(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117467608 A
(43)申请公布日 2024.01.30

(21)申请号 202311347195.2
(22)申请日 2017.08.16
(30)优先权数据
62/375,590 2016.08.16 US
(62)分案原申请数据
201780063703.0 2017.08.16
(71)申请人 富士胶片细胞动力股份有限公司
地址 美国威斯康星州
(72)发明人 C·W·麦克马洪 L·E·利特尔 W·B·王 N·A·埃利奥特
(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
专利代理师 陶家蓉 陈扬扬
(51)Int.Cl.
C12N 5/0793(2010.01)
C12N 5/074(2010.01)

权利要求书1页 说明书54页 附图24页

(54)发明名称

分化多能细胞的方法

(57)摘要

在一些方面中,提供了用于使用单-SMAD抑制或仅用一种SMAD抑制剂抑制SMAD信号转导将多能细胞分化成中脑多巴胺能(DA)神经元的方法。在一些实施方式中,单-SMAD抑制利用骨形态发生蛋白(BMP)的单一抑制剂将多能细胞分化成中脑DA神经元。

CN 117467608 A

1.一种用于制备包含人细胞的细胞组合物的体外方法,所述人细胞表达叉头框蛋白A2(FOXA2)和LIM同源框转录因子1(LMX1)($FOXA2^+/LMX1^+$细胞),所述方法包括在下述信号转导调节剂存在的情况下培养人多能细胞:

(a)小母抗Dpp(SMAD)信号转导的单一抑制剂,

(b)音猬因子(SHH)信号转导的至少一种激活剂,和

(c)无翼(Wnt)信号转导的至少一种激活剂;

并在存在所述调节剂的情况下培养所述细胞一段时间,该段时间足以提供包含所述$FOXA2^+/LMX1^+$细胞的细胞组合物。

2.如权利要求1所述的方法,其中,所述SMAD信号转导的抑制剂是BMP抑制剂。

3.如权利要求2所述的方法,其中,所述BMP抑制剂是LDN-193189,背吗啡,DMH-1或头蛋白。

4.如权利要求3所述的方法,其中,所述BMP抑制剂是LDN-193189。

5.如权利要求4所述的方法,其中,所述LDN-193189以约0.2μM至约4μM的浓度存在。

6.如权利要求5所述的方法,其中,所述LDN-193189以约1μM至约3μM的浓度存在。

7.如权利要求1所述的方法,其中所述SMAD信号转导抑制剂是TGFβ抑制剂。

8.如权利要求7所述的方法,其中所述TGFβ抑制剂是SB431542。

9.如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中,在培养第1-15、1-16或1-17天用所述SMAD的抑制剂培养多能细胞。

10.如权利要求9所述的方法,其中,在培养第1-17天培养用所述SMAD的抑制剂培养多能细胞。

分化多能细胞的方法

[0001] 本申请要求2016年08月16日提交的美国临时专利申请62/375,590的权益,其全部内容通过引用纳入本文。

发明领域

[0002] 本发明一般涉及分子生物学和医学领域。更具体地,其涉及由多能细胞生成多巴胺能神经元的方法。

背景技术

[0003] 保留分化成多种具体细胞类型能力的细胞群能够用于产生大量谱系特异性分化的细胞群。考虑将这些谱系特异性分化的细胞群用于针对患有导致限定细胞群功能丧失的疾病的患者的细胞替代疗法。除了其直接的治疗性价值,谱系特异性分化的细胞还是用于各种目的的有价值研究工具,包括体外筛选试验以鉴定、确认和测试具体功能或用于测试递送治疗性分子以治疗细胞谱系特异性疾病。

[0004] 例如,在帕金森病的情况中,中脑多巴胺能(DA)神经元的损失导致出现疾病症状。因此,需要由多能细胞产生DA神经元细胞的方法,因为这类细胞可以治疗性地使用并用于疾病模型,例如,以鉴定用于帕金森病治疗的新型治疗。

[0005] 已经尝试了各种方法由多能细胞生成中脑DA神经元。例如,由多能细胞生成中脑DA神经元的方法通常需要使用DN-193189,其是BMP信号转导的抑制剂(抑制ALK 1/2/3/6,阻断SMAD 1/5/8)和SB-431542,其是TGF-β信号转导的抑制剂(抑制ALK 4/5/7,阻断SMAD 2/3),如在WO2013/067362中所述。因为这些方法利用小母抗Dpp(Small Mothers Against Decapetaplegic,SMAD)信号转导的2个抑制剂的组合,所述这些方法通常被称为“双SMAD抑制”或“双SMADi”。虽然可能需要发明仅使用单一SMAD抑制剂由诱导型多能干(iPS)细胞生成中脑多巴胺能(mDA)神经元的方法,但是迄今为止这些努力都是失败的。显然,存在对使用单一SMAD抑制剂由iPS细胞生成mDA神经元的方法的需求。

发明内容

[0006] 在一些方面中,本发明通过提供这样的方法克服了现有技术的限制,所述方法使用单-SMAD抑制(单-SMADi)由多能细胞生成神经元。单-SMADi方法的使用可以提供相对于需要使用2个或多个SMAD抑制剂的SMAD信号转导抑制的方法的优势。如下述实施例中所述,提供了由多能细胞,如人诱导的多能细胞(iPS细胞)生成神经细胞系,如多巴胺能神经元。如所示,这些方法可以包括数个方面,其包括:(i)交错安排(stagger)Wnt激动剂(例如,CHIR99021)的添加至第2天或第3天,(ii)将CHIR浓度再优化(例如,使用约0.5-3.0μM,0.7-3μM,1-2.5μM,1.25-2.25μM,大于约1.25μM至约2μM,或约1.55,1.65,1.75μM,或从中衍生的任何范围),和/或(iii)在第3-5天将MEK抑制剂(例如,PD0325901)包含在分化培养基中。该方法可以包括例如,上述方面(i和ii)、(ii和iii),(i和iii)或(i,ii和iii)。在一些实施方式中,将细胞暴露于BMP抑制剂(例如,背吗啡(dorsomorphin)或LDN-193189),而将细胞不

暴露于TGF-β抑制剂如SB431542,以促进细胞分化成中脑DA神经元或FOXA2$^+$/LMX1A$^+$细胞。如小鼠实施例所示,这些方法可以用于以仅含单一SMAD抑制剂(例如,仅有背吗啡或仅有LDN-193189)的培养基由iPS细胞系的高效mDA祖细胞形成。

[0007] 本发明的方面涉及用于制备包含这样人细胞的细胞组合物的体外方法,所述人细胞表达叉头框蛋白A2(FOXA2)和LIM同源框转录因子1(LMX1)(FOXA2$^+$/LMX1$^+$细胞),所述方法包括在下述信号转导调节剂存在的情况下培养人多能细胞:(a)小母抗Dpp(Small Mothers Against Decapentaplegic,SMAD)信号转导的单一抑制剂,(b)音猬因子(Sonic hedgehog)(SHH)信号转导的至少一种激活剂,和(c)无翼(wingless)(Wnt)信号转导的至少一种激活剂;并在存在所述调节剂的情况下培养所述细胞一段时间以提供包含所述FOXA2$^+$/LMX1$^+$细胞的细胞组合物。在一些优选的实施方式中,LMX1是LIM同源框转录因子1α(LMX1A)。在一些实施方式中,SMAD信号转导的抑制剂是BMP抑制剂,诸如LDN-193189(例如,以约0.2μM至约4μM的浓度,或更优选地大于0.2μM至4μM,约1μM,2μM,3μM,4μM,从中衍生的任何范围)背吗啡,DMH-1或头蛋白。如下实施例中所示,增加LDN-193189的浓度(例如,2μM,相较于0.2μM)导致iPS细胞到FOXA2$^+$/LMX1$^+$细胞或背吗啡神经元的分化改善。在一些实施方式中,BMP抑制剂是LDN-193189。SMAD信号转导抑制剂可以是TGFβ抑制剂(TGFβ信号转导途径抑制剂),诸如SB431542(例如,SB431542以约5-100、20-60、30-50μM或约40μM的浓度存在)。在一些实施方式中,在第1-15、1-16或1-17天培养时用SMAD的抑制剂培养多能细胞。基本上连续地或每天用SMAD的抑制剂培养多能细胞15、16或17天。SMAD的抑制剂可以约50-2000、50-500、500-2500或500-2000nM,或约180-240nM的浓度存在。在一些实施方式中,该方法还包括用MEK抑制剂接触多能细胞。MEK抑制剂可以是PD0325901。在一些实施方式中,PD0325901以约0.25-2.5μM或约0.5-1.5μM的浓度存在。在一些实施方式中,与SMAD信号转导的抑制剂的接触开始后,MEK抑制剂与多能细胞接触约1-3天,或在与SMAD信号转导的抑制剂的接触开始后第1-3、2-4、3-5天或第1、2、3、4或5天接触(例如,可从分化第2天或第3天开始持续约72小时完成接触)。与SMAD信号转导的抑制剂的接触开始后,MEK抑制剂可以与多能细胞接触约48至约72小时,24-96小时或24-48小时。在一些实施方式中,与SMAD信号转导的抑制剂的接触开始后约1-2天开始将MEK抑制剂与多能细胞每天或基本连续地接触约3-4天。在一些实施方式中,在第1天开始与SMAD信号转导的抑制剂的接触后第2-5天、第3-6天或第3-5天,MEK抑制剂与多能细胞接触。Wnt信号转导的激活剂可以是GSK3抑制剂,诸如CHIR99021。CHIR99021可以约0.5-3μM的浓度或以大于约1.25μM至约2μM的浓度存在(例如,约1.5-2.0μM,约1.55-1.75μM或约1.55、1.65、1.75μM或其中可衍生的任何范围;并且在一些实施方式中,在第1天与SMAD信号转导的抑制剂的接触开始后第9-17天或11-17天,可以使用较高的浓度,例如,4-7μM或6μM)。在一些实施方式中,与SMAD信号转导的抑制剂的接触开始后,Wnt信号转导的激活剂与多能细胞接触1-3天。与SMAD信号转导的抑制剂的接触开始后,Wnt信号转导的激活剂可与多能细胞接触12-48小时或24-48小时。基本上连续地或每天用Wnt信号转导的激活剂培养多能细胞10、11、12、13、14、15或约16天。在第1天与SMAD信号转导的抑制剂的接触开始后第2-17天,Wnt信号转导的激活剂可与多能细胞接触。在一些实施方式中,SHH信号转导的激活剂是嘌吗啡胺(purmorphamine)、C25II Shh或C24II Shh。在一些实施方式中,C25II Shh可以代替C24II Shh或与C24II Shh组合使用。该方法还包括将多能细胞与SHH信号转导的2个激活剂接触,如嘌吗啡胺和C25II Shh。在一些实施方式中,与SMAD

信号转导的抑制剂开始接触的同一天或与SMAD信号转导的抑制剂的接触开始后的24-48小时内,SHH信号转导的至少一种激活剂与多能细胞接触。在一些实施方式中,在第1天与SMAD信号转导的抑制剂的接触开始之时起或开始之后的第1-7天,SHH信号转导的至少一种激活剂与多能细胞接触。

[0008] 在一些实施方式中,该方法还包括用FGF-8接触多能细胞。FGF-8可以是FGF-8a或FGF-8b;优选地,FGF-8不是FGF-8f。在一些实施方式中,在与SMAD信号转导的抑制剂的接触开始当日,FGF-8不与多能细胞接触。在第1天与SMAD信号转导的抑制剂的接触开始后第9-17天或第11-17天,FGF-8可与多能细胞接触。FGF-8可以约25-500ng/mL,25-250ng/mL,50-150,50-200ng/mL或25,50,75,100,125,150,200,225,250或275ng/mL或其中可衍生的任何范围的浓度存在。在一些实施方式中,包括FGF-8可以改善细胞的活力并且促进所需标志物Engrailed-1(En-1)的表达。多能细胞可以包含受控于神经元启动子的抗生素抗性转基因。该方法可以还包括通过将细胞与抗生素、化疗剂、DNA交联剂、DNA合成抑制剂或有丝分裂接触选择选自多能细胞的神经细胞或中脑DA神经元,例如,以杀伤可能存在于包含神经细胞或中脑DA神经元的细胞培养物的分裂细胞。该方法可以还包括将多能细胞与抗生素(例如,G418(遗传霉素))或化疗剂(例如,丝裂霉素C)接触。在一些实施方式中,在第1天与SMAD信号转导的抑制剂的接触开始后第27、28、28和/或29天,丝裂霉素C与多能细胞接触。该方法可以还包括在与SMAD信号转导的抑制剂的接触开始前,在包含ROCK抑制剂的培养基中培养或孵育多能细胞。该方法可以还包括将多能细胞与布雷他汀(blebbistatin)接触。例如,在分化的第5天和第17天将布雷他汀与细胞接触。

[0009] 在一些实施方式中,至少约40%,至少约60%,至少约80%或至少约85%的细胞分化并表达FOXA2和LMX1(如LMX1A)。在一些实施方式中,至少约30%,至少约40%,至少约50%、至少约60%或至少约70%的细胞分化并表达FOXA2和酪氨酸羟化酶(TH)。表达FOXA2和LMX1(如LMX1A)或表达FOXA2和TH的经分化的细胞可以进一步表达选自下述的至少一个标志物:otd(orthodenticle)同源框2(OTX2),核受体相关1蛋白(NURR1),神经元特异性III型β-微管蛋白(Tuj1),TTF3,配对样同源域3(PITX3),AS(achaete-scute)复合物(ASCL),早期B细胞因子1(EBF-1),早期B细胞因子3(EBF-3),转甲状腺素蛋白(TTR),突触蛋白,多巴胺转运蛋白(DAT)和G蛋白偶联的,向内整流的钾通道(Kir3.2/GIRK2),CD142,DCSM1,CD63和CD99。在一些实施方式横纵,该方法还包括在内切核酸酶诸如Benzonase® or DNA酶I存在的情况下孵育人多能细胞。在一些实施方式中,内切核酸酶是人内切核酸酶。Benzonase®或DNA酶I可以100U/mL存在。在一些实施方式中,在第1天与SMAD信号转导的抑制剂的接触开始后第4-6天中的至少一天,在内切核酸酶和DNA酶存在的情况下孵育人多能细胞。在一些实施方式中,在第1天与SMAD信号转导的抑制剂的接触开始后第5天,在内切核酸酶和DNA酶存在的情况下孵育人多能细胞。

[0010] 本发明的另一方面涉及培养通过本文所述方法生成的或如上所述的中脑多巴胺能(DA)神经元。培养物可以包含在容器器具中。神经元可以包含在药物制剂中,诸如配制成用于注射的药物制剂。

[0011] 本发明的另一方面涉及在哺乳动物对象中治疗疾病的方法,其包括向对象给予治疗有效量的本发明的培养物或如上所述的培养物。哺乳动物对象可以是人。疾病可以是中枢神经系统(CNS)的疾病。在一些实施方式中,疾病是帕金森病(PD)或帕金森叠加综合征

(Parkinson-plus syndrome)(PPS)。培养物可以包含未完全分化的或处于第16、17、18、19、20、21、22、23、24或25天分化的(例如,第17-24天分化的)多巴胺能神经元。在一些实施方式中,培养物包含透明质酸基质。如实施例所示,已经观察到给予处于分化中间阶段细胞的优势,(例如,将未完全分化的多巴胺能神经元给予哺乳动物对象。

[0012] 本发明的另一方面涉及筛选测试化合物的方法,其包括:(a)将所述测试对象与通过本发明或如上所述的方法分化的细胞接触,和(b)测量细胞的功能、生理机能或活力。在一些实施方式中,所述测量包括测试细胞改变的触角电生理反应或毒理学响应。在一些实施方式中,细胞是中脑多巴胺能(DA)细胞。

[0013] 可与本发明组合的其他条件和方法可在例如U.S.2015/0265652,U.S.2015/0010514和WO2013/067362中找到,通过引用将它们的全部内容纳入本文。可以与本发明方法联用的用于纯化或促进多能细胞分化成神经元或中脑DA神经元的其他方法包括,例如Kirkeby等(2012),Kriks,等(2011);Chung,等(2011),Xi等(2012);Young等(2014);aeger等(2011),Jiang等(2012),和US2016/0177260。

[0014] 本文所用“分化天(differentiation day)”指在培养基中孵育细胞的天数,其中在第1天开始将多能细胞暴露于分化培养基。在一些优选的实施方式中,在第一天的分化培养基包含单一SMAD抑制剂。在分化培养基中孵育或培养之前,例如在于分化培养基中孵育前1、2或3天(即,在第0天,第-1天和/或第-2天),可以将细胞在包含下述或有下述组成的培养基中孵育:Essential 8™基础培养基和Essential 8™补充物(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific);马萨诸塞州沃特汉姆),任选地具有ROCK抑制剂的添加(例如,包括约0.25-5μM,0.5,0.75,1,1.25,1.5,2,3,4或其中可衍生的任何范围的H1152,例如,在第-2天)),和/或布本沙丁(blebbestatin)(例如,以约0.1-20μM的浓度,更优选约1.25-5μM或约2.5μM)。

[0015] 本文所述“基本上不含”,就特定成分而言,指所述的特定成分均非有意配制进组合物并且/或者仅作为污染物或以痕量存在。因此,组合物的任何非有意污染所导致的特定成分的总量远小于0.05%,优选小于0.01%。最优选的是其中所述特定成分的量无法使用标准分析方法检测到的组合物。

[0016] 本文所用“一个”或“一种”可指一个/种或多个/种。如本文权利要求中所用,当与词语“包括”联用时,“一种”或“一个”可指一种/个或多于一种/个。

[0017] 在权利要求中使用术语“或”表示“和/或”,除非特别指出仅替代方式,或替代方式互相排除,但公开内容支持仅指替代方式和“和/或的定义。”本文中所用的“另一种/个”可指至少第二种/个或更多种/个。

[0018] 在整篇申请中,术语“约”用于表示包括装置,用于测定数值的方法,或存在于研究对象中的差异造成的包括固有误差的固有变动的值。

[0019] 通过以下详细说明,本发明的其他目的、特征和优点将显而易见。然而,应当理解的是以下详述和具体实施例以及本发明优选实施方式仅仅是用于举例说明,本领域普通技术人员通过阅读所述详述,可以显而易见地得知本发明精神和范围之内的各种变化和改良。

[0020] 附图简述

[0021] 以下附图形成本说明书的部分并且包括以进一步证明本文提供的某些方面。可参

照这些附图中的一幅或者多幅并结合本文所示具体实施方式的详细描述来更好地理解本发明。

[0022] 图1:在第17天处理时通过测量表达FoxA2的全部细胞的比例(通过流式细胞术)或共表达FoxA2和Lmx1的全部细胞的比例(通过ICC)评估的来自3个不同iPSC系的中脑多巴胺能(mDA)祖细胞的模式化。

[0023] 图2:第17天(D17)和第24天(D24)多巴胺能祖细胞(不成熟的mDA神经元)的标志物表达。

[0024] 图3:在第17天处理时由不同的人Ips细胞系生成的mDA祖细胞的模式化。显示了表达FoxA2的所有细胞的比例,或共表达FoxA2和Lmx1的所有细胞的比例。

[0025] 图4A-C:图4A,通过选择非增殖细胞纯化神经元。图4B,mDA神经元在MMC选择后分泌多巴胺的功能。图4C,MMC选择后并未观测到增殖细胞的突触生长(outgrowth),即使在延长解冻后培养后。

[0026] 图5:由人iPS细胞的系产生的细胞中标志物的表达。

[0027] 图6:冷冻保存和解冻后,产生自K系(iPS细胞系21534.101)的mDA神经元解冻后表征。

[0028] 图7A-B:单—SMADi分化过程的交叉-iPSC(Cross-iPSC)系测试。使用经优化的单-SMADi过程分化源自健康供体的3个iPSC系和源自帕金森病患者的9个iPSC系。到处理第17天时,所有iPSC系被高效地转化为DA祖细胞,其中12个系中的11个系中>80% FoxA2/Lmx1共表达(图7A)。到处理完成时(第37天),来自iPSC系的细胞实现了高水平的神经元纯度(>90% MAP2+/巢蛋白-),中脑特异性(>80% FoxA2+)和中脑多巴胺神经元成熟(>40% TH+)(图7B)。

[0029] 图8:FoxA2/Lmx1共表达的流式细胞术。当细胞在第17天时是>80%FoxA2+/Lmx1+时,认为祖细胞模式化是成功的(图8,上图)。示出了标准以下的祖细胞模式化的示例(图8,下图),其中有60% FoxA2+/Lmx1+细胞和显著的FoxA2+/Lmx1-阴性细胞群。

[0030] 图9:由iPSC-mDA神经元释放的多巴胺。使用经优化的单-SMADi方案(“条件9”)将iPSC系“K”分化至处理完成(第37天)并冷冻保存。并未从iPSC衍生的前脑神经元(iCell神经元)检测到多巴胺释放。相反,源自使用经优化的单-SMADi过程的iPSC-mDA细胞(DA疗法神经元)分泌至少与源自使用经优化的双-SMAD过程的细胞(ICell Dopa神经元)一样多的多巴胺。

[0031] 图10:iPSC-mDA神经元的电活性。将冷冻保存的iPSC-mDA神经元解冻,并接种到PET涂覆的48孔多电极阵列(MEA)平板上。以经优化的单-SMADi方案(DA疗法)制造的神经元显示出相较于以优化的双-SMADi方案(iCell Dopa G100)制得的细胞相似的电活性,包括平均放电率(mean firing rate)(mFR),簇发放(bursting)(大BPM)和连通性(connectivity)(顶图)。mFR频率和连通性爆发式锋电位(burst)强度随时间增加,在解冻后大约第16天达到平稳。时间栅格图显示了孔中所有电极上清晰的尖峰电位间(inter-spike)间隔,高爆发式锋电位强度和簇发放,证明了高度的电活性。

[0032] 图11:iPSC-mDA神经元的定量基因表达概况。在第37天处理时由源自使用经优化的单-SMADi过程的4个批次的iPSC-mDA细胞(批次1-4)和源自使用经优化的双-SMADi方案的1个批次的iPSC-mDA细胞(iCee Dopa神经元)提取RNA。RNA分离后,进行实时定量聚合酶

链式反应(PCR),以对GAPDH对照的相对表达表示结果。将<10^{-4}的值认为是背景(阴影框)。中脑和mDA神经元标志物的表达在各批次之间和使用不同方案制得的细胞之间是相似的。针对非中脑区域或非mDA细胞类型的标志物水平低,并且在单-SMADi和双-SMADi衍生的细胞之间也是相似的。

[0033] 图12:向cGMP相容试剂的转化。使用单-SMADi过程使用标准试剂或cGMP相容试剂将iPSC-mDA细胞分化,产生等同祖细胞模式化(第17天)和第37天mDA神经元纯度。

[0034] 图13:非人类灵长类动物中iPSC-DA神经元的移植。人细胞质(STEM121)的染色揭示了所有动物中良好的人细胞移植和神经支配(innervation)。在移植物中观察到多巴胺神经元(TH+),证明这些细胞长期存活并在脑中神经支配mDA神经元靶结构的能力。在这些动物中没有观察到肿瘤、神经突触生长或其他负面影响。

[0035] 图14:大鼠PD模型系统中iPSC-DA祖细胞和神经元的移植。在这些动物中的任一个动物中没有观察到肿瘤、神经突触生长或其他负面影响。该结果支持这样的观点,即相较于更成熟的细胞,取自经优化的单-SMADi分化过程(第17-24天)早期的细胞能够更好地移植和神经支配。

[0036] 图15:使用2μM LDN-193189改善分化。在多个实验中(n=5),当使用2μM LDN时候,观察到分化质量的改善。作为在方案中使用2μM LDN的结果,在第17天的祖细胞中观察到较高的FoxA2和Lmx1表达水平(图15,顶图),并且在第37天处理时观察到较高百分比的底板(floor plate)衍生的神经元(FoxA2+)(图15,底图)。

[0037] 说明性实施方式的描述

[0038] 在一些方面中,本发明通过提供用于将多能细胞诸如诱导型多能干细胞分化成神经元前体细胞或神经元诸如中脑多巴胺能细胞的方法和组合物克服了现有技术的限制。该方法可以涉及在单一SMAD抑制剂存在的情况下("单-SMAD抑制")将多能细胞分化。这类方法相较于之前需要使用两种或多种SMAD抑制剂的方法,可以受益于使用单一SMAD抑制剂的优势(例如,降低成本,简化的或更加少的方法等)。

[0039] I.定义

[0040] "多能性"或"多能"是指这样的干细胞或未分化细胞,其具有分化成构成一种或多种组织或器官的所有细胞的潜能,例如,三种胚层中的任何一种:内胚层(内部胃粘膜、胃肠道、肺)、中胚层(肌肉、骨、血液、泌尿生殖系统)或外胚层(表皮组织和神经系统)。

[0041] "诱导型多能干细胞"通常缩写为iPS细胞或iPSC,其指通过导入或与重编程因子接触由非多能细胞(通常是成年体细胞)或最终分化的细胞(例如,成纤维细胞、造血细胞、肌细胞、神经元、表皮细胞等)人工制备的一类多能干细胞。

[0042] "胚胎干(ES)细胞"是源自早期胚胎的多能干细胞。

[0043] "贴壁培养"指这样的培养,其中细胞或细胞的聚集体附着与表面。

[0044] "悬浮培养"指这样的培养,其中细胞或细胞的聚集体在悬浮于液体培养基的同时增殖。

[0045] "基本上不含"外部添加的组分指这样的培养基,其不具有或基本上没有除了培养基中细胞之外其他来源的特定组分。"基本上不含"外部添加的生长因子或信号转导抑制剂如TGFβ、bFGF、TGFβ超家族信号转导抑制剂等可以表示最小量或不可检测量的外部添加的组分。例如,基本上不含TGFβ或bFGF的培养基或环境可以含有少于5、4、3、2、1、0.9、0.8、

0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.01、0.001ng/mL或其中可衍生的任何范围。例如,基本上不含信号转导抑制剂的环境或培养基可以含有少于0.2、0.1、0.09、0.08、0.07、0.06、0.05、0.04、0.03、0.02、0.01、0.005、0.001μM或其中可衍生的任何范围。

[0046] “分化”是将一种不太特化的细胞形成至少一种更特化的新细胞类型的后代的过程。

[0047] 术语“聚集体促进培养基”表示增强细胞聚集体形成并且对作用方式没有任何限制的任何培养基。

[0048] 术语“聚集体”,即拟胚体指包含悬浮培养的多能干细胞、分化的细胞和/或部分分化的细胞的均质或异质细胞簇。

[0049] “神经元”或“神经细胞”或“神经细胞类型”或“神经谱系”可以包括任何神经元谱系细胞,并且可以用于指处于神经元个体发育的任何阶段的细胞,没有任何限制,除非另有说明。例如,神经元可以包括神经元前体细胞,成熟神经元和神经细胞类型,例如星形胶质细胞。

[0050] “编码”特定蛋白质的“基因”、“多核苷酸”、“编码区域”、“序列”、“区段”或“片段”是这样的核酸分子,当其位于适当调控序列控制下时,其在体外或体内被转录以及任选地也被翻译成基因产物,例如,多肽。编码区域可以cDNA、基因组DNA或RNA形式存在。当以DNA形式存在时候,核酸分子可以是单链(即,有义链)或双链。编码区域的边界由5’(氨基)末端的起始密码子和3’(羧基)末端的翻译终止密码子确定。基因可包括但不限于:来自原核或真核mRNA的cDNA,来自原核或真核DNA的基因组DNA序列,以及合成的DNA序列。转录终止序列通常位于基因序列的3’端。

[0051] 术语“转基因”指通过人工或天然手段,如外源性核酸导入细胞或生物体的藉由、核酸或多核苷酸。外源性核酸可以来自不同的生物体或细胞,或者其可以是生物体或细胞中天然出现的核酸的一个或多个拷贝。作为非限制性的示例,外源性核酸处于与天然细胞不同的染色体位置,或者与天然存在的核酸序列不同的核酸序列侧接。

[0052] 术语“启动子”以其通常含义在本文中使用,指包含DNA调控序列的核苷酸区域,其中该调控序列源自能够结合RNA聚合酶并且开始下游(3’方向)编码序列转录的基因。

[0053] II.单-SMAD抑制的SMAD抑制剂

[0054] 在一些方面中,单一BMP信号转导抑制剂或单一TGF-β信号转导抑制剂被用于在方法中抑制SMAD信号转导以将多能细胞(例如,iPS细胞,ES细胞)转化成神经元细胞,如中脑多巴胺能细胞。例如,在一些方面中,多能细胞被转化成包含中脑DA神经元的神经元细胞群,其中分化发生在包含单一BMP信号转导抑制剂的培养基中。在一些实施方式中,BMP抑制剂是LDN-193189,背吗啡或DMH-1。BMP信号转导的抑制剂的非限制性示例包括背吗啡,显现阴性BMP,截短的BMP受体,可溶性BMP受体,BMP受体-Fc嵌合体,头蛋白,LDN-193189,卵泡抑素,腱蛋白,gremlin,cerberus/DAN家族蛋白,ventropin,高剂量激活素和AMN蛋白(amnionless)在一些实施方式中,核酸,反义,RNAi,siRNA或其他遗传方法可以用于抑制BMP信号转导。本文所用BMP信号转导抑制剂可以简称为“BMP抑制剂”。在分化的第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16天和/或第17天或其中可衍生的任何范围中(例如,第1-17、1-16、1-15、2-15天等),BMP抑制剂可以包含在分化培养基中。在一些实施方式中,在分化的第1-17天中的所有天数中,BMP抑制剂包含于分化培养基中。尽管如此,预期的是,有可

能在某些时间(例如,上述天数中的第1、2或3天)从分化培养基中去除BMP抑制剂。在一些实施方式中,BMP抑制剂任选地在第11-17天不包含在分化培养基中,并且在一些优选的实施方式中,BMP抑制剂在第1-10天包含在分化培养基中。

[0055] 在一些实施方式中,BMP抑制剂是LDN-193189,多吗啡、DMH-1或头蛋白。例如,可以在这样的培养基中培养细胞,所述培养基包含约1-2500、1-2000或1-1,000nM LDN-193189(例如,约10至500、50至500、50至300、50、100、150、200、250、300、500、750、1000、1250、1500、1750、2000、2250或约2500nM LDN-193189或其中可衍生的任何范围)。在一些实施方式中,可以在这样的培养基中培养细胞,所述培养基包含约0.1至10μM背吗啡(例如,约0.1至10、0.5至7.5、0.75至5、0.5至3、1至3、0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.55、1.6、1.65、1.7、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3或约2μM背吗啡或其中可衍生的任何范围)。在一些实施方式中,可以在包含约1μM DMH-1(例如,约0.2-8、0.5-2或约1μM DMH-1或其中可衍生的任何范围)的培养基中培养细胞。如上述示例所示,在单-SMAD抑制方法中成功地使用了LDN-193189、背吗啡和DMH-1以由iPS细胞产生中脑多巴胺能神经元。

[0056] 在一些方面中,TGFβ抑制剂可以作为单-SMAD抑制剂用于抑制SMAD以由多能细胞如iPS细胞产生中脑多巴胺能神经元。例如,在一些实施方式中,分化培养基包含至少第一TGFβ信号转导抑制剂。TGFβ信号转导的抑制剂的非限制性示例包括A-83-01、GW6604、IN-1130、Ki26894、LY2157299、LY364947(HTS-466284)、A-83-01、LY550410、LY573636、LY580276、NPC-30345、SB-431542、SB-505124、SD-093、Sml6、SM305、SX-007、Antp-Sm2A和LY2109761。例如,分化培养基中的TGFβ抑制剂可以是SB431542。在一些方面中,在包含约0.1至100μM SB431542(例如,约1至100、10至80、15至60、20-50之间,或约40μM SB431542)的培养基中培养细胞。本文所用TGFβ信号转导抑制剂,包括TGFβ受体抑制剂可以简称为“TGFβ抑制剂”。在一些实施方式中,TGFβ抑制剂不包含在分化培养基中。在一些实施方式中,TGFβ抑制剂(例如,SB431542)作为单-SMAD抑制剂在第1-3天,或第1、2、3天,和/或第4天包含在分化培养基中。如下述实施例所示,在一些实施方式中,BMP抑制剂被用作单-SMAD抑制剂,因为相较于使用TGFβ抑制剂,观测到这些化合物产生多能细胞向中脑DA神经元更优的分化。

[0057] III.包含MEK抑制剂

[0058] 在一些方面中,MEK抑制剂包含在分化培养基中,例如,与BMP抑制剂或单-SMAD抑制剂组合以由多能细胞如iPS细胞产生中脑多巴胺能神经元。在一些实施方式中,MEK抑制剂是PD0325901。可以根据实施方式使用的MEK抑制剂的非限制性示例包括PD0325901、曲美替尼(GSK1120212)、司美替尼(AZD6244)、比玛舍替尼(pimasertib)(AS-703026)、MEK162、可比美替尼(cobimetinib)、PD184352、PD173074、BIX 02189、AZD8330和PD98059。例如,在一些实施方式中,该方法包括在约0.1至10μM之间(例如,约0.1至5之间;0.5至3之间或0.5和1.5μM之间)的MEK抑制剂如PD0325901存在的情况下培养细胞。在一些实施方式中,细胞与MEK抑制剂(例如,PD0325901)在分化的第3、4、5或第3-5天接触。

[0059] 因此,在某些方面,分化细胞包括在这样的培养基中培养多能细胞群,所述培养基包含BMP抑制剂;音猬因子(Sonic hedgehog)(SHH)信号转导的激活剂;Wnt信号转导的激活剂,MEK抑制剂或前述组合,其中所述培养基不包含外源性添加的FGF8b。在一些情况中,可以使用TGFβ抑制剂,而不是BMP抑制剂。在另一方面,实施方式的方法不包括使用DA特异性

标志物纯化细胞。在一些方面中,多能细胞包含受控于神经元启动子的抗性基因,其可以用于纯化神经元细胞(例如,表达抗生素抗性基因的神经元细胞将在抗生素的暴露下存活,而非神经元细胞将会死亡)。

[0060] 在一些实施方式中,富集的中脑DA神经元群可以通过这样的方法产生,所述方法包括:获得多能细胞群;在包含MEK抑制剂(例如,PD0325901)的培养基中将细胞分化成神经谱系细胞群,其中该培养基在分化的第1天不含有外源性添加的FGF8b;和进一步分化神经谱系细胞群的细胞以产生富集的中脑DA神经元群。如本文所述,在一些情况中,发明人已经观察到,在第1天将FGF8(例如,FGF8b)包含在分化培养基中可以,在一些情况中,阻止或防止细胞分化成中脑DA神经元。在一些实施方式中,在分化的后期数天,诸如第9、10、11、12、13、14、15、16、17天或其中可衍生的任何范围,FGF8可以任选地包含在分化培养基中,例如,优选地,其中多能细胞的接触在第1天于分化培养基中以单一SMAD抑制开始。

[0061] IV.包含Wnt激活剂或GSK抑制剂

[0062] 在一些方面中,Wnt激活剂(例如,GSK3抑制剂)包含在分化培养基中,例如,与BMP抑制剂或单-SMAD抑制剂组合以由多能细胞如iPS细胞产生中脑多巴胺能神经元。在一些实施方式中,多能细胞成为包含中脑DA神经元的神经元细胞群,其中分化是在包含Wnt信号转导的至少一种激活剂的培养基中。

[0063] 多种Wnt激活剂或GSK3抑制剂可以用于本发明的多个方面。例如,WNT信号转导的激活剂可以是糖原合成酶激酶3(GSK3)抑制剂。GSK3抑制剂的非限制示例包括NP031112、TWS119、SB216763、CHIR-98014、AZD2858、AZD1080、SB415286、LY2090314和CHIR99021。在一些实施方式中,多能细胞与非SB415286的单一SMAD抑制剂接触。在一些实施方式中,Wnt信号转导的激活剂是CHIR99021。因此,在一些方面中,用于根据实施方式使用培养培养基包含约0.1至约10μM的CHIR99021(例如,约0.1至5,0.5至5,0.5至3之间,大于约1.25至2.25,约1.25、1.5、1.55、1.65、1.7、1.75、1.8、1.9、2.0或约1.75μM CHIR99021或其中可衍生的任何范围)。

[0064] 在一些优选的实施方式中,任选地,Wnt激活剂(例如,GSK3抑制剂)在分化的第1天不包含在分化培养基中。在一些实施方式中,在第2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16天,和/或第17天,或这些天数的任何组合或所有天数,Wnt激活剂或GSK抑制剂(例如,CHR99021)包含在分化培养基中。例如,在一些实施方式中,Wnt激活剂或GSK抑制剂在第2-17天或第3-17天包含于分化培养基中。

[0065] V.音猬因子激活剂

[0066] 在一些方面中,音猬因子(SHH)信号转导的激活剂包含在分化培养基中,例如,与BMP抑制剂或单-SMAD抑制剂组合以由多能细胞如iPS细胞产生中脑多巴胺能神经元。在一些实施方式中,音猬因子激活剂是音猬因子(SHH)或突变的Shh。Shh可以是,例如,人或小鼠蛋白质,或者其可以源自人或小鼠Shh。例如,在一些实施方式中,Shh是突变的小鼠Shh蛋白,如小鼠C25II Shh或人C24II Shh。在一些实施方式中,分化培养基包含Shh(例如,C25II Shh)和SHH的小分子激活剂,例如,嘌吗啡胺。并不希望受限于理论,Shh和/或音猬因子的激活剂可以促进神经底板分化。

[0067] 在一些实施方式中,由多能细胞通过这样的方法生成中脑DA神经元,所述方法包括在至少包含SHH信号转导的第一激活剂的培养基中培养多能细胞。例如,SHH信号转导的

激活剂可以是重组SHH多肽(或其部分)或小分子激活剂。在某些方面中,SHH的激活剂可以是Shh C25II、嘌吗啡胺或嘌吗啡胺类似物(例如,平滑型激动剂,如SAG-1或3-氯-N-[(1r,4r)-4-(甲基氨基)环己基]-N-[3-(吡啶-4-基)苄基]苯并[b]噻吩-2-羧酰胺)。因此,在一些方面中,用于根据实施方式使用的培养基包含约0.1至10μM的嘌吗啡胺(例如,约0.1至20,0.5至10,0.5至5之间或约2μM的嘌吗啡胺)。在其他方面中,培养基包含约1至1,000ng/ml的Shh C25II(例如,约10至1,000,10至500,50至500或约100ng/ml的Shh C25II)。在一些实施方式中,SHH信号转导的激活剂包括Shh C25II和嘌吗啡胺。例如,细胞可以在包含约0.1至10μM嘌吗啡胺和约1至1,000ng/ml Shh C25II的培养基中培养。SHH激活剂(例如,Shh C25II和嘌吗啡胺)在第1、2、3、4、5、6和/或7天可以包含在分化培养基中。在一些实施方式中,在第1天由分化培养基去除SHH激活剂。例如,在多个实施方式中,SHH激活剂在第1-6天或第2-7天包含在分化培养基中。

[0068] 因此,在某些方面中,可以在具有DMEM/F12培养基的贴壁培养系统中分化培养多能细胞1-6天,所述DMEM/F12培养基包含B27补充物,1-3000或1-1000nM LDN-193189(或0.1至100μM SB431542),0.1至50μM嘌吗啡胺,1至1,000ng/ml Shh C25II和0.1至10μM CHIR99021。在一方面,培养基可以包含B27补充物,200nM LDN-193189(或10μM SB431542),2μM嘌吗啡胺,100ng/ml Shh C25II和1.25μM CHIR99021。在一些实施方式中,MEK抑制剂在1-2天后包含在培养基中(例如,MEK抑制剂在分化的第2-4天,或第2、3和/或4天)。

[0069] VI.多能干细胞的来源

[0070] 多能干细胞可以用于本方法用于多能干细胞的神经诱导。本文公开了这样的方法和组合物,其可以用于例如通过优化培养基组合改善神经分化效率和/或选择通过分化方案产生的所需中脑DA神经元。

[0071] 术语“多能干细胞”或“多能细胞”指这样的细胞,其能够产生所有三胚层(即内胚层、中胚层和外胚层)的细胞。虽然理论上多能干细胞可以分化成机体的任何细胞,但是多能性的实验测定通常基于将多能细胞分化成各胚层的集中细胞类型。在一些实施方式中,多能干细胞是衍生自胚泡的内细胞物质的胚胎干(ES)细胞。在其他实施方式中,多能干细胞是通过重编程体细胞衍生的诱导型多能干细胞。在一些实施方式中,多能干细胞是通过体细胞核转移衍生的胚胎干细胞。多能干细胞可以获自或衍生自健康的对象(例如,健康的人)或患有疾病的对象(例如,神经退行性疾病,帕金森疾病等)。

[0072] A.胚胎干细胞

[0073] 胚胎干(ES)细胞是衍生自胚泡的内细胞物质的多能细胞。通过去除发育中的胚胎的外部滋养外胚层,然后在非生长细胞的饲养层上培养内细胞物质,可以分离ES细胞。在适当条件下,产生增殖的、未分化的ES细胞集落。可以移除菌落,解离成个体细胞,然后在新鲜的饲养层上重新接种。重新接种的细胞可以继续增殖,产生未分化的ES细胞的新集落。然后可以将新集落再次移除,解离,重新接种,并使其生长。“继代培养”或“传代”未分化的ES细胞的这一过程可以重复许多次以产生包含未分化的ES细胞的细胞系(例如,如美国专利号5,843,780;6,200,806;7,029,913中所述)。“原代细胞培养”是培养直接获自组织的细胞,例如,胚泡的内细胞物质。“继代培养”是衍生自原代细胞培养的任何培养。

[0074] 获得小鼠ES细胞的方法是众所周知的。在一方法中,用小鼠抗血清处理来自129品系小鼠的胚胎植入前胚泡以去除滋养外胚层,并且在包含胎牛血清的培养基中化学灭活的

小鼠胚胎成纤维细胞的饲养细胞层上培养内细胞物质。生成的未分化的ES细胞的集落在胎牛血清存在的情况下在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上继代培养,以产生ES细胞群。在一些实施方式中,通过向含有血清的培养基中添加细胞因子白血病抑制因子(LIF),小鼠ES细胞可以在不存在饲养层的情况下生长(Smith,2000)。在其他方法中,在骨形态生成蛋白和LIF存在的情况下,小鼠ES细胞可以在无血清培养基中生长(Ying等,2003)。

[0075] 人ES细胞可以使用之前所述的方法(Thomson等,1995;Thomson等,1998;Thomson和Marshall,1998;Reubinoff等,2000.)由胚泡获得。在一种方法中,将第5天的人胚泡暴露于兔抗-人脾细胞抗血清,然后暴露于1:5稀释的豚鼠补体以裂解滋养外胚层细胞。在将裂解的滋养外胚层细胞由完整的内细胞物质去除后,在γ失活的小鼠胚胎成纤维细胞的饲养层上并在胎牛血清存在的情况下培养内细胞物质。9至15天后,可以化学(即,暴露于胰蛋白酶)或机械解离衍生自内细胞物质的细胞团块,并重新接种在包含胎牛血清和小鼠胚胎成纤维的饲养层的新鲜培养基中。进一步增殖后,通过微量移液管选择具有未分化形态的集落,机械解离成团块,并重新接种(参见美国专利6,833,269)。ES样形态的特征在于紧密的集落,具有明显高的细胞核质比和明显的核仁。通过短暂的胰蛋白酶消化或通过微量移液管选择单个菌落可以将产生的ES细胞常规传代。在一些方法中,通过在基础成纤维细胞生长因子存在的情况下在成纤维细胞的饲养层上培养ES细胞,人ES细胞可以在没有血清的情况下生长(Amit等,2000)。在其他方法中,通过在包含基础成纤维细胞生长因子的“条件型”培养基存在的情况下在蛋白质基质诸如Matrigel™或层粘连蛋白上培养ES细胞,人ES细胞可以在没有饲养细胞层的情况下生长(Xu等,2001)。培养基可以是通过与成纤维细胞共培养预先经调整处理的。

[0076] 用于分离恒河猴和普通狨猴ES细胞的方法也是已知的(Thomson和Marshall,1998;Thomson等,1995;Thomson和Odorico,2000)。

[0077] ES细胞的另一来源是建立的ES细胞系。各种小鼠细胞系和人ES细胞系是已知的,并且已经限定了其生长和增殖条件。例如,小鼠CGR8细胞系建立自小鼠品系129胚胎的内细胞物质,并且CGR8细胞的培养物可以在不具有饲养层的LIF存在的情况下生长。进一步的示例是人ES细胞系H1、H7、H9、H13和H14通过Thomson等(2000)建立。此外,已经生成了H9系的亚克隆H9.1和H9.2。预期的是本领域已知的几乎任何ES或干细胞系可以用于本发明,例如,Yu和Thomson,2008中所述的那些,其通过引用纳入本文。

[0078] 用于本发明某些方面的ES细胞的来源包括胚泡,衍生自培养胚泡内细胞物质的细胞,以及获自建立的细胞系的培养物的细胞。因此,本文所用术语“ES细胞”可以指胚泡的内细胞物质细胞,获自内细胞物质培养物的ES细胞,以及获自ES细胞系培养物的ES细胞。

[0079] B.诱导型多能干细胞

[0080] 诱导型多能干(iPS)是具有ES细胞的特征但是通过重编程分化的体细胞获得的细胞。已经通过各种方法获得诱导型多能干细胞。在一方法中,使用逆转录转导用转录因子Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4转染成体人真皮成纤维细胞(Takahashi等,2006,2007)。将转染的细胞接种在补充有基础成纤维细胞生长因子(bFGF)的培养基中的SNL饲养细胞(产生LIF的小鼠细胞成纤维细胞系)上。大约25天后,培养物中出现类似于人ES细胞集落的集落。采集ES细胞样集落,并在bFGF存在的情况下在饲养细胞上扩增。在一些优选的实施方式中,iPS细胞是人iPS细胞。

[0081] 基于细胞特征,ES细胞样集落的细胞是诱导型多能干细胞。诱导型多能干细胞在形态上与人ES细胞相似,并且表达各种人ES细胞标志物。同时,当在已知导致人ES细胞分化的条件下生长时,诱导型多能干细胞相应地分化。例如,诱导型多能干续表可以分化成具有神经元结构和神经元标志物的细胞。预期的是几乎任何iPS细胞或细胞系可以用于本发明,包括例如,Yu和Thomson,2008中所述的那些。

[0082] 在另一方法中,使用逆转录转导用Oct4、Sox2、Nanog和Lin28这4种基因转染人胎儿或新生成纤维细胞(Yu等,2007)。在转染后12-20天时,具有人ES细胞形态的集落变得可见。采集并扩增集落。组成集落的诱导型多能干细胞与人ES细胞形态上相似,表达各种人ES细胞标志物,并且在注射到小鼠中后形成具有神经组织、软骨和肠上皮细胞的畸胎瘤。

[0083] 也已知由小鼠细胞制备诱导型多能干细胞的方法(Takahashi和Yamanaka,2006)。诱导iPS细胞通常需要表达来自Sox家族的至少一个成员和来自Oct家族的至少一个成员或暴露于来自Sox家族的至少一个成员和来自Oct家族的至少一个成员。Sox和Oct被认为是确定ES细胞身份的转录调控层次的核心。例如,Sox可以是Sox-1、Sox-2、Sox-3、Sox-15或Sox-18;Oct可以是Oct-4。其他因子可以增强重编程效率,例如Nanog、Lin28、Klf4或c-Myc;重编程因子的特定集合可以是包含Sox-2、Oct-4、Nanog和任选地Lin-28的集合;获自包含Sox-2、Oct4、Klf和任选地c-Myc的集合。

[0084] 如同ES细胞,IPS细胞具有可以通过免疫组织化学或流式细胞术鉴定或确认的特征抗原,这使用针对SSEA-1、SSEA-3和SSEA-4的抗体(贝塞斯达马里兰州儿童健康与人类发展国家研究所的杂交瘤发展研究库(Developmental Studies Hybridoma Bank,National Institute of Child Health and Human Development,Bethesda Md))以及TRA-1-60和TRA-1-81(Andrews等,1987)。胚胎干细胞的多能性可以通过例如将大约0.5-10X 10^6个细胞注射到8-12周龄雄性SCID小鼠后腿部肌肉确认。生成的畸胎瘤证明三胚层各自至少一种细胞类型。

[0085] 在本发明的某些方面中,使用重编程因子由重编程体细胞产生iPS细胞,所述重编程因子包括Oct家族成员和Sox家族成员,如与Klf或Nanog组合的Oct4和Sox2,例如,如上所述。体细胞可以是能够被诱导出多能性的任何体细胞,例如,成纤维细胞,角质形成细胞,造血细胞,间充质细胞,肝细胞,胃细胞或β细胞。在一些实施方式中,T细胞还可以用作用于重编程的体细胞的来源(例如,参见WO 2010/141801,其通过引用纳入文本)。

[0086] 重编程因子可以由一个或多个载体包含的表达盒表达,如整合载体,染色体非整合RNA病毒载体(参见美国专利申请号13/054,022,通过引用纳入本文)或附加型载体,如基于EBV元件的系统(例如参见WO 2009/149233,其通过引用纳入本文;Yu等,2009)。在其他方面中,可以通过蛋白质或RNA转染将重编程蛋白质或RNA(诸如mRNA或miRNA)直接导入体细胞(Yakubov等,2010)。

[0087] C.衍生自体细胞核转移的胚胎干细胞

[0088] 多能干细胞可以通过体细胞核转移的方式制备,其中供体核转移到没有纺锤体的卵母细胞中。通过核转移产生的干细胞在遗传上与供体细胞核相同。在一方法中,通过电融合将来自皮肤成纤维细胞的供体成纤维细胞核导入没有纺锤体的成熟中期II卵细胞的细胞质中(Byrne等,2007)。融合的卵母细胞通过暴露于离子毒素激活,然后孵育直至胚泡阶段。然后培养选择的胚泡的内细胞物质以产生胚胎干细胞系。胚胎干细胞系可显示正常的

ES细胞形态,表达各种ES细胞标志物,并在体外和体内分化成多种细胞类型。本文所用术语“ES细胞”指衍生自含有受精细胞核的胚胎的胚胎干细胞。ES细胞与通过核转移产生的胚胎干细胞不同,其被称为“衍生自体细胞核转移的胚胎干细胞”。

[0089] VII.用于分化的培养基

[0090] 可以使用用于培养动物细胞作为其基础培养基的培养基来制备根据本发明某些方面的分化培养基。在一些实施方式中,分化培养基用于仅使用单一BMP抑制剂或单一TGF-β抑制剂将多能细胞分化成中脑多巴胺能神经元。例如,用于促进多能细胞分化(例如,分化成中脑多巴胺能细胞)的分化介质可以包含单一BMP抑制剂(如LDN-193189或背吗啡;例如,在分化的第1-17天;音猬因子(SHH)信号转导的激活剂(如嘌吗啡胺,人C25II SHH或小鼠C24II SHH;例如,在第1-6、2-7或1-7天);Wnt信号转导的激活剂(如GSK抑制剂,例如,CHIR99021;例如,在第2-17或3-17天)和/或MEK抑制剂(如PD0325901;例如,在第2-4或3-5天)。在一些实施方式中,可以使用单一TGFβ抑制剂(如SB-431542;例如,在地1-4天),而不是单一BMP抑制剂;然而,如下述实施例所示,相较于使用单一TGF-β抑制剂,观测到使用单一BMP抑制剂将导致细胞优先分化成FOXA2^{+}/LMX1A^{+}细胞。在一些实施方式中,FGF-8(例如,FGF-8b)在第一天或第1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天或其任何组合(例如,第1-8天)不包含在分化培养基中;例如,在一些实施方式中,FGF-8在第9、10、11、12、13、14、15、16和17天包含在分化培养基中。在各种实施方式中,分化培养基可以包含TGFβ或bFGF,或者任选地,分化培养基可以基本上包含TGFβ和bFGF。

[0091] 在某些方面中,根据实施方式的分化方法涉及通过一系列培养基条件将细胞传代,例如,这样培养细胞:

[0092] -在包括下述的培养基中贴壁培养:单一BMP抑制剂(或TGFβ抑制剂);音猬因子(SHH)信号转导的激活剂;和Wnt信号转导的激活剂;

[0093] -在包含单一BMP抑制剂(或TGFβ抑制剂);SHH信号转导的激活剂;和Wnt信号转导的激活剂的培养基中悬浮以形成细胞聚集体;

[0094] -在包含B27补充物,L-谷氨酰胺,BDNF,GDNF,TGFβ,抗坏血酸,联丁酰基cAMP和DAPT(以及任选地,缺乏外源性添加的视黄醇或视黄酸)的培养基中贴壁培养用于成熟。

[0095] 任何化学限定的培养基可以用作基础培养基,如依氏培养基(BME),BGJb,CMRL 1066,Glasgow MEM,改良的MEM Zinc Option,伊氏改良型达氏培养基(IMDM),Medium 199,伊格尔MEM,αMEM,DMEM,Ham,RPMI 1640和费歇尔培养基或其变形或组合,其中可以包括或可以不包括TGFβ和bFGF。

[0096] 在另一实施方式中,细胞分化环境还可以包含补充物,如B-27补充物,胰岛素,转铁蛋白和硒(ITS)补充物,L-谷氨酰胺,NEAA(非必须氨基酸),P/S(盘尼西林/链霉素),N2补充物(5μg/mL胰岛素,100μg/mL转铁蛋白,20nM孕酮,30nM硒,100μM腐胺(Bottenstein和Sato,1979PNAS USA 76,514-517)和/或β-巯基乙醇(β-ME)。考虑到可以或可以不添加其他因子,包括但不限于纤连蛋白,层粘连蛋白,肝素,硫酸肝素,视黄酸。

[0097] 可以将或可以不将生长因子添加到分化培养基。除了上述因子或者替换上述因子,可以在过程中的各步骤采用生长因子,诸如表皮生长因子家族(EGF)的成员,成纤维细胞生长因子家族(FGF)的成员,包括FGF2和/或FGF8,血小板衍生的生长因子家族(PDGF)成员,转化生长因子(TGF)/骨形态发生蛋白(BMP)/生长和分化因子(GDF)因子家族拮抗剂。在

一些实施方式中,FGF-8包含在如本文所述的分化培养基中。可以或可以不添加到分化培养基的其他因子包括可以通过Notch受体家族使信号转导活化或失活的分子,包括但不限于Δ样和Jagged家族的蛋白质,以及γ分泌酶抑制剂和Notch过程或切割的其他抑制剂如DAPT。其他生长因子可以包括胰岛素样生长因子家族(IGF)、无翼相关(WNT)因子家族和猬(hedgehog)因子家族的成员。

[0098] 可以将其他因子添加到聚集体形成和/或分化培养基以促进神经干/祖细胞增殖和存活,以及神经元存活和分化。这些神经营养因子包括但不限于神经生长因子(NGF),脑源性神经营养因子(BDNF),神经营养因子-3(NT-3),神经营养因子-4/5(NT-4/5),白细胞介素-6(IL-6),睫状神经营养因子(CNTF),白血病抑制因子(LIF),心肌营养素,转化生长因子(TGF)/骨形态发生蛋白(BMP)/生长和分化因子(GDF)家族的成员,神经胶质源性神经营养因子(GDNF)家族,包括但不限于神经生长因子(neurturin)、神经胚素(neublastin)/阿特姆因子(artemin)和佩斯因子(persephin)以及涉及或包含肝细胞生长因子的因子。最终分化以形成有丝分裂后神经元的神经培养物还可含有有丝分裂抑制剂或有丝分裂抑制剂的混合物,包括但不限于5-氟2′-脱氧尿苷,丝裂霉素C和/或胞嘧啶β-D-阿拉伯糖-呋喃糖苷(Ara-C)。

[0099] 培养基可以是含血清或无血清的培养基。无血清培养基可以指没有未加工或未纯化血清的培养基,并且因此可以包括具有纯化的血液来源的组分或动物组织来源的组分(如生长因子)的培养基。从防止异源性动物来源的成分污染的方面来看,血清可以源自与干细胞来源相同的动物。在一些实施方式中,培养基是限定的培养基,并且培养基不含血清或其他动物组织来源的组分(如经辐照的小鼠成纤维细胞或已经用经辐照的成纤维细胞饲养细胞调理的培养基)。

[0100] 培养基可以含有或可以不含有血清的任何替代物。血清的替代物可包括这样的物质,其适当地含有白蛋白(如富含脂质的白蛋白,白蛋白替代物,如重组白蛋白,植物淀粉,右旋糖酐和蛋白质水解物),转铁蛋白(或其他铁转运蛋白),脂肪酸,胰岛素,胶原蛋白前体,微量元素,2-巯基乙醇,3'-硫醇甘油或其等价物。例如,血清的替代物可以通过国际公开号98/30679中所述的方法制备。或者,可以使用市售可得的物质获得更多的便利。市售可得的材料包括无血清替代品(KSR)化学限定的脂质浓缩(吉布可公司(Gibco))。

[0101] 培养基还可以含有脂肪酸或脂质,氨基酸(如非必需氨基酸),维生素,生长因子,细胞因子,抗氧化物质,2-巯基乙醇,丙酮酸,缓冲剂和无机盐。例如,2-巯基乙醇可以是约0.05至1.0mM,并且具体地是约0.1至0.5,或0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.1、0.2、0.5、0.8、1、1.5、2、2.5、5、7.5、10mM或任何中间值,但是浓度具体地不限于此,只要其适合用于培养干细胞。

[0102] 在某些实施方式中,在聚集体形成之前在培养基中培养多能干细胞以改善神经诱导和底板模式化(例如,在被解离成单细胞或小聚集体之前,以诱导聚集体形成)。在本发明的某些实施方式中,可以饲养细胞、饲养细胞提取物和/或血清不存在的情况下培养干细胞。

[0103] B.培养条件

[0104] 用于培养细胞的培养容器可包括但具体地不限于:培养瓶,组织培养瓶,旋转瓶,培养皿,皮氏培养皿,组织培养皿,多皿(multi dish),微板,微孔板,多板,多孔板,微型载

玻片,腔室载玻片,管,托盘,CellSTACK®腔室,培养袋和滚瓶,只要其能够培养其中的细胞。细胞可以至少或约0.2、0.5、1、2、5、10、20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、800、1000、1500mL或其中可以衍生的任何范围的体积培养,取决于培养的需求。在某些实施方式中,培养容器可以是生物反应器,其可以指支持生物活性环境的任何装置或系统。生物反应器可以具有至少或约2、4、5、6、8、10、15、20、25、50、75、100、150、200、500升,1、2、4、6、8、10、15立方米或其中可以衍生的任何范围的体积。

[0105] 根据目的,可以用细胞粘合剂制备或不制备培养容器表面。可以用于细胞粘附的任何底物涂覆细胞粘附培养容器,如胞外基质(ECM),以改善血管表面与细胞的粘附性。用于细胞粘附的底物可以是旨在附着干细胞或饲养细胞(如果使用的话)的任何材料。用于细胞粘附的非限制性的底物包括胶原,明胶,聚-L-赖氨酸,聚-D-赖氨酸,聚-L-鸟氨酸,层粘连蛋白,玻连蛋白和纤连蛋白及其混合物,例如,来自Engelbreth-Holm-Swarm小鼠肉瘤细胞(如Matrigel™或Geltrex)和裂解的细胞膜制备物(Klimanskaya等,2005)的蛋白质混合物。

[0106] 可以适当地限定其他培养条件。例如,培养温度可以是约30至40℃,例如,至少或约31、32、33、34、35、36、37、38、39℃,但是并不特别地限制于它们。CO_2浓度可以是约1至10%,例如,约2至7%,或其中可以衍生的任何范围。氧气张力可以是至少或约1、5、8、10、20%或其中可衍生的任何范围。

[0107] 在某些方面可以使用粘附培养。在这种情况下,可以在饲养细胞的存在的情况下培养细胞。在饲养细胞用于本发明的方法的情况下,诸如胎儿成纤维细胞的基质细胞可用作饲养细胞(例如,参见《小鼠胚胎操作实验室手册》(Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual)(1994);《基因靶向实用方法》(Gene Targeting,A Practical Approach)(1993);Martin(1981);Evans等(1981);Jainchill等,(1969);Nakano等,(1996);Kodama等(1982);和国际公开号01/088100和2005/080554)。

[0108] 在其他方面横纵,可以使用悬浮培养。悬浮培养可以包括在运载体(Fernandes等,2007)或凝胶/生物聚合物包封物(美国专利公开号2007/0116680)上的悬浮培养。干细胞的悬浮培养表示相对于培养容器或培养基中的饲养细胞(如果使用)在非粘附条件下培养干细胞。干细胞的悬浮培养通常包括干细胞的解离培养和干细胞的聚集体悬浮培养。干细胞的解离培养表示培养悬浮的干细胞,并且干细胞的解离培养包括单个干细胞的解离培养或由多个干细胞组成的小细胞聚集体(例如,约2至400个细胞)的解离培养。当继续上述解离培养时,培养的、解离的细胞形成更大的干细胞聚集体,并于此后可以进行聚集体悬浮培养。聚集体悬浮培养包括胚状体培养方法(参见Keller等,1995)和SFEB(不含血清的拟胚体)方法(Watanabe等,2005);国际公开号2005/123902)。

[0109] C.培养多能干细胞

[0110] 用于制备和培养多钱呢跟干细胞如ES细胞的方法可见于细胞生物学、组织培养和胚胎学的标准教材及综述,包括:《畸胎瘤和胚胎干细胞:小鼠发育技术指南》(teratocarcinomas and embryonic stem cells:Guide to Techniques in Mouse Development)(1993);《胚胎干细胞体外分化》(Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro)(1993);《胚胎干细胞的性质和用途:应用于人类生物学和基因治疗的前景》(Properties and uses of Embryonic Stem Cells:Prospects for Application to

Human Biology and Gene Therapy)(1998),所有内容通过引用纳入本文。用于组织培养的标准方法通常述于《动物细胞培养》(Animal Cell Culture)(1987);《哺乳动物细胞基因转移载体》(Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells)(1987);和《新编分子生物学实验指南》(Current Protocols in Molecular Biology)和《分子生物学简明实验方案》(Short Protocols in Molecular Biology)(1987&1995)。

[0111] 在将体细胞导入重编程因子或与重编程因子接触后,可以在足以维持多能性和未分化状态的培养基中培养这些细胞。培养诱导型多能干(iPS)细胞可以使用研发用于培养灵长类多能干细胞、胚胎干细胞或iPS细胞的各种培养基和技术,例如,美国专利公开号2007/0238170和美国专利公开号2003/0211603和美国专利公开号2008/0171385中所述,其各种通过引用纳入本文。应理解的是本领域普通技术人员已知的用于培养和维持多能干细胞的方法也可以与本发明联用。

[0112] 在某些实施方式中,可以使用未限定的条件;例如,多能细胞可以在成纤维细胞饲养细胞或已经暴露于成纤维细胞饲养细胞的培养基上培养,从而将干细胞维持在未分化的状态。或者,可以使用未限定的、非饲养依赖性(Feeder-Independent)培养细胞如TeSR培养基(Ludwig等,2006a;Ludwig等,2006b)或E8培养基(Chen等,2011;PCT/US2011/046796),将多能细胞培养并维持在基本上未分化的状态。非饲养依赖性培养系统和培养基可以用于培养和维持多能细胞。这些方法能够在不需要小鼠成纤维细胞“饲养层”的情况下使人多能干细胞维持在基本上未分化的状态。如本文所述,可以对这些方法进行各种修饰,从而如所需降低成本。

[0113] 各种基质成分可以用于培养、维持或分化人多能干细胞。例如,胶原IV、纤连蛋白,层粘连蛋白和玻连蛋白的组合可以用于涂覆培养表面,作为提供用于多能细胞生长的固体支持物的一种方式,如Ludwig等(2006a;2006b)中所述,其通过引用其全部内容纳入本文。

[0114] Matrigel™还可以用于提供用于人多能干细胞维持和细胞培养的底物。Matrigel™是有小鼠肿瘤细胞分泌的凝胶状蛋白质混合物,并且可以商购自BD生物科学公司(BD Biosciences)(美国新泽西州)。该混合物类似于许多组织中存在的复杂的胞外环境,并被细胞生物学家用作细胞培养的底物。

[0115] D.单细胞传代

[0116] 在多能干细胞培养的一些实施方式中,一旦培养容器装满,通过适合解离的任何方法将集落分裂聚集的细胞或甚至单细胞,然后将细胞放入新的培养容器用于传代。细胞传代或分裂是一种使细胞能够在培养条件下存活和生长很长一段时间的技术。当细胞约70%-100%融合时,通常将传代。

[0117] 多能干细胞单细胞解离以及单细胞传代可以用于本方法,并且具有几个优点,如促进细胞扩增,细胞分选和限定的接种用于分化并使培养过程和克隆扩增自动化。例如,克隆衍生自单细胞的子代细胞可以在遗传结构中是同源的和/或在细胞周期中同步,这可以增加靶向分化。用于单细胞传代的示例性方法可以是如美国专利公开号2008/0171385中所述,其通过引用纳入本文。

[0118] 在某些实施方式中,多能干细胞可以被解离成单个个体细胞,或单个个体细胞和小细胞簇的组合,所述小细胞簇包含2、3、4、5、6、7、8、9、10个细胞或更多个细胞。解离可以通过机械力实现,或通过细胞解离剂实现,如螯合剂,柠檬酸钠(Na柠檬酸)或酶,例如,胰蛋

白酶,胰蛋白酶-EDTA,Accutase酶,TrypLE Select等。细胞的解离可以通过使用化学分离(例如,使用螯合物或酶)和/或机械搅拌以分离细胞。

[0119] 根据多能干细胞的来源和扩增的需要,可以将解离的细胞单独地或以小簇的形式以至少或约下述的分裂比例转移至新的培养容器中:1:2、1:4、1:5、1:6、1:8、1:10、1:20、1:40、1:50、1:100、1:150、1:200或其中可衍生的任何范围。悬浮细胞系分裂比例可以在培养细胞悬浮液的体积上进行。传代间隔可以是至少或约每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20天或其中可衍生的任何范围。例如,不同的酶促传代方法可实现的分裂比例可以是每3-7天1:2,每4-7天1:3和大约每7天1:5至1:10,每7天1:50至1:100。当使用高分裂比例时,传代间隔可以延长到至少12-14天或者不存在由于过度自发性分化或细胞死亡而导致的细胞损失情况下的任何时间段。

[0120] 在某些方面,单细胞传代可以在对增强克隆效率和细胞存活有效的小分子存在的情况下进行,诸如,ROCK抑制剂或肌球蛋白II抑制剂,如上所述。这类ROCK抑制剂或肌球蛋白II抑制剂,例如Y-27632、HA-1077、H-1152或布雷他汀可以有效浓度使用,例如,至少或约0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50至约100μM或其中可衍生的任何范围。

[0121] E.干细胞的分化

[0122] 可以提供方法以改善多能干细胞的神经分化(特别是中脑DA分化效率)效率。可以多种方式诱导多能干细胞的分化,如在附着的集落中或通过形成细胞聚集体,例如,在低附着环境中,其中那些聚集体被称为胚状体(EB)。EB中的分子和细胞形态发生信号和事件模拟了发育中的胚胎中的这类细胞的天然个体发育的许多方面。例如,美国专利公开号2012/0276063中提供了用于将细胞导入神经元分化的方法,通过引用将其纳入。PCT公开号WO2013/067362中提供了DA神经元分化更详细和具体的方法,通过引用纳入本文。

[0123] 胚状体(EB)是源自多能干细胞(如ES细胞或iPS细胞)的细胞的聚集体,并且已经用小鼠胚胎干细胞研究了多年。为了再现体内分化固有的一些线索,可以产生三维聚集体(即,胚状体)作为中间步骤。在细胞聚集开始时,可以开始分化,而细胞可以在有限程度上开始以再现胚胎发育。虽然它们不能形成滋养外胚层组织(包括胎盘),但是生物体中存在的几乎所有其他类型的细胞都可以发育。本发明可以进一步促进聚集体形成之后的神经分化。

[0124] 可以通过悬滴,在非组织培养物处理的平板或旋转瓶上接种来施加细胞聚集;任一种方法都可以防止细胞与表面粘附形成典型的集落生长。可以在聚集体形成之前、期间或之后使用ROCK抑制剂或肌球蛋白II抑制剂来培养多能干细胞。

[0125] 可以使用细胞培养领域中已知的任何方法将多能干细胞接种到聚集体促进培养基中。例如,多能干细胞可以作为单个集落或克隆组接种到聚集体促进培养基中,并且多能干细胞也可以作为必需个体细胞接种。在一些实施方式中,使用本领域已知的机械或酶促方法将多能干细胞解离成必需个体细胞。作为非限制性的实施例,多能干细胞可以暴露于蛋白水解酶,其破坏细胞和培养表面之间以及细胞自身之间的连接。可用于使多能干细胞个体化用于形成聚集体和分化的酶可以包括但不限于胰蛋白酶,处于其各种商业配方中,如TrypLE,或诸如Accutase®的酶的混合物。在某些实施方式中,可以将多能细胞作为基础个体(或分散的)细胞添加或接种到培养基上,用于培养物在培养表面上形成。

[0126] 例如,分离的多能细胞可以接种到培养基中。在这些实施方式中,培养表面可由与本领域中的标准无菌细胞培养方法相容的基本上任何材料组成,例如,非粘附表面。培养表面可以还包括如本文所述的基质组分。在一些实施方式中,在将表面与细胞和培养基接触之前,可以将基质组分施用于培养表面。

[0127] 可用于诱导分化的底物,如胶原,纤连蛋白,玻连蛋白,层粘连蛋白,基质胶等。通过在存在增殖诱导生长因子的情况下使细胞处于悬浮状态,并且不重新开始增殖(即,不解离神经球),也可以诱导分化。

[0128] 在一些实施方式中,在培养基中的固定底物上培养细胞。然后,可以将增殖诱导型生长因子给予细胞。增殖诱导型生长因子可以使细胞与基质(例如,聚鸟氨酸处理的塑料或玻璃)粘附,变平,并开始分化成不同的细胞类型。

[0129] V.非静态培养

[0130] 在某些方面中,非静态培养可以用于培养和分化多能干细胞。非静态培养可以是通过例如摇动、旋转或搅拌平台或培养容器,特别是大体积旋转生物反应器将细胞以受控的移动速度保持的任何培养。在一些实施方式中,可以使用摇杆台。搅拌可以改善营养物和细胞废物的循环,并且还可以通过提供更均匀的环境来控制细胞聚集。例如,旋转速度可以设定为至少或至多约10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100rpm或其中可以衍生的任何范围。多能干细胞、细胞聚集体、分化的干细胞或由其衍生的后代细胞的非静态培养中的孵育期可以是至少或约4小时、8小时、16小时,或1、2、3、4、5、6天,或1、2、3、4、5、6、7周或其中可衍生的任何范围。

[0131] VI.细胞的遗传改变和纯化

[0132] 在一些实施方式中,已经遗传工程改造了多能细胞(例如,多能细胞或DA神经元)。当已经通过任何合适的人工操作方法将多核苷酸转移到细胞中时,或当细胞是遗传多核苷酸的最初改变的细胞的后代时,将细胞称之为“遗传改变的”或“转基因的”。在一些实施方式中,细胞可以包含受控于神经元启动子诸如MAP2启动子的抗生素抗性基因。例如,在一些实施方式中,标志物基因是抗生素抗性基因,并且可以通过将细胞培养物暴露于抗生素来纯化神经元细胞,因此杀伤具有未分化成神经元细胞的细胞。例如,可以将在MAP2启动子控制下表达新霉素的细胞暴露于G418以杀伤非神经元细胞。可以用于本发明的其他方法述于美国专利申请号14/664,245中,其通过在没有免责声明的情况下引用其全部内容纳入本文。

[0133] 在一些实施方式中,可以通过将细胞暴露于有丝分裂抑制剂或化疗剂以杀伤分裂细胞来纯化包含多巴胺能神经元的细胞群。例如,在一些实施方式中,通过与丝裂霉素C接触以杀死分裂细胞可以纯化通过本发明所述方法产生的包含中脑DA细胞的细胞群。

[0134] VII.多巴胺能神经元的应用

[0135] 通过本发明某些方面的方法和组合物提供的DA神经元可以用于各种应用中。这些应用包括但不限DA神经元体内移植或植入;体外筛选细胞毒性化合物,致癌物,诱变生长/调节因子,药物化合物等;说明神经退行性变的机制;研究药物和/或生长因子运作的机制;基因治疗;以及产生生物活性产品,仅举几例。

[0136] A.测试化合物分泌

[0137] 本发明的中脑DA神经元可以用于筛选影响本文所提供的DA神经元的特性的因子

(如溶剂、小分子药物、肽、多核苷酸)或环境条件(如培养条件或操作)。

[0138] 在一些应用中,将干细胞(分化的或未分化的)用于筛选促进细胞沿神经谱系成熟的因子,或者促进这类细胞在长期培养中的增殖和维持的因子。例如,通过将候选神经成熟因子或生长因子添加到不同孔中的干细胞测试候选神经成熟因子或生长因子,然后根据进一步培养和使用细胞的理想标准确定产生的任何表型变化。

[0139] 本发明的特定筛选应用涉及药物研究中药物化合物的测试。测试的标准方法在例如《药物研究中的体外方法》(In vitro Methods in Pharmaceutical Research),学术出版社(Academic Press),1997)。在实施方式的某些方面,通过本文所详述的方法产生的细胞可以用作标准药物筛选和毒性试验的测试细胞(例如,以鉴定,确认和测试具体功能或用于测试递送治疗性分子以治疗细胞谱系特异性疾病),如之前在短期培养中已经在原代神经元上进行的那样。评估候选药物化合物的活性通常包括将本发明某些方面提供的神经元与候选化合物组合,确定可归因于化合物的细胞电生理学,形态学,标志物表型或代谢活性中的任何变化(与未处理的细胞或用惰性化合物处理的细胞相比),然后将化合物的效果与观察到的变化关联。可由于化合物设计成对神经元细胞有药物效果,或由于设计成对其他部分有影响的化合物可能具有意料之外的神经副作用进行筛选。可以组合地测试两种或多种药物(例如,与细胞同时或先后组合)以检测可能的药物间相互作用影响。

[0140] 在一些应用中,最初筛选化合物的潜在神经毒性。细胞毒性可以首先通过对细胞活力、存活、形态学或酶渗入培养基的影响来确定。进行更详细的分析以以确定化合物是否影响细胞功能(如神经传递)而不引起毒性。

[0141] B.中枢神经系统疾病的治疗

[0142] 1.中枢神经系统的疾病

[0143] 可以将多巴胺能神经元诸如有丝分裂后中脑DA神经元移植,以在患有中枢神经系统疾病(CNS)的个体中再生神经细胞。在一些实施方式中,可以将根据本发明的方法产生的中脑DA神经元给予对象以治疗CNS疾病(例如,给予脑或中脑,如尾状核,壳核或黑质以治疗帕金森氏病疾病)。这类疾病可以包括但不限于神经变性疾病,如帕金森病。

[0144] 本文所用术语“帕金森病”是指所有与基底神经节中多巴胺的不足相关的一组疾病,所述基底神经节是控制运动的一部分大脑。症状包括震颤,运动迟缓(运动极度缓慢),屈曲姿势,姿势不稳定和僵硬。帕金森症的诊断需要存在这些症状中的至少两种,其中一种症状必须是震颤或运动迟缓。帕金森症最常见的形式是自发性或典型的帕金森病(PD),但对于极少数的诊断,大约占总数的15%的诊断,可能存在帕金森叠加综合征(PPS)中的一种。这些综合征也称为非典型帕金森症,包括皮质基底节变性,路易体痴呆,多发性系统萎缩和进行性核上性麻痹。通常,帕金森病涉及大脑中重要神经细胞的功能障碍和死亡,主要发生在大脑中被称为黑质的区域。许多这些重要的神经细胞会产生多巴胺。当这些神经元死亡时,多巴胺的量减少,导致人无法正常地控制运动。在帕金森病患者中,肠道中也有退化的多巴胺细胞,这可能是导致作为该疾病一部分的胃肠道症状的重要致病因素。个体经历的特定症状因人而异。帕金森病的主要运动症状包括:手,臂,腿,下颌和面部的震颤,运动迟缓或缓慢,肢体和躯干的僵化或僵硬以及姿势不稳定或平衡和协调受损。

[0145] 2.给予细胞的方法

[0146] 可以局部或全身给予受试者干细胞或分化细胞。用于向对象给予DA神经元的方法

是本领域已知的。如果患者正在接受源自他或她自身细胞的细胞,则称之为自体移植;这样的移植几乎没有被拒绝的可能。

[0147] 向对象、特别是人对象给予干细胞或分化的神经元细胞的示例性方法包括将细胞注射或移植到对象的靶位点(例如,纹状体和/或黑质)中。可以将干细胞和/或DA神经元插入通过注射或移植来促进将细胞导入对象的递送装置中。这类递送装置包括管,例如,导管,用于将细胞和流体注射到受体对象的体内。在优选的实施方式中,管还具有针,例如,注射器,通过该针可以在所需未知将本发明的细胞导入对象中。可以将干细胞以不同形式插入这样的递送装置,例如,注射器。例如,当细胞包含在这样的递送装置中时,细胞可以悬浮于溶液中,可以在细胞聚集体中,或任选地包埋在支持物基质中。

[0148] 可以纳入或包埋干细胞或神经元的支持物基质包括这样的基质,所述基质与受体相容和降解成对受体无害的产品。支持物基质可以是天然的(例如,透明质酸,胶原等)和/或合成的可生物降解基质。可以使用的合成的生物可降解基质包括合成聚合物,如聚酸酐,聚原酸酯和聚乳酸。在一些实施方式中,将多巴胺能神经元(例如,未完全分化的多巴胺能神经元)包埋在透明质酸基质中并给予对象以治疗神经变性疾病(例如,帕金森氏病)。

[0149] 本文所用术语“溶液”包括药学上可接受的运载体或稀释剂,其中本发明的细胞保持存活。药学上可接受的运载体和稀释剂包括盐水,水性缓冲溶液,溶剂和/或分散介质。这些运载体和稀释剂的使用在本领域中是已知的。该溶液优选无菌的,并且流动至易于注射的程度。

[0150] 优选地,溶液在制造和储存条件下是稳定的,并且在保存过程中能够抵抗微生物如细菌和真菌的污染作用。在一些实施方式中,以BSS PLUS(埃孔实验室公司(Alcon),德克萨斯州沃思堡)的无菌溶液向患者含有DA神经元或中脑DA神经元的溶液。如果需要,防腐剂或抗生素可以包含在药物组合物中用于给药。可以通过将如本文所述的神经元纳入药学上可接受的运载体或稀释剂和其他成分(如果需要)来制备本发明的溶液。

[0151] 3.剂量和给药

[0152] 在一方面,本文所述方法提供了增强对象中祖细胞或DA神经元移植的方法。在一实施方式中,对象能可以是哺乳动物。在另一实施方式中,哺乳动物可以是人,虽然该方法对所有哺乳动物有效。

[0153] 将组合物以与剂量制剂相容的方式给药,并以治疗有效量给药。给药量和时间安排取决于待治疗的对象,对象系统利用活性成分的能力以及所需治疗效果的程度。需要给予的每种活性成分的精确量取决于操作者的判断,并且特定于每个个体。然而,合适的剂量范围取决于给药途径。给药的合适方案也是可变的。

[0154] 4.功效

[0155] 本领域技术人员可以确定给定治疗增强DA神经元移植的功效。然而,如本文所用术语“有效治疗”,如果例如不良DA神经元移植的一个或所有体征或症状中的任一项以有益的方式改变,其他临床上可接受的症状得到改善,或者甚至减缓,例如在用如本文所述的细胞群治疗后减轻至少10%,那么治疗被认为是“有效治疗”。功效也可以通过个体失败恶化来测量,如通过住院,对医疗干预的需要(即,疾病的进展停止)或移植失败发生率评估。测量这些指标的方法是本领域技术人员已知的和/或在本文中描述的。治疗包括对个体或动物(一些非限制性示例包括人或哺乳动物)疾病的任何治疗,并且包括:(1)抑制疾病,例如,

防止移植失败;或(2)缓解疾病,例如,导致症状的消退。治疗疾病的有效量表示当给予由此需要的哺乳动物时足以导致对于该疾病治疗或治疗性益处的量。可以通过评估例如DA神经元移植的物理指标确定试剂的功效,例如,震颤,运动迟缓,屈曲姿势,平衡和协调等。在一些实施方式中,使用PET扫描可以体内(例如,在人体中)测量移植和神经功能以测量代谢或活性或多巴胺能系统(例如,使用PET示踪剂进行多巴胺能系统的成像)。可以在帕金森病的动物模型中评估功效,例如,通过进行行为测试,如步伐测试或圆柱体测试。

[0156] C.商业,治疗和研究目的分配

[0157] 出于制造、分配和使用的目的,神经细胞诸如本文所述的中脑DA神经元可以等渗赋形剂或培养基中的细胞培养物或悬浮液的形式提供,任选地冷冻以促进运输或储存。

[0158] 本文所述神经细胞可以提供不同的试剂系统,例如,包括在制造、分配或使用过程中任何时间存在的一组或细胞的组合。细胞组可以包括本公开中所述两种或更多种细胞群的任何组合,例示但不限于编程衍生的细胞(神经谱系细胞,其前体和亚型),与未分化的干细胞或其他分化的细胞类型组合。该组中的细胞群可以共有相同的基因组或其遗传修饰的形式。该组中的各细胞可以在相同实体或共享业务关系的不同实体的控制下包装在一起,或在相同设备中的不同容器内,或处于不同的未知,或处于相同或不同的时间。

实施例

[0159] 包括以下实施例以说明本发明的优选实施方式。本领域的普通技术人员应理解,根据代表本发明人所发现技术的实施例中公开的技术能很好地实施本发明,从而可将其视为实施本发明的优选模式。但是,本领域技术人员根据本公开应理解,在不偏离本发明精神和范围的前提下,可对所公开的具体实施方式进行许多变化,同时仍能获得相同或类似的结果。

[0160] 实施例1

[0161] 材料和方法

[0162] 使用如表1-5中详述的多种分化培养基组合物和方案,用小分子和生长因子诱导,进行扩增于Essential 8培养基中的VTN-TN上的人诱导型多能干细胞(iPS)细胞系的中脑神经元分化。通常,iPS细胞于第1天在D1 DA神经元诱导培养基上,于第2天在D2神经元诱导培养基上,并于第3天和第4天在D3-D4DA诱导培养基上培养。在第5天,用TrypLE解离细胞15分钟并收集在DA淬灭培养基中,然后将细胞转移到旋转培养瓶悬浮培养物以在D5 DA神经元聚集体形成培养基中形成聚集体。

[0163] 在第6天,沉降聚集体,去除约66%的培养基,并用DA神经元诱导培养基饲养聚集体。在第7-16天,用DA神经元聚集体维持培养基饲养聚集体,并在第11天到16天更换培养基。在第17天,用TrypLE将聚集物解离成单细胞悬浮液,并接种在D17 DA神经元聚集体铺板培养基中的基质胶上。在第18、20、22天,用Dopa神经元(DopaNeuron)成熟培养基替换培养基。在第24天,使用Accutase酶将细胞解离,并接种到DA神经元成熟铺板培养基中。第二天,用Dopa神经元成熟培养基替换培养基。

[0164] 在第27和29天,用DA神经元成熟培养基加上丝裂霉素C替换培养基。在第31天,使用Accutase酶将细胞解离,并再次接种到DA神经元成熟铺板培养基中的聚-L-鸟氨酸(PLO)/层粘连蛋白被覆的培养瓶上。之后,在第32、34和36天,用Dopa神经元成熟培养基饲

养细胞。在第37或38天,用Accutase酶再次解离细胞,并进行分析或冷冻保存以备后用。

[0165] 表1:常规定时培养基条件(10μM SB43+200nM LDN)

组分	供应商	目录号	母液	最终浓度
E8 铺板培养基 (第-2 天)				
Essential 8 基础培养基	生命技术公司（Life Technologies）	A14666SA	1X	98%
Essential 8 补充物	生命技术公司	A14666SA	50X	2%
H1152	CDI	H024	100 μM	1 μM
E8 培养基(第-1 和 0 天)				
Essential 8 基础培养基	生命技术公司	A14666SA	1X	98%
Essential 8 补充物	生命技术公司	A14666SA	50X	2%
D1 DA 诱导培养基(第 1 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (+VitA)	生命技术公司	17504-044	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
SB431542	Sigma（西格玛公司）	S4317	40 mM	10 μM
嘌吗啡胺（purmorphamine）	Cayman（卡曼公司）	10009634	10mM	2 μM
C25II SHH	R&D Systems（R&D 系统公司）	464-SH	100 μg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.25 μM
D2 DA 诱导培养基(第 2 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (+VitA)	生命技术公司	17504-044	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
SB431542	西格玛公司	S4317	40 mM	10 μM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 μg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.25 μM
PD0325901	Stemgent 公司	04-0006	10 mM	1.0 μM
D3-4 DA 诱导培养基(第 3 和 4 天)				

[0166]

[0167]

DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
SB431542	西格玛公司	S4317	40 mM	10 μM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 μg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.25 μM
PD0325901	Stemgent 公司	04-0006	10 mM	1.0 μM
DA 淬灭培养基 1 (第 5 和 17 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM
D5 DA 聚集体形成培养基(第 5 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 μg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.25 μM
布雷他汀	西格玛公司	B0560	2,500x	10 μM
D6 DA 诱导培养基(第 6 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 μg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.25 μM
D7-10 DA 聚集体维持培养基(第 7-10 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%

[0168]

B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.25 μM
D11-16 DA 聚集体维持培养基(第 11-16 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	3.0 μM
FGF8	R&D 系统公司	423-F8	50 μg/mL	100 ng/mL
D17 DA 聚集体铺板培养基(第 17 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	3.0 μM
FGF8	R&D 系统公司	423-F8	50 μg/mL	100 ng/mL
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM
DA 成熟培养基(第 18+天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
抗坏血酸	西格玛公司	A4403	200 mM	200 μM
Rec Hu BDNF	R&D 系统公司	248-BD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu GDNF	R&D 系统公司	212-GD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu TGFB3	R&D 系统公司	243-B3	10 μg/mL	1 ng/mL
dbcAMP	西格玛公司	D0627	100 mM	500 μM
DAPT	西格玛公司	D5942	20 mM	5 μM
DA 成熟培养基+ MMC (第 27 和 29 天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM

[0169]

B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
抗坏血酸	西格玛公司	A4403	200 mM	200 μM
Rec Hu BDNF	R&D 系统公司	248-BD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu GDNF	R&D 系统公司	212-GD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu TGFB3	R&D 系统公司	243-B3	10 μg/mL	1 ng/mL
dbcAMP	西格玛公司	D0627	100 mM	500 μM
DAPT	西格玛公司	D5942	20 mM	5 μM
丝裂霉素 C	西格玛公司	M4287	1 mg/mL	100 ng/mL
DA 淬灭培养基 2 (第 18+天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM
DA 成熟铺板培养基(第 18+天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
抗坏血酸	西格玛公司	A4403	200 mM	200 μM
Rec Hu BDNF	R&D 系统公司	248-BD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu GDNF	R&D 系统公司	212-GD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu TGFB3	R&D 系统公司	243-B3	10 μg/mL	1 ng/mL
dbcAMP	西格玛公司	D0627	100 mM	500 μM
DAPT	西格玛公司	D5942	20 mM	5 μM
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM

[0170] 表2:常规定时培养基条件(2μM背吗啡)

[0171]

组分	供应商	目录号	母液	最终浓度
E8 铺板培养基(第-2 天)				
Essential 8 基础培养基	生命技术公司	A14666SA	1X	98%
Essential 8 补充物	生命技术公司	A14666SA	50X	2%
H1152	CDI	H024	100 μM	1 μM
E8 培养基(第-1 和 0 天)				
Essential 8 基础培养基	生命技术公司	A14666SA	1X	98%
Essential 8 补充物	生命技术公司	A14666SA	50X	2%
D1 DA 诱导培养基(第 1 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (+VitA)	生命技术公司	17504-044	2X	2%
背吗啡	西格玛公司	P5499	2.5mM	2 μM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 μg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.25 μM
D2 DA 诱导培养基(第 2 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (+VitA)	生命技术公司	17504-044	2X	2%
背吗啡	西格玛公司	P5499	2.5mM	2 μM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 μg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.25 μM
PD0325901	Stemgent 公司	04-0006	10 mM	1.0 μM
D3-4 DA 诱导培养基(第 3 和 4 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
背吗啡	西格玛公司	P5499	2.5mM	2 μM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM

[0172]

C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 µg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.25 µM
PD0325901	Stemgent 公司	04-0006	10 mM	1.0 µM
DA 淬灭培养基 1 (第 5 和 17 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 µM
D5 DA 聚集体形成培养基(第 5 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
背吗啡	西格玛公司	P5499	2.5mM	2 µM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 µM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 µg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.25 µM
布雷他汀	西格玛公司	B0560	2,500x	10 µM
D6 DA 诱导培养基(第 6 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
背吗啡	西格玛公司	P5499	2.5mM	2 µM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 µM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 µg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.25 µM
D7-10 DA 聚集体维持培养基(第 7-10 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
背吗啡	西格玛公司	P5499	2.5mM	2 µM
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.25 µM
D11-16 DA 聚集体维持培养基(第 11-16 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%

[0173]

B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
背吗啡	西格玛公司	P5499	2.5mM	2 μM
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	3.0 μM
FGF8	R&D 系统公司	423-F8	50 μg/mL	100 ng/mL
D17 DA 聚集体铺板培养基(第 17 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
背吗啡	西格玛公司	P5499	2.5mM	2 μM
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	3.0 μM
FGF8	R&D 系统公司	423-F8	50 μg/mL	100 ng/mL
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM
DA 成熟培养基(第 18+天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
抗坏血酸	西格玛公司	A4403	200 mM	200 μM
Rec Hu BDNF	R&D 系统公司	248-BD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu GDNF	R&D 系统公司	212-GD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu TGFB3	R&D 系统公司	243-B3	10 μg/mL	1 ng/mL
dbcAMP	西格玛公司	D0627	100 mM	500 μM
DAPT	西格玛公司	D5942	20 mM	5 μM
DA 成熟培养基+ MMC (第 27 和 29 天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
抗坏血酸	西格玛公司	A4403	200 mM	200 μM
Rec Hu BDNF	R&D 系统公司	248-BD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu GDNF	R&D 系统公司	212-GD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu TGFB3	R&D 系统公司	243-B3	10 μg/mL	1 ng/mL

[0174]

dbcAMP	西格玛公司	D0627	100 mM	500 μM
DAPT	西格玛公司	D5942	20 mM	5 μM
丝裂霉素 C	西格玛公司	M4287	1 mg/mL	100 ng/mL
DA 淬灭培养基 2 (第 18+天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM
DA 成熟铺板培养基(第 18+天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
抗坏血酸	西格玛公司	A4403	200 mM	200 μM
Rec Hu BDNF	R&D 系统公司	248-BD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu GDNF	R&D 系统公司	212-GD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu TGFB3	R&D 系统公司	243-B3	10 μg/mL	1 ng/mL
dbcAMP	西格玛公司	D0627	100 mM	500 μM
DAPT	西格玛公司	D5942	20 mM	5 μM
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM

[0175] 表3:常规定时培养基条件(200μM LDN)

[0176]

组分	供应商	目录号	母液	最终浓度
E8 铺板培养基(第-2 天)				
Essential 8 基础培养基	生命技术公司	A14666SA	1X	98%
Essential 8 补充物	生命技术公司	A14666SA	50X	2%
H1152	CDI	H024	100 μM	1 μM
E8 培养基(第-1 和 0 天)				
Essential 8 基础培养基	生命技术公司	A14666SA	1X	98%
Essential 8 补充物	生命技术公司	A14666SA	50X	2%
D1 DA 诱导培养基(第 1 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (+VitA)	生命技术公司	17504-044	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 μg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.25 μM
D2 DA 诱导培养基(第 2 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (+VitA)	生命技术公司	17504-044	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 μg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.25 μM
PD0325901	Stemgent 公司	04-0006	10 mM	1.0 μM
D3-4 DA 诱导培养基(第 3 和 4 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM

[0177]

C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 µg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.25 µM
PD0325901	Stemgent 公司	04-0006	10 mM	1.0 µM
DA 淬灭培养基 1 (第 5 和 17 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 µM
D5 DA 聚集体形成培养基(第 5 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 µM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 µg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.25 µM
布雷他汀	西格玛公司	B0560	2,500x	10 µM
D6 DA 诱导培养基(第 6 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 µM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 µg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.25 µM
D7-10 DA 聚集体维持培养基(第 7-10 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.25 µM
D11-16 DA 聚集体维持培养基(第 11-16 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%

[0178]

B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	3.0 μM
FGF8	R&D 系统公司	423-F8	50 μg/mL	100 ng/mL
D17 DA 聚集体铺板培养基(第 17 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	3.0 μM
FGF8	R&D 系统公司	423-F8	50 μg/mL	100 ng/mL
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM
DA 成熟培养基(第 18+天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
抗坏血酸	西格玛公司	A4403	200 mM	200 μM
Rec Hu BDNF	R&D 系统公司	248-BD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu GDNF	R&D 系统公司	212-GD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu TGFB3	R&D 系统公司	243-B3	10 μg/mL	1 ng/mL
dbcAMP	西格玛公司	D0627	100 mM	500 μM
DAPT	西格玛公司	D5942	20 mM	5 μM
DA 成熟培养基+ MMC (第 27 和 29 天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
抗坏血酸	西格玛公司	A4403	200 mM	200 μM
Rec Hu BDNF	R&D 系统公司	248-BD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu GDNF	R&D 系统公司	212-GD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu TGFB3	R&D 系统公司	243-B3	10 μg/mL	1 ng/mL

[0179]

dbcAMP	西格玛公司	D0627	100 mM	500 μM
DAPT	西格玛公司	D5942	20 mM	5 μM
丝裂霉素 C	西格玛公司	M4287	1 mg/mL	100 ng/mL
DA 淬灭培养基 2 (第 18+天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM
DA 成熟铺板培养基(第 18+天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
抗坏血酸	西格玛公司	A4403	200 mM	200 μM
Rec Hu BDNF	R&D 系统公司	248-BD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu GDNF	R&D 系统公司	212-GD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu TGFB3	R&D 系统公司	243-B3	10 μg/mL	1 ng/mL
dbcAMP	西格玛公司	D0627	100 mM	500 μM
DAPT	西格玛公司	D5942	20 mM	5 μM
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM

[0180] 表4:其他定时培养基条件(200μM LDN)

[0181]

组分	供应商	目录号	母液	最终浓度
E8 铺板培养基(第-2 天)				
Essential 8 基础培养基	生命技术公司	A14666SA	1X	98%
Essential 8 补充物	生命技术公司	A14666SA	50X	2%
H1152	CDI	H024	100 μM	1 μM
E8 培养基(第-1 和 0 天)				
Essential 8 基础培养基	生命技术公司	A14666SA	1X	98%
Essential 8 补充物	生命技术公司	A14666SA	50X	2%
D1 DA 诱导培养基(第 1 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (+VitA)	生命技术公司	17504-044	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
D2 DA 诱导培养基(第 2 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (+VitA)	生命技术公司	17504-044	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 μg/mL	100 ng/mL
D3-4 DA 诱导培养基(第 3 和 4 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 μg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	2.00 μM
PD0325901	Stemgent 公司	04-0006	10 mM	1.0 μM
DA 淬灭培养基 1 (第 5 和 17 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%

[0182]

B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM
D5 DA 聚集体形成培养基(第 5 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 μg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	2.00 μM
PD0325901	Stemgent 公司	04-0006	10 mM	1.0 μM
布雷他汀	西格玛公司	B0560	2,500x	10 μM
D6-7 DA 诱导培养基(第 6-7 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 μg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	2.00 μM
D8-10 DA 聚集体维持培养基(第 8-10 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	2.00 μM
D11-16 DA 聚集体维持培养基(第 11-16 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	3.0 μM
FGF8	R&D 系统公司	423-F8	50 μg/mL	100 ng/mL

[0183]

D17 DA 聚集体铺板培养基(第 17 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	3.0 µM
FGF8	R&D 系统公司	423-F8	50 µg/mL	100 ng/mL
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 µM
DA 成熟培养基(第 18+天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
抗坏血酸	西格玛公司	A4403	200 mM	200 µM
Rec Hu BDNF	R&D 系统公司	248-BD	20 µg/mL	20 ng/mL
Rec Hu GDNF	R&D 系统公司	212-GD	20 µg/mL	20 ng/mL
Rec Hu TGFB3	R&D 系统公司	243-B3	10 µg/mL	1 ng/mL
dbcAMP	西格玛公司	D0627	100 mM	500 µM
DAPT	西格玛公司	D5942	20 mM	5 µM
DA 成熟培养基+ MMC (第 27 和 29 天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
抗坏血酸	西格玛公司	A4403	200 mM	200 µM
Rec Hu BDNF	R&D 系统公司	248-BD	20 µg/mL	20 ng/mL
Rec Hu GDNF	R&D 系统公司	212-GD	20 µg/mL	20 ng/mL
Rec Hu TGFB3	R&D 系统公司	243-B3	10 µg/mL	1 ng/mL
dbcAMP	西格玛公司	D0627	100 mM	500 µM
DAPT	西格玛公司	D5942	20 mM	5 µM
丝裂霉素 C	西格玛公司	M4287	1 mg/mL	100 ng/mL
DA 淬灭培养基 2 (第 18+天)				

[0184]

Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM
DA 成熟铺板培养基(第 18+天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
抗坏血酸	西格玛公司	A4403	200 mM	200 μM
Rec Hu BDNF	R&D 系统公司	248-BD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu GDNF	R&D 系统公司	212-GD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu TGFB3	R&D 系统公司	243-B3	10 μg/mL	1 ng/mL
dbcAMP	西格玛公司	D0627	100 mM	500 μM
DAPT	西格玛公司	D5942	20 mM	5 μM
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM

[0185] 表5:替代性定时培养基条件(2μM背吗啡)

[0186]

E8 铺板培养基(第-2 天)				
组分	**供应商**	**目录号**	**母液**	**最终浓度**
Essential 8 基础培养基	生命技术公司	A14666SA	1X	98%
Essential 8 补充物	生命技术公司	A14666SA	50X	2%
H1152	CDI	H024	100 μM	1 μM
E8 培养基(第-1 和 0 天)				
Essential 8 基础培养基	生命技术公司	A14666SA	1X	98%
Essential 8 补充物	生命技术公司	A14666SA	50X	2%
D1 DA 诱导培养基(第 1 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (+VitA)	生命技术公司	17504-044	2X	2%
背吗啡	西格玛公司	P5499	2.5mM	2 mM
D2 DA 诱导培养基(第 2 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (+VitA)	生命技术公司	17504-044	2X	2%
背吗啡	西格玛公司	P5499	2.5mM	2 mM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 mM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 mg/mL	100 ng/mL
D3-4 DA 诱导培养基(第 3 和 4 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
背吗啡	西格玛公司	P5499	2.5mM	2 mM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 mM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 mg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	2.00 μM
PD0325901	Stemgent 公司	04-0006	10 mM	1.0 μM
DA 淬灭培养基 1 (第 5 和 17 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%

[0187]

B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM
D5 DA 聚集体形成培养基(第 5 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
背吗啡	西格玛公司	P5499	2.5mM	2 mM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 mM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 mg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	2.00 μM
PD0325901	Stemgent 公司	04-0006	10 mM	1.0 μM
布雷他汀	西格玛公司	B0560	2,500x	10 μM
D6-7 DA 诱导培养基(第 6-7 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
背吗啡	西格玛公司	P5499	2.5mM	2 mM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 mM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 mg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	2.00 μM
D8-10 DA 聚集体维持培养基(第 8-10 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
背吗啡	西格玛公司	P5499	2.5mM	2 mM
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	2.00 μM
D11-16 DA 聚集体维持培养基(第 11-16 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
背吗啡	西格玛公司	P5499	2.5mM	2 mM
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	3.0 μM
FGF8	R&D 系统公司	423-F8	50 μg/mL	100 ng/mL

[0188]

D17 DA 聚集体铺板培养基(第 17 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
背吗啡	西格玛公司	P5499	2.5mM	2 mM
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	3.0 μM
FGF8	R&D 系统公司	423-F8	50 μg/mL	100 ng/mL
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM
DA 成熟培养基(第 18+天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
抗坏血酸	西格玛公司	A4403	200 mM	200 mM
Rec Hu BDNF	R&D 系统公司	248-BD	20 mg/mL	20 ng/mL
Rec Hu GDNF	R&D 系统公司	212-GD	20 mg/mL	20 ng/mL
Rec Hu TGFB3	R&D 系统公司	243-B3	10 mg/mL	1 ng/mL
dbcAMP	西格玛公司	D0627	100 mM	500 mM
DAPT	西格玛公司	D5942	20 mM	5 mM
DA 成熟培养基+ MMC (第 27 和 29 天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
抗坏血酸	西格玛公司	A4403	200 mM	200 mM
Rec Hu BDNF	R&D 系统公司	248-BD	20 mg/mL	20 ng/mL
Rec Hu GDNF	R&D 系统公司	212-GD	20 mg/mL	20 ng/mL
Rec Hu TGFB3	R&D 系统公司	243-B3	10 mg/mL	1 ng/mL
dbcAMP	西格玛公司	D0627	100 mM	500 mM
DAPT	西格玛公司	D5942	20 mM	5 mM
丝裂霉素 C	西格玛公司	M4287	1 mg/mL	100 ng/mL
DA 淬灭培养基 2 (第 18+天)				

[0189]

Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM
DA 成熟铺板培养基(第 18+天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
抗坏血酸	西格玛公司	A4403	200 mM	200 mM
Rec Hu BDNF	R&D 系统公司	248-BD	20 mg/mL	20 ng/mL
Rec Hu GDNF	R&D 系统公司	212-GD	20 mg/mL	20 ng/mL
Rec Hu TGFB3	R&D 系统公司	243-B3	10 mg/mL	1 ng/mL
dbcAMP	西格玛公司	D0627	100 mM	500 mM
DAPT	西格玛公司	D5942	20 mM	5 mM
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM

[0190] 表6:条件9(200μM LDN)

[0191]

组分	供应商	目录号	母液	最终浓度
E8 铺板培养基(第-2 天)				
Essential 8 基础培养基	生命技术公司	A14666SA	1X	98%
Essential 8 补充物	生命技术公司	A14666SA	50X	2%
H1152	CDI	H024	100 μM	1 μM
E8 培养基(第-1 和 0 天)				
Essential 8 基础培养基	生命技术公司	A14666SA	1X	98%
Essential 8 补充物	生命技术公司	A14666SA	50X	2%
D1 DA 诱导培养基(第 1 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (+VitA)	生命技术公司	17504-044	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 μg/mL	100 ng/mL
D2 DA 诱导培养基(第 2 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (+VitA)	生命技术公司	17504-044	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 μg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.75 μM
D3-4 DA 诱导培养基(第 3 和 4 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 μg/mL	100 ng/mL

[0192]

CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.75 μM
PD0325901	Stemgent 公司	04-0006	10 mM	1.0 μM
DA 淬灭培养基 1 (第 5 和 17 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM
D5 DA 聚集体形成培养基(第 5 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 μg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.75 μM
PD0325901	Stemgent 公司	04-0006	10 mM	1.0 μM
布雷他汀	西格玛公司	B0560	2,500x	10 μM
D6-7 DA 诱导培养基(第 6-7 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
嘌吗啡胺	卡曼公司	10009634	10mM	2 μM
C25II SHH	R&D 系统公司	464-SH	100 μg/mL	100 ng/mL
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.75 μM
D8-10 DA 聚集体维持培养基(第 8-10 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	1.75 μM
D11-16 DA 聚集体维持培养基(第 11-16 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%

[0193]

B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	3.0 μM
FGF8	R&D 系统公司	423-F8	50 μg/mL	100 ng/mL
D17 DA 聚集体铺板培养基(第 17 天)				
DMEM/F12	生命技术公司	11330-032	1X	98%
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
LDN-193189	Stemgent 公司	04-0074	10 mM	200 nM
CHIR99021	Stemgent 公司	04-0004	20 mM	3.0 μM
FGF8	R&D 系统公司	423-F8	50 μg/mL	100 ng/mL
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM
DA 成熟培养基(第 18+天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
抗坏血酸	西格玛公司	A4403	200 mM	200 μM
Rec Hu BDNF	R&D 系统公司	248-BD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu GDNF	R&D 系统公司	212-GD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu TGFB3	R&D 系统公司	243-B3	10 μg/mL	1 ng/mL
dbcAMP	西格玛公司	D0627	100 mM	500 μM
DAPT	西格玛公司	D5942	20 mM	5 μM
DA 成熟培养基+ MMC (第 27 和 29 天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
抗坏血酸	西格玛公司	A4403	200 mM	200 μM
Rec Hu BDNF	R&D 系统公司	248-BD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu GDNF	R&D 系统公司	212-GD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu TGFB3	R&D 系统公司	243-B3	10 μg/mL	1 ng/mL

[0194]

dbcAMP	西格玛公司	D0627	100 mM	500 μM
DAPT	西格玛公司	D5942	20 mM	5 μM
丝裂霉素 C	西格玛公司	M4287	1 mg/mL	100 ng/mL
DA 淬灭培养基 2 (第 18+天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM
DA 成熟铺板培养基(第 18+天)				
Neurobasal	生命技术公司	21103-049	1X	98%
Glutamax	生命技术公司	35050-061	200 mM	2 mM
B-27 补充物 (-VitA)	生命技术公司	12587-010	2X	2%
抗坏血酸	西格玛公司	A4403	200 mM	200 μM
Rec Hu BDNF	R&D 系统公司	248-BD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu GDNF	R&D 系统公司	212-GD	20 μg/mL	20 ng/mL
Rec Hu TGFB3	R&D 系统公司	243-B3	10 μg/mL	1 ng/mL
dbcAMP	西格玛公司	D0627	100 mM	500 μM
DAPT	西格玛公司	D5942	20 mM	5 μM
布雷他汀	西格玛公司	B0560	10,000x	2.5 μM

[0195] 实施例2

[0196] 使用单-SMADi的高效mDA祖细胞模式化

[0197] 在制造过程结束时获得高度富集的mDA神经元群通常需要通过在处理第17天时测量共表达FoxA2和Lmx1的细胞的百分比测量的mDA祖细胞的高效模式化。如果大多数细胞在第17天不是mDA祖细胞,那么获得的神经元将具有大群非中脑表型神经元,或将具有通常导致神经元脱离或难以或无法纯化有丝分裂后神经元情况的增殖细胞突触生长(outgrowth)。

[0198] 用从第1天开始添加的大多数祖细胞模式化因子优化iCell Dopa神经元处理。这包括用于神经化(双-SMADi)、音猬因子信号转导(Shh,PMN)和Wnt信号转导(CHIR)的因子。然而,发明人发现该方法并不适用于使用单-SMAD抑制的神经化背景下测试的几乎所有iPSC系。在数个iPSC系上进行了许多优化实验以确定高效单-SMADi mDA祖细胞模式化的条件,改变所有模式化因子的时间安排和剂量。如图1所述,发现这样的条件(“MONO/ALT”),其中单-SMADi mDA祖细胞模式化与使用之前优化的标准条件(“DUAL/STD”)的双-SMADi模式化一样好,并且该模式化比使用标准条件(“MONO/STD”)的单-SMADi mDA祖细胞模式化显著的更高效。在替代性(ALT)方法中,从第1天到第2天,去除SHH/嘌吗啡胺添加。在该改进中利用的改变包括:(i)将Wnt激动剂(CHIR)的添加交错安排(stagger)至第2天或第3天,(ii)再

次优化CHIR浓度,因为这取决于其首次添加的时间,和(iii)移动添加PD03的窗口,因为最佳窗口取决于何时添加CHIR。最终结果是一组窄的条件,其导致多个iPS细胞系中高效的mDA祖细胞形成。大约一半测试的iPSC系使用单-SMADi条件能够生成mDA祖细胞。图2显示了用于确定优化的模式化条件的基质优化实验的示例。

[0199] 如图1所示,通过测量表达FoxA2(通过流式细胞术)或共表达FoxA2和Lmx1(通过ICC)的所有细胞的比例,在第17天处理时评估来自3个不同的iPSC系的mDA祖细胞的模式化。FoxA2/Lmx1共表达是mDA祖细胞最准确的标志物。使用替代性模式化条件在单-SMAD抑制(“单/替代性”)的情况下能够高效mDA模式化,然而,标准模式化条件在单-SMAD抑制(“单/标准”)的情况下的mDA祖细胞模式化差。示出使用双-SMADi和标准模式化条件(“双/标准”)的对照分化作为对照。

[0200] 图1数据示出获自使用表1针对所有双标准条件所述的条件的数据。使用表4中针对单替代性和表3针对中针对单标准条件所述的条件获得细胞系C数据。细胞系D和K遵循表2和表5针对单标准和单替代性,表示来自细胞系C的数据获自测试LDN,而其他系用背吗啡测试。

[0201] 一旦鉴定出能够使用单-SMAD抑制的成功分化的替代性模式化条件(条件1,即,表4:替代性,LDN为200nM),方法使用条件的矩阵(matrix)精细化,包括CHIR的浓度,以及Shh信号转导、Wnt信号转导和MEK抑制的处理窗口。如图2所述,测试下述条件的单-SMAD抑制,如下表6所示。表6显示了以特定化合物的孵育的开始日期(例如,“D2”表示在第2天开始的孵育)和使用的CHIR99021的浓度。图2示出的是iPSC系K的一个基质实验。条件3、5、7和9导致截至第17天最高百分比的FoxA2+/Lmx1+mDA祖细胞,并且将FoxA2+群维持到第24天。酪氨酸羟化酶(TH)表达在未成熟的mDA神经元中较低。使用1.65μM而非1.75μM的CHIR99021浓度重复这些实验,并且观察到使用较低1.65μM浓度的CHIR99021可以获得相似结果的mDA祖细胞生成。

[0202] 重复这些单-SMAD实验,并进行这样的修改,在第5天将benzonase®(内切核酸酶,EMD密理博公司(EMD Millipore))以100U/mL的浓度包括在孵育中。观察到在第5天将benzonase®包括在孵育内将减少或防止聚集体形成中的过度结块。

[0203] 表6.单-SMAD抑制的条件

[0204]

条件	Shh/PMN起始	PD03起始	CHIR起始	CHIR Conc.
1	D2	D3	D3	1.75uM
2	D2	D2	D2	1.25uM
3	D2	D2	D2	1.75uM
4	D2	D3	D2	1.25uM
5	D2	D3	D2	1.75uM
6	D1	D2	D2	1.25uM
7	D1	D2	D2	1.75uM
8	D1	D3	D2	1.25uM
9	D1	D3	D2	1.75uM
10	D1	D2	D3	1.25uM
11	D1	D2	D3	1.75uM

12	D1	D3	D3	1.25uM
13	D1	D3	D3	1.75uM

[0205] “Shh”指C25II Shh;“PMN”指嘌吗啡胺;“PD03”指PD0325901:“CHIR”指CHIR99021;“Conc.”是浓度:“D1”、“D2”和D3分别指第1、2和3。

[0206] 实施例3

[0207] 确定单-SMAD抑制的抑制剂

[0208] 如下所述,在单-SMADi方法中测试不同抑制剂的功能。使用LDN-193189,BMP信号转导的一种抑制剂(抑制ALK 1/2/3/6,阻断SMAD 1/5/8),和SB-431542,TGF-b信号转导的一种抑制剂(抑制ALK 4/5/7,阻断SMAD 2/3),iCell Dopa神经元过程诱导中和。其被统称为“双SMAD抑制”或“双SMADi”。为了确定在mD过程中仅使用单一SMAD抑制剂的神经化的最佳条件,使用上述替代性模式化条件使多种iPS细胞系分泌LDN-193189和SB-431542的各种类似物。如图3所示,观察到LDN-193189是这样的抑制剂,当在不同iPSC系之间测试时,其在诱导最高百分比的mDA祖细胞时是总体最佳的抑制剂。对于以一种SMAD抑制剂示出的数据,将LDN-193189、背吗啡和DMH-1在第1天到第17天添加到培养基,而SB431542以20μM在第1天到第4天添加。

[0209] 通过测量表达FoxA2(通过流式细胞术)或共表达FoxA2和Lmx1(通过ICC)的所有细胞的比例,在第17天处理时评估mDA祖细胞的模式化,并将结果示于图3。观察到FoxA2/Lmx1共表达是mDA祖细胞最准确的标志物。观察到LDN-193189在多个iPSC系中最高效地使mDA祖细胞神经化。示出的所有单-SMADi测试使用替代性模式化条件;使用标准模式化的双-SMADi条件以对照示出。同样测试的是SB-431542类似物LY364947和A-83-01,其未优于LDN。

[0210] 实施例4

[0211] 纯化和表征单-SMADi产生的多巴胺能神经元

[0212] mDA神经元的过程中纯化:即使以高效mDA祖细胞模式化,仍然存在继续增殖的细胞群,甚至在成熟的mDA神经元离开细胞周期之后(大约第25天)也是如此。为了去除这些不需要的细胞,在mDA神经元已经离开细胞周期后立即以低剂量(50至500ng/mL)添加DNA交联剂丝裂霉素C(MMC)4天(第27-31天)。将获自西格玛公司(Sigma)或Tocris公司的MMC用于实验。使用的剂量和持续时间对有丝分裂后mDA神经元基本上没有或没有副作用,但是杀伤分裂细胞。通过测试对分裂细胞具有毒性的各种化合物,并且改变MMC处理的剂量、持续时间和起始日期来对该方法进行优化。还应注意的是,在更短的时间内给予更高的MMC剂量可以实现相同的效果(杀伤分裂细胞),例如5ug/mL,持续1小时。给予中间时间的中间剂量也可用于实现类似的效果。然而,在4天内使用约100ng/mL的较低浓度,并且观察到导致分裂细胞的去除,并且没有观察到对有丝分裂后神经元的毒性。

[0213] 如图4A所示,在没有纯化的情况下,到第37天,生长出显著的增殖细胞群(巢蛋白+),导致44%的有丝分裂后神经元纯度(MAP2+/巢蛋白-)(“无选择”)。iCell Dopa神经元产物利用具有MAP2启动子驱动的neoR基因的遗传构建体以允许高效选择有丝分裂后神经元(“G418药物选择”),但是该方法通常不适合临床使用。然而,化疗剂药物MMC的使用被用于纯化有丝分裂后神经元,始终产生>90%的最终神经元纯度(“化疗(chemo)药物选择”)。如图4B所示,mDA神经元的功能性在MMC选择后被保留,如通过分泌多巴胺的能力所示,并且其他测试并未解释与遗传选择的细胞的任何差异,所述遗传选择的细胞是广泛表征的iCell

Dopa神经元。重要地是,MMC选择后不存在增殖细胞的突触生长,即使在延长解冻后培养后(图4C)。

[0214] 中脑多巴胺能(mDA)神经元的最终纯度和冷冻保存:使用下述方法将多个iPSC系分化以达到处理完成:单-SMAD抑制,替代性mDA祖细胞模式化和MMC纯化。结果如图5所示。示出3个iPSC系(C、K和H)作为处理完成(第37天)实施方式成功分化的示例(图5)。iPSC系C、K和H是iPSC系(分别为21526.101、21534.101和21531.101)。使用表4中的方法用于替代性LDN和表1中的方法用于标准双对照来获得数据。这些实验利用针对单-SMADi的LDN-193189以及图2中所示替代性模式化变化形式中的一种。为了比较,示出使用双-SMADi和优化的标准模式化分化H系。在各种情况中,观察到高水平的神经元纯度(>90% MAP2+/巢蛋白-),并且基本上所有神经元共表达FoxA2。发明人还观察到,处于这一阶段的绝大多数MAP2+/FoxA2+细胞还表达Lmx1,并且因此是mDA神经元。通过在大部分神经元中表达酪氨酸羟化酶(TH)确认DA神经元表型,所述酪氨酸羟化酶(TH)是更成熟的DA神经元的标志物。

[0215] 如图6所示,将由K系制造的mDA神经元冷冻保存,并解冻以用于解冻后表征。图6中的数据使用如表6中所示的方法获得。观察到细胞活力在解冻时高,并且大多数活细胞能够接种到PLO-层粘连蛋白表面上(接种效率,图6)。此外,如解冻后3天测量,解冻后的细胞保留MAP2+/FoxA2+/TH+的mDA神经元表型。细胞表现出健康的神经突触生长,并且观察到不存在增殖细胞。这些表型特征与解冻后的iCell Dopa神经元中观察到的紧密匹配。

[0216] 实施例5

[0217] 单-SMADi分化过程的交叉-iPSC(Cross-iPSC)系测试

[0218] 使用经优化的单-SMADi过程(来自图2的“条件9”)分化源自健康供体(供体ID 11378和11379)的3个iPSC系和源自帕金森病患者(供体ID 11249、11250和11251)的9个iPSC系。到处理第17天时,所有iPSC系被高效地转化为DA祖细胞,其中12个系中的11个系中>80% FoxA2/Lmx1共表达(图7A)。到处理完成时(第37天),来自iPSC系的细胞实现了高水平的神经元纯度(>90%MAP2+/巢蛋白-),中脑特异性(>80% FoxA2+)和中脑多巴胺甚于成熟(>40%TH+)(图7B)。这些结果证明,经优化的单-SMADi分化方案在iPSC系之间的稳健性,包括那些来自帕金森病患者的iPSC系。

[0219] 实施例6

[0220] FoxA2/Lmx1共表达的流式细胞术

[0221] FoxA2/Lmx1共表达是多巴胺神经能祖细胞模式化的关键读数,因此研发了这样的胞内流式细胞术,相比源自使用在免疫细胞化学图像上运行的细胞计数软件的结果,其主观性和可变性更低。该试验可以准确地定量在处理第17天到第24天时共表达FoxA2和Lmx1的细胞的百分比,并具有与来自分析的ICC成像的计数关联。当细胞在第17天时是>80% FoxA2+/Lmx1+时,认为祖细胞模式化是成功的(图8,上图)。示出了标准以下的祖细胞模式化的示例(图8,下图),其中有60% FoxA2+/Lmx1+细胞和显著的FoxA2+/Lmx1-阴性细胞群。

[0222] 实施例7

[0223] 由iPSC-mDA神经元释放多巴胺

[0224] 使用经优化的单-SMADi方案(“条件9”)将iPSC系“K”分化至处理完成(第37天)并冷冻保存。将细胞解冻并以高密度($8.8x10^5/cm^2$)接种。每三天用不含DAPT的成熟培养基饲养细胞,总共14天。在试验天,洗涤细胞并用HBSS(含有或不含有56mM KCl)孵育30分钟。使

用竞争性多巴胺ELISA试剂盒(伊戈尔生物科学公司(Eagle Biosciences))测定释放溶液中的多巴胺浓度。并未从iPSC衍生的前脑神经元(iCell神经元)检测到多巴胺释放。相反,源自使用经优化的单-SMADi过程的iPSC-mDA细胞(DA疗法神经元)分泌至少与源自使用经优化的双-SMAD过程的细胞(ICell Dopa神经元)一样多的多巴胺。因此,细胞能够行使属于成熟多巴胺神经元的关键功能。结果如图9所示。

[0225] 实施例8

[0226] iPSC-mDA神经元的电活性

[0227] 将冷冻保存的iPSC-mDA神经元解冻,并接种到PET涂覆的48孔多电极阵列(MEA)平板上。根据美国申请号14/830,162中细胞动力学国际公司(cellular Dynamics Intl)申请方案“在Maestro多电极阵列上测量同步神经元活动(Measuring synchronous neuronal activity on the Maestro multielectrode array)”培养细胞。以经优化的单-SMADi方案“条件9”(DA疗法)制造的神经元显示出相较于以优化的双-SMADi方案(iCell Dopa G100)制得的细胞相似的电活性,包括平均放电率(mean firing rate)(mFR),簇发放(bursting)(大BPM)和连通性(connectivity)(图10,顶图)。平均放电率(mFR),频率和连通性爆发式锋电位强度(connectivity burst intensity)随时间增加,在解冻后大约第16天达到平稳。。时间栅格图显示了孔中所有电极上清晰的尖峰电位间间隔,高爆发式锋电位强度(burst intensity)和簇发放(bursting),证明了高度的电活性。结果如图10所示。

[0228] 实施例9

[0229] iPSC-mDA神经元的定量基因表达概况

[0230] 在处理第37天时由源自使用经优化的单-SMADi过程的4个批次的iPSC-mDA细胞(批次1-4)和源自使用经优化的双-SMADi方案的1个批次的iPSC-mDA细胞(iCee Dopa神经元)提取RNA。RNA分离后,使用TaqMan基因表达试验(应用生物系统公司(Applied Biosystems))进行实时定量聚合酶链式反应(PCR),以对GAPDH对照的相对表达表示结果。将$<10^{-4}$的值认为是背景(阴影框)。中脑和mDA神经元标志物的表达在各批次之间和使用不同方案制得的细胞之间是相似的。针对非中脑区域或非mDA细胞类型的标志物较少,并且在单-SMADi和双-SMADi衍生的细胞之间也是相似的。结果如图11所示。

[0231] 实施例10

[0232] 向cGMP相容试剂的转化

[0233] 为了将单-SMADiiPSC-mDA分化方案转化成cGMP相容的过程用于细胞疗法,优选或必需替换多种试剂,所述试剂包含动物来源的成分,包含不可接受水平的内毒素,或与制备用于治疗的cGMP不相容。使用经优化的单-SMADi过程(“条件9”)将iPSC-mDA细胞分化,然后使用下述无异种的cGMP相容试剂:重组人玻连蛋白,层粘连蛋白,音猬因子,FGF-8,GDNF,BDNF和TGF-b3;不含内毒素的dbcAMP。B27和B27(-Vit.A)是用于该过程含有动物成分的唯一试剂。使用“条件9”过程以标准试剂或cGMP相容试剂分化的K系iPSC细胞具有等同祖细胞模式化(第17天)和第37天mDA神经元纯度。结果如图12所示。

[0234] 实施例11

[0235] 非人类灵长类动物中iPSC-DA的移植

[0236] 使用经优化的方案(“条件9”)将iPSC系“K”分化至处理完成(第37天)并冷冻保存。将细胞解冻并双侧移植到MPTP处理且免疫抑制的非洲绿猴(n＝3)的尾状核和壳核

(1.5x10^{6}细胞/注射)。3个月后,通过冠状切片的组织学评估神经元的移植和神经支配。人细胞质(STEM121)的染色揭示了所有动物中良好的人细胞移植和神经支配。在移植物中观测到多巴胺神经元(TH+),证明这些细胞长期存活并在脑中神经支配mDA神经元靶结构的能力。没有在这些动物中观察到肿瘤、神经突触生长或其他负面影响。结果如图13所示。

[0237] 实施例12

[0238] 大鼠帕金森病模型系统中iPSC-DA祖细胞和神经元的移植

[0239] 使用经优化的单-SMADi方案("条件9")将iPSC系"K"分化至过程完成(第37天)并在分化过程的不同阶段冷冻保存(第17天、第24天和第37天)。此外,将使用经优化的双SMADi方案衍生的iPSC-mDA细胞(iCell Dopa)在第37天处理时冷冻保存。将细胞解冻并双侧移植到6-OHDA处理但无症状裸(RNU)大鼠(n=3/组)的纹状体(4.5x10^{5}细胞/注射)。3个月后,通过冠状切片的组织学评估细胞的移植和神经支配。虽然在所有4个组中观察到神经元移植和神经支配(人NCAM染色),但是相较于更成熟的单-SMADi和双-SMADi衍生的mDA神经元(分别为第37天和第37天的iCell Dopa),iPSC-DA祖细胞(第17天)和未成熟的mDA神经元(第24天)具有更大的移植物和更大的神经支配。此外,在祖细胞和未成熟的DA神经元移植物中观察到更多数量的DA神经元(TH+)。Ki67染色揭示来自第37天细胞的移植物中几乎没有增殖细胞,来自第17天和第24天细胞的移植物中有较少的Ki67+细胞。在这些动物中的任一个动物中没有观察到肿瘤、神经突触生长或其他负面影响。这些结果表明相较于更成熟的细胞,取自经优化的单-SMADi分化过程(第17-24天)早期的细胞能够更好地移植和神经支配。结果如图14所示。

[0240] 实施例13

[0241] 使用2μM LDN-193189改善分化

[0242] 使用单-SMADi方案"条件7"或"条件9"(如上所述)使用LDN-193189的标准浓度(200nM)或10倍高的浓度(2μM LDN)将iPSC系"K"分化。在多个实验中(n=5),当使用2μM LDN时,观察到分化质量的改善。例如,2μM LDN对"条件7"方案的改善包括在第17天祖细胞中较高的FoxA2和Lmx1表达水平(挺土)和第37天处理时较高百分比的底板衍生的神经元(FoxA2+)(底图)。这表明2μM LDN改善了分化过程的稳健性,可能是由于LDN在高浓度时候抑制TGF-β1型(ALK4/5/7)受体信号转导的能力(IC_{50}>500nM,Yu等2008)。结果如图15所示。

[0243] ***

[0244] 根据本公开,本文公开和权利要求的所有方法无需过多实验即可进行和执行。虽然以优选实施方式的形式描述了本发明的组合物和方法,但本领域技术人员显然了解,可将各种改变施用于本文所述方法以及本文所述方法的各个步骤或各步骤的顺序,而并不背离本发明的概念、精神和范围。更具体说,显然某些化学和生理相关试剂可代替本文所述的试剂,同时实现相同或类似的结果。认为本领域技术人员了解的所有这些类似的取代物或改进都在所附权利要求所定义的本发明的精神、范围和概念内。

[0245] 参考文献

[0246] 下列参考文献都特定通过引用纳入本文,它们对本文陈述的内容提供示例性、程序上或其他细节上的补充。

[0247] 美国专利号5,843,780

[0248] 美国专利号6,200,806

[0249] 美国专利号6,833,269
[0250] 美国专利号7,029,913
[0251] 美国专利公开号2002/0168766
[0252] 美国专利公开号2003/0022367
[0253] 美国专利公开号2003/0211603
[0254] 美国专利公开号20030087919
[0255] 美国专利公开号20030125344
[0256] 美国专利公开号20040002507
[0257] 美国专利公开号20040002508
[0258] 美国专利公开号20040014755
[0259] 美国专利公开号20050192304
[0260] 美国专利公开号20050209261
[0261] 美国专利公开号2007/0116680
[0262] 美国专利公开号2007/0238170
[0263] 美国专利公开号2008/0171385
[0264] 美国专利公开号2011/0229441
[0265] 美国专利公开号2012/0276063
[0266] 美国专利公开号2015/0010514
[0267] 美国专利公开号2015/0265652
[0268] 美国专利公开号2016/0177260
[0269] 美国专利申请号13/054,022
[0270] 美国专利申请号14/664,245
[0271] 美国专利申请号14/830,162
[0272] PCT/US2010/024487
[0273] PCT/US2011/046796
[0274] WO 2009/149233
[0275] WO 2010/141801
[0276] WO2013/067362
[0277] 国际专利申请号1998/30679
[0278] 国际专利申请号2001/088100
[0279] 国际专利申请号2002/076976
[0280] 国际专利申请号2003/059913
[0281] 国际专利申请号2003/062225
[0282] 国际专利申请号2003/062227
[0283] 国际专利申请号2004/039796
[0284] 国际专利申请号2005/080554
[0285] 国际专利申请号2005/123902
[0286] 国际专利申请号2013/067362
[0287] Amit等,2000.

[0288] Andrews等,于:畸胎癌和胚胎干细胞(Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells),Robertson(编),IRL出版社,207-246,1987.

[0289] 动物细胞培养(Animal Cell Culture),1987.

[0290] Bottenstein和Sato,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,76:514-517,1979.

[0291] Byrne等,Nature,450(7169):497-502,2007.

[0292] Chen等,Cell,133:1106-1117,2008.

[0293] Chen等,Nature Methods 8:424-429,2011.

[0294] Chung,等,ES细胞衍生的可再生和功能性中脑多巴胺能祖细胞(ES cell-derived renewable and functional midbrain dopaminergic progenitors),Proc Natl Acad Sci U S A.108(23):9703-8,2011.

[0295] 《新编分子生物学指南和精编分子生物学》(Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology),1987和1995.

[0296] Doe等,J.Pharmacol.Exp.Ther.,32:89-98,2007.

[0297] 胚胎干细胞体外分化(Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro),1993.

[0298] Evans等,Nature,292:154,1981.

[0299] Fernandes,等,J.Biotechnology,132(2):227-236,2007.

[0300] 《基因靶向实用方法》(Gene Targeting,A Practical Approach),牛津大学出版社的IRL出版社(IRL Press at Oxford University Press),1993.

[0301] 哺乳动物细胞的基因转移载体(Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells),1987.

[0302] Greber等,Stem Cells,25:455-464,2007.

[0303] 小鼠发育技术指南(Guide to Techniques in Mouse Development),1993.

[0304] Harb等,PLoS One,20;3(8):e3001,2008.

[0305] 药物研究的体外方法(In vitro Methods in Pharmaceutical Research),Academic Press,1997.

[0306] Ishizaki,等,Mol.Pharmacol.,57:976-983,2000.

[0307] Jaeger等,Development,138(20):4363-74,Oct.2011

[0308] Jiang等,2012.

[0309] Jainchill等,J.Virol.,4:549,1969.

[0310] Keller等,Curr.Opin.Cell Biol.,7:862-869,1995.

[0311] Kim et al,Nature,418:50-56,2002.

[0312] Kirkeby等,限定条件下由人胚胎干细胞产生区域特异性神经祖细胞和功能神经元(Generation of Regionally Specified Neural Progenitors and Functional Neurons from Human Embryonic Stem Cells under Defined Conditions),Cell Rep.1(6):703-14,2012.

[0313] Klimanskaya等,Lancet.,365:P1636-1641,2005.

[0314] Kodama等,J.Cell.Physiol.,112:89,1982.

[0315] Krencik和Zhang,Nature Protocols 6(11):1710-1717,2011.

[0316] Krencik等,Nature Biotechnology 29:528-534,2011.

[0317] Kriks,等,源自人ES细胞的多巴胺神经元在帕金森氏病动物模型中高效移植(Dopamine Neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease),Nature.480(7378):547-51,2011.

[0318] Ludwig等,Nat.Biotechnol.,24(2):185-187,2006b.

[0319] Ludwig等,Nat.Methods,3(8):637-46,2006a.

[0320] 《小鼠胚胎操作实验室手册》(Manipulating the Mouse Embryo ALaboratory Manual),第二版,Cold冷泉港实验室出版社(Spring Harbor Laboratory Press),1994.

[0321] Martin,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,78:7634,1981.

[0322] 《小鼠研发》(Mouse Development),1993.

[0323] Nakajima等,Cancer Chemother.Pharmacol.,52:319-324,2003.

[0324] Nakano等,Science,272,722,1996.

[0325] Ogawa等,J.Cell Sci.,120:55-65,2007.

[0326] Parkin控制多巴胺在源自诱导的多能干细胞的人中脑多巴胺能的利用(Parkin controls dopamine utilization in human midbrain dopaminergic derived frominduced pluripotent stem cells)"Nat Commun.,3:668,2012.

[0327] Perrier等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,101(34):12543-8,2004.

[0328] 胚胎干细胞的性质和应用:应用于人类生物学和基因疗法的前景(Properties and uses of Embryonic Stem Cells:Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy),1998.

[0329] Reubinoff等,Nat.Biotechnol.,18:399-404,2000.

[0330] Sasaki等,Pharmacol.Ther.,93:225-232,2002.

[0331] Schwartz等,Methods 45(2):142-158,2008.

[0332] Smith,于:小鼠胚胎干细胞的起源和性质(Origins and Properties of Mouse Embryonic Stem Cells),Annu.Rev.Cell.Dev.Biol.,2000.

[0333] Sterneckert等,Stem Cells,28:1772-1781,2010.

[0334] Suzuki等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:10294-10299.,2006.

[0335] Takahashi和Yamanaka,Cell,126:663-676,2006.

[0336] Takahashi等,Cell,126(4):663-76,2006.

[0337] Takahashi等,Cell,131:861-872,2007.

[0338] Thomson和Marshall,Curr.Top.Dev.Biol.,38:133-165,1998.

[0339] Thomson和Odorico,J.Trends.Biotechnol.,18:53B57,2000.

[0340] Thomson等Proc.Natl.Acad.Scie.USA,92:7844-7848,1995.

[0341] Thomson等,Science,282:1145,1998.

[0342] Watabe和Miyazono,Cell Res.,19:103-115,2009.

[0343] Watanabe等,Nature Neurosci.,8:288-296,2005.

[0344] Xi等,Stem Cells.30(8):1655-63.,2012.

[0345] Xu等,Cell Stem Cell,3:196-206.,2008.

[0346] Xu等,Nat.Biotechnol.,19:971-974,2001.

[0347] Yakubov等,Biochemical and Biophysical Research Communications 394:189-193,2010.

[0348] Ying等,Cell,115:281-292,2003.

[0349] Young等,Mol Ther.22(8):1530-43,2014.

[0350] Yu和Thomson,Genes Dev.22(15):1987-97,2008.

[0351] Yu等,Science,318:1917-1920,2007.

[0352] Yu等,Nature Medicine,14:1363,2008.

[0353] Yu等,Science,324(5928):797-801,2009.

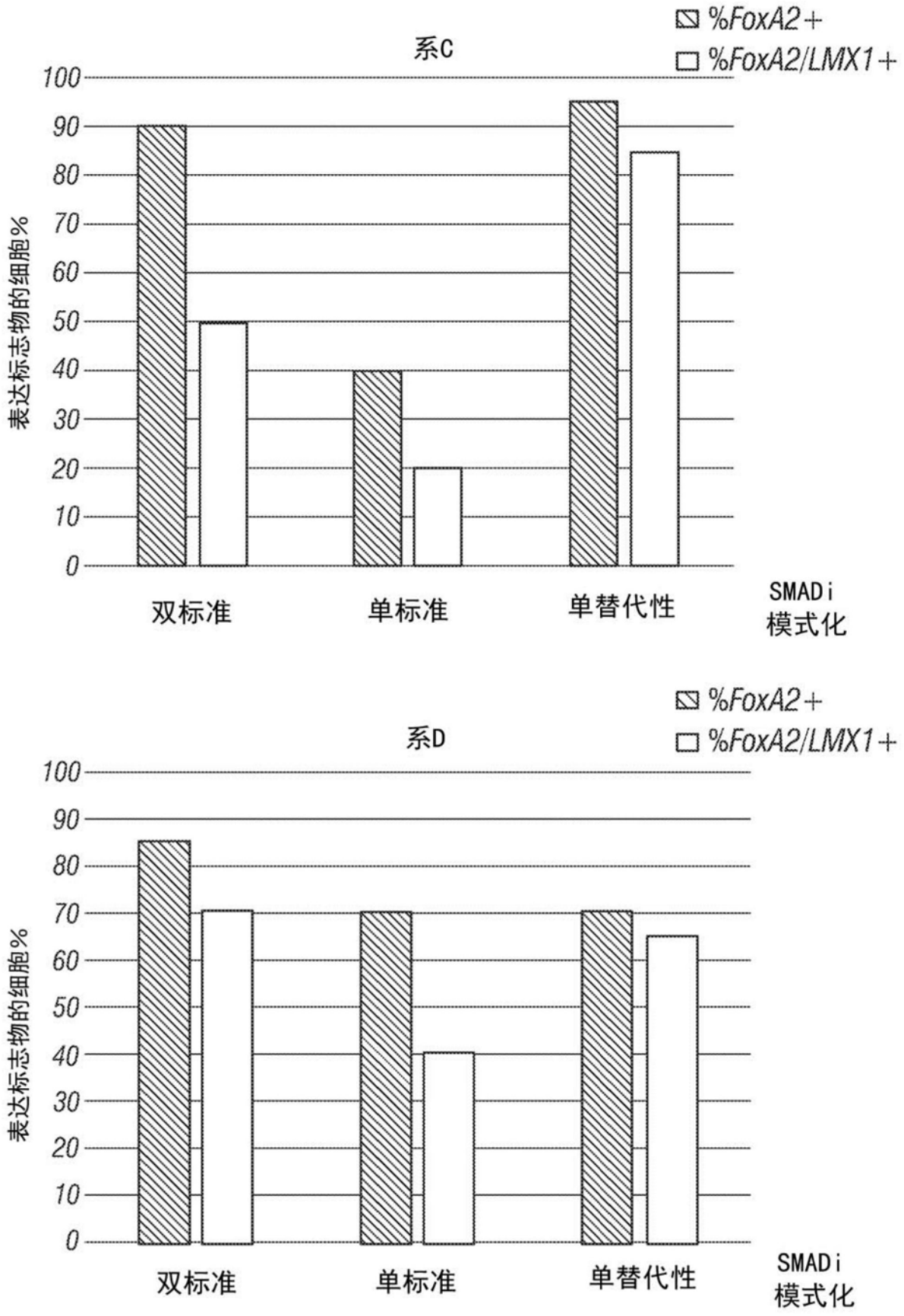

%FoxA2+
%FoxA2/LMX1+
系C
表达标志物的细胞%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
双标准
单标准
单替代性
SMADi
模式化
%FoxA2+
%FoxA2/LMX1+
系D
表达标志物的细胞%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
双标准
单标准
单替代性
SMADi
模式化

图1

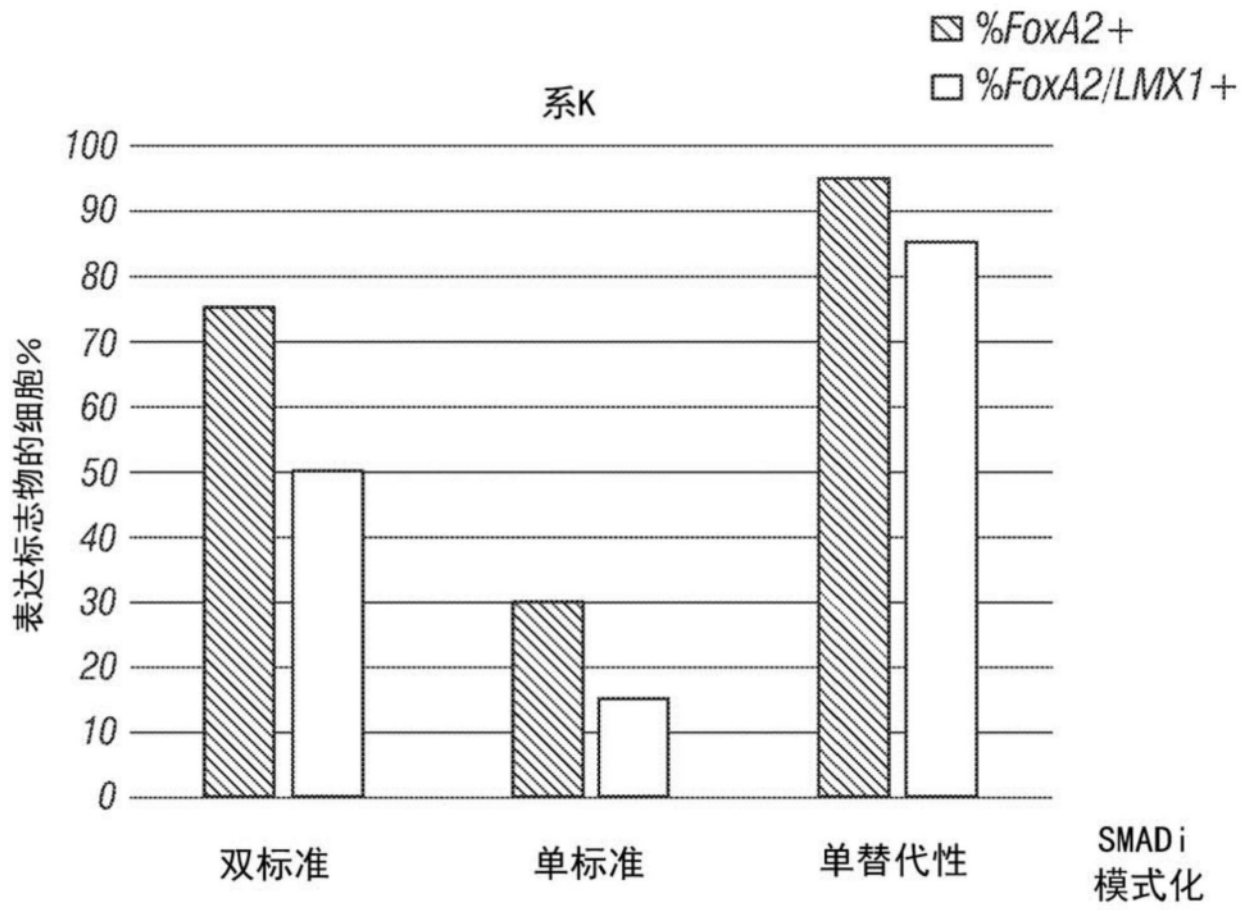

%FoxA2+
%FoxA2/LMX1+
系K
表达标志物的细胞%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
双标准
单标准
单替代性
SMADi
模式化

图1(续)

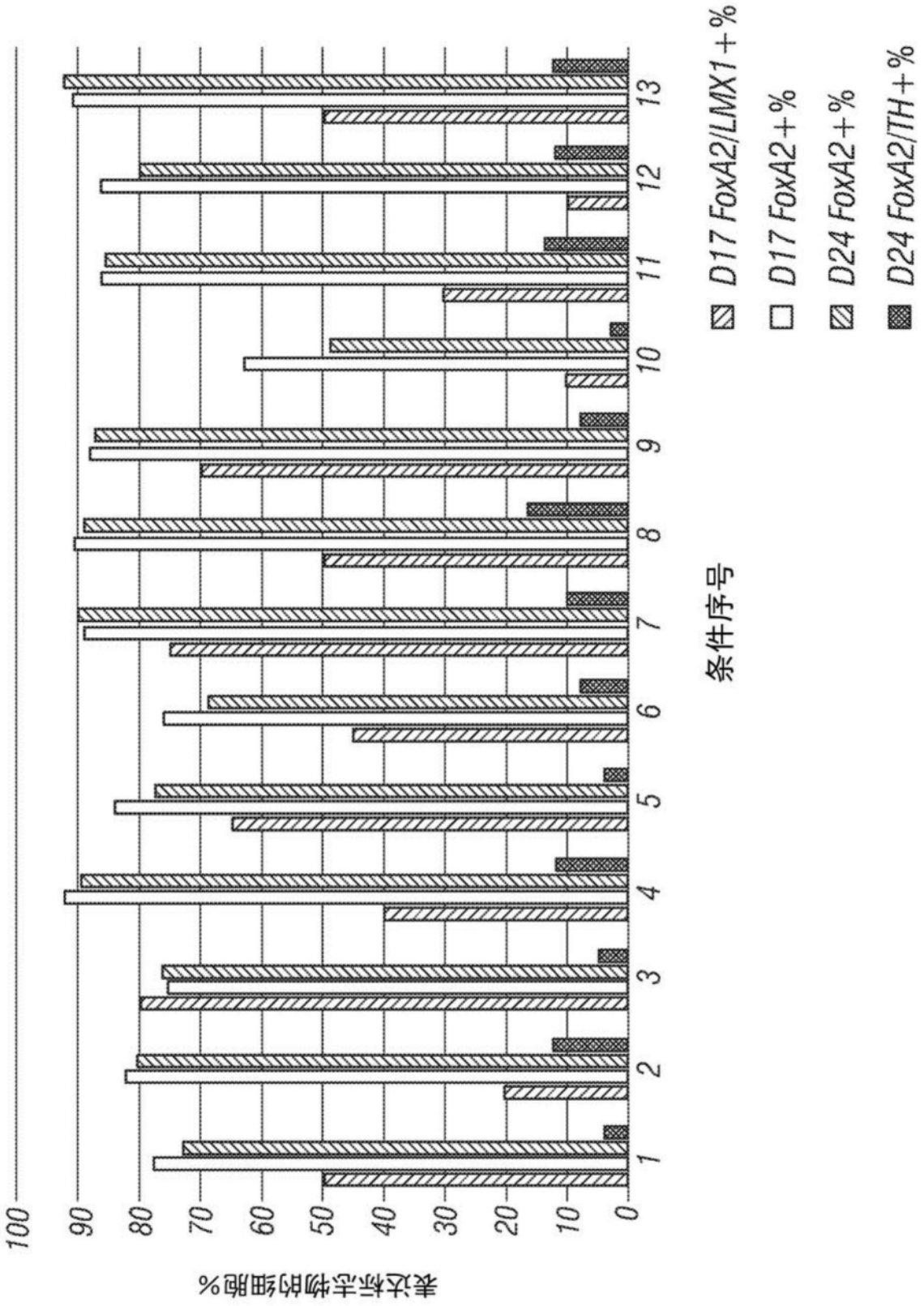

表达标志物的细胞%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
条件序号
D17 FoxA2/LMX1+%
D17 FoxA2+%
D24 FoxA2+%
D24 FoxA2/TH+%

图2

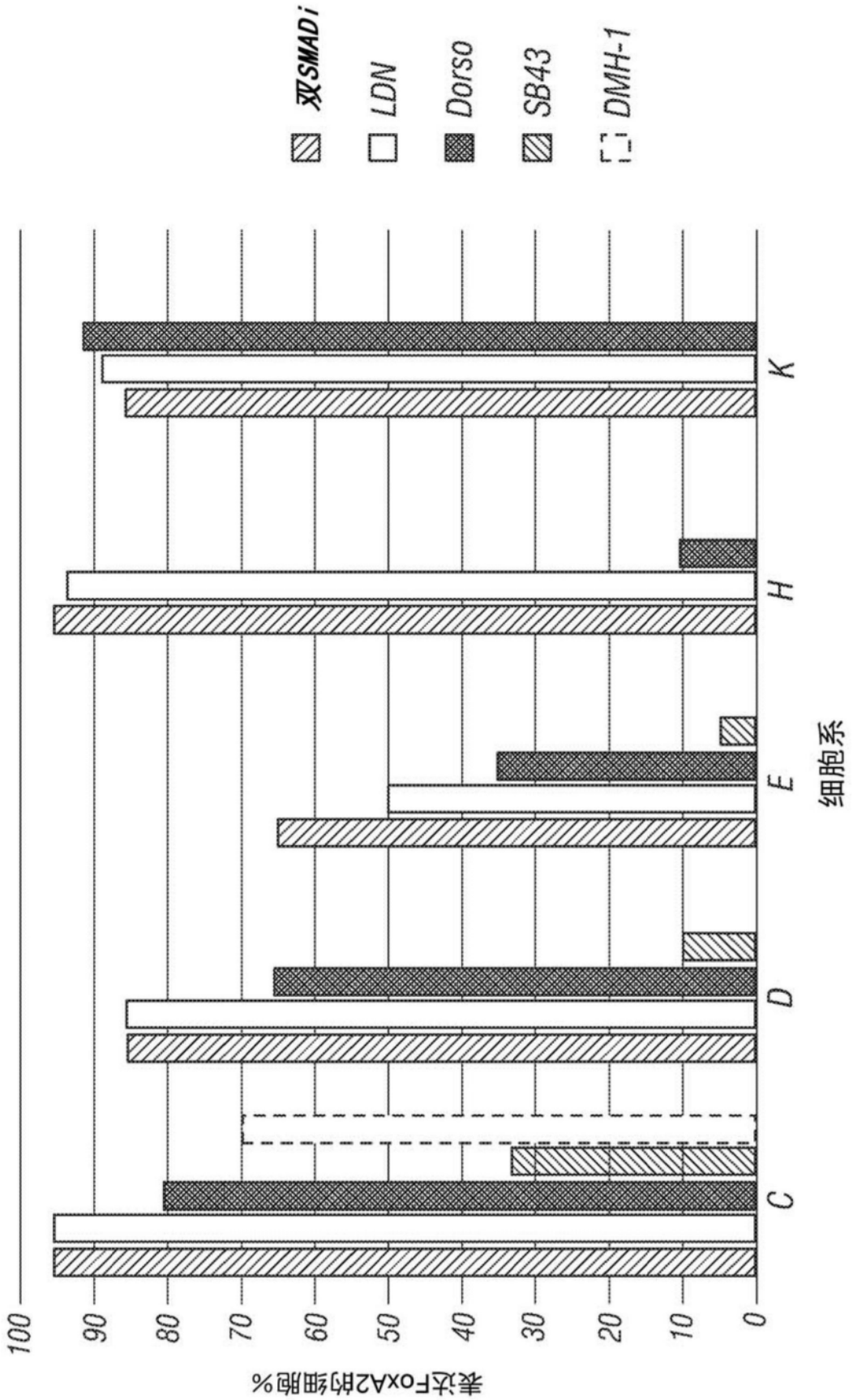

双SMADi
LDN
Dorso
SB43
DMH-1
表达FoxA2的细胞%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
C
D
E
H
K
细胞系

图3

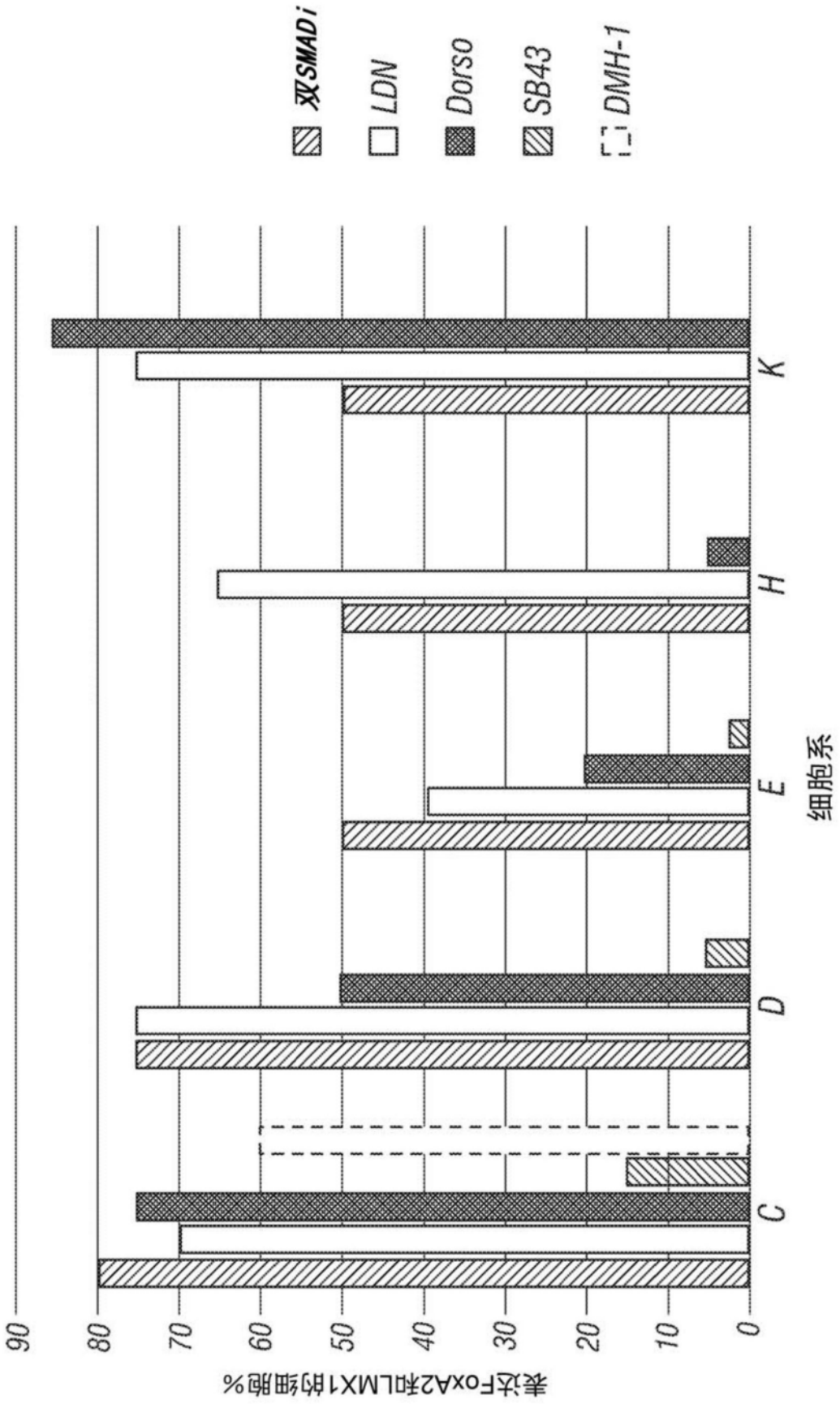

双SMADi
LDN
Dorso
SB43
DMH-1
表达FoxA2和LMX1的细胞%
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
C
D
E
H
K
细胞系

图3(续)

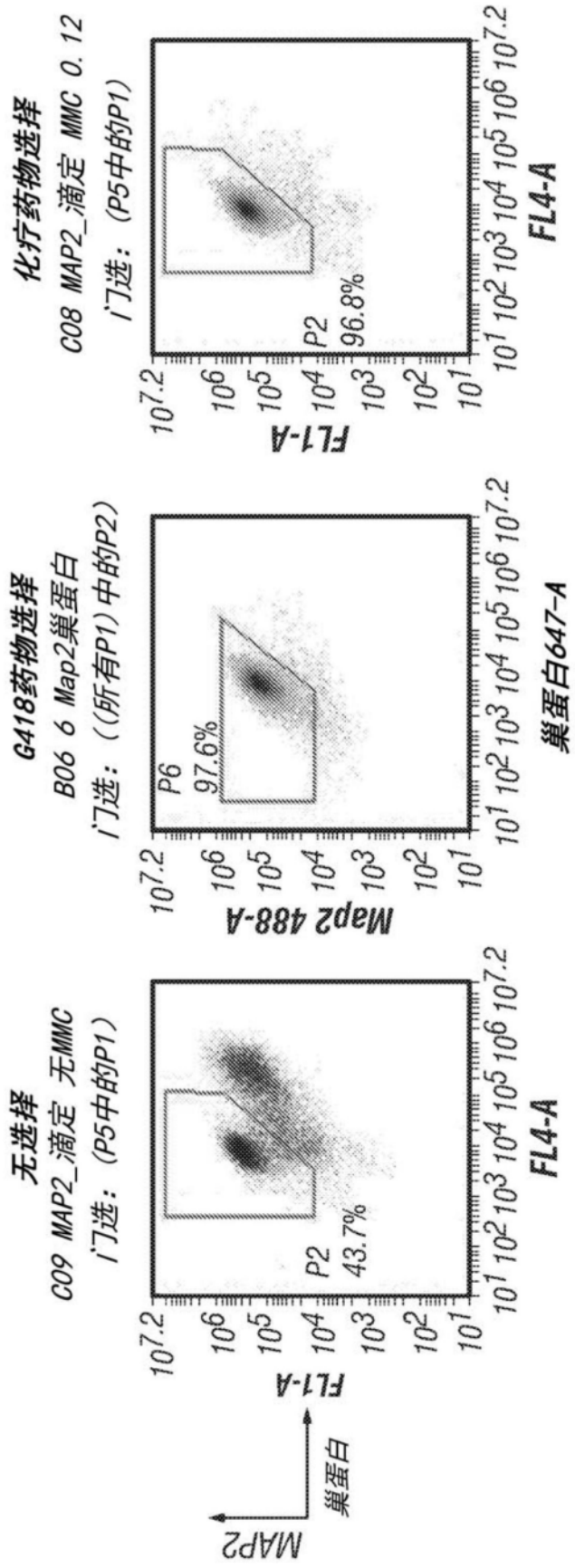

无选择
C09 MAP2_滴定 无MMC
门选：(P5中的P1)
P2
43.7%
FL1-A
FL4-A
G418药物选择
B06 6 Map2巢蛋白
门选：((所有P1)中的P2)
P6
97.6%
Map2 488-A
巢蛋白647-A
化疗药物选择
C08 MAP2_滴定 MMC 0.12
门选：(P5中的P1)
P2
96.8%
FL1-A
FL4-A
MAP2
巢蛋白

图4A

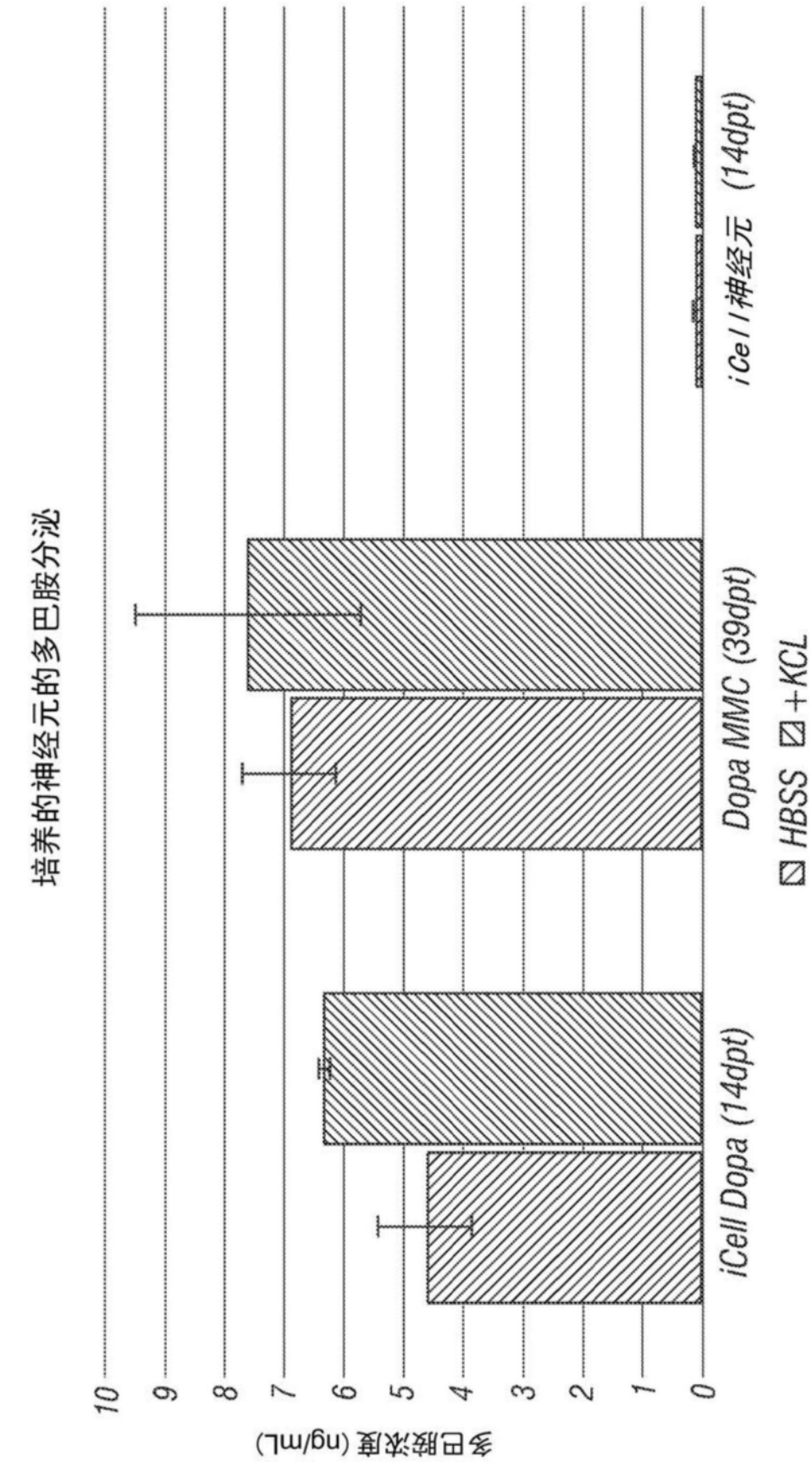

培养的神经元的多巴胺分泌
多巴胺浓度 (ng/mL)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
iCell Dopa (14dpt)
Dopa MMC (39dpt)
iCell神经元 (14dpt)
HBSS +KCL

图4B

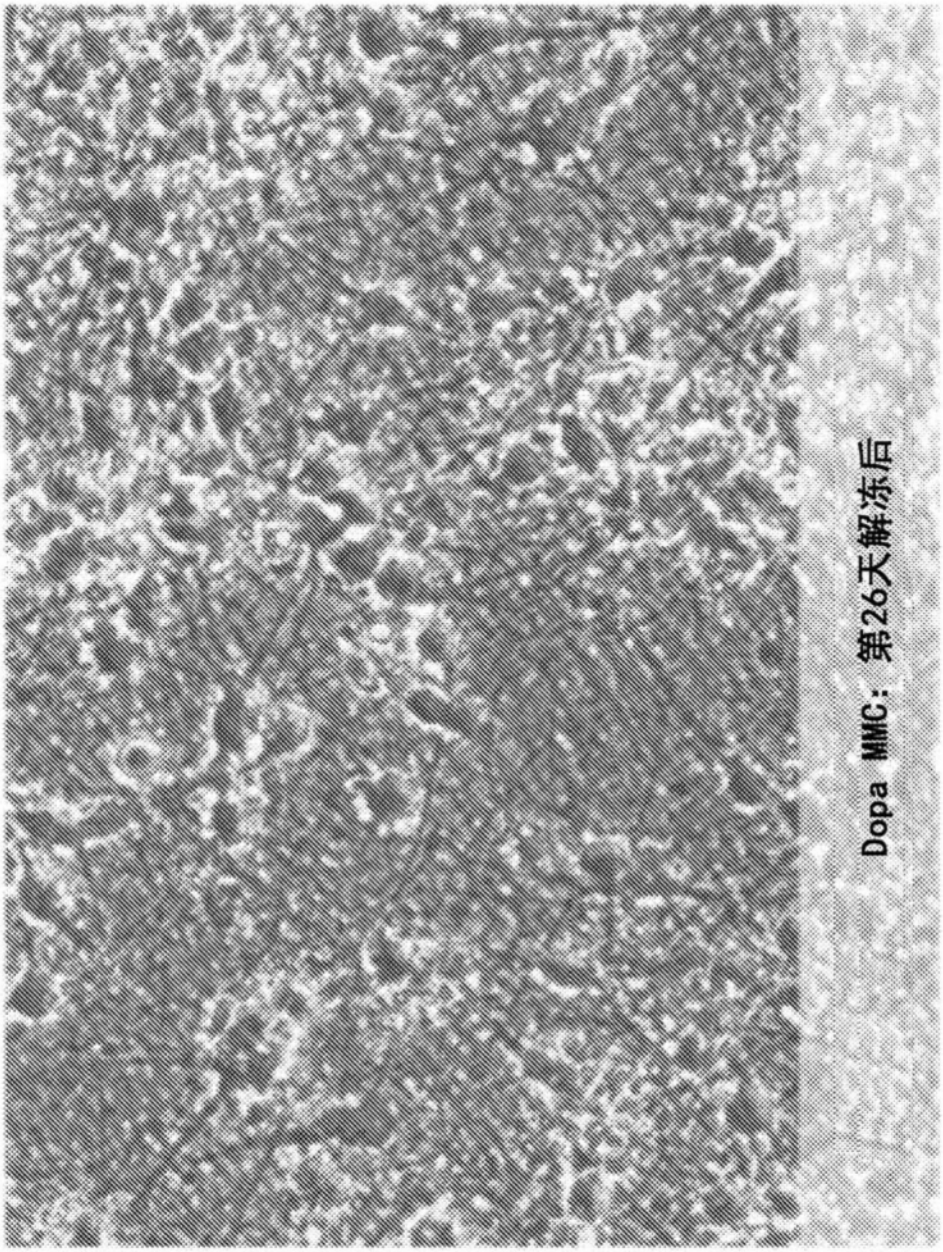


图4C

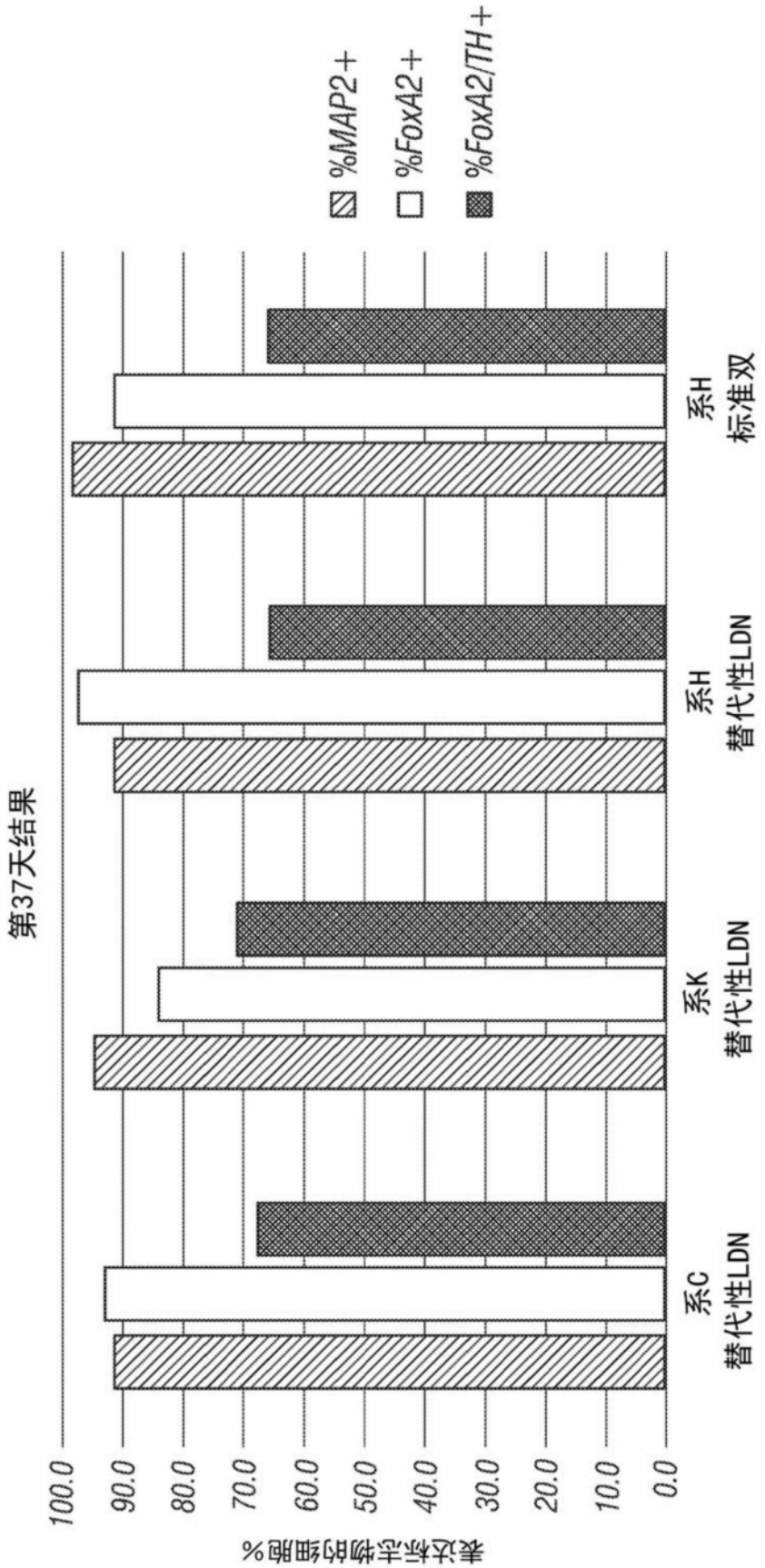
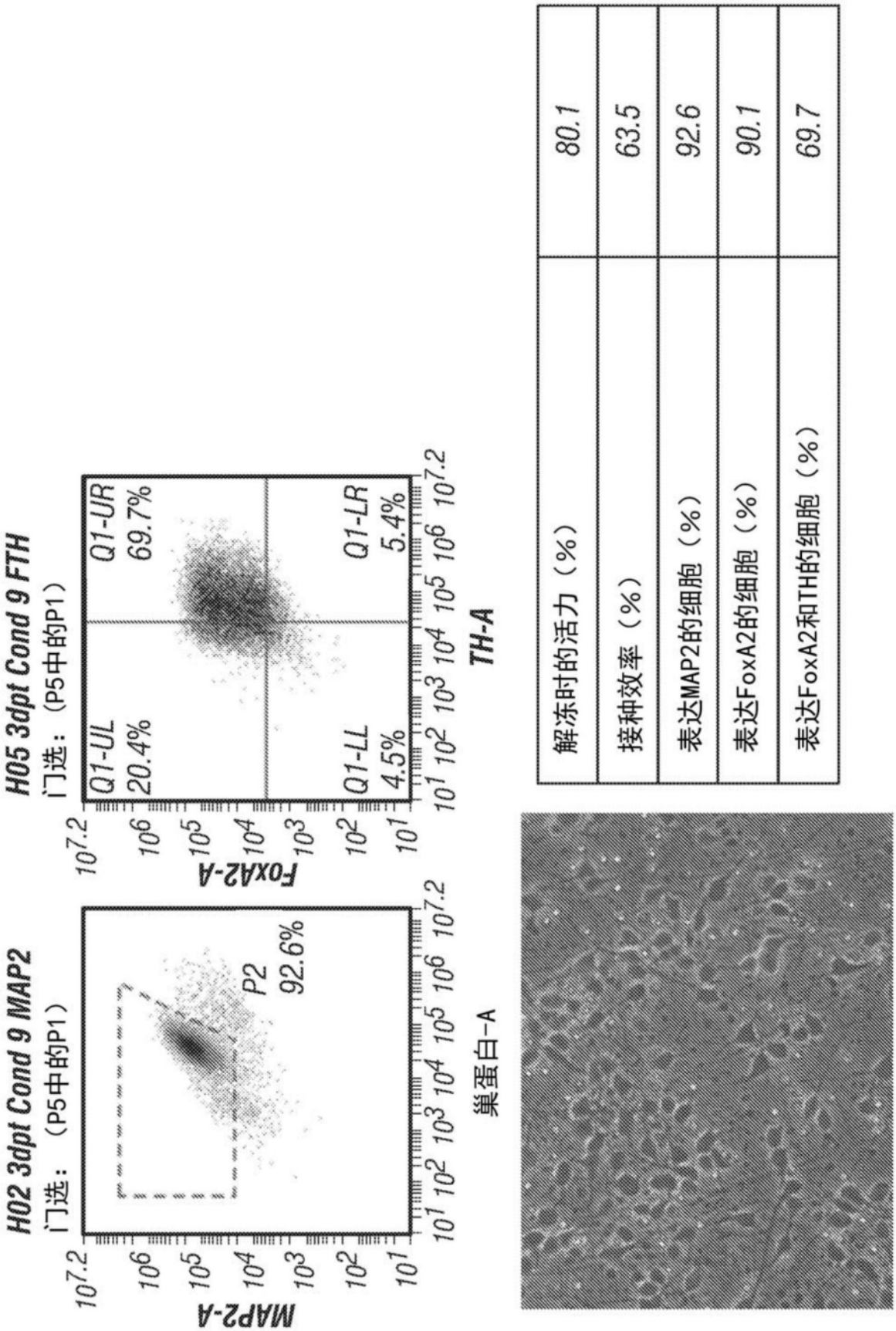

%MAP2+
%FoxA2+
%FoxA2/TH+
第37天结果
表达标志物的细胞%
100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
系C
替代性LDN
系K
替代性LDN
系H
替代性LDN
系H
标准双

图5



解冻时的活力（%）	80.1
接种效率（%）	63.5
表达MAP2的细胞（%）	92.6
表达FoxA2的细胞（%）	90.1
表达FoxA2和TH的细胞（%）	69.7

图6

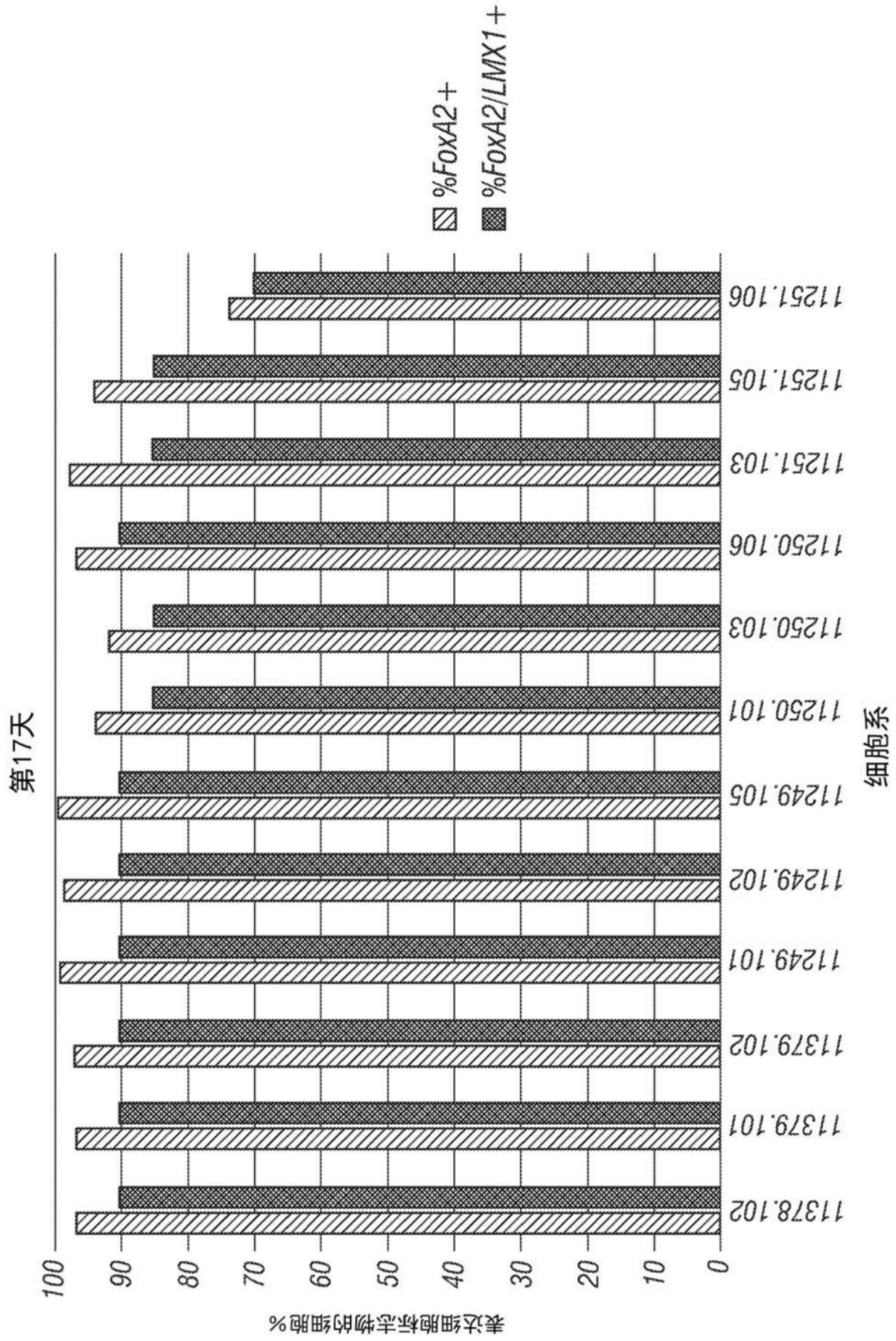

%FoxA2+
%FoxA2/LMX1+
第17天
细胞系
11378.102
11379.101
11379.102
11249.101
11249.102
11249.105
11250.101
11250.103
11250.106
11251.103
11251.105
11251.106
表达细胞标志物的细胞%
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100

图7A

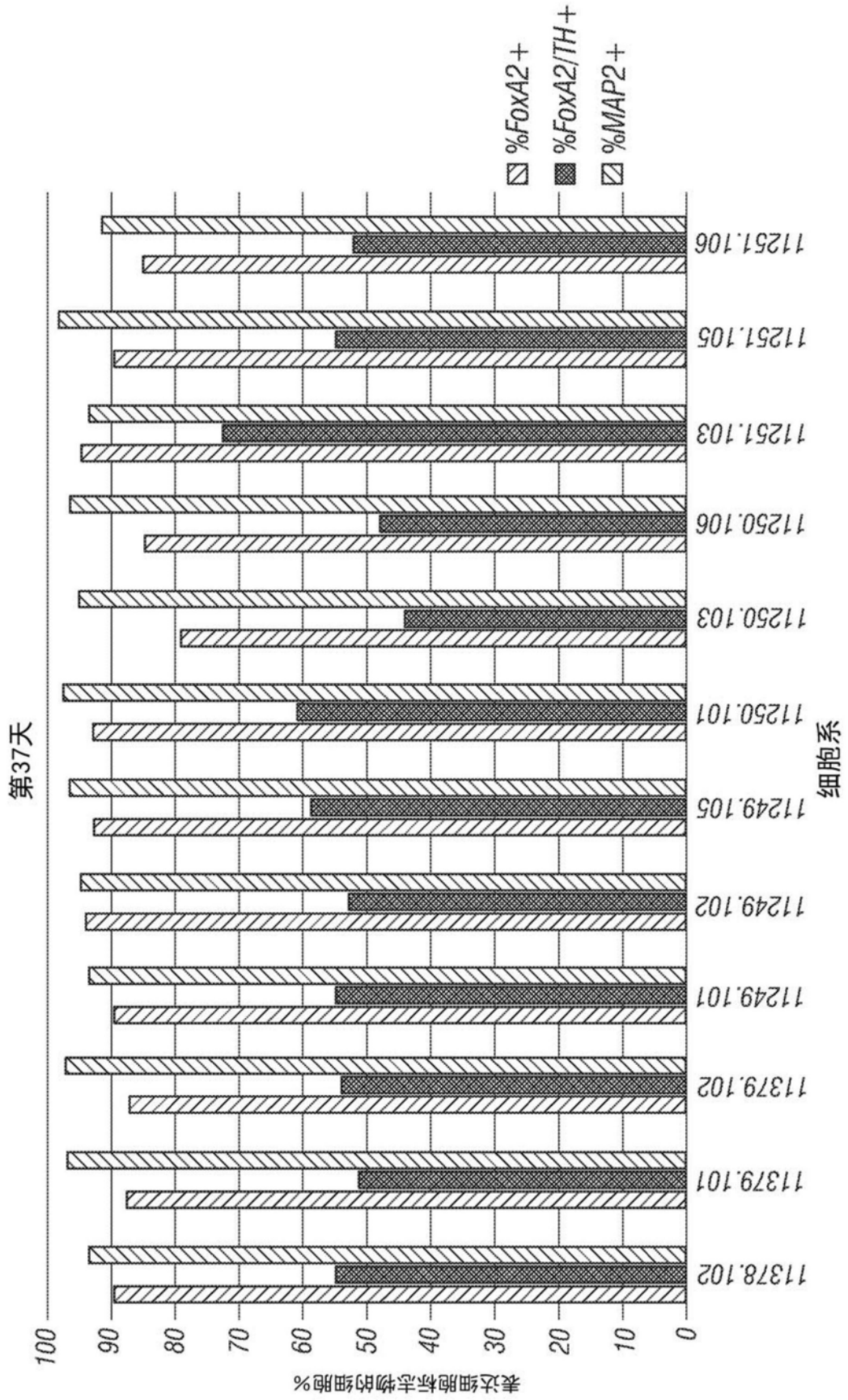

%FoxA2+
%FoxA2/TH+
%MAP2+
第37天
细胞系
11251.106
11251.105
11251.103
11250.106
11250.103
11250.101
11249.105
11249.102
11249.101
11379.102
11379.101
11378.102
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
表达细胞标志物的细胞%

图7B

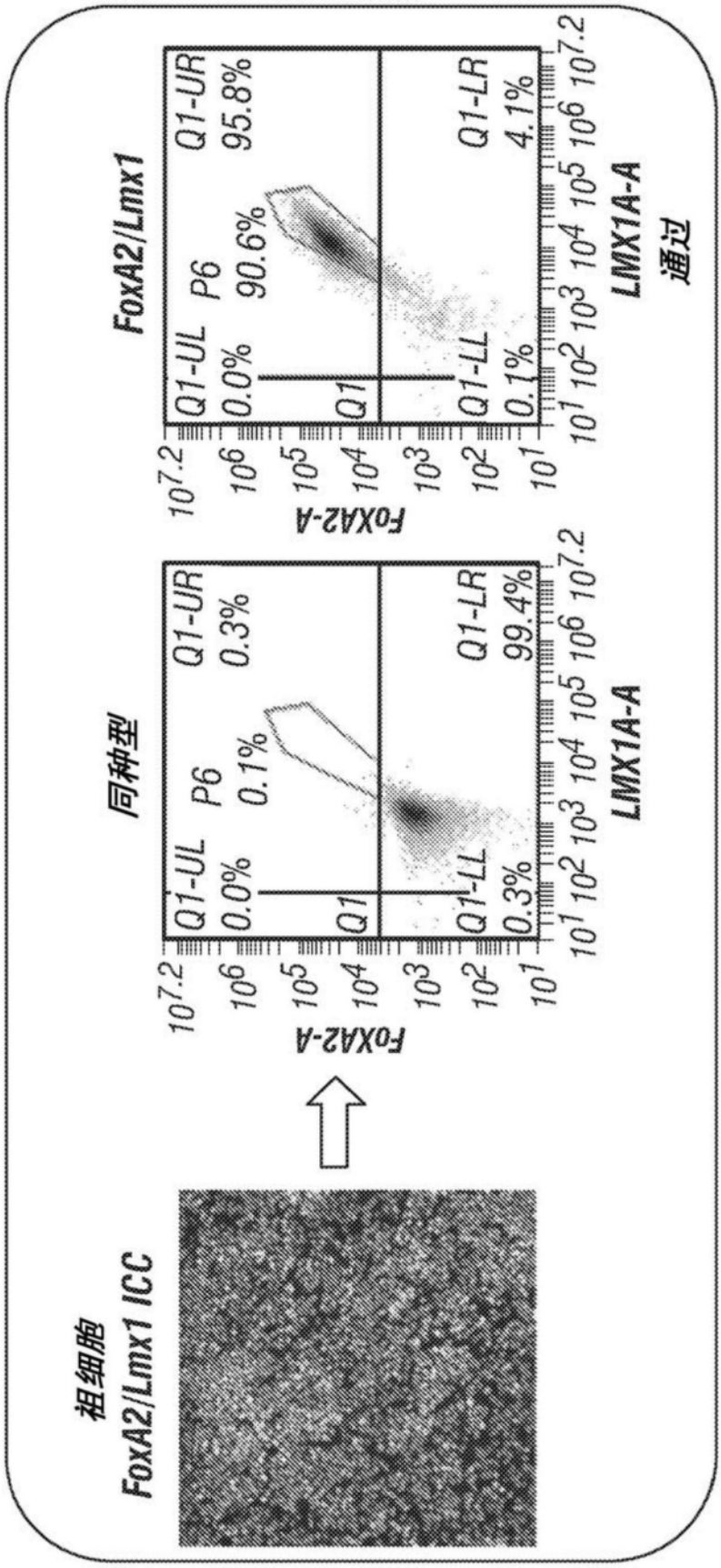

祖细胞
FoxA2/Lmx1 ICC
同种型
FoxA2/Lmx1
通过
FoXA2-A
LMX1A-A
Q1-UL
Q1-UR
Q1-LL
Q1-LR
P6
Q1
0.0%
0.3%
0.1%
99.4%
0.0%
95.8%
90.6%
0.1%
4.1%

图8

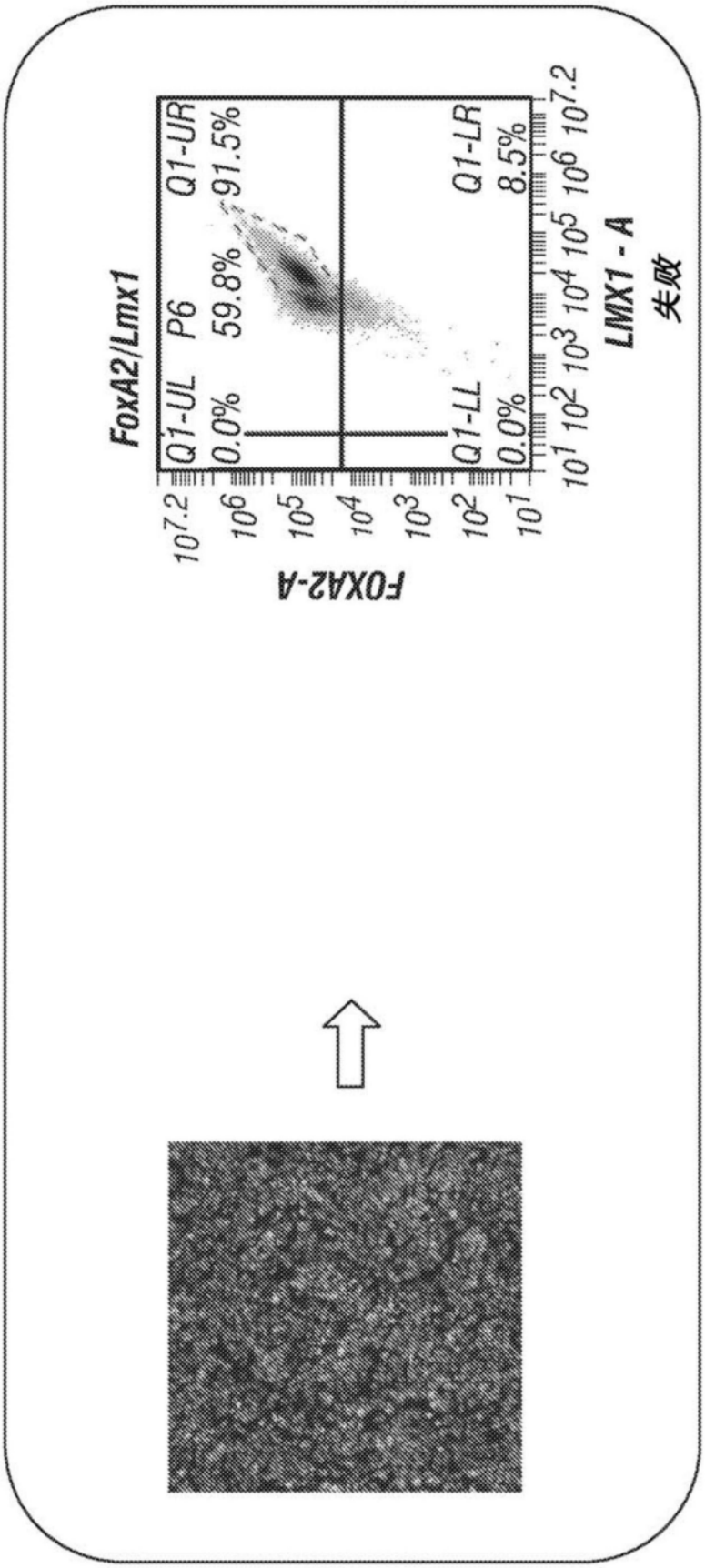

FoxA2/Lmx1
Q1-UL
0.0%
P6
59.8%
Q1-UR
91.5%
Q1-LL
0.0%
Q1-LR
8.5%
FOXA2-A
LMX1 - A
失败

图8(续)

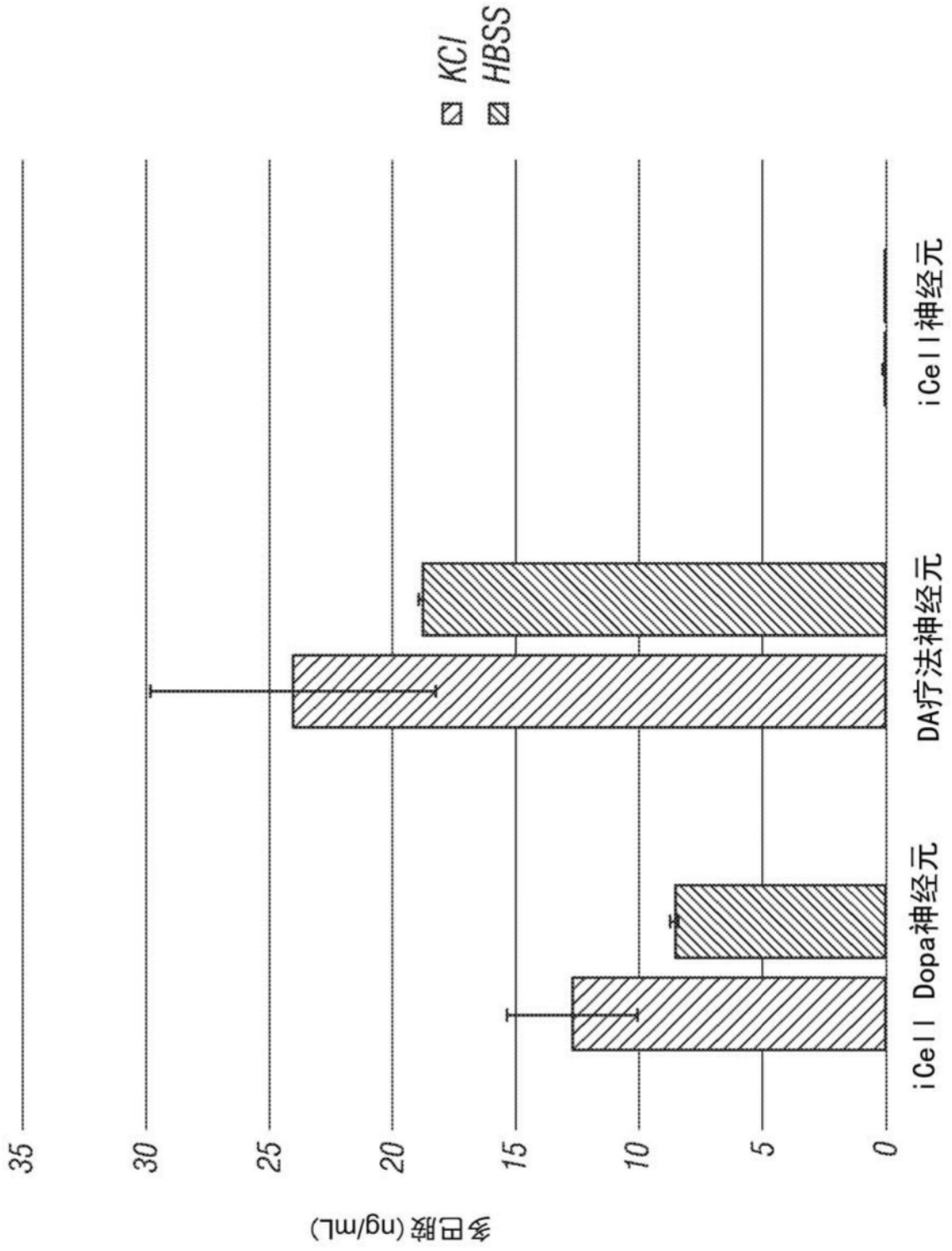

KCl
HBSS
多巴胺 (ng/mL)
35
30
25
20
15
10
5
0
iCell Dopa神经元
DA疗法神经元
iCell神经元

图9

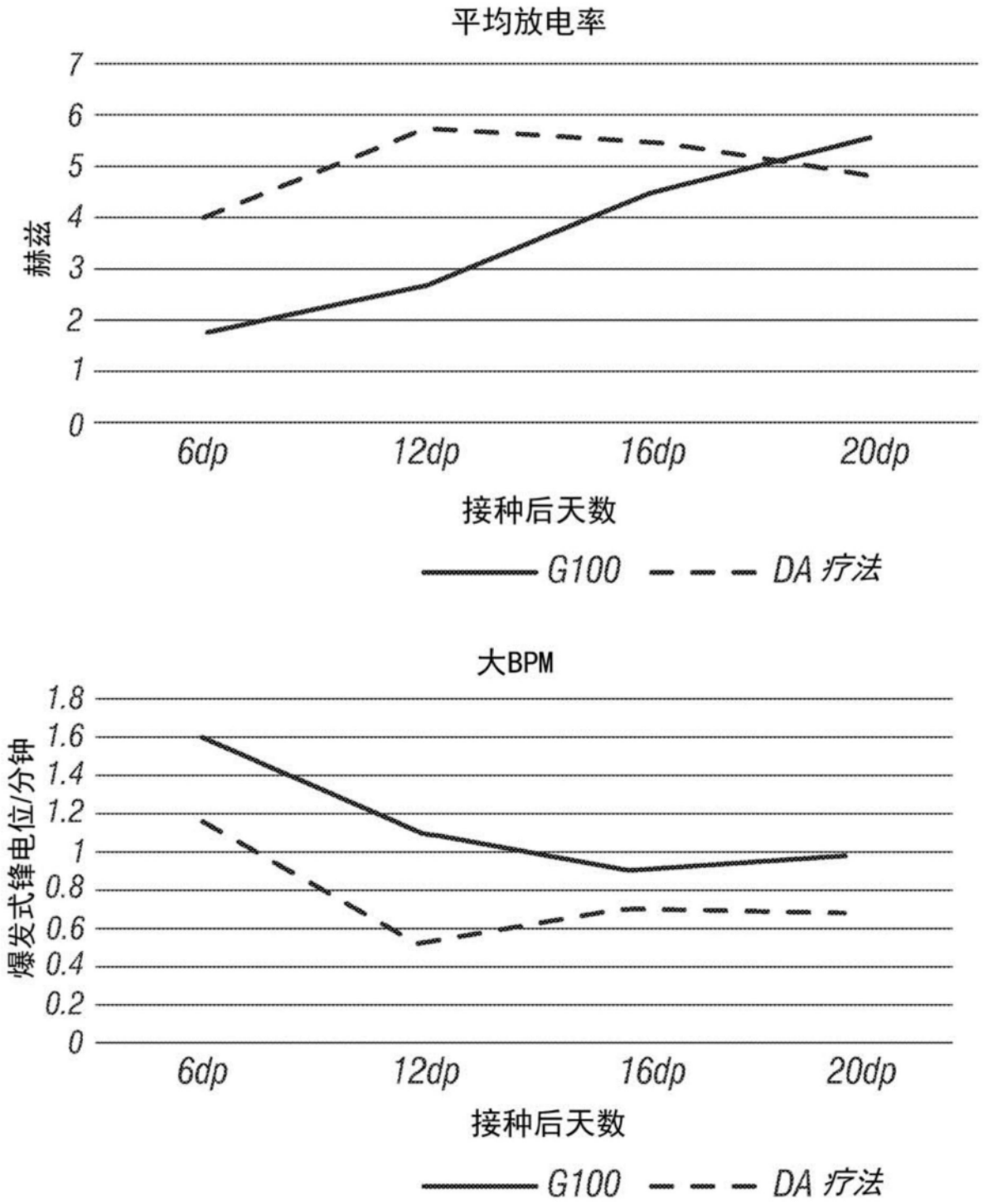

平均放电率
赫兹
7
6
5
4
3
2
1
0
6dp
12dp
16dp
20dp
接种后天数
G100
DA 疗法
大BPM
爆发式锋电位/分钟
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
6dp
12dp
16dp
20dp
接种后天数
G100
DA 疗法

图10

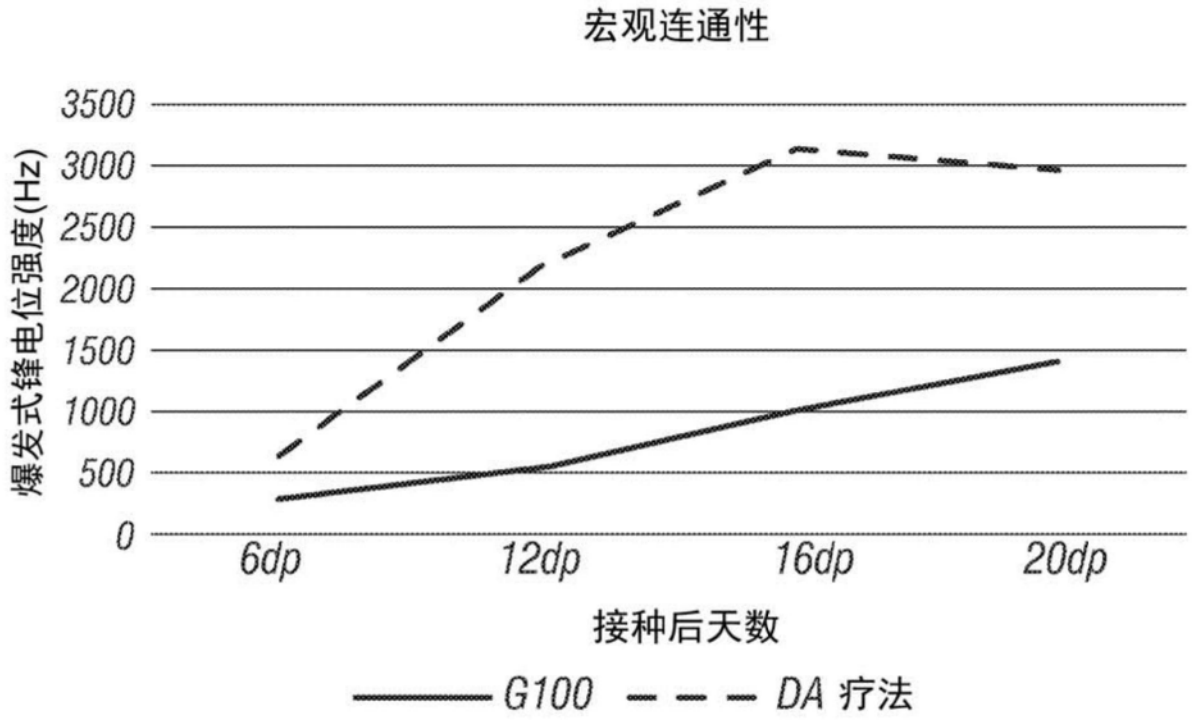

宏观连通性
爆发式锋电位强度(Hz)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
6dp
12dp
16dp
20dp
接种后天数
G100
DA 疗法

图10(续)

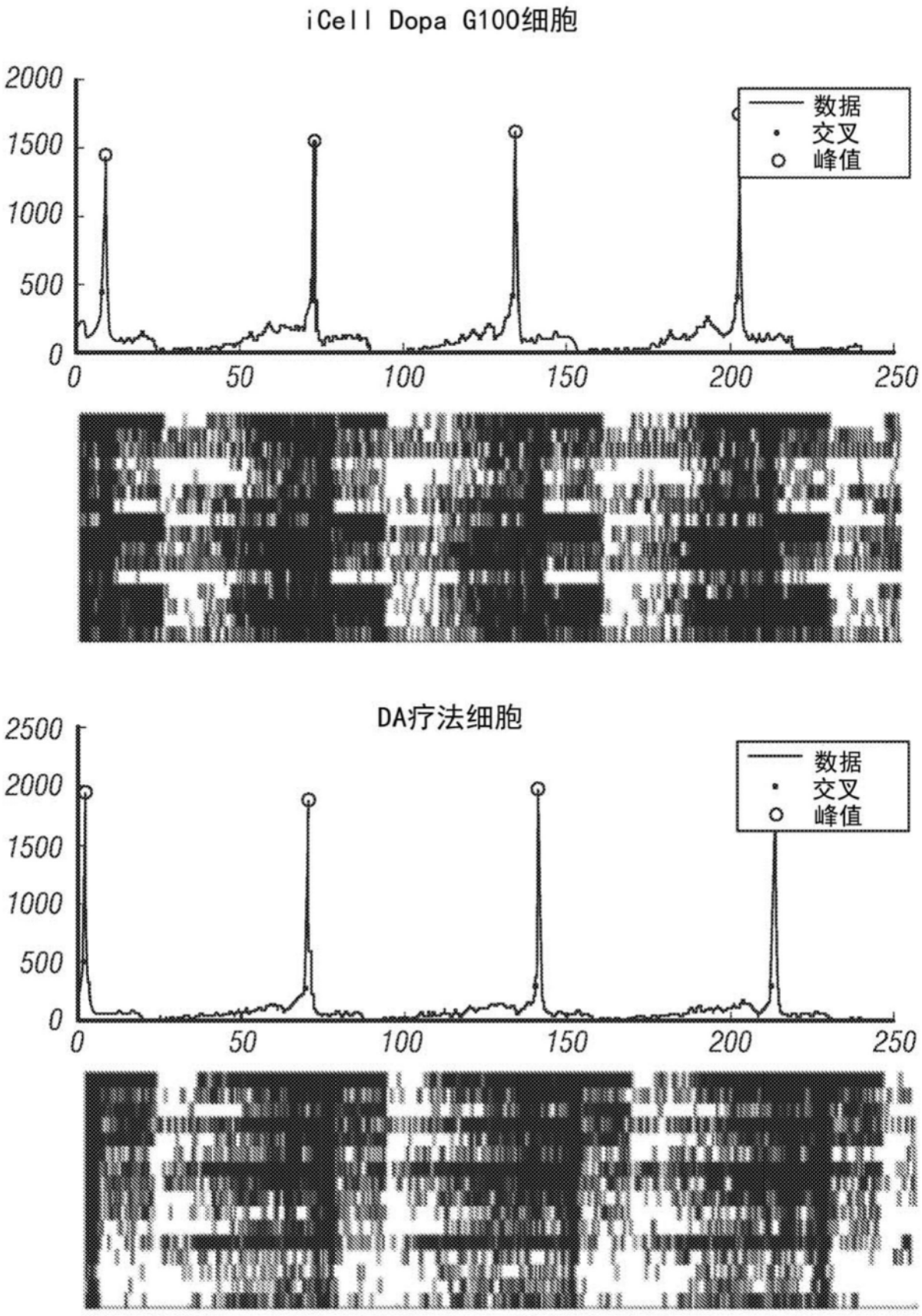

iCell Dopa G100细胞
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
150
200
250
数据
交叉
峰值
DA疗法细胞
2500
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
150
200
250
数据
交叉
峰值

图10(续)

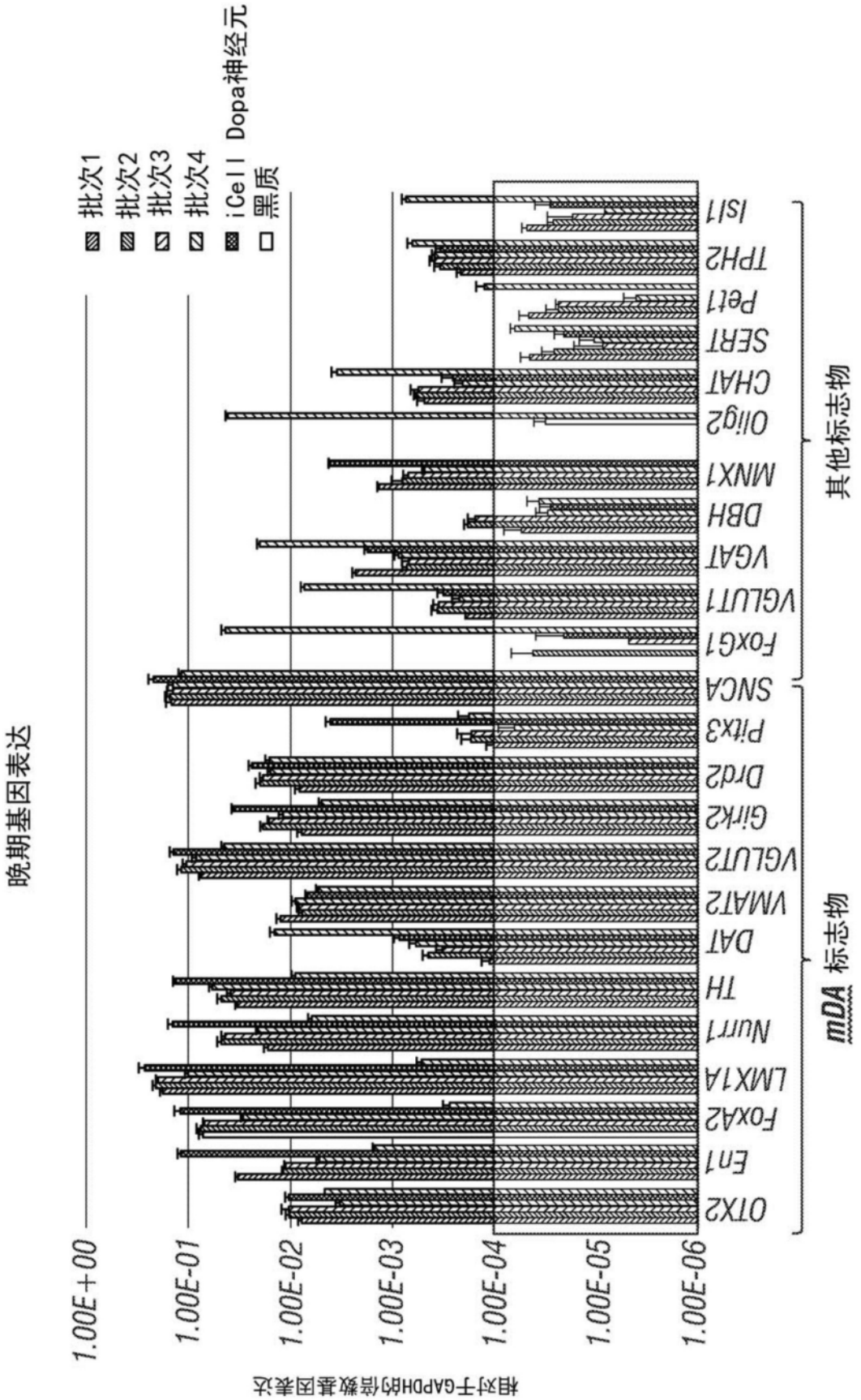

批次1
批次2
批次3
批次4
iCell Dopa神经元
黑质
晚期基因表达
1.00E+00
1.00E-01
1.00E-02
1.00E-03
1.00E-04
1.00E-05
1.00E-06
相对于GAPDH的倍数基因表达
OTX2
En1
FoxA2
LMX1A
Nurr1
TH
DAT
VMAT2
VGLUT2
Girk2
Drd2
Pitx3
SNCA
FoxG1
VGLUT1
VGAT
DBH
MNX1
Olig2
CHAT
SERT
Pet1
TPH2
Isl1
mDA 标志物
其他标志物

图11

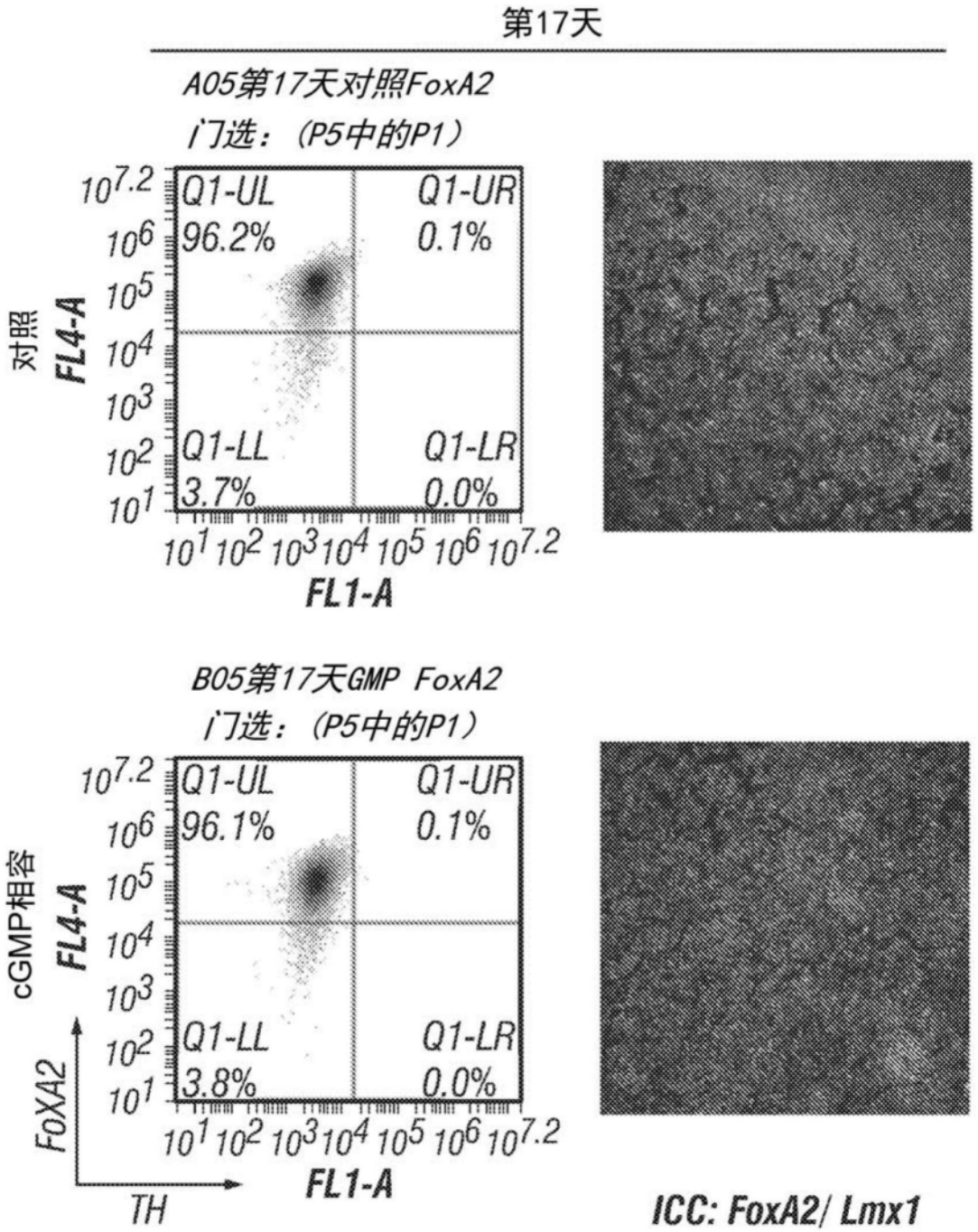

第17天
A05第17天对照FoxA2
门选：（P5中的P1）
对照
FL4-A
Q1-UL
96.2%
Q1-UR
0.1%
Q1-LL
3.7%
Q1-LR
0.0%
FL1-A
B05第17天GMP FoxA2
门选：（P5中的P1）
cGMP相容
FL4-A
Q1-UL
96.1%
Q1-UR
0.1%
Q1-LL
3.8%
Q1-LR
0.0%
FoXA2
TH
FL1-A
ICC: FoxA2/ Lmx1

图12

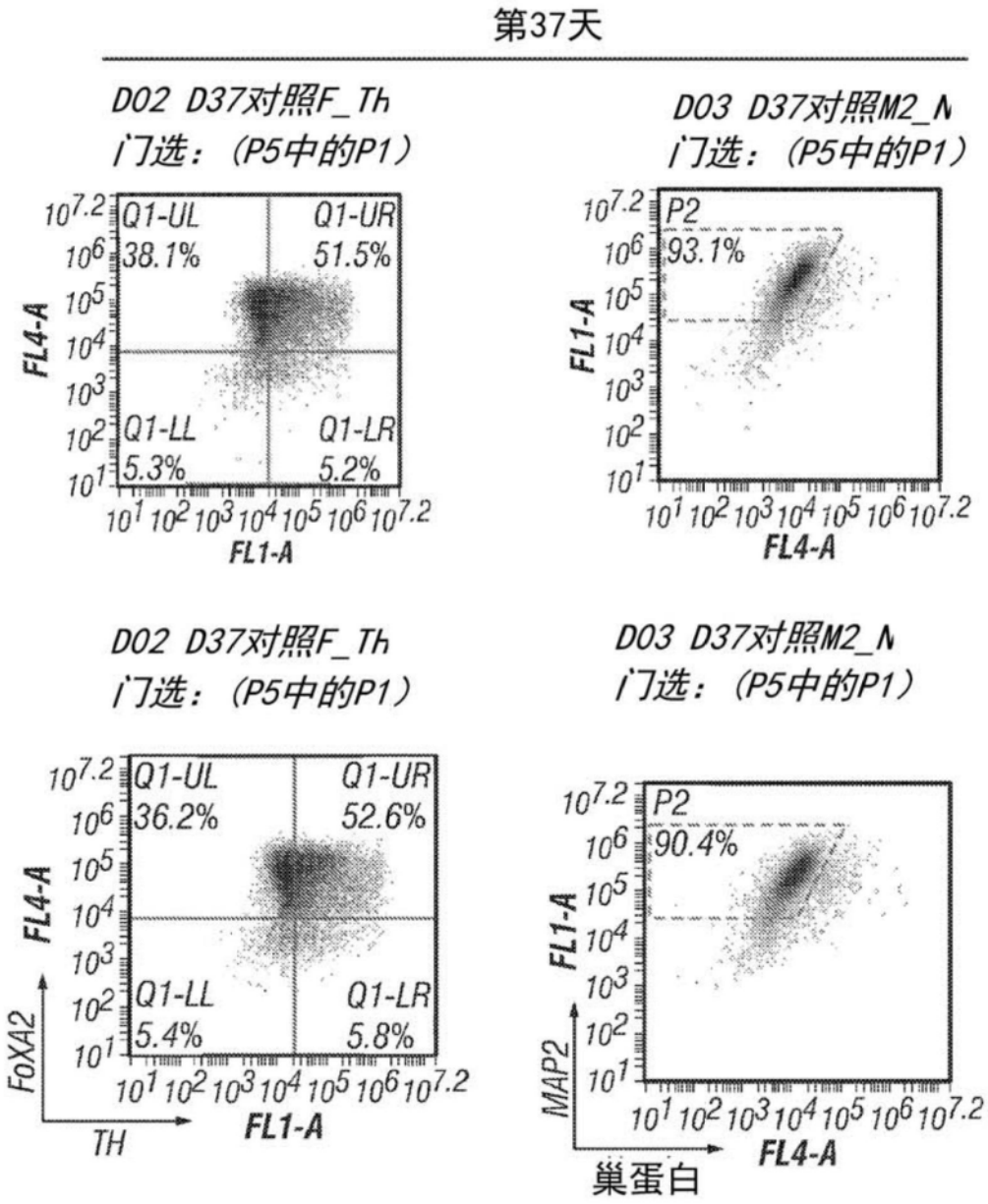

第37天
D02 D37对照F_Th
门选：(P5中的P1)
Q1-UL
38.1%
Q1-UR
51.5%
Q1-LL
5.3%
Q1-LR
5.2%
FL4-A
FL1-A
D03 D37对照M2_N
门选：(P5中的P1)
P2
93.1%
FL1-A
FL4-A
D02 D37对照F_Th
门选：(P5中的P1)
Q1-UL
36.2%
Q1-UR
52.6%
Q1-LL
5.4%
Q1-LR
5.8%
FL4-A
FL1-A
FOXA2
TH
D03 D37对照M2_N
门选：(P5中的P1)
P2
90.4%
FL1-A
FL4-A
MAP2
巢蛋白

图12(续)

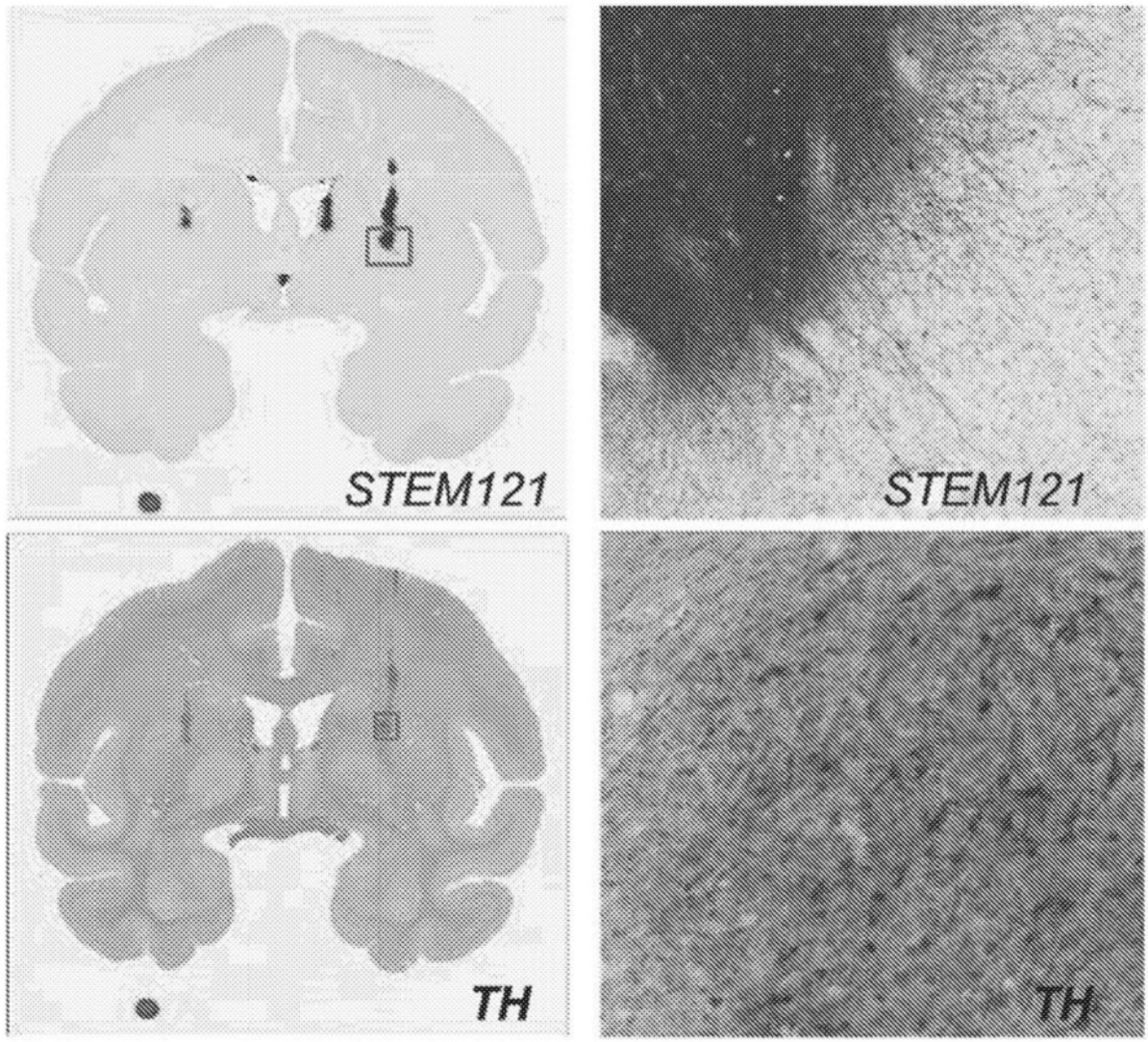


图13

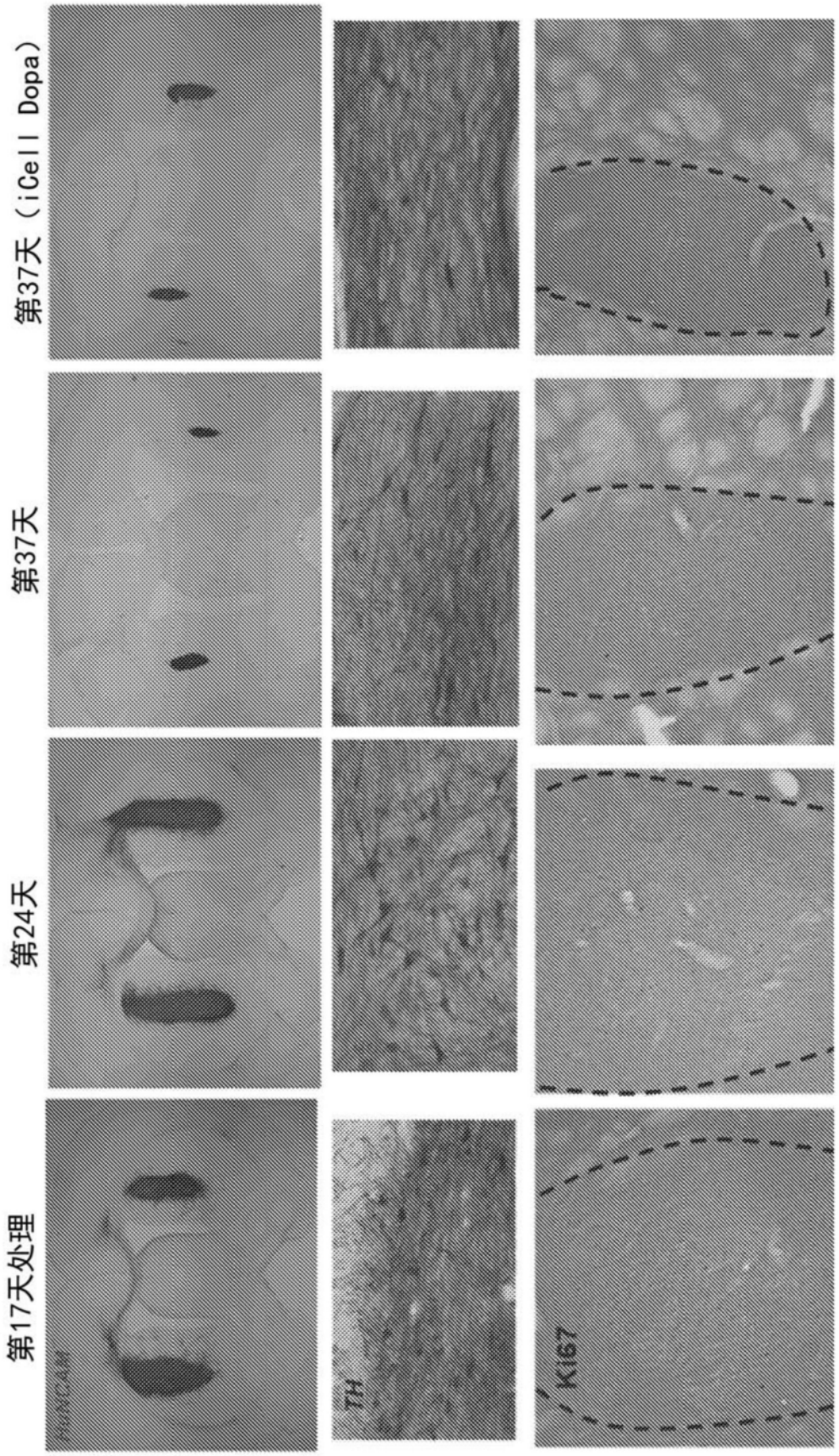


图14

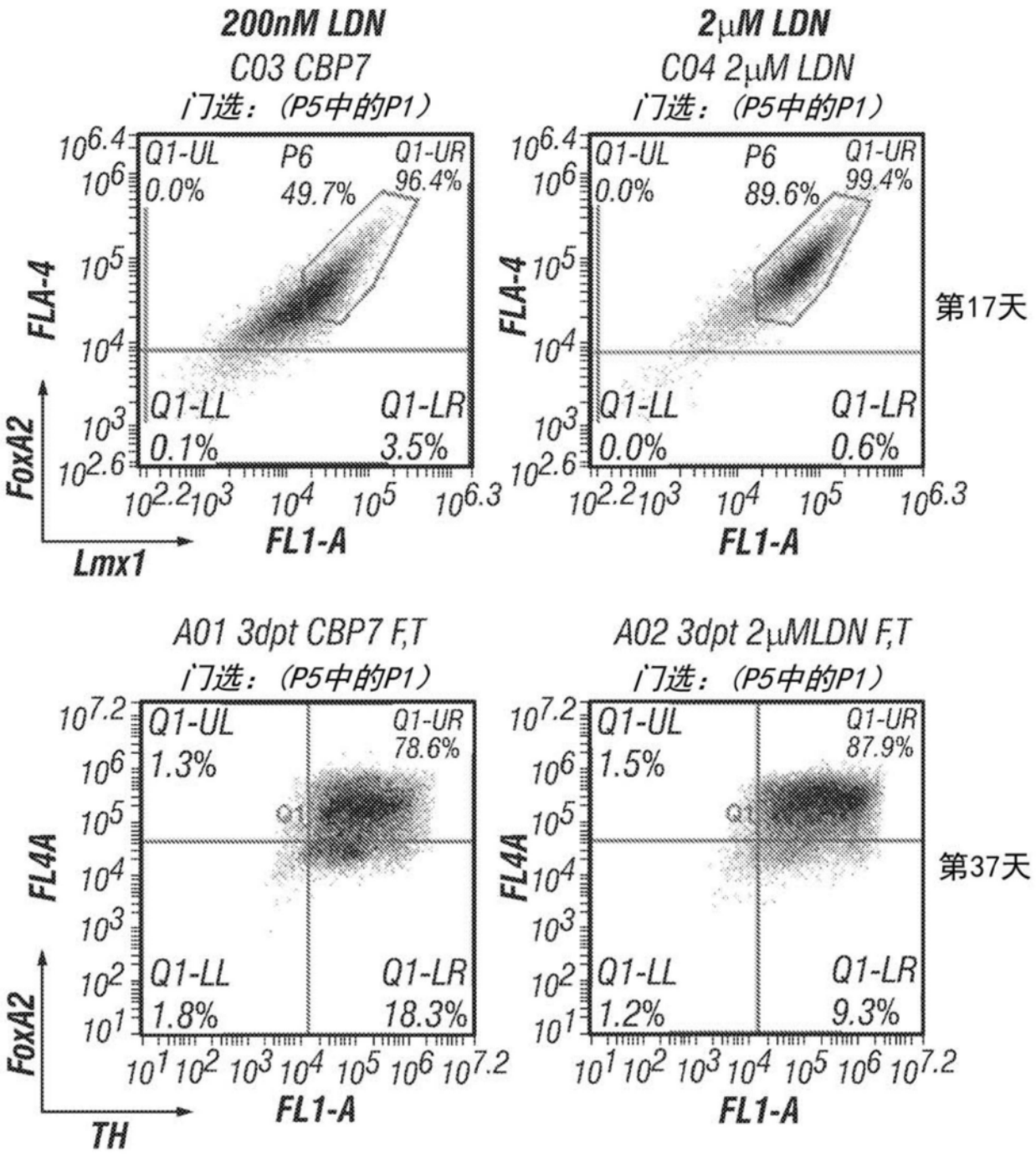

200nM LDN
C03 CBP7
门选：（P5中的P1）
Q1-UL
0.0%
P6
49.7%
Q1-UR
96.4%
Q1-LL
0.1%
Q1-LR
3.5%
FLA-4
FL1-A
2μM LDN
C04 2μM LDN
门选：（P5中的P1）
Q1-UL
0.0%
P6
89.6%
Q1-UR
99.4%
Q1-LL
0.0%
Q1-LR
0.6%
FLA-4
FL1-A
第17天
A01 3dpt CBP7 F,T
门选：（P5中的P1）
Q1-UL
1.3%
Q1-UR
78.6%
Q1-LL
1.8%
Q1-LR
18.3%
FL4A
FoxA2
Lmx1
TH
FL1-A
A02 3dpt 2μMLDN F,T
门选：（P5中的P1）
Q1-UL
1.5%
Q1-UR
87.9%
Q1-LL
1.2%
Q1-LR
9.3%
FL4A
FL1-A
第37天

图15