202340454

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202340454 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：112103136 (22)申請日： 中華民國 112 (2023) 年 01 月 30 日

(51)Int. Cl.： *C12N5/0735 (2010.01)* *C12N5/071 (2010.01)*
C12N5/10 (2006.01) *A61K35/30 (2015.01)*
A61P27/02 (2006.01)

(30)優先權：2022/01/27 美國 63/303,849

(71)申請人：新加坡科技研究局 (新加坡) AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH (SG)
新加坡
新加坡商細胞研究私人有限公司 (新加坡) CELLRESEARCH CORPORATION PTE. LTD. (SG)
新加坡
新加坡商新加坡保健服務私人有限公司 (新加坡) SINGAPORE HEALTH SERVICES PTE LTD (SG)
新加坡

(72)發明人：蘇 心怡 SU, XINYI (SG)；卡卡德 雷加 KAKKAD, REGHA (GB)；巴爾加瓦 馬尤里 BHARGAVA, MAYURI (SG)；楊賓霞 YANG, BINXIA (CN)；亨齊克 沃爾特 HUNZIKER, WALTER (CH)；劉增平 LIU, ZENGPING (CN)；王昊飛 WANG, HAOFEI (CN)；帕里克 巴夫哈沙德 PARIKH, BHAV HARSHAD (SG)；陳 清烽 CHEN, QINGFENG (SG)；賴 憲忠 LAI, FRITZ SHIEN CHOONG (SG)；蔡 兆 CHAI, CHOU (MY)；林 嘉隆 LIM, KAH LEONG (SG)；潘 全胜 PHAN, TOAN THANG (SG)

(74)代理人：鄭志玲

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：65 項 圖式數：24 共 258 頁

(54)名稱

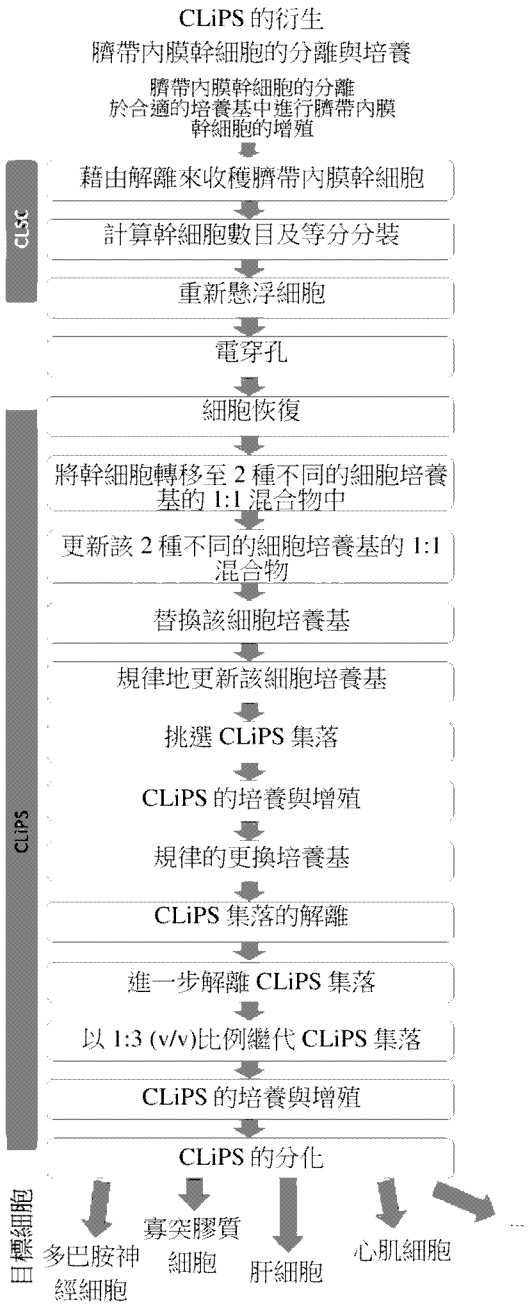
將誘導性多能幹細胞分化為視網膜色素上皮細胞之方法、視網膜色素上皮細胞以及使用該視網膜色素上皮細胞之方法

(57)摘要

本發明係關於一種將誘導性多能幹細胞分化為視網膜色素上皮細胞之方法。此外，本發明係關於可藉由分化方法獲得之視網膜色素上皮細胞培養物以及藉由分化方法獲得之視網膜色素上皮細胞培養物。此外，本發明涉及包含或由可藉由或藉由分化方法獲得之視網膜色素上皮細胞培養物所組成之視網膜色素上皮細胞。本發明亦關於一種包含藉由分化方法獲得之視網膜色素上皮細胞培養物的醫藥組合物。本發明涉及一種治療個體視網膜退化性疾病之方法，包含對個體施用藉由該方法從誘導性多能幹細胞分化而來之視網膜色素上皮細胞。最後，本發明還涉及一種藉由所定義之方法檢測從誘導性多能幹細胞分化的視網膜色素上皮細胞在個體體內的存活率之體內方法，以及一種藉由所定義之方法測定從誘導性多能幹細胞分化的視網膜色素上皮細胞在該個體體內的免疫原性之體外方法，該分化的 RPE 細胞已被預先遞送給該個體。

The present invention relates to a method of differentiating an induced pluripotent stem cell into a retinal pigment epithelial cell. Additionally, the present invention relates to a retinal pigment epithelial cell culture obtainable by the differentiation method and a retinal pigment epithelial cell culture obtained by the differentiation method. In addition, the present invention concerns a retinal pigment epithelium consisting of or comprising a retinal pigment epithelial cell culture obtainable or obtained by the differentiation method. The present invention also relates to a pharmaceutical composition comprising a retinal pigment epithelial cell culture obtained by the differentiation method. The present invention concerns a method of treating a retinal degenerative disease in a subject, comprising administering to a subject a retinal pigment epithelial cell differentiated from the induced pluripotent stem cell by the method. Finally, the present invention also refers to an in vivomethod of detecting the survival rate of a retinal pigment epithelial cell differentiated from an induced pluripotent stem cell by the defined method in a subject and an in vitromethod of determining the immunogenicity of said retinal pigment epithelial cell differentiated from an induced pluripotent stem cell by the defined method in said subject, to whom said differentiated RPE cell has been pre-delivered.

指定代表圖：


CLiPS 的衍生
臍帶內膜幹細胞的分離與培養
臍帶內膜幹細胞的分離
於合適的培養基中進行臍帶內膜
幹細胞的增殖
CLSC
藉由解離來收穫臍帶內膜幹細胞
計算幹細胞數目及等分分裝
重新懸浮細胞
電穿孔
細胞恢復
CLiPS
將幹細胞轉移至 2 種不同的細胞培養
基的 1:1 混合物中
更新該 2 種不同的細胞培養基的 1:1
混合物
替換該細胞培養基
規律地更新該細胞培養基
挑選 CLiPS 集落
CLiPS 的培養與增殖
規律的更換培養基
CLiPS 集落的解離
進一步解離 CLiPS 集落
以 1:3 (v/v)比例繼代 CLiPS 集落
CLiPS 的培養與增殖
CLiPS 的分化
目標細胞
多巴胺神
經細胞
寡突膠質
細胞
肝細胞
心肌細胞
...

【圖1】

202340454
202340454

【發明摘要】

【中文發明名稱】　將誘導性多能幹細胞分化為視網膜色素上皮細胞之方法、視網膜色素上皮細胞以及使用該視網膜色素上皮細胞之方法

【英文發明名稱】　A METHOD OF DIFFERENTIATING AN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL INTO A RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELL, A RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELL AND METHODS OF USING THE RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELL

【中文】本發明係關於一種將誘導性多能幹細胞分化為視網膜色素上皮細胞之方法。此外，本發明係關於可藉由分化方法獲得之視網膜色素上皮細胞培養物以及藉由分化方法獲得之視網膜色素上皮細胞培養物。此外，本發明涉及包含或由可藉由或藉由分化方法獲得之視網膜色素上皮細胞培養物所組成之視網膜色素上皮細胞。本發明亦關於一種包含藉由分化方法獲得之視網膜色素上皮細胞培養物的醫藥組合物。本發明涉及一種治療個體視網膜退化性疾病之方法，包含對個體施用藉由該方法從誘導性多能幹細胞分化而來之視網膜色素上皮細胞。最後，本發明還涉及一種藉由所定義之方法檢測從誘導性多能幹細胞分化的視網膜色素上皮細胞在個體體內的存活率之體內方法，以及一種藉由所定義之方法測定從誘導性多能幹細胞分化的視網膜色素上皮細胞在該個體體內的免疫原性之體外方法，該分化的RPE細胞已被預先遞送給該個體。

【英文】The present invention relates to a method of differentiating an induced pluripotent stem cell into a retinal pigment epithelial cell. Additionally, the present

invention relates to a retinal pigment epithelial cell culture obtainable by the differentiation method and a retinal pigment epithelial cell culture obtained by the differentiation method. In addition, the present invention concerns a retinal pigment epithelium consisting of or comprising a retinal pigment epithelial cell culture obtainable or obtained by the differentiation method. The present invention also relates to a pharmaceutical composition comprising a retinal pigment epithelial cell culture obtained by the differentiation method. The present invention concerns a method of treating a retinal degenerative disease in a subject, comprising administering to a subject a retinal pigment epithelial cell differentiated from the induced pluripotent stem cell by the method. Finally, the present invention also refers to an *in vivo* method of detecting the survival rate of a retinal pigment epithelial cell differentiated from an induced pluripotent stem cell by the defined method in a subject and an *in vitro* method of determining the immunogenicity of said retinal pigment epithelial cell differentiated from an induced pluripotent stem cell by the defined method in said subject, to whom said differentiated RPE cell has been pre-delivered.

【指定代表圖】圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】　將誘導性多能幹細胞分化為視網膜色素上皮細胞之方法、視網膜色素上皮細胞以及使用該視網膜色素上皮細胞之方法

【英文發明名稱】　A METHOD OF DIFFERENTIATING AN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL INTO A RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELL, A RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELL AND METHODS OF USING THE RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELL

【技術領域】

【0001】 相關申請之交互引用。本申請主張於2022年1月27日提出申請之美國臨時專利申請第63/303,849號的優先權，其內容出於所有目的透過引用整體併入本文。

【0002】 本發明係關於一種產生誘導性多能幹細胞之方法。此外，本發明關於一種可藉由該方法獲得之誘導性多能幹細胞群以及藉由該方法獲得之誘導性多能幹細胞群。本發明還涉及包含本發明之誘導性多能幹細胞的醫藥組合物。本發明還涉及分化本發明之誘導性多能幹細胞之方法。此外，還關於包含藉由該方法獲得之分化的誘導性多能幹細胞的醫藥組合物。此外，本發明關於治療個體的先天性或後天性退化性疾病之方法，包含對個體施用由多能幹細胞分化之目標細胞。本發明還關於一種將誘導性多能幹細胞分化為視網膜色素上皮細胞之方法。此外，本發明係關於可藉由分化方法獲得之視網膜色素上皮細胞培養物以及藉由分化方法獲得之視網膜色素上皮細胞培養物。此外，本發明涉及包含或由可藉由或藉由分化方法獲得之視網膜色素上皮細胞培養物所組成之視網膜色素

上皮細胞。本發明亦關於一種包含藉由分化方法獲得之視網膜色素上皮細胞培養物的醫藥組合物。本發明涉及一種治療個體視網膜退化性疾病之方法，包含對個體施用藉由該方法從誘導性多能幹細胞分化而來之視網膜色素上皮細胞。最後，本發明還涉及一種藉由所定義之方法檢測從誘導性多能幹細胞分化的視網膜色素上皮細胞在個體體內的存活率之體內方法，以及一種藉由所定義之方法測定從誘導性多能幹細胞分化的視網膜色素上皮細胞在該個體體內的免疫原性之體外方法，該分化的RPE細胞已被預先遞送給該個體。

【先前技術】

【0003】 幹細胞為一種具有無限自我更新以及分化為多種細胞或組織類型能力的細胞群。幹細胞自我更新的能力對其作為初始未分化細胞庫的功能極為重要，而幹細胞的「可塑性」有賴於它們轉分化為與其來源不同的組織的能力，或許還可跨越胚胎胚層。相較之下，大多數體細胞由於端粒縮短而具有有限的自我更新能力（例如，在Dice, J.F. (1993年) *Physiol. Rev.* 73，第149-159頁中的回顧）。因此，基於幹細胞的療法有可能用於治療多種人類以及動物疾病。

【0004】 胚胎幹細胞（受精後大約第3天至第5天）無限增殖並可自發分化為所有組織類型：因此它們被稱為多能幹細胞（例如，在Smith, A.G. (2001年) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17，第435-462頁中的回顧）。儘管胚胎幹細胞的潛力相大大，但使用這些細胞產生許多倫理問題。因此，已有人提議使用非胚胎幹細胞作為替代來源。

【0005】 成體幹細胞為更具有組織特異性且複製能力可能較低的細胞：因此它們被稱為多潛能幹細胞（例如，在Paul, G.等人 (2002年) *Drug Discov. Today*

7，第295-302頁中的回顧）。這些細胞可由骨髓基質、脂肪組織以及真皮衍生而來，且具有分化為軟骨細胞、脂肪細胞、成骨細胞、成肌細胞、心肌細胞、星形膠質細胞，以及肌腱細胞等的能力。然而，在許多情況下，從骨髓基質、脂肪組織、真皮以及臍帶血中萃取的幹細胞數量相當少。

【0006】 非常年輕且適應性強的成體幹細胞（亦稱為新生兒幹細胞）的綜合來源為臍帶血或臍帶組織或胎盤。例如，可從臍帶組織（即來自沃頓氏膠，即臍帶的基質）中萃取大量的幹細胞（Mitchell, K.E.等人 (2003年) *Stem Cells* 21，第50-60頁；美國專利第5,919,702號；美國專利申請公開第2004/0136967號）。這些細胞已被證明具有分化能力，例如，分別分化為神經元表型以及軟骨組織。從臍帶靜脈的內皮下層也已分離出間質幹細胞，臍帶靜脈為臍帶內發現的三種血管之一（兩條動脈，一條靜脈）（Romanov, Y.A.等人 (2003年) *Stem Cells* 21，第105-110頁；Covas, D.T.等人 (2003年) *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36，第1179-1183頁）。此外，已成功地從臍帶的羊膜組織中分離出間質幹細胞以及上皮幹細胞（美國專利申請公開第US2006/0078993號）。例如，雖然間質幹細胞可在體外及體內進行分化，而使這些幹細胞成為很有機會用於中胚層缺陷修復與疾病管理的候選者，但成體幹細胞的使用受到其多潛能性的限制。為了克服此一限制，非胚胎細胞可重新編程為多能幹細胞：所謂的誘導性多能幹細胞（induced pluripotent stem cells，iPS）。

【0007】 IPS是由Takahashi與Yamanaka最先做出的，他們藉由過度表現四種轉錄因子*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*以及*C-MYC*（亦稱為Yamanaka因子）而將非胚胎細胞重新編程為多能狀態（Takahashi, K.與Yamanaka, S. (2006年)，*Cell*，126(4)，第663-676頁）。詳述之，Takahashi與Yamanaka使用小鼠胚胎纖維母細胞並藉由

反轉錄病毒轉導引入Yamanaka因子，進而使轉錄因子過度表現，並進而產生具有胚胎細胞形態以及生長特性的細胞。雖然這種方法是一項重大的突破，但轉導過程可能導致將轉移的DNA整合到宿主細胞的基因組中，而使iPS危及人類治療。Okita, K.等人於2011年，*Nature methods*，8(5)，第409-412頁，建立了一種產生iPS的非整合替代方法。Okita, K.等人使用電穿孔將編碼Yamanaka因子的三個附加型質體載體以及一個用於p53抑制的*p53-shRNA*轉移至人類真皮纖維母細胞以及牙髓中，使外源DNA過度表現，進而產生無整合的人類iPS。為了支持該無整合的人類iPS的生長及維持，Okita等人，見上文，在由小鼠胚胎纖維母細胞（mouse embryonic fibroblast，MEF）或一STO細胞株所組成的飼養層上培養了iPS，該細胞株已經以新黴素抗性以及鼠LIF基因（SNL）進行轉形。然而，在飼養層上培養可能會產生外源DNA污染iPS的風險。因此，根據Okita等人，見上文，無插入iPS也可能危及人類治療。

【0008】 在產生iPS構想的十年後，iPS技術已進入臨床轉化階段，首次針對老年性黃斑部受損（AMD；Mandai, M.等人，*N Engl J Med*，2017年，376(11):第1038-1046頁）以及帕金森氏症（Parkinson's Disease，PD；Reardon, S.與Cyranoski, D. (2014年) 'Japan stem-cell trial stirs envy'，*Nature. England*，第287-288頁，doi: 10.1038/513287a）進行人體試驗。iPS技術的最大前景在於其實現自體細胞治療的潛力，這可能可避免對長期免疫抑制或組織相容性匹配的需要，以防止移植細胞的排斥。這種範例已經以纖維母細胞以及骨髓衍生的iPS在非人類靈長類動物模型中進行了證明（Morizane, A.等人，*Stem Cell Reports*，2013年，1(4):第283-92頁；Hallett, P.J.等人，*Cell Stem Cell*，2015年，16(3):第269-74頁；Wang, S.等人，*Cell Discov*，2015年，1第15012頁；Shiba, Y.等人，*Nature*，2016

年，538(7625): 第388-391頁)，且為以iPS進行AMD細胞療法的首次人體試驗的基礎（Mandai, M.等人，*N Engl J Med*，2017年，376 (11)：第1038-1046頁）。然而，製造臨床級iPS需要大量的時間及成本，使得這樣的iPS不太可能大規模應用於人類治療。此外，從患者產生自體iPS可能有一些不切實際的情況。例如，對於攜帶致病突變的患者，首先需要糾正這些突變，然後才能使用源自這些患者的iPS。當突變易於處理時，糾正突變是可實現的，但在突變難以處理的情況下，例如許多疾病的散發形式，基因校正的策略可能無法實現。

【0009】 因此，仍然需要產生iPS的替代方法，其中所得的iPS能夠分化為目標細胞，例如適合用於人類治療的視網膜色素上皮（retinal pigment epithelial，RPE）細胞。

【0010】 目前用於RPE產生的幹細胞，亦即誘導性多能幹細胞（iPS）以及胚胎幹細胞（embryonic stem cells，ES），具有一些缺點。眾所週知的是，個體的基因組會在整個生命週期中積累突變，這是與年齡相關的疾病（如癌症）的基礎（Stratton MR等人，2009年，*Nature*，458，第719-7249頁，2001年）。相較於來自老年人的iPS細胞，來自年輕個體的iPS細胞攜帶較少的突變。比較21至100歲個體的DNA序列，在iPS細胞中發現的基因以及表觀遺傳突變隨著捐贈者年齡的增加而增加（Lo Sardo等人，2017年，*Nat Biotechnol.* 35(1):第69-74頁）。粒線體DNA中與年齡相關的異常也增加，老年個體的纖維母細胞衍生的iPS細胞比年輕個體具有明顯更高的突變（Kang等人，2016年，*Cell Stem Cell* 18，625-636，2016年5月5日）。來自成人的iPS細胞如果來自同種異體宿主，也可能需要免疫抑制。使用ES細胞則涉及倫理問題以及需要使用免疫抑制的免疫排斥。由於皮膚組織易於收集，皮膚細胞被廣泛用於產生iPS細胞，但由於長期暴露於陽光中

的紫外線，這些細胞發生突變的變化更大（Apalla Z.等人，2017年，*Dermatol Pract Concept.* 2017年四月，7(2):第1-6頁）。

【0011】 因此，本發明之目的為提供一種產生iPS細胞並將該特定iPS細胞分化為滿足這些需要的RPE細胞之方法。

【發明內容】

【0012】 本發明涉及產生本文所述之誘導性多能幹（iPS）細胞之方法、所得之誘導性多能幹細胞、分化所得之誘導性多能幹細胞之方法，以及以衍生自誘導性多能幹細胞的分化的細胞治療個體的疾病之方法。

【0013】 因此，本發明提供一種產生誘導性多能幹細胞之方法，該方法包含在適合重新編程幹細胞的條件下，於臍帶羊膜幹細胞中表現編碼蛋白*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、*LIN28*以及*L-MYC*以及*p53-shRNA*的外源核酸，進而產生誘導性多能幹細胞。在該方法的具體實施例中，該臍帶羊膜幹細胞為臍帶羊膜間質幹細胞或臍帶羊膜上皮幹細胞。

【0014】 此外，本發明還提供可藉由該方法獲得之誘導性多能幹細胞群以及藉由該方法獲得之誘導性多能幹細胞群。該誘導性多能幹細胞群可為自該臍帶羊膜間質幹細胞（群）衍生的誘導性多能幹細胞群或自該臍帶羊膜上皮幹細胞（群）衍生的誘導性多能幹細胞群。

【0015】 此外，本發明還提供包含本發明之誘導性多能幹細胞的醫藥組合物。

【0016】 此外，本發明提供一種將本發明之誘導性多能幹細胞分化為目標細胞之方法，其中該誘導性多能幹細胞在適合分化的條件下分化為該目標細胞。因此，本發明還提供包含本發明獲得之分化的誘導性多能幹細胞的醫藥組合物。

【0017】 本發明還提供一種治療個體的先天性或後天性退化性疾病之方法，包含對個體施用從藉由本發明獲得之多能幹細胞分化而來的目標細胞。

【0018】 另外，本發明提供由本發明之誘導性多能幹細胞群產生或由藉由本發明之誘導性多能幹細胞分化所獲得之細胞產生的細胞外膜囊泡。本發明進一步包含本發明的這種細胞外膜囊泡作為治療劑的遞送載體之用途。

【0019】 本發明還提供一種細胞培養基，包含乳腺上皮基礎培養基MCDB 170、EpiLife培養基、Dulbecco氏改良Eagle氏培養基（Dulbecco's modified eagle medium，DMEM）、F12（Ham氏F12培養基），以及胎牛血清（Fetal Bovine Serum，FBS）。

【0020】 本發明還涉及將本文所述之誘導性多能幹細胞（iPS）分化為視網膜色素上皮（RPE）細胞、所得之RPE細胞、包含或由本文別處所述之RPE細胞所組成的視網膜色素上皮細胞、一種以藉由本文所述之方法從iPS細胞分化的RPE細胞治療個體的視網膜退化性疾病之方法，以及包含藉由本文所述之方法獲得之RPE細胞的醫藥組合物。此外，本發明還涉及使用藉由本文所述方法獲得之RPE細胞的體內以及體外方法。

【0021】 本案發明人描述使用源自臍帶內膜細胞的iPS細胞（簡稱：CLiPS）以產生用於臨床的RPE細胞。相較於ES以及皮膚iPS細胞，本案發明人使用本發明之方法將CLiPS分化為RPE，並產生具有持續增加的RPE分化效率的RPEs。根據色素沈澱特異性基因（例如，MITF、PMEL17以及TRYP2）以及RPE特異性基

因（例如，BEST1、RPE65、MERTK、RLBP1）的表現含量增加，CLiPS衍生的RPEs比ES衍生的RPEs具有更高的色素沈澱。同樣在功能含量上，藉由比較源自不同幹細胞（CLiPS、ES以及皮膚iPS）的RPE的生物能量學，證明相較於ES衍生的RPEs，CLiPS-RPE包含增加的糖酵解以及粒線體呼吸含量。

【0022】 因此，於本發明之第一方面，本發明提供一種將iPS細胞分化為RPE細胞之方法，該方法包含在適合分化為RPE細胞的條件下，在分化培養基中培養自臍帶羊膜幹細胞衍生的iPS細胞，進而使該iPS細胞分化為RPE細胞。

【0023】 於本發明之第二方面，本發明提供可藉由該方法可獲得之RPE細胞培養物以及藉由該方法獲得之RPE細胞培養物。

【0024】 於本發明之第三個方面，本發明還提供一種視網膜色素上皮細胞，其包含或由該可藉由該方法可獲得之RPE細胞培養物所組成，以及包含或由該藉由該方法獲得之RPE細胞培養物所組成。

【0025】 於本發明之第四個方面，本發明還提供一種醫藥組合物，其包含藉由本發明之方法獲得之RPE細胞培養物。

【0026】 於本發明之第五個方面，本發明還提供一種治療個體的視網膜退化性疾病之方法，包含對個體施用藉由本發明之方法自iPS細胞分化的RPE細胞。

【0027】 於本發明之第六方面，本發明提供一種藉由本文所定義之方法檢測自iPS細胞分化的RPE細胞在個體體內的存活率之體內方法，該方法包含：a）將藉由所定義之方法將從iPS細胞分化的RPE細胞引入個體，其中該RPE細胞包含生物發光標記；b）利用影像方法檢測該RPE細胞隨時間進程的生物發光訊號，進而收集影像數據；c）將步驟b）中接收到的影像數據與參考影像數據進行比較。

【0028】 於本發明之第七個方面，本發明提供一種藉由所定義之方法測定從iPS細胞分化的RPE細胞在個體體內的免疫原性之體外方法，該分化的RPE細胞已被預先遞送給該個體，該方法包含：a）使用影像方法檢測獲自該個體的樣品中的促進發炎細胞激素含量，該樣品包含該分化的RPE細胞，進而收集影像數據；b）將步驟a）中接收到的影像數據與參考影像數據進行比較。

【圖式簡單說明】

【0029】 當考量結合非限制性實施例以及附圖時，參考詳細描述將更好地理解本發明，其中：

【0030】 **圖1**所示為示意性地表示產生本發明之誘導性多能幹細胞之方法的說明性具體實施例的實驗步驟的流程圖。本文使用的幹細胞是從臍帶的羊膜中分離出來的—亦稱為臍帶內膜幹細胞（cord lining stem cells，CLSC）。該具體實施例始於藉由從該細胞培養裝置分離該細胞以收穫分離的CLSC（然而此處應注意的是，CLSC也可以分離的形式提供用於本發明之方法）。然後，對該CLSC進行計數，並將約70萬個細胞等分至微量離心機中並沉澱。在將編碼Yamanaka因子的質體添加至該細胞-緩衝液混合物之前，將該細胞沉澱重新懸浮於適合電穿孔的緩衝液中。針對臍帶內膜間質細胞（cord lining mesenchymal cells，CLMC）以及臍帶內膜上皮細胞（cord lining epithelial cells，CLEC），分別以具有約20 ms持續時間以及約1600V電壓的1個脈衝或具有30 ms持續時間以及約1350V電壓的2個脈衝進行電穿孔。電穿孔後，立即將該幹細胞轉移至適合恢復的培養基中，其中該培養基含有抑制發炎反應以及增強細胞存活的化合物。在適當的恢復時間後，將該適合恢復的培養基更換為兩種不同的細胞培養基的1:1混合物，其中

該兩種不同的細胞培養基為適合恢復的培養基以及第二細胞培養基。為了更新該細胞培養基，於電穿孔後約4天，將該培養基混合物替換為相同的細胞培養基混合物。因此，產生了臍帶內膜誘導的多能幹細胞集落—在本文中亦稱為CLiPS。再過大約2天後，將該兩種不同細胞培養基的1:1混合物替換為該第二細胞培養基。這種培養基也大約每隔一天更換一次，以保持培養基的新鮮。當CLiPS集落的直徑達到約0.5 mm至1.5 mm的大小時，挑取CLiPS集落並轉移至適合細胞培養以及增殖的包覆細胞培養容器中。同樣地，該細胞培養基定期以相同的培養基更換。在CLiPS集落達到約50%的匯合後，從該包覆培養裝置上分離CLiPS集落，並轉移至另一適合細胞培養與增殖的細胞培養容器中。藉此CLiPS集落進一步分離。當CLiPS集落達到約70-80%的匯合時，以約1:3（v/v）的比例繼代該CLiPS集落，其中以約1:3（v/v）的比例繼代是藉由將1體積的解離的CLiPS與2體積的新鮮培養基接觸而進行的。然後將該CLiPS在含有增強細胞存活的物質的培養基中培養，直至達到約30至60%的匯合度。此時，該CLiPS能夠分化為任何所需的目標細胞。

【0031】 **圖2**所示為單個CLSC群體的重新編程效率的示例性比較。幹細胞經過不同的電穿孔設定而將外源核酸轉染至細胞中。使用Okita等人，同上，中指示的電穿孔參數（1650V，10 ms，3個脈衝）以及於本發明中分用於轉染臍帶羊膜上皮幹細胞（在本文中亦稱為「臍帶內膜上皮幹細胞」或CLEC）的相應參數（1350V，30 ms，2個脈衝）以及臍帶羊膜的間質幹細胞（在本文中亦稱為臍帶內膜間質幹細胞或CLMC）的相應參數（1600V，20 ms，1個脈衝）進行電穿孔。將20萬個轉染細胞接種於6孔盤中，進行三重複。轉染後約21天，重新編程效率百分比計算為集落數/200,000 x 10。

【0032】 **圖3**所示為來自人類CLMC的誘導性多能幹細胞的示例性集落發展。**圖3a-f**所示為集落發展的代表性時間過程，其中**圖3a**所示為在培養第0天在其維持培養基中培養的人類CLMC的典型形態。**圖3b**所示為在培養第15天在其維持培養基中培養的人類CLMC的典型形態。**圖3c**所示為在培養第24天在其維持培養基中培養的人類CLMC的典型形態。**圖3d**所示為在培養第29天在其維持培養基中培養的人類CLMC的典型形態。**圖3e**所示為iPS集落第一次繼代的典型形態的4倍放大倍率，**圖3f**所示為iPS集落在第一次繼代時的典型形態的10倍放大倍率。**圖3g-1**所示為源自人臍帶內膜細胞的iPS的示例性免疫螢光染色，顯示多能胚胎幹細胞標記的內源性表現的活化，其中**圖3g**所示為KLF4的表現，**圖3h**所示為NANOG的表現，**圖3i**所示為OCT3/4的表現，**圖3j**所示為SOX2的表現，**圖3k**所示為SSEA4的表現，以及**圖3l**所示為Tra-1-60的表現。**圖3m**所示為示例性的核型分析，展示單個細胞株CLEC23（EC23-CLiPS）、CLMC23（MC23-CLiPS）、CLEC44（EC44-CLiPS）以及CLMC44（MC44-CLiPS）中CLiPS的正常染色體數目以及G條帶模式。**圖3n**所示為示例性的人類CLMSC-DTHN培養物出現10天的重新編程放大20倍，**圖3o**所示為在laminin-511基質上培養的擴展人類CLMSC-DTHN放大4倍的典型形態。**圖3p**所示為在laminin-511基質上培養的人類CLMSC-DTHN放大10倍的典型形態。**圖3q**所示為在laminin-511基質上培養的擴展人類CLMSC-DTHN放大20倍的典型形態。**圖3r**所示為繼代第3代的CLMSC-DTHN iPS中人類多能標記NANOG的示例性表現。**圖3s**所示為繼代第3代的CLMSC-DTHN iPS中人類多能標記OCT3/4的示例性表現。**圖3t**所示為繼代第3代的CLMSC-DTHN iPS中人類多能標記SOX2的示例性表現。**圖3u**所示為繼代第3代的CLMSC-DTHN iPS中人類多能標記NTRA-1-81的示例性表現。比例尺：均為100 μm。**圖3v**所示

為原代親代細胞、載體轉染後11天的親代細胞（D11轉染細胞）以及已建立的iPS選殖株（CLiPS）中重新編程基因表現以及多能基因表現的示例性RT-PCR分析。「Vec」表示特定於載體衍生序列的擴增。以甘油醛-3-磷酸-去氫酶（Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase，GAPDH）作為內部對照。沒有反轉錄的智人（H1）總RNA的PCR作為所有引子對的基因組污染的對照。

【0033】 **圖4**所示為CLiPS注射後由免疫功能低下的非肥胖糖尿病嚴重聯合免疫缺陷（non-obese diabetic severe combined immunodeficiency，NOD-SCID）小鼠形成的畸胎瘤的示例性組織學分析。畸胎瘤形成測定揭露所有三個胚層的形成。**圖4a*插圖***所示為皮下注射3個月後從人類CLEC衍生的iPS獲得之畸胎瘤。藉由蘇木精與伊紅染色進一步分析畸胎瘤切片。**圖4a**所示為畸胎瘤中類呼吸上皮的存在。**圖4b**所示為代表畸胎瘤內胚層存在腺體結構。於**圖4c**中，箭頭所示為畸胎瘤中存在軟骨。於**圖4d**中，箭頭所示為代表畸胎瘤中胚層存在骨骼。**圖4e**所示為畸胎瘤中存在腎組織。實心箭頭表示腎小球，空心箭頭表示腎小管。

【0034】 於**圖4f**中，箭頭顯所示為代表畸胎瘤外胚層存在神經上皮。使用定向分化方法，CLiPS被誘導分化為特定組織。**圖4g**所示為以α-胎兒蛋白（alpha-fetoprotein，AFP）以及4',6-二脒基-2-苯基吲哚（diamidino-2-phenylindole，DAPI）對CLiPS分化為肝細胞的視覺化。**圖4h**所示為以人類血清白蛋白（human serum albumin，HAS）、細胞角蛋白18（cytokeratin 18，CK18）以及DAPI對CLiPS分化為肝細胞的視覺化。**圖4i**所示為以油紅O對CLiPS分化為肝細胞的視覺化。**圖4j**所示為以α-肌動蛋白（alpha-actinin，αACT）、心肌肌鈣蛋白I（cardiac troponin I，cTnl）、肌球蛋白調節輕鏈2a（myosin regulatory light chain 2a，MLC2a）以及DAPI對CLiPS分化為心肌細胞的視覺化。**圖4k**所示為以底板標記FOXA2、頂板

標記LMX1A以及DAPI對CLiPS分化為多巴胺神經元的視覺化。**圖4l**所示為以神經元特異性第III類β-微管蛋白（TUJI）以及酪胺酸羥化酶（tyrosine Hydroxylase，TH）對CLiPS分化為多巴胺神經元的視覺化。**圖4m**所示為以OLIG2以及DAPI對CLiPS分化為寡突膠質前驅細胞的視覺化。**圖4n**所示為以O4以及DAPI對CLiPS分化為寡突膠質細胞前驅細胞的視覺化。**圖4o**所示為分化第45天的成熟人類CLiPS衍生的多巴胺神經元的電生理學分析。該人類CLiPS衍生的多巴胺神經元藉由注入電流激發一系列動作電位。比例尺：**圖4a**、**圖4c**以及**圖4d**為200 μm；**圖4b**、**圖4e**以及**圖4f**為100 μm；**圖4g**、**圖4h**、**圖4i**、**圖4k**、**圖4l**、**圖4m**為50 μm；**圖4j**、**圖4n**為25 μm。

【0035】 **圖5**所示為人類CLiPS示例性定向分化為各種不同細胞類型，其中，**圖5a**所示為以TH、Tuik以及DAPI對人類CLiPS衍生的神經元的視覺化，**圖5b**所示為以CK18、HAS以及DAPI對人類CLiPS衍生的肝細胞的視覺化，**圖5c**所示為以cTnl、αAct以及DAPI對人類CLiPS衍生的心肌細胞的視覺化，以及**圖5d**所示為收縮的人類CLiPS衍生的心肌細胞的電生理分析，說明細胞產生自發動作電位。

【0036】 **圖6**所示為iPS以及衍生自該些iPS的多巴胺神經前驅細胞上的第I型及第II型主要組織相容性複合體（major histocompatibility complex，MHC）以及T細胞共刺激蛋白表現的示例性流式細胞儀分析。**圖6a**所示為未分化的iPS上免疫相關基因表現的流式細胞儀概況。**圖6b**所示為神經細胞黏附分子（neural cell adhesion molecule，NCAM）陽性群體的流式細胞儀分析。對這些群體進行門控以分析免疫相關蛋白的表現。**圖6c**所示為對分化第25天的多巴胺神經前驅細胞的免疫相關蛋白表現的分析。

【0037】 **圖7**所示為來自人類CLiPS以及人類成人纖維母細胞-iPS（human adult fibroblast-iPS，asF-iPS）的多巴胺神經元前驅細胞（neuronal progenitor cells，NPC）植入NOD-SCID小鼠體內的比較。於第25天，將多巴胺NPCs注射至NOD-SCID小鼠的紋狀體中，以評估細胞在免疫缺陷環境中的植入以及分化潛能。TH免疫反應性多巴胺神經元存在於豐富的人類NCAM陽性移植神經元中。**圖7a**所示為自人類asF-iPS衍生的第25天的多巴胺NPCs的體內植入。**圖7b**所示為自人類CLEC-iPS（EC23 CLiPS）衍生的第25天的多巴胺NPCs的體內植入。**圖7c**所示為自CLMC-iPS（MC23-CLiPS）衍生的第25天的多巴胺NPCs的體內植入。**圖7d**所示為在以自人類CLEC iPS衍生的多巴胺NPCs移植1個月後，在具有免疫能力的C57BL/6NTac小鼠中建立的帕金森氏症（Parkinson's Disease，PD）小鼠模型的移植半球的抗體染色。注射部位大量存在人類NCAM（綠色）以及TH（紅色）雙陽性神經元。**圖7e**所示為源自移植部位的長神經元過程，沿著胼胝體的大鉗投射至大腦的遠端區域。**圖7f**中的箭頭表示人類NCAM以及TH雙陽性神經元，它們大量存在於注射部位，如箭頭所示。**圖7g**所示為與**圖7d**所示同一截面的對側非移植半球。**圖7h**說明在以自成人asF-iPS衍生的NPCs移植的紋狀體中看不到存活細胞，這表示存在免疫排斥反應。**圖7i**表示移植的半球中有大量的小膠質細胞/巨噬細胞聚集。**圖7j**所示為在非移植半球中沒有小膠質細胞/巨噬細胞聚集。**圖7k**所示為**圖7i**的更高放大倍率。可看出位於移植物近端以及內部的小膠質細胞顯示出活化小膠質細胞的更多變形蟲形態特徵。**圖7l**所示為**圖7k**的更高放大倍率，表示CD68的表現，CD68為小膠質細胞的活化標記。比例尺：**圖7a-c**以及**圖7k**為100 μm；**圖7d**、**圖7g**以及**圖7h**為200 μm；**圖7e**、**圖7f**以及**圖7l**為50 μm。

【0038】 **圖8**所示為移植後9個月小鼠PD模型中自人類CLEC（EC23-CLiPS）衍生的多巴胺神經元的存活情況。**圖8a**表示移植半球中存在的HuNu+/hNCAM+/TH+神經元。**圖8b**為**圖8c-f**的疊加圖，所示為**圖8a**中框列區域的更高放大倍率。**圖8c**表示移植半球中存在的hNCAM+神經元。**圖8d**表示移植半球中存在的HuNu+神經元。**圖8e**表示移植半球中存在的TH+神經元。**圖8f**表示移植半球中存在的神經元細胞核。**圖8g**示意性地說明了從藉由將6-羥基多巴胺（6-hydroxydopamine，6-OHDA）注射至C57BL/6NTac小鼠的紋狀體中誘導PD損傷開始的實驗步驟。在NPC移植前一週及前兩週進行移植前旋轉行為測定。**圖8h**所示為在移植了自人類EC23-CLiPS及asF-iPS衍生的多巴胺NPCs以及假對照的小鼠中阿朴嗎啡誘導的旋轉不對稱分析之結果。移植後每兩週進行一次檢測，直至移植後22週。自移植後第20週開始，相較於asF-iPS組，人類EC23-CLiPS組的動物顯示出統計學上顯著的旋轉恢復（$n=5$，$p<0.05$）。假手術組未觀察到恢復。**圖8h**所示為[18F]PE-P2I配體攝取的代表性體內正電子發射斷層掃描（Positron Emission Tomography，PET）影像，以評估移植後6個月紋狀體多巴胺神經元中多巴胺轉運蛋白（dopamine transporter，DAT）功能的恢復。相較於移植有人類asF-iPS NPCs或假對照的小鼠，移植有人類EC23-iPS NPCs的小鼠顯示出DAT活性的恢復。比例尺：**圖8a**為200 μm；**圖8b-f**為100 μm。

【0039】 **圖9**所示為植入小鼠紋狀體多巴胺產生的示例性體內PET影像。PET說明了[18F]PE-P21配體的攝取，以評估在自iPS衍生的NPCs移植後6個月紋狀體多巴胺神經元中多巴胺轉運蛋白（DAT）功能的恢復。相較於移植了自人類成年iPS衍生的NPCs或假移植對照的小鼠，移植了自人類CLEC iPS衍生的NPCs的小鼠顯示出明顯的DAT活性恢復。

【0040】 **圖10**所示為自人類CLiPS衍生的移植物在植入小鼠大腦後6個月以及9個月在體內的維持。移植物對人類抗原NCAM以及TH多巴胺標記染色呈陽性。尚未記錄腫瘤的形成。比例尺：50 μm。

【0041】 **圖11**所示為在具有完全免疫能力的Wistar Hannover大鼠中建立的PD的內側前腦束（Medial Forebrain Bundle，MFB）損傷模型中移植人類EC23-CLiPS多巴胺NPCs的組織學以及功能分析結果。**圖11a**所示為移植後3個月大鼠大腦紋狀體區域中人類EC23-CLiPS神經元的植入，藉由人類細胞質（STEM 121）以及人類核抗原（HuNu）抗體的陽性雙染色證實。染色表示功能恢復。**圖11b**表示突觸蛋白1的免疫反應性與hNCAM+/TH+神經元的共定位，表示移植的自人類CLiPS的衍生細胞可能在移植後3個月與宿主組織整合。**圖11c**所示為大鼠大腦黑質中多巴胺系統的逆行損傷。**圖11d**所示為未損傷的大鼠大腦，藉由酪胺酸羥化酶（TH）免疫染色證實**圖11c**的黑質中多巴胺系統的逆行損傷。**圖11e**所示為在移植自人類CLEC23-iPS衍生的多巴胺NPCs的大鼠中阿朴嗎啡誘導的旋轉不對稱測定的結果。結果顯示，在6個月的研究期間，CLiPS-NPC的移植調節了PD大鼠MFB模型中功能性運動缺陷的恢復。比例尺：**圖11a**以及**圖11b**為100 μm；**圖11c**以及**圖11d**為200 μm。

【0042】 **圖12a**、**b**以及**c**各自所示為藉由使用培養基PTTe-3作為恢復培養基產生的自人類CLEC衍生的誘導性多能幹細胞的示例性集落。

【0043】 **圖13**所示為CLiPS與RPE的區別：來自不同幹細胞的分化培養影像，人類ES細胞（H9）、自皮膚衍生的iPS細胞株（Asf5、AGO、HDFA）、臍帶內膜間質細胞（CLMC23、CLMC30、CLMC44），以及臍帶內膜外胚層細胞（CLEC23）。細胞培養盤上較暗的斑塊對應於有色素的RPE細胞的存在。

【0044】 **圖14**所示為CLMCs始終具有高分化效率：**圖14a**所示為一視覺分級系統，用於根據色素細胞佔據的孔面積百分比來估計RPE分化效率，針對無色素沈澱、<30%、30-60%，或>60%的色素沈澱的RPE分化效率分級分別為0、1、2或3。**圖14b**所示為藉由分化盤的色素細胞區域的視覺分級估計的RPE分化效率。每個條代表一個分化盤的分級，條上的數字表示以不同深淺棕色表示的不同色素沉著程度的孔在盤上的百分比。數字1-3代表生物複製物。**圖14c**所示為藉由流式細胞儀分析以Pmel17評估的不同幹細胞的RPE分化效率；匯集來自3個孔的細胞用於FACS分析。

【0045】 **圖15**所示為CLiPS衍生的RPEs較ES衍生的RPEs具有更多的色素沈澱：**圖15a**所示為分化第30天在相同條件下使用ChemiDoc Touch凝膠影像系統（Bio-Rad實驗室）拍攝的分化盤影像。**圖15b**所示為表現出H9的弱色素沈澱的來自不同幹細胞的RPE的相位對比影像。H9：（人類ES細胞衍生的RPE）、CLMC23、CLMC30、CLMC44、CLEC23（CLiPS衍生的RPE）、AGO、HDFA、Asf5（自皮膚iPS細胞衍生的RPE）。**圖15c**所示為CLiPS衍生的RPEs較ES衍生的RPEs具有更多的色素沈澱。該圖所示為使用Biorad公司的Cmemidoc Touch系統在分化H9的不同點拍攝的分化盤影像分析的色素沈澱暗度：（人類ES細胞衍生的RPE）、CLMC23、CLMC30以及CLEC23（CLiPS衍生的RPE）。**圖15d**所示為色素沈澱相關以及RPE特異性基因在CLiPs中較高：分化第18天以及第35天色素沈澱相關基因的RT-qCPR分析：MITF、PMEL17、酪胺酸酶、TRYP2。

【0046】 **圖16**所示為在分化第18天以及第35天表現RPE特異性基因的CLiPS：RPE特異性RPE65以及MERTK的RT-qCPR分析。

【0047】 **圖17**所示為CLiPS衍生的RPEs是有功能的。**圖17a**所示為由體外產生的RPE形成的緊密連接，類似於天然的RPEs：使用上皮電壓歐姆計EVOM2™在4個月內測量來自不同幹細胞的RPEs中的跨上皮電阻（Trans-epithelial electrical resistance，TEER），其為一種緊密連接完整性的測量。**圖17b**所示為體外產生的RPEs具有高度吞噬能力：來自不同幹細胞的RPEs對FITC標記的光感受器外節（photoreceptor outer segments，POS）的吞噬百分比。

【0048】 **圖18**所示為CLiPS衍生的RPEs，顯示具有與ES衍生的RPEs相似的蛋白質表現。CLiPS-RPEs所示為Mertk的頂端表現、ZO-1的連接表現，以及RPE65的細胞質表現。

【0049】 **圖19**所示為RPE分化的原始方法以及修改：**圖19a**所示為原始方法的示意圖，顯示在不同階段使用的分化培養基及其組成。**圖19b**所示為對分化方法的修改，顯示CHIR99021濃度的逐漸增加以及將FGF抑制劑SU5402替換為PD173074。**圖19c**所示為使用SU5402的已公開的方法或使用PD173074的修改方法所分化的CLMC30盤的照片，顯示相似程度的RPE分化及色素沈澱。DM1-DM5：分化培養基1-5。使用PD173074修改後的RPE分化方法可產生功能性RPEs。針對TEER（**圖19d**）以及FITC標記的POS顆粒的吞噬作用（**圖19e**），對使用SU5405或PD173074的分化方法所衍生的RPEs進行的功能測試。

【0050】 **圖20a**及**b**所示為以不同純化方法所獲得之RPE的產量比較。特別是，**圖20a**以及**b**所示為不同的RPE純化方法的示意圖：純化含有RPE以及非RPE的分化培養物：（i）人工純化：根據非RPE細胞的形態以及色素沈澱的缺乏進行識別，並藉由在解剖顯微鏡下觀察進行刮除以人工去除這些細胞，（ii）TrypLE純化：藉由部分TrypLE處理去除大部分弱附著的非RPE細胞簇，（iii）TrypLE +

人工：藉由部分TrypLE處理去除大部分弱附著的非RPE細胞簇，然後藉由在解剖顯微鏡下觀察以人工去除少數逃脫TrypLE處理的非RPE細胞簇，（iv）TrypLE+散射分選：藉由部分TrypLE處理去除弱附著的非RPE細胞簇，然後進行散射分選，（v）散射分選：根據細胞的相對光散射，將所有細胞從混合分化培養物中分離出來，作為高散射（有色素的RPE細胞）以及低散射（無色素的非RPE細胞）群體。**圖20c**以及**d**所示為原始以及修改後的散射分選方法，以更準確地選擇散射高RPE細胞。**圖20c**所示為在原始方法中為散射高（青色）以及低門控（品紅色）任意選擇的門控。**圖20d**所示為使用藉由部分TryPLE處理解離的弱附著非RPE細胞的修改門控選擇，以設定散射低門控（品紅色）以更準確地選擇散射高門控（青色）。**圖20e**所示為從不同純化方法獲得之RPE的產量。**圖20f**所示為藉由Pmel17流式細胞儀分析評估的不同純化方法的RPE純度。**圖20g**所示為從不同純化方法獲得之RPE的TEER；M：人工純化，T：TrypLE純化，T+M：TrypLE+人工純化，T+Sc：TrypLE+散射分選，Sc：散射分選，T（鬆散）：弱附著的非RPE細胞很容易藉由TrypLE處理分離，Sc low：從散射分選中散射低非RPE細胞。**圖20h**所示為藉由光感受器外節（POS）吞噬測定評估的來自不同純化方法的RPE的吞噬能力。**圖20i**所示為比較不同RPE純化方法的表格。**圖20j**所示為CLMC23以及H9中RPE特異性基因表現的定量PCR比較。qPCR結果顯示RPE特異性基因的相對表現，例如BEST1、RPE65、RLBP1、MERTK、MITF、PMEL17以及TRYP2，以GAPDH進行標準化。**圖20k**所示為CLMC23以及H9中基因表現的比較，表示為CLMC23相對於H9的倍數變化。

【0051】 **圖21**所示為CLiPs-RPE（CLEC23-RPE）具有與天然RPE（AHRPE）相似的生物能量特性。相較於skiniPSC-RPE（ASF5-RPE）以及hESC-RPE（H9-

RPE），CLiPsRPE（CLEC23-RPE）也表現出更高的糖酵解以及氧化磷酸化。**圖21a**所示為，相較於H9-RPE，CLiPs-RPE中的OCR曲線基礎呼吸、ATP產生、最大容量以及備用呼吸容量分別高出38%、40%、35%以及36%。**圖21b**所示為，相較於H9-RPE，CLiPs-RPE中的ECAR曲線糖酵解、糖酵解能力以及糖酵解儲備分別高出25%、37%以及50%。**圖21c-f**所示為CLiPs-RPE顯現出對氧化低密度脂蛋白（oxidized low-density lipoprotein，oxLDL）的抵抗力增加，如暴露於oxLDL後CLEC23-RPE的最大容量（虛線曲線）沒有降低（**圖21c**），對比ASF5-RPE減少27%（**圖21d**）以及H9-RPE減少43%（**圖21e**）所證實。（CLiPs-RPE細胞對氧化壓力的反應類似於在天然RPE（AHRPE - **圖21f**）中觀察到的反應，這使得CLiPs-RPE細胞較其他分化的RPE在功能上更接近初始RPE）。**圖21g-j**所示為CLiPs-RPE顯現出對過氧化氫（H_2O_2）的抵抗力增加，如暴露於H_2O_2後CLEC23-RPE的最大容量沒有降低（虛線曲線）（**圖21g**），對比ASF5-RPE減少27%（**圖21h**）以及H9-RPE減少99%（**圖21i**）所證實。CLiPs-RPE細胞對氧化壓力的反應類似於在天然RPE（AHRPE - **圖21f與j**）中觀察到的反應，這使得CLiPs-RPE細胞較其他分化的RPE在功能上更接近初始RPE。

【0052】 **圖22**所示為所有幹細胞衍生的視網膜色素上皮（SC-RPE）細胞株都沒有免疫系統清除。**圖22a**以及**b**所示為在指定時間點在人源化以及NOD-SCID IL2Rγ-/-（免疫缺陷）小鼠中注射的嵌入基質膠栓中的表現螢光素酶的SC-RPE的體內生物發光測量（總輻射）。**圖22c**所示為顯示在2個月的終點時來自植入人源化小鼠的基質膠栓的RPE65、Ki67以及Hoechst染色的所有SC-RPE細胞株的代表性影像。比例尺，50 μm。

【0053】 **圖23**所示為CLEC23-RPE組參與誘導細胞免疫反應的促進發炎細胞激素含量降低。**圖23a**以及**b**所示為分析終點時的血清細胞激素（IFN-γ以及IL-18）。**圖23c**所示為代表免疫細胞浸潤的RPE-基質膠栓的OTX2、人類CD45（HCD45)以及Hoechst染色的代表性影像。**圖23d**以及**e**所示為根據在RPE-基質膠栓中hCD45陽性細胞的細胞免疫反應分級（0至3）。比例尺，50 μm。

【0054】 **圖24**所示為CLEC23-RPE可能抑制CD8 T細胞活化。**圖24a**以及**b**所示為分析終點時的血清細胞激素（IL-23以及IL-17A）。**圖24c**所示為在以流式細胞儀分析後計算的T細胞（CD3）與B細胞（CD19）的比例。**圖24d**所示為CD3陽性細胞進一步門控為輔助T細胞（CD4）以及細胞毒性T細胞（CD8）以分析T細胞的分化。**圖24e**以及**f**所示為根據特定表面標記將CD4陽性細胞以及CD8陽性細胞分為四組不同的T細胞活化狀態。

【實施方式】

【0055】 本發明尤其涉及在適合幹細胞重新編程的條件下從臍帶羊膜幹細胞產生誘導性多能幹細胞之方法，進而產生誘導性多能幹細胞（iPS）。

【0056】 於本發明中，臍帶羊膜的間質幹細胞以及上皮幹細胞（在本文中也被統稱為臍帶內膜幹細胞（CLSC））用於產生iPS（在本文中也被稱為臍帶內膜衍生的誘導性多能幹細胞或「CLiPS」）。令人驚訝地發現，本發明之臍帶內膜衍生的誘導性多能幹細胞是穩健且同質的幹細胞，能夠分化為不同譜系的功能性目標細胞（參見實施例3以及4）。例如，臍帶內膜衍生的誘導性多能幹細胞具有分化為多種細胞類型的能力，並且可分化為各種細胞類型，例如代表內胚層組織的肝細胞（參見實施例8）、代表中胚層組織的心肌細胞（參見實施例9），

以及代表外胚層組織的多巴胺神經元（參見實施例7）以及寡突膠質細胞（參見實施例10）。更令人驚訝且重要的發現是，例如，人類CLiPS衍生的多巴胺神經元能夠在不同物種中進行功能移植，且在沒有免疫抑制的小鼠帕金森氏症（PD）模型中存活長達9個月，在沒有免疫抑制的大鼠PD模型中存活長達6個月（參見實施例12以及13）。因此，總而言之，本案發明人已產生了一種低免疫原性細胞來源，其能夠在具有完全免疫能力的宿主中移植、整合以及調節治療恢復。本發明之臍帶內膜衍生的誘導性多能幹細胞可潛在地作為人類同種異體細胞移植的通用細胞來源，而無需免疫抑制，這使得這些細胞成為此類以細胞為基礎的療法的理想候選者。作為進一步的優點，在此發現本發明之臍帶內膜衍生的誘導性多能幹細胞可藉由無整合以及無飼養層之方法產生，進而允許在當前良好生產規範（current good manufacturing practice，cGMP）條件下進行iPS生產。由於最近建立用於大量生產臍帶羊膜間質幹細胞的GMP方法（參見國際申請公開第WO 2018/067071號或美國專利申請公開第US2018127721號），本發明提供了一個理想的平台來生產iPS以用於人類或動物的後續細胞療法。

【0057】 總之，自非常年輕的組織衍生的CLiPS不太可能攜帶遺傳、表觀遺傳以及粒線體DNA的突變，因為它們源自年輕組織。由於這些優勢，CLiPS為一種潛在的優質幹細胞來源，可用來產生用於再生醫學的分化細胞。因此，CLiPS優於源自皮膚或血液的iPS細胞，後者需要侵入性的組織收集程序。而且CLiPS也不存在與ES細胞相關的倫理問題。因此，CLiPS為再生醫學幹細胞的較佳來源。

【0058】 本案發明人發現，藉由本發明之方法，此類CLiPS可穩健地分化為視網膜色素上皮（RPE）細胞，亦稱為RPE。針對本發明，本案發明人比較了不同的幹細胞來源：人類ES細胞（ES）、源自皮膚的iPS細胞（skin-iPS）以及臍

帶內膜細胞（CLiPS），以了解它們在體外產生RPE的能力。CLiPS可為間質（CLMC）或外胚層（CLEC）來源。然後本案發明人比較了CLiPS與ES-iPS以及皮膚-iPS細胞的RPE分化效率。相較於皮膚-iPS，透過視覺分級以及流式細胞儀分析評估顯示，CLiPS持續地較皮膚-iPS細胞的RPE分化效率高。透過視覺以及影像分析比較分化培養物的色素沈澱還顯示，CLiPS衍生的RPEs比ES衍生的RPEs具有更高的色素沈澱。由CLiPS產生的RPEs在體外成熟後也顯現出RPE的功能特徵，表示它們是RPE細胞的優質來源。此外，本案發明人藉由比較自不同幹細胞衍生的RPE的生物能量學發現，CLiPS-RPE比自ES衍生的RPE具有更高的糖酵解以及粒線體呼吸作用。本發明用於將源自臍帶羊膜幹細胞的誘導性多能幹細胞（iPS）（CLiPS或CLSC）分化為RPE細胞之方法已如本文所述進行了特別修飾，其實現最大RPE產量。

【0059】現在首先描述產生本發明之iPS的方法，該方法可包含表現編碼蛋白質*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、*LIN28*以及*L-MYC*以及*p53-shRNA*的外源核酸。編碼*OCT3/4*的核酸（SEQ ID NO: 1）（有時亦稱為*POU5FL*、*OCT3*或*OCT4*）編碼八聚體結合轉錄因子4。OCT3/4（SEQ ID NO: 2）與SOX2形成異二聚體以調節細胞中的多能性因子。*SOX2*（SEQ ID NO: 3）（有時亦稱為SEY）編碼性別決定區Y-box 2轉錄因子（SEQ ID NO: 4）。當與OCT3/4結合時，SOX2與非回文基因組序列結合，進而活化細胞中多能因子的轉錄。*KLF4*（SEQ ID NO: 5）（有時亦稱為GKLF）編碼類Krueppel因子4。KLF4（SEQ ID NO: 6）為一種鋅指轉錄因子，其功能為腫瘤抑制因子，係藉由調節腫瘤抑制因子p53來控制細胞週期從G1至G2的轉變。*L-MYC*（SEQ ID NO: 7）編碼一轉錄因子（序列號：8）活化增殖基因的表現。*LIN28*（SEQ ID NO: 9）編碼RNA結合蛋白Lin-28同源物A（SEQ ID

NO: 10），其調節幹細胞的自我更新。*p53-shRNA*（SEQ ID NO: 11）編碼指向p53的小髮夾RNA，p53為一種當在細胞中累積時可透過停止細胞週期來調節細胞週期的蛋白質。為了避免p53停止細胞週期，*p53-shRNA*可能會使p53轉錄後的表現沈默。為了產生CLiPS，可將編碼*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、*LIN28*、*L-MYC*以及*p53-shRNA*的外源核酸轉移至CLSC中進行表現。或者，可將蛋白質OCT3/4、SOX2、KLF4、LIN28、L-MYC以及p53-shRNA直接轉移至CLSC中。

【0060】 如上所述，本發明之誘導性多能幹細胞群可藉由重新編程該臍帶羊膜幹細胞獲得。臍帶幹細胞可為臍帶羊膜的（分離的）間質幹細胞，亦稱為臍帶內膜間質幹細胞（CLMC），或臍帶細胞羊膜的（分離的）上皮幹細胞，亦稱為臍帶內膜上皮幹細胞（CLEC）。用於產生本發明之iPS的CLEC及CLMC可源自於任何哺乳動物物種，例如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、山羊、馬、狗、貓、綿羊、猴子或人類，於一具體實施例中，較佳為人類來源的幹細胞。因此，本發明之iPS也可源自於任何哺乳動物物種，例如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、山羊、馬、狗、貓、綿羊、猴子或人類，於一具體實施例中，較佳為人類來源的幹細胞。於一較佳具體實施例中，以CLEC產生本發明之iPS。

【0061】 如果以臍帶羊膜上皮幹細胞作為起始材料，這些上皮幹細胞可以，例如，如美國專利申請公開第2006/0078993號（其後獲准為美國專利第9,085,755號以及第9,737,568號）或其相應的國際專利申請公開第WO2006/019357號中所述獲得。若以臍帶羊膜間質幹細胞作為起始材料，這些細胞亦可依照美國專利申請公開第2006/0078993號（其後獲准為美國專利第9,085,755號以及第9,737,568號）或其相應的國際專利申請公開第WO2006/019357號中所述獲得。

【0062】亦可使用已公開的美國申請公開第2018/127721號或相應的國際申請公開第WO 2018/067071號中描述的間質幹細胞群作為起始材料。國際申請公開第WO 2018/067071號的間質幹細胞群的優點是，該細胞群的99%或更多的幹細胞對三種間質幹細胞標記CD73、CD90以及CD105呈陽性，同時不表現CD34、CD45以及HLA-DR，表示國際申請公開第WO 2018/067071號的間質幹細胞群中99%甚至更多的細胞表現幹細胞標記CD73、CD90以及CD105，而不表現標記CD34、CD45以及HLA-DR。這種極其同質且定義明確的細胞群為臨床試驗以及以細胞為基礎的療法的理想候選者，因為它們完全符合用於細胞治療的人類間質幹細胞普遍接受的標準，例如Dominici等人定義之「Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement」，*Cytotherapy* (2006年) 第8卷第4期，第315-317頁；Sensebe等人，「Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a, review」，*Stem Cell Research & Therapy*，2013年，4:66；Vonk等人，*Stem Cell Research & Therapy* (2015年) 6:94，或Kundrotas，Acta Medica Lituanica，2012年第19卷第2期，第75-79頁。因此，國際申請公開第WO 2018/067071號的間質幹細胞群為在GMP條件下生產本發明之CLiPS的理想起始材料。

【0063】於這種情況下注意到，以轉基因轉染的CLMCs將保持其幹性及幹細胞特徵，但可能顯現出表現間質幹細胞標記（如CD73、CD90以及CD105）的細胞的百分比下降，同時也可能顯現出表現陰性標記（如CD34、CD45或HLA-DR）的細胞的百分比增加。參見Yap等人，*Malaysian J Pathol*，2009年；31(2)：第113-120頁；亦參照Madeira等人，Journal of Biomedicine and Biotechnology，第

2010卷，文章編號735349，12頁。有鑑於此，藉由重新編程本文所述之並從臍帶羊膜分離的CLMC產生本發明之CLiPS可能為幹細胞群，其中至少約81%或更多、約82%或更多、至少83%或更多、至少84%或更多、至少約85%或更多、約86%或更多、約87%或更多、約88%或更多、約89%或更多、約90%或更多、約91%或更多、約92%或更多、約93%或更多、約94%或更多、約95%或更多、約96%或更多、約97%或更多、約98%或更多，約99%或更多的CLiPS群的細胞可表現以下標記中的每一個：CD73、CD90以及CD105。此外，本發明之這種自CLMC衍生的誘導性多能幹細胞群體可為其中至少約81%或更多、約82%或更多、至少83%或更多、至少84%或更多、至少約85%或更多、約86%或更多、約87%或更多、約88%或更多、約89%或更多、約90%或更多、約91%或更多、約92%或更多、約93%或更多、約94%或更多、約95%或更多、約96%或更多、約97%或更多、約98%或更多、約99%或更多的細胞可能缺乏CD34、CD45以及HLA-DR中每一個的表現。此類CLMC衍生的本發明之誘導性多能幹細胞群體的一個較佳實施例可為其中至少約90%或更多、約91%或更多、約92%或更多、約93%或更多、約94%或更多、約95%或更多、約96%或更多、約97%或更多、約98%或更多、約99%或更多的CLMC群的細胞表現CD73、CD90以及CD105中的每一個，且不表現CD34、CD45以及HLA-DR中的每一個。

【0064】 再次轉向本發明之誘導性多能幹細胞（群體）的產生，再次需注意的是，這種誘導性多能幹細胞可藉由任何合適的方法獲得，該方法可重新編程臍帶羊膜的幹細胞（群體）為這樣的誘導性多能幹細胞（種群）。雖然產生這種誘導性多能幹細胞的一種方法包含在適合重新編程該幹細胞的條件下，在一臍帶羊膜幹細胞中表現編碼蛋白質*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、*LIN28*以及*L-MYC*以及

*p53-shRNA*的外源核酸，進而產生該誘導性多能幹細胞，但本發明決不限於藉由該方法獲得之CLiPS。反之，CLiPS可藉由任何合適之方法獲得，例如Cieslar-Probuda等人的回顧「Transdifferentiation and reprogramming: Overview of the processes, their similarities and differences」BBA - *Molecular Cell Research*，第1864卷第7期，2017年7月，第1359-1369頁中所描述。例如，該重新編程於本發明中也亦可藉由使用小分子以化學方式進行或藉由在細胞內表現編碼重新編程因子的外源核酸以生物學方式進行。或者，編碼蛋白質OCT3/4、SOX2、KLF4、LIN28、L-MYC以及p53-shRNA的外源核酸可以任何適合表現的核酸來提供。例如，該核酸可為去氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid，DNA）、包含信使RNA（messenger RNA，mRNA）以及微RNA（microRNA，miRNA）的核糖核酸（ribonucleic acid，RNA）。外源核酸可以原樣轉移或可以將該外源核酸併入一種或多種適合轉移至細胞中的載體中。於此情況下，可使用任何適合轉移至CLSC中的載體。這種載體的說明性實例可為質體。於本發明中，該外源核酸可由一種、兩種、三種或四種適合轉移至幹細胞中的載體來提供。於一示例性實例中，三個載體可提供用於將CLSC重新編程為CLiPS的外源核酸，其中該載體可為pCXLE-hOCT3/4-shp53-F（Addgene質體#27077；SEQ ID NO: 12）、pCXLE-hSK（Addgene質體#27078，SEQ ID NO: 13）以及pCXLE-hUL（Addgene質體#27080；SEQ ID NO: 14）。

【0065】根據上文，可使用適合於將外源核酸或蛋白質轉移至CSLC中的任何方法。於一實施例中，可使用一病毒載體將該外源核酸轉移至CSLC中。這種病毒載體的實例可為反轉錄病毒、慢病毒、誘導型慢病毒、仙台病毒或腺病毒。

或者，可進行轉染以將該外源核酸轉移至CSLC中。於本發明中，轉染可包含電穿孔、顯微注射、脂質體以及非脂質體調節的轉染以及聲轉殖。

【0066】 於一較佳實施例中，CLSC可進行電穿孔，其中可根據所使用的CLSC的類型來調整電參數，因為CLMC可能需要與CLEC不同的電穿孔條件。電參數可包含施加到幹細胞的電脈衝的數量、施加的電脈衝的持續時間以及施加的電脈衝的電壓。可調節每個電參數以進一步最佳化本發明之電穿孔。當這樣做時，每個電參數可獨立地或與一個或多個其他電參數組合地調整（參見實施例1）。於本發明中，可應用適合能將外源核酸轉移至CLSC中的任何參數設定。於本發明之一實施例中，CLMC可進行電穿孔。於此情況下，電穿孔可以1個電脈衝進行，該電脈衝可具有約15毫秒（ms）至約25 ms的持續時間以及約1550V至約1650V的電壓。因此，於一實施例中，CLMC可以具有約20 ms持續時間以及約1600V電壓的1個脈衝進行電穿孔。此外，本文發現電穿孔產生可用量/自CLMC衍生的CLiPS的數量取決於轉染的每個載體（質體）DNA與用於轉染的CLMC數量的比例。該比例在本文中表示為用於進行電穿孔的CLMC數量（在$1x10^6$個細胞中）的每個載體（質體）DNA的量（以μg為單位）。於示例性實施例中，每個載體的載體（質體）DNA的量與細胞數量的比例可在1.5 μg DNA比約$1x10^6$個CLMC至約2.5 μg DNA比約$1x10^6$個CLMC的範圍內。因此，該比例可為約2.5 μg DNA比約$1x10^6$個CLMC、約2.25 μg DNA比約$1x10^6$個CLMC、約1.8 μg DNA比約$1x10^6$個CLMC、約1.7 μg DNA比約$11x10^6$個CLMC、約1.67μg DNA比約$1x10^6$個CLMC、約1.6 μg DNA比約$1x10^6$個CLMC，或約1.5 μg DNA比約$1x10^6$個CLMC（參見表1，顯示使用每個質體的載體（質體）DNA的量比該細胞數為約1.67 μg DNA比約$1x10^6$個CLMC的比例產生有效轉化率）。因此，在產生自CLMC衍生的

CLiPS的一具體實施例中，較佳在CLMC的電穿孔中使用相同量的每種載體。也可對CLEC進行電穿孔以產生本發明之CLiPS。在自CLEC衍生的CLiPS的情況下，可使用2個電脈衝進行電穿孔，每個電脈衝可具有約25 ms至約35 ms的持續時間以及約1300 V至約1400 V的電壓。因此，於一實施例中，可以具有約30 ms持續時間以及約1350V電壓的2個脈衝對CLEC進行電穿孔。針對CLEC，還發現對於自CLEC衍生的CLiPS，電穿孔產生可用量/自CLEC衍生的CLiPS的數量取決於轉染的每個載體（質體）DNA與用於轉染的CLEC數量的比例。此外，該比例在本文中表示為用於進行轉染的CLEC數量（在$1x10^6$個細胞中）的每個載體（質體）DNA的量（以μg為單位）。於示例性實施例中，每個載體的載體（質體）DNA的量與細胞數量的比例可在1.5 μg DNA比約$1x10^6$個CLEC至約2.5 μg DNA比約$1x10^6$個CLEC的範圍內。因此，該比例可為約1.5 μg DNA比約$1x10^6$個CLEC、約1.6 μg DNA比約$1x10^6$個CLEC、約1.67 μg DNA比約$1x10^6$個CLEC、約1.7 μg DNA比約$11x10^6$個CLEC、約1.8μg DNA比約$1x10^6$個CLEC、約1.9 μg DNA比約$1x10^6$個CLEC、約2.0 μg DNA比約$1x10^6$個CLEC，或約2.5 μg DNA比約$1x10^6$個CLEC（參見表1，顯示使用每個質體的載體（質體）DNA的量比該細胞數為約1.67 μg DNA比約$1x10^6$個CLEC的比例產生有效轉化率）。因此，在產生自CLEC衍生的CLiPS的一具體實施例中，較佳在CLEC的電穿孔中使用相同量的每種載體。於本發明之方法中，CLEC以及CLMC的電穿孔可在均勻的電場中進行。因此，可最小化電穿孔的有害後果如pH變化、離子形成或發熱。可藉由最大化電極之間的間隙同時最小化每個電極的表面積來產生均勻電場。提供這種均勻電場的系統的實例是為Thermo Fisher Scientific公司的Neon™轉染系統。合適的商業轉染系統的另一實例為Gene Pulser MXcell電穿孔系統，可獲自Bio-Rad公司。

最後一點，可使用任何合適的電穿孔緩衝液進行轉染。如果使用商業轉染系統，如Neon™轉染系統，通常使用轉染系統製造商提供的相應電穿孔緩衝液進行電穿孔。

【0067】轉染後，可將幹細胞轉移至適合細胞恢復及細胞培養的培養基中。於本發明中，可使用適合細胞恢復及/或增殖的任何細胞培養基。這種合適的細胞培養基的說明性實例可為用於培養（繁殖）人類誘導性多能幹細胞的常用培養基，例如mTeSR1、StemMACS™ iPS-Brew XF、TeSR™-E8、mTeSR™Plus、TeSR™2、mTeSR™1。也可將任何能夠支持CLEC或CLMC增殖（無分化）/健康生長的培養基用於細胞恢復培養。用於這種CLEC培養的合適培養基的實例在例如美國專利申請公開第2006/0078993號中有所描述，包含EpiLife培養基、培養基171、MEGM-乳腺上皮細胞培養基或此類培養基的混合物，例如培養基PTT-e3（已在本文中用於產生自CLEC衍生的CLiPS，下文將對此進行詳細描述）。用於這種CLMC培養的合適培養基的實例描述於例如美國專利申請公開第2006/0078993號以及第2018/127721號以及國際專利申請公開第WO2007/046775號中，包含DMEM/10% FBS、DMEM:F12培養基（為DMEM以及Ham氏F-12培養基的1:1混合物）或PPT-6（包含DMEM、F12陪養基、陪養基171以及FBS的培養基，參見美國申請公開第2018/127721號）或PTT4（其中後者已在本文的實施例章節中用於產生源自CLMC的CLiPS）。對於這種細胞恢復培養，也可使用這些培養基的混合物（例如mTeSR1與培養基PTTe-3或培養基PTT-4的混合物）。適用於如本文所述之轉染的CLEC或CLMC的細胞恢復的培養基可進一步包含可刺激細胞生長以及增殖的生長因子。可將生長因子原樣添加至細胞培養基中。此

外，恢復培養基可含有血清，例如胎牛血清（FBS）。因此，適用於轉染後細胞恢復的培養基可為無血清或含血清培養基。

【0068】 根據以上公開內容，適用於細胞恢復的培養基組合物可能不同，這取決於所使用的CLSC。

【0069】 例如，適合轉染的CLMC恢復的培養基可能由（化學）成分確定的培養基以及FBS所組成。因此，適合轉染的CLMC恢復的培養基可分別由約80%（v/v）、約85%（v/v）、約90%（v/v）或約95%（v/v）的含有化學成分確定的培養基以及約20%（v/v）、約15%（v/v）、約10%（v/v）或約5%（v/v）的FBS所組成。於一較佳實施例中，轉染後CLMC在細胞恢復的培養基PTT-4中培養，其中培養基PTT-4，如國際專利申請公開第WO2007/046775號中所述，由90%（v/v）CMRL-1066以及10%（v/v）胎牛血清所組成。適合轉染的CLEC恢復的培養基可為無血清培養基，其中該培養基可含有細胞激素以及生長因子。

【0070】 適合轉染的CLEC恢復的培養基也可為成分確定的培養基。這樣的恢復培養基可包含乳腺上皮基礎培養基MCDB 170、EpiLife培養基、DMEM（Dulbecco氏改良Eagle氏培養基）、F12（Ham氏F12培養基）以及FBS（胎牛血清）。

【0071】 於說明性實施例中，這樣的培養基包含終濃度為約10%至約30%（v/v）的乳腺上皮基礎培養基MCDB 170、終濃度為約20%至約40%（v/v）的EpiLife培養基，終濃度為約5至約15%（v/v）的F12、終濃度為約30至約45%（v/v）的DMEM，以及終濃度為約0.1至2%（v/v）的FBS。一種此類培養基可包含終濃度為約15%至約25%（v/v）的乳腺上皮基礎培養基MCDB 170、終濃度為約25%至約35%（v/v）的EpiLife培養基、終濃度為約7.5至約13%（v/v）的F12、終濃度

為約35至約40%（v/v）的DMEM，終濃度為約0.5至1.5%（v/v）的FBS。另一種此類培養基可包含終濃度為約20%（v/v）的乳腺上皮基礎培養基MCDB 170、終濃度為約30%（v/v）的EpiLife培養基、終濃度為約12.5（v/v）的F12、終濃度約為37.5%（v/v）的DMEM、終濃度約為1.0%（v/v）的FBS。本文所用的「%（v/v）」值係指單個組成分的體積相對於培養基的最終體積。這表示，例如若DMEM以約35至約40%（v/v）的終濃度存在於該培養基中，則1公升的培養基含有約350 ml至400 ml的DMEM。於一具體實施例中，適合轉染的CLEC細胞恢復的培養基藉由混合以下成分以獲得終體積為1000 ml的培養基：

- 200 mL乳腺上皮基礎培養基MCDB 170，
- 300 mL EpiLife培養基，
- 250 mLDMEM，
- 250 mLDMEM/F12，以及
- 1% 胎牛血清。

【0072】 培養基中適用於轉染的CLEC恢復的生長因子可為類胰島素生長因子（insulin like growth factor，iGF），例如IGF-1或IGF-2，表皮生長因子（EFG），例如HB-EGF或EPR，轉化生長因子（TGF）例如TGF-α或TGF-β 1、活化素、骨形態發生蛋白（bone morphogenic protein，BMP）、血小板衍生生長因子（platelet derived growth factor，PDGF）、轉鐵蛋白以及胰島素。於一實施例中，轉染後的CLEC在細胞恢復的培養基PTTe-3中培養，其中PTTe-3培養基含有人類表皮生長因子（EFG）、一種或多種轉化生長因子如TGF-α及/或TGF-β（TGF-β 1、TGF-β 2及/或TGF-β 3）或胰島素。

【0073】根據上文，適合轉染的CLEC恢復的培養基可包含終濃度為約1至約15 ng/ml的人類表皮生長因子（EGF）。該恢復培養基還可包含終濃度為約1至約7.5 μg/ml的胰島素。該恢復培養基還可包含至少一種以下補充劑：腺嘌呤、氫羥腎上腺皮質素以及3,3',5-三碘-L-甲狀腺原胺酸素鈉鹽（T3）。於一具體實施例中，該培養基包含腺嘌呤、氫羥腎上腺皮質素以及3,3',5-三碘-L-甲狀腺原胺酸素鈉鹽（T3）中的所有三種。於此情況下，該培養基可包含終濃度為約0.05至約0.1 mM的腺嘌呤、終濃度為約0.1至0.5 μM的氫羥腎上腺皮質素，以及終濃度為約0.1至約5 ng/ml的3,3',5-三碘-L-甲狀腺原胺酸素鈉鹽（T3）。該恢復培養基可包含一種或多種轉化生長因子（TGF），例如轉化生長因子β1（TGF-β1）及/或轉化生長因子α（TGF-α）。在這樣的培養基中，TGF-β1的終濃度可為約0.1至約5 ng/ml且TGF-α的終濃度可為約1.0至約10 ng/ml。此外，CLEC的恢復培養基可包含來自霍亂弧菌的霍亂毒素（其可商購而得，例如，來自Sigma Aldrich公司，產品型號為C8052）。若使用來自霍亂弧菌的霍亂毒素，其終濃度可為約1 x 10^{-11}M至約1 x 10^{-10}M。

【0074】「DMEM」係指1969年開發的Dulbecco氏改良Eagle氏培養基，為Eagle氏基礎培養基（basal medium eagle，BME）的改良版（參見圖1，所示為可從Lonza公司獲得之DMEM資料表）。最初的DMEM配方含有1000 mg/L的葡萄糖，首次被報導用於培養小鼠胚胎細胞。自那時起，DMEM 已成為細胞培養的標準培養基，可從各種來源購買，例如Thermo Fisher Scientific公司（產品型號11965-084）、Sigma Aldrich公司（產品型號D5546）或Lonza公司，僅舉幾家供應商為例。因此，任何市售的DMEM均可用於本發明。在較佳具體實施例中，本文使用的DMEM是從Lonza公司獲得之產品型號為12-604F的DMEM培養基。該

培養基為添加了4.5 g/L葡萄糖以及L-麩醯胺酸的DMEM。於另一較佳具體實施例中，本文使用的DMEM為Sigma Aldrich公司產品型號D5546的DMEM培養基，其包含1000 mg/L葡萄糖以及碳酸氫鈉，但不含L-麩醯胺酸。

【0075】「F12」培養基為指Ham氏F12培養基。該培養基也是一種標準細胞培養基，為一種營養混合物，最初設計用於在與血清、激素以及轉鐵蛋白結合使用時培養多種哺乳動物以及雜交瘤細胞。任何可商購的Ham氏F12培養基皆可用於本發明（例如，來自Thermo Fisher Scientific公司（產品型號11765-054）、Sigma Aldrich公司（產品型號N4888）或Lonza公司，僅舉幾家供應商為例）。於較佳具體實施例中，使用來自Lonza公司的Ham氏F12培養基。「DMEM/F12」或「DMEM:F12」係指DMEM與Ham氏F12培養基的1:1混合物。此外，DMEM/F12（1:1）培養基為一種廣泛使用的基礎培養基，用於支持許多不同哺乳動物細胞的生長，可從各種供應商處購買，例如Thermo Fisher Scientific公司（產品型號11330057）、Sigma Aldrich公司（產品型號D6421）或或Lonza公司。任何市售的DMEM:F12培養基均可用於本發明。於較佳具體實施例中，本文使用的DMEM:F12培養基為從Lonza公司獲得之產品型號為12-719F的DMEM/F12（1:1）培養基（其為含有L-麩醯胺酸、15 mM HEPES以及3.151 g/L葡萄糖的DMEM:F12）。

【0076】「M171」係指培養基171，其已被開發為用於培養正常人乳腺上皮細胞生長的基礎培養基。這種基礎培養基也被廣泛使用並可從例如Thermo Fisher Scientific公司或Life Technologies公司（產品型號M171500）等供應商處購得。任何市售的M171培養基均可用於本發明。於較佳具體實施例中，本文使用

的M171培養基為可從Life Technologies公司獲得之產品型號為M171500的M171培養基。

【0077】「乳腺上皮基礎培養基MCDB 170」係指用於乳腺上皮細胞生長的基礎營養培養基，可以粉末形式購得，例如，來自美國麻州塞勒姆市的United States Biological公司，產品型號為M2162，或來自尼德蘭赫伊森市的Bio-Connect B.V.公司，產品型號為MBS652676_10l。

【0078】EpiLife培養基為指不含氯化鈣的HEPES以及碳酸氫鹽緩衝液體培養基，通常用於人類表皮角質形成細胞以及人類角膜上皮細胞的長期無血清培養，設計用於大氣中含有5%二氧化碳以及95%空氣的培養箱。可從 Thermo Fisher Scientific公司獲得，產品型號為MEPICF500，或從Sigma Aldrich公司獲得，產品編號為E 0151。

【0079】「CMRL培養基」係指最初由Connaught Medical Research Laboratories公司開發用於在無血清條件下培養Earle'L'細胞的培養基。已知CMRL培養基在補充馬或小牛血清時也特別適用於選殖猴腎細胞以及其他哺乳動物細胞株的生長。CMRL培養基可商購，例如，來自Thermo Fisher Scientific公司（產品型號11530037）。

【0080】「FBS」係指胎牛血清（亦稱為「fetal calf serum」），即血液自然凝固後殘留的血液部分，然後離心以去除任何殘留的紅血球。胎牛血清為真核細胞體外細胞培養中使用最廣泛的血清補充劑，因為它具有非常低的抗體含量並含有較多的生長因子，可在許多不同的細胞培養應用中實現多功能性。FBS最好由國際血清工業協會（International Serum Industry Association，ISIA）的成員獲得，該協會透過適當的來源可追溯性、標籤真實性以及適當的標準化及監督以

著重血清以及動物衍生產品的安全性及安全使用。ISIA成員的FBS供應商包含Abattoir Basics公司、Animal Technologies公司、Biomin Biotechnologia LTDA公司、GE Healthcare公司、Thermo Fisher Scientific公司旗下的Gibco公司以及Life Science Production公司，僅舉幾家為例。於目前較佳具體實施例中，FBS是從GE Healthcare公司獲得，產品型號為A15-151。

【0081】 適用於細胞恢復的培養基還可包含可抑制發炎反應及/或也可在轉染後增強細胞存活及增殖的化合物。這種化合物的說明性實例可為糖皮質激素。糖皮質激素為類固醇激素，能夠上調細胞核中抗發炎蛋白的表現並抑制胞質溶膠中促進發炎蛋白的表現。本文使用之糖皮質激素可為潑尼松龍、甲基潑尼松龍、地塞米松、倍他米松、皮質酮或氫羥腎上腺皮質素，僅舉出合適的糖皮質激素的幾個說明性實例。也可併用兩種或多種這樣的糖皮質激素，例如皮質酮與氫羥腎上腺皮質素的混合物。糖皮質激素可以任何合適的濃度使用，例如，以約0.1 μM至約2.5 μM或至約5 μM的濃度。於一說明性實例中，適合轉染的CLSC恢復的培養基中的糖皮質激素可為濃度約0.1 μM至約2.5 μM的氫羥腎上腺皮質素。於一實施例中，適合轉染的CLSC恢復的培養基中的氫羥腎上腺皮質素濃度為約0.5 μM至約2 μM。於一這樣的說明性實施例中，該氫羥腎上腺皮質素濃度為約1 μM。

【0082】 轉染的CLSC的恢復可在細胞培養裝置例如一細胞培養容器中進行。該細胞培養容器可為但，不限於，培養瓶、培養皿、滾瓶以及多層盤。此外，該細胞培養容器可被塗覆以提供一塗覆層，其可藉由向細胞提供代謝物來促進細胞生長。該細胞培養容器的塗層可為血清衍生的或無血清的。血清衍生塗層的一個實例可為帶有來自基底類膜基質的膠狀蛋白質的塗層，例如基質膠。該細胞培養容器的無血清塗層的特徵為以不含動物及異種物質，因此能在cGMP條件下

進行細胞培養。該細胞培養容器的無血清塗層的實例可為具有重組蛋白或其部分的塗層，例如具有細胞外基質蛋白的塗層，例如膠原蛋白、纖連蛋白、彈性蛋白、層連結蛋白，包含例如，層連結蛋白511 E8片段，或層連結蛋白521，玻連蛋白，例如，以可商購的citronectin XF™、CELLstart或Synthemax™玻連蛋白基質的形式。於本發明之一實施例中，轉染的CLEC可較佳在具有血清衍生塗層的細胞培養容器中培養，而CLMC可較佳在具有無血清塗層的細胞培養容器中培養。

【0083】 適用於轉染的CLSC恢復的培養基可在一段合適的時間後更換為另一種細胞培養基。合適的時間段可為例如轉染後約1、約2或約3天。因此，於一實施例中，培養基更換可在轉染後約2天進行。用於培養基更換的另一種細胞培養基也可為不同細胞培養基的混合物。於本發明中，可使用適合於產生iPS的任何細胞培養基或細胞培養基混合物。此外，合適的細胞培養基或細胞培養基混合物可包含可抑制發炎反應並增強細胞存活的化合物。於本發明中，轉染後適用於細胞恢復的培養基可在一段合適的時間後更換為兩種不同細胞培養基的混合物，以確保當細胞在進行體細胞重新編程時自天然狀態轉變為更具多潛能性的狀態時，向細胞提供適當的營養供應以及適當的生長因子混合物。因此，本發明之細胞培養基混合物可由適用於細胞恢復的培養基以及一第二細胞培養基所組成，其可含有氫羥腎上腺皮質素。於一較佳實施例中，兩種不同的細胞培養基以約1:1（v/v）的比例混合，其中該混合物可藉由將1體積的適合細胞恢復的培養基與1體積的該第二細胞培養基接觸來製備。於另一較佳實施例中，兩種不同的細胞培養基以約1:2（v/v）或2:1的比例混合，其中混合物可藉由將1體積的適合細胞恢復的培養基與2體積的該第二細胞培養基（或2體積的適用於細胞恢復的培

養基與1體積的該第二細胞培養基）接觸來製備。用於產生細胞培養混合物的該第二細胞培養基可為任何適合增強或維持iPS增殖的細胞培養基（此類培養基在本文中亦稱為「維持培養基」）。使用適合細胞恢復的培養基以及維持培養基的1:1混合物的優點是能使CLiPS細胞從其同源培養基逐漸過渡到ES/iPSC培養基，而不是突然的轉換，這可能減損其存活率。不希望受理論的束縛，假設在轉染後約兩天，一些成功轉染的臍帶內膜幹細胞將開始獲得多能幹細胞特徵並同時獲得PSCs的營養需求。這種合適的細胞培養基的示例包含，但不限於，商業維持培養基，例如mTeSR1、StemMACS™ iPS-Brew XF、TeSRTM E8、mTeSRTMPlus、TeSRTM2或mTeSRTM1 、Corning® NutriStem® hPSC XF培養基、Essential 8 Medium（Thermo Fisher Scientific公司）、StemFlex（Thermo Fisher Scientific公司）、StemFit Basic02（Ajinomoto公司）或PluriSTEM（Merck Millipore公司）。因為培養基mTeSRTM1是在GMP條件下生產的，所以若iPS集落是在無動物以及無異種GMP條件下培養的，則較佳可使用mTeSRTM1。因此，於一較佳實施例中，mTeSR1可為用於產生細胞培養混合物的第二細胞培養基。於本發明中，1:1（v/v）細胞培養基混合物可在合適的時間段內以相同的細胞培養基混合物替換。該合適的時間段可為轉染後約3、約4、約5或約6天。因此，於一實施例中，1:1（v/v）細胞培養基混合物可在轉染後4天以相同的混合物替換。經過一段合適的時間後，1:1（v/v）細胞培養基混合物可進一步替換為僅用於產生細胞培養混合物的第二細胞培養基。於本文中，合適的時間段可為轉染後約4、約5、約6或約7天。於一實施例中，1:1（v/v）細胞培養基混合物可在轉染後6天替換為該第二細胞培養基。於一較佳實施例中，1:1（v/v）細胞培養基混合物可在轉染後6天分

別替換為mTeSR1以及mTeSRTM1。常規細胞培養基的變更及替換可能有助於增加CLiPS的存活率。因此，CLiPS集落可能會生長並增殖。

【0084】將細胞培養基混合物改為一種細胞培養基後，可進一步培養CLiPS。為此，細胞培養基亦可定期更換為相同的培養基，以確保向細胞提供適當的營養供應以及合適的生長因子混合物。例如，可每天或每兩天、每三天或每四天更換細胞培養基。於本發明之一實施例中，細胞培養基可每隔一天更換一次。因此，CLiPS集落可能會進一步生長並增殖。

【0085】CLiPS集落可能在轉染後約10、11、12、13、14、15或16天變得肉眼可見（參見實施例2）。當CLiPS達到合適的大小時，可選擇CLiPS並將其轉移至另一帶塗層的培養容器中，以進一步培養並增殖。於本文中，合適的集落大小可包含直徑約0.1 mm至約2 mm的長度。於本發明之一實施例中，當CLiPS集落的長度達到約0.5 mm至約1.5 mm的直徑時可進行選擇，其中CLiPS集落可在轉染後約20天達到該大小。為了將大小合適的CLiPS集落轉移至另一培養容器中，可挑選CLiPS集落。如果需要，可人工進行挑選。為了便於挑選集落，可使用能夠放大觀察集落的裝置。這種設備的示例可為放大鏡或顯微鏡。於本發明中，可在明場顯微鏡下選擇以及拾取CLiPS。轉向細胞培養容器，可將挑取的CLiPS集落轉移至另一細胞培養容器中，其中細胞培養容器的塗層可以與用於轉染的CLSC恢復的細胞培養容器的塗層不同或者相同。於一較佳的實施例中，培養容器的塗層是相同的，因為迄今為止在cGMP合適條件下培養的CLMC衍生的CLiPS可保持無動物及異種，進而保持在cGMP的條件。因此，例如，可將自CLMC衍生的CLiPS集落轉移至塗覆無血清物質如層連結蛋白511 E8片段的細胞培養容器中以用於進一步培養（參見實施例3）。或者，可將例如CLEC及/或CLMC衍生的CLiPS集

落轉移至塗覆有血清衍生物質（如基質膠）的細胞培養容器中以用於進一步培養。較佳可使用與集落挑取之前所用的相同細胞培養基。於本發明之實施例中，細胞培養基也可在集落挑取後定期更換。例如，可每天、每兩天或每三天更換培養基。於本發明之較佳實施例中，細胞培養基可在集落挑選後每天更換。

【0086】 當達到合適的匯合時，通常將CLiPS集落或由集落形成的細胞群從塗層細胞培養容器中分離出來，並轉移至更大的細胞培養容器中，以便在集落挑選後直接使用的相同培養條件下進一步培養。合適的匯合可為至少約40%、至少約45%、至少約50%、至少約55%、至少約60%，以及至少約65%的匯合。於此情況下應注意，術語「細胞群」更合適用於CLiPS形成集落的繁殖時，因為當CLiPS細胞在達到約70%至約80%的匯合時不會呈現類集落外觀。為了從塗層細胞培養容器中分離CLiPS集落或由集落形成的細胞群，可使用任何適合破壞細胞黏附或水解胜肽鍵的解離劑。這種合適的解離劑的實例可為含有螯合劑如乙二胺四乙酸（ethylenediaminetetraacetic acid，EDTA）的溶液或含有酶如胰蛋白酶或分散酶的溶液（參見本申請的實驗章節，其中已使用分散酶從包覆的細胞培養容器中分離CLiPS集落）。細胞培養基也可定期更換，例如每天、每兩天或每三天更換。於本發明之較佳實施例中，細胞培養基可每天更換。這樣CLiPS可能會進一步生長並增殖。

【0087】 於本發明中，CLiPS集落或由集落形成的細胞群在達到合適大小時可進行繼代。合適的尺寸可對應於約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%，以及約95%的匯合。於本發明之實施例中，該CLiPS集落或由其形成的細胞群可在培養物達到約60-90%匯合時進行繼代。因此，於較佳實施例中，CLiPS集落或由其形成的細胞群可在達到約70-80%匯合時

進行繼代。針對繼代，CLiPS可以合適的比例進行繼代，其中一個體積的CLiPS可與多個體積的細胞培養基接觸。於本發明中，CLiPS可以約1:3（v/v）、或約1:4（v/v）、或約1:5（v/v），或約1:6（v/v），其中可以藉由將1體積的解離的CLiPS分別分成約2、或約3、或約4或約5體積的解離的CLiPS來進行繼代。於較佳實施例中，CLiPS可以約1:3（v/v）的比例進行繼代。為了使本發明之培養的CLiPS繼代，同樣可使用適合於從培養容器分離細胞的任何酶。例如，可使用分散酶來達到於此目的。此外，於本發明之上下文中，任何適合去除細胞間黏附的化學物質都可用於CLiPS繼代，其中化學物質的濃度可適合去除細胞間黏附而不傷害細胞。這種化學物質的說明性實例可為EDTA。由於EDTA可在較高濃度下殺死細胞，因此本發明之合適的EDTA濃度可為約0.5 mM。於本發明中，用於繼代的細胞培養基可以補充適合提高解離時CLiPS存活的物質。為此，可使用任何適合在解離時增強CLiPS存活的物質。這種合適的物質的實例可為訊息傳導途徑的抑制劑，例如rho相關蛋白激酶（rho-associated protein kinase，ROCK）訊息傳導途徑的抑制劑。因此，RHO/ROCK途徑的抑制劑Y-27632可為適用於增強解離CLiPS存活的物質的實例。或者，用於人類iPS細胞單細胞選殖的特定補充劑，如CloneR™（可從StemCell Technologies公司獲得）也可用於增強解離細胞的存活。於本發明中，繼代的CLiPS可在補充有適合增強解離的CLiPS存活的物質的培養基中培養一段合適的時間，然後分化為目標細胞。

【0088】 藉由在繼代後培養CLiPS，可獲得包含（初始）分離的CLiPS的主細胞庫。為了產生CLiPS的主細胞庫，可將藉由本文所述之方法獲得之CLiPS細胞接種於培養容器例如細胞培養盤中。為此，CLiPS可懸浮於任何合適的培養基中並培養，通常是iPS細胞的維持培養基，例如上述商業培養基，例如mTeSR1、

StemMACS™ iPS-Brew XF、TeSRTM E8、mTeSRTMPlus、TeSRTM2或mTeSRTM1，Corning ® NutriStem® hPSC XF培養基、Essential 8培養基（Thermo Fisher Scientific公司）、StemFlex（Thermo Fisher Scientific公司）、StemFit Basic02（Ajinomoto公司）或PluriSTEM（Merck Millipore公司）。自CLMC衍生的CLiPS以及自CLEC衍生的CLiPS都可在這種iPS維持培養基中培養。針對繼代培養，CLiPS細胞（自CLMC及CLEC衍生的CLiPS）可以任何合適的濃度接種，例如，或約0.5 x 10^6個細胞/ml至約5.0 x 10^6個細胞/ml的濃度。於實施例中，細胞以約1.0 x 10^6個細胞/ml的濃度懸浮以進行繼代培養。繼代培養可在簡單的培養瓶中進行，亦可在多層系統中進行，例如CellSTACK（Corning公司，紐約，美國）或Cell Factory（Nunc，Thermo Fisher Scientific公司的部門，塞勒姆市，麻州，美國），而可堆疊於培養箱中。或者，繼代培養也可在封閉的獨立系統如生物反應器中進行。生物反應器的不同設計為本領域技術人員已知的，例如，平行盤、中空纖維，或微流體生物反應器。參見，例如，Sensebe等人「Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review」，同上。市售中空纖維生物反應器之說明性實例為Quantum® Cell Expansion System（Terumo BCT公司）。例如，該反應器已被用於臨床試驗中骨髓間質幹細胞的擴增（參見，Hanley等人，Efficient Manufacturing of Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells Using the Quantum Cell Expansion System, Cytotherapy。2014年8月；16(8):第1048-1058頁）並用於擴增如國際專利申請公開第WO 2018/067071號中描述的高純度臍帶間質幹細胞群。可用於本發明之CLiPS群的繼代培養的市售生物反應器的另一實例為可從GE Healthcare公司獲得之Xuri細胞擴增系統。如果要在GMP條件下生產應用於治療的工作細胞庫並且需要大量細胞，則在自動化系統

（例如Quantum®細胞擴增系統）中培養CLiPS群體是特別有幫助的。同樣針對繼代培養，可培養CLiPS直到合適數量的細胞生長。在示例性實施例中，CLiPS被繼代培養直到CLiPS達到約70%至約80%匯合。CLiPS群體的分離/培養可在哺乳動物細胞培養的標準條件下進行。一旦從繼代培養物中獲得所需/合適數量的CLiPS，就從用於繼代培養的培養容器中取出細胞以收穫細胞。通常以酶處理收穫CLiPS。隨後收集分離的CLiPS並直接使用或保存以供未來使用。通常以冷凍保存進行保存。術語「冷凍保存」在本文中以其常規含義用於描述一種透過冷卻至低於零度的低溫，例如（通常為）-80℃或-196℃（液態氮的沸點）來保存CLiPS的過程。低溫保存可如本領域技術人員已知的方法進行並可包含使用低溫保護劑，例如二甲亞碸（dimethylsulfoxide，DMSO）或甘油，以減緩CLiPS細胞中冰晶的形成。

【0089】 本發明還涉及可藉由本文所述之方法獲得之CLiPS以及藉由本文所述之方法獲得之CLiPS。藉由本發明可獲得/獲得之CLiPS可穩健地生長並增殖（參見實施例2及實施例3）。因此，相較於衍生自例如骨髓基質、脂肪組織、真皮或沃頓氏膠質的iPS培養，CLiPS培養可能更有效。CLiPS功能分析顯示人類胚胎幹細胞標記的表現，表示其具有自我更新特性以及正常核型（參見實施例4以及實施例5）。此外，CLiPS能夠在體外及體內分化為多種細胞類型（功能性目標細胞），顯示其具有多能性（參見實施例6）。因此，CLiPS非常適合藥物及治療應用。因此，本發明還涉及包含藉由本文所述方法可獲得/獲得之iPS的醫藥組合物。

【0090】 本發明還涉及一種在適於分化的條件下將CLiPS分化為目標細胞之方法。合適的目標細胞的實例包含，但決不限於，神經元細胞、多巴胺神經元

細胞、寡突膠質細胞、星形膠質細胞、皮層神經元、肝細胞、軟骨細胞、肌肉細胞、骨細胞、牙細胞、毛囊細胞、內耳毛細胞、皮膚細胞、黑色素細胞、心肌細胞、造血前驅細胞、血球細胞、免疫細胞、T-或B-淋巴細胞、小膠質細胞、自然殺手細胞或運動神經元，僅舉幾例。為了促進定向分化為目標細胞，CLiPS可暴露於一誘發物質下，通常為在本領域技術人員已知的從其他來源衍生的iPS分化為目標細胞的條件下。可在合適的條件下將細胞暴露於誘發物質，其可包含在填充有適合誘發CLiPS分化及後續培養的細胞培養基的細胞培養容器中培養。於本發明中，可使用適合於誘發、增殖以及分化iPS的任何細胞培養基，其中該培養基的組成份以及因此分化的方法可視目標細胞而定，並可採用將iPS分化為所需目標細胞的已知方法（這方面請參見Hirschi等人的回顧「Induced Pluripotent Stem Cells for Regenerative Medicine」*Annu Rev Biomed Eng*. 2014年6月11日；16:第277-294頁，或Shi等人「Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress」*Nat Rev Drug Discov*. 2017年2月；16(2)：第115-130頁）。例如，CLiPS可在適於CLiPS增殖及分化為多巴胺神經元細胞的培養基中培養。於此情況下，培養基可為補充有生長因子如B-27減去維生素A、轉化生長因子3-β（TGFβ3）、神經膠質細胞株衍生的神經營養因子（glial cell line-derived neurotrophic factor，GDNF）、腦衍生的神經營養因子（brain-derived neurotrophic factor，BDNF）、抗壞血酸、二丁基cAMP、糖原合酶激酶3抑制劑（例如，CHIR99021）以及γ分泌酶抑制劑（例如，(2S)-N-[(3,5-二氟苯基)乙醯基]-L-丙胺醯-2-苯基]甘胺酸1,1-二甲基乙酯（DAPT），其誘導神經元分化）。這種培養基之一說明性實例為NB27。CLiPS分化為一多巴胺神經元細胞的實例如實施例7所示。作為另一實施例，CLiPS可在適於CLiPS增殖及分化為肝細胞的培養基中培養。於此情況下，該培養基可為

不含蛋白質、脂質及生長因子的培養基，補充有誘導分化為中內胚層命運的化合物。用於將CLiPS分化為肝細胞的合適培養基的實例可為補充有活化素A的RPMI 1640-B27。CLiPS分化為肝細胞的實例如實施例8所示。作為另一說明性實施例，CLiPS可在適於CLiPS增殖及分化為心肌細胞的培養基中培養。於此情況下，該培養基可為不含蛋白質、脂質以及生長因子的培養基，其補充有糖原合成酶激酶3的抑制劑，例如CHIR99021。用於將CLiPS分化為肝細胞的合適培養基的實例可為RPMI/2%-B27減去胰島素。CLiPS分化為心肌細胞的實例如實施例9所示。作為進一步的說明性實施例，可使用化學成分確定的富含生長因子的培養基將CLiPS分化為寡突膠質細胞，進而分化為配對盒6陽性（paired box 6-positive，PAX6+）的神經幹細胞，然後產生寡突膠質細胞轉錄因子陽性（oligodendrocyte transcription factor positive，OLIG2+）的前驅細胞（參見實施例10）。於此情況下，可注意到也可在適cGMP生產的條件下使CLiPS分化為目標細胞。

【0091】 本發明進一步包含醫藥組合物，其包含藉由本文所述之方法獲得之分化的CLiPS。CLiPS及其神經衍生物的免疫原性分析顯示免疫原性降低（實施例11）。包含分化的CLiPS的醫藥組合物之實例為注射液或適合植入分化的CLiPS的任何種類的移植物。於實施例中，這樣的移植物可包含分化的CLiPS衍生的多層組織，例如器官或其部分。於實施例中，適於植入分化的CLiPS的移植物可包含塗覆分化的CLiPS的可植入基質。該醫藥組合物可配製/適於胃腸外施用。於此情況下，腸胃外施用可包含目的在用於人體或動物體內注射、輸注或植入的無菌製劑。在具有完全免疫能力的小鼠以及大鼠的帕金森氏症模型中移植CLiPS衍生的多巴胺神經元表現出功能植入，甚至顯著恢復多巴胺再攝取功能（參見實施例12及實施例13）。

【0092】本發明進一步包含治療個體的先天性或後天性退化性疾病之方法，其中該個體可選自包含下列之群組：小鼠、大鼠、兔、豬、狗、貓、非人類靈長類動物或人類。於較佳實施例中，該個體為人類。於本文中，治療可包含藉由本文所述之方法向一個體施用從CLiPS分化的目標細胞。該疾病可為已經被認為可藉由以細胞為基礎的療法治療的任何已知疾病，參見本文，例如，Shi等人「Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress」，同上。先天性或後天性退化性疾病可能有不同的起源。例如，先天性或後天性退化性疾病可為神經性疾病，例如帕金森氏症、阿茲海默症、杭汀頓氏症、肌肉萎縮脊髓側索硬化症（Amyotrophic lateral sclerosis，ALS）、脊髓小腦性失調症（Spinocerebellar ataxia，SCA），以及巴騰病。肝變性疾病的實例尤其可為肝衰竭、肝硬化以及病毒性肝炎。先天性或後天性退化性疾病還可為心臟疾病，尤其包含急性Danon氏症、短QT症候群、Brugada症候群、心肌梗塞、Jervell與Lange-Nielsen症候群。該疾病也可為自身免疫性疾病，例如多發性硬化症。

【0093】本發明還涉及可由CLiPS或CLiPS的分化衍生物產生的細胞外膜囊泡。此類囊泡可包含，但不限於，直徑範圍為30至150奈米（nm）的囊泡，亦稱為外泌體。最初被認為主要負責排泄功能，現在已知外泌體參與各種重要的生物學過程，如細胞間的通訊、細胞衰老、增殖及分化、組織穩態、組織修復及再生、抗原呈現及免疫調節（參見，例如，Pegtel, D.M.與S.J. Gould, Exosomes. *Annu Rev Biochem*，2019年，88：第487-514頁，或Kalluri, R.與V.S. LeBleu，The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*，2020年，367(6478)。外泌體與多種疾病有關，包含癌症（參見，例如，Visan, K.S., R.J. Lobb.以及A. Moller，The role of exosomes in the promotion of epithelial-to-mesenchymal transition

and metastasis. *Front Biosci* (Landmark Ed)，2020年，25：第1022-1057頁，或Zhang, L.與D. Yu，*Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity.* Biochim Biophys Acta Rev Cancer，2019年，1871(2)：第455-468頁）、骨關節炎（Asghar, S.等人，Exosomes in intercellular communication and implications for osteoarthritis. Rheumatology (牛津)，2020年，59(1)：第57-68頁）、中樞神經系統疾病，例如中風、阿茲海默症（AD）、帕金森氏症（PD）、朊病毒病，以及肌肉萎縮脊髓側索硬化症（ALS）（參見，例如，Liu, W.等人，Role of Exosomes in Central Nervous System Diseases. Front Mol Neurosci，2019年，12：第240頁，或Quek, C.與A.F. Hill，*The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases.* Biochem Biophys Res Commun，2017年，483(4)：第1178-1186頁）、精神疾病（Saeedi, S.等人，*The emerging role of exosomes in mental disorders.* Transl Psychiatry，2019年，9(1)：第122頁)、心血管疾病（Wang, Y.等人，*Exosomes: An emerging factor in atherosclerosis.* Biomed Pharmacother，2019年，115：第108951頁）、代謝性疾病（參見，例如，Dini, L.等人，*Microvesicles and exosomes in metabolic diseases and inflammation.* Cytokine Growth Factor Rev，2020年，51：第27-39頁，或Soazig, L.L., A. Ramaroson以及M. M. Carmen，*Exosomes in metabolic syndrome*, in *Exosomes: A Clinical Compendium*，L.R. Edelstein等人編輯，2020年，學術出版社，第343 - 356頁）等等。

【0094】外泌體內含物已被證明由各種生物分子所組成，包含蛋白質、脂質及核酸。tRNA、mRNA、lncRNA、環狀RNA以及miRNA等RNA種類可潛在地調節目標細胞及組織中的基因表現。某些細胞類型產生的外泌體已被證明具有治療特性。於此方面，自骨髓、脂肪組織及臍帶等不同來源衍生的分離的間質幹

細胞（MSC）已變得特別受歡迎。MSC衍生的外泌體在角膜、心血管、阿滋海默症、帕金森氏症，以及發炎性腸病等動物模型中顯現出潛在的治療效果。除了內源性細胞外，體外培養的多能幹細胞（PSC），如胚胎幹細胞（ESC）以及誘導性多能幹細胞（iPS）已被證明可產生外泌體（Song，Y.H.，等人，*Exosomes Derived from Embryonic Stem Cells as Potential Treatment for Cardiovascular Diseases.* Adv Exp Med Biol，2017年，998：第187-206頁，或Jeske, R.等人，*Human Pluripotent Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Characteristics and Applications.* Tissue Eng Part B Rev，2020年，26(2)：第129-144頁）。由於存在殘留的未分化細胞可能會形成腫瘤的風險，使用無細胞iPS衍生的外泌體被認為比iPS衍生的細胞更安全（Riazifar, M.等人，*Stem Cell Extracellular Vesicles: Extended Messages of Regeneration.* Annu Rev Pharmacol Toxicol，2017年，57：第125-154頁）。值得注意的是，從iPS的分化衍生物中分離出的外泌體也已證明具有治療特性。例如，使用從iPS衍生的心肌細胞純化的外泌體進行治療可增強心肌梗塞小鼠模型的心臟恢復，相較於未治療的動物，細胞凋亡以及纖維化顯著減少。外泌體還拯救了體外培養的iPS心肌細胞免受缺氧及外泌體生物發生抑制作用（Liu, B.等人，*Cardiac recovery via extended cell-free delivery of extracellular vesicles secreted by cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells.* Nat Biomed Eng，2018年，2(5)：第293-303頁）。於另一項研究中，從iPS衍生的MSCs中分離出的外泌體加速人類皮膚纖維母細胞及人類角質形成細胞的增殖，並在體外划痕試驗中增強傷口癒合。相較於從原代MSCs分離的外泌體，這些外泌體的作用沒有顯著差異（Kim, S.等人，*Exosomes Secreted from Induced Pluripotent Stem Cell-Derived*

Mesenchymal Stem Cells Accelerate Skin Cell Proliferation. Int J Mol Sci，2018年，**19**(10)）。

【0095】 因此，根據這些報告，由CLiPS（源自CLMC或CLEC）或本發明之CLiPS的分化衍生物產生的細胞外膜囊泡或外泌體被認為可用於治療疾病，包含上述示例性疾病，例如，癌症、骨關節炎、中樞神經系統疾病，如中風、阿茲海默症（AD）、帕金森氏症（PD）、朊病毒病，以及肌肉萎縮脊髓側索硬化症（ALS）、精神性疾病，或代謝疾病。

【0096】 此外，利用外泌體高效的遞送物質能力，外泌體被積極地作為遞送載體，以促進細胞攝取各種治療劑，如microRNA、藥物以及胜肽（參見Antimisiaris, S.G.、S. Mourtas以及A. Marazioti，*Exosomes and Exosome-Inspired Vesicles for Targeted Drug Delivery.* Pharmaceutics，2018年，10(4)、Liao, W.等人，*Exosomes: The next generation of endogenous nanomaterials for advanced drug delivery and therapy.* Acta Biomater，2019年，86：第1-14頁，或Wang, X.等人，*Cell-derived Exosomes as Promising Carriers for Drug Delivery and Targeted Therapy.* Curr Cancer Drug Targets，2018年，18(4)：第347-354頁）。與此一致的是，由CLiPS（源自 CLMC或CLEC）或本發明之CLiPS的分化衍生物產生的細胞外膜囊泡或外泌體被認為也可作為遞送載體以促進治療劑的細胞攝取。因此，本發明進一步包含使用CLiPS或CLiPS的分化衍生物來遞送外源加載的或轉基因表現的分子。

【0097】 由CLiPS（源自CLMC或CLEC）或CLiPS的分化衍生物產生的細胞外膜囊泡以及外泌體可使用文獻中描述的相應方法進行分離。通常，外泌體是從它們被分泌出來的細胞外環境中純化出來的。用於分離外泌體的已知方法包

含超速離心、超微過濾、粒徑篩析層析法、場流分級分離、聚合物共沉澱、免疫親和層析法、微流體，或聲學奈米過濾器。所有這些方法都可用於分離由CLiPS或本文描述之CLiPS的分化衍生物所產生的外泌體。

【0098】 本發明進一步涉及將iPS細胞分化為RPE細胞的特定方法，該iPS細胞衍生自如本文別處所定義之臍帶羊膜幹細胞，並也意指如本文所定義之CLiPS。該分化方法包含在適合分化為RPE細胞的條件下在分化培養基中培養該CLiPS。

【0099】 「視網膜色素上皮（簡稱：RPE）細胞」係指來源於/來自/取自視網膜色素上皮的細胞。換言之，這樣的細胞由該視網膜色素上皮細胞構成，並將於以下更詳細地定義。使用根據本發明之快速、定向及改進的分化方法實現了從CLiPs分化RPE。如本文所用之用於分化為RPE細胞的CLiPS可源自臍帶內膜間質細胞（例如，CLMC23、CLMC30、CLMC44）及/或源自臍帶內膜外胚層細胞（例如CLEC23）。於一較佳實施例中，本文用於分化為RPE細胞的CLiPS為CLMC23、CLMC30、CLMC44或CLEC23中的任一種。於一較佳具體實施例中，如本文所用之用於分化為RPE細胞的CLiPS為CLMC23。於另一個較佳具體實施例中，如本文所用之用於分化為RPE細胞的CLiPS為CLMC30。於另一較佳具體實施例中，如本文所用之用於分化為RPE細胞的CLiPS為CLMC44。於另一較佳具體實施例中，如本文所用之用於分化為RPE細胞的CLiPS為CLEC23。藉由如本文所述之分化方法從如本文所定義之CLiPS分化的RPE細胞可指CLiPS衍生的RPE細胞或CLiPS-RPE。使用根據本發明之分化方法，源自CLiP的RPE細胞的分化可與衍生自ES細胞如H9 ES細胞的RPE細胞（當提及此類RPE細胞時亦稱為ES衍生的RPE）的分化及/或來自皮膚的iPS細胞（亦稱為皮膚iPS；因此，當提及此類RPE細胞時

為皮膚iPS衍生的RPE）的RPE細胞，例如Asf5、AGO或HDFA細胞的分化進行比較（參見實施例部分）。

【0100】 在包含培養源自臍帶羊膜幹細胞的iPS細胞的將iPS細胞分化為RPE細胞的分化方法中使用的分化培養基較佳為本文所定義之DMEM（Dulbecco氏改良Eagle氏培養基）培養基，其包含N2補充劑、B27補充劑，以及非必需胺基酸（NEAA），甚至更佳為DMEM（Dulbecco氏改良Eagle氏培養基）/F12（Ham氏F12培養基）培養基，如本文別處所定義，包含N2補充劑、B27補充劑以及非必需胺基酸（NEAA）。於一較佳實施例中，iPS細胞分化為RPE細胞的分化方法中使用的DMEM/F12培養基包含1x N2補充劑、1x B27補充劑，以及1x NEAA。在該培養基中包含1x N2補充劑、1x B27補充劑以及1x NEAA表示最終濃度為1x，亦可在以下實施例中看到。在該具體實施例中，分化培養基，較佳為DMEM培養基，甚至更佳為本文所定義之DMEM/F12培養基，係藉由混合以下成分以獲得終體積為1000 mL的培養基：

- 10 mL100x N2補充劑；
- 20 mL 50x B27補充劑；
- 10 mL100x NEAA；
- 960 mL DMEM，較佳為DMEM/F12。

【0101】 如本文所定義之分化培養基可進一步包含/補充有如本文別處所定義之各種生長因子及/或細胞激素。如上定義之這種分化培養基可指用於iPS培養的基礎培養基。然後可進一步修改/補充這樣的基礎分化培養基以用於培養如本文所定義之iPS細胞，以便藉由使用根據本發明之將iPS細胞分化為RPE細胞之方法使該細胞分化為RPE細胞。

【0102】 特別是，在根據本發明之將iPS細胞分化為RPE細胞之方法中用於培養iPS細胞以使該細胞分化為RPE細胞的分化培養基可包含第一分化培養基，其另外包含IGF1、DKK1、菸鹼醯胺或LDN-193189中的至少任何一種。該第一分化培養基還基於包含DMEM培養基的基礎培養基，較佳為包含N2補充劑、B27補充劑，以及NEAA的DMEM/F12培養基，甚至更佳包含1x N2補充劑、1x B27補充劑，以及1x NEAA的DMEM/F12培養基。於一較佳具體實施例中，本文所定義之第一分化培養基另外包含IGF1、DKK1、菸鹼醯胺以及LDN-193189。

【0103】 此外，在根據本發明之將iPS細胞分化為RPE細胞之方法中用於培養iPS細胞以使該細胞分化為RPE細胞的分化培養基可額外地或可選擇地包含第二分化培養基，該第二分化培養基另外包含IGF1、DKK1、菸鹼醯胺、LDN-193189或b-FGF中的至少任何一種。該第二分化培養基還基於包含DMEM培養基的基礎培養基，較佳為包含N2補充劑、B27補充劑，以及NEAA的DMEM/F12培養基，甚至更佳為包含1x N2補充劑、1x B27補充劑，以及1x NEAA的DMEM/F12培養基。於一較佳具體實施例中，如本文所定義之第二分化培養基另外包含IGF1、DKK1、菸鹼醯胺、LDN-193189以及b-FGF。

【0104】 此外，在根據本發明之將iPS細胞分化為RPE細胞之方法中用於培養該細胞分化為RPE細胞的iPS細胞的分化培養基可額外地或可選擇地包含第三分化培養基，該第三分化培養基另外包含IGF1、DKK1或活化素A中的至少任何一種。該第三分化培養基還基於包含DMEM培養基的基礎培養基，較佳為包含N2補充劑、B27補充劑，以及NEAA的DMEM/F12培養基，甚至更佳為包含1x N2補充劑、1x B27補充劑，以及1x NEAA的DMEM/F12培養基。於一較佳具體實施例中，本文所定義之第三分化培養基進一步包含IGF1、DKK1以及活化素A。

【0105】 此外，在根據本發明之將iPS細胞分化為RPE細胞之方法中用於培養該細胞分化為RPE細胞的iPS細胞的分化培養基可額外地或可選擇地包含一第四分化培養基，其另外包含活化素A與SU5402或活化素A與PD17307。該第四分化培養基還基於包含DMEM培養基的基礎培養基，較佳為包含N2補充劑、B27補充劑，以及NEAA的DMEM/F12培養基，甚至更佳為包含1x N2補充劑、1x B27補充劑，以及1x NEAA的DMEM/F12培養基。於一較佳具體實施例中，如本文所定義之第四分化培養基另外包含活化素A以及PD17307。由於相較於纖維母細胞生長因子抑制劑SU5402，PD17307的施用濃度較低，減少在使用SU5402時因施用較高濃度所引起的基因表現的不良變化，因此本發明之分化方法較佳使用PD17307（**圖19**）。

【0106】 此外，在根據本發明之將iPS細胞分化為RPE細胞之方法中用於培養該細胞分化為RPE細胞的iPS細胞的分化培養基可額外地或可選擇地包含一第五分化培養基，該第五分化培養基另外包含活化素A、CHIR99021或SU5402中的至少任何一種；或包含活化素A、CHIR99021或PD17307中的至少任何一種。該第五分化培養基還基於包含DMEM培養基的基礎培養基，較佳為包含N2補充劑、B27補充劑，以及NEAA的DMEM/F12培養基，甚至更佳為包含1x N2補充劑、1x B27補充劑，以及1x NEAA的DMEM/F12培養基。於一較佳具體實施例中，如本文所定義之第五分化培養基進一步包含活化素A、CHIR99021以及PD17307（使用PD17307的原因與上文所定義相同）。第五分化培養基較佳包含活化素A、SU5402或PD17307，較佳為PD17307，以及低於3 μM的第一濃度的CHIR99021。當再次使用第五分化培養基培養iPS細胞以分化為RPE細胞時，Wnt訊息傳導途徑的活化劑CHIR99021的濃度隨後增加。濃度的逐漸增加可防止使用時CHIR濃

度過高導致的細胞過度死亡。這提高了有色RPE細胞的產量。當隨後應用第五分化培養基時，其較佳包含活化素A、SU5402或PD17307，較佳為PD17307，以及為約3 μM的第二濃度的CHIR99021。

【0107】 當IGF1作為補充劑應用於本文別處所定義之分化培養基時，終濃度為至少約5 ng/ml、至少約6 ng/ml、至少約7 ng/ml、至少約8 ng/ml、至少約9 ng/ml，或至少約10 ng/ml；或者在約5至約15 ng/ml、約6至約14 ng/ml、約7至約13 ng/ml、約8至約12 ng/ml、約9至約11 ng/ml的範圍內使用。於一較佳具體實施例中，IGF1以約10 ng/ml的終濃度用於如本文別處所定義之分化培養基。於一更佳具體實施例中，IGF1以至少約5 ng/ml、至少約6 ng/ml、至少約7 ng/ml、至少約8 ng/ml、至少約9 ng/ml，或至少約10 ng/ml；或者在約5至約15 ng/ml、約6至約14 ng/ml、約7至約13 ng/ml、約8至約12 ng/ml、約9至約11 ng/ml的範圍內使用，最佳終濃度為約10 ng/ml。於另一更佳具體實施例中，IGF1以至少約5 ng/ml、至少約6 ng/ml、至少約7 ng/ml、至少約7 ng/ml、至少約8 ng/ml、少約9 ng/ml，或至少約10 ng/ml；或者在約5至約15 ng/ml、約6至約14 ng/ml、約7至約13 ng/ml、約8至約12 ng/ml、約9至約11 ng/ml的範圍內使用，最佳終濃度為約10 ng/ml。於另一更佳具體實施例中，IGF1以至少約5 ng/ml、至少約6 ng/ml、至少約7 ng/ml、至少約8 ng/ml、至少約9 ng/ml，或至少約10 ng/ml；或者在約5至約15 ng/ml、約6至約14 ng/ml、約7至約13 ng/ml、約8至約12 ng/ml、約9至約11 ng/ml的範圍內使用，最佳終濃度為約10 ng/ml。本發明進一步包含分化為RPE細胞之方法，該方法包含在本文別處所定義之分化培養基中培養該iPS細胞，其中將IGF1以濃度約為10 ng/ml施用於本文所定義之該分化培養基至少約2天、至少約3天、至少約4天、至少約5天、至少約6天，較佳約6天，甚至更佳約連續6天，最佳在最後一

次試驗中使用約（連續）6天。當IGF1施用於本文所定義之第一分化培養基時，IGF1以終濃度約為10 ng/ml使用約2天，較佳約連續2天，表示在培養的第0天至第2天，甚至更佳使用約（連續）2天。當IGF1應用於本文所定義之第二分化培養基時，IGF1以終濃度約為10 ng/ml使用約2天，較佳約連續2天，意指在培養的第2天至第4天，甚至更佳使用約（連續）2天。當IGF1應用於本文所定義之第三分化培養基時，IGF1以終濃度約為10 ng/ml使用約2天，較佳約連續2天，意指在培養的第4天至第6天，甚至更佳使用約（連續）2天。

【0108】 當DKK1施用於本文別處所定義之分化培養基時，終濃度為至少約5 ng/ml、至少約6 ng/ml、至少約7 ng/ml、至少約8 ng/ml、至少約9 ng/ml，或至少約10 ng/ml；或者在約5至約15 ng/ml、約6至約14 ng/ml、約7至約13 ng/ml、約8至約12 ng/ml、約9至約11 ng/ml的範圍內使用。於一較佳具體實施例中，DKK1以約10 ng/ml的終濃度用於本文別處所定義之分化培養基中。在甚至更佳的具體實施例中，DKK1以至少約5 ng/ml、至少約6 ng/ml、至少約7 ng/ml、至少約8 ng/ml、至少約9 ng/ml，或至少約10 ng/ml；或者在約5至約15 ng/ml、約6至約14 ng/ml、約7至約13 ng/ml、約8至約12 ng/ml、約9至約11 ng/ml的範圍內使用，最佳終濃度為約10 ng/ml。於另一更佳具體實施例中，DKK1以至少約5 ng/ml、至少約6 ng/ml、至少約7 ng/ml、至少約8 ng/ml、至少約9 ng/ml，或至少約10 ng/ml；或者在約5至約15 ng/ml、約6至約14 ng/ml、約7至約13 ng/ml、約8至約12 ng/ml、約9至約11 ng/ml的範圍內使用，最佳終濃度為約10 ng/ml。於另一更佳具體實施例中，DKK1以至少約5 ng/ml、至少約6 ng/ml、至少約7 ng/ml、至少約8 ng/ml、至少約9 ng/ml，或至少約10 ng/ml；或者在約5至約15 ng/ml、約6至約14 ng/ml、約7至約13 ng/ml、約8至約12 ng/ml、約9至約11 ng/ml的範圍內使用，最佳終濃度

為約10 ng/ml。本發明進一步包含分化為RPE細胞之方法，該方法包含在本文別處所定義之分化培養基中培養該iPS細胞，其中將DKK1以濃度約為10 ng/ml施用於本文所定義之該分化培養基至少約2天、至少約3天、至少約4天、至少約5天、至少約6天，較佳約6天，甚至更佳約連續6天，最佳在最後一次試驗中使用約（連續）6天。當DKK1施用於本文所定義之第一分化培養基時，DKK1以終濃度約為10 ng/ml使用約2天，較佳約連續2天，意指在培養的第0天至第2天，甚至更佳使用約（連續）2天。當將DKK1施用於本文所定義之第二分化培養基時，DKK1以終濃度約為10 ng/ml使用約2天，較佳約連續2天，意只在培養的第2天至第4天，甚至更佳使用約（連續）2天。當將DKK1施用於本文所定義之第三分化培養基時，DKK1以終濃度約為10 ng/ml使用約2天，較佳約連續2天，意指在培養的第4天至第6天，甚至更佳使用約（連續）2天。

【0109】 當將菸鹼醯胺施用於本文別處所定義之分化培養基時，終濃度為至少約5 mM、至少約6 mM、至少約7 mM、至少約8 mM、至少約9 mM、或至少約10 mM；或在約5至約15 mM、約6至約14 mM、約7至約13 mM、約8至約12 mM、約9至約11 mM的範圍內。於一較佳具體實施例中，菸鹼醯胺以約10 mM的終濃度用於如本文別處所定義之分化培養基。於一甚至更佳的具體實施例中，菸鹼醯胺以至少約5 mM、至少約6 mM、至少約7 mM、至少約8 mM、至少約9 mM，或至少約10 mM；或者在約5至約15 mM、約6至約14 mM、約7至約13 mM、約8至約12 mM、約9至約11 mM的範圍內使用，最佳終濃度約10 mM。於另一更佳的具體實施例中，菸鹼醯胺以至少約5 mM、至少約6 mM、至少約7 mM、至少約8 mM、至少約9 mM，或至少約10 mM；或者在約5至約15 mM、約6至約14 mM、約7至約13 mM、約8至約12 mM、約9至約11 mM的範圍內使用，最佳終濃度約

10 mM。本發明進一步包含分化為RPE細胞之方法，該方法包含在本文別處所定義之分化培養基中培養該iPS細胞，其中菸鹼醯胺在本文所定義之該分化培養基中以約10 mM的終濃度使用至少約2天、至少約3天、至少約4天、較佳約4天，甚至更佳約連續4天，最佳使用約（連續）4天。當菸鹼醯胺施用於本文所定義之第一分化培養基時，菸鹼醯胺以約10 mM的終濃度使用約2天，較佳約連續2天，意指在培養的第0天至第2天，甚至更佳使用約（連續）2天。當將菸鹼醯胺施用於本文所定義之第二分化培養基時，菸鹼醯胺以約10 mM的終濃度使用約2天，較佳約連續2天，意指在培養的第2天至第4天，甚至更佳使用約（連續）2天。

【0110】 當LDN-193189施用於本文別處所定義之分化培養基時，終濃度為至少約0.1 μM、至少約0.2 μM、至少約0.3 μM、至少約0.4 μM、至少約0.5 μM、至少約0.6 μM、至少約0.7 μM、至少約0.8 μM、至少約0.9 μM，或至少約1 μM。於一較佳具體實施例中，LDN-193189以約1 μM的終濃度用於本文別處所定義之分化培養基中。於另一較佳具體實施例中，LDN-193189以約0.2 μM的終濃度用於本文別處所定義之分化培養基中。於一甚至更佳的具體實施例中，LDN-193189以約0.5至約1.5 μM、約0.6至約1.4 μM、約0.7至約1.3 μM，約0.8至約1.2 μM，約0.9至約1.1 μM範圍內的終濃度，最佳為約1 μM的終濃度用於本文別處所定義之第一分化培養基中。於另一甚至更佳的具體實施例中，LDN-193189以約0.1至約0.3 μM、約0.11至約0.29 μM、約0.12至約0.28 μM、約0.13至約0.27 μM、約0.14至約0.26 μM，約0.15至約0.25 μM範圍內的終濃度，最佳為約0.2 μM的終濃度用於本文別處所定義之第二分化培養基中。本發明進一步包含分化為RPE細胞之方法，該方法包含在如本文別處所定義之分化培養基中培養該iPS細胞，其中將LDN-193189以如本文別處所定義之至少約0.1 μM的濃度施用於如本文所定義之

該分化培養基至少約2天、至少約3天、至少約4天，較佳約4天，甚至更佳約連續4天，最佳使用約（連續）4天。當LDN-193189施用於本文所定義之第一分化培養基時，LDN-193189以約1 μM的濃度使用約2天，較佳連續使用約2天，意指在培養的第0天至第2天，甚至更佳使用約（連續）2天。當LDN-193189施用於本文所定義之第二分化培養基時，LDN-193189以約0.2 μM的濃度使用約2天，較佳連續使用約2天，意指在培養的第2天至第4天，甚至更佳使用約（連續）2天。

【0111】 當b-FGF施用於本文別處所定義之分化培養基時，終濃度為至少約2.5 ng/ml、至少約3 ng/ml、至少約3.5 ng/ml、至少約4 ng/ml、至少約4.5 ng/ml，或至少約5 ng/ml；或者在約2.5至約7.5 ng/ml、約3至約7 ng/ml、約3.5至約6.5 ng/ml、約4至約6 ng/ml、約4.5至約5.5 ng/ml的範圍內使用。於一較佳具體實施例中，b-FGF以約5 ng/ml的終濃度用於如本文別處所定義之分化培養基。於一甚至更佳的具體實施例中，b-FGF以至少約2.5 ng/ml、至少約3 ng/ml、至少約3.5 ng/ml、至少約4 ng/ml、至少約4.5 ng/ml，或至少約5 ng/ml；或者在約2.5至約7.5 ng/ml、約3至約7 ng/ml、約3.5至約6.5 ng/ml、約4至約6 ng/ml、約4.5至約5.5 ng/ml範圍內的終濃度用於如本文別處所定義之第二分化培養基，最佳終濃度為約5 ng/ml。本發明進一步包含分化為RPE細胞之方法，該方法包含在如本文別處所定義之分化培養基中培養該iPS細胞，其中將b-FGF以約5 ng/ml的終濃度施用於如本文所定義之該分化培養基至少約1天、至少約2天，較佳約2天，甚至更佳約連續2天，最佳使用約（連續）2天。當將b-FGF施用於本文所定義之第二分化培養基時，b-FGF以最終濃度約為5 ng/ml使用約2天，較佳連續使用約2天，意指在培養的第2天至第4天，甚至更佳使用約（連續）2天。

【0112】當活化素A施用於本文別處所定義之分化培養基時，終濃度為至少約50 ng/ml、至少約60 ng/ml、至少約70 ng/ml、至少約80 ng/ml、至少約90 ng/ml，或至少約100 ng/ml；或者在約50至約150 ng/ml、約60至約140 ng/ml、約70至約130 ng/ml、約80至約120 ng/ml、約90至約110 ng/ml的範圍內使用。於一較佳具體實施例中，活化素A以約100 ng/ml的終濃度用於本文別處所定義之分化培養基中。於一甚至更佳的具體實施例中，活化素A以至少約50 ng/ml、至少約60 ng/ml、至少約70 ng/ml、至少約80 ng/ml、至少約90 ng/ml，或至少約100 ng/ml；或者在約50至約150 ng/ml、約60至約140 ng/ml、約70至約130 ng/ml、約80至約120 ng/ml、約90至約110 ng/ml的範圍內使用，最佳終濃度為約100 ng/ml。於另一甚至更佳的具體實施例中，活化素A以至少約50 ng/ml、至少約60 ng/ml、至少約70 ng/ml、至少約80 ng/ml、至少約90 ng/ml，或至少約100 ng/ml；或者在約50至約150 ng/ml、約60至約140 ng/ml、約70至約130 ng/ml、約80至約120 ng/ml、約90至約110 ng/ml的範圍內使用，最佳終濃度為約100 ng/ml。於另一甚至更佳的具體實施例中，活化素A以至少約50 ng/ml、至少約60 ng/ml、至少約70 ng/ml、至少約80 ng/ml、至少約90 ng/ml，或至少約100 ng/ml；或者在約50至約150 ng/ml、約60至約140 ng/ml、約70至約130 ng/ml、約80至約120 ng/ml、約90至約110 ng/ml的範圍內使用，最佳終濃度為約100 ng/ml。本發明進一步包含分化為RPE細胞之方法，該方法包含在本文別處所定義之分化培養基中培養該iPS細胞，其中將活化素A以約100 ng/ml的終濃度施用於本文所定義之該分化培養基至少約2天、至少約3天、至少約4天、至少約5天、至少約6天、至少約8天、至少約10天、至少約12天，較佳約12天，甚至更佳連續使用約12天，最佳使用約（連續）12天。當將活化素A施用於本文所定義之第三分化培養基時，活化素A以最終濃度約為100 ng/ml使用

約2天，較佳連續使用約2天，意指在培養的第4天至第6天，甚至更佳使用約（連續）2天。當將活化素A施用於本文所定義之第四分化培養基時，活化素A以最終濃度約為100 ng/ml使用約2天，較佳連續使用約2天，意指在培養的第6天至第8天，甚至更佳使用約（連續）2天。當將活化素A施用於本文所定義之第五分化培養基時，活化素A以最終濃度約為100 ng/ml使用約8天，較佳連續使用約8天，意指在培養的第8天至第16天，甚至更佳使用約（連續）8天。

【0113】 當SU5402施用於本文別處所定義之分化培養基時，終濃度為至少約5 μM、至少約6 μM、至少約7 μM、至少約8 μM、至少約9 μM，或至少約10 μM；或者在約5至約15 μM、約6至約14 μM、約7至約13 μM、約8至約12 μM、約9至約11 μM的範圍內使用。於一較佳具體實施例中，SU5402以約10 μM的終濃度用於如本文別處所定義之分化培養基中。於一甚至更佳的具體實施例中，SU5402以至少約5 μM、至少約6 μM、至少約7 μM、至少約8 μM、至少約9 μM，或至少約10 μM；或者在約5至約15 μM、約6至約14 μM、約7至約13 μM、約8至約12 μM、約9至約11 μM的範圍內使用，最佳終濃度約10 μM。於另一甚至更佳的具體實施例中，SU5402以至少約5 μM、至少約6 μM、至少約7 μM、至少約8 μM、至少約9 μM，或至少約10 μM；或者在約5至約15 μM、約6至約14 μM、約7至約13 μM、約8至約12 μM、約9至約11 μM的範圍內使用，最佳終濃度約10 μM。本發明進一步包含分化為RPE細胞之方法，該方法包含在本文別處所定義之分化培養基中培養該iPS細胞，其中將SU5402以如本文別處所定義之約10 μM的濃度施用於本文所定義之該分化培養基約10天，甚至更佳約連續10天，最佳使用約（連續）10天。當SU5402施用於本文所定義之第四分化培養基時，SU5402以濃度約為10 μM使用約2天，較佳約連續2天，意指在培養的第6至8天，甚至更佳使

用約（連續）2天。當SU5402施用於本文所定義之第五分化培養基時，SU5402以終濃度約為10 μM使用約8天，較佳約連續8天，意指在培養的第8至16天，甚至更佳使用約（連續）8天。

【0114】 當PD17307施用於本文別處所定義之分化培養基時，終濃度至少約0.5 μM、至少約0.6 μM、至少約0.7 μM、至少約0.8 μM、至少約0.9 μM、或至少約1 μM；或在約0.5至約1.5 μM、約0.6至約1.4 μM、約0.7至約1.3 μM、約0.8至約1.2 μM、約0.9至約1.1 μM的範圍內使用。於一較佳具體實施例中，PD17307以約1 μM的終濃度用於本文別處所定義之分化培養基中。於一甚至更佳的具體實施例中，PD17307以至少約0.5 μM、至少約0.6 μM、至少約0.7 μM、至少約0.8 μM、至少約0.9 μM，或至少約1 μM；或者在約0.5至約1.5 μM、約0.6至約1.4 μM、約0.7至約1.3 μM、約0.8至約1.2 μM、約0.9至約1.1 μM的範圍內使用，最佳終濃度為約1 μM。於另一甚至更佳的具體實施例中，PD17307以至少約0.5 μM、至少約0.6 μM、至少約0.7 μM、至少約0.8 μM、至少約0.9 μM，或至少約1 μM；或者在約0.5至約1.5 μM、約0.6至約1.4 μM、約0.7至約1.3 μM、約0.8至約1.2 μM、約0.9至約1.1 μM的範圍內使用，最佳終濃度為約1 μM。本發明進一步包含分化為RPE細胞之方法，該方法包含在本文別處所定義之分化培養基中培養該iPS細胞，其中將PD17307以如本文別處所定義之約1 μM的濃度施用於本文所定義之該分化培養基約10天，甚至更佳約連續10天，最佳使用約（連續）10天。當PD17307施用於本文所定義之第四分化培養基時，PD17307以濃度約為1 μM使用約2天，較佳約連續2天，意指在培養的第6天至第8天，甚至更佳使用約（連續）2天。當PD17307施用於本文所定義之第五分化培養基時，PD17307以終濃度約為1 μM使

用約8天，較佳約連續8天，意指在培養的第8至16天，甚至更佳使用約（連續）8天。

【0115】 當CHIR99021施用於本文別處所定義之分化培養基時，終濃度為至少約1 μM且小於約3 μM、至少約1.1 μM且小於約3 μM、至少約1.2 μM且小於約3 μM、至少約1.3 μM且小於約3 μM、至少約1.4 μM且小於約3 μM、至少約1 μM且小於約2.5 μM、至少約1 μM且小於約2 μM、至少約1 μM且小於約1.9 μM、至少約1 μM且小於約1.8 μM、至少約1 μM且小於約1.7 μM、至少約1 μM且小於約1.6 μM。於一較佳具體實施例中，CHIR99021以約1.5 μM的終濃度用於本文別處所定義之分化培養基中。如本文所定義之分化培養基中使用的CHIR99021可用於培養細胞（亦即分化或已經分化為RPE細胞的本發明之iPS細胞）連續培養約3天。於一更佳的具體實施例中，CHIR99021以約1.5 μM的終濃度用於本文別處所定義之分化培養基中，用於培養細胞（亦即分化或已經分化為RPE細胞的本發明之iPS細胞）約連續3個培養日。

【0116】 於一甚至更佳的具體實施例中，CHIR99021以至少約1 μM且小於約3 μM、至少約1.1 μM且小於約3 μM、至少約1.2 μM且小於約3 μM、至少約1.3 μM且小於約3 μM、至少約1.4 μM且小於約3 μM、至少約1 μM且小於約2.5 μM、至少約1 μM且小於約2 μM、至少約1 μM且小於約1.9 μM、至少約1 μM且小於約1.8 μM、至少約1 μM且小於約1.7 μM、至少約1 μM且小於約1.6 μM的濃度使用，最佳終濃度為約1.5 μM。於一甚至更佳的具體實施例中，CHIR99021以至少約1 μM且小於約3 μM、至少約1.1 μM且小於約3 μM、至少約1.2 μM且小於約3 μM、至少約1.3 μM且小於約3 μM、至少約1.4 μM且小於約3 μM、至少約1 μM且小於約2.5 μM、至少約1 μM且小於約2 μM、至少約1 μM且小於約1.9 μM、至少約1

μM且小於約1.8 μM、至少約1 μM且小於約1.7 μM、至少約1 μM且小於約1.6 μM的終濃度用於本文別處所定義之第五分化培養基中，以培養分化或已經分化為RPE細胞的細胞，亦即本發明之iPS細胞，持續約3個連續培養日，最佳以約1.5 μM的終濃度培養細胞（亦即分化或已經分化為RPE細胞的本發明之iPS細胞）持續約3個連續培養日（意指培養的第8天至第11天）。

【0117】 當CHIR99021施用於分化培養基，較佳為如上定義之第五分化培養基，CHIR99021再次施用於分化培養基以隨後進行培養細胞（亦即分化或已經分化為RPE細胞的本發明之iPS細胞），較佳為隨後培養該細胞（亦即分化或已經分化為RPE細胞的本發明之iPS細胞）持續約5個連續培養日。於一較佳具體實施例中，然後以約3 μM的終濃度將CHIR99021用於隨後培養細胞（亦即分化或已經分化為RPE細胞的本發明之iPS細胞），甚至更佳隨後培養細胞（亦即分化或已經分化為RPE細胞的本發明之iPS細胞）持續約5個連續培養日（意指培養的第11天至第16天）。藉由逐漸增加終濃度至1.5 μM 3天，然後增加至 3 μM 5天，色素RPE細胞的產量得到提高。

【0118】 本發明進一步包含分化為RPE細胞之方法，該方法包含在本文別處所定義之分化培養基中培養該iPS細胞，其中使用CHIR99021培養約8天，較佳連續培養約8天，甚至更較地，其中在以CHIR99021培養約8天的（連續）前3天，使用CHIR99021的終濃度至少約1 μM且小於約3 μM、至少約1.1 μM且小於約3 μM、至少約1.2 μM且小於約3 μM、至少約1.3 μM且小於約3 μM、至少約1.4 μM且小於約3 μM、至少約1 μM且小於約2.5 μM、至少約1 μM且小於約2 μM、至少約1 μM且小於約1.9 μM、至少約1 μM且小於約1.8 μM、至少約1 μM小於約1.7

μM、至少約1 μM且小於約1.6 μM，最佳終濃度為約1.5 μM，其中在以CHIR99021培養約8天的接下來的（連續）5天中，以約3 μM的終濃度施用CHIR99021。

【0119】 於一最佳的具體實施例中，該分化培養基包含第一分化培養基，其包含約1 μM LDN-193189、約10 ng/ml DKK1、約10 ng/ml IGF1，以及約10 mM菸鹼醯胺。於另一最佳的具體實施例中，該分化培養基包含第二分化培養基，其包含約0.2 μM LDN-193189、約10 ng/ml DKK1、約10 ng/ml IGF1、約10 mM菸鹼醯胺，以及約5 ng/ml b-FGF。於另一最佳的具體實施例中，該分化培養基包含第三分化培養基，其包含約10 ng/ml DKK1、約10 ng/ml IGF1，以及約100 ng/ml活化素A。於另一最佳的具體實施例中，該分化培養基包含第四分化培養基，其包含約100 ng/ml活化素A以及約10 μM SU5402，較佳包含約100 ng/ml活化素A以及約1 μM PD17307。於另一最佳的具體實施例中，該分化培養基包含第五分化培養基，其包含約100 ng/mL活化素A、約10 μM SU5402，以及約1.5 μM CHIR99021，較佳包含約100 ng/mL活化素A、約1 μM PD17307，以及約1.5 μM CHIR99021。於另一最佳的具體實施例中，該分化培養基包含在分化方法中施用第一次該第五分化培養基之後施用的另一次該第五分化培養基，其包含約100 ng/mL活化素A、約10 μM SU5402，以及約3 μM CHIR99021，較佳包含約100 ng/mL活化素A、約1 μM PD17307，以及約3 μM CHIR99021。

【0120】 於本發明之一較佳具體實施例中，當在分化方法中培養iPS細胞時，包含在本文別處所定義之第一分化培養基中培養該細胞約2天，較佳地在本文別處所定義之第一分化培養基中連續培養約2天，意指從第0天至第2天，iPS細胞首先暴露於本文所定義之第一分化培養基。

【0121】於另一較佳具體實施例中，當於本發明之方法中培養iPS細胞時，包含在如本文別處所定義之第二分化培養基中培養該細胞約2天，較佳地包含在如別處所定義之第一分化培養基中培養該細胞約2天，隨後在如本文別處所定義之第二分化培養基中培養該細胞約2天，甚至更佳地包含在如本文別處所定義之第一分化培養基中培養該細胞約連續2天，隨後在如本文別處所定義之第二分化中培養該細胞約連續2天。意指於本發明之方法中培養iPS細胞的第2天，iPS細胞可從第2天至第4天暴露於該第二分化培養基。

【0122】於另一較佳具體實施例中，當於本發明之方法中培養iPS細胞時，包含在本文別處所定義之第三分化培養基中培養該iPS細胞約2天，較佳包含在本文別處所定義之第一分化培養基中培養該iPS細胞約2天，隨後在如本文別處所定義之第二分化培養基中培養該iPS細胞約2天，隨後在如本文別處所定義之第三分化培養基中培養該iPS細胞約2天，甚至更佳地，包含在本文別處所定義之第一分化培養基中培養該iPS細胞約連續2天，隨後在本文別處所定義之第二分化培養基中培養該iPS細胞約連續2天，隨後在本文別處所定義之第三分化培養基中培養該iPS細胞約連續2天。意指於本發明之方法中培養iPS細胞的第4天，iPS細胞可從第4天至第6天暴露於該第三分化培養基。

【0123】於另一較佳具體實施例中，當於本發明之方法中培養iPS細胞時，包含在本文別處所定義之第四分化培養基中培養該iPS細胞約2天，較佳包含在本文別處所定義之第一分化培養基中培養該iPS細胞約2天，隨後在如本文別處所定義之第二分化培養基中培養該iPS細胞約2天，隨後在如本文別處所定義之第三分化培養基中培養該iPS細胞約2天，隨後在如本文別處所定義之第四分化培養基中培養該iPS細胞約2天，甚至更佳地，包含在本文別處所定義之第一分化培養基中

培養該iPS細胞約連續2天，隨後在本文別處所定義之第二分化培養基中培養該iPS細胞約連續2天，隨後在本文別處所定義之第三分化培養基中培養該iPS細胞約連續2天，隨後在如本文別處所定義之第四分化培養基中培養該iPS細胞約2天。意指於本發明之方法中培養iPS細胞的第6天，iPS細胞可從第6天至第8天暴露於該第四分化培養基。

【0124】 於另一較佳具體實施例中，當於本發明之方法中培養iPS細胞時，包含在如本文別處所定義之第五分化培養基中培養該iPS細胞約8天，較佳包含在本文別處所定義之第一分化培養基中培養該iPS細胞約2天，隨後在如本文別處所定義之第二分化培養基中培養該iPS細胞約2天，隨後在如本文別處所定義之第三分化培養基中培養該iPS細胞約2天，隨後在如本文別處所定義之第四分化培養基中培養該iPS細胞約2天，隨後在如本文別處所定義之第五分化培養基中培養該iPS細胞約8天，甚至更佳地，包含在本文別處所定義之第一分化培養基中培養該iPS細胞約連續2天，隨後在本文別處所定義之第二分化培養基中培養該iPS細胞約連續2天，隨後在本文別處所定義之第三分化培養基中培養該iPS細胞約連續2天，隨後在如本文別處所定義之第四分化培養基中培養該iPS細胞約2天，隨後在如本文別處所定義之第五分化培養基中培養該iPS細胞約8天。意指於本發明之方法中培養iPS細胞的第8天，iPS細胞可從第8天至第16天暴露於該第五分化培養基。

【0125】 於本發明之一甚至更佳的具體實施例中，當於本發明之方法中培養iPS細胞時，包含在本文別處所定義之第五分化培養基中培養約4天，該培養基包含如本文別處所定義之至少約1 μM且小於約3 μM濃度的CHIR99021，然後隨後在包含約3 μM濃度的CHIR99021的第五分化培養基中再培養約4天，最佳包含

在該第一分化培養基中培養約2天，隨後在該第二分化培養基中培養約2天，隨後在該第三分化培養基中培養約2天，隨後在該第四分化培養基中培養約2天，隨後在包含如本文別處所定義之至少約1 μM且小於約3 μM濃度的CHIR99021的第五分化培養基中培養約4天，隨後在包含約3 μM濃度的CHIR99021的第五分化培養基中再培養約4天。於此情況下，在特定培養基中培養的術語「天數」也可與術語「連續天數」互換。意指於本發明之方法中培養的第8天起，自第8天至第11天，細胞可暴露於包含如本文別處所定義之至少約1 μM且小於約3 μM濃度的CHIR99021的第五分化培養基，然後在第11天，自第11天至第16天將細胞暴露於包含約為3 μM濃度的CHIR99021的第五分化培養基。

【0126】 因此，本發明進一步包含將iPS細胞分化為RPE細胞之方法，其中iPS細胞在分化培養基中總共培養約11至約21天、約12至約20天、約13至約19天、約14至約18天、約15至約17天，較佳總共約16天，甚至更佳約連續11至約21天、約連續12至約20天、約連續13至約19天、約連續14至約18天、約連續15至約17天，最佳約連續16天。

【0127】 於本發明之另一個具體實施例中，將iPS細胞分化為RPE細胞之方法進一步較佳包含在如本文所定義之分化培養基中培養該iPS細胞之前，在mTESR1培養基中培養該iPS細胞。CLiPs以及作為參考細胞株的人類ES細胞可在mTeSR1培養基中的基質膠包覆的組織培養盤上生長。當細胞達到約90至約95%匯合時，將細胞暴露於本文別處所定義之分化培養基，較佳為暴露於本文所定義之第一分化培養基，甚至更佳為暴露於本文所定義之第一分化培養基，隨後暴露於本文所定義之第二、第三、第四以及第五分化培養基。於一較佳具體實施例中，將iPS細胞分化為RPE細胞之方法進一步包含在mTESR1培養基中培養iPS細胞約

1至約4個培養日，然後在本文所定義之分化培養基中培養iPS細胞，更佳為在如本文所定義之第一分化培養基中培養iPS細胞之前，最佳為在如本文所定義之第一分化培養基中培養iPS細胞之前，隨後在如本文所定義之第二、第三、第四以及第五分化培養基中培養。

【0128】 於本發明之另一個具體實施例中，將iPS細胞分化為RPE細胞之方法較佳進一步包含在視網膜色素上皮維持（簡稱：RPEM）培養基中培養RPE細胞。根據本發明，在分化培養基中培養iPS細胞，然後分化為RPE細胞之後，分化培養基可被RPEM培養基替代，如下文所定義。較佳地，在該RPEM培養基中培養RPE細胞可在培養第16天之後開始(特別是在如本文別處所定義之第五分化培養基中培養細胞之後)。於一較佳具體實施例中，本發明之分化方法中該RPEM培養基包含約50%的DMEM/F12以及約50%的最低必需培養基（MEM），其包含0.5x N1補充劑以及1x NEAA。於一更佳具體實施例中，本發明之分化方法的RPEM培養基進一步包含熱滅活胎牛血清（FBS）、Glutamax、牛磺酸、氫羥腎上腺皮質素、3,3',5-三碘-L-甲狀腺原胺酸素、青黴素/鏈黴素、菸鹼醯胺，或丙酮酸鈉中的至少一種。於一甚至更佳的具體實施例中，本發明之分化方法中該RPEM培養基進一步包含熱滅活胎牛血清（FBS）、Glutamax、牛磺酸、氫羥腎上腺皮質素、3,3',5-三碘-L-甲狀腺原胺酸素、青黴素/鏈黴素、菸鹼醯胺，以及丙酮酸鈉。於一最佳具體實施例中，本發明之分化方法中該RPEM培養基進一步包含約2%熱滅活胎牛血清（FBS）、1x Glutamax、約0.25 mg/mL牛磺酸、約0.02 μg/mL氫羥腎上腺皮質素、約0.013 ng/mL 3,3',5-三碘-L-甲狀腺原胺酸素、1x青黴素/鏈黴素、約10 mM菸鹼醯胺，以及1x丙酮酸鈉。

【0129】本發明進一步包含本文別處所定義之該分化方法，其中RPE細胞在本文別處所定義之該RPEM培養基中培養約9至約29天、約10至約28天、約11至約27天，約12至約26天、約13至約25天、約14至約24天、約15至約23天、約16至約22天、約17至約21天、約18至約20天，較佳約19天，甚至更佳約連續19天。在該培養基中培養該RPE細胞期間，可以每約2至約3天更換RPEM培養基，較佳在該RPE細胞培養約9至約29天、約10至約28天、約11至約27天、約12至約26天、約13至約25天、約14至約24天、約15至約23天、約16至約22天、約17至約21天、約18至約20天，更佳在培養該RPE細胞期間約19天，甚至更佳約連續19天的期間每約2至約3天更換一次。

【0130】本發明進一步包含如本文別處所定義之該分化方法，其中在如本文所定義之分化培養基中培養iPS細胞以及在如本文所定義之RPEM培養基中培養RPE細胞包含約20至約50天、約25至約45天、約30至約40天，較佳約30至約35天，最佳約35天，特別是具有在本文別處所定義之分化培養基中培養約16天的iPS細胞，以及具有在本文別處所定義之RPEM培養基中培養約19天的分化的RPE細胞。

【0131】本發明進一步包含如本文別處所定義之該分化方法，進一步較佳包含在該RPEM培養基中培養該RPE細胞後純化RPEM培養基中的RPE細胞。分化後存在RPE細胞以及非RPE細胞的混合物，為何進一步的純化步驟會有所幫助，因此分化盤可能只有純RPE細胞（**圖20**）。分化方法的額外純化步驟較佳包含a）根據色素沈澱人工識別RPE細胞，其中根據色素沈澱人工識別RPE細胞較佳包含藉由顯微鏡選擇，更佳藉由本領域技術人員已知的明場顯微鏡進行選擇。此步驟可參考RPE細胞的人工純化。特別是，根據色素沈澱人工識別RPE細胞可

藉由去除非RPE細胞來執行，非RPE細胞具有比RPE細胞更少的色素沈澱以及不同的細胞形態，藉由以接在一移液器上的微量吸管尖進行人工刮擦，同時透過顯微鏡（例如明場顯微鏡）進行觀察。還可包含洗滌，特別是以PBS洗滌約3次，以除去所有非RPE細胞。此外或可選擇地，該分化方法的額外純化步驟較佳包含b）繼代RPE細胞，其中繼代RPE細胞較佳包含以Accutase或TrypLE，最佳以TrypLE處理RPE細胞。此步驟可指RPE細胞的繼代純化。特別是，RPE細胞的繼代可藉由分離非RPE細胞並藉由以溫和的解離劑如Accutase或TrypLE，較佳以TrypLE處理去除非RPE細胞來進行。RPE細胞可能仍附著在培養盤上。然後可進一步包含用溫和的解離劑例如Accutase或TrypLE，較佳以TrypLE再次處理剩餘的RPE細胞，並進一步繼代該RPE細胞。於本文中，術語「繼代RPE細胞」係指在以溫和的解離劑（例如Accutase或TrypLE，較佳為TrypLE）分離並去除非RPE細胞後，對剩餘的RPE細胞進行接種於培養盤上，並以溫和的解離劑（如Accutase或TrypLE，較佳為TrypLE）再次處理該剩餘的RPE細胞。如果使用TrypLE，則所述步驟可指RPE細胞的TrypLE純化。另外地或可選擇地，分化方法的額外純化步驟較佳地包含c）如本文別處所定義之色素沈澱人工識別RPE細胞以及如本文別處所定義之繼代RPE細胞的組合。雖然藉由繼代RPE細胞進行的純化，較佳使用上述TrypLE純化，可去除大部分非RPE細胞/細胞團塊，但仍可能存在一些小團塊，這些小團塊可藉由本文所定義之人工純化去除。另外地或可選擇地，分化方法的額外純化步驟較佳地包含d）繼代RPE細胞以及根據這些細胞的色素沈澱散射分選RPE細胞的組合。該純化步驟可藉由去除如上所定義之非RPE細胞並以溫和的解離劑例如Accutase或TrypLE，較佳為TrypLE進一步處理該剩餘的RPE細胞，並在散射分選中進一步處理RPE細胞來進行，其中藉由溫和的解離劑（如

Accutase或TrypLE，較佳為TrypLE）去除的非RPE細胞可用於設定散射低細胞的門控。另外地或可選擇地，分化方法的額外純化步驟較佳地包含e）根據RPE細胞的色素沈澱散射分選RPE細胞的組合。此步驟可參考RPE細胞的散射分選純化。特別是，散射分選RPE細胞可藉由在任何FACS緩衝液中重新懸浮解離的單細胞（藉由使用溫和的解離劑如Accutase或TrypLE，較佳為TrypLE）並使其通過一過濾器以獲得單細胞來進行，並使用例如本領域技術人員已知的任何FACS細胞分選儀將該些單細胞分為高散射部分及低散射部分。

【0132】藉由比較本文所定義之不同RPE純化方法，發現包含以Accutase或TrypLE（較佳以如上定義之TrypLE）處理RPE細胞的RPE細胞繼代產生高RPE產率（約47%），且相較於人工純化RPE細胞，該方法更容易且更快，因此可惟較佳方法。繼代RPE細胞包含以Accutase或TrypLE（較佳以如上定義之TrypLE）處理RPE細胞，然後根據它們的色素沈澱人工識別RPE細胞，亦如本文別處所定義，不僅得到高RPE產率（約43%），還有最高純度的細胞（約99% PMEL17陽性細胞），這可能對移植來說最重要。此外，RPE細胞的繼代包含以Accutase或TrypLE（較佳為如上定義之TrypLE）處理RPE細胞，然後根據這些細胞的色素沈澱人工識別RPE細胞，亦如本文別處所定義，這也是最容易執行的，因為部分TrypLE處理可在純化所需的短時間內去除大部分的非RPE細胞。總而言之，包含以Accutase或TrypLE（較佳為TrypLE）處理RPE細胞並結合人工識別RPE細胞的RPE細胞繼代純化，涉及額外的人工純化步驟以去除可能逃脫以溫和的解離劑如Accutase或TrypLE（較佳為TrypLE）處理的任何非RPE細胞，且為本發明之方法中最佳純化RPE細胞的方法。

【0133】 本發明進一步包含如本文別處所定義之該分化方法，其中衍生自臍帶羊膜幹細胞並用於分化為RPE細胞之方法的iPS細胞，特別是藉由在適合重新編程幹細胞的條件下，在臍帶羊膜幹細胞中表現編碼蛋白質OCT3/4、SOX2、KLF4、LIN28以及L-MYC以及p53-shRNA的外源核酸，如本文別處所定義之產生誘導性多能幹細胞之方法也包含於本發明中。於一較佳具體實施例中，本發明進一步包含如本文別處所定義之該分化方法，其中該臍帶羊膜幹細胞中編碼蛋白質OCT3/4、SOX2、KLF4、LIN28以及L-MYC以及p53-shRNA的外源核酸由一個、兩個或三個載體提供，其中較佳為一第一載體編碼蛋白質OCT3/4以及53-shRNA，一第二載體編碼蛋白質SOX2以及KLF4，一第三載體編碼蛋白質L-MYC以及LIN28。總而言之，關於如本文別處所定義的產生誘導性多能幹細胞的方法（然後根據該分化方法將iPS細胞分化為RPE細胞）的每個公開內容都可以適用，必要時也適用於將iPS細胞分化成RPE細胞的方法。

【0134】 本發明還涉及藉由本文所述之分化方法可獲得之RPE細胞培養物/RPE細胞，以及藉由本文所述之分化方法獲得之RPE細胞培養物/RPE細胞。本發明還涉及一種視網膜色素上皮細胞，其包含或由透過本文所述之分化方法可獲得或獲得之視網膜色素上皮細胞培養物/RPE細胞所組成。

【0135】 本發明還涉及一種醫藥組合物，其包含透過本文所述之分化方法可獲得/獲得之RPE細胞培養物/RPE細胞。包含分化的RPE細胞/包含分化的RPE細胞的RPE細胞培養物的醫藥組合物之實例為注射溶液或適合植入分化的RPE細胞的任何種類的移植物。當該醫藥組合物為注射液時，該組合物可包含藉由本文所述之分化方法可獲得/獲得之RPE細胞培養物。當該醫藥組合物為適合植入的移植物時，該組合物可包含可植入基質，較佳為聚酯基質，甚至更佳為transwell

中的聚酯基質，該基質包覆有藉由本文所述之分化方法可獲得/獲得之該分化的RPE細胞，該分化的RPE細胞可能已經在該基質上生長。於本文中，在如本文所定義之該基質上生長的RPE細胞可指藉由如本文所述之分化方法可獲得/獲得之該RPE細胞培養物。如本領域技術人員已知的，該醫藥組合物可配製/適用於胃腸外或局部施用。於此情況下，腸胃外施用可包含目的在用於人體或動物體內注射、輸注或植入的無菌製劑。如本文所用，局部施用較佳指視網膜下應用。如果該醫藥組合物係指如上關於可植入基質所定義之移植物，則該組合物可被配製/適合於視網膜下（在眼睛的視網膜下）施用，換言之，可被移植到視網膜下。本發明進一步包含用於研究目的之診斷組合物，其包含RPE細胞（培養物）以及基質膠。該組合物還指適合植入如本文所定義之個體的移植物，其中將藉由如本文所定義之方法分化的該RPE細胞與基質膠混合，然後將移植物（基質膠中的細胞）植入該個體。若該診斷組合物係指如上關於基質膠所定義之移植物，則該組合物可配製/適合皮下施用，換言之可皮下移植。

【0136】藉由如本文所述之分化方法可獲得/獲得之RPE細胞培養物也包含在視網膜色素上皮細胞中，及/或進一步包含在如本文別處所定義之醫藥組合物中，可指多個RPE細胞，這些細胞藉由該分化方法可獲得/獲得，且較佳包含用於該RPE細胞的培養基。術語「群體」亦可與術語「培養物」互換使用。包含在該RPE細胞培養物中的藉由本發明之分化方法可獲得/獲得之該分化的RPE細胞可進一步具有下列特徵：相較於皮膚iPS衍生的RPE，該分化的RPE細胞首先可包含更高百分比的色素沈澱區域。藉由視覺分級，本發明測試的所有四株CLiPS（其可選自由CLMC23、CLMC30、CLMC44以及CLEC23所組成的群組）使用本文所定義之分化培養基產生約30至約100%、約50至約100%、約70至約100%的色素沈

澱RPE細胞，相較之下，僅有30%的皮膚iPS細胞（例如Asf5、AGO及/或HDFA）實現了類似的色素沈澱（**圖13**）。此外，另外包含在該培養物中的該分化的RPE細胞可表現BEST1、PMEL17、MITF、酪胺酸酶、TRYP2、ZO-1、RPE65、RLBP1或MERTK中的至少任何一種，或所有列出的蛋白質標記的組合（**圖15**、**16**以及**18**）。於一具體實施例中，另外包含在該培養物中的該分化的RPE細胞可表現蛋白質標記BEST1。於另一具體實施例中，另外包含在該培養物中的該分化的RPE細胞可表現蛋白質標記PMEL17。於另一具體實施例中，另外包含在該培養物中的該分化的RPE細胞可表現蛋白質標記MITF。於另一具體實施例中，另外包含在該培養物中的該分化的RPE細胞可表現蛋白質標記酪胺酸酶。於另一具體實施例中，另外包含在該培養物中的該分化的RPE細胞可表現蛋白質標記TRYP2。於另一具體實施例中，另外包含在該培養物中的該分化的RPE細胞可表現蛋白質標記ZO-1。於另一具體實施例中，另外包含在該培養物中的該分化的RPE細胞可表現蛋白質標記RPE65。於另一具體實施例中，另外包含在該培養物中的該分化的RPE細胞可表現蛋白質標記RLBP1。於另一具體實施例中，另外包含在該培養物中的該分化的RPE細胞可表現蛋白質標記MERTK。因此，相較於ES衍生的RPE細胞（例如本文使用的H9細胞），CLiPS衍生的RPE細胞的色素沈澱度更高。這與色素沈澱相關基因的更高表現有關，例如MITF、PMEL17、酪胺酸酶以及TRYP2（**圖15**）。此外，另外包含在該培養物中的該分化的RPE細胞的特徵可為缺乏或減少細胞週期增殖標記Ki67的表現。不存在成熟RPE標記RPE65以及作為增殖標記的Ki67的表現，證實成熟及靜止狀態，這反映了根據本文別處所定義之方法從CLiPS分化的此類RPE細胞的存活率（**圖22**）。

【0137】更詳細而言，藉由如本文所定義之方法可獲得/獲得之RPE細胞的特徵還可為，相對於從胚胎幹細胞（ES）（其產生的細胞或培養物）分化的RPE細胞，本文所定義之RPE細胞的BEST1表現倍數變化為至少約2、至少約2.1、至少約2.2、至少約2.3、至少約2.3、約2.4、至少約2.5、至少約2.6、至少約2.7、至少約2.8、至少約2.9、至少約3或更多倍，較佳約3倍。另外地或可選擇地，藉由本文所定義之方法可獲得/獲得之RPE細胞的特徵還可為，相對於自ES（其產生的細胞或培養物）分化的RPE細胞，本文所定義之RPE細胞的PMEL17表現倍數變化為至少約0.9、至少約0.91、至少約0.92、至少約0.93、至少約0.93、至少約0.94、至少約0.95、至少約1、至少約1.1、至少約1.2、至少約1.3或更多倍，較佳約1.3倍。因此，CLiPS-RPE在分化後包含更高百分比的PMEL17陽性細胞。發現在分化方法中使用的CLiPS（例如CLMC23、CLMC30以及CLEC23）包含約89%至約95%純度的RPE細胞。相較之下，所使用的3種皮膚iPS細胞中只有一種具有高於約90%的純度（**圖14**），例如Asf5、AGO及/或HDFA。另外地或可選擇地，藉由如本文所定義之方法可獲得/獲得之RPE細胞的特徵還可為，相對於自ES（其產生的細胞或培養物）分化的RPE細胞，本文所定義之RPE細胞的MITF表現倍數變化為至少約4.5、至少約5、至少約5.5、至少約6、至少約6、至少約6.5、至少約6.6、至少約6.7、至少約6.8或更多倍，較佳約6.8倍。另外地或可選擇地，藉由如本文所定義之方法可獲得/獲得之RPE細胞的特徵還可為，相對於自ES（其產生的細胞或培養物）分化的RPE細胞，本文所定義之RPE細胞的TRYP2表現倍數變化為至少約2.9、至少約3、至少約3.5、至少約4、至少約4、至少約4.1、至少約4.2、至少約4.3或更多倍，較佳約4.3倍。另外地或可選擇地，藉由如本文所定義之方法可獲得/獲得之RPE細胞的特徵還可為，相對於自ES（其產生的細胞或培

養物）分化的RPE細胞，本文所定義之RPE細胞的RPE65表現倍數變化為至少約0.6、至少約0.7、至少約0.8、至少約0.9、至少約0.91、至少約0.92、至少約0.93、至少約0.94、至少約0.95、至少約0.96或更多倍，較佳約0.96倍。另外地或可選擇地，藉由如本文所定義之方法可獲得/獲得之RPE細胞的特徵還可為，相對於自ES（其產生的細胞或培養物）分化的RPE細胞，本文所定義之RPE細胞的RLBP1表現倍數變化為至少約17.5、至少約18、至少約19、至少約20、至少約21、至少約22、至少約23、至少約24、至少約25、至少約26，至少約26.1、至少約26.2或更多倍，較佳約26.2倍。另外地或可選擇地，藉由如本文所定義之方法可獲得/獲得之RPE細胞的特徵還可為，相對於自ES（其產生的細胞或培養物）分化的RPE細胞，本文所定義之RPE細胞的MERTK表現倍數變化為至少約6、至少約6.5、至少約7、至少約7.5、至少約8、至少約8.5、至少約9、至少約9.1或更多倍，較佳約9.1倍（**圖20k**）。在此上下文中，這種用於比較且已經分化出RPE細胞的ES細胞可指H9 ES細胞。

【0138】 於本文中，術語「相對於」或「至」亦可替換為術語「相較於」，將兩個細胞（例如作為測試細胞的CLMC23以及作為參考細胞的H9）相互比較，例如關於基因表現，表示為測試細胞相對於參考細胞的倍數變化。如本文所用，「倍數變化」是描述數量從初始值到最終值變化多少的量度。例如，初始值30以及最終值60對應於倍數變化為2，或者白話說法為增加兩倍。倍數變化簡單地計算為最終值與初始值的比例，亦即如果初始值為A，最終值為B，則倍數變化為B/A。可以關於如本文所述之標記的mRNA含量獲得倍數變化。這種倍數變化可使用RT-qPCR來測量。

【0139】 還發現，CLiPS衍生的RPE可實現跨上皮電阻（簡稱：TEER），類似於自ES（其產生的細胞或培養物）及/或自皮膚iPS（其產生的細胞或培養物）分化的RPE細胞。CLiPS-RPE還表現出高吞噬作用，類似於自ES（其產生的細胞或培養物）及/或自皮膚iPS（其產生的細胞或培養物）分化的RPE細胞（**圖17**）。

【0140】 另外地或可選擇地，藉由本文所定義之方法可獲得/獲得之RPE細胞的特徵還可為包含相對於自ES及/或相對於自皮膚iPS分化而來的RPE細胞，本發明之RPE細胞增加的耗氧率（oxygen consumption rate，OCR）及/或細胞外酸化率（extracellular acidification rate，ECAR）。這些特徵是指該RPE的生物能量學顯示對糖酵解及/或粒線體呼吸的增加。糖酵解功能藉由ECAR量化，而氧化磷酸化（oxidative phosphorylation，oxPhos）則藉由OCR量化（**圖21**）。

【0141】 於此情況下，OCR可包含基礎呼吸、ATP產生、最大容量及/或備用呼吸容量。本文中關於OCR的術語「增加」係指，相對於自ES及/或相對於自皮膚iPS分化的RPE細胞，本發明之RPE細胞的OCR增加至少約30%、至少約31%、至少約32%、至少約33%、至少約34%、至少約35%、較佳至少約35%；或約30至約45%，約31至約44%，約32至約43%、約33至約42%，約35至約40%。更詳細地說，i）相對於自ES分化的RPE細胞及/或相對於自皮膚iPS分化的RPE細胞，本發明之RPE細胞的基礎呼吸增加約38%；ii）相對於自ES分化的RPE細胞及/或相對於自皮膚iPS分化的RPE細胞，本發明之RPE細胞的ATP產生增加約40%；iii）相對於自ES分化的RPE細胞及/或相對於自皮膚iPS分化的RPE細胞，本發明之RPE細胞的最大容量增加約35%；iv）相對於自ES分化的RPE細胞及/或相對於自皮膚iPS分化的RPE細胞，本發明之RPE細胞的備用呼吸能力增加了約36%。

【0142】 此外，於本文中，ECAR可包含糖酵解、糖酵解能力及/或糖酵解儲備。本文中關於ECAR的術語「增加」係指，相對於自ES及/或相對於自皮膚iPS分化的RPE細胞，本發明之RPE細胞的的ECAR增加了至少約20%、至少約21%、至少約22%、至少約23%、至少約24%%、至少約25%、至少約30%、至少約35%、至少約40%、至少約45%、至少約50%；或約20%至約55%、約25%至約55%、約25%至約50%。更詳細地說，i）相對於自ES分化的RPE細胞及/或相對於自皮膚iPS分化的RPE細胞，本發明之RPE細胞的糖酵解增加約25%；ii）相對於自ES分化的RPE細胞及/或相對於自皮膚iPS分化的RPE細胞，本發明之RPE細胞的糖酵解能力增加約37%；iii）相對於自ES分化的RPE細胞及/或相對於自皮膚iPS分化的RPE細胞，本發明之RPE細胞的糖酵解儲備增加約50%。

【0143】 此外，附加地或可選擇地，藉由本文所定義之方法可獲得/獲得之RPE細胞的特徵還可為，相對於自ES（其產生的細胞或培養物）分化的RPE細胞，本文所定義之RPE細胞具有/包含以下更詳細定義的較少免疫原性。在本文中並且還關於如下文定義之體內方法，較低免疫原性係指RPE細胞，較佳地預先遞送至個體，從中獲得包含該RPE細胞的樣品用於進一步分析該細胞，具有降低的全身免疫反應，這可能是指參與細胞免疫反應誘導的促進發炎細胞激素含量降低，較佳為IFN-γ及/或IL-18（如細胞免疫反應的替代物）及/或IL-23及/或IL17A，參與T細胞活化的細胞激素，該降低的細胞激素含量由該個體產生，該RPE細胞之前已被預遞送，特別是藉由存在於該個體體內並且也包含在該樣品中的該免疫細胞。該RPE細胞中的這種全身免疫反應的降低也可指免疫細胞的積累減少，較佳地在如實施例部分所定義之注射部位。降低的全身性免疫反應因此可包含，相對於自ES分化的RPE細胞及/或相對於自皮膚iPS分化的RPE細胞，本文定義之

RPE細胞具有降低的全身性T細胞活化，較佳為減少/抑制CD8細胞毒性T細胞活化。

【0144】本發明進一步包含一種治療個體視網膜退化性疾病之方法，其中該個體可以選自包含下列之群組：小鼠、大鼠、兔、豬、狗、貓、非人靈長類動物（猿猴）或人類。於一較佳實施例中，該個體為一人類。於本文中，治療可包含對一個體施用如本文所定義之藉由如本文描述的分化方法從CLiPS分化的RPE細胞及/或藉由本發明之方法獲得之該RPE細胞培養物及/或如本文所定義之醫藥組合物。藉由本文所定義之方法可獲得/獲得的該分化細胞/培養物適用於在視網膜退化性疾病的特定治療中施用，藉由以下事實證明：該RPE細胞包含低免疫原性特性，例如產生促進發炎細胞激素的含量降低，較佳為以IFN-γ及/或IL-18作為替代物，且具有降低的細胞免疫反應，較佳在將該如本文所定義之分化的RPE細胞預注射到個體中之後（**圖23**）。這表示本發明之該RPE細胞可減少RPE細胞注射到個體的局部部位的免疫細胞浸潤。此外，已經證明，在進行細胞激素分析前，相對於自預先遞送自ES分化的RPE細胞至一參考個體所獲得的樣本，及/或相對於自預先遞送自皮膚iPS分化的RPE細胞至參考個體所獲得的樣本，自預先遞送如本文定義之分化的RPE細胞至該個體所獲得的樣本所包含的涉及T細胞活化的細胞激素，IL-23及/或IL17A的含量降低。總之，如本文所定義之該RPE細胞可能能夠產生降低含量的IL-23及/或IL17A，作為如本文所定義之促進發炎細胞激素的另一個較佳實例。此外，T細胞活化，特別是CD8細胞毒性T細胞活化，可在來自包含本發明之該RPE細胞的個體的樣品中被抑制。換言之，該RPE細胞可抑制T細胞活化，特別是CD8細胞毒性T細胞活化（**圖24**）。所治療的退化性疾病為本領域技術人員已知的視網膜疾病，較佳的視網膜退化性疾病為老年

性黃斑部受損（AMD）或視網膜營養不良。於一具體實施例中，本發明涉及一種如本文所定義之治療個體中的AMD之方法，包含對一個體施用從藉由如本文所定義之方法獲得之iPS細胞分化的RPE細胞。於另一具體實施例中，本發明涉及如本文所定義之治療個體視網膜營養不良之方法，包含對一個體施用從藉由如本文所定義之方法獲得之iPS細胞分化的RPE細胞。在該治療方法中施用該分化自CLiPS的RPE細胞可包含本領域技術人員已知的腸胃外或局部（較佳為視網膜下）施用。

【0145】本發明進一步包含一種在個體體內檢測藉由本文別處所定義之分化方法從iPS細胞分化的RPE細胞的存活率之方法，該方法包含步驟a）藉由本文所定義之方法將引入自iPS分化的RPE細胞引入個體，其中該RPE細胞包含生物發光標記。

【0146】於本文中，術語「存活率」係指RPE細胞尚未死亡且仍處於成熟及/或處於靜止狀態，其可藉由在將該細胞引入如本文所定義的該個體之後，檢測作為成熟RPE標記的RPE65的表現以及檢測作為增殖標記的Ki67的未表現來確認存活率，並在如進一步描述的一段時間內進行檢測。關於所定義之體內方法，監測存活率亦可在本文中互換使用。

【0147】步驟a）中的術語「引入（introduce）」或「引入（introducing）」係指將如本文所定義之該RPE細胞帶入該個體，關於使用小鼠作為個體以及如本文別處所定義之基質膠栓分析，較佳藉由將該RPE細胞移植至該個體體內，甚至更佳藉由將該RPE細胞皮下移植至該個體體內。根據體內方法及體外篩選方法在本文中使用的術語「個體」包含哺乳動物及非哺乳動物個體。該個體較佳為一動物。體內及體外方法的個體可指一哺乳動物，包含人類、家畜及農場動物、非人

類靈長類動物以及具有乳腺組織的任何其他動物。於一些具體實施例中，該哺乳動物為小鼠。於一些具體實施例中，該哺乳動物為大鼠。於一些具體實施例中，該哺乳動物為豚鼠。於一些具體實施例中，該哺乳動物為兔子。於一些具體實施例中，該哺乳動物為貓。於一些具體實施例中，該哺乳動物為狗。於一些具體實施例中，該哺乳動物為猴子。於一些具體實施例中，該哺乳動物為馬。於一較佳具體實施例中，作為本發明所述方法中使用的個體的哺乳動物/動物為小鼠。於一最佳的具體實施例中，作為所述方法中使用的個體的哺乳動物/動物為人源化小鼠。

【0148】 根據本發明分化並以體內方法引入本文所定義之該個體的RPE細胞包含生物發光標記。於本文中，術語「標記」可為螢光標記或適合生物發光的酶。當該標記為螢光標記時，其可為一螢光團（亦稱為螢光染料或發色團）。此類螢光團可為螢光染料中的任何一種，例如，但不限於螢光素（FITC）、Alexa Fluor 350、405、488、532、546、555、568、594、647、680、700、750、太平洋藍、香豆素、太平洋綠、Cy3、德克薩斯紅、PE、PerCP-Cy5、PE-Cy7、太平洋橙，或例如R-PE或APC的螢光蛋白，或例如CFP、EGFP、GFP或RFP等表現的螢光蛋白。當該標記為酶時，其可為但不限於螢光素酶，較佳選自細菌螢光素酶（*uxAB*）、螢光素酶、ren/7/a螢光素酶，以及螢火蟲螢光素酶。於一較佳具體實施例中，該RPE細胞根據本發明被分化並在體內方法中被引入如本文所定義之該個體，其包含生物發光酶基因編碼載體，較佳用如本文所定義之表現的螢光蛋白標記。於一最佳的具體實施例中，該RPE細胞根據本發明被分化並在體內方法中引入如本文所定義之該個體，其包含螢光素酶基因編碼載體，較佳以GFP標記。或者或另外，本文所定義之該體內方法的步驟a）進一步包含將藉由本文所定義

之方法分化的該RPE細胞引入個體中，如本領域技術人員已知的，該RPE細胞包含在RPE-基質膠栓中。如本領域技術人員所知，包含在基質膠栓中表示該RPE細胞與基質膠的混合物/組合物。

【0149】本文所定義之體內方法進一步包含步驟b）使用影像方法檢測該RPE細胞隨時間進程的生物發光訊號，進而收集影像數據。

【0150】當本文中關於體內方法使用的術語「檢測（detecting）或檢測（detection）」（亦可指「監測」）係指使用任何已知的影像方法在體內對該RPE細胞的生物發光進行視覺化以及定性分析，較佳若該生物發光標記為使用生物發光影像方法的螢光素酶。該RPE細胞的生物發光訊號的檢測是根據體內方法的步驟b）隨時間進行的，該時間可指至少約2天、約7天、約10天、約14天、約17天、約21天、約24天、約28天、約35天、約42天、約49天，或至少約56天；或約2至約56天，或約2至約49天。該生物發光的檢測較佳在如本文所定義之所述時間過程中以規則的間隔監測。生物發光的檢測可指本領域技術人員已知的以p/s/cm2/sr表示的該細胞的總輻射的檢測。藉由隨時間對該生物發光訊號的檢測來收集影像數據。

【0151】如本文所定義之體內方法進一步包含步驟c），將在步驟b）中接收的影像數據與參考影像數據進行比較。於本文中，參考影像數據係指自ES細胞（較佳為H9細胞）分化及/或自皮膚iPS（較佳為HDFA或ASF5）分化的RPE細胞的生物發光訊號（「影像訊號」），這些細胞如本文所定義，隨著時間的進程已經被檢測。於此情況下，該自ES細胞分化及/或自皮膚iPS分化的RPE細胞也已如本文所定義引入個體體內（例如不同的小鼠），該個體與那些本文所定義之RPE細胞已經被預先遞送至個體（例如小鼠）體內的那些個體不完全相同，且其

中該自ES細胞分化及/或自皮膚iPS分化的RPE細胞進一步包含如本文所定義之生物發光標記，就如同用於CLiPS衍生的RPE細胞一樣。

【0152】 本發明進一步包含如本文所定義之體內方法，其中該影像數據中的生物發光訊號與參考影像數據相比沒有差異，則表示該RPE細胞在該個體中存活。沒有差異進一步包含與自ES細胞分化及/或自皮膚iPS分化的該RPE細胞的參考影像數據相比，影像數據中生物發光訊號隨時間的輕微但不顯著的降低。

【0153】 本發明進一步包含一種動物，其包含藉由本文別處所定義之分化方法獲得/可獲得之該RPE細胞。於本文中，所述「動物」指本文所定義之任何哺乳動物，較佳為小鼠，最佳為人源化小鼠。包含該RPE細胞的動物可指將藉由本文別處所定義之分化方法獲得/可獲得之該RPE細胞引入本文所定義之動物體內，較佳藉由皮下移植該RPE細胞。

【0154】 可以特別設想將藉由體內分化方法從iPS細胞分化的該RPE細胞引入如本文所定義之該個體體內，以及隨後對包含從該個體獲得之該RPE細胞的樣品進行體外分析，以用於分析各種模型中的此類細胞以用於研究及開發目的。

【0155】 因此，本發明進一步包含一種體外（篩選）方法，該方法藉由本文所定義之方法確定從iPS細胞分化而來的RPE細胞在個體中的免疫原性，該分化的RPE細胞已預先遞送給個體，方法包含步驟a）使用影像方法檢測獲自本文所定義之該個體的樣品中的促進發炎細胞激素含量，其中該樣品包含該分化的RPE細胞，進而收集影像數據。於此方面，「預遞送」包含本發明之分化的RPE細胞在體外篩選方法之前已經遞送給本文所定義之個體。之後，從該個體獲得包含分化的RPE細胞的樣品，並進一步分析樣品，例如針對特定的細胞激素含量。術語「預先引入」也可互換使用。

【0156】於本文中，檢測係指使用適合於檢測細胞激素的任何已知影像方法，例如使用流式細胞儀在體外對如本文所定義之該細胞激素含量進行視覺化及定量分析。如本文所定義之用於體外方法檢測的該細胞激素含量係指但不限於與細胞調節的免疫相關的細胞激素含量，較佳為促進發炎細胞激素IFN-γ、IL-18、IL-23，及/或IL17A的含量。如本文所定義之該細胞激素的含量可以pg/ml表示。

【0157】在體外方法的步驟a）中從所述確定的個體獲得之樣品可為從該個體取得的任何生物樣品，較佳為血清樣品。

【0158】體外方法可包含作為該方法內的附加或替代步驟，檢測從本文所定義之該個體獲得之樣品中的免疫細胞浸潤，該樣品包含該分化的RPE細胞，進而進一步收集影像數據。

【0159】該方法進一步包含步驟b），將在步驟a）中接收到的及/或從關於滲透的檢測步驟接收到的影像數據與參考影像數據進行比較。同樣地，該參考影像數據係指來自一已經預先遞送自ES細胞及/或皮膚iPS分化的RPE細胞至其體內的個體的樣本內檢測到的與本文定義的相同的促進發炎細胞激素的含量的影像數據，及/或來自一已經預先遞送自ES細胞及/或皮膚iPS分化的RPE細胞至其體內的個體的樣本中滲透並檢測的相同免疫細胞的影像數據。該參考細胞也可包含在與包含RPE細胞的樣品相同種類的樣品（例如血液樣品，但不同的血液樣品）中，但是參考樣品可來自與於從中獲得包含該RPE細胞的樣品的個體相比不同的個體（例如，不同的小鼠）。較佳地，相較於參考影像數據，影像數據中降低的細胞激素含量及/或降低的/減少的免疫細胞浸潤/積累表示該個體中該RPE

細胞的免疫原性降低，這表示相較於自ES細胞分化及/或自皮膚iPS分化的RPE細胞的免疫原性，根據本發明之RPE細胞激發個體的免疫反應的能力較低/減少。

【0160】 本發明將藉由以下非限制性實驗實施例進一步說明。

實驗實施例

【0161】 實施例1：為CLiPS開發合適的電穿孔參數

【0162】 發現根據Okita等人（同上）所描述的方法進行的電穿孔根本無法產生作用。當按照Okita等人的方法（同上）以游離型載體pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK以及pCXLE-hUL對CLMC的反應混合物進行電穿孔時，沒有檢測到IPS集落，見上文。針對CLEC，按照Okita等人的方法，同上，使用游離型載體pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK，以及pCXLE-hUL（Addgene質體#27077（SEQ ID NO: 12 - 特別包含SEQ ID NO: 11)、#27078（SEQ ID NO: 13）、#27080（SEQ ID NO: 14））對CLEC進行電穿孔後，發現平均重新編程效率（以IPS集落計數表示）僅為0.2%。因此，有必要從頭開始為CLMC衍生的CLiPS開發合適的電穿孔方法，或者在CLEC的情況下，提供顯著改善的電穿孔方法。為此，改變構成電穿孔的電脈衝數、持續時間以及電壓等電參數，以開發可用於CLSC的電穿孔條件。於本實驗中，分別在此處所述之細胞特定條件下培養的單個CLMC及CLEC樣品上測試了許多不同的電穿孔設定。每次電穿孔後，將約20萬個細胞接種在6孔盤中進行培養，進行三重複試驗。電穿孔後約21天，對此時已形成的CLSC集落進行計數以確定存活率。存活率用於得出關於電穿孔效率的結論。效率百分比計算為集落數/200,000 x 100%。

【0163】 **表1**及**圖2**中顯示的結果表示，可為CLMC及CLEC找到合適的電穿孔條件。此處發現的CLEC最佳電穿孔設定包含針對$1x10^6$個數目的細胞，進行2

次電脈衝，每次脈衝包含30 ms的持續時間以及1350V電壓，使用三個載體（pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK以及pCXLE-hUL）每一個的1.67μg (質體)DNA。用這些設定轉染的四個單獨的CLEC細胞株（CLEC42、CLEC44、CLEC23以及CLEC30）分別表現出4.67%、7.33%、9.33%以及7.50%的存活率。相較於上述Okita等人的方法，用於CLEC的電穿孔設定使CLEC42的電穿孔效率提高約23.35%，使CLEC44的電穿孔效率提高約36.65%。因此，令人驚奇地發現，相較於Okita等人用於人類皮膚纖維母細胞電穿孔的條件，這些電穿孔參數/設定使CLEC的電穿孔效率平均提高了約30%。值得注意的是，此處使用的電穿孔設定與報導的上皮細胞（如角膜上皮細胞）成功電穿孔的條件有很大不同（包含30 ms以及1300 V的1個電脈衝，以及質體DNA量（μg）與細胞數量的比例（1x10^6個細胞）為1:1（參見Png, E.等人(2011年)，Journal of Cellular Physiology. United States，226(3)，第693-699頁）。

【0164】 最佳化的電穿孔方法的效果對於CLMC甚至更顯著，因為如上所述，根據Okita等人（同上）的電穿孔方法導致根本沒有存活的CLMC。於本文中發現，以包含20 ms以及1600 V的1個電脈衝，以及該三個附加型載體（pCXLE-hOCT3/pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK以及pCXLE-hUL）的每一個的質體DNA的量比細胞的數目為1.67 μg（質體）DAN比約1x10^6個CLMC細胞，成功地轉染了四個單獨的CLMC細胞株（CLMC42、CLMC44、CLMC23以及CLMC30）。所得轉基因細胞的存活率分別為6.17%、7.50%、5.00%以及7.33%。值得注意的是，本文發現的最適合從CLMC產生CLiPS的電穿孔/轉染條件也不同於迄今為止報導的電穿孔條件。例如，比較Sprangers, A. J.、Freeman, B.以及Ogle, B. M. (2011年)，第62-66頁的內容，他們研究了電穿孔對人類胚胎幹細胞（hESC）

衍生的間質幹細胞可能產生的負面影響。Sprangers等人發現使用包含20 ms以及1400 V的1個電脈衝在1x10^{6}個間質幹細胞中轉染總共4 μg（質體）DNA，為MSC轉染提供了最佳選擇。因此，本發明分別為CLEC以及CLMC電穿孔提供了獨特且有效的方法。四個單獨的CLSC細胞株（來自不同捐贈者的細胞）的轉染效率差異為個體差異，這是iPS衍生的固有以及記錄特徵。為了確認CLSC細胞株以及源自這些細胞的CLiPS的捐贈者的性別，使用基因特異性引子對從單個CLSC細胞株分離的基因組DNA進行PCR擴增，以確定是否存在*DYS439*以及*SRY*基因座，這些基因座都存在Y染色體上。已確認aSF4成人皮膚纖維母細胞為從男性捐贈者獲得，作為陽性對照。

【0165】 表1：用於產生CLiPS的最佳化電穿孔條件

	1650V，10ms，3個脈衝 (Okita等人，2011)		**最佳化CLEC方法 1350V，30ms，2個脈衝**		**最佳化CLMC方法 1600V，20ms，1個脈衝**	
每個載體的DNA量與細胞數[μg/1x10^{6}個細胞]的比率	**1.67μg / 1x10^{6}個細胞**		**1.67μg / 1x10^{6}個細胞**		**1.67μg / 1x10^{6}個細胞**	
	平均集落數	平均%效率(x10^{-3})	平均集落數	平均%效率(x10^{-3})	平均集落數	平均%效率(x10^{-3})
CLEC42	0.33±0.58	0.2±0.3	9.33±1.53	4.67±0.76	-	-
CLEC44	0.33±0.58	0.2±0.3	14.67±2.08	7.33±1.04	-	-
CLMC42	0	0	-	-	12.33±1.53	6.17±0.76
CLMC44	0	0	-	-	15±3	7.50±1.50
CLEC23	-	-	18.67±1.53	9.33±0.77	-	-
CLEC30	-	-	15.00±2.00	7.50±1.00	-	-
CLMC23	-	-	-	-	10.00±1.00	5.00±0.50
CLMC30	-	-	-	-	14.67±1.15	7.33±0.58

【0166】 實施例2：轉基因整合以及無飼養層人類iPS的衍生

【0167】 臍帶內膜上皮細胞（CLEC）以及臍帶內膜間質細胞（CLMC）由新加坡CellResearch私人公司分離並提供。解凍CLEC以及CLMC並分別在其培養

基PTT-e3以及PTT-4中繁殖。來自健康的78歲亞洲男性捐贈者的成人皮膚纖維母細胞購自CellResearch私人公司，並在DMEM/10% FBS中培養。

【0168】 培養基PTT-4由90%（v/v）CMRL-1066以及10%（v/v）FBS所組成，而培養基PTTe-3具有以下組成分：

MCDB - 170/EpiLife 培養基	200 ml/300ml
DMEM	250 ml
DMEM/F12	250 ml
胎牛血清	1%
腺嘌呤	0.05 至 0.1 mM
氫羥腎上腺皮質素	0.1 至 0.5 μM
表皮生長因子	1 至 15 ng/ml
T3（3,3',5-三碘-L-甲狀腺原胺酸素鈉鹽）	0.1 至 5 ng/ml
自霍亂弧菌的霍亂毒素	1 x 10^{-11}M 至 1 x 10^{-10}M
胰島素	1 至 7.5 μg/ml
TGF-alpha	1.0 至約 10 ng/ml
TGF-beta1	0.1 至 5 ng/ml

【0169】 使用實施例1中建立的條件進行體細胞重新編程，並進一步以不依賴於飼養層的方式進行。藉由以TrypLE Express（Thermo Fisher Scientific公司）解離收穫對數期培養物，並在1.5 ml離心管中沉澱72萬個細胞。將細胞沉澱重新懸浮於120 μL緩衝液R（Neon™轉染系統100 μL套組，Thermo Fisher Scientific公司MPK10096）中。含有1.2 μg每個游離型載體pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK以及pCXLE-hUL（分別為Addgene質體#27077（SEQ ID NO：12）、#27078（SEQ ID NO：13）、#27080（SEQ ID NO：14））的混合物添加到細胞中並徹底混合（每個載體以1.67μg（質體）DNA的量用於1x10^6個數目的細胞）。將細胞懸浮液裝入100 μL Neon® Tip中，並使用以下參數進行Neon電穿孔：成人皮膚纖維母細胞 - 1,650 V，10 ms，3個脈衝；CLEC - 1350V，30ms，2個脈衝；CLMC - 1600V，20ms，1個脈衝。立即將細胞轉移至含有1 μM氫羥腎上腺皮質素

（StemCell Technologies公司）的6 ml CLEC或CLMC培養基中，並平均分配到基質膠包覆的6孔盤的3個孔中。兩天後，將培養基轉換為1:1的CLEC或CLMC培養基以及mTeSR1的混合物，並添加1 μM氫羥腎上腺皮質素。轉染後第4天，以相同的培養基進行培養基更換。轉染後第6天，將培養基轉換為完整的mTeSR1，並從此處省略氫羥腎上腺皮質素。隨後，每兩天以mTeSR1進行一次培養基更換。當iPS集落直徑達到約1-2 mM（大約從第20天開始）時，在明場顯微鏡下人工挑選集落，並將每個集落置於基質膠包覆的24孔盤（Nunc公司）的單個孔中。當每個孔中的細胞達到約50%匯合時，以分散酶（StemCell Technologies公司）分離這些細胞並轉移至基質膠包覆的6孔盤的孔中。隨後，當細胞接近匯合時，藉由以0.5 mM EDTA解離將細胞按1:3的比率繼代。新繼代的細胞在含有10 μM ROCK抑制劑Y-27632的培養基中培養過夜。除了mTeSR1，其他商業ES/iPS培養基如StemMACS™ iPS-Brew XF（Miltenyi Biotec公司）以及TeSR-E8（StemCell Technologies公司）已被用於維持iPS培養。

【0170】用於產生CLiPS的方法：

1. 使用TrypLE Express（Thermo Fisher Scientific公司）藉由解離收穫分別培養於含有其維持培養基PTTe-3以及PTT-4的T-75燒瓶中的活躍分裂的CLEC或CLMC。
2. 計數細胞並將72萬個細胞等分至微量離心管中並沉澱。
3. 將細胞沉澱重新懸浮於120 μL緩衝液R（Neon™轉染系統100 μL套組，Thermo Fisher Scientific公司MPK10096）中。添加含有pCXLE hUL、pCXLE-hSK以及pCXLE-hOCT3/4-shp53-F各1.2 μg的混合物並充分混合。

4. 將細胞懸浮液裝入100 μL Neon® Tip。使用以下參數進行CLEC的電穿孔：1350V、30 ms、2個脈衝，以及使用以下參數進行CLMC的電穿孔：1600V、20 ms、1個脈衝。
5. 立即將細胞轉移至含有1 μM氫羥腎上腺皮質素的4 ml CLEC或CLMC培養基（分別為PTTe-3以及PTT-4）中，然後分配到基質膠包覆的6孔盤的3個孔中。
6. 電穿孔兩天後，將培養基更換為1:1（v/v）的CLEC或CLMC培養基（分別為PTT-e3以及PTT-4）以及mTeSR1的混合物，並添加1 μM氫羥腎上腺皮質素。
7. 電穿孔四天後，以相同的1:1（v/v）培養基混合物進行培養基更換。
8. 電穿孔後6天，將培養基更換為只有mTeSR1。從這裡開始省略氫羥腎上腺皮質素。
9. 每兩天更換一次培養基。
10. iPS集落最早可能在轉染後2週開始出現。當iPS集落直徑達到約0.5 mm至約1 mm時（大約第20天以後），在明場顯微鏡下人工挑選集落，並將每個集落置於基質膠包覆的24孔盤（Nunc公司）的單個孔中。
11. 集落挑選後，每天對分離的集落進行培養基更換。
12. 當每個孔中的細胞佔據約50%的培養表面時，以Dispase（StemCell Technologies公司）將它們分離並轉移至基質膠包覆的6孔盤的孔中。
13. 隨後，當細胞達到約70%-80%匯合時，使用0.5 mM EDTA藉由解離將細胞以1:3的比率繼代。新繼代的細胞在含有10 μM ROCK抑制劑Y-27632的培養基中培養過夜。

【0171】 按照上述方法，從第10天左右開始出現形態上與親本細胞不同的小細胞簇。到第15天，細胞簇獲得了明確的邊緣（**圖3b**），並且從第20天開始出現了離散的類胚胎幹細胞集落（**圖3c**以及**圖3d**）。當集落直徑達到1-2 mm時，將其挑出並擴增以進行特徵分析與儲存。擴增的CLiPS表現出的細胞形態與成人皮膚纖維母細胞衍生的iPS或具有特徵性大細胞核及薄細胞質的人類胚胎幹細胞（ES）無法區分（**圖3e**以及**圖3f**）。

【0172】 **實施例3：符合cGMP的CLiPS（CLMSC-DTHN）的衍生**

【0173】 為了驗證CLiPS可在符合人類治療應用的條件下生產的概念，使用WO2018/067071中描述的用於產生間質幹細胞群的方法，以命名為CLMSC-DTHN的cGMP級CLMC細胞株產生iPS，99%所產生的幹細胞表現標記CD73、CD90以及CD105，而不表現標記CD34、CD45以及HLA-DR。重新編程方法與實施例2中針對CLMC描述的方法相同，但以重組人類層連結蛋白-511 E8片段（iMatrix-511 SILK，ReproCELL公司）（這是一種用於包覆細胞培養容器的成分確定、不含動物及異種物質的基質）取代基質膠（一種從Engelbreth-Holm-Swarm（EHS）小鼠肉瘤細胞製備的細胞外基質）。此外，以cGMP mTeSRTM1（StemCell Technologies公司）取代用於重新編程及隨後維持CLiPS選殖株生長的mTeSR1。

【0174】 在本文所述之條件下，CLMSC-DTHN被重新編程具有與CLMC相當的動力學及效率（未顯示數據）。在以重新編程載體轉染10天，可觀察到具有緊湊形態的小細胞簇（**圖3n**）。這些細胞簇從第20天開始發展成為可分離的集落。擴增的集落顯現出人類多能幹細胞的特徵細胞形態（**圖3n-q**）。

【0175】 **CLiPS的繁殖與冷凍保存**

【0176】 當培養物達到約90%匯合時，進行CLiPS的次培養（再次使用適合維持iPS細胞的培養基，例如mTeSR1或TeSR-E8）。用過的培養基與可能存在的任何明顯分化的區域一起被吸出。應注意不要讓細胞暴露在空氣中的時間過長。培養物以預熱（37°C）的Dulbecco氏磷酸鹽緩衝鹽溶液（Dulbecco's Phosphate Buffered Saline，DPBS）沖洗一次。根據培養容器的大小將適當體積的預熱（37°C）的0.5 mM EDTA溶液添加至培養物中：24孔培養皿使用0.5 ml/孔、6孔培養皿使用1 ml/孔，或6 cm培養皿使用2 ml。將培養物置於37°C的培養箱中5分鐘，然後在顯微鏡下觀察。細胞應呈現圓形但不會脫離培養皿表面。37°C下的培養時間因不同的CLiPS細胞株而異，可能在5-10分鐘左右。培養時間主要取決於每個細胞株的先前經驗。培養後，輕輕吸出EDTA溶液，注意不要移動細胞。使用1 ml的移液器，將含有ROCK抑制劑Y-27632的培養基（例如mTeSR1或TeSR-E8）直接分配到細胞上以去除細胞。所用培養基的體積取決於所用容器的大小：24孔培養皿使用0.5 ml/孔、6孔培養皿使用1 ml/孔，或6 cm培養皿使用2 ml。重複輕輕移液，直到大部分細胞被移走。然後將細胞懸浮液轉移至15 ml Falcon管中。培養容器以新鮮培養基沖洗，沖洗液與Falcon管中的細胞懸浮液混合。管中的細胞被稀釋到適當的體積，以便在新的基質膠塗層容器上進行接種。分盤比可能在1:3至1:10之間，取決於初始培養物的密度及各CLiPS細胞株的生長速率。

【0177】 針對冷凍保存，將細胞懸浮於補充有10% v/v組織培養級二甲基亞碸（DMSO；例如Hybri-Max™，Sigma-Aldrich公司）的mTeSR1或TeSR-E8（或任何其他合適的培養基）中。然後將細胞懸浮液等分至適當數量的冷凍管中。每個等分試樣的細胞密度取決於在解凍及培養該等分試樣內的細胞時所要達到的細胞匯合比例。然後將冷凍管轉移至慢速冷凍裝置，例如Mr. Frosty™冷凍容器

（Thermo Scientific公司）或CoolCell®細胞冷凍容器（BioCision公司），並在-80℃下放置過夜。第二天，冷凍管被轉移至液態氮中儲存。不建議將CLiPS等分試樣在-80℃下放置超過24小時。mFreSR™（StemCell Technologies公司）以及CryoStor® CS10（Biolife Solutions公司）等幾種商業冷凍培養基也可用於冷凍保存，可根據製造商的說明使用。

【0178】 **實施例4：CLiPS功能分析**

【0179】 CLiPS的功能是藉由在電穿孔後對發展中的CLiPS進行免疫螢光染色來確定的。由此，分析了多能胚胎幹細胞標記（OCT4、SOX2、KLF4、NANOG、SSEA-4、TRA-1-81）的表現。為此，細胞以含4%甲醛的磷酸鹽緩衝鹽溶液（PBS）固定15分鐘，隨後以PBS洗滌3次，每次5分鐘。針對細胞內或核標記（OCT4、SOX2、KLF4、NANOG）的染色，細胞以含有0.1% Triton X-100的PBS滲透10分鐘，並以FDB（5% FCS/1% NGS/1% BSA）阻隔1小時。針對表面標記（SSEA-4、TRA-1-81）的染色，省略了滲透步驟。將細胞以使用FDB適當稀釋的一級抗體在4℃下培養過夜，然後在室溫下與適當的螢光染料偶聯的二級抗體培養2小時。染色樣品以帶有DAPI的ProLong Diamond Antifade Mountant（Thermo Fisher Scientific公司）的套組進行染色。

【0180】 此外，藉由執行核型分析及G條帶分析評估單個CLiPS細胞株中染色體的數量及結構，其中G條帶分析由KK婦女兒童醫院私人有限公司（新加坡）的細胞遺傳學實驗室進行。

【0181】 此外，還進行RT-PCR分析，以分析重新編程及多能基因在原代親代細胞、載體轉染後11天的親代細胞（D11轉染細胞）以及CLiPS中的表現。為此，使用RNeasy Mini或Plus Mini套組（Qiagen公司）從細胞沉澱物中分離總RNA。

以DNase I處理2 μg總RNA，並使用RevertAid H Minus First Strand cDNA合成套組（Fermentas，Thermo Fisher Scientific公司）進行cDNA合成。PCR反應設定如下：0.5 μl cDNA、5 μl 2x MyTaq HS Mix（Bioline公司）、0.2 μl正向引子（10μM）、0.2 μl反向引子（10 μM）、4.2 μl PCR用水。在MJ Mini Thermal Cycler熱循環儀（Bio-Rad公司）中進行熱循環，條件如下：1x 95°C 1分鐘、30的循環（95°C 15秒、黏合溫度15秒、72°C 15秒），72°C 1分鐘。下**表2**提供引子序列以及使用的黏合溫度（Tm）。

【0182】藉由瓊脂糖凝膠分析進行定性表現分析，其中將樣品加載至2%瓊脂糖凝膠上，並在1x TAE緩衝液中摻入SYBR Safe DNA染劑（Thermo Fisher Scientific公司），並在80V下進行電泳30分鐘。使用ChemiDoc影像系統（Bio-Rad公司）捕獲凝膠影像。

【0183】**表2**：引子序列

寡核苷酸名稱	SEQ ID No	序列 (5' → 3')	T_m	擴增片段長度(bp)
hNanogF	15	AAGGTCCCGGTCAAGAAACAG	55	237
hNanogR	16	CTTCTGCGTCACACCATTGC	55	
hKlf4F	17	CCCACATGAAGCGACTTCCC	55	169
hKlf4R	18	AGGTCCAGGAGATCGTTGAAC	55	
hSox2F	19	TGGACAGTTACGCGCACATG	55	214
hSox2R	20	GAGTAGGACATGCTGTAGGTG		
hOct4F	21	TGCGGCCCTTGCTGCAGAAG	60	201
hOct4R	22	GCTGCTGGGCGATGTGGCTG		
Oct4VecF	23	ATGCATTCAAACTGAGGTAAGG	55	127
pCXLE-R2	24	TAGCGTAAAAGGAGCAACATAG		
Lin28F/VecF	25	CCATATGGTAGCCTCATGTCC	55	126
hLin28R	26	TCAATTCTGTGCCTCCGGGAG		
Klf4VecF	27	ACCACCTCGCCTTACACATGAAG	55	156
pCXLE-R2	28	TAGCGTAAAAGGAGCAACATAG		
L-mycVecF	29	GGCTGAGAAGAGGATGGCTAC	55	124
pCXLE-2AR	30	AGTTTGTTTGACAGGAGCGAC		
Sox2VecF	31	TCACATGTCCCAGCACTACC	55	112
pCXLE-2AR	32	AGTTTGTTTGACAGGAGCGAC		

hL-mycF	33	AACCCAAGACCCAGGCCTGC	60	135
hL-mycR	34	GGTCTGCTCGCACCGTGATG		
EBNA-1F	35	GAAATGGCCTAGGAGAGAAG	55	214
EBNA-1R	36	CAGCCAATGCAACTTGGACG		
hGDF3F	37	CTTATGCTACGTAAAGGAGCTGGG	60	633
hGDF3R	38	TTGTGCCAACCCAGGTCCCGGAAG		
hREX1F	39	TATCAGATCCTAAACAGCTCGCAG	55	308
hREX1R	40	CGTACGCAAATTAAAGTCCAGAG		
hFGF4F	41	ACTACAACGCCTACGAGTCCTAC	60	372
hFGF4R	42	GTTGCACCAGAAAAGTCAGAGTTG		
hDPPA5F	43	ATATCCCGCCGTGGGTGAAAGTTC	60	243
hDPPA5R	44	ACTCAGCCATGGACTGGAGCATCC		
hTERTF	45	CCTGCTCAAGCTGACTCGACACCGTG	65	446
hTERTR	46	GGAAAAGCTGGCCCTGGGGTGGAGC		
hDNMT3BF	47	TGCTGCTCACAGGGCCCGATAC	60	242
hDNMT3BR	48	TCCTTTCGAGCTCAGTGCACCAC		
hGAPDHF	49	CTGGCGCTGAGTACGTCGTGG	60	200
hGAPDHR	50	GCAGTTGGTGGTGCAGGAGGC		

【0184】結果顯示，CLiPS顯現出人類胚胎幹細胞（hES）標記KLF4、NANOG、OCT4、SOX2、SSEA4及TRA-1-60的穩健表現，如抗體染色所示（**圖3g-l**）。G條帶分析顯示，CLiPS在集落挑選後最多17代保持正常核型（**圖3m**）。針對親本細胞、轉染後第11天的細胞以及擴增的iPS選殖株中分析基因表現的RT-PCR顯示，內源性*OCT4*、*SOX2*、*KLF4*、*LIN28*以及*L-MYC*基因的活化已經取代由載體驅動這些基因表現的作用，而在完全重新編程的CLiPS中維持多能性（**圖3v**）。內源性*NANOG*位點（一種體細胞重新編程的關鍵基因）的誘導在轉染後第11天很明顯。在CLiPS選殖株中沒有可檢測含量的EBNA-1轉錄物，這表示質體載體已經從這些細胞中丟失了。其他hES特異性基因*GDF3*、*DPPA5*、*DNMT3*、*FGF4*以及*REX-1*在CLiPS中的表現進一步證實CLiPS的類hES分子表型。*TERT*（編碼端粒酶的催化反轉錄酶次單元的基因，端粒酶對調節自我更新及維持多能性相當重要）在CLiPS中的表現含量與H1 hES中的含量相同。

【0185】 **實施例5：多能胚胎幹細胞標記在CLiPS-DTHN中的表現分析**

【0186】 為了分析表示多能性的多能胚胎幹細胞標記（Oct4、Sox2、Klf4、Nanog）的表現，在電穿孔後對發育中的CLMSC-DTHN進行免疫螢光染色。免疫螢光染色方法與實施例4中針對CLiPS描述的方法相同。

【0187】 結果顯示，CLMSC-DTHN表現多能幹細胞標記NANOG、OCT4、SOX2以及TRA-1-81（**圖3r-u**），其含量與其非GMP的對應物無法區分。因此，CLMSC-DTHN可提供與非GMP衍生的CLiPS所蘊含的相同胚胎特性。

【0188】 **實施例6：確定CLiPS的多能性**

【0189】 CLiPS以及aSF-iPS的多能性藉由在NOD-SCID小鼠中的畸胎瘤形成試驗進行評估。為此，將1x10^6個CLiPS細胞沉澱，重新懸浮於0.1 ml冰冷的基質膠中，並注射至6-8週齡NOD/MrkBomTac-Prkdc^{scid}小鼠的背側。3個月後犧牲小鼠並收穫畸胎瘤用於組織學分析，使用標準技術進行石蠟切片及蘇木精與伊紅染色。

【0190】 結果顯示，在將iPS皮下注射至小鼠的背側後1個月，一些小鼠開始出現可觸知的腫瘤。注射後3個月分離的畸胎瘤的組織學分析顯示CLiPS自發分化為內胚層、中胚層以及外胚層譜系的組織（**圖4a-f**）。

【0191】 **實施例7：將CLiPS分化為多巴胺神經元**

【0192】 作為CLiPS未來潛在治療應用的重要先決條件，有必要證明它們在定義的體外條件下分化為特定組織類型的能力。針對多巴胺神經元分化，描述於Kriks, S.等人，*Nature*，2011年，480(7378)：第547-51頁的中腦底板誘導方法用於將iPS分化為多巴胺神經前驅細胞以及神經元。簡言之，iPS以每平方公分3.5-4.0x10^4個細胞的密度接種在基質膠（Corning公司）塗層的培養皿上，並在含有

基因敲除DMEM、15%基因敲除血清替代物、1 X GlutaMAX以及10 mM β-巰基乙醇的基因敲除血清替代（knockout serum replacement，KSR）培養基中培養5天。從第5天開始，將KSR培養基逐步過渡到N2培養基，如Tomishima所著「Midbrain dopamine neurons from hESCs」2012年6月10日，記載於StemBook，劍橋（麻州）：哈佛幹細胞研究所；2008年，可獲自：https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK133274/ doi: 10.3824/stembook.1.70.1。中所述。於第11天，將培養基更換為由Neurobasal培養基、2% B27減去維生素A以及1x GlutaMAX所組成的NB27培養基，並補充有CHIR（直到第13天）、BDNF（腦源性神經營養因子，20 ng/ml；Miltenyi公司）、抗壞血酸（0.2 mM，Sigma公司）、GDNF（膠質細胞株衍生的神經營養因子，20 ng/ml；Miltenyi公司）、TGFβ3（β3型轉化生長因子，1 ng/ml；R&D公司）、二丁醯cAMP（0.5 mM；Santa Cruz Biotechnology公司）以及DAPT（10 nM；Tocris公司）培養持9天。於第20天，使用Accutase（Gibco公司）解離細胞，並以高細胞密度（每平方公分3-4x10^5個細胞）重新接種在培養皿上，該培養皿預塗覆含有聚L-鳥胺酸（poly-L-ornithine，PLO；15 mg/ml）/層連結蛋白（1 μg/ml）/纖連蛋白 (2 μg/ml) 並添加10 μM ROCK抑制劑Y-27632的NB27培養基。將該培養物保持在NB27培養基中，每隔一天更換一次培養基，直到達到所需的終點。在這個階段分析分化細胞的細胞特異性標記的表現。為此，進行冷凍切片，其中包含切片的載玻片藉由在37°C下培養30分鐘進行脫水，冷卻至室溫並以TBST洗滌3次。如**實施例4**所述進行切片滲透、阻隔、抗體染色以及封固。使用來自相同宿主物種的一級抗體，在與第二個一級抗體以及偶聯的二級抗體依序作用之前，使用螢光染料偶聯的單價抗體（Jackson ImmunoResearch公司）使第一個一級抗體飽和。

【0193】結果顯示，使用該方法從CLiPS及asF5-iPS獲得多巴胺神經元。抗體染色顯示幾乎90%的細胞共表現底板標記FOXA2以及頂板標記LMX1A（**圖4k、k'、k''**），其為中腦DA神經元前驅物的明確標誌。如TUJ1染色所示，進一步分化產生大量成熟神經元，其中約30-50%共表現多巴胺標記酪胺酸羥化酶（Tyrosine Hydroxylase，TH）（**圖4l、l'、l''**）。在分化第45天對CLiPS衍生的神經元進行的電生理分析顯示，細胞表現出成熟的功能特性，動作電位序列顯示成熟中腦DA神經元在注射超極化電流時的電壓驟降反應特徵（**圖4m**）。

【0194】**實施例8：將CLiPS分化為肝細胞**

【0195】作為CLiPS未來潛在治療應用的重要先決條件，有必要證明它們在定義之體外條件下分化為所需目標細胞類型或特定組織類型的能力。針對肝細胞分化，將原本用來在小鼠飼養層上分化人類胚胎細胞（ES）所開發的方法（Medine, C.N.等人，J Vis Exp，2011年(56)：第e2969頁）適用於在基質膠上以mTeSR1分化CLiPS以及asF-iPS。該方法的一個修改為當iPS培養物達到20-30%的匯合度時，將DMSO補充到2%並培養24小時。當培養物達到約30%-60%的匯合度時，藉由將mTeSR1替換為啟動培養基（補充有100 ng/mL活化素A以及50 ng/mL Wnt3a的RPMI 1640-B27）以誘導定形內胚層形成。培養物在啟動培養基中維持3天，每24小時更換一次培養基。在啟動培養基中培養72小時後，將培養基替換為SR-DMSO（80% KO-DMEM、20% KO-SR、0.5% L-麩醯胺酸、1%非必需胺基酸、0.1 mM β-巰基乙醇以及1% DMSO）每48小時更換培養基，共培養5天。於第8天，將培養物更換至L-15成熟及維持培養基（Leibovitz L-15培養基、8.3%胰蛋白腖磷酸鹽培養液、8.3%熱滅活胎牛血清、10 μM氫羥腎上腺皮質素21-半琥珀酸酯、1 μM胰島素（牛胰腺）、1% L-麩醯胺酸，0.2%抗壞血酸）並補充

有10 ng/mL hHGF以及20 ng/mL OSM，共培養9天（每48小時更換一次培養基）。在此階段再次分析分化細胞的細胞特異性標記之表現。為此，如**實施例7**中所述進行冷凍切片。

【0196】 結果顯示，使用該方法從CLiPS以及asF5-iPS中獲得類肝細胞的細胞。分化17天後，抗體染色顯示出肝細胞標記α-胎兒蛋白（alpha-fetoprotein，AFP；**圖4g、g'、g''**）、細胞角蛋白18（Cytokeratin 18，CK18）以及人類血清白蛋白（Human Serum Albumin，HSA；**圖4h、h'、h''**）。大多數分化的細胞表現出肝細胞的多邊形形狀特徵。此外，以油紅O染色顯示細胞中有大量脂滴積累，這是培養的肝細胞的標記之一（**圖4i、i'、i''**）。

【0197】 **實施例9：將CLiPS分化為心肌細胞**

【0198】 作為CLiPS未來潛在治療應用的重要先決條件，有必要證明它們在定義之體外條件下分化為特定組織類型的能力。針對心肌細胞分化，iPS的心肌細胞分化方法改編自Lian, X.等人，Proc Natl Acad Sci U S A，2012年，109(27)，第E1848-57頁中描述之方法。以StemPro Accutase（Thermo Fisher Scientific公司）於37℃下作用5分鐘，以將維持在mTeSR1培養基中與基質膠上的iPS解離成單顆細胞，然後將細胞以添加有5 μM ROCK抑制劑（Y-27632；Stemgent公司）的mTeSR1調整細胞濃度為$1x10^5$-$2x10^5$個細胞/cm^2（$5x10^5$個細胞/24孔），以接種於包覆基質膠的細胞培養盤上培養24小時。於一種修改的方法中，當細胞達到約80%的匯合度時，將培養基更換為補充有2% DMSO的mTeSR1。當細胞達到匯合時，以含有CHIR99021的RPMI/B27-胰島素處理該細胞24小時。於另一修改的方法中，CHIR99021的濃度在此階段從最初的12 μM降低至5 μM。隔天，將培養基更換為不含胰島素的RPMI/2%B27。兩天後，將一半的舊培養基與等體積的含有

10 μM IWP2（Tocris公司）的新鮮培養基混合。去除孔中剩餘的培養基並將混合物加入該培養物中。兩天後，將培養基更換為僅不含胰島素的RPMI/2%B27。48小時後，將培養物維持在RPMI/2%B27中，每3天更換一次培養基，直至達到所需的終點。如**實施例7**中所述，將跳動的心肌細胞固定並針對細胞特異性標記進行染色。

【0199】 結果顯示，使用該方法從CLiPS以及asF5-iPS中獲得心肌細胞。抗體染色顯示從分化8天開始觀察到自發收縮心肌細胞的表現。功能性心臟標記肌球蛋白調節輕鏈2a（Myosin regulatory light chain 2a，MLC2a）、心肌肌鈣蛋白I（cardiac troponin I，cTnI）以及α-輔肌動蛋白（alpha-actinin，αACT）的免疫螢光抗體染色顯示分化的心肌細胞內的肌節結構（**圖4j、j'、j''**）。之間沒有觀察到分化效率的顯著差異。

【0200】 **實施例10：將CLiPS分化為寡突膠質細胞**

【0201】 為了進一步證明本發明之誘導性多能幹細胞分化為特定目標細胞類型的能力，將CLiPS分化為寡突膠質細胞。CLiPS以及asF-iPS的寡突膠質細胞分化是根據Douvaras, P.以及V. Fossati, Nat Protoc，2015年，10(8)：第1143-54頁所述的方法進行的。此外，如**實施例7**中所述進行冷凍切片以分析細胞特異性標記的表現。

【0202】 在分化的第75天，得到Olig2陽性寡突膠質細胞前驅物細胞簇（Olig2-positive oligodendrocyte precursor cells，OPCs；**圖4n**）以及O4陽性晚期OPCs（**圖4o**）。

【0203】 **實施例11：免疫原性分析**

【0204】 為了深入了解CLiPS及其神經衍生物的免疫原性，藉由流式細胞儀分析評估這些細胞的一組免疫原性相關標記的表現。為此，以TrypLE Express解離細胞以收穫原代細胞以及第25天分化的DA NPCs，並以0.5 mM EDTA解離細胞以收穫iPS培養物。將細胞重新懸浮於含有0.1% 牛血清白蛋白 (BSA）的1x不含Ca^{2+}及Mg^{2+}的DPBS中，細胞濃度為500萬個細胞/ml。100 µl細胞在黑暗中以適當的偶聯抗體或其同種型對照在冰上染色30分鐘。針對HLA-E以及HLA-G染色，細胞在染色前根據製造商的說明以BD Phosflow Perm/Wash Buffer I（BD Biosciences公司）滲透。染色後，細胞在1x不含Ca^{2+}及Mg^{2+}的DPBS/5 mM EDTA中洗滌2次，在黑暗中以1%多聚甲醛固定1小時，然後在1x不含Ca^{2+}及Mg^{2+}的DPBS/5 mM EDTA中洗滌2次。將細胞重新懸浮於0.5 ml 1x不含Ca^{2+}及Mg^{2+}的DPBS/5 mM EDTA中，並在流式細胞儀上進行分析。染色的原代細胞以及iPS在FACSCalibur上進行分析，而染色的多巴胺神經元前驅細胞（NPCs）在FACSCanto II儀（均來自BD Biosciences公司）上進行分析。使用FlowJo軟體套組（FlowJo有限公司）分析數據。使用的抗體列於**表3**。

【0205】 **表3**：用於流式細胞儀分析的抗體

抗原	同種型	共軛物	稀釋倍數	BioLegend 型號
CD40	小鼠 IgG1,κ	FITC	1:20	303604
CD80	小鼠 IgG1,κ	FITC	1:20	305206
CD86	小鼠 IgG2b,κ	Alexa Fluor 488	1:20	305414
HLA-A,B,C	小鼠 IgG2a,κ	PE	1:20	311406
HLA-DR	小鼠 IgG2a,κ	PE	1:20	307606
HLA-E	小鼠 IgG1,κ	PE	1:20	342604
HLA-G	小鼠 IgG2a,κ	APC	1:20	335910
NCAM/CD56	小鼠 IgG1,κ	APC/Cy7	1:20	318332
同種型對照	小鼠 IgG1,κ	FITC	1:20	400108
同種型對照	小鼠 IgG2b,κ	Alexa Fluor 488	1:20	400329
同種型對照	小鼠 IgG1,κ	PE	1:20	400112
同種型對照	小鼠 IgG2a,κ	PE	1:20	404212
同種型對照	小鼠 IgG1,κ	APC	1:20	400120

同種型對照	小鼠 IgG2a,κ	APC	1:20	400222
同種型對照	小鼠 IgG1,κ	APC/Cy7	1:20	400128

【0206】 已知第I類MHC HLA-A、HLA-B及HLA-C以及第II類MHC HLA-DR分子對同種免疫反應很重要。結果顯示，HLA-ABC在所有iPS樣本中均有表現，但觀察到EC23-CLiPS的含量顯著降低（**圖6a**）。所有iPS樣本中均不存在HLA-DR表現（**圖6b**），這與之前關於iPS中HLA-II的表現可忽略不計的報導相符（Säljö, K.等人，Sci Rep，2017. 7(1)：第13072頁，以及Chen, H.F.等人，Cell Transplant，2015年，24(5)：第845-64頁）。T細胞共刺激分子CD40、CD80以及CD86在同種免疫反應期間活化T細胞方面發揮重要的作用。在所檢查的三種分子中，只有CD40在iPS上表現，相較於其餘分子，asF-iPS表現含量最低，MC23-CLiPS表現含量最高（**圖6a**）。由於已報導致耐受性HLA-E以及HLA-G在CLMC（Deuse, T.等人，Cell Transplant，2011年，20(5)：第655-67頁）以及CLEC（Zhou, Y.等人，Cell Transplant，2011年，20(11-12)：第1827-41頁）上的表現，因此也研究了CLiPS上這些抗原的表現。針對滲透細胞的分析顯示，HLA-E在MC23-CLiPS以及EC44-CLiPS中僅具有邊際表現，而在其他樣本中的表現則低於可檢測量。接下來，重複第25天DA分化培養物中整個標記組的表現圖譜。對門控NCAM陽性染色的神經細胞群進行分析。所有樣品的NCAM+分數都超過97%，asF-iPS以及EC23-CLiPS顯示出99.5%的可比分化效率（**圖6b**）。所有NPC樣本皆表現HLA-ABC，但與其親本iPS相比通常含量較低（**圖6c**）。EC23-CLiPS衍生的NPC在各樣本中表現最低量的HLA-ABC，反映其親本iPS顯示的趨勢。MC23-CLiPS上的HLA-ABC表現量在其分化為NPCs時降低。CD40表現在所有NPC樣本中都被下調，只有EC23-iPS以及EC44-iPS衍生的NPCs具有輕微的表現。所有NPC樣本中皆不存

在HLA-E的表現，但在asF-iPS以及EC23-iPS衍生的NPCs中觀察到HLA-G的輕微上調。這些結果顯示CLiPS中的免疫原性降低。

【0207】 實施例12：將CLiPS衍生的多巴胺神經元移植至具有完全免疫能力的帕金森氏症小鼠模型中

【0208】 先前的研究顯示，使用各種方法從人類胚胎幹細胞以及iPS產生的多巴胺神經元可被移植至嚙齒動物中（Kriks, S.等人，Nature，2011年，480(7378)：第547-51頁；Hargus, G.等人，Proc Natl Acad Sci U S A，2010年，107(36)：第15921-6頁；Doi, D.等人，Stem Cell Reports，2014年，2(3)：第337-50頁；Grealish, S.等人，Cell Stem Cell，2014年，15(5)：第653-65頁；Kirkeby, A.等人，Cell Rep，2012年，1(6)：第703-14頁；Qiu, L.等人，Stem Cells Transl Med，2017年，6(9)：第1803-1814頁；Rhee, Y.H.等人，J Clin Invest，2011年，121(6)：第2326-35頁；Samata, B.等人，Nat Commun，2016年，7：第13097頁；Wakeman, D.R.等人，Stem Cell Reports，2017年，9(1)：第149-161頁）以及非人類靈長類動物（Kriks, S.等人，Nature，2011年，480(7378)：第547-51頁；Hargus, G.等人，Proc Natl Acad Sci U S A，2010年，107(36)：第15921-6頁；Wakeman, D.R.等人，Stem Cell Reports，2017年，9(1)：第149-161頁；Daadi, M.M.等人，PLoS One，2012年，7(7)：第e41120頁；Kikuchi , T.等人，Nature，2017年，548(7669)：第592-596頁)的帕金森氏症（PD）模型。在所有這些研究中，這些動物呈現免疫功能低下，或是需在藥理學上進行免疫抑制以防止移植物排斥。只有在使用自體（Morizane, A.等人，Stem Cell Reports，2013年，1(4)：第283-92頁；Hallett, P.J.等人，Cell Stem Cell，2015年，16(3)：第269-74頁；Wang, S.等人，Cell Discov，2015年，1：第15012頁；Emborg, M.E.,等人，Cell Rep，2013年，3(3)：第646-50頁；Sundberg, M. 等人，

Stem Cells，2013年，31(8)：第1548-62頁）或MHC匹配的同種異體（Morizane, A. 等人，2017年，8(1)：第385頁）iPSC衍生的細胞進行移植時，才不需要免疫功能低下或免疫抑制的動物。

【0209】 為了證明使用本發明之方法分化的CLiPS衍生的DA NPCs的可移植性，於第25天將從asF-iPS、EC23 CLiPS以及MC23-CLiPS分化的NPCs移植至免疫功能低下的NOD-SCID小鼠（n=3）中。於此方面，值得注意的是，所有動物實驗都是根據新加坡國家神經科學研究所（National Neuroscience Institute，NNI）機構動物護理暨使用委員會（Institutional Animal Care and Use Committee，IACUC）核准的方法進行的。

【0210】 為了測試CLiPS衍生的DA NPCs的免疫原性，需要在PD模型上進行移植。為此，產生6-羥基多巴胺（6-hydroxydopamine，6-OHDA）單側受損小鼠模型。單側6-OHDA受損為嚙齒動物的一種既定方法，包含在嚙齒動物大腦中注射6-OHDA，導致運動功能障礙，其特徵為旋轉不對稱程度（Bagga, V.、Dunnett, S. B.以及Fricker, R. A.（2015年）*Behavioural Brain Research.* Elsevier B.V.，288，第107-117頁）。於本發明中，對購自InVivos私人有限公司的NOD/MrkBomTac-Prkdc^{scid}小鼠（4週齡）進行6-OHDA受損的誘導，並將小鼠飼養在NNI的動物研究中心，而用於該實驗的購自InVivos私人有限公司的雄性C57BL/6NTac小鼠（6-8週齡）小鼠具有完全免疫能力，並在移植之前或之後未施用免疫抑制劑。

【0211】 為了產生小鼠PD模型，將7.5 μg 6-OHDA（Sigma，Merck-Millipore公司；溶於含有0.2%抗壞血酸的0.9% NaCl中，濃度為2.5 mg/ml）藉由立體定向注射在以下坐標處遞送至左側紋狀體： 距前囪的前側-後側（AP）+0.5 mm；內側-外側（ML）-1.8 mm；距顱腔的背側-腹側（DV）-3.0 mm。經過兩週使小鼠

適應環境後，將3個NPCs樣本（亦即，來自asF-iPS、EC23-CLiPS以及MC23-CLiPS的NPCs）移植至免疫功能正常的紋狀體中，對6-OHDA受損的C57BL/6小鼠進行立體定向注射，其被視為成功損傷的模型。

【0212】 為了確定適合移植的模型，對阿朴嗎啡誘導的旋轉進行評分，並將顯示每分鐘旋轉>6次的小鼠用於移植。針對移植，藉由解離收集第25天多巴胺前驅細胞，並在補充有10 ng/mL BDNF、10 ng/mL GDNF的HBSS中重新懸浮細胞至濃度約1.25x10^5個細胞/μl。將 2 μL細胞懸浮液注射至受損小鼠的以下坐標處：距顱腔的AP +0.5 mm； ML -2.0 mm以及DV -2.8 mm。為了評估移植的NPCs是否可整合以及具有調節受損動物的功能益處，每兩週進行一次旋轉不對稱測試。每2週進行一次旋轉試驗，直至9個月，其中小鼠以腹膜內注射溶解在含有0.1% w/v抗壞血酸的0.9% NaCl中的0.05 mg/kg阿朴嗎啡。使用數位相機記錄旋轉並人工計數。在移植後第1、6以及9個月藉由終末麻醉犧牲多批動物。

【0213】 移植後六個月，使用放射性配體（2-[18F]氟乙基8-[(2E)-3-碘丙基-2-en-1-基]-3-(4-甲基苯基)-8-氮雜雙環[3.2.1]辛烷-2-羧酸酯）（[18F]FE-PE2I），藉由正電子發射斷層掃描（positron-emission tomography，PET）影像評估移植NPC、假注射以及未注射小鼠的紋狀體多巴胺轉蛋白（dopamine transporter，DAT）活性。動物在攝影前禁食3小時。在使用影像床的整合熱空氣通道掃描期間，使動物保持溫暖。在整個掃描過程中監測呼吸頻率及體溫，以確保足夠的麻醉含量。在SingHealth實驗醫學中心（SingHealth Experimental Medicine Centre，SEMC）使用nanoScan PET/MRI掃描儀（Mediso有限公司，匈牙利）對小鼠進行攝影。該掃描儀配備12個探測器模組，軸向視場（field of view，FOV）為94 mm，橫軸視場直徑為94 mm或120 mm，重合模式分別為1:3以及1:5。將動物頭朝前置

於俯臥位，並進行62分鐘的3D動態PET掃描，幀的持續時間不斷增加（即10秒4次、20秒4次、1分鐘3次、3分鐘7次，以及6分鐘6次），之後經由尾靜脈以0.1 ml的最大體積靜脈注射3.57-10.61 MBq的[18F]FE-PE2I。[18F]PE-PE2I是由新加坡Radiopharmaceuticals私人有限公司所合成。MRI影像用於PET掃描的衰減校正，並作為數據分析中PET影像的結構參考。因此，使用nanoScan PET/MRI掃描儀的MRI組件獲取T1加權的MRI影像。在MRI掃描期間，整合的小鼠頭部線圈覆蓋整個大腦。使用3D GRE EXT序列獲得0.6 mm的切片：64 mm正方形FOV、128 × 128 矩陣、20 ms重複時間（repetition time，TR）、2.3 ms回波時間（echo time，TE）、25度翻轉角。[18F]FE-PE2I的PET影像的所有影像以及動力學分析均使用PMOD（版本3.5；PMOD Technologies公司）進行。所有PET影像首先使用PMOD中的FUSION工具自動配準至MRI影像。然後將MRI影像人工配準至T2加權小鼠模板（M.Mirrione，C57BL/6J小鼠；Ma, Y.等人，Neuroscience，2005年，135(4)：第1203-15頁；Mirrione, M.M.等人，Neuroimage，2007年，38(1)：第34-42頁），其中包含具有20個區域的目標體積（volume of interest，VOI）模板。由兩位不同的人員檢視並驗證人工註冊的準確性。最後，應用組合轉換矩陣將PET影像轉換為MRI小鼠模板。使用左右紋狀體以及小腦的VOI進行分析。為了減少錯誤配準及錯誤定義之錯誤（He, B.與E.C. Frey, Phys Med Biol，2010年，55(12)：第3535-44頁），對獲得之VOI應用一個體素的3D腐蝕。使用非侵入性參考組織模型進行[18F]FE-PE2I結合的量化，因為相較於使用動脈輸入函數的動力學分析，這些模型同樣準確（Varrone, A.等人，Nucl Med Biol，2012年，39(2)：第295-303頁）。使用簡化的參考組織模型(simplified reference tissue model，SRTM)(Lammertsma, A.A.與S.P. Hume，1996年，4(3 Pt 1)：第153-8頁）以小腦作為參考計算結合電位

（binding potential，BPnd）值。區域時間活動曲線（time activity curves，TACs）也從紋狀體以及小腦的VOI中萃取。在100% O_2中以5%異氟烷誘導麻醉，並在攝影過程中以1.5-2%異氟烷維持小鼠的麻醉狀態。

【0214】 分析小鼠腦切片是否存在小膠質細胞/巨噬細胞，因為已知這些細胞在中樞神經系統的同種異體移植物及異種移植物排斥反應中具有重要的作用（Hoornaert, C.J.等人，Stem Cells Transl Med，2017年，6(5)：第1434-1441頁）。為此，在經心臟灌注4% PFA後，針對小膠質細胞/巨噬細胞特異性標記Iba1進行免疫染色。為此，PFA灌注的大腦組織在4% PFA中固定過夜，然後以含有15%以及30% w/v蔗糖溶液的PBS進行平衡，直至組織沉降至管底。大腦被嵌入OCT冷凍培養基中，以CM3050 S低溫恆溫器（Leica Biosystems公司）切割18 μm的切片並收集至BOND Plus切片（Leica Microsystems公司）上。

【0215】 結果顯示，hNCAM+/TH+神經元在移植後1個月出現在所有3組動物中（**圖7a-c**），表示NPCs能夠分化為成熟神經元並在宿主環境中存活。然而，在asF-iPS（**圖7h**）或MC23-iPS（未顯示數據）組中沒有明顯的植入跡象。可看到hNCAM/TH+纖維從EC23-CLiPS組的移植核心中的神經元沿著胼胝體的軸突束延伸（**圖7d**與**圖7e**）。小膠質細胞/巨噬細胞特異性標記Iba1的免疫染色顯示，相較於未注射的半球，注射的半球中有大量的小膠質細胞/巨噬細胞（**圖7i**與**圖7j**）。滲入移植物核心的小膠質細胞/巨噬細胞顯現出活化小膠質細胞的變形蟲形態特徵，而移植物外圍的小膠質細胞/巨噬細胞顯現出典型的靜止細胞的分支形態。此外，浸潤的小膠質細胞對CD68染色呈陽性，CD68為活化小膠質細胞的標記。在移植後1個月，在asF5-iPS-及MC23-CLiPS NPC移植大腦的注射部位沒有觀察到小膠質細胞的積累，可能是因為它們在清除異種移植物後已經分散並

恢復到靜止狀態。人類TH+神經元在一些移植有EC23-CLiPS NPC的動物中存活長達9個月，這已透過人類核抗原（HuNu）及人類NCAM染色而證實（**圖8a-f**）。旋轉不對稱測試顯示，當以多巴胺激動劑阿朴嗎啡攻毒時，由於多巴胺耗竭導致受損紋狀體上突觸後D2多巴胺受體的超過敏反應，受損動物將表現出反向旋轉行為。這種旋轉不對稱性改善將視為施用干預效果的表現。相較於asF-iPS NPC或假移植動物，只有移植EC23-CLiPS NPCs的動物的旋轉行為有改善（**圖8h**）。在這些小鼠中，自移植後第20週開始，旋轉減少達到顯著程度（$p<0.05$），在第20週及第22週分別下降至18.2±24.7%以及11.1±20.8%。這些模型顯示出移植後最初觀察到病情惡化的恢復潛伏期。這可能是由於立體定向注射引起的發炎反應以及NPCs成熟、整合以及支配宿主組織所需的時間。EC23-CLiPS NPC移植動物帕金森運動症狀的功能改善表示移植紋狀體中多巴胺功能的恢復。為了進一步研究這一點，我們使用多巴胺轉運蛋白（DAT）配體[18F]FE-PE2I在移植小鼠中進行PET攝影（Bang, J.I.等人，Nucl Med Biol，2016年，43(2)：第158-64頁；Sasaki, T.等人，J Nucl Med，2012年，53(7)：第1065-73頁）。DAT為一種突觸前跨膜蛋白，主要負責突觸處釋放的多巴胺的再攝取，DAT的分子影像是研究多巴胺功能的既定工具。移植後6個月的PET影像顯示移植的受損半球中的DAT活性恢復到EC23-iPS NPC移植小鼠中未受損半球活性的約71.4±10.3%（n=3）（**圖8i**）。相較之下，asF-iPS-NPC移植小鼠的恢復率僅為16.4±4.0%。這些結果清楚地顯示在EC23-iPS NPC移植小鼠中多巴胺再攝取功能顯著恢復。

【0216】 實施例13：在具有完全免疫能力的帕金森氏症嚙齒動物大鼠模型中移植CLiPS衍生的多巴胺神經元

【0217】我們的移植結果顯示，當移植到C56BL/6小鼠的紋狀體中時，EC23-CLiPS衍生的NPC是可被耐受的。為了排除這種現象可能存在的物種特異性偏差，移植研究在不同物種Wistar大鼠中進行重複試驗。藉由將6-OHDA注射至MFB中以損傷黑質紋狀體途徑，誘發這些大鼠產生帕金森氏症。於此方面，值得注意的是，所有動物實驗都是根據新加坡國家神經科學研究所（NNI）機構動物護理暨使用委員會（IACUC）核准的方法進行的。新加坡國立科技大學（National Technological University，NTU）的IACUC額外核准對大鼠的實驗。相較於紋狀體受損，MFB受損已知會導致多巴胺系統更完全耗盡，因此被認為不太可能導致自發恢復（Torres, E.M.與S.B. Dunnett，*Animal Models of Movement Disorders: Volume I*，E.L. Lane與S.B. Dunnett編輯，2012年，Humana出版社：紐澤西州托托瓦市，第267-279頁）。這些大鼠具有完全的免疫能力，且在移植之前或之後沒有進行免疫抑制。為了進行分析，從InVivos私人有限公司購買了約8週齡的雌性Wistar大鼠。藉由在以下坐標處將4 µl的20 µg 6-OHDA立體定向注射至左內側前腦束（medial forebrain bundle，MFB）中，誘導單側損傷：距硬腦膜AP -4.4 mm；ML -1.2 mm；以及DV -8.6 mm。為確定適合移植的模型，如**實施例12**中所述對阿朴嗎啡誘導的旋轉進行評分。將3 µl約1.25x10^5個細胞/µl的第25天多巴胺前驅細胞移植至顯現出>6次旋轉/分鐘的大鼠的左側紋狀體中，移植位置為參照前囟點的以下坐標：距硬腦膜AP +0.8 mm；ML -2.5 mm；以及DV -5 mm。為了評估移植的NPC是否可整合並具有調節受損動物的功能益處，旋轉不對稱測試以1個月的間隔進行，如**實施例12**中所述。在6個月時藉由終末麻醉犧牲大鼠，如**實施例12**所述，在經心臟灌注4% PFA後收穫大腦用於免疫組織學分析。

一些未達到損傷標準的動物也被類似地移植並在移植後1個月及3個月犧牲以評估細胞存活及植入。

【0218】 結果顯示，藉由DAB染色中腦切片中的TH證實在該模型中由於6-OHDA經由MFB逆行轉運，黑質中多巴胺神經元的單側耗竭（**圖11d**）。將asF-iPS-、EC23-CLiPS-以及MC23-CLiPS衍生的NPCs移植至在阿樸嗎啡攻毒下表現出至少5 轉/分鐘的動物體內。移植後3個月的組織學分析顯示，僅在EC23-CLiPS組中存在hCyto+/HuNu+以及hNCAM+/TH+細胞。此外，移植物中的TH+神經元表示突觸蛋白1的表現，代表與宿主神經元整合（**圖11b**）。此外，相較於asF-iPS NPC或假移植動物，只有移植EC23-CLiPS NPCs的動物的旋轉行為有改善（**圖11e**）。大鼠模型也顯示出移植後最初觀察到病情惡化的恢復潛伏期。這可能是由於立體定向注射引起的發炎反應以及NPCs成熟、整合以及支配宿主組織所需的時間。結果還表示在以CLiPS衍生的NPC移植的大鼠體內多巴胺再攝取功能顯著恢復。

【0219】 **實施例14：區分以及確定RPE細胞特徵之方法**

【0220】 使用快速以及定向分化方法進行自CLiPs分化為RPE。分化的RPE細胞被純化並接種於transwells上用於進一步確定其特徵，例如使用定量反轉錄酶聚合酶連鎖反應（quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction，q-RT-PCR）進行免疫染色以及基因表現分析。使用跨上皮電阻（ransepithelial electric resistance，TEER）以及光感受器外節（POS）的吞噬作用分析細胞的功能。

【0221】 **臍帶內膜誘導的多能幹細胞（CLiPs）培養**

【0222】於mTESR1（Stem Cell Technologies公司）培養基中，在基質膠（Corning公司）包覆的組織培養盤（Corning Costar公司）上培養CLiP。

【0223】分化為視網膜色素上皮細胞

【0224】本案發明人使用Foltz與Clegg（2017年）的定向分化方法並應用不同的修改。CLiP以及人類ES細胞在mTeSR1培養基中的基質膠塗層組織培養盤上生長。當細胞達到90-95%匯合時，將這些細胞暴露於各種分化培養基，其中含有添加各種生長因子的基礎培養基（添加1x B27及1x N2補充劑以及非必需胺基酸的DMEM/F12）。

【0225】*分化培養基1*：從第0天至第2天，1 μM LDN-193189、10 ng/ml Dkk1、10 ng/ml IGF1，以及10 mM 菸鹼醯胺。*分化培養基2*：從第2天至第4天，0.2 μM LDN-193189、10 ng/ml Dkk1、10 ng/ml IGF1、10 mM菸鹼醯胺，以及5 ng/ml b-FGF。*分化培養基3*：從第4天至第6天，10 ng/ml Dkk1以及10 ng/ml IGF1以及100 ng/ml活化素A。*分化培養基4*：從第6天至第8天，100 ng/ml活化素A以及10 μM SU5402。*分化培養基5A*：從第8-11天開始，基礎培養基含有100 ng/mL 活化素A、10 μM SU5402以及1.5 μm CHIR99021。*分化培養基5B*：從第11-16天開始，100 ng/mL活化素A、10 μM SU5402以及3 μM CHIR99021。第16天，基礎培養基更換為RPE維持培養基：50% DMEM/F12、50%最低必需培養基Eagle、Alpha修飾、10 mM菸鹼醯胺、青黴素/鏈黴素、丙酮酸鈉、MEM非必需胺基酸、GlutaMAX（所有1:100）、N1補充劑（1:200）、0.25 mg/ml牛磺酸、0.02 μg/ml氫羥腎上腺皮質素，以及0.013 ng/ml 3,3',5-三碘-L-甲狀腺原胺酸素，並補充2%熱滅活胎牛血清（FBS）。每2-3天更換一次培養基。在修改後的方法中，分化培養基4、5A以及5B中的Su5402由1 μM PD173074取代。

【0226】 **CLiPs衍生的RPE的特徵分析**

- 轉錄分析 - 定量反轉錄酶聚合酶連鎖反應
- 用於評估RPE特異性蛋白質的免疫細胞化學
- 跨上皮電阻（TEER）
- 光感受器外節（POS）吞噬作用分析

【0227】 **定量反轉錄酶聚合酶連鎖反應（qRT-PCR）**

【0228】 在第0、2、4、6、8、12、16以及30天收集RNA樣本。使用RNeasy Mini套組（Qiagen公司）分離總RNA。使用iScript cDNA合成套組（Bio-Rad公司）從1 μg RNA合成cDNA。在Quant Studio 3即時PCR系統（Thermo Fischer公司）上使用KAPA SYBR FAST在96孔盤中以技術三重複（10 μl反應）進行qRT-PCR。針對以下標記設計產生75-200鹼基對長度的PCR產物的基因特異性引子：作為多能性標記的OCT4、NANOG以及SOX2，作為早期眼視野標記的OTX2、LHX2、RAX以及SIX3，作為早期RPE標記的PAX6、MITF、VSX2以及SOX10，作為成熟的RPE標記的BEST-1、PMEL 17、MERTK、酪胺酸酶、TRYP2以及RPE65。以「管家」基因磷酸甘油醛去氫酶（glyceraldehyde phosphate dehydrogenase，GAPDH）將數據進行標準化。

【0229】 **免疫細胞化學**

【0230】 在transwells上接種6週後，以PBS洗滌細胞並在室溫（room temperature，RT）下以4%多聚甲醛（pH 7.4）固定細胞20分鐘。然後以PBS洗滌固定的細胞，在室溫下以0.2% Triton X-100滲透3-5分鐘，並在室溫下以含有1%牛血清白蛋白（BSA）的PBS阻隔1小時。然後於4°C下以含1% BSA的一級抗體檢測細胞過夜。洗滌3次以去除一級抗體後，將細胞與適當的Alexa Fluor偶聯的

二級抗體（1:1000；Life Technologies公司）、用於染色細胞核的DAPI，以及用於染色肌動蛋白的Alexa偶聯的鬼筆環肽在室溫下培養45分鐘。細胞以PBS洗滌並使用Fluorsave（Calbiochem公司）封片。使用LSM 700共聚焦顯微鏡（Carl Zeiss公司，耶納市，德國）使用40x或63x油浸物鏡對細胞進行影像分析。

【0231】使用以下抗體：兔閉鎖小帶1（ZO-1、1:200、Invitrogen公司）、兔緊連蛋白（1:125、Invitrogen公司）、小鼠視網膜色素上皮特異性65 KDa蛋白（RPE65、1:125、Abcam公司）、小鼠細胞視黃醛結合蛋白（CRALBP，1:1000，Abcam公司）、小鼠卵黃狀黃斑病蛋白（BEST-1，1:125，Abcam公司）、小鼠Na+/ATPase（1:250，Invitrogen公司）、小鼠Ezrin蛋白（1:200，Abcam公司），以及小鼠密封蛋白19（1:125）。

【0232】跨上皮電阻（TEER）

【0233】藉由測量TEER確定反映RPE單層完整性以及極性的上皮屏障特性的發展以及RPE細胞之間的緊密連接形成。為此，細胞在塗有Synthemax-II（Corning公司）的可滲透0.4-μm 24孔Transwell插入物（Corning公司）上培養。TEER測量每週進行一次，使用上皮電壓歐姆計 - EVOM2（World Precision Instruments公司）按照製造商的說明進行。簡言之，電極以70%乙醇消毒、風乾並在RPE培養基中平衡，然後放置在transwell過濾器中，較長的電極位於下室接觸培養皿底部，較短的電極位於上室。淨TEER（Ω.cm2）的計算方法是從對照、未接種細胞的transwell的電阻值中減去實驗transwell的電阻值，然後將淨值乘以濾膜面積。

【0234】光感受器外節（POS）吞噬作用分析

【0235】 POS是從當地一家屠宰場收集的豬眼中分離出來的。以刀片將它們切成兩半，並在暗室中紅光下以鑷子取出視網膜。將視網膜置於均化培養基中，充分混合並過濾。將視網膜懸浮液層疊在蔗糖梯度（25-60%）之上，並在超速離心機（Optima超速離心機，Beckman公司）中以112,398×g離心1小時。收集粉紅色POS層並在RT下以存在於0.1M碳酸氫鈉緩衝液（pH 9.5）中的螢光異硫氰酸鹽（fluorescein isothiocyanate，FITC，Invitrogen公司）標記1小時。標記的POS被洗滌並以等分試樣儲存於-80℃下備用。針對吞噬作用分析，於37℃ 5% CO_2培養箱中以FITC標記的POS處理在transwell上生長的RPE細胞2小時，或於4℃下作為對照。以未標記的POS處理的細胞作為對照。然後以PBS洗滌培養盤上的孔井三次以去除未結合的POS並使用TrypLE（Gibco公司）解離成單顆細胞。使用BD LSR II流式細胞儀測量FITC螢光以確定POS吞噬作用。

【0236】 **流式細胞儀**

【0237】 使用IntraPrep滲透試劑（Beckman Coulter公司，IM2389）以Pmel17抗體（Dako公司，M0634）對在24孔盤上生長的4-6週齡細胞進行染色。簡言之，根據套組中提供的說明，以TrypLE解離細胞並固定及滲透。將約50,000個細胞轉移至15 ml離心管中，在冷室中與2-4μl Pmel或RPE65抗體在搖床上培養過夜，然後以PBS洗滌細胞，接著與Alexa標記的488/647二級抗體一起培養，並在FACS LSR5 II儀（BD公司）中進行分析。

【0238】 **RPE純化方法**

【0239】 **（i）人工純化**：藉由在解剖顯微鏡下觀察培養盤，以連接至移液管的10 μl吸頭尖人工去除分化培養物中的非RPE細胞。以PBS洗滌培養盤3次以

除去所有非RPE細胞。剩餘的細胞高度富含RPE，藉由添加新鮮的TrypLE並培養5-10分鐘來解離細胞。

【0240】（ii）**TrypLE純化**：相較於非RPE細胞，RPE細胞對組織培養盤的附著力更強。由於對生長表面的附著力較弱，非RPE細胞可藉由使用TrypLE等溫和解離劑處理以輕鬆去除。吸出培養基後，將磷酸鹽緩衝鹽溶液加入孔中，並藉由以1 ml移液器劇烈移液以去除鬆散附著的非RPE團塊。去除分離的細胞團塊後，將培養盤與TrypLE一起培養5-10分鐘，並藉由輕敲及移液將非RPE細胞分離以釋放非RPE細胞。分離的非RPE細胞被收集、解離並作為「鬆散」部分。以PBS徹底清洗培養盤3次以去除所有非RPE細胞，並藉由與新鮮的TrypLE一起培養5-10分鐘來解離緊密附著的RPE細胞。將緊密附著的RPE以及鬆散附著的非RPE細胞接種於培養盤上進行實驗。

【0241】（iii）**TrypLE+人工純化**：雖然上述TrypLE純化去除了大部分大的非RPE團塊，但仍然存在一些小團塊，這些小團塊藉由人工純化去除，如方法1中所述。

【0242】（iv）**TrypLE＋散射分選**：吸出培養基後，鬆散附著的RPE細胞被移除，如方法3中所述。剩餘的細胞藉由進一步的TrypLE處理5-10分鐘解離，並按照散射分選中的描述進行處理。在分選過程中，藉由TrypLE處理去除的弱附著的非RPE細胞被用來設定散射低細胞的門控。僅在強附著部分中存在的散射高群體有助於設定門控以對RPE細胞進行分類。

【0243】（v）**散射分選**：藉由TrypLE處理將分化盤上的所有細胞解離為單個細胞並沉澱。將細胞沉澱重新懸浮在FACS緩衝液中，藉由70 μm過濾器以獲得單細胞，並使用BD FACS Aria II細胞分選儀分離散射高以及散射低的部分。

【0244】 **粒線體及糖酵解功能的分析**

【0245】 使用製造商描述的分析條件，使用XFe96細胞外通量分析儀（Seahorse Bioscience公司）對CLiPs-RPE、皮膚-iPSC-RPE以及H9-RPE細胞進行粒線體及糖酵解功能分析。將細胞以6 x 10^4個的接種密度接種於Synthemax-II包覆的96孔盤中並生長48小時。在基礎條件下檢測耗氧率（OCR），然後使用Cell Mito Stress Test依次添加寡黴素（2 μm）、FCCP（1.5 μm）以及魚藤酮（0.5 μM）與抗黴素A（0.5 μM）。這能測量以下參數：基礎呼吸、OCR、ATP產生量、最大呼吸、備用呼吸能力以及非粒線體呼吸。使用糖酵解壓力測試，在基礎條件下測量細胞外酸化率（Extra cellular acidification rate，ECAR），然後依次添加10 mM葡萄糖、5 μM寡黴素以及100 mM 2-DG。這測量了糖酵解能力以及糖酵解儲備的參數。以細胞數將測定結果進行標準化。

【0246】 **評估色素沈澱的影像分析**

【0247】 從第17天開始，使用Chemidoc觸摸系統（Biorad公司）定期拍攝分化盤的黑白16位影像。基於背景強度閾值，使用Matlab軟體測量RPE細胞的黑色區域及其亮度。從16位影像（65535）的最大可能亮度強度中減去分析得到的色素沈澱亮度，得到色素沈澱的暗度。

【0248】 **實施例15：CLiPS分化為RPE細胞**

【0249】 本案發明人使用RPE分化方法從CLiPS產生RPE，其可為間質（CLMC）或外胚層（CLEC）來源（**表4**）。

【0250】 **表4：**本研究中使用的不同幹細胞

細胞株	細胞種類	捐贈者年齡	捐贈者性別	捐贈者種組背景
AsFS	皮膚iPS	78	男	亞洲人
AG04148	皮膚iPS	56	男	白人

HDFA	皮膚iPS	31	女	白人
CLEC23	CLEC	0	男	亞洲人
CLMC23	CLMC	0	男	亞洲人
CLMC30	CLMC	0	男	亞洲人
CLMC44	CLMC	0	女	亞洲人
H9細胞	人類ES	0	女	

【0251】 本案發明人使用ES細胞及皮膚iPS細胞作為RPE分化的對照（**表4**）。使用這種方法使CLiPS穩健地分化為RPE（**圖13**）。

【0252】 實施例16：CLiPS與皮膚iPS細胞相比具有一致的高RPE分化效率

【0253】 為了比較不同類型幹細胞的RPE分化效率（**表4**），本案發明人開發了視覺分級系統（**圖14a**），以評估分化盤每個孔中色素細胞佔據的面積百分比。針對無色素沈澱、<30%、30-60%或>60%色素沈澱，RPE分化效率分別分級為0、1、2或3。為每個分化盤繪製堆積柱狀圖，不同顏色指示不同等級的色素沈澱（**圖14b**）。在分化的生物複製物中，相較於皮膚iPS細胞，ES細胞以及自臍帶內膜間質細胞（CLMC）衍生的iPS細胞顯示出始終如一的高RPE分化效率。藉由流式細胞儀分析估計表現RPE特異性蛋白Pmel17的細胞百分比，進一步證實CLiPS的高RPE分化（**圖14c**）。

【0254】 實施例17：CLiPS衍生的RPE較ES衍生的RPE具有更多的色素沈澱

【0255】 為了比較由各種細胞株產生的RPE的色素沈澱強度以及色素沈澱採集的動力學，使用ChemiDoc Touch凝膠影像系統（Bio-Rad laboratories公司）從分化第17天開始定期拍攝的分化盤影像。在第30天拍攝的分化盤影像（**圖15a**）以及相差影像（**圖15b**）中，CLiPS的色素沈澱比ES細胞的更深。分化不同天數的色素沈澱強度分析表示，CLiPS-RPE在整個分化過程中比ES衍生的RPE具有更

高的色素沈澱（**圖15c**）。與此一致的是，CLMC23的分化培養物顯示色素沈澱相關基因MITF、PMEL17、酪胺酸酶以及TRYP2的較高表現（**圖15d**）。

【0256】 **實施例18：CLiPS衍生的RPE表現RPE特異性基因**

【0257】 本案發明人在分化第18天及第35天藉由定量PCR檢查CLiPS衍生的RPE中RPE特異性基因的表現。在CLiPS衍生的RPE中觀察到RPE特異性基因RPE65以及MERTK（**圖16**）的穩健表現，且在第35天時這些基因的表現量更高，表示它們更為成熟。

【0258】 **實施例19：CLiPS衍生的RPE具有功能性緊密連接並且能夠吞噬**

【0259】 藉由測量跨上皮電阻（TEER）以及FITC標記的光感受器外節的吞噬作用來確定CLiPS-RPE的功能。CLiPS-RPE的TEER（**圖17a**）以及吞噬作用（**圖17b**）與ES衍生的RPE相似。

【0260】 **實施例20：CLiPS-RPE表現與ES衍生的RPE相似的蛋白質**

【0261】 RPE的極化對於頂端-基底特定功能相當重要，蛋白質在極化的RPE單層中顯現出局部表現。為了測試CLiPS是否顯示與先前報導的RPEs相似的蛋白質表現，本案發明人針對不同蛋白質對RPEs進行免疫染色。ZO-1在細胞-細胞連接處表現，Mertk在頂端側表現，RPE-65在細胞質中表現（**圖18**），類似於天然的、ES以及iPS衍生的RPE。

【0262】 **實施例21：RPE分化方法的修改**

【0263】 本案發明人基於Foltz與Clegg於2017年開發之方法（J Vis Exp. 2017年；(128)：56274）開發了一種略微修改的RPE分化方法。（A）如原始Clegg方法中所述，使用3 μM CHIR（**圖19a**）會導致分化第11-12天左右的細胞過度死亡，進而導致RPE產量急劇下降。為了防止這種情況，本案發明人藉由以下方式

逐漸增加培養基中的CHIR來修改該方法：從1.5 μM開始持續3天（分化的第8-11天），然後3 μM持續5天（第12-17天）。（B）亦確認新的FGF抑制劑來進行RPE分化：本案發明人以PD173074取代SU5402（**圖19b**）以獲得類似程度的RPE分化及色素沈澱（**圖19c**）。PD173074的使用濃度遠低於SU5402（1 μM而非10 μM），這可減少因高濃度化學物質誘導出不想要的基因表現變化（Waldmann T等人，2014年，Chem Res Toxicol，2014年3月17日；27(3)：第408-20頁）。使用不同的FGF抑制劑（SU5402或PD173074）進行分化所獲得之RPE具有相當的TEER及吞噬作用（**圖19d、e**）。

【0264】 實施例22：用於RPE純化之方法的開發

【0265】 當RPE獲得色素沈澱時，以30-35天的分化培養物進行RPE純化。從混合分化培養物中純化RPE之方法包含：根據RPE以及非RPE細胞之間的形態學差異，在分化第14天人工去除非RPE細胞（Foltz與Clegg，2017年）、藉由使用TrypLE或Accutase等弱解離劑進行短期處理以選擇性去除對培養皿的附著力較弱的非RPE細胞（Nazari等人，2015年；Yuko Iwasaki等人，2016年），以及根據RPE中黑色素體對光的較高散射進行散射分選（Shih等人，2017年）。與先前描述的14天齡的培養物（Foltz與Clegg，2017年）不同，本案發明人使用30-35天齡的分化培養物進行RPE純化。到30-35天時，分化培養物中的RPE細胞獲得棕色色素沈澱，這有助於以人工純化方式區分RPE細胞及非RPE細胞。本案發明人比較了不同的方法（**圖20a**及**b**）以確定哪種方法會產生最高純度及產率的功能性RPE。這些包含（i）人工純化：根據非RPE細胞的形態以及色素沈澱的缺乏進行識別，並藉由在解剖顯微鏡下觀察進行刮擦以人工去除這些細胞，（ii）TrypLE純化：藉由部分TrypLE處理去除大部分弱附著的非RPE細胞簇，（iii）TrypLE+

人工純化：藉由部分TrypLE處理消除大部分弱附著的非RPE細胞簇，然後藉由在解剖顯微鏡下觀察人工去除少數逃脫TrypLE處理的非RPE細胞簇，（iv）TrypLE+散射分選：藉由部分TrypLE處理去除弱附著的非RPE細胞簇，然後進行散射分選，（v）散射分選：根據細胞的相對光散射（**圖20c**）將所有細胞從混合分化培養物中分離為高散射（有色RPE細胞）以及低散射（無色素非RPE細胞）細胞群。為了更精確地選擇門控，本案發明人在分化培養物（從部分TrypLE處理中收集）中使用弱附著的非RPE細胞引入低散射對照。基於散射高門控對RPE細胞進行分類及選擇（**圖20d**）。這種兩步純化涉及在流式細胞儀分析之前首先藉由TrypLE去除非RPE細胞，有助於減少分選時間。RPE細胞的百分比產量是藉由純化後獲得之RPE細胞數/純化前混合RPE細胞群中的細胞總數 x 100% 來計算的。

【0266】 由於優先解離預計會去除非RPE細胞，因此純化後獲得的所有細胞都被視為RPE細胞。根據分化培養物中存在的細胞總數以及純化後獲得之細胞數計算純化後RPE的百分比產量。為了純化，本案發明人使用來自HDFA iPS細胞的分化培養物，藉由流式細胞儀分析，該群細胞含有51% Pmel17陽性細胞，表示其含有51%RPE細胞。因此，這種培養物可達到的最大RPE產量為51%。TrypLE純化產生50%的RPE細胞，非常接近51%的最大預期產量。人工純化以及TrypLE+人工純化的產量略低，分別為47.7%以及43.4%。涉及散射分選之方法產生較低產率（21-22%）（**圖20e**）。藉由Pmel17流式細胞儀分析，所有純化方法均達到95%以上的純度（**圖20f**）。到第10週時，藉由不同方法純化的RPE的TEER值相似（**圖20g**）。在吞噬作用分析中，所有純化方法產生的RPE細胞具有超過90%的吞噬作用（**圖20h**）。

【0267】 總之，藉由所有方法純化的RPE細胞具有相當的純度、TEER以及POS吞噬作用。在產量方面，人工純化、TrypLE以及TrypLE+散射分選的RPE產量最高。TrypLE以及TrypLE+人工純化最容易執行，因為部分TrypLE處理去除了大部分非RPE細胞（**圖20i**）。TrypLE純化將是為大多數一般研究目的產生RPE細胞的有效方法，因為其易於純化、高產量、純度以及功能。TrypLE+人工純化方法涉及額外的人工純化步驟，以去除任何可能逃脫TrypLE處理的非RPE細胞，是產生用於移植的RPE細胞的理想方法。純化後，本案發明人比較了純化的CLMC23以及H9中BEST1、RPE65、MERTK、MITF、PMEL17、RLBP1以及TRYP2的表現（**圖20j**）。相較於ES衍生的H9 RPE，大多數的這些基因在CLMC23中的表現量增加（**圖20k**）。

【0268】 **實施例23：CLiPS衍生的RPE具有高糖酵解以及粒線體呼吸**

【0269】 糖酵解以及粒線體呼吸的測量提供生物能量學以及細胞健康的指標。使用XFe96細胞外通量分析儀（Seahorse Bioscience公司）使用細胞絲裂紋壓力測試測定條件測量源自不同幹細胞的RPE細胞的生物能學。糖酵解功能藉由細胞外酸化率（extracellular acidification rate，ECAR）進行量化，而氧化磷酸化（oxPhos）藉由耗氧率（OCR）進行量化。**圖21a**以及**b**表示，在分化的RPE中，CLiPs-RPE細胞具有最接近原代RPE（AHRPE）的生物能量特徵，使它們在生理上更接近天然的RPE。此外，相較於皮膚-iPSC-RPE（ASF5-RPE）以及hESC-RPE（H9-RPE），CLiPs-RPE還顯示出更高的糖酵解及氧化磷酸化（**圖21a**以及**b**）。這些結果顯示，相較於hESC細胞衍生的RPEs，CLiPs-RPEs具有更高的生物能量特性。相較於AMD患者的RPE，健康的RPE表現出較高的糖酵解以及粒線體功能（Ferrington等人，2017年）。CLiPS-RPEs具有較高的OCR及ECAR表示該細胞在

臨床使用上可能優於hESC衍生的RPEs。這點透過與易受氧化壓力影響的皮膚-iPSC-RPE（**圖21d**以及**h**）及hESC-RPE（**圖21e**以及**i**）比較，CLiPs-RPEs在暴露於氧化的低密度脂蛋白（**圖21c**）及過氧化氫（**圖21g**）時顯示對氧化壓力的抵抗力增加而得到證明。這表示CLiPs-RPE在移植後可能存活得更好。CLiPs-RPE細胞對氧化壓力的反應類似於在天然RPE AHRPE中觀察到的反應（**圖21f**以及**j**），這使得CLiPs-RPE與其他分化的RPE相比，它們在功能上更接近原代RPE。

【0270】 實施例24：CLiPS RPE在人源化小鼠模型中具有潛在的免疫特權特性

【0271】 使用標記有GFP的螢光素酶（Luc）基因編碼載體建立生物發光RPE細胞株，藉由慢病毒感染遞送。藉由分析生物發光強度證實Luc在這些細胞株中的穩定表現。為了測試不同RPE細胞株的免疫原性，採用先前公開（PMID：15780993）的基質膠栓試驗。將RPE-基質膠栓皮下移植至人源化小鼠中。使用生物發光影像系統在2個月的時間過程中定期監測RPE-基質膠栓的生物發光。人源化小鼠中所有RPE細胞株的總輻射（生物發光）顯示訊號隨時間略有但不顯著的下降（**圖22a**）。這表示RPE細胞沒有明顯增殖並保持在其預期的典型成熟RPE靜止狀態。為了辨別隨著時間的推移觀察到的輕微下降是否是由於免疫系統的清除，將RPE-基質膠栓移植到NOD-SCID IL2Rγ-/-（NSG）免疫缺陷小鼠中。觀察到總輻射度同樣降低，排除了免疫系統清除RPE細胞的可能性（**圖22b**）。這種減少可歸因於該區域缺乏營養供應，導致實驗期間細胞逐漸死亡。為確認基質膠-RPE栓中RPE細胞的存活並確定其狀態，在實驗終點萃取移植物並使用成熟RPE標記（RPE65）以及增殖標記（Ki67）進行免疫螢光分析（**圖22c**）。在所有測試

的RPE細胞株中，觀察到RPE65的表現，而不存在Ki67，這證實了RPE細胞的成熟以及靜止狀態。

【0272】 **實施例25：監測促進發炎細胞激素作為細胞免疫反應的替代物**

【0273】 在確認所有組別的成熟RPE細胞移植物存活後，檢測在人源化小鼠實驗終點所收集的血清樣本是否存在關鍵的促進發炎細胞激素（IFN-γ以及IL-18），這些激素是細胞調節的免疫反應中的中樞效應因子（PMID：29856726）。所有測試的RPE細胞株均顯示皮克範圍內的細胞激素含量，低於誘導全身免疫系統活化的閾值（**圖23a**以及**b**）。出乎意料的是，相較於其他細胞株，CLEC23-RPE始終顯示出最低含量的這兩種細胞激素。然後在局部含量研究免疫反應，即在RPE-基質膠栓中檢測局部免疫反應。使用人類CD45（HCD45）標記進行免疫螢光分析以觀察免疫細胞浸潤。OTX2為一種RPE特異性轉錄因子，用於區分RPE細胞（**圖23c**）。與低含量的IFN-γ及IL-18細胞激素一致，CLEC23-RPE中確實不存在免疫細胞浸潤。基於hCD45陽性細胞進行定性分級（0至3級）以確定所有組別（至少n = 3）的免疫浸潤嚴重程度並繪製圖式（**圖23d**以及**e**）。CLEC23-RPE具有最低的免疫細胞浸潤。這些數據暗示CLEC23-RPE可能具有免疫特權特性。

【0274】 **實施例26：CLEC23-RPE可調節T細胞活化以賦予低免疫原性**

【0275】 移植排斥主要是由細胞調節的免疫反應所引起的。從前面的圖中觀察到，CLEC23-RPE具有最低的免疫細胞浸潤。因此，我們假設CLEC23-RPE可能影響涉及細胞調節免疫的元素（T細胞）的活化。在人源化小鼠血清（**圖24a**以及**b**）（PMID：26252407）中分析參與T細胞活化的已知細胞激素IL-23以及IL17A。相較於其他組別，CLEC23-RPE顯示出對這兩種細胞激素的含量最低。由於這些細胞激素影響T細胞活化，因此使用流式細胞儀分析計算T細胞（CD3）

與B細胞（CD19）的相對比例（**圖24c**）。只有CLEC23-RPE組的T細胞計數低於B細胞，表示T細胞活化可能受到抑制。對T細胞亞群（輔助性T（CD4）以及細胞毒性T（CD8）細胞）進行額外分析，顯示CLEC23-RPE相對於輔助性T細胞具有最低的細胞毒性T細胞（**圖24d**）。然後將這兩個子集的活化狀態進一步分為四組：初始（靜止）、中央記憶（CM；預活化）以及兩種活化狀態（效應記憶（EM）以及效應記憶再表現CD45RA（TEMRA））。CD4輔助性T細胞亞群的活化狀態之間沒有明顯差異（**圖24e**）。然而，在CD8+細胞毒性T細胞亞群中，CLEC23-RPE清楚地顯示出較高的初始細胞群（**圖24f**）。因此，本案發明人假設CLEC23-RPE的潛在免疫特權狀態可能源於抑制CD8細胞毒性T細胞的活化。

【0276】 對於本領域的技術人員來說顯而易見的是，在不脫離本發明之範圍以及精神的情況下，可對本文公開的發明進行各種替換及修改。

【0277】 說明書中提及的所有專利及出版物都代表本發明所屬領域的普通技術人員的程度。所有專利及出版物均以引用方式併入本文，其程度如同每個單獨的出版物都被具體且單獨地指明以引用方式併入。

【0278】 術語「小於」或「大於」或「之下」不包含該具體數字。在描述本發明之上下文中（特別是在請求項的上下文中）使用的術語「一」以及「一個」以及「該」以及類似的引用應被解釋為涵蓋單數及複數，除非本文另有說明或與上下文明顯矛盾。本文中數值範圍的敘述目的僅在於作為單獨指代落入該範圍內的每個單獨數值的速記方法。除非本文另有說明，否則每個單獨的數值都被併入說明書中，就好像它在本文中被單獨引用一樣。本文所用之術語「及/或」包含「以及」、「或」以及「由所述術語連接的元素的所有或任何其他組合」之含義。「包含」一詞係指「包含但不限於」。「包含」以及「包含但不限於」可互

換使用。術語「約」係指正負20%，較佳為正負10%，更佳為正負5%，最佳為正負1%。

【0279】本文示例性描述的發明可在沒有本文未具體公開的任何一個或多個要素、限制或局限的情況下適當地實施。因此，例如，術語「包含」、「包括」、「含有」等應被廣泛地理解而非限制性的。當在本文中使用時，「由...組成」不包含未在申請專利範圍要素中指定的任何要素、步驟或成分。當在本文中使用時，「主要由...組成」不排除不會實質性影響申請專利範圍的基本以及新穎特徵的材料或步驟。此外，本文使用之術語及表現方式已作為描述性而非限制性術語，使用此類術語及表現方式無意排除所示及描述的特徵或其部分的任何等同物，但應認識到在請求保護的本發明之範圍內可進行各種修改。因此，應當理解的是，雖然本發明已經藉由較佳實施例及可選特徵具體地公開，但本領域技術人員可採用本文公開之具體化的發明的修改及變化，且這些修改及變化被認為涵蓋於本發明之範圍內。本發明已在本文中廣泛且一般地描述。屬於一般公開內容的每個更窄的種類及亞種也構成本發明之一部分。這包含本發明之一般描述，帶有從屬中刪除任何主題的附帶條件或否定限制，無論所刪除的材料是否在本文中具體引用。此外，在根據馬庫西群組描述本發明之特徵或方面的情況下，本領域技術人員將認識到本發明也由此根據馬庫西群組的任何個體成員或成員的亞群組描述。根據所附申請專利範圍，本發明之進一步實施例將變得顯而易見。本發明進一步具有以下各項特徵：

1. 一種誘導性多能幹細胞之產生方法，其中該方法包含在適合重新編程該幹細胞的條件下，在臍帶羊膜幹細胞中表現編碼蛋白OCT3/4、SOX2、KLF4、

LIN28以及L-MYC以及p53-shRNA的外源核酸，進而產生誘導性多能性幹細胞。

2. 根據第1項所述之方法，其中該臍帶羊膜幹細胞為臍帶羊膜間質幹細胞或臍帶羊膜上皮幹細胞。

3. 根據第1或2項所述之方法，其中該臍帶羊膜間質幹細胞為間質幹細胞群，其中至少約90%或更多的該幹細胞群的細胞表現以下標記中的每一種：CD73、CD90以及CD105。

4. 根據第3項所述之方法，其中至少約90%或更多的該間質幹細胞群的細胞缺乏以下標記的表現：CD34、CD45以及HLA-DR。

5. 根據第3或4項中任一項所述之方法，其中至少約91%或更多、約92%或更多、約93%或更多、約94%或更多、約95%或更多、約96%或更多、約97%或更多、約98%或更多、約99%或更多的該間質幹細胞群的細胞表現CD73、CD90以及CD105中的每一種並且不表現CD34、CD45以及HLA-DR中的每一種。

6. 根據第1至5項中任一項所述之方法，其中該編碼蛋白質OCT3/4、SOX2、KLF4、LIN28以及L-MYC以及p53-shRNA的外源核酸由一個、兩個或三個載體提供，其中較佳為一第一載體編碼蛋白質OCT3/4以及53-shRNA、一第二載體編碼蛋白質SOX2以及KLF4，以及一第三載體編碼蛋白質L-MYC以及LIN28。

7. 根據第1至6項中任一項所述之方法，其中將該臍帶羊膜幹細胞進行轉染以將該外源核酸轉移至該幹細胞中。

8. 根據第7項所述之方法，其中對該臍帶羊膜幹細胞進行電穿孔以將該外源核酸轉移至該幹細胞中。

9. 根據第8項所述之方法，其中該臍帶羊膜間質幹細胞以具有約15-25 ms持續時間以及約1550-1650V電壓的1個脈衝進行電穿孔，較佳以具有約20 ms持續時間以及約1600V電壓的1個脈衝進行電穿孔。

10. 根據第9項所述之方法，其中每個載體的載體（質體）DNA的量與進行電穿孔的臍帶羊膜間質幹細胞數的比例在約1.5 μg質體DNA比約1x10^{6}個CLMC至約2.5 μg質體DNA比約1x10^{6}個CLMC的範圍內，其中該比例為，例如約2.5 μg質體DNA：1x10^{6}個細胞、約2.25 μg質體DNA：1x10^{6}個細胞、約1.8 μg質體DNA：1x10^{6}個細胞、約1.7 μg質體DNA：1x10^{6}個細胞、約1.6 μg質體DNA：1x10^{6}個細胞、約1.5 μg質體DNA：1x10^{6}個細胞，或較佳約1.67 μg：1x10^{6}個細胞。

11. 根據第8項所述之方法，其中該臍帶羊膜上皮幹細胞以具有約25-35 ms持續時間以及約1300-1400V電壓的2個脈衝進行電穿孔，較佳以具有約30 ms持續時間以及約1350V電壓的2個脈衝進行電穿孔。

12. 根據第11項所述之方法，其中每個載體的載體（質體）DNA的量與進行電穿孔的臍帶羊膜上皮幹細胞數的比例在約1.5 μg質體DNA比約1x10^{6}個細胞至約2.5 μg質體DNA比約1x10^{6}個細胞的範圍內，其中該比例為，例如約1.5 μg質體DNA：1x10^{6}個細胞、約1.6 μg質體DNA：1x10^{6}個細胞、約1.7 μg質體DNA：1x10^{6}個細胞、約1.8 μg質體DNA：1x10^{6}個細胞、約1.9 μg質體DNA：1x10^{6}個細胞、約2.0 μg質體DNA：1x10^{6}個細胞、約2.5 μg質體DNA：1x10^{6}個細胞，較佳約1.67 μg質體DNA：1x10^{6}個細胞。

13. 根據第7至12項中任一項所述之方法，其中該轉染的幹細胞在適合細胞恢復的培養基中培養。

14. 根據第13項所述之方法，其中該適合細胞恢復的培養基為無血清培養基。

15. 根據第13項所述之方法，其中該適合轉染的臍帶羊膜間質幹細胞恢復的培養基由約85至95%（v/v）所定義之培養基以及5至15%（v/v）胎牛血清所組成。

16. 根據第15項所述之培養基，其中該適合轉染的臍帶羊膜間質幹細胞恢復的培養基由約90%（v/v）化學成分確定的培養基以及約10%（v/v）胎牛血清所組成。

17. 根據第14或15項中任一項所述之培養基，其中該培養基含有約85至95%（v/v）CMRL-1066以及約5至15%（v/v）FBS。

18. 根據第13或14項所述之方法，其中該適合轉染的臍帶羊膜上皮幹細胞恢復的培養基包含乳腺上皮基礎培養基MCDB 170、EpiLife培養基、DMEM（Dulbecco氏改良Eagle氏培養基）、F12（Ham氏F12培養基）以及FBS（胎牛血清）。

19. 根據第18項所述之方法，其中該適合轉染的臍帶羊膜上皮幹細胞恢復的培養基包含終濃度為約10至約30%（v/v）的乳腺上皮基礎培養基MCDB 170、終濃度為約20至約40%（v/v）的EpiLife培養基、終濃度為約5至約15%（v/v）的F12、終濃度為約30至約45%（v/v）的DMEM 45%（v/v），以及終濃度為約0.1至2%（v/v）的FBS。

20. 根據第19項所述之方法，其中該適合轉染的臍帶羊膜上皮幹細胞恢復的培養基包含終濃度為約15至約25%（v/v）的乳腺上皮基礎培養基MCDB 170、終濃度為約25至約35%（v/v）的EpiLife培養基、終濃度為約7.5至約13%（v/v）的F12、終濃度為約35至約40%（v/v）的DMEM，以及終濃度為約0.5至1.5%（v/v）的FBS。

21. 根據第20項所述之方法，其中該適合轉染的臍帶羊膜上皮幹細胞恢復的培養基包含終濃度為約20%（v/v）的乳腺上皮基礎培養基MCDB 170、終濃度為約30%（v/v）的EpiLife培養基、終濃度為約12.5（v/v）的F12、終濃度為約37.5%（v/v）的DMEM，以及終濃度為約1.0%（v/v）的FBS。

22. 根據第18至21項中任一項所述之方法，其中該適合轉染的臍帶羊膜上皮幹細胞恢復的培養基藉由混合以下成分以獲得終體積為1000 ml的培養基：

200 mL乳腺上皮基礎培養基MCDB 170

300ml EpiLife培養基

250 mLDMEM

250 mLDMEM/F12

1%胎牛血清。

23. 根據第18至22項中任一項所述之方法，其中該適合轉染的臍帶羊膜上皮幹細胞恢復的培養基包含終濃度為約1至約7.5 μg/ml的胰島素。

24. 根據第18至24項中任一項所述之方法，其中該適合轉染的臍帶羊膜上皮幹細胞恢復的培養基包含終濃度為約1至約15 ng/ml的人類表皮生長因子。

25. 根據第18至25項中任一項所述之方法，其中該適合轉染的臍帶羊膜上皮幹細胞恢復的培養基進一步包含至少一種以下補充劑：腺嘌呤、氫羥腎上腺皮質素，以及3,3',5-三碘-L-甲狀腺原胺酸素鈉鹽（T3）。

26. 根據第25項所述之方法，其中該適合轉染的臍帶羊膜上皮幹細胞恢復的培養基包含腺嘌呤、氫羥腎上腺皮質素，以及3,3',5-三碘-L-甲狀腺原胺酸素鈉鹽（T3）中的所有三種。

27. 根據第18至26項中任一項所述之方法，其中該適合轉染的臍帶羊膜上皮幹細胞恢復的培養基進一步包含一種或多種轉化生長因子（Transforming Growth Factors，TGF）。

28. 根據第27項所述之方法，其中該培養基包含轉化生長因子β（TGF-β）及/或轉化生長因子α。

29. 根據第18至28項中任一項所述之方法，其中該適合轉染的臍帶羊膜上皮幹細胞恢復的培養基進一步包含來自霍亂弧菌的霍亂毒素。

30. 根據第14至29項中任一項所述之方法，其中該適合細胞恢復的培養基含有抑制發炎反應以及增強細胞存活的化合物。

31. 根據第30項所述之方法，其中該化合物為糖皮質激素。

32. 根據第31項所述之方法，其中該糖皮質激素係選自由下列所組成之群組：潑尼松龍、甲潑尼龍、地塞米松、倍他米松、皮質酮，以及氫羥腎上腺皮質素。

33. 根據第31或32項所述之方法，其中該氫羥腎上腺皮質素的濃度為約0.5 μM至約2 μM。

34. 根據第13至33項中任一項所述之方法，其中該培養在包覆的細胞培養容器中進行，其中該細胞培養容器較佳以血清衍生基質或無血清基質包覆。

35. 根據第14至34項中任一項所述之方法，其中該適合細胞恢復的培養基在轉染後約1、2或3天，較佳在轉染後約2天，以兩種不同的細胞培養基的混合物替換，進而產生誘導性多能幹細胞集落。

36. 根據第35項所述之方法，其中該兩種不同的細胞培養基為適合細胞回收的培養基以及第二細胞培養基。

37. 根據第35或36項所述之方法，其中該兩種不同的細胞培養基以約1:1（v/v）的比例混合，藉由將1體積的該適合細胞回收的培養基與1體積的該第二細胞培養基接觸所製備。

38. 根據第36或37項所述之方法，其中該第二細胞培養基為一用於培養誘導性多能幹細胞的維持培養基，其中該培養基較佳選自由下列所組成之群組：mTeSR1、StemMACS™ iPS-Brew XF、TeSRTM E8、mTeSRTMPlus、TeSRTM2、mTeSRTM1、Corning® NutriStem® hPSC XF培養基、Essential 8培養基、StemFlex、StemFit Basic02，以及PluriSTEM。

39. 根據第35至38項中任一項所述之方法，其中該細胞培養基混合物在轉染後約3、4或5天內，較佳在轉染後約4天內，被相同的細胞培養基混合物替換。

40. 根據第35至39項中任一項所述之方法，其中該細胞培養基混合物在轉染後約5、6或7天內，較佳在轉染後約6天內，以該第二細胞培養基替換。

41. 根據第40項所述之方法，其中該第二細胞培養基每天或每兩天、第三天更換，較佳每兩天更換一次。

42. 根據第40或41項所述之方法，其中當誘導性多能幹細胞集落達到直徑約0.5 mm至約1.5 mm的大小時被挑選，將該挑選的誘導性多能幹細胞集落轉移至一用於培養及增殖的包覆的細胞培養容器中。

43. 根據第42項所述之方法，其中該誘導的多能幹細胞集落為在明場顯微鏡下被挑選的。

44. 根據第42或43項所述之方法，其中該細胞培養基每天或每兩天更換一次，較佳每天更換一次。

45. 根據第43至44項中任一項所述之方法，其中當該誘導的多能幹細胞集落達到約50%匯合時，將該誘導的多能幹細胞集落從該包覆的細胞培養裝置上分離。

46. 根據第45項所述之方法，其中該誘導的多能幹細胞集落以選自由下列所組成之群組的試劑分離：解離試劑、分散酶或EDTA溶液。

47. 根據第45或46項所述之方法，其中當由該誘導的多能幹細胞集落形成的一細胞群達到約60-90%匯合時，較佳當達到約70-80%匯合時，對該細胞群進行繼代。

48. 根據第47項所述之方法，其中由該誘導的多能幹細胞集落形成的該細胞群以約1:3（v/v）的比例進行繼代，其中藉由將約1體積的解離的誘導性多能幹細胞分成約2體積的解離的誘導的多能幹細胞來進行約1:3(v/v)的比例的繼代。

49. 根據第47或48項所述之方法，其中由該誘導的多能幹細胞集落形成的該細胞群以約0.5 mM EDTA解離以進行繼代。

50. 根據第48或49項所述之方法，其中由該誘導的多能幹細胞集落形成的該繼代的細胞群被培養於含有增強該誘導性多能幹細胞存活的物質的培養基中。

51. 根據第50項所述之方法，其中該增強該誘導性多能幹細胞集落存活的物質為一ROCK抑制劑。

52. 一種可藉由第1至51項中任一項所定義之方法獲得之誘導性多能幹細胞群。

53. 一種藉由第1至51項中任一項所定義之方法獲得之誘導性多能幹細胞群。

54. 一種醫藥組合物，包含如第52或53項所定義之誘導性多能幹細胞。

55. 一種將第52或53項中定義之誘導性多能幹細胞分化為目標細胞之方法，其中該誘導性多能幹細胞在適合分化的條件下分化為該目標細胞。

56. 根據第55項所述之方法，其中該目標細胞選自由下列所組成之群組：多巴胺神經元細胞、寡突膠質細胞、肝細胞、心肌細胞、造血前驅細胞、血球細胞、神經元細胞、運動神經元、軟骨細胞、肌肉細胞、骨細胞、牙細胞、毛囊細胞、內耳毛細胞、皮膚細胞、黑色素細胞、免疫細胞、星形膠質細胞、生殖細胞、角膜細胞、腸細胞、肺細胞、腎細胞、胃細胞、腸系膜細胞，以及脂肪細胞。

57. 根據第56項所述之方法，其中該免疫細胞選自由下列所組成之群組：T淋巴細胞、B淋巴細胞、小膠質細胞，以及自然殺手細胞。

58. 根據第56項所述之方法，其中該誘導性多能幹細胞係培養於適合該誘導性多能幹細胞增殖以及分化為多巴胺神經元細胞的培養基中。

59. 根據第56項所述之方法，其中該誘導性多能幹細胞係培養於適合該誘導性多能幹細胞增殖以及分化為肝細胞的培養基中。

60. 根據第56項所述之方法，其中該誘導性多能幹細胞係培養於適合該誘導性多能幹細胞增殖以及分化為心肌細胞的培養基中。

61. 根據第60項所述之方法，其中該誘導性多能幹細胞係培養於適合該誘導性多能幹細胞增殖以及分化為寡突膠質細胞的培養基中。

62. 一種醫藥組合物，包含藉由如第56至61項中任一項所定義之方法獲得之分化的誘導性多能幹細胞。

63. 根據第62項的醫藥組合物，其中該醫藥組合物適合胃腸外施用。

64. 一種治療個體的先天性或後天性退化性疾病之方法，包含藉由第56至61項中任一項所定義之方法對個體施用由多能幹細胞分化的目標細胞。

65. 根據第64項所述之方法，其中該疾病為神經性疾病。

66. 根據第65項所述之方法，其中該疾病係選自由下列所組成之群組的神經性疾病：帕金森氏症、阿茲海默症、杭汀頓氏症、肌肉萎縮脊髓側索硬化症、多發性硬化症，以及貝登氏症。

67. 根據第64項所述之方法，其中該疾病為肝臟疾病。

68. 一種由第52或53項定義之誘導性多能幹細胞群所產生的或由藉由第52或53項定義之誘導性多能幹細胞分化獲得之細胞所產生的細胞外膜囊泡。

69. 根據第68項所述之細胞外膜囊泡，其中該囊泡為外泌體。

70. 根據第68或69項所定義之細胞外膜囊泡作為治療劑的遞送載體之用途。

71. 一種細胞培養基，包含乳腺上皮基礎培養基MCDB 170、EpiLife培養基、DMEM（Dulbecco氏改良Eagle氏培養基）、F12（Ham氏F12培養基）以及FBS（胎牛血清）。

72. 根據第71項所述之細胞培養基，其中該培養基包含終濃度為約10%至約30%（v/v）的乳腺上皮基礎培養基MCDB 170、終濃度為約20%至約40%（v/v）的EpiLife培養基、終濃度為約5至約15%（v/v）的F12、終濃度為約30至約45%（v/v）的DMEM，以及終濃度為約0.1至2%（v/v）的FBS。

73. 根據第72項所述之細胞培養基，其中該培養基包含終濃度為約15%至約25%（v/v）的乳腺上皮基礎培養基MCDB 170、終濃度為約25%至約35%（v/v）的EpiLife培養基、終濃度為約7.5至約13%（v/v）的F12、終濃度為約35至約40%（v/v）的DMEM，以及終濃度為約0.5至1.5%（v/v）的FBS。

74. 根據第73項所述之細胞培養基，其中該培養基包含終濃度為約20%（v/v）的乳腺上皮基礎培養基MCDB 170、終濃度為約30%（v/v）的EpiLife培養基、

終濃度為約12.5（v/v）的F12、終濃度為約37.5%（v/v）的DMEM、終濃度為約1.0%（v/v）的FBS。

75. 根據第71至74項中任一項所述之細胞培養基，其中該培養基係藉由混合以下成分以獲得終體積為1000 mL的培養基：

200 mL乳腺上皮基礎培養基MCDB 170，

300ml EpiLife培養基，

250 mLDMEM，

250 mLDMEM/F12，以及

1% 胎牛血清。

76. 根據第71至75項中任一項所述之細胞培養基，其中該培養基包含終濃度為約1至約7.5 μg/ml的胰島素。

77. 根據第71至76項中任一項所述之細胞培養基，其中該培養基包含終濃度為約1至約15 ng/ml的人類表皮生長因子（EFG）。

78. 根據第71至77項中任一項所述之細胞培養基，其中該適合轉染的臍帶羊膜上皮幹細胞恢復的培養基包含以下至少一種補充劑：腺嘌呤、氫羥腎上腺皮質素，以及3,3',5-三碘-L-甲狀腺原胺酸素鈉鹽（T3）。

79. 根據第78項的細胞培養基，其中該培養基包含腺嘌呤、氫羥腎上腺皮質素以及3,3',5-三碘-L-甲狀腺原胺酸素鈉鹽（T3）中的所有三種。

80. 根據第79項的細胞培養基，其中該培養基包含終濃度為約0.05至約0.1 mM的腺嘌呤、終濃度為約0.1至0.5 μM的氫羥腎上腺皮質素，及/或終濃度為約0.1至約5 ng/ml的3,3',5-三碘-L-甲狀腺原胺酸素鈉鹽（T3）。

81. 根據第71至80項中任一項所述之細胞培養基，其中該培養基包含一種或多種轉化生長因子（TGF）。

82. 根據第81項所述之細胞培養基，其中該培養基包含終濃度為約0.1至約5 ng/ml的轉化生長因子β1（TGF-β1）及/或終濃度為約1.0至約10 ng/ml的轉化生長因子α（TGF-α）。

83. 根據第71至82項中任一項所述之培養基，其中該培養基包含來自霍亂弧菌的霍亂毒素，其終濃度為約1×10^{-11}M至約1×10^{-10}M。

【符號說明】無

【生物材料寄存】無

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"  dtdVersion="V1_3"
fileName="20230529-SWK0029TW-中文序列表.xml" softwareName="WIPO Sequence"
softwareVersion="2.1.1" productionDate="2023-05-29">
 <ApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>112103136</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2023-01-30</FilingDate>
 </ApplicationIdentification>
 <ApplicantFileReference>CRC17159TW</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>US 63/303,849</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2022-01-27</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="zh">新加坡科技研究局</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>Agency for science, Technology and
Research</ApplicantNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="zh">將誘導性多能幹細胞分化為視網膜色素上皮細胞之
方法、視網膜色素上皮細胞以及使用該視網膜色素上皮細胞之方法</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>50</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>741</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..741</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q1">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ttctttttcctacagctcctgggcaacgtgctggttattgtgctgtctcatcattttggcaa
agaattcgcccttcaccatggcgggacacctggcttcggatttcgccttctcgccccctccaggtggtggaggtgatggg
ccaggggggccggagccgggctgggttgatcctcggacctggctaagcttccaaggccctcctggagggccaggaatcgg
gccgggggttgggccaggctctgaggtgtgggggattcccccatgccccccgccgtatgagttctgtgggggggatggcgt
actgtgggccccaggttggagtggggctagtgccccaaggcggcttggagacctctcagcctgagggcgaagcaggagtc
ggggtggagagcaactccgatggggcctccccggagccctgcaccgtcacccctggtgccgtgaagctggagaaggagaa
gctggagcaaaacccggaggagtcccaggacatcaaagctctgcagaaagaactcgagcaatttgccaagctcctgaagc
agaagaggatcaccctgggatatacacaggccgatgtggggctcaccctgggggttctatttgggaaggtattcagccaa
acgaccatctgccgctttgaggctctgcagcttagcttcaagaacatgtgtaagctgcggcccttgctgcagaagtgggt
ggaggaagctgacaacaatgaaaatcttcaggagatatg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>352</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..352</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q2">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MAGHLASDFAFSPPPGGGDGSAGLEPGWVDPRTWLSFQGPPGGPGIGPGSEVLGISPCPPAY
EFCGGMAYCGPQVGLGLVPQVGVETLQPEGQAGARVESNSEGTSSEPCADRPNAVKLEKVEPTPEESQDMKALQKELEQF

AKLLKQKRITLGYTQADVGLTLGVLFGKVFSQTTICRFEALQLSLKNMCKLRPLLEKWVEEADNNENLQEICKSETLVQA
RKRKRTSIENRVRWSLETMFLKCPKPSLQQITHIANQLGLEKDVVRVWFCNRRQKGKRSSIEYSQREEYEATGTPFPGGA
VSFPLPPGPHFGTPGYGSPHFTTLYSVPFPEGEAFPSVPVTALGSPMHSN</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>949</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..949</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q3">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ccgggcggggcggggccgcctcgggccggggagggctcgggggaggggcgcggcggccccg
gagcgccggcggctgtcgaggcgcggcgagccgcagccattgccttttatggtaatcgtgcgagagggcgcagggacttc
ctttgtcccaaatctgtgcggagccgaaatctgggaggcgccgccgcacccccctctagcgggcgcggggcgaagcggtgc
ggcgccggcaggaaggaaatgggcggggagggccttcgtgcgtcgccgcgccgccgtcccccttctccctctccagcctcg
gggctgtccgcgggggacggctgccttcgggggggacggggcagggcggggttcggcttctggcgtgtgaccggcggct
ctagagcctctgctaaccatgttcatgccttcttcttttcctacagctcctgggcaacgtgctggttattgtgctgtct
catcattttggcaaagaattcgcccttcaccatgtacaacatgatggagacggagctgaagccgccgggcccgcagcaaa
cttcgggggcggcggcggcaactccaccgcggcggcggccggcggcaaccagaaaaacagcccggaccgcgtcaagcgg
cccatgaatgccttcatggtgtggtcccgcgggcagcggcgcaagatggcccaggagaaccccaagatgcacaactcgga
gatcagcaagcgcctgggcgccgagtggaaacttttgtcggagacggagaagcggccgttcatcgacgaggctaagcggc
tgcgagcgctgcacatgaaggagcacccggattataaataccggccccggcggaaaaccaagacgctcatgaagaaggat
aagtacacgctgcccggcgggctgctggcccccggcggcaatagcatggcgagcggggtcggggtgggcgccggcctggg
cgcgggc</INSDSeq_sequence>

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>317</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..317</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q4">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MYNMMETELKPPGPQQTSGGGGGNSTAAAAGGNQKNSPDRVKRPMNAFMVWSRGQRRKMAQE
NPKMHNSEISKRLGAEWKLLSETEKRPFIDEAKRLRALHMKEHPDYKYRPRRKTKTLMKKDKYTLPGGLLAPGGNSMASG
VGVGAGLGAGVNQRMDSYAHMNGWSNGSYSMMQDQLGYPQHPGLNAHGAAQMQPMHRYDVSALQYNSMTSSQTYMNGSPT
YSMSYSQQGTPGMALGSMGSVVKSEASSSPPVVTSSSHSRAPCQAGDLRDMISMYLPGAEVPEPAAPSRLHMSQHYQSGP
VPGTAINGTLPLSHM</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="5">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1007</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1007</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q5">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ccccggcggaaaaccaagacgctcatgaagaaggataagtacacgctgcccggcgggctgct
ggcccccggcggcaatagcatggcgagcggggtcggggtgggcgccggcctgggcgcgggcgtgaaccagcgcatggaca
gttacgcgcacatgaacggctggagcaacggcagctacagcatgatgcaggaccagctgggctacccgcagcacccgggc
ctcaatgcgcacggcgcagcgcagatgcagcccatgcaccgctacgacgtgagcgccctgcagtacaactccatgaccag
ctcgcagacctacatgaacggctcgcccacctacagcatgtcctactcgcagcagggcacccctggcatggctcttggct
ccatgggttcggtggtcaagtccgaggccagctccagccccctgtggttacctcttcctcccactccagggcgccctgc
caggccggggacctccgggacatgatcagcatgtatctccccggcgccgaggtgccggaacccgccgcccccagcagact
tcacatgtcccagcactaccagagcggcccggtgcccggcacggccattaacggcacactgcccctctcacacatggggg
atctcaaaattgtcgctcctgtcaaacaaactcttaactttgatttactcaaactggctggggatgtagaaagcaatcca
ggtccactcatgaacaattcgcccttcaccatggctgtcagtgacgcgctgctcccatctttctccacgttcgcgtctgg
cccggcgggaagggagaagacactgcgtcaagcaggtgccccgaataaccgctggcgggaggagctctcccacatgaagc
gacttcccccagtgcttcccggccgcccctatgacctggcggcggcgaccgtggccacagacctggagagcggcggagcc
ggtgcggcttgcggcggtagcaacctggcgcccctacctcggagagagaccgaggagttcaacga</INSDSeq_seque
nce>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="6">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>513</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..513</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q6">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MRQPPGESDMAVSDALLPSFSTFASGPAGREKTLRQAGAPNNRWREELSHMKRLPPVLPGRP
YDLAAATVATDLESGGAGAACGGSNLAPLPRRETEEFNDLLDLDFILSNSLTHPPESVAATVSSSASASSSSSPSSSGPA
SAPSTCSFTYPIRAGNDPGVAPGGTGGGLLYGRESAPPPTAPFNLADINDVSPSGGFVAELLRPELDPVYIPPQQPQPPG
GGLMGKFVLKASLSAPGSEYGSPSVISVSKGSPDGSHPVVVAPYNGGPPRTCPKIKQEAVSSCTHLGAGPPLSNGHRPAA
HDFPLGRQLPSRTTPTLGLEEVLSSRDCHPALPLPPGFHPHPGPNYPSFLPDQMQPQVPPLHYQGQSRGFVARAGEPCVC
WPHFGTHGMMLTPPSSPLELMPPGSCMPEEPKPKRGRRSWPRKRTATHTCDYAGCGKTYTKSSHLKAHLRTHTGEKPYHC
DWDGCGWKFARSDELTRHYRKHTGHRPFQCQKCDRAFSRSDHLALHMKRHF</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="7">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>679</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..679</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q7">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cttcaccatggactacgactcgtaccagcactatttctacgactatgactgcggggaggatt
tctaccgctccacggcgcccagcgaggacatctggaagaaattcgagctggtgccatcgccccccacgtcgccgccctgg
ggcttgggtcccggcgcaggggacccggcccccgggattggtcccccggagccgtggcccggagggtgcaccggagacga
agcggaatcccggggccactcgaaaggctggggcaggaactacgcctccatcatacgccgtgactgcatgtggagcggct
tctcggcccgggaacggctggagagagctgtgagcgaccggctcgctcctggcgcgccccgggggaacccgcccaaggcg
tccgccgccccggactgcactcccagcctcgaagccggcaacccggcgcccgccgccccctgtccgctgggcgaacccaa
gacccaggcctgctccgggtccgagagcccaagcgactcggagaatgaagaaattgatgttgtgacagtagagaagaggc
agtctctgggtattcggaagccggtcaccatcacggtgcgagcagacccccctggatccctgcatgaagcatttccacatc
tccatccatcagcaacagcacaactatgctgcccgttttcctccagaaagctgctcc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="8">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>364</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..364</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q8">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MDYDSYQHYFYDYDCGEDFYRSTAPSEDIWKKFELVPSPPTSPPWGLGPGAGDPAPGIGPPE
PWPGGCTGDEAESRGHSKGWGRNYASIIRRDCMWSGFSARERLERAVSDRLAPGAPRGNPPKASAAPDCTPSLEAGNPAP
AAPCPLGEPKTQACSGSESPSDSENEEIDVVTVEKRQSLGIRKPVTITVRADPLDPCMKHFHISIHQQQHNYAARFPPES
CSQEEASERGPQEEVLERDAAGEKEDEEDEEIVSPPPVESEAAQSCHPKPVSSDTEDVTKRKNHNFLERKRRNDLRSRFL
ALRDQVPTLASCSKAPKVVILSKALEYLQALVGAEKRMATEKRQLRCRQQQLQKRIAYLTGY</INSDSeq_sequence
>
```

</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>901</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..901</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q9">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ccccctggatccctgcatgaagcatttccacatctccatccatcagcaacagcacaactatg
ctgcccgttttcctccagaaagctgctcccaagaagaggcttcagagaggggtccccaagaagaggttctggagagagat
gctgcaggggaaaaggaagatgaggaggatgaagagattgtgagtcccccacctgtagaaagtgaggctgcccagtcctg
ccaccccaaacctgtcagttctgatactgaggatgtgaccaagaggaagaatcacaacttcctggagcgcaagaggcgga
atgacctgcgttcgcgattcttggcgctgagggaccaggtgcccaccctggccagctgctccaaggcccccaaagtagtg
atcctaagcaaggccttggaatacttgcaagccctggtgggggctgagaagaggatggctacagagaaaagacagctccg
atgccggcagcagcagttgcagaaaagaattgcatacctcactggctacggagatctcaaaattgtcgctcctgtcaaac
aaactcttaactttgatttactcaaactggctggggatgtagaaagcaatccaggtccactcatgaacaattcgcccttc
accatgggctccgtgtccaaccagcagtttgcaggtggctgcgccaaggcggcagaagaggcgcccgaggaggcgccgga
ggacgcggcccgggcggcggacgagcctcagctgctgcacggtgcgggcatctgtaagtggttcaacgtgcgcatggggt
tcggcttcctgtccatgaccgcccgcgccggggtcgcgctcgacccccagtggatgtctttgtgcaccagagtaagctg
cacatggaagggttccggagcttgaaggagggtgaggca</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
<INSDSeq>

```
    <INSDSeq_length>209</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..209</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q10">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGSVSNQQFAGGCAKAAEEAPEEAPEDAARAADEPQLLHGAGICKWFNVRMGFGFLSMTARA
GVALDPPVDVFVHQSKLHMEGFRSLKEGEAVEFTFKKSAKGLESIRVTGPGGVFCIGSERRPKGKSMQKRRSKGDRCYNC
GGLDHHAKECKLPPQPKKCHFCQSISHMVASCPLKAQQGPSAQGKPTYFREEEEEIHSPTLLPEAQN</INSDSeq_seq
uence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="11">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>47</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..47</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q51">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gactccagtggtaatctacttcaagagagtagattaccactggagtc</INSDSeq_seque
nce>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="12">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>11681</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..11681</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q52">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gtcgacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagc
ccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgac
gtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaa
ctgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcc
tggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccat
ggtcgaggtgagccccacgttctgcttcactctccccatctccccccccctccccacccccaattttgtatttatttattt
tttaattattttgtgcagcgatgggggcgggggggggggggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggcgaggggcgg
ggcgggcgaggcggagaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgaggcggcgg
```

cggcggcggccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgcgcgctgccttcgccccgtgccccgctccgc
cgccgcctcgcgccgcccgccccggctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcgggcgggacggcccttctcctc
cgggctgtaattagcgcttggtttaatgacggcttgtttcttttctgtggctgcgtgaaagccttgaggggctccgggag
ggcccttgtgcgggggagcggctcgggggtgcgtgcgtgtgtgtgcgtggggagcgccgcgtgcggctccgcgct
gcccggcggctgtgagcgctgcgggcgcggcgcggggctttgtgcgctccgcagtgtgcgcgaggggagcgcggccgggg
gcggtgccccgcggtgcgggggggctgcgaggggaacaaaggctgcgtgcggggtgtgtgcgtgggggggtgagcaggg
ggtgtgggcgcgtcggtcgggctgcaacccccccctgcacccccctccccgagttgctgagcacggcccggcttcgggtgc
ggggctccgtacggggcgtggcgcggggctcgccgtgccgggcgggggggtggcggcaggtgggggtgccgggcggggcgg
ggccgcctcgggccggggagggctcgggggaggggcgcggcggcccccggagcgccggcggctgtcgaggcgcggcgagc
cgcagccattgccttttatggtaatcgtgcgagagggcgcagggacttcctttgtcccaaatctgtgcggagccgaaatc
tgggaggcgccgccgcacccccctctagcgggcgcggggcgaagcggtgcggcgccggcaggaaggaaatgggcggggagg
gccttcgtgcgtcgccgcgccgccgtcccccttctccctctccagcctcggggctgtccgcgggggggacggctgccttcgg
gggggacggggcagggcggggttcggcttctggcgtgtgaccggcggctctagagcctctgctaaccatgttcatgcctt
cttcttttcctacagctcctgggcaacgtgctggttattgtgctgtctcatcattttggcaaagaattcgcccttcacc
atggcgggacacctggcttcggatttcgccttctcgccccctccaggtggtggaggtgatgggccaggggggccggagcc
gggctgggttgatcctcggacctggctaagcttccaaggccctcctggagggccaggaatcgggccgggggttgggccag
gctctgaggtgtgggggattcccccatgcccccccgccgtatgagttctgtgggggggatggcgtactgtgggccccaggtt
ggagtggggctagtgccccaaggcggcttggagacctctcagcctgagggcgaagcaggagtcggggtggagagcaactc
cgatggggcctccccggagccctgcaccgtcacccctggtgccgtgaagctggagaaggagaagctggagcaaaacccgg
aggagtcccaggacatcaaagctctgcagaaagaactcgagcaatttgccaagctcctgaagcagaagaggatcaccctg
ggatatacacaggccgatgtggggctcaccctgggggttctatttgggaaggtattcagccaaacgaccatctgccgctt
tgaggctctgcagcttagcttcaagaacatgtgtaagctgcggcccttgctgcagaagtgggtggaggaagctgacaaca
atgaaaatcttcaggagatatgcaaagcagaaaccctcgtgcaggcccgaaagagaaagcgaaccagtatcgagaaccga
gtgagaggcaacctggagaatttgttcctgcagtgcccgaaacccacactgcagcagatcagccacatcgcccagcagct
tgggctcgagaaggatgtggtccgagtgtggttctgtaaccggcgccagaagggcaagcgatcaagcagcgactatgcac
aacgagaggattttgaggctgctgggtctcctttctcaggggaccagtgtcctttcctctggccccagggccccatttt
ggtaccccaggctatgggagccctcacttcactgcactgtactcctcggtccctttccctgaggggaagcctttccccc
tgtctctgtcaccactctgggctctcccatgcattcaaactgaggtaagggcgaattcaagcttcggggactagtcatat
gataatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtgg
atacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggt
tgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccc
actggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttcccccctccctattgccacggcggaact
catcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgtcggggaagc
tgacgtcctttccatggctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggcc
ctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagac
gagtcggatctccctttgggccgcctccccgcatcggtaaattcactcctcaggtgcaggctgcctatcagaaggtggtg
gctggtgtggccaatgccctggctcacaaataccactgagatcttttccctctgccaaaaattatggggacatcatgaa
gcccccttgagcatctgacttctggctaataaaggaaatttattttcattgcaatagtgtgttggaatttttgtgtctct
cactcggaaggacatatgggagggcaaatcatttaaaacatcagaatgagtatttggtttagagtttggcaacatatgcc
catatgctggctgccatgaacaaaggttggctataaagaggtcatcagtatatgaaacagccccctgctgtccattcctt

attccatagaaaagccttgacttgaggttagatttttttatattttgttttgtgttatttttttctttaacatccctaa
aattttccttacatgttttactagccagatttttcctcctctcctgactactcccagtcatagctgtccctcttctctta
tggagatccctcgacctgcagcccaagcttggcgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctca
caattccacacaacatacgagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatgagtgagctaactcacattaatt
gcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagcggatctcaattccgatcatattcaataaccc
ttaatataacttcgtataatgtatgctatacgaagttattaggtctgaagaggagtttacgtccagccaagcttaggatc
aattctcatgtttgacagcttatcatcgataagctgatcctcacaggccgcacccagcttttcttccgttgccccagtag
catctctgtctggtgaccttgaagaggaagaggaggggtcccgagaatccccatccctaccgtccagcaaaaaggggggac
gaggaatttgaggcctggcttgaggctcaggacgcaaatcttgaggatgttcagcgggagttttccgggctgcgagtaat
tggtgatgaggacgaggatggttcggaggatggggaattttcagacctggatctgtctgacagcgaccatgaaggggatg
agggtgggggggctgttggaggggcaggagtctgcactccctgtattcactgagcgtcgtctaataaagatgtctattg
atctcttttagtgtgaatcatgtctgacgaggggccaggtacaggacctggaaatggcctaggagagaagggagacacat
ctggaccagaaggctccggcggcagtggacctcaaagaagagggggtgataaccatggacgaggacggggaagaggacga
ggacgaggaggcggaagaccaggagccccgggcggctcaggatcagggccaagacatagagatggtgtccggagacccca
aaaacgtccaagttgcattggctgcaaagggacccacggtggaacaggagcaggagcaggagcgggaggggcaggagcag
gaggggcaggagcaggaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggggcaggaggggcaggaggggcaggagcagga
ggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggagcaggaggaggggc
aggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggagcaggaggaggggg
caggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggagcaggaggggca
ggaggggcaggaggggcaggagcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggggcaggaggggcaggagcaggagg
ggcaggagcaggaggggcaggagcaggaggggcaggagcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggggcaggagggg
caggagcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggggca
ggagcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggggcaggaggggcaggagcagg
aggaggggcaggagcaggaggggcaggagcaggaggtggaggccggggtcgaggaggcagtggaggccggggtcgaggag
gtagtggaggccggggtcgaggaggtagtggaggccgccggggtagaggacgtgaaagagccaggggggaagtcgtgaa
agagccaggggagaggtcgtggacgtggagaaaagaggcccaggagtcccagtagtcagtcatcatcatccgggtctcc
accgcgcaggccccctccaggtagaaggccatttttccaccctgtaggggaagccgattattttgaataccaccaagaag
gtggcccagatggtgagcctgacgtgcccccgggagcgatagagcagggccccgcagatgacccaggagaaggcccaagc
actggaccccggggtcagggtgatggaggcaggcgcaaaaaaggagggtggtttggaaagcatcgtggtcaaggaggttc
caacccgaaatttgagaacattgcagaaggtttaagagctctcctggctaggagtcacgtagaaaggactaccgacgaag
gaacttgggtcgccggtgtgttcgtatatggaggtagtaagacctccctttacaacctaaggcgaggaactgcccttgct
attccacaatgtcgtcttacaccattgagtcgtctccccttggaatggcccctggacccggcccacaacctggcccgct
aagggagtccattgtctgttatttcatggtctttttacaaactcatatatttgctgaggttttgaaggatgcgattaagg
accttgttatgacaaagcccgctcctacctgcaatatcagggtgactgtgtgcagctttgacgatggagtagatttgcct
ccctggtttccacctatggtggaaggggctgccgcggagggtgatgacggagatgacggagatgaaggaggtgatggaga
tgagggtgaggaagggcaggagtgatgtaacttgttaggagacgccctcaatcgtattaaaagccgtgtattcccccgca
ctaaagaataaatccccagtagacatcatgcgtgctgttggtgtatttctggccatctgtcttgtcaccattttcgtcct
cccaacatggggcaattgccggaacccttaatataacttcgtataatgtatgctatacgaagttattaggtccctcgaag
aggttcactagcggatctcaattgggcatacccatgttgtcacgtcactcagctccgcgctcaacaccttctcgcgttgg
aaaacattagcgacatttacctggtgagcaatcagacatgcgacggctttagcctggcctccttaaattcacctaagaat

gggagcaaccagcaggaaaaggacaagcagcgaaaattcacgccccctttgggaggtggcggcatatgcaaaggatagcac
tcccactctactactgggtatcatatgctgactgtatatgcatgaggatagcatatgctacccggatacagattaggata
gcatatactacccagatatagattaggatagcatatgctacccagatatagattaggatagcctatgctacccagatata
aattaggatagcatatactacccagatatagattaggatagcatatgctacccagatatagattaggatagcctatgcta
cccagatatagattaggatagcatatgctacccagatatagattaggatagcatatgctatccagatatttgggtagtat
atgctacccagatataaattaggatagcatatactaccctaatctctattaggatagcatatgctacccggatacagatt
aggatagcatatactacccagatatagattaggatagcatatgctacccagatatagattaggatagcctatgctaccca
gatataaattaggatagcatatactacccagatatagattaggatagcatatgctacccagatatagattaggatagcct
atgctacccagatatagattaggatagcatatgctatccagatatttgggtagtatatgctacccatggcaacattagcc
caccgtgctctcagcgacctcgtgaatatgaggaccaacaaccctgtgcttggcgctcaggcgcaagtgtgtgtaatttg
tcctccagatcgcagcaatcgcgcccctatcttggcccgcccacctacttatgcaggtattccccggggtgccattagtg
gttttgtgggcaagtggtttgaccgcagtggttagcggggttacaatcagccaagttattacacccttattttacagtcc
aaaaccgcagggcggcgtgtgggggctgacgcgtgcccccactccacaatttcaaaaaaaagagtggccacttgtctttg
tttatgggccccattggcgtggagccccgtttaattttcgggggtgttagagacaaccagtggagtccgctgctgtcggc
gtccactctctttcccccttgttacaaatagagtgtaacaacatggttcacctgtcttggtccctgcctgggacacatctt
aataaccccagtatcatattgcactaggattatgtgttgcccatagccataaattcgtgtgagatggacatccagtcttt
acggcttgtccccaccccatggatttctattgttaaagatattcagaatgtttcattcctacactagtatttattgccca
aggggtttgtgagggttatattggtgtcatagcacaatgccaccactgaaccccccgtccaaattttattctgggggcgt
cacctgaaaccttgttttcgagcacctcacatacaccttactgttcacaactcagcagttattctattagctaaacgaag
gagaatgaagaagcaggcgaagattcaggagagttcactgcccgctccttgatcttcagccactgcccttgtgactaaaa
tggttcactaccctcgtggaatcctgaccccatgtaaataaaaccgtgacagctcatggggtgggagatatcgctgttcc
ttaggacccttttactaaccctaattcgatagcatatgcttcccgttgggtaacatatgctattgaattagggttagtct
ggatagtatatactactacccgggaagcatatgctacccgtttagggttaacaaggggccttataaacactattgctaa
tgccctcttgagggtccgcttatcggtagctacacaggcccctctgattgacgttggtgtagcctcccgtagtcttcctg
ggcccctgggaggtacatgtcccccagcattggtgtaagagcttcagccaagagttacacataaaggcaatgttgtgttg
cagtccacagactgcaaagtctgctccaggatgaaagccactcagtgttggcaaatgtgcacatccatttataaggatgt
caactacagtcagagaaccccttgtgtttggtcccccccgtgtcacatgtggaacagggcccagttggcaagttgtac
caaccaactgaagggattacatgcactgccccgcgaagaaggggcagagatgtcgtagtcaggtttagttcgtccggggc
ggggcatcgatcctctagagtcgacgctagcggatccgacgccgccatctctaggcccgcgccggccccctcgcacagac
ttgtgggagaagctcggctactcccctgccccggttaatttgcatataatatttcctagtaactatagaggcttaatgtg
cgataaaagacagataatctgttctttttaatactagctacattttacatgataggcttggatttctataagagatacaa
atactaaattattattttaaaaaacagcacaaaaggaaactcaccctaactgtaaagtaattgtgtgttttgagactata
aatatcccttggagaaaagccttgtttgggccgactccagtggtaatctacttcaagagagtagattaccactggagtct
tttttggaattcctgcagcccgggggatccgctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattg
ggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaag
gcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaa
ccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtc
agaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccg
accctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggta
tctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttat

ccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagc
agagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttgg
tatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggta
gcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacg
gggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagat
ccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaa
tcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacg
atacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagc
aataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgtt
gccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacaggcatcgtggtgtca
cgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaa
aaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcag
cactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctga
gaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaa
agtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaac
ccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaat
gccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttccttttcaatattattgaagcattta
tcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttc
cccgaaaagtgccacctgg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>12693</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..12693</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q53">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>

</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gtcgacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagc
ccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgac
gtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaa
ctgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcc
tggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccat
ggtcgaggtgagccccacgttctgcttcactctccccatctccccccccctccccacccccaattttgtatttatttattt
tttaattattttgtgcagcgatgggggcgggggggggggggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggcgaggggcgg
ggcgggcgaggcggagaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgaggcggcgg
cggcggcggccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgcgcgctgccttcgccccgtgccccgctccgc
cgccgcctcgcgccgcccgccccggctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcgggcgggacggcccttctcctc
cgggctgtaattagcgcttggtttaatgacggcttgtttcttttctgtggctgcgtgaaagccttgaggggctccgggag
ggcccttttgtgcgggggggagcggctcgggggggtgcgtgcgtgtgtgtgtgcgtggggagcgccgcgtgcggctccgcgct
gcccggcggctgtgagcgctgcgggcgcggcgcggggctttgtgcgctccgcagtgtgcgcgaggggagcgcggccgggg
gcggtgccccgcggtgcgggggggggctgcgaggggaacaaaggctgcgtgcggggtgtgtgcgtgggggggtgagcaggg
ggtgtgggcgcgtcggtcgggctgcaacccccccctgcacccccctccccgagttgctgagcacggcccggcttcgggtgc
ggggctccgtacggggcgtggcgcggggctcgccgtgccgggcgggggggtggcggcaggtgggggtgccgggcggggcgg
ggccgcctcgggccggggagggctcgggggaggggcgcggcggcccccggagcgccggcggctgtcgaggcgcggcgagc
cgcagccattgccttttatggtaatcgtgcgagagggcgcagggacttcctttgtcccaaatctgtgcggagccgaaatc
tgggaggcgccgccgcacccccctctagcgggcgcggggcgaagcggtgcggcgccggcaggaaggaaatgggcggggagg
gccttcgtgcgtcgccgcgccgccgtcccccttctccctctccagcctcggggctgtccgcgggggggacggctgccttcgg
gggggacggggcagggcggggttcggcttctggcgtgtgaccggcggctctagagcctctgctaaccatgttcatgcctt
cttctttttcctacagctcctgggcaacgtgctggttattgtgctgtctcatcattttggcaaagaattcgcccttcacc
atgtacaacatgatggagacggagctgaagccgccgggcccgcagcaaacttcgggggggcggcggcggcaactccaccgc
ggcggcggccggcggcaaccagaaaaacagcccggaccgcgtcaagcggcccatgaatgccttcatggtgtggtcccgcg
ggcagcggcgcaagatggcccaggagaaccccaagatgcacaactcggagatcagcaagcgcctgggcgccgagtggaaa
ctttgtcggagacggagaagcggccgttcatcgacgaggctaagcggctgcgagcgctgcacatgaaggagcacccgga
ttataaataccggccccggcggaaaaccaagacgctcatgaagaaggataagtacacgctgcccggcgggctgctggccc
ccggcggcaatagcatggcgagcggggtcggggtgggcgccggcctgggcgcgggcgtgaaccagcgcatggacagttac
gcgcacatgaacggctggagcaacggcagctacagcatgatgcaggaccagctgggctacccgcagcacccgggcctcaa
tgcgcacggcgcagcgcagatgcagcccatgcaccgctacgacgtgagcgccctgcagtacaactccatgaccagctcgc
agacctacatgaacggctcgcccacctacagcatgtcctactcgcagcagggcacccctggcatggctcttggctccatg
ggttcggtggtcaagtccgaggccagctccagcccccctgtggttacctcttcctcccactccagggcgccctgccaggc
cggggacctccgggacatgatcagcatgtatctccccggcgccgaggtgccggaacccgccgcccccagcagacttcaca
tgtcccagcactaccagagcggcccggtgcccggcacggccattaacggcacactgcccctctcacacatgggggatctc
aaaattgtcgctcctgtcaaacaaactcttaactttgatttactcaaactggctggggatgtagaaagcaatccaggtcc
actcatgaacaattcgcccttcaccatggctgtcagtgacgcgctgctcccatctttctccacgttcgcgtctggcccgg
cgggaagggagaagacactgcgtcaagcaggtgccccgaataaccgctggcgggaggagctctcccacatgaagcgactt

ccccagtgcttcccggccgcccctatgacctggcggcggcgaccgtggccacagacctggagagcggcggagccggtgc
ggcttgcggcggtagcaacctggcgcccctacctcggagagagaccgaggagttcaacgatctcctggacctggacttta
ttctctccaattcgctgacccatcctccggagtcagtggccgccaccgtgtcctcgtcagcgtcagcctcctcttcgtcg
tcgccgtcgagcagcggccctgccagcgcgccctccacctgcagcttcacctatccgatccgggccgggaacgacccggg
cgtggcgccgggcggcacgggcggaggcctcctctatggcagggagtccgctccccctccgacggctcccttcaacctgg
cggacatcaacgacgtgagcccctcgggcggcttcgtggccgagctcctgcggccagaattggacccggtgtacattccg
ccgcagcagccgcagccgccaggtggcgggctgatgggcaagttcgtgctgaaggcgtcgctgagcgcccctggcagcga
gtacggcagcccgtcggtcatcagcgtcagcaaaggcagccctgacggcagccacccggtggtggtggcgccctacaacg
gcgggccgccgcgcacgtgccccaagatcaagcaggaggcggtctcttcgtgcacccacttgggcgctggacccccctctc
agcaatggccaccggccggctgcacacgacttccccctggggcggcagctccccagcaggactaccccgaccctgggtct
tgaggaagtgctgagcagcagggactgtcaccctgccctgccgcttcctcccggcttccatccccacccggggcccaatt
acccatccttcctgcccgatcagatgcagccgcaagtcccgccgctccattaccaagagctcatgccacccggttcctgc
atgccagaggagcccaagccaaagaggggaagacgatcgtggccccggaaaaggaccgccacccacacttgtgattacgc
gggctgcggcaaaacctacacaaagagttcccatctcaaggcacacctgcgaacccacacaggtgagaaaccttaccact
gtgactgggacggctgtggatggaaattcgcccgctcagatgaactgaccaggcactaccgtaaacacacggggcaccgc
ccgttccagtgccaaaaatgcgaccgagcattttccaggtcggaccacctcgccttacacatgaagagacatttttaaaa
gggcgaattgcctgcaggaattcaagcttcggggactagtcatatgataatcaacctctggattacaaaatttgtgaaag
attgactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattg
cttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtc
aggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcct
ttccgggactttcgctttcccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacagggg
ctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgcctgtgttgcc
acctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgct
gccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggccgcctccccgcatc
ggtaaattcactcctcaggtgcaggctgcctatcagaaggtggtggctggtgtggccaatgccctggctcacaaataccа
ctgagatcttttcccctctgccaaaaattatggggacatcatgaagccccttgagcatctgacttctggctaataaagga
aatttattttcattgcaatagtgtgttggaatttttgtgtctctcactcggaaggacatatgggagggcaaatcattta
aaacatcagaatgagtatttggtttagagtttggcaacatatgcccatatgctggctgccatgaacaaaggttggctata
aagaggtcatcagtatatgaaacagccccctgctgtccattccttattccatagaaaagccttgacttgaggttagattt
tttttatattttgttttgtgttatttttttctttaacatccctaaaattttccttacatgttttactagccagattttтc
ctcctctcctgactactcccagtcatagctgtccctcttctcttatggagatccctcgacctgcagcccaagcttggcgt
aatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacgagccggaagcataaag
tgtaaagcctggggtgcctaatgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaa
cctgtcgtgccagcggatctcaattccgatcatattcaataacccttaatataacttcgtataatgtatgctatacgaag
ttattaggtctgaagaggagtttacgtccagccaagcttaggatcaattctcatgtttgacagcttatcatcgataagct
gatcctcacaggccgcacccagcttttcttccgttgccccagtagcatctctgtctggtgaccttgaagaggaagaggag
gggtcccgagaatccccatccctaccgtccagcaaaaaggggggacgaggaatttgaggcctggcttgaggctcaggacgc
aaatcttgaggatgttcagcgggagttttccgggctgcgagtaattggtgatgaggacgaggatggttcggaggatgggg
aattttcagacctggatctgtctgacagcgaccatgaaggggatgagggtgggggggctgttggaggggggcaggagtctg
cactccctgtattcactgagcgtcgtctaataaagatgtctattgatctcttttagtgtgaatcatgtctgacgaggggc

caggtacaggacctggaaatggcctaggagagaagggagacacatctggaccagaaggctccggcggcagtggacctcaa
agaagaggggtgataaccatggacgaggacggggaagaggacgaggacgaggaggcggaagaccaggagccccgggcgg
ctcaggatcagggccaagacatagagatggtgtccggagaccccaaaaacgtccaagttgcattggctgcaaagggaccc
acggtggaacaggagcaggagcaggagcgggaggggcaggagcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggagcagga
ggaggggcaggaggggcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggggc
aggaggggcaggagcaggaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggagggg
caggaggggcaggagcaggaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggg
gcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggagg
agcaggaggaggggcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggggcaggagcaggaggggcaggagcaggaggggcag
gagcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggggcaggaggggcaggagcagga
ggaggggcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggggcaggaggggcaggagcaggagg
ggcaggaggggcaggagcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggagcaggaggggcaggagcaggag
gtggaggccggggtcgaggaggcagtggaggccggggtcgaggaggtagtggaggccggggtcgaggaggtagtggaggc
cgccggggtagaggacgtgaaagagccaggggggaagtcgtgaaagagccaggggagaggtcgtggacgtggagaaaa
gaggcccaggagtcccagtagtcagtcatcatcatccgggtctccaccgcgcaggccccctccaggtagaaggccatttt
tccaccctgtaggggaagccgattattttgaataccaccaagaaggtggcccagatggtgagcctgacgtgcccccggga
gcgatagagcagggccccgcagatgacccaggagaaggcccaagcactggaccccggggtcagggtgatggaggcaggcg
caaaaaaggagggtggtttggaaagcatcgtggtcaaggaggttccaacccgaaatttgagaacattgcagaaggtttaa
gagctctcctggctaggagtcacgtagaaaggactaccgacgaaggaacttgggtcgccggtgtgttcgtatatggaggt
agtaagacctccctttacaacctaaggcgaggaactgcccttgctattccacaatgtcgtcttacaccattgagtcgtct
ccccttggaatggcccctggacccggcccacaacctggcccgctaagggagtccattgtctgttatttcatggtctttt
tacaaactcatatatttgctgaggttttgaaggatgcgattaaggaccttgttatgacaaagcccgctcctacctgcaat
atcagggtgactgtgtgcagctttgacgatggagtagatttgcctccctggtttccacctatggtggaaggggctgccgc
ggagggtgatgacggagatgacggagatgaaggaggtgatggagatgagggtgaggaagggcaggagtgatgtaacttgt
taggagacgccctcaatcgtattaaaagccgtgtattcccccgcactaaagaataaatccccagtagacatcatgcgtgc
tgttggtgtatttctggccatctgtcttgtcaccattttcgtcctcccaacatggggcaattgccggaaccccttaatata
acttcgtataatgtatgctatacgaagttattaggtccctcgaagaggttcactagcggatctcaattgggcatacccat
gttgtcacgtcactcagctccgcgctcaacaccttctcgcgttggaaaacattagcgacatttacctggtgagcaatcag
acatgcgacggctttagcctggcctccttaaattcacctaagaatgggagcaaccagcaggaaaaggacaagcagcgaaa
attcacgccccctttgggaggtggcggcatatgcaaaggatagcactcccactctactactgggtatcatatgctgactgt
atatgcatgaggatagcatatgctacccggatacagattaggatagcatatactacccagatatagattaggatagcata
tgctacccagatatagattaggatagcctatgctacccagatataaattaggatagcatatactacccagatatagatta
ggatagcatatgctacccagatatagattaggatagcctatgctacccagatatagattaggatagcatatgctacccag
atatagattaggatagcatatgctatccagatatttgggtagtatatgctacccagatataaattaggatagcatatact
accctaatctctattaggatagcatatgctacccggatacagattaggatagcatatactacccagatatagattaggat
agcatatgctacccagatatagattaggatagcctatgctacccagatataaattaggatagcatatactacccagatat
agattaggatagcatatgctacccagatatagattaggatagcctatgctacccagatatagattaggatagcatatgct
atccagatatttgggtagtatatgctacccatggcaacattagcccaccgtgctctcagcgacctcgtgaatatgaggac
caacaaccctgtgcttggcgctcaggcgcaagtgtgtgtaatttgtcctccagatcgcagcaatcgcgcccctatcttgg
cccgcccacctacttatgcaggtattccccggggtgccattagtggttttgtgggcaagtggtttgaccgcagtggttag

cggggttacaatcagccaagttattacacccttattttacagtccaaaaccgcagggcggcgtgtgggggctgacgcgtg
cccccactccacaatttcaaaaaaaagagtggccacttgtctttgtttatgggccccattggcgtggagccccgtttaat
tttcgggggtgttagagacaaccagtggagtccgctgctgtcggcgtccactctctttccccttgttacaaatagagtgt
aacaacatggttcacctgtcttggtccctgcctgggacacatcttaataaccccagtatcatattgcactaggattatgt
gttgcccatagccataaattcgtgtgagatggacatccagtctttacggcttgtccccaccccatggatttctattgtta
aagatattcagaatgtttcattcctacactagtatttattgcccaaggggtttgtgagggttatattggtgtcatagcac
aatgccaccactgaaccccccgtccaaattttattctgggggcgtcacctgaaaccttgttttcgagcacctcacataca
ccttactgttcacaactcagcagttattctattagctaaacgaaggagaatgaagaagcaggcgaagattcaggagagtt
cactgcccgctccttgatcttcagccactgcccttgtgactaaaatggttcactaccctcgtggaatcctgaccccatgt
aaataaaaccgtgacagctcatggggtgggagatatcgctgttccttaggacccttttactaaccctaattcgatagcat
atgcttcccgttgggtaacatatgctattgaattagggttagtctggatagtatatactactacccgggaagcatatgct
acccgtttagggttaacaaggggccttataaacactattgctaatgccctcttgagggtccgcttatcggtagctacac
aggcccctctgattgacgttggtgtagcctcccgtagtcttcctgggcccctgggaggtacatgtcccccagcattggtg
taagagcttcagccaagagttacacataaaggcaatgttgtgttgcagtccacagactgcaaagtctgctccaggatgaa
agccactcagtgttggcaaatgtgcacatccatttataaggatgtcaactacagtcagagaaccccttttgtgtttggtcc
ccccccgtgtcacatgtggaacagggcccagttggcaagttgtaccaaccaactgaagggattacatgcactgccccgcg
aagaaggggcagagatgtcgtagtcaggtttagttcgtccggggcggggcatcgatcctctagagtcgacgctagcggat
ccgctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactga
ctcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcag
gggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgttt
ttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactata
aagataccaggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccg
cctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctcc
aagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaaccc
ggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacag
agttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttacc
ttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagca
gattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaact
cacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaa
tcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctg
tctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggcccca
gtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgag
cgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgcc
agttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattca
gctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccg
atcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgcc
atccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgct
cttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcg
gggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagc
atcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacac

ggaaatgttgaatactcatactcttccttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatac
atatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgg</INSDSeq
_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>12051</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..12051</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q54">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gtcgacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagc
ccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgac
gtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaa
ctgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcc
tggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccat
ggtcgaggtgagccccacgttctgcttcactctccccatctccccccccctccccacccccaattttgtatttatttattt
tttaattattttgtgcagcgatgggggcgggggggggggggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggcgaggggcgg
ggcgggcgaggcggagaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgaggcggcgg
cggcggcggccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgcgcgctgccttcgccccgtgccccgctccgc
cgccgcctcgcgccgcccgccccggctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcgggcgggacggcccttctcctc
cgggctgtaattagcgcttggtttaatgacggcttgtttcttttctgtggctgcgtgaaagccttgaggggctccgggag
ggccctttgtgcgggggagcggctcgggggtgcgtgcgtgtgtgtgtgcgtggggagcgccgcgtgcggctccgcgct
gcccggcggctgtgagcgctgcgggcgcggcgcggggctttgtgcgctccgcagtgtgcgcgaggggagcgcggccgggg
gcggtgccccgcggtgcgggggggctgcgaggggaacaaaggctgcgtgcggggtgtgtgcgtgggggggtgagcaggg

ggtgtgggcgcgtcggtcgggctgcaaccccccctgcacccccctccccgagttgctgagcacggcccggcttcgggtgc
ggggctccgtacggggcgtggcgcggggctcgccgtgccgggcgggggtggcggcaggtgggggtgccgggcggggcgg
ggccgcctcgggccggggagggctcgggggaggggcgcggcggcccccggagcgccggcggctgtcgaggcgcggcgagc
cgcagccattgccttttatggtaatcgtgcgagagggcgcagggacttcctttgtcccaaatctgtgcggagccgaaatc
tgggaggcgccgccgcacccccctctagcgggcgcggggcgaagcggtgcggcgccggcaggaaggaaatgggcggggagg
gccttcgtgcgtcgccgcgccgccgtccccttctccctctccagcctcggggctgtccgcgggggacggctgccttcgg
gggggacggggcagggcggggttcggcttctggcgtgtgaccggcggctctagagcctctgctaaccatgttcatgcctt
cttctttttcctacagctcctgggcaacgtgctggttattgtgctgtctcatcattttggcaaagaattcgcccttcacc
atggactacgactcgtaccagcactatttctacgactatgactgcggggaggatttctaccgctccacggcgcccagcga
ggacatctggaagaaattcgagctggtgccatcgcccccccacgtcgccgccctggggcttgggtcccggcgcaggggacc
cggcccccgggattggtcccccggagccgtggcccggagggtgcaccggagacgaagcggaatcccggggccactcgaaa
ggctggggcaggaactacgcctccatcatacgccgtgactgcatgtggagcggcttctcggcccgggaacggctggagag
agctgtgagcgaccggctcgctcctggcgcgccccgggggaacccgcccaaggcgtccgccgccccggactgcactccca
gcctcgaagccggcaacccggcgcccgccgccccctgtccgctgggcgaacccaagacccaggcctgctccgggtccgag
agcccaagcgactcggagaatgaagaaattgatgttgtgacagtagagaagaggcagtctctgggtattcggaagccggt
caccatcacggtgcgagcagacccccctggatccctgcatgaagcatttccacatctccatccatcagcaacagcacaact
atgctgcccgttttcctccagaaagctgctcccaagaagaggcttcagagaggggtccccaagaagaggttctggagaga
gatgctgcaggggaaaaggaagatgaggaggatgaagagattgtgagtcccccacctgtagaaagtgaggctgcccagtc
ctgccaccccaaacctgtcagttctgatactgaggatgtgaccaagaggaagaatcacaacttcctggagcgcaagaggc
ggaatgacctgcgttcgcgattcttggcgctgagggaccaggtgcccaccctggccagctgctccaaggcccccaaagta
gtgatcctaagcaaggccttggaatacttgcaagccctggtgggggctgagaagaggatggctacagagaaaagacagct
ccgatgccggcagcagcagttgcagaaaagaattgcatacctcactggctacggagatctcaaaattgtcgctcctgtca
aacaaactcttaactttgatttactcaaactggctggggatgtagaaagcaatccaggtccactcatgaacaattcgccc
ttcaccatgggctccgtgtccaaccagcagtttgcaggtggctgcgccaaggcggcagaagaggcgcccgaggaggcgcc
ggaggacgcggcccgggcggcggacgagcctcagctgctgcacggtgcgggcatctgtaagtggttcaacgtgcgcatgg
ggttcggcttcctgtccatgaccgcccgcgccggggtcgcgctcgaccccccagtggatgtctttgtgcaccagagtaag
ctgcacatggaagggttccggagcttgaaggagggtgaggcagtggagttcacctttaagaagtcagccaagggtctgga
atccatccgtgtcaccggacctggtggagtattctgtattgggagtgagaggcggccaaaaggaaagagcatgcagaagc
gcagatcaaaaggagacaggtgctacaactgtggaggtctagatcatcatgccaaggaatgcaagctgccaccccagccc
aagaagtgccacttctgccagagcatcagccatatggtagcctcatgtccgctgaaggcccagcagggccctagtgcaca
gggaaagccaacctactttcgagaggaagaagaagaaatccacagccctaccctgctcccggaggcacagaattgaaagg
gcgaattgcctgcaggaattcaagcttcggggactagtcatatgataatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagat
tgactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgct
tcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcag
gcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctccttt
ccgggactttcgctttcccctcccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggct
cggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgcctgtgttgccac
ctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgc
cggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggccgcctccccgcatcgg
taaattcactcctcaggtgcaggctgcctatcagaaggtggtggctggtgtggccaatgccctggctcacaaataccact

gagatcttttccctctgccaaaaattatggggacatcatgaagccccttgagcatctgacttctggctaataaaggaaa
tttattttcattgcaatagtgtgttggaatttttgtgtctctcactcggaaggacatatgggagggcaaatcatttaaa
acatcagaatgagtatttggtttagagtttggcaacatatgcccatatgctggctgccatgaacaaaggttggctataaa
gaggtcatcagtatatgaaacagccccctgctgtccattccttattccatagaaaagccttgacttgaggttagattttt
tttatattttgttttgtgttatttttttctttaacatccctaaaatttttccttacatgttttactagccagatttttcct
cctctcctgactactcccagtcatagctgtccctcttctcttatggagatccctcgacctgcagcccaagcttggcgtaa
tcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacgagccggaagcataaagtg
taaagcctggggtgcctaatgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacc
tgtcgtgccagcggatctcaattccgatcatattcaataacccttaatataacttcgtataatgtatgctatacgaagtt
attaggtctgaagaggagtttacgtccagccaagcttaggatcaattctcatgtttgacagcttatcatcgataagctga
tcctcacaggccgcacccagcttttcttccgttgccccagtagcatctctgtctggtgaccttgaagaggaagaggaggg
gtcccgagaatccccatccctaccgtccagcaaaaaggggacgaggaatttgaggcctggcttgaggctcaggacgcaa
atcttgaggatgttcagcgggagttttccgggctgcgagtaattggtgatgaggacgaggatggttcggaggatggggaa
ttttcagacctggatctgtctgacagcgaccatgaaggggatgagggtgggggggctgttggaggggcaggagtctgca
ctccctgtattcactgagcgtcgtctaataaagatgtctattgatctcttttagtgtgaatcatgtctgacgaggggcca
ggtacaggacctggaaatggcctaggagagaagggagacacatctggaccagaaggctccggcggcagtggacctcaaag
aagagggggtgataaccatggacgaggacggggaagaggacgaggacgaggaggcggaagaccaggagccccgggcggct
caggatcagggccaagacatagagatggtgtccggagaccccaaaaacgtccaagttgcattggctgcaaagggacccac
ggtggaacaggagcaggagcaggagcgggaggggcaggagcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggagcaggagg
aggggcaggaggggcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggggcag
gaggggcaggagcaggaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggggca
ggaggggcaggagcaggaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggggc
aggaggggcaggagcaggaggaggggcaggagcaggaggggcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggggcaggag
caggaggaggggcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggggcaggagcaggaggggcaggagcaggaggggcagga
gcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggggcaggaggggcaggagcaggagg
aggggcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggggg
caggaggggcaggagcaggaggggcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggagcaggaggggcaggagcaggaggt
ggaggccggggtcgaggaggcagtggaggccggggtcgaggaggtagtggaggccggggtcgaggaggtagtggaggccg
ccggggtagaggacgtgaaagagccaggggggaagtcgtgaaagagccaggggagaggtcgtggacgtggagaaaaga
ggcccaggagtcccagtagtcagtcatcatcatccgggtctccaccgcgcaggccccctccaggtagaaggccatttttc
caccctgtaggggaagccgattattttgaataccaccaagaaggtggcccagatggtgagcctgacgtgcccccgggagc
gatagagcagggccccgcagatgacccaggagaaggcccaagcactggaccccggggtcagggtgatggaggcaggcgca
aaaaaggagggtggtttggaaagcatcgtggtcaaggaggttccaacccgaaatttgagaacattgcagaaggtttaaga
gctctcctggctaggagtcacgtagaaaggactaccgacgaaggaacttgggtcgccggtgtgttcgtatatggaggtag
taagacctccctttacaacctaaggcgaggaactgcccttgctattccacaatgtcgtcttacaccattgagtcgtctcc
cctttggaatggcccctggacccggcccacaacctggcccgctaagggagtccattgtctgttatttcatggtcttttta
caaactcatatatttgctgaggttttgaaggatgcgattaaggaccttgttatgacaaagcccgctcctacctgcaatat
cagggtgactgtgtgcagctttgacgatggagtagatttgcctccctggtttccacctatggtggaaggggctgccgcgg
agggtgatgacggagatgacggagatgaaggaggtgatggagatgagggtgaggaagggcaggagtgatgtaacttgtta
ggagacgccctcaatcgtattaaaagccgtgtattccccgcactaaagaataaatccccagtagacatcatgcgtgctg

ttggtgtatttctggccatctgtcttgtcaccattttcgtcctcccaacatggggcaattgccggaacccttaatataac
ttcgtataatgtatgctatacgaagttattaggtccctcgaagaggttcactagcggatctcaattgggcatacccatgt
tgtcacgtcactcagctccgcgctcaacaccttctcgcgttggaaaacattagcgacatttacctggtgagcaatcagac
atgcgacggctttagcctggcctccttaaattcacctaagaatgggagcaaccagcaggaaaaggacaagcagcgaaaat
tcacgccccttgggaggtggcggcatatgcaaaggatagcactcccactctactactgggtatcatatgctgactgtat
atgcatgaggatagcatatgctacccggatacagattaggatagcatatactacccagatatagattaggatagcatatg
ctacccagatatagattaggatagcctatgctacccagatataaattaggatagcatatactacccagatatagattagg
atagcatatgctacccagatatagattaggatagcctatgctacccagatatagattaggatagcatatgctacccagat
atagattaggatagcatatgctatccagatatttgggtagtatatgctacccagatataaattaggatagcatatactac
cctaatctctattaggatagcatatgctacccggatacagattaggatagcatatactacccagatatagattaggatag
catatgctacccagatatagattaggatagcctatgctacccagatataaattaggatagcatatactacccagatatag
attaggatagcatatgctacccagatatagattaggatagcctatgctacccagatatagattaggatagcatatgctat
ccagatatttgggtagtatatgctacccatggcaacattagcccaccgtgctctcagcgacctcgtgaatatgaggacca
acaaccctgtgcttggcgctcaggcgcaagtgtgtgtaatttgtcctccagatcgcagcaatcgcgcccctatcttggcc
cgcccacctacttatgcaggtattccccggggtgccattagtggttttgtgggcaagtggtttgaccgcagtggttagcg
gggttacaatcagccaagttattacacccttattttacagtccaaaaccgcagggcggcgtgtgggggctgacgcgtgcc
cccactccacaatttcaaaaaaaagagtggccacttgtctttgtttatgggccccattggcgtggagccccgtttaattt
tcgggggtgttagagacaaccagtggagtccgctgctgtcggcgtccactctctttcccccttgttacaaatagagtgtaa
caacatggttcacctgtcttggtccctgcctgggacacatcttaataaccccagtatcatattgcactaggattatgtgt
tgcccatagccataaattcgtgtgagatggacatccagtctttacggcttgtccccaccccatggatttctattgttaaa
gatattcagaatgtttcattcctacactagtatttattgcccaaggggtttgtgagggttatattggtgtcatagcacaa
tgccaccactgaaccccccgtccaaattttattctgggggcgtcacctgaaaccttgttttcgagcacctcacatacacc
ttactgttcacaactcagcagttattctattagctaaacgaaggagaatgaagaagcaggcgaagattcaggagagttca
ctgcccgctccttgatcttcagccactgcccttgtgactaaaatggttcactaccctcgtggaatcctgaccccatgtaa
ataaaaccgtgacagctcatggggtgggagatatcgctgttccttaggacccttttactaaccctaattcgatagcatat
gcttcccgttgggtaacatatgctattgaattagggttagtctggatagtatatactactacccgggaagcatatgctac
ccgtttagggttaacaaggggcccttataaacactattgctaatgccctcttgagggtccgcttatcggtagctacacag
gcccctctgattgacgttggtgtagcctcccgtagtcttcctgggcccctgggaggtacatgtcccccagcattggtgta
agagcttcagccaagagttacacataaaggcaatgttgtgttgcagtccacagactgcaaagtctgctccaggatgaaag
ccactcagtgttggcaaatgtgcacatccatttataaggatgtcaactacagtcagagaacccctttgtgtttggtcccc
ccccgtgtcacatgtggaacagggcccagttggcaagttgtaccaaccaactgaagggattacatgcactgccccgcgaa
gaaggggcagagatgtcgtagtcaggtttagttcgtccggggcggggcatcgatcctctagagtcgacgctagcggatcc
gctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactgact
cgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggg
gataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgttttt
ccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaa
gataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcc
tttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaa
gctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccgg
taagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagag

ttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttacctt
cggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttttgtttgcaagcagcaga
ttacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactca
cgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatc
aatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtc
tatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagt
gctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcg
cagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccag
ttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagc
tccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgat
cgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccat
ccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctct
tgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggg
gcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcat
cttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacgg
aaatgttgaatactcatactcttccttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacat
atttgaatgtatttagaaaaataaacaaataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgg</INSDSeq_s
equence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q55">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>aaggtcccggtcaagaaacag</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q56">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>cttctgcgtcacaccattgc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="17">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q57">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>cccacatgaagcgacttccc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q58">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>aggtccaggagatcgttgaac</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="19">
```

```
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q59">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tggacagttacgcgcacatg</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="20">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q60">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gagtaggacatgctgtaggtg</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="21">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q61">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tgcggcccttgctgcagaag</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="22">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q62">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>gctgctgggcgatgtggctg</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="23">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q63">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>atgcattcaaactgaggtaagg</INSDSeq_sequence>
```

```
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="24">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q64">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tagcgtaaaaggagcaacatag</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="25">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q65">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ccatatggtagcctcatgtcc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="26">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q66">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tcaattctgtgcctccgggag</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
```

```
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q67">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>accacctcgccttacacatgaag</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="28">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q68">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>tagcgtaaaaggagcaacatag</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="29">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q69">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ggctgagaagaggatggctac</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="30">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q70">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>agtttgtttgacaggagcgac</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="31">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q71">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tcacatgtcccagcactacc</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="32">
```

```
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q72">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>agtttgtttgacaggagcgac</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="33">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q73">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>aacccaagacccaggcctgc</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="34">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q74">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ggtctgctcgcaccgtgatg</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="35">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q75">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>gaaatggcctaggagagaag</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="36">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q76">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>cagccaatgcaacttggacg</INSDSeq_sequence>
```

```
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="37">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q77">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>cttatgctacgtaaaggagctggg</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="38">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q78">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ttgtgccaacccaggtcccggaag</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="39">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q79">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tatcagatcctaaacagctcgcag</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="40">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
```

```
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q80">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>cgtacgcaaattaaagtccagag</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="41">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q81">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>actacaacgcctacgagtcctac</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="42">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q82">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gttgcaccagaaaagtcagagttg</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="43">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q83">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>atatcccgccgtgggtgaaagttc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="44">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q84">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>actcagccatggactggagcatcc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="45">
```

```
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>26</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..26</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q85">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>cctgctcaagctgactcgacaccgtg</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="46">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>25</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..25</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q86">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ggaaaagctggccctggggtggagc</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="47">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q87">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tgctgctcacagggcccgatac</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="48">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q88">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>tcctttcgagctcagtgcaccac</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="49">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q89">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ctggcgctgagtacgtcgtgg</INSDSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="50">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q90">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>gcagttggtggtgcaggaggc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種誘導性多能幹（induced pluripotent stem，iPS）細胞分化為視網膜色素上皮（retinal pigment epithelial，RPE）細胞之方法，該方法包含在適合分化為視網膜色素上皮（RPE）細胞的條件下，於分化培養基中培養自臍帶羊膜幹細胞所衍生之誘導性多能幹（iPS）細胞，進而使該iPS細胞分化為該RPE細胞。

【請求項2】 如請求項1之方法，其中該分化培養基為包含N2補充劑、B27補充劑，以及非必需胺基酸（non-essential amino acid，NEAA）的Dulbecco氏改良Eagle氏培養基（Dulbecco's modified eagle medium，DMEM）/F12（Ham氏F12培養基）培養基。

【請求項3】 如請求項2之方法，其中該DMEM / F12培養基包含1x N2補充劑、1x B27補充劑，以及1x NEAA。

【請求項4】 如請求項2或3之方法，其中該分化培養基係透過混合以下成分以獲得終體積為1000 mL的培養基：

10 mL的100x N2補充劑；

20 mL的50x B27補充劑；

10 mL的100x NEAA；

960 mL的DMEM / F12。

【請求項5】 如請求項1至4中任一項之方法，其中該分化培養基包含

i) 第一分化培養基，其額外包含IGF1、DKK1、菸鹼醯胺或LDN-193189中的至少任一種，較佳包含IGF1、DKK1、菸鹼醯胺以及LDN-193189；

ii) 第二分化培養基，其額外包含IGF1、DKK1、菸鹼醯胺、LDN-193189或b-FGF中的至少任一種，較佳包含IGF1、DKK1、菸鹼醯胺、LDN-193189以及b-FGF；

iii) 第三分化培養基，其額外包含IGF1、DKK1或活化素A中的至少任一種，較佳包含IGF1、DKK1以及活化素A；

iv) 第四分化培養基，其額外包含活化素A以及SU5402或PD17307其中之一，較佳包含活化素A與PD17307；及/或

v) 第五分化培養基，其額外包含活化素A、CHIR99021，或SU5402或PD17307其中之一中的至少任一種，較佳包含活化素A、CHIR99021以及PD17307。

【請求項6】 如請求項5之方法，其中i）、ii）及/或iii）的IGF1以至少約5 ng/ml的終濃度使用，較佳為其中i）、ii）及/或iii）的IGF1以約10 ng/ml的最終濃度使用。

【請求項7】 如請求項5或6之方法，其中請求項5中的i）、ii）及/或iii）的DKK1以至少約5 ng/ml的濃度使用，較佳為其中請求項5的i）、ii）及/或iii）的DKK1以約10 ng/ml的濃度使用。

【請求項8】 如請求項5至7中任一項之方法，其中請求項5的i）及/或ii）的菸鹼醯胺以至少約5 mM的濃度使用，較佳為其中請求項5的i）及/或ii）的菸鹼醯胺以約10 mM的濃度使用。

【請求項9】 如請求項5至8中任一項之方法，其中請求項5的i）及/或ii）的LDN-193189以至少約0.1 μM的濃度使用，較佳為其中請求項5的i）的LDN-193189

以約1 μM的濃度使用及/或其中請求項5的ii）的LDN-193189以約0.2 μM的濃度使用。

【請求項10】 如請求項5至9中任一項之方法，其中請求項5的ii）的b-FGF以至少約2.5 ng/ml的濃度使用，較佳為其中請求項5的ii）的b-FGF以約為5 ng/ml的濃度使用。

【請求項11】 如請求項5至10中任一項之方法，其中請求項5的iii）、iv)及/或v)的活化素A以至少約50 ng/ml的濃度使用，較佳為其中請求項5的iii）、iv)及/或v)的活化素A以約100 ng/ml的濃度使用。

【請求項12】 如請求項5至11中任一項之方法，其中請求項5的iv)及/或v)的SU5402以至少約5 μM的濃度使用，較佳為其中請求項5的iv)及/或v)的SU5402以約10 μM的濃度使用。

【請求項13】 如請求項5至11中任一項之方法，其中請求項5的iv)及/或v)的PD17307以至少約0.5 μM的濃度使用，較佳為其中請求項5的iv)及/或v)的PD17307以約1 μM的濃度使用。

【請求項14】 如請求項5至13中任一項之方法，其中請求項5的v)的CHIR99021以至少約1 μM且小於約3 μM的濃度來培養細胞，較佳培養細胞約3個連續培養日。

【請求項15】 如請求項14所述之方法，其中請求項5的v)的CHIR99021以約3 μM的濃度用於隨後培養細胞，較佳隨後培養細胞約5個連續培養日。

【請求項16】 如請求項5至15中任一項之方法，其中培養該iPS細胞包含在該第一分化培養基中培養約2天。

【請求項17】 如請求項5至16中任一項之方法，其中培養該iPS細胞包含在該第一分化培養基中培養約2天，隨後在該第二分化培養基中培養約2天。

【請求項18】 如請求項5至17中任一項之方法，其中培養該iPS細胞包含在該第一分化培養基中培養約2天，隨後在該第二分化培養基中培養約2天，隨後在該第三分化培養基中培養約2天。

【請求項19】 如請求項5至18中任一項之方法，其中培養該iPS細胞包含在該第一分化培養基中培養約2天，隨後在該第二分化培養基中培養約2天，隨後在該第三分化培養基中培養約2天，隨後在該第四分化培養基中培養約2天。

【請求項20】 如請求項5至19中任一項之方法，其中培養該iPS細胞包含在該第一分化培養基中培養約2天，隨後在該第二分化培養基中培養約2天，隨後在該第三分化培養基中培養約2天，隨後在該第四分化培養基中培養約2天，以及隨後在該第五分化培養基中培養約8天。

【請求項21】 如請求項5至20中任一項之方法，其中使用LDN-193189至少約2個培養日。

【請求項22】 如請求項5至21中任一項之方法，其中使用DKK1至少約2個培養日。

【請求項23】 如請求項5至22中任一項之方法，其中使用SU5402或PD173074約10個培養日。

【請求項24】 如請求項5至23中任一項之方法，其中使用CHIR99021約8個培養日。

【請求項25】 如請求項1至24中任一項之方法，其中該iPS細胞在該分化培養基中培養約11至約21天，較佳約16天。

【請求項26】 如請求項1至25中任一項之方法，其中該方法進一步包含在該分化培養基中培養該iPS細胞之前，在mTESR1培養基中培養該iPS細胞，較佳為在mTESR1培養基中培養該iPS細胞約1至約4個培養日。

【請求項27】 如請求項1至26中任一項之方法，其中該方法進一步包含在視網膜色素上皮維持（retinal pigment epithelial maintenance，RPEM）培養基中培養該RPE細胞。

【請求項28】 如請求項27之方法，其中該RPEM培養基包含約50% DMEM/F12以及約50%最低必需培養基（minimum essential medium，MEM），該MEM包含0.5x N1補充劑以及1x NEAA。

【請求項29】 如請求項28之方法，其中該RPEM培養基進一步包含以下至少任一種：熱滅活胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）、Glutamax、牛磺酸、氫羥腎上腺皮質素、3,3',5-三碘-L-甲狀腺原胺酸素、青黴素/鏈黴素、菸鹼醯胺，或丙酮酸鈉。

【請求項30】 如請求項28或29之方法，其中該RPEM培養基進一步包含約2%熱滅活胎牛血清（FBS）、1x Glutamax、約0.25 mg/mL牛磺酸、約0.02 μg/mL氫羥腎上腺皮質素、約0.013 ng/mL 3,3',5-三碘-L-甲狀腺原胺酸素、1x青黴素/鏈黴素、約10 mM菸鹼醯胺，以及1x丙酮酸鈉。

【請求項31】 如請求項27至30中任一項之方法，其中該RPE細胞在該RPEM培養基中培養約9至約29天，較佳約19天。

【請求項32】 如請求項27至31中任一項之方法，其中在該分化培養基中培養該iPS細胞以及在該RPEM培養基中培養該RPE細胞包含約20至約50天，較佳約30至約35天，最佳約35天。

【請求項33】 如請求項27至32中任一項之方法，其中該方法進一步包含在該培養基中培養該細胞後純化在該RPEM培養基中的該RPE細胞。

【請求項34】 如請求項33之方法，其中純化包含：

a. 根據其色素沈澱人工識別該RPE細胞；

b. 繼代該RPE細胞；

c. 根據其色素沈澱人工識別該RPE細胞並繼代該RPE細胞；

d. 繼代該RPE細胞並根據其色素沈澱對該RPE細胞進行散射分選；及/或

e. 根據其色素沈澱對該RPE細胞進行散射分選。

【請求項35】 如請求項34之方法，其中如請求項34的a）及/或c）所述之其色素沈澱人工識別該RPE細胞包含藉由顯微術進行選擇。

【請求項36】 如請求項35之方法，其中顯微術為明場顯微術。

【請求項37】 如請求項34至36中任一項之方法，其中繼代如請求項34的b）、c）及/或d)所述之該RPE細胞包含以Accutase或TrypLE，較佳以TrypLE處理該RPE細胞。

【請求項38】 如前述請求項中任一項之方法，其中該iPS細胞係藉由在適合幹細胞重新編程的條件下在該臍帶羊膜幹細胞中表現編碼蛋白質OCT3/4、SOX2、KLF4、LIN28以及L-MYC以及p53-shRNA的外源核酸所產生的。

【請求項39】 如請求項38之方法，其中對該臍帶羊膜幹細胞進行轉染以將該些外源核酸轉移至該幹細胞中，其中在適合細胞恢復的培養基中培養該轉染的幹細胞，其中該適合細胞恢復的培養基含有抑制發炎反應以及增強細胞存活的化合物。

【請求項40】 如前述請求項中任一項之方法，其中該臍帶羊膜幹細胞為臍帶羊膜間質幹細胞，或臍帶羊膜上皮幹細胞。

【請求項41】 如請求項40之方法，其中該臍帶羊膜間質幹細胞為間質幹細胞群，其中至少約90%或更多的該幹細胞群的細胞表現以下標記中的每一種：CD73、CD90以及CD105。

【請求項42】 如請求項41之方法，其中至少約90%或更多的該間質幹細胞群的細胞缺乏以下標記的表現：CD34、CD45以及HLA-DR。

【請求項43】 如請求項41至42中任一項之方法，其中至少約91%或更多、約92%或更多、約93%或更多、約94%或更多、約95%或更多、約96%或更多、約97%或更多、約98%或更多、約99%或更多的該間質幹細胞群的細胞表現CD73、CD90以及CD105中的每一種並且不表現CD34、CD45以及HLA-DR中的每一種。

【請求項44】 如請求項38至43中任一項之方法，其中該編碼蛋白質OCT3/4、SOX2、KLF4、LIN28以及L-MYC以及p53-shRNA的外源核酸由一個、兩個或三個載體提供，其中較佳為第一載體編碼蛋白質OCT3/4以及53-shRNA、第二載體編碼蛋白質SOX2以及KLF4，以及第三載體編碼蛋白質L-MYC以及LIN28。

【請求項45】 一種可藉由如請求項1至44中任一項所定義之方法獲得之視網膜色素上皮（RPE）細胞培養物。

【請求項46】 一種藉由如請求項1至44中任一項所定義之方法獲得之視網膜色素上皮（RPE）細胞培養物。

【請求項47】 一種視網膜色素上皮細胞，其包含或由可藉由如請求項1至44中任一項所定義之方法獲得之視網膜色素上皮細胞培養物所組成。

【請求項48】 一種視網膜色素上皮細胞，其包含或由藉由如請求項1至44中任一項所定義之方法獲得之視網膜色素上皮細胞培養物所組成。

【請求項49】 一種醫藥組合物，其包含藉由如請求項1至44中任一項所定義之方法獲得之視網膜色素上皮（RPE）細胞培養物。

【請求項50】 如請求項49之醫藥組合物，其中該醫藥組合物適於腸胃外或局部施用。

【請求項51】 如請求項45至46中任一項之RPE細胞培養物、如請求項47至48中任一項之上皮細胞、及/或如請求項49至50中任一項之醫藥組合物，其中包含在該培養物中的RPE細胞表現以下至少任一種：BEST1、PMEL17、MITF、酪胺酸酶、TRYP2、ZO-1、RPE65、RLBP1或MERTK。

【請求項52】 如請求項45至46中任一項及/或請求項51之RPE細胞培養物、如請求項47至48中任一項及/或請求項51之上皮細胞、及/或如請求項49至50中任一項及/或請求項51之醫藥組合物，其中包含在該培養物中的RPE細胞表現BEST1，其相對於從胚胎幹細胞（embryonic stem，ES）分化的RPE細胞具有至少約2的倍數變化。

【請求項53】 如請求項45至46任一項及/或請求項51至52任一項之RPE細胞培養物、如請求項47至48任一項及/或請求項51至52任一項之上皮細胞，及/或如請求項49至50任一項及/或請求項51至52任一項之醫藥組合物，其中包含在該培養物中的RPE細胞表現PMEL17，其相對於從ES分化的RPE細胞具有至少約0.9的倍數變化。

【請求項54】 如請求項45至46中任一項及/或請求項51至53中任一項之RPE細胞培養物、如請求項47至48中任一項及/或請求項51至53中任一項之上皮細胞、

及/或如請求項49至50任一項及/或請求項51至53任一項之醫藥組合物，其中包含在該培養物中的RPE細胞表現MITF，其相對於從ES分化的RPE細胞具有至少約4.5的倍數變化。

【請求項55】 如請求項45至46中任一項及/或請求項51至54中任一項之RPE細胞培養物、如請求項47至48中任一項及/或請求項51至54中任一項之上皮細胞，及/或請求項49至50任一項及/或請求項51至54任一項之醫藥組合物，其中包含在該培養物中的RPE細胞表現TRYP2，其相對於從ES分化的RPE細胞具有至少約2.9的倍數變化。

【請求項56】 如請求項45至46任一項及/或請求項51至55任一項之RPE細胞培養物、如請求項47至48任一項及/或請求項51至55任一項之上皮細胞，及/或如請求項49至50任一項及/或請求項51至55任一項之醫藥組合物，其中包含在該培養物中的RPE細胞表現RPE65，其相對於從ES分化的RPE細胞具有至少約0.6的倍數變化。

【請求項57】 如請求項45至46中任一項及/或請求項51至56中任一項之RPE細胞培養物、如請求項47至48中任一項及/或請求項51至56中任一項之上皮細胞、及/或如請求項49至50任一項及/或請求項51至56任一項之醫藥組合物，其中包含在該培養物中的RPE細胞表現RLBP1，其相對於從ES分化的RPE細胞具有至少約17.5的倍數變化。

【請求項58】 如請求項45至46中任一項及/或請求項51至57中任一項之RPE細胞培養物、如請求項47至48中任一項及/或請求項51至57中任一項之上皮細胞、及/或如請求項49至50任一項及/或請求項51至57任一項之醫藥組合物，其中包含

在該培養物中的RPE細胞表現MERTK，其相對於從ES分化的RPE細胞具有至少約6的倍數變化。

【請求項59】 如請求項45至46中任一項及/或請求項51至58中任一項之RPE細胞培養物、如請求項47至48中任一項及/或請求項51至58中任一項之上皮細胞、及/或如請求項49至50任一項及/或請求項51至58任一項之醫藥組合物，其中包含在該培養物中的RPE細胞包含相對於從ES分化的RPE細胞增加的耗氧率（oxygen consumption rate，OCR）及/或細胞外酸化率（extracellular acidification rate，ECAR）。

【請求項60】 一種治療個體的視網膜退化性疾病之方法，包含藉由如請求項1至44中任一項所定義之方法對個體施用從誘導性多能幹（iPS）細胞分化而來的視網膜色素上皮（RPE）細胞。

【請求項61】 如請求項60之方法，其中該視網膜退化性疾病為老年性黃斑部受損（age-related macular degeneration，AMD）或視網膜營養不良。

【請求項62】 一種藉由如請求項1至44中任一項所定義之方法檢測從誘導性多能幹（iPS）細胞分化的視網膜色素上皮（RPE）細胞在個體體內的存活率之體內方法，該方法包含

a) 將藉由如請求項1至44中任一項所定義之方法將從iPS細胞分化的RPE細胞引入個體，其中該RPE細胞包含生物發光標記；

b) 利用影像方法檢測該RPE細胞隨時間進程的生物發光訊號，進而收集影像數據；

c) 將步驟b）中接收到的影像數據與參考影像數據進行比較。

【請求項63】 如請求項62之方法，其中來自該個體的影像數據中的生物發光訊號與參考影像數據相比沒有差異，表示該RPE細胞在該個體體內存活。

【請求項64】 一種藉由請求項1至44中任一項所定義之方法測定從誘導性多能幹細胞（iPS）細胞分化的視網膜色素上皮（RPE）細胞在個體體內的免疫原性之體外方法，該分化的RPE細胞已被預先遞送給該個體，該方法包含：

a) 使用影像方法檢測獲自該個體的樣品中的促進發炎細胞激素含量，該樣品包含該分化的RPE細胞，進而收集影像數據；

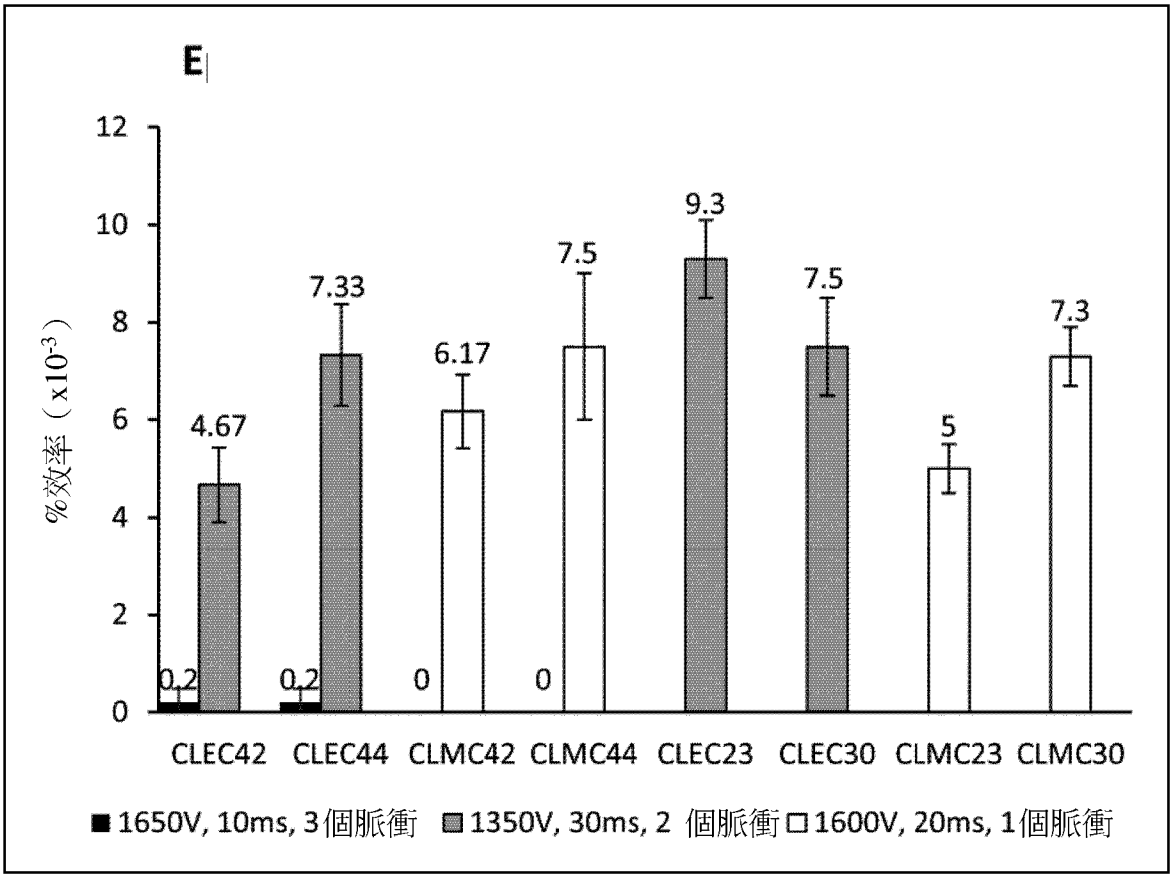
b) 將步驟a）中接收到的影像數據與參考影像數據進行比較。

【請求項65】 如請求項64之方法，其中該影像數據中的細胞激素含量較參考影像數據低，表示該個體體內的該RPE細胞的免疫原性降低。

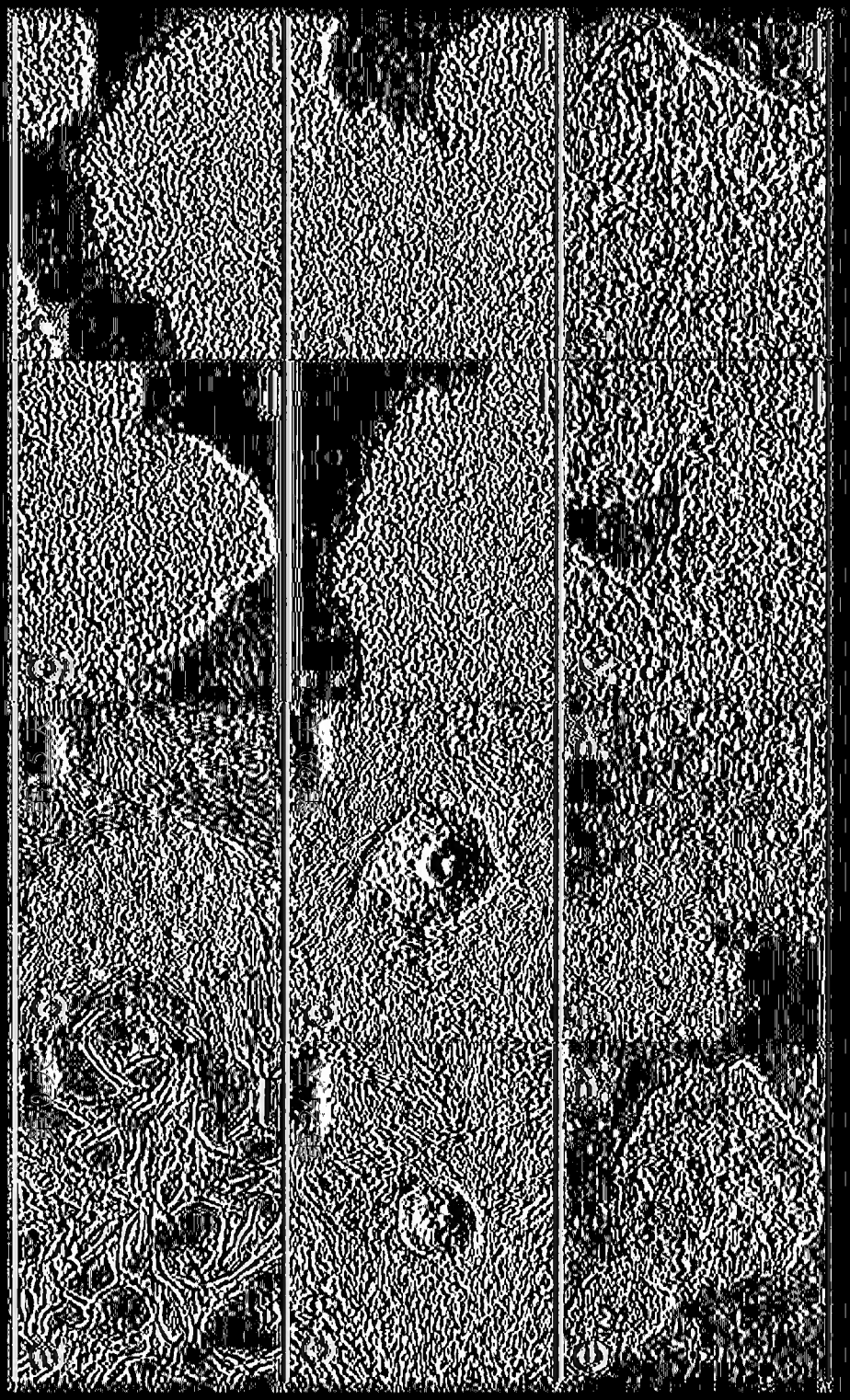
【發明圖式】

CLiPS 的衍生
臍帶內膜幹細胞的分離與培養
臍帶內膜幹細胞的分離
於合適的培養基中進行臍帶內膜幹細胞的增殖
藉由解離來收穫臍帶內膜幹細胞
計算幹細胞數目及等分分裝
重新懸浮細胞
穿孔
細胞恢復
將幹細胞轉移至 2 種不同的細胞培養基的 1:1 混合物中
更新該 2 種不同的細胞培養基的 1:1 混合物
替換該細胞培養基
規律地更新該細胞培養基
挑選 CLiPS 集落
CLiPS 的培養與增殖
規律的更換培養基
CLiPS 集落的解離
進一步解離 CLiPS 集落
以 1:3 (v/v)比例繼代 CLiPS 集落
CLiPS 的培養與增殖
CLiPS 的分化
多巴胺神經細胞
骨骼肌細胞
星突膠質細胞
肝細胞
心肌細胞

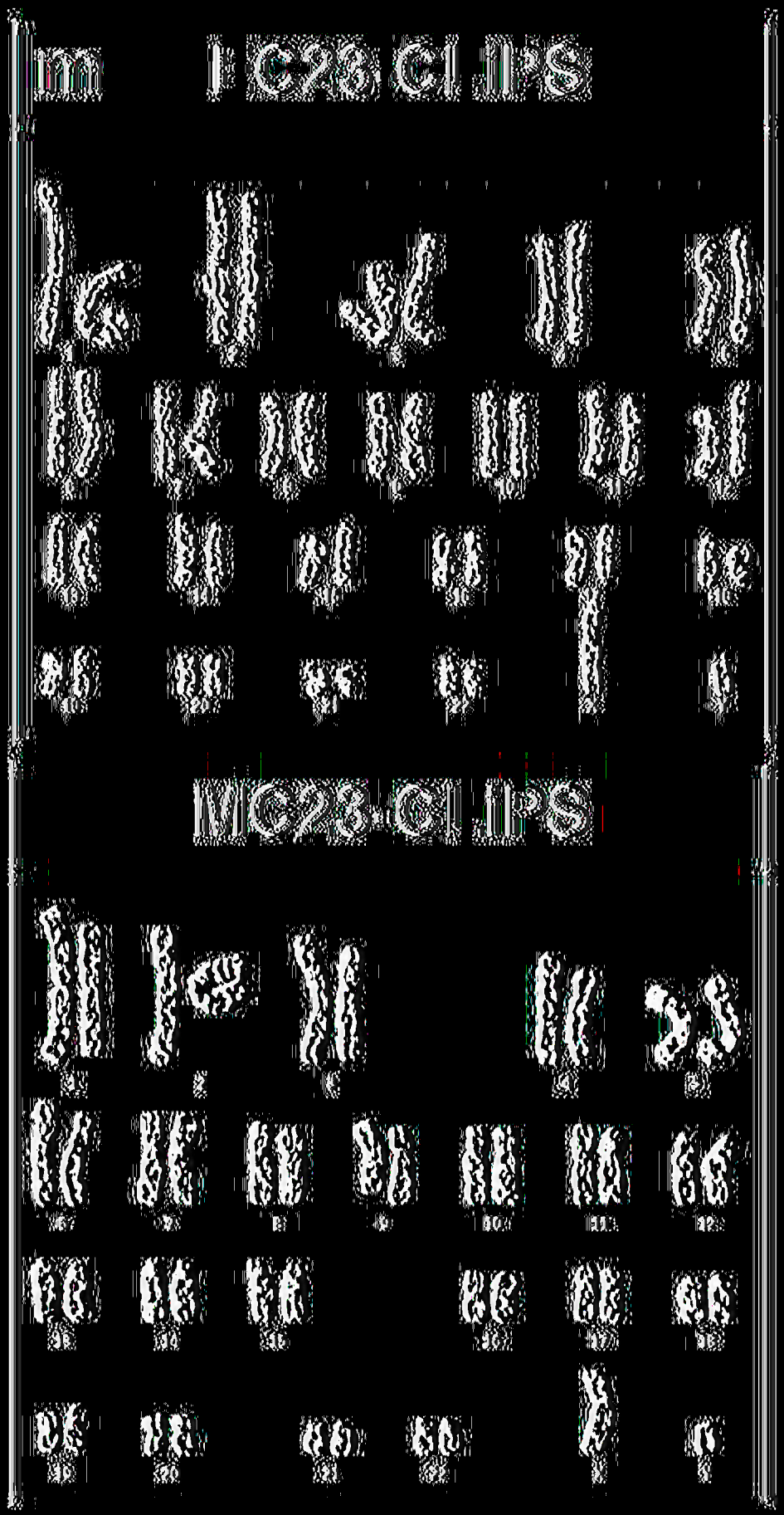
【圖1】


E
12
10
8
6
4
2
0
%效率（x10-3）
4.67
7.33
6.17
7.5
9.3
7.5
5
7.3
0.2
0.2
0
0
CLEC42
CLEC44
CLMC42
CLMC44
CLEC23
CLEC30
CLMC23
CLMC30
1650V, 10ms, 3個脈衝
1350V, 30ms, 2 個脈衝
1600V, 20ms, 1個脈衝

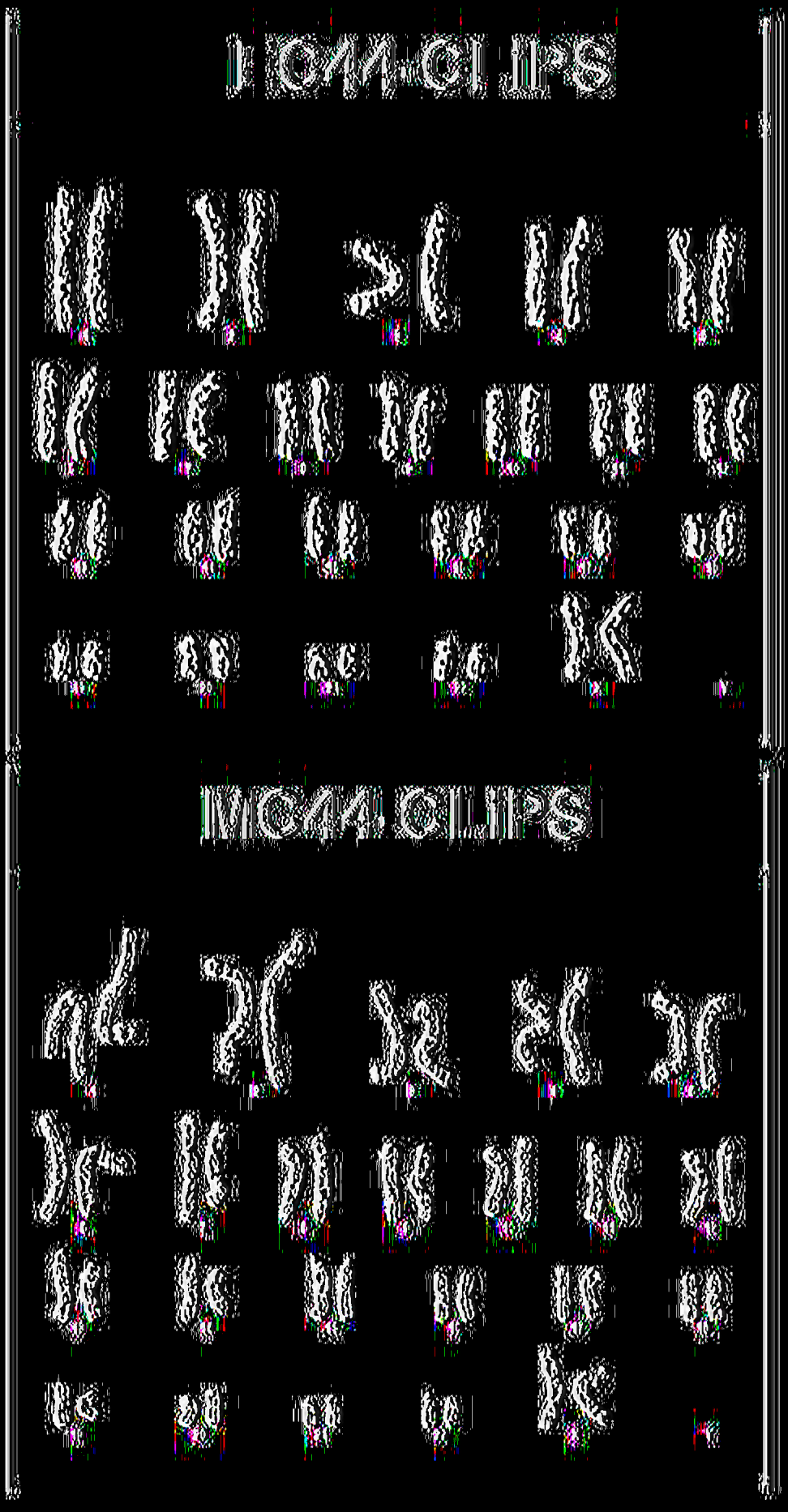
【圖2】



|(圖3)|



（同3(續1)）



(同3(續2))

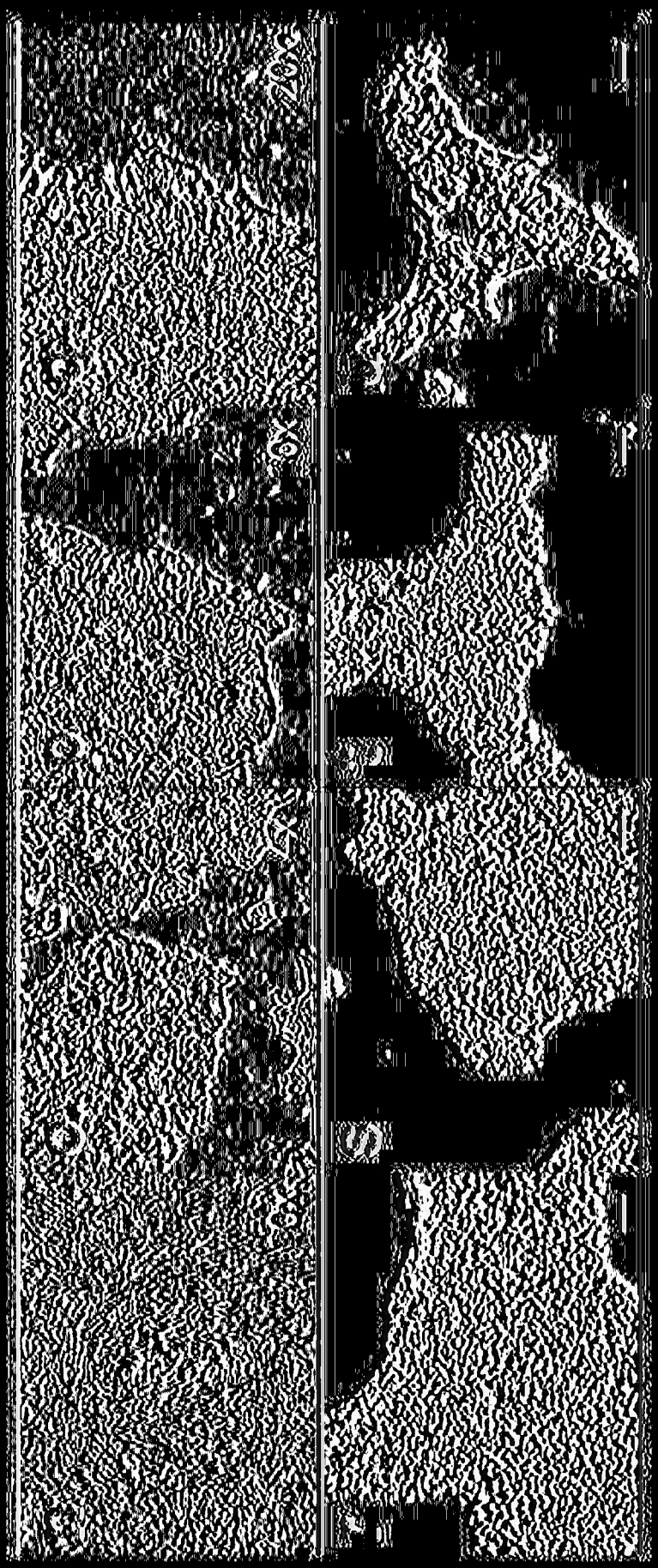
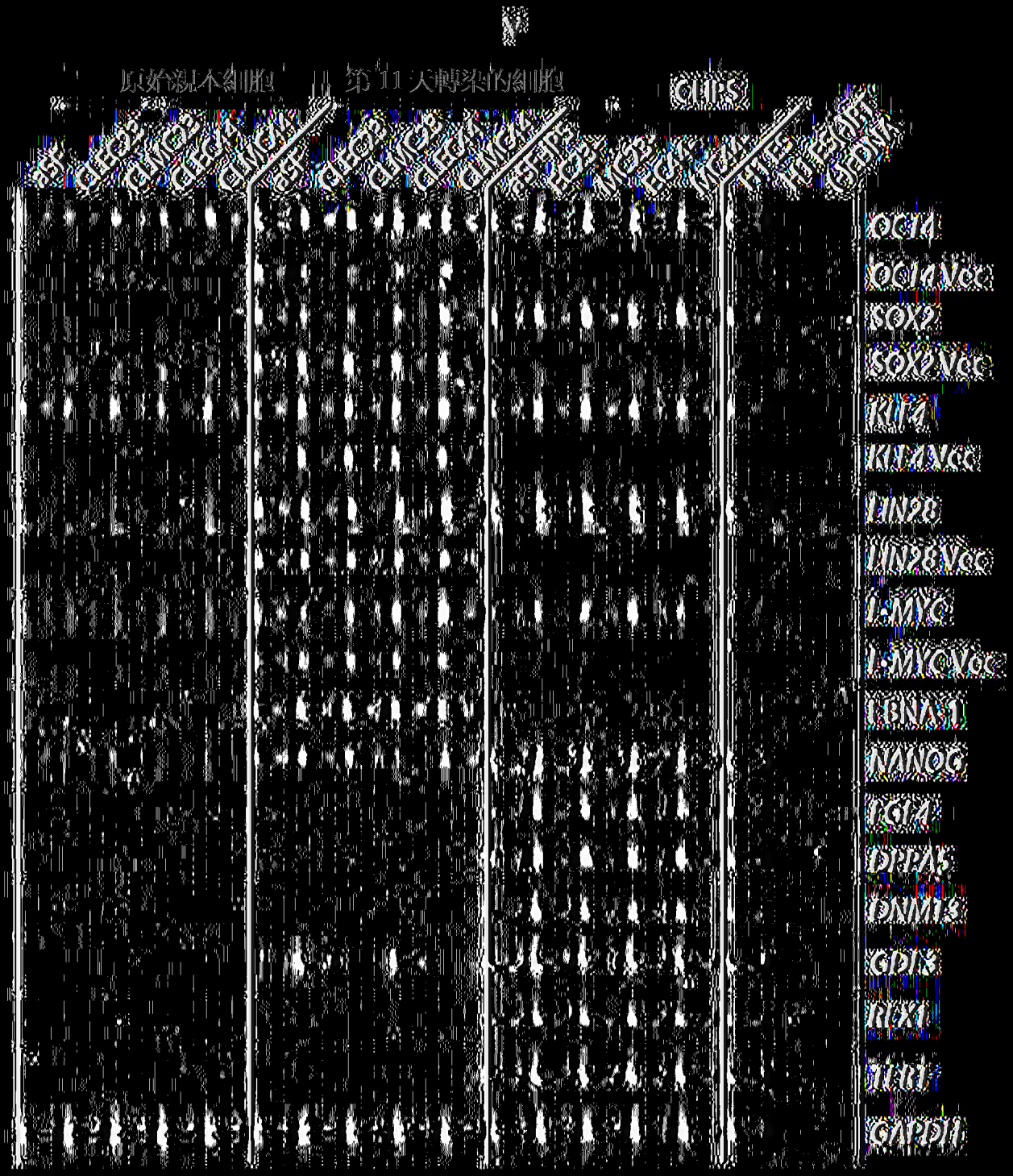
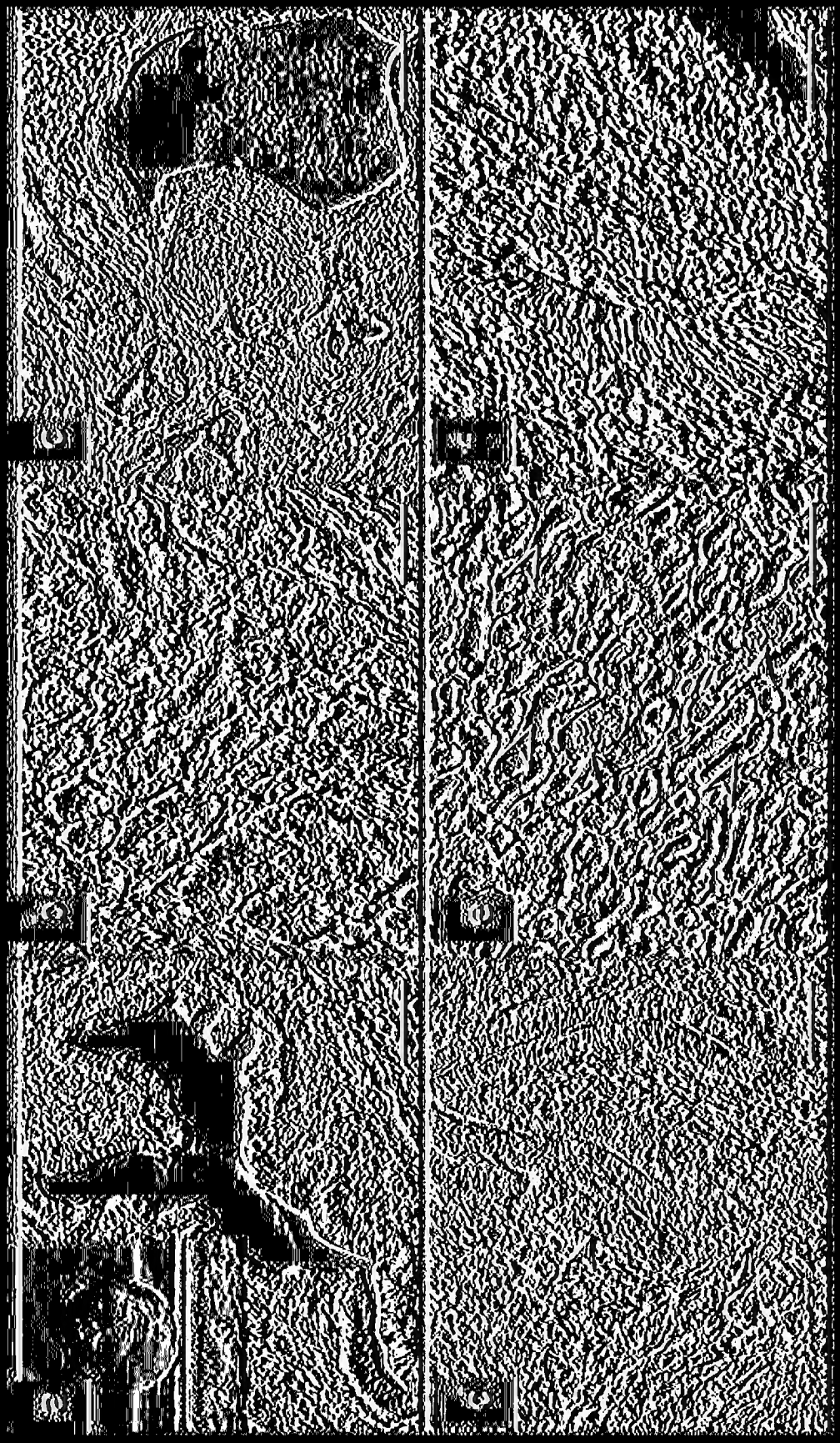


圖3(續3)


原始親本細胞
第 11 天轉染的細胞
OCT4
OCT4 Vec
SOX2
SOX2 Vec
KLF4
KLF4 Vec
LIN28
LIN28 Vec
L-MYC
L-MYC Vec
hTERT
NANOG
GFP
DPPA5
DNMT3
GDF3
REX1
TERT
GAPDH

|(同3(續4))|



圖(4)

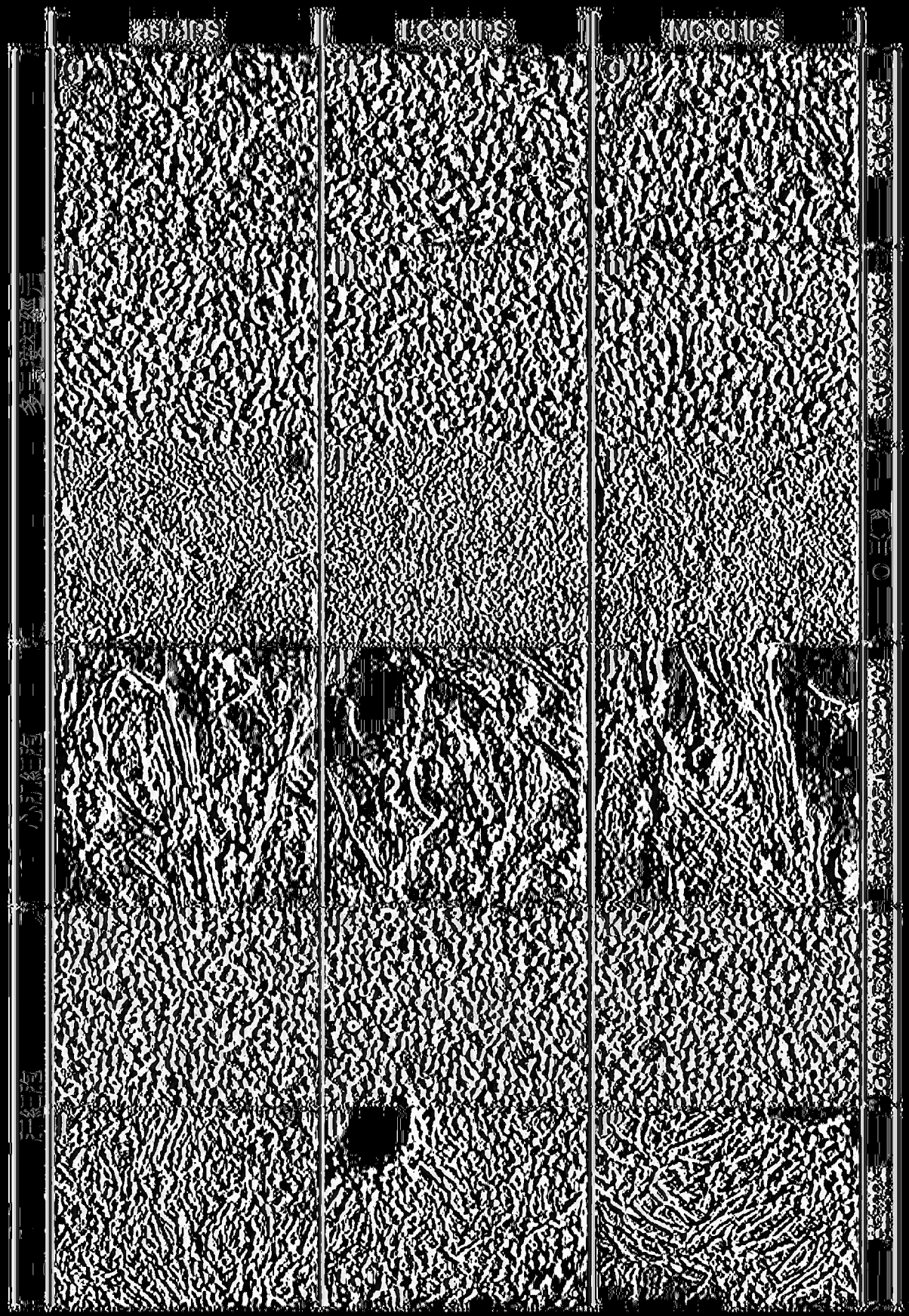
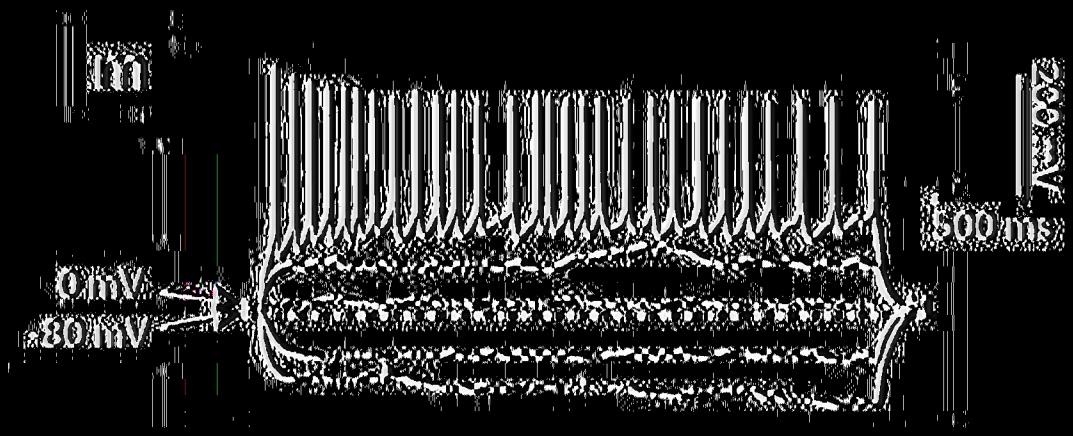


圖4(續1)



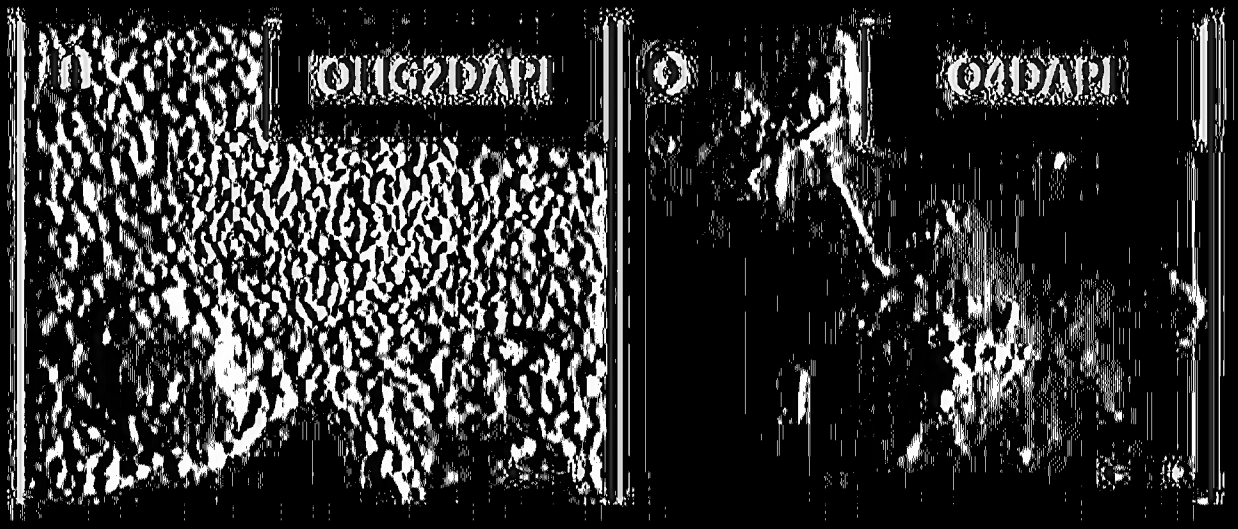
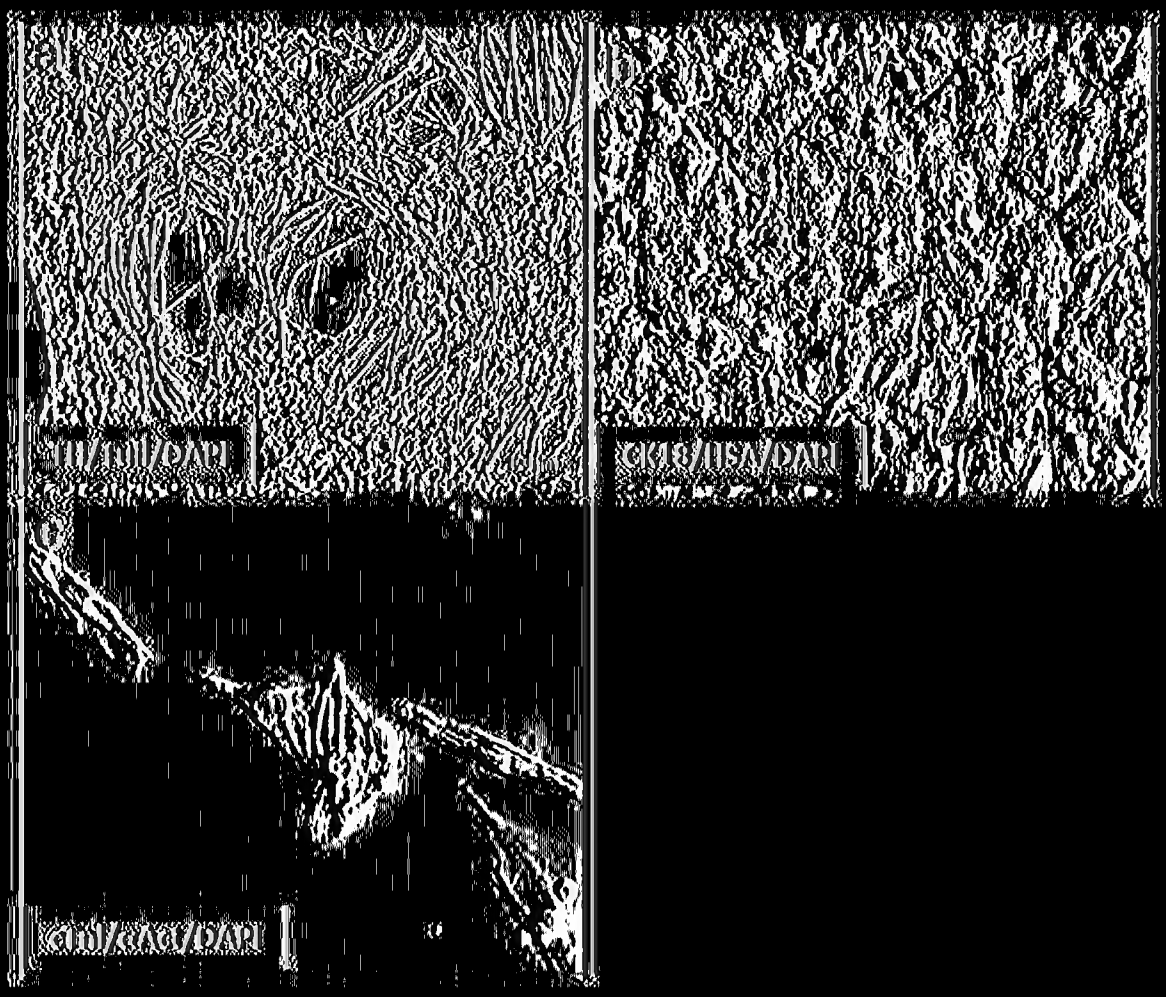


圖4(續2)



|(圖5)|

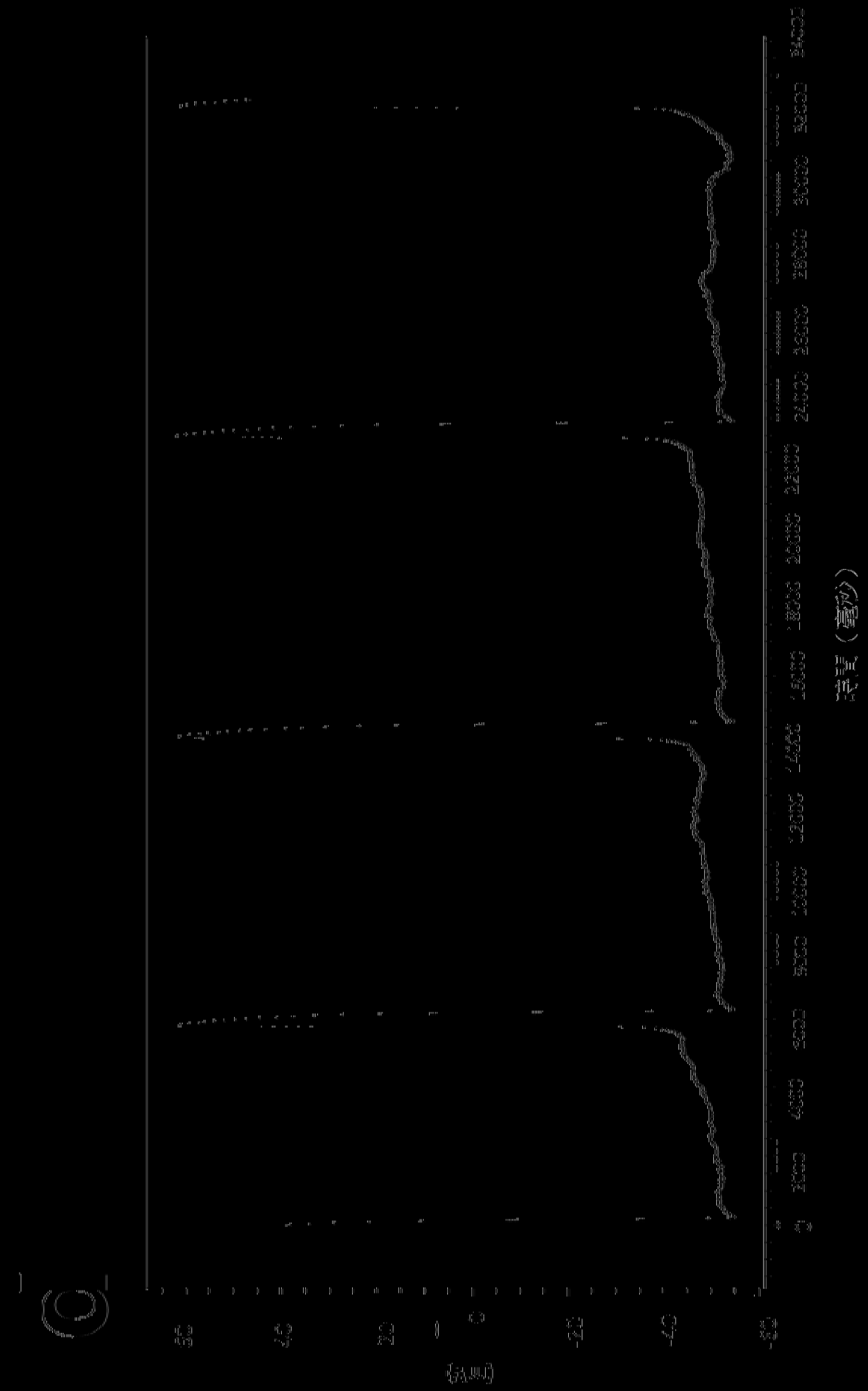


圖5(續1)

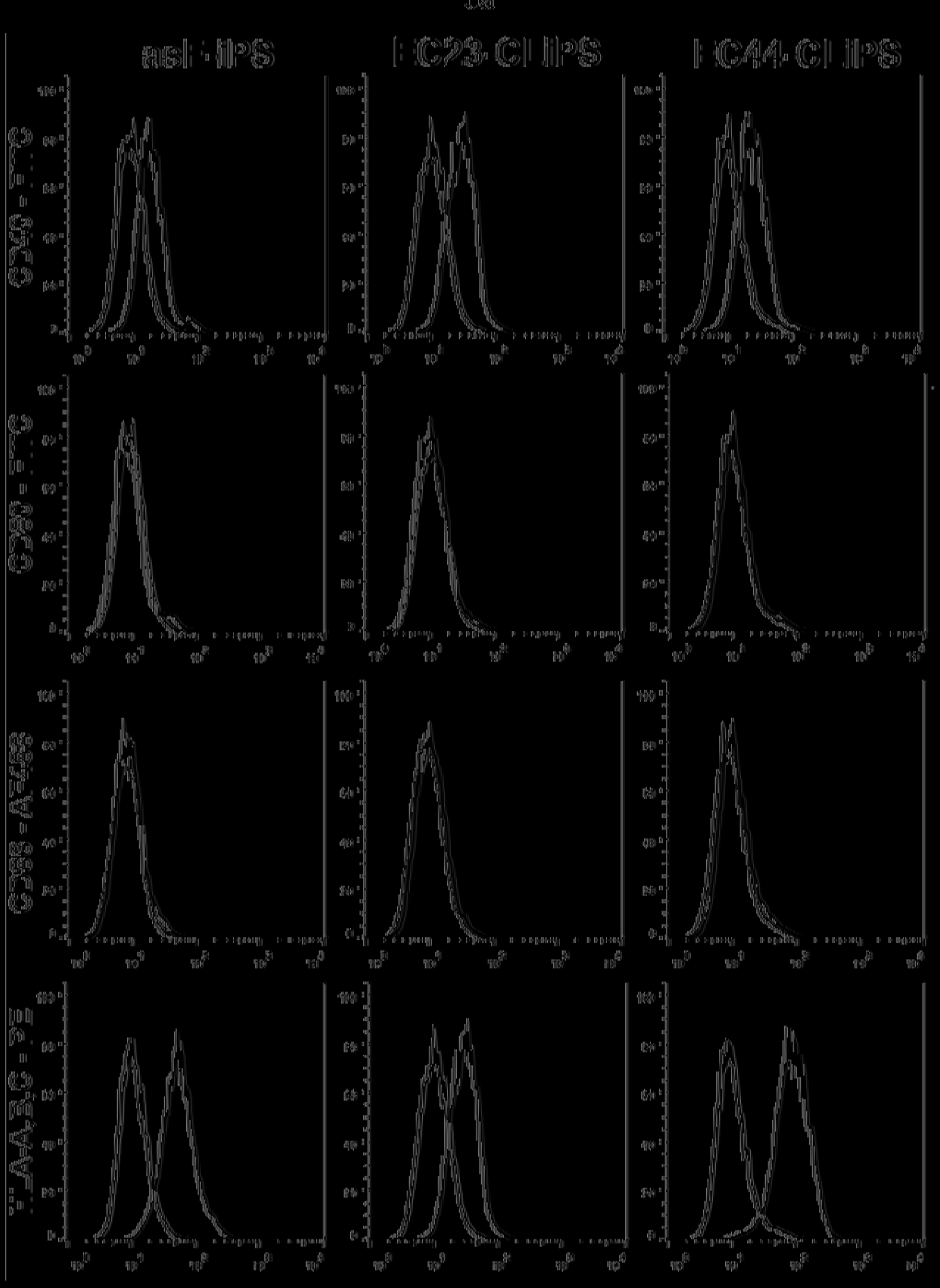

5a
asl-IPS
I-C23-Cl IPS
I-C24-Cl IPS
Cell Count
CD8-PerCP-Cy5-5-A
HLA-A2-PE-A

圖6

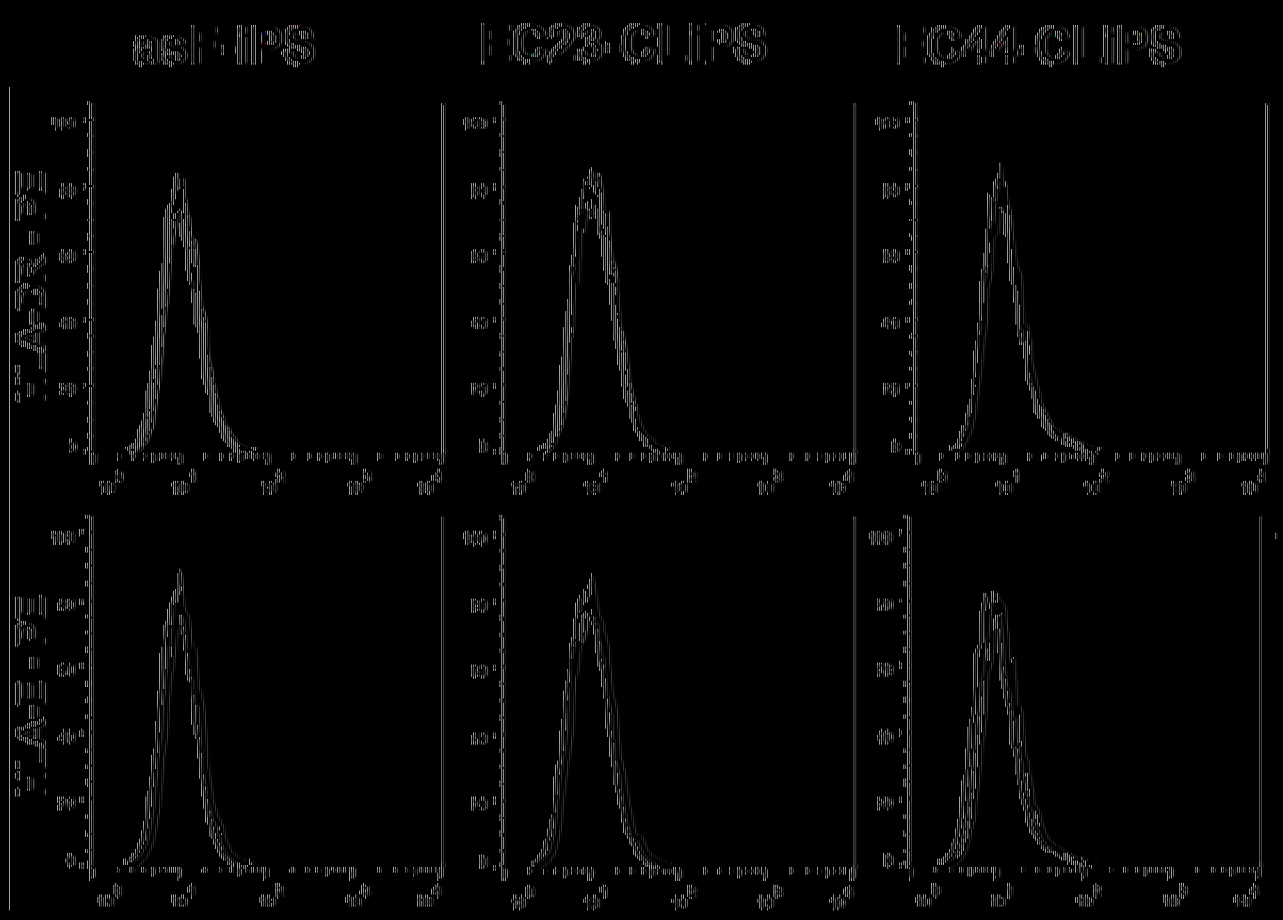


圖6(續1)

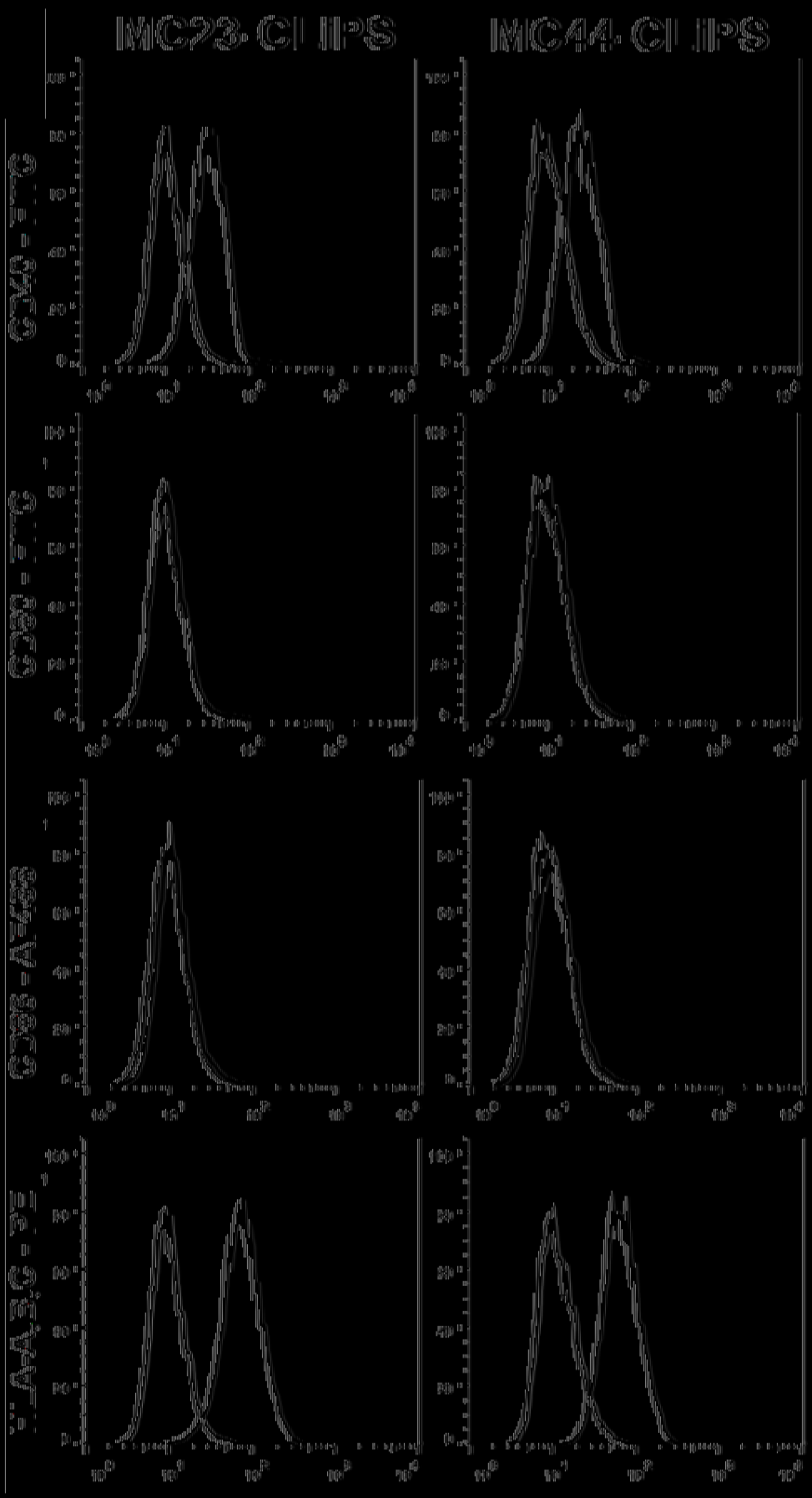


圖6(續2)

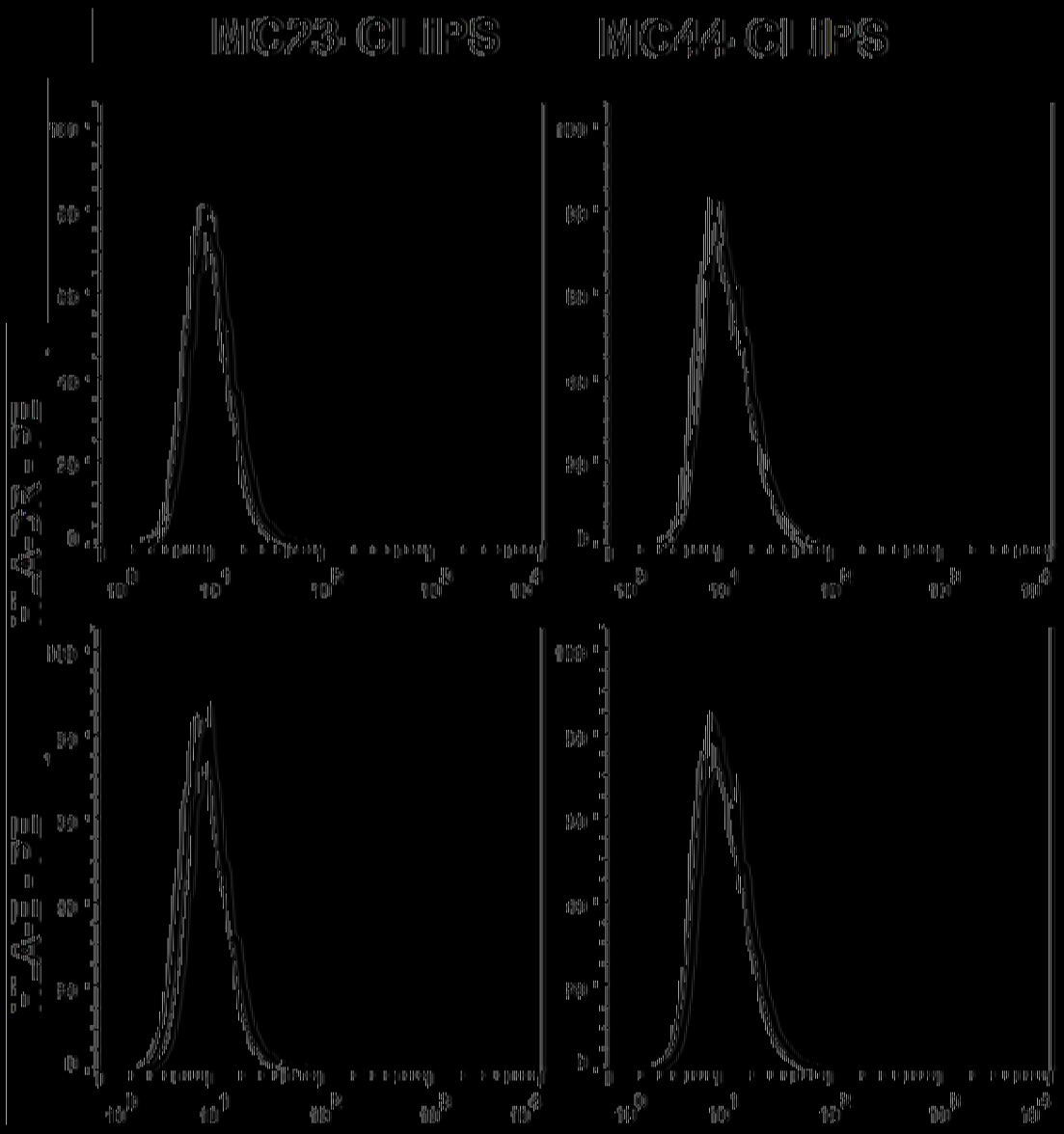
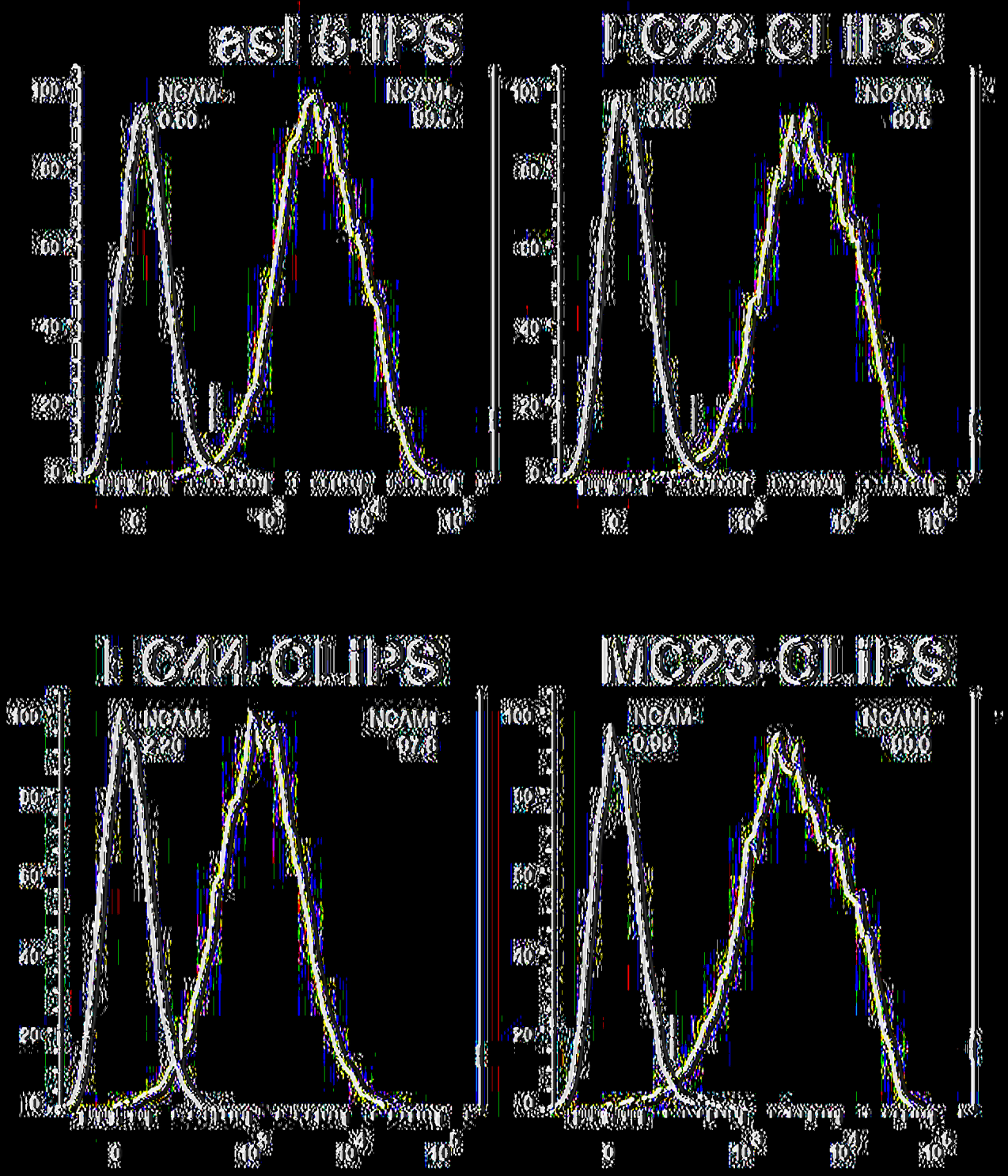

IMC23-CI IPS
IMC44-CI IPS
Particle Size Distribution
Particle Size Distribution

圖6(續3)

圖6


est6-IPS
NGAM
0.60
99.6
FC23-CLIPS
NGAM
0.46
99.6
FC44-CLIPS
NGAM
2.20
97.6
MC23-CLIPS
NGAM
0.98
99.0

(同6(續4))

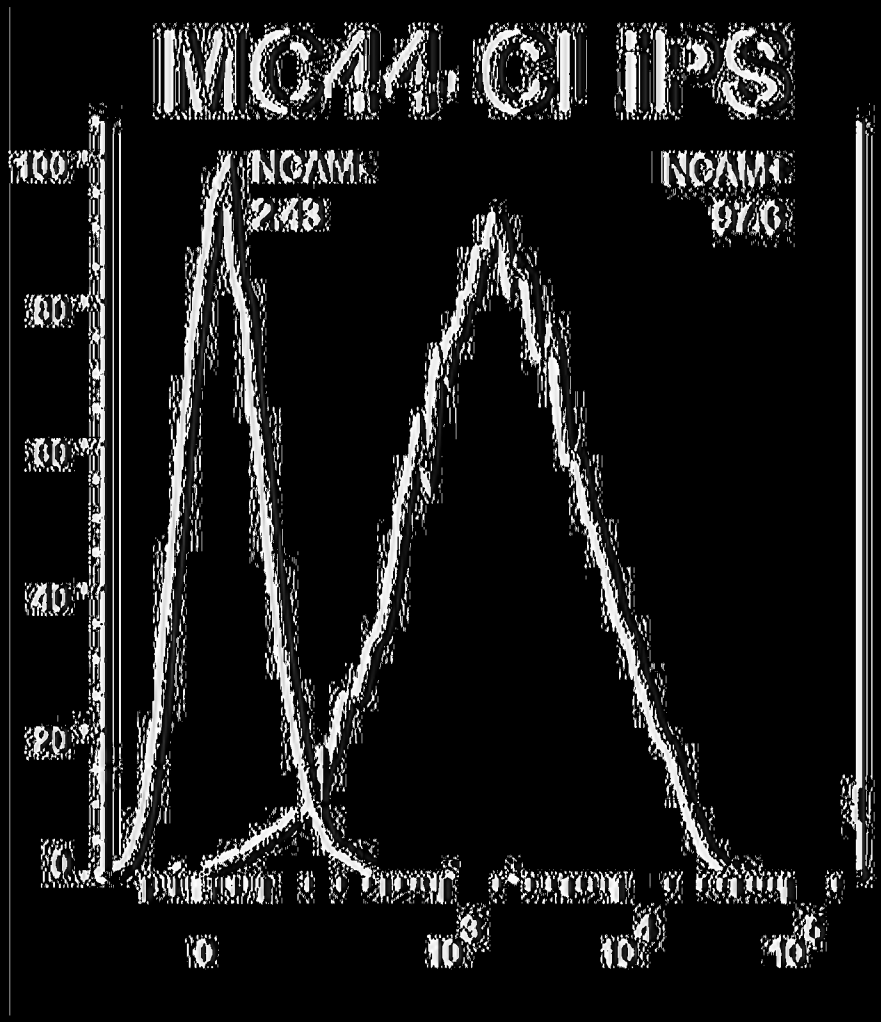


圖6(續5)

6c

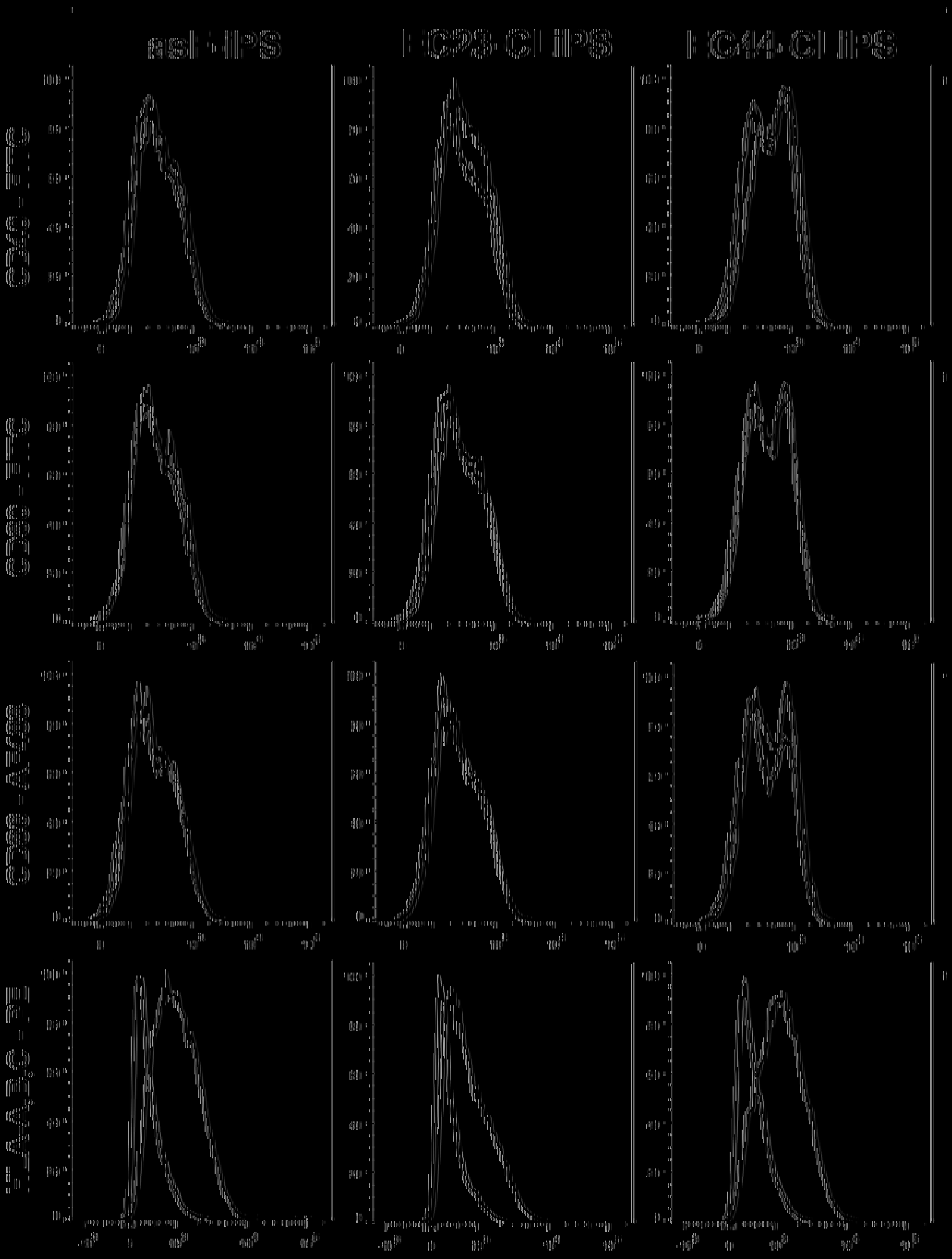


圖6(續6)

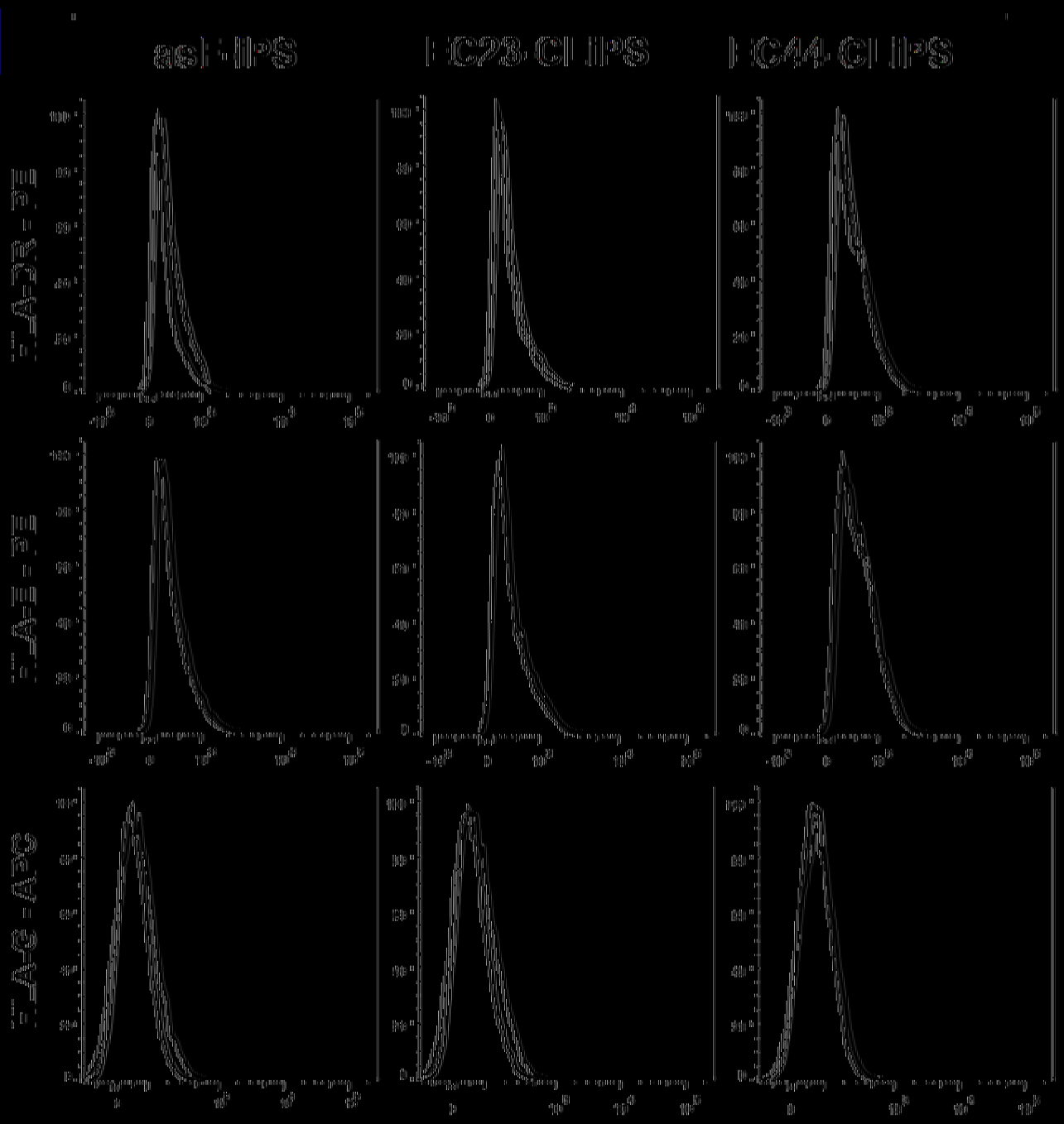

as-IPS
HC23 GI IPS
HC44 GI IPS
Intensity (a.u.)
Intensity (a.u.)
Intensity (a.u.)

圖6(續八)

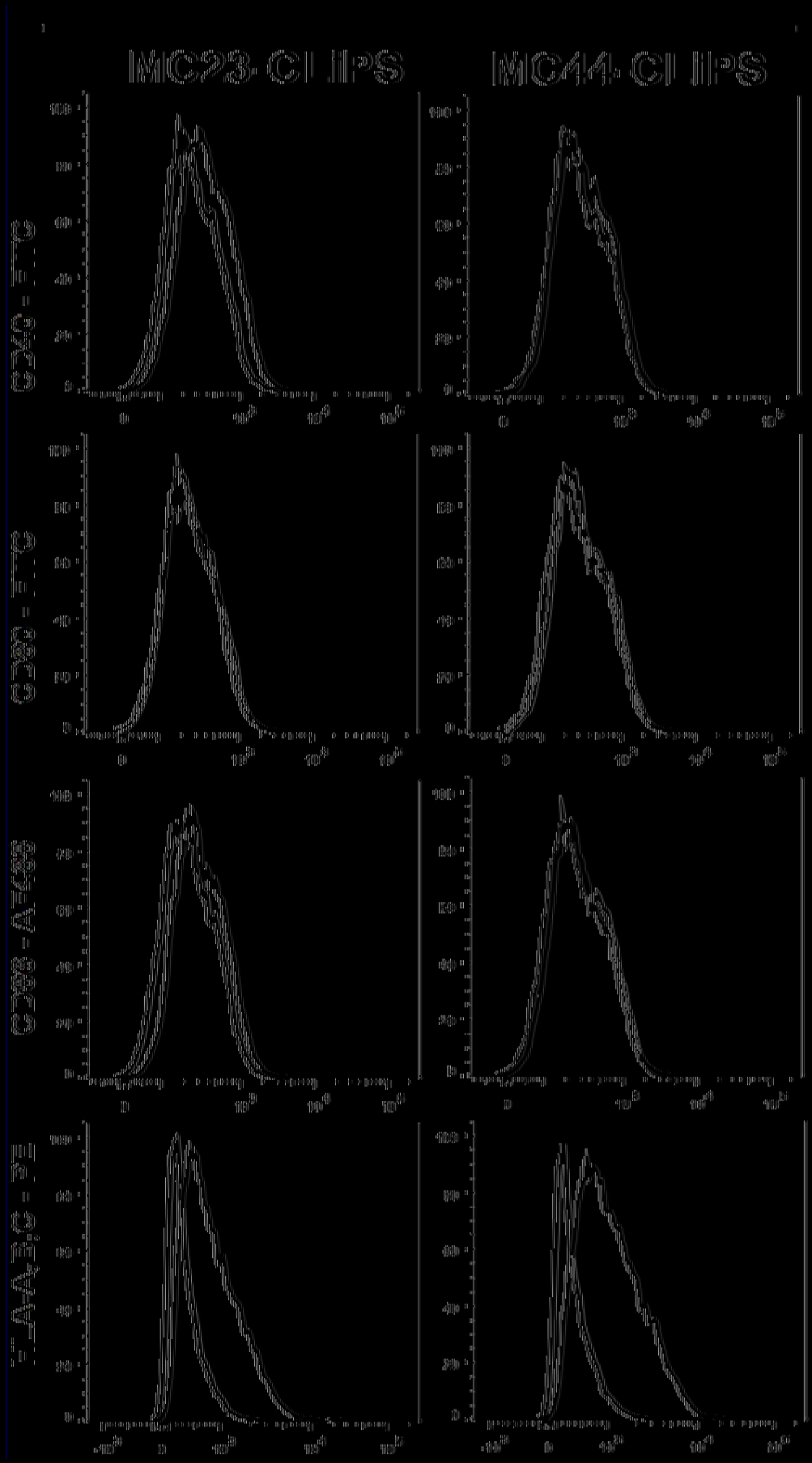

MC23-CI IPS
MC44-CI IPS
CXCR3+ T cells
CXCR6+ T cells
CXCR3+CXCR6+ T cells
CXCR3-CXCR6- T cells

圖6(續8)

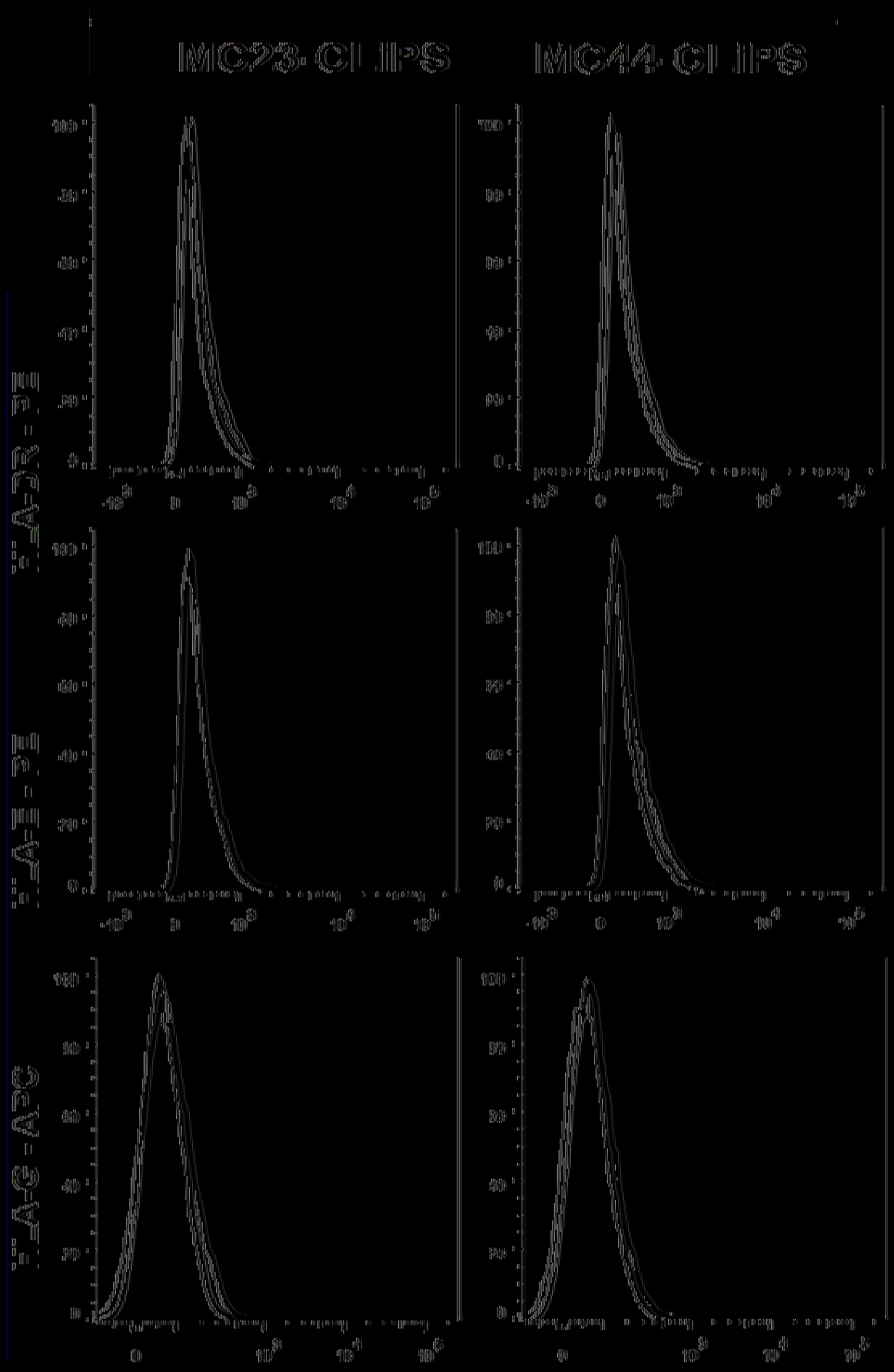

MC23.CI.IPS
MC24.CI.IPS
Intensity (a.u.)
Intensity (a.u.)
Intensity (a.u.)

圖6(續9)

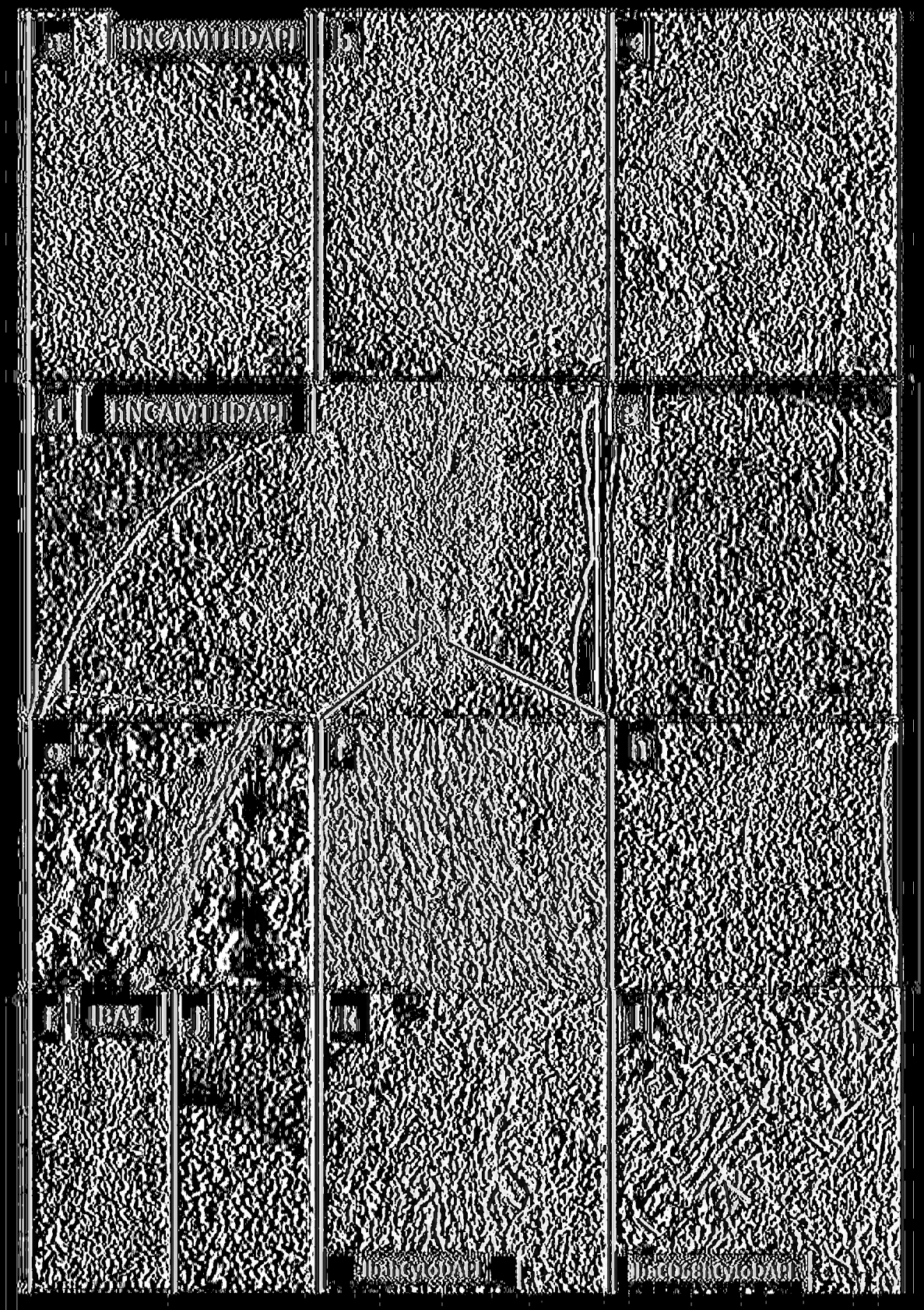
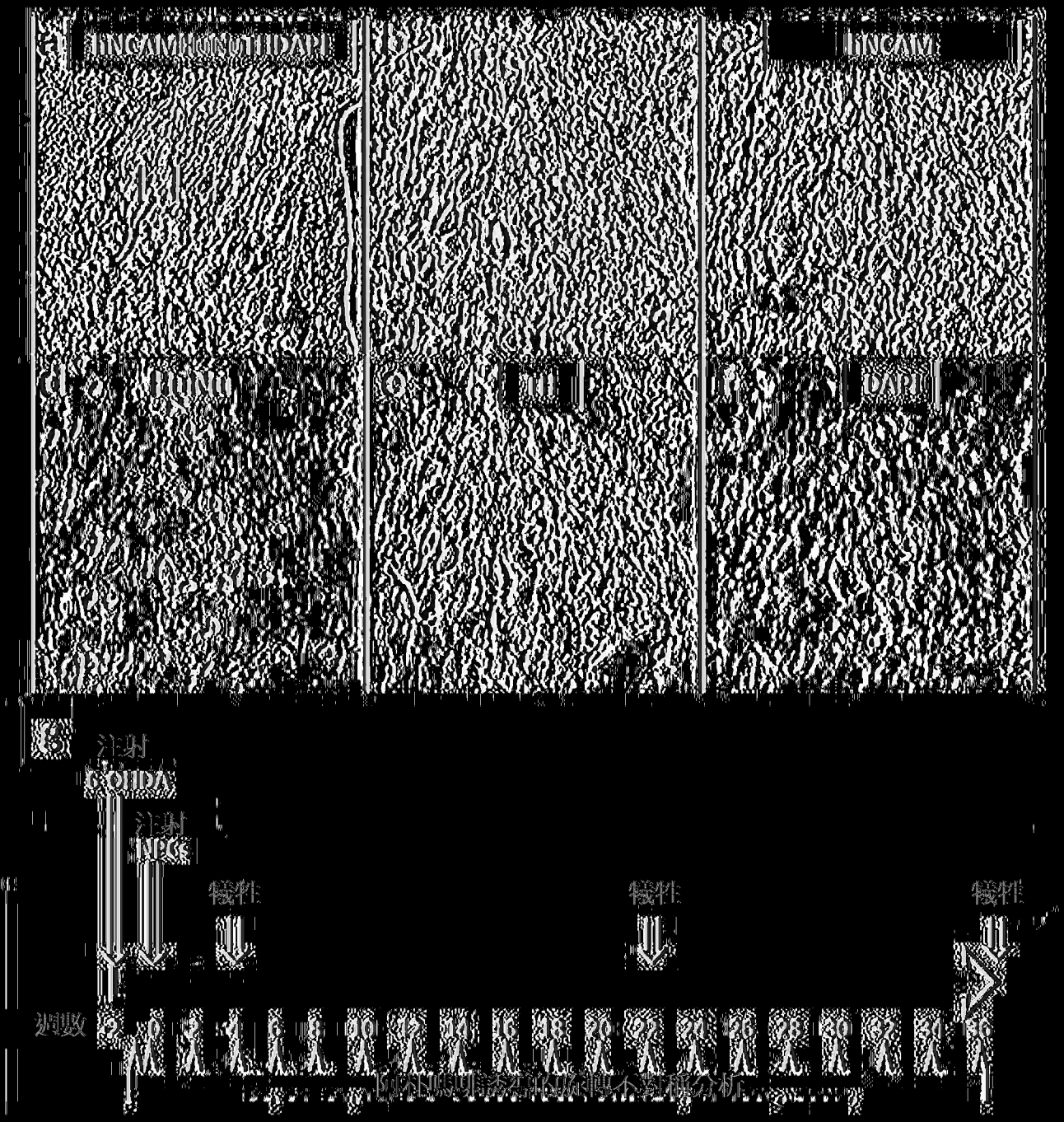
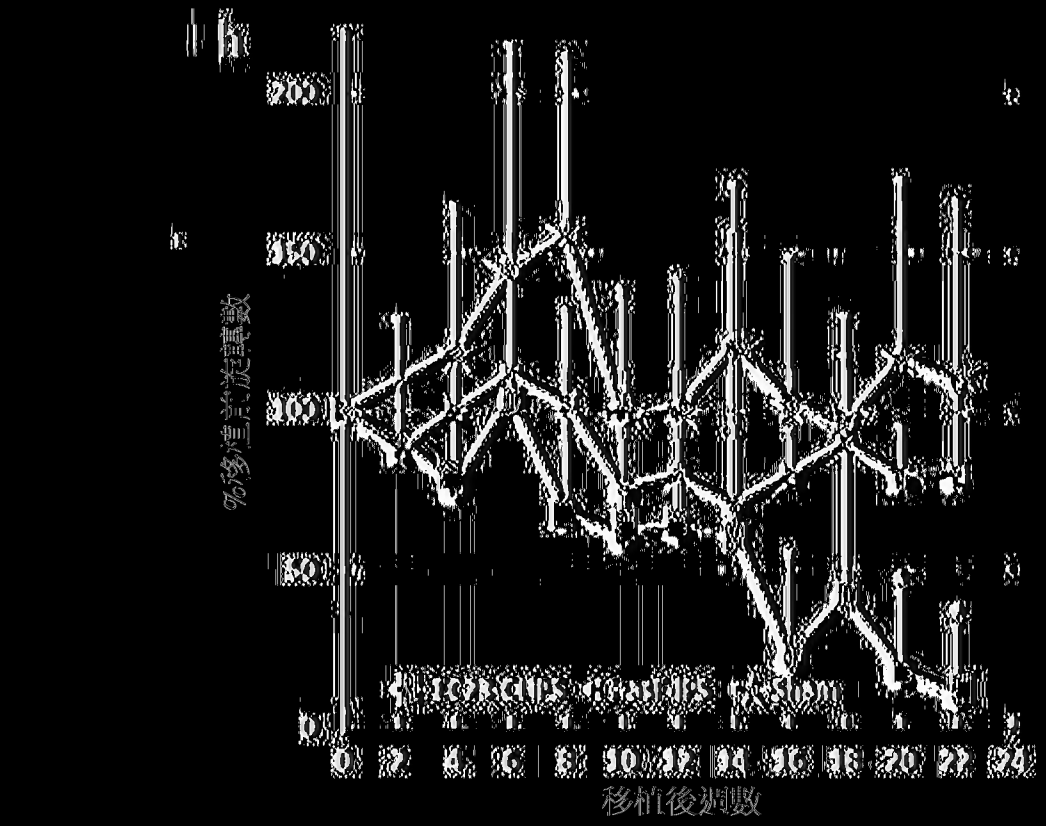


圖7



|(圖8)|



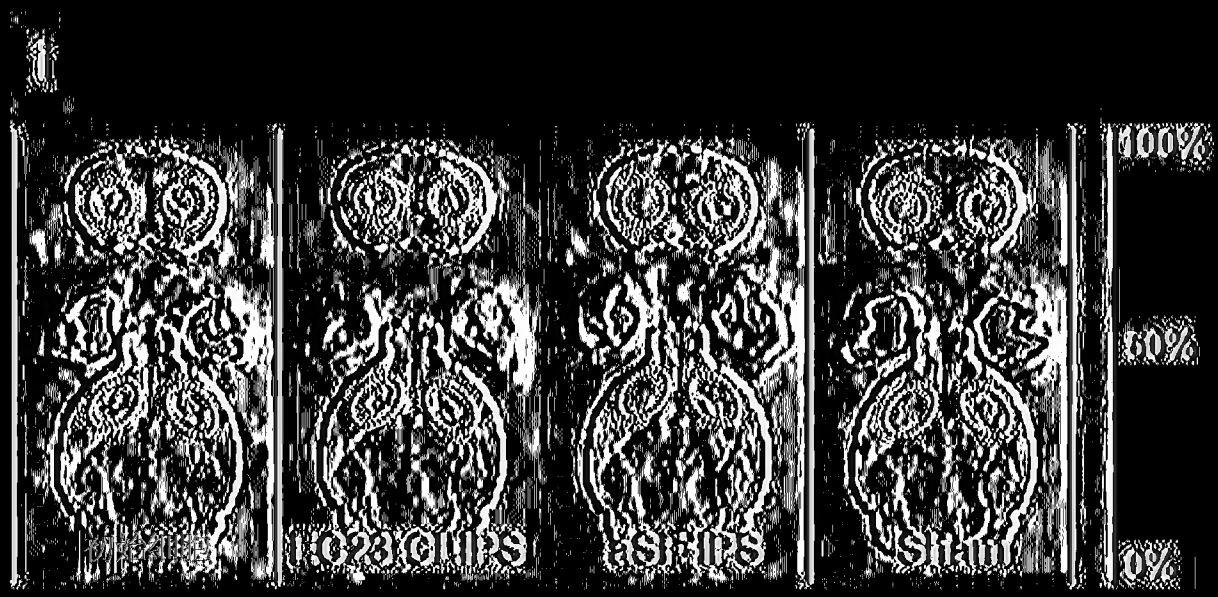
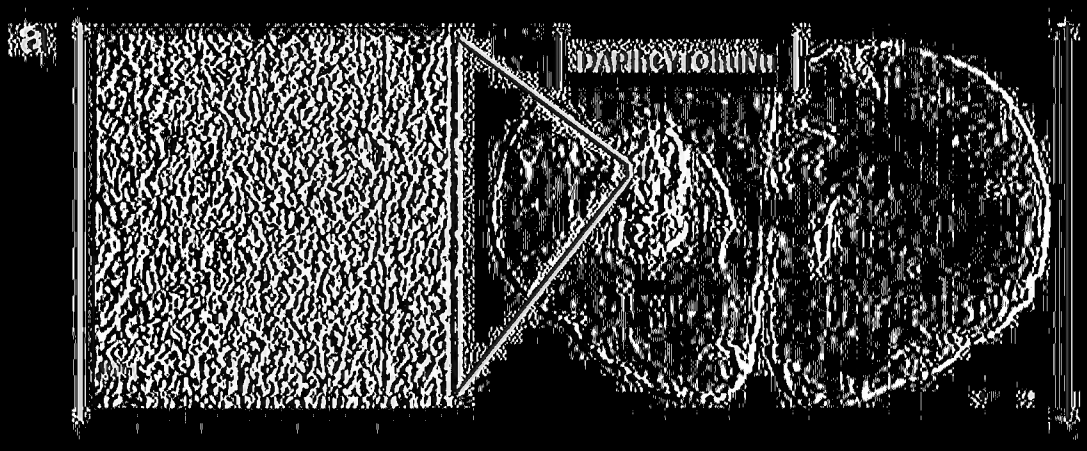
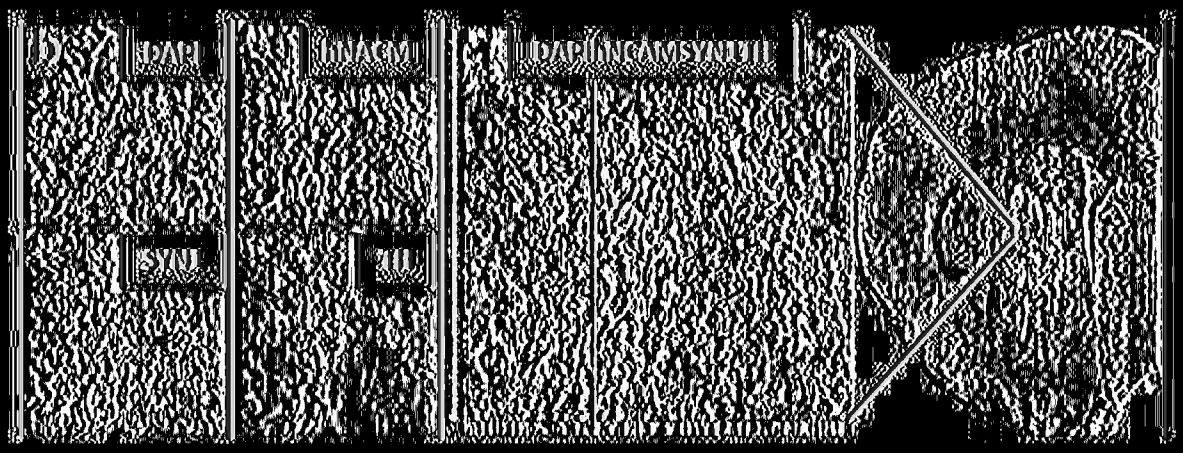


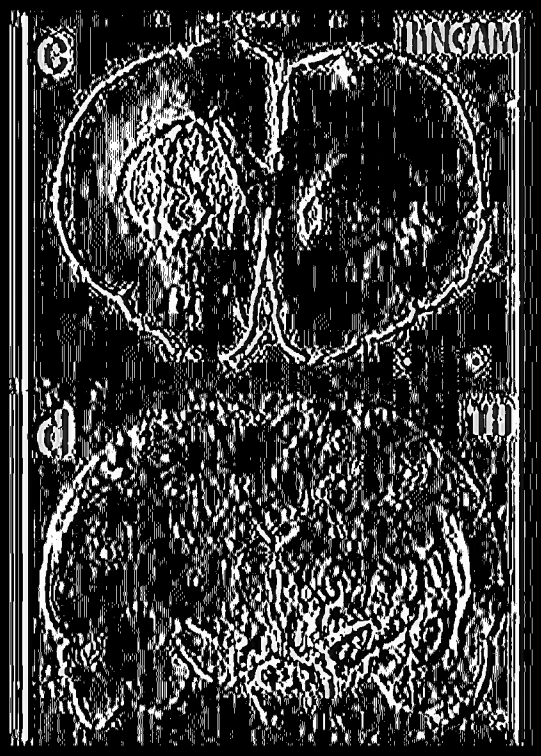
圖8(續1)

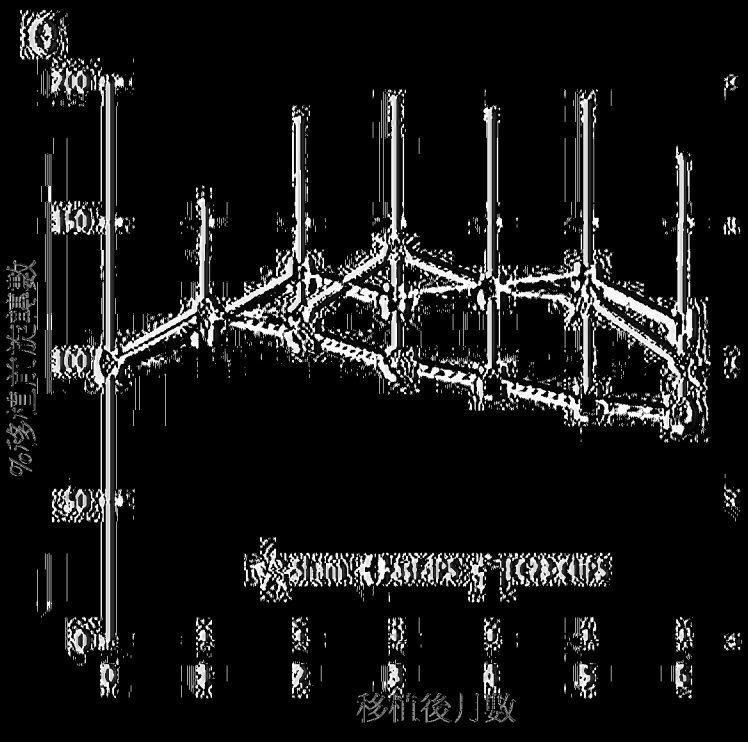
初始位置
第一位置
第二位置
第三位置
第四位置
第五位置
第六位置
第七位置
第八位置
第九位置
第十位置
第十一位置
第十二位置
第十三位置
第十四位置
第十五位置
第十六位置
第十七位置
第十八位置
第十九位置
第二十位置
第二十一位置
第二十二位置
第二十三位置
第二十四位置
第二十五位置
第二十六位置
第二十七位置
第二十八位置
第二十九位置
第三十位置
第三十一位置
第三十二位置
第三十三位置
第三十四位置
第三十五位置
第三十六位置
第三十七位置
第三十八位置
第三十九位置
第四十位置
第四十一位置
第四十二位置
第四十三位置
第四十四位置
第四十五位置
第四十六位置
第四十七位置
第四十八位置
第四十九位置
第五十位置
第五十一位置
第五十二位置
第五十三位置
第五十四位置
第五十五位置
第五十六位置
第五十七位置
第五十八位置
第五十九位置
第六十位置
第六十一位置
第六十二位置
第六十三位置
第六十四位置
第六十五位置
第六十六位置
第六十七位置
第六十八位置
第六十九位置
第七十位置
第七十一位置
第七十二位置
第七十三位置
第七十四位置
第七十五位置
第七十六位置
第七十七位置
第七十八位置
第七十九位置
第八十位置
第八十一位置
第八十二位置
第八十三位置
第八十四位置
第八十五位置
第八十六位置
第八十七位置
第八十八位置
第八十九位置
第九十位置
第九十一位置
第九十二位置
第九十三位置
第九十四位置
第九十五位置
第九十六位置
第九十七位置
第九十八位置
第九十九位置
第一百位置
第一百一位置
第一百二位置
第一百三位置
第一百四位置
第一百五位置
第一百六位置
第一百七位置
第一百八位置
第一百九位置
第一百十位置
第一百十一位置
第一百十二位置
第一百十三位置
第一百十四位置
第一百十五位置
第一百十六位置
第一百十七位置
第一百十八位置
第一百十九位置
第一百二十位置
第一百二十一位置
第一百二十二位置
第一百二十三位置
第一百二十四位置
第一百二十五位置
第一百二十六位置
第一百二十七位置
第一百二十八位置
第一百二十九位置
第一百三十位置
第一百三十一位置
第一百三十二位置
第一百三十三位置
第一百三十四位置
第一百三十五位置
第一百三十六位置
第一百三十七位置
第一百三十八位置
第一百三十九位置
第一百四十位置
第一百四十一位置
第一百四十二位置
第一百四十三位置
第一百四十四位置
第一百四十五位置
第一百四十六位置
第一百四十七位置
第一百四十八位置
第一百四十九位置
第一百五十位置
第一百五十一位置
第一百五十二位置
第一百五十三位置
第一百五十四位置
第一百五十五位置
第一百五十六位置
第一百五十七位置
第一百五十八位置
第一百五十九位置
第一百六十位置
第一百六十一位置
第一百六十二位置
第一百六十三位置
第一百六十四位置
第一百六十五位置
第一百六十六位置
第一百六十七位置
第一百六十八位置
第一百六十九位置
第一百七十位置
第一百七十一位置
第一百七十二位置
第一百七十三位置
第一百七十四位置
第一百七十五位置
第一百七十六位置
第一百七十七位置
第一百七十八位置
第一百七十九位置
第一百八十位置
第一百八十一位置
第一百八十二位置
第一百八十三位置
第一百八十四位置
第一百八十五位置
第一百八十六位置
第一百八十七位置
第一百八十八位置
第一百八十九位置
第一百九十位置
第一百九十一位置
第一百九十二位置
第一百九十三位置
第一百九十四位置
第一百九十五位置
第一百九十六位置
第一百九十七位置
第一百九十八位置
第一百九十九位置
第二百位置
第二百一位置
第二百二位置
第二百三位置
第二百四位置
第二百五位置
第二百六位置
第二百七位置
第二百八位置
第二百九位置
第二百十位置
第二百十一位置
第二百十二位置
第二百十三位置
第二百十四位置
第二百十五位置
第二百十六位置
第二百十七位置
第二百十八位置
第二百十九位置
第二百二十位置
第二百二十一位置
第二百二十二位置
第二百二十三位置
第二百二十四位置
第二百二十五位置
第二百二十六位置
第二百二十七位置
第二百二十八位置
第二百二十九位置
第二百三十位置
第二百三十一位置
第二百三十二位置
第二百三十三位置
第二百三十四位置
第二百三十五位置
第二百三十六位置
第二百三十七位置
第二百三十八位置
第二百三十九位置
第二百四十位置
第二百四十一位置
第二百四十二位置
第二百四十三位置
第二百四十四位置
第二百四十五位置
第二百四十六位置
第二百四十七位置
第二百四十八位置
第二百四十九位置
第二百五十位置
第二百五十一位置
第二百五十二位置
第二百五十三位置
第二百五十四位置
第二百五十五位置
第二百五十六位置
第二百五十七位置
第二百五十八位置
第二百五十九位置
第二百六十位置
第二百六十一位置
第二百六十二位置
第二百六十三位置
第二百六十四位置
第二百六十五位置
第二百六十六位置
第二百六十七位置
第二百六十八位置
第二百六十九位置
第二百七十位置
第二百七十一位置
第二百七十二位置
第二百七十三位置
第二百七十四位置
第二百七十五位置
第二百七十六位置
第二百七十七位置
第二百七十八位置
第二百七十九位置
第二百八十位置
第二百八十一位置
第二百八十二位置
第二百八十三位置
第二百八十四位置
第二百八十五位置
第二百八十六位置
第二百八十七位置
第二百八十八位置
第二百八十九位置
第二百九十位置
第二百九十一位置
第二百九十二位置
第二百九十三位置
第二百九十四位置
第二百九十五位置
第二百九十六位置
第二百九十七位置
第二百九十八位置
第二百九十九位置
第三百位置
第三百一位置
第三百二位置
第三百三位置
第三百四位置
第三百五位置
第三百六位置
第三百七位置
第三百八位置
第三百九位置
第三百十位置
第三百十一位置
第三百十二位置
第三百十三位置
第三百十四位置
第三百十五位置
第三百十六位置
第三百十七位置
第三百十八位置
第三百十九位置
第三百二十位置
第三百二十一位置
第三百二十二位置
第三百二十三位置
第三百二十四位置
第三百二十五位置
第三百二十六位置
第三百二十七位置
第三百二十八位置
第三百二十九位置
第三百三十位置
第三百三十一位置
第三百三十二位置
第三百三十三位置
第三百三十四位置
第三百三十五位置
第三百三十六位置
第三百三十七位置
第三百三十八位置
第三百三十九位置
第三百四十位置
第三百四十一位置
第三百四十二位置
第三百四十三位置
第三百四十四位置
第三百四十五位置
第三百四十六位置
第三百四十七位置
第三百四十八位置
第三百四十九位置
第三百五十位置
第三百五十一位置
第三百五十二位置
第三百五十三位置
第三百五十四位置
第三百五十五位置
第三百五十六位置
第三百五十七位置
第三百五十八位置
第三百五十九位置
第三百六十位置
第三百六十一位置
第三百六十二位置
第三百六十三位置
第三百六十四位置
第三百六十五位置
第三百六十六位置
第三百六十七位置
第三百六十八位置
第三百六十九位置
第三百七十位置
第三百七十一位置
第三百七十二位置
第三百七十三位置
第三百七十四位置
第三百七十五位置
第三百七十六位置
第三百七十七位置
第三百七十八位置
第三百七十九位置
第三百八十位置
第三百八十一位置
第三百八十二位置
第三百八十三位置
第三百八十四位置
第三百八十五位置
第三百八十六位置
第三百八十七位置
第三百八十八位置
第三百八十九位置
第三百九十位置
第三百九十一位置
第三百九十二位置
第三百九十三位置
第三百九十四位置
第三百九十五位置
第三百九十六位置
第三百九十七位置
第三百九十八位置
第三百九十九位置
第四百位置
第四百一位置
第四百二位置
第四百三位置
第四百四位置
第四百五位置
第四百六位置
第四百七位置
第四百八位置
第四百九位置
第四百十位置
第四百十一位置
第四百十二位置
第四百十三位置
第四百十四位置
第四百十五位置
第四百十六位置
第四百十七位置
第四百十八位置
第四百十九位置
第四百二十位置
第四百二十一位置
第四百二十二位置
第四百二十三位置
第四百二十四位置
第四百二十五位置
第四百二十六位置
第四百二十七位置
第四百二十八位置
第四百二十九位置
第四百三十位置
第四百三十一位置
第四百三十二位置
第四百三十三位置
第四百三十四位置
第四百三十五位置
第四百三十六位置
第四百三十七位置
第四百三十八位置
第四百三十九位置
第四百四十位置
第四百四十一位置
第四百四十二位置
第四百四十三位置
第四百四十四位置
第四百四十五位置
第四百四十六位置
第四百四十七位置
第四百四十八位置
第四百四十九位置
第四百五十位置
第四百五十一位置
第四百五十二位置
第四百五十三位置
第四百五十四位置
第四百五十五位置
第四百五十六位置
第四百五十七位置
第四百五十八位置
第四百五十九位置
第四百六十位置
第四百六十一位置
第四百六十二位置
第四百六十三位置
第四百六十四位置
第四百六十五位置
第四百六十六位置
第四百六十七位置
第四百六十八位置
第四百六十九位置
第四百七十位置
第四百七十一位置
第四百七十二位置
第四百七十三位置
第四百七十四位置
第四百七十五位置
第四百七十六位置
第四百七十七位置
第四百七十八位置
第四百七十九位置
第四百八十位置
第四百八十一位置
第四百八十二位置
第四百八十三位置
第四百八十四位置
第四百八十五位置
第四百八十六位置
第四百八十七位置
第四百八十八位置
第四百八十九位置
第四百九十位置
第四百九十一位置
第四百九十二位置
第四百九十三位置
第四百九十四位置
第四百九十五位置
第四百九十六位置
第四百九十七位置
第四百九十八位置
第四百九十九位置
第五百位置
第五百一位置
第五百二位置
第五百三位置
第五百四位置
第五百五位置
第五百六位置
第五百七位置
第五百八位置
第五百九位置
第五百十位置
第五百十一位置
第五百十二位置
第五百十三位置
第五百十四位置
第五百十五位置
第五百十六位置
第五百十七位置
第五百十八位置
第五百十九位置
第五百二十位置
第五百二十一位置
第五百二十二位置
第五百二十三位置
第五百二十四位置
第五百二十五位置
第五百二十六位置
第五百二十七位置
第五百二十八位置
第五百二十九位置
第五百三十位置
第五百三十一位置
第五百三十二位置
第五百三十三位置
第五百三十四位置
第五百三十五位置
第五百三十六位置
第五百三十七位置
第五百三十八位置
第五百三十九位置
第五百四十位置
第五百四十一位置
第五百四十二位置
第五百四十三位置
第五百四十四位置
第五百四十五位置
第五百四十六位置
第五百四十七位置
第五百四十八位置
第五百四十九位置
第五百五十位置
第五百五十一位置
第五百五十二位置
第五百五十三位置
第五百五十四位置
第五百五十五位置
第五百五十六位置
第五百五十七位置
第五百五十八位置
第五百五十九位置
第五百六十位置
第五百六十一位置
第五百六十二位置
第五百六十三位置
第五百六十四位置
第五百六十五位置
第五百六十六位置
第五百六十七位置
第五百六十八位置
第五百六十九位置
第五百七十位置
第五百七十一位置
第五百七十二位置
第五百七十三位置
第五百七十四位置
第五百七十五位置
第五百七十六位置
第五百七十七位置
第五百七十八位置
第五百七十九位置
第五百八十位置
第五百八十一位置
第五百八十二位置
第五百八十三位置
第五百八十四位置
第五百八十五位置
第五百八十六位置
第五百八十七位置
第五百八十八位置
第五百八十九位置
第五百九十位置
第五百九十一位置
第五百九十二位置
第五百九十三位置
第五百九十四位置
第五百九十五位置
第五百九十六位置
第五百九十七位置
第五百九十八位置
第五百九十九位置
第六百位置
第六百一位置
第六百二位置
第六百三位置
第六百四位置
第六百五位置
第六百六位置
第六百七位置
第六百八位置
第六百九位置
第六百十位置
第六百十一位置
第六百十二位置
第六百十三位置
第六百十四位置
第六百十五位置
第六百十六位置
第六百十七位置
第六百十八位置
第六百十九位置
第六百二十位置
第六百二十一位置
第六百二十二位置
第六百二十三位置
第六百二十四位置
第六百二十五位置
第六百二十六位置
第六百二十七位置
第六百二十八位置
第六百二十九位置
第六百三十位置
第六百三十一位置
第六百三十二位置
第六百三十三位置
第六百三十四位置
第六百三十五位置
第六百三十六位置
第六百三十七位置
第六百三十八位置
第六百三十九位置
第六百四十位置
第六百四十一位置
第六百四十二位置
第六百四十三位置
第六百四十四位置
第六百四十五位置
第六百四十六位置
第六百四十七位置
第六百四十八位置
第六百四十九位置
第六百五十位置
第六百五十一位置
第六百五十二位置
第六百五十三位置
第六百五十四位置
第六百五十五位置
第六百五十六位置
第六百五十七位置
第六百五十八位置
第六百五十九位置
第六百六十位置
第六百六十一位置
第六百六十二位置
第六百六十三位置
第六百六十四位置
第六百六十五位置
第六百六十六位置
第六百六十七位置
第六百六十八位置
第六百六十九位置
第六百七十位置
第六百七十一位置
第六百七十二位置
第六百七十三位置
第六百七十四位置
第六百七十五位置
第六百七十六位置
第六百七十七位置
第六百七十八位置
第六百七十九位置
第六百八十位置
第六百八十一位置
第六百八十二位置
第六百八十三位置
第六百八十四位置
第六百八十五位置
第六百八十六位置
第六百八十七位置
第六百八十八位置
第六百八十九位置
第六百九十位置
第六百九十一位置
第六百九十二位置
第六百九十三位置
第六百九十四位置
第六百九十五位置
第六百九十六位置
第六百九十七位置
第六百九十八位置
第六百九十九位置
第七百位置
第七百一位置
第七百二位置
第七百三位置
第七百四位置
第七百五位置
第七百六位置
第七百七位置
第七百八位置
第七百九位置
第七百十位置
第七百十一位置
第七百十二位置
第七百十三位置
第七百十四位置
第七百十五位置
第七百十六位置
第七百十七位置
第七百十八位置
第七百十九位置
第七百二十位置
第七百二十一位置
第七百二十二位置
第七百二十三位置
第七百二十四位置
第七百二十五位置
第七百二十六位置
第七百二十七位置
第七百二十八位置
第七百二十九位置
第七百三十位置
第七百三十一位置
第七百三十二位置
第七百三十三位置
第七百三十四位置
第七百三十五位置
第七百三十六位置
第七百三十七位置
第七百三十八位置
第七百三十九位置
第七百四十位置
第七百四十一位置
第七百四十二位置
第七百四十三位置
第七百四十四位置
第七百四十五位置
第七百四十六位置
第七百四十七位置
第七百四十八位置
第七百四十九位置
第七百五十位置
第七百五十一位置
第七百五十二位置
第七百五十三位置
第七百五十四位置
第七百五十五位置
第七百五十六位置
第七百五十七位置
第七百五十八位置
第七百五十九位置
第七百六十位置
第七百六十一位置
第七百六十二位置
第七百六十三位置
第七百六十四位置
第七百六十五位置
第七百六十六位置
第七百六十七位置
第七百六十八位置
第七百六十九位置
第七百七十位置
第七百七十一位置
第七百七十二位置
第七百七十三位置
第七百七十四位置
第七百七十五位置
第七百七十六位置
第七百七十七位置
第七百七十八位置
第七百七十九位置
第七百八十位置
第七百八十一位置
第七百八十二位置
第七百八十三位置
第七百八十四位置
第七百八十五位置
第七百八十六位置
第七百八十七位置
第七百八十八位置
第七百八十九位置
第七百九十位置
第七百九十一位置
第七百九十二位置
第七百九十三位置
第七百九十四位置
第七百九十五位置
第七百九十六位置
第七百九十七位置
第七百九十八位置
第七百九十九位置
第八百位置
第八百一位置
第八百二位置
第八百三位置
第八百四位置
第八百五位置
第八百六位置
第八百七位置
第八百八位置
第八百九位置
第八百十位置
第八百十一位置
第八百十二位置
第八百十三位置
第八百十四位置
第八百十五位置
第八百十六位置
第八百十七位置
第八百十八位置
第八百十九位置
第八百二十位置
第八百二十一位置
第八百二十二位置
第八百二十三位置
第八百二十四位置
第八百二十五位置
第八百二十六位置
第八百二十七位置
第八百二十八位置
第八百二十九位置
第八百三十位置
第八百三十一位置
第八百三十二位置
第八百三十三位置
第八百三十四位置
第八百三十五位置
第八百三十六位置
第八百三十七位置
第八百三十八位置
第八百三十九位置
第八百四十位置
第八百四十一位置
第八百四十二位置
第八百四十三位置
第八百四十四位置
第八百四十五位置
第八百四十六位置
第八百四十七位置
第八百四十八位置
第八百四十九位置
第八百五十位置
第八百五十一位置
第八百五十二位置
第八百五十三位置
第八百五十四位置
第八百五十五位置
第八百五十六位置
第八百五十七位置
第八百五十八位置
第八百五十九位置
第八百六十位置
第八百六十一位置
第八百六十二位置
第八百六十三位置
第八百六十四位置
第八百六十五位置
第八百六十六位置
第八百六十七位置
第八百六十八位置
第八百六十九位置
第八百七十位置
第八百七十一位置
第八百七十二位置
第八百七十三位置
第八百七十四位置
第八百七十五位置
第八百七十六位置
第八百七十七位置
第八百七十八位置
第八百七十九位置
第八百八十位置
第八百八十一位置
第八百八十二位置
第八百八十三位置
第八百八十四位置
第八百八十五位置
第八百八十六位置
第八百八十七位置
第八百八十八位置
第八百八十九位置
第八百九十位置
第八百九十一位置
第八百九十二位置
第八百九十三位置
第八百九十四位置
第八百九十五位置
第八百九十六位置
第八百九十七位置
第八百九十八位置
第八百九十九位置
第九百位置
第九百一位置
第九百二位置
第九百三位置
第九百四位置
第九百五位置
第九百六位置
第九百七位置
第九百八位置
第九百九位置
第九百十位置
第九百十一位置
第九百十二位置
第九百十三位置
第九百十四位置
第九百十五位置
第九百十六位置
第九百十七位置
第九百十八位置
第九百十九位置
第九百二十位置
第九百二十一位置
第九百二十二位置
第九百二十三位置
第九百二十四位置
第九百二十五位置
第九百二十六位置
第九百二十七位置
第九百二十八位置
第九百二十九位置
第九百三十位置
第九百三十一位置
第九百三十二位置
第九百三十三位置
第九百三十四位置
第九百三十五位置
第九百三十六位置
第九百三十七位置
第九百三十八位置
第九百三十九位置
第九百四十位置
第九百四十一位置
第九百四十二位置
第九百四十三位置
第九百四十四位置
第九百四十五位置
第九百四十六位置
第九百四十七位置
第九百四十八位置
第九百四十九位置
第九百五十位置
第九百五十一位置
第九百五十二位置
第九百五十三位置
第九百五十四位置
第九百五十五位置
第九百五十六位置
第九百五十七位置
第九百五十八位置
第九百五十九位置
第九百六十位置
第九百六十一位置
第九百六十二位置
第九百六十三位置
第九百六十四位置
第九百六十五位置
第九百六十六位置
第九百六十七位置
第九百六十八位置
第九百六十九位置
第九百七十位置
第九百七十一位置
第九百七十二位置
第九百七十三位置
第九百七十四位置
第九百七十五位置
第九百七十六位置
第九百七十七位置
第九百七十八位置
第九百七十九位置
第九百八十位置
第九百八十一位置
第九百八十二位置
第九百八十三位置
第九百八十四位置
第九百八十五位置
第九百八十六位置
第九百八十七位置
第九百八十八位置
第九百八十九位置
第九百九十位置
第九百九十一位置
第九百九十二位置
第九百九十三位置
第九百九十四位置
第九百九十五位置
第九百九十六位置
第九百九十七位置
第九百九十八位置
第九百九十九位置
第一千位置
第一千一位置
第一千二位置
第一千三位置
第一千四位置
第一千五位置
第一千六位置
第一千七位置
第一千八位置
第一千九位置
第一千十位置
第一千十一位置
第一千十二位置
第一千十三位置
第一千十四位置
第一千十五位置
第一千十六位置
第一千十七位置
第一千十八位置
第一千十九位置
第一千二十位置
第一千二十一位置
第一千二十二位置
第一千二十三位置
第一千二十四位置
第一千二十五位置
第一千二十六位置
第一千二十七位置
第一千二十八位置
第一千二十九位置
第一千三十位置
第一千三十一位置
第一千三十二位置
第一千三十三位置
第一千三十四位置
第一千三十五位置
第一千三十六位置
第一千三十七位置
第一千三十八位置
第一千三十九位置
第一千四十位置
第一千四十一位置
第一千四十二位置
第一千四十三位置
第一千四十四位置
第一千四十五位置
第一千四十六位置
第一千四十七位置
第一千四十八位置
第一千四十九位置
第一千五十位置
第一千五十一位置
第一千五十二位置
第一千五十三位置
第一千五十四位置
第一千五十五位置
第一千五十六位置
第一千五十七位置
第一千五十八位置
第一千五十九位置
第一千六十位置
第一千六十一位置
第一千六十二位置
第一千六十三位置
第一千六十四位置
第一千六十五位置
第一千六十六位置
第一千六十七位置
第一千六十八位置
第一千六十九位置
第一千七十位置
第一千七十一位置
第一千七十二位置
第一千七十三位置
第一千七十四位置
第一千七十五位置
第一千七十六位置
第一千七十七位置
第一千七十八位置
第一千七十九位置
第一千八十位置
第一千八十一位置
第一千八十二位置
第一千八十三位置
第一千八十四位置
第一千八十五位置
第一千八十六位置
第一千八十七位置
第一千八十八位置
第一千八十九位置
第一千九十位置
第一千九十一位置
第一千九十二位置
第一千九十三位置
第一千九十四位置
第一千九十五位置
第一千九十六位置
第一千九十七位置
第一千九十八位置
第一千九十九位置
第一千一百位置
第一千一百一位置
第一千一百二位置
第一千一百三位置
第一千一百四位置
第一千一百五位置
第一千一百六位置
第一千一百七位置
第一千一百八位置
第一千一百九位置
第一千一百十位置
第一千一百十一位置
第一千一百十二位置
第一千一百十三位置
第一千一百十四位置
第一千一百十五位置
第一千一百十六位置
第一千一百十七位置
第一千一百十八位置
第一千一百十九位置
第一千一百二十位置
第一千一百二十一位置
第一千一百二十二位置
第一千一百二十三位置
第一千一百二十四位置
第一千一百二十五位置
第一千一百二十六位置
第一千一百二十七位置
第一千一百二十八位置
第一千一百二十九位置
第一千一百三十位置
第一千一百三十一位置
第一千一百三十二位置
第一千一百三十三位置
第一千一百三十四位置
第一千一百三十五位置
第一千一百三十六位置
第一千一百三十七位置
第一千一百三十八位置
第一千一百三十九位置
第一千一百四十位置
第一千一百四十一位置
第一千一百四十二位置
第一千一百四十三位置
第一千一百四十四位置
第一千一百四十五位置
第一千一百四十六位置
第一千一百四十七位置
第一千一百四十八位置
第一千一百四十九位置
第一千一百五十位置
第一千一百五十一位置
第一千一百五十二位置
第一千一百五十三位置
第一千一百五十四位置
第一千一百五十五位置
第一千一百五十六位置
第一千一百五十七位置
第一千一百五十八位置
第一千一百五十九位置
第一千一百六十位置
第一千一百六十一位置
第一千一百六十二位置
第一千一百六十三位置
第一千一百六十四位置
第一千一百六十五位置
第一千一百六十六位置
第一千一百六十七位置
第一千一百六十八位置
第一千一百六十九位置
第一千一百七十位置
第一千一百七十一位置
第一千一百七十二位置
第一千一百七十三位置
第一千一百七十四位置
第一千一百七十五位置
第一千一百七十六位置
第一千一百七十七位置
第一千一百七十八位置
第一千一百七十九位置
第一千一百八十位置
第一千一百八十一位置
第一千一百八十二位置
第一千一百八十三位置
第一千一百八十四位置
第一千一百八十五位置
第一千一百八十六位置
第一千一百八十七位置
第一千一百八十八位置
第一千一百八十九位置
第一千一百九十位置
第一千一百九十一位置
第一千一百九十二位置
第一千一百九十三位置
第一千一百九十四位置
第一千一百九十五位置
第一千一百九十六位置
第一千一百九十七位置
第一千一百九十八位置
第一千一百九十九位置
第一千二百位置
第一千二百一位置
第一千二百二位置
第一千二百三位置
第一千二百四位置
第一千二百五位置
第一千二百六位置
第一千二百七位置
第一千二百八位置
第一千二百九位置
第一千二百十位置
第一千二百十一位置
第一千二百十二位置
第一千二百十三位置
第一千二百十四位置
第一千二百十五位置
第一千二百十六位置
第一千二百十七位置
第一千二百十八位置
第一千二百十九位置
第一千二百二十位置
第一千二百二十一位置
第一千二百二十二位置
第一千二百二十三位置
第一千二百二十四位置
第一千二百二十五位置
第一千二百二十六位置
第一千二百二十七位置
第一千二百二十八位置
第一千二百二十九位置
第一千二百三十位置
第一千二百三十一位置
第一千二百三十二位置
第一千二百三十三位置
第一千二百三十四位置
第一千二百三十五位置
第一千二百三十六位置
第一千二百三十七位置
第一千二百三十八位置
第一千二百三十九位置
第一千二百四十位置
第一千二百四十一位置
第一千二百四十二位置
第一千二百四十三位置
第一千二百四十四位置
第一千二百四十五位置
第一千二百四十六位置
第一千二百四十七位置
第一千二百四十八位置
第一千二百四十九位置
第一千二百五十位置
第一千二百五十一位置
第一千二百五十二位置
第一千二百五十三位置
第一千二百五十四位置
第一千二百五十五位置
第一千二百五十六位置
第一千二百五十七位置
第一千二百五十八位置
第一千二百五十九位置
第一千二百六十位置
第一千二百六十一位置
第一千二百六十二位置
第一千二百六十三位置
第一千二百六十四位置
第一千二百六十五位置
第一千二百六十六位置
第一千二百六十七位置
第一千二百六十八位置
第一千二百六十九位置
第一千二百七十位置
第一千二百七十一位置
第一千二百七十二位置
第一千二百七十三位置
第一千二百七十四位置
第一千二百七十五位置
第一千二百七十六位置
第一千二百七十七位置
第一千二百七十八位置
第一千二百七十九位置
第一千二百八十位置
第一千二百八十一位置
第一千二百八十二位置
第一千二百八十三位置
第一千二百八十四位置
第一千二百八十五位置
第一千二百八十六位置
第一千二百八十七位置
第一千二百八十八位置
第一千二百八十九位置
第一千二百九十位置
第一千二百九十一位置
第一千二百九十二位置
第一千二百九十三位置
第一千二百九十四位置
第一千二百九十五位置
第一千二百九十六位置
第一千二百九十七位置
第一千二百九十八位置
第一千二百九十九位置
第一千三百位置
第一千三百一位置
第一千三百二位置
第一千三百三位置
第一千三百四位置
第一千三百五位置
第一千三百六位置
第一千三百七位置
第一千三百八位置
第一千三百九位置
第一千三百十位置
第一千三百十一位置
第一千三百十二位置
第一千三百十三位置
第一千三百十四位置
第一千三百十五位置
第一千三百十六位置
第一千三百十七位置
第一千三百十八位置
第一千三百十九位置
第一千三百二十位置
第一千三百二十一位置
第一千三百二十二位置
第一千三百二十三位置
第一千三百二十四位置
第一千三百二十五位置
第一千三百二十六位置
第一千三百二十七位置
第一千三百二十八位置
第一千三百二十九位置
第一千三百三十位置
第一千三百三十一位置
第一千三百三十二位置
第一千三百三十三位置
第一千三百三十四位置
第一千三百三十五位置
第一千三百三十六位置
第一千三百三十七位置
第一千三百三十八位置
第一千三百三十九位置
第一千三百四十位置
第一千三百四十一位置
第一千三百四十二位置
第一千三百四十三位置
第一千三百四十四位置
第一千三百四十五位置
第一千三百四十六位置
第一千三百四十七位置
第一千三百四十八位置
第一千三百四十九位置
第一千三百五十位置
第一千三百五十一位置
第一千三百五十二位置
第一千三百五十三位置
第一千三百五十四位置
第一千三百五十五位置
第一千三百五十六位置
第一千三百五十七位置
第一千三百五十八位置
第一千三百五十九位置
第一千三百六十位置
第一千三百六十一位置
第一千三百六十二位置
第一千三百六十三位置
第一千三百六十四位置
第一千三百六十五位置
第一千三百六十六位置
第一千三百六十七位置
第一千三百六十八位置
第一千三百六十九位置
第一千三百七十位置
第一千三百七十一位置
第一千三百七十二位置
第一千三百七十三位置
第一千三百七十四位置
第一千三百七十五位置
第一千三百七十六位置
第一千三百七十七位置
第一千三百七十八位置
第一千三百七十九位置
第一千三百八十位置
第一千三百八十一位置
第一千三百八十二位置
第一千三百八十三位置
第一千三百八十四位置
第一千三百八十五位置
第一千三百八十六位置
第一千三百八十七位置
第一千三百八十八位置
第一千三百八十九位置
第一千三百九十位置
第一千三百九十一位置
第一千三百九十二位置
第一千三百九十三位置
第一千三百九十四位置
第一千三百九十五位置
第一千三百九十六位置
第一千三百九十七位置
第一千三百九十八位置
第一千三百九十九位置
第一千四百位置
第一千四百一位置
第一千四百二位置
第一千四百三位置
第一千四百四位置
第一千四百五位置
第一千四百六位置
第一千四百七位置
第一千四百八位置
第一千四百九位置
第一千四百十位置
第一千四百十一位置
第一千四百十二位置
第一千四百十三位置
第一千四百十四位置
第一千四百十五位置
第一千四百十六位置
第一千四百十七位置
第一千四百十八位置
第一千四百十九位置
第一千四百二十位置
第一千四百二十一位置
第一千四百二十二位置
第一千四百二十三位置
第一千四百二十四位置
第一千四百二十五位置
第一千四百二十六位置
第一千四百二十七位置
第一千四百二十八位置
第一千四百二十九位置
第一千四百三十位置
第一千四百三十一位置
第一千四百三十二位置
第一千四百三十三位置
第一千四百三十四位置
第一千四百三十五位置
第一千四百三十六位置
第一千四百三十七位置
第一千四百三十八位置
第一千四百三十九位置
第一千四百四十位置
第一千四百四十一位置
第一千四百四十二位置
第一千四百四十三位置
第一千四百四十四位置
第一千四百四十五位置
第一千四百四十六位置
第一千四百四十七位置
第一千四百四十八位置
第一千四百四十九位置
第一千四百五十位置
第一千四百五十一位置
第一千四百五十二位置
第一千四百五十三位置
第一千四百五十四位置
第一千四百五十五位置
第一千四百五十六位置
第一千四百五十七位置
第一千四百五十八位置
第一千四百五十九位置
第一千四百六十位置
第一千四百六十一位置
第一千四百六十二位置
第一千四百六十三位置
第一千四百六十四位置
第一千四百六十五位置
第一千四百六十六位置
第一千四百六十七位置
第一千四百六十八位置
第一千四百六十九位置
第一千四百七十位置
第一千四百七十一位置
第一千四百七十二位置
第一千四百七十三位置
第一千四百七十四位置
第一千四百七十五位置
第一千四百七十六位置
第一千四百七十七位置
第一千四百七十八位置
第一千四百七十九位置
第一千四百八十位置
第一千四百八十一位置
第一千四百八十二位置
第一千四百八十三位置
第一千四百八十四位置
第一千四百八十五位置
第一千四百八十六位置
第一千四百八十七位置
第一千四百八十八位置
第一千四百八十九位置
第一千四百九十位置
第一千四百九十一位置
第一千四百九十二位置
第一千四百九十三位置
第一千四百九十四位置
第一千四百九十五位置
第一千四百九十六位置
第一千四百九十七位置
第一千四百九十八位置
第一千四百九十九位置
第一千五百位置
第一千五百一位置
第一千五百二位置
第一千五百三位置
第一千五百四位置
第一千五百五位置
第一千五百六位置
第一千五百七位置
第一千五百八位置
第一千五百九位置
第一千五百十位置
第一千五百十一位置
第一千五百十二位置
第一千五百十三位置
第一千五百十四位置
第一千五百十五位置
第一千五百十六位置
第一千五百十七位置
第一千五百十八位置
第一千五百十九位置
第一千五百二十位置
第一千五百二十一位置
第一千五百二十二位置
第一千五百二十三位置
第一千五百二十四位置
第一千五百二十五位置
第一千五百二十六位置
第一千五百二十七位置
第一千五百二十八位置
第一千五百二十九位置
第一千五百三十位置
第一千五百三十一位置
第一千五百三十二位置
第一千五百三十三位置
第一千五百三十四位置
第一千五百三十五位置
第一千五百三十六位置
第一千五百三十七位置
第一千五百三十八位置
第一千五百三十九位置
第一千五百四十位置
第一千五百四十一位置
第一千五百四十二位置
第一千五百四十三位置
第一千五百四十四位置
第一千五百四十五位置
第一千五百四十六位置
第一千五百四十七位置
第一千五百四十八位置
第一千五百四十九位置
第一千五百五十位置
第一千五百五十一位置
第一千五百五十二位置
第一千五百五十三位置
第一千五百五十四位置
第一千五百五十五位置
第一千五百五十六位置
第一千五百五十七位置
第一千五百五十八位置
第一千五百五十九位置
第一千五百六十位置
第一千五百六十一位置
第一千五百六十二位置
第一千五百六十三位置
第一千五百六十四位置
第一千五百六十五位置
第一千五百六十六位置
第一千五百六十七位置
第一千五百六十八位置
第一千五百六十九位置
第一千五百七十位置
第一千五百七十一位置
第一千五百七十二位置
第一千五百七十三位置
第一千五百七十四位置
第一千五百七十五位置
第一千五百七十六位置
第一千五百七十七位置
第一千五百七十八位置
第一千五百七十九位置
第一千五百八十位置
第一千五百八十一位置
第一千五百八十二位置
第一千五百八十三位置
第一千五百八十四位置
第一千五百八十五位置
第一千五百八十六位置
第一千五百八十七位置
第一千五百八十八位置
第一千五百八十九位置
第一千五百九十位置
第一千五百九十一位置
第一千五百九十二位置
第一千五百九十三位置
第一千五百九十四位置
第一千五百九十五位置
第一千五百九十六位置
第一千五百九十七位置
第一千五百九十八位置
第一千五百九十九位置
第一千六百位置
第一千六百一位置
第一千六百二位置
第一千六百三位置
第一千六百四位置
第一千六百五位置
第一千六百六位置
第一千六百七位置
第一千六百八位置
第一千六百九位置
第一千六百十位置
第一千六百十一位置
第一千六百十二位置
第一千六百十三位置
第一千六百十四位置
第一千六百十五位置
第一千六百十六位置
第一千六百十七位置
第一千六百十八位置
第一千六百十九位置
第一千六百二十位置
第一千六百二十一位置
第一千六百二十二位置
第一千六百二十三位置
第一千六百二十四位置
第一千六百二十五位置
第一千六百二十六位置
第一千六百二十七位置
第一千六百二十八位置
第一千六百二十九位置
第一千六百三十位置
第一千六百三十一位置
第一千六百三十二位置
第一千六百三十三位置
第一千六百三十四位置
第一千六百三十五位置
第一千六百三十六位置
第一千六百三十七位置
第一千六百三十八位置
第一千六百三十九位置
第一千六百四十位置
第一千六百四十一位置
第一千六百四十二位置
第一千六百四十三位置
第一千六百四十四位置
第一千六百四十五位置
第一千六百四十六位置
第一千六百四十七位置
第一千六百四十八位置
第一千六百四十九位置
第一千六百五十位置
第一千六百五十一位置
第一千六百五十二位置
第一千六百五十三位置
第一千六百五十四位置
第一千六百五十五位置
第一千六百五十六位置
第一千六百五十七位置
第一千六百五十八位置
第一千六百五十九位置
第一千六百六十位置
第一千六百六十一位置
第一千六百六十二位置
第一千六百六十三位置
第一千六百六十四位置
第一千六百六十五位置
第一千六百六十六位置
第一千六百六十七位置
第一千六百六十八位置
第一千六百六十九位置
第一千六百七十位置
第一千六百七十一位置
第一千六百七十二位置
第一千六百七十三位置
第一千六百七十四位置
第一千六百七十五位置
第一千六百七十六位置
第一千六百七十七位置
第一千六百七十八位置
第一千六百七十九位置
第一千六百八十位置
第一千六百八十一位置
第一千六百八十二位置
第一千六百八十三位置
第一千六百八十四位置
第一千六百八十五位置
第一千六百八十六位置
第一千六百八十七位置
第一千六百八十八位置
第一千六百八十九位置
第一千六百九十位置
第一千六百九十一位置
第一千六百九十二位置
第一千六百九十三位置
第一千六百九十四位置
第一千六百九十五位置
第一千六百九十六位置
第一千六百九十七位置
第一千六百九十八位置
第一千六百九十九位置
第一千七百位置
第一千七百一位置
第一千七百二位置
第一千七百三位置
第一千七百四位置
第一千七百五位置
第一千七百六位置
第一千七百七位置
第一千七百八位置
第一千七百九位置
第一千七百十位置
第一千七百十一位置
第一千七百十二位置
第一千七百十三位置
第一千七百十四位置
第一千七百十五位置
第一千七百十六位置
第一千七百十七位置
第一千七百十八位置
第一千七百十九位置
第一千七百二十位置
第一千七百二十一位置
第一千七百二十二位置
第一千七百二十三位置
第一千七百二十四位置
第一千七百二十五位置
第一千七百二十六位置
第一千七百二十七位置
第一千七百二十八位置
第一千七百二十九位置
第一千七百三十位置
第一千七百三十一位置
第一千七百三十二位

[圖10]

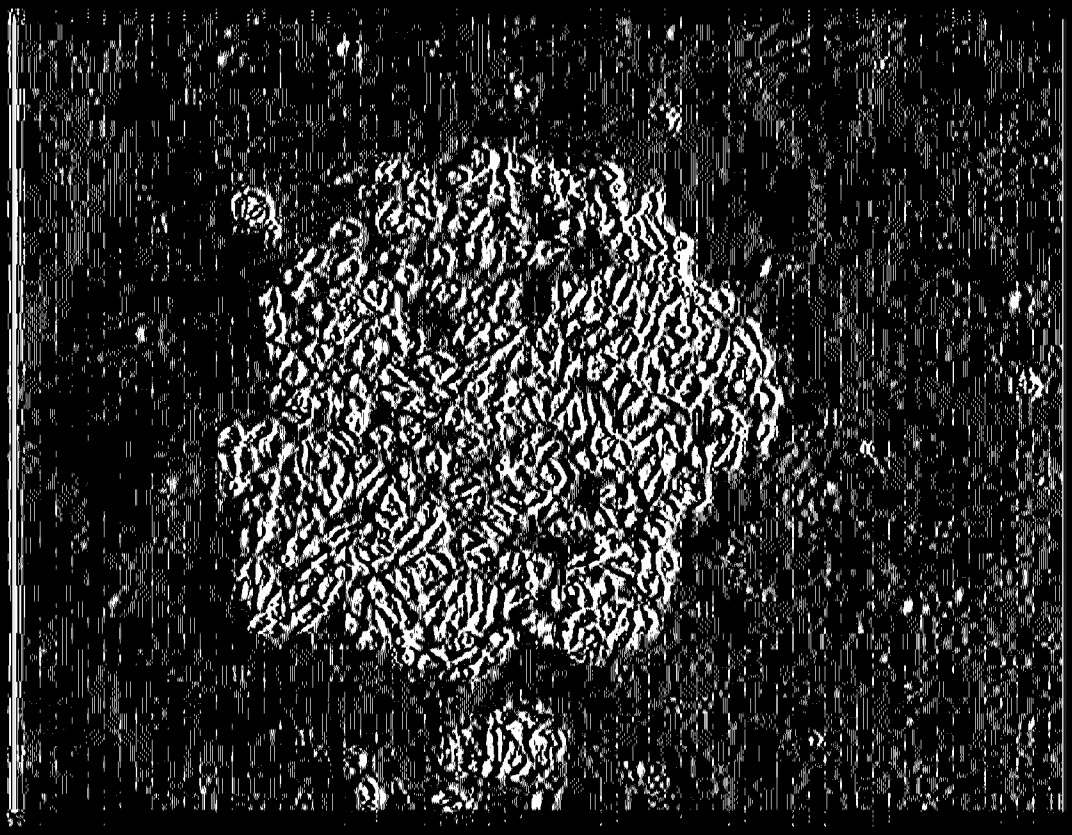

a
DARIEVTOKUNG


b
DARI
UNGAM
DARIUNGAMSYUTTI
SYUTTI

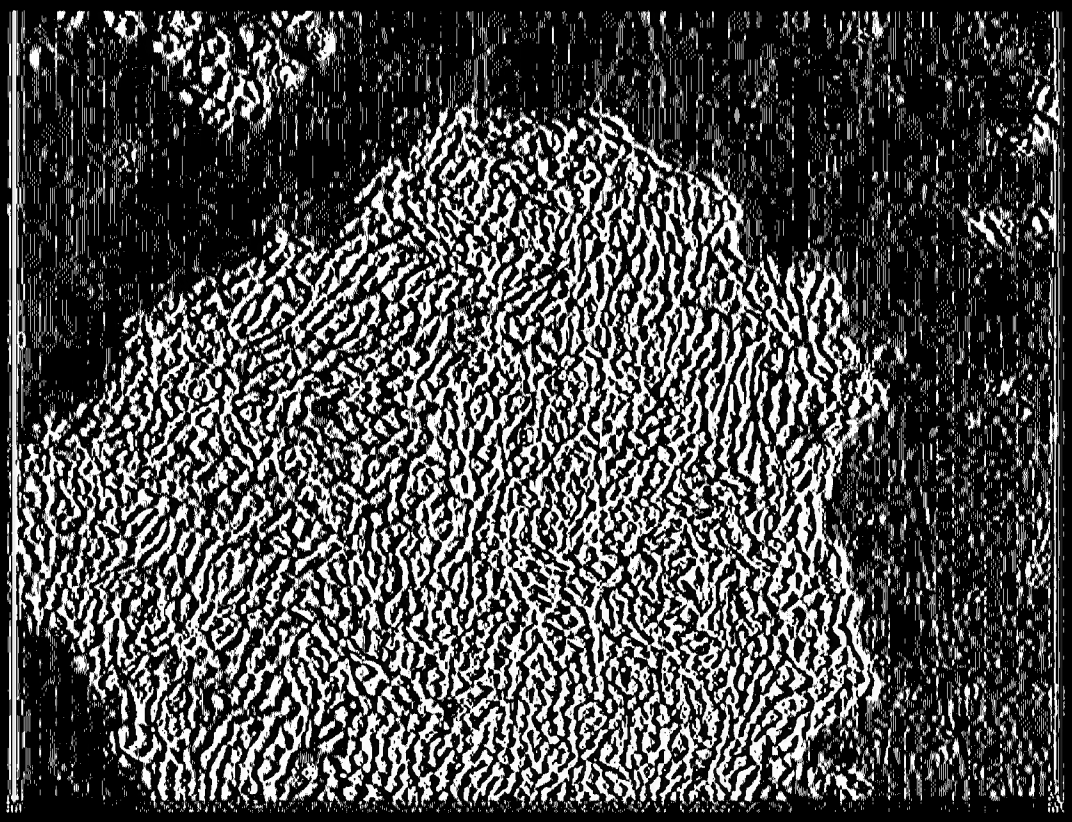

c
UNGAM
d


e
150
100
50
0
移相後打數

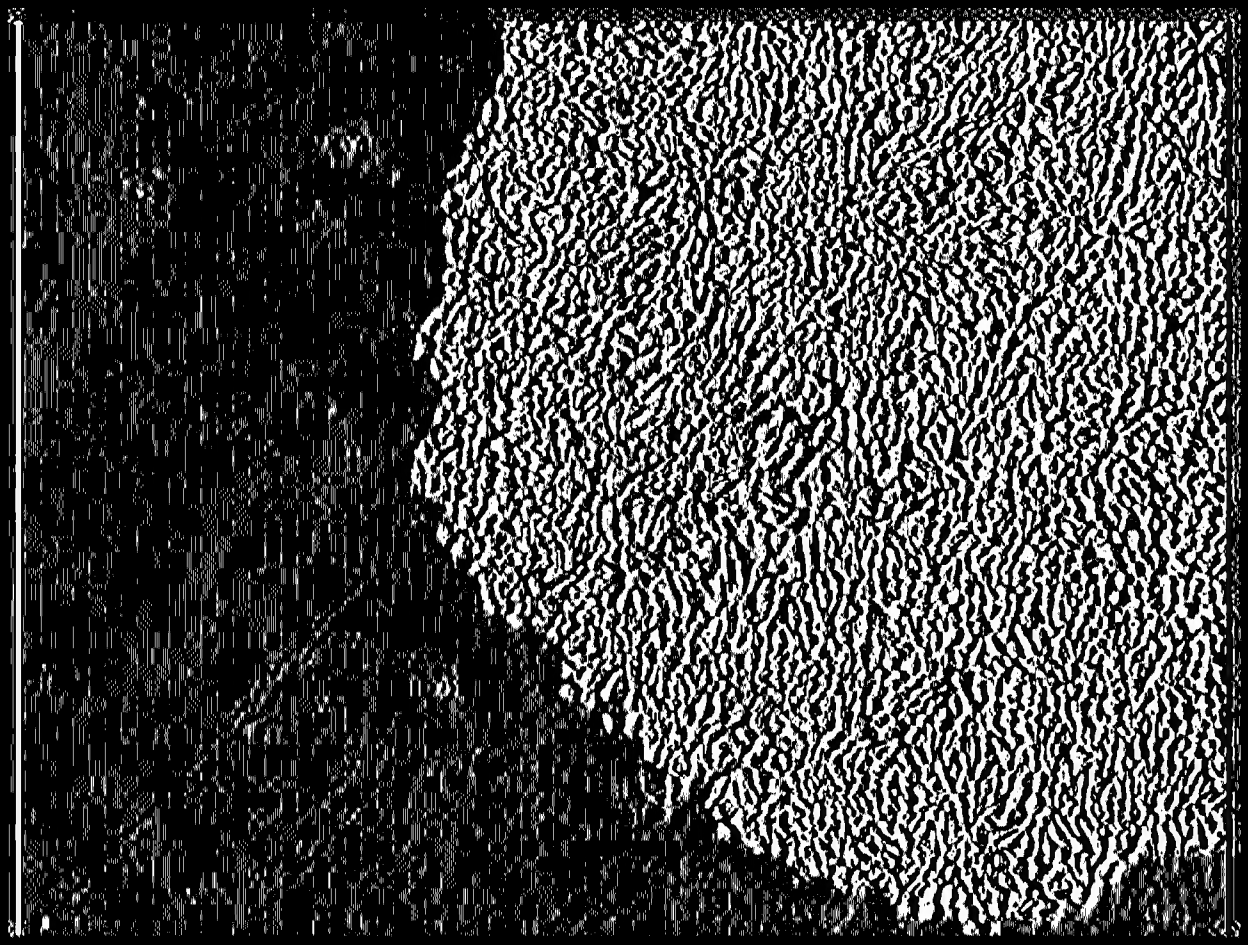
[圖11]



[圖12a]



[圖12b]



[圖12c]

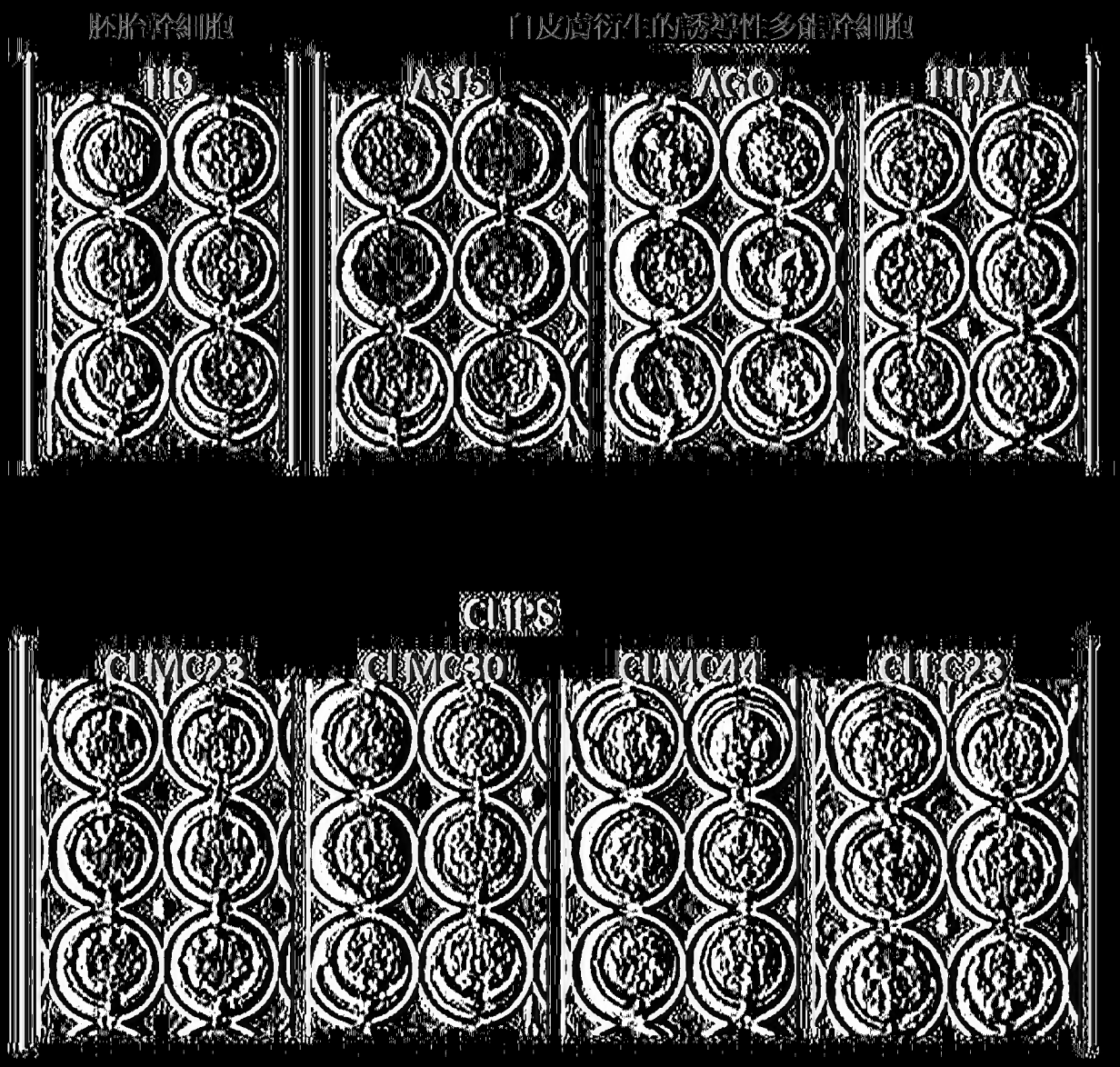
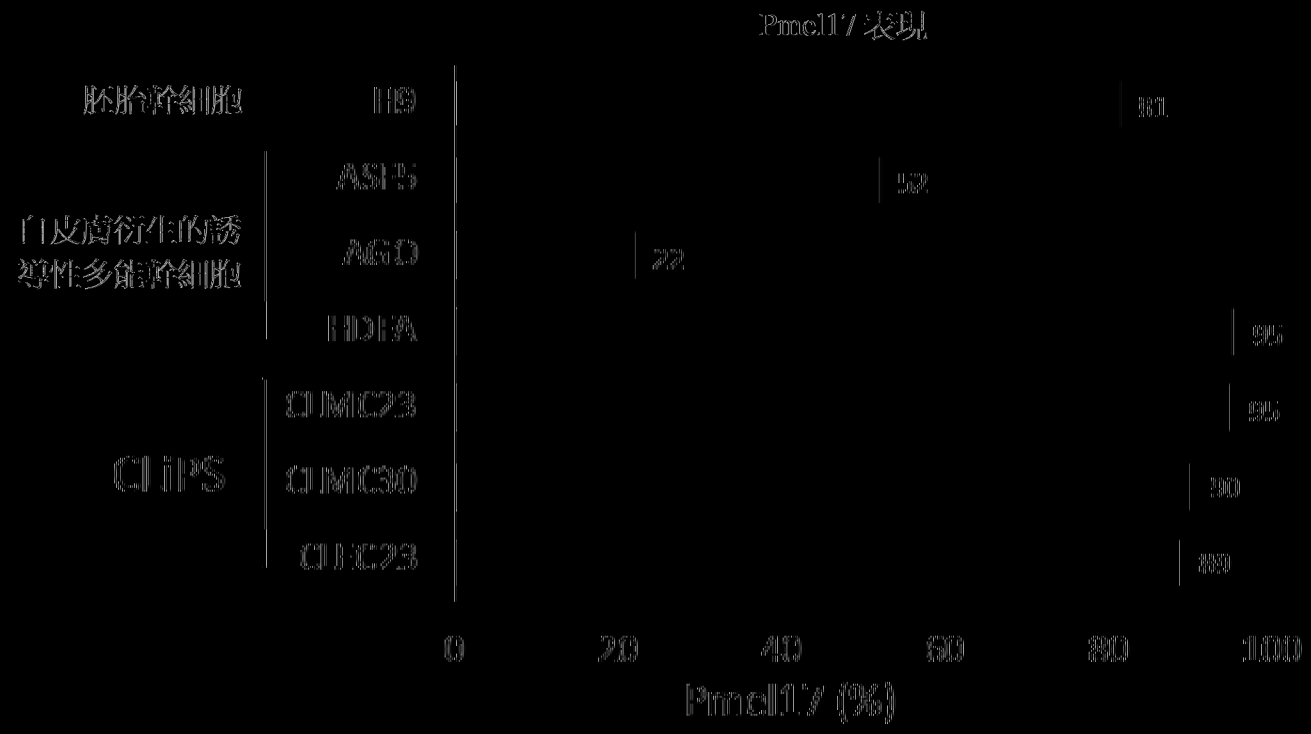

胚胎幹細胞
自皮膚衍生的誘導性多能幹細胞
H9
ASJ5
AG0
HDJA
CHPS
CHMC23
CHMC30
CHMC11
CHC23

圖13

以視覺化分級系統評估視網膜色素上皮的分化效率

[圖14a]

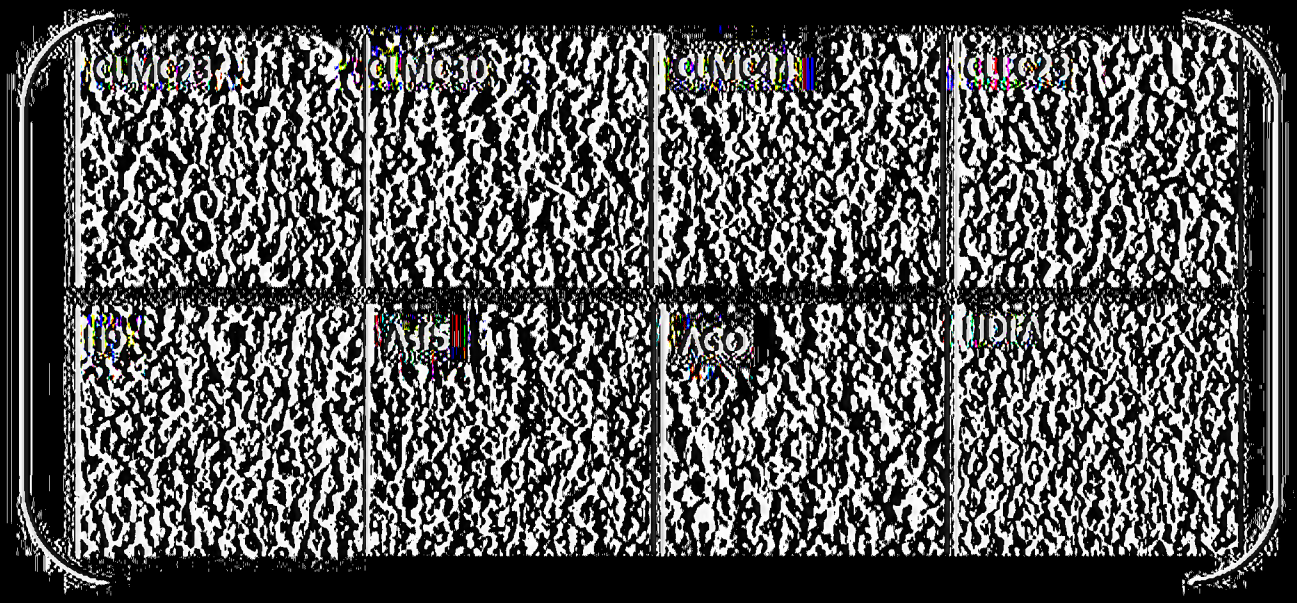
沒有任何改變
一些改變
很多改變
非常多改變
沒有改變
一些改變
很多改變
非常多改變
沒有改變
一些改變
很多改變
非常多改變
沒有


Pmel17表現
胚胎幹細胞
H9
皮膚衍生的誘導性多能幹細胞
ASF5
AG0
HDFA
CiPS
CiMC28
CiMC30
CiHC23
81
57
22
95
92
90
89
0
20
40
60
80
100
Pmel17 (%)

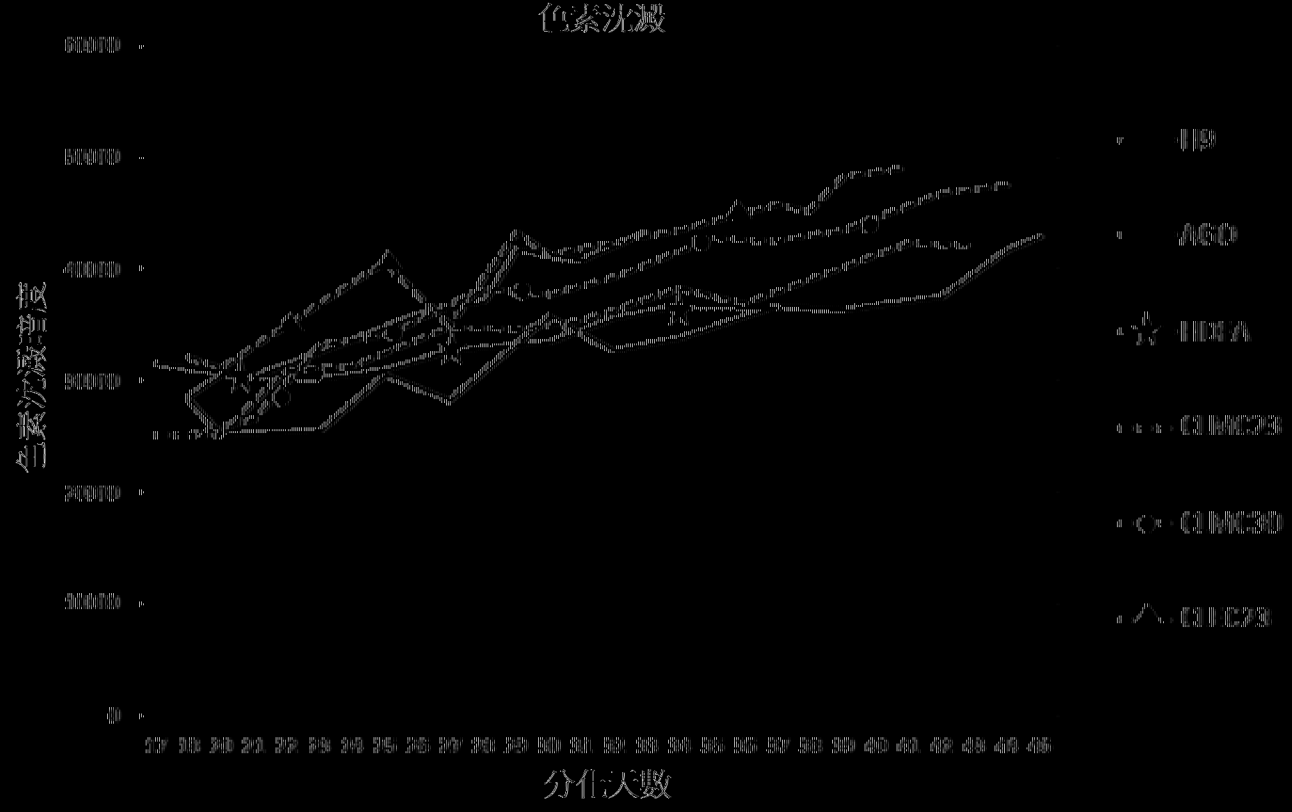
[圖14c]

CiMC28
CiMC30
CiMC41
CiHC23
H9
AF8
ASF5
HDFA

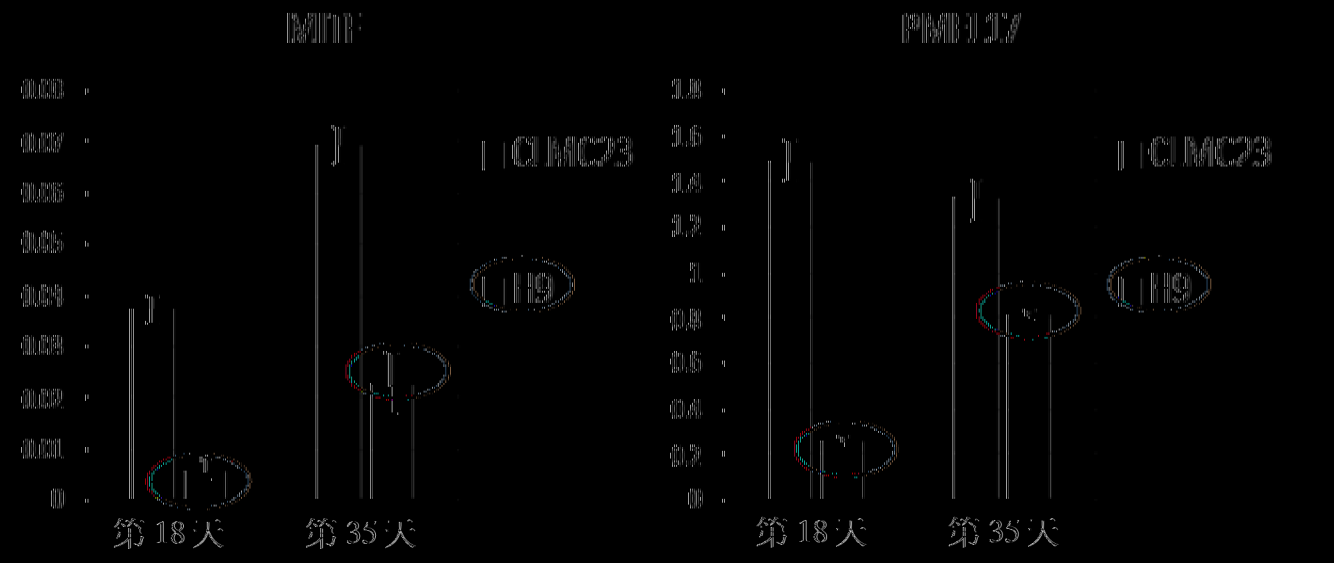
[圖15a]


CLMC3
CLMC2
CLMC1
CLMC4
HDFA
AGO
HP

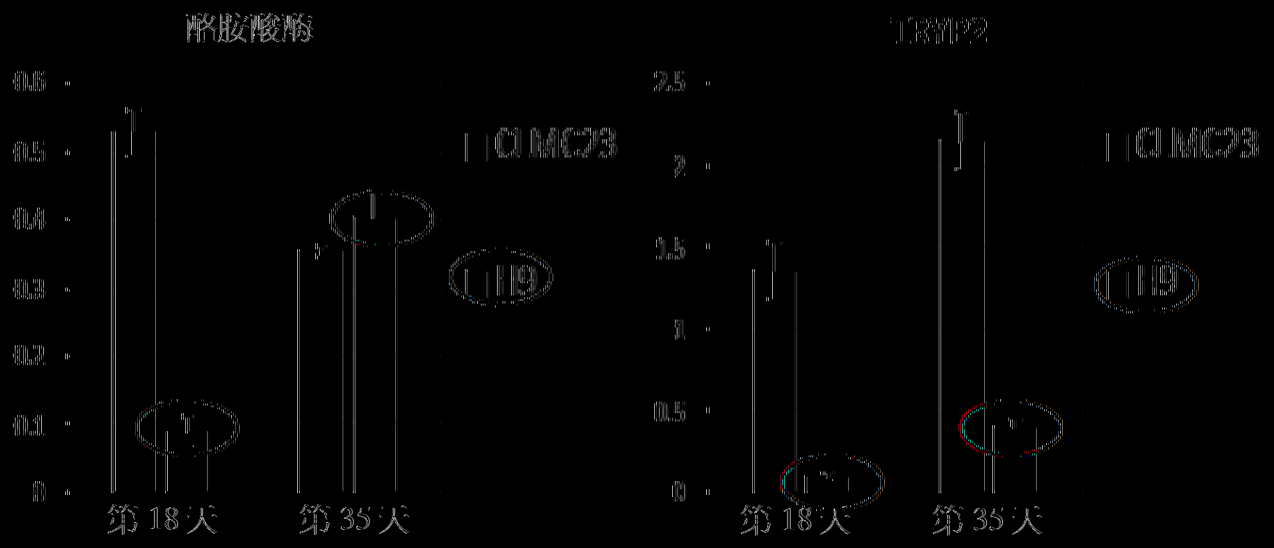
[圖15b]


色素沈澱
相對螢光強度
分化天數
HP
AGO
HDFA
CLMC3
CLMC2
CLMC1

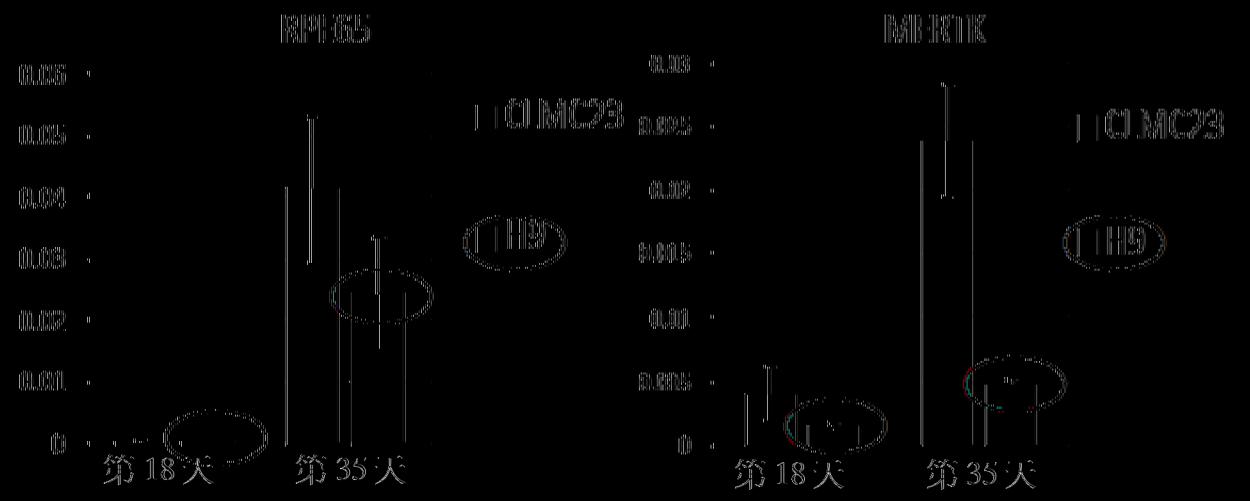
[圖15c]


MMP
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
OMC3
(119)
第 18 天
第 35 天
PMB107
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OMC3
(119)
第 18 天
第 35 天

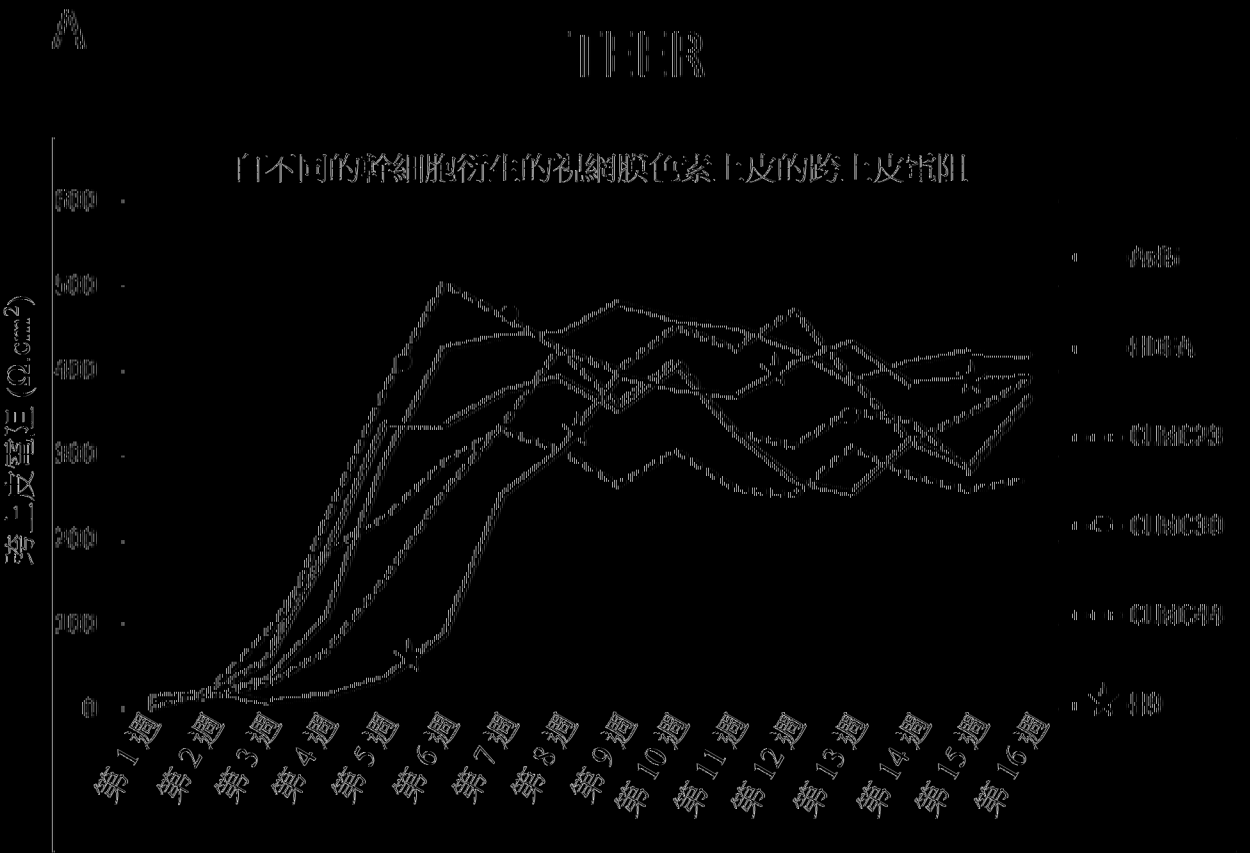
|(圖15d)|


溶胺酸酶
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
OMC3
(119)
第 18 天
第 35 天
IL6P2
2.5
2
1.5
1
0.5
0
OMC3
(119)
第 18 天
第 35 天

|(圖15d(續1))|

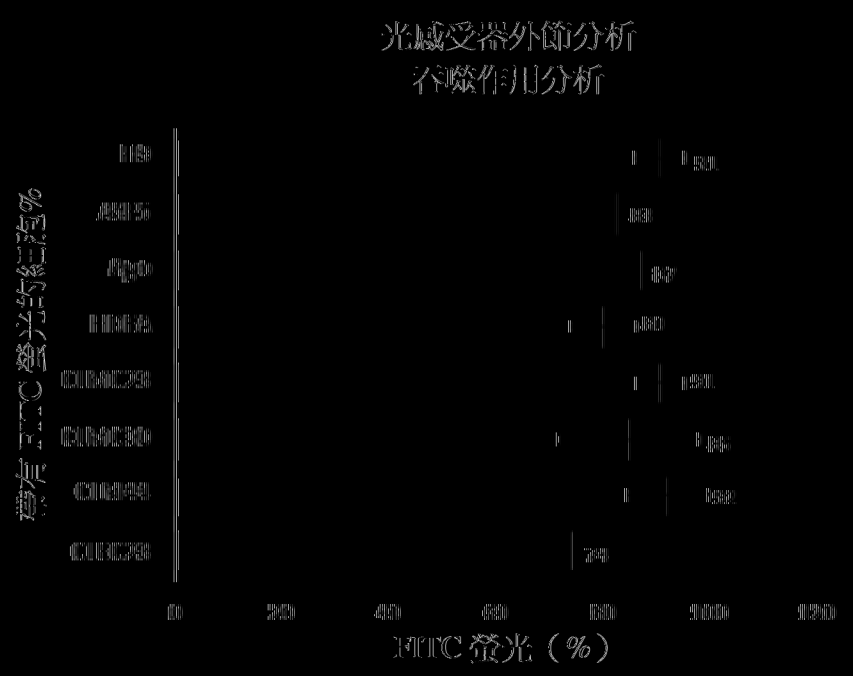

RPE65
MERTK
OMC3
HD
第18天
第35天

[圖16]


A
TER
自不同的幹細胞衍生的視網膜色素上皮的跨上皮電阻
歐姆面積 (Ω·cm²)
第1週
第2週
第3週
第4週
第5週
第6週
第7週
第8週
第9週
第10週
第11週
第12週
第13週
第14週
第15週
第16週
hESC
hiPSC
OMC3
OMC30
OMC6
HD

[圖17a]

B


光感受器外節分析
吞噬作用分析
攝入FITC螢光的百分比%
HB
ABE5
Rpe
HMEA
CHNC28
CHNC30
CHC49
CHC28
0
20
40
60
80
100
120
FITC螢光（%）

|(圖1Fb)|

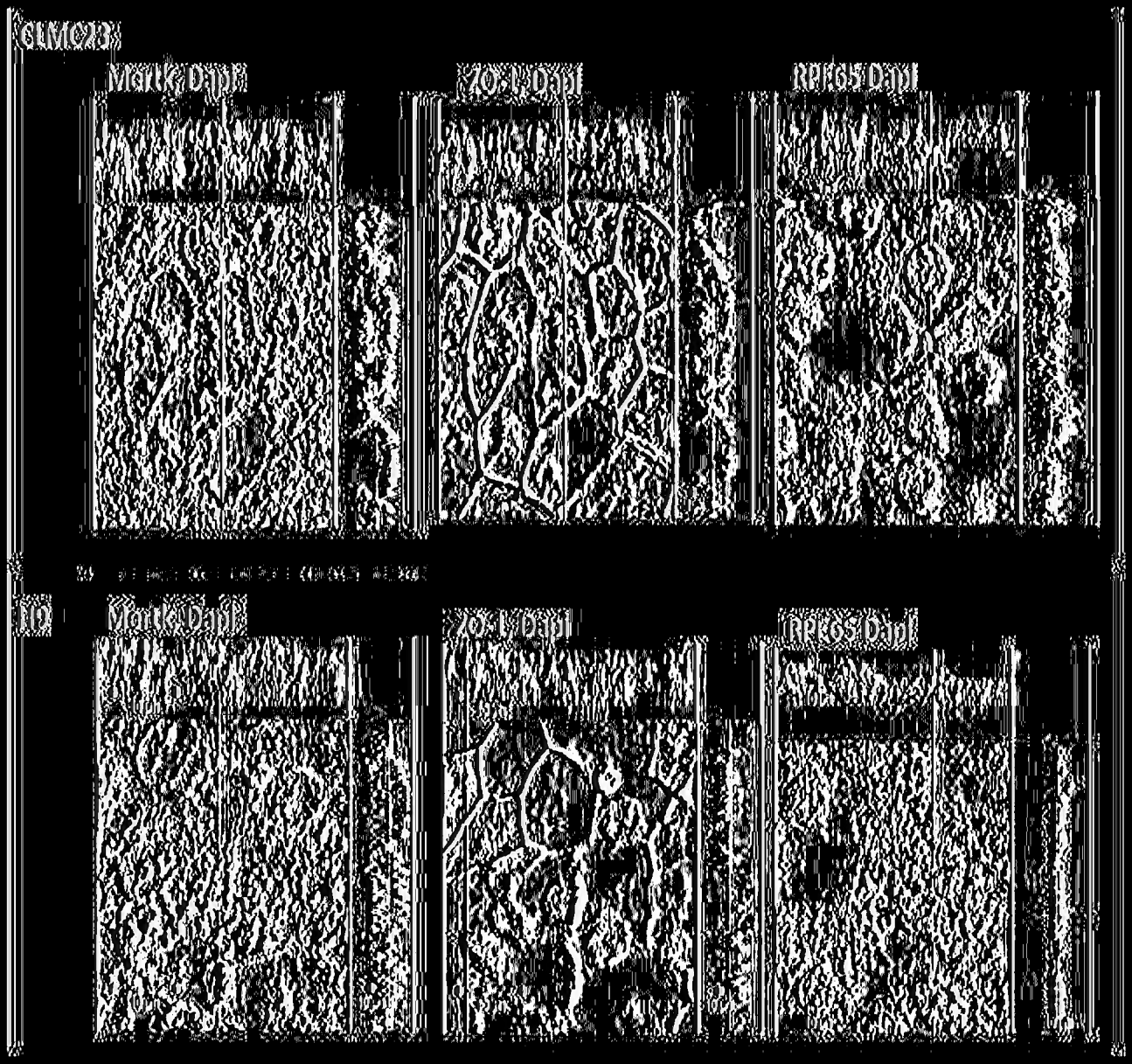
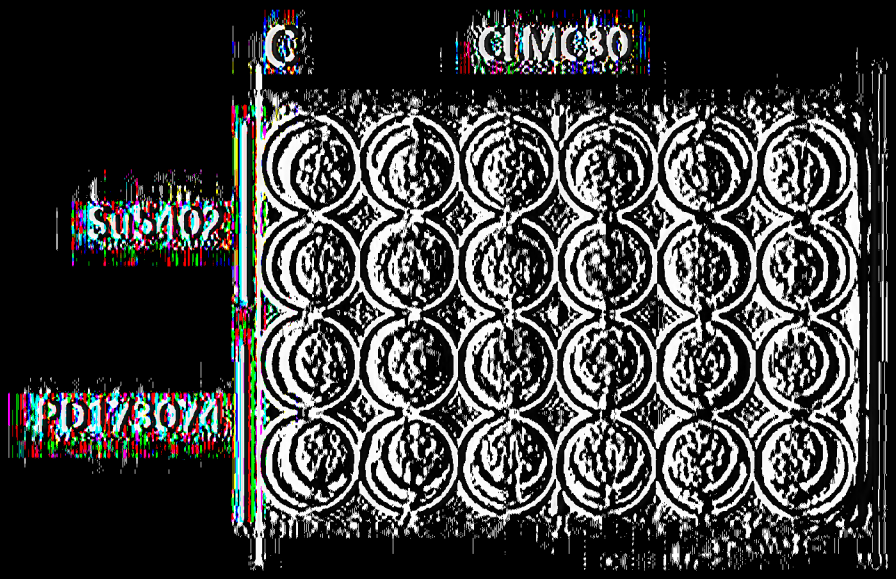
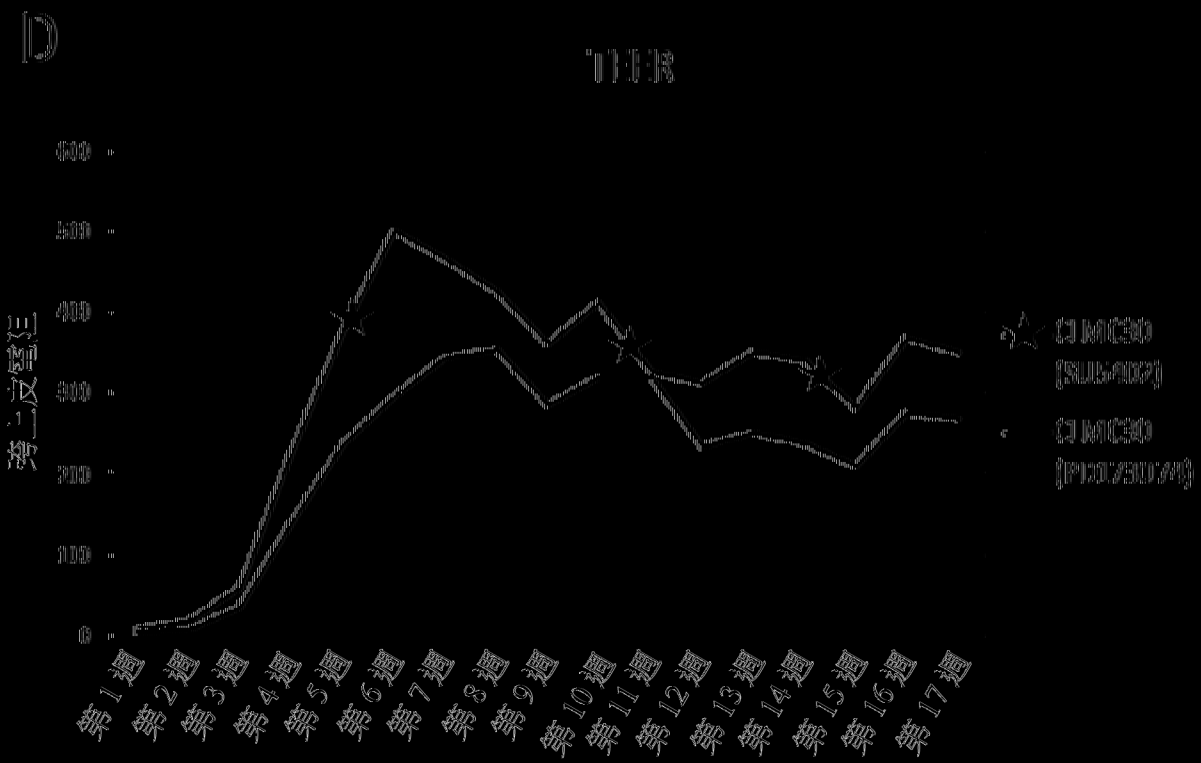

CLMC23
Mart6 Dapl
Zo.1 Dapl
RPL65 Dapl
Mart6 Dapl
Zo.1 Dapl
RPL65 Dapl

圖18

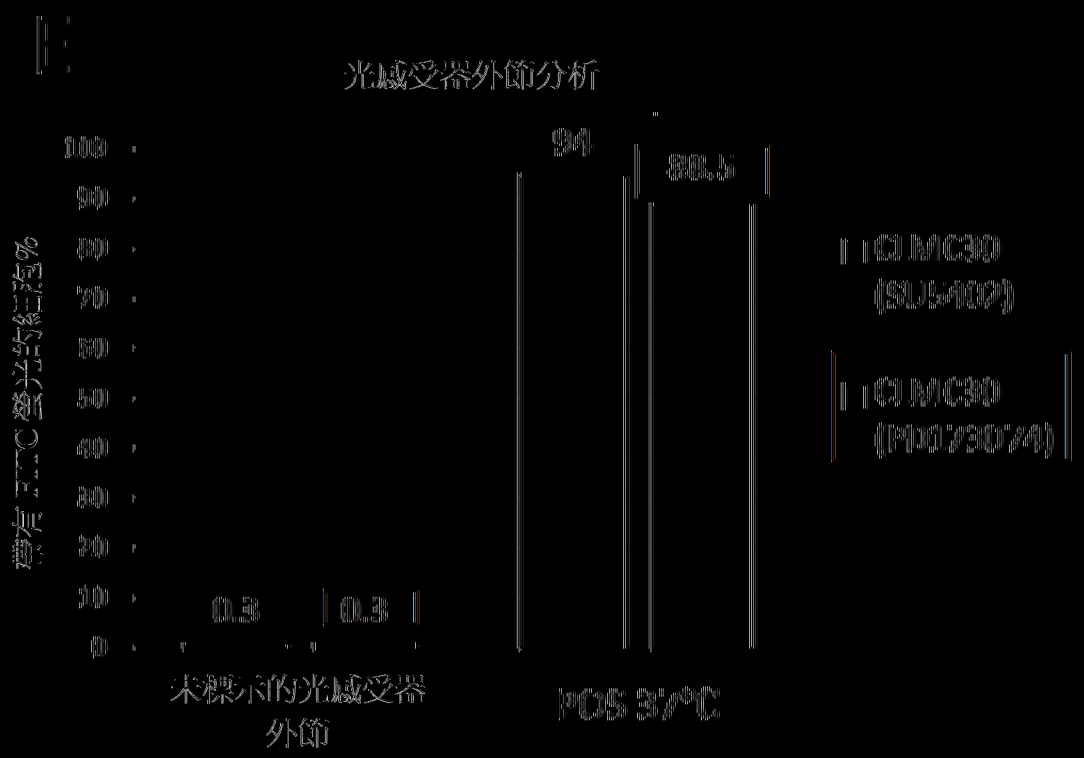
[(圖19a及b)]


C
GMC80
SUB402
PID178072

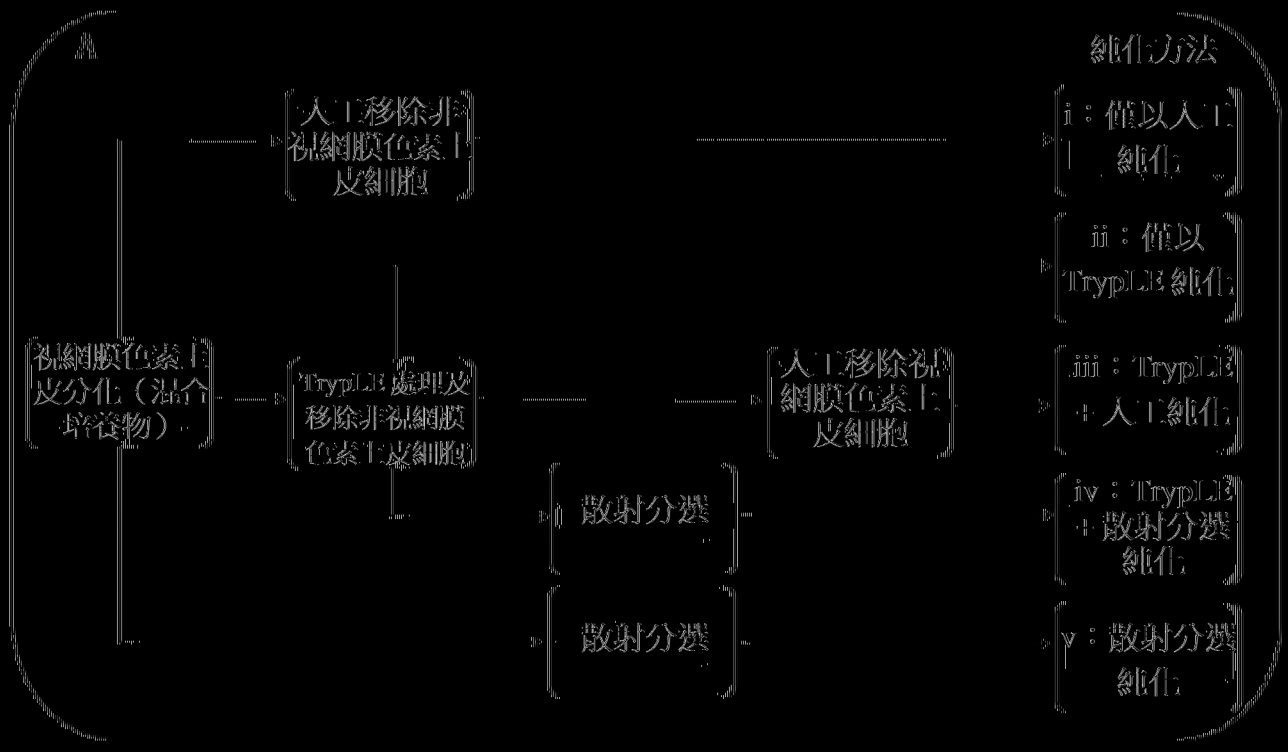
[圖19c]


D
THER
600
500
400
300
200
100
0
GMC80 [SUB402]
GMC80 [PID178072]
第1週
第2週
第3週
第4週
第5週
第6週
第7週
第8週
第9週
第10週
第11週
第12週
第13週
第14週
第15週
第16週
第17週

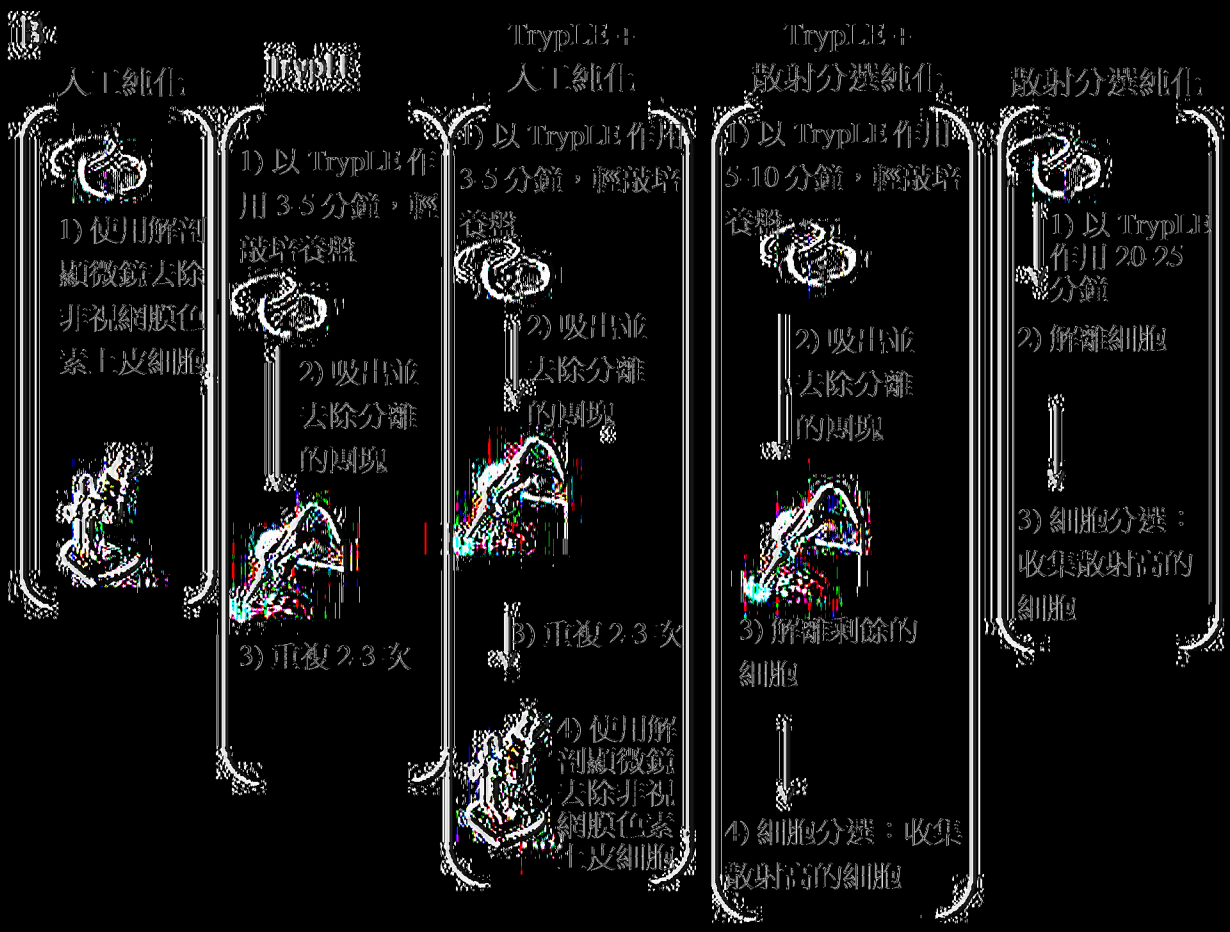
[圖19d]


光感受器外節分析
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.3
0.3
94
80.5
未標示的光感受器外節
POS 3'C
iCell Rod (Sub-type)
iCell Rod (Product)

[圖19c]


A
純化方法
人工移除非視網膜色素上皮細胞
視網膜色素上皮分化（混合培養物）
TrypLE 處理及移除非視網膜色素上皮細胞
人工移除視網膜色素上皮細胞
散射分選
散射分選
i：僅以人工純化
ii：僅以 TrypLE 純化
iii：TrypLE + 人工純化
iv：TrypLE + 散射分選純化
v：散射分選純化

[圖20a]


B
人工組化
1) 使用解剖顯微鏡去除非視網膜色素上皮細胞
TrypLE
1) 以 TrypLE 作用 3-5 分鐘，輕敲皿盤
2) 吸出並去除分離的團塊
3) 重複 2-3 次
TrypLE +
人工組化
1) 以 TrypLE 作用 3-5 分鐘，輕敲皿盤
2) 吸出並去除分離的團塊
3) 重複 2-3 次
4) 使用解剖顯微鏡去除非視網膜色素上皮細胞
TrypLE +
散射分選組化
1) 以 TrypLE 作用 5-10 分鐘，輕敲皿盤
2) 吸出並去除分離的團塊
3) 解離剩餘的細胞
4) 細胞分選：收集散射高的細胞
散射分選組化
1) 以 TrypLE 作用 20-25 分鐘
2) 解離細胞
3) 細胞分選：收集散射高的細胞

|(圖20b)|

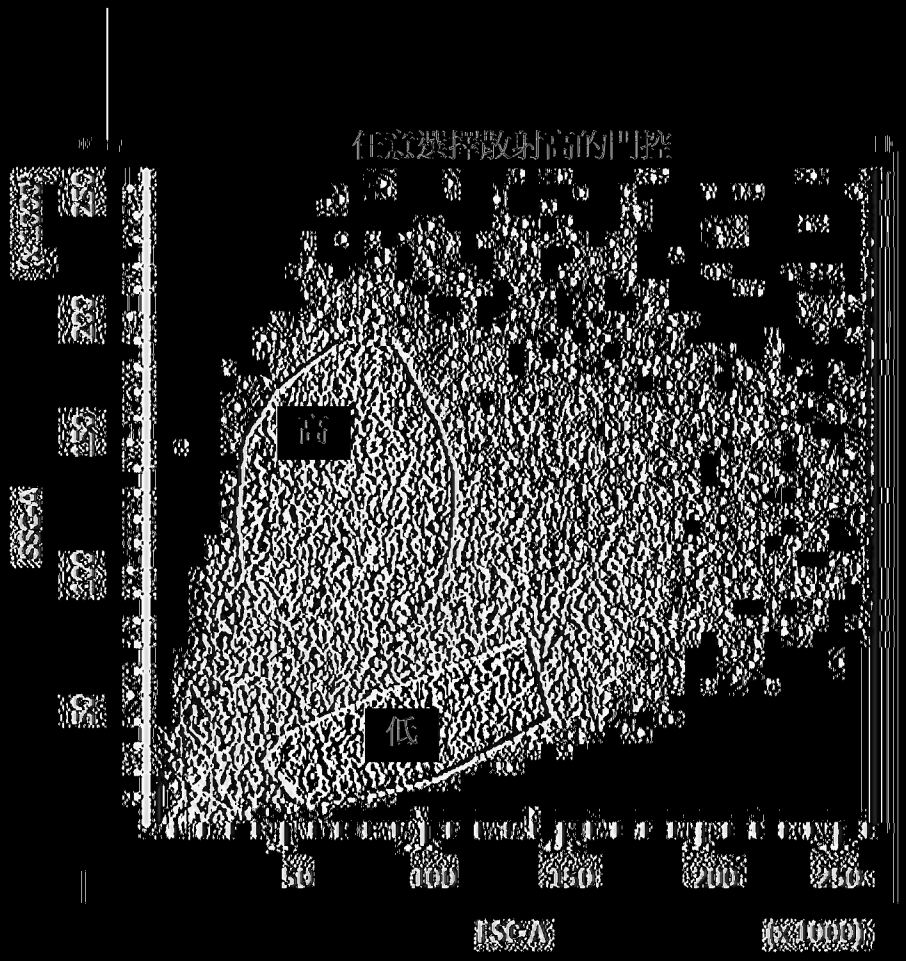
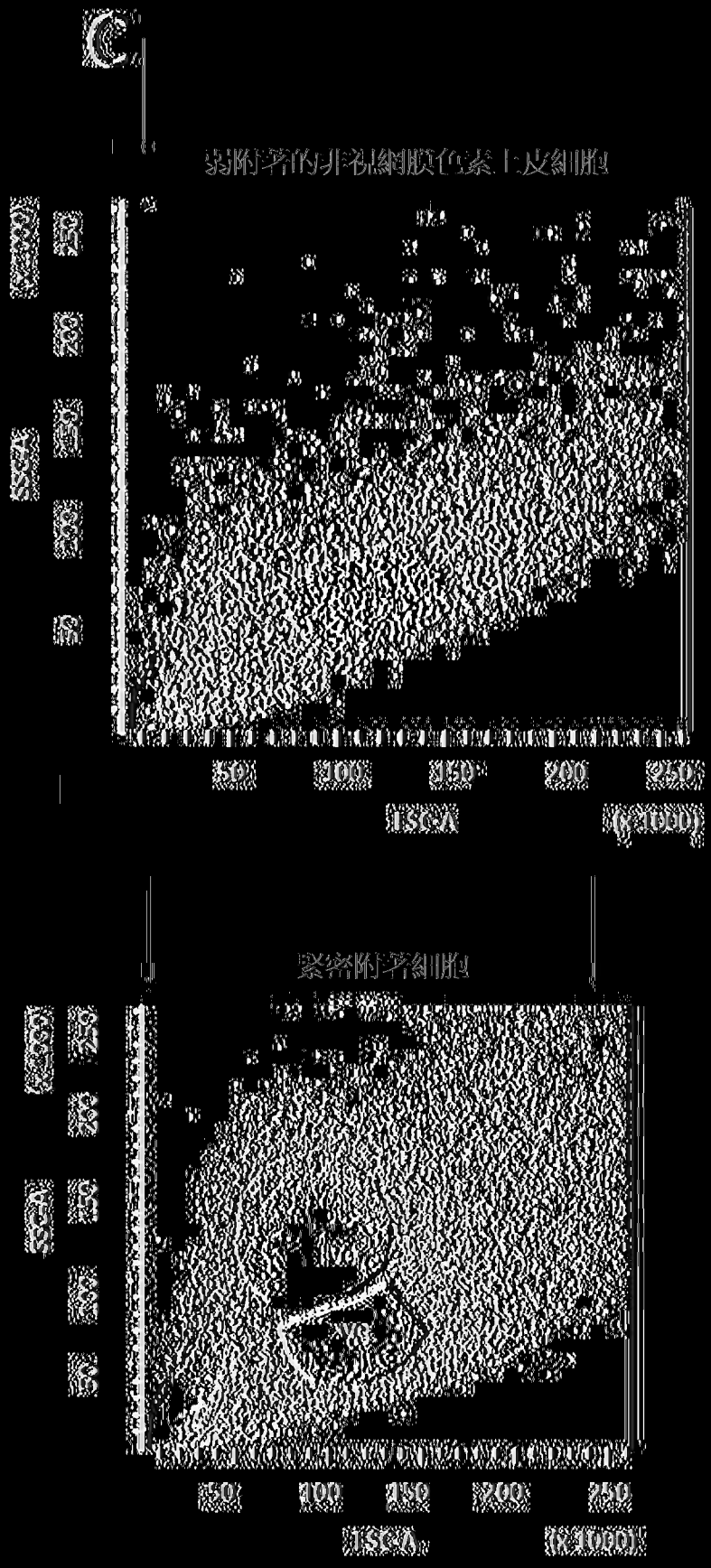
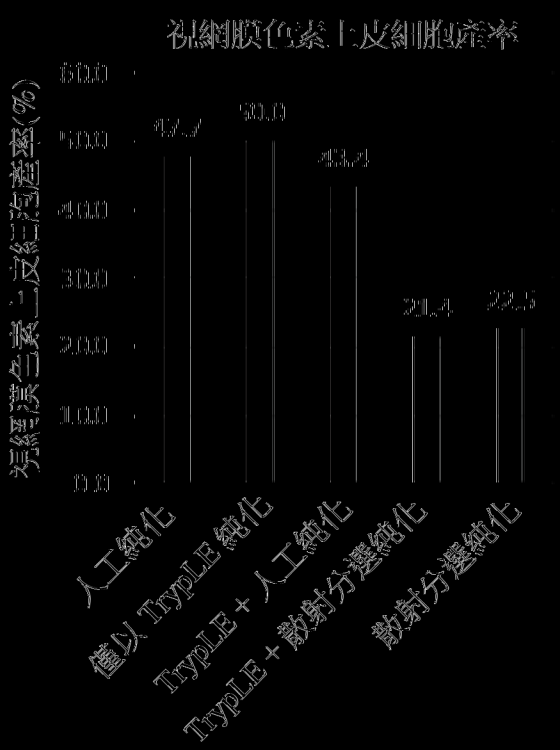


圖20c

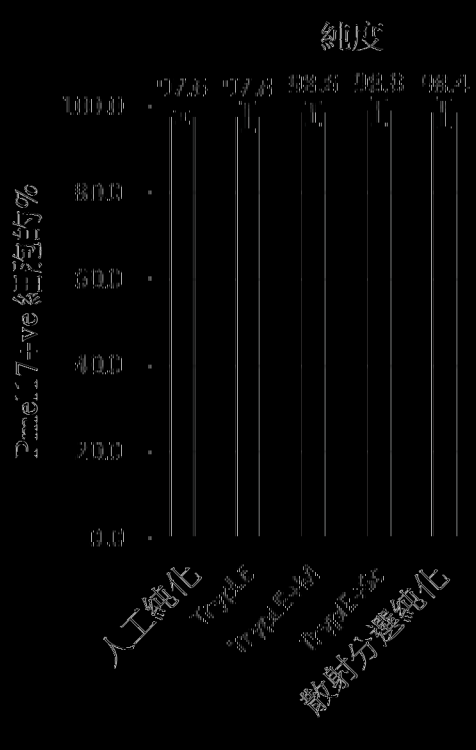

C
弱附著的非乳網膜色素上皮細胞
50
100
150
200
250
TSCA
(x1000)
緊密附著細胞
VG
50
100
150
200
250
TSCA
(x1000)

|(同20d)|

E


視網膜色素上皮細胞產率
活細胞占總細胞的百分比(%)
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
47.7
50.0
43.4
21.4
22.5
人工純化
僅以 TrypLE 純化
TrypLE + 人工純化
TrypLE + 散射分選純化
散射分選純化

F


純度
Pmel-17+ve 細胞百分比
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
97.5
97.8
98.6
98.8
98.4
人工純化
TrypLE
TrypLE+人
TrypLE+
散射分選純化

[(圖20e及f)]

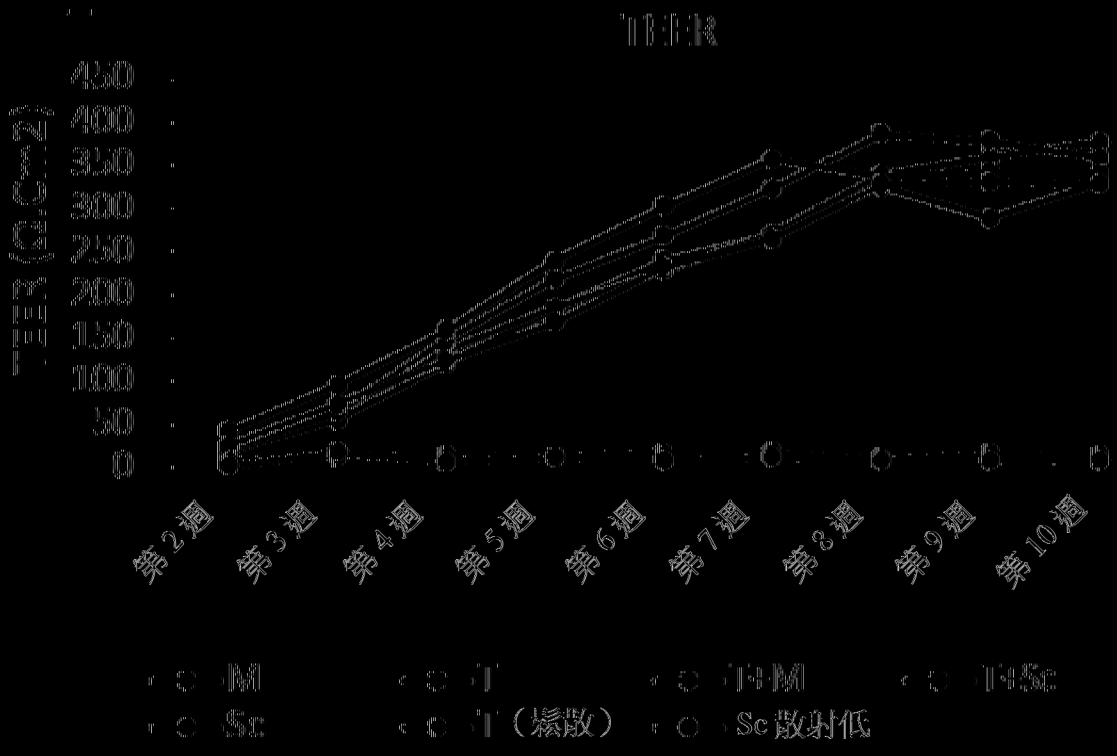

TBK
Feature Count
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
第2週
第3週
第4週
第5週
第6週
第7週
第8週
第9週
第10週
Sc
T（標散）
Sc散射低

圖20g

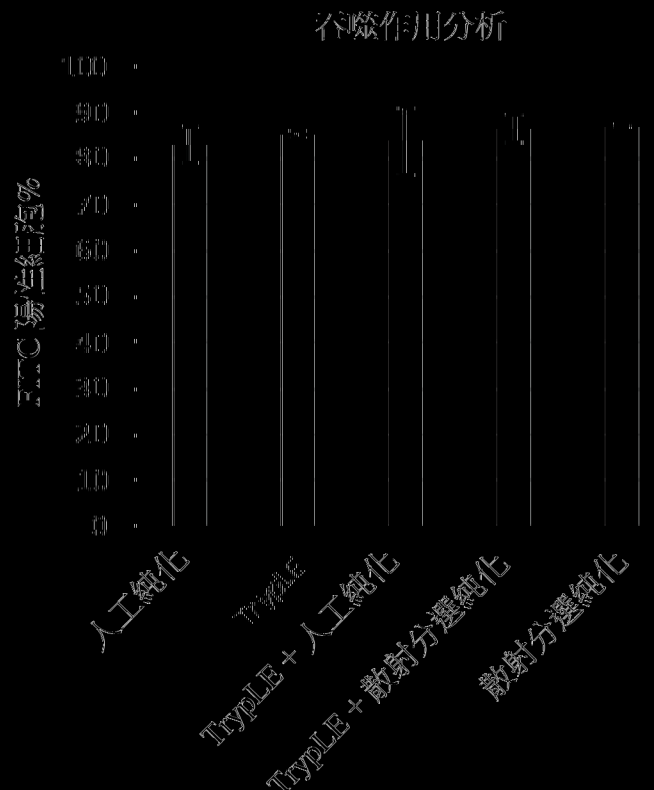
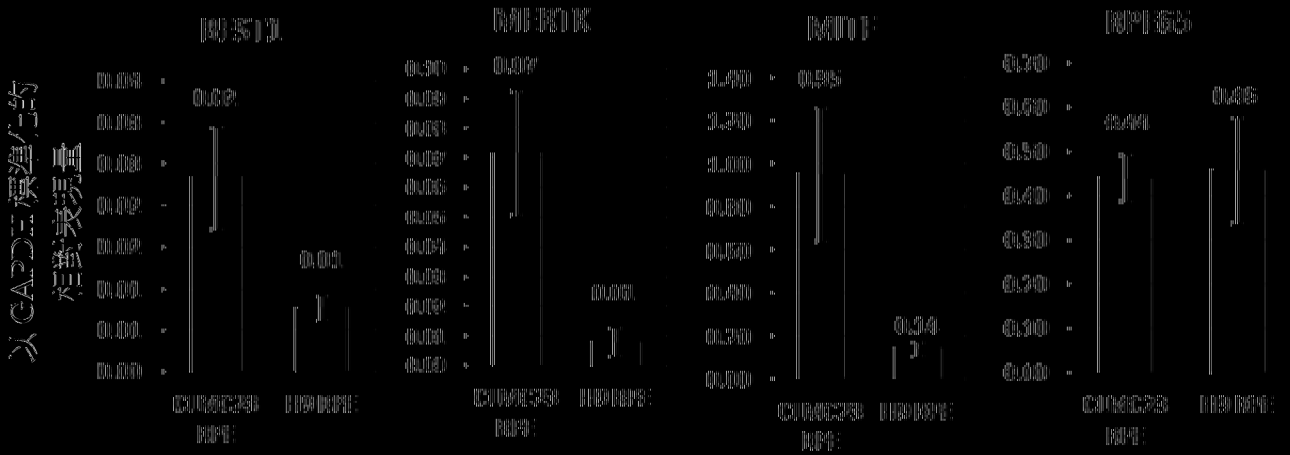

不除作用分析
Enrichment %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
人工純化
TrypLE＋人工純化
TrypLE＋散射分選純化
散射分選純化

圖20h

特徵	人工純化	Trypsin	Trypsin + 人工純化	Trypsin + 散射分選純化	散射分選純化
產率(%)	50	47.7	43.4	21.4	22.5
純度（Pme117%）	98	96	97	96	94
第 10 週的跨上皮電阻	330	377	350	371	392
純化所需時間	++++	+	++	+++	++++

圖 20i



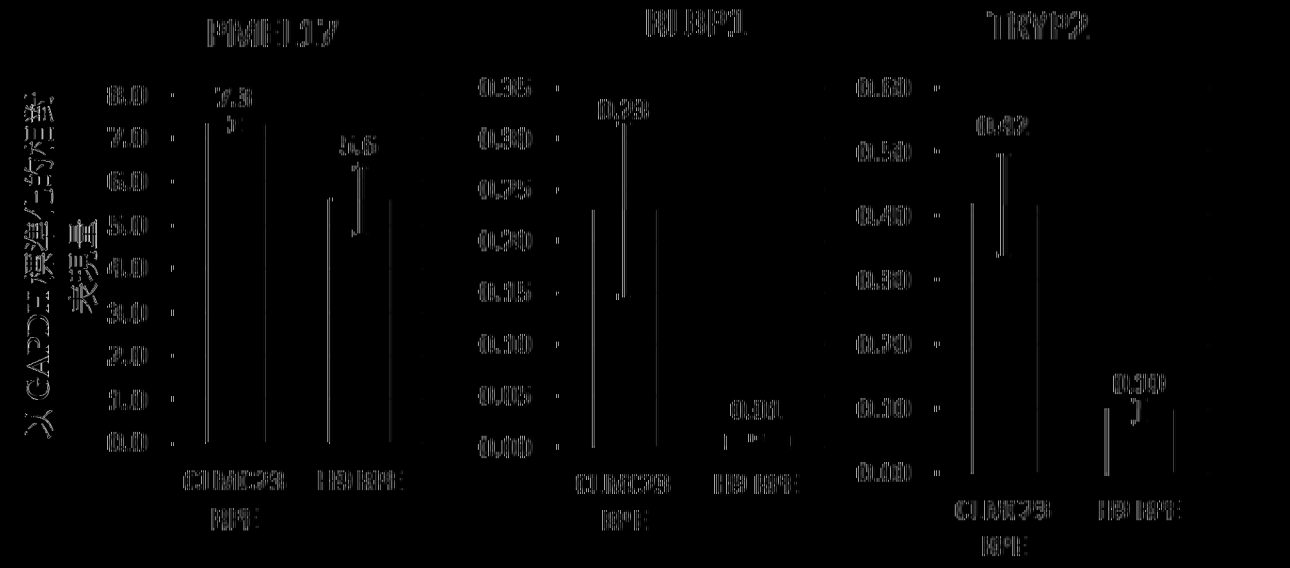
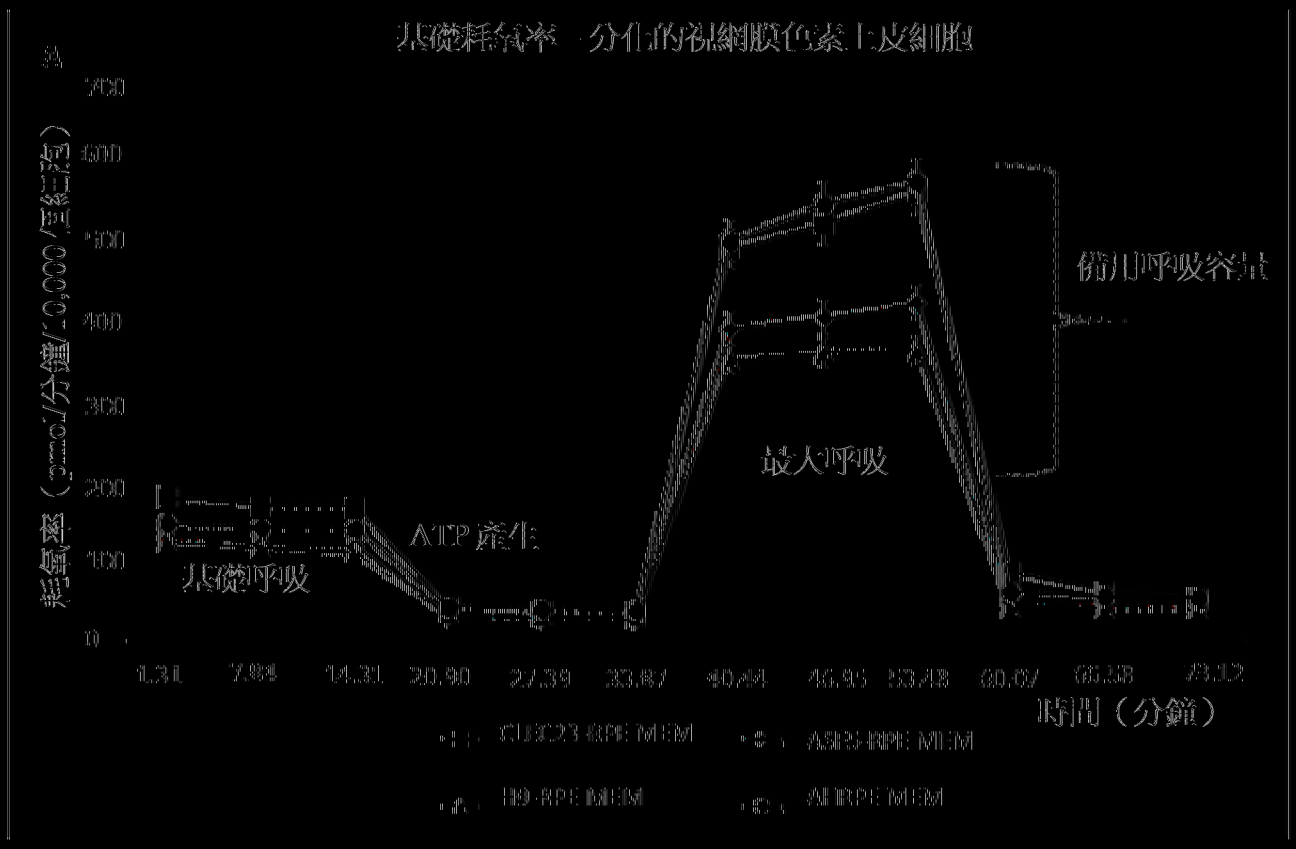
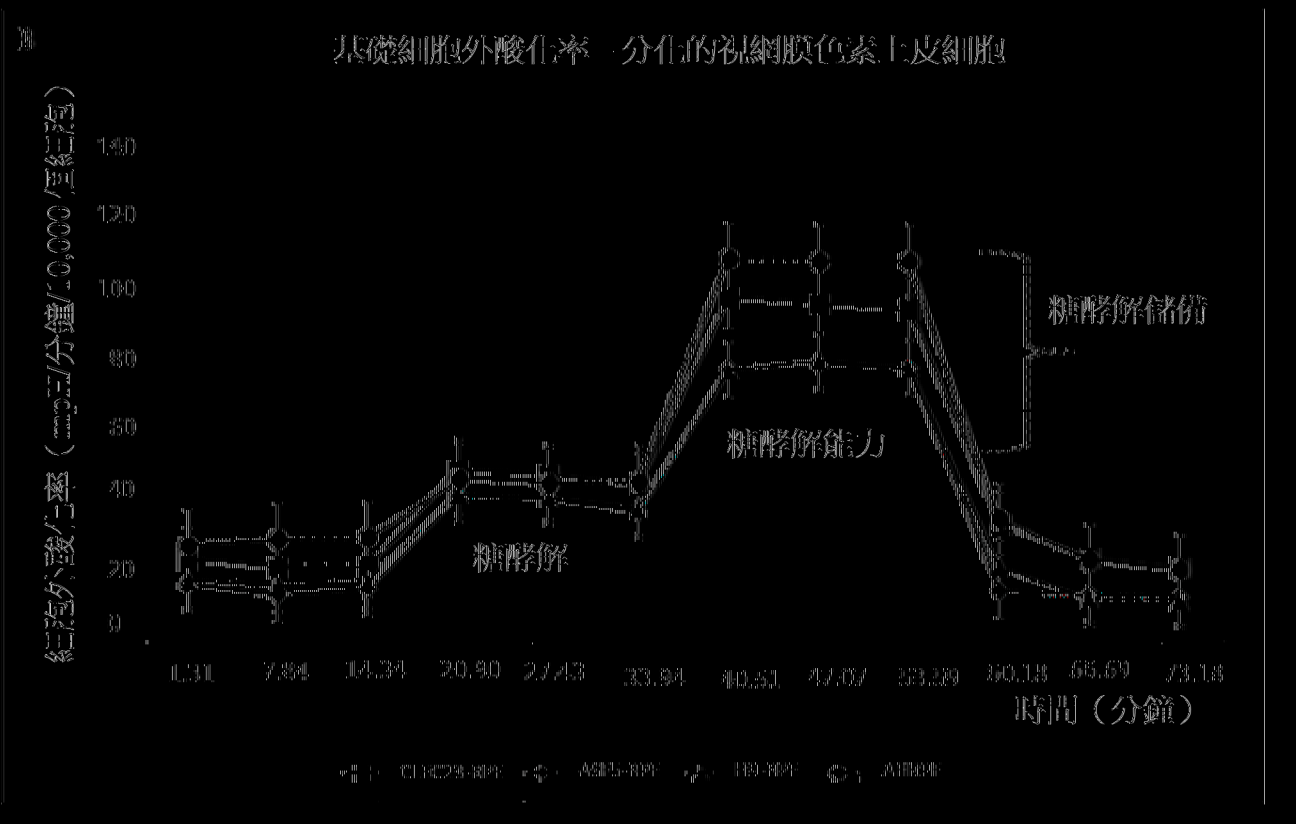


圖 20j

其內	CLMC23細胞中增加的倍數
BCSE1	3.0
MERK3	9.1
MTF2	6.8
RPL65	0.96
PMLM7	1.3
RUBP1	26.2
TRYP2	0.3

[(圖20k)]


基礎耗氧率 分化的視網膜色素上皮細胞
A
氧消耗率（nmol/分鐘/10,000個細胞）
700
600
500
400
300
200
100
0
基礎呼吸
ATP 產生
最大呼吸
備用呼吸容量
1.31
7.84
14.34
20.90
27.39
33.97
40.44
46.95
53.48
60.07
65.58
73.12
時間（分鐘）
CLS2 RPE MEM
ASC RPE MEM
HD-RPE MEM
ARPE MEM


基礎細胞外酸化率 分化的視網膜色素上皮細胞
B
細胞外酸化率（mpH/分鐘/10,000個細胞）
140
120
100
80
60
40
20
0
糖酵解
糖酵解能力
糖酵解儲備
1.31
7.84
14.34
20.90
27.45
33.94
40.51
47.07
53.59
60.18
65.69
73.18
時間（分鐘）
CLS2 RPE
ASC RPE
HD RPE
ARPE

[圖21a及b]

圖 21c：CLPs 的 OCR 圖。圖 21d：對照 OCR 圖。

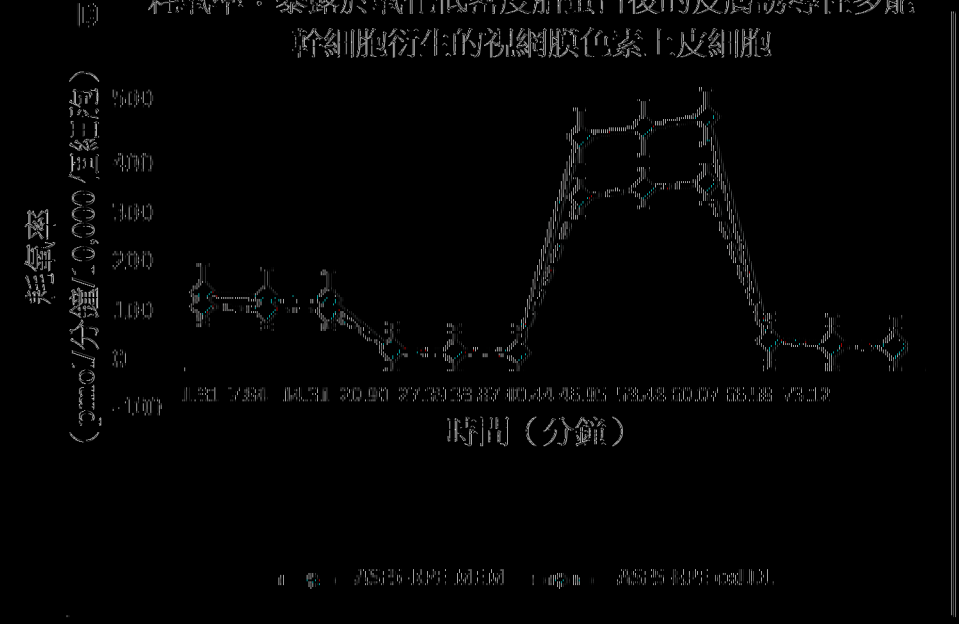
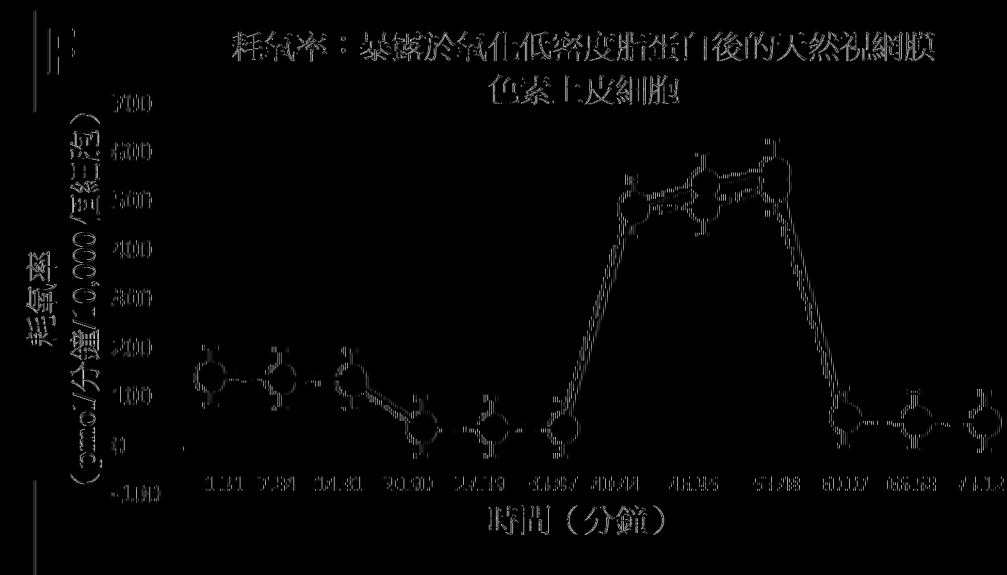


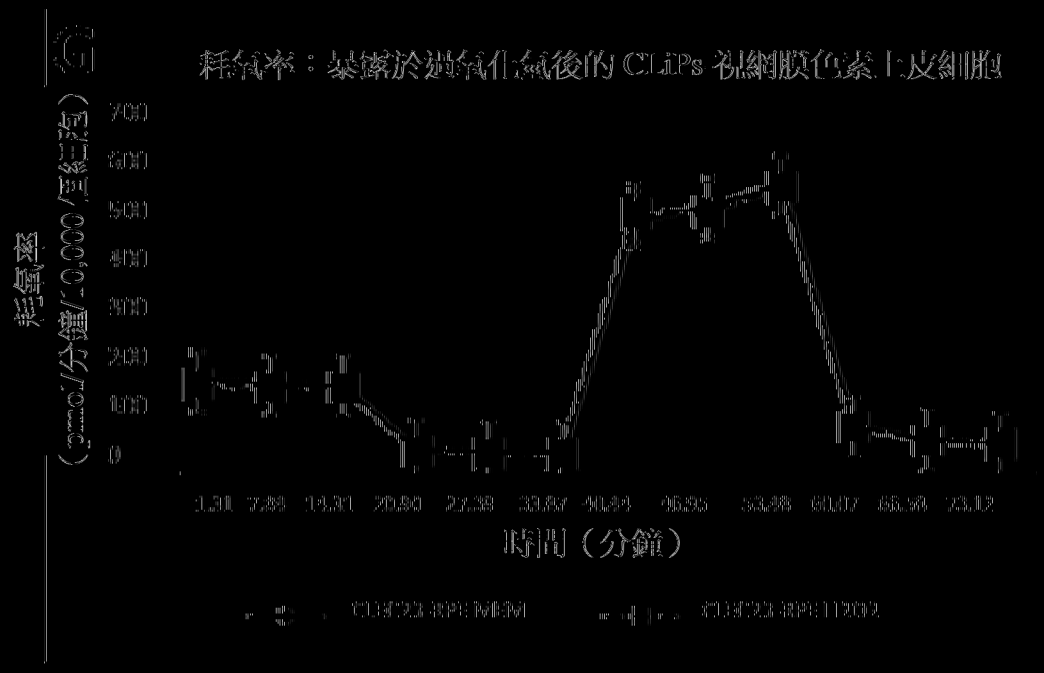
圖 21c：ASES 的 OCR 圖。圖 21d：ASES 對照 OCR 圖。

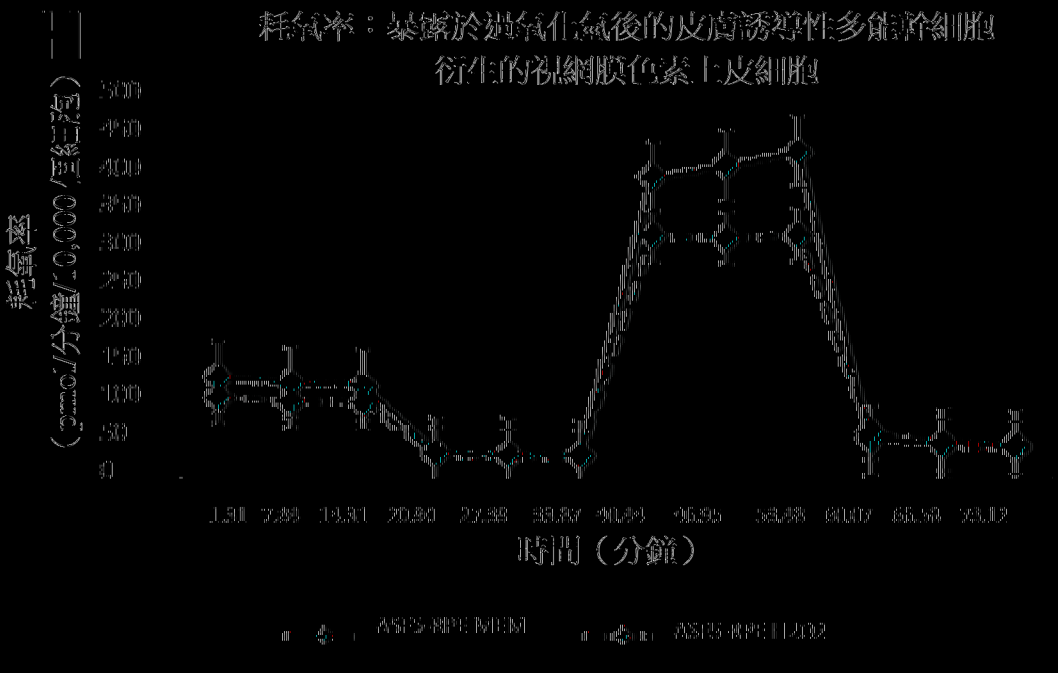
[圖21c及d]

耗氧率：暴露於氧化低密度脂蛋白後的 hiPS 衍生的視網膜色素上皮細胞
耗氧率（pmol/分鐘/10,000 個細胞）
時間（分鐘）
基礎呼吸
ATP 產生
質子漏
最大呼吸
非粒線體耗氧
備用呼吸能力

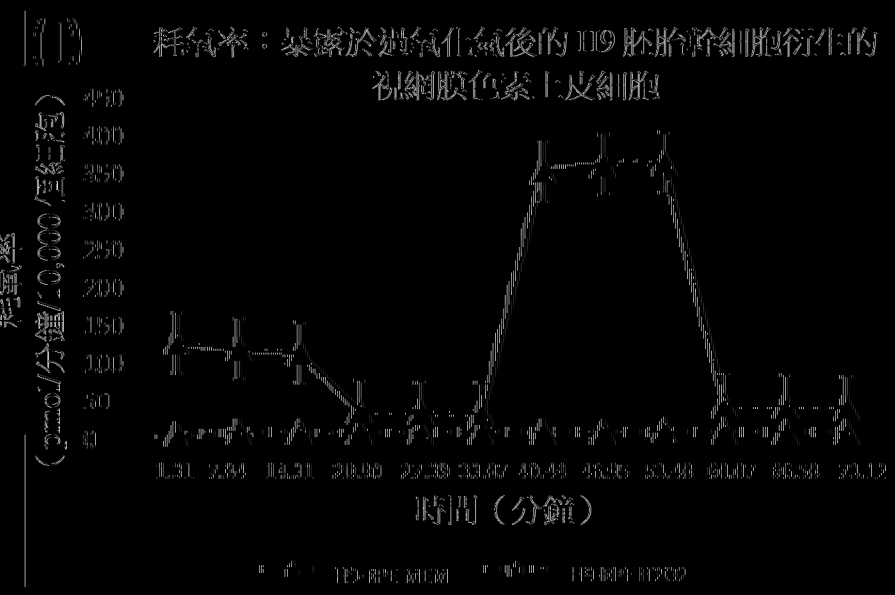

耗氧率：暴露於氧化低密度脂蛋白後的天然視網膜色素上皮細胞
耗氧率（pmol/分鐘/10,000 個細胞）
時間（分鐘）
基礎呼吸
ATP 產生
質子漏
最大呼吸
非粒線體耗氧
備用呼吸能力

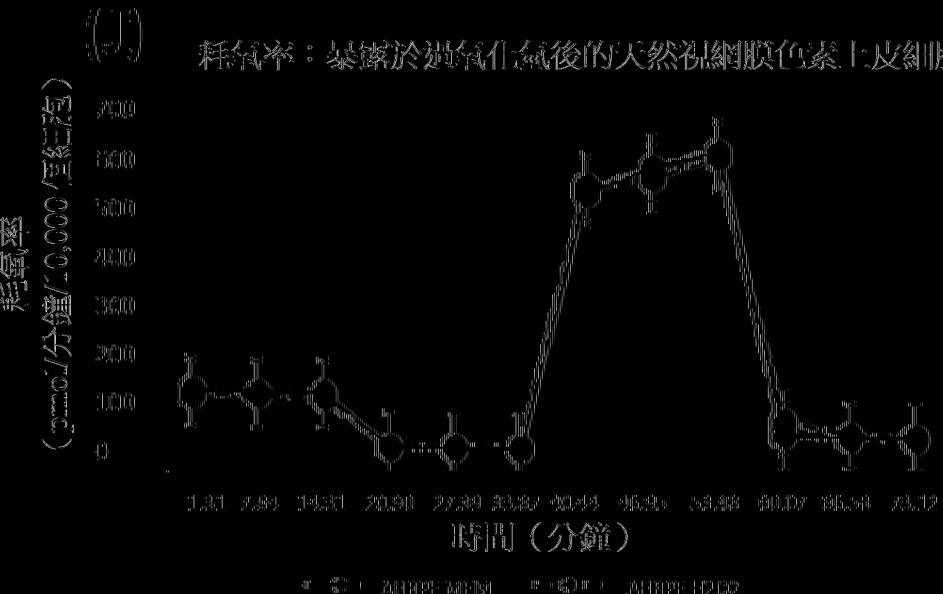
[圖21c及f]


耗氧率：暴露於過氧化氫後的 CLiPs 視網膜色素上皮細胞
細胞數（cells/分鐘/10,000 個細胞）
0
100
200
300
400
500
600
700
1.31
7.89
14.31
20.80
27.38
33.97
40.54
46.95
53.48
60.07
66.56
73.12
時間（分鐘）
CLiPs-RPE-MEM
CLiPs-RPE-D02


耗氧率：暴露於過氧化氫後的皮膚誘導性多能幹細胞
衍生的視網膜色素上皮細胞
細胞數（cells/分鐘/10,000 個細胞）
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
1.31
7.89
14.31
20.80
27.38
33.97
40.54
46.95
53.48
60.07
66.56
73.12
時間（分鐘）
ASTs-RPE-MEM
ASTs-RPE-D02

[圖21g及h]


耗氧率：暴露於過氧化氫後的 hiPS 胚胎幹細胞衍生的視網膜色素上皮細胞
(1)
樹脂量（ppm/分鐘/3,000 個細胞）
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
1.31 7.44 14.31 20.00 27.39 33.47 40.41 46.45 53.01 60.07 66.54 73.17
時間（分鐘）
「1」 TEER MEM 「2」 TEER RPE


耗氧率：暴露於過氧化氫後的天然視網膜色素上皮細胞
(2)
樹脂量（ppm/分鐘/3,000 個細胞）
700
600
500
400
300
200
100
0
1.31 7.44 14.31 20.00 27.39 33.47 40.41 46.45 53.01 60.07 66.54 73.17
時間（分鐘）
「3」 ARPE MEM 「4」 ARPE RPE

[圖21i及j]

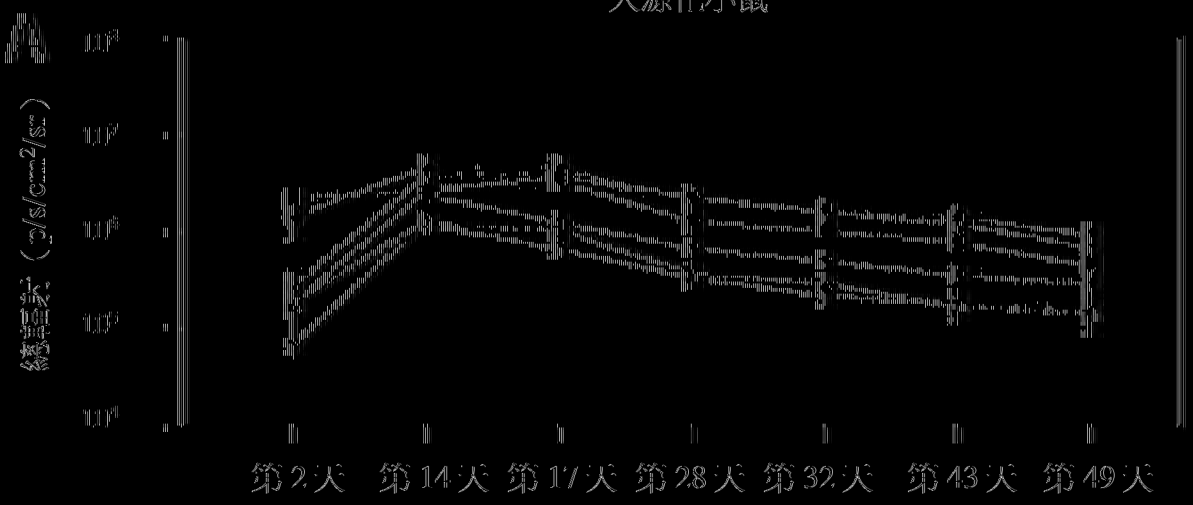
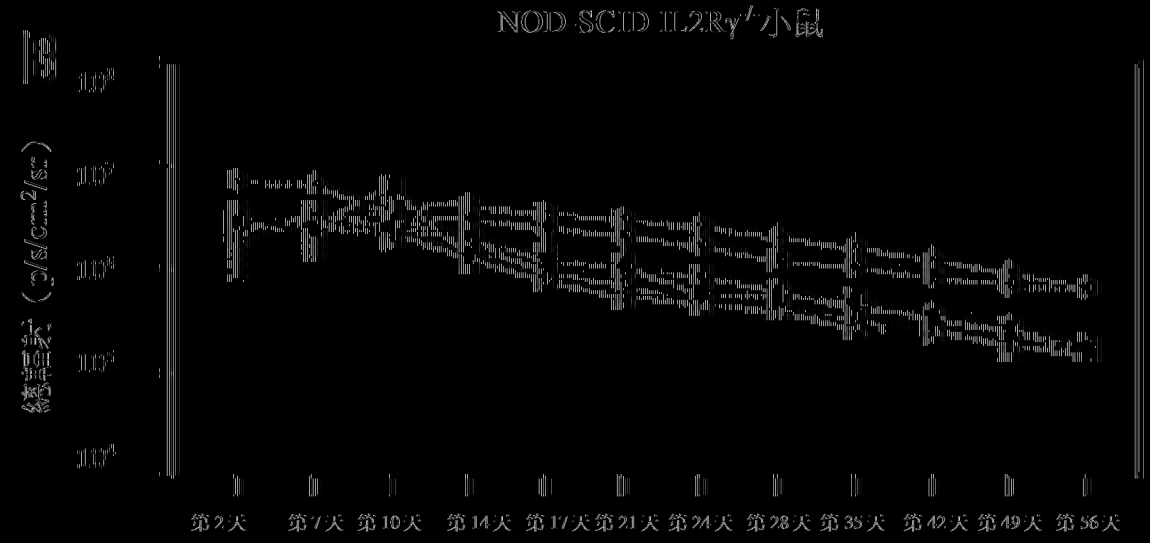

人源化小鼠
A
10^{11}
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
第2天
第14天
第17天
第28天
第32天
第43天
第49天

圖22a


NOD-SCID IL2Rγ-小鼠
B
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
第2天
第7天
第10天
第14天
第17天
第21天
第24天
第28天
第35天
第42天
第49天
第56天

HCEC-RPE
ARPE-RPE
CHRC24-RPE
CHMC24-RPE
CHMC30-RPE

圖22b

圖22c

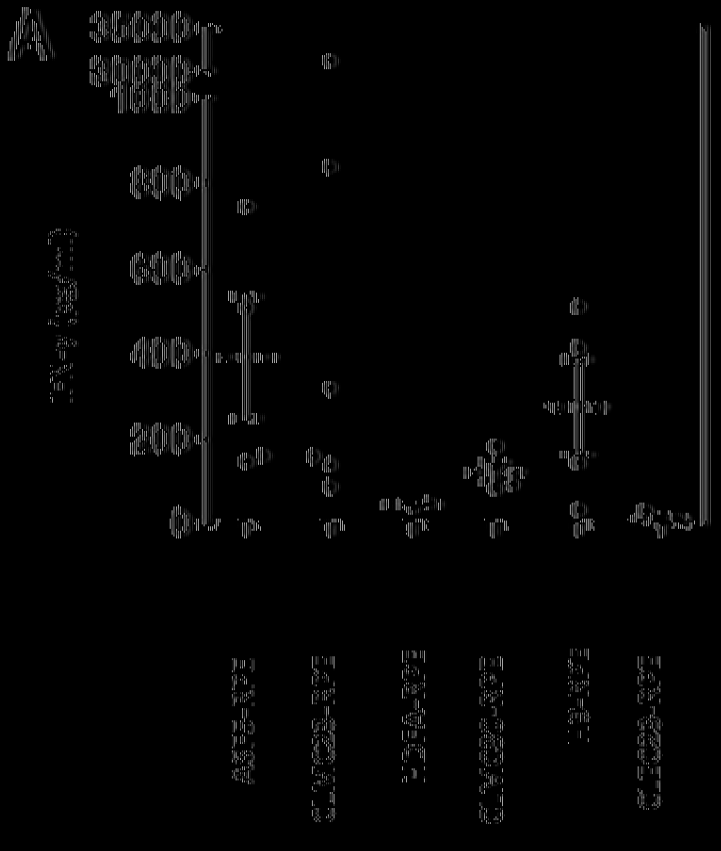

A
3600
3200
2800
2400
2000
1600
1200
800
400
0
Intensity (a.u.)
Raman Shift (cm-1)

圖23a

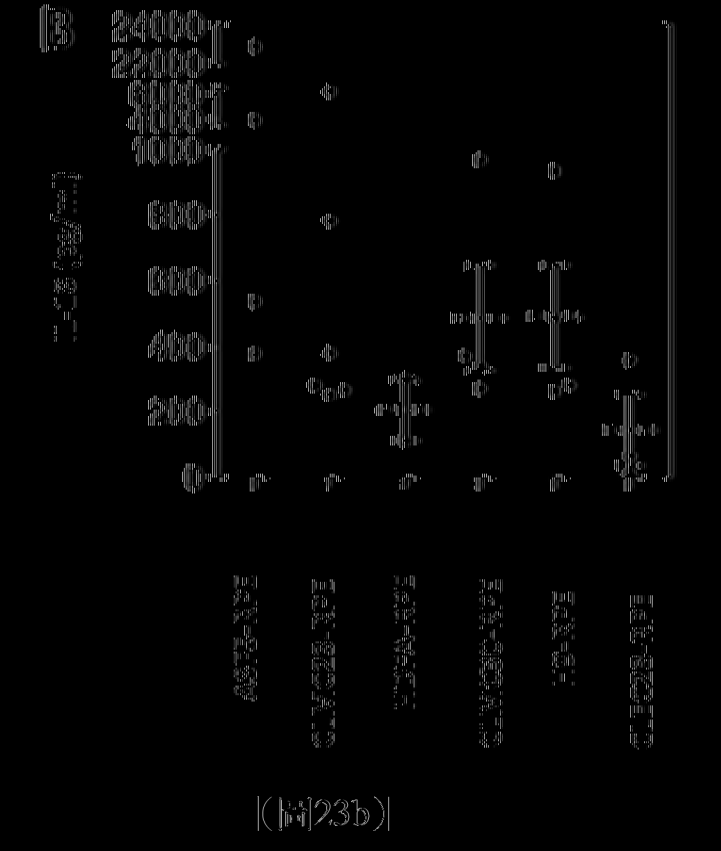
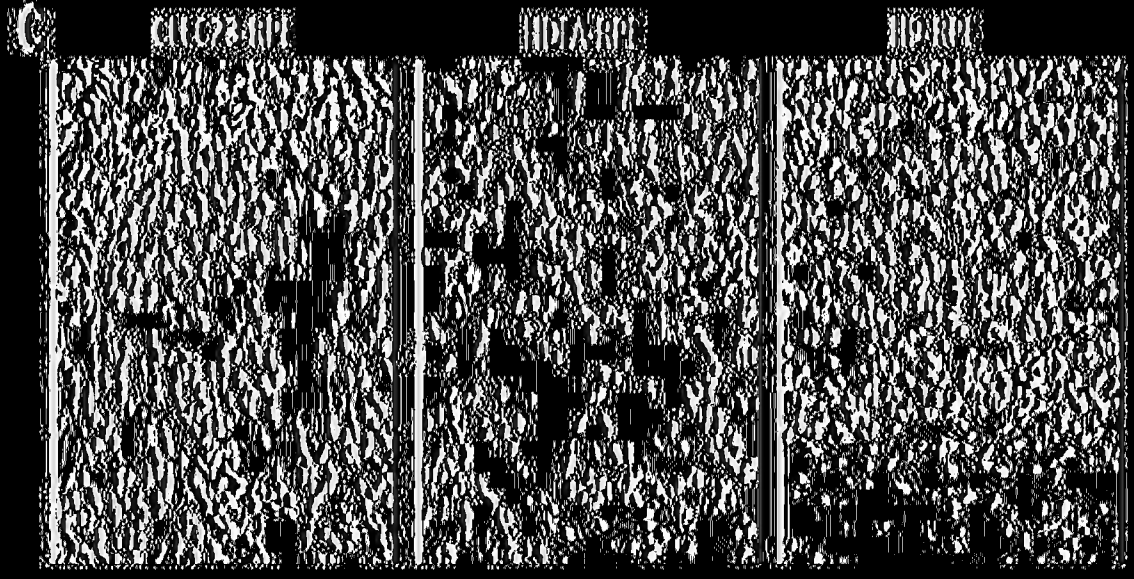
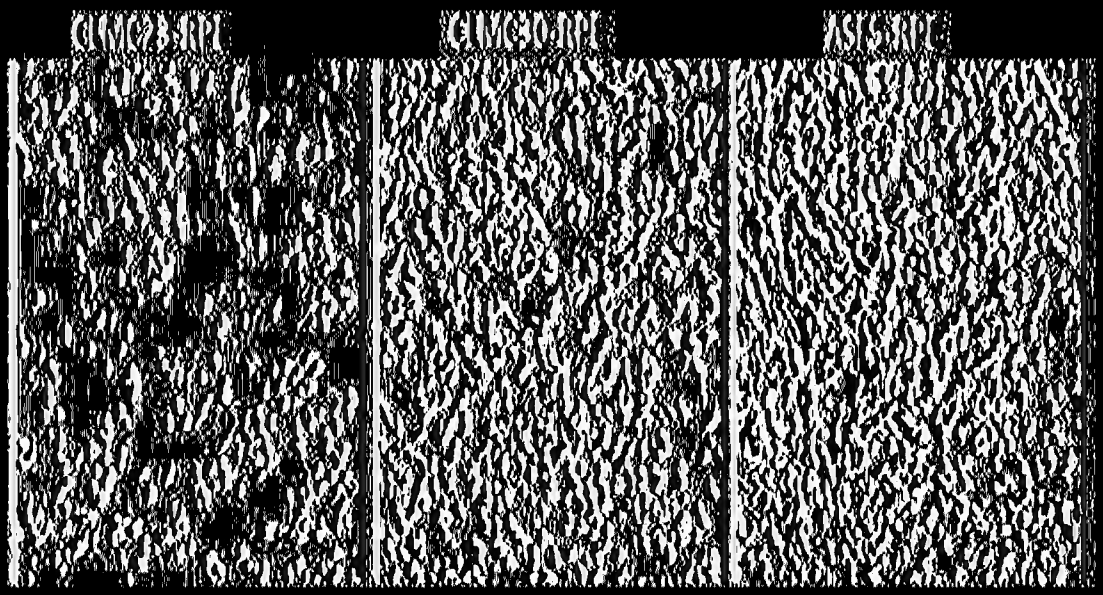
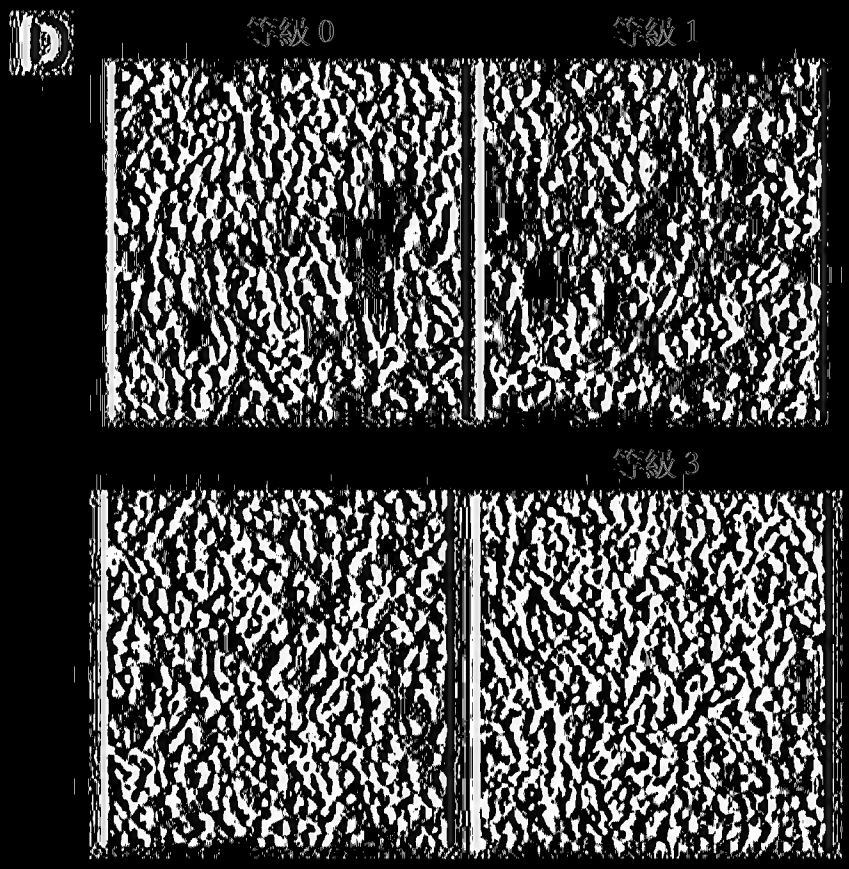

B
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Intensity (a.u.)
Raman Shift (cm-1)

圖23b

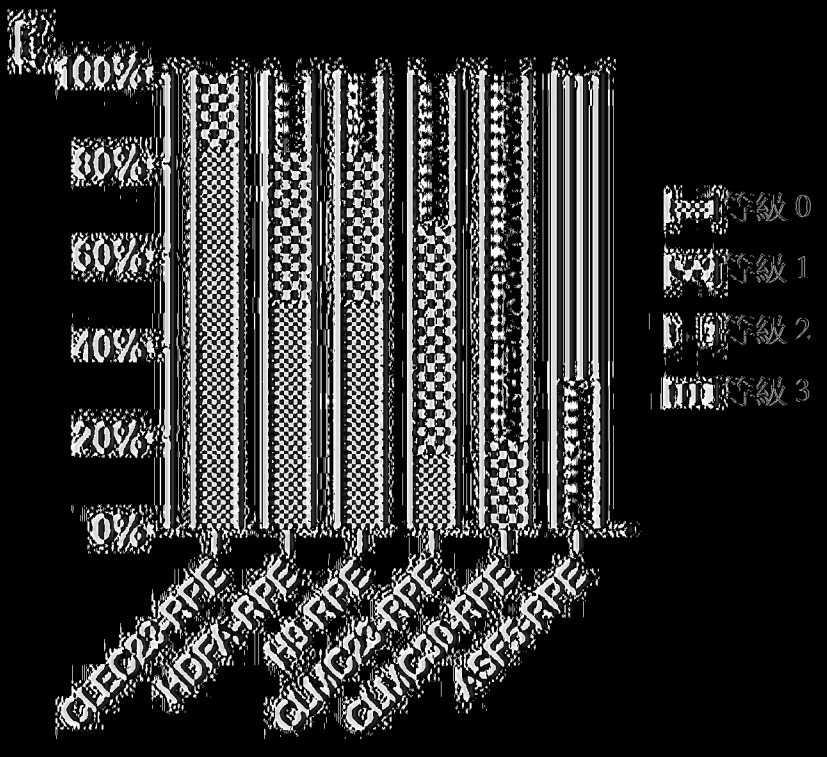

C
CLEC2B-RPE
HDAC3-RPE
HOXB2-RPE
hCD45：紅色 OTX2：綠色 DAPI：藍色


GIMC23-RPE
GIMC30-RPE
ASIC5-RPE

[圖23c]



[圖23d]



[圖23c]

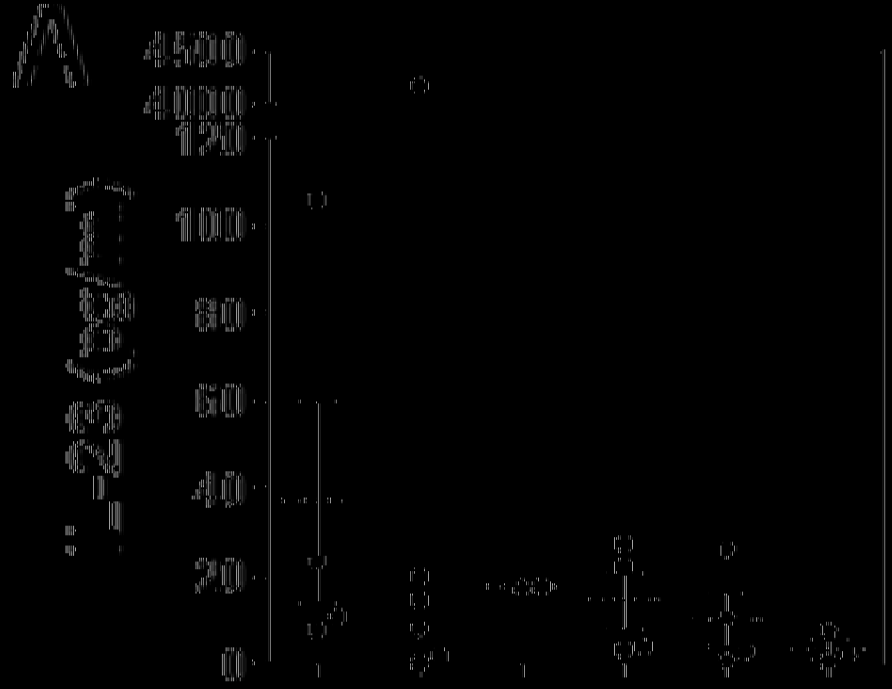


圖2A

圖2B

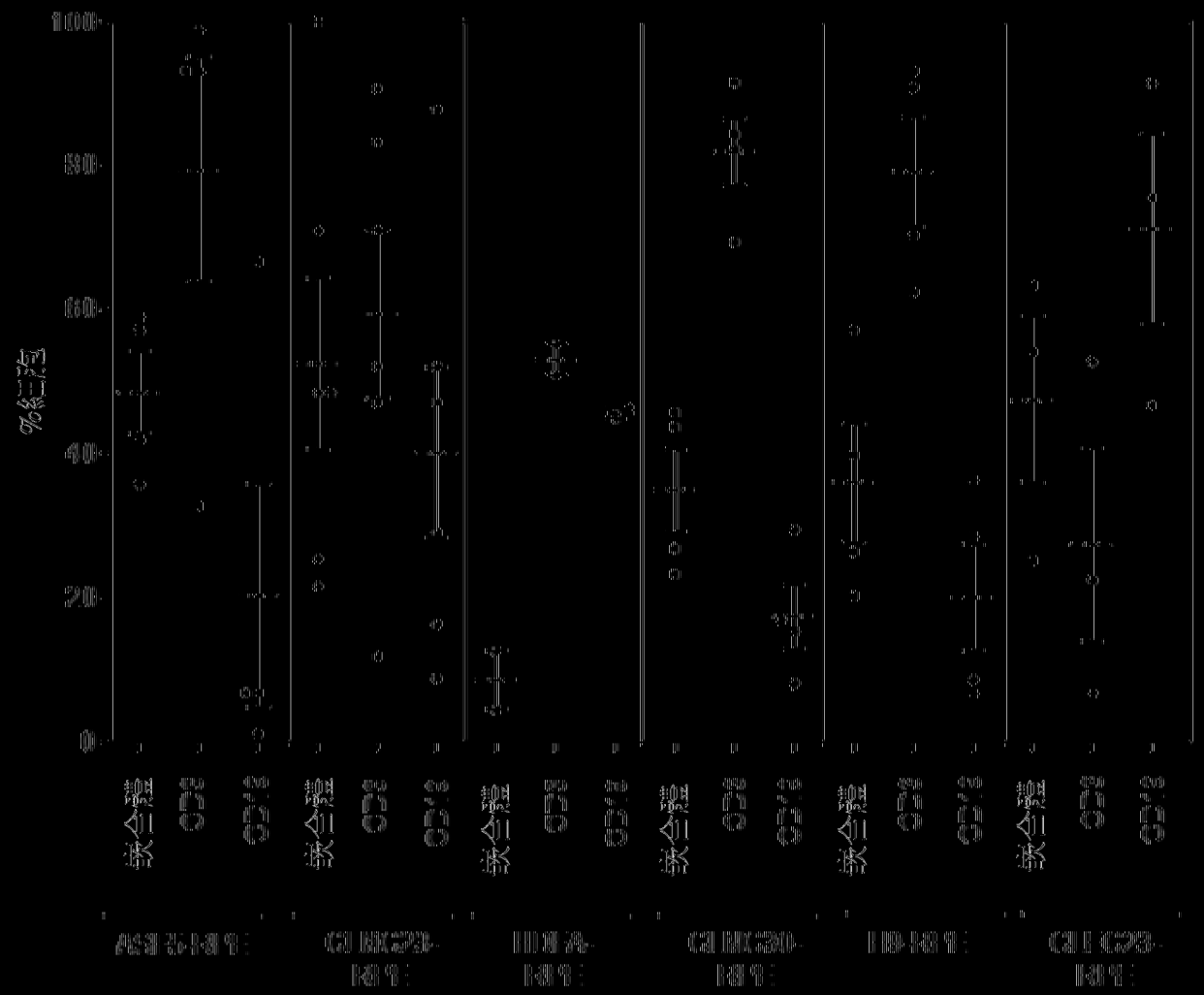


圖2(c)

(D)
100
80
60
40
20
0
%
CO3
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

(圖2Ad)

[圖2A]

[圖] CM
[初始] 初始
[ ] TEMRA
[m] EM
% CD4+ 效應T細胞
0
20
40
60
80
100
120
初始
CM
EM
TEMRA
初始
CM
EM
TEMRA
初始
CM
EM
TEMRA
初始
CM
EM
TEMRA
初始
CM
EM
TEMRA
初始
CM
EM
TEMRA

[圖2C]

圖 3
CH
初始
TiO2/SA
UV
光催化降解率 (%)
0
20
40
60
80
100
120
Rhodamine B
Methyl orange
Methylene blue
Crystal violet

圖 3