



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101044235 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 02

(21) 申请号 200580029936. 6

(22) 申请日 2005. 09. 08

(30) 优先权数据

60/608, 040 2004. 09. 08 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 03. 07

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/031838 2005. 09. 08

(87) PCT申请的公布数据

W02006/029197 EN 2006. 03. 16

(73) 专利权人 威斯康星校友研究基金会

地址 美国威斯康星州

(72) 发明人 J·A·汤姆森 T·路德维格

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 余颖

(51) Int. Cl.

C12N 5/00 (2006. 01)

C12N 5/02 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2004055155 A, 2004. 07. 01, 全文.

AMIT M. FEEDER LAYER- AND

SERUM-FREE CULTURE OF HUMAN EMBRYONIC

STEM CELLS. BIOLOGY OF REPRODUCTION 70

19. 2003, 70 (19), 837-845.

审查员 李振鹏

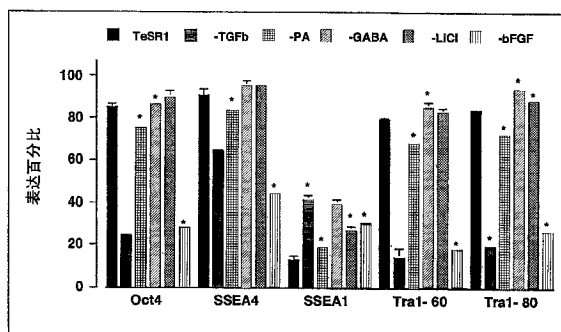
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

(54) 发明名称

胚胎干细胞的培养基和培养

(57) 摘要

以前培养人胚胎干细胞的方法需要成纤维细胞饲养细胞或曾经接触成纤维细胞饲养细胞的培养基以将干细胞维持在未分化状态。现在发现,如果在培养干细胞的培养基中加入高水平的成纤维细胞生长因子、 γ 氨基丁酸、2- 嘧啶酸、锂和转化生长因子 β , 即便没有饲养细胞或调理培养基, 干细胞也将在多次传代中无限期地维持未分化。



1. 一种细胞培养基,含有足量的白蛋白、盐、矿物质、维生素、氨基酸、葡萄糖、运铁蛋白、胰岛素、成纤维细胞生长因子、转化生长因子 β 、 γ 氨基丁酸、2- 哌啶酸和锂,由此,培养在所述培养基中的人胚胎干细胞历经多次培养传代而维持未分化状态。
2. 如权利要求 1 所述的培养基,不含饲养细胞且从未接触饲养细胞。
3. 如权利要求 1 所述的培养基,其中的锂是 LiCl。
4. 如权利要求 1 所述的培养基,含有浓度至少为 40ng/ml 的成纤维细胞生长因子。

胚胎干细胞的培养基和培养

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2004 年 9 月 8 日提交的美国临时专利申请序列号 60/608,040 的优先权。

[0003] 关于联邦政府资助研究或开发的声明

[0004] 本发明是利用下述机构授予的美国政府资助下完成的：NIH RR17721。美国政府对本发明享有一定权利。

[0005] 发明背景

[0006] 干细胞被定义为能够分化成许多其它分化细胞类型的细胞。胚胎干细胞是来自胚胎的干细胞，能够分化成大多数，如果不是全部，成熟机体的分化细胞类型。干细胞被称为是多能的，这是指它能够分化成许多细胞类型。一类受到研究机构高度关注的多能干细胞是人胚胎干细胞，这里简称为人 ES 细胞，这是一种来自人胚胎来源的胚胎干细胞。人胚胎干细胞由于能够在培养基中无限增殖并由此而能够（至少原则上能够）提供细胞和组织以替代缺陷或受损的人组织而受到极大科学关注。人胚胎干细胞培养物的存在有可能提供无限量的人细胞和组织以用于各种有助于人体健康的治疗方案和研究计划。可以想像，在未来，将能够增殖人胚胎干细胞并使其定向分化成特定谱系以产生出于治疗目的的可移植入人体的分化的细胞或组织。人胚胎干细胞和可由它们衍生的分化细胞也是用于研究人类细胞和发育系统的有力科学工具。

[0007] 已经描述了产生和培养人胚胎干细胞的基础技术。现有技术的确有效，但一些目前用来培养人胚胎干细胞的方法有限制和缺点。一种限制意义特别重大。大多数现有人胚胎干细胞系在一定程度上或在其它程度上已经直接暴露于小鼠细胞或暴露于其中已经培养过小鼠细胞的培养基。发现来自现有细胞系的一些人 ES 细胞展示出人类细胞通常不产生的唾液酸残基 Neu5Gc，这一事实倍受关注。最初的产生和培养人胚胎干细胞的技术要使用小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）饲养细胞作为饲养层，在该饲养层上可培养人胚胎干细胞。成纤维细胞饲养层通过一些仍不十分清除的机制使得干细胞能够保持在未分化状态。随后发现，如果使干细胞接触“调理培养基（conditioned medium）”也能获得相同的现象。调理培养基是已经培养过饲养细胞（如 MEF）的干细胞培养基。无论饲养细胞是能赋予培养基某些因子还是能从培养基中除去某些因子，其结果都是调理培养基可用来培养干细胞使其不发生分化。任何一种培养条件，即人 ES 细胞直接在鼠饲养细胞上生长或使用调理培养基都涉及这样的问题，即一种或多种试剂如病毒能从小鼠细胞传递到人 ES 细胞。如果培养人胚胎干细胞的一个目的是产生最终可植入人体的组织，就高度需要干细胞从未暴露于其它物种的细胞或者暴露于曾用来培养其它物种的细胞的培养基。因此，在长期培养人胚胎干细胞技术的持续发展中最感兴趣的是找到能增殖和培养人胚胎干细胞但不含成纤维细胞饲养层的培养条件。

[0008] 培养中的人胚胎干细胞的一个特有性状是，如果条件不够理想，这种细胞则有分化趋势。当在培养时过分要求维持人 ES 细胞处于未分化状态时则容易诱导人 ES 细胞分化。大多数培养条件将导致一定水平不希望的分化，尤其是在正在生长的 ES 细胞集落边缘

周围。尽管培养 ES 细胞时可以有一定程度不希望的分化,但目的是定义能够尽可能使培养物维持未分化即得到尽可能少的分化细胞的培养条件。我们认为,我们已经采用特别严格的标准来定义将支持无限培养未分化的 ES 细胞培养物的条件。

[0009] 一些培养基配方能够在一段时间内使人 ES 细胞维持未分化状态,但长期培养时将不能维持这种状态。具体地说,我们定义来自最初的种子培养物的人 ES 细胞在培养容器上生长至细胞铺满该相同的培养容器为一个“传代”。我们发现一些培养基配方允许培养人 ES 细胞一或两个传代不发生严重分化,但在随后的传代中细胞迅速分化。我们已经开始相信,为得到确实能够支持人 ES 细胞无限增殖而不分化且不含饲养细胞或调理培养基的培养基,培养基必需支持培养人 ES 细胞处于基本均匀且未分化状态至少 5 代。培养物在培养期间维持相对同质和未分化并保留人 ES 细胞所有重要特征也是重要的。

[0010] 可通过形态学特征非常容易地评价干细胞培养物的分化状态。未分化的干细胞具有一个特征形态,即具有清晰细胞边界的小且致密的细胞,通过在显微镜下检测干细胞培养物可容易观察到这种形态。相反,已经分化的细胞看上去较大且更加散开,并具有不明显的边界。尽管一些分化的细胞可能会在未分化细胞集落边缘出现(通常是这样),但最理想的干细胞培养物是这样一种细胞培养物,它在培养容器中增殖,在似乎分化的培养物周围仅具有最少量的细胞。根据经验可以在视觉上准确判断人 ES 细胞培养物的分化状况和健康状况。用来追踪 ES 细胞未分化状态的生化标记是转录因子 Oct4,它被认为是 ES 细胞未分化状态最可靠的标记,并且是当未分化的细胞开始分化时最先失去的标记之一。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明可概述为一种不需要饲养细胞或调理培养基的培养人胚胎干细胞的方法,该方法包括在含有盐、维生素、氨基酸、葡萄糖、成纤维细胞生长因子、 γ 氨基丁酸、2-哌啶酸(piperic acid)、锂和转化生长因子 β 的培养基中培养人胚胎干细胞的步骤,所述物质的含量都足以在多次传代培养中维持干细胞处于未分化状态。

[0013] 本发明还涉及一种人胚胎干细胞的体外细胞培养物,该人胚胎干细胞在含有高水平成纤维细胞生长因子、 γ 氨基丁酸、2-哌啶酸、锂和转化生长因子 β 的培养基中培养,因此干细胞在不需要成纤维细胞饲养细胞或调理培养基的情况下便可以未分化状态无限期地培养。

[0014] 本发明的一个目的是定义人胚胎干细胞的长期培养条件,该培养条件避免使用或暴露于动物细胞和动物蛋白,不论是饲养细胞还是用于调理要培养干细胞的培养基的其它动物细胞和动物蛋白。

[0015] 本发明的另一个目的是定义用于人胚胎干细胞的培养条件,该培养条件尽可能地确定,同时尽可能维持培养中最大比例的细胞处于未分化状态。

[0016] 通过以下描述将了解本发明的其它目的、特征和优点。

[0017] 附图简述

[0018] 图 1 展示了由以下说明书描述的试验工作获得的数据,显示了培养基组分减少了生长于其中的人 ES 细胞培养物中分化细胞的比例。

[0019] 图 2 是显示了含有人基质蛋白的培养基使培养的人 ES 细胞不展示非人源唾液酸残基的数据的图示。

[0020] 图 3 是显示了人干细胞培养物中高水平未分化细胞的数据的图示。

[0021] 图 4 是显示了这里所述的培养基使干细胞培养物健壮生长的数据的图示。

[0022] 发明详述

[0023] 我们已经鉴定了许多能够使人胚胎干细胞以未分化状态无限期地培养和强壮增殖且同时完全不需要饲养细胞和调理培养基的培养条件和培养基。开发这些培养基和培养条件能够无需直接或间接接触任何种类的动物细胞而在确定的和受控的条件下衍生和维持人 ES 细胞系。这些培养基已被证实能支持未分化的 ES 细胞增殖多代,至少 5 代,这是这些培养基将支持这种无限期地培养的有力证据。

[0024] 用来培养和增殖人 ES 细胞的确定的 (defined) 人源化培养基通常包含盐、维生素、葡萄糖源、矿物质和氨基酸。为补充培养基和提供支持细胞生长的条件,最初的干细胞培养基含有来自一种来源或另一种来源的血清。之前还报道加入成纤维细胞生长因子和替代血清添加物可在不需要血清的情况下培养人 ES 细胞。可通过商业获得用于此目的的替代血清,或者替代血清可以用蛋白质如血清白蛋白、维生素、矿物质、运铁蛋白或运铁蛋白替代品、以及胰岛素或胰岛素替代品配制的混合物。也可在这种替代血清组分中添加硒。这里优选使用确定的替代血清来代替培养人 ES 细胞的任何来源的血清,以便避免血清组成变化的问题以及使用尽可能确定的培养基。我们已经定义了充分的培养基,这里提到的培养基的所有组分列于下面的表 1,该表列出了被称为 TeSR1 的我们的培养基的所有组分以及各成分的浓度。TeSR1 培养基由添加了人血清白蛋白、维生素、抗氧化剂、痕量矿物质、特定脂类和克隆生长因子的 DMEM/DF12 基础培养基构成。

[0025] 为避免对之前认为是维持人 ES 细胞处于未分化状态所必需的成纤维细胞饲养层的需要,这里报道将较高浓度的 FGF(10-1000ng/ml) 和 GABA(γ 氨基丁酸)、2- 嘧啶酸 (PA)、锂 (LiCl) 和转化生长因子 β (TGF β) 组合使用将能够使培养基支持未分化的干细胞生长。已经发现这些添加物的组合足以维持人 ES 细胞培养物无限期地处于未分化状态而不需接触饲养细胞或调理培养基。这些添加物被证实是足够的。然而并不是每一种培养基配方都需要它们中的全部。通过选择性删除这些添加剂,可删除这些组分中的一种或多种,产生仍将生长但培养物中未分化状态的纯度有损失的人 ES 细胞培养物。这种培养物可在许多代中保持或不保持稳定。然而,显然这种组合足以使各种培养基能支持在不含饲养细胞或调理培养基的情况下在无限次数的传代中长期培养和增殖未分化的人 ES 细胞。

[0026] 我们最初对这些生长因子进行主观筛选,根据人 ES 细胞表达的受体进行选择,鉴定了一些对未分化细胞的增殖有正面效果的因子。这些因子中有 bFGF、LiCl、 γ - 氨基丁酸 (GABA)、2- 嘧啶酸和 TGF β 最终含在 TeSR1 中。对所测试的四种细胞系中的每一种而言,TeSR1 中持续表达人 ES 细胞特征标记的细胞的增殖率和百分比高于培养在成纤维细胞调理的培养基内的对照细胞,并且,除去这 5 种因子中的任何一种减低了培养的效果。这些数据中的一些示于图 1,该图显示,生长在省略了这些成分中任何一种的培养基中的培养物显示出的未分化细胞的比例低于含有所有这 4 种培养基成分的培养物。注意,Oct4、SSEA-1、SSEA-4、Tral-60 和 Tral-80 都是用来追踪干细胞分化状态的细胞表面标记或转录因子 (Oct4)。图 4 显示了类似的试验,该试验证实,当培养基中含有所有这些组分时,在多次传代中培养物的生长速率最高。

[0027] 对人 ES 细胞的培养条件而言,在培养容器中含有生物基质也是有益的。之前使用的一种此类材料是 Matrigel™,这是来自小鼠细胞的人造基底膜,它以不含小鼠细胞的市售

产品提供。现在已知的用于类似目的的另一种人源材料是纤连蛋白,它是一种人糖蛋白,以不溶形式使用以形成也用作 ES 细胞培养的基底膜的纤维基质。就我们掌握的情况,仅纤连蛋白基质是不够的。然而,现在还发现,人基质材料可由人基质蛋白胶原 IV、纤连蛋白、层粘连蛋白和玻连蛋白的组合制成,这种基质足以支持人 ES 细胞在 TeSR1 培养基中永远处于未分化状态。

[0028] 在系统地测试了超过 80 种生长因子之后得到了上面列出的培养基添加物。虽然这些添加物中的一些在至少几次传代中支持培养中的人 ES 细胞生长,但许多在随后的传代中无法维持 ES 细胞处于未分化状态。我们未鉴定产生了下面的实施例中描述的培养基添加物的结果的这些因子的其它组合。这并不是说不能对这些成分进行改变。例如,由于 LiCl 能刺激 wnt 途径而将其用于该培养基。Wnt 自身或该途径的其它刺激物如活化素可作为 LiCl 的等效物,用于代替 LiCl,虽然 LiCl 可能是用于此目的的最经济的试剂。类似地, GABA 被认为与 GABA 受体反应,科学文献中鉴定了一些作为该相同受体的激动剂的分子,这些分子也可作为等效物,用于代替培养基中的 GABA。还认为 PA 也与 GABA 受体反应。虽然发现 PA 和 GABA 在这里所用浓度下都对培养基有帮助,但也可以想像,可以显著升高这些成分中的一种成分或其它成分的浓度而避免对其它成分的需要。

[0029] 较高浓度 (40-100ng/ml) 的成纤维细胞生长因子似乎可以排除对饲养细胞的需要。优选的 FGF 是碱性 FGF,也称为 bFGF 和 FGF2,但至少包括 FGF4、FGF9、FGF17 和 FGF18 的其它 FGF 也足以满足该目的。其它 FGF 即便是在更高浓度可能也是有效的。

[0030] 之前只有在存在成纤维细胞饲养细胞时或在调理培养基中培养人胚胎干 (ES) 细胞培养物时才能使其维持在未分化状态的这一观察结果导致人们推测成纤维细胞将某种能抑制 ES 细胞分化的因子释放到培养基中。然而,无论由成纤维细胞饲养细胞介导的对培养基的效应如何,现在将清楚下面描述的培养基将代替这种效应。下面描述的三种培养基是确定的,不含动物细胞,并能长期培养未分化的人 ES 细胞处于未分化状态。提供了一个培养基例子,其中培养基中的蛋白质都是人蛋白质,具有“人源化”培养基和培养条件,从而避免任何可能的涉及动物来源的亚细胞产品的问题。

[0031] 实施例

[0032] 除非另有说明,用于这里描述的所有培养的培养基的组成列于下面的表 1。我们预备试验提示,未分化的人 ES 细胞在 pH 7.2、同渗容摩 (osmolality) 350mOsmol 和 10% CO₂/5% O₂ 大气下最适宜增殖。这些条件被用于这里所述的所有随后的培养。

[0033] 人 ES 细胞系 H1、H7、H9 和 H14 的细胞在 TeSR1 中分别强壮增殖 11、7、25 和 17 代 (2-6 个月)。证实细胞系 H14 在 7 代之后、H9 在 8 代和 21 代之后核型正常。证实 H1 和 H9 在 11 和 20 代后形成畸胎瘤。

[0034] 已知之前的 ES 细胞培养物由于存在不是由人制造的唾液酸 Neu5Gc 而不是最佳的。由于人基质组分胶原、纤连蛋白、层粘连蛋白和玻连蛋白将最终的动物产品排除出入 ES 细胞的 TeSR1 培养条件,我们检测了当在这种培养基中培养时现有人 ES 细胞系是否消除了 Neu5Gc。我们证实了培养在成纤维细胞调理培养基中的人 ES 细胞上存在 Neu5Gc,培养在 Matrigel 上的 TeSR1 的细胞上检测到减少的但可检测的 Neu5Gc,培养在使用四种人基质组分的 TeSR1 中的 ES 细胞上检测不到任何 Neu5Gc。这些数据示于图 2。因此,培养在 TeSR1 和人蛋白质基质上的人 ES 细胞不展示培养在鼠科饲养细胞上的细胞中发现的非人唾液酸

残基。

[0035] 为检测 ES 细胞集落的条件和长期维持人 ES 细胞培养物的培养适用性,将 TeSR1 培养基与之前最好的培养条件(就我们掌握的情况是使用调理培养基)进行比较。发现 TeSR1 培养基能够维持人 ES 细胞处于这样一种未分化状态,即超过 90% 的细胞即使在长期培养后仍继续呈 Oct4 阳性。该检测结果示于图 3。这首次说明,不含任何饲养细胞且不含调理培养基的培养基能维持人 ES 细胞的未分化生长水平至培养中 90% 以上的细胞在所有阶段维持未分化的程度。

[0036] 在 TeSR1 培养基和 TeSR 培养基中测试了培养了 3 代的 H1 细胞的生长曲线和 FACS 分析,TeSR 培养基省略了以下各组分: TGF β 、PA、LiCl、GABA 和 bFGF。开始培养时,在第 1 代的第 0 天将 3×10^5 各细胞系的细胞铺板。计算三个复孔的细胞数以评价贴壁情况(第 2-3 天)和传代时的最终细胞数(第 6-7 天)。重复最初的铺板密度和取样时间,可能的话进行 5 代。在第 3 代的第 6 天通过 FACS 分析细胞的细胞表面标记 SSEA1、SSEA4、Tra 1-60 和 Tra 1-81 和转录因子 Oct4。该数据示于图 1。这些数据显示,人 ES 细胞可培养在缺乏这些组分中的每一种的培养基中,但代价是培养时细胞会出现一些不希望的分化,且只有使用所有这些组分才能获得未分化水平最高的培养物。用其它细胞系也获得了类似结果。

[0037] 测试了维持在 TeSR1 培养基中的人 ES 细胞系的多能性。将分别培养在 Matrigel 基质上 TeSR1 培养基中 11 代和 20 代的新出现的细胞系 WA01 和 WA09 的细胞分别注射入 SCID- 米色小鼠。接种 6-8 后在小鼠中出现了展示复杂分化的畸胎瘤。

[0038] 表 1 TeSR1 培养基的完整配方

[0039]	无机盐	mM	氨基酸	mM
[0040]	氯化钙(无水)	0.8232	L- 丙氨酸	0.1392
[0041]	HEPES	11.76	盐酸 L- 精氨酸	0.5488
[0042]	氯化镁(无水)	0.2352	L- 天冬酰胺-H ₂ O	0.1392
[0043]	硫酸镁(MgSO ₄)	0.319088	L- 天冬氨酸	0.1392
[0044]	氯化钾(KCl)	3.26144	L- 半胱氨酸-HCl-H ₂ O	0.0784
[0045]	碳酸氢钠(NaHCO ₃)	11.2112	L- 胱氨酸 2HCl	0.0784
[0046]	氯化钠(NaCl)	94.55824	L- 谷氨酸	0.1392
[0047]	磷酸氢二钠(无水)	0.392	L- 谷氨酰胺	2.96
[0048]	磷酸二氢钠(NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O)	0.355152	甘氨酸	0.296
[0049]			L- 组氨酸-HCl-H ₂ O	0.1176
[0050]	痕量矿物质		L- 异亮氨酸	0.326144
[0051]	硝酸铁(Fe(NO ₃) ₃ -9H ₂ O)	0.00009408	L- 亮氨酸	0.353584
[0052]	硫酸铁(FeSO ₄ -7H ₂ O)	0.001176	盐酸 L- 赖氨酸	0.391216
[0053]	硫酸铜(CuSO ₄ -5H ₂ O)	4.0768E-06	L- 甲硫氨酸	0.090944
[0054]	硫酸锌(ZnSO ₄ -7H ₂ O)	0.001176	L- 苯丙氨酸	0.16856
[0055]	偏钒酸铵 NH ₄ VO ₃	0.000056	L- 脯氨酸	0.2176
[0056]	硫酸锰 MnSO ₄ H ₂ O	1.00592E-05	L- 丝氨酸	0.296
[0057]	钼酸铵	1.00404E-05	L- 苏氨酸	0.352016
[0058]	NiSO ₄ 6H ₂ O	4.94861E-06	L- 色氨酸	0.0346528

[0059]	偏硅酸钠 Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	0.004926108	L- 酪氨酸 2Na 2H ₂ O	0.167776
[0060]	SnCl ₂	5.32544E-06	L- 缬氨酸	0.354368
[0061]	CdCl ₂	6.21931E-05		
[0062]	CrCl ₃	9.41176E-06	维生素	
[0063]	AgNO ₃	5.00293E-06	抗坏血酸	0.375
[0064]	AlCl ₃ 6H ₂ O	2.4855E-05	生物素	1.12112E-05
[0065]	Ba (C ₂ H ₃ O ₂) ₂	4.99217E-05	胆碱盐酸盐	0.0502544
[0066]	CoCl ₂ 6H ₂ O	5.0021E-05	D- 泛酸钙	0.0036064
[0067]	GeO ₂	2.5337E-05	叶酸	0.004704
[0068]	KBr	5.04202E-06	i- 肌醇	0.05488
[0069]	KI	5.12048E-06	烟酰胺	0.012936
[0070]	NaF	0.000500119	盐酸吡哆素	0.0076048
[0071]	RbCl	5.00414E-05	核黄素	0.0004704
[0072]	ZrOCl ₂ 8H ₂ O	9.03834E-05	盐酸硫胺素	0.02460217
[0073]			维生素 B12	0.000392
[0074]	生长因子			
[0075]	GABA	0.979	能量物质	
[0076]	2- 哌啶酸	0.000984	D- 葡萄糖	13.72784
[0077]	bFGF	5.80E-06	丙酮酸钠	0.392
[0078]	LiCl	0.979		
[0079]	TGF β 1	2.35E-08	蛋白质	
[0080]			人胰岛素	0.0034438
[0081]	脂类		人全运铁蛋白 (Holo-Transferrin)	0.14
[0082]	亚油酸	0.0070976	人血清白蛋白 199.7	
[0083]	硫辛酸	0.00039984		
[0084]	花生四烯酸	0.001312	其它组分	
[0085]	胆固醇	0.0113798	谷胱甘肽 (还原型)	0.00592996
[0086]	DL- α 生育酚 - 醋酸盐	0.02962	次黄嘌呤 Na	0.01176
[0087]	亚麻酸	0.007184	酚红	0.0159936
[0088]	肉豆蔻酸	0.008758	腐胺 -2HCl	0.000394352
[0089]	油酸	0.00708	胸苷	0.001176
[0090]	棕榈油酸	0.007862	2- 巯基乙醇	0.1
[0091]	硬脂酸	0.00703	硒	0.000177304
[0092]			Pluronic F-68	0.238
[0093]			Tween 80	0.3358

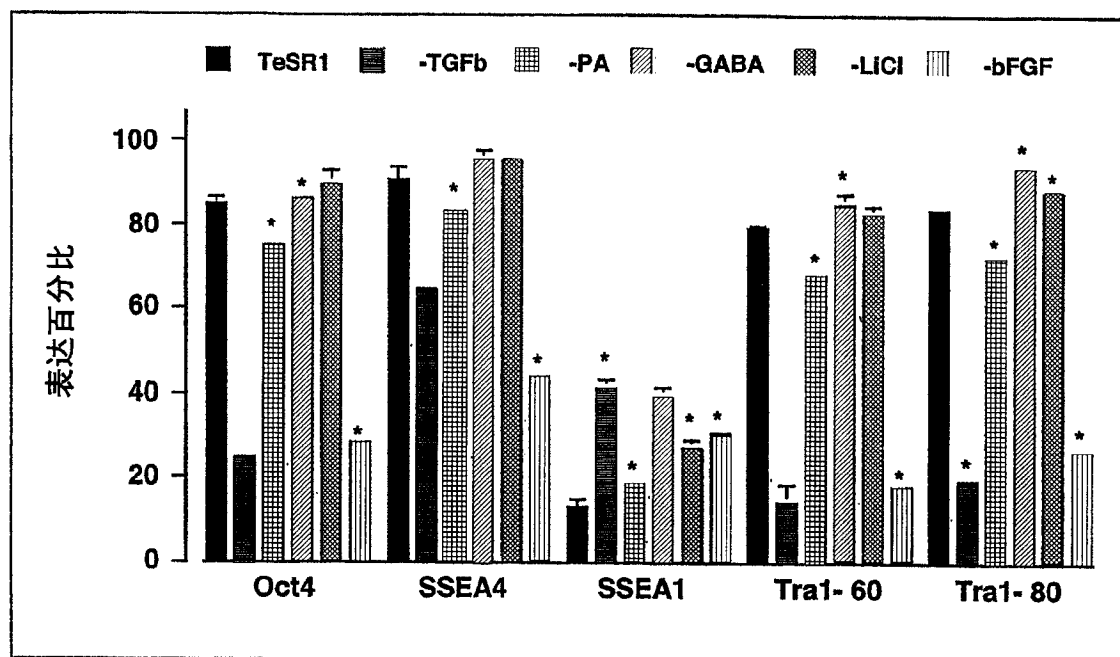


图 1

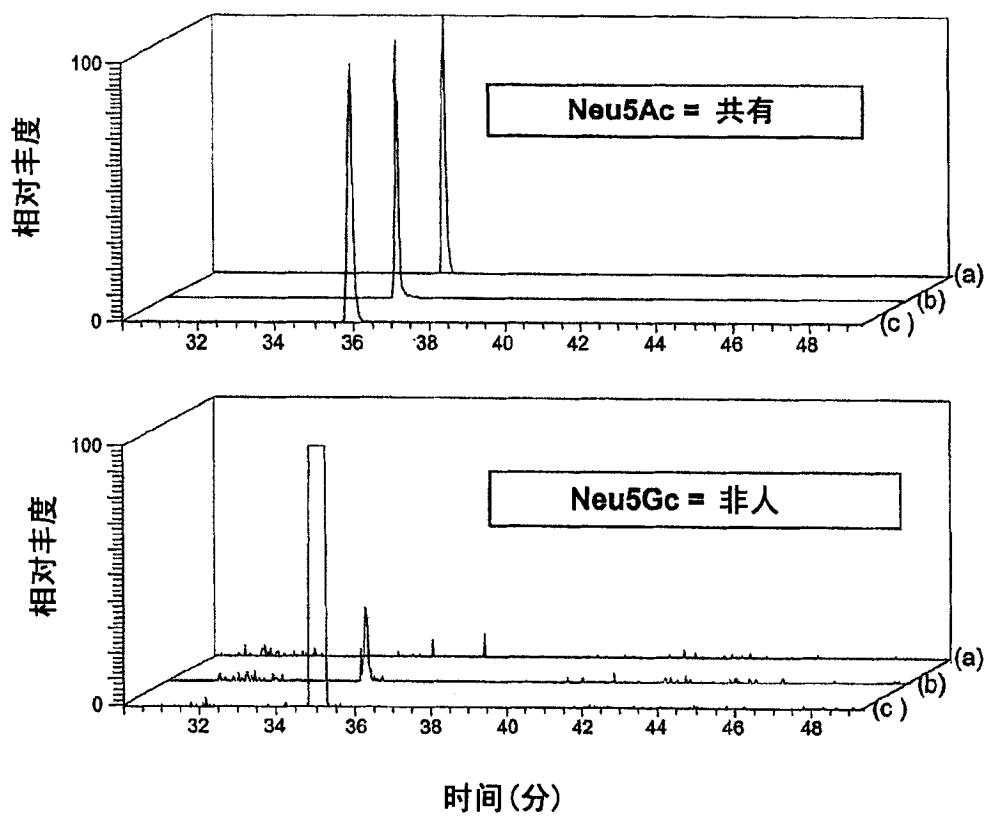


图 2

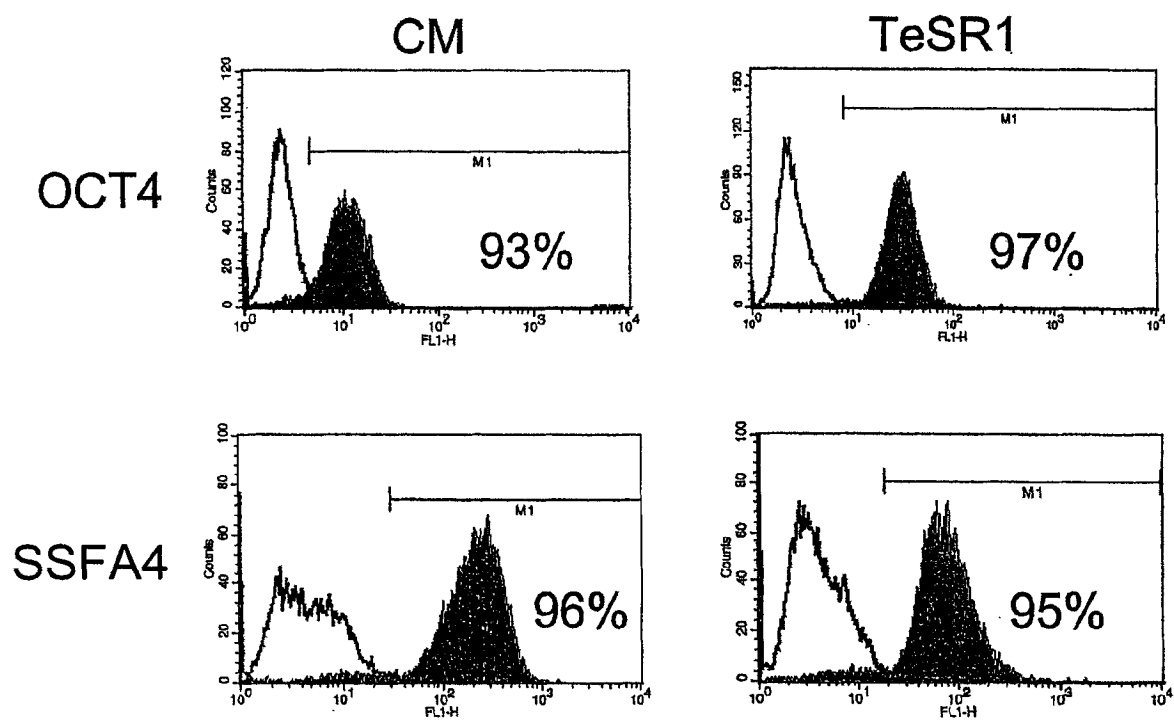


图 3

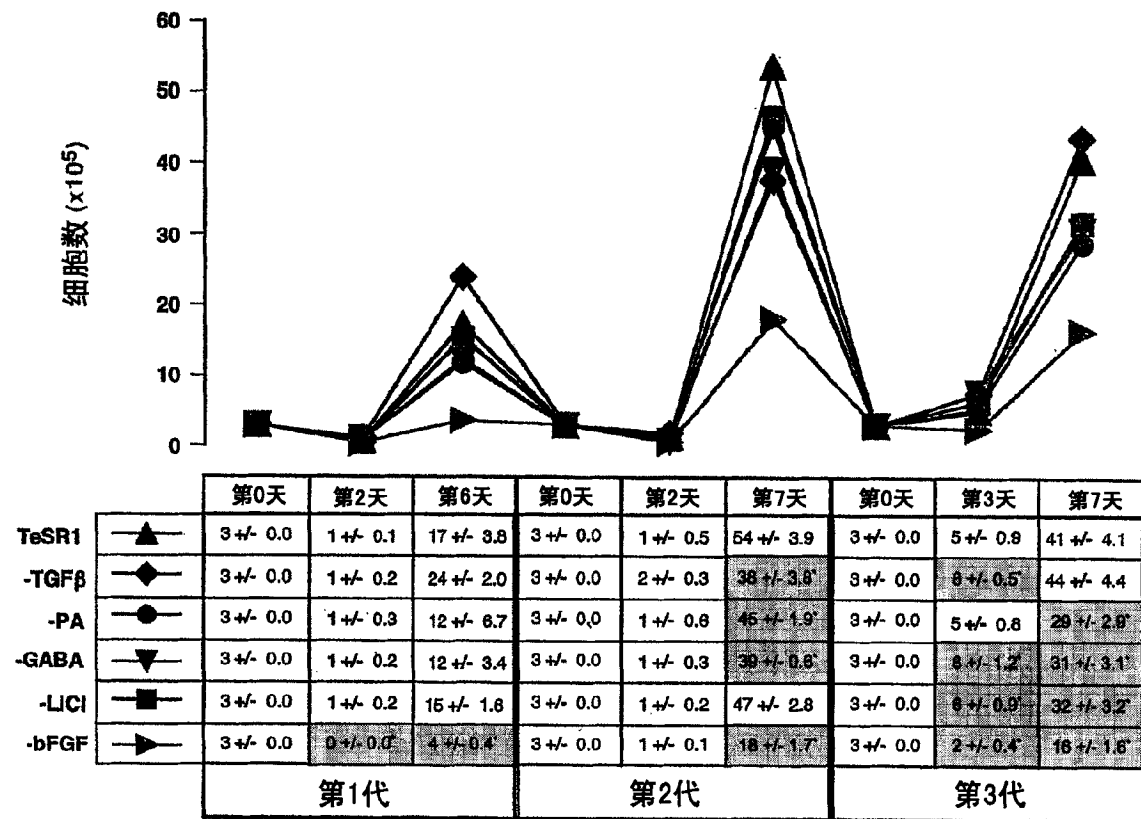


图 4