 两者的小鼠 IgG1K 同种型对照抗体用于测量阳性细胞百分数。

[0498] RT-PCR 分析: 通过在存在含乙醇的高盐缓冲液的情况下与硅胶膜 (Rneasy Mini Kit, Qiagen, CA) 结合, 随后通过洗涤来除去污染物来对 RNA 样品进行纯化。用 TURBO DNA-free 试剂盒 (Ambion, INC) 使 RNA 进一步纯化, 并随后将高质量的 RNA 在水中稀释。通过在分光光度计上读取 A260 和 A280 读数来评估产率和纯度。用 ABI (ABI, CA) 大容量 cDNA 库试剂盒从纯化的 RNA 制备 cDNA 拷贝。

[0499] 除非另外指明, 否则所有试剂均购自 Applied Biosystems。实时 PCR 反应用 ABI PRISM<sup>®</sup> 7900 序列检测系统来进行。将 TAQMAN<sup>®</sup> UNIVERSAL PCR MASTER MIX<sup>®</sup> (ABI, CA) 用于 20ng 的逆转录 RNA, 总反应体积为 20  $\mu$ l。每种 cDNA 样品重复运行两次以校正吸量误差。引物和 FAM 标记的 TAQMAN 探针以 200nM 的浓度使用。使用此前由 Applied

Biosystems 开发的人 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 内源性对照对每一个靶标基因的表达水平进行归一化。引物和探针组在表 12 中列出。在 50°C 下初始孵育 2 分钟然后 95°C 下孵育 10 分钟后,将样品进行 40 次的两阶段循环:变性步骤,95°C 15 秒,然后退火/延伸步骤,60°C 1 分钟。数据分析用 GENEAMP<sup>®</sup> 7000 序列检测系统的软件进行。对于每个引物/探针组,Ct 值确定为荧光强度达到扩增指数区中部中的特定值时的循环数。用比较性 Ct 方法来计算相对基因表达水平。简而言之,对于每种 cDNA 样品,从所关注基因的 Ct 值减去内源对照 Ct 值而得到改变的 Ct 值 ( $\Delta Ct$ )。靶标的归一化量计算为  $2^{-\Delta Ct}$ ,假设扩增为 100% 的效率。最终的数据是相对于校准样品表示的。

[0500] 高内涵分析:在培养结束时,将测试平板用 PBS (Invitrogen; 目录号 14190) 洗涤一次,用 4% 多聚甲醛 (Alexis Biochemical; 目录号 ALX-350-011) 在室温下固定 20 分钟,然后用 PBS 洗涤三次并用 0.5% Triton X-100 (Sigma; 目录号 T8760-2) 在室温下透化处理 20 分钟。将细胞再用 PBS 洗涤三次,然后用 4% 鸡血清 (Invitrogen; 目录号 16110082) 在 PBS 中于室温下封闭 30 分钟。将一抗 (山羊抗人 SOX17; R&D Systems; 目录号 AF1924) 在 4% 鸡血清中以 1 : 100 稀释,在室温下加至每个孔保持两小时。在用 PBS 洗涤三次后,将以 1 : 200 稀释于 PBS 中的 Alexa Fluor488 缀合的二抗 (鸡抗山羊 IgG; Invitrogen; 目录号 A21467) 加至每个孔。为了对细胞核进行复染,在室温下加入 5  $\mu$ g / ml Hoechst33342 (Invitrogen; 目录号 H3570) 保持十分钟。将板用 PBS 洗涤一次,并保留在 100  $\mu$ l / 孔 PBS 中以进行成像。用于分析的其他一抗包括 1 : 200 稀释的兔抗人胰岛素 (Cell Signaling; 目录号 C27C9) 和 1 : 1500 稀释的小鼠抗人胰高血糖素 (Sigma-Aldrich; 目录号 G2654)。用于分析的二抗包括:1 : 1000 稀释的 Alexa Fluor647 鸡抗兔 IgG (Invitrogen; 目录号 A21443) 和 1 : 1000 稀释的 Alexa Fluor488 鸡抗小鼠 IgG (Invitrogen; 目录号 A21200)。

[0501] 用 IN Cell Analyzer1000 细胞分析仪 (GE Healthcare) 进行成像,对于用 Hoechst33342 和 Alexa Fluor488 染色的细胞采用 51008bs 二向分色镜。从每孔的 25 个视野获得图像。用 IN Cell Developer Toolbox1.7 (GE Healthcare) 软件从每个孔获得总强度的测量值。基于灰阶水平 (基线范围 100-300) 和核大小确定细胞核的分裂情况。计算每个重复数据集的平均值和标准偏差。总蛋白表达记录为总强度或累积强度,该强度定义为细胞总荧光乘以细胞面积。基于灰阶范围在 200 至 4500 之间的接受标准来去除背景。通过将每个孔的总强度除以阳性对照的平均总强度,将总强度数据进行归一化。

[0502] 从分化各步收获的细胞的代表性分化标志物的 PCR 结果在表 14 中示出。用 GDF-8 和 Wnt3a 处理或用 GDF-8 和小分子处理的样品显示出类似的与内胚层和内分泌分化相关的标志物的表达水平。

[0503] 图 20 分图 A 示出了在分化的第一个步骤后定形内胚层标志物 CXCR4 的 FACS 分析。用 GDF-8 和 Wnt3a 处理人胚胎干细胞与用激活素 A 和 Wnt3a 处理相比产生了类似百分比的 CXCR4 阳性细胞。用 GDF-8 和本发明的化合物 (化合物 19、化合物 202、化合物 40 或 GSK3 抑制剂 IX BIO) 处理人胚胎干细胞也产生相当的或稍高的百分比的 CXCR4 阳性细胞。图 20 分图 B 示出了在三天的向定形内胚层分化后人胚胎干细胞中归一化的 SOX17 蛋白表达的高内涵图像分析。在一些情况下,用 GDF-8 处理导致在分化的第一步结束时细胞数较低。然而,与 Wnt3a 或与小分子抑制剂相结合的 GDF-8 处理明显诱导了 SOX17 (一种定形内

胚层的标志物)的表达。在一种情形下,用 GDF-8 和化合物 40 处理导致培养物中的细胞数和 SOX17 表达与用激活素 A 和 Wnt3 处理的相当。

[0504] 图 20 分图 C 示出了从通过分化步骤 5 处理的培养物回收的相对细胞数的高内涵图像分析。如较早的步骤 1 结束时所观察到的,相对于用激活素 A 和 Wnt3a 处理,一些处理引起细胞回收率的下降。这种细胞数的降低尤其见于使用 GDF-8 与 GSK3 抑制剂 BIO 以及使用 GDF-8 与化合物 19 的处理组。另外的 GDF-8 处理组的细胞回收率类似于使用激活素 A 和 Wnt3a 的处理。在图 20 分图 D-F 中,示出了各处理组的胰岛素和胰高血糖素的归一化蛋白质水平连同它们相应的比率。相对于用激活素 A 和 Wnt3a 处理,类似水平的胰岛素和胰高血糖素可通过 GDF-8 处理中的每一者获得,从而证实了 GDF-8 结合 Wnt3a 或小分子可以在定形内胚层分化和后续胰腺内胚层和内分泌分化期间替代激活素 A。

#### [0505] 实例 17

[0506] 使用 GDF8 和本发明化合物形成的表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞能够进一步分化为表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞

[0507] 针对定形内胚层分化对与 GDF-8 和激活素 A 相结合的其他的小分子进行了测试。这些包括市售的 GSK3 抑制剂以及本发明的化合物。将分步分化方案应用于用 GDF-8 结合多种小分子处理的细胞。通过代表胰腺内胚层和胰腺内分泌谱系的生物标志物的基因表达来确定分化的效力。在整个分步分化过程中,维持用激活素 A 和 Wnt3a 处理过的细胞的平行对照以用于比较目的。

[0508] 用于测定法的细胞的准备:将人胚胎干细胞(H1 人胚胎干细胞系)的母培养物以未分化、多能状态维持在补充有 8ng / ml bFGF(PeproTech Inc.;目录号 100-18B)的 MEF 调理培养基中的低生长因子 MATRIGEL™(BD Biosciences;目录号 356231)包被的平皿上,平均每四天进行传代。传代通过这样来完成:将细胞培养物在 37°C 下暴露于 1mg / ml 分散酶(Invitrogen;目录号 17105-041)溶液 5 至 7 分钟,然后用 MEF 调理培养基冲洗该单层并小心刮擦以回收细胞簇。将细胞簇低速离心以收集细胞沉淀并除去残余的分散酶。将细胞簇以 1:3 或 1:4 的比例分传以进行例行维持培养,或者以 1:1 比例分传以立即进行测试。将所有的人 ES 细胞系以小于 50 的传代数进行维持,并例行评估核型是否正常和支原体是否存在。

[0509] 将细胞簇均匀地再悬浮于补充有 8ng / ml bFGF 的 MEF 调理培养基中,并以 0.5ml / 孔的体积接种到低生长因子 MATRIGEL™包被的 24 孔黑壁培养板(Arctic White;目录号 AWLS-303012)上。日常饲养是通过从每个孔抽吸掉废培养基并用等体积的新鲜培养基替换来进行。在整个测定法期间,将板维持在 37°C、5% CO<sub>2</sub>下。

[0510] 测定法:如下开始该测定法:从每个孔抽吸掉培养基,并重新添加测试培养基的等分试样(0.5ml)。在三天的周期内进行分化第一步的测试条件,每天通过从各孔抽吸培养基并用新鲜的测试培养基替换该培养基来饲养。在测定法的第一天,将 100ng / ml 激活素 A(PeproTech;目录号 120-14)或 100ng / ml GDF-8(R&D Systems,目录号 788-G8)添加至各测定孔,其中各生长因子被稀释进具有 2%牛血清白蛋白第 V 组分、无脂肪酸(FAF)BSA(MP Biomedicals, Inc;目录号 152401)的 RPMI-1640 培养基(Invitrogen;目录号 22400)中。在一些样品中,还包括 20ng / ml Wnt3a(R&D Systems;目录号 1324-WN / CF)。在测定法的第二天,将 100ng / ml 激活素 A 或 100ng / ml GDF-8 稀释进补充有 2% FAF



BSA 的 RPMI-1640 培养基中,将 Wnt3a 从所有样品省去。在一些使用 GDF-8 的测试样品中,用给定浓度的小分子化合物替换 Wnt3a,其仅在定形内胚层分化的第一天添加。这些小分子包括:化合物 181(在测定法中为 1.25  $\mu$ M)、化合物 180(在测定法中为 2.5  $\mu$ M)、化合物 19(在测定法中为 10  $\mu$ M)、化合物 202(在测定法中为 2.5  $\mu$ M)、化合物 40(在测定法中为 5  $\mu$ M)、化合物 34(在测定法中为 2.5  $\mu$ M)、化合物 206(在测定法中为 2.5  $\mu$ M) 和市售的 GSK3 抑制剂 IXBIO(在测定法中为 10  $\mu$ M)(EMD Chemicals, Inc.; 目录号 361550)。在分化的第一步结束时,从一些孔收获细胞进行流式细胞检测分析,以评价 CXCR4(定形内胚层形成的标志物)的水平。从另外的孔收获样品用于 RT-PCR 分析,以测量其他分化标志物。

[0511] 在定形内胚层分化的第一个步骤结束时,各处理组的重复平行孔组经受进一步分化。重要的是注意到在第一个分化步骤之后,所有经历后续培养和分化的孔接受相同的处理。这种连续分化的方案在下面描述。

[0512] 用二天进行该分化方案的步骤 2。通过从各孔抽吸培养基并用新鲜等分量(0.5ml)的 DMEM:F12 培养基(Invitrogen; 目录号 11330-032) 替换每天对细胞进行饲养,所述 DMEM:F12 培养基含有 2% FAF BSA、50ng/ml FGF7(PeproTech; 目录号 100-19) 和 250nM 环巴胺-KAAD(Calbiochem; 目录号 239804)。

[0513] 用四天进行该分化方案的步骤 3。通过从各孔抽吸培养基并用新鲜等分量(0.5ml)的高葡萄糖 DMEM(Invitrogen; 目录号 10569) 替换每天对细胞进行饲养,所述高葡萄糖 DMEM 补充有 0.1% Albumax(Invitrogen; 目录号:11020-021)、0.5x 胰岛素-转铁蛋白-硒(ITS-X; Invitrogen; 目录号 51500056)、50ng/ml FGF7、100ng/ml 成头蛋白(R&D Systems; 目录号 3344-NG)、250nM KAAD-环巴胺和 2  $\mu$ M 全反式视黄酸(RA)(Sigma-Aldrich; 目录号 R2625)。在该分化的第三个步骤结束时,从一些孔收获细胞用于通过 RT-PCR 分析以测量分化的标志物。

[0514] 用三天进行该分化方案的步骤 4。通过从各孔抽吸培养基并用新鲜等分量(0.5ml)的高葡萄糖 DMEM 替换每天对细胞进行饲养,所述高葡萄糖 DMEM 补充有 0.1% Albumax、0.5x 胰岛素-转铁蛋白-硒、100ng/ml 成头蛋白和 1  $\mu$ M Alk5 抑制剂(Axxora; 目录号 ALX-270-445)。在该分化的第四个步骤结束时,从一些孔收获细胞用于通过 RT-PCR 分析以测量分化的标志物。

[0515] 该分化方案的步骤 5 在具有 0.1% Albumax、0.5x 胰岛素-转铁蛋白-硒和 1  $\mu$ M Alk5 抑制剂的高葡萄糖 DMEM 中进行七天。每天抽吸各孔中的培养基并用新鲜等分试样(0.5ml) 替换。在该分化的第五个步骤结束时,从一些孔收获细胞用于通过 RT-PCR 分析以测量分化的标志物。对其他培养孔进行胰岛素和胰高血糖素的蛋白质表达水平的高内涵图像分析。

[0516] FACS 分析:将用于 FACS 分析的细胞于 4 $^{\circ}$ C 下在 PBS(Invitrogen; 目录号 14040-133) 中的 0.5% 人  $\gamma$ -球蛋白(Sigma; 目录号 G-4386):BD FACS 染色缓冲液-BSA(BD; 目录号 554657) 的 1:5 溶液中封闭 15 分钟。然后将细胞在 4 $^{\circ}$ C 下用 CD9PE(BD; 目录号 555372)、CD99PE(Caltag; 目录号 MHCD9904) 和 CXCR4APC(R&D Systems; 目录号 FAB173A) 的抗体染色 30 分钟。在 BD FACS 染色缓冲液中的一系列洗涤后,将细胞用 7-AAD(BD; 目录号 559925) 针对生活力进行染色并在 BD FACSArray 上进行。将针对 PE 和 APC 两者的小鼠 IgG1K 同种型对照抗体用于测量阳性细胞百分数。

[0517] RT-PCR 分析:通过在存在含乙醇的高盐缓冲液的情况下与硅胶膜 (Rneasy Mini Kit, Qiagen, CA) 结合,随后通过洗涤来除去污染物来对 RNA 样品进行纯化。用 TURBO DNA-free 试剂盒 (Ambion, INC) 使 RNA 进一步纯化,并随后将高质量的 RNA 在水中稀释。通过在分光光度计上读取 A260 和 A280 读数来评估产率和纯度。用 ABI (ABI, CA) 大容量 cDNA 库试剂盒从纯化的 RNA 制备 cDNA 拷贝。

[0518] 除非另外指明,否则所有试剂均购自 Applied Biosystems。实时 PCR 反应用 ABI PRISM<sup>®</sup> 7900 序列检测系统来进行。将 TAQMAN<sup>®</sup> UNIVERSAL PCR MASTER MIX<sup>®</sup> (ABI, CA) 用于 20ng 的逆转录 RNA,总反应体积为 20  $\mu$ l。每种 cDNA 样品重复运行两次以校正吸量误差。引物和 FAM 标记的 TAQMAN 探针以 200nm 的浓度使用。使用此前由 Applied Biosystems 开发的人 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 内源性对照对每一个靶标基因的表达水平进行归一化。引物和探针组在表 12 中列出。在 50 $^{\circ}$ C 下初始孵育 2 分钟然后 95 $^{\circ}$ C 下孵育 10 分钟后,将样品进行 40 次的两阶段循环:变性步骤,95 $^{\circ}$ C 15 秒,然后退火/延伸步骤,60 $^{\circ}$ C 1 分钟。数据分析用 GENEAMP7000 序列检测系统的软件进行。对于每个引物/探针组, Ct 值确定为荧光强度达到扩增指数区中部中的特定值时的循环数。用比较性 Ct 方法来计算相对基因表达水平。简而言之,对于每种 cDNA 样品,从所关注基因的 Ct 值减去内源对照 Ct 值而得到改变的 Ct 值 ( $\Delta$ Ct)。靶标的归一化量计算为  $2^{-\Delta Ct}$ ,假设扩增为 100% 的效率。最终的数据是相对于校准样品表示的。

[0519] 高内涵分析:在培养结束时,将测试平板用 PBS (Invitrogen; 目录号 14190) 洗涤一次,用 4% 多聚甲醛 (Alexis Biochemical; 目录号 ALX-350-011) 在室温下固定 20 分钟,然后用 PBS 洗涤三次并用 0.5% Triton X-100 (Sigma; 目录号 T8760-2) 在室温下透化处理 20 分钟。将细胞再用 PBS 洗涤三次,然后用 4% 鸡血清 (Invitrogen; 目录号 16110082) 在 PBS 中于室温下封闭 30 分钟。将一抗 (山羊抗人 SOX17; R&D Systems; 目录号 AF1924) 在 4% 鸡血清中以 1 : 100 稀释,在室温下加至每个孔保持两小时。在用 PBS 洗涤三次后,将以 1 : 200 稀释于 PBS 中的 Alexa Fluor488 缀合的二抗 (鸡抗山羊 IgG; Invitrogen; 目录号 A21467) 加至每个孔。为了对细胞核进行复染,在室温下加入 5  $\mu$ g / ml Hoechst33342 (Invitrogen; 目录号 H3570) 保持十五分钟。将板用 PBS 洗涤一次,并保留在 100  $\mu$ l / 孔 PBS 中以进行成像。用于分析的其他一抗包括 1 : 100 稀释的小鼠抗人 CDX2 (Invitrogen; 目录号 397800)、1 : 100 稀释的山羊抗人 Pdx1 (Santa Cruz Biotechnology; 目录号 SC-14664)、1 : 200 稀释的兔抗人胰岛素 (Cell Signaling; 目录号 C27C9) 和 1 : 1500 稀释的小鼠抗人胰高血糖素 (Sigma-Aldrich; 目录号 G2654)。用于分析的二抗包括 1 : 400 稀释的 Alexa Fluor647 鸡抗小鼠 IgG (Invitrogen; 目录号 A-21463)、1 : 200 稀释的 Alexa Fluor488 驴抗山羊 IgG (Invitrogen; 目录号 A11055)、1 : 1000 稀释的 Alexa Fluor647 鸡抗兔 IgG (Invitrogen; 目录号 A21443) 和 1 : 1000 稀释的 Alexa Fluor488 鸡抗小鼠 (Invitrogen; 目录号 A21200)。

[0520] 用 IN Cell Analyzer1000 细胞分析仪 (GE Healthcare) 进行成像,对于用 Hoechst33342 和 Alexa Fluor488 染色的细胞采用 51008bs 二向分色镜。从每孔的 25 个视野获得图像。用 IN Cell Developer Toolbox1.7 (GE Healthcare) 软件从每个孔获得总强度的测量值。基于灰阶水平 (基线范围 100-300) 和核大小确定细胞核的分裂情况。计算每个重复数据集的平均值和标准偏差。总蛋白表达记录为总强度或累积强度,该强度定

义为细胞总荧光乘以细胞面积。基于灰阶范围在 200 至 4500 之间的接受标准来去除背景。通过将每个孔的总强度除以阳性对照的平均总强度,将总强度数据进行归一化。

[0521] 结果:从分化各步收获的细胞的代表性分化标志物的结果在图 21 和表 15 中示出。在图 21A 和 B 中,示出在定形内胚层分化的第一个步骤期间多种处理的 CXCR4 流式细胞计数结果。图 21A 示出了通过用多种化合物结合激活素 A 处理对 CXCR4 表达的作用。图 21B 示出了通过用多种化合物结合 GDF-8 处理对 CXCR4 的作用。本发明化合物与激活素 A 相结合没有提高 CXCR4 表达。然而,在该实例中检测的所有本发明化合物与 GDF-8 相结合提高了 CXCR4 表达。

[0522] 在图 21C 和 21D 中,示出了针对在该方案的步骤一期间应用的处理,在分化的步骤一结束时多种分化标志物的归一化 RT-PCR 值,所述处理使用所选的本发明化合物与激活素 A(图 21C)的结合或与 GDF-8(图 21D)的结合。在该分化方案的步骤三结束时(图 21E 和 21F)和在分化方案的步骤四结束时(图 21G 和 21H)以及在分化方案的步骤 5 结束时(图 21I 和 21J)评估类似的归一化 RT-PCR 值。相对于单独的 GDF-8 处理(图 21F、21H 和 21J),在分化步骤 1 期间的处理(其组合了本发明的化合物和 GDF-8)改善了多种内胚层和胰腺标志物的表达。相对于单独用激活素 A 或用激活素 A 和 Wnt3a(图 21E 和 21G 和 21I)处理,将本发明化合物与激活素 A 组合的处理在表达标志物方面很少或没有改善。表 15 概括了在各分化步骤结束时另外的基因标志物的比较 CT 值,其比较了在第步骤一期间将激活素 A 或 GDF-8 与或不与本发明化合物组合的处理。在分化的步骤五结束时,进行高内涵分析以测量细胞数(图 21K 和 21M)以及胰岛素和胰高血糖素的蛋白质表达(图 21L 和 21N)。在分化的第一个步骤期间单独用 GDF-8 或用 GDF-8 与本发明化合物结合处理,在分化的步骤五结束时引起胰岛素和胰高血糖素表达,从而证明 GDF-8 能够在定形内胚层形成开始期间替代激活素 A,并随后导致胰腺激素细胞。总起来说,这些数据显示各小分子中任一者的添加对结合激活素 A 的处理的分化标志物具有极微的作用。然而,与 GDF8 处理结合添加小分子在分化的步骤 1 结束时对直接的定形内胚层分化以及还在第步骤 3、4、和 5 结束时对下游分化标志物具有显著改善的作用。在一组小分子内观察到变异性,这可能可归因于测定法中使用的化合物的浓度和 / 或作用的机理。

#### [0523] 实例 18

[0524] 使用 GDF8 和本发明化合物形成的表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞能够在移植进啮齿动物内后释放 C 肽

[0525] 确定通过用 GDF-8 和小分子处理体外产生表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞是否可以在体内产生功能性内分泌细胞是重要的。进行了体内移植研究以将通过用激活素和 Wnt3a 处理与用 GDF-8 和小分子化合物处理发生分化的细胞相比较。

[0526] 细胞的准备:将 H1 人胚胎干细胞簇在低生长因子 MATRIGEL™(Invitrogen;目录号 356231) 包被的组织培养塑料上培养,平均每四天进行传代。补充有 8ng / mL bFGF 的 MEF 调理培养基用于初始接种和扩增。将所有人胚胎干细胞系以小于 50 的传代数进行维持,并例行评估核型是否正常和支原体污染是否存在。

[0527] 传代通过这样进行:使细胞培养物在 37 °C 下暴露于 1mg / ml 分散酶 (Invitrogen, 目录号:17105-041) 的溶液 5 至 7 分钟,然后用 MEF 调理培养基冲洗细胞单层并小心刮擦以回收细胞簇。将细胞簇在 MEF 调理培养基中低速离心,以除去残余分散酶,

然后均匀地再悬浮于补充有 8ng / ml bFGF(PeproTech Inc. ;目录号 100-18B) 的 MEF 调理培养基中,用以使用 2.5ml / 孔的体积以 1 : 3 的比率接种在低生长因子 MATRIGEL(BD Biosciences ;目录号 356231) 包被的 6 孔板 (Numc ;目录号 140685) 上。日常饲养是通过从每个孔抽吸掉废培养基并用等体积的新鲜培养基替换来进行。在整个培养期间,将板维持在 37°C、5% CO<sub>2</sub>下。

[0528] 细胞分化:在细胞接种到用低生长因子 MATRIGEL™包被的 6 孔板之后三天开始分化过程。将一分四步的方案用于使 H1 人胚胎干细胞体外分化为表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞。用三天进行步骤 1 以产生定形内胚层细胞。在步骤 1 的第一天,通过抽吸掉废培养基并添加等体积的具有 2% 牛血清白蛋白第 V 组分、无脂肪酸 (FAF BSA) (Proliant Biologicals ;目录号 SKU68700) 和 8ng / ml bFGF 的 RPMI-1640 基础培养基 (Invitrogen ;目录号 22400) 开始分化。在一个处理组中,使细胞暴露于 100ng / ml 激活素 A(PeproTech ;目录号 120-14) 与 20ng / ml Wnt3a(R&D Systems ;目录号 1324-WN / CF)。在第二处理组中,使细胞暴露于 100ng / ml GDF-8(R&D Systems ;目录号 788-G8) 与 2.5mM 化合物 40。在第三处理组中,使细胞暴露于 100ng / ml GDF-8(R&D Systems ;目录号 788-G8) 与 2.5mM 化合物 202。在分化的步骤 1 的第二天和第三天,所有处理组中的细胞在没有添加 Wnt3a 或本发明化合物的情况下用含有 2% FAF BSA、8ng / ml bFGF 和 100ng / ml 激活素 A(处理组 1) 或 100ng / ml GDF-8(处理组 2 和 3) 的 RPMI-1640 饲养。在培养的第三天结束时,收集各处理组的一孔用于 FACS 分析。

[0529] 用三天进行该分化方案的步骤 2。所有处理组的细胞每天用补充有 2% FA BSA 和 50ng / ml FGF7(PeproTech ;目录号 100-19) 的 DMEM:F12(Invitrogen ;目录号 11330-032) 饲养。

[0530] 用四天进行该分化方案的步骤 3。所有处理组的细胞每天用补充有 1% B27(Invitrogen ;目录号 :17504-044)、50ng / ml FGF7、100ng / ml 成头蛋白 (R&D Systems ;目录号 3344-NG)、250nM KAAD- 环巴胺 (Calbiochem ;目录号 239804) 和 2mM 全反式视黄酸 (RA) (Sigma-Aldrich ;目录号 R2625) 的高葡萄糖 DMEM(Invitrogen ;目录号 10569) 饲养。

[0531] 用三天进行该分化方案的步骤 4。所有处理组的细胞前两天每天用补充有 1% B27、100ng / ml 成头蛋白和 1mM ALK5 抑制剂 (Axxora ;目录号 ALX-270-445) 的高葡萄糖 DMEM 饲养。在第三天,细胞通过使用 20ml 枪头 (Rainin ;目录号 RT-L10F) 和细胞刮棒 (Corning ;目录号 3008) 从下层提升,然后转移至 50ml 管。让细胞通过重力沉淀,在不扰动细胞沉淀物的情况下抽吸上清液。将细胞再悬浮于补充有 1% B27、100ng / ml 成头蛋白和 1mM ALK5 抑制剂的高葡萄糖 DMEM 中,然后在六孔 Costar 超低吸附微板 (Corning Inc. ,目录号 3471) 中过夜培养。次日,收集悬浮培养物中的细胞并计数。将 10×10<sup>6</sup> 个细胞 / 小鼠的等分试样用于移植。收集 0.5×10<sup>6</sup> 个细胞的等分试样用于 RT-PCR 分析。

[0532] 图 22 分图 A 示出了在各处理组每一者的步骤 1 结束时产生的定形内胚层细胞的流式细胞计数结果。用激活素 A 和 Wnt3a 处理或用 GDF-8 和本发明化合物处理在步骤 1 结束时引起表达类似水平 CXCR4(大于 85%) 的细胞,从而表明从各处理组衍生相当的定形内胚层细胞群体。

[0533] 在该分化方案的步骤 4 结束时各处理组细胞的 RT-PCR 分析的结果示于图 22 分图

B 中。使用激活素 A 和 Wnt3a 或使用 GDF-8 和化合物 40 或使用 GDF-8 和化合物 202 向胰腺内胚层 (PE) 分化的细胞表达了相当水平的 PE 标志物 :CDX2、MAFA、NGN3、NKX6.1、PDX1 和 Ptf1 $\alpha$ 。这些结果表明,利用 GDF-8 和小分子的分化方案在产生胰腺内胚层前体细胞群体方面是同样有效的。

[0534] 将根据本发明的方法处理的人胚胎干细胞移植进小鼠:五至六周龄雄性 scid-beige 小鼠 (C.B-Igh-1b / GbmsTac-Prkdc<sup>scid</sup>-Lyst<sup>bg</sup> N7) 从 Taconic Farms 购得。将小鼠圈养在微隔离笼 (microisolator cage) 中,自由获得无菌食物和水。在手术准备过程中,小鼠通过耳部加标签来辨别,测量其体重,并使用手持血糖测计仪 (LifeScan ;One Touch) 来确定其血糖。在手术当天,用异氟烷和氧气的混合物麻醉小鼠,并且用小型动物剪毛刀刮剃手术部位。在手术前小鼠皮下施予 0.1mg/kg Buprenex。通过用 70%异丙醇、10%聚维酮-碘和 70%异丙醇连续洗涤来准备手术部位,并产生穿透皮肤和肌肉层的左侧切口。使左肾暴露于外并用 0.9%氯化钠保持润湿。将 24G $\times$ 3/4" 静脉留置管用于穿透肾囊,并移除针头。然后在肾囊下推进导管至肾脏的远极。在小鼠的手术前准备期间,将用于移植的细胞在 1.5mL 离心管中离心,并移除大部分上清液,留下足够的培养基以收集细胞沉淀物。将细胞收集进 Rainin Pos-D 容积式移液枪头,并倒置该移液枪头以让细胞通过重力沉降。弃去过量的培养基,留下用于移植的压紧细胞制剂。为了移植,将 Pos-D 移液枪头牢固置于导管的针座中,并将细胞从移液器通过肾囊下的导管分配,用以递送至肾脏的远极。将导管的内腔用少量的培养基冲洗以递送任何其余的细胞,抽回导管。通过低温烧灼而封闭肾囊,并且使肾回复至其原始解剖位置。通过用 5-0VICRYL 缝合线连续缝合来闭合肌肉,并且用缝合夹闭合皮肤。使小鼠脱离麻醉并让其完全恢复。在手术后给小鼠皮下施予 1.0mg/kg Metacam。

[0535] 在移植之后,每周称重小鼠一次,并且每周测量两次血糖。在移植之后的多个时间间隔,给小鼠腹膜内施予 3g / kg 葡萄糖,并在注射葡萄糖后 60 分钟经由眶后窦抽取血液进装有少量肝素的离心管中。离心血液,将血浆置于第二离心管中,在干冰上冷冻,用以在 -80 $^{\circ}$ C 下保存直至进行人 C 肽测定。根据制造商的说明书,用 Mercodia / ALPCO 诊断超敏 C 肽 ELISA 来确定人 C 肽水平。

[0536] 在图 23 中示出了移植有来自各处理组每一者的细胞的小鼠的人 C 肽 ELISA 结果。对于接受了来自任何处理组的细胞的任何小鼠,在移植后四周没有检测到循环人 C 肽。在移植后 8 周,在如下小鼠中发现可检测的 C 肽:两只接受了用激活素 A 和 Wnt3a 处理过的细胞的小鼠中的其中一只;三只接受了用 GDF-8 和化合物 40 处理过的细胞的小鼠中的其中一只;以及三只接受了用 GDF-8 和化合物 202 处理过的细胞的小鼠中的其中两只。这些结果表明,相当的内分泌前体细胞群体可衍生自使用 GDF-8 和小分子的分化方案并且细胞进一步在体内成熟为葡萄糖响应性的胰岛素分泌细胞。

#### [0537] 实例 19

[0538] 使用 GDF-8 形成的表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞能够在移植到啮齿动物内后释放 C 肽

[0539] 证明在没有激活素 A 的情况下使用 GDF-8 分化的细胞也可在啮齿动物移植模型中体内进一步分化为能够分泌人 C 肽的内分泌细胞群是重要的。

[0540] 细胞的准备:将 H1 人胚胎干细胞簇在低生长因子 MATRIGEL<sup>TM</sup> (Invitrogen ;目录号

356231) 包被的组织培养塑料上培养,平均每四天进行传代。补充有 8ng / mL bFGF 的 MEF 调理培养基用于初始接种和扩增。将所有人胚胎干细胞系以小于 50 的传代数进行维持,并例行评估核型是否正常和支原体污染是否存在。

[0541] 传代通过这样进行:使细胞培养物在 37 °C 下暴露于 1mg / ml 分散酶 (Invitrogen, 目录号:17105-041) 的溶液 5 至 7 分钟,然后用 MEF 调理培养基冲洗该细胞单层并小心刮擦以回收细胞簇。将细胞簇在 MEF 调理培养基中低速离心,以除去残余分散酶,然后均匀地再悬浮于补充有 8ng / ml bFGF (PeproTech Inc.; 目录号 100-18B) 的 MEF 调理培养基中,用以使用 2.5ml / 孔的体积以 1:3 的比率接种在低生长因子 MATRIGEL™ (BD Biosciences; 目录号 356231) 包被的 6 孔板 (Nunc; 目录号 140685) 上。日常饲养是通过从每个孔抽吸掉废培养基并用等体积的新鲜培养基替换来进行。在整个培养期间,将板维持在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下。

[0542] 细胞分化:分化过程在将细胞接种进 6 孔板之后三天开始。将一分四步的方案用于使 H1 人胚胎干细胞体外分化为表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞。步骤 1 进行三天以产生表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞。在步骤 1 的第一天,通过抽吸掉废培养基并添加等体积的具有 2% 牛血清白蛋白第 V 组分、无脂肪酸 (FAF BSA) (Proliant Biologicals; 目录号 SKU68700) 和 8ng / ml bFGF 的 RPMI-1640 基础培养基 (Invitrogen; 目录号 22400) 开始分化。在一个处理组中,用 100ng / ml GDF-8 (R&D Systems; 目录号 788-G8) 和 20ng / ml Wnt3a (R&D Systems; 目录号 1324-WN / CF) 处理两个重复细胞组。在第二处理组中,用 100ng / ml GDF-8 和 2.5mM 化合物 40 处理两个重复细胞组。在分化步骤 1 的第二天和第三天,用含有 2% FAF BSA、8ng / ml bFGF 和 100ng / ml GDF-8 但没有添加 Wnt3a 或化合物 40 的 RPMI-1640 饲养所有处理组中的细胞。在培养的第三天结束时,收集各处理组的一孔用于 FACS 分析。

[0543] 用三天进行该分化方案的步骤 2。所有处理组的细胞每天用补充有 2% FA BSA 和 50ng / ml FGF7 (PeproTech; 目录号 100-19) 的 DMEM:F12 (Invitrogen; 目录号 11330-032) 饲养。

[0544] 用四天进行该分化方案的步骤 3。所有处理组的细胞每天用补充有 1% B27 (Invitrogen; 目录号:17504-044)、50ng / ml FGF7、100ng / ml 成头蛋白 (R&D Systems; 目录号 3344-NG)、250nM KAAD-环巴胺 (Calbiochem; 目录号 239804) 和 2 μM 全反式视黄酸 (RA) (Sigma-Aldrich; 目录号 R2625) 的高葡萄糖 DMEM (Invitrogen; 目录号 10569) 饲养。

[0545] 用三天进行该分化方案的步骤 4。在前两天期间每天用补充有 1% B27、100ng / ml 成头蛋白、1mM ALK5 抑制剂 (Axxora; 目录号 ALX-270-445) 和 100ng / ml GDF-8 (R&D Systems; 目录号 788-G8) 的高葡萄糖 DMEM 饲养所有处理组的细胞。在步骤 4 的第三天,使用 20 μl 枪头 (Rainin; 目录号 RT-L10F) 和细胞刮棒 (Corning; 目录号 3008) 从 6 孔板收获细胞,然后将其转移至 50 μl 管。让细胞通过重力沉淀,在不扰动细胞沉淀物的情况下抽吸上清液。将细胞再悬浮于补充有 1% B27、100ng / ml 成头蛋白和 1 μM ALK5 抑制剂的高葡萄糖 DMEM 中,然后在六孔 Costar 超低吸附微板 (Coming Inc., 目录号 3471) 中过夜培养。次日,收集悬浮培养物中的细胞并计数。将 10 × 10<sup>6</sup> 个细胞 / 小鼠的等分试样用于移植。收集 0.5 × 10<sup>6</sup> 个细胞的等分试样用于 RT-PCR 分析。

[0546] 图 24 示出了在各处理组每一者的步骤 1 结束时产生的定形内胚层细胞的流式细胞计数结果。用 GDF-8 和 Wnt3a 处理或用 GDF-8 和化合物 40 处理的结果在步骤 1 结束时表达类似水平的 CXCR4, 从而表明了各处理组引起相当的且强的定形内胚层细胞群体。重复处理组相当一致。在分化方案的步骤 4 结束时移植前的 RT-PCR 分析的结果在图 24B 中示出。使用 GDF-8 和 Wnt3a 或 GDF-8 和化合物 40 向胰腺内胚层 (PE) 分化的细胞表达相当水平的胰腺内胚层谱系特征性标志物, 例如: CDX2、MafA、Ngn3、NKX6.1、Pdx-1 和 Ptf1A。这些结果说明, 利用 GDF-8 和 Wnt3a 或 GDF-8 和本发明化合物的分化方案在产生胰腺内胚层前体细胞群体方面是有效的。该分化方案在两种独立但相同的处理组中进行。重复处理组的结果相当一致, 如通过 RT-PCR 分析所示。

[0547] 人胚胎干细胞移植进小鼠: 五至六周龄雄性 scid-beige 小鼠 (C.B-Igh-1b / GbmsTac-Prkdc<sup>scid</sup>-Lyst<sup>bgN7</sup>) 从 Taconic Farms 购得。将小鼠图养在微隔离笼 (microisolator cage) 中, 自由获得无菌食物和水。在手术准备过程中, 小鼠通过耳部加标签来辨别, 测量其体重, 并使用手持血糖测计仪 (LifeScan ;One Touch) 来确定其血糖。在手术当天, 用异氟烷和氧气的混合物麻醉小鼠, 并且用小型动物剪毛刀刮剃手术部位。在手术前小鼠皮下施予 0.1mg/kg Buprenex。通过用 70% 异丙醇、10% 聚维酮-碘和 70% 异丙醇连续洗涤来准备手术部位, 并产生穿透皮肤和肌肉层的左侧切口。使左肾暴露于外并用 0.9% 氯化钠保持润湿。将 24G×3/4" 静脉留置管用于穿透肾囊, 并移除针头。然后在肾囊下推进导管至肾脏的远极。在小鼠的手术前准备期间, 将用于移植的细胞在 1.5mL 离心管中离心, 并移除大部分上清液, 留下足够的培养基以收集细胞沉淀物。将细胞收集进 Rainin Pos-D 容积式移液枪头, 并倒置该移液枪头以让细胞通过重力沉降。弃去过量的培养基, 留下用于移植的压紧细胞制剂。为了移植, 将 Pos-D 移液枪头牢固置于导管的针座中, 并将细胞从移液器通过肾囊下的导管分配, 用以递送至肾脏的远极。将导管的内腔用少量的培养基冲洗以递送任何其余的细胞, 抽回导管。通过低温烧灼而封闭肾囊, 并且使肾回复至其原始解剖位置。通过用 5-0vicryl 缝合线连续缝合来闭合肌肉, 并且用缝合夹闭合皮肤。使小鼠脱离麻醉并让其完全恢复。在手术后给小鼠皮下施予 1.0mg/kg Metacam。

[0548] 在移植之后, 每周称重小鼠一次, 并且每周测量两次血糖。在移植之后的多个时间间隔, 给小鼠腹膜内施予 3g / kg 葡萄糖, 并在注射葡萄糖后 60 分钟经由眶后窦抽取血液进装有少量肝素的离心管中。离心血液, 将血浆置于第二离心管中, 在干冰上冷冻, 用以在 -80°C 下保存直至进行人 C 肽测定。根据制造商的说明书, 用 Mercodia / ALPCO 诊断超敏 C 肽 ELISA 来确定人 C 肽水平。移植有来自各处理组每一者的细胞的小鼠的人 C 肽 ELISA 结果在图 29C 和图 29D 中示出。对于各处理类别在移植后 8 周可检测到类似水平的人 C 肽, 表明相当的内分泌前体细胞群体可衍生自使用 GDF-8 和 Wnt3a 或 GDF-8 和本发明化合物的分化方案。

#### [0549] 实例 20

[0550] CDK、GSK3 和 TRK 抑制剂使人胚胎干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的潜力的评价

[0551] 对已知对 CDK、GSK3 和 / 或 TRK 信号转导通路具有特异性的一亚组 14 种专利小分子进行评价, 以评价其使人胚胎干细胞分化为表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的潜力。

[0552] 细胞测定接种：简而言之，将H1人胚胎干细胞簇在低生长因子Matrigel™(Invitrogen；目录号356231)包被的组织培养塑料上培养。细胞通过以下方式来传代：利用胶原酶(Invitrogen；目录号17104-019)处理并小心刮擦，洗涤以除去残余酶，并以1：1(表面面积)的比例使用100 μl / 孔的体积在低生长因子MATRIGEL™(BD Biosciences；目录号356231)包被的96孔黑色板(Packard ViewPlates；PerkinElmer；目录号6005182)上均匀分散接种。让细胞贴附，然后在1至3天时间内恢复对数期生长，每天用补充有8ng / ml bFGF(R&D Systems；目录号233-FB)的MEF调理培养基饲养。在整个测定法期间，将板在加湿箱中维持在37℃、5% CO<sub>2</sub>下。

[0553] 化合物和测定法的准备：使用表16所述的化合物进行筛选。另外，包括化合物34作为阳性对照，如前面实例中所证明了的。将化合物制备为96孔板形式的5mM母液供用，其溶于100% DMSO(Sigma；目录号D2650)中并保存于-80℃下。将库化合物在50mM HEPES(Invitrogen；目录号15630-080)、20% DMSO中进一步稀释至0.2mM的中间浓度并保存于4℃下。测试条件一式三份进行，在四天测试期间每隔一天供料。如下开始测定法：从每个孔抽吸掉培养基，然后在PBS(Invitrogen；目录号14190)中洗涤三次以除去残余的生长因子。在测定法的第一天，添加200 μl / 孔的测试体积到各孔，该测试体积使用补充有0.5% FCS(HyClone；目录号SH30070.03)和100ng / ml GDF-8(R&D Systems，目录号788-G8)加2.5 μM化合物的DMEM:F12基础培养基(Invitrogen；目录号11330-032)。平行组的测试样品以相同方式处理，但将GDF-8从培养基省去。在测定法的第三天，添加100 μl / 孔的测试体积到各孔，其使用补充有2% FCS加100ng / ml GDF-8(R&D Systems，目录号788-G8)的DMEM:F12基础培养基。从在测定法的第一天未用GDF-8处理的测试样品中省去GDF-8。阳性对照样品含有相同的基础培养基，其在整个四天的测定期间补充有FCS和100ng / ml重组人激活素A(PeproTech；目录号120-14)并且在第1天和第2天添加了Wnt3a(20ng / ml)。阴性对照样品含有补充有FCS的DMEM:F12基础培养基。

[0554] 高内涵分析：在四天的培养结束时，将测试平板用PBS(Invitrogen；目录号14190)洗涤两次，用4%多聚甲醛(Alexis Biochemical；目录号ALX-350-011)在室温下固定20分钟，然后用PBS洗涤三次并用0.5% Triton X-100(Sigma；目录号T8760-2)在室温下透化处理20分钟。将细胞再用PBS洗涤三次，然后用4%鸡血清(Invitrogen；目录号16110082)在PBS中于室温下封闭30分钟。将一抗(山羊抗人SOX17；R&D Systems；目录号AF1924)在4%鸡血清中以1：100稀释，在室温下加至每个孔保持一小时。将Alexa Fluor488缀合的二抗(鸡抗山羊IgG；Molecular Probes；目录号AZ1467)在PBS中以1：200稀释，并在用PBS洗涤三次后加至每个样品孔。为了对细胞核进行复染，在室温下加入4 μg / ml Hoechst33342(Invitrogen；目录号H3570)保持十分钟。将板用PBS洗涤一次，并保留在100 μl / 孔PBS中以进行成像。

[0555] 用IN Cell Analyzer1000细胞分析仪(GE Healthcare)进行成像，对于用Hoechst33342和Alexa Fluor488染色的细胞采用51008bs二向分色镜。根据阳性对照孔并根据单独用二抗染色的无处理阴性对照孔来优化曝光时间。每孔获取15个视野的图像，以补偿生物鉴定和后续染色程序中的任何细胞损失。用IN Cell Developer Toolbox1.7(GE Healthcare)软件从每个孔获得总细胞数目和总SOX17强度的测量值。基于灰阶水平(基线范围100-300)和核大小确定细胞核的分裂情况。计算每个重复数据集的平均值和标准



偏差。总 SOX17 蛋白表达记录为总强度或累积强度,该强度定义为细胞总荧光乘以细胞面积。基于灰阶范围在 200 至 3500 之间的接受标准来去除背景。收集来自三重复孔的平均数据。计算处理孔相对于阳性对照的百分比。

[0556] 该筛选的结果在表 17 中示出。在四天分化过程期间在没有 GDF-8 的情况下,小分子都未诱导显著的 SOX17 表达。化合物 34 用作实验对照并在存在 GDF-8 的情况下诱导了显著的 SOX17 表达,其相当于使用激活素 A 和 Wnt3a 的阳性对照所观察到的水平。在该实例中测试的其余的本发明化合物显示出弱的至中等的 SOX17 表达诱导的活性范围。值得注意的是,观察到该化合物子集的分化活性与所有三种酶信号通路的选择相关,使得难以最终确定明确的作用机理。

#### [0557] 实例 21

#### [0558] 对能够介导表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的形成的本发明化合物的类似物的筛选

[0559] 基于本发明化合物的结构进行了类似物搜索,并发现了 118 种类似物。初始筛选确定,一些类似物能够在没有激活素 A 的情况下与其他生长因子相结合来诱导定形内胚层分化。确定这些类似物是否也可以仅与 GDF-8 相结合来诱导定形内胚层分化是重要的。

[0560] 细胞测定接种:简而言之,将 H1 人胚胎干细胞簇在低生长因子 Matrigel™(Invitrogen;目录号 356231) 包被的组织培养塑料上培养。细胞通过以下方式来传代:利用胶原酶 (Invitrogen;目录号 17104-019) 处理并小心刮擦,洗涤以除去残余酶,并以 1:1(表面面积)的比例使用 100  $\mu$ l / 孔的体积在低生长因子 MATRIGEL™(BD Biosciences;目录号 356231) 包被的 96 孔黑色板 (Packard ViewPlates;PerkinElmer;目录号 6005182) 上均匀分散接种。让细胞贴附,然后在 1 至 3 天时间内恢复对数期生长,每天用补充有 8ng / ml bFGF(R&D Systems;目录号 233-FB) 的 MEF 调理培养基饲养。在整个测定法期间,将板在加湿箱中维持在 37°C、5% CO<sub>2</sub>下。

[0561] 化合物和测定法的准备:使用类似化合物库进行筛选。此库的化合物制备为 96 孔板形式的 5mM 母液供用,其溶于 100% DMSO(Sigma;目录号 D2650) 并保存于 -80°C 下。将库化合物在 50mM HEPES(Invitrogen;目录号 15630-080)、20% DMSO 中进一步稀释至 0.2mM 的中间浓度并保存于 4°C 下。测试条件一式三份进行,在四天测试期间每隔一天供料。如下开始测定法:从每个孔抽吸掉培养基,然后在 PBS(Invitrogen;目录号 14190) 中洗涤三次以除去残余的生长因子。在测定法的第一天,添加 200ml / 孔的测试体积到各孔,该测试体积使用补充有 0.5% FCS(HyClone;目录号 SH30070.03) 和 200ng / ml GDF-8(R&D Systems,目录号 788-G8) 加 2.5  $\mu$ M 化合物的 DMEM:F12 基础培养基 (Invitrogen;目录号 11330-032)。在测定法的第三天,添加 100  $\mu$ l / 孔的测试体积到各孔,其使用补充有 2% FCS 加 200ng / ml GDF-8(R&D Systems,目录号 788-G8) 的 DMEM:F12 基础培养基。阳性对照样品含有相同的基础培养基,在整个四天测定期间补充有 FCS 和 100ng / ml 重组人激活素 A(PeproTech;目录号 120-14) 并且在第 1 天和第 2 天添加 Wnt3a(20ng / ml)。阴性对照样品含有补充有 FCS 的 DMEM:F12 基础培养基,在第 1 天和第 2 天添加 Wnt3a,但省去用激活素 A 处理。

[0562] 高内涵分析:在四天的培养结束时,将测试平板用 PBS(Invitrogen;目录号 14190) 洗涤两次,用 4%多聚甲醛(Alexis Biochemical;目录号 ALX-350-011) 在室温下

固定 20 分钟,然后用 PBS 洗涤三次并用 0.5% Triton X-100(Sigma;目录号 T8760-2) 在室温下透化处理 20 分钟。将细胞再用 PBS 洗涤三次,然后用 4% 鸡血清 (Invitrogen;目录号 16110082) 在 PBS 中于室温下封闭 30 分钟。将一抗 (山羊抗人 SOX17;R&D Systems;目录号 AF1924) 在 4% 鸡血清中以 1 : 100 稀释,在室温下加至每个孔保持一小时。将 Alexa Fluor488 缀合的二抗 (鸡抗山羊 IgG;Molecular Probes;目录号 AZ1467) 在 PBS 中以 1 : 200 稀释,并在用 PBS 洗涤三次后加至每个样品孔。为了对细胞核进行复染,在室温下加入 4  $\mu$ g / ml Hoechst33342(Invitrogen;目录号 H3570) 保持十分钟。将板用 PBS 洗涤一次,并保留在 100  $\mu$ l / 孔 PBS 中以进行成像。

[0563] 用 IN Cell Analyzer1000 细胞分析仪 (GE Healthcare) 进行成像,对于用 Hoechst33342 和 Alexa Fluor488 染色的细胞采用 51008bs 二向分色镜。根据阳性对照孔并根据单独用二抗染色的无处理阴性对照孔来优化曝光时间。每孔获取 15 个视野的图像,以补偿生物鉴定和后续染色程序中的任何细胞损失。用 IN Cell Developer Toolbox1.7(GE Healthcare) 软件从每个孔获得总细胞数目和总 SOX17 强度的测量值。基于灰阶水平 (基线范围 100-300) 和核大小确定细胞核的分裂情况。计算每个重复数据集的平均值和标准偏差。总 Sox17 蛋白表达记述为总强度或累积强度,该强度定义为细胞总荧光乘以细胞面积。基于灰阶范围在 200 至 3500 之间的接受标准来去除背景。通过将每个孔的总强度除以阳性对照的平均总强度,将总强度数据进行归一化。对于每个重复组,对归一化的数据计算平均值和标准偏差。

[0564] 在该单实验中的四块测定板的筛选结果在表 18 中示出。就作为采用激活素 A 和 Wnt3a 的阳性对照处理的百分比的 SOX17 表达对化合物进行排序。该测定法鉴别了 12 种新的类似命中物,如表 19 所示。

#### [0565] 实例 22

#### [0566] 根据本发明的方法生长在微载体上的人胚胎干细胞可分化成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞

[0567] 为了在可放大的条件下分化并产生大量内分泌细胞的目的,显示人胚胎干细胞可使用本发明的方法在微载体珠上生长并分化为定形内胚层是重要的。

[0568] 用于测定和分化的细胞的准备:将 H1p49C3 细胞根据美国专利申请 No. 61 / 116, 447 所述的方法在 125ml 转瓶中的 Cytodex3 珠 (GE Healthcare Life Sciences, NJ) 上例行培养。在七天后,将细胞和小珠以 30cm<sup>2</sup>珠表面积每孔的比率转移至 6 孔板 (供应商;目录号 XXX),并将板置于摇床上。阳性对照处理孔 (标为 AA / Wnt3a) 中小珠上的细胞通过这样进行分化:在具有 2% 无脂肪酸 BSA (MP Biomedicals, Inc;目录号 152401) 的 RPMI-1640 (Invitrogen;目录号:22400) 中添加 100ng / ml 激活素 A (PeproTech;目录号 120-14) 和 20ng / ml Wnt3a (R&D Systems;目录号 1324-WN / CF) 分化两天,然后添加 100ng / ml 激活素 A 和 8ng / ml bFGF (PeproTech Inc.;目录号:100-18B) 分化一天,每孔使用 2ml 体积的该培养基。化合物 34 以 2.5  $\mu$ M 的最终浓度在没有任何生长因子处理的情况下添加到阴性对照处理孔 (标为仅 CMP) 中的具有 2% 无脂肪酸 BSA 的 RPMI-1640 (2ml / 孔) 中三天。第三处理孔 (标为 CMP+8) 接受具有 2% 无脂肪酸 BSA 的 RPMI-1640 (2ml / 孔) 中的 2.5  $\mu$ M 的化合物 34 加 50ng/ml GDF-8 (R&D Systems, 目录号 788-G8) 三天。第四处理孔 (标为 CMP+8+D) 接受具有 2% 无脂肪酸 BSA 的 RPMI-1640 (2ml / 孔) 中的 2.5  $\mu$ M 的

化合物 34 与 50ng / ml GDF-8 和 50ng / ml PDGF-D 三天。第五处理孔 (标为 CMP+8+D+V) 接受具有 2% 无脂肪酸 BSA 的 RPMI-1640 (2ml / 孔) 中的 2.5  $\mu$ M 的化合物 34 与 50ng / ml GDF-8、50ng / ml PDGF-D 和 50ng / ml VEGF 三天。第六处理孔 (标为 CMP+8+D+V+M) 接受具有 2% 无脂肪酸 BSA 的 RPMI-1640 (2ml / 孔) 中的 2.5  $\mu$ M 的化合物 34 与 50ng / ml GDF-8、50ng / ml PDGF-D、50ng / ml VEGF 和 20ng / ml 蝇蕈醇三天。每天更换所有培养基和处理。

[0569] 在处理和培养结束时,根据美国专利申请 No. 61 / 116,447 所述的方法从小珠收获细胞。根据上述方法通过流式细胞计量术对所收获的细胞进行计数和分析。

[0570] 结果在图 25 中示出。如分图 A 所示,对所有经历分化的处理组的回收了类似数量的细胞。如分图 B 所示,单独用化合物 34 处理的细胞没有分化为 CXCR4 阳性细胞。在分化期间添加激活素 A 和 Wnt3a 的阳性对照处理在 68% 的所得细胞群中诱导了 CXCR4 的表达。添加有多种生长因子组合的化合物 34 平均在 50% 的细胞中诱导了 CXCR4 表达。应当注意的是,在使用化合物 34 结合单种生长因子 GDF-8 或结合包括 GDF-8 在内的多种生长因子的处理期间观察到相当水平的 CXCR4 表达。这证明,化合物 34 与至少 GDF-8 相结合可替代激活素 A 和 Wnt3a 来促进定形内胚层分化。该实例还显示,该处理过程对在微载体珠上生长并分化的细胞是有效的。

[0571] 实例 23

[0572] 本发明的化合物与 GDF-8 一起可增强细胞增殖

[0573] 先前的实例显示, GDF-8 能够替代激活素 A 来使人胚胎干细胞向表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化。了解 GDF-8 和激活素 A 在定形内胚层形成方面的相对效力是重要的。使用当量浓度的各生长因子来进行剂量响应测定法,以比较人胚胎干细胞分化期间的结果。

[0574] 对在定形内胚层分化期间与 GDF-8 结合使用的本发明化合物就其诱导细胞增殖的能力进行了评价。将结果与单独使用激活 A 或 GDF-8 的处理进行比较。

[0575] 用于测定法的细胞准备:将人胚胎干细胞(H1 人胚胎干细胞系)的母培养物以未分化、多能状态维持在 MEF 调理培养基中的低生长因子 MATRIGEL™(BD Biosciences; 目录号 356231) 包被的平皿上,平均每四天传代。传代通过这样进行:使细胞培养物在 37°C 下暴露于 1mg / ml 分散酶 (Invitrogen, 目录号:17105-041) 的溶液 5 至 7 分钟,然后用 MEF 调理培养基冲洗该单层并小心刮擦以回收细胞簇。将细胞簇低速离心以收集细胞沉淀并除去残余的分散酶。将细胞簇以 1 : 3 或 1 : 4 的比例分传以进行例行维持培养,或者以 1 : 1 比例分传以立即进行测试。将所有的人胚胎干细胞系以小于 50 次传代的传代数目进行维持,并例行评估核型表型是否正常和支原体污染是否存在。

[0576] 将用于该测定法的细胞簇均匀地再悬浮于补充有 8ng / ml bFGF 的 MEF 调理培养基中,并以 100ml / 孔的体积接种至低生长因子 MATRIGEL™包被的 96 孔 Packard VIEWPLATES(PerkinElmer; 目录号 6005182) 上。补充有 8ng / mL bFGF 的 MEF 调理培养基用于初始接种和扩增。日常饲养是通过从每个孔抽吸掉废培养基并用等体积的新鲜培养基替换来进行。各测试板中的背景组的孔未用细胞接种,但在整个测定期间用基础培养基条件处理。在整个测定法期间,将板在加湿箱中维持在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下。

[0577] 测定法:如下开始该测定法:从每个孔抽吸掉培养基,并重新添加测试培养基的

最后等分试样 (100  $\mu$ l)。测试条件在总共三天的测定期间重复进行三次, 通过从各孔抽吸培养基并用新鲜测试培养基替换该培养基来饲养。同时平行设定相同的测定用于在 24、48 和 72 小时结束时进行评价。

[0578] 在测定法的第一天, 所有装有细胞的孔均接受等分量 (80  $\mu$ l) 的 RPMI-1640 培养基 (Invitrogen ; 目录号 :22400), 所述 RPMI-1640 培养基补充有 2.5% 牛血清白蛋白第 V 组分、无脂肪酸 (FAF) BSA, 在最终测定中为 2%) (Proliant Inc., 目录号 :SKU68700)。制备 5x 浓度的多种对照样品和测试样品以用于添加至合适的孔 (20  $\mu$ l / 孔)。对照条件包括具有如所示最终生长因子浓度的下列各项 :1) 基础培养基与 2% FAF BSA ;2) 100ng / ml 激活素 A (PeproTech ; 目录号 120-14) 与 8ng / ml bFGF (PeproTech ; 目录号 100-18B) ;3) 100ng / ml 激活素 A 与 8ng / ml bFGF 和 20ng / ml Wnt3a (R&D Systems ; 目录号 1324-WN / CF) ;4) 100ng / ml GDF-8 (R&D Systems, 目录号 788-G8) 与 8ng / ml bFGF ;5) GDF-8 与 8ng / ml bFGF 和 20ng / ml Wnt3a。在整个测定法期间用 MEF 调理培养基处理另外一组对照孔中的细胞。在一些使用 GDF-8 的对照样品中, 用本发明的化合物替换 Wnt3a。对于实验测试样品, 将八种不同的化合物进行两倍系列稀释, 以产生三种不同剂量浓度, 然后与 100ng / ml GDF-8 和 8ng / ml bFGF 组合。这些小分子包括专利化合物即化合物 181、化合物 180、化合物 19、化合物 202、化合物 40、化合物 34、化合物 56 和市售的 GSK3 抑制剂 BIO (EMD Chemicals, Inc. ; 目录号 361550)。在测定法的第二天和第三天, 对所有用于对照样品和实验样品的孔进行抽吸并再次用相同的处理条件来饲养, 不同的是从一些对照孔除去 Wnt3a。

[0579] MTS 测定法 : 在 24、48 或 72 小时培养结束时, 将一组测定板遵照制造商的说明书进行 MTS 测定 (Promega ; 目录号 G3581)。简而言之, 将 20  $\mu$ l MTS 添加至各孔, 并将测定板在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下孵育四小时, 然后获取 OD490 读数。从统计测量值减去背景 (即, 没有细胞的处理孔), 以确定各三次重复的处理组的平均值和平均值的标准误差。

[0580] MTS 测定法是对将四唑𬀓化合物酶促还原为甲贲产物的细胞代谢活性的测量。在单一时点, MTS 测定法可用作细胞活力的比较指标。在连续时点平行评价的 MTS 测定可提供另外的关于细胞代谢活性增加的信息, 所述活性继而可与各处理条件的细胞增殖相关联。图 26 分图 A 示出了在三天测定期间所有对照处理的 OD490 读数。用调理培养基处理的细胞显示三天内 OD490 的改变极小, 从而表明该处理组中的细胞数保持稳定。相比之下, 在没有生长因子的基础培养基中培养的细胞 (无处理) 显示出与细胞数随时间推移而损失相关联的 OD490 的持续下降。在分化过程期间使用和不使用 Wnt3a 的激活素 A 处理显示出 OD490 的递增增加, 表明细胞群体随时间推移而显著扩增。相对于激活素 A 处理, 在没有 Wnt3a 情况下 GDF-8 处理引起 OD490 降低 ; 这在第一天是显著的, 并在整个培养的全部三天得以维持。将 Wnt3a 添加至 GDF-8 处理组导致到培养的第三天 OD490 恢复和增加。

[0581] 图 26 分图 B 至图 26 分图 I 示出了用小分子抑制剂结合 GDF-8 处理的 MTS 测定法结果。使用本发明化合物和 GDF-8 的处理获得的 OD490 读数等于或超过使用激活素 A 的处理的结果。在所有情况下, 相对于单独用 GDF-8 处理, 最佳浓度的各小分子结合 GDF-8 导致在三天测定期间引起的 OD490 读数提供。这表明, 本发明化合物对在定形内胚层分化期间诱导细胞群增殖和扩增是重要的。

[0582] 实例 24

[0583] 根据本发明的方法生长在微载体上的人胚胎干细胞可分化为内分泌祖细胞

[0584] 为了在工业条件下分化和产生大量内分泌细胞的目的,显示人胚胎干细胞可以使用没有激活素 A 的方案在微载体珠上生长并分化为内分泌祖细胞是重要的。

[0585] 用于测定法和分化的细胞的准备:将 H1p45 细胞在置于以约每 10 秒钟 1 转的摇床 (ari Mix, Thermo Scientific, 目录号 M79735) 上的 6 孔超低附着板 (Costar; 目录号 3471) 中的 Cytodex3 珠 (GE Healthcare; 目录号 17-0485-01) 上培养。每天更换 MEF 调理培养基持续六天。然后将培养基换为下列处理以开始内胚层分化。阳性对照处理孔 (标为 AA+Wnt) 中小珠上的细胞通过这样进行分化:在具有 2% 无脂肪酸 BSA (Proliant Biomedicals, Inc; SKU 号 68700) 的 RPMI-1640 (Invitrogen; 目录号:22400) 中添加 100ng / ml 激活素 A (PeproTech; 目录号 120-14)、8ng / ml bFGF (PeproTech Inc.; 目录号:100-18B) 和 20ng / ml Wnt3a (R&D Systems; 目录号 1324-WN / CF) 分化一天,然后添加 100ng / ml 激活素 A 和 8ng / ml bFGF (PeproTech Inc.; 目录号:100-18B) 分化两天,每孔使用 2ml 体积的该培养基。第二处理孔 (标为 GDF-8+MCX) 接受一天的在具有 2% 无脂肪酸 BSA 的 RPMI-1640 培养基 (2ml / 孔) 中的 2.5  $\mu$ M 化合物 202 加 200ng / ml GDF-8 (R&D Systems, 目录号 788-G8) 和 8ng / ml bFGF, 然后接受两天的 200ng / ml GDF-8 和 8ng / ml bFGF。第三处理孔 (标为 GDF-8+Wnt) 接受一天的在具有 2% 无脂肪酸 BSA 的 RPMI-1640 培养基 (2ml / 孔) 中的 200ng / ml GDF-8 与 20ng / ml Wnt3a 和 8ng / ml bFGF, 然后接受两天的 200ng / ml GDF-8 和 8ng / ml bFGF。每天更换所有培养基和处理。

[0586] 在处理 and 培养结束时,收获细胞并计数,以确定细胞回收率和进行流式细胞检测分析。在全部三种处理方案 (图 27A) 之后观察到高水平的 CXCR4 和 CD99。样品间的细胞数不同 (图 27B)。在用 GDF-8 处理的样品中在定形内胚层和第四阶段观察到比其他处理组更少的细胞数。这表明本发明化合物可以在分化期间增加细胞的增殖。

[0587] 在阶段 3 结束时,细胞中表达了内胚层基因 PDX1、HNF4  $\alpha$  和 CDX2 (图 27C、D)。在分化的阶段一期间用 GDF-8 和本发明化合物处理细胞导致 Pdx1 表达比对照分化处理更好。在阶段 4 结束时,内胚层基因得以进一步上调 (图 27E、F)。这些结果可得出结论,GDF-8 加化合物 202 可替代激活素 A 和 Wnt3a 用于定形内胚层分化,从而形成胰腺内胚层。

[0588] 藉此将整篇文档中引用的出版物全文以引用方式并入本文。尽管上文已结合实例和优选实施例描述了本发明的各个方面,但应当理解本发明的范围不受上述具体实施方式的限定,而受以下在专利法原则下正确解释的权利要求书的限定。

[0589]

表 1					
板编号	化合物编号	细胞数		Sox17 表达	
		平均总细胞数	阳性对照 %	平均总强度	阳性对照 %
板 5	无激活素 A (使用 Wnt3a)	7159	67.42	8.12E+06	2.51
板 5	激活素 A/Wnt3a	10619	100.00	3.23E+08	100.00
板 5	化合物 58	4848	45.66	-1.60E+06	-0.49
板 5	化合物 59	20	0.19	-4.62E+06	-1.43
板 5	化合物 60	3348	31.52	-2.33E+05	-0.07
板 5	化合物 61	2931	27.60	-3.05E+06	-0.94
板 5	化合物 62	7171	67.53	-2.04E+06	-0.63
板 5	化合物 3	14211	133.82	-2.34E+06	-0.73

[0590]

板 6	无激活素 A (使用 Wnt3a)	3264	32.97	2.52E+06	0.80
板 6	激活素 A/Wnt3a	9902	100.00	3.14E+08	100.00
板 6	化合物 63	1917	19.36	4.75E+05	0.15
板 6	化合物 26	5434	54.88	-6.33E+05	-0.20
板 6	化合物 27	6288	63.50	-1.13E+06	-0.36
板 6	化合物 28	4121	41.62	-1.89E+06	-0.60
板 6	化合物 29	5164	52.15	-1.66E+06	-0.53
板 6	化合物 30	4726	47.73	-1.23E+06	-0.39
板 7	无激活素 A (使用 Wnt3a)	9545	47.57	-4.87E+06	-0.99
板 7	激活素 A/Wnt3a	20064	100.00	4.92E+08	100.00
板 7	化合物 31	7230	36.03	-3.45E+06	-0.70
板 7	化合物 32	14655	73.04	-3.03E+06	-0.62
板 7	化合物 33	13891	69.23	-8.11E+06	-1.65
板 7	化合物 34	11674	58.18	-2.24E+06	-0.46
板 7	化合物 35	15379	76.65	-7.30E+06	-1.48
板 7	化合物 36	8356	41.65	-4.57E+06	-0.93
板 8	无激活素 A (使用 Wnt3a)	6868	36.97	-2.31E+06	-0.52
板 8	激活素 A/Wnt3a	18575	100.00	4.47E+08	100.00
板 8	化合物 37	9048	48.71	-3.51E+06	-0.79
板 8	化合物 38	11361	61.16	-4.31E+06	-0.96
板 8	化合物 39	7054	37.98	-3.83E+06	-0.86
板 8	化合物 40	8104	43.63	-4.59E+06	-1.03
板 1	无激活素 A (使用 Wnt3a)	2972	27.98	1.64E+07	19.74
板 1	激活素 A/Wnt3a	3126	29.44	8.33E+07	100.00
板 1	化合物 64	2201	20.72	1.71E+07	20.52
板 1	化合物 65	3030	28.53	2.83E+07	33.95
板 1	化合物 66	1990	18.74	2.36E+07	28.30
板 1	化合物 67	2074	19.53	2.63E+07	31.55
板 1	化合物 68	1432	13.48	1.03E+07	12.39
板 1	化合物 69	2593	24.42	2.62E+07	31.43
板 1	化合物 70	2236	21.05	2.59E+07	31.11
板 1	化合物 71	2996	28.22	3.07E+07	36.92
板 1	化合物 72	2179	20.52	1.21E+07	14.50
板 1	化合物 73	2817	26.53	2.93E+07	35.25
板 1	化合物 74	2853	26.86	2.25E+07	27.01
板 1	化合物 75	1689	15.91	1.42E+07	17.05

[0591]

板 1	化合物 76	2324	21.89	1.48E+07	17.81
板 1	化合物 77	2306	21.71	2.04E+07	24.55
板 1	化合物 78	3298	31.06	2.58E+07	31.00
板 1	化合物 79	2855	26.88	2.79E+07	33.47
板 1	化合物 80	3603	33.93	3.22E+07	38.62
板 1	化合物 81	2263	21.31	1.07E+07	12.91
板 1	化合物 82	1210	11.39	1.36E+07	16.33
板 1	化合物 83	1805	17.00	1.82E+07	21.87
板 1	化合物 84	2024	19.06	2.48E+07	29.80
板 1	化合物 85	2840	26.74	3.45E+07	41.44
板 1	化合物 86	1447	13.63	8.43E+06	10.13
板 1	化合物 87	5336	50.25	4.20E+07	50.38
板 2	无激活素 A (使用 Wnt3a)	4033	35.50	2.14E+07	21.70
板 2	激活素 A/Wnt3a	4292	37.78	9.86E+07	100.00
板 2	化合物 88	3416	30.06	4.17E+07	42.28
板 2	化合物 89	4751	41.82	2.11E+07	21.40
板 2	化合物 90	4542	39.98	3.03E+07	30.70
板 2	化合物 91	1401	12.33	1.29E+06	1.31
板 2	化合物 92	4210	37.06	2.95E+07	29.90
板 2	化合物 93	4157	36.59	2.29E+07	23.26
板 2	化合物 94	4046	35.61	2.85E+07	28.91
板 2	化合物 95	8368	73.66	4.02E+07	40.72
板 2	化合物 96	3695	32.53	2.92E+07	29.57
板 2	化合物 97	3437	30.26	2.41E+07	24.44
板 2	化合物 98	4178	36.77	3.75E+07	38.07
板 2	化合物 99	3739	32.91	2.10E+07	21.29
板 2	化合物 100	2275	20.02	1.27E+07	12.86
板 2	化合物 101	3496	30.77	2.98E+07	30.17
板 2	化合物 102	4874	42.90	2.10E+07	21.32
板 2	化合物 103	4228	37.22	2.69E+07	27.32
板 2	化合物 104	6115	53.82	4.93E+07	49.99
板 2	化合物 105	6484	57.07	5.03E+07	50.95
板 2	化合物 106	4211	37.06	3.94E+07	40.00
板 2	化合物 107	2853	25.11	1.78E+07	18.04
板 2	化合物 108	3779	33.27	2.39E+07	24.26
板 2	化合物 108	2869	25.26	2.04E+07	20.71

[0592]



板 2	化合物 110	4398	38.71	2.53E+07	25.65
板 2	无激活素 A (使用 Wnt3a)	2589	91.17	1.17E+07	5.89
板 3	激活素 A/Wnt3a	6933	244.13	1.98E+08	100.00
板 3	化合物 111	6816	240.04	5.33E+07	26.90
板 3	化合物 112	5357	188.66	3.52E+07	17.74
板 3	化合物 113	6002	211.37	8.55E+07	43.11
板 3	化合物 114	3308	116.49	3.85E+07	19.44
板 3	化合物 115	5007	176.31	3.96E+07	19.95
板 3	化合物 116	3802	133.89	3.12E+07	15.75
板 3	化合物 117	6521	229.64	4.16E+07	20.97
板 3	化合物 118	6128	215.81	5.53E+07	27.91
板 3	化合物 119	4184	147.35	3.41E+07	17.21
板 3	化合物 120	2489	87.66	2.87E+07	14.49
板 3	化合物 121	4985	175.54	3.94E+07	19.87
板 3	化合物 25	4151	146.17	4.03E+07	20.32
板 3	化合物 122	6407	225.61	4.15E+07	20.95
板 3	化合物 123	4465	157.24	5.35E+07	26.99
板 3	化合物 124	4417	155.53	4.67E+07	23.55
板 3	化合物 125	6367	224.23	5.73E+07	28.93
板 3	化合物 126	6157	216.82	7.47E+07	37.70
板 3	化合物 127	5593	196.97	5.61E+07	28.28
板 3	化合物 128	4160	146.50	4.91E+07	24.77
板 3	化合物 129	3778	133.03	3.54E+07	17.88
板 3	化合物 130	4357	153.43	4.15E+07	20.92
板 3	化合物 131	6135	216.05	4.28E+07	21.61
板 3	化合物 132	4421	155.69	4.58E+07	23.12
板 3	化合物 133	7069	248.94	6.52E+07	32.88
板 4	无激活素 A (使用 Wnt3a)	3274	86.62	1.25E+07	12.79
板 4	激活素 A/Wnt3a	4158	110.03	9.79E+07	100.00
板 4	化合物 134	5277	139.62	3.43E+07	35.04
板 4	化合物 64	5657	149.67	3.38E+07	34.48
板 4	化合物 135	2790	73.83	1.63E+07	16.63
板 4	化合物 34	4774	126.33	4.35E+07	44.47
板 4	化合物 136	4881	129.16	3.20E+07	32.73
板 4	化合物 137	1740	46.05	9.16E+06	9.35
板 4	化合物 30	6367	168.46	4.22E+07	43.13

[0593]

板 4	化合物 37	5377	142.27	2.85E+07	29.14
板 4	化合物 138	7722	204.32	3.07E+07	31.37
板 4	化合物 139	3574	94.56	1.30E+07	13.32
板 4	化合物 140	3893	103.00	1.12E+07	11.46
板 4	化合物 39	6114	161.77	3.45E+07	35.22
板 4	化合物 141	4310	114.04	1.61E+07	16.48
板 4	化合物 142	5091	134.71	3.74E+07	38.22
板 4	化合物 35	6601	174.65	8.50E+07	86.77
板 4	化合物 143	3582	94.79	2.17E+07	22.14
板 4	化合物 144	6787	179.57	5.45E+07	55.69
板 4	化合物 145	3752	99.29	2.23E+07	22.81
板 4	化合物 146	2554	67.59	1.83E+07	18.71
板 4	化合物 112	3289	87.03	1.48E+07	15.11
板 4	化合物 113	3819	101.06	2.34E+07	23.93
板 4	化合物 114	1259	33.32	1.34E+07	13.67
板 4	化合物 22	5517	145.98	7.09E+07	72.39
板 4	化合物 150	5104	135.04	3.34E+07	34.11
板 5	无激活素 A (使用 Wnt3a)	7159	116.70	8.12E+06	2.51
板 5	激活素 A/Wnt3a	10619	173.09	3.23E+08	100.00
板 5	化合物 151	2785	45.39	-1.03E+06	-0.32
板 5	化合物 152	4693	76.50	-3.08E+06	-0.95
板 5	化合物 153	9718	158.40	-1.20E+06	-0.37
板 5	化合物 154	3479	56.70	-1.97E+06	-0.61
板 5	化合物 155	9343	152.28	-3.45E+06	-1.07
板 5	化合物 156	3813	62.16	-2.58E+05	-0.08
板 6	无激活素 A (使用 Wnt3a)	3264	68.37	2.52E+06	0.80
板 6	激活素 A/Wnt3a	9902	207.40	3.14E+08	100.00
板 6	化合物 157	2480	51.94	-1.22E+06	-0.39
板 6	化合物 158	5271	110.41	-1.30E+06	-0.41
板 6	化合物 159	6478	135.68	-1.84E+06	-0.59
板 6	化合物 160	4212	88.21	1.30E+05	0.04
板 6	化合物 161	2439	51.09	-9.20E+05	-0.29
板 6	化合物 162	1260	26.39	-1.35E+06	-0.43
板 7	无激活素 A (使用 Wnt3a)	9545	156.12	-4.87E+06	-0.99
板 7	激活素 A/Wnt3a	20064	328.17	4.92E+08	100.00
板 7	化合物 163	16557	270.81	-7.31E+06	-1.49

[0594]

板 7	化合物 164	16472	269.42	-7.37E+06	-1.50
板 7	化合物 165	3015	49.32	-7.34E+06	-1.49
板 7	化合物 166	13845	226.45	-7.98E+06	-1.62
板 7	化合物 167	10325	168.87	-7.35E+06	-1.49
板 7	化合物 168	14139	231.26	-6.49E+06	-1.32
板 7	化合物 169	4468	73.08	-6.38E+06	-1.30
板 8	无激活素 A (使用 Wnt3a)	6868	179.83	-2.31E+06	-0.52
板 8	激活素 A/Wnt3a	18575	486.35	4.47E+08	100.00
板 8	化合物 170	13140	344.04	-4.13E+06	-0.93
板 8	化合物 171	10894	285.22	-2.61E+06	-0.58
板 8	化合物 172	3416	89.44	-4.72E+06	-1.06
板 8	化合物 173	8815	230.81	-4.25E+06	-0.95
板 8	化合物 174	11760	307.91	-3.33E+06	-0.75
板 8	化合物 175	5	0.13	-4.91E+06	-1.10
板 8	化合物 176	10139	265.47	-4.73E+06	-1.06
板 8	化合物 177	9994	261.68	-2.95E+06	-0.66
板 8	化合物 178	8998	235.58	-3.74E+06	-0.84
板 5	无激活素 A (使用 Wnt3a)	7159	67.42	8.12E+06	2.51
板 5	激活素 A/Wnt3a	10619	100.00	3.23E+08	100.00
板 5	化合物 21	4719	44.44	-1.96E+06	-0.61
板 5	化合物 22	2036	19.18	-1.79E+06	-0.55
板 5	化合物 23	2563	24.13	-1.56E+06	-0.48
板 5	化合物 24	4470	42.09	-7.05E+05	-0.22
板 5	化合物 24	6085	57.30	-3.08E+06	-0.95
板 5	化合物 26	7276	68.52	-2.38E+06	-0.74
板 5	化合物 27	4588	43.20	-5.63E+05	-0.17
板 5	化合物 28	2682	25.26	-1.37E+06	-0.43
板 5	化合物 29	5778	54.41	-1.94E+06	-0.60
板 5	化合物 30	620	5.84	-5.05E+06	-1.56
板 5	化合物 31	3419	32.19	-1.42E+06	-0.44
板 6	无激活素 A (使用 Wnt3a)	3264	69.07	2.52E+06	0.80
板 6	激活素 A/Wnt3a	9902	209.51	3.14E+08	100.00
板 6	化合物 32	2142	45.32	-1.33E+06	-0.42
板 6	化合物 33	5564	117.73	-8.63E+05	-0.27
板 6	化合物 34	5927	125.41	-2.01E+06	-0.64
板 6	化合物 35	10068	213.01	-2.15E+06	-0.68

[0595]

板 6	化合物 36	5170	109.39	-1.22E+06	-0.39
板 6	化合物 37	3098	65.55	1.91E+06	0.61
板 6	化合物 38	1537	32.52	4.48E+04	0.01
板 6	化合物 39	3650	77.23	-2.01E+06	-0.64
板 6	化合物 40	5817	123.07	4.91E+05	0.16
板 6	化合物 64	4359	92.23	-1.07E+05	-0.03
板 6	化合物 30	4035	85.38	2.09E+06	0.66
板 6	化合物 65	3279	69.37	-5.63E+05	-0.18
板 6	化合物 67	2698	57.08	-1.95E+06	-0.62
板 7	无激活素 A (使用 Wnt3a)	9545	321.22	-4.87E+06	-0.99
板 7	激活素 A/Wnt3a	20064	675.20	4.92E+08	100.00
板 7	化合物 68	10894	366.62	-5.15E+06	-1.05
板 7	化合物 69	9734	327.58	-3.97E+06	-0.81
板 7	化合物 70	16736	563.21	-6.51E+06	-1.32
板 7	化合物 71	17999	605.71	-7.38E+06	-1.50
板 7	化合物 72	7309	245.96	-6.47E+06	-1.32
板 7	化合物 73	8888	299.10	-3.03E+06	-0.62
板 7	化合物 74	11496	386.85	-2.67E+06	-0.54
板 7	化合物 75	9739	327.74	-7.75E+06	-1.57
板 7	化合物 76	14439	485.89	-4.19E+06	-0.85
板 7	化合物 77	12331	414.95	-6.03E+06	-1.22
板 7	化合物 78	9702	326.49	-6.57E+06	-1.33
板 7	化合物 79	8535	287.22	-6.92E+06	-1.41
板 8	无激活素 A (使用 Wnt3a)	6868	295.49	-2.31E+06	-0.52
板 8	激活素 A/Wnt3a	18575	799.17	4.47E+08	100.00
板 8	化合物 80	13939	599.68	-4.23E+06	-0.95
板 8	化合物 81	10466	450.29	-4.91E+06	-1.10
板 8	化合物 82	10323	444.14	-4.90E+06	-1.10
板 8	化合物 83	14619	628.95	1.48E+06	0.33
板 8	化合物 84	14105	606.84	-4.44E+06	-0.99
板 8	化合物 85	12172	523.66	-3.48E+06	-0.78
板 8	化合物 86	7218	310.54	-4.22E+06	-0.94
板 8	化合物 87	5383	231.58	-4.07E+06	-0.91
板 8	化合物 88	10419	448.27	-4.27E+06	-0.96
板 8	化合物 89	11780	506.83	-3.94E+06	-0.88
板 8	化合物 90	7002	301.25	-1.54E+06	-0.35

[0596]

板 8	化合物 91	6224	267.78	-4.53E+06	-1.01
-----	--------	------	--------	-----------	-------

[0597]

化合物编号	细胞数	Sox17 强度
	阳性对照%	阳性对照%
化合物 17	133.8	-0.7
化合物 95	195.0	40.7
化合物 138	185.7	31.4
化合物 87	170.7	50.4
化合物 144	163.2	55.7
化合物 35	158.7	86.8
化合物 30	153.1	43.1
化合物 105	151.0	51.0
化合物 39	147.0	35.2
化合物 104	142.5	50.0
化合物 29	136.0	34.5
化合物 22	132.7	72.4
化合物 37	129.3	29.1
化合物 134	126.9	35.0
化合物 150	122.7	34.1
化合物 142	122.4	38.2
化合物 136	117.4	32.7
化合物 80	115.2	38.6
化合物 34	114.8	44.5
化合物 102	113.5	21.3
化合物 89	110.7	21.4
化合物 105	105.8	30.7
化合物 78	105.5	31.0
化合物 141	103.6	16.5
化合物 110	102.5	25.7
化合物 133	102.0	32.9

[0598]

表 3						
化合物编号	处理		细胞数		Sox17 表达	
			平均总细胞数	阳性对照%	平均总强度	阳性对照%
无	无激活素 A, 使用 Wnt3a		23253	124.16	1.97E+07	10.59
无	激活素 A/Wnt3a		18728	100.00	1.86E+08	100.00
化合物 17	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	21445	114.51	3.43E+07	18.48
无	无激活素 A, 使用 Wnt3a		23253	124.16	1.97E+07	10.59
无	激活素 A/Wnt3a		18728	100.00	1.86E+08	100.00
化合物 22	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	18336	97.91	3.72E+07	20.05
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	18891	100.87	3.26E+07	17.55
化合物 29	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	20221	107.97	2.83E+07	15.27
化合物 39	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	17095	91.28	2.82E+07	15.19
化合物 37	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	15605	83.32	2.67E+07	14.37
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	23823	127.20	2.54E+07	13.69
化合物 80	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	19864	106.07	2.33E+07	12.54
化合物 141	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	17719	94.61	2.24E+07	12.04
化合物 30	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	18063	96.45	2.18E+07	11.73
化合物 150	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	16833	89.88	2.16E+07	11.63
化合物 144	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	17100	91.31	2.04E+07	11.01
化合物 104	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	17863	95.38	1.89E+07	10.19
化合物 142	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	18955	101.21	1.84E+07	9.90

[0599]

化合物 110	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	17534	93.62	1.76E+07	9.45
化合物 78	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	17703	94.52	1.71E+07	9.23
化合物 133	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	16521	88.22	1.67E+07	8.97
化合物 87	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	16495	88.07	1.55E+07	8.33
化合物 95	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	16900	90.24	1.43E+07	7.72
化合物 136	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	19167	102.34	7.91E+06	4.26
化合物 105	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	15217	81.25	7.45E+06	4.01
化合物 134	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	17208	91.88	7.40E+06	3.99
化合物 138	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	16695	89.14	6.65E+06	3.58
化合物 89	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	14652	78.24	3.89E+06	2.10
化合物 90	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	15903	84.92	3.53E+06	1.90
化合物 102	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	12943	69.11	2.85E+05	0.15
无	无激活素 A, 使用 Wnt3a		23253	124.16	1.97E+07	10.59
无	激活素 A/Wnt3a		18728	100.00	1.86E+08	100.00
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	18294	97.68	1.99E+07	10.70

表 3B		
	细胞数	Sox17 强度
化合物编号	阳性对照%	阳性对照%
[0600] 化合物 22	97.91	20.05
化合物 34	100.87	17.55
化合物 29	107.97	15.27
化合物 39	91.28	15.19
化合物 37	83.32	14.37
化合物 35	127.20	13.69

[0601]

表 4						
化合物 编号	处理		细胞数		Sox17 表达	
			平均总细 胞数	阳性对照 %	平均总强 度	阳性对 照%
无	无激活素 A (使用 Wnt3a)		7107	67.96	-1.27E+07	-7.94
无	激活素 A/Wnt3a		10459	100.00	1.60E+08	100.00
化合物 17	无 AA (使用 Wnt3a)	6942	73.43	1.27E+06	0.74	
化合物 17	无 AA (使用 Wnt3a)	5738	60.69	3.14E+06	1.83	
化合物 17	无 AA (使用 Wnt3a)	4453	47.10	9.30E+05	0.54	
化合物 17	无 AA (使用 Wnt3a)	10391	109.91	8.92E+06	5.20	
化合物 17	无 AA (使用 Wnt3a)	5728	60.59	2.14E+06	1.24	
化合物 17	无 AA (使用 Wnt3a)	13198	139.59	1.29E+07	7.54	
化合物 17	无 AA (使用 Wnt3a)	10480	110.85	8.97E+06	5.23	
化合物 17	无 AA (使用 Wnt3a)	13649	144.37	1.45E+07	8.43	
无	无激活素 A (使用 Wnt3a)		3117	34.86	-1.41E+06	-0.72
无	激活素 A/Wnt3a		8942	100.00	1.95E+08	100.00
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF	19334	216.23	6.62E+07	33.86
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	PDGF-AB	16662	186.34	4.95E+07	25.33
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	PDGF-A	16885	188.84	4.48E+07	22.94
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	VEGF	18263	204.25	3.51E+07	17.98
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	FGF4	4410	49.32	3.33E+07	17.04
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	蝇蕈醇	18867	211.00	2.61E+07	13.35
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	PDGF-C	16642	186.12	1.85E+07	9.46
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	PDGF-D	17618	197.03	1.84E+07	9.41

[0602]



化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	PDGF-B	14168	158.46	1.52E+07	7.76
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	PD98059	18877	211.11	1.30E+07	6.64
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	BMP1	18849	210.81	1.29E+07	6.59
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	LY294002	18374	205.49	1.03E+07	5.28
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	BMP4	16748	187.31	8.97E+06	4.59
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	BMP2	16218	181.38	8.89E+06	4.55
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	BMP7	20111	224.91	8.05E+06	4.12
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	U0124	16539	184.97	7.54E+06	3.86
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	BMP6	17838	199.50	7.32E+06	3.75
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	BMP2/7	12042	134.67	7.08E+06	3.62
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	荷芭牡丹碱	19312	215.98	1.95E+06	1.00
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	U0126	19961	223.24	-5.75E+05	-0.29
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	丁酸盐	14238	159.24	-1.85E+06	-0.94
无		无激活素 A (使用 Wnt3a)	6049	45.2	-1.31E+07	-5.2
无		激活素 A/Wnt3a	13392	100.0	2.50E+08	100.0
化合物 20		EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	9434	70.4	1.48E+08	59.1
化合物 17		EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	7988	59.6	1.13E+08	45.0

[0603]

化合物 16	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	8303	62.0	9.20E+07	36.7
化合物 13	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	7045	52.6	7.22E+07	28.8
化合物 19	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	7799	58.2	6.82E+07	27.2
化合物 92	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	5886	44.0	5.63E+07	22.5
化合物 93	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	5463	40.8	4.38E+07	17.5
化合物 94	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	5100	38.1	4.18E+07	16.7
化合物 95	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	4510	33.7	3.32E+07	13.3
化合物 96	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	4570	34.1	3.09E+07	12.3

[0604]

化合物 97	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇蕈醇、 GDF8	4561	34.1	2.15E+07	8.6
化合物 98	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇蕈醇、 GDF8	3176	23.7	9.86E+06	3.9
化合物 99	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇蕈醇、 GDF8	1209	9.0	-1.56E+07	-6.2
无	无激活素 A (使用 Wnt3a)	15494	98.0	-1.25E+07	-4.4
无	激活素 A/Wnt3a	15807	100.0	2.86E+08	100.0
化合物 18	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇蕈醇、 GDF8	8742	55.3	1.01E+08	35.4
化合物 14	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇蕈醇、 GDF8	8464	53.5	8.33E+07	29.1
化合物 15	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇蕈醇、 GDF8	7234	45.8	7.95E+07	27.8
化合物 100	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇蕈醇、 GDF8	6805	43.0	5.88E+07	20.6
化合物 101	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇蕈醇、 GDF8	5668	35.9	5.34E+07	18.7

[0605]

化合物 102	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇蕈醇、 GDF8	6195	39.2	5.29E+07	18.5
化合物 103	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇蕈醇、 GDF8	7545	47.7	5.13E+07	18.0
化合物 104	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇蕈醇、 GDF8	4757	30.1	4.58E+07	16.0
化合物 105	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇蕈醇、 GDF8	6285	39.8	4.29E+07	15.0
化合物 106	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇蕈醇、 GDF8	5622	35.6	2.86E+07	10.0
化合物 107	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇蕈醇、 GDF8	3951	25.0	1.72E+07	6.0
化合物 108	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇蕈醇、 GDF8	3226	20.4	1.58E+07	5.5
化合物 109	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇蕈醇、 GDF8	3473	22.0	1.46E+07	5.1

[0606]

化合物 110	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	3703	23.4	1.32E+07	4.6
化合物 111	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	2918	18.5	1.22E+07	4.3
化合物 112	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	2975	18.8	1.04E+07	3.6
化合物 113	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	2910	18.4	9.18E+06	3.2
化合物 114	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	2734	17.3	6.13E+06	2.1
化合物 115	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	2169	13.7	3.77E+06	1.3
化合物 116	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	3107	19.7	3.52E+06	1.2
化合物 117	EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	3343	21.1	5.35E+05	0.2

[0607]

化合物 118		EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	3034	19.2	2.37E+05	0.1
化合物 119		EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	2263	14.3	-1.66E+06	-0.6
化合物 120		EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	1771	11.2	-5.57E+06	-2.0
化合物 121		EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	1136	7.2	1.79E+07	-6.3
化合物 122		EGF、FGF、 PDGF-A、 VEGF、PDGF- D、蝇草醇、 GDF8	2021	12.8	2.09E+07	-7.3

[0608]

化合物 编号	处理		细胞数		Sox17 表达	
			平均总 细胞数	阳性 对照%	平均总强 度	阳性 对照%
无	无激活素 A (使用 Wnt3a)		7107	67.96	-1.27E+07	-7.94
无	激活素 A/Wnt3a		10459	100.00	1.60E+08	100.00
化合物 17	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF	6942	73.43	1.27E+06	0.74
化合物 17	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	5738	60.69	3.14E+06	1.83
化合物 17	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	4453	47.10	9.30E+05	0.54
化合物 17	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+ 蝇草醇	10391	109.91	8.92E+06	5.20
化合物 17	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	5728	60.59	2.14E+06	1.24

[0609]

化合物 17	无 AA (使用 Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	13198	139.59	1.29E+07	7.54
化合物 17	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF- A+VEGF	10480	110.85	8.97E+06	5.23
化合物 17	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+蝇 蕈醇	13649	144.37	1.45E+07	8.43
无	无激活素 A (使用 Wnt3a)		7107	67.96	-1.27E+07	-7.94
无	激活素 A/Wnt3a		10459	100.00	1.60E+08	100.00
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF	23887	228.40	-1.01E+07	-6.32
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	21268	203.36	1.36E+06	0.85
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	17611	168.39	1.28E+07	8.03
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+ 蝇蕈醇	17949	171.62	1.54E+06	0.96
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	23242	222.23	1.23E+07	7.72
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	16068	153.63	3.92E+07	24.57
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF- A+VEGF	16132	154.25	9.11E+07	57.04
化合物 35	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+蝇 蕈醇	15457	147.80	6.89E+07	43.15
化合物 29	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF	1971	18.84	-1.44E+07	-9.00
化合物 29	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	7436	71.10	-4.35E+06	-2.72
化合物 29	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	6535	62.48	-7.52E+06	-4.71
化合物 29	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+ 蝇蕈醇	1376	13.15	-1.42E+07	-8.91
化合物 29	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	8880	84.91	-8.53E+06	-5.34
化合物 29	无 AA (使用 Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	8146	77.89	-4.82E+06	-3.02
化合物 29	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF- A+VEGF	8858	84.70	-7.15E+06	-4.48
化合物 29	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+蝇 蕈醇	10071	96.30	2.95E+06	1.85
化合物 37	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF	7966	76.17	-1.19E+07	-7.42

[0610]

化合物 37	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	6932	66.28	-4.62E+06	-2.89
化合物 37	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	7473	71.46	-2.61E+06	-1.63
化合物 37	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+ 蝇蕈醇	7914	75.67	-1.91E+06	-1.20
化合物 37	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	12956	123.88	-1.25E+07	-7.82
化合物 37	无 AA (使用 Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	6731	64.36	-1.10E+07	-6.89
化合物 37	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF- A+VEGF	8778	83.93	1.39E+05	0.09
化合物 37	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+蝇 蕈醇	5821	55.66	-1.22E+07	-7.64
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF	13062	124.89	2.78E+07	17.39
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	13133	125.58	1.23E+08	76.85
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	12532	119.83	1.09E+08	68.41
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+ 蝇蕈醇	15811	151.18	6.90E+06	4.32
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	11801	112.84	4.04E+06	2.53
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	15262	145.93	1.15E+07	7.18
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF- A+VEGF	12901	123.36	5.01E+07	31.35
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+蝇 蕈醇	12208	116.72	5.56E+07	34.83
无	无激活素 A (使用 Wnt3a)		10224	108.14	7.36E+05	0.43
无	激活素 A/Wnt3a		9455	100.00	1.72E+08	100.00
化合物 39	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF	11615	122.85	1.49E+05	0.09
化合物 39	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	10456	110.59	5.11E+06	2.98
化合物 39	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	9972	105.47	1.62E+06	0.94
化合物 39	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+ 蝇蕈醇	10540	111.48	2.22E+06	1.29
化合物 39	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	17050	180.34	4.84E+06	2.82

[0611]



化合物 39	无 AA (使用 Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	8856	93.67	7.01E+05	0.41
化合物 39	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF- A+VEGF	7973	84.33	5.30E+06	3.09
化合物 39	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+蝇 蕈醇	9103	96.28	7.32E+05	0.43
化合物 22	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF	14105	149.19	1.75E+06	1.02
化合物 22	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4	12971	137.19	1.04E+07	6.05
化合物 22	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	16580	175.36	8.60E+06	5.01
化合物 22	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+ 蝇蕈醇	14676	155.23	5.61E+06	3.27
化合物 22	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	20372	215.48	4.99E+06	2.91
化合物 22	无 AA (使用 Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	12277	129.85	4.90E+06	2.86
化合物 22	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF- A+VEGF	12522	132.44	7.88E+06	4.59
化合物 22	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+蝇 蕈醇	11610	122.80	1.33E+07	7.77

[0612]

化合物 编号	处理	细胞数		Sox17 表达		
		平均总 细胞数	阳性 对照%	平均总强 度	阳性 对照%	
无	无激活素 A (使用 Wnt3a)	477	6.64	7.4E+04	0.09	
无	激活素 A/Wnt3a	7185	100.00	8.0E+07	100.00	
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	无	4611	64.18	1.4E+07	17.21
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF	6145	85.53	1.5E+07	19.18
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	FGF4	5323	74.09	2.7E+07	33.75
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	PDGF-D	5017	69.84	1.5E+07	18.76
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	PDGF-A	4175	58.11	1.1E+07	13.43
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	VEGF	4713	65.60	1.0E+07	12.49

[0613]

化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	GDF8	6354	88.44	7.1E+07	88.59
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	蝇蕈醇	7286	101.41	3.1E+07	38.38
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	PDGF-D+VEGF	5030	70.01	1.2E+07	14.58
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	VEGF+蝇蕈醇	776	10.81	1.3E+06	1.56
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	PDGF-D+蝇蕈醇	3490	48.57	6.5E+06	8.02
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	GDF8+PDGF-D	6889	95.88	5.8E+07	72.59
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	PDGF-D+蝇蕈醇 +VEGF	2133	29.68	2.7E+06	3.32
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	GDF8+PDGF- D+VEGF	5585	77.74	6.6E+07	81.75
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	GDF8+VEGF+蝇蕈醇	6083	84.67	5.6E+07	69.62
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	GDF8+PDGF- D+VEGF+蝇蕈醇	9455	131.60	9.6E+07	119.24
化合物 34	无 AA, 无 Wnt3a	EGF+FGF4+PDGF- A+VEGF+PDGF-D+蝇 蕈醇+GDF8	4757	66.21	3.9E+07	48.77
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF- A+VEGF+PDGF-D+蝇 蕈醇+GDF8	6028	83.90	7.0E+07	87.44

[0614]

表 7	处理	化合物 编号	细胞数		Sox17 表达	
			平均总 细胞数	阳性 对照%	平均总强 度	阳性 对照%
1	无激活素 A (使用 Wnt3a)	无	6049	45.2	-1.31E+07	-5.2
1	激活素 A/Wnt3a	无	13392	100.0	2.50E+08	100.0
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 18	13037	97.3	1.63E+08	65.2
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 14	9344	69.8	1.23E+08	49.0
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 15	8448	63.1	8.64E+07	34.5
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 16	5498	41.1	6.56E+07	26.2

[0615]

1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 64	5063	37.8	5.88E+07	23.5
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 65	4788	35.8	4.57E+07	18.2
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 66	8129	60.7	3.53E+07	14.1
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 67	6791	50.7	3.18E+07	12.7
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 68	3456	25.8	2.30E+07	9.2
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 69	3995	29.8	1.69E+07	6.8
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 70	474	3.5	-1.80E+07	-7.2
2	无激活素 A (使用 Wnt3a)	无	15494	98.0	-1.25E+07	-4.4
2	激活素 A/Wnt3a	无	15807	100.0	2.86E+08	100.0
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 19	8425	53.3	1.19E+08	41.6
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 13	9123	57.7	1.13E+08	39.7
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 71	6048	38.3	5.51E+07	19.3
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 72	6060	38.3	5.46E+07	19.1
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 73	5545	35.1	3.99E+07	14.0
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 74	10898	68.9	3.91E+07	13.7
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 75	4117	26.0	3.01E+07	10.5
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 76	3825	24.2	2.74E+07	9.6
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 77	5928	37.5	2.44E+07	8.5
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 78	3303	20.9	2.03E+07	7.1
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 79	4767	30.2	1.85E+07	6.5
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 80	2194	13.9	1.22E+07	4.3
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 81	2920	18.5	9.16E+05	0.3

[0616]

2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 82	1819	11.5	-1.05E+07	-3.7
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 83	2153	13.6	-1.19E+07	-4.2
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 84	58	0.4	-2.94E+07	-10.3
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 85	57	0.4	-3.03E+07	-10.6
1	无激活素 A (使用 Wnt3a)	无	6049	45.2	-1.31E+07	-5.2
1	激活素 A/Wnt3a	无	13392	100.0	2.50E+08	100.0
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 20	9434	70.4	1.48E+08	59.1
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 17	7988	59.6	1.13E+08	45.0
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 16	8303	62.0	9.20E+07	36.7
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 13	7045	52.6	7.22E+07	28.8
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 19	7799	58.2	6.82E+07	27.2
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 92	5886	44.0	5.63E+07	22.5
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 93	5463	40.8	4.38E+07	17.5
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 94	5100	38.1	4.18E+07	16.7
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 95	4510	33.7	3.32E+07	13.3
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 96	4570	34.1	3.09E+07	12.3
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 97	4561	34.1	2.15E+07	8.6
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 98	3176	23.7	9.86E+06	3.9
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 99	1209	9.0	-1.56E+07	-6.2
2	无激活素 A (使用 Wnt3a)	无	15494	98.0	-1.25E+07	-4.4
2	激活素 A/Wnt3a	无	15807	100.0	2.86E+08	100.0
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 18	8742	55.3	1.01E+08	35.4

[0617]

2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 14	8464	53.5	8.33E+07	29.1
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 15	7234	45.8	7.95E+07	27.8
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 100	6805	43.0	5.88E+07	20.6
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 101	5668	35.9	5.34E+07	18.7
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 102	6195	39.2	5.29E+07	18.5
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 103	7545	47.7	5.13E+07	18.0
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 104	4757	30.1	4.58E+07	16.0
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 105	6285	39.8	4.29E+07	15.0
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 106	5622	35.6	2.86E+07	10.0
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 107	3951	25.0	1.72E+07	6.0
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 108	3226	20.4	1.58E+07	5.5
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 109	3473	22.0	1.46E+07	5.1
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 110	3703	23.4	1.32E+07	4.6
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 111	2918	18.5	1.22E+07	4.3
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 112	2975	18.8	1.04E+07	3.6
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 113	2910	18.4	9.18E+06	3.2
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 114	2734	17.3	6.13E+06	2.1
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 115	2169	13.7	3.77E+06	1.3
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 116	3107	19.7	3.52E+06	1.2
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 117	3343	21.1	5.35E+05	0.2
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 118	3034	19.2	2.37E+05	0.1

[0618]

2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 119	2263	14.3	-1.66E+06	-0.6
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 120	1771	11.2	-5.57E+06	-2.0
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 121	1136	7.2	-1.79E+07	-6.3
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 122	2021	12.8	-2.09E+07	-7.3
1	无激活素 A (使用 Wnt3a)	无	6049	45.2	-1.31E+07	-5.2
1	激活素 A/Wnt3a	无	13392	100.0	2.50E+08	100.0
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 19	15878	118.6	2.67E+08	106.5
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 24	12714	94.9	2.46E+08	98.2
11	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 23	12165	90.8	2.15E+08	86.0
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 21	12640	94.4	1.65E+08	65.9
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 13	11491	85.8	1.61E+08	64.3
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 30	11396	85.1	1.34E+08	53.4
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 36	7964	59.5	9.47E+07	37.8
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 32	8066	60.2	9.29E+07	37.1
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 26	7415	55.4	8.30E+07	33.1
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 17	6994	52.2	7.76E+07	31.0
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 31	6957	51.9	6.59E+07	26.3
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 179	3573	26.7	2.43E+07	9.7
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 180	922	6.9	-2.20E+07	-8.8
1	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 181	8	0.1	-2.68E+07	-10.7
2	无激活素 A (使用 Wnt3a)	无	15494	98.0	-1.25E+07	-4.4
2	激活素 A/Wnt3a	无	15807	100.0	2.86E+08	100.0

[0619]

2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 18	21102	133.5	4.18E+08	146.3
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 15	15373	97.3	3.74E+08	130.8
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 14	9008	57.0	2.62E+08	91.6
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 38	9650	61.0	2.46E+08	86.2
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 35	10461	66.2	1.59E+08	55.7
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 16	9064	57.3	1.48E+08	51.8
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 34	8907	56.3	9.99E+07	35.0
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 20	7346	46.5	8.90E+07	31.2
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 27	8044	50.9	8.81E+07	30.8
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 28	7591	48.0	8.77E+07	30.7
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 40	4049	25.6	8.23E+07	28.8
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 33	7485	47.4	8.10E+07	28.3
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 25	6571	41.6	7.60E+07	26.6
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 182	7631	48.3	6.74E+07	23.6
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 183	6777	42.9	5.93E+07	20.8
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 184	5475	34.6	5.44E+07	19.0
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 185	4093	25.9	4.92E+07	17.2
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 186	5274	33.4	4.63E+07	16.2
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 187	5342	33.8	4.02E+07	14.1
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 188	5533	35.0	3.98E+07	13.9
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、PDGF-D、蝇蕈醇、GDF8	化合物 189	5928	37.5	3.96E+07	13.9

[0620]

2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 190	4822	30.5	3.90E+07	13.7
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 191	4249	26.9	3.81E+07	13.3
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 192	5616	35.5	3.54E+07	12.4
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 193	4158	26.3	3.23E+07	11.3
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 194	3470	22.0	2.96E+07	10.4
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 195	3800	24.0	2.95E+07	10.3
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 196	4619	29.2	2.78E+07	9.7
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 197	4011	25.4	2.45E+07	8.6
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 198	4367	27.6	1.92E+07	6.7
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 199	3162	20.0	1.20E+07	4.2
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 200	2087	13.2	4.43E+06	1.6
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 201	1568	9.9	-6.17E+06	-2.2
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 202	5213	33.0	-1.41E+07	-4.9
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 203	7	0.0	-3.04E+07	-10.6
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 204	11	0.1	-3.18E+07	-11.1
2	EGF、FGF、PDGF-A、VEGF、 PDGF-D、 蝇蕈醇、GDF8	化合物 205	10	0.1	-3.20E+07	-11.2

[0621]



表 8	细胞数		Sox17 表达	
	平均总细胞数	阳性对照%	平均总强度	阳性对照%
化合物 18	21102	133.5	4.18E+08	146.3
化合物 15	15373	97.3	3.74E+08	130.8
化合物 29	15878	118.6	2.67E+08	106.5
化合物 24	12714	94.9	2.46E+08	98.2
化合物 14	9008	57.0	2.62E+08	91.6
化合物 38	9650	61.0	2.46E+08	86.2
化合物 23	12165	90.8	2.15E+08	86.0
化合物 21	12640	94.4	1.65E+08	65.9
化合物 13	11491	85.8	1.61E+08	64.3
化合物 35	10461	66.2	1.59E+08	55.7
化合物 30	11396	85.1	1.34E+08	53.4
化合物 16	9064	57.3	1.48E+08	51.8
化合物 36	7964	59.5	9.47E+07	37.8
化合物 32	8066	60.2	9.29E+07	37.1
化合物 34	8907	56.3	9.99E+07	35.0
化合物 26	7415	55.4	8.30E+07	33.1
化合物 20	7346	46.5	8.90E+07	31.2
化合物 17	6994	52.2	7.76E+07	31.0
化合物 27	8044	50.9	8.81E+07	30.8
化合物 28	7591	48.0	8.77E+07	30.7
化合物 40	4049	25.6	8.23E+07	28.8
化合物 33	7485	47.4	8.10E+07	28.3
化合物 25	6571	41.6	7.60E+07	26.6
化合物 31	6957	51.9	6.59E+07	26.3
化合物 20	9434	70.4	1.48E+08	59.1
化合物 17	7988	59.6	1.13E+08	45.0
化合物 16	8303	62.0	9.20E+07	36.7
化合物 18	8742	55.3	1.01E+08	35.4
化合物 14	8464	53.5	8.33E+07	29.1
化合物 13	7045	52.6	7.22E+07	28.8
化合物 15	7234	45.8	7.95E+07	27.8
化合物 19	7799	58.2	6.82E+07	27.2

[0622]

表 9							
		处理		细胞数		Sox17 表达	
板编号	激活素 A	化合物编号	生长因子	平均总细胞数	阳性对照%	平均总强度	阳性对照%
1	无	无	无	9164	149.46	-	-5.17
1	10ng/ml AA	无	无	6132	100.00	1.52E+06	1.33
1	100ng/ml AA	无	无	9658	157.51	1.14E+08	100.00
1	10ng/ml AA	化合物 22	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+蝇蕈醇+GDF8+Wnt3a	8556	139.53	8.78E+07	76.82
1	10ng/ml AA	化合物 22	EGF+FGF4+PDGF-AB+VEGF+Wnt3a	7657	124.87	4.70E+07	41.09
1	10ng/ml AA	化合物 22	EGF+FGF4+PDGF-A+蝇蕈醇+Wnt3a	8100	132.10	4.42E+07	38.65
1	10ng/ml AA	化合物 22	EGF+FGF4+PDGF-AB+Wnt3a	7975	130.06	3.43E+07	30.03
1	10ng/ml AA	化合物 22	EGF+FGF4+Wnt3a	9800	159.83	4.59E+07	40.13
1	10ng/ml AA	化合物 22	FGF4+Wnt3a	6490	105.84	4.28E+07	37.43
1	10ng/ml AA	化合物 22	EGF+Wnt3a	5001	81.55	2.80E+07	24.45
1	10ng/ml AA	化合物 22	Wnt3a	4543	74.09	3.05E+07	26.65
1	10ng/ml AA	化合物 35	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+蝇蕈醇+GDF8+Wnt3a	2522	41.14	-	-4.25
1	10ng/ml AA	化合物 35	EGF+FGF4+PDGF-AB+VEGF+Wnt3a	3479	56.74	-	-3.46
1	10ng/ml AA	化合物 35	EGF+FGF4+PDGF-A+蝇蕈醇+Wnt3a	3820	62.29	-	-1.46
1	10ng/ml AA	化合物 35	EGF+FGF4+PDGF-AB+Wnt3a	3263	53.21	-	-3.99
1	10ng/ml AA	化合物 35	EGF+FGF4+Wnt3a	2704	44.10	-	-3.65
1	10ng/ml AA	化合物 35	FGF4+Wnt3a	284	4.64	-	-6.59
1	10ng/ml AA	化合物 35	EGF+Wnt3a	155	2.53	-	-6.84
1	10ng/ml AA	化合物 35	Wnt3a	173	2.83	-	-6.66
1	10ng/ml AA	化合物 29	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+蝇蕈醇+GDF8+Wnt3a	2737	44.63	2.41E+07	21.10

[0623]

1	10ng/ml AA	化合物 29	EGF+FGF4+PDGF-AB+VEGF+Wnt3a	2283	37.23	5.59E+06	4.88
1	10ng/ml AA	化合物 29	EGF+FGF4+PDGF-A+蝇蕈醇+Wnt3a	4676	76.26	2.41E+07	21.11
1	10ng/ml AA	化合物 29	EGF+FGF4+PDGF-AB+Wnt3a	3964	64.65	2.27E+07	19.89
1	10ng/ml AA	化合物 29	EGF+FGF4+Wnt3a	1736	28.31	1.98E+06	1.73
1	10ng/ml AA	化合物 29	FGF4+Wnt3a	2139	34.89	6.98E+06	6.10
1	10ng/ml AA	化合物 29	EGF+Wnt3a	365	5.96	4.86E+06	-4.25
1	10ng/ml AA	化合物 29	Wnt3a	2090	34.09	4.89E+06	4.28
2	无	无	无	9325	121.89	3.35E+06	-3.01
2	10ng/ml AA	无	无	5177	67.67	3.89E+06	3.49
2	100ng/ml AA	无	无	7650	100.00	1.11E+08	100.00
2	10ng/ml AA	化合物 34	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+蝇蕈醇+GDF8+Wnt3a	18362	240.02	3.45E+08	309.74
2	10ng/ml AA	化合物 34	EGF+FGF4+PDGF-AB+VEGF+Wnt3a	15574	203.58	2.59E+08	232.70
2	10ng/ml AA	化合物 34	EGF+FGF4+PDGF-A+蝇蕈醇+Wnt3a	17890	233.85	2.88E+08	258.30
2	10ng/ml AA	化合物 34	EGF+FGF4+PDGF-AB+Wnt3a	17875	233.65	2.68E+08	241.07
2	10ng/ml AA	化合物 34	EGF+FGF4+Wnt3a	14158	185.07	2.40E+08	215.35
2	10ng/ml AA	化合物 34	FGF4+Wnt3a	13323	174.15	2.19E+08	196.86
2	10ng/ml AA	化合物 34	EGF+Wnt3a	14527	189.89	2.28E+08	204.84
2	10ng/ml AA	化合物 34	Wnt3a	3589	46.91	7.02E+07	63.08
2	10ng/ml AA	化合物 39	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+蝇蕈醇+GDF8+Wnt3a	5738	75.00	2.14E+07	19.24
2	10ng/ml AA	化合物 39	EGF+FGF4+PDGF-AB+VEGF+Wnt3a	2531	33.08	2.82E+06	2.53
2	10ng/ml AA	化合物 39	EGF+FGF4+PDGF-A+蝇蕈醇+Wnt3a	2879	37.64	3.61E+06	3.24
2	10ng/ml AA	化合物 39	EGF+FGF4+PDGF-AB+Wnt3a	2989	39.07	1.78E+04	-0.02
2	10ng/ml AA	化合物 39	EGF+FGF4+Wnt3a	734	9.59	3.93E+06	-3.53
2	10ng/ml AA	化合物 39	FGF4+Wnt3a	521	6.81	4.46E+06	-4.01
2	10ng/ml AA	化合物 39	EGF+Wnt3a	211	2.75	4.54E+06	-4.08

[0624]

2	10ng/ml AA	化合物 39	Wnt3a	518	6.78	-	2.37E+06	-2.13
2	10ng/ml AA	化合物 37	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+蝇蕈醇+GDF8+Wnt3a	5711	74.65	-	1.21E+07	10.82
2	10ng/ml AA	化合物 37	EGF+FGF4+PDGF-AB+VEGF+Wnt3a	4767	62.31	-	5.16E+05	-0.46
2	10ng/ml AA	化合物 37	EGF+FGF4+PDGF-A+蝇蕈醇+Wnt3a	4540	59.34	-	9.23E+05	0.83
2	10ng/ml AA	化合物 37	EGF+FGF4+PDGF-AB+Wnt3a	4223	55.20	-	6.15E+05	-0.55
2	10ng/ml AA	化合物 37	EGF+FGF4+Wnt3a	3501	45.77	-	5.60E+05	0.50
2	10ng/ml AA	化合物 37	FGF4+Wnt3a	3930	51.37	-	1.88E+06	-1.69
2	10ng/ml AA	化合物 37	EGF+Wnt3a	1431	18.70	-	2.75E+06	-2.47
2	10ng/ml AA	化合物 37	Wnt3a	791	10.34	-	2.99E+06	-2.68

[0625]

化合物编号	处理			细胞数		Sox17 表达	
				平均总细胞数	阳性对照%	平均总强度	阳性对照%
无	无激活素 A (使用 Wnt3a)			4273	33.70	4.75E+07	17.49
无	激活素 A (使用 Wnt3a)			12676	100.00	2.72E+08	100.00
化合物 34	无 AA (没有 Wnt3a)	FGF (50ng/ml)	EGF (50ng/ml)	13317	105.06	2.01E+08	74.08
化合物 34	无 AA (没有 Wnt3a)	FGF (50ng/ml)	EGF (100ng/ml)	14189	111.93	2.01E+08	73.90
化合物 34	无 AA (没有 Wnt3a)	FGF (100ng/ml)	EGF (50ng/ml)	12616	99.52	1.80E+08	66.21
化合物 34	无 AA (没有 Wnt3a)	FGF (100ng/ml)	EGF (100ng/ml)	8269	65.23	1.13E+08	41.73
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	无	无	11711	92.38	1.65E+08	60.68
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	无	EGF (25ng/ml)	16052	126.63	2.14E+08	78.82
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	无	EGF (50ng/ml)	13593	107.23	1.94E+08	71.52
化合物 34	无 AA (使用 Wnt3a)	无	EGF (100ng/ml)	13170	103.90	1.93E+08	71.04

[0626]

化合物 34	无 AA (使 用 Wnt3a)	FGF (25ng/ml)	无	18433	145.41	2.49E+0 8	91.72
化合物 34	无 AA (使 用 Wnt3a)	FGF (25ng/ml)	EGF (25ng/ml)	18841	148.63	2.60E+0 8	95.72
化合物 34	无 AA (使 用 Wnt3a)	FGF (25ng/ml)	EGF (50ng/ml)	16232	128.05	2.30E+0 8	84.79
化合物 34	无 AA (使 用 Wnt3a)	FGF (25ng/ml)	EGF (100ng/ml)	9309	73.44	1.39E+0 8	51.00
化合物 34	无 AA (使 用 Wnt3a)	FGF (50ng/ml)	无	12757	100.64	1.66E+0 8	61.10
化合物 34	无 AA (使 用 Wnt3a)	FGF (50ng/ml)	EGF (25ng/ml)	17720	139.79	2.31E+0 8	85.01
化合物 34	无 AA (使 用 Wnt3a)	FGF (50ng/ml)	EGF (50ng/ml)	16331	128.83	2.26E+0 8	83.11
化合物 34	无 AA (使 用 Wnt3a)	FGF (50ng/ml)	EGF (100ng/ml)	16336	128.87	2.32E+0 8	85.24
化合物 34	无 AA (使 用 Wnt3a)	FGF (100ng/ml)	无	19853	156.61	2.59E+0 8	95.45
化合物 34	无 AA (使 用 Wnt3a)	FGF (100ng/ml)	EGF (25ng/ml)	19880	156.83	2.59E+0 8	95.47
化合物 34	无 AA (使 用 Wnt3a)	FGF (100ng/ml)	EGF (50ng/ml)	18166	143.30	2.35E+0 8	86.30
化合物 34	无 AA (使 用 Wnt3a)	FGF (100ng/ml)	EGF (100ng/ml)	11241	88.68	1.55E+0 8	57.10
无	无 AA (使 用 Wnt3a)	无	EGF (50ng/ml)	5558	43.85	5.01E+0 7	18.44
无	无 AA (使 用 Wnt3a)	无	EGF (100ng/ml)	6818	53.79	6.42E+0 7	23.62
无	无 AA (使 用 Wnt3a)	FGF (50ng/ml)	无	8494	67.01	6.62E+0 7	24.35
无	无 AA (使 用 Wnt3a)	FGF (50ng/ml)	EGF (50ng/ml)	10138	79.98	7.30E+0 7	26.87
无	无 AA (使 用 Wnt3a)	FGF (50ng/ml)	EGF (100ng/ml)	10219	80.62	7.75E+0 7	28.51
无	无 AA (使 用 Wnt3a)	FGF (100ng/ml)	无	9944	78.45	6.68E+0 7	24.59
无	无 AA (使 用 Wnt3a)	FGF (100ng/ml)	EGF (50ng/ml)	11046	87.14	8.17E+0 7	30.07
无	无 AA (使 用 Wnt3a)	FGF (100ng/ml)	EGF (100ng/ml)	7695	60.71	6.87E+0 7	25.28

[0627]

表 11				
	归一化的 SOX17 强度			
	激活素 A		GDF8	
ng / ml	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差
1600	100.00	9.20	100.00	9.00
800	100.00	6.60	84.90	6.30
400	100.00	3.30	72.20	7.50
200	100.00	1.90	51.30	5.30
100	90.70	8.70	32.70	5.10
50	85.20	4.70	17.60	4.80
25	73.10	2.80	5.10	3.60
12.50	50.90	6.20	0.90	0.80
6.25	18.40	4.80	0.70	1.40
3.13	3.00	1.90	0.10	0.20
1.56	0.10	0.00	0.00	0.20
0.00	0.00	0.20	0.30	0.30

[0628]

表 12	
标志物名称	目录号*
AFP	Hs00173490 ml
CD99	Hs00365982 ml
CD9	Hs00233521 ml
CDH1	Hs00170423 ml
CDH2	Hs00169953 ml
CDX2	Hs00230919 ml
CER1	Hs00193796 ml
CXCR4	Hs00237052 ml
FGF17	Hs00182599 ml
FGF4	Hs00173564 ml
FOXA2	Hs00232764 ml
GAPDH	Hs99999905 ml
GATA4	Hs00171403 ml
GATA6	Hs00232018 ml
GSC	Hs00418279 ml





分化步骤 1		CT 值																						
处理	GA PD H	AFP	CD9	CD9 9	CD H1	CD H2	CD X2	CE R1	CX CR4	FGF 17	FGF 4	FO XA2	GA TA4	GA TA6	GS C	KIT	MIX L1	MN X1	NA NO G	OT X2	POI 5F1	SO X17	SO X7	T
AAAM a	19.5	34.7	23.8	24.1	24.5	21.5	36.8	18.4	22.7	20	33.5	24.7	23.7	22.1	22.3	25	23.4	28	23.8	22.6	31.4	23.5	32.2	32.3
GDF8/ Wnt3a	18.7	36.1	23	23.5	23.3	21	36.2	17.8	21.9	19.9	33.1	23.8	23.7	21.9	22.1	23.9	23.1	28.6	23	21.9	29.6	23.4	31.9	32.2
GDF8/ 化合物 34	18.5	33	23	23.1	23.6	20.9	35.3	17.9	21.3	19.7	32.6	24	23.2	21.7	21.9	24	23	27.5	23.2	21.5	30.1	23.2	31.7	32.1
GDF8/ 化合物 56	17	31.2	20.8	20.9	21.2	18.4	35.3	15.5	19.4	17.2	29.7	21.1	20.8	19.6	20	21.5	21.5	25	21.1	19.3	27.9	21.8	31.1	30.3
分化步骤 3		CT 值																						
处理 /CTs	GA PD H	AL B	AM Y2A	AR X	CD X2	GC G	HN F4	INS	ISL1	MA FA	MA FB	NE DR OD 1	NE DR OG 3	NK X2- 2	NK X2- 5	NK X6- 1	PA X4	PA X6	PD X1	PEC AM 1	PO U3F 4	PTF 1A	SST	ZIC 1
AA/Wnt 3a	18.7	23.1	30.2	30.8	22.4	34.1	21.1	34.9	27.9	35.1	26.8	30.6	28	29.3	33.1	38.5	30.6	36	25.6	28.3	29.5	38.4	30.3	32.7
GDF8/ Wnt3a	18.4	23.1	29.7	30.9	22.5	34.5	21.1	34.7	27.4	34.6	26.9	30.5	28	30	36.4	36	31.1	33.5	25.4	30.4	30.1	38.5	27.9	32.4
GDF8/ 化合物 34	18.4	23.3	29.7	34.7	22.5	36.6	21.1	38.1	27.5	34.2	26.8	33.3	31	32.2	33.8	37.8	33.2	36.5	26.3	28.1	31.1	36.4	27.6	33.2
GDF8/ 化合物 56	18.2	23.5	29.7	31.6	22.5	36.3	21.2	35.7	27.3	34.4	27	30.6	27.9	30	33.8	38.2	30.8	32.7	25	28.9	30.4	34.8	27.5	32.7
分化步骤 4		CT 值																						
处理 /CTs	GA PD H	AL B	AM Y2A	AR X	CD X2	GC G	HN F4	INS	ISL1	MA FA	MA FB	NE DR OD 1	NE DR OG 3	NK X2- 2	NK X2- 5	NK X6- 1	PA X4	PA X6	PD X1	PEC AM 1	PO U3F 4	PTF 1A	SST	ZIC 1
AA/Wnt 3a	18.3	18.3	27.1	23.8	21.7	19.5	20.6	20.5	23.3	31	23.8	23	27.9	24.6	31.5	31.5	27.5	26.4	24.1	26.9	27.6	40	25.2	31.4
GDF8/ Wnt3a	18.9	19.3	27.7	24.1	22.2	19.9	21.2	20.7	23.7	31.2	24.2	23.5	27.8	25	35.4	31.5	27.7	26.3	24.5	29.5	29.3	38.2	24.9	31.4
GDF8/ 化合物 34	18.9	18.9	27.1	25	22.3	21.5	21	22.2	24.4	31.3	24.6	24.6	29.7	25.8	31.6	29.6	27.9	26.4	23.9	27.5	28.1	37.1	24.7	29.5
GDF8/ 化合物 56	18.3	18.8	27.1	22.3	22.6	17.6	21.3	18.6	22.4	29.9	22.9	22.7	25.5	23.2	32	27.9	25.5	23.8	23.2	27.8	27.5	30.9	22.8	32.1
分化步骤 5		CT 值																						
处理 /CTs	GA PD H	AL B	AM Y2A	AR X	CD X2	GC G	HN F4	INS	ISL1	MA FA	MA FB	NE DR OD 1	NE DR OG 3	NK X2- 2	NK X2- 5	NK X6- 1	PA X4	PA X6	PD X1	PEC AM 1	PO U3F 4	PTF 1A	SST	ZIC 1
AA/Wnt 3a	18.3	18.5	27.8	24	22.3	18.2	21.4	16.5	23.4	31.3	23.7	24.1	32.5	25.4	29.7	32	28	25.1	24.2	26.9	29	37.5	22.5	29.9

[0632]

GDF8/ Wnt3a	19.3	19.7	28.5	24.2	23.1	18.2	22	16.7	23.4	31.1	23.4	24.6	32.3	25.6	29.9	30.5	28.1	25.4	24.6	29.9	29.9	33.4	22.1	32.1
GDF8/ 化合物 34	19.9	20.6	29	24.1	23.7	17.8	22.4	16.3	23.7	31.3	24	24.4	32.4	25.8	31.3	32	28.4	25.6	24.6	29.7	30.7	34.5	21.6	35
GDF8/ 化合物 56	20	21.1	29	25.1	24.8	18.3	23.2	17.1	24.6	32.1	24.9	24.8	33.8	26.3	34	30.2	29.7	27.3	25.9	29.7	31.5	34.7	22.1	33.3
分化步 骤 6	CT 值																							
处理 \CTs	GA PD H	AL B	AM Y2A	AR X	CD X2	GC G	HN F4	INS	ISL1	MA FA	MA FB	NE DR OD 1	NE DR OG 3	NK X2- 2	NK X2- 5	NK X6- 1	PA X4	PA X6	PD X1	PEC AM 1	PO U3F 4	PTF 1A	SST	ZIC 1
AA/Wnt3a	20.4	24.3	30.7	27.6	25.7	19.4	24.7	20.5	26.4	34.6	27.2	27.1	40	29.6	30.7	33.4	30.9	28.6	29.2	31.3	32.8	38.4	22.2	34.8
GDF8/ Wnt3a	20.7	23.5	30.4	26.8	25.2	18.4	24.3	19.3	26.2	35.2	26.3	26.5	35	29	32.3	30.5	30.7	27.8	28.5	32.3	31.5	33.9	22.4	27.4
GDF8/ 化合物 34	21.3	24.6	31.3	27.1	26	18.4	24.7	20.1	26.3	34.8	26.4	27	34.5	29.2	31.6	33.1	30.4	28.1	29	32.9	33.9	37.7	22.1	34.5
GDF8/ 化合物 56	21.2	25	30.9	26	25.9	17.4	24.4	19.6	25.7	34.7	25.9	26.1	34.3	28.1	33.8	30.7	29.3	27.2	27.9	33.6	33.2	35.2	21	34.9

表 14  
分化步  
骤  
1

	CT 值																							
处理	GA PD H	AFP	CD9	CD9 9	CD HI	CD H	CD X2	CE R1	CX CR4	FGF 17	FGF 4	FO XA2	GA TA4	GA TA6	GS C	HL XB9	KIT	MIX LI	NA NO G	OT X2	PO U5F 1	SO X17	SO X7	T
AA/Wnt3a	20	35.6	24.1	24.2	26	20.9	40	17.5	22.7	19.8	35.8	24.7	23.8	22.1	21.6	23.4	23.2	28.1	24.5	22	32.6	23.2	33	36.8
GDF8/ Wnt3a	20.1	34	23.8	24.5	24.6	21.6	40	19.5	23.3	21	34.8	25.1	24.5	23.3	23.3	17.6	25.5	28.3	24.9	23	31	23.7	33.3	34.2
GSK3 抑制剂 BIO	19	34.4	23.7	24.1	24.3	21.3	36	18.7	23	20.1	33.5	24.2	24.2	22.4	21.8	23.4	24.2	28.4	23.7	21.8	30.8	23	33.7	33.1
GDF8/ 化合物 19	19.8	34.8	23.8	24	24.6	20.7	37.7	18.8	22.3	20	34.4	24.2	23.6	22.5	21.9	23.1	24.3	28	24.3	21.8	31.3	22.3	33	32.9
GDF8 化合物 202	19.8	40	24.5	23.5	25.9	20.8	40	18.8	22.2	20.3	36.5	24.4	23.4	22.3	22.3	24	24.8	27.3	26	21.9	33.3	22.7	32.6	32.1
GDF8/ 化合物 40														23	23	2b			26					

分化步  
骤  
3

	CT 值																							
处理	GA PD H	AL B	AM Y2A	AR X	CD X2	GC G	HN F4A	INS	ISL1	MA FA	MA FB	NE UR O D1	NE UR O G3	NK X2- 2	NK X2- 5	NK X6- 1	PA X4	PA X6	PD X1	PEC AM	PO U3F 4	PTF 1A	SST	ZIC 1

[0633]

AA/Wnt3a	17.9	25.4	29.5	28.4	23.3	34.1	21.8	29.2	29.4	34	27	25.8	25.2	27.3	34.1	28.3	27.8	35.2	22.7	28.3	28.6	30.8	32.2	37.4
GDF8/Wnt3a	18.5	26.5	30.4	29.4	23.9	34.2	22.6	29	29	34.4	27.1	27.2	26.4	27.9	37.8	29	29.2	31.4	23.3	32.2	30.1	30.7	31	30.1
GSK3抑制剂 BIO	18.5	25.2	30.3	29.4	23.6	32.8	22.6	28.8	29.3	34.7	27.6	26.8	26.2	27.6	35	28.8	28.7	32.9	23.2	32.2	29.5	30.6	31.3	31.1
GDF8/化合物 19	18.4	26.1	30.2	29.1	24	33.1	22.5	28.5	30	34.4	27.3	26.6	25.9	27.5	37.6	27.8	28.3	33.8	22.9	31.7	29.7	30	32.4	33.4
GDF8/化合物 202	18.7	26.7	31.1	29.6	24	34.9	22.7	30.3	31.6	34.2	27.8	27.2	27	28	40	30	29	36.2	23.7	30.9	30.2	32.4	32.4	34.6
GDF8/化合物 40	18.6	25.8	30.5	29.6	23.8	37.6	22.5	30	31.1	34.5	27.9	27.2	26.2	27.8	37.2	29.5	29	37.1	23.2	31.5	30.2	31.5	32.4	35.5

分化步骤 4

处理	Ct值																							
	GA PDH	AL B	AM Y2A	AR X	CD X2	GC G	HN F4A	INS	ISL1	MA FA	MA FB	NE UR ODI	NE UR OG3	NK X2-2	NK X2-5	NK X6-1	PA X4	PA X6	PD X1	PEC AM	PO U3F4	PTF 1A	SST	ZIC 1
AA/Wnt3a	18.9	21.3	28.8	24.6	23.4	21.7	21.9	21.6	25.2	32.4	24.9	23.7	23.8	24.2	33.9	25.6	25.6	27	23	29.2	27	28.1	25.3	32.6
GDF8/Wnt3a	18.3	21.3	28.5	25.3	23.1	22.6	21.9	21.9	25.7	33.1	24.9	24.3	24.2	24.7	35.4	25.8	26.2	27.3	23.2	31.2	27	28.7	24.7	24.6
GSK3抑制剂 BIO	19	21.1	28.7	25.3	23.3	22.3	21.9	22	25.7	32.5	25.4	24	24	24.7	35.4	26.1	26	27.7	23.2	30.7	27.4	28.5	25.6	31.5
GDF8/化合物 19	18.9	21.7	28.9	25.2	23.5	22.4	22.2	22	25.6	34	25.4	24.1	23.9	24.6	35.9	25.7	25.7	27.8	23.1	31.4	27.1	28.6	25.5	31.4
GDF8/化合物 202	19	20.9	29.2	25.1	23.6	22.4	22.1	22	25.5	33.3	25.5	23.9	24.1	24.5	35.7	26	25.8	27.6	23.4	30.2	27.5	28.8	26.1	35.7
GDF8/化合物 40	19.2	21.1	29.4	25.5	23.7	22.8	22.3	22.3	26	33.5	25.8	24.2	24.2	24.6	37.3	25.9	25.9	28.4	23.1	30.4	27.6	28.4	26.3	34.4

分化步骤 5

处理	Ct值																							
	GA PDH	AL B	AM Y2A	AR X	CD X2	GC G	HN F4A	INS	ISL1	MA FA	MA FB	NE UR ODI	NE UR OG3	NK X2-2	NK X2-5	NK X6-1	PA X4	PA X6	PD X1	PEC AM	PO U3F4	PTF 1A	SST	ZIC 1
AA/Wnt3a	19.1	19.5	28.6	23.1	23.9	16.2	21.9	16.9	23.4	33.7	23.3	21.7	27.4	24	33.1	25	26.4	24.7	22.6	27.1	28.4	27.5	22	34.1
GDF8/Wnt3a	18.4	19.9	28.4	23.8	23.8	17.2	22.3	17.4	24	32.6	23.9	22.6	28.6	24.2	33.1	25.8	27.2	25.6	23.6	29.2	28.9	29.1	22.7	25.6
GSK3抑制剂 BIO	19.1	19.2	29.1	24	24.2	17.2	22.4	17.6	24	33.5	23.8	22.9	28.4	24.4	40	25.1	27.3	25.6	23.6	29.2	28.1	28.7	23	26.3

[0634]

GDF8/ 化合物 19	19	20	28.8	23.4	24.2	17	22.6	17.1	23.8	33.2	23.8	22.8	28.6	24.1	34.6	25	26.8	25.6	23.4	29.8	28.2	28.2	22.9	28.8
GDF8/ 化合物 202	19.2	20	29	23	23.9	16.7	22.2	16.8	23.2	32.7	23.8	22.3	28.2	23.2	40	26	27.2	25.8	23.4	29.9	29.1	28.4	22.6	33.8
GDF8/ 化合物 40	19.6	19.5	29	23.7	24.2	16.9	22.2	17.1	23.9	33.2	23.9	22.5	28.1	23.5	34.8	25	27.3	26.4	23.4	29.9	29.2	27.5	22.3	34.8

[0635]

表 15

步骤 1	RT-PCR CT 值																											
	处理	GAPDH	AFP	CD9	CD99	CDH1	CDH	CDX2	CEA	CXCR4	FGF17	FGF4	FOXA2	GA4	GA6	GS	HLXB9	KIT	MKL1	NA	NOG	OTX2	POU5F1	SOX17	SOX7	T		
AA	194	32.8	25.2	24.0	26.1	21.8	36.0	18.3	20.4	20.7	34.0	25.1	25.0	22.9	22.4	24.8	22.7	28.9	24.1	22.5	32.2	21.6	32.3	36.1				
AA+Wnt3a	18.2	40.0	23.5	22.0	24.1	20.9	40.0	17.1	22.0	18.7	33.4	22.9	23.1	21.8	22.8	23.3	22.9	27.7	22.7	19.9	31.0	21.2	31.2	34.1				
AA+化合物181	20.1	40.0	24.5	23.3	26.0	20.7	35.9	18.2	22.0	20.1	35.1	25.6	24.7	22.9	20.8	25.5	19.7	27.8	24.8	22.3	32.8	22.2	33.0	33.8				
AA+化合物180	18.4	34.2	23.6	21.6	25.9	21.4	35.2	17.2	22.0	18.9	34.0	24.0	23.1	22.6	22.5	24.8	22.6	27.9	23.7	20.3	32.1	21.4	32.0	32.7				
AA+化合物19	20.1	35.4	24.4	24.9	26.3	20.8	40.0	17.9	17.7	20.5	32.8	25.6	25.1	22.7	21.3	26.0	22.6	29.5	24.1	22.9	32.1	22.3	33.0	29.6				
AA+化合物202	20.3	40.0	25.1	23.7	25.9	21.4	40.0	18.3	22.0	20.4	36.0	25.7	24.5	23.0	21.8	25.2	23.9	27.7	24.5	22.5	32.7	22.6	32.1	33.5				
AA+化合物40	19.9	40.0	24.6	23.6	25.8	20.4	40.0	17.7	22.7	20.2	35.1	25.5	24.6	22.5	20.9	25.5	22.9	28.0	23.8	22.0	33.6	22.3	32.5	32.8				
GSK3抑制剂BIO	20.2	35.0	25.4	23.7	27.2	21.9	35.5	18.5	22.2	20.9	36.0	25.8	25.0	23.2	22.2	25.2	23.7	28.5	24.9	22.8	34.3	23.4	32.7	33.5				
AA+化合物206	19.8	40.0	24.9	23.7	25.5	21.1	40.0	18.3	19.6	20.7	36.2	24.4	24.8	22.7	22.6	24.1	23.7	27.6	23.9	22.0	33.2	23.3	32.4	34.6				
GDF8	21.6	40.0	25.5	25.9	25.2	22.3	40.0	20.1	24.6	22.1	34.9	25.9	27.5	24.8	24.2	25.3	25.4	30.6	25.0	24.3	29.5	25.2	29.8	32.9				
GDF8+Wnt3a	21.2	40.0	25.0	25.8	25.1	22.6	40.0	19.7	23.6	22.0	34.8	25.7	27.3	24.4	23.8	25.0	25.1	30.5	24.8	24.4	31.1	25.0	34.5	32.6				
GDF8+化合物181	20.7	40.0	25.1	23.6	25.5	22.4	40.0	20.0	23.0	21.5	36.3	25.2	25.4	23.9	23.6	24.3	26.3	28.1	25.4	23.3	31.8	23.7	32.8	31.9				
GDF8+化合物180	20.9	40.0	25.6	24.0	26.9	22.1	34.7	19.9	22.7	21.1	36.6	25.0	25.2	23.9	23.6	24.2	25.8	28.3	26.3	23.0	33.2	24.2	32.8	32.3				
GDF8+化合物9	19.6	40.0	23.9	23.7	24.6	20.7	40.0	18.0	21.8	20.4	33.2	24.2	25.0	22.8	22.1	24.0	22.6	28.5	23.1	22.7	30.3	22.6	32.1	29.3				
GDF8+化合物202	18.5	30.6	22.1	20.2	22.8	19.7	35.8	18.5	22.4	19.9	34.3	23.6	22.7	22.5	23.5	23.1	25.9	27.7	25.1	21.5	30.0	22.3	32.0	32.5				

[0636]

GDF8+ 化合物 40	19.7	40.0	23.0	22.6	24.7	20.5	33.8	18.2	22.4	20.5	35.4	24.9	24.2	22.6	23.4	23.4	25.4	28.5	24.0	22.2	31.6	23.7	31.2	32.7
GSK3 抑制剂 BIO	19.6	30.1	23.1	21.8	24.3	20.0	33.4	17.7	23.3	20.1	34.8	24.7	24.5	22.4	22.7	24.1	25.0	29.3	24.8	21.8	31.7	23.3	33.7	34.6
GDF8+ 化合物 206	19.7	40.0	22.7	22.5	23.2	21.0	29.9	18.4	23.0	20.3	34.5	25.3	24.9	22.9	23.6	23.8	25.7	29.7	24.7	22.2	30.7	24.4	32.8	33.8
步骤 3	RT-PCR CT值																							
处理	GAP DH	AL B	AM Y2A	AR X	CD X2	GC G	HNF 4A	INS	ISL 1	MA FA	MA FB	NE MO	NEU RO	NK X2-2	NK X2-5	NK X6-1	PA X4	PA X6	PD X1	PEC AM	POU 3F4	PIT 1A	SST	ZIC 1
AA	18.5	26.9	30.6	32.0	22.9	34.1	22.4	34.8	29.3	36.4	27.4	30.1	28.0	29.3	34.6	32.2	31.4	40.0	23.3	31.0	30.5	34.6	33.2	34.8
AA+Wnt3a	18.4	27.3	30.2	33.0	23.0	34.7	22.4	40.0	28.8	33.9	27.7	30.4	28.1	29.0	40.0	34.9	31.9	38.1	23.8	30.9	30.7	40.0	32.8	40.0
AA+化 合物 181	18.6	26.0	30.1	34.2	22.3	40.0	22.3	40.0	30.4	34.6	28.5	31.4	29.0	30.3	33.9	35.8	33.3	40.0	25.0	30.0	30.8	36.0	34.6	34.8
AA+化 合物 180	18.8	25.5	30.0	33.3	22.5	35.1	22.5	40.0	29.4	34.3	28.6	32.6	30.3	31.1	32.5	35.3	35.3	36.2	26.3	28.9	31.3	40.0	34.7	34.4
AA+化 合物 19	34.1	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	37.4	40.0	40.0	40.0	34.9	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
AA+化 合物 202	18.5	26.2	30.7	33.0	22.5	34.8	22.6	35.1	29.8	35.1	28.2	30.0	28.5	29.5	33.6	33.9	32.0	36.6	24.1	29.7	31.9	40.0	34.2	40.0
AA+化 合物 40	18.5	25.8	30.1	34.9	22.2	40.0	22.3	40.0	29.7	34.1	28.1	30.8	29.1	30.3	33.6	34.4	32.9	40.0	24.8	30.3	31.3	35.6	35.3	35.4
GSK3 抑制剂 BIO	18.5	24.9	30.1	34.6	22.0	40.0	21.5	40.0	30.2	34.9	27.8	34.0	31.0	31.8	32.6	40.0	34.9	40.0	26.1	31.0	32.4	40.0	35.2	34.9
AA+化 合物 206	18.3	27.0	30.3	33.7	22.7	35.7	22.5	40.0	28.4	34.4	27.8	30.7	28.6	29.8	32.8	35.0	31.5	30.4	23.9	29.7	31.2	35.0	31.9	40.0
GDF8	18.0	28.7	30.4	35.3	23.8	40.0	23.6	40.0	28.5	33.6	27.2	30.3	28.7	30.3	34.4	35.0	32.4	24.8	25.5	30.0	30.8	34.2	29.5	26.1
GDF8+ Wnt3a	17.4	27.0	29.5	33.8	23.1	35.1	22.4	40.0	26.3	30.5	26.1	30.1	27.5	29.1	40.0	32.9	31.5	25.8	23.1	32.2	29.8	34.0	27.7	28.2
GDF8+ 化合物 181	18.8	27.8	30.2	31.3	23.4	40.0	22.7	34.5	28.8	35.5	27.3	28.9	27.0	28.0	35.4	32.5	30.5	35.4	23.5	29.4	30.5	33.9	32.4	34.5
GDF8+ 化合物 180	18.8	27.3	30.6	32.4	22.8	34.9	22.7	40.0	29.5	35.9	27.7	30.0	27.5	29.0	35.4	32.6	31.2	40.0	23.7	31.6	30.8	34.6	34.4	40.0
GDF8+ 化合物 19	18.3	24.9	29.7	33.4	22.0	40.0	22.2	40.0	29.7	34.5	28.4	33.3	31.5	32.2	34.4	35.2	34.4	35.0	25.0	29.4	31.6	40.0	34.1	33.5
GDF8+ 化合物 202	18.7	27.8	30.4	32.8	23.8	40.0	22.9	34.6	28.5	34.2	27.6	29.6	27.1	28.4	35.7	30.5	30.4	31.8	23.0	30.1	30.2	31.6	30.9	34.0
GDF8+ 化合物 40	18.4	27.7	30.1	32.5	23.0	35.1	22.4	40.0	29.1	34.3	27.5	30.0	27.3	28.8	35.3	32.9	31.5	40.0	23.2	29.2	30.5	36.3	33.7	40.0

[0637]

GSK3 抑制剂 BIO	18.4	24.9	30.3	31.5	22.2	34.7	21.7	34.5	29.9	35.3	27.6	29.2	26.8	27.9	34.6	33.9	30.6	35.1	24.0	30.4	30.0	34.8	33.6	40.0
GDF8+ 化合物 206	18.2	27.6	30.2	33.5	23.8	40.0	22.9	40.0	27.9	35.1	27.1	29.9	27.7	29.3	40.0	32.3	31.3	27.4	23.3	32.7	30.8	33.0	29.2	30.3
RT-PCR CT 值																								
步骤 4	RT-PCR CT 值																							
处理	GA PD H	AL B	AM Y2A	AR X	CD X2	GC G	HN F4A	INS	ISL1	MA FA	MA FB	NE UR OD1	NE UR OG3	NK X2- 2	NK X2- 5	NK X6- 1	PA X4	PA X6	PD X1	PEC AM	PO U3F 4	PTF 1A	SST	ZIC 1
AA	19.0	22.4	28.6	23.9	23.7	22.8	22.1	23.6	24.1	30.6	23.5	23.7	23.3	24.0	31.9	27.4	25.7	27.1	23.7	29.8	26.5	29.6	24.3	32.5
AA+Wt t3a	19.5	23.5	29.3	24.6	24.1	25.1	22.7	25.2	25.1	31.1	24.4	24.4	24.1	24.5	31.8	27.5	26.1	27.9	24.1	30.4	27.2	31.1	25.9	32.4
AA+化 合物 181	18.0	21.0	27.7	24.0	22.1	24.5	21.0	24.6	24.5	31.6	24.0	24.2	24.6	24.6	30.9	28.1	26.3	28.0	24.0	27.9	27.5	31.0	25.5	31.2
AA+化 合物 180	19.4	21.0	27.3	26.3	21.6	25.4	20.6	26.7	26.1	34.7	24.6	25.5	25.8	25.0	29.4	28.9	27.7	28.9	24.0	26.7	28.5	32.6	27.1	31.2
AA+化 合物 19	(不足的 RNA 样品)																							
AA+化 合物 202	19.2	20.7	29.1	24.0	23.3	21.8	21.9	22.7	24.4	31.1	23.9	24.0	24.1	24.4	32.1	27.4	26.3	26.9	24.3	29.6	27.7	29.5	24.0	35.1
AA+化 合物 40	19.2	20.8	29.4	24.7	22.9	22.2	21.8	23.5	25.3	31.5	24.7	24.7	25.3	25.0	32.2	28.7	27.1	28.2	25.1	30.3	28.5	31.2	25.6	32.7
GSK3 抑制剂 BIO	19.0	19.1	29.2	26.7	22.7	25.2	21.1	26.3	26.5	33.0	25.4	26.3	27.7	26.2	31.5	32.9	29.4	30.0	26.5	29.6	30.5	33.7	27.2	32.4
AA+化 合物 206	18.8	20.9	28.4	23.3	22.9	21.2	21.7	22.8	24.0	30.4	23.5	23.3	23.3	23.8	31.9	27.2	25.5	26.3	23.6	29.7	26.6	29.3	23.6	32.9
GDF8	18.0	25.5	29.1	29.8	24.6	31.3	23.8	30.9	27.6	32.8	24.1	29.2	28.7	29.0	32.3	31.2	31.1	27.9	26.5	29.4	29.4	40.0	26.0	22.8
GDF8+ Wnt3a	19.0	24.3	29.0	25.4	24.4	27.7	23.0	25.5	25.4	32.7	25.1	25.4	24.0	25.0	33.3	28.0	26.7	28.8	23.8	33.4	27.7	30.5	24.1	29.0
GDF8+ 化合物 181	18.0	22.8	28.1	23.5	23.1	24.6	21.4	22.7	23.8	30.6	23.0	22.9	21.8	23.2	32.1	25.7	24.2	27.0	22.3	27.6	25.4	28.6	24.2	31.6
GDF8+ 化合物 180	19.5	24.0	29.3	24.4	23.9	25.7	22.5	24.5	24.7	31.4	24.4	24.3	23.7	24.4	33.5	27.7	26.0	28.3	23.8	30.6	26.9	30.7	26.3	33.4
GDF8+ 化合物 19	19.1	22.6	28.7	25.5	22.9	26.7	22.1	27.2	25.8	32.6	25.5	26.2	26.4	25.6	34.0	30.2	28.2	30.0	25.1	30.2	29.2	32.6	27.9	31.1
GDF8+ 化合物 202	19.0	22.0	28.9	23.7	24.5	21.8	22.3	21.7	24.3	30.3	23.5	22.9	22.2	23.4	33.4	25.9	24.8	26.5	23.0	29.5	26.1	27.9	22.4	34.1
GDF8+ 化合物 40	19.0	21.4	29.0	23.4	23.6	21.0	22.0	21.5	23.8	30.2	23.3	23.2	22.7	23.7	33.2	26.6	24.8	26.1	23.4	29.3	26.4	28.4	22.7	32.6
GSK3 抑制剂 BIO	19.1	19.4	29.1	24.3	23.0	21.5	21.4	21.8	24.6	31.0	24.0	23.8	23.8	24.2	33.3	27.9	26.1	27.0	24.2	30.0	27.8	29.5	23.4	32.7

[0638]

GDF8+ 化合物 206	18.9	21.6	28.9	24.4	24.0	22.6	22.3	22.7	24.9	30.9	24.2	23.7	23.0	24.0	35.3	26.3	25.5	27.2	23.5	31.4	26.9	27.7	24.0	28.9
步骤 5	RT-PCR CT 值																							
处理	GA PD H	AL B	AM Y2A	AR X	CD X2	GC G	HN F4A	INS	ISL1	MA FA	MA FB	NE UR OD 1	NE UR OG 3	NK X2- 2	NK X2- 5	NK X6- 1	PA X4	PA X6	PD X1	PEC AM	PO U3F 4	PTF 1A	SST	ZIC 1
AA	18.3	20.2	27.6	22.0	23.4	14.1	21.3	14.9	22.4	31.8	22.2	22.8	28.1	23.7	34.1	25.5	27.3	24.0	23.2	30.1	28.8	27.3	19.6	34.4
AA+W nt3a	18.0	20.0	27.7	21.9	23.1	14.0	20.9	14.6	22.3	31.6	22.0	21.6	28.0	23.4	34.8	26.1	27.3	23.7	23.3	29.6	28.8	27.5	19.4	32.5
AA+化 合物 181	18.0	18.8	27.6	22.0	22.9	14.3	20.9	14.5	22.1	31.4	22.2	21.5	28.9	23.3	32.2	26.1	26.8	24.0	23.1	27.5	28.8	28.0	18.8	31.2
AA+化 合物 180	18.0	18.8	27.6	22.4	22.9	14.9	21.0	14.7	22.4	31.9	22.6	21.7	29.5	23.8	30.2	26.5	27.2	24.3	23.2	26.7	29.0	28.7	18.7	30.3
AA+化 合物 19	17.9	23.6	28.6	28.2	25.4	27.0	24.2	26.9	26.2	32.0	24.4	27.2	31.2	28.0	30.1	25.8	35.1	28.6	29.4	31.5	28.2	32.4	23.1	24.0
AA+化 合物 202	18.6	19.2	28.0	22.6	23.4	14.9	21.3	15.0	22.7	31.8	22.6	21.9	28.6	23.7	29.9	25.8	26.9	24.7	23.6	27.7	29.2	27.9	19.4	32.8
AA+化 合物 40	18.3	18.9	27.9	22.3	23.0	14.6	21.1	14.7	22.5	31.5	22.4	21.6	29.0	23.5	32.9	26.1	27.1	24.4	23.2	28.1	29.2	28.1	19.1	31.9
GSK3 抑制剂 BIO	18.3	17.1	28.0	23.0	22.6	15.1	20.5	15.1	22.8	31.8	22.8	22.1	29.5	24.2	33.8	27.5	27.4	24.9	23.8	28.3	29.9	29.7	19.5	32.0
AA+化 合物 206	18.2	19.5	27.9	22.2	23.4	14.4	21.3	14.8	22.5	31.1	22.4	21.7	28.0	23.6	35.8	25.9	27.1	24.1	23.3	29.0	28.7	27.5	19.7	32.7
GDF8	17.4	20.5	28.2	25.2	24.4	18.1	22.9	17.7	24.3	31.8	23.3	24.2	30.1	25.9	31.4	26.6	29.4	26.6	25.6	29.7	27.8	29.5	21.1	22.5
GDF8+ Wnt3a	17.8	20.6	28.2	24.8	24.3	17.7	22.9	17.5	24.2	31.9	23.5	24.0	30.2	25.6	31.9	27.0	29.3	26.5	25.6	29.8	28.1	30.7	21.5	22.8
GDF8+ 化合物 181	18.0	19.1	27.6	22.4	23.4	14.5	21.2	14.8	22.5	31.5	22.6	21.7	27.4	23.4	33.8	25.0	26.8	24.4	23.0	27.5	28.8	27.3	19.5	31.9
GDF8+ 化合物 180	18.0	18.0	27.3	22.2	22.9	14.2	20.9	14.4	22.2	31.4	22.1	21.2	27.9	23.2	40.0	25.1	26.1	23.8	22.9	29.6	28.7	27.3	18.8	31.5
GDF8+ 化合物 19	18.3	18.5	27.8	23.4	23.0	16.2	21.2	15.6	23.2	32.2	23.2	22.6	31.2	24.3	33.9	28.6	27.3	25.2	24.2	29.0	30.1	31.0	20.5	31.9
GDF8+ 化合物 202	18.7	19.6	28.3	23.1	24.0	15.7	21.9	15.8	23.5	32.8	23.3	22.3	27.8	23.8	31.3	24.8	27.1	25.2	23.2	29.0	29.5	27.1	20.8	30.9
GDF8+ 化合物 40	18.1	18.7	27.9	22.3	23.0	14.8	21.1	14.8	22.6	31.5	22.5	21.5	27.3	23.2	33.2	25.0	26.6	24.1	22.9	27.3	28.9	27.4	20.4	32.0
GSK3 抑制剂 BIO	18.4	17.1	27.6	23.2	22.8	15.2	20.6	15.5	23.1	32.6	22.6	22.1	28.2	24.2	35.0	26.7	27.3	24.8	24.0	28.1	30.1	28.5	19.3	32.4
GDF8+ 化合物 206	18.0	20.0	27.9	23.4	24.0	16.0	22.1	16.0	23.6	32.1	22.9	22.8	28.5	24.4	30.5	25.9	27.5	25.4	24.0	29.7	28.3	28.0	20.8	23.9

[0639]

表 16	
化合物编号	主要选择性
化合物 6	GSK 选择性
化合物 7	GSK 选择性
化合物 8	GSK 选择性
化合物 9	CDK 选择性
化合物 57	Trk 选择性
化合物 41	GSK 选择性
化合物 42	CDK 选择性
化合物 10	CDK 选择性
化合物 34	阳性对照
化合物 11	CDK 选择性
化合物 43	Trk 选择性
化合物 44	GSK 选择性
化合物 12	CDK 选择性
化合物 45	Trk 选择性

[0640]



板	处理	化合物编号	化合物选择	细胞数		Sox17 表达	
				平均总 细胞数	阳性 对照%	平均总 强度	阳性 对照%
1	无激活素 A	无	不适用	9809	67.8	4.0E+05	-0.2
1	激活素 A/Wnt3a	无	不适用	14476	100.0	2.3E+08	100.0
1	无 GDF8	化合物 11	CDK 选择性	565	3.9	1.1E+06	-0.5
1	无 GDF8	化合物 44	GSK 选择性	14	0.1	1.1E+06	-0.5
1	无 GDF8	化合物 43	Trk 选择性	8610	59.5	2.1E+05	-0.1
1	无 GDF8	化合物 42	CDK 选择性	8700	60.1	2.4E+05	-0.1
1	无 GDF8	化合物 57	Trk 选择性	1222	8.4	7.1E+05	-0.3
1	无 GDF8	化合物 10	CDK 选择性	7011	48.4	6.6E+05	-0.3
1	无 GDF8	化合物 41	GSK 选择性	9995	69.0	5.9E+04	0.0

[0641]

1	无 GDF8	化合物 7	CDK 选择性	3	0.0	1.4E+06	-0.6
1	无 GDF8	化合物 45	Trk 选择性	8857	61.2	4.5E+05	-0.2
1	无 GDF8	化合物 6	GSK 选择性	14827	102.4	1.8E+05	-0.1
1	无 GDF8	化合物 9	CDK 选择性	7156	49.4	4.2E+04	0.0
1	无 GDF8	化合物 12	GSK 选择性	13124	90.7	2.3E+05	-0.1
1	无 GDF8	化合物 8	GSK 选择性	13235	91.4	3.8E+05	0.2
1	GDF8	化合物 34	阳性对照	13926	96.2	2.6E+08	111.8
1	GDF8	化合物 45	Trk 选择性	9540	65.9	1.1E+08	47.9
1	GDF8	化合物 7	GSK 选择性	5296	36.6	7.0E+07	30.4
1	GDF8	化合物 10	CDK 选择性	4627	32.0	6.6E+07	28.6
1	GDF8	化合物 6	GSK 选择性	5118	35.4	5.8E+07	25.2
1	GDF8	化合物 43	Trk 选择性	6682	46.2	5.4E+07	23.4
1	GDF8	化合物 42	CDK 选择性	5686	39.3	4.9E+07	21.2
1	GDF8	化合物 8	GSK 选择性	5018	34.7	4.7E+07	20.4
1	GDF8	化合物 9	CDK 选择性	4816	33.3	4.5E+07	19.4
1	GDF8	化合物 41	GSK 选择性	4455	30.8	3.4E+07	14.8
1	GDF8	不适用	不适用	2856	19.7	2.2E+07	9.4
1	GDF8	化合物 57	Trk 选择性	2110	14.6	1.1E+07	4.8
1	GDF8	化合物 11	CDK 选择性	210	1.4	4.9E+05	-0.2
1	GDF8	化合物 44	GSK 选择性	226	1.6	9.5E+05	-0.4
1	GDF8	化合物 12	CDK 选择性	31	0.2	1.3E+06	-0.6

[0642]

板	处理	化合物 编号	细胞数				Sox17 表达			
			平均总 细胞数	标准 偏差	CV%	阳性对 照%	平均总 强度	标准偏 差	CV%	阳性 对照 %
1	无激活 素 A (使用 Wnt3a)	无	15489	0	0.00	103.2	3.75E+0 7	0.00E+0 0	0.00	10.9
1	激活素 A/Wnt3a	无	15007	1991	13.27	100.0	3.45E+0 8	7.16E+0 7	20.75	100. 0

[0643]

1	GDF8	化合物 206	20568	1683	8.18	137.1	5.19E+0 8	4.41E+0 7	8.51	150. 3
1	GDF8	化合物 207	19224	1091	5.68	128.1	2.54E+0 8	5.69E+0 7	22.41	73.6
1	GDF8	化合物 19	12569	1524	12.13	83.8	2.40E+0 8	6.34E+0 7	26.44	69.5
1	GDF8	化合物 23	8758	474	5.41	58.4	1.16E+0 8	9.07E+0 6	7.80	33.7
1	GDF8	化合物 170	6460	2305	35.68	43.0	9.44E+0 7	6.98E+0 7	73.93	27.4
1	GDF8	化合物 208	4848	1225	25.27	32.3	2.26E+0 7	2.15E+0 7	94.96	23.6
1	GDF8	化合物 209	4831	1243	25.74	32.2	3.97E+0 7	1.61E+0 7	40.56	11.5
1	GDF8	化合物 32	4338	1520	35.04	28.9	3.63E+0 7	3.27E+0 7	90.14	10.5
1	GDF8	化合物 30	4679	435	9.29	31.2	3.47E+0 7	1.04E+0 7	30.03	10.1
1	GDF8	化合物 223	3704	1077	29.08	24.7	3.45E+0 7	2.74E+0 7	79.43	10.0
1	GDF8	化合物 2	4538	632	13.93	30.2	2.95E+0 7	2.81E+0 6	9.50	8.6
1	GDF8	化合物 210	2645	817	30.88	17.6	2.90E+0 7	2.45E+0 7	84.73	8.4
1	GDF8	化合物 24	5012	1263	25.21	33.4	2.64E+0 7	1.66E+0 7	62.95	7.7
1	GDF8	化合物 211	5165	796	15.41	34.4	2.61E+0 7	5.02E+0 6	19.23	7.6
1	GDF8	化合物 212	5476	1445	26.39	36.5	2.54E+0 7	1.18E+0 7	46.53	7.4
1	GDF8	化合物 224	5188	761	14.67	34.6	2.46E+0 7	8.26E+0 6	33.56	7.1
1	GDF8	化合物 225	4431	1149	25.92	29.5	2.45E+0 7	2.65E+0 7	108.1 9	7.1
1	GDF8	化合物 13	3123	1508	48.27	20.8	2.44E+0 7	2.30E+0 7	94.13	7.1
1	GDF8	化合物 213	1261	1028	81.49	8.4	2.07E+0 7	1.97E+0 7	95.03	6.0
1	GDF8	化合物 52	4932	386	7.82	32.9	1.99E+0 7	6.90E+0 6	34.67	5.8
1	GDF8	化合物 214	3345	335	10.01	22.3	1.93E+0 7	1.39E+0 7	72.18	5.6
1	GDF8	化合物 51	4289	940	21.91	28.6	1.70E+0 7	1.10E+0 7	64.86	4.9

[0644]

1	GDF8	化合物 26	4896	545	11.14	32.6	1.65E+0 7	5.93E+0 6	36.02	4.8
1	GDF8	化合物 226	3617	577	15.94	24.1	1.59E+0 7	4.96E+0 6	31.21	4.6
1	GDF8	化合物 215	4326	165	3.81	28.8	1.45E+0 7	2.69E+0 6	18.53	4.2
1	GDF8	化合物 31	3619	1011	27.92	24.1	1.36E+0 7	4.63E+0 6	34.15	3.9
1	GDF8	化合物 216	3364	629	18.70	22.4	8.75E+0 6	2.30E+0 6	26.32	2.5
1	GDF8	化合物 217	2859	544	19.03	19.1	8.75E+0 6	1.94E+0 6	22.16	2.5
1	GDF8	化合物 218	1327	118	8.92	8.8	6.44E+0 6	9.70E+0 5	15.05	1.9
1	GDF8	化合物 219	368	168	45.67	2.5	1.79E+0 6	1.29E+0 6	72.17	0.5
2	无激活 素 A (使用 Wnt3a)	无	15778	0	0.00	103.2	2.24E+0 7	0.00E+0 0	0.00	6.7
2	激活素 A/Wnt3a	无	15290	1119	7.32	100.0	3.37E+0 8	2.84E+0 7	8.44	100. 0
2	GDF8	化合物 202	20177	987	4.89	132.0	4.85E+0 8	1.94E+0 7	4.00	144. 0
2	GDF8	化合物 227	2911	4619	158.6 9	19.0	3.89E+0 7	6.69E+0 7	172.0 0	11.5
2	GDF8	化合物 15	4383	1775	40.49	28.7	3.57E+0 7	3.57E+0 7	100.0 3	10.6
2	GDF8	化合物 228	4043	1253	30.98	26.4	3.10E+0 7	2.53E+0 7	81.62	9.2
2	GDF8	化合物 229	3451	892	25.85	22.6	1.80E+0 7	1.46E+0 7	81.07	5.4
2	GDF8	化合物 4	3163	805	25.44	20.7	1.58E+0 7	3.54E+0 6	22.32	4.7
2	GDF8	化合物 220	2791	1453	52.05	18.3	1.40E+0 7	9.00E+0 6	64.28	4.2
2	GDF8	化合物 5	3137	1172	37.34	20.5	1.30E+0 7	7.52E+0 6	57.85	3.9
2	GDF8	化合物 230	2624	248	9.46	17.2	1.24E+0 7	1.55E+0 7	124.7 3	3.7
2	GDF8	化合物 231	4773	2651	55.55	31.2	1.22E+0 7	6.51E+0 6	53.37	3.6
2	GDF8	化合物 232	3273	1290	39.41	21.4	1.18E+0 7	1.51E+0 7	127.9 8	3.5

[0645]

2	GDF8	化合物 221	1950	361	18.52	12.8	1.18E+0 7	1.54E+0 7	131.1 1	3.5
2	GDF8	化合物 233	3041	180	5.93	19.9	1.12E+0 7	1.09E+0 7	97.44	3.3
2	GDF8	化合物 147	3434	1199	34.91	22.5	1.12E+0 7	9.80E+0 6	87.75	3.3
2	GDF8	化合物 234	2835	623	21.98	18.5	9.47E+0 6	5.67E+0 6	59.84	2.8
2	GDF8	化合物 235	3391	2269	66.91	22.2	9.10E+0 6	6.51E+0 6	71.52	2.7
2	GDF8	化合物 236	2868	561	19.57	18.8	6.73E+0 6	6.32E+0 6	93.82	2.0
2	GDF8	化合物 33	2362	511	21.66	15.4	6.60E+0 6	2.45E+0 6	37.20	2.0
2	GDF8	化合物 1	3213	166	5.16	21.0	6.48E+0 6	3.09E+0 6	47.67	1.9
2	GDF8	化合物 53	2783	441	15.86	18.2	6.36E+0 6	2.89E+0 6	45.36	1.9
2	GDF8	化合物 237	2973	292	9.83	19.4	6.02E+0 6	3.00E+0 6	49.79	1.8
2	GDF8	化合物 238	2739	485	17.70	17.9	5.97E+0 6	6.10E+0 6	102.0 7	1.8
2	GDF8	化合物 239	3156	667	21.15	20.6	5.60E+0 6	2.42E+0 6	43.24	1.7
2	GDF8	化合物 240	3002	287	9.55	19.6	4.68E+0 6	3.13E+0 6	66.80	1.4
2	GDF8	化合物 200	2308	209	9.04	15.1	4.39E+0 6	1.88E+0 6	42.83	1.3
2	GDF8	化合物 222	1776	719	40.47	11.6	3.33E+0 6	2.52E+0 6	75.78	1.0
2	GDF8	化合物 241	2949	446	15.14	19.3	3.29E+0 6	1.55E+0 6	47.03	1.0
2	GDF8	化合物 242	385	184	47.83	2.5	108E+06	8.85E+0 5	81.61	0.3
2	GDF8	化合物 243	249	55	22.21	1.6	2.53E+0 5	3.07E+0 5	121.2 5	0.1
2	GDF8	化合物 204	250	21	8.38	1.6	1.36E+0 5	2.27E+0 4	16.66	0.0
3	无激活 素 A (使用 Wnt3a)	无	15796	0	0.00	99.6	2.82E+0 7	0.00E+0 0	0.00	8.0
3	激活素 A/Wnt3a	无	15867	785	4.95	100.0	3.54E+0 8	2.40E+0 7	6.77	100. 0

[0646]

3	GDF8	化合物 34	6974	3723	53.38	44.0	2.07E+0 8	9.51E+0 7	45.85	58.6
3	GDF8	化合物 185	10892	1552	14.24	68.6	1.53E+0 8	4.08E+0 7	26.72	43.1
3	GDF8	化合物 35	7746	1873	24.17	48.8	1.35E+0 8	4.86E+0 7	36.08	38.0
3	GDF8	化合物 22	6727	1927	28.64	42.4	1.06E+0 8	5.04E+0 7	47.73	29.8
3	GDF8	化合物 34	4889	1152	23.57	30.8	4.31E+0 7	2.11E+0 7	48.95	12.2
3	GDF8	化合物 184	4173	1758	42.14	26.3	3.94E+0 7	2.24E+0 7	56.78	11.1
3	GDF8	化合物 223	4234	1604	37.88	26.7	3.55E+0 7	2.51E+0 7	70.56	10.0
3	GDF8	化合物 37	4187	338	8.06	26.4	3.11E+0 7	1.56E+0 7	50.18	8.8
3	GDF8	化合物 244	4479	1229	27.43	28.2	2.73E+0 7	1.52E+0 7	55.71	7.7
3	GDF8	化合物 245	4725	99	2.09	29.8	2.59E+0 7	1.03E+0 7	39.90	7.3
3	GDF8	化合物 246	3820	1091	28.57	24.1	2.30E+0 7	2.69E+0 7	117.0 8	6.5
3	GDF8	化合物 247	3730	966	25.90	23.5	2.14E+0 7	1.04E+0 7	48.63	6.1
3	GDF8	化合物 248	3875	445	11.48	24.4	2.13E+0 7	9.45E+0 6	44.45	6.0
3	GDF8	化合物 25	3879	658	16.95	24.4	1.76E+0 7	1.21E+0 7	69.04	5.0
3	GDF8	化合物 195	3703	405	10.94	23.3	1.61E+0 7	3.27E+0 6	20.34	4.5
3	GDF8	化合物 227	2904	397	13.68	18.3	1.43E+0 7	1.35E+0 7	94.25	4.0
3	GDF8	化合物 183	3306	969	29.32	20.8	1.35E+0 7	1.14E+0 7	84.25	3.8
3	GDF8	化合物 187	2768	1426	51.51	17.4	1.35E+0 7	9.02E+0 6	66.67	3.8
3	GDF8	化合物 201	3213	1114	34.66	20.3	1.35E+0 7	1.69E+0 7	125.0 2	3.8
3	GDF8	化合物 197	3268	211	6.46	20.6	1.30E+0 7	5.25E+0 6	40.51	3.7
3	GDF8	化合物 249	3840	348	9.06	24.2	1.29E+0 7	6.79E+0 6	52.72	3.6
3	GDF8	化合物 141	2404	213	8.86	15.1	1.12E+0 7	4.95E+0 6	44.30	3.2

[0647]

3	GDF8	化合物 194	3177	354	11.14	20.0	9.75E+0 6	2.11E+0 6	21.63	2.8
3	GDF8	化合物 250	3683	420	11.40	23.2	9.14E+0 6	4.78E+0 6	52.32	2.6
3	GDF8	化合物 251	3021	668	22.10	19.0	8.41E+0 6	4.59E+0 6	54.60	2.4
3	GDF8	化合物 20	2793	205	7.35	17.6	6.77E+0 6	1.86E+0 6	27.45	1.9
3	GDF8	化合物 252	2580	135	5.24	16.3	6.20E+0 6	2.31E+0 5	3.72	1.8
3	GDF8	化合物 253	2485	820	32.98	15.7	5.83E+0 6	1.47E+0 6	25.20	1.6
3	GDF8	化合物 202	2095	518	24.71	13.2	5.75E+0 6	2.62E+0 6	45.66	1.6
3	GDF8	化合物 21	371	294	79.19	2.3	2.36E+0 6	3.07E+0 6	129.7 8	0.7
4	无激活 素 A (使用 Wnt3a)	无	16629	0	0.00	119.3	2.42E+0 7	0.00E+0 0	0.00	7.8
4	激活素 A/Wnt3a	无	13945	1535	11.01	100.0	3.09E+0 8	4.77E+0 7	15.46	100. 0
4	GDF8	化合物 34	7416	6482	87.41	53.2	2.10E+0 8	1.82E+0 8	86.70	68.0
4	GDF8	化合物 240	11283	2023	17.93	80.9	1.61E+0 8	4.41E+0 7	27.34	52.2
4	GDF8	化合物 28	5236	1787	34.12	37.5	4.03E+0 7	3.08E+0 7	76.36	13.1
4	GDF8	化合物 198	3985	2674	67.10	28.6	3.89E+0 7	5.55E+0 7	142.9 1	12.6
4	GDF8	化合物 196	4861	1501	30.87	34.9	3.03E+0 7	1.98E+0 7	65.37	9.8
4	GDF8	化合物 18	1921	1759	91.56	13.8	2.94E+0 7	3.65E+0 7	123.9 0	9.5
4	GDF8	化合物 186	3486	425	12.19	25.0	2.34E+0 7	1.42E+0 7	60.78	7.6
4	GDF8	化合物 254	3960	1521	38.42	28.4	2.31E+0 7	2.27E+0 7	98.10	7.5
4	GDF8	化合物 168	3460	324	9.36	24.8	2.28E+0 7	7.13E+0 6	31.23	7.4
4	GDF8	化合物 190	3402	1318	38.74	24.4	1.87E+0 7	1.58E+0 7	84.61	6.1
4	GDF8	化合物 255	4006	1625	40.57	28.7	1.52E+0 7	1.05E+0 7	68.91	4.9

[0648]

4	GDF8	化合物 50	2666	743	27.86	19.1	1.48E+0 7	8.30E+0 6	56.15	4.8
4	GDF8	化合物 27	3721	721	19.37	26.7	1.19E+0 7	9.69E+0 6	81.29	3.9
4	GDF8	化合物 256	2922	1275	43.64	21.0	9.41E+0 6	8.65E+0 6	92.01	3.0
4	GDF8	化合物 257	3182	705	22.14	22.8	8.06E+0 6	4.49E+0 6	55.75	2.6
4	GDF8	化合物 258	2731	472	17.29	19.6	7.89E+0 6	7.24E+0 6	91.70	2.6
4	GDF8	化合物 189	2350	1625	69.16	16.9	7.72E+0 6	5.36E+0 6	69.41	2.5
4	GDF8	化合物 259	2195	955	43.49	15.7	6.92E+0 6	2.58E+0 6	37.29	2.2
4	GDF8	化合物 260	2468	741	30.04	17.7	6.64E+0 6	3.33E+0 6	50.18	2.2
4	GDF8	化合物 261	2965	456	15.38	21.3	6.23E+0 6	2.10E+0 6	33.61	2.0
4	GDF8	化合物 192	2377	572	24.08	17.0	6.17E+0 6	2.76E+0 6	44.65	2.0
4	GDF8	化合物 262	2894	399	13.78	20.8	5.75E+0 6	3.00E+0 6	52.20	1.9
4	GDF8	化合物 188	3005	759	25.26	21.6	5.02E+0 6	3.97E+0 6	79.06	1.6
4	GDF8	化合物 263	2129	230	10.79	15.3	4.77E+0 6	1.14E+0 6	23.93	1.5
4	GDF8	化合物 264	2630	342	13.00	18.9	4.28E+0 6	2.17E+0 6	50.73	1.4
4	GDF8	化合物 265	2636	1372	52.04	18.9	4.27E+0 6	1.15E+0 6	26.86	1.4
4	GDF8	化合物 14	274	14	5.02	2.0	1.56E+0 5	9.51E+0 4	60.91	0.1
4	GDF8	化合物 205	241	3	1.20	1.7	1.36E+0 5	6.83E+0 4	50.42	0.0
4	GDF8	化合物 206	271	7	2.67	1.9	1.18E+0 5	3.34E+0 4	28.43	0.0
4	GDF8	化合物 203	253	4	1.49	1.8	1.09E+0 5	3.49E+0 4	32.09	0.0

表 19	
	Sox17 表达
化合物编号	阳性对照%

[0649]



[0650]

化合物 181	150.3
化合物 202	144.0
化合物 180	73.6
化合物 19	69.5
化合物 34	68.0
化合物 40	52.2
化合物 185	43.1
化合物 185	38.0
化合物 35	33.7
化合物 23	29.8
化合物 22	27.4
化合物 17	23.6

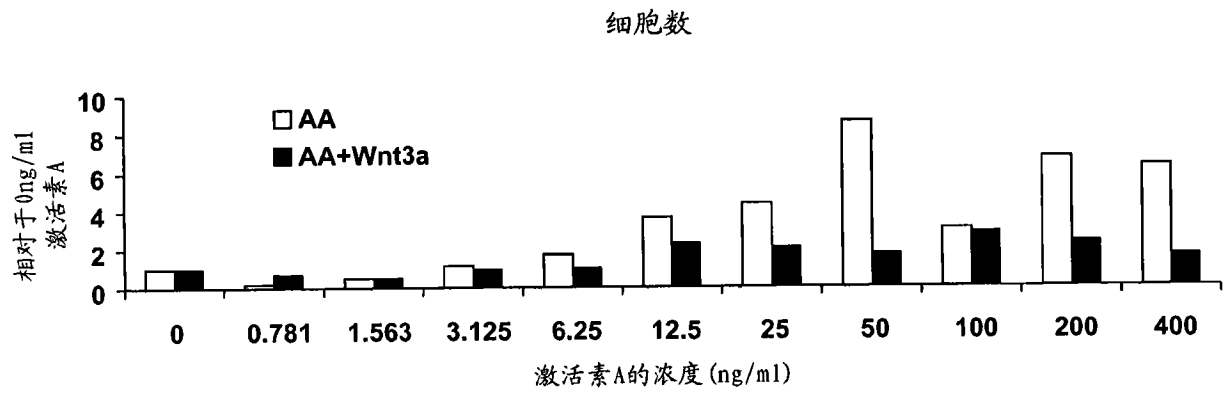


图 1A

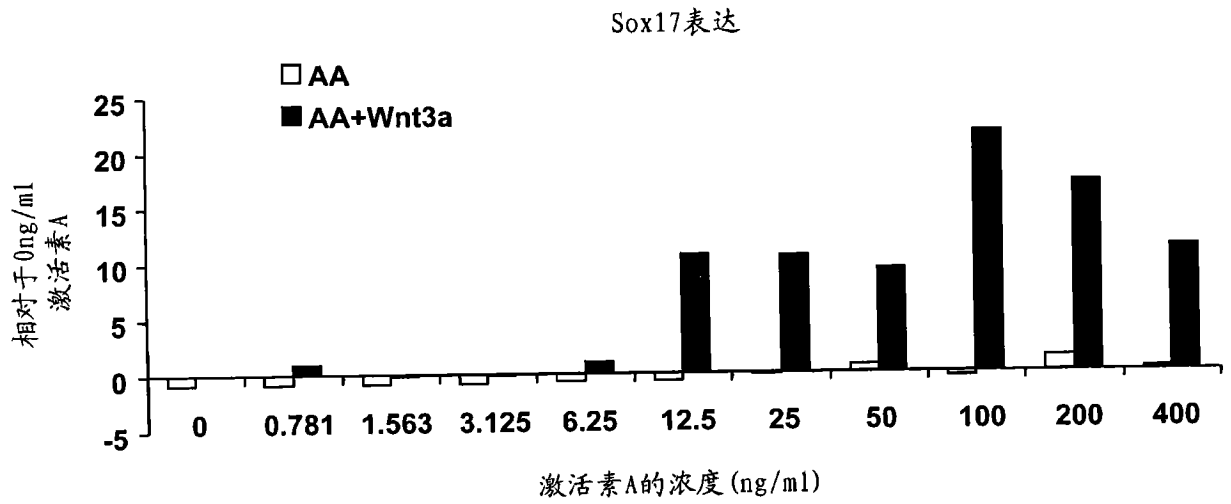


图 1B

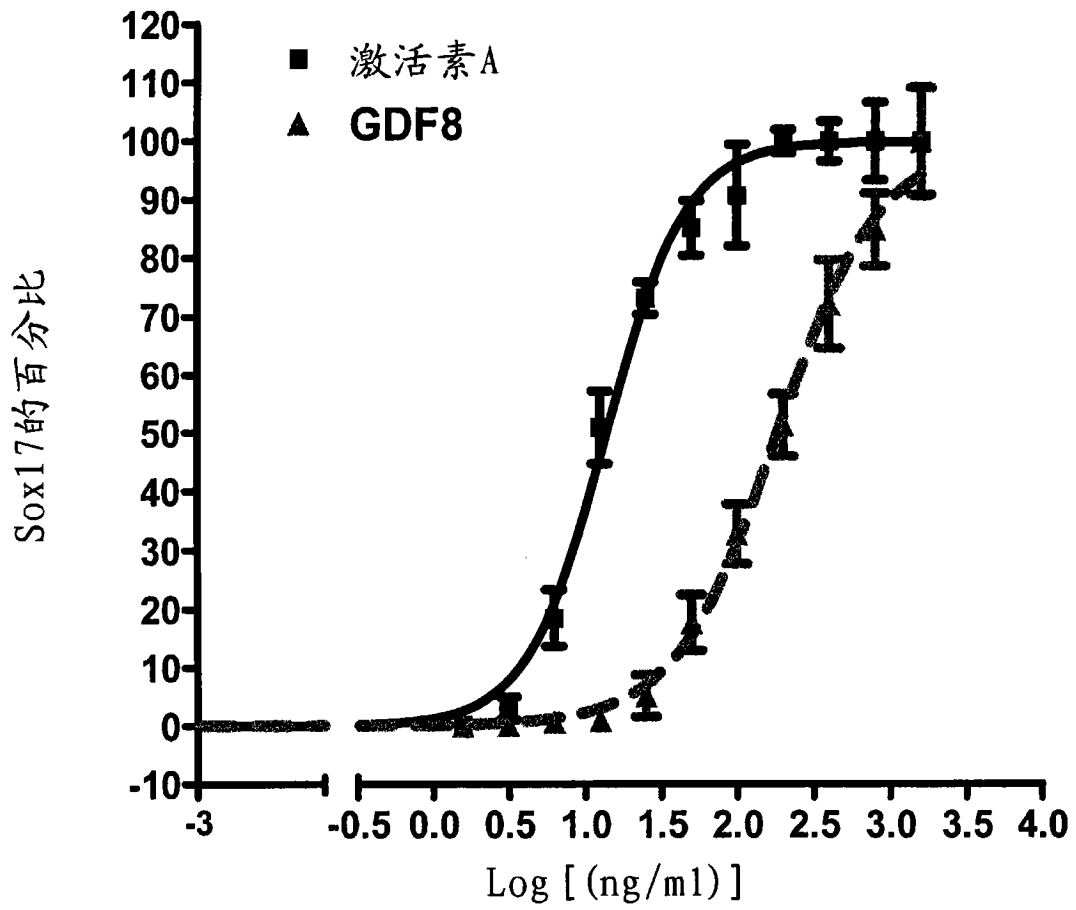


图 2

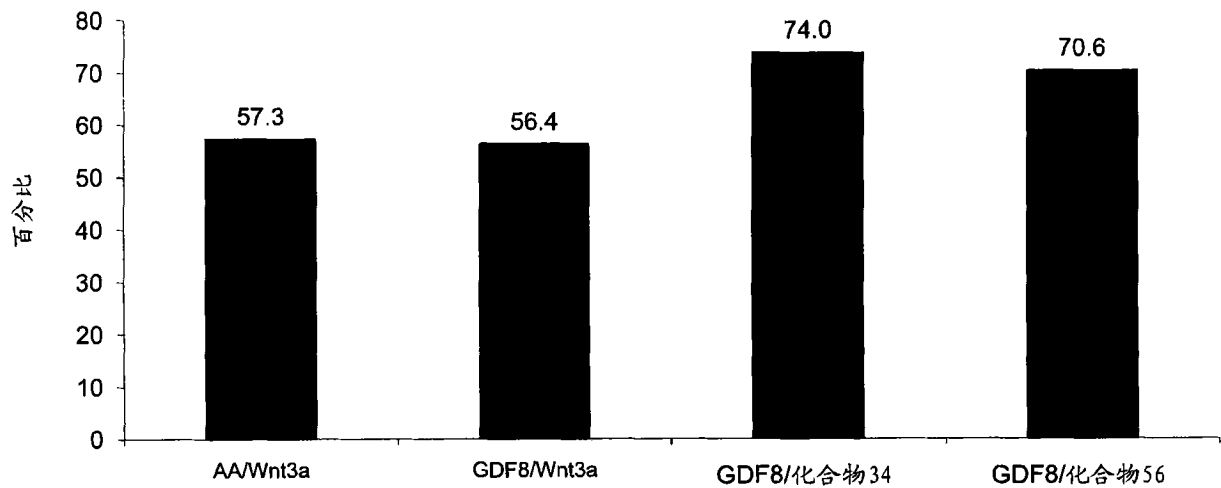


图 3

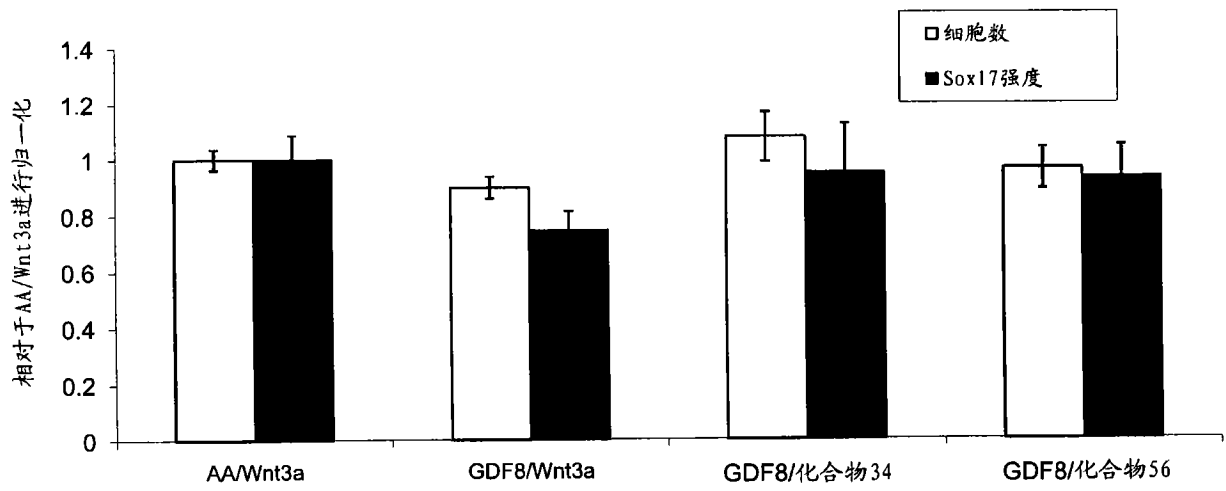


图 4

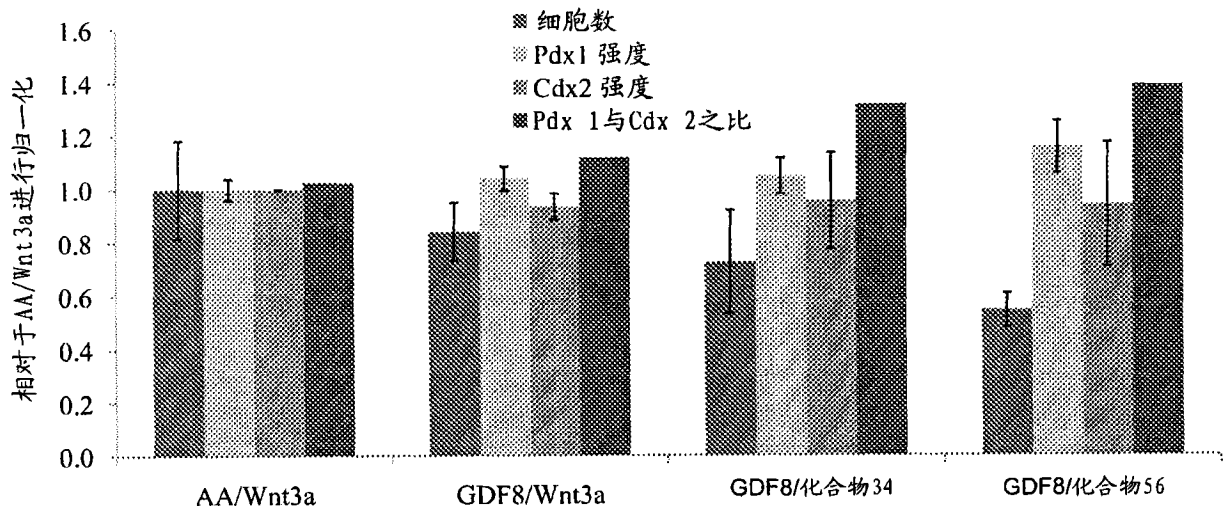


图 5

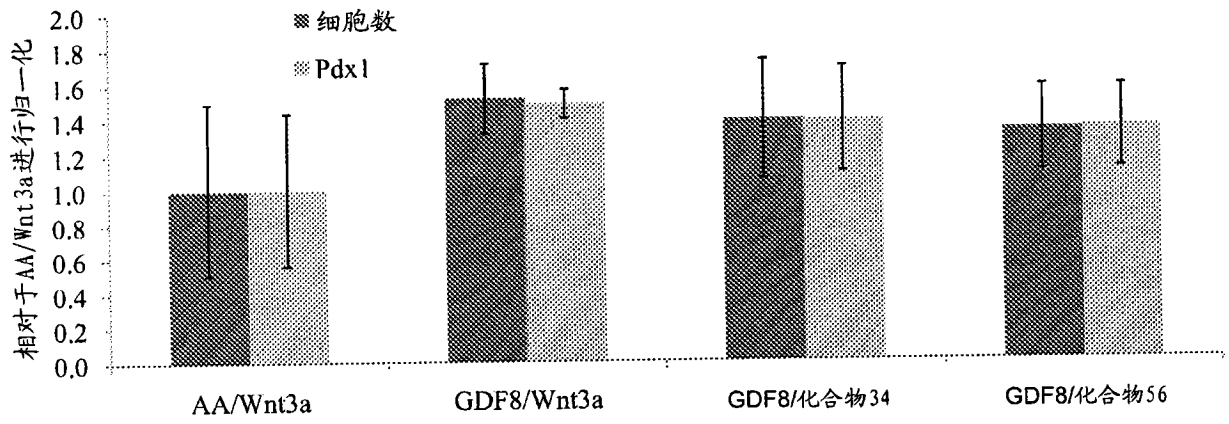


图 6

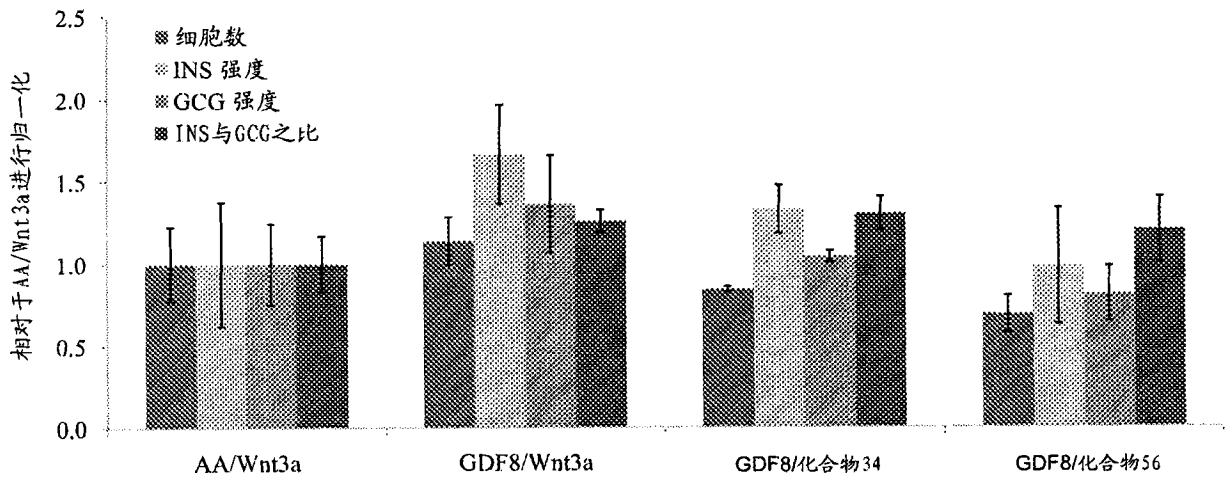


图 7

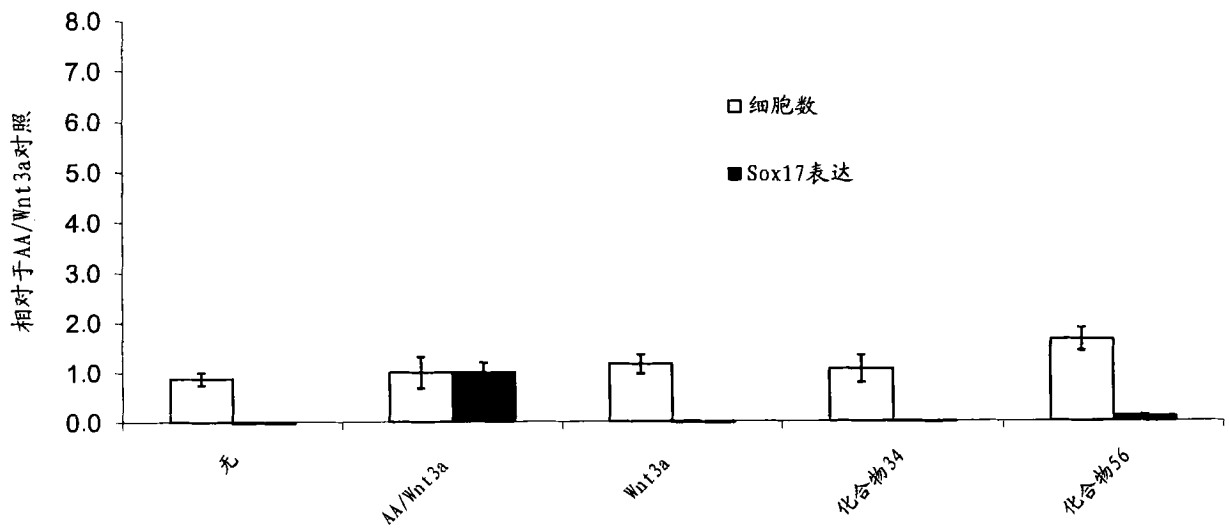


图 8A

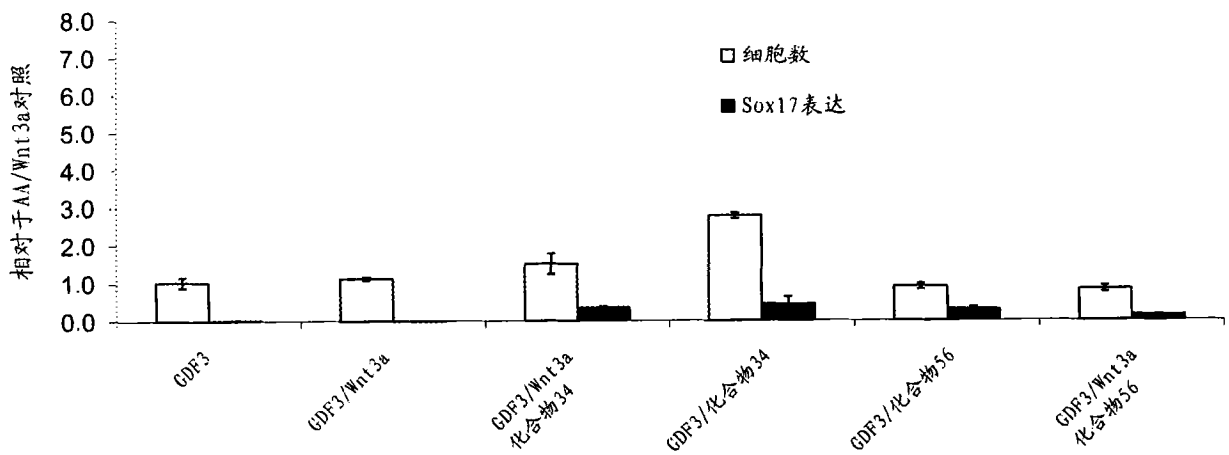


图 8B

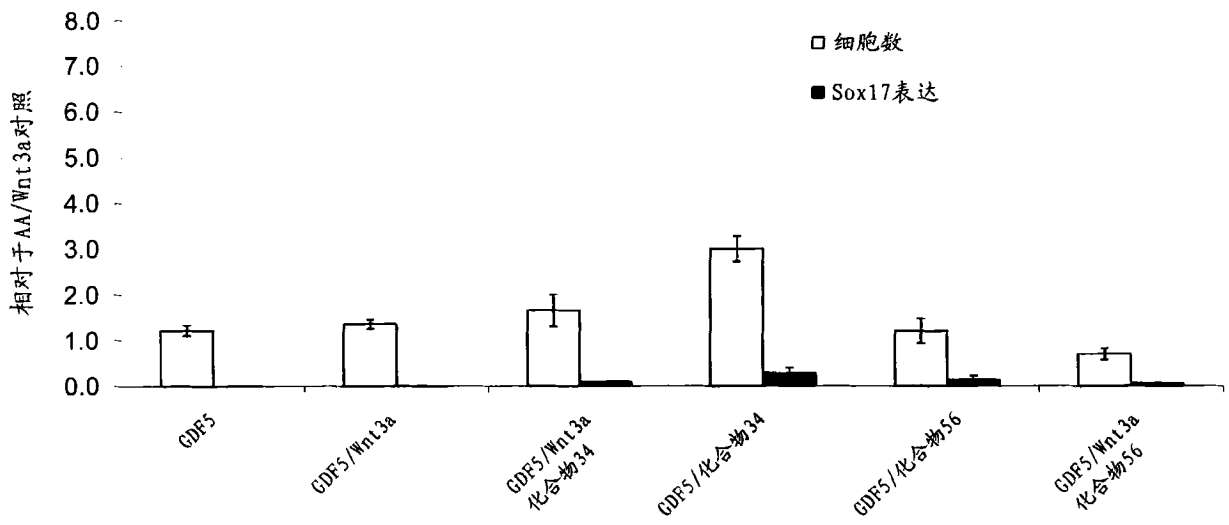


图 8C

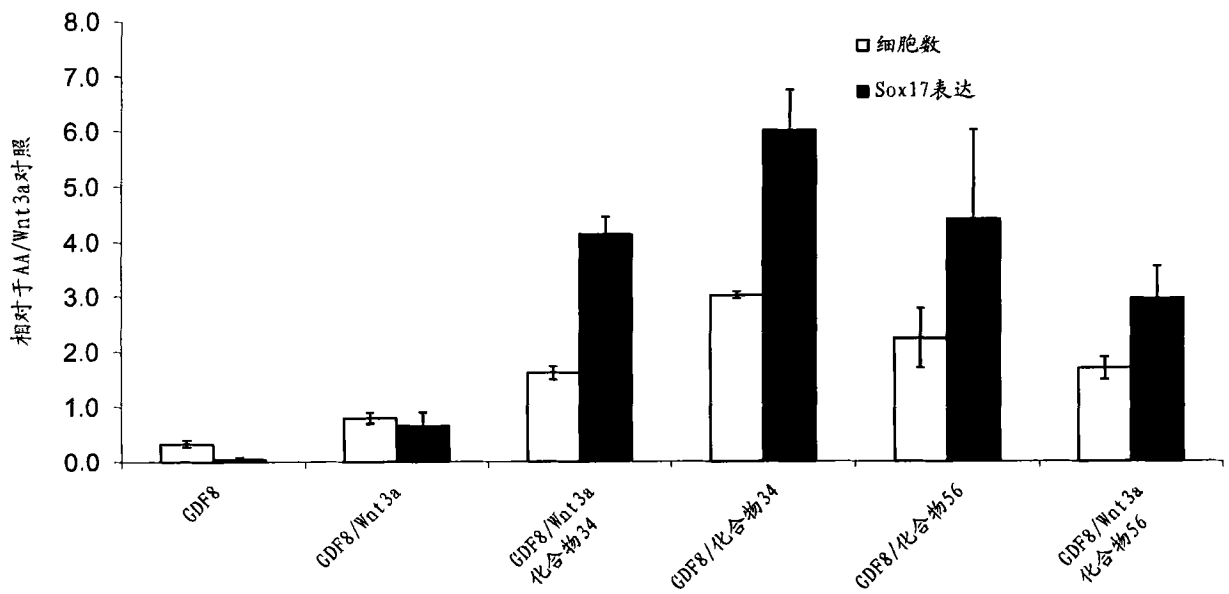


图 8D

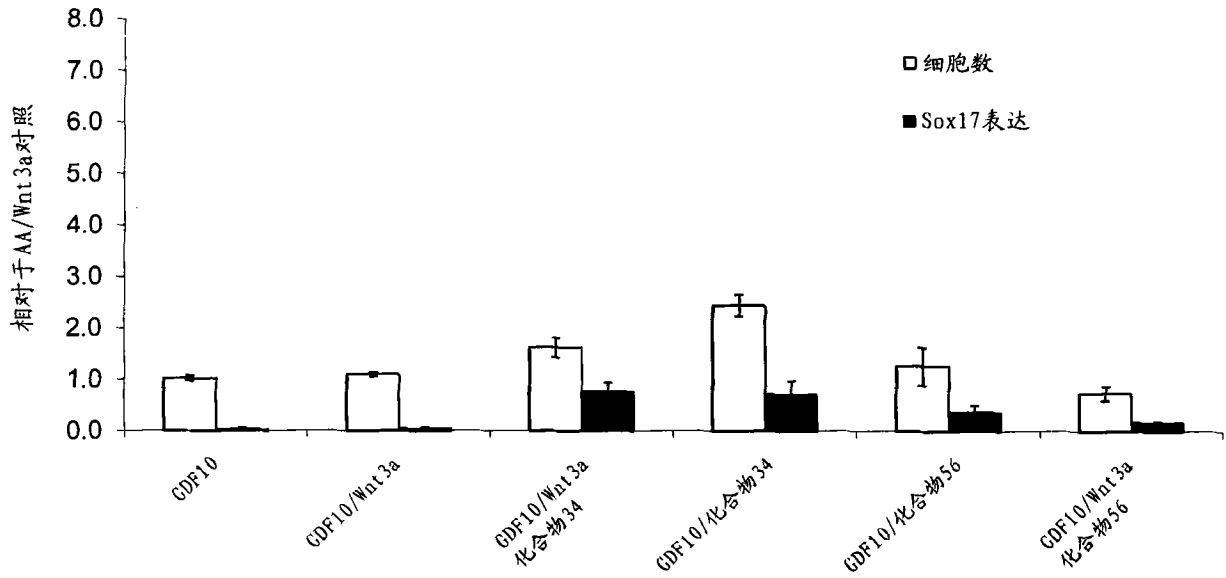


图 8E

CEN527USNP: DIFFERENTIATION OF PLURIPOTENT STEM CELLS  
(多能干细胞的分化) Janet Davis 等

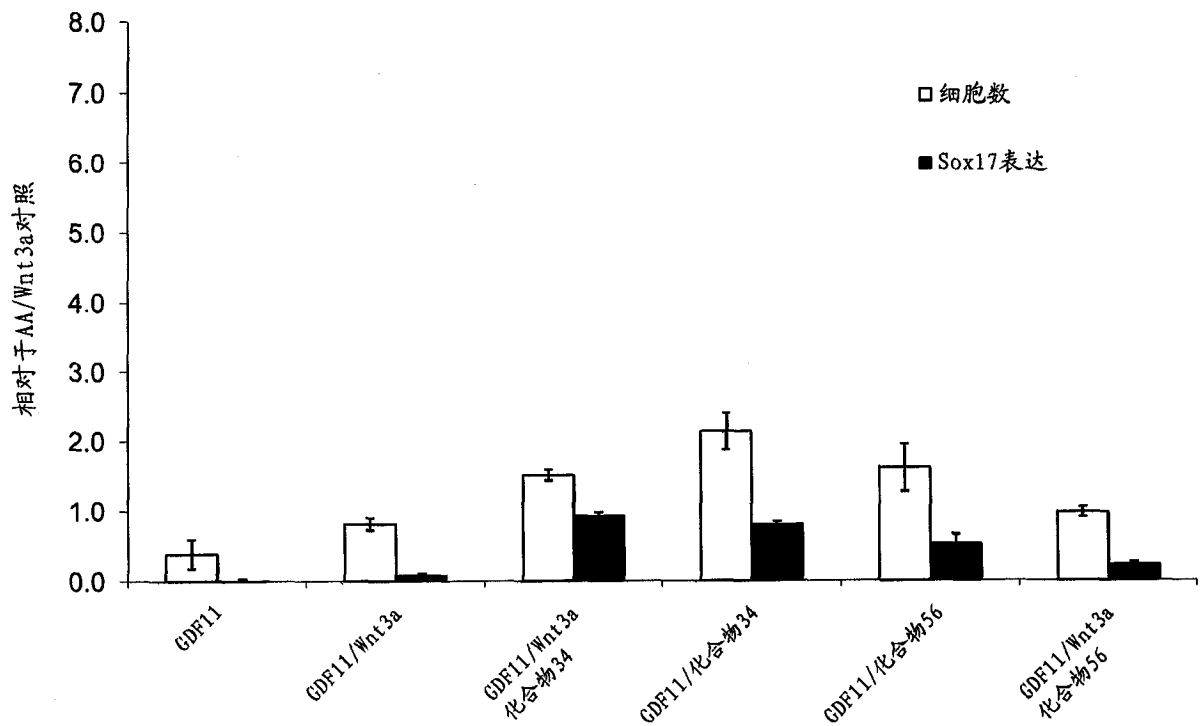


图 8F



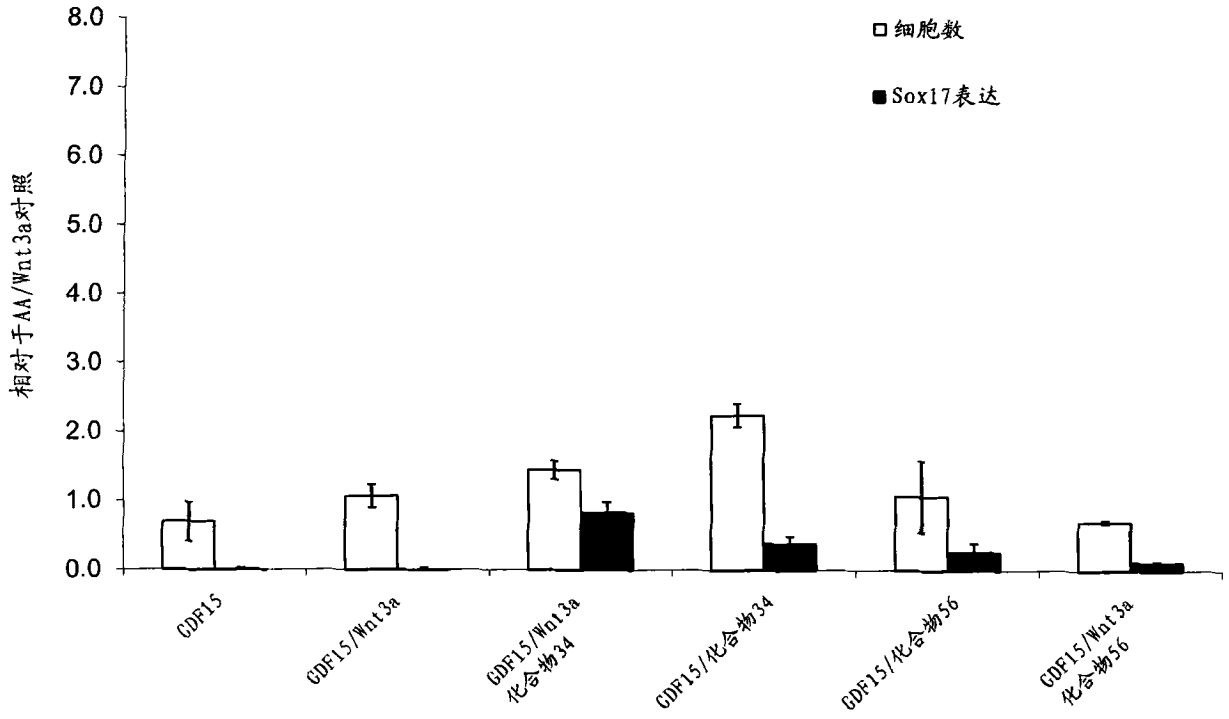


图 8G

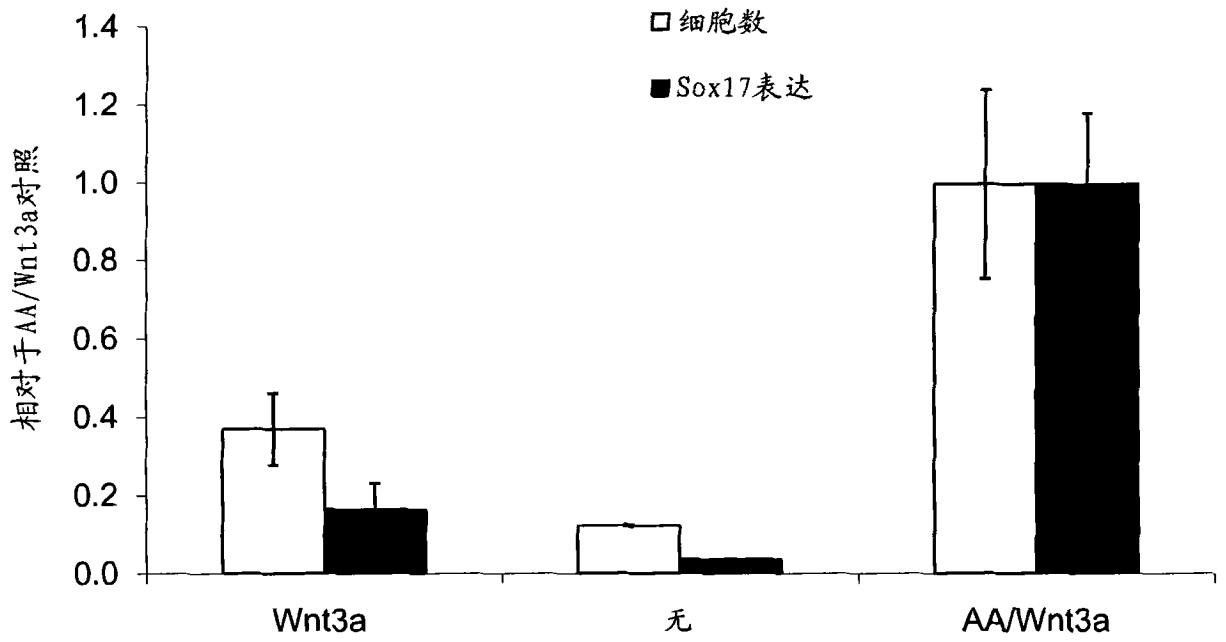


图 9A

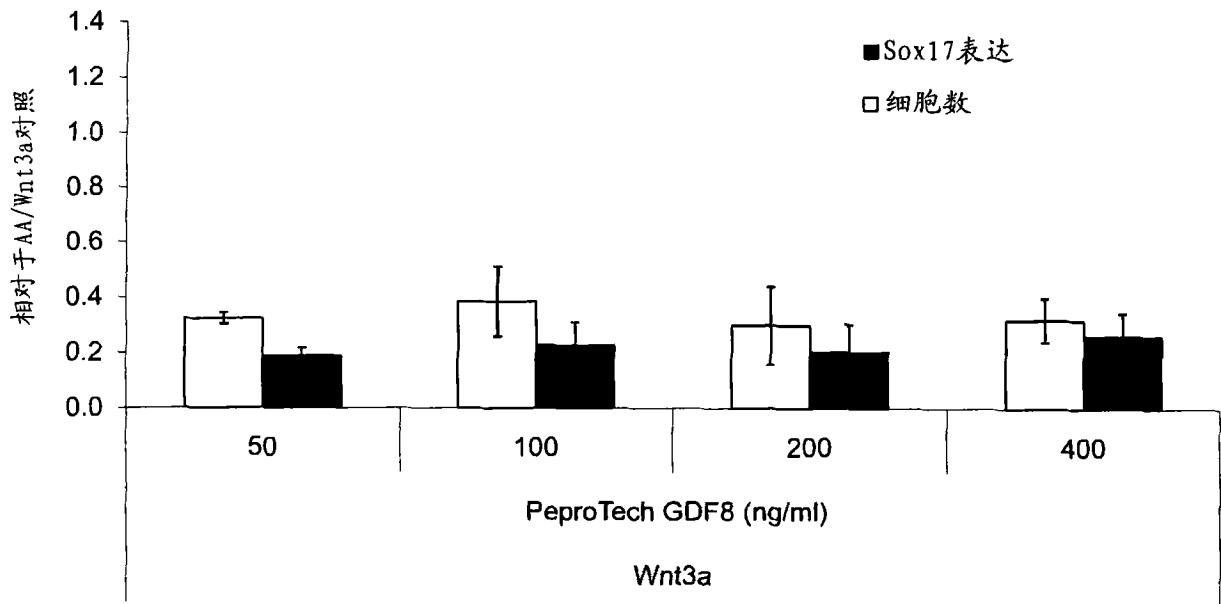


图 9B

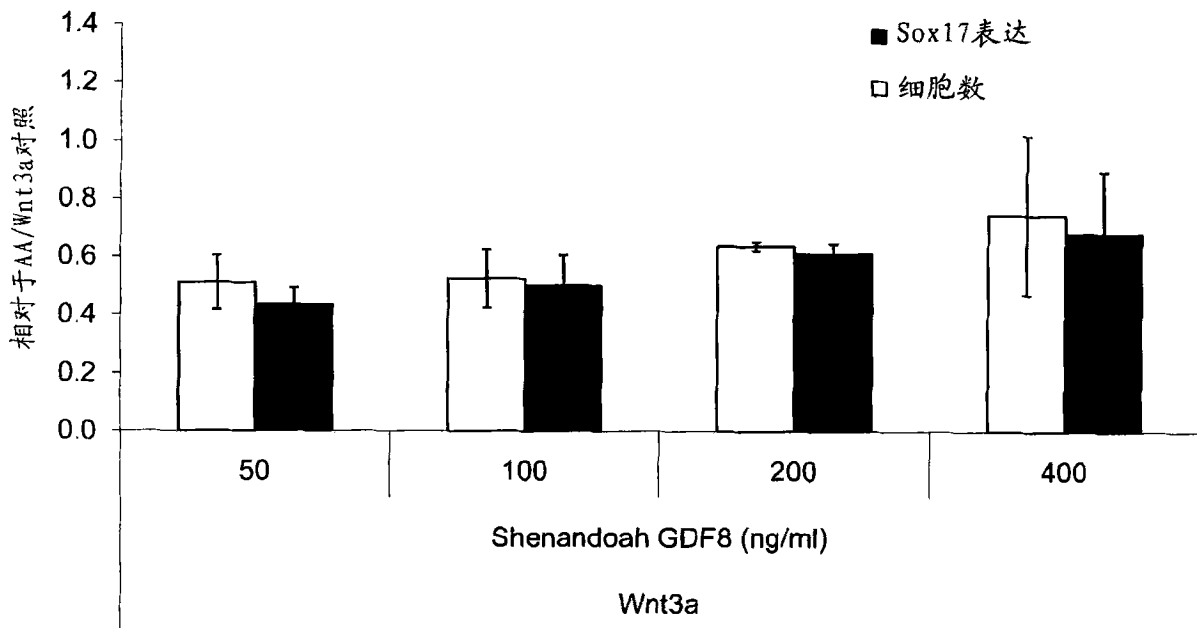


图 9C

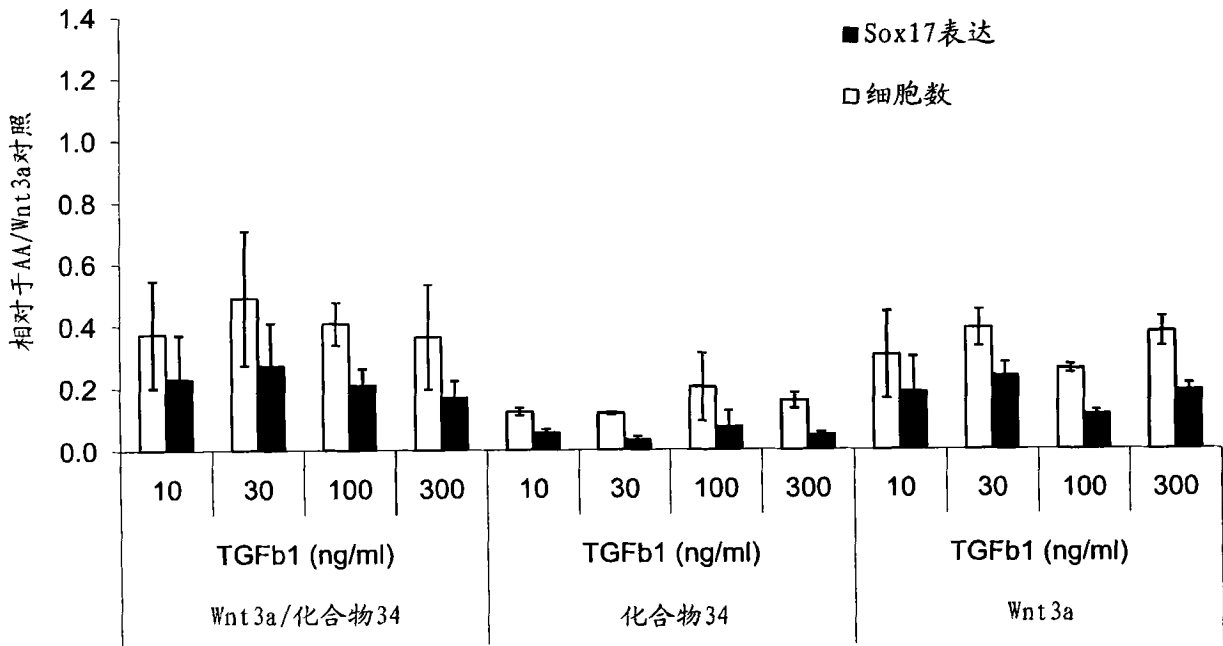


图 9D

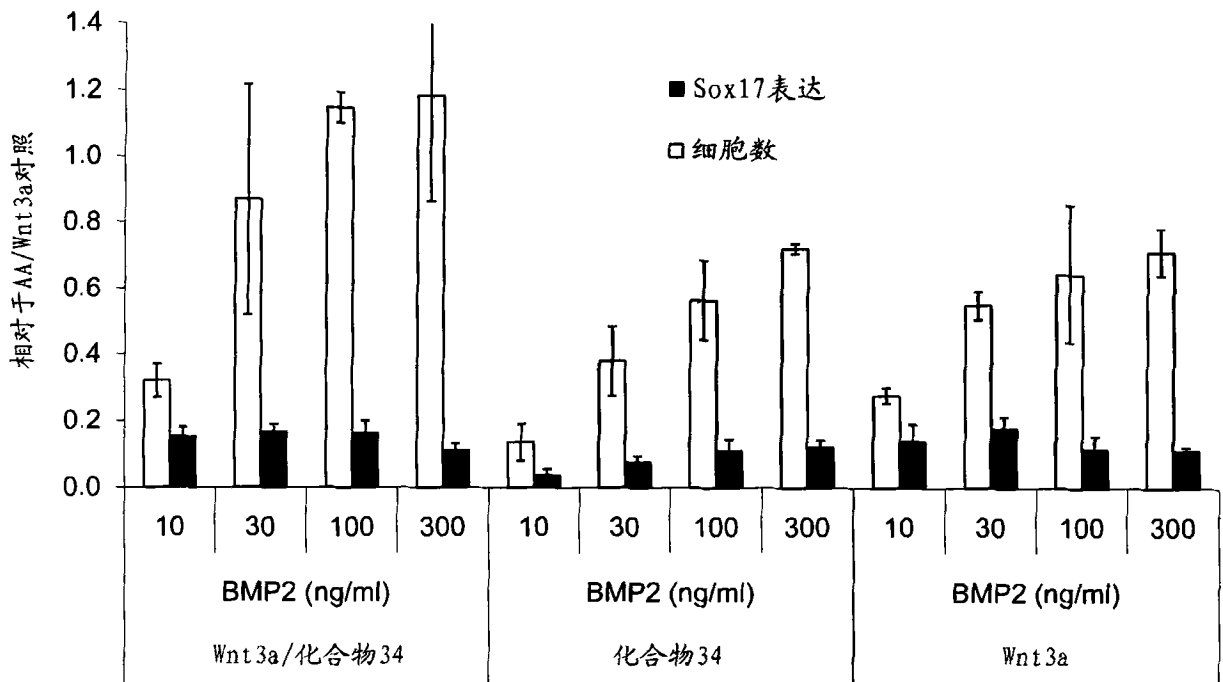


图 9E

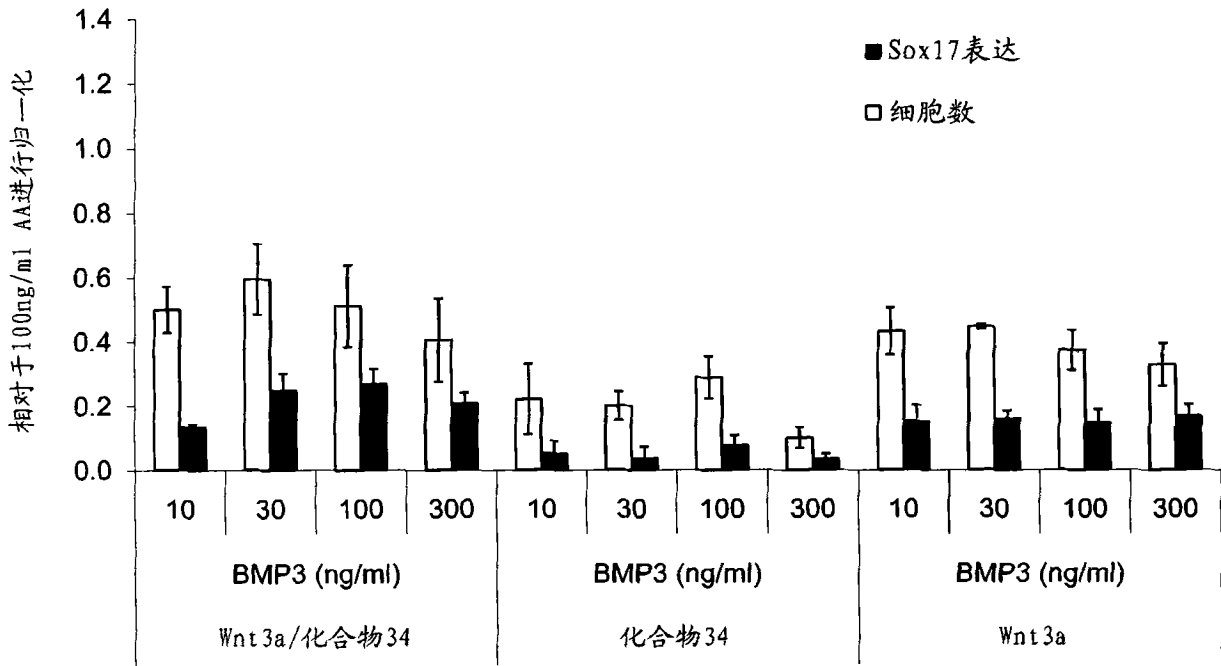


图 9F

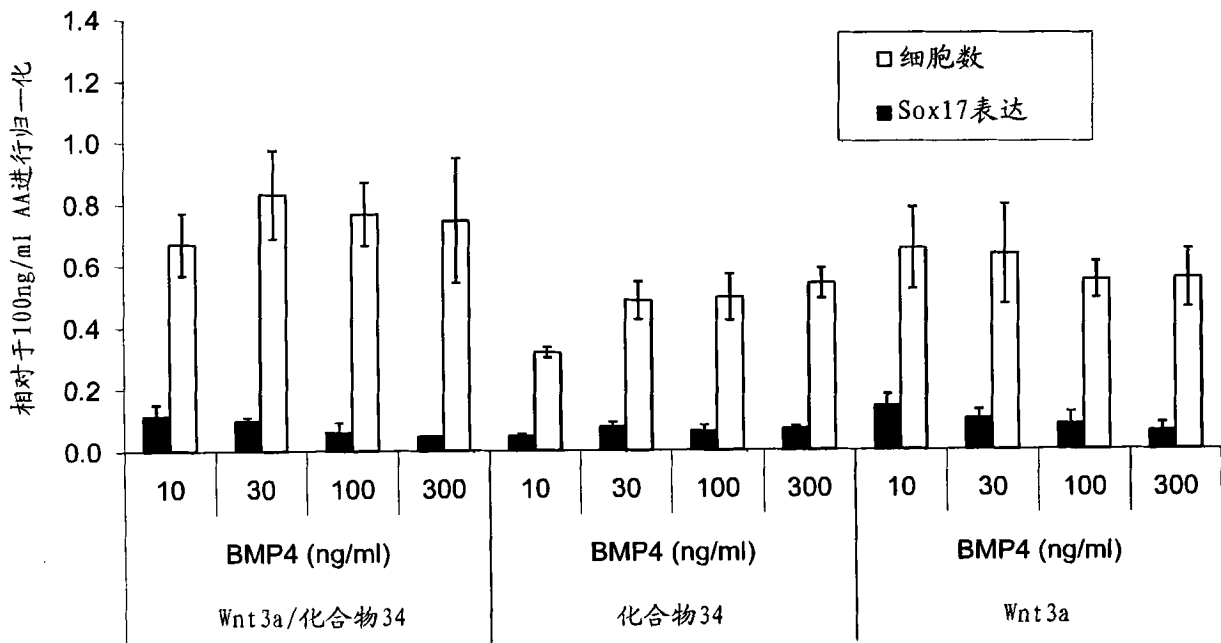


图 9G

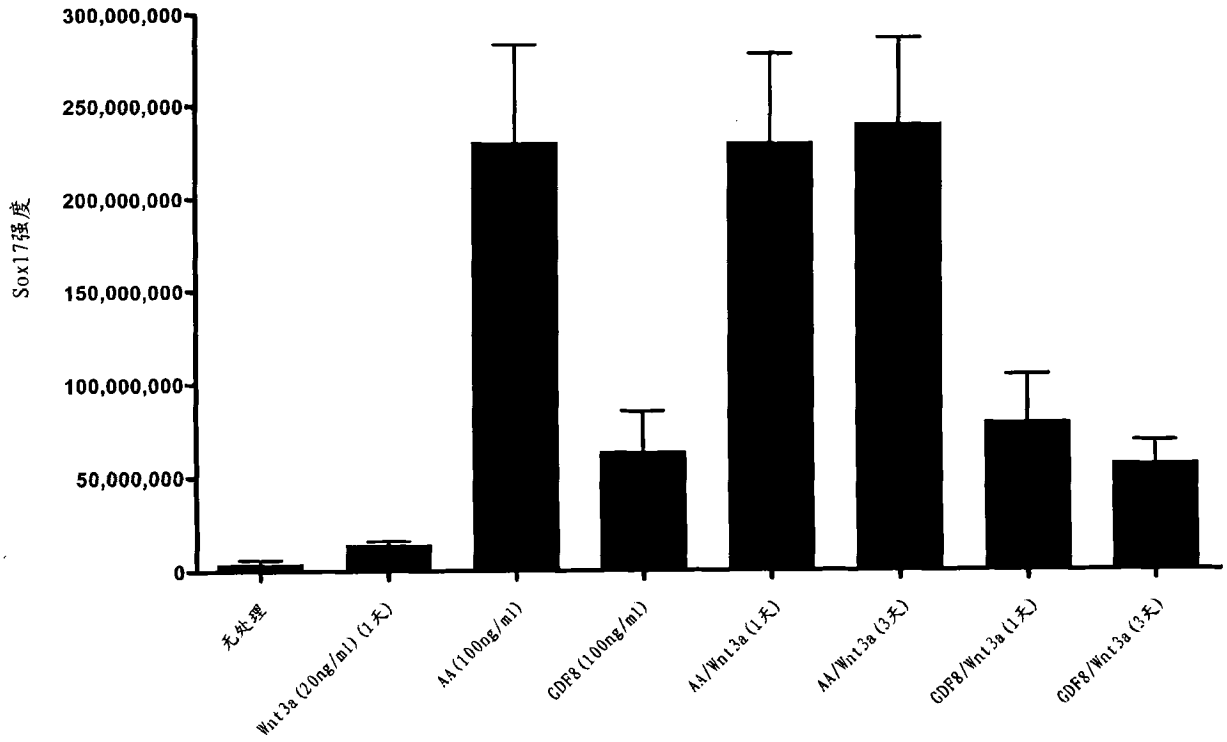


图 10

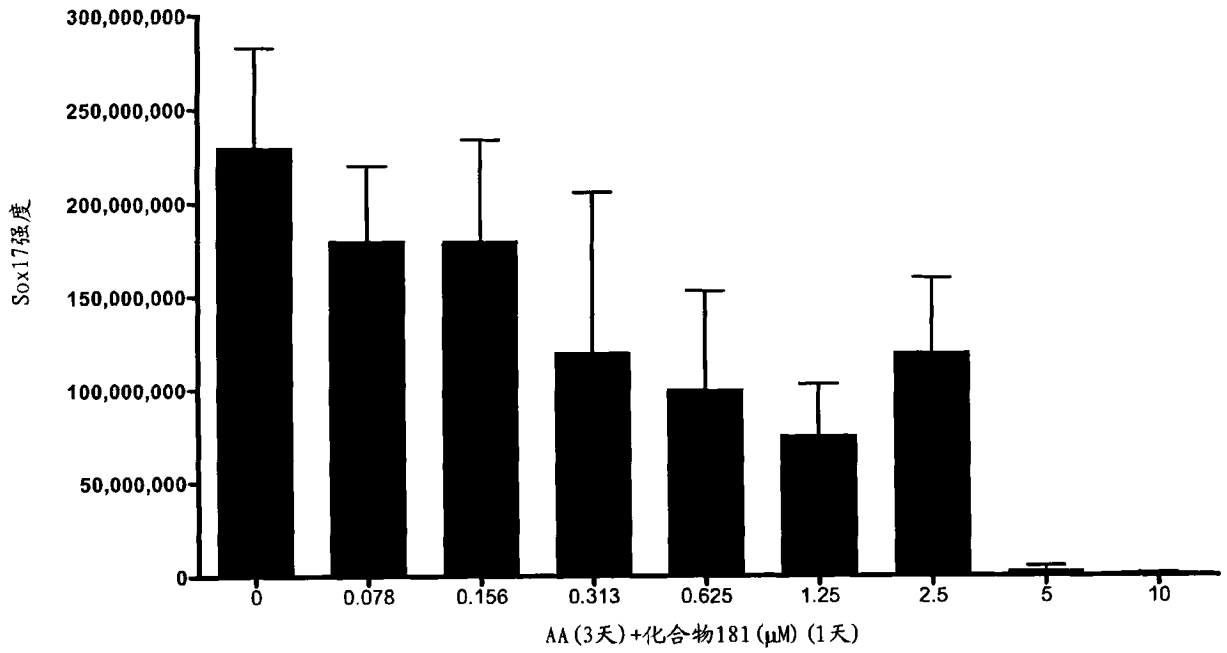


图 11A

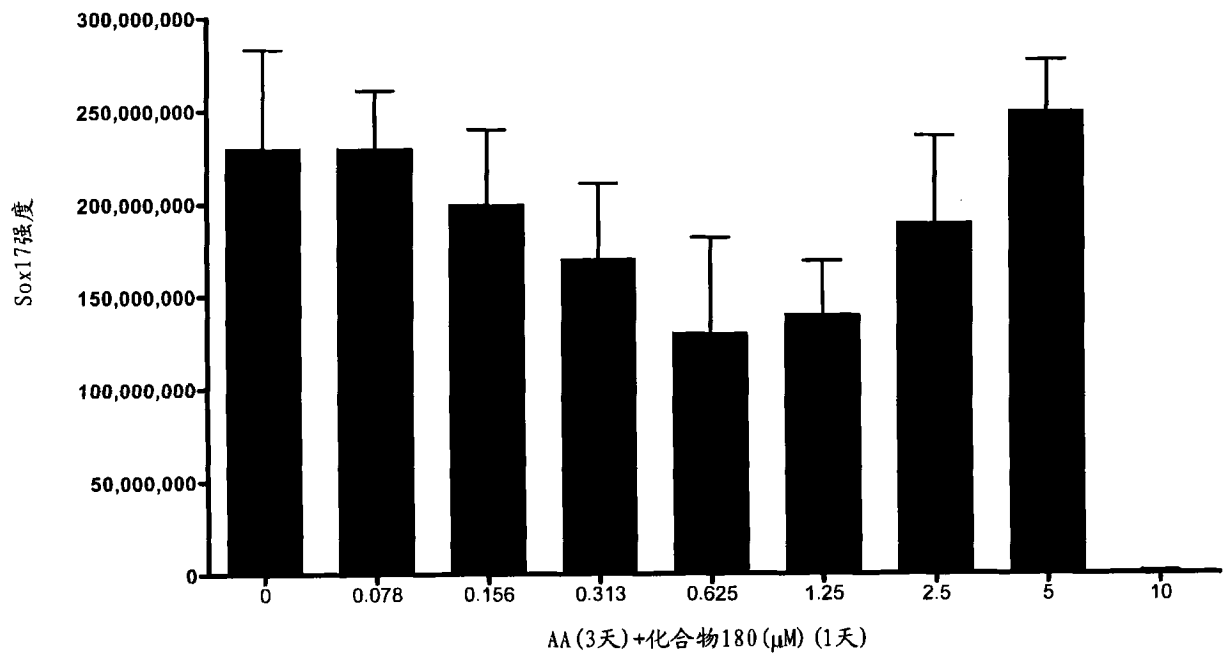


图 11B

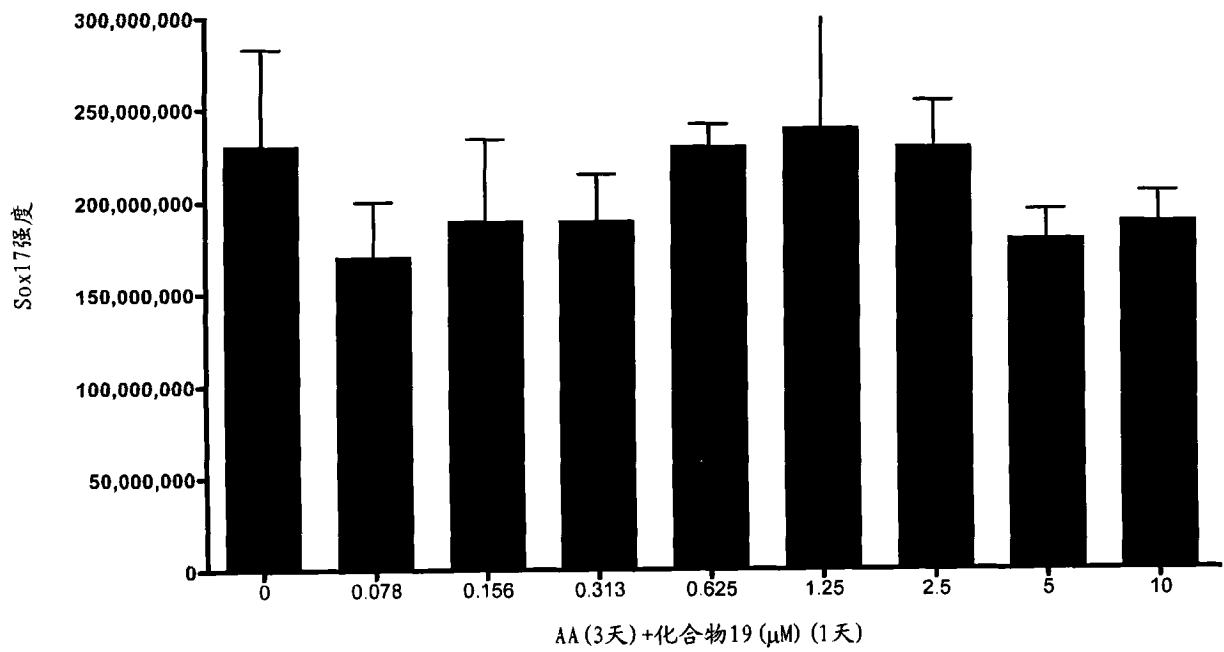


图 11C

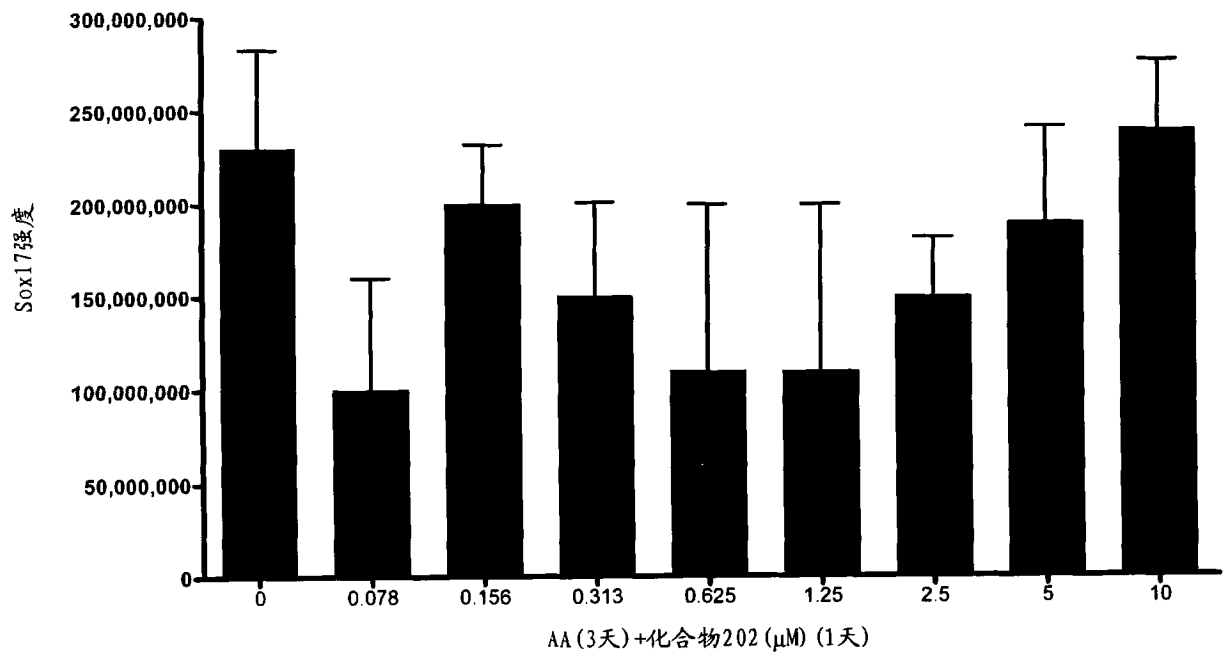


图 11D

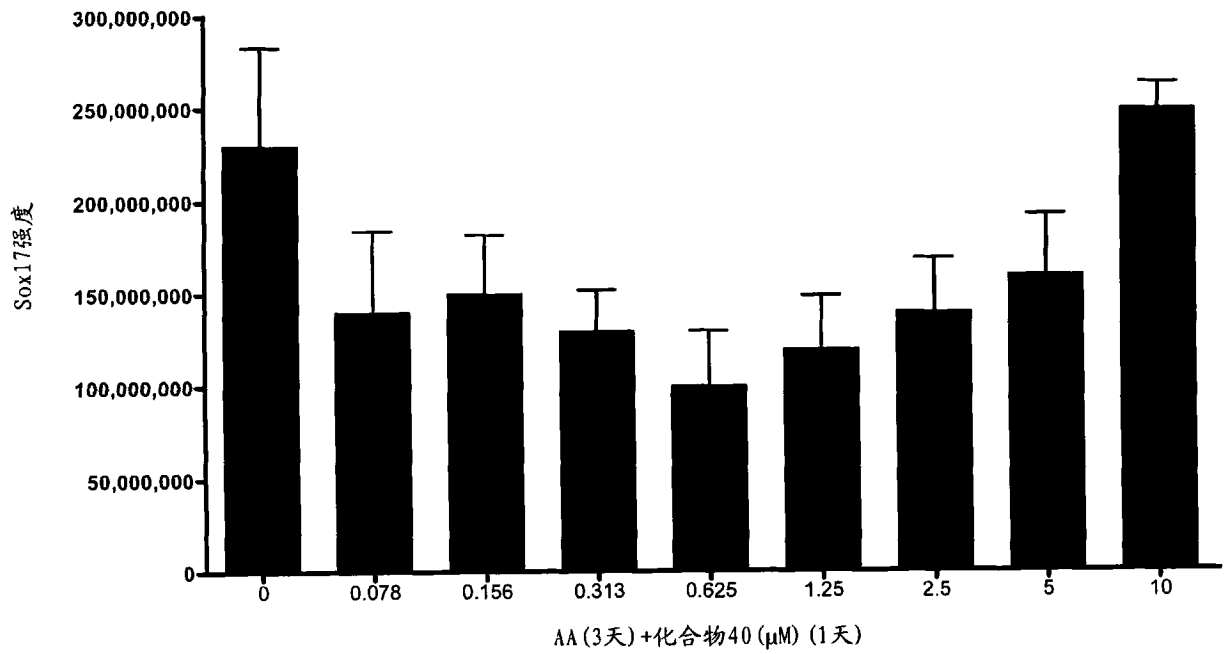


图 11E

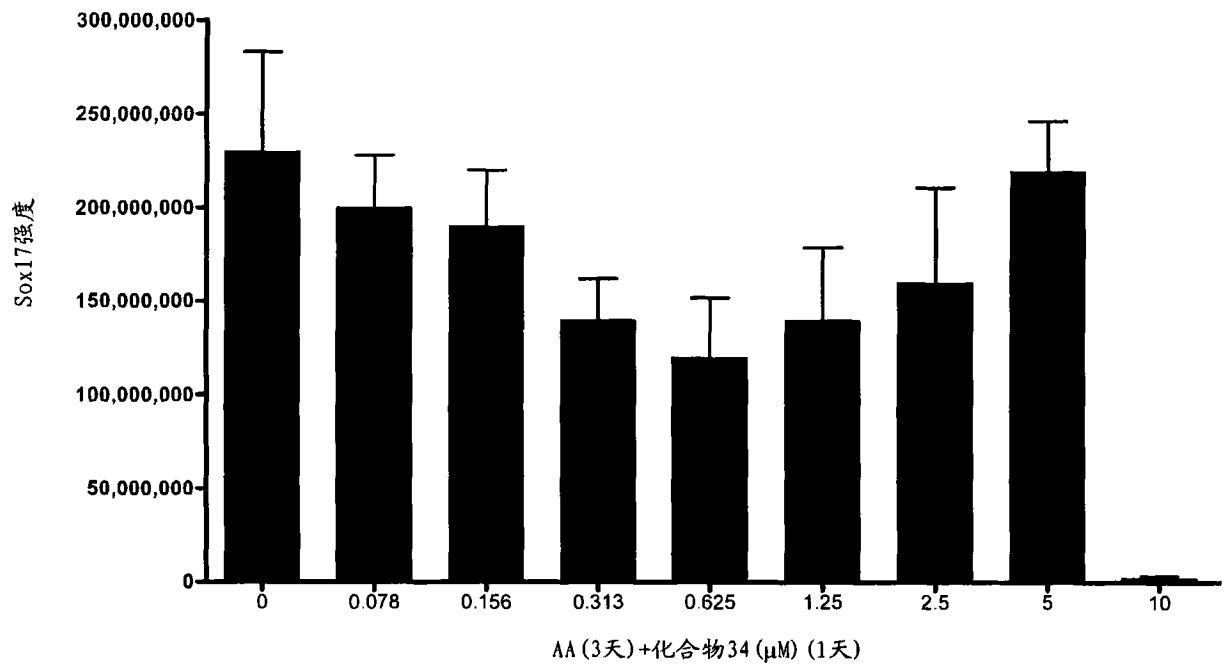


图 11F

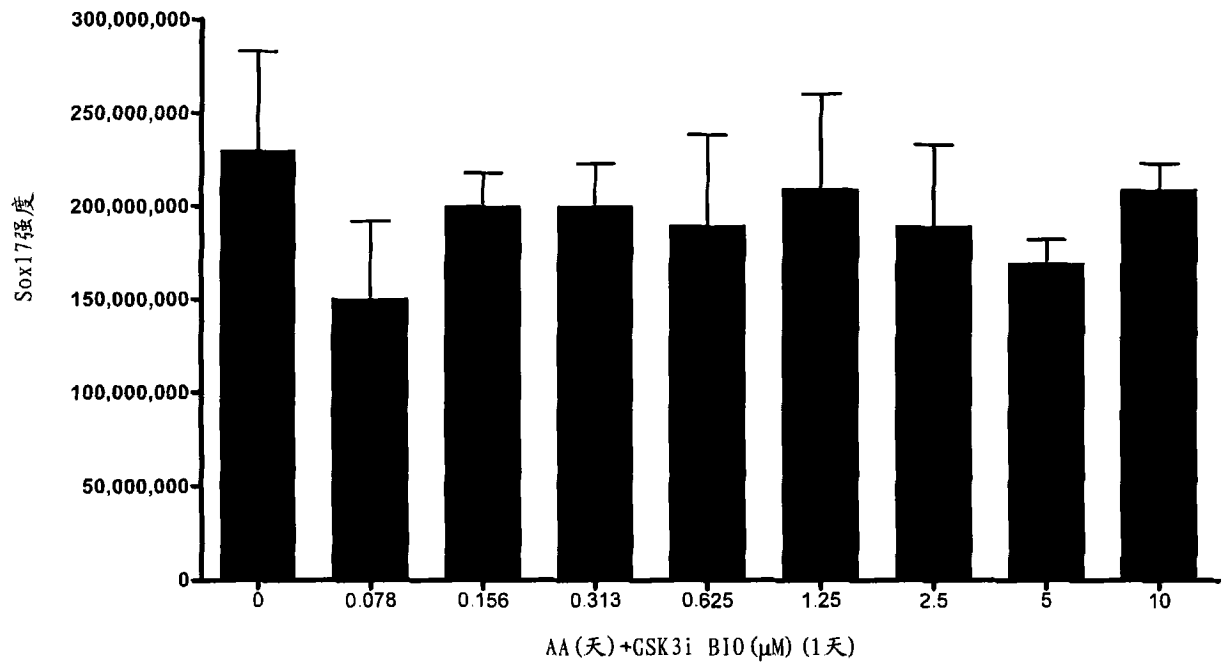


图 11G



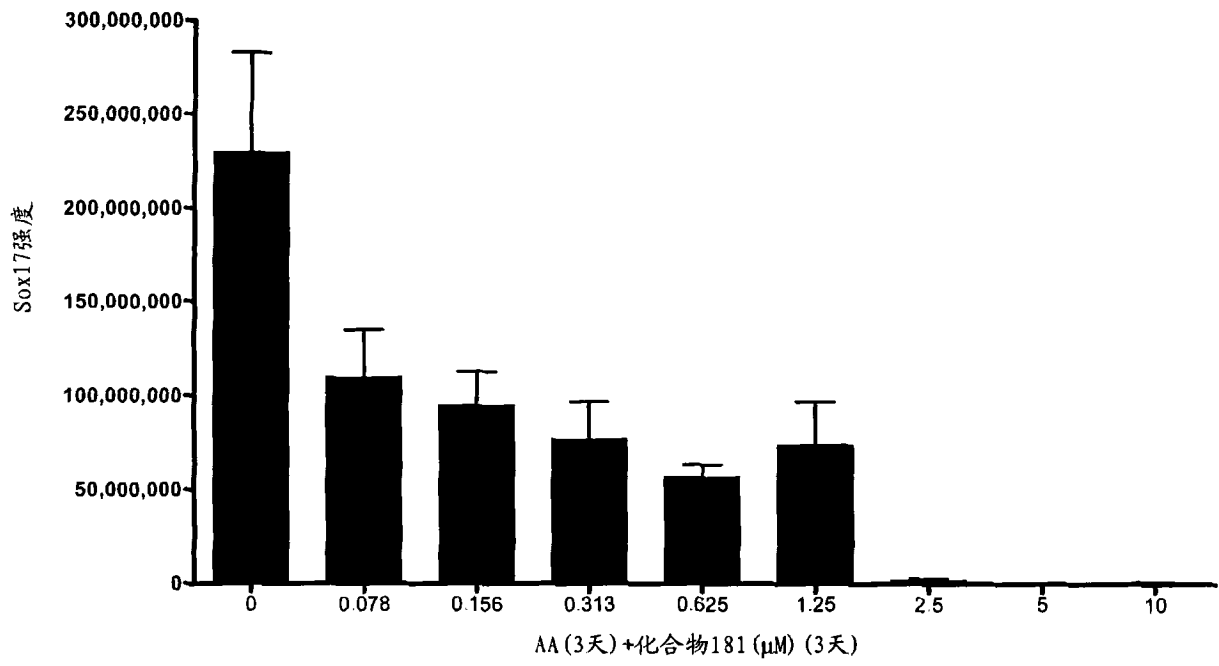


图 12A

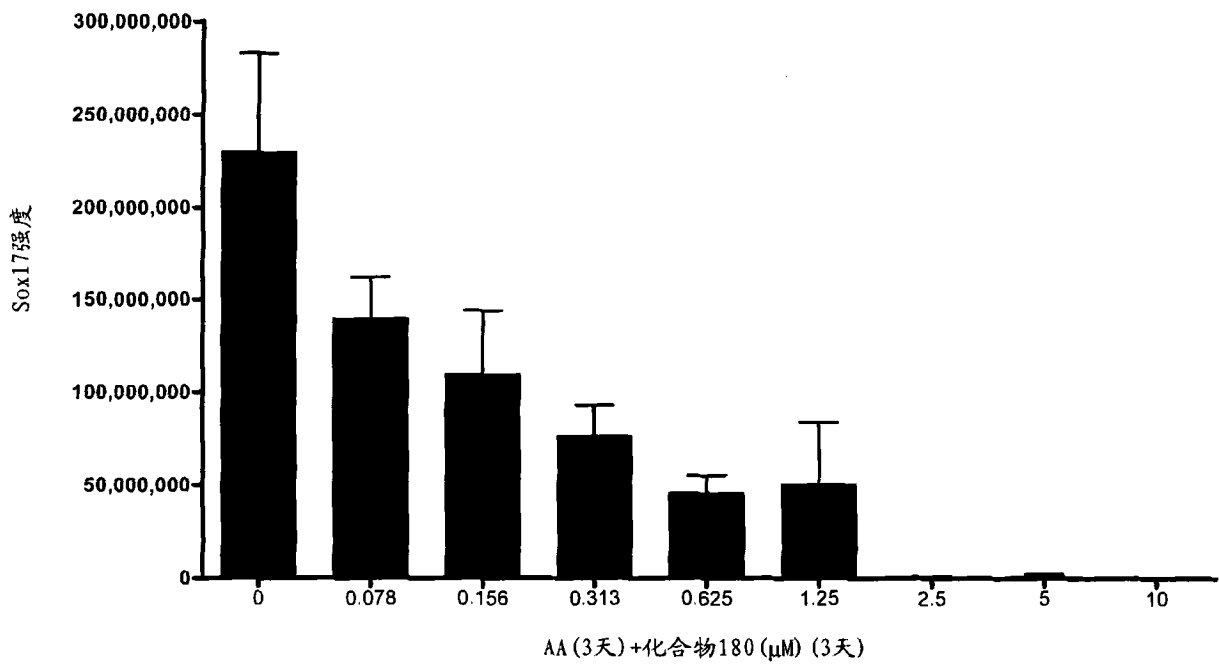


图 12B

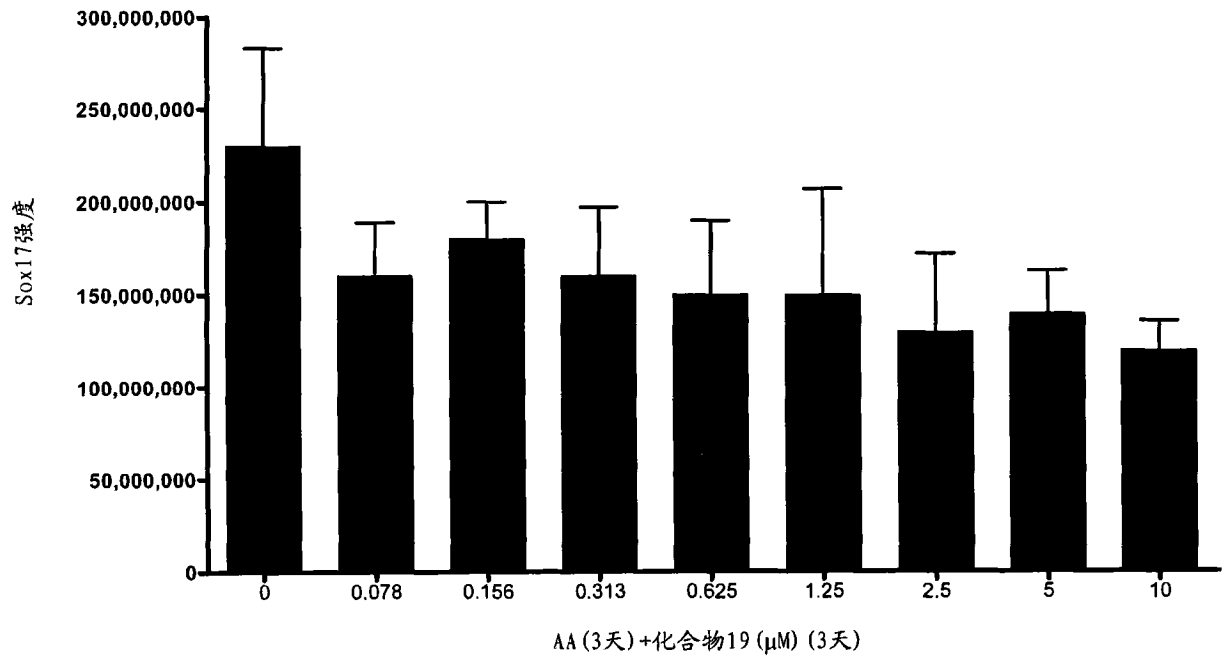


图 12C

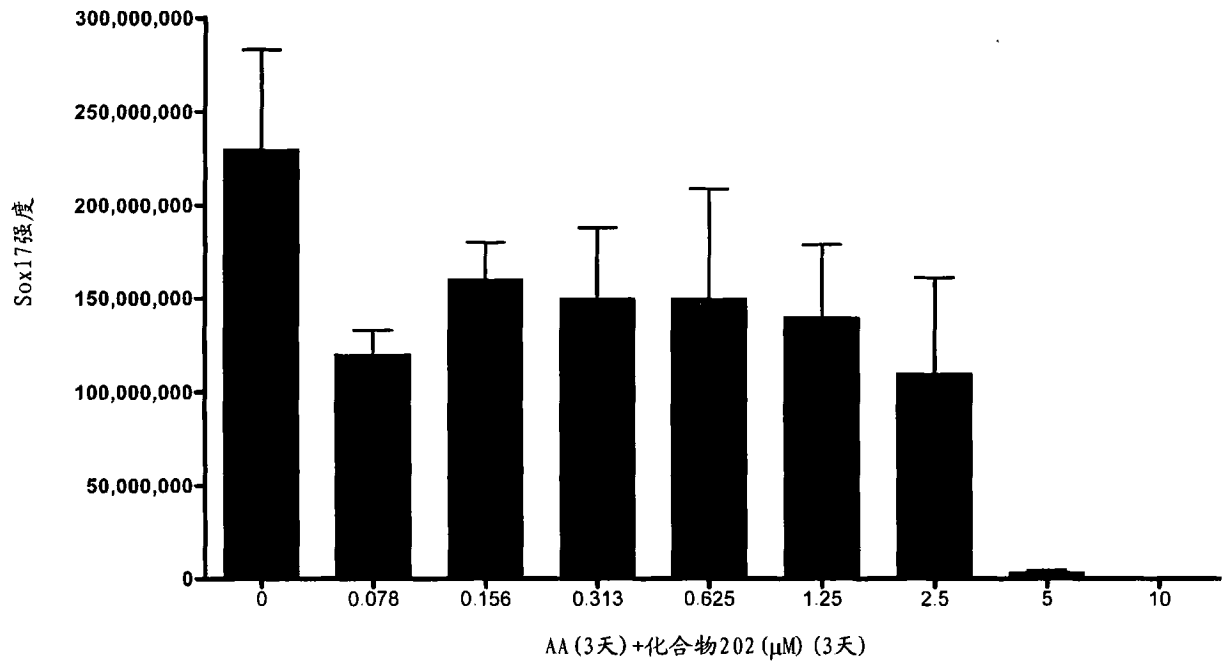


图 12D

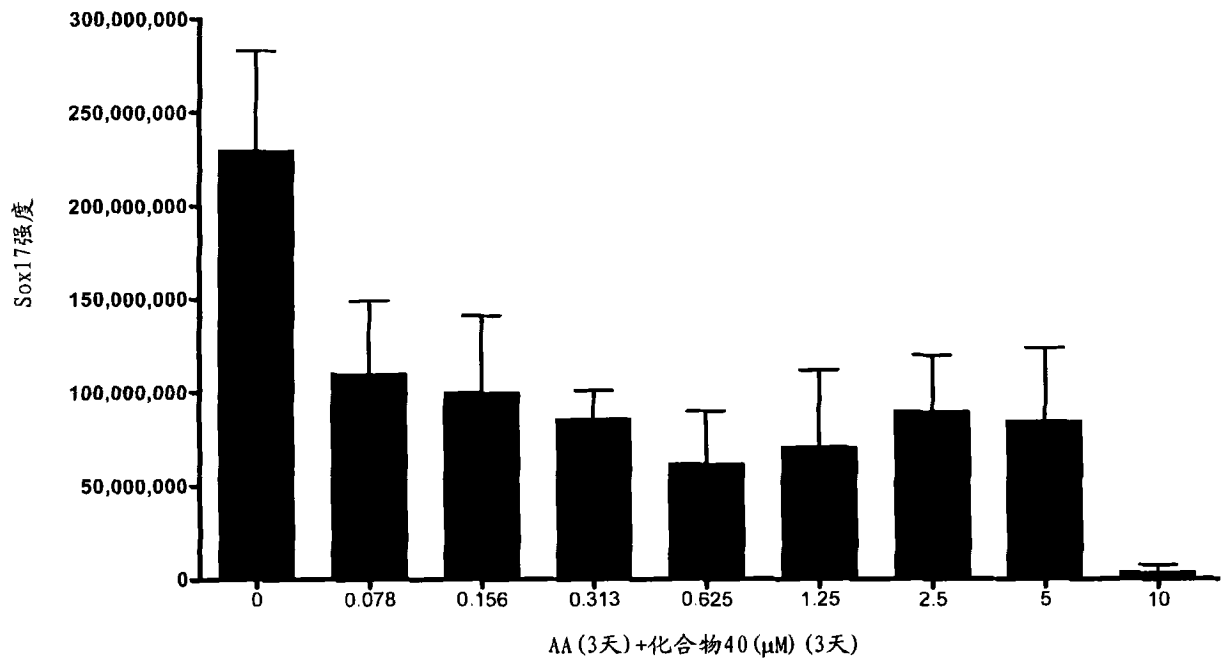


图 12E

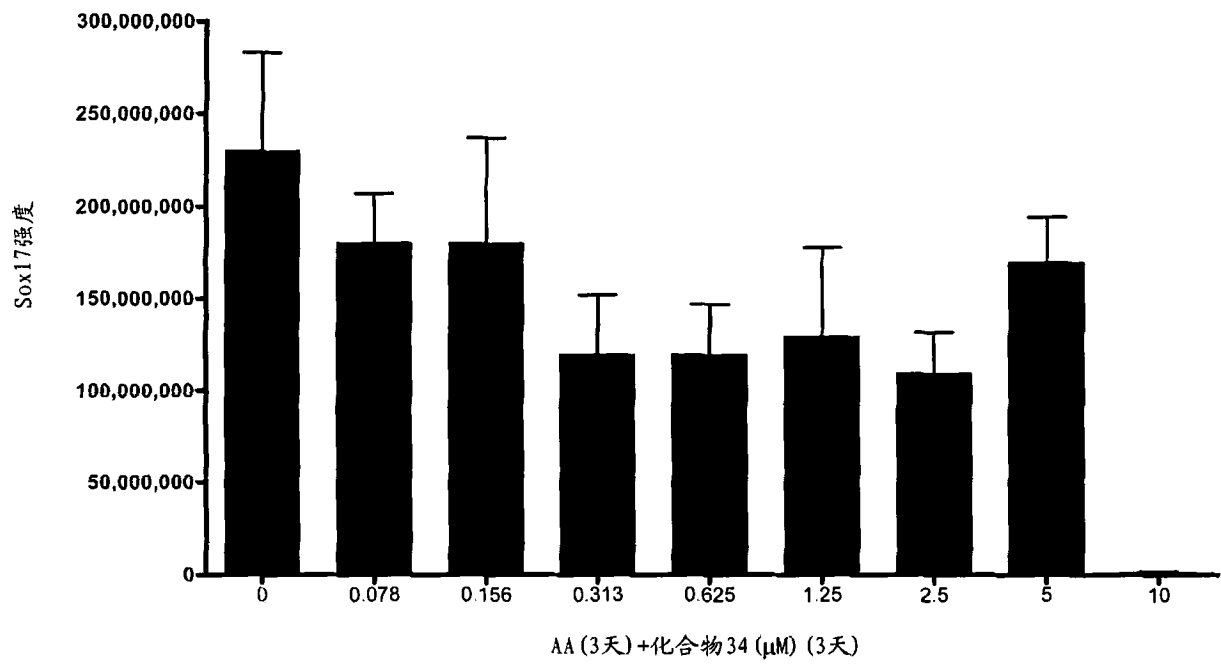


图 12F

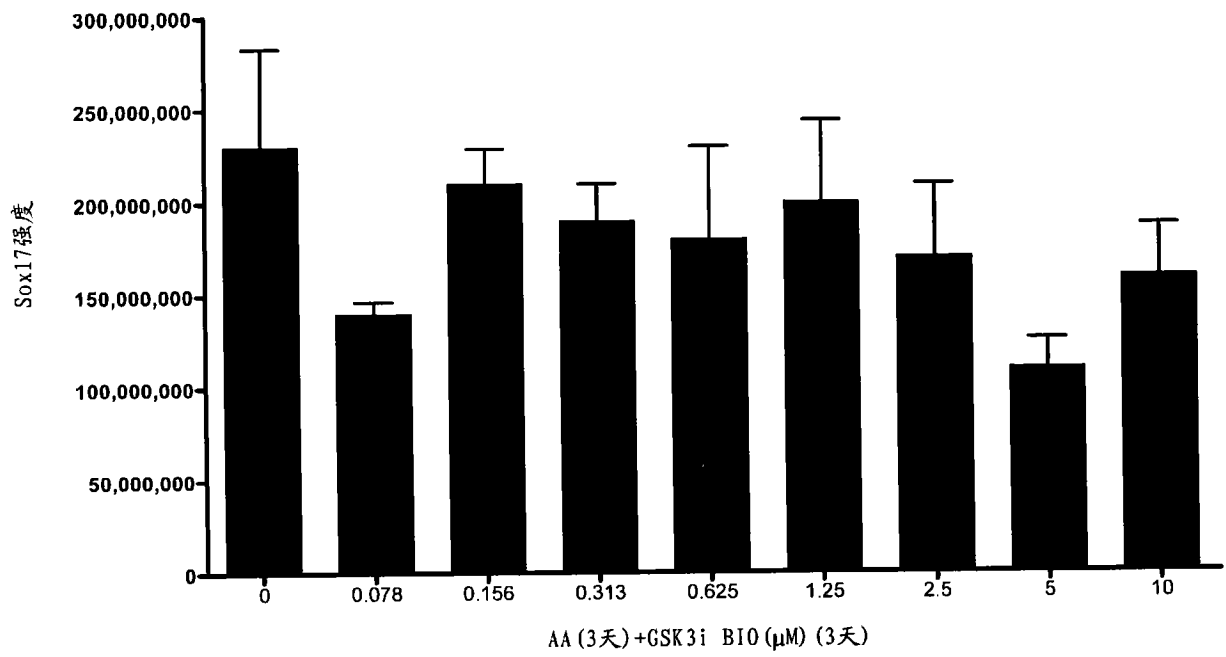


图 12G

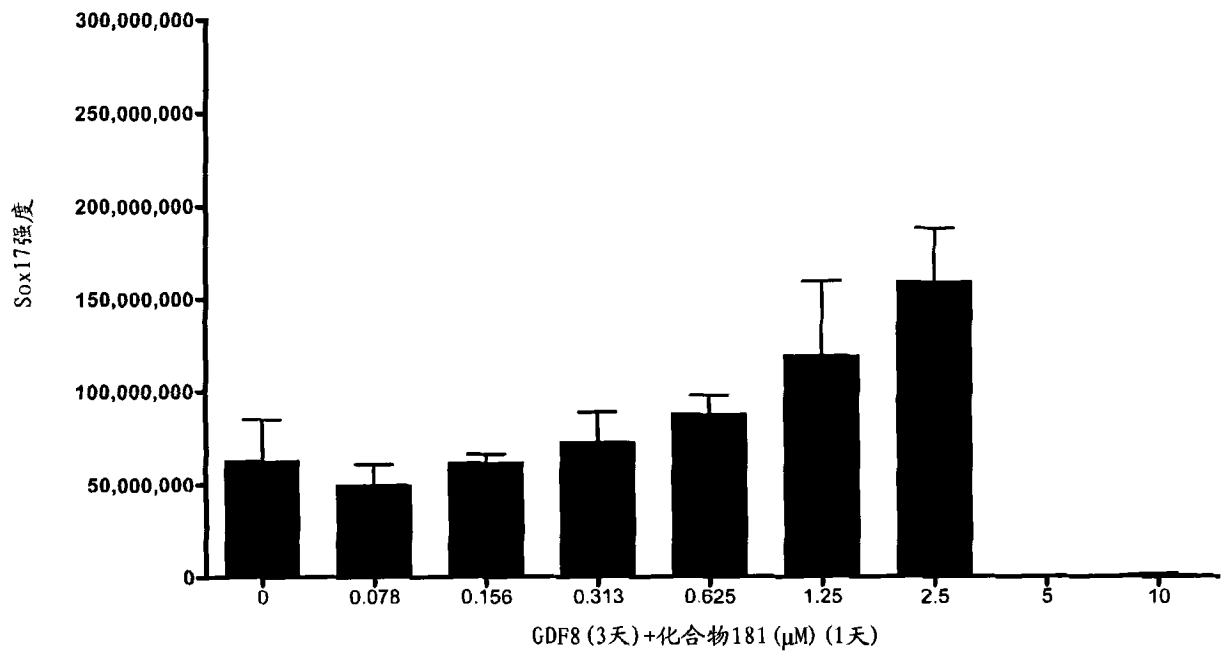


图 13A

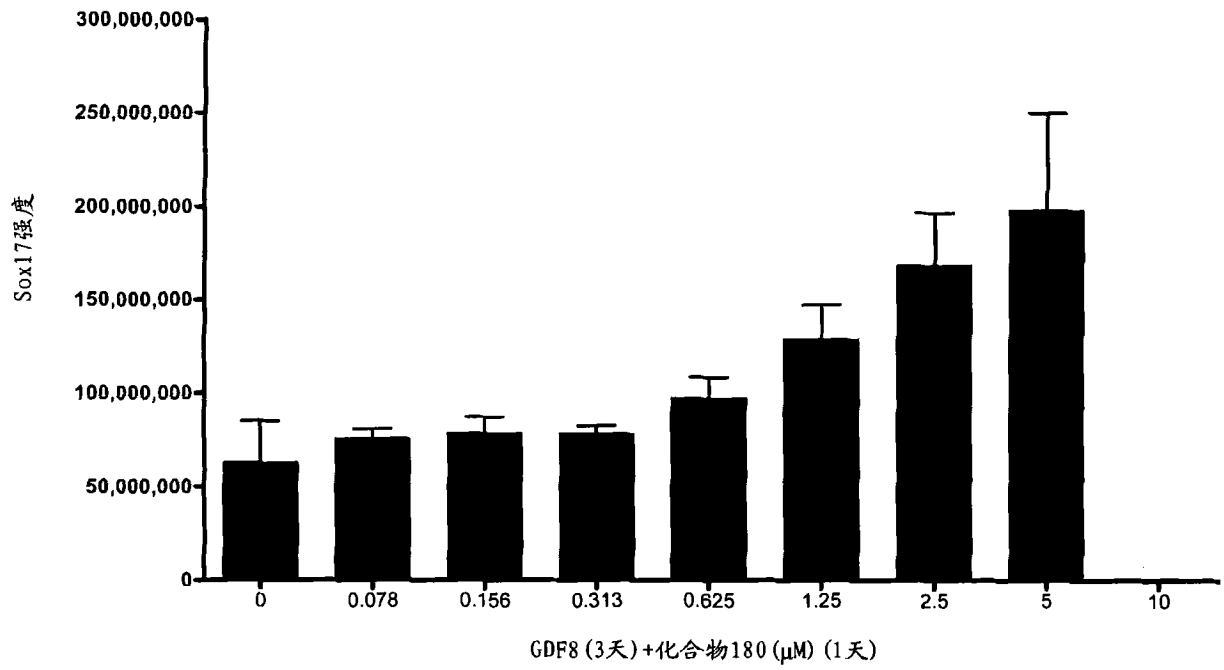


图 13B

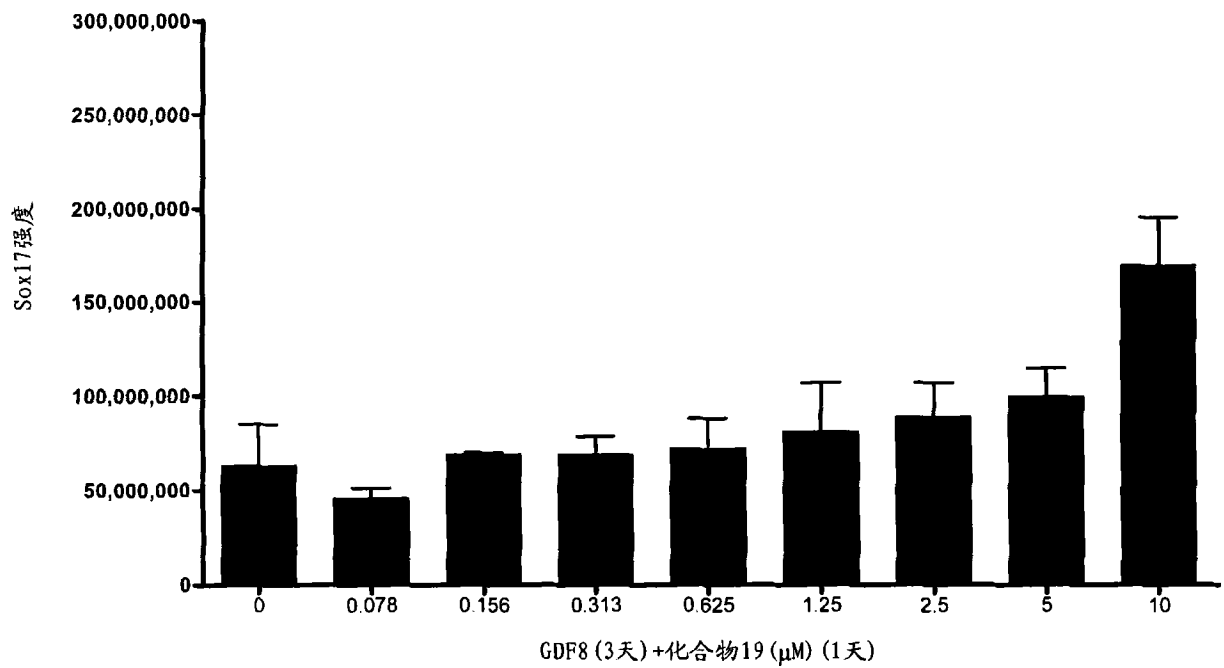


图 13C

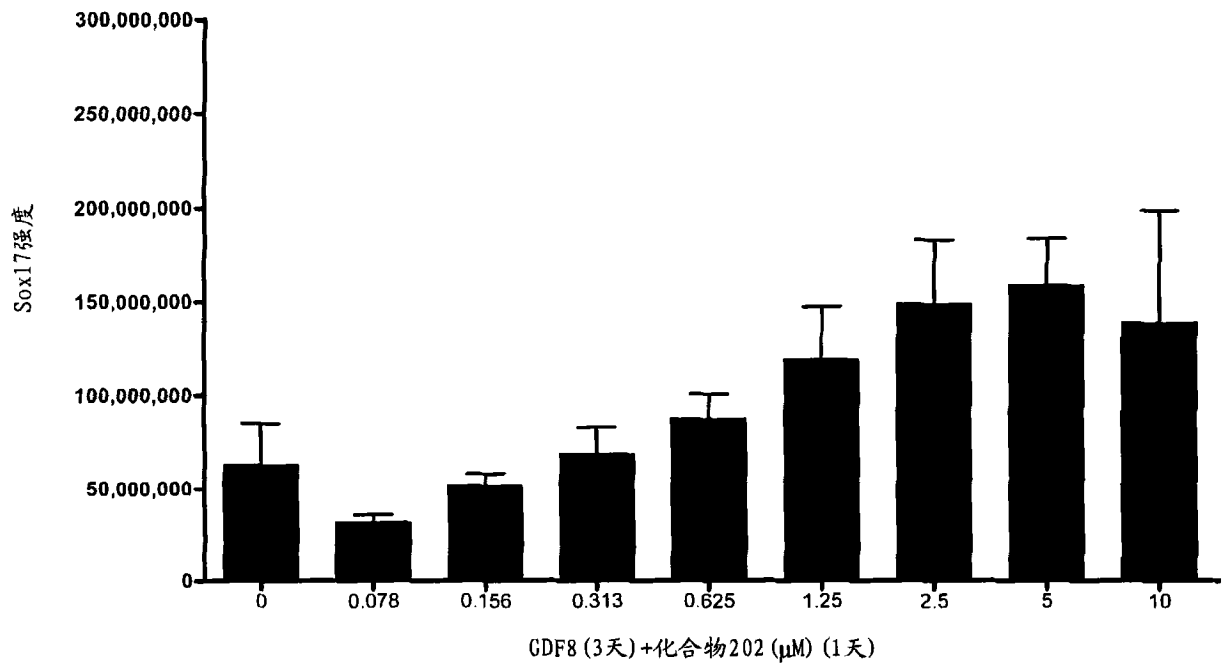


图 13D

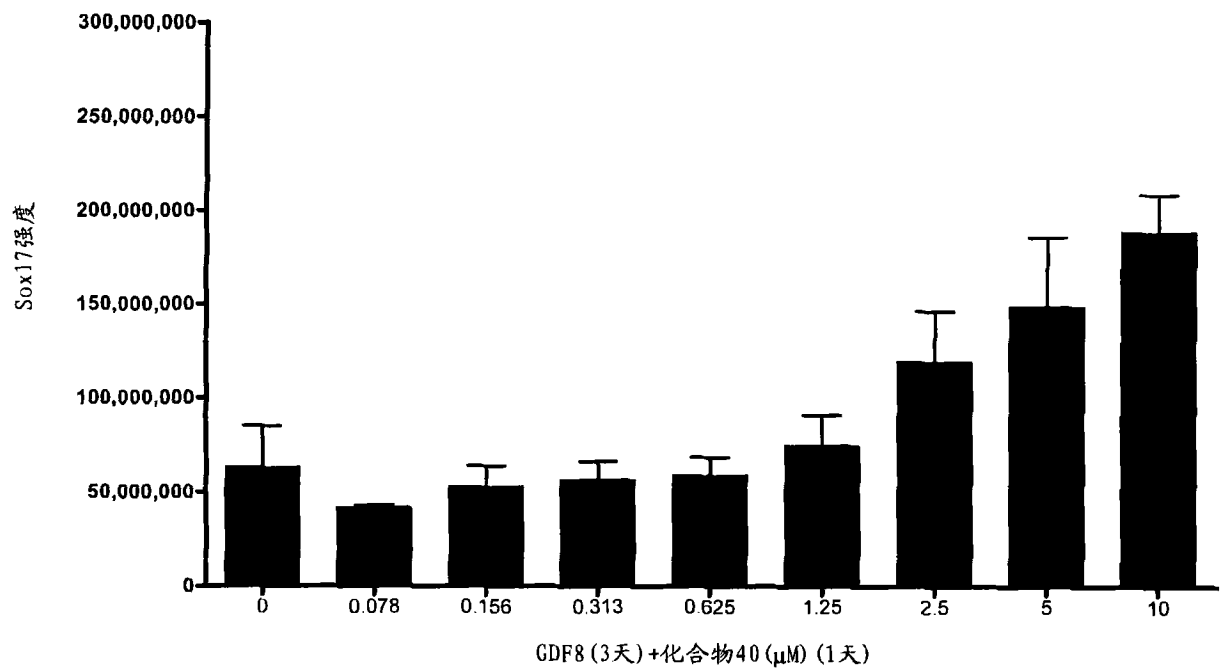


图 13E

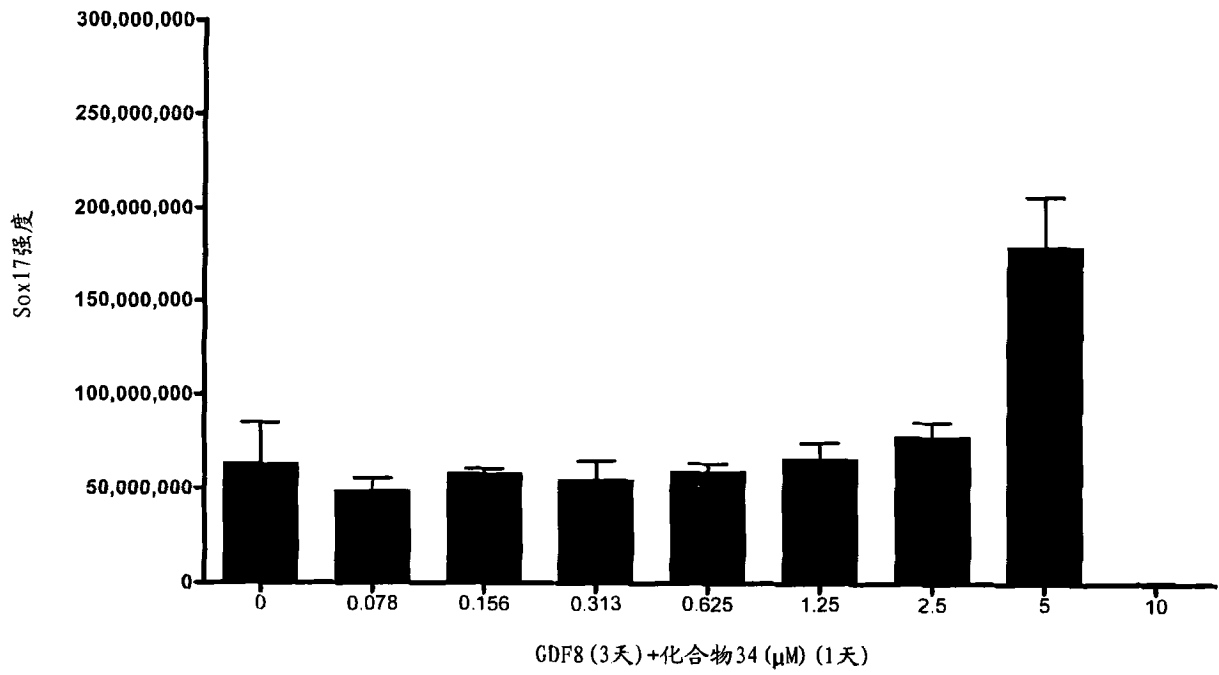


图 13F

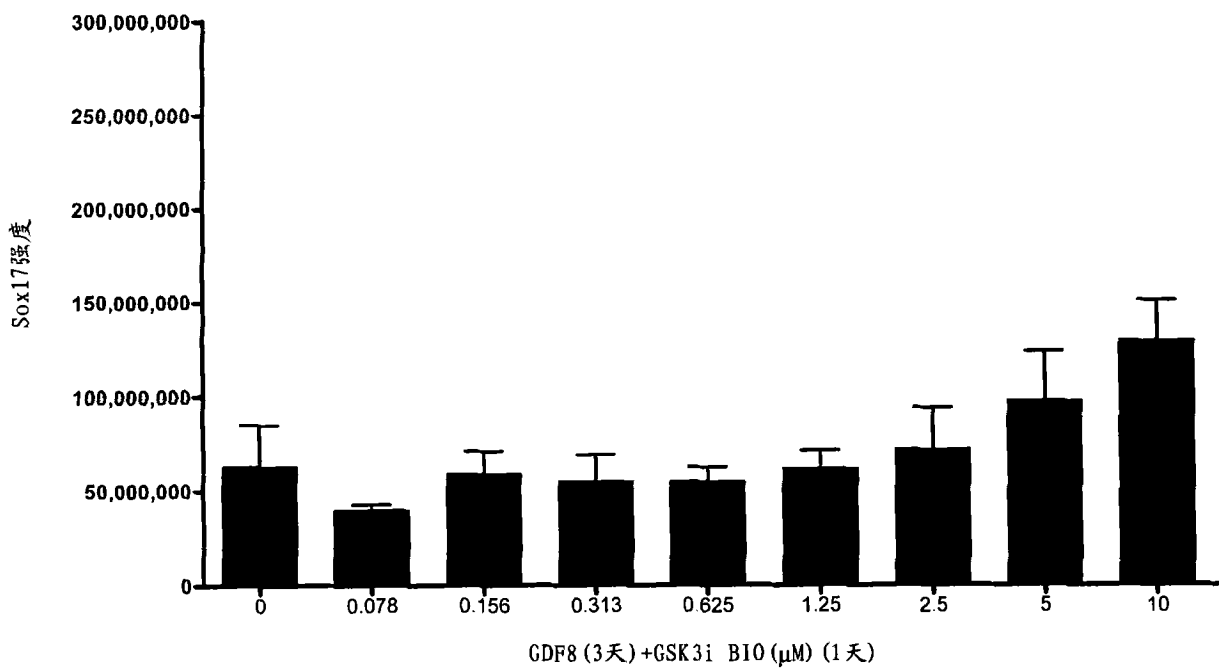


图 13G

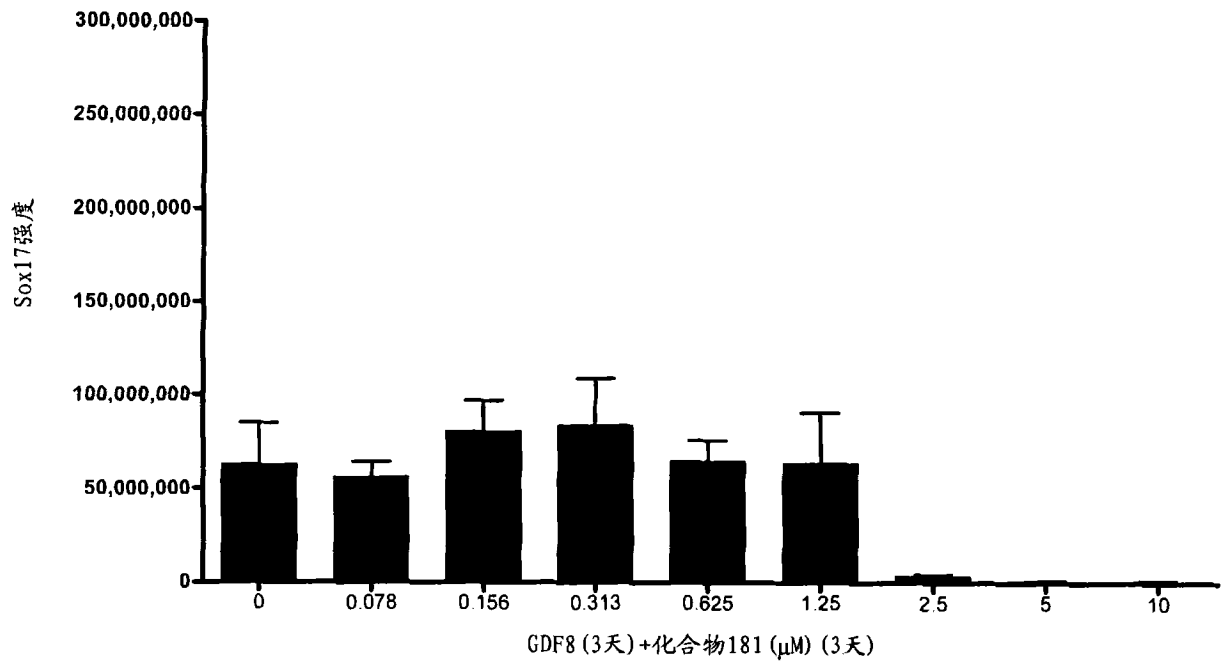


图 14A

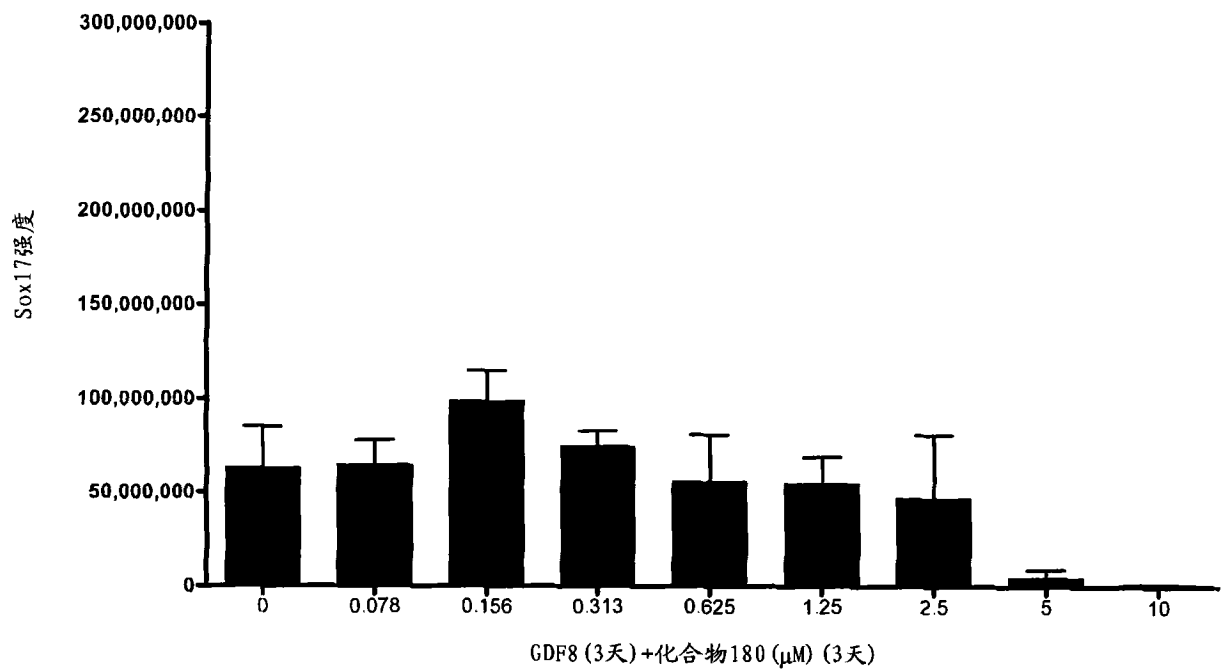


图 14B



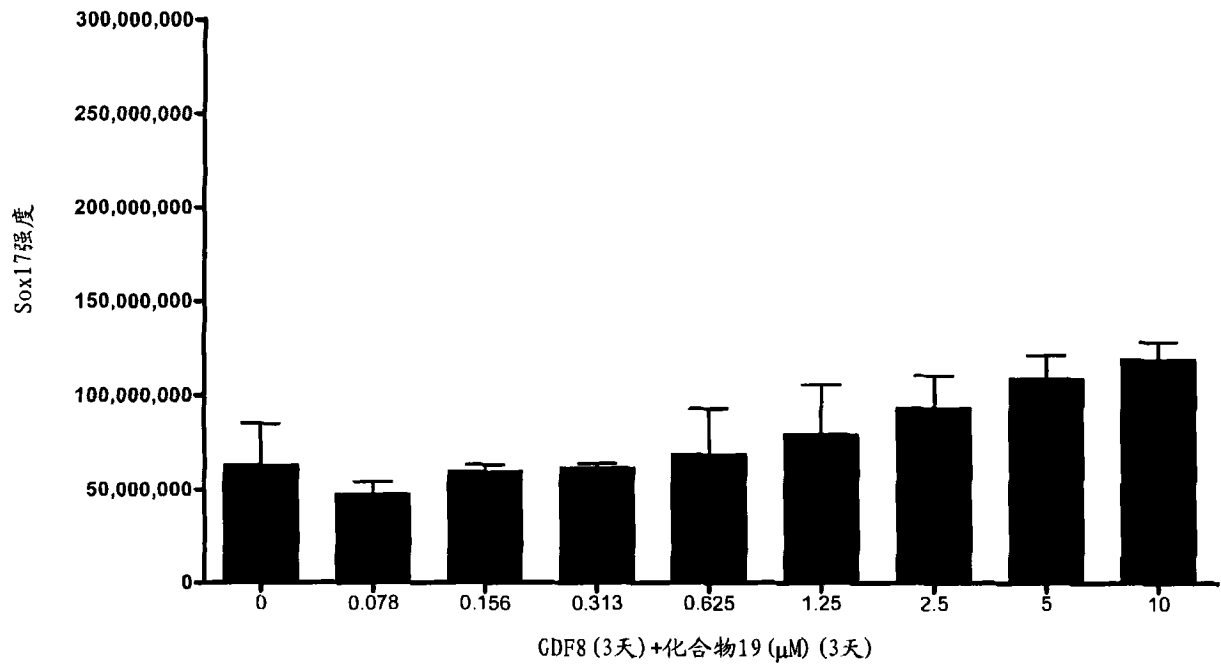


图 14C

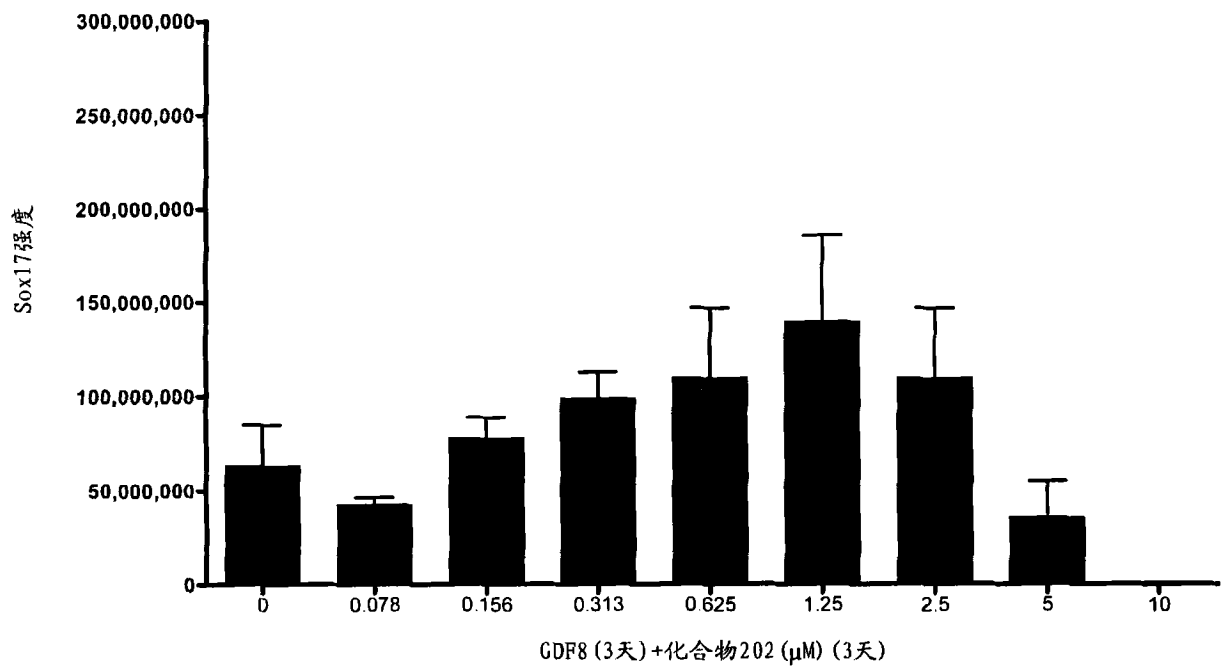


图 14D

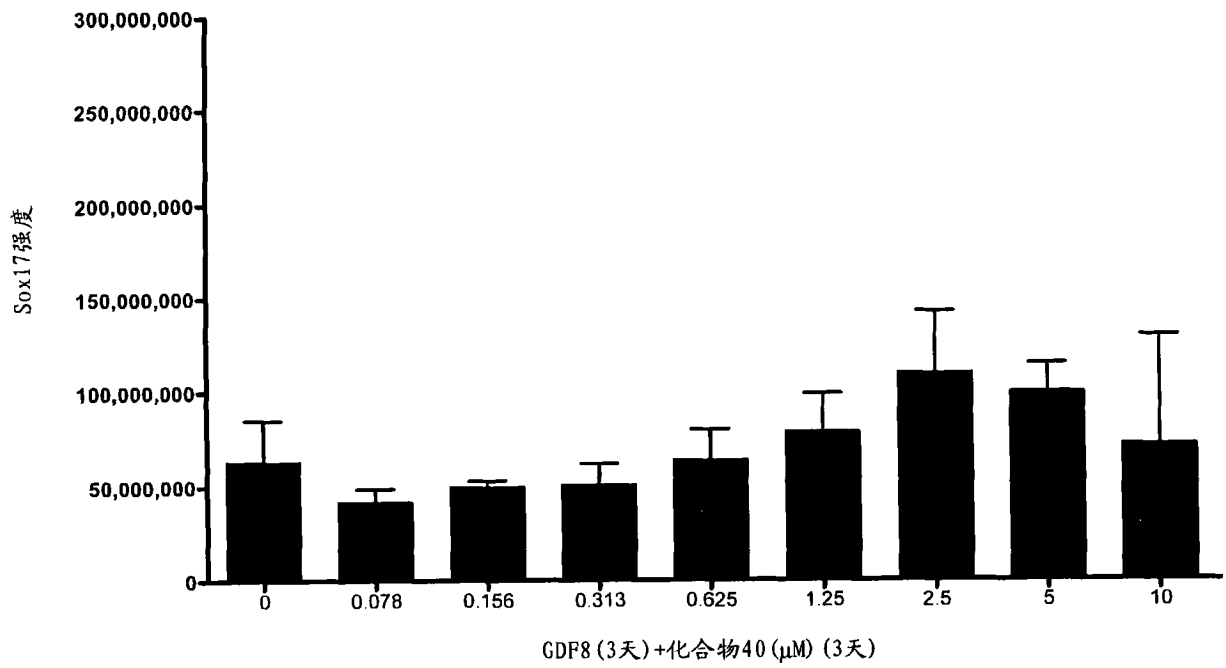


图 14E

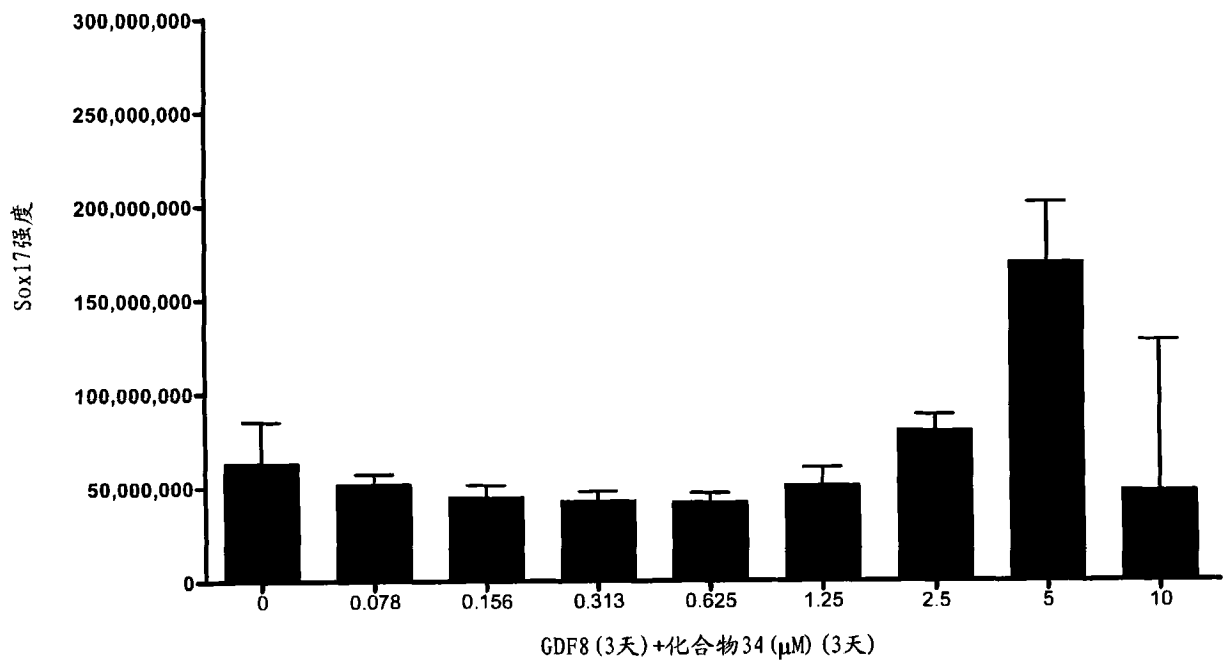


图 14F

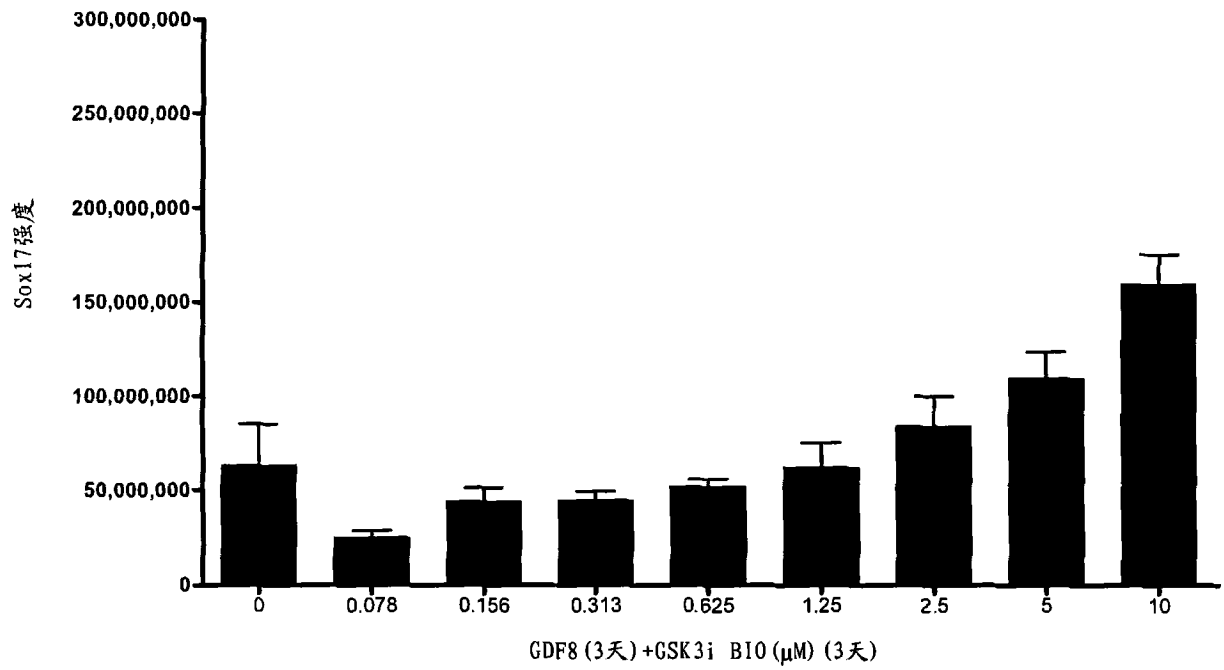


图 14G

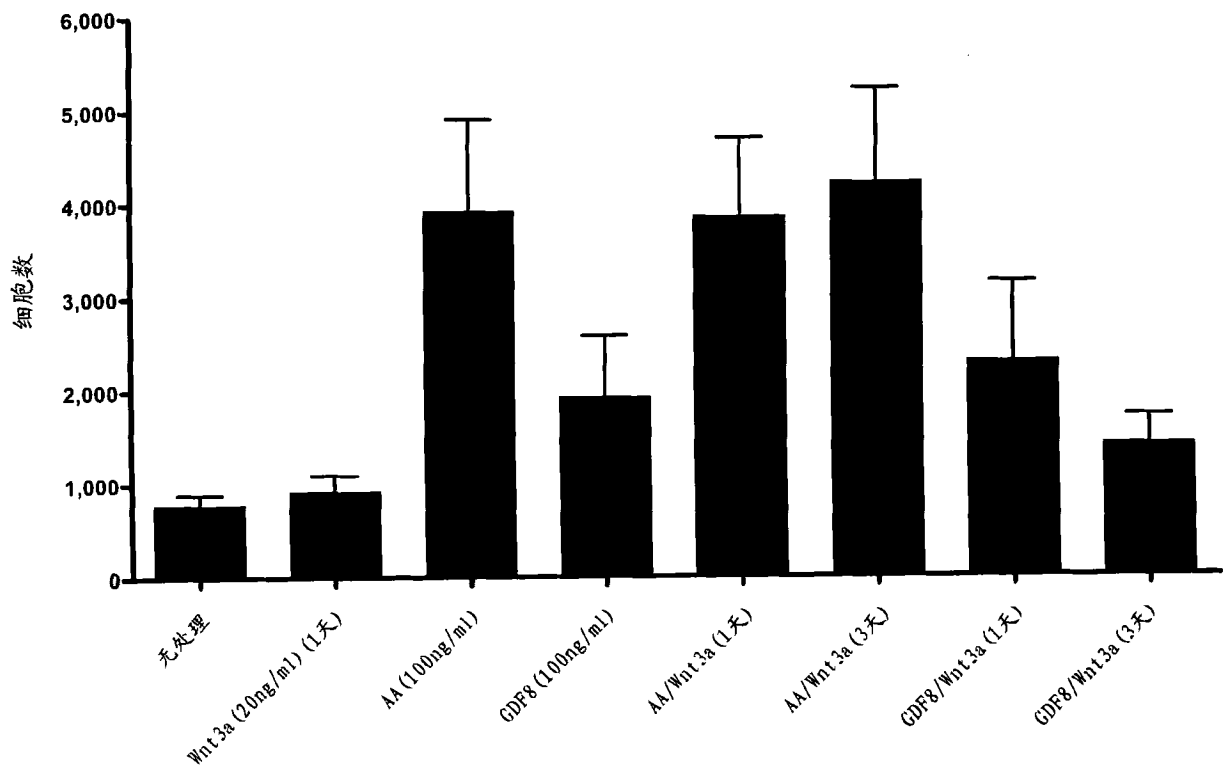


图 15

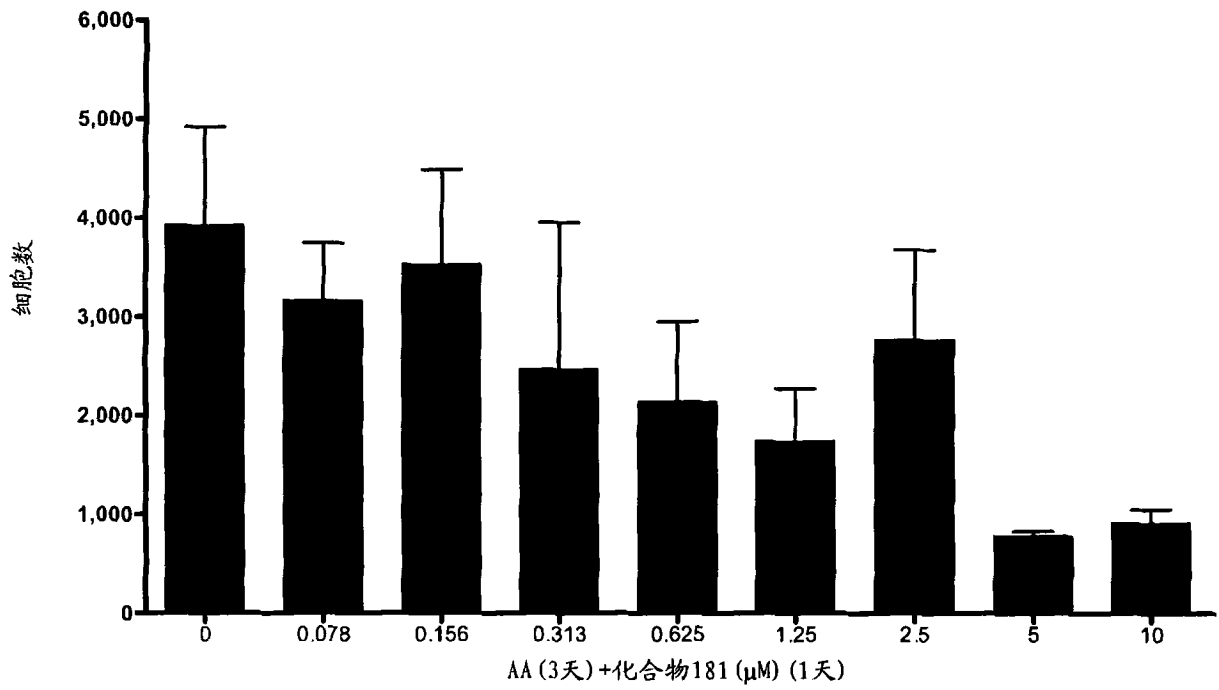


图 16A

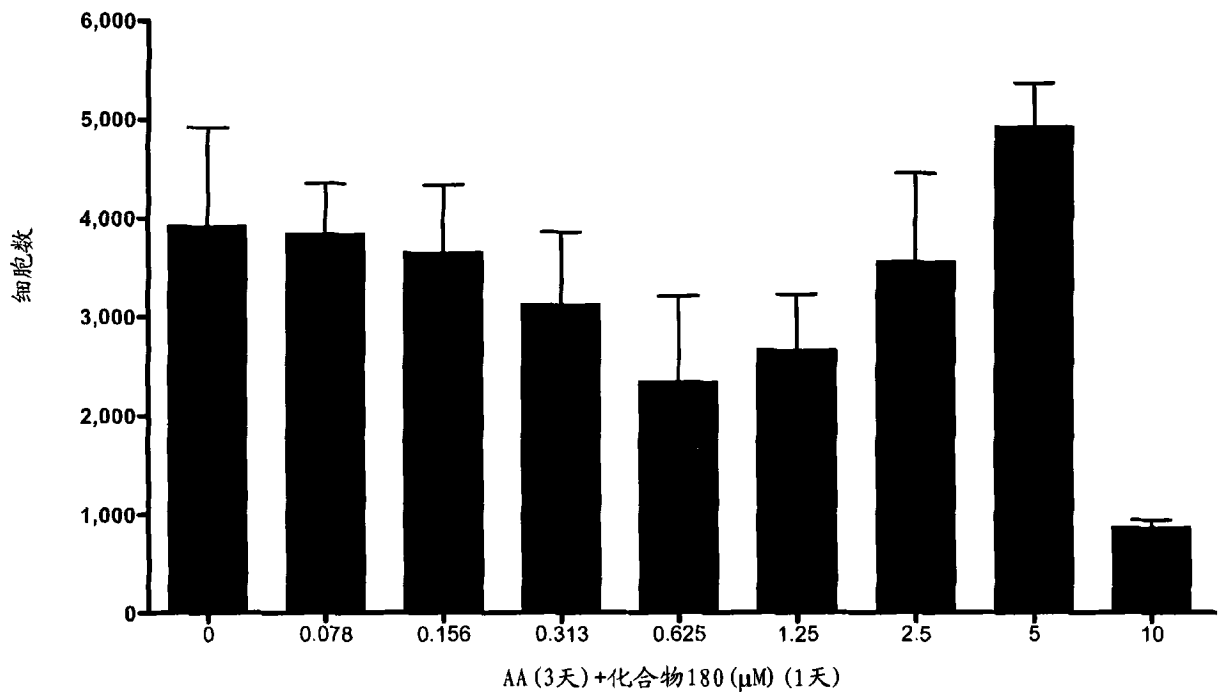


图 16B

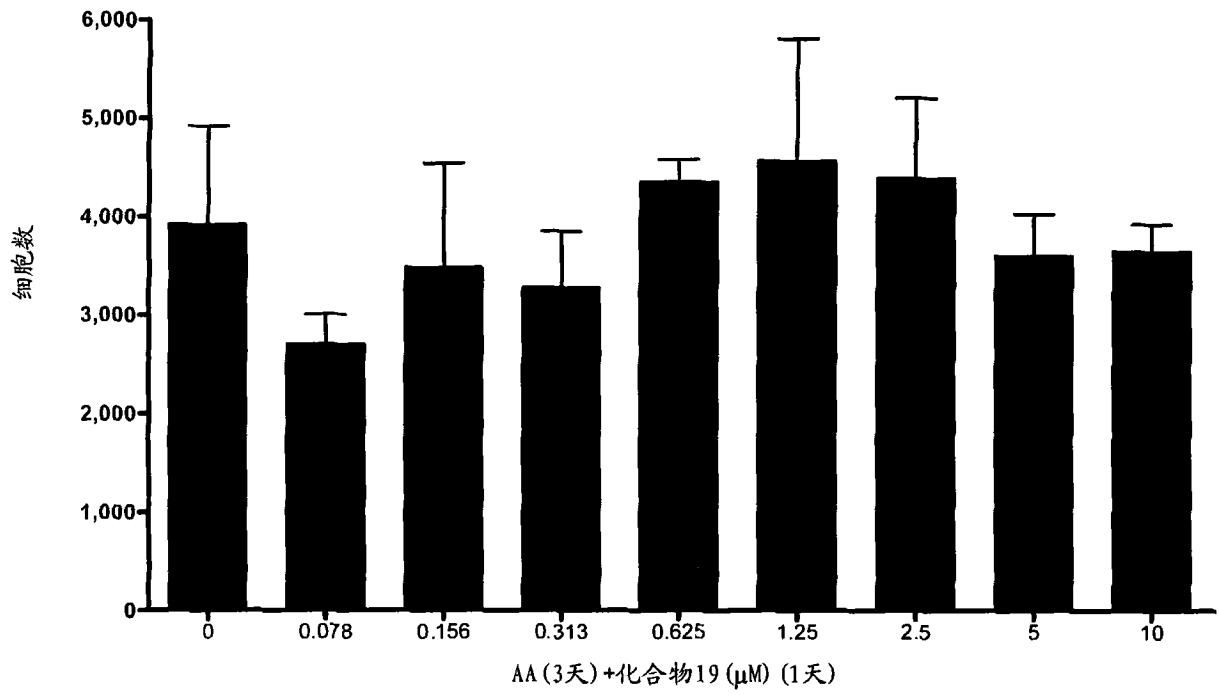


图 16C

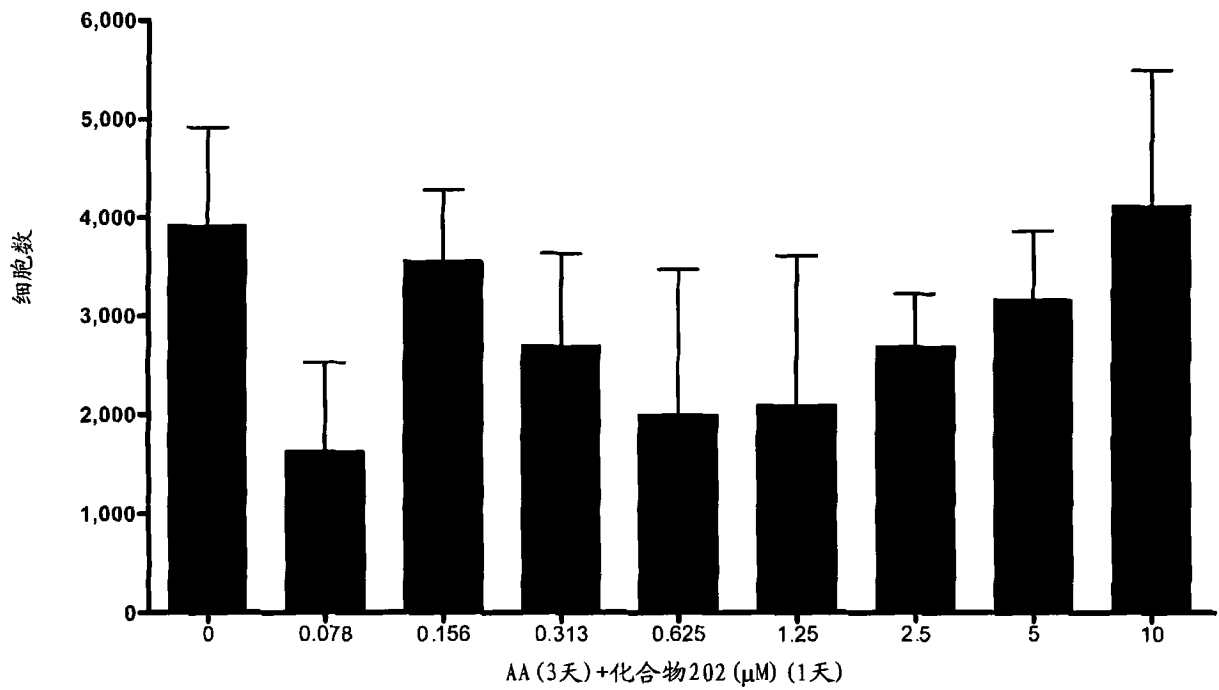


图 16D

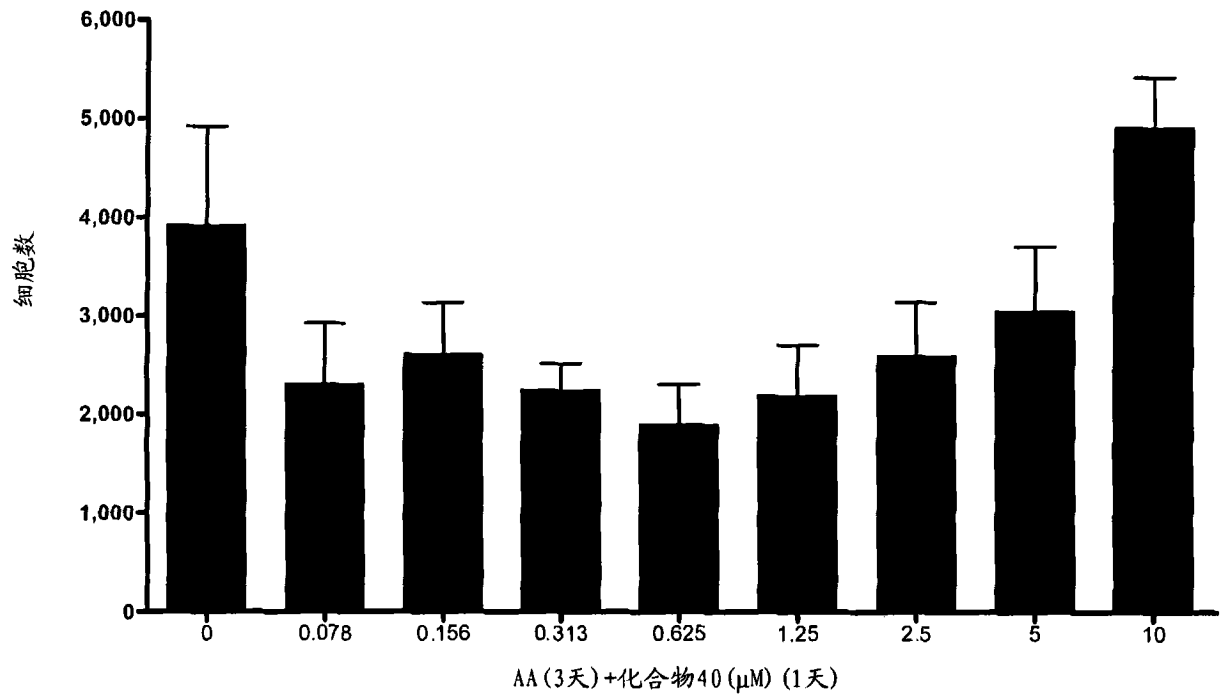


图 16E

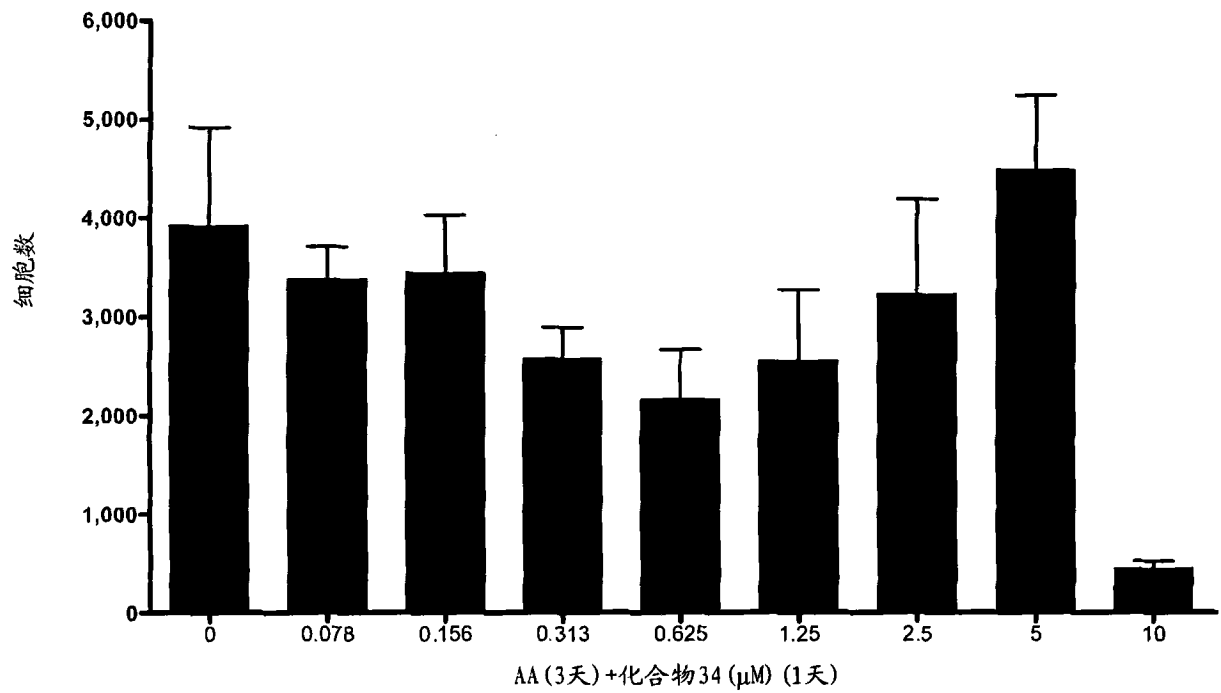


图 16F

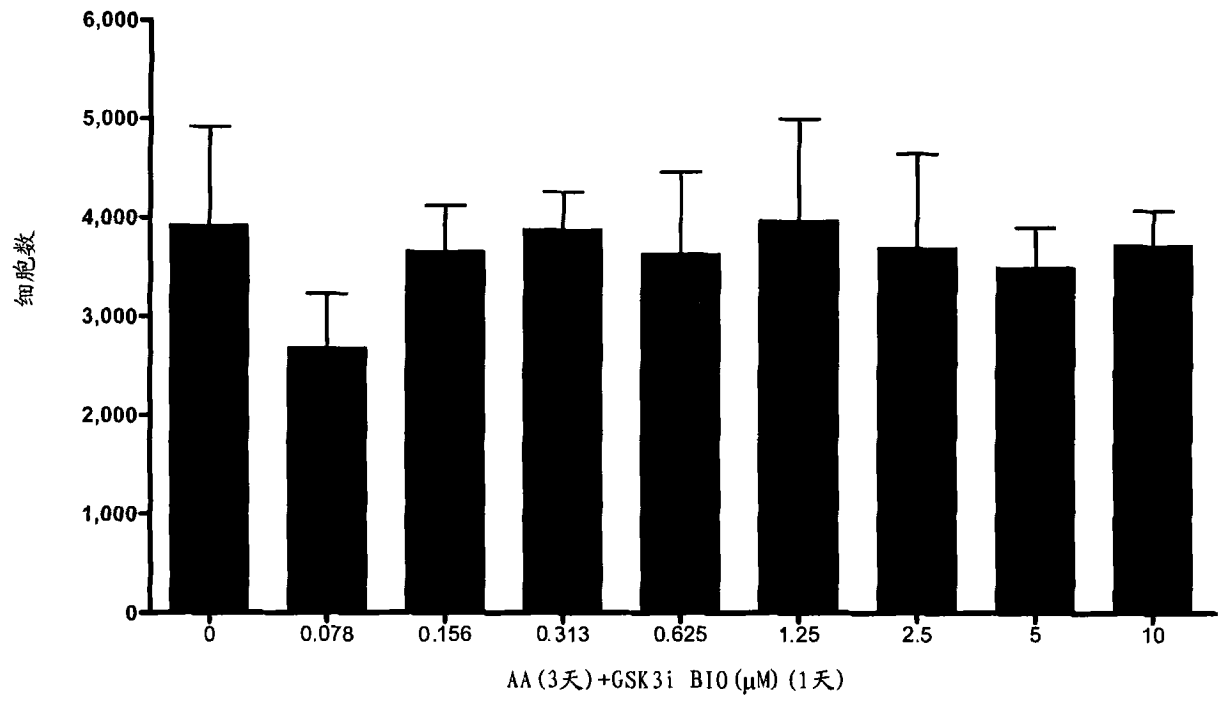


图 16G

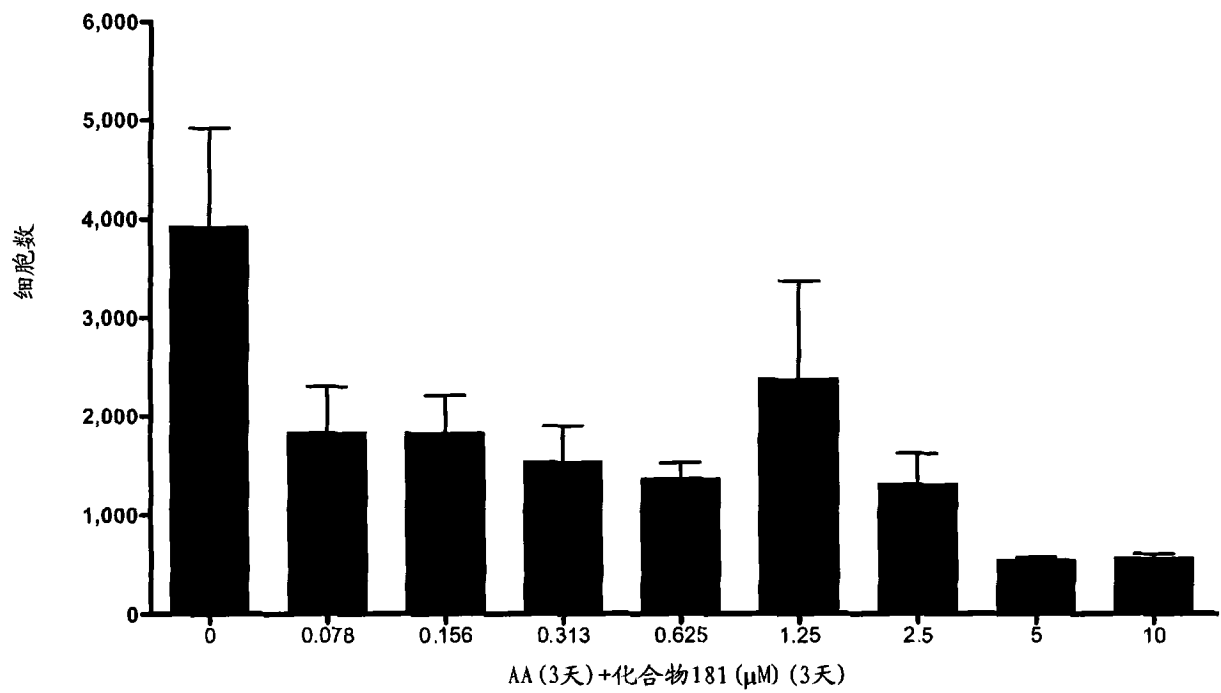


图 17A

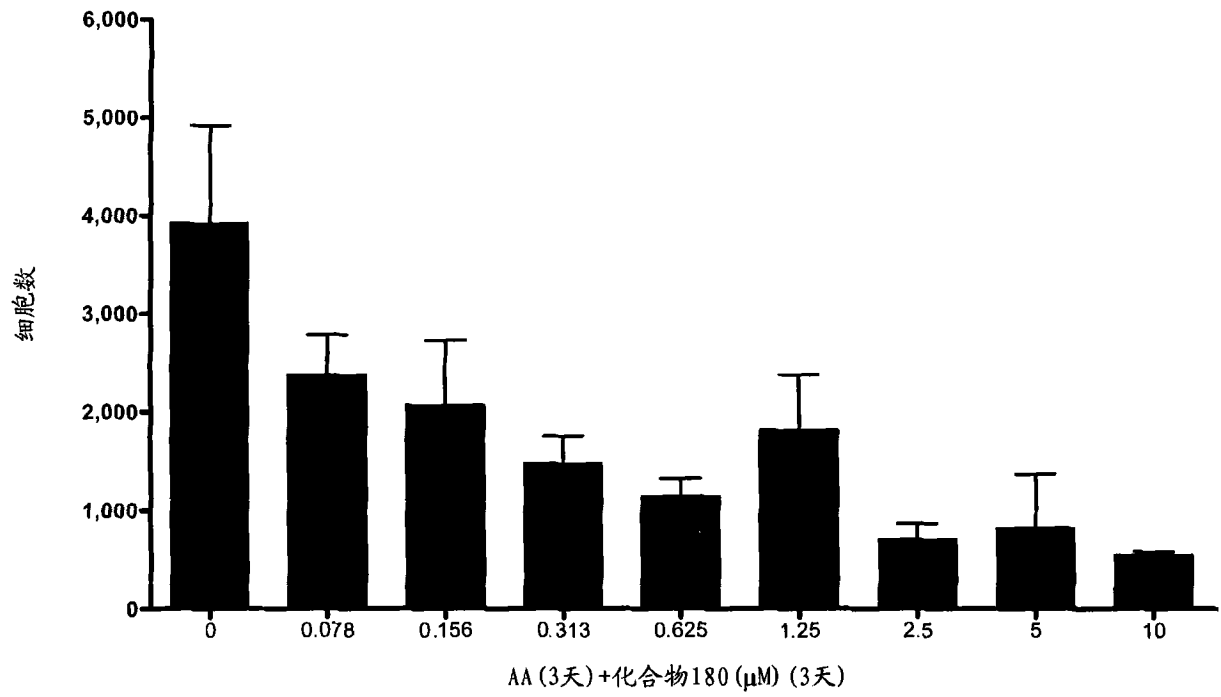


图 17B

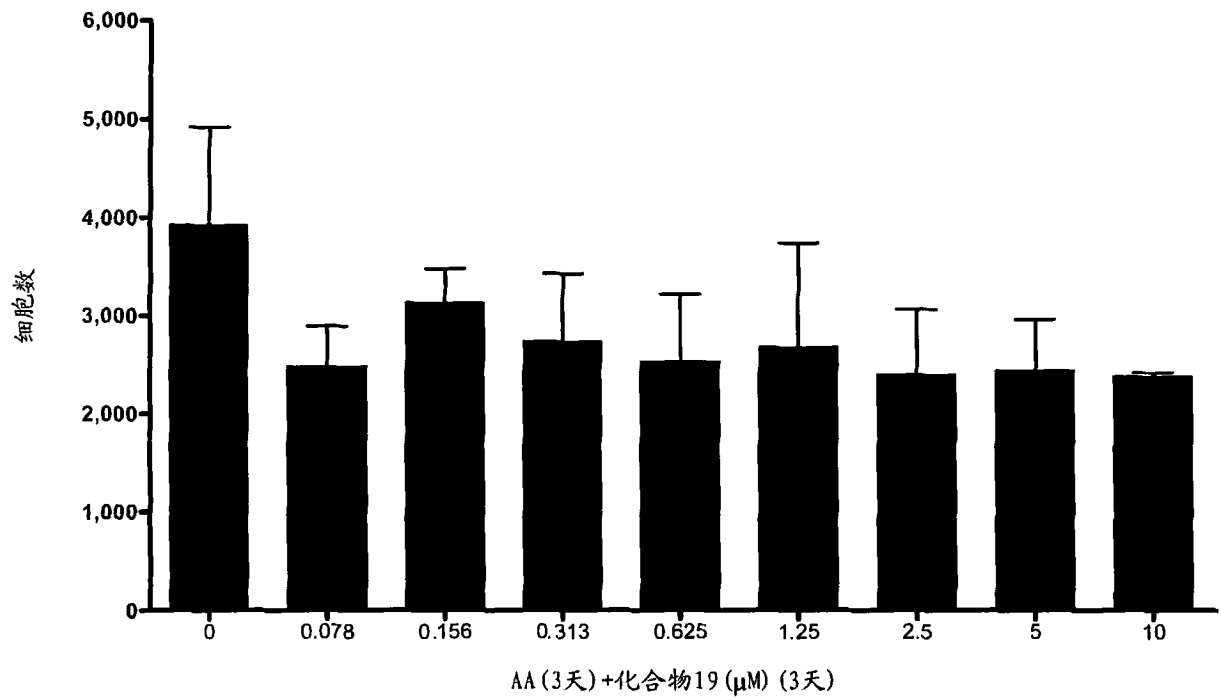


图 17C



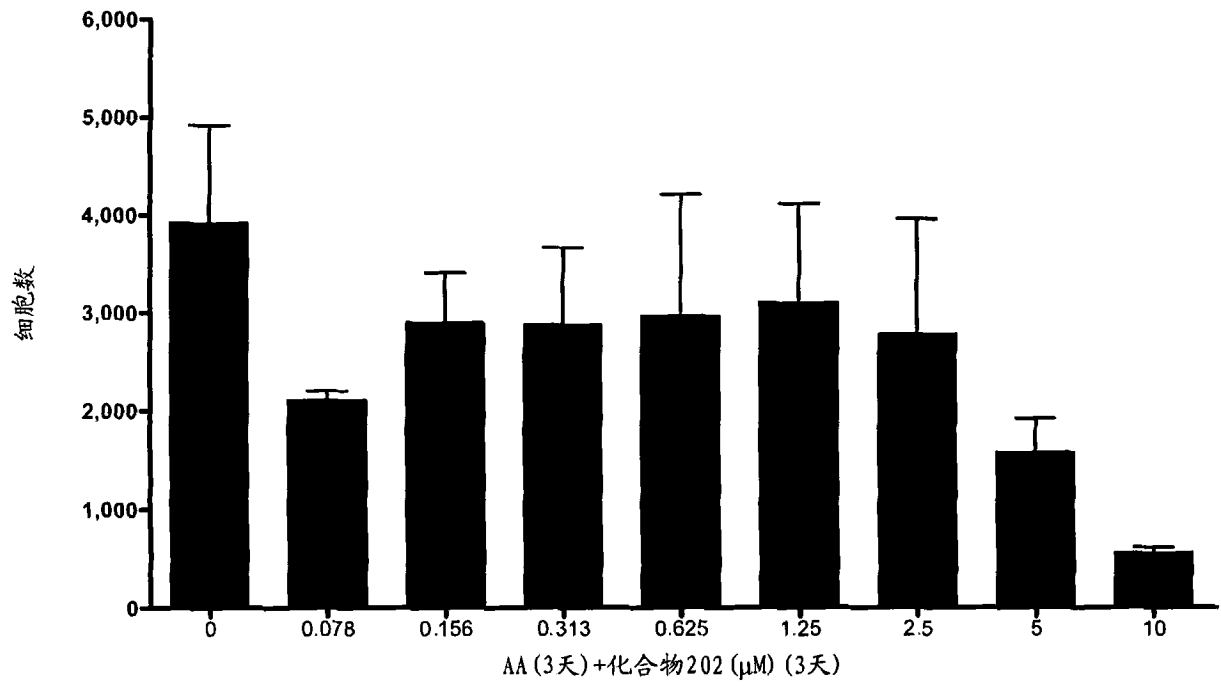


图 17D

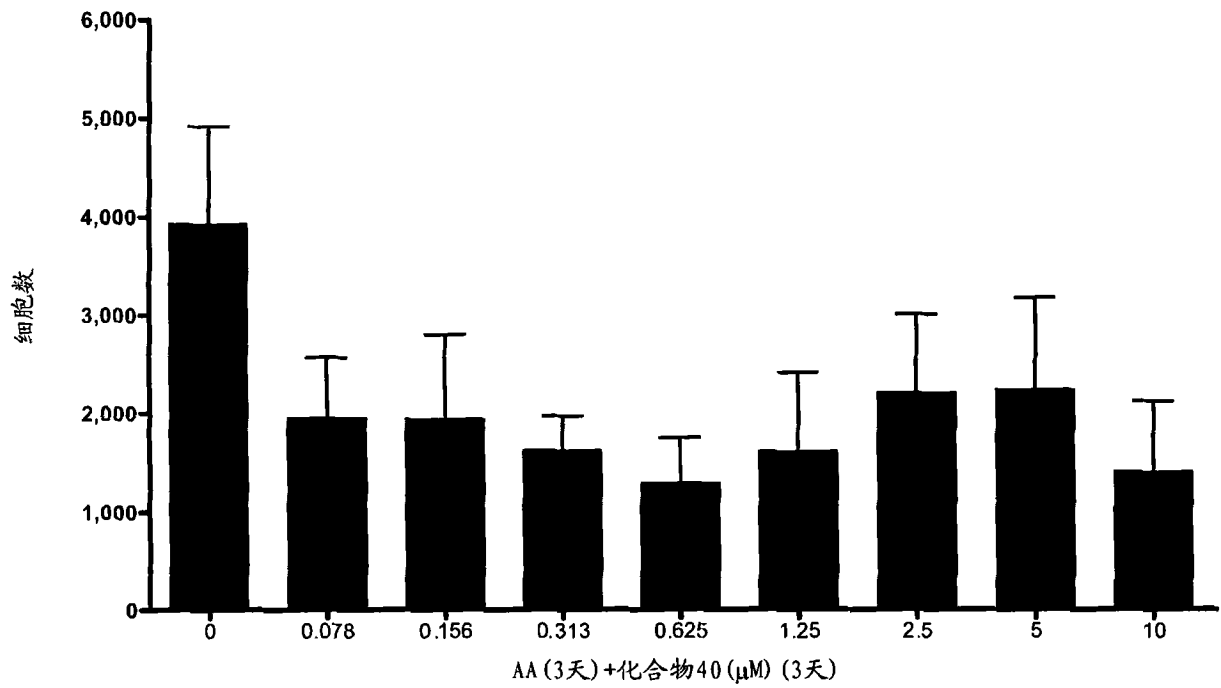


图 17E

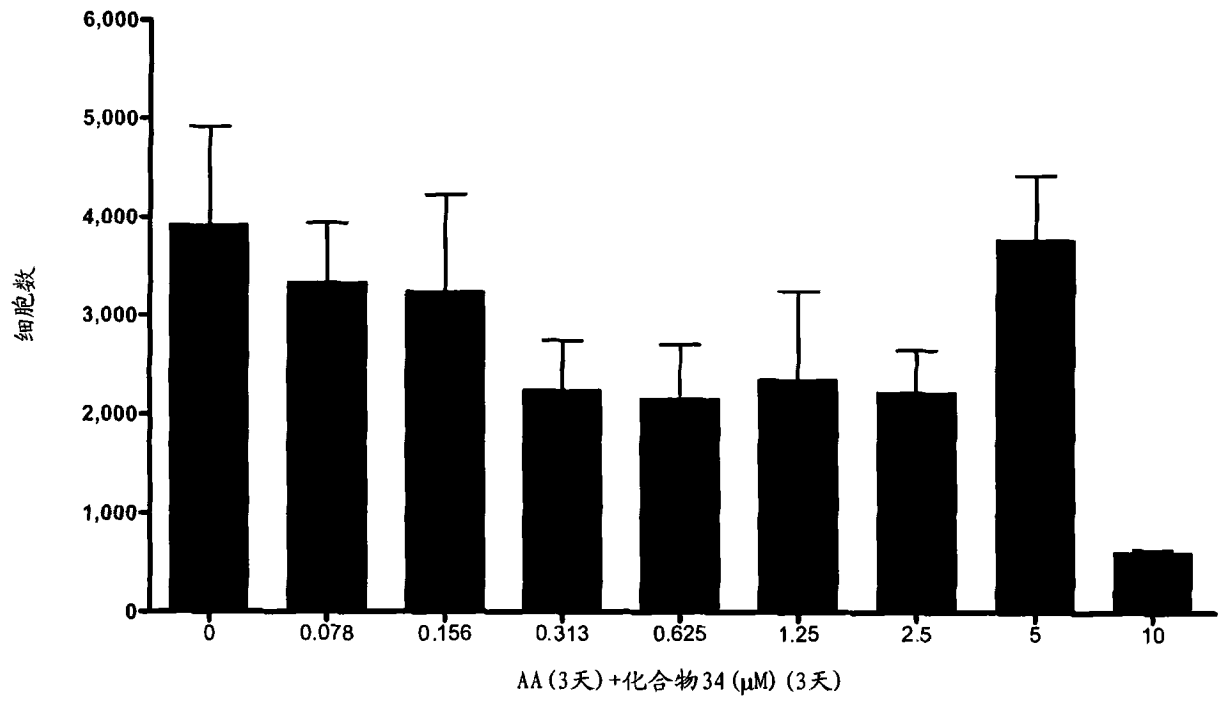


图 17F

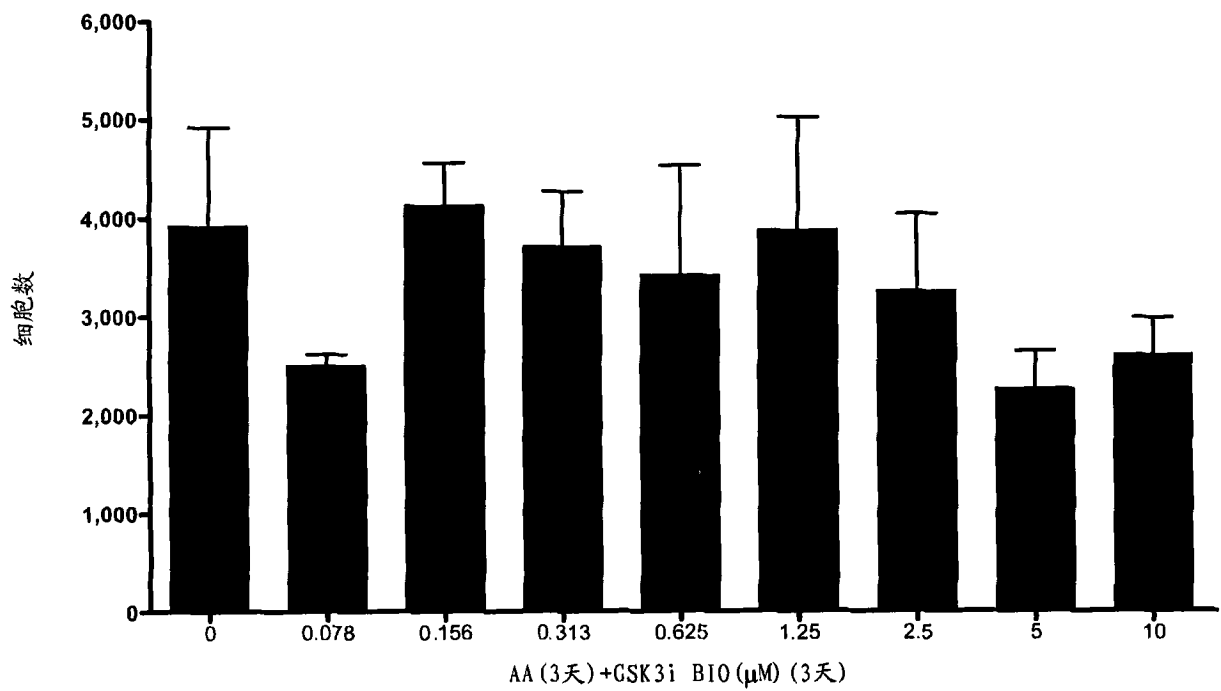


图 17G

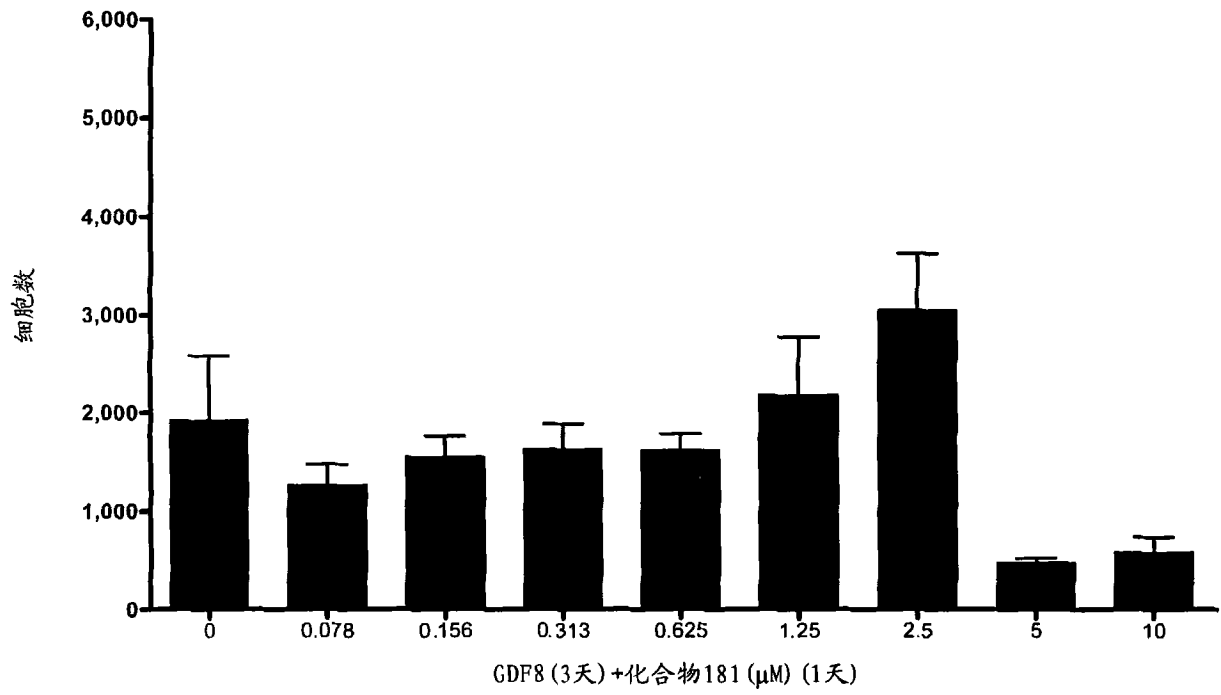


图 18A

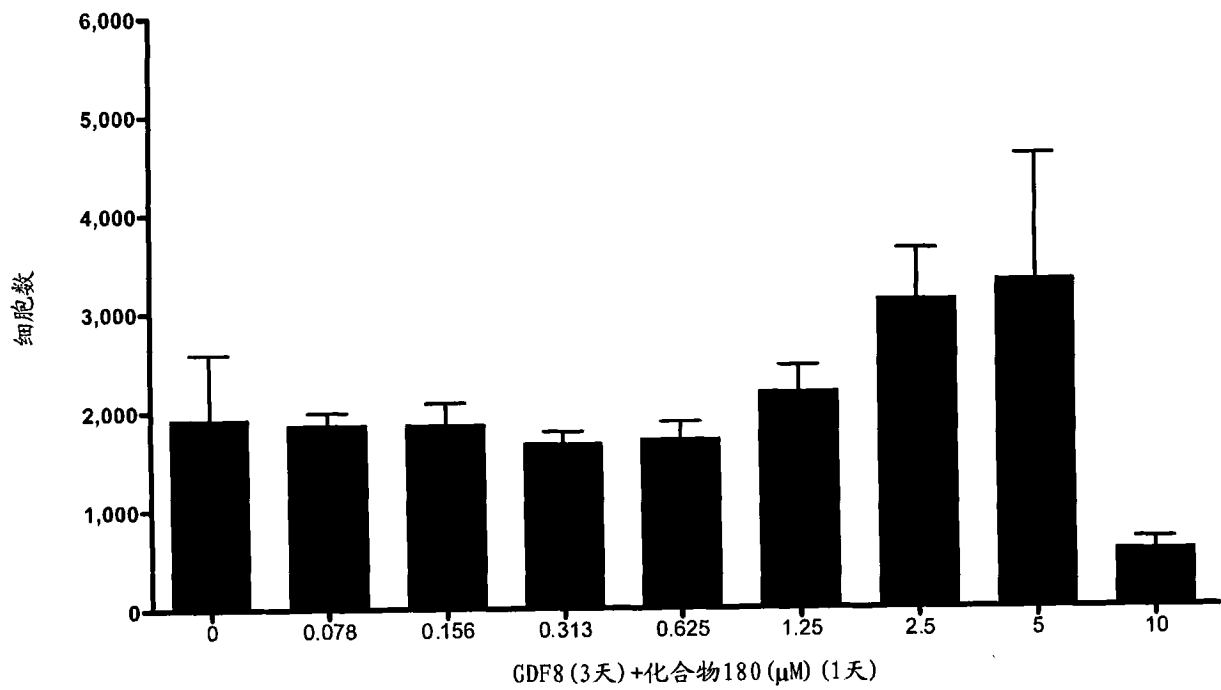


图 18B

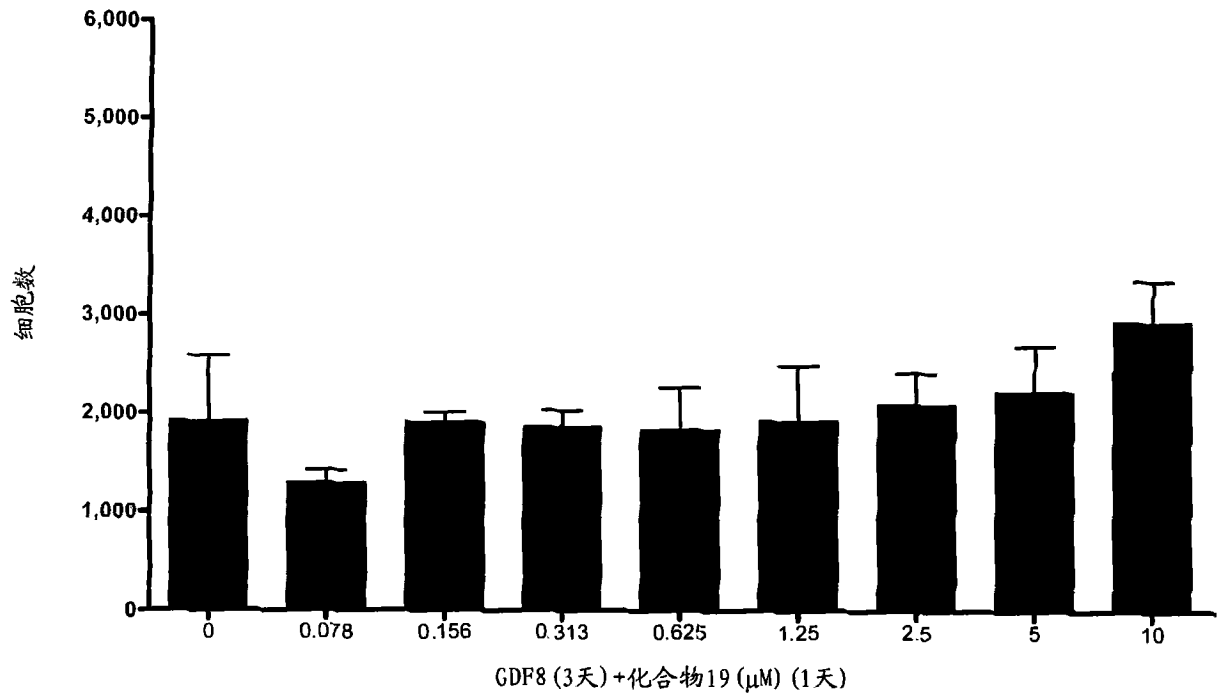


图 18C

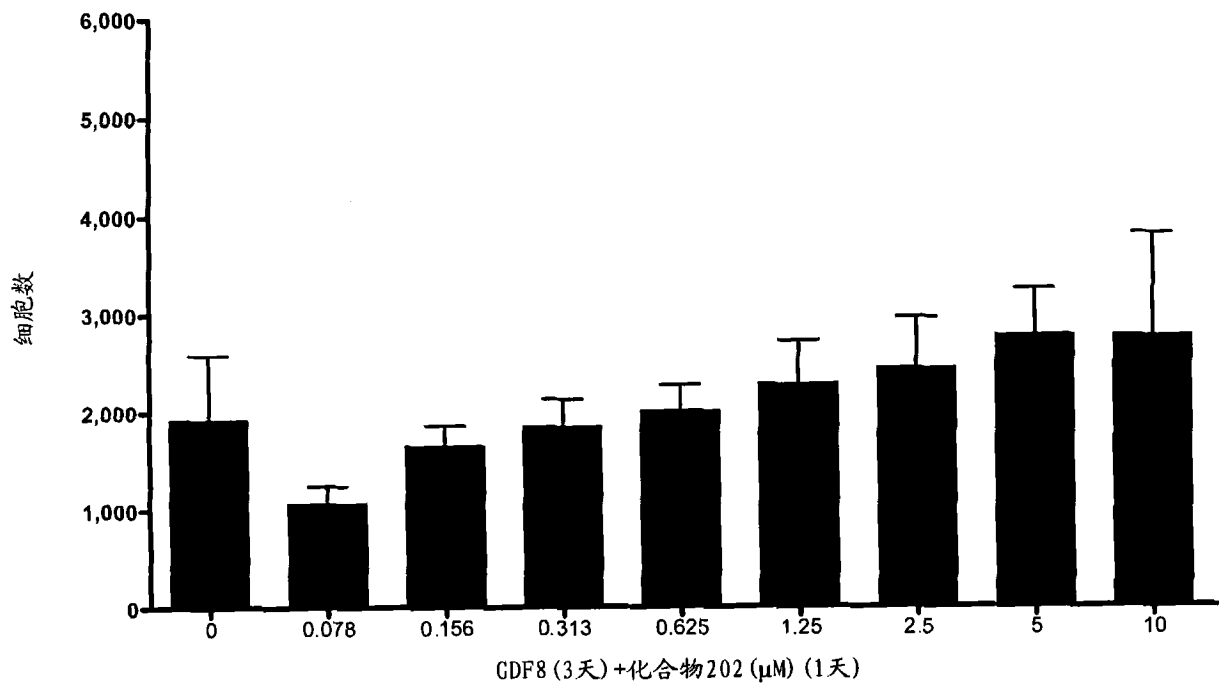


图 18D

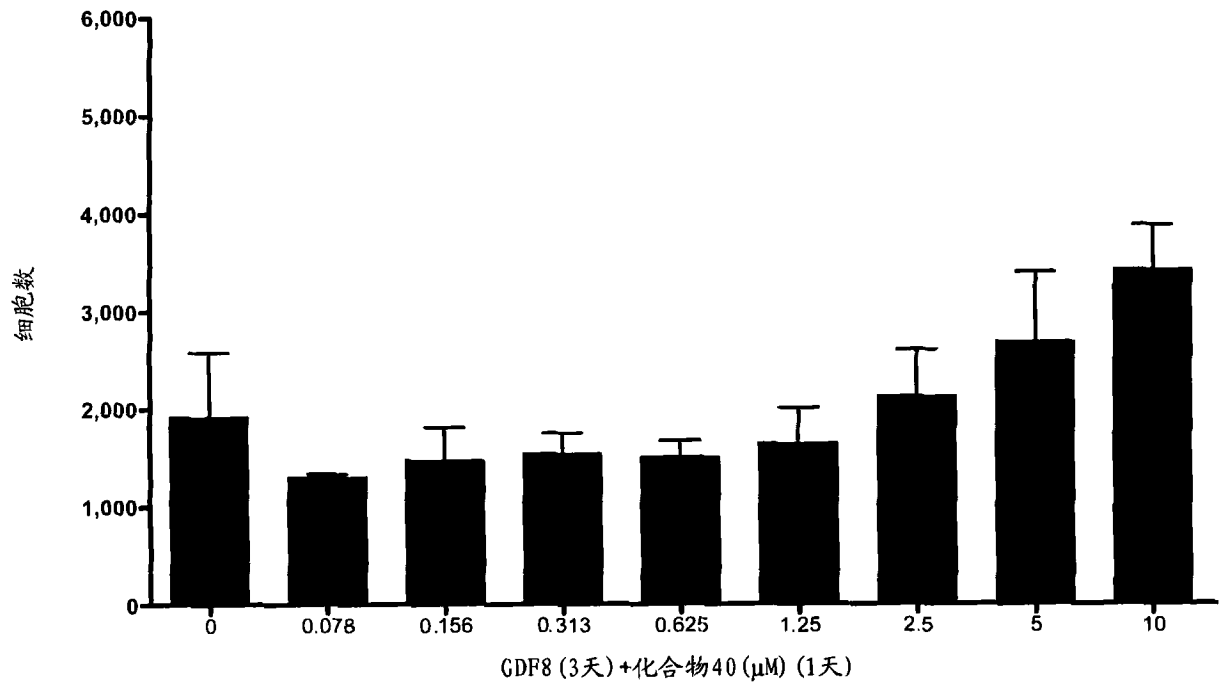


图 18E

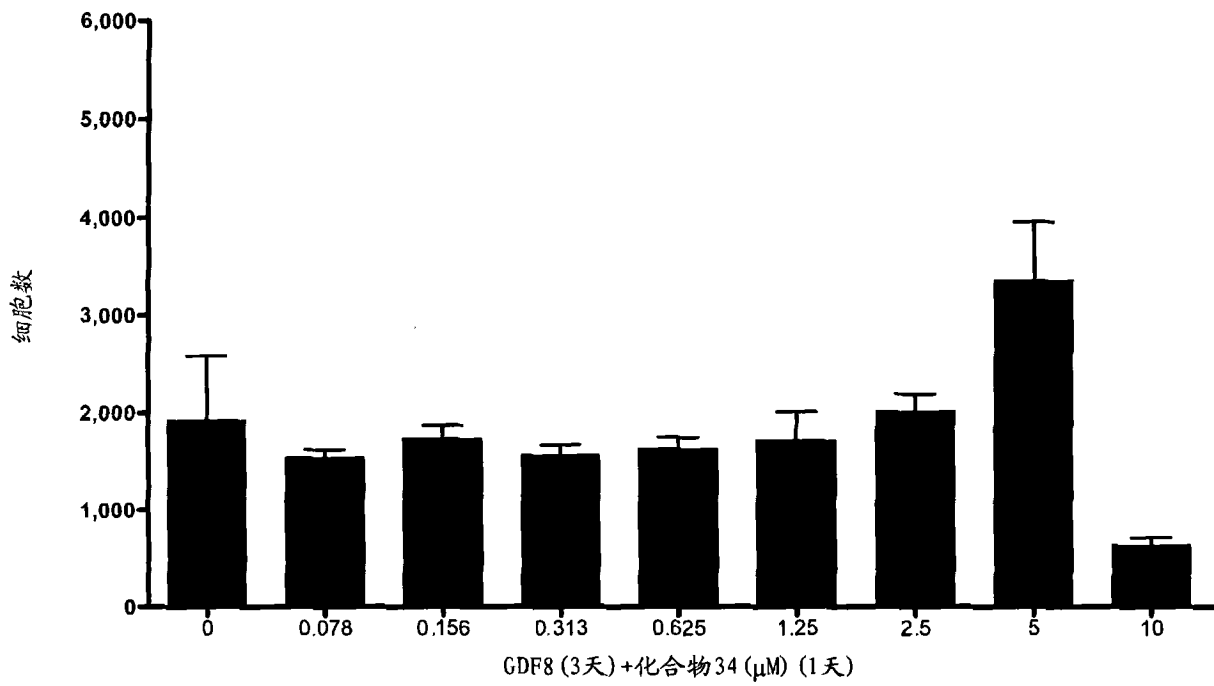


图 18F

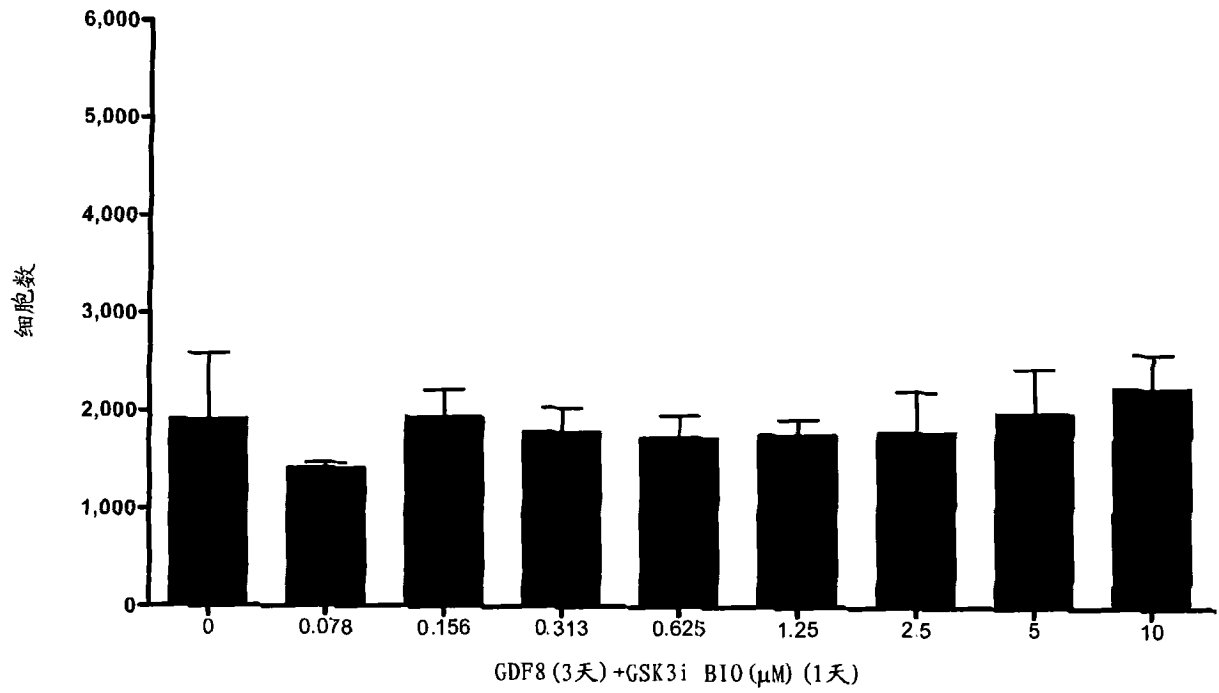


图 18G

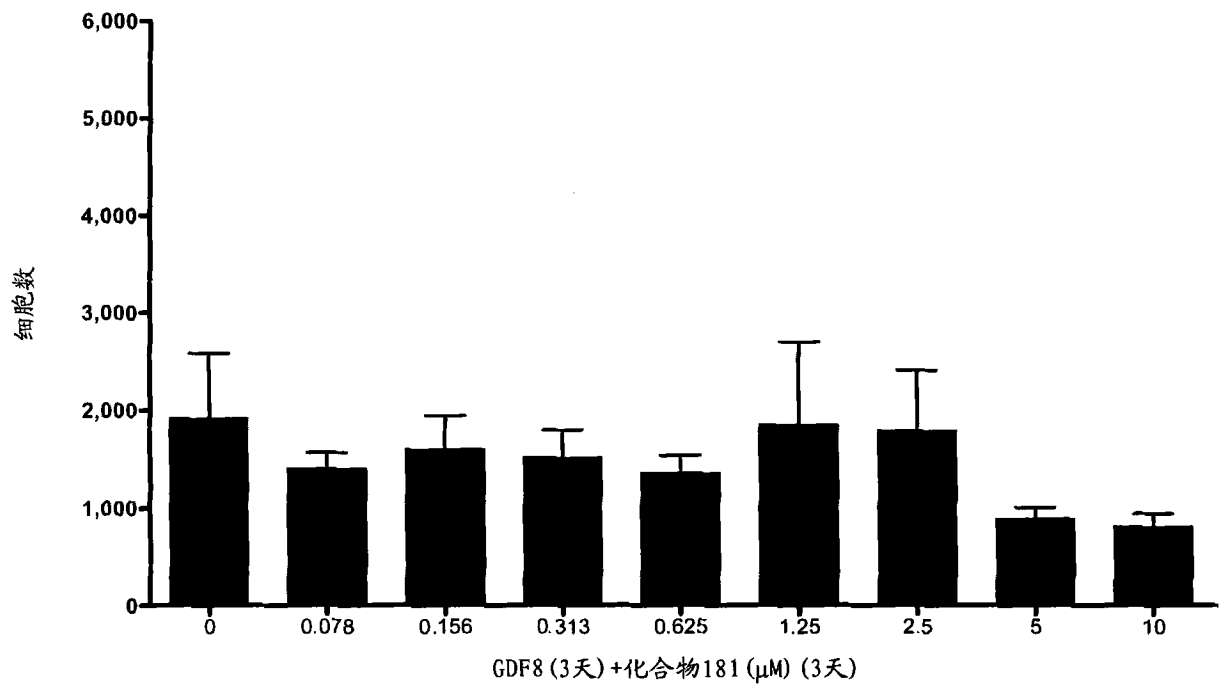


图 19A

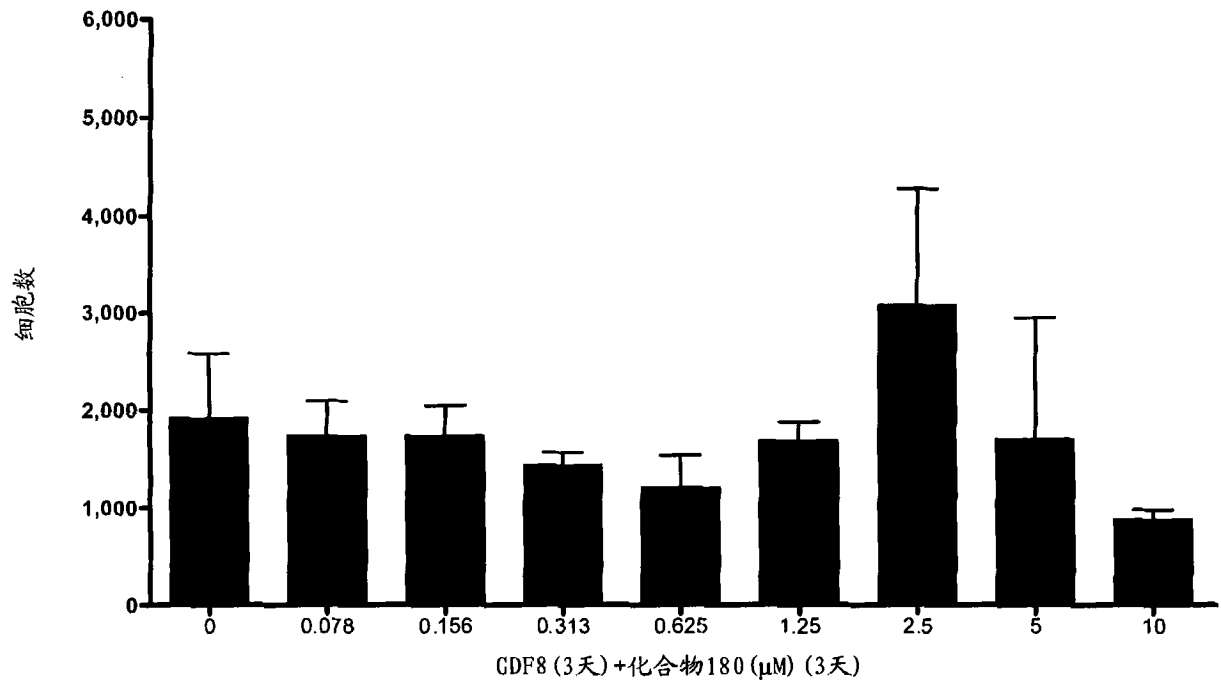


图 19B

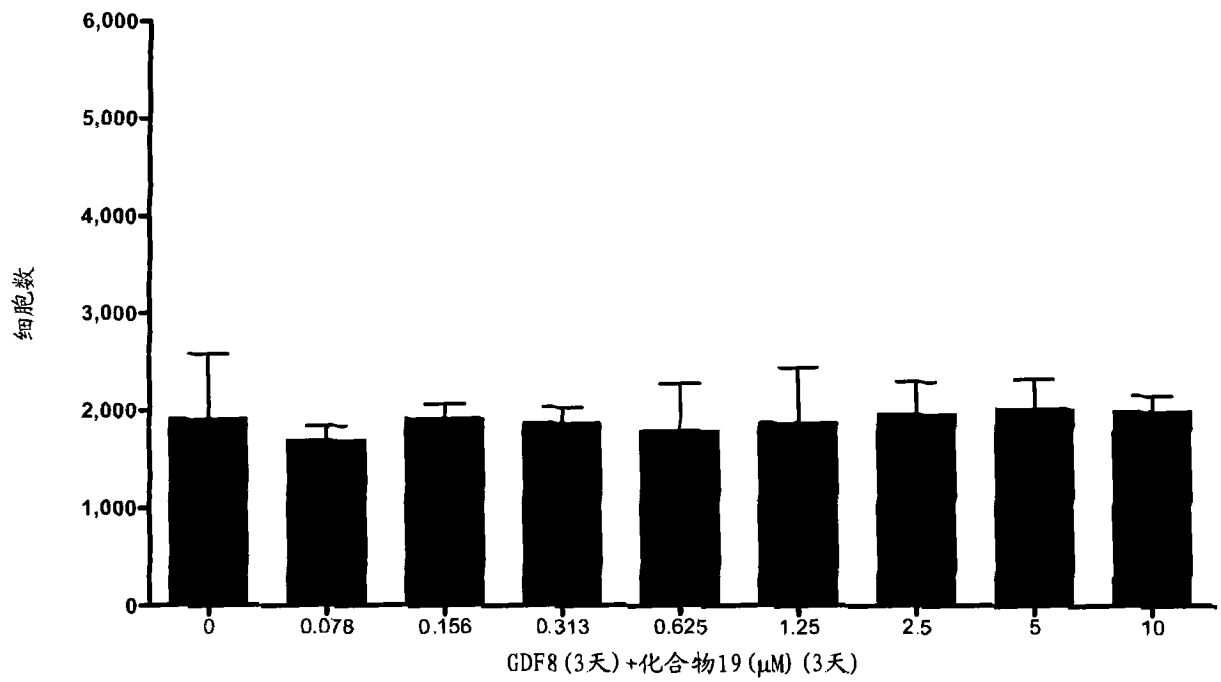


图 19C

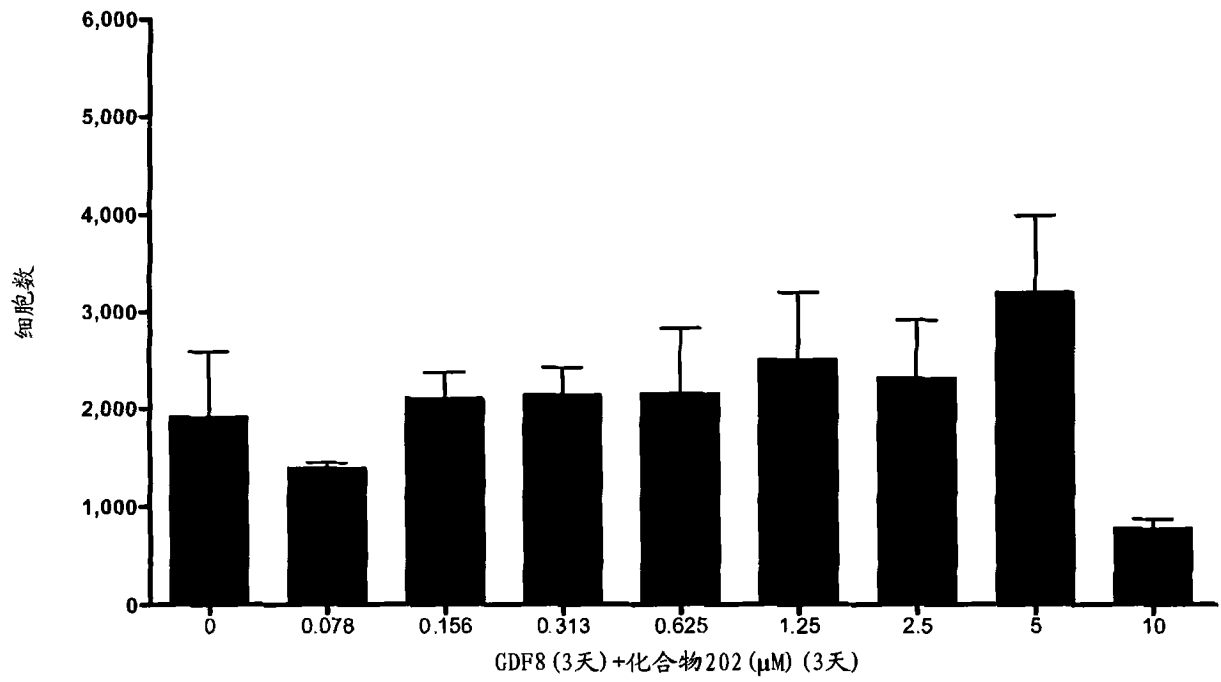


图 19D

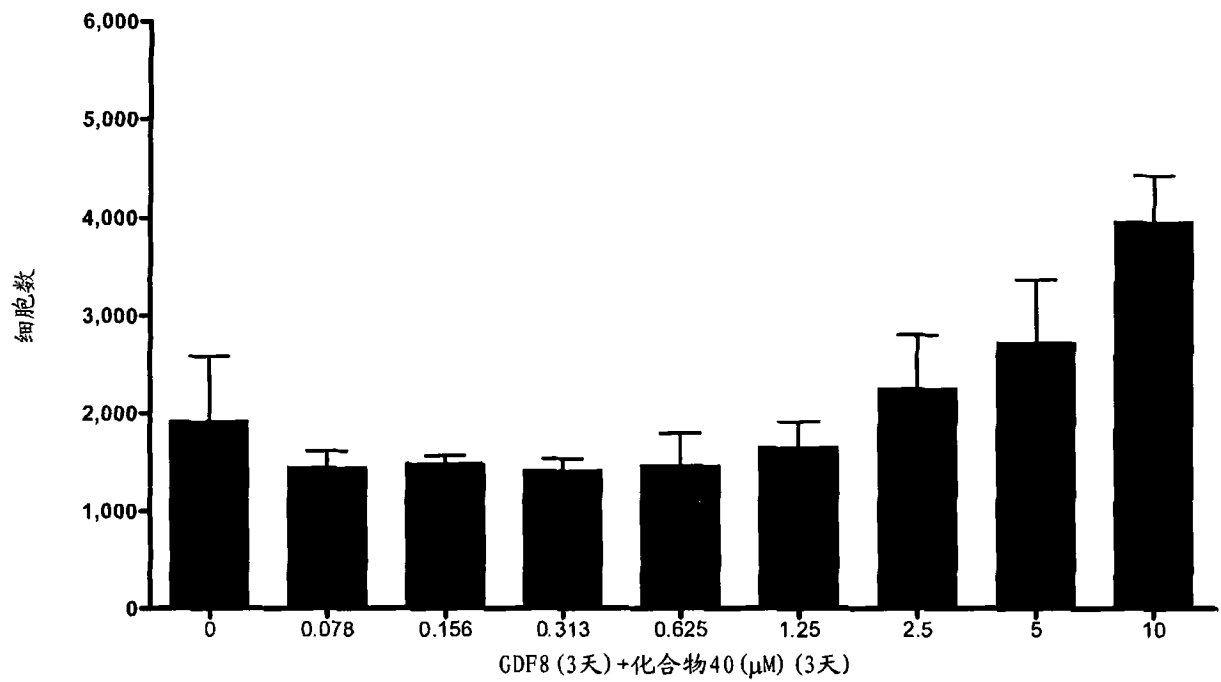


图 19E



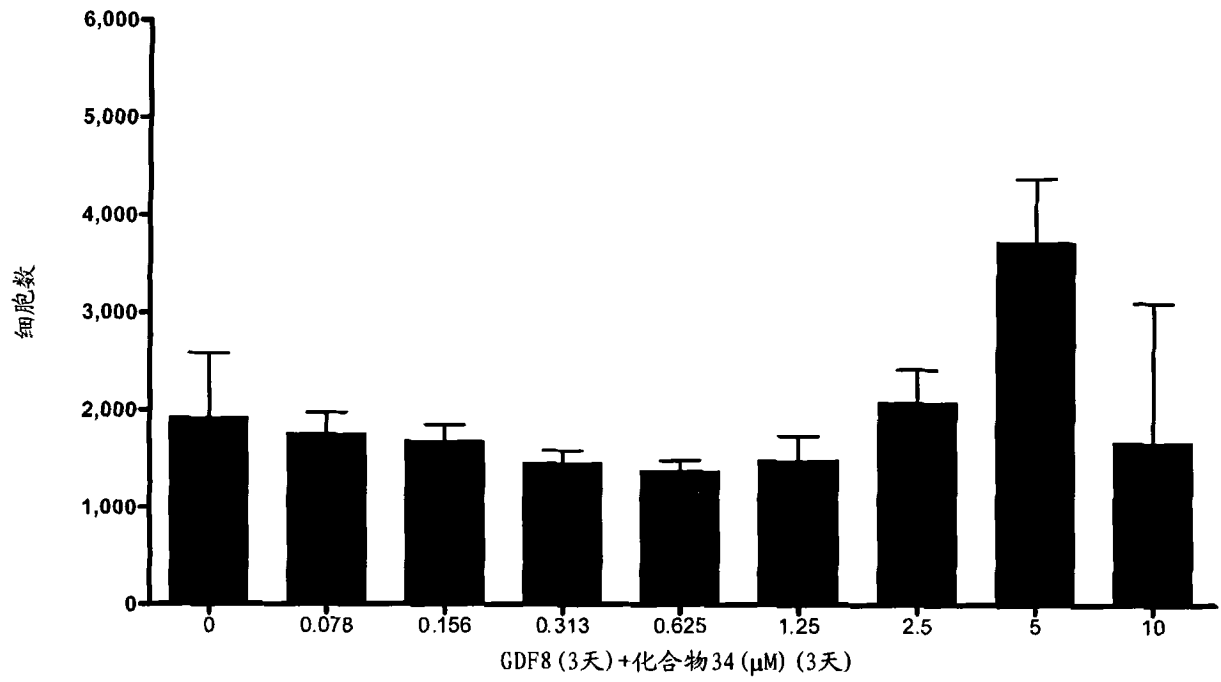


图 19F

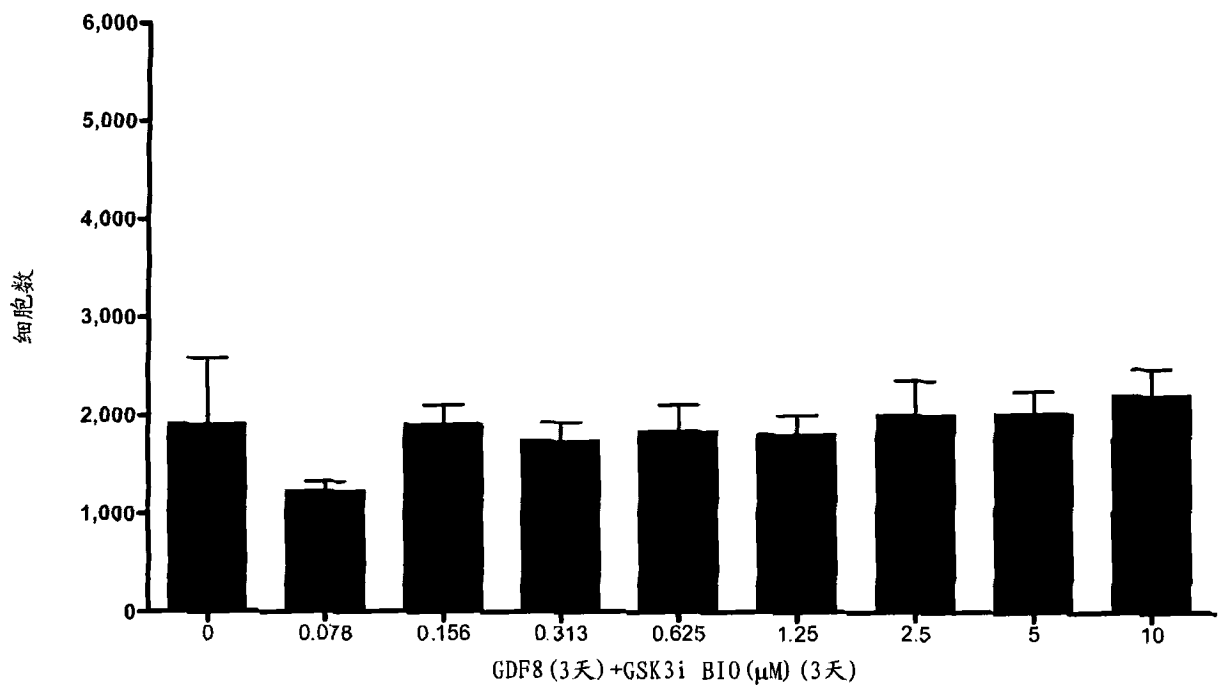


图 19G

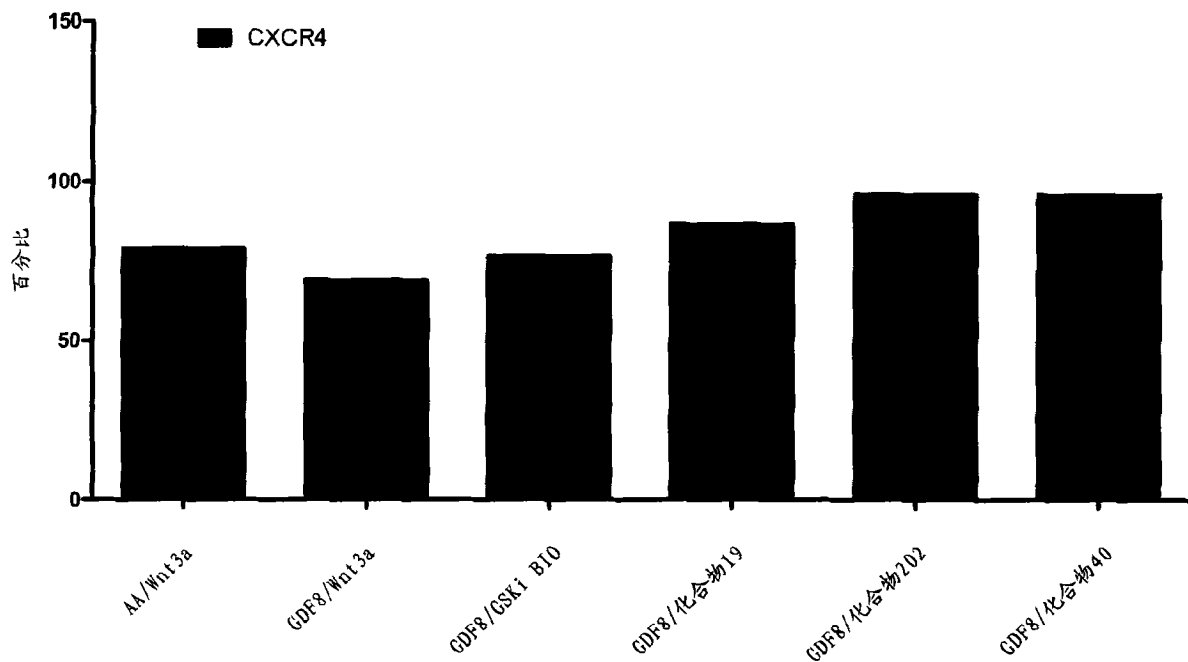


图 20A

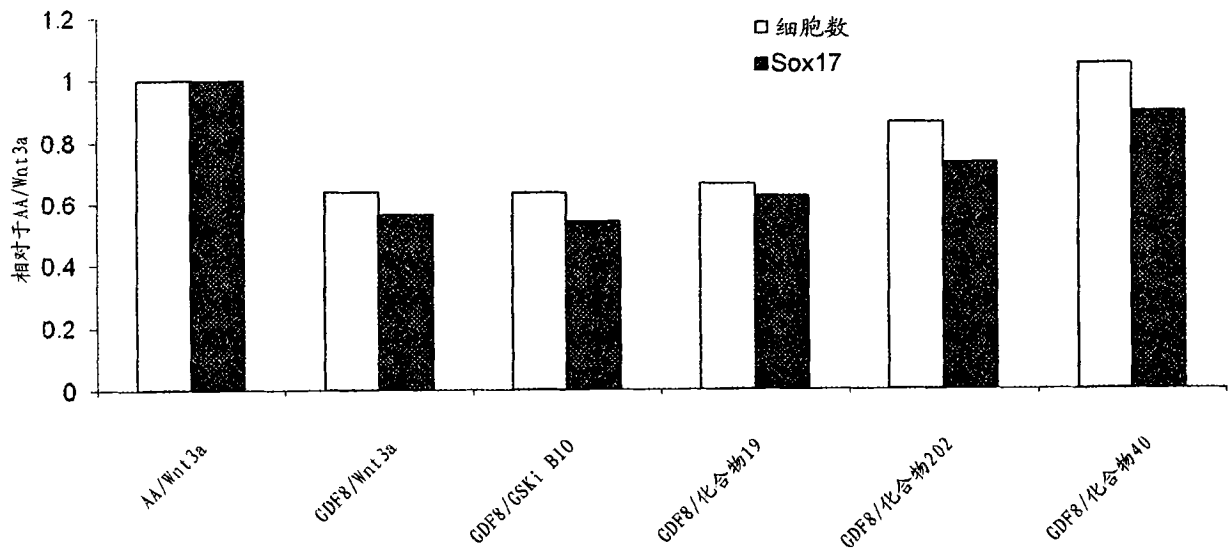


图 20B

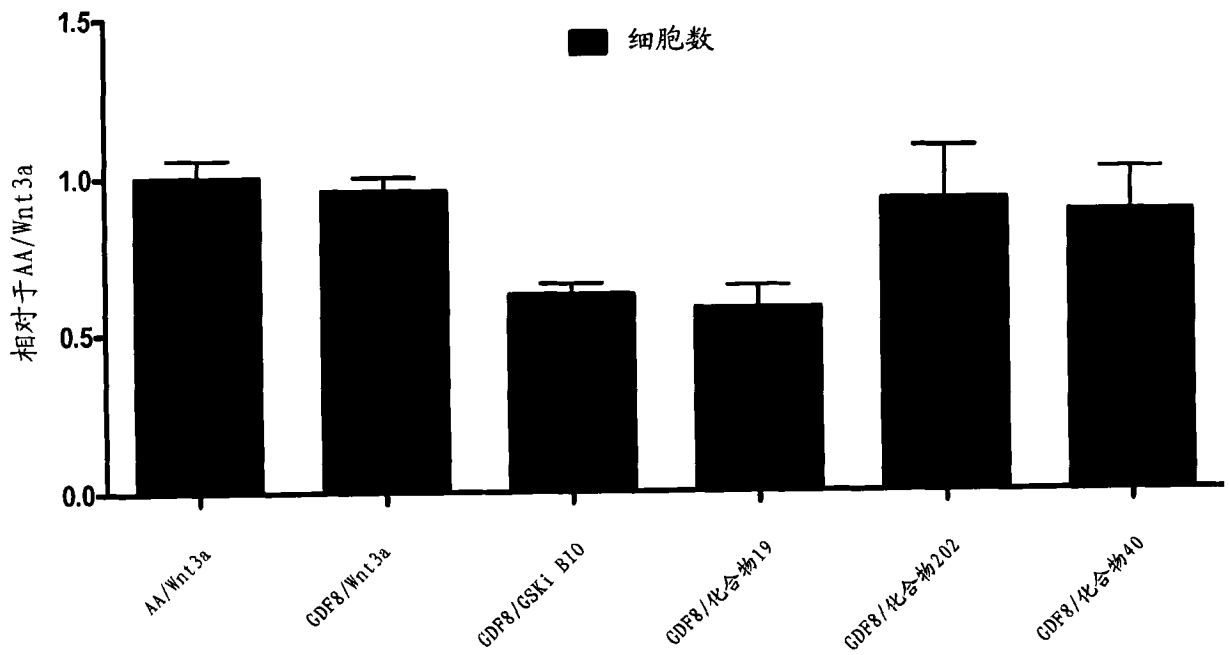


图 20C

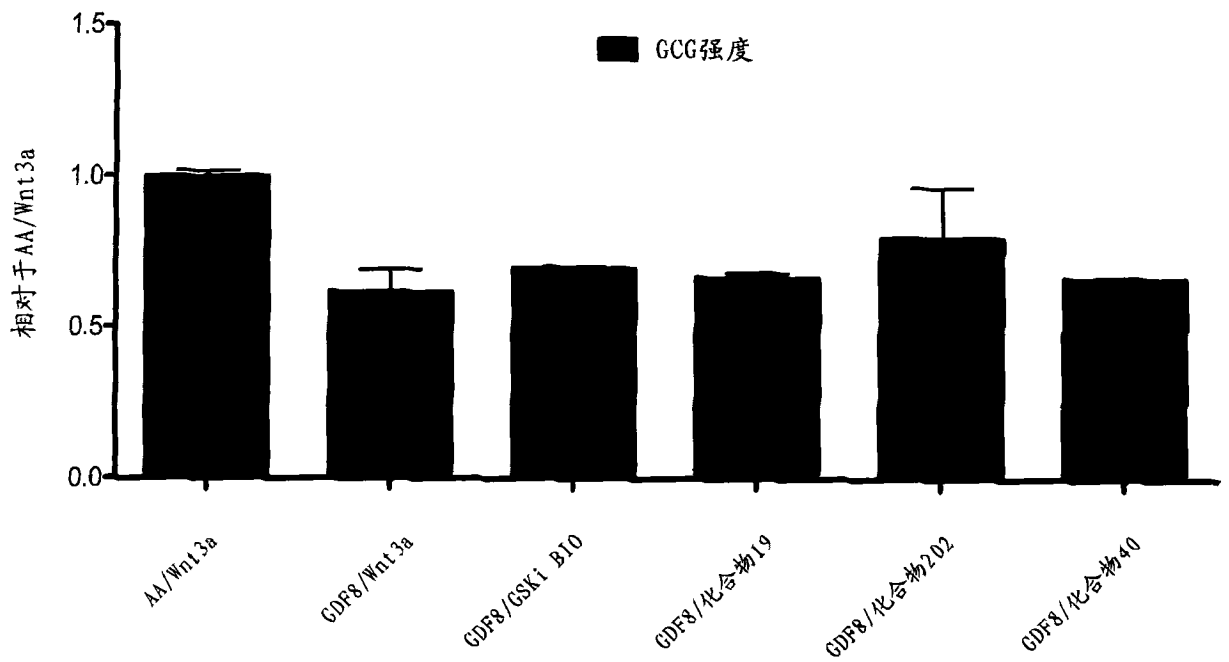


图 20D

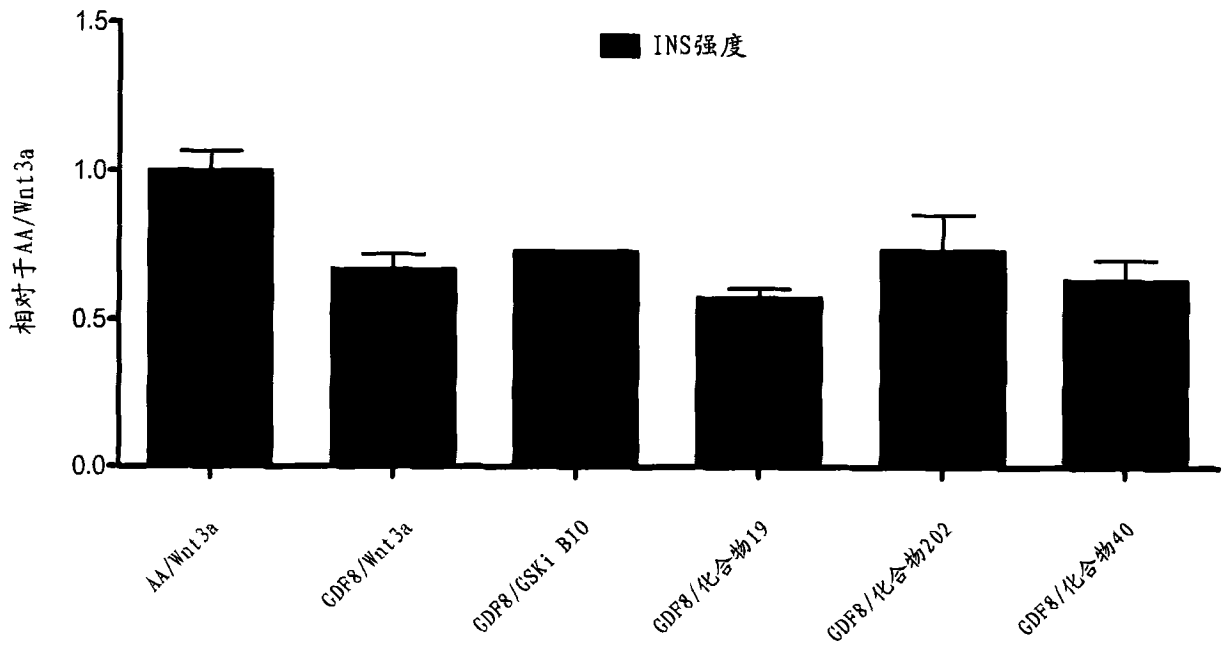


图 20E

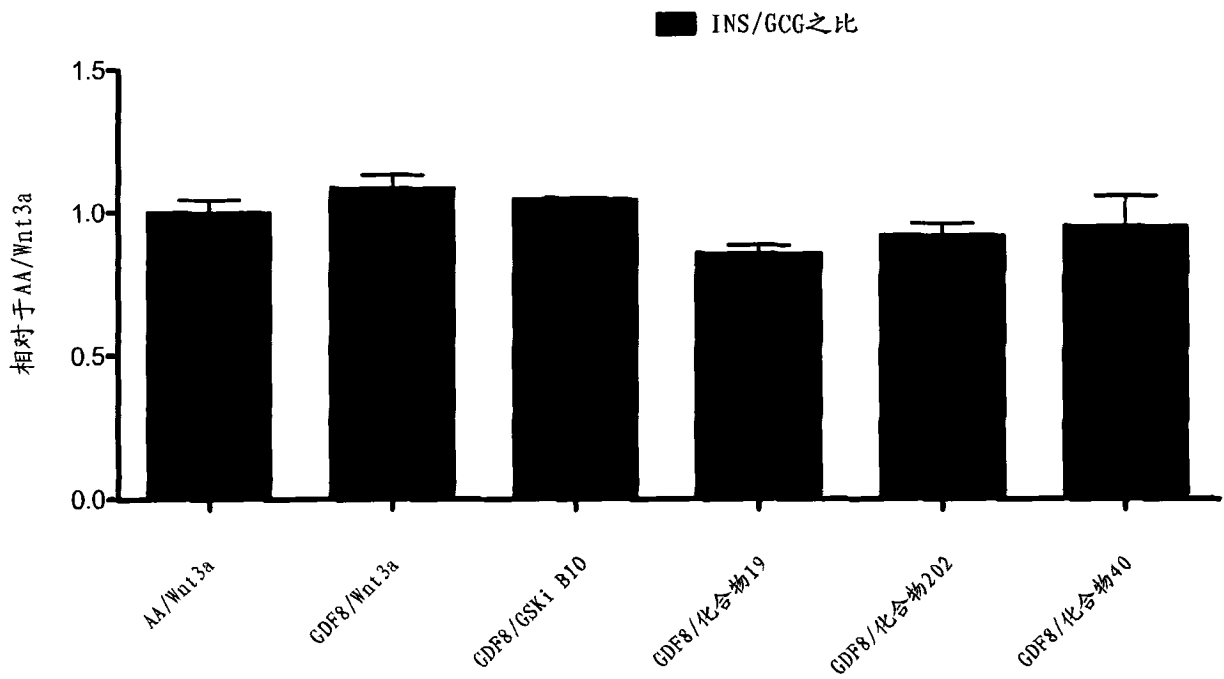


图 20F

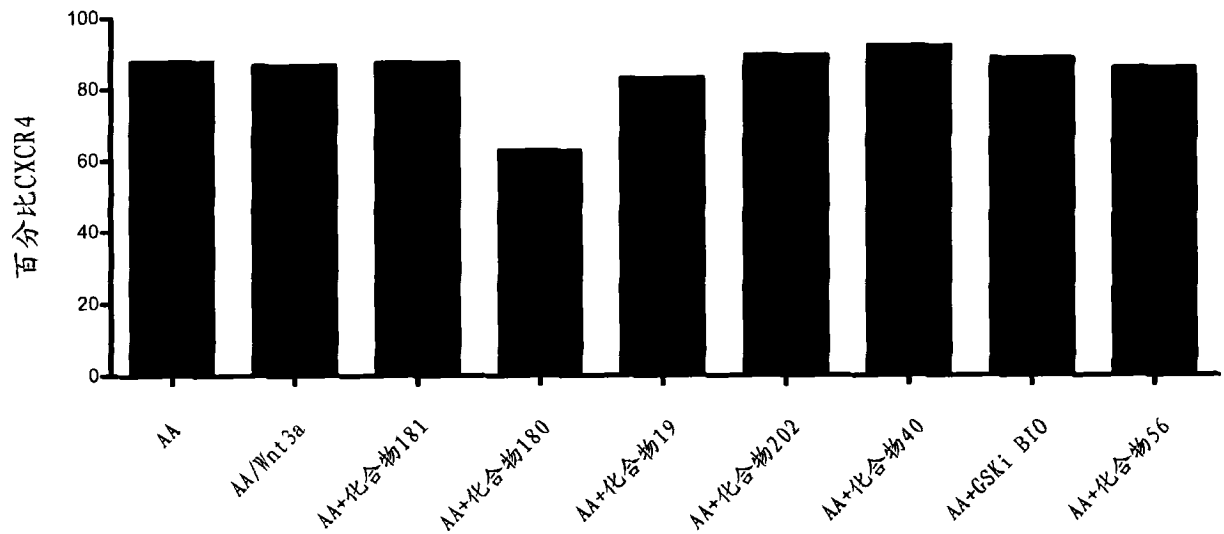


图 21A

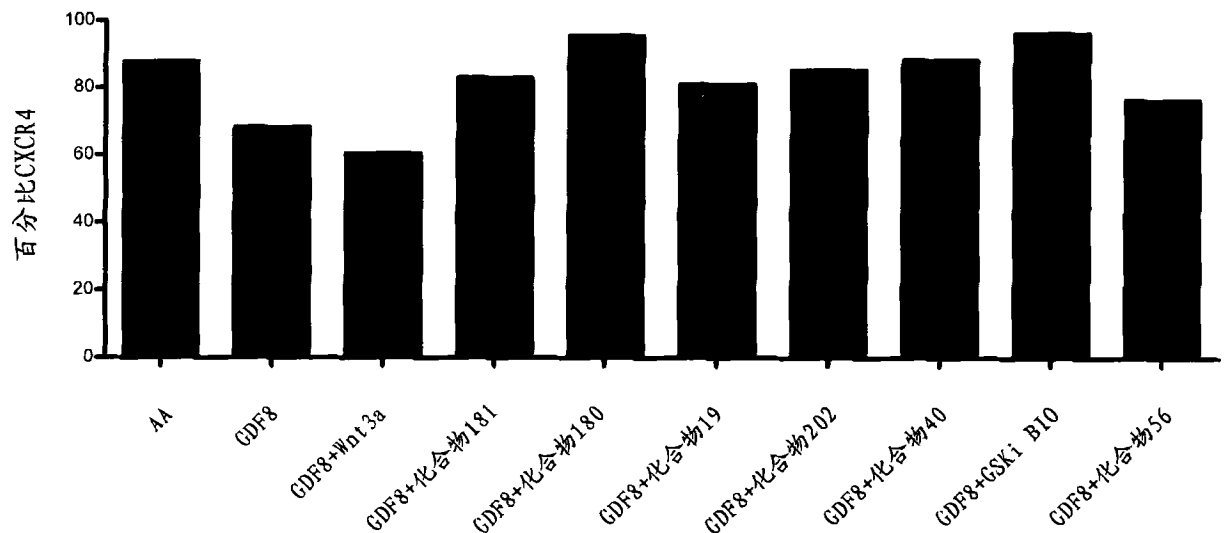
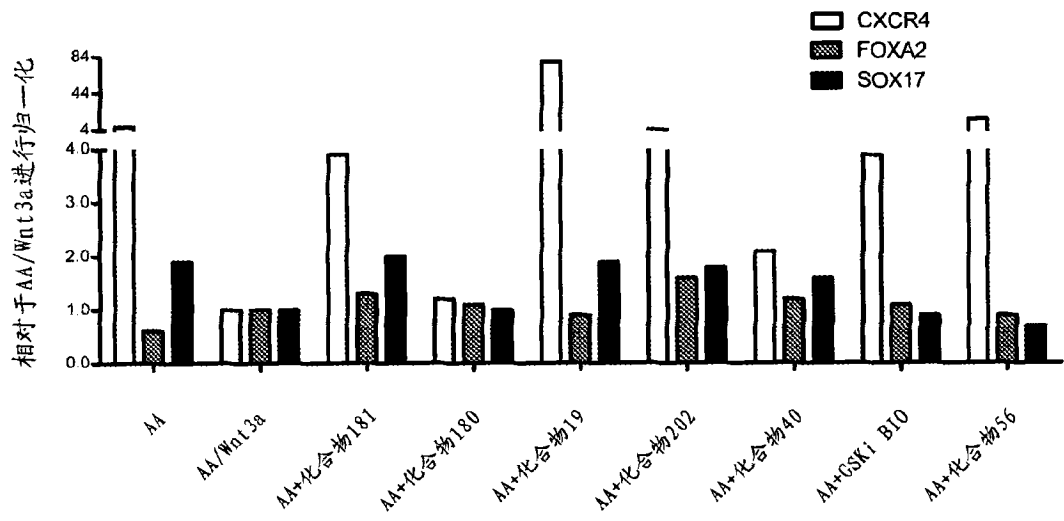
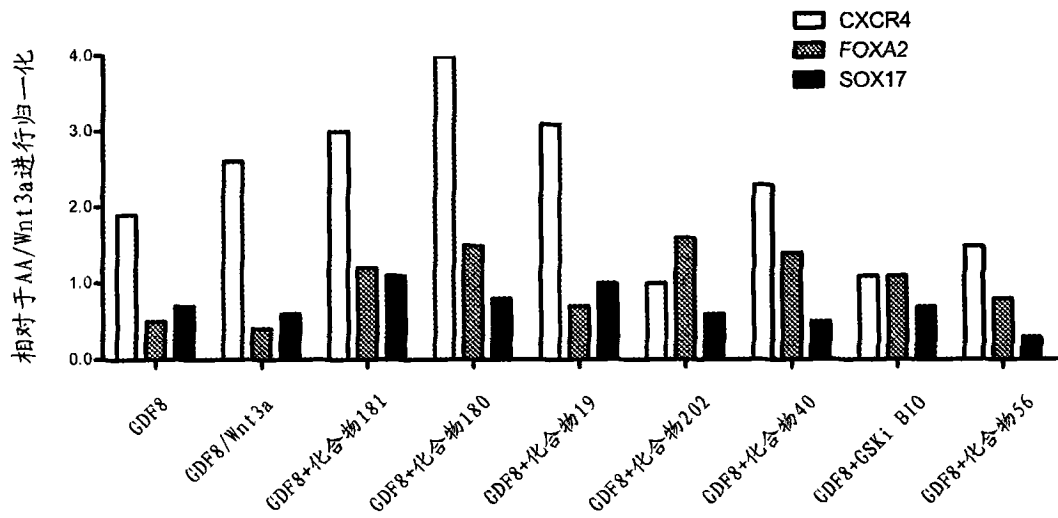


图 21B



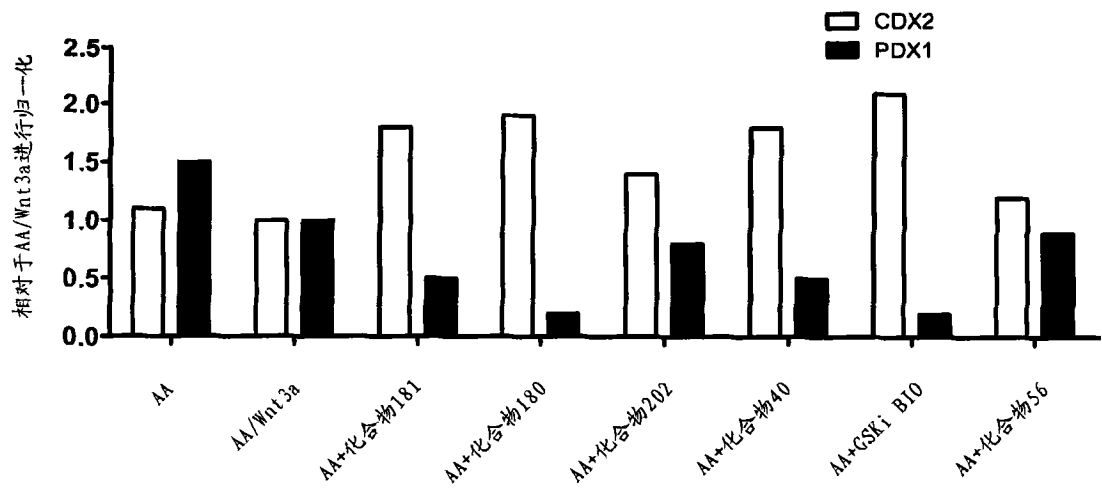
化合物\CT	GAPDH	CXCR4	FOXA2	SOX17
无	19.4	20.4	25.1	21.6
Wnt3a	18.2	22.0	22.9	21.2
化合物181	20.1	22.0	25.6	22.2
化合物180	18.4	22.0	24.0	21.4
化合物19	20.1	17.7	25.6	22.3
化合物202	20.3	22.0	25.7	22.6
化合物40	19.9	22.7	25.5	22.3
GSK3i IX (bio)	20.2	22.2	25.8	23.4
化合物56	19.8	19.6	24.4	23.3

图 21C



化合物\CT	GAPDH	CXCR4	FOXA2	SOX17
无	21.6	24.6	25.9	25.2
Wnt3a	21.2	23.6	25.7	25.0
化合物181	20.7	23.0	25.2	23.7
化合物180	20.9	22.7	25.0	24.2
化合物19	19.6	21.8	24.2	22.6
化合物202	18.5	22.4	23.6	22.3
化合物40	19.7	22.4	24.9	23.7
GSK3i 1X (bio)	19.6	23.3	24.7	23.3
化合物56	19.7	23.0	25.3	24.4

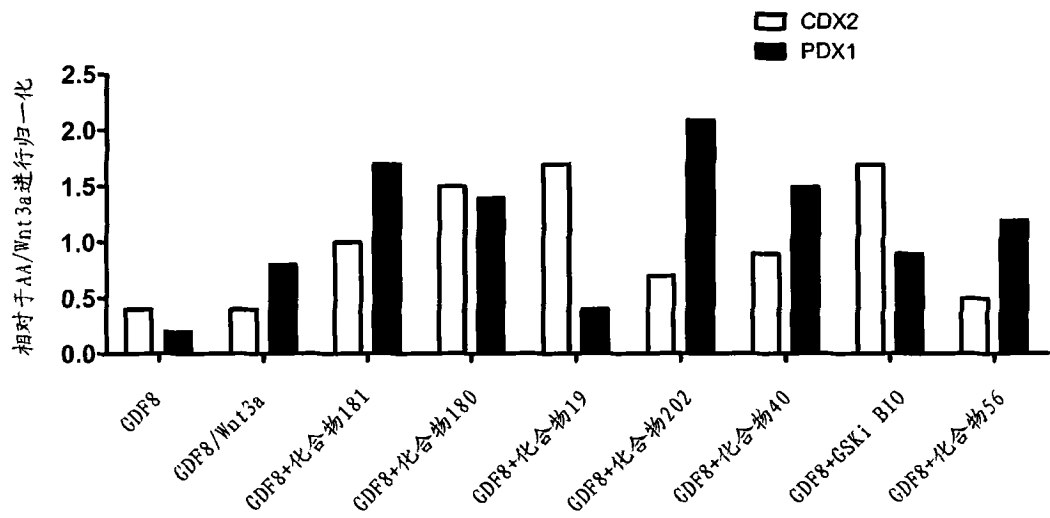
图 21D



化合物\CT	GAPDH	CDX2	PDX1
无	18.5	22.9	23.3
Wnt3a	18.4	23.0	23.8
化合物181	18.6	22.3	25.0
化合物180	18.8	22.5	26.3
化合物202	18.5	22.5	24.1
化合物40	18.5	22.2	24.8
GSK3i IX (bio)	18.5	22.0	26.1
化合物56	18.3	22.7	23.9

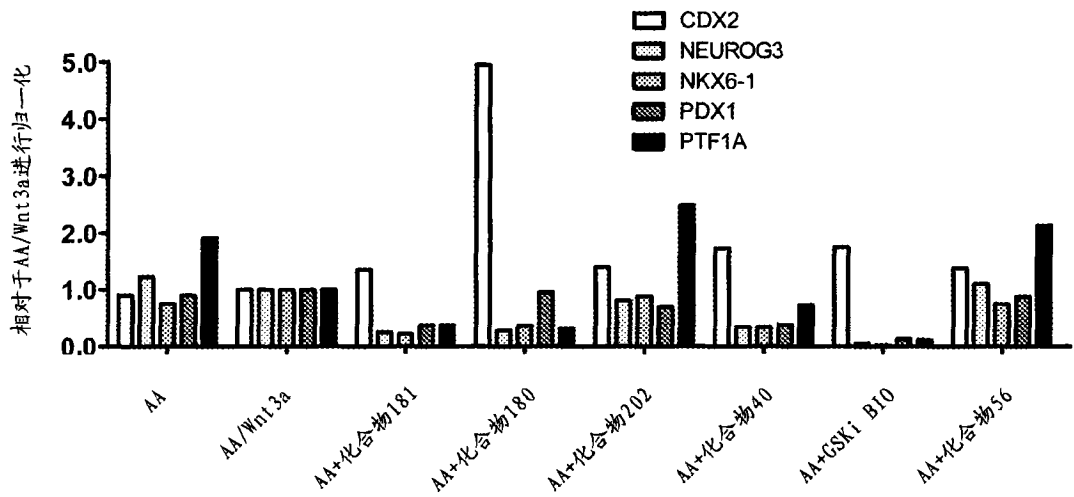
图 21E





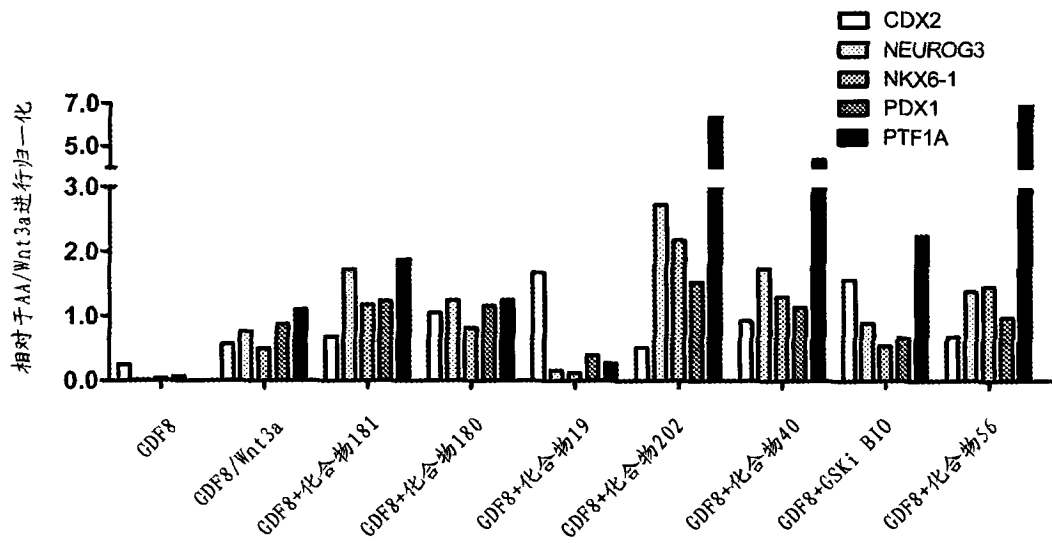
化合物\CT	GAPDH	CDX2	PDX1
无	18.0	23.8	25.5
Wnt3a	17.4	23.1	23.1
化合物181	18.8	23.4	23.5
化合物180	18.8	22.8	23.7
化合物19	18.3	22.0	25.0
化合物202	18.7	23.8	23.0
化合物40	18.4	23.0	23.2
GSK3i IX (bio)	18.4	22.2	24.0
化合物56	18.2	23.8	23.3

图 21F



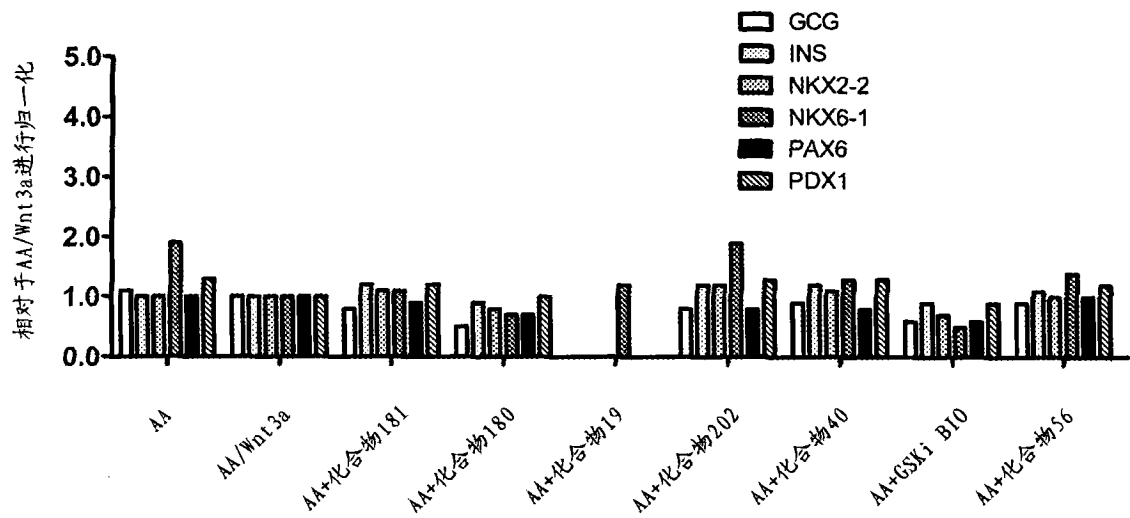
化合物\LT	GAPDH	CDX2	NEUROG3	NKX6-1	PDX1	PTF1A
无	19.0	23.7	23.3	27.4	23.7	29.6
Wnt3a	19.5	24.1	24.1	27.5	24.1	31.1
化合物181	18.0	22.1	24.6	28.1	24.0	31.0
化合物180	19.4	21.6	25.8	28.9	24.0	32.6
化合物202	19.2	23.3	24.1	27.4	24.3	29.5
化合物40	19.2	22.9	25.3	28.7	25.1	31.2
GSK3i IX (bio)	19.0	22.7	27.7	32.9	26.5	33.7
化合物56	18.8	22.9	23.3	27.2	23.6	29.3

图 21G



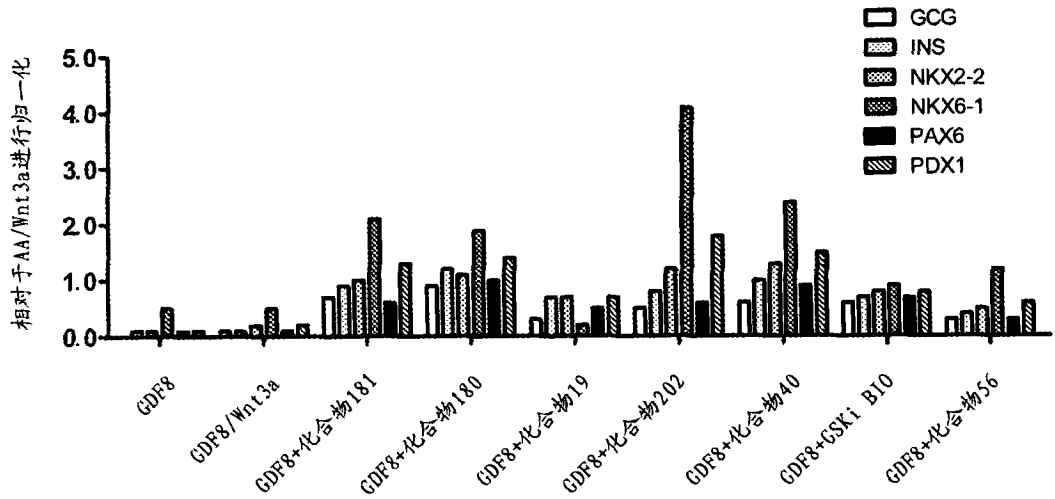
化合物\CT	GAPDH	CDX2	NEUROG3	NKX6-1	PDX1	PTF1A
无	18.0	24.6	28.7	31.2	26.5	40.0
Wnt3a	19.0	24.4	24.0	28.0	23.8	30.5
化合物181	18.0	23.1	21.8	25.7	22.3	28.6
化合物180	19.5	23.9	23.7	27.7	23.8	30.7
化合物19	19.1	22.9	26.4	30.2	25.1	32.6
化合物202	19.0	24.5	22.2	25.9	23.0	27.9
化合物40	19.0	23.6	22.7	26.6	23.4	28.4
GSK3i IX (bio)	19.1	23.0	23.8	27.9	24.2	29.5
化合物56	18.9	24.0	23.0	26.3	23.5	27.7

图 21H



化合物\CT	GAPDH	GCG	INS	NKX2-2	NKX6-1	PAX6	PDX1
无	18.3	14.1	14.9	23.7	25.5	24.0	23.2
Wnt3a	18.0	14.0	14.6	23.4	26.1	23.7	23.3
化合物181	18.0	14.3	14.5	23.3	26.1	24.0	23.1
化合物180	18.0	14.9	14.7	23.8	26.5	24.3	23.2
化合物19	17.9	27.0	26.9	28.0	25.8	28.6	29.4
化合物202	18.6	14.9	15.0	23.7	25.8	24.7	23.6
化合物40	18.3	14.6	14.7	23.5	26.1	24.4	23.2
GSK3i 1X (bio)	18.3	15.1	15.1	24.2	27.5	24.9	23.8
化合物56	18.2	14.4	14.8	23.6	25.9	24.1	23.3

图 21I



化合物\CT	GAPDH	GCG	INS	NKX2-2	NKX6-1	PAX6	PDX1
无	17.4	18.1	17.7	25.9	26.6	26.6	25.6
Wnt3a	17.8	17.7	17.5	25.6	27.0	26.5	25.6
化合物181	18.0	14.5	14.8	23.4	25.0	24.4	23.0
化合物180	18.0	14.2	14.4	23.2	25.1	23.8	22.9
化合物19	18.3	16.2	15.6	24.3	28.6	25.2	24.2
化合物202	18.7	15.7	15.8	23.8	24.8	25.2	23.2
化合物40	18.1	14.8	14.8	23.2	25.0	24.1	22.9
GSK3i 1X(bio)	18.4	15.2	15.5	24.2	26.7	24.8	24.0
化合物56	18.0	16.0	16.0	24.4	25.9	25.4	24.0

图 21J

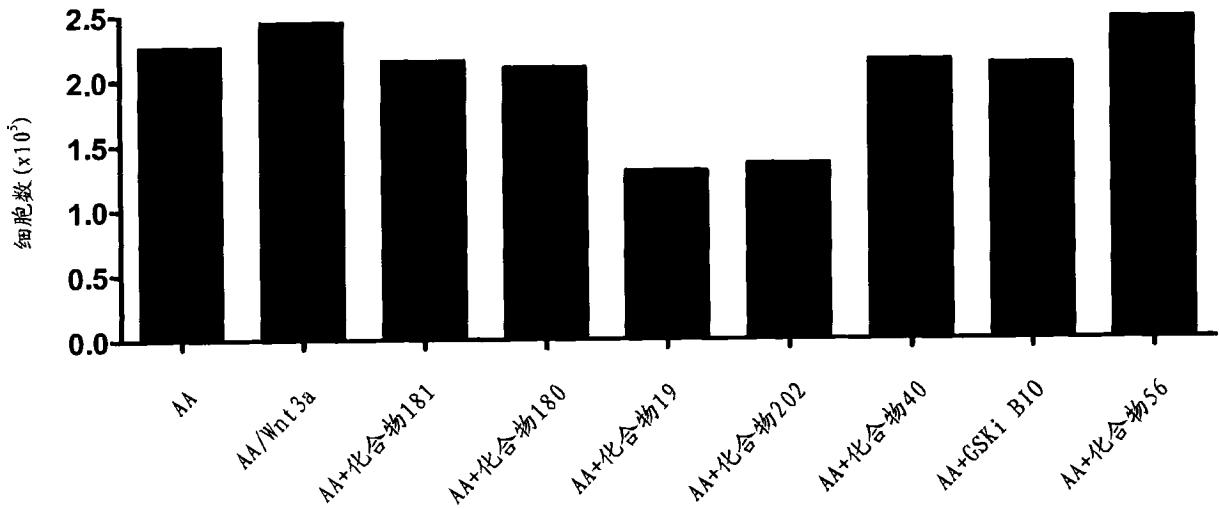


图 21K

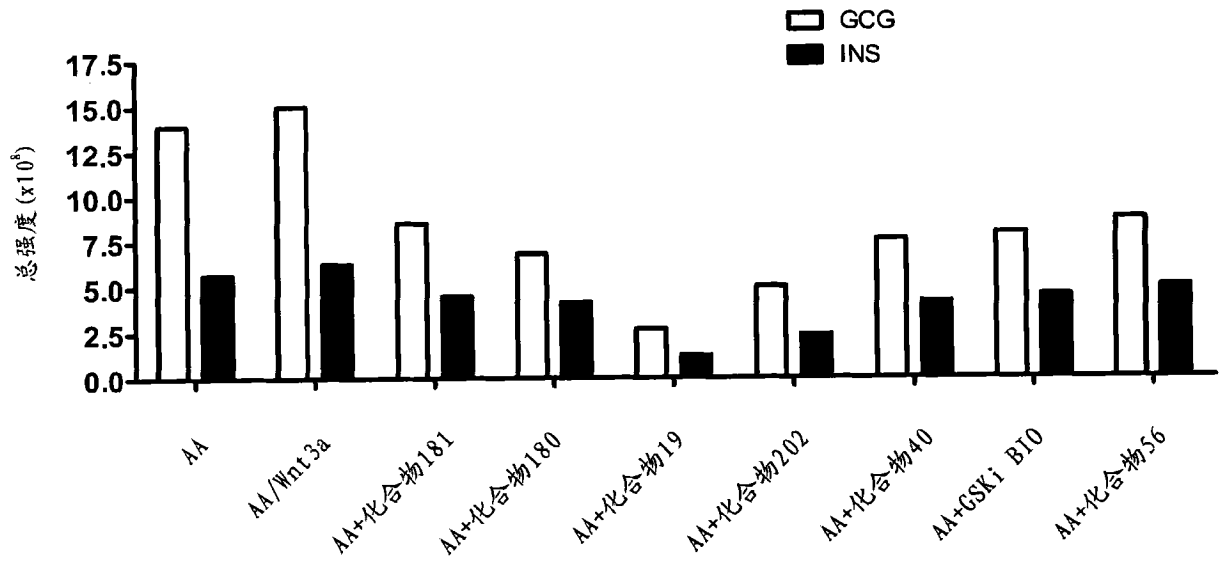


图 21L

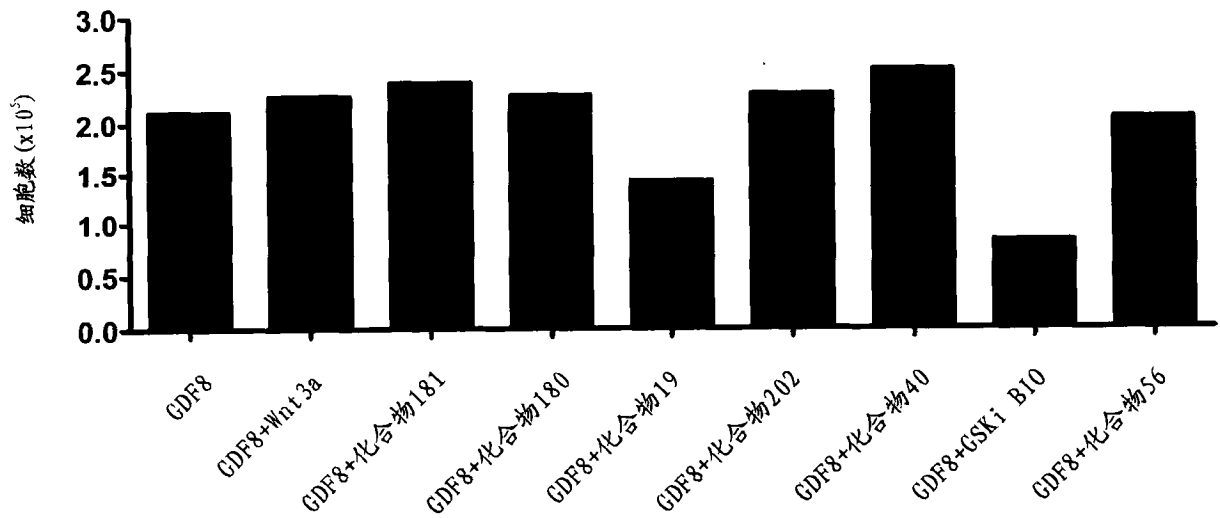


图 21M

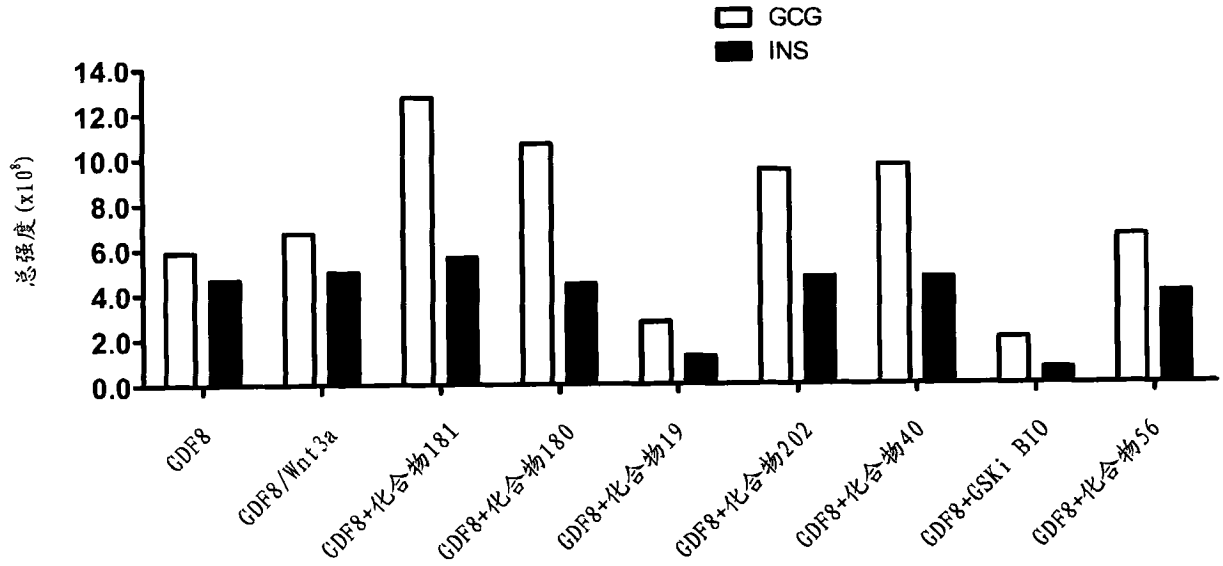


图 21N

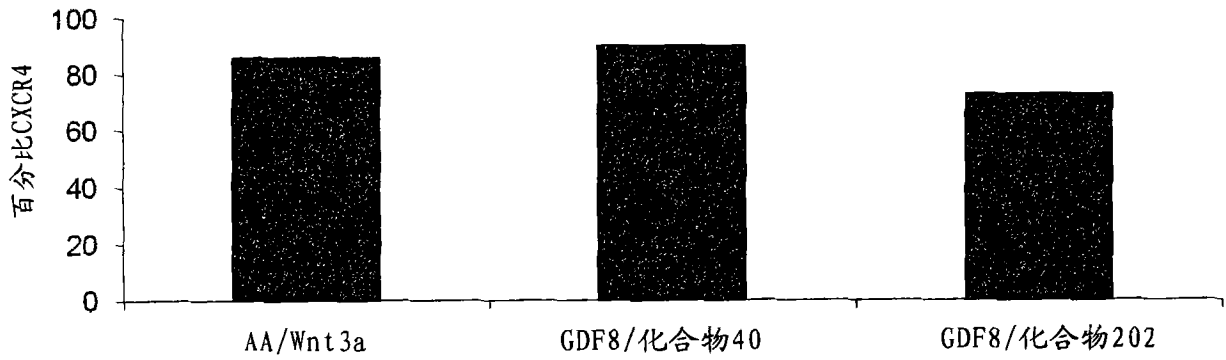


图 22A

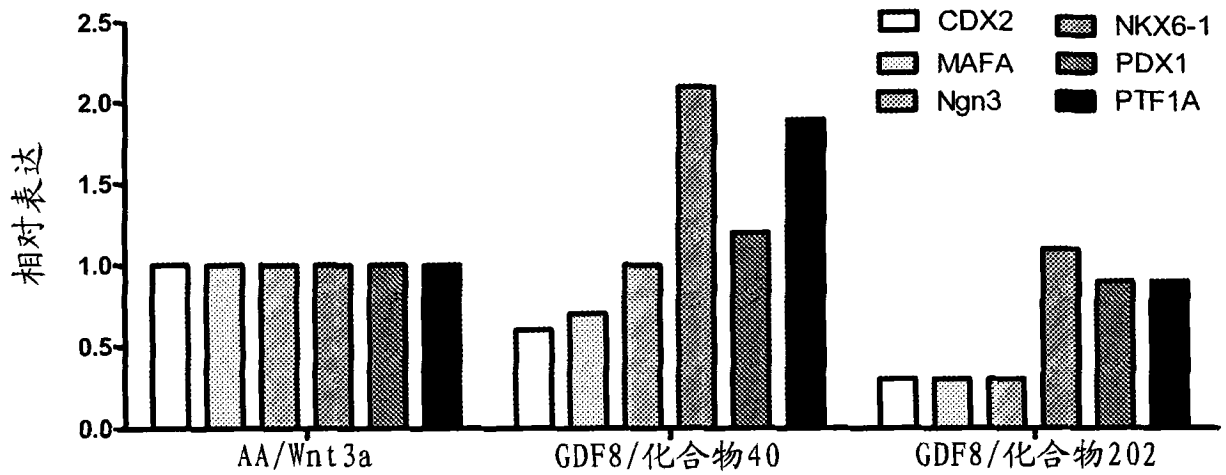


图 22B

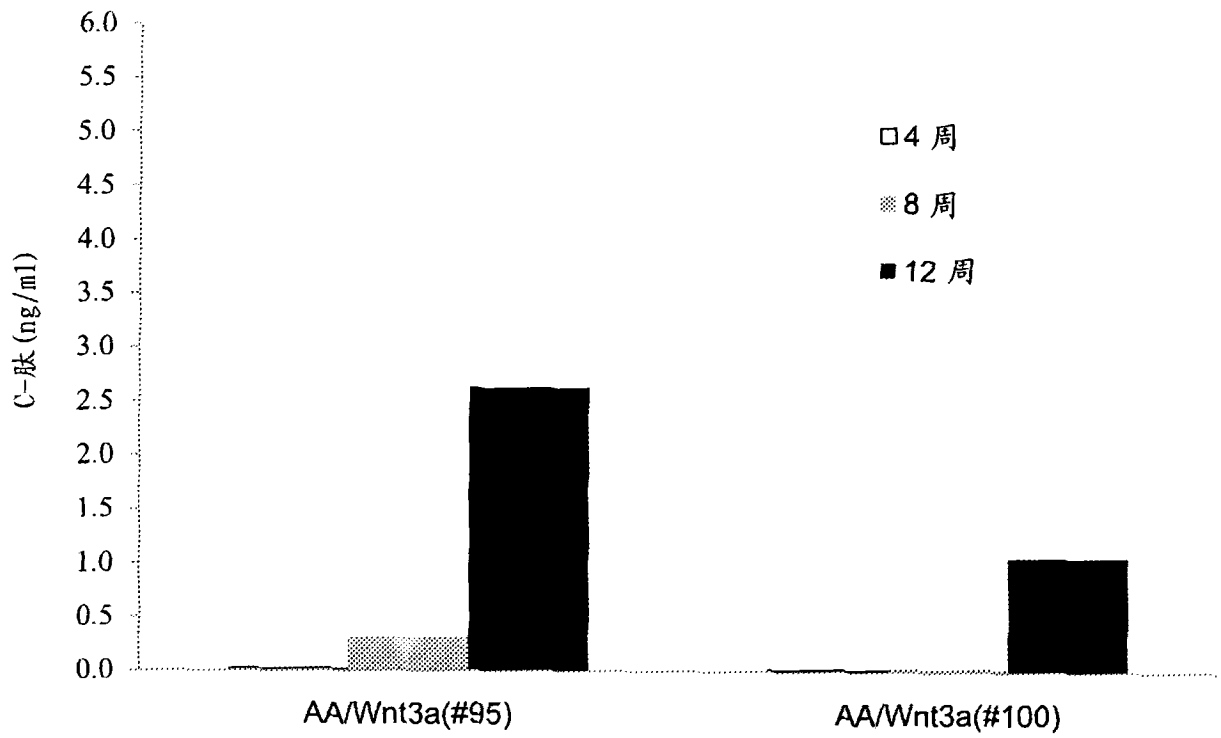


图 23A

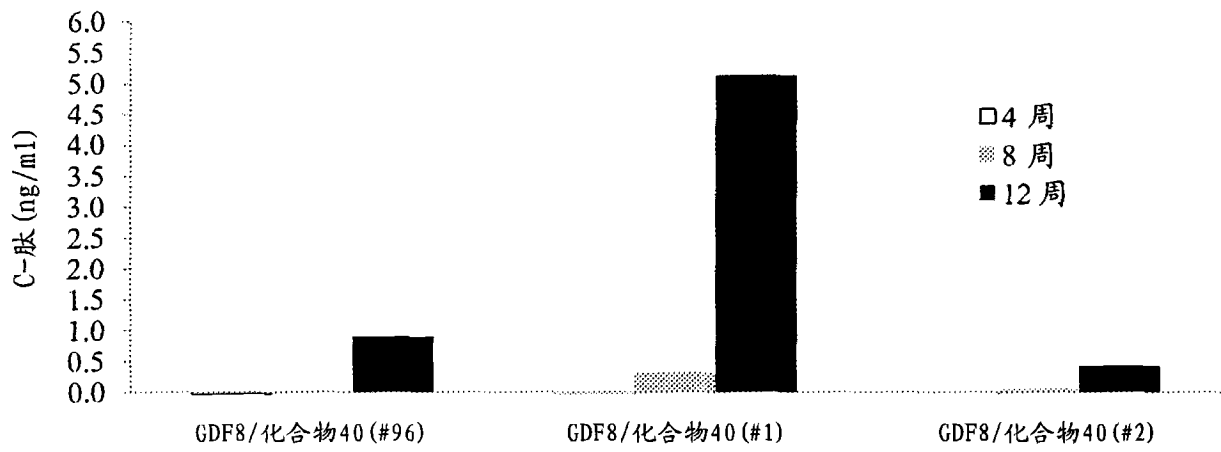


图 23B



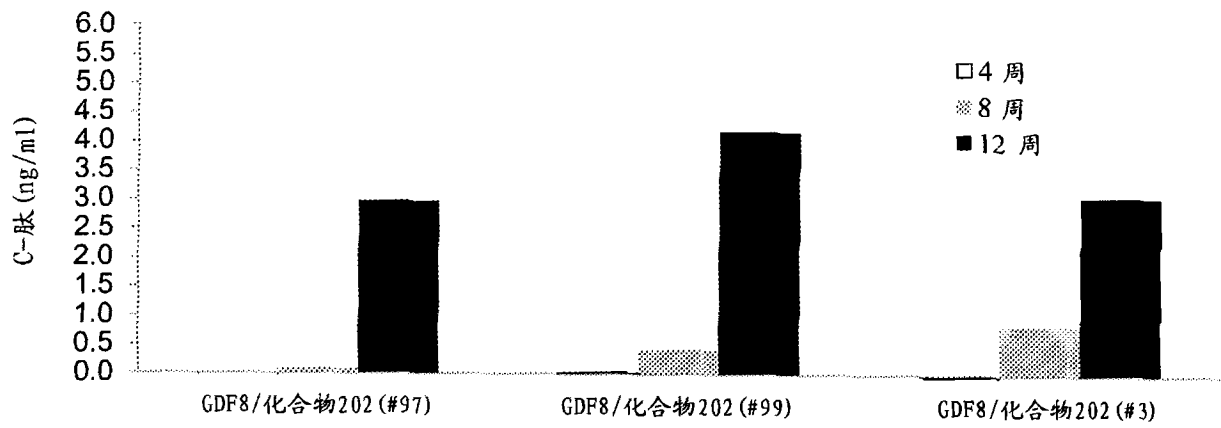


图 23C

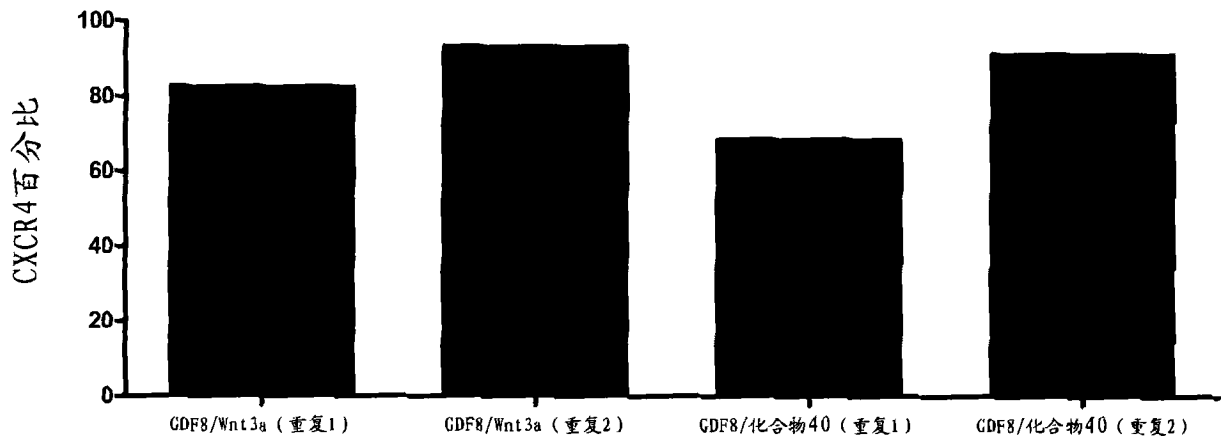


图 24A

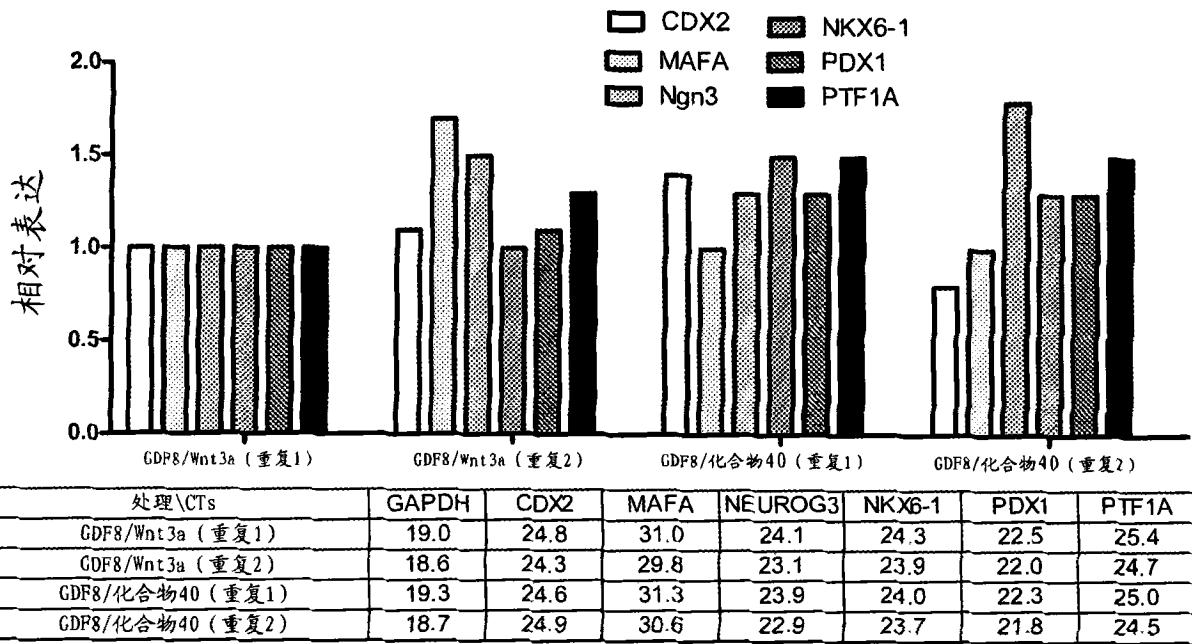


图 24B

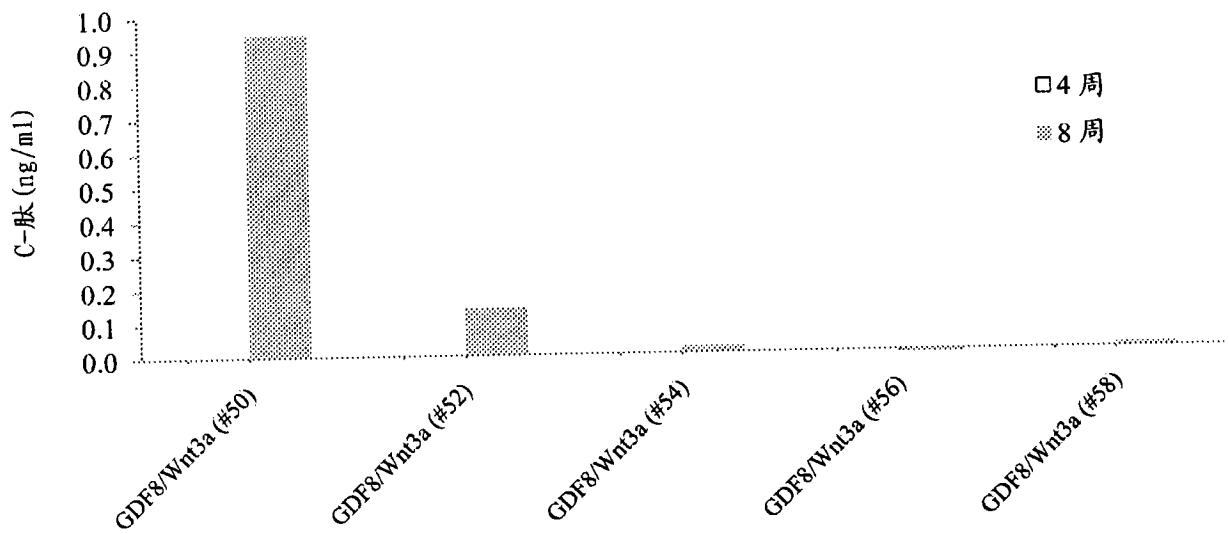


图 24C

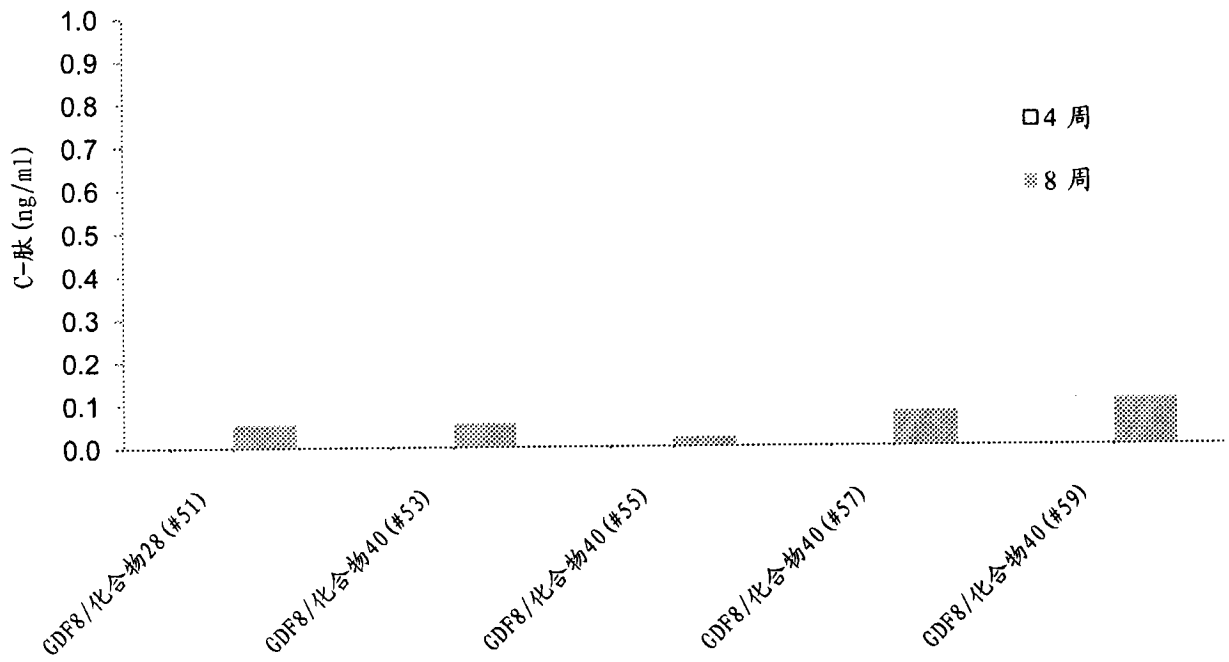


图 24D

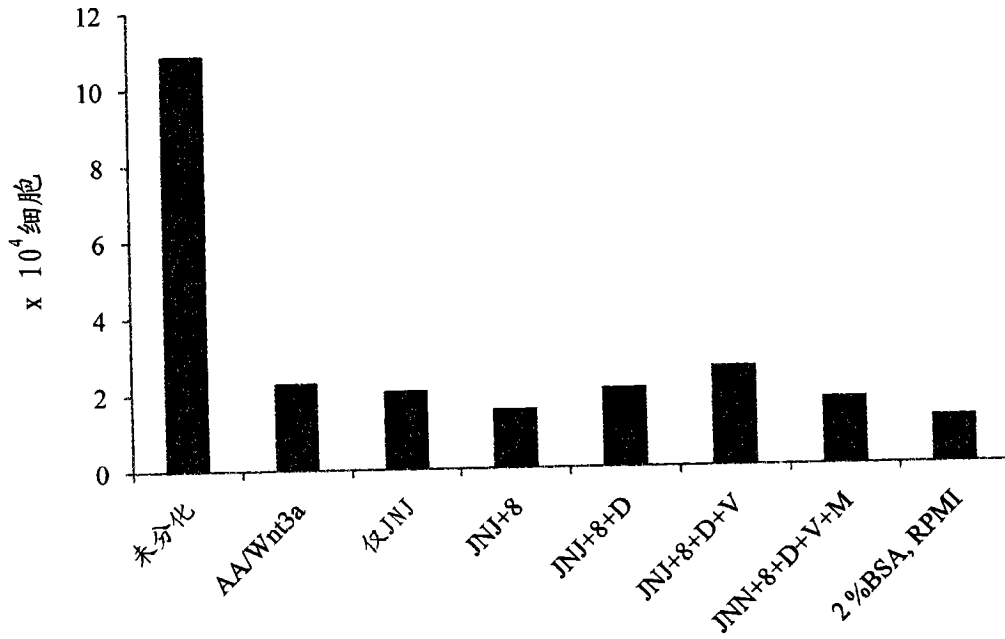


图 25A

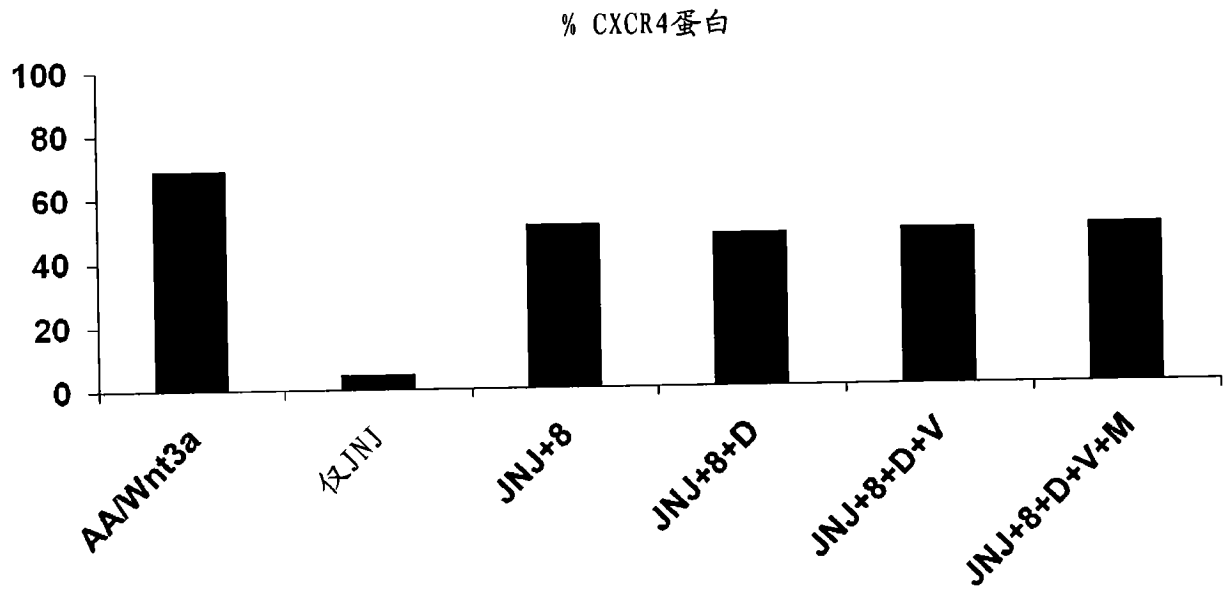


图 25B

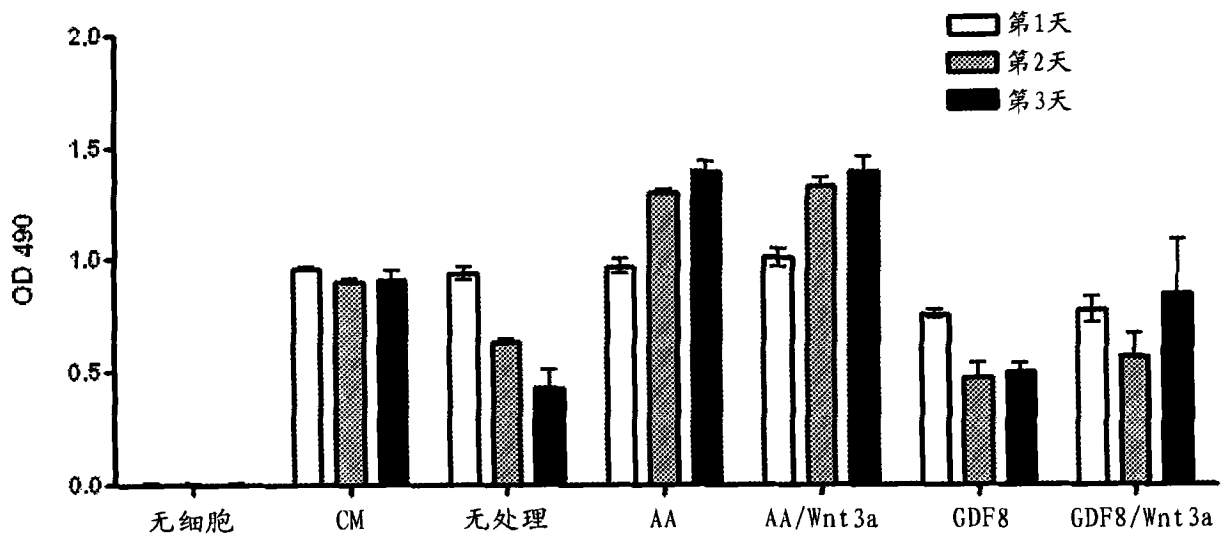


图 26A

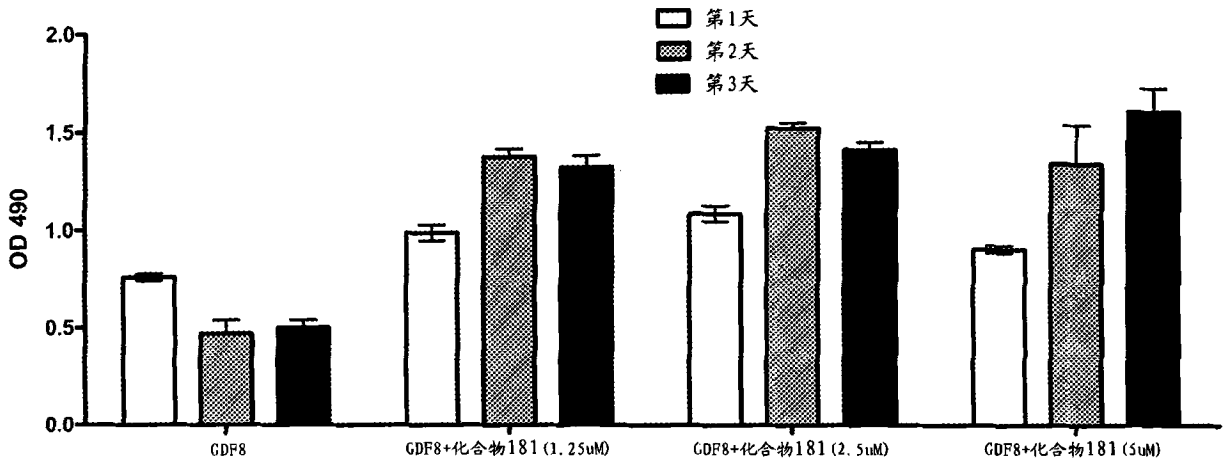


图 26B

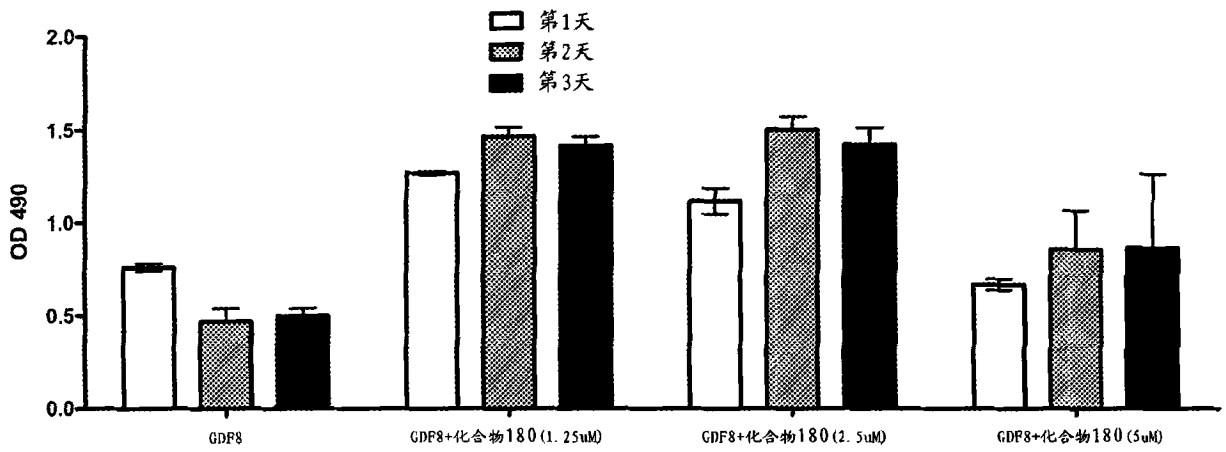


图 26C

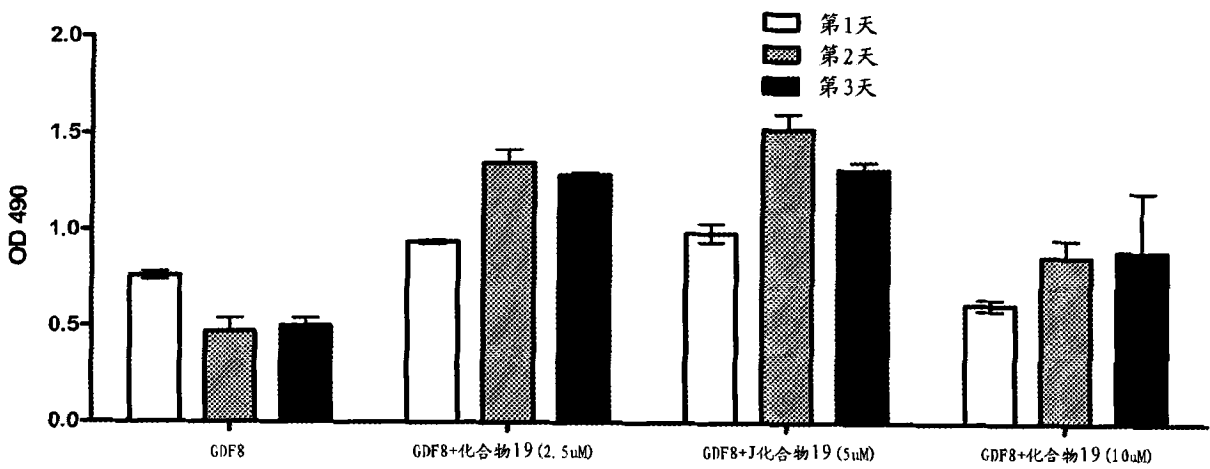


图 26D

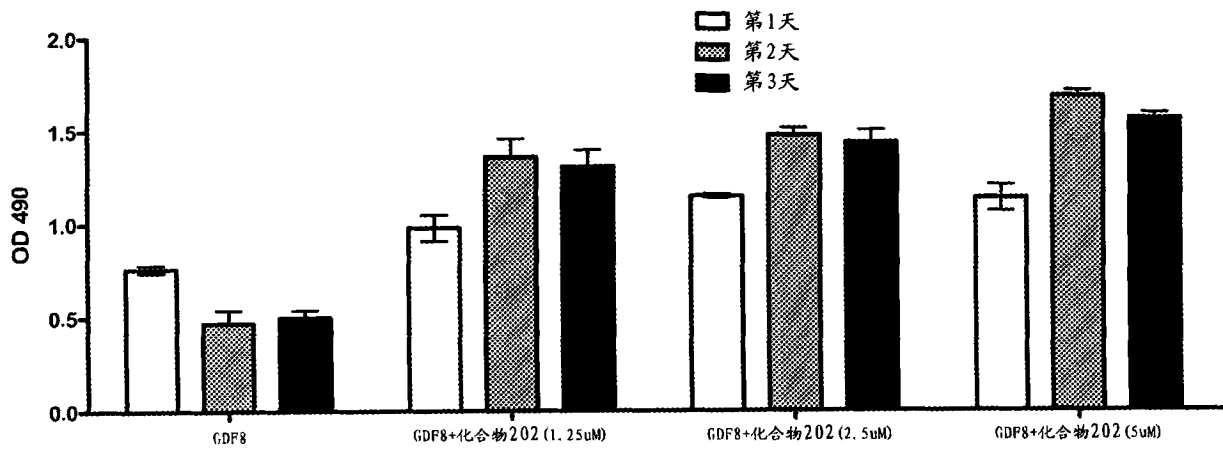


图 26E

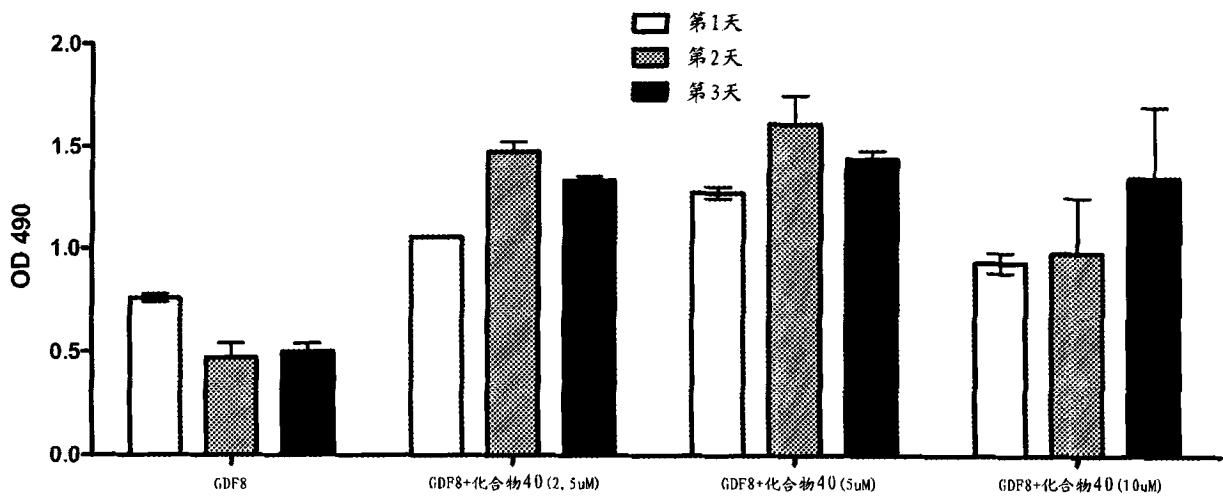


图 26F

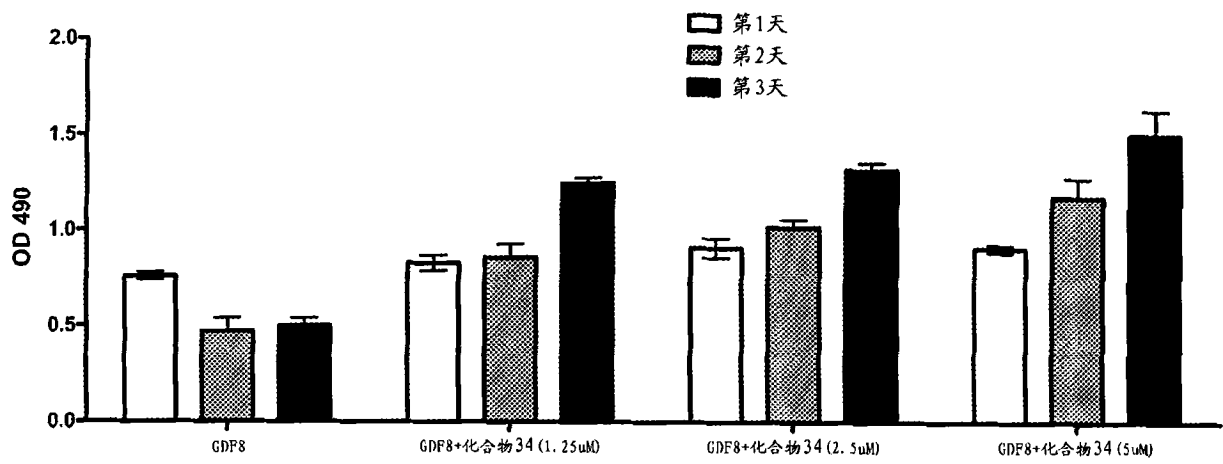


图 26G

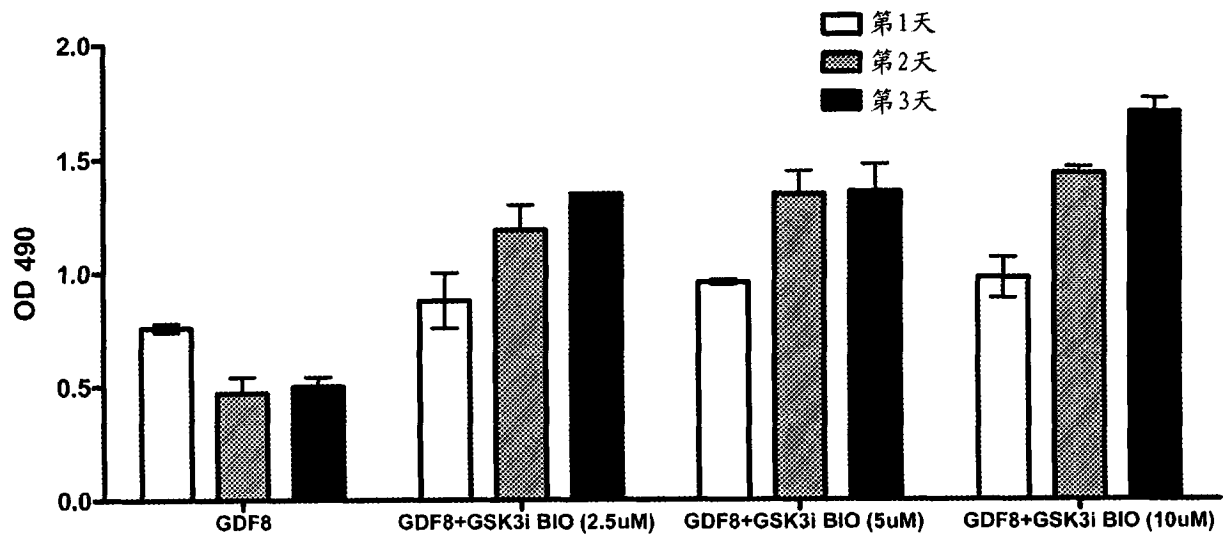


图 26H

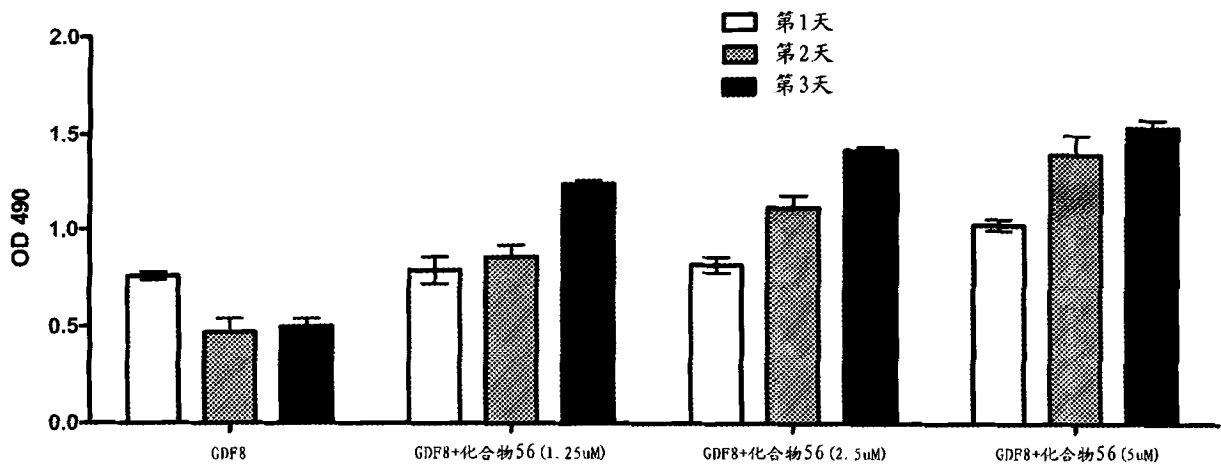


图 26I

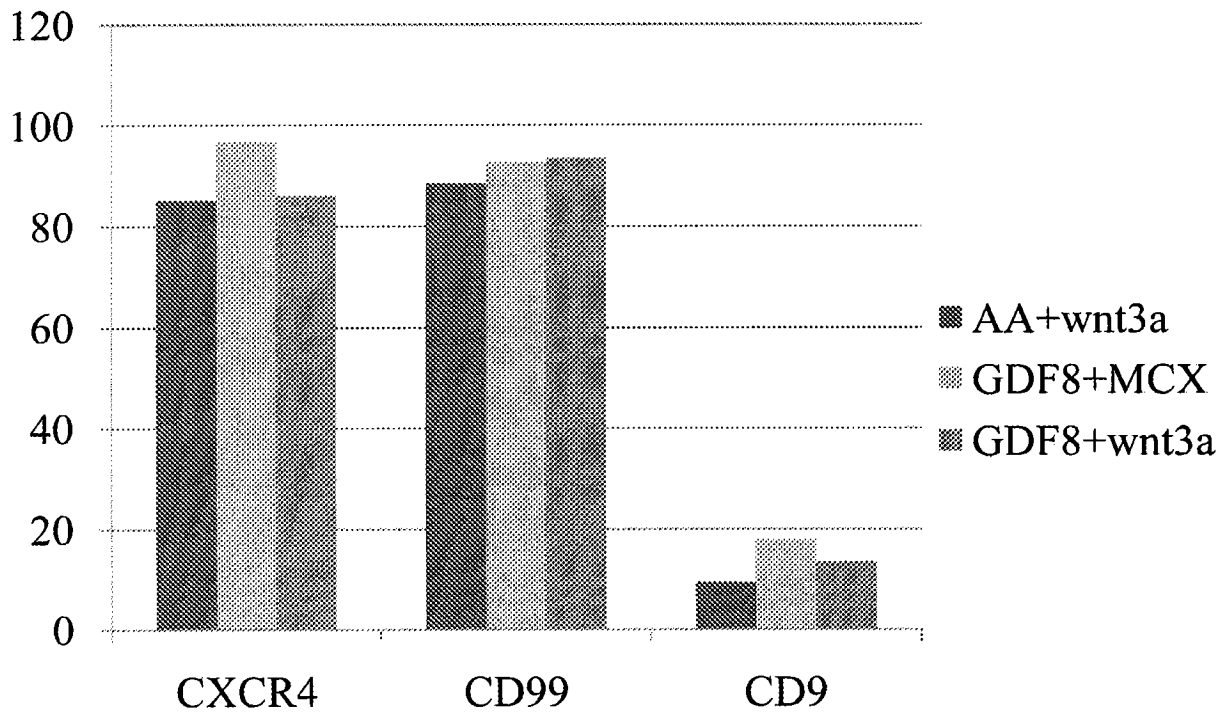


图 27A



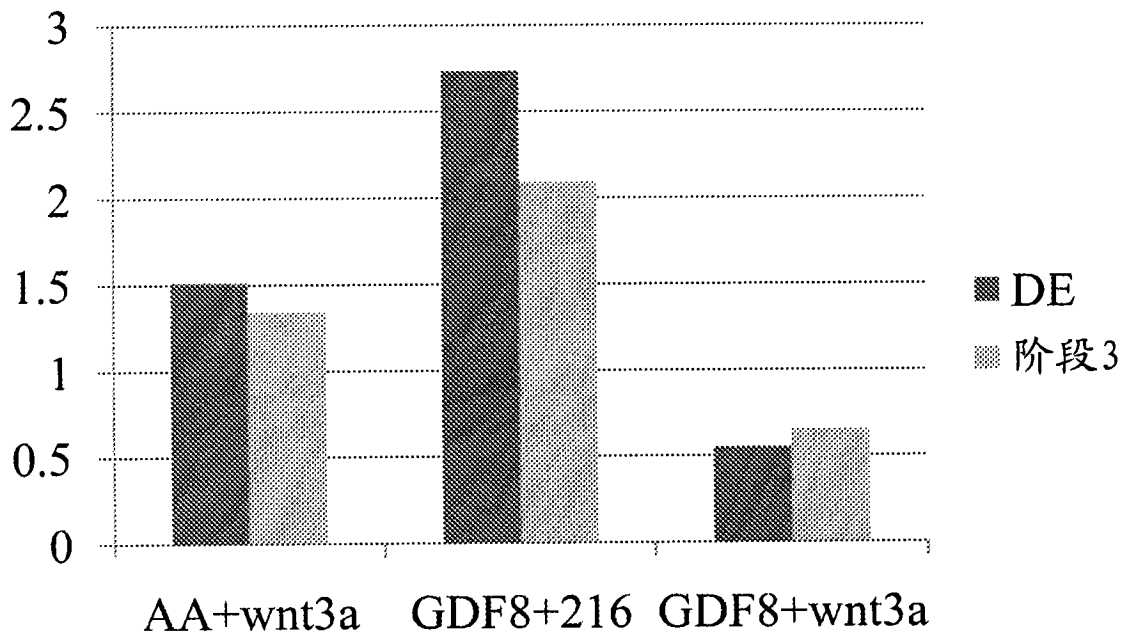


图 27B

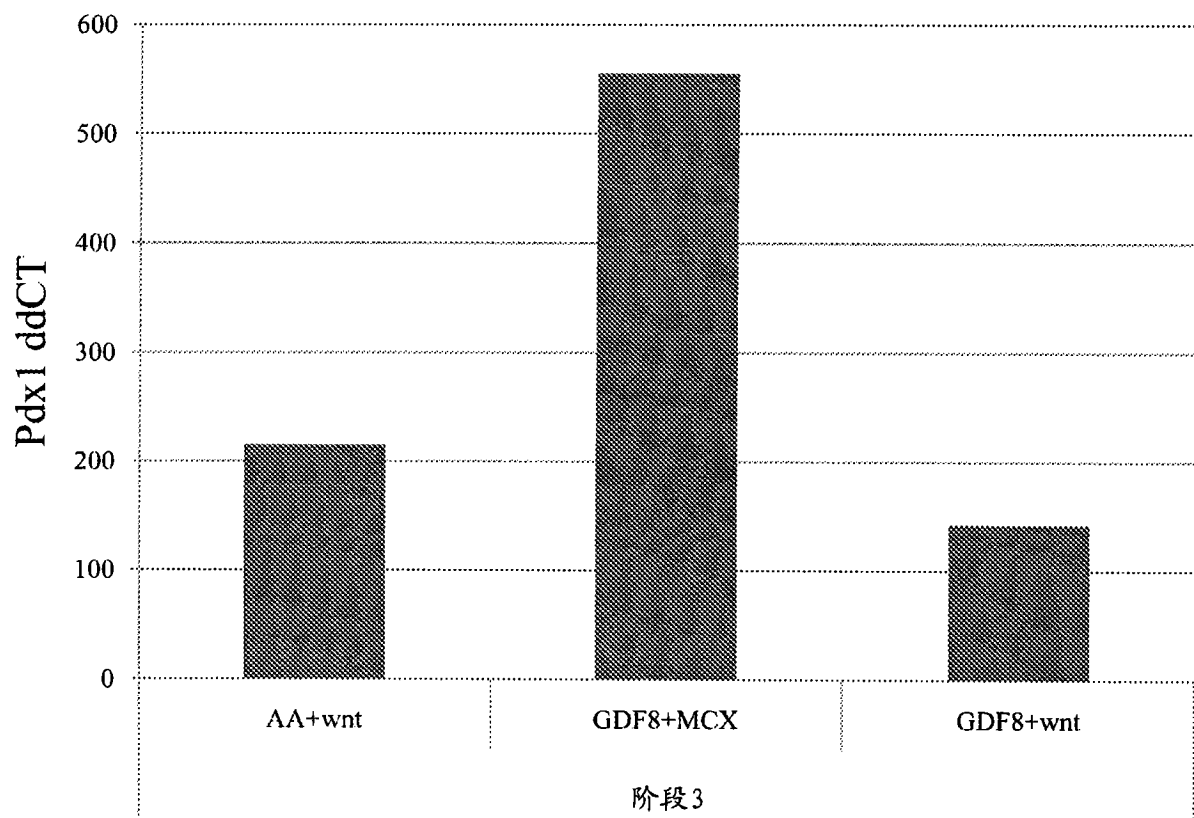


图 27C

阶段3	AA+wnt	GDF8+MCX	GDF8+wnt
Pdx	215	555	142
Cdx2	1614	1567	965
HNF4a	339	210	267

图 27D

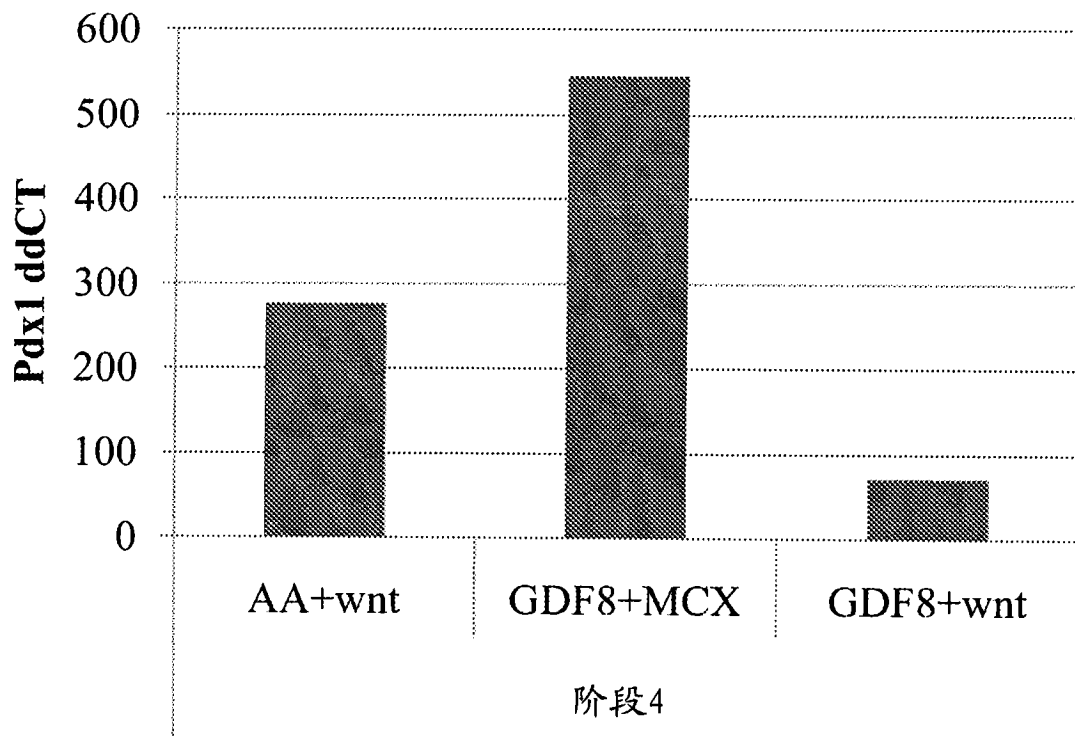


图 27E

阶段4	AA+wnt	GDF8+MCX	GDF8+wnt
Pdx	276	545	71
Cdx2	1971	2496	983
HNF4a	640	426	609

图 27F