



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 101228264 B

(45)授权公告日 2017.12.26

(21)申请号 200680022866.6

(22)申请日 2006.06.20

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 101228264 A

(43)申请公布日 2008.07.23

(30)优先权数据
60/693,141 2005.06.22 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2007.12.24

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2006/024060 2006.06.20

(87)PCT国际申请的公布数据
W02007/002136 EN 2007.01.04

(73)专利权人 阿斯特利亚斯生物治疗股份公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 J·D·戈德 M·哈萨尼波

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 张宜红

(51)Int.Cl.
C12N 5/08(2006.01)
C12N 5/00(2006.01)

(56)对比文件
US 20020146678 A, 2002.10.10, 第43、44、61、71-73段、图3A.

US 20040005701 A, 2004.01.08, 第20、24段.

US 20050266554 A, 2005.12.01, 第306段.
Boheler et al..Differentiation of Pluripotent Embryonic Stem Cells Into Cardiomyocytes..《Circulation Research》.2002,第91卷189-201.

审查员 朱晓乐

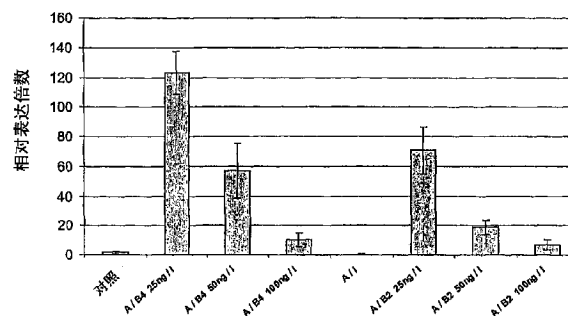
权利要求书1页 说明书19页 附图4页

(54)发明名称

使灵长类多能干细胞分化成心肌细胞系细胞

(57)摘要

本申请描述了使灵长类多能干细胞分化成心肌细胞系细胞的新方法。该方法采用某些生长因子依次培养灵长类多能干细胞以产生心肌细胞系细胞。在本发明的某些实施方式中,进一步富集这种依次培养产生的细胞群中的心肌细胞系细胞以产生较高百分比的那些细胞。



1. 一种从已建立的人胚胎干细胞系获得心肌细胞系细胞的方法,所述方法包括:
 - a) 所述已建立的人胚胎干细胞系在存在活化素A而不存在其他TGF- β 超家族因子的条件下在无血清确定成分培养基中培养约1天,不形成胚状体;和
 - b) 然后在BMP存在且不存在活化素A的条件下在无血清确定成分培养基中培养所述细胞,所述BMP是BMP-2或BMP-4。
2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述BMP是BMP-2。
3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述BMP是BMP-4。
4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述已建立的人胚胎干细胞系在存在活化素A时培养约1天,然后在存在BMP时培养约4天。
5. 如权利要求1所述的方法,其还包括在BMP培养步骤后,用不含活化素A或BMP的培养基进行的培养步骤。
6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,该进一步的培养步骤进行至少1周。
7. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,该进一步的培养步骤进行至少2周。
8. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,该进一步的培养步骤用含有IGF-I或IGF-II的培养基进行。
9. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,该进一步的培养步骤用含有IGF-I的培养基进行。
10. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法还包括在BMP培养步骤之后从培养物中收获细胞以及富集收获的细胞群中的心肌细胞系细胞。
11. 如权利要求10所述的方法,其特征在于,所述收获的细胞群通过珀可梯度富集。
12. 如权利要求10所述的方法,其特征在于,所述富集包括形成心脏小体。
13. 一种从已建立的人胚胎干细胞系获得富集的心肌细胞系细胞群的方法,所述方法依次包括以下步骤:
 - a) 在存在活化素A而不存在其他TGF- β 超家族因子的条件下用无血清确定成分培养基培养已建立的人胚胎干细胞系约1天,不形成胚状体;
 - b) 然后在存在BMP而不存在活化素A的条件下用无血清培养基培养所述细胞约4天,所述BMP是BMP-2或BMP-4;
 - c) 从培养物中收获细胞;和
 - d) 富集收获的细胞群中的心肌细胞系细胞。

使灵长类多能干细胞分化成心肌细胞系细胞

[0001] 相关申请的参考

[0002] 本申请要求2005年6月22日提交的USSN60/693,141的优先权。

发明领域

[0003] 本发明涉及在体外使灵长类多能干细胞分化成心肌细胞系细胞领域。

[0004] 发明背景

[0005] 再生医学(regenerative medicine)研究中主要的挑战在于开发出可有助于重建心脏功能的细胞组合物。据估计5名男性和女性中将近一人会患有某种形式的心血管疾病(《国家健康和营养检查调查III》(National Health and Nutrition Examination SurveyIII),1988-94,疾病控制中心和美国心脏联合会(Center of Disease Control and the American Heart Association))。普遍的病症包括冠心病(占人口的5%)、先天性心血管缺陷(0.5%)以及充血性心力衰竭(3%)。制药领域已生产出有助于限制心脏病所致损伤的小分子药物和生物化合物,但尚没有任何有助于再生受损组织的市售产品。

[0006] 为了开发出能进行心脏再生的细胞群,对数种不同的前沿课题进行了研究。在数个中心中正在进行采用自体骨髓衍生细胞进行心肌梗塞后治疗的临床试验(Perin等,Circulation107:2294,2003;Strauer等,Circulation106:1913,2002;Zeicher等,Circulation106:3009,2002;Tse等,Lancet361:47,2003;Stamm等,Lancet366:45,2003)。推测这类细胞具有清除功能而改善心脏组织的血液灌注。还进行了测试利用自体骨骼肌肌原细胞治疗心脏的临床试验(Menasche等,J.Am.Coll.Cardiol.41:1078,2003;Pagani等,J.Am.Coll.Cardiol.41:879,2003;Hagege等,Lancet361:491,2003)。然而,尚不清楚横纹肌细胞的收缩是否能与心律充分协调。

[0007] 一种更直接的方法是采用功能已定型为心肌细胞的细胞。已在动物模型中采用了同系基因型的新生或出生后心脏细胞以修复因持久性冠状动脉闭塞而引起的损伤(Reffelmann等,J.Mol.Cell Cardiol.35:607,2003;Yao等,J.Molec.Cell.Cardiol.35:607,2003)。因此,如果可将此类细胞用于人体治疗,它们可对局部缺血性心脏病进行十分有效的治疗。此外,心肌细胞可用来筛选诸如药物的化合物。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了从灵长类多能干细胞获得心肌细胞系细胞的方法。心肌细胞系细胞具有许多用途,其中包括但不限于:筛选潜在药物,筛选细胞毒性化学物质,以及治疗应用如在体外修复受损或患病的心脏。

[0010] 在本发明的某些实施方式中,从灵长类多能干细胞获得心肌细胞系细胞的方法依次包括以下步骤:在存在活化素但不存在BMP时培养灵长类多能干细胞;然后在存在BMP时培养所述细胞;以及从培养物收获所得收获的细胞。

[0011] 本发明还提供了获得富集的心肌细胞系细胞群的方法。某些实施方式中,那些方法依次包括以下步骤:在存在活化素但不存在BMP时培养灵长类多能干细胞;然后在存在BMP时培养该细胞;从培养基中收获所述细胞;以及富集收获的细胞群中的心肌细胞系细

胞。某些实施方式中,那些方法依次包括以下步骤:在存在活化素A但不存在BMP时将灵长类多能干细胞在无血清培养基中培养约1天;然后在存在BMP-4或BMP-2但不存在活化素时将所述细胞在无血清培养基中培养约4天;从培养基中收获所述细胞;以及富集收获的细胞群中的心肌细胞系细胞。

[0012] 在本发明的某些实施方式中,所述细胞在培养步骤中附于固体表面。某些实施方式中,所述细胞在使用BMP的培养步骤中能形成胚状体(embryoid body)。某些实施方式中,所述细胞在活化素和/或BMP培养步骤中以单细胞悬浮培养。

[0013] 某些实施方式中,所述细胞在存在活化素时培养1天或多天。某些实施方式中,所述细胞在存在BMP时培养4天或多天。某些实施方式中,所述活化素是活化素A。某些实施方式中,所述BMP是BMP-4或BMP-2。

[0014] 某些实施方式中,所述细胞在BMP培养步骤之后在不存在活化素或BMP时再额外培养一段时间。在那些实施方式中的一些,这种额外的培养步骤为2周或更长时间。在那些实施方式中的一些,该培养步骤包含IGF。在那些实施方式中的一些,所述IGF是IGF-I。

[0015] 在本发明的某些实施方式中,从分化处理后得到的细胞群中富集心肌细胞系细胞。在那些实施方式中的一些,用珀可梯度来富集心肌细胞系细胞。

[0016] 在本发明的某些实施方式中,所述收获的细胞有至少10%为 α -肌球蛋白重链(α MHC)阳性。在本发明的某些实施方式中,所述收获的细胞有至少10%为心肌钙蛋白I(cTnI)阳性)。在本发明的某些实施方式中,所述收获的细胞有至少25%为心肌钙蛋白I(cTnI)阳性)。

[0017] 在本发明的某些实施方式中,形成心脏小体(cardiac body)以富集和/或扩增心肌细胞系细胞群。在那些实施方式中的一些,该方法还包括将富集细胞群中成簇存在的细胞分成单个细胞提供;将成簇存在的细胞重悬于营养培养基;在营养培养基中重培养重悬的细胞;以及收集和洗涤重培养的细胞。

[0018] 本发明还提供了按照本发明的方法从灵长类多能干细胞分化的心肌细胞系细胞群。在本发明的某些实施方式中,灵长类多能干细胞向心肌细胞系细胞的分化发生于无血清培养基中。在本发明的某些实施方式中,灵长类多能干细胞向心肌细胞系细胞的分化发生于含有少于0.5%血清的培养基中。在本发明的某些实施方式中,灵长类多能干细胞向心肌细胞系细胞的分化发生于含有少于1%血清的培养基中。在本发明的某些实施方式中,灵长类多能干细胞向心肌细胞系细胞的分化发生于含有少于5%血清的培养基中。

[0019] 在本发明的某些实施方式中,在灵长类多能干细胞向心肌细胞系细胞分化的过程中所述细胞附于含有明胶、基质胶、层粘连蛋白、纤连蛋白和/或玻连蛋白中一种或多种的基材。

[0020] 在本发明的某些实施方式中,将灵长类多能干细胞在MEM-CM+bFGF中培养1-7天,然后进行活化素培养步骤。某些实施方式中,将灵长类多能干细胞在MEM-CM+bFGF中培养约6天,然后进行活化素培养步骤。某些实施方式中,当在存在活化素时培养细胞时采用培养基RPMI+IX B27。某些实施方式中,当在存在BMP时培养细胞时采用培养基RPMI+IX B27。某些实施方式中,当在存在活化素时培养细胞时采用培养基RPMI+N2。某些实施方式中,当在存在BMP时培养细胞时采用培养基RPMI+N2。

[0021] 附图简述

[0022] 图1:将H7细胞接种在涂有明胶和FBS的孔中,随后按照实施例1描述的方法进行分化。在最初加入活化素后的第24天用胰蛋白酶-EDTA解离培养物、固定、渗透、并用抗心肌钙蛋白I抗体染色。固定前,将细胞与EMA一起培育以区别活细胞(排斥EMA的细胞)和死细胞(掺入EMA的细胞)。用FACScalibur仪分析样品,不对死细胞进行分析。在该实验中,约54%的细胞在胰蛋白酶解离中存活下来;这些活细胞中,24-27%用心肌钙蛋白I特异性抗体标记测定为心肌细胞。在2张图中采用两种不同的门控方法(图1A:基于直方图,图1B:基于散射绘图);这两种方法得到的心肌细胞百分比类似。

[0023] 图2:将H7细胞接种在涂有基质胶的孔中,随后按照实施例2描述的方法进行分化。在最初加入活化素后的第21天用胰蛋白酶-EDTA解离培养物、固定、渗透、并用抗心肌钙蛋白I抗体染色。固定前,将细胞与EMA一起培育以区别活细胞(排斥EMA的细胞)和死细胞(掺入EMA的细胞)。用FACScalibur仪分析样品,不对死细胞进行分析。在该实验中,约69%的细胞在胰蛋白酶解离中存活下来;这些活细胞中,8.9%用心肌钙蛋白I特异性抗体标记测定为心肌细胞。

[0024] 图3显示了在由四种珀可组分中每一种形成的心脏小体中测得的cTnI的表达。未分化的hES细胞被用作阴性对照。培养作为富集的心脏小体的组分IV的细胞,其 α MHC或cTnI的表达提高了100至500倍。

[0025] 图4显示了采用不同浓度的BMP-2和BMP-4时hES细胞分化得到的细胞群中 α MHC的表达。

[0026] 定义

[0027] 术语“心肌细胞系细胞”通常指心肌细胞的前体细胞和成熟的心肌细胞。在本文中所提及的心肌细胞系细胞、前体细胞或心肌细胞可等同于处于心肌细胞个体发育任何阶段的细胞,如上文所定义并无限制,除非另有说明。如下文所述,心肌细胞系细胞可具有选自下组的一种或多种标记(有时至少具有3-5种标记):心肌钙蛋白I(cTnI)、心肌钙蛋白T(cTnT)、肌节肌球蛋白重链(MHC)、GATA-4、Nkx2.5、N-钙粘蛋白、 β 1-肾上腺素受体(β 1-AR)、ANF、MEF-2家族转录因子、肌酸激酶MB(CK-MB)、肌红蛋白或心房钠尿素(ANF)。

[0028] 术语“胚状体”是指灵长类多能干细胞的悬浮培养物或聚集物以非特定方式分化时产生的包含分化和部分分化细胞的异质细胞集落。

[0029] 文中,“灵长类多能干细胞”包括各种类型的胚胎细胞;其它灵长类的胚胎干细胞,如恒河猴干细胞(参见,例如,Thomson等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA92:7844,1995)、狨猴干细胞(参见,例如,Thomson等,Biol.Reprod.55:254,1996)。

[0030] 文中,“未分化的灵长类多能干细胞”指群体中的大部分灵长类多能干细胞及其衍生物显示出未分化细胞的形态学特征的细胞培养物。应理解,该群体中未分化细胞的集落将通常被周围部分分化的细胞包围

[0031] 文中,除了明显有其它要求,“胚胎干细胞”包括已经形成的带有hES细胞表型特征的细胞系,以及仍旧能够产生三个胚层中每一种的后代的这种细胞系的后代。原型“人胚胎干细胞”(hES细胞)由Thomson等人描述(Science282:1145,1998;美国专利6,200,806)。

[0032] 文中,“活化素”指一种多肽生长因子,它是转化生长因子- β (TGF- β)超家族中的一元。目前有四种已知的活化素:A、AB、B和C。

[0033] 文中,“骨形态发生蛋白(BMP)”指TGF- β 超家族的一种多肽生长因子。目前已知BMP

家族约有20名成员。出于本申请的目的,术语“BMP”不包括BMP-1。文中,“富集”指提高某组分在混合物中的水平。例如,在本发明的某些实施方式中,可通过提高某给定细胞群中心肌细胞系细胞的比例来富集该细胞群。

[0034] 文中,“心脏小体”指悬浮液中的灵长类多能干细胞衍生细胞的集落,其具有人心肌细胞系细胞的两个或多个特征。

[0035] 文中,“直接分化”指灵长类多能干细胞不形成作为中间体的胚状体而分化成富含特定组织类型细胞的后代细胞的过程。为了澄清,术语“直接分化”包括由于疏忽形成少量细胞聚集体的过程。

[0036] 文中,“基因改变的”、“转染的”或“基因转化的”指通过任何合适的人工操作方法将多核苷酸转移到细胞内的过程,或者其中的细胞是最初改变的细胞的后代并继承了该多核苷酸。该多核苷酸将通常包含编码感兴趣蛋白质的可转录序列,这样能使细胞以升高的水平表达该蛋白质,或者可包含编码能影响蛋白质的表达(由未修饰的细胞表达或者作为引入另一种多核苷酸序列的结果)但本身不编码蛋白质的分子(如siRNA或反义RNA)的序列。如果改变的细胞的后代具有相同的改变则这种基因改变被称作是“可继承的”。

[0037] 文中,“无血清”指所述组合物不含添加的血清的条件。

[0038] 文中,“饲养细胞”指不同组织类型的并通常有不同基因组的细胞,它们可促进和/或控制与它们一起培养的细胞的增殖和/或分化。例如,未分化的灵长类多能干细胞可与帮助维持未分化状态的饲养细胞共培养,而该过程中的未分化的灵长类多能干细胞可与引导向特定组织类型(例如,心肌细胞系细胞)分化的饲养物(feeder)共培养。

[0039] 文中,“无饲养物的”指所述组合物不含添加的饲养细胞的条件。为了澄清,术语“无饲养物的”中包括这种情况,即将灵长类多能干细胞从含有饲养物的培养物中传代到未添加饲养物的培养物中,即便所述第二种培养物中含有一些第一种培养物的饲养物。

[0040] 文中,“培养”指在体外维持和/或扩增细胞的过程。

[0041] 文中,“相同基因组”指灵长类多能干细胞的基因组和衍生自灵长类多能干细胞的分化细胞的基因组,并表示通过限制性片段长度多态性(“RFLP”)或SNP分析测得的灵长类多能干细胞和衍生细胞之间的染色体DNA相同性将超过90%。即便灵长类多能干细胞或衍生细胞已经发生了基因改变,那些细胞将被认为与衍生出它们的细胞或它们所衍生的细胞具有相同基因组,这是由于所有不可操作的基因元件都是保守的。

[0042] 文中,“基质胶”指BD基质胶™基膜基质,这是一种用Engelbreth-Holm-Swarm肿瘤细胞制造的并含有胞外基质组分如层粘连蛋白的商品化基础膜产品。基质胶购自BD公司(Becton, Dickinson and Company)(富兰克林湖(Franklin Lakes),纽约州)。

[0043] 文中,“RPMI”指RPMI培养基1640(因维曲根公司(Invitrogen),卡尔斯拜德(Carlsbad),加利福尼亚州)。

[0044] 发明详述

[0045] 通用技术-对于实施用于本发明的通用技术的进一步细节,实施者可参考细胞生物学、组织培养、胚胎学和心脏生理学领域的标准教科书和综述。

[0046] 关于组织和细胞培养以及胚胎干细胞,读者可参考《实施方法》(A practical approach)(E.J.Robertson编,IRL出版社有限公司(IRL Press Ltd.)1987);《小鼠发育技术指南》(Guide to Techniques in Mouse Development)(P.M.Wasserman等编,

学术出版社 (Academic Press) 1993);《胚胎干细胞的体外分化》(Embryonic Stem Cell differentiation in Vitro) (M.V.Wiles, Meth. Enzymol. 225:900, 1993);《胚胎干细胞的特性和用途:用于人类生物学和基因治疗的展望》(Properties and uses of embryonic stem cell: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy) (P.D.Rathjen等, Reprod. Fertil. Dev. 10:31, 1998; 以及 R.I. Freshney,《动物细胞的培养》(Culture of Animal Cells), 威利里斯公司 (Wiley-Liss), 纽约, 2000)。关于心脏细胞的培养, 标准的参考文献包括:《培养的心脏细胞》(The Heart Cell in Culture) (A. Pinson 编, CRC 出版社 (CRC Press) 1987)、《分离的成人心肌细胞》(Isolated Adult Cardiomyocytes) (第 I 和 II 卷, Piper 和 Isenberg 编, CRC 出版社 (CRC Press) 1989) 以及《心脏发育》(Heart Development) (Harvey 和 Rosenthal, 学术出版社 (Academic Press) 1998)。可在以下标准教科书中找到分子和细胞生物化学中的通用方法:《精编分子生物学实验指南》(Short Protocols in Molecular Biology), 第 4 版;《免疫学方法手册》(Immunology Methods Manual) (I. Lefkovits 编, 学术出版社 (Academic Press) 1997); 以及《细胞和组织培养:生物技术中的实验室操作》(Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology) (Doyle 和 Griffiths, 约翰威利公司 (John Wiley & Sons) 1998)。

[0047] 灵长类多能干细胞

[0048] 本发明提供了使灵长类多能干细胞分化成心肌细胞系细胞的方法。可用于本发明方法的灵长类多能干细胞包括但不限于胚胎干细胞。

[0049] 用于本发明的胚胎干细胞可选自胚胎干细胞系。已知大量胚胎干细胞系, 其中包括但不限于: H1、H7、H9、H13 或 H14 (参见 Thompson); hESBGN-01、hESBGN-02、hESBGN-03 (希腊雅典的 BG 公司 (BresaGen, Inc.)); HES-1、HES-2、HES-3、HES4、HES-5、HES-6 (获自新加坡的国际胚胎干细胞有限公司 (ES Cell International, Inc.)); HSF-1, HSF-6 (获自加州大学旧金山分校 (University of California at San Francisco)); I3、I3.2、I3.3、I4、I6、I6.2、J3、J3.2 (获自以色列海法的台科宁-以色列技术学院 (Technion-Israel Institute of Technology)); UCSF-1 和 UCSF-2 (Genbacev 等, Fertil. Steril. 83 (5): 1517-29, 2005); HUES1-17 系 (Cowan 等, NEJM 350 (13): 1353-56, 2004); 以及 ACT-14 系 (Klimanskaya 等, Lancet, 365 (9471): 1636-41, 2005)。

[0050] 某些实施方式中, 用于本发明的灵长类多能干细胞是以无饲养物的方式衍生出的 (参见, 例如, Klimanskaya 等, Lancet, 365 (9471): 1636-41 (2005))。

[0051] 灵长类多能干细胞的培养

[0052] 可采用各种基材、培养基和本领域已知的其它添加物和因子来培养灵长类多能干细胞。采用能促进增殖同时抑制分化的培养条件, 可使灵长类多能干细胞在培养物中连续繁殖。示例性的培养基的组成如下: 80% DMEM (例如吉比科公司 (Gibco) 的 Knock-Out DMEM)、20% 成分明确的胎牛血清 (FBS, Hyclone) 或血清替代物 (US2002/0076747A1, 生命技术有限公司 (Life Technologies Inc.))、1% 非必需氨基酸、1mM-谷氨酰胺和 0.1mMβ-巯基乙醇。

[0053] 某些实施方式中, 在饲养细胞层上培养灵长类多能干细胞。某些实施方式中, 那些饲养细胞来自人或小鼠。某些实施方式中, 可采用的人饲养细胞包括但不限于: 胎盘成纤维

细胞(参见,例如,Genbacev等,Fertil.Steril.83(5):1517-29,2005)、输卵管上皮细胞(参见,例如,Richards等,Nat.Biotechnol.,20:933-36,2002)、包皮成纤维细胞(参见,例如,Amit等,Biol.Reprod.68:2150-56,2003)、子宫内膜细胞(参见,例如,Lee等,Biol.Reprod.72(1):4249,2005)。

[0054] 某些实施方式中,胚胎干细胞在不添加饲养细胞时可维持在未分化状态(参见,例如,Rosler等,Dev.Dynam.229:259-274,2004)。无饲养物的培养物通常由含有促进细胞增殖但不发生分化的因子的营养培养基支持(参见,例如,美国专利No.6,800,480)。某些实施方式中,可将培养基与分泌这种因子的细胞一起培养从而在该培养基中引入这种因子,所述细胞如经过照射的(约4000拉德)原代小鼠胚胎成纤维细胞、端粒化的(telomerized)小鼠成纤维细胞、或衍生自灵长类多能干细胞的成纤维细胞样细胞(美国专利6,642,048)。可将饲养物接种于无血清培养基如添加有20%血清替代物和4ng/mL bFGF的KO DMEM中以条件化培养基。再添加bFGF1-2天进一步条件化此培养基,用于支持培养灵长类多能干细胞1-2天(参见,例如,W001/51616;Xu等,Nat.Biotechnol.19:971,2001)。

[0055] 或者,可采用新鲜或未经条件化的培养基,该培养基已补充有能促进未分化形式细胞增殖的附加因子(例如成纤维细胞生长因子或毛喉素)。例子为基础培养基,如X-VIVO™10(拜维塔可公司(Biowhittaker))或QBSF™-60(高级生物公司(QualityBiological Inc.)),添加了40-80ng/mL bFGF,并任选含有干细胞因子(15ng/mL)或Flt3配体(75ng/mL)(参见,例如,Xu等,干细胞23(3):315-23,2005)。这些培养基制剂的优点是所支持的细胞生长速率比其它系统快2-3倍(W003/020920)。

[0056] 例如,以 $>15,000$ 个细胞/ cm^2 (优选 $90,000-170,000/\text{cm}^2$)接种pPS。通常,在细胞完全分散前终止酶消化(即,用胶原蛋白酶IV处理约5分钟)。然后将含有约10到2,000个细胞的团块不经进一步分散直接种到基材上。或者,可在培养平板细胞生长达到铺满前,不用酶而通过在含有0.5mM EDTA的PBS溶液中孵育约5分钟来收获细胞,或者可通过机械方式例如用细移液管刮或分离从板上简单取出所需细胞。从培养容器中洗出后,不作进一步分散将细胞接种入新的培养基中。在其它例子中,在0.05%(重量/体积)胰蛋白酶(吉比科公司)和0.053mM EDTA的溶液中37℃孵育5-15分钟。然后取得板上残留的细胞,将细胞分散成含有单个细胞和小细胞集落的悬液,然后以 $50,000-200,000$ 个细胞/ cm^2 的密度进行接种以促进存活和限制分化。

[0057] 在显微镜下,灵长类多能干细胞显示出高核/胞质比、凸起的核仁和紧凑的集落与难于辨认的细胞连接。灵长类灵长类多能干细胞通常表达阶段特异性胚胎抗原(SSEA)3和4,以及可用命名为Tra-1-60和Tra-1-81的抗体检测的标记。未分化的人胚胎干细胞通常也表达转录因子Oct-3/4、Cripto、胃泌素释放肽(GRP)受体、足萼蛋白样蛋白(PODXL)、以及人端粒末端转移酶的逆转录酶(hTERT)(US2003/0224411A1),均以RT-PCR检测。

[0058] 灵长类多能干细胞向心肌细胞系细胞的分化

[0059] 尤其,本发明提供了通过首先在存在活化素时然后在存在BMP时培养灵长类多能干细胞而使灵长类多能干细胞分化成心肌细胞系细胞的方法。尽管含有活化素的培养步骤中不包括BMP,但随后含有BMP的培养步骤中可任选包含活化素。

[0060] 某些实施方式中,活化素在培养基中的浓度为10-200ng/ml,或25-100ng/ml,或50-100ng/ml。某些实施方式中,活化素在培养基中的浓度低于10ng/ml或高于200ng/ml。

[0061] 某些实施方式中,BMP在培养基中的浓度为10-200ng/ml,或25-100ng/ml,或50-100ng/ml。某些实施方式中,BMP在培养基中的浓度低于10ng/ml或高于200ng/ml。

[0062] 某些实施方式中,用于分化的活化素是活化素A、活化素B、活化素AB或活化素C。某些实施方式中,可采用一种以上的活化素。某些实施方式中,其它TGF β 超家族成员如TGF β 、结节(nodal)或左撇子(lefty)可代替本发明方法中的活化素或作为其补充。某些实施方式中,用于分化的BMP是BMP-2、BMP-4或BMP-7。某些实施方式中,所述BMP是除BMP-2、BMP-4或BMP-7之外的BMP(BMP-1除外)。某些实施方式中,可使用一种以上的BMP。

[0063] 某些实施方式中,在BMP步骤之后在不存在活化素和BMP时培养正在分化的细胞。在那些实施方式中的一些,该培养步骤包含IGF。在那些实施方式中的一些,IGF在培养基中的浓度为10-500ng/ml;或25-100ng/ml;或50-100ng/ml。某些实施方式中,所含IGF的浓度低于10ng/ml或高于500ng/ml。所述IGF可以是IGF-1或IGF-2。某些实施方式中,在本发明的方法中可用胰岛素代替IGF。

[0064] 在灵长类多能干细胞向心肌细胞系细胞分化的过程中,细胞在存在活化素、BMP或IGF时培养不同的指定时间。某些实施方式中,采用活化素的培养步骤的长度为12-36小时,或12小时-2天,或6小时-4天,或4小时-5天。某些实施方式中,采用活化素的培养步骤长于5天。

[0065] 某些实施方式中,采用BMP的培养步骤的长度为3-5天,或2-8天,或1-14天。某些实施方式中,采用BMP的培养步骤长于14天。

[0066] 某些实施方式中,采用IGF的培养步骤的长度为3-5天,或2-8天,或1天-4周。某些实施方式中,采用IGF的培养步骤长于4周。

[0067] 例如,在某些实施方式中,如实施例3所述通过珀可梯度收获并富集所得心肌细胞系细胞。

[0068] 某些实施方式中,灵长类多能干细胞可直接分化成心肌细胞系细胞。灵长类多能干细胞分化的范例传统上包括形成胚状体,使不同类型细胞之间串话(cross-talk),认为这可以使人联想到胚胎形成的方式促进组织形成。然而,不需要形成胚状体常具有优点,可使分化过程受到更好的控制,所得的细胞群倾向于更为均一(W001/51616;US2002/0151053A1)。

[0069] 直接分化技术的一个优点是无需血清或血清替代物来启动或支持心肌细胞分化过程,而这在其它方法中是常用的。相反,可配制含有人工营养补充物的培养基以支持分化细胞(如心肌细胞或神经元)的。例子为B27补充物、N2补充物和G5补充物(生命技术有限公司(Life Technologies Inc.)/吉比科公司(Gibco))。某些实施方式中,补充物包含营养素和辅助因子,如人胰岛素(500 μ g/L)、人转铁蛋白(5-10mg/mL)和硒(0.5 μ g/mL),还可含四甲烯二胺(1.5mg/L)、生物素(1 μ g/L)、氢化可的松(0.4 μ g/L)或孕酮(0.6 μ g/L)和/或低水平的促分裂原如EGF或FGF(1 μ g/L)。对于商品化规模生产和治疗人体的目的,去除非人动物衍生的成分尤为有利。

[0070] 某些实施方式中,分化步骤中使用的培养基是无血清的。某些实施方式中,分化步骤中使用的培养基含有少于0.25%血清,或少于0.5%血清,或少于1.0%血清,或少于2.0%血清,或少于5.0%血清,或少于10%血清。

[0071] 尽管直接分化方法有诸多优点,在本发明的某些实施方式中,可采用本发明的方

法使灵长类多能干细胞在除了活化素培养步骤之外的分化过程中的某些点形成胚状体进而分化成心肌细胞系细胞。可通过本领域已知的各种方法形成胚状体。

[0072] 某些实施方式中,在本发明的方法中,分化中的细胞被培养在基材上。可用于本发明的基材包括但不限于:胶原、层粘连蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白、透明质酸聚-L-赖氨酸-涂布的组织培养塑料,或者基质胶。

[0073] 在本发明的实践中,在培养细胞时可采用各种固体表面。那些固体表面包括但不限于:标准细胞培养平板如6孔、24孔、96孔或144孔平板。其它固体表面包括但不限于:微载体和平皿。某些实施方式中,所述微载体是珠。那些珠可采取各种形式,如带有正电荷基团以提高细胞附着的Cytodex葡聚糖微载体珠、涂布有明胶/胶原以便与细胞附着的珠、以及具有不同孔隙率以便与细胞附着的大孔微载体珠。Cytodex葡聚糖微载体珠、明胶涂布的微载体珠和大孔微载体珠是通过商业获得的(密苏里州圣路易斯(St. Louis)的西格马-奥尔德利希公司(Sigma-Aldrich)或明尼苏达州安阿伯(Ann Arbor)的孤山工程有限公司(Solohill Engineering Inc.))。某些实施方式中,所述珠的大小为90-200 μm 、面积为350-500 cm^2 。珠可由诸如但不限于玻璃或塑料的各种材料构成。某些实施方式中,可在搅拌釜生物反应器中使用平皿以便与细胞附着。平皿由例如新不伦瑞克科学有限公司(New Brunswick Scientific Co, Inc.) (爱迪逊(Edison), 纽约州) 出售。某些实施方式中,所述平皿是Fibra-cel平皿,其为聚酯/聚丙烯平皿。每克这些平皿可提供的表面积为1200 cm^2 。

[0074] 固体表面可由各种基材制成,其中包括但不限于玻璃或塑料,如聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚碳酸酯、聚四氟乙烯、聚酯薄膜或thermanox,在本发明的某些实施方式中,所述固体表面的形状可以是三维的。示例性的三维固体表面描述于,例如,US20050031598。

[0075] 某些实施方式中,所述细胞在本发明方法中处于单细胞悬液中。所述单细胞悬液可用各种方法形成,其中包括但不限于:旋转烧瓶培养,摇瓶培养,或发酵罐培养。可使用的发酵罐包括但不限于:Celligen Plus(新不伦瑞克科学有限公司(New Brunswick Scientific Co, Inc.), 爱迪逊(Edison), 纽约州), 以及STR或搅拌釜反应器(Stirred-Tank Reactor)(埃普利肯公司(Applikon Inc.), 福斯特城(Foster City), 加州)。某些实施方式中,所述生物反应器可用培养基连续灌注或以分批给料方式使用。生物反应器有不同大小,如2.2L、5L、7.5L、14L或20L。

[0076] 富集和扩增心肌细胞系细胞

[0077] 本发明提供了不经富集步骤而获得高纯度心肌细胞系细胞群的方法。然而,加入一个或多个富集步骤可产生纯度更加高的心肌细胞系细胞群。因此,本发明的方法可包括对通过本发明的分化步骤获得的心肌细胞系细胞进行富集和/或扩增的步骤。富集特定细胞类型的各种方法是本领域已知的,其中包括但不限于:机械分离、密度分离、细胞分选、磁力分选以及遗传选择技术(为了解细胞分离的全面讨论可参见Freshney,《动物细胞培养》(Culture of Animal Cells), 威利李斯公司(Wiley-Liss), 纽约, 2000, 第14章)。那些方法中的一些的例子在下面讨论。

[0078] 密度梯度

[0079] 某些实施方式中,心肌细胞系细胞是采用密度梯度介质通过密度梯度分离富集的,所述介质诸如但不限于:珀可(参见,例如,本文的实施例3和Xu等, Circ. Res. 91(6): 501-08, 2002), 菲可(法玛西亚公司(Pharmacia)), 甲泛葡胺(Nygaard), RediGrad (GE健康

护理公司 (GE Healthcare)) 和葡聚糖。

[0080] 细胞分选技术

[0081] 已有许多分选心肌细胞系细胞与非心肌细胞系细胞的细胞分选技术。那些细胞分选技术包括但不限于负免疫选择和正免疫选择。

[0082] 免疫选择是一类术语,其中包括许多由抗体或抗体样分子如凝集素或半抗原赋予选择系统特异性的技术。这种特异性的一个例子是抗体对特异性细胞表面抗原的亲合力。实践了两种常规类型的免疫选择技术。负免疫选择涉及消除异质群体中特定的组分亚群,如消除按照本文所述方法分化灵长类多能干细胞得到的细胞群中的非心肌细胞系细胞。相反,正免疫选择指直接选择并回收特定组分,如直接选择并回收按照本文所述方法分化的灵长类多能干细胞中的心肌细胞系细胞。各种类型的免疫选择可用于本发明的实践,其中包括但不限于:流式细胞术 (FACS)、免疫磁性技术、抗体柱、免疫沉淀和免疫淘选。

[0083] 心脏小体—某些实施方式中,可使心肌细胞系细胞生长成被称为心脏小体的细胞集落以进一步扩增或富集。

[0084] 首先,产生含有心肌细胞系细胞表型特征的细胞的细胞群,并任选地通过密度分离或其它技术对其进行富集。然后使细胞形成集落,去除悬液中的单细胞。通过使细胞集落沉降并吸出含有单细胞的上清液来完成这一步骤。在处理前,将细胞集落分开有时是有利的(例如,通过短时的胰蛋白酶消化和/或机械分散)。然后将细胞悬浮培养在低粘附性培养板中的新鲜培养基中(例子为如前所述的含有胎牛血清、血清替代物或CCT的培养基),使其重新聚集为“次级”心脏小体。然后在继续进行的培养中,可按照需要定期补充心肌细胞系细胞,使其保持大小为10-5000个细胞(通常50-1000个细胞)的细胞集落。

[0085] 经适宜的时间后(通常1-7天),收集培养细胞进行特征鉴定或用于药物筛选或药物制备。如果使细胞经历多轮去除单细胞和重培养细胞集落超过8天或更久,纯化效果会提高。每轮可任选地加入如下步骤:将细胞集落分散成单细胞或较小的细胞集落,以进一步扩增。可通过聚集悬浮细胞或通过细胞集落内增殖或采用这两种方法来形成较大的细胞集落。本发明的一个假设是在适宜的条件下心肌细胞系细胞倾向于形成这种细胞集落,而去除单细胞有助于去除其它细胞类型而提高同质性。

[0086] 可在分化过程中的任何时间,用心脏小体技术来扩增和/或富集细胞群中的心肌细胞。如下文中所示范的,可在密度分离预先富集步骤之后采用此技术。在完成本发明之前,没有预想到完成该技术具有如此好处。具体而言,当细胞培养7天后,通过实时PCR测得肌球蛋白重链表达提高了10-100倍。组合物中大部分的细胞集落显示出自发性收缩的活性,通常超过50%,当以所述的方式处理时,可能达到约80%和100%。

[0087] ES-分化的心肌细胞系细胞的特征鉴定

[0088] 可按照许多表型标准对本发明技术得到的心肌细胞系细胞进行特征鉴定。

[0089] 灵长类多能干细胞系衍生的心肌细胞和前体细胞通常具有其它来源心肌细胞的形态学特征。它们可为纺锤形、圆形、三角形或多角形,且用免疫染色法检测可显示出肌节结构的横纹特征(图1)。它们可形成粘附于基材或漂浮在悬液中的扁平细胞层或聚集物,用电镜观察时显示典型的肌节和心房颗粒(atrial granule)。

[0090] 在适宜的条件下,灵长类多能干细胞衍生的心肌细胞常显示出自发性周期收缩活性。这是指将这些细胞培养在具有适当Ca⁺⁺浓度和电解质平衡的适宜组织培养基中时,可观

观察到它们沿细胞的一条轴线收缩,然后从收缩中放松,而无需在培养基中加入任何其它成分。这种收缩是周期性的,即在规律性或不规律性的基础上反复收缩,其频率为约6到200次收缩/分钟,在普通缓冲液中常为约20到约90次收缩/分钟(图2)。单个细胞自身即可显示出自发性周期收缩活性,或它们可与存在于同一组织、细胞聚集物或培养的细胞团中的相邻细胞一致的自发性周期收缩。

[0091] 可按照培养条件对收缩性质和频率的影响来特征鉴定细胞的收缩活性。降低可利用的 Ca^{++} 浓度或干扰 Ca^{++} 跨膜转运的化合物通常会影响收缩活性。例如,L型钙离子通道阻滞剂地尔硫卓以剂量依赖性方式抑制收缩活性。另一方面,肾上腺素受体激动剂(如异丙肾上腺素和苯福林)具有正性变时性(positive chronotropic)作用。对细胞功能特性的进一步特征分析可涉及到对 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{++} 通道的特征分析。可通过对心肌细胞样活动电位的膜片钳分析来进行电生理研究。参见Igelmund等,PflugersArch.437:669,1999;Wobus等,Ann.N.Y.Acad.Sci.27:752,1995;和Doevendans等,J.Mol.Cell Cardiol.32:839,2000。

[0092] 心肌细胞系细胞通常具有至少一种如下的心肌细胞特异性标记:

[0093] • 心肌钙蛋白I(cTnI),肌钙蛋白复合物的亚单位,该复合物提供了调节横纹肌收缩的钙敏感性分子开关

[0094] • 心肌钙蛋白T(cTnT)

[0095] • Nkx2.5,一种在小鼠早期胚胎发育中心脏中胚层表达的心脏转录因子,在发育中的心脏中仍存在

[0096] 通常,该细胞还将表达至少一种(通常至少3、5或更多种)如下的标记:

[0097] • 心房钠尿素(ANF),一种在发育的心脏中和胎儿心肌细胞中表达,但在成人中下调的激素。由于其以高度特异性的方式在心脏细胞而不在骨骼肌细胞中表达,从而被认为是心肌细胞的一种良好标记

[0098] • 肌球蛋白重链(MHC),具体为心脏特异性的 β 链

[0099] • 肌联蛋白、原肌球蛋白、 α -肌节辅肌动蛋白和结蛋白

[0100] • GATA-4,一种在心脏中胚层中高度表达且在发育的心脏中持续存在的转录因子。其能调节许多心脏基因并在心脏发生中起一定作用

[0101] • MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D;在心脏中胚层中表达并在发育心脏中持续存在的转录因子

[0102] • N-钙粘蛋白,其能介导心脏细胞间的附着

[0103] • 连接蛋白43,其能在心肌细胞间形成缝隙连接

[0104] • β 1-肾上腺素受体(β 1-AR)

[0105] • 肌酸激酶MB(CK-MB)和肌红蛋白,心肌梗塞后它们的血清水平提高

[0106] • α -心脏肌动蛋白、早期生长应答素-1和细胞周期蛋白D2。

[0107] 可用任何适宜的免疫学技术来检测组织特异性标记—例如对细胞表面标记进行流式免疫细胞计数或亲和吸附、对胞内或细胞表面标记使用免疫细胞化学法(例如,对固定的细胞或组织切片)、对细胞提取物进行蛋白质印迹分析、对细胞提取物或分泌入培养基的产物进行酶联免疫试验。可从诸如Sigma和Spectral Diagnostics供应商处购得能鉴别其它同种型的心脏标记(如cTnI和cTnT)的抗体。如果任选在固定该细胞后以及任选使用标记的二抗,在标准的免疫细胞化学或流式细胞计数试验中,可检测到明显数量的抗体与抗原

结合,则说由细胞表达的抗原是可用抗体检测的。

[0108] 也可在mRNA水平通过Nother印迹分析法、斑点杂交分析法或用序列特异性引物、以标准的扩增方法、用公众可获得的序列数据(GenBank)进行由逆转录酶引发的聚合酶链式反应(RT-PCR)来检测组织特异性基因产物的表达。如果蛋白质或mRNA水平上检测到组织特异性标记表达水平为未分化的灵长类多能干细胞的至少2倍,优选高于10倍或50倍以上,则认为是该表达为阳性。

[0109] 也可在mRNA水平通过Nother印迹分析法、斑点杂交分析法或用序列特异性引物以标准扩增方法进行由逆转录酶引发的聚合酶链式反应(RT-PCR)来检测组织特异性基因产物的表达。参见美国专利No.5,843,780以了解进一步的细节。该公开中列出的具体序列数据可从公共数据库如GenBank(URL www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez)获得。根据该公开中描述的一个试验,如果在一典型的受控实验中根据标准过程对细胞样品进行的试验导致可明确辨别的杂交或扩增产物,则mRNA水平的表达被认为是“可检测的”。如果蛋白质或mRNA水平上检测到组织特异性标记表达水平为未分化的灵长类多能干细胞的至少2倍,优选高于10倍或50倍以上,则认为是该表达为阳性。

[0110] 一旦在细胞表面上鉴定到了具有所需表型的标记,就可将这些细胞用于免疫选择以通过诸如免疫淘选或抗体介导的荧光活化细胞分选的技术来进一步富集该细胞群。

[0111] 当从已建立的灵长类多能干细胞系中产生时,可将本发明的细胞群以及分离的细胞特征鉴定为具有与产生它们的细胞系相同的基因组。这是指灵长类多能干细胞和心脏细胞之间染色体DNA将会有90%以上的相同性,如果通过正常的有丝分裂过程从未分化的细胞系中获得心脏细胞,则可推论出该相同性。心肌细胞系细胞衍生自亲代细胞群这一特征在多个方面是很重要的。具体而言,可用未分化的细胞群来产生具有共享基因组的其它细胞—无论是另一批心脏细胞,还是可用于治疗的另一种类型的细胞—例如可使患者对组织相容类型的心脏同种异体移植物产生预耐受性的细胞群(US2002/0086005A1;W003/050251)。

[0112] 分化细胞的遗传改变

[0113] 可在分化前或分化后对本发明的细胞进行遗传工程改造,使其包含一种或多种遗传改变(US2002/0168766A1)。例如,可通过遗传性改变细胞以使其表达端粒酶逆转录酶,以提高细胞的复制能力,无论是在它们发展为发育受限的细胞系(restricteddevelopmental lineage cell)或是终末分化细胞之前或之后(US2003/0022367A1)。

[0114] 也可遗传改变本发明的细胞以增强它们参与组织再生或将治疗基因递送到给药部位的能力。用所需基因的已知编码序列设计了载体,使其操作性连接于在分化的细胞类型中具有泛特异性或特异性活性的启动子。特别感兴趣的是经遗传改变表达一种或多种各种类型的生长因子的细胞,所述生长因子为例如FGF,亲心性因子,例如心房钠尿素、cripto(一种新的表皮生长因子族成员)和心脏转录调节因子,例如GATA-4,Nkx2.5和MEF2-C。在给药部位产生这些因子可使功能性表型更易被接受、增强所给予细胞的有益作用、或提高邻近治疗部位宿主细胞的增殖或活性。

[0115] 某些实施方式中,需要对非人心肌细胞系细胞进行遗传改变以降低或消除一种或多种抗原的表达从而降低那些细胞的免疫原性。例如,在将非人心肌细胞系细胞异种移植入人体时这可能是有用的。

[0116] ES-分化的心肌细胞系细胞的用途

[0117] 本发明提供了一种生产大量心肌细胞系细胞的方法。可将这些细胞群用于许多重要的研究、开发和商业目的。

[0118] 筛选

[0119] 可将本发明的心肌细胞用于商品化筛选能影响这些细胞和它们不同后代的因素(例如溶剂、小分子药物、肽、寡核苷酸)或环境条件(例如培养条件或操作)。

[0120] 在某些应用中,将灵长类多能干细胞(未分化的或已分化的)用于筛选能促进其成熟成为后期阶段心肌前体细胞或终末分化细胞的因子,或在长期培养中能促进这些细胞增殖和保持的因子。例如,可按照进一步培养和应用这些细胞所期望的标准,通过将候选的成熟因子或生长因子加入到不同孔的细胞中,然后测定所导致的任何表型变化来检测这些候选因子。

[0121] 本发明的其它筛选应用涉及到药物组合物对心脏肌肉组织的维持或修复作用的检测。可因该化合物设计为对所述细胞具有药理学作用,或因设计的化合物对其它部位有效而可能对该组织类型的细胞有副作用而进行该筛选。可利用本发明的任何前体细胞或终末分化的细胞来进行这种筛选。

[0122] 一般来说,读者可参考标准教材《药学研究的体外方法》(*In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, 学术出版社(Academic Press), 1997) 和美国专利5,030,015。候选药物化合物活性的评估通常包括将本发明的分化细胞与该候选化合物相混合,无论是单独混合或是与其它药物组合。研究者测定由该化合物所引起的细胞形态、表型标记或功能活性的变化(与未经处理的细胞或用惰性化合物处理的细胞比较),然后将观察到变化与该化合物的作用相关联。

[0123] 可在第一种情况下通过对细胞活力、存活、形态和某些标记和受体的表达的作用来测定细胞毒性。可测定DNA合成或修复来测定药物对染色体DNA的作用。 $[^3\text{H}]$ -胸苷或BrdU掺入,尤其在细胞周期中不特定的时间中掺入,或超过细胞复制所需水平,与药物的作用相符合。不良作用还包括通过分裂中期扩散(metaphase spread)所测定的罕见比例的姐妹染色单体交换。对于更多的细节,读者可参考A.Vickers(《药学研究的体外方法》(*In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, 第375-410页,学术出版社(Academic Press), 1997)。

[0124] 可采用任何标准测试观察心肌细胞的表型或活性,例如检测标记表达、受体结合、收缩活性或电生理—无论在细胞培养物中或在体内来评估对细胞功能的影响。也可检测候选药物对收缩活性的影响—例如它们是否提高或降低了收缩的程度或频率。当观察到有影响时,可滴定化合物的浓度以测定其半数有效剂量(ED_{50})。

[0125] 动物试验

[0126] 本发明还提供为了任何可觉察到的需求,例如先天性代谢功能失调、病情的影响或明显创伤的结果等,采用心肌细胞及其前体细胞促进心肌组织维持或修复。

[0127] 为了确定用于治疗性给药的细胞组合物的适宜性,可先在适宜的动物模型中测试该细胞。在某一水平上,评估细胞在体内存活和保持其表型的能力。将细胞组合物给予免疫缺陷动物(例如裸鼠或用化学方法或辐射方法使其产生免疫缺陷的动物)。经过一定阶段的再生后收集组织,并评估是否仍存在多能干细胞衍生的细胞。

[0128] 这可通过给予能表达可检测标记(例如绿色荧光蛋白或 β -半乳糖苷酶)的细胞来进行;这些细胞是经预先标记的(例如,用BrdU或 $[^3\text{H}]$ 胸苷),或通过后继检测组成性细胞标记(例如,利用人特异性抗体)。可使用人特异性抗体进行免疫组化或ELISA来评估所给予细胞的存在和表型,也可用能引起人多核苷酸特异性扩增的引物和杂交条件,按照公开的序列数据,通过RT-PCR分析来评估。

[0129] 还可通过评估用心肌细胞群治疗后心脏恢复的程度来确定适宜性。已有许多动物模型可用于该测试。例如,可通过使预冷的铝棒接触左心室前壁表面来冻伤心脏(Murry等, J.Clin.Invest.98:2209,1996;Reinecke等, Circulation100:193,1999;美国专利6,099,832;Reinecke等, Circ Res.,2004年3月电子出版)。在较大的动物中,可通过将液氮冷却的30-50mm圆盘铜探头放置在左心室前壁约20分钟来冻伤(Chiu等, Ann.Thorac.Surg.60:12,1995)。可通过结扎左冠状动脉(Li等, J.Clin.Invest.100:1991,1997)或用逐渐膨胀而阻塞动脉的ameroid收缩装置来诱导梗塞。用本发明的细胞制备物治疗受损部位,通过组织学检查心脏组织受损区域中所述细胞的存在。可测定以下参数来监测心功能:左心室舒张末期压、逐渐产生的压力、压力升高的速度以及压力减退的速度。

[0130] 人体治疗用途

[0131] 经适当测试后,可将本发明的分化细胞用于需要此类治疗的病人或其它对象的组织重建或再生。给予该细胞的方式应能使细胞植入或迁移到预定的组织部位重建或再生该功能缺陷区域。可获得能重建心脏功能的细胞将其直接给予心腔、心包或心肌内的所需部位。

[0132] 需要时,可治疗接受同种异体移植心肌细胞的患者以降低其对植入细胞的免疫排斥。考虑的方法包括:给予常规的免疫抑制药物,如环孢霉素A(Dunn等, Drugs61:1957,2001)或采用匹配的多能干细胞衍生细胞群诱导免疫耐受(W002/44343;美国专利6,280,718;W003/050251)。另一方法是例如用别嘌呤醇处理心肌细胞系细胞群,移植入对象后该细胞适应而致使尿酸量产生减少。或者,可联合给予患者别嘌呤醇或能分解代谢尿酸的酶,例如尿酸盐氧化酶(PCT/US04/42917)。

[0133] 适于接受本发明再生医学的患者包括各种类型的急慢性心脏病患者,例如冠心病、心肌病、心内膜炎、先天性心血管缺陷和充血性心力衰竭。可采用临床上接受的标准,例如疤痕组织占据面积的减小或疤痕组织的血管再形成,以及心绞痛的频率和严重程度;或扩张压、收缩压、舒张末期压、 Δ 压力/ Δ 时间、患者活动能力和生活质量来监测治疗效果。

[0134] 可以药物组合物的形式提供本发明的心肌细胞,该组合物包含在充分灭菌条件下制备的用于人体给药中的等渗赋形剂。当分化过程包扩将细胞培养为心脏小体时,需用蛋白酶或柔和的机械操作将细胞分散成单细胞或较小细胞集落的悬液。为了降低植入时细胞死亡的风险,可在给予前用热激处理细胞或将其培养在约0.5U/mL的促红细胞生成素中约24小时。

[0135] 对于药物配制中的常用方案,读者可参考《细胞治疗:干细胞移植、基因治疗和细胞免疫治疗》(Cell Therapy:Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy), G.Morstyn和W.Sheridan编,剑桥大学出版社(Cambridge University Press),1996);和《造血干细胞治疗》(Hematopoietic Stem Cell Therapy), E.D.Ball, J.Lister和P.Law, Churchill Livingstone,2000)。可按照给药所用的途径和装

置选择细胞赋形剂和调整组合物的伴随成分。该组合物还可包含或伴有一种或多种有利于心肌细胞植入或功能性迁移的其它成分。适宜的成分包括基质蛋白类型,尤其是内皮细胞。

[0136] 本发明还包括试剂系统,其包含生产、分布或使用过程中任何时间存在的一系列细胞或细胞组合。所述细胞系列包括本文揭示中所述的两种或多种细胞群的任何组合,例子但不限于一类分化的多能干细胞衍生的细胞(心肌细胞、心肌前体细胞、心脏小体等)与未分化的灵长类多能干细胞或其它分化的细胞类型的组合,它们通常具有相同的基因组。可将该系列的各种细胞类型包装在一起或包装在不同容器中,装入在同一装置中或不同位置中,在相同或不同时间,由同一实体或共享工作关系的不同实体控制。

[0137] 可任选将本发明的药物组合物包装在带有用于所需目的书面说明书的适宜容器中,例如说明用于重建心肌细胞功能以改善病情或改善心肌异常。

[0138] 本发明的细胞可用于制备相对未被较其它细胞系在细胞中优先表达的cDNA污染的cDNA文库。例如,1000rpm离心5分钟以收集心肌细胞系细胞,然后制备mRNA并进行反转录。可通过微阵列分析将心肌细胞系细胞的表达模式与其它细胞类型进行比较,为了解微阵列分析通常可回顾Fritz等,Science288:316,2000;“MicroarrayBiochip Technology (微阵列生物芯片技术)”,L Shi,www.Gene-Chips.com。

[0139] 本发明的分化细胞也可用于制备特异于心肌细胞系细胞标记的抗体。可将免疫原性形式的本发明的细胞注射入脊椎动物以制备多克隆抗体。单克隆抗体的制备描述于以下标准参考资料,如Harrow&Lane (1988),美国专利Nos.4,491,632、4,472,500和4,444,887,以及《酶学方法》(Methods in Enzymology) 73B:3 (1981)。

[0140] 出于任何目的,本申请中提及的所有出版社和专利通过引用纳入本文。

[0141] 实施例1

[0142] 明胶/FBS上的三因子分化

[0143] 制备明胶/FBS涂布的表面:在6孔平板的每个孔中加入1ml 0.5%明胶溶液并在37℃孵育过夜。除去明胶溶液,然后加入足量含20%FBS的培养基(例如,20%FBS (Sigma))并继续孵育5-6小时。加入人胚胎干细胞之前除去孔中的培养基。

[0144] 接种未分化的人胚胎干细胞供随后分化:通过a)除去培养基;b)用PBS冲洗各孔1次;和c)加入1ml 0.25%胰蛋白酶/500mM EDTA溶液将6孔平板1个孔中的未分化的人胚胎干细胞解离。将孔在37℃孵育10分钟,然后用1ml移液管研磨10次。在显微镜下检测该孔观察到细胞完全解离。加入2ml含20%FBS的培养基(例如,含20%FBS的Knockout DMEM)以灭活胰蛋白酶。对细胞计数,该数目被用来以所需密度接种衍生自其余孔的细胞。

[0145] 除去其余孔中的培养基。在各孔中加入20单位/毫升胶原酶溶液(1ml/孔)。各孔在37℃孵育10分钟,然后除去胶原酶溶液。在各孔中加入1ml MEF条件化培养基和8ng/ml bFGF。用5ml吸管刮擦各孔直到细胞分离(形成小的集落);无需进行进一步的研磨。将细胞稀释至所需密度并接种到如上所述制备的6孔平板(此时,每孔接种5ml共670,000个细胞;接种3个孔)。每天除去用过的培养基并更换成新鲜的MEF-CM+8ng/ml bFGF以重新饲养ES细胞(如在星期二接种细胞,则星期六的补料通常被跳过)。

[0146] 生长因子处理:如上所述生长6天后,除去细胞培养基并更换成RPMI+IX B27添加物(因维曲根公司)+50ng/ml活化素A(R&D系统(R&D Systems))。18-24小时后除去培养基并更换成RPMI+IX B27添加物+50ng/ml BMP-4(R&D系统)。在含BMP-4的培养基中总共培养4天

后除去培养基并更换成RPMI+IX B27添加物+50ng/ml IGF-1 (R&D系统),其中不含活化素或BMP。每2-3天除去用过的培养基并更换成不含活化素或BMP的新鲜RPMI+IX B27添加物+50ng/ml IGF-1以重新饲养培养物。

[0147] 加入活化素A约12天后开始出现大量搏动的细胞集落。加入活化素A后的第24天对细胞计数(6孔平板的3个孔内总共有910万个细胞),并通过FACS分析心肌钙蛋白I的表达,其过程如下:

[0148] FACS分析一吸出培养物中的培养基。各孔用5ml不含钙/镁的PBS冲洗。在各孔加入1.5ml 0.25%胰蛋白酶/500mM EDTA溶液,并将细胞在37℃孵育20分钟。用移液管研磨细胞直到获得单细胞悬液。(含20%FBS的Knockout DMEM)。通过计数估算细胞浓度,每次染色(EMA、同种型、cTnI、cTnI+EMA;都含在15ml圆锥管中)使用约500,000个细胞。

[0149] 将含有细胞的试管400xg离心5分钟。吸出培养基并将细胞团重悬于1ml染色缓冲液(PBS+1%热灭活的山羊血清和0.1%叠氮化钠)。为进行EMA染色,在细胞中加入EMA使其终浓度为5微克/毫升。将这些样品在黑暗中于冰上培育15分钟,然后按上文所述离心。将经EMA处理的样品重悬于500微升PBS并曝光10分钟。在EMA处理的样品中加入500微升4%低聚甲醛并在黑暗中室温培育15分钟。将未加入EMA但随后用抗体染色的样品按上文所述离心,重悬于500微升PBS,然后加入500微升4%低聚甲醛,然后在黑暗中室温培育15分钟。

[0150] 将所有样品按上文所述离心并重悬于100微升PBS。然后在所有样品中加入900微升冰冷的100%甲醇并在冰上培育30分钟。在所有样品中加入1ml染色缓冲液(PBS+1%热灭活的山羊血清和0.1%叠氮化钠)并按上文所述离心。吸出上清液并将细胞以约500,000细胞/50微升的密度重悬于封闭缓冲液(PBS+20%正常山羊血清和0.1%叠氮化钠)。将样品在4℃培育10-15分钟。对于各染色样品,取50微升等份细胞加入单独的12×75mm聚苯乙烯管。在要染色的各份样品中加入50微升心肌钙蛋白I抗体(光谱诊断公司(Spectral Diagnostics))或同种型对照(各管中抗体的最终含量为1.2微克)。将样品在4℃培育30分钟。

[0151] 加入2ml染色缓冲液,然后按上文所述离心样品。重复该洗涤步骤。除去第二次的洗涤上清液后将样品重悬于50微升用PBS配制的含0.25微克第二抗体(分子探针公司(Molecular Probes)的山羊抗小鼠IgG,用alexa488标记)的5%正常山羊血清溶液。样品在黑暗中于4℃培育30分钟,再用2ml染色缓冲液洗涤并按上文所述离心。滗出上清液并将样品重悬于300微升染色缓冲液以便在FACScalibur仪上流动获取(flow acquisition)。24.67-27.36%的存活细胞被抗心肌细胞肌节蛋白心肌钙蛋白I的抗体染色。这些结果示于图1。

[0152] 实施例2

[0153] 基质胶涂布表面上的三因子直接分化

[0154] 取1等份生长因子还原的基质胶(之前用冷的Knockout DMEM1:2稀释并储存于-20℃)。该基质胶溶液进一步用冷的Knockout DMEM1:15稀释。用稀释的基质胶溶液涂布6孔平板的空孔,每孔1ml,并将平板在室温下孵育4-5小时。除去基质胶溶液,按上文的描述接种人ES细胞,无需对孔进行预冲洗。

[0155] 接种未分化的hES细胞供随后分化:通过a)除去培养基;b)用PBS冲洗各孔1次;和c)加入1ml 0.05%胰蛋白酶/500mM EDTA溶液将6孔平板1个孔中的未分化的hES细胞解离。

将各孔在37℃的培养箱中培养10分钟。用移液管研磨细胞直到细胞完全解离。加入2ml含20%FBS的培养基(例如,含20%FBS的KnockoutDMEM)以灭活胰蛋白酶。对细胞计数,该数目被用来以所需密度接种衍生自其余孔的细胞。

[0156] 除去其余孔中的培养基。以1ml/孔在各孔中加入胶原酶溶液(200单位/毫升),并将各孔在37℃孵育10分钟。除去胶原酶溶液,并加入MEF条件化培养基和8ng/mlbFGF。用吸管刮擦各孔直到细胞分离(形成小的集落);无需进行进一步的研磨。将细胞稀释至所需密度并接种到如上所述制备的6孔平板(每孔接种5ml共1,850,000个细胞)。每天除去用过的培养基并更换成新鲜的MEF-CM+8ng/ml bFGF以饲养接种的hES细胞(但第二天不这样做)。

[0157] 生长因子处理:如上所述生长6天后,除去细胞培养基并更换成RPMI+IX B27添加物+50ng/ml活化素A。18-24小时后除去培养基并更换成RPMI+IX B27添加物+50ng/ml BMP-4,其中不含活化素A。在含BMP-4的培养基中总共培养4天后除去培养基并更换成不含活化素或BMP的RPMI+IX B27添加物+50ng/ml IGF-1。每2-3天除去用过的培养基并更换成新鲜的不含活化素或BMP的RPMI+IX B27添加物+50ng/ml IGF-1。对细胞计数并通过FACS分析心肌钙蛋白I的表达,其过程如下:

[0158] FACS分析一吸出培养物中的培养基。各孔用5ml不含钙/镁的PBS冲洗。在各孔加入1ml0.25%胰蛋白酶/500mM EDTA溶液,并将细胞在37℃孵育5分钟。将用胰蛋白酶分离的细胞转移到15ml的圆锥管中并再在37℃孵育15-20分钟。用移液管研磨细胞直到获得单细胞悬液。加入2ml含20%FBS的培养基(含20%FBS的Knockout DMEM)终止胰蛋白酶消化。通过计数估算细胞浓度,每次染色(EMA、同种型、cTnI、cTnI+EMA;都含在15ml圆锥管中)使用约500,000个细胞。将含有细胞的试管400xg离心5分钟。吸出培养基并将细胞团重悬于1ml染色缓冲液(PBS+2%热灭活的胎牛血清和0.1%叠氮化钠)。为进行EMA染色,在细胞中加入EMA使其终浓度为5微克/毫升。将这些样品在黑暗中于冰上培育15分钟,然后按上文所述离心。将经EMA处理的样品重悬于1ml PBS并在光下暴露10分钟。在EMA处理的样品中加入1ml4%低聚甲醛并在黑暗中室温培育15分钟。将未加入EMA但随后用抗体染色的样品按上文所述离心,重悬于500微升PBS,然后加入500微升4%低聚甲醛,然后在黑暗中室温培育15分钟。将所有样品按上文所述离心并重悬于100微升PBS。

[0159] 然后在所有样品中加入900微升冰冷的100%甲醇并在冰上培育30分钟。在所有样品中加入1ml染色缓冲液(PBS+2%热灭活的胎牛血清和每 0.5×10^6 个细胞0.2微克大鼠抗小鼠Fc片段(BD))并按上文所述离心。吸出上清液并将细胞以约500,000细胞/100微升的密度重悬于封闭缓冲液(PBS+20%正常山羊血清和0.1%叠氮化钠)。将样品在4℃培育10-15分钟。对于各染色样品,取100微升等份细胞加入单独的12×75mm聚苯乙烯管。在要染色的各份样品中加入20微升心肌钙蛋白I抗体(光谱诊断公司)或同种型对照(各管中抗体的最终含量为1.2微克)。将样品在4℃培育30分钟。加入4ml染色缓冲液,然后按上文所述离心样品。

[0160] 除去第二次的洗涤上清液后将样品重悬于50微升用PBS配制的含0.25微克第二抗体的5%正常山羊血清溶液,在黑暗中于4℃培育30分钟,再用4ml染色缓冲液洗涤并按上文所述离心。灌出上清液并将样品重悬于300微升染色缓冲液+0.5%低聚甲醛以便在FACScalibur仪上流动获取。结果用Flojo软件分析。在该实验中,胰蛋白酶解离后有69%的细胞存活。在这些存活的细胞中有8.9%被抗心肌细胞特异性蛋白质心肌钙蛋白I的抗体染

色(见图2)。

[0161] 实施例3

[0162] 采用四阶段离心分离法富集的例子

[0163] 使H7系的hES细胞形成胚状体4天,然后在明胶涂布的平板上增殖17天(未使用5-氮杂-脱氧-胞苷和生长因子),以此产生心肌细胞。然后用胶原酶B解离细胞,将其重悬于分化培养基。然后将细胞悬液加在不连续珀可梯度上并1500g离心30分钟。收集到4种组分:I.上表面;II.40.5%层;III.下表面;IV.58.5%层。洗涤细胞并重悬于分化培养基。将要进行免疫染色的细胞接种到腔式载玻片中,每孔 10^4 个细胞,培育2或7天,然后固定并染色。

[0164] 结果示于表3。计算从每种组分三复孔获得的30张图像中的细胞数目以确定MHC阳性细胞的百分比,结果表示为3个孔的细胞的平均值 $\pm$ 标准差。

[0165]

表 3: 珀可分离				
组分	细胞数	搏动细胞	被 MHC 染色的百分比	
			第 2 天	第 7 天
分离前		+	$17 \pm 4.4\%$	$15 \pm 4\%$
I	9.0×10^6	$\pm$	$2.6 \pm 0.5\%$	$2.5 \pm 3.0\%$
II	1.6×10^6	+	$4.5 \pm 1.5\%$	$2.4 \pm 0.9\%$

[0166]

III	4.0×10^6	++	$35.7 \pm 2.7\%$	$28.3 \pm 9.4\%$
IV	1.3×10^6	+++	$69.0 \pm 5.0\%$	$52.2 \pm 14.5\%$

[0167] 最高百分比。

[0168] 通过间接免疫细胞化学确定的细胞表型示于表4。

表 4: 分离的细胞群的特征		
表位	心肌细胞系	非心脏细胞
cTnI	++	-
心脏特异性 α/β MHC	++	-
心脏 β MHC	++	-
肌节 MHC	++	-
N-钙粘着蛋白	++	$\pm$
[0169] 平滑肌肌动蛋白	++	亚组
肌细胞生成蛋白	-	-
甲胎蛋白	-	-
β -微管蛋白 III	-	-
Ki67	亚组	亚组
BrdU	亚组	亚组
SSEA-4	-	-
Tra-1-81	-	-

[0170] 可利用对cTnI和MHC的染色来辨别通过密度梯度离心分离的心肌细胞群。不存在对肌细胞生成蛋白、甲胎蛋白或 β -微管蛋白III的染色表示不存在骨骼肌、内胚层细胞类型和神经元。缺乏对SSEA-4和Tra-1-81的染色证实不存在未分化的hES细胞。

[0171] α -平滑肌肌动蛋白(SMA)据说存在于胚胎和胎儿心肌细胞中,但不存在于成人心肌细胞中(Leor等,Circulation97:11332,1996;Etzion等,Mol.Cell Cardiol.33:1321,2001)。实际上,在心肌细胞分化过程中获得的所有cTnI-阳性细胞和cTnI阴性细胞亚组对SMA呈阳性,说明它们处于早期阶段并能够增殖。

[0172] 重新接种组分III和IV的细胞并再培育2天。 $43 \pm 4\%$ 的MHC阳性细胞表达BrdU,这说明它们处于细胞周期的S期。在另一个实验中,发现cTnI阳性细胞的一个亚组表达Ki-67。这些结果显示,群体中约20%或40%的心肌细胞正经历活跃增殖。

[0173] 通过制造心脏小体富集收缩细胞的例子

[0174] 该实施例例举了随后将心肌细胞集落培养成心脏小体以富集具有治疗用途和其它目的所需特征的细胞。

[0175] 如上所述,用3个烧瓶(烧瓶体积为 225cm^2)的H7系未分化hES细胞来产生胚状体。将各烧瓶的EB重悬于75mL培养基并转移至3个低粘附性6孔平板(每孔4mL细胞悬液),总共得到9个EB悬液平板。1天后将新形成的EB转移至50mL圆锥管(每管一个平板),不要搅拌使EB在室温下静置10-20分钟,然后除去培养基并更换成新鲜的培养基(每管25mL),以此重新悬浮饲养EB。

[0176] 将EB送回它们原来的低粘附性平板并在含20%FBS的培养基中再悬浮培养3天,然后转移至总共3个明胶涂布的 225cm^2 组织培养烧瓶中。转移至明胶涂布的烧瓶2天后,除去培养基并在各烧瓶中加入75mL含20%FBS的培养基重新培养。在第8、11、13、15和18天进行类似的重新培养。在第20天时用混合酶(Blendzyme)(罗氏应用科技公司(Roche Applied Sciences),彭滋伯格(Penzberg),德国)分离分化的培养物并如上所述在不连续珀可梯度上分层。回收组分IV(密度最高的组分)并计数,得到约 3.7×10^6 个单个细胞和小的集落。

[0177] 将组分IV的细胞重悬于约6.5mL含20%FBS的培养基,转移至15mL圆锥管,不要搅拌在室温下静置10分钟。除去培养基(含 2.8×10^6 个细胞,其中大多数是单个细胞)并更换成新鲜的培养基。将细胞悬液转移至一个低粘附性6孔平板(每孔约4mL细胞悬液)。每48小时用类似方法重新饲养(转移至50mL试管,静置10分钟,除去培养基并更换培养基)。

[0178] 图3显示了通过实时PCR测得的肌节基因 α MHC和心肌钙蛋白I的表达。相对于在明胶上培养20天后的表达,通过珀可梯度分离细胞使组分IV细胞的表达提高了2-5倍。除去单个细胞并收集集落使表达提高了5-20倍。将细胞培养8天使其成为心脏小体后,表达比未分离的细胞高100至500倍。

[0179] 存在大片自发收缩的细胞。为用于动物试验,可直接植入心脏小体或使其分散成单细胞悬液。

[0180] 实施例5

[0181] 如实施例1所述分化H7hES细胞,但分化在24孔平板而非6孔平板上进行,且各因子的体积为每孔1ml。此外,所用BMP-2和BMP-4的浓度为25ng/ml、50ng/ml和100ng/ml。各浓度一式三份进行。图4显示了结果,其表示为占对照的相对倍数,对照也采用上述过程但未加入活化素、BMP或IGF-I。由图可见,BMP-2在分化过程中也是有效的。

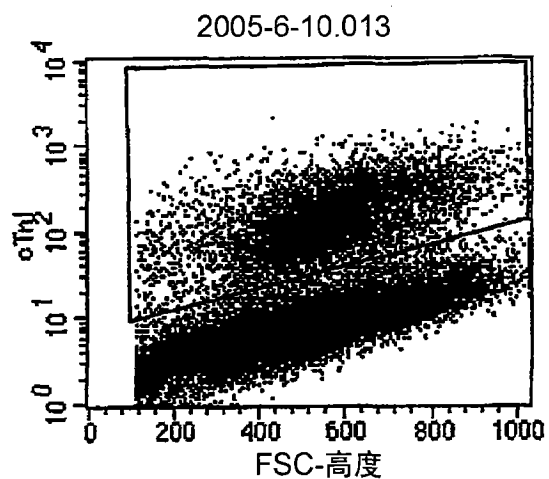
[0182] 实施例6

[0183] 用2ml PBS洗涤生长至汇合的H7hES细胞的6孔平板。然后在各孔中加入2ml用PBS配制的0.5mM EDTA,并将平板在 37°C 孵育10分钟。将EDTA溶液替换成1ml小鼠胚胎成纤维细

胞条件化培养基 (MEF-CM) +8ng/ml bFGF (“培养基A”)。上下吸取2-3次以分离未分化的ES细胞,然后以400,000细胞/孔将细胞接种于24孔平板中的培养基A中。将细胞在37℃孵育2天。

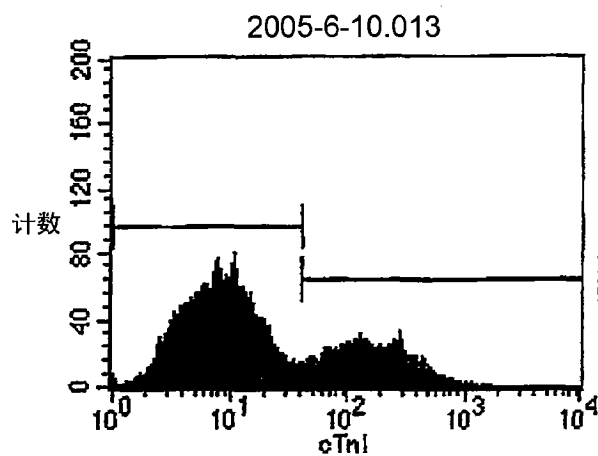
[0184] 为诱导hES细胞分化,将24孔平板每个孔内的培养基A替换成0.5ml B27:RPMI (1:50) (两种试剂都来自因维曲根公司)+100ng/ml活化素A (R&D系统) (“培养基B”)。将细胞培育24小时。然后将培养基B替换成含10ng/ml BMP-4 (R&D系统) 的1:50B27:RPMI (“培养基C”),在24孔平板的每个孔中加入1ml。将细胞培育4天。

[0185] 将24孔平板每个孔中的培养基C替换成1ml1:50B27:RPMI,并将平板培育15天。所得细胞如实施例2所述通过FACS分析,但用0.25%胰蛋白酶/500mM EDTA溶液培育细胞5分钟而非实施例2中所采用的20分钟。约36%的细胞表达cTnI。



区域	%门控	%总数
R1	54.49	54.49
R2	24.67	24.67

图 1A



区域	%门控	%总数
All	100.00	54.49
M1	72.68	39.61
M2	27.36	14.91

图 1B

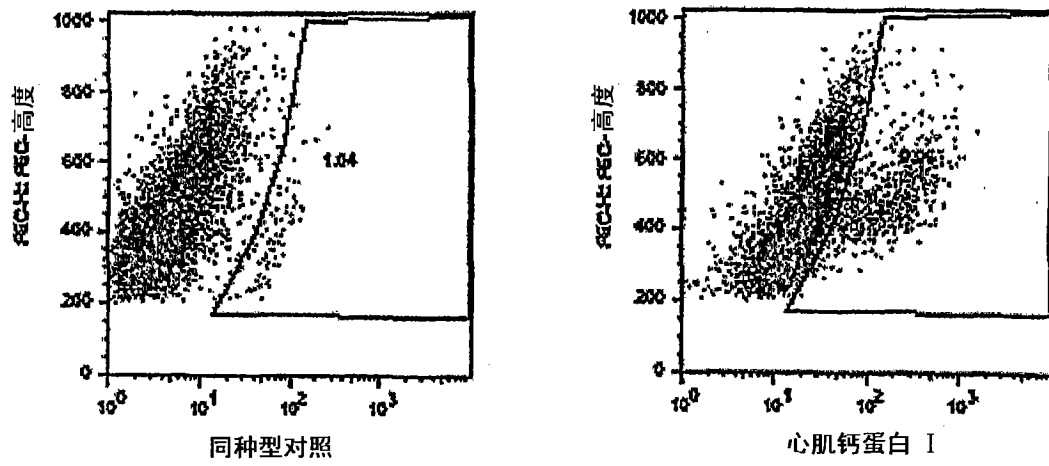


图 2

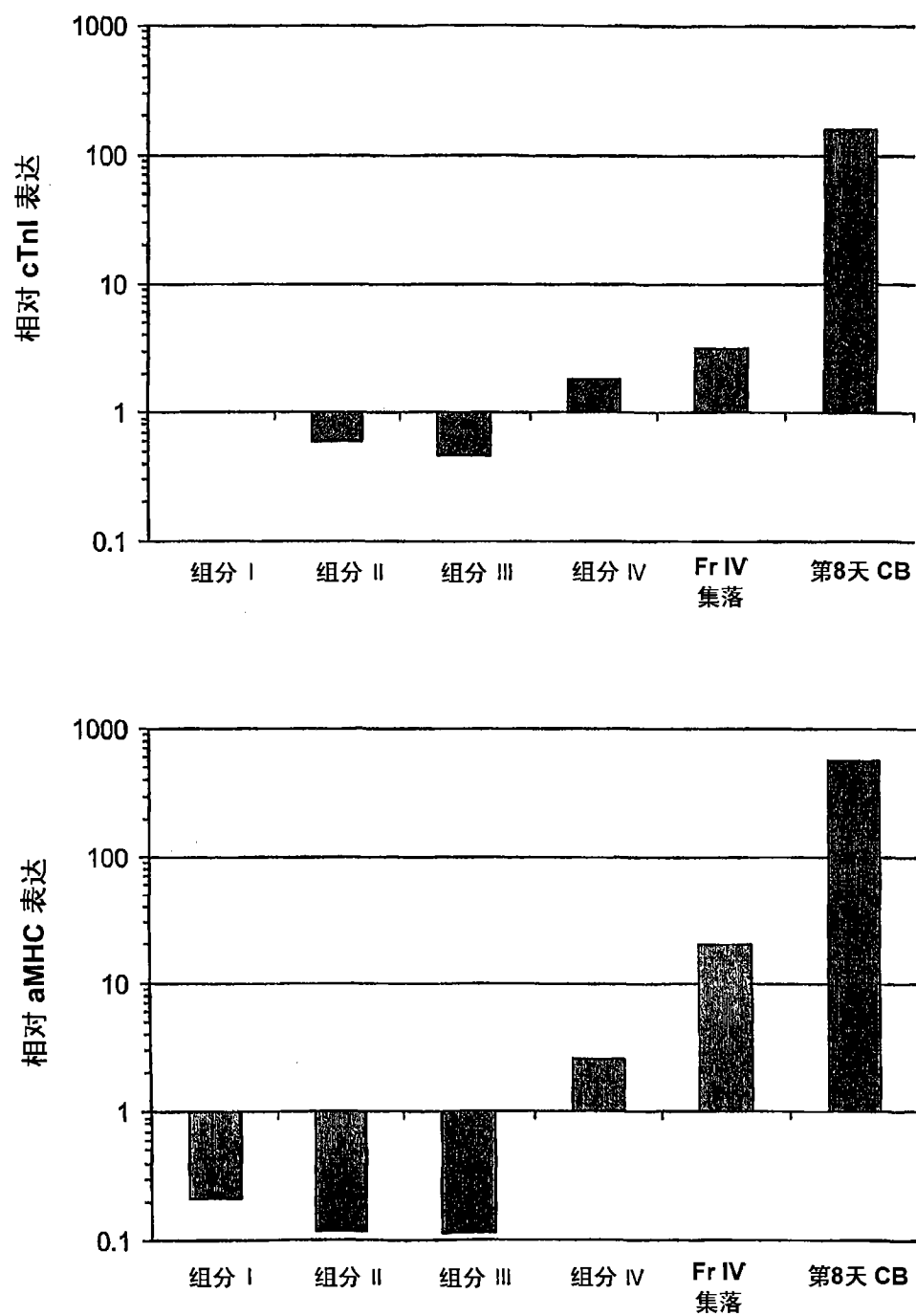


图 3

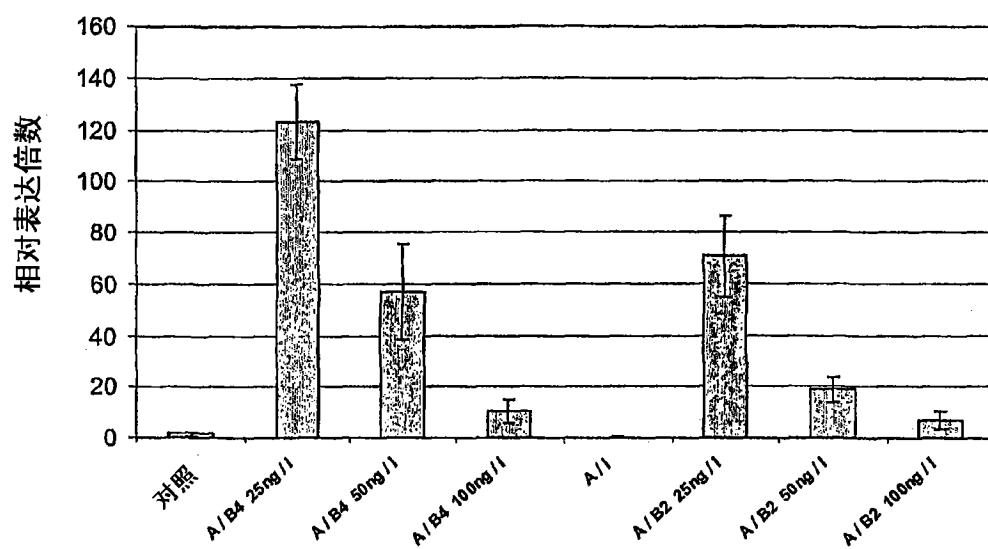


图 4