

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02815144.5

[51] Int. Cl.

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 4 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 100384986C

[22] 申请日 2002.6.20 [21] 申请号 02815144.5

[30] 优先权

[32] 2001. 6. 21 [33] US [31] 09/888,309

[32] 2002. 5. 28 [33] US [31] 10/157,288

[86] 国际申请 PCT/US2002/019477 2002.6.20

[87] 国际公布 WO2003/000868 英 2003.1.3

[85] 进入国家阶段日期 2004.2.2

[73] 专利权人 杰龙公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 M·K·卡朋特 J·J·邓汉姆

M·S·因诺库马 S·R·希斯

[56] 参考文献

US6087168A 2000.7.11

WO9901159A1 1999.1.14

Isolation of lineage - restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. Margot Mayer. Proschel et al. Neuron, Vol. 19 . 1997

NTera 2 Cells: A human cell line which displays characteristic expected of a human committed neuronal progenitor cell. S. J. Pleasure and V. M. . Y. lee. Journal of Neuroscience Research, Vol. 35 . 1993

审查员 邢维玲

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

权利要求书 1 页 说明书 25 页 附图 4 页

[54] 发明名称

用于治疗帕金森病的多巴胺能神经元和具有增殖能力的前体细胞

[57] 摘要

本公开提供了改进的从多能干细胞获得神经祖细胞和分化的神经元群体的方法。该技术可用于制造通过至少 40 次加倍增殖，但却保持分化成为各种不同神经表型的能力的祖细胞。获得的细胞群体含有高比例的对酪氨酸羟化酶着色的细胞，这是多巴胺能神经元的一个特征。可大量生产本发明的神经祖细胞和末端分化的神经元以用于药物筛选和临床上重要的神经疾病，例如帕金森病，的治疗。

1. 一种制备神经元前体细胞群体的方法，其特征在于，所述方法包括：
 - a) 在含有一种或多种附加的 TGF- β 超家族拮抗物的培养基中培养含有 pPS 细胞的细胞群体，和
 - b) 从培养物中收获细胞群体，其中至少 50% 的细胞表达聚唾液酸化的 NCAM 或者 β -微管蛋白 III。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述培养基进一步包含一种或多种神经营养蛋白和一种或多种促细胞分裂原。
3. 如权利要求 1 中所述的方法，其特征在于，所述细胞群体是通过将 pPS 细胞平铺在固体表面制造的，而无需形成胚状体或细胞聚集体。
4. 如权利要求 1 中所述的方法，其特征在于，所述细胞群体是通过在含有头蛋白和促滤泡素抑制素的培养基中培养含有 pPS 细胞的细胞群体制造的。
5. 一种制造分化细胞的方法，其特征在于，所述方法包括，在含有一种或多种选自神经营养蛋白、cAMP 和抗坏血酸的因子，而不含有附加的促细胞分裂素的培养基中培养用权利要求 1-4 中任一项所述方法制备的神经元前体细胞群体。
6. 一种药物，其特征在于，所述药物含有用权利要求 1-5 中任一项所述方法制造的细胞群体，用于通过外科手术或疗法进行人或动物体的治疗。
7. 用权利要求 1-5 中任一项所述方法制造的细胞群体在制备用于在个体中重建或补充中枢神经系统(CNS)功能的药物中的应用。
8. 用权利要求 1-5 中任一项所述方法制造的细胞群体在制备用于治疗帕金森病的药物中的应用。
9. 如权利要求 1-5 任一项所述的方法或权利要求 6 所述的药物或权利要求 7-8 任一项所述的应用，其特征在于，所述 pPS 细胞分离自人胚泡，或是这种细胞的子代。
10. 如权利要求 1-5 任一项所述的方法或权利要求 6 所述的药物或权利要求 7-8 任一项所述的应用，其特征在于，所述 pPS 细胞是人胚胎干细胞。

用于治疗帕金森病的多巴胺能神经元和具有增殖能力的前体细胞

相关申请的参考

本申请要求提交于 2001 年 6 月 21 日的美国实用专利申请 09/888,309 和提交于 2002 年 5 月 28 日的 10/157,288 的优先权。为了在获得许可的美国和其它管辖区域进行申请的目的,这里全文引用了上述两个优先权申请以及国际专利申请 WO 01/51616 和 WO 01/88104 作为参考。

背景

对于适合于人类服用的细胞系的衍生和扩展的新的研究有希望引导出一个美好的新的医疗世界。如果科学继续从神经元和神经元前体细胞的细胞生物学的重要的新发现中受益,那么毁灭性的和以前难以治疗的病症就可能产生获得再生药物的希望。

病症中需要临床治疗的是那些有关神经功能异常的疾病。在这些疾病的列表中接近顶部的是帕金森病,一种自发的、缓慢发展的、中枢神经系统退化性的疾病,特征为运动缓慢和减少、肌肉僵硬、静止震颤和姿势不稳。由黑质、蓝斑以及其它脑干多巴胺能细胞中着色的神经元的持续恶化产生的症状,导致神经递质多巴胺的缺失。帕金森病在中年以上的人群中是第四种最常见的神经退化疾病,影响 0.4% 的年过 40 岁的人,和 1% 的年过 65 岁的人。不管所提出的年龄,对于那些受折磨的患者该疾病常常造成毁灭性的结果。

造成神经系统的痛苦如此难以对付的原因是常常遭受到的破坏是不可逆的。对于这些疾病主要希望是发展能够重建神经网络的细胞群体,并使神经系统的功能恢复协调。有趣的证据显示胎儿多巴胺能神经元移植可恢复帕金森病的化学异常。但是非常缺乏适当的组织。

由于这个原因,在神经祖细胞方面具有浓厚的兴趣。各种类型的谱系-限制前体细胞更新它们自己并驻留于中枢神经系统的选择性的位点(Kalyanl 等, Biochem Cell Biol, 6:1051, 1998)。推断的神经限制前体(Mayer-Proschel 等, Neuron, 19:773, 1997)细胞表达神经细胞粘着分子的聚唾液酸化(polysialylated)同种型(PS-NCAM)。据说它们具有产生各种类型神经元的能力,但不产生神经胶质细胞。另一方面,推断的神经胶质限制前体(Rao 等, Dev. Biol, 188:48, 1997)明显地具

有形成神经胶质而不是神经元的能力。推断的来自胎儿或成人组织的神经前体进一步描述于美国专利 5,852,832; 5,654,183; 5,849,553; 以及 5,968,829; 以及 WO 09/50526 和 WO 99/01159 中。

不幸的是,尚未显示从神经组织中分离的祖细胞具有足够的复制能力以产生用于人类临床治疗所必需的细胞数量。

另一个来源是从早期的胚胎组织中分离的多能细胞。在 25 年前胚胎干(ES)细胞最初分离自小鼠的胚胎(G. R. Martin, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78:7634, 1981)。人们认为 ES 细胞能够产生相同种类的实际上任何组织类型的子代。Li. Smith 等(Cur. Biol. 8:971, 1998)报道了通过谱系选择从小鼠 ES 细胞产生神经元前体。Bjorklund 等报道了从小鼠 ES 细胞生产功能性多巴胺能神经元(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 19:2344, 2002)。

仅仅最近才分离出人的 ES 细胞(Thomson 等, Science 282:114, 1998)。人 ES 细胞需要非常不同的条件来保持它们处于未分化的状态,或指导它们沿着具体的分化途径进行分化(美国专利 6,090,622 和 6,200,806; 澳大利亚专利 AU 729377, 和 PCT 出版物 WO 01/51616)。由于这一原因,如何从人的 ES 细胞制备相对同源的细胞群体了解得非常少。

PCT 出版物 WO 01/88104(Carpenter, Geron Corporation)描述了通过分化人 ES 细胞获得的神经祖细胞群体。获得的群体中超过 90%的呈 NCAM 阳性, 35%呈 β -微管蛋白阳性, 和 75%呈 A2B5 阳性。Zhang 等(Nature Biotech. 19:1129, 2001)随后报道了神经前体从人的 ES 细胞的分化。

迫切需要生产用于某些临床病症的治疗的进一步优化的神经细胞群体的技术。

综述

本发明提供了有效生产已从多能细胞分化为神经谱系细胞的灵长类细胞的系统。本发明的前体和末端分化的细胞可用于许多重要的应用,包括药物试验和恢复神经系统功能的药物的生产。

本发明的一个方面是包括高比例的具有神经谱系特征的细胞的细胞群体,例如神经元细胞和它们的前体。这些细胞可基于表型标记鉴别,例如 A2B5、NCAM、MAP-2、干蛋白、 β -微管蛋白 III 以及本发明后面列出的其它标记,和通过特征形态学和功能标准鉴别。

本发明的另一个方面是制备含有来自多能细胞的神经细胞的群体的方法,这些多能细胞例如胚胎干细胞、胚胎生殖细胞、初级胚胎组织、或来自具有分化(或被

改编)为含有神经表型的细胞的能力的胎儿或成人组织的干细胞。该方法包括用可溶性因子和有助于具有某些所需特性的神经细胞生长的环境条件的组合培养细胞。本发明包括优化用于分化多能干细胞为神经细胞的分化方法的策略,其中候选因子根据功能分组,并且所述干细胞或它们的子代用各种组合的因子组培养。鉴别对于生产所欲细胞类型重要的组,然后将每个组的各个成分一个一个地除去以确定所需的最小量的组合物。

通过例证,多能干细胞可通过在含有添加了例如头蛋白和促滤泡素抑制素的一种或多种 TGF- β 超家族拮抗物的固体表面上直接分化进行生产。另外,多能干细胞可培养为丛聚的或胚状体。各种成熟程度的神经细胞的富集包括在含有添加了促细胞分裂原或生长因子(例如 EGF 和 FGF)的培养基中培养,同时或随后以各种优化的组合添加神经营养蛋白(例如 NT-3 或 BDNF)和其它因子(例如 EPO)。在某些情况下使用的分化因子的列表在以下概括的描述和说明实施例中列出。任选地,专业人员还可使用进一步促进细胞富集的物理分离技术或操纵技术。

根据本发明制备的成熟的神经元及其前体可表征为细胞群体的子代或一个已建立的细胞系,成熟的神经元及其前体从这一细胞系衍生。这可通过诸如标准 DNA 指纹分析等一些适当的技术显示基本上与亲本群体一致的神经细胞的基因组得以证实。另外,可通过检查神经细胞衍生过程中的记录建立这一关系。神经细胞衍生自亲本细胞群体的特征在一些方面是重要的。特别地,未分化的细胞群体可用于生产具有共有基因组的附加细胞—或者另一批神经细胞,或者可用于治疗的另一种细胞类型—例如能够使患者预先耐受(pretolerize)神经异源移植的组织相容性类型的群体。

在本发明的一个实施例中,神经细胞从如所描述的分化为神经元前体细胞的人多能细胞制备,然后在培养物中传代。使用胚胎干细胞作为起始细胞类型,促进快速发展的群体的产生,尽管如此该群体仍然保持最终分化为功能神经元的全部活性—或者当用缺乏促细胞分裂原的神经营养蛋白培养时,或者当给予适当的受检者时。某些前体细胞群体在培养物中具有进行至少 10、20 或 40 倍群体加倍的能力,而当进一步分化时不会丢失它们形成高度富集的神经元群体的能力。根据使用的条件,可生产前体群体,该群体具有分化为高比例的酪氨酸羟化酶阳性细胞的能力。这种表型与多巴胺能神经元一致,是治疗帕金森病所希望的。

本发明的细胞可用于筛选神经细胞毒性的化合物、调节神经元细胞功能的能力、或辅助神经元衍生和增殖的能力。

本发明的细胞还可用于在一个个体中重建或添加神经系统的功能,其中该给予

该个体本发明的分离的细胞或细胞群体。为了这一目的，该分离的细胞或细胞群体被配制成为一种用于治疗影响神经系统的疾病的药物。

这些和本发明其它的实施例将在随后的描述中揭示。

附图

图 1 是显示神经元细胞的荧光显微照相，该神经元细胞是通过在使用分化因子的混合物的固体基质上直接分化 ES 细胞获得的。显示的三个区域都取自包含神经营养蛋白和 TNF- β 超家族拮抗物头蛋白和促滤泡素抑制素的处理。观察到许多细胞对于神经元标记物 β -微管蛋白-III 进行神经元加工和着色。MAP-2 阳性细胞，同时也对酪氨酸羟化酶（一种多巴胺能神经元标记物）呈阳性的细胞比例高达约 15%。

图 2 显示通过直接分化从 hES 细胞制备神经元的情况。当未分化的细胞在层粘连蛋白上铺板并用 TGF- β 超家族拮抗物头蛋白(N)和促滤泡素抑制素(F)(A 组)培养时 β -微管蛋白阳性神经元的产量很高。在干细胞因子存在而促细胞分裂原不存在的情况下(处理 F, B 组)产量被进一步提高。视黄酸提高了产生的神经元的数量(C 组)，但是减少了神经元对酪氨酸羟化酶(TH)阳性染色的比例(D 组)。

图 3 显示制备神经元的情况，其中通过培养 hES 形成胚状体引发分化。然后该细胞在促细胞分裂原中培养，进行不同的胰蛋白酶消化，然后在含有促细胞分裂原或神经营养因子混合物的培养基中多次传代。当促细胞分裂原和神经营养蛋白一起使用时，细胞可传代约 40 倍(A 组)，保持增殖的能力和分化为成熟神经元的能力(B 组)。

图 4 显示在表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)、脑衍生神经营养因子(BDNF)和神经营养蛋白 3(NT)的混合物中传代细胞，产生神经前体群体，该前体群体依据分化产生 TH-阳性细胞占群体中所有细胞的约 7%的细胞群体(A 组)。用于前体细胞末端分化的混合物还可改进 TH-阳性细胞的生产(B 组)。

详细描述

人们已经发现当多能干细胞在选择的分化试剂存在的条件下培养时，衍生出含有相当高比例的具有成熟神经细胞或其前体的表型特征的细胞的细胞群体。这些细胞适合用于药物筛选和与神经系统异常有关的病症的治疗。

本发明包含的系统通过从一个已建立的人胚胎干(hES)细胞系获得的细胞群体说明。可通过下文描述的一些技术引发分化，例如形成胚状体，或通过在一个具有

一种或多种 TGF- β 超家族拮抗物存在的适当的基质上培养 hES 细胞。获得前体细胞, 该前体细胞属于神经元谱系, 并且它可进一步分化为成熟神经元。

如图 3(A) 中所显示的, 从 hES 细胞形成的神经元前体可在培养基中被传代约 40 倍。值得注意的是, 如图 3(B) 所显示的, 甚至在多次传代后, 这些细胞仍保持了分化为成熟神经元的全部能力。以前在人的神经细胞的培养中, 没有利用这种增殖能力和分化能力强有力的结合。

根据本发明获得的成熟神经元延伸了这种细胞类型的特征, 显示对于神经元-特异性标记物如神经丝和 MAP-2 的着色, 并且如通过对突触小泡蛋白染色检测到的, 显示突触形成的证据。这些细胞对各种神经递质物质做出反应, 并且如在标准膜片钳系统中测定的具有动作电位。在所有这些方面中, 该细胞明显具有全部的神经功能。

特别的重要性是该系统可被调节以优化能够产生具有医疗重要特性的神经元的前体的比例的能力。图 1 显示了对于酪氨酸羟化酶染色为阳性的神经元, 这是多巴胺能神经元的特征。这种类型的细胞对于帕金森病的治疗的特别需要的, 但是以前没有描述过其它来源可提供具有足够丰度的适当种类的细胞。如图 4 中所显示的, 在含有促细胞分裂原 EGF 和 FGF-2, 以及神经营养蛋白 BDNF 和 NT-3 的培养基中传代前体细胞, 产生能够产生 TH-阳性细胞占群体全部细胞的约 7% 的增殖细胞群体。

既然本发明的多能干细胞和一些谱系-限制性前体在培养基中大量增殖, 本公开描述的系统提供了神经元细胞无限制的供给。可在未分化的多能干细胞水平上, 或在属于神经前体的水平上发生大规模的扩展。本发明的细胞在研究、药物开发和 CNS 异常的治疗上具有重要的用途。

定义

为了本公开的目的, 术语“神经祖细胞”或“神经前体细胞”是指能够产生或者是神经元细胞(例如神经元前体或成熟神经元)或者是神经胶质细胞(例如胶质前体、成熟星形胶质细胞或成熟少突神经胶质细胞)的子代的细胞。典型地, 当它们自身体外培养时, 它们不产生其它胚胎胚层的子代, 除非以某种方式去分化或重编程。

“神经祖细胞”或“神经前体细胞”是能够产生成熟神经元子代的细胞。这些细胞也可能或不可能具有产生神经胶质细胞的能力。一个“神经胶质祖细胞”或“神经胶质前体细胞”是能够产生成熟星形胶质细胞或成熟少突神经胶质细胞子

代的细胞。这些细胞也可能或不可能具有产生神经元细胞的能力。

一种“分化试剂”，如本公开中所使用的，是指一种化合物的收集，该化合物用于本发明的培养系统中以产生神经谱系的分化细胞(包括前体细胞和末端分化的细胞)。对于化合物的作用方式无意限制。例如，该试剂可通过诱导或辅助表型变化、促进具有特殊表型的细胞生长或延缓其它细胞的生长、或与其它试剂合作通过未知机制发挥作用来辅助分化过程。

原型“灵长类多能干细胞”(pPS 细胞)是衍生自受精后任一时间的胚前期、胚胎或胎儿的多能细胞，并具有能够在适当的条件下生产一些不同的细胞类型的子代的特征，该不同细胞类型是所有三个胚层(内胚层，中胚层和外胚层)的衍生物，根据标准的本领域已接受的检验，例如在8-12周大的SCID小鼠中形成畸胎瘤的能力。包含于pPS细胞定义的是各种类型的胚胎细胞，例如人胚胎干(hES)细胞，和人胚胎生殖细胞(hEG)。该pPS细胞较佳地不是衍生自恶性来源。细胞是整倍体的是理想的(但不总是必需的)。

当群体中大部分的干细胞和它们的衍生物显示未分化细胞的形态特征时pPS细胞培养物被描述为“未分化的”，将他们与胚胎或成人来源的分化细胞相区别。应理解群体内未分化细胞的集落常常为邻近的分化细胞所包围。

“饲养细胞”或“饲养者”是用于描述与另一种类型的细胞共培养的一种类型的细胞的术语，以提供一种环境，在这种环境中第二种类型的细胞可以生长。据说pPS细胞群体“基本上不含”饲养细胞，如果在分裂后这些细胞生长至少一轮，其中没有加入新鲜的饲养细胞以支持pPS细胞的生长。

术语“胚状体”指当pPS细胞在单层培养物上过量生长或保持在悬浮培养物中时出现的分化的和未分化的细胞的聚集体。胚状体是典型地来自几个胚层的不同细胞类型的混合物，可通过形态学标准和使用免疫细胞化学可检测的细胞标记物区别。

“生长环境”是一种感兴趣的细胞可以在其中体外增殖、分化或成熟的环境。环境的特征包括培养细胞的培养基，可存在任何生长因子或分化诱导因子，以及如果存在的话一种支撑结构(例如在固体表面上的基质)。

当一个多核苷酸通过任何适当的人工操作手段转移到细胞时，或者其中细胞是遗传了该多核苷酸的最初改变的细胞的子代，细胞被称做“遗传改变”、“转染”或“遗传转化”。该多核苷酸常常包含编码感兴趣的蛋白质的可转录的序列，它能使细胞以提高的水平表达蛋白质。如果改变的细胞的子代具有相同的改变那么遗传改变是“可遗传的”。

一般技术

分子遗传学和遗传基因工程的一般方法描述于最近出版的《分子克隆实验手册(*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*)》(Sambrook 等, Cold Spring Harbor); 《哺乳动物的基因转移载体(*Gene Transfer Vectors for Mammalian Cell*)》(Miller & Calos 编); 和《分子生物学现代流程(*Current Protocols in Molecular Biology*)》(F.M. Ausubel 等编, Wiley & Sons)。细胞生物学、蛋白质化学和抗体技术可在《蛋白质科学现代方案(*Current Protocol in Protein Science*)》(J.E. Colligan 等编, Wiley & Sons); 《细胞生物学现代方案(*Current Protocol in Cell Biology*)》(J.S. Bonifacino 等, Wiley & Sons)和《免疫学现代方案(*Current Protocol in Immunology*)》(J.E. Colligan 等编, Wiley & Sons)中发现。

细胞培养方法通常描述于最近出版的《动物细胞培养:基础技术手册(*Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*)》(R. I. Freshney 编, Wiley & Sons); 《细胞培养一般技术(*General Techniques of Cell Culture*)》(M. A. Harrison & I. F. Rae, Cambridge Univ. Press), 以及《胚胎干细胞:方法和流程(*Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols*)》(K. Turksen 编, Humana Press)。

关于神经系统异常的详细描述、以及各种类型的神经细胞、标记物和相关可溶因子的特征, 读者可参考《CNS 再生:基础科学和临床进展(*CNS Regeneration: Basic Science and Clinical Advances*)》, M. H. Tuszynski & J. H. Kordower 编, Academic Press, 1999。神经细胞的管理和饲养描述于《神经元:细胞和分子生物学(*The Neuron: Cell and Molecular Biology*)》第三版, I. B. Levitan & L. K. Kaczmarek, Oxford U. Press, 2001; 和《组织培养中的神经元(*The Neuron in Tissue Culture*)》, L. W. Haynes 编, John Wiley & Son Ltd, 1999。

干细胞的来源

本发明可使用各种类型的干细胞进行。具体适用于本发明的是衍生自怀孕后形成的组织的灵长类多能干(pPS)细胞, 例如胚泡、或胎儿或取自怀孕过程中的任何时间的胚胎组织。如下文所描述的, 非限制性的例子是胚胎干细胞或胚胎生殖细胞的初级培养物或已建立的细胞系。本发明的技术还可用初级胚胎或胎儿组织直接进行, 直接从初级胚胎细胞衍生神经细胞, 而不需要最初建立一个未分化的细胞系。

胚胎干细胞可从灵长类成员的胚泡中分离(美国专利 5,843,780; Thomson 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844, 1995)。可使用 Thomson 等(美国专利 6,200,806; Science 282:1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998)和 Reubinoff

等(Nature Biotech. 18:399, 2000)描述的技术从人的胚胎细胞中制备人的胚胎干(hES)细胞。与 hES 细胞等价的细胞类型包括它们的多能衍生物,例如原始外胚层样(EPL)细胞,描述于 WO 01/51610(Bresagen)。

人胚胎生殖(hEG)细胞可从存在于取自末次月经后约 8-11 周的人胎儿材料中的原生殖细胞制备。适当的制备方法描述于 Shamblott 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998 和美国专利 6,090,622。

使用促进增殖而不是促进分化的培养条件, PPS 细胞可在培养物中连续繁殖。典型的含血清的 ES 培养基用 80%的 DMDM(如敲除 DMEM(Knockout DMEM), Gibco)、20%的或者限定的胎牛血清(FBS, Hyclone)或者血清替代物(WO 98/30679)、1%的非必需氨基酸、1mM 的 L-谷氨酰胺和 0.1mM 的 β -巯基乙醇制备。当使用前,加入人的 bFGF 至 4ng/ml(WO 99/20741, Geron 公司)。

常规地, ES 细胞在一层饲养细胞上培养,典型地一个混合的细胞群体衍生自胚胎或胎儿组织(美国专利 6,200,806)。在 Geron 的科学家发现即使没有饲养细胞 pPS 细胞也能保持未分化的状态。可在细胞外的基质上(例如 Matrigel®或层粘连蛋白)支撑不含饲养细胞的培养物,并在含有支持细胞的增殖而不支持分化的因子的营养培养基中培养。典型的是通过用分泌这种因子的细胞预培养获得调整的培养基,例如照射初级小鼠胚胎成纤维细胞(或衍生自人胚胎干细胞的成纤维细胞样细胞),在调整前和调整后添加 8ng/ml 的碱性 FGF。在显微镜下, ES 细胞出现高的核/胞质比、显著的核仁和紧密的群体形成,典型地表达例如 SSEA 3 和 4 的特征表型标记物。在国际专利申请 WO 99/20741 和 WO 01/51616 中提供了关于胚胎干细胞的管理和饲养的进一步详细的描述。

描述于本发明的一些技术还可用于保持或推进从胎儿或成体组织获得的神经细胞或神经前体的分化(美国专利 5,852,832;5,654,183;5,849,553;和 5,968,829;和 WO 99/50526 和 WO 99/01159)。除非特别指出,本发明可使用任何脊椎动物种类的细胞进行,包括人、非-人灵长类、家畜和其它非-人哺乳动物。

制备神经前体和末端分化细胞的材料和步骤

本发明的神经祖细胞和成熟神经元可通过使用适当的分化示例分化干细胞。

典型地,分化过程是在含有适当的基质和添加了分化试剂的营养培养基的培养环境中进行。适当的基质包括包被有正电荷的固体表面,例子为聚-L-赖氨酸和聚鸟氨酸。基质可用细胞外基质成分包被,例子为粘连蛋白和层粘连蛋白。其它允许的细胞外基质包括 Matrigel®(来自 Engelbreth-Holm-Swarm 肿瘤细胞的细胞外基

质)。还有适当的基质是组合基质,例如聚-赖氨酸结合粘连蛋白、层粘连蛋白或二者都结合。

本发明的神经谱系细胞是在支持所欲的细胞类型增殖或存活的培养基上培养的。常常需要使用提供如游离氨基酸而不是血清的营养素的限定的培养基。向培养基中添加开发用于神经细胞持续培养的添加剂也是有益的。例子是 N2 和 B27 添加剂,从 Gibco 商业购得。

沿神经分化途径发展细胞通过包含于培养基中得以促进,该培养基是一种增加所欲的细胞类型生长的分化试剂的混合物。这可能涉及指导细胞或它们的子代接受分化的细胞类型的表型特征,促进具有所欲表型的细胞的生长或抑制其它细胞类型的生长。为了实施本发明通常不需要理解试剂的作用方式。

适当的分化试剂包括各种类型的生长因子,例如表皮生长因子(EGF)、转化生长因子 α (TGF- α)、任何类型的成纤维细胞生长因子(例子为 FGF-4、FGF-8,和碱性成纤维细胞生长因子=bFGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、胰岛素样生长因子 1(IGF-1 和其它)、高浓度的胰岛素、sonic hedgehog、神经营养蛋白家族的成员(例如神经生长因子=NGF、神经营养蛋白 3=NT-3、脑衍生神经营养因子=BDNF)、骨形态发生蛋白(特别是 BMP-2 和 BMP-4)、视黄酸(RA)和于 gp130 混合的受体的配体(例如 LIF、CNTF 和 IL-6)。还有其它适当的分化试剂是另一种与前面提到的因子的各个细胞-表面受体结合的配体和抗体。典型地,使用了许多分化试剂,它们可含有 2、3、4 或更多上文列出的或下文实施例中所描述的试剂。

在一种分化方法中, pPS 细胞在一个适当的基质上直接铺板,例如粘着的玻璃或塑料表面,例如用聚赖氨酸包被、具有或不具有例如纤连蛋白和层粘连蛋白的神经元-友好基质蛋白的盖玻片。然后该细胞培养于适当的培养基中,该培养基适合于促进向神经细胞的分化。这被称做“直接分化”方法,它进一步描述于国际专利申请 WO 01/51616 和具有优先权的美国专利申请 09/888,309。TGF- β 超家族拮抗物例如头蛋白和促滤泡素抑制素在指导神经分化和增加带有通过直接分化获得的神经细胞的表型特征的细胞比例中特别有用(实施例 4)。

在另一种分化方法中, pPS 细胞首先通过形成细胞簇预分化为异源细胞群体。在一个典型的变化中,通过在悬浮液中培养 pPS 细胞形成胚状体。任选地,前面列出的一种或多种分化试剂(例如视黄酸)可包含于培养基中以促进胚状体内的分化。胚状体达到足够大小或成熟后(典型地 3-4 天),它们在分化培养的基质上铺板。胚状体可直接铺板于基质上而不分散细胞。这使得神经细胞前体移出胚状体并到达细胞外基质上。在一些步骤中,该细胞首先培养于促细胞分裂原混合物中,例如 EGF、

bFGF、PDGF 和 IGF-1, 然后在促细胞分裂原和神经营养蛋白的组合物中传代以选择神经祖细胞。

本发明包括鉴别有效产生具体神经表型的因子组合物的策略。根据对来自其它组织或种类的神经细胞的已知作用, 已知的受体结合活性, 与其它已知功能的因子的结构同源性或其它适当的标准, 将已知或怀疑增强神经分化或生长的各种因子分为各种功能类别。各个类别中的因子以适当的工作浓度集合。然后以各种组合, 用各个因子类别一起培养细胞, 并且评估因子促进前体细胞或所欲类型的成熟神经元生长的能力。鉴别必需的因子类别, 当这些因子缺乏时导致混合物丢失其促进所欲表型的能力。一旦鉴定了必需因子并除去其它因子, 那么通过除去单一的成分仔细分析各个类别直到鉴定出最低限度的混合物。实施例 4 中举例说明了这一策略的实施。

如果需要, 分化的细胞可被分类以富集某些群体。例如, 细胞可用与神经细胞的标记物特征(例如 NCAM)结合的抗体或配体接触, 随后使用适当的免疫技术, 例如固相吸附或荧光-活化细胞分类, 分离特异性识别的细胞。还适合的是差别铺板或收获技术, 其中使用所欲细胞类型的粘附或可释放性从一个异源群体的其它细胞中分离所欲的细胞。

已经发现神经前体表型可使用促细胞分裂原(例如 bFGF 和 EGF)的组合, 加之一种或多种神经营养蛋白(例如 BDNF、NT-3 或二者), 在增殖培养物中传代。这在实施例 2、4 和 5 中举例说明。根据本方法, 该细胞可被传代达 40 倍(图 3), 而保持增殖的能力和制成成熟神经元的能力。

假定定向祖细胞在人的治疗中具有特别的价值, 因为它们操作起来更具有弹性, 并且将保持迁移到靶组织的更大的能力并以功能相容的形式整合。祖细胞可在如实施例 5 中说明的固体表面上或悬浮液培养物中生长, 在那里它们倾向于形成簇或球形结构。通过举例说明当接近融合时使用胰蛋白酶收集神经祖细胞。然后细胞以约一半的密度在无粘着力的加样孔中接种, 并培养于含有 10ng/ml 的 BDNF、NT-3、EGF 和 bGFG 的补充培养基中, 每周更换 3 次。

在神经祖细胞衍生或保持过程中培养基其它成分的明智选择可影响它们能产生的成熟细胞的范围和特征。如实施例 4 中所描述的, 在神经祖细胞直接分化过程中包含于培养基中的视黄酸提高了最终分化时产生的 MAP-2 细胞的比例-但是降低了与多巴胺能神经元有关的对酪氨酸羟化酶(TH)呈阳性的细胞的比例。另一方面, 人们发现在神经祖细胞形成过程中包含于培养基中的红细胞生成素(EPO)或提高环状 AMP 水平的试剂增强了形成 TH 阳性神经元的能力。另外, 细胞可用活化 EPO 途

径的某些抗体或拮抗物培养,或细胞可在适度的含氧量低的条件下培养(低 O_2 水平指 3-6%)。使用 EPO 增加多巴胺能表型的形成描述于实施例 3 中。

根据这些步骤中的任一步骤制备的神经前体细胞可进一步分化为成熟成熟神经元。完全分化的细胞是本发明的各种应用所希望的,例如体外评估和筛选各种化合物对神经组织的作用。对于使完全分化的细胞表征产生完全分化的细胞的神经祖细胞的功能性也是有用的。

可通过使用成熟因子培养神经前体细胞形成成熟神经元,成熟因子例如毛喉素(或其它提高细胞内 cAMP 水平的化合物,例如霍乱毒素、异丁基甲基黄嘌呤、二丁基腺苷环状一磷酸)、c-试剂盒配体(c-kit ligand)、视黄酸或来自神经营养蛋白家族的任何因子或因子组合物。特别有效的是神经营养蛋白-3(NT-3)与脑衍生神经营养因子(BDNF)结合。其它候选物是 GDNF、BMP-2 和 BMP-4。另外,可通过除去一些或全部促进神经前体增殖的因子增进成熟,例如 EGF、FGF 或其它预先用于维持培养的促神经分裂素。

进一步的合理修改

本发明的神经细胞前体群体具有相当大的增殖能力。如果需要,可通过提高细胞中端粒酶逆转录酶(TERT)的水平,或者通过从内源基因提高转录,或通过导入转基因进一步增强复制能力。特别适合的是国际专利申请 WO 98/14592 提出的人端粒酶(hTERT)催化成分。人的细胞中端粒酶的转染和表达描述于 Bodnar 等, Science 279:349, 1998 和 Jiang 等, Nat. Genet. 21:111, 1999。根据标准方法,遗传改变的细胞可通过 TR-PCR 评估 hTERT 的表达,端粒酶的活性(TRAP 测定),hTERT 的免疫细胞化学染色或复制能力。

为了在治疗和其它应用中使用,常常需要前体或成熟神经细胞的群体为基本上游离的未分化的 pPS 细胞。从群体中减少未分化的干细胞的一条途径是用载体转染它们,在这个载体中一个在启动子控制下的效应基因引起未分化的细胞优先表达。适当的启动子包括 TERT 启动子和 OCT-4 启动子。效应基因可直接溶解于细胞(例如编码一种毒素或编程性细胞死亡的介质)。另外,效应基因可使细胞对外部试剂的毒性效应敏感,例如一种抗体或一种前体药物。典型的例子是单纯疱疹胸苷激酶(*tK*)基因,它引起它被表达的细胞对鸟嘌呤的敏感。适当的 pTERT-*tK* 构建物描述于国际专利申请 WO 98/14593(Morin 等)中。

神经前体和末端分化的细胞的特征

细胞可依据许多表型标准进行表征,例如形态学特征、表达的细胞标记物的检测或定量、酶活、或神经递质及它们的受体和电生理机能。

包含于本发明的某些细胞具有神经细胞或神经胶质细胞的形态学特征。这些特征为那些熟练评估这种细胞存在的技术人员是容易地理解。例如,神经元的特征是小细胞体,多数具有轴突和树突。本发明的细胞还可根据它们是否表达各种神经细胞的表型标记物特征进行表征。

感兴趣的标记物包括但不限于 β -微管蛋白 III、微管相关蛋白 2 (MAP-2)、或神经丝,神经元的特征;存在于星形胶质细胞中的胶质原纤维酸性蛋白 (GFAP);半乳糖脑苷 (GalC) 或髓磷脂碱性蛋白 (MBP),少突神经胶质细胞的特征;Oct-4,未分化的 hES 细胞的特征;和干蛋白,神经前体和其它细胞的特征。已经描述了 A2B5 (一种糖脂) 和聚唾液酸化 (polysialylated) 的神经细胞粘着分子 (简称为 NCAM)。而当研究神经谱系细胞时, A2B5 和 NCAM 是指示标记物,应理解有时这些标记物可在其它细胞类型上显示,例如肝或肌肉细胞。以前认为 β -微管蛋白 III 对神经细胞是特异性的,但已发现 hES 细胞的亚群体也呈 β -微管蛋白 III 阳性。MAP-2 对于全部各种类型的分化神经元是更加严格的标记物。根据本发明制备的某些细胞群体含有至少 30%、50%、75%、90% 或更多的对这些标记物具有检验阳性的细胞,这些标记物或者是单一的或者是以各种组合存在。

列于本公开的和本领域已知的组织-特异性标记物可使用任何适当的免疫技术检测—例如用于细胞表面标记物的流式免疫细胞化学,用于细胞内或细胞表面标记物的免疫组织学 (例如,固定细胞或组织切片的免疫组织学),细胞提取物的蛋白质印迹分析,和用于细胞提取物或分泌进入培养基的产物的酶-联免疫分析。如果任选地在细胞固定后,和任选地使用标记的第二抗体或其它偶联物 (例如生物素-抗生物素蛋白偶联物) 扩增标记物,在标准免疫细胞化学或流式细胞仪分析中明显的可检测数量的抗体将与抗原结合,那么通过细胞的抗原的表达被称做“可检测的抗体”。

组织特异性基因产物的表达还可通过 RNA 印迹分析、斑点印迹杂交分析,或使用标准扩增方法中的序列特异性引物通过逆转录酶引发的聚合酶链反应 (RT-PCR) 在 mRNA 水平上检测。关于更详细的描述参见美国专利 5,843,780。列于本公开中的具体的标记物的序列数据可从公共数据库例如 GenBank (URL www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez) 获得。根据本公开描述的分析方法中的一种,如果在一个典型的控制试验中根据标准步骤进行对细胞样品的分析产生明显可鉴别的杂交或扩增产物,那么在 mRNA 水平上的表达被称做“可检测的”。如果表达水平至少为 2 倍,和

较佳地大于对照细胞 10 或 50 倍,例如未分化的 pPS 细胞、成纤维细胞或其它无关的细胞,那么当在蛋白质或 mRNA 水平上检测时,组织特异性标记物的表达被认为是阳性的。

还是神经细胞的特征的是,具体是末端分化的细胞,涉及生物合成、释放和神经递质的再摄取的受体和酶,和涉及有关突触传递的去极化和复极化事件的离子通道。突触形成的证据可通过突触小泡蛋白的染色获得。某些神经递质的感受性的证据可通过检测 γ -氨基丁酸(GABA)、谷氨酸、多巴胺、3,4-二羟苯丙氨酸(DOPA)、去甲肾上腺素、乙酰胆碱和血清素的受体获得。

本发明具体的神经前体细胞群体的分化(例如使用 NT-3 和 BDNF)可产生至少为 20%、30%或 40%的 MAP-2 阳性的细胞群体。一个基本的比例,如 5%、10%、25%或更多的 NCAM 或 MAP-2 阳性的细胞(在细胞计数的基础上)将能够合成神经递质,例如乙酰胆碱、甘氨酸、谷氨酸、去甲肾上腺素、血清素或 GABA。本发明的某些细胞群体含有 NCAM 或 MAP-2 阳性细胞,通过免疫细胞化学或 mRNA 表达测定,该细胞中 1%、5%、10%或更多对酪氨酸羟化酶(TH)呈阳性—或者作为 NCAM 或 MAP-2 阳性细胞的百分比,或者存在于群体中的所有细胞。本领域中通常认为 TH 是多巴胺能细胞的标记物。

为了进一步阐明存在于分化群体中的成熟神经元,可根据功能标准测定细胞。例如,可使用任何标准技术、对神经递质的反应、或已知影响体内神经元的其它环境条件测定钙通量。首先,通过形态学标准、或通过例如 NCAM 的标记物鉴别群体中的神经元样细胞。然后神经递质或条件应用于细胞,并监测反应。还可对细胞运用标准膜片钳技术,以测定是否有动作电位的证据,以及外加电势和反应之间的滞后时间是怎样的。

这里衍生自己建立的 pPS 细胞系的本发明的细胞群体和分离的细胞可表征为具有与它们衍生自的细胞系相同的基因组。这意味着在 pPS 细胞和神经细胞之间染色体 DNA 将具有超过 90%的同一性,如果神经细胞是通过正常的有丝分裂过程从未分化的细胞系获得的,那么这是可以推断的。既然保留了所有非-操作的遗传因子,用重组方法以导入一个转基因(例如 TERT)或敲除一个内源基因处理的神经细胞仍被认为与它们衍生自的细胞系具有相同的基因组。

神经前体和末端分化的细胞的应用

本发明提供了生产大量的神经前体细胞和成熟神经元和神经胶质细胞的方法。这些细胞群体可用于重要的研究、开发和商业目的。

本发明的细胞可用于制备 cDNA 文库, 该 cDNA 文库相对地没有为来自其它谱系的细胞中优选表达的 cDNA 所污染。例如, 通过在 1000rpm 离心 5 分钟收集多能神经祖细胞, 然后制备 mRNA, 逆转录, 并任选地减去来自成熟神经元、星形胶质细胞、或少突神经胶质细胞或未分化的星形胶质细胞的 cDNA。神经元的表达模式可通过显微排列分析与其它细胞类型相比较, 通常参考 Fritz 等, Science 288:316, 2000; 《微阵列生物芯片技术 (Microarray Biochip Technology) 》, L Shi, www.Gene-Chips.com。

本发明分化的细胞还可用于制备抗体, 该抗体对多能神经祖细胞、属于神经元或神经胶质细胞谱系的细胞和成熟神经元、星形胶质细胞和少突神经胶质细胞的标记物具有特异性。可以免疫原性的形式用本发明的细胞注射脊椎动物制备多克隆抗体。单克隆抗体的生产描述于如 Harrow 和 Lane(1988), 美国专利 4,491,632, 4,472,500 和 4,444,887, 和《酶法 (Methods in Enzymology) 》73B:3(1981)的标准参考书中。

商业兴趣的应用包括使用细胞筛选小分子药物, 和制备含有用于临床治疗的神经元的药物组合物。

药物筛选

本发明的神经前体细胞可用于筛选影响神经前体细胞和它们的各种子代的特征的因子(如溶剂、小分子药物、肽、多核苷酸)或环境条件(例如培养条件或操作)。

在一些应用中, pPS 细胞(未分化的或分化的)用于筛选促进神经细胞成熟或促进这种细胞在长期培养中增殖和保持的因子。例如, 通过在不同的加样孔中向细胞中加入候选成熟因子或生长因子检验它们, 然后测定获得的任何表型变化, 根据所需的标准进一步培养和使用细胞。

本发明的其它筛选应用涉及检验药物化合物对神经组织或神经传导的影响。进行筛选可能或者是由于设计的化合物具有对神经细胞的药物作用, 或者是由于设计的化合物在别处有作用, 可能对神经系统具有意想不到的副作用。可使用本发明的任何神经前体细胞或末端分化的细胞进行筛选, 例如多巴胺能、5'-羟色胺能、胆碱能、感觉和运动神经元、少突神经胶质细胞和星形胶质细胞。

读者通常参考标准教科书《药物研究的体外方法 (In vitro Methods in Pharmaceutical Research) 》, Academic Press, 1997, 和美国专利 5,030,015。候选药物化合物活性的评估通常包括将本发明分化的细胞与候选化合物结合, 或者单独的或者与其它药物结合。研究者测定可归因于化合物的细胞的形态、标记物表型

或功能活性的任何变化(与未处理的细胞或用无活性的化合物处理的细胞比较),然后把化合物的作用与观察到的变化联系起来。

首先通过对细胞生活力、存活、形态和某些标记物和受体的表达的影响确定细胞毒性。药物对染色体 DNA 的影响可通过测定 DNA 合成或修复确定。尤其是在细胞周期中以不定期的次数,或者在超出细胞复制所需要的水平上, [^3H]-胸苷或 BrdU 的掺入与药物的作用一致。副作用还可包括通过中期扩散测定的姊妹染色单体交换的异常比率。关于进一步详细的描述读者可参考 A. Vickers 的《药物研究的体外方法(*In vitro Methods in Pharmaceutical Research*)》375-410 页, Academic Press 1997)。

细胞功能的作用可使用任何标准分析观察神经细胞的表型或活性进行评估,例如受体结合、神经递质合成、释放或吸收、电生理和神经元突起和髓鞘的生长—或者在细胞培养物中或者在一个适当的模型中。例如,药物改变突触性接触和可塑性的能力可通过突触或突触小泡蛋白的免疫细胞化学染色在培养物中测定。电生理可通过测定 IPSP 和 EPSP(抑制和刺激突触后电位)进行评估。另外,使用双电极系统,刺激一个细胞,评估系统中第二个细胞的反应。有候选药物存在的系统的行为与药物不存在的系统的行为进行比较,并与药物影响突触性接触或细胞可塑性的能力联系起来。

治疗用途

本发明还对可能是由于功能上的先天性障碍、疾病的影响或外伤的结果造成的需要这种治疗的受检者提供了使用神经前体细胞恢复一定程度的中枢神经系统(CNS)功能的用途。

为了确定用于治疗给予的神经前体细胞的适用性,首先可在适当的动物模型中检验该细胞。首先,评估细胞体内存活和保持它们的表型的能力。神经前体细胞在可观察的位点,例如在脑腔中或脊髓中给予免疫缺乏的动物(例如裸鼠、或通过化学或辐射致使免疫缺乏的动物)。在几天到几周或更多的一段时间后收集组织,并评估是否 pPS 衍生细胞仍然存在。

这可通过给予表达被预标记(例如用 BrdU 或 [^3H]-胸苷)的可检测的标记物(例如绿色荧光蛋白、或 β -半乳糖苷酶)的细胞进行;或通过构成细胞标记物的随后检测(例如使用人特异性抗体)进行。在啮齿类动物模型中检验神经前体细胞时,给予的细胞的存在和表型可使用人特异性抗体通过免疫组织化学或 ELISA 评估,或使用引起对人的多核苷酸序列具有特异性的扩增的引物和杂交条件通过 RT-PCR 分析评

估。在本公开的其它地方提供了用于在 mRNA 或蛋白质水平上评估基因表达的适当的标记物。

用于检验神经系统功能的各种动物模型描述于《*CNS 再生:基础科学和临床进展 (CNS Regeneration: Basic Science and Clinical Advances)*》, M.H. Tuszynski 和 Kordower 编, Academic Press, 1999。帕金森病可通过外伤诱导黑质纹状体损伤, 从而阻碍脑中主要的多巴胺途径在大鼠中建立模型。另一种标准动物模型是在具有 MPTP (1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶) 的小鼠或非人灵长类的黑质中多巴胺能神经元的化学损伤。在 Furns 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4546, 1983; Freed 等, Appl. Neurophysiol. 47:16, 1984; 和 Bjorklund 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 19:2344, 2002 中提供了例证。

在需要治疗的人类患者中, 本发明分化的细胞还可用于组织重建或再生。这些细胞以允许它们移植或迁移到预定的组织位点并重建或再生功能缺乏区域的方式给予。通过例证, 依据所治疗的疾病, 神经干细胞直接移植到中枢神经系统的实质或鞘内位点。使用单一的细胞悬浮液或密度为 25, 000-500, 000 细胞/ μ L 的小的聚集体进行移植(美国专利 5, 968, 829)。包含于本发明的某些神经祖细胞设计用于神经系统急性或慢性损伤的治疗。例如, 兴奋性神经毒性为各种条件所影响, 这些条件包括癫痫、中风、局部缺血和阿尔茨海默病。可配制多巴胺能神经元用于治疗帕金森病, GABA 能神经元用于治疗亨廷顿氏病, 和运动神经元用于治疗脊髓损伤或肌萎缩性侧索硬化(ALS)。

根据本发明, 神经祖细胞和末端分化的细胞可以药物组合物的形式供给, 该组合物含有在充分消毒的条件下制备的用于人的给予的等渗的赋形剂。关于药物配制的一般原则读者可参考由 G. Morstyn 和 W. Sheridan 编的《*细胞疗法:干细胞移植, 基因疗法和细胞免疫疗法 (Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy)*》, 剑桥大学出版社, 1996; 和《*造血干细胞疗法 (Hematopoietic Stem Cell Therapy)*》, E. D. Ball, J. Lister 和 P. Law, Churchill Livingstone, 2000。

该组合物可任选地包装于适当的容器中, 该容器上写出了对于所需目的的用法说明, 例如 CNS 功能的重建以改善某些神经异常。

提供下面的实施例用于进一步无限制地说明本发明具体的实施例。

实施例

实施例 1: 胚胎干细胞分化为成熟神经元

如以前所描述的(AU 729377; WO 01/51616), 从不含饲养细胞的培养物中获得人胚胎干细胞(hES)。如下生产胚状体。hES 细胞的融合的单层培养物通过在 1mg/ml 的胶原酶中培养 5-20 分钟获得, 随后从平板上刮下细胞。然后细胞被分离成簇, 并在包含 80%的 KO(“敲除”)DMEM(Gibco)和 20%的非-加热-灭活的 FBS(Hyclone), 添加有 1%的非必需氨基酸, 1mM 的谷氨酰胺, 0.1mM 的 β -巯基乙醇的培养基中的非-粘着细胞培养平板(Costar)中铺板。细胞在每孔 2ml 的培养基中(6 孔平板)以 1:1 或 1:2 的比例接种。

在悬浮液中 4 天后, 在添加了 10ng/mL 的人 EGF、10ng/mL 的人 bFGF、1ng/mL 的 PDGF-AA 和 1ng/mL 的人 IGF-1 的限定的培养基中, 胚状体在纤连细胞包被的平板上铺板。胚状体粘着到平板上, 并且细胞开始迁移到塑料上, 形成单细胞层。

3 天后, 观察到许多具有神经元形态的细胞。神经前体被鉴别为对 BrdU 掺入、干蛋白染色和谱系特异性分化标记物缺乏呈阳性的细胞。推定的神经元和神经胶质祖细胞被鉴定为对聚唾液酸化的 NCAM 和 A2B5 呈阳性。如通过流式细胞仪测定的, 41-60%的细胞表达 NCAM, 20-66%的细胞表达 A2B5。发现 NCAM-阳性细胞的亚群体表达 β -微管蛋白 III 和 MAP-2。这里没有与例如 GFAP 或 GalC 的神经胶质标记物的协同定位。A2B5 阳性细胞似乎生产神经元和神经胶质。A2B5 细胞的亚群体表达 β -微管蛋白 III 或 MAP-2, 而另一个分离的亚群体表达 GFAP。具有神经元形态的一些细胞对 A2B5 和 NCAM 进行双重染色。NCAM 阳性和 A2B5 阳性群体含有的神经元都远比神经胶质多。

通过在不含促细胞分裂原, 但是含有 10ng/mL 的神经营养蛋白-3(NT-3)和 10ng/mL 的脑衍生神经营养因子(BDNF)的培养基中将细胞重复铺板进一步分化细胞群体。约 7 天后观察到具有大量突起的神经元。衍生自保存于视黄酸(RA)的胚状体的培养物比那些衍生自保存于不含 RA 的胚状体的培养物(约 5%)显示更多的 MAP-2 阳性细胞(约 26%)。观察到 GFAP 阳性细胞呈斑点状。鉴别到 GalC 阳性细胞, 但是该细胞大而扁平而不具有复杂的突起。

评估神经递质合成的存在。鉴定到 GABA-免疫活性细胞共表达 β -微管蛋白 III 或 MAP-2, 并具有神经元细胞的形态特征。鉴定到偶尔有些 GABA-阳性细胞不共表达神经元标记物, 但却具有星形胶质细胞样形态。鉴定到神经元细胞表达酪氨酸羟化酶(TH)和 MAP-2。通过用突出小泡蛋白抗体染色鉴定到突出的形成。

在从人的 ES 细胞的 H9 细胞系分化的培养物中观察 TH 染色。胚状体保存于 10 μ M 的视黄酸中 4 天, 然后在 EGF、碱性 FGF、PDGF 和 IGF 中、在纤连蛋白包被的平板上铺板 3 天。接着它们在添加了 10ng/mL 的 NT-3 和 10ng/mL 的 BDNF 的 N2 培养基

中的层粘连蛋白上传代，并使之进一步分化 14 天。分化的细胞用 4%的多聚甲醛在室温下固定 20 分钟，然后使用抗体对 TH 显影，TH 是多巴胺能细胞的标记物。

实施例 2:多巴胺能细胞的富集群体

胚状体培养于具有 $10\mu\text{m}$ 的视黄酸的悬浮液中 4 天，然后铺板于添加了 EGF、bFGF、PDGF 和 IGF-1 的限定的培养基中 3-4 天。接着，通过磁珠分选或免疫淘选将细胞分离为 A2B5-阳性或 NCAM-阳性富集的群体。

免疫-选择的细胞保存于添加了 10ng/mL 的 NT-3 和 10ng/mL 的 BDNF 的限定的培养基中。14 天后， $25\pm 4\%$ 的 NCAM-分选的细胞为 MAP-2 阳性—其中 $1.9\pm 0.8\%$ 的细胞为 GABA-阳性， $3\pm 1\%$ 的细胞对酪氨酸羟化酶 (TH) 呈阳性：用于多巴胺合成的速度限制酶，常常被认为是多巴胺合成细胞的代表。

在对于 NCAM 分选的细胞群体中，NCAM 阳性的细胞不表达神经胶质标记物，例如 GFAP 或 GalC。这些资料表明含有神经元限制前体的群体可从 hES 细胞培养物直接分离，基本上不含神经胶质前体杂质。

另一方面，对于 A2B5 分选的细胞具有产生神经元和星形胶质细胞的能力。富集后，细胞放入添加了 NT-3 和 BDNF 的限定的培养基中，并使之分化 14 天。铺板后最初 1-2 天内，A2B5 富集群体中的细胞开始延伸突触。两周后，细胞呈现成熟神经元的形态，并且 $32\pm 3\%$ 的细胞为 MAP-2 阳性。重要的是， $3\pm 1\%$ 的 MAP-2 细胞为 TH-阳性，而只有 $0.6\pm 0.3\%$ 具有 GABA 免疫反应性。这些资料表明可从含有星形胶质细胞和神经元的祖细胞的 hES 细胞中获得细胞群体，包括合成多巴胺的细胞群体。

关于获得 TH-表达神经元的条件的进一步详细的说明如下。胚状体通过在 1mg/mL 的胶原酶中培养 (37°C ，5-20 分钟) 传代 32 次时从 H7 细胞系的融合 hES 细胞产生，刮削培养皿，并将细胞放入非-粘着培养平板中 (Costar®)。获得的 EB 培养于含有 FBS 和 $10\mu\text{M}$ 的全-反 (all-trans) 视黄酸的培养基中的悬浮液中。4 天后，收集聚集体并使之沉淀于离心管中。然后吸出上清液，并且聚集体在增殖培养基中 (添加 N2 的 DMEM/F12 1:1，半强度 B27， 10ng/mL 的 EGF (R&D 系统)， 10ng/mL 的 bFGF (Gibco)， 1ng/mL 的 PDGF-AA (R 和 D 系统)，和 1ng/mL 的 IGF (R 和 D 系统)) 的聚 L-赖氨酸和纤连蛋白包被的平板上铺板。

使 EB 附着并增殖 3 天；然后通过胰蛋白酶消化约 1 分钟 (Sigma) 收集并以 1.5×10^5 个细胞/孔的密度铺板于增殖培养基中的聚 L-赖氨酸和层粘连蛋白包被的 4-孔分室玻片上 1 天。然后将培养基改为 Neural Basal 培养基，该培养基添加了 B27，

以及下面的生长混合物之一:

- 10 ng/mL 的 bFGF (Gibco), 10 ng/mL 的 BDNF, 和 10 ng/mL 的 NT-3
- 10 ng/mL 的 bFGF, 5000 ng/mL 的 sonic hedgehog, 和 100 ng/mL 的 FGF8b
- 仅 10 ng/mL 的 bFGF

细胞保存于这些条件下6天,隔天饲养。在第7天,培养基改为具有B27的Neural Basal 培养基,添加了如下的混合物之一:

- 10 ng/mL 的 BDNF, 10 ng/mL 的 NT-3
- 1 μ M 的 cAMP, 200 μ M 的抗坏血酸
- 1 μ M 的 Camp, 200 μ M 的抗坏血酸, 10 ng/mL 的 BDNF, 10 ng/mL 的 NT-3

培养物隔天饲养直到第12天,这时固定它们并用抗-TH 或 MAP-2 进行标记用于免疫细胞化学。标记物的表达通过使用 40X 的物镜计数 3 个孔的每一个孔中的 4 个区域定量。

结果显示于表 1 中。最初培养于 bFGF、BDNF 和 NT-3 的产生最高比例的 TH 阳性细胞。

表 1:生产多巴胺能神经元的条件

培养条件		MAP-2 阳性 细胞的%	TH 阳性的 MAP- 2 细胞的%
1-6 天	6-12 天		
BDNF, NT-3, bFGF	BDNF, NT-3	26%	5.5%
BDNF, NT-3, bFGF	cAMP, AA (抗坏血酸)	35%	4.0%
BDNF, NT-3, bFGF	cAMP, AA, BDNF, NT-3	25%	8.7%
bFGF, FGF8, SHH	BDNF, NT-3	37%	3.7%
bFGF, FGF8, SHH	cAMP, AA	34%	3.9%
bFGF, FGF8, SHH	cAMP, AA, BDNF, NT-3	21%	5.8%
bFGF	BDNF, NT-3	28%	3.5%
bFGF	cAMP, AA	26%	4.1%
bFGF	cAMP, AA, BDNF, NT-3	22%	5.7%

实施例 3:通过用促红细胞生成素培养提高多巴胺能细胞的比例

在后来的实验中,胚状体在聚赖氨酸纤连蛋白包被的加样孔上铺板,并用 10 ng/mL 的 EGF、1 ng/mL 的 PDGF-AA、10 ng/mL 的 bFGF 和 1ng/mL 的 IGF-1 培养。第四天,向混合物中添加 5 U/mL 的 EPO、700 μ M 的 cAMP,或二者。细胞被重新铺板,并用 10 ng/mL 的 BDNF、10 ng/mL 的 NT-3,和任选的 EPO、cAMP 和 200 μ M 的抗坏血

酸处理 7 天。结果显示于表 2 中。在这个试验中培养物中 MAP-2 阳性的总的细胞比例异常地低。

表 2:生产多巴胺能神经元的条件			
培养条件			TH 阳性 MAP - 2 细胞的%(SD)
1-3 天	4-5 天	6-12 天	
EGF, bFGF, PDGF, IGF-1	EGF, bFGF, PDGF, IGF-1	BDNF, NT-3	20% (13 %)
(相同)	(相同)	BDNF, NT-3, EPO, cAMP, AA	24% (3 %)
(相同)	相同+EPO	BDNF, NT-3, EPO, cAMP, AA	31% (13 %)
(相同)	相同+cAMP	BDNF, NT-3, EPO, cAMP, AA	47% (2 %)
(相同)	相同+EPO 和 cAMP	BDNF, NT-3, EPO, cAMP, AA	57% (7 %)

这些数据提供了最初的证据，即在神经前体细胞衍生的过程中加入 cAMP 和 EPO 提高了最终获得的表达酪氨酸羟化酶的神经元的百分比。Studer 等报道在 EPO 存在或低氧分压的情况下中脑前体的增殖或分化产生较高数量的多巴胺能神经元 (J. Neurosci. 20:7377, 2000)。人们认为 EPO 在含氧量低的条件下具有神经保护作用，推动多能祖细胞趋向神经元通路 (Shingo 等, J. Neurosci, 21:9733, 2001)。这一作用可能是 Janus 激酶-2 和核因子卡巴 (NF- κ B) 之间通讯、Bcl-x (L) 表达的正调节、或 AP-1 (Jun/Fos) 通路的活化的结果。在 pPS 衍生的神经细胞中通过其它方法调节这些通路可模拟 EPO 的作用。

实施例 4:hES 细胞直接分化为多巴胺能神经元

这一研究评估用于分化人的 ES 细胞成为神经元而不形成胚状体的各种例子。开发了一种策略，其中根据同源性和/或功能的重复性将检验因子分成几组 (表 3)。分组因子提高了组内相关活性在 ES 细胞群体上将被引发的可能性。假设混合物中的某些因子将引发分化级联。当分化进行并细胞的受体表达特征改变时，它们将开始对混合物中的其它因子作出反应。

在整个治疗期间持续地提供复杂的因子混合物避免精确地限定如何和何时改变细胞的反应的需要。当混合物被鉴定引起所需的分化过程时，它可被系统地简化以获得最小量的最佳的混合物。进一步检验后，最少量的处理可能最终包括一个、两个、三个或更多所列出的因子，根据依据经验确定的步骤同时或者依次使用。

表 3: 检验因子组

组 1 神经营养蛋白	组 2 促细胞分裂原	组 3 干细胞因子
30 ng/mL 的 NGF	30 ng/mL 的 EGF	8 ng/mL 的 LIF
30 ng/mL 的 NT-3	30 ng/mL FGF-2(碱性 FGF)	3 ng/mL 的 IL-6
30 ng/mL 的 NT-4	37 ng/mL 的 FGF-8b	3 ng/mL 的 IL-11
30 ng/mL 的 BDNF	30 ng/mL 的 IGF-1	3 ng/mL 的 SCF
	30 ng/mL 的 PDGF-AA	30 ng/mL 的 CNTF
组 4 分化因子 TGF- β 超家族	组 5 TGF- β 超家族拮抗物	组 6 分化因子
30 ng/mL 的 BMP-2	150 ng/mL 的头蛋白	37 ng/mL 的 SHH
37 ng/mL 的 GDF-5	30 ng/mL 的促滤泡素抑制素	
3 ng/mL 的 GDNF		
30 ng/mL 的 Neurturin		
组 7 神经营养因子	组 8 分化因子	组 9 存活因子/抗氧化剂
37 ng/mL 的中期因子	17 μ M 的视黄酸	166 μ M 的抗坏血酸
组 10 分化因子/神经递质	组 11 存活因子	
10 μ M 的多巴胺	100 μ M 的联丁酰基 cAMP	

如下进行试验。通过培养于胶原酶 IV 5-10 分钟收获人 ES 细胞系的单层培养物, 然后从平板上刮落细胞。通过研磨将细胞分离, 并使其几乎铺满用减少了生长因子的 Matrigel® 预处理的 96 孔组织培养平板, 该平板置于敲除 DMEM (Knock DMEN) 培养基 (Gibco BRL) 中, 培养基中含有小鼠胚胎饲养细胞调节了 24 小时的敲除血清替换物 (Knockout Serum Replacement) (Gibco BRL)。铺板 1 天后, 该培养基为添加了 0.5mM 的谷氨酰胺、B27 补充物 (Gibco BRL) 和如下文描述的检验因子组的神经基础 (Neurobasal) (NB) 培养基 (Gibco BRL) 取代。每天用含有谷氨酰胺、B27 和检验因子的新鲜神经基础培养基饲养细胞, 饲养 11 天。

11 天后, 通过在胰蛋白酶中培养 5-10 分钟收获细胞, 在用层粘连蛋白预处理的 96 孔组织培养平板上以 1:6 的稀释重新铺板, 并每天用含有谷氨酰胺、B27 和检验因子的新鲜神经基础培养基再饲养 5 天。细胞在 4% 的多聚甲醛中固定 20 分钟, 并用抗体对早期神经元标记物— β -微管蛋白-III、晚期神经元标记物—MAP-2 和酪氨酸羟化酶—一种与多巴胺能神经元有关的酶进行染色。细胞核用 DAPI 标记, 并

通过目视检查定量。结果显示于表 4 中。

表 4:hES 细胞直接分化为神经元

包含于细胞培养物中的检验化合物组		B-微管蛋白-III		MAP-2	酪氨酸羟化酶	
		阳性		阳性	阳性	
		细胞/孔	%总量	细胞/孔	细胞/孔	%总量
对照		102	—	2	1	—
处理 A	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11	0	0	0	0	—
处理 B	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	362	6%	132	14	0.2%
处理 C	1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11	—	—	—	—	—
处理 D	1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	378	11%	162	16	0.5%
处理 E	1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11	6	—	2	4	—
处理 F	1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	282	12%	92	4	0.2%
处理 G	1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11	17	—	0	2	—

— = 未测定

在另一个试验中，细胞象前面一样培养于添加有谷氨酰胺、B27 和检验因子组的神经基础培养基中，在第 8 天时用胰蛋白酶收获，并重新铺板 5 天。结果显示于表 5 中。

表 5:hES 细胞直接分化为神经元

包含于细胞培养物中的 检验化合物组		β 微管蛋白 -III 阳性	MAP-2 阳性	酪氨酸羟化 酶阳性	对 TH 也呈 阳性的 MAP- 2 阳性细胞 的百分比
		细胞/孔	细胞/孔	细胞/孔	
对照		4	4	0	
处理	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11	12	8	3	
处理	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	268	12	4	
处理	1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11	12	0	0	
处理	1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	372	48	7	15%
处理	1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11	0	0	0	
处理	1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	196	56	0	
处理	1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11	16	0	9	

一些处理范例诱导神经元的直接分化。包括第 5 组因子的处理(头蛋白和促滤泡素抑制素)是最有效的。

图 1 显示了使用处理 B、处理 D 和处理 F 获得、并对 β-微管蛋白-III 染色的直

接分化的细胞的典型区域。根据形态学和 β -微管蛋白-III 染色, 大约 5-12% 的细胞是神经元。根据 MAP-2 染色, 其中大约 1/3 是成熟的神经元。神经元总量的大约 2-5% (5-15% 的 MAP-2 阳性神经元) 也对酪氨酸羟化酶染色, 这与多巴胺能表型一致。

进行随后的试验以进一步说明某些因子混合物的作用和分化动力学。

图 2(A) 显示一个试验的结果, 其中 TGF- β 超家族拮抗物头蛋白和促滤泡素抑制素用于不同的时间周期。H7 细胞系的分会合 hES 细胞用处理 D (除 cAMP 浓度为 700 μ g 外) 处理 15 天。结果表明头蛋白和促滤泡素抑制素都会促成神经元的分化, 并相互协作。头蛋白明显地在约 1 周时 (第 5-8 天) 重要, 而促滤泡素抑制素在约 2 周时 (第 13-15 天) 重要, 最大化的生产成熟神经元而不是小的轴突。

图 2(B) 显示使用表 4 中含有 TGF- β 超家族拮抗物的处理混合物的神经元诱导的时程。图 2(C) 进一步说明了头蛋白和促滤泡素抑制素在直接分化中的作用。由第一个条形代表的 hES 细胞用组 1、4、6、7、9、10 和 11 的因子 (表 3) 处理, 其中具有 700 μ M 的 Camp、5U/mL 的 EPO, 加上 30 ng/mL 的 FGF-8 (组 2)。实际上, 在缺乏头蛋白和促滤泡素抑制素的情况下没有形成 β -微管蛋白阳性神经元。然而, 仅头蛋白和促滤泡素抑制素或与视黄酸结合通过神经元诱导的第一步直接诱导 hES 细胞。假定最初的头蛋白/促滤泡素抑制素诱导产生神经祖细胞, 随后可通过加入其它因子诱导它形成神经元。

图 2(D) 显示从需要得到多巴胺能神经元的混合物中除去视黄酸 (RA) 的好处。细胞根据前面描述的处理 F (左边 2 个条形) 或除去视黄酸 (右边 2 个条形) 进行分化。包含视黄酸稍微提高了 β -微管蛋白阳性神经元的百分比, 但是降低了那些神经元对酪氨酸羟化酶的阳性着色的比例。

实施例 5: 通过系列传代神经前体的增殖再生

本发明的神经祖细胞可在培养物中传代和扩展, 表明它们的一些独特的和有益的特性。

在一个典型的实施例中, 收获人胚胎干细胞并放置于悬浮培养物中以在含有 20% 的 FBS 加上 10 μ M 的视黄酸的基因敲除 DMEM 中形成胚状体。4 天后, 胚状体在 DMEM/F12 培养基中在聚-L-赖氨酸/层粘连蛋白包被的平板上铺板, 该 DMEM/F12 培养基添加了 N2 添加物、通常量的一半的 B27、10ng/mL 的人 EGF、10ng/mL 的人 bFGF、1 ng/mL 的人 PDGF-AA 和 1 ng/mL 的人 IGF-1。

培养细胞 3 天, 通过如下简单的胰蛋白酶处理收获细胞。0.53mM 的 EDTA (Gibco # 25300-054) 中的 0.5mL 的 0.5% 的胰蛋白酶铺在 6 孔平板的各个孔中, 然后立即

从平板上除去。等待 15 秒钟后(室温)，将加有 B27 添加物的神经基础培养基放置在加样孔中，然后除去并离心以回收释放的细胞(在细胞的 1 和 10%之间)。

6 孔平板用 1mL/孔的 15 $\mu\text{g/mL}$ 的聚-L-赖氨酸(Sigma # 1274)包被，随后是 1mL/孔的 20 $\mu\text{g/mL}$ 的人胎盘层粘连蛋白(Gibco # 23017-015)过夜。从不同的胰蛋白酶化获得的细胞颗粒在含有 B27 添加物、10 ng/mL 的 NT-3 和 10 ng/mL 的 BDNF 的神经基础培养基中重悬浮，并以 500,000-750,000 细胞/孔在包被的孔上铺板。

5 天后，细胞通过完全胰蛋白酶化回收，计数，并以 100,000-500,000 细胞/孔在有各种因子混合物存在的新的聚-赖氨酸/层粘连蛋白包被的孔中重新铺板。使用的浓度如下：各种组合的 10ng/mL 的 NT-3、10ng/mL 的 BDNF、10ng/mL 的人 EGF、10ng/mL 的人 bFGF、或 10ng/mL 的 LIF。每周更换三次培养基，每次更换一半以饲养细胞。每 7 天，细胞被胰蛋白酶化，计数，并在含有相同因子的新鲜培养基中再次传代。

图 3(A) 显示本试验的生长曲线。仅在 BDNF 和 NT-3 中传代的细胞约 1 周后停止了生长，主要分化成神经元。然而，向培养基中加入 EGF 和 bFGF 使细胞以前体的形式继续增殖。这些细胞的标记物特征显示于表 5 中。

表 5: 神经祖细胞的表型

混合物	传代	标记物						
		干蛋白	PS-NCAM	A2B5	β -微管细胞 III	GFAP	MAP2	酪氨酸羟化酶
NT-3, BDNF,	p4	+++	+++	++	+	+	-	-
EGF, bFGF, LIF	P8	+++	+++	+	+	+	-	-
NT-3, BDNF,	p4	+++	+++	+	+	+	-	-
EGF, bFGF,	P8	+++	+++	-	+	+	-	-
EGF, bFGF, LIF	p4	++	++	+	+	+	-	-
	P8	++	++	-	+	-	-	-
EGF, Bfgf	p4	++	++	-	-	-	-	-
	P8	+	+	-	-	-	-	-

因此，在 BDNF、NT-3、EGF 和 bFGF 的组合物中传代的细胞大量地表达神经祖细胞标记物干蛋白和 NCAM。

图 3(B) 显示当仅在 BDNF 和 NT-3 中这些细胞被诱导进行最终分化时获得的结果。在 BDNF、NT-3、EGF 和 bFGF 的组合物中传代的细胞在最终分化时产生更多的神经元，与在分化前较高比例的神经前体一致。

图 4(A) 显示对酪氨酸羟化酶染色阳性的细胞的比例。在检验的组合物中 BDNF、NT-3、EGF 和 bFGF 的组合物又一次提供了最佳的收获量。

图 4(B) 显示甚至更多的 TH-阳性神经元可通过诱导最终分化生产，这种分化不是仅由 BDNF 和 NT-3 诱导，还包括添加的因子，例如 NT-4、神经生长因子、抗坏血酸、cAMP 和多巴胺(以表 3 中显示的浓度)。群体中相当于细胞总量的 5%的细胞显示多巴胺能标记物的表型。

来自 H7 hES 细胞系的神经祖细胞在含有 B27 添加物、30%的血清替代物和 10%的 DMSO 的神经基础培养基中在传代 10 次时冷冻(5×10^5 细胞/冷冻瓶)。约 6 个半月后细胞解冻。解冻的细胞具有许多与它们冷冻前相同的特征:60-80%的 β -微管蛋白和 MAP-2 阳性，约 5%的对酪氨酸羟化酶呈阳性。

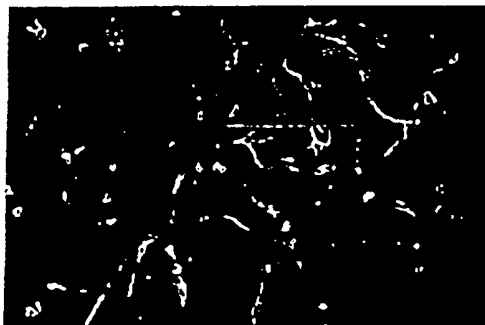
在一个相关试验中，细胞呈簇生长和传代，而不是在培养基上。当接近融合时使用胰蛋白酶从 6 孔平板中收获神经祖细胞(约 3 或 4×10^5 细胞/孔)。然后它们以约 2.5×10^5 细胞/孔在非粘着的加样孔中接种，并培养于 2mL 的含有 B27 添加物、10ng/mL 的 BDNF、10ng/mL 的 EGF 和 10ng/mL 的 bFGF 的神经基础培养基中。随后的一天通过更换一半培养基饲养细胞，并继续培养 4 天。然后它们在含有 10 ng/mL 的 BDNF 和 10ng/mL 的 NT-3 但不含有促细胞分裂原的培养基中分化。

本公开中描述的发明的适应是常规优化的问题，并且可在不偏离本发明的精神或下文权利要求的范围的情况下进行。

处理B



处理D



处理F



图 1

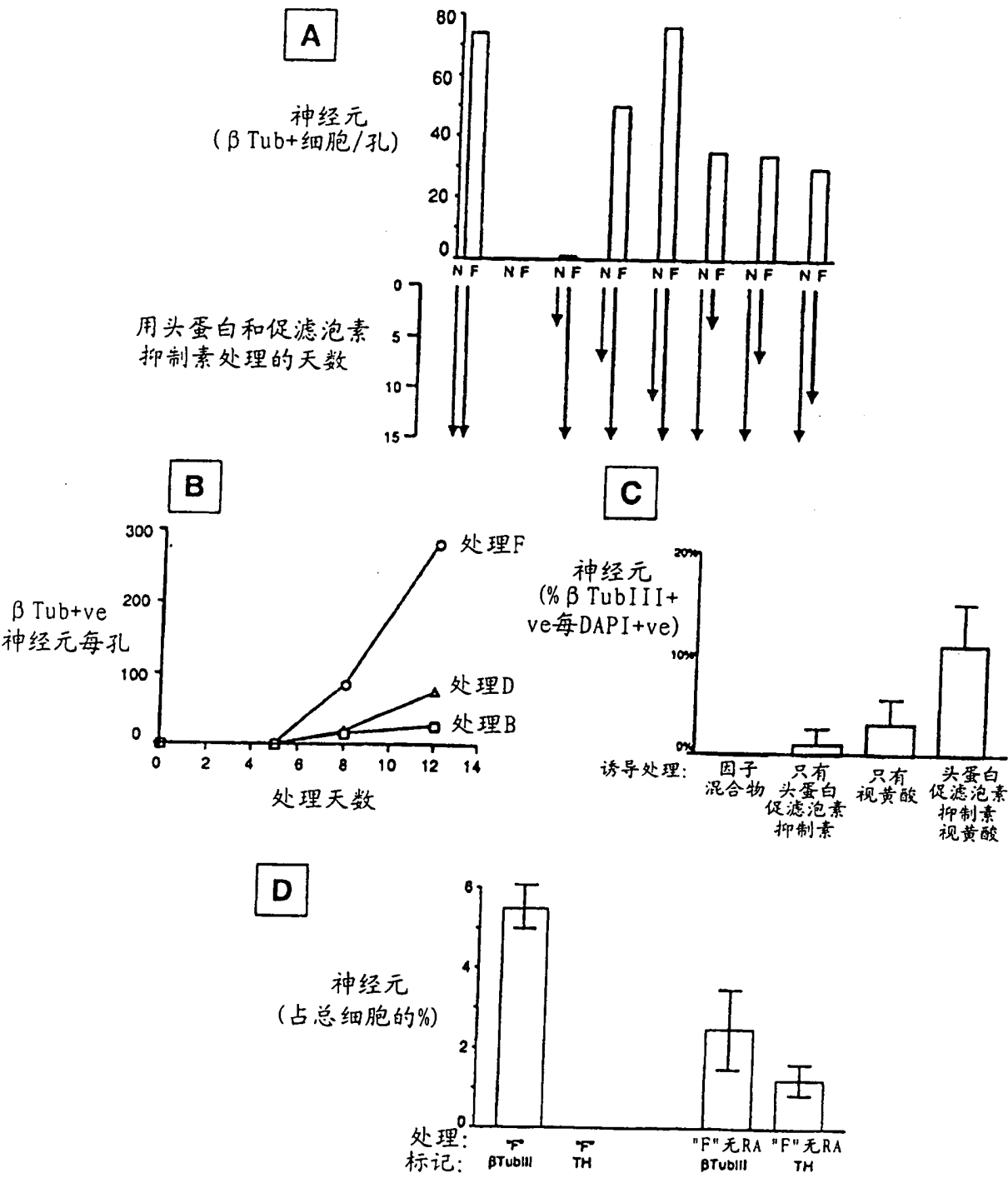
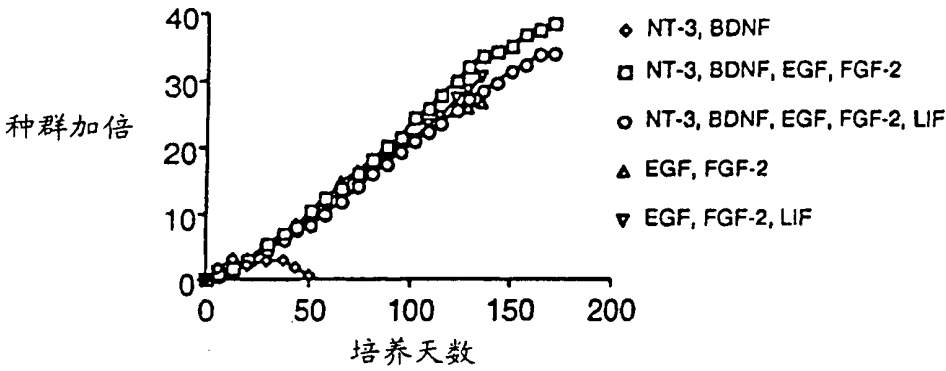


图 2

A



B

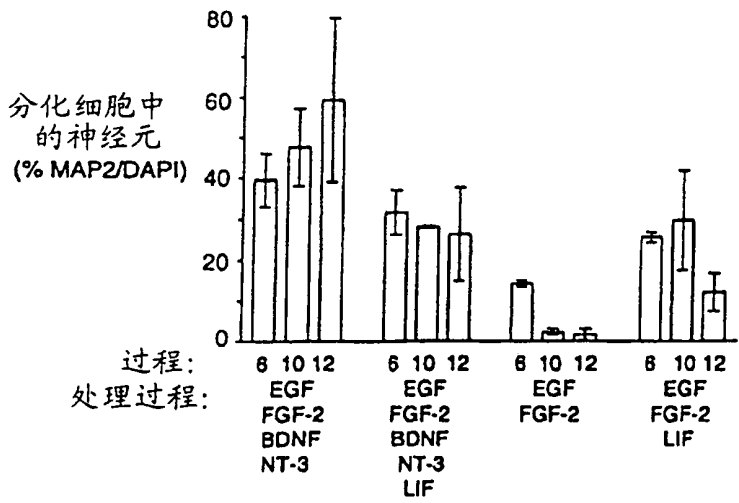
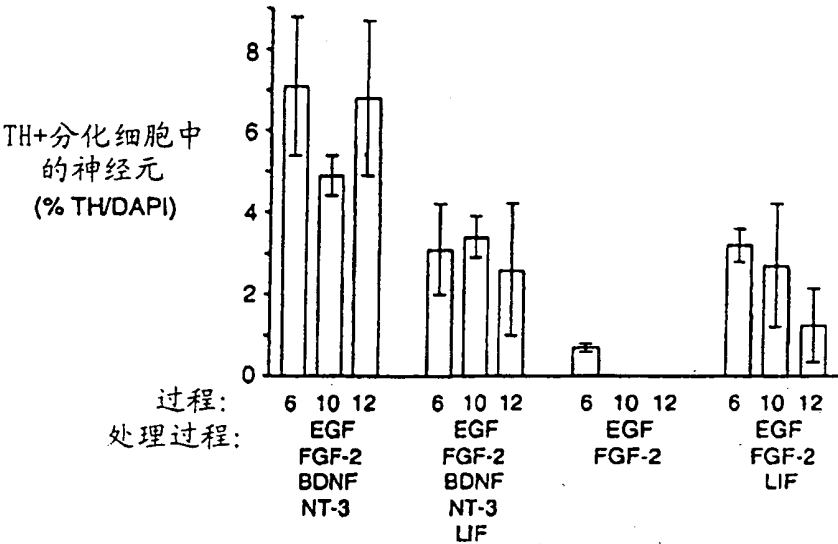


图 3

A



B

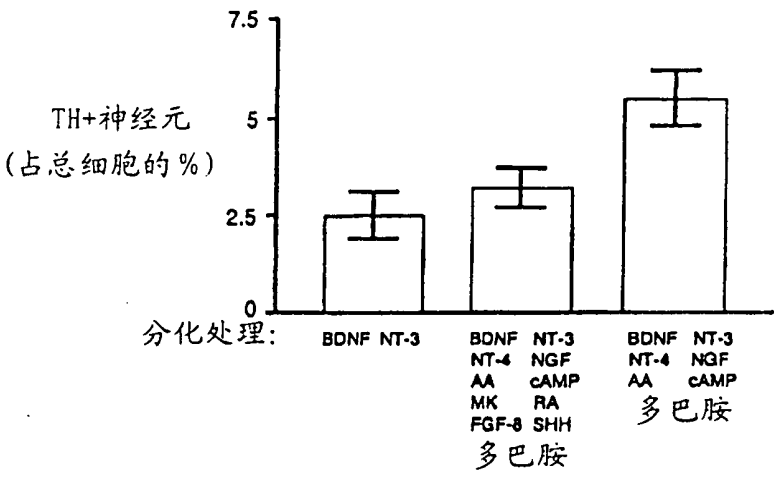


图 4