(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1543500 B
(45)授权公告日 2014.04.09

(21)申请号 02813927.5

(22)申请日 2002.07.12

(30)优先权数据
60/305,087 2001.07.12 US
60/322,695 2001.09.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2004.01.12

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2002/022245 2002.07.12

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2003/006950 EN 2003.01.23

(73)专利权人 杰龙公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 C·徐

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 周承泽

(51)Int.Cl.
C12N 5/00(2006.01)
C12N 5/02(2006.01)
C12N 5/06(2006.01)

(56)对比文件

WO 0181549 A,2001.11.01, 摘要,权利要求1-32.

WO 0151616 A,2001.07.19, 摘要,权利要求1-32.

作者:ITSKOVITS-ELDOR, J. ET AL.. 标题:DIFEERENTIATION OF HUMAN EMBRYONIC STEMCELLS INTO EMBRYOID BODIES COMPRISING THETHREE EMBRYONI GERM LAYERS.MOLECULAR MEDICINE 卷号:6 期号:2.2000,6(2),88-95.

作者:SHAMBLOTT M J ET AL. 标题:HUMAN EMBRYONIC CELL DERIVATIVES EXPRESS ABROAD RANGE OF DEVELOPMENTALLY DISTINCTMARKERS AND PROLIFERATEEXTENSIVELY IN VITRO.PNAS卷号:98 期号:.2001,98113-118.

审查员 李美宣

权利要求书1页 说明书24页 附图11页

(54)发明名称

从人多能干细胞产生心肌细胞系细胞

(57)摘要

本发明提供了人心肌细胞系细胞群。通过使多能干细胞的培养物体外分化,然后收集具有某些表型特征的细胞而获得这些细胞。此分化细胞具有心肌细胞的特征性细胞表面标志和形态标志,并且它们的一部分经历了自发性的周期性收缩,可获得高度富集的此种心肌细胞群和它们的复制性前体细胞,适用于各种应用,如心脏病的药物筛选和治疗。

CN 1543500 B

1. 一种产生含有人心肌细胞或心肌细胞前体细胞的细胞组合物的方法，其特征在于，所述方法包括：

a) 在基本上无饲养细胞的环境中培养来自已建立的细胞系的人胚胎干细胞，所述基本上无饲养细胞的环境包含胞外基质和成纤维细胞条件培养液；

b) 使步骤 a) 中的所述人胚胎干细胞形成胚胎样小体；

c) 用向心因子使培养的细胞分化成为心肌细胞或心肌细胞前体细胞，所述向心因子是 5- 氮脱氧胞嘧啶。

2. 如权利要求 1 所述的方法，所述方法还包括在含肌酸、肉碱和牛磺酸的培养液中培养所述细胞至少一周。

3. 一种富集多种从来自已建立的细胞系的人胚胎干细胞分化而来的心肌细胞的方法，其特征在于，所述方法包括：

a) 使来自已建立的细胞系的人胚胎干细胞通过权利要求 1 所述的方法产生含有人心肌细胞的细胞组合物；

b) 用密度梯度离心增加心肌细胞百分数。

4. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述密度梯度离心是用 Percoll 梯度进行的。

从人多能干细胞产生心肌细胞系细胞

技术领域

[0001] 本发明总地涉及胚胎细胞及其分化的细胞生物学领域。更具体说，本发明采用特殊培养条件和筛选技术提供了可控制的人多能干细胞分化成为心肌细胞及其前体细胞。

[0002] 相关申请参考

[0003] 本申请要求2001年7月12日提交的美国前专利申请60/305,087和2001年9月10日提交的60/322695的优先权。在美国和其它管辖范围内允许将此优先权文件以及国际专利出版物WO01/51616的全部内容纳入本文参考文献中。

[0004] 背景

[0005] 心脏病是西方世界最受关注的严重疾病之一。据估计6100万美国人（几乎每5位男性和女性有1人）患有1种或多种心血管疾病（全国健康和营养研究调查III,1988-94，疾病控制中心和美国心脏病协会）。广泛散播的疾病包括冠心病（1240万）、先天性心血管缺陷（100万）和充血性心力衰竭（4700万）。对于再生医学研究的主要挑战是开发能帮助在这些疾病中重建心脏功能的细胞组合物。

[0006] 迄今已进行的大多数研究工作采用啮齿动物模型开发的各种类型干细胞。

[0007] Maltsev、Wobus等(Mechauisms Dev.44:41,1993)报道了小鼠的胚胎干细胞(ES)可通过胚胎样聚集体体外分化为自发搏动的心肌细胞，Wobus等(Ann.N.Y.Acad.Sci,27:460,1995)报道小鼠多能ES细胞复现了心肌细胞从未定型的胚胎细胞发育成为心肌（层）特有的细胞表型。可接种胎胚样小体、培养、分离并用免疫荧光和电生理研究测定。据报道此细胞可表达心脏特异性基因和所有主要的心脏特异性离子通道。Wobus等(J.Mol.Cell.Cardiol.29:1525,1997)报道视黄酸可加速ES细胞的心脏分化并增加心室心肌细胞的发育。该研究所用细胞克隆转染后表达了在MLC-2V启动子控制下的β-半乳糖苷酶。

[0008] Kolossov等(J.Cell.Biol.143:2045,1988)报道采用含有在心源性α-肌动蛋白启动子控制下的绿荧光蛋白质载体，分离得到小鼠ES细胞衍生的心前体细胞。膜片钳(Patch clamp)和Ca^{++}成象提示L型钙通道的表达起始于胚胎样小体发育的第7天。Narifa等(Development122:3755,1996)报道GATA-4缺陷小鼠的ES细胞能分化成心肌细胞。在嵌合小鼠的心内膜、心肌层和心外膜中发现了GATA-4缺陷性细胞。这些作者提出其它GATA蛋白质可能补偿GATA-4的缺乏。

[0009] 美国专利6,015,671(Field)和Klug等(J.Clin.Invest.98:216,1996)报道用基因工程方法从分化性小鼠ES细胞选出的心肌细胞形成了稳定的心内移植物。用α-心肌球蛋白重链(MHC)启动子驱动氨基葡糖苷磷酸转移酶或neo^r，和用抗菌素G418筛选，从分化性小鼠ES细胞选出了这些细胞，将其移植入成年营养障碍性小鼠的心脏内，据报告移植后长达7周都发现标记的心肌细胞。国际专利出版物WO00/78119(Field等）提出一种通过增加细胞周期蛋白D2活性来提高心肌细胞增殖潜能的方法。

[0010] Doevendans等(J.Mol.Cell Cardiol.32:839,2000)提出漂浮的胚胎样小体中，心肌细胞的分化相当于胚胎心肌细胞。啮齿动物干细胞产生的心肌细胞据报道可分化成为心室肌细胞并具有钠钙和钾流。

[0011] Muller 等 (FASEB J.14 :2540,2000) 报道从用心室特异性 2.1Kb 肌球蛋白轻链 2V 启动子和 CMV 增强子控制下的绿荧光蛋白转染的小鼠 ES 细胞中，分离得到心室样心肌细胞。电生理研究提示存在心室表型但无起搏点样的心肌细胞。Gryschenko 等 (Pflugers Arch 439 :798,2000) 研究了小鼠 ES 细胞产生的心肌细胞中的输出电流。早期 ES 衍生心肌细胞中的优势再极化电流，是 4- 氨基吡啶敏感性短暂输出电流。这些作者的结论是在早期心肌细胞中，这些短暂的输出电流在控制心电活动中起着重要作用。

[0012] 国际专利出版物 WO 92/13066(Loyola 大学) 报道从用致癌基因 V-myc 或 V-ras 进行基因修饰的胎胚物质，构建了大鼠心肌细胞系。美国专利 6,099,832 和 6,110,459(Mickle 等，Geugyme) 报道采用成年心肌细胞、儿童心肌细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞、内皮细胞或骨骼肌细胞的不同组合改进了大鼠模型的心脏功能。美国专利 5,919,449(Diacrin) 报道采用猪心肌细胞治疗异种个体的心功能不全，细胞获自妊娠 20-30 天的猪胚。

[0013] Makino 等 (J.Clin.Invest.103 :697,1999) 和 K.Fukuda(Artificial Orgoms25 : 1978,2001) 从中胚层干细胞产生了新生的心肌细胞进行心血管组织工程改造，从骨髓基质产生了心肌细胞系并培养了 4 个月以上。为了诱导细胞分化用 5- 氮脱氧胞嘧啶处理细胞 24 小时，引起 30％的细胞形成肌管样结构，获得心肌细胞标志并开始搏动。

[0014] 大多数已建立的心肌细胞系获自动物组织，尚未建立可批准广泛用于人类心脏治疗的心肌细胞系。

[0015] Liechty 等 (Nature Med 6 :1282,2000) 报道了人中胚层干细胞的移植，并证明绵羊子宫内移植后发生了部位特异性分化。据报道移植后移植物长期存活时间长达 13 个月并如期望的发育成免疫活性。国际专利出版物 WO 01/22978 提出一种方法来改进心力衰竭病人的心脏功能，该方法包括将自身骨髓基质细胞移植入心肌层产生新的肌纤维。

[0016] 国际专利出版物 WO 99/49105(Zymogenetics) 提出分离人的非粘附多能心肌干细胞。悬浮此心肌细胞进行密度梯度离心，培养并测定其心肌特异性标志。经过增殖和分化，所述细胞系产生的后代细胞为成纤维细胞、肌细胞、心肌细胞、角质形成细胞或骨细胞或软骨细胞。

[0017] 尚不清楚这些专利中例举的细胞制品是否可以大量生产提供给市场作为再生心脏功能的治疗性复合物。治疗心脏病的新生细胞的一种更具前景的来源是获自胚胎组织的人多能干细胞。

[0018] Thomson 等 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92 :7844,1995) 首先用恒河猴或狨猴作模型成功地培养出灵长类动物的胚胎干细胞，他们随后从人的胚泡产生了人的胚胎干 (hES) 细胞系 (Science 828 :114,1998)Gearhart 和同事从胚胎卵巢组织产生了人胚胎种系 (hES) 细胞系 (Shambloot 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95 :13726,1998) 国际专利出版物 WO 00/70021 提出分化的人胚胎样细胞和从 hES 细胞产生它们的方法。国际专利出版物 WO 01/53465 概述了从 hEG 细胞制备胚胎样小体衍生的细胞。

[0019] 胚胎干细胞和胚胎种系细胞二者都能在体外增殖而不分化，它们保留着正常核型和分化产生各种成人类型细胞的能力。然而，已知道人多能干细胞的增殖和分化要遵循的规则与培养的啮齿动物干细胞发育所遵循的大不相同。

[0020] Geron 公司开发了新颖的组织培养条件使得人的多能干细胞能在基本上无饲养细

胞的环境中不断增殖，参见澳大利亚专利AU729377和国际专利出版物WO01/51616。能在无饲养细胞环境中培养干细胞提供了一种系统，该系统中用的细胞组合物不难按照人类治疗所规定的要求来制备。

[0021] 为了在人类健康和疾病的治疗中发挥多能干细胞这种潜力、现在必须发展新的方案使这些细胞发育成为能治疗重要组织类型的细胞群。

[0022] 发明概述

[0023] 本发明提供一种能有效产生灵长动物细胞的系统，这些灵长动物细胞可从多能干细胞分化成为心肌细胞系细胞。

[0024] 本发明一实施例是含有心肌细胞系细胞的细胞群，这些细胞具有本文所述的特殊性能。例如，它们可以是：

[0025] • 晚期心肌细胞

[0026] • 能在体外增殖和能在体内外分化成为具有上述特性之一细胞的心肌细胞前体细胞

[0027] • 能表达以下内源性基因的一种或多种标志：心肌钙蛋白I(cTnI)、和前房利钠尿因子(ANF)

[0028] • 能表达本文所述的三种或多种其它表型标志。

[0029] • 能由灵长动物多能干(pPS)细胞产生

[0030] • 具有与已建立的人胚胎干(hES)细胞系相同的基因组。

[0031] • 表现出自发性的周期性收缩活性。

[0032] •表现出心肌细胞的其它特征，如离子通道或相应的电生理学行为。可将本发明的细胞群富集到约5%，约20%或约60%的细胞具有所述特征。如需要，这些细胞也可用端粒酶逆转录酶作基因修饰，以扩展复制能力，或表达生长因子、向心因子或转录调控元件。

[0033] 本发明的另一实施例是产生这类细胞群的方法，该方法包括在合适的生长环境中使pPS细胞或其后代分化。在一示范性方法中将hES细胞培养在基本上无饲养细胞的条件下。然后，其分化成为带有一种或多种上述特征的心肌细胞或心肌细胞前体细胞。在某些情况下，此分化方法可能包括以下一个或多个步骤：在悬浮培养液中培养pPS细胞形成胚胎样小体或细胞聚集物，在含有一种或多种向心因子的生长环境中培养，将自发性收缩细胞与细胞群中的其它细胞分开或在含有一种或多种心肌细胞富集因子的生长环境中培养。

[0034] 本发明一实施例是一种筛选能影响心肌细胞的化合物的方法。此方法包括使该项化合物与本发明细胞群混合，然后测定该化合物所产生的调节作用。这可能包括检查细胞的毒性、代谢变化或对收缩活性的影响。

[0035] 本发明又一实施例是输送含有本发明细胞群装置的药物，目的是治疗人体和动物体，可将此细胞群制备成治疗心肌疾病的药物。本发明的另一实施例是重建或提供心脏组织收缩活性的方法，该方法包括使心脏组织与本发明的细胞群接触，包括给予个体适当剂型的本发明细胞群来治疗个体的心脏病。

[0036] 将从以下描述中了解本发明的这些和其它实施方案。本文所述的组合物、方法和技术对诊断、药物筛选和治疗应用具有相当好的前景。

[0037] 本发明中的人胚胎干细胞由已建立的细胞系提供。

[0038] 附图

[0039] 图 1 显示用免疫组化检测人未分化胚胎干 (hES) 细胞的标志表达。培养物按常规方法在小鼠胚胎饲养细胞上或含有胞外基质Matrigel®或层粘连蛋白的条件培养液无饲养细胞环境中培养，生长在无饲养细胞培养液中的 hES 细胞具有的表型标志类似于生长在原代小鼠成纤维细胞饲养层上的 hES 的表型标志。

[0040] 图 2 是获自 pPS 细胞的心肌细胞图（上图）和心肌细胞形成的动力学图（下图）。实施例 2 提供了悬浮培养的 hES 细胞开始分化形成胚胎样小体的说明，悬浮培养 4 天后将胚胎样小体转移到明胶包被板上，分化第 8 天时可在培养物的不同区域观察到自发性收缩，细胞再过一周数量增加至 60％以上的细胞集团含有收缩性细胞。

[0041] 图 3 显示在分化自人胚胎干 (hES) 细胞的心肌细胞中检测到的标志。上图显示用免疫印染分析心肌钙蛋白 I(cTnI) 标志的结果。cTnI 和 GATA-4 见於收缩性细胞中，但未见於不含收缩性细胞的其它孔中。下图显示发育过程中心肌球蛋白重链（α MHC) 表达的动力学。α MHC 的表达至第 8 天很显著，对应于培养物中收缩性细胞十分丰富的时间。

[0042] 图 4 显示分离的和对原肌球蛋白、肌联蛋白、肌球蛋白重链 (MHC)、α - 肌动蛋白、结合蛋白、心肌钙蛋白 I(cTnI) 和心肌钙蛋白 T(cTnT) 染色阳性的单细胞和细胞集落。单细胞和集落对所有这些标志染色阳性。可观察到肌原纤维节结构的条纹特征。

[0043] 图 5 显示药物对 hES 衍生的心肌细胞收缩活性的作用。L 型钙通道抑制剂盐酸地尔硫卓以剂量依赖方式抵制了收缩活性。肾上腺素受体激动剂异丙肾上腺素、苯福林和克仑特罗（一种粘液溶解药）具有变时性作用。

[0044] 图 6 显示胞嘧啶类似物 5- 氮脱氧胞嘧啶作为心肌细胞分化诱导剂的能力。将悬浮培养 4 天 hES 细胞形成的胚胎样小体接种在明胶包被板上，于 1-4 天、4-6 天或 6-8 天期间在培养液中加入 5- 氮脱氧胞嘧啶。此药在 hES 细胞良好进行分化后最有效。

[0045] 图 7 评价了潜在的向心因子提高细胞群中心肌细胞系细胞比率的能力，在胚胎样小体形成期间加入活化素和某些生长因子（组 I)，其它生长因子（组 II) 和在接种于明胶上后加入 5- 氮脱氧胞嘧啶，以及分化期后加入其它因子（组 III)，以三种浓度测试了诸组合的作用，低浓度生长因子联合 5- 氮脱氧胞嘧啶最有效。

[0046] 图 8(A) 和 8(B) 显示通过单独调整各细胞因子组进一步精心安排实验方案。当采用低水平的组 I 和组 2 诸因子，然后用 5- 氮脱氧胞嘧啶处理时，最大量地产生了心肌细胞特征性 α -MHC 标志。在这些条件下早期心肌细胞相关基因 GATA-4 的表达也得到提高。与内胚层相关基因 HNF36（其用任何生长因子组合均增加，但用 5- 氮脱氧胞嘧啶不增加）相比，对 α -MHC 和 GATA-4 的作用是筛选性的。

[0047] 图 9 显示以含有肌酸、肉碱和牛磺酸 (CCT) 的培养液培养含心肌细胞的细胞群 1-2 周实现了富集。每条线代表在整个实验过程一孔中见到的搏动区。与用标准分化培养液培养的细胞相比，CCT 培养液使培养物中的搏动区数目增加了大约 4 倍。

[0048] 图 10 显示在不连续性 PercoII™ 梯度上分离 hES 细胞分化产生的细胞群的效果，组分 I 在上层界面，组分 II 在 40.5％层，组分 III 在下层界面，组分 IV- 在 58.5％层，如实时 RT-PCR 分析所测定、心肌细胞标志 α - 肌球蛋白重链的表达在较高密度组分中最高。

[0049] 发明详述

[0050] 本发明提供了一种制备和特征鉴定灵长动物多能干细胞衍生的心肌细胞及其前体细胞的系统。

[0051] 在开发获得灵长动物多能干 (pPS) 细胞衍生的心肌细胞系的大量富集细胞群路途中有许多障碍需要克服。一些障碍是由于灵长动物多能干细胞相当脆弱，培养困难和它们对培养环境中存在的各种因素异常敏感和依赖。其它障碍是需要了解祖代心肌细胞的终末分化要求存在内脏、胚胎内胚层和胚线 (Arai 等 Dynamucs 210 :344，1997)。为了使 pPS 细胞体外分化为祖代心细胞，必须模拟或代替所有发生在发育胚胎中这类细胞天然个体发育中的活动。

[0052] 尽管有这些障碍，但现已发现可从 pPS 培养物中相对富含表达心肌细胞特征的细胞获得这种细胞群。图 4 显示原肌球蛋白、肌联蛋白、肌球蛋白重链 (MHC)、α－肌动蛋白、结合蛋白、心肌钙蛋白 I(cTnI) 和心肌钙蛋白 T(cTnT) 染色阳性的单个细胞，并显示了肌原纤维节结构的条纹特征。这些细胞在组织培养中有自发性的周期性收缩。图 5 显示其收缩活性受到 L 型钙通道抑制剂盐酸地尔琉卓的抑制，并在对肾上腺素受体激动剂异丙肾上腺素和苯福林的反应中增强。

[0053] 应明白制备人多能干细胞衍生的心肌细胞的途径不同于先前报道的制备小鼠心肌细胞的许多途径。首先，未分化期的人 pPS 细胞增殖和准备进行心肌细胞的分化需要不同的培养系统，小鼠胚胎干细胞可简单地在培养液中加入白血病抑制因子 (LIF) 而增殖但不分化。而 LIF 本身不足以防止人 ES 细胞分化，人 ES 常规在原代胚胎成纤维细胞饲养层上增殖 (Thomson 等同上)。另外，能使小鼠干细胞产生心肌细胞的因子如视黄酸 (Wobus 等 J.Mol.Cardiol.29 :1525，1997) 和 DMSO(McBurney 等，Nature 299 :165，1982) 当在相似条件下用于人干细胞时效果差得多。

[0054] 本发明通过提供一种新的可高度富集所需心肌细胞系细胞群的系统、解决了从人多能干细胞制备重要细胞的问题。该系统不难使其自身按商品化规模实施。可用于提高心肌细胞产生的方法包括 :

[0055] 1、将未分化的 pPS 细胞置于可启动分化过程的培养条件下形成胚胎样小体或直接分化。

[0056] 2、在据信有助于驱使 pPS 细胞分化成为心肌细胞系的一种或多种向心因子存在下培养所述细胞。

[0057] 3、通过密度离心或其它合适的分离方法使心肌细胞与其它细胞分离。

[0058] 4、在据信能有助于所需类型细胞优先生长的心肌细胞富集因子存在下，培养含心肌细胞系的细胞群。

[0059] 本文所述的这些和其它步骤可单独应用或有效组合应用，如实施例 9 所述，这些组合方法只有几种提供了含心肌细胞系 69％以上的新的细胞群，根据本发明所产生的细胞的显著均一性和功能特性使得这些细胞对于开发新的治疗药物极有价值和可作为体外研究心脏组织的一种工具。

[0060] 定义

[0061] 本发明的技术和组合物涉及 pPS 衍生的心肌细胞及其前体细胞，在本文后叙章节中提供了心肌细胞的表型特征。对于心肌细胞的前体细胞的定义没有具体的特征，但已知道在个体发生的正常过程中未分化的 pPS 细胞先分化为中胚层细胞，然后经各种前体细胞期分化为功能性（末期）心肌细胞。

[0062] 因此对于本文的目的，将心肌细胞的前体细胞定义为一种能（不经去分化或重新

编程）产生子代细胞（包括心肌细胞）和表达下列至少一种标志（优选至少 3 或 5 种标志）的细胞：心肌钙蛋白 I(cTnI)、心肌钙蛋白 T(cTnT)、肌原纤维节肌球蛋白重链 (MHC)、GATA-4、NKx2.5、N- 钙粘着蛋白、β1- 肾上腺素受体（β1-AR)、ANF、转录因子 MEF-2 家族，肌酸激酶 MB(CK-MB)、肌球蛋白或前房利尿钠因子 (ANF)。

[0063] 可将以上本文所述的技术和称为“心肌细胞”或“心肌细胞前体细胞”的组合物同等地应用于心肌细胞个体发生任何阶段的细胞而无限制，除非另有说明。这类细胞可以具有或不具有增殖能力或显示收缩性活力。

[0064] 本发明的某些细胞显示自发性的周期性收缩活性，这意味它在适当的组织培养环境和适当的 Ca^{++} 浓度和电解质平衡中培养时，可观察到细胞以周期方式沿细胞一条轴横向收缩，然后放松，而不需要在培养液中加入任何其它成分。

[0065] 原型“灵长动物多能干细胞”(pPS 细胞）是衍生自任何类型胚胎组织（胚胎或前胚胎组织）的多能细胞，具有在适当条件下产生不同类型（所有三种胚层：内胚层、中胚层和外胚层）后代细胞的能力特征，按照该领域所接受的标准试验，如在 8-12 同龄 SCID 小鼠中形成畸胎瘤的能力或在组织培养中形成所有三种胚层的能力可鉴定此细胞。

[0066] pPS 定义包括各种类型的胚胎样细胞，例如 Thomson 等 (Science 282：1145，1998) 所述的人胚胎干 (hES) 细胞；其它灵长动物的胚胎干细胞如恒河猴干细胞 (Thomson 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92：7844，1995)、狨猴干细胞 (Thomson 等，Biol.Reprod.55：254，1996) 和人胚种系 (hEG) 细胞 (Shamblott 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95：13726，1998)。这些类型的细胞可以用已建立的细胞系形式提供。其它类型的多能细胞也包括在此术语中，任何灵长动物起源能产所有三种胚层后代的细胞都包括在内。pPS 细胞不能衍生自恶性肿瘤来源并要求（但不总是需要）这类细胞核型正常。

[0067] 当细胞群中高比例的干细胞质其衍生细胞显示未分化细胞的形态特征时，pPS 细胞培养物描述为“未分化的”，使它们可与胚胎或成年来源的分化细胞明确相鉴别。本领域技术人员不难识别未分化的 pPS 细胞，其在两维显微镜视野中通常显现为细胞集落，具有核 / 胞质高比例和突出的核仁。已知细胞群中未分化细胞的集落常常围绕分化的毗邻细胞。

[0068] 在细胞个体发生过程中，形容词“分化的”是一种相对术语，“分化的细胞”是一种进展到相比较该细胞发育通路更下游的细胞。因此。多能胚胎样干细胞可分化为种系限制的前体细胞（如中胚层干细胞），后者进而可分化为发育通路更下游的其它类型前体细胞（如心肌细胞前体细胞），然后发育成终末期分化细胞，在某些类型组织中起着特殊作用并可能保留或不保留进一步增殖的能力。

[0069] 术语“饲养细胞”或“饲养者”用于描述一种细胞类型，当其与另一类型的细胞一起培育时，能提供第二种类型细胞生长的环境。如果 pPS 细胞分离后不在其中加入新鲜的饲养细胞以支持其生长，而 pPS 细胞已生长了至少一轮，就说 pPS 细胞群“基本上无”饲养细胞。应认识到如果采用先前含饲养细胞的培养物作为 pPS 的来源进行新的不含饲养细胞的培养，将会有一些饲养细胞存活于传代物中，当存在的存活饲养细胞低于 5％时，该培养物即为基本上无饲养细胞。更优选含有不到 1％、0.2％、0.05％或 0.01％饲养细胞（以培养物中细胞总数的百分率表示）的组合物。当同一培养物中的一种细胞系分化成为多种类型细胞时，应认为这些不同类型的细胞彼此起着本定义含义中的饲养细胞作用，即使它们

可能以支持方式相互作用。

[0070] “生长环境”是感兴趣细胞能在其中体外增殖、分化或成熟的环境。此环境的特征包括培养细胞的培养基，可存在生长因子或分化诱导因子，以及支持结构（如固相表面上的基质）。

[0071] 当通过适当的人工操作方法将一多核苷酸转移到某细胞内，或当某细胞是先前已改造而继承了该多核苷酸的细胞的后代，就说该细胞是基因修饰的细胞。所述多核苷酸常含有编码某蛋白质的可转录序列，使该细胞表达升高水平的该蛋白质，如果修饰细胞的后代具有相同的（基因）变化就说这种基因修饰是可遗传继承的。

[0072] 本文所用的术语“抗体”指多克隆和单克隆抗体。该术语的范围谨慎地不仅包括整个免疫球蛋白分子，而且包括免疫球蛋白分子的片段和衍生物（如单链 FV 结构、双抗体和融合结构）、可用本领域已知技术制备并保留了所需的抗体结合特异性

[0073] 通用技术

[0074] 为了进一步详细阐述实施本发明所用的通用技术，医生可参见标准的教课书和回顾细胞生物学、组织培养、胚胎学和心脏生理学。

[0075] 关于组织培养和胚胎干细胞，读者可能希望参考“畸胎瘤和胚胎干细胞：实施方法 (Teratocarcinomas and embryonic stem cells:A practical approach)”(E.J.Robertson 编，LPL Press Ltd,1987)；“小鼠开发技术指南 (Guide toTechniques in Mouse Development)”(P.M.Wasserman 等编，Academic Press,1993)；“胚胎干细胞的体外分化 (Embryonic Stem Cell Differentiation inVitro)”(M.V.Wiles，Meth.Engymol.225:900,1993)；“胚胎干细胞的特性和应用：在人类生物和基因治疗中的应用前景 (Properties and uses of Embryonic StemCells:Prospects for Application to Humcn.Biology and Gene Therapy)”(P.D.Rathjen 等，Repord.Fortil.Dev.10:31,1998)。关于心脏细胞培养，标准参考文献包括“培养物中的心脏细胞 (The Heart Cell in Cluture)”(A.Pinson 编，CRC Press 1987)，“分离的成人心肌细胞 (Isolated Adult Cardiomyocytes)”（第 I 和 II 卷，Piper&Isenberg 编，CRC Press,1989)，“心脏发展 (HeartDevelopment)”(Harvey&Rosenthal,Academic Press 1998)，“我把我的心脏留在了旧金山 (I Left my Heart in San Francisco)”(T.Bennet,Sony Records,1990) 和“随 Wnt 而去 (Gone with the Wnt)”(M.Mitchell,Scribner 1996)。

[0076] 分子和细胞生物学通用方法可在以下标准教课书中找到：“分子克隆，实验手册 (Molecular Cloning:A Laboratory Manual)”第三版 (Sambrook 等，HarborLaboratory Press2001)；“分子生物学短方案 (Short Protocols in MolecularBiology)”第 4 版 (Ausubel 等编，John Wiley&Sons 1999)；“蛋白质方法 (ProteinMethods)”(Bollag 等，John Wiley&Sons 1996)；“基因治疗的非病毒载体 (Nonviral Vectors for Gene Therapy)”(Wagner 等编，Academic Press 1999)；“病毒载体 (Viral Vectors)”(Kapl itt 和 Loewy 编，Academic Press,1995)；“免疫方法手册 (Immunology Methods Manual)”(I.Lefkovits 编，Academic Press,1997) 和“细胞和组织培养：生物技术中的试验方法 (Cell and Tissue Cluture:Laboratory Procedures in Biotechnolgy)”(Doyle&Griffiths，John Wiley&Sons 1998)。本文所述的基因操作的试剂、克隆载体和试剂盒可从商品供货商如 BioRad、Stratagene、Invitrogen、Sigma-Aldrich 和 Clon Tech 获得。

[0077] 干细胞来源

[0078] 实施本发明可采用各种类型的多能干细胞，特别是由胚胎组织衍生的具有产生所有上述三种胚层后代能力的干细胞。

[0079] 用作现存细胞系或已建立的细胞系的例子是灵长动物（包括人）原代胚胎组织的胚胎干细胞和胚胎种系细胞。

[0080] 胚胎干细胞

[0081] 已从灵长动物诸成员的胚泡中分离到胚胎干细胞 (Thomson 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:7844,1995)。

[0082] 增殖非分化期的 pPS 细胞

[0083] 采用促进增殖但不促进分化的培养条件可连续培养增殖 pPS 细胞，示范性的含血清 ES 培养液用 80% DMEM（如敲除的 DMEM、Gibco)。20%胎牛血清 (FBS，Hyclone) 或血清替代品 (WO 98/30679)、1%非必须氨基酸、1mML 谷氨酰胺和 0.1mMβ-巯基乙醇制备。应用前可加入 4-8ng/ml 的人 bFGF(WO 99/20741Geron Corp)

[0084] 常规将 ES 细胞培养在一层饲养细胞上，通常为胚胎样或胚胎组织衍生的成纤维细胞上。采集妊娠 13 天的 CF1 小鼠的胚胎，转移到 2ml 胰蛋白酶 /EDTA 中。细细切碎，37℃培育 5 分钟，加入 1% FBS 使碎片沉降，细胞在 90% DMEH、10% FBS 和 2mM 谷氨酰胺液中增殖。为了准备饲养细胞层，照射细胞以抑制增殖，但允许合成支持 ES 细胞的因子（约 4000 拉德 γ 射线）。培养板用 0.5%明胶包被过夜，每孔接种 37.5 万个照射过的 mEF 细胞，接种后可用 5 小时至 4 天。接种 pPS 细胞前刻换上新鲜的 hES 培养液。

[0085] Geran 公司开发了新的组织培养环境能够在基本上无饲养细胞的环境中连续增殖多能干细胞，参见澳大利亚专利 AU729377 和国际专利出版物 WO 01/51616。可在饲养细胞产生的条件培养液或添加了如 FGF 和 SCF 等生长因子的培养液中胞外基质Matrigel®或层粘连蛋白上培养干细胞。能够在无饲养细胞的环境中培养干细胞提供了可容易地制备遵守人类治疗规范要求的细胞组合物的一种系统，为了实行比项应用，将美国要求国际专利出版物 WO 01/51616 的优先权的任何申请全部内容纳入本文参考。

[0086] 无饲养细胞培养环境包括适合的培养基质，具体是例如Matrigel®或层粘连蛋白等胞外基质。pPS 细胞接种量＞ 15.000 细胞 /cm^2（最佳 90.000-17.000/cm^2)。通常酶消化至细胞完全分散（用胶原酶 IV 大约 5-20 分钟）。然后，将大约 10-2000 个细胞的小块直接接种到基质上无须再分散，用营养培养液（通常为培养照射过的原代小鼠胚胎成纤维细胞、端粒酶处理的小鼠成纤维细胞或 pPS 细胞衍生的成纤维样细胞新产生的条件培养液）来支持无饲养细胞培养，可在无血清培养液如添加了 20%血清代用品和 4ng/mlbFGF 的 KO DMEM 中，以约 $5-6\times10^4/cm^2$ 密度接种饲养细胞调理培养液。将经 24 小时调理的培养液以 0.2μM 滤膜过滤，再加入 8ng/ml bFGF 用于支持 pPS 细胞培养 1-2 天。

[0087] 显微镜下，ES 细胞呈现高的核 / 胞质比率，核仁突出和由不易辨认的细胞连接形成的致密集落。灵长动物 ES 细胞可表达一种或多种阶段特异性胚胎抗原 (SSEA)3 和 4，和用命名为抗 Tra-1-60 和 Tra-1-81 的抗体可检测的标志 (Thomson 等，Science 282:1145，1998)。未分化 hES 细胞还通常表达 Oct-4 和 TERT（可用 RT-PCR 检测）和碱性磷酸酶活性（用酶试验检测）。hES 细胞的体外分化通常导致这些标志丧失（如果存在）和 SSEA-1 表达增加。

[0088] 制备心肌细胞的程序

[0089] 本发明的细胞可通过在能富集具有所需表型细胞的特殊生长环境（或者使所需细胞生长或者抑制杀伤其它类型细胞）中培养干细胞或使其分化来获得。这些方法可用于许多类型的干细胞特别是以上章节中所述的灵长动物多能干（pPS）细胞。

[0090] 通常通过形成胚胎样小体或聚集物来启动分化，例如通过供者 pPS 细胞培养物的过度生长或在含有低粘附性能基质的培养瓶中（得以形成 EB）悬浮培养 pPS 细胞。以胶原酶简单消化，收获 pPS 细胞，分解成小块，接种在非粘附性细胞培养板中，每隔数日饲喂聚集物，适当时间（常为 4-8 天）后收获。将收获的聚集物接种在固体基质上培养一段时间，使聚集物中的细胞采取心肌细胞表型。一般讲分化总时间至少 8 天，可能至少 10 或 12 天。

[0091] 另外，可按分化方案培养细胞启动分化过程。能诱导 hES 细胞分化成为异质性细胞群的条件，包括加入视黄酸（RA）或二甲基亚砜（DMSO）到培养其中或将细胞从培养它们的常用胞外基质中撤出。见美国专利申请 60/312,740 和国际专利出版物 WO 01/51616。然而，要小心，因为某些情况下这些制剂可降低所获得的心肌细胞比率（实施例 6）。

[0092] 在某些情况下，在培养其中加入一种或多种“向心因子”有益。这些简单的因子可单独或联合增强心肌细胞类型细胞的增殖或存活，或抑制其它类型细胞生长。此作用可能是由于直接作用于心肌细胞本身或由于作用于另一类型细胞进而有利于心肌细胞形成。例如诱导外胚层或内胚层等同细胞形成的因子，或引起这些细胞产生其自身心肌增强元件的因子，所有均包括在向心因子的定义内。

[0093] 认为能诱导 pPS 细胞分化为中胚层细胞或促进进一步分化为心肌细胞系细胞的因子包括如下：

[0094] • 能影响 DNA 甲基化和改变心肌细胞相关基因表达的核苷类似物。

[0095] • TGF-β 配体（TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3 和下述 TGF-β 超家族其它成员），这些配体能结合 TGF-β 受体，激活 I 型和 II 型丝氨酸激酶并引起 Smad 效应器磷酸化。

[0096] • 形态发生素如活化素 A 和活化素 B(TGF-β 超家族的成员）

[0097] • 胰岛素样生长因子（例如 IGF11）

[0098] • 骨形态发生蛋白质（TGF-β 超家族的成员、以 BMP-2 和 BMP-4 为例）

[0099] • 成纤维细胞生长因子（以 bFGF、FGF-4 和 FGF-8 为例）和能激活胞液激酶和有丝分裂原活化的蛋白激酶（MAPK）的其它配体。

[0100] • 血小板衍生生长因子（以 PDGFβ 为例）

[0101] • 利尿钠因子，如前房利尿钠因子（ANF），脑利尿钠肽（BNP）

[0102] • 相关因子例如胰岛素，白血病抑制因子（LIF）上皮生长因子（EGF）TGFα 和 Oripto 基因的产物。

[0103] • 对相同受体有激动活性的特异性抗体

[0104] 或者可将所述细胞与分泌促进心肌细胞分化因子的细胞（如各种类型的内皮细胞）一起培育。

[0105] 如实施例 6 所述，可有效采用能影响 DNA 甲基化（从而影响基因表达）的核苷类似物来提高初步分化出现的心肌细胞系细胞的比率，例如，已发现在培养其中加入 5- 氮脱氧胞嘧啶增加了细胞群中收缩性细胞的频率和心肌 αMHC 的表达。在某些情况下仅通过此步骤富集，可增加细胞群的收缩性细胞约 1％至 3％以上。

[0106] 向心制剂的评价进一步见实施例 7 所述。向心制剂特别有效的组合包括采用形态发生素如活化素 A 和多种生长因子、例如在投入早期加入 TGF-β 和 IGF 家族的生长因子。可任选地添加其它向心素，例如一种或多种成纤维细胞生长因子，骨形态发生蛋白质和血小板衍生生长因子。

[0107] 在精心思考本发明时，发现在体外分化末期删除胰岛素样生长因子 11(IGF11) 和相关分子事实上能提高心肌基因的表达水平。在无关研究中发现 IGF11 可减少成纤维细胞的 GSD3β 水平 (Scalia 等，J.Cell.Bilchem.82 :610,2001)。IGF11 可能加强培养液中存在的或细胞分泌的 Wnt 蛋白质的作用，Wnt 蛋白质能正常稳定胞质分子 β－连环蛋白（其含有转录因子 TCF 的一部分）并引起其核转位。这样就改变了多个基因的转录活性。缺乏 Wnt 时，激酶 GSK3β 磷酸化 β－连环蛋白使其不稳定并将其保持在胞质中。

[0108] 由于 Wnt 激活剂像 IL-11 那样明显限制了心肌细胞的分化，据信用 Wnt 拮抗剂培养可提高 hES 细胞分化为心肌细胞的程序或比率。注射编码 DKK-1 或 Crescent（分泌蛋白，可结合和灭活 Wnt) 的合成性 mRNA(Schneider 等，Gene Dev.15 :304,2001)，或用编码 DKK-1 的逆转录病毒感染 (Marvin 等，Genes Dev 15 :316,2001)，可抑制 Wnt 的信号传递。或者提高激酶 GSK3β 的活性，例如将细胞与 IL-6 或糖皮质激素一起培育可抑制 Wnt 通路。

[0109] 当然，在本发明的分化方案中采用向心因子不一定总是需要了解其作用方式。这些化合物有效富集心肌细胞产生的组合方式和用量可凭经验，通过在培养环境中加入这类因子，然后依据以下列出的表型标志测定该化全物是否增加了细胞群中心肌细胞系细胞的数量来确定。

[0110] 已发现 pPS 衍生的心肌细胞可分成单细胞悬液分别用于再接种和扩增、富集、克隆和表型特征测定。实施例 2 说明了用胶原酶 B 溶液制备分离的单个心肌细胞。胶原酶 II 或胶原酶混合物如 Blendzyme IV(Roche) 也适合此项制备。解离后，将细胞接种在带小室的玻片上，在分化培养液中培养。重新培养的这种单个心脏细胞能存活并继续跳动。

[0111] 可通过例如机械分离或细胞分栋，进一步富集 pPS 衍生细胞悬液中具有所需特征的细胞。已发现采用适当技术进行密度分离可富集收缩性细胞，提高百分率约 20 倍。实施例 4 和 9 说明了等密度富集的心肌细胞群，可获得含有至少约 5％，约 20％，约 60％和可能 90％以上的心肌细胞系细胞群。本文所述的许多研究和治疗应用得益于所获心肌细胞的高比率，但通常不需要完全均一。

[0112] 启动分化后（和分离步骤之前或之后，如果采用分离方法时）可以在含心肌细胞富集制剂的环境中培养来提高心肌细胞系细胞的百分率。培养液中的或表面基质上的因子可通过促进心肌细胞系细胞增殖，或通过抑制其它类型组织的细胞生长（或引起凋亡）而促进所需类型细胞的生长。上列某些向心因子适用于此目的，某些已知有益于体内心肌细胞的化合物或其类似物也适合此目的，包括能形成高能磷酸键（如肌酸）的化合物、酰基运载体分子（如肉碱）和心肌细胞钙通道调节剂（如牛磺酸）。

[0113] 心肌细胞系细胞的特征鉴定

[0114] 用本发明技术获得的细胞可根据标准表型的数目特征鉴定。pPS 细胞系衍生的心肌细胞和前体细胞常具有其它来源心肌细胞的形态学特征。它们可能是纺锤形、园形、三角或多角形和具有免疫染色可检测的肌原纤维节结构的条纹特征（实施例 3)，它们可形成肌管样结构，当用电镜检查时显示典型的肌原纤维节和前房粒。

[0115] pPS 衍生的心肌细胞及其前体细胞通常具有至少一种以下心肌细胞的特异性标志：

[0116] • 心肌钙蛋白 I(cTnI)，它是肌钙蛋白复合物的一个亚基，提供调节横纹肌收缩的钙敏感分子开关。

[0117] • 心肌钙蛋白 T(cTnT)

[0118] • 前房利尿钠因子 (ANF)，一种发育中的心脏和胚胎心肌细胞中表达的激素，但在成熟时下调，认为是心肌细胞的一种良好标志，因为以高度特异性方式在心肌细胞中但不在骨骼肌细胞上表达。

[0119] 所述细胞通常还表达至少一种以下标志：

[0120] • 肌原纤维的肌球蛋白重链 (MHC)

[0121] • 肌联蛋白、原肌球蛋白、α - 肌动蛋白和结合蛋白

[0122] • GATA-4，一种在心脏中胚层中高表达和在发育中持续存在的转录因子，它能调节许多心肌基因在心脏发生中起重要作用。

[0123] •NKx2.5，早期小鼠胚胎发育心脏中胚层表达的一种转录因子。在发育心脏中持续存在。

[0124] •MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D，心脏中胚层表达的发育心脏中持续存在的转录因子

[0125] • N- 钙粘着蛋白，其介导了心肌细胞之间的粘附

[0126] • 间隙连接蛋白，它形成了心肌细胞之间的间隙连接

[0127] • β 1- 肾上腺素受体 (β 1-AR)

[0128] • 肌酸激酶 MB(CK-MB) 和肌球蛋白，二者在心肌梗塞后血清浓度升高心肌细胞及其前体细胞上可能阳性的其它标志包括 α - 心肌动蛋白，早期生长反应 -1 和细胞周期蛋白 D2。

[0129] 可采用任何适当的免疫技术检测这些组织特异性标志，例如流式免疫细胞化学或细胞表面标志的亲和吸附法，胞内或细胞表面标志的免疫细胞化学 (例如固定的细胞或组织切片)，细胞抽提物的免疫印染分析，和分泌到培养液中的细胞提取物或产物的酶联免疫试验。如果在标准的免疫细胞化学或流式细胞计数试验中可检测到明显量的抗体与某抗原结合，就说细胞表达的该抗原是抗体可检测到的。可任选地在该细胞固定后和任选地采用标记的第二抗体，或其它偶联物 (如生物素 - 亲和素偶联物) 来放大标记。

[0130] 组织特异性基因产物的表达也可用 Norther 印染分析，斑点杂交印染分析或用序列特异性引物以标准扩增方法进行逆转录酶引起的聚合酶链反应 (RT-PCR) 在 mRNA 水平上检测。参见美国专利 5,843,780 详细了解这些通用性技术。本文中列出的其它标志的序列资料可从公众数据库如 Gen Bank(URL www.ucbi.nlm.mih.gov :80/entrez) 获得。如果在细胞样品上按标准程序进行一项试验，在典型的受控制实验中产生清晰可辨的杂交或扩增产品，就说 mRNA 水平的表达是本文所述试验之一可检测的。如果蛋白质或 mRNA 水平检测到的组织特异性标志表达高于对照细胞，如未分化 pPS 细胞或其它无关类型细胞高至少 2 倍，宜 10 或 50 倍以上，就认为是阳性。

[0131] 一旦在细胞表面检测到所需表型的标志，可将它们用于免疫筛选，以诸如免疫淘选或抗体介导的荧光激活细胞选拣技术进一步富集该细胞群。

[0132] 在适当的环境中，pPS 衍生心肌细胞常显示自发性的周期性收缩活动，这意味着当培养在适当 Ca++ 浓度及电解质平衡的适合组织培养环境中时，可观察到这些细胞模越细胞一条轴的收缩，然后放松，无须在培养液中加入任何其它成分。收缩是周期性的，意味着收缩以每分大约 6-20 次之间，常常为大约 20-90 次之间的频率，有规律或无规律地重复（图 5），单个细胞本身可显示自发性的周期性收缩活性，或显示与组织中细胞聚集体或培养的细胞块中相邻的细胞协同的自发周期性收缩活动。

[0133] 可根据培养条件对收缩的性质和频率的影响，特征性分析细胞的收缩活性。能降低 Ca++ 浓度或干扰 Ca++ 的跨膜转运的化合物常常影响收缩活性。例如 L 型钙通道阻断剂盐酸地尔硫卓可以剂量依赖方式抑制收缩活性（图 5）。另一方面，肾上腺素受体激动剂如异丙肾上腺素和苯福林具有阳性变时作用。进一步特征鉴定细胞的功能特性可包括鉴定 Na^+、k^+ 和 Ca^{++} 通道。可通过膜片钳分析研究心肌细胞动作电势的电生理学，见 Igelmound 等，Pflugers Arch 437 :699，1999 ；Wobus 等，Ann. N. Y. Acad. Sci. 27 :752，1995 和 Doevendans 等，J. Mol. Cell Cardiol 32 :839，2000。

[0134] 功能特性分析研究提供了体外特征鉴定细胞及其前体细胞的方法，但对本文所述某些应用可能是不需要的。例如，富集了带有上述某些标志细胞的混合细胞群不是所有细胞都具有功能和电生理特性。如果将它们移植到受损伤的心脏组织可获得体内支持心功能所需的功能特性，或认为它们具有治疗价值。

[0135] 本发明的细胞群和分离的细胞如衍生于已建立的 pPS 细胞系，可特征鉴定为具有与其所衍生的细胞系相同的基因组。这意味着该 pPS 细胞和心肌细胞（如果该心肌细胞通过正常有丝分裂过程获自未分化细胞系）之间的染色体 DNA 相同性超过 90％。用重组方法导入一转基因（如 TERT）或敲除一内源基因的细胞仍可认为具有与其所衍生的细胞系相同的基因组，因为其保留了所有未经操作过的遗传元件。用标准技术如 DNA 指纹法，这两种细胞群可显示具有相同的基因组。或者通过观察细胞分裂期间保存的记录可确立这种关系。特征鉴定衍生自亲代细胞群的心肌细胞系细胞在几个方面有重要性，具体说，未分化细胞群可用于产生含共享基因组的其它细胞——另一批心肌细胞，或可用于治疗的其它类型细胞——例如可使病人预先耐受心脏异体移植的组织相容性类型的细胞群。

[0136] 对于治疗应用，常需要本发明的分化细胞群基本上不含有未分化的 pPS 细胞。清除该细胞群中未分化干细胞的一种方法是用一种载体转染它们。该载体中效应基因在可引起其在未分化细胞中优先表达的一种启动子控制下。适合的启动子包括 TERT 启动子和 OCT-4 启动子。该效应基因可直接裂解此细胞（例如编码毒素或凋亡介质的基因）。或者该效应基因能赋予细胞对外来制剂如抗体或前体药物毒性作用的敏感性。例子有单纯疱疹病毒胸苷激酶（tk）基因，它可引起表达它的细胞对更昔洛韦敏感。WO 98/14593(Morin 等）中提供了合适的 pTERT-tk 构建物。

[0137] 由于已证明可从 pPS 细胞产生心肌细胞及其前体细胞，读者可判断本文所述的分化方案是否适合自己的目的。例如，读者可通过在与获得本文所述细胞相当的试验条件下，培养 pPS 细胞或其衍生细胞和其它类型对照细胞（如原代人心肌细胞、肝细胞或成纤维细胞），然后比较所获细胞上述标志的表型，来轻松地测试这种培养条件的适合性。调整培养和细胞分离条件以改变具体成分，是这种培养方法正常预期的常规优化工作，不脱离本发明的思路。

[0138] 分化细胞的基因修饰

[0139] 在某些药物筛选和治疗应用中可能需要所述细胞具有复制能力和提供产生心肌细胞及其前体细胞贮备池的能力，本发明的细胞在其进展至限制性发育系细胞或终未分化细胞前后可任选地作端粒化处理以提高它们的复制能力，端粒化处理的 pPS 细胞可进入上述分化通路，或可端粒化直接处理分化细胞。

[0140] 端粒化处理的细胞通过用适当的载体转染或转导；同源重组或其它适当技术，在基因上修饰了它们，使它们表达端粒酶催化成分 (TERT)，该成分通常在一种异源启动子调控下，这增加了端粒酶的表达超过在内源启动子调控下的表达。特别适合的是人端粒酶 (hTETR) 的催化成分，在国际专利出版物 WO 98/14592 中有提供。在某些应用中也可采用其种族同源物如小鼠 TERT(WO 99/27113)。人细胞中端粒酶的转染和表达见 Bodnar 等，Science 279：349，1998 和 Jiang 和 Nat. Genet. 21：111，1999。在另一实施例中采用 hTERT 克隆 (WO 98/14592) 作为 hTERT 编码序列的来源，将其剪接入在 MPSV 启动子控制下的 PBBS 212 载体的 ECOR1 位点，或剪接入在 LTR 启动子控制下的商品化 pBABE 逆转录病毒载体的 EcoRI 位点。

[0141] 将用载体进行了基因修饰的分化或未分化 pPS 细胞，在含有 8-16 小时培养的上清液中培养，然后换入生长培养液中培养 1-2 天。用药物筛选试剂如嘌呤霉素、G418 或杀稻瘟素筛选基因已修饰的细胞，重新培养。然后通过 RT-PCR 端粒酶活性 (TRAP 试验)、hTERT 的免疫细胞化学染色或复制能力，评估它们的 hTERT 表达。下列试剂盒可从商品市场获得用于研究：TRAPege® XL 端粒酶检测试剂盒 (目录号 s7707；Intergen co Purchase NY) 和 TeloTAGGG 端粒酶 PCRELISAplus(目录号 2,013,89；Roche Diagnostics，Indianapolis IN)。也可用 FT-PCR 在 mRNA 水平上评价 TERT 表达。用于研究目的的商品化试剂有 LigheCycler Telo TAGA hTERT 定量试剂盒 (目录号 3,102,344；Roche Diagnostics)。可通过在支持增殖的条件下进一步培养来富集不断复制的集落，并用有限稀释法克隆具有所需表型的细胞。

[0142] 在本发明某些实施例中，使 pPS 细胞分化为心肌细胞前体细胞，然后作基因修饰来表达 TERT，在本发明其它实施例中，基因修饰 pPS 细胞来表达 TERT，然后分化为心肌细胞前体细胞或终末分化细胞。提高 TERT 表达的成功修饰可用 TRAP 试验来测定，或测定细胞的复制能力是否得到提高。

[0143] 取决于所用细胞，也可接受其它使细胞不死化的方法，如用编码 myc SV40 大 T 抗原或 MOT-2(美国专利 5,869,243，国际专利申请 WO 97/32972 和 WO 01/23555) 的 DNA 转化此细胞。当该细胞用于治疗目的时用致癌基因或致癌病毒转染不大适当。本发明应用中特别感兴趣的是端粒化的细胞，其优点是在例如药物筛选中和在给予病人分化细胞以加强心功能的治疗过程中，这些细胞可增殖和保持其核型。

[0144] 还可基因修饰本发明的细胞以提高它们参与组织修复的能力，或输送治疗基因至给药部位的能力。采用所需基因的已知编码序列设计一种载体将其与在分化细胞类型中有特异性或特异活性的启动子操作性连接。特别感兴趣的细胞是经基因修饰能表达一种或多种各类生长因子、向心因子如前房利尿钠因子、Cripto 和心脏转录调节因子如 GATA-4、Nkx2.5 和 MEF2-C 的细胞。在给药部位产生这些因子具有促进采纳功能性表型、增加被给药细胞的有益作用，或提高相邻于治疗部位的宿主细胞的增殖或活性。

[0145] 心肌细胞及其前体细胞的用途

[0146] 本发明提供了大量产生心肌细胞系细胞的方法，这些细胞群可用于许多重要的研究、开发和商业目的。

[0147] 本发明的细胞可用于制备一种才 cDNA 文库，该文库相对没有污染在其它细胞中优先表达的 cDNA。例如以 1000rpm 离心 5 分钟收集心肌细胞，然后用标准方法制备沉降细胞团的 mRNA(Sambrook 等，同上），经逆转录为 cDNA 后可除去该制备物中未分化 pPS 细胞、其它祖代细胞或心肌细胞或其它发育通路产生的末期细胞的 cDNA。

[0148] 本发明的分化细胞也可用于制备抗心肌细胞及其前体细胞标志的特异性抗体，给脊椎动物注射免疫原形式的本发明细胞可制备多克隆抗体。单克隆抗体的产生可参见标准参考文献，如美国专利 4,491,632、4,472,500 和 4,444,887 和酶学方法 73B：3(1981)。也可使免疫活性细胞或病毒颗粒文库与靶抗原接触和培养选出的阳性克隆来产生特异性抗体分子。见 Marks 等，New Eng. J. Med. 335：730，1996 和 McGuiness 等，Nature Biotechnol. 14：1449，1996。另一种方法是将随机 DNA 片段重组装入抗体编码区如欧洲专利申请 1,094,108A 中所述。

[0149] 通过采用本发明的特异性细胞作阳性筛选和采用具有更广泛分布的抗原的细胞（如具有其它表型的胚胎细胞后代）或成年心肌细胞作阴性筛选，可获得所需特性（抗体），这种抗体进而可用于鉴定或拯救混合细胞群中所需表型的心脏细胞，目的是在组织样品的免疫诊断中共同染色或分离终末分化的心肌细胞和其它系细胞的前体细胞。

[0150] 本发明的细胞令人感兴趣的还有可用于鉴定心特肌细胞特征性的转录物和新合成蛋白质的表达模式，可能有助于指导分化通路或促进细胞之间的相互作用。获得分化细胞的表达模式并与对照细胞系如未分化的 pPS 细胞、其它类型的定型前体细胞（如 pPS 细胞向其它种系分化）或终末分化细胞的模式相比较。

[0151] 用微阵列分析基因表达的综述见 Frifg 等 Science. 288：316，2000；MiceoarmyBiochip Technology，L Shi，www.Gene-Chips.com。可用阵列产生仪和 TM 扫描实行示范性方法。先扩增编码待分析标志序列的 cDNA 片段并直接点在载玻片上制备微阵列。为了比较两种感兴趣的细胞的 mRNA 制备物，将一制备物转变成 Cy3 标记的 cDNA，同时另一转变为 Cy5 标记的 cDNA。使这两种 cDNA 制备物同时与微阵列玻片杂交，然后洗涤除去非特异性结合。以适合各标记的波长扫描玻片，定量测定产生的荧光，结果表示为该阵列上各标志的 mRNA 的相对丰度。

[0152] 药物筛选

[0153] 本发明的心肌细胞可用于筛选能影响该细胞及其各种后代细胞特征的因素（如溶剂＼小分子药物、肽、寡核苷酸）或环境条件（如培养条件或操作）。

[0154] 在某些应用中，用 pPS 细胞（分化或未分化）筛选能促进其成熟为后期心肌细胞前体细胞或终未分化细胞或能促进这类细胞增殖和维持长期培养的因子。例如将候选的成熟因子或生长因子加入不同孔细胞中，然后按照进一步培养和应用这类细胞的标准，测定所产生的表型变化来测试这些因子。

[0155] 本发明的其它筛选应用涉及测试药物化合物对维持或修复心肌组织的作用，因为所设计的化合物对这类细胞具有药理作用或因为设计的化合物可能对此类组织具有不期望的副作用而可能进行这种筛选。可用本发明的前体细胞或终未分化细胞进行筛选。

[0156] 读者可参见标准教课书“药物研究的体外方法(In Vitro Methods inPharmacentical Research)”,Academic Press,1997 和美国专利 5,030,015。对候选药物组合物的评估通常包括将本发明的分化细胞与候选化合物(单独或再与其它药物组合)相混合。研究人员可测定这类细胞归因于该化合物的形态学、标志表型或功能活性的变化(与未处理细胞或用惰性化合物处理的细胞相比较),然后将该化合物的作用与所见变化相关联。

[0157] 可首先测定对细胞生命力、存活形态和某些标志和受体表达的影响来确定细胞毒性。某药物对染色体 DNA 的作用可通过测定与所述药物作用相一致的 DNA 合成或修复([^{3}H]- 胸苷或 BrdU 掺入,特别是在细胞周期的未计划时刻的掺入,或超过细胞复制所需水平)来确定。不良作用可能还包括罕见的姐妹染色体交换率(通过中期扩散测定)。读者可参见A.Vickers(药物研究的体外方法(In Vitro Methods inPharmacentical Research),Academic Press,1997,第 375-410 页)的进一步评述。

[0158] 对细胞功能的作用可用标准试验观察心肌细胞的表型或活力,例如细胞培养时或体内的标志表达、受体结合、收缩活性或电生理学来评估。也可测试候选药物对收缩活性的影响,例如是否提高或降低了收缩程序和频率。观察这种影响时可滴定化合物的浓度以确定有效剂量中位值 (ED_{50})。

[0159] 治疗应用

[0160] 本发明还提供应用心肌细胞及其前体细胞来提高由于心脏代谢功能先天性缺陷、疾病所引起的或严重创作所致的、必须的心肌组织维持和修复。

[0161] 为了确定细胞组合物是否适合治疗给药,可先在合适的动物模型中测试该细胞在一种水平上评估该细胞在体内存活和维持其表型的能力。将此细胞组合物给予免疫缺陷动物(如裸鼠或经化学方法或照射产生免疫缺陷的动物)重生长一段时间后,收集组织并评估 pPS 衍生细胞是否仍然存在。

[0162] 这可以通过给予能表达某可检测标记(如绿荧光蛋白或 β- 米乳糖苷酸)的细胞来进行,预先标记(如用 Brdo 或 [^{3}H]) 细胞,然后检测组成性细胞标志(如用人特异性抗体)。所给予细胞的存在和表型,可用免疫组化或采用人特异性抗体的 ELISA 评估,或用能导致人多核苷酸(根据公布的序列资料)特异性扩增的引物和杂交条件进行 RT-PCR 来评估。

[0163] 这种适合性还可通过评估因采用 pPS 衍生的心肌细胞治疗使心脏复原的程序来确定。已有许多动物模型用于这种测试。例如,可将预冷的铝捧接触左心室前壁表面,冻伤心脏 (Marry 等,J.Clin.Invest.98.2209,1996,Reinecke 等,Circulation100 :193,1999 ;美国专利 6,099,832)。对较大动物可将液氮中冷却的 30-50mm 铜园片探头置于左心室前壁约 20 分钟引起冻伤 (Chiu 等,Ann Thorac.Surg.60 :12,1995)。结扎左侧主冠动物可引起梗阻 (Li 等,J.Clin Invest.100 :1991,1997)。用本发明细胞制剂治疗损伤部位,用组织学方法检查心脏组织损伤区域是否存在此种细胞。可测定左心室舒张末期压力、产生的压力,压力上升速度和压力下降速度等参数来监测心功能。

[0164] 充分检测后,本发明的分化细胞可用于病人或需要这种治疗的其它对像的组织重建或再生。这些细胞给予的方式是使其移植或迁入所需组织部位并重建或再产生功能缺陷区域,可得到特殊装置将这些细胞直接给予心脏腔室、心包或心肌内部所需部位得以重建

心功能。

[0165] 这类治疗的用药指征包括各种急慢性心脏病，如冠心病、心肌病、先天性心血管缺损和充血性心力衰竭。治疗效果可按临床上接受的标准监测，如疤痕组织面积减少；疤痕组织重新长出血管；心绞痛频率和严重性减轻；产生的压力、收缩压、舒张末压力提高；Δ 压力 / Δ 时间、病人的运动和生活质量。

[0166] 本发明的心肌细胞可以药物组合物形式提供，该组合物包含人用的在充分灭菌条件下制备的等渗赋形剂。药物制剂的通用原则读者可参见“细胞治疗：干细胞移植、基因治疗和细胞免疫疗法 (Cell Therapy：Stem Cell Transplantation，GeneTherapy and Cellular Immunotherapy)”G.Morstyn&W.Sheridan 编，CambridgeUniversity Press，1996 和“造血干细胞疗法 (Hematopoietic Stem Cell Therapy)”E.D.Ball，JLister&P.Law，Churchill Livingstone，2000。该组合物的细胞赋形剂和相伴元件的筛选将按照给药途径和所用装置而定。此组合物也可含有或伴有能促进心肌细胞移植和功能活动的一种或多种其它成分。合适的成分包括能支持或促进心肌细胞粘附的基质蛋白或辅助性细胞类型特别是内皮细胞。

[0167] 该组合物任选地包装在适合的容器中，内有所用目的的说明书，如重建心肌细胞功能以改善心肌的某种异常。

[0168] 提供以下实施例作为进一步非限制性地阐明本发明的具体实施方式。

实施例

[0169] 实施例 1：胚胎干细胞的无饲养细胞增殖

[0170] 将已建立的未分化人胚胎干 (hES) 细胞维持在基本上无饲养细胞的培养环境中。

[0171] 采用标准方法 (WO 01/51616) 分离的原代小鼠胚胎成纤维细胞制备的条件培养液维持无饲养细胞培养。用无 Ca^{++}/Mg^{++}PBS 冲洗一次并在 1.5-2ml 的胰蛋白酶 / EDTA(Gibco) 中培育 5 分钟，收集 T150 瓶中的成纤维细胞。使成纤维细胞从瓶上脱下后，收集在 mEF 培养液 (DMEM+10％ FBS) 中，用 4000 拉德照射细胞，计数并以 5.5 万细胞 /cm^2 接种于 mEF 培养液中 (6 孔板每孔 52.5 万个细胞)。

[0172] 至少 4 小时后，用含 ES 培养液 (80％敲除 DMEM、Gibo BRL Rockville MD)20％敲除血清替代物 (Gibco)、1％非必须氨基酸 (Gibco)、1mML 谷氨酰胺 (Gibco)、0.1mMB 硫基乙醇 (Sigma St Louis MO) 添加有 4ng/ml 重组人碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF，Gibco) 的 SR 更换培养液。每平方厘米板表面积有 0.3-0.4 毫升培养液，此条件培养液加入 hES 培养前添加 4ng/ml 人 bFGF。

[0173] 培养 hES 细胞板的包被用Matrigel® (Becton-Dickinson.Bedford MA)，以冷 KODMEM 1 ： 30 稀释其贮存液按每孔 9.6 平方厘米 0.75-1.0 毫升分配，室温培育 1-4 小时或 4℃包被过夜。

[0174] 以 200U/ml 胶原酶 IV 37℃培育约 5-10 分钟传代 hES 培养物。刮下细胞然后在条件培养液中轻轻解离成小块接种在Matrigel®包被的板上，接种约一周后培养物铺满即可传代。这些条件下维持培养物 180 天以上，不断地显示 ES 样形态。将样品与用敲除 DMEM 稀释的抗 SSEA-4(1 ： 20)，Tra-1-60(1 ： 40) 和 Tra-1-81(1 ： 80) 第一抗体一起培育 37℃ 30 分钟进行免疫细胞化学检查，用热的敲除 DMEM 洗涤细胞并用 2％多聚甲醛固定 15

分钟，再用PBS洗涤，将细胞与含5％山羊血清的PBS室温培育30分钟，然后与FITC偶联山羊抗小鼠IgG(1 ： 125，Sigma)培育30分钟。洗涤细胞，用DAPI染色并封固。

[0175] 还检查了细胞的碱性磷酸酶（未分化ES细胞的一种标志）表达。在带小室玻片上培育细胞，用4％多聚甲醛固定5分钟。然后用PBS洗涤进行此项检查。然后将细胞与碱性磷酸酶底物(Vector Labe-ratories.Inc.Burlingame.CA)室温暗处培育1小时。用100％乙醇淋洗玻片2-5分钟然后封固。

[0176] 图1显示组化方法所检测到的hES细胞上标志表达。hES集落表达了SSEA-4、Tra-1-60、Tra-1-81和碱性磷酸酶，如在饲养层上的细胞所见，但不象集落间的分化细胞表达的那样。

[0177] 用逆转录酶PCR扩增检测了未分化细胞标志的表达。为了用放射活性相对定量测定各基因产物，按厂商说明书采用了Quantum RNA™ Alternate18S内部标准引物(Ambion.Austin.TX.USA)。简言之，检查了一特定引物对的扩增线性范围，然后用Alternate 18S引物：竞争者(competimers)的适当混合物共同扩增产生具有重叠线性范围的PCR产物。将Ampli Tag™(Roche)加入PCR反应之前，将此酶与TagStart™抗体(ProMega)按厂商说明书一起培育。在5％非变性聚丙烯酰胺凝胶上分析放射活性PCR反应，干燥并曝光磷成象屏(Molecular Dynamisc)12小时，用MolecularDynamics Strom860扫描此屏并用ImageQuant™软件定量测定条带强度。结果表示为掺入hERT或OCT-4条带中的放射活性比率，标准化至掺入18S条带的放射活性。该实验用的引物序列可在国际专利出版物WO 01/51616中找到。

[0178] 转录因子OCT-4正常表达于未分化的hES细胞并在分化时下调，维持在条件培养液中Matrigel®上的细胞表达了hERT或OCT-4。TRAP试验测到了端粒酶活性(Kim等，Science 266：2011，1977；Weinrich等，Nature Genetics17：498，1997)。维持在无饲养细胞培养环境中的细胞在培养180天后显示出端粒酶活性。

[0179] 无饲养细胞培养的未分化细胞的多能性，可通过悬浮培养4天形成胚胎样小体，然后在聚乌氨酸包被的板上培养7天来测定，免疫细胞化学显示染色模式与神经元和心肌细胞系细胞细胞相一致，并且细胞甲胎蛋白（内胚层的一种标志）染色阳性。还通过肌肉内注射SCID小鼠测试了未分化细胞产生端粒酶的能力。78-84天后切下产生的肿瘤，通过组织学分析鉴定到所有三个胚层衍生的细胞类型。

[0180] 实施例2：hES细胞分化成心肌细胞

[0181] 将hES细胞系：H1、H7、H9和H9.2(H9衍生的克隆系）先维持在饲养细胞上，然后在无饲养细胞条件下培养，如实施例1所述。每周用200U/ml胶原酶IV 37℃培育5-10分钟，然后按1 ： 3-1 ： 6比率，9万-17万细胞/cm^2接种在Matrigel®包被板上进行培养物传代，并维持在原代小鼠胚胎成纤维细胞产生的条件培养液中。

[0182] 图2（上图）显示分化性hES细胞成为心肌细胞的时间表。培养悬浮的hES细胞启动分化形成胚胎样小体，通过在1mg/ml胶原酶IV中37℃培育5-10分钟使hES细胞解离成小块，然后培养在分化培养液中形成聚集物。该分化培养液含80％敲除DMEM(KO-DMEM)(Gibco，BRL，Rockville MD)1mML-谷氨酰胺、0.1％mM β-琉基乙醇和1％非必须氨基酸原液(Bibco BRL Rockvi l l.MD)添加有20％胎牛血清。

[0183] 悬浮培养4天后，将胚胎样小体转移到明胶包被板或带小室玻片上，接种后EB贴

附在表面，增殖并分化为异质细胞群，分化第 8 天在培养物的各区域中观察到自发性收缩细胞。

[0184] 图 2（下图）显示随着细胞不断分化，接种胚胎样小体含搏动细胞的比率增加。长至 32 天培养物中可见到收缩性细胞。

[0185] 分化第 11-14 天用机械方法从生长的 EB 中分离出中搏动的心肌细胞，收集在含低钙培养液或 PBS 的 15ml 试管中，然后洗涤。测试了不同试剂包括胰蛋白酶、EDTA，胶原酶 IV 或 B 产生活心肌细胞单细胞悬液的能力。将细胞与胶原酶 B 溶液一起 37℃培育 60-120 分钟（取决于胶原酶活性）获得单个活的收缩性心肌细胞，重悬于 KB 培养液（85mM KCl，30mM K_2HPO_4 5mM $MgSO_4$、1mM EGTA、5mM 肌酸、20mM 葡萄糖、2mM Na_2ATP、5mM 丙酮酸和 20mM 牛磺酸、缓冲至 pH7.2）（Maltsev 等，Circ.Res，75：233，1994）。细胞在该培养液 37℃培养 15-30 分钟，解离然后接种于带小室玻片中，以分化培养。在传代培养后单个心肌细胞存活并不断跳动。

[0186] 测试了所有的 hES 细胞系，包括 H1、H7、H9、H9.1 和 H9.2，均具有产生搏动心肌细胞的能力，甚至在维持 50 次传代后（约 260 群双倍体）。

[0187] 实施例 3：心肌细胞的特征鉴定

[0188] 分析了实施例 2 制备的 hES 衍生细胞是否存在心肌细胞特征性的表型标志。

[0189] 如下进行 EB 生长培养物或解离的心肌细胞的免疫染色：用甲醇/丙酮（3：1）-20℃固定分化培养物 20 分钟，用 PBS 洗细胞 2 次，用 5％正常羊血清（NGS）PBS 封闭过夜，然后，室温与第一抗体（用第一抗体稀释缓冲液（Biomeda Corp.，FoterCity CA）作 1：20-1：800 稀释）一起培育 30-60 分钟、再洗涤细胞，用 DAP1 染色，用 Vectashield™（Vector Claboratories Inc.，Burl ingame CA）封固。在 Nikonlabphot™（装有落射荧光装置和 SPOT CCD 防冻照相机）上进行光学显微镜检查。

[0190] 第 15 天拍照 H9.2 细胞分化培养物中的各个收缩性中心，记录收缩性区域，然后固定培养物，对该培养物作心肌钙蛋白（cTnI）染色，与光学显微图相匹对，以确定 cTnI 染色阳性的收缩性区域的百分率。收缩性区域 100％ cTnI 染色阳性，而非搏动细胞中几乎没见染色。

[0191] 如下进行了 cTnI 表达的免疫印染：将未分化和分化细胞用裂解缓冲液裂解，在 10％ SDS-PAGE 中分离，然后转移到硝酸纤维膜（Schleichef&Schull）上，室温用含有 0.05％ Tween™20PBS（PBST）配的 5％脱脂牛奶封闭此膜 1 小时。然后将此膜与用 PBST 配的 1％脱脂牛奶作 1：8000 稀释的偶联了辣根过氧化物酶（Vector Laboratories Inc.，Burlingame CA）的马抗小鼠 IgG（H+L）抗体一起室温培育 1.5 小时。抗体结合的信号用 SuperSignal™West Pilo 化学系统（Pierce，Rockford.TN）检测。作为对照，探测了同一膜上的 β－肌动蛋白如下：先作 ECL 检测后用 PBS 洗涤此膜，曝光 Vector™-SG 底片约 5 分钟（Vector Laboratories Inc）然后再用抗 β－肌动蛋白（Sigma）单克隆抗体检测。

[0192] 图 3（上图）显示免疫印染分析的结果。含收缩性细胞的诸孔（泳道 2 和 3）有一条约 31kDa 的条带（分子量大小相应于人 cTnI），但未分化 hES 细胞（泳道 1）或不含收缩性细胞（泳道 4）的孔无此条带。所有泳道存在 β－肌动蛋白（蛋白质回收的标准）染色。

[0193] 用 LightCycler 进行了实时逆转录 PCR，为了相对定量测定 α MHC，按试剂盒说明将 RNA 样品和引物与 RT-PCR 反应混合物（LightCycler RNA AmplificationRit-Hybri

dization Probes,Roche Molecular Biochemicals) 混合。反应条件如下 :55℃逆转录 10 分钟,95℃变性 30 秒,扩增 45 轮 :95℃ 10 秒,60℃ 15 秒,72℃ 13 秒。用 LightCycler3 程序分析反应,相对 MHC 水平表示为各样品一式三份份应的 MHC 和 28S 的比率。

[0194] 图 3(下图) 显示了结果,分化 7 天后 α MHC 水平明显提高,但在未分化 hES 细胞或分化细胞早期中不能检测到。此后表达水平不断提高,与出现搏动细胞相一致。分化期间发现 hTERT 表达降低。

[0195] 用胶原酶 β 如实施例所述,将 hES 衍生的心肌细胞分离成单个细胞,检查分离的心肌细胞是否表达肌原纤维节肌球蛋白重链 (MHC)、肌联蛋白、原肌球蛋白、α - 活化素、结合蛋白、cTnI 和心肌钙蛋白 T(cTnT)。

[0196] 图 4 显示了结果,单个细胞和集落所有这些标志染色阳性,染色的单个心肌细胞为纺锤形、圆形和三角或多角形。可见肌原纤维节结构的条纹特征,此与肌肉功能所必须的收缩装置相一致。

[0197] GATA-4 是一种在心脏中胚层高表达的转录因子,在所有 cTnI 阳性细胞的核中观察到强的 GATA-4 免疫反应。免疫印染表明 GATA-4 在含收缩性细胞的分化 hES 细胞中强表达 (图 1 泳道 2 和 3),但在无收缩性细胞的分化培养物中检测不到 (图 1 泳道 4)。也可在未分化细胞中检测到弱信号 (泳道 1),这可能是由于自发性分化为内脏的内胚层,它也表达 GATA-4,或由于未分化细胞低水平表达 GATA-4。

[0198] 免疫细胞化学在所有 cTnI 阳性细胞的核中检测到 MEF2 心脏转录因子。心脏转录因子 NKx2.5 的半定量 RT-PCR(Xu 等, Dev Biol,196 :237,1998) 表明其在含搏动心肌细胞的培养物中高表达,但在未分化细胞中检测不到。粘附标志 N- 钙粘着蛋白和间隙连接标志连接蛋白 43 可在鉴定为 cTnI 或 MHC 表达的心肌细胞中检测到,但在周围非心肌细胞中测不到。此外,我们用抗 β1- 肾上腺素受体 (β1-AR) 和 cTnI 抗体染色了部分解离的细胞。表面标志的特异性染色表明这些细胞可通过基于这些标志的选拣技术进一步富集。

[0199] 肌酸激酶 MB(CK-MB) 和肌球蛋白也可通过 hES 衍生心肌细胞与 MHC 共染的免疫技术染色检测。认为 CK-MB 负责高能贮备,只存于肌细胞系细胞中。肌球蛋白是一种胞质氧结合蛋白,负责肌细胞中氧的贮备和扩散, CK-MB 和肌球蛋白二者可用于诊断急性心肌梗塞。在 cTnI 阳性细胞膜上观察到 β1 肾上腺素受体 (β1-AR) 的强免疫反应。

[0200] 前房利尿钠因子 (ANF) 在 hES 细胞分化期间上调,可用半定量 RT-PCR 检测。18% 的 cTnI 阳性细胞为 Ki-67(一种存在于活跃分裂细胞中但不存在于静止性 G0 细胞中的蛋白质) 双染色,表明表明该细胞仍有增殖能力。

[0201] 综合在一起,这些资料表明 hES 衍生的心肌细胞具有与早期 (胚胎期) 心肌细胞表型相一致的适当基因表达模式。

[0202] 实施例 4“密度离心富集心肌细胞

[0203] 在不连续梯度 Percoll™(一种含有胶体 PVP 包被硅料的密度分离介质) 上进行密度分离进一步富集了心肌细胞。通过诱导悬浮的 hES 细胞分化 4 天,再在明脱离危险包被板上分化 15 天,产生了心肌细胞。用胶原酶 B37℃解离此细胞 2 小时,洗涤细胞重悬于分化培养液中。静置 5 分钟后将细胞悬液加到 40.5% Percoll™(Pharmacia 约 1.05g/ml) 层上,此层在 58.5% Percoll™(约 1.075g/ml) 之上。然后以 1500g 离心细胞 30 分钟。离心后收集 Percoll™ 上面的细胞 (组分 1) 和两层 Percoll™ 界面中的一层细胞 (组分 2)。洗

涤收集的细胞，重悬于分化培养液中，心每孔 10^4 个细胞接种于带小室玻片上。

[0204] 一周后，固定细胞并染色肌球蛋白重链 (MHC) 的表达（实施例 3），计数每组分一式三孔 30 个图象中的细胞来测定 MHC 阳性细胞百分比，以三孔细胞的均值 ± 标准差表示。在两组分中均看到搏动细胞，但组分 2 含有更多。结果见表 1。组分 2 中富集的比开始细胞群的高至少 20 倍。

[0205]

表 1 Percoll™分离 hES 衍生的心肌细胞

[0206]

组 分	细 胞 计 数	增 殖	搏 动 细 胞	MHC 染色百分比
1	1.92×10^6	+++	+	2.7 ± 3.3%
2	0.56×10^6	+	++	26.8 ± 41%

[0207] 实施例 5：药理学反应

[0208] 通过测定心肌细胞对心脏活性药物的变时性作用是否有适当反应，测定了 hES 衍生细胞的功能。

[0209] 药理学反应的研究

[0210] 如实施例 2 所述，将 EB 细胞接种在明胶包被 24 孔板上使其分化。采用分化第 15 天的收缩性心肌细胞检查药理学反应。在 37℃加热的倒置显微镜小室中计数维持在分蘖期经培养液中搏击动区域的收缩速度来测定自发搏动频率。然后在培养箱中培育细胞和测试化合物 20-30 分钟，并观察收缩速度。通过逐渐加入递增浓度的各种物质测定其剂量依赖性作用。数据以 10-20 个搏动区域测定的平均搏动速率 ± 标准差表示。

[0211] 为了证明这些细胞能表达心肌收缩中起关键作用的功能性 L 型钙通道，我们检查了 L 型钙通道阻断剂盐酸地尔硫卓对 hES 衍生心肌细胞搏动的影响。将分化细胞与不同浓度的此药一起培育并计算每期分钟搏动数。用培养液洗涤细胞，维持在分化培养液中 24 小时，观察恢复收缩力的时间。

[0212] 图 5(A) 显示盐酸地尔硫卓以浓度依赖性方式抑制了搏动速度。当用 10^{-5} 盐酸地尔硫卓处理细胞时，100％的搏动区仃止了收缩。去除此药后 24-48 小时收缩恢复至正常水平。Fisher 氏 PLSD 检验测定 $*P < 0.05$，$**P < 0.005$，$***P < 0.0005$ 有统计学意义。该观察表明 hES 衍生的心肌细胞具有功能性 L 钙通道。在另一独立实验中发现克仑特罗可提高 72 天细胞的搏动速率从每分钟 72 跳到每分钟 98 跳 (1-10nM，$P < 0.005$)。

[0213] 图 5B 和 5C 显示异丙肾上腺素（一种 β-肾上腺素受体激动剂）和苯福林（一种 α-肾上腺素受体激动剂）诱导的阳性变时性作用。图 5D 和 5E 显示磷酸二酯酶抑制齐 IBMX 和 β2-肾上腺素受体激动剂克仑特罗具有类似作用。因此 hES 衍生细胞能以心肌细胞系细胞相应的方式对心脏活性药物反应。

[0214] 实施例 6：向心因子作为分化诱导剂

[0215] 分化 1-4 天、4-6 天或 6-8 天时，用 5-氮脱氧胞嘧啶（一种能影响 DNA 甲基化，从而激活基因表达的胞嘧啶类似物）分化成为胚胎样 α MHC。Tagman™ 7700 序列测定系统采

纳了实施例 3 的 RT-PCR 试验，采用同样的引物，扩增 40 轮，9515 分钟，60℃ 1 分钟。采用 Tagman™ 核糖体 RNA 对照试剂试剂盒 (Applied Biosystems) 糖增 18S 核糖体 RNA 作为对照。用 AB1Prism™7700 序列测定系统分析反应。

[0216] 图 6 显示用 5- 氮脱氧胞嘧啶作为分化诱导剂的结果（均值 ±S. 测定一式三份的 α MHC 与 18S RNA 的比率）。数据显示第 6-8 天，1-10 μ M 的 5- 氮脱氧胞嘧啶显著提高了心肌 α MHC 表达，伴培养物搏动区比率增加。

[0217] 检查了其它制定诱导心肌细胞分化的能力，包括＝甲基亚砜 (DMSO) 和所有所式视黄酸 (RA)。用 0.5％ DMSO 处理 0-4 天的胚胎样小体产生的搏动区比未处理培养物少，用 0.8％或 1％ DMSO 处理的培养物缺乏搏动细胞，1.5％ DMSO 对细胞实际上有毒性。DMSO 处理与未处理相比，也引起 α MHC 表达明显降低。

[0218] 以 10^{-9} 和 10^{-5}M 之间剂量在分化 hES 培养物中加入视黄酸，0-4 天时 RA 对细胞有毒性，而 4-8 天、8-15 天或 4-15 天与未处理培养物比较搏动细胞不增加。

[0219] 因此 5- 氮脱氧胞嘧啶是一种有效的心肌细胞分化诱导剂，能增加细胞群中的心肌细胞比率。相反，DMSO 和视黄酸抑制了心肌细胞分化，即使这些化合物能从胚胎癌或胚胎干细胞产生心肌细胞 (Wobus 等，J. Mol. Cell. Cardiol. 29 :1525，1997 ；MeBurney 等，Nature 299 :165，1982)

[0220] 在直接分化方案中也实现了心肌细胞分化。解离 H7 系未分化 hES 细胞，直接接种在明胶包被上的，无须经过胚胎样小体阶段。在分化培养液 (80％ KO-DMEM，1mML- 谷氨酰胺，0.1mM β - 巯基乙醇，1％氨基酸和 20％胎牛血清）中培养接种细胞。第 14 天在用 10 μ M5- 氮脱氧胞嘧啶处理的培养物中，第 10-12 天或 12-14 天和更迟时间在所有培养物中发现了收缩性心肌细胞。

[0221] 实施例 7 ：向心因子的有效组合

[0222] 此实施例是加入的生长因子和 5- 氮脱氧胞嘧啶影响人 ES 细胞分化成为心肌细胞联合作用的研究。

[0223] 称为 H1 的人 ES 细胞系通常在标准的胚胎样小体方法后产生比 H4 和 H9 系较少的搏动性心肌细胞。为了提高心肌细胞产量，将一系列生长因子以及 5- 氮脱氧胞嘧啶加入分化性 H1 培养物中。

[0224] 原理如下 ：筛选第一组因子因为它们能在最初定型中提供内胚层功能。筛选第 2 组因为在后续发育中与第 1 组因子联合能提供内胚层功能。筛选第三组因子因为它们是心肌细胞延长培养的存活因子。典型的工作浓度定义为“中等”水平，低 4 倍和高 4 倍定义为“低”水平和“高”水平。浓度显示如下

[0225] 表 2 示范性向心因子

[0226]

生长因子	低浓度	中浓度	高浓度
组 I			
活化素 A	6.25ng/ml	25ng/ml	100ng/ml
TGFβ1	2.5ng/ml	10ng/ml	40ng/ml
IGFII	6.25 nM	25 nM	100 nM
组 II			
BMP4	1.25ng/ml	5ng/ml	20ng/ml
FGF4	12.5ng/ml	50ng/ml	200ng/ml
胰岛素	6.25ng/ml	25ng/ml	100ng/ml
bFGF	12.5ng/ml	50ng/ml	200ng/ml
pDGF-BB	12.5ng/ml	50ng/ml	200ng/ml
5-氮脱氧胞嘧啶	10μM	10μM	10μM
组 III			
1GFI	6.25nM	25nM	100nM
1GFII	6.25nM	25nM	100nM
LIF	5ng/ml	20ng/ml	80ng/ml
EGF	6.25ng/ml	25ng/ml	100ng/ml
pDGF-BB	0.9ng/ml	3.6ng/ml	14.4ng/ml
bFGF	2.5ng/ml	10ng/ml	40ng/ml
胰岛素	6.25nM	25nM	100nM

[0227] 图 7（上图）显示采用这些因子的时间表。第 48 代的 H1 细胞用胶原酶处理然后用机械方法以 5ml 移液管刮，从平皿中取出 H1 细胞用于产生胚胎样小体。将一孔 10 平方厘米的细胞转移到低粘附性板中的一个 10 平方厘米孔中，在 4ml 含 20% FBS 的 DMEM 中（含或不含其它因子）培养 4 天。4 天后将每份胚胎样小体悬液分成二等份接种在明胶包被的粘附性 6 孔组织培养板的 2 孔中。在 4ml 含 20% FBS 的 DMEM 中（含或不含其它因子）的培养粘附性胚胎样小体及其生长物 11 天。用光学显微镜观察每孔中搏动区的数目后，收获各孔的 RNA 进行定量 PCR 分析。

[0228] 在第 0 天（未分化细胞移入悬浮培养产生胚胎样小体的那一天）加入第一组因子直到第 8 天（胚胎样小体种入明胶包被孔后 4 天）。第 4 天（接种时间）加入第 2 组因子直到第 8 天。第 8 天加入第 3 组因子直到实验结束（第 15 天）。使一部分培养物接触 5- 氮脱氧胞嘧啶 48 小时（第 6-8 天）第 6.8.11 和 13 天用加或不加因子的新鲜培养液饲喂培养物。

[0229] 发现在对照培养物（维持在缺乏添加的生长因子 /5- 氮脱氧胞嘧啶中）或维持在加有生长因子但缺乏 5- 氮脱氧胞嘧啶的那些培养物中没观察到搏动区，但在加入生长因子和 5- 氮脱氧胞嘧啶混合物的所有孔中观察到搏动区。

[0230] 图 7（下图）显示定量 PCR 分析 (Tagman™) 心肌基因 α 肌球蛋白重链（α MHC）的表达相当于正常心脏 RNA 的水平。在接触生长因子 (GF) 加 5- 氮脱氧胞嘧啶的细胞中其表达水平高得多，测试的最低浓度足以获得较高的 α MHC 表达（比对照高 30 倍）。

[0231] 后续实验详细说明了这些结果。如上所述培养 H1 细胞（第 38 代）例外的是 :a) 只采用先前实验所用的最低浓度的生长因子和 b) 在一组样品中删去第 3 组因子处理，以实时 PCR 试验测定了相对于未分化细胞的标志表达水平。

[0232] 图8显示从方案中删去第3组因子处理导致α MHC的RNA表达量进一步提高3倍，还测到早期心肌细胞相关基因GATA-4表达的提高。相反在这些条件下没有特异性诱导内胚层相关基因HNF3b。与内胚层相关基因HNV3b相比对α MHC和GATA-4的作用是筛选性的。而用任何生长因子的组合但不用5-氮脱氧胞嘧啶时HNF3b的表达都提高了。

[0233] 这些结果表明第1组和第2组生长因子提高了心肌细胞特征性搏动细胞的比例。

[0234] 实施例8：在含有富集因子的培养液中培养

[0235] 通过在悬浮液中形成胚胎样小体5天，分化H9系hES细胞，并在分化培养液中Matrigel®包被板上进一步分化12天。用含200U/ml胶原酶II(Worthington)、0.2%胰蛋白酶(Invine Scientific)和0.02%葡萄糖的PBS溶液解离这些细胞，接种在分化培养液中Matrigel®包被板上，再培养14天。

[0236] 然后将细胞移入含10^{-7}M胰岛素(Sigma)、0.2%牛白蛋白(Sigma)、5mM肌酸(Sigma)、2mM肉碱和5mM牛磺酸(Sigma)的“CCT”培养液(用Gibco培养液199配)中。见Volz等，J.Mol.Cell Cardiol.23:161,1991和Li等，J.Tiss.Cult.Meth.15:147,1993。为了比较，将对照培养物维持在含20% FBS的标准分化培养液中。

[0237] 图9显示移入CCT培养液后搏动区的数目(分开的线表示研究过程中各孔分离后进行的观察)。在CCT培养液中细胞生长7-14天后显示搏动区数目增加，这表明肌酸、肉碱和牛磺酸分别或联合作用提高了培养物中心肌细胞系细胞的比例。

[0238] 实施例9：四相离心分离方法

[0239] 通过第4天形成胚胎样小体然后在明胶包被板上增殖(不用5-氮脱氧胞嘧啶和生长因子)，H7系细胞的hES细胞产生了心肌细胞。用胶原酶B解离细胞重悬于分化培养液中，然后将细胞悬液铺到不连续梯度Percoll™上，1500g离心30分钟。收集4个组分：I.上界面层；II.40.5%层；III.下界面层；IV.58.5%层。洗涤细胞，重悬于分化培养液中。将免疫染色的细胞接种在带小室的玻片上，每孔10000个细胞，培养2天或7天，然后固定并染色。

[0240] 结果见表3。计算各组分一式三孔30个图象中的MHC阳性细胞百分比，以3孔细胞的平均值±标准差表示。

[0241]

表3：Percoll™ 分离

组分	细胞计数	搏动细胞	MHC染色%	
			第2天	第7天
分离器		+	17 ± 4.4	15 ± 4
I	9.0×10^6	±	2.6 ±0.5	2.5 ± 3.0
II	1.6×10^6	+	4.5 ±1.5	2.4 ± 0.9
III	4.0×10^6	++	35.7 ±2.7	28.3 ± 9.4
IV	1.3×10^6	+++	69.0 ±5.0	52.2 ±14.5

[0242] 所有组分中均观察到搏动细胞，但组分III和IV含有最高百分比的搏动细胞。

[0243] 图 10 显示用 H1 系 hES 细胞进行类似方法的结果。在分化 22 天用 Percoll™ 分离细胞。实时 RT-PCR 分析检测的心肌 MHC 水平比分离前的细胞高得多。数据显示用 18S RNA 作为标准，组分 III 和 IV 按总转录比率而言具有最高水平的 MHC 表达。

[0244] 表 4 显示间接免疫细胞化学测定的细胞表型。

[0245]

表 4 分离的细胞群的特征鉴定

表位	心肌细胞系	非心肌细胞系
cTnI	++	-
心肌特异性 α/β MHC	++	-
心肌 βMHC	++	-
肌原纤维节 MHC	++	-
N-钙粘着蛋白	++	±
平滑肌肌动蛋白	++	亚组

[0246]

肌细胞生成素	-	-
甲胎蛋白	-	-
β-微管蛋白	-	-
Ki67	亚组	亚组
BrdU	亚组	亚组
SSEA-4	-	-
Tra-1-81	-	-

[0247] 密度梯度离心分离的心肌细胞群可通过 cTnI 和 MHC 染色鉴别。肌细胞生成素、甲胎蛋白或 β 微管蛋白 III 不染色表示缺乏骨骼肌、内胚层细胞和神经元。缺乏 SSEA-4 和 Tra-1-81 染色证实没有未分化的 hES 细胞。

[0248] 据报道 α - 平滑肌肌动蛋白 (SMA) 存在于胚胎样和胚胎心肌细胞中，但不存在于成熟心肌细胞中 (Leor 等，Circulation 97 ：1332，1996 ；Etzion 等，Mol. Cell. Cardiol. 33 ：1321，2001)。事实上该心肌细胞分化方案获得的所有 cTnI- 阳性细胞和 cTnI- 阴性细胞的一个亚组为 SMA 阳性，这提示它们可能处在早期并能增殖。

[0249] 将组分 III 和 IV 的细胞再接种培养 2 天，43±4% 的 sMHC 阳性细胞表达了 BrdU，表明它们处在细胞周期的 S 期。其他实验中发现 cTnI- 阳性细胞的一个亚组表达 Ki67。这些结果表明该细胞群中大约 20% 或 40% 的心肌细胞正经历活跃增殖。

[0250] 本领域技术人员可在不脱离本发明以下权利要求书所述的思路下对本文提供的组合物和方法进行有效的修改。

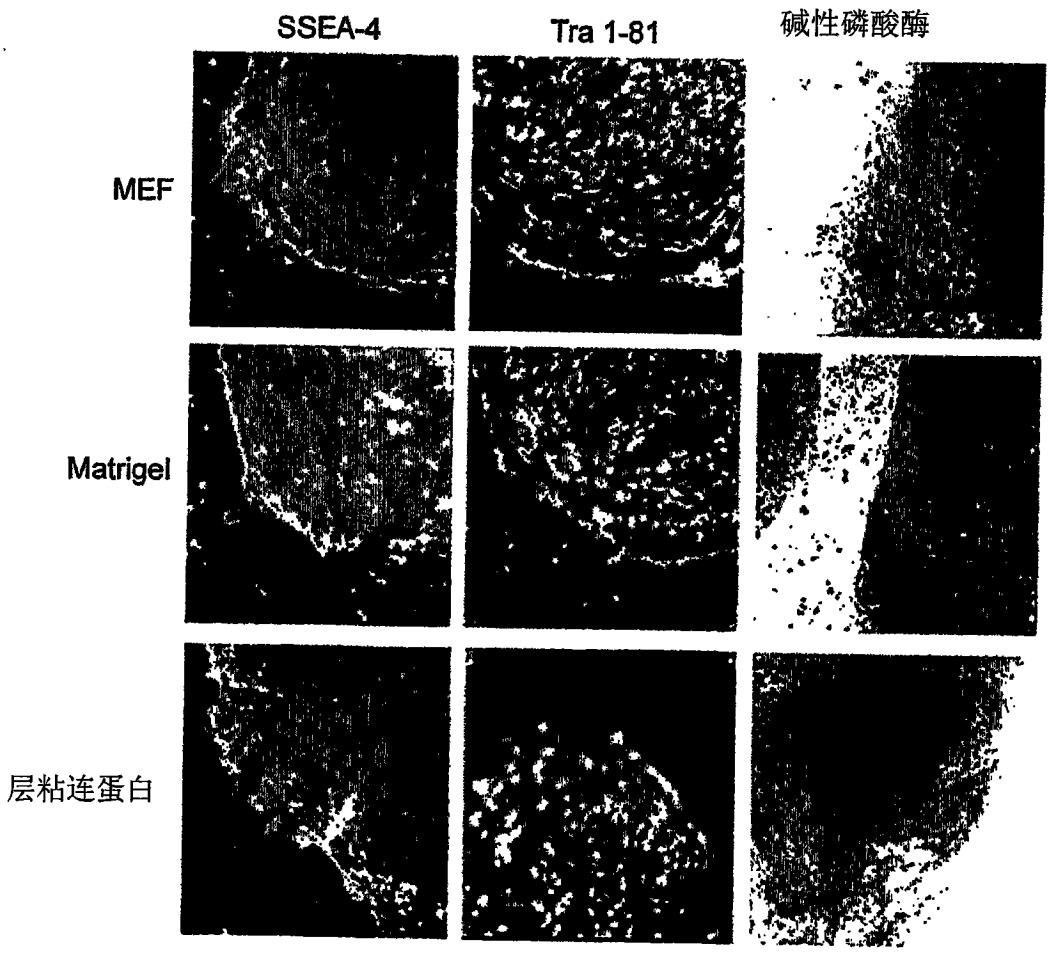


图 1

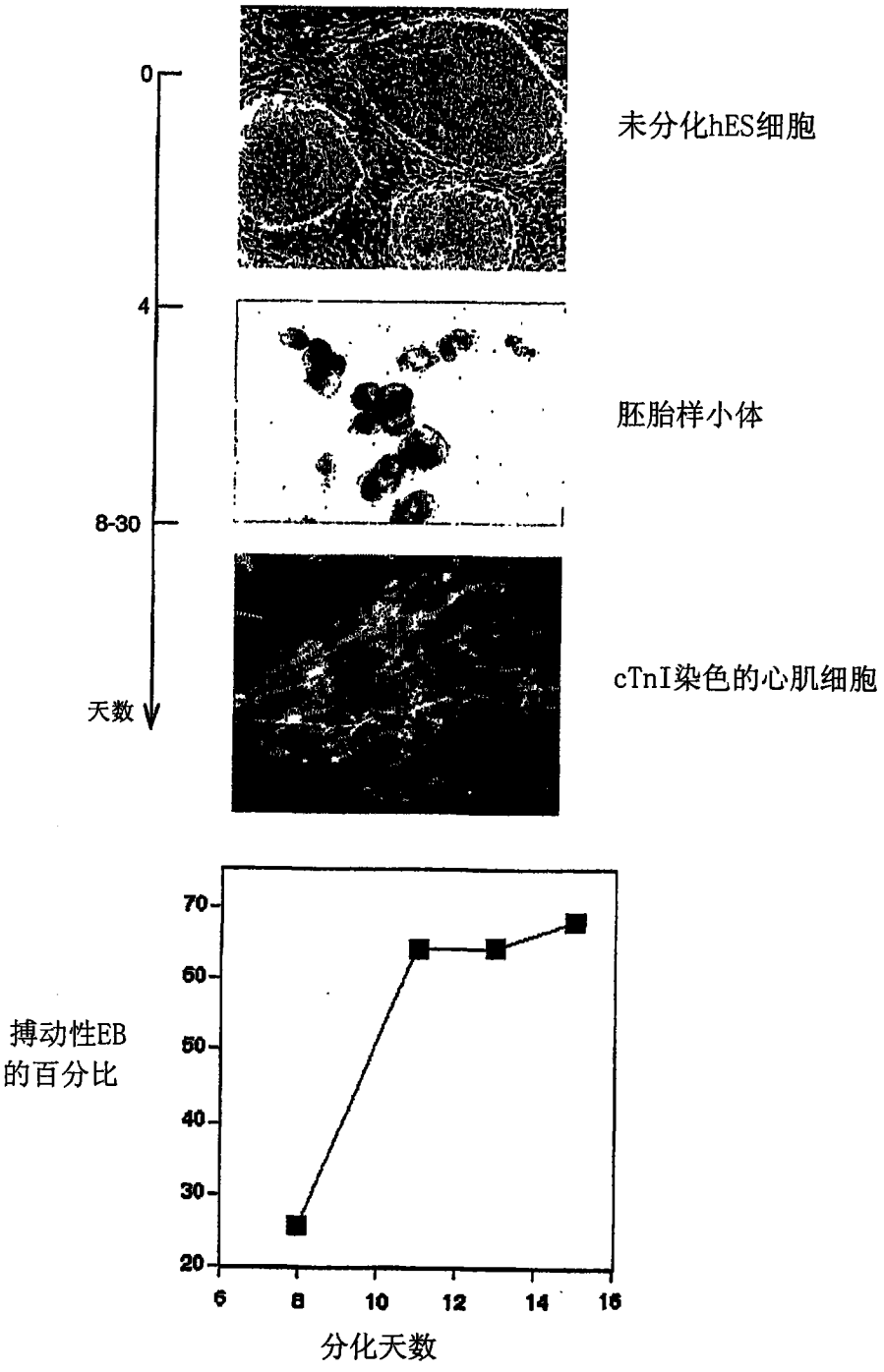
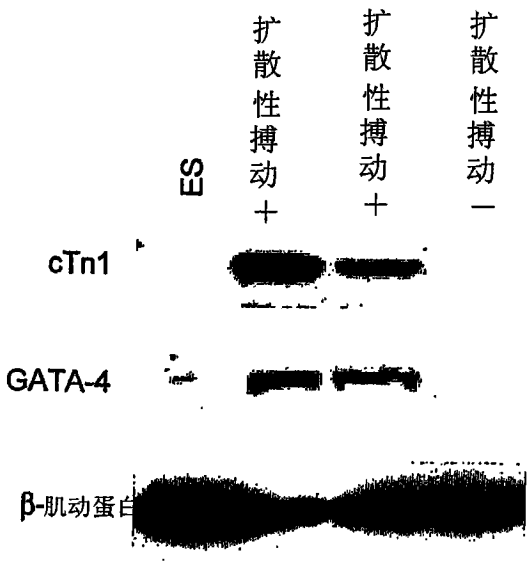

0
4
8-30
天数
未分化hES细胞
胚胎样小体
cTnI染色的心肌细胞
搏动性EB
的百分比
70
60
50
40
30
20
6
8
10
12
14
16
分化天数

图 2


ES
扩散性搏动+
扩散性搏动+
扩散性搏动−
cTn1
GATA-4
β-肌动蛋白

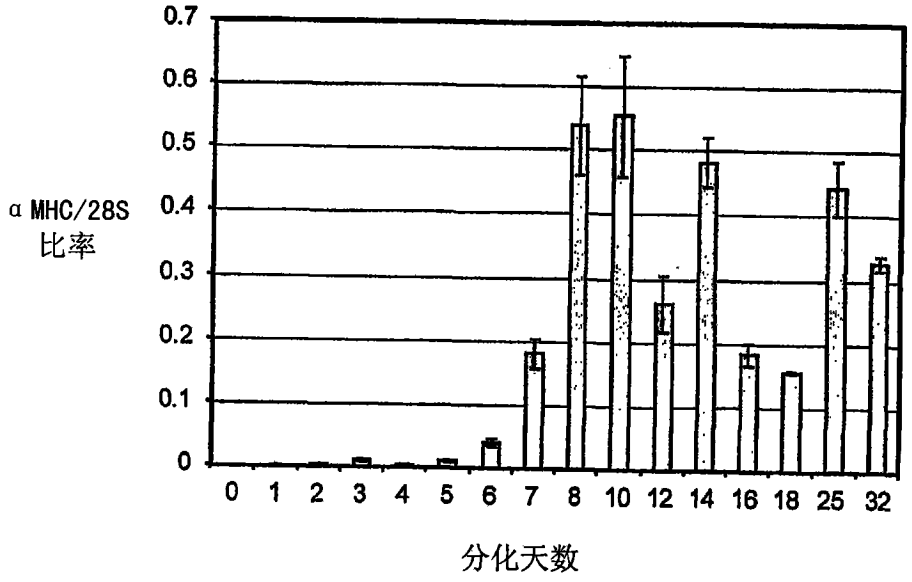

α MHC/28S
比率
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 10 12 14 16 18 25 32
分化天数

图 3

酶促分离hES衍生的心肌细胞

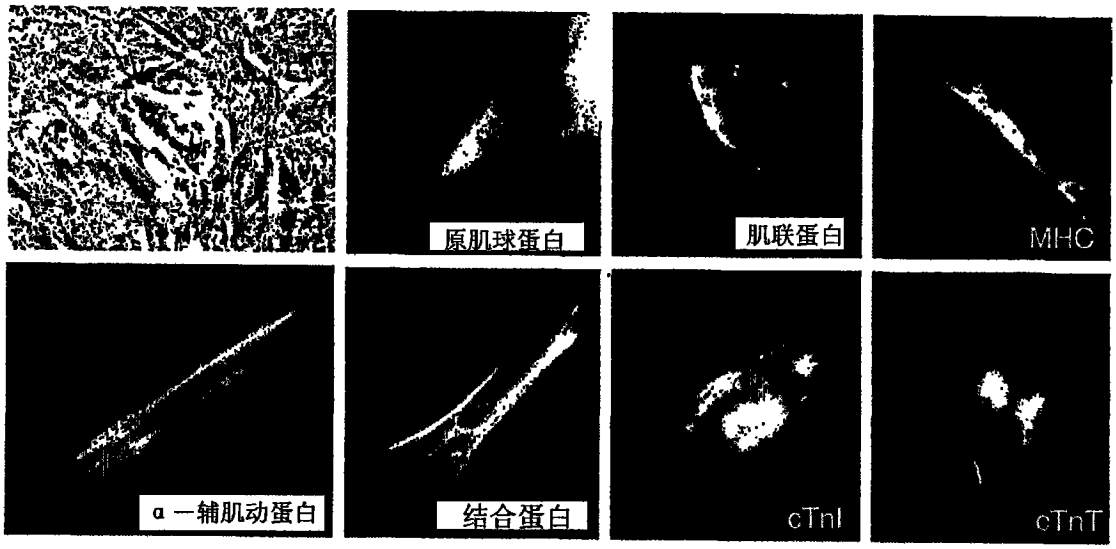


图 4

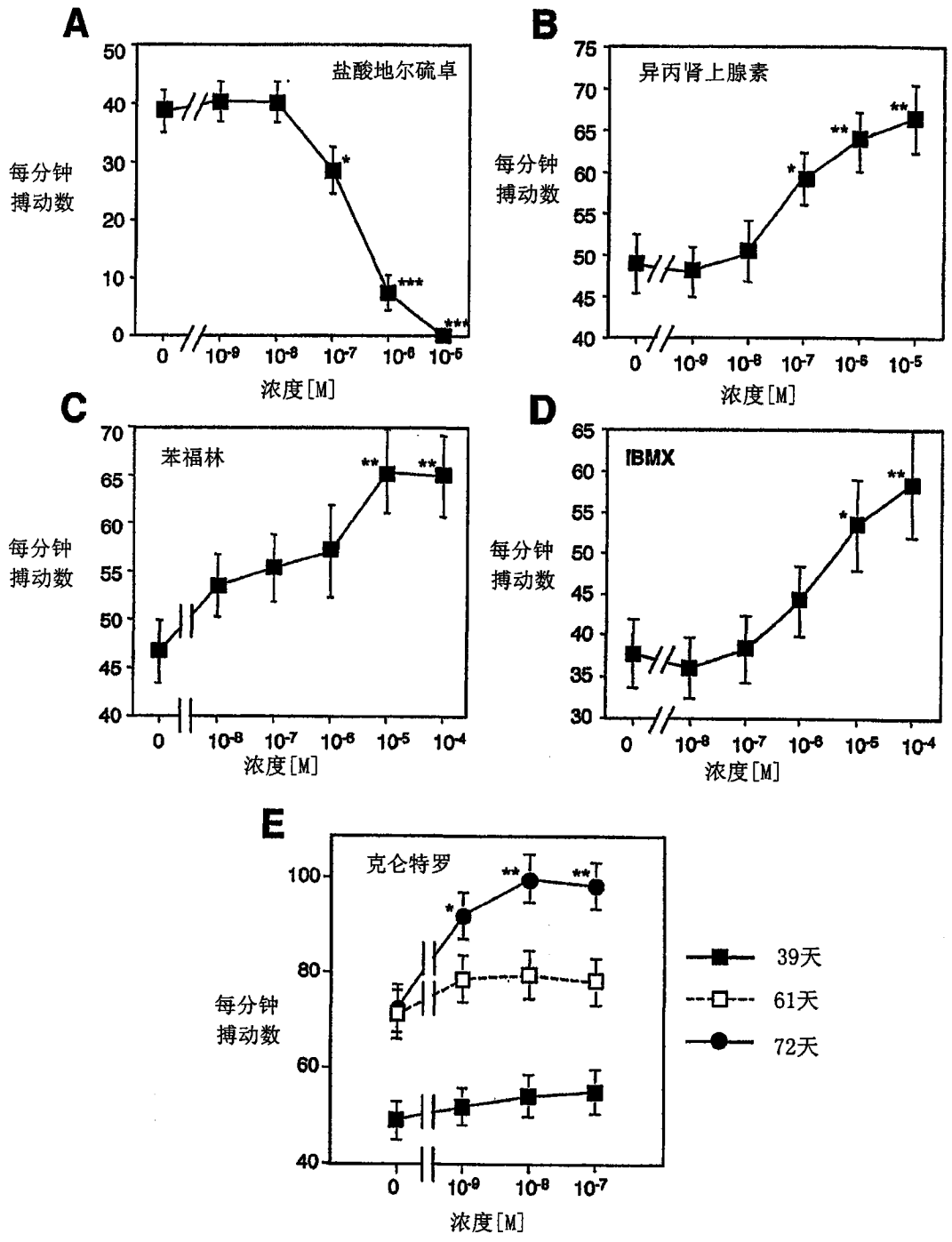

A
盐酸地尔硫卓
每分钟搏动数
浓度[M]
B
异丙肾上腺素
每分钟搏动数
浓度[M]
C
苯福林
每分钟搏动数
浓度[M]
D
IBMX
每分钟搏动数
浓度[M]
E
克仑特罗
每分钟搏动数
浓度[M]
39天
61天
72天

图 5

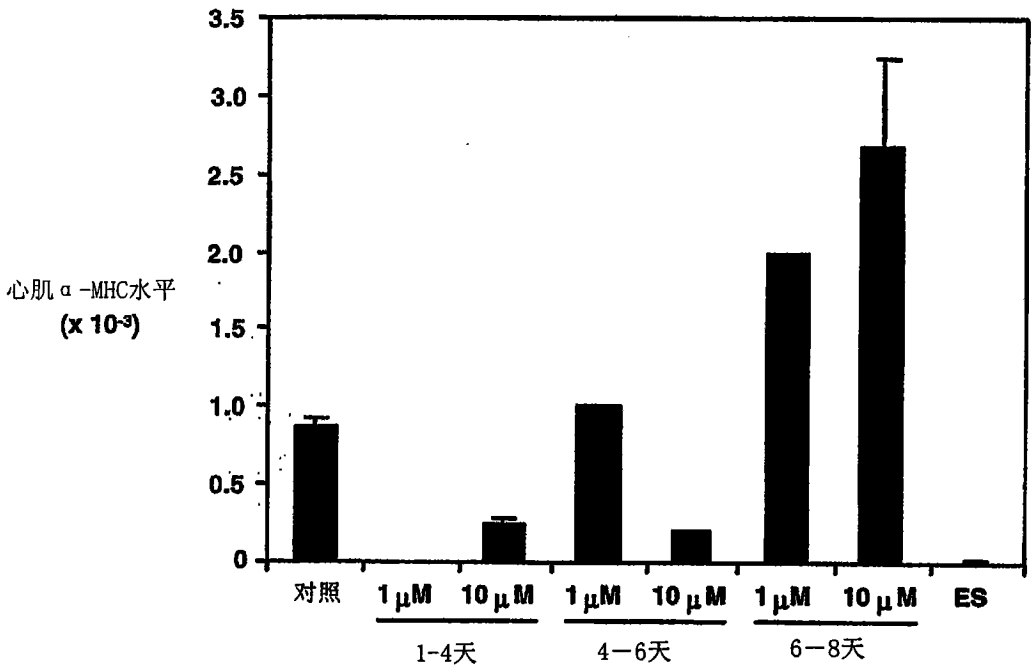
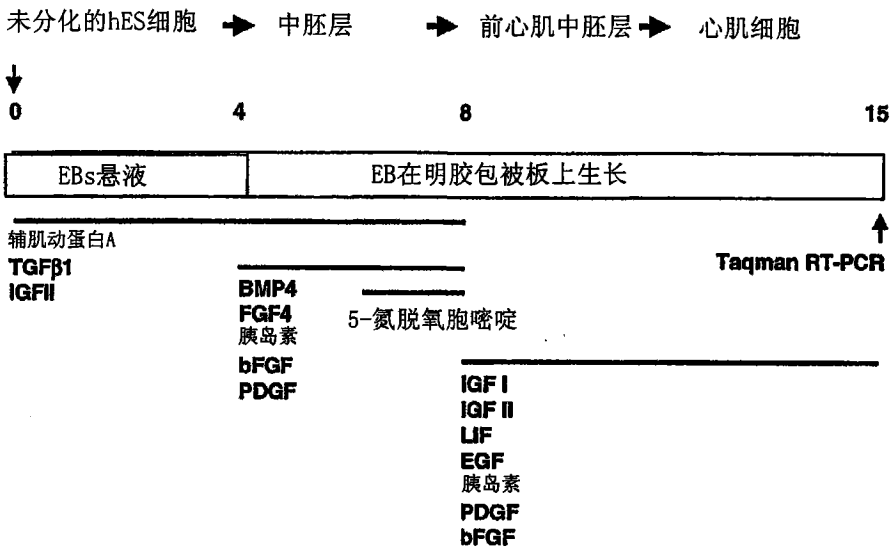

心肌α-MHC水平
(x 10-3)
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
对照
1μM
10μM
1μM
10μM
1μM
10μM
ES
1-4天
4—6天
6—8天
5-氮脱氧胞嘧啶处理

图 6


未分化的hES细胞
中胚层
前心肌中胚层
心肌细胞
0
4
8
15
EBs悬液
EB在明胶包被板上生长
辅肌动蛋白A
TGFβ1
IGFII
BMP4
FGF4
胰岛素
bFGF
PDGF
5-氮脱氧胞嘧啶
Taqman RT-PCR
IGF I
IGF II
LIF
EGF
胰岛素
PDGF
bFGF

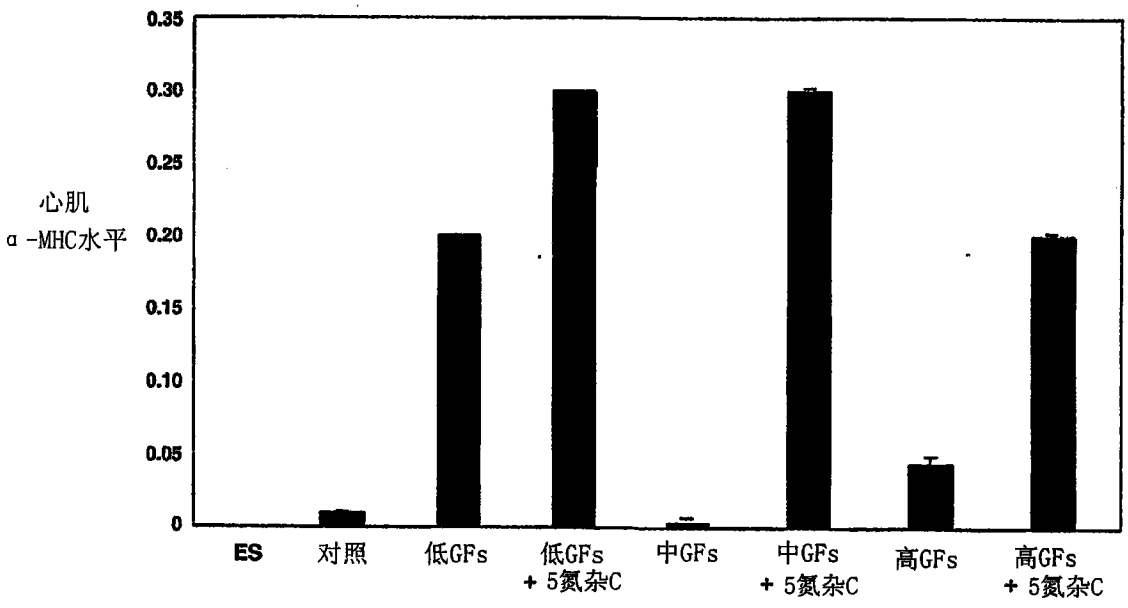

心肌
α-MHC水平
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0
ES
对照
低GFs
低GFs + 5氮杂C
中GFs
中GFs + 5氮杂C
高GFs
高GFs + 5氮杂C

图 7

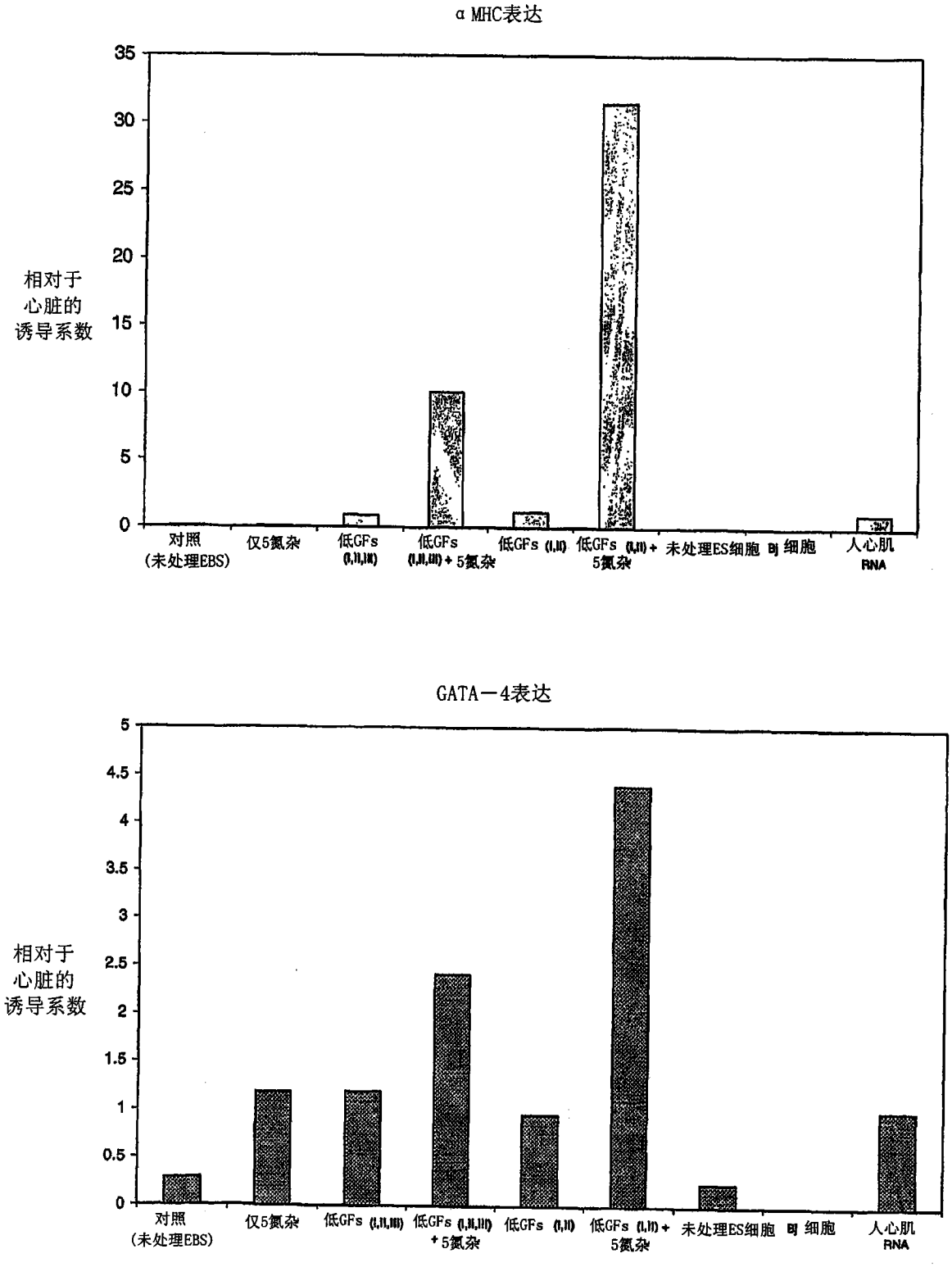

α MHC表达
相对于心脏的诱导系数
35
30
25
20
15
10
5
0
对照（未处理EBS）
仅5氮杂
低GFs (I,II,III)
低GFs (I,II,III) + 5氮杂
低GFs (I,II)
低GFs (I,II) + 5氮杂
未处理ES细胞
EB 细胞
人心肌 RNA
GATA－4表达
相对于心脏的诱导系数
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
对照（未处理EBS）
仅5氮杂
低GFs (I,II,III)
低GFs (I,II,III) + 5氮杂
低GFs (I,II)
低GFs (I,II) + 5氮杂
未处理ES细胞
EB 细胞
人心肌 RNA

图 8A

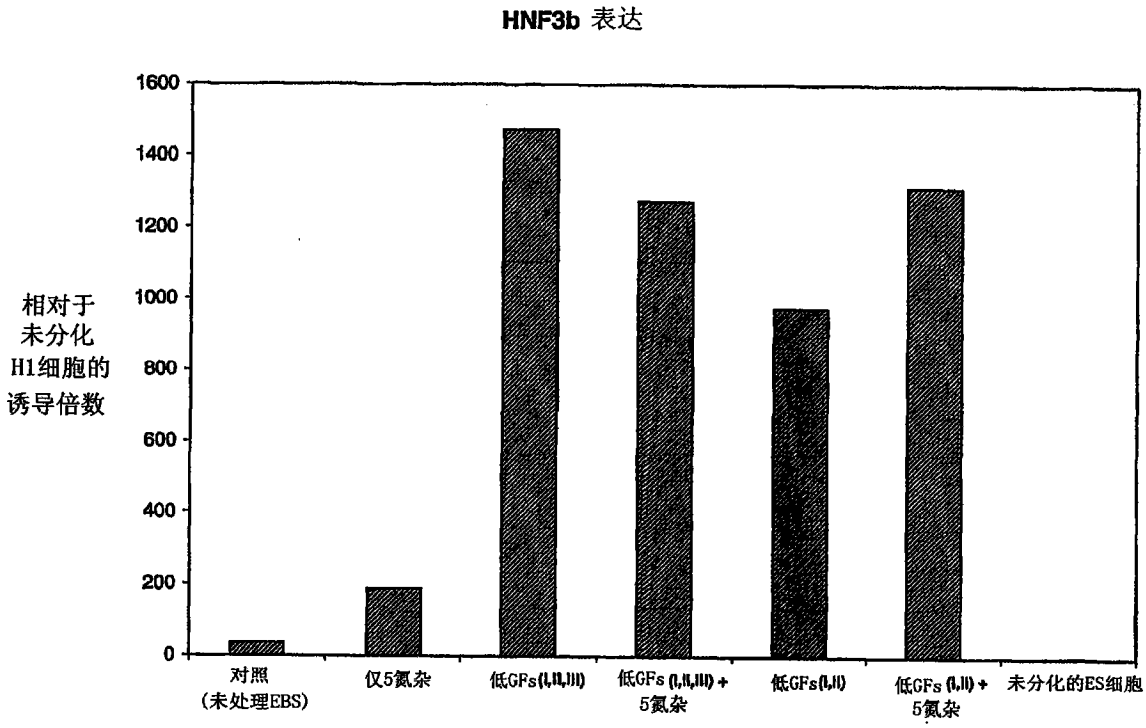
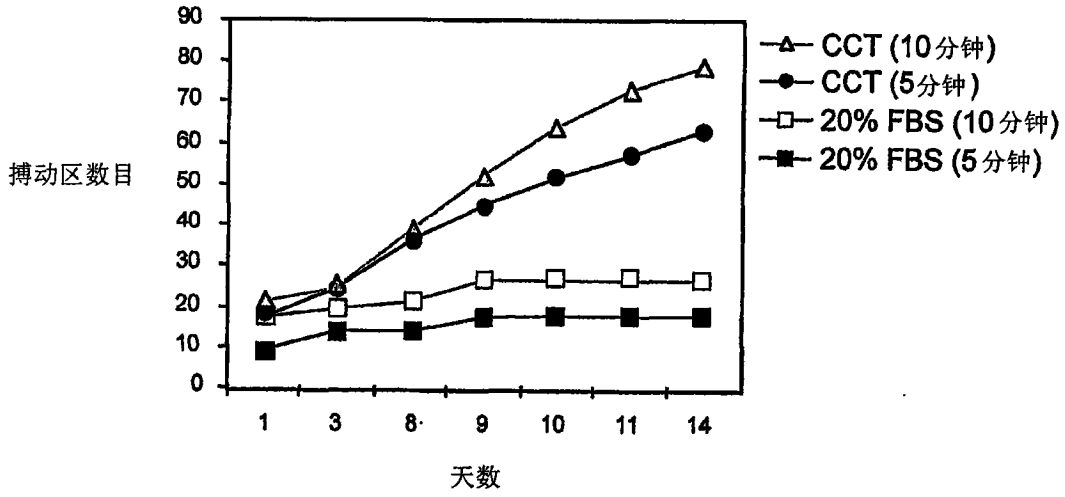

HNF3b 表达
相对于未分化H1细胞的诱导倍数
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
对照（未处理EBS）
仅5氮杂
低GFs(I,II,III)
低GFs (I,II,III) + 5氮杂
低GFs(I,II)
低GFs (I,II) + 5氮杂
未分化的ES细胞

图 8B


搏动区数目
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
3
8
9
10
11
14
天数
CCT (10分钟)
CCT (5分钟)
20% FBS (10分钟)
20% FBS (5分钟)

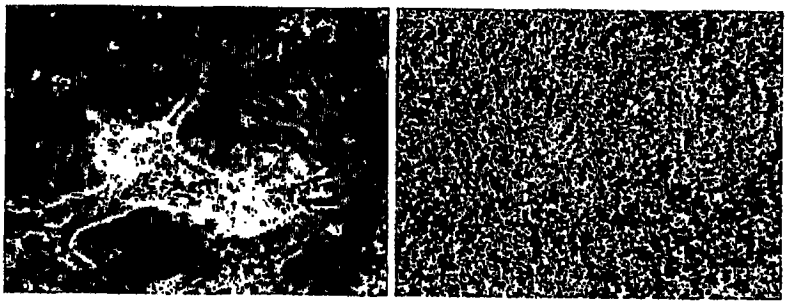

肌酸、肉碱和牛磺酸
20% FBS

图 9

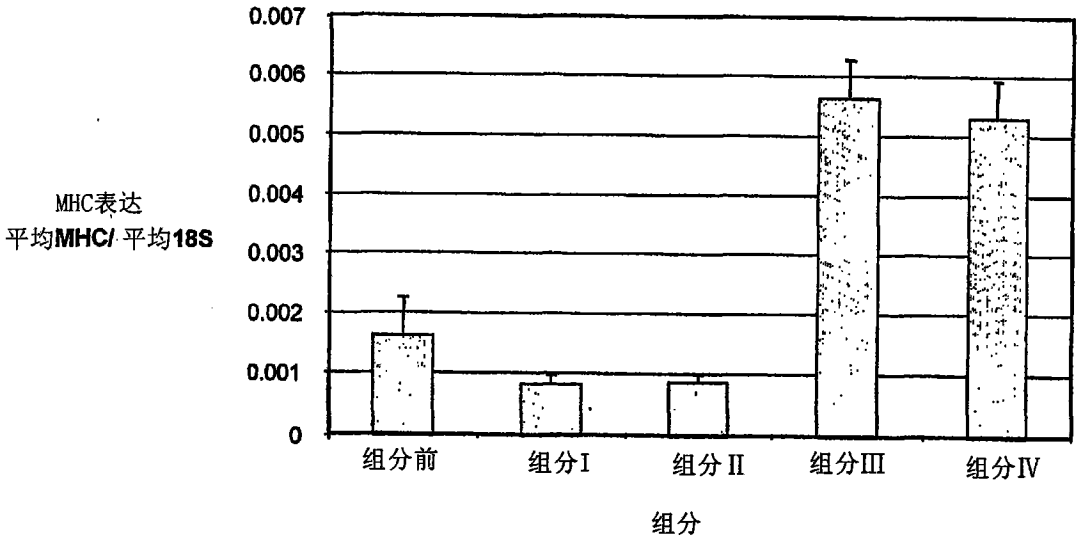

MHC表达
平均MHC/平均18S
0.007
0.006
0.005
0.004
0.003
0.002
0.001
0
组分前
组分I
组分 II
组分III
组分IV
组分

图 10