



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104520422 B

(45)授权公告日 2019.08.23

(21)申请号 201380037915.3

C12N 15/63(2006.01)

(22)申请日 2013.05.30

C12N 5/10(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61P 35/00(2006.01)

申请公布号 CN 104520422 A

A61K 48/00(2006.01)

A61K 35/50(2015.01)

(43)申请公布日 2015.04.15

(30)优先权数据

61/653,185 2012.05.30 US

61/709,431 2012.10.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.01.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/043236 2013.05.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/181326 EN 2013.12.05

(73)专利权人 康奈尔大学

地址 美国纽约州

(72)发明人 S·拉菲 S·Y·拉博尼

M·金斯伯格

(74)专利代理机构 北京市万慧达律师事务所

11111

代理人 戈晓美 杨颖

(51)Int.Cl.

C12N 5/0735(2010.01)

(56)对比文件

WO 2012/006440 A2,2012.01.12,

WO 2011/090684 A2,2011.07.28,

Omar M. Benavides et al..Evaluation of Endothelial Cells Differentiated from Amniotic Fluid-Derived Stem Cells.《TISSUE ENGINEERING: Part A》.2012,第18卷(第11和12期),第1122-1131页.

Omar M. Benavides et al..Evaluation of Endothelial Cells Differentiated from Amniotic Fluid-Derived Stem Cells.《TISSUE ENGINEERING: Part A》.2012,第18卷(第11和12期),第1122-1131页.

Hiroshi Kataoka et al..Etv2/ER71 induces vascular mesoderm from Flk1+PDGFR α + primitive mesoderm.《BLOOD》.2011,第118卷(第26期),第6975-6986页.

审查员 曹梦超

权利要求书1页 说明书28页

序列表10页 附图26页

(54)发明名称

由人羊水来源的细胞生成功能性的和持久的内皮细胞

(57)摘要

本申请涉及由羊膜细胞可重复地产生大量内皮细胞的方法。本申请还公开了根据本申请的方法产生的内皮细胞以及利用这些细胞的治疗方法。

1. 一种产生血管内皮细胞的方法,所述方法包括
在存在TGFβ信号抑制剂的情况下,在外源性引入的转录因子ETV2、FLI1和ERG在羊水细胞中表达的条件下,培养所述羊水细胞,从而获得内皮细胞,其中所述羊水细胞在前13-15天表达ETV2,且其中所述TGFβ信号抑制剂在前20-21天存在。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中在所述羊水细胞中ETV2的表达是瞬时的,并且FLI1和ERG的表达是组成性的。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中用载体转导所述羊水细胞,所述载体包含编码转录因子ETV2、FLI1和ERG的核酸以实现所述转录因子的表达。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中将编码所述转录因子的mRNA递送至羊水细胞以实现所述转录因子的表达。
5. 一种产生血管内皮细胞的方法,所述方法包括
在存在TGFβ信号抑制剂的情况下,将所述转录因子ETV2、FLI1和ERG以多肽形式递送至羊水细胞,培养所述羊水细胞,从而获得内皮细胞,其中所述ETV2在前13-15天存在,且其中所述TGFβ信号抑制剂在前20-21天存在。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述TGFβ信号抑制剂是I型TGFβ受体的特异性抑制剂。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述抑制剂是多肽,所述多肽包含I型TGFβ受体的可溶性形式、针对I型TGFβ受体或配体的抗体或小分子化合物。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述抑制剂是选自下述的小分子化合物:SB-431542、A 83-01、D 4476、LY 364947、SB 525334、SD 208和SJN 2511。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述抑制剂是SB-431542。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中培养羊水细胞至少21天,在前13-15天在所述羊水细胞中表达ETV2,在前20-21天存在TGFβ信号抑制剂,并且组成性表达FLI1和ERG。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述细胞的培养共持续至少28天。
12. 根据权利要求10所述的方法,其中所述细胞的培养共持续至少42天。
13. 根据权利要求1、2或10中任意一项所述的方法,其中ERG是ERG1。
14. 根据权利要求1所述的方法,其中将具有表达表面标记物VE-钙粘蛋白、CD31和VEGFR2特征的细胞分离。
15. 一个根据权利要求1所述的方法生成的基本上纯的来源于羊水细胞的EC群,其中所述EC群中至少75%的细胞是来源于羊水细胞的EC,且其中所述EC具有表达表面标记物VE-钙粘蛋白、CD31和VEGFR2的特征。
16. 一种组合物,所述组合物包含根据权利要求15所述的基本上纯的EC群和至少一种药学上可接受的运载体或稀释剂。
17. 权利要求16所述的组合物在制备用于在人类受试者中修复受损组织的药物中的用途,其中给予所述受试者所述药物以促进在所述组织中形成血管。
18. 权利要求16所述的组合物在制备用于在人类受试者中治疗肿瘤的药物中的用途,其中给予所述受试者所述药物,其中对所述EC进行工程改造以递送抗肿瘤剂,并且在给药后,所述EC形成进入所述肿瘤的血管。

由人羊水来源的细胞生成功能性的和持久的内皮细胞

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2012年5月30日提交的美国临时申请61/653,185和2012年10月4提交的美国临时申请61/709,431的优先权,此二者的全部内容通过引用并入本申请。

[0003] 关于联邦政府资助的研究或开发的声明

[0004] 本发明在由国家心肺和血液研究所授予的编号为R01HL097797的政府支持下进行。政府对本发明拥有一定的权利。

发明领域

[0005] 本发明涉及产生功能性的和持久的内皮细胞的方法。具体地,本发明涉及通过强制表达ETS-TF并与TGF β 信号通路的抑制相结合重编程羊膜细胞(AC)以从AC中产生大量真正的内皮细胞。

背景技术

[0006] 从容易获得的非血管细胞来源产生和扩增人内皮细胞(EC)对缺血和损伤器官的血管重建具有很大的治疗潜力。然而,目前还没有实现临床相关规模并同时保持其血管生成特征的稳定的EC的培养和扩增。成人来源的EC具有有限的扩增潜力并且在几代后就开始衰老。类似地,人胚胎干细胞(hESC)和诱导性多能干细胞(iPSC)来源的EC具有有限的增殖能力并且表型不稳定,其在连续传代后经常会转变成其他非血管谱系(JAMES等,Nat Biotechnol,28:161-166(2010))。当在汇集的富含血小板的血浆中生长时(REINISCH等,Blood,113:6716-6725(2009)),来源于内皮祖细胞(EPC)的人EC(LYDEN等,Nat Med,7,1194-1201(2001);RAFII等,Nat Med 9:702-712(2003);RAFII等,Nat Rev Cancer,2:826-835(2002);JIN等,Nat Med,12:557-567(2006))及其后代内皮集落形成细胞(ECFC)显示出显著的增殖潜能(INGRAM等,Blood,104:2752-2760(2004);YODER等,Blood,109:1801-1809(2007))。然而,EPC和ECFC是否能够维持其血管稳定性,以使得这些细胞增殖到临床规模仍是未知的。这些基于成人和hESC策略的不足之处可能是因对建立和维持EC一致性所必须的转录因子和微环境信号以及培养条件的认识不足所致。

[0007] 已发现转录因子(TF)E-26(ETS)家族的一些成员,包括ETV2(LEE等,Cell stem cell,2:497-507(2008);SUMANAS等,Blood,111:4500-4510(2008))、FLI1(LIU等,Current Bio.18:1234-1240(2008))和ERG(MCLAUGHLIN等,Blood,98:3332-3339(2001))参与调节血管发育和血管生成(DE VAL等,Dev Cell,16:180-195(2009);SATO等,Cell Struct Funct,26:19-24(2001))。这些TF直接调节与EC的发育和功能相关的基因的表达。成人的EC组成性表达一些ETS因子,如FLI1、ERG(亚型1和2)、ETS1、ETS2、Elf1、Elk1、VEZF和ETV6,而ETV2是在胚胎发育过程中瞬时表达且在成人EC中不存在的(KATAOKA等,Blood,118:6975-6986(2011);LELIEVRE等,The International Journal Of Biochemistry&Cell Biology,33:391-407(2001))。尽管这些TF中的多种在血管特化中发挥重要作用(LIU等,Circ Res,103:1147-1154(2008);PHAM等,Dev Biol,303:772-783(2007)),但是尚不知晓这些EC特异性TF

是否也能够非血管细胞中开启内皮基因。

[0008] 人羊水来源的细胞 (AC) 是可能适合于重编程为真正的 EC 的非血管细胞的潜在来源。出于诊断目的, 会常规培养来自于妊娠中期的人胎儿羊水的新鲜分离的 AC, 所述 AC 来自于具有广泛的遗传和种族背景的个体。其显示出较高的增殖潜能, 可以是 HLA 类型的、冻存的和公开留存用于临床应用的。AC 可以变成各种细胞类型, 包括内皮细胞、间叶细胞和神经细胞 (DE COPPI 等, *Nature biotechnology*, 25:100-106 (2007); Prusa 和 Hengstschlager, *Med Sci Monit*, RA253-7 (2002))。一种罕见的亚类 c-Kit⁺ (CD117⁺) AC, 占 AC 群的 0.2 至 2%, 其代表多能的羊水干细胞 (AFS) (ARNHOLD 等, *Stem Cells Int* 2011, 715341 (2011); DE COPPI 等, *Nature biotechnology*, 25:100-106 (2007)), 其可以变成各种细胞类型, 包括上皮细胞、间叶细胞和神经细胞。尽管据信这些 c-Kit⁺ 细胞中的一些表达多能性 Oct-4 基因 (DE COPPI 等, *Nature biotechnology*, 25:100-106 (2007); PRUSA 等, *Hum Reprod*, 18:1489-1493 (2003)), 但是不清楚这些细胞是真正的多潜 (pluripotent) 还是主要专能细胞 (multipotent)。事实上, 认为大部分的 AC 是谱系定向细胞。已鉴定得到三个谱系定向 AC 的亚类: 上皮样的 (E-类型)、羊水 (AF-类型) 和成纤维细胞样的 (F-类型) (BOSSOLASCO 等, *Cell Res*, 16:329-336 (2006))。据推测 E-类型 AC 来源于胎儿的皮肤, 而 F-类型来源于结缔组织 (Gosden, 1983; Hoehn 和 Salk, 1982)。

[0009] 已在对 AC 是否能够产生血管细胞进行了研究。在使血管生成的培养条件下孵育天然的人 AC 或预先选择的 c-Kit⁺ AC 导致 EC 样细胞的产生和生长, 所述 EC 样细胞表达一些 EC 特异性标记物, 包括 VE-钙粘蛋白、VEGFR2 和 CD31, 并且其能够被重塑成管样结构 (ENAVIDES 等, *Tissue Eng Part A*, (2012); DE COPPI 等, *Nature biotechnology*, 25:100-106 (2007); KONIG 等, *Stem cells and development*, 21:1309-1320 (2012); HANG 等, *Stem cells and development*, 18:1299-1308 (2009))。然而, 这些 EC 样细胞具有较低的增殖潜能, 其不表达完整的成熟 EC 基因库, 并且也没有确证其原始的 AC 特征已被去除。因此, 不能将这些细胞视为是真正的血管内皮细胞。

[0010] 发明概述

[0011] 根据本发明已发现在羊膜细胞 (AC) 中表达 ETS-TF 并与 TGF β 信号通路的抑制相结合将 AC 重编程为增殖性的稳定的血管 EC 群, 其称为 rAC-VEC (“羊膜细胞重编程产生的血管内皮细胞”), 所述细胞具有形成灌注脉管系统和在体内移植进入肝窦内皮的能力。因此, 本发明提供了从羊膜细胞中可重复地产生大量内皮细胞的方法。本申请还提供了根据本发明的方法工艺产生的内皮细胞以及利用这些细胞的治疗方法。

[0012] 在一个方面, 本发明涉及在存在 TGF β 信号抑制剂的情况下, 在转录因子 ETV2、FLI1 和 ERG (如 ERG1 或 ERG2) 在所述羊膜细胞中表达的条件下, 通过培养 AC 由 AC 产生内皮细胞的方法。

[0013] 在一个实施方式中, 在 ETV2 在羊膜细胞中的表达是瞬时的, 并且 FLI 和 ERG 的表达是组成性的条件下培养所述 AC。可以基于使用携带编码转录因子 ETV2、FLI1 和 ERG 的核酸的载体转导所述细胞以将编码所述转录因子的裸 DNA 或 mRNA 递送至 AC, 或者基于将这些转录因子的多肽形式递送至 AC 实现所述转录因子的表达。

[0014] 在一些实施方式中, 所述 TGF β 信号抑制剂是特异性针对 I 型 TGF β 受体的抑制剂, 其可以是包含 I 型 TGF β 受体的可溶性形式的多肽、针对 I 型 TGF β 受体或配体的抗体、或小分子

化合物。

[0015] 在特定的实施方式中,在前13-15天在所述羊膜细胞中瞬时表达ETV2,在前20-21天存在TGF β 信号抑制剂,并且在21天中组成性表达FLI1和ERG的条件下培养AC。

[0016] 在另一个方面,本发明涉及基本上纯的来源于羊膜细胞的EC群,其中所述EC的特征在于表达表面标记物VE-钙粘蛋白、CD31和VEGFR2。在一个实施方式中,所述基本上纯的来源于羊膜细胞的EC群的特征在于在所述EC中存在外源性引入的编码FLI1的核酸。

[0017] 在又一个方面,本发明提供了通过将本申请产生的基本上纯的EC群与至少一种药学上可接受的运载体或稀释剂混合制成的组合物。

[0018] 在又一个方面,本发明提供了一种在受试者中通过给予受试者包含本申请产生的基本上纯的EC群的组合物以促进在所述组织中形成血管的修复损伤组织的方法。

[0019] 在又一个方面,本发明提供了一种在受试者中通过给予受试者包含本申请产生的基本上纯的EC群的组合物治疗肿瘤的方法,其中对所述EC进行工程改造以递送抗肿瘤剂,并且在给药后,所述EC形成进入所述肿瘤的血管。

[0020] 附图简述

[0021] 图1:使用ETS-TF转导和TGF β 抑制剂的羊水来源的细胞(AC)显示出血管表型,所述细胞的血管表型是稳定的并且与来源于人胚胎干细胞(hESC)的内皮细胞(EC)相比具有增强的增殖性潜能。a)血管内皮细胞(rAC-VEC)重编程平台的示意图。在存在TGF β 抑制(SB431542-5 μ M)的条件下培养已使用ETS转录因子(ETS-TF)转导的羊膜细胞(AC)并且每周一次测定EC标记物的表达情况。b)在存在TGF β 抑制的条件下,在使用或不使用编码ETV2、ERG1和FLI1的慢病毒载体转导的AC中测定几周内EC标记物(VE-钙粘蛋白、CD31和VEGFR2)的mRNA水平。["+"=使用ETV2、ERG1和FLI1慢病毒转导的细胞;"-"=使用等效量的空载体慢病毒转导的细胞。除非另有说明,在本报告中所有后文中的对照('ctrl')样品均使用空载体病毒转导]。误差线:重复三次的标准误差(VE-钙粘蛋白、VEGFR2和CD31:*表示在第7天-第28天时间段与对照AC相比 $p < .01$)。c)在存在TGF β 抑制的条件下,使用(或不使用)ETS-TF(ETV2、FLI1和/或ERG1)对AC进行慢病毒转导后3周时间段内测定的细胞扩增情况($n=3$,所有条件下 $p < 0.05$)。d)在存在TGF β 抑制的条件下,使用(或不使用)ETS-TF(ETV2/FLI1/ERG1)对AC进行慢病毒转导后7周时间段内测定的细胞扩增情况($n=4$ 次独立实验)。在第7周进行的荧光活化细胞分选(FACS)显示95%以上的这些细胞表达VE-钙粘蛋白。e)在存在TGF β 抑制的条件下,使用(或不使用)ETV2/FLI1/ERG1因子(ETS-TF)对AC和hESC来源的VE-钙粘蛋白⁺CD31⁺VEGFR2⁺EC进行慢病毒转导后3周时间段内测定的细胞扩增情况。误差线:重复三次的标准误差($n=3$, $p < 0.05$)。f)FACS显示的在ETS-TF慢病毒转导后7天时间间隔后VE-钙粘蛋白的表面表达情况。误差线:重复三次的标准误差。g)对在存在TGF β 抑制的条件下使用ETS-TF转导21天的AC(rAC-VEC)和使用ETS-TF转导21天的hESC来源的VE-钙粘蛋白⁺CD31⁺VEGFR2⁺EC的免疫荧光显微照片,使用VE-钙粘蛋白和平滑肌 α -肌动蛋白的抗体染色。使用人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和平滑肌细胞作为对照。VE-钙粘蛋白(绿色染色)、平滑肌 α -肌动蛋白(红色染色)、DAPI(蓝色染色),白色箭头表示VE-钙粘蛋白的交界区染色。标尺-25 μ m。

[0022] 图2:大多数谱系定型的Tral⁻81⁻c-Kit⁻成熟上皮样和间叶细胞/成纤维细胞样AC可重编程为rAC-VEC。a)针对OCT4蛋白(粉色)对人ESC(hESC)(i.)、HUVEC(ii.)和四个独立

的AC样品 (AC1至AC4) (iii.-vi.) 进行染色。标尺-100 μ m。b) 在hESC、HUVEC和三个独立的AC样品 (AC1、AC5、AC6) 中测定OCT4mRNA (上图) 和SOX2 mRNA (下图) 的相对水平。对于hESC数据而言, 红色线表示左侧图的y轴标尺。对于AC和HUVEC数据而言, 蓝色线表示右侧图的y轴标尺。误差线: 重复三次的标准误差 (OCT4和SOX2: *表示与AC和HUVEC相比 $p < .002$)。c) AC的FACS表明在AC群中存在谱系定型的和非特异性细胞类型。描述了一个代表性的细胞系 (i.-iv.)。经检测的特异性的标记物在 'x' 和 'y' 轴上示出, 其相应的水平以总细胞群的百分率表示。图中 (右图) 显示了在15份独立的AC样品中表达特定标记物的细胞百分率的平均值 (SE: 标准误差)。d) (上图) 在存在TGF β 抑制 (SB431542) 的条件下, 使用ETS-TF (ETV2/FLI1/ERG1) 对EpCAM⁺Tra1-81⁻c-Kit⁻和EpCAM⁻Tra1-81⁻c-Kit⁻AC进行慢病毒转导后4周时间段内测定的细胞扩增情况。(下图) FACS显示了在存在TGF β 抑制剂的条件下使用ETS-TF转导EpCAM⁺Tra1-81⁻c-Kit⁻和EpCAM⁻Tra1-81⁻c-Kit⁻AC 28天后VE-钙粘蛋白的表面表达情况 ($n = 3, P < 0.05$)。e) 显示在存在TGF β 抑制剂的条件下使用ETS-TF转导EpCAM⁺Tra1-81⁻c-Kit⁻和EpCAM⁻Tra1-81⁻c-Kit⁻AC 28天后的免疫荧光显微照片。

[0023] EpCAM (红色染色)、VE-钙粘蛋白 (绿色染色)、DAPI (蓝色染色)。标尺-25 μ m。

[0024] 图3: ETS-TF转导的AC (rAC-VEC) 活化EC特异性基因的表达, 并且处于克隆扩增的rAC-VEC显示出了用于产生成熟的增殖性rAC-VEC的ETV2、ERG1和FLI1的最佳化学计量比。FACS分析显示了在存在TGF β 抑制剂 (SB431542) 的条件下使用所示的ETS-TF (ETV2/FLI1/ERG1) 转导后4天 (a: i.-ii.)、12天 (a: iii.-iv.)、21天 (a: v.-vi.) 和28天 (b: i.-ii.) 时在新出现的rAC-VEC上的VE-钙粘蛋白 (VE-cad) 和VEGFR2的表面表达情况。使用HUVEC作为阳性对照 (b: iii.)。所述新出现的rAC-VEC的形态 (b: iv.-vi.) 和尺寸 (b: vii.-ix.) 近似于EC如HUVEC的那些。标尺-50 μ m。c) 单细胞克隆扩增方案的示意图: 在存在TGF β 抑制剂的条件下使用ETS-TF转导AC, 并培养3周。在第21天时, 使用针对VE-钙粘蛋白、VEGFR2和CD31的单克隆抗体 (mAb) 分离VE-钙粘蛋白⁺VEGFR2⁺CD31⁺细胞。将VE-钙粘蛋白⁺VEGFR2⁺CD31⁺细胞自动单细胞铺板至96孔板中以进行为期几周的克隆扩增。平均20至25%的各铺板细胞形成集落。d) 在VE-钙粘蛋白⁺VEGFR2⁺CD31⁺细胞分离后的3周时间段内克隆单细胞扩增的典型示例 (第21天至第42天)。标尺-100 μ m。e) 特异性rAC-VEC克隆1、克隆2和克隆3 (框图ii.-iv.) 的FACS分析揭示了在克隆扩增方案的第42天 (即VE-钙粘蛋白⁺VEGFR2⁺CD31⁺分离3周后) VE-钙粘蛋白 (VE-cad)、VEGFR2和CD31的表面表达情况。测定从单细胞铺板 (克隆扩增方案的 '第21天') 至随后5周时间段内rAC-VEC克隆的细胞扩增情况 (框图v.)。显示了在克隆扩增方案的第42天rAC-VEC克隆的ETS-TS (ETV2、FLI1和ERG1) 的表达水平 (框图vi.-viii.)。

[0025] 图4: ETS-TF转导结果产生了重编程的AC, 其显示出了与成熟EC的转录组匹配的基因表达的总体改变, 并且同时显示出其原始AC特性的消除。a) 显示了对照 (ctrl) AC、克隆rAC-VEC (克隆3-第42天) 和HUVEC的免疫荧光显微图像。VE-钙粘蛋白 (绿色染色: i.、vi.、xi.)、CD31 (红色染色: ii.、vii.、xii.)、ESAM (红色染色: iii.、viii.、xiii.)、JAM-A (红色染色: iv.、ix.、xiv.)、EpCAM (红色染色: v.、x.、xv.)、DAPI (蓝色染色)。标尺-50 μ m。b) 在存在TGF β 抑制剂 (SB431542) 的条件下, 使用ETS-TF转导约2个月的AC ('rAC-VEC') 进行RNA-seq。此外, 在存在TGF β 抑制剂的条件下将培养约2个月的两个rAC-VEC克隆 ('rAC-VEC克隆-3' 和 'rAC-VEC克隆-4') 进行RNA-seq分析。rAC-VEC克隆-4与rAC-VEC克隆-3具有相似的ETS-TF表达性质 (数据未列出)。将这些rAC-VEC样品与人脐带血来源的CD34⁺细胞 ('CD34

^{*)}、人骨髓基质细胞(‘BMS’)、天然的人AC(‘Amni ctrl’)、人肺小气道上皮细胞、HUVEC(‘HUVEC’)和LSEC(‘LSEC’)进行比较。显示了相对转录水平的热图,其描绘了与前述的细胞类型相比,1)在rAC-VEC中开启的表达血管的基因,2)在rAC-VEC中沉默的不表达血管的基因和3)在rAC-VEC中TGFβ家族基因表达的形式。c)三维MDS图(3D MDS):对于这项分析,发明人计算了此处显示的样品在整个转录组范围的RNA-seq谱之间的全部配对距离。将距离定义为为1减去两个谱之间的Pearson相关。然后发明人使用多维标尺(MDS)以鉴定在3D空间中的点的集合,以使得在所述点之间的距离约等于样品之间的真实距离。该分析显示rAC-VEC(克隆和非克隆来源的)与HUVEC和LSEC为紧密的共定位,因此表明其基因组范围的表达谱高度相似。另一方面,其他非血管细胞类型如BMS、上皮细胞和CD34⁺造血细胞的定位较远并且显示与rAC-VEC没有相似性。显示了从两个不同角度对同一3D-MDS分析进行观察以更好地捕获在此图中研究的不同样品之间的3D关系。重要的是,此项分析没有偏向任何基因集合或过程:使用表达通过RNA-seq定量的全部>30,000个RefSeq转录本计算样本之间的距离。

[0026] 图5:TGFβ抑制剂在经ETV2/FLI1/ERG1转导的AC中使得VEGFR2上调并使其具有功能。a)使用或不使用TGFβ配体中和单克隆抗体(TGFβ配体mAb。针对β1、β2和β3)或TGFβ小分子抑制剂(SB431542)处理,AC经过或未经过ETV2/FLI1/ERG1转导后21天的Western印迹分析。这项实验在存在和不存在重组TGFβ配体(TGFβ1和TGFβ3)的条件下进行以描述TGFβ受体活性的程度。在使用ETV2/FLI1/ERG1转导后,在存在或不存在TGFβ配体mAb(10μg/ml)或TGFβ小分子抑制剂的条件下,将AC每两天与或不与TGFβ配体(10ng/ml)孵育(‘恒量’)。此外,在存在和不存在TGFβ配体mAb或TGFβ小分子抑制剂的条件下,在第21天时将经ETV2/FLI1/ERG1转导的AC血清饥饿4小时,然后使用或不使用一个剂量的TGFβ配体(10ng/ml)处理45min(‘脉冲’)。在第21天处理后,对所有细胞磷酸化的SMAD2(P-SMAD2)、总SMAD2和GAPDH进行检测。b)在存在或不存在如上文所述的‘恒量’TGFβ配体、TGFβ配体mAb和/或TGFβ小分子抑制剂的条件下,21天后对经过或未经ETV2/FLI1/ERG1转导的AC进行的Western印迹分析。此外,在第21天时将经ETV2/FLI1/ERG1转导的AC血清饥饿4小时,然后使用或不使用VEGF-A配体(50ng/ml)处理5分钟。在经过该第21天的处理后,对细胞磷酸化的VEGFR2(P-VEGFR2)、总VEGFR2和GAPDH进行检测。c)显示了经TGFβ配体、TGFβ配体mAb和/或TGFβ小分子抑制剂处理的对照AC(i.)、经ETV2/FLI1/ERG1转导的AC(ii.-v.)和HUVEC(vi.)的细胞形态。标尺-100μm。d)FACS显示了在存在(黑色柱子)或不存在(透明/白色柱子)持续的TGFβ抑制的条件下,经ETV2/FLI1/ERG1转导的AC在21天时间段内VEGFR2的表面表达情况。e)FACS了显示经ETV2/FLI1/ERG1转导的AC在28天时间段内VEGFR2(左图)和VE-钙粘蛋白(右图)的表面表达情况。红色柱子:细胞受到持续的TGFβ抑制-在第14天、第21天和第28天对EC标记物进行检测。白色柱子:细胞受到TGFβ抑制14天-在第21天对EC标记物进行检测。灰色柱子:细胞受到TGFβ抑制21天-在第28天对EC标记物进行检测。误差线:重复三次的标准误差。

[0027] 图6:rAC-VEC在体外和体内建立功能性的灌注血管。a)将对照AC、第21天的rAC-VEC和HUVEC在Matrigel/内皮生长培养基+TGFβ抑制剂(SB431542)条件下培养12小时后进行体外管形成检测。显示了不同组的相差显微镜图像。标尺-100μm。b)对照AC、第21天rAC-VEC和HUVEC的体外乙酰化LDL(Ac-LDL)摄取检测。使用标记的Ac-LDL(DiI标记)处理细胞4小时、洗涤并成像。标尺-100μm。c)GFP标记的对照AC(i.,v.,ix.)、GFP标记的第42天的rAC-

VEC (ii., vi., x.) 和在第21天时除去TGF β 抑制剂的GFP标记的第42天的rAC-VEC (样品A-iii., vii., xi.; 样品B-iv., viii., xii.) 的体内管形成检测。将对照细胞和rAC-VEC分别载入Matrigel填块并皮下植入NOD-SCIDIL2R $\gamma^{-/-}$ (NSG) 小鼠。植入两周后, 静脉注射给予小鼠Alexa568-Isolectin-B4, 其与灌注脉管系统结合以鉴定功能性的血管。注射10分钟后, 取出填块并切片。在免疫荧光显微照片中以绿色表示对照AC和rAC-VEC (GFP)、以红色表示灌注脉管系统的活体标记 (Isolectin) 和以蓝色表示核复染 (DAPI)。标尺-50 μ m。白色箭头表示GFP-和isolectin标记的 (吻合) 血管的共定位。桔色箭头表示仅被isolectin标记的宿主小鼠血管。d和e) 将第21天的rAC-VEC (GFP标记) 体内移植进入两只小鼠的肝窦血管。在NSG小鼠中进行70%的部分肝脏切除术后, 将约 5×10^5 的GFP标记的第21天rAC-VEC通过脾内途径进行移植, 其将进入门静脉循环并进入肝脏脉管系统中。移植3个月后, 注射给予小鼠Alexa568-Isolectin-B4以检测灌注的血管, 将各肝脏取出并进行冰冻切片。在免疫荧光显微照片中以绿色表示对照rAC-VEC (GFP)、以红色表示灌注脉管系统的活体标记 (Isolectin)、以青色表示人CD31染色并以蓝色表示核复染 (DAPI)。肝脏样品#1 (d) 以较低的放大倍数成像 (i.-iv.: 标尺-50 μ m)。肝脏样品#2 (e) 以较低 (i.-iv.: 标尺-50 μ m) 和较高的放大倍数成像 (v.-viii.: 标尺-25 μ m)。白色箭头表示GFP-、CD31-和isolectin-标记的 (吻合) 血管的共定位。桔色箭头表示仅isolectin标记的宿主小鼠血管。

[0028] 图7: 伴随TGF β 抑制的瞬时ETV2以及组成性FLI1和ERG1表达产生不丧失血管特征的持久的rAC-VEC。a) FACS显示了在存在TGF β 抑制剂 (SB431542) 的条件下经iETV2/FLI1/ERG1转导的AC经过14天 (i.)、21天 (ii.-iii.) 和28天 (iv.-v.) 后VE-钙粘蛋白和CD31的表面表达情况。(‘iETV2’: 诱导性ETV2慢病毒, 其通过使用多西环素处理被抑制)。在第14天时使用多西环素处理这些细胞的亚组 (iii. 和v.) 以抑制ETV2蛋白。b) 显示了通过FACS确定的VE-钙粘蛋白⁺CD31⁺细胞的百分率。透明柱子: 未经多西环素处理。黑色柱子: 在第14天时使用多西环素处理。c) 通过Western印迹分析确证了多西环素对iETV2的抑制。使用GAPDH作为对照。d) GFP标记的第42天的rAC-VEC的体内管形成检测, 在第14天其iETV2的表达被抑制。将rAC-VEC载入Matrigel填块并皮下植入NOD-SCIDIL2R $\gamma^{-/-}$ (NSG) 小鼠。植入2周后, 通过静脉注射给予小鼠与灌注脉管系统结合的Alexa568-Isolectin-B4以鉴定功能性的血管。注射10分钟后, 取出填块并切片。在免疫荧光显微照片中以绿色表示rAC-VEC (GFP)、以红色表示灌注脉管系统的活体标记 (Isolectin)、以青色表示人CD31染色并以蓝色表示核复染 (DAPI)。样品A以较低的放大倍数成像 (i.-iv.: 标尺-100 μ m)。样品B以较高的放大倍数成像 (v.-viii.: 标尺-50 μ m)。白色箭头表示GFP-、CD31-和isolectin-标记的 (吻合) 血管的共定位。桔色箭头表示仅isolectin标记的宿主小鼠血管。e) 模块化的ETS-TF介导了AC重编程为大量成熟的rAC-VEC。尽管实现了‘理想的内皮细胞条件’, 但是未转导的AC既不会重编程为rAC-VEC, 也不会增殖 (下图)。在不存在TGF β 抑制剂的条件下, ETS-TF转导的AC显示出VE-钙粘蛋白的表面表达, 但是不会产生其他重要的EC-标记物, 包括VEGFR2, 结果导致‘VEGF-A非应答性’内皮样前体的产生 (下游的通路)。TGF β 信号瞬时抑制约3周使得VEGFR2上调并使其具有功能, 这使得VEGF-A依赖性信号事件继续进行 (中间和上游的通路)。当作为单一ETS因子使用时, 即使ETV2促进AC的增殖和对EC的特异性, 但是其不能启动成熟的EC标记物, 包括CD31, 这导致未成熟的内皮祖细胞的累积 (中间的通路)。FLI1/ERG1与ETV2的共表达同时伴随TGF β 抑制活化CD31的表达; 然而, 组成性的ETV2最终下调这种成熟的EC-标记物, 结果导

致不稳定的血管内皮的产生(上游的通路-下图)。在第14天ETV2抑制时,CD31持续表达,这促进了成熟rAC-VEC的生成(上游的通路-上图)。因此,模块化的TGFβ抑制和ETV2表达以及组成性FLI1/ERG1共表达为将谱系定型的AC重编程为持久的功能性的rAC-VEC提供了新的平台。

[0029] 详述

[0030] 发明人已证明在羊膜细胞(AC)中与TGFβ信号通路的抑制相关的ETS-TE的表达将AC重编程为增殖性的稳定的rAC-VEC(“羊膜细胞重编程产生的血管内皮细胞”)群,其具有形成灌注脉管系统和在体内移植进入肝窦内皮的能力。在示例性的实施方式中,本申请公开了在AC中FLI1/ERG1的组成性表达联合ETV2的瞬时表达和TGFβ通路的抑制不仅开启和关闭大多数EC特异性基因的表达,而且还抑制非血管基因的表达。TGFβ信号的衰减使得所述VEGFR2信号通路功能化,结果导致大量rAC-VEC的扩增,同时不会导致EC特性的丧失。基因组范围的转录谱分析显示,本申请中产生的rAC-VEC显示出与成人EC相似的完整的血管生成库。本申请中产生的rAC-VEC还能够在连续传代后保持其血管特性,并且能够在免疫功能低下的小鼠中建立功能性的新的持久血管。因此,本发明提供了从羊膜细胞中可重复地产生大量功能性的和稳定的内皮细胞的方法,所产生的内皮细胞以及所产生的内皮细胞的治疗性用途。

[0031] I. 羊膜细胞(“AC”)

[0032] 在本申请中使用的术语“羊膜细胞”(或“AC”)指从羊水中提取的细胞,因此在本申请中也将其称为“羊水细胞”。

[0033] 尽管AC优选地从人羊水中分离,但是其也能够从其他哺乳动物物种的羊水中分离。适用于收集羊水的哺乳动物物种的示例包括但不限于人、灵长类、犬、猫、山羊、大象、牛、马、猪、小鼠、家兔等。由给定物种的AC发育得到的内皮细胞能够用于相同物种对象的治疗。

[0034] 针对本发明的目的,AC可以从处于妊娠任意阶段怀孕女性的羊水中提取。在一些实施方式中,在妊娠中期收集羊水。在某些实施方式中,在妇女怀孕10-25周期间收集羊水。在其他实施方式中,在怀孕妇女的中期妊娠期间即14-26周收集羊水。在特定的实施方式中,在妇女怀孕的16-21周期间收集羊水。

[0035] 可以采用常规方法从羊水中提取AC,例如离心。可以将细胞沉淀重悬于适宜的基质中,以便立即用于本申请所公开的重编程方案,或重悬于培养基(例如市售的“羊膜培养基”,在下文中示例)中并且在重编程之前培养一段时间。或者,可以将提取的AC冻存(和例如“库存”),以便在将来使用的常规技术中使用。例如,可以从培养物(例如培养瓶、培养板等)中例如使用Accutase (EBioscience#00-4555-56)收集,然后旋转沉降准备用于冻存的AC。然后可以将所述细胞沉淀重悬于用于冻存的适宜的培养基(例如含90%FBS (Omega Scientific#FB-11)和10%DMSO (Cellgro#25-950-COC)的培养基)中并转移至冻存管中。可以将所述细胞在-80°C下保存至少3天(初期冷冻),然后转移至液氮中(长期冷冻)。

[0036] 在细胞组成方面AC通常是异质性的,并且包括专能(multipotent)细胞(例如c-Kit⁺AC)和成熟AC(例如c-Kit⁻AC)两者。成熟的AC包括谱系定型的和非特异性细胞两者。本申请所公开的重编程方法在由提取的AC产生rAC-VEC方面是有效的,所述提取的AC包括专能(multipotent)和成熟细胞两者。本申请所公开的重编程方法在从成熟的c-Kit⁻AC中产

生rAC-VEC方面也是有效的,所述成熟的c-Kit⁻AC包括来自谱系特异的EpCam⁺Tra1-81⁻c-Kit⁻上皮样的和EpCam⁻Tra1-81⁻c-Kit⁻非上皮样(间叶细胞样/成纤维细胞样)的AC。换言之,其能够直接重编程经提取的异质性AC,或重编程更加成熟的AC亚群,但是对经提取的AC进行处理以分离更成熟的亚群用于产生rAC-VEC并不是必要的。

[0037] II. 将AC重编程为rAC-VEC

[0038] 如本申请所公开的,能够将AC重编程为增殖性的稳定的rAC-VEC(“羊膜细胞重编程产生的血管内皮细胞”)群体。所述重编程涉及在AC中表达ETS家族的转录因子(ETS-TF)并且与TGFβ信号通路的抑制相结合。

[0039] II.1 在AC中ETS-TF的表达

[0040] 根据本发明,参与所述重编程的ETS-TF包括ETV2(人ETV2,也称为ER71或Estrp)、FLI1和ERG。ERG特别有用的亚型包括ERG1和ERG2,而其他亚型如ERG3和ERG4也可能是适宜的。在现有技术中已对这些ETS-TF进行了描述(LEE等,Cell stem cell,2:497-507(2008); SUMANAS等,Blood,111:4500-4510(2008); LIU等,Current Bio.18:1234-1240(2008); MCLAUGHLIN等,Blood,98:3332-3339(2001)),并且其核酸和蛋白序列也能够从GenBank中获得(ETV2:NCBI登录号NM_014209.2,GI:153791177;ERG1:登陆号NM_182918.3;GI:209954798;ERG4:登录号NM_001136155.1;GI:209954807)。

[0041] 本申请中公开了ETV2是诱导EC结局的关键,而ERG和FLI促进EC的成熟度。例如,单独的ETV2能够启动血管标记物VE-钙粘蛋白和VEGFR2而非CD31的表达。而相反的是,ERG1或FLI1能够活化CD31的表达,而不是一些由ETV2启动的其他的其他的关键EC标记物。

[0042] 因此,本方法重编程的AC涉及实现在AC中ETV2、FLI1和ERG的组合的表达。在一些实施方式中,所述重编程涉及ETV2、FLI1和ERG1的组合的表达。

[0043] 为了实现在AC中转录因子的表达,可以使用各种载体将编码所述转录因子的核酸递送至AC,其包括整合载体和保持在染色体外的游离基因载体,所述整合载体使用同源重组通过随机整合或靶向整合整合至宿主细胞的基因组。除了通过载体递送以外,还可以以mRNA形式将编码转录因子的核酸递送至AC,如Yamamoto等所述(Eur. J. Phar. Biophar 71: 484-89(2009))。

[0044] 递送载体的示例包括但不限于质粒、粘粒、病毒(噬菌体、动物病毒和植物病毒)和人工染色体(例如YAC)。病毒载体包括例如逆转录病毒载体(例如来源于莫罗尼鼠白血病毒(MoMLV)、MSCV、SFFV、MPSV、SNV等的载体)、慢病毒载体(例如来源于HIV-1、HIV-2、SIV、BIV、FIV等)、腺病毒(Ad)载体、腺相关病毒(AAV)载体、猴病毒40(SV-40)载体、牛乳头状瘤病毒载体、爱泼斯坦-巴尔病毒载体、疱疹病毒载体、痘苗病毒载体、哈维鼠肉瘤病毒载体、鼠乳腺肿瘤病毒载体和劳氏肉瘤病毒载体。

[0045] 在特定的实施方式中,编码所需转录因子的核酸通过慢病毒载体递送。慢病毒载体是本领域熟知的(参见例如美国专利号6,013,516和5,994,136)并且其能够提供持续几个月的较强的和持续的表达。

[0046] 本领域技术人员能够利用现有的分子生物学技术将编码转录因子的核酸克隆进入适宜的载体中。所述载体可以包括适宜的附加序列,如5'调控序列(例如启动子、增强子或其组合)、3'转录终止序列、一个或多个复制原点或选择标记物。在所述载体中的启动子可以是天然与所述转录因子结合的,也可以是在AC中使所述转录因子有效表达的异源性启

动子。适于在本申请中使用的启动子的示例包括但不限于SV40早期或晚期启动子、巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、劳氏肉瘤病毒(RSV)早期启动子、 β 肌动蛋白启动子、GADPH启动子、金属硫蛋白启动子;环AMP应答元件启动子(cre)、血清应答元件启动子(sre)、佛波酯启动子(TPA)和应答元件启动子(tre)。

[0047] 可以使用各种适宜的方法实现以载体或病毒的形式将编码转录因子的核酸如DNA或RNA引入AC。此类方法包括但不限于脂质体介导的转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-Detxan后接聚乙二醇、超声装载、基因枪法以及上述熟知技术的任意组合。

[0048] 除了核酸递送以外,在一些实施方式中,还可以通过多肽的直接递送将转录因子引入AC,其也称为蛋白转导。在蛋白转导中,将所需的转录因子与蛋白转导结构域(或“PTD”)融合,所述结构域能够穿过细胞膜并将所述融合蛋白递送至AC。在Ho等,Cancer Research 61(2):474-7(2001)(HIV Tat)、W003/059940(人SIM-2)、W003/059941(Mph)、Rothbard等,Nature Med.6(11):1253-7(2000)等等中对PTD的示例进行了描述。

[0049] II.2 ETV2的受控表达

[0050] 本发明人发现了ETV2相对于FLI1和ERG的受控表达对于产生成熟的和增殖性的rAC-VEC是重要的。例如,克隆分析显示ETV2与FLI1和ERG1的化学计量比对成熟的和增殖性的rAC-VEC的产生是重要的。在特定的示例中,FLI1和ERG1两者均在表达成熟EC标记物如CD31的理想rAC-VEC克隆中表达,并且ETV2的表达似乎与CD31成反比。此外,在初始瞬时ETV2表达后,ETV2表达的抑制实际上增加了成熟EC的百分率。因此,可以对所述重编程方法进行精确的调控,以使得ETV2的表达被控制,以获得同质性更高的成熟EC群。

[0051] 在一些实施方式中,所述AC的重编程包括实现在AC中表达ETV2、FLI1和ERG的组合一段时间后的克隆选择步骤,以根据在所述克隆中的ETV2相对于FLI1和ERG适宜的化学计量比,鉴定表达至少一种成熟EC标记物(例如CD31)的克隆。例如,在使用编码ETV2、FLI1和ERG1的病毒载体转导AC后约第21天,对AC进行筛选以鉴定不仅表达早期EC标记物(例如VE-钙粘蛋白和VEGFR2)还表达成熟EC标记物(例如CD31)的克隆。尽管第21天可能据信是rAC-VEC已达到最大成熟的时间点并且因此可能产生具有较高效能的理想克隆,但是将培养低至16天或优选地17天或18天或更长时间,或者19天或20天或更长时间的rAC-VEC的克隆扩增也认为是足以产生理想克隆的。

[0052] 在其他实施方式中,所述AC的重编程涉及利用不同表达性质(例如持续时间和强度)的载体和/或5'调控序列以分别递送和表达ETV2和FLI1/ERG,以便在接受体AC中达到适宜的ETV2与FLI1和ERG的化学计量比。例如,持续强表达的慢病毒载体可以用于FLI1和ERG1,相对瞬时表达的腺病毒载体可以用于ETV2。编码所述转录因子的裸DNA也可能是适宜的。

[0053] 在其他实施方式中,所述AC的重编程涉及ETV2的瞬时表达,以及FLI1和ERG的组成性表达。在特定的实施方式中,ETV2的瞬时表达指ETV2表达约10至18天、12-16天、13-15天或约14天。一般来说,最少10天被认为是ETV2足以使羊膜细胞特异性转化为内皮细胞结局的时间。可以对VEGFR2和VE-钙粘蛋白进行评估以确证产生了rAC-VEC。而且,因为在本申请中ETV2显示出对rAC-VEC中CD31(PECAM)表达的负向调节,也可以在ETV2的关闭之后检测CD31。在ETV2关闭和TGF β 抑制除去后,对于全部三个EC蛋白标记物(VEGFR2、VE-钙粘蛋白和CD31)均为阳性的rAC-VEC是可靠的rAC-VEC。

[0054] 可以通过各种方法实现瞬时表达,包括但不限于使用可诱导的或条件表达系统(包括可诱导的启动子)、重组酶系统和拮抗ETV2mRNA的产生或活性的核酸剂。

[0055] 在一个示例性的实施方式中,使用Lenti-X™ Tet-Off可诱导的表达系统实现瞬时表达,所述表达系统可从CLONETECH购买获得。简言之,该系统利用了两种慢病毒载体:稳定表达Tet-Off转录激活剂的调控载体和控制ETV2基因表达的应答载体(pLVX-Tight-Puro)。慢病毒颗粒由各所述载体产生并用于共转导AC。在不存在多西环素的条件下,所述调节载体中Tet-Off转录激活子的表达启动所述应答载体中ETV2的转录。随后通过使用多西环素处理实现ETV2表达的抑制。

[0056] 在另一个示例性实施方式中,通过使用基于重组酶的系统如Cre/Lox或FLP/FRT实现ETV2的瞬时表达。FLP蛋白催化位点特异性重组事件,并且FLP基因克隆自酿酒酵母(Cox (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:4223-4227,其通过引用并入本申请)。将被所述FLP蛋白识别的重组位点称为FRT,其在不对称的8-bp间隔周围含有两个反向的13个碱基对(bp)的重复:所述FLP蛋白裂解在所述重复和所述间隔连接处的位点。可以将所述ETV2编码序列置于在正向重复方向的两个FRT位点之间的递送载体中。在将此类载体引入AC并且ETV2表达一段时间后,向所述细胞提供所述FLP重组酶可以导致所述FRT重复之间的DNA序列和所述FRT重复之一的缺失,在剩余的FRT序列中留下“疤痕”使其难以再被FLP重组。类似地,噬菌体重组酶Cre催化两个lox位点之间的位点特异性重组,导致所述重组位点之间的序列缺失,并与适当选择的lox序列也形成“疤痕”序列。对于Cre重组酶的更多细节,参见Hamilton等, J. Mol. Biol. 178:481-486 (1984), Sternberg等, J. Mol. Biol. 187:197-212 (1986), Sauer等, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85.:5166-5170 (1988) 和Sauer等, Nucleic Acids Res. 17:147-161 (1989),其全部通过引用整体并入本申请。

[0057] 在其他实施方式中,通过利用有效抑制或沉默ETV2mRNA的产生或功能的核酸分子实现ETV2的瞬时表达。这些包括反义RNA、siRNA和miRNA(或“微RNA”),所有这些均可以基于ETV2的基因序列设计并引入AC中。

[0058] 还可以通过被递送进入细胞的编码ETV2的裸DNA实现ETV2的瞬时表达。

[0059] II.3 TGFβ信号的抑制

[0060] 本重编程方法包括与ETS-TF的强制表达结合的TGFβ信号的抑制。TGFβ信号的抑制至少在短期内使VEGFR2信号具有功能并且增加AC针对rAC-VEC的特异性。“短期”指从重编程开始至少2周的一段时间;在特定的实施方式中,至少18-19天的一段时间;并且在其他实施方式中,至少20-21天,例如20-24天或约21天。通过向培养基中加入广谱的TGFβ抑制剂分子或直接针对TGFβ配体的抗体可以容易地控制TGFβ的抑制。在细胞表面表达VEGFR2和VE-钙粘蛋白(可以通过FACS检测)是两个主要的细胞特征,可以对其进行检测以鉴定rAC-VEC的产生。一旦rAC-VEC的结局被建立(例如在约21天),则不再需要TGFβ抑制。

[0061] 可以通过向AC的细胞培养基中加入TGFβ信号抑制剂实现TGFβ信号的抑制。TGFβ超家族信号被两类受体所介导:I型或激活素样激酶(ALK)受体和II型受体。I型受体包括ALK4(针对激活素或抑制素的I型受体)、ALK5(针对TGFβ的I型受体)和ALK7(针对nodal的I型受体)。

[0062] 在某些实施方式中,在本申请中使用的TGFβ信号抑制剂是I型受体的选择性抑制剂,即该抑制剂对I型受体与II型受体存在差异(即选择性)。可以在标准检测中根据在各检

测中抑制的IC₅₀比率对选择性进行检测。所述抑制剂可以是某个I型受体(即ALK4、ALK5或ALK7之一)的特异性抑制剂,或抑制若干I型受体信号(例如ALK4、ALK5和ALK7全部)的抑制剂。

[0063] 在一个特定的实施方式中,所述抑制剂至少抑制ALK5介导的信号。在活化后,ALK5使胞质蛋白smad2和smad3磷酸化。所述磷酸化的smad蛋白转位入核并活化某基因表达。ALK5介导的信号的抑制剂可以是抑制ALK5的激酶活性并阻止smad蛋白磷酸化的化合物。参见例如Yingling等的综述,Nature Reviews (药物发现) 3:1011-1022 (2004)。

[0064] 所述抑制剂可以是多肽,如TGFβ受体的可溶性形式(例如由受体的胞外区段组成的多肽),特定的I型受体的可溶性形式或针对TGFβ受体、特定的I型受体或其配体的抗体,例如针对TGFβ配体的单克隆抗体,可以从R&D购买获得:#MAB1835。

[0065] 所述抑制剂还可以是小分子化合物。“小分子化合物”指有机小分子化合物,其通常具有低于1200、1000或800道尔顿的分子量。TGFβ信号的小分子抑制剂已在现有技术中有广泛的记载,包括美国专利6,465,493和US 20030149277 A1中披露的吡啶基取代的三芳基咪唑、US 20030166633 A1和US 20040220230 A1中披露的吡啶基取代的咪唑、US 20040152738 A1中披露的吡啶基取代的三唑、US 20040266842 A1中披露的噻唑基取代的三唑、US 20040063745 A1中披露的2-氨基-4-(吡啶-2-基)-噻唑衍生物、US 20040039198 A1中披露的2-吡啶基取代的二芳基咪唑,US 20050014938 A1中披露的苯基取代的三唑、US 20050165011 A1中披露的苯并噁唑和苯并噁嗪酮取代的三唑、US 20070072901 A1中披露的异喹啉衍生物、US 20070154428 A1中披露的噻唑基咪唑衍生物、美国专利号7,417,041中披露的使用至少一个2-吡啶基部分取代的杂芳基化合物,以及Yingling等综述的那些,Nature Reviews (药物发现) 3:1011-1022 (2004),这些出版物的全部内容均通过引用并入本申请。还可以通过各种商业来源获得小分子抑制剂。例如,可以从Tocris Bioscience (Missouri,USA)获得下表中列出的化合物,并且其是适于在本发明的方法中使用的抑制剂。可以从EMD4Bisciences (New Jersey,USA)获得其他小分子抑制剂。

[0066]

化合物	化学名/功能
A 83-01	3-(6-甲基-2-吡啶基)-N-苯基-4-(4-喹啉基)-1H-吡唑-1-硫代酰胺 (ALK5、ALK4 和 ALK7 的选择性抑制剂)
D 4476	4-[4-(2,3-二氢-1,4-苯并二噁烷-6-基)-5-(2-吡啶基)-1H-咪唑-2-基]苯甲酰胺 (选择性 CK1 抑制剂。还抑制 ALK5)
LY 364947	4-[3-(2-吡啶)-1H-吡唑-4-基]-喹啉 (ALK5 的选择性抑制剂)
SB 431542	4-[4-(1,3-苯并二噁唑-5-基)-5-(2-吡啶基)-1H-咪唑-2-基]苯甲酰胺 (ALK5、ALK4 和 ALK7 的选择性抑制剂)
SB 525334	6-[2-(1,1-二甲基乙基)-5-(6-甲基-2-吡啶基)-1H-咪唑-4-基]喹啉 (ALK5 的选择性抑制剂)
SD 208	2-(5-氯-2-氟苯基)-4-[(4-吡啶基)氨基]蝶啶 (高效 ATP 竞争性 ALK5)
SJN 2511	2-(3-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,5-萘啶 (ALK5 的选择性抑制剂)

[0067] 在一个实施方式中,将化合物SB-431542用作TGFβ信号抑制剂。将该化合物以浓度范围为约1μM至约15μM、或约2μM至约10μM加入培养基中。在一个特定的实施方式中,将约5μM的该化合物加入培养基中。其他小分子抑制剂的适宜浓度可能取决于特定抑制剂的结构或功能机制并且可以在微摩范围内,其可以由本领域技术人员确定(例如基于在适宜的体外测定中确定的IC50值)。

[0068] II.4细胞培养

[0069] 无论是从羊水中新鲜提取的还是从冷冻保存中融化的AC,在重编程之前,可以将AC在培养基中保持例如3-4周。用于培养AC的适宜培养基包括高糖杜尔贝科改良的伊格尔培养基(DMEM)、DMEM/F-15、Liebovitz L-15、RPMI 1640、Iscove改良的杜尔贝科培养基(IMDM)和Opti-MEM SFM(Invitrogen Inc.(英骏公司))。

[0070] 为了转录重编程对AC进行处理(例如转导)后,在存在TGFβ抑制剂的条件下,可以在能够使内皮细胞生长的培养基中对所述细胞进行培养。适宜的培养基包括内皮生长培养基(EM),其由培养基199(Thermo Scientific(赛默菲公司):#FB-01)、15%胎牛血清(Omega Scientific(欧米茄科学))、20μg/ml内皮细胞添加剂(Biomedical Technologies(生物医学技术):#BT-203)、1X Pen/Strep、20单位/ml肝素(Sigma(西格玛):#H3149-100KU)组成。

[0071] 在实现ETV2、FLI1和ERG的表达并同时抑制TGFβ的条件下培养所述细胞。在特定的实施方式中,在存在TGFβ抑制剂并表达ETV2、FLI1和ERG1的条件下培养AC 12-16天或约14天,在此期间所述ETV2的表达被关闭,而在存在TGFβ抑制剂的条件下实现FLI1和ERG1的持续表达直至在存在TGFβ抑制剂的条件下将所述细胞培养总计18-24天或约21天的时间点。从该时间点起在培养基中不再需要TGFβ抑制剂,将所述细胞移至不含所述抑制剂的培养基中并根据需要例如再培养几天至几周或更长时间使其持续表达FLI1和ERG1。

[0072] III.羊膜细胞重编程成为血管内皮细胞(“rAC-VEC”)

[0073] 使用术语“羊膜细胞重编程成为血管内皮细胞”或“rAC-VEC”指使用本申请所公开

的重编程方案由AC产生的血管内皮细胞,其不同于从哺乳动物对象中分离的成年血管内皮细胞,如人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和成人肝窦EC(“LSEC”),尽管事实上rAC-VEC和成人EC具有相似的形态特征、细胞表面表型和转录谱。例如,rAC-VEC与HUVEC类似,长度约10 μ m,为“煎鸡蛋”或鹅卵石形状。rAC-VEC的细胞表面标记物特征包括至少VE-钙粘蛋白+、VEGFR2+和CD31+,以及还任选地包括EC-选择性粘附分子(ESAM)和连接粘附分子A(JAM-A),其均在成人EC上表达。rAC-VEC的转录谱的特征为表达VE-钙粘蛋白、VEGFR2、CD31+,表达内分泌性血管因子包括BMP、Notch-配体、IGF、CSF、Kit-配体、信号素和EGFL7;不表达非-EC基因如平滑肌肌动蛋白、肌肉素、调宁蛋白-1和促尿钠排泄肽B;和造血细胞标记物阴性的包括CD45、CD15、Pu.1、TPO-受体、Flt3受体或Lhx2。

[0074] 可以基于生长特征、形态特性、细胞表面表型、转录谱或任意这些特征的组合确定在AC培养物中rAC-VEC的出现。本申请中显示使用ETV2/FLI1/ERG1转导AC不仅导致血管特性的完全诱导,其还在AC中关闭了非血管程序。rAC-VEC是高度增殖性和稳定的,在50天内能够释放6x10⁴-倍的扩增,并同时保持其全部的血管生成库。如果有需要可以使用EC表面标记物特异性抗体将rAC-VEC从细胞培养物中分离,如VE-钙粘蛋白、CD31或VEGFR2,其连接至磁性小珠或荧光团以用于磁性或荧光活化细胞分选(MACS或FACS)。

[0075] 因此,本发明还提供了基本上纯的稳定的rAC-VEC群。“基本上纯的”指rAC-VEC占所述细胞群中细胞的至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或更高的百分率。“稳定的”指rAC-VEC能够培养较长时间,例如至少5代、至少10代、至少15代或更长时间,而不丧失rAC-VEC特征。

[0076] rAC-VEC可以直接用于治疗应用或使用常规的冻存方法冻存以供将来使用。

[0077] IV. 药物组合物和治疗方法

[0078] 本申请公开的重编程方法允许可重复地生产大量功能性的和稳定的rAC-VEC,这是可靠的,并且可以是HLA型的,因此其对于受损组织的治疗性血管形成将是有用的。

[0079] 因此,在又一个方面,本申请提供了含有rAC-VEC的组合物。所述组合物可以包括一种或多种药学上可接受的运载体和稀释剂。所述组合物还可以包括有助于移植的组分。

[0080] 在又一个方面,本申请涉及本申请提供的所述内皮细胞的治疗性用途。例如,所述瞬时内皮细胞可以用于缺血组织的修复、血管和心脏瓣膜的形成、人工血管的工程改造、受损血管的修复和在工程改造的组织中形成血管(例如在移植前)的细胞治疗。此外,还可以对所述瞬时内皮细胞进行进一步修饰以便将治疗剂递送至靶点治疗肿瘤。

[0081] 在特定的实施方式中,本申请提供了修复或替代需要血管细胞或血管形成的组织的方法。该方法涉及给予需要这种治疗的人类受试者含有分离的rAC-VEC的组合物以促进在此类组织中的血管形成。

[0082] 需要血管细胞或血管形成的组织可以是心脏组织、肝脏组织、胰脏组织、肾脏组织、肌肉组织、神经组织、骨组织等,其可以是受损的和大量细胞死亡的组织,具有受损风险的组织或人工工程改造的组织。

[0083] 促进组织中的血管生成对具有或处于发展成某状况风险下的个体可能是有利的,所述状况包括缺血状况,例如心肌梗死、充血性心力衰竭和周围血管阻塞性疾病、中风、再灌注损伤、肢体缺血、神经病(例如周围神经病或糖尿病性神经病)、器官衰竭(例如肝衰竭、肾衰竭等)、糖尿病、类风湿性关节炎和骨质疏松症。

[0084] 本发明的rAC-VEC或含有此类细胞的组合物可以以使其递送或迁移至或接近需要修复或血管形成的组织的方式给予。在一些实施方式中,所述细胞是全身性给予的并循环至对其有需要的组织;或者,局部给予,例如直接递送(通过注射、植入或任意适宜的方式)至需要这些细胞的组织中或所述组织的附近。在其他实施方式中,在植入前将所述细胞整合至人工工程改造的组织中。

[0085] 在另一个实施方式中,本申请提供了一种在受试者中将某些药剂靶向肿瘤的方法,所述方法通过给予所述受试者已经过工程改造用于递送此类药剂的内皮细胞。因为肿瘤通常刺激新生血管向所述肿瘤中生长(刺激肿瘤血管生成),所以向受试者递送的内皮细胞能够用于新生肿瘤的脉管系统。因此,所述细胞能够用于直接向肿瘤部位递送药剂。能够使用内皮细胞靶向至肿瘤的药剂的示例包括但不限于细胞毒性药物、其他毒素、放射性核素和基因表达产物。例如,可以对内皮细胞进行工程改造,以使其还表达具有抗肿瘤活性的蛋白,或者以使其分泌、释放或涂覆毒性剂如化疗剂或放射性核素。例如,可以将放射性核素药物或化疗药物与同所述内皮细胞表面结合的抗体缀合,以便用于将所述放射性核素或化疗药物递送至肿瘤。

[0086] 通过下述实施例对本说明书进行进一步阐述,不应将其解释为以任意方式进行限制。所有引用的参考文献(包括在本申请中引用的参考文献、已授权专利和已公开的专利申请)的内容均在此通过引用明确地并入本申请。

[0087] 实施例1:材料和方法

[0088] 细胞培养

[0089] 在本研究中使用的人胚胎干细胞(hESC)是原代的RUES1hESC(由Ali Brivanlou博士提供,洛克菲勒大学)。经康奈尔-洛克菲勒-斯隆凯特琳研究所ESCR0委员会全面审核后,获得了使用这些细胞系的许可。执行这些研究的经费来自经批准的非联邦资金来源。人ESC培养基(KOSR)含有高级DMEM/F12(Invitrogen(英骏公司):#12634-028),其添加了20%的敲除血清替代品(Knockout Serum Replacement)(Invitrogen(英骏公司):#10828-028)、1X非必需氨基酸(Gibco:#11140050)、1X L-谷氨酰胺(Invitrogen(英骏公司):#25030-081)、1X Pen/Strep(Invitrogen(英骏公司):#15240-062)、1XB-巯基乙醇(Gibco:#21985023)和4ng/ml FGF-2(Invitrogen(英骏公司))。人ESC保存于Matrigel™中,在37°C和5%CO₂的条件下使用加入了小鼠胚胎成纤维细胞的hESC培养基(MEF, Chemicon)。

[0090] 羊膜细胞(AC)来自威尔康奈尔医学院的病理细胞遗传实验室系。使用废弃AC(即在我们使用前将“预先培养的AC”在细胞实验室补充了添加剂的Amino-Max中培养3-4周)的许可来自威尔康奈尔医学院的机构审查委员会。在37°C和5%CO₂条件下在羊膜培养基(AM)中培养AC:在进行用于转录重编程的处理之前,使用含1X Pen/Strep的Amnio-Max(GIBCO:#17001-074)+添加剂(GIBCO:#12556-023)培养3至4周。对于重编程实验而言,在内皮生长培养基(EM)中培养AC:培养基199(Thermo Scientific(赛默菲公司):#FB-01)、15%胎牛血清(Omega Scientific(欧米茄科学))、20μg/ml内皮细胞补充剂(Biomedical Technologies(生物医学技术):#BT-203)、1X Pen/Strep、20单位/ml肝素(Sigma(西格玛):#H3149-100KU),并且在指定位置加入5μM TGFβ抑制剂(SB431542)或TGFβ配体中和的mAb(R&D)。培养基199厄尔氏液体培养基含有一系列的无机盐、氨基酸和维生素,其均可见于赛默菲公司网站的产品数据表上。内皮细胞补充剂(又名内皮有丝分裂原-ECGS)是来自牛下丘脑的部

分纯化的制剂,用于改善体外培养的血管内皮细胞的生长。

[0091] 肝窦内皮细胞 (LSEC, ScienCell) 在含有20%胎牛血清的EM中培养。如前所述的获得人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) (RAFII等, Blood, 86:3353-3363 (1995); RAFII等, Blood, 84:10-19 (1994)) 并且在含有20%胎牛血清的EM中培养。对于经历重编程的AC而言,使用1 μ g/ml纤连蛋白 (Sigma (西格玛):#F0895-5MG) 涂覆培养板并且使细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂和5%O₂的条件下生长。

[0092] 细胞因子/小分子处理

[0093] 小分子SB431542 (Tocris:#SB431542) 以终浓度5 μ M使用。对于ETV2的诱导性表达/抑制而言 (图7),以终浓度2 μ g/ml使用多西环素 (Clontech:#631311)。对于TGF β 实验而言 (图5),TGF β 配体 β 1 (R&D:#8915) 和 β 3 (R&D:#8425) 在指定时间点以10ng/ml的终浓度使用。TGF β 配体中和单克隆抗体 (TGF β mAb R&D:#MAB1835) 以10 μ g/ml的终浓度使用。对于VEGFR2磷酸化实验而言 (图5),使用50ng/ml VEGF-A (Peprotech) 处理细胞5分钟。对于乙酰化-LDL摄取测定而言 (图6),以10 μ g/ml的终浓度使用DiI-标记的Ac-LDL (生物医药技术公司:#BT-902)。

[0094] 慢病毒载体和转导策略

[0095] 将编码ETV2、ERG1和FLI1的cDNA分别克隆至pCCL-PGK慢病毒载体。通过快速更换定点突变试剂盒 (Stratagene:#200521) 将三重Flag-标签亚克隆至ETV2构建体的氨基末端。对于条件性表达/抑制实验而言,将Flag-标签ETV2重新亚克隆至pLVX-Tight-Puro载体 (Clontech:#632163) 并与pLVX-Tet-Off载体共转导。通过多西环素 (2 μ g/ml) 处理实现Flag-标签ETV2的抑制。将乱序shRNA构建体克隆至pLKO载体作为对照。利用钙沉淀法通过将15 μ g我们的目的慢病毒载体基因、3 μ g pENV/VSV-G、5 μ g pRRE和2.5 μ g pRSV-REV在293T细胞 (传代8-10次;亚融合,100mm皿) 中共转染生成慢病毒。根据此前的描述 (NALDINI等, Science, 272:263-267 (1996)) 收集转染后40和64小时的上清液。利用Lenti-X浓缩器 (Clontech:#631232) 浓缩病毒上清液并通过使用Lenti-X p24快速滴度试剂盒 (Clontech:#632200) 确定病毒滴度。除非另有明示,使用感染复数 (MOI) 5转导AC,以及未分化的RUES1和WMC-2hESC。

[0096] 流式细胞术

[0097] 在Becton Dickenson LSRII SORP上进行流式细胞术 (FACS) 和在Aria II SORP上进行流式分选。使用针对人VEGFR2 (R&D:FAB357P)、CD31 (eBiosciences:#11-0319-42)、VE-钙粘蛋白 (eBiosciences:#17-1449-42)、c-Kit (BD:#339206)、EpCam (BD:#347198)、E-钙粘蛋白 (BD:#612130)、Tra1-60 (BD:#560071)、Tra1-81 (BD:#560793)、CD24 (eBiosciences:#14-0247-82) 和SSEA3 (BD:#560237) 的抗体。所有电压和补偿使用CompBeads (BD Pharmingen) 进行,使用荧光扣除 (FMO) 对照进行设门。

[0098] 定量PCR

[0099] 根据生产厂商的说明书使用RNeasy提取试剂盒 (Qiagen (凯杰公司):#74106) 从培养细胞中制备总RNA和使用QuantiTect逆转录试剂盒 (Qiagen:#205313) 进行逆转录。使用SYBR Green PCR mix (Applied Biosystems (应用生物系统公司)) 在7500快速实时PCR系统 (Applied Biosystems (应用生物系统公司)) 上进行相对定量PCR。循环条件为:50 $^{\circ}$ C下2min进行1个循环,随后95 $^{\circ}$ C下10分钟进行1个循环,随后95 $^{\circ}$ C下15s和60 $^{\circ}$ C下1分钟进行40个循

环。检查引物在线性范围内扩增及引物解离,并且对引物进行验证。将引物探针的阈值循环归一化至管家基因 β -肌动蛋白并转化为相对值。(引物序列见表1。)

[0100] 体外Matrigel™小管生成和体内血管生成测定

[0101] 为检测rAC-VEC在体内小管生成的能力,使用GFP-慢病毒转导经ETS-TF感染的AC,并将其与Matrigel (BD:#354234)、100ng/ml VEGF-A和50ng/ml FGF-2混合,皮下植入NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) 小鼠 (Jackson Laboratories (杰克逊实验室), Bar Harbor, ME) 的侧腹部。为检测rAC-VEC功能性掺入再生肝窦脉管系统的能力,根据此前的描述 (Ding等,2010),对NSG小鼠进行70%部分肝脏切除术2天后,对其进行脾内注射GFP-标记的rAC-VEC。rAC-VEC注射2周 (Matrigel填块) 或三个月 (脾内) 后,静脉注射给予小鼠与Alexa568缀合的Isolectin-B4 (Invitrogen:#I21412) (2mg/kg),并在10分钟后将其处死。然后使用4%的多聚甲醛固定Matrigel填块或肝脏,随后在30%蔗糖中饱和48小时。制备20 μ m冰冻切片并使用Hoechst 33342复染。对GFP-标记的rAC-VEC的掺入情况进行鉴定,通过使用Isolectin-B4荧光共染显示功能性的移植物进入宿主脉管系统的情况。还进行抗人CD31 (BD) 染色以便对rAC-VEC和宿主小鼠EC进行区分。利用共聚焦显微镜 (710META Zeiss) 对荧光信号进行分析。通过ImageJ对GFP-阳性视野区域进行定量,通过计数随机选取的三个视野中存在的细胞数确定凝集素阳性功能性的血管的数量。对于体外测定而言,将200 μ l Matrigel涂覆在12孔TC板上,并将200,000个rAC-VEC接种在Matrigel上,根据此前的描述确定小管生成情况 (KOBAYASHI等,Nature cell biology,12:1046-1056 (2010))。

[0102] 免疫荧光/Western印迹分析

[0103] 根据此前的描述 (James等,2010) 对样品进行染色。简言之,将样品浸入PBST中并使用5%驴血清封闭。在封闭溶液中使用缀合的抗体孵育样品1小时,洗涤并使用DAPI或ToPro3 (Invitrogen (英骏公司)) 对核酸进行复染,以用于共聚焦显微镜法成像。用于免疫染色的一抗为VE-钙粘蛋白 (R&D:#AF938)、CD31 (eBiosciences:#11-0319-42)、VEGFR1 (R&D:#AF321)、VEGFR2 (R&D:#FAB357P)、ESAM (R&D:#AF2688)、JAM-A (R&D:AF1103)、EpCam (BD:#347198)、平滑肌肌肉蛋白 (R&D:#MAB1420) 和Oct4 (R&D:#AF1759)。所使用的全部抗体均是针对人抗原的。所有成像均使用Zeiss 510或共聚焦显微镜进行。根据此前的描述 (Kobayashi等,2010) 进行Western印迹分析。在western印迹测定中使用的抗体:Flag (Sigma (西格玛):#F1804-5MG-1:1000)、VEGFR2 (Cell Signaling:#2479S-1:2000)、pVEGFR2 (Cell Signaling:#4991-1:300)、SMAD2 (Cell Signaling:#3102S-1:1000)、pSMAD2 (Cell Signaling:#3108S-1:300)、GAPDH (Cell Signaling:#2118L-1:5000)、ERG (BioCare Medical (保科医疗):#CM421C-1:1000) 和FLI1 (Epitomics (宜百康):#3645-1-1:3000)。

[0104] RNA-Seq文库构建、测序和分析

[0105] 使用Qiagen (凯杰) RNeasy提取试剂盒从培养细胞中制备总RNA并且在Agilent Technologies (安捷伦科技) 2100生物分析仪上对其进行质量检查。使用1 μ g高品质总RNA作为输入,以便将mRNA转化成模板分子文库,该文库使用Illumina TruSeq RNA样品制备试剂盒 (San Diego, CA) 中提供的试剂生成并用于随后的簇生成和测序。在使用与poly-T oligo结合的磁珠对含有poly-A的mRNA分子进行纯化后,在升高的温度下使用二价阳离子将所述mRNA片段化成小碎片。使用逆转录酶和随机引物将剪切的RNA片段复制成第一链cDNA。随后

使用DNA聚合酶I和RNase H合成第二链cDNA。然后使这些cDNA片段经历末端修复过程,加上单个的“A”碱基,然后连接适配体。随后对产物进行纯化并使用PCR富集以形成最终的cDNA文库。在对所述产品的大小和纯度进行定量和确认后,将多重DNA文库归一化至10nM,随后将两个样品文库等体积混合在一起。各取7pM混合DNA文库模板在Illumina cBot仪器上扩增,涉及固化和3'延伸、桥扩增、线性化和杂交,然后使用对端模块在Illumina HiSeq2000测序仪的一条道上测序并产生2x58bp-长的读数。使用Illumina管线QC后,使用采用默认参数的TopHat (TRAPNELL等, Bioinformatics, 25:1105-1111 (2009)) 将读数投射至人基因组中 (hg18)。然后使用前四分之一归一化和序列特异性倚倚校正的CuffLinks (TRAPNELL等, Nat Biotechnol, 28:511-515 (2010)) 对RefSeq (2010年6月) 的转录水平 (FPKM) 进行定量。对于热图产生而言,确定所显示的样品中各转录本的最大FRKM;然后使用FPKM除以该数字以产生按照比例的表达值。然后使用绿色至红色颜色的标尺对热图作图。使用R统计软件中的cmdscale函数进行多维尺度 (MDS) 分析。使用hclust R函数的平均连锁方法进行层次聚类。对于MDS和层次聚类二者而言,使用1减去Pearson相关作为基因组范围的转录组谱之间相异性的度量。

[0106] 在Agilent (安捷伦) 1M CGH阵列上的DNA谱

[0107] 使用DNeasy回收试剂盒 (Qiagen (凯杰公司): #69506) 从样品中提取基因组DNA。在1%的琼脂糖凝胶上确认DNA的完整性。然后对3 μ g DNA进行消化并使用Bioprime试剂盒 (Invitrogen (英骏公司)) 和Cy3或Cy5-dUTP进行随机引物标记。在60 $^{\circ}$ C下将标记的DNA与Agilent (安捷伦) 1M CGH阵列杂交40小时。在根据生产厂商的说明书进行洗涤后,在Agilent (安捷伦) DNA微阵列扫描仪上对所述载玻片进行扫描并使用Feature Extraction 10.7 (Agilent (安捷伦)) 对图像进行定量。

[0108] 实施例2:ETV2、FLI1和ERG1的上调增加人胚胎干细胞 (hESC) 向EC的分化

[0109] 为了鉴定EC血管特化必须的ETS-TF,发明人使用了已建立的hESC向胚胎EC分化的模型 (JAMES等, Nat Biotechnol, 28:161-166 (2010))。使用显微阵列谱,发明人发现在hESC向EC分化的过程中表达ETS-TF,而ETV2、FLI1和ERG是关键的ETS-TF。与ERG2亚型相比,ERG1亚型在原型EC中显示出了持续性的表达,因此在由hESC产生EC的方案中使用ERG1。

[0110] 使用BMP2和VEGF-A孵育hESC 10天以产生VEGFR2⁺VE-钙粘蛋白⁻细胞,其是早期胚胎EC的血管前体。随后,分离VEGFR2⁺CD31⁻VE-钙粘蛋白⁻细胞并使用慢病毒载体转导,所述慢病毒载体表达针对ETV2、FLI1和ERG1 (ETV2/FLI1/ERG1) 或者对照病毒的cDNA。在使用VEGF-A、FGF-2和TGF β 抑制剂SB431542处理的细胞扩增后,与对照细胞相比在ETS-TF转导的细胞中观察到了VEGFR2⁺CD31⁺VE-钙粘蛋白⁺EC的适度增加。然而,经过或未经ETS-TF转导的VEGFR2⁺CD31⁺VE-钙粘蛋白⁺EC细胞均无法增殖超过3周并且最终其转分化为非EC细胞类型如平滑肌细胞。因此,尽管实施了ETS-TF的表达,来源于hESC的EC不能持续性具有增殖潜能和EC特性。

[0111] 实施例3:羊膜细胞重编程成为血管内皮细胞 (rAC-VEC) 与来源于ETS转导的hESC的EC相比显示出更强的增殖能力和血管稳定性

[0112] 因为hESC-来源的胚胎EC具有有限的扩增潜能并且在传代后‘漂移’为非血管细胞,发明人对能够重编程为血管细胞的容易获得的人细胞来源进行了研究。对成人人源成纤维细胞和间叶细胞重编程的尝试均是不成功的 (数据未显示)。在筛选了大量的胎儿和

成人组织后,发明人观察到来源于妊娠中期羊膜细胞(AC)的间叶细胞和上皮细胞能够出乎意料地高效重编程为血管内皮细胞(rAC-VEC)。为了这个目的,单独或组合使用慢病毒ETS-TF(ETV2、FLI1、ERG1)对AC(‘预先培养的AC’-参见方法)进行转导以确定是否这些细胞能够重编程为rAC-VEC(图1a)。因为在阻止EC发生hESC来源的胚胎EC间叶细胞转化(Endo-MT)的过程中TGFβ抑制是关键(JAMES等,Nat Biotechnol,28:161-166(2010)),所以还在存在TGFβ受体抑制剂SB431542或TGFβ配体中和单克隆抗体(mAb)的条件下培养AC。

[0113] 使用编码ETV2、FLI1或ERG1的慢病毒转导AC导致持续几个月的可检测水平的相应mRNA和蛋白的表达。对血管标记物VE-钙粘蛋白、VEGFR2和CD31的表达水平进行评估以估计经转导的AC的重编程效率。单独的ETV2开启血管标记物VE-钙粘蛋白和VEGFR2的表达,但是不活化CD31。而相反的是,ERG1或FLI1活化CD31的表达,但是不会诱导由ETV2启动的其他关键的EC标记物。因此,ETV2是诱导EC结局的关键,而ERG1和FLI1促进EC的成熟。值得注意的是,同时使用全部三个ETS-TF转导的AC在7天内和此后持续超过1个月的时间段内显示出对各EC标记物较强的诱导作用(图1b),这表明这些因子的组合对活化与EC的特性和成熟相关的基因是必要的。ETS-TF的表达还促进了经转导的AC的扩增,因为仅使用ETV2转导获得最高的生长速率,而经FLI1或ERG1转导的细胞的增殖性较差(图1c)。实现全部三个ETS-TF表达的rAC-VEC具有较强的增殖作用。初始经ETV2、FLI1和ERG1(ETV2/FLI1/ERG1)转导的 10^5 个AC,在第3周时生长出接近3千万个细胞,到第7周时增加至超过60亿个细胞(图1d)。值得注意的是,在整个该时间段内,在超过98%的经ETV2/FLI1/ERG1转导的AC中均保持了VE-钙粘蛋白的表面表达。

[0114] 在使用ETS-TF转导和TGFβ抑制后,AC扩增至的数量比经过或未经过ETS-TF转导的hESC→EC高接近30倍(图1e)。而且,与使用ETS-TF转导的AC相比,经过或未经过ETS-TF转导的hESC来源的EC在连续传代后VE-钙粘蛋白⁺细胞出现显著的减少(图1f)。在hESC来源的EC群中EC表型的这种‘漂移’被使用平滑肌β-肌动蛋白(SMA)抗体的染色所验证(图1g-框图iii、iv和vi)。使用ETS因子转导的AC中这种非-EC标记物是阴性的(图1g-框图ii);其显示出在其他成人EC类型中典型的VE-钙粘蛋白的表达类型,如人脐静脉内皮细胞(HUVEC:图1g-框图v)和肝窦EC。因此,AC被赋予了独特的表观遗传构成,其与hESC相比更易于转录重编程为稳定的EC。

[0115] 实施例4:AC不含EC前体细胞

[0116] 为了评估AC来源的rAC-VEC是否是从事先已存在的EC前体细胞中生长出来的,发明人检测了通过在缺乏ETS-TF的足以使EC扩增的条件下培养AC是否能够产生rAC-VEC。在含氧量正常的,存在和不存在TGFβ抑制剂SB431542的条件下,在含有VEFG-A、FGF-2、EGF和IGF的最佳EC生长培养基(EM)中培养AC(SIMON等,Nature reviews Molecular cell biology,9:285-296(2008))。在第14天时,在这些未经转导的AC中仍未出现VE-钙粘蛋白和CD31的表达。在使EC增殖的培养条件下进一步处理AC 21天和更长时间导致细胞死亡(数据未显示)。因此,rAC-VEC不是事先存在的EC祖细胞的产物。AC的子集如c-Kit⁺细胞,约占AC群的0.2至2%,其已显示出是专能的(multipotent)(DE COPPI等,Nature biotechnology,25:100-106(2007))。为了排除rAC-VEC仅来自专能(multipotent)AC亚群的可能性,发明人评估了在AC中专能的(multipotent)标记物OCT4的存在情况。绝大多数的AC群是OCT4蛋白阴性的(图2a),其确证了来自其他组的类似结果(JEZIERSKI等,Stem cell reviews,6:199-

214 (2010))。针对OCT4 (图2b-上图) 和SOX2 (图2b-下图) 以及NANOG (数据未列出) 几乎检测不到mRNA的表达水平,这进一步表明除了可能有少量c-Kit⁺细胞子集以外几乎没有AC是多能性的。因此,绝大部分AC均不含EC前体或专能 (multipotent) 细胞,所述EC前体或专能 (multipotent) 细胞无需使用ETS-TF转导就能自发分化成大量真正的血管细胞。

[0117] 实施例5:谱系特异的上皮样和间叶细胞样/成纤维细胞样AC有助于重编程为rAC-VEC

[0118] AC由表型标记为E-钙粘蛋白⁺ (E-Cad, CD324)、EpCAM⁺ (CD326) 和CD24⁺的谱系特异细胞以及表达c-Kit、Tra1-60、Tra1-81、SSEA-3和SSEA-4的未分化细胞组成 (图2c)。值得注意的是,c-Kit⁺占AC的<1% (DE COPPI等, Nature biotechnology, 25:100-106 (2007)), 且无CD31⁺细胞。

[0119] 由于c-Kit⁺细胞的数量过少,因此发明人假设非专能 (multipotent) 细胞谱系定型的AC是产生rAC-VEC的主要来源。在从AC池中耗竭c-Kit⁺细胞后,对EpCAM⁺Tra1-81⁻c-Kit⁻细胞和EpCAM⁻Tra1-81⁻c-Kit⁻细胞进行纯化,使用ETS-TF对其进行转导并在存在TGFβ的条件下增殖。在培养4周时间段内ETS-TF转导的亚群均良好地增殖 (图2d-上图)。而且,在经ETS-TF转导的EpCAM⁺Tra1-81⁻c-Kit⁻和EpCAM⁻Tra1-81⁻c-Kit⁻亚群中观察到VE-钙粘蛋白⁺细胞显著增加 (图2d-下图)。对EpCAM和VE-钙粘蛋白的免疫细胞染色确证了作为ETS-TF转导和TGFβ抑制结果的上皮样类型的AC向rAC-VEC的转变 (图2e)。因此,所述谱系定型的AC能够重编程为rAC-VEC。

[0120] 实施例6:ETS-TF活化在AC中血管特征的表达

[0121] 为了评估rAC-VEC获得血管特征的程度,发明人检测了在新出现的rAC-VEC中VE-钙粘蛋白和VEGF2的表面表达 (图3a)。使用ETS-TF转导经TGFβ抑制的AC 4天后,产生了VE-钙粘蛋白⁺细胞和略低程度的VEGFR2⁺细胞 (图3a-框图ii.)。在几周时间段内表达这些标记物的细胞百分率显著增加 (图3a-框图iv.和vi.),这样重编程4周后,经转导的AC的整个群 (~99%) 均为VE-钙粘蛋白⁺ (图3b-框图ii.),且其中约三分之二还显示出VEGFR2的表达。此外,现在这些转换细胞的形态类似于HUVEC (图3b-框图iv.-ix.)。由于所述重编程方法利用了依赖于慢病毒将cDNA整合至宿主基因组,因而发明人进行了比较基因组杂交 (CGH) 分析以评估第28天时rAC-VEC的基因组完整性。此项分析显示无基因组异常,这表明增殖的rAC-VEC是遗传稳定的。

[0122] 实施例7:ETS-TF表达的最佳化学计量是产生成熟rAC-VEC所必需的

[0123] 尽管大部分d21rAC-VEC是VE-钙粘蛋白⁺,但是尚不清楚这些细胞是否由成熟和未成熟rAC-VEC的克隆或异质性群组成。为了产生表达完整EC程序的均质的成熟rAC-VEC群,发明人在重编程过程开始时进行了克隆分析。rAC-VEC通过使用ETV2/ERG1/FLI1转导和TGFβ抑制由AC产生并且培养21天。然后分离表达VE-钙粘蛋白、VEGFR2和CD31 (VE-cad⁺VEGFR2⁺CD31⁺) 的单个细胞并以一个细胞每孔的密度铺板于96孔板中用于克隆扩增 (图3c)。在21天内,20-25%的单细胞克隆显示出扩增潜能 (图3d),各克隆产生具有非一致性表型的后代 (图3e-框图i.-iv.)。尽管克隆1、克隆2和克隆3均几乎为99%的VE-钙粘蛋白⁺,但是CD31的表达变化很大。值得注意的是,克隆-3细胞表达CD31,而克隆-1不产生CD31⁺细胞并且克隆-2产生CD31⁺ (18%) 和CD31⁻细胞。无论是否表达CD31,全部三个克隆均能够扩增4周以上 (图3e-框图v.)。

[0124] 因为在不同克隆的EC标记物诱导之间存在的这些差异可能是由于ETS-TF表达的化学计量导致,所以对ETV2、ERG1的mRNA水平和FLI1mRNA进行了评估(图3e-框图vi.-viii.和汇总)。ERG1和FLI1均在克隆3中表达,表明这些因子对于诱导CD31的表达是重要的。而且,ETV2的表达与CD31成反比,表明ETV2负向调节CD31。这样,克隆-3似乎具有ETS-TF表达以启动VE-钙粘蛋白、VEGFR2和CD31的适宜组合。因此,到目前为止所描述的重编程平台产生的rAC-VEC群的异质型的原因在于不同的ETS-TF表达水平。

[0125] 为了评估rAC-VEC克隆是否与成熟的血管特异性EC产生相似的血管生成性质,发明人使用一系列针对成熟EC标记物的抗体进行了免疫染色。除了VE-钙粘蛋白和CD31以外,克隆-3针对EC选择性粘附分子(ESAM)和连接粘附分子A(JAM-A)也是染色阳性的(图4a)。在rAC-VEC中EpCam的消失(图4a)表明这些细胞原始的非血管特征被除去。因此,不同的ETS-EC表达水平对于生成能够维持其成熟时的EC特性的rAC-VEC是很重要的。

[0126] 实施例8:克隆来源的rAC-VEC显示出与成熟EC相似的转录组谱

[0127] 为评估rAC-VEC是否表达整个的EC特异性基因库,并且同时显示出非血管基因的表达的去除,发明人对来源于AC(克隆和非克隆的)rAC-VEC进行了转录组测序(RNA-seq)。然后将rAC-VEC进行的基因组范围的分析与原型的成熟EC的转录组进行比较,如人脐静脉EC('HUVEC')和成人肝窦EC('LSEC'),以及非内皮细胞类型包括CD34⁺造血细胞('CD34⁺')、骨髓基质细胞('BMS')、肺来源的小气道上皮细胞(Hackett等,2012)和初始对照AC('Amni ctrl')进行比较。与初始AC相比在非克隆('rAC-VEC')和克隆('rAC-VEC克隆-3'和'rAC-VEC克隆-4')来源的rAC-VEC中血管基因的数量显著上调(图4b)。而且,这些诱导EC基因的表达水平与在体外培养的HUVEC和LSEC中所观察到的那些是相当的,这证实了rAC-VEC已获得了完整的EC性质的观点。调节EC驱动的器官再生(BUTLER等,Cell Stem Cell,6:251-264(2010b);DING等,Nature,468:310-315(2010);DING等,Cell,147:539-553(2011);KOBAYASHI等,Nature cell biology,12:1046-1056(2010))和肿瘤生长(BUTLER等,Nat Rev Cancer,10:138-146(2010a))的内分泌性血管因子(包括BMP、Notch-配体、IGF、CSF、Kit-配体和信号素)在rAC-VEC中也均开启。重要的是,通常在AC中表达的一组非EC基因如平滑肌肌动蛋白、肌肉素和调宁蛋白-1在rAC-VEC中沉默。

[0128] 然后发明人通过进行3D多维尺度测量(3D-MDS)(图4c)和层次聚类分析对从RNA-测序中获得的rAC-VEC和成人EC的转录组进行了比较。这些分析显示克隆和非克隆来源的rAC-VEC与HUVEC和LSEC密切相关,而BMS、上皮细胞和CD34⁺造血细胞未显示出与rAC-VEC的相似性(图4c)。值得注意的是,rAC-VEC不表达造血标记物(包括CD45和CD15),这排除了FLI1和ERG1能够诱导造血特性的可能性。因此,基因组范围的分析显示适宜的化学计量水平的ETV2、FLI1和ERG1表达以及TGFβ抑制将AC重编程为成熟的rAC-VEC群,所述rAC-VEC群与真正成熟的EC类似。

[0129] 实施例9:TGFβ抑制在rAC-VEC中维持了功能性的VEGFR2信号

[0130] 经ETS-TF转导的AC产生TGFβ及其受体(图4b),这增加了自分泌/近分泌循环可能通过促成Endo-MT并阻止rAC-VEC的生成调节TGFβ依赖性细胞结局转化的可能性(MEDICI等,Nat Med 16:1400-1406(2011);ZEISBERG等,Nat Med,13:952-961(2007))。因此,在存在和不存在TGFβ配体的中和mAb或TGFβ小分子抑制剂(SB431542)的条件下培养经ETV2/FLI1/ERG1转导的AC 21天。观察到甚至在缺乏外源性TGFβ配体的条件下,在对照和经ETV2/

FLI1/ERG1转导的AC中作为TGFβ信号读数的磷酸化SMAD2 (P-SMAD2) 的基线水平仍是活跃的(图5a-第1,2道)。这与在这些TGFβ活化的对照和经ETV2/FLI1/ERG1转导的AC中缺乏总的VEGFR2蛋白和磷酸化的VEGFR2蛋白是具有相关性的(图5b-第1、2、3、4道)。然而,加入TGFβ配体的mAb消除rAC-VEC中P-SMAD2的表达(图5a-第7、8道),上调VEGFR2蛋白(图5b-第11、12道)。重要的是,如VEGFR2的磷酸化所示,经TGFβ配体的mAb处理的rAC-VEC对VEGF-A的刺激具有应答性(图5b-第12道)。即使加入TGFβ配体(图5a-第3-6道)或脉冲式的TGFβ配体刺激(图5a-第11-16道),TGFβ抑制剂的存在阻止SMAD-2磷酸化,这使得VEGFR2蛋白(图5b-第7、8、9、10道)和VEGF-A依赖性磷酸化(图5b-第8,10道)上调。值得注意的是,TGFβ活化的rAC-VEC不能获得EC形态(图5c-框图ii.对比框图vi.),而TGFβ信号的抑制(图5c-框图iii.、iv.、v.)使得rAC-VEC具有典型的EC单层的鹅卵石形态(图5c-框图vi.)。因此,TGFβ信号的抑制使得VEGFR2具有功能,这使得rAC-VEC持续性的具有血管特性。

[0131] 实施例10:瞬时TGFβ抑制3周维持长期的VEGFR2信号和rAC-VEC特性

[0132] 为了在rAC-VEC中产生功能性的VEGFR2蛋白,必需从AC的ETS-TF转导开始抑制TGFβ信号(图5d)。为了确定TGFβ信号的持续性抑制是否是维持长期的rAC-VEC稳定性所必需的,发明人在ETS-TF转导后的几个时间点依次除去TGFβ抑制(图5e-左图)。在使用ETV2/FLI1/ERG1转导后的第14天除去TGFβ抑制后,在接下来的细胞生长7天的时间段内观察到VEGFR2⁺细胞减少(图5e-左图,白色柱子)。然而,当在使用ETV2/FLI1/ERG1转导后的第21天除去TGFβ抑制时,VEGFR2⁺细胞的百分率保持不变(图5e-左图,灰色柱子)。值得注意的是,对TGFβ通路的操作不影响VE-钙粘蛋白在rAC-VEC中的表达(图5e-右图)。因此,除去TGFβ信号3周足以使VEGFR2信号具有功能,使稳定的和具有增殖性的rAC-VEC保持长期的血管特征。

[0133] 实施例11:AC来源的rAC-VEC被移植并形成功能性的灌注血管

[0134] 接下来,发明人使用体外和体内模型评估是否rAC-VEC获得了完全的血管生成潜能。使用Matrigel作为底物,对使用TGFβ抑制剂处理的第21天rAC-VEC进行管形成测定(图6a)。rAC-VEC而非初始AC能够在体外形成与HUVEC的小管生成相当的管。在rAC-VEC上进行另一项体外测定以证实另一个EC属性——乙酰化LDL(Ac-LDL)的摄取(图6b)。将第21天的rAC-VEC与Ac-LDL孵育后显示出与在HUVEC中观察到的Ac-LDL摄取类似的这种脂蛋白的显著累积。

[0135] 然后发明人在两个体内模型中检测了rAC-VEC形成功能性的血管的能力。在一个模型中,将GFP标记的第42天rAC-VEC(和对照细胞)装载至添加了VEGF-A和FGF-2的Matrigel填块上,并注射至免疫功能低下的NOD-SCIDIL2R $\gamma^{-/-}$ (NSG)小鼠中后持续2周(图6c)。在通过静脉内(IV)注射Alexa568-异凝集素-B4(在处死小鼠前10分钟)活体标记脉管系统以鉴定新血管后,然后取出Matrigel填块以进行分析。尽管初始AC不能形成任何毛细血管(图6c-框图ix.),但是rAC-VEC形成了大量功能性的与宿主的脉管系统吻合的各种管径的血管。其被根据在‘重叠’图像中可见的GFP信号与异凝集素标记物的共定位所确证(图6c-框图x.)。

[0136] 为了确定使用短期TGFβ信号抑制处理的rAC-VEC是否维持了其血管特性,通过重编程21天产生rAC-VEC,然后接下来在不含TGFβ抑制的EC培养基中再培养21天。然后将这些rAC-VEC负载于Matrigel填块上并注射至小鼠中(图6c-框图xi.、xii.)。在2周后回收,对这

些填块的分析显示了大量各种管径和尺寸的与宿主血管吻合的灌注血管,强调了其在体内的功能性。

[0137] EC的脾内移植引起这些细胞植入70%部分肝切除的NSG小鼠的肝窦血管中(BENTEN等,Hepatology,42:140-148(2005);DING等,Nature,468:310-315(2010))。该体内模型用于考察rAC-VEC长期掺入NSG小鼠脉管系统的潜能。在脾内移植 5×10^5 个GFP标记的第21天rAC-VEC 3个月后,IV注射给予所述小鼠Alexa568-异凝集素-B4以鉴定功能性的血管。通过使用对人CD31(hCD31)具有特异性的mAb染色确定经人GFP⁺rAC-VEC移植的灌注血管的数量。值得注意的是,发明人在5-10%的再生血管中检测到存在GFP⁺异凝集素⁺hCD31⁺EC(图6d和6e)。因此,rAC-VEC包括成熟的持久性的EC,所述EC能够移植并在再生肝脏中形成持久的新窦状血管,并且在Matrigel填块中形成功能性的灌注血管。

[0138] 实施例12:在ETV2抑制后rAC-VEC的血管特性保持完好

[0139] ETV2在血管发育的早期阶段瞬时表达并且据推测其表达在成人EC中关闭(KATAOKA等,Blood,118:6975-6986(2011))。这与在本申请中观察到的rAC-VEC克隆具有较低的ETV2水平以及适宜的ERG1和ELI1水平是一致的,其能够代表已获得成熟血管结局的群。因此,与FLI1和ERG1的持续表达结合的ETV2的瞬时表达可能足以启动AC的重编程并且然后将其锁定为最佳的rAC-VEC特性。使用依赖于多西环素的诱导性("Tet-off")表达系统控制ETV2的产生(诱导性ETV2:"iETV2"),在AC中转导iETV2/FLI1/ERG1并使用TGFβ抑制剂培养14天以使其向EC特性转变(图7a)。接下来,使用多西环素处理细胞以抑制iETV2表达,但不干扰FLI1和ERG1的表达。在经过多西环素处理(iETV2抑制)和未经处理的细胞中,使用iETV2/FLI1/ERG1转导的AC显示了VE-钙粘蛋白和CD31的存在超过4周。值得注意的是,在使用多西环素处理7和14天使得iETV2的表达沉默后,与未经处理的rAC-VEC相比,VE-钙粘蛋白⁺CD31⁺rAC-VEC的百分率更高(图7b)。Western印迹分析确证iETV2在多西环素处理的细胞中的确被沉默(图7c),这表明ETV2不再是维持VE-钙粘蛋白在rAC-VEC中的表达所需要的。

[0140] 实施例13:ETV2的抑制和组成性FLI/ERG1表达产生持久稳定的成熟rAC-VEC

[0141] ERG1被认为与FLI1具有协同作用以增强和维持CD31的表达以及在成熟rAC-VEC中的其他血管特异性基因(图3c和图7b)。因此,通过在不存在ERG1的条件下使用iETV2/FLI1转导TGFβ抑制的AC测定其在重编程中的重要性。然后在第14天时将这些细胞分成两部分,其中的一部分使用多西环素处理以抑制iETV2的表达但不干扰FLI1的表达。与缺乏ERG1转导的AC相比,观察到在由经iETV2/FLI1/ERG1转导的AC产生的VE-钙粘蛋白⁺CD31⁺rAC-VEC显著增加。对培养28天的经iETV2/FLI1/ERG1转导的老AC(其中iETV2的表达已被抑制两周)进行免疫细胞染色,显示VE-钙粘蛋白和CD31共定位于细胞膜,而对这些细胞的qPCR分析显示了指示成熟EC表型的多种标记物的表达。通过体内小管生成测定显示了这些细胞的功能性。对GFP标记的经iETV2/FLI1/ERG1转导的AC培养14天,在该时间点iETV2的表达被抑制。随后,再使这些细胞生长28天(d42 rAC-VEC)并且然后将其负载于Matrigel填块上。将填块注射入NSG小鼠中保持2周。随后通过IV注射Alexa568-异凝集素-B4对其进行活体标记,然后取出Matrigel填块以进行分析(图7d)。免疫荧光研究显示GFP、人CD31(hCD31)和异凝集素标记的细胞共定位,这确证了不再表达iETV2的rAC-VEC仍能够与宿主的脉管系统吻合。因此,在获得EC特性后,通过FLI1和ERG1的持续表达伴随ETV2的抑制永久形成了rAC-VEC的血管表型,该调控机制模拟了其在胎儿发育过程中的生理表达模式。

[0142] 实施例14:对实施例1-13中所述结果的讨论

[0143] 新型ETS-TF驱动的平台将AC重编程为持久的和高度可扩增的rAC-VEC

[0144] 脉管系统的功能障碍能够导致大量的病理异常,包括充血性心力衰竭、动脉粥样硬化、中风、肢体缺血和糖尿病。因此,大量能够移植的人EC的诱导和扩增对患有缺血性疾病和器官损伤的患者是有益的。然而,成人EC的纯化和扩增在技术上是繁琐的。而且,目前从hESC演化EC甚至是在使用ETS-TF转导后的策略导致产生表观遗传学上不稳定的和具有有限的扩增潜能的EC(图1e-1g)。发明人在本申请中鉴定出人谱系定型的AC的通用替代性来源,所述AC能够重编程为高增殖性的功能性的EC,在本申请中将其称为rAC-VEC。发明人发现实现FLI1/ERG1的表达并伴随ETV2的瞬时表达和TGFB的抑制将AC重编程为rAC-VEC,其具有成熟EC的形态和持久型的血管生成库(图7e)。

[0145] 使用ETV2/FLI1/ERG1转导AC不仅产生完整的血管特征的诱导,而且其还关闭AC中的非血管程序。ETS-TF启动了建立血管功能的关键因子的表达,包括粘附分子、ECM(细胞外基质)和内分泌性血管因子。rAC-VEC是高度增殖性的和稳定的,能够在50天内扩增 6×10^4 -倍,同时保持其完整的血管生成库。随着世界范围内羊膜穿刺数量的增加,遗传上匹配的AC将可以用于产生异源相容性的rAC-VEC。因此,AC,其可以是HLA类型的、冻存的和公开留存的,是能够重编程为持久的、增殖性的和可移植的EC的非血管细胞的理想来源。

[0146] 谱系定型的上皮细胞样和间叶细胞样AC能够重编程为rAC-VEC

[0147] 已通过使用特异性细胞标记物染色对AC的细胞异质性进行了初步研究(JEZIERSKI等,Stem cell reviews,6:199-214(2010);ZHANG等,Stem cells and development,18:1299-1308(2009))。据信c-Kit⁺细胞组成了罕见的AC亚群(1%至2%),其是专能(multipotent)的(DE COPPI等,Nature biotechnology,25:100-106(2007))。本申请中对完整AC混合物的分析支持了罕见c-Kit⁺亚群(<0.5%)的发现,但是大多数的AC(即c-Kit⁻细胞)表达多种多样的指示谱系定型的和非定型细胞类型的标记物(图2c)。而且,发明人没有观察到任何功能性的多潜能性(pluripotency)基因OCT4、NANOG和SOX2的表达。

[0148] 在AC中实现ETV2/FLI1/ERG1的表达产生的rAC-VEC仅来自于c-Kit⁺多能性细胞是不可能的,因为其在AC群中是稀少的,并且因为发明人尝试未经过ETS-TF转导产生rAC-VEC是不成功的。无论如何,本申请所述的重编程策略在由成熟的c-Kit⁻AC产生rAC-VEC方面是有效的。在使用ETS-TF转导c-Kit⁻耗竭的AC 4天内,接近20%的转化AC表达VE-钙粘蛋白,最终其均变换为rAC-VEC。发明人还发现谱系定型的EpCAM⁺Tra1-81⁻c-Kit⁻上皮细胞样AC和EpCAM⁻Tra1-81⁻c-Kit⁻间叶细胞样/成纤维细胞样AC均能够转录重编程为rAC-VEC,这支持了rAC-VEC主要来源于这些谱系定型的成熟AC群的结论。

[0149] 并非旨在被任何特定理论所束缚,ETV2、FLI1和ERG1需要与其他TF相互作用以启动血管特异性基因同时沉默非血管基因是合理的。例如,ETS-TF在胚胎组织中启动EC特异性基因所借助的机制通过与叉头转录因子的相互作用所介导(DE VAL等,Cell,135:1053-1064(2008))。ETV2和FoxC2与特异性增强子FOX:ETS区的结合增加了EC特化基因的表达。值得注意的是,FoxC2在AC中组成性表达并且在ETV2/FLI1/ERG1介导的重编程为rAC-VEC的过程中维持其表达。因此,在AC转导4天内ETV2启动多种EC特异性基因的显著的能力可能是由于足量的转录因子如FoxC2在AC中的表达所致。

[0150] ETV2/FLI1/ERG1 TF启动血管特异性基因,同时沉默非血管基因的表达

[0151] 本申请中已发现使用ETV2/FLI1/ERG1转导不仅仅导致全部足量的EC特异性基因的表达,而且重编程沉默了AC表达的非血管基因。在本申请中已通过3D-MDS和层次树状图聚类分析发现rAC-VEC在基因组范围标度的转录组与原型的胎儿(HUVEC)和成人(LSEC)成熟EC高度相似,且完全不同于非血管细胞。

[0152] 非血管转录程序的永久性沉默是临床相关的,因为非血管基因的持续性表达可能会导致rAC-VEC的功能障碍。例如,AC表达基因如调宁蛋白-1或角蛋白-7在rAC-VEC中的持续表达可能使体内植入的rAC-VEC易于出现血管畸形和血栓形成。在这一点上,本申请已显示rAC-VEC植入Matrigel填块或再生小鼠肝窦血管3个月产生了新的血管而没有出现明显的血栓。因此,可移植的rAC-VEC已沉默了促进凝血介质和炎症介质,以允许持久血管的生成。

[0153] ETS-TF-介导的AC重编程需要TGF β 抑制以功能化VEGFR2

[0154] ETV2/FLI1/ERG1转导进入AC但未进行TGF β 抑制不能生成功能性的增殖性rAC-VEC。与特定类型的器官特异性成人EC如LSEC类似,rAC-VEC不仅表达TGF β 1、 β 2、 β 3和LTBP,还表达TGF β RII和TGF β RI,其导致组成性SMAD2磷酸化。TGF β -受体信号通路的活化能够拮抗rAC-VEC产生。TGF β -受体信号触发Endo-MT (MEDICI等,NatMed 16:1400-1406 (2011); ZEISBERG等,Nat Med,13:952-961 (2007)),从而妨碍rAC-VEC的形成。TGF β 还调节FLI1蛋白的乙酰化,导致FLI1的稳定性及其与DNA结合能力的降低(ASANO等,Mol Cell Biol 29:1882-1894 (2009))。值得注意的是,TGF β 信号消除VEGFR2在成人EC中的表达(MANDRIOTA等,J Biol Chem,271:11500-11505 (1996)),削弱其增殖性和血管生成功能。因此,rAC-VEC的产生最初需要TGF β 抑制以功能化VEGFR2和可能地FLI1以及其他未知的EC特异性靶点(图5)。

[0155] ETV2的瞬时表达和TGF β 通路的抑制足以维持长期将AC血管生成性重编程为rAC-VEC

[0156] 大部分的成人EC不表达ETV2,但是组成性表达FLI1、ERG1(DEV VAL等,Dev Cell,16:180-195 (2009))。类似地,在AC中瞬时ETV2表达2周足以启动除了FLI1和ERG1以外的全部这些下游EC特异性ETS转录因子。因此,ETV2是导致血管生成基因完全诱导的主要EC特异性调节子。通过瞬时表达ETV214天使得在AC中EC特异性基因永久性特化的不可逆性表观遗传学机制是引人注目的,并且未被其他成人成纤维细胞的重编程方法所报道。通过沉默ETV2,实现FLI1/ERG1的共表达和其他EC特异性ETS转录因子的组成性表达维持EC特异性基因的长期表达是可信的。

[0157] 在使用ETV2/FLI1/ERG1转导的AC中,抑制TGF β 信号21天足以维持此后VEGFR2的表达和活化。因此,AC不仅能够重编程,还在转化成rAC-VEC后具有稳定的表观遗传学状态。

[0158] ETV2抑制后,FLI1和ERG1保持长期的rAC-VEC血管成熟和静默

[0159] 由ETV2启动的基因是AC特异化为功能性的EC所必需的因子,包括VEGFR2、VE-钙粘蛋白、TIE1、TIE2、EDG-1、VEGFR1和Notch信号通路基因。然而,单独的ETV2不足以启动全部的EC基因。FLI1和ERG1同时启动与成熟相关的EC基因,如CD31、ECM和内分泌性血管因子。因此,ETV2特异性地将AC转化为不成熟的内皮祖细胞,而FLI1与ERG1协同诱导使这些祖细胞变成成熟的功能性的EC的基因(图7e)。

[0160] 在rAC-VEC中的ETV2沉默后,FLI1和ERG1保持了EC特性。事实上,FLI1基因在成人

EC中的缺失导致调节EC特性的血管特异性基因的下调(Asano等,Am J Pathol 176:1983-1998,2010)。因此,如本申请所示,FLI1的组成性表达在稳定rAC-VEC中起重要作用。类似地,ERG也可以通过阻遏NF- κ B的活性维持EC静默(DRYDEN等,J Biol Chem,287:12331-12342(2012);YUAN等,Circ Res,104:1049-1057(2009))并且通过强制紧密连接蛋白(Claudin5)(YUAN等,J Biol Chem,287:6582-6591(2012))和VE-钙粘蛋白(BIRDSEY等,Blood,111:3498-3506(2008))表达来保障血管的渗透性。

[0161] FLI1和ERG参与了造血细胞的特化(De Val和Black,Dev Cell 16:180-195,2009;Lee等,Cell stem cell 2:497-507,2008)。然而,如本申请所示,ETV2与FLI1/ERG1的联合转导(伴随TGF β 抑制)在rAC-VEC中并不诱导造血特异性基因(即CD45,血小板生成素受体)。值得注意的是,SCL/TAL1、VAV3和LMO2基因在EC和造血细胞中的共表达被ETV2/FLI1/ERG1所诱导。而且,真正的造血细胞的诱导可能需要其他TF(i.e.RUNX1,PU.1)的引入,其在AC中不表达。因此,ETV2的瞬时表达可以改变FLI1/ERG1针对涉及初生rAC-VEC向血管结局转变的造血特异性偏好。

[0162] 发明人发现在成熟EC中,ERG表达至少两种亚型(ERG1和ERG2),ERG1的表达最多比ERG2转录本高5倍。而且,因为初始的筛选显示与ERG2相比ERG1增加了CD31的表达,发明人将驱动AC转化成成熟rAC-VEC的焦点集中在ERG1上。ERG2与ERG1的共表达在增强rAC-VEC的血管特性方面是否起到生理作用是未知的。

[0163] FLI1和ERG1的组成性表达并不与恶性转化相关

[0164] FLI1的异常表达能够诱导白血病(CUI等,Leukemia,23:1311-1319(2009))和骨肉瘤(ZHANG等,Oncogene,8:1621-1630(1993))。ERG过量表达和融合蛋白还与不同恶性肿瘤相关,包括白血病(MARTENS等,Int J Biochem Cell Biol,43:1413-1416(2012))。然而,如本申请所示,将到Matrigel填块中的表达FLI1和ERG1的rAC-VEC体内移植14天或在再生肝脏中3个月均未与恶性肿瘤的出现相关联。使用CGH,我们也发现rAC-VEC扩增28天以上不与任何染色体异常相关。rAC-VEC长期扩增80天以上未显示出任何出现恶性转化、血管瘤或血管肉瘤的证据。因此,rAC-VEC是稳定的和可扩增的细胞群,其为治疗性干涉提供了安全的血管细胞来源。

[0165] 优化AC中ETS-TF的比例增加增殖性成熟rAC-VEC克隆的收率

[0166] 单独使用FLI1和/或ERG1转导不仅不能使AC具有EC-特性,还不能有效地支持这些细胞的增殖。基于克隆分析(图3c-3e),发现ETV2与Flil1和ERG1适宜的化学计量比是成熟和增殖性rAC-VEC产生的关键,使得所述rAC-VEC在培养的80天中具有增殖能力。

[0167] 在第21天时,此时为rAC-VEC达到其最大成熟度的时间点,理想的rAC-VEC如克隆-3的克隆效率为约20%。通过对使用不同ETS-TF对AC进行转导所使用的技术进一步的优化可以对该效率进行改进。基因组范围的3D-MDS分析显示克隆-3和其他类似克隆(即克隆-4)的转录组与HUVEC和LSEC的那些相匹配。特异性rAC-VEC克隆的显著的增殖能力表明在AC中这些ETS-TF的最佳组合比例是产生大量成熟和稳定的rAC-VEC的重要决定因素。

[0168] rAC-VEC用于治疗性血管化的潜在用途

[0169] 器官特异性EC具有独特的分子和表型特征。尽管微环境因素可能在使得EC具有器官特异性方面起主要作用,但是TF也可能在这一过程中起作用。由AC产生的重编程的rAC-VEC具有成熟成人EC的分子特征。重编程rAC-VEC的基因库与普通体外培养的EC如HUVEC和

LSEC相似。事实上,在静态培养条件下对任何器官特异性EC的体外传代均会导致内源性器官特异性血管表型的部分丧失。这样,与其他成人EC类似,一旦再次引入给定器官的微环境所述重编程的rAC-VEC可能进一步经历组织特异性特化。最后,对使EC具有组织特异性特征的特异性转录因子的鉴定将能够产生适于该特定器官生理需要的rAC-VEC。发明人已鉴定了能够重编程为大量功能性的rAC-VEC的具有HLA-类型和异源相容性潜能的易于获得的人谱系定型的增殖性细胞的来源。rAC-VEC的产生开启了缺血组织血管化的大门。仅在美国每年就进行数千例羊膜穿刺术,这保证了将能够获得足够多用于重编程为rAC-VEC的基因匹配的AC,这可能有利于不同种族人群的广泛共享。考虑到将HLA匹配的AC公开留存的可能性,可以使用这些细胞建立用于产生大量用于治疗患有血管疾病患者的遗传多样性群体的血管细胞的细胞库。

[0170] 表1:qPCR的引物序列

[0171]

<i>ETV2</i>	f, 5'-ccgacggcgatacctactg-3' (SEQ ID NO: 1) r, 5'-gttcggagcaaacgggtgag-3' (SEQ ID NO: 2)
<i>ERGI</i>	f, 5'-tgctcaaccatctcctcca-3' (SEQ ID NO: 3) r, 5'-tgggtttgctctccgctct-3' (SEQ ID NO: 4)
<i>FLII</i>	f, 5'-gaggagcttggggcaataac-3' (SEQ ID NO: 5) r, 5'-agagcagctccaggaggaat-3' (SEQ ID NO: 6)
<i>CD31</i>	f, 5'-tctatgacctcgccctccacaaa-3' (SEQ ID NO: 7) r, 5' gaacgggtgtcttcagggttgatttca-3' (SEQ ID NO: 8)
<i>VE-钙粘蛋白</i>	f, 5'-tggagaagtggcatcagtaacag-3' (SEQ ID NO: 9) r, 5'-tctacaatcccttgcaagtgtgag-3' (SEQ ID NO: 10)
<i>VEGFR1</i>	f, 5'-tttgctgaaatggtgagtaagg-3' (SEQ ID NO: 11) r, 5'-tggtttgcttgagctgtgttc-3' (SEQ ID NO: 12)
<i>VEGFR2</i>	f, 5'-actttggaagacagaaccaaattatctc-3' (SEQ ID NO: 13) r, 5'-tgggcaccattccacca-3' (SEQ ID NO: 14)
<i>VEGFR3</i>	f, 5'- tgcacgaggtacatgccaac-3' (SEQ ID NO: 15) r, 5'-gctgctcaaagtctctcacgaa-3' (SEQ ID NO: 16)
<i>RASIP</i> (Ras相互作用蛋白1)	f, 5'-tctggtgaacggaaggagg-3' (SEQ ID NO: 17) r, 5'-cgaagaagactgacagaggc-3' (SEQ ID NO: 18)
<i>Tie1</i>	f, 5'-ttcctgacttgcgtgtctgg-3' (SEQ ID NO: 19) r, 5'-cacgatacggctccttct-3' (SEQ ID NO: 20)
EC-清道夫受体	f, 5'- cctgccagaaagacgaggtg-3' (SEQ ID NO: 21) r, 5'- ccaggcttgcacgcagagag-3' (SEQ ID NO: 22)
EC-特异性趋化性受体	f, 5'- cccagacctctagcttcagg-3' (SEQ ID NO: 23) r, 5'-ggtcagacttagaccgccaag-3' (SEQ ID NO: 24)
<i>ESAM</i> (EC-选择性粘附分子)	f, 5'- ccctttgtgatgtggttctca-3' (SEQ ID NO: 25) r, 5'- tgtaggacaacacctgatcctc-3' (SEQ ID NO: 26)
内皮素	f, 5'- agagtgtgtctactctgcca-3' (SEQ ID NO: 27)

[0172]

	r, 5'-ctccaagtccatacgggaaca-3' (SEQ ID NO: 28)
<i>OCT3/4</i>	f, 5'-aacctggagtttgccagggtt-3' (SEQ ID NO: 29) r, 5'-tgaacttcacctccccaacca-3' (SEQ ID NO: 30)
<i>SOX2</i>	f, 5'-cacatgaaggagcaccggattat-3' (SEQ ID NO: 31) r, 5'-gttcattgtgcgcgtaactgtccat-3' (SEQ ID NO: 32)
<i>β-肌动蛋白</i>	f, 5'-cgtgcgtgacatcaaagagaa-3' (SEQ ID NO: 33) r, 5'-ggccatctcctgctcgaa-3' (SEQ ID NO: 34)

序列表

- <110> 康奈尔大学
 <120> 由人羊水来源的细胞生成功能性的和持久的内皮细胞
 <130> 28828
 <150> 61/653, 185
 <151> 2012-05-30
 <150> 61/709, 431
 <151> 2012-10-04
 <160> 34
 <170> PatentIn 3.5版
 <210> 1
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
 <400> 1
 ccgacggcga tacctactg
 19
 <210> 2
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
 <400> 2
 gttcggagca aacggtgag
 19
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 3
tgctcaacca tctccttcca
20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 4
tgggtttgct cttccgctct
20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

[0002]

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 5
gaggagcttg gggcaataac
20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 6
agagcagctc caggaggaat
20

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 7
tctatgacct cgccctccac aaa
23

<210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 8
gaacggtgtc ttcaggttgg tatttca
27

[0003] <210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 9
tggagaagtg gcatcagtca acag
24

<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 10
tctacaatcc cttgcagtgt gag
23

<210> 11
<211> 23

<212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <400> 11
 ttgacctgaa atggtgagta agg
 23

<210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <400> 12
 tggtttgctt gagctgtgtt c
 21

[0004]

<210> 13
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <400> 13
 actttggaag acagaaccaa attatctc
 28

<210> 14
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <400> 14
 tgggcacat tccacca
 17

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 15
tgcacgaggt acatgccaac
20

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 16
gctgctcaaa gtctctcacg aa
22

[0005]

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 17
tctggtgaac ggaaggagg
19

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 18
cgaagaagac ttgacagagg c
21

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 19
ttcctgactt gcgtgtctgg
20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 20
cacgatacgg tcgtccttct
20

[0006]

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 21
cctgccagaa agacgaggtg
20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 22

ccaggcttgc atcgacagag
20

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 23
cccagacctc tagctctcag g
21

<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

[0007] <400> 24
ggtcagactt agaccgccaa g
21

<210> 25
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 25
ccctttgtga tgtggttctt ca
22

<210> 26
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 26
tgtaggacaa cacctgatcc tc
22

<210> 27
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 27
agagtgtgtc tacttctgcc a
21

<210> 28
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

[0008] <220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 28
cttccaagtc catacggaac aa
22

<210> 29
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 29
aacctggagt ttgtgccagg gttt
24

<210> 30
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 30
tgaacttcac cttccctcca acca
24

<210> 31
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 31
cacatgaagg agcaccgga ttat
24

<210> 32
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

[0009]

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 32
gttcatgtgc gcgtaactgt ccat
24

<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 33
cgtgcgtgac atcaaagaga a
21

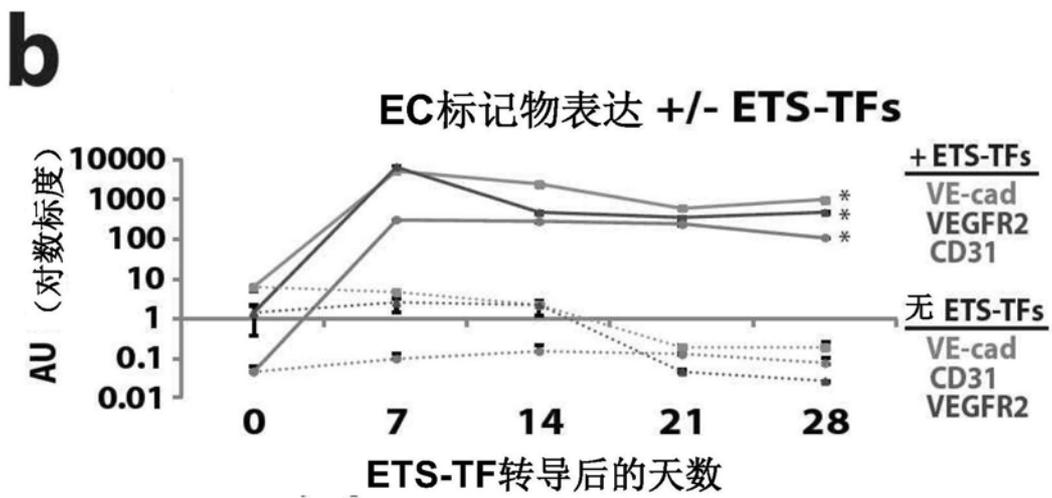
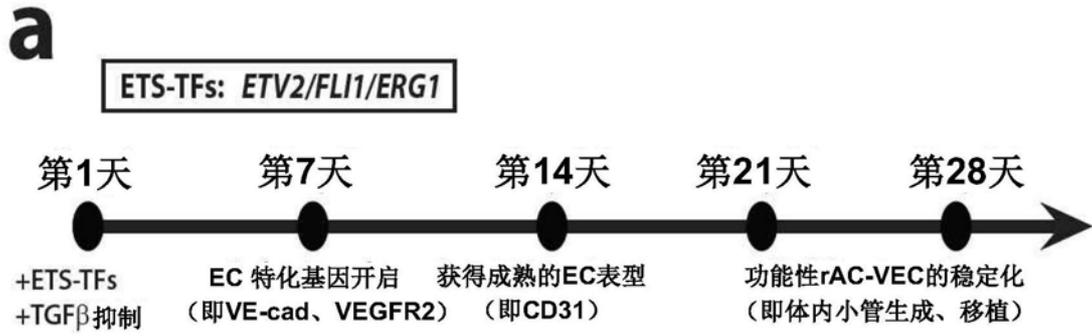
<210> 34
<211> 18
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0010] <223> 合成的寡核苷酸

<400> 34
ggccatctcc tgctcgaa
18



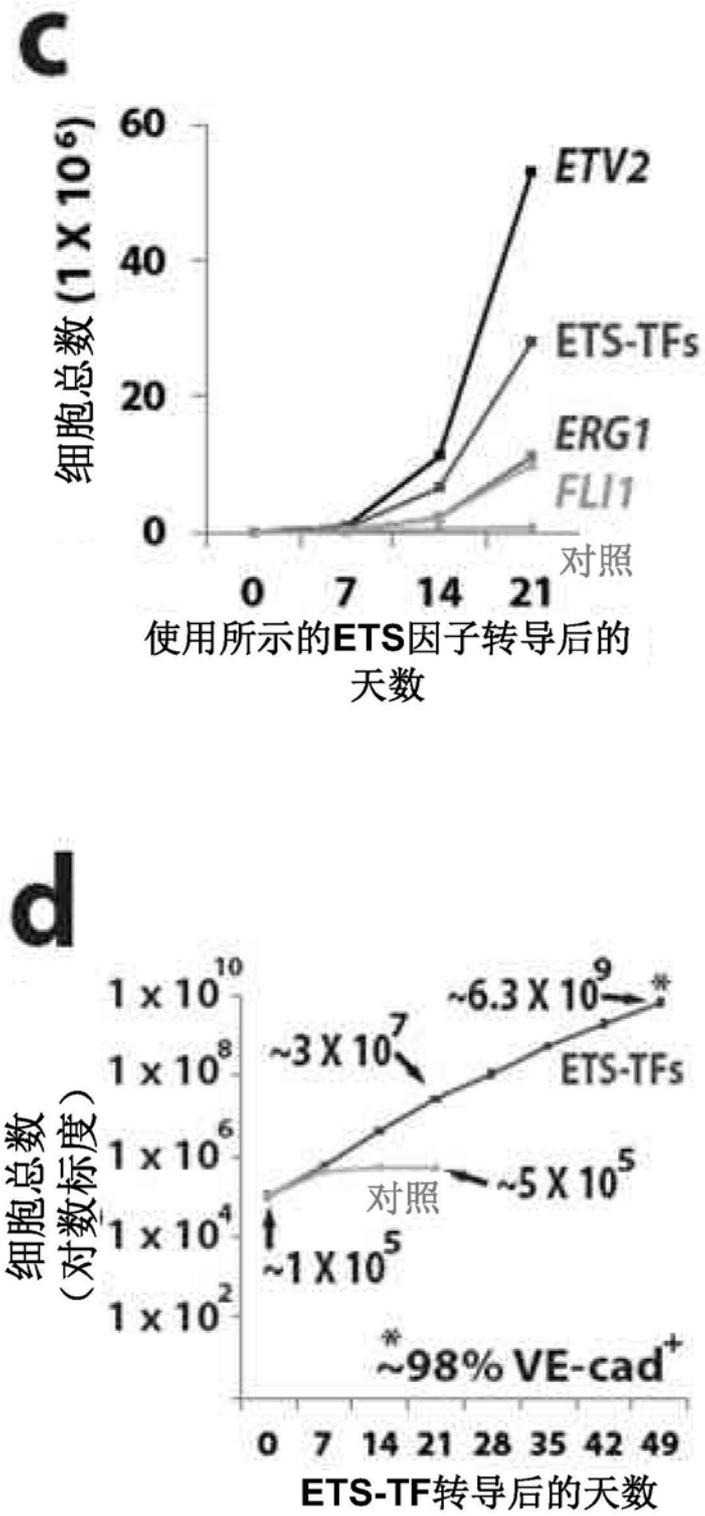


图1c-d

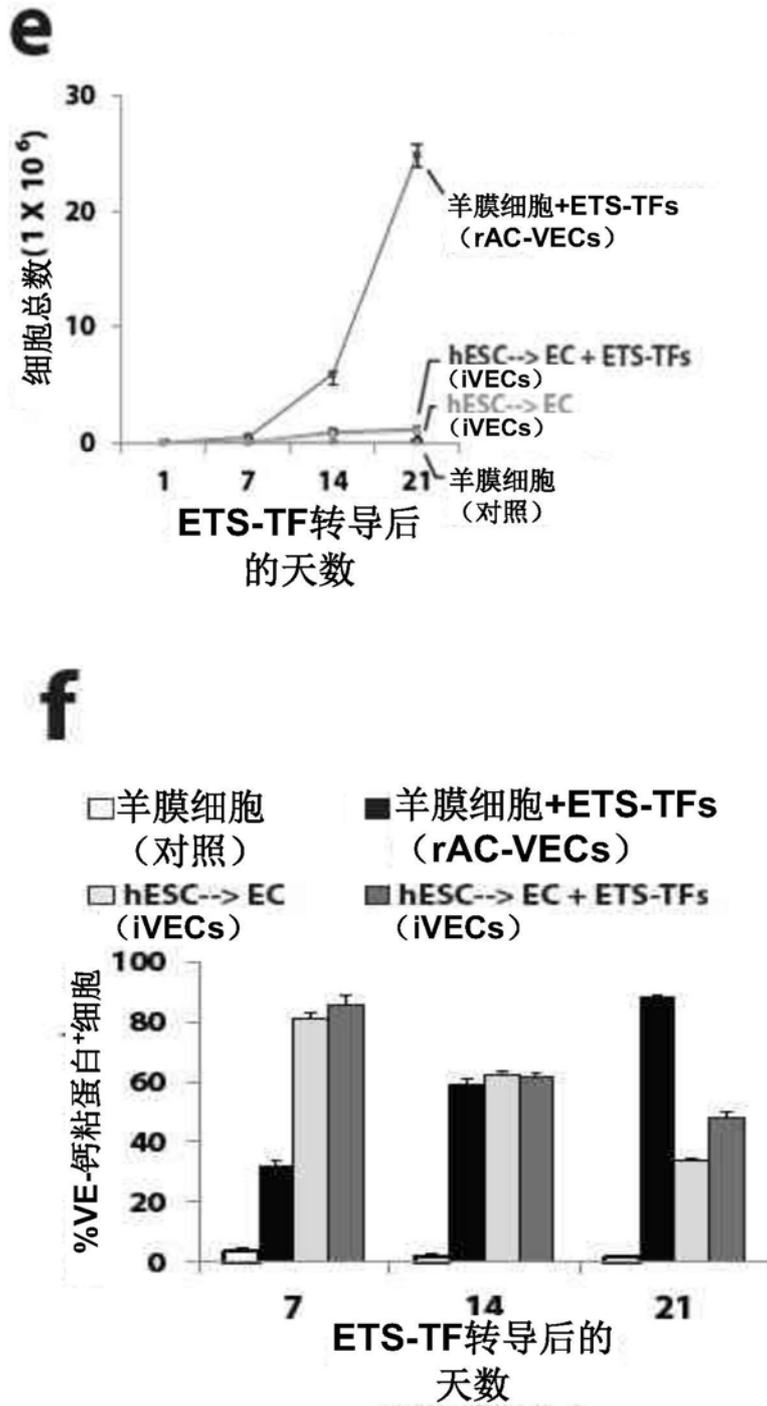


图1e-f

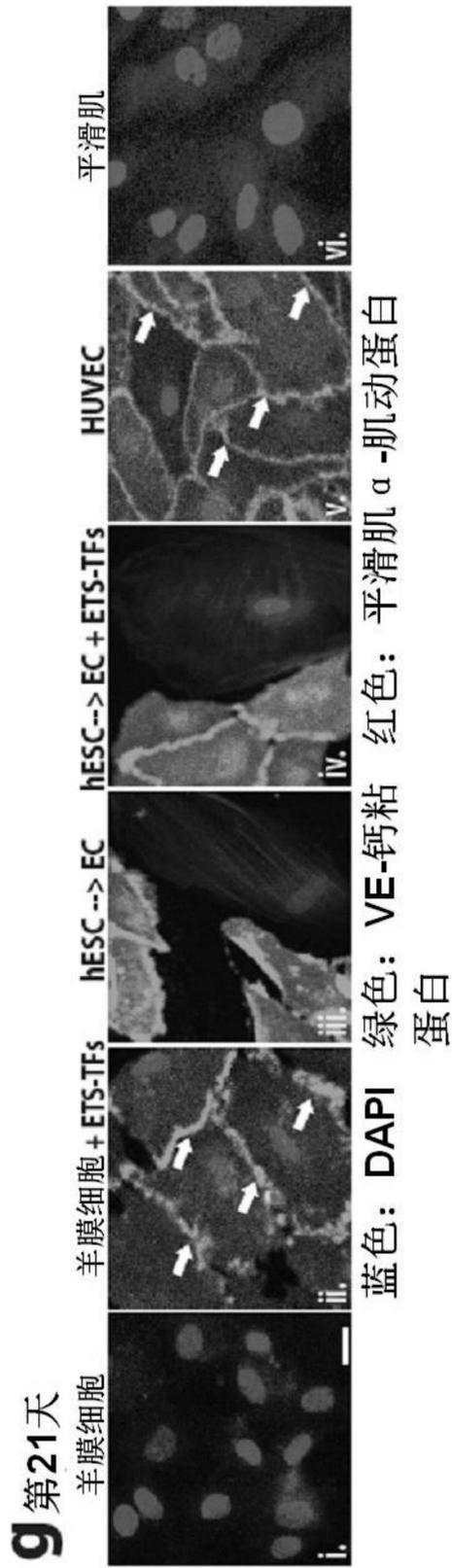


图1g

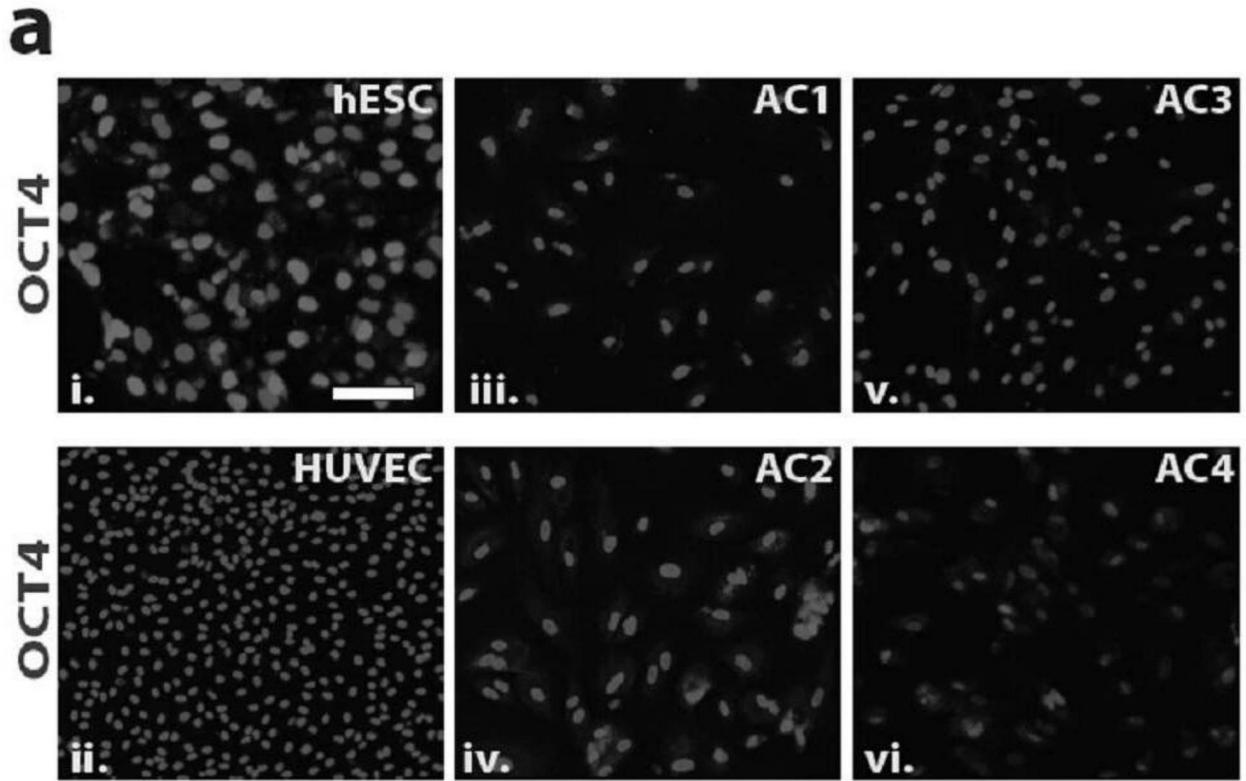


图2a

b

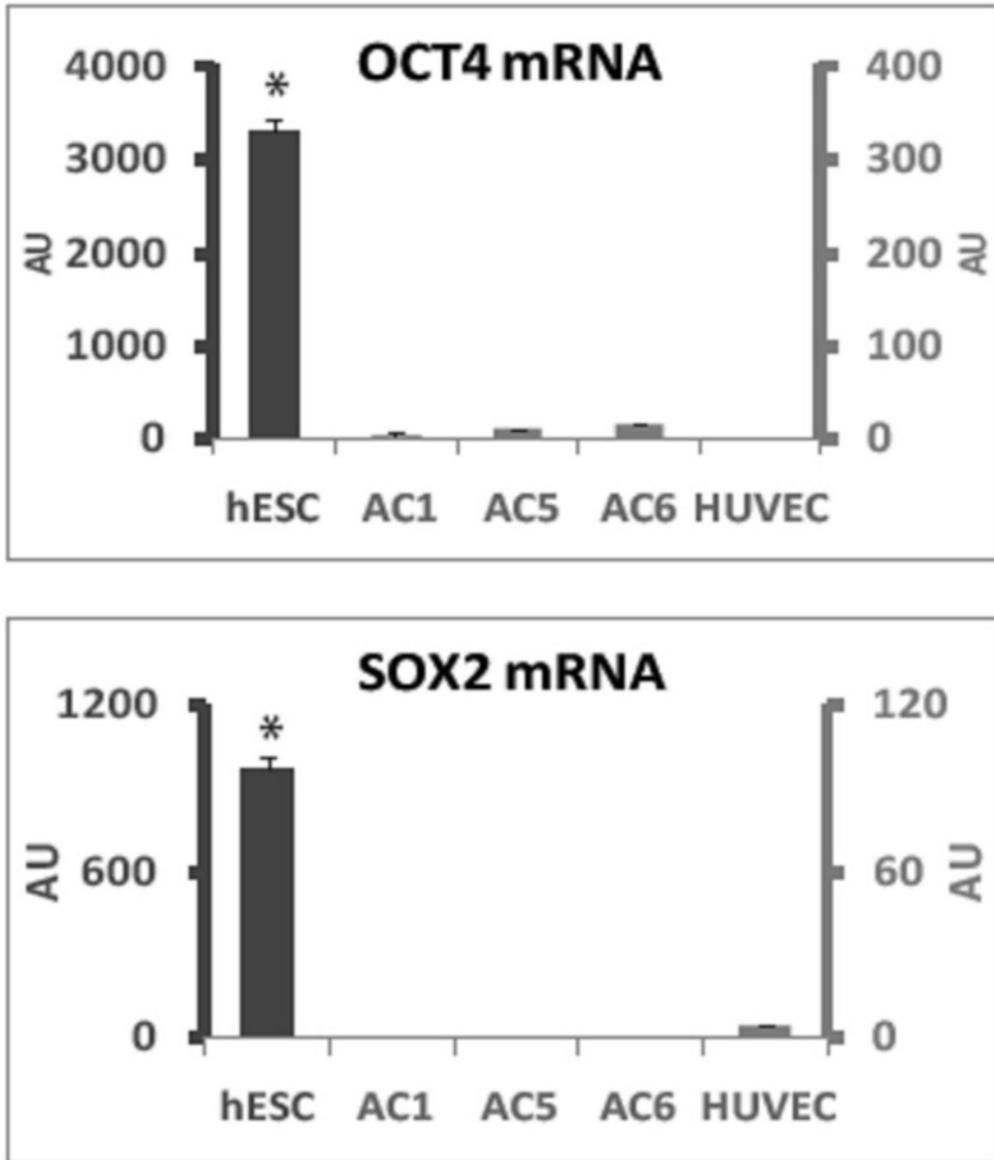
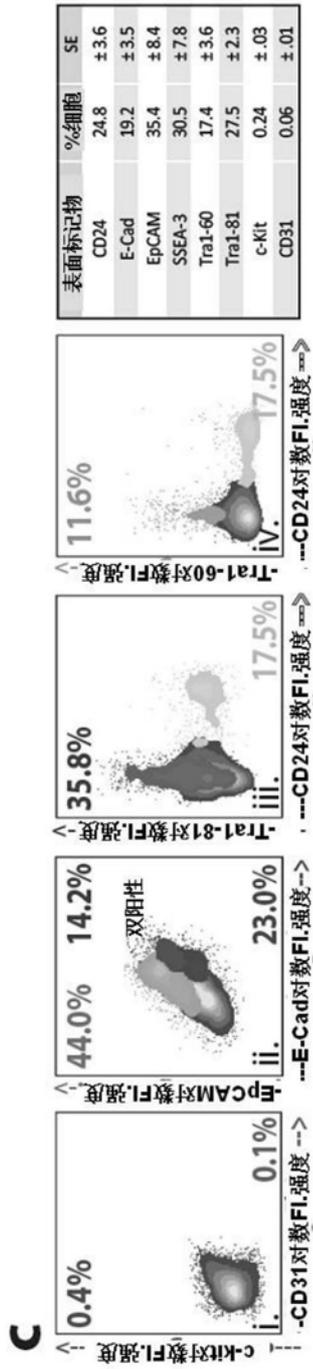


图2b



d

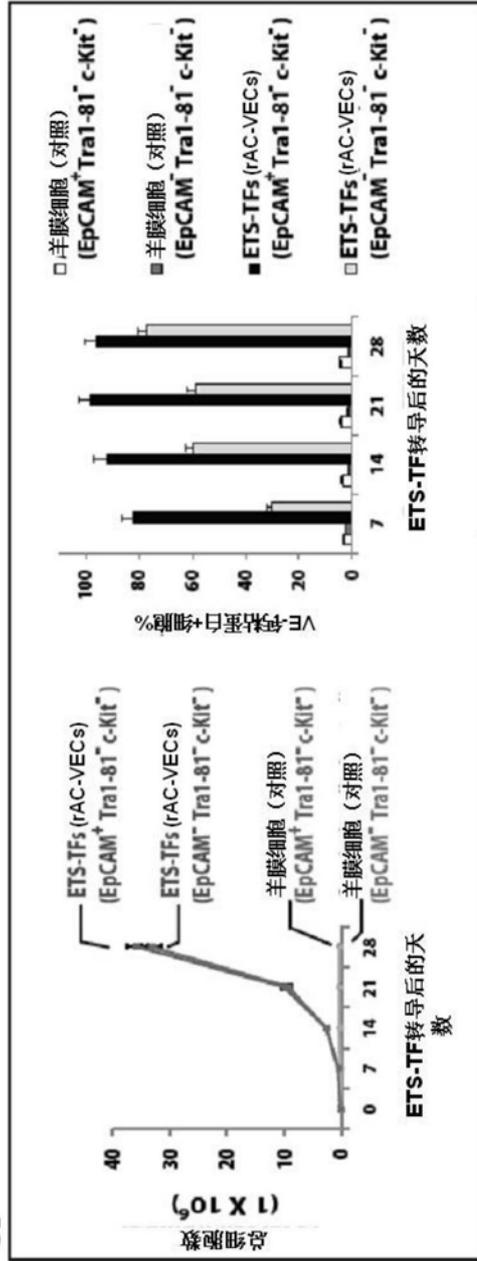


图2c-d

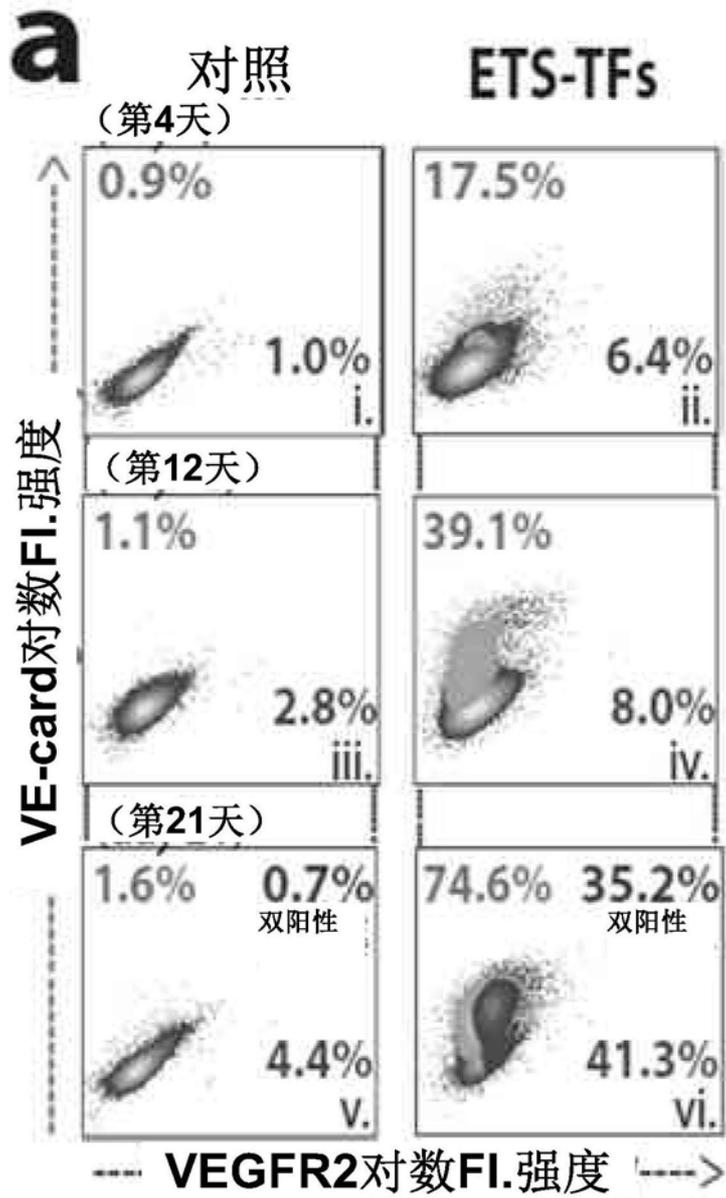


图3a

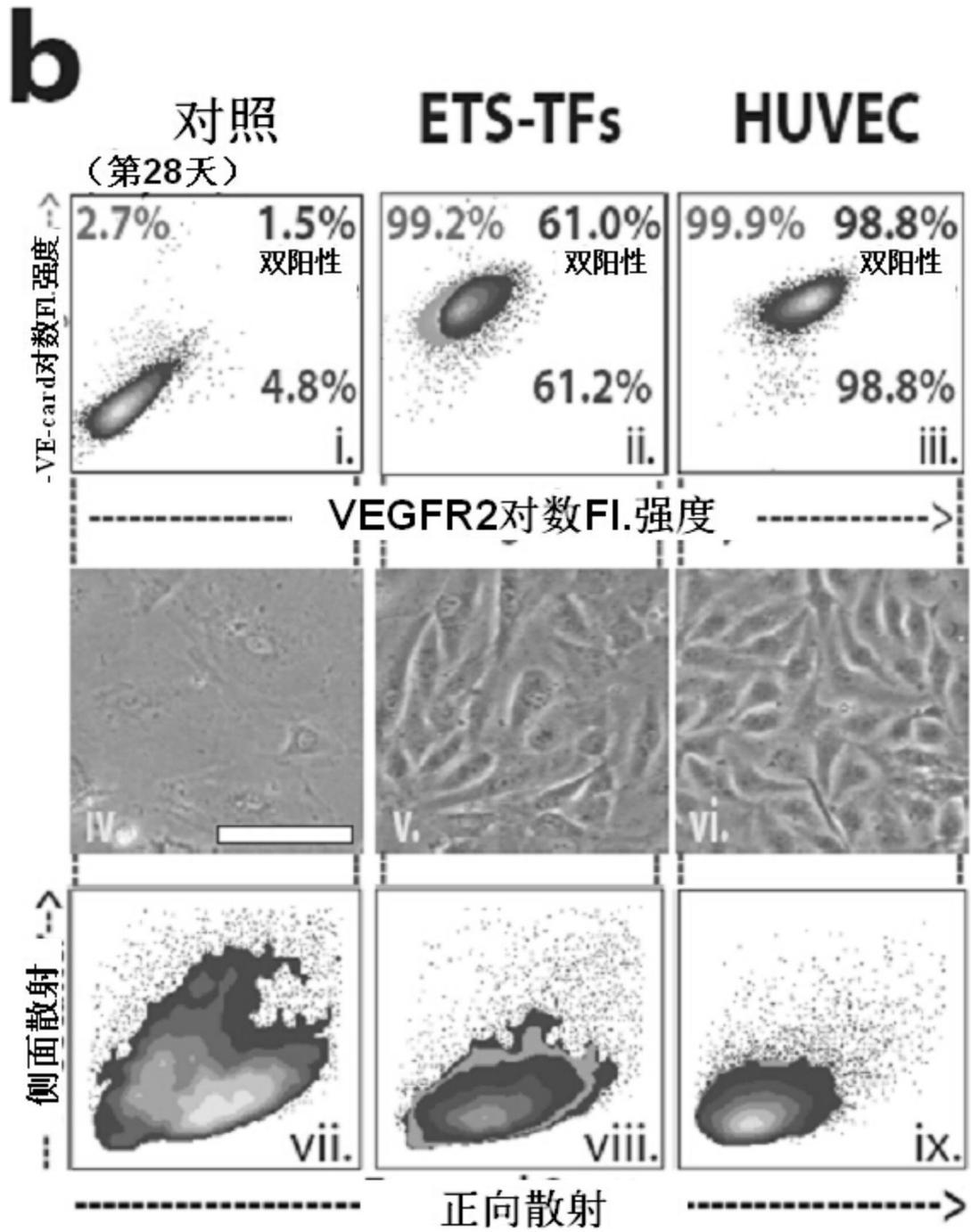


图3b

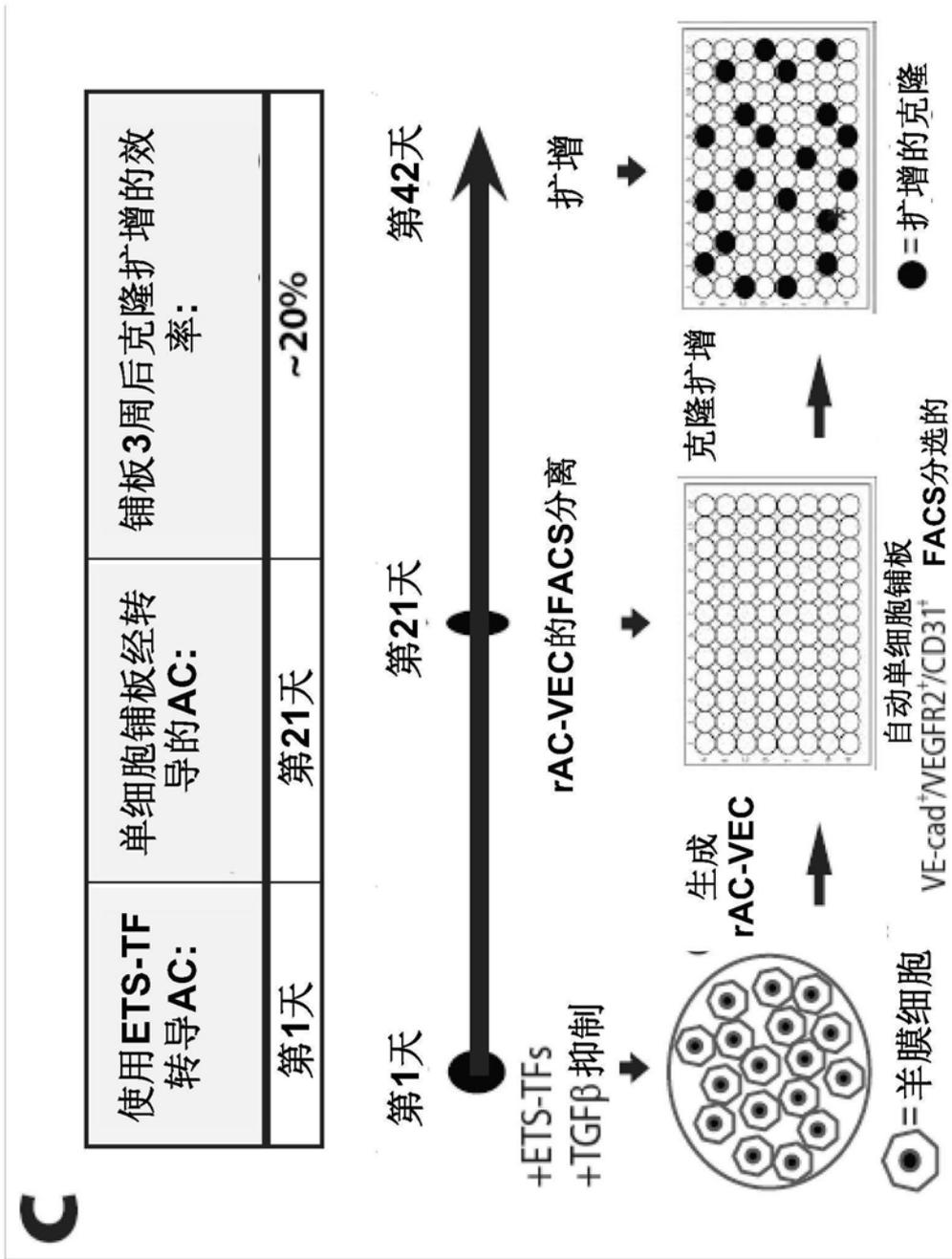


图3c

d

单细胞克隆扩增

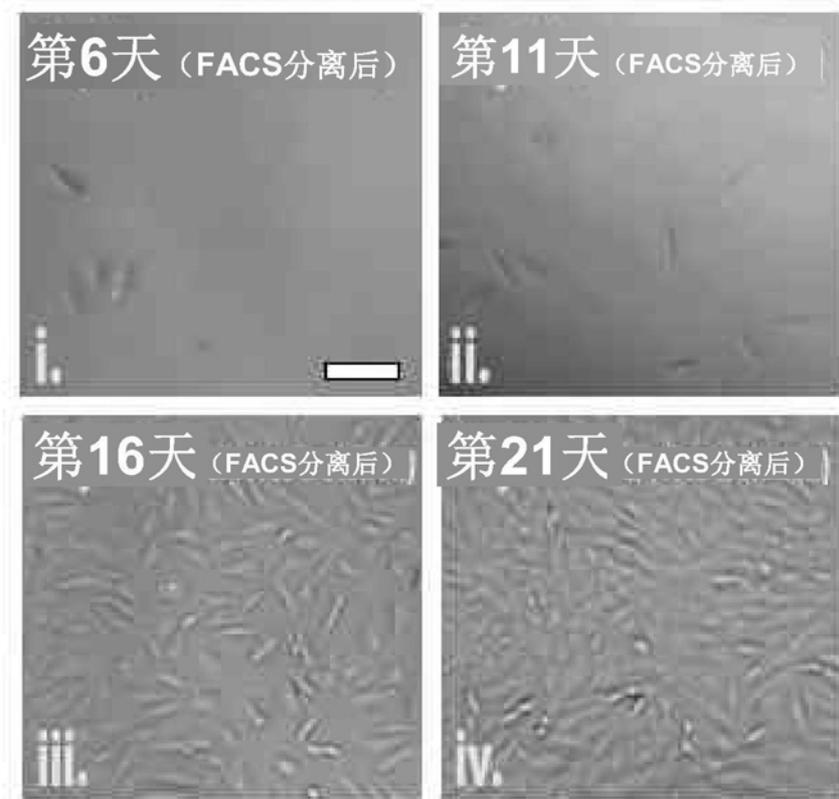


图3d

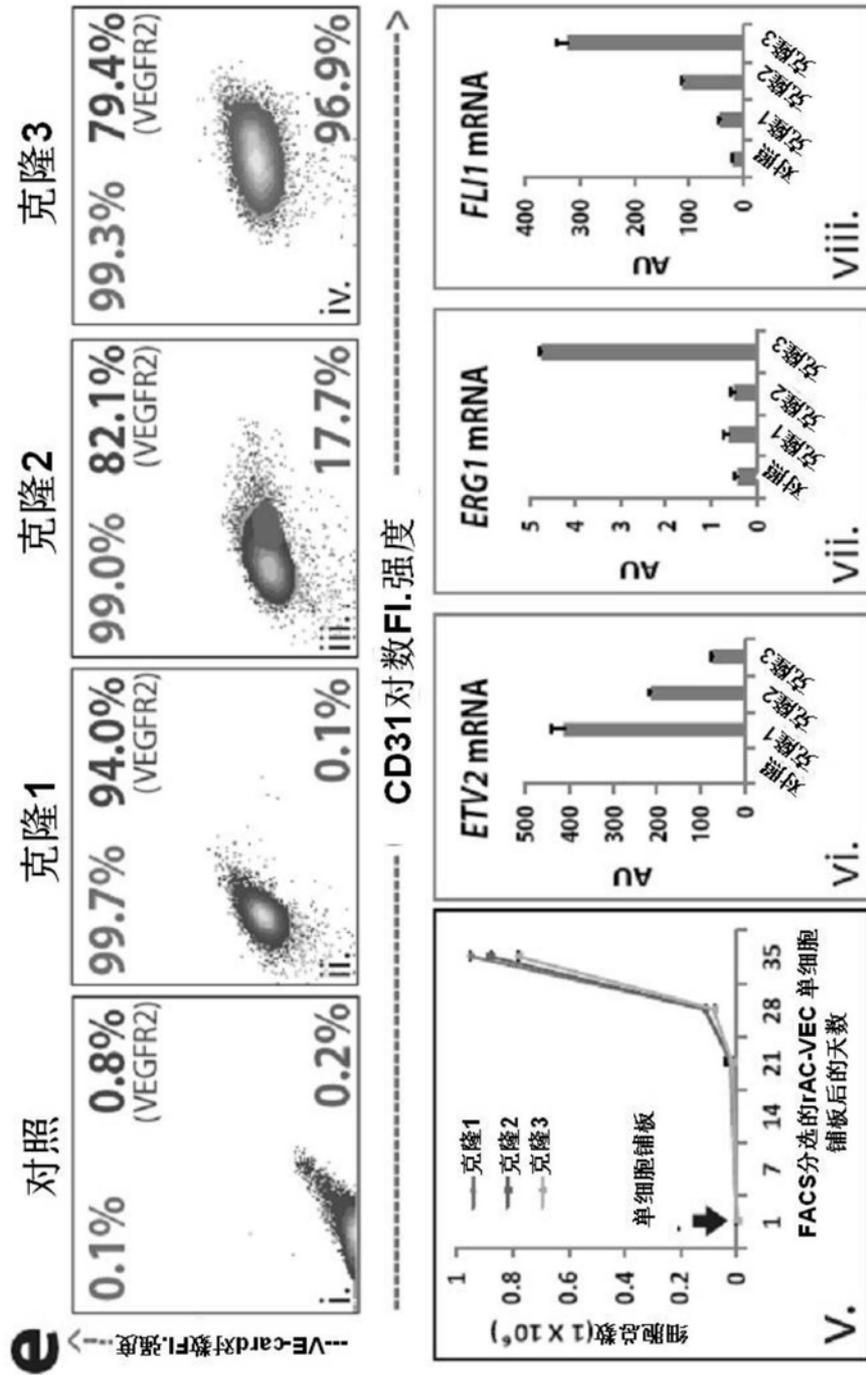


图3e

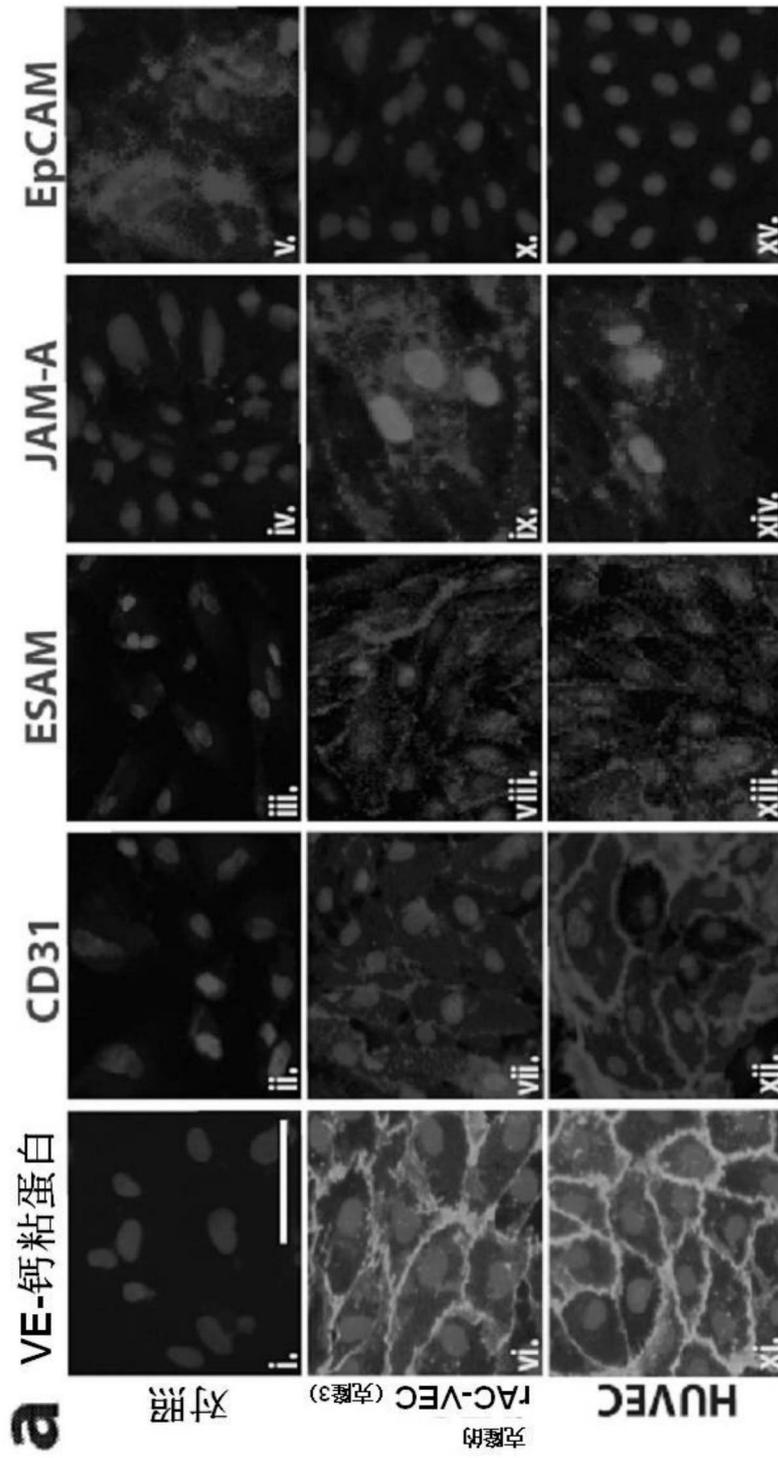


图4a

C

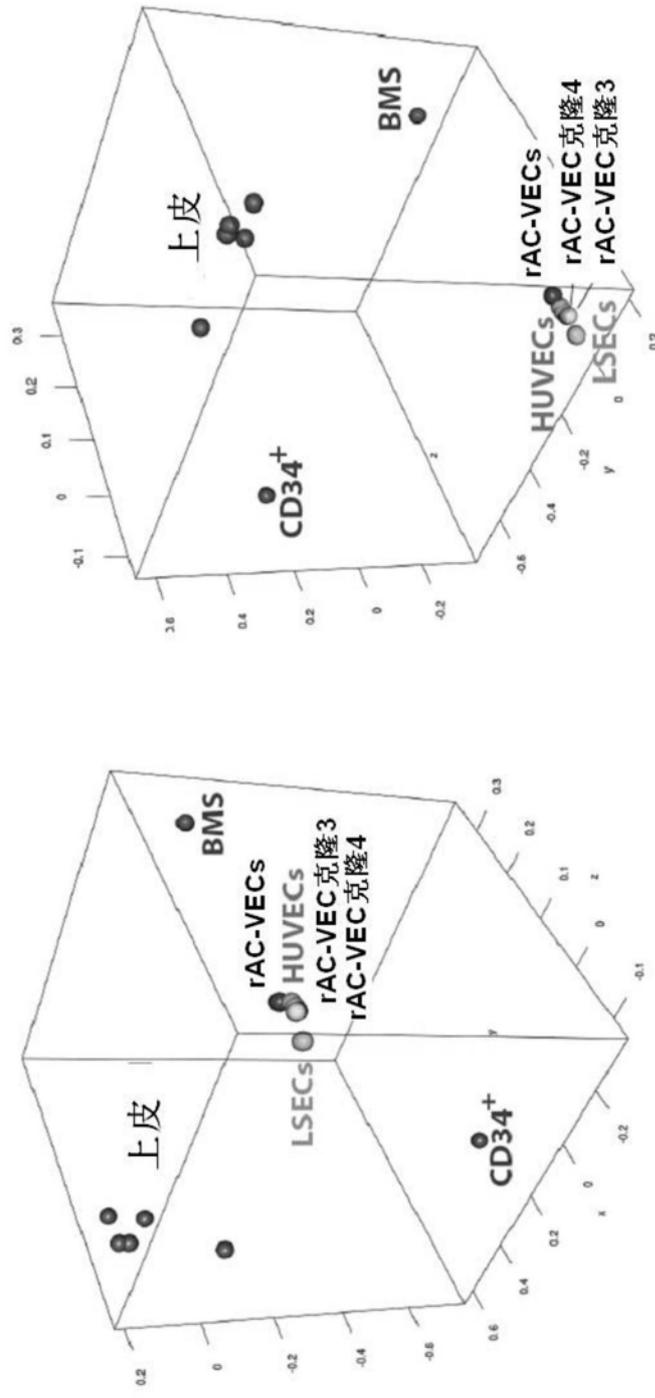


图4c

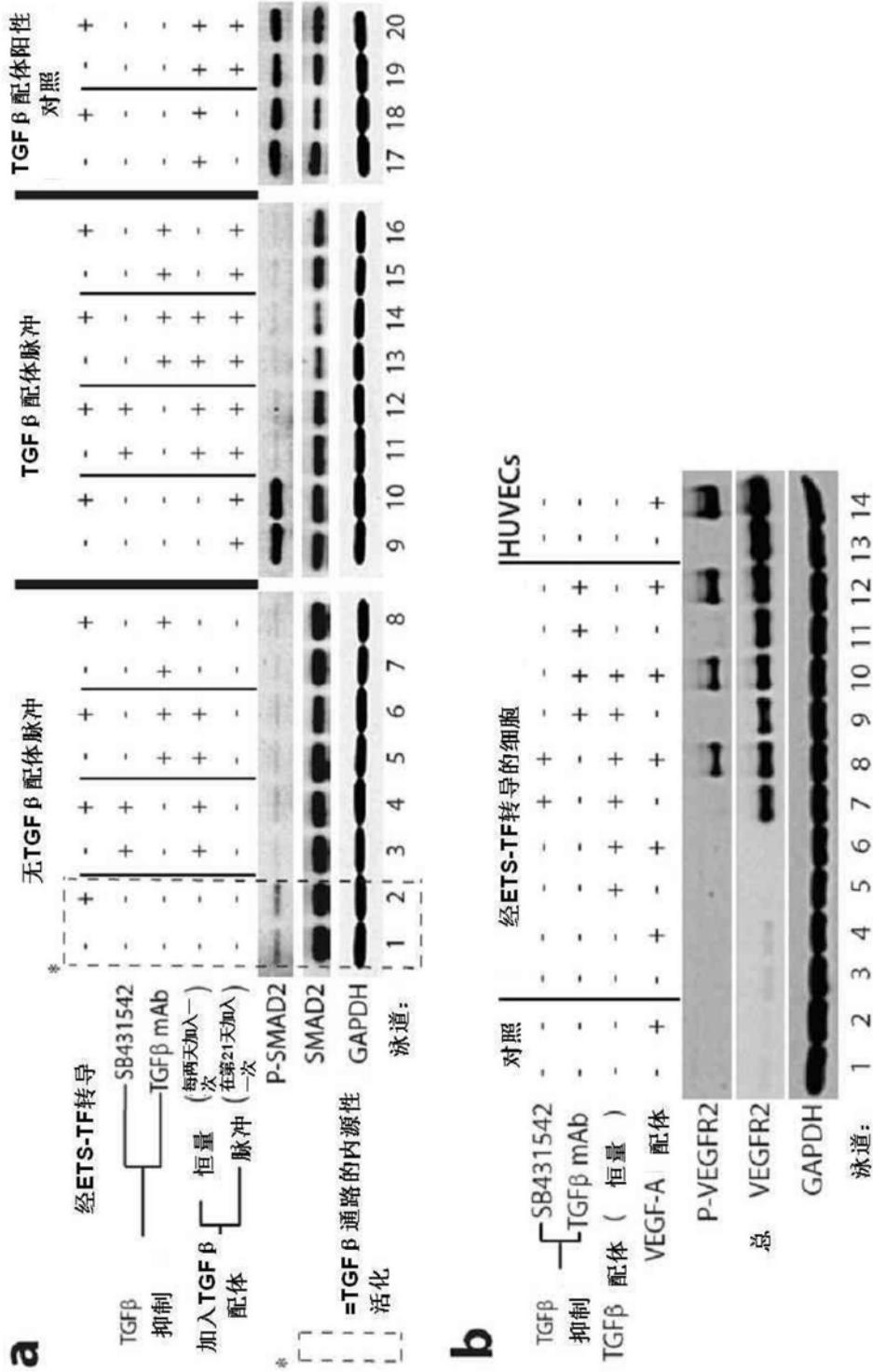


图5a-b

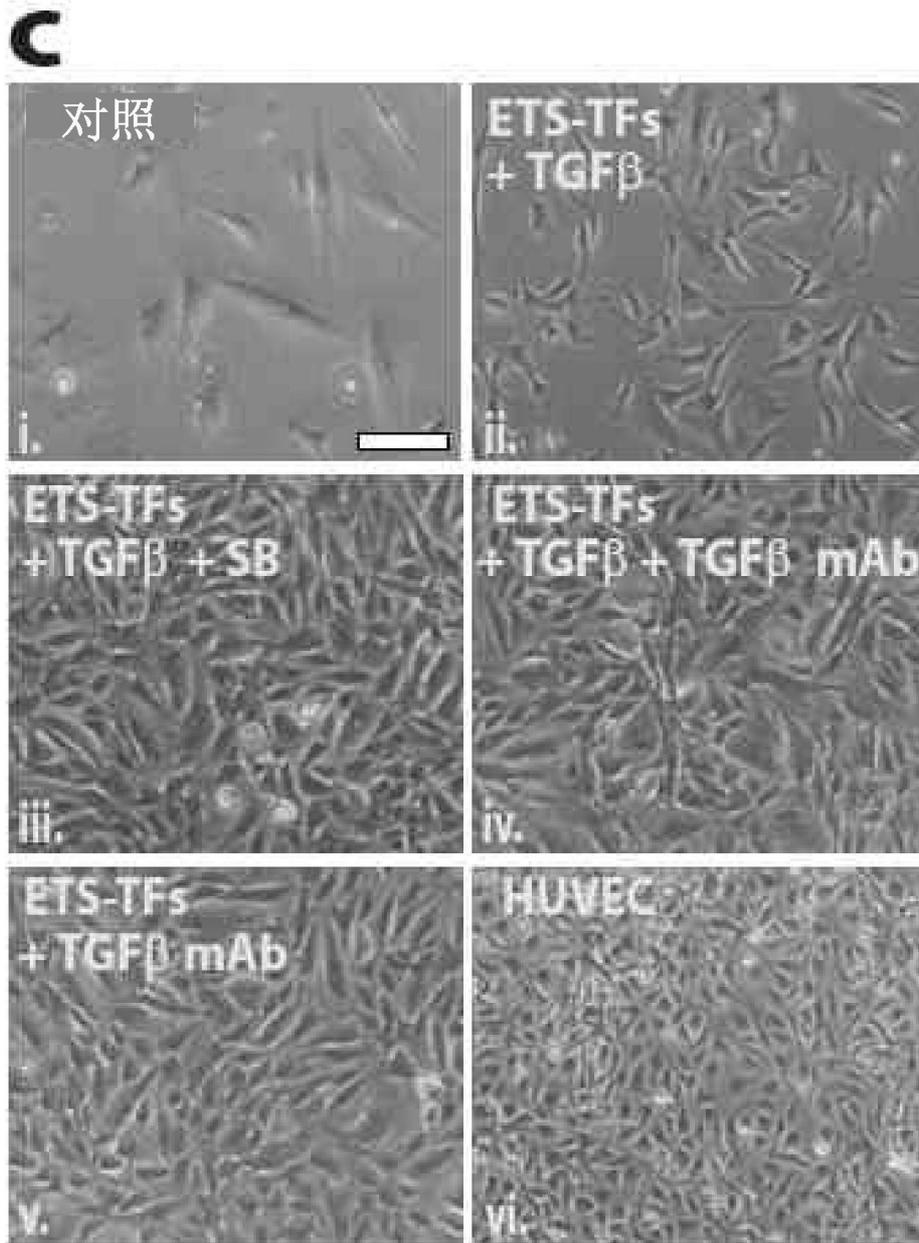
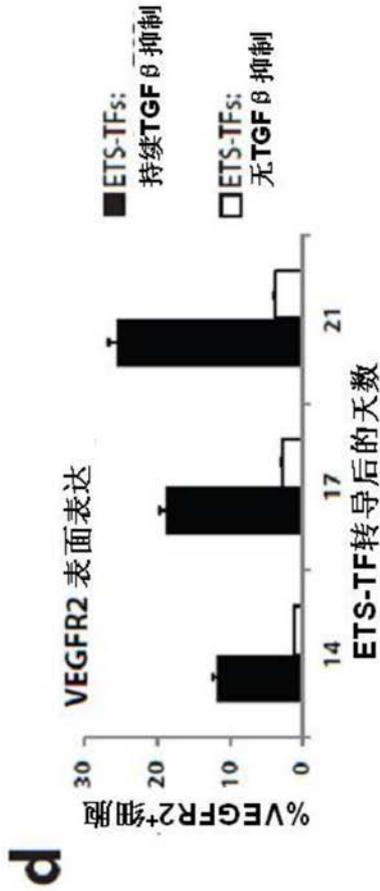


图5c



e

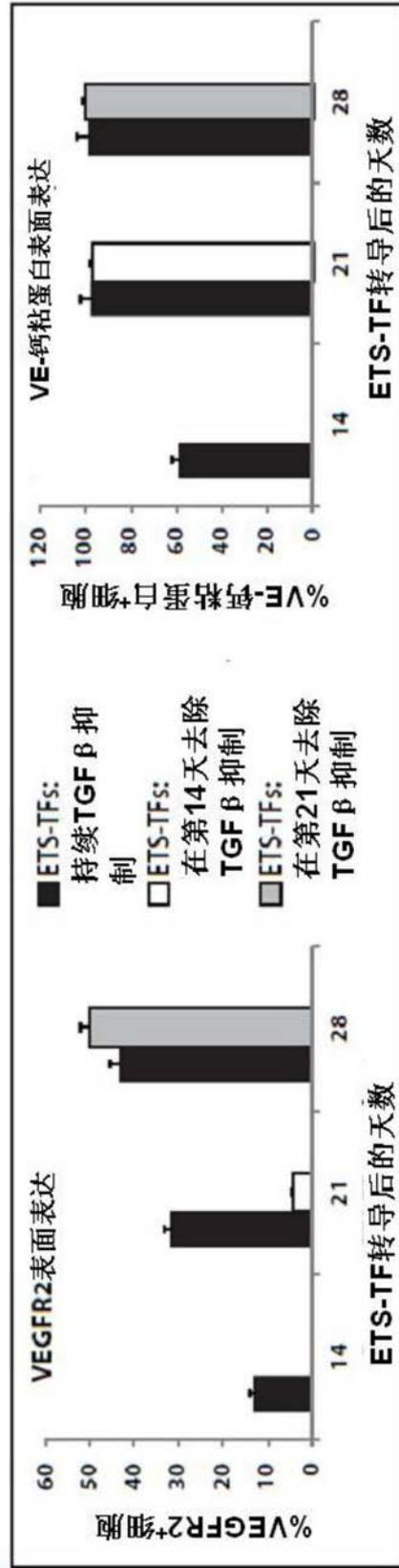


图5d-e

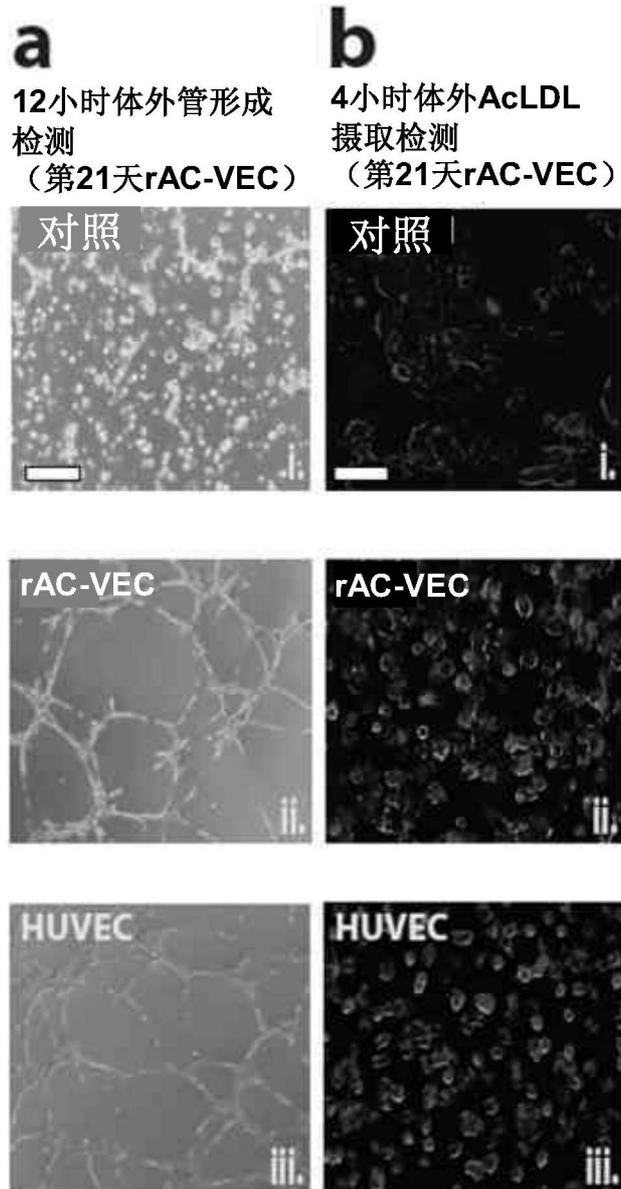


图6a-b

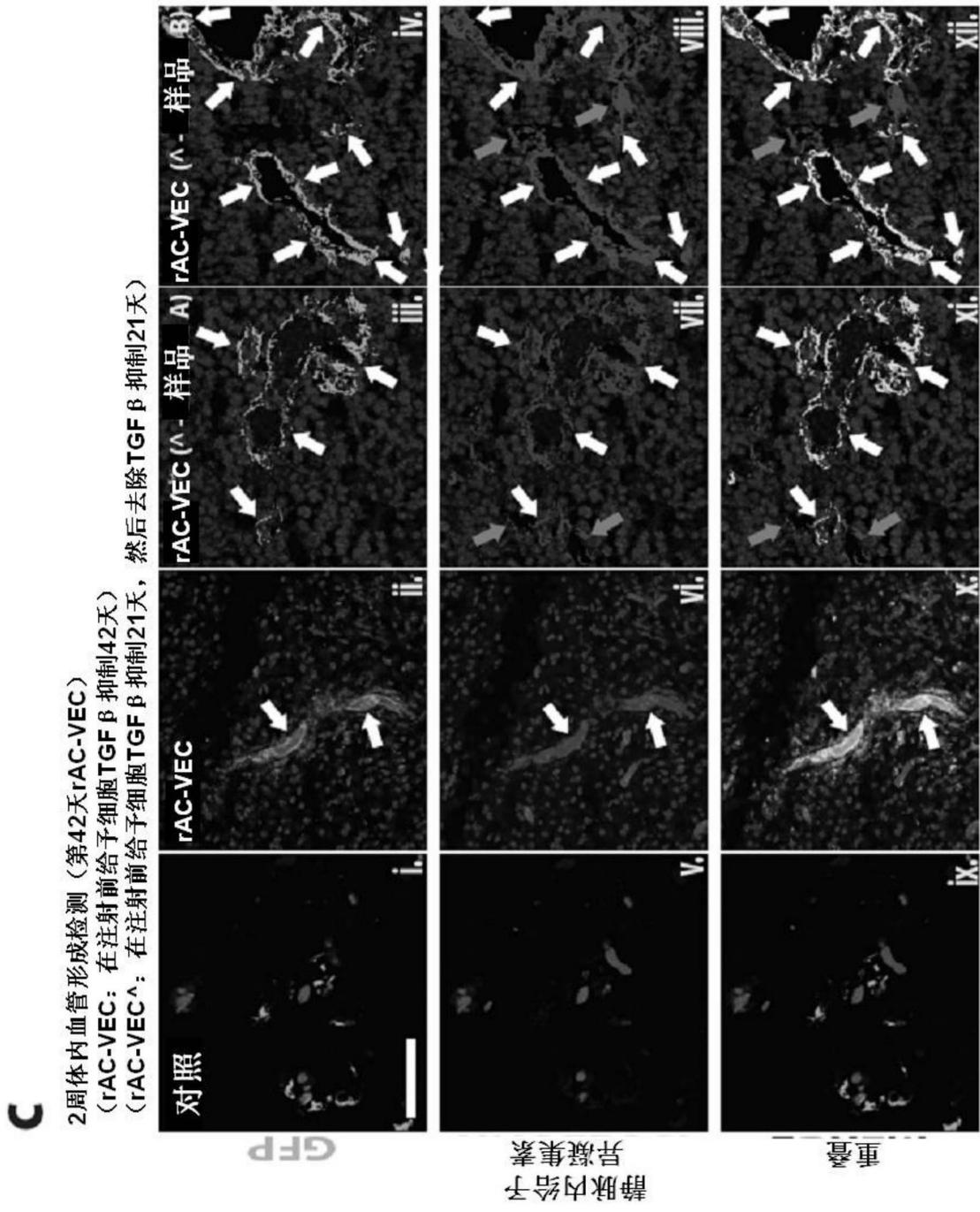


图6c

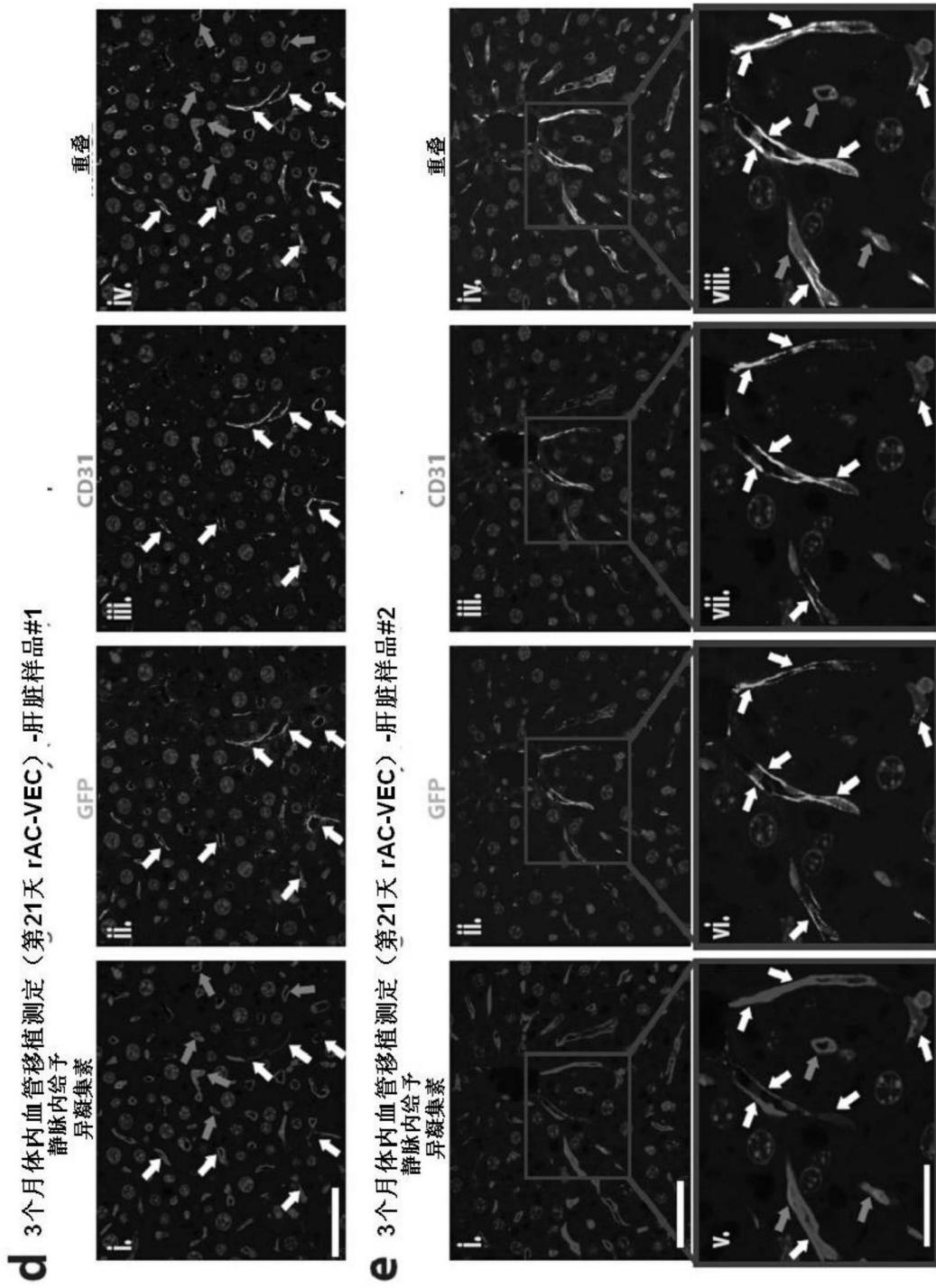


图6d-e

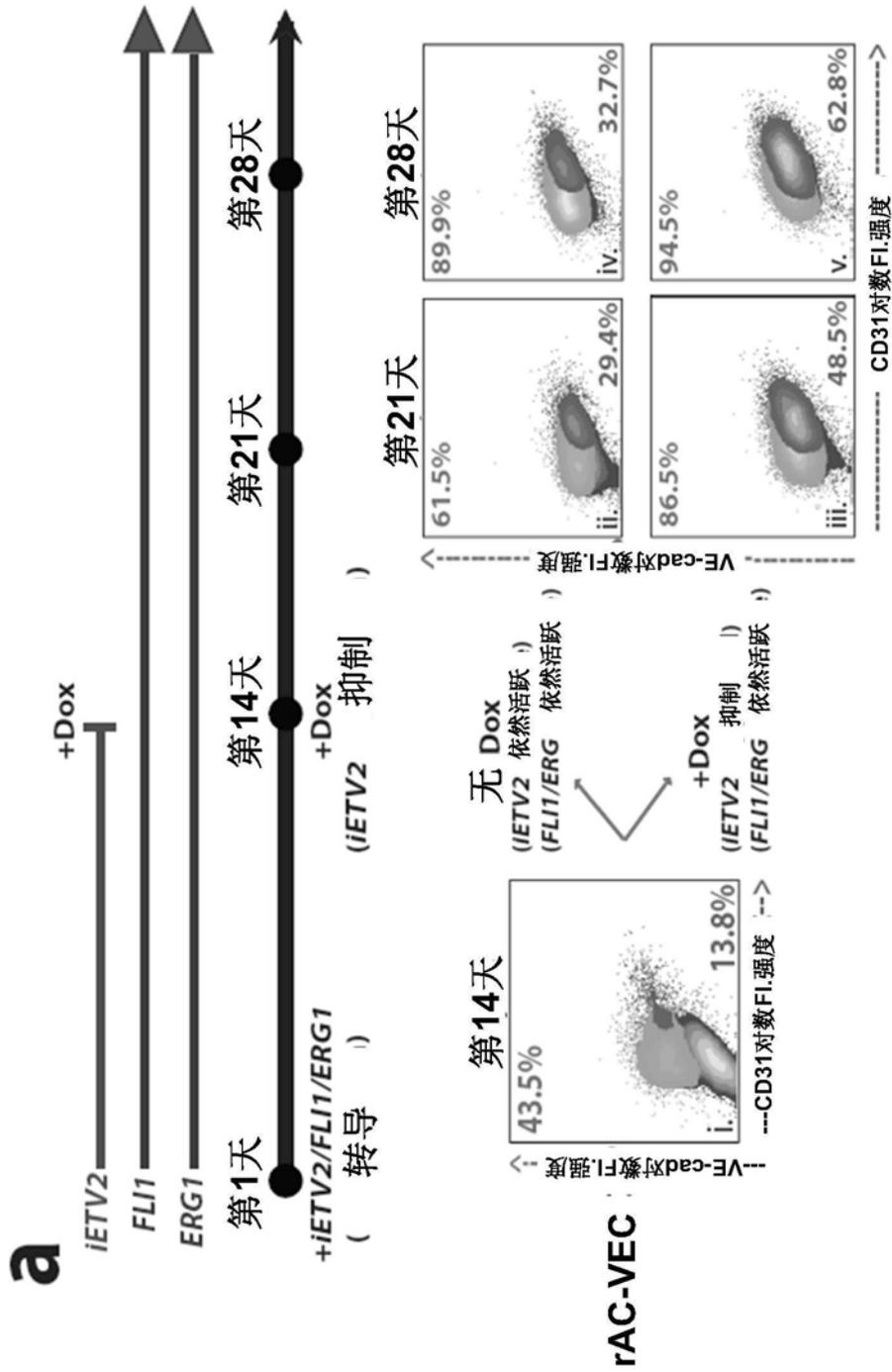


图7a

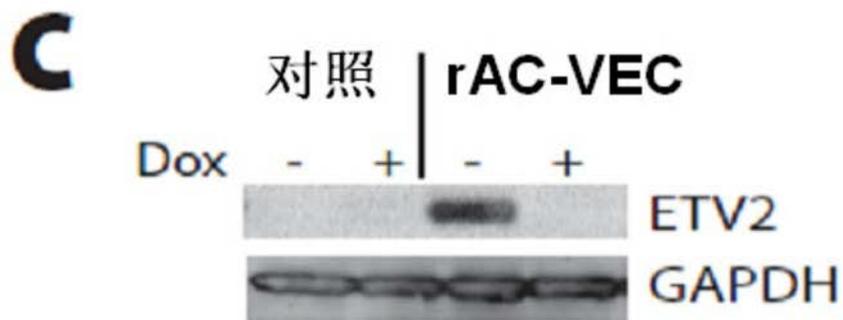
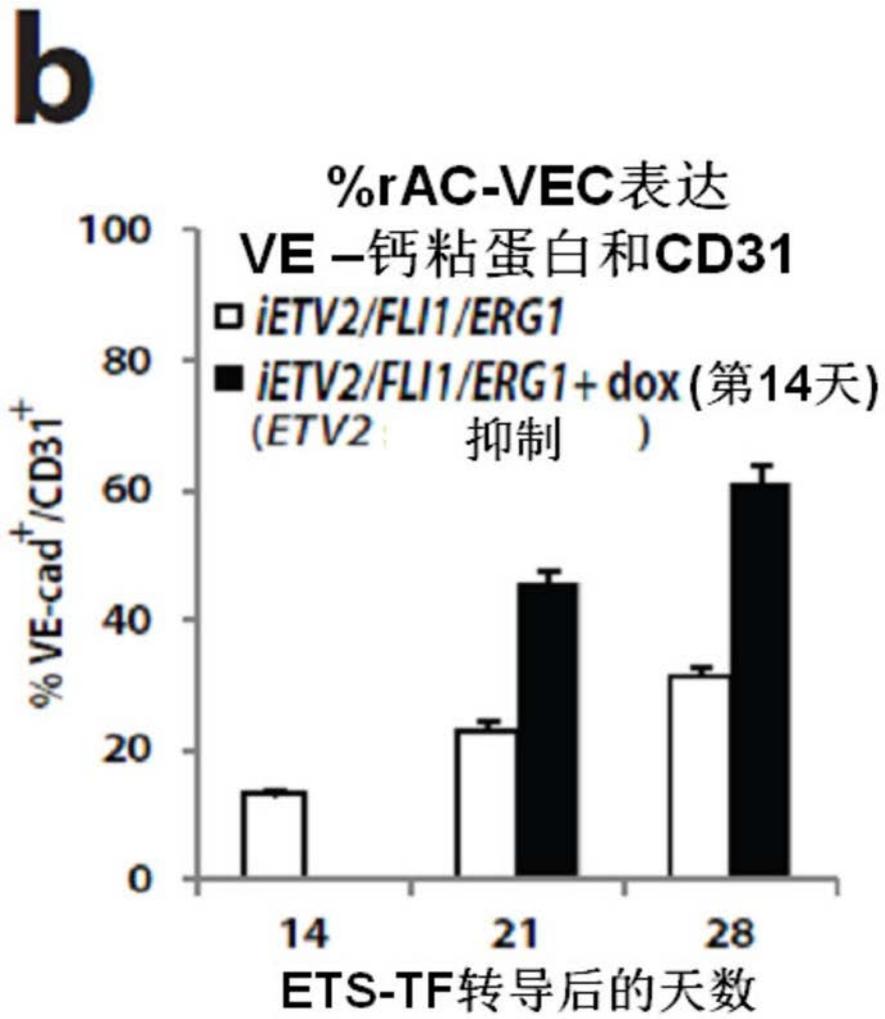


图7b-c

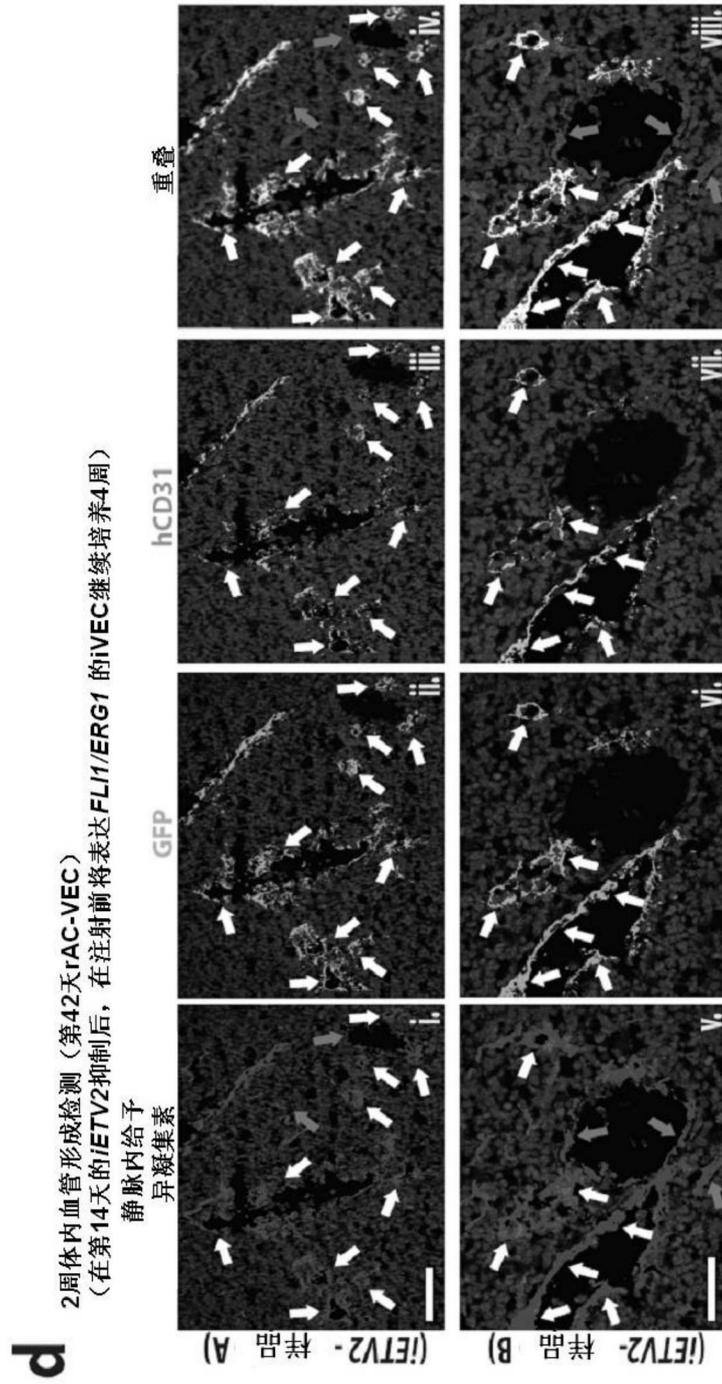


图7d

