



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118843687 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 25

(21) 申请号 202280088573.7

(22) 申请日 2022.11.11

(30) 优先权数据

63/278,751 2021.11.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2022/051664 2022.11.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/082007 EN 2023.05.19

(71) 申请人 先马士联盟

地址 加拿大安大略省

(72) 发明人 R·拉布雷克 S-J·江

(74) 专利代理机构 北京彩和律师事务所 11688

专利代理师 张红春

(51) Int.Cl.

C12N 5/00 (2006.01)

A01K 67/02 (2006.01)

A61K 35/545 (2006.01)

A61P 15/08 (2006.01)

C12N 5/073 (2006.01)

C12N 5/0735 (2006.01)

权利要求书5页 说明书24页 附图15页

(54) 发明名称

初始牛胚胎干细胞的衍生

(57) 摘要

本公开涉及可用于初始牛胚胎干细胞的衍生的方法、产品和组合物。描述了包含带正电的生物相容性聚合物的ECM包被的基底,其允许胚胎附着和生长物(outgrowth)形成。还提供了适合于培养牛胚胎以及衍生初始胚胎干细胞的扩增培养基。初始牛胚胎干细胞可用于体外育种计划,包括具有所希望的遗传特征的植入前胚胎的增殖,衍生用于体外育种计划的原生殖细胞/配子,以及开发和提供兽医医学生物制品和疗法。

1. 一种衍生初始牛胚胎干细胞的方法,所述方法包括:
 - a) 提供包含初始牛胚胎干细胞的无透明带 (ZP) 牛胚胎;
 - b) 使所述无ZP牛胚胎与细胞外基质 (ECM) 包被的基底接触,其中,所述ECM包被的基底包含:包含与带正电的生物相容性聚合物层相邻的带负电的基底表面的基底、和与所述带正电的生物相容性聚合物层相邻的带负电的ECM层;和
 - c) 在扩增培养基的存在下培养所述无ZP牛胚胎,以诱导所述无ZP牛胚胎附着到所述ECM包被的基底上,以及诱导包含衍生的初始牛胚胎干细胞的内细胞团 (ICM) 的生长物。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述带正电的生物相容性聚合物层包含A型明胶。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述带负电的ECM层包含EHS-ECM。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中,所述基底包含聚苯乙烯。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中,所述扩增培养基包含以下中的一种或多种:
 - N2B27组分;
 - Wnt激活剂组分;
 - Wnt抑制剂组分;
 - MEK/ERK抑制剂组分;
 - ROCK抑制剂组分;
 - LIF组分;
 - 激活素A组分;
 - PKC抑制剂;和
 - 胰岛素组分。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中,所述扩增培养基包含:
 - 所述N2B27组分;
 - 所述Wnt激活剂组分;
 - 所述Wnt抑制剂组分;
 - 所述MEK/ERK抑制剂组分;
 - 所述ROCK抑制剂组分;
 - 所述LIF组分;
 - 所述PKC抑制剂;和
 - 所述胰岛素组分。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述扩增培养基还包含激活素A组分,任选的人激活素A。
8. 根据权利要求5至7中任一项所述的方法,其中
 - 所述N2B27组分包含B27补充剂和N2补充剂,任选地约1%B27补充剂和约0.5%N2补充剂;
 - 所述Wnt激活剂组分包含CHIR99021、BIO、CHIR-98014、LY2090314和/或IM-12;
 - 所述Wnt抑制剂组分包含XAV939、IWR-1和/或IWP-2;
 - 所述MEK/ERK抑制剂组分包含PD0325901、拉沃西替尼、GSK1120212、MEK162、PD184352、曲美替尼、LY3214996和/或优立替尼;

所述ROCK抑制剂组分包含Y27632、噻唑维文和/或布比他汀；

所述LIF组分包含人LIF；

所述PKC抑制剂包含**Gö6983**、**Gö6976**、LY317615、LY333531、PKC412、GSK690693、索曲妥林、星形孢菌素和/或双吡啶马来酰亚胺；和/或

所述胰岛素组分包含胰岛素。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法，其中，所述无ZP牛胚胎是3至8天的胚胎，任选地6或7天的胚胎；或者所述无ZP胚胎是桑椹胚（第4阶段）；胚囊（第5阶段）；扩张中的胚囊（第6阶段）；扩张后的胚囊（第7阶段）；孵化中的胚囊（第8阶段）或孵化后的胚囊（第9阶段）。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法，其中，所述无ZP牛胚胎通过酶辅助ZP去除来获得。

11. 根据权利要求10所述的方法，其中，所述方法还包括通过包括以下步骤的酶辅助ZP去除来获得所述无ZP牛胚胎：

- a) 提供胚胎；
- b) 使所述胚胎与蛋白酶溶液接触；
- c) 在所述蛋白酶溶液中孵育所述胚胎以部分消化所述ZP并获得ZP减薄的胚胎；
- d) 使所述ZP减薄的胚胎与蛋白酶失活培养基接触以使所述蛋白酶失活；
- e) 使所述ZP破裂；和
- f) 操纵所述胚胎以将所述ZP从所述胚胎分离。

12. 根据权利要求11所述的方法，其中，在步骤c)中蛋白酶的浓度为0.1% - 0.5%，任选地为约0.25%。

13. 根据权利要求11或12所述的方法，其中，在步骤c)中，将所述胚胎和蛋白酶溶液孵育约30-60秒，任选地约45秒。

14. 根据权利要求11至13中任一项所述的方法，其中，在步骤e)中使用微刀片来使所述ZP破裂。

15. 根据权利要求11至14中任一项所述的方法，其中，在步骤f)中操纵所述胚胎包括吹打。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法，其中，所述无ZP胚胎被遗传修饰。

17. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法，其中，所述无ZP胚胎已经进行了遗传测试，以确定对于一种或更多种生物标志物的所述无ZP胚胎的一种或更多种基因型。

18. 根据权利要求1至16中任一项所述的方法，其还包括进行遗传测试以确定对于一种或更多种生物标志物的所述无ZP牛胚胎的一种或更多种基因型。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的方法，其还包括基于对一种或更多种生物标志物的遗传测试来选择所述无ZP牛胚胎。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法，其还包括进行遗传测试以确定所述衍生的初始牛胚胎干细胞的一种或更多种基因型。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的方法，其中，所述无ZP牛胚胎从重构的二倍体胚胎获得。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法，其中，所述无ZP牛胚胎从新鲜胚胎，任选地新鲜的经活检的胚胎获得。

23. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法, 其中, 所述无ZP牛胚胎从冷冻胚胎, 任选地经活检的冷冻胚胎获得。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其包括解冻所述冷冻胚胎并使所述胚胎与恢复培养基接触。

25. 根据权利要求24所述的方法, 其包括通过包括以下步骤的方法获得所述无ZP牛胚胎:

- a) 解冻所述冷冻胚胎;
- b) 使所述冷冻胚胎与所述恢复培养基接触;
- c) 在所述恢复培养基中操纵所述胚胎以将所述ZP从所述胚胎分离; 和
- d) 在所述恢复培养基中孵育所述无ZP牛胚胎。

26. 根据权利要求24或25所述的方法, 其中, 所述恢复培养基包含糖原合酶激酶3 (GSK-3) 抑制剂、MEK/ERK激酶抑制剂和Rho相关的含有卷曲螺旋的蛋白激酶 (ROCK) 抑制剂。

27. 根据权利要求24至26中任一项所述的方法, 其中, 所述恢复培养基包含CHIR99021、PD0325901和Y27632。

28. 根据权利要求24至27中任一项所述的方法, 其还包括用适应培养基孵育所述无ZP胚胎, 其中, 所述适应培养基包含恢复培养基和扩增培养基的组合。

29. 根据权利要求28所述的方法, 其中, 所述适应培养基包含比率为约0.3:1至1.7:1、约0.5:1至1.5:1、或任选地约1:1的恢复培养基和扩增培养基的组合。

30. 一种制备细胞外基质 (ECM) 包被的基底的方法, 所述方法包括:

- a) 提供包含带负电的表面的基底;
- b) 使所述带负电的表面与包含生物相容性聚合物的第一溶液接触, 其中, 所述生物相容性聚合物带正电;
- c) 孵育与所述第一溶液接触的所述基底, 使得带正电的生物相容性聚合物在所述基底的所述带负电的表面上沉积;
- d) 去除所述第一溶液, 并任选地清洗所述基底;
- e) 使所述基底与包含细胞外基质 (ECM) 的第二溶液接触, 其中, 所述ECM带负电; 和
- f) 孵育与所述第二溶液接触的所述基底, 使得带负电的ECM沉积在所述带正电的生物相容性聚合物上。

31. 根据权利要求30所述的方法, 其中, 所述生物相容性聚合物为A型明胶。

32. 根据权利要求30或31所述的方法, 其中, 所述ECM包含EHS-ECM。

33. 根据权利要求30至32中任一项所述的方法, 其中, 所述基底是聚苯乙烯。

34. 一种根据权利要求30至33中任一项所述的方法生产的ECM包被的基底。

35. 一种ECM包被的基底, 其包含:

包含带正电的表面的基底;
带正电的生物相容性聚合物层, 所述带正电的生物相容性聚合物层与所述基底的带负电的表面接触;

带负电的ECM层, 所述带负电的ECM层与所述带正电的生物相容性聚合物层接触。

36. 根据权利要求35所述的ECM包被的基底, 其中, 所述生物相容性聚合物为A型明胶。

37. 根据权利要求35或36所述的ECM包被的基底, 其中, 所述ECM包含EHS-ECM。

38. 根据权利要求35至37中任一项所述的ECM包被的基底,其中,所述基底是聚苯乙烯。
39. 权利要求35至38中任一项所述的ECM包被的基底用于培养胚胎,任选地以诱导ICM生长物和/或初始胚胎干细胞的衍生的用途。
40. 权利要求39所述的用途,其中,所述胚胎是牛胚胎,任选地是第5天至第7天的牛胚胎。
41. 权利要求40所述的用途,其中,所述牛胚胎是重构的二倍体胚胎。
42. 一种培养基组合物,其包含:
N2B27组分;
Wnt激活剂组分;
Wnt抑制剂组分;
MEK/ERK抑制剂组分;
ROCK抑制剂组分;
LIF组分;
PKC抑制剂;和
胰岛素组分。
43. 根据权利要求42所述的培养基组合物,其中,
所述N2B27组分包含B27补充剂和N2补充剂,任选地约1%的B27补充剂和约0.5%的N2补充剂;
所述Wnt激活剂组分包含CHIR99021、BIO、CHIR-98014、LY2090314或IM-12;
所述Wnt抑制剂组分包含XAV939、IWR-1或IWP-2;
所述MEK/ERK抑制剂组分包含PD0325901、拉沃西替尼、GSK1120212、MEK162、PD184352、曲美替尼、LY3214996或优立替尼;
所述ROCK抑制剂组分包含Y27632、噻唑维文或布比他汀;
所述LIF组分包含人LIF;
所述PKC抑制剂包含**Gö6983**、**Gö6976**、LY317615、LY333531、PKC412、GSK690693、索曲妥林、星形孢菌素或双吡啶马来酰亚胺;和/或
所述胰岛素组分包含胰岛素。
44. 根据权利要求42或43所述的培养基组合物,其还包含激活素A组分,任选地人激活素A。
45. 权利要求42至44中任一项所述的培养基组合物用于培养胚胎以诱导ICM生长物形成的用途,任选地,其中所述胚胎是牛胚胎。
46. 根据权利要求45所述的用途,其中,所述牛胚胎是重构的二倍体胚胎。
47. 一种通过酶辅助ZP去除来获得无ZP牛胚胎的方法,所述方法包括以下步骤:
a) 提供胚胎;
b) 使所述胚胎与蛋白酶溶液接触;
c) 在所述蛋白酶溶液中孵育所述胚胎以部分消化所述ZP并获得ZP减薄的胚胎;
d) 使所述ZP减薄的胚胎与蛋白酶失活培养基接触以使所述蛋白酶失活;
e) 使所述ZP破裂;和
f) 操纵所述胚胎以将所述ZP从所述胚胎分离。

48. 根据权利要求47的方法, 其中, 步骤c) 中蛋白酶的浓度为0.1%-0.5%, 任选地为约0.25%。

49. 根据权利要求47或48所述的方法, 其中, 所述胚胎和蛋白酶溶液在步骤c) 中孵育约30-60秒, 任选地约45秒。

50. 根据权利要求47至49中任一项所述的方法, 其中, 在步骤e) 中使用微刀片使所述ZP破裂。

51. 根据权利要求47至50中任一项所述的方法, 其中, 在步骤f) 中操纵所述胚胎包括吹打。

52. 一种恢复培养基, 其包含糖原合酶激酶3 (GSK-3) 抑制剂、MEK/ERK激酶抑制剂和Rho相关的含有卷曲螺旋的蛋白激酶 (ROCK) 抑制剂。

53. 根据权利要求52所述的培养基, 其中, 所述恢复培养基包含: CHIR99021, 任选地约3 μM ; PD0325901, 任选地约1 μM ; 以及Y27632, 任选地约10 μM 。

54. 权利要求52或53所述的恢复培养基用于在解冻、活检、基因编辑或细胞衍生过程中或之后使胚胎恢复的用途。

55. 使用权利要求1至29中任一项所述的方法生产的初始牛胚胎干细胞。

56. 权利要求55所述的初始牛胚胎干细胞在育种方案或遗传改良计划中的用途。

57. 权利要求55所述的初始牛胚胎干细胞用于繁殖任选地具有所希望的遗传特征的植入前胚胎; 衍生原始生殖细胞和/或配子, 任选地用于体外育种计划; 和/或开发和提供兽医医学生物制品或疗法的用途。

初始牛胚胎干细胞的衍生

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年11月12日提交的第63/278,751号美国临时申请的优先权,该申请的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及牛干细胞,更具体地涉及初始牛胚胎干细胞、相关方法和组合物。

背景技术

[0004] 初始胚胎干细胞可以分化为包括胚胎外细胞(如滋养层干细胞和胚胎外内胚层谱系细胞)的体内所有类型的细胞。已通过分化扩增的多能干细胞(EPS)来生成小鼠胚囊样结构(也称为iblastoid)(Li等人,2019),最近已使用衍生自胚胎干细胞的初始多能干细胞(Yu等人,2021)或诱导的多能干细胞(iPS,Liu等人,2021年)来生成人iblastoid结构。然而,与小鼠或人相比,牛初始干细胞的衍生尚未报道。

[0005] 有极少报道称活化的牛胚胎干细胞衍生自植入前胚胎,更具体地胚胎的内细胞团(ICM)结构(Bogliotti等人,2018;Soto等人,2021)。然而,活化的ESC不分化为胚胎外细胞,因此不能直接用于生成iblastoid结构。此外,活化的ESC不能有效地用于体外育种中使用的生殖细胞分化(Hou等人,2018)。代表多能性基态(植入前ICM)的初始胚胎干细胞可以比活化的ES更有效地分化为生殖细胞(De Los Angeles,2019)。

[0006] 与使用核转移(克隆)方法(其既是劳动密集型的,又通常受到低胚胎产生率(约占胚囊形成的20-30%)的限制)相比,牛初始干细胞的衍生可有助于具有所希望的特征的胚胎的有效增殖。胚胎中所希望的基因特征可能由于减数分裂、突变和基因迁移等过程而产生,这些过程可以自然发生,可以使用辅助生殖技术(如Smith等人,WO 2020/168422)或通过遗传修饰生成。此外,动物和兽医科学可以通过提供用于大规模产生遗传修饰动物的有效平台,提供用于体外育种项目的重要组成技术,以及使开发和提供先进的兽医医学生物制品和疗法成为可能,而从初始干细胞技术实现广泛的益处。仍然需要初始牛胚胎干细胞和用于iblastid产生的相关方法。

发明内容

[0007] 本文描述了使用用于建立牛初始胚胎干细胞的牛胚胎(如桑椹胚和胚囊期胚胎),可用于实现附着和生长物形成的材料和方法。如在实施例中所证明的,与接种在传统ECM包被的基底上的胚胎相比,接种在层状ECM包被的基底上的无透明带(ZP)牛胚胎提供了更大的附着率和生长物形成。

[0008] 此外,描述了支持胚胎附着和生长物形成的扩增培养基组合物和相关方法,以及从这样的生长物繁殖内细胞团(ICM)细胞,从而允许从ICM衍生初始胚胎干细胞。因此,本文中所描述的实施方式可用于衍生初始牛胚胎干细胞以及任选地用于育种计划,如用于生成iblastoid结构,繁殖具有所希望的基因特征的植入前胚胎,衍生用于体外育种计划的原生

殖细胞和/或配子,和/或开发和提供兽医医学生物制品或疗法。

[0009] 因此,在一个方面,提供了一种用于衍生初始牛胚胎干细胞的方法。在一个实施方式中,该方法包括:

[0010] 提供包含初始牛胚胎干细胞的无透明带(ZP)牛胚胎;

[0011] 使所述无ZP牛胚胎与细胞外基质(ECM)包被的基底接触,其中,所述ECM包被的基底包括:包含与带正电的生物相容性聚合物层相邻的带负电的基底表面的基底、和与所述带正电的生物相容性聚合物层相邻的带负电的ECM层;和

[0012] 在扩增培养基的存在下培养所述无ZP牛胚胎,以诱导所述无ZP牛胚胎附着到所述ECM包被的基底上,以及诱导包含衍生的初始牛胚胎干细胞的内细胞团(ICM)的生长物。

[0013] 在一个实施方式中,所述牛胚胎被遗传修饰。

[0014] 在另一实施方式中,所述无ZP牛胚胎从重构的二倍体胚胎获得。

[0015] 在一个实施方式中,所述生物相容性聚合物在生理pH下带负电。在一实施方式中,所述生物相容性聚合物为A型明胶。

[0016] 在一个实施方式中,所述ECM包括EHS-ECM。

[0017] 在一个实施方式中,所述基底包括聚苯乙烯。

[0018] 在一个实施方式中,所述扩增培养基包括基础培养基、和一种或更多种本文中所描述的可用于诱导无ZP胚胎附着到所述ECM包被的基底上,以及诱导在无饲养层培养系统中ICM的生长物的组分。例如,在一个实施方式中,所述扩增培养基包括以下的一种或更多种:DMEM/F12和Neurobasal培养基的1:1混合物;N2B27组分;Wnt激活剂组分;Wnt抑制剂组分;MEK/ERK抑制剂组分;ROCK抑制剂组分;LIF组分;PKC抑制剂组分;和胰岛素组分。任选地,所述扩增培养基进一步包括激活素A组分。

[0019] 在一个实施方式中,所述扩增培养基包括:所述N2B27组分;所述Wnt激活剂组分;所述Wnt抑制剂组分;所述MEK/ERK抑制剂组分;所述ROCK抑制剂组分;所述LIF组分;所述激活素A组分;所述PKC抑制剂;和所述胰岛素组分。

[0020] 在一个实施方式中,所述N2B27组分包括B27补充剂和N2补充剂,任选地约1%B27补充剂和约0.5%N2补充剂;所述Wnt激活剂组分包括CHIR99021、BI0、CHIR-98014、LY2090314和/或IM-12;所述Wnt抑制剂组分包括XAV939、IWR-1和/或IWP-2;所述MEK/ERK抑制剂组分包括PD0325901、拉沃西替尼(Ravoxertinib)、GSK1120212、MEK162、PD184352、曲美替尼(Trametinib)、LY3214996和/或优立替尼(Ulixertinib);所述ROCK抑制剂组分包括Y27632、噻唑维文(Thiazovivin)和/或布比他汀(Blebbistatin);所述LIF组分包括人LIF;所述激活素A包括人激活素A;所述PKC抑制剂包括Gö6983、Gö6976、LY317615、LY333531、PKC412、GSK690693、索曲妥林(Sotrastaurin)、星形孢菌素(Staurosporine)和/或双吡啶马来酰亚胺(Bisindolylmaleimide);和/或所述胰岛素组分包括胰岛素。

[0021] 在一个实施方式中,所述无ZP牛胚胎是桑椹胚(第4阶段);胚囊(第5阶段);扩张中的胚囊(第6阶段);扩张后的胚囊(第7阶段);孵化中的胚囊(第8阶段)或孵化后的胚囊(第9阶段)。

[0022] 在一个实施方式中,所述无ZP牛胚胎通过酶辅助ZP去除来获得。

[0023] 在一个实施方式中,所述方法包括通过酶辅助ZP去除来获得所述无ZP牛胚胎。

[0024] 本文中还提供一种酶辅助ZP去除的方法,其包括如下步骤:a)提供胚胎;b)使所述

胚胎与蛋白酶溶液接触;c)在所述蛋白酶溶液中孵育所述胚胎以部分消化所述ZP并获得ZP减薄的胚胎;d)使所述ZP减薄的胚胎与蛋白酶失活培养基接触以使蛋白酶失活;e)使所述ZP破裂;和f)操纵所述胚胎以将所述ZP从所述胚胎分离。

[0025] 在一个实施方式中,在步骤c)中蛋白酶的浓度为约0.1%至约0.5%、约0.2%至0.3%、或约0.25%。

[0026] 在一个实施方式中,在步骤c)中,将所述胚胎和蛋白酶溶液孵育约30-60秒,任选地约45秒。

[0027] 在一个实施方式中,在步骤e)中使用微刀片来使所述ZP破裂。

[0028] 在一个实施方式中,在步骤f)中操纵所述胚胎包括吹打。

[0029] 在一个实施方式中,所述方法进一步包括进行遗传测试以确定对于一种或更多种生物标志物的所述无ZP牛胚胎的一种或更多种基因型。

[0030] 在一个实施方式中,所述方法进一步包括基于对于一种或更多种生物标志物的遗传测试来选择所述无ZP牛胚胎。

[0031] 在一个实施方式中,所述方法进一步包括进行遗传测试以确定所述衍生的初始牛胚胎干细胞的一种或更多种基因型。

[0032] 在一个实施方式中,所述无ZP牛胚胎从新鲜胚胎,任选地新鲜的经活检的胚胎获得。

[0033] 在一个实施方式中,步骤a)的所述胚胎是遗传修饰的胚胎。

[0034] 在一个实施方式中,所述无ZP牛胚胎从冷冻胚胎,任选地经活检的冷冻胚胎获得。

[0035] 在一个实施方式中,所述方法包括解冻所述冷冻胚胎并使所述胚胎与恢复培养基接触。

[0036] 在一个实施方式中,通过包括以下步骤的方法获得所述无ZP牛胚胎:解冻所述冷冻胚胎;使所述冷冻胚胎与所述恢复培养基接触;在所述恢复培养基中操纵所述胚胎以将所述ZP从所述胚胎分离;和在所述恢复培养基中孵育所述无ZP牛胚胎。

[0037] 在一个实施方式中,所述恢复培养基包含糖原合酶激酶3(GSK-3)抑制剂、MEK/ERK激酶抑制剂和Rho相关的含有卷曲螺旋的蛋白激酶(ROCK)抑制剂。

[0038] 在一个实施方式中,所述恢复培养基包括CHIR99021、PD0325901和Y27632。

[0039] 在一个实施方式中,所述方法进一步包括用适应培养基孵育所述无ZP胚胎,其中,所述适应培养基包括恢复培养基和扩增培养基的组合。

[0040] 在一个实施方式中,所述适应培养基包括比率为在约0.5:1和1.5:1之间、或任选地约1:1的恢复培养基和扩增培养基的组合。

[0041] 在另一方面,提供了一种使用本文中所描述的方法衍生的初始牛干细胞。又一方面包括使用本文中所描述的方法衍生的初始牛干细胞在育种方案或遗传改良计划中,以及用于繁殖具有所希望的遗传特征的植入前胚胎,衍生用于体外育种计划的原生殖细胞和/或配子,和/或开发和提供兽医医学生物制品和疗法的用途。

[0042] 在另一方面,提供了一种制备细胞外基质(ECM)包被的基底的方法,该方法包括:提供包括带负电的表面的基底;使所述带负电的表面与包含生物相容性聚合物的第一溶液接触,其中,所述生物相容性聚合物带正电;孵育与所述第一溶液接触的所述基底,使得带正电的生物相容性聚合物层在所述基底的所述带负电的表面上沉积;去除所述第一溶液并

任选地清洗所述基底；使所述基底与包含细胞外基质 (ECM) 的第二溶液接触，其中，所述ECM带负电；和孵育与所述第二溶液接触的所述基底，使得带负电的ECM层沉积在所述带正电的生物相容性聚合物层上。

[0043] 在一个实施方式中，所述生物相容性聚合物为A型明胶。

[0044] 在一个实施方式中，所述ECM包括EHS-ECM。

[0045] 在一个实施方式中，所述基底包括聚苯乙烯。

[0046] 一方面包括根据本文中所描述的方法生产的ECM包被的基底。

[0047] 又一方面包括ECM包被的基底，其包括：包括带正电的表面的基底；与所述基底的带负电的表面接触的带正电的生物相容性聚合物层；与所述带正电的生物相容性聚合物层接触的带负电的ECM层。

[0048] 在一个实施方式中，所述生物相容性聚合物为A型明胶。

[0049] 在一个实施方式中，所述ECM包括EHS-ECM。

[0050] 在一个实施方式中，所述基底包括聚苯乙烯。

[0051] 本公开的一方面包括本文中所描述的ECM包被的基底用于培养胚胎，任选地以诱导ICM生长物和/或初始胚胎干细胞的衍生的用途。

[0052] 在一个实施方式中，所述胚胎是牛胚胎，任选地是第5天至第7天的牛胚胎。

[0053] 在另一实施方式中，所述牛胚胎是重构的二倍体胚胎。

[0054] 在一个实施方式中，所述牛胚胎是经遗传修饰的胚胎。

[0055] 在另一方面，提供了一种培养基组合物，其包括：基础培养基和一种或更多种组分，用于培养胚胎，任选地以诱导ICM生长物和/或初始胚胎干细胞的衍生。在一个实施方式中，所述培养基组合物包括以下的一种或更多种：N2B27组分；Wnt激活剂组分；Wnt抑制剂组分MEK/ERK抑制剂组分；ROCK抑制剂组分；LIF组分；PKC抑制剂；和胰岛素组分。任选地，所述培养基组合物还包括激活素A组分。

[0056] 在一个实施方式中，所述N2B27组分包括约1%的B27补充剂和约0.5%的N2补充剂；所述Wnt激活剂组分包括CHIR99021、BIO、CHIR-98014、LY2090314或IM-12；所述Wnt抑制剂组分包括XAV939、IWR-1或IWP-2；所述MEK/ERK抑制剂组分包括PD0325901、拉沃西替尼、GSK1120212、MEK162、PD184352、曲美替尼、LY3214996或优立替尼；所述ROCK抑制剂组分包括Y27632、噻唑维文或布比他汀；所述LIF组分包括人LIF；所述激活素A组分包括人激活素A；所述PKC抑制剂包括Gö6983、Gö6976、LY317615、LY333531、PKC412、GSK690693、索曲妥林、星形孢菌素或双吡啶马来酰亚胺；和/或所述胰岛素组分包括胰岛素。

[0057] 又一方面包括本文中所描述的培养基组合物用于培养胚胎以诱导ICM生长物形成的用途，任选地，其中所述胚胎为牛胚胎、重构的二倍体牛胚胎，和/或所述胚胎是经遗传修饰的胚胎。

[0058] 又一方面包括恢复培养基，其包括糖原合酶激酶3 (GSK-3) 抑制剂，任选地CHIR99021，MEK/ERK激酶抑制剂，任选地PD0325901，和Rho相关的、含有卷曲螺旋的蛋白激酶 (ROCK) 抑制剂，任选地Y27632。

[0059] 前述部分仅作为实例提供，并不旨在限制本公开和所附权利要求的范围。根据本公开的权利要求、说明书和实施例，本领域普通技术人员会理解与本公开的组合物和方法相关联的其他的优点和目的。例如，本公开的多个方面和实施方式可以以多种组合来利用，

所有这些组合都由本说明书明确地加以考虑。这些其他的优点、目的和实施方式明确地包括在本公开的范围之内。本文中用于阐明本公开的背景,并且在特定情况下,用于提供关于该实践的其他细节的出版物和其他材料通过引用并入,并且为了方便起见,在所附的参考部分中列出。

附图说明

[0060] 通过以下结合附图的详细描述,本公开的进一步目的、特征和优点将变得明显,附图显示了本公开的示例说明的实施方式,其中:

[0061] 图1示出了确定在不同包被材料上接种的胚胎的附着和生长物比例的实验结果。(左上)带包被溶液的Nunc 35mm培养皿,(右上)根据包被材料的附着和生长物效率,(左下)未附着胚胎,(右下)附着胚胎。

[0062] 图2示出了带有Geltrex和30 μ m孔细胞滤网的预制皿表面的图像(图像放大倍数;x100)。

[0063] 图3示出了等离子体处理的聚苯乙烯皿表面的化学结构示意图。

[0064] 图4示出了逐层(LbL)包被的示例说明。

[0065] 图5示出了使用逐层ECM包被的基底改善的衍生效率。与仅使用EHS-ECM的对照方案相比,LbL-ECM包被的基底表现出高且稳定的附着率、TE(滋养层细胞)和ICM(内细胞团)生长。

[0066] 图6示出了(左)蛋白酶处理皿的布局的示意图和(右)蛋白酶处理的劣质胚胎(其中ZP通过酶促处理被完全去除)的图像。

[0067] 图7示出了无ZP的第6天的新鲜胚胎。在ZP去除后,所有胚胎看起来都是健康的。

[0068] 图8示出(左上)解冻后恢复皿的布局的示意图,(右上)和显示2iY培养基对解冻后胚胎的恢复的影响的图像。(底部)2iY处理的胚胎显示出比对照胚胎培养基更快的恢复和更高的衍生效率,如通过胚胎更快的再扩张所观察到的。2iY处理的胚胎显示出比对照组更大的尺寸和清晰的ICM(虚线圆圈)。

[0069] 图9是示出2iY对解冻后胚胎质量的影响的图。2iY处理的胚胎在解冻后恢复后表现出更高阶段的发育。

[0070] 图10示出了适应培养基皿#1和皿#2的布局的示意图。下部是示出了适应时间对生长物衍生的影响的图。

[0071] 图11是示出多种类型的血清来源的衍生结果的图。FBS=胎牛血清;KOSR=敲除血清替代物;SR=血清替代物;N2B27=N2补充剂+B27补充剂(参见实施例)。

[0072] 图12是示出多种Wnt信号通路和靶标的示意图。

[0073] 图13是示出毛喉素(Forskolin)和双激酶Wnt通路调节对初始干细胞衍生的影响的图。

[0074] 图14是示出IL-6和SRC抑制剂对生长物的衍生的影响的图。底部是示出SRC下游的多种通路的示意图。

[0075] 图15示出了MEK抑制剂对初始生长物形成的影响。

[0076] 图16是示出初始干细胞培养基之间的衍生效率的图(左)和示出通过t2iLGöY培养基衍生的生长物集落的图像。

[0077] 图17示出了(左)生长物的内胚层分化。ICM集落(箭头)被未分化的(箭号)和分化的(星号)内胚层细胞覆盖。(右)胰岛素添加后第一次传代后的ICM细胞集落(具有明亮边缘的细胞块)。

[0078] 图18示出了基于初始牛胚胎干细胞的衍生,衍生用于随后生成原生殖细胞系和配子以及生成多个遗传上相同的胚胎(也称为成iblastoid)细胞系的细胞系所涉及的步骤的示意图。

具体实施方式

[0079] 以下是为帮助本领域技术人员实践本公开而提供的详细描述。除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在本文的描述中使用的术语仅用于描述特定实施方式,而不旨在限制本公开。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、附图和其他参考文献均通过引用以其整体明确并入本文。

[0080] 此外,如本领域技术人员所理解的,特定部分中描述的定义和实施方式旨在适用于本文中所描述的其适用的其他实施方式。例如,在以下段落中,更详细地定义了本公开的不同方面。如此定义的每个方面可以与任何其他方面或多个方面相结合,除非有明确的相反指示。特别地,本文中描述的任何特征可以与本文中描述的任意其它特征或特征相结合。

[0081] I. 一般定义

[0082] 如本文中所用,除非另有规定,否则以下术语可具有以下赋予其的含义。然而,应当理解,本领域普通技术人员已知或理解的其他含义也是可能的,并且在本公开的范围内。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用以其整体并入本文。在冲突的情况下,会以包括定义在内的本说明书为准。此外,材料、方法和实施例仅是示例说明的,而非限制性的。

[0083] 在提供范围值的情况下,应理解的是,除非上下文另有明确规定,否则该范围的上限和下限之间的每个中间值,到下限单位的十分之一,以及该规定范围内的任何其他规定值或中间值都包含在说明书中。可以考虑从任何下限到任何上限的范围。可独立地包括在较小范围中的这些较小范围的上限和下限也包含在说明书中,受制于规定范围中的任何具体被排除的限值。如果所述范围包括一个或两个限值,则说明中也包括排除这两个限值的范围。

[0084] 必须注意,如本文和所附权利要求中所使用的,单数形式的“一(a)”、“一个(an)”和“所述(the)”包括复数引用,除非上下文另有明确规定。

[0085] 本文中详细的说明和权利要求中的所有数值都由指示值“约”或“近似”修饰,并考虑了本领域普通技术人员会预料到的实验误差和变化。

[0086] 说明书和权利要求中使用的短语“和/或”应理解为意指如此结合的元件中的“两者之一或两者”,即,在某些情况下结合存在而在其他情况下分离存在的元件。以“和/或”列出的多个元件应以相同的方式解释,即如此结合的元件中的“一个或更多个”。除了由“和/或”子句具体标识的元件之外,其他元件可任选地存在,无论与具体标识的那些元件相关还是无关。

[0087] 如说明书和权利要求中所用,“或”应理解为与上文定义的“和/或”具有相同含义。

例如,当分隔列表中的项目时,“或”或“和/或”应被解释为具有包容性,即,包括多个元件或元件列表中的至少一个,但也包括不止一个,以及任选的其他未列出的项目。仅明确表示相反的术语,如“仅一个”或“恰好一个”,或当在权利要求中使用时,“由…组成”指的是包含多个元件或元件列表中的恰好一个元件。一般而言,本文中使用的术语“或”当前面出现排他性术语(如两者之一”、“其中的一个”、“仅其中的一个”或“恰好其中的一个”)时,仅应解释为表示排他性替代物(即“一个或另一个,但不是两者”)。

[0088] 在权利要求和上述说明书中,所有过渡短语,如“包含”、“包括”、“携带”、“具有”、“含有”、“涉及”、“持有”、“由…构成”等应理解为开放式的,即意指包括但不限于。只有过渡短语“由…组成”和“基本上由…组成”应为封闭或半封闭过渡短语。

[0089] 如说明书和权利要求书中所用,短语“至少一个”,在提及一个或多个元件的列表时,应理解为指从元件列表中的任何一个或多个元件中选择的至少一个元件,但不必须包括元件列表中具体列出的每个元件中的至少一种,并且不排除元件列表中元件的任何组合。该定义还允许除了短语“至少一个”所指的元件列表中具体标识的元件之外,元件可以任选地存在,无论是与具体标识的那些元件相关还是无关。

[0090] 本文中使用的术语“约”是指所提及的数字的 $\pm 10\% - 15\%$ 、 $5\% - 10\%$ 或任选的约 5% 。

[0091] 应当理解,在本文中所描述的包括一个以上步骤或动作的某些方法中,除非上下文另有指示,否则该方法的步骤或动作的顺序不必须限于所记载的方法的步骤和动作的顺序。

[0092] 还应理解,与本文中所描述的方法和材料相似或等同的任何方法和材料也可用于本公开的实践或试验。

[0093] II. 方法

[0094] 本文描述的是用于初始胚胎干细胞生长物形成和初始胚胎干细胞的衍生的方法。如实施例中所述,本发明的发明人已经证明了在包括层状ECM包被的基底和特殊配制的扩增培养基的无饲养层培养体系中的初始牛干细胞生长物形成。该层状ECM包被的基底和扩增培养基支持衍生自胚胎(例如桑椹胚或胚囊期(例如牛第6天或第7天)胚胎)的内细胞团(ICM)细胞的离体或体外附着和生长。因此,本文中所述的材料和方法可用于衍生和维持初始牛胚胎干细胞,并任选地用于育种计划如用于具有所希望的遗传特征的植入前胚胎的增殖和/或iblastoid结构的产生,衍生用于体外育种计划的原生殖细胞和/或配子,以及开发和提供兽医医学生物制品和疗法。所希望的遗传特征可以通过自然过程或遗传修饰来产生。

[0095] 因此,在一个方面,提供一种用于衍生初始牛胚胎干细胞的方法。在一个实施方式中,该方法包括:

[0096] 提供包含初始牛胚胎干细胞的无透明带(ZP)牛胚胎;

[0097] 使所述无ZP牛胚胎与细胞外基质(ECM)包被的基底接触,其中,所述ECM包被的基底包括:包含与带正电的生物相容性聚合物层相邻的带负电的基底表面的基底,和与所述带正电的生物相容性聚合物层相邻的带负电的ECM层;和

[0098] 在扩增培养基的存在下培养所述无ZP牛胚胎,以诱导所述无ZP牛胚胎附着到ECM包被的基底上,以及诱导包含衍生的初始牛胚胎干细胞的内细胞团(ICM)的生长物。

[0099] 如本文中所用,术语“初始胚胎干细胞”用于指基本上保留桑椹胚期胚胎(如第5天或第6天的牛胚胎)细胞的分子特征的胚胎干细胞,其中,细胞仍处于未分化状态。初始胚胎干细胞可以在胚囊(如第7天的胚胎)的内细胞团(ICM)中发现。初始胚胎干细胞可能能够发育成完整的生物体,和/或可保留产生体组织和/或细胞类型的完全补偿(full complement)的能力。与诱导的多能干细胞(iPSC)相比,初始胚胎干细胞能够在不需要外源性表达的多能性因子的情况下被衍生并保持在自我更新的未分化状态。相似地,术语“初始牛胚胎干细胞”是指牛来源的初始胚胎干细胞。

[0100] 初始胚胎干细胞,如初始牛胚胎干细胞可以衍生自充分未分化的组织,如胚胎的胚胎细胞,例如桑椹胚(第4阶段);胚囊(第5阶段);扩张中的胚囊(第6阶段);扩张后的胚囊(第7阶段);孵化中的胚囊(第8阶段)或孵化后的胚囊(第9阶段)。在一个实施方式中,初始牛胚胎干细胞可衍生自3至8天的牛胚胎,任选地3、4、5、6、7或8天的牛胚胎,或5至7天的牛胚胎。在一个实施方式中,牛胚胎是桑椹胚(第4阶段);胚囊(第5阶段);扩张中的胚囊(第6阶段);扩张后的胚囊(第7阶段);孵化中的胚囊(第8阶段)或孵化后的胚囊(阶段9)。在一个实施方式中,牛胚胎是3至7天的胚胎,任选地5至7天的胚胎,或者6天或7天的胚胎。在一个实施方式中,胚胎是植入前胚胎。在一个实施方式中,胚胎是先前已经冷冻和/或活检的胚胎。在一个实施方式中,胚胎是经遗传修饰的。在一个实施方式中,胚胎是基于对于一种或更多种生物标志物的遗传测试来选择的。

[0101] “遗传修饰的胚胎”是指胚胎中细胞的基因组DNA已被操纵以表达一个或更多个外源基因和/或在内源基因或基因间区域内引入突变,其影响一个或更多个内源基因或基因产物的表达或功能活性的胚胎。牛胚胎中成功的遗传修饰的实例包括通过显微注射(U.S.7067713)和慢病毒感染(Park,2007)引入转基因,以及最近使用转染和基因组编辑器(如锌指核酸酶、转录激活子样效应核酸酶(TALEN)和聚簇规则间隔短回文重复序列/CRISPR相关基因(CRISPR/Cas)系统)进行的基因组编辑(Bishop和Van Eenennaam,2020)。遗传修饰的常见牛靶点是乳蛋白基因,如 β -乳球蛋白、 β -酪蛋白、肌生成抑制蛋白、无角/有角的、赋予光滑的被毛以提高耐热性的催乳素受体,以及与疾病易感性或复原力有关的多种基因(Wang et al.,2022)。

[0102] 同样,“遗传修饰的细胞”是指细胞的基因组DNA已被操纵以表达一个或更多个外源基因和/或在内源基因或基因间区域内引入突变,其影响一个或更多个内源基因或基因产物的表达或功能活性的细胞。

[0103] 透明带(ZP)阻止胚胎细胞附着在培养基底上。因此,在一个实施方式中,胚胎的ZP在与层状ECM包被的基底和/或扩增培养基接触之前被去除。可以使用任何合适的方法提供或获得无ZP胚胎。例如,可以使用酶促、化学和/或机械手段使ZP变薄和/或破裂,随后通过机械操作将ZP与胚胎分离以获得无ZP胚胎。用于使ZP变薄和/或破裂的合适的酶促或化学手段包括例如使用蛋白酶,如链霉蛋白酶或酸化的台罗德氏溶液。用于使ZP破裂的合适的机械方法包括例如使用微刀片、微量移液管、微针或激光。破裂的ZP可以例如通过搅拌如吹打、涡旋或使用微量移液管或微针的直接操作而从胚胎分离。

[0104] 在一个实施方式中,通过酶辅助ZP去除来获得无ZP胚胎。如实施例中所述,桑椹胚(6天)牛胚胎的蛋白酶处理和随后ZP的机械破裂和分离产生适合于衍生本文中所述的初始胚胎干细胞的无ZP胚胎。

[0105] 常规的胚胎活检技术例如使用微刀片导致ZP破裂。因此,在一个实施方式中,无ZP胚胎是从经活检的胚胎获得的。

[0106] 胚胎中所希望的遗传特征可能由于减数分裂、突变和基因迁移等过程而产生,这些过程可以自然发生,也可以通过遗传修饰发生。因此,在一个实施方式中,无ZP胚胎是从遗传修饰的胚胎获得的。

[0107] 从中获得无ZP牛胚胎的胚胎可以是新鲜的或预先冷冻的,并且任选地可以从经活检的冷冻胚胎获得。在一个实施方式中,胚胎是经遗传测试的胚胎。

[0108] 在一个实施方式中,牛胚胎是重构的二倍体胚胎。例如在Smith等,WO 2020/168422中描述了重构的二倍体胚胎,其内容通过引用以其整体并入本文。

[0109] 通过使用经筛选和选择的产雄和孤雌生殖胚胎单倍体细胞重构双亲胚胎,可以在体外生成具有预定基因组的二倍体胚胎(Smith等人,WO 2020/168422)。使重构的二倍体胚胎的基因组可以产生以含有等位基因、单倍型或满足大量遗传特征或基因组特征的严格遗传标准的形状(如生产性状(例如奶、脂肪、蛋白质、脂肪%、蛋白质%、奶蛋白变体组成,例如A2A2奶)、肉质性状、生长性状、健康性状(例如体细胞评分、乳腺炎抗性、免疫反应、存活率、抗病性)、生殖性状(例如妊娠率、受孕率)、产仔性状(例如产仔容易、首次受精产仔、死胎)、构象性状(例如无角性状、乳房和乳头性状、脚和腿性状、躯干性状、尺寸性状)、效率性状(例如饲料效率性状、可加工性、寿命、生产寿命)、新性状(例如机器人挤奶性状、耐热性、活动性状和行为性状)和综合指数性状(例如LPI(生命生产指数)、TPI(总生产指数),以及缺乏多种有害的等位基因和单倍型(例如侏儒症、并蹄症、少毛症、短脊椎综合征、瓜氨酸血症、牛白细胞粘附缺陷病)的独特组合。

[0110] 培养中的大多数细胞(基质衍生细胞除外)需要支持层以在体外(如组织培养皿中)附着和增殖。这种支持层可以由基质细胞(直接附着在培养皿上)制成,通常已知为饲养层细胞系统。对于胚胎干细胞的培养,经常使用小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)饲养层系统。然而,使用饲养层系统的一个缺点是,当来自不同于小鼠的物种的细胞(如胚胎干细胞)在MEF上培养时,可能存在跨物种污染。另一种选择是使用蛋白质基质作为支持层,也已知为无饲养层系统。

[0111] Boggliotti等人(2018)描述了饲养层系统用于培养活化的牛胚胎干细胞的用途,其中为了补偿低附着率,使用针将胚胎压到培养皿的底部。然而,使用这样的外源性机械力可损伤细胞。相反,本文中所述的实施方式实现了低分化初始胚胎干细胞的附着和生长物形成,而无需将细胞机械地压到培养皿上。在一个实施方式中,本文中所述的方法和提供用于初始胚胎干细胞的衍生的无饲养层系统。

[0112] 例如,如图5所示,与使用从Engelbreth-Holm-Swarm小鼠肉瘤细胞中提取的ECM(如Matrigel(来自Corning)或Geltrex(来自Invitrogen))的对照基底相比,使用具有带正电的生物相容性聚合物结合层的逐层(LbL)方案生成的ECM包被的基底显示出更高、更稳定的附着率以及TE(滋养层细胞)和ICM(内细胞团)生长。

[0113] 因此,在一个实施方式中,提供一基底,其包括带正电的表面;与基底的带负电的表面接触的带正电的生物相容性聚合物层;和与带正电的生物相容性聚合物层接触的带负电的ECM层。

[0114] 还提供一种制备适合于本文中所描述的胚胎附着和生长物的ECM包被的基底的方

法。在一个实施方式中,该方法包括:

[0115] a) 提供包括带负电的表面的基底,

[0116] b) 使带负电的表面与包括生物相容性聚合物的第一溶液接触,其中,所述生物相容性聚合物带正电;

[0117] c) 孵育与所述第一溶液接触的所述基底,使得带正电的生物相容性聚合物层沉积在所述基底的带负电的表面上;

[0118] d) 去除所述第一溶液并任选地清洗所述基底;

[0119] e) 使所述基底与包含细胞外基质 (ECM) 的第二溶液接触,其中,所述ECM带负电;和

[0120] f) 孵育与所述第二溶液接触的所述基底,使得带负电的ECM层沉积在所述带正电的生物相容性聚合物层上。

[0121] 如本文中所用,术语“基底”通常指沉积或粘附材料层的物理表面。基底可以是刚性的或柔性的,并且可以由任何合适的材料例如塑料(如聚苯乙烯)制成。可以对基底进行处理以使其具有亲水性和/或赋予表面如负电荷的电荷。任选地,对基底进行等离子体处理。在一个实施方式中,基底是等离子体处理的聚苯乙烯(也称为组织培养塑料)。

[0122] 如本文中所用,术语“生物相容性聚合物”通常指与活组织或细胞相容的聚合物,例如无毒且不会对例如细胞的存活、生长、增殖和/或其他生物活性引起不希望的影响的聚合物。生物相容性聚合物对于这样的活性可以是惰性的,和/或可以支持所希望的活性。生物相容性聚合物可以是天然存在的聚合物,可以由天然存在的聚合物制备,或者可以是具有所希望的性质的合成聚合物。合适的生物相容性聚合物具有以在用于用聚合物包被基底的条件下引起聚合物沉积和/或粘附到基底表面上的性质。聚合物的沉积或粘附可以例如通过静电相互作用、氢键或任何其他合适类型的相互作用而发生。因此,生物相容性聚合物的合适性质可以包括例如在用于包被的溶液的pH的电荷(例如正电荷)。聚合物和基底之间的相互作用应在用于后续清洗和ECM包被步骤的条件(例如pH)以及用于细胞培养的条件(如生理pH)下保持。合适的聚合物包括A型明胶(如衍生自酸固化组织的明胶)。因此,在一个实施方式中,生物相容性聚合物是A型明胶,任选地是A型猪明胶。

[0123] 如本领域所理解的,术语“孵育(incubate)”或“孵育(incubating)”是指将例如物质、材料、组合物等保持在特定温度或温度范围内一段时间。

[0124] 如本文中所用,术语“生理pH”是指约7.1至约7.6,任选约7.15至约7.45,约7.2至约7.4,约7.25至约7.35,或约7.3的pH。

[0125] 本文中所用的术语“细胞外基质”或“ECM”通常指包含一种或更多种大分子组分(如蛋白质、糖胺聚糖(GAG)和/或蛋白聚糖)的生物相容性基质,其为细胞(如例如离体或体外生长的细胞)的生长和增殖提供附着和支持。常见的ECM组分可包括但不限于层粘连蛋白、胶原蛋白(例如胶原蛋白I-XIV)、纤连蛋白、玻连蛋白、巢蛋白(entactin/nidogen)、硫酸乙酰肝素蛋白多糖一种或更多种,和/或其一种或更多种功能变体。如本领域已知,ECM通常包括基膜提取物,如从Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 小鼠肉瘤细胞中分离的那些,并且在下文中称为“EHS-ECM”(例如以商品名Matrigel™ (Corning) 和Geltrex™ (Thermo Fisher) 出售)。在一个实施方式中,EHS-ECM可以包括例如层粘连蛋白、胶原蛋白IV、巢蛋白(entactin/nidogen)和硫酸乙酰肝素蛋白多糖。或者,如果需要,也可以在包被方法中使用具有不同组成和/或纯化组分(例如FN)的其他来源的ECM和/或合成ECM样基底(例如包含

RGD肽)。如本领域技术人员所理解的,合适的ECM组分的选择会取决于许多因素,包括但不限于细胞类型、分化阶段和其他实验参数。例如,本文中证明了EHS-ECM适合于牛胚胎的培养(例如附着和生长物)。因此,在一个实施方式中,该ECM是EHS-ECM,任选地是Matrigel或Geltrex。

[0126] 如本文中所示,牛胚胎的附着和生长物形成受到培养胚胎的扩增培养基的组成的影响。扩增培养基可以包括例如基础培养基和一种或更多种小分子、生长因子和/或营养物质。合适的基础培养基可以由本领域技术人员容易地确定,并且包括但不限于DMEM/F12、advanced DMEM/F2和Neurobasal培养基。合适的补充剂可以由本领域技术人员容易地确定,并且包括但不限于MEM非必需氨基酸、L-谷氨酰胺、Glutamax、抗坏血酸、胰岛素、BSA(组分V)、 β -巯基乙醇和青霉素/链霉素。在本公开的一个方面中,提供了可用于衍生和维持初始胚胎干细胞(包括ICM的附着和生长物)的扩增培养基组分。在一个实施方式中,扩增培养基包括基础培养基和/或补充剂以及一种或更多种扩增培养基组分。在一个实施方式中,扩增培养基包含以下一种或多种:N2B27组分,其包含B27补充剂和N2补充剂,任选地包含约1%的B27补充剂和约0.5%的N2补充剂;Wnt激活剂组分,任选地CHIR99021、BIO、CHIR-99014、LY2090314或IM-12;Wnt抑制剂组分,任选地XAV939、IWR-1或IWP-2;MEK/ERK抑制剂组分,任选地PD0325901、拉沃西替尼(Ravoxertinib)、GSK1120212、MEK162、PD184352、曲美替尼、LY3214996或优立替尼;ROCK抑制剂组分,任选地Y27632、噻唑维文(Thiazovivin)或布比他汀(Blebbistatin);LIF组分,任选地人LIF;PKC抑制剂,任选地Gö6983、Gö6976、LY317615、LY333531、PKC412、GSK690693、索曲妥林、星形孢菌素或双吡啶马来酰亚胺(Bisindolylmaleimide);以及胰岛素组分,任选地胰岛素中。任选地,扩增培养基可包含N2B27、CHIR99021(Wnt激活剂)、XAV939(Wnt抑制剂)、PD0325901(MEK/ERK抑制剂)、拉沃西替尼(ERK特异性抑制剂)、Gö6983(PKC抑制剂)、Y27632(ROCK抑制剂)和/或LIF中的一种或更多种。在一个实施方式中,扩增培养基进一步包括激活素A组分,任选地人激活素A。

[0127] II. 物质的产品和组成

[0128] 在本公开的一个方面,提供了可用于初始牛胚胎干细胞的衍生和培养的物质产品和组成。

[0129] 例如,在一个实施方式中,提供了一种ECM包被的基底,其包括:包含与带正电的生物相容性聚合物层相邻的带负电的基底表面的基底、和与所述带正电的生物相容性聚合物层相邻的带负电的ECM层。在一个实施方式中,生物相容性聚合物是A型明胶。在一个实施方式中,ECM包括EHS-ECM。在一个实施方式中,基底是适合于细胞培养的塑料基底,如聚苯乙烯。

[0130] 还提供了适用于促进牛胚胎附着、生长物形成和/或衍生如本文中所描述的初始牛胚胎干细胞的培养基的配方。

[0131] 在一个实施方式中,扩增培养基包括基础培养基和本文鉴定的一种或更多种组分。例如,在一个实施方式中,扩增培养基包括N2B27组分、Wnt激活剂组分、Wnt抑制剂组分、MEK/ERK抑制剂组分、ROCK抑制剂组分、LIF组分、PKC抑制剂和胰岛素组分中的一种或多种。在一个实施方式中,扩增培养基包括N2B27组分、Wnt激活剂组分、Wnt抑制剂组分、MEK/ERK抑制剂组分、ROCK抑制剂组份、LIF组分、PKC抑制剂和胰岛素组分。

[0132] 在一个实施方式中,N2B27组分包括B27补充剂和N2补充剂,任选地约1%的B27补

充剂和约0.5%的N2补充剂。

[0133] 在一个实施方式中,Wnt激活剂组分包括CHIR99021、BIO、CHIR-98014、LY2090314或IM-12。任选地,Wnt激活剂组分包括任选地浓度为约0.1 μ M至约5 μ M,任选地约1 μ M至约3 μ M,任选地约1 μ M、约2 μ M、或约3 μ M的CHIR99021。

[0134] 在一个实施方式中,Wnt抑制剂组分包括XAV939、IWR-1或IWP-2。任选地,Wnt抑制剂组分包括任选地浓度为约0.2 μ M至约10 μ M,任选地约1 μ M至约5 μ M,任选地约2 μ M的XAV939。任选地,Wnt抑制剂组分包括任选地浓度为约0.25 μ M至约10 μ M,任选地约1 μ M至约5 μ M,任选地约2.5 μ M的IWR-1。

[0135] 在一个实施方式中,MEK/ERK抑制剂组分包括PD0325901、拉沃西替尼、GSK1120212、MEK162、PD184352、曲美替尼、LY3214996或优立替尼。任选地,MEK/ERK抑制剂组分包括PD0325901或拉沃西替尼。任选地,MEK/ERK抑制剂组分包括浓度为约0.05 μ M至约5 μ M,任选地约0.1 μ M至约2 μ M,任选地约1 μ M的PD0325901。任选地,MEK/ERK抑制剂组分包括浓度为约0.25 μ M至约10 μ M,任选地约1 μ M至约5 μ M,任选地约2.5 μ M的拉沃西替尼。

[0136] 在一个实施方式中,ROCK抑制剂组分包括Y27632噻唑维文或布比他汀。任选地,ROCK抑制剂组分包括任选地浓度为约0.5 μ M至约20 μ M,任选地约5 μ M至约10 μ M,任选地约5 μ M或约10 μ M的Y27632。

[0137] 在一个实施方式中,LIF组分包括任选地浓度为约1ng/ml至约1000ng/ml,任选地约5ng/ml至约100ng/ml,任选地约5ng/ml、约10ng/ml、约20ng/ml、或约100ng/ml的人LIF。

[0138] 在一个实施方式中,激活素A包括任选地浓度为约1ng/ml至约50ng/ml,任选地约5ng/ml至约50ng/ml,任选地约10ng/ml或约20ng/ml的人激活素A。

[0139] 在一个实施方式中,PKC抑制剂包括Gö6983、Gö6976、LY317615、LY333531、PKC412、GSK690693、索曲妥林、星形孢菌素或双吡啶马来酰亚胺。任选地,PKC抑制剂包括任选地浓度为约0.2 μ M至约25 μ M,任选地约2 μ M至约2.5 μ M,任选地约2 μ M或约2.5 μ M的Gö6983。

[0140] 在一个实施方式中,胰岛素组分包括任选地浓度为约2ug/ml至约200ug/ml,任选地约20ug/ml的胰岛素肽。

[0141] 还提供了适合于胚胎解冻后恢复的配方。如图8和图9所示,用如本文中所述配制的恢复培养基处理的胚胎相对于对照表现出更快的恢复和更高的衍生效率,如通过胚胎更快的再扩张所观察到的。相对于对照,用恢复培养基处理的胚胎似乎也更大,具有更清晰的ICM。

[0142] 在一个实施方式中,所述恢复培养基包含糖原合酶激酶3(GSK-3)抑制剂、MEK/ERK激酶抑制剂和Rho相关的含有卷曲螺旋的蛋白激酶(ROCK)抑制剂。合适的GSK-3抑制剂包括例如CHIR99021。合适的MEK/ERK抑制剂包括例如PD0325901。合适的ROCK抑制剂包括例如Y27632。在一个实施方式中,所述恢复培养基包含CHIR99021,任选地0.1 μ M至约5 μ M,任选地约1 μ M至约3 μ M,任选地约1 μ M、约2 μ M、或约3 μ M;PD0325901,任选地约0.05 μ M至约5 μ M,任选地约0.1 μ M至约2 μ M,或约1 μ M;和Y27632,任选地约0.5 μ M至约20 μ M,任选地约5 μ M至约10 μ M,或约10 μ M。

[0143] 还提供了包括如本文中所描述的ECM包被的基底、扩增培养基和/或恢复培养基中的一种或更多种的试剂盒。在一个实施方式中,ECM包被的基底、扩增培养基和/或恢复培养基被包装在单独的容器中。

[0144] 一个方面包括使用本文中所述的方法衍生的初始牛干细胞。在一个实施方式中,初始牛干细胞是经遗传修饰的干细胞。

[0145] III. 用途

[0146] 还提供了本文中所述的产品、组合物或试剂盒用于支持培养中的胚胎的附着、胚胎细胞的生长物和/或初始胚胎干细胞的衍生的用途。

[0147] 例如,在一个实施方式中,提供了如本文中所描述的ECM包被的基底用于培养胚胎和/或衍生自胚胎的细胞的用途。在一个实施方式中,ECM包被的基底可用于促进胚胎的附着和/或生长物以及初始胚胎干细胞(任选地初始牛胚胎干细胞)的衍生。

[0148] 在另一实施方式中,提供了如本文中所描述的扩增培养基用于培养胚胎和/或衍生自胚胎的细胞的用途。在一个实施方式中,扩增培养基可用于促进胚胎的附着和/或生长物,以及初始胚胎干细胞(任选地初始牛胚胎干细胞)的衍生。在一个实施方式中,扩增培养基用于与本文中所描述的ECM包被的基底组合使用。

[0149] 在另一实施方式中,提供了如本文中所描述的恢复培养基或适应培养基用于处理胚胎、任选的牛胚胎和任选的重构的二倍体牛胚胎的用途。在一个实施方式中,恢复培养基可用于处理新鲜胚胎,或先前已被活检和/或冷冻的胚胎。恢复培养基也可用于胚胎可受益于恢复培养基的过程,如例如ZP去除、解冻、活检、基因编辑或细胞衍生。

[0150] 另一方面包括使用本文中所描述的方法衍生的初始牛干细胞在育种方案或遗传改良计划中,或用于繁殖具有所希望的遗传特征的植入前胚胎,衍生用于体外育种计划的原生殖细胞和/或配子,和/或开发和提供兽医医学生物制品和疗法的用途。

[0151] 以下非限制性实施例是本申请的示例说明:

[0152] 实施例

[0153] 实施例1. 包被材料的优化

[0154] 在本实施例中,作为包被材料测试了三种不同的细胞外基质包被材料:A型明胶(Sigma,G1890)、Geltrex™(Thermo Fisher,A1413301)和Matrigel™(Corning,354277)。除非特别指出,否则在实施例中使用EHS-ECM(细胞外基质)来指代Geltrex和/或Matrigel。

[0155] 对每种类型的包被材料和处于多种浓度的材料测定附着率和生长物率。

[0156] 包被方案如下:

[0157] 1. 将4滴50μL的包被溶液:0.1%明胶或不同浓度的EHS-ECM(以100x浓缩溶液来提供)应用于Nunc表面35mm²细胞培养皿上(参见图1)。

[0158] 2. 将包被的基底在38.5°C的5%CO₂加湿培养箱中孵育1小时。

[0159] 3. 孵育后,去除过量的包被溶液,将50μL的细胞培养基应用于包被的区域,用4mL矿物油覆盖,并将50μL额外的培养基加入到每滴中。

[0160] 4. 允许培养基在38.5°C的5%O₂、5%CO₂加湿孵育箱中平衡2小时。

[0161] 5. 在ZP去除和胚胎适应后,将1个胚胎放入1个微培养滴中以开始生长物衍生。

[0162] 6. 在生长物培养48小时时测定第一附着率,并在第一次附着测定后立即进行第一次培养基更换。

[0163] 7. 每天评价附着率和生长物率,并在每天评价后立即更换培养基。

[0164] 结果

[0165] 如图1所示,与明胶包被相比,用EHS-ECM包被(Geltrex)观察到更高的附着率,但

在生长物形成率方面没有观察到差异。

[0166] 当使用不同浓度的EHS-ECM时,没有观察到生长物效率方面的差异。总体附着率低,导致生长物效率低。

[0167] 实施例2.有网格包被的带凹槽的表面

[0168] 据猜测,包被溶液的薄层形成的光滑表面没有为胚胎附着提供合适的“地形”。为了测试是否可以提高附着率,通过用明胶或EHS-ECM包被材料包被网状膜来创建带凹槽的表面。

[0169] 培养皿的制作方案如下:

[0170] 1.将细胞滤网膜(30 μ m孔径)切割成1cm²大小。

[0171] 2.将切割的膜放置在35mm²的培养皿上。

[0172] 3.将50 μ l的包被材料(0.5%明胶或1x EHS-ECM)应用于切割的膜上。在实施例1中1x EHS-ECM给出了最佳的附着率,因此被选择用于该实验。

[0173] 4.允许包被材料在38.5°C的加湿培养箱中聚合1小时,然后在室温在实验台上(层流通风橱下)干燥30分钟。

[0174] 5.包被的表面在UV下灭菌20分钟。

[0175] 6.将表面预制皿放置在冰上,并小心地去除膜。

[0176] 结果

[0177] 如图2所示,使用该方案可以很容易地制作带凹槽的培养皿表面。然而,随着培养基的加入,凹槽迅速塌陷。

[0178] 实施例3.使用逐层(LbL)的方案生成的ECM包被的基底

[0179] 尽管使用新鲜胚胎时,用EHS-ECM获得了中等的附着率,但生长物很难衍生,尤其是很难从冻融的胚胎衍生。使用实施例1中描述的包被方案,在培养液滴的底部观察到一些蛋白质碎片。据猜测蛋白质基质已经从培养皿的表面分离,并进一步猜测蛋白质基质没有足够牢固地附着在培养皿上。为了解决这个问题,对包被方案进行了修改来采用了逐层的方法。

[0180] 实施例1和实施例2中使用的NuncTMdelta(等离子体处理)聚苯乙烯皿具有带负电的表面(参见例如图3和图4)。常见的ECM组分,例如基膜提取物,在用于包被的条件下和/或在生理pH也带负电。例如,Geltrex(A14133,Thermo-fisher)在pH7.2带负电,pH7.2是用于包被的稀释缓冲液的pH(EHS-ECM的等电点:4-5)。蛋白质基质的分子可以通过氢结合表面的-OH残基而与等离子体处理的聚苯乙烯表面粘附(Lerman等人,2018)。

[0181] 然而,由于两种组分具有相似的静电荷,因此两侧之间的相互作用相对较弱。因此,研究了一种“逐层”的方法,其中带正电的材料被定位为两种带负电的组分之间的“静电胶”(参见图4)。A型明胶(通常从猪提取)的等电点为7-9,而B型明胶(通常从牛提取)的等电点为4.8-5.1。因此,A型明胶在pH 7.2带正电荷,使其在逐层的方案中作为“静电胶”起作用的合适候选者。此外,明胶不仅可以提供静电稳定性,还可以提供大量类似于EHS-ECM的蛋白质基序,这可能会增强明胶层和EHS-ECM层之间的生物相互作用。

[0182] 用于生成LbL ECM包被的基底的方案如下:

[0183] 1.将40 μ l的0.1%A型明胶(用DMEM/F12基础培养基稀释)应用于Nunc35mm²细胞培养皿的表面以制成小液滴。

[0184] 2. 将培养皿在38.5°C的5%CO₂加湿培养箱中孵育1小时。

[0185] 3. 在孵育后, 去除明胶溶液, 并加入50μl具有Ca²⁺和Mg²⁺的DPBS以从液滴中清洗过量的明胶, 然后使用抽吸来去除。清洗步骤重复2次以上。

[0186] 4. 将50μl的1x EHS-ECM应用于明胶包被的区域, 并在38.5°C的5%CO₂加湿培养箱中孵育1小时。

[0187] 5. 孵育后, 去除EHS-ECM溶液, 并应用50μl培养基; 用4ml矿物油覆盖液滴, 并向每滴中加入50μL额外的培养基。

[0188] 6. 使培养基在5%CO₂培养箱中平衡2小时。

[0189] 结果

[0190] 如图5所示, 与对照条件 (仅EHS-ECM) 相比, 使用LBL EHS-ECM包被的基底, 胚胎的附着得到了改善, 并且更加稳定。LbL EHS-ECM包被的基底的使用也大幅度改善了从胚胎产生生长物的能力。与常规的EHS-ECM包被的基底相比, 生长物表现出更好的ICM生长, 其最终产生胚胎干细胞。相对于对照组, 还观察到TE生长的改善。

[0191] 实施例4. 用于生长物培养的胚胎制备

[0192] 胚胎, 也称为胚囊, 被形成透明带 (ZP) 的糖蛋白的厚膜包围。在发育过程中, 胚囊会开始扩张并最终“孵化”, 这会允许胚囊离开“外壳”。通常在体外培养的第8天左右可能获得孵化中和孵化后的胚囊。然而, 牛体外胚胎培养基可以有效地支持发育, 直到第7天, 之后胚胎需要转移到接受者中或被冷冻。从初步实验发现, ZP阻挡胚胎的附着, 因此应在生长物培养前将其去除。因此, 进行了研究来尝试及改善从新鲜的第6天/第7天胚胎和/或冷冻/解冻的第7天胚胎中去除ZP。

[0193] 基于酶的针对新鲜胚胎的透明带 (ZP) 消化方案

[0194] 基于酶的方法是一种常用的ZP去除技术。该方案通常使用浓度为0.05%至0.5%的蛋白酶 (来自灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*), 链霉蛋白酶, Sigma P8811)。然而, 由于蛋白酶不是糖蛋白特异性酶, 一旦ZP被完全消化, 它也会损害胚胎。

[0195] ZP消化方案如下:

[0196] 1. 制备蛋白酶处理皿 (参见图6)。

[0197] 2. 将胚胎从胚胎培养基转移到胚胎处理培养基 (Hepes缓冲培养基) 的液滴1中。

[0198] 3. 通过从液滴1连续转移到液滴3来清洗胚胎。

[0199] 4. 将胚胎转移到蛋白酶液滴 (测试浓度: 0.05%; 0.1%; 0.25% 或 0.5%) 中, 并孵育直到观察到ZP的消化 (约2分钟)。

[0200] 5. 将蛋白酶处理的胚胎转移到含10%FBS的胚胎处理培养基制成的灭活培养基的液滴4、液滴5和液滴6中。

[0201] 结果

[0202] 如图6所示, 长期暴露于蛋白酶会可以导致胚胎自身解离并损伤细胞 (如深色和不透明细胞所示例说明的)。

[0203] 由于桑椹胚期 (例如, 牛第6天) 胚胎具有非常厚的ZP (与扩张的胚囊期 (例如牛第7天) 相比, 在扩张的胚囊期, ZP由于胚囊的扩张而开始变薄), 因此在最低浓度 (<0.1%) 不可能完全消化。

[0204] 在较高浓度 (>0.25%) 下, 暴露于FBS后, 酶没有完全失活, 因此胚胎受到高浓度蛋

白酶的负面影响,这导致胚胎完全分解为单个卵裂球(blastomere)。

[0205] 消化ZP所需的时间在胚胎之间也是高度可变的。因此,很难获得标准化的方案。

[0206] 新鲜或冷冻/解冻的酶辅助ZP去除方案

[0207] 现有的第7天胚胎的胚胎活检方案采取使用微刀片切割ZP来进行胚胎活检。通过活检在ZP中形成的开口便于胚胎从ZP中释放。然而,由于ZP更厚/更硬,这种方法不能容易地应用于桑椹胚期(例如第6天)胚胎。因此,将两种不同的方案结合起来以开发一种用于桑椹胚期胚胎的“酶辅助ZP去除方案”。简言之,用足以使ZP变薄变软而不引起胚胎解离或对细胞损伤的蛋白酶处理胚胎。然后,具有减薄的ZP的桑椹胚,现在可以很容易地利用使用微刀片的常规活检技术。

[0208] ZP消化方案如下:

[0209] 1.用0.25%蛋白酶制备蛋白酶皿(例如,如图6所示)。蛋白酶液滴最多在使用前2小时制备。

[0210] 2.将一个或多个胚胎从胚胎培养基转移到用胚胎处理培养基制成的液滴1中。

[0211] 3.通过从液滴1转移到液滴3来清洗胚胎。

[0212] 4.将胚胎转移到0.25%蛋白酶液滴中并孵育45秒。

[0213] 5.将处理过的胚胎转移到用含10%FBS的胚胎处理培养基制成的灭活培养基的液滴4、液滴5和液滴6中。

[0214] 6.将ZP减薄的胚胎转移到活检皿中。

[0215] 结果

[0216] 酶辅助ZP去除方案可用于产生无ZP的桑椹胚,如图7所示。

[0217] 实施例5.提高经活检的冷冻胚胎解冻后质量的组合物

[0218] 在育种应用中,通常对经活检的冷冻胚胎进行遗传鉴定(例如筛选生物标志物),使从业者能够选择具有所希望的遗传特征的那些胚胎。尽管可能对第7天的胚胎进行活检和冷冻,但这些胚胎与新鲜胚胎相比暴露在更大的压力下。经活检的冷冻胚胎已经打开ZP(因为活检程序),因此ZP可以通过轻柔的吹打容易地去除。然而,经活检-冷冻-解冻的胚胎质量通常不如新鲜胚胎。本文描述了一种解冻后恢复培养基(本文称为“2iY”培养基或“恢复培养基”),其包括三种抑制剂:CHIR99021、PD0325901和Y27632。CHIR99021和PD0325901是表征良好的抑制剂,在干细胞领域也被称为“2i”。这两种抑制剂调节涉及初始胚胎干细胞的转录因子活性的两个重要通路(CHIR99021:通过抑制GSK3的Wnt通路激活剂,PD0325901:MEK通路抑制)。为ROCK抑制剂的Y27632是一种肌动蛋白丝稳定剂。测试了这三种抑制剂通过调节关键的干性途径来保护细胞免受解冻后压力和促进细胞更快恢复的能力。本文所示的实验表明,该方案显著提高了解冻后胚胎的质量,这允许更有效地衍生生长物。

[0219] 方案

[0220] 1.向胚胎处理培养基(2iY培养基)中加入3 μ M CHIR99021(2520691, PeproTech)、1 μ M PD0325901(3911091, PeproTech)和10 μ M Y27632(1293823, PeproTech)。

[0221] 2.使用2iY培养基(参见图8)或对照胚胎培养培养基制备解冻皿。

[0222] 3.根据方案解冻一个或多个胚胎。

[0223] 4.将胚胎放入2iY培养基或对照胚胎处理培养基中。

[0224] 5.解冻后立即通过轻柔的吹打来去除ZP。

[0225] 6.将胚胎在38.5℃的6.8%CO₂及5%O₂的加湿培养箱中孵育4小时。

[0226] 7.当胚胎完全恢复(再扩张)时,将其转移到扩增培养基中。通过胚囊腔外观的存在来确认恢复。

[0227] 结果

[0228] 如图8所示,当在LbL ECM包被的培养皿上分别被接种2天和4-5天时,2iY处理组表现出比对照组更高的附着和生长物形成率。2iY处理的胚胎表现出比对照胚胎培养培养基更快的恢复和如通过胚胎的更快的再扩张所观察到的更高的衍生效率。2iY处理的胚胎相对于对照组更大,并且在恢复4小时后显示出明显的ICM(图8中的虚线圆圈)。

[0229] 2iY处理组在冷冻保存解冻4小时后表现出更晚期以及质量改善的胚胎(参见图9)。

[0230] 实施例6.胚胎对新培养环境的适应

[0231] 培养中的细胞,尤其是胚胎干细胞,对培养基组分和营养水平非常敏感。然而,在细胞培养中,有两个因素即培养基渗透压和pH经常被忽视,尤其是当使用完全/商业培养基时。观察到将胚胎直接从胚胎处理培养基转移到DMEM(胚胎干细胞基础培养基)对细胞有压力(数据未提供),渗透压和pH测量证实了两种培养基之间的巨大差异(参见表1)。因此,据猜测适应培养基可以促进细胞逐渐适应新的微环境。

[0232] 方案

[0233] 1.将解冻培养基和扩增培养基以1:1的比例混合。

[0234] 2.如图10所示,制备适应皿。

[0235] 3.解冻后恢复之后,将胚胎在适应培养基(1:1比例的解冻培养基(例如胚胎处理培养基和扩增培养基(例如DMEM)))中清洗两次,然后放入皿#1中的适应液滴中(图10)。

[0236] 4.适应1小时后,通将胚胎转移到皿#2中的清洗液滴(扩增培养基)中将胚胎清洗四次。

[0237] 5.然后将胚胎移动到扩增培养基(DMEM)中用于接种。

[0238] 6.然后将适应后的胚胎接种到LbL包被的微液滴。

[0239] 结果

[0240] 表1:多种培养基的pH和渗透压(Osm)测量值。测量结果一式两份。

	培养基	pH	Osm
[0241]	胚胎处理培养基	7.17, 7.15	269, 268
	适应	7.21, 7.22	309, 310
[0242]	扩增培养基	7.27, 7.28	353, 353

[0243] 作为适应处理函数的衍生效率(胚胎接种后4-6天测量的附着、TE生长和ICM生长)如图10所示。在1小时的适应之后,衍生效率与0.5小时的适应或没有适应的对照相比得到了提高。超过1小时的适应(2小时和4小时的孵育)相对于1小时的适应性没有显示出任何差

异。

[0244] 实施例7.培养基支持生长物形成的能力的测试

[0245] 细胞培养基包含多种组分,以支持细胞的一般维持,如代谢、存活和增殖。还可以加入额外的生长因子或抑制剂来促进分化、自我更新或仅促进细胞生长。要衍生初始胚胎干细胞并将其维持在未分化状态,需要在培养基中生长因子和抑制剂的组合。添加剂的不当组合或这些分子的不同浓度可诱导干细胞的不可逆分化。

[0246] 血清类型/血清替代物

[0247] 如图11所示,测试了五种不同的血清来源/浓度条件。FBS (10091, Gibco™)、敲除血清替代物 (10828-10, Gibco™)、血清替代物 (S0638, Sigma)、B27补充剂 (17504-044, Gibco™) 和N2补充剂 (17502-048, Gibco™) 用于该测试。传统的小鼠2iL培养基 (DMEM/F12+1% MEM非必需氨基酸+2mM Glutamax+100μMβ-巯基乙醇+100IU青霉素/链霉素+生长因子/抑制剂 (包括3μM CHIR99021、1μM PD0325901和100ng/ml LIF)) 用作10% FBS和20% KOSR以及1x、2x SR组的血清测试的基础培养基。t2iLGöY培养基 (DMEM/F12和neurobasal培养基的1:1混合物+1% MEM非必需氨基酸+2mM Glutamax+50μg/ml BSA, V部分+100μMβ-巯基乙醇+100IU青霉素/链霉素+生长因子/抑制剂 (包括1μM CHIR99021、1μM PD0325901、10μM Y27632、2.5μM G66983和10ng/ml LIF)) 用于N2B27组的测试。这种不同组合的原因是2iL培养基具有更简单的配方 (与t2iLGoY培养基相比), 这使其更适合于基础血清来源, 如FBS; KOSR或SR。

[0248] 敲除血清替代物 (KOSR) 是其他物种中广泛使用的血清来源, 在牛胚胎生长物方面显示出非常低的效率。

[0249] 与KOSR相比, 含有牛来源组分的血清替代物 (SR) 显示出更好的效率。

[0250] 包括1%的B27补充剂和0.5%的N2补充剂的N2B27培养基, 与所测试的其他组分相比表现出牛胚胎生长物衍生 (TE和ICM生长) 的最佳结果。

[0251] 所测试的其他基础培养基和其他组分/添加剂

[0252] 传统小鼠2iL培养基: 培养基组成: DMEM/F12+1x血清替代物+100ng/ml白血病抑制因子 (LIF)+3μM CHIR99021+1μM PD0325901。

[0253] 表2: 使用小鼠2iL培养基的衍生率

培养基	基础培养基	来源	生长因子/抑制剂	n=	附着%	TE %	ICM %
2iL	DMEM/F12	第六天	hLIF: 100 ng/ml	32	88%	50%	19%
		胚胎	CHIR99021: 3 μM				
			PD0325901: 1 μM				

[0255] 获得了正附着率, 但生长物形成率较低, 只有19%的ICM扩张和50%的TE扩张。

[0256] 初始人干细胞培养基-NHSS (Gafni等人, 2013): 培养基组成: DMEM/F12: Neurobasal培养基 (1:1混合物)+N2B27血清+8ng/ml FGF+1ng/ml TGF-β+20ng/ml LIF+3μM CHIR99021+1μM PD0325901+10μM SP600125+10μM SB203580

[0257] 表3: 使用NHSM培养基的衍生率

培养 基	基础培养基		血清类型		生长	附着 n=	TE %	ICM %
					因子/抑制剂			
[0258]	NHSM	DMEM/F12和 Neurobasal培养基的1:1 混合物	第五天 胚胎	N2B27	hFGF: 8 ng/ml	30	63%	27%
					hTGF- β : 1 ng/ml			
					hLIF: 20 ng/ml			
					CHIR99021: 3 μ M			
					PD0325901: 1 μ M			
					SP600125: 10 μ M			
					SB203580: 10 μ M			

[0259] 这种组合表现出非常低的效率, ICM扩张为0%。

[0260] 毛喉素培养基

[0261] 毛喉素是一种腺苷酸环化酶刺激因子, 可增加细胞中的cAMP水平, cAMP是参与许多信号通路的第二信使。毛喉素和2iL培养基的组合在人初始干细胞的衍生 (Hanna等人, 2010) 和牛初始样多能干细胞的重编程 (Kawaguchi等人, 2015) 方面显示出良好的效率。

[0262] 2iLfk的配方: 传统小鼠2iL培养基+10 μ M毛喉素

[0263] 与传统的2iL培养基和NHSM培养基相比, 这种组合显示出改善的衍生效率 (图13)。然而, ICM衍生的初始干细胞集落在传代后在2iLfk培养基中没有显示出任何进一步的扩增。

[0264] Wnt的双激酶调节

[0265] 已知Wnt是初始干细胞信号通路的关键参与者。Wnt激活剂CHIR99021和Wnt抑制剂如IWR-1或XAV939 (两者都是相同蛋白质复合物的抑制剂, 但各自靶向不同的单元) 的组合引起 β -连环蛋白的细胞质积累, 并可通过作为粘附连接的关键组分的E-钙粘蛋白的稳定来促进小鼠多能干细胞的自我更新 (Kim等人, 2013)。测试了Wnt的双调节克服用2iLfk培养基时观察到的较差扩张的能力。

[0266] 双Wnt培养基的配方: 1.5 μ M CHIR99021+2.5 μ M IWR-1+1 μ M PD0325901+100 ng/ml LIF+10 μ M毛喉素。

[0267] 如图13所示, 该组合对牛胚胎干细胞显示出负面影响。

[0268] 牛IL-6 (LIF的超家族) 和SRCi:

[0269] 测试了牛IL-6 (LIF的超家族) 和SRC抑制剂分别作为hLIF和PD0325901的替代物, 用于已用于人初始干细胞衍生的t2iLGöY培养基 (滴定后的 2i/LIF/Gö6983/Y27632, Guo等人, 2016)。

[0270] 人LIF最初用于t2iLGöY的配方。然而, 人和牛的LIF序列不同。因此, 测试了作为LIF超家族成员的牛IL-6作为人LIF的替代物。

[0271] SRC抑制剂是一种RTK抑制剂, 参与生长因子诱导的大多数信号通路 (Theunissen等人, 2014)。知道SRC抑制的终点最终将靶向ERK/MEK通路, 测试了SRC抑制剂作为替代和MEK途径抑制的新策略 (通过MEKi PD0325901)。

[0272] t2iLGöY培养基的配方: DMEM/F12: Neurobasal培养基 (1:1混合物) + N2B27血清+

1 μ M CHIR99021+1 μ M PD0325901+10 ng/ml人LIF+2.5 μ M **Gö6983**+10 μ M Y27632。

[0273] SRCi培养基的配方:t2iLGöY培养基,其中PD0325901已被2 μ M CGP77675 (SRC抑制剂)取代,人LIF被10 ng/ml牛IL-6取代。

[0274] 如图14所示,与t2iLGöY培养基相比,用牛IL-6代替人LIF或用SRC抑制剂CGP77675代替MEK抑制剂PD0325901对衍生效率(无论是通过低附着率还是低生长物形成率)显示出负面影响。

[0275] MEK抑制剂(MEKi)

[0276] Zhao等人(2021)发表的结果表明,必须从牛ES细胞培养基中去除MEK抑制剂,这与之前发表的关于人细胞的结果相反。通过从培养基中去除MEK抑制剂来进行研究以测试这种方法。

[0277] 表4:用MEK调节的衍生率

培养基	基础培养基	来源	血清类型	生长			
				因子/抑制剂	附着%	TE %	ICM %
[0278]	+MEK 抑制剂	DMEM/F12和 Neurobasal培养基的 1:1混合物	第六天 胚胎	N2B27	CHIR99021: 1 μ M		
					PD0325901: 1 μ M		
					Gö6983: 2.5 μ M		
					Y27632: 10 μ M		
					hLIF: 20 ng/ml		
	-MEK 抑制剂	DMEM/F12和 Neurobasal培养基的 1:1混合物	第六天 胚胎	N2B27	CHIR99021: 1 μ M		
					Gö6983: 2.5 μ M		
					XAV939: 2 μ M		
					hLIF: 20 ng/ml		

[0279] 当将MEK抑制剂PD0325901从培养基中撤出时,衍生效率降低,如胚胎腔形成(其是ICM细胞分化的清晰标志)所示(参见图15)。

[0280] PKC抑制剂,**Gö6983**

[0281] 随着培养基组成的最新改进,迄今为止测试的最佳培养条件,即2iLfk和t2iLGoY培养基与2i和NHSM培养基并排进行了测试。值得注意的是,如图16所示,在t2iLGoY中加入PKC抑制剂**Gö6983**(Guo等人,2016)改善了衍生效率。

[0282] t2iLGoY培养基显示出相似的ICM生长率,但在附着和生长物形成方面,尤其是TE生长方面,显示出要高得多的比率。

[0283] t2iLGoY的配方:DMEM/F12:Neurobasal培养基(1:1混合物)+N2B27血清+1 μ M CHIR99021+1 μ M PD0325901+10ng/ml LIF+2.5 μ M **Gö6983**+10 μ M Y27632。

[0284] 胰岛素

[0285] 在使用上述多种培养基组合物进行第一次传代后,ICM细胞形态没有得到维持。ICM细胞在生长物培养过程中和传代后迅速分化为胚外内胚层细胞(下胚层(hypoblast))。

[0286] 据推测,调节培养基中胰岛素的浓度可克服这种类型的分化(Anderson等人,2017)。

[0287] 随着在培养基中加入20 μ g/ml胰岛素,在生长物培养过程中没有观察到下胚层形成,传代后可以获得ICM细胞,如图17所示。

[0288] ERK通路抑制

[0289] Khan等人(2021)使用高通量化学筛选来鉴定人初始干细胞的最佳培养条件,把ERK通路的抑制坚定定为维持稳定的人初始干细胞培养的关键因素(Khan等人,2021)。

[0290] Wnt通路的抑制也被强调为人初始干细胞领域的关键因素(Bredenkamp等人,2019)。将Khan等人(2021)和Bredenkamp等人(2019)的方法相结合来研究和开发PXGRY/LA培养基。

[0291] PXGRY/LA的配方:DMEM/F12:Neurobasal培养基(1:1混合物)+N2B27血清+1 μ M PD0325901+2 μ M XAV939+2 μ M G66983+2.5 μ M拉沃西替尼+10 μ M Y27632+10ng/ml LIF+20ng/ml激活素A。

[0292] 如表5所示,Wnt通路的激活(使用t2iLGoY培养基)或其抑制(通过使用PXGRY/LA培养基)在使用无饲养层系统衍生初始生长物的效率方面没有显示出任何显著差异。然而,初始干细胞通常被衍生并维持在饲养层细胞上,而初始干细胞培养基在技术上是为这样的培养系统设计的。根据Cosin-Roger等人,2019和Talbot等人,2012,饲养层细胞分泌几种重要的生长因子以及更重要的是分泌Wnt配体。在具有无饲养层系统的PXGRY/LA培养基中,Wnt通路不仅被抑制,而且被正常从饲养层细胞分泌的Wnt配体完全耗尽。因此,与维持在饲养层细胞上的细胞相比,使用无饲养层条件,Wnt抑制的效果可能不相同,特别是在培养的几次传代之后。因此t2iLGöY可能更适合于使用无饲养层条件的牛初始细胞衍生。

[0293] 表5:用Wnt调节的衍生率

培养基		血清	生长				
培养基	基础培养基	来源	类型	因子/抑制剂	附着%	TE %	ICM %
[0294] t2iLGöY	DMEM/F12和 Neurobasal培养基的1:1 混合物	第六天 胚胎	N2B27	CHIR99021 : μ M	98%	83%	34%
				PD0325901 : 1 μ M			
				Gö6983 : 2.5 μ M			
				Y27632 : 10 μ M			
				hLIF : 20 ng/ml			
[0295] PXGRY/LA	DMEM/F12和 Neurobasal培养基的1:1 混合物	第六天 胚胎	N2B27	PD0325901: 1 μ M	100%	90%	33%
				XAV939: 2 μ M			
				Gö6983: 2 μ M			
				拉沃西替尼: 2.5 μ M			
				Y27632: 10 μ M			
				hLIF: 20 ng/ml			
Activin A: 20 ng/ml							

[0296] 实施例8:iBlastoid结构的生产

[0297] 使用与Liu等人(2021)、Yu等人(2021)和Yanagida等人(2021)最近发表的方法类似的方法,将使用前述实施例中描述的高效方案生成的稳定牛初始干细胞用于重构

iBlastoid结构。

[0298] 方案

[0299] 1.使用酶促解离方法将初始干细胞集落解离成单个细胞。

[0300] 2.在iBlastoid培养基1中计数细胞数并将细胞密度调节至500个细胞/ml。iBlastoid培养基1会允许初始干细胞分化为滋养层干细胞,以形成胚囊的外层(TE)。

[0301] 3.用多通道移液管将100个细胞(200 μ l)接种到非粘附的圆底96孔板的每个孔中。

[0302] 4. 48小时后,从培养板中去除iblastoid培养基1,并加入200ul的iblastoid培养基2。

[0303] 5.在48小时时,将已较好建立的iblastoid转移到iblastoid操纵培养基(Hepes缓冲DMEM/F12+Neurobasal培养基)中,并基于常规胚胎分级系统评价iblastoid质量。

[0304] 6.通过Boviteq胚胎冷冻方案来冷冻iblastid。

[0305] iBlastoid培养基1的配方为Advanced DMEM/F12+0.5%血清替代物+1%MEM NEAA+1%GlutamaxTM+0.1mM β -巯基乙醇+庆大霉素(Gentamycin)+2 μ M CHIR99021+5 μ M Y27632+0.5mM丙戊酸+1 μ M A83-01+50ng/ml EGF。

[0306] iBlastoid培养基2的配方为DMEM/F12和neurobasal培养基的1:1混合物+1%MEM NEAA+1%GlutamaxTM+0.1mM β -巯基乙醇+100IU/ml Pen/Strep+100ng/ml激活素A+3 μ M CHIR99021+10ng/ml。

[0307] 参考文献

[0308] Anderson KGV,Hamilton WB,Roske F V.,Azad A,Knudsen TE,Canham MA,Forrester LM and Brickman JM(2017) Insulin fine-tunes self-renewal pathways governing naive pluripotency and extra-embryonic endoderm.Nature Cell Biology 19 1164-1177.

[0309] Bishop TF and Van Eenennam AL. (2020) Genome editing approaches to augment livestock breeding programs.J Exp Biol.223(Suppl_1):jeb207159..doi:10.1242/jeb.207159.

[0310] Bogliotti YS,Wu J,Vilarino M,Okamura D,Soto DA,Zhong C,Sakurai M,Sampaio RV,Suzuki K,Izpisua Belmonte JC et al.(2018)Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 115 2090-2095.

[0311] Bredenkamp N,Stirparo GG,Nichols J,Smith A and Guo G(2019)The Cell-Surface Marker Sushi Containing Domain 2Facilitates Establishment of Human Naive Pluripotent Stem Cells.Stem Cell Reports 12.

[0312] Cosin-Roger J,Ortiz-MasiàMD and Barrachina MD(2019)Macrophages as an emerging source of wnt ligands:Relevance in mucosal integrity.Frontiers in Immunology 10 2297.

[0313] De Los Angeles A(2019)Frontiers of Pluripotency.Methods in Molecular Biology 20053-27.

[0314] Gafni O,Weinberger L,Mansour AA,Manor YS,Chomsky E,Ben-Yosef D,Kalma

Y, Viukov S, Maza I, Zviran A et al. (2013) Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* 504.

[0315] Guo G, Von Meyenn F, Santos F, Chen Y, Reik W, Bertone P, Smith A and Nichols J (2016) Naive Pluripotent Stem Cells Derived Directly from Isolated Cells of the Human Inner Cell Mass. *Stem Cell Reports* 6.

[0316] Hanna J, Cheng AW, Saha K, Kim J, Lengner CJ, Soldner F, Cassady JP, Muffat J, Carey BW and Jaenisch R (2010) Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 9222-9227.

[0317] Hou Z, An L, Han J, Yuan Y, Chen D and Tian J (2018) Revolutionize livestock breeding in the future: an animal embryo-stem cell breeding system in a dish. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 2018 9:1 9 1-11.

[0318] Kawaguchi T, Tsukiyama T, Kimura K, Matsuyama S, Minami N, Yamada M and Imai H (2015) Generation of **Naïve** Bovine Induced Pluripotent Stem Cells Using PiggyBac Transposition of Doxycycline-Inducible Transcription Factors. *PLoS ONE* 10e0135403.

[0319] Khan SA, Park K mi, Fischer LA, Dong C, Lungjangwa T, Jimenez M, Casalena D, Chew B, Dietmann S, Auld DS et al. (2021) Probing the signaling requirements for naive human pluripotency by high-throughput chemical screening. *Cell Reports* 35.

[0320] Kim H, Wu J, Ye S, Tai CI, Zhou X, Yan H, Li P, Pera M and Ying QL (2013) Modulation of β -catenin function maintains mouse epiblast stem cell and human embryonic stem cell self-renewal. *Nature Communications* 4.

[0321] Lerman MJ, Lembong J, Muramoto S, Gillen G and Fisher JP (2018) The Evolution of Polystyrene as a Cell Culture Material. *Tissue Engineering-Part B: Reviews* 24.

[0322] Li R, Zhong C, Yu Y, Liu H, Sakurai M, Yu L, Min Z, Shi L, Wei Y, Takahashi Y et al. (2019) Generation of Blastocyst-like Structures from Mouse Embryonic and Adult Cell Cultures. *Cell* 179 687-702.e18.

[0323] Liu X, Tan JP, Schröder J, Aberkane A, Ouyang JF, Mohenska M, Lim SM, Sun YBY, Chen J, Sun G et al. (2021) Modelling human blastocysts by reprogramming fibroblasts into iBlastoids. *Nature* 591 627-632.

[0324] Park F. (2007) Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiol Genomics*. 31:159-173.

[0325] Smith, LC, Labrecque, R, Paredes LMA, Therrien J, and Vigneault, C. 2020. Use of haploid embryonic cells to generate offspring with predetermined genomes. *WO* 2020/168422.

[0326] Solter D and Knowles BB (1975) Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proc Natl Acad Sci USA* 72(12):099-102

- [0327] Soto DA,Navarro M,Zheng C,Halstead MM,Zhou C,Guiltinan C,Wu J and Ross PJ(2021).Simplification of culture conditions and feeder-free expansion of bovine embryonic stem cells.Scientific Reports 2021 11:1 11 1-15.
- [0328] Talbot NC,Sparks WO,Powell AM,Kahl S and Caperna TJ(2012)Quantitative and semiquantitative immunoassay of growth factors and cytokines in the conditioned medium of ST0 and CF-1 mouse feeder cells.In Vitro Cellular& Developmental Biology.Animal 48 1-11.
- [0329] Theunissen TW,Powell BE,Wang H,Mitalipova M,Faddah DA,Reddy J,Fan ZP, Maetzel D,Ganz K,Shi L et al. (2014)Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency.Cell Stem Cell 15.
- [0330] Wang S,Qu Z,Huang Q,Zhang J,Lin S,Yang Y,Meng F,Li J,and Zhang K. (2022)Application of Gene Editing Technology in Resistance Breeding of Livestock.Life(Basel) .12:1070.doi:10.3390/life12071070.
- [0331] Yanagida A,Spindlow D,Nichols J,Dattani A,Smith A and Guo G(2021) Naive stem cell blastocyst model captures human embryo lineage segregation.Cell Stem Cell 28.
- [0332] Yu L,Wei Y,Duan J,Schmitz DA,Sakurai M,Wang L,Wang K,Zhao S,Hon GC and Wu J(2021)Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells.Nature591 620-626.
- [0333] Zhao L,Gao X,Zheng Y,Wang Z,Zhao G,Ren J,Zhang J,Wu J,Wu B,Chen Y et al.(2021)Establishment of bovine expanded potential stem cells.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 118.

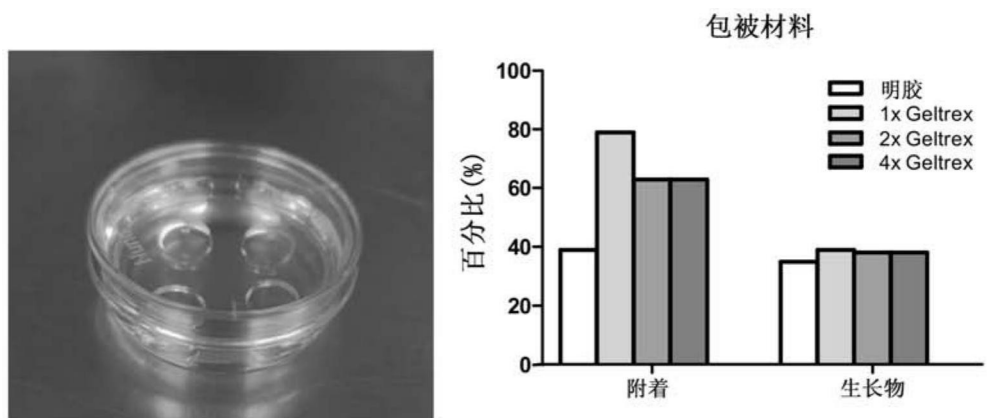
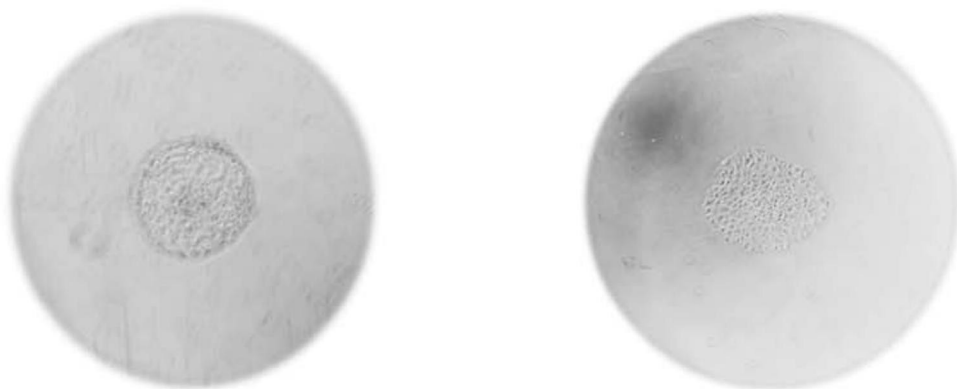


图1

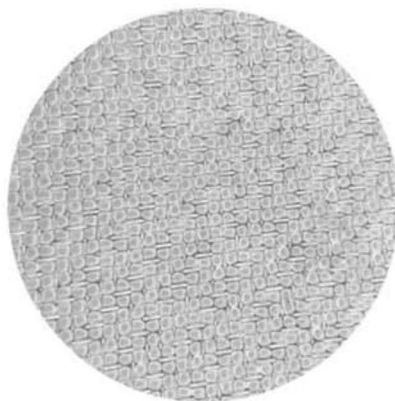


图2

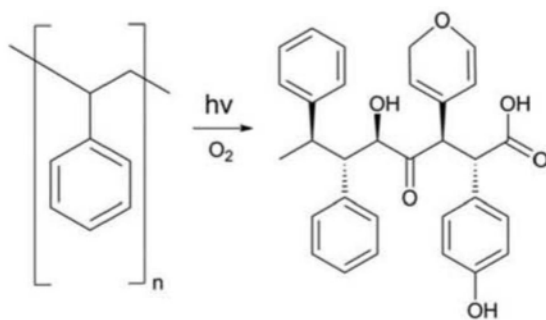


图3

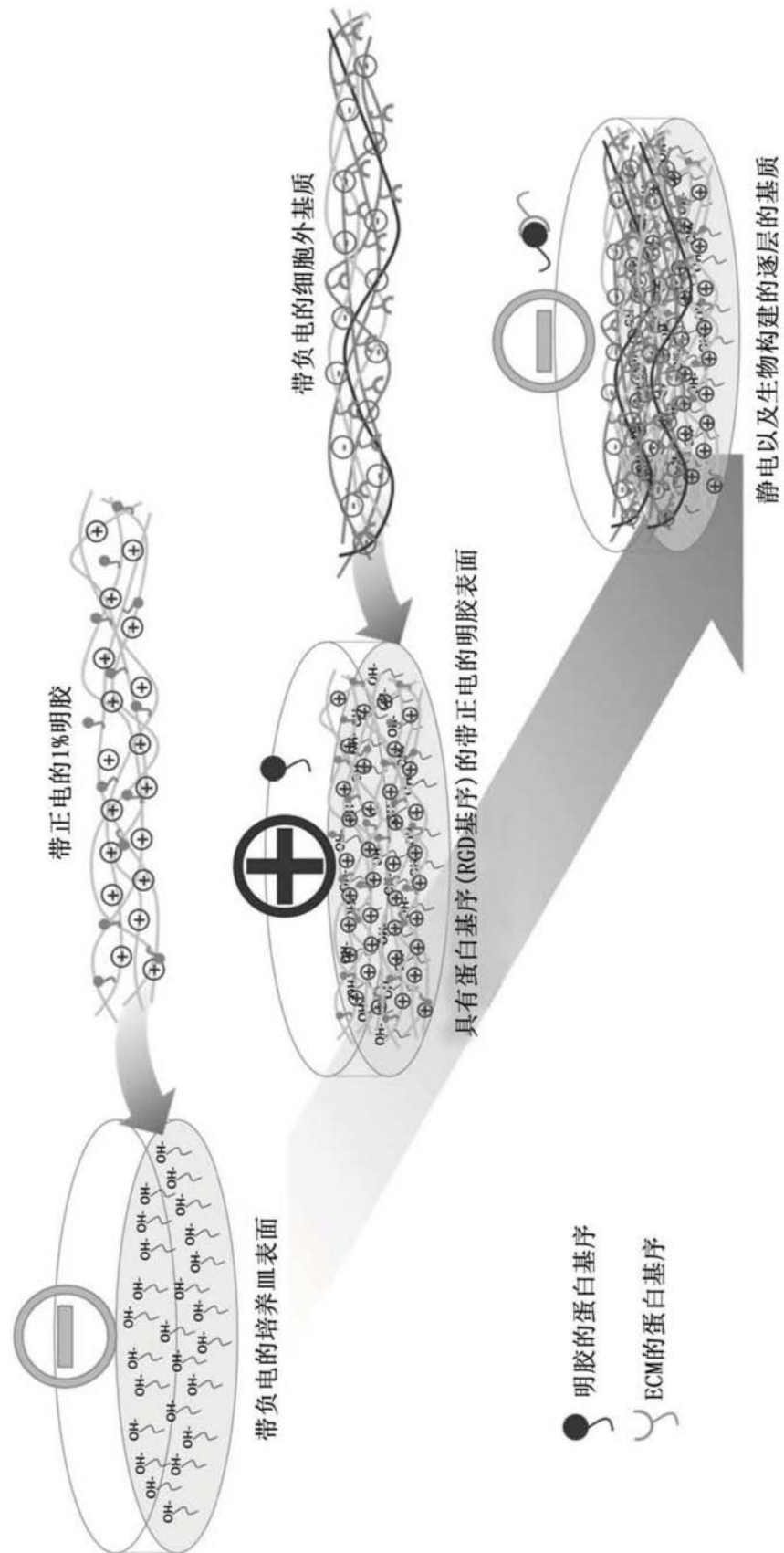


图4

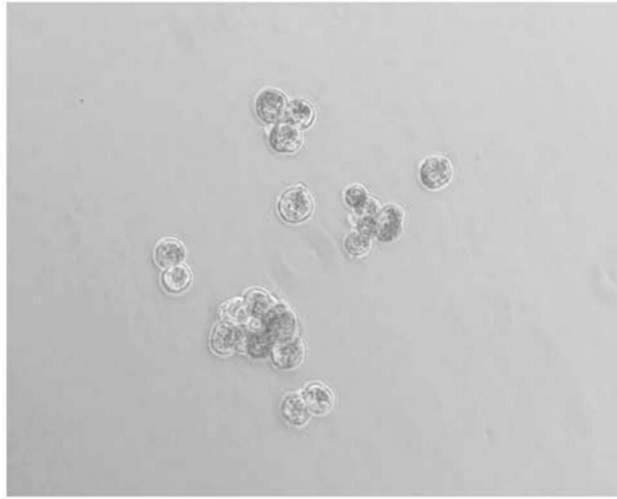


图6(续)

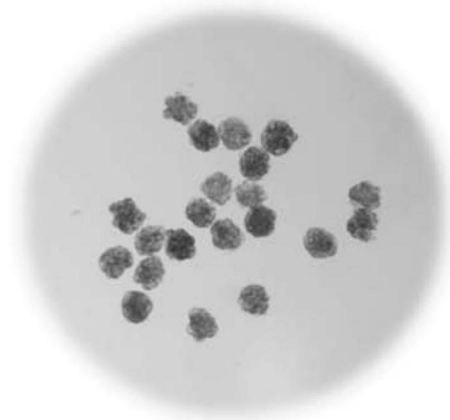


图7

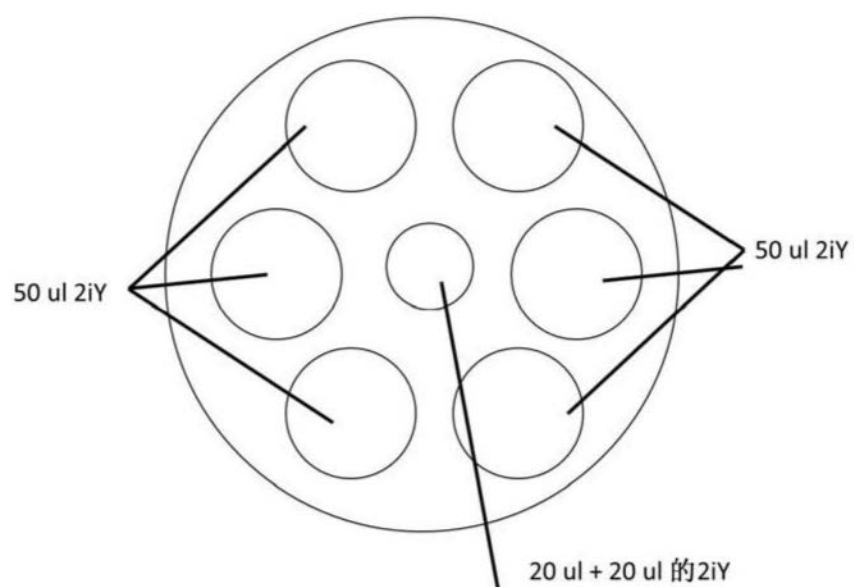
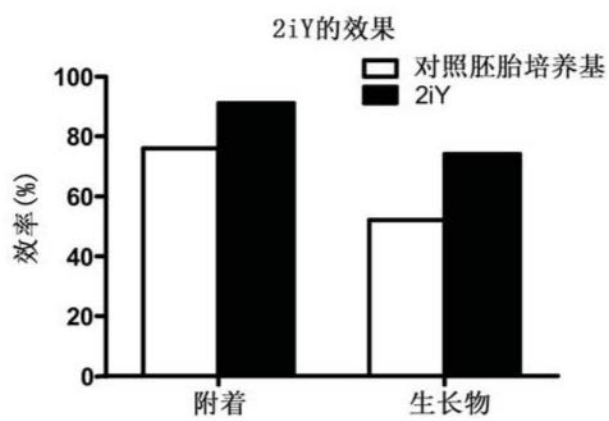


图8

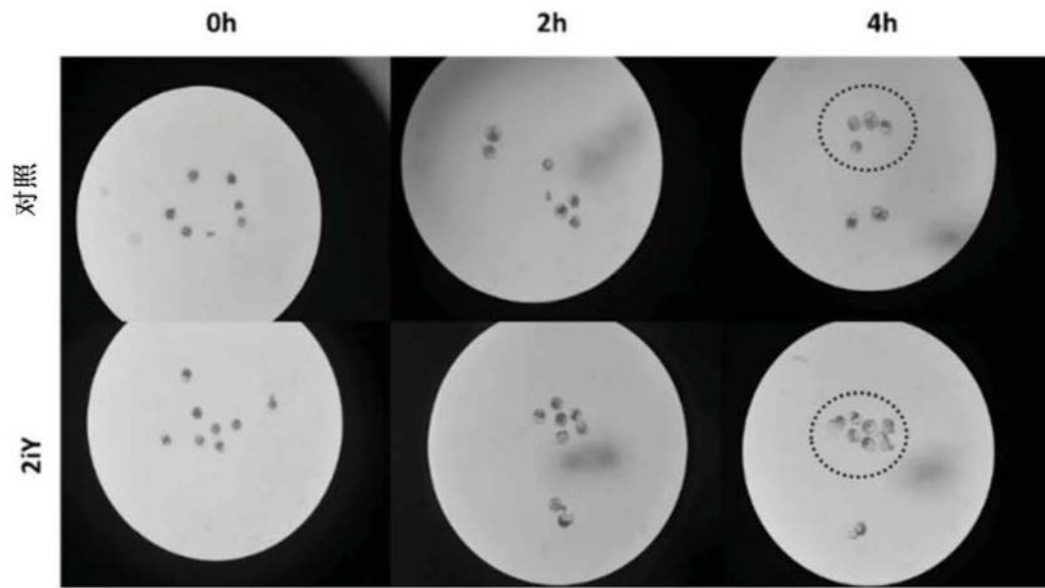


图8 (续)

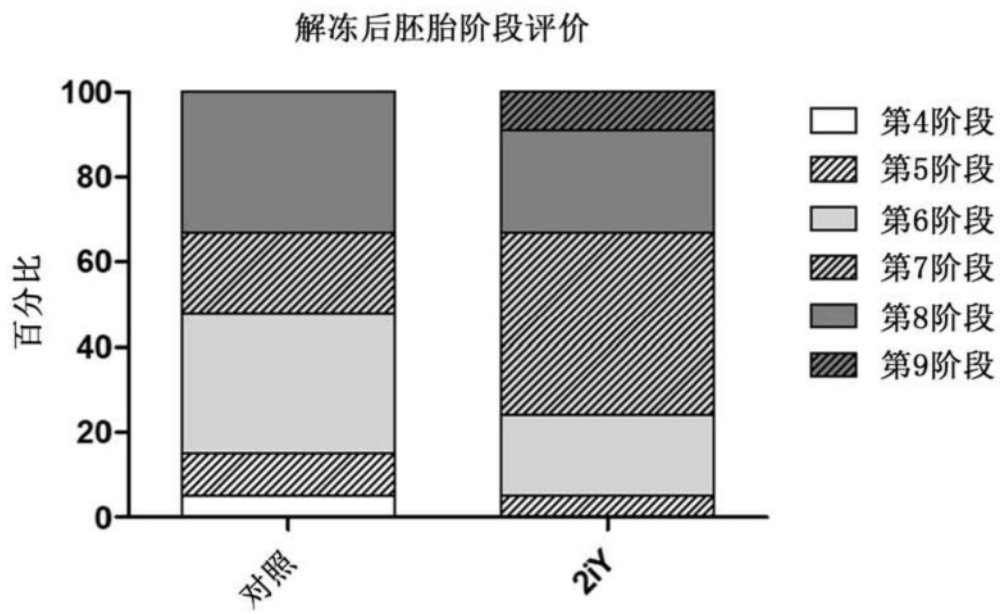


图9

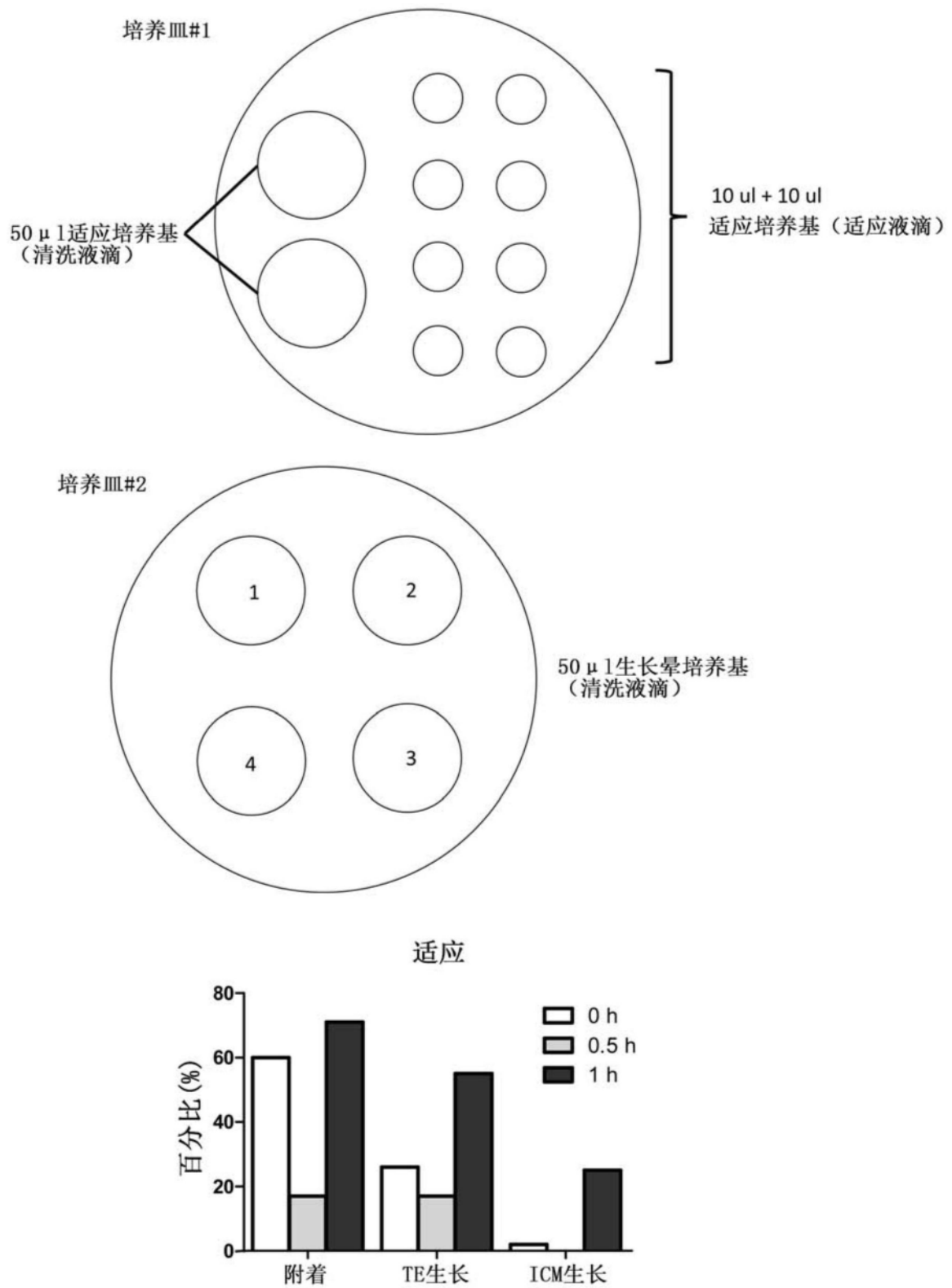


图10

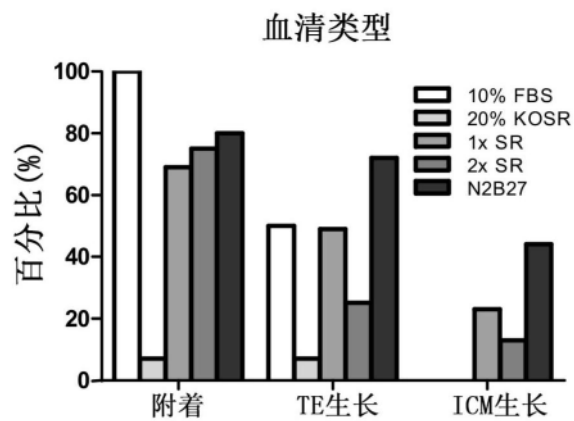


图11

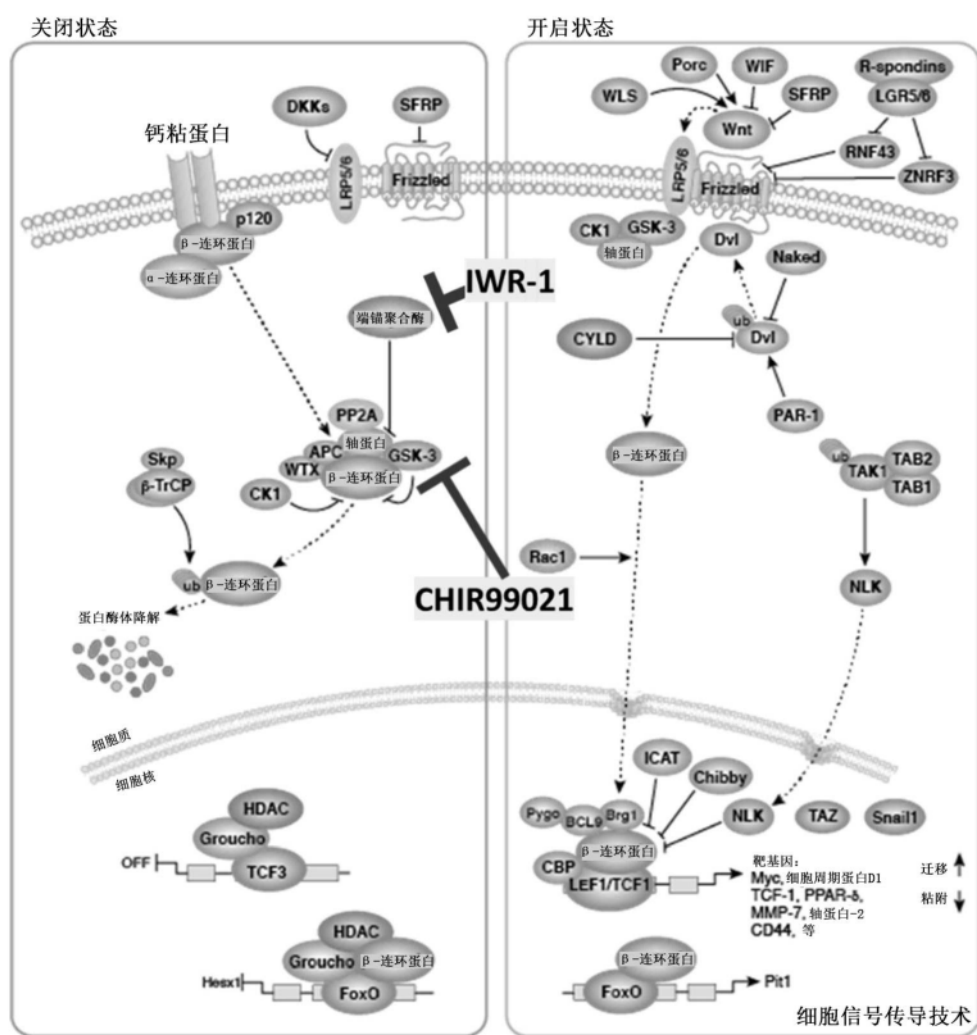


图12

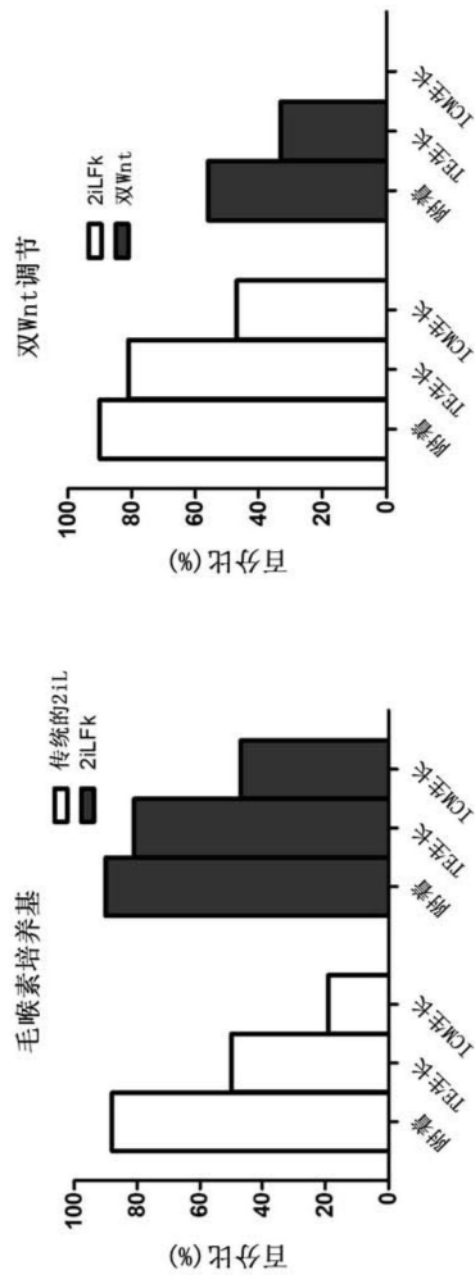


图13

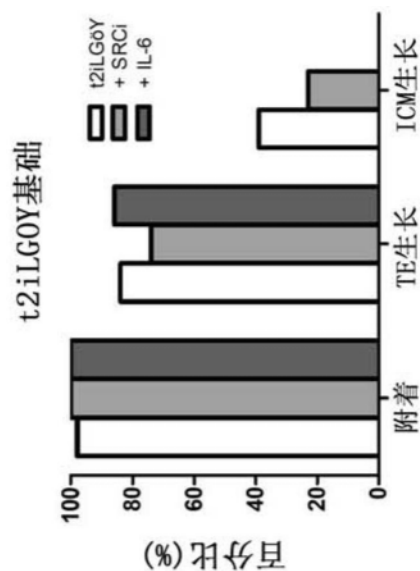


图14

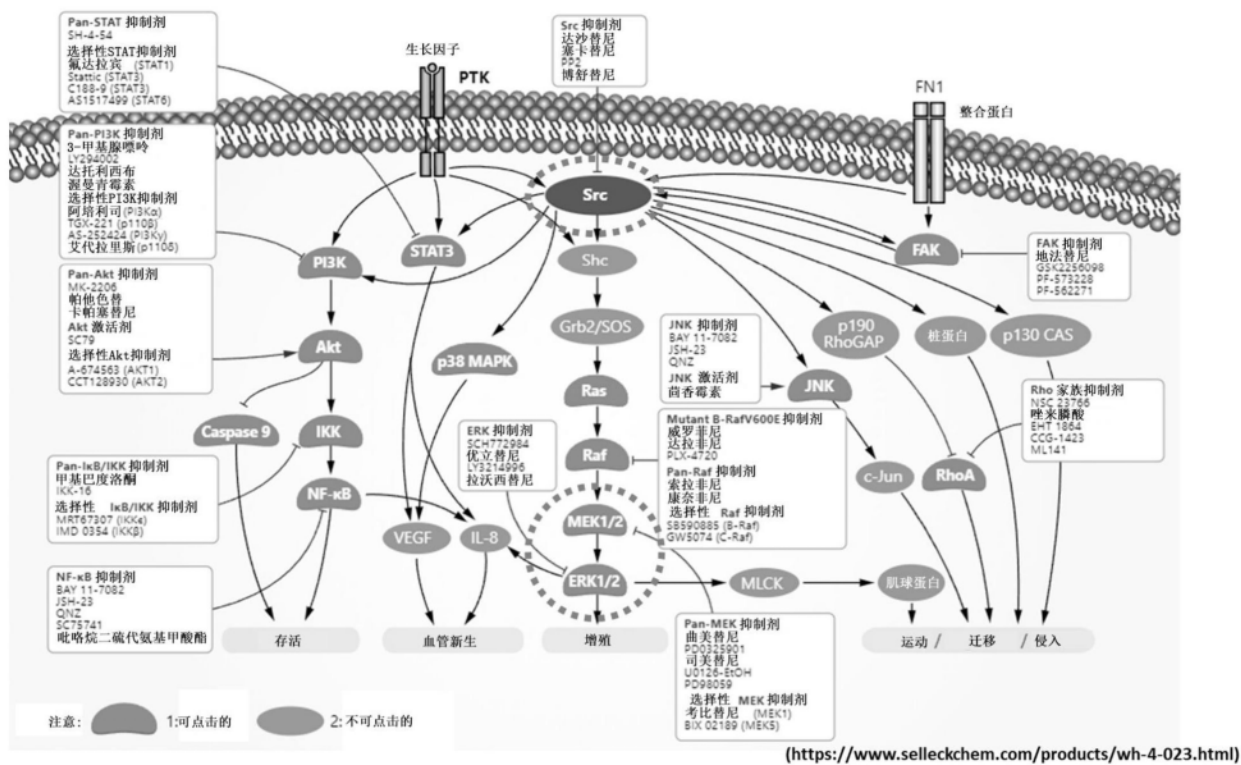


图14(续)

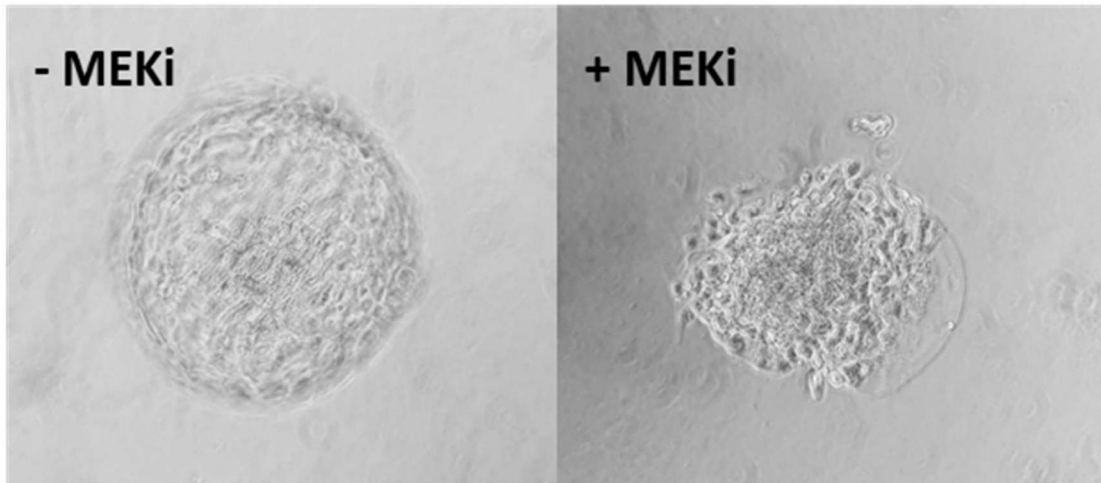


图15

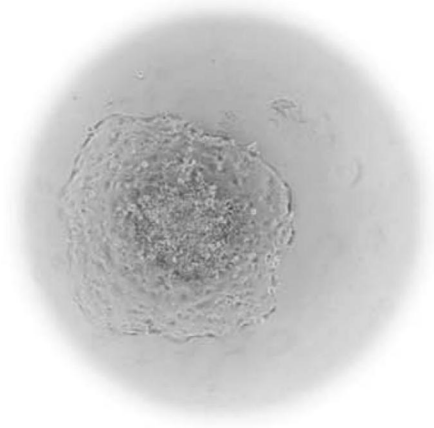
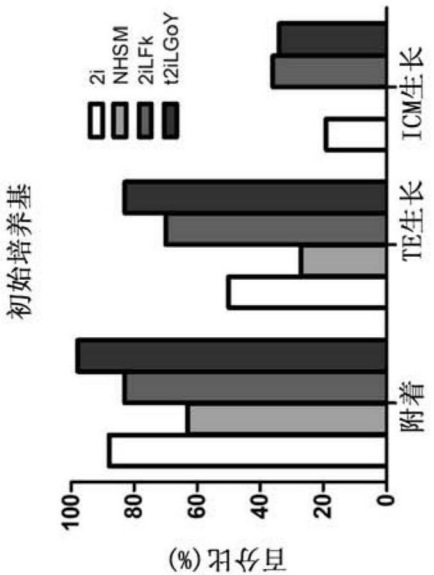


图16



图17

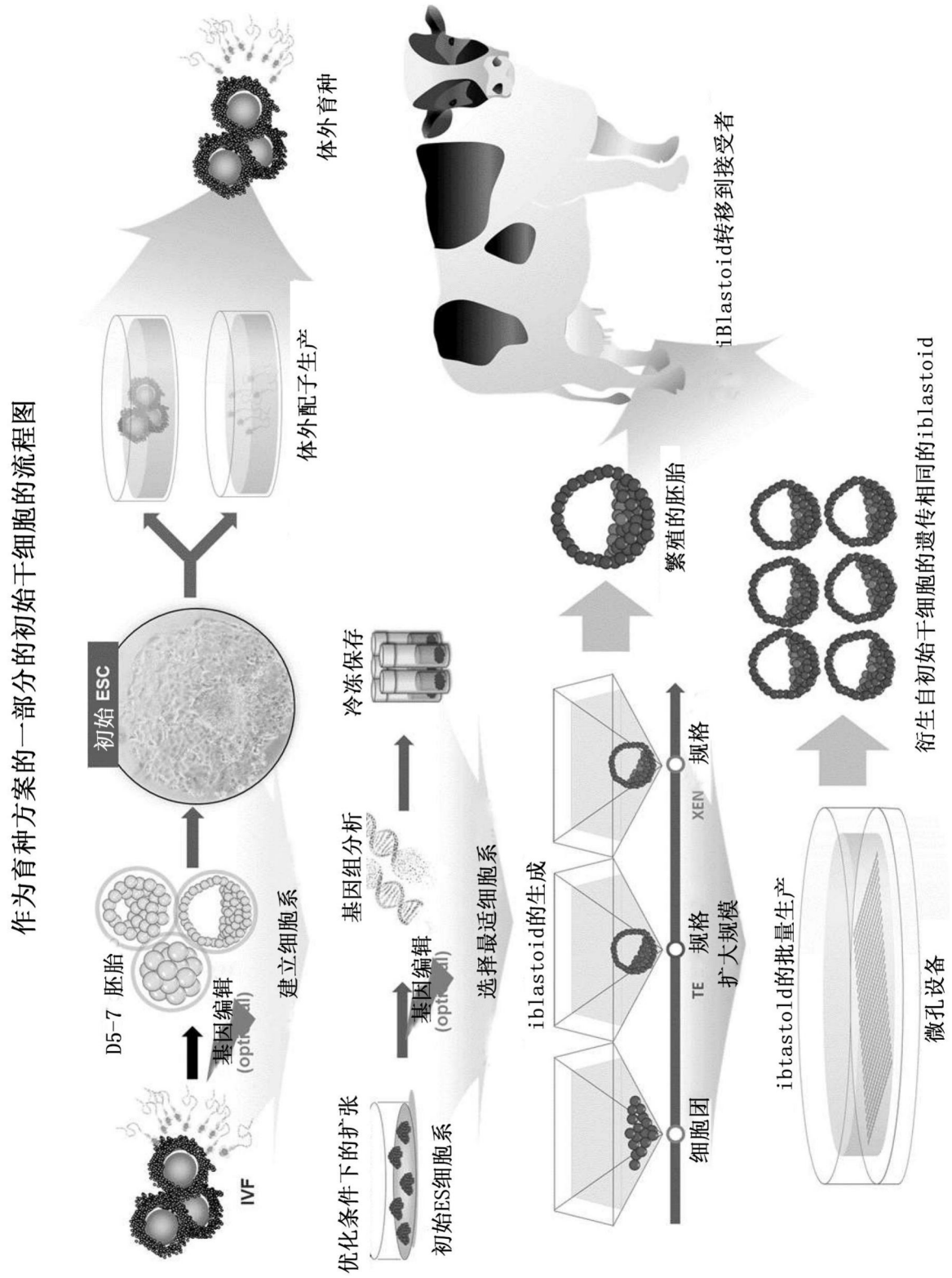


图18