



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113265370 A

(43) 申请公布日 2021.08.17

(21) 申请号 202110419726.9

A61P 1/18 (2006.01)

(22) 申请日 2013.06.24

A61P 43/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

61/664,259 2012.06.26 US

(62) 分案原申请数据

201380033028.9 2013.06.24

(71) 申请人 塞拉克西斯股份有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 W·L·拉斯特

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51) Int.Cl.

G12N 5/071 (2010.01)

G12N 5/074 (2010.01)

A61K 35/39 (2015.01)

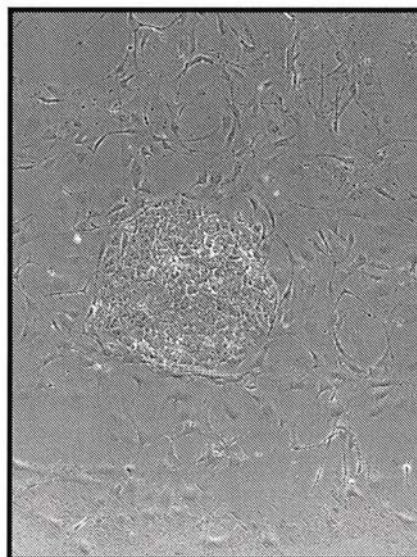
权利要求书1页 说明书12页 附图7页

(54) 发明名称

可用于治疗胰岛素依赖性糖尿病的干细胞
和胰腺细胞

(57) 摘要

新鲜人类胰腺组织可用作细胞来源,从而鉴别并选择易于成为可用于治疗胰岛素依赖的糖尿病的替代胰腺细胞的来源的非干细胞群。这些替代胰腺细胞的祖细胞不具有整合至其基因组的重编程基因,根据仅采用明确限定的试剂的方案分化成胰腺谱系,且实质上不能分化为中胚层谱系。



1. 生成包含替代胰腺细胞的非多能祖细胞的组合物的方法, 所述方法包括:

在仅使用非动物来源的试剂的培养条件中培养从人胰腺组织收集的细胞少于5次群体倍增或少于9天;

利用质粒将重编程基因递送入细胞以获得重编程细胞, 所述质粒不将所述重编程基因整合入基因组; 和

从所述重编程细胞选择替代胰腺细胞的非多能祖细胞, 所述非多能祖细胞具有在仅使用非动物来源的试剂的最低限度的培养条件中增殖同时维持干细胞形态的能力, 具有在仅采用非动物来源的试剂的方案的过程中分化为胰腺谱系的能力, 且不能分化为中胚层谱系。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述质粒是游离型质粒。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述重编程基因不包括C-myc。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述重编程基因包括L-myc。

5. 一种组合物, 其包含替代胰腺细胞的非多能祖细胞, 其中由从受试者的胰腺收获的多样性的天然胰腺细胞群通过利用重编程基因重编程使得所述重编程基因不在基因组中整合而获得所述非多能祖细胞, 其中所述非多能祖细胞在被重编程之前在仅非动物来源试剂中培养少于5次群体倍增, 并且其中所述非多能祖细胞不能分化为中胚层谱系, 但是可以分化为适用于治疗胰岛素依赖性糖尿病的替代胰腺细胞。

6. 根据权利要求5所述的组合物, 其中所述祖细胞具有在包含非动物来源试剂的培养条件中增殖的能力。

7. 根据权利要求5所述的组合物, 其中所述祖细胞具有分化为纯的胰腺细胞群的能力。

8. 根据权利要求7所述的组合物, 其中所述纯的胰腺细胞群包含至少80%表达胰腺内分泌祖细胞的基因特征并且可以成熟为胰岛的激素产生细胞的细胞。

9. 根据权利要求7所述的组合物, 其中所述纯的胰腺细胞群包含至少90%表达胰腺内分泌祖细胞的基因特征并且可以成熟为胰岛的激素产生细胞的细胞。

10. 根据权利要求5所述的组合物, 其中所述组合物中包含的多于90%的细胞表达标志物Pdx1、Nkx6.1和NeuroD1。

11. 根据权利要求5所述的组合物, 其中在游离型质粒中递送所述重编程基因。

12. 一种组合物, 其包含替代胰腺细胞的非多能祖细胞, 其中当实施分化方案并且由于实施所述分化方案可以有效产生胰腺细胞群时, 所述非多能祖细胞具有生存能力, 其中所述分化方案仅使用非动物来源试剂, 其中通过利用重编程基因重编程从人胰腺获得的细胞使得所述重编程基因不在基因组中整合而获得所述非多能祖细胞, 并且其中所述非多能祖细胞不能分化为中胚层谱系, 但是可以分化为适用于治疗胰岛素依赖性糖尿病并且多于90%的所述替代胰腺细胞表达标志物Pdx1、Nkx6.1和NeuroD1的替代胰腺细胞。

13. 根据权利要求12所述的组合物, 其中所述分化方案不包括将所述祖细胞与wnt家族成员接触。

14. 根据权利要求12所述的组合物, 其中所述分化方案包括将所述非多能祖细胞暴露于驱动向内胚层谱系分化的组分的第一组合, 从而获得内胚层细胞, 然后将所述内胚层细胞暴露于驱动向胰腺内分泌谱系分化的组分的组合。

15. 根据权利要求12所述的组合物, 其中在游离型质粒中递送所述重编程基因。

可用于治疗胰岛素依赖性糖尿病的干细胞和胰腺细胞

[0001] 本发明申请是基于申请日为2013年6月24日、申请号为201380033028.9 (国际申请号为PCT/US2013/047243)、名称为“可用于治疗胰岛素依赖性糖尿病的干细胞和胰腺细胞”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关专利申请的交叉援引

[0003] 本申请要求于2012年6月26日提交的美国临时申请61/664,259的优先权,将其整体引入本申请。

[0004] 发明背景

[0005] A. 对胰腺内分泌细胞未满足的需求

[0006] 胰岛素依赖性糖尿病是一种由胰腺胰岛素产生细胞丧失为特征的疾病。所述胰岛素产生细胞,也称为“ β ”细胞,通常存在于被称为胰岛(islets of Langerhans)的小球结构中,该结构分散遍布于胰腺中。已证明在人和动物中替代胰岛(包括其功能性 β 细胞)的移植可治愈胰岛素依赖性糖尿病。在此过程中,自一个或多个已故器官供体的胰腺纯化胰岛,并将胰岛注射至机体多个部位中的一个。一些胰岛在此过程中存活并驻留于机体中,并且在机体中制造和分泌胰岛素。这足以治愈该患者数年,直至移植胰岛的寿命结束。参见Shapiro (2011) 和Robertson (2010)。

[0007] 尽管该方法可有效地治疗糖尿病,但没有足够的供体胰腺,仅能治疗很小一部分的糖尿病患者。因此,需要 β 细胞或胰岛的替代性来源。

[0008] B. 胰腺细胞的替代性来源

[0009] 一种已经获得许多关注的有前景的替代胰腺细胞的来源是多能干细胞。多能干细胞收获自胚胎,或者可人工生成,通过将完全分化的体细胞导向胚胎样状态,即通过将成体细胞“重编程”为类似于自胚胎收获的细胞的细胞。不论是通过收获或者重编程,所有多能干细胞共有以下三个特征:

[0010] • 表达干细胞基因:它们表达通常在早期哺乳动物胚胎中表达的基因。

[0011] • 不死性:它们在培养中可扩增至理论上无限的数量。

[0012] • 成熟为哺乳动物机体的所有谱系:所有成体器官均源于早期胚胎三种组织谱系中的一种。这三种组织谱系为:内胚层,胰腺和其它肠道器官自其形成;中胚层,肌肉和骨骼自其形成;和外胚层,脑和皮肤自其形成。参见Yamanaka (2012), Plath (2011), Lai, (2011) 和Stover (2011)。

[0013] 已经设计出了多种方案操作多能干细胞以形成胰腺细胞。这些方案中的一些能够驱使多能干细胞分化形成与胎儿胰岛祖细胞相似的细胞。参见Kroon (2008) 和Rezania (2011)。然而,这些方案均无法生成这样的胰腺细胞:能够进一步成熟为功能性的、产生胰岛素的细胞,可以按照上述方式用于治疗。

[0014] 常规的获得胰腺祖细胞的方案有许多不足和劣势,其中主要的为:

[0015] • 胰腺祖细胞群不纯,被非胰腺细胞污染。多能干细胞倾向于形成所有三种胚层。因此,即使最高效的方案产生的胰腺细胞群也混有非胰腺细胞。

[0016] • 胰腺祖细胞群被未成熟细胞污染。这些细胞保留不死的性质,并可能在移植至

患者后引发肿瘤。

[0017] • 胰腺祖细胞未能成熟为完全功能性的产生胰岛素的 β 细胞。

[0018] • 培养细胞的方案采用了管理机构通常不接受用于人类使用的试剂和操作。

[0019] 参见Matveyenko (2010), Tahamtani (2013)。也参见美国联邦法规, 第21编, 第1271部分。

[0020] C. 成体胰腺的细胞异质性

[0021] 胰岛起源于胚胎发生期间从正在发育的胰腺管萌出的祖细胞。在健康个体的生命过程中, β 细胞仅仅通过现存 β 细胞的复制而生成。参见Dor (2004)。 β 细胞复制过程的发生在体重增加、怀孕以及胰腺损伤后的恢复期间更为迅速。迄今为止, 尚未做到在培养中复制分离的 β 细胞而不丧失其成熟特性。参见Pagluca (2013)。

[0022] 尚未通过谱系追踪实验在成熟组织中鉴定胰腺干细胞或祖细胞。然而, 许多出版物已经描述了自哺乳动物胰腺分离的细胞, 其据说展示了一些干细胞特性。这些细胞已在导管组织中、在外分泌组织中和在胰岛本身中鉴定。例如, 参见Gong (2012), Noguchi (2010) 和Ciba (2009)。据描述, 它们具有有限的复制能力并被诱导表达胰岛素。

[0023] 此外, 许多已公开的专利文献描述所述成体干细胞直接收获自成熟胰腺。参见美国专利6436704、6815203、7544510、8110399和8377689, 以及公开的美国专利申请2004/0115805。

[0024] 这些细胞群尚未以治疗患者所需的规模制备, 而且均未显示应答于葡萄糖而适当地分泌胰岛素。由于这些原因, 这些细胞群尚未显示临床效益。

[0025] 例如, 美国专利8377689提及胰腺细胞在培养中复制并被诱导表达胰岛素。然而, 根据描述, 这些细胞具有有限的复制能力而且并未成熟为完全功能性的 β 细胞或者至少不能逆转啮齿类动物模型中的糖尿病。即, 实际获得的结果显示, 在“糖尿病小鼠”模型中, “在5周内自…高血糖症(>400mg/dl)恢复至接近正常(<300mg/dl), 而未移植的糖尿病小鼠在整个研究期间为高血糖。”第45栏, 18行后各行(重点添加)。然而, 在糖尿病小鼠模型中, “正常”是约150mg/dl, 而根据报告, 持续读数高于250mg/dl被视为稳定的糖尿病状态的证明。例如, 参见Dang (2013)。

[0026] 因此, 由于缺乏可放大的药用级别治疗性胰腺细胞的来源, 通过移植替代 β 细胞或胰岛来治愈糖尿病的策略的潜力基本上尚未转化为实际。

[0027] 所有这些工作都不同于本文所述的发明, 因为其涉及从哺乳动物胰腺分离干细胞。本发明涉及从胰腺或其它来源分离完全成熟的非干细胞, 其在培养物中被操作以获得干细胞特性。本方法依赖于对人类器官内成熟细胞的遗传多样性的掌控, 来鉴定可被操作成为治疗有用的干细胞的亚群。存在于成熟人类组织中的细胞多样性是近来才认识到的, 而对成熟胰腺内的细胞异质性的传统理解尚不全面。

[0028] 发明概述

[0029] 如前所述, 现有的产生胰腺细胞的技术不能生成有效的替代胰腺细胞(即, 可被移植至哺乳动物机体部位, 在该位置驻留并行使天然胰腺细胞的功能的细胞)。本发明通过提供药用级别的(即, 美国食品药品监督管理局(FDA)和/或其它此类管理机构认为可接受用于人类使用的)替代胰腺细胞以及含该细胞的组合物克服了此点不足和其它缺点。例如, 参见美国联邦法规, 第21编, 第1271部分, 将其内容整体引入本申请。

[0030] 关于一般意义上的人类细胞疗法,世界范围内监管机构的可接受性标准强调所采用的细胞的安全性和有效性。在此语境中核心的安全性担忧是:(i)细胞形成肿瘤的趋势和(ii)从该细胞可能接触过的动物源试剂转移毒性、免疫原性或感染性颗粒的风险。有效性标准包括:细胞群对于给定的细胞功能是强效的,并且在该有效治疗期间是稳定的。

[0031] 因此,本发明的含有替代胰腺细胞的组合物(1)不含降低效力或行使不需要功能的非治疗性细胞,但其组成的治疗性细胞(2)是根据国际上接受的标准使用明确限定的(defined)、非动物来源的组分培养的,且(3)不是遗传修饰的、转化的、核型异常的,或者具有其他高风险的不稳定性或致癌性特征的。

[0032] 因此,根据本发明的一个方面,提供了一种包含替代胰腺细胞的非多能祖细胞的组合物。所述祖细胞(i)不具有整合至其基因组的重编程基因,(ii)依照仅采用明确限定的(defined)试剂的方案分化为胰腺谱系,且(iii)实质上不能分化为中胚层谱系。

[0033] 根据本发明的另一方面,还提供了一种用于生成包含此类替代胰腺细胞的非多能祖细胞的组合物的方法,所述替代胰腺细胞适用于治疗胰岛素依赖性糖尿病。本发明的方法包括:

[0034] a.在最低限度的(minimal)、明确限定的(defined)培养条件中自有活力的人胰腺组织收获人细胞;

[0035] b.培养所述原代人细胞数天时间,天数少于约9天;然后

[0036] c.使用重编程基因重编程来自(b)的原代人细胞,从而获得不具有基因组整合的重编程基因、但具有干细胞形态学的重编程细胞;

[0037] d.首先在最低限度的、明确限定的培养条件中,对在(c)中获得的重编程细胞选择不丧失干细胞形态的情况下增殖的能力,从而获得增殖的重编程细胞;然后

[0038] e.其次,从所述增殖的重编程细胞中选择有下述特征的细胞群:(i)在仅采用明确限定试剂的方案的过程中,有能力存活并分化为胰腺谱系,和(ii)实质上不能分化为中胚层谱系,

[0039] 从而获得前述的非多能祖细胞。

[0040] 本发明的另一方面涉及包含替代胰腺细胞的组合物,其适用于治疗胰岛素依赖性糖尿病,其中(A)所述替代胰腺细胞衍生自上述非多能祖细胞和(B)多于约90%的组成该组合物的细胞表达标志物Pdx1、Nkx6.1和NeuroD1。本发明还提供了一种生成此类替代胰腺细胞的方法,该方法包括:

[0041] a.将所述非多能祖细胞暴露于驱动向内胚层谱系分化的组分的第一组合,从而获得内胚层细胞,所述第一组合不包含血清和任何wnt家族成员;然后

[0042] b.将所述内胚层细胞暴露于驱动向胰腺内分泌谱系分化的组分的组合,

[0043] 从而获得所讨论的替代胰腺细胞。

[0044] 本发明还包括如下项:

[0045] 1.组合物,其包含适用于治疗胰岛素依赖性糖尿病的替代胰腺细胞的非多能祖细胞,其中所述祖细胞(i)不具有整合至其基因组中的重编程基因,(ii)根据仅采用明确限定的试剂的方案分化为胰腺谱系,且(iii)实质上不能分化为中胚层谱系。

[0046] 2.生成包含适用于治疗胰岛素依赖性糖尿病的替代胰腺细胞的非多能祖细胞的组合物的方法,所述方法包括:

- [0047] a.在最低限度的、明确限定的培养条件中自有活力的人胰腺组织收获人细胞；
- [0048] b.培养该原代人细胞数天时间，天数少于约9天；然后
- [0049] c.使用重编程基因重编程来自(b)的原代人细胞，从而获得不具有在基因组中整合的重编程基因但具有干细胞形态的重编程细胞；
- [0050] d.首先在最低限度的、明确限定的培养条件中，对在(c)中获得的重编程细胞选择不丧失所述形态的情况下增殖的能力，从而获得增殖的重编程细胞；然后
- [0051] e.其次，从该增殖的重编程细胞中选择具有以下特征的细胞群：(i)在仅采用明确限定的试剂的方案的过程中能够存活并分化为胰腺谱系，和(ii)实质上不能分化为中胚层谱系，
- [0052] 从而获得所述非多能祖细胞。
- [0053] 3.组合物，其包含适用于治疗胰岛素依赖性糖尿病的替代胰腺细胞，其中(A)所述替代胰腺细胞衍生自项1的非多能祖细胞，且(B)多于约90%的构成所述组合物的细胞表达标志物Pdx1、Nkx6.1和NeuroD1。
- [0054] 4.生成适用于治疗胰岛素依赖性糖尿病的替代胰腺细胞的方法，其包括：
- [0055] a.将项1的非多能祖细胞暴露于驱动向内胚层谱系分化的组分的第一组合，从而获得内胚层细胞，所述第一组合不包含血清和任何wnt家族成员；然后
- [0056] b.将所述内胚层细胞暴露于驱动向胰腺内分泌谱系分化的组分的组合，
- [0057] 从而获得所述替代胰腺细胞。
- [0058] 附图简述
- [0059] 图1描述了自人器官收获细胞。即，将有活力的人胰腺切碎成碎片(A)，然后将碎片在锥形管中冲洗并沉降(B)。培养72小时后获得贴壁细胞(C)。在所提供的明确限定的培养条件中，各细胞培养物分别包含混合的细胞群，这些细胞呈现上皮细胞核成纤维细胞形态。无干细胞或间充质细胞形态的证据。
- [0060] 图2概略地图示了重编程游离型质粒上的基因构造。缩写--CMV：巨细胞病毒启动子，2A：自体裂解肽序列，WPRE：早发肝炎病毒转录后反应元件，SV40 Poly A：多腺苷酸化信号，OriP：复制起点，EBNA1：Epstein Barr核抗原1，p53shRNA：靶向p53的小发夹RNA。
- [0061] 图3表示重编程细胞的显微照片。该相衬图像显示到重编程后20天为止细胞呈现干细胞形态。
- [0062] 图4的条形图说明了针对呈现干细胞形态被选择的诸细胞集落在培养中的增殖。与图3中所示的干细胞相似的十个细胞集落被人工转移至各别的培养容器中。当生长表面被汇合的干细胞层覆盖时，将细胞传代至新的培养容器中。通过计数在三个连续传代的开始和结束时存在的细胞数目来跟踪所转移的细胞随时间的增殖。使用血球计数器人工计数细胞数目并且计算每一克隆的倍增时间。结果显示，十个所选克隆中的六个能够在最低限度的明确限定培养基中增殖。
- [0063] 图5呈现了显微照片A-D，描述了对上述在最低限度明确限定培养基中增殖的六个克隆应用选择的结果。所述六个克隆中的两个经历分化过程而存活，所述分化过程采用最低限度的、明确限定的试剂。克隆9的细胞只有部分(<50%)经历分化过程而存活，在组织培养皿中产生小细胞簇(A,C)，培养皿中他处为空白。免疫细胞荧光显示Pdx1表达于那些细胞中的一些细胞的细胞核中(A)，但在其它细胞中出现于细胞质中(C)。Nkx6.1似乎同样表达

于细胞核中 (C)。克隆10的细胞有至少80%经历分化过程而存活,在培养皿中产生细胞的汇合单层 (B,D)。Pdx1 (B,D) 和Nkx6.1 (D) 表达于>90%的细胞的细胞核中。因此,只有克隆9和10经历分化过程而存活。克隆9存活较差,且细胞并不正常地表达胰腺基因。淘汰该克隆。克隆10的细胞多于80%经历分化过程而存活,那些细胞中多于90%正常地表达胰腺基因。选择该克隆。

[0064] 图6包括条形图,其描述了基因表达的RT-qPCR分析结果。自克隆5-9获得的胚状体在分化的第3天和第10天表达内胚层、中胚层和外胚层的代表性基因。然而,克隆10未表达中胚层的代表性基因。在分化的同时,在第3天和第10天所有胚状体均下调了多能性相关基因的表达。结果对 β -肌动蛋白归一化并且以相对于第0天培养物(未分化的)的方式显示。误差棒表示三个重复的标准偏差。

[0065] 图7呈现条形图,显示的实验结果证实克隆10不能分化为中胚层谱系。遵循自多能干细胞生成高纯度心肌细胞群的方案,克隆5和10被导向分化为中胚层心肌细胞谱系。参见Xu (2009)。在第15天,通过RT-qPCR来定量心脏特异性生长因子 (Gata4,Nkx2.5) 和结构蛋白 (α MHC) 的基因表达。克隆5上调了心脏基因的表达,而克隆10维持了与未分化细胞类似的心脏基因表达水平。结果呈现于图6中(参见上述的相关评论)。

[0066] 优选实施方案的详述

[0067] A. 本发明的提供药用级别的替代胰腺细胞的方法

[0068] 在成体胰腺内存在的多种多样的细胞中,已发现一个细胞亚群可用于衍生如上所述的治疗性细胞。这些细胞不是胰腺干细胞或祖细胞,而是一个具有多种多样的遗传组成的成熟细胞群的成员,这些成员包含特定的遗传特征使得它们易于进行如下详述的操作。因此,本发明的一个重要方面是自成体器官收获细胞从而维持多样性的细胞群,包括本发明的发明人鉴定的亚群。参见以下实施例1。

[0069] 本发明的另一重要方面是上述多样性的细胞群重编程为干细胞状态,细胞群每一细胞可被扩增用于分析和选择(参见实施例2和3)。该重编程应当以不引起任何重编程基因整合至所述细胞基因组或者其它限制监管机构批准所述细胞用于人类治疗用途的方式实现。

[0070] 本发明的另一重要方面是自重编程细胞群中选择具有首次被本发明的发明人所揭示的独特性质,即用作药用级别替代胰腺细胞的来源的干细胞。选择标准不同于多能性(这是常规方法学的目标)的标准。因而,根据本发明获得不具有多能性但具有改善的临床效用的细胞(参见实施例4)。

[0071] 使用重编程基因衍生多能干细胞是一种低效的方法,导致仅有0.01至0.0001%的细胞的重编程满足多能性的标准。在科学文献中,这些细胞被称为“诱导多能干细胞”或iPS细胞。在常规方法中,未满足多能性标准的细胞被淘汰;这些细胞通常被标注为“不完全重编程的”或“部分重编程的”。

[0072] iPS细胞群体的基因型可包含特定的遗传变异,其仅以非常低的频率存在于亲代细胞群中。因此,所述重编程的方法可鉴别并选择初始细胞群的仅一小部分所表现的基因型。

[0073] 根据(i)重编程是一种低效的方法和(ii)iPS细胞基因型经常不同于初始细胞群的典型细胞的事实,本发明的发明人推测某种特定遗传改变可能促使细胞易于成功重编程

为iPS细胞。因此,发明人意识到此前由于重编程不完全而被淘汰的细胞可能具有罕见的遗传改变使得它们易于变成某种非iPS细胞表型,此前从未有如此认知,但该表型仍然具有用于本发明治疗目的的价值。

[0074] 自人类器官新收获的细胞群具有比已培养较长时间的细胞大得多的细胞多样性。发明人将重编程基因应用于新收获的细胞群,以便鉴别并选择具有特定临床效用的细胞,如上所述。以下事实证明如此鉴别的细胞不是胰腺干细胞:所鉴定的细胞(1)不能复制,而是在长期培养中消失,(2)不呈现干细胞形态,和(3)可从不含有推定的胰腺干细胞的组织中分离。(假设推定的胰腺干细胞存在于胰腺管中)参见以下实施例1。

[0075] 自成体胰腺收获的本发明的细胞不需要血清用于其分离,不呈现干细胞形态,并且不需要自纯化的胰腺细胞亚群的特定级分中分离。所有这些均与例如美国专利8377689的描述构成鲜明的对比。

[0076] 因此,根据本发明,新鲜人类胰腺组织可用作细胞来源,从其中鉴别并选择易于成为替代胰腺细胞来源的非干细胞群,所述替代胰腺细胞能够治疗胰岛素依赖的糖尿病。具体地,如以下所详述,细胞可在自器官收获一周内重编程而成为干细胞状态。

[0077] 对所得的干细胞选择如下能力:(1)高效地分化为胰腺内分泌祖细胞(其本身能够治疗如上所述的胰岛素依赖的糖尿病)的能力,和(2)在可放大(scalable)且通常为管理机构所接受的最低限度的培养条件中存活并分化的能力。在这点上“高效地”是指在分化过程结束时生成包含至少约80%内分泌祖细胞,更优选地至少约90%的内分泌祖细胞的细胞群。“内分泌祖细胞”是将会成熟为胰岛的激素产生细胞的细胞。这些细胞以例如同时表达基因Pdx1、Nkx6.1和NeuroD1为特征。在这点上“存活”表示初始活细胞群的至少约80%、优选初始活细胞群的至少约90%在分化过程结束时能够有活力。

[0078] 更具体地,驱使向内胚层谱系分化的化合物对多能干细胞是有毒的。因此,常规方案采用血清以增强细胞存活;在使用血清的条件下,细胞存活可超过50%。然而,血清是一种非明确限定的试剂,管理机构通常不希望其用于培养人类治疗细胞。

[0079] 与常规方案相反,本发明的方法省略了血清,从而使所得细胞可被认为适用于人类细胞疗法。而且,常规方案采用wnt,一种昂贵且极其不稳定的生长因子。本发明省略了wnt的使用,从而提供了一致且可放大的方法。

[0080] 在避开使用血清和wnt的情况下,本发明的方法学对于驱使多能干细胞的高效分化是无效的。另一方面,本发明的组合物的细胞经过选择,从而对该新方法应答并可经历该新方法而存活。因此,根据本发明所选择的超过约80%的细胞,优选超过约90%的细胞可经历分化过程而存活。此外,超过约80%,且优选超过约90%的存活细胞同时表达胰腺内分泌谱系的标志物Pdx1、Nkx6.1和NeuroD1(参见实施例3,最后一段)。

[0081] 在本发明的鉴别和选择过程中,忽略多能干细胞的选择标准,且根据本发明生成的细胞确实不是多能性的;即,它们缺乏实质性分化为非胰腺谱系的能力。在本文中,“实质性(实质上)”是指分化细胞群的至少约5%,优选至少约10%,且更优选至少约20%展现非胰腺谱系特有的性质。

[0082] 例如,对根据本发明生成的细胞实施了常用于衍生三种谱系(中胚层、内胚层和外胚层)的混合物的方案。为证明分化成三种谱系的混合物的能力,常规做法是向干细胞簇的悬浮液中提供不会导致一种谱系的分化优于另一种的培养基,如血清,使得自发生长和分

化成为可能。在这样的培养条件下,所述干细胞簇将根据其遗传编程分化,而不被所提供的培养条件特异性地引导。由此形成的簇由于与早期哺乳动物胚胎相似被称为“胚状体”。参见Rust (2006)。多能细胞将生成含有所有依照哺乳动物胚胎的模式三种胚层:外胚层、内胚层和中胚层的胚状体。然而,不同于多能干细胞,从本发明的细胞生成的混合物不包括中胚层谱系的细胞(参见实施例4,例如在第5段中)。

[0083] 还对本发明的细胞实施了常用于使多能干细胞分化成心肌细胞的方案,心肌细胞是中胚层谱系细胞。同样,与多能干细胞相反,本发明的细胞未响应于分化方案而表达心肌细胞相关的基因。目视检查显示本发明所述的细胞未展示心肌细胞的典型跳动形态。因此,低于约5%的细胞对本领域使用的从多能干细胞衍生心肌细胞的方案应答(参见实施例4,例如在其第6段和第7段中)。

[0084] 本发明所生成的干细胞具有以下此前未被描述的性质:

[0085] • 组成衍生自新鲜人类胰腺的有更新的(renewing)干细胞群;

[0086] • 易于高效分化成能够治疗胰岛素依赖性糖尿病的替代胰腺细胞的基本上纯的群(即, $\geq 80\%$ 或 $\geq 90\%$);

[0087] • 缺少外源基因的基因组整合;和

[0088] • 使用通常被管理机构认为可接受用于人类使用的试剂和方法衍生、重编程和培养。

[0089] 根据本发明获得的替代胰腺细胞也具有此前未被描述的性质。这些性质为:

[0090] • 组成基本上纯的治疗细胞群(即 $\geq 80\%$ 或 $\geq 90\%$),未被具有致癌潜力的干细胞所污染;

[0091] • 使用通常被管理机构认为可接受用于人类使用且可放大的试剂和方法分化而来;和

[0092] • 缺少外源基因的基因组整合。

[0093] B. 实施本发明方法的指南

[0094] 1. 获得天然胰腺细胞而不牺牲多样性

[0095] 现有的自器官收获细胞的方法导致细胞长时培养(over time)。结果,适应于培养条件的增殖细胞的亚群受惠,占据群体的主导地位而生成均质的细胞培养物。这种现象常被称为“培养漂移(culture drift)”,仅经过每10群体倍增就会发生。

[0096] 相反,本发明规定了自成熟器官收获的细胞不能长时间培养,优选1周或更短时间,且少于5次群体倍增。这可防止所述细胞群对培养条件产生适应,并且使得快速生长的细胞占据所述细胞群的主导地位并降低整体细胞群多样性的机会最小化。

[0097] 2. 无重编程基因整合或长期表达的重编程细胞

[0098] 四种基因Oct4、Sox2、Klf4和Myc会使得成熟细胞具有干细胞的性质。这些“重编程基因”必须表达于将要重编程的相同细胞中,并且它们通常用病毒递送,病毒将这些基因插入宿主基因组,它们可以在那里表达。

[0099] 管理机构通常不接受基因组中随机插入有基因的细胞用于对人体移植。这是因为如此修饰的细胞较未操作的细胞存在更高的致癌性危险。

[0100] 本发明需要在这样的质粒中递送重编程基因:这样的质粒不将基因整合至基因组,因此仅仅暂时地造成它们的表达。当在细胞核中时,由质粒携带的基因可被宿主核转录

复合物转录。参见Takacs (2010)。

[0101] 在一项优选实施方案中,所述基因在游离型质粒中递送。“游离型”修饰这样的质粒,其可持续存在于细胞核中但不整合至该细胞的任何染色体中(Takacs,上文)。随着时间的推移,游离型质粒在细胞群中被稀释,因为其不被复制却在有丝分裂中被分离。而且,游离型质粒可从细胞核消除或者可被降解。

[0102] 常用于重编程的myc家族成员,C-myc,是一种已知的癌基因。在一项优选实施方案中,本发明采用了L-myc (其不是癌基因) 替代C-myc。参见Nakagawa (2010)。

[0103] 3. 具有治疗效用的细胞的选择

[0104] 重编程的细胞可通过展示典型的干细胞形态而区别于未重编程的细胞。典型的干细胞小且圆,具有显著的细胞核和小细胞质,并且在紧密的簇中生长。

[0105] 根据本发明,这些重编程细胞的相对小但可辨别的部分是药用级别的替代胰腺细胞的来源。这些部分通过符合详述如下的标准来鉴别。

[0106] • 能够在由明确限定的、非动物来源的组分构成的培养条件中增殖;

[0107] • 能够对最小分化方案应答,分化成基本上纯的胰腺细胞群(即,由至少约80%,优选至少约90%的表达胰腺内分泌祖细胞的基因特性、并可成熟为胰岛的激素产生细胞的细胞组成的细胞群)。

[0108] 本发明的方案设计驱使受影响的细胞经历这样一条通路:该通路重演胰腺发育中人体干细胞所经历的通路。由此,该方案充分忠实地模拟人类发育,从而产生与可自发育中的人类胎儿或新生儿分离的胰腺细胞无法区分的胰腺细胞。与常规技术相反,本发明的方案还仅仅使用明确限定的、非动物来源的组分,这些组分可以是可放大的药用级别制备方法的一部分。即,本发明的方案既不采用此前用于增强细胞存活的血清,也不采用wnt家族成员(一种极其不稳定且昂贵的生长因子)。

[0109] • 所述细胞群能够经历分化过程而存活,从而高效地生成大群胰腺细胞。

[0110] 如上所述,“存活”表示初始活细胞群的至少约80%,优选初始活细胞群的至少约90%在分化过程结束时能够有活力。

[0111] 根据本发明,对易于形成胰腺细胞的细胞的选择是对具有可高效成熟为人体全部三种谱系的多能特性的细胞的反选择。具体地说,组成符合这些标准的上述部分的细胞不具有多能性,因为它们不能实质地分化为中胚层谱系的细胞,即,分化细胞群的至少约5%,优选至少约10%,且更优选至少约20%展现中胚层谱系特有的特性。

实施例

[0112] 1. 仅使用明确限定的、非动物来源的试剂收获原代胰腺细胞

[0113] 将一枚人胰腺在补充有5X抗生素/抗真菌剂(青霉素、链霉素、两性霉素Life Technologies)的DMEM中彻底洗净。将一小部分组织切成直径不大于2mm的碎片。将切碎的组织转移至50ml锥形管中并让其重力沉降(图1A、B)。将培养基更换为补充有5X抗生素/抗真菌剂的新配制的DMEM,并在室温孵育5分钟。然后将培养基更换为原代培养基,其组成为DMEM/F12、L-抗坏血酸-2-磷酸盐(64mg/L),亚硒酸钠(Na Selenium)(14μg/L)、胰岛素(19.4mg/L)、NaHCO₃(543mg/L)、转铁蛋白(10.7mg/L),TGFβ1(2μg/L)、bFGF(10μg/L)、肝素(50μg/L)和氢化可的松(100nM)。将培养基调整为pH 7.4和340mOSM。

[0114] 前述方案的一种变型采用补充有EGF (100µg/L)、凝血酶 (1U/ml) 和氢化可的松 (100nM) 的Essential 8培养基 (Life Technologies)。在另一种变型中,用购自Prodo Labs (Irvine,CA) 的碎裂的胰腺组织代替完整的人胰腺,即,胰腺组织被碎裂成胰岛制备物和导管制备物。在再另一种变型中,使用皮肤穿孔活组织检查。这些变型均未产生任何实质的结果变化。

[0115] 向培养基中添加50mg/ml量的无动物来源的胶原酶,AFA级 (Worthington Biochemical) 并将培养瓶放置于37℃湿化孵箱中过夜。第二天通过研磨使剩余的细胞团破裂。将溶液转移至锥形管中并在200XG离心4分钟。将培养基吸出并将细胞离心沉淀再悬于原代培养基中。然后将细胞转移至预包被有CELLstart (Invitrogen) 的细胞培养瓶中并将其返回至孵箱中。24小时后,细胞已粘附于培养皿上并开始增殖 (参见图1,C图)。

[0116] 在本方案的一种变型中,将胶原酶替换为1X TrypLE Select (Life Technologies)。在另一种变型中,将CELLstart替换为包被有1X VitronectinXF (Stem Cell Technologies) 的培养皿。未发生与任一种变型有关的实质改变。

[0117] 当细胞培养物生长到接近在生长表面汇合时,通过添加TrypLE Select (Life Technologies) 将它们解离,并收获用于重编程。该过程,自收到胰腺起始,持续时间不长于9天。根据制造商说明书,将过量的细胞冷藏保存于Synth-a-freeze CTS (Life Technologies) 中。在一种变型中,将过量的细胞冷藏保存于补充有10%DMSO的原代培养基中,未导致实质改变。

[0118] 2. 仅使用非整合性的基因载体和非动物来源的明确限定试剂重编程胰腺细胞

[0119] 使用TrypLE Select将细胞培养物解离成单个细胞。使用血球计数器计数所述单个细胞悬浮液。将1.5E6个细胞转移至一根新的锥形管中并在200XG离心4分钟。将离心沉淀再悬于补充有7.5µg重编程质粒1和12.5µg重编程质粒2的溶液V (Lonza) 中 (图2), 并加至电穿孔小杯 (electroporation cuvette) 中。重编程质粒1和2是游离型、非整合性质粒。用于重编程质粒中的基因已由例如Takahashi (2006) 描述。使用L-myc来代替C-myc (一种已知的癌基因)。参见Nakagawa (2010)。将小杯迅速地插入Lonza Nucleofector中,并使用程序T-024电穿孔。

[0120] 将经电穿孔的细胞稀释于重编程培养基中并转移至预包被CELLstart的培养皿。重编程培养基由以下组成:DMEM/F12、L-抗坏血酸-2-磷酸盐 (64mg/L)、亚硒酸钠 (Na Selenium) (14µg/L)、胰岛素 (19.4mg/L)、NaHCO₃ (543mg/L)、转铁蛋白 (10.7mg/L)、TGFβ1 (2 µg/L)、bFGF (10µg/L) 和肝素 (50µg/L)。将培养基调整至pH 7.4和340mOSM。或者,将经电穿孔的细胞稀释于补充有100ng/ml bFGF (Sigma)、100µM丁酸钠 (Sigma) 和100nM氢化可的松 (Sigma) 的Essential 6培养基 (Life Technologies)。

[0121] 每2天更新培养基。任选地,在第4-10天对培养基补充2mM丙戊酸 (Sigma)。当细胞达到汇合时,使用TrypLE将细胞传代。截至20天,已出现了具有干细胞形态的细胞集落 (图3)。

[0122] 3. 可用于治疗胰岛素依赖性糖尿病的细胞的鉴别和选择

[0123] 人工从支持物上解离出呈小细胞团状的具有干细胞形态的10个细胞集落,将其转移至新的预包被有CELLstart的组织培养皿,并使用重编程培养基培养。在本方案的一种变型中,将具有干细胞形态的集落转移至预包被有玻连蛋白XF (Stem Cell Technologies) 的

组织培养皿。

[0124] 在如此获得的10个集落中,6个继续增殖而形态无变化。在1-3个传代过程中计算细胞群的倍增时间(图4)。

[0125] 然后将增殖细胞的集落转移至预包被有CELLstart的6孔组织培养皿的各孔中,并让其生长至接近汇合。在接近汇合时,对细胞实施引导分化成胰腺谱系的方案。或者,将细胞转移至预包被有玻连蛋白XF (Stem Cell Technologies)的6孔组织培养皿的各孔中。

[0126] 驱使干细胞分化为胰腺谱系的新方案:将培养基替换为补充有0.2%人血清白蛋白(HSA)、0.5XN2 (Life Technologies)、0.5XB27 (Life Technologies)、100ng/ml激活蛋白A和1 μ M渥曼青霉素 (Sigma) 的DMEM/F-12。两天后更新培养基。至第4天止,细胞表达内胚层谱系的特征基因Sox17、HNF3 β 和HNF4 α 。在第5天,将培养基替换为补充有0.5%HAS、2 μ M视黄酸 (Sigma)、50ng/ml Noggin、10ng/ml FGF7/KGF和0.5%胰岛素-转铁蛋白-硒 (BD Biosciences) 的IMDM/F-12。在第7天更新培养基。在第9天,将培养基替换为补充有1%ITS、1XN2和50ng/ml EGF的DMEM。在第11天和13天更换培养基。至第15天止,细胞同时表达衍生内分泌胰腺的胰腺细胞的特征基因Pdx1、Nkx6.1和NeuroD。

[0127] 在6个集落中,仅有两个集落能够经历分化过程而存活。存活定义为经历分化过程的细胞至少有80%在分化后仍保留。在第15天,使用4%的多聚甲醛固定两个存活的培养物并准备用于免疫细胞荧光法。通过使用抗Pdx1和抗Nkx6.1抗体首次孵育、和用荧光偶合的第二抗体二次孵育,来使蛋白Pdx1和Nkx6.1的表达可视化。在这两个培养物中,仅有一个维持了几乎完全由Pdx1和Nkx6.1双阳性细胞组成的接近汇合的培养物(图5)。对克隆10的数个荧光图像中的核计数,显示>95%的细胞表达Pdx1和Nkx6.1。

[0128] 4.多能性测试

[0129] 将克隆5-10分化成三种原始胚层以确定这些干细胞是否具有多能性。本领域技术人员常用的分化方案使得干细胞能够分化成“胚状体”。参见[Rust2006]。通过对基因表达的RT-qPCR分析评估分化。

[0130] 将含有克隆5-10中每一个的6孔培养皿的2个孔在分散酶 (Stem Cell Technologies) 中培养5分钟,并通过吸管端刮擦将其人工解离。将含有细胞团的培养基转移至锥形管并在90XG离心5分钟。将细胞离心沉淀在DMEM (Gibco) 中冲洗,并重悬于补充有20%血清替代品 (Invitrogen) 和0.5%体积/体积青霉素/链霉素 (Gibco) 的RPMI中。

[0131] 将细胞离心沉淀转移至6孔低吸附培养皿的各孔中并培养15天。每2-3天更换培养基。在2天内,胚状体已开始形成。在第0、3和10天收获等份的胚样体,并通过RT-PCR分析。使用RNeasy试剂盒 (Qiagen) 分离总RNA,用滤器上的脱氧核糖核酸酶处理并通过UV吸收定量。根据制造商的说明,使用Moloney小鼠白血病病毒 (M-MuLV) 逆转录酶 (New England Biolabs) 和随机六核苷酸引物 (random hexamer primer) 将总共1 μ g RNA转化为cDNA。

[0132] 使用50ng每个逆转录酶反应、250nM每种引物和1XSYBR green PCR master mix (Bio-RAD) 进行定量PCR,并通过iCycler thermocycler (Bio-RAD) 分析。引物对列于下表1。用标准曲线计算表达,对 β -肌动蛋白归一化,并转化为相对于第0天(未分化细胞)的相对值。

[0133] 表1.用于RT-qPCR的引物

基因	正向引物	反向引物
Oct4	GGCAACCTGGAGAATTTGTT	GCCGGTTACAGAACCACACT
Nanog	TACCTCAGCCTCCAGCAGAT	TGCGTCACACCATTGCTATT
Sox17	CCAGAATCCAGACCTGCACAA	CTCTGCCTCCTCCACGAA
AFP	GTAGCGCTGCAAACAATGAA	TCCAACAGCCTGAGAAATC
HNF3 β	GGAGCGGTGAAGATGGAA	TACGTGTTTCATGCCGTTTCAT
SHH	CCAATTACAACCCCTACATC	CAGTTTCACTCCTGGCCACT
Tbx6	AGTGCTGAGGCCTACCTCCT	CCAGAAATGCAGCCGAGTAG
巢蛋白	GCCCTGACCACTCCAGTTTA	GGAGTCCTGGATTTCCCTCC
NeuroD	GCCCCAGGGTTATGAGACTA	GTCCAGCTTGGAGGACCTT
Nkx2.5	AGGACCCTAGAGCCGAAAAG	GTTGTCCGCCTCGTCTTCT
GATA4	GGAAGCCCAAGAACCTGAAT	GGGAGGAAGGCTCTCACTG
α MHC	ATTGCTGAAACCGAGAATGG	CGCTCCTTGAGGTTGAAAAG
β 肌动蛋白	CAATGTGGCCGAGGACTTTG	CATTCTCCTTAGAGAGAAGTGG

[0134] 向胰腺谱系的高效分化与向中胚层谱系的低效分化之间具有明显的相关性(图6)。随着分化的进展,所有克隆显示多能性相关的基因表达减少和内胚层和外胚层相关的基因表达增加。克隆5-9显示中胚层相关的基因增加。克隆10未展示中胚层相关的基因的显著表达。

[0136] 为确认最后一个结果,对克隆5和10实施设计用于驱使多能性细胞分化为中胚层心肌细胞的方案[Xu 2009]。简而言之,如上所述将克隆传代至低吸附板上以形成细胞簇,不同之处在于使用重编程培养基。在过夜孵育后,将培养基替换为以下组成的培养基:DMEM、1X非必需氨基酸(Gibco)、2mM L-谷氨酰胺(Gibco)、5.5 μ g/ml转铁蛋白(Sigma)、5ng/ml亚硒酸钠(Sigma)、0.1mM β -巯基乙醇(Gibco)和1X青霉素/链霉素(Gibco)。每3-4天更换培养基。

[0137] 在克隆5的培养物中,在约第12天出现含有中胚层心肌细胞的自发搏动细胞簇。至第15天止,至少50%的所述细胞簇在至少一个位点自发收缩。在第15天收获胚状体,并对心肌细胞的代表性基因进行RT-PCR分析。克隆5鲁棒地表达心肌细胞基因,即至少5倍于未分化细胞(图7)。相反,无论在分化的第12天或第15天,克隆10的培养物中均不存在自发搏动细胞簇。对细胞簇基因表达的RT-PCR分析显示,心肌细胞基因表达的水平不高于未分化干细胞。

[0138] 因此,克隆10不能实质分化成中胚层心脏谱系的细胞。因为未鉴别出自发搏动细胞簇,且因为心肌细胞基因表达的水平不高于未分化细胞群,所以得出结论的是:对常用于将多能干细胞分化成心肌细胞的方案应答的细胞少于约5%。

[0139] 尽管上文讨论了本发明的具体实施方案,但它们仅是说明本发明而非限制本发明。通过审阅对本说明书,本发明领域的技术人员将容易想到本发明的很多变型。本发明的全部范围应当通过参考下面的权利要求书、其全部等同物、说明书、以及此类变型来确定。

[0140] 所引用的公开

[0141] 美国专利文献

[0142] 6,436,704B1 8/2002 Roberts和Mather

[0143] 6,815,203B1 11/2004Bonner-Weir和Taneja

- [0144] 7,544,510B2 6/2009 Habener等人
- [0145] 7,604,991B2 10/2009Bouwens和Baeyens
- [0146] 8,110,399B2 2/2012 Habener等人
- [0147] 2004/0115805A1 6/2004 Tsang等人
- [0148] 8,377,689B2 2/2013 Tsang等人
- [0149] 其他公开
- [0150] Shapiro,A.M.2011 Curr Opin Organ Transplant 16(6) ,627-31
- [0151] Robertson,R.P.2010 Endocrinol Metab Clin N Am 39,655-67
- [0152] Yamanaka,S.2012 Cell Stem Cell 10,678-84
- [0153] Plath,K.2011 Nat Rev Genet.12(4) ,253-65
- [0154] Lai,M.I.2011 J Assist Reprod Genet 28,291-301
- [0155] Stover,A.E.,et al.2011 Methods Mol Biol 767,391-8
- [0156] Kroon,E.,et al.2008 Nat Biotechnol 26(4) ,443-52
- [0157] Rezania,A.,et al.2012 Diabetes 61(8) ,2016-29
- [0158] Matveyenko,A.V.,et al.2010 Am J Physiol Endocrinol Metab 299,E713-20
- [0159] Tahamtani,Y.,et al 2013 Stem Cells and Dev 22(9) ,1419-32
- [0160] Title 21,U.S.Code of Federal Regulations,part 1271
- [0161] Dor Y.,et al.2004 Nature 429(6987) ,41-6
- [0162] Pagluca,F.W.and Melton,D.A.2013 Dev 140,2472-83
- [0163] Gong J,et al.2012 J Mol Histol 43(6) ,745-50
- [0164] Noguchi H,et al.2010 Cell Transplant 19(6) ,879-86
- [0165] Ciba P,et al.2009 Ann Anat 191(1) ,94-103
- [0166] Dang T.T.,et al.2013 Biomaterials 34,5792-801
- [0167] Xu X.Q.,et al.2009 Stem Cells.27(9) ,2163-74
- [0168] Rust W.L.,et al.2006 Stem Cells Dev 15(6) ,889-904
- [0169] Takacs M,et al.2010 Biochim Biophys Acta 1799(3-4) ,228-35
- [0170] Nakagawa M,et al.2010 Proc Natl Acad Sci U S A 107(32) ,14152-7
- [0171] Takahashi K and Yamanaka S.2006 Cell 126(4) ,663-76。

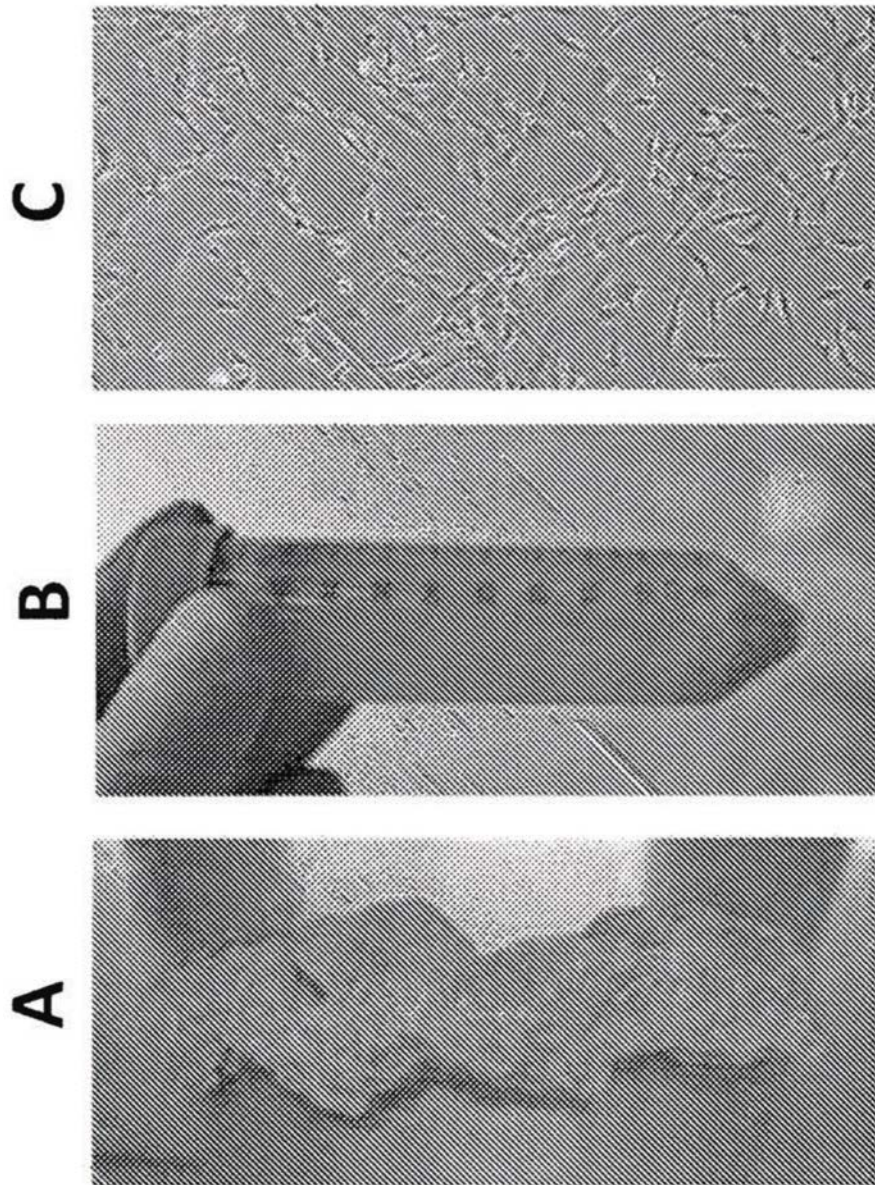


图1

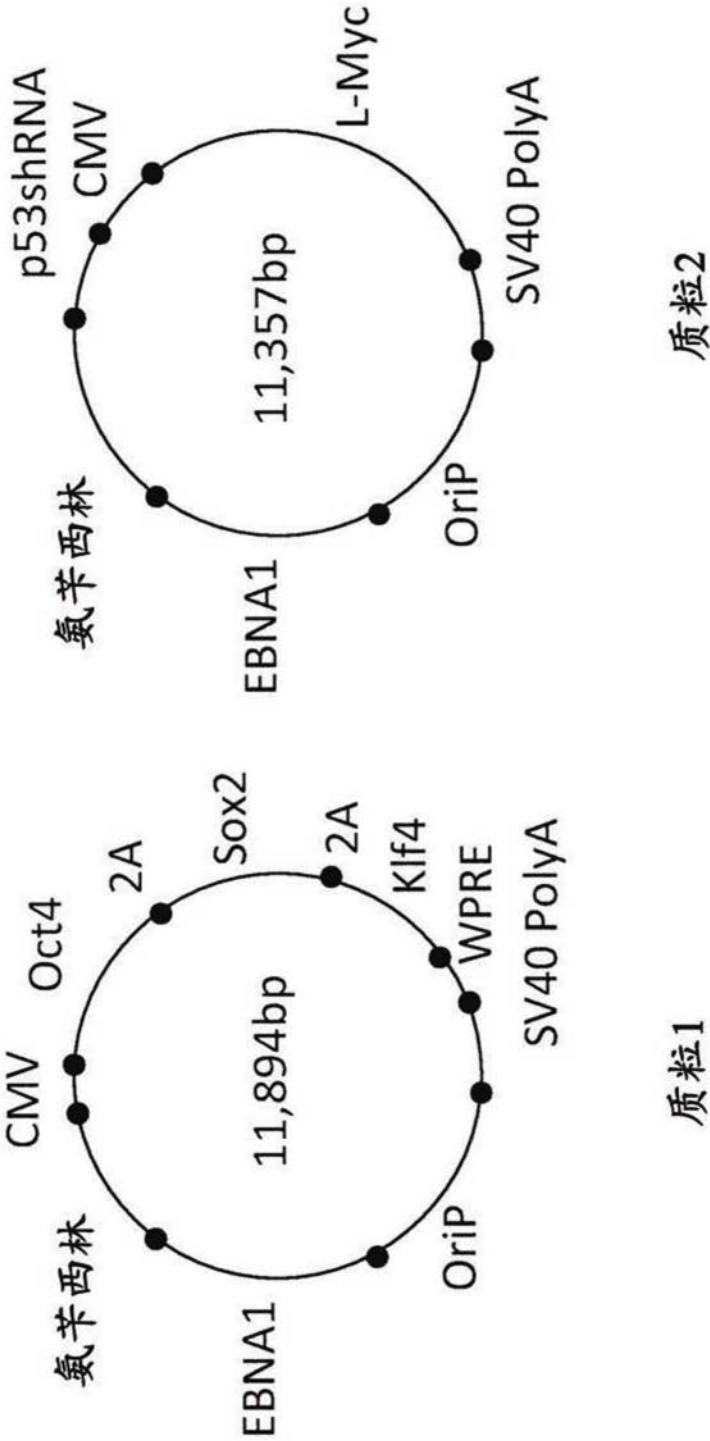


图2

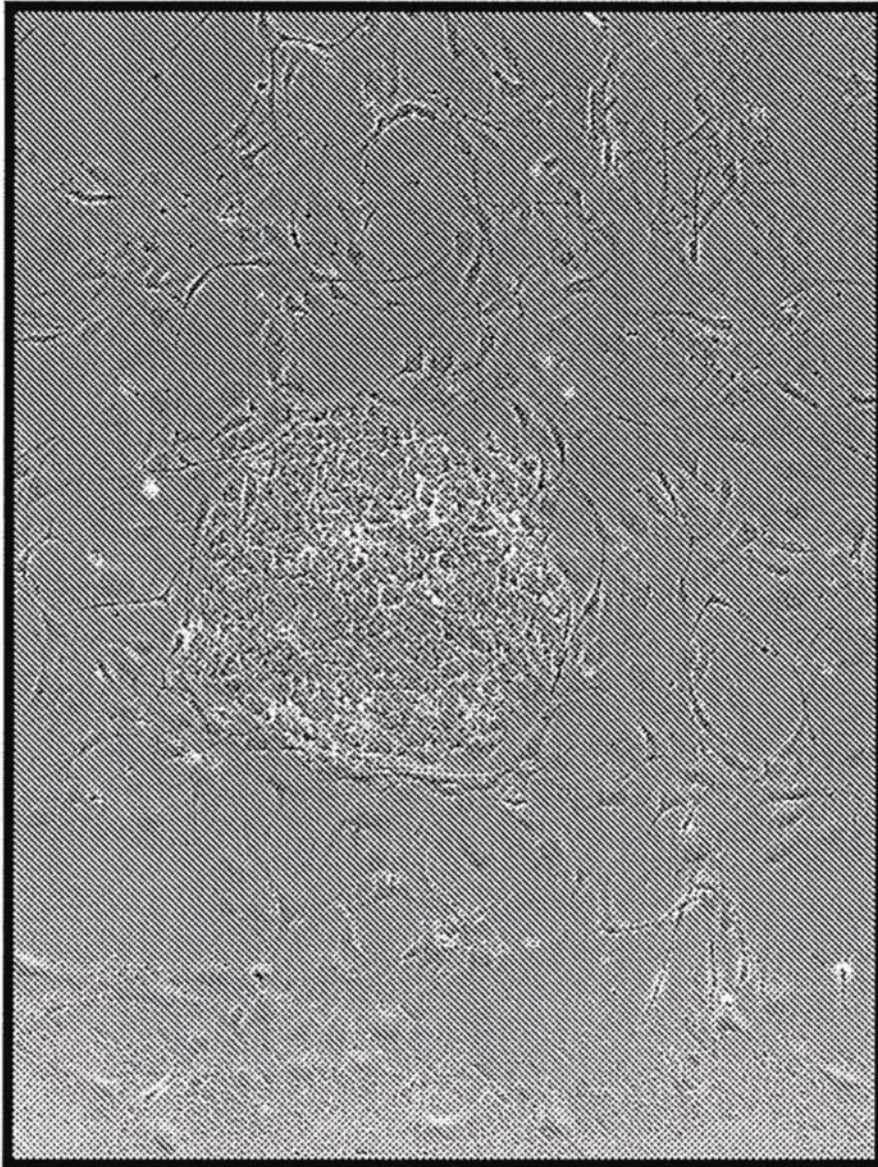


图3

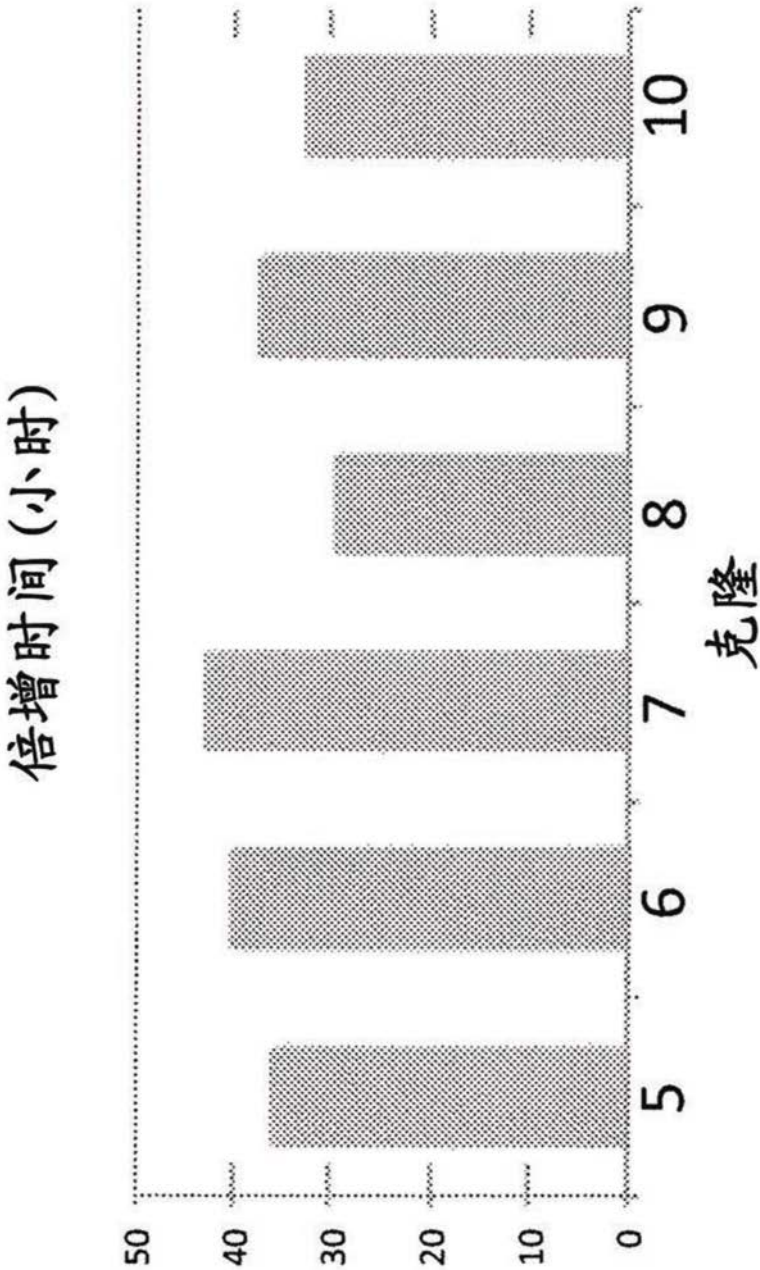


图4

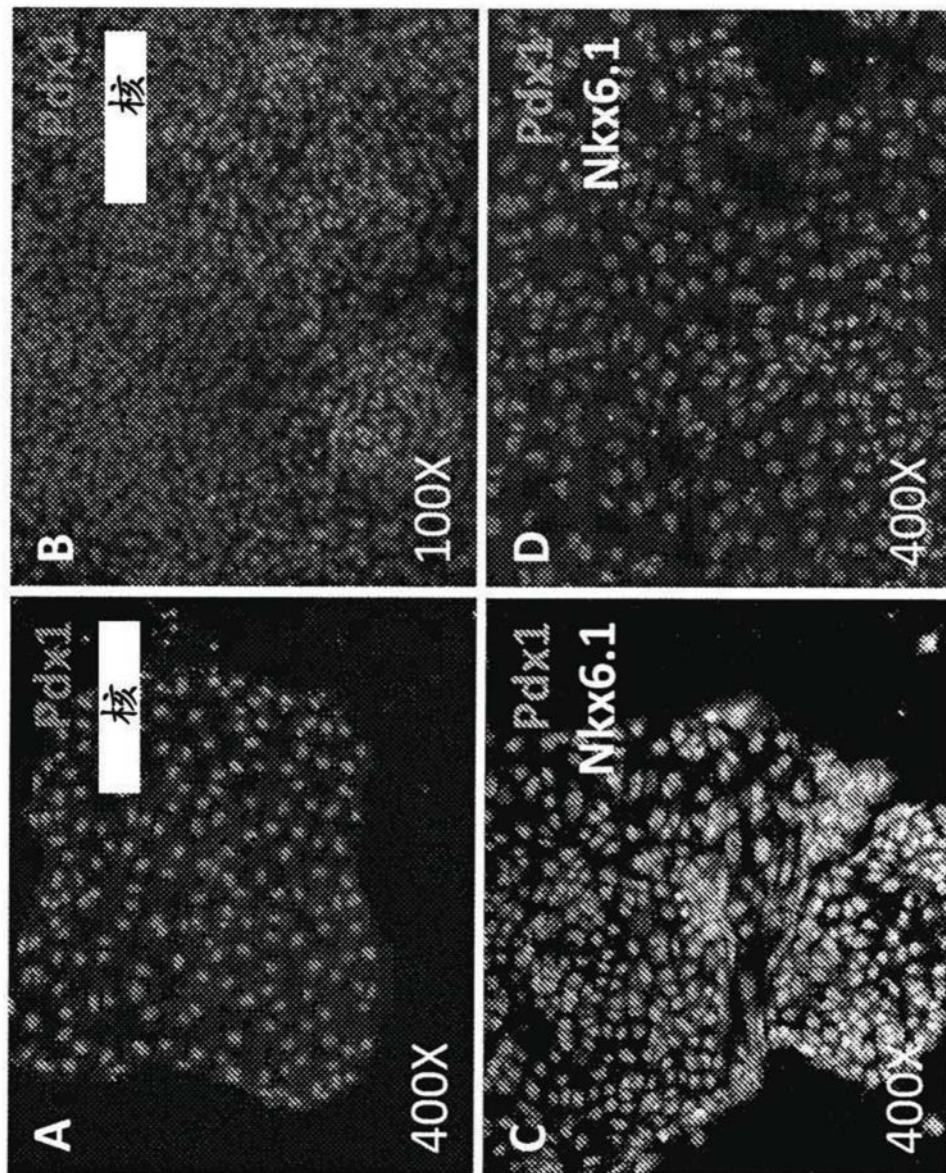


图5

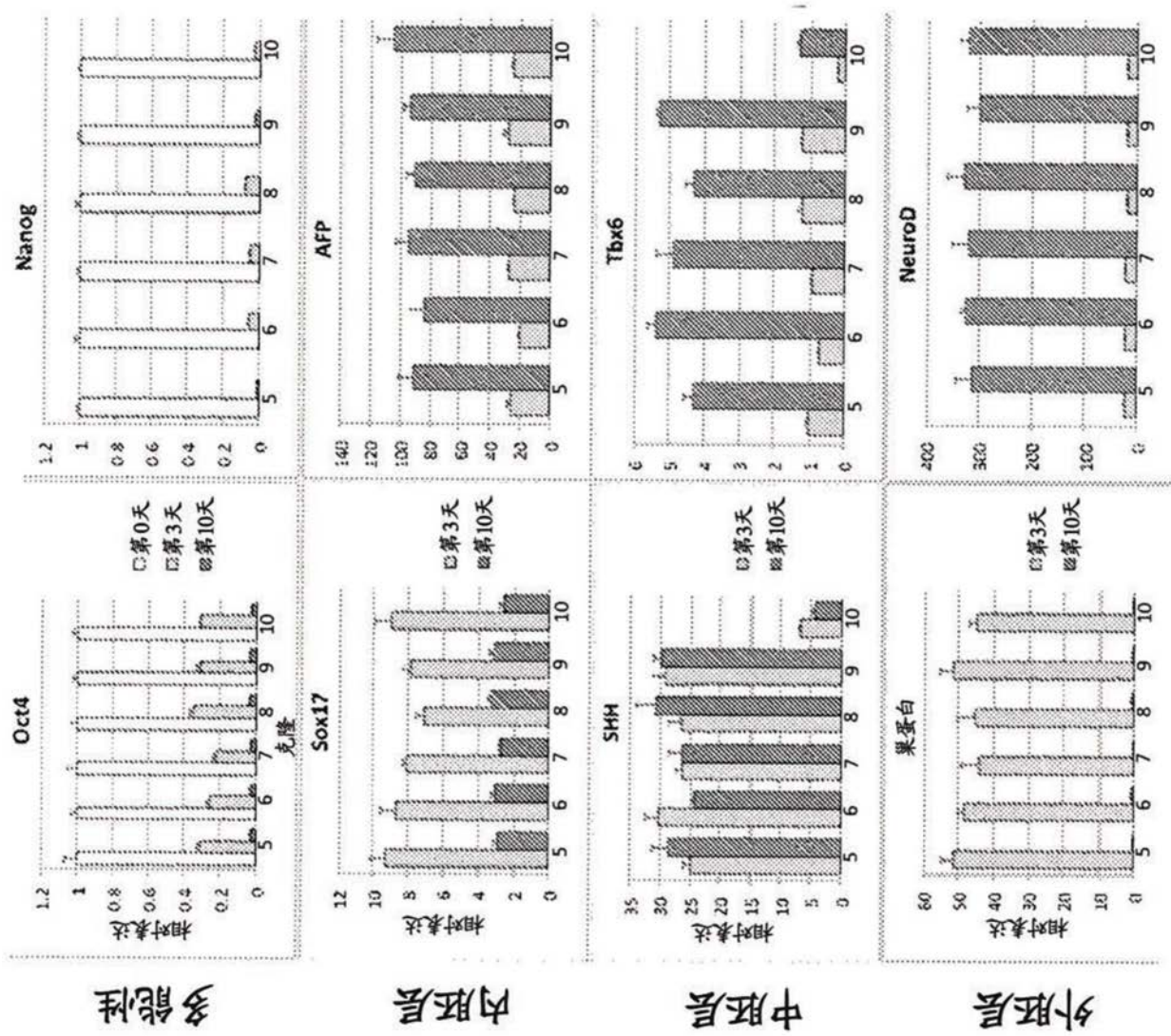


图6

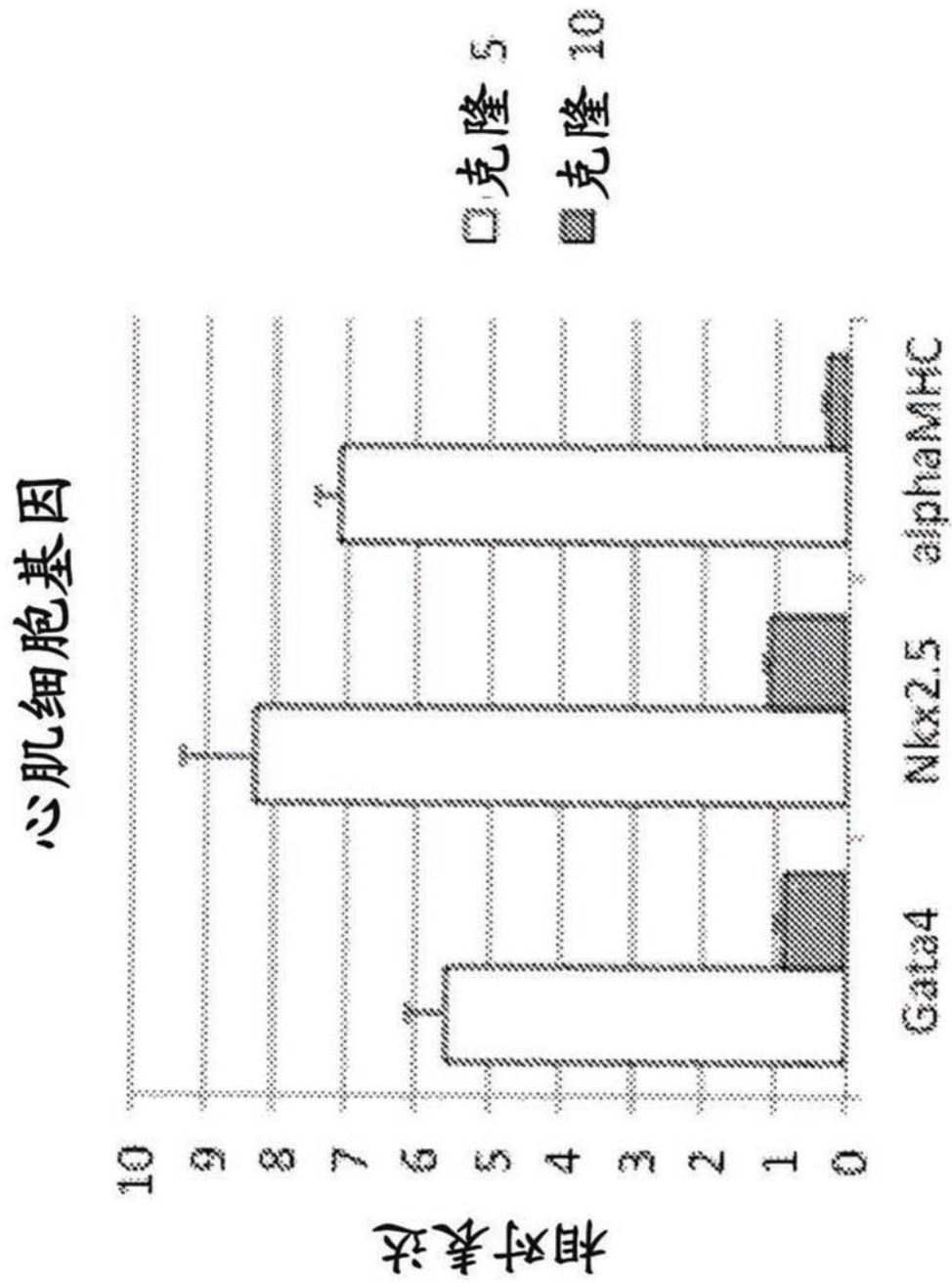


图7