



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102586170 B

(45)授权公告日 2019.11.29

(21)申请号 201210020574.6

(22)申请日 2005.07.08

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 102586170 A

(43)申请公布日 2012.07.18

(30)优先权数据  
60/586,566 2004.07.09 US  
60/587,942 2004.07.14 US  
11/021,618 2004.12.23 US  
60/693,364 2005.06.23 US

(62)分案原申请数据  
200580030083.8 2005.07.08

(73)专利权人 维亚希特公司  
地址 美国特拉华州

(72)发明人 凯文·艾伦·达穆尔  
艾伦·D·阿古尼克  
苏珊·埃利泽 依文特·克鲁恩  
伊曼纽尔·E·贝特格

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

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.  
C12N 5/07(2010.01)  
C12N 5/071(2010.01)  
C12Q 1/6888(2018.01)  
C12Q 1/02(2006.01)  
G01N 33/68(2006.01)

(56)对比文件  
WO 03/050249 A2,2003.06.19,  
CN 1439049 A,2003.08.27,  
KUBO A et al.Development of  
definitive endoderm from embryonic stem  
cells in culture.《DEVELOPMENT》.2004,第131  
卷(第7期),1651-1662.

审查员 王莉

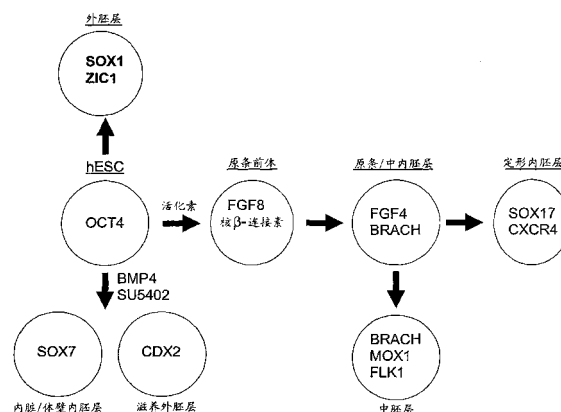
权利要求书2页 说明书74页 附图15页

### (54)发明名称

前原条和中内胚层细胞

### (57)摘要

本发明涉及包含人前原条细胞和/或人中内胚层细胞的组合物及其生产方法。此外,本发明还公开了鉴定可用于进一步分化前原条和中内胚层细胞类型的因子的方法。



1. 细胞培养物, 包含:

包含少于2% (v/v) 血清和100ng/ml活化素A的培养基,

第一体外细胞群, 其包含表达选自OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和SOX1的标志物的细胞, 其中所述第一体外细胞群选自H7和H9; 以及

第二细胞群, 其包含第一体外细胞群的后代细胞, 其中该后代细胞选自中内胚层细胞和前原条细胞, 其中所述中内胚层细胞表达brachyury、FGF4或SNAI1, 以及所述前原条细胞表达FGF8或核定位的 $\beta$ -连接素, 其中所述第二细胞群包含至少5%的所述后代细胞,

其中通过使用人胚胎获得的人细胞被排除在外,

其中所述中内胚层细胞通过在所述培养基中培养第一体外细胞群12至48小时获得; 所述前原条细胞通过在所述培养基中培养第一体外细胞群6至24小时获得, 以及

其中所述中内胚层细胞是能分化为中胚层细胞或定形内胚层细胞的专能细胞; 所述前原条细胞是能分化为中内胚层细胞的专能细胞。

2. 根据权利要求1的细胞培养物, 其中, 所述第二细胞群包含至少90%的所述后代细胞。

3. 根据权利要求1的细胞培养物, 其中, 所述brachyury、FGF4或SNAI1的表达高于OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7或SOX1的表达。

4. 根据权利要求1的细胞培养物, 其中, 所述FGF8或核定位的 $\beta$ -连接素的表达高于brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7或SOX1的表达。

5. 根据权利要求1的细胞培养物, 其中, 所述第二细胞群不含选自内脏内胚层细胞、体壁内胚层细胞、原始内胚层细胞、定形内胚层细胞、外胚层细胞和中胚层细胞的细胞。

6. 一种细胞培养物, 其包含:

包含少于2% (v/v) 血清和100ng/ml活化素A的培养基, 和

选自中内胚层细胞和前原条细胞的细胞, 其中所述细胞来源于选自H7和H9的细胞, 其中所述中内胚层细胞表达brachyury、FGF4或SNAI1, 以及所述前原条细胞表达FGF8或核定位的 $\beta$ -连接素;

其中所述中内胚层细胞通过在所述培养基中培养H7或H9细胞12至48小时获得; 以及所述前原条细胞通过在所述培养基中培养H7或H9细胞6至24小时获得, 和

其中所述中内胚层细胞是能分化为中胚层细胞或定形内胚层细胞的专能细胞; 以及所述前原条细胞是能分化为中内胚层细胞的专能细胞。

7. 一种体外细胞群, 其包含中内胚层细胞, 所述中内胚层细胞是能分化为中胚层细胞或定形内胚层细胞的专能细胞, 其中所述中内胚层细胞来源于选自H7和H9的细胞, 以及所述中内胚层细胞表达brachyury、FGF4或SNAI1, 其中所述中内胚层细胞通过在包含少于2% (v/v) 血清和100ng/ml活化素A的培养基中培养H7或H9细胞12至48小时获得。

8. 根据权利要求7的体外细胞群, 其中, 所述体外细胞群包含至少95%的中内胚层细胞。

9. 一种体外细胞群, 其包含前原条细胞, 所述前原条细胞是能分化为中内胚层细胞的专能细胞, 其中所述前原条细胞来源于选自H7和H9的细胞, 以及所述前原条细胞表达FGF8或核定位的 $\beta$ -连接素, 其中所述前原条细胞通过在包含少于2% (v/v) 血清和100ng/ml活化素A的培养基中培养H7或H9细胞6至24小时获得。

10. 根据权利要求9的体外细胞群,其中,所述体外细胞群包含至少95%的前原条细胞。

11. 一种筛选化合物促进选自中内胚层细胞和前原条细胞的细胞分化能力的方法,所述方法包括如下步骤:

获得包含表达选自brachyury、FGF4和SNAI1的标志物的中内胚层细胞或表达选自FGF8和核定位的 $\beta$ -连接素的标志物的前原条细胞的细胞群,其中在所述细胞群中所述中内胚层细胞或前原条细胞包含至少5%的人细胞,其中所述中内胚层细胞或前原条细胞来源于选自H7和H9的细胞,其中所述中内胚层细胞通过在包含少于2% (v/v) 血清和活化素A的培养基中培养H7或H9细胞12至48小时获得,其中所述前原条细胞通过在包含少于2% (v/v) 血清和100ng/ml活化素A的培养基中培养H7或H9细胞6至24小时获得;以及其中所述中内胚层细胞是能分化为定形内胚层细胞的专能细胞,和所述前原条细胞是能分化为中内胚层细胞的专能细胞;

向所述细胞群提供候选分化因子;

确定所述细胞群中标志物在第一时间点的表达,其中所述第一时间点与向所述细胞群提供所述候选分化因子大致同时或者所述第一时间点在向所述细胞群提供所述候选分化因子之后;

确定所述细胞群中相同标志物在第二时间点的表达,其中所述第二时间点与所述第一时间点之后并且所述第二时间点在向所述细胞群提供所述候选分化因子之后;以及

确定所述细胞群中标志物在所述第二时间点的表达与所述中内胚层细胞或前原条细胞中标志物在第一时间点的表达相比是否增加,其中所述细胞群中所述标志物的表达增加表明所述候选分化因子促进所述中内胚层细胞或前原条细胞的分化。

12. 一种将人胚胎干细胞分化为选自中内胚层细胞和前原条细胞的细胞的方法,包括如下步骤:

在包含100ng/ml活化素A和少于2% (v/v) 血清的培养基中培养表达选自OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和SOX1的标志物的H7或H9的细胞群;

其中所述中内胚层细胞表达brachyury、FGF4或SNAI1,并通过在所述培养基中培养H7或H9细胞12至48小时获得;以及所述前原条细胞表达FGF8或核定位的 $\beta$ -连接素,并通过在所述培养基中培养H7或H9细胞6至24小时获得,以及

其中所述中内胚层细胞是能分化为定形内胚层细胞的专能细胞;以及所述前原条细胞是能分化为中内胚层细胞的专能细胞。

## 前原条和中内胚层细胞

[0001] 本案是申请日为2005年7月8日,中国专利申请号200580030083.8,发明名称为“前原条和中内胚层细胞”的发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及医学和细胞生物学领域。具体地,本发明涉及包含前原条和/或中内胚层细胞的组合物,以及制备、分离和使用这些细胞的方法,其中通过使用人胚胎获得的人细胞被排除在外。

[0003] 发明背景

[0004] 人多能性干细胞(pluripotent stem cell),如胚胎干细胞(ES)和胚胎生殖细胞(EG),于1994年首先从无成纤维细胞饲养层的培养物中分离(Bongso et al.,1994),1997年从含成纤维细胞饲养层的培养物中分离(Hogan,1997)。随后Thomson、Reubinoff和Shamblott建立了采用有丝分裂失活的小鼠饲养层连续培养人ES和EG细胞的方法(Reubinoff et al.,2000;Shamblott et al.,1998;Thomson et al.,1998)。

[0005] 人ES和EG细胞(hESC)为研究人类早期发育和为治疗性干预一些疾病状态(如糖尿病和帕金森氏症)提供了极难得的机会。例如,在采用细胞疗法治疗糖尿病的过程中,使用衍生自hSEC的产生胰岛素的 $\beta$ 细胞会比目前利用来自供者胰腺的细胞治疗糖尿病有很大进步。但目前还不知道如何从hSEC得到产生胰岛素的 $\beta$ 细胞。因此,目前利用来自供者胰腺的胰岛细胞治疗糖尿病的细胞疗法受限于缺乏移植所需的高质量胰岛细胞。对单一I型糖尿病人的细胞治疗需要移植大约 $8 \times 10^8$ 胰岛细胞(Shapiro et al.,2000;Shapiro et al.,2001a;Shapiro et al.,2001b)。一次成功移植所需的胰岛细胞至少需要两个健康供者的器官提供。而人胚胎干细胞为开发用于人类细胞治疗的大量的的高质量分化细胞提供了起始材料的来源。

[0006] 多能性和能够维持hSEC细胞较长时间培养这两个性质使其特别适合用于细胞治疗。多能性是指hESC能够分化为所有3种主要胚层(内胚层,中胚层和外胚层)的衍生物,进而在除胚胎外组织(如胎盘)和生殖细胞外还形成成熟器官的所有体细胞类型的能力。尽管多能性赋予了hSEC特殊的用途,但这个性质也给这些细胞及其衍生物的研究和控制带来挑战。由于在分化hSEC培养基中会产生大量细胞类型,所以大部分细胞类型产生效率很低。而且,成功评价任一指定细胞类型的产生关键取决于定义合适的标志物。高效、定向的分化对hESC的治疗应用非常重要。

[0007] 由此,除完成hESC的高效定向分化外,鉴定可以用于鉴定和/或分离特定细胞的标志物是有利的,该特定细胞处于其从hESC分化出来的最早期阶段。此外,还有利的是鉴定促进这些源自hESC的早期前体细胞向可用于细胞治疗的细胞类型分化的因子。

### 发明内容

[0008] 本发明的实施方案涉及包含人细胞的细胞培养物。这些细胞培养物中,至少约5%的人细胞是前原条细胞(preprimitive streak),其中该前原条细胞是可以分化为中内胚

层细胞的专能细胞 (multipotent cell)。其它实施方案中,培养物中至少约10%到至少约90%的人细胞是前原条细胞。本文所述的某些实施方案中,人饲养细胞也存在于细胞培养物中。这些实施方案中,除饲养细胞外,至少约5%到至少约75%的人细胞是前原条细胞。一些实施方案中,该前原条细胞表达标志物,例如FGF8和/或核定位的 $\beta$ -连接素 ( $\beta$ -catenin)。某些实施方案中,这些标志物中的一种或两种的表达高于brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和/或SOX1的表达。本文所述的其它实施方案中,该细胞培养物基本上不含有内脏内胚层细胞、体壁内胚层细胞、原始内胚层细胞、定形内胚层细胞 (definitive endodermal cell)、外胚层细胞和/或中胚层细胞。

[0009] 关于本发明的某些实施方案,前原条细胞培养物包含多能性人细胞,如人胚胎干细胞 (hESC)。这些实施方案中,细胞培养物中对应每1个hESC存在至少约2个到至少约10个前原条细胞。一些实施方案中,含有人前原条细胞的细胞培养物包含的培养基含有少于约2% (v/v) 到少于约0.2% (v/v) 的血清。优选实施方案中,该细胞培养物包含不含血清或血清替代物的培养基。其它实施方案中,含有人前原条细胞的细胞培养物包含TGF $\beta$ 超家族的Nodal/活化素 (Activin) 亚组的生长因子。优选实施方案中,该生长因子是活化素A。

[0010] 本文所述的其它实施方案涉及包含中内胚层细胞的细胞培养物,其中该中内胚层细胞是可以分化为中胚层或定形内胚层细胞的专能细胞。这些实施方案中,该细胞培养物包含人细胞,其中至少约5%的人细胞是中内胚层细胞。其它实施方案中,培养物中至少约10%到至少约90%的人细胞是中内胚层细胞。本文所述的某些实施方案中,人饲养细胞也存在于细胞培养物中。这些实施方案中,至少约5%到至少约75%的除饲养细胞外的人细胞是中内胚层细胞。一些实施方案中,中内胚层细胞表达标志物,如brachyury、FGF4、和/或SNAI1。某些实施方案中,这些标志物中一种或多种的表达高于OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和/或SOX1的表达。本文所述的其它实施方案中,该细胞培养物基本上不含有内脏内胚层细胞、体壁内胚层细胞、原始内胚层细胞、定形内胚层细胞、外胚层细胞和/或中胚层细胞。

[0011] 关于本发明的某些实施方案,中内胚层细胞培养物包含多能性人细胞,如人胚胎干细胞 (hESC)。这些实施方案中,细胞培养物中对应每1个hESC存在至少约2个到至少约10个中内胚层细胞。一些实施方案中,含有人中内胚层细胞的细胞培养物包含的培养基含有少于约2% (v/v) 到少于约0.2% (v/v) 的血清。优选实施方案中,该细胞培养物包含不含血清或血清替代物的培养基。其它实施方案中,含有人中内胚层细胞的细胞培养物包含TGF $\beta$ 超家族的Nodal/活化素亚组的生长因子。优选实施方案中,该生长因子是活化素A。

[0012] 本文所述其它实施方案涉及包含特定细胞的细胞群,该特定细胞中至少约90%是人前原条细胞。这些实施方案中,该前原条细胞是可以分化为中内胚层细胞的专能细胞。其它实施方案中,该细胞群中至少约95%到至少约98%的人细胞是前原条细胞。一些实施方案中,前原条细胞表达标志物,如FGF8和/或核定位的 $\beta$ -连接素。某些实施方案中,这两个标志物中一种或两种的表达高于brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和/或SOX1的表达。本文所述的其它实施方案中,该细胞群基本上不含有内脏内胚层细胞、体壁内胚层细胞、原始内胚层细胞、定形内胚层细胞、外胚层细胞和/或中胚层细胞。

[0013] 本文所述其它实施方案涉及包含特定细胞的细胞群,该特定细胞中至少约90%是人中内胚层细胞。这些实施方案中,该中内胚层细胞是可以分化为中胚层细胞和/或定形内胚层细胞的专能细胞。其它实施方案中,该细胞群中至少约95%到至少约98%的人细胞是中

内胚层细胞。一些实施方案中,中内胚层细胞表达标志物,如brachyury、FGF4、和/或SNAI1。某些实施方案中,这些标志物中一种或多种的表达高于OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和/或SOX1的表达。本文所述的其它实施方案中,该细胞培养物基本上不含有内脏内胚层细胞、体壁内胚层细胞、原始内胚层细胞、定形内胚层细胞、外胚层细胞和/或中胚层细胞。

[0014] 本文所述其它实施方案涉及生产前原条细胞的方法。这些方法中,获得包含诸如hESC的多能性人细胞的细胞群。该细胞群中的多能性人细胞在包含少于约2%血清和至少一种TGF $\beta$ 超家族的生长因子的培养基中分化,其中培养基中存在的生长因子的量足以促进至少一部分所述多能性细胞向前原条细胞分化,该前原条细胞是专能的并且可以分化为中内胚层细胞。一些实施方案包括其它步骤,其包含给予足够的时间使前原条细胞形成,其中通过检测所述细胞群中前原条细胞的存在来确定所述足够使前原条细胞形成的时长。一些实施方案中,该足够时长是至少约6小时。其它实施方案中,检测细胞群中前原条细胞的存在包括检测细胞群的细胞中至少一种选自FGF8和核定位的 $\beta$ -连接素的标志物和至少一种选自brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和SOX1的标志物的表达,其中所述前原条细胞中,选自FGF8和核定位的 $\beta$ -连接素中的标志物的表达高于选自brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和SOX1中的标志物的表达。这些实施方案中,标志物检测可以通过定量聚合酶链式反应(Q-PCR)、免疫细胞化学或其它类似方法。

[0015] 关于本文所述的某些方法,培养物中至少约5%到至少约90%的人细胞分化为前原条细胞。本文所述方法的一些实施方案中,培养基中存在的生长因子是TGF $\beta$ 超家族的Nodal/活化素亚组的生长因子。优选实施方案中,该生长因子是活化素A。其它优选的实施方案中,该生长因子在培养基中存在的浓度范围为从至少约10ng/ml到至少约1000ng/ml。某些实施方案中,约6小时、12小时或18小时后撤除该生长因子。其它实施方案中,培养基包含少于约1% (v/v) 到少于约0.2% (v/v) 的血清。其它实施方案中,培养基是低血清RPMI。其它实施方案中,细胞群在缺乏血清或缺乏血清替代物下分化。

[0016] 本文所述其它方法是生产中内胚层细胞的方法。这些方法中,获得包含诸如hESC的多能性人细胞的细胞群。该细胞群中的多能性人细胞在包含少于约2%血清和至少一个TGF $\beta$ 超家族的生长因子的培养基中分化,其中培养基中存在的生长因子的量足以促进至少一部分所述多能性细胞向中内胚层细胞分化,该中内胚层细胞是专能的并且可以分化为中胚层细胞和/或定形内胚层细胞。一些实施方案包括其它步骤,其包含给予足够的时间使中内胚层细胞形成,其中通过检测所述细胞群中中内胚层细胞的存在来确定所述使中内胚层细胞形成的足够时长。一些实施方案中,该足够时长是至少约24小时。其它实施方案中,检测细胞群中中内胚层细胞的存在包含检测细胞群的细胞中至少一种选自brachyury、FGF4和/或SNAI1的标志物和至少一种选自OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和/或SOX1的标志物的表达,其中所述中内胚层细胞中,选自brachyury、FGF4和/或SNAI1中的标志物的表达高于选自OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和/或SOX1中的标志物的表达。这些实施方案中,标志物检测可以通过定量聚合酶链式反应(Q-PCR)、免疫细胞化学或其它类似方法。

[0017] 关于本文所述的某些方法,培养物中至少约5%到至少约90%的人细胞分化为中内胚层细胞。本文所述方法的一些实施方案中,培养基中存在的生长因子是TGF $\beta$ 超家族的Nodal/活化素亚组的生长因子。优选实施方案中,该生长因子是活化素A。其它优选的实施方案中,该生长因子在培养基中存在的浓度范围为从至少约10ng/ml到至少约1000ng/ml。

某些实施方案中,约24小时、36小时或48小时后撤除该生长因子。其它实施方案中,培养基包含少于约1% (v/v) 到少于约0.2% (v/v) 的血清。其它实施方案中,培养基是低血清RPMI。其它实施方案中,细胞群在缺乏血清或血清替代物下分化。

[0018] 本文所述的其它实施方案涉及产生富集前原条细胞的细胞群的方法。这些方法包括步骤 (a) 获得诸如hESC的多能性细胞群,其中该多能细胞群中至少一个细胞包含置于FGF8启动子控制下的编码绿色荧光蛋白 (GFP) 的核酸序列或其生物活性片段的拷贝, (b) 分化该多能性细胞以便生产前原条细胞,该前原条细胞为可以分化为中内胚层细胞的专能细胞,以及 (c) 从不表达GFP的细胞中分离前原条细胞。一些实施方案中,该细胞群包含至少约95%到至少约98%的前原条细胞。一些实施方案中,本文所述方法的分化步骤包含向多能细胞群提供至少一种TGF $\beta$ 超家族的生长因子,如活化素A。活化素A的优选浓度范围从至少约50ng/ml到至少约500ng/ml。其它实施方案中,该细胞群在包含少于约1% (v/v) 到少于约0.1% (v/v) 的血清的培养基中分化。其它实施方案中,该培养基是低血清RPMI。其它实施方案中,该细胞群在缺乏血清或血清替代物下分化。

[0019] 本文所述其它实施方案涉及生产富集中内胚层细胞的细胞群的方法。这些方法包括步骤 (a) 获得诸如hESC的多能性细胞群,其中该多能细胞群中至少一个细胞包含置于brachyury、FGF4和/或SNAI1启动子控制下的编码绿色荧光蛋白 (GFP) 的核酸序列的拷贝或生物活性片段, (b) 分化该多能细胞以便生产中内胚层细胞,该中内胚层细胞为可以分化为中胚层细胞和/或定形内胚层细胞的专能细胞,以及 (c) 从不表达GFP的细胞中分离中内胚层细胞。一些实施方案中,该细胞群包含至少约95%到至少约98%的中内胚层细胞。一些实施方案中,本文所述方法的分化步骤包含向多能细胞群提供至少一个TGF $\beta$ 超家族的生长因子,如活化素A。活化素A的优选浓度范围从至少约50ng/ml到至少约500ng/ml。其它实施方案中,该细胞群在包含少于约1% (v/v) 到少于约0.1% (v/v) 的血清的培养基中分化。其它实施方案中,该培养基是低血清RPMI。其它实施方案中,该细胞群在缺乏血清或血清替代物下分化。

[0020] 本发明的一些实施方案是鉴定分化因子的筛选方法,该分化因子能够促进包含人细胞的细胞群中的前原条细胞的分化。这些方法包括步骤 (a) 获得包含人前原条细胞的细胞群, (b) 向该细胞群提供候选分化因子, (c) 确定细胞群中标志物在第一时间点的表达,确定该细胞群中相同标志物在第二时间点的表达,其中第二时间点在第一时间点之后,并且第二时间点在向该细胞群提供候选分化因子之后, (d) 以及确定与该标志物在细胞群中第一时间点的表达相比,其在细胞群中第二时间点的表达是否增加或减少,其中标志物在细胞群中的表达的增加或减少表明该候选分化因子能够促进前原条细胞的分化。某些实施方案中,第一时间点在向细胞群提供候选分化因子之前或大致同时。其它实施方案中,第一时间点在向细胞群提供候选分化因子之后。本文所述筛选方法的一些实施方案中,该人前原条细胞响应候选分化因子分化为特定细胞,如中内胚层细胞、中胚层细胞和/或定形内胚层细胞。一些实施方案中,中内胚层由诸如brachyury、FGF4和/或SNAI1的标志物的表达表明。其它实施方案中,中胚层由诸如FOXF1、FLK1、BMP4、MOX1和SDF1的标志物的表达表明。其它实施方案中,定形内胚层由诸如CXCR4和/或SOX17的标志物的表达表明。

[0021] 关于本文所述筛选方法,某些实施方案涉及提供候选分化因子,如至少一种TGF $\beta$ 超家族的生长因子,如活化素A。其它实施方案中,该候选分化因子是小分子或多肽。其它实

施方案中,该候选分化因子不是TGF $\beta$ 超家族的因子。其它实施方案中,该候选分化因子是未知能造成前原条细胞分化的因子。

[0022] 本文所述的其它实施方案是鉴定能够促进包含人细胞的细胞群中中内胚层细胞分化的分化因子的筛选方法。此类方法包含步骤(a)获得包含人中内胚层细胞的细胞群,(b)向该细胞群提供候选分化因子,(c)确定该细胞群中标志物在第一时间点的表达,确定该细胞群中相同标志物在第二时间点的表达,其中第二时间点在第一时间点之后,并且第二时间点在向该群提供候选分化因子之后,(d)以及确定与该标志物在细胞群中第一时间点的表达相比,其在细胞群中第二时间点的表达是否增加或减少,其中标志物在细胞群中的表达的增加或减少表明该候选分化因子能够促进中内胚层细胞的分化。某些实施方案中,第一时间点在向细胞群提供候选分化因子之前或大致同时。其它实施方案中,第一时间点在向细胞群提供候选分化因子之后。本文所述筛选方法的一些实施方案中,该人中内胚层细胞响应候选分化因子分化为特定细胞,如中胚层细胞和/或定形内胚层细胞。一些实施方案中,中胚层由诸如FOXF1、FLK1、BMP4、MOX1和SDF1的标志物的表达表明。其它实施方案中,定形内胚层由诸如CXCR4和/或SOX17的标志物的表达表明。

[0023] 关于本文所述筛选方法,某些实施方案涉及提供候选分化因子,如至少一种TGF $\beta$ 超家族的生长因子,如活化素A。其它实施方案中,该候选分化因子是小分子或多肽。其它实施方案中,该候选分化因子不是TGF $\beta$ 超家族的因子。其它实施方案中,该候选分化因子是未知能造成中内胚层细胞分化的因子。

[0024] 其它实施方案涉及在体外提高人胚胎干细胞(hESC)中FGF8基因产物的表达的方法。该方法包括在包含少于约2%(v/v)血清的培养基中获得hESC,并且使该hESC接触特定量的分化因子,该特定量足以增加FGF8基因产物的表达。一些实施方案中,该分化因子是至少一种TGF $\beta$ 超家族的生长因子,如活化素A。一些实施方案中,该培养基不包含血清替代物。

[0025] 其它实施方案涉及在体外提高人胚胎干细胞(hESC)中选自brachyury、FGF4和SNAI1的基因产物的表达的方法。所述方法包括在包含少于约2%(v/v)血清的培养基中获得hESC,并且使该hESC接触特定量的分化因子,该特定量足以增加选自brachyury、FGF4和SNAI1的基因产物的表达。一些实施方案中,该分化因子是至少一种TGF $\beta$ 超家族的生长因子,如活化素A。一些实施方案中,该培养基不包含血清替代物。

[0026] 本文所述的一些实施方案涉及包含人胚胎干细胞(hESC)和含有少于约2%(v/v)血清的培养基的细胞培养物,其中该hESC从特定参考时间点开始分化,与该hESC的基线FGF8mRNA表达相比,距所述参考时间点约6小时时FGF8mRNA的表达显著上调。一些实施方案中,距该参考时间点约17小时 $\beta$ -连接素多肽的表达开始向细胞核定位。其它实施方案中,距该参考时间点约24小时brachyury、FGF4和/或SNAI1mRNA的表达显著上调。其它实施方案中,距该参考时间点约12小时时E-钙粘着素(E-cadherin)mRNA的表达开始下调。此外,一些实施方案中,距该参考时间点约48小时时SOX17mRNA的表达显著上调和/或距该参考时间点约96小时时FOXA2mRNA的表达显著上调。本文所述细胞培养物的某些实施方案中,该培养基包含少于约1%(v/v)到少于约0.2%(v/v)的血清。其它实施方案中,该培养基包含约0%(v/v)的血清。其它实施方案中,该培养基不包含血清替代物。

[0027] 本文所述的其它实施方案涉及包含人胚胎干细胞、TGF $\beta$ 超家族的分化因子和含有少于约2%(v/v)血清的培养基的细胞培养物,其中第一套标志物基因在第二套和/或第三套



标志物基因的上调或峰值表达之前或大致同时上调或下调。

[0028] 其它实施方案涉及分化细胞培养物中细胞的方法,通过使包含人胚胎干细胞的细胞培养物与包含少于约2%血清的培养基接触、向该hESC提供TGF $\beta$ 超家族的分化因子、以及允许hESC分化的发生。一些实施方案中,该方法产生特定细胞,该细胞中第一套标志物基因在第二套和/或第三套标志物基因的上调或峰值表达之前或大约同时上调或下调。一些实施方案中,该培养基不包含血清或血清替代物。

[0029] 一些权限中,术语“包含”可能不具有任何通常所接受的定义。此处使用的术语“包含”是开放式的,可以包括任何其他元素。考虑到这一点,本发明的其他实施方案参考以下编号的段落进行描述:

[0030] 1. 包含人细胞的细胞培养物,其中至少约5%的所述人细胞是前原条细胞,所述前原条细胞是能分化为中内胚层细胞的专能细胞。

[0031] 2. 段落1的细胞培养物,其中至少约10%的所述人细胞是前原条细胞。

[0032] 3. 段落1的细胞培养物,其中至少约20%的所述人细胞是前原条细胞。

[0033] 4. 段落1的细胞培养物,其中至少约30%的所述人细胞是前原条细胞。

[0034] 5. 段落1的细胞培养物,其中至少约40%的所述人细胞是前原条细胞。

[0035] 6. 段落1的细胞培养物,其中至少约50%的所述人细胞是前原条细胞。

[0036] 7. 段落1的细胞培养物,其中至少约60%的所述人细胞是前原条细胞。

[0037] 8. 段落1的细胞培养物,其中至少约70%的所述人细胞是前原条细胞。

[0038] 9. 段落1的细胞培养物,其中至少约80%的所述人细胞是前原条细胞。

[0039] 10. 段落1的细胞培养物,其中至少约90%的所述人细胞是前原条细胞。

[0040] 11. 段落1的细胞培养物,其中所述培养物中存在人饲养细胞,并且其中至少约5%的除所述人饲养细胞外的人细胞是前原条细胞。

[0041] 12. 段落1的细胞培养物,其中所述培养物中存在人饲养细胞,并且其中至少约25%的除所述人饲养细胞外的人细胞是前原条细胞。

[0042] 13. 段落1的细胞培养物,其中所述培养物中存在人饲养细胞,并且其中至少约50%的除所述人饲养细胞外的人细胞是前原条细胞。

[0043] 14. 段落1的细胞培养物,其中所述培养物中存在人饲养细胞,并且其中至少约75%的除所述人饲养细胞外的人细胞是前原条细胞。

[0044] 15. 段落1的细胞培养物,其中所述前原条细胞表达选自FGF8和核定位的 $\beta$ -连接素的标志物。

[0045] 16. 段落15的细胞培养物,其中所述前原条细胞中选自FGF8和核定位的 $\beta$ -连接素的标志物的表达高于选自brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和SOX1的标志物的表达。

[0046] 17. 段落15的细胞培养物,其中所述前原条细胞不显著表达选自brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和SOX1的标志物。

[0047] 18. 段落1的细胞培养物,其中所述前原条细胞表达FGF8和核定位的 $\beta$ -连接素。

[0048] 19. 段落18的细胞培养物,其中所述前原条细胞中FGF8和细胞核定位的 $\beta$ 连接素的表达高于brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和SOX1的表达。

[0049] 20. 段落18的细胞培养物,其中所述前原条细胞不显著表达brachyury、FGF4、

SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和SOX1。

[0050] 21.段落1的细胞培养物,其中所述细胞培养物基本上不含有选自内脏内胚层细胞、体壁内胚层细胞、原始内胚层细胞、定形内胚层细胞、外胚层细胞和中胚层细胞的细胞。

[0051] 22.段落1的细胞培养物,还包含人胚胎干细胞(hESC)。

[0052] 23.段落22的细胞培养物,其中所述细胞培养物中对应约每一个hESC存在至少约2个前原条细胞。

[0053] 24.段落22的细胞培养物,其中所述细胞培养物中对应约每一个hESC存在至少约10个前原条细胞。

[0054] 26.段落1的细胞培养物,还包含含有少于约2%(v/v)血清的培养基。

[0055] 27.段落1的细胞培养物,还包含含有少于约1%(v/v)血清的培养基。

[0056] 28.段落1的细胞培养物,还包含含有少于约0.5%(v/v)血清的培养基。

[0057] 29.段落1的细胞培养物,还包含含有少于约0.2%(v/v)血清的培养基。

[0058] 30.段落1的细胞培养物,还包含不含血清或血清替代物的培养基。

[0059] 31.段落1的细胞培养物,还包含TGF $\beta$ 超家族的Nodal/活化素亚组的生长因子。

[0060] 32.段落31的细胞培养物,其中所述TGF $\beta$ 超家族的Nodal/活化素亚组的生长因子包括活化素A。

[0061] 33.包含人细胞的细胞培养物,其中至少约5%的所述人细胞是中内胚层细胞,所述中内胚层细胞是能分化为中胚层细胞或定形内胚层细胞的专能细胞。

[0062] 34.段落33的细胞培养物,其中至少约10%的所述人细胞是中内胚层细胞。

[0063] 35.段落33的细胞培养物,其中至少约20%的所述人细胞是中内胚层细胞。

[0064] 36.段落33的细胞培养物,其中至少约30%的所述人细胞是中内胚层细胞。

[0065] 37.段落33的细胞培养物,其中至少约40%的所述人细胞是前原条细胞。

[0066] 38.段落33的细胞培养物,其中至少约50%的所述人细胞是中内胚层细胞。

[0067] 39.段落33的细胞培养物,其中至少约60%的所述人细胞是中内胚层细胞。

[0068] 40.段落33的细胞培养物,其中至少约70%的所述人细胞是中内胚层细胞。

[0069] 41.段落33的细胞培养物,其中至少约80%的所述人细胞是中内胚层细胞。

[0070] 42.段落33的细胞培养物,其中至少约90%的所述人细胞是中内胚层细胞。

[0071] 43.段落33的细胞培养物,其中所述培养物中存在人饲养细胞,并且其中至少约5%的除所述人饲养细胞外的人细胞是中内胚层细胞。

[0072] 44.段落33的细胞培养物,其中所述培养物中存在人饲养细胞,并且其中至少约25%的除所述人饲养细胞外的人细胞是中内胚层细胞。

[0073] 45.段落33的细胞培养物,其中所述培养物中存在人饲养细胞,并且其中至少约50%的除所述人饲养细胞外的人细胞是中内胚层细胞。

[0074] 46.段落33的细胞培养物,其中所述培养物中存在人饲养细胞,并且其中至少约75%的除所述人饲养细胞外的人细胞是中内胚层细胞。

[0075] 47.段落33的细胞培养物,其中所述中内胚层细胞表达选自brachyury、FGF4和SNAI1的标志物。

[0076] 48.段落47的细胞培养物,其中所述中内胚层细胞中选自brachyury、FGF4和SNAI1的标志物的表达高于选自OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和SOX1的标志物的表达。

- [0077] 49.段落47的细胞培养物,其中所述中内胚层细胞不显著表达选自OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和SOX1的标志物。
- [0078] 50.段落33的细胞培养物,其中所述中内胚层细胞表达brachyury、FGF4和SNAI1。
- [0079] 51.段落51的细胞培养物,其中所述中内胚层细胞中brachyury、FGF4和SNAI1的表达高于OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和SOX1的表达。
- [0080] 52.段落51的细胞培养物,其中所述中内胚层细胞不显著表达OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和SOX1。
- [0081] 53.段落33的细胞培养物,其中所述细胞培养物基本上不含选自内脏内胚层细胞、体壁内胚层细胞、原始内胚层细胞、定形内胚层细胞、外胚层细胞和中胚层细胞的细胞。
- [0082] 54.段落33的细胞培养物,还包含人胚胎干细胞(hESC)。
- [0083] 55.段落54的细胞培养物,其中所述细胞培养物中对应约每一个hESC存在至少约2个中内胚层细胞。
- [0084] 56.段落54的细胞培养物,其中所述细胞培养物中对应约每一个hESC存在至少约10个中内胚层细胞。
- [0085] 58.段落33的细胞培养物,还包含含有少于约2%(v/v)血清的培养基。
- [0086] 59.段落33的细胞培养物,还包含含有少于约1%(v/v)血清的培养基。
- [0087] 60.段落33的细胞培养物,还包含含有少于约0.5%(v/v)血清的培养基。
- [0088] 61.段落33的细胞培养物,还包含含有少于约0.2%(v/v)血清的培养基。
- [0089] 62.段落33的细胞培养物,还包含不含血清或血清替代物的培养基。
- [0090] 63.段落33的细胞培养物,还包含TGF $\beta$ 超家族的Nodal/活化素亚组的生长因子。
- [0091] 64.段落63的细胞培养物,其中所述TGF $\beta$ 超家族的Nodal/活化素亚组的生长因子包含活化素A。
- [0092] 65.包含细胞的细胞群,其中至少约90%的所述细胞是人前原条细胞,所述前原条细胞是能分化为中内胚层细胞的专能细胞。
- [0093] 66.段落65的细胞群,其中至少约95%的所述细胞是人前原条细胞。
- [0094] 67.段落65的细胞群,其中至少约98%的所述细胞是人前原条细胞。
- [0095] 68.段落65的细胞群,其中所述人前原条细胞表达选自FGF8和核定位的 $\beta$ -连接素的标志物。
- [0096] 69.段落68的细胞群,其中所述人前原条细胞中选自FGF8和核定位的 $\beta$ -连接素的标志物的表达高于选自brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和SOX1的标志物的表达。
- [0097] 70.段落68的细胞群,其中所述人前原条细胞不显著表达选自brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和SOX1的标志物。
- [0098] 71.段落65的细胞群,其中所述人前原条细胞表达FGF8和核定位的 $\beta$ -连接素。
- [0099] 72.段落71的细胞群,其中所述人前原条细胞中FGF8和核定位的 $\beta$ -连接素的表达高于brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和SOX1的表达。
- [0100] 73.段落71的细胞群,其中所述人前原条细胞不显著表达brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和SOX1。
- [0101] 74.包含细胞的细胞群,其中至少约90%的所述细胞是人中内胚层细胞,所述中内

胚层细胞是能分化为中胚层细胞或定形内胚层细胞的专能细胞。

[0102] 75.段落74的细胞群,其中至少约95%的所述细胞是人中内胚层细胞。

[0103] 76.段落74的细胞群,其中至少约98%的所述细胞是人中内胚层细胞。

[0104] 77.段落74的细胞群,其中所述人中内胚层细胞表达选自brachyury、FGF4和SNAI1的标志物。

[0105] 78.段落77的细胞群,其中所述人中内胚层细胞中选自brachyury、FGF4和SNAI1的标志物的表达高于选自OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和SOX1的标志物的表达。

[0106] 79.段落77的细胞群,其中所述人中内胚层细胞不显著表达选自OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和SOX1的标志物。

[0107] 80.段落74的细胞群,其中所述人中内胚层细胞表达brachyury、FGF4和SNAI1。

[0108] 81.段落77的细胞群,其中所述人中内胚层细胞中brachyury、FGF4和SNAI1的表达高于OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和SOX1的表达。

[0109] 82.段落77的细胞群,其中所述人中内胚层细胞不显著表达OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和SOX1。

[0110] 83.产生前原条细胞的方法,所述方法包括获得含有多能性人细胞的细胞群和在含有少于约2%的血清和至少一种TGF $\beta$ 超家族的生长因子的培养基中分化所述多能性人细胞的步骤,其中所述生长因子以足以促进至少一部分所述多能性细胞分化为前原条细胞的量存在于所述培养基中,所述前原条细胞是能分化为中内胚层细胞的专能细胞。

[0111] 84.段落83的方法,还包括给予足够时间让前原条细胞形成,其中所述让前原条细胞形成的足够时间通过检测前原条细胞在所述细胞群中的存在来确定。

[0112] 85.段落84的方法,其中足够时间为最少约6小时。

[0113] 86.段落84的方法,其中检测前原条细胞在所述细胞群中的存在包括检测所述细胞群细胞中至少一种选自FGF8和核定位的 $\beta$ -连接素的标志物和至少一种选自brachyury、FGF4、SNAI1、FOXA2、SOX7和SOX1的标志物的表达,其中所述前原条细胞中选自FGF8和核定位的 $\beta$ -连接素的标志物的表达高于选自brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和SOX1的标志物的表达。

[0114] 87.段落86的方法,其中通过定量聚合酶链式反应(Q-PCR)确定至少一种所述标志物的表达。

[0115] 88.段落86的方法,其中通过免疫细胞化学确定至少一种所述标志物的表达。

[0116] 89.段落83的方法,其中至少约5%的所述多能性人细胞分化为前原条细胞。

[0117] 90.段落83的方法,其中至少约10%的所述多能性人细胞分化为前原条细胞。

[0118] 91.段落83的方法,其中至少约20%的所述多能性人细胞分化为前原条细胞。

[0119] 92.段落83的方法,其中至少约30%的所述多能性人细胞分化为前原条细胞。

[0120] 93.段落83的方法,其中至少约40%的所述多能性人细胞分化为前原条细胞。

[0121] 94.段落83的方法,其中至少约50%的所述多能性人细胞分化为前原条细胞。

[0122] 95.段落83的方法,其中至少约60%的所述多能性人细胞分化为前原条细胞。

[0123] 96.段落83的方法,其中至少约70%的所述多能性人细胞分化为前原条细胞。

[0124] 97.段落83的方法,其中至少约80%的所述多能性人细胞分化为前原条细胞。

[0125] 98.段落83的方法,其中至少约90%的所述多能性人细胞分化为前原条细胞。

- [0126] 99.段落83的方法,其中所述至少一种生长因子属于TGF $\beta$ 超家族的Nodal/活化素亚组。
- [0127] 100.段落99的方法,其中所述至少一种属于TGF $\beta$ 超家族的Nodal/活化素亚组的生长因子包含活化素A。
- [0128] 101.段落83的方法,其中所述至少一种生长因子以至少约10ng/ml的浓度提供。
- [0129] 102.段落83的方法,其中所述至少一种生长因子以至少约100ng/ml的浓度提供。
- [0130] 103.段落83的方法,其中所述至少一种生长因子以至少约500ng/ml的浓度提供。
- [0131] 104.段落83的方法,其中所述至少一种生长因子以至少约1000ng/ml的浓度提供。
- [0132] 105.段落83的方法,其中在约6小时后撤除所述至少一种生长因子。
- [0133] 106.段落83的方法,其中在约12小时后撤除所述至少一种生长因子。
- [0134] 107.段落83的方法,其中在约18小时后撤除所述至少一种生长因子。
- [0135] 108.段落83的方法,其中所述细胞群在含有少于约1% (v/v) 血清的培养基中分化。
- [0136] 109.段落83的方法,其中所述细胞群在含有少于约0.5% (v/v) 血清的培养基中分化。
- [0137] 110.段落83的方法,其中所述细胞群在含有少于约0.2% (v/v) 血清的培养基中分化。
- [0138] 111.段落83的方法,其中所述细胞群在含有少于约0.1% (v/v) 血清的培养基中分化。
- [0139] 112.段落83的方法,其中所述细胞群在不存在血清或不存在血清替代物下分化。
- [0140] 113.段落83的方法,其中所述细胞群在特定血清含量的培养基中分化,所述培养基在加入所述至少一种生长因子后的约第一天含有约0% (v/v) 血清,在加入所述至少一种生长因子后的约第二天含有约0.2% (v/v) 或更少血清,并且在加入所述至少一种生长因子后的约第三天含有约2% (v/v) 或更少血清。
- [0141] 114.段落83的方法,其中所述细胞群在低血清RPMI培养基中分化。
- [0142] 115.段落83的方法,其中所述多能性人细胞包含人胚胎干细胞 (hESC)。
- [0143] 117.通过段落83的方法制备的前原条细胞。
- [0144] 118.制备中内胚层细胞的方法,所述方法包括获得含有多能性人细胞的细胞群和在含有少于约2%的血清和至少一种TGF $\beta$ 超家族的生长因子的培养基中分化所述多能性人细胞的步骤,其中所述生长因子以足以促进至少一部分所述多能性细胞分化为中内胚层细胞的量存在于所述培养基中,所述中内胚层细胞是能分化为中内胚层细胞的专能细胞。
- [0145] 119.段落118的方法,还包括给予足够时间让中内胚层细胞形成的步骤,其中所述让中内胚层细胞形成的足够时间通过检测中内胚层细胞在所述细胞群中的存在来确定。
- [0146] 120.段落119的方法,其中足够时间为最少约24小时。
- [0147] 121.段落118的方法,其中检测中内胚层细胞在所述细胞群中的存在包括检测所述细胞群中至少一种选自brachyury、FGF4和SNAI1的标志物和至少一种选自OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和SOX1的标志物的表达,其中在所述中内胚层细胞中选自brachyury、FGF4和SNAI1的标志物的表达高于选自OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和SOX1的标志物的表达。
- [0148] 122.段落121的方法,其中通过定量聚合酶链式反应 (Q-PCR) 确定至少一种所述标

志物的表达。

- [0149] 123.段落121的方法,其中通过免疫细胞化学确定至少一种所述标志物的表达。
- [0150] 124.段落118的方法,其中至少约5%的所述多能性人细胞分化为中内胚层细胞。
- [0151] 125.段落118的方法,其中至少约10%的所述多能性人细胞分化为中内胚层细胞。
- [0152] 126.段落118的方法,其中至少约20%的所述多能性人细胞分化为中内胚层细胞。
- [0153] 127.段落118的方法,其中至少约30%的所述多能性人细胞分化为中内胚层细胞。
- [0154] 128.段落118的方法,其中至少约40%的所述多能性人细胞分化为中内胚层细胞。
- [0155] 129.段落118的方法,其中至少约50%的所述多能性人细胞分化为中内胚层细胞。
- [0156] 130.段落118的方法,其中至少约60%的所述多能性人细胞分化为中内胚层细胞。
- [0157] 131.段落118的方法,其中至少约70%的所述多能性人细胞分化为中内胚层细胞。
- [0158] 132.段落118的方法,其中至少约80%的所述多能性人细胞分化为中内胚层细胞。
- [0159] 133.段落118的方法,其中至少约90%的所述多能性人细胞分化为中内胚层细胞。
- [0160] 134.段落118的方法,其中所述至少一种生长因子属于TGF $\beta$ 超家族的Nodal/活化素亚组。
- [0161] 135.段落134的方法,其中所述至少一种属于TGF $\beta$ 超家族的Nodal/活化素亚组的生长因子包含活化素A。
- [0162] 136.段落118的方法,其中所述至少一种生长因子以至少约10ng/ml的浓度提供。
- [0163] 137.段落118的方法,其中所述至少一种生长因子以至少约100ng/ml的浓度提供。
- [0164] 138.段落118的方法,其中所述至少一种生长因子以至少约500ng/ml的浓度提供。
- [0165] 139.段落118的方法,其中所述至少一种生长因子以至少约1000ng/ml的浓度提供。
- [0166] 140.段落118的方法,其中在约24小时后撤除所述至少一种生长因子。
- [0167] 141.段落118的方法,其中在约36小时后撤除所述至少一种生长因子。
- [0168] 142.段落118的方法,其中在约48小时后撤除所述至少一种生长因子。
- [0169] 143.段落118的方法,其中所述细胞群在含有少于约1% (v/v) 血清的培养基中分化。
- [0170] 144.段落118的方法,其中所述细胞群在含有少于约0.5% (v/v) 血清的培养基中分化。
- [0171] 145.段落118的方法,其中所述细胞群在含有少于约0.2% (v/v) 血清的培养基中分化。
- [0172] 146.段落118的方法,其中所述细胞群在含有少于约0.1% (v/v) 血清的培养基中分化。
- [0173] 147.段落118的方法,其中所述细胞群在不存在血清或不存在血清替代物下分化。
- [0174] 148.段落118的方法,其中所述细胞群在特定血清含量的培养基中分化,所述培养基在加入所述至少一种生长因子后的约第一天含有约0% (v/v) 血清,在加入所述至少一种生长因子后的约第二天含有约0.2% (v/v) 或更少血清,并且在加入所述至少一种生长因子后的约第三天含有约2% (v/v) 或更少血清。
- [0175] 149.段落118的方法,其中所述细胞群在低血清RPMI培养基中分化。
- [0176] 150.段落118的方法,其中所述细胞群包含人胚胎干细胞 (hESC)。

- [0177] 152.通过段落118方法制备的中内胚层细胞。
- [0178] 153.产生富集前原条细胞的细胞群方法,所述方法包括以下步骤:获得多能性细胞的群,其中所述多能性细胞群的至少一个细胞含有至少一个拷贝的受FGF8启动子控制的核酸,所述核酸含有编码绿色荧光蛋白(GFP)或其生物活性片段的序列;分化所述多能性细胞以制备前原条细胞,所述前原条细胞是能分化为中内胚层细胞的专能细胞;以及从不表达GFP的细胞中分离所述前原条细胞。
- [0179] 154.段落153的方法,其中所述富集细胞群包含至少约95%的前原条细胞。
- [0180] 155.段落153的方法,其中所述富集细胞群包含至少约98%的前原条细胞。
- [0181] 156.段落153的方法,其中所述分化步骤包括以特定量向所述多能性细胞群提供至少一种来自TGF $\beta$ 超家族的生长因子,该特定量足以促进所述多能性细胞向前原条细胞分化。
- [0182] 157.段落156的方法,其中所述至少一种TGF $\beta$ 超家族的生长因子是活化素A。
- [0183] 158.段落157的方法,其中所述活化素A以至少约50ng/ml的浓度提供。
- [0184] 159.段落157的方法,其中所述活化素A以至少约100ng/ml的浓度提供。
- [0185] 160.段落157的方法,其中所述活化素A以至少约500ng/ml的浓度提供。
- [0186] 161.段落153的方法,其中所述细胞群在含有少于约1%(v/v)血清的培养基中分化。
- [0187] 162.段落153的方法,其中所述细胞群在含有少于约0.5%(v/v)血清的培养基中分化。
- [0188] 163.段落153的方法,其中所述细胞群在含有少于约0.2%(v/v)血清的培养基中分化。
- [0189] 164.段落153的方法,其中所述细胞群在含有少于约0.1%(v/v)血清的培养基中分化。
- [0190] 165.段落153的方法,其中所述细胞群在不存在血清或不存在血清替代物下分化。
- [0191] 166.段落153的方法,其中所述细胞群在特定血清含量的培养基中分化,所述培养基在加入所述至少一种生长因子后的约第一天含有约0%(v/v)血清,在加入所述至少一种生长因子后的约第二天含有约0.2%(v/v)或更少血清,并且在加入所述至少一种生长因子后的约第三天含有约2%(v/v)或更少血清。
- [0192] 167.段落153的方法,其中所述细胞群在低血清RPMI培养基中分化。
- [0193] 168.通过段落153的方法产生的前原条细胞的富集群。
- [0194] 169.产生富集中内胚层细胞的细胞群的方法,所述方法包括以下步骤:获得多能性细胞群,其中所述多能性细胞群的至少一个细胞含有至少一个拷贝的受选自brachyury启动子、FGF4启动子和SNAI1启动子的启动子控制的核酸,所述核酸含有编码绿色荧光蛋白(GFP)或其生物活性片段的序列;分化所述多能性细胞以产生中内胚层细胞,所述中内胚层细胞是能分化为中胚层细胞或定形内胚层细胞的专能细胞;以及从不表达GFP的细胞中分离所述中内胚层细胞。
- [0195] 170.段落169的方法,其中所述富集细胞群包含至少约95%的中内胚层细胞。
- [0196] 171.段落169的方法,其中所述富集细胞群包含至少约98%的中内胚层细胞。
- [0197] 172.段落169的方法,其中所述分化步骤包括以特定量向所述多能性细胞群提供

至少一种来自TGF $\beta$ 超家族的生长因子,该特定量足以促进所述多能性细胞向中内胚层细胞分化。

[0198] 173.段落172的方法,其中所述至少一种TGF $\beta$ 超家族的生长因子是活化素A。

[0199] 174.段落173的方法,其中所述活化素A以至少约50ng/ml的浓度提供。

[0200] 175.段落173的方法,其中所述活化素A以至少约100ng/ml的浓度提供。

[0201] 176.段落173的方法,其中所述活化素A以至少约500ng/ml的浓度提供。

[0202] 177.段落169的方法,其中所述细胞群在含有少于约1%(v/v)血清的培养基中分化。

[0203] 178.段落169的方法,其中所述细胞群在含有少于约0.5%(v/v)血清的培养基中分化。

[0204] 179.段落169的方法,其中所述细胞群在含有少于约0.2%(v/v)血清的培养基中分化。

[0205] 180.段落169的方法,其中所述细胞群在含有少于约0.1%(v/v)血清的培养基中分化。

[0206] 181.段落169的方法,其中所述细胞群在不存在血清或不存在血清替代物下分化。

[0207] 182.段落169的方法,其中所述细胞群在特定血清含量的培养基中分化,所述培养基在加入所述至少一种生长因子后的约第一天含有约0%(v/v)血清,在加入所述至少一种生长因子后的约第二天含有约0.2%(v/v)或更少血清,并且在加入所述至少一种生长因子后的约第三天含有约2%(v/v)或更少血清。

[0208] 183.段落169的方法,其中所述细胞群在低血清RPMI培养基中分化。

[0209] 184.通过段落169的方法产生的中内胚层细胞的富集群。

[0210] 185.鉴定能够促进包含人细胞的细胞群中前原条细胞的分化的分化因子的方法,所述方法包含以下步骤:获得包含人前原条细胞的细胞群,向所述细胞群提供候选分化因子,确定所述细胞群中标志物在第一时间点的表达、确定所述细胞群中相同标志物在第二时间点的表达,其中所述第二时间点与所述第一时间点之后,并且其中所述第二时间点在向所述细胞群提供所述候选分化因子之后,以及确定所述细胞群中该标志物在所述第二时间点的表达与所述细胞群中该标志物在所述第一时间点的表达相比是否增加或减少,其中所述细胞群中所述标志物表达的增加或减少表明所述候选分化因子能够促进所述前原条细胞的分化。

[0211] 186.段落185的方法,其中在所述细胞群中所述人前原条细胞占所述人细胞的至少约10%。

[0212] 187.段落185的方法,其中所述细胞群中存在人饲养细胞,并且其中至少约10%的除所述饲养细胞外的人细胞是前原条细胞。

[0213] 188.段落185的方法,其中在所述细胞群中所述人前原条细胞占所述人细胞的至少约50%。

[0214] 189.段落185的方法,其中所述细胞群中存在人饲养细胞,并且其中至少约50%的除所述饲养细胞外的人细胞是前原条细胞。

[0215] 190.段落185的方法,其中所述人前原条细胞响应所述候选分化因子分化为选自中内胚层、中胚层和定形内胚层的细胞。



- [0216] 191.段落185的方法,其中所述人前原条细胞响应所述候选分化因子分化为中内胚层细胞。
- [0217] 192.段落191的方法,其中所述标志物选自brachyury、FGF4和SNAI1。
- [0218] 193.段落185的方法,其中所述人前原条细胞响应所述候选分化因子分化为中胚层细胞。
- [0219] 194.段落193的方法,其中所述标志物选自FOXF1、FLK1、BMP4、MOX1和SDF1。
- [0220] 195.段落185的方法,其中所述人前原条细胞响应所述候选分化因子分化为定形内胚层细胞。
- [0221] 196.段落195的方法,其中所述标志物选自CXCR4和SOX17。
- [0222] 197.段落185的方法,其中所述第一时间点在向所述细胞群提供所述候选分化因子之前。
- [0223] 198.段落185的方法,其中所述第一时间点与向所述细胞群提供所述候选分化因子大致同时。
- [0224] 199.段落185的方法,其中所述第一时间点在向所述细胞群提供所述候选分化因子之后。
- [0225] 200.段落185的方法,其中所述标志物的表达增加。
- [0226] 201.段落185的方法,其中所述标志物的表达减少。
- [0227] 202.段落185的方法,其中所述标志物的表达通过定量聚合酶链式反应(Q-PCR)确定。
- [0228] 203.段落185的方法,其中所述标志物的表达通过免疫细胞化学确定。
- [0229] 204.段落185的方法,其中所述候选分化因子包括至少一种TGF $\beta$ 超家族的生长因子。
- [0230] 205.段落204的方法,其中所述至少一种TGF $\beta$ 超家族的生长因子是活化素A。
- [0231] 206.段落185的方法,其中所述候选分化因子包括小分子。
- [0232] 207.段落185的方法,其中所述候选分化因子包括多肽。
- [0233] 208.段落185的方法,其中所述候选分化因子不是TGF $\beta$ 超家族的生长因子。
- [0234] 209.段落185的方法,其中以约0.1ng/ml至约10mg/ml的浓度向所述细胞群提供所述候选分化因子。
- [0235] 210.段落185的方法,其中以约1ng/ml至约1mg/ml的浓度向所述细胞群提供所述候选分化因子。
- [0236] 211.段落185的方法,其中以约10ng/ml至约100 $\mu$ g/ml的浓度向所述细胞群提供所述候选分化因子。
- [0237] 212.段落185的方法,其中以约100ng/ml至约10 $\mu$ g/ml的浓度向所述细胞群提供所述候选分化因子。
- [0238] 213.段落185的方法,其中以约1 $\mu$ g/ml的浓度向所述细胞群提供所述候选分化因子。
- [0239] 214.鉴定能够促进包含人细胞的细胞群中中内胚层细胞的分化的分化因子的方法,所述方法包括以下步骤:获得包含人中内胚层细胞的细胞群,向所述细胞群提供候选分化因子,确定所述细胞群中标志物在第一时间点的表达,确定所述细胞群中相同标志物在

第二时间点的表达,其中所述第二时间点在所述第一时间点之后,并且其中所述第二时间点在向所述细胞群提供所述候选分化因子之后,以及确定所述细胞群中该标志物在所述第二时间点的表达与所述细胞群中该标志物在所述第一时间点的表达相比是否增加或减少,其中所述细胞群中所述标志物表达的增加或减少表明所述候选分化因子能够促进所述中内胚层细胞的分化。

[0240] 215.段落214的方法,其中所述细胞群中所述人中内胚层细胞占所述人细胞的至少约10%。

[0241] 216.段落214的方法,其中所述细胞群中存在人饲养细胞,并且其中至少约10%的除所述饲养细胞外的所述人细胞是中内胚层细胞。

[0242] 217.段落214的方法,其中所述细胞群中所述人中内胚层细胞占所述人细胞的至少约50%。

[0243] 218.段落214的方法,其中所述细胞群中存在人饲养细胞,并且其中至少约50%的除所述饲养细胞外的所述人细胞是中内胚层细胞。

[0244] 219.段落214的方法,其中所述人中内胚层细胞响应所述候选分化因子分化为选自中胚层细胞和定形内胚层的细胞。

[0245] 220.段落214的方法,其中所述人中内胚层细胞响应所述候选分化因子分化为中胚层细胞。

[0246] 221.段落220的方法,其中所述标志物选自FOXF1、FLK1、BMP4、MOX1和SDF1。

[0247] 222.段落214的方法,其中所述人中内胚层细胞响应所述候选分化因子分化为定形内胚层细胞。

[0248] 223.段落222的方法,其中所述标志物选自CXCR4和SOX17。

[0249] 224.段落214的方法,其中所述第一时间点在向所述细胞群提供所述候选分化因子之前。

[0250] 225.段落214的方法,其中所述第一时间点与向所述细胞群提供所述候选分化因子大致同时。

[0251] 226.段落214的方法,其中所述第一时间点在向所述细胞群提供所述候选分化因子之后。

[0252] 227.段落214的方法,其中所述标志物的表达增加。

[0253] 228.段落214的方法,其中所述标志物的表达减少。

[0254] 229.段落214的方法,其中所述标志物的表达通过定量聚合酶链式反应(Q-PCR)确定。

[0255] 230.段落214的方法,其中所述标志物的表达通过免疫细胞化学确定。

[0256] 231.段落214的方法,其中所述候选分化因子包括至少一种TGF $\beta$ 超家族的生长因子。

[0257] 232.段落231的方法,其中所述至少一种TGF $\beta$ 超家族的生长因子是活化素A。

[0258] 233.段落214的方法,其中所述候选分化因子包括小分子。

[0259] 234.段落214的方法,其中所述候选分化因子包括多肽。

[0260] 235.段落214的方法,其中所述候选分化因子不是TGF $\beta$ 超家族的生长因子。

[0261] 236.段落214的方法,其中以约0.1ng/ml至约10mg/ml的浓度向所述细胞群提供所

述候选分化因子。

[0262] 237.段落214的方法,其中以约1ng/ml至约1mg/ml的浓度向所述细胞群提供所述候选分化因子。

[0263] 238.段落214的方法,其中以约10ng/ml至约100μg/ml的浓度向所述细胞群提供所述候选分化因子。

[0264] 239.段落214的方法,其中以约100ng/ml至约10μg/ml的浓度向所述细胞群提供所述候选分化因子。

[0265] 240.段落214的方法,其中以约1μg/ml的浓度向所述细胞群提供所述候选分化因子。

[0266] 241.在体外提高人胚胎干细胞(hESC)中FGF8基因产物的表达的方法,所述方法包括在含有少于约2%(v/v)血清的培养基中获得所述hESC,并且使所述hESC接触足以增加FGF8基因产物的表达的量的分化因子。

[0267] 242.段落241的方法,其中所述分化因子包括至少一种TGFβ超家族的生长因子。

[0268] 243.段落242的方法,其中所述分化因子包括活化素A。

[0269] 244.段落241的方法,其中所述培养基缺乏血清或缺乏血清替代物。

[0270] 245.在体外提高人胚胎干细胞(hESC)或前原条细胞中选自brachyury、FGF4和SNAI1的基因产物的表达的方法,所述方法包括在包含少于约2%(v/v)血清的培养基中获得所述hESC或前原条细胞,并且使所述hESC或所述前原条细胞接触足以增加选自brachyury、FGF4和SNAI1的基因产物的表达的量的细胞因子。

[0271] 246.段落245的方法,其中所述分化因子包括至少一种TGFβ超家族的生长因子。

[0272] 247.段落246的方法,其中所述分化因子包括活化素A。

[0273] 248.段落245的方法,其中所述培养基缺乏血清或缺乏血清替代物。

[0274] 249.包含人胚胎干细胞(hESC)和含有少于约2%(v/v)血清的培养基的细胞培养物,其中所述hESC在参考时间点开始分化,以至于与所述hESC中基线FGF8mRNA表达相比,距所述参考时间点约6小时时FGF8mRNA的表达显著上调。

[0275] 250.段落249的细胞培养物,其中距所述参考时间点约24小时时FGF8mRNA的表达显著下调。

[0276] 251.段落250的细胞培养物,其中在距所述参考时间点约6小时至约24小时之间FGF8mRNA的表达达到峰值。

[0277] 252.段落249的细胞培养物,其中距所述参考时间点约17小时时β-连接素多肽开始向细胞核定位。

[0278] 253.段落249的细胞培养物,其中距所述参考时间点约24小时时brachyury mRNA的表达显著上调。

[0279] 254.段落253的细胞培养物,其中距所述参考时间点约48小时时brachyury mRNA的表达显著下调。

[0280] 255.段落254的细胞培养物,其中在距所述参考时间点约12小时至约48小时之间brachyury mRNA的表达达到峰值。

[0281] 256.段落255的细胞培养物,其中距所述参考时间点约72小时时brachyury mRNA不显著表达。

- [0282] 257.段落249的细胞培养物,其中距所述参考时间点约24小时时FGF4mRNA的表达显著上调。
- [0283] 258.段落257的细胞培养物,其中距所述参考时间点约48小时时FGF4mRNA的表达显著下调。
- [0284] 259.段落258的细胞培养物,其中在距所述参考时间点约12小时至约48小时之间FGF4mRNA的表达达到峰值。
- [0285] 260.段落259的细胞培养物,其中距所述参考时间点约72小时时FGF4mRNA不显著表达。
- [0286] 261.段落249的细胞培养物,其中距所述参考时间点约24小时时brachyury和FGF4mRNA的表达显著上调。
- [0287] 262.段落261的细胞培养物,其中距所述参考时间点约48小时时brachyury和FGF4mRNA的表达显著下调。
- [0288] 263.段落262的细胞培养物,其中在距所述参考时间点约12小时至约48小时之间brachyury和FGF4mRNA的表达达到峰值。
- [0289] 264.段落263的细胞培养物,其中距所述参考时间点约72小时时brachyury和FGF4mRNA不显著表达。
- [0290] 265.段落249的细胞培养物,其中距所述参考时间点约24小时时SNAI1mRNA的表达显著上调。
- [0291] 266.段落265的细胞培养物,其中距所述参考时间点约48小时时SNAI1mRNA的表达显著下调。
- [0292] 267.段落266的细胞培养物,其中在距所述参考时间点约12小时至约48小时之间SNAI1mRNA的表达达到峰值。
- [0293] 268.段落249的细胞培养物,其中距所述参考时间点约12小时时E-钙粘着素mRNA的表达开始下调。
- [0294] 269.段落249的细胞培养物,其中距所述参考时间点约48小时时E-钙粘着素mRNA的表达显著下调。
- [0295] 270.段落249的细胞培养物,其中距所述参考时间点约48小时时SOX17mRNA的表达显著上调。
- [0296] 271.段落249的细胞培养物,其中距所述参考时间点约96小时时FOXA2mRNA的表达显著上调。
- [0297] 272.段落249的细胞培养物,其中所述培养基包含少于约1% (v/v) 的血清。
- [0298] 273.段落249的细胞培养物,其中所述培养基包含少于约0.2% (v/v) 的血清。
- [0299] 274.段落249的细胞培养物,其中所述培养基包含约0% (v/v) 的血清。
- [0300] 275.段落249的细胞培养物,其中所述培养基缺乏血清或缺乏血清替代物。
- [0301] 276.段落249的细胞培养物,还包含TGFβ超家族的分化因子。
- [0302] 277.段落276的细胞培养物,其中所述分化因子包括活化素A。
- [0303] 278.段落277的细胞培养物,其中所述活化素A以约100ng/ml的浓度存在。
- [0304] 279.包含人胚胎干细胞 (hESC)、TGFβ超家族的分化因子和含有少于约2% (v/v) 血清的培养基的细胞培养物。

[0305] 280. 段落279的细胞培养物,其中所述细胞培养物的细胞中,选自FGF8、Nodal、HEG、HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的表达上调之前上调。

[0306] 281. 段落280的细胞培养物,其中所述细胞培养物的细胞中,选自FGF8、Nodal、HEG、HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的峰值表达之前上调。

[0307] 282. 段落281的细胞培养物,其中所述细胞培养物的细胞中,选自HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的峰值表达之前或大约同时下调。

[0308] 283. 段落279的细胞培养物,其中所述细胞培养物的细胞中,选自FGF8、Nodal、HEG、HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自SOX17、FOXA2、CXCR4和MIXL1的标志物基因的表达上调之前上调。

[0309] 284. 段落283的细胞培养物,其中所述细胞培养物的细胞中,选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的表达在选自SOX17、FOXA2、CXCR4和MIXL1的标志物基因的表达上调之前或大致同时上调。

[0310] 285. 段落284的细胞培养物,其中所述细胞培养物的细胞中,选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因在选自SOX17、FOXA2、CXCR4和MIXL1的标志物基因的表达上调之前或大致同时达到其峰值表达。

[0311] 286. 段落283的细胞培养物,其中所述细胞培养物的细胞中,选自FGF8、Nodal、HEG、HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的表达上调之前上调。

[0312] 287. 段落279的细胞培养物,其中所述培养基包含少于约1% (v/v) 的血清。

[0313] 288. 段落279的细胞培养物,其中所述培养基包含少于约0.2% (v/v) 的血清。

[0314] 289. 段落279的细胞培养物,其中所述培养基包含约0% (v/v) 的血清。

[0315] 290. 段落279的细胞培养物,其中所述培养基缺乏血清或缺乏血清替代物。

[0316] 291. 段落279的细胞培养物,其中所述TGF $\beta$ 超家族的分化因子包括活化素A。

[0317] 292. 段落291的细胞培养物,其中所述活化素A以约100ng/ml的浓度存在于培养基中。

[0318] 293. 在细胞培养物中分化细胞的方法,所述方法包括(a)使包含人胚胎干细胞(hESC)的细胞培养物与含有少于约2%血清的培养基接触,(b)向所述hESC提供TGF $\beta$ 超家族的分化因子,以及(c)允许所述hESC的分化发生。

[0319] 294. 段落283的方法,其中所述细胞培养物的细胞中,选自FGF8、Nodal、HEG、HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的表达上调之前上调。

[0320] 295.段落294的方法,其中所述细胞培养物的细胞中,选自FGF8、Nodal、HEG、HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的峰值表达之前上调。

[0321] 296.段落295的方法,其中所述细胞培养物的细胞中,选自HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的峰值表达之前或大致同时下调。

[0322] 297.段落293的方法,其中所述细胞培养物的细胞中,选自FGF8、Nodal、HEG、HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自SOX17、FOXA2、CXCR4和MIXL1的标志物基因的表达上调之前上调。

[0323] 298.段落297的方法,其中所述细胞培养物的细胞中,选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的表达在选自SOX17、FOXA2、CXCR4和MIXL1的标志物基因的表达上调之前或大致同时上调。

[0324] 299.段落298的方法,其中所述细胞培养物的细胞中,选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因在选自SOX17、FOXA2、CXCR4和MIXL1的标志物基因的表达上调之前或大致同时达到其峰值表达。

[0325] 300.段落297的方法,其中所述细胞培养物的细胞中,选自FGF8、Nodal、HEG、HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的表达上调之前上调。

[0326] 301.段落293的方法,其中所述培养基包含少于约1%(v/v)的血清。

[0327] 302.段落293的方法,其中所述培养基包含少于约0.2%(v/v)的血清。

[0328] 303.段落293的方法,其中所述培养基包含约0%(v/v)的血清。

[0329] 304.段落293的方法,其中所述培养基缺乏血清或缺乏血清替代物。

[0330] 305.段落293的方法,其中所述TGFβ超家族的分化因子包括活化素A。

[0331] 306.段落305的方法,其中所述活化素A以约100ng/ml的浓度存在于所述培养基中。

[0332] 307.包含人胚胎干细胞(hESC)和含有少于约2%(v/v)血清的培养基的细胞培养物,其中所述hESC在参考时间点开始分化,以至于距所述参考时间点约2小时所述hESC中选自FZD10、FGF5和OCT4的mRNA的表达与选自FZD10、FGF5和OCT4的相应mRNA的基线表达相比显著上调。

[0333] 308.段落307的细胞培养物,其中所述培养基包含少于约1%(v/v)的血清。

[0334] 309.段落307的细胞培养物,其中所述培养基包含少于约0.2%(v/v)的血清。

[0335] 310.段落307的细胞培养物,其中所述培养基包含约0%(v/v)的血清。

[0336] 311.段落307的细胞培养物,其中所述培养基缺乏血清或缺乏血清替代物。

[0337] 312.段落307的细胞培养物,还包含TGFβ超家族的分化因子。

[0338] 313.段落312的细胞培养物,其中所述分化因子包括活化素A。

[0339] 314.段落313的细胞培养物,其中所述活化素A以约100ng/ml的浓度存在。

[0340] 315.包含人胚胎干细胞(hESC)和含有少于约2%(v/v)血清的培养基的细胞培养物,其中所述hESC在参考时间点开始分化,以至于距所述参考时间点约2小时所述hESC中选自GBX2、ZFP42和SOX2的mRNA的表达与选自GBX2、ZFP42和SOX2的相应mRNA的基线表达相

比显著下调。

[0341] 316.段落315的细胞培养物,其中所述培养基包含少于约1% (v/v) 的血清。

[0342] 317.段落315的细胞培养物,其中所述培养基包含少于约0.2% (v/v) 的血清。

[0343] 318.段落315的细胞培养物,其中所述培养基包含约0% (v/v) 的血清。

[0344] 319.段落315的细胞培养物,其中所述培养基缺乏血清或缺乏血清替代物。

[0345] 320.段落315的细胞培养物,还包含TGF $\beta$ 超家族的分化因子。

[0346] 321.段落320的细胞培养物,其中所述TGF $\beta$ 超家族的分化因子包括活化素A。

[0347] 322.段落321的细胞培养物,其中所述活化素A以约100ng/ml的浓度存在。

[0348] 323.包含人胚胎干细胞 (hESC)、TGF $\beta$ 超家族的分化因子和含有少于约2% (v/v) 血清的培养基的细胞培养物,其中所述细胞培养物的细胞中,在选自FGF8、Nodal、HEG、HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达上调之前选自FZD10、FGF5、Nanog和OCT4的标志物基因的表达上调,或者选自GBX2、ZFP42和SOX2的标志物基因的表达下调。

[0349] 324.段落323的细胞培养物,其中在选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的表达上调之前选自FZD10、FGF5、Nanog和OCT4的标志物基因的表达上调,或者选自GBX2、ZFP42和SOX2的标志物基因的表达下调。

[0350] 325.段落323的细胞培养物,其中所述培养基包含少于约1% (v/v) 的血清。

[0351] 326.段落323的细胞培养物,其中所述培养基包含少于约0.2% (v/v) 的血清。

[0352] 327.段落323的细胞培养物,其中所述培养基包含约0% (v/v) 的血清。

[0353] 328.段落323的细胞培养物,其中所述培养基缺乏血清或缺乏血清替代物。

[0354] 329.段落323的细胞培养物,还包含TGF $\beta$ 超家族的分化因子。

[0355] 330.段落329的细胞培养物,其中所述TGF $\beta$ 超家族的分化因子包括活化素A。

[0356] 331.段落330的细胞培养物,其中所述活化素A以约100ng/ml的浓度存在。

[0357] 332.分化细胞培养物中细胞的方法,所述方法包括 (a) 使包含人胚胎干细胞 (hESC) 的细胞培养物与包含少于约2%血清的培养基接触, (b) 向所述hESC提供TGF $\beta$ 超家族的分化因子,以及 (c) 允许所述hESC分化的发生,其中所述细胞培养物的细胞中,在选自FGF8、Nodal、HEG、HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达上调之前选自FZD10、FGF5、Nanog和OCT4的标志物基因的表达上调,或者选自GBX2、ZFP42和SOX2的标志物基因的表达下调。

[0358] 333.段落332所述的方法,其中在选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的表达上调之前选自FZD10、FGF5、Nanog和OCT4的标志物基因的表达上调,或者选自GBX2、ZFP42和SOX2的标志物基因的表达下调。

[0359] 334.段落332的方法,其中所述培养基包含少于约1% (v/v) 的血清。

[0360] 335.段落332的方法,其中所述培养基包含少于约0.2% (v/v) 的血清。

[0361] 336.段落332的方法,其中所述培养基包含约0% (v/v) 的血清。

[0362] 337.段落332的方法,其中所述培养基缺乏血清或缺乏血清替代物。

[0363] 338.段落332的方法,还包含TGF $\beta$ 超家族的分化因子。

[0364] 339.段落338的方法,其中所述分化因子包括活化素A。

[0365] 340.段落339的方法,其中所述活化素A以约100ng/ml的浓度存在。

[0366] 应理解上述方法和组合物涉及体外培养的细胞。但是,上述的体外分化的细胞组合物可用于体内应用。

[0367] 本发明的其他实施方案也可参见以下专利申请:于2003年12月23日提交的题为DEFINITIVE ENDODERM(定形内胚层)的第60/532,004号美国临时专利申请;于2004年4月27日提交的题为PDX1EXPRESSING ENDODERM(表达PDX1的内胚层)的第60/566,293号美国临时专利申请;于2004年7月9日提交的题为CHEMOKINE CELL SURFACE RECEPTOR FOR THE ISOLATION OF DEFINITIVE ENDODERM(用于分离定形内胚层的趋化因子细胞表面受体)的第60/586,566号美国临时专利申请;于2004年7月14日提交的题为CHEMOKINE CELL SURFACE RECEPTOR FOR THE ISOLATION OF DEFINITIVE ENDODERM(用于分离定形内胚层的趋化因子细胞表面受体)的第60/587,942号美国临时专利申请;于2004年12月23日提交的题为DEFINITIVE ENDODERM(定形内胚层)的第11/021,618号美国专利申请;于2005年4月26日提交的题为PDX1EXPRESSING ENDODERM(表达PDX1的定形内胚层)的第11/115,868号美国专利申请;于2005年6月23日提交的题为METHODS FOR IDENTIFYING FACTORS FOR DIFFERENTIATING DEFINITIVE ENDODERM(鉴定用于分化定形内胚层的因子的方法)的第11/165,305号美国专利申请和于2005年6月23日提交的题为PREPRIMITIVE STREAK CELLS AND MESENODERM CELLS(前原条细胞和中内胚层细胞)的第60/693,364号美国临时专利申请,其公开在此整体并入以供参考。

[0368] 附图简要说明

[0369] 图1是描述在活化素存在下、在BMP4和SU5402组合存在下、和不存在任何分化因子时胚胎干细胞(ESC)的分化的示意图。还列出了一些对鉴定和/或检测每种细胞类型有用的标志物基因。

[0370] 图2A-M是显示可用于鉴定定形内胚层细胞的标志物基因的表达模式的条形图。图G-L依次显示了定形内胚层标志物FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1和CRIP1的表达分析。图A-F依次显示了前述细胞系标志基因SOX17、SOX7、SOX17/SOX7、TM、ZIC1和MOX1的表达分析。图M显示了CXCR4的表达分析。对于图A-M的每一图,标注hESC的列表示来自纯化的人胚胎干细胞的基因表达;2NF表示细胞经过2%FBS处理,不添加活化素;0.1A100表示细胞经0.1%FBS和100ng/ml活化素A处理;1A100表示细胞经过1%FBS和100ng/ml活化素A处理;2A100表示细胞经过2%FBS和100ng/ml活化素A处理。

[0371] 图3是显示了某些标志物基因在(A)前原条细胞,(B-D)原条(中内胚层)细胞,(E-F)中内胚层和定形内胚层细胞,(G)定形内胚层细胞,和(H-L)滋养外胚层和原始内胚层细胞中表达的条形图。分化过程中,在向细胞培养物中加入100ng/ml活化素A(用“A”表明)或100ng/mlBMP4和2.5 $\mu$ M SU5402的组合(用“B/SU”表明)后的0、6、12、24、48、72和96小时时,通过Q-PCR确定标志物的表达。所有细胞都生长在第一天(最初24小时)含有0%(v/v)FBS、在第二天(24-48小时)含有0.2%(v/v)FBS和在第三和第四天(48-96小时)含有2%(v/v)FBS的RPMI培养基中。表1提供了每种标志物基因的全称。

[0372] 图4A-C是显示在100ng/ml活化素A和0.1%(v/v)FBS存在下,在hESC(用“ESC”表明)分化的最初48小时中(A)中内胚层的Brachyury标志物(BRACH),(B)hESC的E-钙粘着素标志物,和(C)中内胚层的SNAI1标志物的mRNA表达模式的条形图。



[0373] 图5A和B是依次显示了100ng/ml活化素A和0.1% (v/v) FBS (用“ESC”表明) 存在下, 在hESC分化的最初48小时中, 中内胚层的Brachyury标志物 (BRACH) 和定形内胚层的性别决定区Y-Box17 (SOX17) 标志物的mRNA表达模式的条形图。

[0374] 图6A-D是显微图片, 显示了在100ng/ml活化素A和0.1% (v/v) FBS存在下, 从hESC分化48小时后的细胞。图A显示了用DAPI染色的细胞区域。图B-D显示了用抗Brachyury (B)、抗SOX17 (C) 或抗Brachyury和SOX17二者 (D) 的抗体染色的相同细胞区域。

[0375] 图7是描述了低血清条件下, 存在100ng/ml活化素A (A100) 或不存在活化素A (NF) 时胚胎干细胞 (ESC) 的分化的示意图。PS表示原条细胞 (中内胚层细胞); DE表示定形内胚层细胞; 并且M表示中胚层细胞。

[0376] 图8A-F是描述特定条件下细胞培养物中中胚层标志物基因 (A) BRACH, (B) FOXF1, (C) FLK1, (D) BMP4, (E) MOX1和 (F) SDF1表达的条形图, 该特定条件为在100ng/ml活化素A连续存在下孵育4天后 (A100), 或孵育4天后但在第一天后撤除活化素A (NF)。通过Q-PCR确定标志物基因的表达。

[0377] 图9A-C是描述特定条件下细胞培养物中定形内胚层标志物基因 (A) GSC, (B) SOX17和 (C) FOXA2表达的条形图, 该特定条件为在100ng/ml活化素A连续存在下孵育4天后 (A100), 或孵育4天后但在第一天后撤除活化素A (NF)。通过Q-PCR确定标志物基因的表达。

[0378] 图10A-I是描述可用于鉴定和/或检测定形内胚层细胞的某些标志物基因表达的条形图。在含有0.5%、2%或10%小牛血清 (FBS) 和100ng/ml活化素A (A100) 或没有活化素A (NF) 的五天的细胞培养物中, 通过Q-PCR确定标志物基因的表达。

[0379] 图11A和B是描述了在100ng/ml活化素A存在下分化了4天的细胞培养物中定形内胚层标志物 (A) SOX17和 (B) FOXA2表达的条形图。通过Q-PCR确定分化过程中, 加入活化素A后0、6、24、30、48和96小时标志物基因的表达。

[0380] 图12A-D显示了移植到免疫妥协小鼠的肾包膜下的定形内胚层细胞的体内分化。各图: A-苏木精-伊红染色显示肠管样结构; B-抗肝细胞特异性抗原 (肝) 的抗体免疫反应性; C-抗绒毛蛋白 (肠) 的抗体免疫反应性; 和D-抗CDX2 (肠) 的抗体免疫反应性。

[0381] 详细描述

[0382] 称为原肠胚形成的早期人发育中的重要阶段发生于受精后2-3周。原肠胚形成非常重要, 因为在这个阶段三种主要胚层第一次特异化和组织化 (Lu et al., 2001; Schoenwolf和Smith, 2000)。外胚层负责身体外表和整个神经系统的最终形成, 而中胚层衍生出心、血、骨、骨骼肌和其他结缔组织。定形内胚层被定义为负责整个肠管 (包括食道、胃、小肠和大肠) 以及肠管衍生的器官 (如肺、肝、胸腺、甲状旁腺、甲状腺、胆囊和胰腺) 形成的胚层 (Grapin-Botton和Melton, 2000; Kimelman和Griffin, 2000; Tremblay et al., 2000; Wells和Melton, 1999; Wells和Melton, 2000)。定形内胚层细胞与称为原始内胚层的完全分离细胞系有重要区别。原始内胚层主要负责胚外组织的形成, 主要是胎盘卵黄囊的腔壁和内脏内胚层部分和Reichert's膜的胞外基质物质。

[0383] 在原肠胚形成期, 定形内胚层形成过程起始于细胞迁移, 其中中内胚层细胞 (有形成中胚层或内胚层能力的细胞) 迁移穿过称为原条的结构。当中内胚层进入原条, 它们经历表皮间质转化 (EMT), 成为中胚层或定形内胚层。定形内胚层源自迁移穿过原条前部及节 (在原条最前部区域的特化结构) 的细胞。当迁移发生时, 定形内胚层首先集中于最前部肠

管,随后以肠管后端的形成而终止。

[0384] 原条前体细胞(前原条细胞)和原条细胞(中内胚层细胞)是产生中胚层和定形内胚层的早期阶段前体细胞。事实上,前原条细胞和中内胚层细胞可能是从多能性向由中胚层和定形内胚层细胞系形成的终分化的细胞、组织和/或器官的发育过程中最早的前体。直到目前,尚未获得富集人前原条细胞的细胞群或富集人中内胚层细胞的细胞群。而且,该细胞群的细胞之前未在体外被表征过。

[0385] 考虑以上所述,本发明的一些实施方案涉及包含人前原条细胞的细胞培养物和/或富集细胞群,以及包含人中内胚层细胞的细胞培养物和/或富集细胞群。这些实施方案中,前原条细胞和中内胚层细胞能够进一步分化为中胚层细胞和/或定形内胚层细胞以及源自这些细胞系的细胞、组织和/或器官。

[0386] 本发明的其它实施方案涉及制备包含人前原条细胞的细胞培养物和/或富集细胞群,以及制备包含人中内胚层细胞的细胞培养物和/或富集细胞群的方法。

[0387] 本文所述其它实施方案涉及鉴定可用于使包含前原条细胞或中内胚层细胞的细胞群中细胞分化的一种或多种分化因子的筛选方法。这些因子可用于促进这些细胞类型向中胚层和/或定形内胚层细胞以及源自这些细胞系的细胞、组织和/或器官的分化。

[0388] 本发明的某些其它方面涉及提高某些早期阶段细胞标志物表达的方法。其它方面涉及包含在分化过程中表达某些标志物的细胞的细胞组合物。

[0389] 定义

[0390] 贯穿本申请的某些术语和短语具有以下所描述的意义:

[0391] 此处使用的“胚胎的”指有机体的一系列发育阶段,开始于单一受精卵,结束于多细胞结构,这种多细胞结构除了发育的配子生殖细胞外不再包含多能性或全能细胞。除了来自配子融合的胚胎,术语“胚胎的”也指来自体细胞核转移的胚胎。

[0392] 本文使用的“专能的(multipotent)”或“专能细胞(multipotent cell)”指能产生有限数量的其它具体细胞类型的细胞类型。

[0393] 本文使用的“表达”指材料或物质的产生以及材料或物质产生的水平或数量。因此,检测特定标志物的表达指测定表达标志物的相对或绝对量,或仅仅检测标志物的存在或缺失。

[0394] 此处使用的“标志物”指能够被观察或检测到的任何分子。例如,标志物可包括但不限于核酸,如特异基因的转录本、基因的多肽产物、非基因多肽产物、糖蛋白、糖、糖脂、脂质、脂蛋白或小分子(例如,分子量小于10,000amu的分子)。

[0395] 当涉及细胞培养物和/或细胞群时,术语“部分”表示细胞培养物或细胞群任意不为零的数量,范围从单个细胞到整个细胞培养物或细胞群。

[0396] 关于细胞培养物或细胞群中的细胞,术语“基本上不含”表示细胞培养物或细胞群不含的特异细胞类型在细胞培养物或细胞群的所有细胞中占有的比例少于5%。

[0397] 关于细胞培养的培养基,此处使用的“低血清RPMI”指含有低血清的培养基,其中血清浓度在限定的时间段内逐渐增强。例如,在一个实施方案中,低血清RPMI在细胞生长的第一天包含浓度为约0.2%的小牛血清(FBS),在细胞生长的第二天包含浓度为约0.5%的小牛血清(FBS),在细胞生长的第三天到第五天包含浓度为约2%的小牛血清(FBS)。另一实施方案中,低血清RPMI在第一天包含浓度为约0%的,在第二天包含浓度为约0.2%的,以及在第

三天及以后包含约2%的。

[0398] 本文使用的“血清替代物”指包含IGF或胰岛素的血清替代物。

[0399] hESC向定形内胚层细胞分化中早期事件的模型

[0400] 图1显示了总结在体外人胚胎干细胞(hESC)早期转变的模型。可以通过在低血清添加情况下使用高剂量的活化素A组织hESC通过接近重演原肠胚形成的过程的分化。约24小时(前原条细胞)之前FGF8和核定位的 $\beta$ -连接素的表达(其为原条形成之前发生在最接近的上胚层的事件)明显。原条表达基因(brachyury和FGF4)的高水平表达发生在约24小时。如果保持在高剂量活化素A中,该原条细胞(中内胚层细胞)有效地转化为定形内胚层。相反,缺乏活化素时,这些中内胚层前体成为中胚层。用BMP4和SU5402处理hESC诱导与原始内胚层和滋养外胚层相关的基因表达。

[0401] 前原条细胞和中内胚层细胞及其相关过程

[0402] 本发明的实施方案涉及在培养物中生成前原条细胞和/或中内胚层细胞的新的确定方法,其通过将诸如干细胞的多能性细胞分化为前原条细胞和/或中内胚层细胞来实现。如上所述,前原条细胞能够分化中内胚层细胞以及源于它们的细胞、组织和/或器官。中内胚层细胞能够分化中胚层细胞和/或定形内胚层细胞以及源于这些细胞系中任一种的细胞、组织和/或器官。一些实施方案中,前原条细胞经过中内胚层中间体转化为中胚层或定形内胚层细胞系的终末分化的细胞。如以下将要进一步详细描述,这些方法可以提供有效生成多种人内胚层和中胚层衍生组织的基础。例如,这些方法可以提供有效生成人内胚层衍生的组织,如胰、肝、肺、胃、肠、甲状腺、胸腺、咽、胆囊和膀胱的基础。重要地,前原条细胞和/或中内胚层细胞的产生是干细胞向功能性的产生胰岛素的 $\beta$ 细胞分化的早期步骤。作为另一例子,前原条细胞和/或中内胚层细胞可以提供有效生成人中胚层衍生的组织,如血细胞、心血管组织、骨组织和其它结构和结缔组织的基础。为了获得有用量的任何上述的细胞或组织类型,在达到终末分化的细胞命运之前,期望发生的每个分化步骤都是高效的。因为干细胞分化为前原条细胞和/或中内胚层细胞代表着生成功能性中胚层和定形内胚层细胞系的终末分化细胞的最初步骤(如图1所示),特别需要此步分化高效。

[0403] 鉴于分化多能性细胞至前原条细胞和/或中内胚层细胞的需要,本发明一些方面涉及体外方法学,将约5-90%的多能性细胞转变为前原条细胞和/或中内胚层细胞。典型地,这些方法包括以已确定及暂时指定的方式使用培养物及生长因子。通过基于差异荧光标志物表达挑选细胞,从细胞群中将前原条细胞和/或中内胚层细胞与其它细胞分离和/或纯化,可获得前原条细胞和/或中内胚层细胞细胞群的更大富集。这样,本文所述一些实施方案涉及前原条细胞及制备和分离和/或纯化这些细胞的方法。其它实施方案涉及中内胚层细胞及制备和分离和/或纯化这些细胞的方法。

[0404] 为了确定细胞培养物或细胞群内前原条细胞细胞的数量,需要从培养物或细胞群中区分这类细胞与其它细胞的方法。因此,本发明实施方案涉及细胞标志物,其存在、缺失和/或相对表达水平对前原条细胞是特异的,以及检测确定这些标志物表达的方法。

[0405] 本发明的一些实施方案中,标志物表达的存在与否和/或其水平由定量PCR(Q-PCR)确定。例如,一些遗传标志物产生的转录本量,例如OCT4、ECAD、FGF8、 $\beta$ -连接素、brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、CXCR4、GSC、MIXL1、FOXA2、SOX7、FOXF1、FLK1、BML4、MOX1、SDF1及本文所述的其它标志物,由定量Q-PCR确定。其它实施方案中,免疫组化技术用于检

测上述基因表达的蛋白。其它实施方案中,免疫组化技术/免疫细胞化学用于检测例如核定位的 $\beta$ -连接素的某些多肽标志物的细胞区室定位。其它实施方案中,Q-PCR及免疫组化技术用于识别及确定这些标志物的量或相对比例。

[0406] 通过使用如上述的确定一种或多种合适的标志物表达的方法,在细胞培养物或细胞群内识别前原条细胞和/或中内胚层细胞以及确定前原条细胞和/或中内胚层细胞的比例是可能的。例如,本发明的一些实施方案中,产生的前原条细胞或细胞群表达FGF8标志物和/或核定位的 $\beta$ -连接素的水平比非前原条细胞类型或细胞群高约2个数量级。在其它实施方案中,产生的前原条细胞或细胞群表达FGF8标志物和/或核定位的 $\beta$ -连接素的水平比非前原条细胞类型或细胞群高2个数量级以上。在本发明的其它实施方案中,产生的中内胚层细胞或细胞群表达brachyury、FGF4和/或SNAI1标志物的水平比非中内胚层细胞类型或细胞群高约2个数量级。其它实施方案中,产生的中内胚层细胞或细胞群表达brachyury、FGF4和/或SNAI1标志物的水平比非中内胚层细胞类型或细胞群高2个数量级以上。

[0407] 本文所述实施方案还涉及前原条细胞和/或中内胚层细胞组合物。例如,一些实施方案涉及包括前原条细胞和/或中内胚层细胞的细胞培养物,然而其它的涉及富集了前原条细胞和/或中内胚层细胞的细胞群。一些优选的实施方案涉及包括前原条细胞和/或中内胚层细胞的细胞培养物,其中所述培养物中至少约5-90%的细胞为前原条细胞和/或中内胚层细胞。特别优选的实施方案涉及包括人细胞的细胞培养物,其中培养物中至少约5-90%的人细胞为前原条细胞和/或中内胚层细胞。由于分化方法的效果可以通过改变一些参数进行调节,这些参数包括但不限于细胞生长条件、生长因子浓度及培养步骤的时间安排,本发明所述的分化方法可使约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、或大于95%的多能性细胞转化为前原条细胞和/或中内胚层细胞。在其它优选的实施方案中,考虑将诸如干细胞群体的多能性细胞群转化为基本纯的前原条细胞和/或中内胚层细胞群。

[0408] 本发明所述的组合物及方法具有几个有用的特征。例如,包括前原条细胞和/或中内胚层细胞的细胞培养物及细胞群,以及制备这些细胞培养物及细胞群的方法可用于模建人发育的早期阶段。此外,本发明所述的组合物及方法也可用于诸如糖尿病的疾病的治疗性干预。例如,由于前原条细胞和/或中内胚层细胞仅为有限数量的组织的来源,因而其可用于发育纯的组织或细胞类型。

#### [0409] 从多能性细胞产生前原条细胞

[0410] 产生前原条细胞的一些方法中,作为起始材料的多能性细胞是干细胞。某些方法中,从胚胎干细胞产生包含前原条细胞的细胞培养物和富集的细胞群。优选的衍生前原条细胞的方法利用人胚胎干细胞作为制备前原条细胞的起始材料。使用现有技术已知的方法,人胚胎干细胞可在培养基中保持多能性状态而基本不分化。所述的方法在诸如第5,453,357、5,670,372、5,690,926、5,843,780、6,200,806及6,251,671号美国专利中有所描述,其公开在此整体并入以供参考。

[0411] 在产生前原条细胞的一些方法中,hESC维持在滋养层。在这些方法中,任何能够使hESC保持在多能性状态的滋养层都可使用。一种常用的培养人胚胎干细胞的滋养层为一层小鼠成纤维细胞。最近,人成纤维细胞滋养层也已开发出来用于培养hESC(参见第2002/0072117号美国专利申请中公开的方法,其公开在此整体并入以供参考)。产生前原条细胞

的其它方法允许不使用滋养层而保持多能性hESC。在没有滋养层条件下保持多能hESC的方法已在第2003/0175956号美国专利申请中有描述,其公开在此整体并入以供参考。

[0412] 本发明所述的人胚胎干细胞可以保持在具有或不具有血清的培养基中。在一些胚胎干细胞保持方法中,使用血清替代品。在其它方法中,使用无血清培养技术,如美国专利申请号2003/0190748所述,其公开在此全部引入,以供参考。

[0413] 在培养基中保持多能性状态的干细胞按照常规传代,直到分化为前原条细胞。在一些实施方案中,分化至前原条细胞的完成是通过向干细胞培养基中加入分化因子,如TGF $\beta$ 超家族的生长因子,其加入的量足以促进至前原条细胞的分化。用于制备前原条细胞的TGF $\beta$ 超家族生长因子选自Nodal/活化素亚群。一些优选的分化方法中,生长因子选自Nodal、活化素A和活化素B。在某些分化方法中,使用生长因子活化素A。

[0414] 关于从多能性干细胞向前原条细胞分化的一些方法,向细胞中加入的上述生长因子,使其在培养基中的浓度足以促进至少一部分干细胞分化至前原条细胞。一些方法中,培养基中上述生长因子的浓度至少约5ng/ml、至少约10ng/ml、至少约25ng/ml、至少约50ng/ml、至少约75ng/ml、至少约100ng/ml、至少约200ng/ml、至少约300ng/ml、至少约400ng/ml、至少约500ng/ml、至少约1000ng/ml、至少约2000ng/ml、至少约3000ng/ml、至少约4000ng/ml、至少约5000ng/ml或大于5000ng/ml。

[0415] 在使多能干细胞向前原条细胞分化的某些方法中,上述生长因子加入培养基后需要被从细胞培养物中除去。例如,生长因子的除去时间约1小时之内、约2小时之内、约3小时之内、约4小时之内、约5小时之内、约6小时之内、约7小时之内、约8小时之内、约9小时之内、约10小时之内、约11小时之内、约12小时之内、约13小时之内、约14小时之内、约15小时之内、约16小时之内、约17小时之内、约18小时之内、约19小时之内、约20小时之内、约21小时之内、约22小时之内、约23小时之内、约24小时之内或约多于24小时之内。

[0416] 前原条细胞的培养物可生长在包含少量血清或无血清的培养基中。在某些培养条件下,血清的浓度范围为约0% (v/v) 至约10% (v/v)。例如,在一些分化方法中,培养基中血清的浓度可以低于约0.05% (v/v)、低于约0.1% (v/v)、低于约0.2% (v/v)、低于约0.3% (v/v)、低于约0.4% (v/v)、低于约0.5% (v/v)、低于约0.6% (v/v)、低于约0.7% (v/v)、低于约0.8% (v/v)、低于约0.9% (v/v)、低于约1% (v/v)、低于约2% (v/v)、低于约3% (v/v)、低于约4% (v/v)、低于约5% (v/v)、低于约6% (v/v)、低于约7% (v/v)、低于约8% (v/v)、低于约9% (v/v) 或低于约10% (v/v)。在一些方法中,前原条细胞在无血清或无血清替代物下生长。在其它方法中,前原条细胞在B27存在下生长。在这些方法中,B27添加物的浓度范围为约0.1% (v/v) 至约20% (v/v)。

[0417] 监测多能性细胞向前原条细胞的分化

[0418] hESC培养物至前原条细胞的进程可以通过确定前原条细胞特征性标志物的时间性表达来监测。在一些方法中,一些标志物的表达可通过标志物的存在或缺失来确定。或者,某些标志物的表达可通过测定标志物在细胞培养物或细胞群的细胞中,在加入分化因子之后的一个或多个时间点的水平来确定。在这些方法中,可以定性或定量测定标志物的表达。定量标志物基因产生的标志物表达的一种方法可以使用定量聚合酶链式反应(Q-PCR)。进行Q-PCR的方法为现有技术。现有技术已知的其它方法也可用于定量标志物基因的表达。例如,标志物基因产物的表达可以通过使用针对感兴趣的特异标志物基因产物的抗

体来检测。某些方法中,测定前原条细胞的特征性标志物基因的表达,以及缺乏hESC及其它细胞类型的特征标志物基因的显著表达。其它方法中,确定前原条细胞的特征性标志物基因在加入分化因子后的一个或多个时间点的表达的时间性和量。

[0419] 如以下实施例的进一步所述,前原条细胞的标志物为FGF8和 $\beta$ -连接素。这样,本发明所述方法制备的前原条细胞表达FGF8和 $\beta$ -连接素标志物基因,由此产生FGF8和 $\beta$ -连接素标志物基因产物。在一些实施方案中,FGF8mRNA在前原条细胞但不在hESC中大量表达。FGF8mRNA的显著上调,直至接近峰值水平,可以在hESC接触诸如活化素A的合适的分化因子后6小时时在分化中的hESC培养物中观察到。此时,指示诸如中内胚层、原始内胚层、定形内胚层、中胚层和外胚层的其它细胞类型的标志物(参见表1)的表达依然相对较低。一些实施方案中,指示中内胚层、原始内胚层、定形内胚层、中胚层和外胚层的标志物在hESC接触分化因子后6小时时不显著表达。FGF8mRNA的表达在hESC接触分化因子后至少约24小时维持高水平,但是其后开始下降。此外,hESC接触诸如活化素A的合适的分化因子后17小时,通过免疫细胞化学观察到 $\beta$ -连接素多肽的细胞核定位(细胞核定位的 $\beta$ -连接素的表达)。hESC中,该 $\beta$ -连接素多肽存在于细胞外周但不在细胞核中。

[0420] 应当理解,根据分化条件,在前原条细胞内诱导不同水平范围的FGF8和细胞核定位的 $\beta$ -连接素的表达。这样,在本发明一些实施方案中,在hESC分化的最初6至18小时内,FGF8标志物和/或核定位的 $\beta$ -连接素标志物在前原条细胞或细胞群的表达比这些标志物在非前原条细胞或细胞群中的表达至少高约2倍至至少高约10,000倍。其它实施方案中,在hESC分化的最初6至18小时内,FGF8标志物和/或核定位的 $\beta$ -连接素标志物在前原条细胞或细胞群的表达比FGF8标志物和/或核定位的 $\beta$ -连接素标志物在非前原条细胞或细胞群中的表达高至少约4倍、至少约6倍、至少约8倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约40倍、至少约80倍、至少约100倍、至少约150倍、至少约200倍、至少约500倍、至少约750倍、至少约1000倍、至少约2500倍、至少约5000倍、至少约7500倍或至少约10,000倍。一些实施方案中,在hESC分化的最初6至18小时内,FGF8标志物和/或核定位的 $\beta$ -连接素标志物在前原条细胞或细胞群的表达无限地高于FGF8标志物和/或细胞核定位的 $\beta$ -连接素标志物在非前原条细胞或细胞群中的表达。

[0421] 还应当理解,在前原条细胞内,FGF8标志物的表达水平与brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和/或SOX1标志物的表达水平存在差异范围。类似地,在前原条细胞内,核定位的 $\beta$ -连接素标志物的表达水平与brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和/或SOX1标志物的表达水平存在差异范围。类似地,在本发明一些实施方案中,FGF8标志物和/或核定位的 $\beta$ -连接素标志物的表达比brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和/或SOX1标志物的表达高至少约2倍至至少约10,000倍。其它实施方案中,FGF8标志物和/或核定位的 $\beta$ -连接素标志物的表达比brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和/或SOX1标志物的表达高至少约4倍、至少约6倍、至少约8倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约40倍、至少约80倍、至少约100倍、至少约150倍、至少约200倍、至少约500倍、至少约750倍、至少约1000倍、至少约2500倍、至少约5000倍、至少约7500倍或至少约10,000倍。一些实施方案中,brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和/或SOX1标志物在前原条细胞内不显著表达。

[0422] 前原条细胞的富集、分离和/或纯化

[0423] 关于本发明方法的其它方面,前原条细胞可被富集、分离和/或纯化。一些实施方案中,通过从细胞培养物中分离此类细胞制备富集前原条细胞的细胞群。

[0424] 本文所述方法的一些实施方案中,前原条细胞被荧光标记,然后通过荧光活化细胞分选器(FACS)将其从未标记细胞中分离。这些实施方案中,编码绿色荧光蛋白(GFP)的核酸或编码可表达荧光标志物的其它核酸被用于标记前原条细胞。例如,一些实施方案中,至少一个拷贝的编码GFP或其生物活性片段的核酸被引入多能性细胞中,优选为人胚胎干细胞,该核酸位于FGF8启动子下游,使得GFP基因产物或其生物活性片段的表达处于FGF8启动子的控制之下。一些实施方案中,编码FGF8的核酸的全部编码区被编码GFP或其生物活性片段的核酸替换。其它实施方案中,编码GFP或其生物活性片段的核酸与至少部分FGF8的核酸同框融合,因而提供融合蛋白。这些实施方案中,该融合蛋白保持与GFP类似的荧光活性。

[0425] 荧光标记的细胞,如上述的多能性细胞,分化为如之前所述的前原条细胞。因为前原条细胞表达荧光标志物基因,而非前原条细胞不表达,因此这两种细胞类型可被分开。一些实施方案中,包含荧光标记的前原条细胞和未标记的非前原条细胞的悬浮培养物用FACS分选。前原条细胞被从非前原条细胞分离收集,因而造成所述细胞类型的分离。如果需要的话,分离的细胞组合物可通过更多轮的分选被进一步纯化,该分选使用特异针对前原条细胞的相同或不同标志物。

[0426] 除所述方法之外,可通过其它细胞分离技术分离前原条细胞。此外,可通过在特定生长条件下连续次培养(subculture)的方法富集或分离前原条细胞,该特定生长条件促进前原条细胞的选择性存活或选择性生长。

[0427] 应该理解,上述的富集、分离和纯化方法可用于任何分化阶段的培养物。

[0428] 使用本文所述方法,前原条细胞和/或组织的富集的、分离的和/或纯化的群可体外自hESC培养物或细胞群制备,该hESC培养物或细胞群经历约1小时至约24小时的分化。一些实施方案中,所述细胞进行随机分化。但在优选实施方案中,所述细胞被定向主要分化为前原条细胞。一些优选的富集、分离和/或纯化方法涉及在体外产生始于人胚胎干细胞的前原条细胞。

[0429] 使用本文所述方法,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,细胞群或细胞培养物中前原条细胞的含量可被富集至少约2倍至约1000倍。在一些实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,前原条细胞可被富集至少约5倍至约500倍。在其它实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,前原条细胞可被富集至少约10倍至约200倍。在其它实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,前原条细胞可被富集至少约20倍至约100倍。在其它实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,前原条细胞可被富集至少约40倍至约80倍。在某些实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,前原条细胞可被富集至少约2倍至约20倍。

[0430] 包含前原条细胞的组合物

[0431] 上述方法产生的细胞组合物包括包含前原条细胞的细胞培养物和富集前原条细胞的细胞群。例如,能够产生包含前原条细胞的细胞培养物,其中培养物中至少约5-90%的细胞是前原条细胞。因为可通过调整某些参数(这些参数包括但不限于,细胞生长条件、生长因子浓度和培养步骤的时间安排)来调整分化方法的效率,本文所述的分化方法可导致约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、



约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或超过约95%的多能性细胞向前原条细胞的转化。在使用分离前原条细胞的方法中,可回收基本上纯的前原条细胞群。

[0432] 本发明的一些实施方案涉及包含诸如干细胞的多能性细胞和前原条细胞的组合物,例如细胞群和细胞培养物。例如,用本发明的方法可以产生包含hESC和前原条细胞的混合物的组合物。一些实施方案中,产生包含约每95个多能性细胞对应至少约5个前原条细胞的组合物。其它实施方案中,产生包含约每5个多能性细胞对应至少约95个前原条细胞的组合物。此外,预期可以得到包含前原条细胞和多能性细胞其他比例的组合物。例如,预期可以得到包含至少约1个前原条细胞对应约每1,000,000个多能性细胞、至少约1个前原条细胞对应约每100,000个多能性细胞、至少约1个前原条细胞对应约每10,000个多能性细胞、至少约1个前原条细胞对应约每1000个多能性细胞、至少约1个前原条细胞对应约每500个多能性细胞、至少约1个前原条细胞对应约每100个多能性细胞、至少约1个前原条细胞对应约每10个多能性细胞、至少约1个前原条细胞对应约每5个多能性细胞、至少约1个前原条细胞对应约每2个多能性细胞、至少约2个前原条细胞对应约每1个多能性细胞、至少约5个前原条细胞对应约每1个多能性细胞、至少约10个前原条细胞对应约每1个多能性细胞、至少约20个前原条细胞对应约每1个多能性细胞、至少约50个前原条细胞对应约每1个多能性细胞、至少约100个前原条细胞对应约每1个多能性细胞、至少约1000个前原条细胞对应约每1个多能性细胞、至少约10,000个前原条细胞对应约每1个多能性细胞、至少约100,000个前原条细胞对应约每一个多能性细胞、以及至少约1,000,000个前原条细胞对应约每1个多能性细胞的组合物。一些实施方案中,该多能性细胞是人多能干细胞。某些其他实施方案中,该多能性细胞衍生自发育已经越过胚胎期的多细胞结构的性腺组织或生殖组织。

[0433] 本发明的一些实施方案涉及包含从至少约5%前原条细胞到至少约99%前原条细胞的细胞培养物或细胞群。一些实施方案中,该细胞培养物或细胞群包含哺乳动物细胞。优选实施方案中,该细胞培养物或细胞群包含人细胞。例如,某些特定实施方案涉及含有人细胞的细胞培养物,其中从至少约5%到至少约99%的人类细胞是前原条细胞。其它实施方案涉及含有人细胞的细胞培养物,其中至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或多于99%的人细胞是前原条细胞。一些实施方案中,细胞培养物或细胞群包含人饲养细胞,计算上述百分比时不考虑细胞培养物或细胞群中的人饲养细胞。

[0434] 本发明的其它实施方案涉及包含诸如人前原条细胞的人细胞的组合物,例如细胞培养物或细胞群,其中至少约5%的人细胞中FGF8标志物和/或核定位的 $\beta$ -连接素标志物的表达高于brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和/或SOX1标志物的表达。其他实施方案中,至少约10%的人细胞中、至少约15%的人细胞中、至少约20%的人细胞中、至少约25%的人细胞中、至少约30%的人细胞中、至少约35%的人细胞中、至少约40%的人细胞中、至少约45%的人细胞中、至少约50%的人细胞中、至少约55%的人细胞中、至少约60%的人细胞中、至少约65%的人细胞中、至少约70%的人细胞中、至少约75%的人细胞中、至少约80%的人细胞中、至少约85%的人细胞中、至少约90%的人细胞中、至少约95%的人细胞中、至少约98%的人细胞中、至少约99%的人细胞中或多于99%的人细胞中,FGF8或核定位的 $\beta$ -连接素标志物的表达高于brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和/或SOX1标志物的表达。一些实施方案中,



细胞培养物或细胞群包含人饲养细胞,计算上述百分比时不考虑细胞培养物或细胞群中的人饲养细胞。

[0435] 本发明的其它实施方案涉及包含人hESC和人前原条细胞的组合物,例如细胞培养物或细胞群,其中在细胞培养物或细胞群的细胞中,FGF8mRNA表达的显著上调发生在使培养物中的hESC与诸如活化素A的适当分化因子接触后约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时、约24小时或晚于约24小时。这些实施方案中,FGF8mRNA表达的显著上调发生在至少约5%的人细胞中、至少约10%的人细胞中、至少约15%的人细胞中、至少约20%的人细胞中、至少约25%的人细胞中、至少约30%的人细胞中、至少约35%的人细胞中、至少约40%的人细胞中、至少约45%的人细胞中、至少约50%的人细胞中、至少约55%的人细胞中、至少约60%的人细胞中、至少约65%的人细胞中、至少约70%的人细胞中、至少约75%的人细胞中、至少约80%的人细胞中、至少约85%的人细胞中、至少约90%的人细胞中、至少95%的人细胞中、至少98%的人细胞中、至少99%的人细胞中或多于99%的人细胞中。一些实施方案中,细胞培养物或细胞群包含人饲养细胞,计算上述百分比时不考虑细胞培养物或细胞群中的人饲养细胞。

[0436] 本发明的其它实施方案涉及包含人hESC和人前原条细胞的组合物,例如细胞培养物或细胞群,其中在细胞培养物或细胞群的细胞中, $\beta$ -连接素多肽的显著细胞核定位(核定位的 $\beta$ -连接素标志物的表达)发生在使培养物中的hESC与诸如活化素A的适当分化因子接触后约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时、约24小时或晚于约24小时。这些实施方案中,核定位的 $\beta$ -连接素的表达发生在至少约5%的人细胞中、至少约10%的人细胞中、至少约15%的人细胞中、至少约20%的人细胞中、至少约25%的人细胞中、至少约30%的人细胞中、至少约35%的人细胞中、至少约40%的人细胞中、至少约45%的人细胞中、至少约50%的人细胞中、至少约55%的人细胞中、至少约60%的人细胞中、至少约65%的人细胞中、至少约70%的人细胞中、至少约75%的人细胞中、至少约80%的人细胞中、至少约85%的人细胞中、至少约90%的人细胞中、至少95%的人细胞中、至少98%的人细胞中、至少99%的人细胞中或多于99%的人细胞中。一些实施方案中,细胞培养物或细胞群包含人饲养细胞,计算上述百分比时不考虑细胞培养物或细胞群中的人饲养细胞。

[0437] 使用本发明的方法可以产生基本上不含其它细胞类型的前原条细胞的组合物。本发明的一些实施方案中,通过本发明方法制备的前原条细胞群或细胞培养物基本上不含显著表达brachyury、FGF4、SNAI1、SOX17、FOXA2、SOX7和/或SOX1标志物基因的细胞。

[0438] 一个实施方案中,基于标志物基因表达的前原条细胞的描述是FGF8高、核定位的 $\beta$ -连接素高、brachyury低、FGF4低、SNAI1低、SOX17低、FOXA2低、SOX7低和SOX1低。

[0439] 从多能细胞产生中内胚层细胞

[0440] 一些产生中内胚层细胞的方法中,作为起始材料的多能性细胞是干细胞。某些方法中,从胚胎干细胞产生包含中内胚层细胞的细胞培养物和富集的细胞群。优选的衍生中内胚层细胞的方法利用人胚胎干细胞作为产生中内胚层细胞的起始材料。使用现有技术中

已知的方法,人胚胎干细胞可在培养基中保持多能性状态而基本不分化。所述的方法在诸如美国专利第5,453,357、5,670,372、5,690,926、5,843,780、6,200,806及6,251,671号中有所描述,其公开在此整体引入,以供参考。

[0441] 在产生中内胚层细胞的一些方法中,将hESC维持在滋养层上。在这些方法中,可以使用任何能够使hESC保持在多能性状态的滋养层。一种常用的培养人胚胎干细胞的滋养层为一层小鼠成纤维细胞。最近,人成纤维细胞滋养层也已开发出来用于培养hESC(参见第2002/0072117号美国专利申请,其公开在此整体引入,以供参考)。制备中内胚层细胞的其它方法允许不使用滋养层保持多能hESC。在没有滋养层的条件下保持多能性hESC的方法已在第2003/0175956号美国专利申请中有描述,其公开在此整体引入,以供参考。

[0442] 本发明使用的人胚胎干细胞可以保持在含有或不含有血清的培养基中。在一些胚胎干细胞保持方法中,使用血清替代品。其它方法中,使用无血清培养技术,例如美国专利申请第2003/0190748号所述的方法,其公开在此整体引入,以供参考。

[0443] 在培养物中保持多能性状态的干细胞按照常规传代,直到分化为中内胚层细胞。在一些实施方案中,通过向干细胞培养物中加入诸如TGF $\beta$ 超家族生长因子的分化因子完成向中内胚层细胞的分化,其加入的量足以促进向中内胚层细胞的分化。用于制备中内胚层细胞的TGF $\beta$ 超家族生长因子选自Nodal/活化素亚组。在一些优选的分化方法中,生长因子选自Nodal、活化素A和活化素B。某些分化方法中,使用生长因子活化素A。

[0444] 关于从多能性干细胞向中内胚层细胞分化的一些方法,向细胞提供上述生长因子,使其在培养基中的浓度足以促进至少一部分干细胞分化为中内胚层细胞。在一些方法中,上述生长因子在细胞培养物中存在的浓度为至少约5ng/ml、至少约10ng/ml、至少约25ng/ml、至少约50ng/ml、至少约75ng/ml、至少约100ng/ml、至少约200ng/ml、至少约300ng/ml、至少约400ng/ml、至少约500ng/ml、至少约1000ng/ml、至少约2000ng/ml、至少约3000ng/ml、至少约4000ng/ml、至少约5000ng/ml或大于5000ng/ml。

[0445] 在使多能性干细胞向中内胚层细胞分化的某些方法中,上述生长因子加入细胞培养物后从细胞培养物中除去。例如,可以在约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时、约24小时、约25小时、约26小时、约27小时、约28小时、约29小时、约30小时、约31小时、约32小时、约33小时、约34小时、约35小时、约36小时、约37小时、约38小时、约39小时、约40小时、约41小时、约42小时、约43小时、约44小时、约45小时、约46小时、约47小时、约48小时或约多于48小时之内除去生长因子。

[0446] 可在含有减量血清或不含血清的培养基中培养中内胚层细胞的培养物。在某些培养条件下,血清的浓度范围为约0% (v/v) 至约10% (v/v)。例如,在一些分化方法中,培养基中血清的浓度可以低于约0.05% (v/v)、低于约0.1% (v/v)、低于约0.2% (v/v)、低于约0.3% (v/v)、低于约0.4% (v/v)、低于约0.5% (v/v)、低于约0.6% (v/v)、低于约0.7% (v/v)、低于约0.8% (v/v)、低于约0.9% (v/v)、低于约1% (v/v)、低于约2% (v/v)、低于约3% (v/v)、低于约4% (v/v)、低于约5% (v/v)、低于约6% (v/v)、低于约7% (v/v)、低于约8% (v/v)、低于约9% (v/v) 或低于约10% (v/v)。一些方法中,中内胚层细胞在无血清或无血清替代物下生长。在其它方法中,中内胚层细胞在B27存在下生长。在这些方法中,B27添加物的浓度范围为约0.1% (v/v) 至约20% (v/v)。

[0447] 监测多能性细胞向中内胚层细胞的分化

[0448] 可以通过确定中内胚层细胞特征性标志物的时间性表达来监测hESC培养物向中内胚层细胞的进行。一些方法中,某些标志物的表达可通过检测是否存在该标志物来确定。或者,某些标志物的表达可通过测量该标志物在加入分化因子后的一个或多个时间点细胞培养物或细胞群细胞中存在的水平来确定。在这些方法中,可以定性或定量测定标志物的表达。定量标志物基因产生的标志物表达的一种方法是通过使用Q-PCR。也可以使用本领域已知的其它方法定量标志物基因的表达。例如,可以通过使用对所关注的标志物基因产物特异的抗体来检测标志物基因产物的表达。某些方法中,确定中内胚层细胞的特征性标志物基因的表达以及hESC和其它细胞类型的特征性标志物基因的显著表达的缺乏。其它方法中,测定加入分化因子后的一个或多个时间点时,中内胚层细胞的特征性标志物基因表达的时间性和数量。

[0449] 如以下实施例进一步所述,中内胚层细胞的标志物为brachyury、FGF4和SNAI1。同样地,用本发明所述方法制备的中内胚层细胞表达brachyury、FGF4和SNAI1标志物基因,因此产生brachyury、FGF4和SNAI1标志物基因产物。一些实施方案中,brachyury、FGF4和SNAI1mRNA在中内胚层细胞中但不在hESC中显著表达。在使hESC与诸如活化素A的适当分化因子接触后24小时,可在分化中的hESC培养物中观察到brachyury、FGF4和SNAI1mRNA的显著上调,直至接近峰值。这时,指示诸如原始内胚层、定形内胚层、中胚层和外胚层的其它细胞类型(参见表1)的某些标志物的表达依然相对较低。一些实施方案中,指示原始内胚层、定形内胚层、中胚层和外胚层的某些标志物在使hESC与分化因子接触后24小时不显著表达。一些实施方案中,brachyury、FGF4和/或SNAI1mRNA的表达在使hESC与分化因子接触后24小时之后开始下降。一些实施方案中,brachyury、FGF4和/或SNAI1mRNA的表达在使hESC与分化因子接触后约30小时、约36小时、约42小时、约48小时或晚于约48小时之后开始下降。

[0450] 应当理解,可根据分化条件诱导不同水平的brachyury、FGF4和/或SNAI1在中内胚层细胞中的表达。由此,本发明的一些实施方案中,在从hESC开始分化约24小时之后,brachyury、FGF4和/或SNAI1标志物在中内胚层细胞或细胞群中的表达比这些标志物在非中内胚层细胞或细胞群中的表达高至少约2倍至至少约10,000倍。其它实施方案中,在从hESC开始分化约24小时之后,brachyury、FGF4和/或SNAI1标志物在中内胚层细胞或细胞群中的表达比这些标志物在非中内胚层细胞或细胞群中的表达高至少约4倍、高至少约6倍、高至少约8倍、高至少约10倍、高至少约15倍、高至少约20倍、高至少约40倍、高至少约80倍、高至少约100倍、高至少约150倍、高至少约200倍、高至少约500倍、高至少约750倍、高至少约1000倍、高至少约2500倍、高至少约5000倍、高至少约7500倍或高至少约10,000倍。一些实施方案中,在从hESC开始分化约24小时之后,brachyury、FGF4和/或SNAI1标志物在中内胚层细胞或细胞群中的表达无限地高于brachyury、FGF4和/或SNAI1标志物在非中内胚层细胞或细胞群中的表达。

[0451] 另外,应当理解,在中内胚层细胞内,brachyury、FGF4和/或SNAI1标志物的表达水平与OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和/或SOX1标志物的表达水平存在差异范围。类似地,在本发明一些实施方案中,brachyury、FGF4和/或SNAI1标志物的表达比OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和/或SOX1标志物的表达高至少约2倍至至少约10,000倍。其它实施方案中,brachyury、FGF4和/或SNAI1标志物的表达比OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和/或SOX1

标志物的表达高至少约4倍、至少约6倍、至少约8倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约40倍、至少约80倍、至少约100倍、至少约150倍、至少约200倍、至少约500倍、至少约750倍、至少约1000倍、至少约2500倍、至少约5000倍、至少约7500倍或至少约10,000倍。在一些实施方案中,OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和/或SOX1标志物在中内胚层细胞中不显著表达。

**[0452] 中内胚层细胞的富集、分离和/或纯化**

**[0453]** 关于本发明方法的其它方面,可以富集、分离和/或纯化中内胚层细胞。在一些实施方案中,通过从细胞培养物中分离中内胚层细胞产生富集中内胚层细胞的细胞群。

**[0454]** 本发明方法的一些实施方案中,荧光标记中内胚层细胞,然后使用FACS从未标记的细胞中将其分离。这些实施方案中,使用编码绿色荧光蛋白(GFP)的核酸或编码可表达的荧光标志物基因的另一核酸标记中内胚层细胞。例如,在一些实施方案中,向优选为人胚胎干细胞的多能性细胞中引入编码GFP或其生物活性片段的至少一个拷贝的核酸,该编码GFP或其生物活性片段的至少一个拷贝的核酸位于brachyury、FGF4和SNAI1启动子的下游,使得其处于brachyury、FGF4和SNAI1启动子的控制之下。在一些实施方案中,编码brachyury、FGF4或SNAI1的核酸的全部编码区被编码GFP或其生物活性片段的核酸替代。在其它实施方案中,编码GFP或其生物活性片段的核酸与至少部分编码brachyury、FGF4或SNAI1的核酸同框融合,从而产生融合蛋白。这些实施方案中,该融合蛋白保留了与GFP相似的荧光活性。

**[0455]** 例如上述多能性细胞的荧光标记的细胞如前所述地分化为中内胚层细胞。因为中内胚层细胞表达荧光标志物基因而非中内胚层细胞不表达,这两类细胞可被分开。在一些实施方案中,使用FACS分选包含荧光标记的中内胚层细胞和未标记的非中内胚层细胞混合物的细胞悬浮培养物。中内胚层细胞被从非中内胚层细胞中分离收集,从而导致这些细胞类型的分离。如果需要的话,分离的细胞组合物可通过更多轮的分选被进一步纯化,该分选使用特异针对中内胚层细胞的相同或不同标志物。

**[0456]** 除上述的方法之外,还可以通过细胞分离的其它技术分离中内胚层细胞。另外,还可以通过特定生长条件下连续次培养的方法富集或分离中内胚层细胞,该特定生长条件促进中内胚层细胞的选择性存活或选择性生长。

**[0457]** 应该理解,上述的富集、分离和纯化方法可用于任何分化阶段的培养物。

**[0458]** 使用本文所述方法,富集的、分离的和/或纯化的中内胚层细胞群和/或组织可体外自hESC培养物或细胞群制备,该hESC培养物或细胞群经历约18小时至约48小时的分化。一些实施方案中,所述细胞进行随机分化。但在优选的实施方案中,所述细胞被定向为主要分化为中内胚层细胞。一些优选的富集、分离和/或纯化方法涉及在体外产生始于人胚胎干细胞的中内胚层细胞。

**[0459]** 使用本文所述方法,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,细胞群或细胞培养物中中内胚层细胞的含量可被富集至少约2倍至约1000倍。在一些实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,中内胚层细胞可被富集至少约5倍至约500倍。在其它实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,中内胚层细胞可被富集至少约10倍至约200倍。在其它实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,中内胚层细胞可被富集至少约20倍至约100倍。在其它实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,中内胚层细胞可被富集至少约40倍至约80倍。在某些实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,中内

胚层细胞可被富集至少约2倍至约20倍。

[0460] 包含中内胚层细胞的组合物

[0461] 上述方法产生的细胞组合物包括包含中内胚层细胞的细胞培养物和富集中内胚层细胞的细胞群。例如,能够产生包含中内胚层细胞的细胞培养物,其中培养物中至少约5-90%的细胞是中内胚层细胞。因为可通过调整某些参数(这些参数包括但不限于,细胞生长条件、生长因子浓度和培养步骤的时间安排)来调整分化方法的效率,本文所述的分化方法可导致约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或超过约95%的多能性细胞向中内胚层细胞的转化。在使用分离中内胚层细胞的方法中,可回收基本上纯的中内胚层细胞群。

[0462] 本发明的一些实施方案涉及包含诸如干细胞的多能性细胞和中内胚层细胞的组合物,例如细胞群和细胞培养物。例如,用本发明的方法可以制备包含hESC和中内胚层细胞的混合物的组合物。一些实施方案中,产生包含至少约5个中内胚层细胞对应约每95个多能性细胞的组合物。其它实施方案中,产生包含至少约95个中内胚层细胞对应约每5个多能性细胞的组合物。此外,预期可以得到包含中内胚层细胞和多能细胞其他比例的组合物。例如,预期可以得到包含至少约1个中内胚层细胞对应约每1,000,000个多能性细胞、至少约1个中内胚层细胞对应约每100,000个多能性细胞、至少约1个中内胚层细胞对应约每10,000个多能性细胞、至少约1个中内胚层细胞对应约每1000个多能性细胞、至少约1个中内胚层细胞对应约每500个多能细胞、至少约1个中内胚层细胞对应约每100个多能细胞、至少约1个中内胚层细胞对应约每10个多能细胞、至少约1个中内胚层细胞对应约每5个多能细胞、至少约1个中内胚层细胞对应约每2个多能细胞、至少约2个中内胚层细胞对应约每1个多能细胞、至少约5个中内胚层细胞对应约每1个多能细胞、至少约10个中内胚层细胞对应约每1个多能细胞、至少约20个中内胚层细胞对应约每1个多能细胞、至少约50个中内胚层细胞对应约每1个多能细胞、至少约100个中内胚层细胞对应约每1个多能细胞、至少约1000个中内胚层细胞对应约每1个多能细胞、至少约10,000个中内胚层细胞对应约每1个多能细胞、至少约100,000个中内胚层细胞对应约每1个多能细胞、以及至少约1,000,000个中内胚层细胞对应约每1个多能细胞的组合物。一些实施方案中,该多能性细胞是人多能性干细胞。某些其他实施方案中,该多能性细胞衍生自发育已经越过胚胎期的多细胞结构的性腺组织或生殖组织。

[0463] 本发明的一些实施方案涉及包含从至少约5%的中内胚层细胞到至少约99%的中内胚层细胞的细胞培养物或细胞群。一些实施方案中,该细胞培养物或细胞群包含哺乳动物细胞。优选实施方案中,该细胞培养物或细胞群包含人细胞。例如,某些特定实施方案涉及含有人细胞的细胞培养物,其中从至少约5%到至少约99%的人细胞是中内胚层细胞。其它实施方案涉及含有人细胞的细胞培养物,其中至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或多于99%的人类细胞是中内胚层细胞。一些实施方案中,细胞培养物或细胞群包含人饲养细胞,计算上述百分比时不考虑细胞培养物或细胞群中的人饲养细胞。

[0464] 本发明的其它实施方案涉及包含诸如人中内胚层细胞的人细胞的组合物,例如细

胞培养物或细胞群,其中至少约5%的人细胞中brachyury、FGF4和/或SNAI1标志物的表达高于OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和/或SOX1标志物的表达。其他实施方案中,至少约10%的人细胞中、至少约15%的人细胞中、至少约20%的人细胞中、至少约25%的人细胞中、至少约30%的人细胞中、至少约35%的人细胞中、至少约40%的人细胞中、至少约45%的人细胞中、至少约50%的人细胞中、至少约55%的人细胞中、至少约60%的人细胞中、至少约65%的人细胞中、至少约70%的人细胞中、至少约75%的人细胞中、至少约80%的人细胞中、至少约85%的人细胞中、至少约90%的人细胞中、至少95%的人细胞中、至少98%的人细胞中、至少99%的人细胞中或多于99%的人细胞中,brachyury、FGF4和/或SNAI1标志物的表达高于OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和/或SOX1标志物的表达。一些实施方案中,细胞培养物或细胞群包含人饲养细胞,计算上述百分比时不考虑细胞培养物或细胞群中的人饲养细胞。

[0465] 本发明的其它实施方案涉及包含人hESC和/或人内胚层细胞的组合物,例如细胞培养物或细胞群,其中在细胞培养物或细胞群的细胞中,brachyury、FGF4和/或SNAI1mRNA表达的显著上调发生在使培养物中的hESC与诸如活化素A的适当分化因子接触后约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时、约24小时、约25小时、约26小时、约27小时、约28小时、约29小时、约30小时、约31小时、约32小时、约33小时、约34小时、约35小时、约36小时、约37小时、约38小时、约39小时、约40小时、约41小时、约42小时、约43小时、约44小时、约45小时、约46小时、约47小时、约48小时或晚于约48小时。这些实施方案中,brachyury、FGF4和/或SNAI1mRNA表达的显著上调发生在至少约5%的人细胞中、至少约10%的人细胞中、至少约15%的人细胞中、至少约20%的人细胞中、至少约25%的人细胞中、至少约30%的人细胞中、至少约35%的人细胞中、至少约40%的人细胞中、至少约45%的人细胞中、至少约50%的人细胞中、至少约55%的人细胞中、至少约60%的人细胞中、至少约65%的人细胞中、至少约70%的人细胞中、至少约75%的人细胞中、至少约80%的人细胞中、至少约85%的人细胞中、至少约90%的人细胞中、至少95%的人细胞中、至少98%的人细胞中、至少99%的人细胞中或多于99%的人细胞中。一些实施方案中,细胞培养物或细胞群包含人饲养细胞,计算上述百分比时不考虑细胞培养物或细胞群中的人饲养细胞。

[0466] 使用本发明的方法,可以制备包含基本上不含其它细胞类型的中内胚层细胞的组合物。本发明的一些实施方案中,通过本发明方法制备的中内胚层细胞群或细胞培养物基本上不含显著表达OCT4、SOX17、CXCR4、FOXA2、SOX7和/或SOX1标志物基因的细胞。

[0467] 一个实施方案中,基于标志物基因表达的中内胚层细胞的描述是brachyury高、FGF4高、SNAI1高、SOX17低、CXCR4低、FOXA2低、SOX7低和SOX1低。

#### [0468] 定形内胚层细胞的产生

[0469] 下文简述分化多能性细胞产生包含定形内胚层的细胞培养物和富集的细胞群的方法,在于2004年12月23日提交的题为DEFINITIVE ENDODERM(定形内胚层)的第11/021,618号美国专利中详细描述了该方法,其公开内容在此整体并入以供参考。一些制备定形内胚层细胞的方法中,作为起始材料的多能性细胞是干细胞。某些方法中,从胚胎干细胞产生包含定形内胚层细胞的细胞培养物和富集的细胞群。优选的衍生定形内胚层细胞的方法利用人胚胎干细胞作为产生定形内胚层的起始材料。使用现有技术中已知的方法,人胚胎干细胞可在培养基中保持多能性状态而基本不分化。所述的方法在诸如美国专利第5,453,357、5,670,372、5,690,926、5,843,780、6,200,806及6,251,671号中有所描述,其公开在此

整体引入,以供参考。

[0470] 在产生定形内胚层细胞的一些方法中,将hESC保持在滋养层上。在这些方法中,可以使用任何能够使hESC保持在多能性状态的滋养层。一种常用的培养人胚胎干细胞的滋养层为一层小鼠成纤维细胞。最近,人成纤维细胞滋养层也已开发出来用于培养hESC(参见第2002/0072117号美国专利申请,其公开在此整体引入,以供参考)。制备定形内胚层细胞的其它方法允许不使用滋养层保持多能性hESC。在没有滋养层的条件下保持多能性hESC的方法已在第2003/0175956号美国专利申请中有描述,其公开在此整体引入,以供参考。

[0471] 本发明使用的人胚胎干细胞可以保持在含有或不含有血清的培养基中。在一些胚胎干细胞保持方法中,使用血清替代品。其它方法中,使用无血清培养技术,例如美国专利申请第2003/0190748号所述的方法,其公开在此整体引入,以供参考。

[0472] 在培养物中保持多能性状态的干细胞按照常规传代,直到分化为定形内胚层。在一些方法中,通过向干细胞培养物中加入诸如TGF $\beta$ 超家族生长因子的分化因子完成向定形内胚层的分化,其加入的量足以促进向定形内胚层细胞的分化。可用于制备定形内胚层的TGF $\beta$ 超家族生长因子选自Nodal/活化素亚组。在一些优选的分化方法中,生长因子选自Nodal、活化素A和活化素B。某些分化方法中,可以使用任何上述生长因子的组合。

[0473] 关于从多能性干细胞向定形内胚层细胞分化的一些方法,向细胞提供上述生长因子,使其在培养基中的浓度足以促进至少一部分干细胞分化为定形内胚层细胞。在一些方法中,上述生长因子在细胞培养物中存在的浓度为至少约5ng/ml、至少约10ng/ml、至少约25ng/ml、至少约50ng/ml、至少约75ng/ml、至少约100ng/ml、至少约200ng/ml、至少约300ng/ml、至少约400ng/ml、至少约500ng/ml、至少约1000ng/ml、至少约2000ng/ml、至少约3000ng/ml、至少约4000ng/ml、至少约5000ng/ml或大于约5000ng/ml。

[0474] 在使多能性干细胞向定形内胚层细胞分化的某些方法中,上述生长因子加入细胞培养物后从细胞培养物中除去。例如,可以在加入后约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天或约10天除去生长因子。在优选的方法中,在加入后约4天除去生长因子。

[0475] 可在含有减量血清或不含血清的培养基中培养定形内胚层细胞的培养物。在某些培养条件下,血清的浓度范围为约0.05% (v/v) 至约20% (v/v)。例如,在一些分化方法中,培养基中血清的浓度可以低于约0.05% (v/v)、低于约0.1% (v/v)、低于约0.2% (v/v)、低于约0.3% (v/v)、低于约0.4% (v/v)、低于约0.5% (v/v)、低于约0.6% (v/v)、低于约0.7% (v/v)、低于约0.8% (v/v)、低于约0.9% (v/v)、低于约1% (v/v)、低于约2% (v/v)、低于约3% (v/v)、低于约4% (v/v)、低于约5% (v/v)、低于约6% (v/v)、低于约7% (v/v)、低于约8% (v/v)、低于约9% (v/v)、低于约10% (v/v)、低于约15% (v/v) 或低于约20% (v/v)。一些方法中,定形内胚层细胞在无血清或无血清替代物下生长。一些实施方案中,定形内胚层细胞在有血清替代物下生长。在其它方法中,定形内胚层细胞在B27存在下生长。在这些方法中,B27添加物的浓度范围为约0.1% (v/v) 至约20% (v/v)。

[0476] 监测多能性细胞向定形内胚层细胞的分化

[0477] 可以通过测定定形内胚层特征性标志物的表达来监测hESC培养物向定形内胚层的进行。一些方法中,某些标志物的表达可通过检测是否存在该标志物来确定。或者,某些标志物的表达可通过测量该标志物在细胞培养物或细胞群细胞中存在的水平来确定。在这

些方法中,可以定性或定量测定标志物的表达。定量标志物基因产生的标志物表达的一种方法是通过使用Q-PCR。也可以使用本领域已知的其它方法定量标志物基因的表达。例如,可以通过使用对所关注的标志物基因产物特异的抗体来检测标志物基因产物的表达。某些方法中,确定定形内胚层的特征性标志物基因的表达以及hESC和其它细胞类型的特征性标志物基因的显著表达的缺乏。

[0478] 如以下实施例进一步所述,定形内胚层的可靠标志物为SOX17基因。这样,用本发明所述方法产生的定形内胚层细胞表达SOX17标志物基因,因此产生SOX17基因产物。定形内胚层的其它标志物为MIXL1、GATA4、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1和CRIP1。因为定形内胚层细胞表达SOX17标志物基因的水平高于表达SOX7标志物基因的水平,所以在一些方法中,既监测SOX17又监测SOX7的表达,SOX7是原始内胚层和内脏内胚层的特征性标志物基因。其它方法中,既监测SOX17标志物基因又监测OCT4标志物基因的表达,OCT4是hESC的特征性标志物基因。另外,因为定形内胚层细胞表达SOX17标志物基因的水平高于表达AFP、SPARC或血栓调节蛋白(TM)标志物基因的水平,所以还可以监测这些基因的表达。

[0479] 定形内胚层的另一标志物是CXCR4基因。CXCR4基因编码配体为趋化吸引剂SDF-1的细胞表面趋化因子受体。成体中具有CXCR4受体的细胞的主要作用被认为有造血细胞向骨髓的迁移、淋巴细胞传输以及各种B细胞和巨噬细胞血细胞谱系的分化[Kim,C.,and Broxmeyer,H.J.Leukocyte Biol.65,6-15(1999)]。CXCR4受体还作为HIV-1进入T细胞的共同受体[Feng,Y.,et al.Science,272,872-877(1996)]。在[McGrath,K.E.et al.Dev.Biology213,442-456(1999)]进行的一系列广泛研究中,描述了小鼠中趋化因子受体CXCR4及其独特的配体SDF-1[Kim,C.,and Broxmeyer,H.J.Leukocyte Biol.65,6-15(1999)]在早期发育和成体生活期间的表达。当证实转基因小鼠中,CXCR4和SDF-1的任意一个被破坏[Nagasawa et al.Nature,382,635-638(1996);Ma,Q.,et al Immunity,10,463-471(1999)]都导致晚期胚胎死亡时,发育中CXCR4/SDF-1的相互作用变得明显。McGrath等人使用RNase保护和原位杂交方法证实CXCR4是在早期原肠胚(E7.5)期间检测到的最大量的趋化因子受体信使RNA。在原肠胚中,CXCR4/SDF-1信号看来主要涉及诱导原条胚层细胞的迁移,并且其在此时存在的定形内胚层、中胚层和胚外中胚层表达。在E7.2-7.8小鼠胚胎中,CXCR4和甲胎蛋白互相排斥,表明其在内脏内胚层缺乏表达[McGrath,K.E.et al.Dev.Biology213,442-456(1999)]。

[0480] 因为通过分化多能性细胞制备的定形内胚层细胞表达CXCR4标志物基因,所以为了追踪定形内胚层细胞的产生可以监测CXCR4的表达。另外,用本发明方法制备的定形内胚层细胞表达定形内胚层的其它标志物,包括但不限于SOX17、MIXL1、GATA4、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1和CRIP1。因为定形内胚层细胞表达CXCR4标志物基因的水平高于表达SOX7标志物基因的水平,所以可以既监测CXCR4又监测SOX7的表达。其它方法中,监测CXCR4标志物基因和OCT4标志物基因的表达。另外,因为定形内胚层细胞表达CXCR4标志物基因的水平高于表达AFP、SPARC或血栓调节蛋白(TM)标志物基因的水平,所以还可以监测这些基因的表达。

[0481] 应当理解,CXCR4在内胚层细胞中的表达不排除SOX17的表达。由此,用本发明方法产生的定形内胚层细胞将显著表达SOX17和CXCR4,但不会显著表达AFP、TM、SPARC或PDX1。



[0482] 定形内胚层细胞的富集、分离和/或纯化

[0483] 可以使用对该细胞特异的亲和标签富集、分离和/或纯化通过任何上述方法制备的定形内胚层细胞。对定形内胚层细胞特异的亲和标签的实例是对诸如多肽的标志物分子特异的抗体、配体或其它结合剂,该标志物分子存在于定形内胚层细胞的细胞表面,但不在可在通过本发明方法产生的细胞培养物中找到的其它细胞类型上显著存在。在一些方法中,结合CXCR4的抗体被用做富集、分离和/或纯化定形内胚层细胞的亲和标签。在其它方法中,趋化因子SDF-1或基于SDF-1的其它分子也可以被用做亲和标签。这样的分子包括但不限于SDF-1片段、SDF-1融和物或SDF-1模拟物。

[0484] 本领域已知制备抗体以及使用它们分离细胞的方法,这些方法可用于本文所述的抗体和定形内胚层细胞。一种方法中,结合CXCR4的抗体被连接到磁珠上,然后使其在细胞培养物中与定形内胚层细胞结合,该细胞培养物已经过酶处理以减少细胞间及与基质间的粘附。然后将该细胞/抗体/珠子复合体暴露于用于从未结合细胞中分离珠子结合的定形内胚层细胞的活动磁场中。一旦定形内胚层细胞与培养物的其它细胞物理分离,就破坏所述抗体结合,并且将定形内胚层细胞再次接种在适当的组织培养培养基中。

[0485] 也可以使用其它方法获得富集的、分离的或纯化的定形内胚层细胞培养物或群。例如,在一些实施方案中,CXCR4抗体与含有定形内胚层的细胞培养物一起孵育,该细胞培养物已经过酶处理以减少细胞间及与基质间的粘附。然后清洗、离心并且再次悬浮这些细胞。然后该细胞悬浮物与诸如能够结合所述初级抗体的FITC-偶联抗体等二级抗体一起孵育。然后清洗、离心并且在缓冲液中再次悬浮这些细胞。然后使用荧光激活细胞分选仪(FACS)分析和分选该细胞悬浮物。CXCR4-阳性细胞被从CXCR4-阴性细胞中分离收集,因此产生该细胞类型的分离。如果需要的话,分离的细胞组合物可通过更多轮的分选被进一步纯化,该分选通过其它基于亲和的方法或者使用特异针对定形内胚层细胞的相同或不同标志物。

[0486] 在其它方法中,可以使用配体或与CXCR4结合的其它分子富集、分离和/或纯化定形内胚层细胞。在一些实施方案中,该分子是SDF-1或其片段、融合物或模拟物。

[0487] 优选的方法中,在诱导干细胞培养物向定形内胚层谱系分化后,从其它非定形内胚层细胞富集、分离和/或纯化定形内胚层细胞。应当理解,上述富集、分离和纯化方法可用于处于分化任何阶段的培养物。

[0488] 除了刚描述过的方法外,也可以使用其它细胞分离技术分离定形内胚层细胞。另外,还可以通过特定生长条件下连续次培养的方法富集或分离定形内胚层细胞,该特定生长条件促进定形内胚层细胞的选择性存活或选择性生长。

[0489] 使用本发明的方法,富集的、分离的和/或纯化的定形内胚层细胞群和/或组织可在体外自多能性细胞培养物或细胞群产生,例如已经经历至少一些分化的干细胞培养物或细胞群。在一些方法中,所述细胞进行随机分化。但在优选的方法中,所述细胞被定向主要分化为定形内胚层细胞。一些优选的富集、分离和/或纯化方法涉及在体外产生始于人胚胎干细胞的定形内胚层细胞。使用本发明的方法,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,细胞群或细胞培养物中定形内胚层细胞的含量可被富集至少约2倍至约1000倍。

[0490] 包含定形内胚层细胞的组合物

[0491] 上述方法产生的细胞组合物包括包含定形内胚层细胞的细胞培养物和富集定形

内胚层细胞的细胞群。例如,可以产生包含定形内胚层细胞的细胞培养物,其中该细胞培养物或细胞群中至少约50-90%的细胞是定形内胚层细胞。因为可通过调整某些参数(这些参数包括但不限于,细胞生长条件、生长因子浓度和培养步骤的时间安排)来调整分化方法的效率,本文所述的分化方法可导致约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约98%、约99%或超过约99%的多能性细胞向定形内胚层细胞转化。在使用分离定形内胚层细胞的方法中,例如通过使用与CXCR4受体结合的亲和试剂,可回收基本上纯的定形内胚层细胞群。一些实施方案中,细胞培养物或细胞群包含人饲养细胞,计算上述百分比时不考虑细胞培养物或细胞群中的人饲养细胞。

[0492] 鉴定能够促进前原条和/或中内胚层分化的因子

[0493] 本发明的某些筛选方法涉及鉴定能够促进前原条和/或中内胚层细胞分化的至少一种分化因子的方法。这些方法的一些实施方案中,获得包含诸如人前原条和/或中内胚层细胞的前原条和/或中内胚层细胞的细胞群。然后向该细胞群提供候选分化因子。在第一时间点,其在提供候选分化因子之前或大约同时,确定标志物的表达。或者,可以在提供候选因子之后确定该标志物的表达。在第二时间点,其在第一时间点之后并且在向所述细胞群提供候选分化因子之后,再次确定相同标志物的表达。通过比较所述标志物在第一时间点的表达和所述标志物在第二时间点的表达,确定所述候选分化因子是否能够促进定形内胚层细胞的分化。如果所述标志物在第二时间点的表达比所述标志物在第一时间点的表达增加或减少,则所述候选分化因子能够促进定形内胚层细胞的分化。

[0494] 本发明筛选方法的一些实施方案使用包含人前原条和/或中内胚层细胞的细胞群或细胞培养物。例如,该细胞群可以是基本上纯的人前原条和/或中内胚层细胞群。或者,该细胞群可以是富集的人前原条和/或中内胚层细胞群,其中该细胞群中至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或多于至少约99%的人细胞是人前原条和/或中内胚层细胞。本发明的其它实施方案中,所述细胞群包含人细胞,其中至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%或多于至少约85%的人细胞是人前原条和/或中内胚层细胞。其它实施方案中,所述细胞群包含非人细胞,例如非人饲养细胞。其它实施方案中,所述细胞群包含人饲养细胞。这些实施方案中,至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或多于至少约95%的除所述饲养细胞外的人细胞是人前原条和/或中内胚层细胞。

[0495] 本发明筛选方法的一些实施方案中,使所述细胞群接触候选(测试)分化因子,或者以其它方式向所述细胞群提供候选(测试)分化因子。该候选分化因子可以包括有可能促进人前原条和/或中内胚层细胞分化的任何分子。本发明的一些实施方案中,所述候选分化因子包括已知是一种或多种细胞类型的分化因子的分子。其它实施方案中,所述候选分化因子包括未知能够促进细胞分化的分子。在优选实施方案中,所述候选分化因子包括未知能够促进人前原条和/或中内胚层细胞分化的分子。

[0496] 本发明筛选方法的一些实施方案中,所述候选分化因子包括小分子。在优选实施

方案中,小分子是分子量约10,000amu或更小的分子。在一些实施方案中,小分子是类视黄醇,例如视黄酸。

[0497] 本发明的其它实施方案中,候选分化因子包括多肽。该多肽可以是包括但不限于糖蛋白、脂蛋白、细胞外基质蛋白、细胞因子、趋化因子、肽类激素、白介素或生长因子的任何多肽。优选的多肽包括生长因子。一些优选实施方案中,候选分化因子包括一种或多种选自FGF10、FGF4、FGF2和Wnt3B的生长因子。

[0498] 本文所述筛选方法的一些实施方案中,候选分化因子包括一种或多种选自双调蛋白(amphiregulin)、B-淋巴细胞刺激因子、IL-16、胸腺生成素、TRAIL/Apo-2、前B细胞集落增强因子、内皮分化相关因子1(EDF1)、内皮单核细胞活化多肽II、巨噬细胞移动抑制因子(MIF)、自然杀伤细胞增强因子(NKEFA)、骨形态发生蛋白2、骨形态发生蛋白8(成骨蛋白2)、骨形态发生蛋白6、骨形态发生蛋白7、结缔组织生长因子(CTGF)、CGI-149蛋白(神经内分泌分化因子)、细胞因子A3(巨噬细胞炎性蛋白1- $\alpha$ )、神经胶母细胞分化相关蛋白(GBDR1)、肝癌衍生生长因子、神经调节肽U-25前体、血管内皮生长因子(VEGF)、血管内皮生长因子B(VEGF-B)、T细胞特异RANTES前体、胸腺树突状细胞衍生因子1、运铁蛋白、白介素-1(IL1)、白介素-2(IL2)、白介素-3(IL3)、白介素-4(IL4)、白介素-5(IL5)、白介素-6(IL6)、白介素-7(IL7)、白介素-8(IL8)、白介素-9(IL9)、白介素-10(IL10)、白介素-11(IL11)、白介素-12(IL12)、白介素-13(IL13)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、红细胞生成素、血小板生成素、维生素D<sub>3</sub>、表皮生长因子(EGF)、脑衍生神经营养因子、白血病抑制因子、甲状腺激素、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、aFGF、FGF-4、FGF-6、角质形成细胞生长因子(KGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、血小板衍生生长因子BB、 $\beta$ 神经生长因子、活化素A、转化生长因子 $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)、干扰素- $\alpha$ 、干扰素- $\beta$ 、干扰素- $\gamma$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、肿瘤坏死因子- $\beta$ 、爆裂刺激活性物(BPA)、红细胞系刺激活性物(EPA)、PGE<sub>2</sub>、胰岛素生长因子(IGF-1)、IGF-II、神经营养蛋白生长因子(NGF)、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白4/5、睫状神经营养因子、胶质源性连接蛋白(Glia1-derived nexin)、地塞米松(Dexamethasone)、 $\beta$ -巯基乙醇、视黄酸、叔丁对甲氧酚、5-氮杂胞苷、两性霉素B、抗坏血酸、抗坏血酸盐、异丁基黄嘌呤、吡啶美辛、 $\beta$ -甘油磷酸盐、烟酰胺、DMSO、噻唑烷二酮、TWS119、氧化毒素(oxytoxin)、血管升压素、促黑素细胞激素、促皮质激素、促脂解素、促甲状腺素、生长激素、促乳素、黄体生成素、人绒毛膜促性腺激素、促卵泡激素、促肾上腺皮质激素释放因子、促性腺激素释放因子、促乳素释放因子、促乳素抑制因子、生长激素释放因子、促生长素抑制素、促甲状腺素释放因子、降钙素基因相关肽、甲状旁腺激素、胰高血糖素样肽1、葡萄糖依赖性促胰岛多肽、胃泌素、肠促胰液素、缩胆囊素、促胃动素、血管活性肠肽、P物质、胰多肽、酪酪肽、酪神经肽、胰岛素、胰高血糖素、胎盘促乳素、松弛素、血管紧张素II、钙三醇、心房钠尿肽、褪黑激素、甲状腺素、三碘甲腺原氨酸、降钙素、雌二醇、雌酮、孕酮、睾酮、皮质醇、皮质酮、醛固酮、肾上腺素、去甲肾上腺素、雄甾烯(androstiene)、钙三醇、胶原蛋白、地塞米松、 $\beta$ -巯基乙醇、视黄酸、叔丁对甲氧酚、5-氮杂胞苷、两性霉素B、抗坏血酸、抗坏血酸盐、异丁基黄嘌呤、吡啶美辛、 $\beta$ -甘油磷酸盐、烟酰胺、DMSO、噻唑烷二酮和TWS119的生长因子。

[0499] 本发明筛选方法的一些实施方案中,以一种或多种浓度向细胞群提供候选分化因子。一些实施方案中,向细胞群提供候选分化因子使围绕细胞的培养基中候选分化因子的

浓度范围为从约0.1ng/ml到约10mg/ml。一些实施方案中,围绕细胞的培养基中候选分化因子的浓度范围为从约1ng/ml到约1mg/ml。其它实施方案中,围绕细胞的培养基中候选分化因子的浓度范围为从约10ng/ml到约100 $\mu$ g/ml。其它实施方案中,围绕细胞的培养基中候选分化因子的浓度范围为从约100ng/ml到约10 $\mu$ g/ml。优选实施方案中,围绕细胞的培养基中候选分化因子的浓度为约5ng/ml、约25ng/ml、约50ng/ml、约75ng/ml、约100ng/ml、约125ng/ml、约150ng/ml、约175ng/ml、约200ng/ml、约225ng/ml、约250ng/ml、约275ng/ml、约300ng/ml、约325ng/ml、约350ng/ml、约375ng/ml、约400ng/ml、约425ng/ml、约450ng/ml、约475ng/ml、约500ng/ml、约525ng/ml、约550ng/ml、约575ng/ml、约600ng/ml、约625ng/ml、约650ng/ml、约675ng/ml、约700ng/ml、约725ng/ml、约750ng/ml、约775ng/ml、约800ng/ml、约825ng/ml、约850ng/ml、约875ng/ml、约900ng/ml、约925ng/ml、约950ng/ml、约975ng/ml、约1 $\mu$ g/ml、约2 $\mu$ g/ml、约3 $\mu$ g/ml、约4 $\mu$ g/ml、约5 $\mu$ g/ml、约6 $\mu$ g/ml、约7 $\mu$ g/ml、约8 $\mu$ g/ml、约9 $\mu$ g/ml、约10 $\mu$ g/ml、约11 $\mu$ g/ml、约12 $\mu$ g/ml、约13 $\mu$ g/ml、约14 $\mu$ g/ml、约15 $\mu$ g/ml、约16 $\mu$ g/ml、约17 $\mu$ g/ml、约18 $\mu$ g/ml、约19 $\mu$ g/ml、约20 $\mu$ g/ml、约25 $\mu$ g/ml、约50 $\mu$ g/ml、约75 $\mu$ g/ml、约100 $\mu$ g/ml、约125 $\mu$ g/ml、约150 $\mu$ g/ml、约175 $\mu$ g/ml、约200 $\mu$ g/ml、约250 $\mu$ g/ml、约300 $\mu$ g/ml、约350 $\mu$ g/ml、约400 $\mu$ g/ml、约450 $\mu$ g/ml、约500 $\mu$ g/ml、约550 $\mu$ g/ml、约600 $\mu$ g/ml、约650 $\mu$ g/ml、约700 $\mu$ g/ml、约750 $\mu$ g/ml、约800 $\mu$ g/ml、约850 $\mu$ g/ml、约900 $\mu$ g/ml、约950 $\mu$ g/ml、约1000 $\mu$ g/ml或大于1000 $\mu$ g/ml。

[0500] 本发明筛选方法的某些实施方案中,向细胞群提供除前肠分化因子之外的包括任何分子的候选分化因子。例如,一些实施方案中,向细胞群提供除类视黄醇、生长因子TGF $\beta$ 超家族的成员、FGF10和FGF4之外的包括任何分子的候选分化因子。一些实施方案中,向细胞群提供除视黄酸之外的包括任何分子的候选分化因子。

[0501] 一些实施方案中,本文所述筛选方法的步骤包括确定至少一种标志物在第一时间点和第二时间点的表达。一些实施方案中,该第一时间点可以在向细胞群提供候选分化因子之前或与之大致同时。或者,一些实施方案中,该第一时间点在向细胞群提供候选分化因子之后。一些实施方案中,确定多种标志物在第一时间点的表达。

[0502] 除确定至少一种标志物在第一时间点的表达之外,本文所述筛选方法的一些实施方案考虑确定至少一种标志物在第二时间点的表达,该第二时间点在第一时间点之后,也在向细胞群提供候选分化因子之后。这些实施方案中,确定相同标志物在第一时间点和第二时间点的表达。一些实施方案中,确定多种标志物在第一时间点和第二时间点的表达。这些实施方案中,确定相同的多种标志物在第一时间点和第二时间点的表达。一些实施方案中,在多个时间点确定标志物的表达,其中每一个都在第一时间点之后,并且每一个都在向细胞群提供候选分化因子之后。某些实施方案中,用Q-PCR确定标志物的表达。其它实施方案中,用免疫细胞化学确定标志物的表达。

[0503] 本文所述筛选方法的某些实施方案中,在第一时间点和第二时间点确定其表达的标志物是与人前原条细胞和/或中内胚层细胞分化为特定细胞相关的标志物,该特定细胞为组成衍生自肠管的组织和/或器官的细胞的前体。一些实施方案中,衍生自肠管的组织和/或器官包含终末分化的细胞。一些实施方案中,标志物指示胰细胞或胰前体细胞。优选实施方案中,标志物是胰-十二指肠同源框因子-1(PDX1)。其它实施方案中,标志物是同源框A13(HOXA13)或同源框C6(HOXC6)。另外,其它实施方案中,标志物指示肝细胞或肝前体细

胞。某些优选实施方案中,标志物是白蛋白、肝细胞特异性抗原(HSA)或普洛斯彼罗(prospéro)-相关同源框1(PROX1)。其它实施方案中,标志物指示肺或肺前体细胞。一些优选实施方案中,标志物是甲状腺转录因子1(TITF1)。其它实施方案中,标志物指示肠或肠前体细胞。其它优选实施方案中,标志物是绒毛蛋白(villin)或尾型同源框转录因子2(CDX2)。其它实施方案中,标志物指示胃或胃前体细胞。其它优选实施方案中,标志物是VACM1、VMF或CXCR4。其它实施方案中,标志物指示甲状腺或甲状腺前体细胞。这些实施方案中,标志物是TITF1。其它实施方案中,标志物指示胸腺或胸腺前体细胞。

[0504] 本发明筛选方法的一些实施方案中,使向细胞群提供候选趋化因子和确定标记物在第二时间点的表达之间经过足够长的时间。该向细胞群提供候选趋化因子和确定标记物在第二时间点的表达之间的足够的时间间隔可以从最短约1小时到最长约10天。一些实施方案中,向细胞群提供候选趋化因子后多次确定至少一种标志物的表达。一些实施方案中,该足够的时间间隔是最短约1小时、最短约6小时、最短约12小时、最短约18小时、最短约24小时、最短约30小时、最短约36小时、最短约42小时、最短约48小时、最短约54小时、最短约60小时、最短约66小时、最短约72小时、最短约78小时、最短约84小时、最短约90小时、最短约96小时、最短约102小时、最短约108小时、最短约114小时、最短约120小时、最短约126小时、最短约132小时、最短约138小时、最短约144小时、最短约150小时、最短约156小时、最短约162小时、最短约168小时、最短约174小时、最短约180小时、最短约186小时、最短约192小时、最短约198小时、最短约204小时、最短约210小时、最短约216小时、最短约222小时、最短约228小时、最短约234小时或最短约240小时。

[0505] 本文所述方法的一些实施方案中,进一步确定标志物在第二时间点的表达与该标志物在第一时间点的表达相比是否增加或减少。所述至少一种标志物表达的增加或减少表明候选分化因子能够促进定形内胚层细胞的分化。类似地,如果确定了多种标志物表达,进一步确定该多种标志物在第二时间点的表达与该多种标志物在第一时间点的表达相比是否增加或减少。可以通过测量或评估细胞群中标志物在第一和第二时间点的数量、水平或活性来确定标志物表达的增加或减少。这种确定可以是与其它标志物(如看家基因的表达)相比较的,或绝对的。某些实施方案中,其中标志物在第二时间点的表达比其在第一时间点的表达增加了,增加的量为至少约2倍、至少约5倍、至少约10倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍、至少约50倍、至少约60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍、至少约100倍或多于至少约100倍。一些实施方案中,增加的量为少于2倍。标志物在第二时间点的表达比其在第一时间点的表达减少的实施方案中,减少的量为至少约2倍、至少约5倍、至少约10倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍、至少约50倍、至少约60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍、至少约100倍或多于至少约100倍。一些实施方案中,减少的量为少于2倍。

[0506] 本文所述筛选方法的一些实施方案中,向细胞群提供候选趋化因子之后,人前原条和/或中内胚层细胞分化成一种或多种定形内胚层谱系的细胞类型。一些实施方案中,向细胞群提供候选趋化因子之后,人前原条和/或中内胚层细胞分化为衍生自肠管的细胞。这些细胞包括但不限于,胰腺、肝、肺、胃、肠、甲状腺、胸腺、咽、胆囊和膀胱的细胞和这些细胞的前体。此外,这些细胞可以进一步发育为更高级的结构如组织和/或器官。

[0507] 本发明的筛选方法的其它实施方案中,向所述细胞群提供候选分化因子之后,所述人前原条和/或中内胚层细胞分化为中胚层谱系的一种或多种细胞类型。一些实施方案

中,向所述细胞群提供候选分化因子之后,所述人前原条和/或中内胚层细胞分化为包括但不限于血细胞、心血管系统的细胞、骨骼组织及其它结构和结缔组织以及每一前述细胞类型的前体的细胞。或者,这些细胞可以进一步发育为诸如组织和/或器官的更高级结构。

#### [0508] 增加FGF8基因产物表达的方法

[0509] 本发明方法的一些实施方案涉及在体外增加FGF8基因产物在人胚胎干细胞中的表达的方法。此类方法包括在含有少于约2% (v/v) 血清的培养基中获得所述hESC的步骤。例如,该培养基可以含有浓度为约0% (v/v)、约0.05% (v/v)、约0.1% (v/v)、约0.2% (v/v)、约0.3% (v/v)、约0.4% (v/v)、约0.5% (v/v)、约0.6% (v/v)、约0.7% (v/v)、约0.8% (v/v)、约0.9% (v/v)、约1% (v/v)、约1.1% (v/v)、约1.2% (v/v)、约1.3% (v/v)、约1.4% (v/v)、约1.5% (v/v)、约1.6% (v/v)、约1.7% (v/v)、约1.8% (v/v)、约1.9% (v/v) 的血清。一些实施方案中,所述培养基不包含血清替代物。让hESC与足以增加FGF8基因产物的表达的量的分化因子接触。一些实施方案中,所述分化因子是至少一种TGF $\beta$ 超家族的生长因子。在优选实施方案中,所述TGF $\beta$ 超家族的生长因子是活化素A。用于接触hESC的分化因子的浓度范围从约1ng/ml至约1mg/ml。例如,分化因子可以以1ng/ml、约5ng/ml、约25ng/ml、约50ng/ml、约75ng/ml、约100ng/ml、约125ng/ml、约150ng/ml、约175ng/ml、约200ng/ml、约225ng/ml、约250ng/ml、约275ng/ml、约300ng/ml、约325ng/ml、约350ng/ml、约375ng/ml、约400ng/ml、约425ng/ml、约450ng/ml、约475ng/ml、约500ng/ml、约525ng/ml、约550ng/ml、约575ng/ml、约600ng/ml、约625ng/ml、约650ng/ml、约675ng/ml、约700ng/ml、约725ng/ml、约750ng/ml、约775ng/ml、约800ng/ml、约825ng/ml、约850ng/ml、约875ng/ml、约900ng/ml、约925ng/ml、约950ng/ml、约975ng/ml、约1 $\mu$ g/ml、约2 $\mu$ g/ml、约3 $\mu$ g/ml、约4 $\mu$ g/ml、约5 $\mu$ g/ml、约6 $\mu$ g/ml、约7 $\mu$ g/ml、约8 $\mu$ g/ml、约9 $\mu$ g/ml、约10 $\mu$ g/ml、约11 $\mu$ g/ml、约12 $\mu$ g/ml、约13 $\mu$ g/ml、约14 $\mu$ g/ml、约15 $\mu$ g/ml、约16 $\mu$ g/ml、约17 $\mu$ g/ml、约18 $\mu$ g/ml、约19 $\mu$ g/ml、约20 $\mu$ g/ml、约25 $\mu$ g/ml、约50 $\mu$ g/ml、约75 $\mu$ g/ml、约100 $\mu$ g/ml、约125 $\mu$ g/ml、约150 $\mu$ g/ml、约175 $\mu$ g/ml、约200 $\mu$ g/ml、约250 $\mu$ g/ml、约300 $\mu$ g/ml、约350 $\mu$ g/ml、约400 $\mu$ g/ml、约450 $\mu$ g/ml、约500 $\mu$ g/ml、约550 $\mu$ g/ml、约600 $\mu$ g/ml、约650 $\mu$ g/ml、约700 $\mu$ g/ml、约750 $\mu$ g/ml、约800 $\mu$ g/ml、约850 $\mu$ g/ml、约900 $\mu$ g/ml、约950 $\mu$ g/ml、约1000 $\mu$ g/ml的浓度接触hESC。

#### [0510] 增加Brachyury、FGF4和/或SNAI1基因产物表达的方法

[0511] 本发明的其它实施方案涉及在体外增加brachyury、FGF4和/或SNAI1基因产物在人胚胎干细胞中的表达的方法。此类方法包括在含有少于约2% (v/v) 血清的培养基中获得所述hESC的步骤。例如,该培养基可以含有浓度为约0% (v/v)、约0.05% (v/v)、约0.1% (v/v)、约0.2% (v/v)、约0.3% (v/v)、约0.4% (v/v)、约0.5% (v/v)、约0.6% (v/v)、约0.7% (v/v)、约0.8% (v/v)、约0.9% (v/v)、约1% (v/v)、约1.1% (v/v)、约1.2% (v/v)、约1.3% (v/v)、约1.4% (v/v)、约1.5% (v/v)、约1.6% (v/v)、约1.7% (v/v)、约1.8% (v/v)、约1.9% (v/v) 的血清。一些实施方案中,所述培养基不包含血清替代物。让hESC与足以增加brachyury、FGF4和/或SNAI1基因产物的表达的量的分化因子接触。一些实施方案中,所述分化因子是至少一种TGF $\beta$ 超家族的生长因子。在优选实施方案中,所述TGF $\beta$ 超家族的生长因子是活化素A。用于接触hESC的分化因子的浓度范围从约1ng/ml至约1mg/ml。例如,分化因子可以以1ng/ml、约5ng/ml、约25ng/ml、约50ng/ml、约75ng/ml、约100ng/ml、约125ng/ml、约150ng/ml、约175ng/ml、约200ng/ml、约225ng/ml、约250ng/ml、约275ng/ml、约300ng/ml、约325ng/ml、约350ng/ml、约

375ng/ml、约400ng/ml、约425ng/ml、约450ng/ml、约475ng/ml、约500ng/ml、约525ng/ml、约550ng/ml、约575ng/ml、约600ng/ml、约625ng/ml、约650ng/ml、约675ng/ml、约700ng/ml、约725ng/ml、约750ng/ml、约775ng/ml、约800ng/ml、约825ng/ml、约850ng/ml、约875ng/ml、约900ng/ml、约925ng/ml、约950ng/ml、约975ng/ml、约1 $\mu$ g/ml、约2 $\mu$ g/ml、约3 $\mu$ g/ml、约4 $\mu$ g/ml、约5 $\mu$ g/ml、约6 $\mu$ g/ml、约7 $\mu$ g/ml、约8 $\mu$ g/ml、约9 $\mu$ g/ml、约10 $\mu$ g/ml、约11 $\mu$ g/ml、约12 $\mu$ g/ml、约13 $\mu$ g/ml、约14 $\mu$ g/ml、约15 $\mu$ g/ml、约16 $\mu$ g/ml、约17 $\mu$ g/ml、约18 $\mu$ g/ml、约19 $\mu$ g/ml、约20 $\mu$ g/ml、约25 $\mu$ g/ml、约50 $\mu$ g/ml、约75 $\mu$ g/ml、约100 $\mu$ g/ml、约125 $\mu$ g/ml、约150 $\mu$ g/ml、约175 $\mu$ g/ml、约200 $\mu$ g/ml、约250 $\mu$ g/ml、约300 $\mu$ g/ml、约350 $\mu$ g/ml、约400 $\mu$ g/ml、约450 $\mu$ g/ml、约500 $\mu$ g/ml、约550 $\mu$ g/ml、约600 $\mu$ g/ml、约650 $\mu$ g/ml、约700 $\mu$ g/ml、约750 $\mu$ g/ml、约800 $\mu$ g/ml、约850 $\mu$ g/ml、约900 $\mu$ g/ml、约950 $\mu$ g/ml、约1000 $\mu$ g/ml的浓度接触hESC。

[0512] 基因产物在细胞培养物中的时间性表达

[0513] 本发明的其它实施方案涉及具有特定时间模式的基因表达的细胞培养物。一些实施方案中,该细胞培养物包含人胚胎干细胞(hESC)和含有少于约2%(v/v)血清的培养基。例如,该培养基可以含有浓度为约0%(v/v)、约0.05%(v/v)、约0.1%(v/v)、约0.2%(v/v)、约0.3%(v/v)、约0.4%(v/v)、约0.5%(v/v)、约0.6%(v/v)、约0.7%(v/v)、约0.8%(v/v)、约0.9%(v/v)、约1%(v/v)、约1.1%(v/v)、约1.2%(v/v)、约1.3%(v/v)、约1.4%(v/v)、约1.5%(v/v)、约1.6%(v/v)、约1.7%(v/v)、约1.8%(v/v)、约1.9%(v/v)的血清。一些实施方案中,所述培养基不包含血清替代物。一些实施方案中,所述培养基是低血清RPMI。

[0514] 本发明的一些实施方案中,培养物中的hESC在参考时间点开始分化。该参考时间点是向所述细胞提供分化因子的点。一些实施方案中,所述分化因子是至少一种TGF $\beta$ 超家族的生长因子。在优选实施方案中,所述TGF $\beta$ 超家族的生长因子是活化素A。向hESC提供的分化因子的浓度范围从约1ng/ml至约1mg/ml。例如,分化因子可以以1ng/ml、约5ng/ml、约25ng/ml、约50ng/ml、约75ng/ml、约100ng/ml、约125ng/ml、约150ng/ml、约175ng/ml、约200ng/ml、约225ng/ml、约250ng/ml、约275ng/ml、约300ng/ml、约325ng/ml、约350ng/ml、约375ng/ml、约400ng/ml、约425ng/ml、约450ng/ml、约475ng/ml、约500ng/ml、约525ng/ml、约550ng/ml、约575ng/ml、约600ng/ml、约625ng/ml、约650ng/ml、约675ng/ml、约700ng/ml、约725ng/ml、约750ng/ml、约775ng/ml、约800ng/ml、约825ng/ml、约850ng/ml、约875ng/ml、约900ng/ml、约925ng/ml、约950ng/ml、约975ng/ml、约1 $\mu$ g/ml、约2 $\mu$ g/ml、约3 $\mu$ g/ml、约4 $\mu$ g/ml、约5 $\mu$ g/ml、约6 $\mu$ g/ml、约7 $\mu$ g/ml、约8 $\mu$ g/ml、约9 $\mu$ g/ml、约10 $\mu$ g/ml、约11 $\mu$ g/ml、约12 $\mu$ g/ml、约13 $\mu$ g/ml、约14 $\mu$ g/ml、约15 $\mu$ g/ml、约16 $\mu$ g/ml、约17 $\mu$ g/ml、约18 $\mu$ g/ml、约19 $\mu$ g/ml、约20 $\mu$ g/ml、约25 $\mu$ g/ml、约50 $\mu$ g/ml、约75 $\mu$ g/ml、约100 $\mu$ g/ml、约125 $\mu$ g/ml、约150 $\mu$ g/ml、约175 $\mu$ g/ml、约200 $\mu$ g/ml、约250 $\mu$ g/ml、约300 $\mu$ g/ml、约350 $\mu$ g/ml、约400 $\mu$ g/ml、约450 $\mu$ g/ml、约500 $\mu$ g/ml、约550 $\mu$ g/ml、约600 $\mu$ g/ml、约650 $\mu$ g/ml、约700 $\mu$ g/ml、约750 $\mu$ g/ml、约800 $\mu$ g/ml、约850 $\mu$ g/ml、约900 $\mu$ g/ml、约950 $\mu$ g/ml、约1000 $\mu$ g/ml的浓度接触hESC。

[0515] 向hESC提供分化因子后,与hESC中的基线FGF8mRNA表达相比,FGF8mRNA的表达显著上调。hESC中的基线FGF8表达是诸如mRNA等的FGF8基因产物的表达,该FGF8基因产物存在于维持在未分化状态的hESC细胞培养物中。一些实施方案中,距参考时间点约6小时时,FGF8mRNA的表达显著上调。本发明的其它实施方案中,距参考时间点约24小时后,FGF8mRNA的表达下调。其它实施方案中,FGF8mRNA的表达在距参考时间点约6小时至约24小时之间达

到峰值。其它实施方案中,FGF8的峰值表达在距参考时间点少于约6小时时达到。

[0516] 本发明的其它实施方案涉及细胞培养物,其展现 $\beta$ -连接素多肽的增加的细胞核定位。在这些实施方案中,距所述参考时间点约17小时时 $\beta$ -连接素多肽开始向细胞核定位。一些实施方案中,距所述参考时间点短于约17小时时 $\beta$ -连接素多肽开始向细胞核定位。其它实施方案中,距所述参考时间点约17小时时 $\beta$ -连接素多肽显著地向细胞核定位。

[0517] 本发明的细胞培养物的其它实施方案涉及具有增加的brachyury mRNA表达的细胞培养物。在该细胞培养物中,距所述参考时间点约24小时时brachyury mRNA的表达显著上调。一些实施方案中,距所述参考时间点约24小时之前brachyury mRNA的表达显著上调。一些实施方案中,距所述参考时间点约48小时时brachyury mRNA的表达显著下调。某些实施方案中,brachyury mRNA的表达在距参考时间点约12小时至约48小时之间达到峰值。在优选实施方案中,距所述参考时间点约72小时时brachyury mRNA不显著表达。在其它优选实施方案中,距所述参考时间点约24小时时brachyury mRNA的表达显著上调,而在距所述参考时间点约72小时时brachyury mRNA不显著表达。

[0518] 本发明的细胞培养物的其它实施方案涉及具有增加的FGF4mRNA表达的细胞培养物。在该细胞培养物中,距所述参考时间点约24小时时FGF4mRNA的表达显著上调。一些实施方案中,距所述参考时间点约24小时之前FGF4mRNA的表达显著上调。一些实施方案中,距所述参考时间点约48小时时FGF4mRNA的表达显著下调。某些实施方案中,FGF4mRNA的表达在距参考时间点约12小时至约48小时之间达到峰值。在优选实施方案中,距所述参考时间点约72小时时FGF4mRNA不显著表达。在其它优选实施方案中,距所述参考时间点约24小时时FGF4mRNA的表达显著上调,而在距所述参考时间点约72小时时FGF4mRNA不显著表达。

[0519] 本发明的细胞培养物的优选实施方案涉及具有增加的brachyury和FGF4mRNA表达的细胞培养物。在该细胞培养物中,距所述参考时间点约24小时时brachyury和FGF4mRNA的表达显著上调。一些实施方案中,距所述参考时间点约24小时之前brachyury和FGF4mRNA的表达显著上调。一些实施方案中,距所述参考时间点约48小时时brachyury和FGF4mRNA的表达显著下调。某些实施方案中,brachyury和FGF4mRNA的表达在距参考时间点约12小时至约48小时之间达到峰值。在优选实施方案中,距所述参考时间点约72小时时brachyury和FGF4mRNA不显著表达。在其它优选实施方案中,距所述参考时间点约24小时时brachyury和FGF4mRNA的表达显著上调,而在距所述参考时间点约72小时时brachyury和FGF4mRNA不显著表达。

[0520] 本发明的细胞培养物的其它实施方案涉及具有增加的SNAI1mRNA表达的细胞培养物。在该细胞培养物中,距所述参考时间点约24小时时SNAI1mRNA的表达显著上调。一些实施方案中,距所述参考时间点约24小时之前SNAI1mRNA的表达显著上调。一些实施方案中,距所述参考时间点约48小时时SNAI1mRNA的表达下调。某些实施方案中,SNAI1mRNA的表达在距参考时间点约12小时至约48小时之间达到峰值。

[0521] 本发明的细胞培养物的实施方案还涉及具有E-钙粘着素 (ECAD) 基因产物的特异时间表达的细胞培养物。该实施方案中,距所述参考时间点约12小时时E-钙粘着素mRNA的表达下调。其它实施方案中,距所述参考时间点短于12小时时E-钙粘着素mRNA的表达可以下调。在优选实施方案中,距所述参考时间点约48小时时E-钙粘着素mRNA的表达显著下调。

[0522] 本发明的其它实施方案涉及表达SOX17和/或FOXA2标志物的细胞培养物。一些实



施方案中,距所述参考时间点约48小时时SOX17mRNA的表达显著上调。其它实施方案中,距所述参考时间点约96小时时FOXA2mRNA的表达显著上调。

[0523] 本发明的一些实施方案涉及包括具有某些特定模式的基因表达的细胞的细胞培养物。这些实施方案中,所述细胞培养物包含hESC、例如TGF $\beta$ 超家族的分化因子等的分化因子和包含少于约2% (v/v) 血清的培养基。其它实施方案中,所述培养基包含多于2% (v/v) 的血清。一些实施方案中,所述培养物缺乏血清替代物。

[0524] 一些实施方案中,在向所述细胞培养物提供所述分化因子时,所述细胞培养物全部是或主要全部是hESC。在分化期间,至少部分hESC分化为其它细胞类型,如通过某些标志物基因产物(mRNA和/或多肽)的表达所表明的。

[0525] 本发明的细胞培养物的一些实施方案中,第一套标志物基因的表达在第二和/或第三套标志物基因的表达上调之前上调。一些实施方案中,每一套标志物基因都可以包括一种或多种标志物基因。基因表达上调的范围可以是从轻微到显著。例如,与未分化hESC中相同标志物基因的表达相比,该标志物基因的表达可以上调至少约10%。其它实施方案中,与未分化hESC中相同标志物基因的表达相比,该标志物基因的表达可以上调至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或多于至少约90%。其它实施方案中,与未分化hESC中相同标志物基因的表达相比,该标志物基因的表达可以上调至少2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍、至少约50倍、至少约60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍、至少约100倍或多于至少约100倍。

[0526] 本发明的细胞培养物的其它实施方案中,第一套标志物基因的表达在第二和/或第三套标志物基因的表达上调之前下调。这些实施方案中,每一套标志物基因都可以包括一种或多种标志物基因。如同基因表达的上调,下调的范围可以是从轻微到显著。例如,与未分化hESC中相同标志物基因的表达相比,该标志物基因的表达可以下调至少约10%。其它实施方案中,与未分化hESC中相同标志物基因的表达相比,该标志物基因的表达可以下调至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或多于至少约90%。其它实施方案中,与未分化hESC中相同标志物基因的表达相比,该标志物基因的表达可以下调至少2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍、至少约50倍、至少约60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍、至少约100倍或多于至少约100倍。

[0527] 本发明的细胞培养物的其它实施方案中,第一套标志物基因的表达在第二和/或第三套标志物基因的峰值表达之前或大致同时上调。这些实施方案中,每一套标志物基因都可以包括一种或多种标志物基因。其它实施方案中,第一套标志物基因的表达在第二和/或第三套标志物基因的峰值表达之前或大致同时下调。如上所述,在这些实施方案中,每一套标志物基因都可以包括一种或多种标志物基因。而且,在上述实施方案中,基因表达的上调和下调的范围都可以是从轻微到显著。例如,与未分化hESC中相同标志物基因的表达相比,该标志物基因的表达可以上调或下调至少约10%。其它实施方案中,与未分化hESC中相同标志物基因的表达相比,该标志物基因的表达可以上调或下调至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或多于至少约90%。其它

实施方案中,与未分化hESC中相同标志物基因的表达相比,该标志物基因的表达可以上调或下调至少2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍、至少约50倍、至少约60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍、至少约100倍或多于至少约100倍。

[0528] 本发明的一些实施方案中,在所述细胞培养物的至少一些细胞中,选自FGF8、Nodal、HEG、HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的表达上调之前上调。其它实施方案中,在所述细胞培养物的至少一些细胞中,选自FGF8、Nodal、HEG、HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的峰值表达之前上调。其它实施方案中,在所述细胞培养物的至少一些细胞中,选自HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的峰值表达之前或大致同时下调。其它实施方案中,在所述细胞培养物的至少一些细胞中,选自FGF8、Nodal、HEG、HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自SOX17、FOXA2、CXCR4和MIXL1的标志物基因的表达上调之前上调。其它实施方案中,在所述细胞培养物的至少一些细胞中,选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的表达在选自SOX17、FOXA2、CXCR4和MIXL1的标志物基因的表达上调之前或大致同时上调。其它实施方案中,在所述细胞培养物的至少一些细胞中,选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因在选自SOX17、FOXA2、CXCR4和MIXL1的标志物基因的表达上调之前或大致同时达到峰值表达。其它实施方案中,在所述细胞培养物的至少一些细胞中,选自FGF8、Nodal、HEG、HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的表达上调之前上调。

[0529] 具有一种或多种上述时间性基因表达模式的细胞培养物中的一些包括包含少于约2% (v/v) 血清的培养基。在一些实施方案中,培养基不含血清。在其它实施方案中,培养基不含血清替代物。用于本发明细胞培养物的一些培养基包括浓度少于约1.9% (v/v)、少于约1.8% (v/v)、少于约1.7% (v/v)、少于约1.6% (v/v)、少于约1.5% (v/v)、少于约1.4% (v/v)、少于约1.3% (v/v)、少于约1.2% (v/v)、少于约1.1% (v/v)、少于约1% (v/v)、少于约0.9% (v/v)、少于约0.8% (v/v)、少于约0.7% (v/v)、少于约0.6% (v/v)、少于约0.5% (v/v)、少于约0.4% (v/v)、少于约0.3% (v/v)、少于约0.2% (v/v)、少于约0.1% (v/v) 或少于约0.05% (v/v) 的血清。

[0530] 具有一种或多种上述时间性基因表达模式的细胞培养物中的一些包含至少一种TGF $\beta$ 超家族的分化因子。一些实施方案中,该生长因子是nodal、活化素A和/或活化素B。在优选实施方案中,所述分化因子是活化素A。在更优选的实施方案中,活化素A在培养基中存在的浓度为约100ng/ml。

[0531] 然而,应该理解,可以以约1ng/ml至约1mg/ml的浓度范围向细胞培养物提供所述TGF $\beta$ 超家族的分化因子。一些实施方案中,以约5ng/ml、约25ng/ml、约50ng/ml、约75ng/ml、约100ng/ml、约125ng/ml、约150ng/ml、约175ng/ml、约200ng/ml、约225ng/ml、约250ng/ml、约275ng/ml、约300ng/ml、约325ng/ml、约350ng/ml、约375ng/ml、约400ng/ml、约425ng/ml、

约450ng/ml、约475ng/ml、约500ng/ml、约525ng/ml、约550ng/ml、约575ng/ml、约600ng/ml、约625ng/ml、约650ng/ml、约675ng/ml、约700ng/ml、约725ng/ml、约750ng/ml、约775ng/ml、约800ng/ml、约825ng/ml、约850ng/ml、约875ng/ml、约900ng/ml、约925ng/ml、约950ng/ml、约975ng/ml、约1 $\mu$ g/ml、约2 $\mu$ g/ml、约3 $\mu$ g/ml、约4 $\mu$ g/ml、约5 $\mu$ g/ml、约6 $\mu$ g/ml、约7 $\mu$ g/ml、约8 $\mu$ g/ml、约9 $\mu$ g/ml、约10 $\mu$ g/ml、约11 $\mu$ g/ml、约12 $\mu$ g/ml、约13 $\mu$ g/ml、约14 $\mu$ g/ml、约15 $\mu$ g/ml、约16 $\mu$ g/ml、约17 $\mu$ g/ml、约18 $\mu$ g/ml、约19 $\mu$ g/ml、约20 $\mu$ g/ml、约25 $\mu$ g/ml、约50 $\mu$ g/ml、约75 $\mu$ g/ml、约100 $\mu$ g/ml、约125 $\mu$ g/ml、约150 $\mu$ g/ml、约175 $\mu$ g/ml、约200 $\mu$ g/ml、约250 $\mu$ g/ml、约300 $\mu$ g/ml、约350 $\mu$ g/ml、约400 $\mu$ g/ml、约450 $\mu$ g/ml、约500 $\mu$ g/ml、约550 $\mu$ g/ml、约600 $\mu$ g/ml、约650 $\mu$ g/ml、约700 $\mu$ g/ml、约750 $\mu$ g/ml、约800 $\mu$ g/ml、约850 $\mu$ g/ml、约900 $\mu$ g/ml、约950 $\mu$ g/ml、约1000 $\mu$ g/ml或高于约1000 $\mu$ g/ml向细胞培养物提供所述TGF $\beta$ 超家族的分化因子。

[0532] 本发明还预期分化hESC以产生具有特定时间性标志物基因表达模式的细胞的方法。例如，一些实施方案涉及分化人胚胎干细胞(hESC)的方法，其通过使hESC接触包含少于约2%(v/v)血清的培养基，向该hESC提供TGF $\beta$ 超家族的分化因子，然后容许hESC的分化发生来实现。

[0533] 在上述分化hESC的方法的一些实施方案中，第一套标志物基因的表达在第二和/或第三套标志物基因的表达上调之前上调。一些实施方案中，每一套标志物基因都可以包括一种或多种标志物基因。基因表达上调的范围可以从轻微到显著。例如，与未分化hESC中相同标志物基因的表达相比，该标志物基因的表达可以上调至少约10%。其它实施方案中，与未分化hESC中相同标志物基因的表达相比，该标志物基因的表达可以上调至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或多于至少约90%。其它实施方案中，与未分化hESC中相同标志物基因的表达相比，该标志物基因的表达可以上调至少2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍、至少约50倍、至少约60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍、至少约100倍或多于至少约100倍。

[0534] 本发明的分化hESC的方法的其它实施方案中，第一套标志物基因的表达在第二和/或第三套标志物基因的表达上调之前下调。这些实施方案中，每一套标志物基因都可以包括一个或多个标志物基因。如同基因表达的上调，下调的范围可以从轻微到显著。例如，与未分化hESC中同一标志物基因的表达相比，该标志物基因的表达可以下调至少约10%。其它实施方案中，与未分化hESC中同一标志物基因的表达相比，该标志物基因的表达可以下调至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或多于至少约90%。其它实施方案中，与未分化hESC中同一标志物基因的表达相比，该标志物基因的表达可以下调至少2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍、至少约50倍、至少约60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍、至少约100倍或多于至少约100倍。

[0535] 本发明的分化hESC的方法的其它实施方案中，第一套标志物基因的表达在第二和/或第三套标志物基因的峰值表达之前或大致同时上调。这些实施方案中，每一套标志物基因都可以包括一种或多种标志物基因。其它实施方案中，第一套标志物基因的表达在第

二和/或第三套标志物基因的峰值表达之前或大约同时下调。如上所述,在这些实施方案中,每一套标志物基因都可以包括一种或多种标志物基因。而且,在上述实施方案中,基因表达的上调和下调的范围都可以是从轻微到显著。例如,与未分化hESC中相同标志物基因的表达相比,该标志物基因的表达可以上调或下调至少约10%。其它实施方案中,与未分化hESC中相同标志物基因的表达相比,该标志物基因的表达可以上调或下调至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或多于至少约90%。其它实施方案中,与未分化hESC中相同标志物基因的表达相比,该标志物基因的表达可以上调或下调至少2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍、至少约50倍、至少约60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍、至少约100倍或多于至少约100倍。

[0536] 本发明的一些实施方案中,在所述细胞培养物的至少一些细胞中,选自FGF8、Nodal、HEG、HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的表达上调之前上调。其它实施方案中,在所述细胞培养物的至少一些细胞中,选自FGF8、Nodal、HEG、HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的峰值表达之前上调。其它实施方案中,在所述细胞培养物的至少一些细胞中,选自HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的峰值表达之前或大致同时下调。其它实施方案中,在所述细胞培养物的至少一些细胞中,选自FGF8、Nodal、HEG、HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自SOX17、FOXA2、CXCR4和MIXL1的标志物基因的表达上调之前上调。其它实施方案中,在所述细胞培养物的至少一些细胞中,选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的表达在选自SOX17、FOXA2、CXCR4和MIXL1的标志物基因的表达上调之前或大致同时上调。其它实施方案中,在所述细胞培养物的至少一些细胞中,选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因在选自SOX17、FOXA2、CXCR4和MIXL1的标志物基因的表达上调之前或大致同时达到峰值表达。其它实施方案中,在所述细胞培养物的至少一些细胞中,选自FGF8、Nodal、HEG、HEY1、GATA2、BIK和ID1的标志物基因的表达在选自brachyury、FGF4、SNAI1、Wnt3、MIXL1、DKK4、NETO1、T、DACT1、FLJ22662、SLIT2、GAD1和GRM4的标志物基因的表达上调之前上调。

[0537] 在本发明分化方法的一些实施方案中,使细胞培养物接触或者以其它方式向其提供包含少于约2% (v/v) 血清的培养基。在一些实施方案中,培养基不含血清。在其它实施方案中,培养基不含血清替代物。用于本发明方法的一些培养基包括浓度少于约1.9% (v/v)、少于约1.8% (v/v)、少于约1.7% (v/v)、少于约1.6% (v/v)、少于约1.5% (v/v)、少于约1.4% (v/v)、少于约1.3% (v/v)、少于约1.2% (v/v)、少于约1.1% (v/v)、少于约1% (v/v)、少于约0.9% (v/v)、少于约0.8% (v/v)、少于约0.7% (v/v)、少于约0.6% (v/v)、少于约0.5% (v/v)、少于约0.4% (v/v)、少于约0.3% (v/v)、少于约0.2% (v/v)、少于约0.1% (v/v) 或少于约0.05% (v/v) 的血清。

[0538] 分化hESC以产生上述基因表达的时间模式的一些方法包括向例如hESC的培养物中的细胞提供至少一种TGF $\beta$ 超家族的分化因子。一些实施方案中,该生长因子是noda1、活化素A和/或活化素B。在优选实施方案中,所述分化因子是活化素A。在更优选的实施方案中,活化素A在培养基中存在的浓度为约100ng/ml。

[0539] 然而,应该理解,可以以约1ng/ml至约1mg/ml的浓度范围向细胞培养物提供所述TGF $\beta$ 超家族的分化因子。一些实施方案中,以约5ng/ml、约25ng/ml、约50ng/ml、约75ng/ml、约100ng/ml、约125ng/ml、约150ng/ml、约175ng/ml、约200ng/ml、约225ng/ml、约250ng/ml、约275ng/ml、约300ng/ml、约325ng/ml、约350ng/ml、约375ng/ml、约400ng/ml、约425ng/ml、约450ng/ml、约475ng/ml、约500ng/ml、约525ng/ml、约550ng/ml、约575ng/ml、约600ng/ml、约625ng/ml、约650ng/ml、约675ng/ml、约700ng/ml、约725ng/ml、约750ng/ml、约775ng/ml、约800ng/ml、约825ng/ml、约850ng/ml、约875ng/ml、约900ng/ml、约925ng/ml、约950ng/ml、约975ng/ml、约1 $\mu$ g/ml、约2 $\mu$ g/ml、约3 $\mu$ g/ml、约4 $\mu$ g/ml、约5 $\mu$ g/ml、约6 $\mu$ g/ml、约7 $\mu$ g/ml、约8 $\mu$ g/ml、约9 $\mu$ g/ml、约10 $\mu$ g/ml、约11 $\mu$ g/ml、约12 $\mu$ g/ml、约13 $\mu$ g/ml、约14 $\mu$ g/ml、约15 $\mu$ g/ml、约16 $\mu$ g/ml、约17 $\mu$ g/ml、约18 $\mu$ g/ml、约19 $\mu$ g/ml、约20 $\mu$ g/ml、约25 $\mu$ g/ml、约50 $\mu$ g/ml、约75 $\mu$ g/ml、约100 $\mu$ g/ml、约125 $\mu$ g/ml、约150 $\mu$ g/ml、约175 $\mu$ g/ml、约200 $\mu$ g/ml、约250 $\mu$ g/ml、约300 $\mu$ g/ml、约350 $\mu$ g/ml、约400 $\mu$ g/ml、约450 $\mu$ g/ml、约500 $\mu$ g/ml、约550 $\mu$ g/ml、约600 $\mu$ g/ml、约650 $\mu$ g/ml、约700 $\mu$ g/ml、约750 $\mu$ g/ml、约800 $\mu$ g/ml、约850 $\mu$ g/ml、约900 $\mu$ g/ml、约950 $\mu$ g/ml、约1000 $\mu$ g/ml或高于约1000 $\mu$ g/ml向细胞培养物提供所述TGF $\beta$ 超家族的分化因子。

[0540] 以上概括描述了本发明,可通过参照本文提供的某些具体实施例进一步理解本发明,这些实施例仅是为了说明而不是限制本发明。

## 实施例

[0541] 以下很多实施例描述了人多能性细胞的使用。产生人多能性细胞的方法在现有技术中是公知的,在许多科学出版物中都有描述,包括第5,453,357、5,670,372、5,690,926、6,090,622、6,200,806和6,251,671号美国专利及公开号为2004/0229350的美国专利申请,其公开在此整体并入以供参考。

[0542] 实施例1

[0543] hESCyt-25的特征

[0544] 人胚胎干细胞系hESCyt-25在培养基中培养18个月后仍保持正常的形态、核型、生长和自我更新性质。此细胞系对OCT4、SSEA-4和TRA-1-60抗原均显示很强的免疫反应性(这几个抗原都是未分化hESC的特征性抗原)、显示碱性磷酸酶活性以及与其它已建立的hESC系相似的形态。此外,人胚胎干细胞系hESCyt-25在悬浮培养时容易形成胚状体(EB)。hESCyt-25可以分化为代表三种主要胚层的不同细胞类型,这表明hESCyt-25的多能性。对ZIC1的Q-PCR检测以及对nestin和更多成熟神经标志物的免疫细胞化学(ICC)鉴定证明了外胚层的产生。在延伸细胞簇中观察到了 $\beta$ -III微管蛋白的免疫细胞化学染色,这是早期神经元的特征。之前,我们以视黄酸处理悬浮液中的EB,以诱导多能性干细胞向内脏内胚层(VE)、胚外细胞系的分化。经54小时处理后,经处理的细胞大量表达VE的标志物: $\alpha$ -胎蛋白(AFP)和SOX7。免疫细胞化学染色表明在单层中分化的细胞在零星块中表达AFP。下面将描述,在无AFP表达时,SOX-17的实时定量聚合酶链式反应(Q-PCR)和免疫细胞化学检测证明

hESCCyt-25细胞系还可以形成定形内胚层细胞。在不同时间点检测了分化的EB中Brachyury基因的表达式以证明向中胚层的分化。在实验过程中Brachyury表达逐渐提高。综上所述，hESCCyt-25细胞系具有形成代表三种胚层的细胞的能力，因此是多能性的。

[0545] 实施例2

[0546] 定形内胚层细胞

[0547] 同时待决并且共同所有的于2004年12月23日提交的题为DEFINITIVE ENDODERM (定形内胚层)的美国专利申请第11/021,618号描述了包含人定形内胚层细胞的细胞培养物和富集细胞群。该申请还描述了在分化因子的存在下通过从hESC分化产生定形内胚层的方法，以及从混合的细胞培养物和/或细胞群中富集、分离和/或纯化这些定形内胚层细胞的方法。该申请还描述了用于鉴定和/或监测定形内胚层细胞的标志物，以及可用于纯化这些细胞的标志物。于2004年12月23日提交的题为DEFINITIVE ENDODERM (定形内胚层)的美国专利申请第11/021,618号的公开在此整体并入以供参考。

[0548] 本实施例是从前述同时待决的专利申请中重现的，描述了用于检测和/或鉴定定形内胚层细胞的标志物。

[0549] 以下实验中，从纯化的定形内胚层和人胚胎干细胞群分离RNA。然后通过来自于每一个纯化群的RNA基因芯片分析分析基因表达。进行Q-PCR以进一步研究在定形内胚层中表达但不在胚胎干细胞中表达的基因作为定形内胚层标志物的可能。

[0550] 在补充有20%KnockOut血清替代物、4ng/ml重组人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、0.1mM2-巯基乙醇、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸和青霉素/链霉素的DMEM/F12培养基中培养人胚胎干细胞(hESC)。通过在补充有100ng/ml重组人活化素A、小牛血清(FBS)和青霉素/链霉素的RPMI培养基中培养5天，hESC分化为定形内胚层。FBS的浓度每天变化如下：0.1%(第一天)，0.2%(第二天)，2%(第3-5天)。

[0551] 用荧光激活细胞分选术(FACS)分离细胞获得纯化的hESC和定形内胚层细胞群，以用于基因表达分析。用SSEA4抗原(R&D Systems, cat#FAB1435P)免疫纯化hESC，用CXCR4(R&D Systems, cat#FAB170P)纯化定形内胚层。细胞用胰蛋白酶/EDTA(Invitrogen, cat#25300-054)解离，用含2%人血清的磷酸缓冲盐水(PBS)洗涤，然后在100%人血清中冰浴重悬10分钟以封闭非特异性结合。向含 $5 \times 10^6$ 细胞的800 $\mu$ l人血清中添加200 $\mu$ l藻红蛋白偶联抗体在冰上染色30分钟。细胞用8ml PBS洗涤两次，在1ml PBS中重悬。FACS分离是在The Scripps Research Institute的核心实验室用FACS Vantage(BD Bioscience)进行的。细胞直接用RLT裂解缓冲液收集，然后按照使用说明书(Qiagen)用RNeasy分离RNA。

[0552] 提交双份纯化的RNA给Expression Analysis(Durham, NC)，以便采用Affymetrix平台和U133Plus2.0高密度寡核苷酸阵列产生表达谱数据。呈现的数据是一组比较，其鉴定在hESC和定形内胚层细胞群中差异表达的基因。选择在表达水平上与hESC中相比有明显上调变化的基因作为定形内胚层最具特征性的新的候选标志物。选择的基因用上述Q-PCR检测以证实基因芯片发现的基因表达变化，并研究hESC分化过程中这些基因的表达模式。

[0553] 图2A-M显示某些标志物的基因表达结果。显示了添加100ng/ml活化素A1、3和5天后分析的细胞培养物，5天分化步骤(CXDE)结束后纯化的表达CXCR4的定形内胚层细胞和纯化的hESC中的结果。图2C和G-M的比较证明六个标志物基因，FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1和CRIP1显示了几乎相同的表达模式，并且与CXCR4的表达模式和SOX17/SOX7的比例

也相似。如前所述,在定形内胚层和表达SOX7的胚外内胚层中SOX17均有表达。因为在定形内胚层SOX7不表达,根据SOX17/SOX7的比例可以可靠估计定形内胚层对整个细胞群中观察到的SOX17的表达的贡献。图G-L和图M与图C的相似性表明FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1和CRIP1是定形内胚层的标志物,它们不在胚外内胚层细胞中高表达。

[0554] 应该了解的是此处描述的Q-PCR结果可进一步被ICC证实。

[0555] 实施例3

[0556] 定形内胚层前体细胞中基因表达的时间顺序

[0557] 为评估向定形内胚层分化期间发生的基因表达的动态,监测了两个不同的4天分化实验方案期间多个基因在分化中的细胞培养物中在不同时间点的表达。

[0558] 具体地,hESC培养的最初24小时不含FBS,第二个24小时含有0.2%(v/v) FBS,第3和第4天含有2%(v/v) FBS,整个过程中始终存在100ng/ml活化素A以诱导向定形内胚层的分化,或者始终存在100ng/ml BMP4和2.5 $\mu$ M FGFR1抑制剂SU5402以诱导向滋养外胚层(TE)和原始内胚层(PrE)的混合细胞群的分化。通过在分化过程期间的多个时间点测量基因表达确定所述培养物中基因表达的动态。具体地,在加入分化因子时以及加入这些因子后6小时、12小时、24小时、48小时、72小时和96小时通过Q-PCR确定基因表达。图3A-L展示了多种不同标志物基因在所述时间段内的基因表达谱。

[0559] 图3A显示FGF8的表达在活化素A处理后6小时内增加到接近其最大值。FGF8的高水平表达维持了约24小时,之后开始下降。BMP4/SU5402处理造成FGF8表达水平的很少变化(图3A)。这些结果说明活化素A介导hESC向表达FGF8的细胞的快速转变。由于FGF8的表达是外胚层中后部模式形成(posterior pattern formation)的最早指示之一,正在分化的hESC中FGF8的快速上调表明这些早期阶段细胞已经从hESC细胞类型分化出来形成“前条”(前原条)细胞群。

[0560] 如图3B-F所示,诸如brachyury、FGF4、SNAI1、MIXL1和GSC的某些原条(中内胚层)标志物的诱导在活化素A处理后6小时开始。然而,与FGF8诱导相比,这些标志物的表达继续增加并且在约24小时达到最高水平,或者一些情况下,在加入活化素A后48小时达到最高水平。在BMP4/SU5402处理的培养物中很少或没有观察到原条标志物的表达增加(图3B-F)。此外,不在定形内胚层细胞中表达的brachyury和FGF4的表达水平在活化素A处理后48-72小时极其快速地下调到hESC的水平或更低(图3B-C)。相反,SNAI1、MIXL1和GSC在48-96小时继续显著表达(图3D-F)。

[0561] 在活化素A处理约72小时后,SOX17显示有力上调,该结果与从原条(中内胚层)中间体向定形内胚层细胞命运的转变一致(图3G)。在BMP4/SU5402处理的细胞培养物中没有该SOX17表达的上调发生(图3G)。

[0562] 刚刚描述的活化素A处理的、体外细胞培养物的基因表达的时间顺序模拟早期脊椎动物原肠胚形成中发生的事件,并且因此,其暗示hESC在本文所述分化过程中通过相似的中间体转变。

[0563] 除导致定形内胚层的前述一系列事件之外,图3H-L显示在约24-48小时,诸如HCG、DAB2、SOX7、CHRD和E-钙粘着素(ECAD)的滋养外胚层和原始内胚层标志物在BMP4/SU5402处理的细胞中开始有力上调。这些标志物在72和96小时继续上调。相反,暴露于100ng/ml活化素A的细胞培养物中没有HCG、DAB2、SOX7、CHRD和E-钙粘着素的上调发生(图3H-L)。这些结

果表明hESC具有在适当条件下分化为滋养外胚层和原始内胚层的潜能,然而,在活化素处理的培养物中向这些谱系的分化未达到以显著水平发生。

[0564] 实施例4

[0565] 人胚胎干细胞上皮间质转化

[0566] 脊椎动物原肠胚形成期间在原条处经历上皮间质转化(EMT)的外胚层细胞改变了细胞表面的E-钙粘着素蛋白的表达模式。FGF和TGF $\beta$ 信号的联合作用诱导了锌指转录因子SNAIL, SNAIL是E-钙粘着素的直接转录抑制物。本实施例显示E-钙粘着素的转录在暴露于活化素的体外hESC培养物的早期分化阶段期间被抑制,如同体内在原肠胚形成期间发生在EMT中的。

[0567] 人胚胎干细胞在存在100ng/ml活化素A的含有0.1%(v/v) FBS的RMPI培养基中分化2天。使用Q-PCR和/或免疫细胞化学确定某些标志物基因的表达。图4A-C分别显示Q-PCR确定的brachyury、E-钙粘着素和SNAIL mRNA的表达。使用免疫细胞化学确定brachyury、E-钙粘着素和活化的(去磷酸化的)B-连接素的表达。

[0568] 如前所述,培养物中的暴露于活化素的前原条细胞在暴露于活化素约24小时之后分化为原条(中内胚层)细胞(实施例4和图7)。图4A和4C的比较显示brachyury和SNAIL mRNA的水平都在约24小时达到峰值。观察到相似的FGF4 mRNA的峰值表达(图3C)。与此时间段期间的brachyury表达相比,E-钙粘着素mRNA的表达减少并且到活化素A处理起始后48小时时继续减少3倍以上(图4B)。距活化素暴露后12小时时,即当E-钙粘着素mRNA的水平减少了其在分化中的细胞培养物中的起始水平的约33%时,E-钙粘着素(推测涉及粘着连接)的特征性顶端细胞表面免疫定位在集落边缘的brachyury阳性细胞中同时消失。24小时后,随着表达brachyury的细胞数目增加,brachyury阳性细胞中的连接相关E-钙粘着素的消失更加明显。另外,12和24小时时DAPI和brachyury染色的细胞核的形态区别证明了细胞形态的一致性下降,其进一步支持了EMT的发生。

[0569] 除前述基因表达之外,hESC分化为定形内胚层时确定 $\beta$ -连接素的细胞内定位。使用只识别未磷酸化(Ser37和Thr41)形式的 $\beta$ -连接素的抗体,发现该蛋白只定位在未分化hESC的细胞质表面。到活化素处理后17小时时,在brachyury阴性和表达brachyury的细胞中检测到核结合的 $\beta$ -连接素以及膜结合的 $\beta$ -连接素。而且,Western印迹分析确认了 $\beta$ -连接素存在于分化细胞的可溶的、排除膜的蛋白质组分中,但不存在于未分化细胞的可溶的、排除膜的蛋白质部分中。这些结果与 $\beta$ -连接素的细胞核定位发生在brachyury蛋白质表达之前的假设一致。此外,综合考虑,上述数据暗示在暴露于活化素的细胞培养物中,随着原条样状态发展,经典EMT发生,其中活化的 $\beta$ -连接素向细胞核的转移发生在brachyury蛋白质表达之前,与位于细胞间上皮边界的粘着连接的解体同时。

[0570] 实施例5

[0571] 中内胚层向定形内胚层的分化

[0572] 本实施例说明了中内胚层前体细胞分化为定形内胚层的能力。

[0573] 人胚胎干细胞培养物在存在100ng/ml活化素A的含有0.1%(v/v) FBS的RMPI培养基中孵育2天。如图5A所示,brachyury mRNA的表达在约24小时时达到峰值。同时,SOX17基因的表达开始增加(图5B)。到约48小时时,brachyury mRNA的表达已经回到基线水平(图5A)并且SOX17以高于基线18倍的水平表达(图5B)。这些已经被多于7次的独立实验所证实的结



果与表达brachyury的中内胚层细胞在活化素处理后约36-48小时开始向表达SOX17的定形内胚层转变的假设一致。

[0574] 为了说明上述假设的有效性,进行了brachyury和SOX17标志物的基于免疫细胞化学的分析。brachyury蛋白质表达的时间过程显示免疫反应性细胞的出现,该免疫反应性细胞在12小时时从最大的集落边缘开始并且到36-48小时时快速展开到该集落内部。在这些较晚的时间,培养物中大部分细胞是brachyury蛋白阳性。由此,与图5A所示的brachyury mRNA表达的峰值相比,所述brachyury蛋白质表达模式延迟了12-24小时。分化48小时后,当SOX17mRNA和蛋白质表达快速增加并且brachyury表达快速减少时,绝大多数SOX17阳性细胞共表达brachyury (图6A-D)。这些数据清楚地说明,100ng/ml活化素A和低血清存在下,大部分SOX17阳性细胞源自brachyury阳性的中内胚层细胞。而且,本发现强烈暗示人发育中中内胚层中间体的存在。此外,因为brachyury表达不在发育期间的任何时间发生在原始内胚层谱系的细胞中,所以所述发现最后地证明了活化素产生的内胚层的定形性质。

[0575] 实施例6

[0576] 来自中内胚层细胞的中胚层和定形内胚层的形成

[0577] 除上述实施例外,进行实验以说明本文所述的中内胚层中间体可以经历分化成为中胚层或定形内胚层细胞。

[0578] 图7显示了本实施例所用的试验设计和培养条件。具体地,将两个平行hESC在RPMI培养基中培养4天。如实施例4中,该培养基的血清浓度被调整为在第1天含有0% (v/v) FBS,在第2天含有0.2% (v/v) FBS,以及在第3和第4天含有2% (v/v) FBS。在每一个平行培养物中,在最初24小时以100ng/ml的浓度补充活化素A。此时间段结束时,从一个平行培养物(NF)中除去活化素A,在另一个平行培养物(A100)中保留活化素A。

[0579] 图8A-F显示在高活化素和低FBS条件下缺乏中胚层标志物brachyury、MOX1、FOXF1、FLK1、BMP4和SDF1的表达。这些结果说明表达brachyury/FGF4/MIXL1的中内胚层细胞在高活化素A的条件下,以向产生定形内胚层而非中胚层的方向被模式化。诸如GSC、SOX17和FOXA2的定形内胚层标志物在经活化素处理全部4天的培养物中有力表达也说明了所述结论(图9A-C)。相反,在24小时时除去刺激较低nodal/活化素信号的活化素A导致定形内胚层基因表达的明显丧失(图9A-C),同时导致明显获得中胚层特征(图8A-F)。

[0580] 实施例7

[0581] 在含有0.5%血清的培养基中产生定形内胚层

[0582] 为进一步说明血清减少对定形内胚层细胞生产的影响,将hESC在含有不同浓度血清的培养基中分化为定形内胚层细胞。

[0583] 人胚胎干细胞在存在10% (v/v) FBS、2% (v/v) FBS或0.5% (v/v) FBS的含有100ng/ml活化素A的RPMI培养基中培养5天。为所述三个测试血清水平的每一个建立不含活化素A的对照血清培养物。对于每一个培养物,通过Q-PCR确定多种标志物基因的表达(图10A-I)。另外,通过免疫细胞化学确定这些培养物中的细胞产生的SOX17蛋白至的量,该免疫细胞化学使用前述的SOX17抗体。

[0584] 图10A-I显示了在不同FBS浓度下的某些定形内胚层标志物基因的表达。具体地,图10A-D显示减少经活化素A处理的细胞培养物中的血清浓度导致对应定形内胚层阳性标志物SOX17、GSC、MIXL1和FOXA2的mRNA产生的显著增加。对于响应活化素A其mRNA表达减少

的标志物(非定形内胚层细胞类型的标志物,包括Brachyury、MOX1、SOX7、SOX1和ZIC1),减少血清浓度导致对应这些标志物的mRNA产生的显著减少。

[0585] 通过使用SOX17抗体的免疫细胞化学确定在每个血清浓度下转化为定形内胚层细胞的hESC的相对比例。在100ng/ml活化素A和0.5% (v/v) FBS中分化5天后,SOX17阳性细胞的比例大于80%(>3个单独实验),并且没有甲胎蛋白(AFP)和血栓调节蛋白(THBD)的可检测到的免疫反应性,其中甲胎蛋白(AFP)和血栓调节蛋白(THBD)分别为VE/PE和滋养外胚层(TE)的标志物。增加的SOX17mRNA表达和这些条件下的SOX17免疫反应细胞的增加数目之间的相关性表明相对基因表达测量也是对所述群中SOX17阳性细胞数目的合理测量。

[0586] 实施例8

[0587] SOX17表达的上调在FOXA2表达的上调之前

[0588] 本实施例说明了在活化素介导的hESC向定形内胚层的分化中,SOX17mRNA表达在FOXA2mRNA表达之前。

[0589] 如实施例4中所述,人胚胎干细胞在存在活化素A和低血清的RPMI培养基中培养4天。通过Q-PCR确定SOX17和FOXA2mRNA的表达。

[0590] 如图11A所示,在加入活化素A后约48小时时SOX17mRNA开始显著增加。但未观察到FOXA2mRNA表达的类似显著增加,直到加入活化素A后约96小时。这些结果与定形内胚层而非轴中胚层的产生一致(还参见图9A-C)。然而,这些结果与和活化素一起孵育的小鼠胚胎样体中的SOX17和FOXA2的时间表达相反,其中FOXA2表达在SOX17表达之前。由此,很可能该小鼠胚胎样体被优化为产生轴中胚层而非定形内胚层。

[0591] 实施例9

[0592] 在8个不同的hESC系中产生定形内胚层

[0593] 本实施例显示了使用本发明的方法,可以从8个独立来源的hESC系中产生定形内胚层细胞。

[0594] 在存在100ng/ml活化素A的低血清RPMI培养基中将8个不同的hESC系(CyT25、CyT-DM3、BG01、BG02、BG03、H7、H9和HUES7)分别培养5天。具体地,该RPMI培养基在第1天含有0% (v/v) FBS,在第2天含有0.2% (v/v) FBS,在第3-5天含有2% (v/v) FBS。

[0595] 所述8个细胞系中的每一个都分化为SOX17/CXCR4阳性定形内胚层细胞。

[0596] 实施例10

[0597] 小鼠肾被膜下的人定形内胚层细胞移植

[0598] 为说明用本文所述方法产生的人定形内胚层细胞能够响应分化因子以至于产生衍生自肠管的细胞,将该人定形内胚层细胞用于体内分化试验方案。

[0599] 按前述实施例的描述产生人定形内胚层细胞。收集该人定形内胚层细胞并用标准方法将其移植到免疫妥协小鼠的肾被膜下。三周后,处死该小鼠,将移植组织取出、切片并用于组织学和免疫细胞化学分析。

[0600] 图12A-D显示了移植后(post-transplantation)后三周,人定形内胚层细胞分化为衍生自肠管的细胞和细胞结构。具体地,图12A显示了苏木精和伊红染色的切片,该切片中移植的人定形内胚层细胞已经分化为肠管样结构。图12B显示了经抗肝细胞特异性抗原(HSA)的抗体免疫染色的移植的人定形内胚层细胞的切片。该结果表明人定形内胚层细胞能够分化为肝或肝前体细胞。图12C和12D分别显示了经抗绒毛蛋白的抗体免疫染色的移植

的人定形内胚层细胞,以及经抗尾型同源框转录因子2 (CDX2) 免疫染色的的移植的人定形内胚层细胞。这些结果表明人定形内胚层细胞能够分化为肠细胞或肠细胞前体。

[0601] 实施例11

[0602] FGF8启动子-EGFP和Brachyury启动子-EGFP转基因人胚胎干细胞系的产生

[0603] 为了将FGF8和brachyury标志物用于细胞分离,构建了具有与可表达的报告基因融合的FGF8或brachyury基因启动子的hESC。具体地,本实施例描述了包含报告盒的载体的构建,该报告盒包含受FGF8调节区控制的报告基因。另外,描述了包含报告盒的载体的构建,该报告盒包含受到brachyury调节区控制的报告基因。本实施例还描述了特定细胞的制备,该特定细胞是经一种或多种所述载体转染的例如人胚胎干细胞的细胞以及具有一种或两种所述报告盒整合到其基因组中的细胞。

[0604] 通过将GFP报告基因分别置于FGF8基因或brachyury基因调节区(启动子)的控制之下,构建了用报告基因遗传标记的表达FGF8的前原条细胞系和表达brachyury的中内胚层细胞系。首先,通过用人FGF8或者brachyury控制区替换pEGFP-N1 (Clontech) 载体的CMV启动子而产生特定质粒构建体,在该特定质粒构建体中EGFP的表达受到FGF8或brachyury基因启动子的驱动。所述控制区包含FGF8或者brachyury基因的特征调节元件,并且所述控制区足以在转基因小鼠中赋予所述基因的正常表达模式。在得到的载体中,EGFP的表达被FGF8启动子或者brachyury启动子驱动。在一些实验中,该载体被转染到hESC中。

[0605] 从上述载体中切出FGF8启动子/EGFP盒或者brachyury启动子/EGFP盒,然后将它们亚克隆到含有受到磷酸甘油酸激酶-1启动子控制的新霉素磷酸转移酶的选择载体中。该选择盒在两侧具有flp重组酶识别位点使得容许除去所述盒。所述选择载体被线形化,然后使用标准脂质体转染(lipofection)方法将其引入hESC。在G418中选择10-14天后,未分化的转基因hESC克隆被分离和扩展。

[0606] 应当理解,还可以构建含有受到FGF4或者SNAI1启动子控制的GFP或EGFP报告基因的载体。此外,应当理解,除GFP和EGFP之外的报告基因可用于任何上述构建体只要该报告基因容许通过FACS的细胞分离。

[0607] 实施例12

[0608] 富集前原条细胞的细胞群的制备

[0609] 以下实施例说明了包含FGF8启动子/EGFP盒的hESC可以分化为前原条细胞,随后通过荧光激活细胞分选术(FACS)分离。

[0610] FGF8启动子/EGFP转基因hESC在含有100ng/ml活化素A且不含血清的生长培养基中分化约6、12和18小时。然后通过胰蛋白酶消化收集分化的细胞并在Becton Dickinson FACS Diva上将其直接分选到RNA裂解缓冲液或PBS中。取得未经EGFP分选的单活细胞、分选为EGFP阳性和GFP阴性群的单活细胞的样品。另一实验中,EGFP阳性部分根据荧光强度(Hi和Lo)被分为两个相等大小的群。

[0611] 分选后,通过Q-PCR和免疫细胞化学分析细胞群。对于Q-PCR分析,使用Qiagen RNeasy柱准备RNA,然后将其转化为cDNA。Q-PCR按以前的描述进行。对于免疫细胞化学分析,细胞被分选到PBS中,在4%多聚甲醛中固定10分钟,然后使用Cytospin离心将其附着于载玻片上。初级抗体抗β-连接素。使用合适的与FITC(绿色)或Rhodamine(红色)偶联的二级抗体检测初级抗体的结合。

[0612] 进一步对分离的细胞进行Q-PCR分析。分化的细胞显示EGFP荧光与内源FGF8基因表达的相关性。与非荧光细胞相比,EGFP阳性细胞显示FGF8的表达水平增加了2倍以上。高和低EGFP密度的细胞的分离表明EGFP表达水平与FGF8表达水平相关。除FGF8标志物分析外,对分选的细胞进行核定位的 $\beta$ -连接素(核 $\beta$ -连接素)的免疫化学分析。此标志物的细胞核定位在EGFP阳性部分富集。相反,在EGFP阴性部分中几乎没有观察到 $\beta$ -连接素的细胞核定位。

[0613] 根据这些结果,分选之前分化的细胞培养物中至少约5%的细胞是FGF8/核 $\beta$ -连接素阳性细胞。经分选的细胞群中至少约90%的细胞是FGF8/核 $\beta$ -连接素阳性前原条细胞。

[0614] 实施例13

[0615] 富集中内胚层细胞的细胞群的制备

[0616] 以下实施例说明了包含brachyury启动子/EGFP盒的hESC可以分化为原条(中内胚层)细胞,随后通过荧光激活细胞分选术(FACS)分离。

[0617] brachyury启动子/EGFP转基因hESC在含有100ng/ml活化素A且不含血清的或者含有100ng/ml活化素A和0.1(v/v)FBS的生长培养基中分化约24小时。然后通过胰蛋白酶消化收集分化的细胞并在Becton Dickinson FACS Diva上将其直接分选到RNA裂解缓冲液或PBS中。取得未经EGFP分选的单个活细胞、分选为EGFP阳性和GFP阴性群的单个活细胞的样品。另一实验中,EGFP阳性部分根据荧光强度(Hi和Lo)被分为两个相等大小的群。

[0618] 分选后,通过Q-PCR和免疫细胞化学分析细胞群。对于Q-PCR分析,使用Qiagen RNeasy柱准备RNA,然后将其转化为cDNA。Q-PCR按以前的描述进行。对于免疫细胞化学分析,细胞被分选到PBS中,在4%多聚甲醛中固定10分钟,然后使用Cytospin离心将其附着于载玻片上。初级抗体抗FGF4和SNAI1。使用合适的与FITC(绿色)或Rhodamine(红色)偶联的二级抗体检测初级抗体的结合。

[0619] 进一步对分离的细胞进行Q-PCR分析。分化的细胞显示EGFP荧光与内源brachyury基因表达的相关性。与非荧光细胞相比,EGFP阳性细胞显示brachyury的表达水平增加了2倍以上。高和低EGFP密度的细胞的分离表明EGFP表达水平与brachyury表达水平相关。除brachyury标志物分析外,对分选的细胞进行FGF4和SNAI1的免疫化学分析。这些标志物中的每一种都在EGFP阳性部分富集。相反,在EGFP阴性部分中几乎没有观察到FGF4和SNAI1。

[0620] 根据这些结果,分选之前分化的细胞培养物中至少约5%的细胞是brachyury/FGF4/SNAI1阳性细胞。经分选的细胞群中至少约90%的细胞是brachyury/FGF4/SNAI1阳性中内胚层细胞。

[0621] 应当理解,作为包含EGFP/brachyury构建体的载体的其它选择,包含受FGF4或SNAI1启动子控制的GFP或EGFP报告基因的载体可以用于本实施例所述的中内胚层富集方法。

[0622] 实施例14

[0623] 能够促进体外人前原条和/或中内胚层细胞分化的分化因子的鉴定

[0624] 为了举例说明本发明的分化因子筛选方法,向使用本发明方法制备的人前原条和中内胚层细胞群分别提供多种候选分化因子,而且确定某些标志物基因产物在多个时间点的校正的表达水平。

[0625] 按照之前的实施例所述制备人前原条和中内胚层细胞培养物。简要地说,hESC细

胞在含有100ng/ml活化素A的不含血清的RPMI培养基中生长约12小时(前原条)或24小时(中内胚层)。前原条细胞和中内胚层细胞形成后,该细胞群被维持在含有0.2%FBS的RPMI的单独培养皿中,并进行以下处理:20ng/ml Wnt3B、5ng/ml FGF2或100ng/ml FGF2。使用Q-PCR量化白蛋白、PROX1和TITF1的标志物基因产物的表达。

[0626] 预期所述前原条细胞和中内胚层细胞与上述分子一起孵育会造成所述前原条细胞和中内胚层细胞向源自定形内胚层谱系的细胞分化。

[0627] 实施例15

[0628] 早期胚胎细胞类型中标志物表达的概要

[0629] 本实施例提供了总结用于鉴定和/或检测在hESC的分化早期获得的细胞类型的标志物基因表达的表。下表1中,第一和第二列提供了每一种标志物的全称和缩写。之后的每一列描述了该基因是否在特定组织类型中表达。使用以下细胞类型的缩写:ICM/ESC指hESC;PS指前原条(中内胚层)细胞;Ecto指外胚层细胞;Meso指中胚层细胞;DE指定形内胚层细胞;PrE指原始内胚层;VE指内脏内胚层;PE指体壁内胚层。

[0630] 表1

[0631]

基因名称	基因缩写	表达区域—原肠胚形成阶段						
		ICM/ ESC	PS	Ecto	Meso	DE	PrE/ VE/PE	TE
成纤维细胞生长因子8	FGF8	-	+	-	+	+	+	-
brachyury	BRACH	-	+	-	+	-	-	-
成纤维细胞生长因子4	FGF4	+	+	-	+	-	-	-
snail 同源物1 (果蝇)	SNAI1	-	+	-	+	+	+	+
Mix1 同源框(爪蟾)-样1	MIXL1	-	+	-	+	+	+	-
goosecoid	GSC	-	+	-	+	+	+	-
SRY(性别决定区Y)-盒17	SOX17	-	-	-	-	+	+	-
趋化因子(C-X-C基元)受体4	CXCR4	-	-	-	+	+	-	-
肝细胞核因子3, $\beta$	FOXA2	-	+	-	+	+	+	-
disabled 同源物2	DAB2	-	-	-	-	-	+	-
SRY (性别决定区Y)-盒7	SOX7	-	-	-	-	-	+	-
chordin	CHRD	-	+	-	+	+	+	-
E-钙粘着蛋白 (上皮)	ECAD	+	-	+	-	+/-	+	+
SRY (性别决定区Y)-盒1	SOX1	-	-	+	-	-	-	-
小脑锌指蛋白1	ZIC1	-	-	+/-	+/-	-	-	-
POU结构域, 5型, 转录因子1	OCT4	+	-	-	-	-	+	-
叉头框F1	FOXF1	-	-	-	+	-	-	-
间充质同源框1	MOX1	-	-	-	+	-	-	-
VEGFR, 激酶插入结构域受体	FLK1	-	-	-	+	-	-	-
骨形态发生蛋白4	BMP4	-	-	-	+	-	-	+
基质细胞源性因子1	SDF1	unk	-	-	+	-	+	+
绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 多肽5	HCG	-	-	-	-	-	-	+

[0632] 实施例16

[0633] 用于鉴定和/或检测前原条细胞和中内胚层细胞的其它标志物

[0634] 本实施例描述了可用于鉴定和/或检测前原条和/或中内胚层细胞的其它标志物。应当理解本实施例中描述的前原条标志物可用于代替或者补充任何前述的前原条细胞标志物。还应当理解本实施例中描述的中内胚层标志物可用于代替或者补充任何前述的中内胚层细胞标志物。

[0635] 为了研究hESC向前原条、中内胚层以及随后向内胚层和中胚层分化的过程,我们在分化的最初24小时之后以短时间累加的方式进行了特定条件下的分化中的hESC培养物

的全面表达谱分析,该条件包括:低血清( $\leq 2\%$  (v/v) FBS)和高活化素A (100ng/ml)、加入或不加入FGF受体抑制剂SU5402。在24小时向活化素A加入SU5402导致定形内胚层特征性基因表达的强烈减少以及中胚层标志物表达的极大增加。

[0636] 为了介导细胞分化,hESC在含有100ng/ml活化素A的低血清RPMI培养基中生长4天。血清补充物在分化的最初24小时为0% (v/v),在第二个24小时为0.2% (v/v),在第3和第4天为2% (v/v)。分化的最初24小时之后,通过除活化素A外使用5 $\mu$ M SU5402在一批培养物中诱导中胚层。另一批培养物维持在单独的活化素A中并且因此高效产生定形内胚层。在0、2、6、24、30、48和96小时时间点双份取样。在48和96小时点或者对定形内胚层(仅有活化素A)取样,或者对中胚层(活化素A和SU5402)取样。提取总RNA并且送至Expression Analysis (Durham,NC)使用Affymetrix高密度寡核苷酸阵列(U133plus2.0)进行全面表达谱分析。

[0637] 使用分等级的聚类分析(clustering analysis)和在不同时间点的成对样品的组之间的比较分析研究hESC分化期间的基因表达模式。显示特定表达模式的基因被确定为涉及hESC向前原条细胞分化的基因,该特定表达模式的特征为最初6小时的表达有力增加,随后在以后的时间点其表达维持或减少。在24-30小时时间点显示表达峰值的基因被确定为涉及中内胚层分化的基因。

[0638] 以下表2描述了在使hESC接触活化素A后6小时以高度提高的水平表达的标志物基因。这些基因指示前原条细胞。下述表3描述了使hESC接触活化素A后约24至约30小时以峰值水平表达的标志物基因。这些基因指示中内胚层细胞。每一张表中,第一列列出了探针识别号码,第二列提供了Unigene识别号码(Unigene Identification Number)。Unigene数据库通过National Center for Biotechnology Information (NCBI)网站向公众提供。因此通过在NCBI网站查询适当的Unigene识别号码可以获得这些表中所述任何标志物基因的核苷酸和氨基酸序列。在此整体并入Unigene数据库以供参考。每张表的第三列提供了每一个所述标志物的公知基因符号。其它列提供了在0、2、6、24、30、48和96小时时间点的基因表达的相对水平。这些表中所用的“DE”指定形内胚层,“M”指中胚层。

表 2

探针Id	Unigene Id	基因符号	0 hr	2 hr	6 hr	24 hr	30 hr	48 hr- DE	48 hr-M	96 hr- DE	96 hr-M
208449_s_at	Hs.57710	FGF8	47	212	534	741	513	390	939	701	93
230916_at	Hs.370414	NODAL	2799	4147	9451	9789	12388	6368	8090	8202	1921
213069_at	Hs.477420	HEG	76	160	720	567	915	970	619	719	481
218839_at	Hs.234434	HEY1	30	233	999	202	160	38	98	33	768
209710_at	Hs.367725	GATA2	75	283	903	317	197	94	345	132	930
205780_at	Hs.475055	BIK	418	1061	2403	804	367	165	1157	746	1003
208937_s_at	Hs.504609	ID1	5378	13769	21979	8886	7177	8627	15486	6468	24305

表 3

探针Id	Unigene Id	基因符号	0 hr	2 hr	6 hr	24 hr	30 hr	48 hr- DE	48 hr-M	96 hr- DE	96 hr-M
206783_at	Hs.1755	FGF4	1138	1401	1558	4521	3291	2538	3581	181	932
229103_at	Hs.445884	WNT3	234	240	717	1415	859	1123	758	881	77
231746_at	Hs.282079	MIXL1	286	427	1252	12014	12911	11598	4121	5674	152
206619_at	Hs.159311	DKK4	35	14	16	3876	3218	3877	7	19	22
219480_at	Hs.48029	SNAI1	78	131	249	525	434	536	338	243	261
1562713_a_at	Hs.465407	NETO1	104	174	192	330	283	165	71	64	19
206524_at	Hs.389457	(brachyury)	581	552	722	1761	1816	604	344	159	123
219179_at	Hs.48950	DACT1	824	683	702	2734	2023	1016	467	285	680
218454_at	Hs.131933	FLJ22662	974	1318	1106	3651	2532	1205	1048	874	1294
209897_s_at	Hs.29802	SLIT2	223	244	212	547	625	321	173	145	285
205278_at	Hs.420036	GAD1	160	167	212	676	723	292	444	264	18
210234_at	Hs.429018	GRM4	384	359	389	738	823	216	116	139	213

[0640] 实施例17

[0641] 可用于鉴定和/或监测前原条阶段(原始外胚层细胞)之前的胚胎干细胞分化的标志物



[0642] 本实施例描述了用于鉴定和/或监测前原条阶段之前的胚胎干细胞分化的标志物。该细胞类型此处被称为原始外胚层细胞。应当理解本实施例中描述的原始外胚层细胞标志物可以与原始外胚层细胞组合物相关,并且可被用于已经描述的产生和筛选前原条细胞和/或中内胚层细胞的方法。

[0643] 为了研究hESC向原始外胚层分化的过程,我们如实施例17所述的进行了分化中的hESC培养物的全面表达谱分析。

[0644] 以下表4描述了在使hESC接触活化素A后6小时之前增加或减少了表达的标志物基因。这些基因指示原始外胚层细胞。如同上述图2和图3,图4中,第一列列出了探针识别号码,第二列提供了Unigene 识别号码。Unigene数据库通过National Center for Biotechnology Information (NCBI)网站向公众提供。因此通过在NCBI网站查询适当的Unigene识别号码可以获得此表中所述任何标志物基因的核苷酸和氨基酸序列。在此整体并入Unigene数据库以供参考。表4的第三列提供了每一个所述标志物的公知基因符号。其它列提供了在0、2、6、24、30、48和96小时时间点的基因表达的相对水平。此表中所用的“DE”指定形内胚层,“M”指中胚层。

[0645] 表4显示了在使hESC接触100 ng/ml活化素A后2小时,FZD10、FGF5和OCT4 mRNA的表达显著上调。相反,在活化素A处理后2小时,GBX2、ZFP42和SOX2 mRNA的表达显著下调。预期Nanog mRNA的表达在活化素A处理后6小时之前的某个时间显著上调。

表 4

[0646]

探针 Id	Unigene Id	基因符号	0 hr	2 hr	6 hr	24 hr	30 hr	48 hr- DE	48 hr-M	96 hr- DE	96 hr-M
219764_at	Hs.31664	FZD10	141	788	318	314	200	67	134	35	9
210311_at	Hs.37055	FGF5	59	130	98	70	49	221	88	161	92
220184_at	Hs.329926	NANOG	8341	8065	14341	8716	7906	4436	8874	3977	1291
214532_x_at	Hs.249184	OCT4	26278	33882	33953	29083	25912	15736	20166	7488	18338
210560_at	Hs.184945	GBX2	161	80	46	29	10	56	43	10	13
1554776_at	Hs.335787	ZFP42	2727	1445	2213	1723	1493	1011	1489	526	2329
213722_at	Hs.518438	SOX2	937	643	518	387	354	193	719	108	472

[0647] 本文所述的方法、组合物和设备是代表目前的优选实施方案,并且是示例性的而不作为对本发明范围的限制。本领域技术人员会想到被包括在本发明精神内并且被本公开的范围所界定的所述方法、组合物和设备的变化和其它用途。因此,对本领域技术人员来说

显而易见的是,可以在不偏离本发明的范围和精神内对本文所公开的发明进行各种替代和修改。

[0648] 如所附权利要求书和本公开中所用,短语“基本上由……组成”指包括短语后所列的任何成分,以及只限于不干扰且不促进所列成分的本公开指定的活性或作用的其它成分。因此,短语“基本上由……组成”表明所列成分是必需的或强制的,但是其它成分是可选的,并且根据其是否影响所列成分的活性或作用,该其它成分可能存在或者可能不存在。

[0649] REFERENCES

[0650] 本专利申请中引用了大量文献和专利参考资料。在此整体并入本专利申请中引用的每一篇参考资料以供参考。

[0651] 对于一些参考资料,在文中已经完全引用。对于其它参考资料,文中只引用了作者和年份,其完全引用如下:

[0652] Alexander,J.,Rothenberg,M.,Henry,G.L.,and Stainier,D.Y. (1999).Casanova plays an early and essential role in endoderm formation in zebrafish (Casanova在斑马鱼的内胚层形成中具有早期和必要的作用).Dev Biol215,343-357.

[0653] Alexander,J.,and Stainier,D.Y. (1999).A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish (使得斑马鱼内胚层形成的分子途径).Curr Biol9,1147-1157.

[0654] Ang,S.L.et al.The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse:involvement of HNF3/forkhead proteins (小鼠中定形内胚层谱系的形成和保持:HNF3/叉头蛋白的参与).Development119,1301-1315 (1993).

[0655] Ang,S.L.&Rossant,J.HNF-3 $\beta$  is essential for node and notochord formation in mouse development (HNF-3 $\beta$ 对于小鼠发育中的节和脊索形成是必要的).Cell178,561-574 (1994).

[0656] Aoki,T.O.,Mathieu,J.,Saint-Etienne,L.,Rebagliati,M.R.,Peyrieras,N.,and Rosa,F.M. (2002).Regulation of nodal signalling and mesendoderm formation by TARAM-A,a TGF $\beta$ -related type I receptor (通过TGF $\beta$ 相关的I型受体TARAM-A的nodal信号传导的调节和中内胚层形成).Dev Biol241,273-288.

[0657] Arnold,S.J.et al.Brachyury is a target gene of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway (Brachyury是Wnt/ $\beta$ -连接素信号传导途径的靶基因).Mech Dev91,249-258 (2000).

[0658] Bachiller,D.et al.The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development (组织者因子Chordin和Noggin为小鼠前脑发育所必需).Nature403,658-661 (2000).

[0659] Battle,E.et al.The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells (转录因子snail是上皮肿瘤细胞中E-钙粘着素基因表达的抑制物).Nat Cell Biol2,84-89 (2000).

[0660] Beck,S.,Le Good,J.A.,Guzman,M.,Ben Haim,N.,Roy,K.,Beermann,F.,and Constam,D.B. (2002).Extra-embryonic proteases regulate Nodal signalling during

gastrulation (胚外蛋白酶调节原肠胚形成期间的Nodal信号传导). *Nat Cell Biol* 4, 981-985.

[0661] Beddington, R.S., Rashbass, P., and Wilson, V. (1992). Brachyury--a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis (Brachyury--影响小鼠原肠胚形成和早期器官发生的基因). *Dev Suppl*, 157-165.

[0662] Blum, M. et al. Gastrulation in the mouse: the role of the homeobox gene goosecoid (小鼠中原肠胚形成: 同源框基因goosecoid的作用). *Cell* 69, 1097-1106 (1992).

[0663] Bongso, A., Fong, C.Y., Ng, S.C., and Ratnam, S. (1994). Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts (从人胚泡分离和培养内细胞团细胞). *Hum Reprod* 9, 2110-2117.

[0664] Brennan, J. et al. Nodal signalling in the epiblast patterns the early mouse embryo (外胚层中的Nodal信号形成早期小鼠胚胎模式). *Nature* 411, 965-969 (2001).

[0665] Candia, A.F. et al. Mox-1 and Mox-2 define a novel homeobox gene subfamily and are differentially expressed during early mesodermal patterning in mouse embryos (Mox-1和Mox-2定义了新的同源框基因亚家族, 并且在小鼠胚胎的早期中胚层模式化期间差异表达). *Development* 116, 1123-1136 (1992).

[0666] Candia, A.F. & Wright, C.V. Differential localization of Mox-1 and Mox-2 proteins indicates distinct roles during development (Mox-1和Mox-2蛋白的差异定位表明其在发育期间的不同作用). *Int J Dev Biol* 40, 1179-1184 (1996).

[0667] Chang, H., Brown, C.W., and Matzuk, M.M. (2002). Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily (哺乳动物转化生长因子β超家族的遗传分析). *Endocr Rev* 23, 787-823.

[0668] Ciruna, B.G., Schwartz, L., Harpal, K., Yamaguchi, T.P. & Rossant, J. Chimeric analysis of fibroblast growth factor receptor-1 (Fgfr1) function: a role for FGFR1 in morphogenetic movement through the primitive streak (成纤维细胞生长因子受体-1 (Fgfr1) 作用的嵌合分析: FGFR1在通过前原条的形态形成运动中的作用). *Development* 124, 2829-2841 (1997).

[0669] Ciruna, B. & Rossant, J. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak (FGF信号在前原条调节中胚层细胞命运特化和形态形成运动). *Dev Cell* 1, 37-49 (2001).

[0670] Conlon, F.L., Lyons, K.M., Takeda, N., Barth, K.S., Kispert, A., Herrmann, B., and Robertson, E.J. (1994). A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse (小鼠中前原条形成和保持对nodal的基本要求). *Development* 120, 1919-1928.

[0671] de Caestecker, M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors (受体的转化生长因子β超家族). *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 1-11 (2004).

[0672] Dougan, S.T., Warga, R.M., Kane, D.A., Schier, A.F., and Talbot, W.S. (2003). The role of the zebrafish nodal-related genes squint and cyclops in

patterning of mesendoderm(斑马鱼nodal-相关基因squint和cyclops在中内胚层模式化中的作用).Development130,1837-1851.

[0673] Elms,P.et al.Overlapping and distinct expression domains of Zic2and Zic3during mouse gastrulation(小鼠原肠胚形成期间Zic2和Zic3的重叠及不同的表达区域).Gene Expr Patterns4,505-511(2004).

[0674] Feldman,B.,Gates,M.A.,Egan,E.S.,Dougan,S.T.,Rennebeck,G.,Sirotkin,H.I.,Schier,A.F.,and Talbot,W.S.(1998).Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals(斑马鱼组织者发育和胚层形成要求nodal-相关的信号).Nature395,181-185.

[0675] Feng,Y.,Broder,C.C.,Kennedy,P.E.,and Berger,E.A.(1996).HIV-1entry cofactor:functional cDNA cloning of a seven-transmembrane,G protein-coupled receptor(HIV-1进入辅因子:7次跨膜G蛋白偶联受体的功能性cDNA克隆).Science272,872-877.

[0676] Futaki,S.,Hayashi,Y.,Yamashita,M.,Yagi,K.,Bono,H.,Hayashizaki,Y.,Okazaki,Y.,and Sekiguchi,K.(2003).Molecular basis of constitutive production of basement membrane components:Gene expression profiles of engelbreth-holm-swarm tumor and F9embryonal carcinoma cells(基底膜组成物的组成型产生的分子基础:engelbreth-holm-swarm肿瘤和F9胚胎性癌细胞的基因表达谱).J Biol Chem.

[0677] Grapin-Botton,A.,and Melton,D.A.(2000).Endoderm development:from patterning to organogenesis(内胚层发育:从模式化到器官发生).Trends Genet16,124-130.

[0678] Haegel,H.et al.Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation(缺乏 $\beta$ -连接素影响原肠胚形成时的小鼠发育).Development121,3529-3537(1995).

[0679] Hallonet,M.et al.Maintenance of the specification of the anterior definitive endoderm and forebrain depends on the axial mesendoderm:a study using HNF3beta/Foxa2conditional mutants(前部定形内胚层和前脑特异性的保持依赖轴中胚层:使用HNF3 $\beta$ /Foxa2条件突变体的研究).Dev Biol243,20-33(2002).

[0680] Harris,T.M.,and Childs,G.(2002).Global gene expression patterns during differentiation of F9embryonal carcinoma cells into parietal endoderm(F9胚胎性癌细胞向体壁内胚层分化过程中总体基因表达模式).Funct Integr Genomics2,105-119.

[0681] Henry,G.L.&Melton,D.A.Mixer,a homeobox gene required for endoderm development(Mixer,一种内胚层发育必需的同源框基因).Science281,91-96(1998).

[0682] Herrmann,B.G.,Labeit,S.,Poustka,A.,King,T.R.&Lehrach,H.Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse(小鼠中胚层形成需要T基因的克隆).Nature343,617-622(1990).

[0683] Hogan,B.L.(1996).Bone morphogenetic proteins in development(发育中的骨形成蛋白).Curr Opin Genet Dev6,432-438.

- [0684] Hogan,B.L.(1997).Pluripotent embryonic cells and methods of making same(多能性胚胎细胞和制备多能性胚胎细胞的方法)(U.S.A.,Vanderbilt University).
- [0685] Howe,C.C.,Overton,G.C.,Sawicki,J.,Solter,D.,Stein,P.,and Strickland,S.(1988).Expression of SPARC/osteonectin transcript in murine embryos and gonads(鼠胚胎和生殖腺中SPARC/骨连接素转录物的表达).Differentiation37,20-25.
- [0686] Hudson,C.,Clements,D.,Friday,R.V.,Stott,D.,and Woodland,H.R.(1997).Xsox17alpha and-beta mediate endoderm formation in Xenopus(非洲蟾蜍中Xsox17 $\alpha$ 和- $\beta$ 调节内胚层形成).Cell191,397-405.
- [0687] Huelsken,J.et al.Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice(小鼠中前-后轴形成需要 $\beta$ -连接素).J Cell Biol148,567-578(2000).
- [0688] Imada,M.,Imada,S.,Iwasaki,H.,Kume,A.,Yamaguchi,H.,and Moore,E.E.(1987).Fetomodulin:marker surface protein of fetal development which is modulatable by cyclic AMP(胎儿调节素:可受环状AMP调节的胎儿发育的标志物表面蛋白).Dev Biol122,483-491.
- [0689] Kalinichenko,V.V.,Gusarova,G.A.,Shin,B.&Costa,R.H.The forkhead box F1transcription factor is expressed in brain and head mesenchyme during mouse embryonic development(叉头框F1转录因子在小鼠胚胎发育期间在脑和头间充质中表达).Gene Expr Patterns3,153-158(2003).
- [0690] Kanai-Azuma,M.,Kanai,Y.,Gad,J.M.,Tajima,Y.,Taya,C.,Kurohmaru,M.,Sanai,Y.,Yonekawa,H.,Yazaki,K.,Tam,P.P.,and Hayashi,Y.(2002).Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice(无Sox17突变小鼠中定形肠内胚层的缺失).Development129,2367-2379.
- [0691] Katoh,M.(2002).Expression of human SOX7in normal tissues and tumors(正常组织和肿瘤中人SOX7的表达).Int J Mol Med9,363-368.
- [0692] Kikuchi,Y.,Agathon,A.,Alexander,J.,Thisse,C.,Waldron,S.,Yelon,D.,Thisse,B.,and Stainier,D.Y.(2001).casanova encodes a novel Sox-related protein necessary and sufficient for early endoderm formation in zebrafish(casanova编码一个新的Sox相关的斑马鱼中早期内胚层形成所需的蛋白).Genes Dev15,1493-1505.
- [0693] Kim,C.H.,and Broxmeyer,H.E.(1999).Chemokines:signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function(趋化因子:用于发育和效应子功能的T和B细胞运输的信号灯).J Leukoc Biol65,6-15.
- [0694] Kimelman,D.,and Griffin,K.J.(2000).Vertebrate mesendoderm induction and patterning(脊椎动物中内胚层的诱导和模式形成).Curr Opin Genet Dev10,350-356.
- [0695] Kinder,S.J.et al.The organizer of the mouse gastrula is composed of a dynamic population of progenitor cells for the axial mesoderm(小鼠原肠胚组织者由轴中胚层祖细胞的动态群组成).Development128,3623-3634(2001).

- [0696] Kubo A,Shinozaki K,Shannon J M,Kouskoff V,Kennedy M,Woo S,Fehling H J,Keller G. (2004)Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture (从培养物中胚胎干细胞发育定形内胚层). *Development*.131,1651-62.
- [0697] Kumar,A.,Novoselov,V.,Celeste,A.J.,Wolfman,N.M.,ten Dijke,P.,and Kuehn,M.R. (2001).Nodal signaling uses activin and transforming growth factor-beta receptor-regulated Smads (Nodal信号使用活化素和转化生长因子 $\beta$ 受体调节的Smads). *J Biol Chem*276,656-661.
- [0698] Labosky,P.A.,Barlow,D.P.,and Hogan,B.L. (1994a).Embryonic germ cell lines and their derivation from mouse primordial germ cells (胚胎生殖细胞系和源自小鼠原始生殖细胞的衍生). *Ciba Found Symp*182,157-168;discussion168-178.
- [0699] Labosky,P.A.,Barlow,D.P.,and Hogan,B.L. (1994b).Mouse embryonic germ (EG) cell lines:transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor2receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines (小鼠胚胎生殖 (EG) 细胞系:通过种系的传递和胰岛素样生长因子2受体 (Igf2r) 基因与胚胎干细胞 (ES) 系甲基化标记的差异). *Development*120,3197-3204.
- [0700] Lacroix,M.C.,Guibourdenche,J.,Frendo,J.L.,Pidoux,G.&Evain-Brion,D. Placental growth hormones (胎盘生长激素). *Endocrine*19,73-79 (2002).
- [0701] Lawson,K.A.et al. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo (小鼠胚胎中原始生殖细胞的产生需要Bmp4). *Genes Dev*13,424-436 (1999).
- [0702] Lickert,H.,Kutsch,S.,Kanzler,B.,Tamai,Y.,Taketo,M.M.,and Kemler,R. (2002).Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm (小鼠胚胎内胚层中删除 $\beta$ -连接素后多重心脏的形成). *Dev Cell*13,171-181.
- [0703] Liu,P.et al. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation (脊椎动物轴形成需要Wnt3). *Nat Genet*22,361-365 (1999).
- [0704] Lowe,L.A.,Yamada,S.&Kuehn,M.R. Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo (小鼠胚胎模式形成中nodal作用的遗传剖析). *Development*128,1831-1843 (2001).
- [0705] Lu,C.C.,Brennan,J.,and Robertson,E.J. (2001).From fertilization to gastrulation:axis formation in the mouse embryo (从受精到原肠胚形成:小鼠胚胎中轴的形成). *Curr Opin Genet Dev*11,384-392.
- [0706] Ma,Q.,Jones,D.,and Springer,T.A. (1999).The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment (骨髓微环境中B系和粒细胞前体的维持需要趋化因子受体CXCR4). *Immunity*10,463-471.
- [0707] Maruoka,Y.et al. Comparison of the expression of three highly related genes,Fgf8,Fgf17 and Fgf18, in the mouse embryo (三个高度相关的基因Fgf8、Fgf17和

Fgf18在小鼠胚胎中的表达的比较). *Mech Dev*74,175-177 (1998) .

[0708] McGrath K E,Koniski A D,Maltby K M,McGann J K,Palis J. (1999) Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1and its receptor,CXCR4 (趋化因子SDF-1和其受体CXCR4的胚胎表达和功能). *Dev Biol*.213,442-56.

[0709] Miyazono,K.,Kusanagi,K.,and Inoue,H. (2001).Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling (TGF- $\beta$ /BMP信号的多样性和趋同性). *J Cell Physiol*187, 265-276.

[0710] Nagai,T.et al.The expression of the mouse Zic1,Zic2,and Zic3gene suggests an essential role for Zic genes in body pattern formation (小鼠Zic1、Zic2和Zic3基因的表达暗示Zic基因在躯体模式形成中的必要作用). *Dev Biol*182,299-313 (1997) .

[0711] Nagasawa,T.,Hirota,S.,Tachibana,K.,Takakura,N.,Nishikawa,S.,Kitamura,Y.,Yoshida,N.,Kikutani,H.,and Kishimoto,T. (1996).Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1 (CXC趋化因子PBSF/SDF-1缺失的小鼠中B-细胞淋巴细胞生成和骨髓髓细胞生成的缺陷). *Nature*382,635-638.

[0712] Nieto,M.A.,Bennett,M.F.,Sargent,M.G.&Wilkinson,D.G.Cloning and developmental expression of Snai,a murine homologue of the Drosophila snail gene (果蝇snail基因的鼠同源物Snai的克隆和发育表达). *Development*116,227-237 (1992) .

[0713] Nieto,M.A.The snail superfamily of zinc-finger transcription factors (锌指转录因子的snail超家族). *Nat Rev Mol Cell Biol*3,155-166 (2002) .

[0714] Niswander,L.&Martin,G.R.Fgf-4expression during gastrulation, myogenesis,limb and tooth development in the mouse (小鼠中原肠胚形成、肌形成、肢和齿发育期间Fgf-4的表达). *Development*114,755-768 (1992) .

[0715] Niwa,H. (2001).Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells (保持ES细胞的干细胞更新的分子机理). *Cell Struct Funct*26,137-148.

[0716] Ogura,H.,Aruga,J.,and Mikoshiba,K. (2001).Behavioral abnormalities of Zic1and Zic2mutant mice:implications as models for human neurological disorders (Zic1和Zic2突变小鼠的行为异常:作为人神经功能紊乱的模型). *Behav Genet*31,317-324.

[0717] Ormestad,M.,Astorga,J.&Carlsson,P.Differences in the embryonic expression patterns of mouse Foxf1 and-2match their distinct mutant phenotypes (小鼠Foxf1和-2的胚胎表达模式的不同匹配它们的不同突变体表型). *Dev Dyn*229,328-333 (2004) .

[0718] Pearce,J.J.&Evans,M.J.Mml,a mouse Mix-like gene expressed in the primitive streak (小鼠Mix样基因Mml在原条中表达). *Mech Dev*87,189-192 (1999) .

[0719] Pera,M.F.et al.Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2and its antagonist noggin (BMP-2及其拮抗物noggin调节人



胚胎干细胞分化). *J Cell Sci*117,1269-1280 (2004).

[0720] Perea-Gomez,A.et al.Initiation of gastrulation in the mouse embryo is preceded by an apparent shift in the orientation of the anterior-posterior axis (小鼠胚胎中原肠胚形成的起始在前-后轴方向的明显转变之前). *Curr Biol*14,197-207 (2004).

[0721] Pesce,M.&Scholer,H.R.Oct-4:gatekeeper in the beginnings of mammalian development (Oct-4:哺乳动物发育开始的看门人). *Stem Cells*19,271-278 (2001).

[0722] Pevny,L.H.,Sockanathan,S.,Placzek,M.&Lovell-Badge,R.A role for SOX1 in neural determination (神经决定中SOX1的作用). *Development*125,1967-1978 (1998).

[0723] Reubinoff,B.E.,Pera,M.F.,Fong,C.Y.,Trownson,A.,and Bongso,A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts:somatic differentiation in vitro (来自人胚泡的胚胎干细胞系:体外体细胞分化). *Nat Biotechnol*18,399-404.

[0724] Robb,L.&Tam,P.P.Gastrula organiser and embryonic patterning in the mouse (小鼠中原肠胚组织者和胚胎模式化). *Semin Cell Dev Biol*15,543-554 (2004).

[0725] Rodaway,A.,and Patient,R. (2001). Mesendoderm.an ancient germ layer? (中内胚层,一个古老的胚层?) *Cell*105,169-172.

[0726] Rodaway,A.,Takeda,H.,Koshida,S.,Broadbent,J.,Price,B.,Smith,J.C., Patient,R.,and Holder,N. (1999). Induction of the mesendoderm in the zebrafish germ ring by yolk cell-derived TGF-beta family signals and discrimination of mesoderm and endoderm by FGF (卵黄细胞衍生的TGF- $\beta$ 家族信号对斑马鱼胚环中内胚层的诱导和用FGF对中胚层和内胚层的鉴别). *Development*126,3067-3078.

[0727] Rohr,K.B.,Schulte-Merker,S.,and Tautz,D. (1999). Zebrafish *zic1* expression in brain and somites is affected by BMP and hedgehog signaling (斑马鱼脑和体节中的*zic1*表达受BMP和hedgehog信号影响). *Mech Dev*85,147-159.

[0728] Rossant,J.&Tam,P.P.Emerging asymmetry and embryonic patterning in early mouse development (早期小鼠发育中浮现的不对称的和胚胎性的模式化). *Dev Cell*7,155-164 (2004).

[0729] Sasaki,H.&Hogan,B.L.Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo (小鼠胚胎中原肠胚形成和轴模式形成期间多种叉头相关基因的差异表达). *Development*118,47-59 (1993).

[0730] Schier,A.F. (2003). Nodal signaling in vertebrate development (脊椎动物发育中的Nodal信号). *Annu Rev Cell Dev Biol*19,589-621.

[0731] Schoenwolf,G.C.,and Smith,J.L. (2000). Gastrulation and early mesodermal patterning in vertebrates (脊椎动物中原肠胚形成和早期中胚层模式化). *Methods Mol Biol*135,113-125.

[0732] Shalaby,F.et al.Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice (Flk-1缺陷小鼠中血岛形成和血管发生的失败). *Nature*376, 62-66 (1995).

- [0733] Shamblott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littlefield, J.W., Donovan, P.J., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., and Gearhart, J.D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells (从培养的人原始生殖细胞衍生多能性干细胞). *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13726-13731.
- [0734] Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Ryan, E.A., Korbitt, G.S., Toth, E., Warnock, G.L., Kneteman, N.M., and Rajotte, R.V. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen (7例1型糖尿病病人中使用不含糖皮质激素免疫抑制疗法的胰岛移植). *N Engl J Med* 343, 230-238.
- [0735] Shapiro, A.M., Ryan, E.A., and Lakey, J.R. (2001a). Pancreatic islet transplantation in the treatment of diabetes mellitus (在糖尿病治疗中的胰岛移植). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 15, 241-264.
- [0736] Shapiro, J., Ryan, E., Warnock, G.L., Kneteman, N.M., Lakey, J., Korbitt, G.S., and Rajotte, R.V. (2001b). Could fewer islet cells be transplanted in type 1 diabetes? Insulin independence should be dominant force in islet transplantation (1型糖尿病中能否移植较少量胰岛细胞? 胰岛素非依赖性为胰岛移植中的主要因素). *Bmj* 322, 861.
- [0737] Shiozawa, M., Hiraoka, Y., Komatsu, N., Ogawa, M., Sakai, Y., and Aiso, S. (1996). Cloning and characterization of *Xenopus laevis* xSox7 cDNA (非洲蟾蜍 *Xenopus laevis* xSox7 cDNA的克隆和鉴定). *Biochim Biophys Acta* 1309, 73-76.
- [0738] Shook, D. & Keller, R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development (早期发育中上皮-间质转化的机理、方法和功能). *Mech Dev* 120, 1351-1383 (2003).
- [0739] Sinner, D., Rankin, S., Lee, M. & Zom, A.M. Sox17 and beta-catenin cooperate to regulate the transcription of endodermal genes (SOX17和 $\beta$ -连接素合作调节内胚层基因的转录). *Development* 131, 3069-3080 (2004).
- [0740] Smith, J. (1997). Brachyury and the T-box genes (Brachyury和T-box基因). *Curr Opin Genet Dev* 7, 474-480.
- [0741] Smith, J.C., Armes, N.A., Conlon, F.L., Tada, M., Umbhauer, M., and Weston, K.M. (1997). Upstream and downstream from Brachyury, a gene required for vertebrate mesoderm formation (Brachyury的上游和下游, 一种脊椎动物中胚层形成需要的基因). *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62, 337-346.
- [0742] Stainier, D.Y. A glimpse into the molecular entrails of endoderm formation (内胚层形成的分子机理的初探). *Genes Dev* 16, 893-907 (2002).
- [0743] Stemmler, M.P., Hecht, A., Kinzel, B. & Kemler, R. Analysis of regulatory elements of E-cadherin with reporter gene constructs in transgenic mouse embryos (与报告基因构建体连接的E-钙粘着素调节元件在转基因小鼠胚胎中的分析). *Dev Dyn* 227, 238-245 (2003).
- [0744] Sun, X., Meyers, E.N., Lewandoski, M. & Martin, G.R. Targeted disruption of

Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo (Fgf8的靶向破坏造成在原肠胚形成的小鼠胚胎中细胞迁移的失败). *Genes Dev* 13, 1834-1846 (1999).

[0745] Sun, X. et al. Conditional inactivation of Fgf4 reveals complexity of signalling during limb bud development (Fgf4的条件失活揭示了肢芽发育期间信号的复杂性). *Nat Genet* 25, 83-86 (2000).

[0746] Takash, W., Canizares, J., Bonneaud, N., Poulat, F., Mattei, M.G., Jay, P., and Berta, P. (2001). SOX7 transcription factor: sequence, chromosomal localisation, expression, transactivation and interference with Wnt signaling (SOX7转录因子: 序列, 染色体定位, 表达, Wnt信号的转活和干扰). *Nucleic Acids Res* 29, 4274-4283.

[0747] Tam, P.P. & Behringer, R.R. Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan (小鼠原肠胚形成: 哺乳动物躯体计划的形成). *Mech Dev* 68, 3-25 (1997).

[0748] Taniguchi, K., Hiraoka, Y., Ogawa, M., Sakai, Y., Kido, S., and Aiso, S. (1999). Isolation and characterization of a mouse SRY-related cDNA, mSox7 (小鼠SRY相关的cDNA, mSox7的分离和鉴定). *Biochim Biophys Acta* 1445, 225-231.

[0749] Technau, U. (2001). Brachyury, the blastopore and the evolution of the mesoderm (Brachyury, 胚孔和中胚层的演变). *Bioessays* 23, 788-794.

[0750] Thomas, T., Voss, A.K., Petrou, P. & Gruss, P. The murine gene, Traube, is essential for the growth of preimplantation embryos (鼠基因Traube对于植入前胚胎的生长是必要的). *Dev Biol* 227, 324-342 (2000).

[0751] Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts (衍生自人胚泡的胚胎干细胞系). *Science* 282, 1145-1147.

[0752] Tremblay, K.D., Hoodless, P.A., Bikoff, E.K., and Robertson, E.J. (2000). Formation of the definitive endoderm in mouse is a Smad2-dependent process (小鼠定形内胚层的形成是一个Smad2依赖的过程). *Development* 127, 3079-3090.

[0753] Vallier, L., Reynolds, D. & Pedersen, R.A. Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway (Nodal抑制人胚胎干细胞延神经外胚层默认途径的分化). *Dev Biol* 275, 403-421 (2004).

[0754] Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., DePaepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes (通过多种内在对照基因的几何平均准确校正实时定量RT-PCR). *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.

[0755] Varlet, I., Collignon, J., and Robertson, E.J. (1997). nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation (小鼠原肠胚形成期间前轴特化需要nodal在原始内胚层中的表达). *Development* 124, 1033-1044.

[0756] Vincent, S.D., Dunn, N.R., Hayashi, S., Norris, D.P., and Robertson, E.J.

(2003).Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals (小鼠形成体中细胞命运决定受梯度Nodal信号控制).Genes Dev17,1646-1662.

[0757] Wei,C.L.et al.Transcriptome profiling of human and murine ESCs identifies divergent paths required to maintain the stem cell state (人和鼠 ESCs的转录体谱鉴定了维持干细胞状态所需的不同途径).Stem Cells23,166-185 (2005).

[0758] Weiler-Guettler,H.,Aird,W.C.,Rayburn,H.,Husain,M.,and Rosenberg,R.D. (1996).Developmentally regulated gene expression of thrombomodulin in postimplantation mouse embryos (移植后小鼠胚胎中血栓调节蛋白的发育调节的基因表达).Development122,2271-2281.

[0759] Weiler-Guettler,H.,Yu,K.,Soff,G.,Gudas,L.J.,and Rosenberg,R.D. (1992).Thrombomodulin gene regulation by cAMP and retinoic acid in F9embryonal carcinoma cells (cAMP和视黄酸在F9胚胎癌细胞中调节血栓调节蛋白基因).Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America89,2155-2159.

[0760] Weinstein,D.C.et al.The winged-helix transcription factor HNF-3beta is required for notochord development in the mouse embryo (翼螺旋转录因子HNF-3 $\beta$ 为小鼠胚胎中脊索发育所必需).Cell178,575-588 (1994).

[0761] Wells,J.M.,and Melton,D.A. (1999).Vertebrate endoderm development (脊椎动物内胚层发育).Annu Rev Cell Dev Biol15,393-410.

[0762] Wells,J.M.,and Melton,D.A. (2000).Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers (早期小鼠内胚层由来自邻近胚层的可溶因子模式化).Development127,1563-1572.

[0763] Willison,K. (1990).The mouse Brachyury gene and mesoderm formation (小鼠Brachyury基因和中胚层形成).Trends Genet6,104-105.

[0764] Xu,R.H.et al.BMP4initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast (BMP4起动人胚胎干细胞向胚胎滋养层的分化).Nat Biotechnol20,1261-1264 (2002).

[0765] Yamaguchi,T.P.,Dumont,D.J.,Conlon,R.A.,Breitman,M.L.&Rossant,J.flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors (flt相关的受体酪氨酸激酶flk-1是内皮细胞前体的早期标志物).Development118,489-498 (1993).

[0766] Yamaguchi,T.P.,Takada,S.,Yoshikawa,Y.,Wu,N.&McMahon,A.P.T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification (在轴旁中胚层特化期间T (Brachyury) 是Wnt3a的直接靶标).Genes Dev3185-3190 (1999).

[0767] Yang,D.H.et al.Disabled-2is essential for endodermal cell positioning and structure formation during mouse embryogenesis (Disabled-2为小鼠胚胎形成期间内胚层细胞定位和结构形成所需).Dev Biol251,27-44 (2002).

[0768] Zhao,G.Q. (2003).Consequences of knocking out BMP signaling in the

mouse (小鼠中敲除BMP信号的结果).Genesis35,43-56.

[0769] Zhou,X.,Sasaki,H.,Lowe,L.,Hogan,B.L.,and Kuehn,M.R. (1993) .Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation (nodal是原肠胚形成期间在小鼠节中表达的新的TGF $\beta$ 样基因).Nature361,543-547.

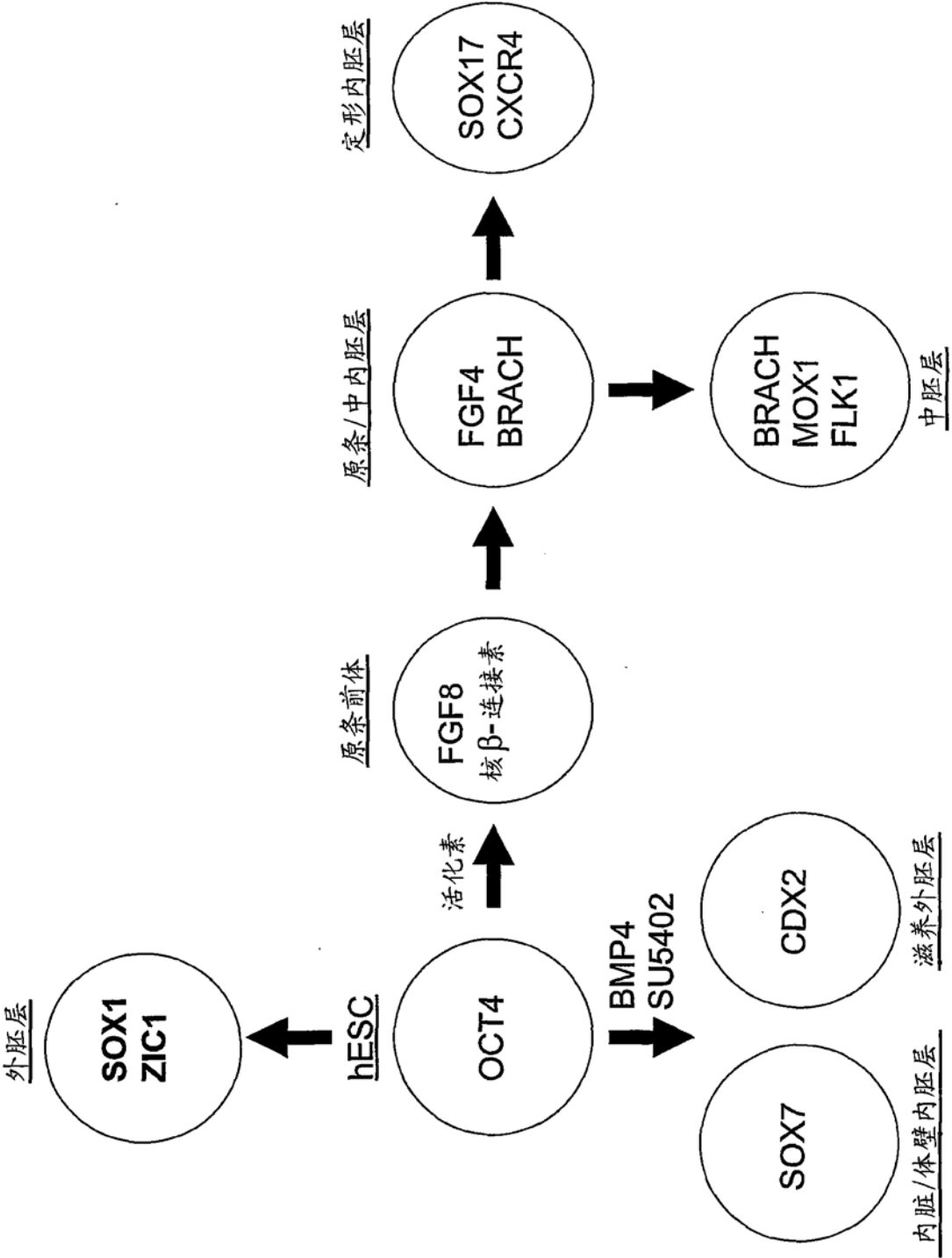
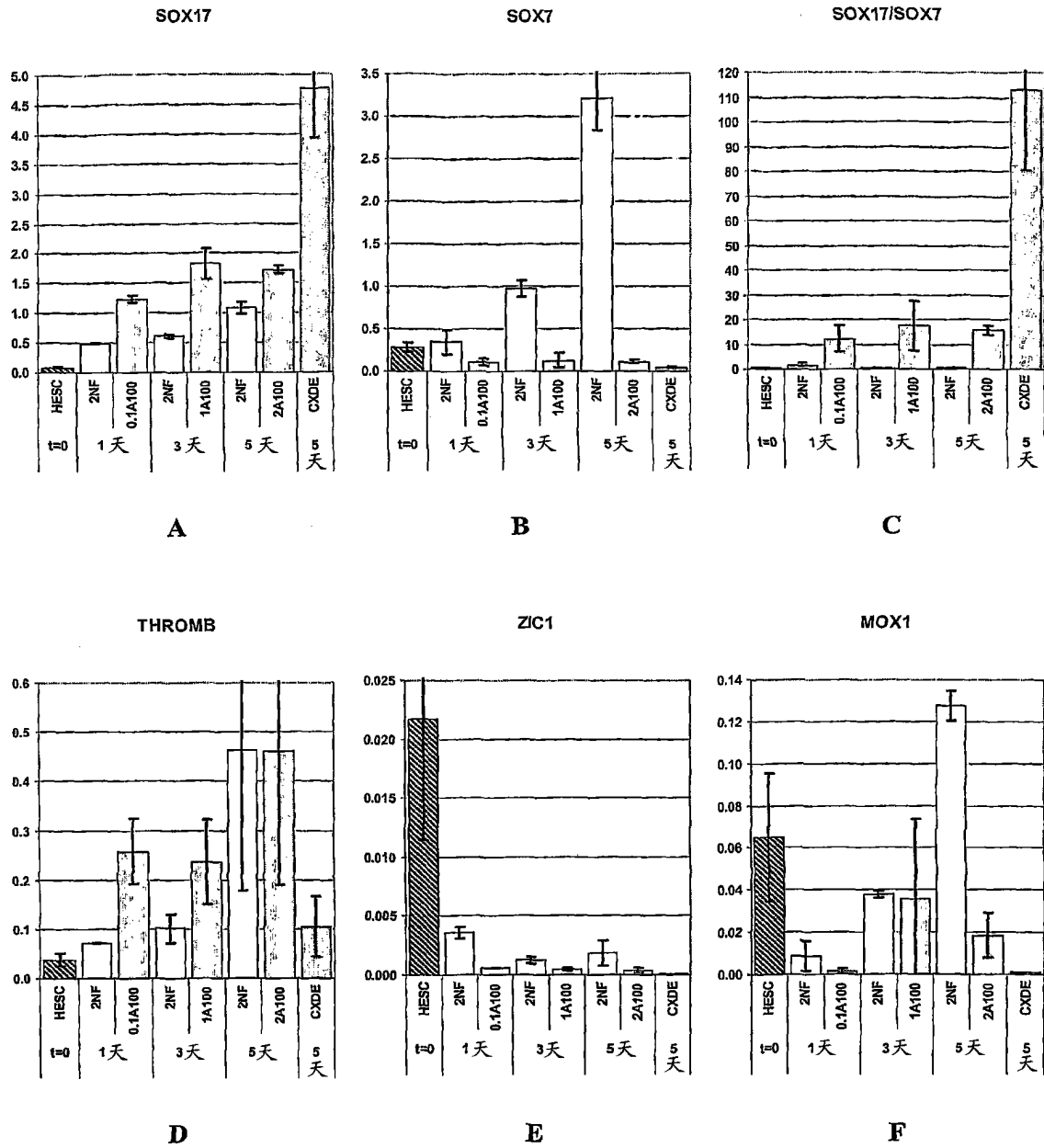
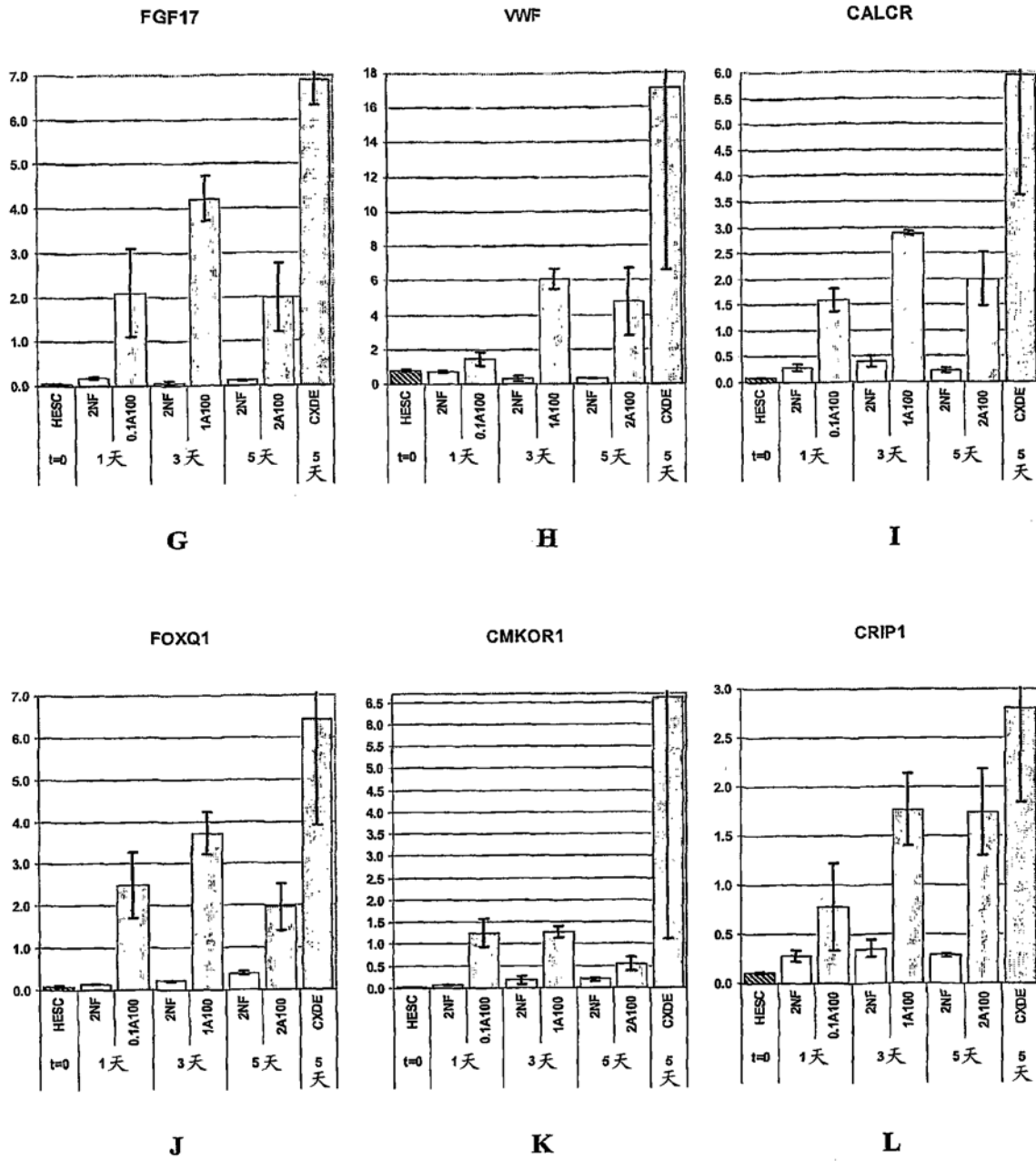


图1







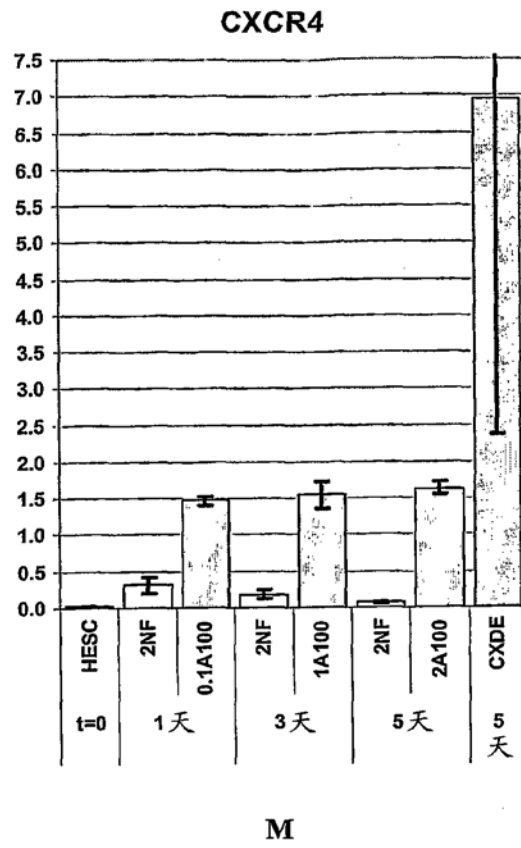
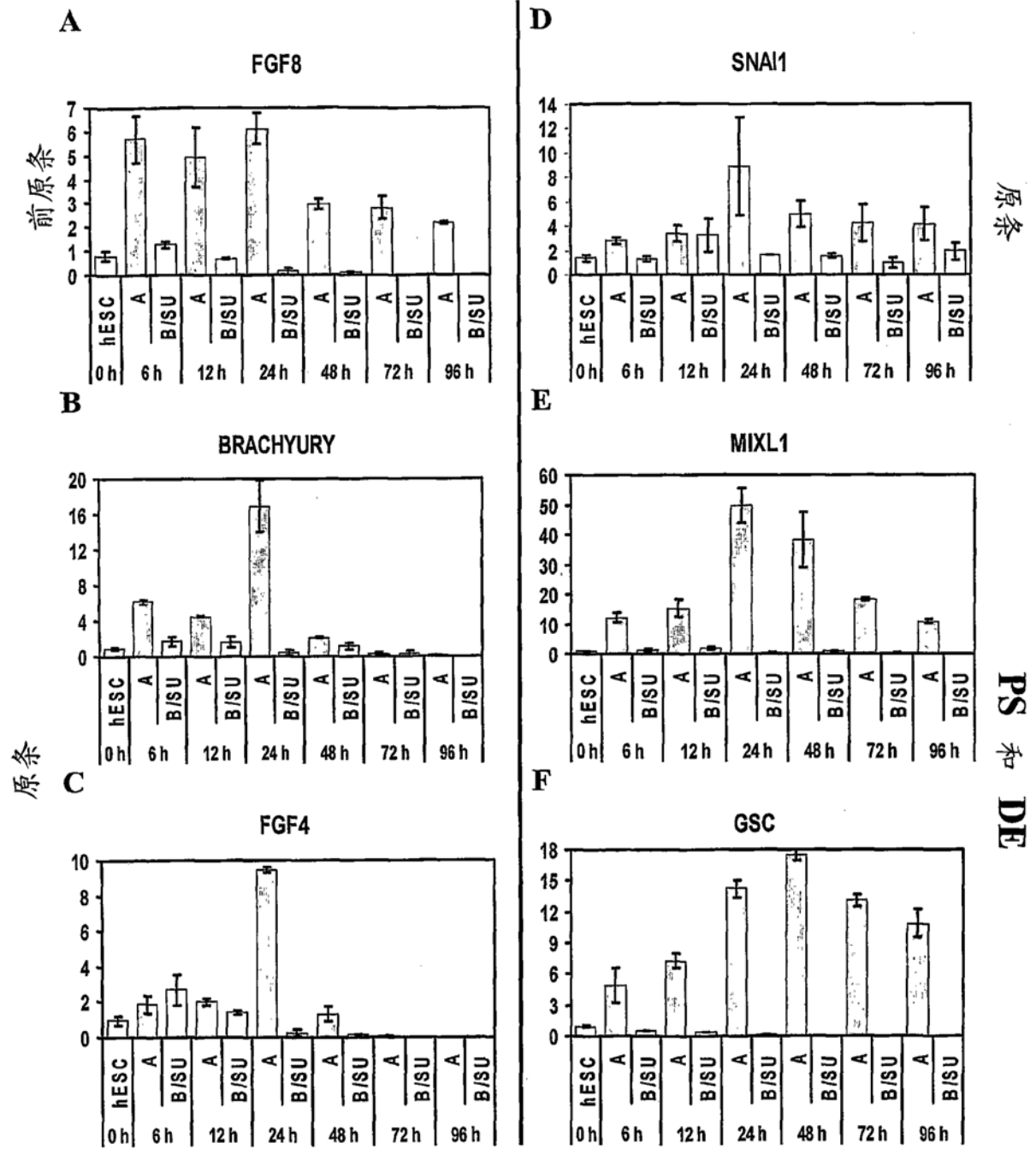


图2



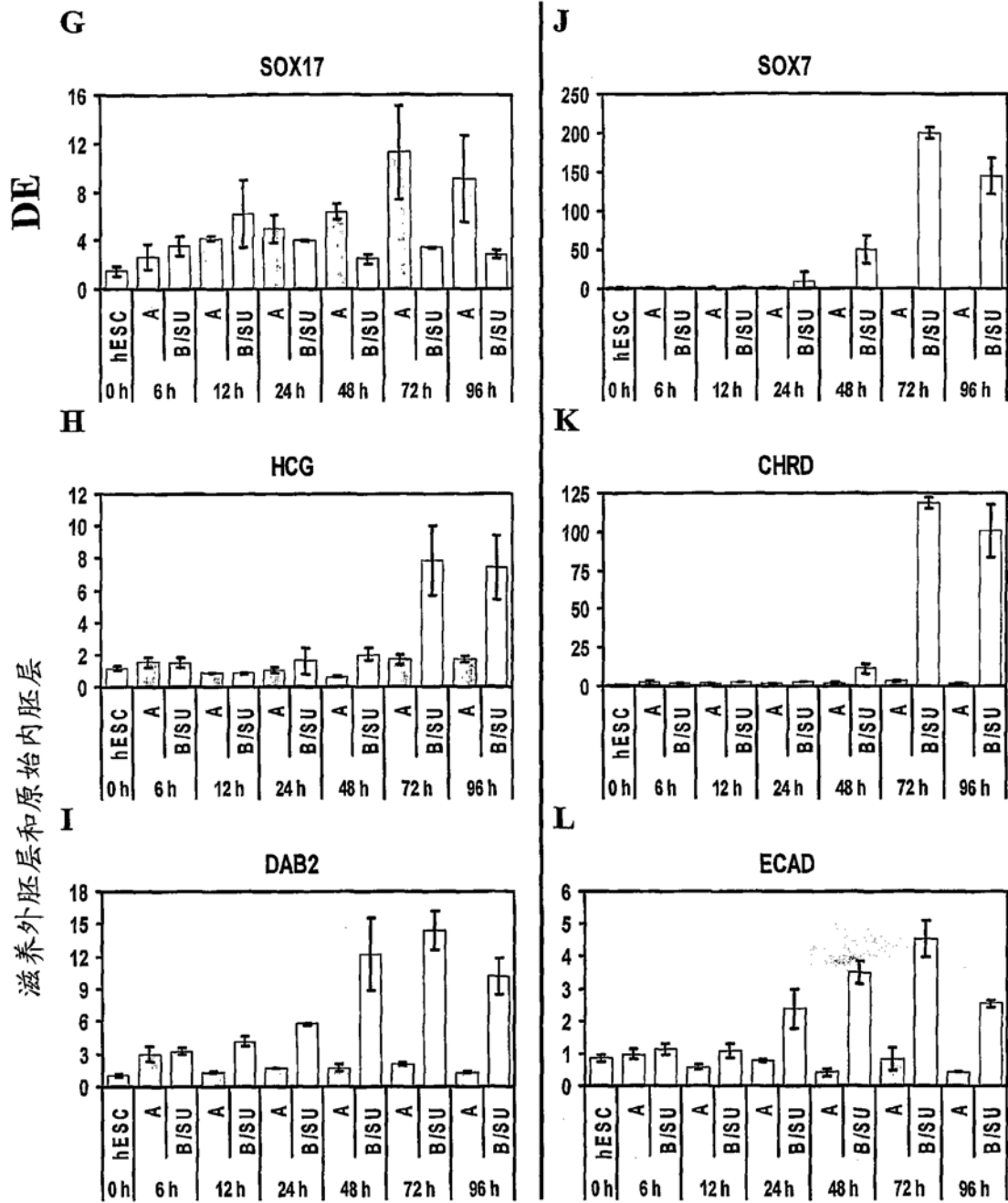


图3

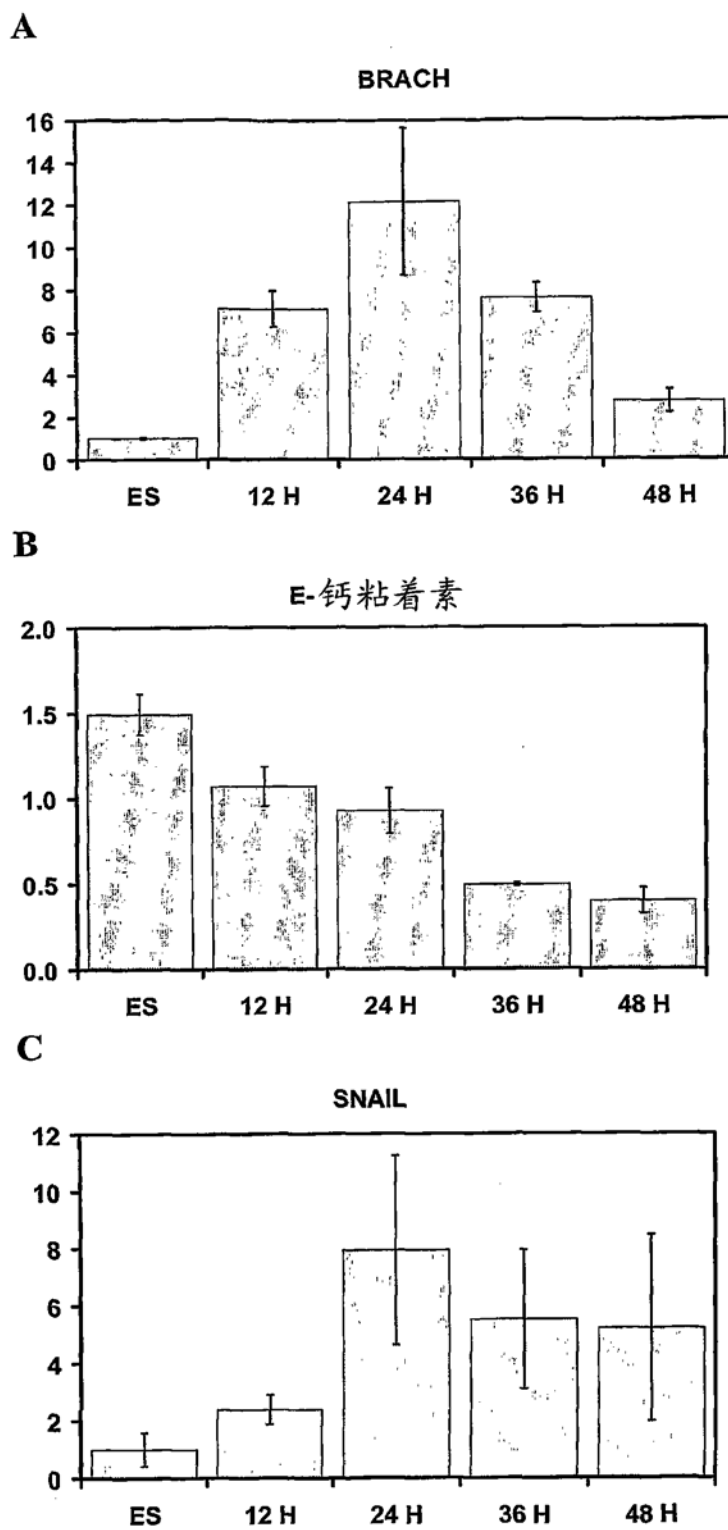
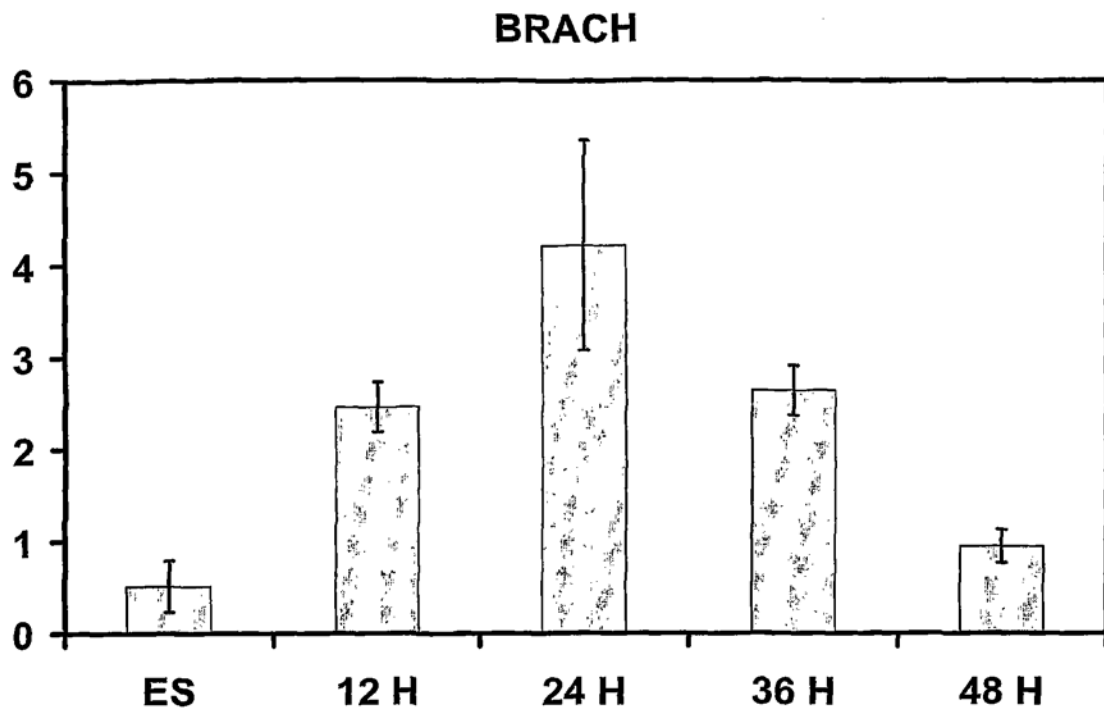


图4

A



B

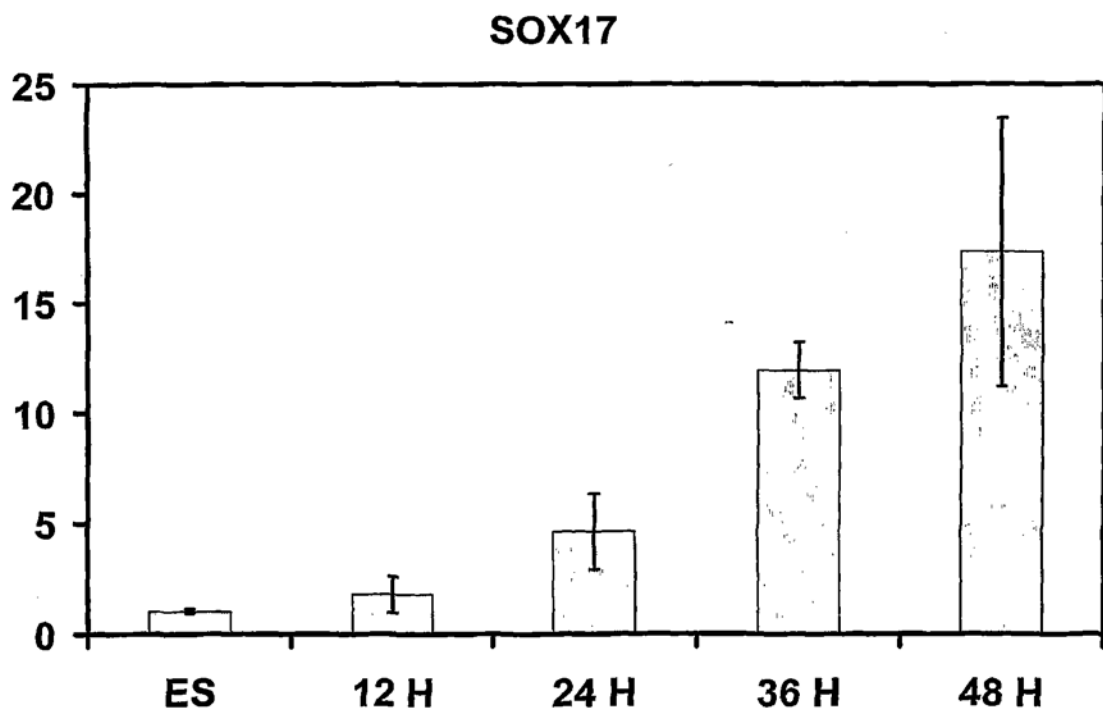


图5

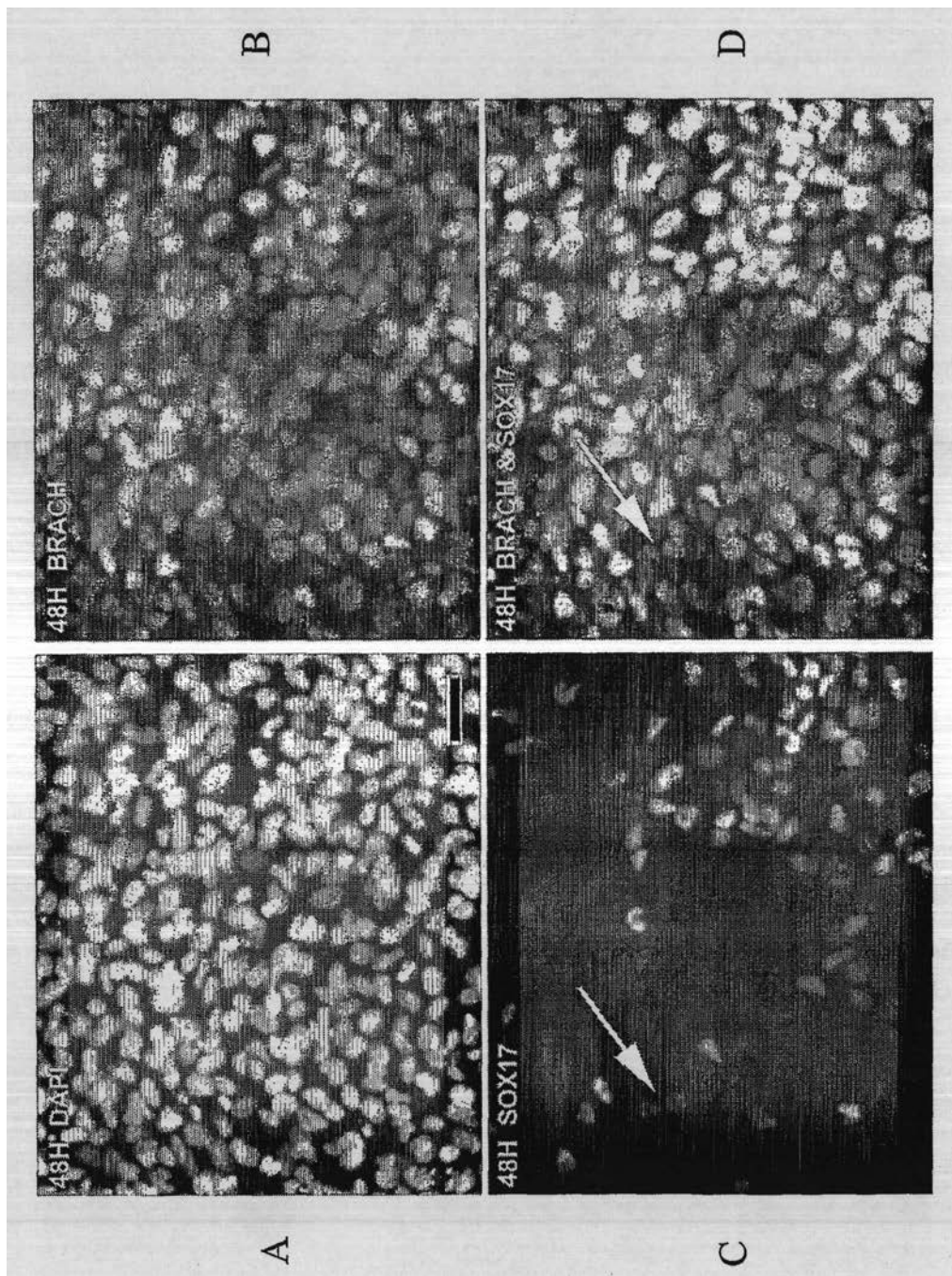


图6

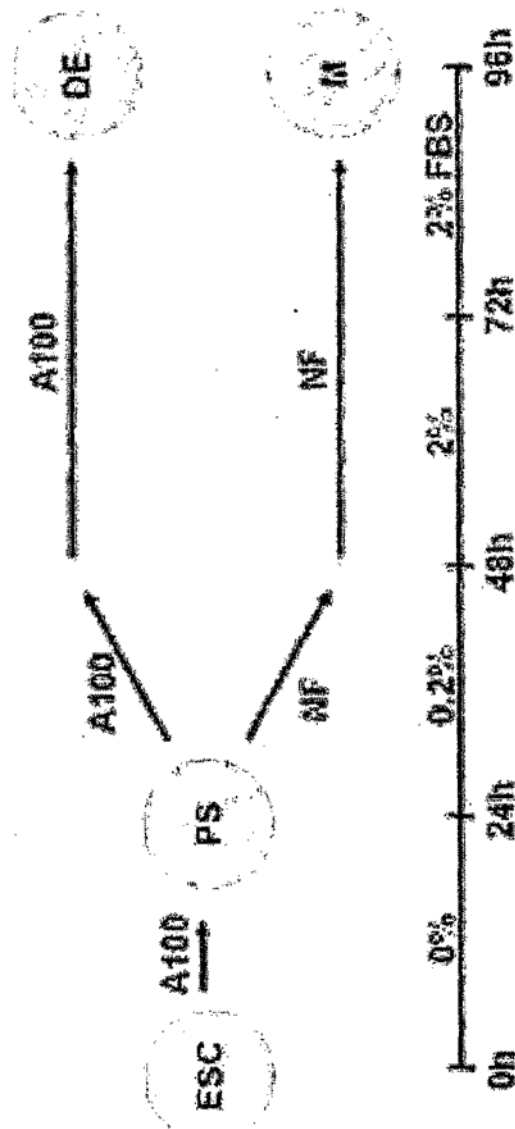


图7

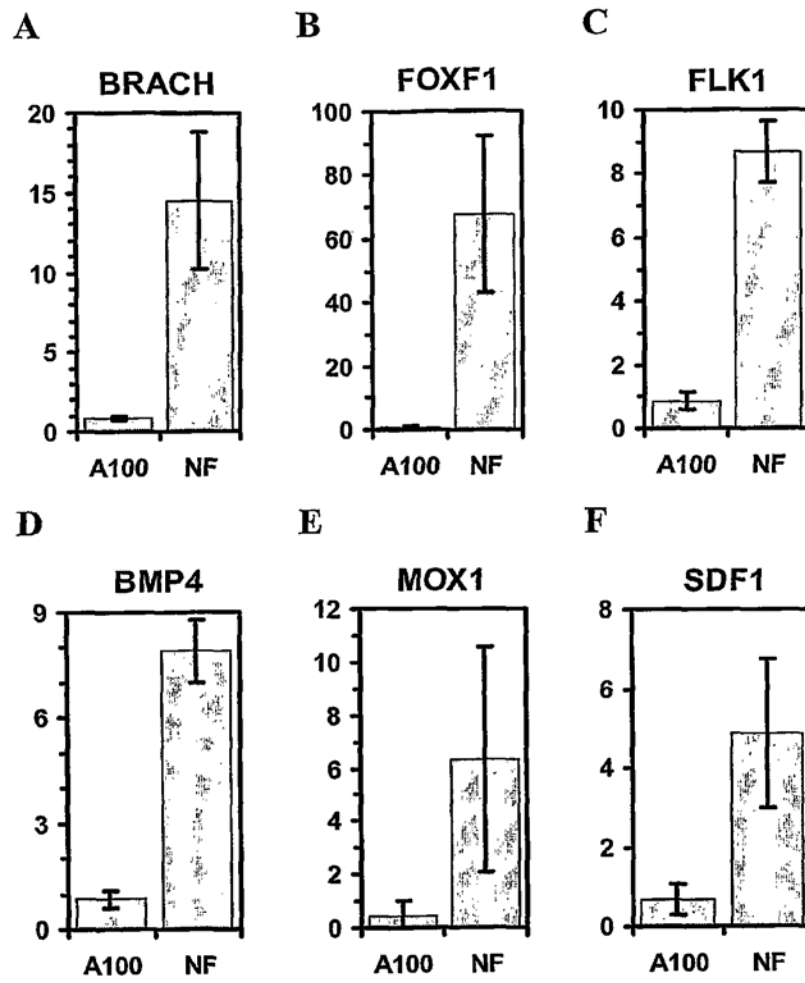


图8

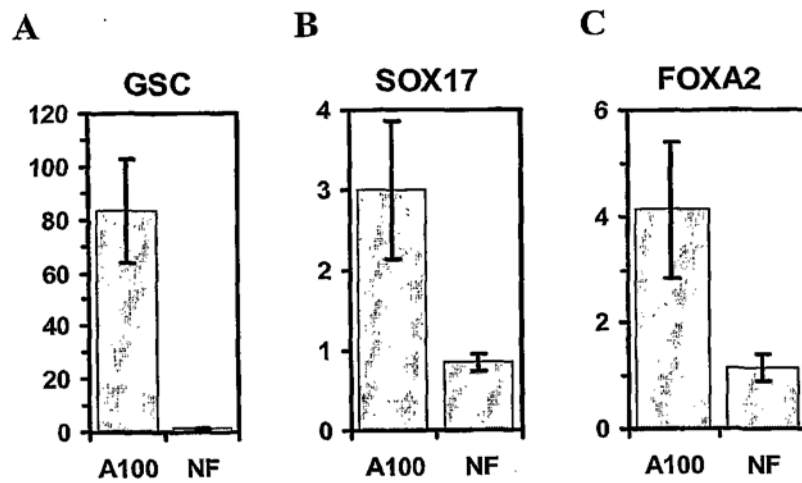
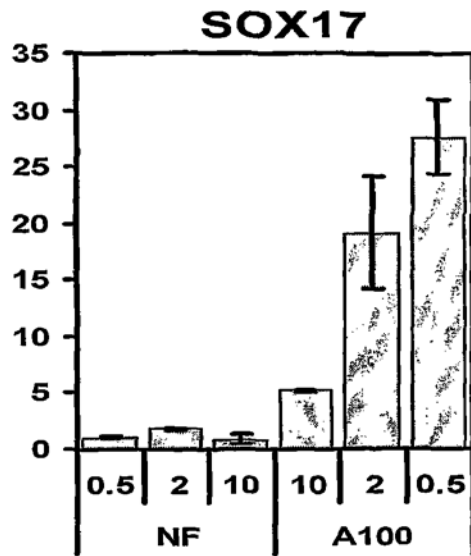


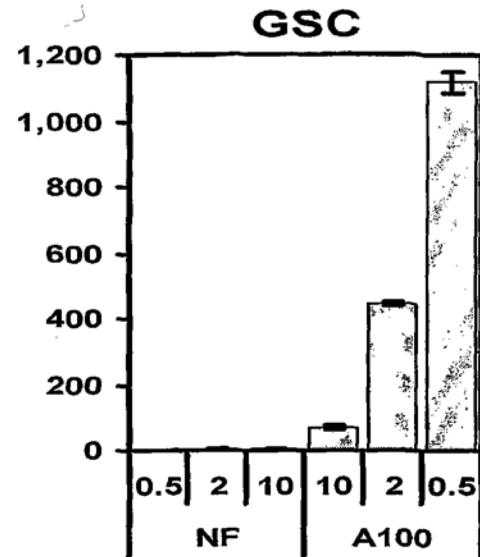
图9



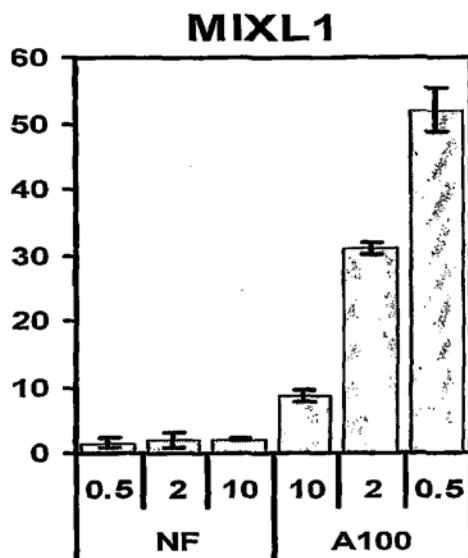
A



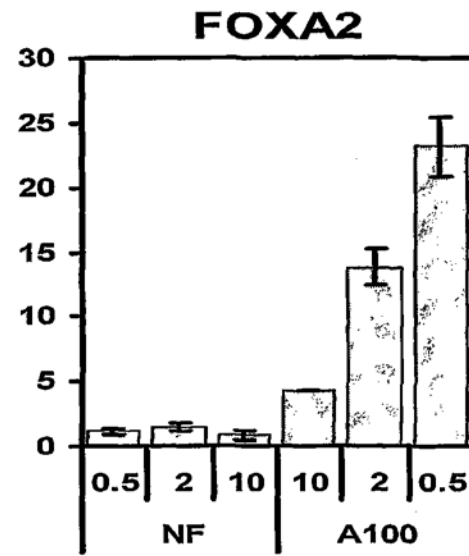
B



C



D



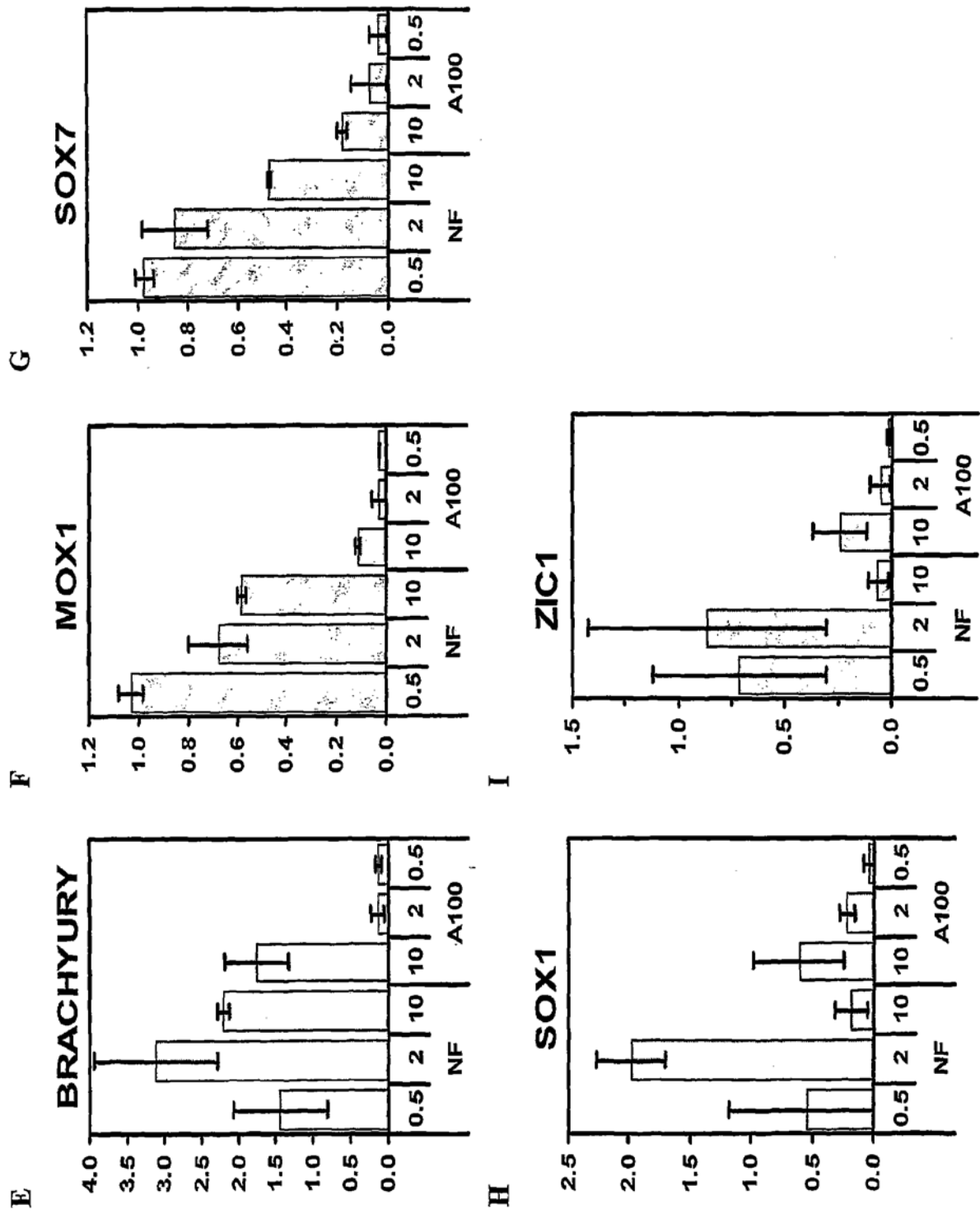


图10

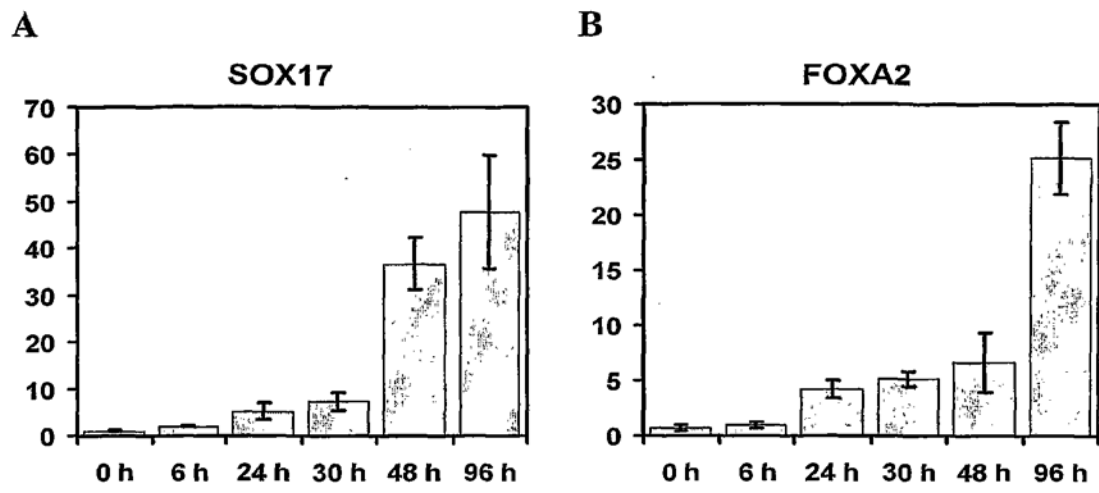


图11

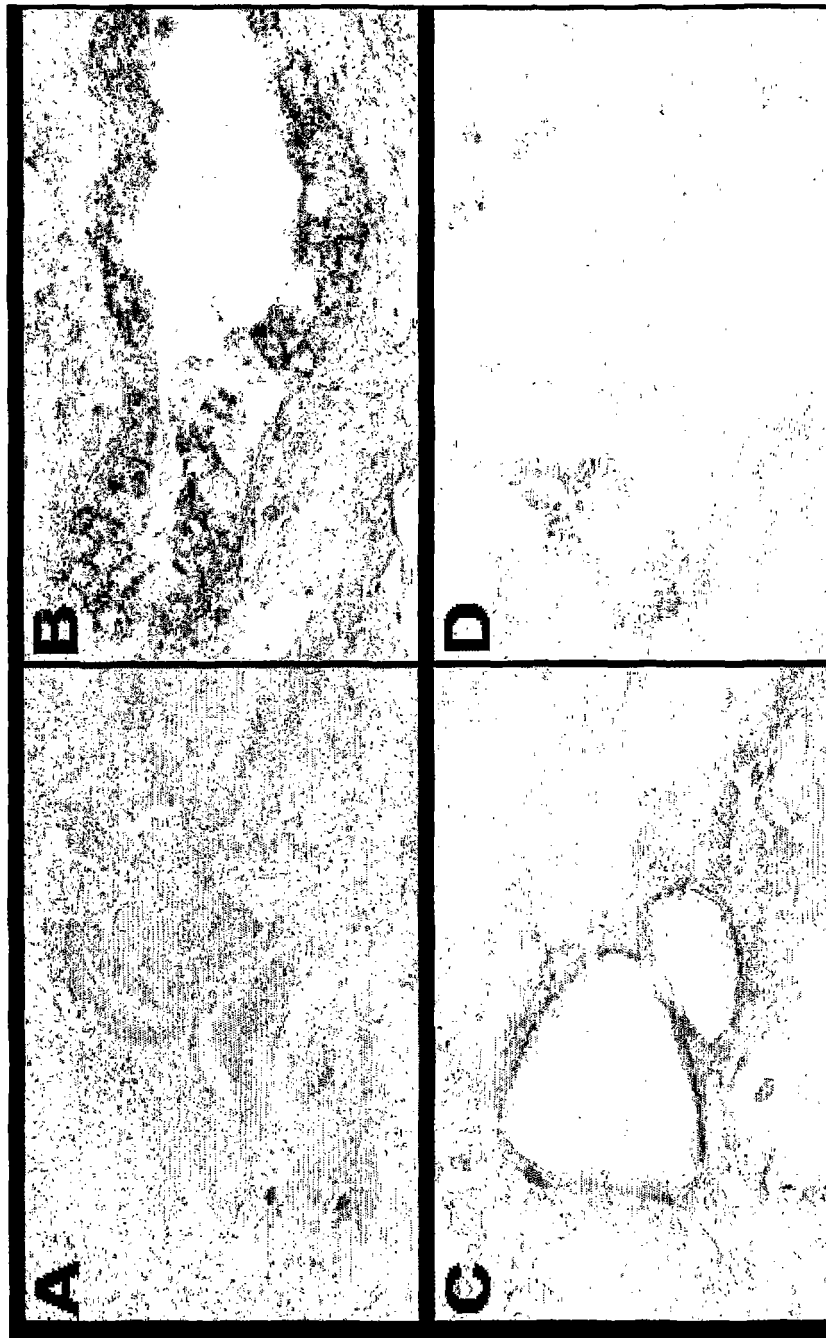


图12