



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102361970 B

(45)授权公告日 2018.03.27

(21)申请号 200880132607.8

艾伦·阿库尔尼科 艾德·比特戈

(22)申请日 2008.11.04

凯文·达穆尔

(65)同一申请的已公布的文献号

托马斯·C·斯库尔兹

申请公布号 CN 102361970 A

艾伦·J·罗宾斯

(43)申请公布日 2012.02.22

(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

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

代理人 王达佐 洪欣

2011.07.01

(51)Int.Cl.

C12N 5/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C12N 5/02(2006.01)

PCT/US2008/082356 2008.11.04

(87)PCT国际申请的公布数据

(56)对比文件

W02010/053472 EN 2010.05.14

US 20060194321 A1, 2006.08.31,

(73)专利权人 韦尔赛特公司

US 20030203008 A1, 2003.10.30,

地址 美国加利福尼亚州

US 20080102063 A1, 2008.05.01,

(72)发明人 查德·格林 俞小洁 安妮·邦

审查员 安玉萍

尤金·P·布朗顿

权利要求书2页 说明书54页 附图38页

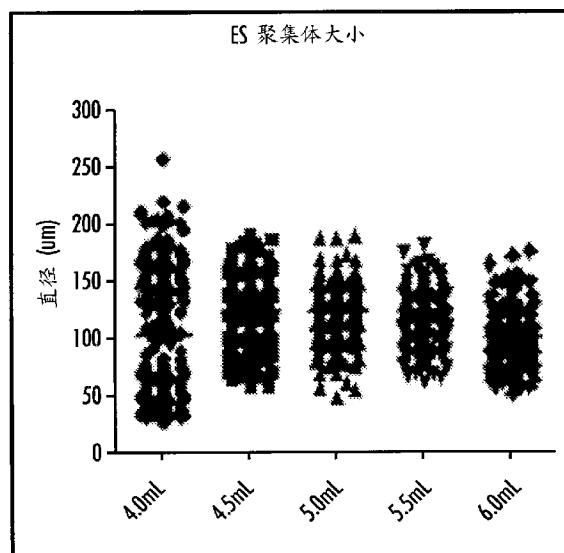
奥利维亚·凯利

(54)发明名称

干细胞聚集体悬浮组合物及其分化方法

(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. 生成hES衍生细胞悬浮聚集体的方法,包括:
  - (a) 提供未分化的贴壁hES细胞培养物,其中所述hES细胞是BG01,BG02,或BG03细胞;
  - (b) 将步骤(a)的所述贴壁hES细胞培养物解离为多能的hES细胞单细胞悬浮液;
  - (c) 将所述hES细胞单细胞悬浮液接种在支持所述hES细胞未分化生长的限定培养基中,由此形成hES细胞单细胞悬浮培养物;
  - (d) 以60rpm至140rpm转动所述hES细胞单细胞悬浮培养物,其中,所述悬浮培养物中的hES单细胞形成均一的hES细胞悬浮聚集体;以及
  - (e) 使所述hES细胞悬浮聚集体与分化培养条件接触,其中hES细胞悬浮聚集体形成hES衍生细胞悬浮聚集体,由此生成hES衍生细胞悬浮聚集体。
2. 如权利要求1所述的方法,其中将所述hES细胞单细胞悬浮培养物搅动至少30分钟。
3. 如权利要求1所述的方法,其中通过在80rpm至140rpm下的轨道旋转搅动所述hES细胞单细胞悬浮培养物。
4. 如权利要求1所述的方法,其中通过在100rpm至140rpm下的轨道旋转搅动所述hES细胞单细胞悬浮培养物。
5. 如权利要求1所述的方法,其中悬浮产生多个hES衍生细胞聚集体,并且所述hES衍生细胞悬浮聚集体的直径大小和形状实质上是均一的。
6. 如权利要求1所述的方法,其中所述hES衍生细胞聚集体是内胚层谱系特异性细胞聚集体。
7. 如权利要求6所述的方法,其中所述内胚层谱系特异性细胞聚集体选自胰腺谱系类型细胞聚集体、肝谱系类型细胞聚集体、上皮谱系类型细胞聚集体、甲状腺谱系细胞聚集体和胸腺谱系细胞聚集体。
8. 如权利要求6所述的方法,其中所述内胚层谱系特异性细胞聚集体是胰腺谱系类型细胞聚集体。
9. 如权利要求1所述的方法,其中所述hES衍生细胞聚集体是专能胰腺祖细胞聚集体或内分泌细胞聚集体。
10. 如权利要求1所述的方法,还包括在所述与分化培养条件接触的步骤之后,通过利用一种或多种可选择的标志物或试剂来选择或纯化hES衍生细胞聚集体的另外步骤。
11. 如权利要求10所述的方法,其中所述可选择的标志物或试剂选自CD30、CD49a、CD49e、CD55、CD98、CD99、CD142、CD165、CD200、CD318、CD334和CD340。
12. 如权利要求10所述的方法,其中所述选择或纯化hES衍生细胞聚集体通过利用细胞分选进行。
13. 如权利要求1所述的方法,还包括在所述与分化培养条件接触的步骤之后,使所述hES衍生细胞聚集体与生长因子接触的另外步骤,所述生长因子选自FGF10、EGF、KGF、头蛋白和视黄酸,由此富集hES衍生细胞聚集体培养物中的胰腺内胚层细胞,其中FGF10的浓度为25ng/mL,EGF的浓度为10ng/mL,KGF的浓度为25ng/mL,头蛋白的浓度为30ng/mL,以及视黄酸的浓度为1μM。
14. 如权利要求1所述的方法,还包括在所述与分化培养条件接触的步骤之后,使所述hES衍生细胞聚集体与生长因子接触的另外步骤,所述生长因子选自FGF10、EGF、KGF、头蛋白和视黄酸,由此富集hES衍生细胞聚集体培养物中的胰腺内胚层细胞,其中FGF10的浓度为25ng/mL,EGF的浓度为10ng/mL,KGF的浓度为25ng/mL,头蛋白的浓度为30ng/mL,以及视黄酸的浓度为1μM。

白和视黄酸,由此富集hES衍生细胞聚集体培养物中的胰腺内分泌细胞,其中FGF10的浓度为50ng/mL,EGF的浓度为50ng/mL,KGF的浓度为50ng/mL,头蛋白的浓度为100ng/mL,以及视黄酸的浓度为2μM。

15. 如权利要求1所述的方法,还包含向所述hES细胞单细胞悬浮培养物添加促进细胞存活的试剂,其中所述试剂选自Y-27632、法舒地尔、H-1152P以及包含胰岛素、转铁蛋白和硒的混合物。

16. 如权利要求1所述的方法,其中所述未分化的贴壁hES细胞培养物缺乏基底或基质,其中所述基底或基质选自细胞外基质、细胞外基质蛋白和人或小鼠饲养层。

17. 如权利要求1所述的方法,其中所述未分化的贴壁hES细胞培养物是无异种成分、无基质和无饲养层的。

18. 如权利要求1所述的方法,其中步骤(e)的所述分化培养条件包含活化TGF-β家族成员受体的TGF-β家族成员,其中所述TGF-β家族成员选自活化素A、活化素B、Nodal、GDF-8和GDF-11,由此生成定形内胚层细胞悬浮聚集体。

19. 如权利要求18所述的方法,还包括如下步骤:

(f) 使所述定形内胚层细胞悬浮聚集体与包含KGF和任选的TGF-β抑制剂的分化培养条件接触,由此生成PDX1-阴性前肠内胚层细胞悬浮聚集体。

20. 如权利要求19所述的方法,还包括如下步骤:

(g) 使所述PDX1-阴性前肠内胚层细胞悬浮聚集体与包含至少一种生长因子的分化培养条件接触,所述生长因子选自视黄酸、KAAD-环巴胺和任选的头蛋白,由此生成PDX1-阳性前肠内胚层细胞悬浮聚集体。

21. 如权利要求20所述的方法,还包括如下步骤:

(h) 使所述PDX1-阳性前肠内胚层细胞悬浮聚集体与包含至少一种生长因子的分化培养条件接触,所述生长因子选自FGF10、EGF、KGF、头蛋白和视黄酸,由此生成胰腺祖细胞悬浮聚集体或内分泌祖细胞悬浮聚集体。

22. 如权利要求21所述的方法,还包括通过增加步骤(h)的所述聚集体的细胞密度,富集所述胰腺祖细胞悬浮聚集体。

23. 如权利要求21所述的方法,还包括通过减少步骤(h)的所述聚集体的细胞密度,富集所述内分泌祖细胞悬浮聚集体。

24. 生成hES细胞衍生细胞悬浮聚集体的方法,包括:

(a) 提供未分化的贴壁hES细胞培养物,其中所述hES细胞是BG01,BG02,或BG03细胞;

(b) 使所述未分化的贴壁hES细胞与将所述hES细胞分化为贴壁hES细胞衍生细胞的分化培养条件接触;

(c) 将所述贴壁hES衍生细胞解离为单细胞悬浮培养物;以及

(d) 以60rpm至140rpm搅动所述单细胞悬浮培养物,其中,悬浮的所述hES衍生单细胞形成均一的hES衍生细胞聚集体,由此生成hES衍生细胞悬浮聚集体。

## 干细胞聚集体悬浮组合物及其分化方法

[0001] 关于联邦政府资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5 R24 RR021313-05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,对于真核哺乳动物细胞,特别是哺乳动物多能细胞(pluripotent cell)如人胚胎干(hES)细胞,还没有提供大规模生产方法(“放大的”)的有效系统。为了体外维持hES细胞处于未分化状态,一般将hES细胞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)和转移单独的克隆来传代。这些方法对于不需要大规模生产未分化的hES细胞或分化的hES细胞的调查研究是足够的,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,用于稳定地大规模扩增hES细胞,包括酶促传代。

[0006] 可以实施hES细胞的酶促扩增,但这些方法具有技术缺陷,因为hES细胞的存活依赖于细胞-细胞相互作用以及旁-和自分泌信号。因此,与以单细胞存在相比,hES细胞更喜欢这种细胞微环境。此外,据报道,hES细胞的酶促解离可以导致异常核型以及导致基因和基因外改变。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hES或分化的hES细胞稳健的大规模扩增(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,衍生自人胚胎干细胞(hESCs)的、产生胰岛素的 $\beta$ -细胞的使用会相对于目前利用供体胰腺细胞的细胞治疗方案提供巨大的改进。目前糖尿病的细胞疗法治疗利用来自供体胰腺的细胞,受限于需要移植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 $8 \times 10^8$ 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,胚胎干(ES)细胞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,ES细胞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WO 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)、畸胎癌细胞(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WO 97/32033

和U.S.Patent No.5,453,357描述了包括来自啮齿动物外物种的细胞的多能细胞。人ES细胞描述于国际专利申请WO 00/27995和U.S.Patent No.6,200,806中,以及人EG细胞描述于国际专利申请WO 98/43679中。

[0009] 调节ES细胞多能性和分化的生化机制了解的较少。然而,可以得到的有限的经验数据(和大量轶事证据)表明,多能ES细胞在体外培养条件下的持续维持依赖于存在于细胞外环境中的细胞因子和生长因子的存在。

[0010] 尽管人ESCs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下获得和/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化学限定培养基。这种化学限定/GMP标准条件的开发对于促进使用hESCs和衍生自hESCs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hESCs生长条件,这些研究仍有显著的局限性。然而迄今为止,成功的分离、长期的克隆维持、多能细胞的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., 2005 Stem Cells, 23:315-323; Xu et al., 2005 Nature Methods, 2:185-189; Beattie et al., 2005 Stem Cells, 23:489-495; Amit et al., 2004 Biol. Reprod., 70:837-845; James et al., 2005 Development, 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多能在含有FGF2、活化素A和胰岛素的化学限定培养基中的长期维持,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., 2005 J Cell Sci., 118 (Pt 19): 4495-509)。尽管FGF2是所有这些培养基中的组分,但并不清楚它是否是绝对必需的,特别是在如一些制剂中,是否必需使用高浓度的FGF2(高达100ng/mL, Xu et al., 2005 Nature Methods, 2:185-189)是不清楚的。

[0013] 此外,所用这些研究组在培养基中都添加了 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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”信号传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( $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水平)的存在/需要表明,主要活性是通过结合到由hESCs表达的IGF1受体来引发(Sperger et al., 2003 PNAS, 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传导途径成员在hESCs中的表达,其可能预示着该途径的功能活性(Miura et al., 2004 Aging Cell, 3:333-343)。胰岛素或IGF1可以引发hESCs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., 2005 Nat. Biotechnol., 23 (12): 1534-41; McLean et al., 2007 Stem Cells 25:29-38)。

[0014] 最近的出版物概括了hESCs的人源化的限定培养基(Ludwig et al., Nature

Biotechnology, published online January 1, 2006, doi:10.1038/nbt1177)。然而,这一最近制剂包括几种被认为影响hESCs增殖的因子,包括FGF2、TGF $\beta$ 、LiCl、 $\gamma$ -氨基丁酸和吡啶酸。注意,这一最近限定的细胞培养基也包含胰岛素。

[0015] EGF生长因子家族具有至少14个成员,包括但不限于EGF、TGF $\beta$ 、肝素结合-EGF(hb-EGF)、神经调节蛋白- $\beta$ (还称为hereregulin- $\beta$ (HRG- $\beta$ )、神经胶质生长因子以及其他)、HRG- $\alpha$ 、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 $\alpha$ 和hbEGF以高亲和力(1-100nM范围)结合ErbB1/1(EGFR)同源二聚体和ErbB1/2异源二聚体,而HRG- $\beta$ 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途径传导信号。ErbB2和ErbB3是hESCs中最高度表达的生长因子之一(Sperger et al., 2003PNAS, 100 (23) :13350-13355),先前已表明HRG- $\beta$ 支持小鼠原始生殖细胞的扩增(Toyoda-Ohno et al., 1999Dev.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., 2001Ann.Oncol., 12Suppl 1:S9-13; Zhou& Hung, 2003Semin.Oncol., 30 (5Suppl 16) :38-48; Yarden, 2001Oncology, 61Suppl 2:1-13)。人ErbB2(染色体17q)和ErbB3(染色体12q)存在于据观察在一些hESCs中作为三体聚集的染色体上(Draper et al., 2004Nat.Biotechnol., 22 (1) :53-4; Cowan et al., 2004N Engl.J.Med., 350 (13) :1353-6; Brimble et al., 2004Stem Cells Dev., 13 (6) :585-97; Maitra et al., 2005Nat.Genet. 37 (10) :1099-103; Mitalipova et al., 2005Nat.Biotechnol. 23 (1) :19-20; Draper et al., 2004Stem Cells Dev., 13 (4) :325-36; Ludwig et al., Nature Biotechnology, 网络发表于2006年1月1日, doi:10.1038/nbt1177)。

[0016] ErbB2和ErbB3(Brown et al., 2004Biol.Reprod., 71:2003-2011; 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),以及ErbB1、EGF和TGF $\beta$ 表达在人胚泡中(Chia et al., 1995Development, 1221 (2) :299-307)。HB-EGF在人IVF胚泡培养中具有增殖效应(Martin et al., 1998Hum.Reprod., 13 (6) :1645-52; Sargent et al., 1998Hum.Reprod. 13Suppl 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., 2005, Am.J.Phys.Cell Physiol., in press)。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., 1998Genes Dev., 12:1825-36),ADAM17-/(Peschon, et al., 1998Science, 282:1281-1284)和ADAM19-/(Horiuchi, 2005Dev.Biol., 283 (2) :459-71)无效胚胎中不受影响。因此,hESCs中通过ErbB受体家族传导信号的重要性目前并不清楚。

[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, 2003Exp.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/hereregulin。HRG- $\alpha$ 和- $\beta$ 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: 227-231)。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)信号传导。

[0018] 在培养物中维持多能hESC研究进展中的重要发展仍是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hESCs培养基的可利用性,但化学上未限定的组分是可接受的,如果它们的生产符合GMP标准。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生产符合GMP标准。

[0019] 发明概述

[0020] 本发明涉及包含基础盐营养溶液和ErbB3配体的组合物,该组合物实质上无血清。

[0021] 本发明还涉及包含基础盐营养溶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。

[0022] 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,提供给可分化的细胞基础盐营养溶液以及提供特异结合ErbB3的配体。

[0023] 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,并提供给可分化的细胞基础盐营养溶液。

[0024] 本发明还涉及培养可分化细胞的方法,该方法包括提供给在消化前包含在培养室中的可分化细胞层消化液,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,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。

[0025] 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细胞;将贴壁hES细胞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旋转来实施。

[0026] 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细胞与适于分化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旋转来实施。

[0027] 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。

[0028] 附图简述

[0029] 图1描绘了ADAM19、神经调节蛋白1和ErbB1-3在生长于限定条件(8ng/mL FGF2, 100ng/mL LR-IGF1, 1ng/mL活化素A)的BG01v中的实时RT-PCR表达分析。显示了GAPDH和OCT4对照反应。

[0030] 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-20μM AG1478 (B) 或100nM-20μM 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20μM)下看起来不影响增殖，但AG879在5μM (C) 显著减慢细胞生长。

[0031] 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)。

[0032] 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。

[0033] 图5描绘了ErbB1和ErbB2信号传导在小鼠ES细胞中的抑制。将 $2 \times 10^5$ 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)、1-50μM AG1478或1-50μM 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1-50μM AG1478 (B和C) 没有明显抑制增殖。AG879在50μM显著抑制细胞生长(比较D和F)，以及在20μM (E) 可能已减缓增殖。

[0034] 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) 50μM AG825抑制生长在CM中的BG02hESCs的增殖。(B) AG825抑制hESCs中ErbB2Y1248磷酸化。(C) CyT49hESCs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BG01 DC-HAIF hESCs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)。

[0035] 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 $2 \times 10^5$ 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。

[0036] 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BG02 DC-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47,296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BG02 DC-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软件生成的不同群中相对基因表达的分级群聚(Hierarchical clustering)系统树图。

[0037] 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MATRIGEL™(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)VITROGRO<sup>TM</sup>的组织培养皿中。

[0038] 图10描绘了人ES细胞的单细胞传代。(A-D)用ACCUTASE<sup>TM</sup>传代并以约 $5 \times 10^5$ 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ACCUTASE<sup>TM</sup>传代19次的BG02培养物显示的正常雄性核型。

[0039] 图11描绘了利用(A)ACCUTASE<sup>TM</sup>、(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。

[0040] 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 $>10^{10}$ 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、CRYPTO、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 $\alpha$ -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。

[0041] 图13描绘了生长在包含HRG- $\beta$ 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)。

[0042] 图14描绘了来自维持在DC-HAIF(32代)或DC-HAI(10代)中的hESCs(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hESCs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 $>0.99$ (R<sup>2</sup>选择,由虚椭圆形显示的点)的转录物生成相关系数(R<sup>2</sup>)。成角度的线显示了2-倍差异的均值和极限。

[0043] 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( $\sim 0.0075$ ),并与维持在条件培养基(CM)( $\sim 0.037$ )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<sup>TM</sup>单细胞传代;DC-HAI与本文定义的DC-HAIF相同,除了没有FGF2外。

[0044] 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( $10^4$ 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( $10^3$ 细胞/孔)的(C)相衬成像和(D)碱性磷酸酶染色。

[0045] 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。

[0046] 图18描绘了在DC-HAIF中的贴壁和悬浮培养物的生长率。将 $1 \times 10^6$ 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。

[0047] 图19描绘了悬浮和贴壁hESCs的qPCR分析。悬浮(S.hESCs)和贴壁(hESCs)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hESCs两者均展示了预期的OCT4的显著下调和SOX17表达的上调。

[0048] 图20描绘了在Y27632存在下、在悬浮培养中hESC聚集的增强。将 $2 \times 10^6$ 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。

[0049] 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。

[0050] 图22A-N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 $\beta$ (图面D)、HNF1 $\beta$ (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。

[0051] 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。

[0052] 图24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。

### [0053] 发明详述

[0054] 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。

[0055] 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衍生的细胞培养物的单细胞悬浮液产生hES细胞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hESCs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。

[0056] 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，分化培养基例如分化培养基试剂，优选TGF $\beta$ 家族成员，其能够活化TGF $\beta$ 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。

[0057] 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 2005和2006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。

[0058] 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的方法,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。

[0059] 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(1998Supplement)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(a cell)”可以指可以利用至少一个细胞。

[0060] 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。

[0061] 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体活力和性能相关,以及提供可以用于放大的标准化变量,需要表征在多种培养容器、皿、生物反应器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。

[0062] 剪切率和剪切应力是定义系统内流体剪切的机械特征。剪切率被定义为给定距离内流体的速率,并被表示为 $\text{sec}^{-1}$ 。剪切率与剪切应力成比例,其中剪切率( $\gamma$ )=剪切应力( $t$ )/粘度( $\mu$ )。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/ $\text{cm}^2$ 或 $\text{N}/\text{m}^2$ )。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 $\text{sec}/\text{cm}^2$ =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°C温度下为1.0至1.1cp。密度和温度都能影响流体的粘度。

[0063] 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)的无因次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。

[0064] 按照Henzler (Henzler, 2000, Particle stress in bioreactors, In Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Scherer, 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)<sup>湍流指数</sup>。剪切应力等于无因次应力\*流体密度\*(运动粘度\*功率输入)<sup>0.5</sup>。剪切率等于剪切应力/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)<sup>2</sup>/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率计算随旋转率变化。

[0065] 而且,剪切应力和剪切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率随着旋转时间增加。对于100–200μm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)<sup>3</sup>)<sup>0.5</sup>。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。

[0066] 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。

[0067] 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。

[0068] 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细胞单细胞悬浮液或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hES细胞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细胞或hES衍生细胞培养系统的方法，所述hES细胞或hES衍生细胞培养系统能够支持未分化的多能hES细胞或分化的hES细胞的长期维持和有效扩增。

[0069] 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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。

[0070] 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hES细胞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。

[0071] 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（supplement）、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，提供了不含血清的限定培养基，或者是100%无血清的，或者是基本上无血清的。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、赋形剂等意指处理过程、方法、溶液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至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%相似。

[0072] 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。

[0073] 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。

[0074] 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。

[0075] 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。

[0076] 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。

[0077] 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., 1989Molecular Cloning(分子克隆), Second Edution (第二版), Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York; Maniatis et al., 1982Molecular 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., (Eds.) 1983Meth. Enzymol. 100 and 101; Grossman and Moldave (Eds.) 1980Meth. Enzymol. 65; Miller (ed.) 1972Experiments in Molecular Genetics(分子遗传学实验), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; Old and Primrose, 1981Principles of Gene Manipulation(基因操作原理), University of California Press, Berkeley; Schleif and Wensink, 1982Practical Methods in Molecular Biology(分子生物学实践方法); Glover (Ed.) 1985DNA Cloning Vol. I and II, IRL Press, Oxford, UK; Hames and Higgins (Eds.) 1985Nucleic Acid Hybridization(核酸杂交), IRL Press, Oxford, UK; 以及Setlow and Hollaender 1979Genetic 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。

[0078] 本发明涉及包括基础盐营养溶液和有效量的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溶液和用于活化ErbB2-定向的酪氨酸激酶的手段。

[0079] 尽管本文描述的基础盐营养溶液被应用于维持hES细胞的细胞生长和活力,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HEScGRO(Millipore)、基于DMEM的培养基等。

[0080] 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hES细胞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hES细胞孵育在含有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°C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hES细胞的平板效率(plating efficiency)与培养在PCT/US2007/062755描述的DC-HAIF中的或者培养在利用MATRIGELTM作为ECM的DC-HAIF培养基或者其他类似基质中的hES细胞所观察的平板效率是可比较的。用于在基本上无血清的限定培养基中培养hES细胞的方法描述于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的美国申请中,该美国申请通过引用的方式以其整体并入本文。

[0081] 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Thomson, J.享有的美国专利7,005,252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hES细胞。

[0082] 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。

[0083] 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: $\alpha$ (ROCK2)和 $\beta$ (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、在其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。

[0084] 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、 $\alpha$ -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。

[0085] 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的。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、放大和制备。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%。

[0086] 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形细胞聚集体,但大小和形状仍是均一的。

[0087] 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)。

[0088] 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hES细胞组成、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-阳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。

[0089] 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hES细胞”、“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。

[0090] 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、PDX-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%。

[0091] 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)。

[0092] 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hES细胞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悬浮培养物用于分化,基本上如在前面d' Amour 2005&2006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。

[0093] 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。

[0094] 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Shamblott, 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U.S. Pat. No. 5,670,372和Shamblott, et al., 同上。

[0095] 存在多种制备EBs的方法,例如,Ng et al. (2008) Nature Protocols 3 (5) : 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,如上文的Bauwens et al (2008) 所述。然而,这些方法对于hES细胞和hES衍生细胞的大规模制备(生产)而言成本过高且效率较低,因为它们在放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hES细胞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hES细胞和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。最后,在所有这些方法学中,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。

[0096] 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。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., Blood. 2005 106 (5) : 1601)。然而,在本工作中,研究者们在静态聚集培养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,ES细胞聚集和分化的该方案不生成胚状体。

[0097] 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。

[0098] 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。

[0099] 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。

[0100] 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、 $\alpha$ -甲胎蛋白(AFP)、凝血调节蛋白(TM)、SPARC、SOX7和HNF4 $\alpha$ 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的美国申请中,该申请整体并入本文。

[0101] 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PDX阳性内胚层,前肠内胚层细胞表达的SOX17、HNF1B、HNF1 $\alpha$ 、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的美国申请中,该申请通过引用的方式以其整体并入本文。

[0102] 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。

[0103] 在本发明的其他实施方案中，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。

[0104] 可选择地，本发明的其他实施方案涉及“PDX1-阳性胰腺内胚层顶细胞”或其等同物的细胞培养物。在一些实施方案中，PDX1-阳性胰腺内胚层顶细胞表达的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-阳性胰腺内胚层顶细胞额外表达的PTF1A、CPA和cMYC的水平增加。PDX1-阳性胰腺内胚层顶细胞还表达低至零水平的NGN3、PAX4、ARX和NKX2.2、INS、GCG、GHRL、SST以及PP。

[0105] 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 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 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。

[0106] 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 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 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、PAX4、ARX和NKX2.2。

[0107] 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“PDX1 EXPRESSING DORSAL AND VENTRAL FOREGUT ENDODERM (PDX1表达的背和腹部前肠内胚层)”的相关美国申请11/588,693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的美国申请，这两篇美国申请通过引用的方式整体并入本文。

[0108] 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、寡能和单能组细胞,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,专能造血组细胞和/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的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。

[0109] 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。

[0110] 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。

[0111] 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。

[0112] 可以利用本领域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。

[0113] 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。

[0114] 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。

[0115] 组合物和方法包括基础盐营养溶液。如本文使用的，基础盐营养溶液指盐的混合物，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。基础盐营养溶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 (αMEM)、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，基础盐营养溶液是DMEM和Ham's F12近似50:50的混合物。

[0116] 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、镁、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<sub>3</sub>、AgNO<sub>3</sub>、Ba(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>、CdCl<sub>2</sub>、CdSO<sub>4</sub>、CoCl<sub>2</sub>、CrCl<sub>3</sub>、Cr<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、CuSO<sub>4</sub>、柠檬酸铁、GeO<sub>2</sub>、KI、KBr、Li、钼酸、MnSO<sub>4</sub>、MnCl<sub>2</sub>、NaF、Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>、NaVO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>、NiSO<sub>4</sub>、RbCl、硒、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>、亚硒酸二钠、硒基甲硫氨酸、SnCl<sub>2</sub>、ZnSO<sub>4</sub>、ZrOCl<sub>2</sub>，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。

[0117] 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。

[0118] 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500mg/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。

[0119] 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0.001μM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0.005μM、0.01μM、0.05μM、0.1μM、0.5μM、1.0μM、2.0μM、2.5μM、3.0μM、4.0μM、5.0μM、10μM、20μM、100μM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。在一具体实施方案中，组合物和方法包括维生素D3和ATP。在一具体实施方案中，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。在一具体实施方案中，组合物和方法包含谷氨酰胺和ATP。在一具体实施方案中，组合

物和方法包含 $\omega$ -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 $\omega$ -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 $\alpha$ -亚麻酸和B2。

[0120] 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。

[0121] 本发明的组合物和方法还包含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。

[0122] 如本文使用的，“ErbB3配体”指结合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- $\beta$ 、HRG- $\alpha$ 、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- $\beta$ ，外调蛋白(Epiregulin)和双调蛋白(Biregulin)。

[0123] 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- $\beta$ (HRG- $\beta$ )、Heregulin- $\alpha$ (HRG- $\alpha$ )、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 $\beta$ (NRG2- $\beta$ )、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。

[0124] 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- $\beta$ 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- $\beta$ 序列相同的氨基酸序列的HRG- $\beta$ 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- $\beta$ 序列相同的氨基酸序列的HRG- $\beta$ 用作培养基的添加剂，并且被视为“不同种类的”。

[0125] 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- $\beta$ 的功能片段能够可检测地刺激ErbB2-定向的酪氨酸激酶。

[0126] 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。

[0127] 例如, 具有与参考氨基酸序列 (例如, 编码TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 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。

[0128] 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义, 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 Heijne, 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, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (i) :387 (1984))、BLASTP、ExPASy、BLASTN、FASTA (Atschul, S.F., et al., J Molec Biol 215:403 (1990)) 和FASTDB。确定同一性和相似性的方法的实例讨论于 Michaels, G. and Garian, R., Current Protocols in Protein Science (蛋白质科学最新方法), Vol 1, John Wiley&Sons, Inc. (2000), 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。

[0129] 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 (Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990), 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。

[0130] 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,通过将在不匹配/对齐的参考序列的N末端和C末端的查询序列碱基的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。

[0131] 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除。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。

[0132] 本发明还提供了嵌合的或融合多肽。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。

[0133] 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。

[0134] 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。

[0135] 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- $\beta$ 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。

[0136] 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: $\alpha$ 和 $\beta$ 。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- $\alpha$ 32%相同,与EGF 27%相同。

[0137] 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 $\alpha$ 或 $\beta$ 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,EP 505 148;WO 93/22424;和WO 94/28133,其通过引用的方式并入本文。

[0138] 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 $\mu$ g/mL的胰岛素。

[0139] 如本文所用的,术语“胰岛素”指在正常生理浓度下结合胰岛素受体并且能够诱导经由胰岛素受体的信号传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传导的多肽片段。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。

[0140] 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。

[0141] 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、[Arg<sup>3</sup>] IGF-1、[Ala<sup>31</sup>] IGF-1、Des (2, 3) [Ala<sup>31</sup>] IGF-1、[Leu<sup>24</sup>] IGF1、Des (2, 3) [Leu<sup>24</sup>] IGF-1、[Leu<sup>60</sup>] IGF-1、[Ala<sup>31</sup>] [Leu<sup>60</sup>] IGF-1、[Leu<sup>24</sup>] [Ala<sup>31</sup>] IGF-1、以及其组合。在另一实施方案中，IFG-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。

[0142] 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Nodal1、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。

[0143] 应考虑到，如果存在Nodal1，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1000ng/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。

[0144] 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。

[0145] 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50ng/mL,更特别是约1ng/mL至约25ng/mL,更特别是1ng/mL至约12ng/mL,或者最特别是浓度为约8ng/mL。

[0146] 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)。

[0147] 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。

[0148] 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“平板接种(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MATTRIGEL<sup>TM</sup>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。

[0149] 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。

[0150] 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。

[0151] 在某些实施方案中，组合物和方法包括BMP信号传导的灭活剂。如本文所用，“BMP信号传导的灭活剂”指通过任一可能的信号传导途径拮抗一种或多种BMP蛋白或其任一上游或下游信号传导组分活性的试剂。用于灭活BMP信号传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信号传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)。

[0152] 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。

[0153] 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(TNFα)、肿瘤坏死因子-β(TNFβ)、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。

[0154] 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溶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。

[0155] 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。

[0156] 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。

[0157] 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N.E.Timmins, et al. (2004) Angiogenesis 7, 97-103; W.Dai, et al., (1996) Biotechnology and Bioengineering 50, 349-356; R.A.Foty, et al. (1996) Development 122, 1611-1620; G.Forgacs, et al. (2001) J.Biophys. 74, 2227-2234 (1998); K.S.Furukawa, et al., Cell Transplantation 10, 441-445; R.Glicklis, et al. (2004) Biotechnology and Bioengineering 86, 672-680; Carpenedo et al., (2007) Stem Cells 25, 2224-2234; 以及T.Korff, et al., (2001) FASEB J. 15, 447-457, 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., (2008) PLoS ONE 3 (2), 1-12; Bauwens et al (2008) Stem Cells, 网络发表于2008年6月26号)，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。

[0158] 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。

[0159] 在本发明另一实施方案中，应用灌注方法预防必需被频繁取代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，U.S.Pat.No.5,320,963描述了用于悬浮细胞灌注培养的生物反应器。U.S.Pat.No.5,605,

822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。U.S.Pat.No.5,646,043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。U.S.Pat.No.5,155,035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。

[0160] 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。

[0161] 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,K.,et al.,Nat.Biotechnol.,25(6):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HA1077、二氢氯化物(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。

[0162] 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)。

[0163] 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hES细胞的方法,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皿、6孔板、旋转瓶、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。

[0164] 建立以及维持恒定的、优化的搅动剪切率对于维持细胞生长和活力是重要的。例如,增加的剪切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<sup>-1</sup>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。

[0165] 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<sup>-1</sup>的剪切率。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孔皿在大体积流体中产生相同的时均剪切率和剪切应力,所述6孔皿以100rpm旋转用于产生直径为100μm的聚集体。

[0166] 本发明的方法还可以用于在生产放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。

[0167] 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ACCATASE<sup>TM</sup>。在一个实施方案中,ACCATASE<sup>TM</sup>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., 2004 Stem Cells, 22 (7) :

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。

[0168] 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溶液和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。

[0169] 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、ACCATASE<sup>TM</sup>、0.25% Trypsin/EDTA、TrypLE或者VERSENE<sup>TM</sup>(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。

[0170] 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 $0.01 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $0.05 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $0.1 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $0.5 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $1.0 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $1.2 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $1.4 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $1.6 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $1.8 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $2.0 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $3.0 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $4.0 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $5.0 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $6.0 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $7.0 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $8.0 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $9.0 \times 10^5$ 个细胞/mL或者 $10.0 \times 10^5$ 个细胞/mL或者更高,例如高达 $5 \times 10^7$ 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。

[0171] 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细胞培养物的产生的细胞密度。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。

[0172] 可以维持的操作细胞密度是从至少约 $0.5 \times 10^6$ 个细胞/mL起的那些密度。在典型的放大系统中,操作细胞密度可以为约 $0.5 \times 10^6$ 个细胞/mL至约 $25 \times 10^6$ 个细胞/mL。示例性密度可以为约 $2.5 \times 10^6$ 个细胞/mL、 $22 \times 10^6$ 个细胞/mL至高达 $5 \times 10^7$ 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%。其他放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、分批补料和连续补料配制(continuous feed configuration),细胞密度可以为约 $0.5 \times 10^6$ 个细胞/mL至 $15 \times 10^6$ 个细胞/mL。

[0173] 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。

[0174] 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](http://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。

[0175] 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细胞聚集体的具体培养室尺寸和/或手段和设备。

[0176] 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。

[0177] 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。

[0178] 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。

[0179] 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

信号传导,这些因子包括但不限于Delta-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。

[0180] 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。

[0181] 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。

[0182] 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)在包含基础盐营养溶液和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- $\beta$ 。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物都可以用于本发明的筛选方法。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。

[0183] 利用本文描述的方法可以产生包含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。

[0184] 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。

[0185] 本发明还涉及试剂盒,其中试剂盒包含基础盐营养溶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- $\beta$ 或TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 或TGF- $\beta$ 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。

[0186] 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。

[0187] 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

[0188] 人胚胎干细胞系BG01v (BresaGen, Inc., Athens, GA) 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(7):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具加有 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、0.1mMβ-巯基乙醇 (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) 的 DMEM:F12，以及胶原蛋白酶传代。

[0189] 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、10μg/mL 转铁蛋白 (所有都来自 Invitrogen, Carlsbad, California, USA) 0.1mMβ-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 50μg/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-βEGF 结构域 (HRGβ, Peprotech)、TGFβ (R&D systems)、nodal (R&D systems)、LIF (R&D systems)、EGF (R&D systems)、TGFα (R&D systems)、HRGα (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 结合蛋白的亲和力降低，IGF1 结合蛋白的一些表达在 hESCs 中。DC-HAIF 是如上述的限定培养基，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。

[0190] 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™ 包被的皿。在一个实施方案中，MATRIGEL™ 浓度约 1:200。利用 1ml/35mm 皿在室温下包被皿 1-2 小时或在 4°C 至少过夜。平板在 4°C 储存长达 1 周。在使用前立即去除 MATRIGEL™ 溶液。

[0191] 对于测试的条件，亲代培养物接种于 6 孔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。

[0192] 实施例1-ErbB1-3、Nrg1和ADAM19在BG01v细胞中的表达

[0193] 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。

[0194] ADAM19(Hs00224960\_m1)、EGFR(Hs00193306\_m1)、ErbB2(Hs00170433\_m1)、ErbB3(Hs00176538\_m1)、NRG1(Hs00247620\_m1)、OCT4(Hs00742896\_s1)和对照GAPDH的按需TaqMan测定法(Applied Biosystems)与TaqMan通用PCR(Applied Biosystems)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。

[0195] 实施例2-抑制ErbB2减缓了BG01v细胞的增殖

[0196] 配体的EGF结构域家族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, 8ng/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。

[0197] 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信号传导。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。

[0198] 实施例3-BG01v细胞维持在包含Heregulin的限定培养基中

[0199] 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信号传导，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B)。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。

[0200] 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。

[0201] 实施例4-ErbB2-定向的酪氨酸激酶在ES细胞中的作用

[0202] 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3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。

[0203] 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。

[0204] AG1478和AG879用于检测HRG/ErbB信号传导在小鼠ES细胞中的作用。R1小鼠ES细胞维持在标准条件下,在DMEM、10%FBS、10%KSR、0.5U/mL青霉素、0.5U/mL链霉索、1xNEAA,1mM丙酮酸钠、1000U/mL LIF(ESGRO)、0.1mMβ-ME中,并用0.5%胰酶/EDTA传代。将 $2 \times 10^5$ 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。

[0205] 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。

[0206] 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信号传导。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。

[0207] 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. 2001Cancer Res 61, 7408-7412)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/hereregulin(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信号传导的破坏严重抑制hESC增殖。为了在限定生长条件下确立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)。

[0208] 实施例5-小鼠ES细胞在限定条件中的培养

[0209] 为了进一步检测HRG/ErbB2信号传导在小鼠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 $1 \times 10^5$ 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1,下文)组合的DC中。观测增殖8天。

[0210] 存活的集落仅生长在含有至少LIF/HRG-β或LIF/BMP4(表1)的条件中。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。

[0211] 表1

|        | HRG | IGF | 活化素 | LIF | BMP4 | 生长 |
|--------|-----|-----|-----|-----|------|----|
| [0212] | +   |     |     |     |      | 否  |
|        | +   |     |     | +   |      | 是  |
|        | +   | +   |     |     |      | 否  |
|        | +   | +   |     | +   |      | 是  |
|        | +   | +   | +   |     |      | 否  |
|        | +   | +   | +   | +   |      | 是  |
|        | +   |     | +   |     |      | 否  |
|        | +   |     | +   | +   |      | 是  |
|        | +   |     |     | +   | +    | 是  |

[0213] 通过将 $2 \times 10^5$ 细胞/孔接种于6-孔盘中于1:1000MATTRIGEL™上,其与10或50ng/mL HRG-β、10ng/mL EGF、1000U/mL LIF或10ng/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下没有观察到集落,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。这表明在限定条件下,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-G)。

[0214] 实施例6-维持在DC-HAIF中的人胚胎干细胞(hESCs)多能性表征

[0215] 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 16, 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11,600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( $R^2$ 选择=0.928),以及在早代和后代细胞中观测到高相关系数( $R^2$ 选择=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 16, 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。

[0216] 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

[0217] 为了研究ErbB2信号传导的作用,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MATTRIGEL™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。

[0218] 实施例8-人胚胎干细胞(hESCs)的单细胞传代

[0219] 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 (2) : 207–215)。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。

[0220] 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 $>1.12 \times 10^{10}$ 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。

[0221] 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

[0222] 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200ng/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。

[0223] 实施例10-筛选补加剂作用的方法

[0224] 首先为了检测维生素B<sub>12</sub>和维生素B<sub>6</sub>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 $1 \times 10^5$ 细胞/孔在限定培养基(DC)中接种于6-孔盘中。DC培养基含有10ng/mL HRG-β、200ng/mL LongR3-IGF1以及10ng/mL FGF10。将维生素B<sub>6</sub>(0.5μM)和/或维生素B<sub>12</sub>(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B<sub>6</sub>和维生素B<sub>12</sub>对细胞生长的影响。

[0225] 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。

[0226] 实施例11-hESCs在缺乏FGF2情况下的培养

[0227] 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)。

[0228] 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 and 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47,296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( $R^2$ 选择=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)。

[0229] 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。

[0230] 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<sup>TM</sup>传代并生长在仅含有10ng/mL HRG-β和200ng/mL LongR3-IGF1 (DC-HI) 的限定条件下。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慢化。

[0231] 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。

[0232] 实施例12-悬浮培养物

[0233] 如本文所述,将BG02细胞的起始培养物在包被有1:200的人工基底膜(matrigel)的皿上维持在DC-HAIF培养基中,并且通过用ACCUtase<sup>TM</sup>传代来分裂。为了启动悬浮培养,

BG02细胞用ACCUtase<sup>TM</sup>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 $6 \times 10^5$ 细胞/mL(0.5、1或 $2 \times 10^6$ 个细胞在3mL体积中)。将上述盘置于含5%CO<sub>2</sub>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。

[0234] 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。

[0235] 悬浮培养物约每7天用ACCUtase<sup>TM</sup>解聚，并确立新球。尽管在不同实验中密度是不同的，但在该密度范围(1.6– $6 \times 10^5$ 细胞/mL)内确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。

#### [0236] 实施例13-可分化细胞在悬浮培养中的扩增

[0237] 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<sup>TM</sup>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。

[0238] 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<sup>TM</sup>传代，并且将约 $1 \times 10^6$ 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 $5 \times 10^5$ 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。

#### [0239] 实施例14-悬浮培养扩增的可分化细胞的特征

[0240] 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。

[0241] 实施例15—悬浮培养中凋亡抑制剂的添加

[0242] 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。

[0243] 通过将 $2 \times 10^6$ 个单细胞在3mL DC-HAIF培养基中接种在6孔皿中,以100 rpm在培养箱中的旋转平台上形成BG02细胞的悬浮聚集体(表2,实验A)。在实验过程中将10μM Y27632 ROCK抑制剂添加到测试孔,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2,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2,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)。

[0244] 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(表2,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 $3.9 \times 10^6$ 个细胞,抑制剂存在时生成 $1.4 \times 10^7$ (+Y27632)和 $1.8 \times 10^7$ (+/-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。

[0245] 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2,实验C)。之前的实验已经表明,以每3mL DC-HAIF约 $5 \times 10^5$ 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 $2 \times 10^6$ 个总细胞低至约 $1 \times 10^5$ 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10μM 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 $1 \times 10^5$ 个细胞的培养物,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。

[0246] 表2-有或无凋亡抑制剂的悬浮培养

[0247]

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

[0248] Expt.=实验;p0=0代,p1=1代;N/A=不可用;细胞计数和百分比分别四舍五入到1和0位小数位。

[0249] 实施例16-不同培养基中的悬浮培养物

[0250] 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3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。

[0251] 表3-不同培养基中的悬浮培养物

| 处理     | 接种          | 细胞计数:           |  |
|--------|-------------|-----------------|--|
|        |             | 总计(存活, %)       | 扩增倍数   |
|        |             | p0, 第 5 天       |  |
| [0252] | HAIF        | $2 \times 10^6$ | $7.7 \times 10^6$ ( $6.5 \times 10^6$ , 83%) |
|        | HAI         | $2 \times 10^6$ | $7.0 \times 10^6$ ( $6.3 \times 10^6$ , 91%) |
|        | HI          | $2 \times 10^6$ | $6.4 \times 10^6$ ( $5.3 \times 10^6$ , 83%) |
|        | HAIF+Y27632 | $2 \times 10^6$ | $1.5 \times 10^7$ ( $1.3 \times 10^7$ , 90%) |
|        | HAI+Y27632  | $2 \times 10^6$ | $1.5 \times 10^7$ ( $1.3 \times 10^7$ , 91%) |
|        | HI+Y27632   | $2 \times 10^6$ | $1.9 \times 10^7$ ( $9.2 \times 10^6$ , 49%) |

[0253] 实施例17-优化的剪切速率导致悬浮细胞聚集体存活率增加、密度和大小均一。

[0254] 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、BG01和BG02,小鼠、狗和非人灵长类干细胞系以及其他。

[0255] 本文提供的结果表明细胞增殖和分化能够维持在控制水平或减弱,这取决于反应仪器的运行参数,特别是培养流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。

[0256] 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,容易地确定最优旋转速度。特别是,本文描述和预期的旋转速度是有用的,以便维持层流条件。因此,本文描述的实验处于以下条件,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)消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。

[0257] 下面的表4描述了剪切率和应力,因为它与细胞聚集体的直径( $\mu\text{m}$ )有关。利用轨道旋转器(Barnstead LabLine Multipurpose Rotator),以60rpm、80rpm、100rpm、120rpm、130rpm、140rpm、150rpm和160rpm的不同旋转速度聚集人ES细胞1、2、3和/或4天。表4还证实,细胞聚集体经历的有效剪切率依赖于该细胞聚集体的直径。

[0258] 表4-细胞聚集体的大小依赖于剪切率和剪切应力

| 聚集体直径(mm) | 旋转速度(rpm) | 无因次应力 | 剪切应力(dynes/cm^2) | 剪切速率(1/sec) |
|-----------|-----------|-------|------------------|-------------|
| [0259]    | 200       | 140   | 0.94             | 3.16        |
|           |           | 120   | 0.76             | 2.06        |
|           | 175       | 100   | 0.59             | 1.24        |
|           |           | 80    | 0.43             | 0.66        |
|           |           | 60    | 0.29             | 0.30        |
|           | 150       | 140   | 0.72             | 2.42        |
|           |           | 120   | 0.58             | 1.58        |
|           |           | 100   | 0.45             | 0.95        |
|           |           | 80    | 0.33             | 0.50        |
|           |           | 60    | 0.22             | 0.23        |
|           | 125       | 140   | 0.53             | 1.78        |
|           |           | 120   | 0.43             | 1.16        |
|           |           | 100   | 0.33             | 0.70        |
|           |           | 80    | 0.24             | 0.37        |
|           |           | 60    | 0.16             | 0.17        |
|           | 100       | 140   | 0.37             | 1.23        |
|           |           | 120   | 0.30             | 0.80        |
|           |           | 100   | 0.23             | 0.49        |
|           |           | 80    | 0.17             | 0.26        |
|           |           | 60    | 0.11             | 0.12        |

[0260] 为了确定旋转速度如何调控ES聚集体的直径,我们通过以100rpm、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+/-SD为198μm+/-21μm。对于120rpm培养物,平均直径+/-SD为225μm+/-28μm。对于140rpm培养物,平均直径+/-SD为85μm+/-15μm。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4所显示的,剪切率以指数方式从60rpm增加到140rpm,例如,100μm直径聚集体的剪切率在100rpm为约30sec<sup>-1</sup>,在140rpm为约80sec<sup>-1</sup>,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60rpm至80rpm培养约1天,此后以较高的旋转速度培养(例如,100rpm-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。

[0261] 重要的是,注意到尽管细胞聚集体的直径随着剪切率变化,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hES细胞或hES衍生细胞类型(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)的特征签标志物与在前述的d' Amour et al.中描述的那些一致,相关申请通过引用并入本文。

[0262] 为了确定旋转速度、剪切率和剪切应力对细胞存活或细胞活力的影响,经证实通过单天降低的速度(例如60rpm至80rpm)就改善了存活率。例如,细胞存活率范围在旋转速度为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100rpm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。

[0263] 此外,培养体积影响剪切率和剪切应力,而这又进一步影响细胞聚集体大小和形态的均一性,如以上所述的。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启始,但预期从hES衍生的贴壁平板培养物启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启始的阶段。

[0264] 而且,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;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;或者还含有10ng/mL Heregulin B的StemPro®和DMEM/F12培养基。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。

[0265] 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

[0266] 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)以及美国第2005/0266554、2005/0158853、2006/0003313、2006/0148081、2007/0122905和2007/0259421号专利申请公布中所述,这些以其整体并入本文。

[0267] 简言之,未分化的多能hES贴壁(平板)细胞维持在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层(Millipore,以前的Chemicon或Specialty Media)上或人血清包被的60mm平板(0.1-20%终浓度;Valley Biomedical)上,在补充以下的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)、0.55mM 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。此外,在已将hES细胞经接种在未包被的培养平板上后,将人血清已经添加至培养物。将低剂量的活化素A(2-25ng/ml,R&D Systems)添加至生长培养基以有助于维持未分化生长。0天(d0)的贴壁多能hES细胞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。

[0268] 细胞通过人工或酶促方式再次传代,基本上如前面d'Amour et al.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 $3 \times 10^6$ 至 $12 \times 10^6$ 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 $1\times10^6$ 细胞/mL。该体积可以增加至 $>4\times10^6$ 细胞/mL,但可能需要更频繁的饲养。将ROCK抑制剂Y27632(Axxora)添加至细胞悬浮液至终浓度为约1–15μM,通常为10μM,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。

[0269] 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时间段。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。

[0270] 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)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5mLRMP1(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,基本上如前面d'Amour et al. (2006)中所描述的,并且下文更为详细地对其进行了描述。

#### [0271] 向定形内胚层的分化(阶段1)

[0272] hES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(第1天)),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。

[0273] 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。

[0274] 利用CXCR4和HNF3β(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% HNF3β–阳性的以及至少95%

CXCR4/HNF3 $\beta$ -共阳性的。

[0275] 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 $\beta$ 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 $\beta$ 和/或SOX17。

[0276] 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。

[0277] 向PDX1-阴性前肠内胚层细胞的分化(阶段2)

[0278] 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 $\mu$ M SB431542 (Sigma Aldrich, Inc.) 或2.5 $\mu$ M TGF- $\beta$ 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。

[0279] 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 $\beta$ 和HNF4 $\alpha$ 。参见图22,阶段2(d5)的图面E (HNF1B) 和图面O (HNF4 $\alpha$ )。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,其启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 $\alpha$  (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。

[0280] 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。

[0281] 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。

[0282] 向PDX1-阳性前肠内胚层细胞的分化(阶段3)

[0283] 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 $\mu$ M至2 $\mu$ M视黄酸(RA, Sigma) 和0.25nM KAAD-环巴胺(Toronto Research Chemicals);或者1 $\mu$ M至2 $\mu$ 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 $\mu$ M至0.5 $\mu$ M RA和0.25nM KAAD-环巴胺添加至培养基1天。仍然地,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。仍在其他实施方案中,添加0.1-0.2%有效浓度的BSA。

[0284] 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。

[0285] 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。

[0286] 向胰腺内胚层或胰腺内分泌祖细胞的分化 (阶段 4)

[0287] 在阶段 4, 从阶段 3 培养物中剥夺 RA, 用加 B27 (1:100 Gibco) 的 DMEM 洗涤培养物一次, 然后用单独的 DMEM+1XB27 补添加剂或与以下因子的任一或全部组合的 DMEM+1XB27 补添加剂替代洗涤液 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。

[0288] 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 (PTF1A) 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  $1 \times 10^7$  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  $1 \times 10^6$  至  $2 \times 10^7$  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 100 rpm 至 140 rpm 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。

[0289] 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胚内胚层污染物。利用 NKX6.1、HNF3 $\beta$  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 $\beta$  和其他类型的细胞。

[0290] 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向胰腺内胚层 (或 PDX1- 阳性胰腺内胚层) 的高效分化, 几乎所有细胞表达 PDX1 以及大群细胞表达 NKX6.1 (约 40% 的细胞) 和 / 或 NKX2.2 (约 40% 的细胞)。

[0291] 向表达激素的内分泌细胞的分化 (阶段 5)

[0292] 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- 补添加剂中。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。

[0293] 再次, 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胚层污染物。

[0294] 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。

[0295] 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。

[0296] 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

[0297] 以下证实了hES衍生细胞聚集体的产生不仅能够从多能hES细胞启始,而且细胞聚集体能够直接在分化培养基中启始(0天细胞聚集体),还能够从分化的或hES衍生细胞启始,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。

#### [0298] 0天细胞聚集体

[0299] 在阶段1的第一天(d0)产生的细胞聚集体:使贴壁多能hES细胞生长,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 $1\times 10^6$ 细胞/mL至 $4\times 10^6$ 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1-15μM,通常为10μM。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。重悬的细胞等同地分布到低结合的6孔皿的每孔中,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。

[0300] 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。

#### [0301] 阶段1-第2天至第3天

[0302] 阶段1的d2-d3天产生的细胞聚集体:使贴壁hES细胞生长,并基本上如上述进行传

代,然后分化至阶段1,基本上如在前面d' Amour et al. (2006)中描述的那样。

[0303] 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)。

[0304] 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 (50-100μg/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,加上2%FBS和DNase (50-100μg/ml)、25ng-50ng/ml KGF (R&D Systems)。在一些实验中,与KGF一起包括5μM SB431542 (Sigma Aldrich, Inc.) 或2.5μM TGF-β抑制剂IV (Calbiochem)。在一些实验中,包括Y27332 (10μM)。将重悬的细胞等同地分布至低结合的6孔皿的每孔中,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。

[0305] 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。

#### [0306] 阶段2-第5天至第6天

[0307] 阶段2d5-d6产生的细胞聚集体:使贴壁hES细胞生长,并基本如上所述进行传代,然后分化至阶段2,基本上如前面d' Amour et al. (2006)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2%FBS、Glutamax、青霉素/链霉素和25ng-50ng/ml KGF (R&D Systems)的RMPI中进一步分化3天。在一些实验中,在阶段2的第一天添加5μM SB431542 (Sigma Aldrich, Inc.) 或2.5μM TGF-β抑制剂IV (Calbiochem)。

[0308] 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 (50-100μg/ml, Roche Diagnostics) 以及不含FBS或1-2%FBS或0.5%-10%人血清(hS),以及或者1μM至2μM视黄酸(RA, Sigma) 和0.25nM KAAD-环巴胺(Toronto Research Chemicals);或者1μM至2μM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0.2μM至0.5μM RA和0.25nM KAAD-环巴胺;或者0.2μM至0.5μM RA和0.25nM KAAD-环巴胺加上50ng/ml头蛋白。在一些实验中,包括Y27332 (10μM)。

[0309] 将重悬浮的细胞等同地分布至每孔中,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。

[0310] 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1μM至2μM视黄酸(RA, Sigma) 和0.25nM KAAD-环巴胺(Toronto Research Chemicals);或者1μM至2μM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0.2μM-0.5μM RA和0.25nM KAAD-环巴胺;或者0.2μM-0.5μM RA和0.25nM KAAD-环巴胺加上50ng/ml头蛋白。

[0311] 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。

[0312] 阶段4和5-第10天至第30天

[0313] 阶段4的d10-d14产生的细胞聚集体：再次，使贴壁hES细胞生长，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前面d' Amour et al. (2006) 中所述。

[0314] 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 $\mu$ M至2 $\mu$ 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 $\mu$ M至0.5 $\mu$ M的RA和0.25nM的KAAD-环巴胺添加至培养基仅一天。仍在其他实验中，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。

[0315] 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 $\mu$ 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 $\mu$ M)。将细胞等同地分布到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。

[0316] 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。

[0317] 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hES细胞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、内胚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)。

[0318] 实施例20-细胞密度影响hES细胞分化结果

[0319] 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。

[0320] 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添加剂(vol/vol)+0.25uM 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。

[0321] 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。

[0322] 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。

[0323] 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

[0324] 通过调控不同生长因子和/或试剂的浓度,优化hES衍生细胞聚集群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贴壁培养物启始,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4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。

[0325] 表4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,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。

[0326] 因此,表4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。

[0327] 表4-生长因子对细胞组合物的影响

[0328]

| 聚集阶段     | 阶段4培养基中的因子(ng/mL)    | CHGA+ | CHGA-<br>NKX6.1+<br>PDX1+ | CHGA-<br>NKX6.1-<br>PDX1+ | CHGA-<br>NKX6.1+/-<br>PDX1- | 总计                              |
|----------|----------------------|-------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
|          |                      |       |                           |                           |                             | 内分泌<br>胰腺内胚层<br>PDX1+内胚层<br>非胰腺 |
| 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                           |
| 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  | None added           | 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                           |

[0329] 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 HES CELLS(纯化衍生自hES细胞的内胚层和胰腺内胚层细胞的方法)”的美国申请12/107,020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,如前面d' Amour et al. 2005和2006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。

[0330] 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,但能够包括允许某一细胞类型富集的可利用的、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。

[0331] 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

[0332] 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) Nature Biotechnology 26 (4) : 443-452中和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)”的美国第11/773,944号申请所述进行,这些参考文献以其整体并入本文。如在上述Kroon et al. 和美国第11/773,944号申请中所示的相似时间段,在这些动物的血清中观察到基本上相似水平的人C-肽。

[0333] 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。

[0334] 应认识到,出于清楚的目的在单独的实施方案语境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语境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。

[0335] 本说明书所提及的所有出版物和专利都通过引用的方式以其整体并入本文。

[0336] 如以下权利要求书和整个公开内容所用的，短语“基本上由…组成”意指包括该短语后列出的任何元素，但局限于不干扰或促进公开内容明确的所列元素的活性或作用的其他元素。因此，短语“基本上由……组成”表示所列元素是必需的或强制的，但其他元素是任选的，以及可以存在或可以不存在，这依赖于它们是否影响所列元件的活性或作用。

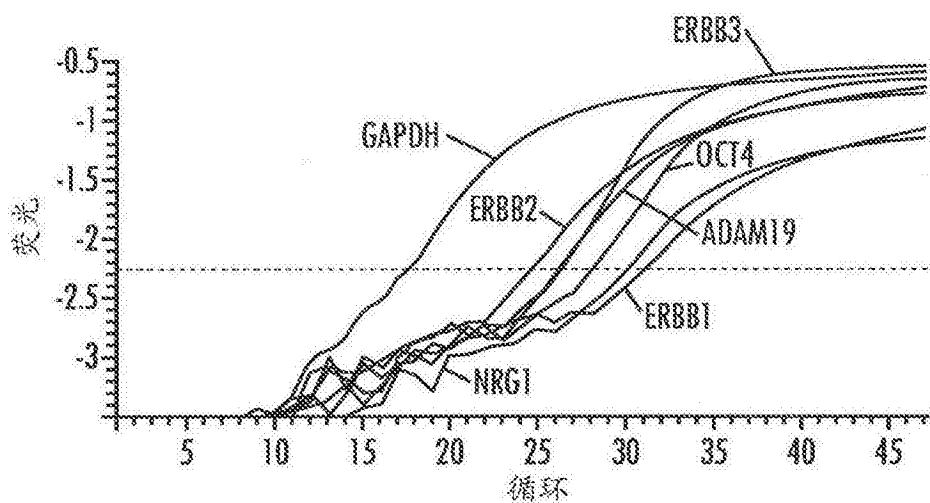


图1



图2A

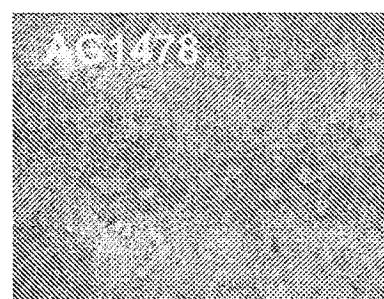


图2B

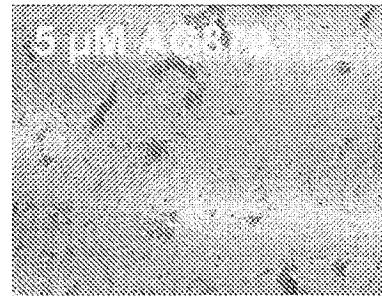


图2C

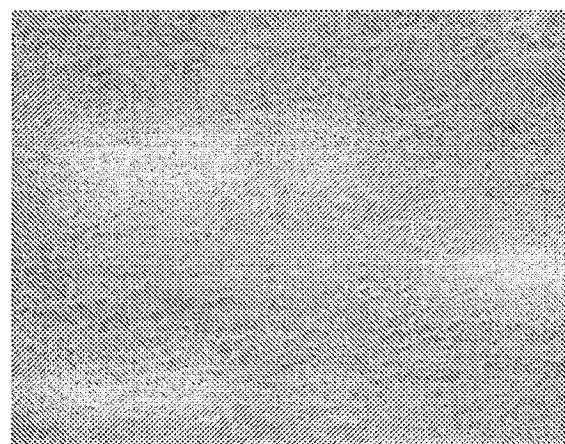


图3A

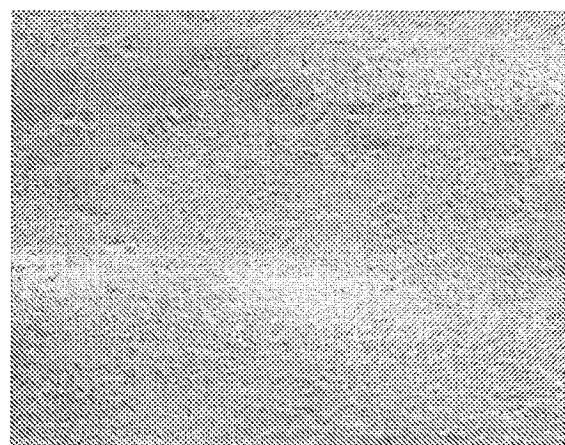


图3B



图3C

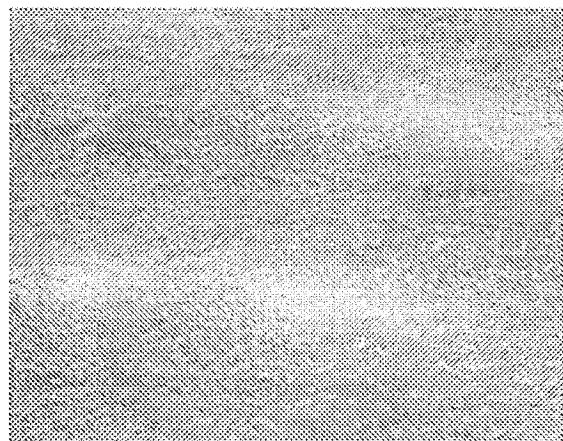


图3D

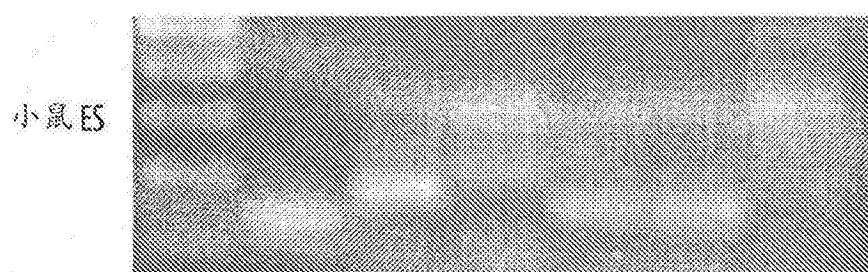


图4A

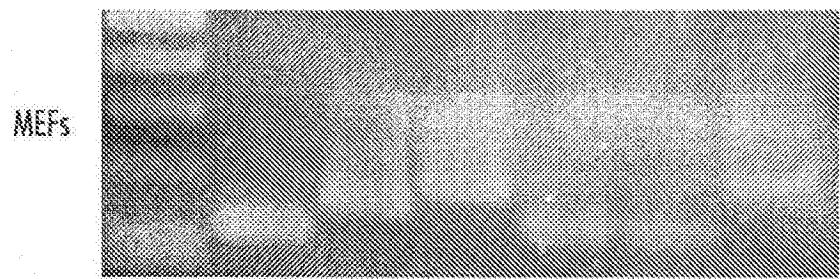


图4B

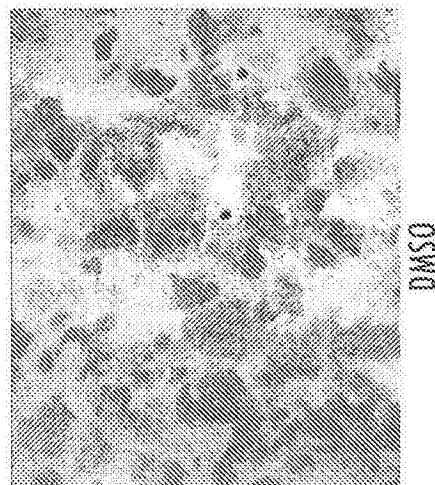


图5A

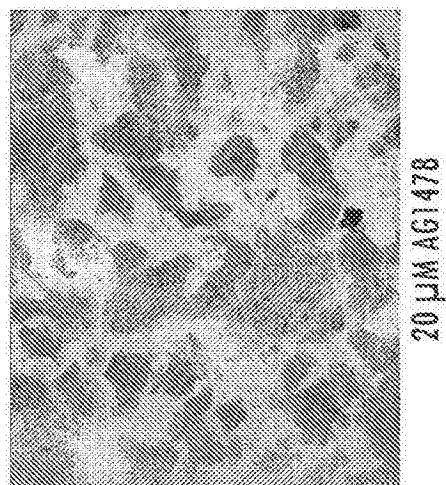


图5B

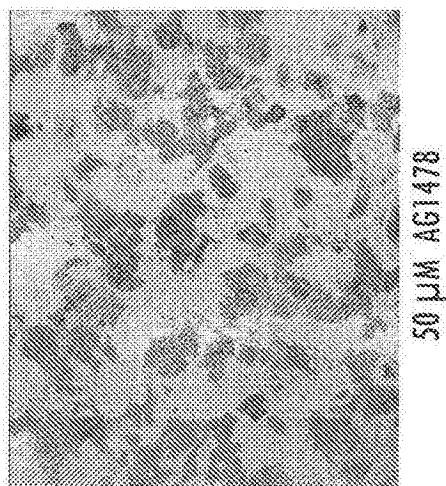


图5C

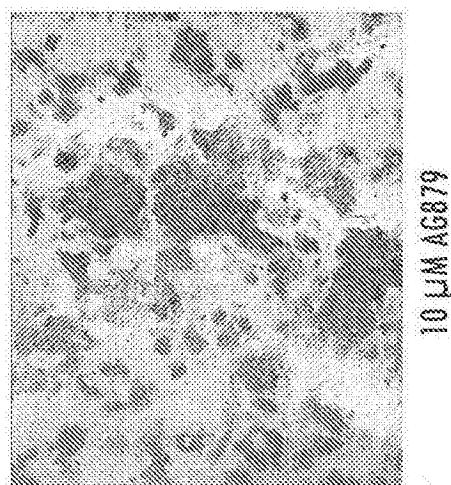
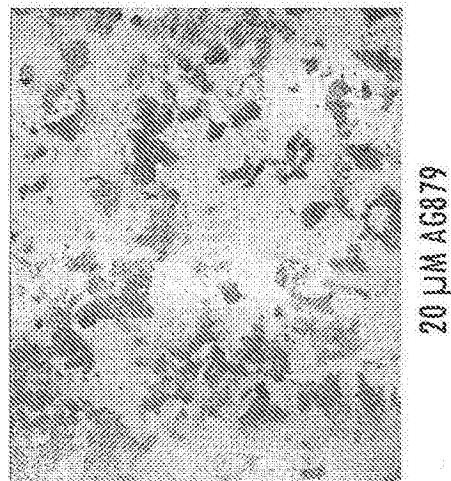
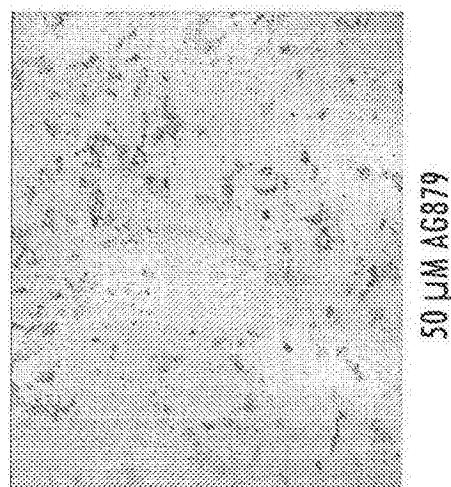


图5D



201100146878

图5E



501100146879

图5F

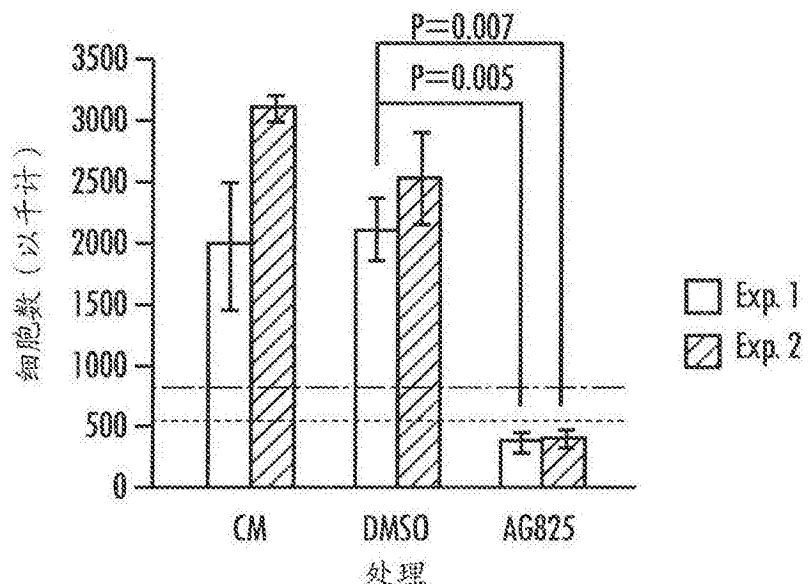


图6A

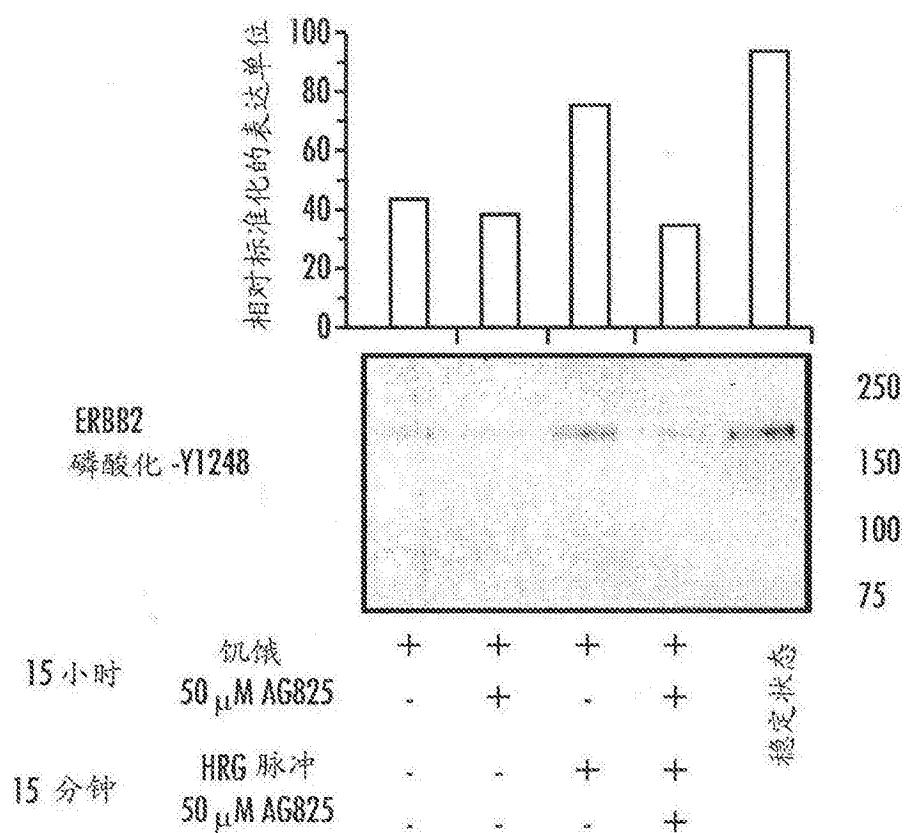


图6B



图6

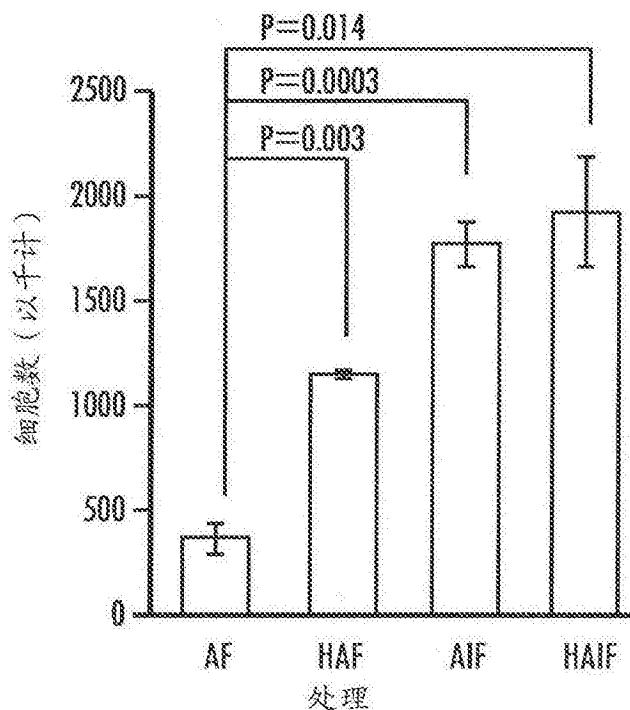


图6D

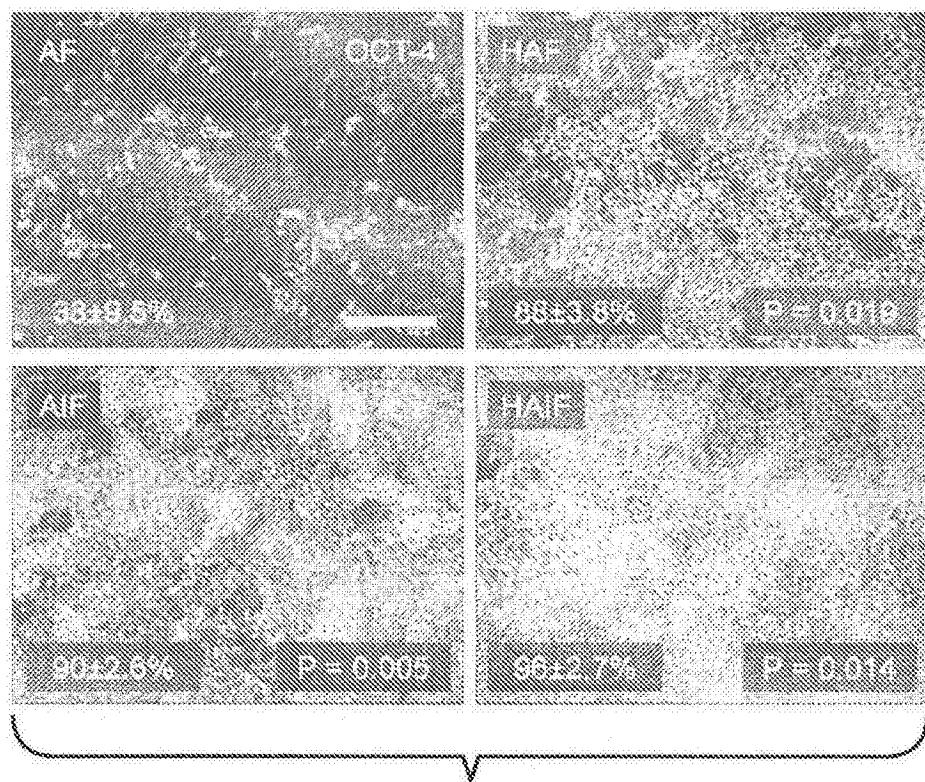


图6E

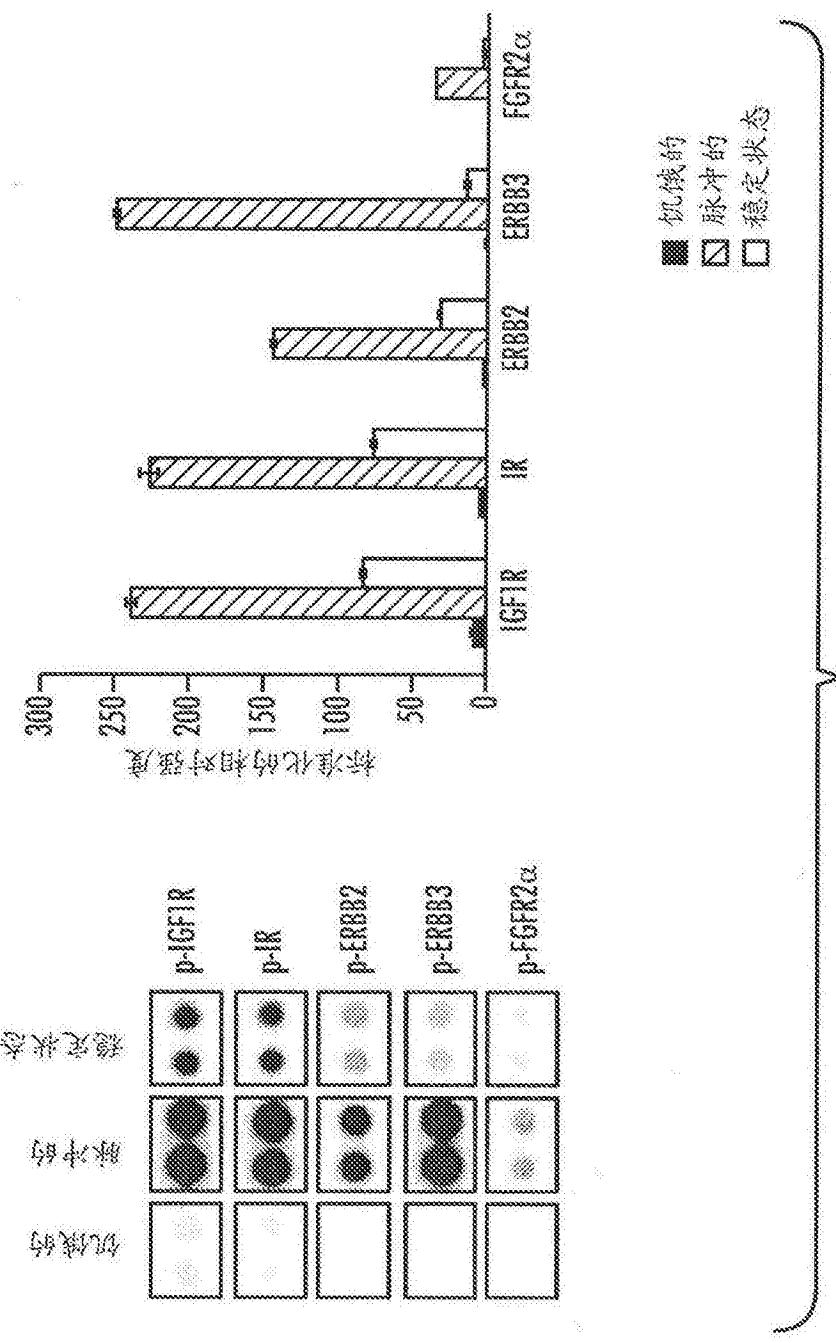


图6F

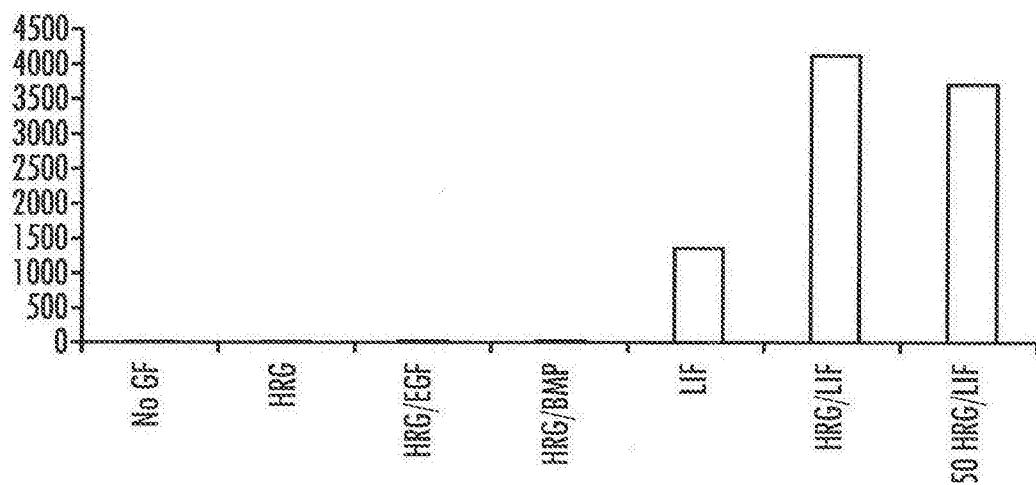


图7A

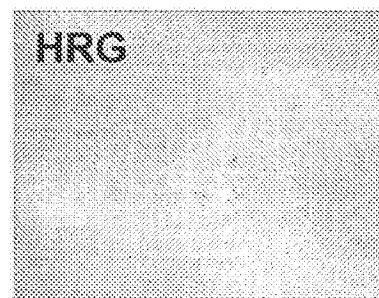


图7B



图7C

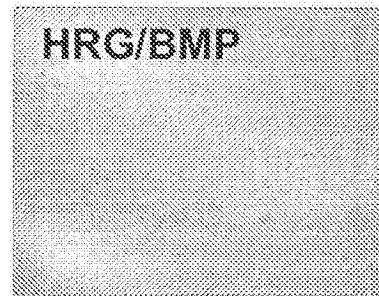


图7D

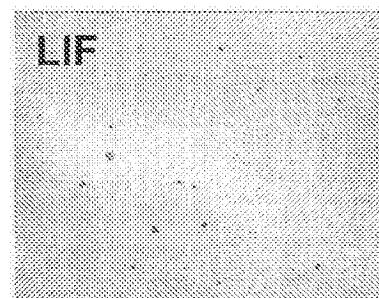


图7E

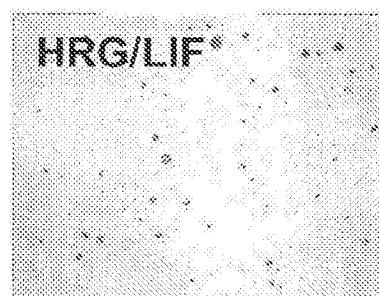


图7F

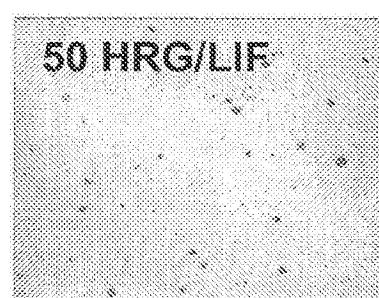


图7G

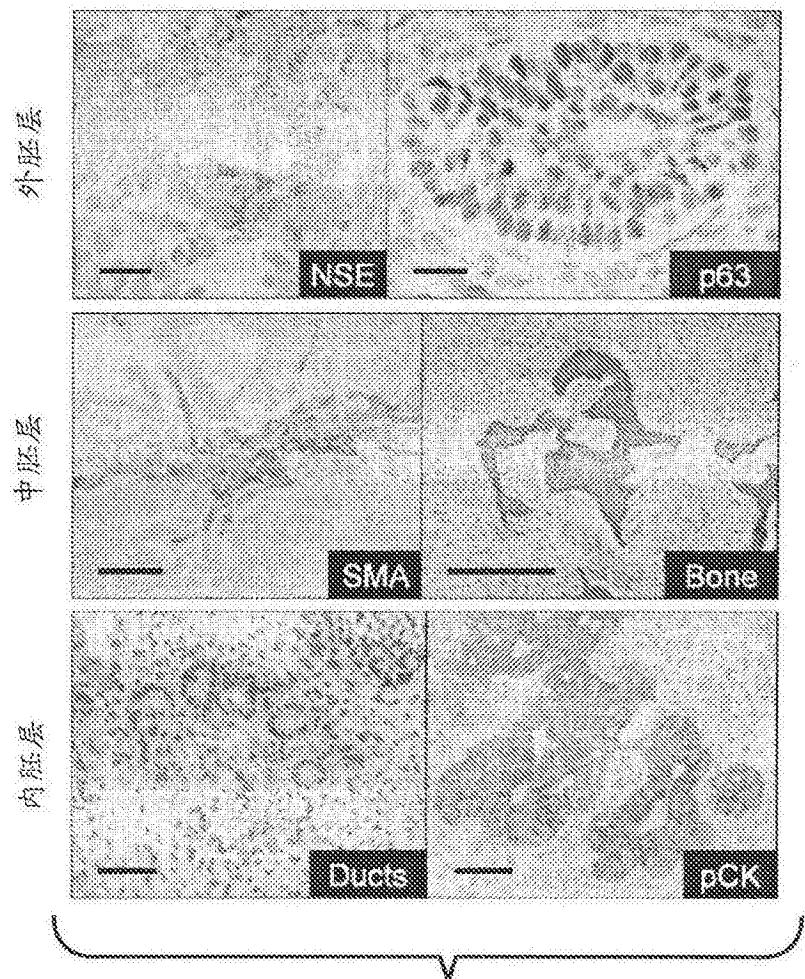


图8A

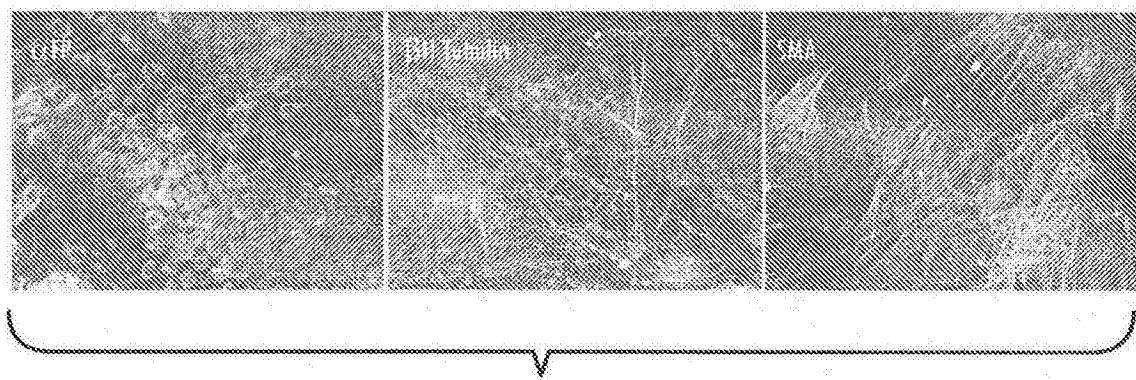


图8B

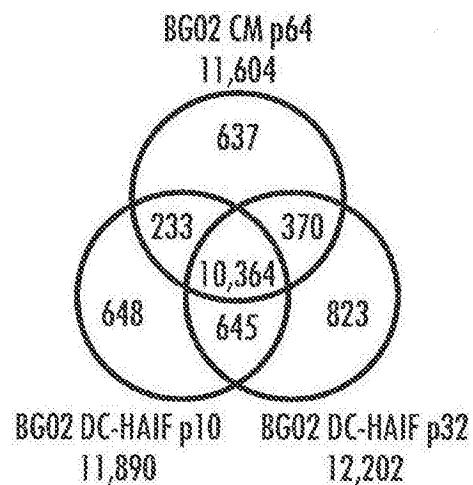


图8C

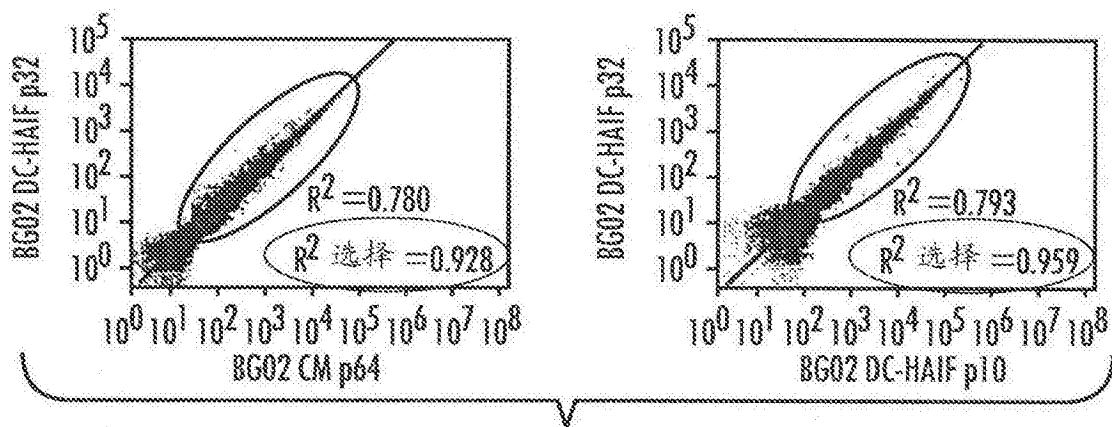


图8E

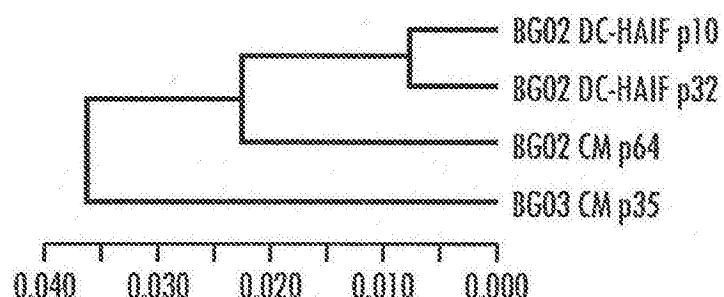


图8E

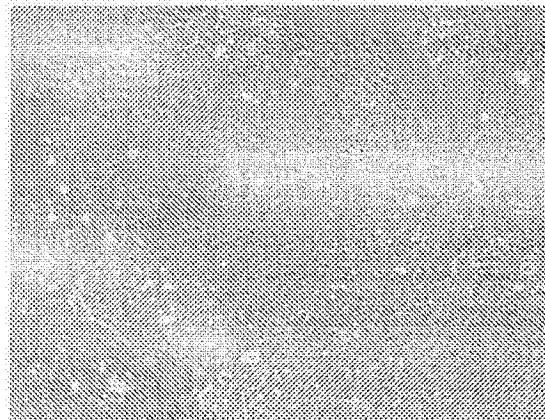


图9A

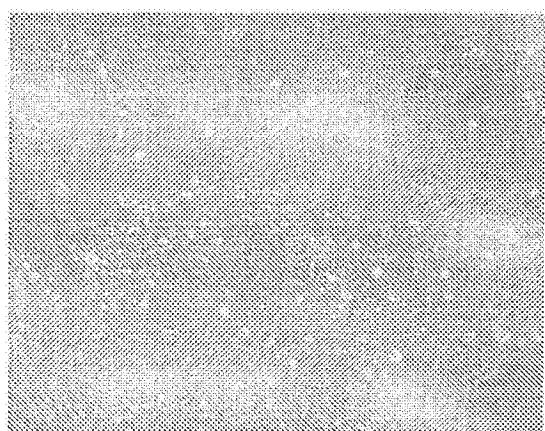


图9B



图9C



图9D

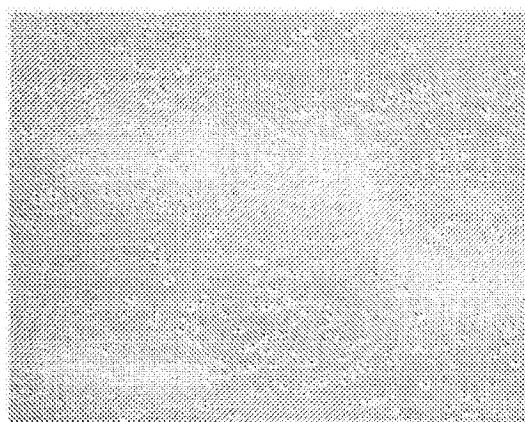


图10A



图10B



图10C



图10D

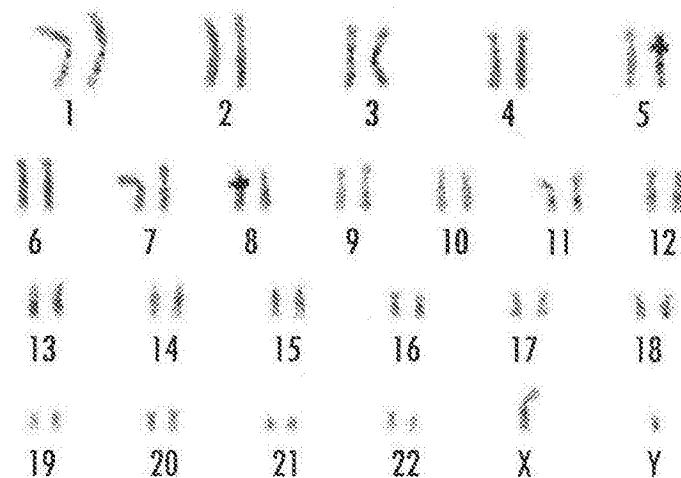


图10E

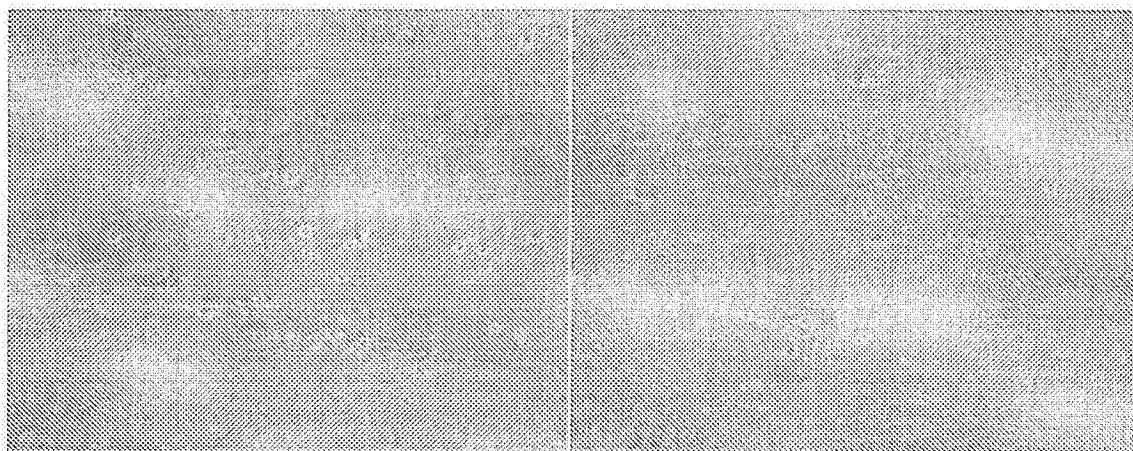


图 11A

图 11B

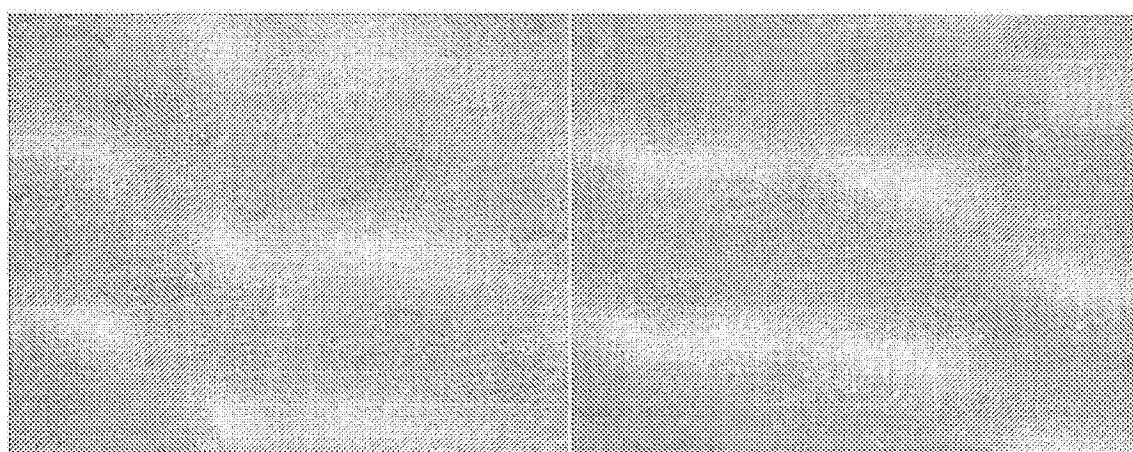


图 11C

图 11D

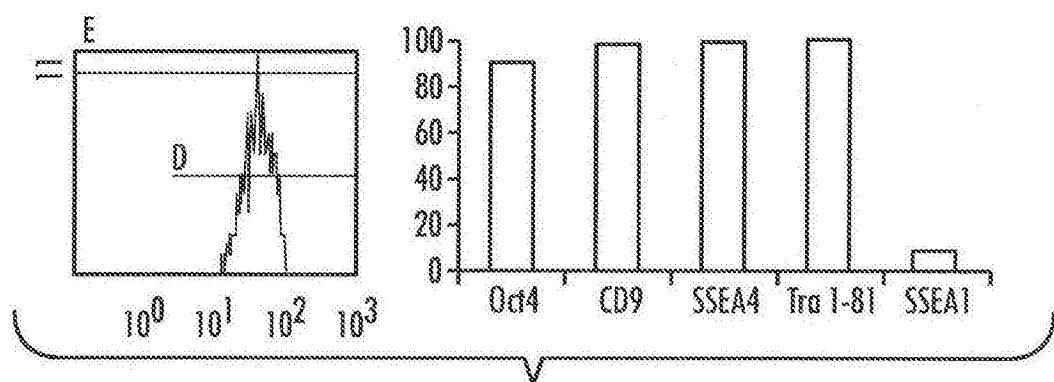


图12A

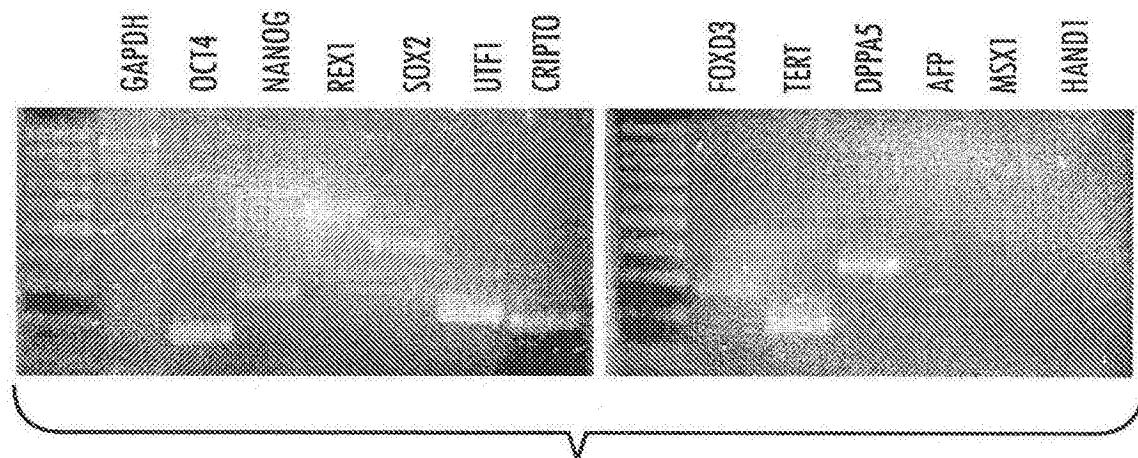


图12B

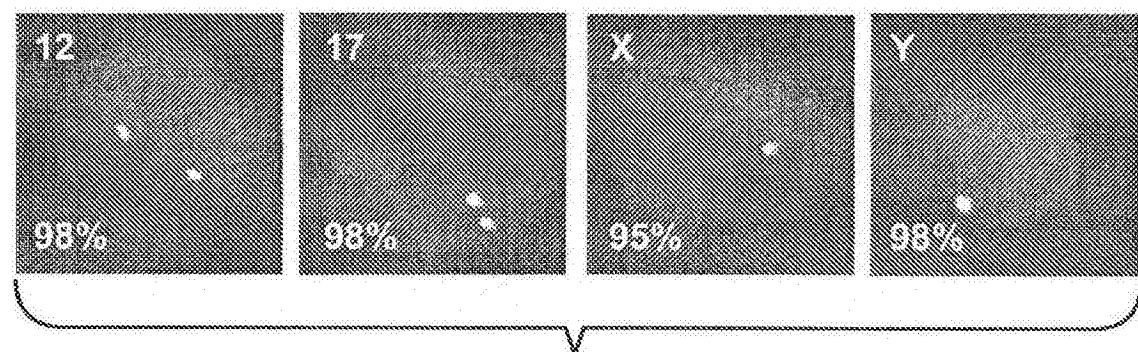


图12C



图13A

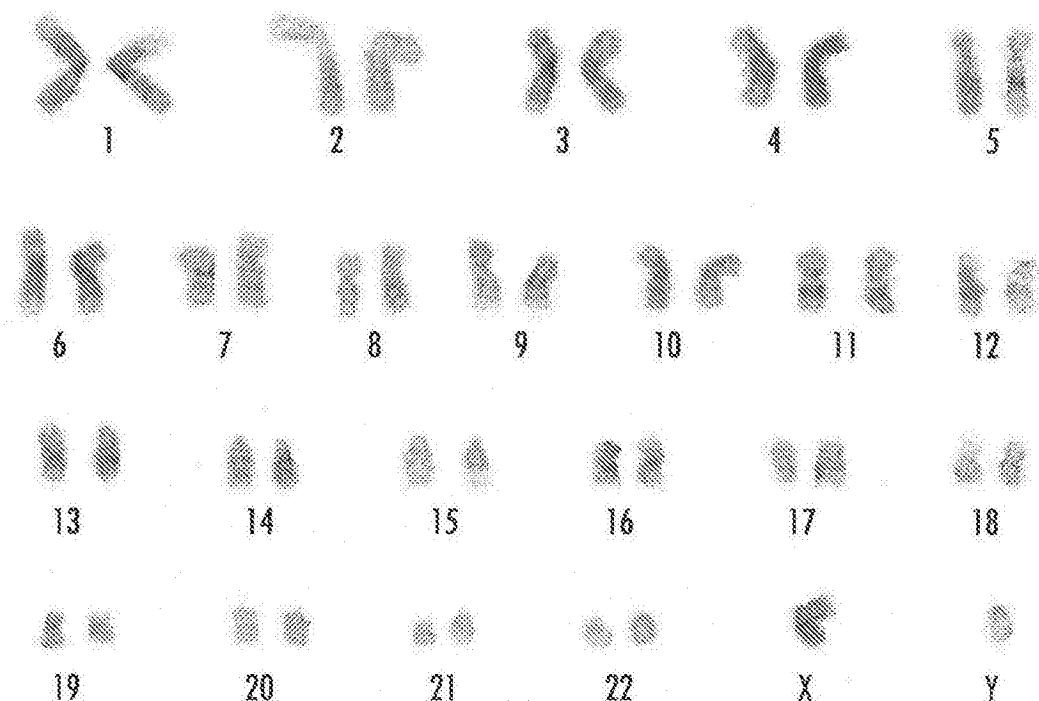


图13B

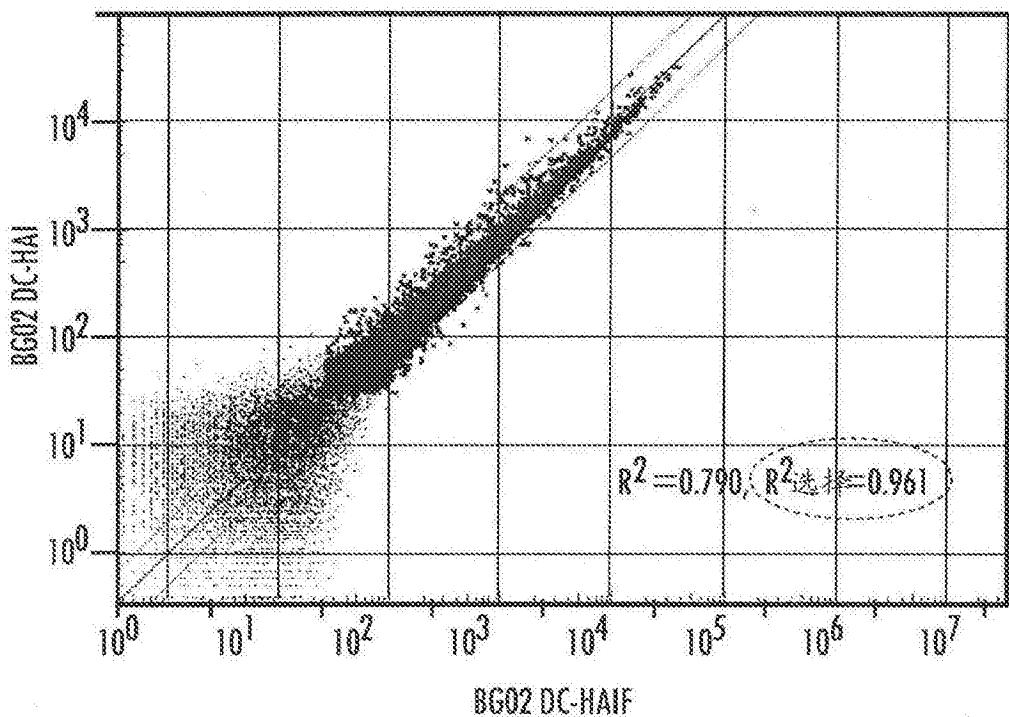


图14

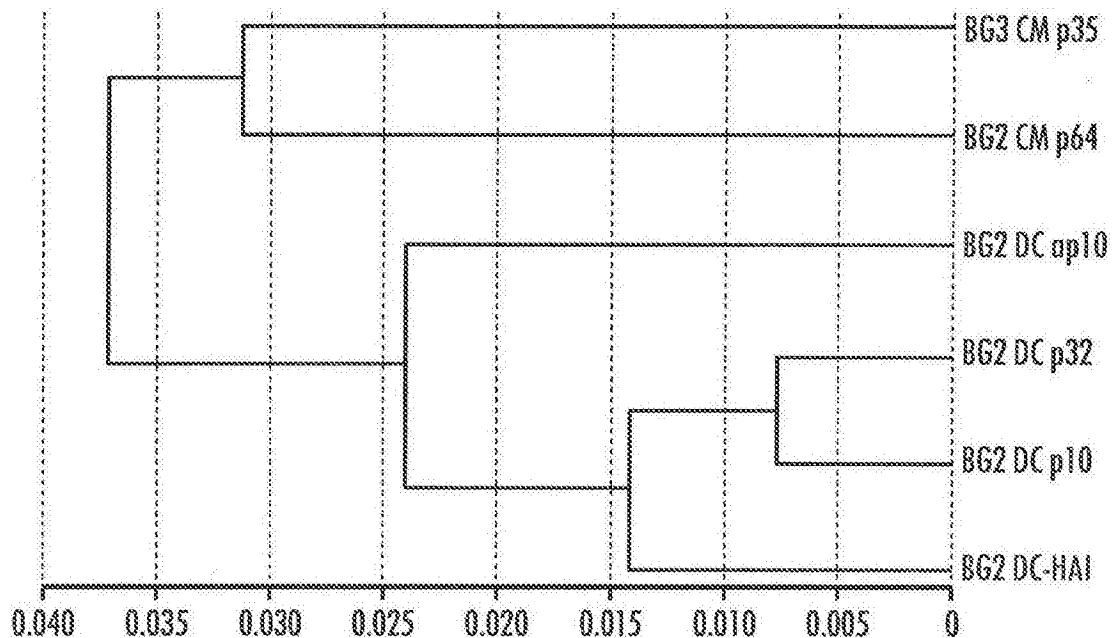


图15



图16A

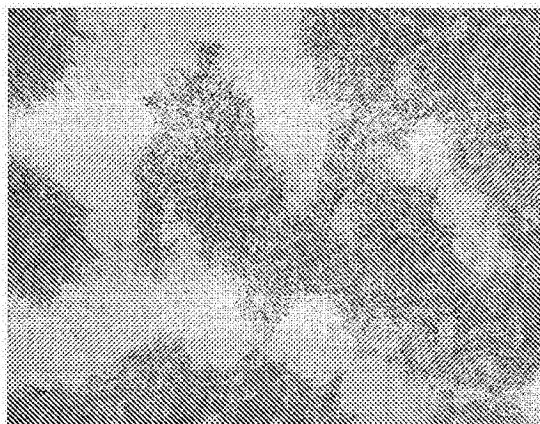


图16B

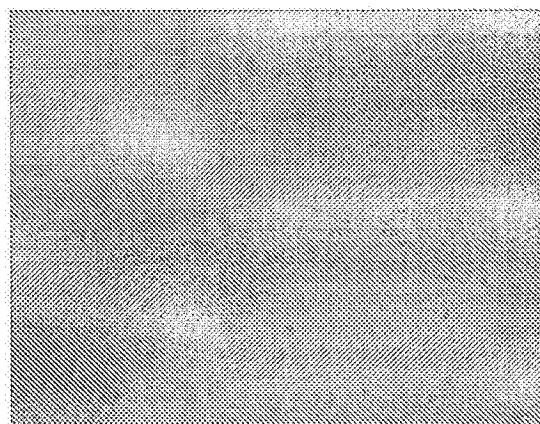


图16C



图16D

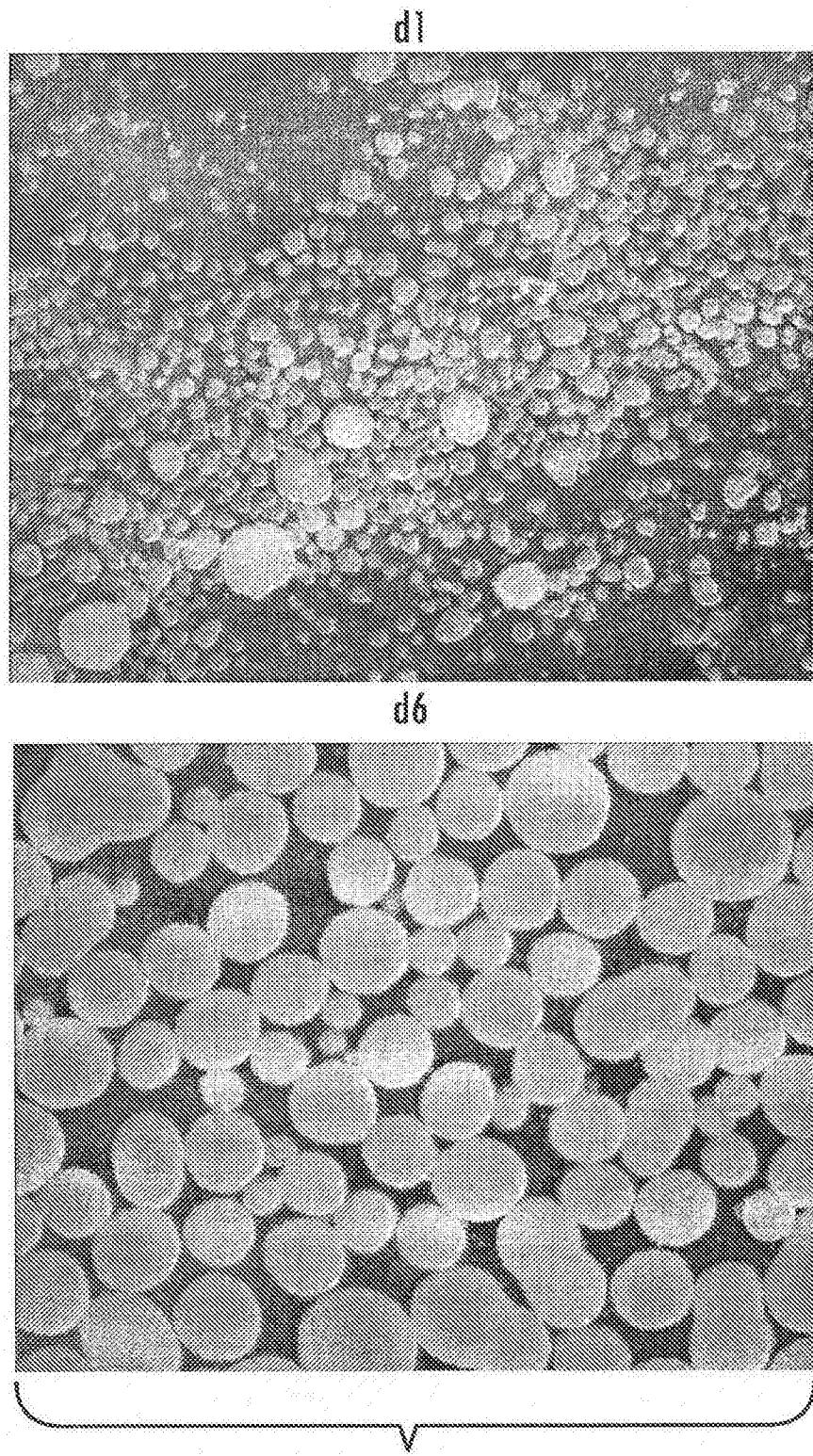


图17

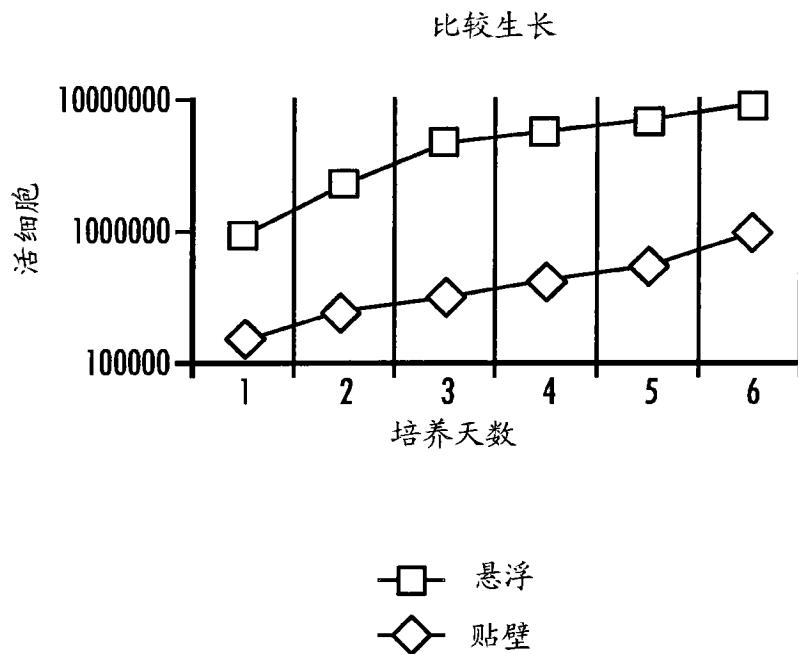


图18

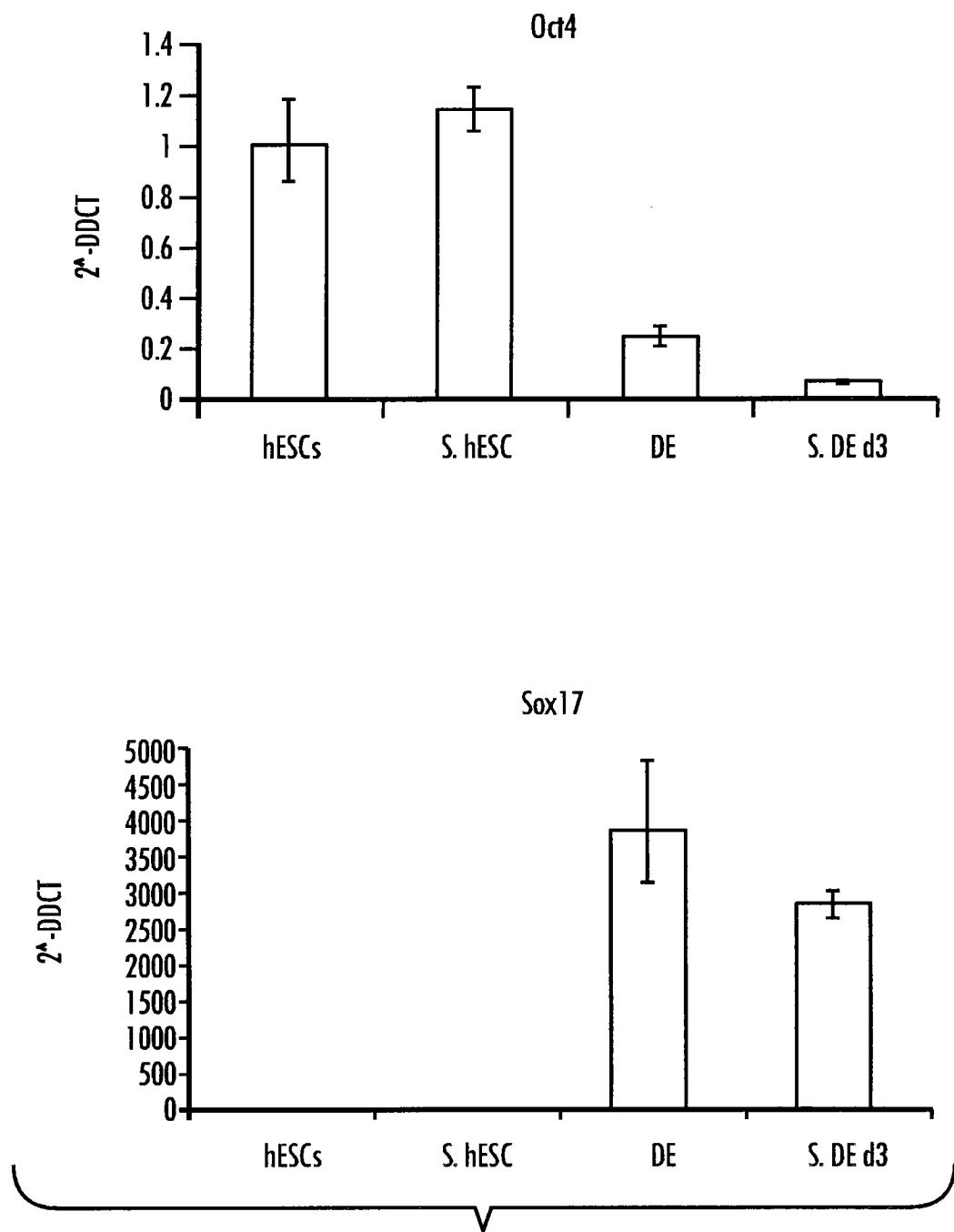


图19

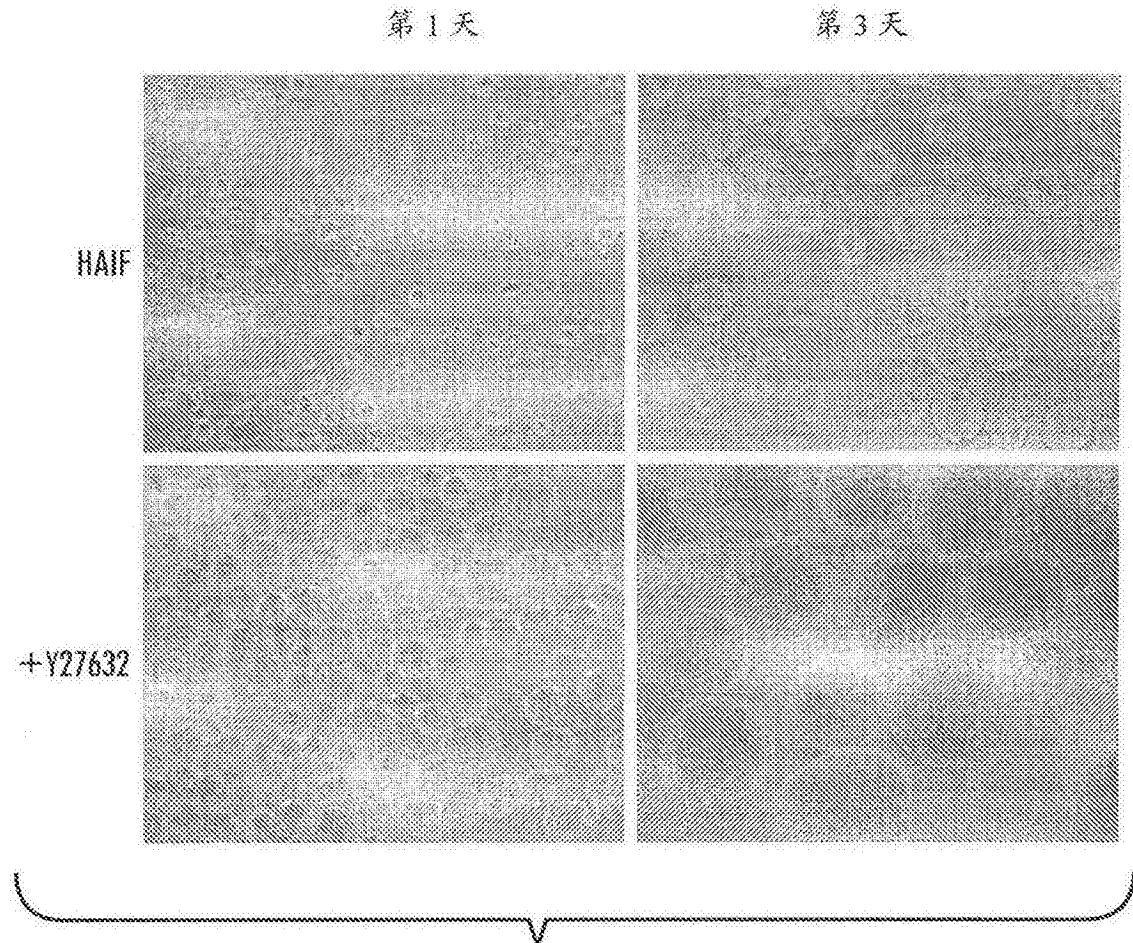


图20

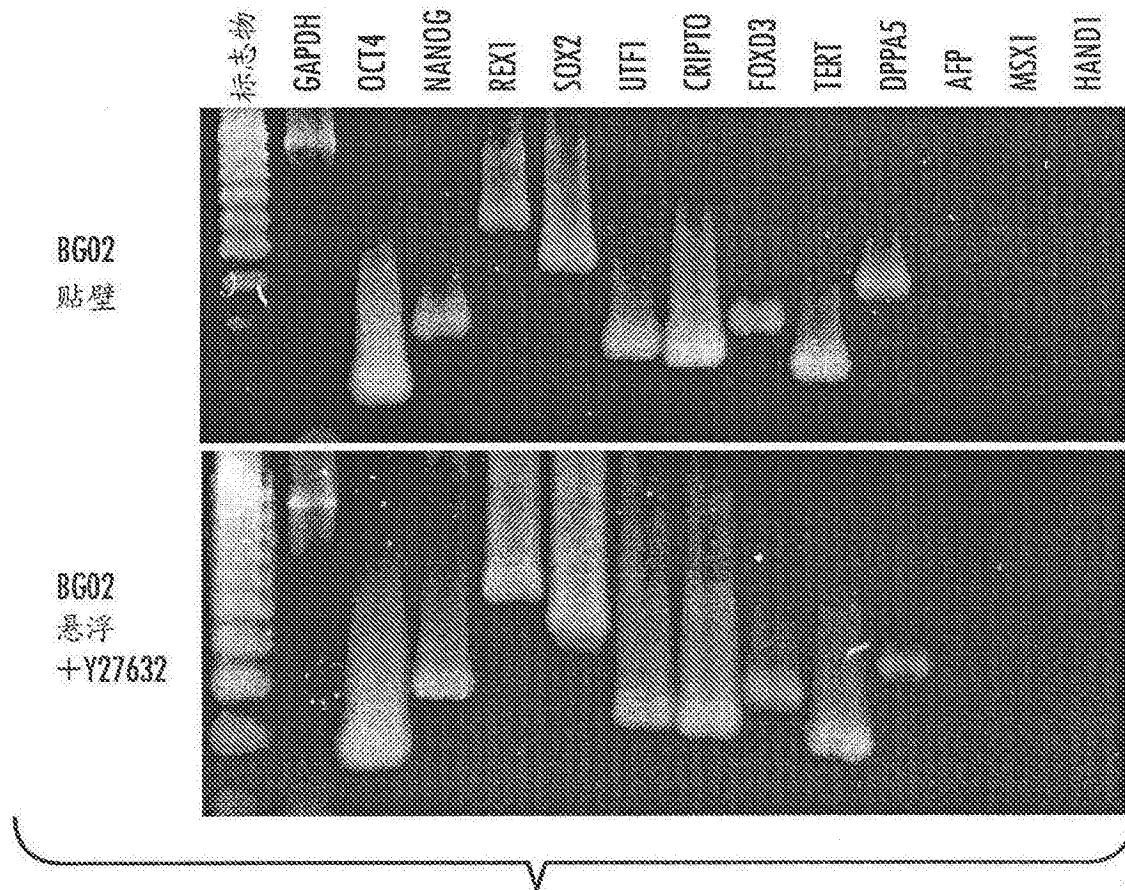


图21

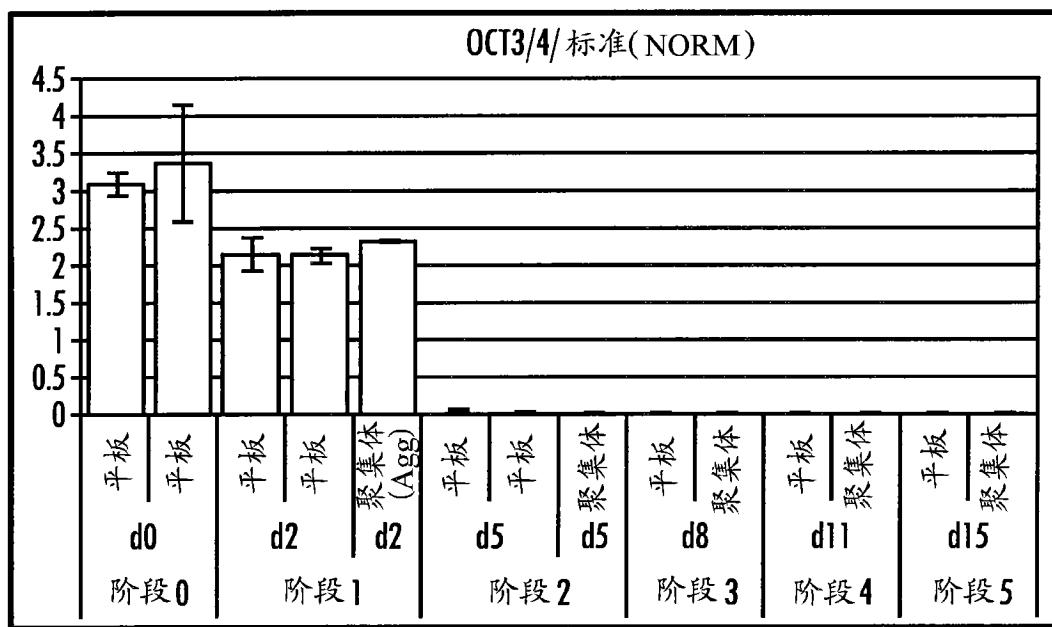


图22A

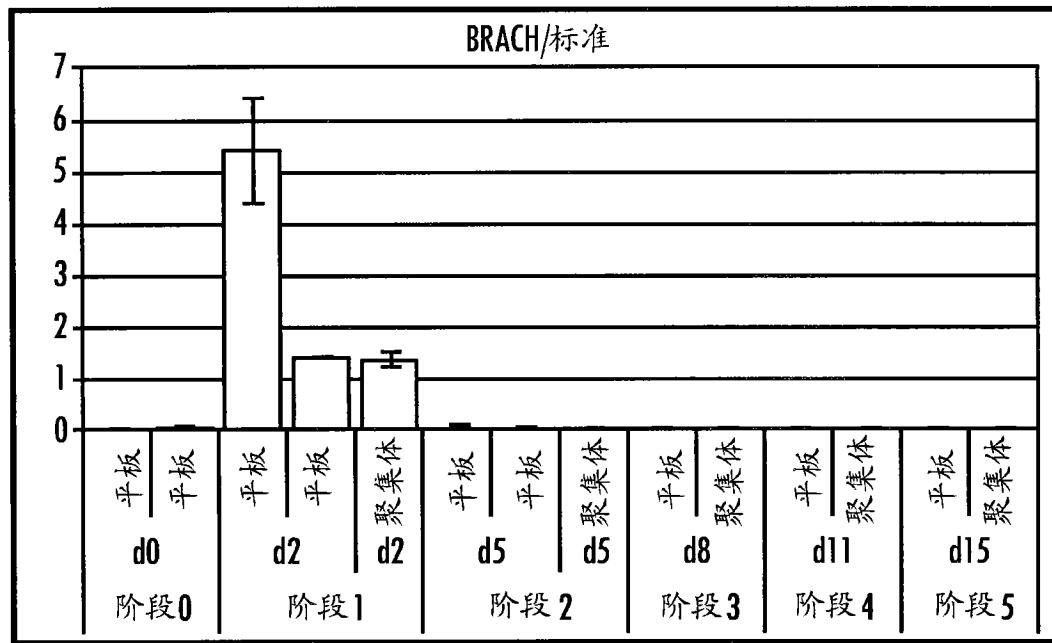


图 22B

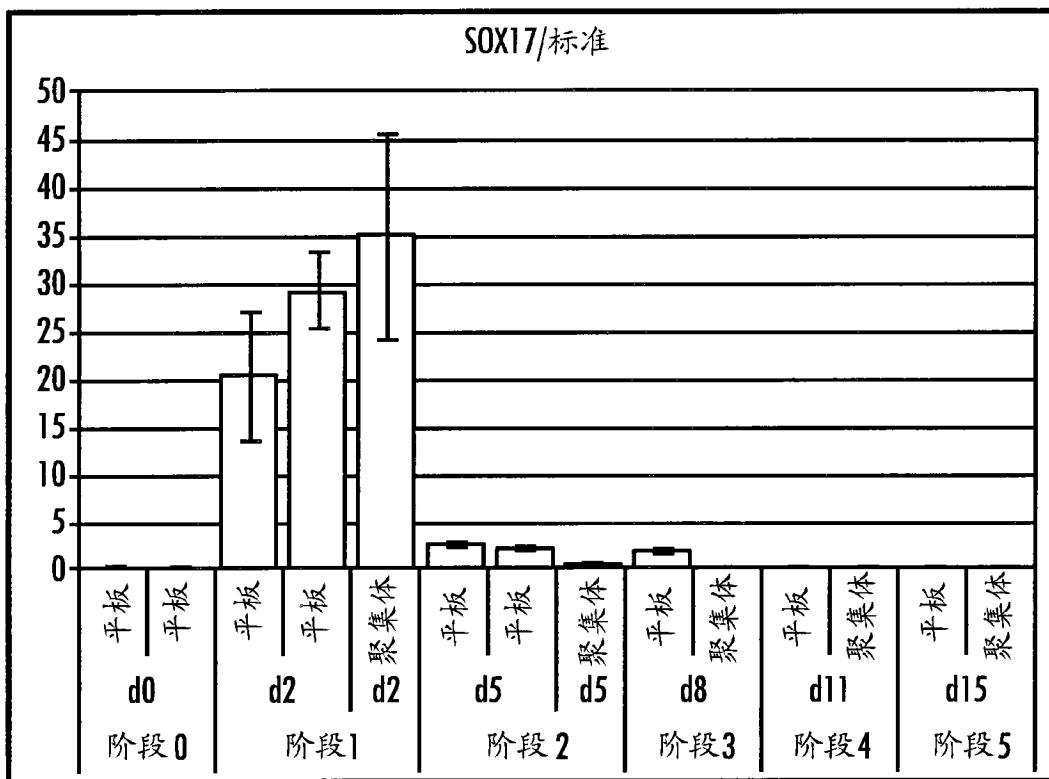


图 22C

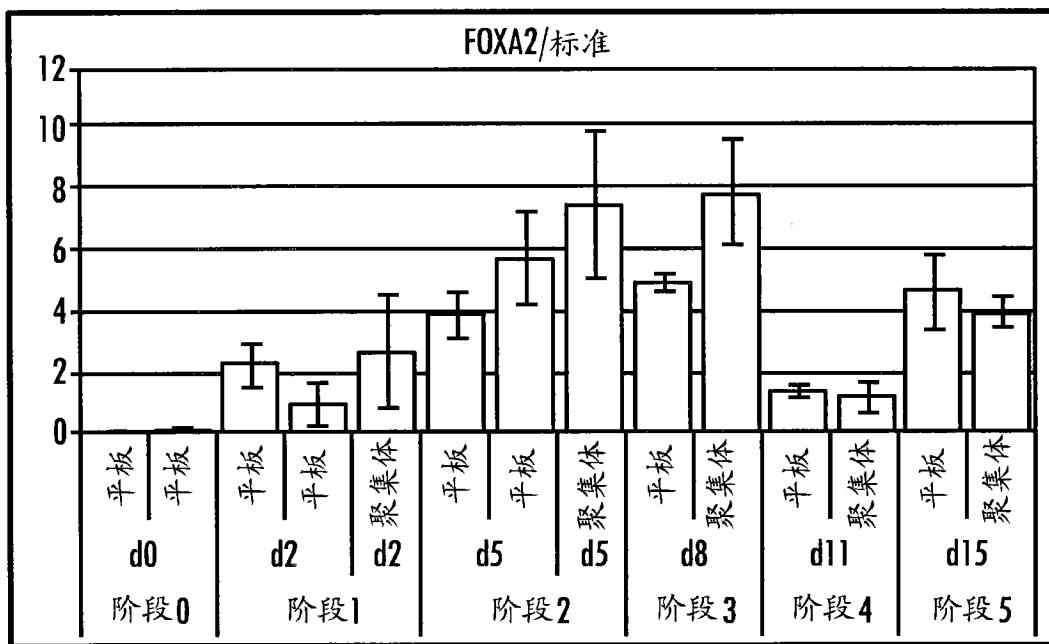


图22D

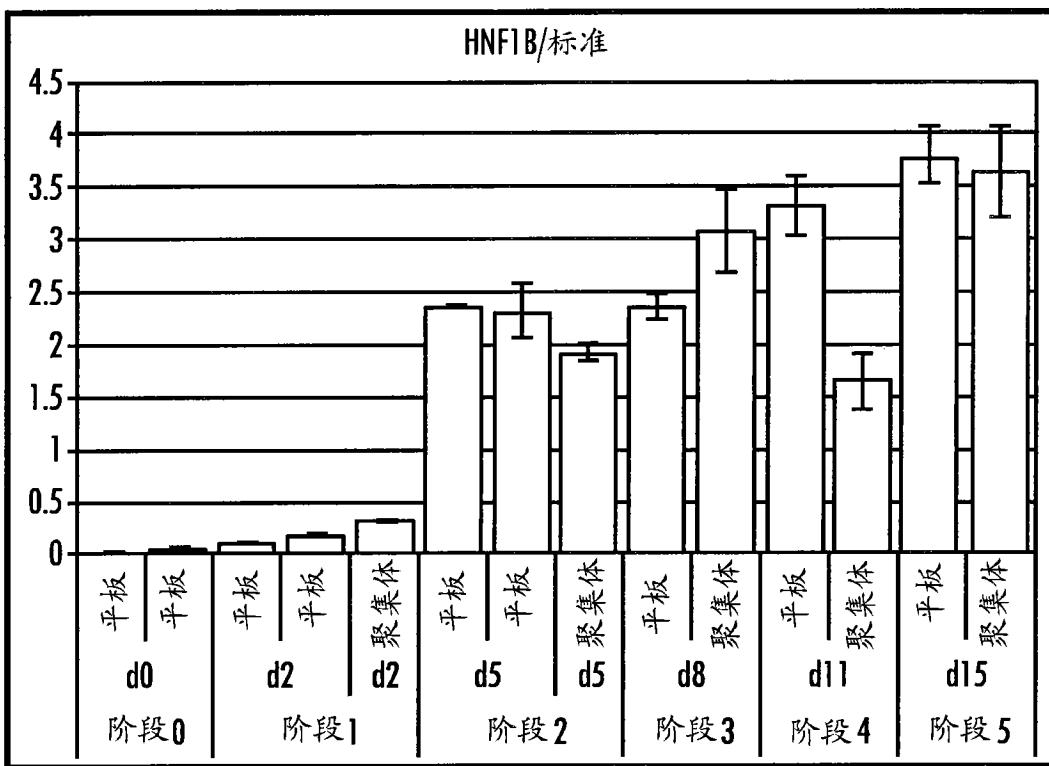


图22E

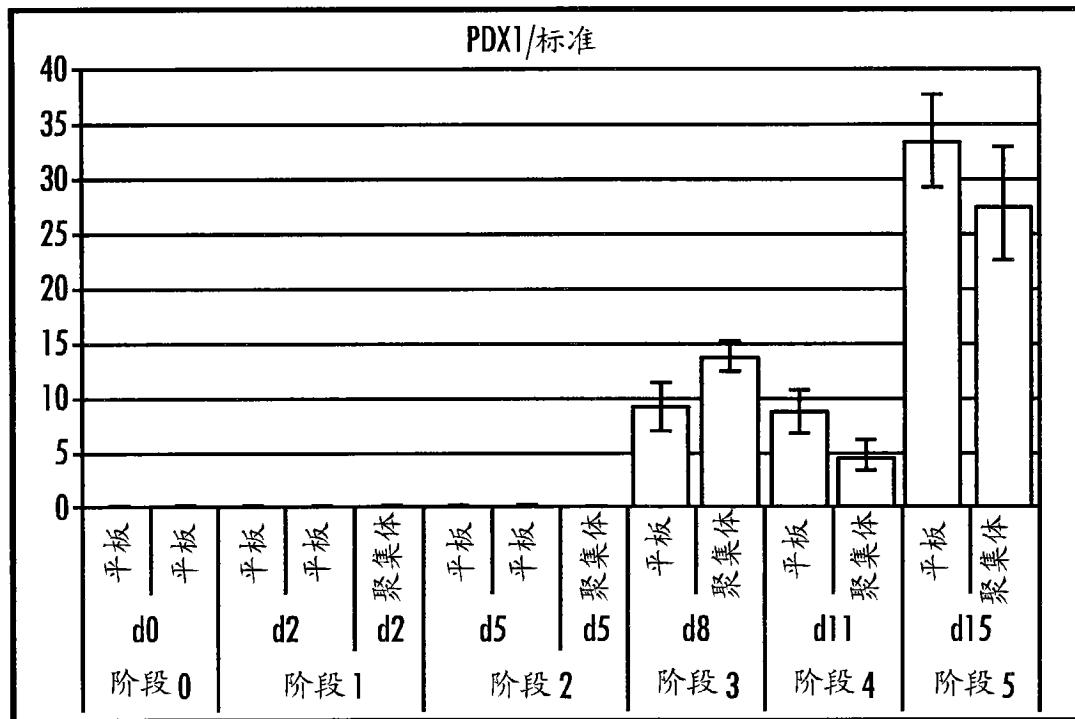


图22F

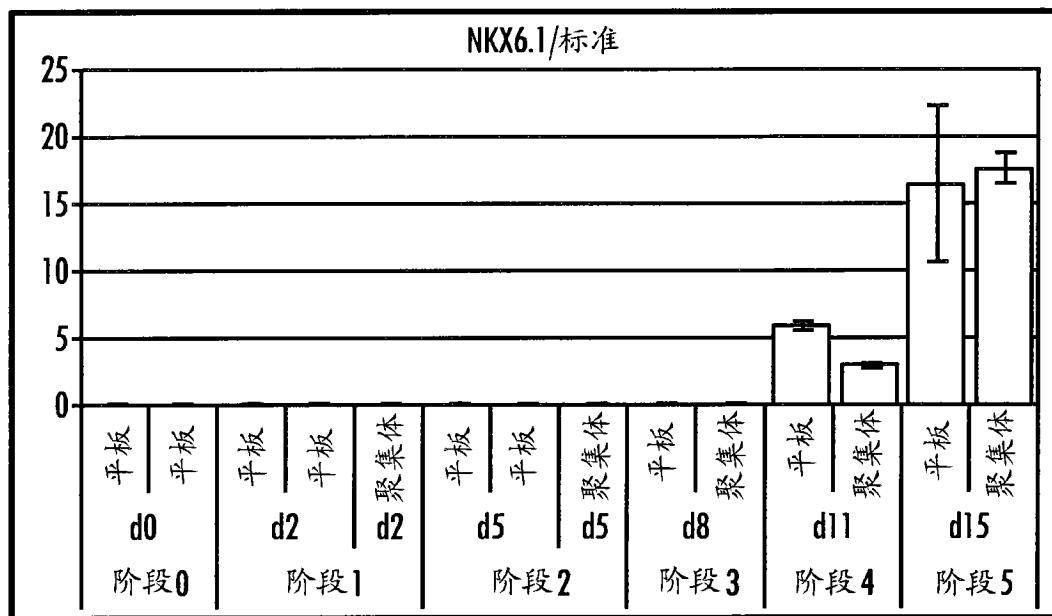


图22G

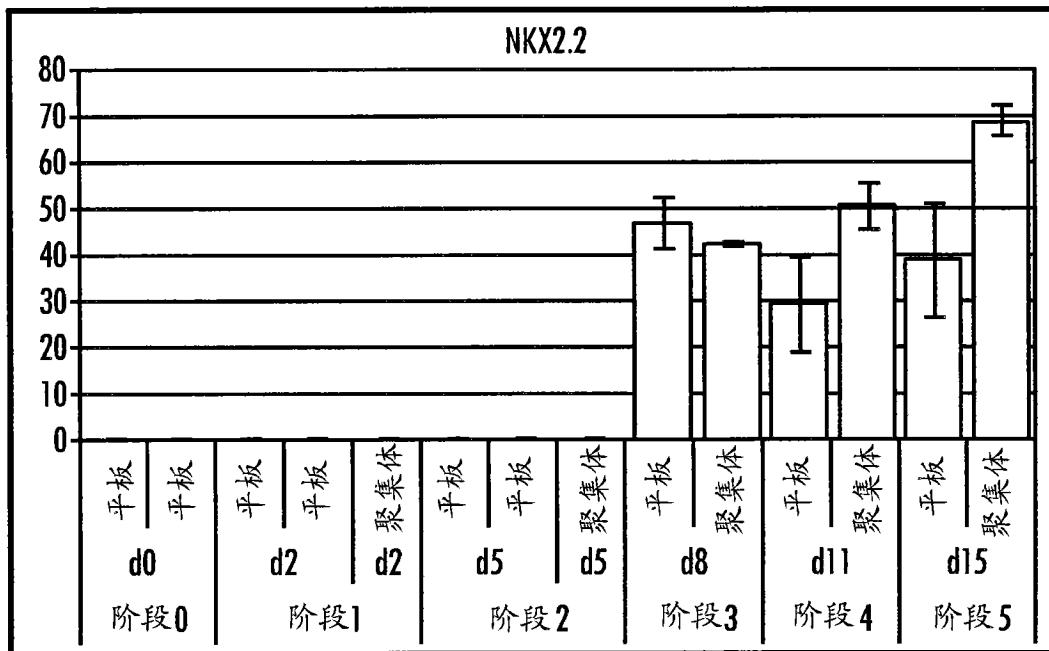


图22H

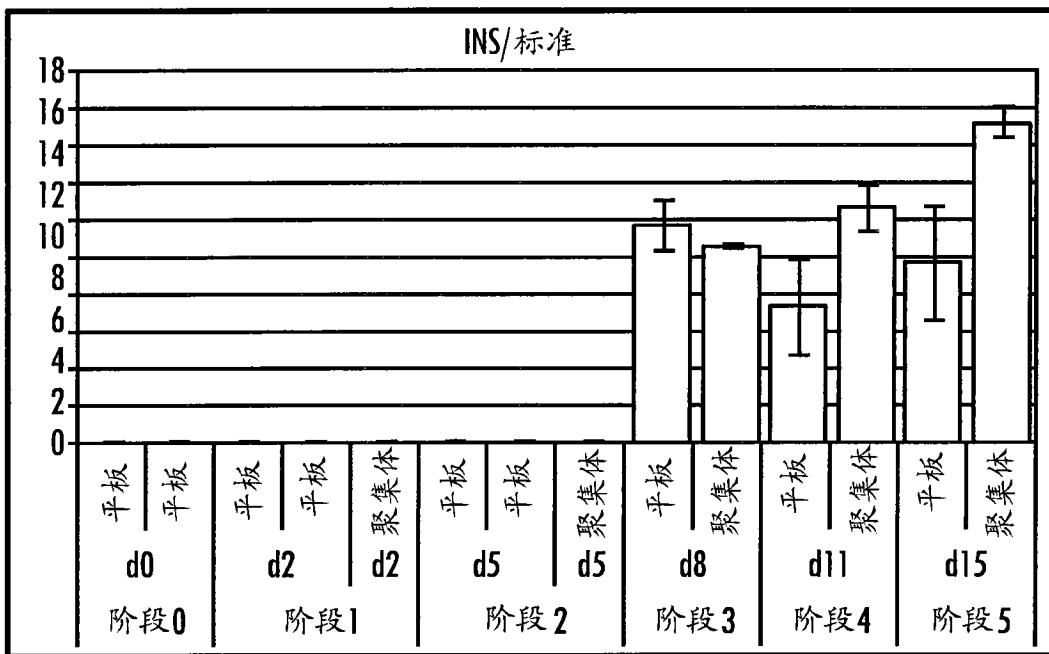


图22I

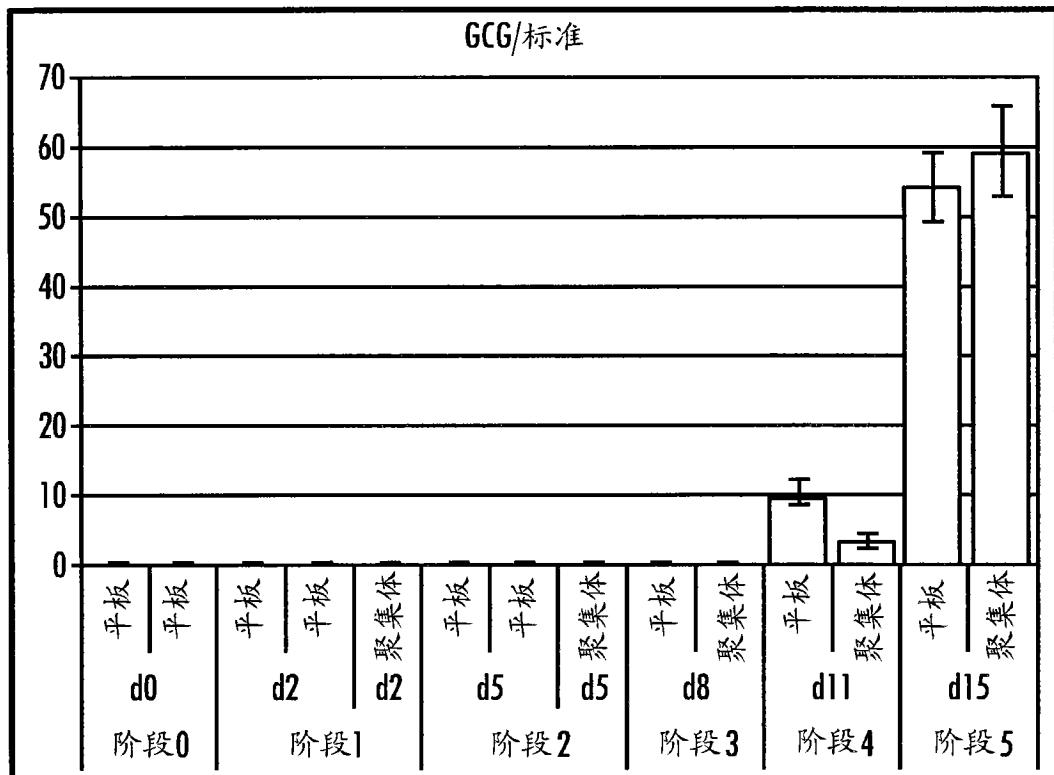


图22J

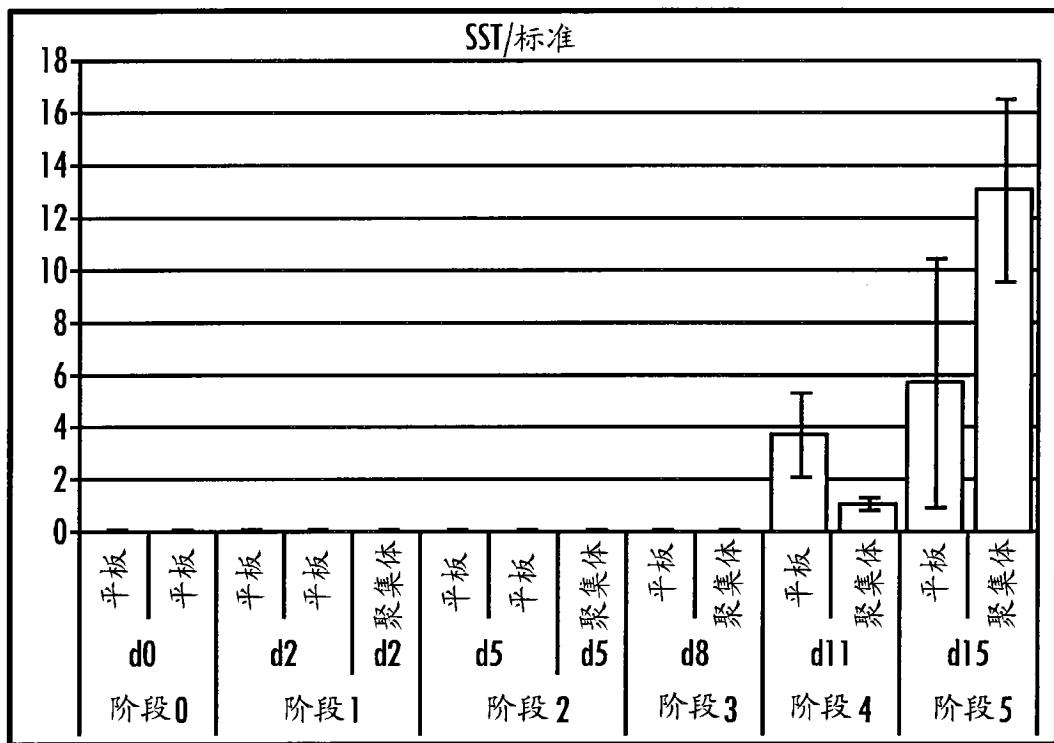


图22K

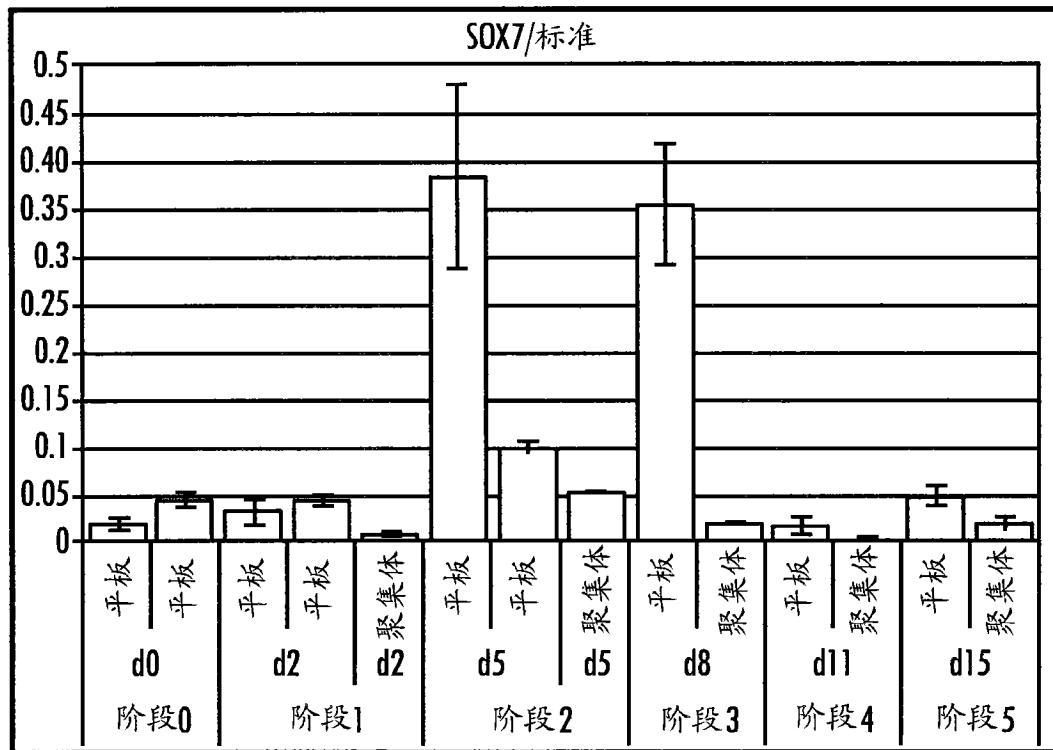


图22L

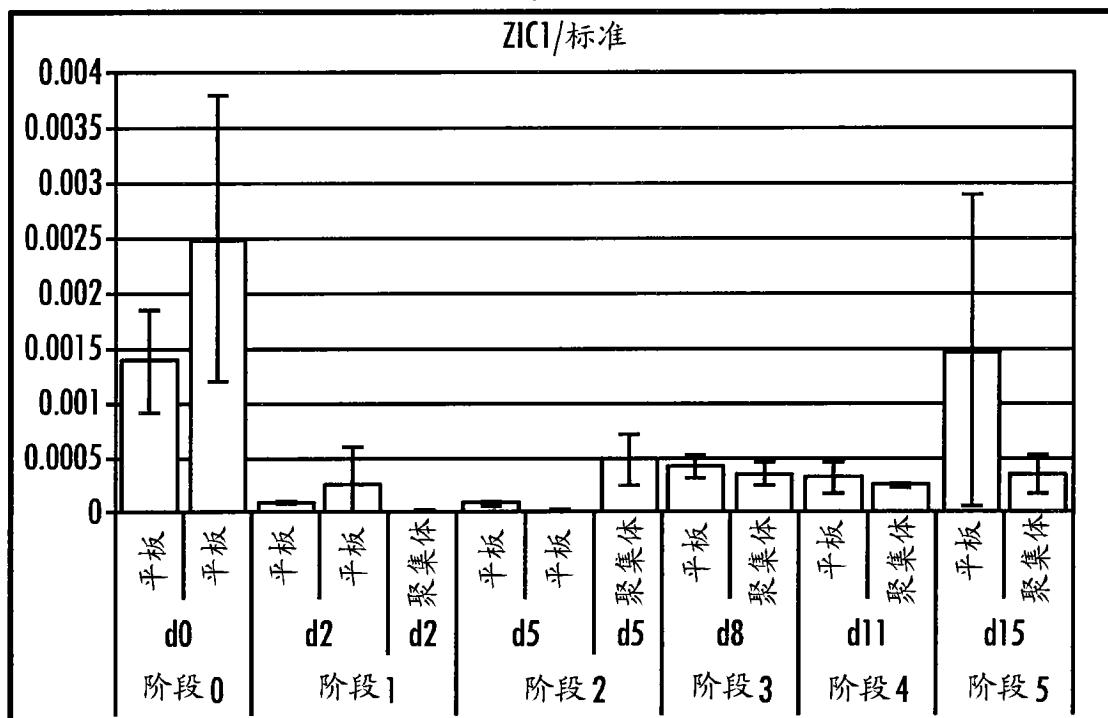


图22M

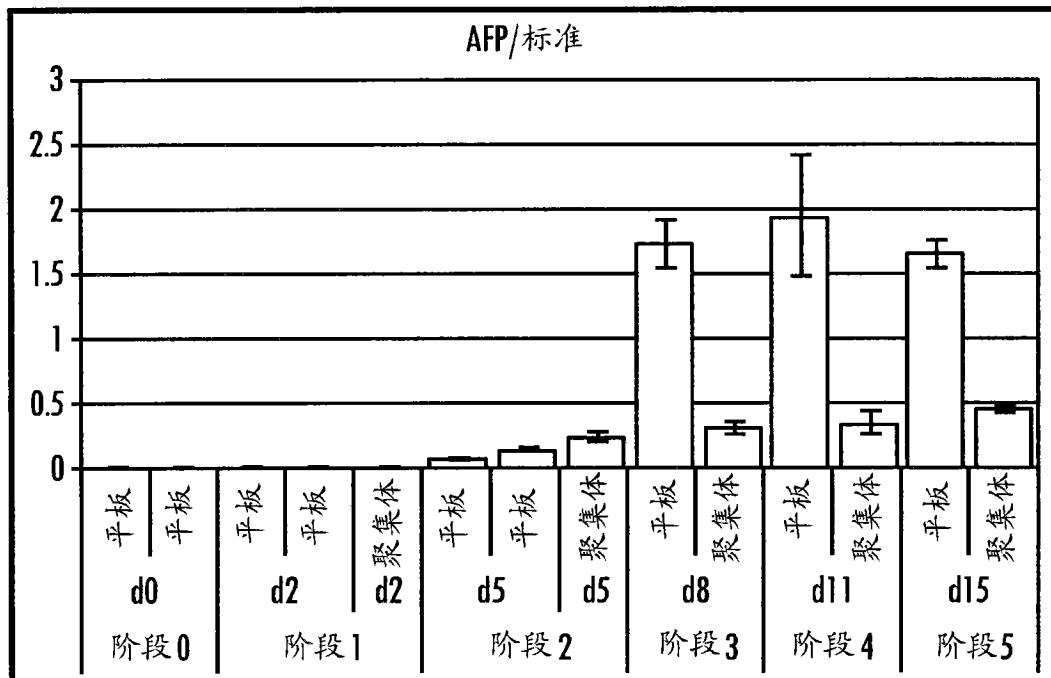


图22N

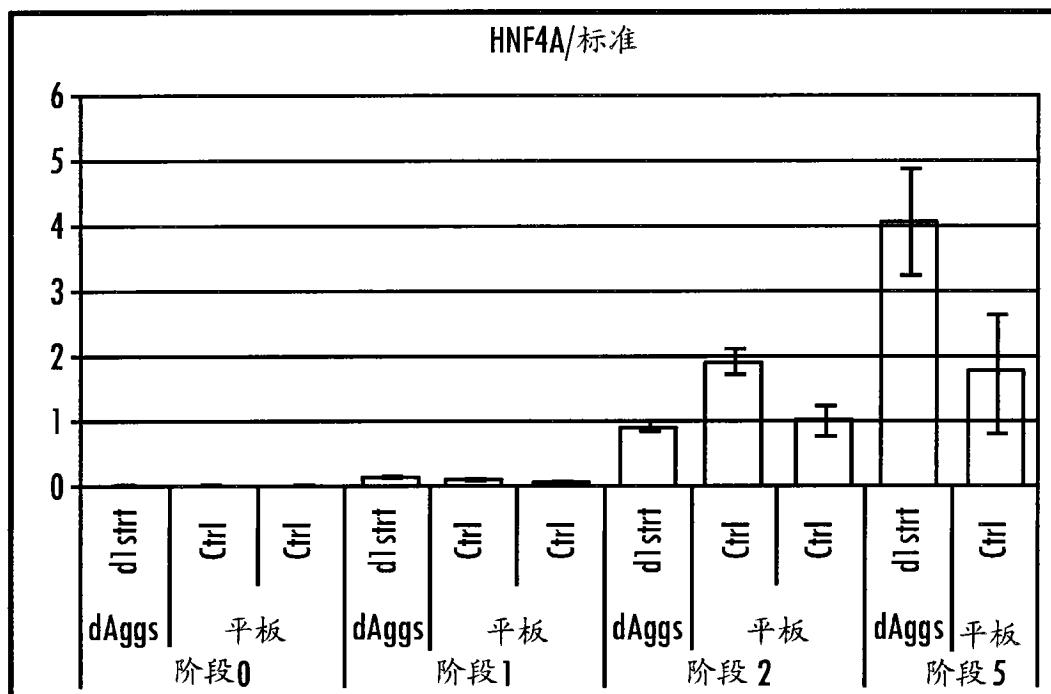


图22O

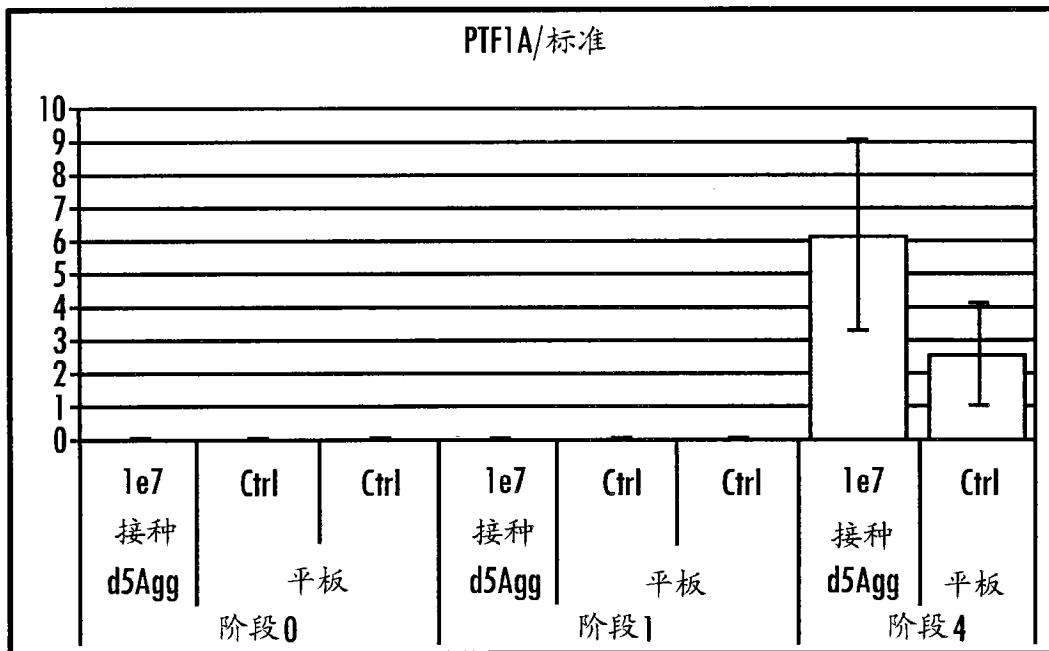


图22P

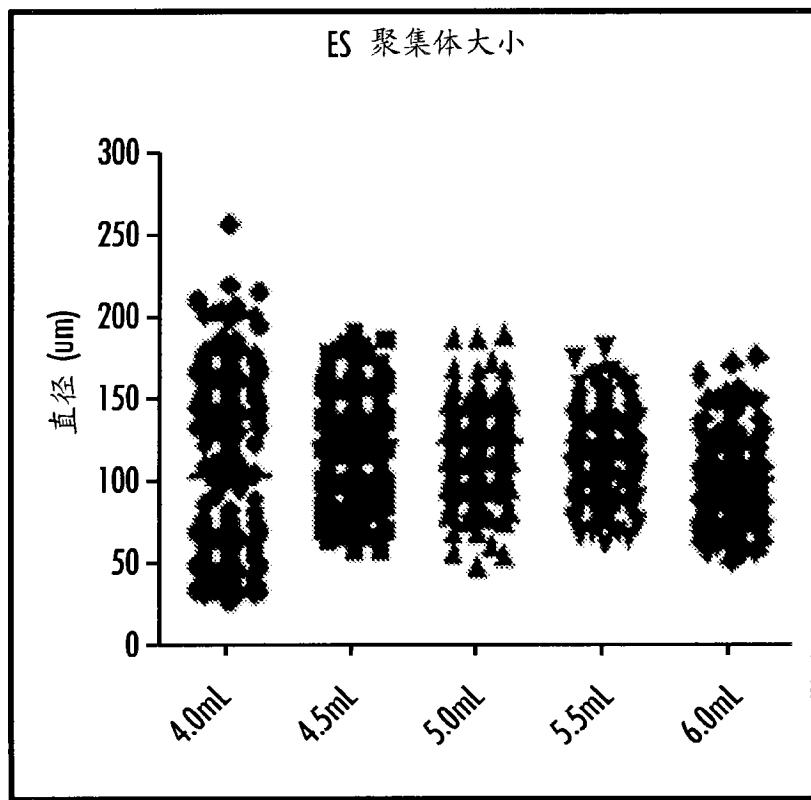


图23

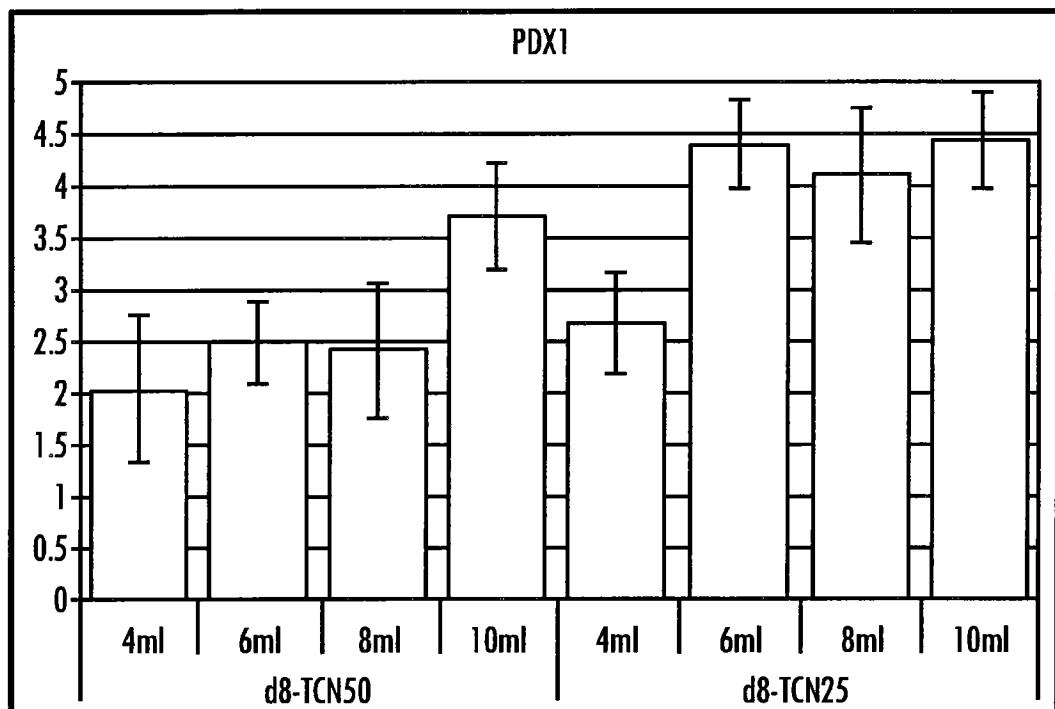


图24A

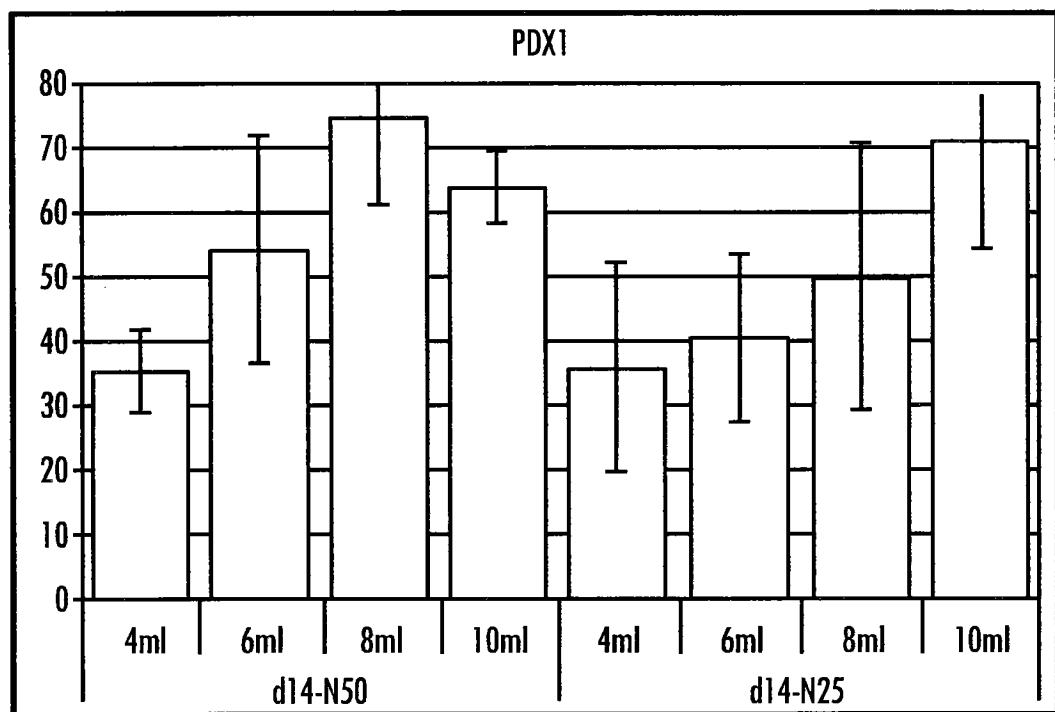


图24B

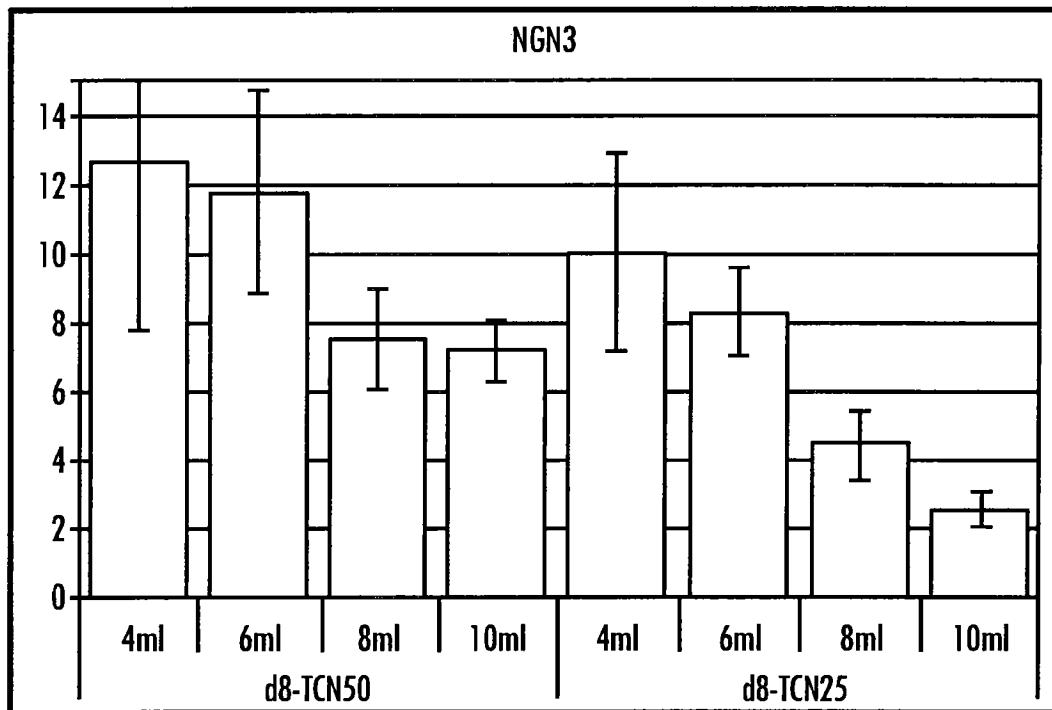


图24C

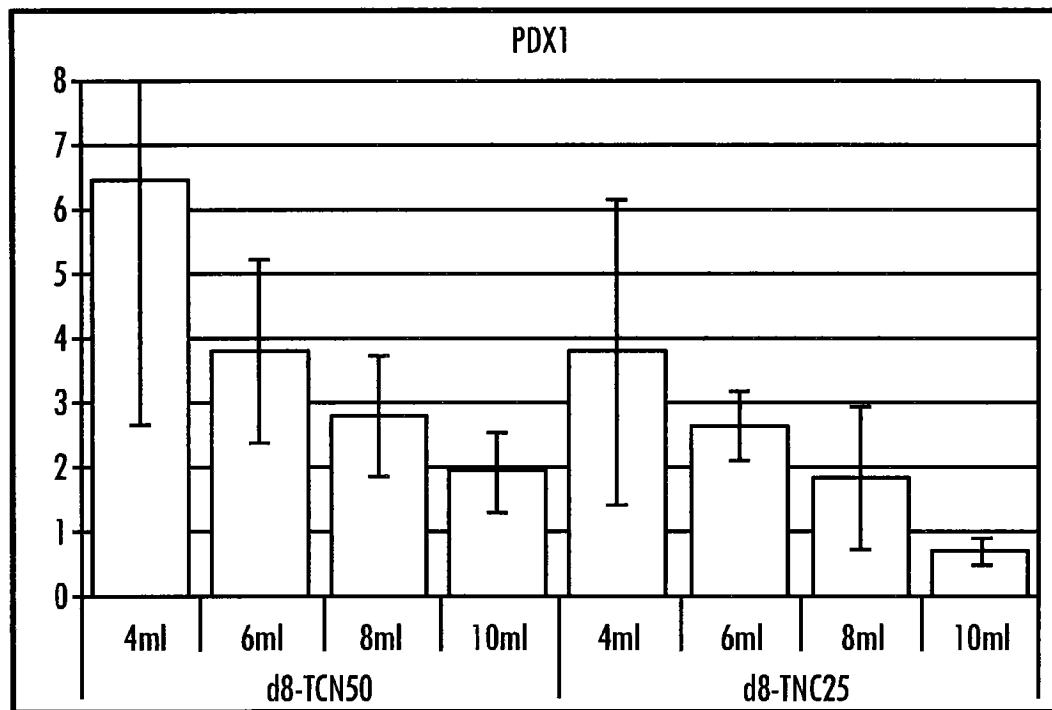


图24D