



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103898045 B

(45)授权公告日 2019.02.01

(21)申请号 201410120990.2

(22)申请日 2004.12.23

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103898045 A

(43)申请公布日 2014.07.02

(30)优先权数据

60/532,004 2003.12.23 US

60/586,566 2004.07.09 US

60/587,942 2004.07.14 US

(62)分案原申请数据

200480038720.1 2004.12.23

(73)专利权人 维亚希特公司

地址 美国特拉华州

(72)发明人 凯文·艾伦·德阿姆尔

艾兰·D·奥戈尔尼克

埃马纽埃尔·E·拜特格

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

C12N 5/071(2010.01)

C12N 5/073(2010.01)

C12N 15/12(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

(54)发明名称

定形内胚层

(57)摘要

本发明公开了包括定形内胚层细胞的细胞培养物及其制备方法。本发明也公开了基本纯化的定形内胚层细胞的细胞群及从其它细胞类型中分离、富集及纯化定形内胚层细胞的方法。

CN 103898045 B

(56)对比文件

WO 02059278 A3, 2002.08.01,

WO 0210347 A2, 2002.02.07,

SCHULDINER MAYA等. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells.《PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA》.2000, 第97卷(第21期), 11307-11312.

GOUMANS M-J等. MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS WITH ABERRANT TRANSFORMING GROWTH FACTORBETA SIGNALLING EXHIBIT IMPAIRED DIFFERENTIATION IN VITRO AND IN VIVO.《DIFFERENTIATION》.1998, 第63卷(第3期), 101-113.

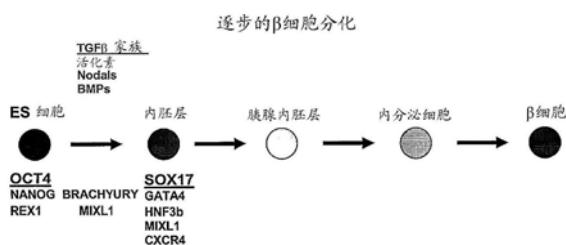
MCGRATH KATHLEEN E等. Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4.《DEVELOPMENTAL BIOLOGY》.1999, 第213卷(第2期), 442-456.

ABE K等. Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies.《EXPERIMENTAL CELL RESEARCH》.1996, 第229卷(第1期), 27-34.

审查员 温婧

权利要求书2页 说明书34页

序列表3页 附图31页



1. 培养基,其包含TGF β 超家族生长因子和Wnt家族成员,其中所述TGF β 超家族生长因子包含至少100ng/ml的活化素A,以及所述培养基包含少于约10% (v/v) 的血清,并且其中所述Wnt家族成员是Wnt3a。

2. 权利要求1的培养基,其中所述TGF β 超家族生长因子是Nodal1、活化素A和活化素B,其中所述活化素A的浓度为至少100ng/ml。

3. 权利要求1的培养基,其中所述TGF β 超家族生长因子是至少100ng/ml的活化素A。

4. 权利要求1的培养基,其中所述TGF β 超家族生长因子是活化素A和活化素B,其中所述活化素A的浓度为至少100ng/ml。

5. 权利要求1的培养基,其中所述TGF β 超家族生长因子是活化素A和nodal1,其中所述活化素A的浓度为至少100ng/ml。

6. 权利要求1的培养基,其中所述培养基还包含BMP亚组。

7. 权利要求6的培养基,其中所述BMP亚组是BMP4。

8. 权利要求1的培养基,其中所述培养基包含约10% (v/v) 的血清。

9. 权利要求1的培养基,其中所述培养基包含约2% (v/v) 的血清。

10. 权利要求1的培养基,其中所述培养基包含约0.5% (v/v) 的血清。

11. 培养基,其包含活化素A、活化素B和Wnt3a,其中所述培养基包含少于约10% (v/v) 的血清,以及其中所述活化素A的浓度为至少100ng/ml。

12. 权利要求11的培养基,其中所述培养基包含约10% (v/v) 的血清。

13. 权利要求11的培养基,其中所述培养基包含约2% (v/v) 的血清。

14. 权利要求11的培养基,其中所述培养基包含约0.5% (v/v) 的血清。

15. 干细胞培养基,其包含活化素A以及Wnt3a,其中所述培养基包含少于约10% (v/v) 的血清,以及其中所述活化素A的浓度为至少100ng/ml。

16. 权利要求15的干细胞培养基,其中所述培养基还包含活化素B。

17. 权利要求15的干细胞培养基,其中所述培养基还包含nodal1。

18. 权利要求15的干细胞培养基,其中所述培养基还包含BMP亚组。

19. 权利要求18的干细胞培养基,其中所述BMP亚组是BMP4。

20. 权利要求15的干细胞培养基,其中所述培养基包含约10% (v/v) 的血清。

21. 权利要求15的干细胞培养基,其中所述培养基包含约2% (v/v) 的血清。

22. 权利要求15的干细胞培养基,其中所述培养基包含约0.5% (v/v) 的血清。

23. 干细胞培养基,其包含活化素A、活化素B和Wnt3a,其中所述培养基包含少于约10% (v/v) 的血清,以及其中所述活化素A的浓度为至少100ng/ml。

24. 权利要求23的干细胞培养基,其中所述培养基包含约10% (v/v) 的血清。

25. 权利要求23的干细胞培养基,其中所述培养基包含约2% (v/v) 的血清。

26. 权利要求23的干细胞培养基,其中所述培养基包含约0.5% (v/v) 的血清。

27. 权利要求23的干细胞培养基,其中所述培养基还包含BMP亚组。

28. 权利要求27的干细胞培养基,其中所述BMP亚组是BMP4。

29. 权利要求23的干细胞培养基,其还包含Nodal1。

30. 定形内胚层培养基,其包含活化素A以及Wnt3a,其中所述培养基包含少于约10% (v/v) 的血清,以及其中所述活化素A的浓度为至少100ng/ml。

31. 权利要求30的定形内胚层培养基,其中所述培养基还包含活化素B。
32. 权利要求30的定形内胚层培养基,其中所述培养基还包含nodal。
33. 权利要求30的定形内胚层培养基,其中所述培养基还包含BMP亚组。
34. 权利要求33的定形内胚层培养基,其中所述BMP亚组是BMP4。
35. 权利要求30的定形内胚层培养基,其中所述培养基包含约10% (v/v) 的血清。
36. 权利要求30的定形内胚层培养基,其中所述培养基包含约2% (v/v) 的血清。
37. 权利要求30的定形内胚层培养基,其中所述培养基包含约0.5% (v/v) 的血清。
38. 定形内胚层培养基,其包含活化素A、活化素B和Wnt3a,其中所述培养基包含少于约10% (v/v) 的血清,以及其中所述活化素A的浓度为至少100ng/ml。
39. 权利要求38的定形内胚层培养基,其中所述培养基包含约10% (v/v) 的血清。
40. 权利要求38的定形内胚层培养基,其中所述培养基包含约2% (v/v) 的血清。
41. 权利要求38的定形内胚层培养基,其中所述培养基包含约0.5% (v/v) 的血清。
42. 权利要求38的定形内胚层培养基,其中所述培养基还包含BMP亚组。
43. 权利要求42的定形内胚层培养基,其中所述BMP亚组是BMP4。
44. 权利要求38的定形内胚层培养基,其还包含Nodal。

定形内胚层

[0001] 本申请是申请日为2004年12月23日、申请号为200480038720.1的同名申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请为非临时申请,在35U.S.C. §119 (e) 项的规定下享有于2003年12月23日提交的美国临时专利申请号60/532,004、名称为《定形内胚层》的优先权,在35U.S.C. §119 (e) 项的规定下还享有于2004年7月9日提交的美国临时专利申请号60/586,566的名称为《用于分离定形内胚层的化学因子细胞表面受体》项的优先权,以及在35U.S.C. §119 (e) 项的规定下享有于2004年7月14日提交的美国临时专利申请号60/587,942,名称为《用于分离定形内胚层的化学因子细胞表面受体》的优先权。本文将上面列出的各优先权申请的公开全部引入,以供参考。

发明领域

[0004] 本发明涉及医药和细胞生物学领域。特别是,本发明涉及组合物,包括哺乳动物定形内胚层细胞及制备、分离及使用这些细胞的方法。

[0005] 发明背景

[0006] 在1994年,首次在不具有成纤维细胞滋养物的培养物中分离了人多能干细胞,例如胚胎干(ES)细胞和胚胎生殖(EG)细胞(Bongso et al., 1994),然后在具有成纤维细胞滋养物的培养物中分离了这些干细胞(Hogan, 1997)。后来,Thomson、Reubinoff和Shamblott使用使有丝分裂失活的小鼠滋养层建立了人ES和EG细胞的连续培养物(Reubinoff et al., 2000; Shamblott et al., 1998; Thomson et al., 1998)。

[0007] 人ES和EG细胞(hESCs)为研究人的早期发育和对一些诸如糖尿病和帕金森氏病的疾病治疗干预提供了新的机会。例如,使用源于hESCs的产生胰岛素的细胞将对目前的利用供体胰腺细胞的细胞治疗方法提供巨大的改善。然而,目前还不了解怎样从hESCs产生生成胰岛素的 β 细胞。同样地,目前对糖尿病的利用来自供体胰腺的胰岛细胞的细胞治疗受到了移植所需的高质量胰岛细胞短缺的限制。对一个I型糖尿病患者的细胞治疗需要移植大约 8×10^8 的胰腺胰岛细胞(Shapiro et al., 2000; Shapiro et al., 2001a; Shapiro et al., 2001b)。同样地,就需要至少两个健康供体器官以获得足够的胰岛细胞进行成功的移植。HESCs提供了一种起始材料的来源,从该材料发展出基本量的高质量的分化细胞用于人细胞治疗。

[0008] 使hESCs非常适于细胞治疗应用的两种特性是多能性和在长期的培养中保持这些细胞的能力,不会发生遗传变化的积累。多能性是指hESCs分化为所有3种原始生殖细胞层(内胚层、中胚层、外胚层)的衍生物的能力,随后这些原始生殖细胞层形成成体的所有体细胞类型和胚外组织(如,胎盘)以及生殖细胞。虽然多能性赋予了hESCs特别的有用性,但这种特性也给研究和操作这些细胞及其衍生物带来了特殊的挑战。由于在分化的hESC培养物中可能产生大量细胞类型,因此,绝大多数细胞类型产生的效率很低。此外,成功评价任何既定细胞类型的产生关键依赖于确定合适的标志物。实现高效率的定向分化对于hESCs的

治疗应用非常重要。

[0009] 为了将hESCs作为起始材料用来产生可用于细胞治疗应用的细胞,克服前述问题是有益的。例如,为了达到胰岛细胞移植治疗需要的细胞材料水平,在分化的最早期,将hESCs高效率地定向分化为胰岛/β细胞系是有利的。

[0010] 除分化过程的高效定向分化以外,沿着分化途径向胰岛/β细胞系分化的中间细胞类型的分离和定性,并且将这种细胞作为合适的谱系前体用于分化中的其它步骤,也是有益的。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明的一些实施方案涉及包括定形内胚层细胞的细胞培养物,其中所述的定形内胚层细胞为多能细胞,能分化成肠管细胞或衍生于肠管的器官。根据一些实施方案,定形内胚层细胞为哺乳动物细胞,以及在优选实施方案中,定形内胚层细胞为人细胞。在本发明的一些实施方案中,定形内胚层细胞表达或不显著表达特定的标志物。在一些实施方案中,定形内胚层细胞表达一或多种标志物,所述标志物选自SOX17、CXCR4、MIXL1、GATA4、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1及CRIP1。在其它实施方案中,定形内胚层细胞不显著表达一或多种标志物,该标志物选自OCT4、α-胎蛋白(AFP)、凝血调节蛋白(TM)、SPARC及SOX7。

[0013] 根据本发明的其它实施方案,描述了从多能细胞产生定形内胚层的方法。

[0014] 在本发明的一些实施方案中,将一种或多种生长因子用于从多能细胞至定形内胚层细胞的分化过程中。这些用于分化过程的一种或多种生长因子可包括来自TGFβ超家族的生长因子。在这些实施方案中,所述一种或多种生长因子包括Nodal/活化素和/或生长因子TGFβ超家族的BMP亚群。在一些实施方案中,所述一种或多种生长因子选自Nodal、活化素A,活化素B、BMP4、Wnt3a或任何这些生长因子的组合。

[0015] 本发明实施方案还涉及富集于定形内胚层细胞中的细胞群。在某些实施方案中,将所述定形内胚层细胞分离或基本纯化。在一些实施方案中,所述分离或基本纯化的定形内胚层细胞表达SOX17和/或CXRC4标志物,其表达程度高于OCT4、AFP、TM、SPARC和/或SOX7标志物。

[0016] 还提供了富集具有定形内胚层的细胞群的方法。在一些实施方案中,可将定形内胚层细胞从混合细胞群体中分离或基本纯化,通过将所述细胞与一种试剂接触,该试剂与一种分子结合,该分子位于定形内胚层细胞表面,而不是混合细胞群体中的其它细胞表面,然后分离与试剂结合的细胞。在某些实施方案中,位于所述定形内胚层细胞表面的分子为CXCR4。

[0017] 本发明的其它实施方案还涉及CXCR4抗体,SDF-1配体或CXCR4的其它配体,其用于获得富集的、分离的或基本纯化形式的定形内胚层细胞。例如,可将CXCR4抗体、SDF-1配体或CXCR4的另一种配体用作诸如亲和分离或磁分离的方法中的试剂,以富集、分离或基本纯化与所述试剂结合的定形内胚层细胞。

[0018] 本文所述的本发明的其它实施方案涉及诸如细胞培养物的组合物,其包括多能细胞和定形内胚层细胞。在某些实施方案中,细胞培养物同时包括干细胞和定形内胚层细胞。这些培养物中的干细胞数目可大于、等于或小于该培养物中的定形内胚层细胞数目。在一些实施方案中,干细胞为人胚胎干细胞。在某些实施方案中,将hESCs保持在滋养层上。在这

些实施方案中,所述滋养层细胞可为从人、小鼠或其它合适生物获得的诸如成纤维细胞的细胞。

[0019] 在本发明的一些实施方案中,包括定形内胚层细胞和hESCs的所述组合物还包括一种或多种生长因子。这些生长因子可包括来自TGF β 超家族的生长因子。在这些实施方案中,所述一种或多种生长因子包括Nodal1/活化素和/或生长因子TGF β 超家族的BMP亚群。在一些实施方案中,所述一种或多种生长因子选自Nodal1、活化素A、活化素B、BMP4、Wnt3a或任何这些生长因子的组合。

[0020] 本发明的其它实施方案参考下述编号段落进行描述:

[0021] 1. 包括人细胞的细胞培养物,其中至少约10%的所述人细胞为定形内胚层细胞,所述的定形内胚层细胞为能分化成肠管细胞或衍生于肠管的器官的多能细胞。

[0022] 2. 段落1所述的细胞培养物,其中至少约50%的所述人细胞为定形内胚层细胞。

[0023] 3. 段落1所述的细胞培养物,其中至少约80%的所述人细胞为定形内胚层细胞。

[0024] 4. 段落1所述的细胞培养物,其中所述的定形内胚层细胞表达选自SOX17和CXCR4的标志物。

[0025] 5. 段落4所述的细胞培养物,其中在所述定形内胚层细胞中,选自SOX17和CXCR4的所述标志物的表达高于选自OCT4、 α -胎蛋白(AFP)、凝血调节蛋白(TM)、SPARC及SOX7的标志物的表达。

[0026] 6. 段落4所述的细胞培养物,其中所述定形内胚层细胞不表达选自OCT4、AFP、TM、SPARC和SOX7的标志物。

[0027] 7. 段落4所述的细胞培养物,其中所述定形内胚层细胞表达选自MIXL1、GATA4和HNF3b的标志物。

[0028] 8. 段落4所述的细胞培养物,其中所述定形内胚层细胞表达选自FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1和CRIP1的标志物。

[0029] 9. 段落1所述的细胞培养物,其中所述定形内胚层细胞表达SOX17和CXCR4。

[0030] 10. 段落9所述的细胞培养物,其中在所述的定形内胚层细胞中,所述SOX17和CXCR4的表达高于OCT4、AFP、TM、SPARC和SOX7的表达。

[0031] 11. 段落9所述的细胞培养物,其中所述定形内胚层细胞不表达OCT4、AFP、TM、SPARC和SOX7。

[0032] 12. 段落9所述的细胞培养物,其中所述定形内胚层细胞表达MIXL1、GATA4和HNF3b。

[0033] 13. 段落9所述的细胞培养物,其中所述定形内胚层细胞表达选自FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1和CRIP1的标志物。

[0034] 14. 段落1所述的细胞培养物,其中在所述的细胞培养物中,对应每一种多能细胞存在至少约2个定形内胚层细胞。

[0035] 17. 段落1所述的细胞培养物进一步包括培养基,该培养基包含少于约10%的血清。

[0036] 18. 段落1所述的细胞培养物进一步包括TGF β 超家族的Nodal1/活化素亚群的生长因子。

[0037] 19. 段落1所述的细胞培养物,进一步包括选自Nodal1、活化素A、活化素B及其组合

的生长因子。

[0038] 20. 包括细胞的细胞群, 其中至少约90%的所述细胞为人定形内胚层细胞, 所述的人定形内胚层细胞为多能细胞, 该多能细胞能分化成肠管细胞或衍生于肠管的器官。

[0039] 21. 段落20所述的细胞群, 其中至少约95%的所述细胞为人定形内胚层细胞。

[0040] 22. 段落20所述的细胞群, 其中至少约98%的所述细胞为人定形内胚层细胞。

[0041] 23. 段落20所述的细胞群, 其中所述人定形内胚层细胞表达选自SOX17和CXCR4的标志物。

[0042] 24. 段落23所述的细胞群, 其中在所述人定形内胚层细胞中, 选自SOX17和CXCR4的所述标志物的表达高于选自OCT4、AFP、TM、SPARC和SOX7的标志物的表达。

[0043] 25. 段落23所述的细胞群, 其中所述人定形内胚层细胞不表达选自OCT4、AFP、TM、SPARC和SOX7的标志物。

[0044] 26. 段落23所述的细胞群, 其中所述人定形内胚层细胞表达选自MIXL1、GATA4和HNF3b的标志物。

[0045] 27. 段落23所述的细胞群, 其中所述定形内胚层细胞表达选自FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1和CRIP1的标志物。

[0046] 28. 段落20所述的细胞群, 其中所述人定形内胚层细胞表达SOX17和CXCR4。

[0047] 29. 段落28所述的细胞群, 其中在所述的人定形内胚层细胞中, SOX17和CXCR4的表达高于OCT4、AFP、TM、SPARC和SOX7的表达。

[0048] 30. 段落28所述的细胞群, 其中所述人定形内胚层细胞不表达OCT4、AFP、TM、SPARC和SOX7。

[0049] 31. 段落28所述的细胞群, 其中所述的人定形内胚层细胞表达MIXL1、GATA4和HNF3b。

[0050] 32. 段落28所述的细胞群, 其中所述定形内胚层细胞表达选自FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1和CRIP1的标志物。

[0051] 33. 段落20所述的细胞群, 其中在所述的细胞群体中, 对应每一种多能细胞存在至少约2个定形内胚层细胞。

[0052] 36. 产生定形内胚层细胞的方法, 所述的方法包括下述步骤:

[0053] 获得包括人多能细胞的细胞群;

[0054] 为所述的细胞群提供至少一种TGF β 超家族生长因子, 所述生长因子的量足以促进所述多能细胞分化成定形内胚层细胞, 所述的定形内胚层细胞为能分化成肠管细胞或衍生于肠管的器官的多能细胞; 以及

[0055] 给予足够的时间来形成定形内胚层细胞, 其中所述的形成定形内胚层细胞的足够时间以检测所述细胞群体中定形内胚层细胞的存在来确定。

[0056] 37. 段落36所述的方法, 其中至少约10%的所述多能细胞分化成定形内胚层细胞。

[0057] 38. 段落36所述的方法, 其中至少约50%的所述多能细胞分化成定形内胚层细胞。

[0058] 39. 段落36所述的方法, 其中至少约70%的所述多能细胞分化成定形内胚层细胞。

[0059] 40. 段落36所述的方法, 其中至少约80%的所述多能细胞分化成定形内胚层细胞。

[0060] 41. 段落36所述的方法, 其中检测定形内胚层细胞在所述细胞群体中的存在包括在所述细胞群细胞中检测至少一种选自SOX17和CXCR4的标志物的表达, 以及至少一种选自

OCT4、AFP、TM、SPARC和SOX7的标志物的表达,其中在所述定形内胚层细胞中,选自SOX17和CXCR4的所述标志物的表达高于选自OCT4、AFP、TM、SPARC和SOX7的所述标志物的表达。

[0061] 42. 段落36所述的方法,其中检测定形内胚层细胞在所述的细胞群中的存在包括在所述细胞群细胞中检测至少一种选自SOX17和CXCR4的标志物的表达,以及至少一种选自AFP、TM和SOX7的标志物的表达,其中在所述定形内胚层细胞中,选自SOX17和CXCR4的所述标志物的表达高于选自AFP、TM和SOX7的所述标志物的表达。

[0062] 43. 段落42所述的方法,其中至少一种所述的标志物的表达以Q-PCR来测定。

[0063] 44. 段落42所述的方法,其中至少一种所述的标志物的表达以免疫细胞化学来测定。

[0064] 45. 段落36所述的方法,其中检测在所述的细胞群体中定形内胚层细胞的存在包括在所述细胞群体细胞中检测至少一种选自VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1和CRIP1的标志物的表达,以及至少一种选自OCT4、AFP、TM、SPARC和SOX7的标志物的表达,其中在所述的定形内胚层细胞中,选自FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1和CRIP1的标志物的表达高于选自OCT4、AFP、TM、SPARC和SOX7的标志物的表达。

[0065] 46. 段落36所述的方法,其中所述的至少一种生长因子为TGF β 超家族的Nodal/活化素亚群。

[0066] 47. 段落46所述的方法,其中所述的至少一种生长因子选自Nodal、活化素A、活化素B及其组合。

[0067] 48. 段落47所述的方法,其中所述的至少一种生长因子为Nodal。

[0068] 49. 段落47所述的方法,其中所述的至少一种生长因子为活化素A。

[0069] 50. 段落47所述的方法,其中所述的至少一种生长因子为活化素B。

[0070] 51. 段落36所述的方法,其中提供了TGF β 超家族的多种生长因子。

[0071] 52. 段落51所述的方法,其中所述的多种生长因子包括Nodal、活化素A及活化素B。

[0072] 53. 段落36所述的方法,其中所述至少一种生长因子的浓度为至少约10ng/ml。

[0073] 54. 段落36所述的方法,其中所述至少一种生长因子的浓度为至少约100ng/ml。

[0074] 55. 段落36所述的方法,其中所述至少一种生长因子的浓度为至少约500ng/ml。

[0075] 56. 段落36所述的方法,其中所述至少一种生长因子的浓度为至少约1000ng/ml。

[0076] 57. 段落36所述的方法,其中所述至少一种生长因子的浓度为至少约5000ng/ml。

[0077] 58. 段落36所述的方法,其中所述细胞群体生长于包括少于约10%血清的培养基中。

[0078] 59. 段落36所述的方法,其中所述多能细胞包括干细胞。

[0079] 62. 以段落36的方法产生的定形内胚层细胞。

[0080] 63. 产生富集的定形内胚层细胞的细胞群方法,包括下述步骤:

[0081] 分化多能人细胞群体中的细胞,以产生定形内胚层细胞,所述的定形内胚层细胞为多能细胞,该多能细胞能分化成肠管细胞或衍生于肠管的器官;

[0082] 向所述的细胞群提供试剂,所述试剂与标志物结合,所述标志物表达于所述的定形内胚层细胞中而基本上不表达于所述细胞群中的其它细胞类型中;及

[0083] 将与所述试剂结合的所述定形内胚层细胞与位于所述细胞群中所述其它细胞类型分离,从而产生富集的定形内胚层细胞的细胞群。

- [0084] 64. 段落63所述的方法,其中分化步骤进一步包括,
- [0085] 获得包括多能人细胞的细胞群,
- [0086] 向所述细胞群体提供所述至少一种TGF β 超家族生长因子,该生长因子的量足以促进将所述多能细胞分化成定形内胚层细胞,所述的定形内胚层细胞为多能细胞,该多能细胞能分化成肠管细胞或衍生于肠管的器官,并
- [0087] 给予足够的时间形成定形内胚层细胞,其中所述的形成定形内胚层细胞的足够时间以检测所述细胞群体中定形内胚层细胞的存在来确定。
- [0088] 65. 段落63所述的方法,其中检测包括,
- [0089] 在所述细胞群体的细胞中检测至少一种选自SOX17和CXCR4的标志物的表达,以及至少一种选自OCT4、AFP、TM、SPARC和SOX7的标志物的表达,其中在所述的定形内胚层细胞中,选自SOX17和CXCR4的标志物的表达高于选自OCT4、AFP、TM、SPARC和SOX7的标志物的表达。
- [0090] 66. 段落63所述的方法,其中检测包括,在所述细胞群体的细胞中检测至少一种选自SOX17和CXCR4的标志物的表达,以及至少一种选自AFP、TM和SOX7的标志物的表达,其中在所述的定形内胚层细胞中,选自SOX17和CXCR4的标志物的表达高于选自AFP、TM和SOX7的标志物的表达。
- [0091] 67. 段落63所述的方法,其中检测包括,在所述细胞群体的细胞中检测至少一种选自FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1和CRIP1的标志物的表达,以及至少一种选自OCT4、AFP、TM、SPARC和SOX7的标志物的表达,其中在所述的定形内胚层细胞中,选自FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1和CRIP1的标志物的表达高于选自OCT4、AFP、TM、SPARC和SOX7的标志物的表达。
- [0092] 68. 段落63所述的方法,其中至少约95%的所述细胞为定形内胚层细胞。
- [0093] 69. 段落63所述的方法,其中至少约98%的所述细胞为定形内胚层细胞。
- [0094] 70. 段落63所述的方法,其中所述的标志物为CXCR4。
- [0095] 71. 段落63所述的方法,其中所述的试剂为抗体。
- [0096] 72. 段落71所述方法,其中所述的抗体对CXCR4具有亲和性。
- [0097] 73. 段落63所述的方法产生的富集定形内胚层细胞的细胞群。
- [0098] 74. 段落4或9的任一项所述的细胞培养物,其中所述的定形内胚层细胞不显著表达选自OCT4、AFP、TM、SPARC和SOX7的标志物。
- [0099] 75. 段落23或28的任一段落的细胞群,其中所述的定形内胚层细胞不显著表达选自OCT4、AFP、TM、SPARC和SOX7的标志物。
- [0100] 应当了解,上述的方法和组合物涉及体外细胞培养。然而,上述的体外分化细胞组合物可于体内应用。
- [0101] 本发明的其它实施方案还可发现于下述美国临时专利申请中,即2003年12月23日提交的美国临时专利申请第60/532,004号,名为《定形内胚层》;2004年7月9日提交的美国临时专利申请第60/586,566号,名为《用于分离定形内胚层的趋化因子细胞表面受体》;以及2004年7月14日提交的美国临时专利申请第60/587,942号,名为《用于分离定形内胚层的细胞表面受体》,本文将这些公开全部引入,以供参考。
- [0102] 附图简述

[0103] 图1为提出的从hESCs产生 β -细胞的分化途径的示意图。该途径中的第一步为将ES细胞转变为定形内胚层细胞系,其代表进一步将ES细胞分化为胰腺内胚层、内分泌腺内胚层或胰岛/ β -细胞最早的已知步骤之一。可用于介导此转变的一些因子为TGF β 家族的成员,这些成员包括,但不局限于活化素、nodals和BMPs。确定定形内胚层靶细胞的代表性标志物为SOX17、GATA4、HNF3b、MIX1和CXCR4。

[0104] 图2为人SOX17cDNA图解,其显示了保守基序的位置并突出了用于GENOVAC的免疫方法的区域。

[0105] 图3为一种相关性树状图,表明SOX17与SOX7的相关性最强,与SOX18的相关性稍弱。在同源物种中的SOX17蛋白质比相同物种中的SOX群F亚族的其它成员的相关性强得多。

[0106] 图4为以大鼠抗SOX17抗体为探针的蛋白质杂交(Western blot)。该杂交证明了该抗体对成纤维细胞中过量表达的人SOX17蛋白质的特异性(泳道1),以及对EGFP(泳道2)或最相关的SOX家族成员SOX7(泳道3)缺少免疫反应性。

[0107] 图5A-B为显示SOX17 $^+$ 细胞簇的显微照片,显示大量的共标记的AFP $^+$ 细胞(A)。这与其它SOX17 $^+$ 细胞簇(B)观察到少量AFP $^+$ 细胞或未观察到AFP $^+$ 细胞形成鲜明对比。

[0108] 图6A-C为显示体壁内胚层和SOX17的显微照片。嵌图A显示对人凝血调节蛋白(TM)的免疫细胞化学,该蛋白质位于随机分化的hES细胞培养物中的体壁内胚层细胞的细胞表面。嵌图B为TM和SOX17双重标志显示的与嵌图A相同的区域。嵌图C为以DAPI标记核的相同区域的相差图像。注意DAPI标记核与SOX17标记完全相关。

[0109] 图7A-B为显示定量PCR(Q-PCR)的SOX17基因表达和SOX17特异性抗体的抗SOX17阳性细胞的直方图。相对于非分化的对照培养基(SR20)而言,嵌图A显示活化素A增加SOX17基因表达,而视黄酸(RA)强烈抑制SOX17表达。嵌图B表明,相同模式和相似程度的变化反应在SOX17 $^+$ 细胞数目上,表明SOX17基因表达的Q-PCR测试对单细胞水平的变化是非常敏感的。

[0110] 图8A为直方图,显示在活化素A存在下分化的hESCs培养物保持低水平的AFP基因表达,而在10%的胎牛血清(FBS)中,细胞随机分化,显示AFP严重上调。表达水平上的差异大约为7倍。

[0111] 图8B-C为两张显微照片图像,显示了活化素A对AFP表达抑制在单细胞水平也很明显,相对于仅用10%的FBS(顶部)而言,在活化素A处理的条件下(底部)观察到的AFP $^+$ 细胞簇很少而且很小。

[0112] 图9A-B为对照图,显示使用流式细胞仪定量AFP $^+$ 细胞数。该图表明,在存在(右嵌图)或不存在(左嵌图)活化素A时AFP基因表达变化幅度(图8A)与AFP $^+$ 细胞数非常一致,进一步表明Q-PCR分析对显示在单细胞水平上出现的变化的实用性。

[0113] 图10A-F为显微照片,显示将hESCs暴露于nodal、活化素A和活化素B(NAA),在5天时间产生了细胞数的显著增加(A-C)。通过比较SOX17 $^+$ 细胞与该区域存在的细胞总量的相对量,如DAPI显色核(D-F)所示,可以看出约30-50%的所有细胞在以NAA处理5天后对SOX17具有免疫反应性。

[0114] 图11为直方图,显示活化素A(0、10、30或100ng/mL)剂量依赖性地增加分化的hESCs的SOX17基因表达。在对粘附培养物处理3天后,继续再悬浮培养3~5天,表达增加已经很明显。

[0115] 图12A-C为直方图,证实了活化素A对MIXL1(嵌图A)、GATA4(嵌图B)及HNF3b(嵌图

C)表达的作用。在其它三个定形内胚层标志物MIXL1、GATA4及HNF3b中也观察到了对活化素呈剂量依赖性的增加。对活化素剂量依赖性增加的表达幅度与SOX17的极其相似,强烈显示了活化素A特异作用于共表达所有四个基因 (SOX17⁺, MIXL1⁺, GATA4⁺andHNF3b⁺) 的细胞群。

[0116] 图13A-C为直方图,证实了活化素A对AFP (嵌图A)、SOX7 (嵌图B) 及SPARC (嵌图C) 表达中的作用。活化素A剂量依赖性地降低内脏内胚层标志物AFP的表达。原始内胚层(SOX7) 及体壁内胚层(SPARC) 标志物仍然不变或仅在某些点显示抑制,表明活化素A并不特异作用于这些胚外内胚层细胞类型。这进一步支持SOX17、MIXL1、GATA4及HNF3b的表达增加是由于活化素A引起定形内胚层细胞数量的增加。

[0117] 图14A-B为直方图,表明了活化素A对ZIC1 (嵌图A) 及Brachyury (嵌图B) 表达的作用。神经标志物ZIC1的持续表达显示活化素A对神经分化无剂量依赖性的效果。从brachyury表达降低可以看出,100ng/mL活化素A处理对中胚层的分化有显著的抑制。这可能是来自中内胚层前体的定形内胚层特异性增加的结果。与无处理的空白对照培养物相比,低水平的活化素A处理(10及30ng/mL) 在分化后期时间点保持了brachyury表达。

[0118] 图15A-B为显微照片,活化素处理引起体壁内胚层分化降低。在仅以血清分化的培养物(A) 内发现TM^{hi}体壁内胚层区域,然而当包括活化素(B) 时很少分化为TM⁺细胞及总免疫反应性的强度较低。

[0119] 图16A-D为显微照片,表明活化素A及活化素B处理引起的标志物表达。连续以活化素A及活化素B处理hESCs 4天,以SOX17、AFP及TM抗体进行三标记。嵌图A-SOX17; 嵌图B- AFP; 嵌图C-TM; 及嵌图D-Phase/DAPI。注意当完全无AFP (B) 及TM (C) 免疫反应性时可见大量的SOX17阳性细胞 (A) 。

[0120] 图17是显微图片,表明在体外自hESCs 出现定形内胚层及内脏内胚层。内脏内胚层区域以AFP^{hi}/SOX17^{lo/-}鉴定,然而定形内胚层显示了完全相反的特征,SOX17^{hi}/AFP^{lo/-}。选择该域是由于这两个区域彼此接近,然而,有多次在完全分离的AFP^{hi}细胞区域观察到SOX17^{hi}/AFP^{lo/-}区域,表明部分定形内胚层细胞衍生于内脏内胚层细胞。

[0121] 图18为描述TGF β 家族配体及受体的图表。活化AR-Smads及BR-Smads的因子有利于从人胚胎干细胞产生定形内胚层(参见, J Cell Physiol. 187: 265-76)。

[0122] 图19为直方图,表明以单一或多种TGF- β 因子处理诱导的SOX17随时间表达。

[0123] 图20为直方图,表明以多种TGF- β 因子处理引起SOX17⁺细胞数量随时间的增加。

[0124] 图21为直方图,表明以多种TGF- β 因子处理诱导的SOX17随时间表达。

[0125] 图22为直方图,表明活化素A剂量依赖性地增加SOX17⁺细胞数量。

[0126] 图23为直方图,显示Wnt3a加入至活化素A及活化素B处理的培养物中增加SOX17表达,高于活化素A及活化素B单独使用诱导的水平。

[0127] 图24A-C为直方图,表明在低FBS条件下,分化为定形内胚层增加。在包括2%FBS (2AA) 的培养基中以活化素A及B处理hESCs 与在10%FBS (10AA) (嵌图A) 中同样条件下处理比,SOX17表达水平高2-3倍。定形内胚层标志物MIXL1 (嵌图B) 也以相同的方式受到影响,而且2%FBS对AFP (内脏内胚层) (嵌图C) 的抑制比在10%FBS条件下高。

[0128] 图25A-D为显微照片,显示培养中的SOX17⁺细胞分裂。SOX17免疫反应性细胞处于hESC克隆分化边缘 (C,D),以增殖细胞细胞核抗原 (PCNA) (嵌图B) 标记,而不以OCT4 (嵌图C) 共标志。此外,以DAPI标记核,在SOX17⁺细胞 (箭头) 及OCT4⁺,未分化的hESCs (箭头) (D) 中可

清晰看见有丝分裂图片。

[0129] 图26为直方图,显示在各种培养基中,CXCR4在正在分化的hESCs中的相对表达水平。

[0130] 图27A-D为直方图,通过与图26相同处理,显示一系列定形内胚层标志物如何具有非常相似的CXCR4表达模式。

[0131] 图28A-E为直方图,显示中胚层(BRACHYURY,MOX1)、外胚层(SOX1,ZIC1)及内脏内胚层(SOX7)标志物如何通过与图26相同处理具有相反的CXCR4表达。

[0132] 图29A-F为显微照片,显示在图26-28三种培养基条件下SOX17免疫反应性细胞的相对差异。

[0133] 图30A-C为流式细胞仪点图,证实随着加入至分化培养基中的活化素A的浓度增加,CXCR4⁺细胞数量增加。

[0134] 图31A-D为直方图,显示高剂量活化素A处理(A100-CX+)后分离的CXCR4⁺细胞的定形内胚层标志物数量较其母体细胞群(A100)更为丰富。

[0135] 图32为直方图,显示使用荧光活化细胞分选器(FACS)分离的CXCR4⁺及CXCR4⁻细胞及母体细胞群的基因表达。这证实CXCR4⁺细胞基本包括所有的在各母体细胞群上存在的CXCR4基因表达,CXCR4⁻则包括很少或不包括CXCR4基因表达。

[0136] 图33A-D为直方图,证实高剂量活化素A处理的CXCR4⁺细胞的中胚层(BRACHYURY,MOX1)、外胚层(SOX1,ZIC1)及内脏内胚层(SOX7)基因表达缺失,这些非定形内胚层标志物的表达被抑制。

[0137] 图34A-M为直方图,表明标志物基因表达模式,其可用于鉴定定形内胚层细胞。定形内胚层标志物FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1及CRIP1的表达分析分别如嵌图G-L所示。前述谱系标志基因SOX17、SOX7、SOX17/SOX7、TM、ZIC1及MOX1分别如嵌图A-F所示。嵌图M显示CXCR4的表达分析。关于嵌图A-M,标记hESC一栏显示纯化的人胚胎干细胞基因表达;2NF显示以2%FBS处理的细胞,不加活化素;0.1A100显示以0.1%FBS、100ng/ml活化素A处理的细胞;1A100显示以1%FBS、100ng/ml活化素A处理的细胞;2A100显示以2%FBS、100ng/ml活化素A处理的细胞。

[0138] 发明详述

[0139] 人早期发育的一个关键阶段,即术语原肠胚形成发生在受精2-3周后。原肠胚形成极端重要,因为在此期三个原始胚首先专一化和有序化(Lu et al., 2001; Schoenwolf and Smith, 2000)。外胚层负责身体外层及全部神经系统的形成,然而,心脏、血液、骨骼、骨骼肌及其它结缔组织均衍生于中胚层。定形内胚层定义为负责全部肠管形成的胚层,该全部的肠管包括食道、胃、小肠及大肠,以及从肠道衍生的器官,如肺、肝、胸腺、甲状腺及甲状旁腺、胆囊及胰(Grapin-Botton and Melton, 2000; Kimelman and Griffin, 2000; Tremblay et al., 2000; Wells and Melton, 1999; Wells and Melton, 2000)。定形内胚层与称为原始内胚层的完全分离的细胞系之间有着非常明显的不同。原始内胚层主要形成胚外组织,主要是胎盘卵黄囊的体壁及内脏内胚层部分及Reichert's膜的细胞外基质材料。

[0140] 在原肠胚形成过程中,定形内胚层形成过程始于细胞迁徙事件,其中,中内胚层细胞(能够形成中胚层或内胚层的细胞组分)穿过一个称做原线的结构。定形内胚层衍生于穿过原线前部及结(一个位于原线最前面部分的特定结构)的细胞。当迁徙发生时,定形内胚

层首先形成肠管的最前面部分直至形成肠管后端时结束。

[0141] 定形内胚层形成的体内分析,如Conlon et al.,1994;Feldman et al.,1998; Zhou et al.,1993;Aoki et al.,2002;Dougan et al.,2003;Tremblay et al.,2000; Vincent et al.,2003;Alexander et al.,1999;Alexander and Stainier,1999;Kikuchi et al.,2001;Hudson et al.,1997及小鼠Kanai-Azuma et al.,2002进行的斑马鱼及非洲蟾蜍的研究,这些研究为如何在培养皿中使用人胚胎干细胞完成特定胚层细胞类型的发育奠定了基础。与体外ESC培养相关的两个方面构成了在培养皿中重启发育的主要瓶颈。首先,不会产生有序的胚层或器官结构。在正在分化的hESC培养系统中,大部分胚层及器官的特异遗传标志物会以异源的形式来表达。因此,由于缺乏器官特异性界限,很难估计特异性组织或细胞类型形成。在一个具体胚层的细胞类型或组织类型中表达的几乎所有基因也在其它胚层的细胞类型或组织类型中表达。没有特异的界限,很难以1-3个基因样本赋予基因表达的特异性。因而,必须仔细检测相当多的基因,有些基因应当也可在不感兴趣器官或组织的具体细胞类型上表达。其次,基因表达类型的时机对沿特定通道发育的活动至关重要。

[0142] 至于更复杂的事件,应当指出,体外干细胞分化是相当不同步的且可能比体内要显著得多。这样,一组细胞可能在表达与原肠胚形成有关的基因时,而另一组可能正在开始最终的分化。而且,在具有或不具有外源因素参与时,处理hESC单层或胚状体(EBs)可能导致全部基因表达模式或分化状态的显著差异。因而,为了有效地沿特定的分化通道前进,根据异质细胞混合物的基因表达模式,外源因子的使用必须进行时间控制。在培养容器里考虑这些细胞的形态学关系也是有益的。与在培养基容器中成长或分化为单层和/或hESC克隆时能力相比,均一影响形成所谓胚状体时的hESCs的能力远非最理想。

[0143] 作为处理上述异质和不同步的一个有效方法,本发明的一些实施方案考虑将分化细胞的方法与富集、分离和/或纯化分化通道中的中间细胞类型的方法联合。

[0144] 本发明实施方案涉及在培养物中生成定形内胚层细胞的新的确定方法,其通过将诸如干细胞的多能细胞分化为多能定形内胚层细胞。本文使用的“多能”或“多能细胞”指能产生有限数量的其它具体细胞类型的细胞类型。如上所述,定形内胚层细胞并不分化为源于外胚层或中胚层的组织,然而,可分化为肠管及源于肠管的器官。这些方法提供了有效生成人内胚层衍生的组织,如胰、肝、肺、胃、肠及甲状腺的基础。例如,定形内胚层的生成第一步可分化干细胞为功能性的产生胰岛素的 β 细胞。为了获得有用量的产生胰岛素的 β 细胞,在达到胰岛/ β 细胞前,期望每个分化步骤都是高效的分化步骤。因为干细胞分化为定形内胚层细胞也许代表着生成功能性胰岛/ β 细胞的最初步骤(如图1所示),特别需要此步分化高效。

[0145] 鉴于分化多能细胞至定形内胚层细胞的需要,本发明一些方面涉及体外方法学,将约50-80%的多能细胞转变为定形内胚层细胞。典型地,这些方法包括已定义及暂时指定的方式使用培养物及生长因子。使用可与定形内胚层细胞特异结合的试剂,从细胞群中将定形内胚层细胞与其它细胞分离和/或纯化,可获得定形内胚层细胞群的更多富集。这样,本发明涉及定形内胚层细胞及制备分离和/或纯化这些细胞的方法。

[0146] 为了确定细胞培养物或细胞群内定形内胚层细胞的数量,需要从培养物或细胞群中区分这类细胞与其它细胞的方法。因此,本发明实施方案涉及细胞标志物,其存在、缺失

和/或相对表达水平对定形内胚层是特异的,以及检测确定这些标志物表达的方法。此处使用的“表达”指材料或物质的产生,或者材料或物质产生的水平或含量。因而,确定特异标志物的表达指检测表达的标志物的相对或绝对含量,或仅检测标志物是否存在。此处使用的“标志物”指能够被观察或检测到的任何分子。例如,标志物可包括但不局限于核酸,如特异基因的转录本、基因的多肽产物、非基因多肽产物、糖蛋白、糖、糖脂、脂质、脂蛋白或小分子。

[0147] 在本发明的一些实施方案,标志物表达的存在与否和/或其水平由定量PCR (Q-PCR) 确定。例如,一些遗传标志物产生的转录本量,例如SOX17、CXCR4、OCT4、AFP、TM、SPARC、SOX7、MIXL1、GATA4、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1、CRIP1及本文所述的其它标志物,由定量Q-PCR确定。在其它实施方案中,Q-PCR及免疫组化技术用于识别及确定这些标志物的量或相对比例。

[0148] 通过使用如上述确定的一种或多种合适的标志物表达的方法,在细胞培养物或细胞群内识别定形内胚层细胞以及确定定形内胚层细胞的比例是可能的。例如,在本发明的一些实施方案中,产生的定形内胚层细胞或细胞群表达SOX17和/或CXCR4基因的水平比非定形内胚层细胞类型或细胞群高约2个数量级。在其它实施方案中,产生的定形内胚层细胞或细胞群表达SOX17和/或CXCR4基因的水平比非定形内胚层细胞类型或细胞群高2个以上数量级。在另一些其它实施方案中,产生的定形内胚层细胞或细胞群表达一种或多种选自SOX17、CXCR4、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1及CRIP1的标志物,比非定形内胚层细胞类型或细胞群的表达高约2个或2个以上的数量级。

[0149] 本发明涉及细胞培养物,包括具有大量定形内胚层及包含富集的定形内胚层细胞的细胞群。由此,一些实施方案涉及包括定形内胚层细胞的细胞培养物,其中所述培养物中至少约50-80%的细胞为定形内胚层细胞。一个优选实施方案涉及包括人细胞的细胞培养物,其中培养物中至少约50-80%人细胞为定形内胚层细胞。由于分化方法的效果可以通过改变一些参数调节,包括但不限于细胞生长条件、生长因子浓度及培养步骤的时间,本发明所述的分化方法可使约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、或大于95%的多能细胞转化为定形内胚层。在本发明其它实施方案中,将诸如干细胞群体的多能细胞群转化为基本纯的定形内胚层细胞。

[0150] 本发明所述的组合物及方法具有几个有用的特征。例如,包括定形内胚层的细胞培养物及细胞群,以及制备这些细胞培养物及细胞群的方法可用于模建人发育的早期阶段。此外,本发明所述的组合物及方法也可用于如糖尿病的疾病的干预治疗。例如,由于定形内胚层仅为有限数量的组织来源,因而其可用于发育纯的组织或细胞类型。

[0151] 从多能细胞制备定形内胚层

[0152] 包括本文所述的定形内胚层细胞的定形内胚层细胞培养物及组合物可自如胚胎干细胞的多能细胞中制备。使用现有技术方法,人干细胞可在培养基中保持多能状态而基本不分化。所述的方法,例如,美国专利第5,670,5,690,9265,843,6,200,806及6,251,671号中公开的方法,本文全部引入,以供参考。

[0153] 在本发明所述方法的一些实施方案中,hESCs保持在滋养层。在这些实施方案中,任何能够使hESCs保持在多能状态的滋养层可用于本发明所述的方法中。一个常用的培养

人胚胎干细胞的滋养层为一层小鼠成纤维细胞。最近,人成纤维细胞滋养层也已开发出来用于培养hESCs(参见美国专利申请号2002/0072117中公开的方法,本文全部引入,以供参考)。本发明所述方法的其它实施方案允许不使用滋养层保持多能hESCs。这些方法如美国专利申请号2003/0175956所述,其公开在此全部引入,以供参考。

[0154] 本发明所述的人胚胎干细胞可以保持在具有或不具有血清的培养基中。在一些实施方案中,使用血清替代品。在其它实施方案,无血清的培养基技术,如美国专利申请号2003/0190748所述,其公开在此全部引入,以供参考。

[0155] 在培养基中保持多能状态的干细胞按照常规传代,直到分化为定形内胚层。在一些实施方案中,分化至定形内胚层的完成是通过向干细胞培养基中加入TGF β 超家族生长因子,其加入的量足以促进分化至定形内胚层。用于制备定形内胚层的TGF β 超家族生长因子选自Nodal/活化素或BMP亚群。在本发明所述分化方法的一些实施方案中,生长因子选自Nodal、活化素A、活化素B及BMP4。此外,生长因子Wnt3a及其它Wnt家族成员可用于制备定形内胚层细胞。在本发明的一些实施方案中,可以使用上述提及的任何生长因子。

[0156] 在本发明所述分化方法的一些实施方案中,向细胞中加入的上述生长因子,其在培养基中的浓度足以促进至少部分干细胞分化至定形内胚。在本发明的一些实施方案中,培养基中上述生长因子的浓度至少约5ng/ml、至少约10ng/ml、至少约25ng/ml、至少约50ng/ml、至少约75ng/ml、至少约100ng/ml、至少约200ng/ml、至少约300ng/ml、至少约400ng/ml、至少约500ng/ml、至少约1000ng/ml、至少约2000ng/ml、至少约3000ng/ml、至少约4000ng/ml、至少约5000ng/ml或大于5000ng/ml。

[0157] 在本发明一些实施方案中,上述生长因子加入培养基后需要从细胞培养物除去。例如,生长因子的除去时间约在加入后1天、约2天、约3天、约4、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天或约10天。在一个优选实施方案中,生长因子的除去时间约在加入后4天。

[0158] 定形内胚层细胞的培养可在包含少量血清或无血清的培养基中。在本发明的一些实施方案中,血清的浓度范围为约0.05%v/v至约20%v/v。例如,在一些实施方案中,培养基中血清的浓度可以低于约0.05% (v/v)、低于约0.1% (v/v)、低于约0.2% (v/v)、低于约0.3% (v/v)、低于约0.4% (v/v)、低于约0.5% (v/v)、低于约0.6% (v/v)、低于约0.7% (v/v)、低于约0.8% (v/v)、低于约0.9% (v/v)、低于约1% (v/v)、低于约2% (v/v)、低于约3% (v/v)、低于约4% (v/v)、低于约5% (v/v)、低于约6% (v/v)、低于约7% (v/v)、低于约8% (v/v)、低于约9% (v/v)、低于约10% (v/v)、低于约15% (v/v)或低于约20% (v/v)。在一些实施方案中,定形内胚层细胞在无血清下生长。在其它实施方案中,定形内胚层细胞在血清替代品存在下生长。在其它实施方案中,定形内胚层细胞在B27存在下生长。在这些实施方案中,B27添加物的浓度范围为约0.2%至约20%v/v。

[0159] hESC培养至定形内胚层可以通过确定定形内胚层的标志物特征表达监测。在一些实施方案中,一些标志物的表达可通过是否存在标志物来确定。可选择地,一些标志物的表达可通过测定标志物在细胞培养物或细胞群细胞中的水平来确定。在这些实施方案中,可以定性或定量测定标志物的表达。定量标志物基因产生的表达标志物的方法可以使用定量PCR (Q-PCR)。开展Q-PCR的方法为现有技术。现有技术的其它方法也可用于定量标志物基因的表达。例如,标志物基因产物的表达可以通过使用针对感兴趣的特异标志物基因产物的抗体来检测。在本发明的一些实施方案中,确定了具有定形内胚层的标志物特征基因的表

达,及缺乏显著表达的hESCs及其它细胞类型的标志物特征基因的表达。

[0160] 如下述实施例的进一步所述,定形内胚层的一个可靠标志物为SOX17基因。这样,本发明所述方法制备的定形内胚层细胞表达SOX17标志物基因,由此产生SOX17基因产物。其它定形内胚层的标志物为MIXL1、GATA4、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1和CRIP1。在本发明的一些实施方案中,定形内胚层细胞表达SOX17标志物基因的水平高于SOX7标志物基因的水平,其具有原始及内脏内胚层特征(参见表1)。此外,在一些实施方案中,SOX17标志物基因表达高于OCT4标志物基因的表达,其具有hESCs的特征。在本发明其它实施方案中,定形内胚层细胞表达SOX17标志物基因的水平高于AFP、SPARC或凝血调节蛋白(TM)标志物基因的水平。在本发明的一些实施方案中,根据本发明所述方法表达SOX17的定形内胚层细胞不表达显著水平或量的PDX1(PDX1-阴性)。

[0161] 定形内胚层的其它标志物为CXCR4基因。CXCR4基因编码细胞表面趋化因子受体,其配体为趋化物SDF-1。成年人中包含CXCR4受体的细胞的主要作用据信为迁移造血细胞至骨髓、运载淋巴细胞、分化各种B细胞及巨噬血细胞系[Kim, C., and Broxmeyer, H.J. Leukocyte Biol. 65, 6-15 (1999)]。CXCR4受体也起着HIV-1进入T细胞中的共受体作用[Feng, Y., et al. Science, 272, 872-877 (1996)]。在一系列[McGrath, K.E. et al. Dev. Biology 213, 442-456 (1999)]开展的研究中,描述了在成年小鼠及其早期发育中趋化因子受体CXCR4及其独特配体SDF-1的表达[Kim, C., and Broxmyer, H., J. Leukocyte Biol. 65, 6-15 (1999)]。CXCR4/SDF1在发育中的相互作用已经清楚,在转基因小鼠中,当其中任一基因破坏[Nagasaki et al. Nature, 382, 635-638 (1996)], Ma, Q., et al. Immunity, 10, 463-471 (1999)]都导致晚期胚胎死亡。McGrath等使用核糖核酸酶保护及原位杂交方法证实,在形成原肠胚的早期(E7.5),CXCR4为最丰富的趋化因子受体信使RNA。处于原肠胚阶段,CXCR4/SDF-1信号似乎主要诱导原线细胞的迁移,并表达在此时存在的定形内胚层、中胚层及外胚层上。在E7.2-7.8小鼠胚胎中,CXCR4及α胎蛋白互相排斥,显示在内脏内胚层缺乏表达[McGrath, K.E. et al. Dev. Biology 213, 442-456 (1999)]。

[0162] 在本发明的一些实施方案中,根据本发明所述方法制备的定形内胚层细胞表达CXCR4标志物基因。其它实施方案中,根据本发明所述方法制备的定形内胚层细胞表达CXCR4标志物基因及其它定形内胚层标志物,包括但不限于SOX17、MIXL1、GATA4、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1及CRIP1。在本发明一些实施方案中,定形内胚层细胞表达CXCR4标志物基因的水平高于SOX7标志物基因。此外,在一些实施方案中,CXCR4标志物基因表达高于OCT4标志物基因表达的水平。在本发明其它实施方案中,定形内胚层细胞表达CXCR4标志物基因的水平高于AFP、SPARC或凝血调节蛋白(TM)标志物基因的水平。在本发明一些实施方案中,根据本发明所述的方法制备表达CXCR4的定形内胚层细胞不表达显著水平或量的PDX1(PDX1-阴性)。

[0163] 应当理解,在内胚层细胞中CXCR4的表达并不排斥SOX17的表达。相应地,在本发明一些实施方案中,定形内胚层细胞表达SOX17和CXCR4标志物基因的水平均高于SOX7标志物基因的水平。此外,在一些实施方案中,SOX17及CXCR4标志物基因的表达均高于OCT4标志物基因的表达。在本发明的其它实施方案中,定形内胚层细胞表达SOX17及CXCR4标志物基因的水平高于AFP、SPARC或凝血调节蛋白(TM)标志物基因的水平。在本发明一些实施方案中,根据本发明所述的方法制备表达SOX17/CXCR4的定形内胚层细胞不表达显著水平或量的

PDX1 (PDX1-阴性)。

[0164] 应当理解,根据分化条件,在定形内胚层细胞内诱导不同水平范围的SOX17和/或CXCR4标志物表达。这样,在本发明一些实施方案中,SOX17标志物和/或CXCR4标志物在定形内胚层细胞或细胞群的表达比SOX17标志物和/或CXCR4标志物在诸如多能干细胞的非定形内胚层细胞或细胞群中的表达至少高约2倍至至少约10,000倍。在本发明其它实施方案中,SOX17标志物和/或CXCR4标志物在定形内胚层细胞或细胞群的表达比SOX17标志物和/或CXCR4标志物在诸如多能干细胞的非定形内胚层细胞或细胞群表达高至少约4倍、至少约6倍、至少约8倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约40倍、至少约80倍、至少约100倍、至少约150倍、至少约200倍、至少约500倍、至少约750倍、至少约1000倍、至少约2500倍、至少约5000倍、至少约7500倍或至少约10,000倍。在一些实施方案中,SOX17标志物和/或CXCR4标志物在定形内胚层细胞或细胞群的表达无限制地高于SOX17标志物和/或CXCR4标志物在诸如多能干细胞的非定形内胚层细胞或细胞群表达。

[0165] 应当理解,在本发明一些实施方案中,与在非定形内胚层细胞或细胞群中的GATA4、MIXL1、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1及CRIP1标志物的表达相比,在定形内胚层细胞或细胞群体中的GATA4、MIXL1、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1及CRIP1标志物的表达增加。

[0166] 也应当理解,在定形内胚层细胞内,SOX17标志物的表达水平与OCT4、SPARC、AFP、TM和/或SOX7标志物表达水平存在差异范围。类似地,在定形内胚层细胞内,CXCR4标志物的表达水平与OCT4、SPARC、AFP、TM和/或SOX7标志物表达水平存在差异范围。类似地,在本发明一些实施方案中,SOX17标志物或CXCR4标志物的表达比OCT4、SPARC、AFP、TM和/或SOX7标志物的表达高至少约2倍至至少约10,000倍。在本发明其它实施方案中,SOX17标志物或CXCR4标志物的表达比OCT4、SPARC、AFP、TM和/或SOX7标志物的表达高至少约4倍、至少约6倍、至少约8倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约40倍、至少约80倍、至少约100倍、至少约150倍、至少约200倍、至少约500倍、至少约750倍、至少约1000倍、至少约2500倍、至少约5000倍、至少约7500倍或至少约10,000倍。在一些实施方案中,OCT4、SPARC、AFP、TM和/或SOX7标志物在定形内胚层细胞表达不显著。

[0167] 应当理解,在本发明一些实施方案中,在定形内胚层细胞内,与OCT4、SPARC、AFP、TM和/或SOX7相比,选自GATA4、MIXL1、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1及CRIP1的标志物的表达增加。

[0168] 包括定形内胚层的组合物

[0169] 本发明一些方面涉及诸如细胞群体及细胞培养物的组合物,其包括诸如干细胞的多能细胞及定形内胚层细胞。在一些实施方案中,制备的组合物中每包括95个多能细胞就包括至少约5个定形内胚层细胞。在其它实施方案中,每包括5个多能细胞就包括至少约95个定形内胚层细胞。此外,组合物包括其它比例的定形内胚层细胞与多能细胞。例如,在组合物中,每包括1,000,000个多能细胞就包括至少约1个定形内胚层细胞、每包括100,000个多能细胞就包括至少约1个定形内胚层细胞、每包括100,000个多能细胞就包括至少约1个定形内胚层细胞、每包括10,000个多能细胞就包括至少约1个定形内胚层细胞、每包括1,000个多能细胞就包括至少约1个定形内胚层细胞、每包括500个多能细胞就包括至少约1个定形内胚层细胞、每包括100个多能细胞就包括至少约1个定形内胚层细胞、每包括10个

能细胞就包括至少约1个定形内胚层细胞、每包括5个多能细胞就包括至少约1个定形内胚层细胞、每包括2个多能细胞就包括至少约1个定形内胚层细胞、每包括1个多能细胞就包括至少约2个定形内胚层细胞、每包括1个多能细胞就包括至少约5个定形内胚层细胞、每包括1个多能细胞就包括至少约10个定形内胚层细胞、每包括1个多能细胞就包括至少约20个定形内胚层细胞、每包括1个多能细胞就包括至少约50个定形内胚层细胞、每包括1个多能细胞就包括至少约100个定形内胚层细胞、每包括1个多能细胞就包括至少约1,000个定形内胚层细胞、每包括1个多能细胞就包括至少约10,000个定形内胚层细胞、每包括1个多能细胞就包括至少约100,000个定形内胚层细胞、每包括1个多能细胞就包括至少约1,000,000个定形内胚层细胞。在本发明一些实施方案中,多能细胞为人多能干细胞。

[0170] 本发明一些方面涉及细胞培养物或细胞群,包括至少约5%定形内胚层细胞至至少约95%定形内胚层细胞。在一些实施方案中,细胞培养物或细胞群包括哺乳动物细胞。在优选实施方案中,细胞培养物或细胞群包括人细胞。例如,一些具体实施方案中涉及细胞培养物,包括人细胞,其中至少约5%至至少约95%人细胞为定形内胚层细胞。本发明其它实施方案涉及细胞培养物,包括人细胞,其中至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或大于90%的人细胞为定形内胚层细胞。

[0171] 本发明其它实施方案涉及诸如细胞培养物或细胞群体的组合物,其包括诸如人定形内胚层细胞的人细胞,其中在至少在约5%的人细胞中SOX17或CXCR4标志物的表达均大于OCT4、SPARC、 α 胎蛋白(AFP)、凝血调节蛋白(TM)和/或SOX7标志物的表达。在其它实施方案中,其中在至少在约10%的人细胞中、至少约15%的人细胞中、至少约20%的人细胞中、至少约25%的人细胞中、至少约30%的人细胞中、至少约35%的人细胞中、至少约40%的人细胞中、至少约45%的人细胞中、至少约50%的人细胞中、至少约55%的人细胞中、至少约60%的人细胞中、至少约65%的人细胞中、至少约70%的人细胞中、至少约75%的人细胞中、至少约80%的人细胞中、至少约85%的人细胞中、至少约90%的人细胞中、至少约95%人细胞中或大于95%人细胞中,SOX17或CXCR4标志物的表达均大于OCT4、SPARC、AFP、TM和/或SOX7标志物的表达。

[0172] 应当理解,本发明一些实施方案涉及诸如细胞培养物或细胞群的组合物,其包括如人定形内胚层细胞的人细胞,其中在至少约5%至大于至少约95%人细胞中,其中选自GATA4、MIXL1、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1及CRIP1的一种或多种标志物的表达高于OCT4、SPARC、AFP、TM和/或SOX7标志物的表达。

[0173] 本发明其它实施方案涉及如细胞培养物或细胞群的组合物,其包括如人定形内胚层细胞的人细胞,其中在至少约5%的人细胞中SOX17及CXCR4标志物的表达均高于OCT4、SPARC、AFP、TM和/或SOX7标志物表达。在其它实施方案中,在至少约10%人细胞中、至少约15%的人细胞中、在至少约20%人细胞中、在至少约25%人细胞中、在至少约30%人细胞中、在至少约40%人细胞中、在至少约50%人细胞中、在至少约55%人细胞中、在至少约60%人细胞中、在至少约65%人细胞中、在至少约70%人细胞中、在至少约75%人细胞中、在至少约80%人细胞中、在至少约85%人细胞中、在至少约90%人细胞中、在至少约95%人细胞中或大于95%人细胞中,SOX17及CXCR4标志物的表达均高于OCT4、SPARC、AFP、TM和/或

SOX7标志物的表达。

[0174] 应当理解,本发明一些实施方案涉及如细胞培养物或细胞群的组合物,其包括如人定形内胚层细胞的人细胞,在至少约5%至大于至少约95%人细胞中,其中GATA4、MIXL1、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1及CRIP1的标志物的表达高于OCT4、SPARC、AFP、TM和/或SOX7标志物的表达。

[0175] 本发明其它实施方案涉及诸如细胞培养物或细胞群的组合物,包括诸如人定形内胚层细胞的哺乳动物内胚层细胞,其中在至少在约5%的内胚层细胞中SOX17或CXCR4标志物的表达均大于OCT4、SPARC、 α 胎蛋白 (AFP)、凝血调节蛋白 (TM) 和/或SOX7标志物的表达。在其它实施方案中,其中在至少在约10%的内胚层细胞中、至少约15%的内胚层细胞中、至少约20%的内胚层细胞中、至少约25%的内胚层细胞中、至少约30%的内胚层细胞中、至少约35%的内胚层细胞中、至少约40%的内胚层细胞中、至少约45%的内胚层细胞中、至少约50%的内胚层细胞中、至少约55%的内胚层细胞中、至少约60%的内胚层细胞中、至少约65%的内胚层细胞中、至少约70%的内胚层细胞中、至少约75%的内胚层细胞中、至少约80%的内胚层细胞中、至少约85%的内胚层细胞中、至少约90%的内胚层细胞中、至少约95%的内胚层细胞中或大于95%的内胚层细胞中,SOX17或CXCR4标志物的表达均大于OCT4、SPARC、AFP、TM和/或SOX7标志物的表达。

[0176] 应当明白,本发明一些实施方案涉及如细胞培养物或细胞群的组合物,其包括哺乳动物内胚层细胞,其中在至少约5%至大于至少约95%所述内胚层细胞中,一种或多种选自GATA4、MIXL1、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1及CRIP1的标志物的表达高于OCT4、SPARC、AFP、TM和/或SOX7标志物的表达。

[0177] 本发明其它进一步实施方案涉及如细胞培养物或细胞群的组合物,包括诸如人定形内胚层细胞的哺乳动物内胚层细胞,其中在至少在约5%的所述内胚层细胞中SOX17及CXCR4标志物的表达均大于OCT4、SPARC、 α 胎蛋白 (AFP)、凝血调节蛋白 (TM) 和/或SOX7标志物的表达。在其它实施方案中,其中在至少约10%的内胚层细胞中、至少约15%的内胚层细胞中、至少约20%的内胚层细胞中、至少约25%的内胚层细胞中、至少约30%的内胚层细胞中、至少约35%的内胚层细胞中、至少约40%的内胚层细胞中、至少约45%的内胚层细胞中、至少约50%的内胚层细胞中、至少约55%的内胚层细胞中、至少约60%的内胚层细胞中、至少约65%的内胚层细胞中、至少约70%的内胚层细胞中、至少约75%的内胚层细胞中、至少约80%的内胚层细胞中、至少约85%的内胚层细胞中、至少约90%的内胚层细胞中、至少约95%的内胚层细胞中或大于95%的内胚层细胞中,SOX17及CXCR4标志物的表达均大于OCT4、SPARC、AFP、TM和/或SOX7标志物的表达。

[0178] 应当理解,本发明一些实施方案涉及诸如细胞培养物或细胞群的组合物,包括哺乳动物内胚层细胞,其中在至少约5%至大于至少约95%内胚层细胞中,GATA4、MIXL1、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1及CRIP1的标志物的表达高于OCT4、SPARC、AFP、TM和/或SOX7标志物的表达。

[0179] 使用本发明所述的方法,可以制备基本不含其它细胞类型的包括定形内胚层细胞的组合物。关于细胞培养物或细胞群里的细胞,术语“基本不含”指在细胞培养物或细胞群里的特定的细胞不存在、或小于细胞培养物或细胞群里总细胞数的约5%。在本发明的一些实施方案中,使用本发明所述的方法制备的定形内胚层细胞群或细胞培养物基本不含特异

显著表达OCT4、SOX7、AFP、SPARC、TM、ZIC1或BRACH标志物基因的细胞。

[0180] 在本发明一个实施方案中,基于标志物基因的表达,定形内胚层细胞的描述为SOX17高、MIXL1高、AFP低、SPARC低、凝血调节蛋白低、SOX7低、CXCR4高。

[0181] 定形内胚层的富集、分离和/或纯化

[0182] 关于本发明的其它方面,定形内胚层细胞可使用特异针对这些细胞的亲和标记来富集、分离和/或纯化。特异针对定形内胚层细胞的亲和标记的实例为抗体、配体或其它特异针对如多肽的标志物分子的结合试剂,该标志物分子存在于细胞定形内胚层细胞的表面,但基本不存在于根据本发明所述的方法制备的细胞培养基中发现的其它细胞类型中。在一些实施方案中,与CXCR4结合的抗体用于定形内胚层的富集、分离和/或纯化的亲和标记。在其它实施方案中,趋化因子SDF-1或其它基于SDF-1的分子也可用于亲和标记。这些分子包括,但不限于SDF-1片段,SDF-1融合物或SDF-1模拟物。

[0183] 制备抗体及其用于细胞分离的方法在本技术领域已知,这些方法可利用本发明所述的抗体及细胞来实施。在一个实施方案中,将结合CXCR4的抗体与磁珠结合,然后在细胞培养基中与定形内胚层细胞结合,经酶处理后降低了细胞间及与底物的粘附。将细胞/抗体/磁珠复合物暴露于移动磁场中以将磁珠结合的定形内胚层细胞与未结合的细胞分开。一旦定形内胚层细胞在培养基中与其它细胞物理分开,破坏结合的抗体,将细胞重新置于合适的组织培养基中。

[0184] 本发明实施方案考虑了其它定形内胚层细胞培养物或细胞群的富集、分离和/或纯化方法。例如,在一些实施方案中,CXCR4抗体在包含定形内胚层的细胞培养物中孵育,经处理后降低细胞间及与底物的粘附。然后将细胞洗涤、离心及再悬浮。细胞悬浮物然后再与第二抗体,如能够与第一抗体结合的FITC轭合抗体孵育。然后再将细胞洗涤、离心及再悬浮缓冲液中。随后分析细胞悬浮物,使用荧光活化细胞分选器(FACS)分选。将CXCR4⁻阴性细胞分离,收集CXCR4⁺阳性细胞,由此分离了该类型细胞。需要时,分离的细胞组合物可进一步使用替代的亲和方法或增加分选次数,使用特异针对定形内胚层的相同或不同标志物。

[0185] 在本发明其它实施方案中,使用与CXCR4结合的配体或其它分子富集、分离和/或纯化定形内胚层。在一些实施方案中,所述分子为SDF-1或其片段、融合物或其模拟物。

[0186] 在优选实施方案中,当干细胞培养物被诱导向定形内胚层系分化后,自其它非定形内胚层细胞中富集、分离和/或纯化定形内胚层细胞。应当明白,上述富集、分离和/或纯化方法可利用任何分化阶段的这种培养物。

[0187] 除上述的方法,定形内胚层细胞也可以其它细胞分离技术分离。此外,定形内胚层细胞也可以在生长条件下通过一系列再培养的方法富集或分离,该生长条件有利于所述的定形内胚层细胞选择性存活或选择性扩增。

[0188] 使用本发明所述的方法,可体外自至少经过一些分化的如干细胞培养物或细胞群的多能细胞培养物或细胞群中富集、分离和/或纯化定形内胚层细胞。在一些实施方案中,所述细胞进行随机分化。然而,在一些优选实施方案,所述细胞主要分化为定形内胚层。一些优选的富集、分离和/或纯化方法涉及体外自人胚胎干细胞制备定形内胚层。使用本发明所述的方法,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,定形内胚层中富集的细胞群或细胞培养物为至少约2倍至约1000倍。在一些实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,富集的定形内胚层至少约5倍至约500倍。在其它实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培

养物相比,富集的定形内胚层为至少约10倍至约200倍。在其它实施方案中,与未处理的细胞群或细胞培养物相比,富集的定形内胚层为至少约20倍至约100倍。在其它实施方案中,与未处理的细胞群体或细胞培养物相比,富集的定形内胚层为至少约40倍至约80倍。在某些实施方案中,与未处理的细胞群体或细胞培养物相比,富集的定形内胚层为至少约2倍至约20倍。

[0189] 已经对本发明进行了一般性描述,参考一些具体实施例可进一步理解本发明,本发明的这些实施例仅为示例性说明的目的,而非意在限制本发明。

实施例

[0190] 下述许多实施例描述了多能人细胞的使用。制备多能人细胞的方法为本领域一般技术人员熟知,大量科技出版物,包括美国专利号5,453,357、5,670,372、5,690,926、6,090,622、6,200,806及6,251,671及美国专利申请公开号2004/0229350均有描述,本文将其全部引入,作为参考。

[0191] 实施例1

[0192] 连续传代hESCyT-25100次。我们利用hESCyT-25人胚胎干细胞系作为起始材料制备定形内胚层。

[0193] 本领域一般技术人员应当明白,干细胞或其它多能细胞也可用作本发明所述的分化方法的起始材料。

[0194] 实施例2

[0195] hESCyT-25的表征

[0196] 人胚胎干细胞系hESCyT-25在培养18个月中一直保持正常的形态学、染色体组型、生长及自我更新特性。该细胞系对OCT4、SSEA-4及TRA-1-60抗原显示了强烈的免疫反应性,上述抗原都是未分化hESCs的特征,并显示其它已建立的hESC系相同的碱性磷酸酯活性与形态学。此外,当人干细胞系hESCyT-25悬浮培养时,也易于形成类胚胎体(EBs)。由于其多能本质的证明,hESCyT-25分化为代表三种主要胚层的不同细胞类型。以Q-PCR检测ZIC1及免疫细胞化学(ICC)检测巢蛋白及更多成熟的神经标志物来确证外胚层的生成。 β -III微管的免疫细胞化学染色可在伸长的细胞簇中观察到,具有早期神经元的特征。此前,我们在包含视黄酸的悬浮液中处理EBs可诱导多能干细胞分化为一种胚外系的内胚内胚层(VE)。经过54小时的处理,处理的细胞表达高水平的 α 胎蛋白(AFP)、SOX7的两个VE标志物。免疫细胞化学染色显示以单层分化的细胞表达AFP为零星的片状。如下所述,hESCyT-25细胞系也可形成定形内胚层,通过实时定量聚合酶链反应(Q-PCR)及检测SOX17、无AFP表达的免疫细胞化学确证。为了证实分化为中胚层,在几个时间点分析正在分化的EB以检测短尾(Brachyury)基因表达。在试验过程中,短尾基因表达进行性增加。如前所述,hESCyT-25系为多能的,能够形成代表三个胚层的细胞。

[0197] 实施例3

[0198] SOX17抗体的制备

[0199] 在hESC培养中识别定形内胚层的主要瓶颈为缺乏适当的工具。我们因而制备抗SOX17蛋白的抗体。

[0200] 在原肠胚形成期间形成时,标志物SOX17表达在整个定形内胚层,且其表达保持在

肠管(尽管表达水平延A-P轴有差异)直至器官开始形成。SOX17也表达在一系列胚外内胚层细胞上。这种蛋白质在中胚层或外胚层无表达。当与其它标志物结合排除胚外谱系时,现已发现SOX17为定形内胚层谱系的合适的标志物。

[0201] 如本文详述,为了制备SOX17阳性的定形内胚层细胞,将SOX17抗体用于特异检测各种处理及分化方法的效果。其它与AFP、SPARC及凝血调节蛋白反应的抗体也用于排除内脏及体壁内胚层(胚外内胚层)的生成。

[0202] 为了制备抗SOX17的抗体,根据抗体制备公司GENOVAC(Freiberg,Germany)开发的方法,与SOX17蛋白(附图2)的羧端氨基酸172-414(SEQNO:2)对应的部分人SOX17cDNA(SEQIDNO:1)用于大鼠的遗传免疫。遗传免疫的方法可见于美国专利号5,830,876、5,817,637、6,165,993及6,261,281及国际专利申请公开号WO 00/29442及W099/13915,其公开在此引入,以供参考。

[0203] 遗传免疫的其它方法也可见于非专利文献。例如,Barry等所述的根据遗传免疫制备单克隆抗体,Biotechniques 16:616-620,1994,其公开在此全部引入,以供参考。根据遗传免疫制备抗特异蛋白抗体的具体方法,例如,Costaglia等(1998)人促甲状腺素受体的遗传免疫引起甲状腺炎及制备识别自身受体的单克隆抗体,J. Immunol. 160:1458-1465; Kilpatrick等人(1998)基因枪传送的基于DNA的免疫介导了F1t-3受体的鼠单克隆抗体的快速制备,Hybridoma 17:569-576; Schmolke等人,(1998),在人血清中通过DNA免疫产生的E2-特异性单克隆抗体识别肝炎G病毒颗粒J. Virol. 72:4541-4545; Krasemann等人,(1999)使用非传统的核酸免疫策略产生针对蛋白的单克隆抗体,J. 73:119-129;及Ulivieri等人(1996)通过DNA免疫产生幽门螺杆菌空泡毒素确定部分的单克隆抗体,51:191-194,上述公开在此全部引入,以供参考。

[0204] 如图3的关系树所示,在Sox家族,SOX7及SOX18与SOX17最相近。我们利用人SOX7多肽作为阴性对照以证实SOX17抗体对SOX17是特异的,不与最相近的家族成员反应。特别是,为了证明遗传免疫产生的抗体对SOX17是特异的,将SOX7及其它蛋白表达在人成纤维细胞上,然后通过Western blot及ICC分析与SOX17抗体的总反应活性。例如,使用下述方法制备SOX17、SOX7及EGFP的表达载体,将其转染入人成纤维细胞并用Western blot来分析。用于制备SOX17、SOX7及EGFP的表达载体分别为pCMV6 (Origene Technologies, Inc., Rockville, MD)、pCMV-SPORT6 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 及pEGFP-N1 (Clonetech, Palo Alto, CA)。为制备蛋白,使用Lipofectamine 2000以超螺旋DNA瞬时转染端粒酶永生化的MDX人成纤维细胞(Invitrogen, Carlsbad, CA)。转染36小时后,收集总细胞裂解物于50mM TRIS-HCl (pH 8)、150mM NaCl、0.1% SDS、0.5% 脱氧胆酸及一些蛋白酶抑制剂(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)中。Western blot分析100μg的细胞蛋白,以SDS-PAGE在NuPAGE (4-12% 梯度聚丙烯酰胺, Invitrogen, Carlsbad, CA) 分离,通过电印迹转移至PVDF膜上(Hercules, CA),以在10mM TRIS-HCl (pH 8)、150mM NaCl、10% BSA、0.05% Tween-20 (Sigma, St. Louis, MO) 中稀释至1/1000的鼠SOX17抗血清进行探测,然后以结合碱性磷酸酯酶的抗大鼠IgG处理(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA),结果以Vector Black碱性磷酸酯酶染色显示(Vector Laboratories, Burlingame, CA)。使用的蛋白大小标准为宽范围的彩色标志物(Sigma, St. Louis, MO)。

[0205] 在图4中,将来自SOX17、SOX7或EGFP cDNA瞬时转染的人成纤维细胞的蛋白质提取

物,以SOX17抗体为探针进行Western blot。仅hSOX17转染的细胞中提取的蛋白质产生了约51Kda的带,该带与预测的人SOX17蛋白质的46Kda分子量最匹配。SOX17抗体对来自人SOX7或EGFP转染细胞的提取物不具有反应性。此外,SOX17抗体明显地标记了以hSOX17表达构建体转染的人成纤维细胞核,但不标记以EGFP单独转染的细胞。同样地,SOX17抗体显示通过ICC检测的特异性。

[0206] 实施例4

[0207] SOX17抗体作为定形内胚层标志物的确证

[0208] 根据SOX17抗体对人SOX17蛋白质具有特异性并进一步标志定形内胚层,将部分分化的hESCs与SOX17和AFP抗体共同标记。已证明了SOX17、SOX7及AFP各自表达于内脏内胚层中,SOX7为SOX基因家族F亚群密切相关的成员(图3)。然而,AFP及SOX7在定形内胚层细胞中的表达不在可被ICC检测的水平,因此,可将其用作bonifide定形内胚层细胞的阴性标志物。据显示,SOX17抗体标志细胞群体以分散的细胞群存在,或与AFP阳性细胞混合。特别是,图5A显示与AFP共同标志的少量SOX17细胞;然而,也发现了一些区域,其中在SOX17⁺细胞领域中具有少量或不具有AFP⁺细胞(图5B)。类似地,因为还报道了体壁内胚层表达SOX17,可将与SOX17共同标志的抗体与体壁标志物SPARC和/或凝血调节蛋白(TM)一起用于鉴别体壁内胚层的SOX17⁺细胞。如附图6A-C所示,通过hES细胞的随机分化产生凝血调节蛋白及SOX17共同标志的体壁内胚层细胞。

[0209] 根据上述细胞标志试验,可将定形内胚层细胞的特性通过标志物表达谱SOX17^{hi}/AFP^{lo}/[TM^{lo}或SPARC^{lo}]建立。换言之,SOX17标志物的表达高于AFP标志物及TM或SPARC标志物的表达,AFP标志物为内脏内胚层的一种特征,TM或SPARC标志物为体壁内胚层的特征。因此,那些对SOX17呈阳性而对AFP呈阴性并对TM或SPARC呈阴性的细胞为定形内胚层。

[0210] SOX17^{hi}/AFP^{lo}/TM^{lo}/SPARC^{lo}标志物表达谱的特异性可作为定形内胚层预测的进一步证据,将SOX17及AFP基因表达可定量地与抗体标记细胞的相对数量相当。如图7A所示,以视黄酸(内脏内胚层诱导物)或活化素A(定形内胚层诱导物)处理的hESCs导致了在SOX17mRNA表达水平的10倍差异。该结果反映出SOX17抗体标记的细胞数量的10倍差异(图7B)。此外,如图8A所示,与未处理相比,hESCs的活化素A处理抑制了6.8倍的AFP基因表达。在这些培养物中AFP标记的细胞数量的急剧减少从视觉上反映了这种变化,如图8B-C所示。为进一步量化,以流式细胞仪测定,证明了AFP基因表达的约7倍的减少为AFP抗体标记的细胞数量约减少7倍的结果(附图9A-B)。该结果非常重要,表明了Q-PCR中观察到的基因表达的数量变化,反映了通过抗体染色观察的细胞类型特异化典型的变化。

[0211] hESCs在Nodal家族成员(Nodal1、活化素A及活化素B-NAA)存在的条件下培养,导致SOX17抗体标志的细胞随着时间明显增加。连续以活化素处理5天,有多于50%的细胞被SOX17标记(图10A-F)。活化素处理5天后,几乎没有细胞以AFP标志。

[0212] 总之,所产生的抗人SOX17蛋白质的碳端242个氨基酸抗体,在Western blots鉴别了人SOX17蛋白质但未识别SOX7,其为最近的Sox家族的近亲。SOX17抗体识别了分化的hESC培养物中的细胞亚群,该亚群主要为SOX17⁺/AFP^{lo/-}(多于95%的标志细胞)以及少量(<5%)的SOX17、AFP共同标志的细胞(内脏内胚层)。以活化素处理hESC培养物,产生了SOX17基因表达和SOX17标记细胞的显著上升,并显著地抑制了AFP mRNA表达及以AFP抗体标记的细胞数量。

[0213] 实施例5

[0214] Q-PCR基因表达分析

[0215] 在下述试验中,实时定量RT-PCR (Q-PCR) 为用于筛查各种处理对hESC分化作用的主要方法。特别是,在多个时间点以Q-PCR实时测定基因表达,分析多个标志基因。评价期望和不期望的细胞类型的标志基因特征,以获得对细胞群体总体动力学的更好了解。Q-PCR分析的力量包括其极端灵敏以及因基因组序列易于利用而相对容易能够发展必要的标志物。此外,Q-PCR极高的灵敏度允许在较大的群体中检测相对少量细胞的基因表达。此外,检测极低水平的基因表达的能力提供了群体内的“分化倾向”的指示。在这些细胞表型的明显分化之前,其向具体分化途径的倾向性不能用免疫细胞化学技术识别。因而,Q-PCR提供了一种分析方法,该方法至少为免疫细胞活性技术的补充,并潜在地更优于免疫细胞活性技术,用于筛查分化处理成功性。此外,Q-PCR提供了一种机制,该机制通过半高通量规模上的定量分析评价分化方法是否成功。

[0216] 此处使用的方法相对定量,在Rotor Gene 3000instrument (Corbett Research) 上使用SYBR Green化学及两步RT-PCR操作。该方法允许储存cDNA样品,以分析未来的其它标志基因,因此,避免样品间反转录效率的变异性。

[0217] 若可能,设计的引物定位于外显子-外显子边界或横越至少800bp的内含子,因为这根据经验可消除污染的基因组DNA的扩增。当使用不含内含子或不具有假基因的标志基因时,进行RNA样品的DNA酶I处理。

[0218] 我们通常使用Q-PCR测定靶标和非靶标细胞类型的多个标志物的基因表达,以提供描述细胞样品基因表达的宽泛表达谱。将hESC分化早期(具体地,外胚层、中胚层、定形内胚层及胚外内胚层)相关标志物及可用的验证引物提供于下述表1中。也已证明了这些引物组的人特异性。该事实很重要,因为通常将hESCs生长于小鼠滋养层上。最常见的是,各条件取3个样品,并独立地分析两次,以评价与各种定量检测相关的生物变异性。

[0219] 为制备PCR模板,将总RNA用RNeasy (Qiagen) 分离,并用RiboGreen (Molecular Probes) 定量。用iScript反转录试剂盒 (BioRad) 完成350-500ng总RNA的反转录,该试剂盒包含寡聚dT和随机引物的混合物。随后将各20 μ L反应物稀释至100 μ L总体积,取3 μ L用于各10 μ L Q-PCR反应,该反应包含400nM正向引物和反向引物及5 μ L 2X SYBR Green master mix (Qiagen)。选用两步循环参数,在85-94°C 5秒变性(根据各引物组扩增子的熔解温度进行具体选择),然后在60°C退火/延伸45秒。在各延伸期的最后15秒期间收集荧光数据。将10倍稀释系列的三个点用于产生各轮的标准曲线,并基于该标准曲线将循环阈 (Ct' s) 转变为定量数值。将各样品的数值以看家基因表征校准,然后计算三个样品的平均及标准差。在结束PCR循环时,以熔解曲线分析确定反应的特异性。将单一特异产物显示在对PCR扩增子合适的T_m单一峰处。此外,将不具有反转录酶的反应作为阴性对照,不扩增。

[0220] 在建立Q-PCR方法学中的第一步为确定试验体系中合适的看家基因 (HGs)。由于HG用于样品间RNA输入、RNA完整性及RT效率校准,为使校准有意义,HG在所有样品类型中随时间恒定表达水平是有价值的。我们测定了在分化hESCs中Cyclophilin G、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1 (HPRT)、 β -2-微球蛋白 (microglobulin)、hydroxymethylbiane合成酶 (HMBS)、TATA-结合蛋白 (TBP) 及glucuronidase β (GUS) 的表达水平。我们的结果显示了 β -2-微球蛋白表达水平在分化过程中提高,因此,我们排除了将该基因用于校准。其它基因表达水平与

随时间和整个处理过程一致。我们通常同时使用Cyclophilin G及GUS来计算所有样品的校准系数。同时使用多个HGs减少校准过程固有的变异,增加相对基因表达值的可靠性。

[0221] 在获得用于校准的基因后,将Q-PCR用于检测接受不同试验处理后样品,确定许多标志基因的相对基因表达水平。选择使用的标志基因是在早期胚层的代表性特异群体中富集,特别是在定形内胚层和胚外内胚层中有差别表达的多组基因。将这些基因及其相关富集特征突出显示于表1中。

[0222] 表1

[0223]

胚层	基因	表达结构域
内胚层	SOX17	定形、内脏及体壁内胚层
	MIXL1	内胚层和中胚层
	GATA4	定形及原始内胚层
	HNF3b	定形内胚层和原始内胚层、中胚层、神经板
胚外	GSC	内胚层和中胚层
	SOX7	内脏内胚层
	AFP	内脏内胚层、肝
	SPARC	体壁内胚层
外胚层	TM	体壁内胚层/滋养外胚层
	ZIC1	神经管、神经系统前体
中胚层	BRACH	初生中胚层

[0224] 因为许多基因在不只一个胚层中表达,在同一试验中定量比较许多基因的表达水平是有用的。SOX17在定形内胚层中表达,在内脏及体壁内胚层中较小程度地表达。SOX7和AFP在内脏内胚层中在早期的发育时间点表达。SPARC和TM在体壁内胚层中表达,以及Brachyury在早期中胚层中表达。

[0225] 预测定形内胚层细胞高水平表达SOX17mRNA,低水平表达AFP和SOX7(内脏内胚层)、SPARC(体壁内胚层)和Brachyury(中胚层)。此外,本发明将ZIC1用于进一步排除早期外胚层的诱导。最后,GATA4和HNF3b同时在定形及胚外内胚层中表达,因此,与SOX17在定形内胚层中的表达相关(表1)。代表性试验显示于图11-14中,证实了表1所述的标志物基因如何与各样本彼此相关,因而强调了定形内胚层、胚外内胚层、中胚层以及神经细胞类型的特异分化模式。

[0226] 上述数据清晰表明了活化素剂量增加,导致的SOX17基因表达增加。进一步地,该SOX17表达主要代表定形内胚层,而不是相反的胚外内胚层。观察的结论为,SOX17基因表达

与AFP、SOX7及SPARC反相关。

[0227] 实施例6

[0228] 人ES细胞定向分化为定形内胚层

[0229] 若人ES细胞培养物在不主动地保持其未分化状态下培养,该培养物将随机分化。不同的分化导致形成胚外内胚层细胞,其包括体壁及内脏内胚层(AFP、SPARC及SOX7表达)两者,以及以ZIC1、Nestin(外胚层)及Brachyury(中胚层)的表达为标志的外胚层、中胚层衍生物。在ES细胞培养物中,由于缺乏特异抗体标志物,定形内胚层细胞外观未经传统方法检测或确定。同样地,由于缺乏手段,从ES细胞的培养物中产生早期定形内胚层未经仔细研究。由于无良好的、可用的定形内胚层细胞的抗体试剂,绝大多数确证集中在外胚层及胚外内胚层。总之,在随机的分化ES细胞培养物中,与SOX17^{hi}定形内胚层细胞相比,有显著大量的胚外及神经外胚层细胞类型产生。

[0230] 当将未分化的hESC克隆在成纤维细胞滋养物扩充时,克隆的边缘呈现出与克隆内部细胞不同的形态学特征。许多边缘细胞能以其较大的不均一的细胞体型及OCT4的高水平表达来区分。已有描述,当ES细胞开始分化时,它们表达OCT4的水平相对于未分化ES细胞的水平呈上下改变。相对于未分化细胞的OCT4阈值水平,上下改变显示离开多能状态的初始分化状态。

[0231] 当未分化的克隆以SOX17免疫细胞化学检测时,在未分化ES克隆的四周及连接处偶尔可随机检测到SOX17阳性细胞的10-15个细胞组成的小簇。如上所述,当克隆体积扩增以致变得拥挤时,克隆外缘分布的袋状似乎是从经典的ESC形态分化的第一批细胞。在克隆的内部及边缘的年龄较小、体积较小的未分化克隆(<1mm;4-5天大小)无SOX17阳性细胞,然而在一些克隆的周边及边缘以内的年龄较大、体积较大克隆(1-2mm直径,>5天大小)含有零星的、游离的片状SOX17阳性、AFP阴性细胞,如上所述,其从经典的hESC形态分化而来。鉴于这为有效的SOX17抗体的首次开发,在该早期“未分化”ES培养物中生成的定形内胚层细胞此前尚未证实。

[0232] 基于Q-PCR测定的SOX17及SPARC基因表达水平的负相关,绝大多数SOX17阳性、AFP阴性细胞将对抗体共标记的体壁标志物呈阴性。如图15A-B所示,在表达TM的体壁内胚层细胞得到特异证实。与Nodal1因子活化素A及B接触导致TM表达强度及TM阳性细胞的数目的剧降。在活化素处理的培养基上,通过使用SOX17、AFP及TM抗体的三重标记,观察到对AFP及TM也呈阴性的SOX17阳性细胞(图16A-D)。这些都是在分化ES的培养物上首次细胞证实SOX17阳性定形内胚层细胞(图16A-D及17)。

[0233] 使用上述的SOX17抗体及Q-PCR工具,我们已经开发一系列能够有效程序化ESCs变为SOX17^{hi}/AFP^{lo}/SPARC/TM^{lo}定形内胚层细胞的方法。我们应用了一系列的旨在增加这些细胞数量及增殖能力的分化方法,在群体水平上使用Q-PCR检测SOX17基因表达,在个体细胞上使用SOX17蛋白抗体标记。

[0234] 我们首次分析并描述了TGF β 家族生长因子,如Nodal1/活化素/BMP,用于自体外细胞培养的胚胎干细胞中创建定形内胚层细胞的效果。在典型的试验中,我们将活化素A、活化素B、BMP或其组合加入至未分化的人干细胞系hESCYT-25培养物中开始分化过程。

[0235] 如图19所示,加入100ng/ml浓度的活化素A分化4天,与未分化的hESCs相比,诱导了19倍SOX17基因表达。与活化素A一起加入活化素家族的第二个成员活化素B通过4天的组

合活化素处理,与未分化的hESCs相比,诱导了37倍SOX17基因表达。与活化素A及活化素B一同加入TGF β 家族Nodal/活化素及BMP亚群的第三个成员BMP4,与未分化的hESCs相比,诱导了57倍SOX17基因表达(图19)。当以活化素及BMP诱导SOX17时,与不加因子的培养物对照相比,分化4天导致5-,10-及15-倍的诱导。通过5天活化素A、B及BMP的三重处理,SOX17诱导的倍数比hESCs高70倍以上。这些数据显示,以Nodal/活化素TGF β 家族成员较高剂量、较长的处理时间引起SOX17表达增加。

[0236] Nodal及相关活化素A、B及BMP分子促进SOX17的表达、定形内胚层体内体外的形成。此外,加入BMP引起SOX17诱导升高,可能是通过Nodal共受体Cripto的进一步诱导。

[0237] 我们已经证实联合使用活化素A、B及BMP4引起SOX17诱导的增加及进而的定形内胚层形成。与活化素A及B组合,长期加入BMP4(>4天)可诱导体壁及内脏内胚层及定形内胚层的SOX17增加。因此,在本发明的一些实施方案中,在加入处理的4天内除去BMP4是重要的。

[0238] 为了在单细胞水平上确定TGF β 因子处理的效果,使用SOX17抗体标记检测加入一个时程的TGF β 因子的效果。如前图10A-F所示,随着时间进行,SOX17标记的细胞的相对数量出现剧增。相对定量(图20)显示SOX17-标记的细胞增加20倍以上。该结果表明,与TGF β 因子暴露的时间增加,细胞数量及基因表达水平平均增加。如图21所示,与Nodal、活化素A、活化素B及BMP4接触4天后,SOX17诱导的水平比未分化的hESCs高168倍。图22表明SOX17阳性细胞的数量也呈剂量依赖性。100ng/mL或更高剂量的活化素A能够强有力地诱导SOX17的基因表达及细胞数量增加。

[0239] 除TGF β 家族成员,Wnt家族分子可能在定形内胚层特异性和/或保持上起作用。与单用活化素相比,使用活化素+Wnt3a的样本SOX17基因表达增加,表明Wnt分子对hESCs分化为定形内胚层也有益(图23)。

[0240] 上述所有试验均在含10%血清及添加因子的组织培养基中进行。令人吃惊的是,我们发现在添加的活化素存在下,血清浓度对SOX17表达水平有作用,如图24A-C所示。当血清水平由10%降至2%时,在活化素A及B的存在下,SOX17的表达增加3倍。

[0241] 最后,我们证实活化素诱导SOX17 $^+$ 细胞在培养物中分裂,如图25A-D所示。箭头显示以SOX17/PCNA/DAPI标记的细胞处于有丝分裂期,证据是PCNA/DAPI-标记的有丝分裂板模式及时相差有丝分裂特征。

[0242] 实施例7

[0243] 趋化因子受体4(CXCR4)的表达与定形内胚层标志物相关、而与中胚层、外胚层或内脏内胚层标志物不相关

[0244] 如上所述,通过使用TGF β 家族及更特异的活化素/nodal亚族的细胞因子,ESCs可被诱导分化至定形内胚层胚层。此外,我们已经表明胎牛血清(FBS)在分化培养基中的比例影响定形内胚层自ESCs分化的效率。该效果为,在培养基中既定的活化素A浓度的条件下,较高水平的FBS将抑制其最大分化至定形内胚层胚层。缺乏外源活化素A时,ESCs分化至定形内胚层谱系的效率极低,且FBS浓度对ESCs的分化过程有较弱的效果。

[0245] 在这些试验中,hESCs的分化是在RPMI培养基(Invitrogen,Carlsbad,CA;cat#61870-036)中生长6天,该培养基补充有0.5%、2.0%或10%FBS,包含或不含100ng/mL活化素A。此外,在分化的前三天,0.5%-2.0%的梯度FBS也与100ng/mL活化素A联合使用。6天

后,自各培养条件中收集复制物样本,以实时定量PCR分析相对基因表达。将剩余细胞混合,以免疫荧光检测SOX17蛋白。

[0246] 在使用的7个培养条件下,CXCR4的表达水平差异巨大(图26)。一般地,CXCR4表达在活化素A处理的培养基(A100)中高,而在无外源活化素A(NF)的培养基中低。此外,在A100处理的培养基中,当FBS浓度最低时,CXCR4表达最高。在10%FBS条件下,CXCR4水平显著降低,以致相对表达更吻合无活化素A(NF)的条件。

[0247] 如上所述,SOX17、GSC、MIXL1、及HNF3 β 基因的表达与定形内胚层细胞的特征相一致。这4个基因在7个分化条件下的相对表达影射了CXCR4(图27A-D)的表达。这也证实了CXCR4也为一种定形内胚层标志物。

[0248] 外胚层及中胚层谱系可通过其表达的各种标志物与定形内胚层区分开。早期中胚层表达Brachyury及MOX1基因,然而,初生神经外胚层表达SOX1及ZIC1。图28A-D证实无外源活化素A的培养物有利于中胚层及外胚层基因表达,在活化素处理的培养物中,10%FBS条件也增加了中胚层及外胚层标志物表达的水平。这些表达模式与CXCR4模式相反,显示在该发育时程,CXCR4并不高表达于衍生于ESCs中胚层或外胚层中。

[0249] 在哺乳动物发育早期,也发生了分化至胚外谱系。内脏内胚层的分化在此具有特异的相关性,其与定形内胚层共同的许多基因,包括SOX17具有相同的表达。为了将定形内胚层与胚外内脏内胚层区分,应当检测两者不同的标志物。SOX7代表表达在内脏内胚层,而不是定形内胚层谱系的标志物。因而,在无SOX7表达的条件下,显示强SOX17基因表达的培养物条件可能包括定形内胚层,而非内脏内胚层。如图28E所示,SOX7在无活化素A培养基中高表达,SOX7甚至在活化素A存在的条件下,当FBS包括10%时,也表达增加。该模式与CXCR4表达模式相反,表明CXCR4在内脏内胚层不高表达。

[0250] 还检测了上述各分化条件下SOX17免疫活性(SOX17 $^+$)细胞的相对数量。当hESCs在高剂量活化素A及低FBS浓度(0.5%-2.0%)下分化时,SOX17 $^+$ 细胞在培养物中普遍分布。当使用高剂量活化素A,而FBS浓度为10% (v/v)时,SOX17 $^+$ 细胞出现的频率降低,经常以孤立的簇出现,而不是均匀分布在培养物中(图29A、C、B及E)。当无外源活化素A使用时,发现SOX17 $^+$ 细胞进一步降低。在这些条件下,SOX17 $^+$ 细胞也以簇状出现,但这些簇较小且较高活化素A、低FBS处理时少(图29C及F)。这些结果表明,CXCR4表达模式不仅在各种条件下符合定形内胚层基因表达,而且符合定形内胚层细胞的数量。

[0251] 实施例8

[0252] 富集定形内胚层的分化条件增加CXCR4阳性细胞的比例

[0253] 活化素A的剂量也影响了定形内胚层从ESCs衍生的效率。本实施例增加活化素A的剂量增加了CXCR4 $^+$ 细胞在培养物中的比例。

[0254] 将hESCs在添加了0.5%-2%FBS(在分化的前3天,逐渐由0.5%增加至1.0%,再至2.0%)及0、10或100ng/mL活化素A的RPMI培养基中分化。分化7天后,将细胞在不含Ca $^{2+}$ /Mg $^{2+}$ 、包含2%FBS及2mM(EDTA)的PBS中室温解离5分钟。以35 μ m尼龙滤器过滤细胞、计数及沉淀。将沉淀再悬浮于50%人血清/50%正常驴血清,在冰上孵育2分钟阻断非特异抗体结合位点。向每50 μ L(包含约10 5 个细胞)悬液加入1 μ L小鼠抗CXCR4抗体(Abcam, cat#ab10403-100),再在冰上标记45分钟。加入5mL包含2%人血清(缓冲液)的PBS洗涤细胞、沉淀。再以5mL缓冲液洗涤一次后,将细胞再以50 μ L缓冲液/10 5 细胞浓度悬浮。加入终浓度为5 μ g/mL的

第二抗体(结合的FITC驴抗小鼠抗体;Jackson Immuno Research,cat#715-096-151),标记30分钟后再以上述缓冲液洗涤2次。将细胞再以 5×10^6 细胞/mL悬浮于缓冲液中,由流式细胞仪设备操作人员(The Scripps Research Institute)使用FACS Vantage(Beckton Dickenson)分析、分选。将细胞直接收集于RLT裂解缓冲液(Qiagen)供随后的总RNA分离,再以实时定量PCR进行基因表达分析。

[0255] 当活化素A在分化培养基中的剂量(图30A-C)增加时,可观察到流式细胞仪测定的CXCR4⁺细胞也剧增(图30A-C)。CXCR4⁺细胞落入R4门,该门仅使用第二抗体作为对照,R4门中存在0.2%的该对照事件。当活化素A的剂量增加时,CXCR4⁺细胞数量的剧增与定形内胚层基因表达明显增加相关(图31A-D)。

[0256] 实施例9

[0257] 富集分离CXCR4阳性细胞供定形内胚层基因表达、除去表达中胚层、外胚层及内脏内胚层标志物的细胞

[0258] 收集上述实施例8识别的CXCR4⁺及CXCR4⁻细胞,分析了其相对基因表达,同时测定了母体细胞群的基因表达。

[0259] 当活化素A的剂量增加时,CXCR4⁺基因表达的相对水平剧增(图32)。这与活化素A剂量依赖性增加CXCR4⁺细胞相关良好(图30A-C)。也很明显,从各细胞群分离出CXCR4⁺细胞占据了该细胞群中几乎所有的CXCR4基因表达细胞。这证实了FACS方法收集这些细胞方法的效率。基因表达分析表明,CXCR4⁺细胞不仅包括大部分CXCR4基因表达,而且也包括其它定形内胚层标志物的基因表达。如图31A-D所示,进一步从SOX17、GSC、HNF3B、及MIXL1的母体A100细胞群富集CXCR4⁺细胞。此外,CXCR4⁻部分包括极少的这些定形内胚层标志物基因表达。而且,CXCR4⁺及CXCR4⁻细胞群显示了中胚层、外胚层及胚外内胚层标志物基因表达相反模式。图33A-D表明,相对于A100母体细胞群,除去CXCR4⁺细胞以进行Brachyury、MOX1、ZIC1及SOX7基因表达。相对于低或无活化素A的条件,该A100母体细胞群表达这些标志物已经很低。这些结果表明,高剂量活化素A存在分化条件下自hESCs中分离的CXCR4⁺细胞获得高度富集的基本纯的定形内胚层细胞。

[0260] 实施例10

[0261] 使用CXCR4定量细胞群体中的定形内胚层细胞

[0262] 为了确定细胞培养物或细胞群中定形内胚层细胞的比例定量,根据前述方法或于2003年12月23日提交的美国临时专利申请第60/532,004号,题目为“定形内胚层”所述的方法,其公开在此全部引入以供参考,以FACS分析表达CXCR4及其它定形内胚层标志物的细胞。

[0263] 使用诸如上述实施例所述的方法,将hESCs分化产生定形内胚层。特别是,增加表达在分化细胞培养物的产率及纯度,培养基中血清浓度严格控制如下:第一天0.2%FBS、第二天1.0%FBS及第3-6天2.0%FBS。以FACS使用三种细胞表面抗原决定簇E-钙粘蛋白(Cadherin)、CXCR4及凝血调节蛋白分选分化的培养物。然后以Q-PCR分析分选细胞群以确定定形内胚层、胚外内胚层及其它细胞类型的标志物相对表达水平。从最佳分化培养物获得的CXCR4分选细胞产生了>98%纯度的定形内胚层细胞的分离。

[0264] 表2显示了使用本发明所述的方法自hESCs分化的定形内胚层培养物标志物分析的结果

[0265] 表2

[0266] 定形内胚层培养物的成分

标志物	%培养物	%定形内胚层	%胚外内胚层	%hES 细胞
SOX17	70-80	100		
[0267] 凝血调节蛋白	<2	0	75	
AFP	<1	0	25	
CXCR4	70-80	100	0	
ECAD	10	0		100
[0268] 其它(ECAD 阴性)	10-20			
总计	100	100	100	100

[0269] 特别是,表2显示CXCR4及SOX17阳性细胞(内胚层)包括70%-80%的细胞培养物中的细胞。在这些表达SOX17的细胞中,低于2%表达TM(体壁内胚层),低于1%表达AFP(内脏内胚层)。当从SOX17/CXCR4阳性细胞比例中减去TM阳性及AFP阳性细胞(体壁及内脏内胚层组合;总计3%),可发现约67%-77%细胞培养物为定形内胚层。大约10%的细胞为E-钙粘蛋白(ECAD)阳性,其为hESCs标志物,约10-20%的细胞为其它细胞类型。

[0270] 我们也发现,与前述的在整个5-6天的分化操作中将FBS浓度保持在<0.5%的低血清方法相比,在FACS分离前分化细胞培养物中的定形内胚层的纯度可提高。然而,在整个5-6天的分化操作中将细胞培养物浓度保持在<0.5%,也导致了产生的定形内胚层细胞总的数量减少。

[0271] 根据本发明所述的方法制备的定形内胚层细胞在活化素存在下的培养物中保持扩增50天以上而无明显分化。在这些情况下,培养期间保持SOX17、CXCR4、MIXL1、GATA4、HNF3 β 的表达。此外,在这些培养物中未检测到TM、SPARC、OCT4、AFP、SOX7、ZIC1及BRACH。将定形内胚层细胞在活化素存在下的培养物中保持扩增基本上50天以上而无明显分化是可能的。

[0272] 实施例11

[0273] 定形内胚层细胞的其它标志物

[0274] 在下述试验中,RNA分离自纯化的定形内胚层及人胚胎干细胞群。然后以基因芯片分析来自每一纯化细胞群的RNA。采用Q-PCR进一步考察定形内胚层而非胚胎干细胞表达的基因作为定形内胚层标志物的潜力。

[0275] 将人胚胎干细胞(hESCs)保持在DMEM/F12培养基中,该培养基补充了20% KnockOut血清替代品、4ng/mL重组人基础成纤维生长因子(bFGF)、0.1mM 2-巯基乙醇、L-谷氨酸、非必需氨基酸及青霉素/链霉素。将hESCs在RPMI培养基中培养5天分化至定形内胚层,该培养基补充了100ng/mL重组人活化素A、胎牛血清(FBS)及青霉素/链霉素。FBS每天的浓度变化为:0.1% (第一天)、0.2% (第二天) 及2% (第3-5天)。

[0276] 为获得细胞hESCs及定形内胚层纯的群体进行基因表达分析,以荧光活化细胞分选(FACS)分离。使用SSEA4抗原(R&D Systems, cat#FAB1435P)免疫纯化hESCs,使用CXCR4

(R&D Systems, cat#FAB170P) 纯化定形内胚层。细胞解离使用胰蛋白酶/EDTA (Invitrogen, cat#25300-054)、以含2%人血清的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,重新悬浮于100%人血清中并置于冰上10分钟阻断非特异性结合。将200 μ L的结合藻红蛋白的抗体加入800 μ L的人血清中的5 \times 10⁶细胞中,在冰上染色30分钟。以8mL PBS缓冲液洗涤细胞两次,再悬浮于1mL PBS中。FACS分离以Scripps研究所的核心设备,使用FACS Vantage (BD Biosciences) 进行。将细胞直接收集于RLT裂解缓冲液,根据操作说明 (Qiagen) 以RNeasy分离RNA。

[0277] 将纯化的RNA送样两次 (Durham, NC), 使用Affymetrix平台的U133Plus2.0高密度寡核苷酸阵列生成表达特征数据产生表达谱数据。呈现的数据是一组比较, 鉴别hESCs与定形内胚层两个细胞群差异表达的基因。将表达水平与hESCs发现的基因水平相比强烈升高变化的基因选作新的候选标志物, 其具有高度的定形内胚层特征。根据所述的方法使用Q-PCR测定选定的基因, 以验证基因芯片上发现的基因表达变化, 并考察hESC分化时程间的这些基因的表达模式。

[0278] 图34A-M显示一些标志物基因表达结果。加入100ng/ml活化素A后,于第1、3及5天分析细胞培养物,显示分化操作 (CXDE) 5天结束后表达CXCR4的定形内胚层细胞及人胚胎干细胞 (HESC) 的结果。图34C及G-M比较表明六个标志物基因FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1及CRIP1, 显示彼此几乎完全相同的表达模式, 其也完全与CXCR4及SOX17/SOX7表达模式相同。如上所述, SOX17在定形内胚层及表达SOX7的胚外内胚层两者中均表达。由于SOX7在定形内胚层不表达, SOX17/SOX7的比值可靠的估计了整个群体所表明的定形内胚层中SOX17表达的贡献。嵌图G-L及M与嵌图C的相似性显示FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1及CRIP1可能为定形内胚层的标志物, 且表明了其在胚外内胚层细胞中表达不显著。

[0279] 应当理解, 本文所述Q-PCR结果可进一步以ICC确证。

[0280] 本发明所述的方法、组合物及设备是优选实施方案的代表, 是示例性的, 不能视为对本发明范围的限制。本领域技术人员可对其作出变化及作其它应用, 这包含在本发明的精神中并由公开的范围来定义。因此, 很明显, 本领域技术人员在不偏离本发明范围及精神下, 可对本文公开的发明作出替换及变动。

[0281] 如下述权利要求及全部公开所述, 短语“基本上由……组成”指包括短语后所列的任何成分, 并限于那些对公开中说明的活性或作用不干扰或无贡献的其它成分。因而, 短语“基本上由……组成”表明列出的成分是需要的或必需的, 但是其它成分任选, 视是否影响列出成分的活性或作用选用或不用。

[0282] 参考文献

[0283] 在本发明中引用大量的文献及专利参考, 本发明引用的各参考文献在此全部引人, 以供参考。

[0284] 一些参考已经在正文中完整引用。正文中引用的一些其它仅按照作者及年引用的参考文献, 其完整引用如下:

[0285] Alexander, J., Rothenberg, M., Henry, G. L. 及 Stainier, D. Y. (1999). Casanova plays an early and essential role in endoderm formation in zebrafish (Casanova在斑马鱼内胚层形成中起着早期的基本作用). Dev Biol 215, 343-357.

[0286] Alexander, J. 及 Stainier, D. Y. (1999). A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish (引起斑马鱼内胚层形成的分子通道). Curr Biol 9,

1147-1157.

[0287] Aoki, T.O., Mathieu, J., Saint-Etienne, L., Rebagliati, M.R., Peyrieras, N. 及 Rosa, F.M. (2002) . Regulation of nodal signalling and mesendoderm formation by TARAM-A, a TGFbeta-related type I receptor (以TARAM-A,一种TGF beta相关的I型受体调节nodal信号系统及中内胚层形成) . Dev Biol 241, 273-288.

[0288] Beck, S., Le Good, J.A., Guzman, M., Ben Haim, N., Roy, K., Beermann, F. 及 Constam, D.B. (2002) . Extra-embryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation (在原肠胚形成过程中调节Nodal信号的胚外蛋白酶) . Nat Cell Biol 4, 981-985.

[0289] Beddington, R.S., Rashbass, P. 及 Wilson, V. (1992) . Brachyury--a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis (Brachyury--影响小鼠原肠胚形成及早期器官发生的基因) . Dev Suppl, 157-165.

[0290] Bongso, A., Fong, C.Y., Ng, S.C. 及 Ratnam, S. (1994) . Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts (人胚泡内细胞团的分离和培养) . Hum Reprod 9, 2110-2117) .

[0291] Chang, H., Brown, C.W. 及 Matzuk, M.M. (2002) . Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily (哺乳动物转化生长因子-β超家族的遗传分析) . Endocr Rev 23, 787-823.

[0292] Conlon, F.L., Lyons, K.M., Takaesu, N., Barth, K.S., Kispert, A., Herrmann, B. 及 Robertson, E.J. (1994) . A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse (形成及保持小鼠原线对nodal的首要要求) . Development 120, 1919-1928.

[0293] Dougan, S.T., Warga, R.M., Kane, D.A., Schier, A.F. 及 Talbot, W.S. (2003) . The role of the zebrafish nodal-related genes squint and cyclops in patterning of mesendoderm (斑马鱼nodal相关基因squint及cyclops在确定中内胚层模式中的作用) . Development 130, 1837-1851.

[0294] Feldman, B., Gates, M.A., Egan, E.S., Dougan, S.T., Rennebeck, G., Sirotkin, H.I., Schier, A.F. 及 Talbot, W.S. (1998) . Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals (斑马鱼形成体发育及胚层形成需要nodal相关的信号) . Nature 395, 181-185.

[0295] Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E. 及 Berger, E.A. (1996) . HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor (HIV-1进入共因子:七次跨膜的G蛋白偶联受体的功能性cDNA克隆) . Science 272, 872-877.

[0296] Futaki, S., Hayashi, Y., Yamashita, M., Yagi, K., Bono, H., Hayashizaki, Y., Okazaki, Y. 及 Sekiguchi, K. (2003) . Molecular basis of constitutive production of basement membrane components: Gene expression profiles of engelbreth-holm-swarm tumor and F9embryonal carcinoma cells (基底膜成分的构成产物的分子基础: engelbreth-holm-swarm肿瘤及F9胚胎肿瘤细胞基因表达特征) . J Biol Chem.

- [0297] Grapin-Botton, A. 及 Melton, D.A. (2000) . Endoderm development: from patterning to organogenesis (内胚层发育: 从模式化到器官发生) . Trends Genet 16, 124–130.
- [0298] Harris, T.M. 及 Childs, G. (2002) . Global gene expression patterns during differentiation of F9embryonal carcinoma cells into parietal endoderm (在F9胚胎肿瘤细胞分化为体壁内胚层过程中的全基因表达模式) . Funct Integr Genomics 2, 105–119.
- [0299] Hogan, B.L. (1996) . Bone morphogenetic proteins in development (发育中的骨形态蛋白) . Curr Opin Genet Dev 6, 432–438.
- [0300] Hogan, B.L. (1997) . Pluripotent embryonic cells and methods of making same (多能胚胎细胞及其复制方法) (U.S.A., Vanderbilt University) .
- [0301] Howe, C.C., Overton, G.C., Sawicki, J., Solter, D., Stein, P. 及 Strickland, S. (1988) . Expression of SPARC/osteonectin transcript in murine embryos and gonads (在鼠胚胎及性腺中SPARC/骨结合素转录的表达) . Differentiation 37, 20–25.
- [0302] Hudson, C., Clements, D., Friday, R.V., Stott, D. 及 Woodland, H.R. (1997) . Xsox17alpha and-beta mediate endoderm formation in Xenopus (Xsox17 α 及 β 介导非洲蟾蜍内胚层的形成) . Cell 91, 397–405.
- [0303] Imada, M., Imada, S., Iwasaki, H., Kume, A., Yamaguchi, H. 及 Moore, E.E. (1987) . Fetomodulin: marker surface protein of fetal development which is modulatable by cyclic AMP (胎儿调节素: 周期AMP模拟的胎发育的标志物表面蛋白) . Dev Biol 122, 483–491.
- [0304] Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Gad, J.M., Tajima, Y., Taya, C., Kurohmaru, M., Sanai, Y., Yonekawa, H., Yazaki, K., Tam, P.P. 及 Hayashi, Y. (2002) . Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice (缺失Sox17的变异小鼠定形肠内胚层的缺失) . Development 129, 2367–2379.
- [0305] Katoh, M. (2002) . Expression of human SOX7 in normal tissues and tumors (正常组织及肿瘤的人SOX7的表达) . Int J Mol Med 9, 363–368.
- [0306] Kikuchi, Y., Agathon, A., Alexander, J., Thisse, C., Waldron, S., Yelon, D., Thisse, B. 及 Stainier, D.Y. (2001) . casanova encodes a novel Sox-related protein necessary and sufficient for early endoderm formation in zebrafish (casanova编码斑马鱼早期内胚层形成充分必要的一种新的Sox相关蛋白) . Genes Dev 15, 1493–1505.
- [0307] Kim, C.H. 及 Broxmeyer, H.E. (1999) . Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function (趋化因子: 运输具有发育及效应器功能的T及B细胞的信号灯) . J Leukoc Biol 65, 6–15.
- [0308] Kimelman, D. 及 Griffin, K.J. (2000) . Vertebrate mesendoderm induction and patterning (脊柱中内胚层诱导及模式化) . Curr Opin Genet Dev 10, 350–356.
- [0309] Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM, Kouskoff V, Kennedy M, Woo S, Fehling HJ, Keller G. (2004) Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture (培养物胚胎干细胞定形内胚层的发育) . Development 131, 1651–62.

- [0310] Kumar, A., Novoselov, V., Celeste, A.J., Wolfman, N.M., ten Dijke, P. 及 Kuehn, M.R. (2001). Nodal signaling uses activin and transforming growth factor-beta receptor-regulated Smads (Nodal信号传导使用活化素及转化生长因子-β受体调节的Smads). *J Biol Chem* 276, 656-661.
- [0311] Labosky, P.A., Barlow, D.P. 及 Hogan, B.L. (1994a). Embryonic germ cell lines and their derivation from mouse primordial germ cells (胚胎生殖细胞系及其自小鼠多能生殖细胞衍生). *Ciba Found Symp* 182, 157-168; discussion 168-178.
- [0312] Labosky, P.A., Barlow, D.P. 及 Hogan, B.L. (1994b). Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines (小鼠胚胎生殖(EG)细胞系:种系的传递及与胚胎干(ES)细胞系相比胰岛素样生长因子2受体(Igf2r)基因甲基化印迹的差异). *Development* 120, 3197-3204.
- [0313] Lickert, H., Kutsch, S., Kanzler, B., Tamai, Y., Taketo, M.M. 及 Kemler, R. (2002). Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm (敲除胚胎内胚层β-连环蛋白小鼠的多心脏的形成). *Dev Cell* 3, 171-181.
- [0314] Lu, C.C., Brennan, J. 及 Robertson, E.J. (2001). From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo (从受精到原肠胚形成:小鼠胚胎轴线形成). *Curr Opin Genet Dev* 11, 384-392.
- [0315] Ma, Q., Jones, D. 及 Springer, T.A. (1999). The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment (趋化因子受体CXCR4需要在骨髓微环境中保留B谱系及粒细胞前体). *Immunity* 10, 463-471.
- [0316] McGrath KE, Koniski AD, Maltby KM, McGann JK, Palis J. (1999) Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4 (趋化因子SDF-1及其受体,CXCR4胚胎表达及功能). *Dev Biol.* 213, 442-56.
- [0317] Miyazono, K., Kusanagi, K. 及 Inoue, H. (2001). Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling (TGF-beta/BMP信号系统的辐射与汇聚). *J Cell Physiol* 187, 265-276.
- [0318] Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H. 及 Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1 (缺乏CXC趋化因子PBSF/SDF-1小鼠B-细胞淋巴细胞生成及骨髓髓细胞生成缺陷). *Nature* 382, 635-638.
- [0319] Niwa, H. (2001). Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells (保持ES细胞干细胞再生的分子机制). *Cell Struct Funct* 26, 137-148.
- [0320] Ogura, H., Aruga, J. 及 Mikoshiba, K. (2001). Behavioral abnormalities of Zic1 and Zic2 mutant mice: implications as models for human neurological

disorders (Zic1及Zic2突变小鼠的行为异常:潜在的人神经疾病模型) .Behav Genet 31, 317-324.

[0321] Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A. 及Bongso, A. (2000) .Embryonic stem cell lines from human blastocysts:somatic differentiation in vitro(人胚泡胚胎干细胞系:体外体细胞分化) .Nat Biotechnol 18,399-404.

[0322] Rodaway, A. 及Patient, R. (2001) .Mesendoderm.an ancient germ layer(中内胚层.一个古老的胚层) ?Cell 105,169-172.

[0323] Rodaway, A., Takeda, H., Koshida, S., Broadbent, J., Price, B., Smith, J.C., Patient, R. 及Holder, N. (1999) .Induction of the mesendoderm in the zebrafish germ ring by yolk cell-derived TGF-beta family signals and discrimination of mesoderm and endoderm by FGF(卵细胞衍生的TGF- β 家族信号诱导斑马鱼胚环中内胚层及以FGF辨别中胚层及内胚层) .Development 126,3067-3078.

[0324] Rohr, K.B., Schulte-Merker, S. 及Tautz, D. (1999) .Zebrafish zic1expression in brain and somites is affected by BMP and hedgehog signalling(BMP及hedgehog信号系统影响斑马鱼zic1在脑及体节的表达) .Mech Dev 85,147-159.

[0325] Schier, A.F. (2003) .Nodal signaling in vertebrate development(脊椎动物发育中的Nodal信号系统) .Annu Rev Cell Dev Biol 19,589-621.

[0326] Schoenwolf, G.C. 及Smith, J.L. (2000) .Gastrulation and early mesodermal patterning in vertebrates(脊椎动物原肠胚及早期中胚层的图式发育) .Methods Mol Biol 135,113-125.

[0327] Shambrook, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littlefield, J.W., Donovan, P. J., Blumenthal, P. D., Huggins, G. R. 及Gearhart, J. D. (1998) .Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells(培养的人原始生殖细胞衍生的多能干细胞) .Proc Natl Acad Sci U S A 95,13726-13731.

[0328] Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Ryan, E.A., Korbutt, G.S., Toth, E., Warnock, G.L., Kneteman, N.M. 及Rajotte, R.V. (2000) .Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen(7例I型糖尿病患者不使用糖皮质激素免疫抑制疗法的胰岛移植) .N Engl J Med 343,230-238.

[0329] Shapiro, A.M., Ryan, E.A. 及Lakey, J.R. (2001a) .Pancreatic islet transplantation in the treatment of diabetes mellitus(糖尿病治疗中的胰岛移植) .Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 15,241-264.

[0330] Shapiro, J., Ryan, E., Warnock, G.L., Kneteman, N.M., Lakey, J., Korbutt, G.S. 及Rajotte, R.V. (2001b) .Could fewer islet cells be transplanted in type 1 diabetes?Insulin independence should be dominant force in islet transplantation(I型糖尿病可移植较少的胰岛细胞?胰岛素自主是胰岛移植中的优先考虑) .Bmj 322,861.

[0331] Shiozawa, M., Hiraoka, Y., Komatsu, N., Ogawa, M., Sakai, Y. 及Aiso, S. (1996) .Cloning and characterization of Xenopus laevis xSox7cDNA(非洲爪蛙xSox7cDNA克隆及特性) .

隆及确证). *Biochim Biophys Acta* 1309, 73-76.

[0332] Smith, J. (1997) . *Brachyury and the T-box genes (Brachyury及T-box基因)* . *Curr Opin Genet Dev* 7, 474-480.

[0333] Smith, J.C. ,Armes, N.A. ,Conlon, F.L. ,Tada, M. ,Umbhauer, M. 及Weston, K.M. (1997) . *Upstream and downstream from Brachyury, a gene required for vertebrate mesoderm formation (一个脊椎动物中胚层形成必需基因Brachyury的上游及下游)* . *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62, 337-346.

[0334] Takash, W. ,Canizares, J. ,Bonneaud, N. ,Poulat, F. ,Mattei, M.G. ,Jay, P. 及 Berta, P. (2001) . *SOX7transcription factor:sequence,chromosomal localisation, expression, transactivation and interference with Wnt signalling (SOX7转录因子:测序、染色体定位、表达、转活及对Wnt信号系统的干扰)* . *Nucleic Acids Res* 29, 4274-4283.

[0335] Taniguchi, K. ,Hiraoka, Y. ,Ogawa, M. ,Sakai, Y. ,Kido, S. 及Aiso, S. (1999) . *Isolation and characterization of a mouse SRY-related cDNA, mSox7 (小鼠SRY相关cDNA, mSox7的分离及确证)* . *Biochim Biophys Acta* 1445, 225-231.

[0336] Technau, U. (2001) . *Brachyury, the blastopore and the evolution of the mesoderm (Brachyury、胚孔及中胚层进化)* . *Bioessays* 23, 788-794.

[0337] Thomson, J.A. ,Itskovitz-Eldor, J. ,Shapiro, S.S. ,Waknitz, M.A. ,Swiergiel, J. J. ,Marshall, V.S. 及 Jones, J.M. (1998) . *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts (人胚泡胚胎干细胞系)* . *Science* 282, 1145-1147.

[0338] Tremblay, K.D. ,Hoodless, P.A. ,Bikoff, E.K. 及 Robertson, E. J. (2000) . *Formation of the definitive endoderm in mouse is a Smad2-dependent process. (小鼠定形内胚层形成为Smad2依赖过程)* . *Development* 127, 3079-3090.

[0339] Vandesompele, J. ,De Preter, K. ,Pattyn, F. ,Poppe, B. ,Van Roy, N. ,De Paepe, A. 及 Speleman, F. (2002) . *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes (几何平均多个内部控制基因准确校准实时定量RT-PCR的数据)* . *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.

[0340] Varlet, I. ,Collignon, J. 及 Robertson, E. J. (1997) . *nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation (原始内胚层中的nodal表达为小鼠原肠胚前轴的特异化所必需)* . *Development* 124, 1033-1044.

[0341] Vincent, S.D. ,Dunn, N.R. ,Hayashi, S. ,Norris, D.P. 及 Robertson, E. J. (2003) . *Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals (小鼠形成体中细胞命运决定受分级Nodal信号控制)* . *Genes Dev* 17, 1646-1662.

[0342] Weiler-Guettler, H. ,Aird, W.C. ,Rayburn, H. ,Husain, M. 及 Rosenberg, R. D. (1996) . *Developmentally regulated gene expression of thrombomodulin in postimplantation mouse embryos (植入后小鼠胚胎中凝血调节蛋白的发育调控基因的表达)* . *Development* 122, 2271-2281.

[0343] Weiler-Guettler, H. ,Yu, K. ,Soff, G. ,Gudas, L.J. 及 Rosenberg, R. D. (1992)

.Thrombomodulin gene regulation by cAMP and retinoic acid in F9embryonal carcinoma cells (F9胚胎癌细胞中凝血调节蛋白基因由cAMP及视黄酸调控).Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 89,2155-2159.

[0344] Wells,J.M.及Melton,D.A.(1999).Vertebrate endoderm development (脊椎动物内胚层发育).Annu Rev Cell Dev Biol 15,393-410.

[0345] Wells,J.M.及Melton,D.A.(2000).Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers (早期小鼠内胚层为邻近胚层的可溶因子模式化).Development 127,1563-1572.

[0346] Willison,K.(1990).The mouse Brachyury gene and mesoderm formation (小鼠短尾基因及中胚层形成).Trends Genet 6,104-105.

[0347] Zhao,G.Q.(2003).Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse (敲除小鼠BMP信号系统的结果).Genesis 35,43-56.

[0348] Zhou,X.,Sasaki,H.,Lowe,L.,Hogan,B.L.及Kuehn,M.R.(1993).Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation (Nodal为一种在原肠胚形成过程中表达在小鼠node中的TGF-β类新基因).Nature 361,543-547.

序列表

<110> ViaCyte, Inc.
 D'Amour, Kevin A.
 Agulnick, Alan D.
 Baetge, Emmanuel E.

<120> 定形内胚层

<130> 96183-000242US

<140> US 14/072, 642
 <141> 2013-11-05

<150> US 12/710, 300
 <151> 2010-02-22

<150> US 10/584, 338
 <151> 2007-01-09

<150> WO PCT/US2004/043696
 <151> 2004-12-23

<150> US 60/587, 942
 <151> 2004-07-14

<150> US 60/586, 566
 <151> 2004-07-09

<150> US 60/532, 004
 <151> 2003-12-23

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

[0001] <210> 1
 <211> 1245
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 1
 atgaggcagcc cggatgcggg atacgccagt gacgaccaga gccagaccca gagcgcgctg 60
 cccgcgtga tggccggct gggccctgc ccctggccg agtcgttag ccccateggg 120
 gacatgaagg tgaaggcga ggcgcggcg aacagcggag caccggccg ggcgcggc 180
 cgagccaagg gcgagtcccg tatccggcgg ccgtatgaaacg ctttcatggt gtggctaag 240
 gacgagcgc a cggctggc gcagcagaat ccagacctgc acaacgcga gttgagcaag 300
 atgctggca agtcgtggaa ggcgtacg ctggcggaga agcggccct cgtggaggag 360
 gcagagcggc tgcgtgcgc acatgcag gaccacccca actacaagta cggccgcgg 420
 cggcgaagc aggtgaagcg gctgaagcgg gtggaggcg gttcctgca cggctggct 480
 gagccgcagg cggccgcgt gggcccgag ggcgcggcg tggccatgga cggctggc 540
 ctccagttcc ccgagcagg cttccgcgc ggcccgcgc tgctgcctcc geacatggc 600
 ggccactacc gcgactgcca gagtctggc ggcgcctccgc tcgacggcta cccgttgc 660
 acgcccaca cgtccccgtt ggacggcgtg gacccgaccc cggctttttt cggcccccgg 720
 atgcccgggg actgcccggc ggccggcacc tacagctacg cgcaggcttc ggactacgt 780
 gggcccccgg agcctccgc cggteccatg caccggcagc tggcccaaga gcccgggt 840
 ccctcgatcc cggccctctt ggcgcaccc agcgccttc acgtgtacta cggcgcgt 900
 ggctcgcccg gggccggcgg cggcgcggc ttccagatgc agccgcaaca ccagcaccag 960
 caccagcacc agcaccaccc cccggccccc ggacagccgt cggccctcc ggaggactg 1020

ccctgccggg acggcacgga cccagtcag cccggcggc tcctcgaaa ggtggaccgc	1080
acggaattt aacagtatct gcacttcgtg tgcaagctg agatggcct cccctaccag	1140
ggccatgact ccgggtgtgaa tctcccgac agccacgggg ccatttcctc ggtgggtgtcc	1200
gacgccccgttata ttactgcaac tatectgacg tgtga	1245
<210> 2	
<211> 414	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 2	
Met Ser Ser Pro Asp Ala Gly Tyr Ala Ser Asp Asp Gln Ser Gln Thr	
1 5 10 15	
Gln Ser Ala Leu Pro Ala Val Met Ala Gly Leu Gly Pro Cys Pro Trp	
20 25 30	
Ala Glu Ser Leu Ser Pro Ile Gly Asp Met Lys Val Lys Gly Glu Ala	
35 40 45	
Pro Ala Asn Ser Gly Ala Pro Ala Gly Ala Ala Gly Arg Ala Lys Gly	
50 55 60	
Glu Ser Arg Ile Arg Arg Pro Met Asn Ala Phe Met Val Trp Ala Lys	
65 70 75 80	
[0002] Asp Glu Arg Lys Arg Leu Ala Gln Gln Asn Pro Asp Leu His Asn Ala	
85 90 95	
Glu Leu Ser Lys Met Leu Gly Lys Ser Trp Lys Ala Leu Thr Leu Ala	
100 105 110	
Glu Lys Arg Pro Phe Val Glu Ala Glu Arg Leu Arg Val Gln His	
115 120 125	
Met Gln Asp His Pro Asn Tyr Lys Tyr Arg Pro Arg Arg Arg Lys Gln	
130 135 140	
Val Lys Arg Leu Lys Arg Val Glu Gly Gly Phe Leu His Gly Leu Ala	
145 150 155 160	
Glu Pro Gln Ala Ala Leu Gly Pro Glu Gly Gly Arg Val Ala Met	
165 170 175	
Asp Gly Leu Gly Leu Gln Phe Pro Glu Gln Gly Phe Pro Ala Gly Pro	
180 185 190	
Pro Leu Leu Pro Pro His Met Gly Gly His Tyr Arg Asp Cys Gln Ser	
195 200 205	
Leu Gly Ala Pro Pro Leu Asp Gly Tyr Pro Leu Pro Thr Pro Asp Thr	
210 215 220	
Ser Pro Leu Asp Gly Val Asp Pro Asp Pro Ala Phe Phe Ala Ala Pro	
225 230 235 240	

Met Pro Gly Asp Cys Pro Ala Ala Gly Thr Tyr Ser Tyr Ala Gln Val
245 250 255

Ser Asp Tyr Ala Gly Pro Pro Glu Pro Pro Ala Gly Pro Met His Pro
260 265 270

Arg Leu Gly Pro Glu Pro Ala Gly Pro Ser Ile Pro Gly Leu Leu Ala
275 280 285

Pro Pro Ser Ala Leu His Val Tyr Tyr Gly Ala Met Gly Ser Pro Gly
290 295 300

Ala Gly Gly Arg Gly Phe Gln Met Gln Pro Gln His Gln His Gln
305 310 315 320

[0003] His Gln His Gln His His Pro Pro Gly Pro Gly Gln Pro Ser Pro Pro
325 330 335

Pro Glu Ala Leu Pro Cys Arg Asp Gly Thr Asp Pro Ser Gln Pro Ala
340 345 350

Glu Leu Leu Gly Glu Val Asp Arg Thr Glu Phe Glu Gln Tyr Leu His
355 360 365

Phe Val Cys Lys Pro Glu Met Gly Leu Pro Tyr Gln Gly His Asp Ser
370 375 380

Gly Val Asn Leu Pro Asp Ser His Gly Ala Ile Ser Ser Val Val Ser
385 390 395 400

Asp Ala Ser Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Tyr Pro Asp Val
405 410

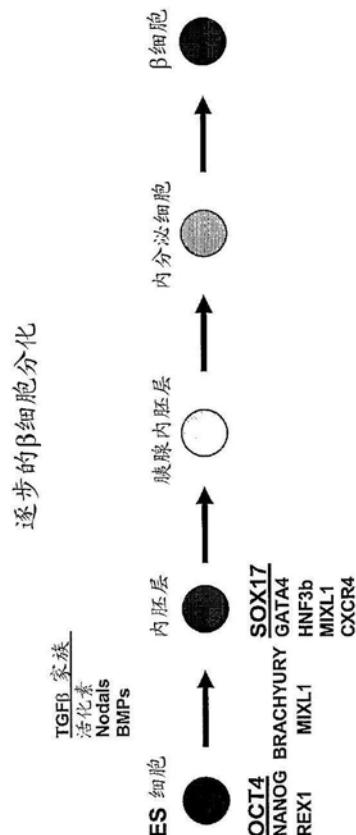


图1

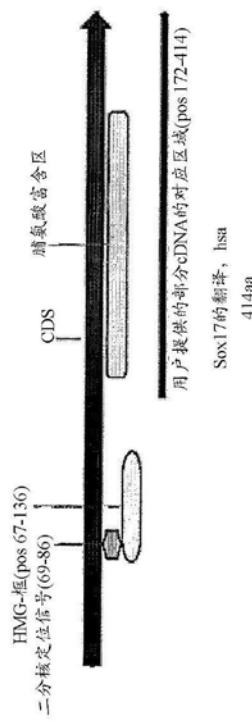


图2

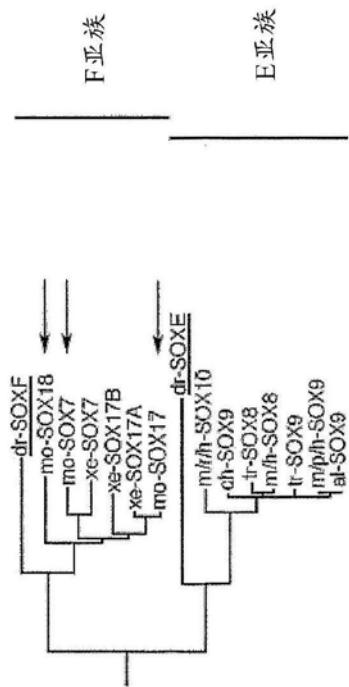


图3

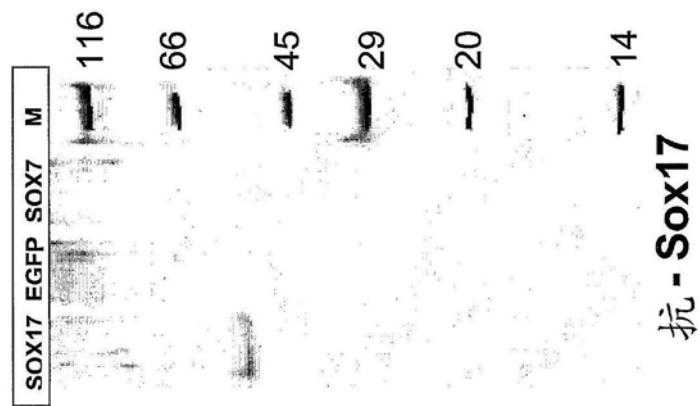


图4

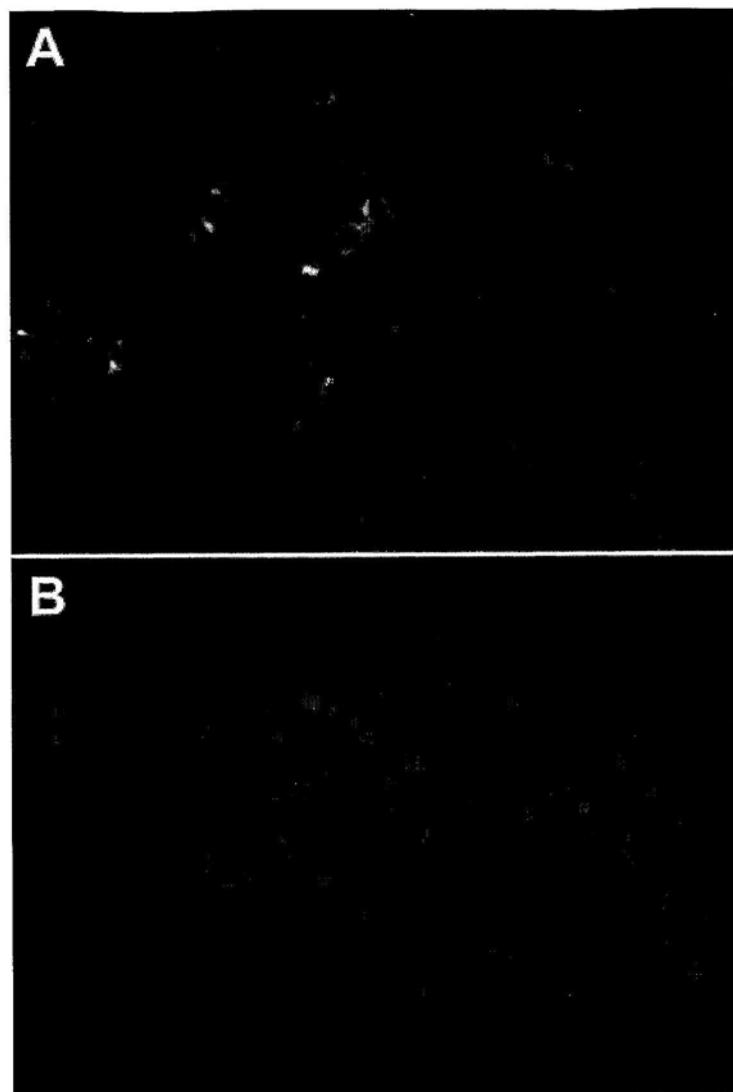


图5

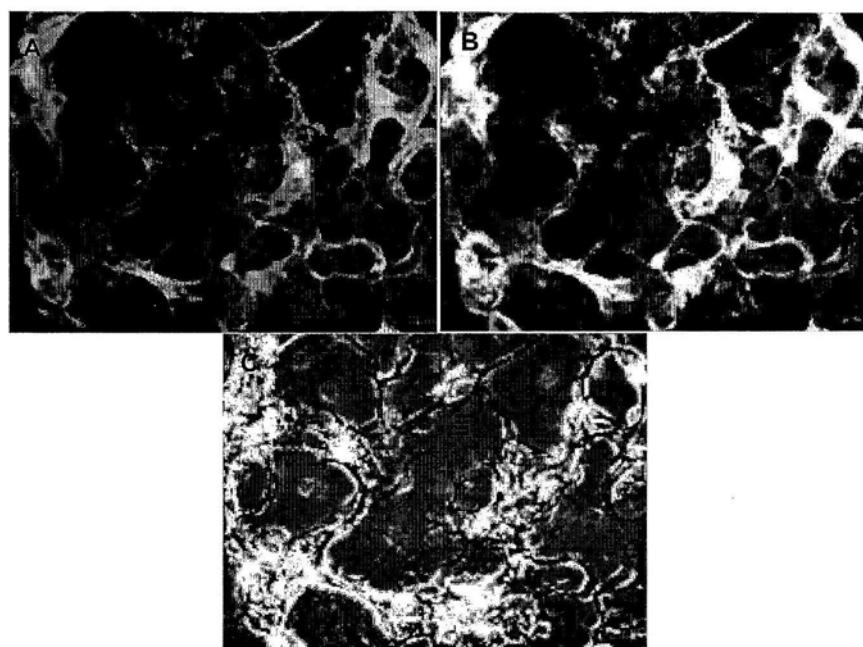


图6

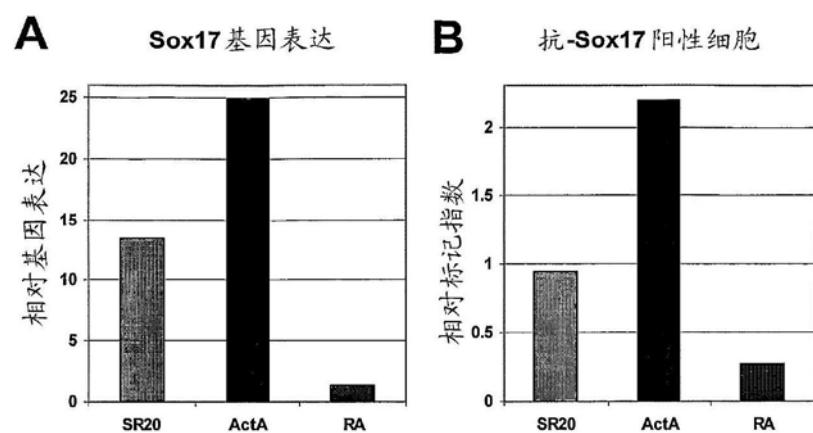


图7

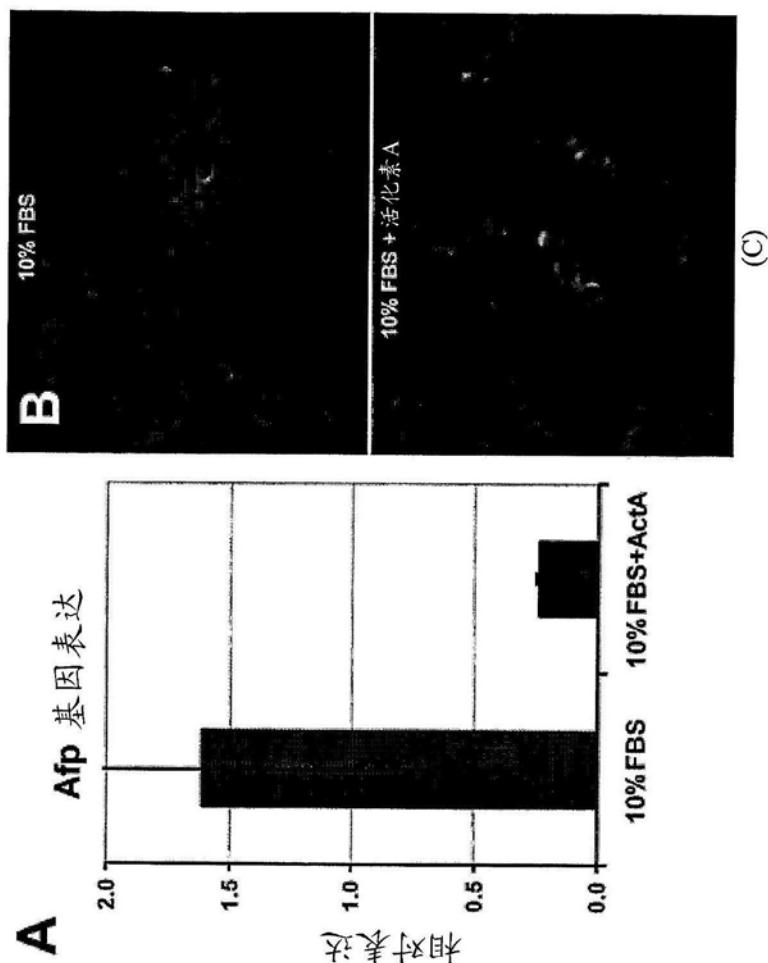


图8

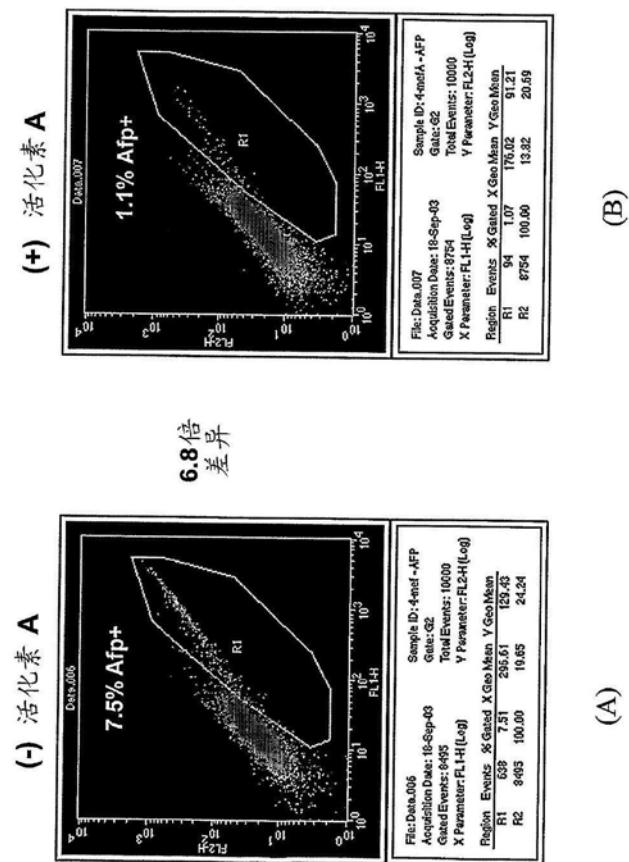


图9

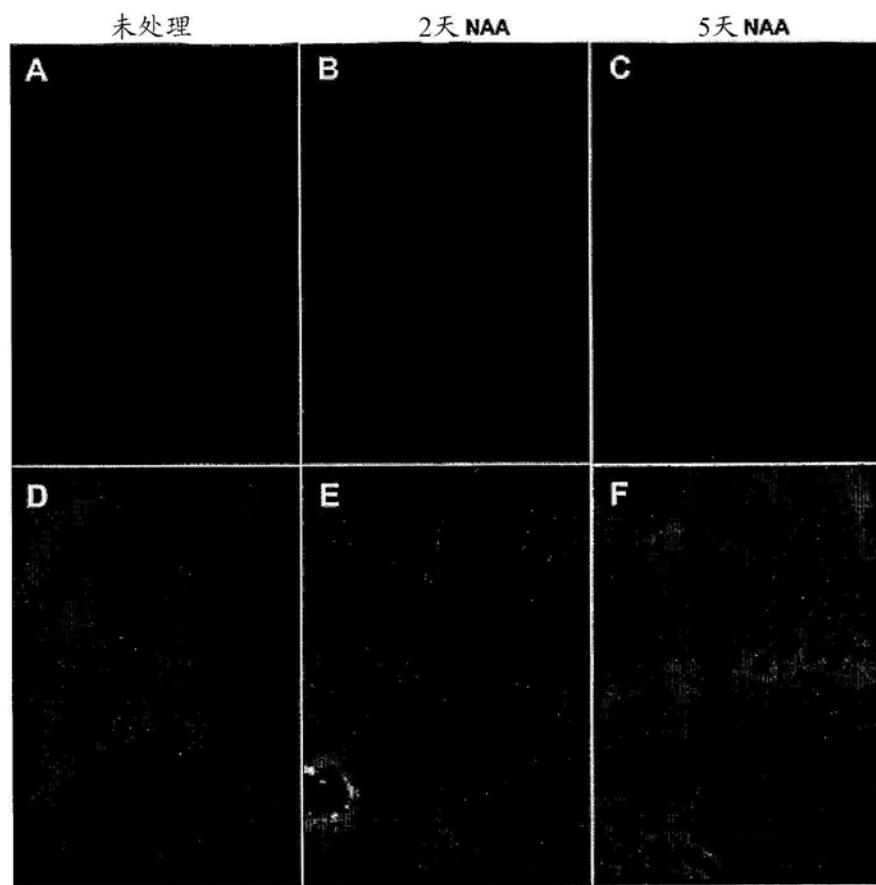


图10

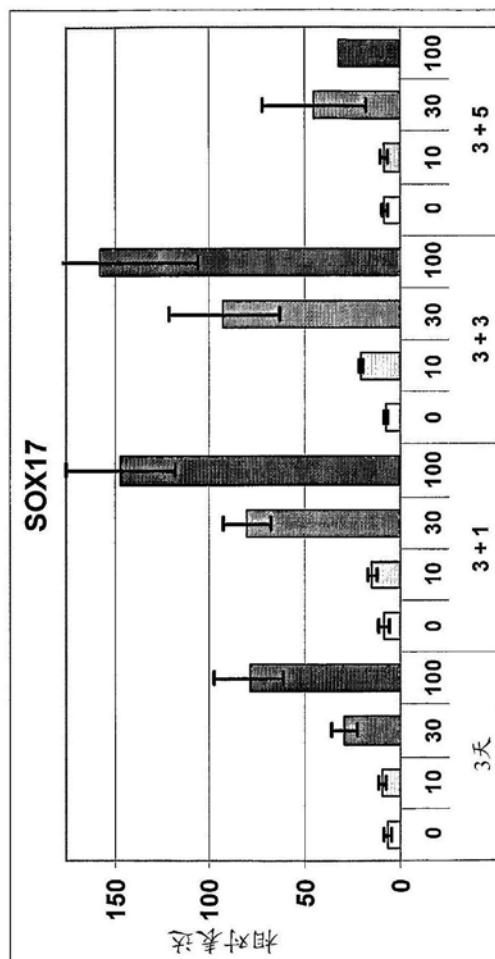


图11

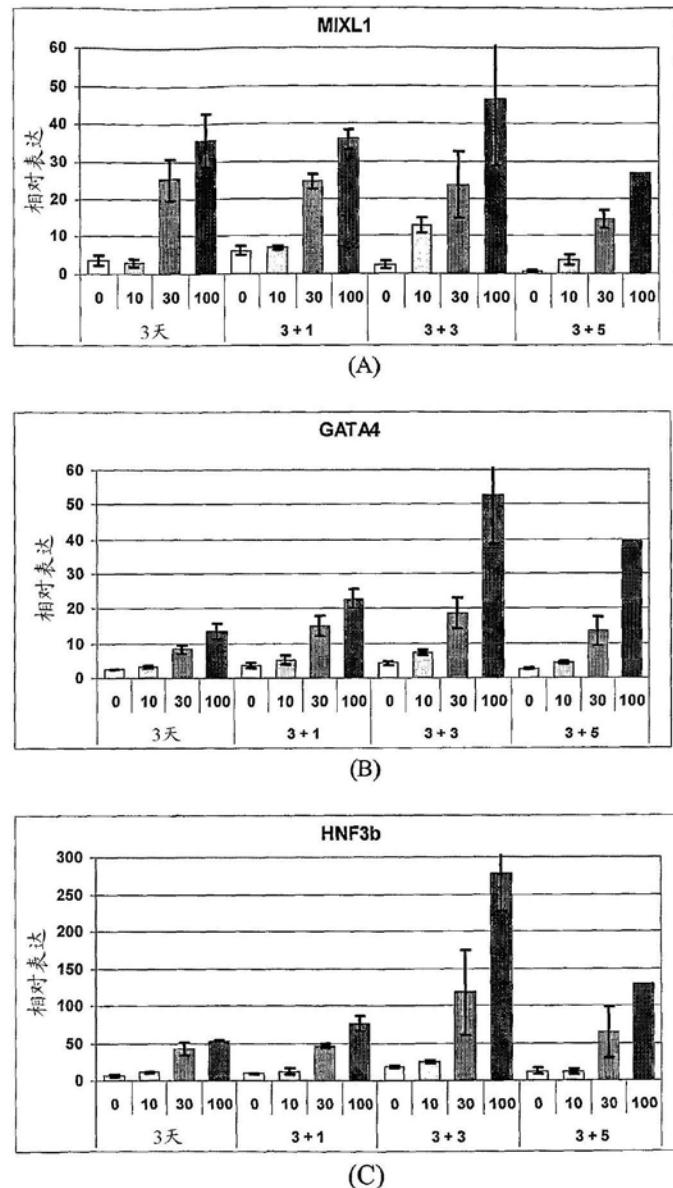


图12

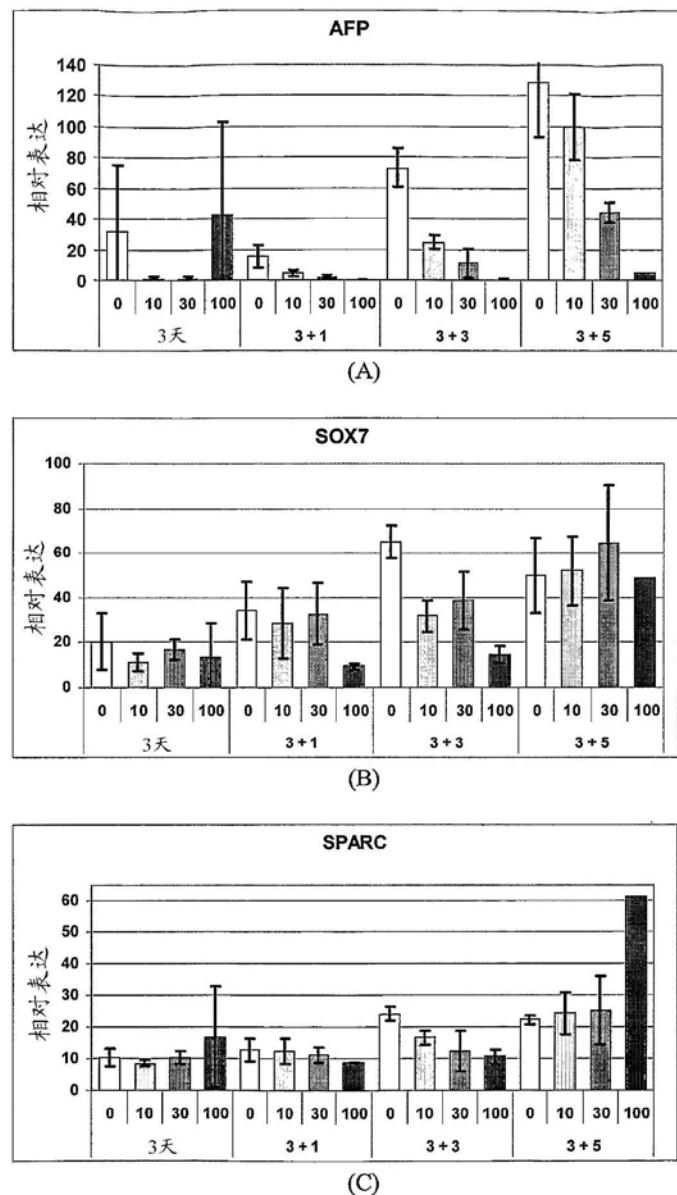


图13

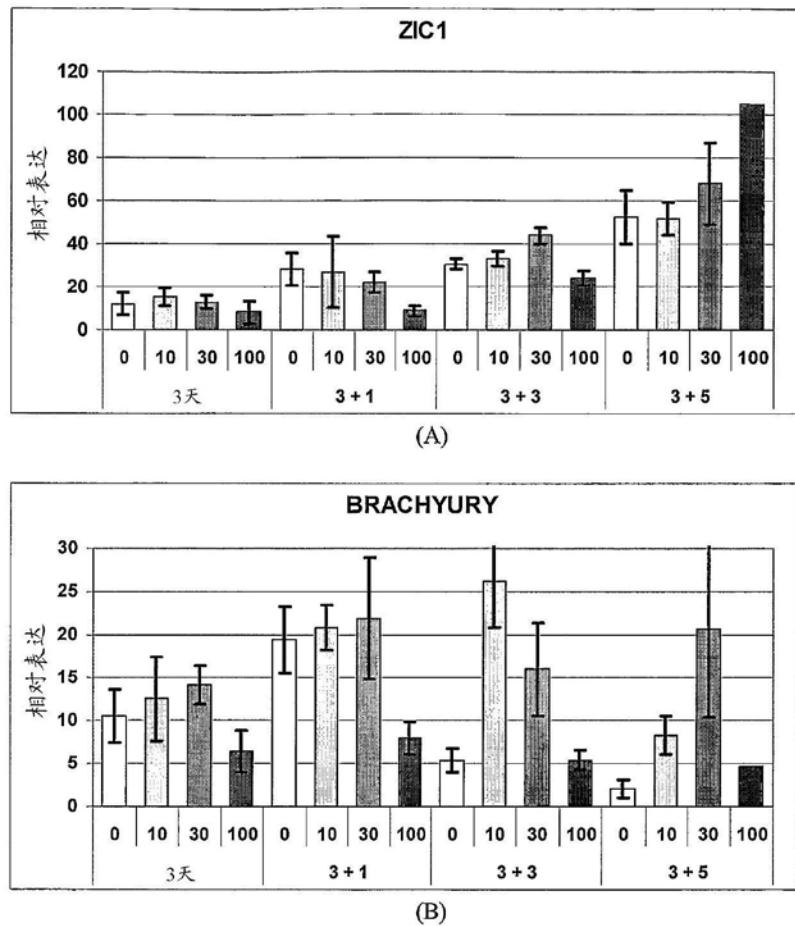


图14

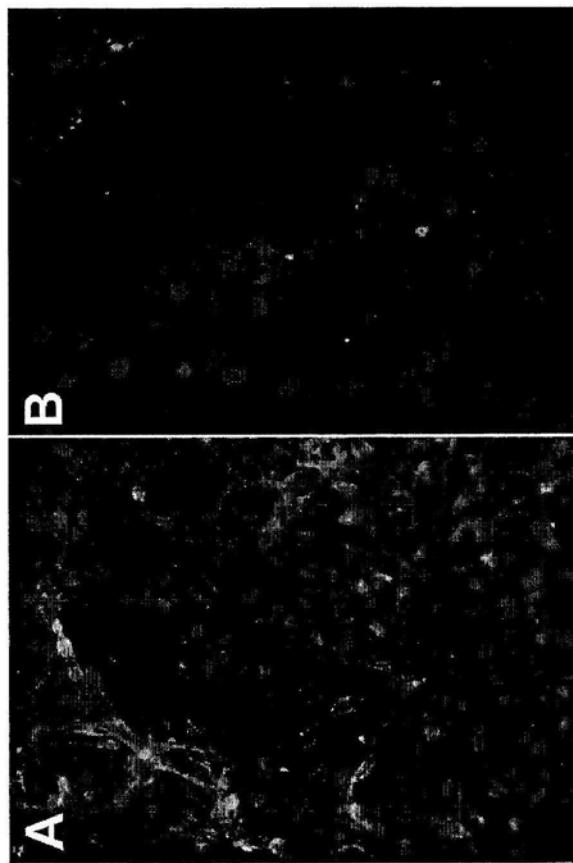


图15

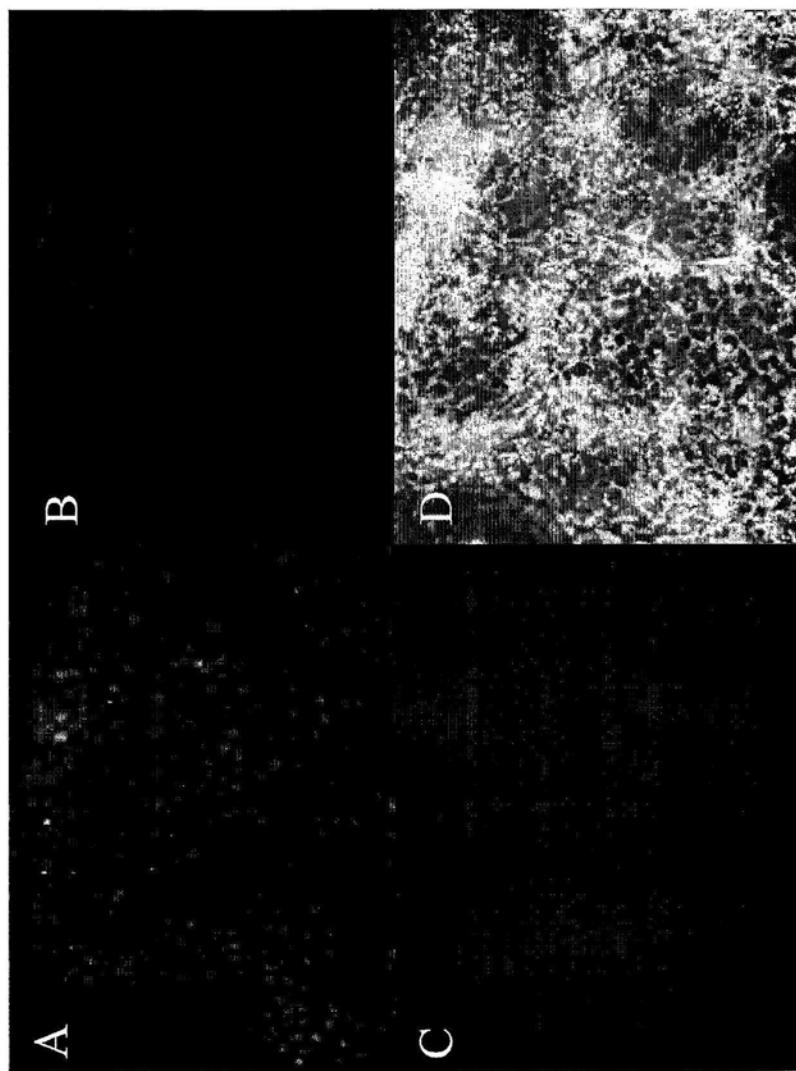


图16

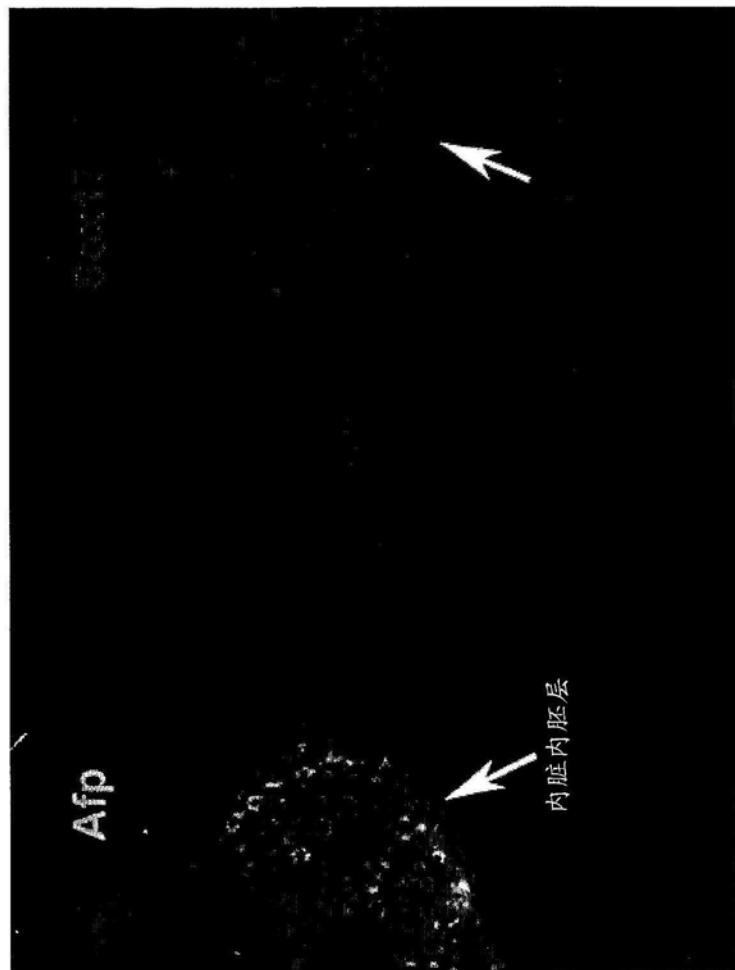


图17

Tgfb 家族分子

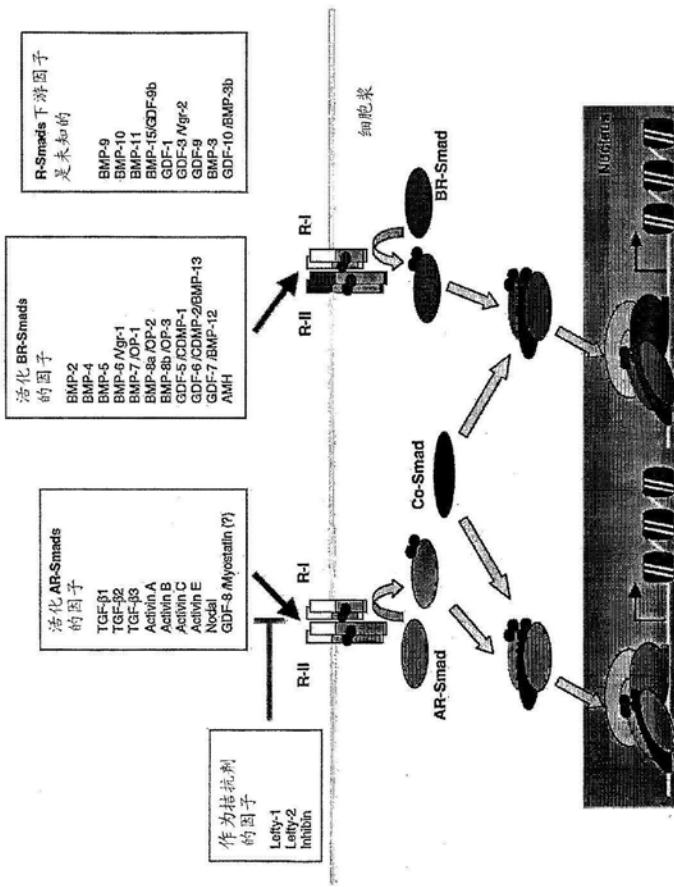


图 18

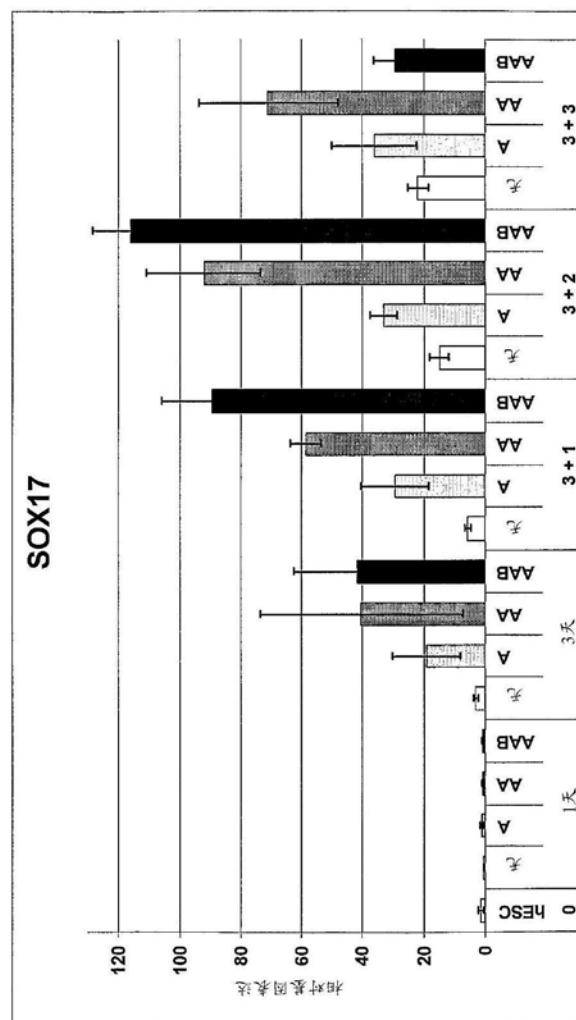


图19

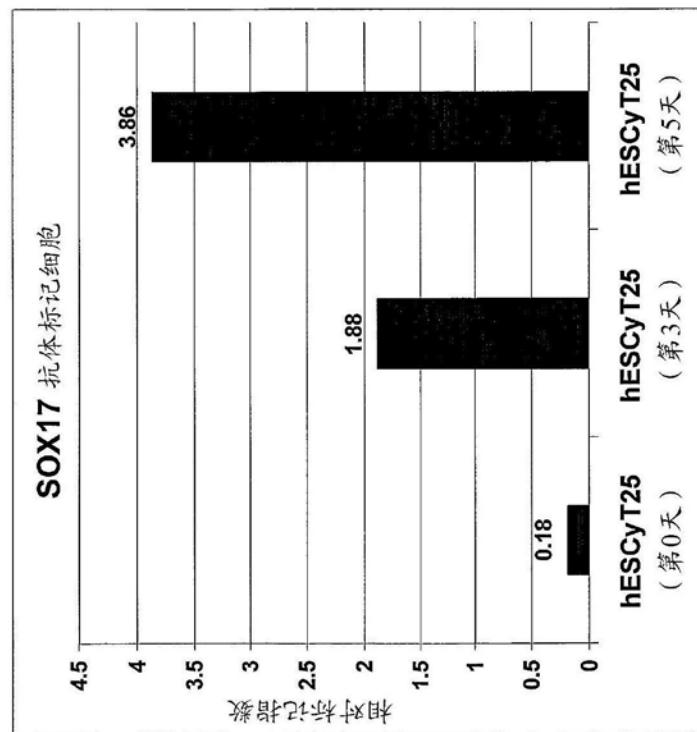


图20

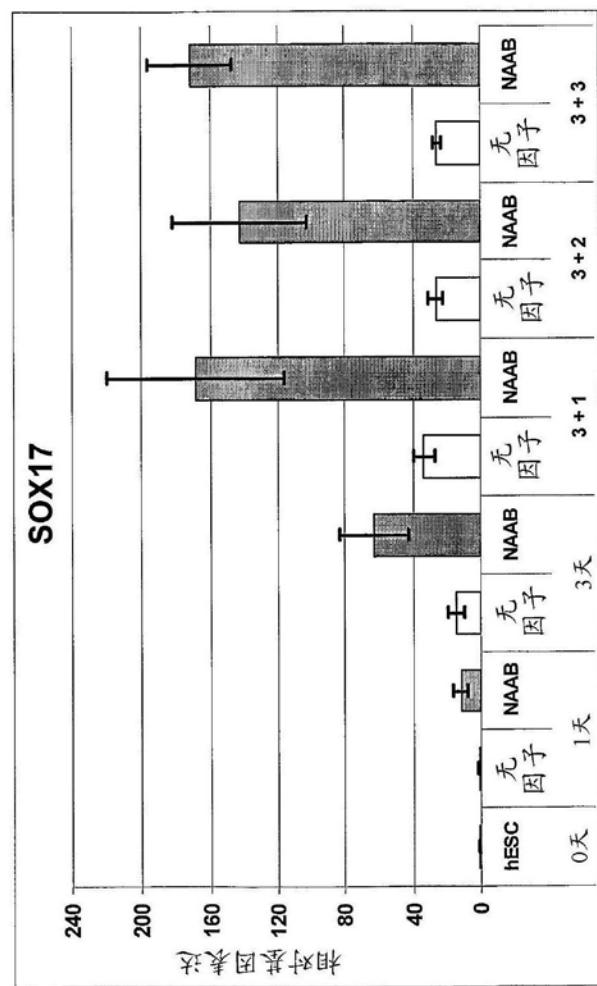


图21

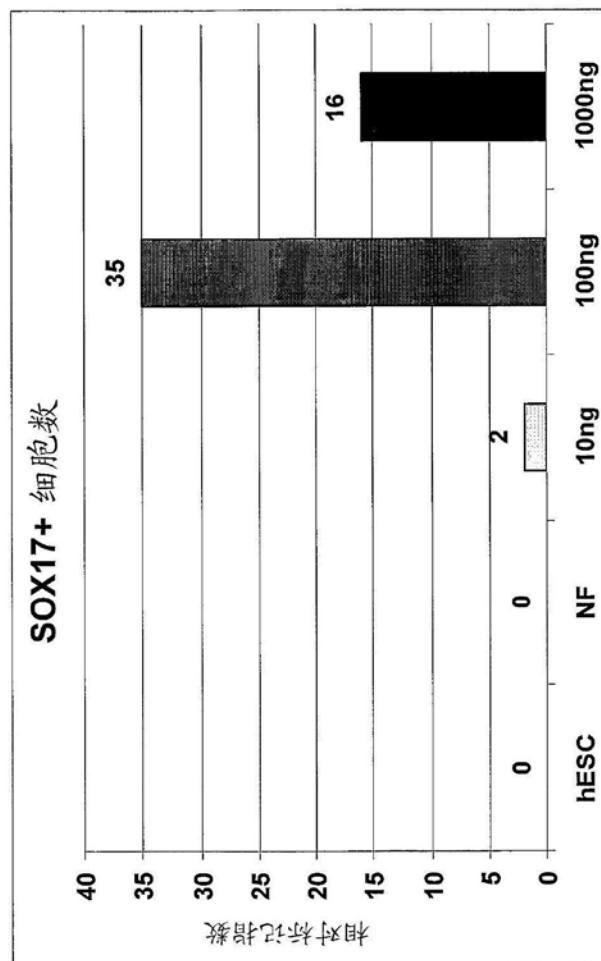


图22

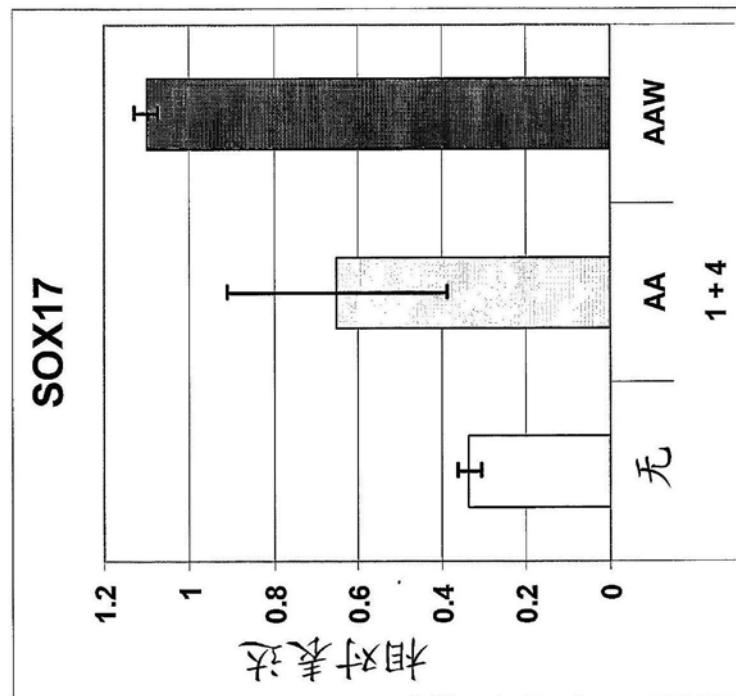


图23

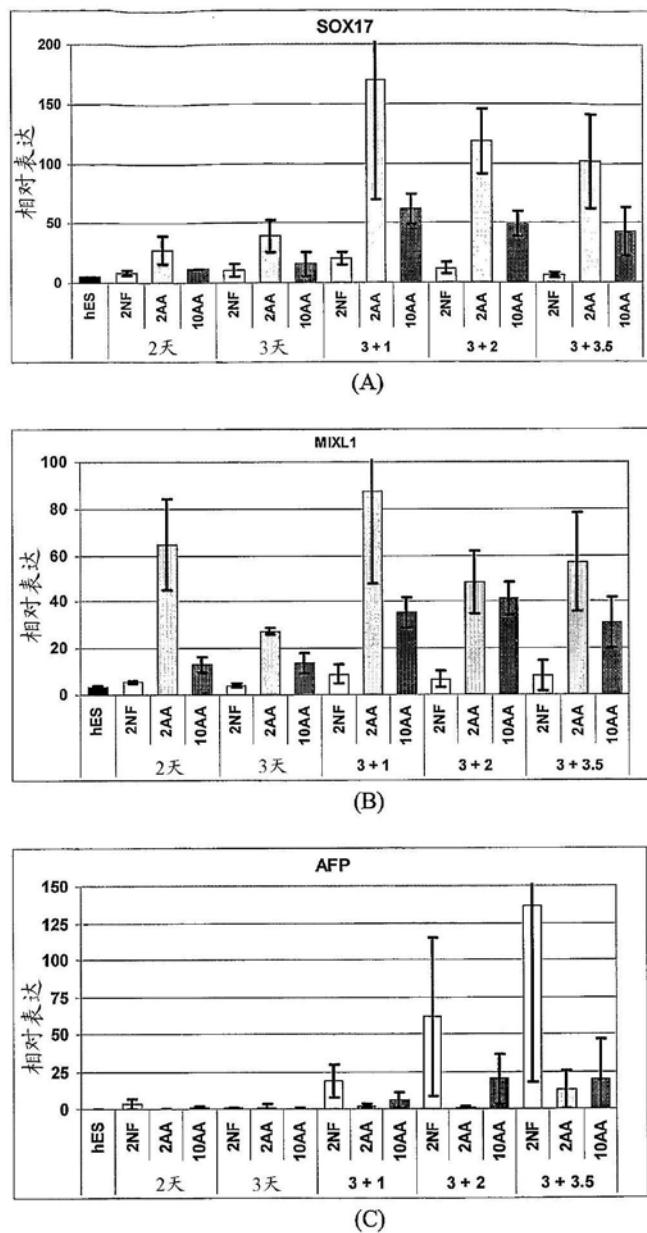


图24

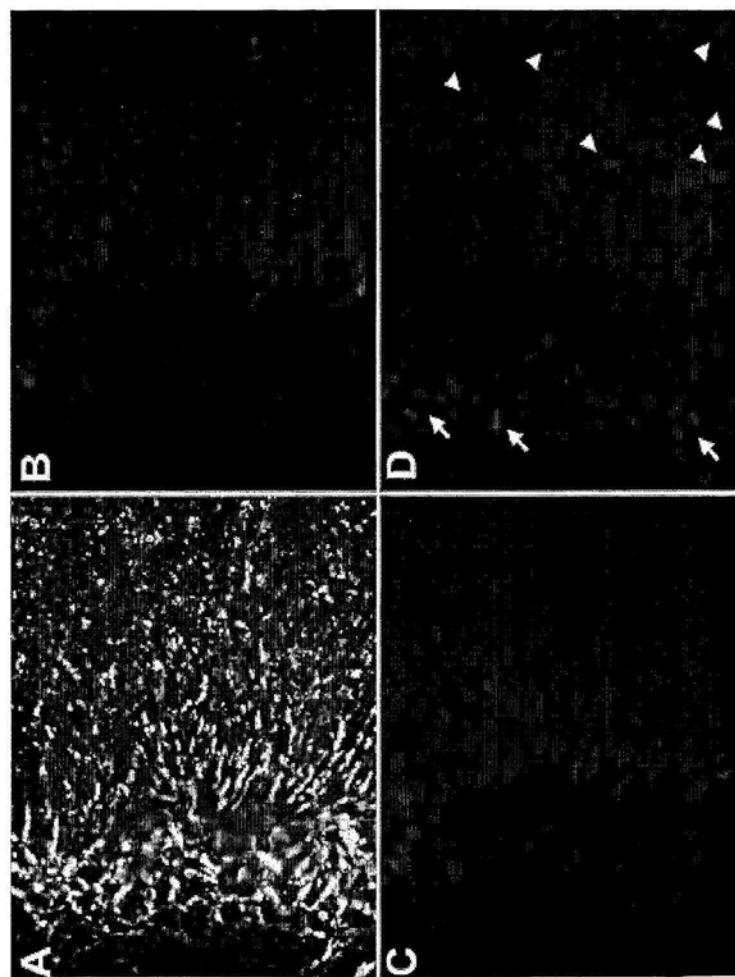


图25

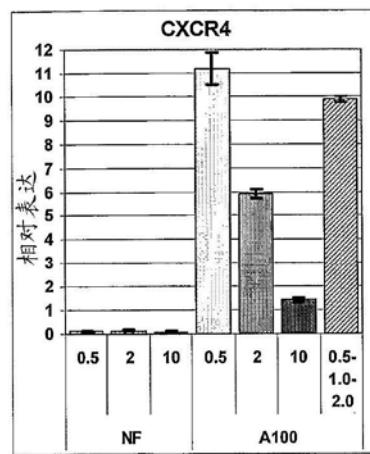


图26

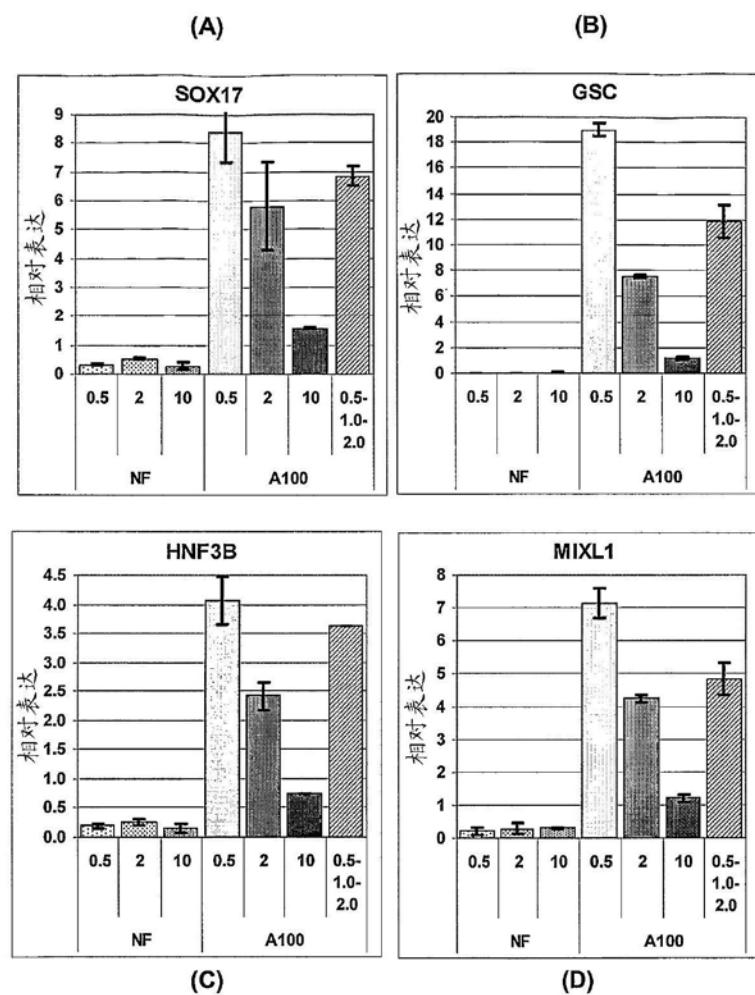


图27

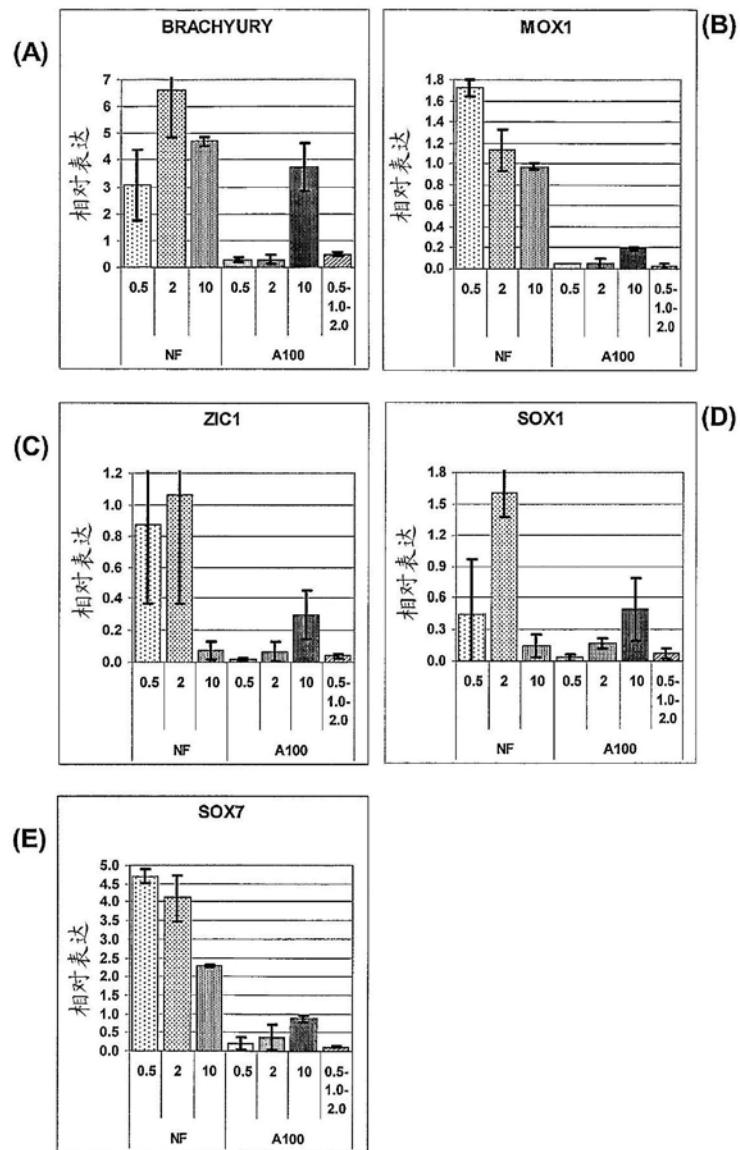


图28

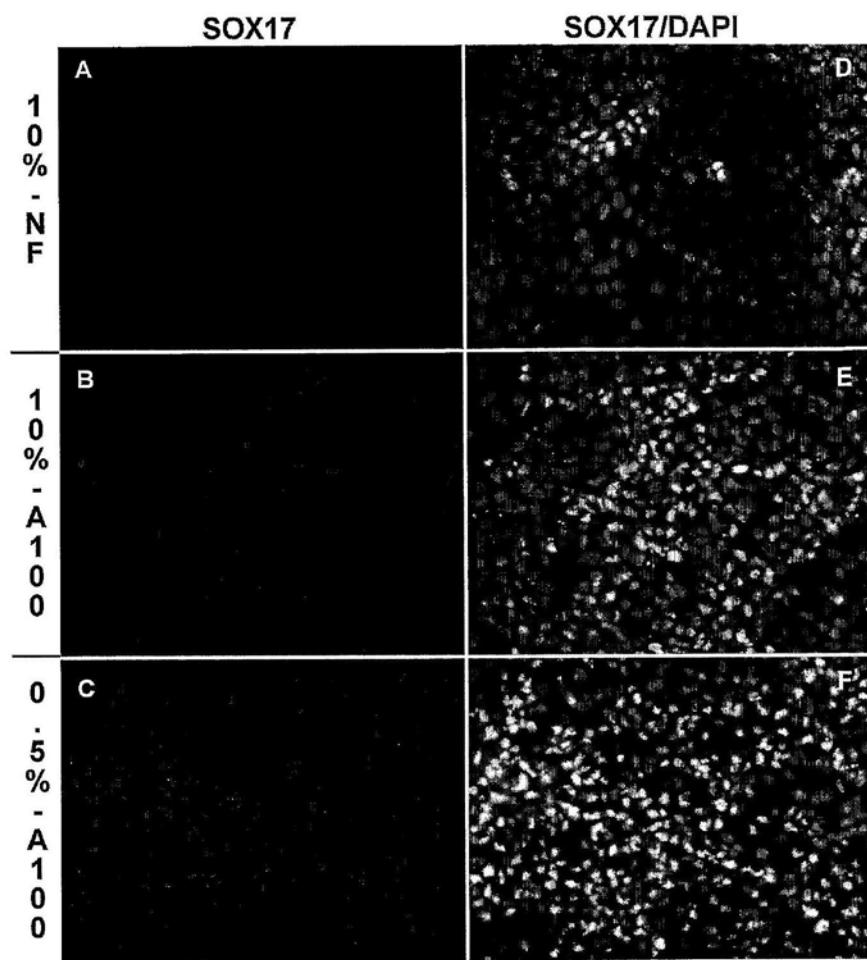


图29

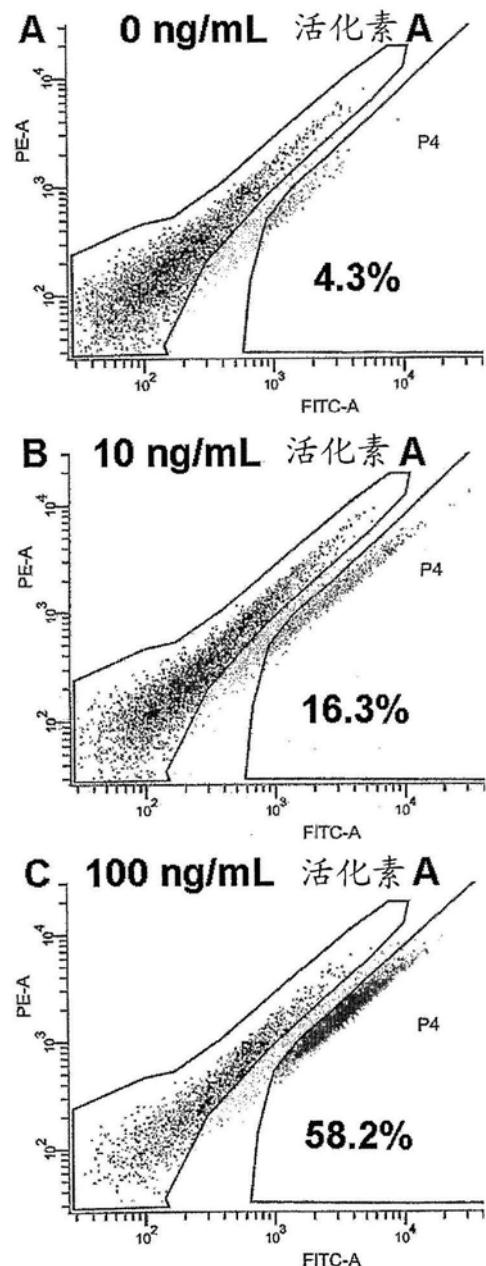


图30

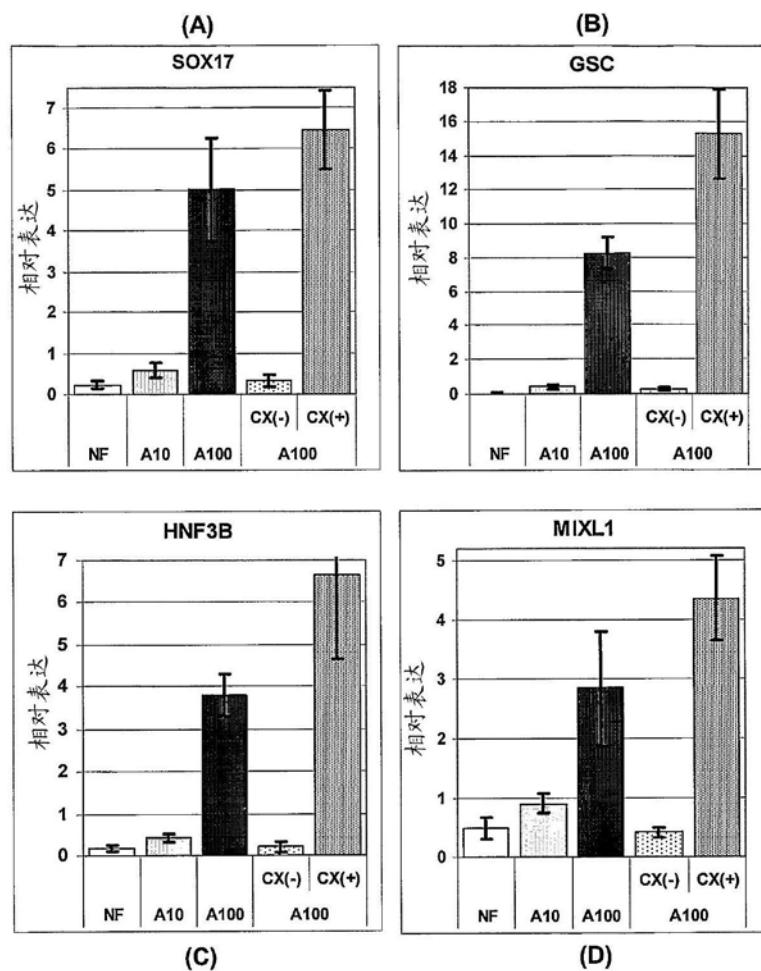


图31

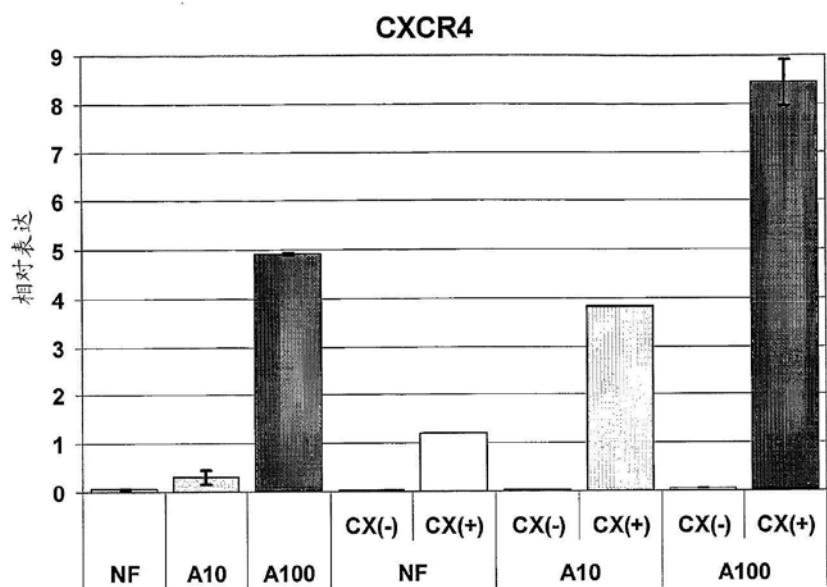


图32

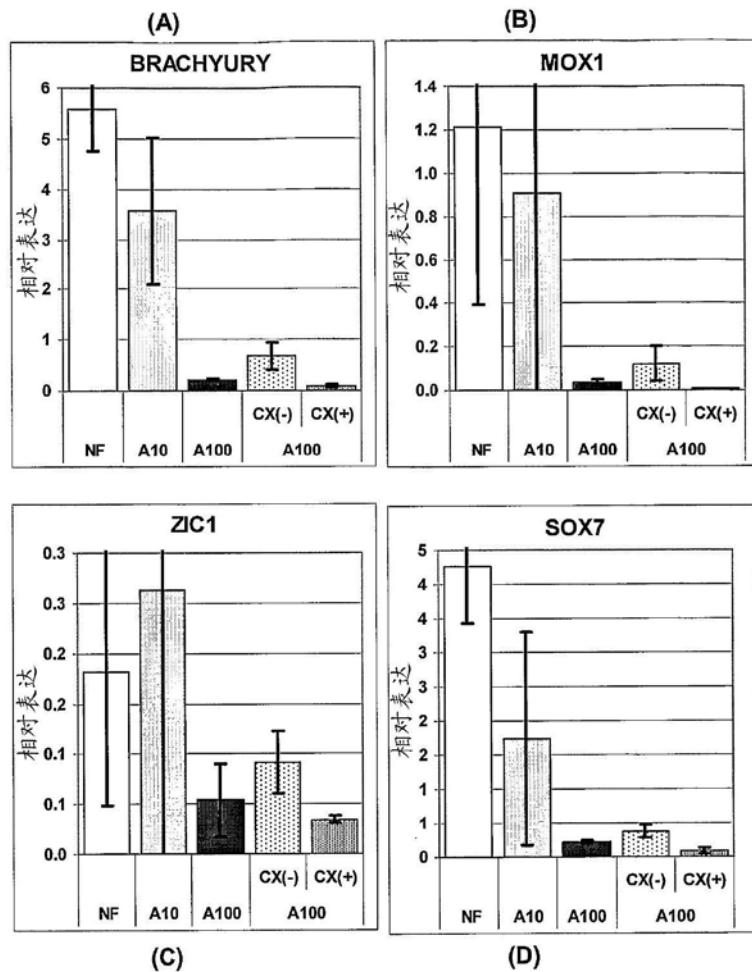
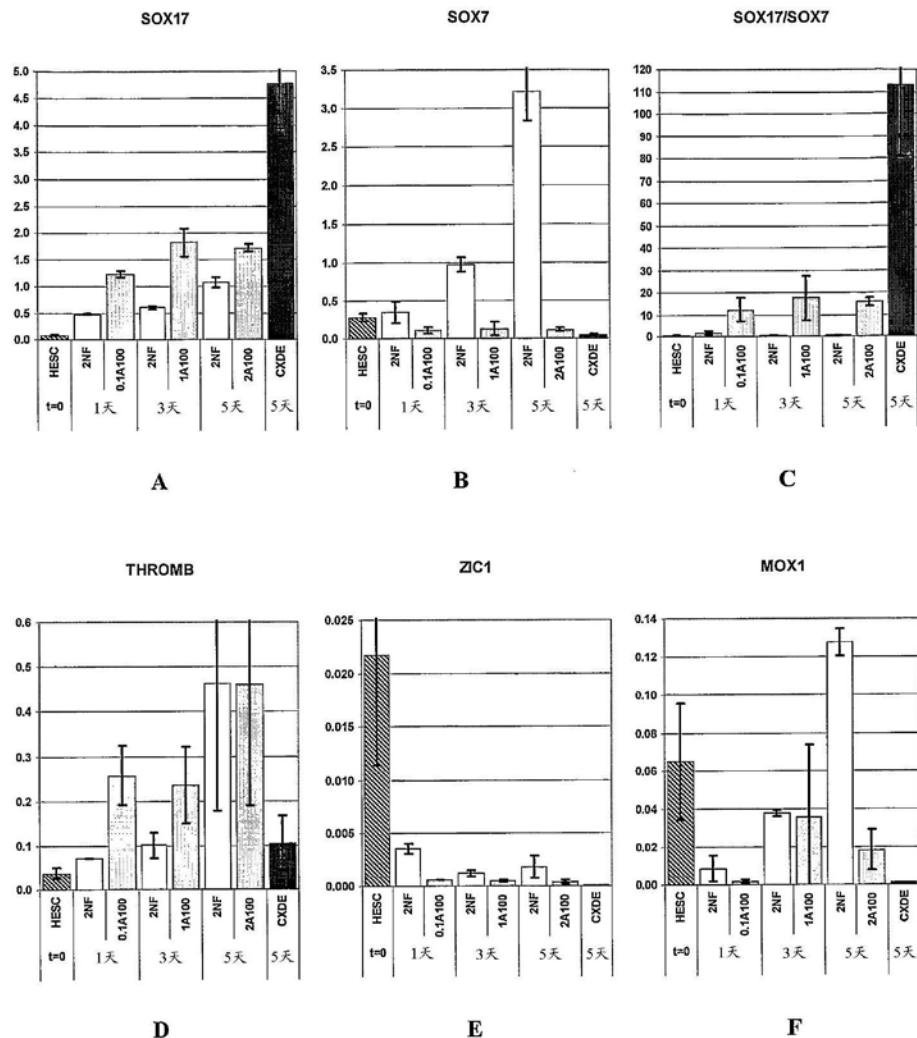
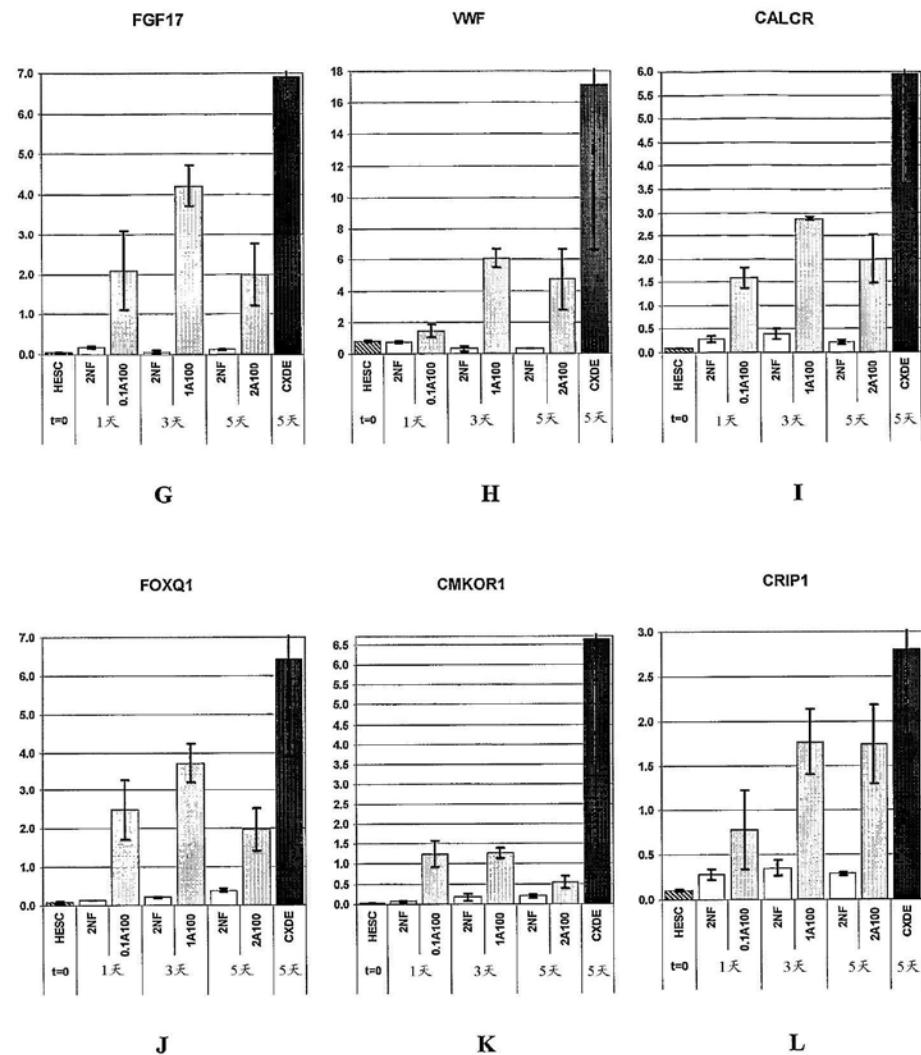


图33





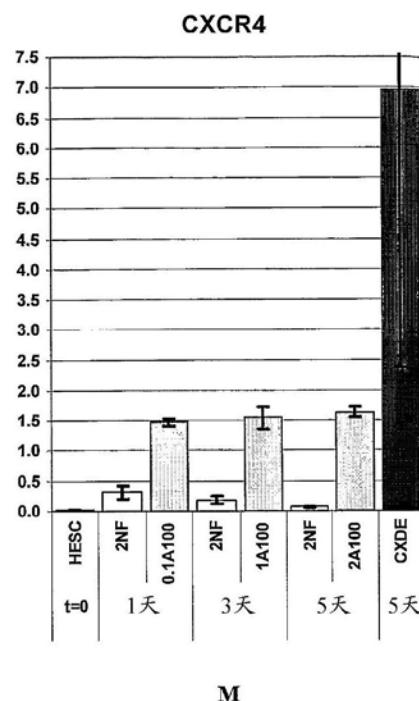


图34