



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108342354 B

(45) 授权公告日 2022.03.04

(21) 申请号 201810149768.3

(22) 申请日 2013.11.05

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108342354 A

(43) 申请公布日 2018.07.31

(30) 优先权数据
13/672,688 2012.11.08 US

(62) 分案原申请数据
201310541026.2 2013.11.05

(73) 专利权人 韦尔赛特公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 托马斯·C·斯库尔兹

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

C12M 3/02 (2006.01)

C12M 1/24 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 2012135621 A2, 2012.10.04

W0 2009058451 A2, 2009.05.07

CN 101903515 A, 2010.12.01

CN 102361970 A, 2012.02.22

Sylvia Niebruegge等. "Generation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Mesoderm and Cardiac Cells Using Size-Specified Aggregates in an Oxygen-Controlled Bioreactor". 《Biotechnology and Bioengineering》. 2008, 第102卷 (第2期),

审查员 唐雪珂

权利要求书2页 说明书88页 附图50页

(54) 发明名称

可扩大的灵长类动物多能干细胞聚集体悬浮培养物及其分化

(57) 摘要

本发明涉及从未分化的或分化的胚胎干细胞单细胞悬浮液制备未分化的或分化的胚胎干细胞聚集体悬浮培养物的方法, 以及其分化的方法。

1. 滚瓶,其包含悬浮于生理上可接受的培养基中的人胚胎干细胞衍生的细胞聚集体,其中所述人胚胎干细胞衍生的细胞聚集体来自通过以3rpm至20rpm的速度旋转搅动的人胚胎干细胞的单细胞悬液。

2. 根据权利要求1所述的滚瓶,其中所述人胚胎干细胞衍生的细胞聚集体在所述滚瓶中形成。

3. 根据权利要求1所述的滚瓶,其中所述人胚胎干细胞衍生的细胞聚集体包含胰腺内胚层细胞或包含定形内胚层细胞。

4. 根据权利要求3所述的滚瓶,其中所述定形内胚层细胞聚集体表达Sox17或HNF3 β 。

5. 根据权利要求3所述的滚瓶,其中所述定形内胚层细胞聚集体不显著表达PAX6, SOX7或ZIC1。

6. 根据权利要求1所述的滚瓶,其还包含1 μ M至2 μ M的视黄酸。

7. 根据权利要求1所述的滚瓶,其中还通过以3rpm至20rpm的速度旋转来搅动所述人胚胎干细胞衍生的细胞聚集体。

8. 根据权利要求1所述的滚瓶,其中所述人胚胎干细胞衍生的细胞聚集体的大小和形状基本上是均一的。

9. 根据权利要求3所述的滚瓶,其中所述定形内胚层细胞聚集体通过层流或流线流被搅动。

10. 根据权利要求1所述的滚瓶,其中所述人胚胎干细胞衍生的细胞聚集体的直径为50微米至250微米。

11. 制备包含人胚胎干细胞衍生的悬浮细胞聚集体的滚瓶的方法,所述方法包括:

(a) 提供包含人胚胎干细胞聚集体的滚瓶,所述人胚胎干细胞聚集体来自人胚胎干细胞的单细胞悬浮液;以及

(b) 将所述人胚胎干细胞聚集体与使人胚胎干细胞分化的培养条件接触,从而得到包含人胚胎干细胞衍生的悬浮细胞聚集体的滚瓶,

其中通过以3rpm至20rpm的速度旋转来搅动所述人胚胎干细胞衍生的细胞聚集体。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述人胚胎干细胞衍生的细胞聚集体表达选自以下的至少一种标志物:Sox17, HNF3 β , HNF1 β , PDX1, NKX6.1, PTF1A, NGN3和NKX2.2。

13. 根据权利要求11所述的方法,其中所述人胚胎干细胞衍生的细胞聚集体不显著表达PAX6, SOX7或ZIC1。

14. 根据权利要求11所述的方法,其中所述人胚胎干细胞衍生的细胞聚集体通过层流或流线流产生。

15. 根据权利要求11所述的方法,其中所述人胚胎干细胞衍生的细胞聚集体包含胰腺内胚层细胞或包含定形内胚层细胞。

16. 根据权利要求11所述的方法,其中所述人胚胎干细胞衍生的细胞聚集体的直径为50微米至250微米。

17. 根据权利要求11所述的方法,其中所述人胚胎干细胞衍生的细胞聚集体的大小和形状基本上是均一的。

18. 使滚瓶中的灵长类动物多能干细胞分化的方法,所述方法包括:

a. 提供未分化的灵长类动物多能干细胞的培养物;

b. 以3rpm至20rpm的转速搅动滚瓶的生理上可接受的培养基中的所述灵长类动物多能干细胞,以形成灵长类动物多能干细胞聚集体,

c. 使滚瓶中的所述灵长类动物多能干细胞聚集体与能使所述灵长类动物多能干细胞分化形成分化的细胞聚集体的培养基接触,

从而使滚瓶中的灵长类动物多能干细胞分化。

19. 滚瓶,其包含悬浮于生理上可接受的培养基中的灵长类动物多能干细胞聚集体培养物。

可扩大的灵长类动物多能干细胞聚集体悬浮培养物及其分化

[0001] 关于联邦政府赞助的研究或开发的声明

[0002] 本发明研发期间所进行的部分工作利用了来自国立卫生研究院批准号为5R24RR021313-05的美国政府基金。美国政府享有本发明的某些权利。

发明领域

[0003] 本发明涉及实质上无血清和饲养层的悬浮细胞聚集体组合物,以及用于分化该细胞聚集体悬浮液的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 迄今为止,对于哺乳动物多能细胞(pluripotent cell)如本文所描述的人胚胎干细胞(hESC),还没有提供大规模生产方法(“扩大的”)的有效系统。为了体外维持hESC处于未分化状态,一般将hESC维持在小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)饲养层上,并且通过人工机械解离(例如,显微解离)和转移单独的克隆碎片(pieces)来传代。这些方法对于不需要大规模生产未分化的hESC或分化的hESC的探讨性研究是足够的,基因靶向、药物开发、体外毒理学、将来的临床应用需要改进的方法以用于稳定地大规模扩增hESC,包括酶促传代。

[0006] 可以实施hESC的酶促扩增,但这些方法具有技术缺陷,因为hESC的存活依赖于细胞-细胞相互作用以及旁分泌信号和自分泌信号。因此,与以单细胞存在相比,hESC更喜欢这种细胞微环境。此外,据报道,hESC的酶促解离可以导致异常核型以及导致基因和基因组外改变。因此,在长期培养周期中提供高度支持性培养环境,同时允许未分化的hESC或分化的hESC稳健地大规模扩增(即,生产过程),而不危害多能性(pluripotency)、专能性(multipotency)或遗传稳定性是必需的。

[0007] 人多能细胞为研究人发育早期以及在诸如糖尿病和帕金森病的若干疾病状态中的治疗干预提供了独特的机会。例如,衍生自hESC的产胰岛素 β -细胞的使用相对于目前利用供体胰腺细胞的细胞治疗方案将提供巨大的改进。目前糖尿病的细胞疗法治疗利用来自供体胰腺的细胞,受限于移植所需的高质量胰岛细胞的不足。一例I型糖尿病患者的细胞疗法需要移植约 8×10^8 个胰腺胰岛细胞(Shapiro et al.,2000, N Engl J Med 343:230-238;Shapiro et al.,2001a,Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 15:241-264;Shapiro et al.,2001,British Medical Journal 322:861)。这样,一次成功的移植需要至少两例健康供体器官以获得足够的胰岛细胞。

[0008] 因此,hESC代表研究早期胚胎内多能细胞生物学和分化的机制的强大模型系统,以及为哺乳动物的基因操纵和由此带来的商业、医学和农业应用提供了机会。此外,hESC的适当增殖和分化能够潜在地用于生成无限制的适于移植的细胞来源,以用于治疗由细胞受损或功能失调导致的疾病。其他多能细胞和细胞系,包括国际专利申请W0 99/53021所述的早期原始外胚层样(EPL)细胞、体内或体外衍生的ICM/上胚层、体内或体外衍生的原始外胚层、原始生殖细胞(EG细胞)、畸胎瘤细胞(EC细胞)以及通过去分化或通过核转移衍生的多能细胞,会共享这些特性和应用的部分或全部。国际专利申请W0 97/32033和美国专利第5,453,357号描述了包括来自除啮齿动物以外物种细胞的多能细胞。人ES细胞描

述于国际专利申请W0 00/27995和美国专利 第6,200,806号中,以及人EG细胞描述于国际专利申请W0 98/43679 中。

[0009] 人们对调节ES细胞多能性和分化的生化机制了解很少。然而,可以得到的有限的经验数据(和大量轶事证据)表明,在体外培养条件下持续维持多能ES细胞依赖于细胞外环境中细胞因子和生长因子的存在。

[0010] 尽管人ESC提供了起始材料的来源,从其发展大量高质量的分化细胞用于人细胞疗法,这些细胞必须在以下条件中获得和/或培养:符合管理临床安全性和功效的预期法规性指导方针。这些指导方针可能需要利用所有组分均符合cGMP来源的培养基。这种化学限定/GMP 标准条件的开发对于促进使用hESC和衍生自hESC的细胞以用于人治疗目的是必需的。

[0011] 此外,基于hESC的细胞替代疗法的最终应用,需要开发使符合法规性指导方针的大规模培养和分化条件成为可能的方法。尽管几个研究组已经报道了简化的hESC生长条件,这些研究仍有显著的局限性。然而迄今为止,多能细胞的成功分离、长期克隆维持、遗传操纵和种系传递是普遍困难的。

[0012] 大多数用于干细胞的细胞培养条件仍在培养基中包含血清替代物(KSR)(Xu et al.,2005Stem Cells,23:315-323;Xu et al.,2005Nature Methods,2:185-189;Beattie et al.,2005Stem Cells,23:489-495;Amit et al.,2004Biol.Reprod.,70:837-845;James et al.,2005Development, 132:1279-1282)。KSR包含牛血清白蛋白(BSA)的粗制组分,而不是高纯来源。其他研究组仅进行了短期研究,因此并不清楚它们的条件是否能够维持长期的多能性(Sato et al.,2004,Nature Med.,10:55-63;U.S. Patent Publication Nos.2006/0030042和2005/0233446)。其他研究组已经表明在含有FGF2、活化素A和胰岛素的化学限定培养基中多能性的长期维持,但细胞生长在包被有人血清的平板上,这些血清在细胞平板接种前被“冲洗掉”(Vallier et al.,2005J Cell Sci.,118 (Pt 19):4495-509)。尽管FGF2是所有这些培养基中的组分,但并不清楚其是否提供了初级或次级自我更新信号(Bendall et al.2007Nature 448:1015-1027);特别是如在一些制剂中是否必需使用高浓度的FGF2(高达100ng/mL,Xu et al.,2005Nature Methods,2:185-189)。

[0013] 此外,所有这些研究组在培养基中都添加了 $\mu\text{g/mL}$ 水平的胰岛素,或者由于使用KSR引入胰岛素。胰岛素通常被认为在葡萄糖代谢和“细胞存活”信号转导中通过结合胰岛素受体发挥作用。然而在高于生理浓度的水平,胰岛素还能够以较低效率结合IGF1受体,并通过PI3 激酶/AKT途径提供经典的生长因子活性。KSR或这些其他培养基条件中这种高水平胰岛素($\mu\text{g/mL}$ 水平)的存在/需要表明,主要活性是通过结合到由hESC表达的IGF1受体来引发(Sperger et al.,2003PNAS, 100 (23):13350-13355)。其他研究组已经注意到IGF1R的完全互补物以及细胞内信号转导途径成员在hESC中的表达,其可能预示着该途径的功能活性(Miura et al.,2004Aging Cell,3:333-343)。胰岛素或IGF1 可以引发hESC自我更新所需的主要信号,如通过以下事实所提示的:所有目前开发的用于培养hESC的条件都包含胰岛素、KSR提供的胰岛素或者血清提供的IGF1。为了支持这一概念,已经表明如果PI3激酶在hESC培养物中被抑制,细胞则分化(D'Amour et al.,2005Nat. Biotechnol., 23:1534-41;McLean et al.,2007Stem Cells 25:29-38)。

[0014] 最近的出版物概括了hESC的人源化限定培养基(Ludwig et al., Nature Biotechnology, 2006年1月1日在线公布, doi:10.1038/nbt1177)。然而,这一最新制剂包括几种被认为影响hESC增殖的因子,包括 FGF2、TGF β 、LiCl、 γ -氨基丁酸和吡啶酸。注意,这一最新限定的细胞培养基也包含胰岛素。

[0015] 申请人此前报道了基于胰岛素/IGF1、heregulin、活化素A信号转导的组合的hESC的自我更新信号转导示例。参见Wang et al. 2007, Blood 110:4111-4119。在该文章中我们发现,外源FGF2信号是多余的且不是必需的(Schulz&Robins 2009, 同上) Schulz&Robins 2009, (In:Lakshmipathy et al. eds., Emerging Technology Platforms for Stem Cells. John Wiley&Sons., Hoboken, NJ, pp. 251-274); Heregulin是EGF生长因子家族的成员。该家族有至少14个成员,包括但不限于EGF、TGF β 、肝素结合-EGF(hb-EGF)、神经调节蛋白- β (还称为heregulin- β (HRG- β))、神经胶质生长因子以及其他)、HRG- α 、双调蛋白、乙胞素(betacellulin)和外调蛋白。所有这些生长因子包含EGF结构域,并且通常首先表达为跨膜蛋白,其通过金属蛋白酶(特别是ADAM)蛋白加工生成可溶性胞外域生长因子。EGF家族成员以不同亲和力与ErbB1、2、3和4细胞表面受体的同源-或异源-二聚体相互作用(Jones et al., FEBS Lett, 1999, 447:227-231)。EGF、TGF α 和hbEGF以高亲和力(1-100 nM范围)结合ErbB1/1(EGFR)同源二聚体和ErbB1/2异源二聚体,而HRG- β 以极高亲和力(<1nM范围)结合ErbB3和ErbB4。活化的ErbB受体通过PI3激酶/AKT途径以及还通过MAPK途径转导信号。ErbB2和ErbB3是hESC中最高度表达的生长因子之一(Sperger et al., 2003 PNAS, 100:13350-13355), 先前已表明HRG- β 支持小鼠原始生殖细胞的扩增(Toyoda-Ohno et al., 1999 Dev. Biol., 215(2):399-406)。此外, ErbB2的超表达和随后不适当的活化与肿瘤发生有关(Neve et al., 2001 Ann. Oncol., 12(Suppl 1):S9-13; Zhou&Hung, 2003 Semin. Oncol., 30(5 Suppl 16):38-48; Yarden, 2001 Oncology, 61 Suppl 2:1-13)。人ErbB2(染色体17q)和ErbB3(染色体12q)存在于据观察在一些hESC中作为三体聚集的染色体上(Draper et al., 2004 Nat. Biotechnol., 22:53-4; Cowan et al., 2004 N Engl. J. Med., 350(13):1353-6; Brimble et al., 2004 Stem Cells Dev, 13:585-97; Maitra et al., 2005 Nat. Genet. 37:1099-103; Mitalipova et al., 2005 Nat. Biotechnol. 23:19-20; Draper et al., 2004 Stem Cells Dev., 13:325-36; Ludwig et al., Nature Biotech, 2006年1月1日在线公布, doi:10.1038/nbt1177)。

[0016] ErbB2和ErbB3(Brown et al., 2004 Biol. Reprod., 71:2003-11; Salas-Vidal&Lomeli, 2004, Dev Biol., 265:75-89)表达在小鼠胚泡中, 尽管并不特异性局限于内细胞团(ICM), 而ErbB1、EGF和TGF β 表达在人胚泡中(Chia et al., 1995 Development, 122(2):299-307)。HB-EGF在人IVF胚泡培养中具有增殖效应(Martin et al., 1998 Hum. Reprod., 13:1645-52; Sargent et al., 1998 Hum. Reprod. 13(Suppl 4):239-48), 对生长在15%血清中的小鼠ES细胞具有适度的额外效应(Heo et al., 2006, Am. J. Phy. Cell Physiol., 290:C123-33, Epub 2005 Aug 17)。移植前和移植后早期的发育看起来在ErbB2-/-, ErbB3-/-, 神经调节蛋白1-/- (Britsch et al., 1998 Genes Dev., 12:1825-36), ADAM17-/- (Peschon, et al., 1998 Science, 282:1281-1284)和ADAM19-/- (Horiuchi, 2005 Dev. Biol., 283(2):459-71)无效胚胎中不受影响。因此, hESC中通过ErbB受体家族转导信号的重要性至今并不清楚。

[0017] 神经调节蛋白-1 (NRG1) 是展示多重剪接和蛋白加工变体的大基因。这产生了大量的蛋白同种型,其在本文统称为神经调节蛋白。神经调节蛋白主要表达为细胞表面跨膜蛋白。细胞外区域包含免疫球蛋白样结构域、糖类修饰区域和EGF结构域。以前已经对NRG1表达同种型做过综述 (Falls, 2003 Exp. Cell Res., 284:14-30)。已表明,细胞膜金属蛋白酶ADAM17和ADAM19将神经调节蛋白-1的跨膜形式加工为可溶性神经调节蛋白/heregulin。HRG- α 和- β 是神经调节蛋白切割的胞外结构域,包含EGF和其他结构域。因为EGF结构域负责ErbB受体的结合和活化,因此仅包含该结构域的重组分子就能够展示该蛋白基本上全部的可溶性生长因子效应 (Jones et al., 1999 FEBS Lett., 447:227-31)。此外,存在神经调节蛋白的经加工的跨膜同种型,其被认为在邻近细胞中通过EGF结构域与ErbB受体的相互作用触发近分泌 (juxtacrine) 信号转导。

[0018] 在hESC研究进展中在培养物中维持多能性方面的重要发展还将阐明符合预期的管理临床安全和功效的法治性指导方针的培养基和细胞培养条件。尽管最好的结果是化学限定的hESC培养基的可利用性,但如果其生产符合GMP标准,化学上未限定的组分是可接受的。因此,需要鉴定用于培养和稳定能够用于治疗目的的多能干细胞群的方法和组合物,其中所述培养组合物的限定和/或生产符合GMP标准。

[0019] 生产能够在移植后起作用的定向祖细胞或分化细胞类型,是基于hESC的治疗研究潜力的主要前景。使用分步方案,尤其与本文、申请人此前的专利和非专利出版物中所述的基本上相似的4-阶段分步方案,本文中也称为灵长类动物的多能干细胞 (pPSC) 例如, hESC或iPSC是可分化细胞,其可在第4阶段结束时定向分化为混合的胰腺型细胞群。所述细胞混合物至少包含通常称为“胰腺祖细胞”,或“胰腺内胚层”或“胰腺上皮细胞”的细胞,二者也称为“PE”或“PDX1-阳性胰腺内胚层”或“胰腺内胚层细胞”或“PEC”或其等同物。

[0020] PEC细胞组合物已经得以充分的表征,如申请人此前的专利和非专利申请所描述,包括但不限于, Kroon et al. 2008 Nature Biotechnology 26:443-52, 美国专利第7,534,608号、第7,695,965号和第7,993,920号 (名称:体内制备胰岛素的方法 (METHODS FOR MAKING INSULIN IN VIVO)), 以及第8,278,106号 (名称:源自人多能干细胞的胰腺细胞的封装 (ENCAPSULATION OF PANCREATIC CELLS DERIVED FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS)), 这些都以引用的方式全部并入本文。使用流式细胞仪,从PEC的多于10个不同发育组 (lots) 定量20多个样品,显示了如下的细胞类型。细胞混合物约50% (范围33-60%) 由表达NKX6-1而非嗜铬粒蛋白 (CHGA) 的细胞组成。约44% (范围33-62%) 的聚合-激素内分泌细胞表达CHGA。已表明CHGA阳性细胞在体内移植或植入后发育并成熟为表达胰高血糖素的细胞。约7% (范围1.3-13%) 表达PDX1的同时不表达CHGA或NKX6-1 (仅为PDX1群)。混合物或群体中非常少量的细胞,约1% (范围0.27-6.9%) 不表达上述任何标志物:既非PDX1,也非NKX6-1或CHGA (或三阴性细胞)。因此,PEC或其等同物是指这类细胞的混合物或群体。PEC组合物或群体还更详细地描述于实施例27和表12。Kroon et al. 2008, (同上); Schulz et al. 2012, (同上); 其内容通过引用的方式全部并入本文。

[0021] 植入的PEC (包封或未包封的) 通过一种机制在体内产生功能性的胰岛样结构,该机制看上去主要涉及胰腺祖细胞重新定向为内分泌谱系,然后进一步成熟为响应葡萄糖的 β -细胞。因此,在小鼠中这样的移植能够感知血糖,对加工后的人胰岛素的计量释放产生响应,并预防链脲霉素 (STZ) -诱导的高血糖症。参见Kroon et al. 2008, (同上)。

[0022] 尽管已从hESC衍生出其他候选的胰腺谱系,它们都没有在体内 显示出实质上的移植后功能,如同长期响应葡萄糖的人c-肽分泌和预防STZ-诱导的高血糖症所限定的。没有在动物模型中显示出功能,就很难估计这些替代方案的可扩大性或临床潜力。参见Cai J.et al.2009 J Mol Cell Biol 2:50-60;Johannesson et al.2009PLoS One 4:e4794;Mfopou et al.2010Gastroenterology 138:2233-2245;Ungrin et al.2011 Biotechnol Bioeng. Dec 2.doi:10.1002/bit.24375;Clark et al.2007 Biochem Biophys Res Commun 356:587-593;Jiang et al.2007Cell Res 17: 333-344;以及Shim et al.2007Diabetologia 50:1228-1238,其通过引用 全部并入本文。

[0023] 本文所描述的发明是继申请人此前所证明的之后进行的,即使用 限定培养基的无饲养层条件能够支持单细胞传代和hESC的大量培养。参见Schulz&Robins 2009,(同上);和美国专利第8,278,106号(名称: 源自人多功能干细胞的胰腺细胞的封装, ENCAPSULATION OF PANCREATIC CELLS DERIVED FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS),它们均通过引用的方式全部并入本文。基于hESC的 技术进展到临床试验的关键是相当的可扩大性的证明。提高扩增效率 的改善也将节省时间并节约生产费用,以及使随培养时间发生群漂移 的可能性最小化。参见Maitra et al.2005Nat Genet 37:1099-1103,其 通过引用的方式全部并入本文。重要的是,使用本文所述的滚瓶按比 例缩放,例如与hESC的低温储藏一起提供了确定和一致的用于产品 生产的材料,以用于近期和长期的研究和开发战略。

[0024] 发明概述

[0025] 本发明涉及包含基础盐营养液和ErbB3配体的组合物,该组合物 实质上无血清。

[0026] 本发明还涉及包含基础盐营养液的组合物以及用于在可分化的细 胞中刺激ErbB2-定向的酪氨酸激酶活性的手段。

[0027] 本发明涉及培养可分化细胞的方法,该方法包括将可分化的细胞 接种于细胞培养表面,给可分化的细胞提供基础盐营养液以及提供特 异结合ErbB3的配体。

[0028] 本发明涉及培养可分化的细胞的方法和用于在可分化的细胞中刺 激ErbB2-定向的酪氨酸激酶活性的手段,该方法包括将可分化的细胞 接种于细胞培养表面,并给可分化的细胞提供基础盐营养液。

[0029] 本发明还涉及培养可分化细胞的方法,该方法包括给在消化前包 含在培养室中的可分化细胞层提供消化液,其中消化将细胞层分散为 单个细胞。消化后,将单个细胞置于含有可分化细胞培养液的新组织 培养室中,其中可分化细胞培养液包含基础盐营养液和ErbB3配体。一旦培养,将单个可分化的细胞置于允许单个细胞生长和分裂的条件 下。

[0030] 本发明涉及用于通过以下方式从多能hES贴壁培养物生成hES细 胞悬浮聚集体的方法:在允许以未分化状态扩增的贴壁生长培养条件 下培养hES;将贴壁hES培养物解离为单细胞悬浮培养物;使单细胞 悬浮培养物与允许通过搅动单细胞悬浮培养物形成hES衍生 细胞悬浮 聚集体的第一分化培养条件接触,直至单细胞悬浮培养物形成hES衍 生细胞悬 浮聚集体的这一时间段,由此生成hES衍生细胞悬浮聚集体。在优选的实施方案中,单细胞 悬浮培养物的搅动通过以约80rpm至 160rpm的旋转来实施。

[0031] 本发明还涉及用于通过以下方式从hES衍生单细胞悬浮液生成 hES衍生细胞悬浮 聚集体的方法:在允许以未分化状态扩增的贴壁生 长培养条件下培养hES细胞;使未分化

的hES与适于分化hES细胞并导致贴壁hES衍生细胞形成的第一分化培养条件接触;将贴壁hES衍生细胞解离为单细胞悬浮培养物;使单细胞悬浮培养物与允许通过搅动单细胞悬浮培养物形成hES衍生细胞悬浮聚集体的第二分化培养条件接触,直至单细胞悬浮培养物形成hES衍生细胞悬浮聚集体的这一时间段,以及由此生成hES衍生细胞悬浮聚集体。在优选的实施方案中,单细胞悬浮培养物的搅动通过以约80rpm至160rpm的旋转来实施。

[0032] 本发明涉及包含灵长类多能干细胞(pPSC)悬浮聚集体的滚瓶。在本发明的某些方面,所述pPSC聚集体为选自人胚胎干细胞(hESC)、诱导的多能干细胞(iPSC)和/或其他人多能干细胞的细胞。在一个实施方案中,所述滚瓶是不透气的,但根据培养箱或烘箱的能力可以是透气的。

[0033] 本发明还涉及产生包含pPSC聚集体的滚瓶的方法,其通过将pPSC与多能干细胞培养条件接触,并搅动培养物直至形成pPSC聚集体,从而在滚瓶中产生pPSC聚集体。在某些实施方案中,所述pPSC培养物的搅动通过以约3rpm、约4rpm、约5rpm、约6rpm、约7rpm、约8rpm、约9rpm、约10rpm、约11rpm、约12rpm、约13rpm、约14rpm、约15rpm、约16rpm、约17rpm、约18rpm、约19rpm、约20rpm、约21rpm、约22rpm、约23rpm、约24rpm、约25rpm、约26rpm、约27rpm、约28rpm、约29rpm和约30rpm的旋转来实施。通常,所述pPSC培养物的搅动以约5rpm、约6rpm、约7rpm、约8rpm、约9rpm、约10rpm、约11rpm和约12rpm的旋转来实施。

[0034] 本发明的另一方面涉及在滚瓶中使pPSC聚集体分化的方法,其通过将可分化的或未分化的pPSC聚集体与使pPSC聚集体分化的培养条件接触,并搅动所述pPSC聚集体培养物直至形成pPSC衍生聚集体,从而在滚瓶中产生pPSC衍生悬浮聚集体。在一些实施方案中,所述pPSC衍生聚集体悬浮培养物的搅动以约3rpm、约4rpm、约5rpm、约6rpm、约7rpm、约8rpm、约9rpm、约10rpm、约11rpm、约12rpm、约13rpm、约14rpm、约15rpm、约16rpm、约17rpm、约18rpm、约19rpm、约20rpm、约21rpm、约22rpm、约23rpm、约24rpm、约25rpm、约26rpm、约27rpm、约28rpm、约29rpm和约30rpm的旋转来实施。通常所述pPSC培养物的搅动以约5rpm、约6rpm、约7rpm、约8rpm、约9rpm、约10rpm、约11rpm和约12rpm的旋转来实施。

[0035] 本发明又一个实施方案涉及方法,其中滚瓶型容器中的液流涉及无需旋转或滚动瓶子的滚动。在一个实施方案中,在没有使用滚动容器的情况下,滚动型运动被基本上重建。在一个实施方案中,例如,通过泵送或使流体以小或无湍流的有序方式平稳流动,赋予灵长类动物多能干细胞培养物流体运动。在这类实施方案中,任何子流通常以与相邻子流并行的方式流动。这种运动方式也被表征为层流(通常用于驱动粘性流体,尤其是那些以低流速流动的流体)或流线流(流体运动的稳定运动)。在又一个实施方案中,流体运动涉及一个或多个挡板,其分配腔室内的液流以产生连续的、均匀的细胞悬浮液。在又一个实施方案中,流体运动涉及导流板(deflector plate)、分配通道和/或流动通道之一或组合。在每个实施方案中,培养容器上包括至少一个或多个密封物(seal)以确保在细胞聚集、生长和分化期间容器内的无菌环境。

[0036] 本发明还涉及通过优化多能细胞培养物的细胞密度或改变多种生长因子的浓度来富集或改变得到的hES衍生细胞聚集悬浮液的细胞培养物和/或细胞群的方法,所述多种生长因子例如FGF10、EGF、KGF、头蛋白和视黄酸、凋亡抑制剂、Rho-激酶抑制剂等。

[0037] 据此,本申请还涉及以下方面或保护的主题。

[0038] 主题1.滚瓶,包含悬浮于生理上可接受的培养基中的灵长类动物多能干细胞

(pPSC)聚集体培养物。

[0039] 主题2.根据主题1所述的滚瓶,其中所述pPSC聚集体的直径为 约100-300微米。

[0040] 主题3.根据主题1所述的滚瓶,其中所述培养物中基本上无直径 大于300 μ m的pPSC块。

[0041] 主题4.根据主题1所述的滚瓶,其中所述pPSC聚集体表达至少 一种选自OCT4、NANOG、SSEA-3、SSEA-4、Tra-1-80和Tra-1-60的标志物。

[0042] 主题5.根据主题1所述的滚瓶,其中所述pPSC聚集体为人细胞。

[0043] 主题6.根据主题5所述的滚瓶,其中所述pPSC聚集体选自人胚 胎干细胞(hESC)和诱导的多能干细胞(iPSC)。

[0044] 主题7.根据主题1所述的滚瓶,其中所述灵长类动物多能干细胞 衍生的悬浮细胞聚集体通过包括以下的方法产生:

[0045] a.提供未分化的pPSC的培养物;

[0046] b.将所述未分化的pPSC接种到滚瓶的能支持所述pPSC的未分化生 长的培养基中;以及

[0047] c.低转速搅动所述pPSC以形成pPSC聚集体。

[0048] 主题8.根据主题7所述的滚瓶,其中所述pPSC聚集体的直径为 约100-300微米。

[0049] 主题9.根据主题7所述的滚瓶,其中所述培养物中基本上无直径 大于300微米的pPSC块。

[0050] 主题10.根据主题7所述的滚瓶,其中所述pPSC聚集体表达至少 一种选自OCT4、NANOG、SSEA-3、SSEA-4、Tra-1-80和Tra-1-60的标志物。

[0051] 主题11.根据主题7所述的滚瓶,其中所述pPSC聚集体为人细胞。

[0052] 主题12.根据主题11所述的滚瓶,其中所述pPSC聚集体选自人 胚胎干细胞(hESC)和诱导的多能干细胞(iPSC)。

[0053] 主题13.根据主题7所述的滚瓶,其中所述转速为约3至约20 rpm。

[0054] 主题14.根据主题7所述的滚瓶,其中所述转速为约5至约12 rpm。

[0055] 主题15.根据主题7所述的滚瓶,其中步骤a中的未分化的pPSC 培养物为单细胞pPSC的悬浮液。

[0056] 主题16.制备主题1所述的滚瓶的方法,所述方法包括:

[0057] a.提供未分化的pPSC的培养物;

[0058] b.将所述未分化的pPSC接种到滚瓶的能支持所述pPSC的未分化生 长的培养基中;以及

[0059] c.低转速搅动滚瓶中的单细胞悬浮液以形成pPSC细胞聚集体,

[0060] 从而制备包含悬浮于生理上可接受的培养基中的pPSC聚集体培养 物的滚瓶。

[0061] 主题17.根据主题16所述的方法,其中所述未分化的pPSC培养 物为单细胞pPSC的悬浮液。

[0062] 主题18.根据主题16所述的方法,其中所述未分化的pPSC培养 物为悬浮于培养基中的解冻pPSC的悬浮液。

[0063] 主题19.根据主题16所述的方法,其中所述转速为约3至约20 rpm。

[0064] 主题20.根据主题16所述的方法,其中所述转速为约5至约20 rpm。

- [0065] 主题21.根据主题16所述的方法,其中所述转速为约5至约12 rpm。
- [0066] 主题22.根据主题16所述的方法,其中所述pPSC为人细胞。
- [0067] 主题23.根据主题22所述的方法,其中所述pPSC选自hESC和 iPSC。
- [0068] 主题24.使滚瓶中的灵长类动物多能干细胞(pPSC)分化的方法,所述方法包括:
- [0069] a.提供未分化的pPSC的培养物;
- [0070] b.低转速搅动滚瓶的生理上可接受的培养基中的所述pPSC,以形成 pPSC聚集体,以及
- [0071] c.使滚瓶中的所述pPSC聚集体与能使所述pPSC分化形成分化的 细胞聚集体的培养基接触,
- [0072] 从而使滚瓶中的pPSC分化。
- [0073] 主题25.根据主题24所述的方法,其中所述pPSC在无饲养层、无基质和无贴壁生长培养物的环境中分化。
- [0074] 主题26.根据主题24所述的方法,其中所述转速为约3至约20 rpm。
- [0075] 主题27.根据主题24所述的方法,其中所述转速为约5至约20 rpm。
- [0076] 主题28.根据主题24所述的方法,其中所述转速为约5至约12 rpm。
- [0077] 主题29.根据主题24所述的方法,其中所述pPSC为人细胞。
- [0078] 主题30.根据主题29所述的方法,其中所述pPSC选自hESC和 iPSC。
- [0079] 附图简述
- [0080] 图1描绘了生长于限定条件(8ng/mL FGF2、100ng/mL LR-IGF1、1ng/mL活化素A)下的BG01v中的ADAM19、神经调节蛋白1和 ErbB1-3的实时RT-PCR表达分析。显示了GAPDH和OCT4对照反应。
- [0081] 图2描绘了利用AG879对BG01v细胞增殖的抑制。BG01v细胞 接种于6-孔盘中,并在平板接种后24小时暴露于DMSO (A)、50nM-20 μ M AG1478 (B) 或100mM-20 μ M AG879 (C)。培养5天后,将培养物 固定并进行碱性磷酸酶活性染色。AG1478在这些浓度(B中显示的20 μ M)下看起来不影响增殖,但AG879在5 μ M (C) 显著减慢细胞生长。
- [0082] 图3描绘了培养在DC-HAIF中和限定培养基(DC)中的BG01v细 胞的形态学,DC-HAIF是含有10ng/mL HRG- β 、10ng/mL活化素A、200ng/mL LR-IGF1和8ng/mL FGF2的限定培养基(A和B),限定培养基(DC)含有10ng/mL HRG- β 、10ng/mL活化素A和200ng/mL的 LR-IGF1 (C和D)。
- [0083] 图4描绘了ADAM19、神经调节蛋白1和ErbB1-4通过RT-PCR 在 小鼠ES细胞(A)和MEFs (B)中的表达。
- [0084] 图5描绘了ErbB1和ErbB2信号转导在小鼠ES细胞中的抑制。将 2×10^5 个小鼠R1ES细胞在10%FBS,10%KSR与1000U/mL小鼠 LIF (ESGRO) 中接种于1:1000MATRIGEL™上。第二天,DMSO(载体 对照)、1-50 μ M AG1478或1-50 μ M AG879随新鲜培养基加入。第8 天固定培养物,并进行碱性磷酸酶活性染色。DMSO (A) 和1-50 μ M AG1478 (B和C) 没有明显抑制增殖。AG879在50 μ M显著抑制细胞生 长(比较D和F),以及在20 μ M (E) 可能已减缓增殖。
- [0085] 图6描绘了生长在条件培养基(CM)中的BG02细胞增殖的抑制。(A) 50 μ M AG825抑制生长在CM中的BG02hESC的增殖。(B) AG825 抑制hESC中ErbB2Y1248磷酸化。(C) CyT49hESC在生长因子不同 组合中连续传代的集落计数。(D) 利用BG02细胞(左侧),IGF1和HRG 在

hESC增殖中的作用的细胞计数分析。(E)两次重复实验的OCT4/DAPI免疫染色表明,IGF1和HRG相比于ActA/FGF2条件显著增加OCT4⁺细胞的比例。(F)显示了无生长因子过夜、饥饿然后用DC-HAIF脉冲15分钟或者稳定状态培养物的BG01DC-HAIF hESC的RTK免疫印迹分析(左侧)。对标准化的相对强度的均值和范围作图(右侧)。

[0086] 图7描绘了生长于含有不同生长因子组合的限定条件中的小鼠ES细胞。(A)显示了 2×10^5 个细胞生长在不同的生长因子组合8天后AP⁺集落的得分。(B-G)显示了生长在不同生长因子组合的AP⁺集落的4x放大图像。

[0087] 图8描绘了维持在DC-HAIF培养基中的人ES细胞的特征。(A)来自BG02DC-HAIF p25细胞的畸胎瘤分析,证实了向外胚层、中胚层和内胚层的多能分化潜力。(B)培养于15%FCS/5%KSR的已分化的BG02细胞的免疫染色。(C)利用含有47296个转录探针的高密度Illumina Sentrix Human-6Expression Beadchips在BG02细胞中检测到的转录物分布的维恩图,BG02细胞维持在CM(64代)或DC-HAIF(在限定培养基中的10或32代)中。(D)证实BG02DC-HAIF p32细胞的转录图谱的散点图分析与维持在CM(上侧)中的BG02细胞的散点图高度相似,并且在DC-HAIF早期和后期传代培养物中没有显著变化(下侧)。(E)利用Beadstudio软件生成的在不同群中相对基因表达的分级群聚(Hierarchical clustering)系统树图。

[0088] 图9描绘了在DC-HAIF培养基中培养在人源化细胞外基质(ECMs)上的细胞的形态。(A)生长在生长因子简化的MATRIGELTM(以1:200稀释)上的CyT49细胞(以1:200稀释)。CyT49细胞还能够生长在包被有(B)全人血清、(C)人纤连蛋白和(D)VITROGROTM的组织培养皿中。

[0089] 图10描绘了人ES细胞的单细胞传代。(A-D)用ACCUTASETM传代并以约 5×10^5 细胞接种于60mm培养皿后,BG02细胞的分期成像。(A)初次平板接种后1.5小时,显示粘附于培养皿的活细胞。(B)在平板接种后20小时,大多数细胞聚集形成小集落。这些集落到平板接种后第4天通过增殖扩增(C),以及5-6天的过程形成覆盖整个培养皿的上皮样单层(D)。(E)在DC-HAIF中用ACCUTASETM传代19次的BG02培养物显示的正常雄性核型。

[0090] 图11描绘了利用(A)ACCUTASETM、(B)0.25%胰酶/EDTA、(C)TrypLE或(D)维尔烯(Versene)的人ES细胞的单细胞传代后的细胞形态。

[0091] 图12描绘了培养在DC-HAIF中的人ES细胞的大规模生长。(A)扩增至>1010细胞后的BG02细胞的流式细胞术分析。>85%的细胞表达OCT4、CD9、SSEA-4、TRA-1-81。(B)多能性OCT4、NANOG、REX1、SOX2、UTF1、CRIP1、FOXD3、TERT和DPPA5的标志物表达的RT-PCR分析。没有检测到分化的谱系的标志物 α -甲胎蛋白(AFP)、MSX1和HAND1。(C)利用人染色体特异性重复的荧光原位杂交(FISH)证实了hChr 12、17、X和Y正常拷贝数的维持。

[0092] 图13描绘了生长在包含HRG-和IGF1但缺乏FGF2的限定培养基中达7代或者大于2个月的hESC BG02细胞的形态(A)和正常核型(B)。

[0093] 图14描绘了来自维持在DC-HAIF(32代)或DC-HAI(10代)中的hESC(BG02)的转录物的散点图分析。在两种样品中都检测到了大比例的表达的转录物,转录并没有通过在缺乏外源性FGF2下培养hESC而显著改变。利用所有表达水平>0的检测到的转录物(所有点),或者利用显示检测置信度水平>0.99(R2选择,由虚椭圆形显示的点)的转录物生成相关系数(R2)。成角度的线显示了2-倍差异的均值和极限。

[0094] 图15描绘了在不同群的维持在DC-HAIF中的早代和晚代BG02 细胞中的相对基因表达的分级群聚系统树图。细胞紧密聚集(~ 0.0075), 并与维持在条件培养基(CM) (~ 0.037) 的BG02和BG03细胞保持接近 相似。维持在DC-HAI中的BG02细胞还与其他检测的hESC群紧密 聚集。作为图15的解释,CM是条件培养基;DC是限定培养基,DC-HAIF如上文定义;ap是ACCUTASE™单细胞传代;DC-HAI与本文定义的DC-HAIF相同,除了没有FGF2外。

[0095] 图16描绘了培养在96孔和384孔板中的DC-HAIF中的BG02细 胞的形态和碱性磷酸酶染色。生长在96孔板的一孔中的BG02细胞 (104细胞/孔) 的(A) 相衬成像(phase contrast imaging) 和(B) 碱性磷酸酶 染色。生长在384孔板的一孔中的BG02细胞 (103细胞/孔) 的(C) 相衬 成像和(D) 碱性磷酸酶染色。

[0096] 图17描绘了生长于DC-HAIF悬浮培养中的BG02的暗场图像。显示了第2天和第6天的培养物。利用4x放大捕获图像。

[0097] 图18描绘了在DC-HAIF中的贴壁和悬浮培养物的生长率。将 1×10^6 BG02细胞接种于贴壁和悬浮培养的平行孔中,在第1-6天进行 细胞计数。

[0098] 图19描绘了悬浮和贴壁hESC的qPCR分析。悬浮(S.hESC) 和贴 壁(hESC) 培养生长的BG02细胞显示了可比较水平的OCT4,并且缺 乏SOX17表达。分化为定形内胚层(DE)的贴壁细胞以及分化为悬浮 的定形内胚层(S.DE d3)的悬浮hESC两者均展示了预期的OCT4的显著下调和SOX17表达的上调。

[0099] 图20描绘了在Y27632存在下、在悬浮培养中hESC聚集的增强。将 2×10^6 个BG02细胞在6孔托盘中接种在3mL DC-HAIF或DC-HAIF +Y27632中,托盘置于在100rpm旋转平台上的孵育器内。在第1和 第3天捕获聚集体的图像。

[0100] 图21描绘了悬浮聚集体在Y27632存在下的RT-PCR分析。对扩 增的培养物实施RT-PCR以评价多能性标志物的表达。检测到OCT4、NANOG、REX1、SOX2、UTF1、CRIPTO、FOXD3、TERT和DPPA5 的表达,而分化的谱系AFP、MSX1和HAND1的标志物没有检测到。

[0101] 图22A-P是条形图,显示了标志物基因OCT4(图面A)、BRACH (图面B)、SOX17(图面C)、FOXA2或HNF3 β (图面D)、HNF1 β (图面 E)、PDX1(图面F)、NKX6.1(图面G)、NKX2.2(图面H)、INS(图面 I)、GCG(图面J)、SST(图面K)、SOX7(图面L)、ZIC1(图面M)、AFP(图面N)、HNF4A(图面O)和PTF1A(图面P)的表达模式,这不 是穷尽的列举,仅是可以用于鉴定多能人胚胎干(hES)细胞(阶段0,d0 (0天))、定形内胚层细胞(阶段1;d2(第2天))、PDX1-阴性前肠内胚层细胞(阶段2;d5)、PDX1-阳性内胚层细胞(阶段3,d8)、胰腺内胚层 细胞(阶段4;d11)、胰腺内分泌前体细胞和/或激素分泌细胞(阶段5; d15)的标志物。

[0102] 图23为显示细胞悬浮聚集体相对于培养时培养基总体积(mL) 的 直径范围(微米)的图。

[0103] 图24A-D是条形图,显示了hES衍生细胞中的标志物基因PDX1 (图面A)、NKX6.1(图面B)、NGN3(图面C)和NKX2.2(图面D)的表 达模式,该表达模式与衍生它们的hES细胞培养物的细胞密度有关。

[0104] 图25显示了多能细胞的细胞聚集体在第0天(d0)时和分化细胞聚 集体在第2天、第5天、第8天和第12天(分别为d2、d5、d8和d12) 时的直径。对细胞聚集体大小进行了测量并绘图,显示了最小值、最 大值、第二和第三四分位数以及中值。在每一天都显示了由 1×10^6 细 胞/mL(左边)和 2×10^6 细胞/mL(右边)形成的细胞聚集体的图。

[0105] 图26A-D是条形图,显示了滚瓶式容器中多种指出的标志物基因的表达模式。每张图的左边样品表示6孔盘中形成的第0天(d0)细胞聚集体(多能细胞标志物对照)。由棒标示的样品表示(从左至右):第0天时的未分化的聚集体以及第2天、第5天、第8天和第12天时的分化聚集体。黑线, 1×10^6 细胞/mL的滚瓶;黑色虚线, 2×10^6 细胞/mL密度的滚瓶;灰线,6孔盘。

[0106] 图27A-D是条形图,显示了如实施例27的表11和表12中所述的较大滚瓶式容器中的多种指出的标志物基因的表达模式。左边样品表示6孔盘hESC聚集和分化(对照;图27A);显示了第0天、第2天、第5天、第8天和第12天时透气(V)或不透气的(NV) 490cm^2 滚瓶(约1.2L容积)中的分化。由于培养物损失,没有收集最后的490V样品的第2天的样品(最右栏)。每个滚瓶分化都使用了相同的d0对照(标有星号)。

[0107] 发明详述

[0108] 与先前已知的基于将单独的细胞接种在多聚物支架、基质和/或凝胶的组织工程学方法相比,本文描述的方法使用从多能hES单细胞悬浮液或hES衍生的(分化的)单细胞悬浮液形成的细胞聚集体悬浮液作为组织形成的基础材料。细胞聚集体经常包含成百上千个单独的细胞,其通过共同促成最终分化产物的连接粘附和细胞外基质而连接。在这方面,细胞聚集体可以定义为,相对于更传统的工程化组织提供了许多性能优势的一种组织类型。

[0109] 在本发明的一个实施方案中,提供了用于从多能干细胞培养物或hES衍生细胞培养物的单细胞悬浮液产生hES聚集体悬浮液的方法。多能干细胞可以最初培养在成纤维细胞饲养层上,或者它们可以是无饲养层的。解离hESC以及在人饲养层细胞上培养hESC的方法描述于题目为“METHODS FOR THE CULTURE OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS ON HUMAN FEEDER CELLS(在人饲养层细胞上培养人胚胎干细胞的方法)”的美国第7,432,104号专利中,该专利通过引用的方式以其整体并入本文。直接制备的或从培养于饲养层上的hESC启动的多能ES细胞聚集体悬浮培养物避免了对制备hESC单层的需求,例如,如在贴壁培养物中。这些方法详细描述于实施例17和18中。

[0110] 本发明的其他实施方案提供了直接在分化培养基内产生细胞聚集体悬浮液的方法,分化培养基例如含有试剂的分化培养基,所述试剂优选TGF β 家族成员,其能够活化TGF β 受体家族。这种试剂包括但不限于活化素(Activin)A、活化素B、GDF-8、GDF-11和Nodal。在分化培养基中产生细胞聚集体悬浮液的方法不同于本文描述的其他方法,其提供了在多能干细胞培养基,例如StemPro中产生细胞聚集体悬浮培养物。

[0111] 本发明的其他实施方案提供了产生细胞聚集体悬浮液的方法,该悬浮液从分化的hES细胞培养物(也被称为“hES衍生的细胞培养物”或“hES衍生的细胞”)形成,例如,在前面D'Amour et al.2005,(同上)和D'Amour et al.2006(Nature Biotech 26 2006:1392-1401)中描述的来自阶段1、2、3、4和5的细胞。因此,制备本文描述的细胞聚集体的方法并不限于hES或hES衍生细胞的任一多能或专能阶段,而是使用方式和对细胞类型优化的需要会决定哪种方法是优选的。这些方法详细描述于实施例19-22中。

[0112] 在本发明的另一实施方案中,提供了用于调控得到的细胞组合物方法,如通过改变不同生长因子的浓度,调控胰腺内胚层细胞、胰腺内分泌细胞和/或PDX1-内胚层细胞的比例。这些方法详细描述于实施例21中。

[0113] 除非另外指出,本文使用的术语应该按照本领域技术人员的常规用法来理解。除了以下提供的术语的定义,分子生物学中的常用术语的定义还可以在Rieger et al., 1991Glossary of genetics: classical and molecular, 5th Ed., Berlin: Springer-Verlag; 以及在Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., Eds., Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. 和 John Wiley & Sons, Inc. 间的联合企业 (1998 Supplement) 中找到。应理解,如本说明书和权利要求书中所用的,“a(一个)”或“an(一个)”可以意指一个或多个,取决于它使用的语境。因此,例如,提及“细胞(cell)”可以指可以利用至少一个细胞。

[0114] 此外,出于本说明书和随附的权利要求书的目的,除非另外指明,本说明书和权利要求书使用的所有表示成分的量、材料的百分比或比例、反应条件的数字以及其他数值都应该理解为在所有情形下通过术语“约”可被改变。因此,除非被相反地指出,以下说明书和所附的权利要求书列出的数值参数是近似值,可以根据本发明寻求的期望特性而变化。至少,不是试图将等同值教义的应用局限于权利要求书的范围,每一数值参数应该至少结合报道的有意义的位数以及通过应用平常的四舍五入技术来理解。

[0115] 如本文所用,“约”是指一个作为“约”提及的数字包括所列举的数字加上或减去所列举数字的1-10%。例如,“约”100个细胞根据情况可指95-105个细胞或少至99-101个细胞。无论本文中何时出现,数值范围如“1-20”是指在该给定范围内的每个整数;例如,“1-20个细胞”是指1个细胞、2个细胞、3个细胞等直至并包括20个细胞。当“约”修饰一个用非整数表示的范围时,其指所列举的数字加上或减去所表示的相同程度的有效数字的1-10%。例如,约1.50-2.50mM可指少至1.35mM或多至2.75mM或在0.01增量之间的任何量。

[0116] 本发明提供了用于从hES衍生的单细胞悬浮液产生hES衍生细胞聚集体的方法。因为多种机械和非生理因素影响培养的细胞的运动和聚集,流体机械微环境与最佳的细胞聚集活力和性能相关,以及提供可以用于扩大的标准化变量,需要表征在多种培养容器、平皿、锥形瓶、生物反应器、瓶子等中生长或分化的细胞的运动,以及表征多种培养基条件对细胞的影响,如果有的话。这些因素中的一些包括但不限于剪切速率和剪切应力、细胞密度和多种生长因子在任一细胞培养基中的浓度。

[0117] 剪切速率和剪切应力是定义系统内流体剪切的机械特征。剪切速率被定义为给定距离内流体的速率,并被表示为 sec^{-1} 。剪切速率与剪切应力成比例,其中剪切速率(γ) = 剪切应力(τ) / 粘度(μ)。剪切应力被定义为切向作用于细胞表面的流体剪切力,并被表示为每单位面积的力(达因/ cm^2 或 N/m^2)。能够通过搅动的液体流过静态细胞、搅动的细胞流经静态液体或者通过细胞移入搅动的、动态的流体环境来产生剪切应力。流体粘度通常以泊(poise)测量,其中1泊=1达因 sec/cm^2 =100厘泊(cp)。水是已知的粘性最小的流体之一,其粘度为0.01cp。培养基中的真核细胞典型悬浮液的粘度在25℃温度下为1.0至1.1cp。密度和温度都能影响流体的粘度。

[0118] 流体速率还决定流动是否是层流或湍流。当粘滞力占优势时,发生层流,其特征为平滑的,在低粘度时甚至成流线型。相反,在湍流时高速率和惯性力占优势,湍流的特征为在跨越时空的流动中出现涡流、漩涡和混乱的波动。称为雷诺数(Reynold's number)(Re)的无量纲值通常用于定量层流或湍流的存在。雷诺数是惯性力与粘性力的比率,并被定量为(密度*粘度*长度值)/(粘度)。Re<2300时层流占优势,而当Re>4000时,湍流占优

势。基于与流体速率的这种关系,雷诺数以 及由此流体流动是层流或湍流的程度与悬浮液中细胞经历的剪切速率 和剪切应力成正比例。然而,能够在层流和湍流环境中都产生高剪切 应力条件。最初,液体倾向于抵制运动,最接近固体表面的流体经历 了吸引力,该吸引力在直接邻近表面产生了无流动的边界层或区。这 产生了从表面到流体流中心的流体速率梯度。速率梯度的陡度是液体 移动的速度和边界层到最高流体速率区的距离的函数。当经过容器或 容器周围的液体流动率增加时,流动的速率克服了液体的粘度,并且 平滑、层式梯度破坏,产生了湍流。Thomas等证明,湍流条件下的细 胞裂解最经常发生在局部高剪切应力和高能量损耗率的区域。参见, Thomas et al. (1994) Cytotechnology 15:329-335。这些区域随机出现, 但经常发现于速率梯度最高的边界层。这些流体速率随机的波动能够 产生非常高的剪切应力区域,其最终能够对基于细胞培养的生产系统 的扩大具有负面影响。因此,需要能够通过调控在哺乳动物细胞培养 生产扩大系统中的剪切力的主要来源来维持这种系统中细胞密度和活 力的方法。

[0119] 按照Henzler (Henzler,2000,Particle stress in bioreactors,In Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology,Scheper,T.Ed. Springer-Verlag, Berlin) 和Colomer et al. (Colomer,J.et al.2005. Experimental analysis of coagulation of particles under low-shear flow. Water Res.39:2994) 提供的方法, 计算了旋转6孔平皿中大体积流体的 流体机械特性。无因次应力(Dimensionless Stress) 等于湍流常数*(聚集 体直径/Kolmogorov's Microscale)^{湍流指数}。剪切应力等于无因次应 力*流体密度*(运动粘度*功率输入)^{0.5}。剪切速率等于剪切应力/运动 粘度。为了 功率输入和Kolmogorov's Microscale的计算,需要每一旋 转率下的雷诺数,其等于(旋转 率*瓶径)²/粘度。因为功率输入和 Kolmogorov's Microscale都是雷诺数的函数,所有剪 切应力和剪切速 率计算随旋转率变化。

[0120] 而且,剪切应力和剪切速率是无因次应力的函数,其取决于形成 的聚集体的直 径,因此预期聚集体经历的剪切应力和剪切速率随着旋 转时间增加。对于100-200 μ m的聚 集体直径,以及60-140rpm的旋转 速度,实施例17显示了实例计算。这些方法用于提供大体 积流体随时 间的平均剪切的估值。然而,预期血管壁的剪切应力由于边界效应会 是最高 的。为了评估壁剪切应力,Ley等提出6孔平皿中的壁剪切应 力等于旋转半径*(密度*动态 粘度*(2*pi*旋转率)³)^{0.5}。利用这种方 法,计算旋转速度为60rpm至140rpm的壁剪切应 力,并显示在实施 例18中。注意,与大体积流体中的聚集体经历的时均剪切应力不同,发 生在壁的剪切应力独立于聚集体直径。

[0121] 培养细胞密度对于组织功能也是关键的因素,并且在传统的2-维 组织(例如,粘 附的工程构建体)中难于实现和/或优化。实施例20更为 详细地描述了细胞密度对分化的 影响。细胞聚集体通过呈现更准确地 反映体内细胞密度和构象的有组织的3维(3D)架构可 以克服这一局限 性。因此,细胞实现它们预期结构的时间周期可以显著减少和/或变得 更为 一致和有效。而且,3D聚集体形式的细胞可以分化以及更好地发 挥作用,因为该架构比 贴壁培养更类似于正常的生理。此外,与该生 产过程有关的机械困难与例如贴壁培养中的 机械困难相比较不易破坏 悬浮培养物中自由浮动的细胞聚集体。

[0122] 典型生产规模的悬浮培养还利用培养基的连续灌注作为维持细胞 活力同时最大 化细胞密度的方法。因此,培养基更换提供给培养物流 体剪切,其对贴壁细胞和悬浮的聚

集体的影响不同。当培养基切线流过细胞表面时,固定的贴壁细胞经受流体剪切应力。与之相比,悬浮的聚集体在聚集体表面经历显著减小的剪切应力,因为聚集体自由滚动以响应施加的剪切力。预期延长的剪切应力对粘附的ES细胞是有害的,悬浮的聚集体形式对于最佳的存活和功能是优选的。因此,基于对产生多能干细胞和/或衍生自多能干细胞的专能祖细胞的有效生产过程的需要,以及上述观测到的有关剪切速率和剪切应力的力学,本发明第一次提供了用于产生悬浮形式的、特别是细胞聚集体悬浮形式的多能干细胞和/或多能干细胞衍生的专能祖细胞的生产方法。

[0123] 如本文所用的,“单细胞悬浮液”或其等同物指通过任一机械的或化学手段的hES单细胞悬浮液或hES衍生的单细胞悬浮液。存在几种用于解离细胞簇以从原代组织、粘附的培养细胞和聚集体形成单细胞悬浮液的方法,例如物理力(机械解离,诸如细胞刮擦器、通过针孔移液管研磨、细针穿刺、涡旋解聚和通过精细尼龙和不锈钢网筛的强制过滤)、酶(酶促解离诸如胰蛋白酶、胶原酶、蕲蛇酶(Acutase)等)或者两者的组合。此外,能够支持hESC的单细胞解离的方法和培养基用于扩增、细胞分选和多孔板测定的限定接种,以及能够使培养程序和克隆扩增自动化。因此,本发明的一个实施方案提供了用于生成稳定的单细胞酶促解离hES或hES衍生细胞培养系统的方法,所述hES或hES衍生细胞培养系统能够支持未分化的多能hES或分化的hESC的长期维持和有效扩增。

[0124] 如本文所用,“滚瓶(roller bottle/rolling bottle)”或其等同物是指适于围绕其轴线旋转的圆柱形容器。这些容器包括但不限于,通过Corning、Fisher Scientific和其他生产商销售的滚瓶,以及例如能够在其侧壁上旋转的鼓形、桶形和其他瓶形容器。本文所述的滚瓶不必一定是圆柱形或具有圆形横截面。例如它们可为宽度恒定的非圆形封闭曲线。在一个实施方案中,所述曲线可为鲁洛三角形或具有圆形角的鲁洛三角形,如美国专利第5,866,419号所述,其通过引用全部并入本文。圆形横截面的滚瓶并非是提供平稳旋转的唯一形状或几何体,因为存在无数种这类曲线,它们均在本发明考虑的范围。然而,工业上并不经常遇到这类曲线,因为用于旋转瓶子的大部分机器要求垂直于该曲线运行的水平轴保持在固定位置,其不用于非圆形旋转器因旋转时其轴有前后转换运动。相比圆形横截面型滚瓶,除了如其他圆柱形滚瓶通常的圆形运动,该额外的运动或旋转可增强气体交换。

[0125] 典型的圆柱形滚瓶包括底壁、顶壁和在底壁与顶壁之间延伸的圆柱形侧壁。顶壁包括开口以提供进入该滚瓶内部的入口。此类滚瓶的内表面提供了用于细胞相互作用和/或贴附的活性表面。因此,牛津生化词典提供的解释是,滚瓶为用于培养单层贴壁细胞的圆柱形容器。的确,滚瓶适于大量细胞如贴壁细胞的生长,或适于生产细胞副产品如细胞分泌的药用物质。滚瓶的圆柱形侧壁可为平滑的或定制图案的,而图案基本上从底壁延伸至顶壁以增加细胞生长的表面积,并且当瓶子围绕侧壁的轴转动时有助于液体流至瓶子的所有内表面。

[0126] 无论滚瓶的横截面为何(圆形或非圆形的),都将液体生长培养基引入并容纳于滚瓶中。瓶子的旋转运动使得内表面被液体培养基润湿,从而促进细胞的生长。使用合适设备的旋转仪来旋转本发明的滚瓶。

[0127] 通常将滚瓶构造为玻璃的、不锈钢的或透明塑料的如聚苯乙烯、聚氨酯、聚氯乙烯、聚碳酸酯、聚烯烃如聚丙烯、具有乙二醇添加剂的聚对苯二甲酸乙二醇酯、乙二醇-1,4-

环己烷二甲醇对苯二酸共聚酯等。优选透明材料,因为能够通过将瓶子置于倒置显微镜下监控细胞生长。

[0128] 在医药、生化和医学邻域用于一些处理过程(如细胞生长和感染、异源糖蛋白生产、疫苗制备和高密度植物细胞培养)的人工和自动化滚瓶系统已经应用了40多年。参见 Tanaka et al.1983,Biotechnol.Bioeng. 25:2359;Tanaka 1987,Process Biochem.Aug.,106;Hong,et al.1989, Biotechnol.Prog.5:137;Elliot 1990, Bioprocess Tech.10:207;Tsao 1992, Annals N.Y.Acad.Sci.665:127;Pennell& Milstein 1992,J.of Immun. Meth.146:43;Olivas et al.,1995,Immun.Meth.182,73 (1995);Singhvi et al.1996,Cytotechnology 22:79;以及Kunitake et al.1997, Biotechnology 52:3289,其通过引用全部并入本文。此外,对于工业规模生产细胞培养产物(即疫苗),即使当使用基于单元操作的系统时,在将细胞转移至用于最终生长期的微载体培养之前,滚瓶中的细胞被频繁传代。参见Edy,1984,Adv.Exp.Med.Biol.172:169,其通过引用全部并入本文。

[0129] 到目前为止,滚瓶广泛用于培养贴壁细胞可归因于几个因素。该方法基于:(i)水平的圆柱形容器装有足够体积的培养基或流体且轴向地旋转;由于滚瓶的扩大是长度的函数,无需扩大研发或发明,这导致缩短了工业化的研发时间线并较快地将新产品推向市场;(ii)滚瓶系统使得能有恒定的流体-气体接触,即由于轴向的旋转,任何时候均有至少一薄层的流体或培养基随着旋转而覆盖瓶子的内表面;该层允许增加流体-气体交换,并且随着瓶子旋转气体返回位于滚瓶底部的培养基池中的细胞;(iii)在大规模培养中维持无菌条件持续延长的时间是可能的,因为一个或多个滚瓶的污染不会导致整个批次的污染;(iv)精确控制营养物和废物产物水平是可能的;以及(v)直接监测细胞是相对简单的,例如,确定某些细胞标志物以确保例如在1-4阶段后细胞的有效分化和适当的特化。

[0130] 然而不想局限于使用滚瓶或滚子式容器培养三维细胞聚集体,意图还有其它用于制备本发明细胞聚集体的手段,但不使用通过滚瓶或在例如鼓上旋转的圆柱形容器产生的运动。用于聚集pPSC的运动类型通常可通过例如雾化容器或腔室以产生更多的层流来产生。该运动也可通过具有一个入口和出口来产生,以帮助流体培养基或甚至细胞本身的流入和流出,并产生类似于本文描述的滚瓶所实现的运动。该运动还可通过使用一个或多个流量分配器或其组合来实现。例如,这样的流量分配器可包括挡板以在所述腔室内分配流体或培养基的流动,从而产生三维细胞聚集体的连续均匀的混合物。在另一个实例中,流量分配器可为一个或多个导流板、分配通道和/或流动通道的组合,其产生类似于滚瓶中所见的流体运动而不必发生于滚瓶型圆柱形容器或腔室中。因此,以无湍流方式产生流体运动的替代性手段,也产生足够低的剪切力以促进细胞碰触,并使得细胞能彼此粘附而形成本文所述的细胞聚集体。

[0131] 滚瓶中生长的粘附或贴壁细胞的某些特性也具有缺点。例如,自然的贴壁细胞生长需要大量表面积供细胞贴附,而滚瓶可用于生长的表面积有限。为所有目的,例如细胞种植或接种、细胞生长和/或病毒繁殖和扩增,在滚瓶中进行混合的常规方法是以均匀的速率朝一个方向旋转。大多数用于培养粘附或贴壁细胞的滚瓶处理过程的标准旋转频率为约0.125-5rpm。对于这些培养,重要的是所述细胞尽快与滚瓶的侧面接触,因为只有附着于容器壁后细胞随后才能增殖并形成细胞片层。细胞缓慢附着于容器内壁导致细胞低

活力和/或种植不均,因而 导致在滚瓶的表面的不均匀生长。而且,低效的混合限制了细胞的 生长,因为细胞无法随着瓶子旋转而获得充足的养分(例如,氧气)或 从浸没的表面贴附的细胞片层中充分移除毒素(例如,二氧化碳)。令 人感兴趣的是,这些缺点对于使用滚瓶来聚集、生长、扩增和分化可 分化的悬浮多能细胞并不关键。

[0132] 鉴于上述特性以及申请人自己公开的用于在6-孔盘等当中制备 hES细胞聚集体的方法,本领域技术人员还不会转而使用滚瓶来制备 多能干细胞聚集体。参见Schulz et al.2012,Stem Cells 7:1-17,e37004 以及美国专利第8,153,429号和第8,008,075号,其通过引用全部并入 本文。例如,Schulz et al.2012,(同上),教导了通过使用圆形或径向运动、移动或旋转,多能干细胞可有效地聚集,所述圆形或径向运动、移动或旋转被施加于主涡流上,并基于旋转形式将细胞拖入培养容器 中心更高的局部密度处,例如将细胞拖入6-孔盘的孔的中心或锥形瓶 中心或生物反应器中心。该径向涡流在滚瓶中无法实现,因为其性质,滚瓶以其侧壁而非底座旋转,因此,将方法从包括中心涡流运动的系 统转变至不包括中心涡流运动的系统如本文所述的滚瓶,这并不直观。

[0133] 申请人使用其他类型运动研究了静态培养,包括研究摇晃、搅拌 和离心hES细胞,而这些运动形式无法形成hES细胞聚集体或可分化 的细胞聚集体。而且,确实这些条件下形成的这些hES或hES细胞 -衍生的聚集体无法在体内产生功能性的葡萄糖响应的细胞类型,这为 任何成功生产PEC的方法的最终检测。参见至少Kroon et al.2008,(同 上)和Schulz et al.(2012),(同上)。因此,不能够说仅运动或移动就足 以形成多能干细胞或hES细胞悬浮聚集体或可分化的细胞聚集体,因 为并非如此。这些研究(数据未显示)表明,不仅仅是流体运动和该运 动产生的力促进了细胞聚集体形成所需的粘附接触,其导致单细胞多 能干细胞转变为稳定的细胞-细胞聚集体。

[0134] 如上所简述,滚瓶的旋转与6-孔盘、锥形瓶等围绕中心涡流发生 的旋转极为不同。在滚瓶中,当瓶子以其侧壁旋转时大多数培养物体 积保留在瓶底,且随着瓶子旋转一薄层流体或培养基覆盖于瓶子的内 表面。该薄的流体层随瓶子的旋转而增加了气体交换,从而全面增加 了培养基的氧气水平;即一旦该薄层培养基返回大多数培养基所在的 瓶底,其携带了增加量的氧气。然而并不直观的是该运动,尤其是当 以本领域标准的用于粘附细胞的很低的速度(例如,0.125-5rpm)旋转 时,将允许充足的细胞-细胞接触或碰触,同时维持足以使得灵长类动 物多能干细胞(pPSC)聚集体形成(更不用说可分化细胞聚集体的分化) 的低剪切力。

[0135] 由于两种方式之间的转速不同,使用滚瓶来聚集、培养、传代、扩增和分化细胞也与6-孔盘、锥形瓶、生物反应器不同。6-孔盘、锥 形瓶、生物反应器等例如使用约80、85、90、95、100、105、110、115 和120rpm的更高转速,这是至少为了在培养中防止细胞聚集体结块 或形成簇或更大的细胞团块所要求的。注意,结块的细胞簇(例如,300 μm 或更大的大聚集体)不应该与大体上为球形、尺寸更小(约100-200 μm)且均匀的细胞聚集体混同。相反,滚瓶中pPSC的聚集、生长、传 代、扩增和分化是在约3、4、5、6、7、8、9和10rpm的相对低的转 速下进行的。这些较低的转速并不产生与6-孔盘、锥形瓶、生物反应 器等当中发生的相同程度的剪切力,且鉴于申请人此前的经验(参见 Schulz et al.2012,同上),预期在这些条件下会成功形成细胞聚集体。

[0136] 使用滚瓶进行多能干细胞聚集、培养、传代、扩增和分化相比其 他细胞培养容器

的优点为,一旦在最小的滚瓶中得到优化,其方法将与在更大的滚瓶中非常相似地起作用而无需其他实质性发明。例如,通过使用具有相同标准横截面但实质上更大容积的更长瓶子,或使用成组的瓶子,用同样的瓶子直径、直径/体积比率和旋转速度可以按比例扩大总培养物质。滚瓶长度(按比例)的增加并不影响细胞聚集或分化过程。因此,按比例扩大细胞处理过程或生产,从490cm²滚瓶(直径11.12cm;长17.30cm,包括盖)至850cm²滚瓶(直径11.63cm;长27.36cm,包括盖)至1750cm²滚瓶(直径11.73cm;长53.16cm,包括盖)或更大,除了本文的描述并不涉及实质上或大的修改。

[0137] 由于至少以上理由,滚瓶中细胞生产的可扩大性,不同于在6-孔盘、锥形瓶、生物反应器等旋转平台系统。例如,为了获得1x 10⁶细胞/mL的1L多能干细胞培养物,需要约30个6-孔盘。用另一种方式表述,不是使用80个6-孔盘(共480个孔),本领域技术人员仅需要4,850cm²的滚瓶。本领域技术人员应理解,滚瓶需要更少的操作和劳动是生产的改善。此外,当在不同规模下使用旋转平台时,为了实现聚集必须调整容积、速度和旋转半径。例如,在锥形瓶中可实现灵长类动物PSC聚集,但在约150rpm的相对高的转速下发生得最好,这会引起太多湍流和剪切力而导致细胞死亡增加(数据未显示)。仅将瓶子或罐置于摇动的平台不产生本文描述的细胞悬浮聚集体(数据未显示)。摇动没有产生合适的流体运动来支持恰当的细胞-细胞接触和粘附,且可能产生了太多湍流和剪切力而导致细胞死亡增加。类似地,方形瓶和15cm玻璃罐由于类似原因而不是按比例扩大pPSC聚集体形成的合适培养容器(数据未显示)。而且,仅细胞-细胞接触不会导致pPSC聚集体形成,因为当将hES细胞的单细胞悬浮液离心后回收细胞团时,没有观察到细胞聚集体(数据未显示)。因此,发现真正具有可支持高效和一致的细胞聚集(包括一致的聚集体直径)的合适流体运动的可扩大系统并非显然或常规的,其困难明显超过本领域技术人员的期望或预期。事实上,出人意料的是,常规用于大规模培养粘附和贴壁细胞类型的滚瓶,配合速度高达30倍的降低,就将提供生产本文所描述的pPSC聚集体和分化的合适条件。

[0138] 如本文所用的,术语“接触”(即,使细胞,例如可分化的细胞与化合物接触)意在包括在体外共同孵育化合物和细胞(例如,将化合物添加至培养的细胞)。术语“接触”并不意在包括细胞向限定的细胞培养基的体内暴露,所述限定的细胞培养基包含ErbB3配体,以及任选地TGF-β家族的成员,这可以在个体内天然发生(即,暴露可以作为天然生理过程的结果发生)。使细胞与包含ErbB3配体以及任选的TGF-β家族成员的限定的细胞培养基接触的步骤可以以任何合适的方式进行。例如,可以在贴壁培养或在悬浮培养中处理细胞。应当理解,与限定培养基接触的细胞还可以用细胞分化环境进一步处理以稳定细胞或分化细胞。

[0139] 如本文所用的,术语“分化”指比其来源的细胞类型更为分化的细胞类型的产生。因此该术语包括部分分化和终末分化的细胞类型。衍生自hESC的分化的细胞通常称为hES衍生细胞,或hES衍生细胞聚集体培养物,或hES衍生的单细胞悬浮液,或hES衍生细胞贴壁培养物等。

[0140] 如本文所用的,术语“基本上(substantially)”指大范围或程度,例如,上下文中的“基本上相似”用于描述一种方法与另一种方法大范围或程度相似或不同。然而,如本文所用的,术语“基本上无”,例如“基本上无”或“基本上无污染物”,或者“基本上无血清”或“基本上无胰岛素或胰岛素样生长因子”或其等同物,意指溶液、培养基、补加剂、赋形剂

等至少98%、或至少98.5%、或至少99%、或至少99.5%、或至少100%无血清、污染物或其等同物。在一个实施方案中,提供了不含血清,或者100%无血清的,或者基本上无血清的限定培养基。相反,如本文所用的,术语“基本上相似的”或其等同物意指组合物、处理过程、方法、溶液、培养基、补加剂、赋形剂等与在本文说明书先前描述的或在以其整体并入本文的以前描述的处理过程或方法中的那些有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%相似。

[0141] 在本发明的某些实施方案中,术语“富集的”指包含超过约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的期望的细胞谱系的细胞培养物。

[0142] 如本文所用的,术语化合物的“有效量”或其等同物指化合物的浓度在限定培养基的其余组分存在下足以使培养物中的可分化细胞在缺乏饲养层细胞以及缺乏血清或血清替代物的情况下稳定超过一个月。本领域技术人员可以容易地确定该浓度。

[0143] 如本文所用的,术语“表达”指细胞中多核苷酸的转录或多肽的翻译,使得该分子在表达该分子的细胞中的水平比在不表达该分子的细胞的水平显著地高。测量分子表达的方法是本领域技术人员公知的,以及包括但不限于Northern印迹(RNA印迹)、RT-PCR、原位杂交、Western印迹(蛋白质印迹)和免疫染色。

[0144] 如本文所用的,当指细胞、细胞系、细胞培养物或细胞群时,术语“分离的”指基本上与细胞的天然来源分开,使得细胞、细胞系、细胞培养物或细胞群能够在体外培养。此外,术语“分离”用于指从两种或更多种细胞组中物理选择一种或多种细胞,其中基于细胞形态和/或不同标志物的表达来选择细胞。

[0145] 通过参考以下本发明优选实施方案的详细描述和其中包括的实施例,可以更容易地理解本发明。然而,应理解,在本发明的组合物和方法被公开和描述前,本发明并不局限于特定的核酸、特定的多肽、特定的细胞类型、特定的宿主细胞、特定的条件或特定的方法等,因为,这些当然可以变化,并且其中众多的改进和变型对本领域技术人员是显而易见的。

[0146] 用于克隆、DNA分离、扩增和纯化、用于涉及DNA连接酶、DNA聚合酶、限制性内切核酸酶等的酶反应的标准技术以及多种分离技术是本领域技术人员已知和经常应用的。大量标准技术描述于Sambrook et al.,1989“Molecular Cloning”(分子克隆),第二版,Cold Spring Harbor Laboratory,Plainview,New York;Maniatis et al.,1982“Molecular Cloning”(分子克隆),Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview,New York;Wu(ed.) 1993Meth.Enzymol.218,Part I;Wu(ed.) 1979Meth.Enzymol.68;Wu et al.,(ed.) 1983Meth.Enzymol.100and 101;Grossman and Moldave(eds.) 1980Meth.Enzymol.65;Miller(ed.) 1972“Experiments in Molecular Genetics”(分子遗传学实验),Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,New York;Old and Primrose,1981“Principles of Gene Manipulation”(基因操作原理),University of California Press,Berkeley;Schleif&Wensink,1982“Practical Methods in Molecular Biology”(分子生物学实践方法);Glover(ed.) 1985“DNA Cloning”Vol.I and II,IRL Press,Oxford,UK;Hames and Higgins(eds.) 1985“Nucleic Acid Hybridization”(核酸杂交),IRL Press,Oxford,UK;以及Setlow and Hollaender 1979“Genetic Engineering: Principles and Methods”(基因工程:原理和方法),Vols. 1-4,Plenum Press,New York。

其中使用的缩略词和术语被视为本领域的标准,并常用于专业学术期刊中,诸如本文引用的那些。

[0147] 本发明涉及包括基础盐营养液和有效量的ErbB3配体的组合物和方法,该组合物实质上不含血清。本发明的组合物和方法用于培养细胞,特别是可分化的细胞。应当理解,在培养可分化细胞的不同点,可以将多种组分添加至细胞培养物,以使培养基能够包含除本文描述的组分外的组分。然而,考虑在制备培养物期间或培养可分化细胞期间的至少一个点,限定培养基包含基础盐营养液和用于活化ErbB2-定向的酪氨酸激酶的手段。

[0148] 尽管本文描述的基础盐营养液被应用于维持hESC的细胞生长和活力,在本发明的其他实施方案中,维持多能细胞的多能性或用于多能细胞分化的可选的干细胞培养基以基本上相似的方式发挥作用,这些培养基包括但不限于KSR (Invitrogen)、或无异种成分KSR (xeno-free KSR, Invitrogen)、**StemPro®** (Invitrogen)、mTeSR™ 1 (StemCell Technologies) 和HEScGR0 (Millipore)、基于DMEM的培养基等。

[0149] 在另一实施方案中,在细胞外基质蛋白 (ECM),例如MATRIGEL 不存在和/或存在的情况下,将hESC培养在本文描述的限定培养基中。无ECM下培养的人ES细胞包含约0.5至10%人血清 (hS) 或来自300K 和/或100K截止离心柱 (Microcon) 的hS滞留部分。可以通过以下方 式制备hES细胞聚集体悬浮液:直接将hESC孵育在含有hS或hS滞 留部分的培养基中;或者将培养容器与hS或hS滞留部分在37℃孵 育约30分、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、12小 时和24小时后。在含有hS或hS滞留部分的培养基中的hESC的接种 效率与培养在PCT/US2007/062755描述的DC-HAIF中的或者培养在 利用MATRIGEL™作为ECM的DC-HAIF培养基或者其他类似基质 中的hESC所观察的接种效率是可比较的。用于在基本上无 血清的限 定培养基中培养hESC的方法描述于2007年10月19日提交的题目为“METHODS AND COMPOSITIONS FOR FEEDER-FREE PLURIPOTENT STEM CELL MEDIA CONTAINING HUMAN SERUM (用于含人血清的无 饲养层多能干细胞的方法和组合物)”的序列号为11/8875,057 的美国专 利申请中,该美国申请通过引用的方式以其整体并入本文。

[0150] 仍在另一实施方案中,将hES细胞聚集体悬浮液培养在基本上无 血清且还无外源 添加的成纤维细胞生长因子 (FGF) 的培养基中。这与美 国专利7,005,252 (Thomson) 不同, 该美国专利需要在无血清但含有外 源添加的生长因子包括FGF的培养集中培养hESC。

[0151] 能够通过细胞外信号跨膜转导来实施细胞调节,所述细胞外信号 跨膜转导进一步调节细胞内的生物化学途径。蛋白磷酸化代表细胞内 信号从分子到分子传播的一个过程,最终引起细胞反应。这些信号转 导级联受到高度调节,并且经常重叠,如通过许多蛋白 激酶以及磷酸 酶的存在所证实的。据报道,在人类,蛋白酪氨酸激酶已知在包括糖 尿病、 癌症的多种疾病状态的发展中都具有重要作用,并且也与种类 多样的先天性综合征有关。丝氨酸苏氨酸激酶,例如,Rho激酶,是 一类如果受到抑制,能够与人疾病包括糖尿病、癌症 和多种炎症性心 血管病症和AIDS有关联的酶。迄今为止,鉴定/设计的大多数抑制剂 在 ATP结合位点起作用。这种ATP竞争性抑制剂通过它们靶向ATP 结合位点更不保守区已经显示 出选择性。

[0152] 小GTP结合蛋白的Rho激酶家族包含至少10个成员,包括Rho A-E和G、Rac 1和2、 Cdc42以及TC10。抑制剂通常称为ROK或ROCK 抑制剂,并且它们在本文可互换使用。RhoA、 RhoB和RhoC的效应 器结构域具有相同的氨基酸序列,并且看起来具有相似的细胞内靶标。

Rho激酶作为Rho的主要下游媒介起作用,并以两种同种型存在: α (ROCK2) 和 β (ROCK1)。Rho激酶家族蛋白在其N-末端结构域具有催化(激酶)结构域、在中间部分具有卷曲螺旋结构域以及在其C-末端结构域具有推定的pleckstrin同源(PH)结构域。ROCK的Rho-结合结构域位于卷曲螺旋结构域的C-末端部分,且Rho的GTP结合形式的结合导致激酶活性的增加。Rho/Rho-激酶-介导的途径在多种激动剂起始的信号转导中发挥重要作用,所述多种激动剂包括血管紧张素II、血清素、凝血酶、内皮素-1、去甲肾上腺素、血小板衍生的生长因子、ATP/ADP和细胞外核苷酸以及尾加压素II。通过它的靶标效应器/底物的调节,Rho激酶在包括平滑肌收缩、肌动蛋白细胞骨架组织、细胞粘附和运动性以及基因表达的多种细胞功能中发挥重要作用。通过Rho激酶蛋白在介导被认为与动脉硬化发病有关的多种细胞功能中所起的作用,该激酶的抑制剂还可以用于治疗或预防多种动脉硬化心血管疾病,并与被认为促进动脉硬化的内皮收缩和内皮渗透性增加有关。因此,在本发明的一些实施方案中,将促进和/或支持细胞存活的试剂添加至多种细胞培养基中,例如,Rho-激酶抑制剂Y-27632、法舒地尔(Fasudil)以及H-1152P和ITS(胰岛素/转铁蛋白/硒;Gibco)。这些细胞存活试剂部分通过促进解离的hES细胞或hES衍生培养物,例如前肠内胚层、胰腺内胚层、胰腺上皮、胰腺祖细胞群等,特别是解离的胰腺内胚层和胰腺祖细胞群的重新联接发挥作用。hES或hES衍生细胞的存活增加的实现不依赖于这些细胞是否从细胞悬浮聚集体产生或从贴壁平板培养物(有或无细胞外基质、有或无血清、有或无饲养层)产生。增加这些细胞群的存活促进和改善了利用细胞分选仪的纯化系统,因此使细胞的回收得以改善。利用诸如Y27632的Rho激酶抑制剂可以允许hES衍生细胞类型的扩增以及促进它们在连续传代解离的单细胞的存活或从冷冻保存物的存活。尽管已经在hES和hES衍生细胞培养物上检测了诸如Y27632的Rho激酶抑制剂,但Rho激酶抑制剂可以应用于其他细胞类型,一般地例如,上皮细胞,包括但不限于肠、肺、胸腺、肾以及如神经细胞类型的着色的视网膜上皮。

[0153] 如本文所用的,术语“可分化细胞”用于描述能够分化为至少部分成熟的细胞或者能够参与细胞分化例如与能够至少分化为部分成熟细胞的其他细胞融合的细胞或细胞群。如本文所用的,“部分成熟的细胞”、“祖细胞”、“不成熟细胞”、“前体细胞”、“专能细胞(multipotent cell)”或其等同物还包括终末分化的那些细胞,例如,定形内胚层细胞、PDX1-阴性前肠内胚层细胞、PDX1-阳性胰腺内胚层细胞,PDX1-阳性胰腺内胚层细胞还包括PDX1-阳性前胰腺内胚层细胞和PDX1-阳性胰腺内胚层尖细胞。所有上述细胞都是这样的细胞,其展示来自相同器官或组织的成熟细胞的诸如形态学或蛋白表达的至少一种表型特征,但还能够分化为至少一种其他细胞类型。例如,正常的成熟肝细胞通常表达诸如白蛋白、纤维蛋白原、 α -1-抗胰蛋白酶、凝血酶原凝血因子、转铁蛋白和诸如细胞色素P-450s的解毒酶等。因此,如本发明定义的,“部分成熟的肝细胞”可以表达白蛋白或另一种或多种蛋白,或者开始呈现正常的成熟肝细胞的外观或功能。

[0154] 与通过以前已知方法制备的大小和形状都可以变化的细胞聚集体相比,本文描述的细胞聚集体和方法具有窄的大小和形状分布,即,细胞聚集体在大小和/或形状方面基本上是均一的。细胞聚集体的大小均一性对于分化性能和培养物同质性是关键。将基本的传质分析应用到聚集体,预期氧气和营养素向大聚集体中心的扩散与向较小聚集体的扩增会减缓,假定渗透性相等。由于聚集的ES细胞向胰腺谱系细胞的分化依赖于特定生

长因子的暂时应用,与细胞聚集体的均一(体积和形状)培养物相比,具有不同直径聚集体混合物的培养物可能是去同步的。这种细胞聚集体的混合物产生异质类型,并且可以导致差的分化性能以及最终不适合生产、扩大和制备。本文使用的细胞聚集体能够具有多种形状,诸如,例如球形、圆柱形(优选具有相同的高度和直径)或者棒状等。尽管可以使用其他形状的聚集体,但在本发明的一个实施方案中,细胞聚集体是球形或圆柱形通常是优选的。在另一实施方案中,细胞聚集体是球形并且在大小和形状方面基本是均一的。例如,如果细胞聚集体的大小不同或不是均一的,可靠地生产和进行大规模细胞处理会是困难的。因此,如本文所用的,短语“基本上均一的”或“大小和形状基本上均一的”或其等同物指聚集体均一性的散布不超过约20%。在另一实施方案中,聚集体均一性的散布不超过约15%、10%或5%。

[0155] 尽管每一聚集体中细胞的确切数目不是关键的,但本领域技术人员应当认识到,每一聚集体(和因此的每一聚集体的细胞数目)的大小受限于氧气和营养素扩散到中心细胞的能力,以及该数目还可以取决于细胞类型和该细胞类型的营养需求而变化。细胞聚集体可以在每一聚集体包含最小数目的细胞(例如,两个或三个细胞),或者可以在每一聚集体包含成百上千个细胞。通常,细胞聚集体在每一聚集体包含几百到几千个细胞。出于本发明的目的,尽管细胞聚集体的大小取决于细胞类型通常为约50微米至约600微米,但该大小可以小于或大于这一范围。在一个实施方案中,细胞聚集体的大小为约50微米至约250微米,或者为约75微米至约200微米,以及优选地,它们的大小约为100微米至150微米。与之相比,悬浮存在的圆柱形或非球形细胞聚集体是基于短轴和长轴(例如,X、Y和Z)的直径不相等的那些聚集体。这些非球形细胞聚集体的大小倾向于更大,直径和高度为约500微米至600微米。然而,在本文描述的方法中,这些非球形hES细胞聚集体一旦开始分化(如果它们尚没有分化)就变为球形。非球形细胞聚集体包括但不限于圆柱形和立方体细胞聚集体,但大小和形状仍是均一的。

[0156] 许多细胞类型可以用于形成本文描述的细胞聚集体。通常,取决于待工程化的三维构建体的类型(例如,包括胰腺、肝脏、肺脏、肾脏、心脏、膀胱、血管等的多种器官结构),细胞类型的选择会变化。例如,如果三维结构是胰腺,则细胞聚集体会有利地包含通常在胰腺中发现的一种或多种细胞类型(例如,诸如胰岛素、胰高血糖素、胃饥饿素(ghrelin)、生长抑素类型细胞的内分泌细胞,以及内皮细胞、平滑肌细胞等)。基于期望的三维组织或器官的类型,本领域技术人员能够选择适当的细胞聚集体的细胞类型。合适的细胞类型的非限定性实例包括干细胞(例如,成体干细胞和胚胎干细胞)、收缩性或肌细胞(例如,横纹肌细胞和平滑肌细胞)、神经细胞(例如,神经胶质细胞、树突状细胞和神经元)、结缔组织(包括骨、软骨、分化为骨形成细胞和软骨细胞的细胞以及淋巴组织)、薄壁组织细胞、上皮细胞(包括形成腔和血管或通道的衬里的内皮细胞、外分泌性分泌上皮细胞、上皮吸收细胞、角化上皮细胞(例如,角质细胞和角膜上皮细胞)、细胞外基质分泌细胞、粘膜上皮细胞、肾上皮细胞、肺上皮细胞、乳腺上皮细胞等,以及未分化的细胞(诸如胚胎细胞、干细胞和其他前体细胞)等。

[0157] 本文描述的细胞聚集体可以是同质细胞的聚集体或异质细胞的聚集体。如本文所用的,“同质细胞的”、“单一细胞的”细胞聚集体或其等同物指多个细胞悬浮聚集体,其中每一细胞聚集体包含基本上为单一细胞类型的多个活细胞,例如,用于制备本文描述的

hES细胞聚集体的方法可以基本上是同质细胞的,基本上由多能hESC组成、基本上由定形内胚层细胞、前肠内胚层细胞组成、基本上由胰腺内胚层细胞组成,其还可以包括PDX1-阴性前胰腺内胚层细胞、PDX1-阳性胰腺内胚层细胞、PDX1-阳性胰腺内胚层尖细胞、胰腺内分泌前体细胞、胰腺内分泌细胞等。

[0158] 如本文所用的,术语“实质上(essentially)”或“基本上(substantially)”指存在于任一细胞聚集体悬浮类型中的组分或细胞最低允许(de minimus)量或量减少,例如,本文描述的细胞悬浮聚集体是“实质上或基本上同源的”、“实质上或基本上同质细胞的”或由“实质上hESC”、“实质上或基本上定形内胚层细胞”、“实质上或基本上前肠内胚层细胞”、“实质上或基本上PDX1-阴性前肠内胚层细胞”、“实质上或基本上PDX1-阳性前胰腺内胚层细胞”、“实质上或基本上PDX1-阳性胰腺内胚层或祖细胞”、“实质上或基本上PDX1-阳性胰腺内胚层尖细胞”、“实质上或基本上胰腺内分泌前体细胞”、“实质上或基本上胰腺内分泌细胞”等组成。

[0159] 基本上同质细胞的细胞聚集体悬浮培养物中的一些是例如hES衍生细胞聚集体悬浮培养物,其包含培养的总hES衍生细胞的少于约50%的hESCs、少于约45%的hESCs、少于约40%的hESCs、少于约35%的hESCs、少于约30%的hESCs、少于约25%的hESCs、少于约20%的hESCs、少于约15%的hESCs、少于约10%的hESCs、少于约5%的hESCs、少于约4%的hESCs、少于约3%的hESCs、少于约2%的hESCs或少于约1%的hESCs。以另一方式陈述,hES衍生细胞聚集体悬浮培养物,例如PDX1-阴性前肠内胚层、PDX1-阳性前胰腺内胚层细胞、PDX1-阳性胰腺内胚层或祖细胞、PDX1-阳性胰腺尖细胞、胰腺内分泌祖细胞和胰腺内分泌细胞,包含至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。

[0160] 如本文所用的,“异质细胞的”、“多细胞的”或其等同物指细胞聚集体,由此,每一单独细胞聚集体包含至少为两个、三个、四个、五个、六个或更多细胞类型的多个细胞,或者至少一种细胞类型和非细胞组分,例如细胞外基质(ECM)物质(例如,胶原蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白、弹性蛋白和/或蛋白聚糖)。这种ECM组分可以由细胞天然分泌,或可选地,细胞可以通过任何本领域已知的方法进行遗传操纵以改变诸如选择素、整合素、免疫球蛋白和钙粘素等的ECM物质和/或细胞粘附分子的表达水平。在另一实施方案中,天然的ECM物质或模拟ECM物质的任一合成组分可以在聚集体形成过程中并入聚集体。例如,制备本文描述的hES衍生细胞聚集体诸如胰腺上皮或胰腺内胚层细胞聚集体(或4期细胞聚集体)的方法基本上由胰腺上皮或内胚层细胞组成,但还可以存在小细胞数目的其他非胰腺上皮类型细胞,或者其他内胚层祖细胞,以及甚至胰腺内分泌性分泌细胞(例如胰岛素分泌细胞)。

[0161] 为了清楚起见,本文描述的以及通过本文描述的悬浮方法制备的同质-或异质-细胞的聚集体不是本领域和其他人描述的称为胚状体(EBs)的细胞聚集体。胚状体与本文描述的细胞聚集体是明显不同的,因为EBs是分化的和未分化细胞的细胞聚集体,其出现在ES细胞在单层培养中生长过度时,或维持在非限定培养基的悬浮培养物中或通过非定向方案(即随机分化)向多生殖层组织分化时。相反,实施例17和20详细讨论的本发明酶促解离贴壁平板培养的hESC以制备单细胞悬浮液,然后将这些细胞聚在一起形成细胞聚集体;然后利用这些细胞聚集体悬浮培养物用于分化,基本上如在前面D'Amour et al.2005,

(同上), &D'Amour et al. 2006, (同上) 中描述的。EBs 和本发明的细胞聚集体间的其他差异在下文进一步讨论。

[0162] 仍有其他方法描述了制备胚状体 (EBs)。如本文使用的, 术语“胚状体”、“聚集体”或其等同物指分化的和未分化的细胞的聚集体, 其出现在当ES细胞在单层培养中生长过度时, 或维持在非限定培养基的悬浮培养物中或通过非定向方案向多胚层组织分化时。换句话说, EBs 不是从本文描述的多能干细胞的单细胞悬浮液形成的, 也不是从hES 衍生的专能细胞的贴壁培养物形成的。这些特征本身使本发明清楚地区别于胚状体。

[0163] 胚状体是不同细胞类型的混合物, 通常来自通过形态学标准可以区分的几个胚层。胚状体通常指由细胞群组成的形态学结构, 其大部分衍生自经历非定向分化的胚胎干细胞 (ES) 细胞, 即如当未分化的细胞在无限定生长因子下暴露于高浓度的血清时出现的那些。在适合EB形成的培养条件下 (例如, 从小鼠ES细胞移除白血病抑制因子, 或者其他的类似阻断因子), ES细胞增殖并形成开始分化的小细胞团。首先, 对应于人ES细胞分化的约1-4天, 小细胞团在外层形成内胚层细胞层, 并被视为“简单的胚状体”。其次, 对应于人ES细胞分化后的约3-20天, 形成“复杂的胚状体”, 其特征不在于外胚层和中胚层以及衍生组织的广泛分化。如本文所用的, EBs包括简单和复杂的EBs, 除非上下文另外要求。胚状体何时在ES细胞培养中形成常规由本领域技术人员通过例如肉眼检测形态学来确定。取决于培养条件, 约20个细胞或更多的细胞的漂浮团被认为是EBs。参见, 例如, Schmitt et al. (1991) *Genes Dev.* 5, 728-740; Doetschman et al. 1985 *J. Embryol. Exp. Morph.* 87:27-45。该术语还指衍生自原始生殖细胞的等同结构, 其为从胚胎性腺区提取的原始细胞; 参见, 例如 Shambloott, et al. 1998 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13726。原始生殖细胞, 本领域中有时还称为EG细胞或胚胎生殖细胞, 当用适当的因子处理时, 形成多能ES细胞, 胚状体可以衍生自所述多能ES细胞; 参见, 例如美国专利第5,670,372号和Shambloott, et al., (同上)。

[0164] 存在多种制备EBs的方法, 例如, Ng et al. 2008 *Nature Protocols* 3:468-776描述的旋转胚状体 (spin embryoid bodies) 和从接种在微图案细胞外基质岛上的单细胞悬浮液制备的EBs, 描述于 Bauwens et al 2008, *Stem Cells* 26:2300-10, Epub 2008 Jun 26。然而, 这些方法对于hESC和hES衍生细胞的大规模制备 (生产) 而言成本过高且效率较低, 因为它们在扩大制备实际启动前需要过多步骤。例如, Bauwens et al., 在能够选择细胞以开始悬浮培养之前, 首先必须将hESC接种在生长因子降低的MATRIGEL™上。该方法的时间和成本使它繁杂, 因为需要定制的微图案组织培养板。此外, Ng等应用的方法对于大规模生产hESC和hES衍生细胞而言也没有成本效益, 因为使用离心机以便生成更均一的EB。这些方法受到表面积约束的限制, 这也影响到它们的可扩大性。最后, 在所有这些方法中, 细胞聚集体不是如本发明这样从多能干细胞的单细胞悬浮液中制备。

[0165] 不像本发明描述的细胞聚集体, 胚状体是如下的细胞聚集体: 其由来自三个胚层的众多细胞类型组成, 并通常通过将未分化的ES细胞的聚集体暴露于诸如20%胎牛血清的非定向的分化信号而建立的。该定向方法得到的是细胞类型的混合物, 其用来在体外模拟正常的胚胎发育。尽管该方法在用于检测胚胎发育的基础研究水平是有用的, 但它不适用于任何大规模的细胞治疗生产过程, 其中细胞产量、群体同一性、群体纯度、批次同一性、安全性、细胞功能和商品成本主要的考虑因素。而且, 不管用于从胚状体纯化给定细胞

类型的任何富集策略,分化方案都没有提供会产生大群单细胞类型的定向方法。随后,污染物群体会一直占据优势,并且会阻碍纯化特定群体的任何努力。以前所有建立和分化ES细胞聚集体的工作在它们的方法学中具有以下组成部分的一个或多个:1) 利用小鼠而不是人ES细胞,2) 依赖离心聚集细胞的强迫聚集方案而不是正常的细胞粘附过程,3) 细胞大块在静态条件下的聚集,4) 非单细胞解离或将细胞从表面刮擦下来以生成聚集体,5) 利用15-20%的胎牛血清的细胞聚集体的非直接分化,从而形成胚状体和全胚层的细胞类型,6) 在“悬滴”条件下形成,其仅能在小规模下进行。据我们所知,不利用15-20%FCS分化胚状体的唯一研究描述了这样一个方案:其中细胞聚集体通过强迫聚集形成,然后利用适于中胚层的培养基立即分化聚集体(Ng et al.,2005,Blood. 106:1601)。然而,在本工作中,研究者在静态聚集培养10-12天后将胚状体转移到非聚集贴壁培养,使与本申请的比较不相关。与所有以前的工作相比,本申请提出的方法1) 将人ES细胞解离为单细胞,然后通过在最优化聚集体直径和细胞存活的改善调控的剪切速率下的旋转培养生成聚集体,2) 直接将ES细胞聚集体分化为定形内胚层,然后前肠内胚层,然后前胰腺前肠内胚层,然后胰腺内胚层,以及最后胰腺内分泌细胞。该分化方案高效产生定形内胚层和胰腺谱系群,同时污染群体最小化。而且,与所有其他发表的研究完全相反,该ES细胞聚集和分化的方案不产生胚状体。

[0166] 胚状体是分化的和未分化细胞的混合物,通常由来自几个胚层的细胞组成,并且经历随机分化,与之相反,本文描述的细胞聚集体实质上或基本上是同质细胞的,作为例如胚胎细胞、定形内胚层、前肠内胚层、PDX1阳性胰腺内胚层、胰腺内分泌细胞等的多能、专能、双能或单能类型细胞的聚集体存在。

[0167] 本发明通过提供能够再现地制备大小和形状基本上均一的细胞聚集体的有成本效益的生产过程或方法解决了上述问题,所述生产过程或方法利用容易地应用于大规模生产的过程。在一个具体实施方案中,利用本发明的细胞培养基,在悬浮培养中扩增可分化细胞。在另一具体实施方案中,可分化细胞可以以悬浮的形式维持和扩增,即,它们保持未分化或被阻止进一步分化。在细胞培养的上下文中,术语“扩增”用其本领域所使用的含义,指细胞增殖,以及增加细胞的数目,优选增加存活细胞的数目。在具体的实施方案中,通过培养超过约1天,即约24小时在细胞悬浮液中扩增细胞。在更具体的实施方案中,通过培养至少1、2、3、4、5、6、7天或至少2、3、4、5、6、7、8周在悬浮培养中扩增细胞。

[0168] 本文描述的分化培养条件和hES衍生的细胞类型与前面D'Amour et al.2006中描述的那些基本类似。D'Amour et al.2006描述了5步分化方案;阶段1(基本上导致定形内胚层产生),阶段2(基本上导致PDX1-阴性前肠内胚层产生),阶段3(基本上导致PDX1-阳性前肠内胚层产生),阶段4(基本上导致胰腺内胚层或上皮或胰腺内分泌祖细胞产生)以及阶段5(基本上导致激素表达内分泌细胞产生)。重要地,所有这些细胞第一次能够通过本文描述的悬浮方法产生。

[0169] 如本文所用的,“定形内胚层(DE)”指能够分化为肠管细胞或衍生自肠管的器官的专能内胚层谱系细胞。根据某些实施方案中,定形内胚层细胞是哺乳动物细胞,以及在优选的实施方案中,定形内胚层细胞是人细胞。在本发明的一些实施方案中,定形内胚层细胞表达或不能显著表达某些标志物。在一些实施方案中,选自SOX17、CXCR4、MIXL1、GATA4、HNF3beta、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1、CRIP1和CER的一种或多种标志物

表达在定形内胚层细胞中。在其他实施方案中,选自OCT4、 α -甲胎蛋白(AFP)、凝血调节蛋白(TM)、SPARC、SOX7和HNF4 α 的一种或多种标志物没有显著表达在定形内胚层细胞中。定形内胚层细胞群和其制备方法还描述于2004年12月13日提交的、题目为“DEFINITIVE ENDODERM(定形内胚层)”、申请号为11/021,618的美国专利申请中,该申请整体并入本文。

[0170] 本发明的其他实施方案涉及称为“PDX1-阴性前肠内胚层细胞”、“前肠内胚层细胞”或其等同物的细胞培养物和细胞聚集体。PDX1-阴性前肠内胚层细胞也是专能的,并且能够产生多种细胞和组织,包括但不限于胸腺、甲状腺、甲状旁腺、肺/支气管、肝、咽、咽囊、十二指肠和咽鼓管的部分。在一些实施方案中,与非前肠内胚层细胞相比,例如不明显表达这些标志物的定形内胚层或PDX1阳性内胚层,前肠内胚层细胞表达的SOX17、HNF1B、HNF1 α 、FOXA1水平增加。PDX1-阴性前肠内胚层细胞还表达低至零水平的PDX1、AFP、SOX7和SOX1。PDX1-阴性前肠内胚层细胞群以及其制备方法还描述于2006年10月27日提交的、题目为“PDX1-expressing dorsal and ventral foregut endoderm(PDX1表达的背和腹部前肠内胚层)”的、申请号为11/588,693的美国专利申请中,该申请通过引用的方式以其整体并入本文。

[0171] 本发明其他的实施方案涉及“PDX1-阳性胰腺前肠内胚层细胞”、“PDX1-阳性前胰腺内胚层”或其等同物的细胞培养物。PDX1-阳性前胰腺内胚层细胞是专能的,并且能够产生多种细胞和/或组织,包括但不限于胃、小肠和胰腺。在一些实施方案中,与不明显表达这些标志物的非前胰腺内胚层细胞相比,PDX1-阳性前胰腺内胚层细胞表达的PDX1、HNF6、SOX9和PROX1的水平增加。PDX1-阳性前胰腺内胚层细胞还表达低至零水平的NKX6.1、PTF1A、CPA和cMYC。

[0172] 本发明的其他实施方案涉及“PDX1-阳性胰腺内胚层细胞”、“PDX1-阳性胰腺祖细胞”、“胰腺上皮”、“PE”或其等同物的细胞培养物。PDX1-阳性胰腺祖细胞是专能的,并且能够在胰腺中产生多种细胞,包括但不限于腺泡细胞、导管细胞和内分泌细胞。在一些实施方案中,与不明显表达PDX1和NKX6.1的非前胰腺内胚层细胞相比,PDX1-阳性胰腺祖细胞表达的这些标志物的水平增加。PDX1-阳性胰腺祖细胞还表达低至零水平的PTF1A、CPA、cMYC、NGN3、PAX4、ARX和NKX2.2、INS、GCG、GHRL、SST以及PP。

[0173] 可选择地,本发明的其他实施方案涉及“PDX1-阳性胰腺内胚层尖细胞”或其等同物的细胞培养物。在一些实施方案中,PDX1-阳性胰腺内胚层尖细胞表达的PDX1和NKX6.1的水平增加,这与PDX1-阳性胰腺祖细胞相似,但与PDX1-阳性胰腺祖细胞不同,PDX1-阳性胰腺内胚层尖细胞额外表达的PTF1A、CPA和cMYC的水平增加。PDX1-阳性胰腺内胚层尖细胞还表达低至零水平的NGN3、PAX4、ARX和NKX2.2、INS、GCG、GHRL、SST以及PP。

[0174] 仍然,本发明的其他实施方案涉及“胰腺内分泌前体细胞”、“胰腺内分泌祖细胞”或其等同物的细胞培养物。胰腺内分泌祖细胞是专能的,并且产生成熟内分泌细胞,包括 α 、 β 、 δ 和PP细胞。在一些实施方案中,与其他非分泌祖细胞类型相比,胰腺内分泌祖细胞表达的NGN3、PAX4、ARX和NKX2.2的水平增加。胰腺祖细胞还表达低至零水平的INS、GCG、GHRL、SST和PP。

[0175] 仍然,本发明的其他实施方案涉及“胰腺内分泌细胞”、“胰腺激素分泌细胞”、“胰岛激素表达细胞”或其等同物的细胞培养物,指从多能细胞如 α 、 β 、 δ 和/或PP细胞或其组合体外衍生的细胞。内分泌细胞可以是多激素或单激素的,例如表达胰岛素、胰高血糖素、胃

饥饿素、生长抑素和胰腺多肽或其组合。因此,内分泌细胞能够表达一种或多种胰腺激素,其至少具有人胰岛细胞的一些功能。胰岛激素表达细胞可以是成熟的或不成熟的。基于某些标志物的差异表达或者基于它们的作用能力,例如体外和体内的葡萄糖反应,能够将不成熟的胰岛激素表达细胞与成熟胰腺胰岛表达细胞区分开。胰腺内分泌细胞还表达低至零水平的NGN3、PAX 4、ARX和NKX2.2。

[0176] 与间质定形内胚层细胞相比,上数细胞类型的大多数是上皮型的。在一些实施方案中,胰腺内胚层细胞表达选自2006年10月27日提交、题目为“PDX1EXPRESSING DORSAL AND VENTRAL FOREGUT ENDODERM (PDX1表达的背和腹部前肠内胚层)”的相关美国专利申请第11/588,693号的表3的一种或多种标志物,和/或一种或多种选自该申请中表4的标志物,以及还有2005年4月26日提交、题目为“PDX1-expressing endoderm (PDX1-表达内胚层)”、申请号为11/115,868的美国专利申请,这两篇美国专利申请通过引用的方式整体并入本文。

[0177] 本发明考虑用于可分化细胞的组合物和方法,不管它们的来源或它们的可塑性。细胞的“可塑性”用于本文大致如同本领域所使用的。也就是说,细胞的“可塑性”指细胞分化为特定细胞类型的能力,所述特定细胞类型存在于来自胚胎、胎儿或发育的有机体的组织或器官中。细胞“越可塑”,则细胞能够分化为的组织越多。“多能细胞”包括细胞及其子代,其可以能够分化为或产生多能、专能、寡能和单能细胞,和/或存在于胚胎、胎儿或发育的生物体的成熟或部分成熟细胞类型中的几种,如果不是全部的话。“专能细胞”包括细胞和其子代,其可以能够分化为或生成专能、寡能和单能细胞,和/或一种或多种成熟或部分成熟的细胞类型,除了衍生自专能细胞的成熟或部分成熟的细胞类型局限于特定组织、器官或器官系统的细胞。例如,专能造血祖细胞和/或其子代具有分化为或生成一种或多种类型的寡能细胞,诸如骨髓祖细胞和淋巴祖细胞的能力,并且还生成通常在血液中存在其他成熟的细胞组分。“寡能细胞”包括细胞和其子代,其分化为成熟或部分成熟的细胞的能力比专能细胞更为局限。然而,寡能细胞仍可以具有分化为寡能和单能细胞和/或给定组织、器官或器官系统的一种或多种成熟或部分成熟的细胞类型的能力。寡能细胞的一个实例是骨髓祖细胞,其能够最终产生成熟的或部分成熟的红细胞、血小板、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和单核细胞。“单能细胞”包括具有分化为或产生其他单能细胞和/或一种类型的成熟或部分成熟细胞类型的能力的细胞和其子代。

[0178] 如本文使用的,可分化细胞可以是多能的、专能的、寡能的甚或单能的。在本发明的某些实施方案中,可分化细胞是多能可分化细胞。在更具体的实施方案中,多能可分化细胞选自胚胎干细胞、ICM/上胚层细胞、原始外胚层细胞、原始生殖细胞和畸胎瘤细胞。在一个具体实施方案中,可分化细胞是哺乳动物胚胎干细胞。在更具体的实施方案中,可分化细胞是人胚胎干细胞。

[0179] 本发明还考虑来自动物内任何来源的可分化细胞,只要该细胞是如本文所定义的可分化的。例如,可分化细胞可以获自胚胎或其中的任一原始胚层,获自胎盘或绒毛膜组织,或者获自更成熟的组织诸如成体干细胞,包括但不限于脂肪、骨髓、神经组织、乳腺组织、肝组织、胰腺、上皮、呼吸组织、性腺和肌肉组织。在具体实施方案中,可分化的细胞是胚胎干细胞。在其他具体实施方案中,可分化的细胞是成体干细胞。仍在其他具体实施方案中,干细胞是胎盘-或绒毛膜衍生的干细胞。

[0180] 当然,本发明考虑使用来自任何能够产生可分化细胞的动物的可分化细胞。获得可分化细胞的动物可以是脊椎动物或是无脊椎动物、哺乳动物或是非哺乳动物、人类或非人类。动物来源的实例包括但不限于灵长类、啮齿类、犬、猫科、马、牛和猪。

[0181] 可以利用本领域技术人员已知的任一方法衍生本发明的可分化细胞。例如,人多能细胞可以利用去分化和核转移方法来制备。另外地,用于本发明的人ICM/上胚层细胞或原始外胚层细胞可以在体内或体外衍生。原始外胚层细胞可以在贴壁培养中产生或在悬浮培养中作为细胞聚集体产生,如WO 99/53021中所描述的。此外,能够利用本领域已知的任何方法传代人多能细胞,这些方法包括人工传代方法和诸如酶促或非酶促传代的大体积传代方法。

[0182] 在某些实施方案中,当利用ES细胞时,胚胎干细胞具有正常的核型,而在其他实施方案中,胚胎干细胞具有异常的核型。在一个实施方案中,大多数胚胎干细胞具有正常核型。预期大于50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或大于95%的经检测的细胞分裂中期的细胞会显示正常核型。

[0183] 在另一实施方案中,大多数胚胎干细胞具有异常核型。预期大于50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或者大于95%的经检测的细胞分裂中期的细胞会显示异常核型。在某些实施方案中,细胞被培养超过5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或20代后,异常核型是明显的。在一个具体实施方案中,异常核型包括至少一个常染色体的三体性,其中常染色体选自染色体1、7、8、12、14和17。在另一实施方案中,异常核型包括多于一个常染色体的三体性,其中多个常染色体的至少一个选自染色体1、7、8、12、14和17。在一个实施方案中,常染色体是染色体12或17。在另一实施方案中,异常核型包括另外的性染色体。在一个实施方案中,核型包括两个X染色体和一个Y染色体。还预期,染色体的易位可以发生,以及这种易位包括在术语“异常核型”中。前述染色体异常和其他染色体异常的组合也包括在本发明内。

[0184] 组合物和方法包括基础盐营养液。如本文使用的,基础盐营养液指盐的混合物,其提供给细胞正常细胞代谢所需的水和某些大量的无机离子,维持细胞内和细胞外渗透平衡,提供碳水化合物作为能量源,以及提供缓冲系统以维持培养基在生理pH范围内。基础盐营养液的实例包括但不限于达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)、最小必需培养基(MEM)、基础伊格尔培养基(Basal Eagle Medium, BME)、RPMI 1640、Ham's F-10、Ham's F-12、 α -最小必需培养基(α MEM)、Glasgow's最小必需培养基(G-MEM)和伊思考夫改良达尔伯克氏培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium),以及其混合物。在一个特定实施方案中,基础盐营养液是DMEM和Ham's F12近似50:50的混合物。

[0185] 预期组合物还包含微量元素。微量元素可以商购,例如,从Mediatech购买。微量元素的非限定性实例包括但不限于化合物,包括铝、氯、硫酸盐、铁、镉、钴、铬、锗、钠、钾、钙、磷和镁。含有微量元素的化合物的具体实例包括但不限于 AlCl_3 、 AgNO_3 、 $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ 、 CdCl_2 、 CdSO_4 、 CoCl_2 、 CrCl_3 、 $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ 、 CuSO_4 、柠檬酸铁、 GeO_2 、KI、KBr、Li、钼酸、 MnSO_4 、 MnCl_2 、NaF、 Na_2SiO_3 、 NaVO_3 、 NH_4VO_3 、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 、 NiSO_4 、RbCl、硒、 Na_2SeO_3 、 H_2SeO_3 、亚硒酸二钠、硒基甲硫氨酸、 SnCl_2 、 ZnSO_4 、 ZrOCl_2 ,以及其混合物和盐。如果存在硒、亚硒酸盐或硒基甲硫氨酸,它的浓度为约0.002至约0.02mg/L。此外,还可以存在羟基磷灰石。

[0186] 预期氨基酸可以添加至限定培养基。这种氨基酸的非限定实例是 甘氨酸、L-丙氨酸、L-丙氨酰-L-谷氨酸、L-谷氨酸/Glutamax、L-精氨酸盐酸盐、L-天冬酰胺一水合物、L-天冬氨酸、L-半胱氨酸盐酸盐一水合物、L-胱氨酸2HCl、L-谷氨酸、L-组氨酸盐酸盐一水合物、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸盐酸盐、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸二钠盐二水合物和L-缬氨酸。在某些实施方案中,氨基酸是L-异亮氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟基脯氨酸、L-缬氨酸以及其混合物。

[0187] 还预期,限定培养基能够包含抗坏血酸。优选地,抗坏血酸以约 1mg/L至约 1000mg/L的起始浓度存在,或者从约2mg/L至约500 mg/L,或者从约5mg/L至约100mg/L,或者从约10mg/L至约100mg/L 或者约在50mg/L。

[0188] 此外,组合物和方法还可以包括其他组分,诸如血清白蛋白、转铁蛋白、L-谷氨酰胺、脂类、抗生素、 β -巯基乙醇、维生素、矿物质,可以存在ATP和类似组分。可以存在的维生素的实例包括但不限于维生素A、B1、B2、B3、B5、B6、B7、B9、B12、C、D1、D2、D3、D4、D5、E、生育三烯酚、K1和K2。本领域技术人员能够确定用于给定培养的矿物质、维生素、ATP、脂类、必需脂肪酸等的最佳浓度。补加剂的浓度可以,例如为从约0.001 μ M至约1mM或更高。可以提供的补加剂的浓度的具体实例包括但不限于约0.005 μ M、0.01 μ M、0.05 μ M、0.1 μ M、0.5 μ M、1.0 μ M、2.0 μ M、2.5 μ M、3.0 μ M、4.0 μ M、5.0 μ M、10 μ M、20 μ M、100 μ M等。在一个具体实施方案中,组合物和方法包括维生素B6和谷氨酰胺。在另一具体实施方案中,组合物和方法包括维生素C和铁补加剂。在另一具体实施方案中,组合物和方法包含维生素K1和维生素A。在另一具体实施方案中,组合物和方法包括维生素D3和ATP。在另一具体实施方案中,组合物和方法包括维生素B12和转铁蛋白。在另一具体实施方案中,组合物和方法包含生育三烯酚和 β -巯基乙醇。在另一具体实施方案中,组合物和方法包含谷氨酰胺和ATP。在另一具体实施方案中,组合物和方法包含 ω -3脂肪酸和谷氨酰胺。在另一具体实施方案中,组合物和方法包含 ω -6脂肪酸和维生素B₁。在另一具体实施方案中,组合物和方法包含 α -亚麻酸和B₂。

[0189] 本发明的组合物实质上无血清。如本文所用的,“实质上无血清”指在本发明的溶液中不存在血清。血清不是本发明的组合物和方法的必需成分。因此,血清在任一组合物中的存在仅应该归因于杂质,例如,来自起始物质或来自原代细胞培养物的残余血清。例如,实质上无血清培养基或环境能够包含少于10、9、8、7、6、5、4、3、2或1%的血清,其中仍然观察到培养基或环境的目前改善的生物活性维持能力。在本发明的具体实施方案中,实质上无血清的组合物不包含血清或血清替代物,或者仅包含来自分离添加至限定培养基的血清或血清替代物组分的微量血清或血清替代物。

[0190] 本发明的组合物和方法还包括用于刺激可分化细胞内ErbB2酪氨酸激酶活性的方法。在一个具体实施方案中,本发明的组合物和方法包括至少一种ErbB3配体的存在。通常,ErbB3配体会结合ErbB3受体,并且与ErbB2受体二聚化。ErbB2受体进而一般负责可分化细胞内的细胞内酪氨酸激酶活性。

[0191] 如本文使用的,“ErbB3配体”指能结合ErbB3的配体,ErbB3进而与ErbB2二聚化,由此活化了ErbB2/ErbB3异二聚体受体的ErbB2部分的酪氨酸激酶活性。ErbB3配体的非限定性实例包括神经调节蛋白-1;神经调节蛋白-1的剪接变体和同种型,包括但不限于HRG-

β 、HRG- α 、Neu分化因子(NDF)、乙酰胆碱受体诱导活性(ARIA)、神经胶质生长因子2(GGF2)以及感觉和运动神经元衍生因子(SMDF);神经调节蛋白-2,神经调节蛋白-2的剪接变体和同种型,包括但不限于 NRG2- β 、外调蛋白(Epiregulin)和双调蛋白(Biregulin)。

[0192] 在一个实施方案中,用于刺激ErbB2-定向的酪氨酸激酶活性的方法包括至少一种ErbB3配体,其选自神经调节蛋白-1、Heregulin- β (HRG- β)、Heregulin- α (HRG- α)、Neu分化因子(NDF)、乙酰胆碱受体诱导活性(ARIA)、神经胶质生长因子2(GGF2)、运动神经元衍生因子(SMDF)、神经调节蛋白-2、神经调节蛋白-2 β (NRG2- β)、外调蛋白、双调蛋白以及其变体和功能片段。在另一具体实施方案中,本发明的组合物和方法包括用于刺激ErbB2-定向的酪氨酸激酶活性的多种方法,诸如但不限于利用多种ErbB3配体。

[0193] 在本发明的组合物和方法的更具体实施方案中,ErbB3配体是 HRG- β 或其变体或功能片段。在一个实施方案中,衍生培养添加蛋白、多肽或其变体或功能片段的种类与培养的细胞的种类相同。例如,如果培养小鼠ES细胞,具有与小鼠(*mus musculus*)HRG- β 序列相同的氨基酸序列的HRG- β 被用作培养添加剂,以及被视为是“相同种类的”。在其他实施方案中,衍生生物添加剂的种类不同于培养的细胞。例如,如果培养小鼠ES细胞,具有与人HRG- β 序列相同的氨基酸序列的 HRG- β 用作培养基的添加剂,并且被视为“不同种类的”。

[0194] 如本文使用的,“功能片段”是与全长多肽发挥相似生理或细胞效应的全长多肽的片段或剪接变体。功能片段的生物效应在范围或强度上不必与全长多肽相同,只要观测到相似得生理或细胞效应即可。例如,HRG- β 的功能片段能够可检测地刺激ErbB2-定向的酪氨酸激酶。

[0195] 如本文所用的,术语“变体”包括嵌合的或融合的多肽、同系物(homolog)、类似物、直向同源物、和旁系同源物。此外,参考蛋白或多肽的变体是其氨基酸序列与参考蛋白或多肽至少约80%相同的蛋白或多肽。在具体实施方案中,变体与参考蛋白或多肽至少约85%、90%、95%、95%、97%、98%、99%甚或100%相同。如本文所用的,术语“对应于(correspond(s) to)”和“对应于(corresponding to)”当涉及序列比对时,意指参考蛋白或多肽,例如野生型人或小鼠神经调节蛋白-1内列举的位置,以及与参考蛋白或多肽上的位置对齐的修饰的蛋白或多肽中的那些位置。因此,当目标蛋白(subject protein)或多肽的氨基酸序列与参考蛋白或多肽的氨基酸序列对齐时,“对应于”参考蛋白或多肽序列的某些列举位置的序列是与参考序列的这些位置对齐但并不必然位于参考序列的这些精确数值位置的那些序列。用于确定序列间的对应氨基酸的比对序列的方法在下文有描述。

[0196] 例如,具有与参考氨基酸序列(例如,编码TGF- β 的序列)至少约95%“相同”的氨基酸序列的多肽被理解为指该多肽的氨基酸序列与参考序列相同,除了该氨基酸序列可以在编码参考TGF- β 的参考氨基酸序列的每100个氨基酸中包括多达约5个修饰。换句话说,为了获得具有与参考氨基酸序列至少约95%相同的氨基酸序列的肽,参考序列的多达约5%氨基酸残基可以被缺失或由另一氨基酸取代,或者可以将多达参考序列的总氨基酸约5%的多个氨基酸插入参考序列。参考序列的这些修饰可以发生在参考氨基酸序列的N-末端或C-末端位置,或者发生在那些末端位置的任一处,单独散置在参考序列的氨基酸间,或者参考序列内的一个或多个邻近组(contiguous group)中。

[0197] 如本文所用的,“同一性(identity)”是核苷酸序列或氨基酸序列与参考核苷酸或氨基酸序列相比的同一性度量。一般而言,对比序列以获得最高阶匹配。“同一性”本身

具有本领域认可的含意,并且能够利用发表的技术来计算。(参见,例如,Computational Molecular Biology (计算分子生物学),Lesk,A.M.,ed.,Oxford University Press,New York (1988);Biocomputing:Informatics And Genome Projects(生物计算:信息和基因组项目),Smith,D.W.,ed.,Academic Press,New York(1993); Computer Analysis of Sequence Data(序列数据的计算机分析),Part I, Griffin,A.M.,and Griffin,H.G., eds.,Humana Press,New Jersey(1994); von Heinje,G.,Sequence Analysis In Molecular Biology(分子生物学的序列分析),Academic Press(1987);以及Sequence Analysis Primer(序列分析引物),Gribskov,M.and Devereux,J.,eds.,M Stockton Press,New York(1991))。尽管存在测量两个多核苷酸或多肽序列间同一性的几种方法,但术语“同一性”为本领域技术人员所熟知(Carillo,H.&Lipton, D.,Siam J Applied Math 48:1073(1988))。确定两序列间同一性或相似性常用的方法包括,但不限于在Guide to Huge Computers(巨型计算机指南),Martin J.Bishop,ed.,Academic Press,San Diego(1994)and Carillo,H.&Lipton,D.,Siam J Applied Math 48:1073(1988)中公开的那些。计算机程序还可以包含计算同一性和相似性的方法和算法。确定两个序列间同一性和相似性的计算机程序方法的实例包括但不限于 GCG程序包(Devereux,et al.1984, Nucleic Acids Research 12:387)、BLASTP、ExPASy、BLASTN、FASTA(Atschul,et al.1990,J Molec Biol 215:403)和FASTDB。确定同一性和相似性的方法的实例讨论于 Michaels&Garian,2000,Current Protocols in Protein Science(蛋白质科学最新方法),Vol 1,John Wiley&Sons,Inc.,其通过引用并入本文。在本发明的一个实施方案中,用于确定两个或更多个多肽间同一性的算法是BLASTP。

[0198] 在本发明的另一实施方案中,用于确定两个或更多个多肽间同一性的算法是FASTDB,其基于Brutlag等的算法(1990,Comp.App. Biosci.6:237-245,其通过引用并入本文)。在FASTDB序列比对中,查询序列和目标序列(subject sequence)是氨基酸序列。序列比对的结果是同一性百分比。可以用于计算同一性百分比的氨基酸序列的FASTDB比对的参数包括但不限于矩阵(Matrix)=PAM,k-维(tuple)=2,错配罚分(Mismatch Penalty)=1,联合罚分(Joining Penalty)=20,随机组长度(Randomization Group Length)=0,截止分数(Cutoff Score)=1,空位罚分(Gap Penalty)=5,空位大小罚分(Gap Size Penalty)0.05,窗口大小(Window Size)=500或目标氨基酸序列的长度,无论哪个更短。

[0199] 如果目标序列由于N-末端或C-末端添加或缺失而不是由于内部的添加或缺失而短或长于查询序列,可以进行人工校正,因为当计算同一性百分比时,FASTDB程序不计算目标序列的N-末端和C-末端截断或添加。对于5'或3'末端截断的目标序列,相对于查询序列,通过将不匹配/对齐的参考序列的N末端和C末端的查询序列碱基数目计算为查询序列总碱基的百分比,来校正同一性百分比。FASTDB序列比对的结果确定匹配/对齐。然后从同一性百分比减去对齐百分比以达到最终同一性百分比分数,这通过利用指定参数的上述FASTDB程序来计算。该校正的分数能够用于以下目的:确定对比结果如何彼此“对应”,以及同一性百分比。处于人工调整同一性百分比分数的目的,可以考虑分别延伸超过参考或目标序列的N-或C-末端的查询(受试)序列或参考序列的残基。也就是说,当人工调整同一性百分比得分或对齐数目时,可以计数不与对照序列的N或C末端匹配/对齐的残基。

[0200] 例如,将90个氨基酸残基的目标序列与100个残基的参考序列比对,以确定同一性百分比。缺失发生在受试序列的N-末端,因此,FASTDB比对没有显示N-末端前10个残基的匹配/对齐。10个不成对的残基表示序列的10% (N-和C-末端的不匹配残基数目/查询序列的残基总数目),从而将10%从FASTDB程序计算出的同一性百分比中减去。如果剩余的90个残基完全匹配,则最终的同一性百分比会是90%。在另一实施例中,90个残基的目标序列与100个残基的参考序列比较。这一次,缺失是内部缺失,因此在不与查询序列匹配/对齐的受试序列没有N-或C-末端。在这种情况下,不人工校正通过FASTDB计算的同一性百分比。

[0201] 本发明还提供了嵌合的或融合的多肽。如本文所用的,“嵌合”多肽或“融合多肽”包含参考多肽一成员的至少一部分,所述参考多肽可操作地连接到第二不同多肽。第二多肽具有对应于与参考多肽基本上不相同的且衍生自相同或不同的生物体的多肽的氨基酸序列。关于融合多肽,术语“可操作地连接”意指参考多肽和第二多肽彼此融合,以使两序列实现归因于所使用序列的提议的功能。第二多肽可以融合到参考多肽的N-末端或C-末端。例如,在一个实施方案中,融合多肽是GST-IGF-1融合多肽,其中IGF-1序列融合到GST序列的C-末端。这种融合多肽能够促进重组多肽的纯化。在另一实施方案中,融合多肽能够在N-末端包含异源信号序列。在某些宿主细胞中(例如,哺乳动物宿主细胞),能够通过利用异源性信号序列增加多肽的表达和/或分泌。

[0202] 除了片段和融合多肽外,本发明还包括天然存在多肽的同系物和类似物。“同系物”在本文被定义为分别具有相似或“相同的”核苷酸或多肽序列的两个核酸或多肽。同系物包括等位变体、直系同源物、旁系同源物、如下文定义的激动剂和拮抗剂。术语“同系物”还包括由于遗传密码的兼并性而不同与参考核苷酸序列的核酸分子,以及由此编码与参考核苷酸序列编码的多肽相同的多肽。如本文所用的,“天然存在的”指存在于自然界的核酸或氨基酸序列。

[0203] 多肽的激动剂能够保留基本上相同的多肽的生物活性,或多肽的生物活性的子集。多肽的拮抗剂能够抑制天然存在形式的多肽的一种或多种活性。

[0204] 在本发明的组合物和方法的另一更为具体的实施方案中,ErbB3配体是HRG- β 或其变体或功能片段。ErbB3配体另外的非限定性实例披露于美国第6,136,558、6,387,638和7,063,961号专利中,这些专利通过引用并入本文。

[0205] 基于在其C-末端部分不同的两种变异EGF-样结构域,Heregulins一般被分类为两种主要类型: α 和 β 。然而,这些EGF-样结构域在包含其中的六个半胱氨酸残基的间隔中是相同的。基于氨基酸序列比较,Holmes等发现在EGF-样结构域的第一和第六个半胱氨酸间,HRGs与肝素结合EGF-样生长因子(HB-EGF) 45%相似,与双调蛋白(AR) 35%相同,与TGF- α 32%相同,与EGF 27%相同。

[0206] 44kDa的neu分化因子(NDF)是人HRG的大鼠等同物。与HRG多肽一样,NDF具有免疫球蛋白(Ig)同源结构域,随后是EGF样结构域,并且缺乏N-末端信号肽。目前,至少有六种不同的成纤维细胞的pro-NDFs,基于EGF样结构域的序列,分类为 α 或 β 多肽。基于EGF样结构域和跨膜结构域间的一段可变序列,分类为同种型1至4。因此,看起来,不同的NDF同种型通过可变剪接产生,并且可以实施截然不同的组织特异性功能。参见,欧洲专利第505148号;以及国际专利公开号W0 93/22424;和W0 94/28133,其通过引用的方式并入本文。

[0207] 在本发明的一个实施方案中,组合物和方法无外源性胰岛素和胰岛素替代物。短语“外源性胰岛素或胰岛素替代物”在本文中用于指不是有意添加到本发明组合物或方法的胰岛素或胰岛素替代物。因此,在本发明的某些实施方案中,方法和组合物无有意补充的胰岛素或胰岛素替代物。然而,组合物或方法可以不必是无内源性胰岛素的。如本文使用的,“内源性胰岛素”指培养的细胞当按照本发明的方法培养时可以主动产生胰岛素。内源性胰岛素还可以用于指来自原代细胞培养物的残留杂质或来自起始物质的杂质。在具体实施方案中,本发明的组合物和方法包含少于50、45、40、35、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1 μ g/mL的胰岛素。

[0208] 如本文所用的,术语“胰岛素”指在正常生理浓度下能够结合胰岛素受体并且能够诱导经由胰岛素受体的信号转导的蛋白或其变体或片段。术语“胰岛素”包括具有天然人胰岛素的或其他哺乳动物胰岛素的或这些序列的任一同系物或变体的多肽序列的蛋白。另外,术语胰岛素包括能够结合胰岛素受体以诱导经由胰岛素受体的信号转导的多肽片段。术语“胰岛素替代物”指任一含锌的化合物,其可以用来代替胰岛素,产生与胰岛素基本上相似的结果。胰岛素替代物的实例包括,但不限于氯化锌、硝酸锌、溴化锌和硫酸锌。

[0209] 为了清楚起见,胰岛素样生长因子不是胰岛素替代物或胰岛素同系物,如本发明所考虑的。因此,在另一具体的实施方案中,本发明的组合物和方法包括使用至少一种胰岛素样生长因子(IGF)或其变体或功能片段。在另一实施方案中,本发明的组合物和方法无任何外源性胰岛素样生长因子(IGFs)。在具体实施方案中,本发明的组合物和方法包含少于200、150、100、75、50、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1ng/mL的IGF-1。

[0210] 如本文所用的,术语“IGF-1R的活化剂”指在调节细胞增殖、分化和凋亡中发挥关键作用的有丝分裂原。IGF-1R活化剂的效应通常通过IGF-1R介导,尽管它们能够通过其他受体来介导。IGF-1R还参与肿瘤病毒蛋白和致癌基因产物诱导的细胞转化,以及该相互作用受到一组特异结合蛋白(IGFBPs)的调节。此外,一大组IGFBP蛋白酶水解IGFBPs,从而导致结合的IGFs的释放,然后释放的IGFs恢复与IGF-1R相互作用的能力。出于本发明的目的,配体、受体、结合蛋白和蛋白酶都被视为IGF-1R的活化剂。在一个实施方案中,IGF-1R的活化剂是IGF-1或IGF-2。在另一实施方案中,IGF-1R的活化剂是IGF-1类似物。IGF-1类似物的非限定性实例包括LongR3-IGF1、Des(1-3)IGF-1、[Arg³]IGF-1、[Ala³¹]IGF-1、Des(2,3)[Ala³¹]IGF-1、[Leu²⁴]IGF1、Des(2,3)[Leu²⁴]IGF-1、[Leu⁶⁰]IGF-1、[Ala³¹][Leu⁶⁰]IGF-1、[Leu²⁴][Ala³¹]IGF-1、以及其组合。在另一实施方案中,IGF-1类似物是LongR3-IGF1,其为人胰岛素生长因子-1的重组类似物。预期LongR3-IGF1最初存在的浓度为约1ng/mL至约1000ng/mL,更优选约5ng/mL至约500ng/mL,更优选约50ng/mL至约500ng/mL,更优选约100ng/mL至约300ng/mL,或者浓度为约100ng/mL。

[0211] 在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括转化生长因子 β (TGF- β)或TGF- β 家族成员或者其变体或功能片段。如本文所用的,术语“TGF- β 家族的成员”或类似物指,由于与TGF- β 家族已知成员的同源型,或者由于在功能方面与TGF- β 家族已知成员的相似性而一般被本领域技术人员分类为属于TGF- β 家族的生长因子。在本发明的具体实施方案中,如果存在TGF- β 家族的成员,TGF- β 家族成员或其变体或功能片段活化SMAD 2或3。在某些实施方案中,TGF- β 家族的成员选自Nodal、活化素A、活化素B、TGF- β 、骨形态发生蛋白-2

(BMP2) 和骨形态发生蛋白-4 (BMP4)。在一个实施方案中, TGF- β 家族的成员 是活化素A。

[0212] 应考虑到, 如果存在Nodal, 它最初存在的浓度为约0.1ng/mL至 约2000ng/ml, 更优选约1ng/mL至约1000ng/ml, 更优选约10ng/mL 至约750ng/ml, 或者更优选约25ng/mL至约500ng/ml。应考虑到, 如果使用活化素A, 它最初存在的浓度为约0.01ng/mL至约1000 ng/ml, 更优选约0.1ng/mL至约100ng/ml, 更优选地约0.1ng/mL至 约25ng/ml, 或者最优选浓度为约10ng/ml。应考虑到, 如果存在 TGF- β , 它最初存在的浓度为约0.01ng/mL至约100ng/ml, 更优选约 0.1ng/mL至约50ng/ml, 或者更优选约0.1ng/mL至约20ng/ml。

[0213] 在本发明的另外实施方案中, 本发明的组合物和方法不含FGF受 体的活化剂。目前至少有22种已知的成纤维细胞生长因子家族的成 员, 这些因子结合四种FGF受体的至少一种中的一个。如本文所用的, 术语“FGF受体的活化剂”指, 要么由于与FGF家族已知成员 的同源性, 要么由于与FGF家族已知成员在功能上的相似性, 通常被本领域 技术人员分类为属于FGF家族的生长因子。在某些实施方案中, FGF 受体的活化剂是FGF, 诸如但不限于 α -FGF和FGF2。在具体实施方 案中, 组合物和方法无外源性FGF2。短语“外源性FGF2”在本文中 用于指不是有意添加到本发明的组合物或方法中的成纤维细胞生长因子 2, 即碱性FGF。因此, 在本发明的某些实施方案中, 方法和组合物无 有意补充的FGF2。然而, 组合物或方法可以不必无内源性FGF2。如 本文所用的, “内源性FGF2”指培养的细胞当按照本发明的方法进行培 养时可以主动产生FGF2。“内源性FGF2”还可以用于指来自原代细胞 培养物的残余杂质或来自起始物质的杂质。在具体的实施方案中, 本 发明的组合物和方法包含少于10、9、8、7、6、5、4、3、2或1ng/mL 的FGF2。

[0214] 然而, 应考虑到, 本发明的组合物和方法能够包括FGF受体的至 少一种活化剂, 包括FGF多肽、其功能片段或其变体的任一种。应考 虑, 如果存在FGF2, 它最初存在的浓度为约0.1ng/mL至约100ng/ml, 更优选约0.5ng/mL至约50ng/ml, 更优选约1ng/mL至约25ng/ml, 更优选约1ng/mL至约12ng/ml, 或者最优选的浓度为约8ng/ml。在 另一具体实施方案中, 本发明的组合物和方法可以包括除FGF2外的 FGF受体的至少一种活化剂。例如, 本发明的组合物和方法可以包括 FGF-7、FGF-10或FGF-22或其变体或功能片段中的至少一种。在具 体的实施方案中, 存在FGF-7、FGF-10和FGF-22中的至少两种或其 变体或功能片段的组合。在另一实施方案中, 存在FGF-7、FGF-10和 FGF-22所有三者或其变体或功能片段。应考虑到, 如果存在FGF-7、 FGF-10或FGF-22或其变体或功能片段的任一种, 则每一种最初存在 的浓度为约0.1ng/mL至约100ng/ml, 更特别是约0.5ng/mL至约50 ng/ml, 更特别是约1ng/mL至约25ng/ml, 更特别是1ng/mL至约12 ng/ml, 或者最特别是浓度为约8ng/ml。

[0215] 在另外某些实施方案中, 本发明的组合物和方法包含血清白蛋白 (SA)。在具体的实施方案中, SA是牛SA (BSA) 或人SA (HAS)。在更 具体的实施方案中, SA的浓度大于约0.2% 体积比 (v/v), 但小于约10% v/v。在更具体的实施方案中, SA的浓度大于约0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.2%、1.4%、1.6%、1.8%、2.0%、2.2%、2.4%、2.6%、2.8%、3.0%、3.2%、3.4%、3.6%、3.8%、4.0%、4.2%、4.4%、4.6%、4.8%、5.0%、5.2%、5.4%、5.6%、5.8%、6.0%、6.2%、6.4%、6.6%、6.8%、7.0%、7.2%、7.4%、7.6%、7.8%、8.0%、8.2%、8.4%、8.6%、8.8%、9.0%、9.2%、9.4%、9.6%和9.8% (v/v)。

[0216] 在另外的实施方案中, 组合物和方法包括至少一种不溶底物。例 如, 可以将可分

化细胞置于包含化合物的细胞培养表面,所述化合物 诸如但不限于聚苯乙烯、聚丙烯。该表面可以进而被不溶底物包被。在具体的实施方案中,不溶底物选自胶原蛋白、纤连蛋白以及其片段 或变体。不溶底物的其他实例包括但不限于纤维蛋白、弹性蛋白、纤 连蛋白、层粘连蛋白和巢蛋白。

[0217] 因此,本发明的细胞培养环境和方法包括在贴壁培养中接种细胞。如本文所用的,术语“接种(plated)”和“接种(plating)”指允许细胞在贴壁 培养中生长的任一过程。如本文所用的,术语“贴壁培养”指细胞凭借 其培养在固体表面的细胞培养系统,所述固体表面可以进而由不溶基 底包被,该不溶基底可以进一步由诸如以下列出的那些基底的另一基 底表面被覆包被,或者允许细胞增殖或在培养中稳定的任何其他化学 或生物材料包被。细胞可以或可以不紧紧粘附到固体表面或粘附到基 底。用于贴壁培养的基底可以包含以下任一种或组合:多鸟氨酸、层 粘连蛋白、聚赖氨酸、纯化的胶原蛋白、明胶、纤连蛋白、肌腱蛋白、玻连蛋白、巢蛋白、硫酸肝素蛋白聚糖、聚乙醇酸(PGA)、聚乳酸(PLA) 和聚乳酸-乙醇酸(PLGA)。此外,用于贴壁培养的基底可以包含置于 饲养层下面的基质,或者置于多能人细胞或细胞培养物下面的基质。如本文所用的,术语“细胞外基质”包括固体基底,诸如但不限于上文 描述的那些基底,以及置于饲养层或置于多能人细胞或细胞培养物下面的基质。在一个实施方案中,将细胞接种于MATRIGEL™包被的平 板上。在另一实施方案中,细胞接种于纤连蛋白包被的平板上。在某些实施方案中,如果将细胞接种于纤连蛋白上,则平板通过在室温下 用被稀释于组织级水中的10μg/mL的人血浆纤连蛋白(Invitrogen, #33016-015)包被2-3小时来制备。在另一实施方案中,可以将血清置 于培养基长达24小时以允许细胞接种于塑料制品。如果使用血清以促 进细胞附着,则移走培养基,并将基本上无血清的组合物添加到被接 种的细胞。

[0218] 本发明的组合物和方法预期到,将可分化细胞培养于实质上无饲 养细胞或饲养层的条件中。如本文所用的,“饲养细胞”是体外生长的 与靶细胞共培养并将靶细胞稳定在它当前的分化状态的细胞。如本文 所用的,“饲养细胞层”可以与术语“饲养细胞”交替使用。如本文所用 的,术语“实质上无饲养细胞”指不包含饲养细胞或包含最低允许数目的 饲养细胞的组织培养条件。所用“最低允许”指从可分化细胞可能已 经在饲养细胞上培养的前次培养条件带入本次培养条件的饲养细胞的 数目。在以上方法的一个实施方案中,条件培养基获自将靶细胞稳定 于目前的分化状态的饲养细胞。在另一实施方案中,限定培养基是非 条件培养基,其不是从饲养细胞获得的培养基。

[0219] 如本文所用的,术语“稳定”当用于提及细胞或细胞培养物的分化 状态时,指细胞会继续在培养中增殖多代,以及优选地在培养中无限 期增殖,其中培养的大多数(如果不是全部的话)细胞是相同分化状态。此外,当稳定的细胞分裂时,分裂通常产生相同细胞类型的细胞或产 生相同分化状态的细胞。如果细胞培养条件不改变,稳定的细胞或细 胞群一般不会进一步分化或去分化,这些细胞继续传代,不会生长过 度。在一个实施方案中,稳定的细胞能够在稳定状态无限期地增殖, 或者增殖至少超过两代。在更具体的实施方案中,细胞稳定超过3代、4代、5代、6代、7代、8代、9代、超过10代、超过15代、超过 20代、超过 25代、或者超过30代。在一个实施方案中,细胞稳定超 过约1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个 月、9个月、10个月或11个月的连续传代。在另一实施方案中,细胞 稳定超过约1年的连续传代。在一个实施方案中,干细胞通过在限定培 养基中的常规传代以

多能状态维持在培养中,直至期望分化它们时。如 本文所用,术语“增殖”指细胞培养物中细胞数目的增加。

[0220] 在某些实施方案中,组合物和方法包括BMP信号转导的灭活剂。如本文所用,“BMP信号转导的灭活剂”指通过任一可能的信号转导途径拮抗一种或多种BMP蛋白或其任一上游或下游信号转导组分活性的试剂。用于灭活BMP信号转导的化合物可以是本领域已知的或以后发现的任何化合物。BMP信号转导的灭活剂的非限定实例包括显性抑制的、截断的BMP受体、可溶性BMP受体、BMP受体-Fc嵌合体、头蛋白、滤泡稳定蛋白、腱蛋白、gremlin、cerberus/DAN家族蛋白、ventropin、高剂量活化素和无羊膜(amnionless)。

[0221] 在某些实施方案中,组合物和方法可以包含至少一种激素、细胞因子、脂肪因子、生长激素或其变体或功能片段。目前应考虑到,在某些实施方案中,存在于限定培养基中的生长激素会与培养在限定培养基的可分化细胞来自相同物种。因此,例如,如果培养人细胞,则生长激素是人生长激素。还可以考虑使用来自与培养的细胞不同物种的生长激素。优选地,激素、细胞因子、脂肪因子和/或生长激素存在的初始浓度为约0.001ng/mL至约1000ng/mL,更优选地约0.001ng/mL至约250ng/mL,或者更优选约0.01ng/mL至约150ng/mL。

[0222] 可以包括在本发明的组合物和方法中的细胞因子和脂肪因子的实例包括,但不限于四 α -螺旋束家族的细胞因子、白介素-1(IL-1)家族的细胞因子、IL-17家族的细胞因子和趋化因子家族的细胞因子。当然,本发明考虑了这些家族的细胞因子每种的成员和亚类,诸如,但不限于CC趋化因子、CXC趋化因子、C趋化因子和CX3C趋化因子、干扰素、白介素、淋巴毒素、c-试剂盒配体(c-kit ligand)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、单细胞-巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、瘦素、脂联素、抵抗素、纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF α)、肿瘤坏死因子- β (TNF β)、白血病抑制因子、内脂素、视黄醇结合蛋白4(RBP4)、红细胞生成素(EPO)、血小板生成素(THPO)。当然,本领域技术人员应当理解,本发明考虑了上文所列因子的变体或功能片段。

[0223] 本发明涉及培养可分化细胞的方法,该方法包括将可分化细胞接种于细胞培养表面,提供给细胞基础盐营养液以及提供用于刺激细胞中ErbB2-定向的酪氨酸激酶活性的手段。

[0224] 在一个实施方案中,在无血清或血清替代物以及无饲养细胞层的情况下,使可分化细胞与本发明的至少一种组合物接触,以使细胞维持未分化状态至少一个月。多能性可以通过细胞有关表面标志物、转录标志物、核型以及分化为三个胚层细胞的能力的特征来确定。这些特征为本领域技术人员所熟知。

[0225] 本发明的实施方案描述了多种可分化的pPSC包括人多能干细胞如hESC,包括但不限于CyT49、CyT203、CyT25、BG01、BG02和MEL1,以及诱导的多能干(iPS)细胞如iPSC-482c7和iPSC-603(Cellular Dynamics International, Inc., Madison, Wisconsin)以及iPSC-G4和iPSC-B7(Shinya Yamanaka, Center for iPS Cell Research, Kyoto University);使用G4和B7的研究详细描述于2010年4月22日提交的,题目为:CELL COMPOSITIONS DERIVED FROM DEDIFFERENTIATED REPROGRAMMED CELLS(源自分化的重编程细胞的细胞组合物)的美国专利申请第12/765,714号中,其通过引用全部并入本文。这

些人多能干细胞中的一些通过国家登记处如美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 进行了登记,并列举于NIH人干细胞登记处 (Human Stem Registry) (例如, CyT49登记号#0041)。关于CyT49和其他可获得的细胞系的信息也可在万维网的 stemcells.nih.gov/research/registry 地址下找到。还有其他的细胞系例如, BG01和BG01v, 在售和分别由 **WiCell®** (产品目录名: BG01) 和ATCC (产品目录号No. SCRC-2002) 分配于第三方, 所述 **WiCell®** 隶属于威斯康辛州国际干细胞库 (Wisconsin International Stem Cell Bank)。尽管本文描述的其他细胞系可能没有由生物保藏机构如 **WiCell®** 或ATCC进行登记或分配, 但这些细胞系可以直接或间接地从主要研究者、实验室和/或研究机构为公众所获得。对于生命科学领域的技术人员来说, 公众提出细胞系和试剂的使用请求是常见的。通常, 这些细胞或材料的转移是通过细胞系或材料的所有者与其接受者之间标准的材料转移协议来进行的。这种类型的材料转移在研究领域, 特别是在生命科学领域经常发生。事实上, 自从细胞产生并被表征出来以后, 申请人就已经将所述细胞, 包括CyT49 (2006)、CyT203 (2005)、CyT25 (2002)、BG01 (2001)、BG02 (2001)、BG03 (2001) 和BG01v (2004), 通过这类协议转移给商业的和非盈利行业的合作伙伴和协作者。括号中的日期显示细胞系或材料为公众可利用时的日期。

[0226] 2006年8月, Klimanskaya等人证明hESC可衍生自单个分裂球, 因此保持了胚胎的完整并且不会导致其毁坏。使用显微操作技术对每个胚胎进行活组织检查, 获得了19个ES细胞样产物和2个稳定的hESC系。这些hESC系能够被维持在未分化状态超过6个月, 并显示出正常核型和多能性标志物的表达, 包括Oct-4、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、nanog和碱性磷酸酶。这些hESC能够分化并在体外形成所有3个胚层的衍生物和在体内形成畸胎瘤。这些产生了新的干细胞系而没有破坏胚胎的方法, 解决了使用人胚胎的道德担忧。参见Klimanskaya et al. 2006 Nature 444:481-5, Epub 2006Aug 23, 其通过引用全部并入本文。

[0227] 本研究使用一些CyT或BG hES细胞系, 然而, 继2006年6月16日最初提交临时优先权申请美国专利申请第60/805,039号后, 其他研究者已经公布了使用最初描述的方法或其变型利用其他人多能干细胞系的报道, 所述人多能干细胞系包括但不限于H7、H9、HUES7、H1、HSF6、chHES-8 (ch=中国)、chHES-20和chHES-22、H9、BG01、BG02、HUES4、HUES8、HUES9和HUES 2; 其他诱导的多能干细胞 (iPSC) 系如DiPS-H1 & DiPS-H2 (T1-糖尿病特异性iPS细胞), 以及其他描述于2010年4月22日提交的, 题目为: CELL COMPOSITIONS DERIVED FROM DEDIFFERENTIATED REPROGRAMMED CELLS (源自分化的重编程细胞的细胞组合物) 的美国专利公开第2010-0272695号中的iPS细胞, 其通过引用全部并入本文; 以及人多能干细胞如人单性生殖干细胞 (hpSC)。参见例如, D'Amour et al. 2005, Nature Biotechnology 23:1534-1541; Cai et al. 2007, Hepatology, 45:1229-39; King et al. 2008, Regen. Med. 3:175-80; Zhou et al. 2008, Stem Cells & Development 17:737-750; Brunner et al. 2009, Genome Res. 19:1044-1056; Maehr et al. 2009, PNAS 106:15768-15773; Argawal et al. 2008, Stem Cells 26:1117-1127; Bingham et al. 2009, Stem Cells & Development 18:1-10; Borowiak et al. 2009, Cell Stem Cell 4:348-358; Chen et al. 2009, Nature Chem Biology 5:258-265; Revazova et al. 2007, Cloning Stem Cells 9:432-449; Turovets et al. 2011, Differentiation 81:292-8, Epub 2011Feb 8,

其通过引用全部并入本文。因此研究机构详细提供的大量证据表明了,本发明的方法不限于本文所述的多能细胞。

[0228] 表1和2分别为某些hESC和iPSC的非穷举性列表,其在世界范围内可提供用于研究和/或商业目的,并适用于本发明的方法和组合物。表 1和2的信息源自文献和公开提供的数据库,包括例如美国国家卫生研究院 (NIH) 干细胞登记处、人胚胎干细胞登记处 (Human Embryonic Stem Cell Registry) 和位于美国马萨诸塞州伍斯特市麻省大学医学院的国际干细胞 登记处 (International Stem Cell Registry)。随着细胞系可获得并获得了登 记,这些数据库被定期更新。

[0229] 表1:人ES细胞系

[0230]

机构（国家）	名称
美国	
位于乔治亚州雅典的布雷萨杰公司（ <u>BresaGen, Inc., Athens, Georgia</u> ）（美国）	BG01、BG02、BG03；BG04；BG01v
英杰公司（ <u>Invitrogen</u> ）（美国）	BG01v/hOG
位于加利福尼亚州圣地亚哥的塞瑟公司（ <u>CyThera, Inc., San Diego, California</u> ）（美国）	CyT49、CyT203、CyT25
位于加利福尼亚州门罗公园的吉罗公司（ <u>Geron Corporation, Menlo Park, California</u> ）（美国）	GE01、GE07、GE09、GE13、GE14、GE91、GE92（H1、H7、H9、H13、H14、H9.1、H9.2）
位于加利福尼亚州旧金山的加利福尼亚大学（ <u>University of California, San Francisco, California</u> ）（美国）	UC01、UC06（HSF-1、HSF-6）；UCSFB1、UCSFB2、UCSFB3、UCSFB4、UCSFB5、UCSFB6、UCSFB7、UCSFB8、UCSFB9 和 UCSFB10
位于威斯康辛州麦迪逊的威斯康辛校友研究基金会（ <u>Wisconsin Alumni Research Foundation, Madison, Wisconsin</u> ）（美国）	WA01、WA07、WA09、WA13、WA14（H1、H7、H9、H13、H14）
儿童医院公司（ <u>Children's Hospital Corporation</u> ）（美国）	CHB-1、CHB-2 CHB-3 CHB-4、CHB-5、CHB-6、CHB-8、CHB-9、CHB-10、CHB-11 和 CHB-12
洛克菲勒大学（ <u>The Rockefeller University</u> ）（美国）	RUES1、RUES2 和 RUES3
哈佛大学（ <u>Harvard University</u> ）（美国）	HUES1、HUES2、HUES3、HUES4、HUES5、HUES6、HUES7、HUES8、HUES9、HUES10、HUES11、HUES12、HUES13、HUES14、HUES15、HUES16、HUES17、HUES18、HUES19、HUES20、HUES21、HUES22、HUES23、HUES24、HUES25、HUES26、HUES27；HUES28；HUES48；HUES49；HUES53；HUES55；和 HUES 56
西奈山医院山缪卢纶菲尔德研究所（ <u>Mt Sinai Hosp-Samuel Lunenfeld Research Institute</u> ）（美国）	CA1 和 CA2
儿童纪念医院（ <u>Children's Memorial Hospital</u> ）（美国）	CM-1、CM-2、CM-5、CM-6、CM-7、CM-8、CM-11、CM-12、CM-13、CM-14、CM-16

[0231]

机构（国家）	名称
德克萨斯大学休斯顿健康科学中心（The University of Texas Health Science Center at Houston）（美国）	CR1 和 CR2
加利福尼亚干细胞公司（California Stem Cell, Inc.）（美国）	CSC14
康涅狄格大学医学/牙科学院（University of Connecticut School of Medicine/Dentistry）（美国）	CSC14、CT1、CT2、CT3 和 CT4
广州医学院第三附属医院（The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College）（美国）	FY-3PN; FY-hES-1; FY-hES-3; FY-hES-5; FY-hES-7; 和 FY-hES-8
先进细胞技术公司（Advanced Cell Technology, Inc.）（美国）	MA 01; MA 09; MA 42; MA 50; MA135; NED 1; NED 2; NED 3; 和 NED 4
斯坦福大学（Stanford University）（美国）	MFS5
纽约大学医学院（New York University School of Medicine）（美国）	NYUES1; NYUES2; NYUES3; NYUES4; NYUES5; NYUES6; 和 NYUES7
雷普吉尼克有限公司（Reprogenetics, LLC）（美国）	RNJ7
加利福尼亚大学洛杉矶分校（University of California, Los Angeles）（美国）	UCLA1; UCLA2; 和 UCLA3
东弗吉尼亚医学院（Eastern Virginia Medical School）（美国）	ES-76; ES-78-1; ES-78-2
生殖遗传医学研究所（Reproductive Genetics Institute）（美国）	RG-222; RG-230; RG-249; RG-308; RG-313; RG-148; 患有肌营养不良性肌强直症 1（DYSTROPHIA MYOTONICA 1, DM1），46,XY; RG-153; 患有肌营养不良性肌强直症 1（DM1），46,XX; RG-170; 患有贝克尔型肌营养不良（MUSCULAR DYSTROPHY, BECKER TYPE, BMD），46,XY; RG-186; 患有亨廷顿氏病（HUNTINGTON DISEASE,

[0232]

机构 (国家)	名称
	<p>HD), 46,XX;</p> <p>RG-194; 患有亨廷顿氏病 (HD), 46,XY;</p> <p>RG-233; 患有血红蛋白 β 基因座 (HEMOGLOBIN BETA LOCUS, HBB)(HbS/HbS - 镰状细胞性贫血), 46,XX;</p> <p>RG-245; X 连锁艾米雷-德福斯型肌营养不良 (EMERY-DREIFUSS MUSCULAR DYSTROPHY, X-LINKED, EDMD), 携带者, 47,XXY;</p> <p>RG-246; 患有 X 连锁艾米雷-德福斯型肌营养不良 (EDMD), 46,XY;</p> <p>RG-271; 患有常染色体显性扭转性肌张力障碍 1 (TORSION DYSTONIA 1, DYT1) (N/GAG 缺失), 46,XY;</p> <p>RG-283; 患有杜兴型肌营养不良 (MUSCULAR DYSTROPHY, DUCHENNE TYPE, DMD), 46,XY;</p> <p>RG-288; 患有囊性纤维化 (CYSTIC FIBROSIS, CF) ($\delta F508/\delta F508$), 46,XY;</p> <p>RG-289; 患有囊性纤维化 (CF), ($\delta F508/\delta F508$), 46,XX;</p> <p>RG-301; 患有杜兴型肌营养不良 (DMD), 46,XY;</p> <p>RG-302; 杜兴型肌营养不良 (DMD), 携带者, 46,XX;</p> <p>RG-315; 患有 I 型神经纤维瘤病 (NEUROFIBROMATOSIS, TYPE I, NF1) (R19 47X/N), 46,XY;</p> <p>RG-316; 患有 1 型结节性硬化 (TUBEROUS SCLEROSIS, TYPE 1, TSC1) (N/IVS7+1 G-A);</p> <p>RG-316; 患有 1 型结节性硬化 (TSC1) (N/IVS7+1 G-A);</p> <p>RG-320; 患有 1 型结节性硬化 (TSC1) (N/IVS7+1 G-A);</p> <p>RG-326; 患有腓翼状胫肉综合症 (POPLITEAL PTERYGIUM SYNDROME, PPS)(R84H/N), 46,XY;</p> <p>RG-328; 患有面肩肱型肌营养不良 1A (FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY 1A, FSHD), 46,XY;</p> <p>RG-330; 患有面肩肱型肌营养不良 1A (FSHD), 46,XY;</p> <p>RG-333; 患有面肩肱型肌营养不良 1A (FSHD), 46,XX;</p> <p>RG-356; 患有血红蛋白 α 基因座 (HEMOGLOBIN ALPHA LOCUS, HBA) ($-\alpha/--$), 46,XX;</p> <p>RG-357; 患有 X 连锁艾米雷-德福斯型肌营养不良 (EDMD), 46,XY;</p>

[0233]

机构（国家）	名称
	RG-358; 患有 X 连锁艾米雷-德福斯型肌营养不良 (EDMD), 46,XY; RG-399; 患有面肩肱型肌营养不良 1A (FSHD), 46,XX; RG-401; 患有面肩肱型肌营养不良 1A (FSHD), 46,XX; RG-402; 患有面肩肱型肌营养不良 1A (FSHD), 46,XX; RG-403; 患有面肩肱型肌营养不良 1A (FSHD); RG-404; 患有 I 型脊髓性肌萎缩症 (SPINAL MUSCULAR ATROPHY, TYPE I, SMA1), 46,XY; RG-406; 患有常染色体显性扭转性肌张力障碍 1 (DYT1) (N/GAG 缺失); RG-413; 患有家族性乳癌 (BREAST CANCER, FAMILIAL, BRCA2) (N/IVS7 GT 缺失) 且患有 I 型多发性内分泌瘤 (MULTIPLE ENDOCRINE NEOPLASIA, TYPE I, MEN1) (N/3036 4bp 缺失); RG-414; 患有 I 型多发性内分泌瘤 (MEN1) (N/3036 4bp 缺失); RG-415; 患有亨廷顿氏病 (HD); RG-416; 患有囊性纤维化 (CF), (δF508/1717-1 G-A); RG-417; 患有囊性纤维化 (CF), (δF508/1717-1 G-A); RG-418; 患有血红蛋白 β 基因座 (HBB) (cd8+G/619 缺失); RG-420; 患有血红蛋白 β 基因座 (HBB) (cd8+G/619 缺失); RG-422; 患有囊性纤维化 (CF), (N1303K/δF508); RG-423; 囊性纤维化 (CF), 携带者 (N/δF508); RG-424; 患有 2 型多发性内分泌瘤 (MEN2B) (M918T/N); RG-426; 患有佩梅病 (PELIZAEUS-MERZBACHER DISEASE, PMLD); RG-428; 患有 1 型结节性硬化 (TSC1) (N/IVS7+1 G-A)
南美	
圣保罗生物科技研究所 (Instituto de Biociências, São Paulo) (巴西)	BR-1
中东	
位于海法的以色列技术工程学院 (Technion-Israel)	TE03、TE04、TE06 (I3、I4、I6)

[0234]

机构（国家）	名称
Institute of Technology, Haifa）（以色列）	
哈达萨大学医院（Hadassah University Hospital）（以色列）	HAD 1; HAD 2; HAD 3; HAD 4; HAD 5; HAD 6
耶路撒冷希伯来大学（Hebrew University of Jerusalem）	HEFX1
以色列技术工程学院	I3; I3.2; I3.3; 14; 16; 16.2; J3; J3.2
罗扬研究院（Royan Institute）（伊朗）	ARMD.1.H.iPSC.2; BOM.1.H.iPSC.1; CNS.1.H.iPSC.10; CNS.2.H.iPSC.7; FHC.1.H.iPSC.3; GSD.1.H.iPSC.7; HER.1.H.iPSC.1; LCA.1.H.iPSC.1; LHON.1.H.iPSC.5; R.1.H.iPSC.1; R.1.H.iPSC.4; R.1.H.iPSC.9; Royan H1; Royan H10; Royan H2; Royan H3; Royan H4; Royan H5; Royan H6; Royan H7; Royan H8; Royan H9; RP.1.H.iPSC.2; RP2.H.iPSC.3; TYR.1.H.iPSC.1; USH.1.H.iPSC.6
欧洲	
位于格森伯格的塞拉提斯 AB 公司（Cellartis AB, Gotenberg）（瑞典）	SA001、SA002（萨赫尔格雷斯卡 1（Sahlgrenska 1）、萨赫尔格雷斯卡 2）; SA002.2; SA003; AS034.1; AS034.1.1; AS034.2; AS038; AS046; FC018; AS085; AS094; SA111; SA121; SA142; SA167; SA181; SA191; SA196; SA202; SA203; SA211; SA218; SA240; SA279; SA348; SA352; SA399; SA461; SA502; SA506; SA521; SA540; SA611
卡洛林斯卡研究所（Karolinska Institutet）（瑞典）	HS181; HS207; HS235; HS237; HS293; HS306; HS346; HS351; HS356; HS360; HS361; HS362; HS363; HS364; HS366; HS368; HD380; HS382; HS400; HS401; HS402; HS415; HS420; HS422; HS426; HS429; HS429A; HS429B; HS429C; HS429D; HS475; HS480; HS481; HS539
位于哥德堡的哥德堡大学（Göteborg University, Göteborg）（瑞典）	SA04–SA19（萨赫尔格雷斯卡 4–萨赫尔格雷斯卡 19）
位于斯德哥尔摩的卡洛林斯卡研究所（Karolinska Institute, Stockholm）（瑞典）	KA08、KA09、KA40、KA41、KA42、KA43（hICM8、hICM9、hICM40、hICM41、hICM42、hICM43）
日内瓦大学（Geneva University）（瑞士）	CH-ES1
巴塞尔大学（University of Basel）（瑞士）	CH-ES3; CH-ES3; CH-ES5
罗斯林细胞有限公司	RC2; RC3; RC4; RC5

[0235]

机构（国家）	名称
(Roslin Cells Ltd) (英国)	
纽卡斯尔大学 (University of Newcastle upon Tyne) (英国)	NCL-1; NCL-2; NCL-3; NCL-4; NCL-5; NCL-6; NCL-7; NCL-8; NCL-9
罗斯林研究所 (Roslin Institute) (爱丁堡 (Edinburgh)) 和基隆公司 (Geron Corporation) (英国)	RH1; RH2; RH3; RH4; RH5; RH6; RH7; RH9;
曼彻斯特大学 (University of Manchester) (英国)	Man 2
伦敦大学国王学院 (King's College London) (英国)	KCL-001 (先前称为 WT3)
位于谢菲尔德的谢菲尔德大学 (The University of Sheffield, Sheffield) (英国)	SHEF-1; SHEF-2; SHEF-3; SHEF-4; SHEF-5; SHEF-6; SHEF-7; SHEF-8
爱丁堡大学 (Universities of Edinburgh) 和牛津大学; 剑桥大学 (University of Cambridge) (英国)	Edi-1; Edi-2; Edi-3; Edi-4
罗斯林细胞有限公司、罗斯林研究所、爱丁堡大学和曼彻斯特大学、曼彻斯特和曼彻斯特的中心儿童大学医院 NHS 信托基金 (Central Manchester & Manchester Children's University Hospitals NHS Trust) (英国)	RCM-1; RC-1; RC-2; RC-3; RC-4; RC-5; RC-6; RC-7; RC-8; RC-9; RC-10
盖氏和圣托马斯的伦敦大学国王学院与盖氏医院信托/残障基金 (King's College London & Guy's Hospital Trust / Charitable Foundation of Guy's & St Thomas) (英国)	KCL-003-CF1 (先前称为 CF1); KCL-005-HD1; KCL008-HD-2; KCL009-trans-1; KCL-001 (WT-3); KCL-001 (WT-4)
澳大利亚干细胞科技有限公司 (Stem Cell Sciences Ltd, Australia; SCS) 和澳大利亚干细胞中心 (Australian Stem Cell Centre, ASCC)	MEL-1; MEL-2; MEL-3; MEL-4

[0236]

机构（国家）	名称
爱丁堡大学 (University of Edinburgh) (英国)	CB660
艾瑞达有限公司 (Axordia Ltd.) (英国)	Shef-1; Shef-2; Shef-3; Shef-4; Shef-5; Shef-6; Shef-7
诺丁汉大学 (University of Nottingham) (英国)	Nott-1; Nott-2
巴萨罗那再生医学中心 (Centre of Regenerative Medicine in Barcelona) (西班牙)	ES-2; ES-3; ES-4; ES-5; ES-6; ES-7; ES-8; ES-9; ES-10; ES-11EM; cFA404-KiPS4F-1; cFA404-KiPS4F-3; KiPS3F-7; KiPS4F-1; KiPS4F-8
费利佩王子的实验室研究中心 (Principe Felipe Centro de Investigacion) (西班牙)	VAL-3; VAL-4; VAL-5; VAL-6M; VAL-7; VAL-8; VAL-9; VAL-10B
布鲁塞尔自由大学 (Université Libre de Bruxelles) (比利时)	ERA-1; ERA2; ERA-3; ERAMUC-1; ERAMUC-1
布鲁塞尔自由大学 (Vrije Universiteit Brussel) (比利时)	VUB01; VUB02; VUB06; VUB07; VUB03_DM1; VUB04_CF; VUB05_HD; VUB08_MFS; VUB09_FSHD; VUB10_SCA7; VUB11_FXS; VUB13_FXS; VUB14; VUB19_DM1; VUB20_CMT1A; VUB22_CF; VUB23_OI; VUB24_DM1; VUB26; VUB27; VUB28_HD_MFS
曼彻斯特和曼彻斯特的中心儿童大学医院 NHS (Central Manchester and Manchester Children's University Hospitals NHS) (英国)	Man 1; Man 2
巴黎第十一大学 (Université Paris-Sud 11) (法国)	CL01; CL02; CL03; PB04; PB05; PB05-1; PB06; PB06-1; PB07; PB08; PB09; PB10
因信美公司 (INSERM) (法国)	OSCAR; STR-I-155-HD; STR-I-171-GLA; STR-I-189-FRAXA; STR-I-203-CFTR; STR-I-209-MEN2a; STR-I-211-MEN2a; STR-I-221-Sca2; STR-I-229-MTMX; STR-I-231-MTMX; STR-I-233-FRAXA; STR-I-251-CFTR; STR-I-301-MFS; STR-I-305-APC; STR-I-315-CMT1a; STR-I-347-FRAXA; STR-I-355-APC; STR-I-359-APC
马萨里克大学 (Masaryk University) (捷克共和国)	CCTL 6; CCTL 8; CCTL 9; CCTL 10; CCTL 12; CCTL 13; CCRL 14
奥尔堡大学 (Aalborg)	CLS1; CLS2; CLS3; CLS4

[0237]

机构（国家）	名称
University）（丹麦）	
哥本哈根大学（University of Copenhagen）（丹麦）	LRB001; LRB002; LRB003; LRB004; LRB005; LRB006; LRB007; LRB008; LRB009; LRB010; LRB011; LRB013; LRB014; LRB016; LRB017; LRB018;
南丹麦大学（University of Southern Denmark）	KMEB1; KMEB2; KMEB3; KMEB4; KMEB
赫尔辛基大学（University of Helsinki）（芬兰）	FES21; FES22; FES29; FES30; FES61; FES75
坦佩雷大学（University of Tampere）（芬兰）	Regea 06/015; Regea 06/040; Regea 07/027; Regea 07/046; Regea 08/013; Regea 08/017; Regea 08/023; Regea 08/056
莱顿大学医学中心（Leiden University Medical Center）（荷兰）	HESC-NL1; HESC-NL2; HESC-NL3; HESC-NL4
俄罗斯科学院（Russian Academy of Sciences）（俄罗斯）	ESM01; ESM02; ESM03;
伊斯坦布尔纪念医院（Istanbul Memorial Hospital）（土耳其）	MINE: NS-2; NS-3; NS-4; NS-5; NS-6; NS-7; NS-8; NS-9; NS-10; OZ-1; OZ-2; OZ-3; OZ-4; OZ-5; OZ-6; OZ-7; OZ-8
澳大利亚	
莫纳什大学（Monash University）（澳大利亚）	Envy
位于悉尼的威尔斯亲王医院（Prince of Wales Hospital, Sydney）（澳大利亚）	E1C1; E1C2; E1C3; E1C4; Endeavour 1; Endeavour 2; hES3.1; hES3.2; hES3.3
悉尼 IVF 有限公司（Sydney IVF Limited）（澳大利亚）	SIVF01; SIVF03; SIVF05; SIVF06; SIVF07; SIVF08; SIVF09; SIVF10; SIVF11; SIVF12; SIVF13
亚洲	
京都大学（Kyoto University）（日本）	201B1; 201B2; 201B3; 201B6; 201B7; 243H1; 243H7; 246G1; 246G3; 246G4; 246G5; 246G6; khES-1; khES-2; khES-3;
新加坡干细胞合作联盟（Singapore Stem Cell Consortium）	ESI-013; ESI-014; ESI-017; ESI-027; ESI-035; ESI-049; ESI-051; ESI-053
胚胎干细胞国际公司（ES Cell International Pte Ltd）（新加坡）	ES01、ES02、ES03、ES04、ES05、ES06 (HES-1、HES-2、HES-3、HES-4、HES-5、HES-6
玛利亚生物科技有限公司（Maria Biotech Co.	MB01、MB02、MB03; MB04; MB05; MB06; MB07; MB08; MB09

[0238]

机构（国家）	名称
Ltd.) – 位于首尔的玛利亚不孕不育医学研究所 (Maria Infertility Hospital Medical Institute, Seoul) (韩国)	
美滋梅迪医院 (MizMedi Hospital) — 位于首尔的首尔国立大学 (Seoul National University, Seoul) (韩国)	MI01 (Miz-hES1); Miz-hES2; Miz-hES3; Miz-hES4; Miz-hES5; Miz-hES6; Miz-hES7; Miz-hES8; Miz-hES9; Miz-hES10; Miz-hES11; Miz-hES12; Miz-hES13; Miz-hES14; Miz-hES15;
抱川中文医科大学医学院 (Pochon CHA University College of Medicine) (韩国)	CHA-hES3; CHA-hES4
首尔国立大学 (韩国)	SNUhES1; SNUhES2; SNUhES3; SNUhES4; SNUhES11; SNUhES16
位于巴尔的摩的国家生物科技中心/塔塔基础研究院 (National Centre for Biological Sciences/Tata Institute of Fundamental Research, Bangalore) (印度)	NC01、NC02、NC03 (FCNCBS1、FCNCBS2、FCNCBS3); BJN-hem19; BJN-hem20
位于孟买的瑞莱恩斯生命科技公司 (Reliance Life Sciences, Mumbai) (印度)	RL05、RL07、RL10、RL13、RL15、RL20、RL21 (RLS ES 05、RLS ES 07、RLS ES 10)
国家生殖健康研究院 (National Institute for Research in Reproductive Health) (印度)	KIND-1; KIND-2
塔塔基础研究院 (印度)	FCNCBS1; FCNCBS2; FCNCBS3
高雄医学大学 (Kaohsiung Medical University) (台湾)	T1; T2; T3; T4; T5
中南大学 (Central South University) (中国)	chESC-3 (H3); chESC-8; chESC-20; chESC-22; EBNA1+H9
中国科学院研究生院 (Graduate University of Chinese Academy of Sciences) (中国)	hPES-1; hPES-2
华中科技大学 (Huazhong University of Science and Technology) (中国)	hES-8; hES18
北京大学第三医院	B4; B7; PKU1; PKU2

[0239]

机构（国家）	名称
（Peking University Third Hospital）（中国）	
上海交通大学医学院 （Shanghai Jiao Tong University School of Medicine）（中国）	SHhES1
上海第二医科大学 （Shanghai Second Medical University）（中国）	SH1; SH2; SH4; SH7; SH28; SH35; SH35a; SH38; SH39; SH42
中山大学（Sun Yat-sen University）（中国）	CHES-1; SYSU-1; SYSU-2
中山大学附属第二医院 （Sun Yat-sen University Second Affiliated Hospital）（中国）	CHE-1; CHE-2; CHE-3
广州医学院第三附属医院 （The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College）（中国）	FY-hES-5; FY-hES-9; FY-hES-10;; FY-hES-11

[0240] 表2:人诱导的多能干(hIPS)细胞系的列表

[0241]

位于麦迪逊的威斯康辛大学 （University of Wisconsin – Madison）（美国）	<ol style="list-style-type: none"> 1. IPS(包皮)-1 (正常; 46XY; 余 J. (Yu, J.) 等人, [汤姆逊 (Thomson)] 科学 (Science). 2007, 来源于人类体细胞的诱导性多能干细胞系 (Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells) 318(5858):1917-20。) 2. IPS(包皮)-2 (正常; 46XY; 余 J. 等人, [汤姆逊] 科学. 2007, 来源于人类体细胞的诱导性多能干细胞系 318(5858):1917-20。) 3. IPS(包皮)-3 (正常; 46XY; 余 J. 等人, [汤姆逊] 科学. 2007, 来源于人类体细胞的诱导性多能干细胞系 318(5858):1917-20。) 4. IPS(包皮)-4 (正常; 46XY; 余 J. 等人, [汤姆逊] 科学. 2007, 来源于人类体细胞的诱导性多能干细胞系 318(5858):1917-20。) 5. IPS(IMR90)-1 (正常; 46XX; 余 J. 等人, [汤姆逊] 科学. 2007, 来源于人类体细胞的诱导性多能干细胞系 318(5858):1917-20。) 6. IPS(IMR90)-2 (正常; 46XX; 余 J. 等人, [汤姆逊] 科学. 2007, 来源于人类体细胞的诱导性多能干细胞系 318(5858):1917-20。) 7. IPS(IMR90)-3 (正常; 46XX; 余 J. 等人, [汤姆逊] 科学. 2007, 来源于人类体细胞的诱导性多能干细胞系 318(5858):1917-20。)
---	--

[0242]

	<p>8. IPS(IMR90)-4 (正常; 46XX; 余 J. 等人, [汤姆逊] 科学. 2007, 来源于人类体细胞的诱导性多能干细胞系 318(5858):1917-20。)</p> <p>9. IPS-SMA-3.5 (正常; 46XY; I 型脊髓性肌萎缩症; 艾伯特 A. D. (Ebert, A. D.) 等人, 2009. 来自脊髓性肌萎缩症患者的诱导性多能干细胞 (Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient), 自然 (Nature). 457:277-80)</p> <p>10. IPS-SMA-3.6 (正常; 46XY; I 型脊髓性肌萎缩症; 艾伯特 A. D. 等人, 2009. 来自脊髓性肌萎缩症患者的诱导性多能干细胞, 自然. 457:277-80)</p> <p>11. IPS-WT (正常; 46XX; I 型脊髓性肌萎缩症; 艾伯特 A. D. 等人, 2009. 来自脊髓性肌萎缩症患者的诱导性多能干细胞, 自然. 457:277-80)</p>
位于洛杉矶的加利福尼亚大学 (University of California, Los Angeles) (美国)	<p>1. IPS-1 (卡鲁贝雅雷姆 S. (Karumbayaram, S.) 等人, 2009. 人诱导的多能干细胞定向分化产生活性运动神经干细胞 (Directed Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells Generates Active Motor Neurons Stem Cells). 27:806-811; 拉瑞 W. E. (Lowry, W. E.) 等人, 2008. 来自真皮成纤维细胞的人诱导的多能干细胞的产生 (Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts), 美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci U S A). 105:2883-8)</p> <p>2. IPS-2 (卡鲁贝雅雷姆 S. 等人, 2009. 人诱导的多能干细胞定向分化产生活性运动神经干细胞. 27:806-811; 拉瑞 W. E. 等人, 2008. 来自真皮成纤维细胞的人诱导的多能干细胞的产生, 美国国家科学院院刊. 105:2883-8)</p> <p>3. IPS-5 (拉瑞 W. E. 等人, 2008. 来自真皮成纤维细胞的人诱导的多能干细胞的产生, 美国国家科学院院刊 105:2883-8)</p> <p>4. IPS-7 (拉瑞 W. E. 等人, 2008. 来自真皮成纤维细胞的人诱导的多能干细胞的产生, 美国国家科学院院刊 105:2883-8)</p> <p>5. IPS-18 (卡鲁贝雅雷姆 S. 等人, 2009. 人诱导的多能干细胞定向分化产生活性运动神经干细胞. 27:806-811; 拉瑞 W. E. 等人, 2008. 来自真皮成纤维细胞的人诱导的多能干细胞的产生, 美国国家科学院院刊 105:2883-8)</p> <p>6. IPS-24 (拉瑞 W. E. 等人, 2008. 来自真皮成纤维细胞的人诱导的多能干细胞的产生, 美国国家科学院院刊 105:2883-8)</p> <p>7. IPS-29 (拉瑞 W. E. 等人, 2008. 来自真皮成纤维细胞的人诱导的多能干细胞的产生, 美国国家科学院院刊 105:2883-8)</p>
西奈山医院 (Mt. Sinai Hospital) (山缪卢纶菲尔德研究所 (Samuel Lunenfeld Research	<p>1. (沃特杰 K. (Woltjen, K.) 等人, 2009. PiggyBac 转位将成纤维细胞重新编程为诱导性多能干细胞 (PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells), 自然 (Nature). 458(7239):766-70)</p> <p>2. 61 (沃特杰 K. 等人, 2009. PiggyBac 转位将成纤维细胞重新编程为诱导性多能干细胞, 自然. 458(7239):766-70)</p> <p>3. 66 (沃特杰 K. 等人, 2009. PiggyBac 转位将成纤维细胞重新</p>

[0243]

Institute); 美国)	<p>编程为诱导性多能干细胞, 自然. 458(7239):766-70)</p> <p>4. 67 (沃特杰 K. 等人, 2009. PiggyBac 转位将成纤维细胞重新编程为诱导性多能干细胞, 自然. 458(7239):766-70)</p> <p>5. HIPSC117 (卡吉 K (Kaji K) 等人, 2009, 不使用病毒诱导多能性且随后切除重新编程的因子 (Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors), 自然 458(7239):771-5)</p> <p>6. HIPSC121 (卡吉 K 等人, 2009, 不使用病毒诱导多能性且随后切除重新编程的因子, 自然 458(7239):771-5)</p> <p>7. HIPSC122 (卡吉 K 等人, 2009, 不使用病毒诱导多能性且随后切除重新编程的因子, 自然 458(7239):771-5)</p>
位于波士顿的儿童医院 (Children's Hospital -Boston)(美国)	<p>1. 551-IPS8 (帕克 IH (Park IH) 等人, 2008. 利用指定因子将人类体细胞重新编程为具有多能性 (Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors). 自然 451:141-6)。</p> <p>2. ADA-IPS2 ((ADA-SCID), 腺苷脱氨酶缺乏相关性重度联合免疫缺陷病 (Adenosine Deaminase Deficiency-related Severe Combined Immunodeficiency) (GGG>AGG, 外显子 7, ADA 基因); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞 (Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells), 细胞 (Cell), 134(5):877-86)</p> <p>3. ADA-IPS3 ((ADA-SCID), 腺苷脱氨酶缺乏相关性重度联合免疫缺陷病(GGG>AGG, 外显子 7, ADA 基因); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>4. BJ1-IPS1 (帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>5. BMD-IPS1 (男性; (BMD)贝克尔型肌营养不良(肌养蛋白中的未鉴别突变 (Unidentified mutation in dystrophin)); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>6. BMD-IPS4 (正常; 46XY; (BMD), 贝克尔型肌营养不良(肌养蛋白中的未鉴别突变); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>7. DH1CF16-IPS1 (正常; 46XY; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>8. DH1CF32-IPS2 (男性; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>9. DH1F-IPS3-3(正常; 46XY; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>10. DMD-IPS1 ((正常; 46XY; DMD), 杜兴型肌营养不良(缺失外显子 45-52, 肌养蛋白基因; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>11. DMD-IPS2 (男性; (DMD), 杜兴型肌营养不良(缺失外显子 45-52, 肌养蛋白基因; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导</p>

[0244]

型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)

12. DS1-IPS4 (男性; 唐氏综合症 (Down syndrome) (21 三体症); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)

13. DS2-IPS1 (男性; 唐氏综合症(21 三体症); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)

14. DS2-IPS10 (男性; 唐氏综合症(21 三体症); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)

15. GD-IPS1(男性; (GD) III 型戈谢病 (Gaucher Disease type III) (AAC > AGC, 外显子 9, cDNA 的核苷酸 84 插入 G (G-insertion, nucleotide 84 of cDNA) , GBA 基因; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)

16. GD-IPS3 (男性; (GD) III 型戈谢病(AAC > AGC, 外显子 9, cDNA 的核苷酸 84 插入 G, GBA 基因; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)

17. HFIB2-IPS2 (帕克 I. H. 等人, 2008. 人类诱导的多能干细胞的产生 (Generation of human-induced pluripotent stem cells), 自然—实验手册 (Nat Protoc.), 3:1180-6; 帕克 I. H. 等人, 2008. 利用指定因子将人类体细胞重新编程为具有多能性 (Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors), 自然. 451:141-6)

18. HFIB2-IPS4 (帕克 I. H. 等人, 2008. 人类诱导的多能干细胞的产生, 自然—实验手册, 3:1180-6; 帕克 I. H. 等人, 2008. 利用指定因子将人类体细胞重新编程为具有多能性, 自然. 451:141-6)

19. HFIB2-IPS5 (帕克 I. H. 等人, 2008. 人类诱导的多能干细胞的产生, 自然—实验手册 3:1180-6; 帕克 I. H. 等人, 2008. 利用指定因子将人类体细胞重新编程为具有多能性, 自然. 451:141-6)

20. JDM-IPS1 (正常, 46XX; 青少年糖尿病(多因素); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)

21. JDM-IPS1 (正常, 46XX; 青少年糖尿病(多因素); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)

22. JDM-IPS2 (女性; 青少年糖尿病(多因素); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)

23. JDM-IPS3 (女性; 青少年糖尿病(多因素); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)

24. LNSC-IPS2 (女性; 莱施-尼汉综合症 (Lesch-Nyhan syndrome)(携带者, HPRT1 的异型接合性; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)

25. MRC5-IPS7 (男性; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)

26. MRC5-IPS12 (正常; 46XY; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特

[0245]

	<p>异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>27. MRC5-IPS1 (男性; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>28. PD-IPS1 (男性; 帕金森氏病 (Parkinson disease) (多因素); 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>29. SBDS-IPS1 (男性; 舒-戴二氏综合症 (Swachman-Bodian-Diamond syndrome) (IV2 + 2T>C 且 IV3 - 1G>A, SBDS 基因; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p> <p>30. SBDS-IPS2</p> <p>31. SBDS-IPS3 (正常; 46XY; 舒-戴二氏综合症 (IV2 + 2T>C 且 IV3 - 1G>A, SBDS 基因; 帕克 I. H. 等人, 2008. 疾病特异性诱导型多能干细胞, 细胞, 134(5):877-86)</p>
哈佛大学 (Harvard University) (美国)	<p>1. A29a (46XX; (ALS) 肌萎缩性侧索硬化(L144F [Leu144 > Phe] 超氧化物歧化酶(SOD1)基因的显性等位基因; 白种人 (Caucasian); 迪莫斯 J. T. (Dimos, J. T.) 等人, 2008. 由 ALS 患者产生的诱导性多能干细胞可分化成运动神经元 (Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons), 科学. 321:1218-21)</p> <p>2. A29b (46XX; (ALS) 肌萎缩性侧索硬化(L144F [Leu144 > Phe] 显性等位基因超氧化物歧化酶(SOD1)基因; 白种人; 迪莫斯 J. T. 等人, 2008. 由 ALS 患者产生的诱导性多能干细胞可分化成运动神经元, 科学. 321:1218-21)</p> <p>3. A29c (46XX; (ALS) 肌萎缩性侧索硬化(L144F [Leu144 > Phe] 显性等位基因超氧化物歧化酶(SOD1)基因; 白种人; 迪莫斯 J. T. 等人, 2008. 由 ALS 患者产生的诱导性多能干细胞可分化成运动神经元, 科学. 321:1218-21)</p>
索尔克研究院 (Salk Institute) (美国)	<p>1. HAIR-IPS1 (艾森 T. (Aasen, T.) 等人, [贝尔蒙特 J. C. (Belmonte, J. C.)] 2008. 由人角质细胞有效且迅速地产生诱导性多能干细胞 (Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes), 自然—生物技术 (Nat Biotechnol.) 26:1276-84)</p> <p>2. HAIR-IPS2 (艾森 T. 等人, [贝尔蒙特 J. C.] 2008. 由人角质细胞有效且迅速地产生诱导性多能干细胞, 自然—生物技术. 26:1276-84)</p>
罗扬研究院 (伊朗)	<p>1. R.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p> <p>2. BOM.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p> <p>3. FHC.1.H.iPSC.3 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p> <p>4. GSD.1.H.iPSC.7 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p> <p>5. TYR.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p> <p>6. HER.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p> <p>7. R.1.H.iPSC.4 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p> <p>8. R.1.H.iPSC.9 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞)</p>

[0246]

	9. RP2.H.iPSC.3 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS 细胞) 10. LCA.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS 细胞) 11. USH.1.H.iPSC.6 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞) 12. RP.1.H.iPSC.2 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞) 13. ARMD.1.H.iPSC.2 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人成纤维细胞) 14. LHON.1.H.iPSC.5 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS 细胞) 15. CNS.1.H.iPSC.10 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS 细胞) 16. CNS.2.H.iPSC.7 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS 细胞)
巴萨罗那再生医学中心(西班牙)	1. KiPS4F-1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 人包皮角质细胞; 46XY) 2. KiPS3F-7 (OCT4, Sox2, KLF4); 人包皮角质细胞) 3. KiPS4F-8 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc 人包皮角质细胞; 46XY) 4. cFA404-KiPS4F-1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 表皮角质细胞; 46XY) 5. cFA404-KiPS4F-3 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 表皮角质细胞; 46XY)
巴黎第十一大学(法国)	1. PB03 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 原代羊膜细胞; 46XX; 慢病毒) 2. PB04 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 原代羊膜细胞; 患有乙型地中海贫血; 46XY; 慢病毒) 3. PB05-1 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 原代羊膜细胞; 患有乙型地中海贫血; 46XY; 慢病毒) 4. PB05 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 原代羊膜细胞; 患有乙型地中海贫血; 46XY; 慢病毒) 5. PB06 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 原代羊膜细胞; 唐氏综合症; 47XY, +21; 慢病毒) 6. PB06-1 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 原代羊膜细胞; 唐氏综合症; 47XY, +21; 慢病毒) 7. PB07 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 原代羊膜细胞; 46XY; 逆转录病毒) 8. PB08 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 原代羊膜细胞; 46XY; 逆转录病毒) 9. PB09 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 原代羊膜细胞; 46XY; 慢病毒) 10. PB10 (Oct4, Sox2; 原代羊膜细胞 46XY, 慢病毒)
京都大学(日本)	1. 201B1 (人成纤维细胞; 46XX) 2. 201B2 (人成纤维细胞; 46XX) 3. 201B3 (人成纤维细胞; 46XX) 4. 201B6 (人成纤维细胞; 46XX) 5. 201B7 (人成纤维细胞; 46XX) 6. 243H1 (人成纤维细胞) 7. 243H7 (人成纤维细胞)

[0247]

	<p>8. 246B1 (正常, 46XX)</p> <p>9. 246B2 (正常, 46XX)</p> <p>10. 246B3 (正常, 46XX)</p> <p>11. 246B4 (正常, 46XX)</p> <p>12. 246B5 (正常, 46XX)</p> <p>13. 246B6 (正常, 46XX)</p> <p>14. 246G1 (人成纤维细胞; 高桥 K. (Takahashi, K.) 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞 (Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors), 细胞 (Cell). 131:861-72)</p> <p>15. 246G3 (人成纤维细胞; 高桥 K. 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞, 细胞. 131:861-72)</p> <p>16. 246G4 (人成纤维细胞; 高桥 K. 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞, 细胞. 131:861-72)</p> <p>17. 246G5 (人成纤维细胞; 高桥 K. 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞, 细胞. 131:861-72)</p> <p>18. 246G6 (人成纤维细胞; 高桥 K. 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞, 细胞. 131:861-72)</p> <p>19. 253F1 (正常, 46XX; 高桥 K. 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞, 细胞. 131:861-72)</p> <p>20. 253F2 (正常, 46XX; 高桥 K. 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞, 细胞. 131:861-72)</p> <p>21. 253F3 (正常, 46XX; 高桥 K. 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞, 细胞. 131:861-72)</p> <p>22. 253F4 (正常, 46XX; 高桥 K. 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞, 细胞. 131:861-72)</p> <p>23. 253F5 (正常, 46XX; 高桥 K. 等人, 2007. 利用指定因子由成人成纤维细胞诱导多能干细胞, 细胞. 131:861-72)</p>
上海生命科学 研究院 (Shanghai Institutes for Biological Sciences) (中 国)	<p>1. HAFDC-IPS-6 (李 C. (Li C.) 等人, 2009, 在人羊水源性细胞中可迅速且有效地诱导多能性 (Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells), 人类分子遗传学 (Hum Mol Genet). 2009 年 11 月 15 日, 18(22):4340-9)</p> <p>2. IPS-S (廖 J. (Liao, J.) 等人, 2008. 利用 6 种转录因子的组合使人类体细胞产生诱导性多能干 (iPS) 细胞的效率增加 (Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors), 细胞研究 (Cell Res). 18:600-3)</p>

[0248] 对于 iPSCs (诱导的多能干细胞), 申请人此前在 2010 年 4 月 22 日提交的, 题目为: CELL COMPOSITIONS DERIVED FROM DEDIFFERENTIATED REPROGRAMMED CELLS (源自分化的重编程 细胞的细胞组合物) 的美国专利申请第 12/765,714 号 (美国专利公开第 2010-0272695 号) 中, 已经详细地描述了悬浮细胞聚集体的分化, 其通过引用全部并入本文。人 iPSC 聚集体更详细地描述于实施例 27 中。美国专利公开第 2010-0272695 号和本文的实施例 27 描述了在细胞培养基中包含至少一种 Rho 激酶或 ROCK 抑制剂, 以增强、增加和/或促进细胞的生长、存活、增殖和细胞-细胞粘附。例如, 当使用 Y-27632 时, 其浓度范围为约

0.01至约1000 μ M,通常约0.1至约100 μ M,经常约1.0至约50 μ M,以及更经常约5至20 μ M,当使用Fasudil/HA1077 时,可使用约2或3倍于上述Y-27632的浓度。当使用H-1152时,可使用上述Y-27632浓度的量的约几分之一,例如,约1/10、1/20、1/30、1/40、1/50或1/60。所使用的ROCK抑制剂的浓度部分取决于抑制剂的生物活性和效力以及其所用的条件。而且,用ROCK抑制剂 处理的时间或阶段尤其不受限制,只要能实现期望的效果如增强、增加和/或促进细胞的生长、存活、增殖和细胞-细胞粘附即可。

[0249] 本文描述的细胞聚集体可以悬浮在任何生理学上可接受的培养基 中,通常根据所涉及的细胞类型来选择。组织培养基可以包含,例如,诸如糖和氨基酸的基础营养物、生长因子、抗生素(以使污染最小化) 等。在另一实施方案中,利用本文描述的细胞培养基,将可分化细胞 悬浮培养。用于细胞培养上下文中的术语“悬浮”如其在本领域使用的 一样。也就是说,细胞培养悬浮液是其中细胞或细胞聚集体不粘附到 表面的细胞培养环境。本领域技术人员应当熟知悬浮培养技术,包括 但不限于使用设备,诸如流罩(flow hood)、培养箱和/或用于保持细胞 恒定运动的装置,例如旋转平台、振荡器等,如果需要的话。如本文所用,如果细胞在移动或者它们直接的环境相对于细胞移动,则细胞 在“运动中”。如果将细胞保持在“运动中”,则在一个实施方案中,该 运动为“温和的运动”或“温和搅动”,其被设计为避免或预防细胞暴露 于剪切应力。

[0250] 多种制备细胞聚集体的方法以及这些技术的多种改进是本领域已 知的,诸如,例如“悬滴”法,其中组织培养基的倒滴中的细胞沉到它 们在其中聚集的滴的底部;在实验室长颈瓶中摇荡细胞悬浮液。参见, 例如Timmins,et al.2004Angiogenesis 7:97-103;Dai et al.,1996, Biotech Bioeng 50:349-56;Foty et al.1996,Development 122,1611-20; Forgacs et al.2001,J.Biophys.74,2227-2234;Furukawa et al.1998, Cell Transplantation 10:441-45;Glicklis et al.2004,Biotech Bioeng 86:672-80; Carpenedo et al.,2007,Stem Cells 25:2224-34;以及Korff et al.,2001,FASEB J.15: 447-57,这些通过引用以其整体并入本文。最近,通过将微图案集落刮成悬浮液,将集落离心至脱离微滴定板并成 悬浮液或者利用移液管脱落和悬浮生长在图案微孔中的集落 (Ungrin et al.,2008PLoS ONE 3:1-12;Bauwens et al 2008Stem Cells,于2008 年6月26号在线发表),已经形成细胞聚集体。尽管这类方法能够用 于产生本文描述的细胞聚集体,但本文产生的细胞聚集体被优化为同 步的定向分化,如在前面的D' Amour et al.2006中描述的。此外,不 像其他方法那样,本文所述的用于制备细胞悬浮聚集体的方法适于大规模生产。

[0251] 一般来说,本发明的细胞培养基组合物至少一天更新一次,但培 养基可以更换地更经常或不经常,这取决于悬浮培养的具体需要和环 境。在体外,细胞通常生长在批处理模式(即分批补料)的培养基中, 并暴露于不同培养基条件。如本文所述的,细胞以贴壁培养物或细胞 悬浮聚集体存在于平皿培养中,并维持与周围培养基接触;并定期更 换废弃培养基。一般地,每约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时更新 培养基,或其组分。在另外的实施方案中,可以较不经常地更新培养 基,诸如但不限于每1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9或 每2天或更多天,或者以上两者间的任一时间范围。

[0252] 在本发明另一实施方案中,应用灌注方法预防必需被频繁替换的 生长因子和其

他试剂的降解;或者灌注作为在一段时间耗竭来自培养基的废弃产物的方法。例如,美国专利第5,320,963号描述了用于悬浮细胞灌注培养的生物反应器。美国专利第5,605,822号描述了利用基质细胞提供生长因子的生物反应器系统,其通过灌注用于培养中的HSC细胞的生长。美国专利第5,646,043号描述了HSC细胞的生长,其通过连续的和定期的灌注包括用于HSC细胞生长的培养基组合物。美国专利第5,155,035号描述了通过流体介质旋转用于细胞悬浮培养的生物反应器。这些参考文献以其整体并入本文。

[0253] 一般而言,悬浮培养在本发明的培养基组合物中的细胞每周左右“分裂”或“传代”,但这些细胞可以更频繁或较不频繁分裂,这取决于悬浮培养的具体要求和环境。例如,细胞可以每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或更多天,或者两者之间的任何时间段分裂。如本文所用的,细胞培养语境中的术语“分裂”或“传代”的用法与其在本领域的用法相同。也就是说,细胞培养分裂或传代是从之前培养收集细胞,并随后将较小数目的收集的(收获的)细胞转移至新细胞培养容器中。本领域技术人员应当熟知细胞培养传代的过程和方法,其可以但不必然涉及利用酶促或非酶促方法,该方法可以用于解聚细胞生长扩增过程中聚集在一起的细胞。

[0254] 在一些实例中,细胞死亡的程度可以在传代后立即发生在培养的(悬浮的和贴壁的)细胞中。在一个实施方案中,可分化细胞可以从传代中“回收”,通过延迟更新细胞培养基达大于24小时。此后,细胞培养基可以更频繁地更换。在另一实施方案中,细胞培养基还可以包含细胞死亡的抑制剂。例如,Wantanabe et al.等最近公开了使用Rho-相关的激酶抑制剂,Y27632,以保护解离后的人ES细胞。参见,Wantanabe et al., Nat.Biotechnol.,25:681-686 2007,其通过引用并入本文。在另外的实施方案中,细胞培养基可以包含半胱天冬酶(caspase)抑制剂、生长因子或其他营养因子,以预防或减少传代后立即的细胞死亡。可以使用的化合物的具体实例包括,但不限于HA 1077、二氢氟化物(Dihydrochloride)、羟基法舒地尔(Hydroxyfasudil)、Rho激酶抑制剂、Rho-激酶抑制剂II、Rho激酶抑制剂III、激酶抑制剂IV和Y27632,所有这些都可以商购获得。在另一实施方案中,用于预防或减少细胞传代期间或之后立即发生的细胞死亡的化合物或因子可以在细胞已经从传代过程回收之后从细胞培养基中回收。在另一实施方案中,未分化的ES细胞在标准基础培养基中有效聚集,并且不需要Y27632或其他干预以维持解离和聚集期间的活力。

[0255] 在另一实施方案中,本发明的组合物和方法还可以包括表面活性剂的存在或使用。在一个具体实施方案中,组合物和方法包含悬浮培养环境中的至少一种表面活性剂。表面活性剂是本领域公知的,并且一般来说,在性质上是两性的。在具体的实施方案中,本发明包括使用至少一种表面活性剂,其为阴离子的、阳离子的、非离子的或两性离子的。用于本发明的组合物和方法中的表面活性剂的浓度是常规筛选和优化的事项。例如,Owen等人报道了在HeLa细胞和人羊膜细胞的细胞培养技术中使用表面活性剂。参见,Owen et al., J.Cell.Sci., 32:363-376 (1978),其通过引用并入本文。可以使用的表面活性剂的实例包括但不限于十二烷基硫酸钠(SDS)、月桂醇硫酸酯铵盐,和其他的烷基硫酸盐,月桂醇聚醚硫酸酯钠(SLES)、烷基苯磺酸盐、肥皂或脂肪酸盐、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)(溴化十六烷基三甲基铵)和其他烷基三甲基铵盐,西吡氯铵(CPC),聚乙氧基牛脂胺(POEA),苯扎氯铵(BAC),苄索氯铵(BZT),十二烷基甜菜碱,十二烷基二甲基氧化胺,椰油酰基胺

丙基甜菜碱, 椰油酰甘氨酸盐, 烷基聚(乙撑氧), 聚(乙撑氧)和聚(环氧丙烷)的共聚物诸如Pluronic F68, 烷基糖苷, 诸如但不限于, 辛基葡萄糖苷、癸基麦芽糖苷, 脂肪醇, 十六醇, 油醇, 椰油酸单乙醇酰胺, 椰油酸二乙醇酰胺和椰油酸三乙醇酰胺和/或聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯(Tween)。

[0256] 本文描述的实施方案提供了通过维持低剪切环境用于大规模生产增殖和/分化的hESC的方法, 由此维持系统中运行细胞密度以及最小化流体剪切应力。特别是, 本发明提供了用于在真核细胞大规模生产系统中维持低剪切环境的方法, 其通过在60mm平皿、6孔板、滚瓶、生物反应器(例如旋转长颈瓶)、容器等中培养细胞悬浮液而进行。可选地, 用于培养细胞的连续灌注系统需要在生物反应器或容器中的搅动或运动以提供细胞的悬浮、氧化作用和供给新鲜营养, 例如用于生长和/或分化。为了获得细胞悬浮, 生物反应器容器通常利用一种或多种可移动机械搅动装置, 其也可以是剪切应力的潜在来源。

[0257] 建立以及维持恒定的、优化的搅动剪切速率对于维持细胞生长和活力是重要的。例如, 增加的剪切速率在以下方面是有害的: (1) 过度的剪切增加能量消耗, (2) 过度的剪切干扰膜表面的扩散, (3) 过度的剪切能够使某些化合物丧失它们的生物活性, 以及(4) 过度的剪切能够使细胞膜变形超出破裂张力阈值, 导致细胞裂解。因此, 期望将剪切维持在5至500sec⁻¹的最优范围, 这取决于细胞聚集体的直径和特定细胞系对单个细胞解离和剪切的敏感性。对于6孔平皿, 聚集体直径为100-200μm, 旋转速度为60-140rpm, 通过离心产生的用于本发明方法的示例性剪切速率显示在实施例17中。这些值估计了时均剪切应力, 其发生在旋转期间的大体积流体中。然而, 预期血管壁的剪切应力由于边界效应会更高。利用Ley等(同上)的方法, 计算的壁剪切应力的旋转速度为60rpm至140rpm, 这显示在实施例17-19中。

[0258] 仍存在用于产生温和搅动的细胞悬浮液的方法或装置的其他实例, 这些实例为本领域技术人员熟知, 包括产生细胞悬浮液的叶轮, 诸如螺旋桨, 或者其他机械方式, 囊状物、基于流体或气体流动的方式、超声驻波发生器、摇动或旋转平台或其组合。在本发明的方法中, 当细胞在6孔板中时, 旋转平台是用于在培养基中悬浮细胞的示例性方式, 从而产生小于400sec⁻¹的剪切速率。不管用于产生搅动的混合的流体悬浮液的旋转类型或机制, 预计的大体积流体中的时均剪切速率和剪切应力提供了所有流体混合装置相关的标准因子。尽管装置间的流动方案可以在它们的外形以及层流或湍流的程度上有所变化, 剪切计算提供了用于使装置中的流动等同的基础, 所述装置通过不同机制产生混合。例如, 对于具有4cm的叶轮直径、6.4cm的容器宽度、90度的叶轮角度和0.1cm的叶轮宽度的125mL旋式长颈瓶, 135rpm的叶轮旋转速度会与具有5mL培养基的6孔平皿在大体积流体中产生相同的时均剪切速率和剪切应力, 所述6孔平皿以100rpm旋转用于产生直径为100μm的聚集体。

[0259] 本发明的方法还可以用于在生产扩大系统中维持低剪切环境达1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、23、24、25、26、27、28、29、30天至超过40天、超过50天的时间段。示例性操作时间至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、23、24、25、26、27、28、29、30天至超过40天、至超过50天。

[0260] 预期, 可分化细胞可以利用酶促、非酶剪切或人工解离方法在与本发明的限定培养基接触前和/或之后传代。酶促解离方法的非限定示例包括使用蛋白酶, 诸如胰蛋白酶、

胶原蛋白酶、分散酶和 ACCUTASETM。在一个实施方案中,ACCUTASETM用于传代接触过的细胞。当利用酶促传代方法时,得到的培养物能够包含单个、两个、三个、以及团块细胞的混合物,团块细胞的大小依赖于使用的酶而不同。非酶促解离方法的非限定性实例是细胞分散缓冲器。本领域已经描述了人工传代技术,诸如在Schulz et al.,2004Stem Cells,22:1218-38 中。如果存在,传代方法的选择受细胞外基质(如果存在一种细胞外基质的话)选择的影响,并且容易由本领域技术人员来确定。

[0261] 在一个具体的实施方案中,培养可分化细胞的方法包括在解离前提供给包含在培养室中的可分化细胞层解离溶液,其中解离将细胞层分裂为单细胞。解离后,将单细胞置于具有干细胞培养液的新组织培养室中,其中干细胞培养液包含基础盐营养液和ErbB3配体。一旦培养,将单个干细胞置于允许单细胞生长和分裂的条件中。在另一具体实施方案中,培养可分化细胞的方法包括提供给之前包含在细胞室的聚集可分化细胞解离液,其中解离将细胞聚集体分裂为单细胞或更小的细胞聚集体。

[0262] 用于本发明的解聚溶液可以是能够将细胞分裂或解聚为单细胞而不对细胞导致广泛毒性的任何解聚溶液。解聚溶液的实例包括,但不限于胰蛋白酶、ACCUTASETM、0.25% Trypsin/EDTA、TrypLE或者 VERSENETM (EDTA) 和胰蛋白酶。本发明的方法不需要导致汇合层或悬浮液的每个细胞解聚为单细胞,只要至少一些单细胞被解聚以及能够被再培养。

[0263] 要么在培养初期,要么在传代后,可分化细胞能够以任何密度接种,包括培养室中的单细胞。接种的细胞的细胞密度可以根据多种因素来调整,包括但不限于利用贴壁或悬浮培养物、使用的细胞培养基的具体配方、生长条件以及培养的细胞的预期用途。细胞培养密度的实例包括,但不限于 0.01×10^5 个细胞/ml、 0.05×10^5 个细胞/ml、 0.1×10^5 个细胞/ml、 0.5×10^5 个细胞/ml、 1.0×10^5 个细胞/ml、 1.2×10^5 个细胞/ml、 1.4×10^5 个细胞/ml、 1.6×10^5 个细胞/ml、 1.8×10^5 个细胞/ml、 2.0×10^5 个细胞/ml、 3.0×10^5 个细胞/ml、 4.0×10^5 个细胞/ml、 5.0×10^5 个细胞/ml、 6.0×10^5 个细胞/ml、 7.0×10^5 个细胞/ml、 8.0×10^5 个细胞/ml、 9.0×10^5 个细胞/ml或者 10.0×10^5 个细胞/ml或者更高,例如高达 5×10^7 个细胞/mL已经以良好的细胞存活率培养,或者之间的任何值。

[0264] 除了上述,如本文使用的,术语“操作细胞密度”或者“可操作的细胞密度”或其等同物,指操作生产过程或系统以获得增殖或分化的hES细胞培养物产生的细胞密度。这种细胞密度是供给系统的诸如维生素、矿物质、氨基酸或代谢物的营养物以及诸如氧压的环境条件足以维持细胞活力的密度。可选地,这种细胞密度是废弃产物能够以足以维持细胞活力的速率从系统中移除的密度。这种细胞密度可以由本领域技术人员容易地确定。

[0265] 可以维持的操作细胞密度是从至少约 0.5×10^6 个细胞/mL起的那些密度。在典型的扩大系统中,操作细胞密度可以为约 0.5×10^6 个细胞/mL至约 25×10^6 个细胞/mL。示例性密度可以为约 2.5×10^6 个细胞/mL、 22×10^6 个细胞/mL至高达 5×10^7 个细胞/mL。在本发明的方法中,细胞活力为至少约40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%以及高达约100%。其他扩大系统的操作细胞密度和可接受的细胞活力水平会被本领域技术人员所认可,并且能够通过本领域技术人员已知的技术来确定。例如,批处理(分批补料)、分批补料和连续补料配制(continuous feed configuration),细胞密度可以为约 0.5×10^6 个细胞/mL至 15×10^6 个细胞/mL。

[0266] 可分化细胞还可以用于筛选影响它们可塑性或其他特征的分子或因子。例如,可

分化的细胞能够用于鉴定在从可分化细胞产生的分化的谱系中诱导凋亡、分化或增殖以及类似效应的试剂。

[0267] 因为本发明的组合物和方法允许单细胞传代,因此可分化细胞已经成功地培养在高通量环境中,诸如但不限于96-孔板和384-孔板。图16显示了利用本文描述的方法,培养在96-孔板和384-孔板中的DC-HAIF中的BG02细胞的形态和碱性磷酸酶染色。简言之,利用 ACCUTASE™分离、接种于96-孔板和384-孔板中并培养的hESC细胞显示了与利用其他培养器皿观察到的相似的平板效率。此外,细胞形成集落,并在较小的环境中成功扩增5天。这些更小的培养物形态学上保持未分化,并且对于碱性磷酸酶即未分化的细胞标志物呈现均一地染色阳性。此外,hESCs还能够生长在96孔培养装置中(未显示),其提供了阻抗的实时测量,这可以用于利用来自ACEA Biosciences, Inc. (www.aceabio.com)的RT-CES™方法测量细胞增殖和活力。这种方法使对可分化细胞的微细或即时效应的无标签鉴定和定量以及增殖、凋亡和形态变化的实时测量成为可能。

[0268] 如果组合物和方法包括基础盐营养液和用于刺激ErbB2定向酪氨酸激酶活性的手段,则本发明的组合物和方法实际上可以包含上文列出或本文其他地方描述的组分的任何组合。如本领域技术人员会认识到的,本发明的组合物和方法的组分会根据方案设计而变化。因此,本发明的一个实施方案涉及在96孔板和/或384孔板中培养可分化的细胞。实际上,利用本发明的方法和组合物,细胞培养室,即培养皿不再局限于具体尺寸。因此,本文描述的方法决不局限于产生hESC细胞的具体培养室尺寸和/或手段和设备。

[0269] 本文描述的组合物和方法具有几个有用的特征。例如,本文描述的组合物和方法用于人发育早期的建模。此外,通过诸如纯组织或细胞类型的发育,本文描述的组合物和方法还可以用于诸如神经退行病症、糖尿病或肾衰竭的疾病状态的治疗干预。

[0270] 从可分化细胞分化的细胞类型在研发的多个领域具有若干用途,包括但不限于药物发现、药物开发和测试、毒理学、用于治疗目的的细胞产生以及基础科研。这些细胞类型表达在多个研究领域受关注的分子。这些包括已知对于多种细胞类型的功能必需的分子,如在标准的参考文本中所描述的。这些分子包括但不限于细胞因子、生长因子、细胞因子受体、细胞为爱基质、转录因子、分泌的多肽和其他分子,以及生长因子受体。

[0271] 据预期,本发明的可分化细胞可以通过与细胞分化环境接触来分化。如本文所用的,术语“细胞分化环境”指,诱导可分化细胞分化,或者诱导可分化细胞成为富集分化的细胞的人细胞培养物的细胞培养条件。优选地,生长因子诱导的分化的细胞谱系在本质上是均一的。术语“同质的”指包含超过约50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的期望细胞谱系的群体。

[0272] 细胞分化培养基或环境可以用于部分地、最终地或可逆转地分化本发明的可分化细胞。按照本发明,细胞分化环境的培养基可以包含多种组分,包括例如KODMEM培养基(Knockout Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、DMEM、Ham's F12培养基、FBS(胎牛血清)、FGF2(成纤维细胞生长因子2)、KSR或hLIF(人白血病抑制因子)。细胞分化环境还可以包含诸如L-谷氨酰胺、NEAA(非必需氨基酸)、P/S(青霉素/链霉素)、N2,B27和β-巯基乙醇(β-ME)的补加剂。预期额外的因子可以添加到细胞分化环境中,包括但不限于纤连蛋白、层粘连蛋白、肝素、硫酸肝素、视黄酸、表皮生长因子家族(EGFs)的成员,成纤维生长因子家族(FGFs)的成员,包括FGF2、FGF7、FGF8和/或FGF10,血小板衍生生长因子家族

(PDGFs)的成员,转化生长因子(TGF)/骨形态形成蛋白(BMP)/生长和分子因子(GDF)家族拮抗剂,包括但不限于头蛋白、滤泡稳定蛋白、腱蛋白、gremlin、cerberus/DAN家族蛋白、ventropin、高剂量活化素以及无羊膜或其变体或功能片段。TGF/BMP/GDF拮抗剂还能够以TGF/BMP/GDF受体-Fc嵌合体的形式添加。可以添加的其他因子包括能够活化或灭活通过Notch受体家族的信号转导,这些因子包括但不限于 Δ -样和Jagged家族的蛋白以及Notch加工或切割的抑制剂,或者其变体或功能片段。其他生长因子可以包括胰岛素样生长因子家族(IGF)的成员、胰岛素、无翼相关(WNT)因子家族以及hedgehog因子家族或者其变体或功能片段。可以添加额外的因子以促进中内胚层干/祖细胞、内胚层干/祖细胞、中胚层干/祖细胞,或者定形内胚层干/祖细胞增殖和存活以及这些祖细胞衍生物的存活和分化。

[0273] 本文描述的组合物用于筛选测试化合物以确定测试化合物是否调节可分化细胞的多能性、增殖和/或分化。可分化细胞的多能性、增殖和/或分化可以由本领域技术人员容易地确定。非限定性方法包括检测细胞多态性、各种标志物的表达、畸胎瘤形成、细胞计数和阻抗测量。

[0274] 可分化细胞向期望的细胞谱系的进展或者它在未分化状态的维持可以通过定量为所期望的细胞谱系特有的标志物基因的表达以及为可分化细胞类型特有的标志物基因表达的缺乏来监测。定量这种标志物基因的基因表达的一种方法是,通过使用定量PCR(Q-PCR)。进行Q-PCR的方法是本领域公知的。本领域已知的其他方法还可以用于定量标志物基因表达。标志物基因表达可以通过利用感兴趣标志物基因的特异性抗体来检测。

[0275] 在某些实施方案中,筛选方法包括鉴定能够调节可分化细胞多能性、增殖和/或分化的化合物的方法,其包括(a)提供可分化的细胞;(b)在包含基础盐营养液和ErbB3配体的组合物中培养细胞,其中该组合物实质上无血清;(c)将细胞与测试化合物接触;以及确定多能性、增殖和/或分化的增加或减少是否发生在与化合物接触的细胞中,所述增加表示该化合物调节多能性、增殖和/或分化。在某些实施方案中,ErbB3配体是HRG- β 。在其他实施方案中,ErbB3配体可以被测试化合物取代,以确定测试化合物的作用。例如,使用测试化合物发生的对多能性、增殖和/或分化的影响可以与使用ErbB3配体发生的对多能性、增殖和/或分化的影响比较,以确定测试化合物对可分化细胞的影响。预期本文描述的任一组合合物都可以用于本发明的筛选方法。

[0276] 在另一实施方案中,可以在缺乏ErbB3配体(ErbB2-定向的酪氨酸激酶活性)的情况下培养细胞,以确定缺乏ErbB3配体(ErbB2-定向的酪氨酸激酶活性)对细胞的影响。

[0277] 利用本文描述的方法可以产生基本上无其他细胞类型的期望细胞谱系的组合物。可选地,也可以产生包含可分化细胞和所期望细胞谱系的混合物的组合物。

[0278] 在本发明的一些实施方案中,期望的细胞谱系的细胞可以通过利用对这些细胞特异性的亲和性标签来分离。对靶细胞特异性的亲和性标签的一个实例是对标志物多肽特异性的抗体,所述多肽存在于靶细胞的细胞表面但基本上不存在于会在通过本文描述的方法产生的细胞培养物中发现的其他细胞类型上。

[0279] 本发明还涉及试剂盒,其中试剂盒包含基础盐营养液和至少一种能够刺激ErbB2-定向的酪氨酸激酶活性的化合物。在一个实施方案中,试剂盒包含至少一种如本文所描述的ErbB3配体,在另一实施方案中,试剂盒包含多种ErbB3配体。在另一实施方案

中,试剂盒包含本文描述的TGF- β 或TGF- β 家族成员或其变体或功能片段的至少一种。在另一实施方案中,试剂盒包含多种TGF- β 或TGF- β 家族成员或其变体或功能片段。仍在另一实施方案中,试剂盒包含至少一种成纤维细胞生长因子或其变体或功能片段。在另一实施方案中,试剂盒包含多种成纤维细胞生长因子或其变体或功能片段。在具体实施方案中,试剂盒包含FGF-7、FGF-8、FGF-10、FGF-22或其变体或功能片段中的至少一种。在另一实施方案中,试剂盒包含血清白蛋白。仍在另一实施方案中,试剂盒包含血清和/或至少一种本文描述的不溶性基底和/或至少一种解聚溶液。

[0280] 本发明的试剂盒实际上可以包含上文列出的或本文其他地方描述的组分的任一组合。如本领域技术人员会认识到的,用本发明的试剂盒提供的组分会随着试剂盒的预定用途而变化。因此,试剂盒可以设计为实施本申请列出的不同功能,因此所述试剂盒的组分会相应地变化。

[0281] 在整个申请中,引用了多种出版物。所有这些出版物及其整体引用在这些出版物中的那些参考文献的公开内容都以其整体并入本申请中,以便更全面地描述本发明所属领域的现有技术状态。

实施例

[0282] 人胚胎干细胞系BG01v (BresaGen, Inc., Athens, GA) 被用于本文描述的一些实验中。BG01v hESC系是核型变异细胞系,其展示了包含特异性三体的稳定核型(核型:49, XXY, +12, +17)。如前描述维持亲代培养物 (Schulz et al.2003, BMC Neurosci., 4:27; Schulz et al.2004, Stem Cells 22:1218-38; Rosler et al.2004, Dev. Dynamics, 229: 259-274; Brimble et al.2004 Stem Cells Dev. 13:585-596)。简言之,细胞生长在包被 MATRIGEL™或纤连蛋白的平皿内来自小鼠胚胎成纤维细胞 (MEFs) (MEF-CM) 的条件培养基中,所述条件培养基包含DMEM:F12: 其加有20%KSR、8ng/mL FGF2、2mM L-谷氨酰胺、1x非必需氨基酸、0.5U/mL青霉素、0.5U/mL链霉素、0.1mM β -巯基乙醇 (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), 采用胶原蛋白酶传代。

[0283] 本文测试的限定培养基 (DC) 包含DMEM/F12、2mM Glutamax、1x非必需氨基酸、0.5U/mL青霉素、0.5U/mL链霉素、10 μ g/mL转铁蛋白(所有都来自Invitrogen, Carlsbad, California, USA) 0.1mM β -巯基乙醇 (Sigma)、0.2%无脂肪酸的Cohn's组分V BSA (Serologicals)、1x微量元素混合物A、B和C (Cellgro), 以及50 μ g/mL抗坏血酸 (Sigma)。使用不同水平的重组生长因子, 包括FGF2 (Sigma)、LongR3-IGF1 (JRH Biosciences)、Heregulin- β EGF结构域 (HRG β , Peprotech)、TGF β (R&D systems)、nodal (R&D systems)、LIF (R&D systems)、EGF (R&D systems)、TGF α (R&D systems)、HRG α (R&D systems)、BMP4 (R&D systems) 以及活化素A (R&D Systems)。LongR3-IGF1是修饰形式的IGF1, 其对IGF1结合蛋白的亲合力降低, IGF1结合蛋白的一些表达在hESCs中。DC-HAIF是如上所述的限定培养基, 含有10ng/mL HRG- β 、10ng/mL活化素A、200ng/mL LR-IGF1 和8ng/mL FGF2。DC-HAI是如上所述的限定培养基, 含有10ng/mL HRG- β 、10ng/mL活化素A以及200ng/mL LR-IGF1。在DC-HAIF和 DC-HAI中, LR-IGF1组分当然可以被IFG1取代。

[0284] 通过将生长因子降低的BD MATRIGEL™基质 (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) 在冷DMEM/F-12中稀释到约1:30至 约1:1000的终浓度范围来制备

MATRIGEL™包被的平皿。在一个实施方案中, MATRIGEL™浓度约1:200。利用1mL/35mm平皿在室温下包被平皿1-2小时或在4℃至少过夜。平板在4℃储存长达1周。在使用前立即去除MATRIGEL™溶液。

[0285] 对于测试的条件, 亲代培养物接种于6孔平皿中用于比较多个条件。通常, 将培养物直接接种于测试条件。每天评价培养物并在平板接种后4至5天, 基于形态标准来分级。1至5的分级标准包括检测整个培养物和评价未分化的集落的总比例、它们相对大小、以及展示明显分化的集落或集落部分的比例。5级表示“理想的”培养物, 有大的未分化集落和可忽略的分化。4级表示非常好的培养物, 但有一些明显的分化。3级表示可接受的培养, 但具有约一半的集落显示明显分化。2级培养物主要是分化的, 具有偶尔推定的未分化细胞。1级培养物包含分化的集落, 或者培养物不贴壁或不存活。将显示未分化细胞良好扩增的培养物传代以评价在这些条件中更长期的培养物。

[0286] 实施例1-ErbB1-3、Nrg1和ADAM19在BG01v细胞中的表达

[0287] 实时RT-PCR用于证实ErbB1-3、Neuregulin和ADAM-19在BG01v细胞中的表达(图1)。BG01v细胞培养在如上所述的包含100ng/mL LongR3-IGF1 (LR-IGF1)、8ng/mL FGF2和1ng/mL活化素A的DC培养基中, 收集BG01v细胞, 并利用RNeasy小型试剂盒(Qiagen)按照生产商的说明书制备RNA。利用iScript试剂盒(Biorad)制备第一链cDNA以及利用MJ Research Opticon热循环仪进行实时PCR。

[0288] 将ADAM19 (Hs00224960_m1)、EGFR (Hs00193306_m1)、ErbB2 (Hs00170433_m1)、ErbB3 (Hs00176538_m1)、NRG1 (Hs00247620_m1)、OCT4 (Hs00742896_s1) 和对照GAPDH的根据需要的TaqMan测定法 (Applied Biosystems) 与TaqMan通用PCR (Applied Biosystems) 结合使用。实时扩增图显示于图1中, 其证实了这些转录物在未分化的BG01v细胞中的表达。

[0289] 实施例2-抑制ErbB2减缓了BG01v细胞的增殖

[0290] 配体的EGF结构域家族可结合受体酪氨酸激酶的ErbB家族。为了检测hESCs中ErbB酪氨酸激酶已知抑制剂的作用, 将BG01v细胞在限定培养基(DC)中接种于6孔盘中, 在以1:1000稀释的MATRIGEL™上, 所述限定培养基包含100ng/mL的LongR3-IGF1、8 ng/mL FGF2和1ng/mL活化素A。第二天, 随新鲜培养基添加DMSO (载体对照)、50nM-20μM AG1478 (ErbB1抑制剂) 或100nM-20μM AG879 (ErbB2抑制剂)。再将细胞培养5天, 每天更换培养基。然后固定培养物并进行碱性磷酸酶活性染色。

[0291] 在对照和AG1478培养的细胞中观察到AP+BG01v细胞的亚汇合集落(图2A和B), 这表明DMSO和AG1478 (50nM-20μM) 对细胞增殖都没有明显的影响。然而, AG879在5μM基本上抑制了细胞生长(图2C), 并在20μM导致了细胞死亡(未显示)。生长在AG879的培养物看起来没有分化, 并看起来可维持多能形态和碱性磷酸酶活性, 这表明AG879看起来抑制增殖, 而不诱导分化, 提示BG01v细胞的细胞存活依赖于ErbB2信号转导。相反地, 生长在上述相似条件中的BG01v细胞的增殖看起来并不依赖于ErbB1信号。

[0292] 实施例3-BG01v细胞维持在包含Heregulin的限定培养基中

[0293] ErbB2和ErbB3的表达以及用AG879对增殖的抑制表明BG01v细胞具有活化的内源性ErbB信号转导, 并且它们还响应外源性HRG-β。BG01v细胞生长在含有10ng/mL HRG-β、200ng/mL LongR3-IGF1、8ng/mL FGF2和10ng/mL活化素A的DC培养基中, 在1:1000稀释的

MATRIGEL™上(图3A和图3B)。这些细胞生长4代或>20天,展示未分化形态,但没有显示自发分化增强。

[0294] 而且,还将BG01v细胞在包含10ng/mL HRGβ、200ng/mL LongR3-IGF1和10ng/mL活化素A的DC培养基中维持2代或>13天。这些培养物正常增殖,并显示了非常低的自发分化,这证实了BG01v细胞能够在缺乏FGF2情况下维持在含HRGβ的限定性条件中。

[0295] 实施例4-ErbB2-定向的酪氨酸激酶在ES细胞中的作用

[0296] RT-PCR证实了mESCs表达ADAM19、神经调节蛋白1(Nrg1)和ErbB1-4(图4A)。在mESCs中,ErbB2和ErbB3看起来表达的水平高于ErbB1,同时检测到低水平的ErbB4。这些数据表明内源性HRG-β能够参与驱动mESC自我更新。

[0297] 还检测了ErbB受体转录物在小鼠胚胎成纤维性细胞(MEFs)中的表达(图4B)。MEFs是来自E12.5-13.5内脏的异源细胞群,其历史上用于维持小鼠和人EC细胞和ES细胞。Nrg1和Adam19在该群中的表达表明,HRG-β胞外结构域还存在于MEF条件培养基,并且可以对多能性发挥显著的作用。

[0298] AG1478和AG879用于检测HRG/ErbB信号转导在小鼠ES细胞中的作用。R1小鼠ES细胞维持在标准条件中,在DMEM、10%FBS、10%KSR、0.5U/mL青霉素、0.5U/mL链霉素、1xNEAA、1mM丙酮酸钠、1000U/mL LIF(ESGRO)、0.1mMβ-ME中,并用0.5%胰酶/EDTA传代。将 2×10^5 细胞/孔接种于6孔盘中,在1:1000稀释的MATRIGEL™上。平板接种后第二天,随新鲜培养基添加DMSO(载体对照)、1-50μM AG1478或1-50μM AG879。细胞再另外培养8天,每天更换培养基。然后固定培养物,并进行碱性磷酸酶活性染色。

[0299] DMSO和1-50μM AG1478对细胞增殖没有明显的影响,观测到碱性磷酸酶阳性mESCs的亚汇合集落(图5A-C)。然而,AG879在50μM时显著抑制细胞生长(比较图5D和5F),在20μM时可以减缓增殖(图5E)。在AG879中生长的mESCs看起来没有分化,并且维持多能形态和碱性磷酸酶活性。

[0300] 这些结果表明AG879看起来抑制mESCs的增殖,而不诱导mESCs的分化,这表明mESCs的增殖需要ErbB2信号转导。相反地,mESCs的增殖看起来不依赖于ErbB1信号。需要抑制增殖的AG879的浓度对于mESCs比对于生长在限定条件中的BG01v细胞高10倍,这表明mESC条件所用的血清可能干扰药物的活性,AG879对于小鼠ErbB2酪氨酸激酶比对人ErbB2酪氨酸激酶具有更低的亲和力,或者表明ErbB2可以就不同种类的ES细胞发挥略微不同的作用。

[0301] ErbB2酪氨酸激酶的另一高选择性抑制剂,酪氨酸磷酸化抑制剂AG825(Murillo, et al.2001,Cancer Res 61:7408-12)用于研究ErbB2在人ESCs中的作用。AG825显著抑制生长在条件培养基(CM)中的hESCs的增殖(图6A)。AG825抑制增殖,但没有广泛的细胞死亡,以及存活的hESCs能够维持>5天(未显示)。蛋白质免疫印迹表明,AG825在生长在DC-HAIF中的饥饿/herregulin(HRG)脉冲的hESCs中抑制ErbB2在酪氨酸-1248的自动磷酸化(图6B)。因此,ErbB2信号转导的破坏严重抑制hESC增殖。为了在限定生长条件中确立hESCs,培养物能够从CM条件直接传代到DC-HAIF,并且显示最小自发的分化(图6C)。集落和细胞计数测定证实,在本发明实施方案之一中LongR3-IGF1和HRG在自我更新和增殖中发挥重要作用(图6D、6E)。IGF1R、IR、FGF2α、ErbB2和ErbB3的磷酸化还在稳态DC-HAIF培养物中以及用DC-HAIF脉冲的饥饿培养物中观测到(图6F)。

[0302] 实施例5-小鼠ES细胞在限定条件中的培养

[0303] 为了进一步检测HRG/ErbB2信号转导在小鼠ES细胞中的作用,在DC培养基中利用生长因子组合检测R1ES细胞的增殖。将 1×10^5 细胞/孔接种于用0.2%的明胶包被的6-孔盘中,在含有10ng/mL HRG- β 、100ng/mL LongR3-IGF1、1ng/mL活化素A、1000U/mL小鼠LIF或10ng/mL BMP4(表3,下文)组合的DC中。观测增殖8天。

[0304] 存活的集落仅生长在含有至少LIF/HRG- β 或LIF/BMP4(表3)的条件下。当将LongR3-IGF1或活化素添加到这些组合时,没有观测到另外的明显益处。在对照亲代培养物中观测到正常增殖,在没有任何生长因子的限定培养基中没有观测到存活的集落。

[0305] 表3

	活化					生长
	HRG	IGF	素	LIF	BMP4	
[0306]	+					否
	+			+		是
	+	+				否
	+	+		+		是
	+	+	+			否
	+	+	+	+		是
	+		+			否
	+		+	+		是
				+	+	是
	+			+	+	是

[0307] 通过将 2×10^5 细胞/孔接种于6-孔盘中于1:1000MATRIGEL™上,其与10或50ng/mL HRG- β 、10ng/mL EGF、1000U/mL LIF或10 ng/mL BMP4的选择组合,进行定量测定。使培养物生长8天,将其固定,并计数碱性磷酸酶集落的数目(图7A)。在没有生长因子的限定条件中没有观察到集落,使用HRG- β 、HRG- β /EGF和HRG- β /BMP组合时观察到<45的集落。尽管在单独的LIF中观测到1358个集落,但在10ng/mL HRG- β /LIF和50ng/mL HRG- β /LIF组合中分别观察到4114和3734个集落。这表明在限定条件中,单独的LIF提供了显著的多能信号,以及HRG- β 表现出与LIF的强协同作用,超过了本次测定中增殖性mESC集落数目两倍。本次测定的低放大图像也表明这种协同性增殖效应(图7B-图7G)。

[0308] 实施例6-维持在DC-HAIF中的人胚胎干细胞(hESCs)多能性表征

[0309] 多种方法用于确认hESCs可塑性在DC-HAIF中的维持。培养在DC-HAIF中6个月的BG02细胞(25代)维持了形成复杂性畸胎瘤的能力(图8A),代表体外三种胚层(图8B)。转录分析用于比较维持在CM和DC-HAIF中的hESCs细胞的整体表达(Liu et al. 2006, BMC Dev Biol 6:20)。在生长在DC-HAIF中10代和32代的BG02细胞以及生长在CM中64代的BG02细胞中检测到大于11600种的转录物。所有群体共有转录物有约10364种(图8C),包括已知的hESC标志物,诸如CD9、DNMT3、NANOG、OCT4、TERT和UTF1(未显示)。在CM和DC-HAIF培养物比较中观察到高相关系数(选择区域的 $R^2=0.928$),以及在早代和后代细胞中观测到高相

关系数(选择区域的 $R^2=0.959$) (图8D)。分级 群聚分析证实了维持在DC-HAIF中的BG02细胞紧密成群,并且与维持在CM中的BG02和BG03细胞保持密切的类似性(图8E)。这些数据与之前的分析一致,表明未分化的hESCs与胚状体或成纤维细胞相比紧密聚集(Liu et al.2006,BMC Dev Biol 6:20)。因此,维持在本发明 组合物中的细胞能够维持多能性的关键标志物。因此,本发明的组合物可以作为支持可分化细胞自我更新的简单培养基。

[0310] 实施例7-人胚胎干细胞(hESCs)在DC-HAIF中的人源化细胞外基质(ECMs)上的维持

[0311] 为了研究ErbB2信号转导的作用,以及开发hESCs的限定培养基,最初将DC-HAIF培养物在包被有生长因子MATRIGEL™1:30减少的培养皿上扩增,但还可以在1:200(图9A)或1:1000稀释的该基底上成功地长时间维持。BG02和CyT49hESCs还可以在包被有人血清(图9B)、人纤连蛋白(图9C)或VITROGRO™(图9D)的组织培养皿上维持>5代,VITROGRO™为享有专利权的人源化ECM。

[0312] 实施例8-人胚胎干细胞(hESCs)的单细胞传代

[0313] 多个研究组已经证实,某些三倍性,尤其是hChr12和17的三倍性在某些次优培养条件下在hESCs中累积(Baker et al.2007,Nat. Biotech.25:207-15)。三倍性的出现似乎与培养物在传代时分裂为单细胞时差的细胞存活最直接相关,从而为具有这些非整倍性的细胞提供了假定的强选择生长优势。相反,生长在本发明的一个实施方案 DC-HAIF中的hESCs在分裂为单个细胞后在接种时维持高活力(图10A-D)。BG01和BG02细胞在用ACCUTASE™分别传代>18和19代后维持正常核型(图10E)。细胞正常核型的维持证实了hESC培养物解离为单细胞并不会固有地导致这些三体性在维持于DC-HAIF中的hESCs中的累积。BG01和BG02培养物还可以通过用多种传代剂解离为单细胞来传代(图11)。培养物用ACCUTASE™、0.25%胰蛋白酶/EDTA、TrypLE或VERSENE™(EDTA)分裂5代并测定核型。这些数据证实,利用不同细胞解聚试剂,在本发明的组合物中培养和传代hESCs,在至少两种人胚胎细胞系中维持正常核型。

[0314] 利用本发明的组合物,大规模扩增未分化的hESCs也是可能的。在单次实验中,BG02细胞在60mm平板中的起始汇合培养物在DC-HAIF中扩增4代以在20天内生成>1.12x10¹⁰细胞。培养物保持未分化,如通过流式细胞术检测时在一批次中>85%的细胞维持诸如OCT4、CD9、SSEA-4、TRA-1-81的多能性标志物表达所证实的(图12A)。其他多能性标志物的表达还可以通过RT-PCR分析来观测,而分化的谱系标志物 α -胎蛋白、MSX1和HAND1没有检测到(图12B)。原位杂交荧光分析证实在DC-HAIF中培养和传代的细胞维持对于hChr12(98%2-拷贝)、hChr17(98%2-拷贝)、hChrX(95%1-拷贝)和hChrY(98%1-拷贝)的期望拷贝数(图12C)。核型分析还证实了正常的整倍性染色体含量和谱带特征维持在这些细胞中。

[0315] 实施例9-应用生理浓度的胰岛素和IGF1对hESCs发挥不同的作用

[0316] 迄今为止,基本上所有报道的hESCs培养条件都包括超生理水平的胰岛素,其能够刺激IR和IGF1R。为了区别胰岛素和胰岛素替代物与IGF1比较发挥的活性,将hESCs培养在生理水平的这些生长因子的限定培养基条件。滴定的胰岛素和IGF1的浓度为约0.2至约200 ng/mL,5天后通过计数细胞来监测细胞增殖。使成功扩增的培养物连续传代5次。生理水平的IGF1支持hESC培养物的扩增,而生理水平的胰岛素不支持,这表明胰岛素或胰岛素

替代物的活性不能取代 IGF1, 以及 IGF1 和胰岛素 (或胰岛素替代物) 对于对 hESCs 的作用代表分别的生物活性类别。

[0317] 实施例10-筛选补加剂作用的方法

[0318] 首先为了检测维生素B₁₂和维生素B₆对以中等密度生长的hESCs 生长或分化的影响, 利用ACCUTASE™分裂BG02细胞, 并且将1x 10⁵细胞/孔在限定培养基 (DC) 中接种于6-孔盘中。DC培养基含有10

[0319] ng/mL HRG-β、200ng/mL LongR3-IGF1以及10ng/mL FGF10。将维生素B₆ (0.5μM) 和/或维生素B₁₂ (0.5μM) 添加到实验孔中。7天后计数每一条件中的细胞数目。实验和对照孔两者的细胞计数和集落计数会洞察维生素B₆和维生素B₁₂对细胞生长的影响。

[0320] 此外, 可以在实验孔中检测诸如OCT4的分化标志物以确定添加剂和补加剂对可分化细胞分化状态的作用。

[0321] 实施例11-hESCs在缺乏FGF2情况下的培养

[0322] 将BG02细胞长时间维持在DC-HAI中, 维持20代 (图13A), 以及还将BG01细胞在DC-HAI中连续传代, 两者都在缺乏FGF2的情况下。培养物没有恶化或显示明显的分化, 并且在整个培养期都显示了未分化集落的正常扩增。在DC-HAI中传6代后, 证实了正常雄性核型在BG02培养物中的维持 (图13B, 20/20正常的分裂中期相)。

[0323] 转录分析用于比较维持在DC-HAIF和DC-HAI中的hESCs细胞中的总体表达。利用Trizol (Invitrogen) 自hESCs分离总细胞RNA, 并根据生产商建议的方案用DNase I (DNA酶I, Invitrogen) 处理。利用Illumina RNA扩增试剂盒, 用100ng总RNA进行样品扩增, 通过与未标记的UTP 1:1的比例掺入生物素-16-UTP (Perkin Elmer Life和 Analytical Sciences) 来实现标记。按照生产商的说明 (Illumina, Inc.), 将标记的扩增材料 (700ng每一阵列) 与含有47296转录探针的Illumina Sentrix Human-6Expression Beadchips杂交。用Illumina Bead Array Reader共焦扫描仪扫描阵列, 处理原始数据, 消减背景, 并且利用Illumina BeadStudio软件按照生产商的说明进行数据分析。0.99的最小检测可信分值 (计算的截止表示靶序列信号与阴性对照是可区分的) 用于区别转录物表达的存在和缺乏。利用描述的用于其它hESC样品的平行方法 (Liu et al. 2006, BMC Dev Biol 6:20) 进行数据分析。分级群聚如以前所述进行 (Liu et al. 2005, BMC Dev Biol 6:20), 并且基于利用由ANOVA鉴定的差异表达基因 (p<0.05) 的平均数联结和欧几里得距离作为相似性度量标准。用于阵列生产的灵敏度和质量控制的详细说明以及用于Bead studio软件的算法可从Illumina, Inc (San Diego, CA) 获得。检测的大部分转录物表达在DC-HAIF和DC-HAI BG02培养物中, 包括诸如CD9、DNMT3、NANOG、OCT4、TERT和UTF1 (未显示) 的已知hESC标志物。在DC-HAIF和DC-HAI培养物比较中观察到高相关系数 (选择区域的R²=0.961) (图14)。分级群聚分析证实维持在DC-HAI中的BG02细胞紧密成群, 并且与维持在DC-HAIF中的细胞以及多培养模式中的BG02和其他hESC系保持密切的相似性 (图 15)。这些数据与以前的分析是一致的, 这表明未分化的hESCs与胚状体或成纤维细胞相比紧密地聚集 (Liu et al. 2006, BMC Dev Biol 6:20)。

[0324] 而且, 维持在DC-HAI中的BG02细胞分化为在SCID-beige小鼠中形成的复杂畸胎瘤中的中胚层、内胚层和外胚层的代表 (未显示), 这从形式上证实了多能性在无外源性FGF2情况下生长的培养物中的维持。

[0325] 为了检测在单细胞传代情形下是否需要外源性FGF2, BG01细胞 用ACCUTASE™传代并生长在仅含有10ng/mL HRG-β和200ng/mL LongR3-IGF1 (DC-HI) 的限定条件中。将这些DC-HI培养物维持10代, 并且其不显示明显的分化或增殖减缓。

[0326] 这些研究清楚地证实, 当hESCs维持在最低限度地包含heregulin 和IGF1的限定培养基中时, 外源性FGF2的供给不是必需的。此外, 缺乏FGF2的培养物保持多能性的主要特性, 包括转录特征以及体内 向中胚层、内胚层和外胚层的分化。

[0327] 实施例12-悬浮培养物

[0328] 如本文所述, 将BG02细胞的起始培养物在包被有1:200的基质 胶(matrigel)的平皿上维持在DC-HAIF培养基中, 并且通过用 ACCUTASE™传代来分裂。为了启动悬浮培养, BG02细胞用 ACCUTASE™解聚并接种于低粘附6孔盘中, 在DC-HAIF培养基中 的密度为1.6、3或 6×10^5 细胞/mL (0.5、1或 2×10^6 个细胞在3mL体 积中)。将上述盘置于含5%CO₂的湿润培养箱中的80-100rpm的旋转 平台上。在这些条件下, hESCs在24小时内合并为形态上为小球的存活细胞。

[0329] 第二天, 更换孔中的培养基, 此后每天更换。悬浮聚集体继续增殖, 随着时间变大, 而没有明显的分化迹象(图17)。一些小球随着培养进程继续聚集, 同时一些聚集体变得远大于大多数。此外, 在培养 的前几天, 能够在合并过程中观察到非球状聚集体。为了限制这种继续的聚集, 将38μg/mL DNaseI加入一些悬浮培养物中达首个24小时。这种方法看起来有助于初期聚集, 相对较大但更少的聚集体在DNaseI 存在下形成。然而, 并不清楚是否DNaseI处理降低随后的小球合并, 以及是否暴露于DNaseI一直使得这些聚集体在分裂时更难分解。

[0330] 悬浮培养物约每7天用ACCUTASE™解聚, 并建立新球。尽管在 不同实验中密度是不同的, 但在该密度范围(1.6- 6×10^5 细胞/mL)内建立的小球能够维持在培养中超过12代, 或者大于80天, 而没有分化的形态迹象。还进行了连续传代的悬浮hESCs的FISH分析以评价常见非整倍体的染色体数。悬浮生长6代的BG02细胞对于hChr 12 (96% 2拷贝, n=788)、hChr 17 (97% 2拷贝, n=587)、hChr X (97% 1拷贝, n=724) 和hChr Y (98% 1拷贝, n=689) 显示了正常计数。

[0331] 实施例13-可分化细胞在悬浮培养中的扩增

[0332] 与存在血清或分化诱导剂情况下的胚状体培养物不同, DC-HAIF 中的hESCs悬浮聚集体看起来没有分化。没有观察到明显的内脏内胚 层, 也没有观察到类似前羊膜腔的结构形成, 两者都是胚状体分化的 典型标志。为了更密切地检测分化的缺乏, 将培养物接种回贴壁条件, 在1:200稀释的MATRIGEL™上, 并培养于DC-HAIF中。这些培养 物也是主要未分化的, 没有显示分化增加的明显的形态迹象, 诸如较大的变平的细胞或结构区域的出现。

[0333] 细胞计数用于评价悬浮细胞相对于贴壁培养的相对生长率。在该 实验中, BG02细胞的贴壁培养物用ACCUTASE™传代, 并且将约 1×10^6 个细胞置于平行的悬浮或贴壁培养孔中。在1-6天, 计数单独的 孔, 并以对数分度作图(图18)。尽管贴壁培养24小时后, 更高初期比例的hESCs是存活的(约90%比约4%), 但此后的生长率是相当的。这表明hESCs在悬浮培养中的增殖能够与在传统贴壁培养中一样快。在传代期间进行的细胞计数允许估计在这一简单悬浮系统中可能的扩增数。在接种 5×10^5 个细胞的几个培养物中, 7天后生成约 10^7

个细胞 或更多个细胞。悬浮培养中7天后的扩增相当于约20倍或更多扩增, 观察到的最大扩增为输入细胞数的约24倍。

[0334] 实施例14-悬浮培养扩增的可分化细胞的特征

[0335] 定量RT-PCR (qPCR) 用于比较DC-HAIF中悬浮培养和贴壁培养 生长的hESCs中的基因表达。在两种培养模式中,观察到多能细胞标志物OCT4的水平相当,这证实了悬浮维持的培养物主要是未分化的。定形内胚层标志物SOX17在hESCs任一群体中都没有表达。qPCR 分析还检测了作为悬浮聚集体的悬浮hESCs分化为定形内胚层的潜力。利用平行条件分化贴壁和悬浮hESCs。hESC培养物用含有2%BSA、100ng/mL活化素A、8ng/mL FGF2和25ng/mL Wnt3A的RPMI处理 24小时,随后在不含Wnt3A的相同培养基中培养2天。与未分化hESCs相比,在两种定形内胚层样品中OCT4的表达下调,以及SOX17的表达上调相似。这一分化分析证实,在DC-HAIF中悬浮培养的hESCs 维持它们的分化潜力,如定形内胚层的可能形成所证明的。

[0336] 实施例15-悬浮培养中凋亡抑制剂的添加

[0337] 为了减少细胞在悬浮中初次传代后的丢失,将凋亡抑制剂加入培养基。如实施例12对细胞进行传代,除了将p160-Rho-相关卷曲螺旋 激酶 (ROCK) 抑制剂Y-27632加入培养基外。

[0338] 通过将 2×10^6 个单细胞在3mL DC-HAIF培养基中接种在6孔平皿中,以100rpm在培养箱中的旋转平台上形成BG02细胞的悬浮聚集体(表4,实验A)。在实验过程中将 $10 \mu\text{M}$ Y27632 ROCK抑制剂添加到测试孔中,每天观察培养物,并且在24小时(第1天)后以及4或5天后计数。如图20所示,Y27632的添加对悬浮培养物的初期聚集相具有深刻影响。与没有抑制剂的培养基中的聚集的细胞相比,在存在Y27632的情况下形成大得多的聚集体(图20)。细胞计数证实,在抑制剂存在情况下,存在更多存活的细胞(表4,实验A)。细胞数目的这一差异在整个培养期都存在,在第4天,与没有抑制剂的培养物相比,还观察到更多的细胞。如之前的悬浮培养实验,暴露于Y27632的细胞也能够连续传代,并维持在未分化状态(未显示)。当聚集体再次分裂时,用Y27632处理观察到几乎两倍多的细胞(表4,实验A)。RT-PCR 分析表明,在Y27632存在时悬浮培养生长的BG02细胞保持未分化(图21)。

[0339] 因为之前的实验已经证明,悬浮培养和贴壁培养的细胞的生长率在最初24小时后是相似的,因此进行了实验,其中Y27632在该初期后去除时(表4,实验B)。与之前的观察一致,Y27632增强了hESCs在初次传代后的最初存活和聚集,但24小时后移除该抑制剂并没有不利地影响第5天分析的细胞数目和活力计数。相比于未进行处理的培养物中的 3.9×10^6 个细胞,抑制剂存在时生成 1.4×10^7 (+Y27632) 和 1.8×10^7 (+/-Y27632) 个存活细胞。该分析证实,在悬浮hESC培养的最初24小时期间,Y27632的影响最大。

[0340] 由于Y27632存在情况下观察到存活和聚集增强,所以进行试验以检测是否可能降低用于接种悬浮培养物的细胞数目(表4,实验C)。之前的实验已经表明,以每3mL DC-HAIF约 5×10^5 个细胞或更少的细胞的低密度接种ES细胞的效果并不好。为了确定添加ROCK抑制剂是否会允许更低密度的细胞接种,从约 2×10^6 个总细胞低至约 1×10^5 个总细胞的细胞浓度范围用于在6孔盘中接种在3mL DC-HAIF中的悬浮培养物。将 $10 \mu\text{M}$ Y27632添加至所有条件,在第5天评价细胞数目和活力。即便以低接种密度,也观察到成功的聚集和扩增。即便在仅接种 1×10^5 个细胞的培养物中,也观察到大约13倍扩增的存活细胞。因此用Y27632

抑制ROCK促进了hESCs在低得多的密度时在该 悬浮系统中的初期存活。

[0341] 表4-有和无凋亡抑制剂的悬浮培养物

Expt.	处理	接种	细胞计数: 总计(存活, %)		
			p0, 第一天	p0, 第 4 天	p1, 第 4 天
A	HAIF	2×10^6	1.9×10^6 (3.5×10^5 , 19%)	1.8×10^6 (1.3×10^6 , 75%)	2.5×10^6 (2.2×10^6 , 88%)
	+Y27632	2×10^6	1.6×10^6 (1.2×10^6 , 74%)	7.8×10^6 (7.1×10^6 , 91%)	4.6×10^6 (4.2×10^6 , 91%)
				p0, 第 5 天	
B	HAIF	2×10^6	2.9×10^6 (5.5×10^5 , 26%)	4.8×10^6 (3.9×10^6 , 81.3%)	
	+Y27632	2×10^6	1.9×10^6 (1.4×10^6 , 73%)	1.5×10^7 (1.4×10^7 , 92%)	
	+/- Y27632	2×10^6	N/A	1.9×10^7 (1.8×10^7 , 96%)	
				p0, 第 5 天	
C	+Y27632	2×10^6	1.9×10^6 (1.6×10^6 , 84%)	1.4×10^7 (1.2×10^7 , 90%)	
		1×10^6	8.7×10^5 (6.6×10^5 , 76%)	8.6×10^6 (7.8×10^6 , 91%)	
		5×10^5	4.6×10^5 (3.5×10^5 , 75%)	5.7×10^6 (5.3×10^6 , 93%)	
		2.5×10^5	2.6×10^5 (2.3×10^5 , 91%)	2.7×10^6 (2.5×10^6 , 91%)	
		10^5	6.8×10^4 (5.4×10^4 , 79%)	1.4×10^6 (1.3×10^6 , 92%)	

[0343] Expt. = 实验; p0=0代, p1=1代; N/A=不可得到; 细胞计数和百分比分别四舍五入到1和0位小数位。

[0344] 实施例16-不同培养基中的悬浮培养物

[0345] 为了确定是否ES细胞的悬浮液能够在无FGF2和/或活化素A存在的情况下培养, 将ES细胞培养在有和无这些因子的多种培养基中。表5显示了来自悬浮培养物的细胞计数结果, 并且表明悬浮培养物能够在无外源FGF2的情况下 (HAI条件) 以及无外源性FGF2或活化素A (HI条件) 的情况下成功扩增。Y27632的添加在所有条件下到第5天时 都增加了生成的细胞量。此外, 每一培养基中的细胞成功传代, 没有 分化的形态迹象。

[0346] 表5-不同培养基中的悬浮培养物

[0347]

处理	接种	细胞计数: 总计(存活, %)	扩增倍数
		p0, 第 5 天	
HAIF	2×10^6	7.7×10^6 (6.5×10^6 , 83%)	3.25
HAI	2×10^6	7.0×10^6 (6.3×10^6 , 91%)	3.15
HI	2×10^6	6.4×10^6 (5.3×10^6 , 83%)	2.65
HAIF+Y27632	2×10^6	1.5×10^7 (1.3×10^7 , 90%)	6.5
HAI+Y27632	2×10^6	1.5×10^7 (1.3×10^7 , 91%)	6.5
HI+Y27632	2×10^6	1.9×10^7 (9.2×10^6 , 49%)	4.6

[0348] 实施例17-优化的剪切速率导致悬浮细胞聚集体存活、密度和大小一致性的增加

[0349] 预期能够维持在悬浮细胞培养中的任何细胞会通过本文公开的系 统、方法和仪器获益,以及能够根据本文公开的系统、方法和仪器来 使用。细胞包括但不限于哺乳动物细胞,包括但不限于人细胞系 CyT49、CyT203、Cyt25、BG01和BG02、小鼠、狗和非人灵长类干细胞系以及其他。

[0350] 本文提供的结果表明细胞增殖和分化能够维持在对照水平或减 弱,这取决于反应仪器的运行参数,特别是培养物流动的速率和提供 的剪切力。作用于细胞培养的剪切力对细胞增殖能够具有显著的影响。对称系统,诸如本文应用的旋转平台,在容器周围提供了均一 的、主要为层式的剪切应力,而不对称系统和装置诸如搅拌罐生物反 应器具有特征为局部高剪切应力的湍流区。这样,如果生物反应器或 细胞培养仪器不是对称系统,则培养流的方向既影响来自旋转的剪切 应力的性质又影响其程度。

[0351] 当然,最优旋转速度是培养特异性的,并且能够依据细胞培养物 的细胞计数、培养基粘度、培养基类型、特定悬浮细胞的稳健性(一 些细胞能够比另外细胞抵抗更高水平的剪切力)等而变化。对于考虑 的特定条件集,可容易地确定最优旋转速度。具体来说,为了维持层 流条件,本文描述和预期的旋转速度是有用的。因此,本文描述的实 验在以下条件下进行:其中1)细胞增殖和分化维持在对照水平或接近 对照水平;以及2)削弱细胞增殖和分化的条件。以下是对于维持hES 细胞聚集体培养物或分化的hES细胞聚集体培养物有效的一般方法。本领域技术人员能够基于本文提供的描述优化细胞聚集体的大小和形状。

[0352] 下面的表6描述了剪切速率和应力,因为它与细胞聚集体的直径 (μm) 有关。利用轨道旋转器(Barnstead LabLine Multipurpose Rotator),以60rpm、80rpm、100rpm、120rpm、130rpm、140 rpm、150rpm和160rpm的不同旋转速度聚集人ES细胞1、2、3和/ 或4天。表6还证实,细胞聚集体经历的有效剪切速率依赖于该细胞 聚集体的直径。

[0353] 表6-细胞聚集体的大小依赖于剪切速率和剪切应力

	聚集体直径 (μm)	旋转速度 (rpm)	无因次应力	剪切应力 (达因/ cm^2)	剪切速率 (1/秒)
[0354]	200	140	0.94	3.16	322.24
		120	0.76	2.06	210.12
		100	0.59	1.24	126.82
		80	0.43	0.66	67.05
		60	0.29	0.30	30.17
	175	140	0.72	2.42	246.72
		120	0.58	1.58	160.87
		100	0.45	0.95	97.10
		80	0.33	0.50	51.33
		60	0.22	0.23	23.10
	150	140	0.53	1.78	181.26
		120	0.43	1.16	118.19
		100	0.33	0.70	71.34
		80	0.24	0.37	37.71
		60	0.16	0.17	16.97
	125	140	0.37	1.23	125.88
		120	0.30	0.80	82.08
		100	0.23	0.49	49.54
		80	0.17	0.26	26.19
		60	0.11	0.12	11.79
	100	140	0.24	0.79	80.56
		120	0.19	0.51	52.53
[0355]		100	0.15	0.31	31.71
		80	0.11	0.16	16.76
		60	0.07	0.07	7.54

[0356] 为了确定旋转速度如何调控ES聚集体的直径,我们通过以100 rpm、120rpm或140rpm旋转生成了ES聚集体。由旋转培养2天后 摄取的5X相衬图像来定量聚集体直径。对于100rpm培养物,平均直径 $\pm$ SD为 $198\mu\text{m}\pm 21\mu\text{m}$ 。对于120rpm培养物,平均直径 $\pm$ SD 为 $225\mu\text{m}\pm 28\mu\text{m}$ 。对于140rpm培养物,平均直径 $\pm$ SD为 $85\mu\text{m}\pm 15\mu\text{m}$ 。利用ANOVA和Tukey多重比较后检验,每一直径分布是 统计学上显著的 ($p<.001$)。如表6中所显示,剪切速率以指数方式从 60rpm增加到140rpm,例如,100 μm 直径聚集体的剪切速率在100 rpm为约 30秒^{-1} ,在140rpm为约 80秒^{-1} ,其增加了约3倍。通常, 高于140rpm的旋转速度产生更大的、较不均一的hES细胞聚集体。细胞聚集体培养物还可以以降低的旋转速度进行初期培养,例如60 rpm至80rpm培养约1天,此后以较高的旋转速度培养(例如,100 rpm-140rpm或更高),而对细胞聚集体的大小或形状没有任何不利影响。

[0357] 重要的是,注意到尽管细胞聚集体的直径随着剪切速率变化,但 基因表达在不同条件之间,即不同旋转速度和/或不同大小和形状的细胞聚集体之间没有明显影响。也就是说,观察到多能hESC或hES衍生细胞类型(例如定形内胚层、前肠内胚层、PDX1内胚层、胰腺内胚层以及分泌细胞)的标签标志物与在D' Amour et al. (同上)中描述的那些一致,相关申请通过引用并入本文。

[0358] 为了确定旋转速度、剪切速率和剪切应力对细胞存活或细胞活力的影响,经证实,在减小的速度下(例如60rpm至80rpm),一天即可改善存活率。例如,细胞存活在旋转速度为60rpm至140rpm下是至少60%或更高。此外,d1(第1天)、d2(第2天)和d3(第3天)时,细胞聚集体的数目在降低的旋转速度培养下比更高的旋转速度下(例如100 rpm或更高)更高。当细胞聚集体以较高的旋转速度(例如,140rpm或更高)培养时,还存在显著的破坏和解聚。总之,这些数据表明,当细胞聚集体以降低的旋转速度首次培养至少一天时,细胞存活是增加的,然而当旋转速度增加到100rpm至140rpm时,不存在细胞存活的显著下降;尽管以低于140rpm的旋转速度的分化是优选的。

[0359] 此外,培养体积影响剪切速率和剪切应力,而这又进一步影响细胞聚集体大小和形态的均一性,如上文所述。例如,当启动单细胞悬浮培养以便在6mL中形成细胞聚集体时,与4mL中的相比,形成了大小和形态更为均一的细胞聚集体。参见图23,其中当用4mL培养时,细胞聚集体的直径在小于50微米变化至大于250微米间变动,然而当培养在6mL中时,直径具有更为紧凑的范围,从大于约50微米变化至小于200微米。尽管描述的细胞聚集体从由贴壁hES细胞培养物制备的单细胞悬浮培养物起始,但预期从hES衍生的贴壁平板培养物起始的细胞聚集体悬浮培养物的表现相似。因此,培养基的体积可能不依赖于细胞聚集体悬浮培养物起始的阶段。

[0360] 此外,hES细胞聚集体可以在多种不同培养条件下培养。例如,hES细胞聚集体培养物能够维持在含**StemPro**[®]的培养基中、含DMEM/F12的培养基中或者含DMEM/F12的20%Knockout血清替代物(KSR,Invitrogen)培养基中;或者还含有20ng/mL FGF(R&D Systems)和20ng/mL活化素A(R&D Systems)的**StemPro**[®]和DMEM/F12培养基中;或者还含有10ng/mL Heregulin B的**StemPro**[®]和DMEM/F12培养基中。可选择地,本文提及的任一种培养基和可以商购的那些培养基还可以添加无异种成分KSR(Invitrogen)。最后,还可以在上述培养基的任一种中产生和培养细胞聚集体,并且还不含外源性FGF。

[0361] 实施例18-hES细胞悬浮聚集体能够分化成内胚层谱系类型细胞

[0362] 人胚胎干(hES)细胞体外维持并分化成定形内胚层(阶段1)、前肠内胚层和PDX1内胚层,基本上如前述的D' Amour et al.2006(同上)以及美国专利公开第2005/0266554号、第2005/0158853号、第2006/0003313号、第2006/0148081号、第2007/0122905号和第2007/0259421号中所述,这些以其整体并入本文。

[0363] 简言之,未分化的多能hES贴壁(平板)细胞被维持在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层(Millipore,以前为Chemicon或Specialty Media)上或人血清包被的60mm平板(0.1-20%终浓度;Valley Biomedical)上,培养在补充有以下成分的DMEM/F12(Mediatech)中:20% KnockOut血清替代物(Invitrogen/Gibco)、1mM非必需氨基酸(Invitrogen/Gibco)、Glutamax(Invitrogen/Gibco)、青霉素/链霉素(Invitrogen/Gibco)、0.55 mM 2-巯基乙醇

(Invitrogen/Gibco) 以及4ng/mL至20ng/mL重组人 FGF2 (R&D Systems)。可选择地,上述培养基可以补充无异种成分KSR (Gibco) 和人血清。另外,在将hESC接种在未包被的培养平板上后,将人血清添加至培养物中。将低剂量的活化素A (2-25ng/ml, R&D Systems) 添加至生长培养基以助于维持未分化生长。0天 (d0) 的贴壁多能hESC表达高水平的多能性蛋白标志物OCT4。参见图1,图面A, d0 (第0天) 的平板对照。

[0364] 将细胞通过人工或酶促方式再次传代,基本上如D' Amour et al. 2006 (同上) 所述。解离悬浮培养物并将其转移至锥形管,以1000rpm 离心约5分钟。去除上清液,并利用ViCell细胞分析仪进行标准的细胞计数。来自60mm平板的典型细胞数目的范围为 3×10^6 至 12×10^6 细胞,取决于细胞系和传代前培养的天数。一旦确定了原代细胞悬浮液中的细胞数目,则将悬浮液进一步用上述的StemPro®或含有无异种成分KSR的培养基稀释至终体积 1×10^6 细胞/mL。该体积可以增加至 $>4 \times 10^6$ 细胞/mL,但可能需要更频繁的饲养。将ROCK抑制剂Y27632 (Axxora) 添加至细胞悬浮液中至终浓度为约1-15 μ M,通常为10 μ M, 以及通过轻轻翻转混合上述管。在一些情况下,没有将Y27632添加至悬浮液以便控制聚集体形成的速率。然后将重悬浮的细胞等分至低结合6孔平皿的每个孔中 (每孔约5mL的细胞悬浮液),并在分化前置于100rpm至140rpm的旋转平台上1-4天。

[0365] 在该培养期,形成hES细胞聚集体,并且通过用4mL不含Y27632 的新鲜StemPro®培养基或者任一所述补充了无异种成分KSR的培养基替换4mL培养基,每天饲养培养物至少1-2次。培养基更换(“饲养”) 应进行得尽可能快,以破坏或阻止任何凝聚,以及破坏可以导致聚集体在旋转期间漂浮的表面张力。此外,为了优化细胞聚集体的生长以及大小和形态的均一性,细胞聚集体不应从旋转平台或仪器中移开任一长一段时间。因此,hES细胞聚集体可以从本领域已确立的hES细胞贴壁培养物产生。

[0366] hES细胞聚集体现在能够直接分化为悬浮聚集体,基本上如在前 面D' Amour et al. 2006 (同上) 中所述。简言之,从孔中移除 (如抽吸) StemPro® (不含Y27632) 培养基或补充有无异种成分KSR的任一描述的培养基,用5mLRMPI (Cat.15-040-CV; Mediatech) 洗涤hES细胞聚集体,所述RMPI不含血清、含青霉素/链霉素 (Invitrogen) 和Glutamax (Invitrogen) (也被称为RMPI、Pen/Strep和Glutamax培养基)、0%FBS、1%PenStrep、1% Glutamax。然后在洗涤培养基移走之前,将6孔平皿放回旋转平台1-2分钟。重复该过程至少两次或直至胰岛素和/或 IGF-I已经被充分移除,因为尽管对于维持多能性和ES自我更新是必需的,但相同因素对受控的同步的谱系定向分化是有害的。通过添加和移除多种外源性有丝分裂原,在100rpm下进行向全内胚层谱系的分化,基本上如D' Amour et al. 2006 (同上) 中所描述,并且下文更为详细地对其进行了描述。

[0367] 向定形内胚层的分化 (阶段1)

[0368] 人ES细胞聚集体在RPMI、100ng/mL活化素A和不同浓度的FBS (US Defined FBS, HyClone, catalogue no.SH30070.03), 以及25ng/mL- 75ng/mL Wnt3a中分化第一天,在还含有100ng/mL活化素A和不同浓度的FBS (HyClone) 的RMPI、Pen/Strep和Glutamax培养基中分化第二和第三天 (d0至d2)。在大多数分化实验中,如果应用或期望三天的阶段1方案,FBS的浓度在前24个小时为0% (d1),在第二个24 小时为0.2% (d2),以及在第三个24小时为0.2% (d3)。优选地,进行两天的阶段1方案。

[0369] hES衍生细胞悬浮聚集体在2天的阶段1方案结束时的QPCR分析表明,hES聚集体与贴壁平板对照相比高效地定向分化至定形内胚层。在100rpm、120rpm和140rpm下形成细胞聚集体。在一些实验中,在分化前,将hES衍生聚集体转移至生物反应器(旋转长颈瓶)。贴壁hES细胞培养物以及分化成定形内胚层细胞的hES细胞培养物用作对照。与未分化的hES细胞聚集体和贴壁平板对照相比,在细胞悬浮聚集体和贴壁培养物中观察到表达水平增加的SOX17和FOXA2。参见图22,阶段1(d2)的图面C(SOX17)和D(FOXA2)。而且,与定形内胚层贴壁平板对照相比,与污染的胚胎外和内脏内胚层有关的基因SOX17的表达水平在定形内胚层细胞聚集体中显著降低。参见图22,阶段1(d2)的图面L。

[0370] 利用CXCR4和HNF3 β (FoxA2)蛋白的流式细胞术分析表明,ES细胞衍生的聚集体的定向分化形成的聚集体是至少97%CXCR4-阳性的、至少97%HNF3 β -阳性的以及至少95%CXCR4/HNF3 β -共阳性的。

[0371] 为了进一步评价hES细胞聚集体分化的效率,利用免疫细胞化学和共聚焦显微镜检查来检测ES衍生细胞聚集体的冰冻切片的SOX17和HNF3 β 表达。染色的冰冻切片的图像分析表明,在阶段1结束时,大于约90%的所有细胞(定形内胚层细胞)表达HNF3 β 和/或SOX17。

[0372] 这些数据都表明,能够实现ES细胞作为细胞聚集体的高效分化,并且基于特征定形内胚层标志物的表达水平,用于产生本文所述的定形内胚层的方法相比贴壁平板培养物的分化更为有效。

[0373] 向PDX1-阴性前肠内胚层细胞的分化(阶段2)

[0374] 将来自阶段1的人定形内胚层细胞聚集体在PBS+/+中简单洗涤,然后在还含有2%FBS和25ng-50ng/mL KGF(R&D Systems)的RMPI、Pen/Strep和Glutamax培养基中再分化2或3天。在一些实验中,5 μ M SB431542(Sigma Aldrich, Inc.)或2.5 μ M TGF- β 抑制剂IV(Calbiochem)在阶段2的第一天期间添加;以及可选地与RMPI、Pen/Strep和Glutamax培养基/0.2%FBS/ITS(胰岛素/转铁蛋白/硒)一起添加。

[0375] 基本上如上所讨论的,进行QPCR分析。相比于贴壁平板对照,在细胞聚集培养物中观察到表达水平增加的HNF1 β 和HNF4 α 。参见图22,阶段2(d5)的图面E(HNF1B)和图面O(HNF4 α)。产生具体阶段0、1、2和5的hES或hES衍生细胞聚集体(或者对于分化的聚集体,“dAggs”)的方法在图面O中稍加变化。本文中的分化的细胞聚集体指分化的hES或hES衍生的细胞聚集体培养物,其起始于衍生它的对应阶段的贴壁平板对照培养物。例如,在阶段1,分化的细胞聚集体(“dAggs”)悬浮培养物从阶段0贴壁平板开始,并且在100rpm至140rpm的旋转平台上、在本文所述的任一培养基中孵育约24小时。将这些分化的细胞聚集体然后与对应的贴壁平板对照一起进一步分化为阶段1定形内胚层细胞。图22,图面O显示在阶段1分化的细胞聚集体或贴壁平板对照中没有明显的HNF4 α (HNF4A)表达。相比之下,对阶段2样品进行了类似的方法并且产生了表达水平增加的HNF4A。HNF4A表达对于阶段5样品也是稳健的。

[0376] 而且,与胚外内胚层(SOX7)有关的基因的表达水平在hES衍生细胞聚集体培养物中相比平板对照明显降低。参见图22,阶段2(d5)的图面L。因此,证实了PDX1-阴性前肠内胚层细胞通过悬浮培养的细胞聚集体的定向分化去除了胚外内胚层污染物。

[0377] 总之,这些数据都表明hES细胞聚集体的定向分化是高效的,以及基于特征PDX1-

阴性前肠内胚层标志物的表达水平,用于产生前肠 内胚层细胞的方法相比于用贴壁平板培养物的分化获得改善。

[0378] 向PDX1-阳性前肠内胚层细胞的分化(阶段3)

[0379] 来自阶段2的前肠内胚层细胞还在RMPI中分化1至3天,该RMPI 不含血清,含 Glutamax (Invitrogen) 和青霉素/链霉素 (Invitrogen),加上 0.5X B27-补加剂 (Invitrogen/Gibco),以及或者1 μ M至2 μ M视黄酸(RA, Sigma)和0.25nM KAAD-环巴胺 (Toronto Research Chemicals);或者1 μ M至2 μ M视黄酸、0.25nM KAAD-环巴胺加上50ng/mL头蛋白(R&D systems)。可选择地,将0.2 μ M至0.5 μ M RA和0.25nM KAAD-环巴胺添加至培养基1天。仍然,在一些实验中,没有RA或KAAD-环巴胺添加至细胞聚集体培养物。在其他实施方案中,添加了0.1-0.2%有效浓度的BSA。

[0380] 与贴壁平板对照相比,在hES衍生的细胞聚集体中观察到的PDX1 的水平增加。参见图22,阶段3(d8)的图面F(PDX1)。而且,与平板 对照相比,与胚外内胚层(SOX7)和内脏内胚层(AFP)有关的基因表达 水平在hES衍生的细胞聚集体培养物中显著降低。参见图22,图面L (SOX7)和图面N(AFP)的阶段3(d8)。因此,证实了通过悬浮培养的细胞聚集体产生PDX1-阳性前肠内胚层细胞的定向分化去除了胚外内胚层污染物。

[0381] 总之,这些数据表明hES细胞聚集体的定向分化是高效的,以及 基于特征PDX1-阳性内胚层标志物的表达水平,产生PDX1-阳性内胚层的方法与贴壁平板对照相比获得改善。

[0382] 向胰腺内胚层或胰腺内分泌祖细胞的分化(阶段4)

[0383] 在阶段4,从阶段3培养物中剥夺RA,用加B27(1:100Gibco)的 DMEM洗涤培养物一次,然后用单独的DMEM+1XB27补加剂或与以下因子的任一或全部组合的DMEM+1XB27补加剂替代洗涤液4-8天: 头蛋白(50ng/ml)、FGF10(50ng/ml)、KGF(25-50ng/ml)、EGF(25-50ng/ml)、1-5%FBS。在没有添加RA的情况下,将30-100ng/mL(R&D systems)的头蛋白添加至培养基1-9天。此外,在一些实验中,还添加了25ng/mL的FGF10。

[0384] 在ES细胞衍生的聚集体和对应贴壁平板对照中观察到NKX6.1 和PDX-1和PTF1A的表达水平增加。参见图22,图面F(PDX1),图面G(NKX6.1)和图面P(PTFA1)的阶段4(d11)。在图22的图面P,柱状图描绘了来自以下方法的结果,该方法用于确定hES和/或hES衍生细胞悬浮聚集体是否受衍生它们的贴壁平板培养物中的细胞数目影响。尽管,图面P仅显示了1x 10⁷个细胞的结果,但细胞聚集体悬浮培养物从不同接种计数开始,例如1x 10⁶至2x 10⁷个细胞。所有接种计数都基本上相似,并产生了具有良好活力和几乎无细胞死亡的细胞聚集体培养物。例如,在阶段4,分化的细胞聚集体悬浮培养物(“dAggs”)从d5(阶段2)贴壁平板开始,并再次在本文描述的任一培养基中孵育约24小时,在100rpm至140rpm的旋转平台上。然后这些分化的细胞聚集体分化成表达PTF1A的阶段4的胰腺内胚层类型细胞(图面P)。与对应的阶段4贴壁平板对照相比,存在表达增加的PTF1A。

[0385] 而且,与贴壁平板对照相比,AFP的表达水平在hES衍生细胞聚集体中显著降低。参见图22,图面N的阶段4(d11)。因此,这证实了通过悬浮培养的细胞聚集体产生PDX1-阳性胰腺内胚层细胞的定向分化去除了内脏内胚层污染物。

[0386] 利用NKX6.1、HNF3 β 和嗜铬素(CHG)蛋白的流式细胞术分析表明,hES衍生细胞聚集体的定向分化形成至少53%CHG阳性、至少40%NKX6.1和CHG共阳性的细胞聚集体,以及

少量的HNF3 β 和其他类型的细胞。

[0387] 在阶段4结束时,利用免疫细胞化学和共焦显微镜检查检测hES 衍生聚集体冰冻切片的NKX6.1、PDX1和NKX2.2表达。图像分析表明聚集的细胞高效分化为胰腺内胚层(或PDX1-阳性胰腺内胚层),其中几乎所有细胞都表达PDX1,且大群细胞表达NKX6.1(约40%的细胞)和/或NKX2.2(约40%的细胞)。

[0388] 向表达激素的内分泌细胞的分化(阶段5)

[0389] 对于阶段5的分化,阶段4分化的细胞聚集体继续在CMRL (Invitrogen/Gibco)或RMPI、Pen/Strep和Glutamax培养基以及0.5X B27-补加剂中。在一些实验中,在阶段5期间,培养基还补充有浓度为0.2-5%的人血清(Valley Biomedical)或胎牛血清。

[0390] 再次地,与来自阶段2-4的细胞类型相似,与贴壁平板对照相比,观察到与特定细胞类型有关的基因表达的增加。例如,观察到激素胰岛素(INS)、胰高血糖素(GCG)和生长抑素(SST)的表达水平增加。参见图22,图面I(INS),图面J(GCG)和图面K(SST)的阶段5(d15)。而且,与贴壁平板对照相比,在hES衍生的细胞聚集体中,AFP和ZIC1的表达水平显著降低,AFP和ZIC1是与外胚层有关的基因。参见图22,图面M(ZIC1)和图面N(AFP)的阶段5(d15)。因此,这证实了通过悬浮培养的细胞聚集体产生胰腺内分泌细胞的定向分化去除了外胚层和内脏内胚层污染物。

[0391] hES衍生的表达激素的内分泌聚集体细胞的产生,通过流式细胞术分析在上述方案的第23天得以证实。聚集体最初在5mL DMEM/F12中在140rpm下形成,然后在100rpm下分化,DMEM/F12可选择地包含knockout血清替代物(KSR;Gibco/Invitrogen对比0063用于一致性)或无异种成分KSR(Invitrogen)。NKX6.1、嗜铬素A、胰岛素、胰高血糖素和生长抑素蛋白表达的分析表明ES细胞衍生的聚集体包含约20%的NKX6.1+/嗜铬素A-胰腺上皮细胞和约74%的嗜铬素A+内分泌组织。而且,11%的细胞表达胰岛素,14%的细胞表达胰高血糖素以及11%的细胞表达生长抑素。在这些细胞中,68%的胰岛素+细胞是单阳性的,70%的胰高血糖素+细胞是单阳性的,以及52%的生长抑素阳性细胞是单阳性的。这种单激素阳性程度超出了描述的主要是多激素细胞的贴壁培养物的值。

[0392] 为了进一步评价聚集体分化为表达激素的内分泌细胞的效率,在阶段5期间,利用免疫细胞化学和共聚焦显微镜,检测了ES-衍生的聚集体冰冻切片的胰高血糖素、胰岛素和生长抑素的表达。冰冻切片在20X下的图像分析表明,聚集的细胞高效分化为激素阳性,几乎所有细胞表达胰高血糖素、生长抑素或胰岛素。此外,与之前贴壁培养实验相比,聚集体中的大多数细胞看起来表达单激素,如在体内发育过程发生的那样。

[0393] 实施例19-来自不同阶段的贴壁培养物能够形成细胞聚集体并分化为胰腺内胚层类型细胞

[0394] 以下证实了hES衍生细胞聚集体的产生不仅能够从多能hESC起始,而且细胞聚集体能够直接在分化培养基中起始(第0天细胞聚集体),还能够从分化的或hES衍生细胞起始,例如,细胞聚集体能够从阶段1、2、4和5或hES衍生细胞产生。

[0395] 第0天细胞聚集体

[0396] 在阶段1的第一天(d0)产生的细胞聚集体:使贴壁多能hESC生长,将其手工或酶促传代、解离、计数、沉淀,以及沉淀物在分化培养基中重悬到终体积为约 1×10^6 细胞/mL至 4×10^6 细胞/mL,分化培养基含有RMPI、Pen/Strep和Glutamax培养基,还含有100ng/mL

活化素 A,以及25ng/mL-75ng/mL Wnt3a、0.2%FBS (HyClone)。这一体积能够增加至 $>4 \times 10^6$ 细胞/mL,但可能需要更频繁的饲养。有时包括浓度为10-50ng/mL的DNase。在一些情况下,将ROCK抑制剂Y27632 (Axxora)添加到细胞悬浮液至终浓度为1-15 μ M,通常为10 μ M。在其他情况下,将约1:2000至1:5000的ITS (胰岛素/转铁蛋白/硒,Gibco)添加至培养物中。添加Rho-激酶抑制剂和ITS两者以支持细胞存活。重悬的细胞等地分布到低结合的6孔平皿的每孔中,基本上如上所述的,并且置于100rpm至140rpm的旋转平台上过夜。在这一培养期间,形成了大小和形态均一的细胞聚集体。因此,更高密度的培养物有效富集或基本上富集PDX1-阳性胰腺内胚层或PDX-阳性胰腺祖细胞类型细胞。实施例21中提供了进一步的细节。

[0397] 然后在接下来的2-3天,将阶段1的d0产生的细胞聚集体每天饲养多达1-2X,利用另外的分化培养基,其包含RMPI、Pen/Strep和Glutamax培养,并且还包含100ng/mL活化素A和0.2%的FBS (HyClone)。该方案接下来的步骤(阶段2-5)基本上如上对于ES聚集体描述的那样。

[0398] 阶段1-第2天至第3天

[0399] 阶段1的d2-d3天产生的细胞聚集体:使贴壁hESC生长,并基本上如上述进行传代,然后分化至阶段1,基本上如在D'Amour et al. 2006(同上)中描述的那样。

[0400] 阶段1结束时的贴壁培养物(分化方案中的约d2或d3;定形内胚层类型细胞)用1x PBS-/-洗涤,并在37°C,利用1mL或5mL的移液管,用2mL预热的Accutase解离为单细胞约2-3分钟。然后添加4mL RMPI、Pen/Strep和Glutamax培养基中的10%FBS,并且将单细胞悬浮液过滤通过40微米管过滤器(BD Biosciences)至50mL锥形管。基本上如上述,计数细胞,并沉淀(离心)。

[0401] 然后将细胞沉淀物重悬浮在RMPI、Pen/Strep和Glutamax培养基中,其还包含2%FBS、加上DNase (50-100 μ g/mL,Roche Diagnostics)和100ng/mL的活化素A。可选择地,将细胞沉淀物重悬浮在RMPI、Pen/Strep和Glutamax培养基中,加入2%FBS和DNase (50-100 μ g/mL)、25ng-50ng/mL KGF (R&D Systems)。在一些实验中,包含了5 μ M SB431542 (Sigma Aldrich, Inc.)或2.5 μ M TGF- β 抑制剂IV (Calbiochem)与KGF。在一些实验中,包含了Y27332 (10 μ M)。将重悬的细胞等地分布至低结合的6孔平皿的每孔中,基本上如上所述,并置于100rpm至140rpm的旋转平台上过夜,在这期间,形成大小和形态均一的细胞聚集体。

[0402] 然后将阶段1结束时产生的细胞聚集体进一步分化。该方案随后的步骤(阶段2-5)基本上如上文实施例17和18中对于ES聚集体描述的那样。

[0403] 阶段2-第5天至第6天

[0404] 阶段2d5-d6产生的细胞聚集体:使贴壁hESC生长,并基本上如上述进行传代,然后分化至阶段2,基本上如D'Amour et al. 2006(同上)中所述。对于阶段2,来自阶段1的贴壁细胞在PBS+/+中简单洗涤,然后在补充有2%FBS、Glutamax、青霉素/链霉素和25ng-50ng/mL KGF (R&D Systems)的RPMI中进一步分化3天。在一些实验中,在阶段2的第一天添加5 μ M SB431542 (Sigma Aldrich, Inc.)或2.5 μ M TGF- β 抑制剂IV (Calbiochem)。

[0405] 将阶段2结束时(分化方案的约d5或d6;前肠类型细胞)的贴壁培养物解离为单个细胞,计数并基本上如上述进行沉淀。然后将细胞沉淀重悬浮在分化培养基中,分化培养

基含浮DMEM、Pen/Strep和 Glutamax培养基,还含有1X B27-补加剂和DNase (50-100 μ g/ml, Roche Diagnostics)以及不含FBS或1-2%FBS或0.5%-10%人血清(hS),以及或者1 μ M至2 μ M视黄酸(RA,Sigma)和0.25nM KAAD-环巴胺(Toronto Research Chemicals);或者1 μ M至2 μ M视黄酸、0.25nM KAAD-环巴胺加上50ng/mL头蛋白(R&D systems);或者0.25nM KAAD-环巴胺加上100ng/mL头蛋白;或者100ng/mL头蛋白;或者 0.2 μ M至0.5 μ M RA和0.25nM KAAD-环巴胺;或者0.2 μ M至0.5 μ M RA和0.25nM KAAD-环巴胺加上50ng/mL头蛋白。在一些实验中,包含Y27332(10 μ M)。

[0406] 将重悬浮的细胞等地分布至每孔中,并置于100rpm至140rpm 的旋转平台上过夜,在这期间,形成大小和形态均一的细胞聚集体。

[0407] 在阶段2结束时产生的细胞聚集体在旋转平台上进一步分化,并 在额外0-2天中用DMEM、Pen/Strep和Glutamax培养基每天饲养 1-2X,该培养基还包含1X B27-补加剂,或者1 μ M至2 μ M视黄酸(RA, Sigma)和0.25nM KAAD-环巴胺(Toronto Research Chemicals);或者1 μ M至2 μ M视黄酸、0.25nM KAAD-环巴胺加上50ng/mL头蛋白(R&D systems);或者0.25nM KAAD-环巴胺加上100ng/mL头蛋白;或者 100ng/mL头蛋白;或者0.2 μ M-0.5 μ M RA和0.25nM KAAD-环巴胺;或者0.2 μ M-0.5 μ M RA和0.25nM KAAD-环巴胺加上50ng/mL头蛋白。

[0408] 然后基本上如上述,将阶段2结束时产生的细胞聚集体进一步分 化至阶段3、4和5。

[0409] 阶段4和5-第10天至第30天

[0410] 阶段4的d10-d14产生的细胞聚集体:再次,使贴壁hESC生长,并基本上如上所述进行传代,然后分化至阶段2,基本上如上所述以及如D'Amour et al.2006(同上)中所述。

[0411] 对于阶段3,来自阶段2的贴壁细胞进一步在DMEM、Pen/Strep 和Glutamax培养基中分化1至3天,该培养基还含有1X B27-补加剂 以及或者1 μ M至2 μ M RA和0.25nM KAAD-环巴胺。在其他情况下, 50ng/mL头蛋白与RA和KAAD-环巴胺一起添加。可选择地,将0.2 μ M 至0.5 μ M的RA和0.25nM的KAAD-环巴胺添加至培养基仅一天。仍然,在其他实验中,在任一天都没添加RA或KAAD-环巴胺。在阶段4,用添加有Glutamax、青霉素/链霉素和1X B27-补加剂的DMEM 每天饲养细胞1-2X。阶段4的细胞能够进一步分化至阶段5的细胞,如在实施例17和18中已经描述的。

[0412] 类似地,将阶段4(分化方案中的约d10-d14;胰腺上皮和内分泌 类型细胞)或阶段5(分化方案中的约第16天至第30天;内分泌前体 细胞和内分泌细胞)的贴壁培养物解离为单个细胞、计数并沉淀。然后 将细胞沉淀物重悬浮在补充了Pen/Strep和Glutamax、以及1X B27- 补加剂和DNase (50-100 μ g/ml,Roche Diagnostics)和0-2%FBS的 DMEM CMRL中。在一些实验中,包括支持细胞存活的Y27332(10 μ M)。将细胞等地分布到6孔平板中,并置于100rpm至140rpm的 旋转平台上4小时至过夜,基本上如上所述。

[0413] 此外,如实施例17-19中阶段2和阶段5产生的细胞聚集体与衍 生它们的贴壁平板培养物相比有效富集胰腺细胞类型。例如,在一个 典型实验中,第二阶段产生以及在第4阶段通过流式细胞术分析的细 胞聚集体由至少98%的胰腺细胞类型(73%的嗜铬素A阳性内 分泌细胞 和25%的Nkx6.1阳性胰腺内胚层(PE))以及2%的非胰腺细胞类型组 成;然而衍生细胞聚集体的贴壁平板培养物由约73%的胰腺细胞类型 (33%嗜铬素A阳性内分泌细胞和40%Nkx6.1阳性PE)以及27%的非 胰腺细胞类型组成。因此,阶段2的聚集能够有效富集

产生胰腺细胞类型的祖细胞,并耗竭非胰腺细胞类型。类似地,在典型实验中,阶段5产生的以及通过流式细胞术分析的细胞聚集体由至少75%的嗜铬素A阳性内分泌细胞类型组成,而衍生细胞聚集体的贴壁平板培养物由约25%的嗜铬素A阳性内分泌细胞类型组成。因此阶段5的聚集能够有效富集胰腺内分泌细胞。

[0414] 因此本文描述的方法提供了不仅改善细胞聚集体悬浮液中的hESC的定向分化效率的方法,还提供了用于减少具有污染群体(例如,外胚层、滋养外胚层、内脏内胚层和胚外内胚层)的hES衍生胰腺细胞类型(或者聚集体)的方法,同时富集了胰腺细胞类型(例如,胰腺内胚层和内分泌细胞)。

[0415] 实施例20-细胞密度影响hES细胞分化结果

[0416] 以下证实了细胞密度的变化在给定培养基和生长因子条件下影响分化结果。由细胞密度调整导致的分化效率结果反映了不同浓度的内源性产生的信号分子,以及这些分子在影响细胞分化中的浓度依赖性影响。

[0417] 人ES细胞聚集体和hES衍生的细胞聚集体,包括直接在分化培养基中产生的d0细胞聚集体,基本上如上述生成。经过阶段1和2分化约五(5)天后,收集分化细胞聚集体,并以不同接种密度重新等分入单独孔中,例如前肠内胚层阶段细胞聚集体悬浮液的28mL悬浮液以每孔4、6、8或10mL(2.5-倍范围的细胞密度)接种或等分。一式两份进行这一细胞分布,以及一组孔饲养含有50ng/mL头蛋白的阶段3的培养基(DMEM/PenStrep/Glutamax+1%B27补加剂(vol/vol)+0.25 μ M KAAD-环巴胺+3nM TTNPB),以及另一组孔含有25ng/mL的头蛋白。阶段3进行3天,每天更换培养基。在阶段3的3天结束(或约第8天)时,以及在4后(或约第14天),获取细胞样品,一式两份,用于实时QPCR分析。

[0418] 阶段3使用的细胞密度和头蛋白浓度对于指示胰腺内胚层祖细胞和/或内分泌祖细胞或前体细胞的那些基因的表达具有不同影响。简言之,在细胞密度增加和胰腺祖细胞类型(例如,胰腺内胚层、胰腺上皮细胞、PDX1-阳性胰腺内胚层)相应增加之间存在线性关系。例如,阶段3(或第8天)后,细胞密度增加在胰腺祖细胞的细胞数目方面具有相应增加,如通过PDX1和NKX6-1增加的基因表达所指示的。参见图24A和24B。相反,阶段4(或第14天)后,在细胞密度增加和内分泌祖细胞类型相应减少间呈反向关系。例如,随着细胞密度降低,至少NGN3和NKX2-2在阶段3(或第8天)后表达减少。参见图24C和24D。

[0419] 然而,在任一给定细胞密度下,较低浓度的头蛋白(例如,25ng/mL)导致内分泌祖细胞类型减少,如通过NGN3和NKX2-2的表达降低所示。参见图24C和24D。头蛋白在细胞培养物中这种不依赖于细胞密度的效应提示,来自细胞的内源性产生的BMP信号受到外源性添加的头蛋白的拮抗。内源性产生的信号对分化结果的影响可能不仅局限于BMP,而是由细胞分泌入培养基的其他生长因子和/或试剂单独地或与外源性生长因子和/或试剂联合能够具有相似或对比的影响。

[0420] 实施例21-优化细胞聚集体悬浮培养物以生成富集的胰腺内胚层或内分泌细胞类型

[0421] 通过调控不同生长因子和/或试剂的浓度,优化hES衍生细胞聚集体群的细胞组合物的某些细胞类型。本文描述的胰腺细胞组合物是从单细胞悬浮培养物产生的hES衍生细胞聚集体悬浮液,单细胞悬浮培养物衍生自hES细胞贴壁培养物、d0细胞聚集体(细胞聚集体从hES贴壁培养物起始,但直接在分化培养基中而不是多能干细胞培养基中),或者

衍生自不同分化阶段的hES衍生细胞贴壁培养物,如前面实施例中所述。在阶段4期间,将细胞聚集体暴露于不同浓度的因子: 头蛋白(N)、KGF(K)、FGF10(F)和EGF(E)。利用包括CHGA、NKX6.1和PDX1在内的一组标志物,通过流式细胞术来评价分化的hES细胞聚集体的细胞组合物。表6中显示了任一细胞群中内分泌细胞、胰腺内胚层细胞、PDX1+内胚层细胞和非胰腺细胞的总百分比。

[0422] 表6中的数据证实,通过调控某些生长因子的浓度和比例,可以优化得到的组合物的某些细胞类型。例如,通过降低KGF和EGF的浓度,与内分泌类型细胞相比,胰腺内胚层类型细胞的百分比是增加的(例如,K(25)E(10)以及71%比22.1%)。相反,高浓度的KGF和EGF,以及头蛋白和FGF10(例如,N(50)F(50)K(50)E(50))的加入降低了胰腺内胚层类型细胞的数目,总数目与内分泌类型细胞的数目相当(例如,39.6%比40.1%)。与胰腺内分泌内胚层细胞类型相比,较高浓度(例如,N(50)K(50))的头蛋白和KGF或者不添加生长因子增加了所得群体中内分泌类型细胞的总数。此外,通过降低KGF和EGF(例如,

[0423] K(25)E(10);1.51%)水平或不添加任何生长因子(1.53%),能够显著降低非胰腺细胞类型(即,非PDX1-阳性类型细胞)的百分比。

[0424] 因此,表7清楚地表明,在分化的某些阶段(例如,阶段4),至少改变培养基中不同生长因子的浓度显著增加和/或减少胰腺内胚层、内分泌、PDX1阳性内胚层或非胰腺细胞类型的某些群体。

[0425] 表7-生长因子对细胞组合物的影响

聚集阶段	阶段4培养基中的因子(ng/mL)	内分泌	胰腺内胚层	PDX1+内胚层	非胰腺	总计
		CHGA+	CHGA-NKX6.1+PDX1+	CHGA-NKX6.1-PDX1+	CHGA-NKX6.1+/-PDX1-	
ESC	K(25)E(10)	22.1	71.0	3.0	4.0	100.1
ESC	K(25)E(10)	29.0	67.1	2.37	1.61	100.0
[0426] 阶段1, 0天	K(25)E(10)	25.4	68.9	2.87	2.01	99.2
阶段1, 0天	N(50)K(50)F(50)E(50)	40.1	39.6	13.30	6.85	99.9
阶段1, 0天	未添加	69.4	27.4	1.46	1.53	99.8
阶段1, 0天	N(50)K(50)	52.2	30.4	13.9	3.48	99.9
阶段1, 0天	K(25)E(10)	38.8	50.8	2.17	8.22	100.0
阶段2, 第5天	N(50)K(50)	42.3	42.3	12.2	3.20	99.9
阶段2, 第5天	K(25)E(10)	28.3	59.4	7.36	4.97	100.0

[0427] 仍然存在其他富集或纯化特定hES衍生细胞类型的方法,如2008年4月8号提交的、题目为“METHODS FOR PURIFYING ENDODERM AND PANCREATIC ENDODERM CELLS DERIVED FROM HESC(纯化衍生自hES细胞的内胚层和胰腺内胚层细胞的方法)”的美国专利申请12/107020所述,其通过引用的方式以其整体并入本文。该申请描述了用于富集包括导致阶段1、2、3、4和5中每一阶段的所有细胞类型在内的多种hES-细胞类型的方法,如D'Amour et al.2005(同上)和2006(同上)中所述。本申请利用多种抗体,包括但不限于CD30、CD49a、CD49e、CD55、CD98、CD99、CD142、CD165、CD200、CD318、CD334和CD340。

[0428] 用于富集hES衍生细胞或细胞聚集体的方法不限于应用抗体亲和性手段的方法,但能够包括可利用的或允许某一细胞类型富集的、本领域技术人员公知的任何方法。通过耗竭或从另一细胞类型或培养物分离一种细胞类型能够实现富集。

[0429] 实施例22-胰腺内胚层的细胞聚集体悬浮液在体内成熟并响应胰岛素

[0430] 为了证实本文描述的用于制备和生产细胞聚集体悬浮液的方法提供了在体内发挥作用的胰腺祖细胞,将上述的实施例17-21中的hES 衍生细胞聚集体(例如,PDX1-阳性内胚层、胰腺内胚层、胰腺上皮、内分泌前体细胞、内分泌细胞等)移植到动物中。向正常和糖尿病诱发的动物中的移植、动物体内葡萄糖响应的测定以及由此体内成熟的移植细胞的胰岛素产生的测定的方法,基本上按Kroon et al.2008(同上)和2007年7月5日提交的题目为“METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES (产生胰腺激素的方法)”的美国专利申请 第11/773944号申请所述进行,这些参考文献以其整体并入本文。在 如Kroon et al.2008(同上)和美国专利申请第11/773944号申请(同上) 中所示的相似时间段,在这些动物的血清中观察到了基本上相似水平 的人C-肽。

[0431] 本文描述的方法、组合物和装置目前代表优选的实施方案,并且 是示例性的,且并非意在限制本发明的范围。本领域技术人员想到的 其中的变化、替代、修饰和变型以及其他用途都包括在本发明的精神 内,并由本公开内容的范围来限定。因此,对本领域技术人员显而易见的是,可以对本文公开的发明作出不同的替代和修饰,而不偏离本 发明的范围和精神。

[0432] 应认识到,出于清楚的目的在单独的实施方案中描述的本发明的 某些特征还可以在单个实施方案中组合提供。例如,可以生成和优化 用于制备hES衍生细胞悬浮聚集体的方法,以产生任何内胚层谱系细 胞类型,例如,胰腺谱系类型细胞、肝谱系类型细胞、上皮细胞谱系 类型细胞、甲状腺谱系细胞和胸腺谱系细胞,以及因此不限于本文具 体描述的hES衍生细胞类型。相反地,出于简要目的在单个实施方案 中描述的发明的不同特征还可以分开提供或以任何合适的亚组合提 供。例如,对本领域技术人员显而易见的是,描述的 用于从贴壁平板 培养物或从未分化的悬浮培养物、从未分化的贴壁平板培养物或从分化的悬浮培养物以及从分化的贴壁平板培养物或从悬浮细胞聚集体生 成hES和hES衍生细胞聚集体的方法仅是示例的,还可以应用这些方 法的组合。

[0433] 实施例23-人多能干细胞和胰腺祖细胞的低温储藏和建库

[0434] 根据实施例24中所描述的传代方案收获贴壁hES细胞培养物, 合并并计数。在预热的约50%hESC培养基(无生长因子)/50%人血清 中重悬浮细胞团。在涡旋的情况下逐滴加入等体积的约80%hESC培 养基(无生长因子)/20%DMSO。在转移到液氮之前,将1mL的细胞 分配到1.8mL的冷冻管中,在Nalgene Mr.Frosty容器中于-80℃冷冻 约24小时。在cGMP 下进行大体上相似的方法。

[0435] 以上方法描述了多能干细胞或可分化干细胞的低温储藏。由多能 干细胞分化来的细胞,例如胰腺祖细胞的低温储藏先前描述于2009 年11月13日提交的,题目为“ENCAPSULATION OF PANCREATIC LINEAGE CELLS DERIVED FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELL”的第12/618659号美国专利申请中,该申请和相关的申请通过 引用全文并入本文中。

[0436] 实施例24-未分化的人多能干细胞在包括滚瓶在内的不同培养容器 中的贴壁培养、传代和扩增

[0437] 制备基于细胞聚集体的细胞疗法产品,尤其是来源于人多能干细 胞的细胞疗法产品的主要瓶颈,为悬浮的3维细胞聚集体的形成。具 体来说,该瓶颈是采集单层贴壁多能干细胞并将其转化为多能干细胞 聚集体,即悬浮聚集体培养物。如上所述,例如,可以在6

孔盘中形成hES细胞聚集体,并随后在6孔盘或其他培养容器模式,例如生物反应器、瓶子等当中分化。以下实施例中描述的本发明的实施方案,提供了多能干细胞作为悬浮细胞聚集体的生长、传代和扩增的方法,以及使滚瓶中的细胞聚集体分化的方法。见实施例25。

[0438] 人多能干细胞的培养和扩增。解冻或定期传代以后,以50000或33000细胞/cm² (分别为3和4天的生长周期)将解离的hESC接种在不同的细胞培养容器中。hESC生长培养基(XF HA)由DMEM/F12组成,其含有GlutaMAX,并补充有10%v/v的无异种成分KnockOut血清替代物、1%v/v非必需氨基酸、0.1mM 2-巯基乙醇、1%v/v青霉素/链霉素、10ng/mL heregulin-1和10ng/mL活化素A。在仅接种的当天(一天处理),通过加入约10% (体积/体积)的非热灭活的人AB血清(Valley Biomedical),同时加入如前所述的无异种成分培养基,促进细胞粘附。对于不同的组织培养板、T型烧瓶和至少如在以下的表8中所描述的细胞工厂,使用了0.2mL/cm²的标准化的接种体积。饲养每增加一天都增加使用的生长培养基的体积,并将其显示在表8中。

[0439] 表8:贴壁hES细胞培养物的培养和扩增

容器类型	60mm	T75	T175	3 倍 T175	2 层	5 层
S.A.	19.6 cm ²	80 cm ²	175 cm ²	525 cm ²	1272 cm ²	3180 cm ²
[0440] 接种	4	16	35	105	260	650
第一天	5.5	22	50	150	350	875
第二天	7	28	60	180	450	1100
第三天	8.5	35	80	240	550	1350

[0441] 体积以mL表示;SA:表面积。

[0442] 传代人多能干细胞。在传代的当天,供给培养物新鲜的生长培养基并在解离前培养4-8小时。用PBS (Life Technologies)清洗培养物并在约37℃下使用预热的ACCUTASE (Innovative Cell Technologies)解离6分钟。在一些实验中,加入了ACCUTASE,随后立即抽吸(即少于4-6分钟),以便在最小工作体积的残留试剂中实现细胞离解,从而使培养基更换步骤的数目减到最小,其中当使用某些培养容器,包括细胞工厂时,最小的工作体积是优选的。暴露于ACCUTASE后,加入3x体积的冷hESC培养基(不含heregulin或活化素),并离解和收集细胞。使用3x体积的冷hESC培养基(不含heregulin或活化素)轻轻收集解离的细胞,使用ViCell自动化细胞计数器(BD Biosciences)或血细胞计数器计数,200x g下离心5分钟,并以1-10x 10⁶细胞/mL将细胞团重悬浮在新鲜的生长培养基中,用于随后在相同的培养条件下的接种。

[0443] 表8描述了多种培养容器和使用的培养基体积,然而,本领域技术人员应当理解,没有被具体描述的其他的培养容器可以基于本文中描述的详细描述,被用于人多能干细胞的生长、传代和扩增。例如,见实施例25的滚瓶内的悬浮分化方法。

[0444] 在一些研究中,将传代的hESCs加入到了新的、未包被的6孔盘培养容器中,没有细胞粘附,并如上所述进行旋转以形成聚集体。通常,将补充有10ng/mL heregulin-1β和10ng/mL活化素A的StemPro® hESC SFM培养基(Life Technologies),或者XF-HA培养基用于hESC的悬浮培养。在潮湿培养箱中、在37℃和8%CO₂下进行细胞培养。

[0445] 为了测试滚瓶模式中多能干细胞的聚集,将基本上如上所述制备的来自贴壁

hESC培养物或直接来自冷冻细胞小瓶的用于hESC聚集的被解冻、清洗和悬浮在培养基中的 10^6 hESC/mL的单细胞悬浮液放置在不同的容器中,每个容器都为管状,当以其侧面放置时所述容器可以旋转。将含有10mL细胞悬浮液的50mL管和含有30mL或120 mL细胞悬浮液的150mL瓶子放置在杂交箱中,维持在约37℃并以约5rpm旋转。使用嵌入的、可变速度的、机械瓶式旋转器实现旋转。在最初的研究中,箱中没有充入CO₂气体。为了细胞聚集对照的目的,使用6孔盘进行了同步研究。基于聚集体直径和形态,在滚瓶模式和对照6孔盘模式中都成功形成了多能干细胞聚集体。在先前使用塑料罐的实验中 also 形成了多能干细胞聚集体。这些研究证明聚集可以在就速度,容器形状和流体动力学方面完全不同于6孔盘的旋转培养的容器模式中进行。此外,该滚瓶模式很可能为可扩大的,而不需要大幅优化本文中描述的方法,从而绕开关键的瓶颈方面。

[0446] 实施例25-滚瓶中的多能干细胞聚集和分化

[0447] 使用如上所述的申请人的阶段1-4分化方案使人ES细胞(实施例24)在150mL瓶子中聚集,并分化为胰腺祖细胞(或PEC)。用StemPro® hESC SFM培养基或XF HA培养基中的 1×10^6 细胞/mL或 2×10^6 细胞/mL细胞密度的120mL细胞悬浮液接种150mL滚瓶;见表9。阶段1-4培养基条件基本上与先前的描述一致(见Schulz et al. (2012)同上),其被总结在表9中。在整个hESC聚集和阶段1-4分化中测试了约5rpm、8rpm、10rpm或12rpm的旋转速度,且没有将CO₂充气并入培养箱中。是否充入CO₂可取决于滚瓶使用的盖子,例如,塞子盖、透气盖或不透气盖。图25显示了滚瓶聚集和分化期间形成的细胞聚集体的平均直径大小。每个箱型图都显示了最初未分化的(d0)和分化的细胞聚集体(d2、d5、d8和d12)的最小值、最大值、第二和第三四分位数,以及中值。测量了两种条件下的细胞聚集体直径。相比 2×10^6 细胞/mL,当以约 1×10^6 细胞/mL接种培养物时最初形成的细胞聚集体的平均直径较大。然而,在分化的较晚阶段(例如阶段3-4),直径大小是相当且不能区别的。图25还显示滚瓶中形成的分化的细胞聚集体与先前的在6孔盘中进行的悬浮分化实验期间形成的细胞聚集体间不存在本质差异。滚瓶中的分化还显示了聚集体直径的典型扩增和收缩,如先前在6孔盘、生物反应器等中进行的培养所观察到的一样(图25)。聚集体直径不依赖初始细胞密度,且不依赖初始hESC或未分化的细胞生长培养基组成。简单地说,细胞聚集体在阶段1和2期间扩增(图25,d0和d2)、在阶段3期间收缩(图25,d5),且在阶段4期间再次扩增(图25,d8和d15)。在整个分化中,细胞聚集体没有显示明显的结块现象(例如,300微米或更大的大聚集体)或者剪切破坏。

[0448] 表9:6孔盘和滚瓶中阶段1-4分化的培养基条件

时间点(天)	阶段(1-4)	培养基条件	滚瓶转速(rpm)	6孔盘转速 (rpm)
第-1天	hESC 聚集	XF HA, SP	5、8、10 或 12	95
第0天	1	r0.2FBS-ITS1:5000 A100	5、8、10 或 12	95
第1天		r0.2FBS-ITS1:5000 A100	5、8、10 或 12	95
第2天		r0.2FBS-ITS1:1000 K25	5、8、10 或 12	95
第3天	2	r0.2FBS-ITS1:1000 K25	5、8、10 或 12	95
第4天		r0.2FBS-ITS1:1000 K25	5、8、10 或 12	105
第5天		db-CTT3 N50	5、8、10 或 12	105
第6天	3	db-CTT3 N50	5、8、10 或 12	105
第7天		db-CTT3 N50	5、8、10 或 12	105
第8天		db-N50 K50 E50	5、8、10 或 12	105
第9天	4	db-N50 K50 E50	5、8、10 或 12	95
第10天		db-N50 K50 E50	5、8、10 或 12	95
第11天		db-N50 K50 E50	5、8、10 或 12	95
第12天		db-N50 K50 E50	5、8、10 或 12	95

[0449]

[0450] XF HA, DMEM/F12, 含有GlutaMAX, 补充有10%v/v的无异种成份 KnockOut血清替代物、1%v/v非必需氨基酸、0.1mM 2-巯基乙醇、1%v/v青霉素/链霉素(都来自Life Technologies)、10ng/mL heregulin-1 β (Peprotech) 和10 ng/mL活化素A (R&D Systems); SP, StemPro® hESC SFM (Life Technologies); r0.2FBS:RPMI 1640 (Mediatech), 0.2% FBS (HyClone)、1x GlutaMAX-1 (Life Technologies)、1%v/v青霉素/链霉素; ITS:1:5000 或1:1000 稀释的胰岛素-转铁蛋白-硒 (Life Technologies); A100:100ng/mL重组人活化素 A (R&D Systems); W50:50ng/mL重组小鼠Wnt3A (R&D Systems); K25:25 ng/mL重组人KGF (R&D Systems); IV:2.5 μ M TGF- β RI 激酶抑制剂IV (EMD Bioscience); db:DMEM HI葡萄糖 (HyClone), 补充有0.5x B-27补加剂 (Life Technologies)、1x GlutaMAX-1和1%v/v青霉素/链霉素; CTT3:0.25 μ M KAAD-环巴胺 (Toronto Research Chemicals) 和3nM TTNPB (Sigma-Aldrich); N50:50ng/mL重组人Noggin (R&D Systems); K50:50ng/mL重组人KGF (R&D Systems); E50:50ng/mL重组人EGF (R&D Systems); 在hESC聚集或阶段1-4 分化或者两者中进行5、8、10、12rpm的转速。

[0451] 为了检测整个阶段1-4的基因表达, 使用了Q-PCR来分析用1x 10⁶细胞/mL对2x 10⁶细胞/mL起始细胞密度进行分化(图26)。尽管图26中仅显示了某些基因, 但是申请人先前已经非常详细地描述过阶段1-4的每个阶段中许多基因的表达和不表达。参见例如: 第8,211,699号美国专利, METHODS FOR CULTURING PLURIPOTENT STEM CELLS IN SUSPENSION USING ERBB3LIGANDS, 2012年7月3日 授权; 第7,958,585号美国专利, PREPRIMITIVE STREAK AND MESENTERODERM CELLS, 2011年7月26日授权; 第7,510,876号美国专利, DEFINITIVE ENDODERM (CYTHERA.045A), 2009年3月31日授权; 第7,541,185号美国

专利, METHODS FOR IDENTIFYING FACTORS FOR DIFFERENTIATING DEFINITIVE ENDODERM, 2009年6月2日授权; 第7,625,753号美国专利, EXPANSION OF DEFINITIVE ENDODERM, 2009年12月1日授权; 第7,695,963号 美国专利, METHODS FOR INCREASING DEFINITIVE ENDODERM PRODUCTION, 2010年4月13日授权; 第7,704,738号美国专利, DEFINITIVE ENDODERM, 2010年4月27日授权; 第7,993,916号 美国专利, METHODS FOR INCREASING DEFINITIVE ENDODERM PRODUCTION, 2011年8月9日授权; 第8,008,075号美国专利, STEM CELL AGGREGATE SUSPENSION COMPOSITIONS AND METHODS OF DIFFERENTIATION THEREOF, 2011年8月30日授权; 第 8,178,878号美国专利, COMPOSITIONS AND METHODS FOR SELF-RENEWAL AND DIFFERENTIATION IN HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS, 2012年5月29日授权; 第8,216,836号 美国专利, METHODS FOR IDENTIFYING FACTORS FOR DIFFERENTIATING DEFINITIVE ENDODERM, 2012年7月10日授 权; 第7,534,608号美国专利, METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES, 2009年5月19日授权; 第7,695,965号 美国专利, METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES, 2010年4月13日授权; 第7,993,920号美国专利, METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES, 2011年8月9日授权; 第 8,129,182号美国专利, ENDOCRINE PRECURSOR CELLS, PANCREATIC HORMONE EXPRESSING CELLS AND METHODS OF PRODUCTION, 2012年3月6日授权; 第11/875,057号美国专利申 请, METHODS AND COMPOSITIONS FOR FEEDER-FREE PLURIPOTENT STEM CELL MEDIA CONTAINING HUMAN SERUM, 2007年10月19日提交; 第12/618,659号美国专利申请, ENCAPSULATION OF PANCREATIC LINEAGE CELLS DERIVED FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS, 2009年11月13日提 交; 这些专利和专利申请都通过引用整体并入到了本文中。仅在获得 分化方法的高置信度后, 申请人才会挑选较小的标志物组作为标签标 志物来指示和鉴别不同阶段1-4的细胞群, 如图26中所示。

[0452] 图26表明滚瓶模式中的分化的细胞聚集体表达了分化的每一阶 段预期的典型的标签标志物, 这与在6孔盘中同步进行的分化研究(对 照, 图26)一致。类似地, 按预期观察到了标签标志物表达的缺失。例 如, 在d0时, 所有的培养条件都存在诸如OCT4和Nanog的多 能干 细胞标志物(图26A)。类似地, 在滚瓶分化和6孔盘分化中都存在中 内胚层标志物 MIXL1和Eomes的短暂的上调(图26, 分别比较黑线、黑色虚线、灰线)。阶段2细胞产生定形 内胚层, 其表达SOX17和HNF3 [FOXA2], 这与观察到的6孔盘中分化的阶段2型细胞相似。阶 段4 型细胞表达PDX1和NKX6.1, 这与观察到的6孔盘中分化的培养物 相似(图26, 分别比较 黑线、黑色虚线、灰线)。最后, 6孔盘和150mL 滚瓶中分化的培养物中的脱靶谱系的标志物 的表达没有实质上的差 异, 表明旋转模式中的分化控制仍然紧密。这些标志物包括ZIC1 (外 胚层谱系)、早表达PAX6(神经元谱系)、SOX7(胚外内胚层)、CDX2(滋 养外胚层)和AFP 的早表达(卵黄囊)。

[0453] 表10a: 大滚瓶中的pPSC分化

	瓶容积	瓶表面积	聚集体积	盖子, 透气的 (V); 不透气的 (NV)	细胞团体 积 d0	%并入 d0	聚集体 直径 (μm)
[0454]							
	1200 mL	490 cm^2	275 mL	V	1050 μL	79.6	177 $\pm$ 23
	1200 mL	490 cm^2	275 mL	NV	1090 μL	78	167 $\pm$ 21
	2275 mL	850 cm^2	580 mL	V	2300 μL	76	171 $\pm$ 26
[0455]	6-孔盘	-	33 mL/盘	-	$\sim$ 105 μL /盘	$\sim$ 75	136 $\pm$ 15

[0456] 一旦证明pPSC可以小规模地在滚瓶模式中聚集(实施例25),就可以制备较大的培养物,以便证明在滚瓶中聚集和分化hESC为PEC的实际可扩大性。按如表10中所述进行了使用CyT49hESC的实验。使人ESC在**StemPro®** hESC SFM培养基中聚集。在其它的实验中使用了其它的多能干细胞培养基,例如具有或没有人血清白蛋白(HAS)的XF HA培养基(数据未显示)。第0天(d0)hESC聚集体在每种条件下都可有效形成。将表10中总结的实验培养物在8rpm下旋转。在其它的实验中,利用了5、10和12rpm下的聚集,且hESC聚集体形成了与在6孔盘和8rpm下的滚瓶中观察到的相似的形态和直径(数据未显示)。在以较低范围的转速(例如5、6和7rpm)或使用**StemPro®** hESC SFM(Life Technologies)培养基进行hESC聚集的一些情况下,观察到了细胞聚集体结块现象的增加(即,大于300 μm 的结构;数据未显示)。一些实验使用透气的瓶盖(V)进行而其他的不具有透气的瓶盖(NV)。透气盖没有对分化过程造成实质差异,其看起来也没有影响hESC的恰当特化,如通过qPCR基因表达分析所测定的(图26)。总之,使用不同的多能干细胞培养基,且以透气的或不透气的瓶盖,且在充入或未充入 CO_2 的培养箱中,可以在一系列的转速下(例如,约5至12rpm)完成滚瓶中的hESC聚集。这些不同的因素看起来没有大幅改变聚集体的形态、形状和平均直径大小。

[0457] 实施例26-滚瓶中干细胞聚集体的尺幅分化

[0458] 大体上按以上实施例25中所述使用1200mL或490 cm^2 滚瓶再次进行了人ESC聚集。因为每个滚瓶聚集中的hESC聚集体看起来均一且类似(例如形态和直径大小),将聚集体合并、离心,并将聚集体的团块分配在1200mL或490 cm^2 滚瓶间,用于表11所述的分化。hESC聚集体团块的总体积为约4400 μL ,并被重新分配到4x 1200mL瓶(490 cm^2)中,用于表11所述的分化。按如以上表9中描述进行分化。除了在瓶子中观察到小量的结块外,分化培养物展现出类似的形态,其中在较低转速下旋转分化培养物(数据未显示)。然而,到第12天(阶段4)时所有测试条件下的聚集体团块体积都是相似的,且相比每个瓶子($\sim$ 1100 μL)中的起始团块体积,回收的所有细胞团均为约1:1的产量。见表11。

[0459] pPSC的聚集不限于hESCs。以与以上描述的hESCs大体上类似的方式,在表11中列出的条件下测试了人iPSC。使人iPSC-482c7 (Cellular Dynamics International Inc. Madison, 美国威斯康星州)在490 cm^2 滚瓶中聚集。hiPSCs的总起始体积仅为约25mL,密度为 1×10^6 细胞/mL。聚集平台足够强大,以致可以在一系列的细胞体积范围内以及甚至当起始体积和较大的490 cm^2 滚瓶间存在较大的不同时运行良好。人iPSC细胞聚集体看起来在形态上与如上所述的6孔盘或滚瓶中的hESCs聚集体相似,即,iPSC聚集体大小范围

为约100至约300 微米,不具有明显的结块。另外,如先前在2010年4月22日提交的 标题为“CELL COMPOSITIONS DERIVED FROM DEDIFFERENTIATED REPROGRAMMED CELLS”的第12/765714号 美国专利申请(其被完整并入到本文中)中所描述,Rho激酶抑制剂的使 用改善了pPSC聚集体分化;然而,由于所述714申请没有显示hESC 聚集(仅有分化),所以那一申请没有表明在起始pPSC培养中例如10 μ M Y-27632的使用也会增加pPSC聚集。因为可以在滚瓶中进行hESC 聚集,所以也可以在滚瓶中进行细胞聚集体分化,且大体上如所述714 申请或相关的申请中详细描述,或大体上如本文描述并依据表9所 描述的。

[0460] 此外,为了证明hESC聚集体的完整性,首先在滚瓶中形成了hESC 聚集体,随后在6孔盘中分化。这使用在滚瓶中、在多种条件下,例 如在不同的转速和使用不同的多能干细胞培养基,首次形成的hESC 聚集体进行。6孔盘中的滚瓶hESC聚集体的分化与在6孔盘中首次形 成hESC聚集体时(对照;数据未显示)所观察到的在聚集体形状、直径 和细胞形态上是相当的。因此,滚瓶中hESC聚集体的完整性基本上 没有由于模式变化而改变。

[0461] 为了证明使用滚瓶按比例缩放不会损害细胞并入聚集体中,在d0 (即聚集起始后18-24小时)时进行了活的、聚集体形成后未并入的细胞 的细胞计数,证实了约75-80%的输入细胞被并入未分化的hESC聚集 体中,这与6孔盘中观察到的比例(约75%)相当或更好。见Schulz et al. 2012(同上)、图S4、图S6。取决于使用的多能干细胞培养基,并入的百分比可以发生变化,因为使用XF HA培养基的研究提供了范围为约 50%至约77%的并入(数据未显示)。

[0462] 根据表11和表9的分化过程的Q-PCR分析,证明在直至PEC形 成的每一阶段都发生了合适的谱系分化。见图27A-D。如表11中列出 的4种培养中的每一种都展现多能性的标志物(例如,OCT4、Nanog) 的下调和内胚层的标志物(例如,MixL1、Eomes)的短暂上调。见图 27A。从第2天起如期望的那样表达定形内胚层的标志物(例如,SOX17 和HNF3 β),随后表达其他的内胚层和胰腺标志物(例如,HNF1 β 、PDX1、NKX6-1、PTF1A、NGN3和NKX2-2)。见图27B。重要的是,相比6孔盘对照分化(例如,PAX6、SOX7、CDX2、AFP和ZIC1), 指示脱靶谱系(非内胚层或非胰腺谱系)的标志物没有得到提高,因此 在这些按比例缩放的分化实验中维持了胰腺特化的紧密控制。见图 27C。例如,通常指示在一些分化中偶然发生的小量脱靶群体的 存在 的AFP表达,在6孔盘对照中较低。见图27D和Schulz et al.2012(同 上)。AFP表达在滚瓶培养物中甚至更低,可能暗示d12聚集体中该小 量群体的减少。见图27D。

[0463] 为了评估用多步骤(阶段1-4)方案由hESC分化来的胰腺细胞培养 物的细胞组成,使用了基于共染色组合的流式细胞仪分析,这大体上 如先前在以下文献中所描述的: Kelly et al.2011,Nature Biotech 29:750-56;D'Amour et al.2005(同上);Kroon et al.2008(同上);Schulz et al.2012(同上),这些文献通过引用被整体并入到了本文中。例 如 Schulz et al.2012(同上)显示了广泛的流式细胞仪分析和至少37个分 化循环的PEC 细胞组合物(图2)。Schulz et al.描述了PEC的细胞组合 物,其由以下部分组成:约26-36%CHGA⁻/NKX6-1⁺/PDX1^{+/+}、约 46-56%CHGA⁺/NKX6-1^{+/+}/PDX1^{+/+}(多激素内分泌细胞)、约 10-15% CHGA⁻/NKX6-1⁻/PDX1⁺(仅PDX1内胚层细胞)以及少于3%CHGA⁻ /NKX6-1⁻/PDX1⁻(残留细胞或三阴性细胞)。见Schulz et al.2012(同 上)、图2C。

[0464] 类似地,对如表11中所示的在滚瓶中分化的阶段4(第12天)PEC 培养物进行了流式细胞仪分析。PEC组合物与先前在以上Schulz et al. 中描述的一致,且来自4种滚瓶条

件的精确百分比以及均值显示在表 12 中。来自这些按比例缩放的滚瓶分化的 PEC 显示：约 40% CHGA⁻/NKX6-1⁺/PDX1^{+/-}、约 43% CHGA⁺/NKX6-1^{+/-}/PDX1^{+/-} (或多激素内 分泌细胞)、约 10% CHGA⁻/NKX6-1⁻/PDX1⁺ (或仅 PDX1 内胚层细 胞) 以及约 2% CHGA⁻/NKX6-1⁻/PDX1⁻ (或残留 细胞;或三阴性细胞)。PEC 组合物的流式细胞仪分析还表明 5 和 8rpm 的不同的转速和透气或不透气类型的瓶盖对 PEC 细胞组合物都没有明显的影响。如上所述 且基于 Q-PCR 分析, 这些条件看起来也没有引起阶段 1-4 细胞向 PEC 的谱系特化 (图 26)。因此, 以上研究和分析证实了可扩大的滚瓶模式 中的 hESC 聚集和分化为 PEC 的有效性。

[0465] 表 11: 大滚瓶中的 pPSC 聚集

[0466] 表 12: 来自阶段 1-4 分化后的滚瓶的 PEC 细胞组合物

[0467]	瓶表面积 (1200 ml)	聚集体积	盖子, 透气的 (V); 不透气的 (NV)	速度	阶段 4, 第 12 天, 团块体积
	490 cm ²	275 ml	V	5 rpm	1000 μl
	490 cm ²	275 ml	NV	5 rpm	1100 μl
	490 cm ²	275 ml	V	8 rpm	800 μl
	490 cm ²	275 ml	NV	8 rpm	1200 μl

[0468]	CHGA + (多 激素内分泌 物)		CHGA- NKX6.1+ PDX1 或 -	CHGA- NKX6.1- PDX1+ (仅 PDX)	CHGA- NKX6.1- PDX1- (残 留-三阴性)
	RB-A 490cm ² V 8rpm	40.2	41.0	16.8	1.92
	RB-B 490cm ² NV 8rpm	45.5	41.5	11.6	1.36
	RB-C 490cm ² V 5rpm	43.6	35.0	20.1	1.34
	RB-D 490cm ² NV 5rpm	43.8	42.9	9.71	3.65
	均值, RB A-D	43.25	40.1	14.55	2.07

[0469] 应当理解以上描述的方法和组合物涉及体外培养的细胞。然而, 可以将上述的体外分化的细胞组合物用于体内应用。本文中描述的组 合物的用途至少在申请人的以下专利中得到详细描述: 标题为 “METHODS FOR PRODUCING PANCREATIC HORMONES”, 分别在 2009 年 5 月 19 日、2010 年 4 月 13 日和 2011 年 8 月 9 日授权的 第 7,534,608 号、第 7,695,965 号和第 7,993,920 号美国专利; 以及标题为 “ENCAPSULATION OF PANCREATIC CELLS DERIVED FROM PLURIPOTENT STEM CELLS” 的第 8278106 号美国专利, 这些专利 的公开内容通过引用被全文并入到了本文中。申请人在先前的非专利 性出版物 (包括 Kroon et al. 2008 (同上) 和 Schulz et al. 2012 (同上)) 也 报导了本文中描述的组合物的用途和功能, 这些出版物通过引用也被 全文并入到了本文中。

[0470] 因此, 对本领域技术人员显而易见的是可以对本文中公开的实 施 方案进行不同的替换、修改或优化, 或者组合, 而不脱离本发明的范 围和精神。如上所述, 滚瓶可以为不同的大小、形状, 且可能地, 可 以使用那些甚至形状不为圆柱形但其方法模仿与滚瓶运动

相同的运动 的容器。此外,从以上描述可以清楚的是诸如XF HA或StemPro® hESC SFM培养基和其他类型的培养基的不同类型的pPSC培养基的 使用完全是可预期的,例如mTeSR™培养基、Essential™ 8或用于pPSC 或相似细胞的生长和培养的工业中常用的任何其他pPSC培养基。

[0471] 例如,聚集和/或分化是否需要充气(例如CO₂和其他气体)可能部 分取决于使用的滚瓶盖的类型(例如透气的或不透气的)。在标准的组 织培养培养箱中,可以容易地将CO₂并入培养条件中。然而,没有外 部CO₂的(未充气的)聚集和/或分化可以为按比例缩放的生产带来某些 优势:更多的体积/瓶子,因而每次大的生产运行需要更少的瓶。另外, 相比培养箱,可以在可进入的热室中运行大批量的瓶,例如,从而大 大简化了按比例缩放过程中机器人和自动化的并入。

[0472] 本文中虽然描述了某些培养容器(例如6孔盘、生物反应器、锥形 瓶、滚瓶等),然而其他相似的培养容器,例如,具有类似大小、形状、尺寸和功能的培养容器也在考虑范围内。诸如Corning's塑料和玻璃滚 瓶的销售的滚瓶,大小存在差异:490cm²(可容纳100至150mL); 850cm²(可容纳170至255mL);1700cm²(可容纳340至510mL); 1750cm²(可容纳350至525mL);670-680cm²(可容纳135至200mL); 840cm²(可容纳170至255mL);1170cm²(可容纳235至350mL); 1330cm²(可容纳265至400mL);1585cm²(315至475mL);以及1585 cm²(可容纳315至475mL)。

[0473] 锥形瓶为圆锥形且具有锥形主体和狭窄的瓶颈。区别于烧杯的这 一形状,允许使用外部机械装置或通过手动对内含物打旋或搅拌,而 狭窄的瓶颈相比烧杯可防止内含物溅出并减少蒸发损失,同时锥形瓶 的平底使其稳当。本文中描述的发明包括具有类似形状的其他容器。

[0474] 本文中描述的发明还包括支持生物活性环境的生物反应器或者任 何生产的或设计的装置或系统的使用。此类生物反应器通常为圆柱形 的,大小范围为公升至立方米。存在许多可商购的生物反应器,且本 领域技术人员可以被指导来选择本文提供的详细描述中给出其过程的 合适的容器。

[0475] 因此,本领域技术人员基于本发明的描述和生产建议,能够容易 地选择满足其扩大培养需求的合适大小的滚瓶。

[0476] 本说明书中提及的所有出版物和专利都通过引用完整并入到了本 文中。

[0477] 如以下的权利要求中所使用且在整个本公开中,通过短语“大体 上由组成”是指包括该词组后列出的任何元素,且限于不干扰或贡献 于详细说明的本公开中列出的元素的活性或活动的其他的元素。因此, 短语“大体上由组成”表明列出的元素为必须的或强制的,但是其他 的元素为可选的,且可能提供或可能不提供这些元素,这取决于它们 是否影响列出的元素的活性或活动。

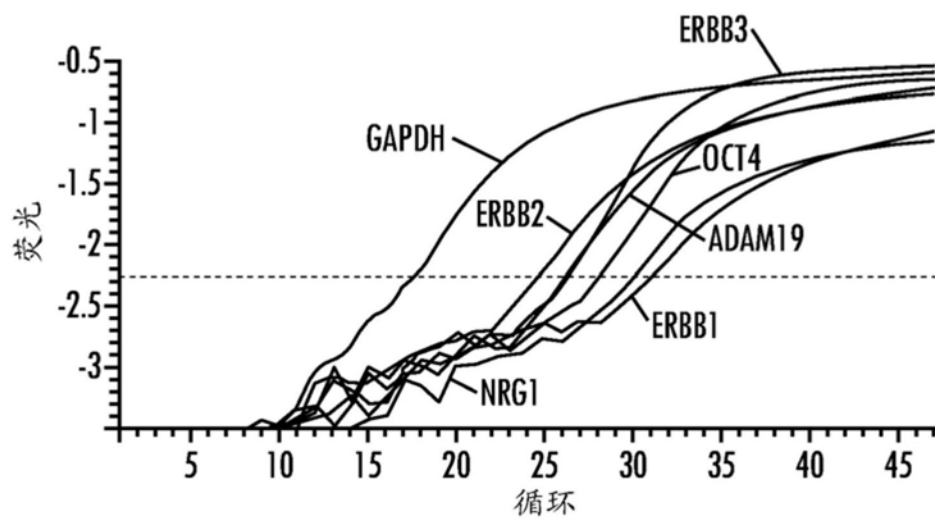


图1

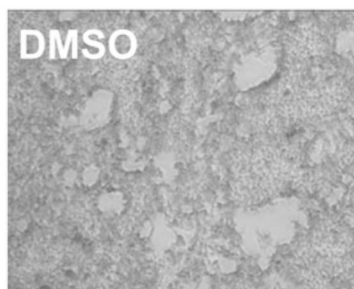


图2A



图2B

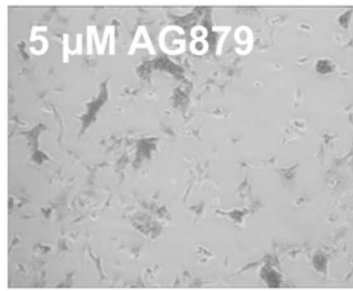


图2C



图3A

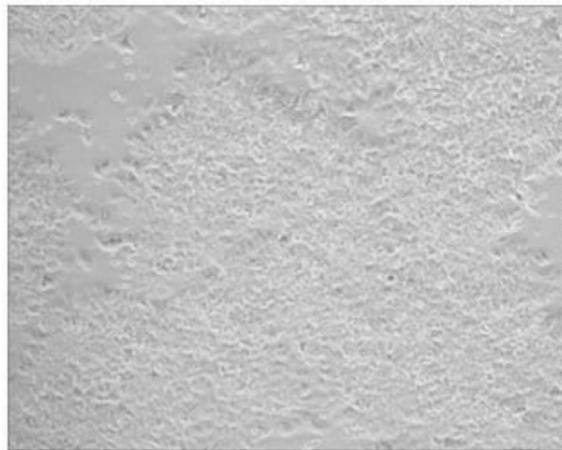


图3B

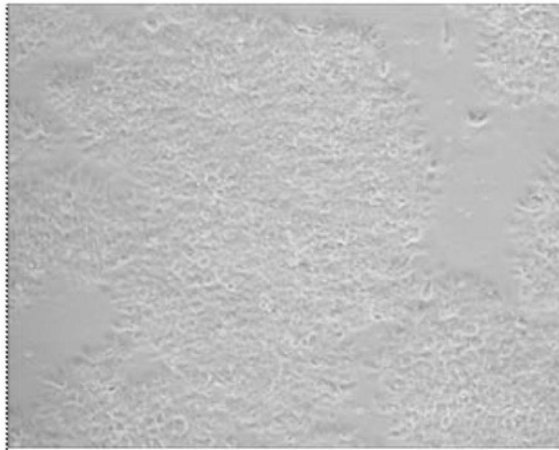


图3C

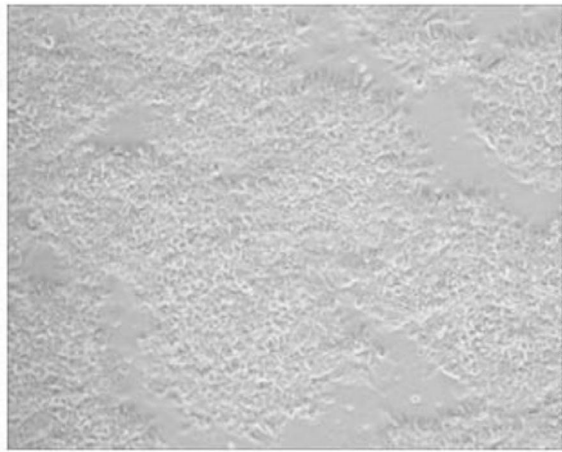


图3D

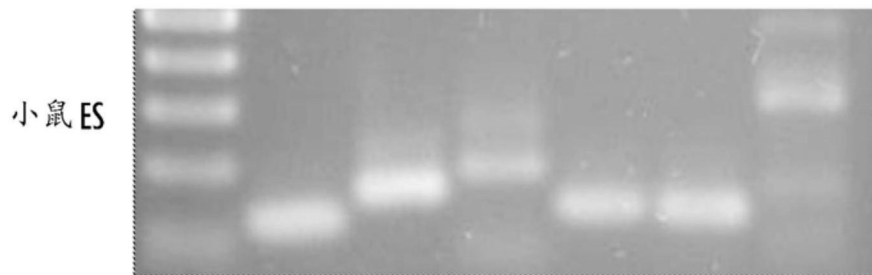


图4A

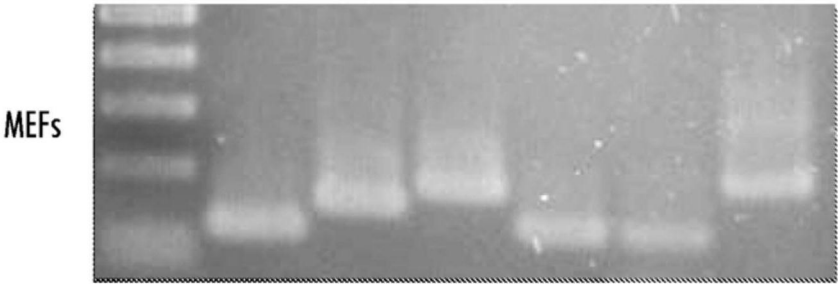


图4B

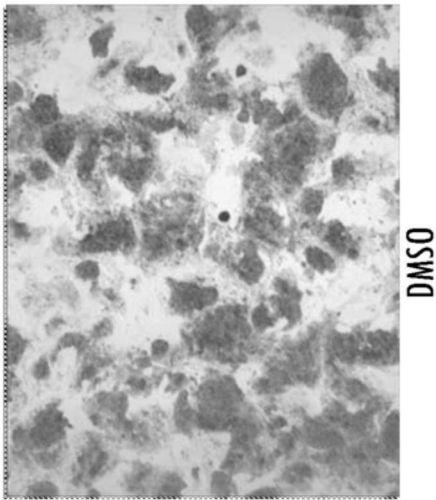


图5A

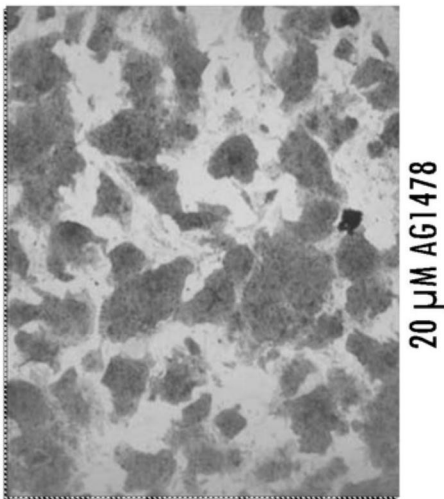


图5B

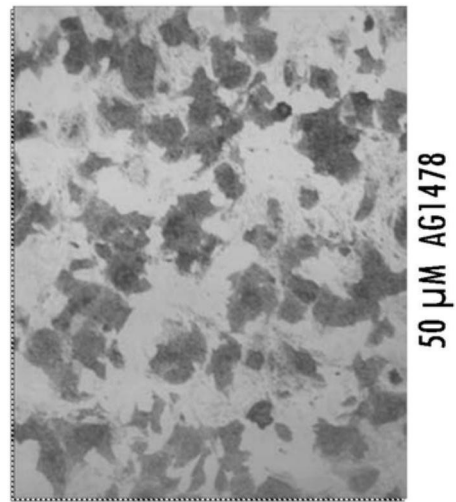


图5C

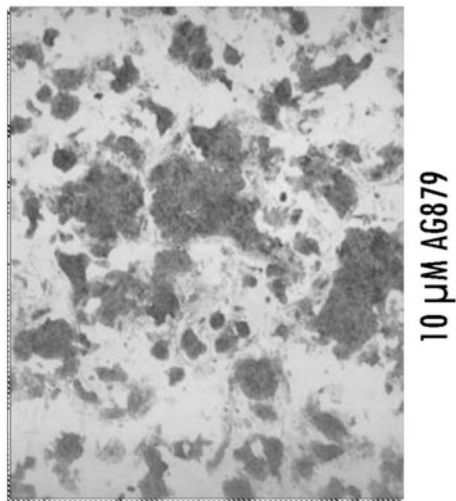


图5D

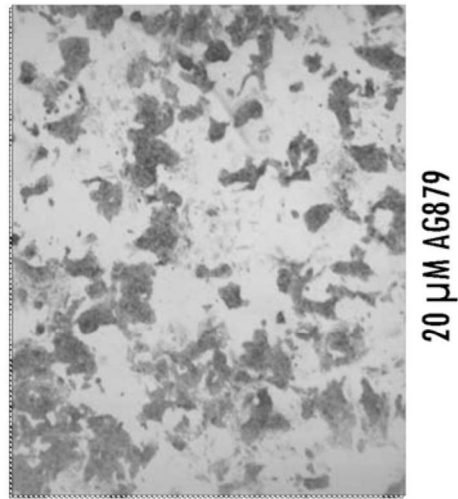


图5E

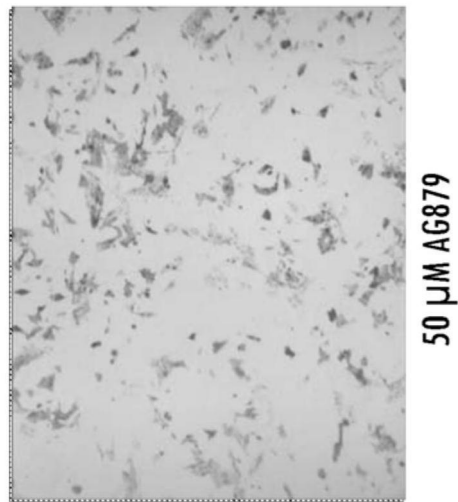


图5F

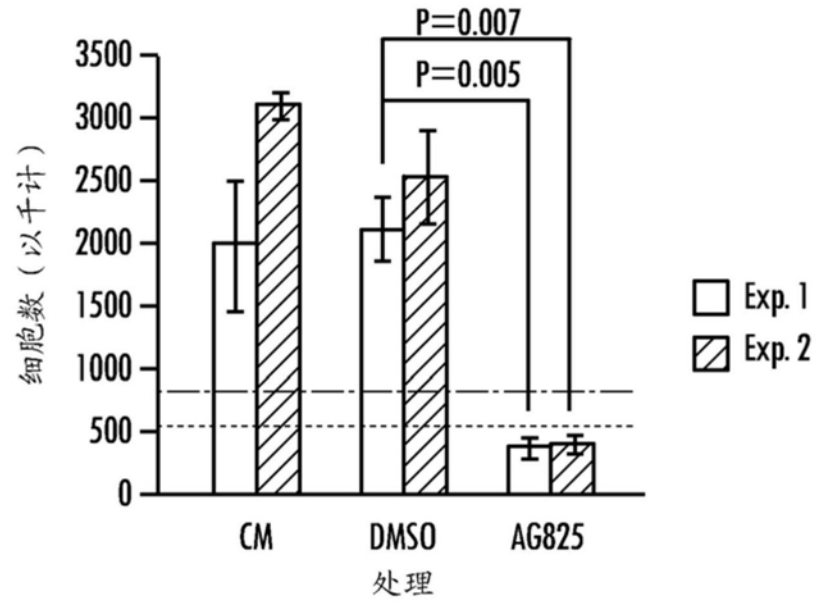


图6A

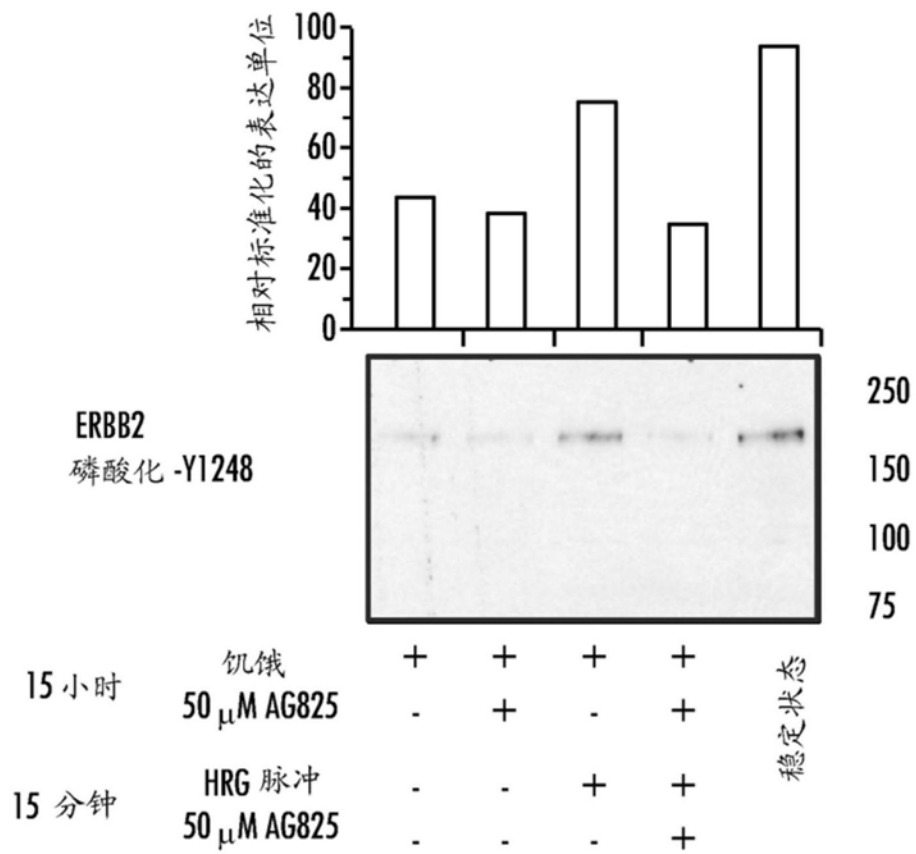


图6B

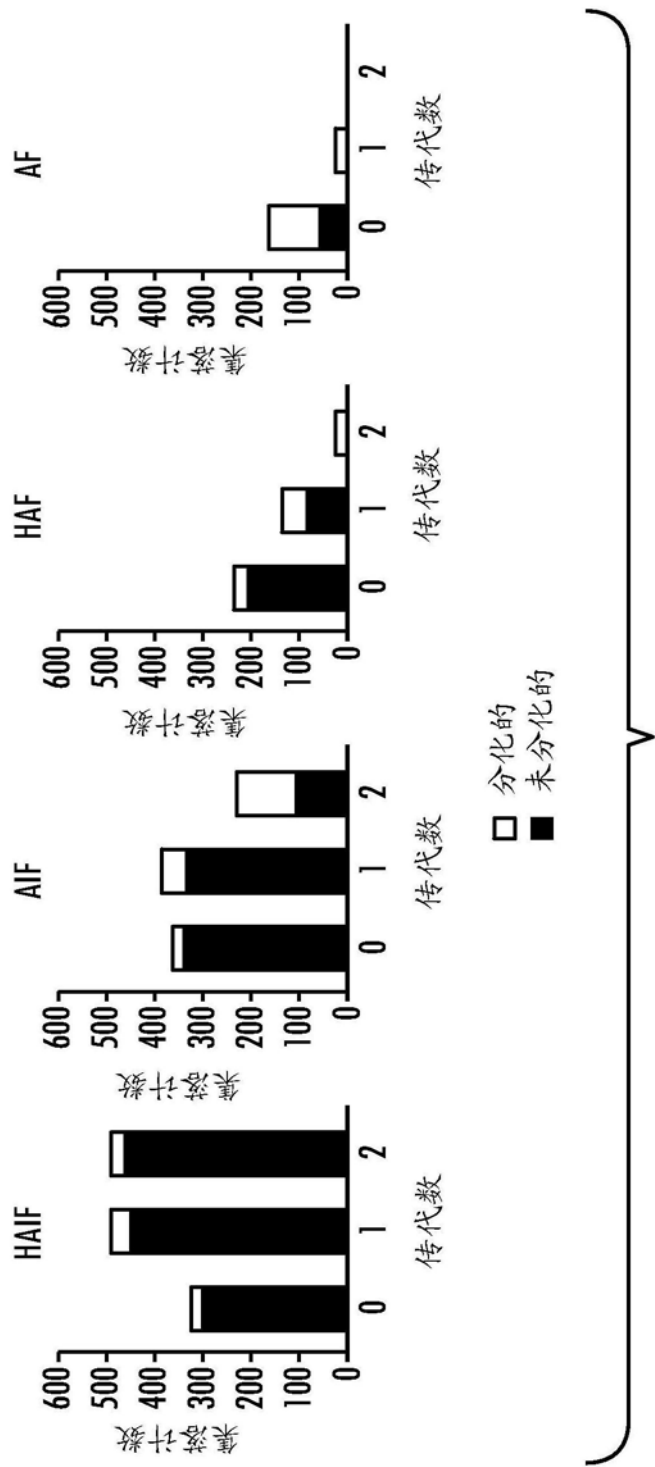


图 6C

图6C

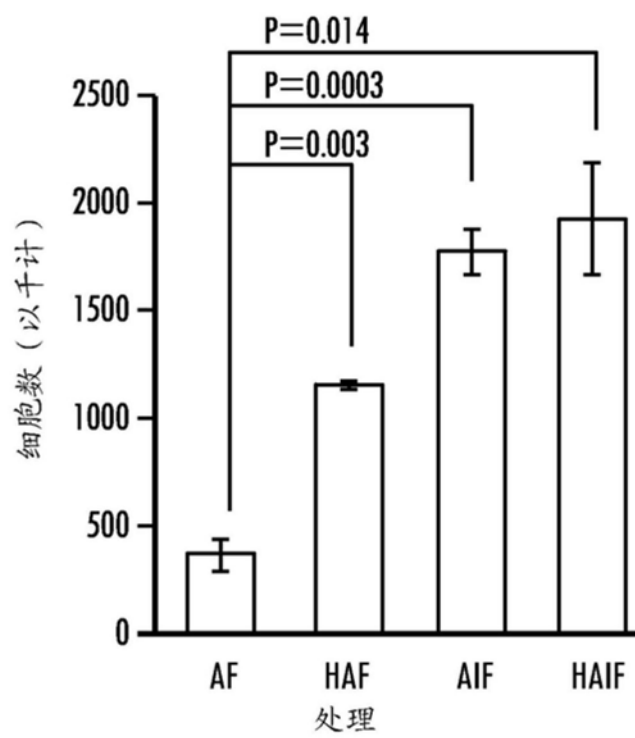


图6D

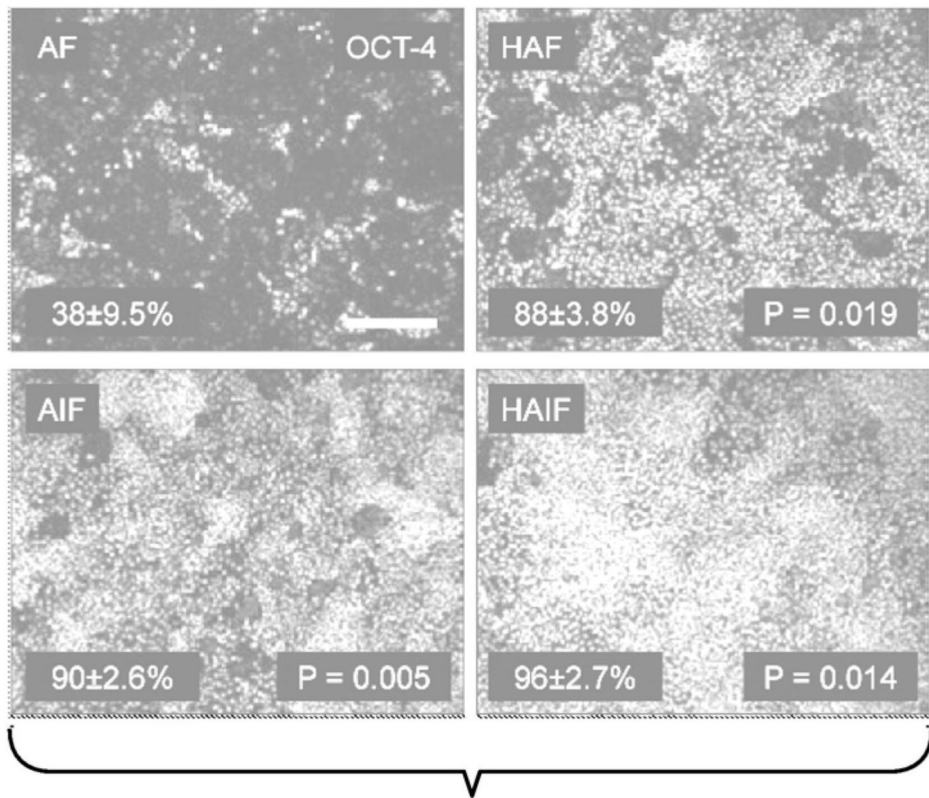


图 6E

图6E

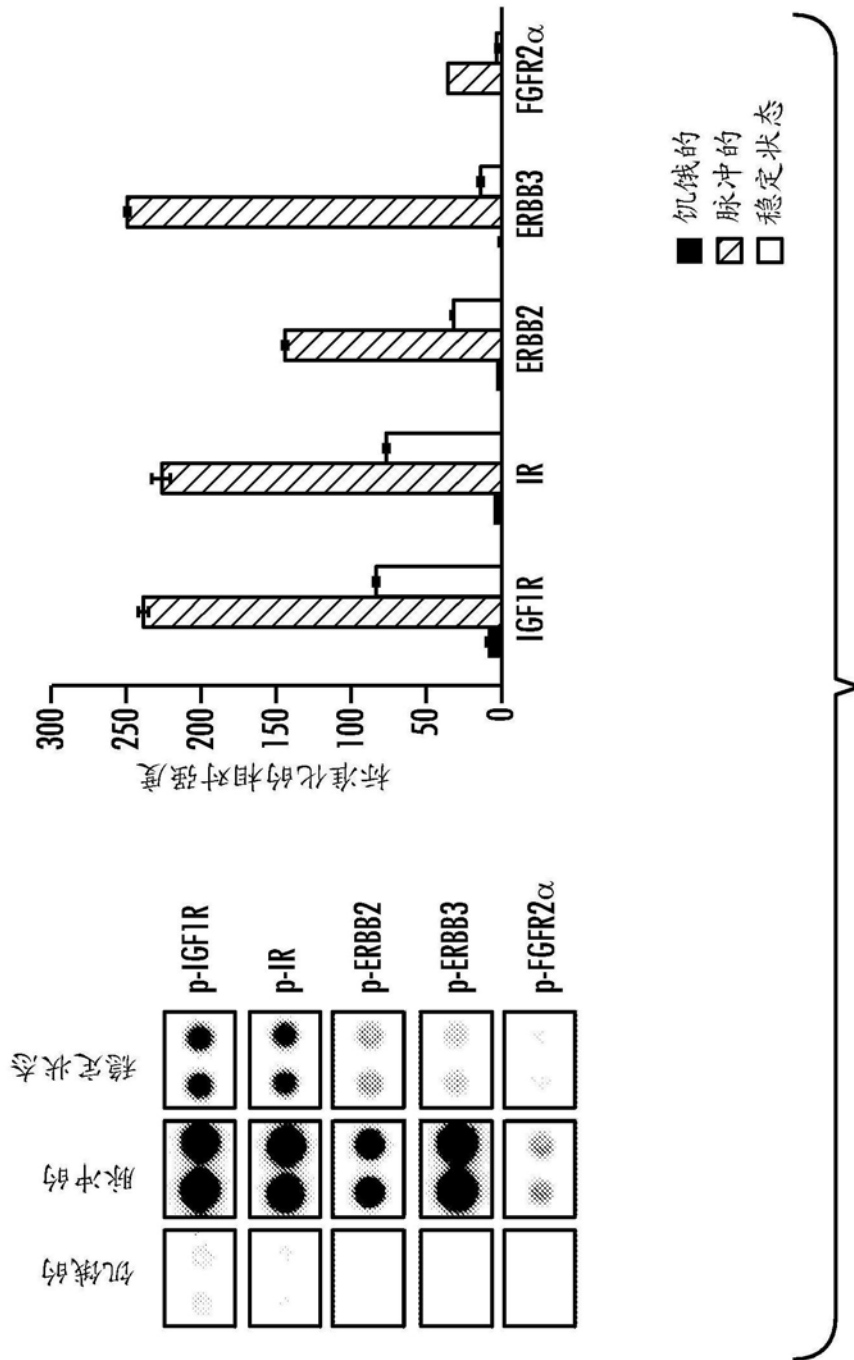


图 6F

图6F

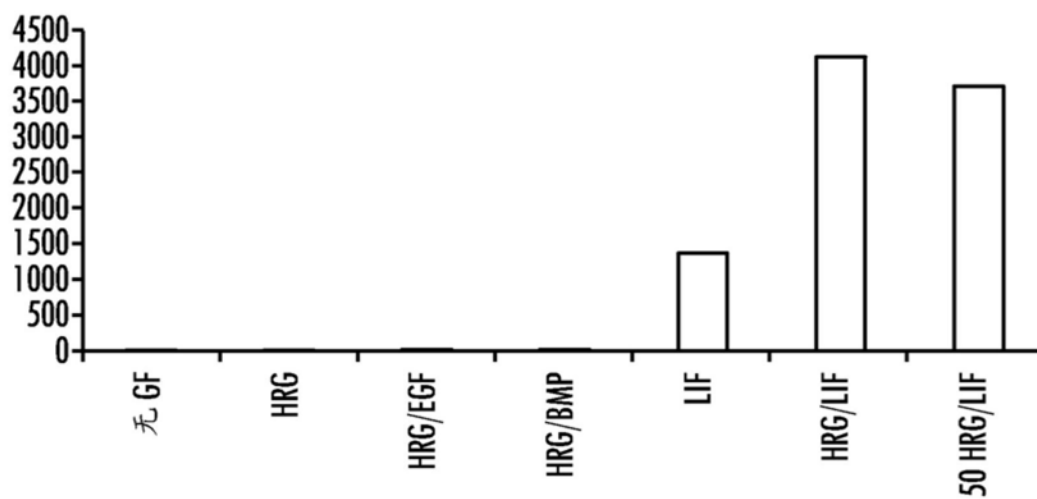


图7A

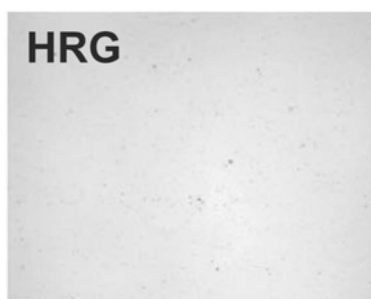


图7B



图7C



图7D

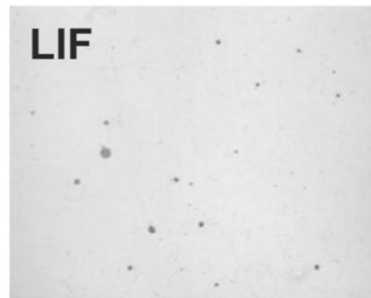


图7E

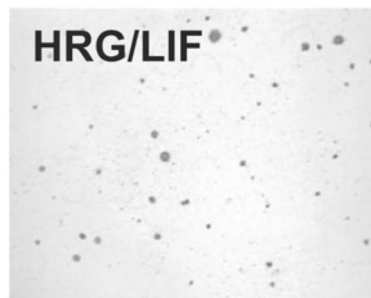


图7F

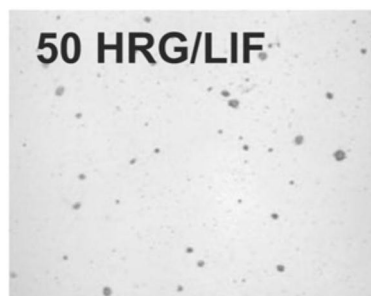


图7G

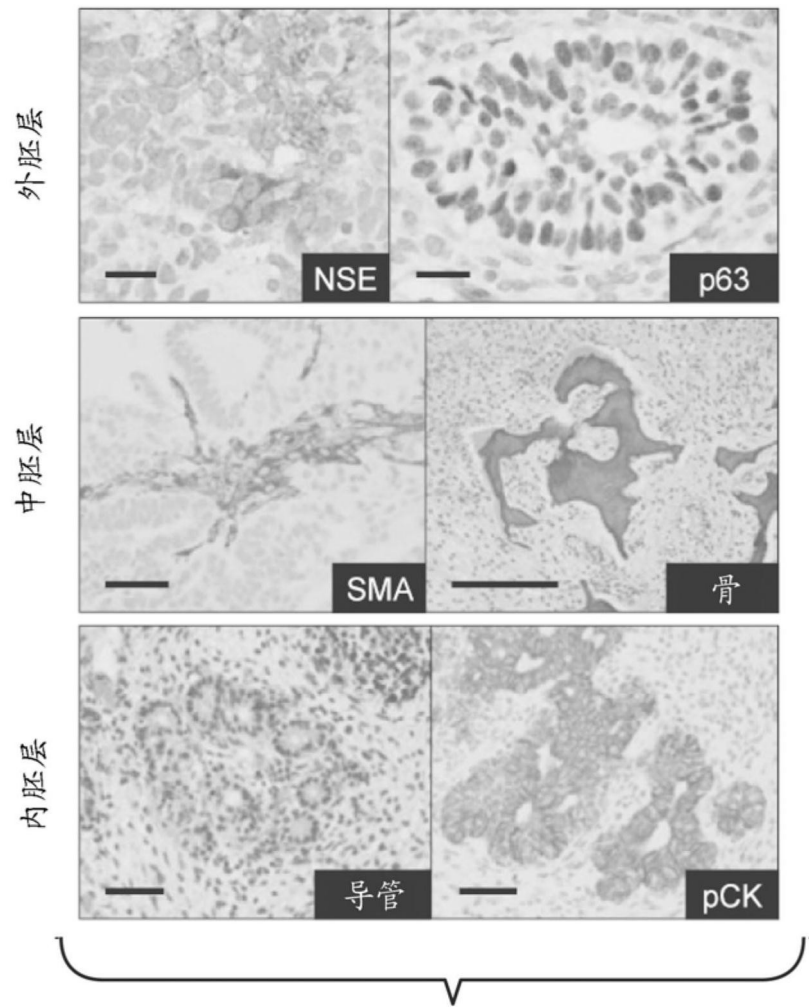


图8A

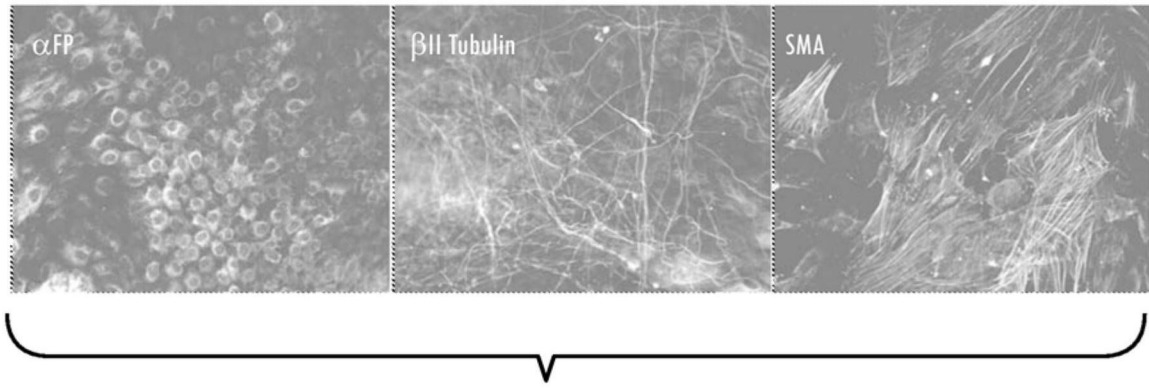


图 8B

图8B

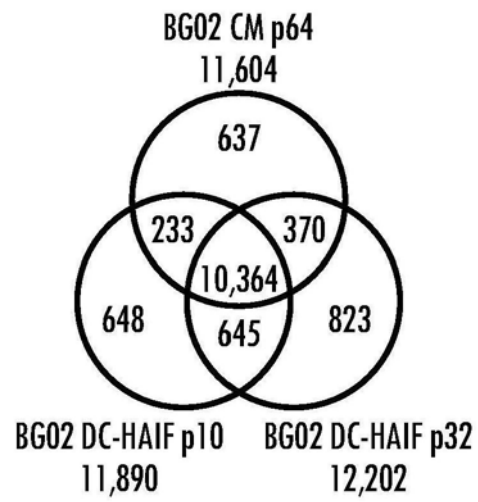


图8C

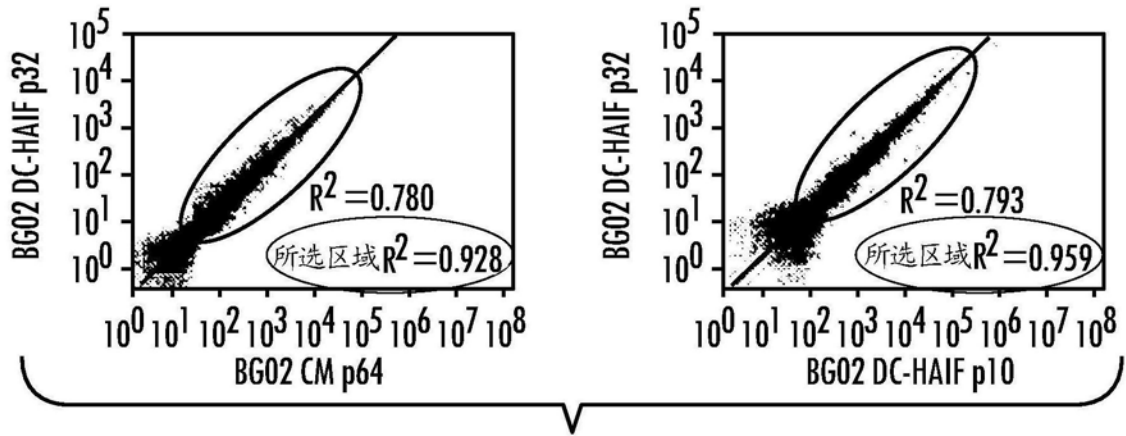


图 8D

图8D

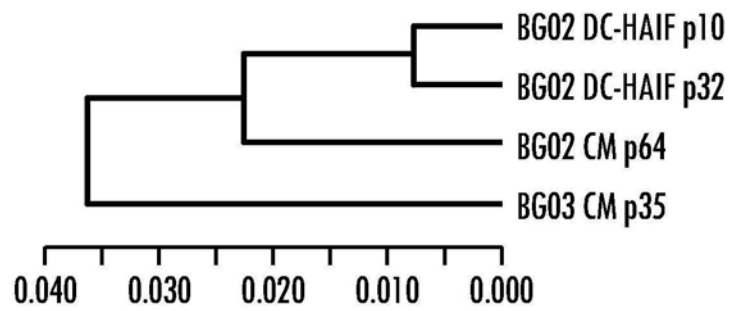


图8E

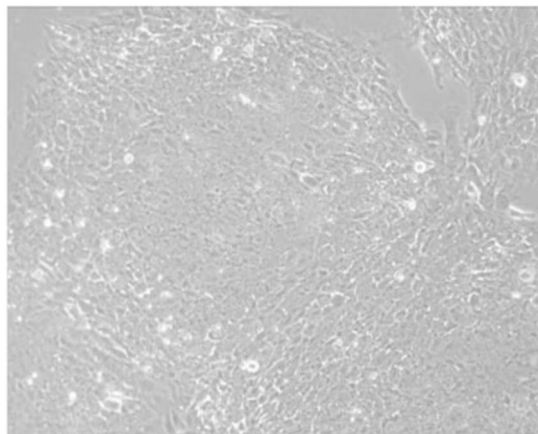


图9A

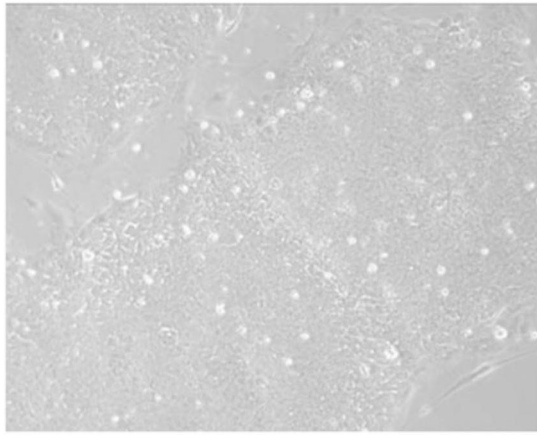


图9B

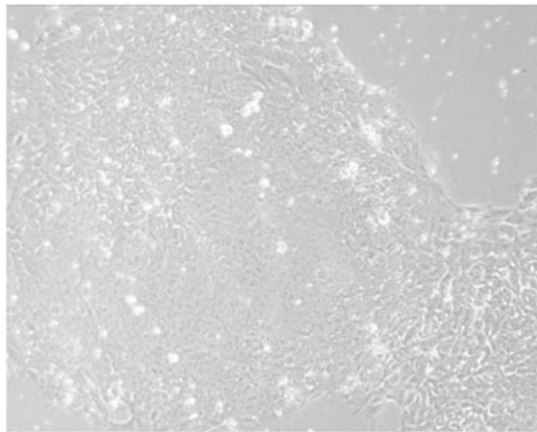


图9C

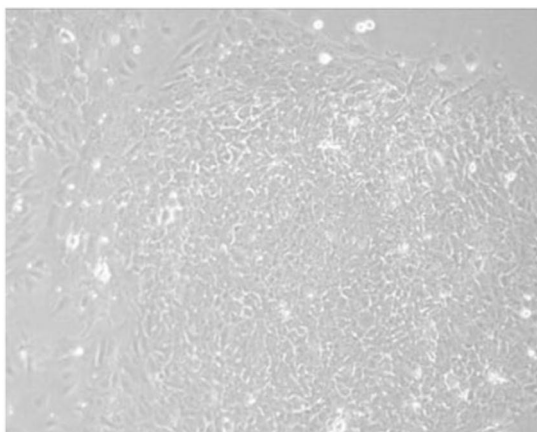


图9D



图10A

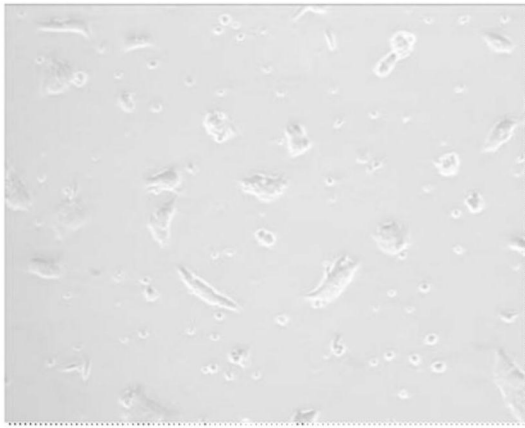


图10B



图10C

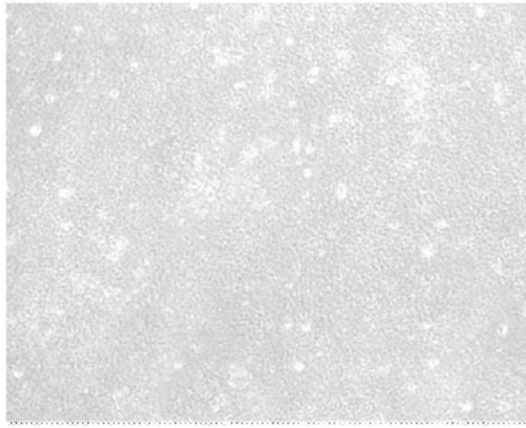


图10D

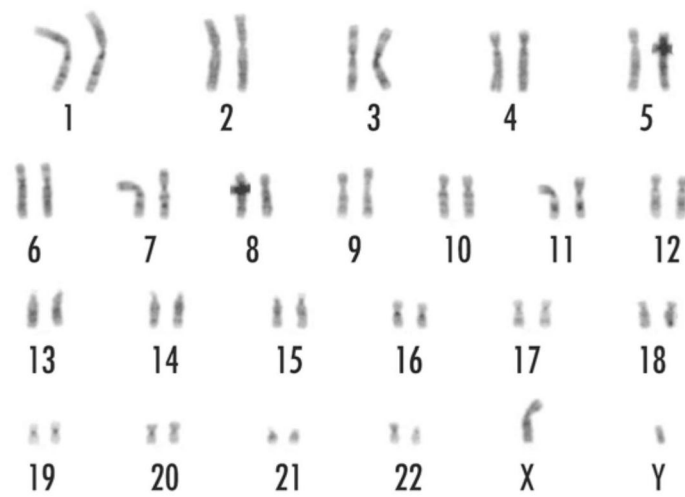


图10E

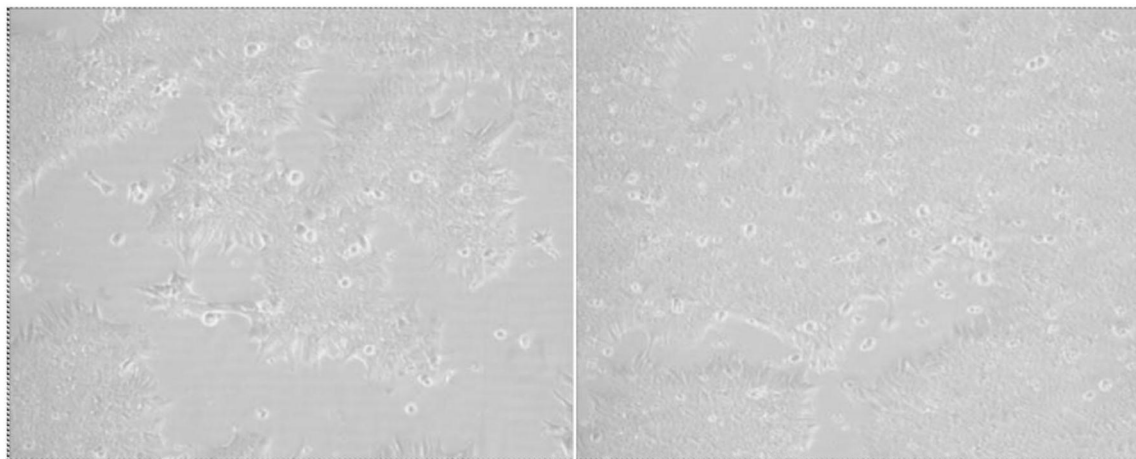


图 11A

图 11B

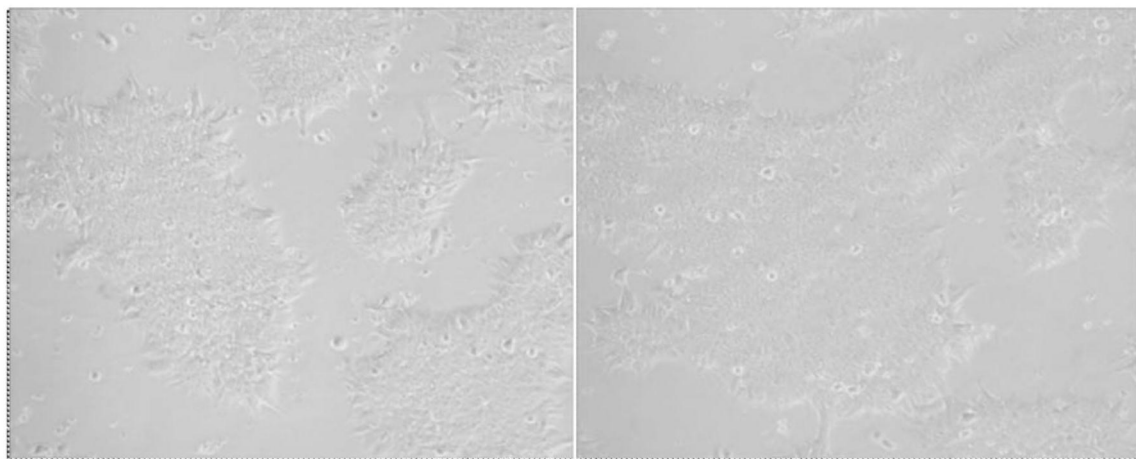


图 11C

图 11D

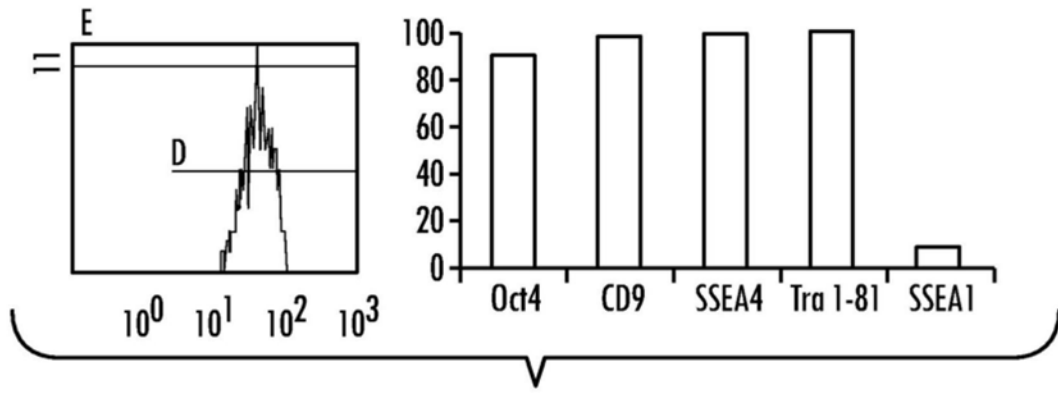


图 12A

图12A

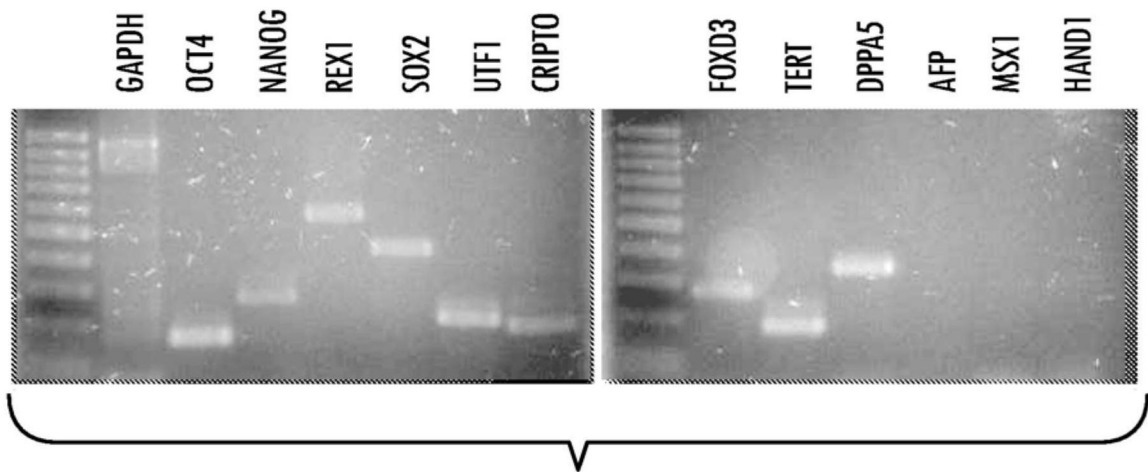


图 12B

图12B

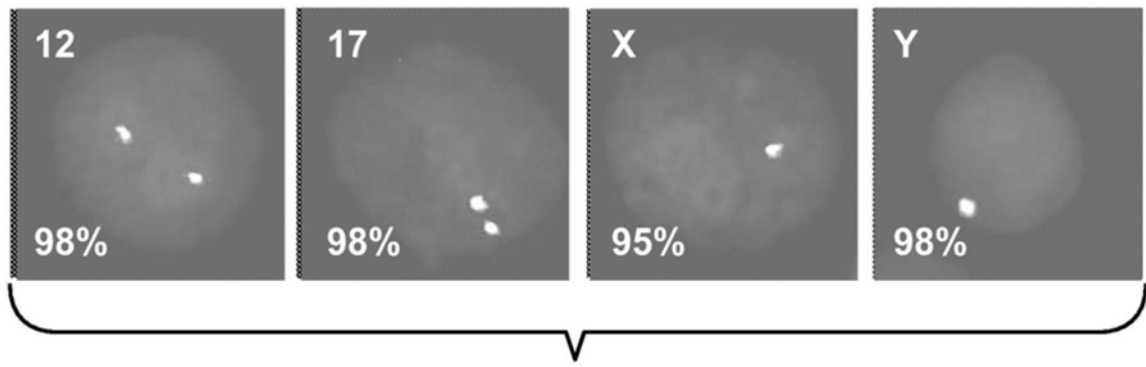


图 12C

图12C



图13A

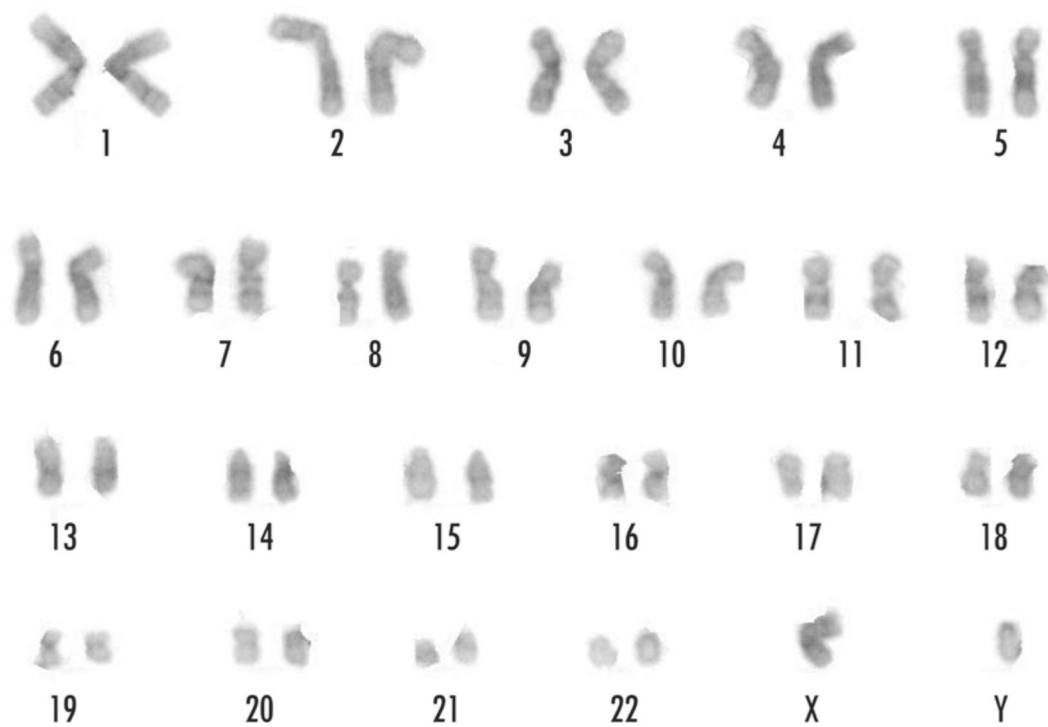


图13B

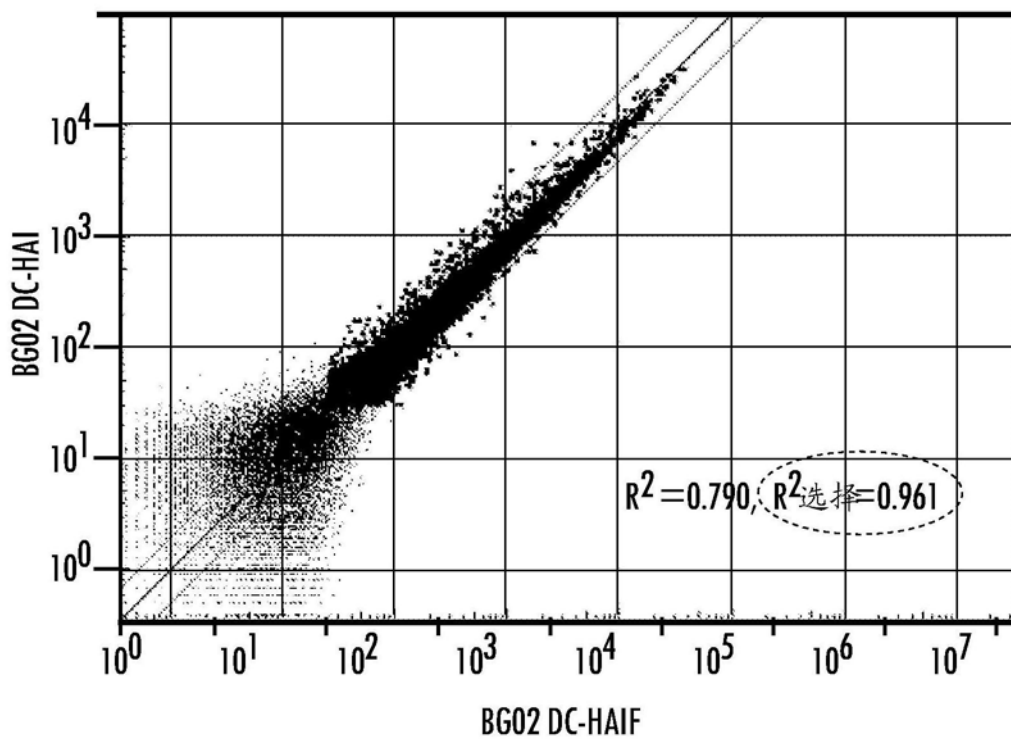


图14

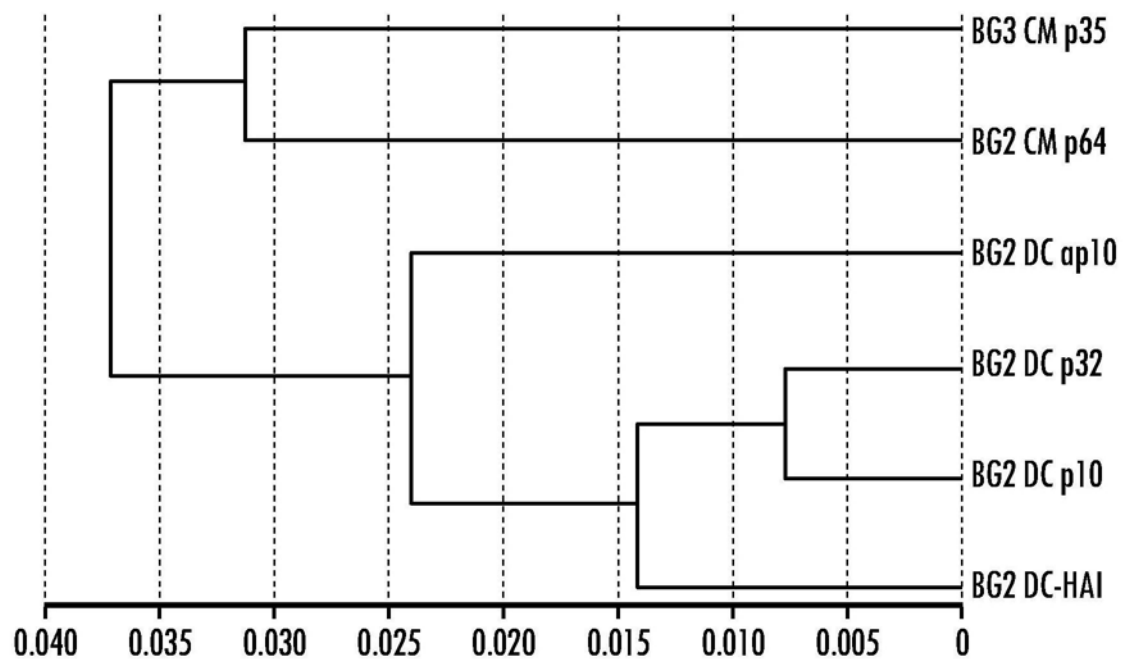


图15



图16A

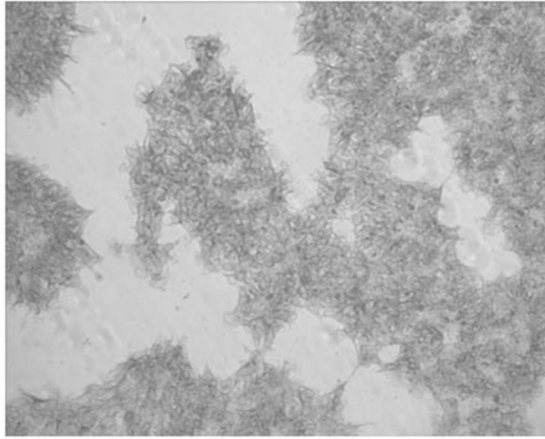


图16B

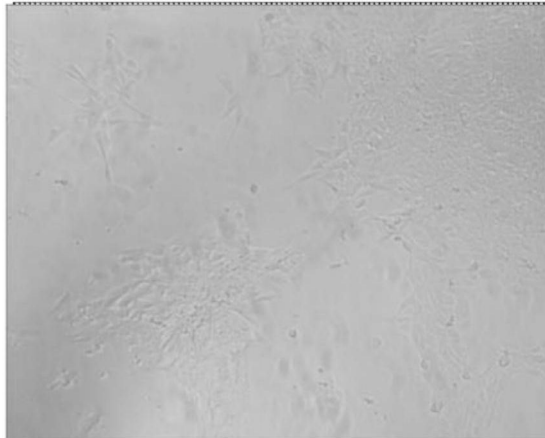


图16C

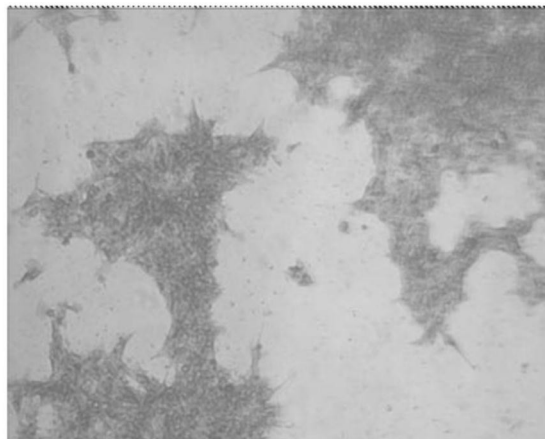


图16D

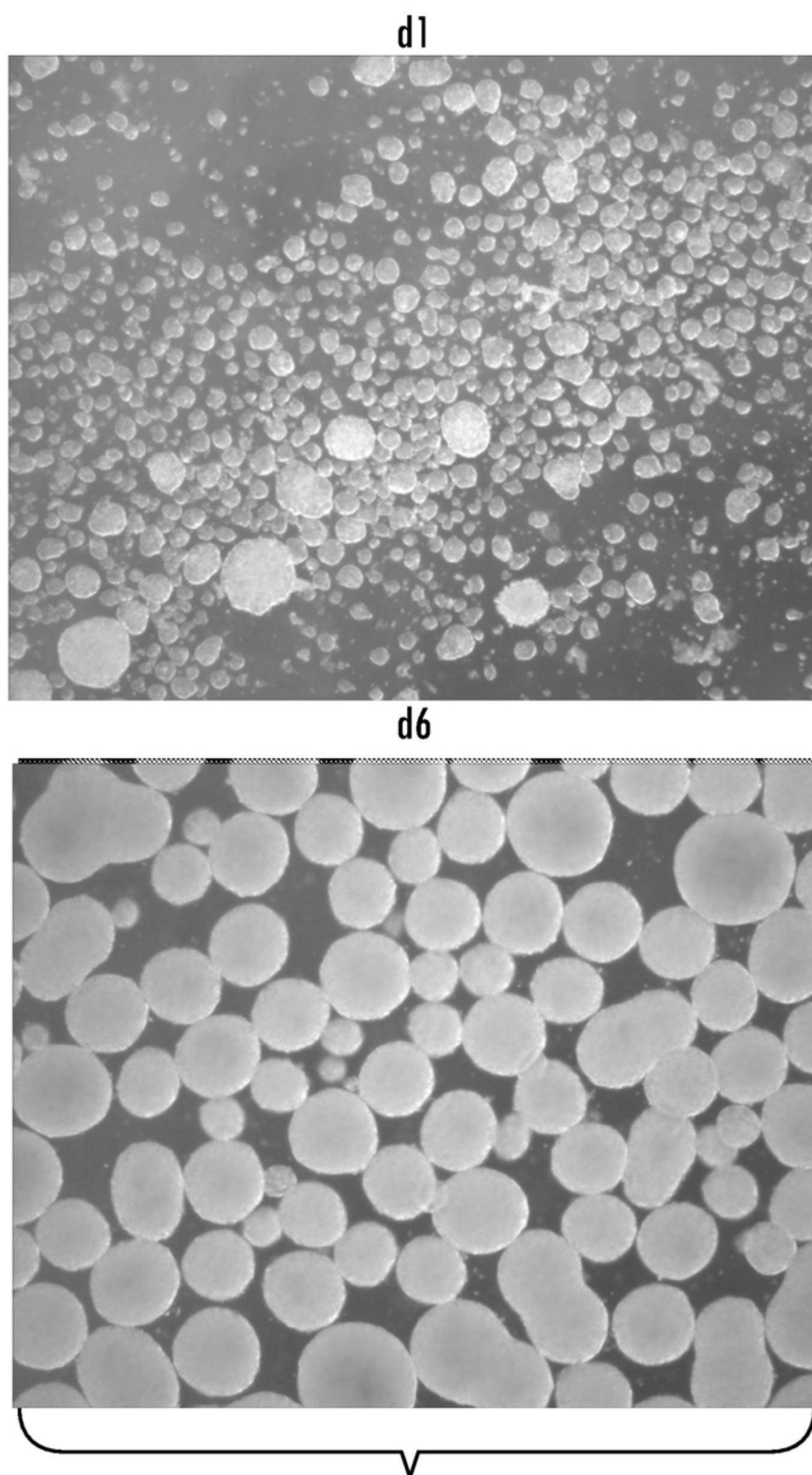


图 17

图17

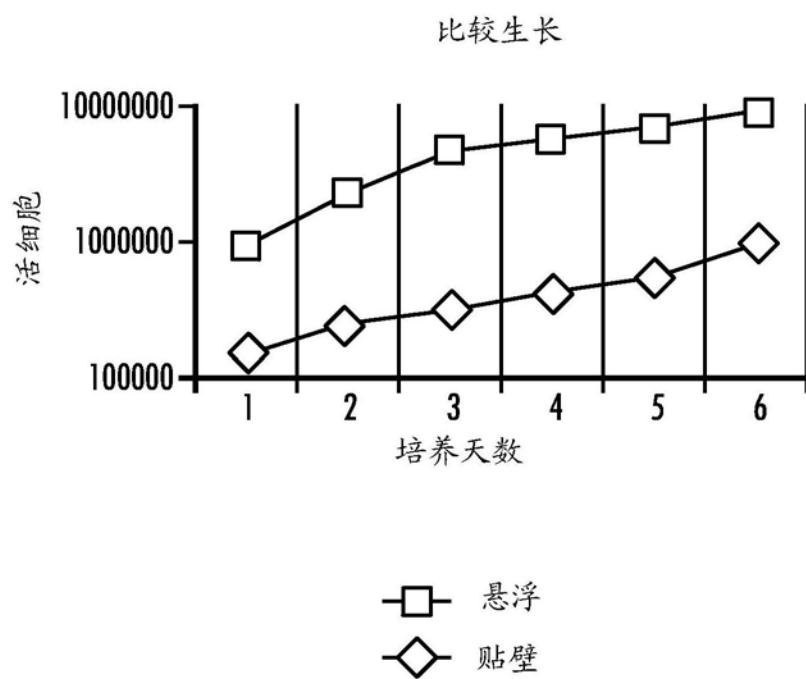


图18

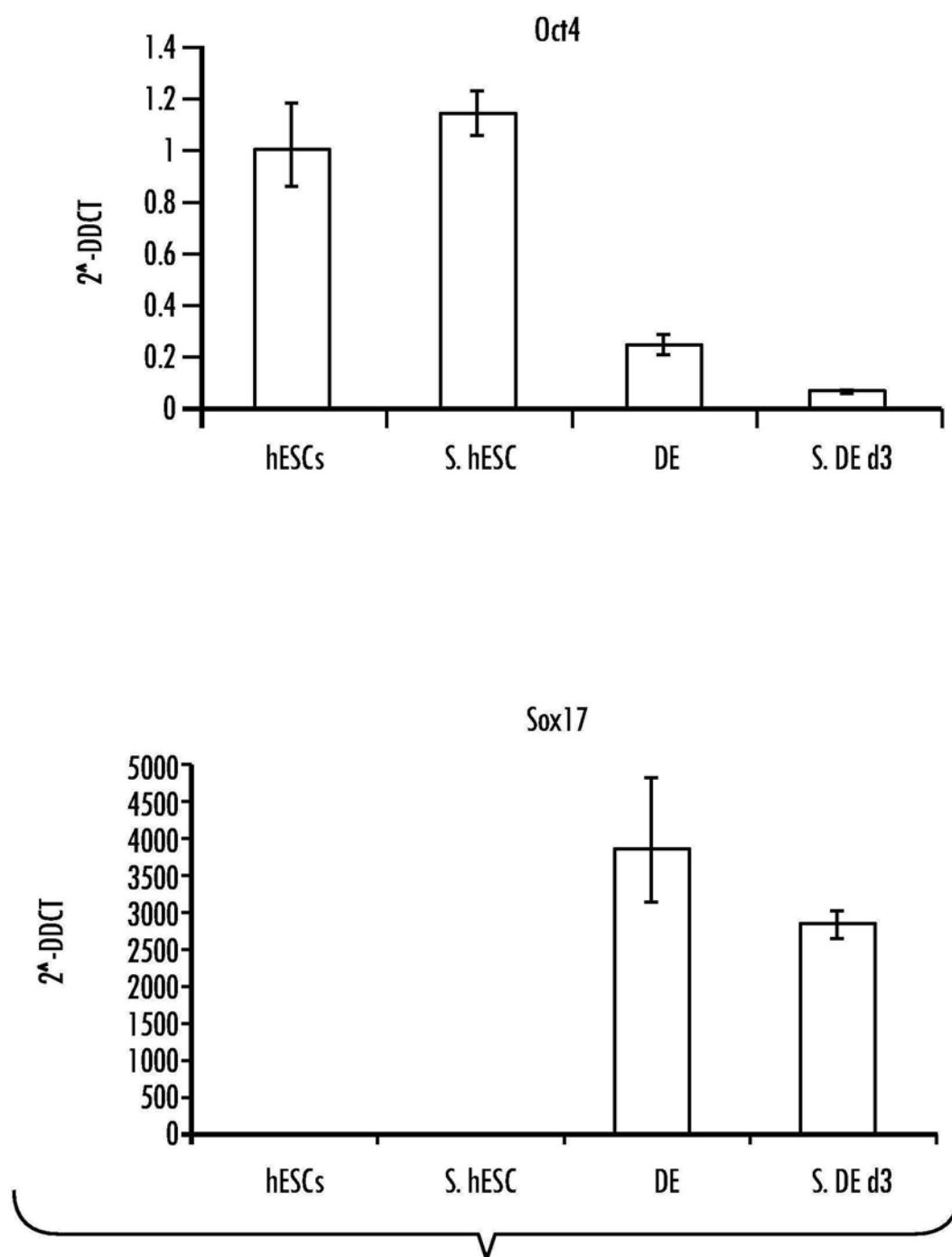


图 19

图19

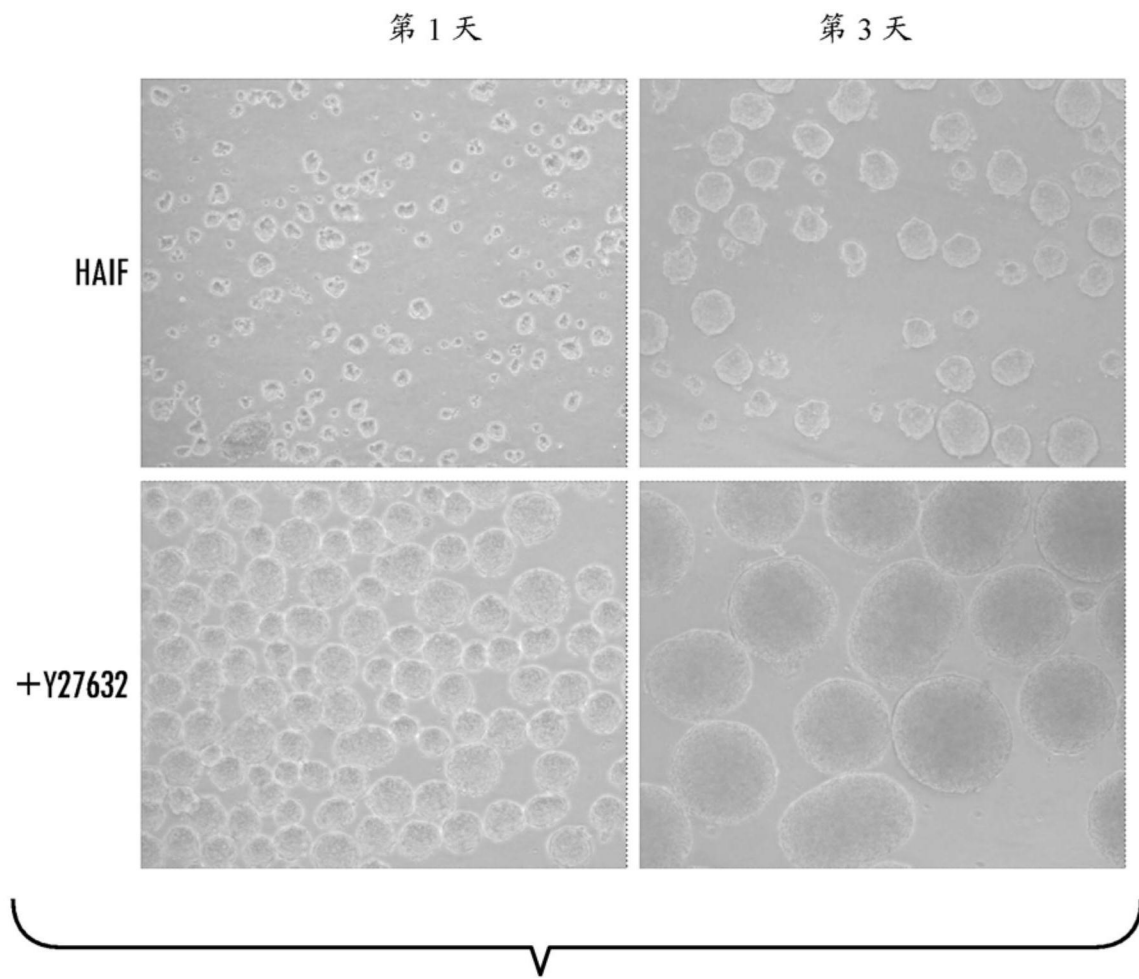


图 20

图20

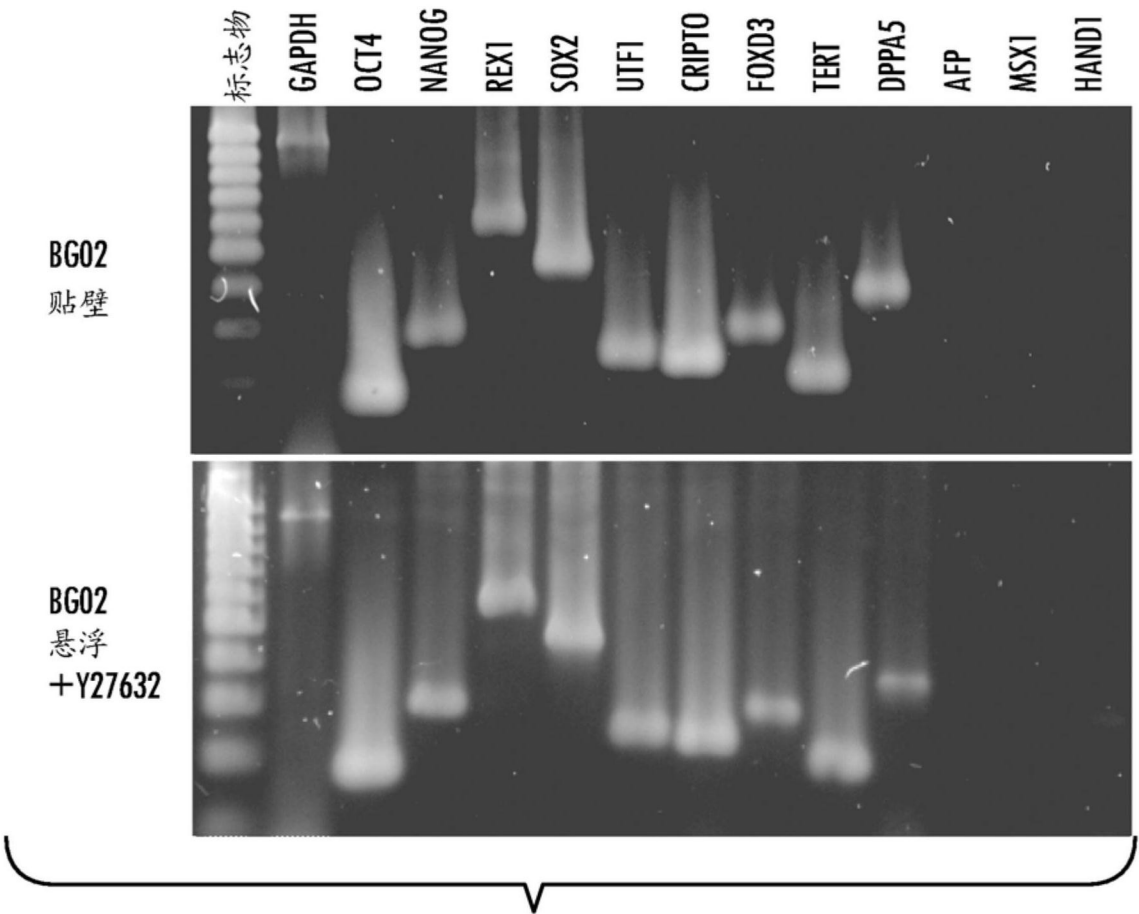


图 21

图21

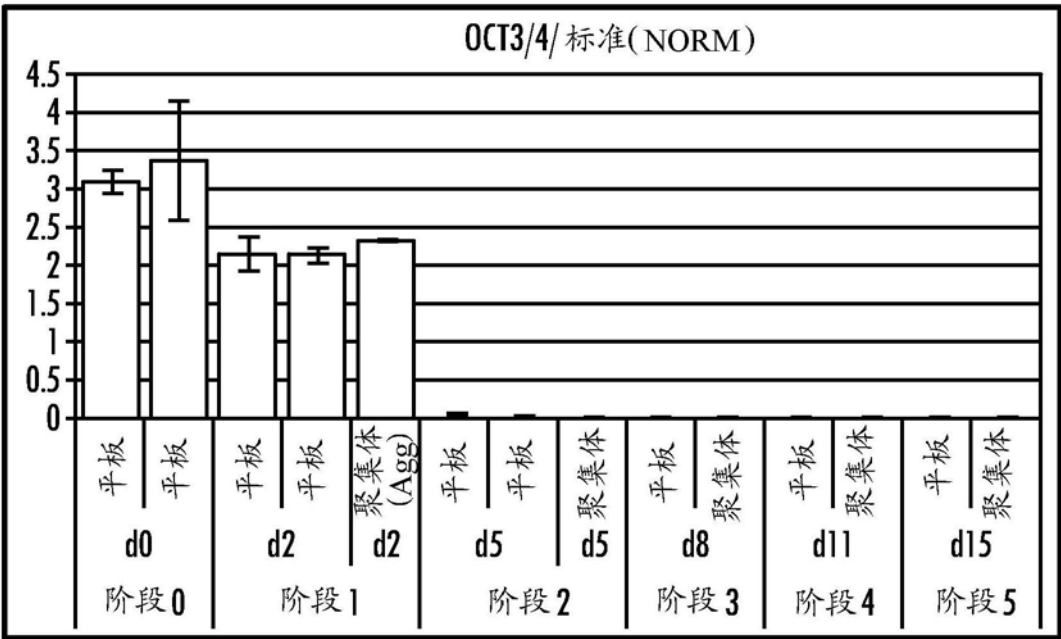


图22A

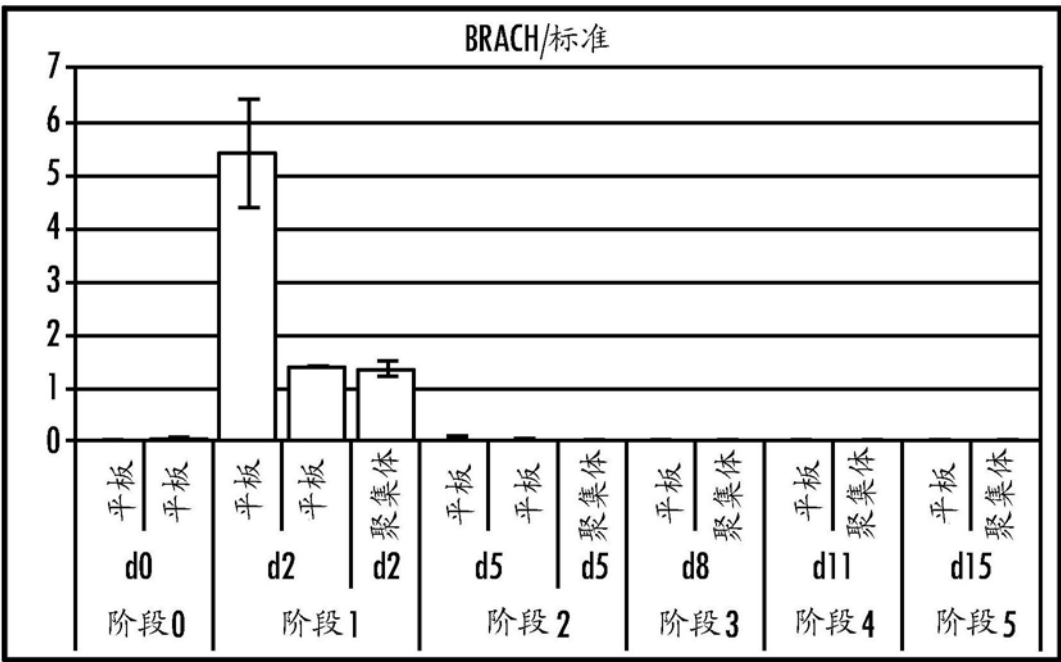


图22B

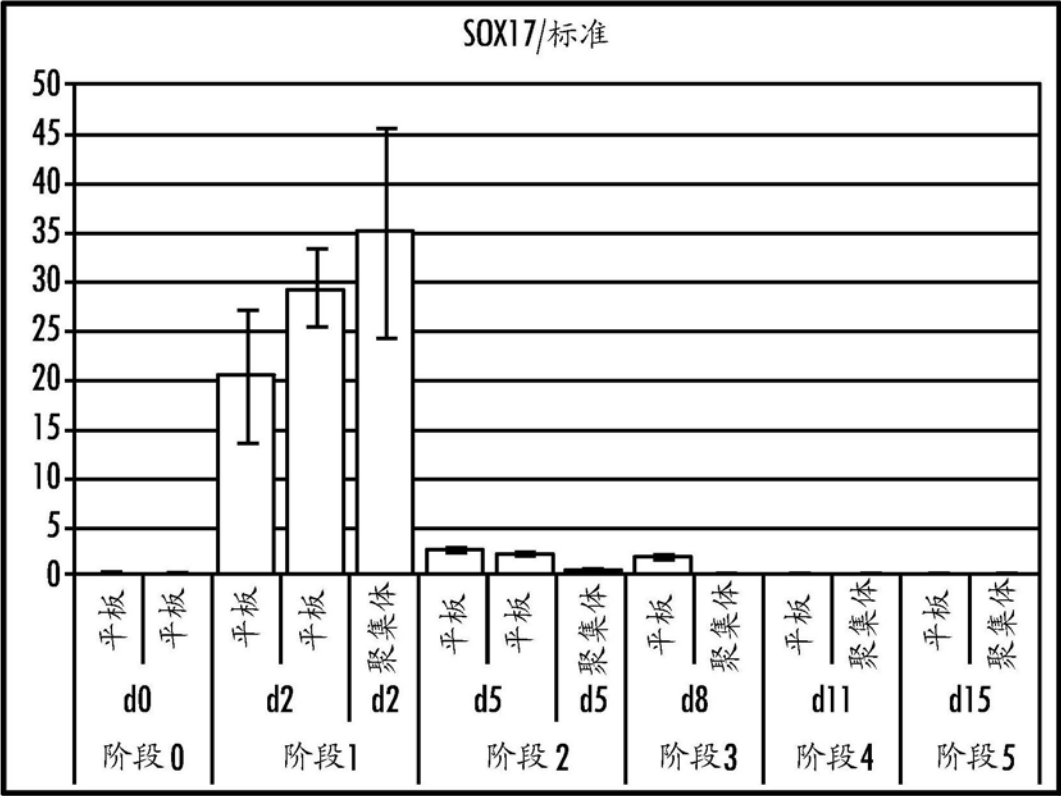


图22C

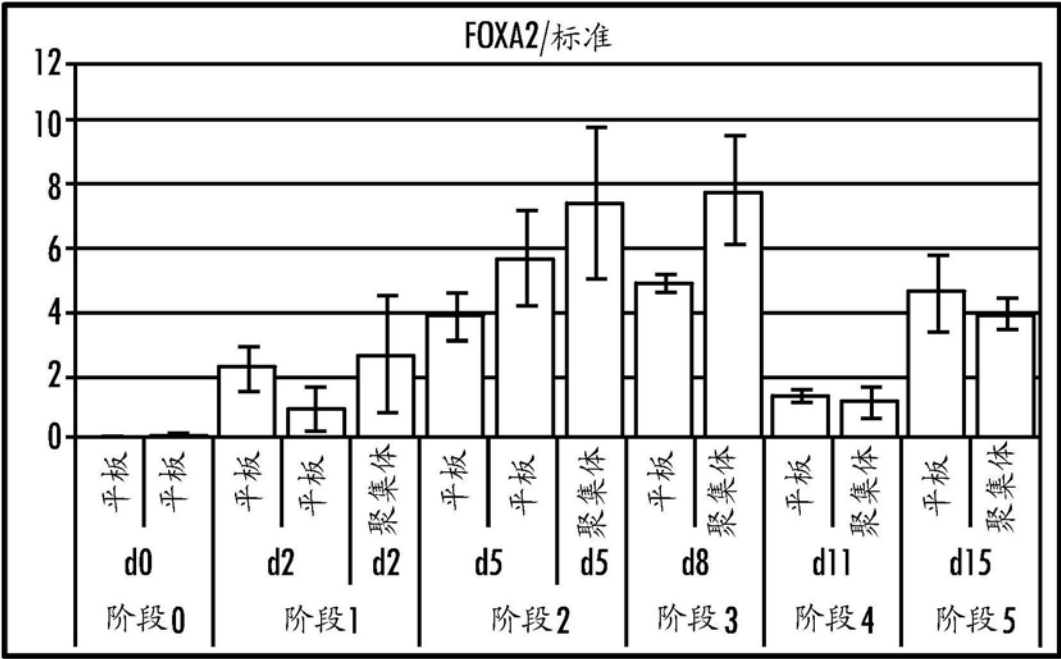


图22D

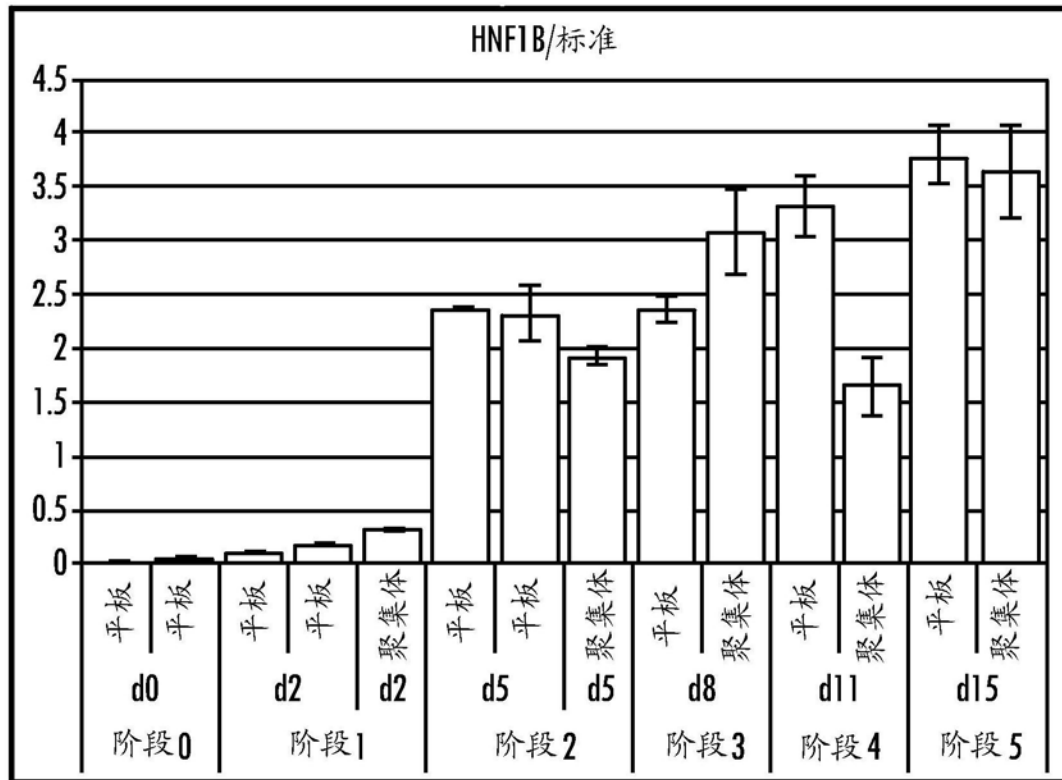


图22E

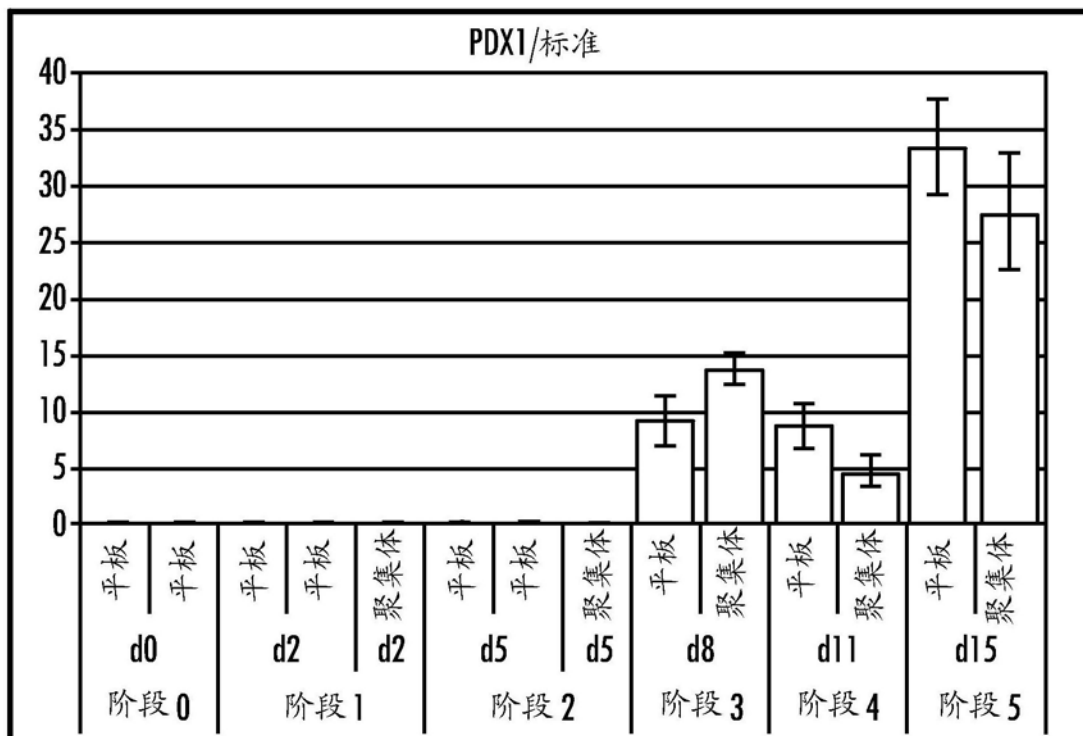


图22F

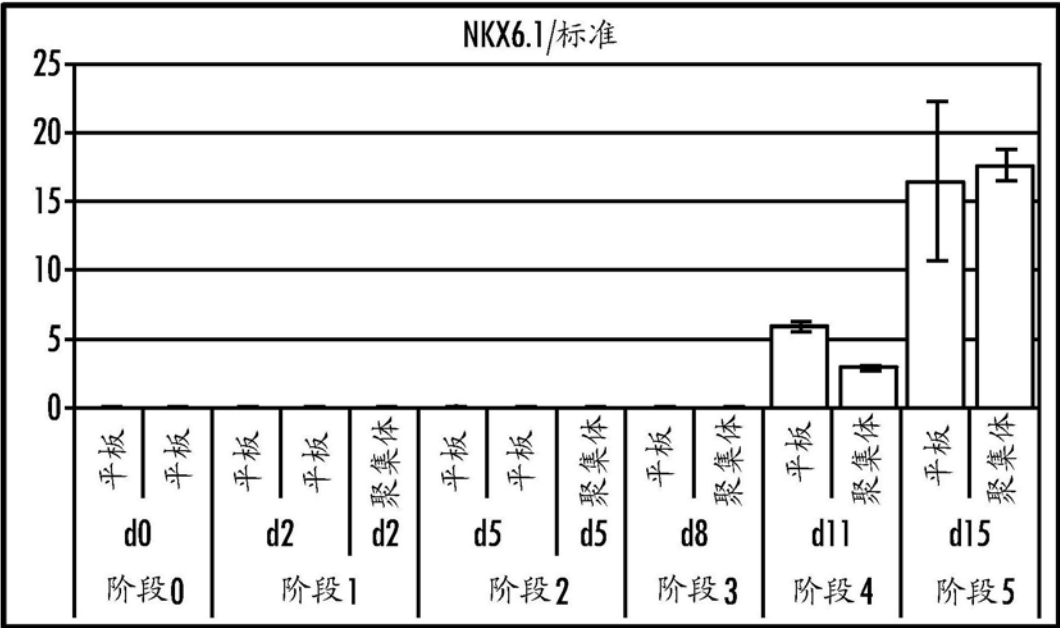


图22G

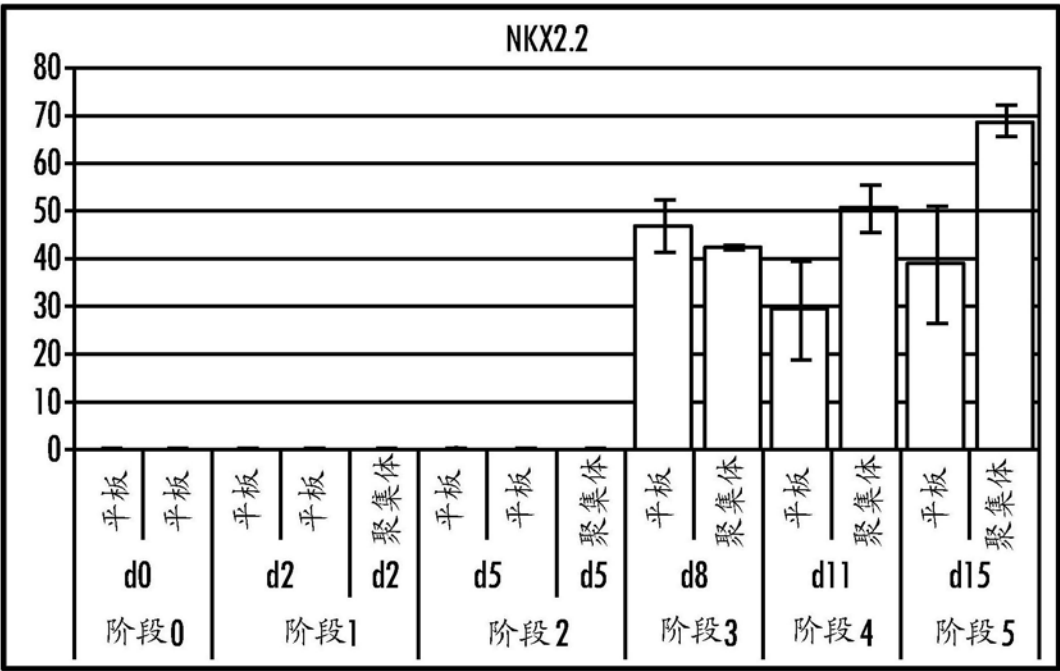


图22H

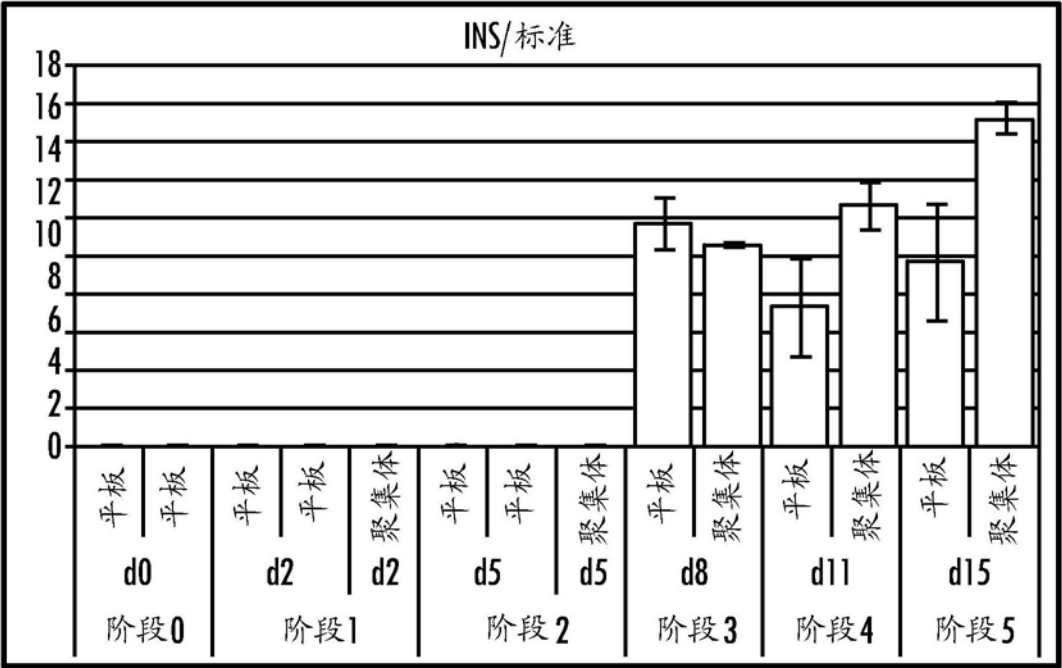


图22I

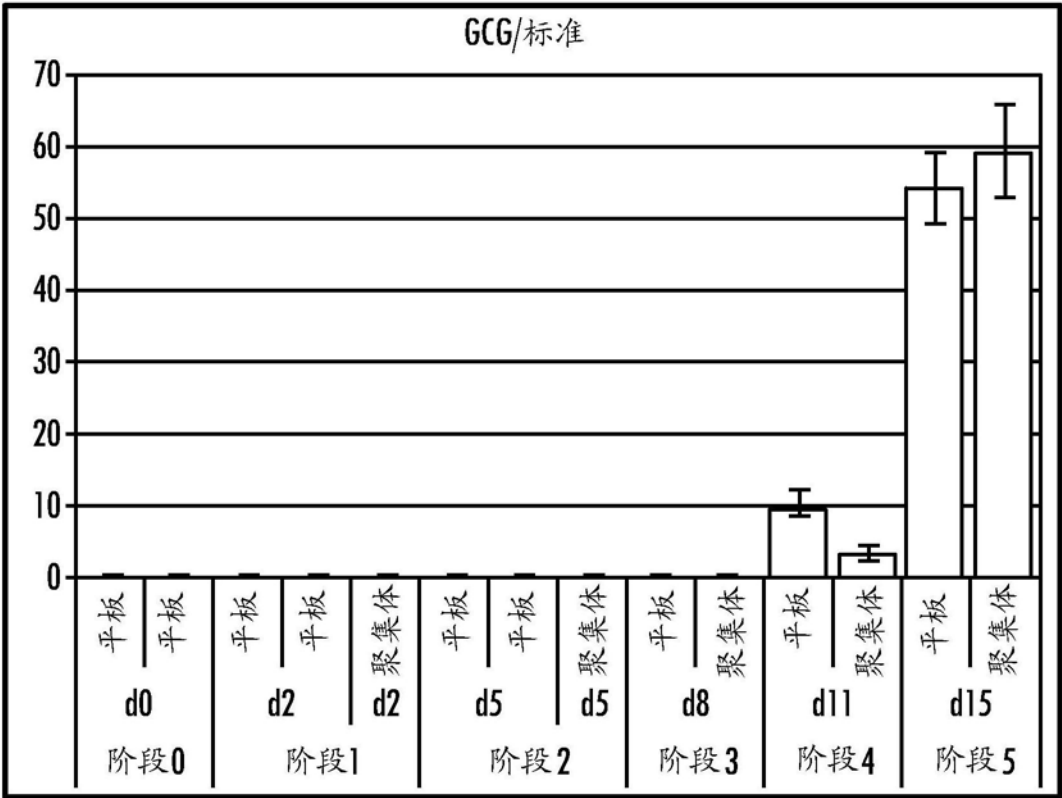


图22J

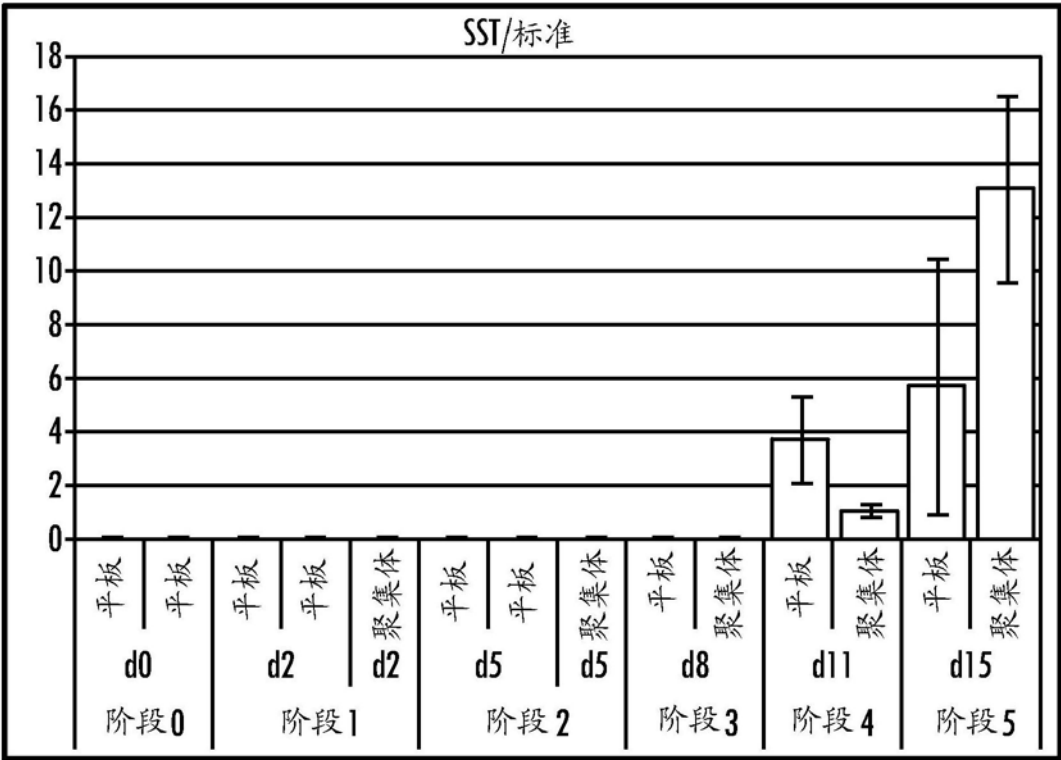


图22K

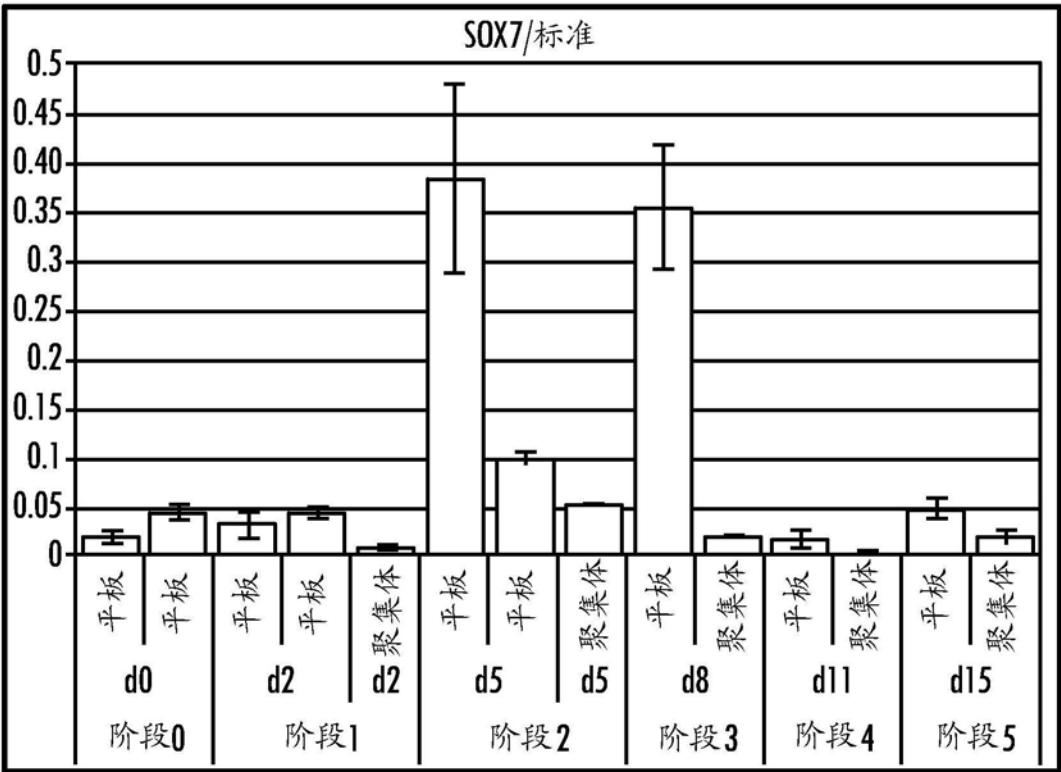


图22L

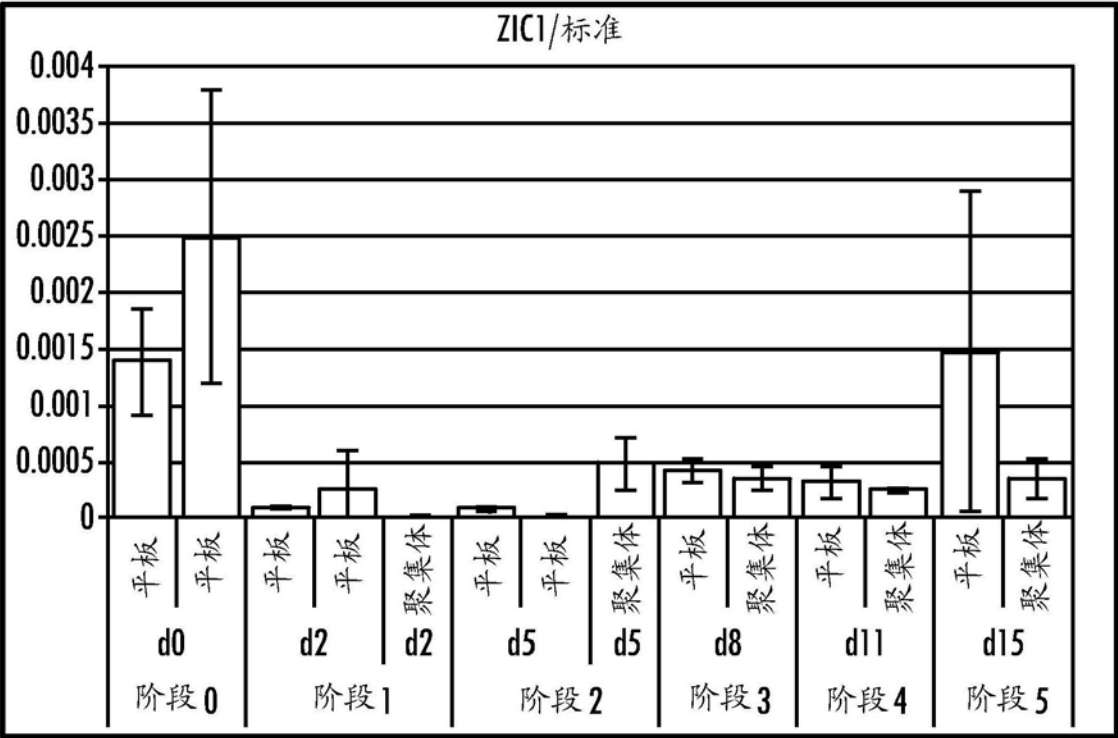


图22M

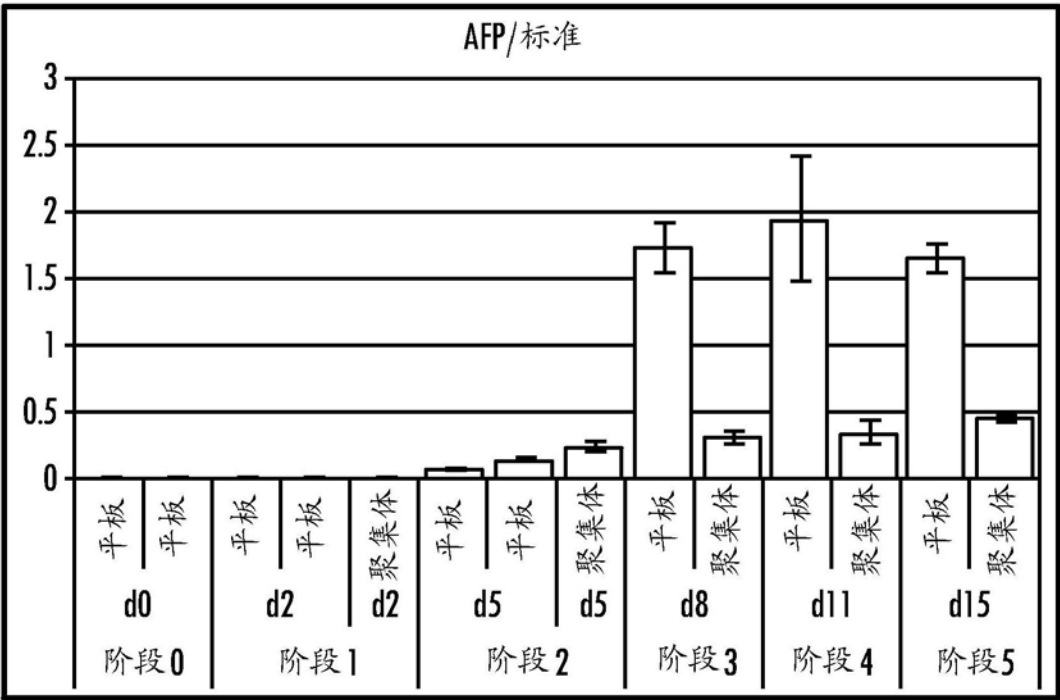


图22N

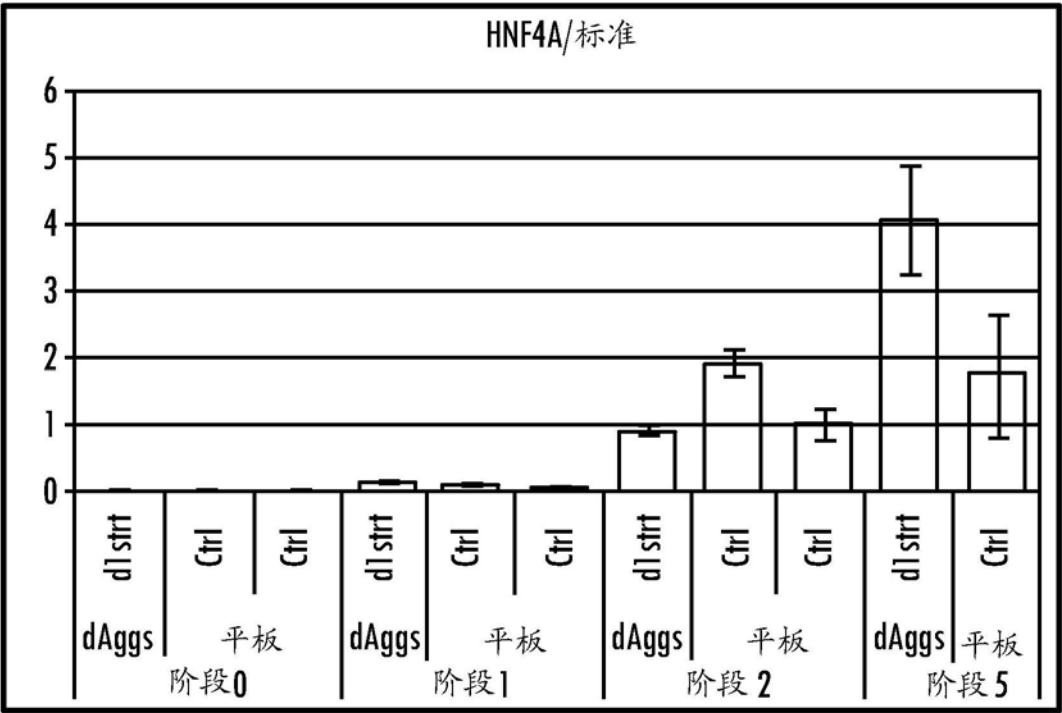


图220

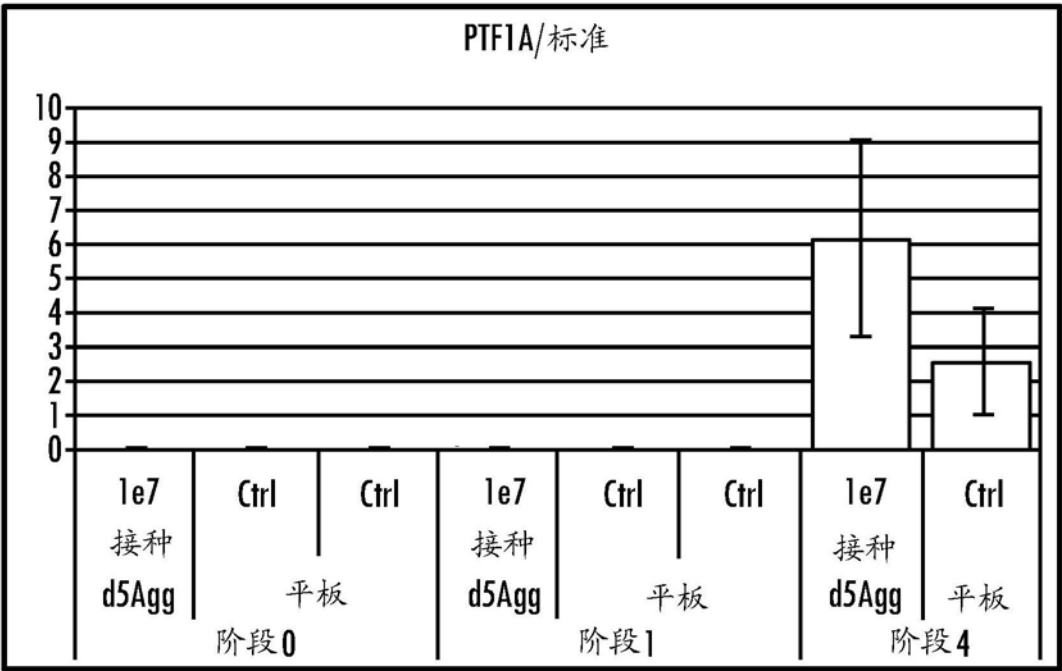


图22P

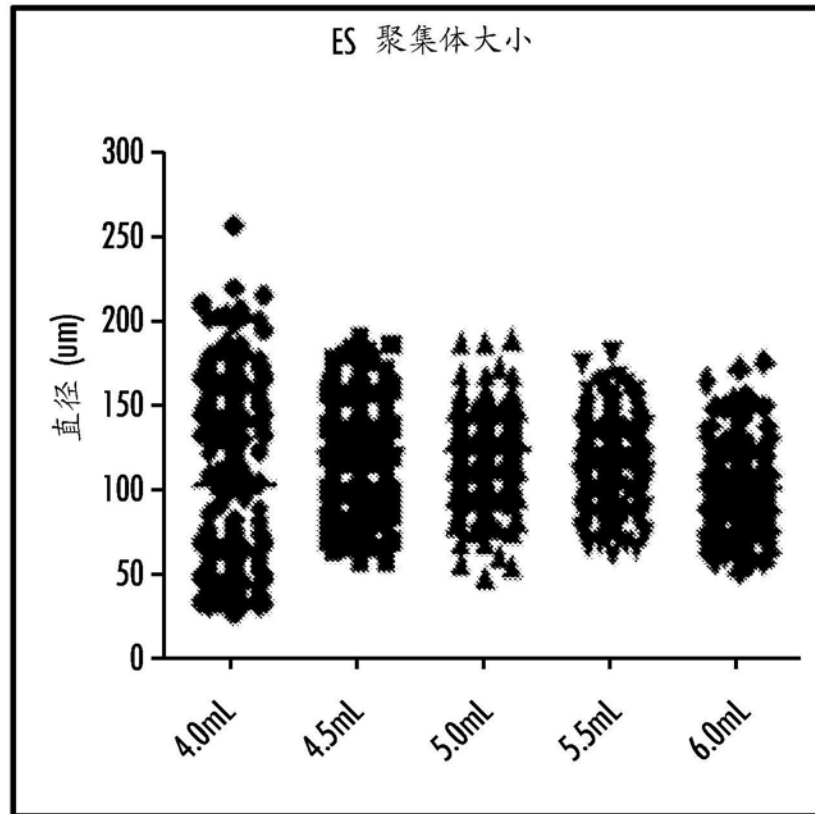


图23

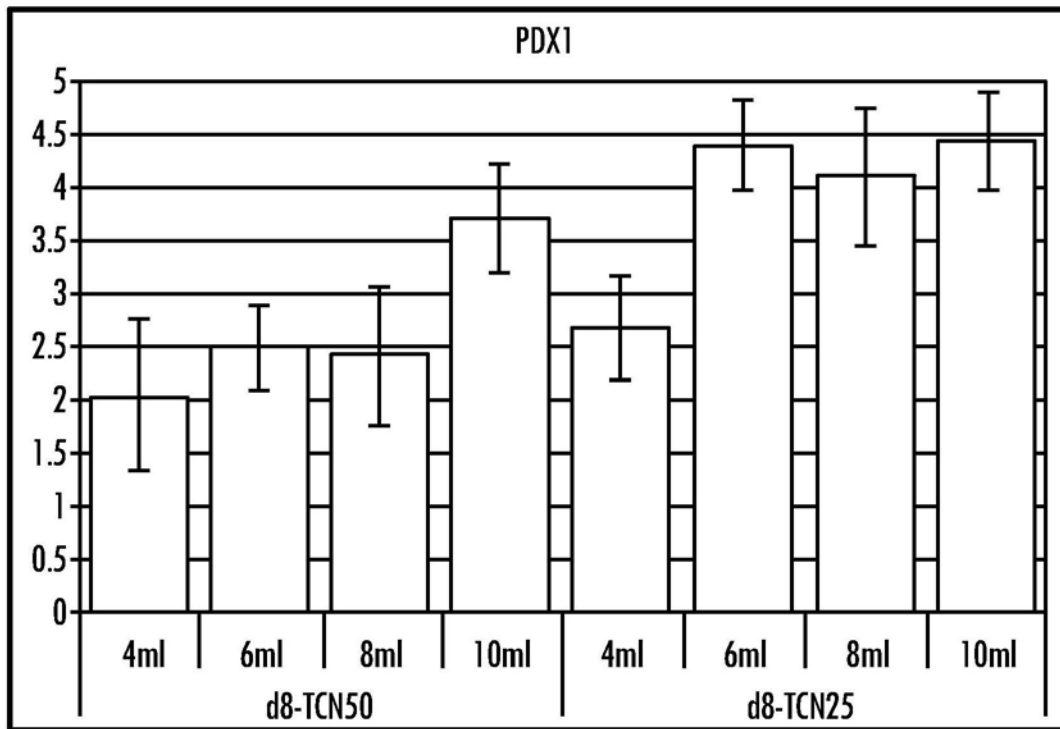


图24A

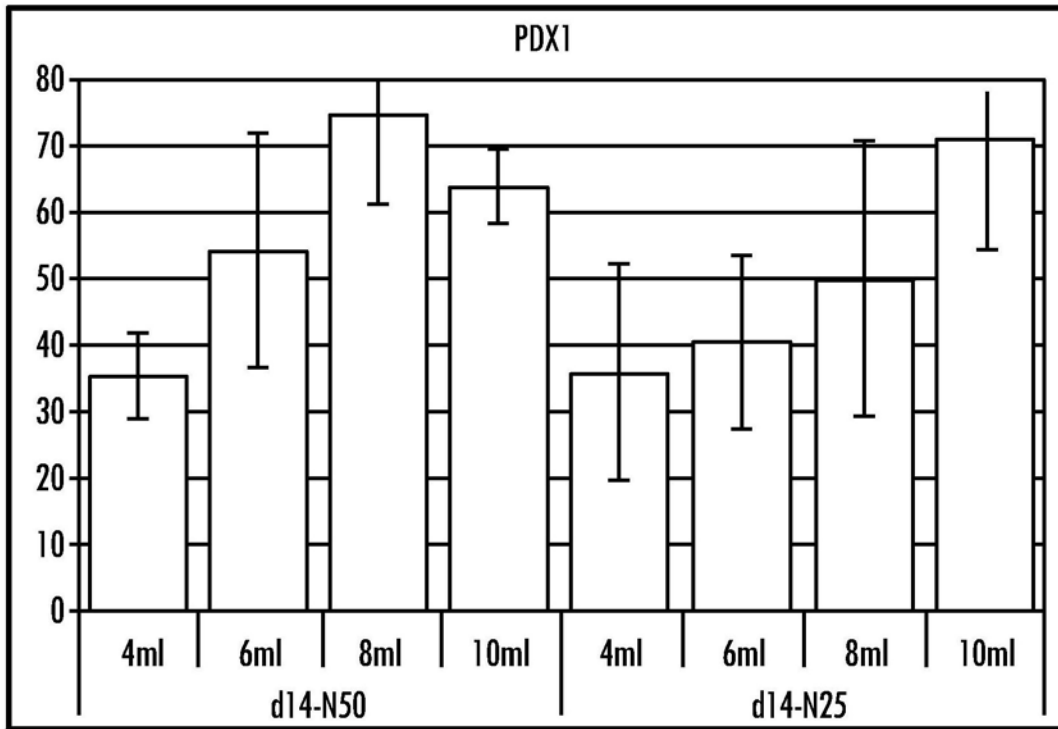


图24B

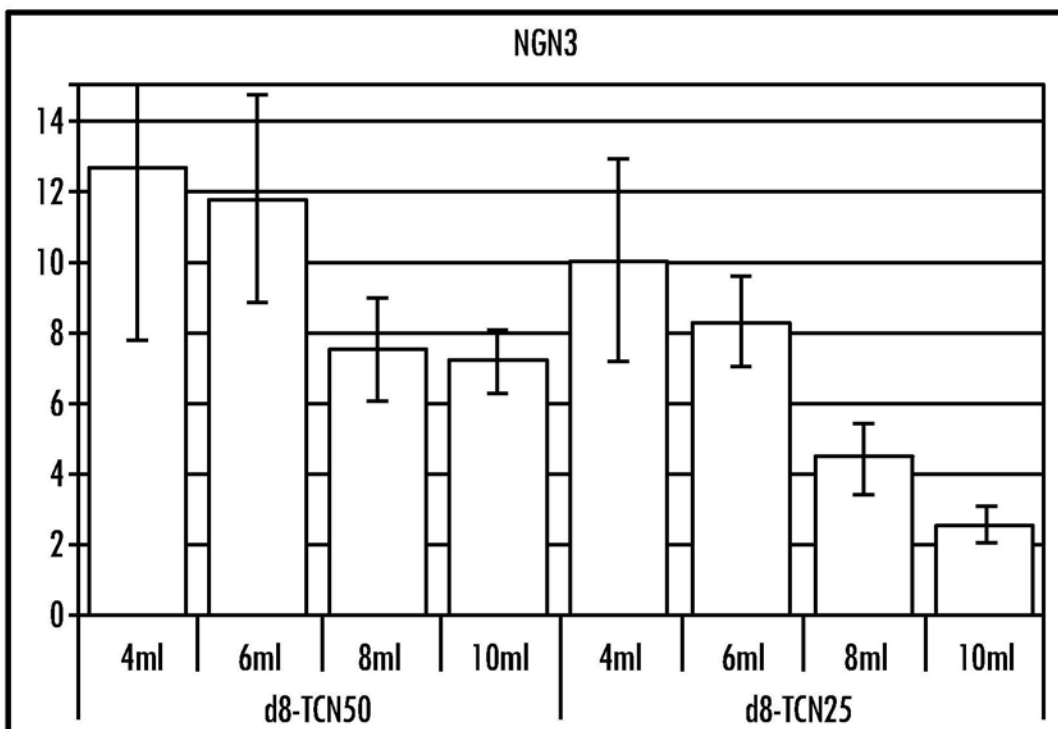


图24C

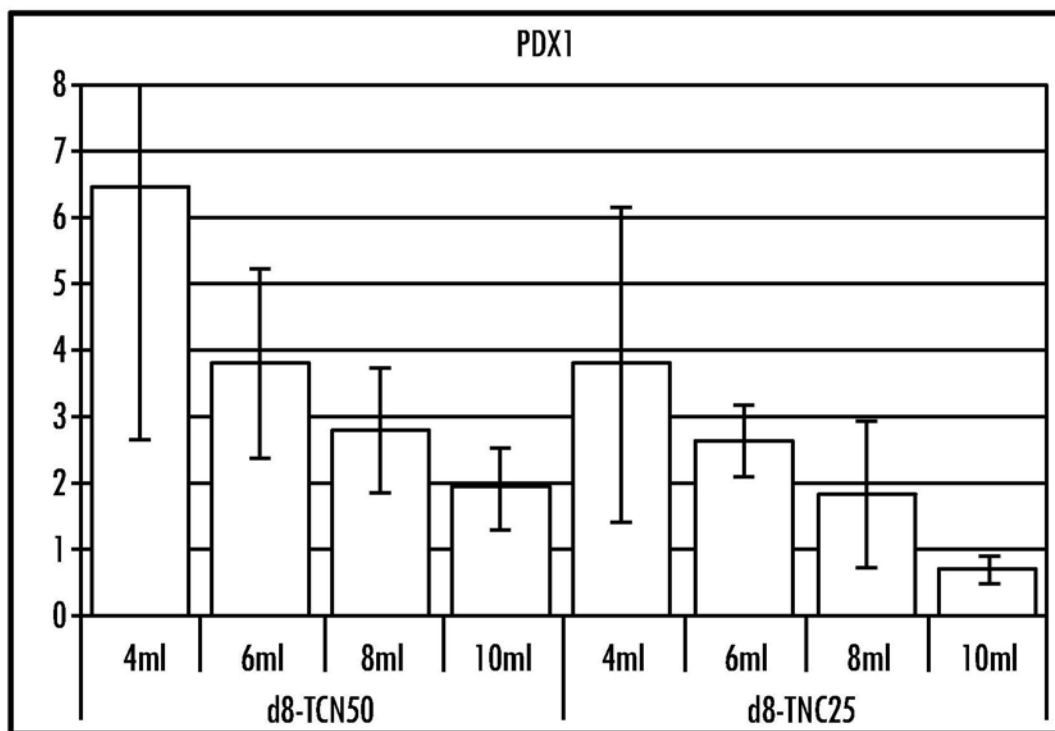


图24D

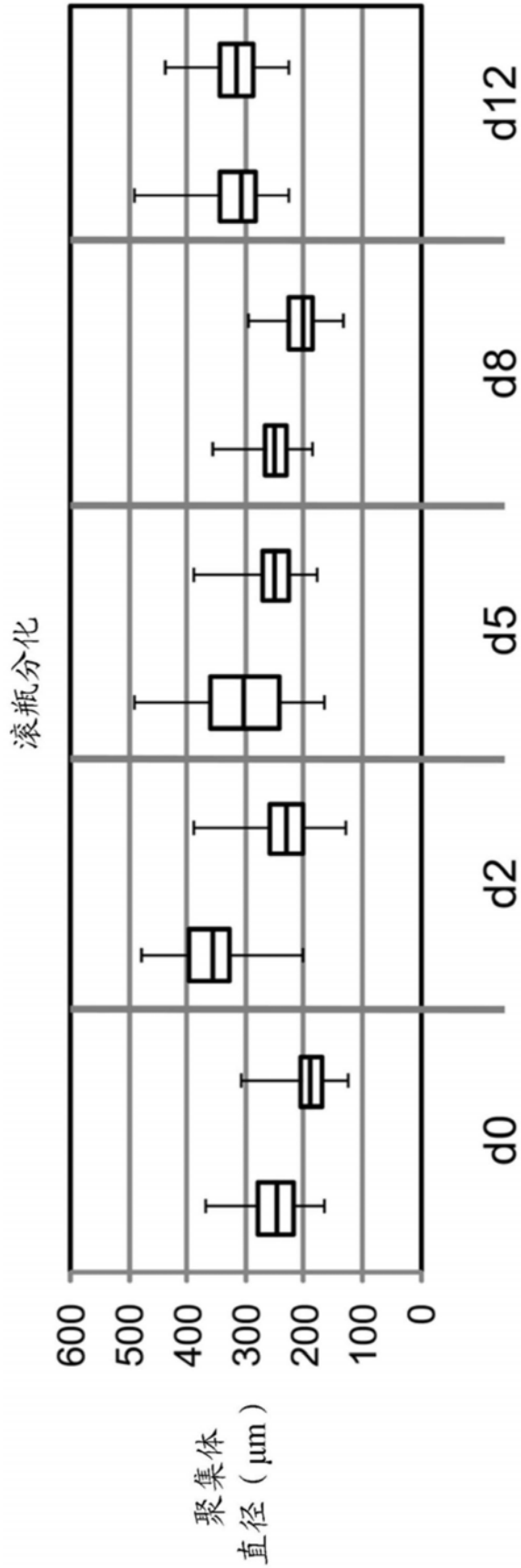


图25

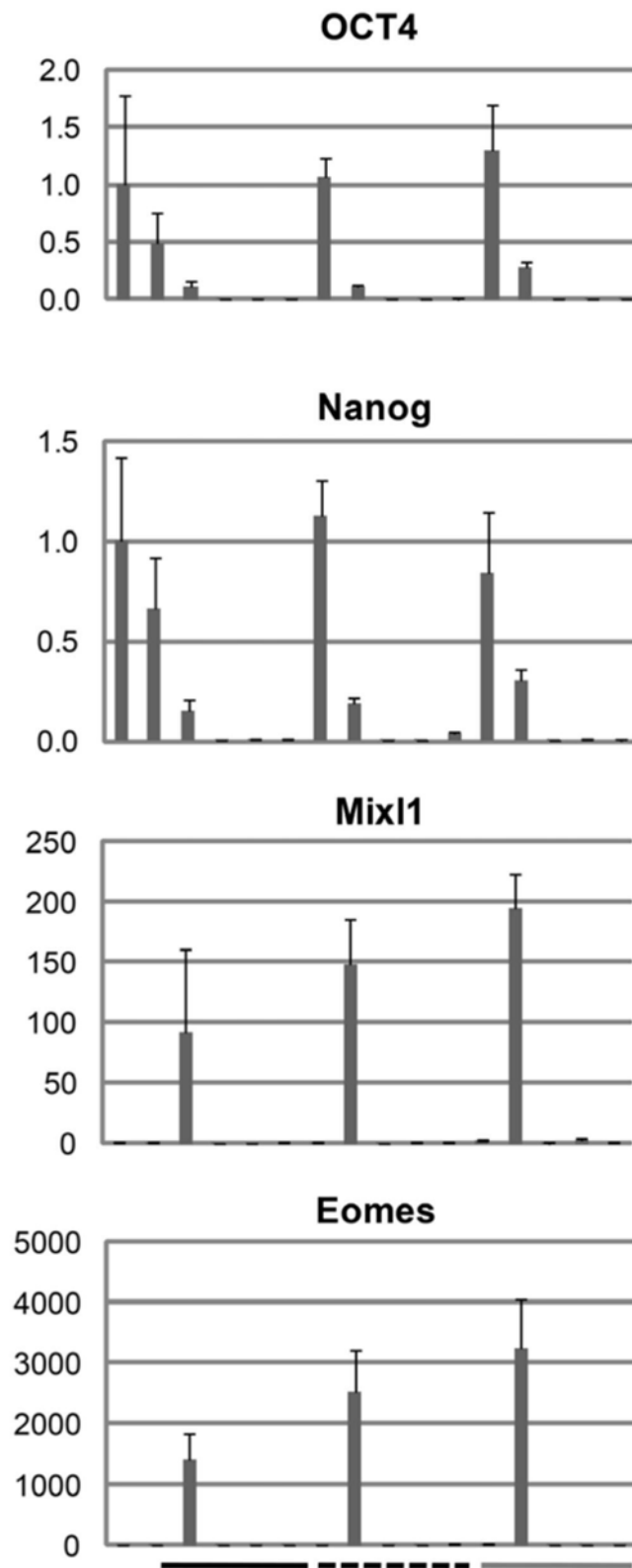


图26A

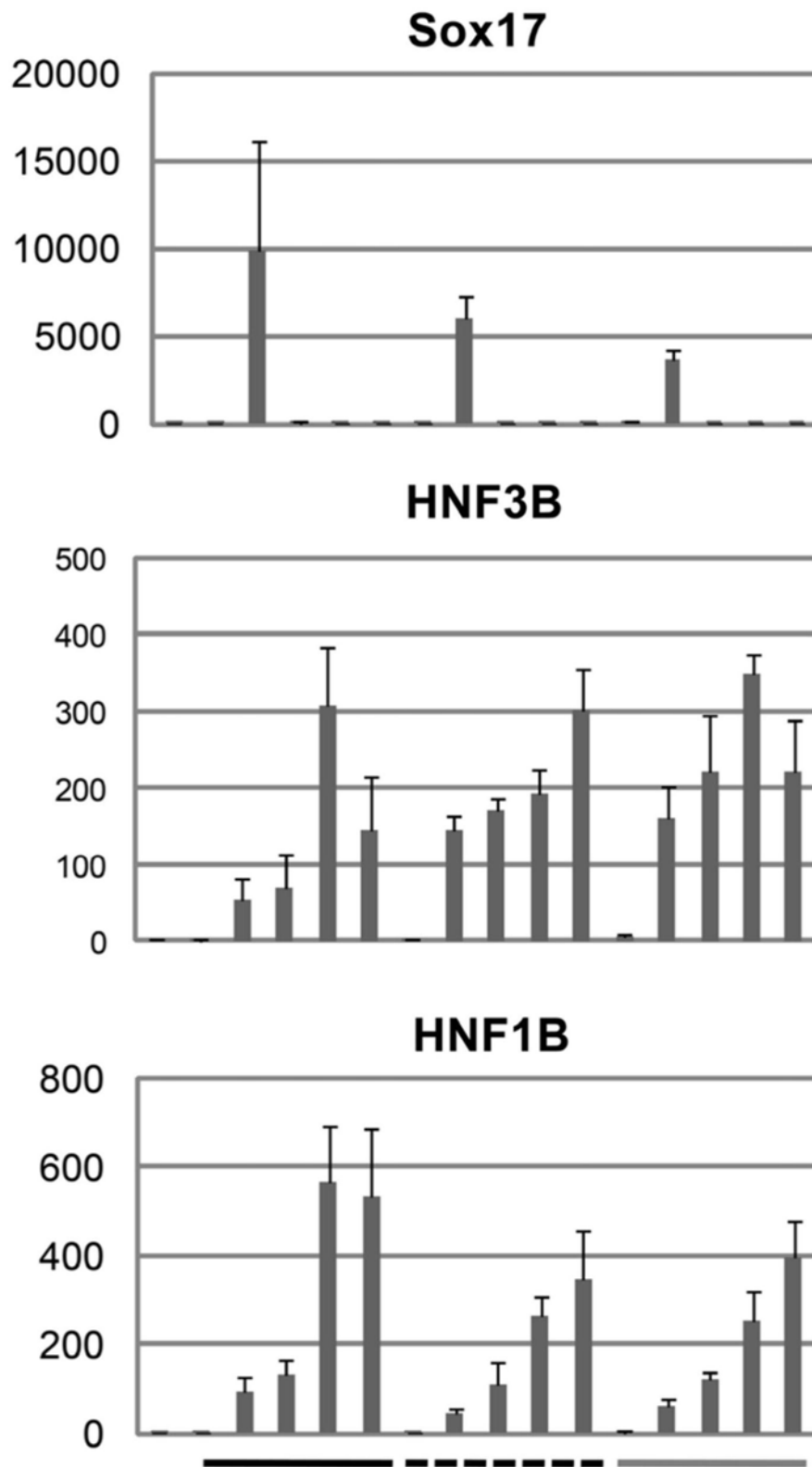


图26B

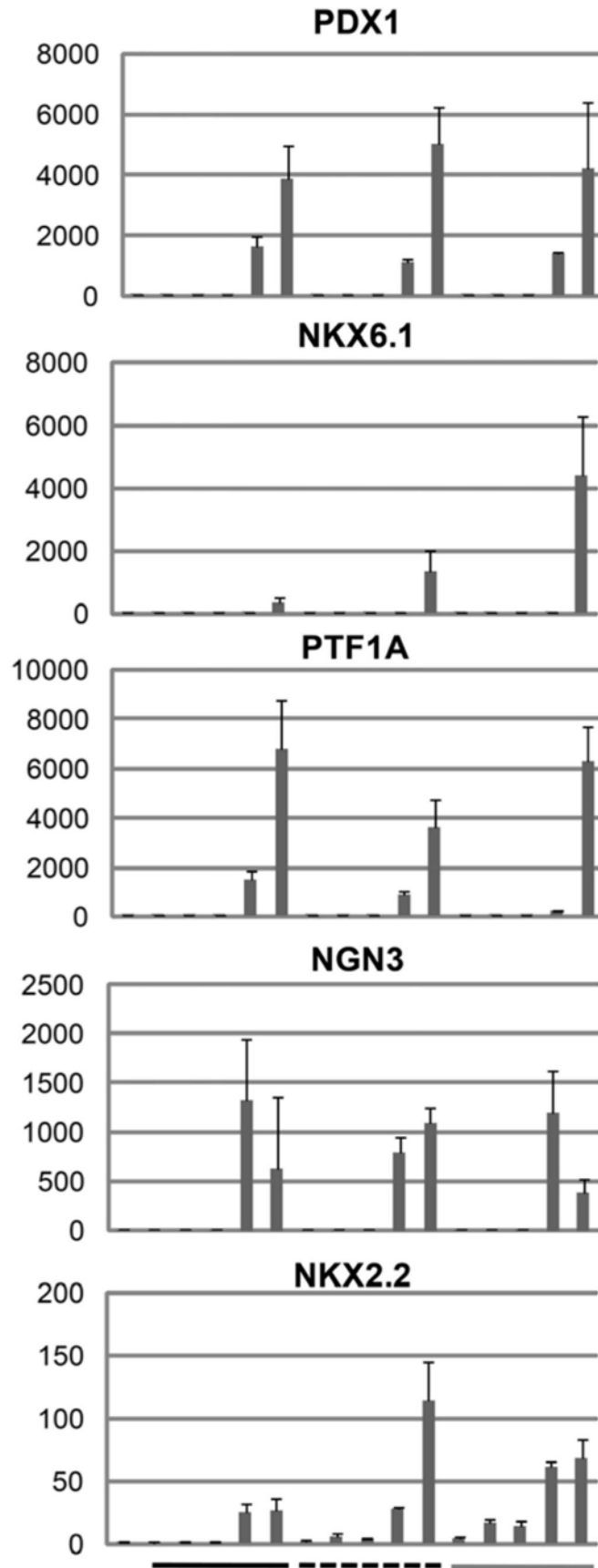


图26C

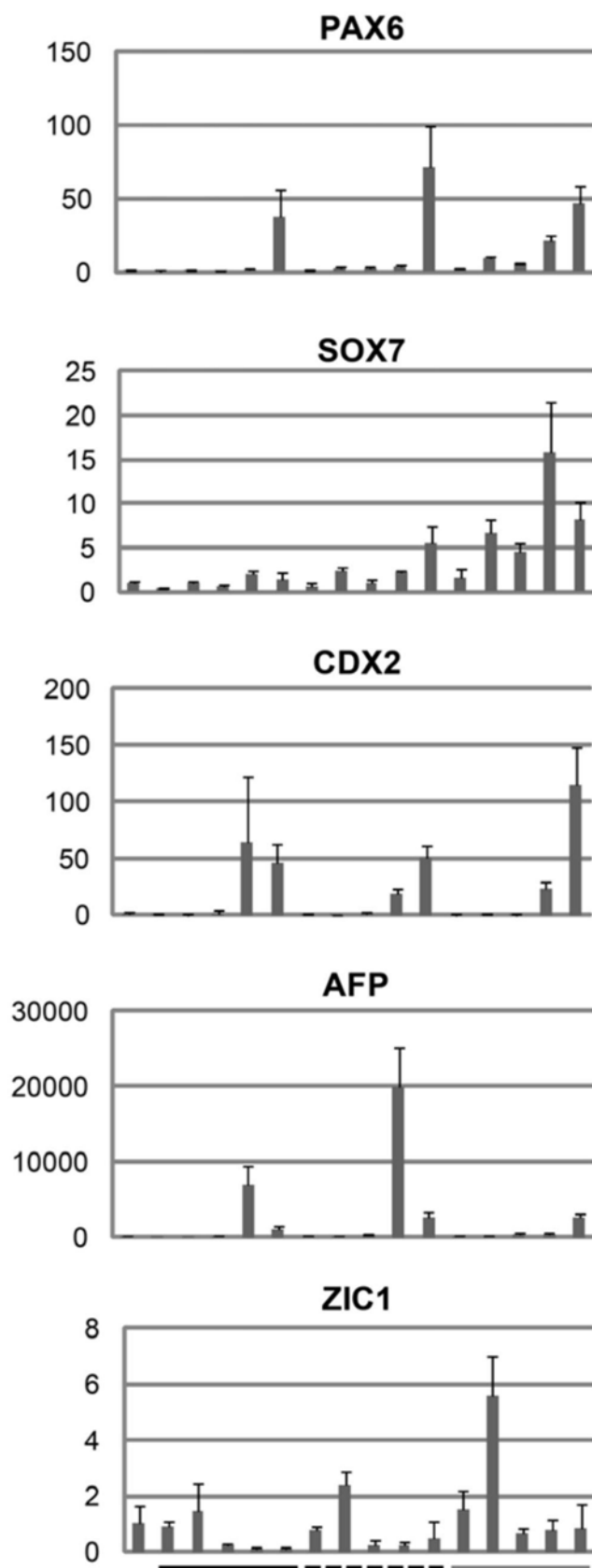


图26D

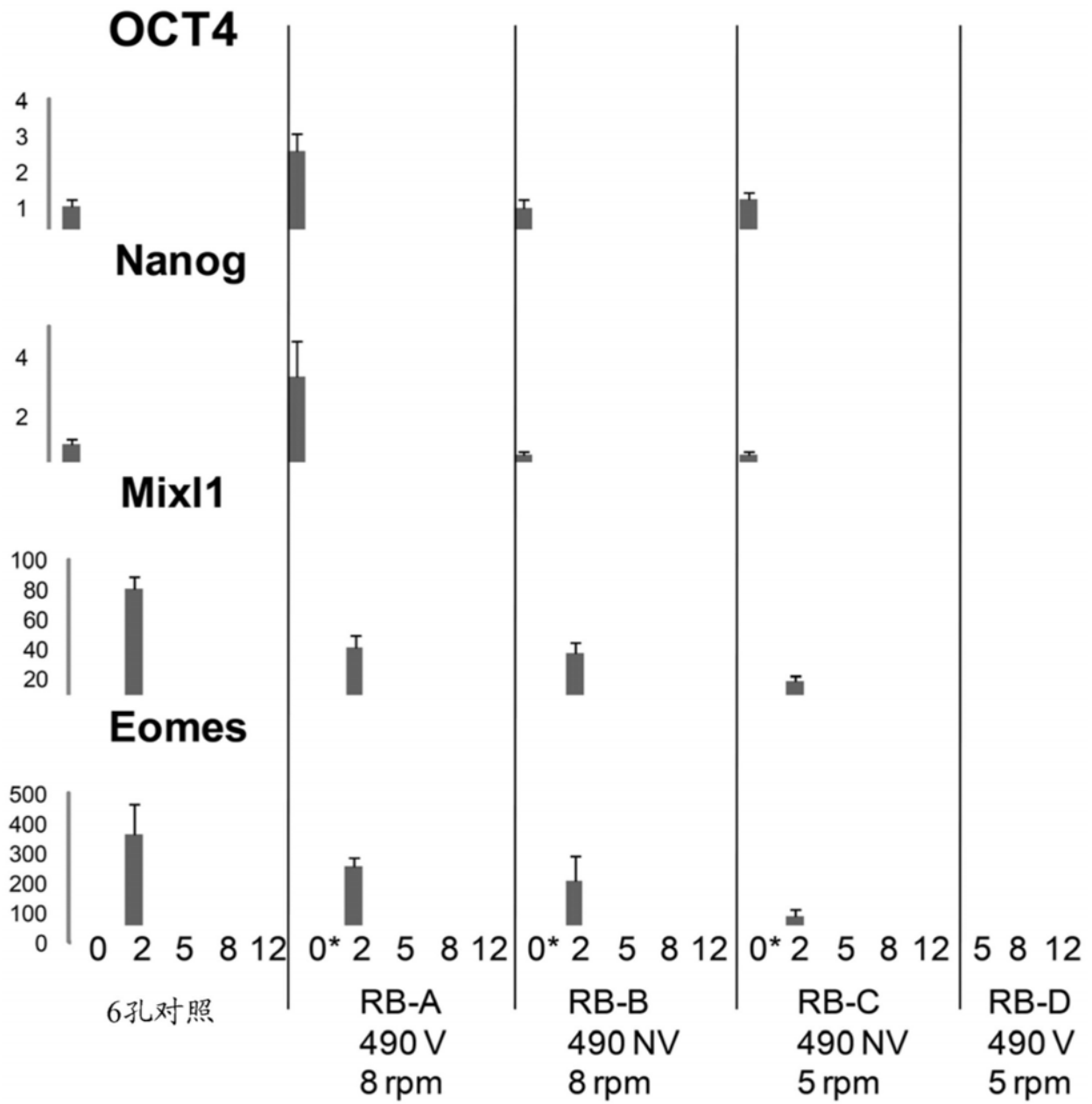


图27A

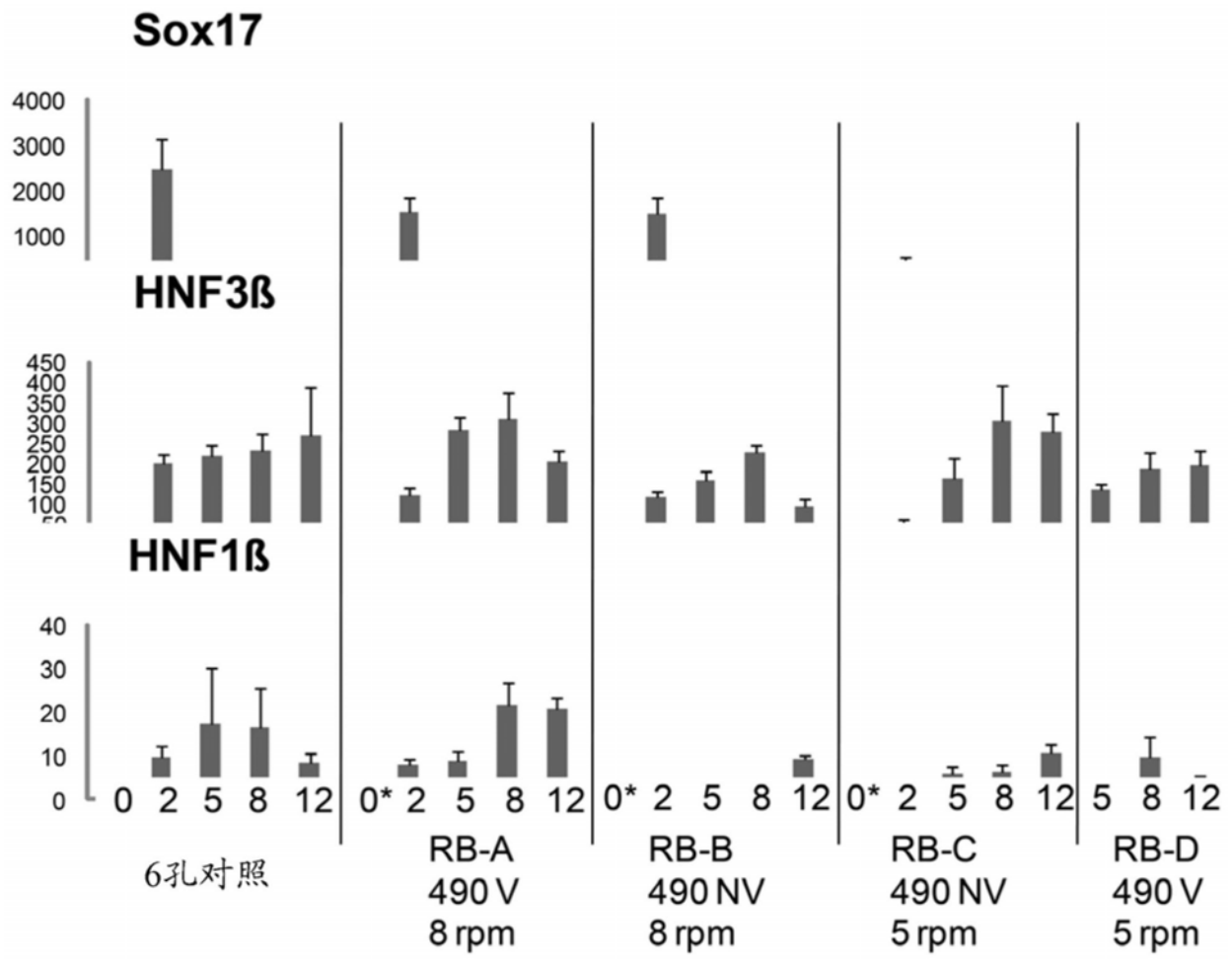


图27B

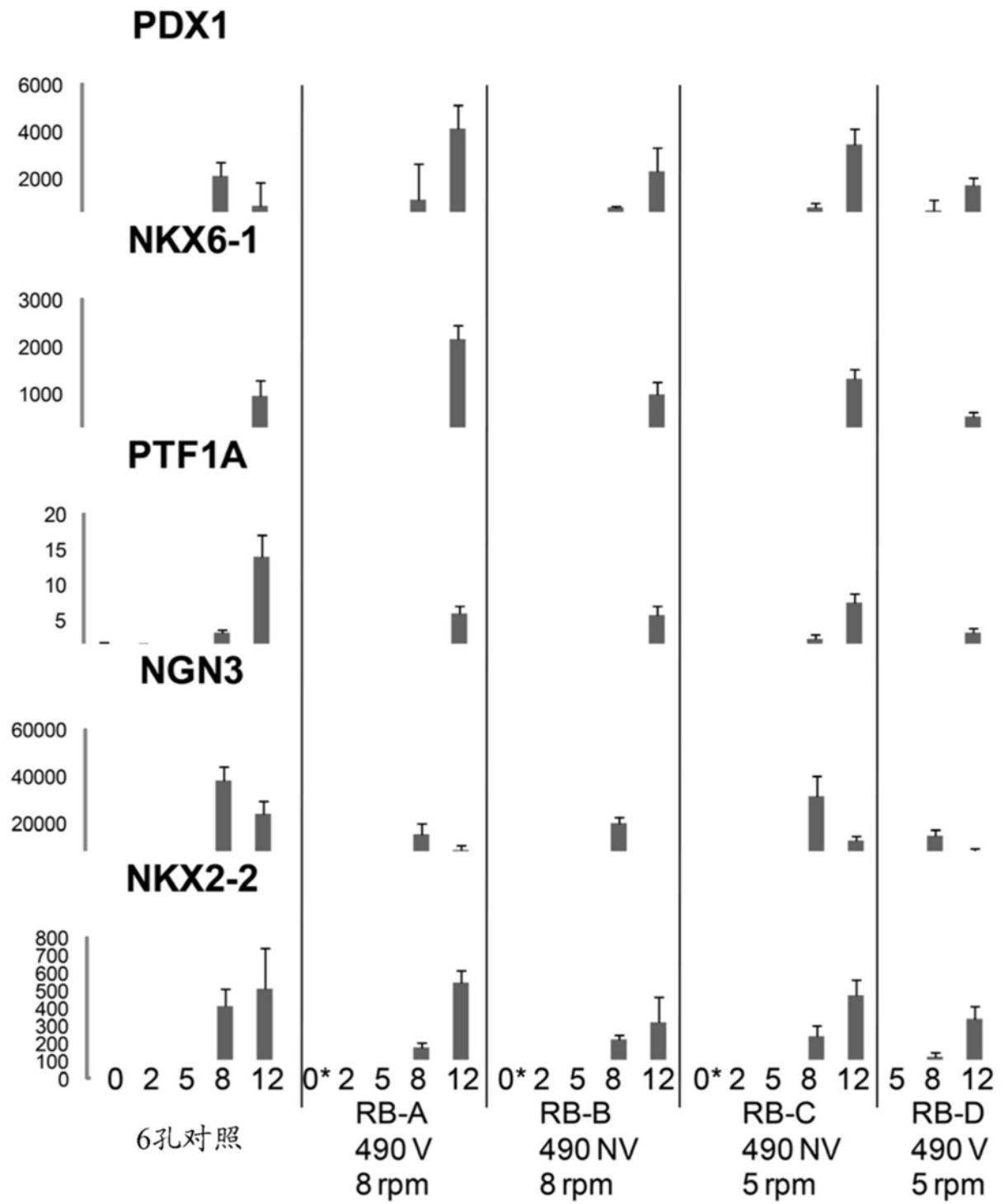


图27C

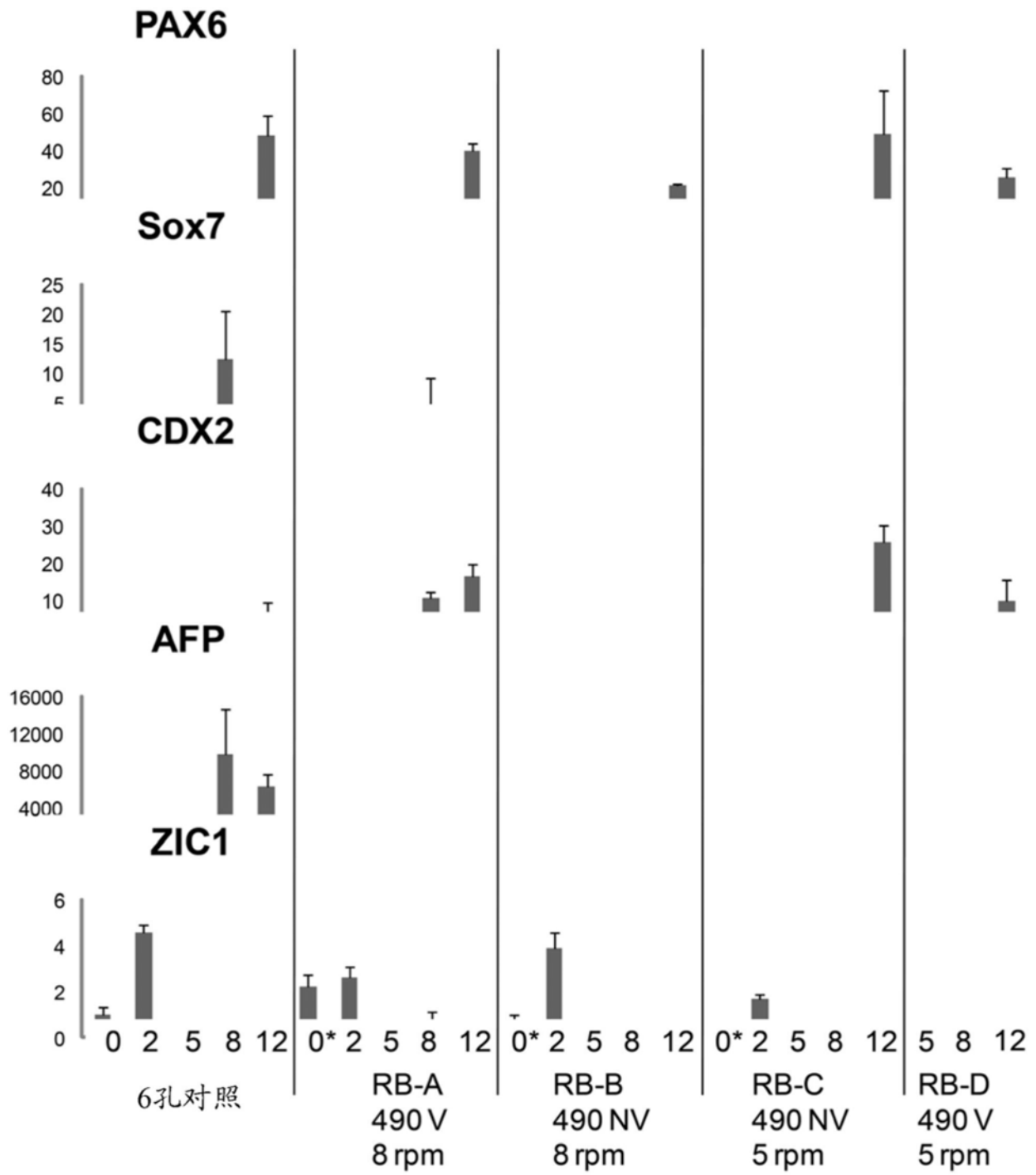


图27D