



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111394298 A

(43)申请公布日 2020.07.10

(21)申请号 202010174030.X

(22)申请日 2013.12.18

(30)优先权数据

61/747672 2012.12.31 US

(62)分案原申请数据

201380074033.4 2013.12.18

(71)申请人 詹森生物科技公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 A.雷扎尼亚

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 黄希贵

(51)Int.Cl.

C12N 5/071(2010.01)

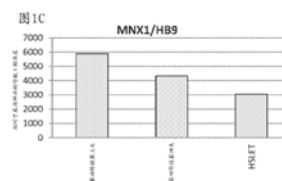
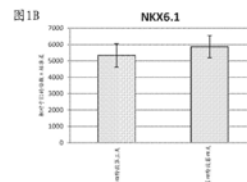
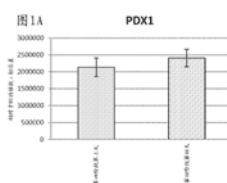
权利要求书1页 说明书30页 附图17页

(54)发明名称

使用HB9调节子使人胚胎干细胞分化为胰腺内分泌细胞的方法

(57)摘要

本发明提供了促进多能干细胞分化成表达PDX1、NKX6.1和HB9的胰腺内胚层细胞的方法。具体地,所述方法涵盖用甲状腺激素(例如T3)、ALK5抑制剂、或甲状腺激素和ALK5抑制剂两者培养第四阶段至第六阶段的细胞。



1. 一种体外细胞培养物,包括:
 - a. 培养容器;
 - b. 一定体积的补充有ALK5抑制剂和甲状腺激素的生长培养基,所述甲状腺激素选自三碘甲状腺原氨酸、四碘甲状腺原氨酸、GC-1、DITPA (3,5-二碘甲状腺丙酸)、KB-141、MB07344、T0681、GC-24和它们的混合物;和
 - c. 前肠内胚层细胞。
2. 权利要求1的体外细胞培养物,其中所述甲状腺激素是三碘甲状腺原氨酸。
3. 权利要求1或2的体外细胞培养物,其中所述ALK5抑制剂选自ALK5抑制剂II、ALK5i、SD208、SB431542、ITD-1、LY2109761、A83-01、LY2157299、TGF- β 受体抑制剂V、TGF- β 受体抑制剂I、TGF- β 受体抑制剂IV、TGF- β 受体抑制剂VII、TGF- β 受体抑制剂VIII、TGF- β 受体抑制剂II、TGF- β 受体抑制剂VI和TGF- β 受体抑制剂III。
4. 权利要求1-2中任一项的体外细胞培养物,其中所述生长培养基还补充有BMP受体和PKC活化剂。
5. 权利要求1-2中任一项的体外细胞培养物,其中所述生长培养基还补充有一种或多种以下物质:
 - a. SHH信号转导途径拮抗剂,所述SHH信号转导途径拮抗剂选自SANT-1或HPI-1;
 - b. 视黄酸;
 - c. BMP受体抑制剂,所述BMP受体抑制剂选自LDN-193189、头蛋白或脊索发生素;
 - d. PKC活化剂,所述PKC活化剂选自TPB、PDBu、PMA和ILV;
 - e. FGF7;和
 - f. 抗坏血酸。
6. 权利要求5的体外细胞培养物,包含SANT-1、视黄酸、抗坏血酸、FGF7、LDN-193189和TPB。
7. 权利要求1-2中任一项的体外细胞培养物,其中所述前肠内胚层细胞表达PDX1、FOXA2、CDX2、SOX2和HNG4 α 中的至少一种。
8. 权利要求1-2中任一项的体外细胞培养物,其中所述前肠内胚层细胞是人前肠内胚层细胞。

使用HB9调节子使人胚胎干细胞分化为胰腺内分泌细胞的方法

[0001] 本申请是与母案发明名称相同的分案申请，母案的中国申请号是201380074033.4，国家申请号是PCT/US2013/075959，申请日是2013年12月18日。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求美国临时申请61/747,672 (2012年12月31日提交) 的优先权，该美国临时申请全文以引用方式并入本文。

技术领域

[0004] 本发明所属领域为细胞分化领域。更具体地，本发明涉及将特定的甲状腺激素或其类似物、和ALK5抑制剂用作胰腺内胚层和内分泌细胞的HB9调节子。

背景技术

[0005] I型糖尿病的细胞替代疗法在不断推进，同时可移植胰岛又一直短缺，这使人们重点着眼于扩大适于移植产胰岛素细胞(即 β 细胞)的来源。一种方法是由多能干细胞(例如胚胎干细胞)产生功能性 β 细胞。

[0006] 在脊椎动物的胚胎发育期间，多能细胞在称为原肠胚形成的过程中产生包括三个胚层(外胚层、中胚层和内胚层)的细胞群。例如甲状腺、胸腺、胰腺、肠和肝脏之类的组织将从内胚层经由中间阶段发育产生。原肠胚形成的中间阶段涉及形成定形内胚层。

[0007] 到原肠胚形成结束时，内胚层分裂成了前、中、后三个区域，可通过检测一组独特标记内胚层这三个区域的因子的表达水平来识别这些区域。例如，HHEX和SOX2是内胚层前区的独特标记物；而CDX1、CDX2和CDX4是内胚层后区的独特标记物。

[0008] 内胚层组织迁移使内胚层与不同的中胚层组织紧密靠近，从而有助于肠管分区。肠管分区在多种分泌因子例如FGF、WNT、TGF- β 、视黄酸(RA)、BMP配体和它们的拮抗物的作用下实现。例如，FGF4和BMP促进预定后肠内胚层中的CDX2表达并阻遏前基因HHEX和SOX2的表达(2000Development, 127:1563-1567)。还证明了WNT信号转导与FGF信号转导并存，能够刺激后肠发育并控制前肠命运(2007Development, 134:2207-2217)。最后，间充质分泌的视黄酸调节前肠与后肠的边界(2002Curr Biol, 12:1215-1220)。

[0009] 可利用特异性转录因子的表达水平来判断组织的种类。在定形内胚层转化为原肠管期间，肠管在大范围内逐渐分区，形成多个区域。技术人员可通过识别这些区域的有限基因表达模式，在分子水平上观察到这些区域。肠管中分区的胰腺域显示出PDX1有极高表达，但CDX2和SOX2的表达却非常低。PDX1、NKX6.1、PTF1A和NKX2.2在胰腺组织内高度表达，CDX2在肠组织内高度表达。

[0010] 胰腺形成源于定形内胚层分化成胰腺内胚层。背侧和腹侧胰腺域衍生自前肠上皮组织。前肠还会分化成食道、气管、肺、甲状腺、胃、肝和胆管系统。

[0011] 胰腺内胚层细胞会表达胰十二指肠同源盒基因PDX1。没有PDX1时，胰腺在形成腹胰芽和背胰芽后便不再发育。因而，PDX1表达是胰腺器官形成中至关重要的一步。成熟胰腺

由胰腺内胚层分化产生的外分泌组织和内分泌组织构成。

[0012] D' Amour等人描述了向人胚胎干细胞的培养基中加入高浓度活化素和少量血清,由此制得源于人胚胎干细胞的定形内胚层的富集培养物(Nature Biotechnology 2005, 23:1534-1541;美国专利7,704,738)。据报道,在把这些定形内胚层细胞移植到小鼠的肾包膜下之后,这些细胞会分化成具有内胚层组织特征的更成熟细胞(美国专利7,704,738)。在添加FGF10和视黄酸后,这些衍生自人胚胎干细胞的定形内胚层细胞还可进一步分化成PDX1阳性细胞(美国专利申请公布2005/0266554)。接下来将这些胰腺前体细胞移植到免疫缺陷小鼠的脂肪垫中,在三至四个月的成熟期后,便得到了功能性胰腺内分泌细胞(美国专利7,993,920和美国专利7,534,608)。

[0013] Fisk等人报道了一种由人胚胎干细胞产生胰岛细胞的体系(美国专利7,033,831)。在这种情况下,分化途径分三个阶段。首先使用丁酸钠和活化素A的组合,使人胚胎干细胞分化成内胚层(美国专利7,326,572)。然后将这些细胞与结合了EGF或 β -细胞素的BMP拮抗物(如头蛋白(Noggin))一起培养,得到PDX1阳性细胞。用烟酰胺诱导终末分化。

[0014] 一直以来,技术人员还使用小分子抑制剂来诱导胰腺内分泌前体细胞产生。例如,已使用TGF- β 受体和BMP受体的小分子抑制剂(Development 2011,138:861-871;Diabetes 2011,60:239-247)来显著增加胰腺内分泌细胞的数量。另外,还使用小分子活化剂来生成定形内胚层细胞或胰腺前体细胞(Curr Opin CellBiol 2009,21:727-732;Nature Chem Biol2009,5:258-265)。

[0015] HB9(也称为H1XB9和MNX1)是一种在胰腺发育(从胚胎期大约第八天开始)早期表达的bHLH转录活化因子蛋白。HB9也在脊索和脊髓中表达。在胚胎期的第十天半左右,HB9在胰腺上皮中表达PDX1和NKX6.1的细胞内瞬时表达,水平达到峰值。HB9表达在第十二天半左右开始衰退,且在胰腺发育后期,只局限于 β 细胞内。H1XB9无效突变纯合的小鼠未能发育出胰腺背叶(Nat Genet 23:67-70,1999;Nat Genet 23:71-75,1999)。HB9-/- β -细胞只表达低浓度的葡萄糖转运蛋白GLUT2和NKX6.1。此外,HB9-/-胰腺显示胰岛素阳性细胞数目明显减少,但这种细胞数目减少并未显著影响其他胰腺激素的表达水平。时序控制HB9对于 β 细胞正常发育并具有正常功能是至关重要的。虽然我们不太清楚有哪些因子调节HB9在 β 细胞中的表达,但近期用斑马鱼作的研究揭示,视黄酸可能对HB9表达有正向调节作用(Development,138,4597-4608,2011)。

[0016] 四碘甲状腺原氨酸("T4")和三碘甲状腺原氨酸("T3"),它们是由甲状腺分泌的基于酪氨酸的激素,主要负责调节机体代谢。血液循环中的甲状腺激素大多为T4,T4的半衰期比T3长。释放入血的T4和T3的比例大约为20比1。T4在细胞中会被脱碘酶转化为活性较强的T3(T3的活性是T4的三至四倍)。

[0017] T3随后结合到甲状腺激素受体TR α 1和TR β 1(统称TR)上。甲状腺激素受体(TR)是一种核激素受体,能与类视色素X受体结合,形成异源二聚体。没有配体时,这种异源二聚体便结合到甲状腺应答元件(TRE)上,充当转录抑制子。T3结合到TR减轻了TRE依赖性基因所受抑制,随后活化各种靶基因表达。虽然多项研究的结果已揭示T3能够增进 β 细胞增殖、减少细胞凋亡并促进胰岛素分泌,但目前仍不明确T3在细胞分化过程中所起的作用。

[0018] 转化生长因子 β (TGF- β)是参与多种生物过程的一大家族多效性细胞因子的成员,这些生物过程包括控制细胞生长、分化和迁移,维持细胞活性,促进细胞纤维化,和促进细

胞发育命运的特化。TGF- β 超家族的成员利用由II型受体和I型受体构成的受体复合物传导信号。TGF- β 配体(例如活化素和GDF(生长分化因子))将II型受体与I型受体拉到一起形成复合物。该复合物中的II型受体随后磷酸化I型受体,使I型受体活化。哺乳动物体内有五种II型受体,分别为T β R-II、ActR-II、ActR-IIB、BMPR-II和AMHR-II;和七种I型受体(ALK1到ALK7)。活化素和相关配体利用ActR-II与ALK4或ALK5的组合,或ActR-IIB与ALK4或ALK5的组合来传导信号;BMP利用ALK2、ALK3和ALK6与ActR-II的组合,ALK2、ALK3和ALK6与ActR-IIB的组合,或ALK2、ALK3和ALK6与BMPR-II的组合来传导信号。AMH利用AMHR-II与ALK6的复合物来传导信号;另外,最近的研究结果已显示,节点利用ActR-IIB与ALK7的复合物来传导信号(Cell.2003,113(6):685-700)。在TGF- β 配体结合到适当的受体之后,接下来出现的信号就主要靠活化Smad复合物传递到细胞核。在活化Smad复合物时,I型受体使由受体调节的Smad亚家族的成员磷酸化。磷酸化使这些成员活化,一旦活化,这些成员就能与常见的中介体Smad(即Smad4)形成复合物。Smad 1、Smad 5、Smad 8是ALK 1、ALK 2、ALK3、ALK 6的底物,Smad 2和Smad 3是ALK 4、ALK 5、ALK 7的底物(FASEB J 13:2105-2124)。活化后的Smad复合物在细胞核中蓄积,直接参与通常和其他特异性DNA结合转录因子相关联的靶基因转录。研究人员研制出了能选择性抑制TGF- β 受体的化合物,并已将它们用于治疗应用,另外,已在对各种干细胞群重新编程且诱导其分化的背景下,使用了这些化合物来调控细胞命运。具体地,先前已使用ALK5抑制剂来引导胚胎干细胞分化为内分泌细胞(Diabetes,2011,60(1):239-47)。

[0019] 一般来讲,使祖细胞分化为功能性 β 细胞的过程涉及多个阶段。迄今为止人们已认识到,要在体外定向引导人胚胎干细胞(“hES”)经历多阶段逐步形成与 β 细胞类似的细胞颇为困难,另外,由人胚胎干细胞产生功能性 β 细胞也是相当繁琐的过程。在使祖细胞分化的过程中,每个步骤面临的难题各不相同。虽然已在由祖细胞例如人多功能干细胞产生胰腺细胞的方案方面取得进展,但仍需要继续开发用于产生功能性内分泌细胞(尤其是功能性 β 细胞)的方案。

附图说明

[0020] 图1A至图1C绘出按实例1概述的步骤分化为胰腺内胚层/内分泌前体细胞的人胚胎干细胞系H1的细胞中以下基因表达的实时PCR分析数据,这些基因分别是:PDX1(图1A),NKX6.1(图1B),HB9(图1C)。

[0021] 图2A至图2C示出按实例1概述的步骤分化为胰腺内胚层/内分泌前体细胞的人胚胎干细胞系H1的以下基因的FACS分析结果,这些基因分别是:PDX1(图2A),NKX6.1(图2B),HB9(图2C)。

[0022] 图3A和图3B示出在对细胞中的NKX6.1、胰岛素或HB9行免疫染色后采集的细胞图像。这些细胞首先按实例1概述的步骤分化为胰腺内胚层/内分泌前体细胞,再行免疫染色。图3A的左图示出对NKX6.1行免疫染色后的细胞图像,右图示出对胰岛素行免疫染色后的细胞图像。图3B的左图示出对HB9行免疫染色后的细胞图像,右图示出对胰岛素行免疫染色后的细胞图像。

[0023] 图4A、图4B和图4C绘出按实例2概述的步骤分化到第四阶段再到第六阶段的人胚胎干细胞系H1,在分化过程的第四阶段第三天(图4A)、第五阶段第四天(图4B)和第六阶段

第三天(图4C),其中PDX1、NKX6.1和HB9基因表达百分比的FACS数据。

[0024] 图5A为按实例2概述的步骤分化的细胞在分化第二阶段到第六阶段,其中的HB9mRNA表达水平与人类胰岛中HB9mRNA表达水平的对比图。

[0025] 图5B绘出在对按实例2概述的步骤分化到第四阶段第三天的细胞行NKX6.1和HB9免疫染色后,采集的细胞图像:左图为对NKX6.1行免疫染色后的图像,右图为对HB9行免疫染色后的图像。

[0026] 图6A至图6J绘出按实例2概述的步骤分化到第四阶段,接着只在第四阶段、或在第四阶段到第五阶段、或在第四阶段到第六阶段接受处理的人胚胎干细胞系H1的细胞中以下基因表达的实时PCR分析数据。图6A至图6J依次绘出以下基因的表达数据:NKX6.1(图6A),PDX1(图6B),NKX2.2(图6C),胰高血糖素基因(图6D),胰岛素基因(图6E),生长激素抑制素基因(图6F),CDX2(图6G),白蛋白基因(图6H),胃泌素基因(图6I),SOX2(图6J)。

[0027] 图7A示出对按实例2概述的步骤分化的对照培养物行免疫染色的结果,图7B示出对按实例2概述的步骤分化的经处理培养物行免疫染色的结果。对第六阶段的对照培养物和经处理培养物行免疫染色的结果显示,与第六阶段的对照组(图7A)相比,T3处理组(图7B)中的HB9阳性细胞的数量显著增加。

[0028] 图8A和图8B绘出对按实例3概述的步骤分化到第六阶段的细胞,在分化过程第六阶段第七天,行NKX6.1和HB9免疫染色得到的结果。图8C绘出按实例3概述的步骤分化到第六阶段的人胚胎干细胞系H1的细胞中HB9表达的实时PCR分析数据。

[0029] 图9A和图9B绘出按实例3概述的步骤分化到第六阶段的人胚胎干细胞系H1的细胞,分别在分化过程第六阶段的第五天和第十五天,其中HB9的FACS数据。

[0030] 图10A至图10E绘出对根据实例4概述的方案分化的细胞,在分化过程第六阶段第六天,行NKX6.1和HB9免疫染色得到的结果。T3以剂量依赖的方式显著增加NKX6.1阳性胰腺内胚层前体细胞中HB9阳性细胞的数量。

[0031] 图11A至图11L绘出按实例4概述的步骤分化到第六阶段的人胚胎干细胞系H1的细胞中以下基因表达的实时PCR分析数据,这些基因分别是:SOX2(图11A),NKX6.1(图11B),NKX2.2(图11C),胃泌素基因(图11D),PDX1(图11E),NGN3(图11F),PAX6(图11G),PAX4(图11H),胰岛素基因(图11I),胰高血糖素基因(图11J),生长激素释放肽基因(图11K),生长激素抑制素基因(图11L)。

具体实施方式

[0032] 结合附图阅读本发明的以下具体实施方式,能更好地理解具体实施方式。提供附图是出于举例说明本发明的某些实施例的目的。然而,本发明并不限于示出的精确布置方式、实例和手段。为了清晰说明本公开内容,以非限制性方式将本发明的具体实施方式分成描述或阐明本发明的某些特征、实施例或应用方式的多个小节。

[0033] 本发明涉及使用某些甲状腺激素或其类似物、与ALK5(TGF β I型受体激酶)抑制剂,以特定培养顺序产生对于NKX6.1、PDX1和HB9呈阳性的胰腺内胚层细胞。因此,本发明提供了一种体外细胞培养物,其用于使衍生自多能干细胞的细胞分化成表达 β 细胞谱系的特征性标志物并表达NKX6.1、PDX1和HB9的细胞。本发明还提供了利用体外细胞培养物获得此类细胞的方法。在某些实施例中,本发明基于这样的发现:分化细胞中包含的T3、T4或它们的

类似物在细胞分化中充当HB9蛋白质表达的诱导物,以有利于向β细胞分化。HB9在第三阶段和第四阶段都不以蛋白质水平表达。因此,本发明提供了通过调控HB9蛋白质表达使干细胞分化的方法。具体地,本发明提供了通过使用T3、T4或它们的类似物与ALK5抑制剂,以特定培养顺序产生对于NKX6.1、PDX1和HB9呈阳性的胰腺内胚层细胞的方法。

[0034] 定义

[0035] 干细胞是通过其在单细胞水平上既自我更新又分化的能力来定义的未分化细胞。干细胞可产生子代细胞,包括自我更新祖细胞、非更新祖细胞和终末分化细胞。干细胞的特征还在于其具备在体外分化成来自多个胚层(内胚层、中胚层和外胚层)的多种细胞谱系的功能细胞的能力。干细胞还在移植后产生多种胚层的组织,并且在注射到胚泡内之后,促成基本上至大部分(如果不是所有的话)组织。

[0036] 干细胞根据其发育潜能分类。多能干细胞能够产生所有胚胎细胞类型。

[0037] 分化是未特化的(“未定向的”)或特化不足的细胞获得特化细胞(例如神经细胞或肌肉细胞)的特征的过程。分化的细胞是已在细胞谱系中占据更特化的(“定向的”)位置的细胞。当应用于分化过程时,术语“定向的”是指已经在分化途径中进行到一定程度的细胞,其中在正常情况下,该细胞将继续分化成特定的细胞类型或一个亚群的细胞类型,并且在正常情况下,不能分化成不同的细胞类型或回复至分化程度更低的细胞类型。“去分化”指细胞回复到细胞的谱系当中特化(或定向)程度较低的地位的过程。如本文所用,“细胞谱系”限定细胞的遗传性,即它来自哪些细胞和它能产生什么细胞。细胞谱系将细胞定位于发育和分化的遗传计划内。谱系特异性标记物是指与所关注谱系的细胞的表型明确地相关联的特征,可用来评估未定向细胞向所关注谱系的分化。

[0038] 如本文所用,“标志物”是在所关注的细胞中差异表达的核酸或多肽分子。在该语境中,差异表达意指与未分化细胞相比针对阳性标志物的升高的水平以及针对阴性标志物的下降的水平。由于标志物核酸或多肽在所关注细胞中的可检测水平充分地高于或低于在其他细胞中的那些,所以可使用本领域已知的多种方法中的任何一种将所关注细胞与其他细胞鉴别和区分开来。

[0039] 如本文所用,当在细胞中充分检测到特定标记物时,细胞“对于该特定标记物是阳性的”,或是“阳性的”。相似地,当未在细胞中充分检测到特定标志物时,细胞为该特定标记物“阴性”,或为该特定标记物“阴性”。具体地,FACS检测的阳性阈值通常大于2%,而FACS检测的阴性阈值通常小于1%。通常以循环数(Ct)小于34判断PCR检测为阳性,而通常以循环数大于34.5判断PCR检测为阴性。

[0040] 尝试着在静态体外细胞培养物中将多能干细胞的分化过程复制进功能性胰腺内分泌细胞时,通常将该分化过程视为分多个连续阶段循序进行。具体地,该分化过程常被视为分六个阶段循序进行。在这种分步进行的过程中,“第一阶段”是指分化过程的第一步,多能干细胞分化为表达定形内胚层细胞的特征性标志物的细胞(下文也称作“第一阶段细胞”)。“第二阶段”是指分化过程的第二步,表达定形内胚层细胞的特征性标志物的细胞分化为表达肠管细胞的特征性标志物的细胞(下文也称作“第二阶段细胞”)。“第三阶段”是指分化过程的第三步,表达肠管细胞的特征性标志物的细胞分化为表达前肠内胚层细胞的特征性标志物的细胞(下文也称作“第三阶段细胞”)。“第四阶段”是指分化过程的第三步,表达前肠内胚层细胞的特征性标志物的细胞分化为表达胰腺前肠前体细胞的特征性标志物

的细胞(下文也称作“第四阶段细胞”)。“第五阶段”是指分化过程的第五步,表达胰腺前肠前体细胞的特征性标志物的细胞分化为表达胰腺内胚层细胞和/或胰腺内分泌前体细胞的特征性标志物的细胞(下文统称为“胰腺内胚层/内分泌前体细胞”,或是“第五阶段细胞”)。“第六阶段”是指分化过程的第六步,表达胰腺内胚层/内分泌前体细胞的特征性标志物的细胞分化为表达胰腺内分泌细胞的特征性标志物的细胞(下文也称作“第六阶段细胞”)。

[0041] 然而,应当指出在特定细胞群中并非所有细胞都以相同的分化速率经历所有这些分化阶段。因此,在体外细胞培养物中检测到存在这样的细胞,其比存在于细胞群中的大多数细胞在分化途径中进程靠前或靠后的情况并不少见,尤其在处于后期分化阶段的培养物中。例如,在细胞培养物处于分化过程的第五阶段期间,不时能观察到有胰腺内分泌细胞的特征性标志物出现。出于举例说明本发明的目的,本文描述了与上文定义的各阶段相关联的各种细胞类型的特征。

[0042] 如本文所用,“定形内胚层细胞”是指具有在原肠胚形成中由上胚层产生的细胞的特征并形成胃肠道及其衍生物的细胞。定形内胚层细胞表达下列标志物中的至少一种:FOXA2(也称肝细胞核因子3- β (“HNF3 β ”))、GATA4、SOX17、CXCR4、Brachyury、Cerberus、OTX2、goosecoid、C-Kit、CD99和MIXL1。定形内胚层细胞的特征性标志物包括CXCR4、FOXA2和SOX17。因此,定形内胚层细胞的特征可在于其中有CXCR4、FOXA2和SOX17表达。此外,取决于细胞能保持在第一阶段的时长,可能观察到HNF4 α 增多。

[0043] 如本文所用,“肠管细胞”是指源于定形内胚层的细胞,这些细胞可产生所有的内胚层器官,如肺、肝、胰腺、胃和肠。肠管细胞的特征可在于其中的HNF4 α 表达较之定形内胚层细胞中的HNF4 α 表达大幅提高。例如,在第二阶段期间,可能观察到HNF4 α 在mRNA中的表达增大到之前的十到四十倍。

[0044] 如本文所用,“前肠内胚层细胞”是指产生食道、肺、胃、肝、胰腺、胆囊和一部分十二指肠的内胚层细胞。前肠内胚层细胞表达下列标志物中的至少一种:PDX1、FOXA2、CDX2、SOX2和HNF4 α 。前肠内胚层细胞的特征可在于与肠管细胞相比,PDX1表达提高。例如,超过百分之五十的第三阶段培养物的细胞通常表达PDX1。

[0045] 如本文所用,“胰腺前肠前体细胞”是指表达下列标志物中的至少一种的细胞:PDX1、NKX6.1、HNF6、NGN3、SOX9、PAX4、PAX6、ISL1、胃泌素、FOXA2、PTF1 α 、PROX1和HNF4 α 。胰腺前肠前体细胞的特征可对于PDX1、NKX6.1和SOX9的表达呈阳性。

[0046] 如本文所用,“胰腺内胚层细胞”是指表达下列标志物中的至少一种的细胞:PDX1、NKX6.1、HNF1 β 、PTF1 α 、HNF6、HNF4 α 、SOX9、NGN3、胃泌素、HB9或PROX1。胰腺内胚层细胞的特征可在于没有CDX2和SOX2大量表达。

[0047] 如本文所用,“胰腺内分泌前体细胞”是指能够变成胰腺激素表达细胞的胰腺内胚层细胞。胰腺内分泌前体细胞表达下列标志物中的至少一种:NGN3、NKX2.2、NeuroD1、ISL1、PAX4、PAX6或ARX。胰腺内分泌前体细胞的特征可在于其表达NKX2.2和NeuroD1。

[0048] 如本文所用,“胰腺内分泌细胞”是指能够分泌下列激素中的至少一种的细胞:胰岛素、胰高血糖素、生长激素抑制素、生长激素释放肽和胰多肽。除这些激素外,胰腺内分泌细胞的特征性标志物还包括下列一种或多种:NGN3、NeuroD1、ISL1、PDX1、NKX6.1、PAX4、ARX、NKX2.2和PAX6。表达 β 细胞的特征性标志物的胰腺内分泌细胞的特征可在于其表达胰岛素和至少一种下列转录因子,这些转录因子为:PDX1、NKX2.2、NKX6.1、NeuroD1、ISL1、

HNF3 β 、MAFA和PAX6。

[0049] “d1”、“1d”和“第一天”，“d2”、“2d”和“第二天”等在本文中可互换使用。这些数字字母组合是指在本专利申请的分步分化方案过程中的不同阶段中温育的具体天数。

[0050] 本文使用的“葡萄糖”是指右旋糖,这种糖在自然界普遍存在。

[0051] 本文使用的“NeuroD1”是指在胰腺内分泌祖细胞中表达的蛋白质及其编码基因。

[0052] “LDN-193189”是指(6-(4-(2-(哌啶-1-基)乙氧基)苯基)-3-(吡啶-4-基)吡啶并[1,5-a]嘧啶盐酸盐(DM-3189),它是一种可以商标STEMOLECULE得自TMStemgent, Inc. (Cambridge, MA, USA)的BMP受体抑制剂。

[0053] 多能干细胞的特征描述、来源、扩增和培养

[0054] A. 多能干细胞的特征描述

[0055] 多能干细胞可表达阶段特异性胚胎抗原(SSEA)3和(SSEA)4,以及可用Tra-1-60和Tra-1-81抗体检测的标志物中的一种或多种(Thomson et al.1998,Science 282:1145-1147)。多能干细胞在体外分化导致Tra-1-60和Tra-1-81表达丧失。未分化的多能干细胞通常具有碱性磷酸酶活性,这种活性可通过用4%多聚甲醛固定细胞,然后用VECTOR[®] Red作为底物显色来检测,如制造商(Vector Laboratories, CA, USA)描述的那样。未分化的多能干细胞通常也表达OCT4和TERT,这通过RT-PCR检测。

[0056] 增殖的多能干细胞的另一理想表型是分化成所有三个胚层即内胚层、中胚层和外胚层组织的细胞的潜能。可例如通过如下方式来确认干细胞的多能性:将细胞注射到重症联合免疫缺陷(“SCID”)小鼠体内,使用4%多聚甲醛固定形成的畸胎瘤,然后对其进行组织学检测,找出来自这三个胚层的细胞类型的证据。另选地,可以通过产生胚状体并评估胚状体中与三个胚层相关的标志物的存在来确定多能性。

[0057] 增殖的多能干细胞系可用标准G-显带技术进行核型分析与公开的相应灵长类物种的核型相比较。希望获得具有“正常核型”(意指细胞为整倍体)的细胞,其中所有人染色体都存在并且无明显的改变。

[0058] B. 多能干细胞的来源

[0059] 可使用的多能干细胞的示例性类型包括建立的多能细胞系。限制性例子是建立的人胚胎干细胞系或人胚胎生殖细胞系,例如人胚胎干细胞系H1、H7和H9(WiCellResearch Institute, Madison, WI, USA)。取自在没有饲养细胞的情况下培养过的多能干细胞群的细胞也是合适的选择。还可使用可诱导多能细胞(IPS)、或重新编程的多能细胞,这些细胞可利用多种多能相关转录因子的被迫表达衍生自成人细胞,所述多能相关转录因子例如OCT4、NANOG、SOX2、KLF4和ZFP42(AnnuRev GenomicsHum Genet2011,12:165-185;还可参见IPS,Cell,126(4):663-676)。也可使用突变的人胚胎干细胞系,诸如BG01v(BresaGen, Athens, Ga.),或衍生自成人细胞的那些细胞,诸如Takahashi等人在Cell 131:1-12(2007)公开的那些细胞。在某些实施例中,适用于本发明的多能干细胞可根据以下文献中描述的方法获得:Li等人(CellStem Cell4:16-19,2009);Maherali等人(CellStem Cell1:55-70,2007);Stadtfield等人(CellStem Cell2:230-240);Nakagawa等人(NatureBiotechnol26:101-106,2008);Takahashi等人(Cell 131:861-872,2007);以及美国专利申请公布2011/0104805。所有这些参考文献、专利和专利申请全文以引用方式并入本文,尤其是它们与多能细胞的分离、培养、扩增和分化有关的内容。

[0060] C. 多能干细胞的扩增和培养

[0061] 在一个实施例中,通常在饲养细胞层上培养多能干细胞,这些饲养细胞可以多种方式支持多能干细胞的生命活动。另选地,在培养系统中培养多能干细胞,所述培养系统基本上不含饲养细胞,但同样支持多能干细胞增殖而不会显著分化。使用通过此前培养另一细胞类型而调理过的培养基来支持多能干细胞在无饲养细胞的培养物中生长而不分化。另选地,用化学成分确定的培养基来支持多能干细胞在无饲养细胞的培养物中生长而不分化。

[0062] 使用多种饲养层或通过使用基质蛋白质涂布的容器,可轻易地使多能细胞在培养物中扩增。另选地,可使用与成分确定的培养基例如 mTesk[®] 1 培养基 (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) 组合的化学成分确定的表面来执行常规细胞扩增。可使用酶促消化、机械分离或使用多种钙螯合剂诸如 EDTA (乙二胺四乙酸) 轻松地将多能细胞从培养平板中取出。另选地,多能细胞可在不存在任何基质蛋白质或饲养层的情况下悬浮扩增。

[0063] 在受权利要求保护的本发明中可使用多种不同的扩增和培养多能干细胞的方法。例如,本发明的方法可以是 Reubinoff 等人、Thompson 等人、Richard 等人的方法,以及美国专利申请公布 2002/0072117。Reubinoff 等人 (Nature Biotechnology 18:399-404 (2000)) 和 Thompson 等人 (Science 282:1145-1147 (1998)) 公开了用小鼠胚胎成纤维细胞饲养细胞层培养来自人胚泡的多能干细胞系。Richards 等人 (Stem Cells 21:546-556, 2003) 评估了一组十一种不同的成人、胎儿和新生儿饲养细胞层在支持人多能干细胞培养方面的能力,指出在成人皮肤成纤维细胞饲养细胞上培养的人胚胎干细胞系保持人胚胎干细胞形态并保留了多能性。美国专利申请公布 2002/0072117 公开了产生支持灵长类多能干细胞在无饲养细胞的培养物中生长的培养基的细胞系。所采用的细胞系是从胚胎组织获得或从胚胎干细胞分化而来的间质细胞系和成纤维细胞样细胞系。美国专利申请公布 2002/072117 还公开了上述细胞系作为原代饲养细胞层的用途。

[0064] 扩增和培养多能干细胞的其他合适的方法在例如 Wang 等人、Stojkovic 等人、Miyamoto 等人和 Amit 等人的文献中有公开。Wang 等人 (Stem Cells 23:1221-1227, 2005) 公开了用于在源自人胚胎干细胞的饲养细胞层上长期培育人多能干细胞的方法。Stojkovic 等人 (Stem Cells 200523:306-314, 2005) 公开了一种源自人胚胎干细胞自发分化的饲养细胞系统。Miyamoto 等人 (Stem Cells 22:433-440, 2004) 公开了从人胎盘获得的饲养细胞源。Amit 等人 (Biol.Reprod 68:2150-2156, 2003) 公开了源自人包皮的饲养细胞层。

[0065] 在另一个实施例中,扩增和培养多能干细胞的合适方法在(例如) Inzunza 等人的文献,美国专利 6,642,048, WO 2005/014799, Xu 等人的文献和美国专利申请 2007/0010011 中有公开。Inzunza 等人 (Stem Cells 23:544-549, 2005) 公开了来自人出生后包皮成纤维细胞的饲养细胞层。美国专利 6,642,048 公开了可支持灵长类多能干细胞在无饲养细胞的培养物中生长的培养基以及可用于产生这种培养基的细胞系。美国专利 6,642,048 报道了从胚胎组织获得或从胚胎干细胞分化而来的间质细胞系和成纤维样细胞系,和获得此类细胞系、处理培养基及使用这种培养基培育干细胞的方法。WO2005/014799 公开了一种用于维持哺乳动物细胞活性,促进哺乳动物细胞增殖和分化的调理过的培养基。WO 2005/014799 报道了通过鼠细胞、尤其是那些分化并永生化的转基因肝细胞(称为 MMH (Met 鼠肝细胞))的

细胞分泌活性对根据本发明制备的培养基进行调理。Xu等人 (Stem Cells 22:972-980, 2004) 公开了一种从人胚胎干细胞衍生物获得的调理过的培养基,这些人胚胎干细胞衍生物被遗传修饰过,其中过表达人端粒酶逆转录酶。美国专利申请2007/0010011公开了一种用于维持多能干细胞的化学成分确定的培养基。

[0066] 一种另选的培养系统采用补充有能促进胚胎干细胞增殖的生长因子的无血清培养基。此类培养系统的例子包括但不限于Cheon等人、Levenstein等人和美国专利申请公布2005/0148070中公开的那些。Cheon等人 (BioReprod DOI:10.1095/biolreprod.105.046870, 2005年10月19日) 公开了一种无饲养细胞的无血清培养系统,其中胚胎干细胞维持在补充有能引发胚胎干细胞自我更新的不同生长因子的未经调理的血清替代(SR)培养基中。Levenstein等人 (Stem Cells 24:568-574, 2006) 公开了使用补充有bFGF的培养基,在不存在成纤维细胞或调理过的培养基的情况下长期培养人胚胎干细胞的方法。美国专利申请公布2005/0148070公开了一种在无血清且无成纤维细胞饲养细胞的成分确定的培养基中培养人胚胎干细胞的方法,该方法包括:在含有白蛋白、氨基酸、维生素、矿物质、至少一种转铁蛋白或转铁蛋白替代品、至少一种胰岛素或胰岛素替代品的培养基中培养干细胞,该培养基基本上无哺乳动物胎血清且含有至少约100ng/ml能活化成纤维细胞生长因子信号转导受体的成纤维细胞生长因子,其中该生长因子的供给来源不只是成纤维细胞饲养层,该培养基支持干细胞在无饲养细胞或调理过的培养基的情况下以未分化状态增殖。

[0067] 培养并扩增多能干干细胞的其他合适的方法在美国专利申请公布2005/0233446、美国专利6,800,480、美国专利申请公布2005/0244962和WO 2005/065354中有公开。美国专利申请公布2005/0233446公开了一种可用于培养干细胞的成分确定的培养基,所述干细胞包括未分化的灵长类原始干细胞。在溶液中,此培养基与培养中的干细胞相比基本上是等渗的。在给定的培养物中,特定的培养基包含基础培养基和各为一定量的bFGF、胰岛素和抗坏血酸,所述一定量的bFGF、胰岛素和抗坏血酸为支持原始干细胞大体上以不分化状态生长所必需的。美国专利6,800,480报道称,发明人提供了一种以大体上不分化状态培养灵长类来源的原始干细胞的细胞培养基,这种培养基具有渗透压低且内毒素含量小的基础培养基,该基础培养基可有效支持灵长类来源的原始干细胞生长。专利6,800,480的公开内容还报道,该基础培养基混合了可有效支持灵长类来源的原始干细胞生长的营养血清,和选自饲养细胞和衍生自饲养细胞的胞外基质组分的基质。还应注意,该基础培养基还包含非必需氨基酸、抗氧化剂,和选自核苷和丙酮酸盐的第一生长因子。美国专利申请公布2005/0244962报道,其公开内容的一个方面提供了一种培养灵长类胚胎干细胞的方法;这种干细胞在基本上不含哺乳动物胎血清(优选也基本上不含任何动物血清)的培养物中,且在存在由不只是成纤维细胞饲养层的来源提供的成纤维细胞生长因子的情况下培养。

[0068] WO 2005/065354公开了一种成分确定的等渗培养基,该培养基基本上不含饲养细胞且不含血清,包含:基础培养基、bFGF、胰岛素和抗坏血酸。此外,WO 2005/086845公开了一种维持未分化的干细胞的方法,该方法包括使干细胞暴露于转化生长因子- β (TGF- β) 蛋白家族的成员、成纤维细胞生长因子 (FGF) 蛋白家族的成员、或烟酰胺 (NIC),所述成员或烟酰胺的量足以维持未分化干细胞处于未分化状态一段足以实现所需结果的时间。

[0069] 可将多能干细胞接种到合适的培养基质上。在一个实施例中,合适的培养基质是

细胞外基质组分,例如衍生自基底膜或可形成粘附分子受体-配体偶联物的一部分的那些。在一个实施例中,合适的培养基质是MATRIGEL™(Becton Dickenson)。MATRIGEL™是来自Engelbreth-Holm Swarm肿瘤细胞的可溶性制剂,其在室温下胶凝形成重构的基底膜。

[0070] 其他细胞外基质组分和组分混合物适合作为替代物。取决于所扩增的细胞类型,这些替代物可包括单独的层粘连蛋白、纤连蛋白、蛋白聚糖、巢蛋白、硫酸乙酰肝素等,或者这些物质的各种组合。

[0071] 可在存在可促进细胞存活、增殖和保持理想特性的培养基的情况下,将多能干细胞以合适的分布接种到培养基质上。所有这些特性可得益于对接种分布的认真考虑并可由本领域技术人员轻松确定。合适的培养基可由(例如)下列组分制成:由Life Technologies Corporation(Grand Island,NY)以商标Gibco™(货号11965-092)出售的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM);由Life Technologies Corporation(Grand Island,NY)以商标Gibco™(货号10829-018)出售的Knockout Dulbecco改良Eagle培养基(KO DMEM);由Life Technologies Corporation(Grand Island,NY)以商标Gibco™(货号15039-027)出售的Ham F12/50%DMEM基础培养基,含200mM L-谷氨酰胺;由Life Technologies Corporation(Grand Island,NY)以商标Gibco™(货号11140-050)出售的非必需氨基酸溶液;由Sigma-Aldrich,Company,LLC(Saint Louis,MO)出售的β-巯基乙醇(货号M7522);以及由Life Technologies Corporation(Grand Island,NY)以商标Gibco™(货号13256-029)出售的重组人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)。

[0072] 多能干细胞的分化

[0073] 当多能细胞向β细胞分化时,它们经多个阶段分化,每一阶段的特征可在于其中有无特定标志物存在。细胞分化到这些阶段是通过特定培养条件实现的,这些特定培养条件包括向培养基中添加某些生长因子,或是不向培养基中添加某些生长因子。一般来讲,这种分化可能涉及多能干细胞分化成定形内胚层细胞。这些定形内胚层细胞随后可进一步分化成肠管细胞,这些肠管细胞可继而分化成前肠内胚层细胞。前肠内胚层细胞可分化成胰腺前肠前体细胞,这些胰腺前肠前体细胞可继而分化成胰腺内胚层细胞和/或胰腺内分泌前体细胞。这些胰腺内胚层细胞和/或胰腺内分泌前体细胞随后可分化成产胰腺激素的细胞(诸如β细胞)。

[0074] 本发明提供了使用甲状腺激素(诸如T3,T3的类似物,T4,T4的类似物,或它们的组合(下文统称为“T3/T4”))和ALK5抑制剂使多能干细胞分阶段向胰腺内分泌细胞分化。本发明还提供了使用甲状腺激素(诸如T3/T4)或ALK5抑制剂使多能干细胞分阶段向胰腺内分泌细胞分化。合适的甲状腺激素类似物可包括:得自R&D Systems,Inc.的GC-1(Sobertrome),目录号4554;DITPA(3,5-二碘甲状腺丙酸);KB-141,在J.Steroid Biochem.Mol.Biol.2008,111:262-267和Proc.Natl.Acad.Sci.US 2003,100:10067-10072中述及;MB07344,在Proc.Natl.Acad.Sci.US 2007,104:15490-15495中述及;T0681,在PLoS One,2010,5e8722和J.Lipid Res.2009,50:938-944中述及;和GC-24,在PLoS One,2010e8722和Endocr.Pract.2012,18(6):954-964中述及,上述所有文献的公开内容皆全文并入本文。可用的ALK5抑制剂包括:ALK5抑制剂II(Enzo,Farmingdale,NY);ALK5i(Axxora, San Diego,CA);SD208(R&D systems(MN));TGF-β抑制剂SB431542(Xcess Biosciences(San Diego,CA));ITD-1(Xcess Biosciences(San Diego,CA));LY2109761(Xcess

Biosciences (San Diego, CA); A83-01 (Xcess Biosciences (San Diego, CA)); LY2157299 (Xcess Biosciences (San Diego, CA)); TGF- β 受体抑制剂V (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ); TGF- β 受体抑制剂I (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ); TGF- β 受体抑制剂IV (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ); TGF- β 受体抑制剂VII (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ); TGF- β 受体抑制剂VIII (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ); TGF- β 受体抑制剂II (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ); TGF- β 受体抑制剂VI (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ); TGF- β 受体抑制剂III (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ)。

[0075] 多能干细胞向表达胰腺内分泌细胞的特征性标志物的细胞分化

[0076] 多能干细胞的特征是本领域技术人员熟知的, 这些细胞的其他特征有待继续识别。表达的多能干细胞标志物包括(例如)一种或多种下列标志物: ABCG2、cripto、FOXD3、CONNEXIN43、CONNEXIN45、OCT4、SOX2、NANOG、hTERT、UTF1、ZFP42、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60和TRA-1-81。

[0077] 示例性的多能干细胞包括人胚胎干细胞系H9 (NIH代码: WA09)、人胚胎干细胞系H1 (NIH代码: WA01)、人胚胎干细胞系H7 (NIH代码: WA07) 和人胚胎干细胞系SA002 (Cellartis, Sweden)。表达下列多能细胞特征性标志物中的至少一种的细胞也是合适的, 这些标志物为: ABCG2、cripto、CD9、FOXD3、CONNEXIN43、CONNEXIN45、OCT4、SOX2、NANOG、hTERT、UTF1、ZFP42、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60和TRA-1-81。

[0078] 表达定形内胚层谱系特征性标志物中的至少一种的细胞也适用于本发明。在本发明的一个实施例中, 表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞为原条前体细胞。在另选实施例中, 表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞是中内胚层细胞。在另选实施例中, 表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞是定形内胚层细胞。

[0079] 表达胰腺内胚层谱系特征性标志物中的至少一种的细胞也适用于本发明。在本发明的一个实施例中, 表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞是胰腺内胚层细胞, 其中PDX1和NKX6.1的表达水平显著高于CDX2和SOX2的表达水平。PDX1和NKX6.1的表达水平是CDX2或SOX2表达水平的至少两倍的细胞特别有用。

[0080] 在一个实施例中, 生成了能够表达胰岛素、胰高血糖素、生长激素抑制素和胰多肽中至少一种激素的胰腺内分泌细胞。表达胰腺内分泌谱系特征性标志物中的至少一种的前体细胞适用于本发明。在本发明的一个实施例中, 表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞为胰腺内分泌细胞。在优选的实施例中, 胰腺内分泌细胞是产胰岛素的 β 细胞。

[0081] 在本发明的某些实施例中, 为了得到表达胰腺内分泌细胞的特征性标志物的细胞, 采用了将多能干细胞或可诱导多能细胞(优选多能干细胞)用作起始物的方案。该方案包括以下阶段:

[0082] 第一阶段: 用合适的生长因子处理由多能干细胞(诸如胚胎干细胞)获得的细胞培养系, 诱导其分化成表达定形内胚层细胞的特征性标志物的细胞。

[0083] 第二阶段: 用合适的生长因子处理来自第一阶段的细胞, 诱导其进一步分化成表达肠管细胞的特征性标志物的细胞。

[0084] 第三阶段: 用合适的生长因子处理来自第二阶段的细胞, 诱导其进一步分化成表达前肠内胚层细胞的特征性标志物的细胞。

[0085] 第四阶段: 用合适的生长因子(在某些实施例中包括T3/T4)处理来自第三阶段的

细胞,诱导其进一步分化成表达胰腺前肠前体细胞的特征性标志物的细胞。

[0086] 第五阶段:用合适的生长因子(在某些实施例中包括:(i) T3或T4, (ii) ALK5抑制剂,或(iii) T3与ALK 5抑制剂,或T4与ALK 5抑制剂)处理来自第四阶段的细胞,诱导其进一步分化成表达胰腺内胚层/内分泌前体细胞的特征性标志物的细胞。

[0087] 第六阶段:用合适的因子(在某些实施例中包括T3/T4,和/或ALK5抑制剂)处理来自第五阶段的细胞,诱导其进一步分化成表达胰腺内分泌细胞的特征性标志物的细胞。

[0088] 虽然在某些实施例中,本发明涵盖使多能干细胞分化成表达胰腺内分泌细胞的特征性标志物的细胞,但本发明也涵盖使来自其他中间阶段的细胞向胰腺内分泌细胞分化。具体地,本发明涵盖使表达胰腺前肠前体细胞的特征性标志物的细胞分化成表达胰腺内分泌细胞的特征性标志物的细胞。此外,虽然上文将分化过程描述为独立的阶段,但处理和经历分化过程的细胞的进程可能是循序不间断的。

[0089] 用于评估培养的或分离的细胞中蛋白质标志物和核酸标志物的表达水平的方法是本领域的标准方法。这些方法包括定量反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法、Northern印迹法、原位杂交法(参见例如,Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人编辑,2001增刊)、免疫测定法(诸如切片材料的免疫组织化学分析)、Western印迹法,和测定完整细胞中容易获得的标志物的FACS法(参见例如,Harlow和Lane,Using Antibodies:A Laboratory Manual,New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press(1998))。另外,可将处理过的细胞群暴露于能特异性识别由表达目标细胞类型特征性标志物的细胞表达的蛋白质标志物的试剂(诸如抗体),由此确定分化效率。

[0090] 还可将已分化细胞进一步纯化。例如,在用本发明方法处理多能干细胞后,可使处理过的细胞群暴露于能特异性识别由正被纯化的已分化细胞特征性表达的蛋白质标志物的试剂(诸如抗体),由此纯化已分化细胞。

[0091] 第一阶段:多能干细胞分化成表达定形内胚层细胞的特征性标志物的细胞

[0092] 可采用本领域已知的任何合适的方法或本发明提出的任何方法,使多能干细胞分化成表达定形内胚层细胞的特征性标志物的细胞。使多能干细胞分化成表达定形内胚层细胞的特征性标志物的细胞的合适方法在下列专利中公开:美国专利申请公布2007/0254359,美国专利申请公布2009/0170198,美国专利申请公布2009/0170198,美国专利申请公布2011/0091971,美国专利申请公布2010/0015711,美国专利申请公布2010/0015711,美国专利申请公布2012/0190111,美国专利申请公布2012/0190112,美国专利申请公布2012/0196365,美国专利申请公布2010/0015711,美国专利申请公布2012/0190111,美国专利申请公布2012/0190112,美国专利申请公布2012/0196365,美国专利申请公布2010/0015711,美国专利申请公布2012/0190111,美国专利申请公布2012/0190112,美国专利申请公布2012/0196365,美国临时专利申请61/076,900,美国临时专利申请61/076,908和美国临时专利申请61/076,915,以上专利全文以引用方式并入本文,因为它们涉及多能干细胞,和使多能干细胞分化为表达定形内胚层细胞的特征性标志物的细胞的方法。

[0093] 在本发明的一个实施例中,用补充有活化素A和Wnt3A的培养基处理多能干细胞,由此得到表达定形内胚层细胞的特征性标志物的细胞。上述处理可能涉及使多能干细胞与包含约50ng/ml至约150ng/ml、或者约75ng/ml至约125ng/ml、或者约100ng/ml的活化素A的培养基接触。上述处理还可能涉及使多能干细胞与约10ng/ml至约50ng/ml、或者约15ng/ml

至约30ng/ml、或者约20ng/ml的Wnt3A接触。可将多能细胞培养二到五天左右,优选二到三天左右,使其分化成表达定形内胚层细胞的特征性标志物的细胞。在一个实施例中,在活化素A和Wnt3A的存在下培养多能细胞一天,然后在活化素A的存在下(没有Wnt3A)继续培养。

[0094] 在本发明的另一个实施例中,用补充有生长分化因子8(“GDF8”)和糖原合成酶激酶-3 β (“GSK3 β ”)抑制剂(诸如在美国专利申请公布2010/0015711中公开的环苯胺-吡啶并三嗪化合物;该专利全文以引用方式并入本文)的培养基处理多能干细胞,诱导其分化成表达定形内胚层细胞的特征性标志物的细胞。优选的GSK3 β 抑制剂是14-丙-2-烯-1-基-3,5,7,14,17,23,27-七氮杂四环[19.3.1.1 \sim 2,6 \sim .1 \sim 8,12 \sim]二十七-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-壬-16-酮,本文称之为“MCX化合物”。上述处理可涉及使多能干细胞与补充有约50ng/ml至约150ng/ml、或者约75ng/ml至约125ng/ml、或者约100ng/ml的GDF8的培养基接触。上述处理还可涉及使多能干细胞与约0.1 μ M至5 μ M、或者约0.5 μ M至约2.5 μ M,优选约1 μ M的MCX化合物接触。可将多能细胞培养二到五天左右,优选三到四天左右,使其分化成定形内胚层细胞。在一个实施例中,将多能细胞在存在GDF8和MCX化合物的情况下培养一天,然后在存在GDF8和较低浓度MCX化合物的情况下培养一天,接着在存在GDF8但不存在MCX化合物的情况下培养一天。具体地,可将多能细胞在存在GDF8和约1 μ M MCX化合物的情况下培养一天,然后在存在GDF8和约0.1 μ M MCX化合物的情况下培养一天,接着在存在GDF8但不存在MCX化合物的情况下培养一天。在另选实施例中,可将细胞在存在GDF8和约1 μ M MCX化合物的情况下培养一天,然后在存在GDF8和约0.1 μ M MCX化合物的情况下培养一天。

[0095] 可通过在执行特定方案前后分别检测是否有定形内胚层细胞的特征性标志物,来确定是否生成了表达这些特征性标志物的细胞。多能干细胞通常不表达此类标志物。因此,在细胞开始表达定形内胚层细胞的特征性标志物后,就能够检测到多能细胞发生了分化。

[0096] 第二阶段:使表达定形内胚层细胞的特征性标志物的细胞分化成表达肠管细胞的特征性标志物的细胞

[0097] 可使表达定形内胚层细胞的特征性标志物的细胞进一步分化成表达肠管细胞的特征性标志物的细胞。在一个实施例中,形成表达肠管细胞的特征性标志物的细胞的方式包括:用包含成纤维细胞生长因子(“FGF”)7或FGF10的培养基培养表达定形内胚层细胞的特征性标志物的细胞,使其分化。例如,这种培养基可包含约25ng/ml至约75ng/ml、或者约30ng/ml至约60ng/ml、或者约50ng/ml的FGF7或FGF10,优选FGF7。可在这些条件下培养表达定形内胚层细胞的特征性标志物的细胞二到三天左右,优选两天左右。

[0098] 在另一个实施例中,分化得到表达肠管细胞的特征性标志物的细胞的方式包括:用包含FGF7或FGF10与抗坏血酸(维生素C)的培养基培养表达定形内胚层细胞的特征性标志物的细胞,使其分化。这种培养基可包含约0.1mM至约0.5mM的抗坏血酸,或者约0.2mM至约0.4mM、或是约0.25mM的抗坏血酸。这种培养基还可包含约10ng/ml至约35ng/ml、或者约15ng/ml至约30ng/ml、或者约25ng/ml的FGF7或FGF10,优选FGF7。举例来说,这种培养基可包含约0.25mM的抗坏血酸和约25ng/ml的FGF7。在一个实施例中,用FGF7和抗坏血酸处理表达定形内胚层细胞的特征性标志物的细胞两天。

[0099] 第三阶段:表达肠管细胞的特征性标志物的细胞分化成表达前肠内胚层细胞的特征性标志物的细胞

[0100] 表达肠管细胞的特征性标志物的细胞可进一步分化成表达前肠内胚层细胞的特

征性标志物的细胞。在一个实施例中,用以下方式使第二阶段细胞进一步分化成第三阶段细胞:将第二阶段细胞置于补充有smoothened (“SMO”)受体抑制剂(诸如环杷明或MRT10(N-[[[3-苯甲酰氨基)苯基]氨基]硫代甲酰]-3,4,5-三甲氧基苯甲酰胺))或Sonic Hedgehog (“SHH”)信号转导途径拮抗剂(诸如SMO拮抗剂1 (“SANT-1”) ((E)-4-苄基-N-(3,5-二甲基-1-苯基-1H-吡唑-4-基)亚甲基-哌嗪-1-胺)、Hedgehog途径抑制剂1 (“HPI-1”) (2-甲氧基乙基-1,4,5,6,7,8-六氢化-4-(3-羟苯基)-7-(2-甲氧基苯基)-2-甲基-5-氧代-3-喹啉羧酸酯)、视黄酸和头蛋白的培养基中培养。另选地,该培养基可补充有SMO抑制剂、SHH信号转导途径拮抗剂、视黄酸和头蛋白。可将第二阶段细胞培养二到四天左右,优选两天左右。在一个实施例中,该培养基补充有约0.1 μ M至约0.3 μ M SANT-1、约0.5 μ M至约3 μ M视黄酸,和约75ng/ml至约125ng/ml头蛋白。在另一个实施例中,该培养基补充有约0.25 μ M SANT-1、约2 μ M视黄酸和约100ng/ml头蛋白。

[0101] 在另选实施例中,用以下方式使第二阶段细胞进一步分化成第三阶段细胞:用补充有FGF7或FGF10、视黄酸、SMO抑制剂(诸如MRT10或环杷明)或SHH信号转导途径拮抗剂(诸如SANT-1或HPI-1)、蛋白激酶C (“PKC”)活化剂(诸如((2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(三氟甲基)苯基)-2,4-戊二烯酰氨基)苯并内酰胺 (“TPB”)),EMD Chemicals,Inc.(Gibbstown,NJ))、12,13-二丁酸佛波醇 (“PDBu”)、12-豆蔻酸-13-乙酸佛波醇 (“PMA”)或吡啶内酰胺V (“ILV”)、骨形态发生蛋白 (“BMP”)抑制剂(诸如LDN-193189、头蛋白或脊索发生素)和抗坏血酸的培养基处理第二阶段细胞。在另一个实施例中,该培养基可补充有FGF7或FGF10、视黄酸、SMO抑制剂、SHH信号转导途径拮抗剂(诸如SANT-1)、PKC活化剂(诸如TPB)、BMP抑制剂(诸如LDN-193189)和抗坏血酸。可在存在这些生长因子、小分子激动剂和拮抗剂的情况下培养第二阶段细胞二到三天左右。

[0102] 在一个实施例中,该培养基补充有约15ng/ml至约35ng/ml FGF7、约0.5 μ M至约2 μ M视黄酸、约0.1 μ M至约0.4 μ M SANT-1、约100nM至约300nM TPB、约50nM至约200nM LDN-193189和约0.15mM至约0.35mM抗坏血酸。在另一个实施例中,该培养基补充有约25ng/ml FGF7、约1 μ M视黄酸、约0.25 μ M SANT-1、约200nM TPB、约100nM LDN-193189和约0.25mM抗坏血酸。

[0103] 第四阶段到第六阶段:用补充有甲状腺激素T3/T4或ALK5抑制剂、或T3/T4和ALK5抑制剂两者的培养基处理表达前肠内胚层细胞的特征性标志物的细胞,使其分化成表达胰腺内胚层细胞的特征性标志物的细胞。

[0104] 本发明利用补充有甲状腺激素T3/T4或ALK5抑制剂,或T3/T4和ALK5抑制剂两者的培养基处理表达前肠内胚层细胞的特征性标志物的细胞,来使这种细胞进一步分化。在一些实施例中,本发明利用补充有(a) T3、(b) ALK5抑制剂或(c) T3和ALK5抑制剂的培养基在第四阶段到第六阶段的任一阶段中处理细胞,来使第四阶段到第六阶段的细胞进一步分化。

[0105] 在一个实施例中,本发明提供了用于从多能干细胞产生表达胰腺内分泌细胞的特征性标志物的细胞的方法,该方法包括:

[0106] a. 培养多能干细胞;

[0107] b. 使多能干细胞分化成表达前肠内胚层细胞的特征性标志物的细胞;

[0108] c. 用补充有(i) T3/T4、(ii) ALK5抑制剂或(iii) T3/T4和ALK5抑制剂两者的培养基处理表达前肠内胚层细胞的特征性标志物的细胞,使其分化成表达胰腺内分泌细胞的特征

性标志物的细胞。

[0109] 在一个实施例中,表达胰腺内分泌细胞的特征性标志物的细胞是β细胞。在另一个实施例中,所得细胞为对于NKX6.1、PDX1和HB-9呈阳性。该方法可增加NKX6.1阳性胰腺内胚层前体细胞中HB9阳性细胞的数量。该方法还可减少NKX2.2和/或SOX2的表达,以及白蛋白表达。该方法还可通过在补充有T3/T4的培养基中培养表达胰腺内胚层/内分泌细胞的特征性标志物的细胞,来提供表达胰腺内分泌细胞的特征性标志物的细胞,包括β细胞。由多能干干细胞产生表达胰腺内分泌细胞的特征性标志物的细胞的方法可采用表I至表III示出的或本文描述的培养条件。在一个实施例中,ALK 5抑制剂是SD208 (2-(5-氯-2-氟苯基)-N-4-吡啶基-4-蝶啶胺)。在另一个实施例中,还可使用ALK5抑制剂II ((2-(3-(6-甲基-2-吡啶基)-1H-吡唑-4-基)-1,5-萘啶), ALX-270-445, ENZO (Farmingdale, NY))。

[0110] 用补充有T3/T4、ALK5抑制剂或这两者的培养基处理第四阶段到第六阶段的细胞有若干优点。例如,向第四阶段到第六阶段的细胞添加甲状腺激素大幅下调了胰高血糖素、生长激素抑制素和生长激素释放肽的表达水平,且适度提高了第五阶段细胞的胰岛素表达水平。向第四阶段到第六阶段的细胞添加T3/T4还使NKX2.2的表达显著减少,同时不影响NKX6.1和PDX1的表达。此外,向第四阶段到第六阶段的细胞添加T3/T4抑制SOX2(胃标志物)和白蛋白(肝标志物)的表达,同时不影响CDX2(肠标志物)表达。另外,与未经处理的对照细胞相比,在第四阶段用T3处理过的细胞分化到第六阶段时,HB9阳性细胞数量有所增加。此外,用T3处理会导致表达HB9的NKX6.1阳性细胞数量增加。持续暴露于ALK5抑制剂和T3/T4使HB9表达水平显著提升,同时使NKX6.1持续高水平表达。培养基中包含T3/T4以剂量依赖的方式显著增加了NKX6.1阳性胰腺内胚层前体细胞中HB9阳性细胞的数量。

[0111] 因此,在某些实施例中,本发明提供了用至少补充有甲状腺激素T3/T4的培养基处理正处于第四阶段到第六阶段的已分化细胞,来下调这些细胞内的胰高血糖素、生长激素抑制素和生长激素释放肽的方法。此外,本发明还提供了用至少补充有甲状腺激素T3/T4的培养基处理正处于第四阶段到第六阶段的表达NKX6.1和PDX1的已分化细胞,来减少这些细胞内的NKX 2.2表达的方法。此外,本发明提供了在含有甲状腺激素T3/T4和ALK5抑制剂(可选)的培养基中培养表达HB9的NKX6.1阳性细胞,由此增加这种细胞的数量。在某些实施例中,该方法使用表I至表III中示出的培养条件。

[0112] 本发明的一个实施例是一种形成表达β细胞的特征性标志物的细胞的方法,该方法包括用补充有甲状腺激素T3/T4、ALK5抑制剂或这两者(诸如T3和ALK5抑制剂)的培养基处理表达前肠内胚层特征性标志物的细胞,使其分化成表达β细胞的特征性标志物的细胞。所得细胞为对于NKX6.1、PDX1和Hb-9呈阳性。可使用该方法增加NKX6.1阳性胰腺内胚层前体细胞中HB9阳性细胞的数量。还可使用该方法降低NKX2.2的表达水平。另外,可使用该方法抑制SOX2和白蛋白表达。甲状腺激素可以是T3。也可使用该方法增强HB9表达。用补充有T3和ALK5抑制剂的培养基培养细胞后,细胞中的HB9表达水平高于没有用这种培养基培养过的细胞中的HB9表达水平。此外,该方法包括将表达胰腺内胚层/内分泌前体细胞的特征性标志物的细胞置于补充有T3/T4的培养基中培养,使其形成表达β细胞的特征性标志物的细胞。该方法可采用表I至表III示出的或本文描述的培养条件。

[0113] 本发明的另一实施例是一种将表达胰腺前肠前体细胞的特征性标志物的细胞、表达胰腺内胚层/内分泌前体细胞的特征性标志物的细胞、或表达胰腺内分泌细胞的特征性

标志物的细胞置于补充有T3/T4和ALK5抑制剂的培养基中培养,由此下调该细胞内的胰高血糖素、生长激素抑制素和生长激素释放肽的方法。该培养基还可能补充有SMO抑制剂、SHH信号转导途径拮抗剂(诸如SANT-1)、视黄酸和抗坏血酸。另选地,该培养基还可补充有SMO抑制剂或SHH信号转导途径拮抗剂、视黄酸和抗坏血酸。培养基尤其是培养第四阶段细胞的培养基可优选地补充有FGF7。在某些实施例中,该方法采用表I至表III示出的或本文描述的培养条件。

[0114] 具体地,在某些实施例中,可如下表I概述的那样在第四阶段至第六阶段处理细胞(即,第四阶段和第五阶段和第六阶段,或第四阶段和第五阶段,或第五阶段和第六阶段,或第四阶段和第六阶段),下表I示出了适用于本发明方法的示例性培养条件。在某些实施例中,对某一阶段(例如,第四阶段)细胞的任一种处理可与对另一阶段(例如,第五阶段)细胞的任一种处理结合起来。

[0115] 在另选实施例中,本发明提供了一种用于使衍生自多能干细胞的细胞分化成表达胰腺内分泌 β 细胞特征标志物以及NKX6.1、PDX1和HB9的细胞的体外细胞培养物。该细胞培养物包括培养容器、分化培养基和衍生自多能干细胞的分化细胞群。该细胞培养物提供的分化细胞群中,至少有百分之十的分化细胞表达PDX1、NKX6.1和HB9。可用于该细胞培养物的培养基示于表I至表III,其优选地含有T3/T4和/或ALK5抑制剂。

表 I: 适用于本发明方法的示例性培养条件

	第四阶段	第五阶段	第六阶段
处理对象	第三阶段细胞	第四阶段细胞	第五阶段细胞
至少用这些物质处理	T3	ALK5 抑制剂+ T3	T3
	T3	ALK5 抑制剂+ T3	ALK5 抑制剂+ T3
	T3	T3	T3
其他可选成分	以下成分中的一种或多种: SANT-1 视黄酸 抗坏血酸 FGF7 BMP 受体抑制剂(例如 LDN-193189) PKC 活化剂(例如 TPB)	以下组分中的一种或多种: SANT-1 视黄酸 抗坏血酸	以下组分中的一种或多种: SANT-1 视黄酸 抗坏血酸
处理持续时间	二到四天左右, 优选三天左右	二到四天左右, 优选三天左右	二到四天左右, 优选三天左右

[0116] 虽然通常优选T3,但也可用其他甲状腺激素代替T3。具体地,可用T4,或合适的T3的类似物和T4的类似物代替T3。合适的甲状腺激素类似物可包括:得自R&D Systems, Inc.的GC-1 (Sobertiro), 目录号4554;DITPA (3,5-二碘甲状腺丙酸);KB-141,在J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2008, 111:262-267和Proc. Natl. Acad. Sci. US 2003, 100:10067-10072中述及;MB07344,在Proc. Natl. Acad. Sci. US 2007, 104:15490-15495中述及;T0681,在PLoS One, 2010, 5:e8722和J. Lipid Res. 2009, 50:938-944中述及;和GC-24,在PLoS One, 2010:e8722和Endocr. Pract. 2012, 18 (6) :954-964中述及,上述所有文献的公开内容皆全文并入本文。向不同阶段细胞施用的T3、ALK5抑制剂、SANT-1、视黄酸、抗坏血酸、FGF7、LDN-

193189和TPB的量可能不同。这些成分示例性的合适范围示于下表II中。

表 II 适用于本发明方法的培养用成分的示例性用量		
成分	示例性的合适用量	另选用量
[0118] T3	约 0nM 至约 1,000nM	约 1nM 至约 1000nM, 约 10nM 至约 900nM, 约 100nM 至约 800nM, 约 200nM 至约 700nM, 约 300nM 至约

表 II 适用于本发明方法的培养用成分的示例性用量

成分	示例性的合适用量	另选用量
		600nM, 约 400nM 至约 500nM, 约 1nM 至约 500nM, 约 1nM 至约 100nM, 约 100nM 至约 1000nM, 约 500nM 至约 1000nM, 约 100nM, 约 500nM, 或约 1 μ M
ALK5 抑制剂	约 250nM 至约 2 μ M	约 300nM 至约 2000nM, 约 400nM 至约 2000nM, 约 500nM 至约 2000nM, 约 700nM 至约 2000nM, 约 800nM 至约 2000nM, 约 1000nM 至约 2000nM, 约 1500nM 至约 2000nM, 约 250nM 至约 1000nM, 约 250nM 至约 500nM, 约 300nM 至约 1000nM, 约 400nM 至约 1000nM, 约 500nM 至约 1000nM, 约 600nM 至约 1000nM, 约 700nM 至约 1000nM, 约 800nM 至约 1000nM, 约 100nM, 约 500nM, 或约 1 μ M
SANT-1	约 0.1 μ M 至约 0.3 μ M	约 0.25 μ M
视黄酸	向第三阶段细胞的施用量: 约 100nM 至约 2000nM 向第四、第五和第六阶段细胞的施用量: 约 25nM 至约 150nM	向第三阶段细胞的施用量: 约 200nM 至约 1800nM, 约 300nM 至约 1700nM, 约 400nM 至约 1500nM, 约 500nM 至约 1500nM, 或约 500nM 至约 1000nM 向第四、第五和第六阶段细胞的施用量: 约 25nM 至约 100nM, 约 50nM 至约 150nM, 约 50nM 至约 100nM, 约 25nM, 约 50nM, 或约 100nM
抗坏血酸	约 0.1mM 至约 0.4mM	约 0.1mM 至约 0.3mM, 约 0.1mM 至约 0.25mM, 约 0.1mM 至约 0.2mM, 约 0.1mM 至约 0.15mM, 约 0.15mM 至约 0.4mM, 约 0.2mM 至约 0.4mM, 约 0.25mM 至约

[0119]

表 II 适用于本发明方法的培养用成分的示例性用量

成分	示例性的合适用量	另选用量
		0.4mM, 约 0.3mM 至约 0.4mM, 约 0.1mM, 约 0.2mM, 约 0.3mM, 约 0.4mM, 或约 0.25mM
FGF7	约 2ng/ml 至约 35ng/ml	约 2ng/ml 至约 30ng/ml, 约 5ng/ml 至约 25ng/ml, 约 10ng/ml 至约 20ng/ml, 约 2ng/ml 至约 25ng/ml, 约 2ng/ml 至约 20ng/ml, 约 2ng/ml 至约 15ng/ml, 约 2ng/ml 至约 10ng/ml, 约 2ng/ml 至约 5ng/ml, 约 5ng/ml 至约 35ng/ml, 约 10ng/ml 至约 35ng/ml, 约 15ng/ml 至约 35ng/ml, 约 20ng/ml 至约 35ng/ml, 约 25ng/ml 至约 35ng/ml, 约 30ng/ml 至约 35ng/ml, 约 2ng/ml, 约 5ng/ml, 约 10ng/ml, 约 15ng/ml, 约 20ng/ml, 约 25ng/ml, 约 30ng/ml, 或约 35ng/ml
BMP 受体抑制剂 (例如 LDN)	约 50nM 至约 150nM	约 50nM 至约 140nM, 约 50nM 至约 130nM, 约 50nM 至约 120nM, 约 50nM 至约 110nM, 约 50nM 至约 100nM, 约 50nM 至约 90nM, 约 50nM 至约 80nM, 约 60nM 至约 150nM, 约 70nM 至约 150nM, 约 80nM 至约 150nM, 约 90nM 至约 150nM, 约 100nM 至约 150nM, 约 80nM 至约 120nM, 约 90nM 至约 110nM, 约 50nM, 约 100nM, 或约 150nM。
PKC 活化剂 (例如 TPB)	约 50mM 至约 150mM	约 50nM 至约 140nM, 约 50nM 至约 130nM, 约 50nM 至约 120nM, 约 50nM 至约 110nM, 约 50nM 至约 100nM, 约 50nM 至约 90nM, 约 50nM 至约 80nM, 约 60nM 至约 150nM,

[0120]

表 II 适用于本发明方法的培养用成分的示例性用量

成分	示例性的合适用量	另选用量
[0121]		约 70nM 至约 150nM, 约 80nM 至约 150nM, 约 90nM 至约 150nM, 约 100nM 至约 150nM, 约 80nM 至约 120nM, 约 90nM 至约 110nM, 约 50nM, 约 100nM, 或约 150nM。

[0122] 在一个实施例中,本发明的方法包括用补充有SANT-1、视黄酸(“RA”)、FGF7、LDN-193189、抗坏血酸和TPB的培养基处理表达前肠内胚层细胞的特征性标志物的细胞二到四天左右,优选三天左右,使其分化成表达胰腺前肠前体细胞的特征性标志物的细胞。具体地,可用补充有约0.25 μ M SANT-1、约100nM RA、约2ng/ml FGF7、约100nM LDN-193189、约0.25mM抗坏血酸和约100nM TPB的培养基处理第三阶段细胞三天。在一个实施例中,该培养基还补充有T3,诸如约1 μ M T3。在另一个实施例中,该培养基可补充有ALK5抑制剂,诸如约1 μ M ALK5抑制剂。

[0123] 在另选实施例中,本发明的方法包括用补充有SANT-1、RA、抗坏血酸和ALK5抑制剂的培养基处理表达胰腺前肠前体细胞的特征性标志物的细胞二到三天左右,使其分化成表达胰腺内胚层/内分泌前体细胞的特征性标志物的细胞。在某些实施例中,该培养基还可补充有T3。在一个实施例中,用补充有约0.25 μ M SANT-1、约50nM RA、约0.25mM抗坏血酸和约500nM ALK5抑制剂的培养基处理第四阶段细胞,使其分化成第五阶段细胞。在另一个实施例中,用补充有约0.25 μ M SANT-1、约50nM RA、约0.25mM抗坏血酸、约1 μ M ALK5抑制剂和0-1000nM(例如100nM) T3/T4的培养基处理第四阶段细胞二到四天左右,优选三天左右,使其进一步分化成第五阶段细胞。在一个实施例中,由本发明实施例得到第四阶段细胞,再使其分化成第五阶段细胞;而在其他实施例中,可由其他方案得到第四阶段细胞,再使其进一步分化。

[0124] 在本发明的一个实施例中,用补充有SANT-1、RA、抗坏血酸和要么(1) T3/T4,要么(2) T3/T4和ALK5抑制剂的培养基处理表达胰腺内胚层/内分泌前体细胞的特征性标志物的细胞二至四天左右,优选三天左右,使其分化成表达胰腺内分泌细胞的特征性标志物的细胞。例如,可用补充有约0.25 μ M SANT-1、约50nM RA、约0.25mM抗坏血酸和约1 μ M T3/T4的培养基处理第五阶段细胞三天左右,使其分化成第六阶段细胞。另选地,可用补充有约0.25 μ M SANT-1、约50nM RA、约0.25mM抗坏血酸、约500nM ALK5抑制剂和10nM T3/T4的培养基处理第五阶段细胞三天左右,使其分化成第六阶段细胞。另选地,可用补充有约0.25 μ M SANT-1、约50nM RA、约0.25mM抗坏血酸、约1 μ M ALK5抑制剂和0-1000nM T3/T4的培养基处理第五阶段细胞三天左右,使其分化成第六阶段细胞。如有需要,可使这些第六阶段细胞在该培养基中继续生长,总培养时长十五天左右。

[0125] 在一个实施例中,由本发明实施例得到第五阶段细胞,再使其分化成第六阶段细胞;而在其他实施例中,可由其他方案得到第五阶段细胞,再使其进一步分化。

[0126] 本发明的一个方面提供了在包含T3/T4、ALK5抑制剂、或T3/T4与ALK5抑制剂的组合的培养基中处理第四阶段至第六阶段细胞,以提升这些细胞的HB9表达水平的方法。第四

阶段细胞,第五阶段细胞,第六阶段细胞分别可能是胰腺前肠前体细胞,胰腺内胚层/内分泌前体细胞,胰腺内分泌细胞。在一些实施例中,经处理细胞群表达的HB9蛋白量是未经处理培养物表达的HB9蛋白量的至少两倍。在其他实施例中,经处理培养物中的胰岛素表达水平比未经处理培养物中的胰岛素表达水平高。然而,经处理培养物中的生长激素抑制素、生长激素释放肽和胰高血糖素的表达水平比未经处理培养物中的这些物质的表达水平低。在另外的实施例中,第五阶段细胞基本上不表达CDX2和SOX2。

[0127] 在另外的实施例中,本发明涉及分化多能细胞的分步方法,包括将第四阶段至第六阶段细胞置于含有足量T3/T4、ALK5抑制剂、或T3/T4和ALK5抑制剂的组合的培养基中培养,得到对于NKX6.1、PDX1和HB9蛋白呈阳性的胰腺内胚层谱系细胞群。在其他实施例中,PDX1和NKX6.1共阳性细胞的至少5%表达HB9蛋白。在另有其他实施例中,PDX1和NKX6.1共阳性细胞的至少10%表达HB9蛋白。在另选实施例中,PDX1和NKX6.1共阳性细胞的至少20%表达HB9蛋白。在其他实施例中,PDX1和NKX6.1共阳性细胞的至少30%表达HB9蛋白。在另选实施例中,PDX1和NKX6.1共阳性细胞的至少40%表达HB9蛋白。在其他实施例中,PDX1和NKX6.1共阳性细胞的至少50%表达HB9蛋白。在另有其他实施例中,PDX1和NKX6.1共阳性细胞的至少60%表达HB9蛋白。在另选实施例中,PDX1和NKX6.1共阳性细胞的至少70%表达HB9蛋白。在其他实施例中,PDX1和NKX6.1共阳性细胞的至少80%表达HB9蛋白。在另有其他实施例中,PDX1和NKX6.1共阳性细胞的至少90%表达HB9蛋白。在另选实施例中,PDX1和NKX6.1共阳性细胞的至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%表达HB9蛋白。

[0128] 在一些实施例中,将由PDX1阳性细胞、NKX6.1阳性细胞和HB9蛋白阳性细胞组成的胰腺内胚层谱系细胞群移植到糖尿病动物体内,使其进一步体外发育成熟为功能性胰腺内分泌细胞。在另一个实施例中,本发明还涵盖通过本发明的方法生成的表达胰岛素和NKX6.1的细胞。在又一个实施例中,本发明涵盖使前体细胞诸如多能干细胞分化成表达HB9的胰腺内胚层谱系细胞的分步过程。本发明的方法包括下列步骤中的一个或多个。具体地,该方法涵盖使多能干细胞分化成表达定形内胚层细胞的特征性标志物的细胞的步骤。该步骤可能耗时三天左右。然后在适当条件下培养该步骤得到的细胞,使其分化成表达肠管细胞的特征性标志物的细胞。在一个实施例中,可将表达定形内胚层细胞的特征性标志物的细胞培养两天左右。接下来,使表达肠管细胞的特征性标志物的细胞分化成表达前肠内胚层细胞的特征性标志物的细胞。培养表达肠管细胞的特征性标志物的细胞两天左右便可完成该分化过程。在另外的实施例中,多能干细胞是人胚胎多能干细胞。

[0129] 然后,使表达前肠内胚层细胞的特征性标志物的细胞分化成表达胰腺前肠前体细胞的特征性标志物的细胞,再使表达胰腺前肠前体细胞的特征性标志物的细胞分化成表达胰腺内胚层/内分泌前体细胞的特征性标志物的细胞,最后使表达胰腺内胚层/内分泌前体细胞的特征性标志物的细胞分化成表达胰腺内分泌细胞的特征性标志物的细胞。要使细胞最终分化为表达HB9的胰腺内胚层谱系细胞,可以用活化素受体抑制剂(优选ALK5抑制剂)和/或T3/T4甲状腺激素培养表达胰腺前肠前体细胞的特征性标志物的细胞和表达胰腺内胚层/内分泌前体细胞的特征性标志物的细胞。在一个实施例中,用T3/T4培养表达胰腺前肠前体细胞的特征性标志物的细胞和表达胰腺内胚层/内分泌前体细胞的特征性标志物的细胞。在另一个实施例中,用活化素受体抑制剂培养表达胰腺前肠前体细胞的特征性标志

物的细胞和表达胰腺内胚层/内分泌前体细胞的特征性标志物的细胞。在另选实施例中，用活化素受体抑制剂和T3/T4两者培养该细胞。本发明的方法适用于可分化成表达HB9的胰腺内胚层谱系细胞的任何细胞。表III示出了适用于本发明方法的实施例的示例性培养条件。如下表III中所用，“MCX”为MXC化合物，“AA”为活化素，“ALK5inh.”为ALK5抑制剂，“RA”为视黄酸，“Vit.C”为抗坏血酸，“inh.”为抑制剂，“act.”为活化剂。在某些实施例中，对某一阶段（例如，第一阶段、第二阶段、第三阶段、第四阶段、第五阶段或第六阶段）细胞的任一种处理可与对另一阶段（例如，第一阶段、第二阶段、第三阶段、第四阶段、第五阶段或第六阶段，与前述阶段不同的任一阶段）细胞的任一种处理结合起来。

[0130] 此处留白

[0131]

	第一阶段	第二阶段	第三阶段	第四阶段	第五阶段	第六阶段
处理对象	多能干细胞	第一阶段细胞	第二阶段细胞	第三阶段细胞	第四阶段细胞	第五阶段细胞
至少用这些物质处理	AA 和 Wnt3A					
	GDF8 和 MCX					
		FGF7 和 Vit.C				
			SANT-1、RA 和头蛋白			
			FGF7、视黄酸、SANT-1、PKC act. (例如 TPB)、BMP inh. (例如 LDN-193189) 和 Vit. C			
				T3	ALK5 inh.+ T3	T3

表 III 适用于本发明方法的实施例的示例性培养条件

	第一阶段	第二阶段	第三阶段	第四阶段	第五阶段	第六阶段
				T3	ALK5 inh.+ T3	ALK5 inh.+ T3
				T3	T3	T3
其他可选成分				以下成分中的一种或多种: SANT-1 RA Vit. C FGF7 BMP 受体 Inh. (例如 LDN- 193189) PKC act. (例如 TPB)	以下成分中的一种或多种: SANT-1 RA Vit. C	以下成分中的一种或多种: SANT-1 RA Vit. C
处理持续时间	二到五天左右, 优选三到四天左右	二到三天左右, 优选两天左右	二到四天左右, 优选两天左右	二到四天左右, 优选三天左右	二到四天左右, 优选三天左右	二到四天左右, 优选三天左右

[0132]

[0133] 在一个实施例中, 本发明提供通过在包含T3的培养基中培养胰腺内胚层谱系细胞群来提高其HB9表达水平的方法。在一些实施例中, 胰腺内胚层谱系细胞群基本上不表达CDX2和SOX2。在其他实施例中, 胰腺内胚层谱系细胞群由多能细胞分步分化得到。在另外的实施例中, 多能细胞是人胚胎多能细胞。

[0134] 在一个实施例中, 本发明提供在包含ALK5抑制剂的培养基中培养胰腺内胚层谱系细胞群来提高其HB9表达水平的方法。在一些实施例中, 胰腺内胚层谱系细胞群由多能细胞分步分化得到。在一些实施例中, 多能细胞是人胚胎多能细胞。

[0135] 在优选的实施例中, 本发明涉及在包含ALK5抑制剂和T3的培养基中培养胰腺内胚层谱系细胞群来提高其HB9表达水平的方法。在一些实施例中, 胰腺内胚层谱系细胞群由多能细胞分步分化得到。在另外的实施例中, 多能细胞是人胚胎多能细胞。

[0136] 在另一个实施例中, 本发明涉及在包含足量T3、ALK5抑制剂、或T3和ALK5抑制剂的组合的培养基中处理胰腺内胚层谱系细胞群, 来提高PDX1和NKX6.1共表达细胞中的HB9表达水平的方法。

[0137] 本发明的一个实施例是由多能干细胞产生表达β细胞的特征性标志物的细胞的方法, 该方法包括如下步骤: (a) 培养多能干细胞; (b) 使多能干细胞分化成表达前肠内胚层细胞的特征性标志物的细胞; (c) 用补充有T3/T4、ALK5抑制剂、或T3/T4和ALK5抑制剂的培养基处理表达前肠内胚层细胞的特征性标志物的细胞, 使其分化成表达β细胞的特征性标志物的细胞。所得细胞为对于NKX6.1、PDX1和Hb-9呈阳性。可使用该方法以增加表达胰腺内胚层前体细胞的特征性标志物的NKX6.1阳性细胞中HB9阳性细胞的数量。还可使用该方法以降低NKX2.2的表达。此外, 该方法抑制SOX2和白蛋白表达。另外, 可使用该方法以增加表达胰岛素细胞的收率。

[0138] 在一个实施例中, 使用了T3。该方法可包括在补充有T3和ALK5抑制剂的培养基中

培养细胞。与用补充有T3和ALK5抑制剂的培养基培养的细胞相比,该方法也可增强HB9表达。该培养基还可补充有SMO抑制剂、SHH信号转导途径拮抗剂(诸如SANT-1)、视黄酸和抗坏血酸中的任意一种或任意多种(例如一种、两种、三种或全部)。在一个实施例中,该方法通过在补充有T3的培养基(该培养基还可能补充有ALK5抑制剂)中培养表达胰腺内胚层/内分泌前体细胞的特征性标志物的细胞,来提供表达β细胞的特征性标志物的细胞。

[0139] 本发明的另一个实施例是提供表达β细胞的特征性标志物的细胞的方法,其包括用补充有T3/T4、ALK5抑制剂、或T3/T4和ALK5抑制剂的培养基处理表达前肠内胚层细胞的特征性标志物的细胞,使其分化成表达β细胞的特征性标志物的细胞。在某些实施例中,该培养基还补充有BMP受体抑制剂和PKC活化剂。所得细胞优选地为对于NKX6.1、PDX1和Hb-9呈阳性。可使用该方法增加NKX6.1阳性胰腺内胚层前体细胞中HB9阳性细胞的数量、降低NKX2.2的表达水平并/或抑制SOX2和白蛋白表达。在优选的实施例中,使用了T3。该方法还可包括在补充有T3和ALK5抑制剂的培养基中培养细胞。与用补充有T3和ALK5抑制剂的培养基培养的细胞相比,该方法也可增强HB9表达。此外,该方法可包括在补充有T3和ALK5抑制剂(可选)的培养基中培养表达胰腺内胚层/内分泌前体细胞的特征性标志物的细胞,来形成表达β细胞的特征性标志物的细胞。

[0140] 本发明的另一个实施例是增强HB9表达并抑制SOX2和白蛋白表达的方法,其通过在补充有T3/T4和ALK5抑制剂的培养基中培养表达胰腺前肠前体细胞的特征性标志物的细胞。本发明的另选实施例是下调下列细胞中的胰高血糖素、生长激素抑制素和生长激素释放肽的方法:表达胰腺前肠前体细胞的特征性标志物的细胞、表达胰腺内胚层/内分泌前体细胞的特征性标志物的细胞或表达内分泌细胞的特征性标志物的细胞,该方法包括在补充有T3/T4和ALK5抑制剂的培养基中培养该细胞。该培养基还可能补充有SMO抑制剂、SHH信号转导途径拮抗剂(诸如SANT-1)、视黄酸和抗坏血酸中的一种或多种。在一个实施例中,该细胞是第四阶段细胞,培养基还补充有FGF7。

[0141] 本发明还提供了通过本发明的方法可以获得的细胞或细胞群。本发明还提供了通过本发明的方法获得的细胞或细胞群。

[0142] 本发明提供了治疗方法。具体地,本发明提供了治疗患有糖尿病、或面临发展为糖尿病的风险的病患的方法。

[0143] 本发明还提供了通过本发明方法可以获得的或通过本发明方法获得的用于治疗方法的细胞或细胞群。具体地,本发明提供了通过本发明方法可以获得的或通过本发明方法获得的,用于治疗患有糖尿病、或面临发展为糖尿病的风险的病患的方法的细胞或细胞群。

[0144] 糖尿病可为1型糖尿病或2型糖尿病。

[0145] 在一个实施例中,该治疗方法包括把通过本发明方法可以获得的或通过本发明方法获得的细胞植入病患体内。

[0146] 在一个实施例中,该治疗方法包括:例如像本文所述那样,使多能干细胞在体外分化成第一阶段细胞、第二阶段细胞、第三阶段细胞、第四阶段细胞、第五阶段细胞或第六阶段细胞,随后把已分化细胞植入病患体内。

[0147] 在一个实施例中,该方法还在使多能干细胞分化的步骤之前,包括例如像本文所述那样培养多能干细胞的步骤。

[0148] 在一个实施例中,该方法还在植入步骤之后,包括细胞在体内分化的步骤。

[0149] 在一个实施例中,病患是哺乳动物,优选是人。

[0150] 在一个实施例中,可将已分化细胞分散植入,也可先使这些细胞形成细胞团,再把细胞团推注到肝门静脉中。另选地,可把已分化细胞引入可降解的生物相容性高分子载体中、不可降解的多孔装置中,也可将已分化细胞包封起来,使其免受宿主免疫应答破坏。可把细胞植入受体体内的适当部位。植入部位包括(例如)肝脏、原有的胰腺、肾包膜下空间、网膜、腹膜、浆膜下空间、肠、胃或皮下袋囊。

[0151] 为了促进植入细胞在体内进一步分化,并保证其体内存活率或活性维持在一定水平,可在植入细胞前、植入细胞的同时或在植入细胞后向受体施用额外的因子,例如生长因子、抗氧化剂或抗炎剂。这些因子可由内源性细胞分泌,并原位接触植入的细胞。可通过本领域已知的内源施用生长因子和外源施用生长因子的任意组合诱导植入细胞分化。

[0152] 移植细胞量取决于多种因素(包括病患的身体状况和对该疗法的响应度),并可由本领域技术人员确定。

[0153] 在一个实施例中,该治疗方法还包括移植之前将细胞结合到三维载体中。这些细胞在被移植到病患体内前,在体外时可一直停留在该载体上。另选地,无需另外的体外培养,包含这些细胞的载体能够直接植入病患体内。可任选地将至少一种有利于移植细胞存活并发挥功能的药剂掺入该载体。

[0154] 据此将整篇文档中引用的出版物全文以引用方式并入本文。以下实例进一步阐释本发明,但不限制本发明的范围。

[0155] 实例

[0156] 实例1

[0157] 此前公布生成胰腺内胚层细胞群的方案,该胰腺内胚层细胞群衍生自基本上不表达HB9蛋白的人多能细胞

[0158] 本实例涉及按本实例所述的步骤识别由多能干细胞衍生的细胞中的HB9表达模式。将人胚胎干细胞系H1的细胞(第40代)以单细胞的形式和 1×10^5 个细胞/ cm^2 的密度,接种到装于涂有MATRIGEL™(1:30稀释;BD Biosciences,NJ)的培养皿内并补充有 $10 \mu\text{M}$ Y27632(Rock抑制剂,目录号Y0503,Sigma-Aldrich(St.Louis,MO))的MTESR®1培养基(StemCell Technologies(Vancouver,Canada))中。接种后四十八小时,用不完全PBS(不含Mg和Ca的磷酸盐缓冲盐水溶液)洗涤培养物。随后按照先前在Diabetes,61,2016,2012中所述的方法,使培养物分化为胰腺内胚层/内分泌前体细胞。所用的分化方案如下:

[0159] a. 仅在第一天将接种在涂覆有1:30MATRIGEL™表面上的未分化H1细胞的汇合贴壁培养物的60-70%暴露于补充有0.2%胎牛血清(FBS)(Hyclone,Utah)、 100ng/ml 活化素-A(AA;Pepro-tech(RockyHill,NJ))和 20ng/ml Wnt3A(R&D Systems)的RPMI 1640培养基(Invitrogen)。接下来的两天,在补充有0.5%FBS和 100ng/ml AA的RPMI培养基中培养细胞。

[0160] b. 将(a)中获得的细胞暴露于补充有2%FBS和 50ng/ml FGF7(Pepro-tech)的DMEM-F12培养基(Invitrogen)中三天。

[0161] c. 在补充有 $0.25 \mu\text{M}$ SANT-1(Sigma-Aldrich(St.Louis,MO))、 $2 \mu\text{M}$ 视黄酸(Sigma-Aldrich)、 100ng/ml 头蛋白(R&D Systems)和以商标B27®出售的1%(v/v)补充剂(目录号

17504044, Life Technologies Corporation (Grand Island, NY)) 的 DMEM-HG 培养基 (Invitrogen) 中继续培养 (b) 中获得的培养物四天。

[0162] d. 在补充有 $1\mu\text{M}$ ALK5 抑制剂 (ALK5i; Farmingdale, NY)、 100ng/mL 头蛋白、 50nM TPB ((2S, 5S) - (E, E) - 8 - (5 - (4 - (三氟甲基) 苯基) - 2, 4 - 戊二烯酰氨基) 苯并内酰胺; EMD Chemicals Inc. (Gibbstown NJ)) 和 1% B27 的单层形式的 DMEM-HG 培养基中培养 (c) 中获得的细胞三天。在培养的最后一天, 用 5mg/mL 分散酶处理细胞 5 分钟, 接着温和地吹打混匀细胞并使细胞分散成细胞团 (<100 微米)。向 125mL 容量的一次性聚苯乙烯转瓶 (Corning) 中加入补充有 $1\mu\text{M}$ ALK5 抑制剂、 100ng/mL 头蛋白和 1% B27 的 DMEM-HG, 再将该细胞团转移到该转瓶中, 以 80 至 100rpm 的速度旋转形成悬浮液, 再旋转培养过夜。

[0163] 在 (d) 结束时, 采集胰腺内胚层/内分泌相关基因的 mRNA 进行 PCR 分析。根据制造商说明书, 用 RNeasy[®] 微型试剂盒 (Qiagen (Valencia, CA)) 提取总 RNA, 接着用高容量 cDNA 逆转录试剂盒 (Applied Biosystems (Foster City, CA)) 逆转录。使用预上样于定制 Taqman[®] 阵列 (Applied Biosystems) 上的 Taqman[®] 通用预混液和 Taqman[®] 基因表达试剂盒扩增 cDNA。利用序列检测软件 (Applied Biosystems) 分析数据, 再使用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 方法 (即, 用内对照校正 qPCR 结果 ($\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{试验样品}} - \Delta\text{Ct}_{\text{基因样品}}$)) 将数据归一化为未分化的人胚胎干细胞 (hES)。所有引物均购自 Applied Biosystems。按照先前所述完成 FACS 和免疫荧光分析 (Diabetes, 61, 20126, 2012)。HB9 抗体得自 Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, Iowa)。实例中所使用的 Y27632 ((1R, 4r) - 4 - ((R) - 1 - 氨基乙基) - N - (吡啶-4-基) 环己甲酰胺) 是具有细胞渗透性的小分子 Rho 相关激酶 (ROCK) 抑制剂。

[0164] 图 1A 至图 1C 绘出按实例 1 概述的步骤分化为胰腺内胚层/内分泌前体细胞的人胚胎干细胞系 H1 的细胞中以下基因表达的实时 PCR 分析数据, 这些基因分别是: PDX1 (图 1A), NKX6.1 (图 1B), HB9 (图 1C)。如图 1 所示, 在这些培养物中检测到 PDX1、NKX6.1 和 HB9 的 mRNA 表达稳定。此外, 相比于人类尸体胰岛, 这些细胞中的 HB9 的 mRNA 表达水平相等或更高。然而, 如图 2 所示, 虽然由 FACS 分析测得的 PDX1 和 NKX6.1 的基因表达数据与对应蛋白的高水平表达相一致, 但 HB9 的 mRNA 表达与 HB9 的蛋白表达却有所不同。在 (d) 完成后第二天, 即第 5 天, 大约 1% 的细胞为 HB9 阳性, 大约 50% 的细胞对于 NKX6.1 呈阳性, 大约 90% 的细胞为 PDX1 阳性。对细胞团行免疫染色的结果也证实 FACS 数据准确无误。如图 3A 至图 3B 所示, 细胞团中存在大量的 NKX6.1 阳性细胞和极少数胰岛素阳性细胞。然而, 并没有通过免疫染色检测到 HB9 阳性细胞 (图 3B)。

[0165] 实例 2

[0166] 在第四阶段至第六阶段添加 T3 增加了 HB9 阳性细胞的数量

[0167] 该实例涉及在第四阶段至第六阶段添加 T3, 以便显著增加 HB9 阳性细胞的数量。

[0168] 将人胚胎干细胞系 H1 的细胞 (第 40 代) 以单细胞的形式和 1×10^5 个细胞/ cm^2 的密度, 接种到装于涂有 MATRIGEL[™] (1:30 稀释; BD Biosciences, NJ) 的培养皿内并补充有 $10\mu\text{M}$ Y27632 的 mTeSR[®] 1 培养基中。接种后四十八小时, 用不完全 PBS (不含 Mg 和 Ca 的磷酸盐缓冲盐水溶液) 洗涤培养物。然后按照下文概述的方案使培养物分化成表达胰腺内胚层/内分泌前体细胞的特征性标志物的细胞。

[0169] a. 第一阶段 (三天): 在 MCDB-131 培养基 (Invitrogen 目录号 10372-019) 中培养干

细胞一天,该MCDB-131培养基补充有2%无脂肪酸BSA (Proliant目录号68700)、0.0012g/ml 碳酸氢钠(Sigma-Aldrich目录号S3187)、1X GlutaMax™(Invitrogen目录号35050-079)、4.5mM D-葡萄糖(Sigma-Aldrich目录号G8769)、100ng/ml GDF8(R&D Systems)和1μM MCX化合物。将MCDB-131培养基中再培养细胞一天,该MCDB-131培养基补充有2%无脂肪酸BSA、0.0012g/ml碳酸氢钠、1X GlutaMax™、4.5mM D-葡萄糖、100ng/ml GDF8和0.1μM MCX化合物。在MCDB-131培养基中再培养细胞一天,该MCDB-131培养基补充有2%无脂肪酸BSA、0.0012g/ml碳酸氢钠、1X GlutaMax™、4.5mM D-葡萄糖和100ng/ml GDF8。

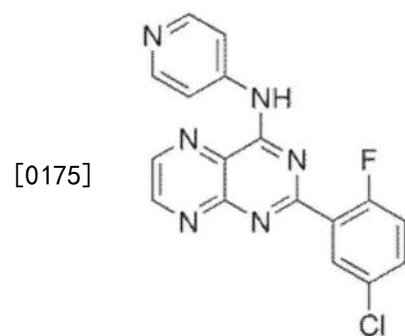
[0170] b. 第二阶段(两天):随后用MCDB-131培养基处理第一阶段细胞两天,该MCDB-131培养基补充有2%无脂肪酸BSA、0.0012g/ml碳酸氢钠、1X GlutaMax™、4.5mM D-葡萄糖、0.25mM抗坏血酸(Sigma,MO)和25ng/ml FGF7(R&D Systems,MN)。

[0171] c. 第三阶段(两天):随后用MCDB-131培养基处理第二阶段细胞两天,该MCDB-131培养基补充有1:200稀释的ITS-X(Gibco®胰岛素-转铁蛋白-硒-乙醇胺;Invitrogen,Ca)、4.5mM葡萄糖、1X GlutaMax™、0.0017g/ml碳酸氢钠、2%无脂肪酸BSA、0.25μM SANT-1(Sigma,MO)、1μM RA(Sigma,MO)、25ng/ml FGF7、0.25mM抗坏血酸、200nM TPB(PKC活化剂;目录号565740;EMD Chemicals(Gibbstown,NJ))和100nM LDN(BMP受体抑制剂;目录号04-0019;Stemgent)。

[0172] d. 第四阶段(三天):随后用MCDB-131培养基处理第三阶段细胞三天,该MCDB-131培养基补充有1:200稀释的ITS-X、4.5mM葡萄糖、1X GlutaMax™、0.0017g/ml碳酸氢钠、2%无脂肪酸BSA、0.25μM SANT-1、100nM RA、2ng/ml FGF7、100nM LDN-193189、0.25mM抗坏血酸和100nM TPB。

[0173] e. 第五阶段(三天):随后用MCDB-131培养基处理第四阶段细胞三天,该MCDB-131培养基补充有1:200稀释的ITS-X、4.5mM葡萄糖、1X GlutaMax™、0.0015g/ml碳酸氢钠、2%无脂肪酸BSA、0.25μM SANT-1、50nM RA、0.25mM抗坏血酸和500nM ALK5抑制剂SD208。SD208是具有结构式I的2-(5-氯-2-氟苯基)-N-4-吡啶基-4-蝶啶胺,目前已公开于Molecular Pharmacology 2007,72:152-161中。这种物质是一种2,4-二取代蝶啶,同时也是TGF-βR I激酶的ATP竞争性抑制剂。

[0174] (I)



[0176] f. 第六阶段(三至十五天):随后用MCDB-131培养基处理第五阶段细胞三天,该MCDB-131培养基补充有1:200稀释的ITS-X、4.5mM葡萄糖、1X GlutaMax™、0.0015g/mL碳酸氢钠、2%无脂肪酸BSA、0.25μM SANT-1、50nM RA和0.25mM抗坏血酸。

[0177] 在一些培养物中,向第四阶段至第六阶段细胞添加了1μM T3(T6397,Sigma,MO)。

第四阶段末至第六阶段,通过FACS和免疫染色分析对照和经处理的培养物。另外,需在第二阶段至第六阶段收集对照培养物和经处理培养物的mRNA。

[0178] 图4绘出第四阶段(图4A)、第五阶段(图4B)和第六阶段(图4C)的PDX1、NKX6.1和HB9的FACS数据。这些数据与实例1的数据一致,虽然在第四阶段至第六阶段存在大量的PDX1和NKX6.1阳性细胞,但HB9的表达却很低。HB9的表达在第五阶段达到峰值并在第六阶段减少。总的来说,相比于使用实例1中所述的方案产生的细胞,使用实例2中所述的方案产生的细胞的HB9表达更高。图5A为实例2的第二阶段至第六阶段,HB9mRNA表达水平与人类胰岛中HB9mRNA表达水平的对比图。其结果与实例1类似,虽然在第三阶段至第四阶段HB9的mRNA表达水平与人类胰岛相当,但在第四阶段HB9蛋白表达非常低(图5B)。

[0179] 图6A至图6J绘出按实例2概述的步骤分化到第四阶段,接着只在第四阶段、或在第四阶段到第五阶段、或在第四阶段到第六阶段接受处理的人胚胎干细胞系H1的细胞中以下基因表达的实时PCR分析数据: NKX6.1(图6A), PDX1(图6B), NKX2.2(图6C), 胰高血糖素基因(图6D), 胰岛素基因(图6E), 生长激素抑制素基因(图6F), CDX2(图6G), 白蛋白基因(图6H), 胃泌素基因(图6I), SOX2(图6J)。在第四阶段至第六阶段添加T3显著降低胰高血糖素、生长激素抑制素和生长激素释放肽的表达水平,且适度提高了第五阶段的胰岛素表达水平。在第四阶段至第六阶段添加T3导致NKX2.2的表达显著减少,但对NKX6.1和PDX1的表达没有明显影响。另外,添加T3抑制SOX2(胃标志物)和白蛋白(肝标志物)的表达,但不影响CDX2(肠标志物)的表达。对第六阶段的对照培养物和经处理培养物行免疫染色的结果显示:与第六阶段的对照组(图7A)相比,T3处理组(图7B)中的HB9阳性细胞的数量显著增加。另外, NKX6.1阳性细胞数量的增加表明T3处理的培养物中有HB9表达。

[0180] 实例3

[0181] 在第六阶段用T3和ALK5抑制剂进行组合处理可提升HB9表达

[0182] 该实例证明,在第六阶段,培养基中的ALK5抑制剂和T3的组合会显著提高HB9的表达。

[0183] 将人胚胎干细胞系H1的细胞(第40代)以单细胞的形式和 1×10^5 个细胞/cm²的密度,接种到装于涂有MATRIGEL™(1:30稀释;BD Biosciences,NJ)的培养皿内并补充有10μM Y27632的mTeSR®1培养基中。接种后四十八小时,用不完全PBS(不含Mg和Ca的磷酸盐缓冲盐水溶液)洗涤培养物。然后按照下文概述的方案使培养物分化为胰腺内胚层/内分泌谱系。

[0184] a. 第一阶段(三天):在MCDB-131培养基(Invitrogen目录号10372-019)中培养细胞一天,该MCDB-131培养基补充有2%无脂肪酸BSA(Proliant目录号68700)、0.0012g/ml碳酸氢钠(Sigma-Aldrich目录号S3187)、1X GlutaMax™(Invitrogen目录号35050-079)、4.5mM D-葡萄糖(Sigma-Aldrich目录号G8769)、100ng/ml GDF8(R&D Systems)和1μM MCX化合物。将MCDB-131培养基中再培养细胞一天,该MCDB-131培养基补充有2%无脂肪酸BSA、0.0012g/ml碳酸氢钠、1X GlutaMax™、4.5mM D-葡萄糖、100ng/ml GDF8和0.1μM MCX化合物。在MCDB-131培养基中再培养细胞一天,该MCDB-131培养基补充有2%无脂肪酸BSA、0.0012g/ml碳酸氢钠、1X GlutaMax™、4.5mM D-葡萄糖和100ng/ml GDF8。

[0185] b. 第二阶段(两天):用MCDB-131培养基处理第一阶段细胞两天,该MCDB-131培养基补充有2%无脂肪酸BSA、0.0012g/ml碳酸氢钠、1X GlutaMax™、4.5mM D-葡萄糖、0.25mM

抗坏血酸(Sigma,MO)和25ng/ml FGF7(R&D Systems,MN)。

[0186] c. 第三阶段(两天):用MCDB-131培养基处理第二阶段细胞两天,该MCDB-131培养基补充有1:200稀释的ITS-X(Invitrogen,Ca)、4.5mM葡萄糖、1X GlutaMax™、0.0017g/ml碳酸氢钠、2%无脂肪酸BSA、0.25μM SANT-1(Sigma,MO)、1μM RA(Sigma,MO)、25ng/ml FGF7、0.25mM抗坏血酸、200nM TPB(PKC活化剂;目录号565740;EMD Chemicals(Gibbstown,NJ))和100nM LDN(BMP受体抑制剂;目录号04-0019;Stemgent)。

[0187] d. 第四阶段(三天):用MCDB-131培养基处理第三阶段细胞三天,该MCDB-131培养基补充有1:200稀释的ITS-X、4.5mM葡萄糖、1X GlutaMax™、0.0017g/ml碳酸氢钠、2%无脂肪酸BSA、0.25μM SANT-1、100nM RA、2ng/ml FGF7、100nM LDN-193189、0.25mM抗坏血酸、100nM TPB和1μM T3。

[0188] e. 第五阶段(三天):用MCDB-131培养基处理第四阶段细胞三天,该MCDB-131培养基补充有1:200稀释的ITS-X、4.5mM葡萄糖、1X GlutaMax™、0.0015g/mL碳酸氢钠、2%无脂肪酸BSA、0.25μM SANT-1、50nM RA、0.25mM抗坏血酸、1μM ALK5抑制剂SD208和100nM T3。

[0189] f. 第六阶段(三至十五天):用MCDB-131培养基处理第五阶段细胞三天,该MCDB-131培养基补充有1:200稀释的ITS-X、4.5mM葡萄糖、1X GlutaMax™、0.0015g/mL碳酸氢钠、2%无脂肪酸BSA、0.25μM SANT-1、500nM ALK5抑制剂、50nM RA、0.25mM抗坏血酸和10nM T3。

[0190] 图8A和图8B绘出在第六阶段第七天对NKX6.1和HB9行免疫染色得到的结果。图8C绘出按实例3概述的步骤分化到第六阶段的人胚胎干细胞系H1的细胞中HB9基因表达的实时PCR分析数据。HB9的mRNA表达以及免疫染色图像显示,长期暴露于ALK5抑制剂和T3会造成HB9的表达显著增加,但NKX6.1的表达则保持稳定。图9A和图9B分别绘出第六阶段的第五天和第十五天的FACS数据。在第六阶段第十五天的培养物中,相当一部分第六阶段细胞都表现出HB9的表达。

[0191] 实例4

[0192] T3以剂量依赖的方式增强HB9的表达

[0193] 该实例显示在第六阶段,T3以剂量依赖的方式增强HB9的表达,同时NKX6.1的表达保持不变。将人胚胎干细胞系H1的细胞(第40代)以单细胞的形式和 1×10^5 个细胞/cm²的密度,接种到装于涂有MATRIGEL™(1:30稀释;BD Biosciences,NJ)的培养皿内并补充有10μM Y27632的mTeSR® 1培养基中。接种后四十八小时,用不完全PBS(不含Mg和Ca的磷酸盐缓冲盐水溶液)洗涤培养物。然后按照下文概述的方案使培养物分化成表达胰腺内胚层/内分泌前体细胞的特征性标志物的细胞。

[0194] a. 第一阶段(三天):在MCDB-131培养基(Invitrogen目录号10372-019)中培养细胞一天,该MCDB-131培养基补充有2%无脂肪酸BSA(Proliant目录号68700)、0.0012g/ml碳酸氢钠(Sigma-Aldrich目录号S3187)、1X GlutaMax™(Invitrogen目录号35050-079)、4.5mM D-葡萄糖(Sigma-Aldrich目录号G8769)、100ng/ml GDF8(R&D Systems)和1μM MCX化合物。将MCDB-131培养基中再培养细胞一天,该MCDB-131培养基补充有2%无脂肪酸BSA、0.0012g/ml碳酸氢钠、1X GlutaMax™、4.5mM D-葡萄糖、100ng/ml GDF8和0.1μM MCX化合物。在MCDB-131培养基中再培养细胞一天,该MCDB-131培养基补充有2%无脂肪酸BSA、0.0012g/ml碳酸氢钠、1X GlutaMax™、4.5mM D-葡萄糖和100ng/ml GDF8。

[0195] b. 第二阶段(两天):随后用MCDB-131培养基处理第一阶段细胞两天,该MCDB-131培养基补充有2%无脂肪酸BSA、0.0012g/ml碳酸氢钠、1X GlutaMax™、4.5mM D--葡萄糖、0.25mM抗坏血酸(Sigma,MO)和25ng/ml FGF7(R&D Systems,MN)。

[0196] c. 第三阶段(两天):随后用MCDB-131培养基处理第二阶段细胞两天,该MCDB-131培养基补充有1:200稀释的ITS-X(Invitrogen,Ca)、4.5mM葡萄糖、1X GlutaMax™、0.0017g/ml碳酸氢钠、2%无脂肪酸BSA、0.25μM SANT-1(Sigma,MO)、1μM RA(Sigma,MO)、25ng/ml FGF7、0.25mM抗坏血酸、200nM TPB(PKC活化剂;目录号565740;EMD Chemicals(Gibbstown,NJ)),和100nM LDN(BMP受体抑制剂;目录号04-0019;Stemgent)。

[0197] d. 第四阶段(三天):随后用MCDB-131培养基处理第三阶段细胞三天,该MCDB-131培养基补充有1:200稀释的ITS-X、4.5mM葡萄糖、1X GlutaMax™、0.0017g/ml碳酸氢钠、2%无脂肪酸BSA、0.25μM SANT-1、100nM RA、2ng/ml FGF7、100nM LDN-193189、0.25mM抗坏血酸和100nM TPB。

[0198] e. 第五阶段(三天):随后用MCDB-131培养基处理第四阶段细胞三天,该MCDB-131培养基补充有1:200稀释的ITS-X、4.5mM葡萄糖、1X GlutaMax™、0.0015g/mL碳酸氢钠、2%无脂肪酸BSA、0.25μM SANT-1、50nM RA、0.25mM抗坏血酸、1μM ALK5抑制剂SD208和0-1000nM T3。

[0199] f. 第六阶段(六天):随后用MCDB-131培养基处理第五阶段细胞六天,该MCDB-131培养基补充有1:200稀释的ITS-X、4.5mM葡萄糖、1X GlutaMax™、0.0015g/mL碳酸氢钠、2%无脂肪酸BSA、0.25μM SANT-1、500nM ALK5抑制剂、50nM RA、0.25mM抗坏血酸和0-1000nM T3。

[0200] 图10A至图10E绘出在第六阶段第六天对NKX6.1和HB9行免疫染色得到的结果。T3以剂量依赖的方式显著增加NKX6.1阳性胰腺内胚层前体细胞中HB9阳性细胞的数量。图11A至图11L绘出按实例4概述的步骤分化到第六阶段的人胚胎干细胞系H1的细胞中以下基因表达的实时PCR分析数据:SOX2(图11A),NKX6.1(图11B),NKX2.2(图11C),胃泌素基因(图11D),PDX1(图11E),NGN3(图11F),PAX6(图11G),PAX4(图11H),胰岛素基因(图11I),胰高血糖素基因(图11J),生长激素释放肽基因(图11K),生长激素抑制素基因(图11L)。

[0201] 尽管本发明已结合各种具体材料、操作步骤和实例进行了描述和举例说明,然而应当理解,本发明并不限于出于描述和举例说明目的选择的材料和操作步骤的特定组合。本领域的技术人员应当理解,本发明可能暗示此类细节的多种变型。认为说明书和实例的作用仅在于示例,本发明的真实范围和实质仅由随附权利要求书限定。本申请中提到的所有参考文献、专利和专利申请全文以引用方式并入本文。

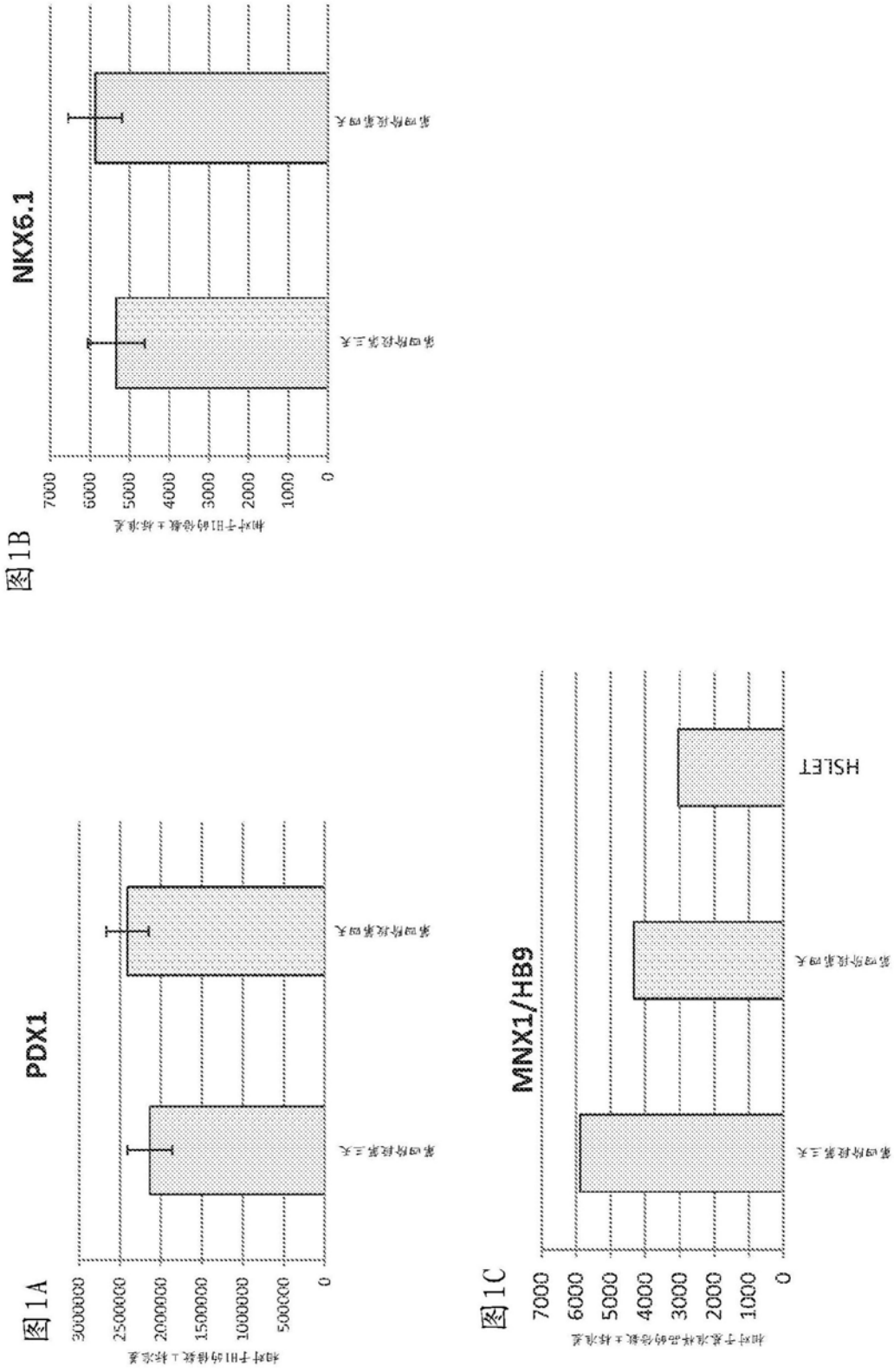


图1

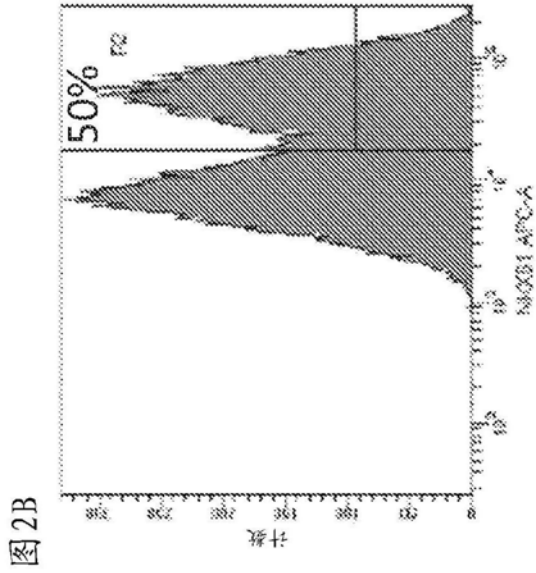


图 2B

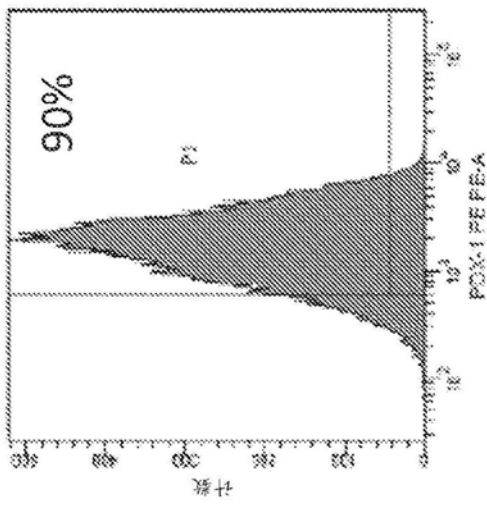


图 2A

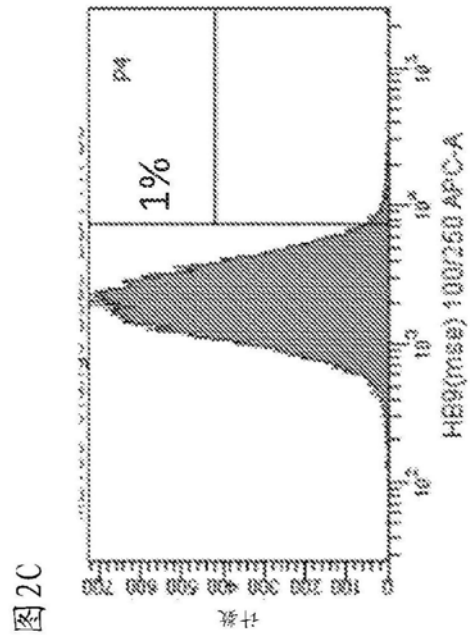


图 2C

图 2

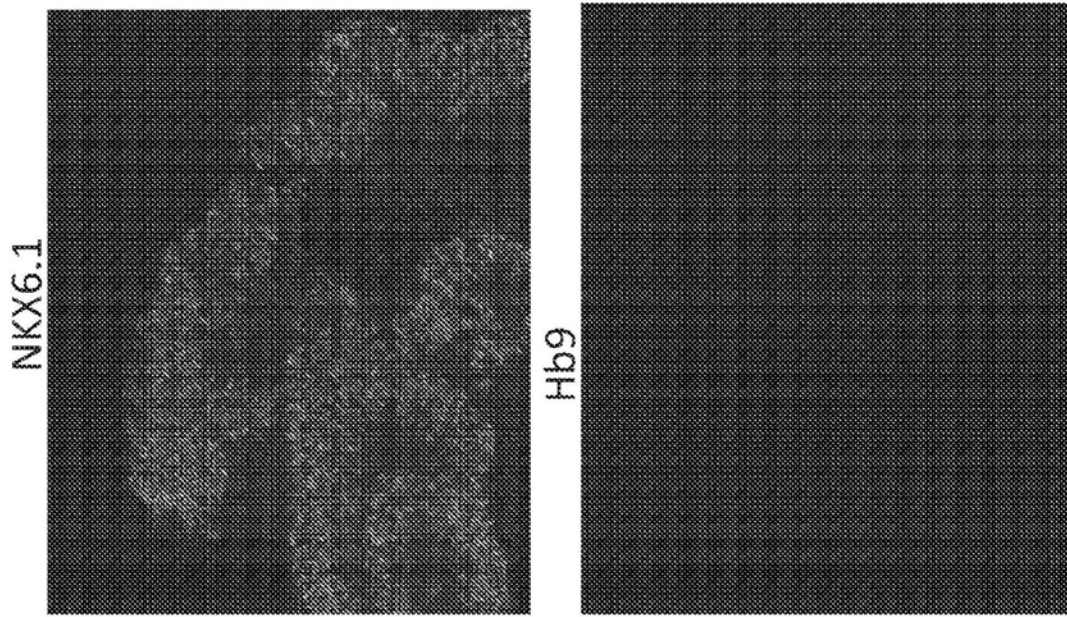
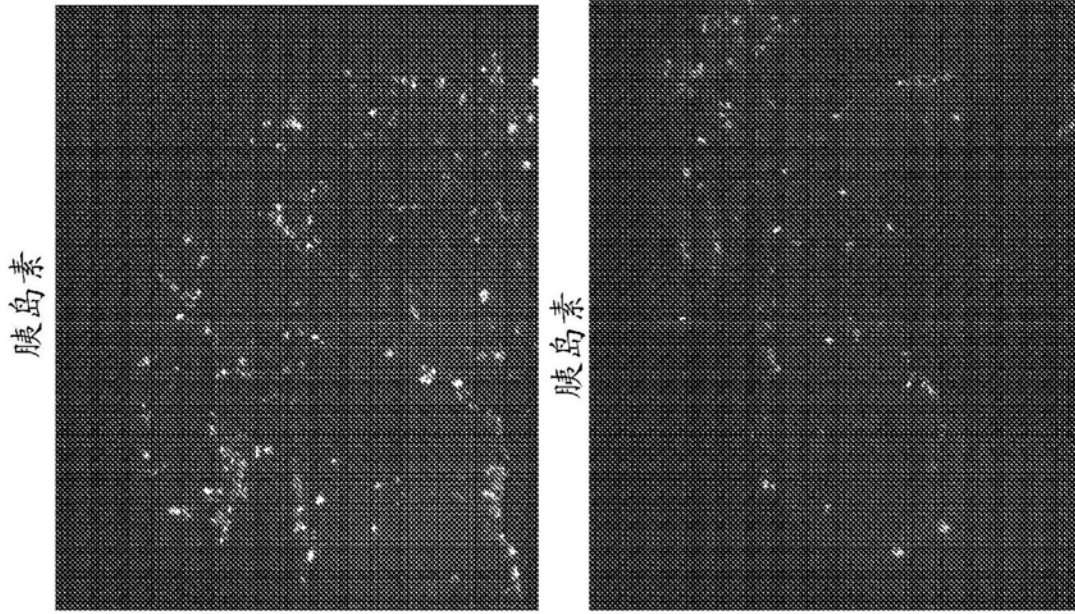


图 3A

图 3B

图 3

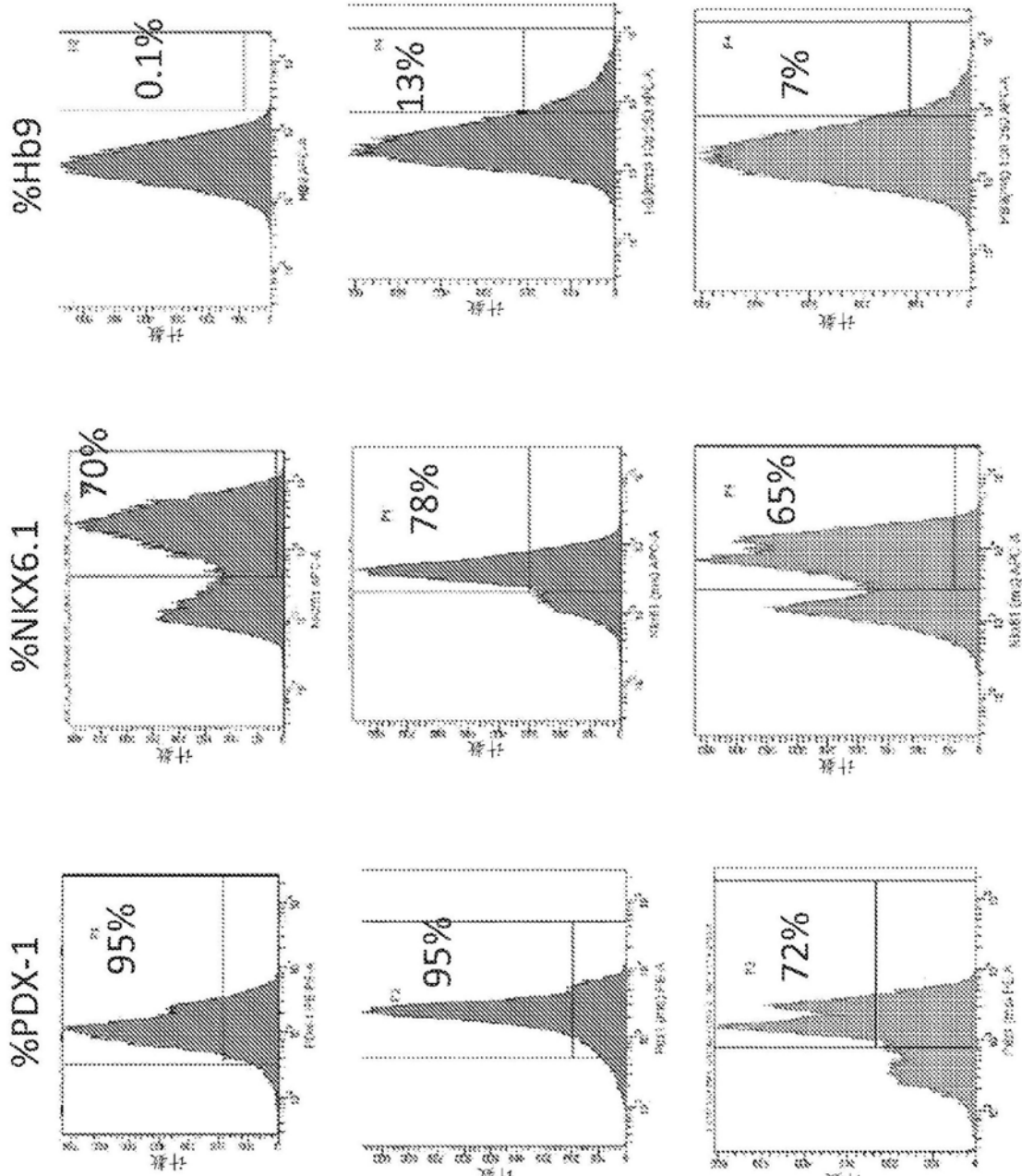


图4A

第四阶段三天

图4B

第五阶段三天

图4C

第六阶段三天

图4

图 5A

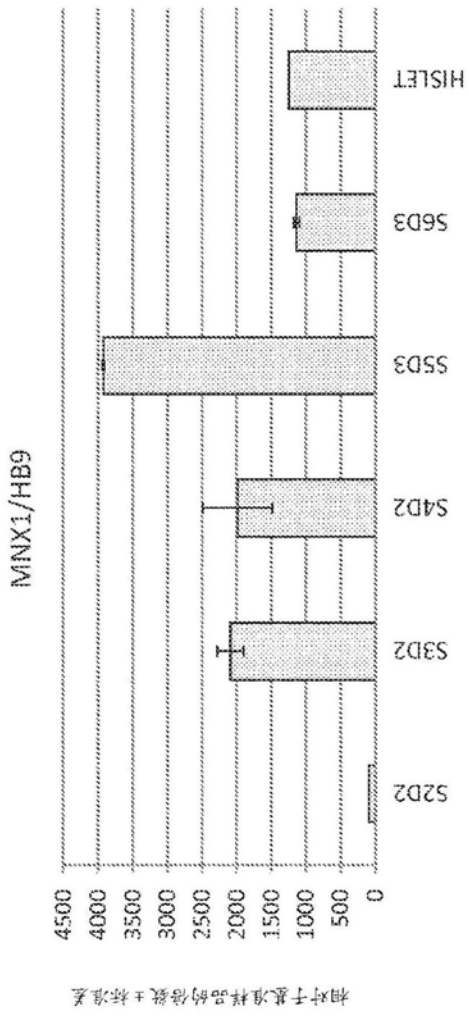
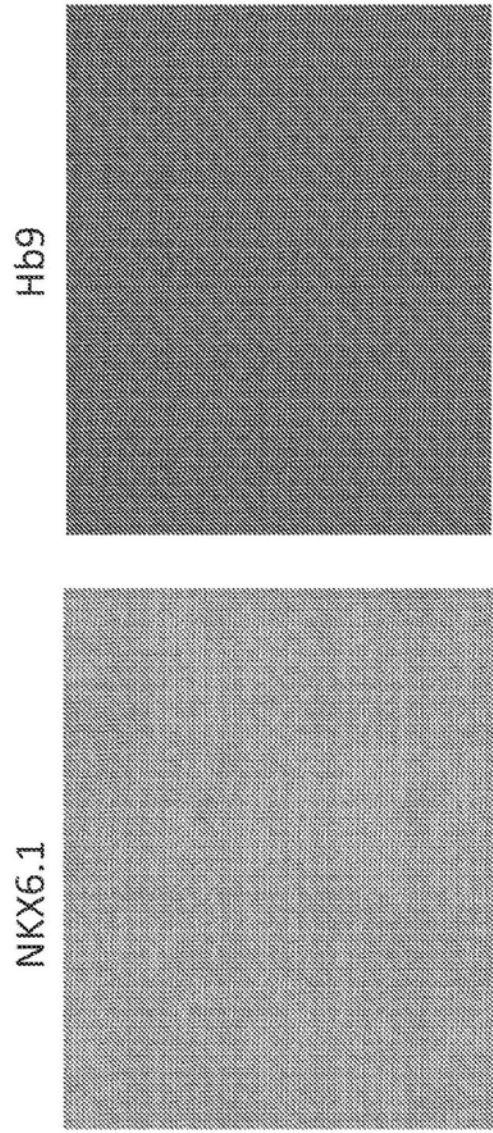


图 5B



第四阶段三天

图5

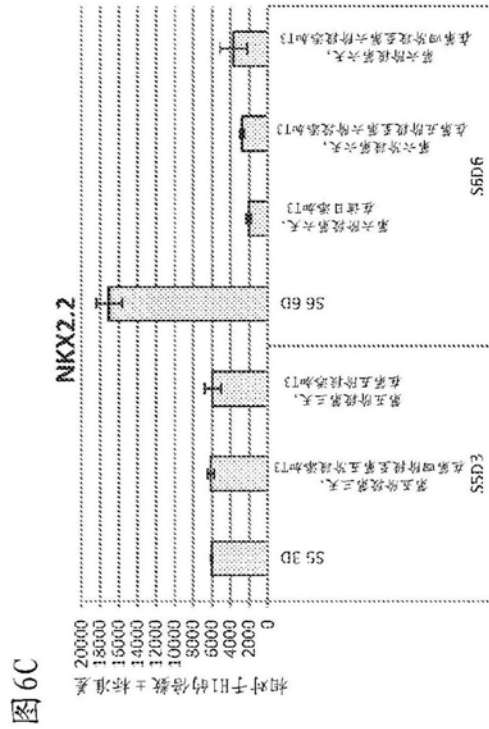
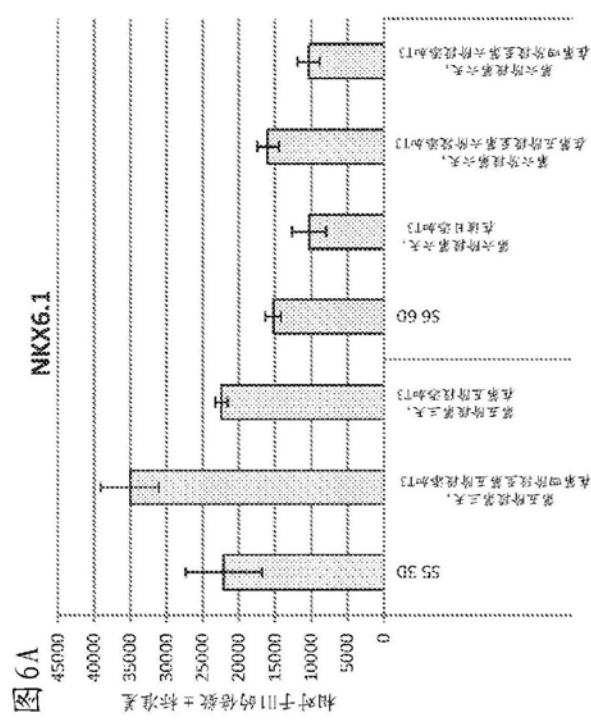
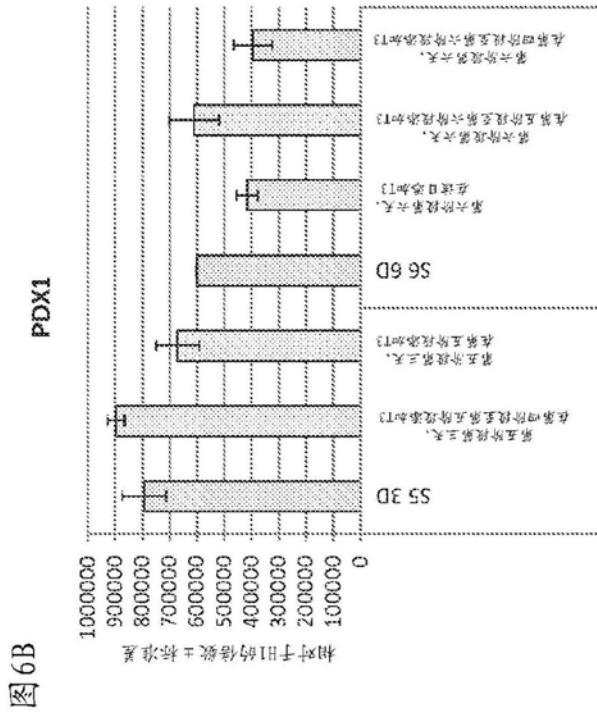


图6

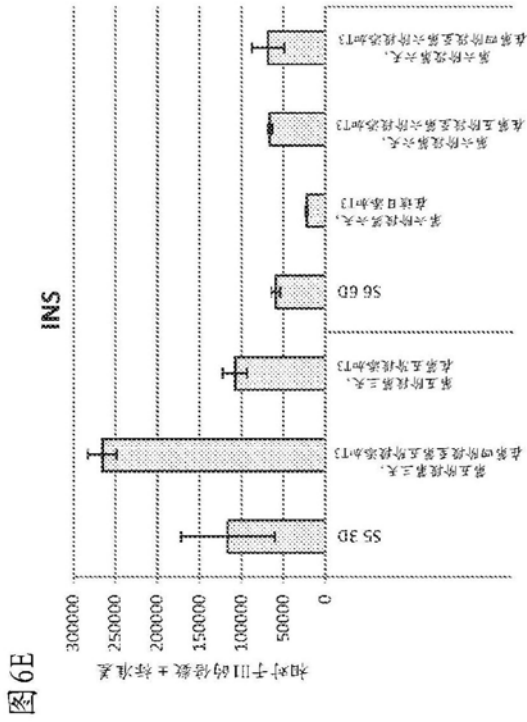


图 6E

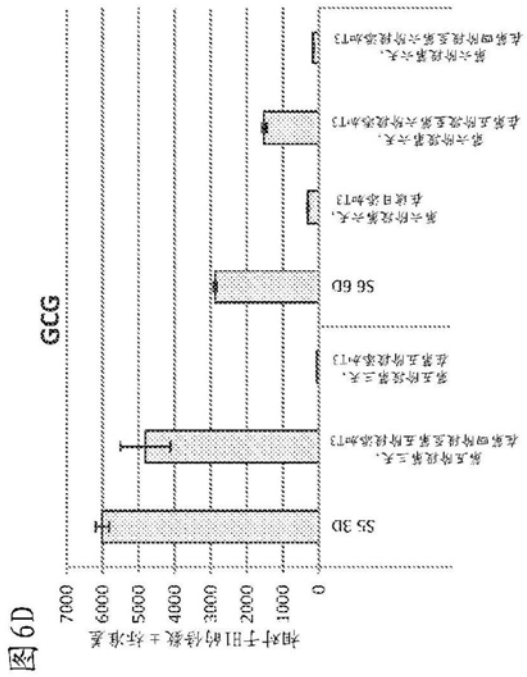


图 6D

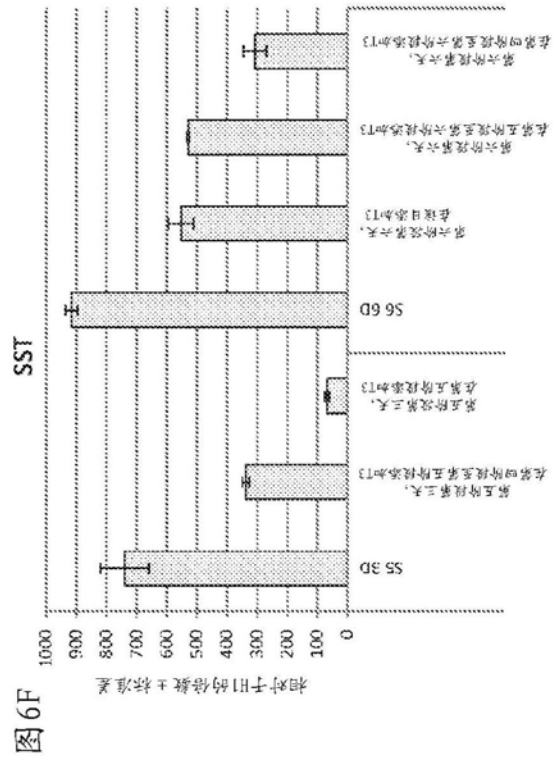


图 6F

图 6

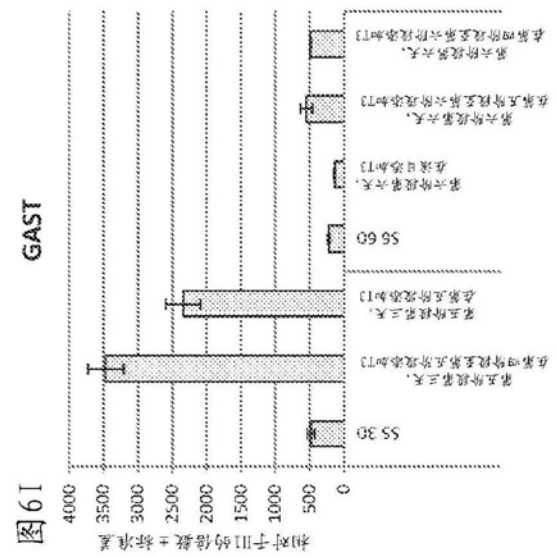
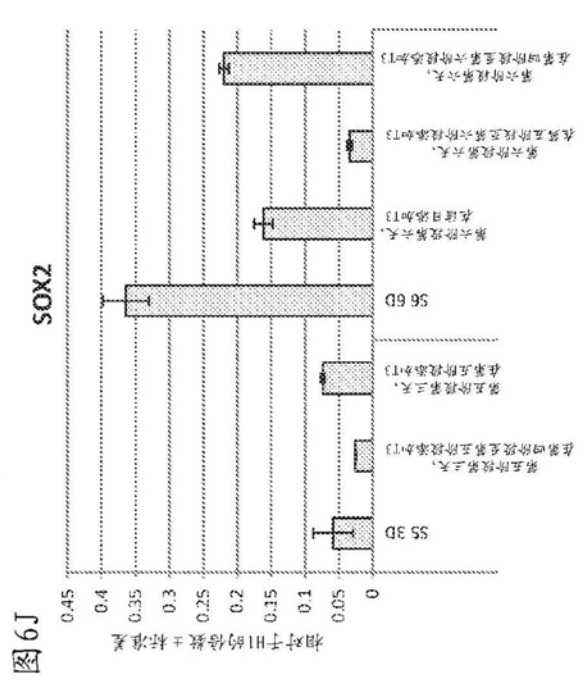
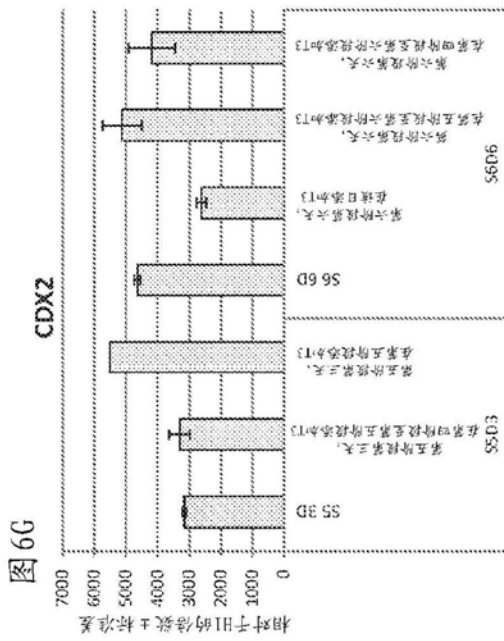
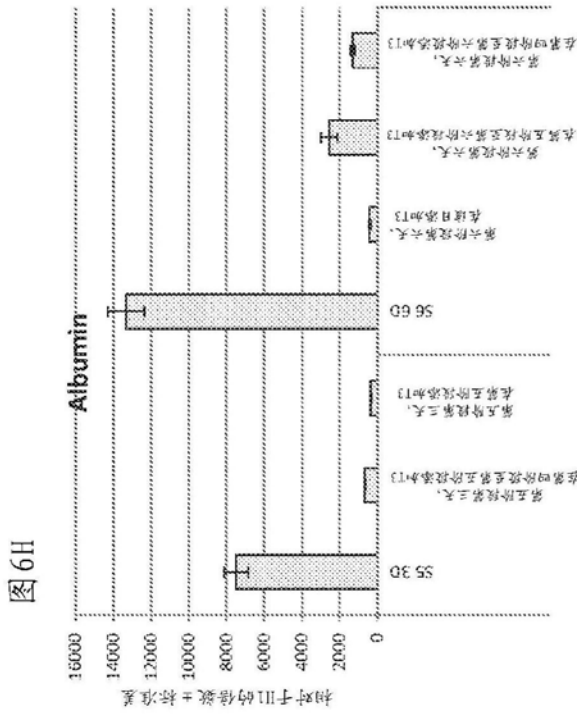
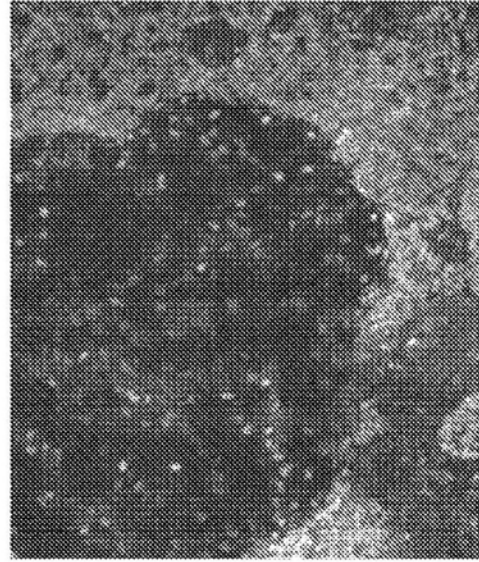
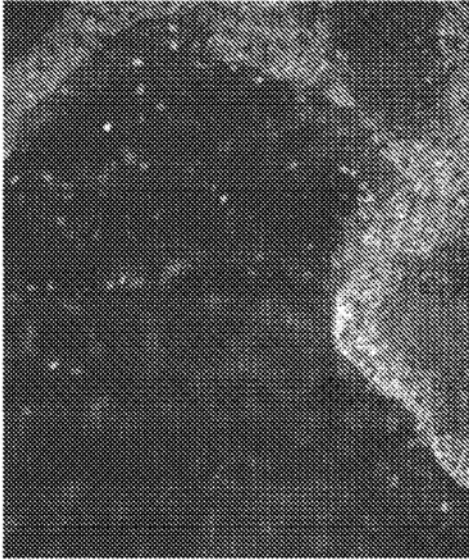


图6

NKX6.1



Hb9

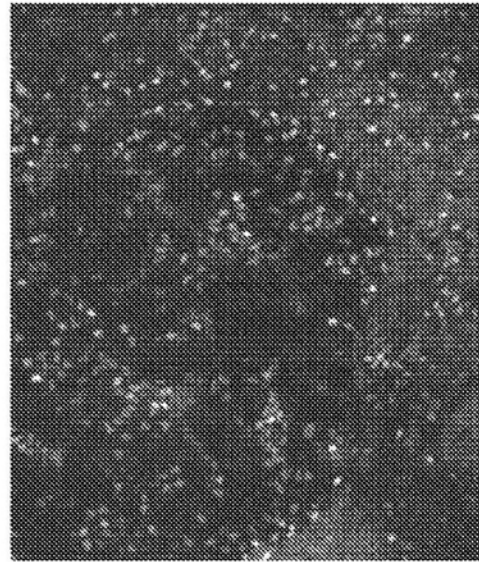
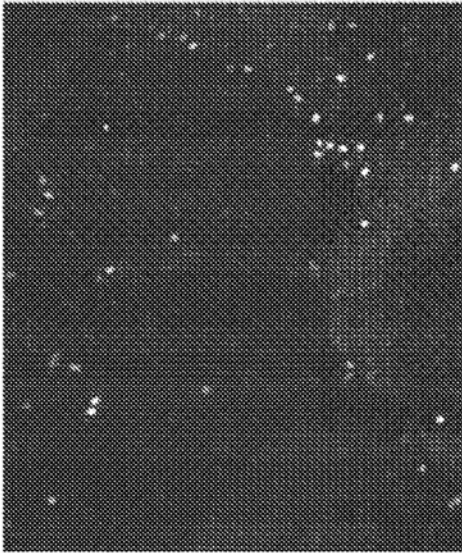


图7A

图7B

图7

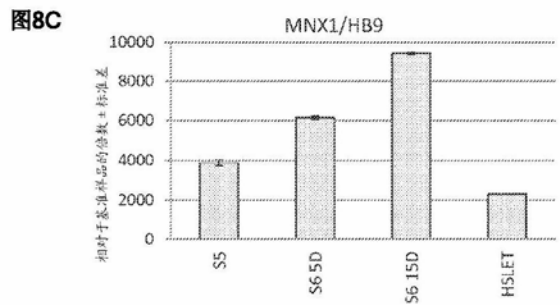
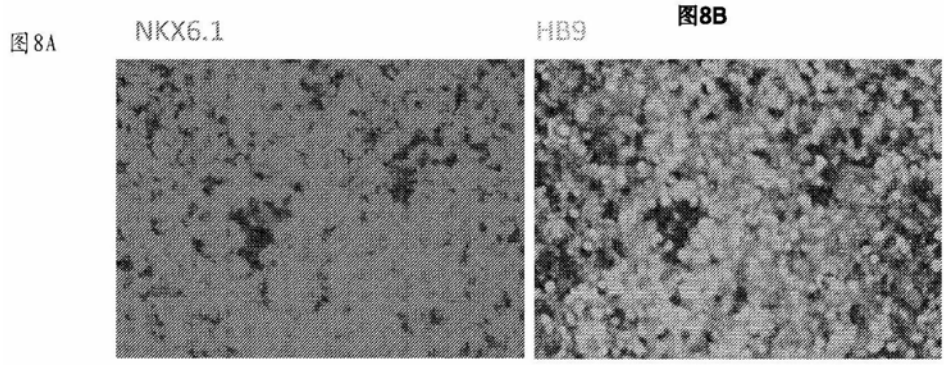


图8

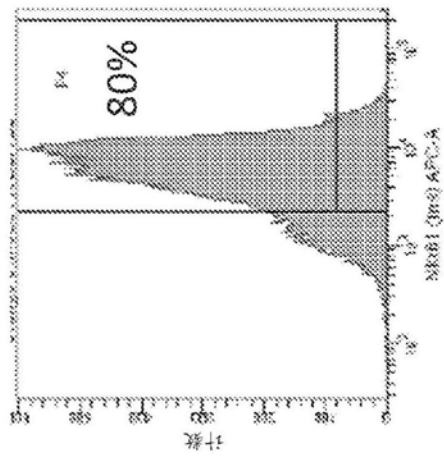
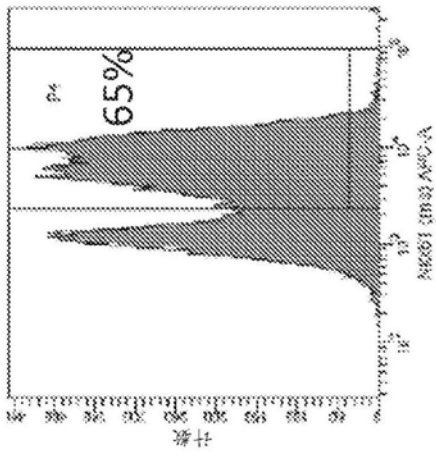
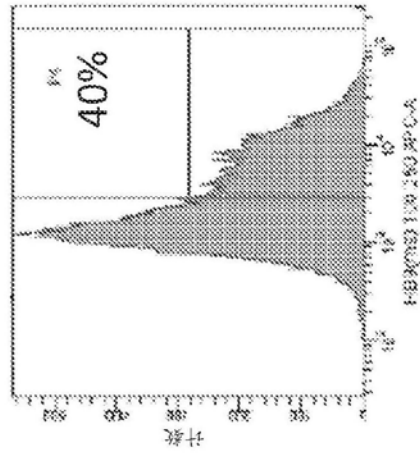
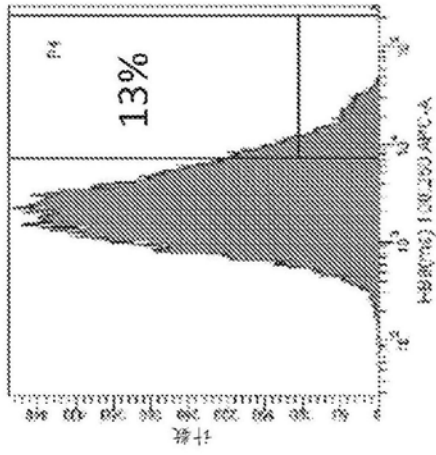


图9A

图9B

图9

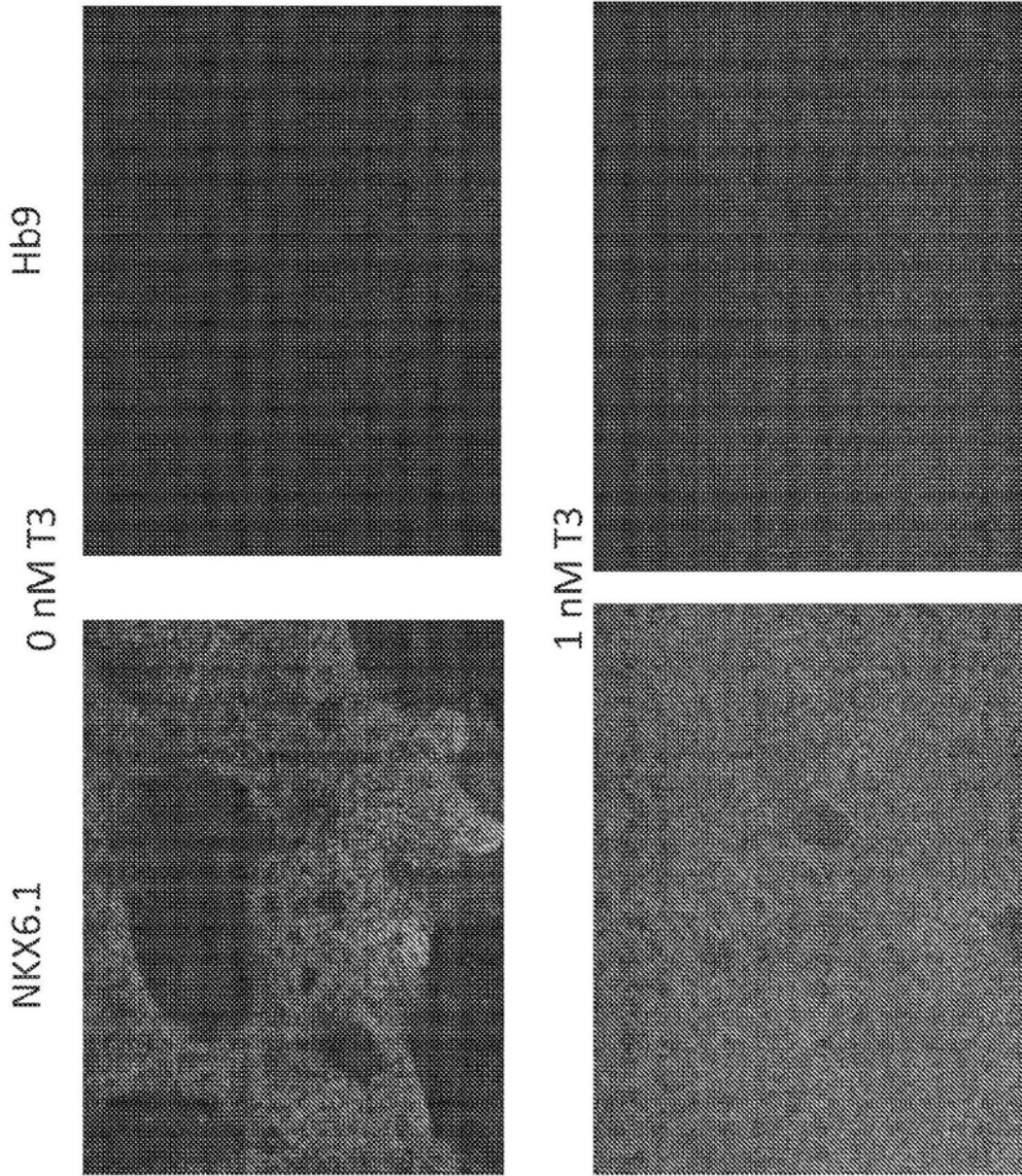


图10A

图10B

图10

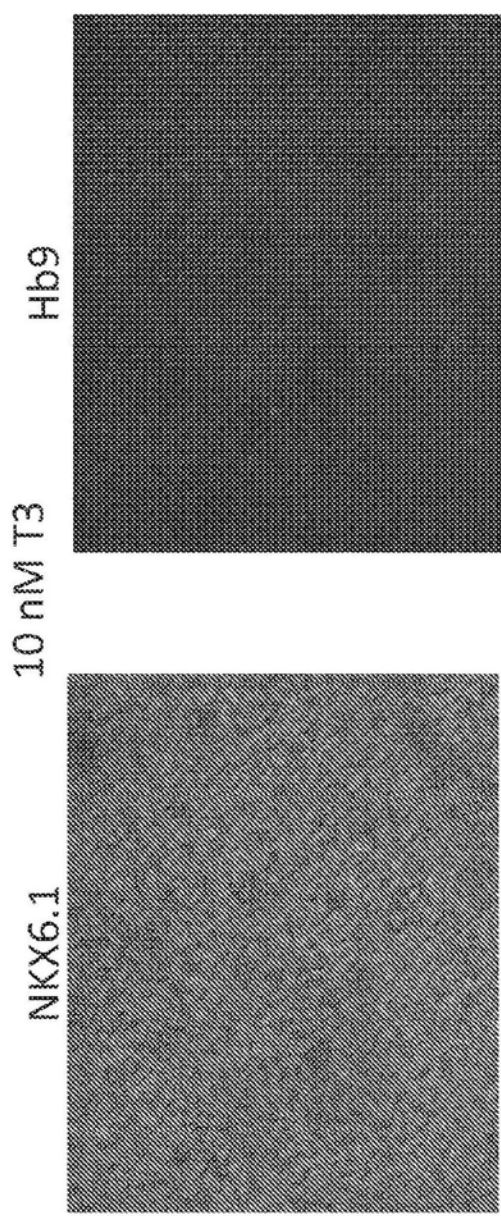


图10C

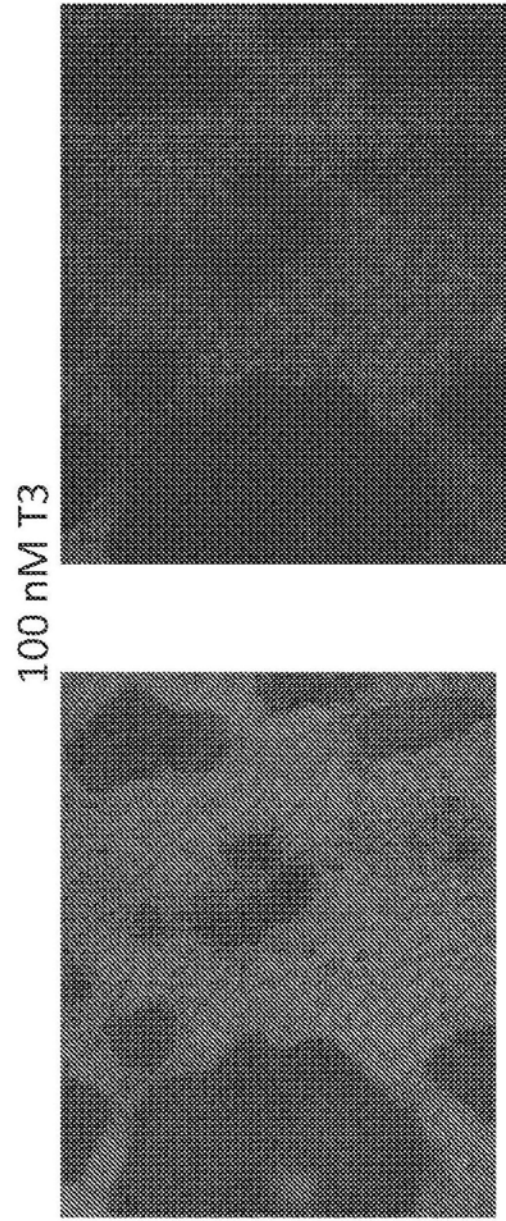


图10D

图10

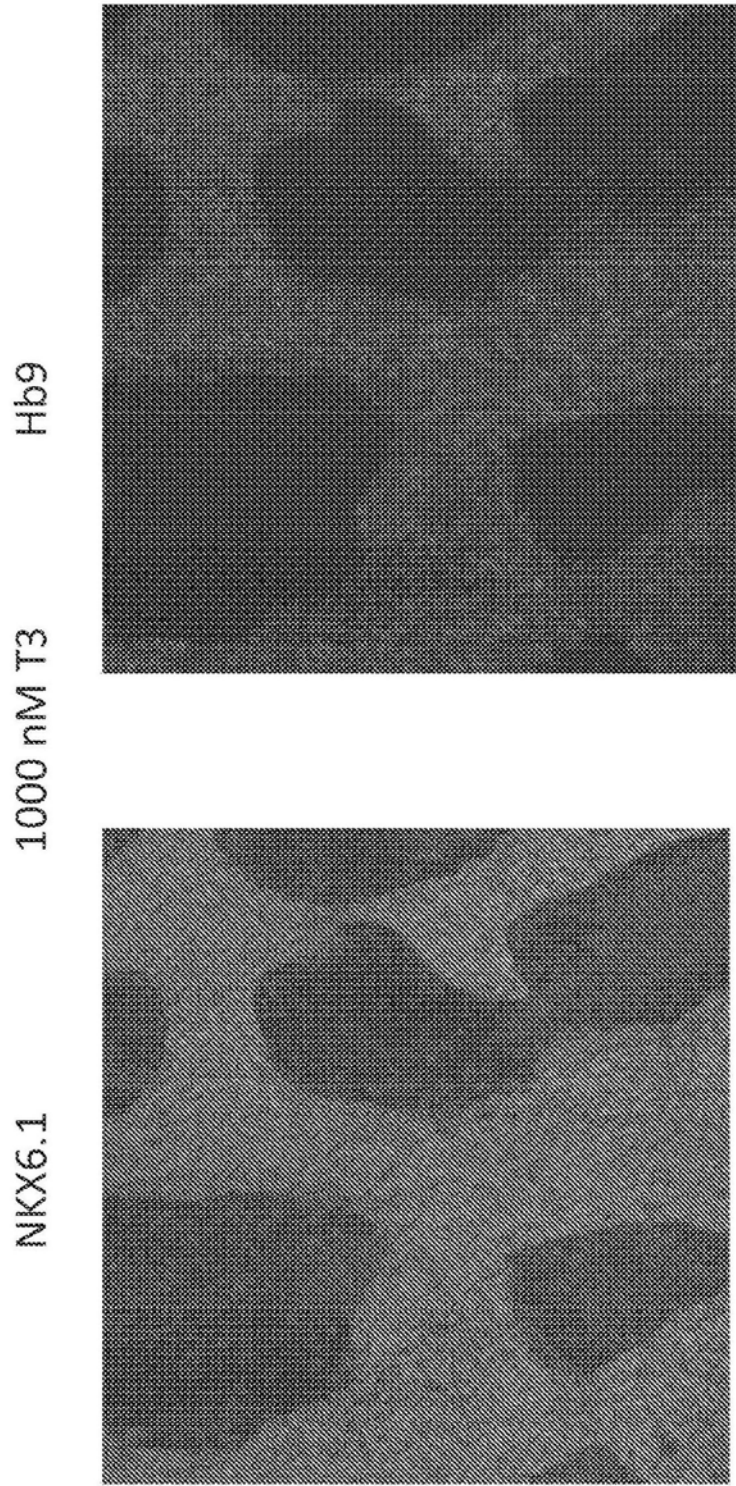


图10E

图10

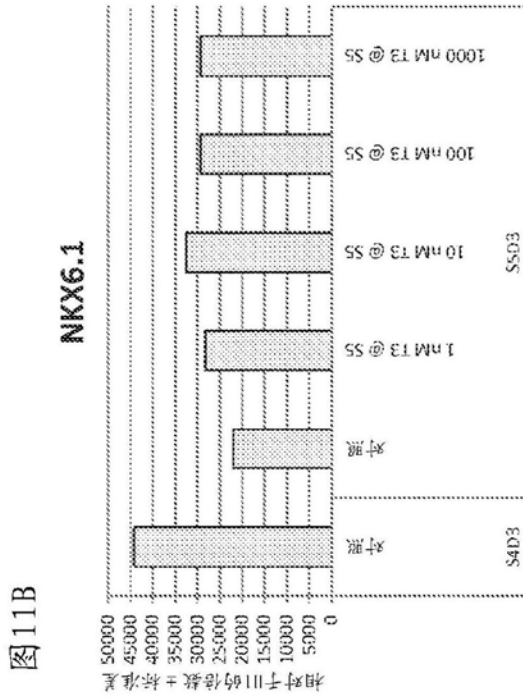


图11B

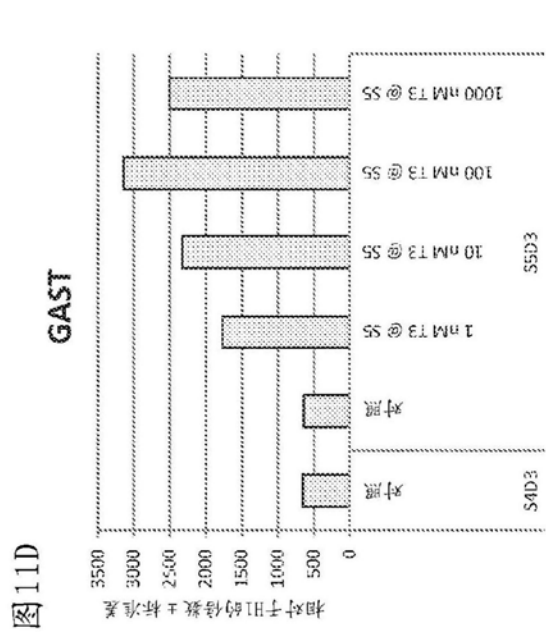


图11D

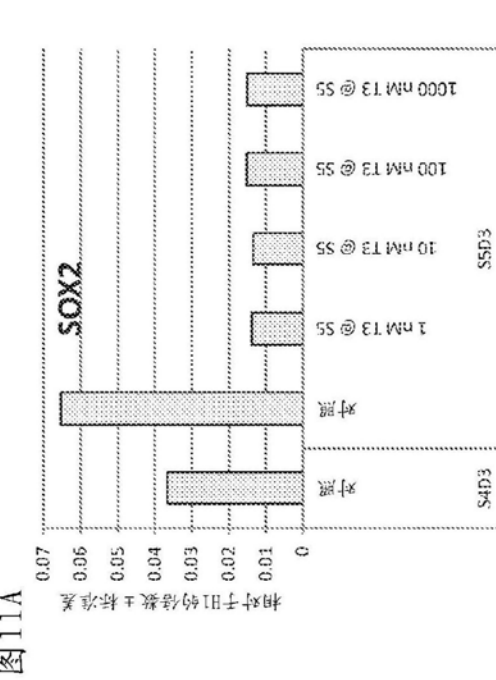


图11A

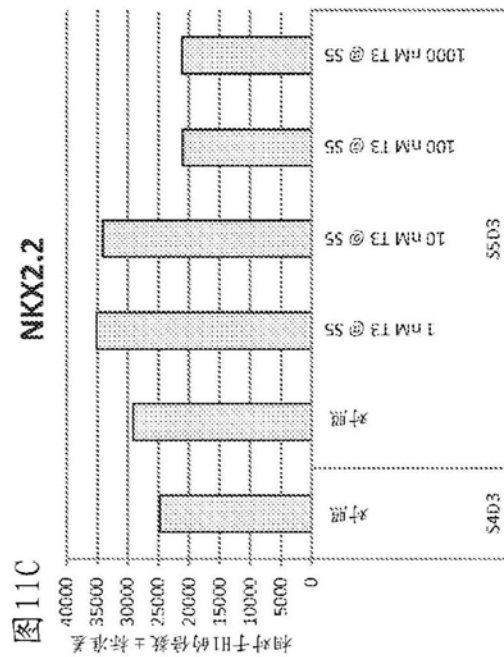


图11C

图11

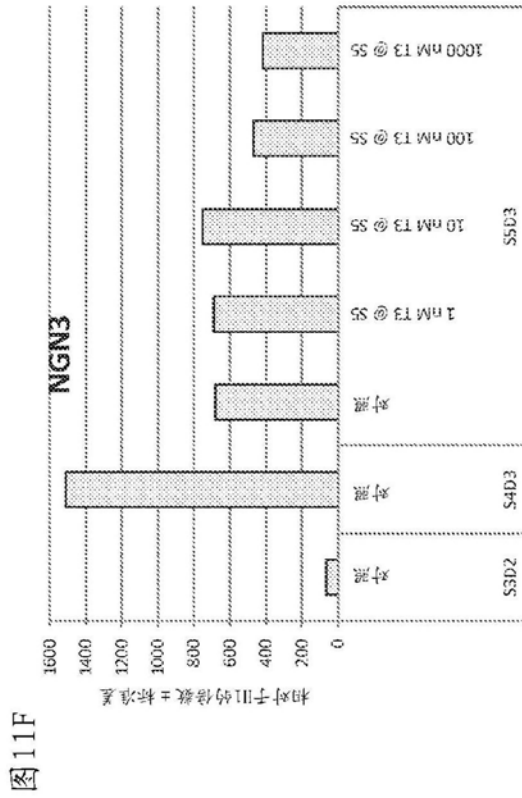


图 11H

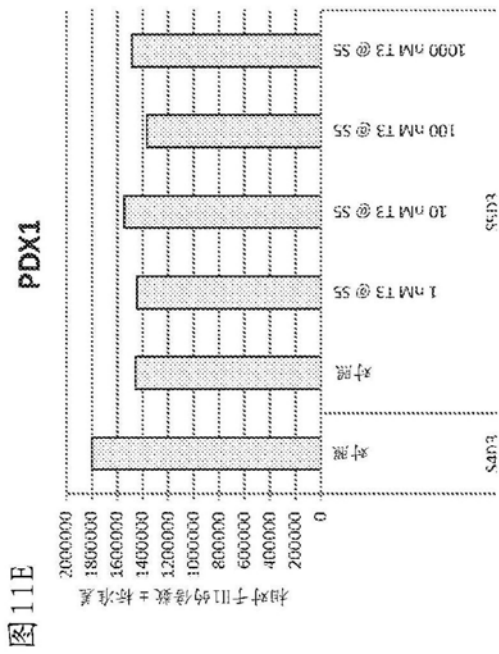
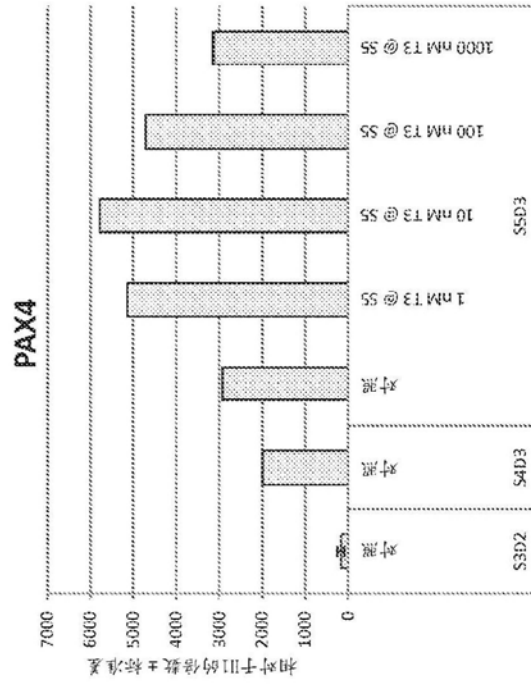


图 11G

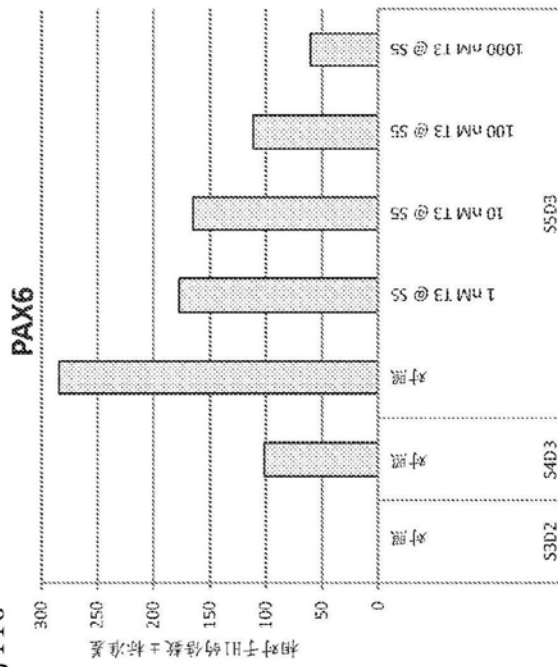


图 11

图 11J

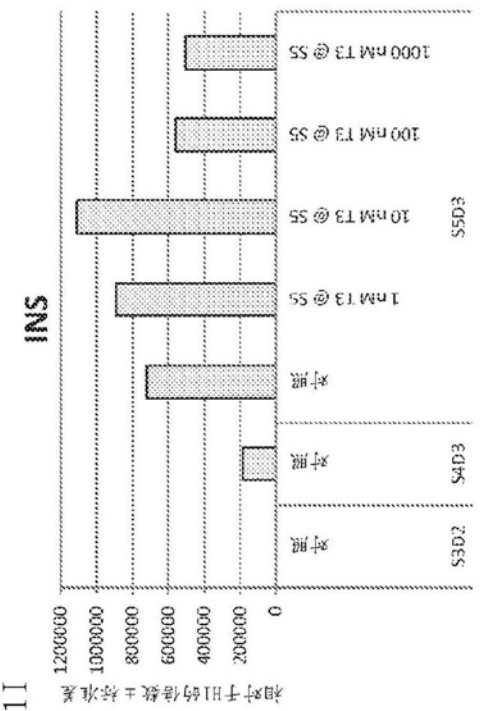


图 11I



图 11L

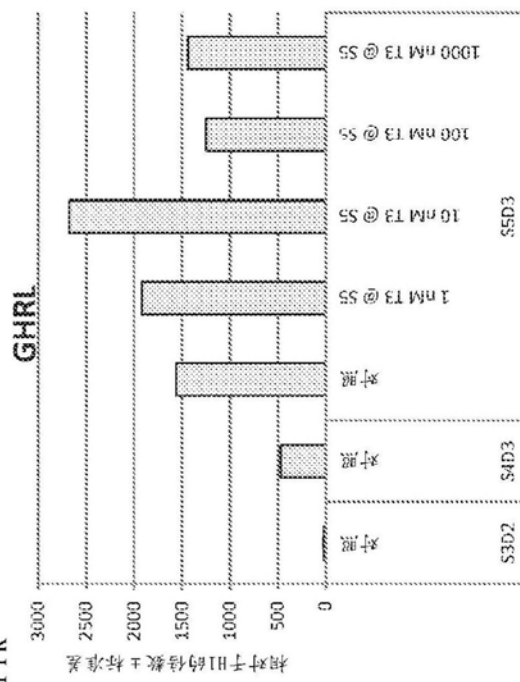


图 11K



图 11