



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1894401 B

(45) 授权公告日 2012.05.23

(21) 申请号 200480012748.8

C12N 5/00(2006.01)

(22) 申请日 2004.03.11

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

269/MUM/2003 2003.03.12 IN

60/520,048 2003.11.14 US

W0 03000868 A1, 说明书第 11 页第 18 行至第 12 页 22 行.

US 6277820 B1, 2001.08.21, 说明书第 3 栏第 58 行至第 4 栏 51 行.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2005.11.11

Alexandra Rolletschek et al..

Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons

is enhanced by survival-promoting

factors. Mechanisms of

Development 105, 2001, 10594-95.

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/IB2004/001246 2004.03.11

(87) PCT 申请的公布数据

W02004/081172 EN 2004.09.23

审查员 刘红霞

(73) 专利权人 睿良思生命科学私人有限公司

地址 印度孟买

(72) 发明人 S·M·托泰伊 G·拉温德兰

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C12N 5/08(2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 27 页 附图 13 页

(54) 发明名称

从人胚胎干细胞衍生终末分化的多巴胺能神经元

(57) 摘要

本发明公开涉及一种从多能干细胞,例如人胚胎干细胞有效制备神经祖细胞和分化的神经细胞例如多巴胺能神经元和 5-羟色胺能神经元的改进方法。使用所公开的方法分离了含有高比例酪氨酸羟化酶阳性细胞的细胞群,其中酪氨酸羟化酶是多巴胺能神经元的特异性标志物。本发明公开的神经祖细胞和终末分化细胞可进行大量生产,因此可用作神经性病症,例如帕金森氏病的细胞替换治疗的优良来源。

1. 一种从灵长类动物多能干细胞产生分化的神经细胞群的方法,包括下列步骤:
 - (a) 扩增灵长类动物多能干细胞的培养物;
 - (b) 培养该多能干细胞以选择巢蛋白阳性的神经祖细胞;
 - (c) 分选巢蛋白阳性的神经祖细胞以富集 NCAM 阳性细胞;
 - (d) 通过在包含 TGF- β 3 或白细胞介素 -1 β 或含有两者的分化培养基中培养细胞,使巢蛋白阳性、NCAM 阳性细胞分化以产生分化的神经细胞群,其中所述干细胞的获得没有违反社会公德。
2. 权利要求 1 的方法,其中采用激光消融技术获得多能干细胞。
3. 权利要求 1 的方法,其中多能干细胞是人胚胎干细胞。
4. 权利要求 3 的方法,其中采用激光消融技术获得人胚胎干细胞。
5. 权利要求 1 的方法,其中分化的神经细胞群包含至少 60% 的多巴胺能神经元。
6. 权利要求 1 的方法,其中分化的神经细胞群包含至少 30% 的 5-羟色胺能神经元。
7. 权利要求 1 的方法,其中分化的神经细胞群包含至少 25% 的少突胶质细胞。
8. 权利要求 1 的方法,进一步包括培养步骤 (b) 中的多能干细胞以形成胚状体。
9. 权利要求 8 的方法,其中培养胚状体来选择巢蛋白阳性的神经祖细胞。
10. 权利要求 1 的方法,其中通过无血清培养基中培养多能干细胞来选择巢蛋白阳性的神经祖细胞。
11. 权利要求 10 的方法,其中无血清培养基是已知成分的无血清 ITSFn 培养基。
12. 权利要求 10 的方法,其中无血清培养基包含一种或多种选自胰岛素,亚硒酸钠,转铁蛋白和纤连蛋白的可溶性因子。
13. 权利要求 12 的方法,其中无血清培养基包含胰岛素,亚硒酸钠,转铁蛋白和纤连蛋白。
14. 权利要求 9 的方法,其中通过无血清培养基中培养胚状体来选择巢蛋白阳性的神经祖细胞。
15. 权利要求 14 的方法,其中无血清培养基是已知成分的无血清 ITSFn 培养基。
16. 权利要求 14 的方法,其中无血清培养基包含一种或多种选自胰岛素,亚硒酸钠,碱性成纤维细胞生长因子,转铁蛋白和纤连蛋白的可溶性因子。
17. 权利要求 16 的方法,其中无血清培养基包含胰岛素,亚硒酸钠,转铁蛋白和纤连蛋白。
18. 权利要求 17 的方法,其中神经祖细胞包含至少 95% 的巢蛋白阳性细胞。
19. 权利要求 1 的方法,其中通过磁性细胞分选术 (MACS) 分选步骤 (c) 中的巢蛋白阳性神经祖细胞以富集 NCAM 阳性细胞。
20. 权利要求 19 的方法,其中巢蛋白阳性神经祖细胞包含至少 50-60% 的 NCAM 阳性细胞。
21. 权利要求 1 的方法,进一步包括在扩增培养基中扩增步骤 (c) 中的巢蛋白阳性、NCAM 阳性神经祖细胞。
22. 权利要求 21 的方法,其中扩增培养基包含一种或多种选自胰岛素,亚硒酸钠,转铁蛋白,层粘连蛋白,腐胺,黄体酮,碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF),表皮生长因子 (EGF), Sonic hedgehog (SHH), 成纤维细胞生长因子 -8 (FGF-8) 和脑衍生神经营养因子 (BDNF) 的

可溶性因子。

23. 权利要求 22 的方法,其中细胞在扩增培养基中生长 6-10 天。

24. 权利要求 22 的方法,其中培养细胞并连续传代一个或多个群体倍增数。

25. 权利要求 22 的方法,其中细胞被冷冻保藏在液氮中。

26. 权利要求 1 的方法,其中分化培养基包含添加了胎牛血清, B27, 抗坏血酸和 N- 乙酰半胱氨酸的 Neurobasal 培养基。

27. 权利要求 1 的方法,其中分化培养基进一步包括一种或多种分化因子,所述分化因子选自抗坏血酸, N- 乙酰半胱氨酸, 胶质细胞系衍生神经营养因子 (GDNF), 双丁酰环 AMP (db-cAMP), 脑衍生神经营养因子 (BDNF), neurturin, Sonic hedgehog 蛋白 (SHH) 和成纤维细胞生长因子 -8 (FGF-8)。

28. 权利要求 1 的方法,其中在分化培养基中生长巢蛋白阳性、NCAM 阳性细胞 30-50 天。

29. 一种通过分化灵长类动物多能干细胞获得的体外培养物中的分化细胞群,其中至少 60% 的分化细胞是多巴胺能神经元,且其中所述干细胞的获得没有违反社会公德,且所述分化细胞群是通过权利要求 1-28 中任一项所述的方法获得的。

30. 权利要求 29 的细胞群,其中灵长类动物多能干细胞是人胚胎干细胞。

31. 一种通过分化灵长类动物多能干细胞获得的体外培养物中的分化细胞群,其中至少 60% 的分化细胞表达酪氨酸羟化酶,且其中所述干细胞的获得没有违反社会公德,且所述分化细胞群是通过权利要求 1-28 中任一项所述的方法获得的。

32. 权利要求 31 的细胞群,其中灵长类动物多能干细胞是人胚胎干细胞。

33. 一种从神经祖细胞产生多巴胺能神经元的方法,包括从神经祖细胞中富集巢蛋白阳性的细胞,并通过在 TGF- β 3 或白介素 -1 β 或两者、和 N- 乙酰半胱氨酸存在的情况下培养细胞使巢蛋白阳性细胞分化,产生多巴胺能神经元。

34. 权利要求 33 的方法,其中在 N- 乙酰半胱氨酸存在的情况下 40% 或更多的巢蛋白阳性细胞分化成多巴胺能神经元。

35. 权利要求 33 的方法,其中进一步包括从神经祖细胞中富集 NCAM 阳性细胞。

36. 权利要求 34 的方法,其中分化巢蛋白阳性、NCAM 阳性细胞以产生多巴胺能神经元。

37. 权利要求 36 的方法,其中至少 60% 的巢蛋白阳性、NCAM 阳性细胞分化成多巴胺能神经元。

38. 一种从神经祖细胞产生 5- 羟色胺能神经元的方法,包括从神经祖细胞中富集巢蛋白阳性和 NCAM 阳性的细胞,并通过在 TGF- β 3 或白介素 -1 β 或两者存在的情况下培养细胞使巢蛋白阳性、NCAM 阳性细胞分化,产生 5- 羟色胺能神经元。

39. 权利要求 38 的方法,其中至少 30% 巢蛋白阳性、NCAM 阳性细胞分化成 5- 羟色胺能神经元。

40. 神经细胞在制备用于治疗神经变性病症或神经元疾病患者的药物中的用途,其中所述神经细胞通过下列步骤获得:

(a) 扩增灵长类动物多能干细胞的培养物;

(b) 培养该多能干细胞以选择巢蛋白阳性的神经祖细胞;

(c) 分选巢蛋白阳性的神经祖细胞以富集 NCAM 阳性细胞;

(d) 通过在包含 TGF- β 3 或白介素 -1 β 或包含两者的分化培养基中培养细胞使巢蛋白阳性、NCAM 阳性细胞分化以产生分化的神经细胞群，

其中所述干细胞的获得没有违反社会公德。

41. 权利要求 40 的用途，其中灵长类动物多能干细胞是人胚胎干细胞。

42. 权利要求 40 的用途，其中所述获得进一步包括从分化的神经细胞群中分离多巴胺能神经元。

43. 权利要求 40 的用途，其中神经变性病症或神经元疾病选自帕金森氏病，阿尔茨海默氏病，亨廷顿舞蹈病，脊髓损伤，肌萎缩侧索硬化 (ALS)，癫痫，中风和局部缺血。

从人胚胎干细胞衍生终末分化的多巴胺能神经元

[0001] 相关申请的相互参照

[0002] 不适用。

[0003] 关于联邦政府赞助的研究或研发的声明

[0004] 不适用。

[0005] “缩微胶片附件”的引用

[0006] 不适用。

[0007] 发明背景

[0008] 1. 发明领域

[0009] 本发明公开涉及一种从多能胚胎干细胞,例如人胚胎干细胞制备终末分化的神经元细胞,例如多巴胺能和 5-羟色胺能神经元的改进方法。依照本发明产生的多巴胺能和 5-羟色胺能神经元可用作神经变性病症和神经元疾病的细胞替换疗法的优良来源。

[0010] 2. 相关文献的描述

[0011] 神经变性病症和神经元疾病,例如帕金森氏病,阿尔茨海默氏病和精神分裂症是在我们的社会中变得更加显著的破坏性疾病。这些神经病症中的多种情况与多巴胺能或 5-羟色胺能神经元相关。多巴胺能神经元位于中脑的腹面和腹外侧面,控制姿势反射,运动和奖赏相关的行为。这些神经元支配前脑的多个结构,它们的变性或功能异常与帕金森氏病,精神分裂症和药物成瘾 (Hynes et al., 1995, Cell 80 :95-101) 相关。5-羟色胺能神经元集中在后脑的腹面和腹外侧面,支配中枢神经系统的大部分,包括大脑皮层,边缘系统和脊髓。这些神经元控制意识,觉醒,行为特征和食物摄取的水平,它们的功能异常与攻击,抑郁和精神分裂症 (Jacobs and Gelperin, 1981, Serotonin Neurotransmission and Behavior. The MIT Press, Cambridge, Mass.) 相关。5-羟色胺能神经元功能异常也可能在各种精神疾病,神经疾病和其他疾病,例如精神抑郁 (Asberget al, 1986, J. Clin. Psychiatry 47 :23-35), 自杀 (Lester, 1995, Pharmacopsychiatry 28(2) :45-50) 和暴力攻击行为 (Brown et al., J. Clin. Psychiatry, 1990, 54 :31-41 ;Eichelman, 1990, Annu. Rev. Md. 41 :149-158) 的病理生理发生过程中起作用。

[0012] 帕金森氏病是一种由脑的运动控制区中的神经细胞(神经元)变性引起的进行性神经障碍。这种变性使被称为多巴胺的脑信号传递化学物质(神经递质)变得不足,导致出现这种疾病特征性的运动障碍。病理研究表明黑质区多巴胺能神经元的损失促成了帕金森氏病。例如,黑质纹状体路径的双侧损伤在实验动物中产生了一种与在帕金森氏病中观察到的运动功能障碍非常相似的综合征:静止性震颤,强直,运动不能和姿势异常。由 6-羟基多巴胺 (OHDA) 导致的黑质纹状体路径的双侧损伤在啮齿类动物中引起了严重的运动不能,不渴症,不能食和感觉忽视 (Ungerstedt, 1971, U. Acta Physiol. Scand. Suppl. 367 :95-121 ;Yirek and Sladek, 1990, Annu. Rev. Neurosci. 13 :415-440)。

[0013] 在帕金森氏综合征中,多巴胺能受体状态的变化可能依赖于疾病进展的阶段。帕金森氏综合征的标志是基底神经节所有部分中多巴胺的严重下降 (Hornykiewicz, 1988, Mt. Sinai J. Med. 55 :11-20)。当多巴胺耗尽时,脑中许多其他区域,例如丘脑,苍白球,底丘

脑核开始出现功能障碍。因为这些区域将信号传送到脑的其他部分,因此这些小区域的功能障碍可导致广泛的脑功能障碍。

[0014] 帕金森氏病的患病率变化很大,在日本为 82/100,000 人,在 UK 为 108/100,000 人,而在北美州则接近人口的 1% (大约 1 百万)。在印度,帕金森氏病的患病率在北印度为 14/100,000 人,南印度为 27/100,000 人,东印度为 06/100,000 人,西印度的印度拜火教徒社区为 363/100,000 人。尽管目前认为帕金森氏病是不可治愈的,但可用的多种药物,包括左旋多巴,溴隐亭,培高利特,司来吉兰,抗胆碱能药和金刚烷胺能缓解帕金森氏病的症状。虽然这些药物能够缓解帕金森氏病的症状,但它们经常会产生显著的副作用。而且,这些药物既不能够治愈这种疾病,也不能够减慢神经元的进行性损失,而只能够缓解症状,产生的有益效果也通常随时间逐渐减弱。一些患者对治疗的反应变弱,而其他患者则变得高度敏感并发展为运动障碍。

[0015] 这些令人不满意的结果导致人们开始研究治疗这种疾病的其它方法,例如多巴受体激动剂治疗和外科手术方法,包括苍白球切开术,苍白球深部脑刺激 (DBS) 和尝试通过破坏活动过度的脑区域或植入 DBS 电极使这些区域安静以阻止这种网络异常。虽然针对帕金森氏病患者的这些和其他手术类型已经产生了一些有益的结果,但这种手术的长期效应还不清楚。这些治疗也有一定的局限性和副作用。

[0016] 正在推行的另一种针对这种不可治愈疾病的方法是基因治疗。神经疾病分子基础的发现和基因传送系统的进展允许针对多种中枢神经系统病症进行局部或整体传送治疗基因。但是基因治疗具有一定的局限性,例如转基因表达的稳定性和调节,以及载体和表达的转基因的安全性 (Costantini et al., 2000, Gene Therapy 7 :93-109)。可用于基因治疗的载体包括但不限于 1 型单纯疱疹病毒 (HSV-1) (During et al., 1994, Science 266 : 1399-1403), 腺相关病毒载体 (AAV) (During et al., 1998, Gene Therapy 5 :820-827), 逆转录病毒, HSV/EB 病毒 (HSV/EBV) 杂合载体和 HSV/AAV 杂合载体。已经发现一种基因治疗方法可用于治疗帕金森氏病的动物模型。一种包被的能够释放神经保护分子 (神经胶质细胞系衍生的营养神经因子 (GDNF) 基因) 的基因工程细胞系和编码 GDNF 基因的慢病毒载体能够改善移植物的存活和分化,因此加速动物模型中的行为恢复 (Zurn et al., 2001, Brain Res Rev. 36 :222-229 ;Date et al., 2001, Cell Transplant 10 :397-401)。还发现使用神经干细胞的基因治疗在体内能有效表达治疗水平的 GDNF (Akerud et al., 2001, J. Neurosci. 21 :8108-8118)。

[0017] 细胞移植是提供替换帕金森氏病,以及其他神经变性病症和神经元疾病中损失的神经细胞的希望的另一种治疗方法。正在进行中的胎儿组织移植临床试验已经研发了将细胞植入脑中的方法,并且显示出该概念的生机,并在至少一些患者身上产生了有希望的结果。也尝试将多巴胺能神经细胞的前体细胞直接移植到帕金森氏病患者的纹状体内,发现人的胎儿或胚胎多巴胺能神经元的移植对帕金森氏病患者产生了有益效果 (Freed et al., 2001, N. Engl. J. Med. 344 :710-719)。然而实验数据表明要获得完全康复可能需更从解剖学上修复路径,而不是异位安置移植物 (Winkler et al., 2000, Prog. Brain Res. 127 : 233-265)。而且为了使患者获得临床上可信赖的改善,胎儿黑质移植治疗需要来自至少 5-10 个胎儿的人胎儿组织,而这会引发大量的道德,法律和安全问题。因此迫切需要神经元细胞,例如治疗神经变性病症和神经元疾病的多巴胺能神经元的替代来源。

[0018] 最近在成人脑中发现了可更新的神经干细胞来源。具有自身更新和形成各种类型脑细胞能力的神经干细胞提供了潜在无限供应产多巴胺脑细胞的方式,由此为神经变性病征和神经元疾病提供了全新的治疗方法 (Eriksson et al., 1998, *Nature Medicine* 4: 1313-1317)。已有报道显示来源于人胚胎前脑的神经干细胞培养物能在体外扩增到千万倍。这些成年动物神经干细胞已经被移植到是很好表征的帕金森氏病模型的成年大鼠中。移植后细胞在动物模型体内生存时间达一年,分化为神经元,并能一些实验动物中减轻运动障碍 (Svendsen et al., 1997, *Exp. Neurol.* 148:135-146)。然而不幸的是,成年动物神经干细胞在组织培养中的生存期有限 (Kukekov et al., 1999, *Exp. Neurol.* 156:333-344)。

[0019] 能够用来治疗各种神经变性病征和神经元疾病的多巴胺能神经元和其他神经元的一个可行的备选来源是多能胚胎干 (ES) 细胞,特别是人 ES 细胞。ES 细胞能够以未分化状态无限增殖,而且是多能的,意味着它们能够分化成体内存在的几乎所有细胞类型。因为 ES 细胞几乎能够变成所有的机体特化细胞,因此它们具有产生广泛组织和器官,例如心脏,胰腺,神经组织,肌肉,软骨等的替代细胞的潜能。ES 细胞可以衍生自胚泡的内细胞团 (ICM),胚泡是移植前的一个胚胎发育期。人 ES 细胞可以衍生自受精后第 4 天到第 7 天的发育胚胎早期阶段的人胚泡。来源于 ICM 的 ES 细胞可以在体外进行培养,在适当的条件下无限增殖。

[0020] 已经成功建立了包括小鼠 (Evans et al., 1981, *Nature* 292:154-156), 大鼠 (Iannaccone et al., 1994, *Dev. Biol.*, 163:288-292), 猪 (Evans et al., 1990, *Theriogenology* 33:125-128; Notarianni et al., 1990, *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 41: 51-6), 绵羊和山羊 (Meinecke-Tillmann and Meinecke, 1996, *J. Animal Breeding and Genetics* 113:413-426; Notarianni et al., 1991, *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 43:255-60), 兔 (Giles et al., 1993, *Mol. Reprod. Dev.* 36:130-138; Graves et al., 1993, *Mol. Reprod. Dev.* 36:424-433), 貂 (Sukoyan et al., *Mol. Reprod. Dev.* 1992, 33:418-431), 仓鼠 (Doetschman et al., 1988, *Dev. Biol.* 127:224-227), 家禽 (Pain et al., 1996, *Development* 122(8):2339-48), 灵长类动物 (美国专利 No. 5,843,780) 和人 (Thomson et al., 1998, *Science* 282:1145-1147; Reubinoff et al., 2000, *Nature Biotech.* 18: 399-403) 在内的多个物种的 ES 细胞系。人 ES 细胞和其他哺乳动物 ES 细胞一样,当注射到免疫缺陷小鼠体内时,能分化并形成全部三个胚层的组织,这证明了其多能性。已公开的报道显示人 ES 细胞可培养维持一年以上,期间细胞保持其多能性,自我更新能力和正常核型 (Thomson et al., 1995, *PNAS* 92:7844-7848)。

[0021] 研究表明 ES 细胞能够分化为神经祖细胞 (Zhang et al., 2001, *Nature Biotech.* 19:1129-33; WO 01/88104; 美国序号 09/872,183, 09/888,309, 10/157,288; WO 03/000868; 将各文件具体地引入此处作为参考)。这些细胞能够进一步分化成多巴胺能神经元 (Rolletschek et al., 2001, *Mech. Dev.* 105:93-104)。ES 细胞分化的最初步骤可以是形成胚状体,例如 $1\mu\text{M}$ 的视黄酸可以促进神经分化成胚状体 (Bain et al., 1995, *Dev. Biol.* 168:342-357)。虽然可以用视黄酸来产生神经细胞,但视黄酸是一种强的致畸剂。已有若干报道公开了通过使用基质细胞诱导活性 (SIDA) (Kawasaki et al., 2000, *Neuron* 28:1-20), 通过表达核受体相关-1 基因 (Nurr-1) (Kim et al., 2002, *Nature* 418:50-56), 或通过直接将未分化 ES 细胞移植到小鼠模型体内 (Bjorklund et al., 2002,

Proc. Natl Acad. Sci. 99 :2344-2349) 使得 ES 细胞分化成多巴胺能神经元。Lee 等 (2000, Nat. Biotechnol. 18 :675-79) 报道了一种在体外将 ES 细胞分化成神经祖细胞,多巴胺能或 5-羟色胺能神经元的方法。然而所有这些实验都是采用小鼠 ES 细胞进行实施的,且该分化方法得到 5-50% 的多巴胺能神经元。在 Lee 等 (WO 01/83715) 的研究中约有 20% 的小鼠 ES 细胞分化为多巴胺能神经元,在 Studer 等 (WO 02/086073) 的研究中有 5-50% 分化为多巴胺能神经元。虽然也可从人 ES 细胞分化多巴胺能神经元,但仅能得到 5-7% 的多巴胺能神经元产率 (占群体中所有细胞总数的百分数) (WO 03/000868)。

[0022] 由于帕金森氏病的特征在于中脑黑质中多巴胺能神经元的选择性逐步损失,故其被认为是特别适合细胞移植策略的临床疾病。在该特定脑位点内的产多巴胺神经元的损失导致神经细胞异常发放 (firing),这导致患者不能够控制或支配其运动。但是细胞替换治疗需要大量的多巴胺能神经元。因此,需要更高效地从人 ES 细胞制备多巴胺能神经元的替代方法,其将增大该治疗方法对于帕金森氏病的适用性,并提高该治疗方法的成功率。另外,可以在体外利用这些多巴胺能神经元以帮助鉴定在神经变性病症和神经元疾病中防止或减少产多巴胺脑细胞死亡的物质。

[0023] 发明概述

[0024] 本发明公开涉及一种从多能干细胞,例如人胚胎干细胞产生神经祖细胞 (neuroprogenitor cells),以及终末分化神经元的改进方法。例如,本发明公开证明人胚胎干细胞群能分化为高比例的酪氨酸羟化酶 (TH) (其是多巴胺能神经元的特异性标志物) 阳性神经元 (例如至少大约 60%)。本发明公开还证明人胚胎干细胞群能分化为高比例的 5-羟色胺能神经元。依照本发明公开的方法产生的多巴胺能神经元和 5-羟色胺能神经元的比例高于先前描述的方法。此处公开的方法也可以用来从人胚胎干细胞制备具有胆碱能神经元和感觉神经元表型特征的细胞以及星形胶质细胞和少突胶质细胞。

[0025] 本发明公开提供了在通过分化灵长类动物多能干细胞所得到的体外培养物中的分化细胞群,其中至少 60% 的分化细胞是多巴胺能神经元,表达酪氨酸羟化酶,或者是表达酪氨酸羟化酶的多巴胺能神经元。在其他实施方案中,至少大约 30%,40%,50%,70%,80%,90%,95% 或 99% 的分化细胞是多巴胺能神经元。本发明公开还提供了在通过分化灵长类动物多能干细胞所得到的体外培养物中的分化细胞群,其中至少 30% 的分化细胞是 5-羟色胺能神经元。在其他实施方案中至少大约 40%,50%,60%,70%,80%,90%,95% 或 99% 的分化细胞是 5-羟色胺能神经元。在优选实施方案中,分化成神经祖细胞或神经元的灵长类动物多能干细胞是人胚胎干细胞。

[0026] 本发明公开还提供了从灵长类动物多能干细胞制备分化的神经细胞群的方法,包括下列步骤:

[0027] (a) 扩增灵长类动物多能干细胞的培养物;

[0028] (b) 培养该多能干细胞以选择巢蛋白 (nestin) 阳性的神经祖细胞;

[0029] (c) 分选巢蛋白阳性神经祖细胞以富集 NCAM 阳性细胞;

[0030] (d) 通过在分化培养基中培养细胞使巢蛋白阳性、NCAM 阳性细胞分化,产生分化的神经细胞群。

[0031] 在优选实施方案中,灵长类动物多能干细胞是人胚胎干细胞。在另一个优选的实施方案中,上述方法中使用的多能干细胞优选是通过激光消融技术 (laser ablation

technique) 得到的。

[0032] 在其他实施方案中,上述方法进一步包括培养步骤(b)中的多能干细胞形成胚状体(embryoid bodies)的步骤。优选在选择巢蛋白阳性神经祖细胞的条件下培养这些胚状体,例如通过无血清培养基中培养多能干细胞或胚状体。在优选实施方案中,无血清培养基是成分已知的无血清 ITSFn 培养基,其中优选包含一种或多种选自胰岛素,亚硒酸钠,碱性成纤维细胞生长因子,转铁蛋白和纤连蛋白的可溶性因子。在优选实施方案中,这些方法将产生优选包含至少大约 60-75%巢蛋白阳性细胞,更优选包含大约 80-90%巢蛋白阳性细胞,最优选包含大约 95-99%巢蛋白阳性细胞的神经祖细胞。

[0033] 然后可以使用合适的免疫学技术,例如免疫标记和荧光分选法,如磁性细胞分选术(Magnetic Cell Sorting, MACS),固相吸附,荧光激活细胞分选术(FACS),针对细胞表面标记的流式免疫细胞化学(flow immunocytochemistry)或流式细胞计量术来分选巢蛋白阳性神经祖细胞以富集 NCAM 阳性细胞。在优选实施方案中,这些方法将产生优选包含至少大约 40-70% NCAM 阳性细胞,更优选包含大约 50-60% NCAM 阳性细胞,最优选包含大约 80-99% NCAM 阳性细胞的巢蛋白阳性细胞。在某些实施方案中,上述的方法进一步包括在扩增培养基(expansion medium)中扩增(expanding)步骤(c)中巢蛋白阳性、NCAM 阳性神经祖细胞,优选 6-10 天。优选地,扩增培养基包含一种或多种选自胰岛素,亚硒酸钠,转铁蛋白,层粘连蛋白,腐胺,黄体酮,碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),表皮生长因子(EGF),sonic hedgehog(SHH),成纤维细胞生长因子-8(FGF-8)和脑衍生神经营养因子(neurotrophic factor)(BDNF)的可溶性物质。

[0034] 巢蛋白阳性、NCAM 阳性神经祖细胞在扩增并连续传代一个或多个群体倍增数。这些细胞也可以冷冻保存在液氮中。按照上述方法的步骤(d),NCAM 阳性神经祖细胞优选在分化培养基中生长 30-50 天。在优选实施方案中,分化培养基包含添加了胎牛血清, B27, 抗坏血酸和 N-乙酰半胱氨酸的 Neurobasal 培养基(Neurobasal medium)。在另一个优选实施方案中,分化培养基包括 TGF- β 3 或白介素-1 β 或两者都包括。优选地,分化培养基进一步包括一种或多种分化剂,其中分化剂选自抗坏血酸, N-乙酰半胱氨酸,胶质细胞系衍生神经营养(neurotrophic)因子(GDNF),双丁酰环 AMP(db-cAMP),脑衍生神经营养(neurotrophic)因子(BDNF),neurturin,sonic hedgehog(SHH)和成纤维细胞生长因子-8(FGF-8)。

[0035] 在优选实施方案中,上面公开的方法被用来制备优选包含大约 40-60%多巴胺能神经元,更优选包含大约 70-80%多巴胺能神经元,最优选包含大约 90-99%多巴胺能神经元的分化神经细胞群。在特定实施方案中,这些方法被用来产生优选包含大约 20-50% 5-羟色胺能神经元,更优选包含大约 30-70% 5-羟色胺能神经元,最优选包含大约 60-99% 5-羟色胺能神经元的分化神经细胞群。在其他实施例中,这些方法被用来制备优选包含大约 15-40%少突胶质细胞,更优选包含大约 25-50%少突胶质细胞,最优选包含大约 60-99%少突胶质细胞的分化神经细胞群。

[0036] 本发明公开提供了从神经祖细胞制备多巴胺能神经元的方法,包括从神经祖细胞中富集巢蛋白阳性的细胞,并通过在 TGF- β 3 或白介素-1 β 存在或两者都存在的情况下培养细胞使巢蛋白阳性细胞分化产生多巴胺能神经元。优选地,使用这些方法使至少大约 40-99%巢蛋白阳性细胞分化为多巴胺能神经元。在其他的实施方案中,这些方法进一步包

括从神经祖细胞中富集 NCAM 阳性的细胞,这些巢蛋白阳性、NCAM 阳性细胞优选被分化产生多巴胺能神经元(例如至少大约 60-99% 的细胞分化为多巴胺能神经元)。本发明公开还提供了从神经祖细胞制备神经元的方法,包括从神经祖细胞中富集巢蛋白和 NCAM 阳性的细胞,以及通过在 TGF- β 3 或白介素-1 β 存在或两者都存在的情况下培养细胞使巢蛋白和 NCAM 阳性的细胞分化产生 5-羟色胺能神经元。优选地,使用这些方法使至少大约 30-99% 巢蛋白阳性、NCAM 阳性细胞分化为 5-羟色胺能神经元。

[0037] 本发明公开还提供了通过给个体施用这里所描述的来源于灵长类动物多能干细胞的分化的神经细胞对神经变性病或神经元疾病患者进行治疗的方法。例如,可以按下述步骤制备分化的神经细胞群:

[0038] (a) 扩增灵长类动物多能干细胞的培养物;

[0039] (b) 培养该多能干细胞以选择巢蛋白阳性的神经祖细胞;

[0040] (c) 分选巢蛋白阳性神经祖细胞以富集 NCAM 阳性细胞;

[0041] (d) 通过在分化培养基中培养细胞使巢蛋白阳性、NCAM 阳性细胞分化,产生分化的神经细胞群。

[0042] (e) 将治疗有效量的分化的神经细胞群施用到个体的中枢神经系统内。

[0043] 优选地,分化培养基包括 TGF- β 3 或白介素-1 β 或两者都包括。在优选实施方案中,个体是患者,更优选是人类患者,而灵长类动物多能干细胞是人胚胎干细胞。优选地,人胚胎干细胞和患者具有组织相容性,例如所使用的多能干细胞具有与患者基本相同的基因组。在特定实施方案中,从分化的神经细胞群中分离出多巴胺能神经元,5-羟色胺能神经元,胆碱能神经元,或感觉神经元,或作为替代方案星形胶质细胞或少突胶质细胞,并给患者施用。可以给个体对象施用这些包括分化神经细胞群在内的细胞治疗许多种神经变性病或神经元疾病,包括但不限于中枢神经系统(CNS) 紊乱,帕金森氏病,阿尔茨海默氏病,亨廷顿舞蹈病,脊髓损伤,肌萎缩性脊髓侧索硬化(ALS),癫痫,中风和局部缺血。优选通过移植来施用细胞,例如将目的细胞移植到个体脑内。

[0044] 在其他实施方案中,此处所描述的来源于灵长类动物多能干细胞的分化的神经细胞可以用来筛选化合物(例如小分子和药物)对分化神经细胞成这些细胞活性的影响效果。也可以筛查化合物的神经细胞毒性或对神经细胞的调节作用。通过把化合物加入到分化的神经细胞群中,然后与在相似条件下培养但没有暴露于该化合物的分化的神经细胞比较存活率,形态,表型,功能活性或细胞的其他特征,可以对化合物进行评价。例如可以筛查化合物确定化合物是否会影响细胞合成、释放或摄取神经递质的改变。

[0045] 附图的简单描述

[0046] 下列附图构成本说明书的一部分,用来对本发明的特定方面作进一步的说明,通过参考一幅或多幅附图、结合这里给出的详细描述的具体实施方案能够更好地理解本发明。

[0047] 图 1 显示来源于人胚胎干细胞的巢蛋白阳性神经祖细胞:(A) 显示与巢蛋白标记物发生免疫反应的神经祖细胞;(B) 是在选择的生长因子存在时,在无血清条件下扩增的巢蛋白阳性细胞的相差照片。

[0048] 图 2 显示了来源于人胚胎干细胞且标记了 NCAM-FITC 的巢蛋白阳性细胞的 FACS 分析:(A) 显示用抗-兔 FITC 处理过的未标记细胞的分析;(B) 显示用 NCAM 一抗处理的和

用抗-兔FITC(二抗)标记的细胞的分析。在这项研究中,大约50-60%的巢蛋白阳性细胞呈NCAM免疫阳性。

[0049] 图3A和3B是用MACS分选并接种到组织培养皿中的来源于人胚胎干细胞的NCAM阳性细胞的荧光显微照片。

[0050] 图4A和4B是用MAP-2和 β 微管蛋白标记的来源于人胚胎干细胞的神经元的荧光显微照片。

[0051] 图5显示了酪氨酸羟化酶(TH)阳性神经元的存在:(A)免疫荧光分析显示用MACS得到的NCAM阳性细胞富集群中大约60%的神经元为TH阳性;(B)免疫荧光分析显示在扩增和分化未分选的巢蛋白阳性细胞后大约40%的神经元为TH阳性。

[0052] 图6是少突胶质细胞有代表性的荧光显微照片。免疫荧光分析显示大约25-30%的分离的巢蛋白阳性细胞为少突胶质细胞阳性染色。

[0053] 图7是表选神经递质5-羟色胺的神经元细胞的有代表性的荧光显微照片。大约30%的巢蛋白阳性细胞,和大约20%的NCAM阳性细胞与5-羟色胺发生免疫反应。

[0054] 图8是对TH(绿色)和另一种神经元特异性抗原(红色)进行免疫标记后的多巴胺能神经元的荧光显微照片:TH和(A) β 微管蛋白;(B)MAP-2;(C)Nurr1;(D)DAT共定位。

[0055] 图9是显示MAP-2阳性神经元中TH阳性神经元(多巴胺能神经元)百分比的条形图:如图所示,进一步分化7,22和37天时TH阳性神经元增加。

[0056] 图10是显示NCAM阳性富集细胞中不同神经元细胞群定量分析的条形图:大约60%的NCAM阳性细胞也呈TH免疫阳性;大约30%呈5-羟色胺免疫阳性;和大约15%呈GABA和谷氨酸免疫阳性。

[0057] 图11是显示在扩增和分化巢蛋白阳性细胞后免疫荧光分析的不同神经元细胞群的定量分析的条形图:大约40%的巢蛋白阳性细胞呈TH免疫阳性;大约30%呈5-羟色胺免疫阳性;大约28%呈少突胶质细胞免疫阳性;大约2%呈神经胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillar acidic protein,GFAP,星形胶质细胞的标志物)免疫阳性。

[0058] 图12显示了在实施例1公开的条件下在细胞体外终末分化过程中人胚胎干细胞的基因表达图谱:UD=未分化的;EB=胚状体;NS=巢蛋白阳性细胞;NE=巢蛋白扩增细胞;剩余的时间点显示在实施例1公开的Neurobasal培养基和选择的生长因子中培养细胞的天数。多巴胺能神经元特异性因子,例如Nurr1,En-1,D2RL的转录在分化早期被表达。除未分化干细胞外在所有阶段都观察到多巴胺能神经元特异性基因TH的表达。不存在任何DBH表达证实了这些细胞具有中脑表型。

[0059] 图13显示在分化7,22和37天,通过RP-HPLC确定的细胞溶解物的胞内多巴胺水平。在生长因子存在时,多巴胺水平(4-6 μ g/ml)远远高于未处理细胞的水平(1-4 μ g/ml)。用MPTP处理的细胞在7和22天时没有检测到多巴胺,而在37天时多巴胺水平下降。

[0060] 图14是显示在条件培养基中培养的、分化7,22和37天后的分化细胞中氯化钾引起多巴胺释放的条形图。用56mM氯化钾刺激细胞15分钟诱导多巴胺分泌;在用RP-HPLC分析前用7.5%正磷酸(orthophosphoric acid)和偏亚硫酸氢钠稳定培养上清液。

[0061] 发明详述

[0062] 本发明公开提供了有效产生从多能干细胞分化的神经谱系细胞的方法。这里产生的细胞包括但不限于具有神经祖细胞,多巴胺能神经元,5-羟色胺能神经元,胆碱能神经

元,和感觉神经元,以及星形胶质细胞或少突胶质细胞之表型特征的细胞。这里产生的细胞可通过表型特征,形态学特征和 / 或细胞标志物(这些是评估这类细胞的领域中的技术人员易于理解的)进行鉴定。这里使用的术语“神经祖细胞”与术语“神经的祖细胞(neural progenitor cell)”或“神经前体细胞(neural precursor cell)”可以互换,指能够产生神经元细胞,例如神经元前体或神经元,或胶质细胞,例如胶质细胞前体,星形胶质或少突胶质细胞这样的子代的细胞。此处公开的方法包括结合有助于细胞分化成神经谱系的可溶性因子和环境条件对细胞进行培养。另外,可以使用物理分离或操作技术进一步富集目的神经细胞类型。

[0063] 这些前体和分化的神经细胞可以用于许多方面,包括用于治疗性和试验性应用,以及体外药物研发和筛选,例如筛选具有神经细胞毒性或具有调节神经细胞功能的化合物。从多能干细胞产生前体和分化的神经细胞,例如多巴胺能和 5- 羟色胺能神经元,以及其他类型的特化神经元细胞为这些神经元提供了潜在无限的供应,为罹患使人虚弱的神经变性病症和神经元疾病的患者带来了巨大的潜在好处。此处描述的前体和分化的神经细胞典型地是其所衍生自的细胞群的子代细胞,因此具有与母体群(包括在遗传学上被改变,转化或转染的母体群)基本相同的基因组。

[0064] 本发明公开的一个实施方案涉及从多能干细胞,优选灵长类动物胚胎干(ES)细胞或灵长类动物胚胎生殖(embryonic germ)(EG)细胞产生具有中脑神经元特征的神经元,例如多巴胺能神经元的改进方法。另一实施方案涉及从多能干细胞,优选灵长类动物 ES 细胞或灵长类动物 EG 细胞产生具有后脑神经元特征的神经元,例如 5- 羟色胺能神经元的改进方法。可以在这些方法中使用的灵长类动物 ES 细胞或 EG 细胞最优选是人 ES 细胞或 EG 细胞。这些神经元通过在某些可溶性因子和环境条件存在的情况下培养细胞而从多能干细胞中进行衍生。

[0065] 此处使用的术语“多巴胺能神经元”是指表达酪氨酸羟化酶(TH)(多巴胺合成的限速酶)的神经元细胞。优选地多巴胺能神经元分泌神经递质多巴胺,且几乎不或者不表达多巴胺 β 羟化酶。多巴胺能神经元在活体内支配纹状体,边缘系统和新大脑皮质,其与包括运动神经元在内的其它几类神经元一起位于中脑腹侧。多巴胺能神经元特异性地位于中脑黑质,其控制姿势反射,运动和奖赏相关的行为(reward-associated behaviors)。正常功能性多巴胺能神经元的损失会导致帕金森氏病,其功能异常与精神分裂症和药物成瘾相关。此处使用的术语“5- 羟色胺能神经元”是指分泌神经递质 5- 羟色胺(5- 羟色胺)的神经元。5- 羟色胺能神经元典型地具有缓慢、有节奏的发放(firing)模式且在体内集中于后脑的腹面和腹外侧面并支配中枢神经系统(包括大脑皮质,边缘系统和脊髓)的大部分。这些神经元控制觉知,唤醒,行为和食物摄取。5- 羟色胺能神经元功能异常与攻击,抑郁(包括自杀行为)和精神分裂症相关。

[0066] 本发明公开涉及使多能干细胞分化为神经祖细胞,以及分化为具有与神经谱系(neural lineage)细胞相似的表型、分子和 / 或细胞特征的分化的神经细胞群的改进方法。多能干细胞可以是人 ES 细胞,分化的神经细胞可以是多巴胺能神经元或 5- 羟色胺能神经元。本发明公开还涉及通过所公开的方法产生的细胞和细胞群。在某些实施方案中,所公开的方法包括下列步骤:

[0067] 1. 分离多能干细胞群;多能干细胞优选是采用新激光消融术获得的人 ES 细胞。

- [0068] 2. 扩增多能干细胞以提供足够的起始材料。
- [0069] 3. 悬浮培养多能干细胞以产生胚状体。
- [0070] 4. 将胚状体再接种于基质上并在选择巢蛋白阳性神经祖细胞的无血清培养基中孵育。
- [0071] 5. 分选巢蛋白阳性细胞以分离出 NCAM 阳性细胞的富集细胞群。
- [0072] 6. 在包含神经系统相关可溶性因子的扩增培养基中扩增巢蛋白阳性和 / 或 NCAM 阳性神经祖细胞。
- [0073] 7. 在包含神经系统相关可溶性因子组合的 Neurobasal 培养基中将巢蛋白阳性和 / 或 NCAM 阳性神经祖细胞分化为成熟神经元。

[0074] 多能干细胞的来源

[0075] 此处公开的从多能干细胞分化神经谱系细胞的方法涉及使用能指导非常高比例的多能干细胞分化成特定神经元细胞类型的特定培养条件。多能干细胞来源于受精后任何时间的胚前期、胚胎或胎儿组织,在合适的条件下,后者能够分化为衍生自所有三个胚层(内胚层,中胚层和外胚层)的几种不同的细胞类型。神经谱系的细胞还可以来源于从胎儿或成年动物组织中分离的具有分化或重新编程形成神经谱系细胞能力的干细胞。多能干细胞包括但不限于哺乳动物 ES 细胞或 EG 细胞,优选灵长类动物或人 ES 细胞或 EG 细胞。优选地,未分化的多能干细胞在培养时具有无限分裂和增殖的能力。此处使用的术语“分化”是指未分化多能干细胞或前体细胞获得更为特化的命运的过程。例如,分化的细胞具有为特定细胞类型或组织特征性的表型。

[0076] 在优选实施方案中,此处使用的 ES 细胞和 ES 细胞系来源于胚泡的内细胞团。这些胚泡可以从回收的体内受精的植入前胚胎,或体外受精(IVF),例如通过常规授精,胞浆内精子注射技术或卵质转移而受精得到的胚胎中分离。人胚泡从自愿捐赠其过剩胚胎的夫妇或捐赠者处获得。在得到这些夫妇或捐赠者的自愿书面同意后将这些胚胎用于研究目的。或者,可通过将体细胞或细胞核转移到人或非人来源的去核卵母细胞中、然后刺激后者以发育到胚泡阶段来获得胚泡。所用胚泡也可冷冻保存过,或来源于在早期阶段冷冻保存且被允许继续发育成胚泡期胚胎的胚胎。胚泡和内细胞团的发育将根据物种而有不同,此为本领域技术人员众所周知的。

[0077] 可以使用美国专利 No. 5,843,780 和 No. 6,200,806、Thomson 等 (Science 282: 1145-1147, 1998) 和 Reubinoff 等 (Nature Biotech. 18:399-403, 2000) (将各文件具体地引入此处作为参考) 中公开的标准免疫切除技术从胚泡中制备灵长类动物或人 ES 细胞。虽然在公开的方法中可以使用通过本领域技术人员已知的任何方法制备的 ES 细胞,但一个优选实施方案使用通过独特的激光消融法(美国序号 10/226,711,将其具体地引入此作为参考)制备的人 ES 细胞。简单来说,这种方法通过对胚泡的透明带和滋养外胚层的一部分进行激光消融,在胚泡中形成可以抽吸内细胞团的细胞的洞或孔来从胚泡内细胞团中分离细胞。然后进一步培养这些细胞以建立 ES 细胞系。该技术是有利的因为其不进行免疫切除的常规烦琐程序即可分离内细胞团的细胞。另外,可在无任何动物产生的抗体或血清存在时分离采用该方法产生的 ES 细胞系,特别是人细胞系,这使得动物微生物向人 ES 细胞系的任何传播的风险最小化。在另一实施方案中,使用来自存在于人胎儿材料中的原生殖细胞的人 EG 细胞(美国专利 No. 6,090,622,和 Shamblott et al., 1998, Proc. Natl. Acad.

Sci. USA. 95 :13726-13731, 将各文件具体地引入此处作为参考)。

[0078] 优选地, 可将 ES 细胞系以未分化状态维持于培养中较长时间, 例如超过一年的时间, 并维持其正常的整倍体核型。可以通过高核质比, 显著性核仁和集落的紧密形成 (通常具有清晰的细胞边界和比小鼠 ES 细胞平坦的集落) 而从形态上鉴定人 ES 细胞。人 ES 细胞还优选地与人多能干细胞的标志物, 例如 Thomson 等 (1998), Reubinoff 等 (2000), Buehr 和 McLaren (1993) (将各文件具体地引入此处作为参考) 中所描述的 SSEA-3, SSEA-4, GCTM-2 抗原和 TRA1-60 发生免疫反应。优选地人 ES 细胞还表达碱性磷酸酶, 以及 OCT-4。在其它实施方案中, 人 ES 细胞在非贴壁培养条件下也能形成胚状体 (美国专利 No. 6, 602, 711, 将其引入此处作为参考)。这些胚状体可用于衍生内胚层、中胚层和外胚层、以及其它所需细胞谱系的分化衍生物。

[0079] 多能干细胞, 特别是人 ES 或 EG 细胞可在维持细胞处于基本上未分化状态的培养条件下持续增殖。在频繁更换培养基以防止 ES 细胞分化的同时, 必须保持合适的 ES 细胞密度并进行重复离解和继代培养。针对细胞培养和培养 ES 细胞相关的一般技术, 操作人员可参考标准的教科书和综述, 例如 E. J. Robertson, " Teratocarcinomas and embryonic stem cells : A practical approach " ed., IRL Press Ltd. 1987 ; Hu and Aunins, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8 (2) : 148-53 ; Kitano, 1991, Biotechnology 17 : 73-106 ; Spier, 1991, Curr. Opin. Biotechnol. 2 : 375-79 ; Birch and Arathoon, 1990, Bioprocess Technol. 10 : 251-70 ; Xu et al., 2001, Nat. Biotechnol. 19 (10) : 971-4 和 Lebkowski et al., 2001, Cancer J. 7 Suppl. 2 : S83-93 ; 将各文件具体地引入此处作为参考。

[0080] 传统地, 在 ES 培养基中于饲养细胞层上培养 ES 细胞。饲养细胞层是与 ES 细胞共培养, 并提供 ES 细胞可在其中生长而不进行实质上分化的环境的一种组织类型细胞。在饲养层细胞上培养 ES 细胞的方法是本领域技术人员众所周知的 (美国专利 No. 5, 843, 780 和 No. 6, 200, 806, W099/20741, 美国专利序号 09/530, 346 和 09/849, 022, W001/51616, 将各文件具体地引入此处作为参考)。饲养细胞层优选能够减少, 抑制或防止 ES 细胞分化。饲养细胞层典型地是人或小鼠来源的胚胎成纤维细胞饲养层, 例如是小鼠胚胎成纤维细胞, 人胚胎成纤维细胞, 人成纤维细胞样细胞, 或来源于人胚胎干细胞的间充质细胞, 或 STO 细胞。

[0081] 优选在存在能够减少, 抑制或防止 ES 细胞分化的 ES 培养基时培养 ES 细胞。优选地, 用来培养 ES 细胞的 ES 培养基中添加了营养血清, 例如可提供有效维持 ES 细胞生长和成活所需营养物质的血清或以血清为基础的溶液。营养血清可以是动物血清, 例如胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 或胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) (美国专利 No. 5, 453, 357, 5, 670, 372, 和 5, 690, 296, 将其引入此处作为参考)。ES 培养基还可以不含血清 (W098/30679, W0 01/66697, 美国专利序号 09/522, 030, 将各文件具体地引入此处作为参考)。含有血清的用于培养 ES 细胞的合适 ES 培养基的实例是 Dulbecco' s 改良 Eagle' s 培养基 (DMEM), 不含丙酮酸钠, 葡萄糖含量高 (70-90%) (GIBCO), 其中添加了 FBS 或 FCS (10-30%), β -巯基乙醇 (0.1mM), 非必需氨基酸 (1%) 和 2mM L- 谷氨酰胺, 4ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF), 50U/ml 青霉素, 50 μ g/ml 链霉素和 1000U/ml 的白血病抑制因子 (LIF)。不含有血清的用于培养 ES 细胞的合适 ES 培养基的实例是 80% "敲除" 的 Dulbecco' s 改良的 Eagle' s 培养基 (DMEM) (GIBCO), 20% KnockOut SR (无血清替代

品, GIBCO), β - 巯基乙醇 (0. 1mM), 非必需氨基酸 (1%) 和 L- 谷氨酰胺 1mM。

[0082] ES 细胞还可在无饲养细胞的培养条件下培养。在无饲养细胞的培养条件下培养 ES 细胞的方法是本领域技术人员众所周知的 (美国专利公开 No. 2002/0022268, WO 03/020920, 美国序号 10/235, 094, 将各文件具体地引入此处作为参考)。在无饲养细胞培养物中 ES 细胞优选生长在合适的培养基质, 例如胞外基质, 如 Matrigel® (Becton Dickenson) 或层粘连蛋白上。无饲养细胞培养还优选使用支持 ES 细胞生长的条件培养基。条件培养基通过在培养基中培养第一群鼠胚胎成纤维细胞或人胚胎成纤维细胞足以产生将支持 ES 细胞培养而无实质上分化的“条件”培养基的时间来制备。或者, 无饲养细胞培养可将有效培养基与胞外基质结合, 其中将培养基新鲜加入培养物而不被另一种细胞类型进行调制 (美国专利公开 No. 2003/0017589, 将其具体地引入此处作为参考)。

[0083] 神经祖细胞的制备

[0084] 扩增分离的多能干细胞, 然后将其置于可使之分化成神经祖细胞的培养条件中。对于沿神经分化路径发展的多能干细胞, 根据此处公开的分化方法进行培养。多能干细胞在含有分化因子, 例如可溶生因子和生长因子的分化营养培养基中于合适的基质上进行培养。合适的基质包括但不限于包被有正电荷, 例如聚-L- 赖氨酸或聚鸟氨酸的固体表面, 包被有细胞外基质成分, 例如纤连蛋白, 层粘连蛋白, Matrigel®, 或其组合的基质。优选的分化营养培养基是能够支持所需神经细胞类型增殖, 分化和存活的条件培养基, 可含有一种或多种合适的分化因子。此处使用的术语“生长因子”是指能够与细胞表面受体结合以主更导致激活细胞增殖和分化的蛋白质。合适的可溶性因子包括但不限于神经营养蛋白, 有丝分裂剂, 干细胞因子, 生长因子, 分化因子 (例如 TGF- β 超家族), TGF- β 超家族激动剂, 神经营养因子, 抗氧化剂, 神经递质和存活因子。多种可溶性因子是非常多能的, 能够刺激多种不同类型的细胞分裂, 而其它的则对特定细胞类型是特异性的。

[0085] 特异性刺激神经细胞类型分化的合适的分化因子包括但不限于黄体酮, 腐胺, 层粘连蛋白, 胰岛素, 亚硒酸钠, 转铁蛋白, neurturin, sonic hedgehog (SHH), noggin, 卵泡抑素 (follistatin), 表皮生长因子 (EGF), 任何类型的成纤维细胞生长因子 (例如 FGF-4, FGF-8, 碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)), 生长和分化因子 5 (GDF-5), 神经营养蛋白家族成员 (神经生长因子 (NGF), 神经营养蛋白 3 (NT-3), 神经营养蛋白 4 (NT-4), 脑衍生神经营养因子 (BDNF)), 转化生长因子 α (TGF- α), 转化生长因子 β -3 (TGF β 3), 血小板衍生生长因子 (PDGF-AA), 胰岛素样生长因子 (IGF-1), 骨形态发生蛋白 (BMP-2, BMP-4), 神经胶质细胞衍生神经营养因子 (GDNF), 视黄酸 (RA), midkine, 抗坏血酸, 双丁酰 cAMP, 多巴胺和与 gp130 形成复合体的受体的配体 (例如 LIF, CNTF, SCF, IL-11 和 IL-6)。分化营养培养基还可包含有助于维持神经细胞培养的添加剂, 例如 N2 和 B27 添加剂 (Gibco)。

[0086] 首先诱导多能干细胞形成胚状体。直接将胚状体接种于含有或不含有细胞外基质成分, 例如纤连蛋白或层粘连蛋白的合适的基质上, 在适于促进细胞分化成神经祖细胞, 例如巢蛋白 (nestin) 阳性神经祖细胞的合适的分化营养培养基中培养。巢蛋白是神经前体细胞特征性的细胞标志物。在另一实施方案中, 首先通过形成胚状体, 例如通过在悬浮液中培养多能干细胞, 将多能干细胞聚集成非均质细胞群。在含有或不含有血清, 以及含有一种或多种上面列出的分化因子的营养培养基中培养这些细胞以促进胚状体中的细胞分化。此处使用的术语“胚状体”是指当多能干细胞在悬浮培养中生长或在单层培养中过度生长时

所产生的分化细胞的集合体。胚状体也可以在细胞集合体中有未分化细胞。优选地这种细胞集合体被原始内胚层包围。胚状体一般包含来源于所有三个胚层,即内胚层,中胚层和外胚层的细胞。在成熟的人胚状体中,能够辨别出具有不同细胞类型标志物的细胞,例如神经细胞,造血细胞,肝细胞和心肌细胞。成熟的人胚状体中的某些细胞表现出类似分化细胞的功能。例如,活性心肌细胞能使胚状体搏动。优选地控制多能干细胞的分化以便获得用于治疗目的的特定细胞类型。

[0087] 培养胚状体直至达到足够大的尺寸或所需的分化程度,例如在培养 3-10 天后,然后将其接种于基质上。优选地基质用细胞外基质成分包被,所述成分包括但不限于聚-L-赖氨酸或聚-L-鸟氨酸,层粘连蛋白,胶原蛋白,纤连蛋白,Matrigel®或其组合。优选地无需分散细胞而将胚状体直接接种于基质上。然后在能够刺激接种细胞进一步分化的条件下培养胚状体,例如在对巢蛋白阳性细胞具有选择性的、成分已知的无血清 ITSFn(巢蛋白选择)培养基中培养。巢蛋白是神经上皮中表达的中间丝蛋白。优选地,在 5-16 天期间从细胞中选择巢蛋白阳性细胞。优选地,用于扩增巢蛋白阳性细胞的 ITSFn 培养基是添加了一种或多种生长因子的 DMEM:F-12,其中生长因子选自黄体酮,腐胺,层粘连蛋白,胰岛素,亚硒酸钠,转铁蛋白,bFGF,SHH,EGF,FGF-2,FGF-8 和 BDNF。

[0088] 然后扩增或分选包含巢蛋白阳性细胞的非均质细胞群以富集神经细胞粘着分子(NCAM)阳性细胞。NCAM 是神经细胞特征性的表面标志物。可以在选择巢蛋白阳性细胞后或培养扩增巢蛋白阳性细胞后立即分选 NCAM 阳性细胞。在特定实施方案中,通过将细胞接触结合 NCAM 的抗体或配体,然后采用合适的免疫学技术如免疫标记和荧光分选法,例如固相吸附,荧光激活细胞分选术(FACS),针对细胞表面标记的流式免疫细胞化学,流式细胞计量术或磁性细胞分选术(MACS)分离出被特异性识别的细胞来分选出 NCAM 阳性细胞。分离 NCAM 阳性细胞的其他方法,包括但不限于差异平板接种法(differential plating),污染细胞的免疫特异性裂解,或收获技术,是本领域技术人员众所周知的。在优选的实施方案中,分选巢蛋白阳性细胞(例如通过 MACS)可将表达 NCAM 的活巢蛋白阳性细胞群富集至大约 40-70%,优选大约 60%-80%,更优选大约 85%-90%,最优选大约 95%-99%。

[0089] 在一个实施方案中,通过无饲养细胞的合适培养基中于细菌培养皿上的培养来从人 ES 细胞制备胚状体。优选将人 ES 细胞离解成团,然后接种在非粘附性培养皿中以利于胚状体的发育。合适的培养基优选包含高糖 DME 并添加 10-20% FCS。培养基中也可加入其它添加剂,例如 0.1mM 2-巯基乙醇,2mM L-谷氨酰胺,50U/ml 青霉素和 50 μg/ml 链霉素。优选使胚状体生长 4-8 天,然后将胚状体接种在用 0.1% 凝胶包被的培养皿中,在无血清 ITSFn 培养基中选择巢蛋白阳性细胞。无血清 ITSFn 培养基优选包括添加了用于选择巢蛋白阳性细胞的生长因子胰岛素,亚硒酸钠,转铁蛋白和纤连蛋白的基础培养基 DMEM:F-12(1:1)或 IMDM 培养基。

[0090] 在优选实施方案中,通过 MACS 分选巢蛋白阳性细胞以分离出 NCAM 阳性细胞。然后在有助于增加神经祖细胞百分比和进一步诱导这些细胞采取更多分化表型的培养基中扩增 NCAM 阳性细胞。优选地,在预先用细胞外基质成分,例如聚-L-赖氨酸,聚-L-鸟氨酸,层粘连蛋白,胶原蛋白,纤连蛋白,Matrigel®或其组合包被的基质上培养 NCAM 阳性细胞。用细胞外基质对培养皿预包被可使细胞在扩增培养基中更好地黏附和增殖,也会产生更好的多巴胺能神经元分化结果。在添加了一种或多种生长因子的扩增培养基,例如 DMEM/

F12 培养基中培养细胞,其中生长因子选自黄体酮,腐胺,层粘连蛋白,胰岛素,亚硒酸钠,转铁蛋白, bFGF, SHH, EGF, FGF-2, FGF-8, BDNF, PDGF, IGF-1, CTNF 和 NT-3。虽然不希望受任何特殊机制束缚,但确信这些存在于扩增培养基中的多种因子促成了神经细胞百分比的整体增加,且进一步诱导中脑神经元前体细胞表现多巴胺能表型。在优选实施方案中,使巢蛋白阳性 NCAM 阳性前体细胞增殖 3-10 天。这些细胞也可连续传代至少三十个群体倍增数并冷冻以备进一步使用,而不会丧失任何分化潜能。

[0091] 多巴胺能和 5-羟色胺能神经元的分化

[0092] 根据此处公开的方法制备的神经祖细胞可以进一步分化成高比例的成熟神经元,例如多巴胺能神经元和 5-羟色胺能神经元。神经祖细胞还可以进一步分化成星形胶质细胞和少突胶质细胞。优选地,可以在有助于祖细胞分化成终末分化的神经细胞或成熟神经元的 Neurobasal 培养基中扩增巢蛋白阳性和 / 或 NCAM 阳性神经祖细胞 5-60 天。在优选实施方案中,在 Neurobasal 培养基 (Gibco) 中加入 10% FBS 或 FCS, B27, 和一种或多种选自白介素 -1 β , 双丁酰环 AMP (db-cAMP), 神经胶质细胞系衍生神经营养因子 (GDNF), 转化生长因子 β 3 (TGF- β 3), 转化生长因子 α (TGF- α), neurturin, SHH, 抗坏血酸, BDNF, FGF-2, FGF-8, N-乙酰半胱氨酸, c-kit 配体, 视黄酸, NT-3, BMP-2 和 BMP-4 的生长因子。在优选的实施方案中, Neurobasal 培养基包含一种或多种下列因子: 白介素 -1 β , db-cAMP, GDNF, TGF- β 3, neurturin, SHH, 抗坏血酸, BDNF, FGF-8 和 N-乙酰半胱氨酸。另外,可以通过撤消某些或全部促进神经祖细胞分化,增殖,或二者的因子来促进分化。

[0093] 优选地,高百分比的神经祖细胞分化成多巴胺能神经元,5-羟色胺能神经元或少突胶质细胞,例如至少大约 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 或 99% 的细胞。另外,通过本领域技术人员众所周知的方法,例如免疫标记和荧光分选法如固相吸附, FACS, MACS 等,可进一步从分化的神经细胞群中纯化一种神经细胞类型,例如多巴胺能神经元。在一个优选实施方案中,在适宜培养基中扩增和分化通过免疫分选富集的 NCAM 阳性细胞群,从而产生高百分比 (大约 60%) 的多巴胺能神经元。

[0094] 神经祖细胞和分化的神经细胞的用途

[0095] 这里描述的神经祖细胞和分化的神经细胞 (例如成熟的神经元,星形胶质细胞和少突胶质细胞) 可以用于许多方面,例如用于治疗,以及体外评估和筛选各种化合物,例如小分子药物对这些细胞的作用。还可使用本领域技术人员众所周知的方法将这些细胞用于制备 cDNA 表达文库以分析表达模式,以及制备特异性针对所用特定细胞的标志物的单克隆或多克隆抗体。这些细胞也可在治疗上使用以有益于罹患使人虚弱的神经变性病和神经元疾病的患者。

[0096] 本发明公开还涉及使用这里所描述的神经祖细胞和分化的神经细胞来恢复需要所述治疗个体的中枢神经系统 (CNS) 的功能。例如,通过将这些细胞直接移植到 CNS 实质或鞘内位点 (依赖于需治疗的疾病或病症) 可治疗性地使用这些细胞。这些细胞可以用来治疗急性或慢性神经系统损伤,以及使人虚弱的神经变性病和神经元疾病,例如帕金森氏病,阿尔茨海默氏病,亨廷顿舞蹈病,脊髓损伤,肌萎缩性脊髓侧索硬化 (ALS), 癫痫, 中风, 局部缺血, 等等。

[0097] 本发明公开的一个实施方案涉及通过施用或移植治疗有效量的来源于多能干细

胞,优选人多能干细胞的多巴胺能神经元来治疗特征在于多巴胺能神经元变性或损伤的神经变性病症或神经元疾病的方法。在另一个实施方案中,本发明公开涉及通过施用或移植治疗有效量的来源于多能干细胞,优选人多能干细胞的 5-羟色胺能神经元来治疗特征在于 5-羟色胺能神经元变性或损伤的神经变性病症或神经元疾病的方法。优选地,通过将治疗有效量的本发明公开的多能干细胞和分化的神经细胞植入患者体内对罹患神经变性病症或神经元疾病的人类患者进行治疗。这里使用的细胞的“治疗有效量”是指足以阻止或改善试验对象体内由分化的神经细胞,例如成熟神经元(例如多巴胺能和 5-羟色胺能神经元),星形胶质细胞和少突胶质细胞丧失,损伤或变性所产生的生理效应的量。

[0098] 所使用的细胞的治疗有效量取决于个体的需要,个体的年龄,生理条件,健康状况,所需治疗效果,所治疗的靶组织区域的大小,病理程度和选择的递送路径。例如,与较小的靶区域相比,影响脑中较大区域的病症的治疗可能需要更大量细胞来获得治疗效果。细胞还可以通过低细胞剂量的多个小移植物而被施用于给定靶组织内一个以上的位点。本发明公开的细胞可以在移植前完全分散,例如形成单细胞悬浮液,或在移植前几乎完全分散,例如形成小的细胞聚集物。细胞可以用允许其移植或迁移到预定组织位点并使功能不足区域重建或再生的方式进行施用。

[0099] 可施用以产生治疗效果的细胞的适宜范围可以是大约 100 到大约 1,000,000 个神经元,优选大约 500 到大约 500,000 个神经元或大约 1000 到大约 100,000 个神经元。给个体施用的神经细胞的治疗浓度范围还可以是大约 10、100、500、1000、5000、10,000、15,000、20,000、25,000、30,000、35,000、40,000、45,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、150,000、200,000、250,000、300,000、350,000、400,000、450,000 到大约 500,000 个细胞/ μ l 药学上可接受的载体。载体中细胞的浓度范围包括例如 100–50,000 细胞/ μ l, 1000–10,000 细胞/ μ l, 5000–25,000 细胞/ μ l, 15,000–45,000 细胞/ μ l, 20,000–50,000 细胞/ μ l, 55,000–200,000 细胞/ μ l, 100,000–40,000 细胞/ μ l, 150,000–50,000 细胞/ μ l 等。植入移植位点的细胞数量也将影响治疗效果。

[0100] 对于治疗应用,通常优选基本上不含有任何未分化多能干细胞的前体细胞或分化的神经细胞群。从治疗药剂中去除多能干细胞的一个策略是用含有在未分化细胞中优先表达的基因的载体转染细胞,所述表达可选择去除多能干细胞。在未分化细胞中优先表达的适宜启动子是端粒酶逆转录酶(TERT)启动子和 OCT-4 启动子。在载体中表达的基因例如可以是可裂解细胞的,例如毒素,或者可通过应用外部物质来选择除去这种基因。

[0101] 如此处所述的由多能干细胞产生多巴胺能神经元和 5-羟色胺能神经元的能力对于多种神经变性病症和神经元疾病的移植治疗具有很大的临床相关性。例如,可以用多巴胺能神经元治疗特征在于姿势反射,运动和奖赏相关行为的调节出现异常的神经变性病症和神经元疾病,例如帕金森氏病,精神分裂症和药物成瘾性,以及因为外伤或其他导致类帕金森症状,例如静止性震颤,强直,运动不能和姿势异常如运动不能,不渴症,吞咽不能和感觉忽视的疾病引起的病变。另外可以用 5-羟色胺能神经元来治疗特征在于食物摄取,激素分泌,应激反应,疼痛和免疫功能,性欲活动,心血管功能和温度的调节存在异常的神经变性病症和神经元疾病,例如各种精神的,神经的或其他的疾病,如精神抑郁,自杀倾向,暴力攻击行为,强迫行为,厌食症/食欲过剩和精神分裂症。

[0102] 在另一个实施方案中,本发明公开涉及同时施用一种或多种神经元存活因子和本

发明的源于多能干细胞的神经祖细胞及分化的神经细胞来治疗神经变性病或神经元疾病。可以在施用所需细胞之前,或与之联合,组合或在施用所需细胞之后施用神经元存活因子。此处使用的“神经元存活因子”是指在接触神经元(体外或体内)后能使神经元的存活时间超过这种因子不存在时神经元的存活时间的任何物质。可以在本发明治疗实施方案中使用的神经元存活因子包括但不限于神经胶质细胞衍生神经营养因子(GDNF),神经生长因子(NGF),睫状神经营养因子(CNTF),脑衍生神经营养因子(BDNF),神经营养蛋白3(NT-3),神经营养蛋白4(NT-4),FGF,IL-1 β ,TNF α ,胰岛素样生长因子(IGF-1,IGF-2)和转化生长因子 β (TGF- β 1)。

[0103] GDNF 已知具有对胚胎中脑腹侧多巴胺能神经元的体外营养作用(Lin et al., 1993, Science 260:1130-1132; Lin et al., 1994, J. Neurochem. 63:758-768)。重组人 GDNF 也被证明可在体内诱导多巴胺能神经元纤维的萌发(Hudson et al., 1993, Soc. Neurosci. Absir. 19:652),增加大鼠黑质中多巴胺的转换(Miller et al., 1994, Soc. Neurosci. Abstr. 20:535-7),保护神经元抵抗 6-OHDA 病变,在眼中可以增加大鼠胎儿黑质组织移植物的生长和纤维形成(Stromberg et al., 1993, Exp. Neurol. 124:401-412)。BDNF 是周围感觉神经元,多巴胺能神经元,视网膜神经节的营养因子(Henderson et al., 1993, Restor. Neurol. Neurosci. 5:15-28),已经显示出其在体外和体内都能够防止正常发生的细胞死亡(Hofer and Barde, 1988, Nature 331:161-262)。

[0104] 这里使用的术语“治疗”或“用来治疗”指治疗性处理和预防性或防止性的措施。因此,需要治疗的对象包括那些已经患有神经变性病或神经元疾病的个体,以及那些需要预防神经变性病和神经元疾病的个体。本发明公开的方法可以用来治疗任何需要治疗的哺乳动物,包括但不限于人类,灵长类动物,驯养的动物,农场动物,宠物或运动动物,例如狗,马,猫,绵羊,猪,牛等。“病症”指能够从使用本发明公开的神经祖细胞,分化的神经细胞,或这两种类型的细胞进行治疗中获得益处的任何状态。能够从多巴胺能神经元移植中获得益处的病症的实例是那些与异常姿势反射,运动和奖赏相关行为相关的状态,例如帕金森氏病,精神分裂症和药物成瘾。能够从 5-羟色胺能神经元移植中获得益处的病症的实例是那些具有意识,唤起,行为和食物摄取异常的特征的状态,包括但不限于攻击,抑郁(包括自杀行为),精神分裂症,厌食症/食欲过剩。能够从使用本发明公开的细胞进行治疗中获得益处的其它病症有阿尔茨海默氏病,亨廷顿舞蹈病和 Hirschsprung 氏病。

[0105] 本发明公开的方法可以通过直接移植本发明公开的神经祖细胞或分化的神经细胞到病变区域方便地进行实施。神经元移植和细胞培养的方法是本领域技术人员众所周知的,例如美国专利 No. 5,514,552; Yurek and Sladek, 1990, Annu. Rev. Neurosci. 13:415-440; Rosenthal, 1998, Neuron 20:169-172; Vescovi et al., 1999, J. Neurotrauma 16(8):689-93; Vescovi et al., 1999, Exp. Neuro. 156(1):71-83; Brustle et al., 1999, Science 285:754-56; 各文件均被具体地引入此处作为参考。在一个实施方案中,本发明公开的多巴胺能神经元被移植到帕金森氏病患者的黑质或纹状体内。可以单独递送细胞或其他因子,例如神经元存活因子一起递送细胞,也可以和药学上可接受的载体一起递送细胞。比较理想的情况是这种载体能够增强细胞的稳定性和递送性质。

[0106] 本发明公开还提供了包含可通过使用合适载体,例如脂质体,微粒或微囊进行递送的细胞的药物组合物。本发明公开的细胞还可用包含等渗赋形剂的药物组合物的形式

来提供,和在对于人类给药而言充分无菌的条件下进行制备。细胞组合物的医学制剂的一般原则可见于 Cell Therapy :Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, G. Morstyn&W. Sheridan eds, Cambridge University Press,1996, and Hema topoietic StemCell Therapy, E. Ball, J. Lister&P. Law, Churchill Livingstone, 2000, 将其具体地引入此处作为参考。另外,可能需要将包含神经元存活因子的药物组合物局部施用于需要治疗的区域,其可通过,例如手术中的局部输注,注射,使用导管的方式或植入方式实现,其中所述植入物可以是包括膜,例如硅橡胶膜或纤维的多孔的,无细孔的或凝胶状物质。

[0107] 可以用基本上均质,接近均质或异质的细胞群形式将本发明公开的神经祖细胞或分化的神经细胞移植到个体中。基本上均质的细胞群包含大于 75%,更优选大于 90%,最优选大于 95%-99% 的单一细胞类型,例如多巴胺能神经元或 5-羟色胺能神经元。异质细胞群由混合在一个细胞群中的两种或多种细胞类型,例如多巴胺能神经元,5-羟色胺能神经元,施万细胞,少突胶质细胞,星形胶质细胞, GABA 神经元和神经胶质细胞组成。细胞还可以采用本领域技术人员众所周知的方法进行遗传学改变以使其在脑,中枢神经系统,周围神经系统或其他组织的损伤区域内表达或释放营养因子,生长因子,神经元存活因子或其他治疗性化合物。使用启动子和细胞类型的组合以表达蛋白是分子生物学领域的技术人员众所周知的,例如参见 Sambrook, et al. 1989, Molecular Cloning :A Laboratory Manual 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 将其具体地引入此处作为参考。

[0108] 为了实现在本发明公开的神经祖细胞和分化的神经细胞中表达营养因子,生长因子,神经元存活因子或其他的治疗性化合物,可从多种来源得到适宜的调控元件,并且本领域普通技术人员可很容易地对其进行选择。调控元件的实例包括转录启动子,增强子, RNA 聚合酶结合序列,以及核糖体结合序列,包括翻译起始信号。也可以将其他附加遗传元件,例如选择性标记整合到重组分子中。可以使用体外递送载体或体内技术将重组分子导入多能干细胞,或来源于多能干细胞的神经祖细胞或分化的神经细胞中。递送技术的实例包括逆转录病毒载体,腺病毒载体, DNA 病毒载体,脂质体,物理技术例如显微注射,和借助电穿孔或磷酸钙沉淀的转染,或本领域中已知用于转移以生成重组细胞的其他方法。可以将遗传学改变的细胞包裹在微球中并移植到病变或损伤组织内或其附近。所使用的方法步骤是本领域技术人员众所周知的,可见于例如 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, New York, N. Y., 1997, 引入此处作为参考。

[0109] 从使用帕金森氏综合征的各种动物模型作为胚胎神经细胞或旁神经元组织植入到脑损伤区域的接受体的基础科学研究中发展了涉及对罹患帕金森氏病患者进行神经元移植的临床试验。采用胎儿多巴胺能神经细胞移植物的动物试验提供了鼓舞性结果,即这种移植物能够逆转多巴胺能缺陷,并恢复黑质纹状体多巴胺能系统实验性损伤的动物的运动功能。例如,取自 14-16 日龄胚胎的鼠中脑细胞比取自较晚妊娠期供体的细胞更好地作为自体移植物或异体移植物用于移植中而不进行免疫抑制治疗 (Yurek and Sladek, 1990, Annu. Rev. Neurosci. 13 :415-440)。令人感兴趣地是,这些年龄与多巴胺能神经元经历其最终细胞分裂的胎龄相对应 (Lauder and Bloom, 1974, J. Comp. Neurol. 155 :469-82)。还可以将胚胎中脑组织的固体移植物分散成细胞悬液用于移植。但是,这种细胞悬液的一般存

活率限于移植的多巴胺能细胞的大约 10% (Brudinet al., 1987, Ann. N. Y. Acad. Sci. 495 : 473-96)。因为胚胎中脑组织不是纯多巴胺能细胞来源 (总存活细胞中仅大约 0.1-1.0% 的为存活的多巴胺能细胞), 任何分散的中脑细胞移植物优选包含最少 100,000 到 150,000 个活细胞以便有效弥补多巴胺能损失。

[0110] 优选地, 本发明公开的细胞移植治疗也包括某些用于移植手术的储藏和保存神经祖细胞和分化的神经细胞的方法, 例如通过冷冻保存的长期储存, 或在保存培养基中短期储存。冷冻保存的胚胎中脑组织已成功地储存达 70 天并作为自体移植物移植至啮齿动物 (Collier et al., Progress in Brain Research, Vol. 78, New York, Elsevier (1988), pp. 631-36, 将其具体地引入此处作为参考) 和灵长类动物 (Collier et al., 1987, Brain Res. 436 : 363-66, 将其具体地引入此处作为参考) 中。胚胎中脑细胞在冷冻保存后仍能成功培养也已被证明。中脑组织也可以在 4°C 于保存培养基中短期储存 (2-5 天), 并随后以存活移植物体积与用于新鲜组织的体积相似的方法进行移植 (Sauer et al., 1989, Restor. Neurol. Neurosci. (Suppl. : 3. sup. rd Int. Symp. Neural Tranplan.) : 56, 将其具体地引入此处作为参考)。

[0111] 移植物的放置和移植物使纹状体重新获得神经支配的程度都是中脑纹状体多巴胺能系统功能恢复的重要因素。在单侧去除多巴胺能神经支配的动物中, 已经显示皮层中放置的多巴胺能移植物能够减少运动不对称, 但对感觉疏忽几乎没有影响 (Bjorklund et al., 1980, Brain Res. 199 : 307-33; Dunnett et al., 1981, Brain Res. 215 : 147-61)。相反, 在双侧去除多巴胺能神经支配的动物中, 放置在侧面纹状体附近的黑质移植物能有效恢复感觉损伤 (Dunnett et al., 1983, Acta Physiol. Scan. Suppl. 522 : 39-47)。而且, 在双侧受损的动物中仅当多巴胺能移植物使伏核重新获得神经支配时才能够观察到运动不能的逆转 (Nadaud et al., 1984, Brain Res. 304 : 137-41)。

[0112] 多巴胺能移植物的移植位点最常见于室区附近 (因为这些区域中良好的脑脊液 (CSF) 环境可提供移植物存活的条件), 但帕金森氏病中壳核内多巴胺能神经元变性的程度比尾状核内显著。壳核内多巴胺水平常比尾状核中的低 10-15% (Bemhiemer et al., J. Neurol. Sci. 20 : 415-55; Nyberg et al., 1983, Neurochem. Pathol. 1 : 93-202)。另外, 壳核尾部 (caudal putamen) 多巴胺能神经元的衰竭比壳核喙部 (rostral putamen) 更严重 (Kish et al., 1986, Ann. Neurol. 20 : 26-31)。在这两个纹状体部件 (尾状核和壳核) 中, 壳核通过皮质 - 丘脑 - 壳核路径接受大部分的运动输入 (DeLong & Georgopoulos, 1983, Handbook of Physiology, Section I : The Nervous System, Vol. 2, ed. Brookhard, Mountcastle, Geiger, pp. 1017-61, Bethesda, Md. : Am. Physiol. Soc.)。因此, 在靶向与帕金森氏病相关的运动障碍时壳核可能是更合适的多巴胺能移植物的植入位点。

[0113] 这里描述的神经祖细胞和分化的神经细胞还可用于筛查影响这些细胞的表型或特征的化合物例如药物化合物, 溶剂, 小分子, 肽或多核苷酸, 以及环境因子例如培养条件或操作。此外, 这些细胞可用于评估候选生长因子或分化因子。例如, 可以将候选药物化合物单独或和其他药物一起加入到神经祖细胞或成熟神经元中, 对细胞形态, 表型或功能活性的任何变化进行评测和评估。

[0114] 另外, 这里描述的神经祖细胞和分化的神经细胞可在分化的任何阶段作进一步修饰。例如, 可以对这些细胞进行遗传修饰使其具有单个或多个暂时或稳定的遗传修饰。这

些细胞的遗传改变可以是多种原因所需的,例如为了提供用于基因治疗的修饰的细胞或用于移植或植入的替换组织。本发明公开的细胞可通过导入本领域技术人员众所周知的、在神经特异性启动子的控制下表达选择性标志物的载体的方法进行遗传修饰。这些细胞还可任何阶段进行修饰以表达某些可用于进一步纯化源于多能干细胞的分化细胞或者用来诱导细胞分化为特定细胞谱系的标志物或基因。可以修饰这些细胞以减少或防止移植后免疫排斥反应,即与所需接受者的组织相容性。

[0115] 为了提高使用本发明公开所制备的细胞的复制能力,可通过用合适的载体遗传改变这些细胞使其表达端粒酶催化成分(TERT)而将其端粒化。所用的TERT序列可以来源于人或小鼠(WO 98/14592和WO 99/27113,将其具体地引入此处作为参考),以及其他哺乳动物种类。或者,可以增加内源性TERT基因的转录。用于遗传修饰细胞的方法是本领域技术人员众所周知的。这些方法使用了多种分子生物学技术,其中多种技术一般地描述于Sambrook, et al. 1989, Molecular Cloning :A Laboratory Manual 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 将其具体地引入此处作为参考。

[0116] * * *

[0117] 以下实施例用以说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应能理解以下实施例中公开的技术代表本发明人发现的在实施发明时功能优良的技术,因此可认为其构成优选的实施模式。然而本领域技术人员应能理解(在本发明公开的启示下)在不背离本发明精神和范围的情况下可以对所公开的具体实施方案作出多种改变,并仍可以获得相似或类似的结果。

[0118] 实施例 1

[0119] 在以下实施例中,本发明的申请人证明了可以从人胚胎干细胞衍生功能性多巴胺能和5-羟色胺能神经元。

[0120] 1) 人胚胎干细胞:

[0121] 首先,从人胚泡的内细胞团分离人ES细胞。在个体患者同意试验性使用胚泡后从多余的人胚泡中获取人多能ES细胞。使用美国专利序号10/226,711(引入此处作为参考)中公开的新激光消融技术从人胚泡的内细胞团细胞中获取此处使用的人ES细胞系。简言之,分离具有透明带,滋养外胚层和内细胞团的人胚泡,然后使用1.48 μm非触式二极管激光器产生穿透人胚泡透明带和滋养外胚层的孔。随后,用经该孔导入的抽吸管抽吸分离出内细胞团中的细胞。随后在0.1%凝胶化培养皿上于ES培养基中用丝裂霉素C处理的小鼠饲养细胞培养这些细胞,形成内细胞团衍生的细胞团。ES细胞培养基的细成为添加了10-20% ES细胞优等胎牛血清(FCS)(Hyclone)或血清替代品Knockout血清(Gibco),1% MEM非必需氨基酸溶液,2mL-谷氨酰胺,0.1mM β-巯基乙醇,4 ng/ml碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)(Sigma),50U/ml青霉素,50 μg/ml链霉素的Dulbecco's改良Eagles培养基(DMEM)或Knockout DMEM(Gibco)。这些内细胞团衍生的细胞团被分散,再次接种在ES培养基中的小鼠饲养细胞层上,用来制备人ES细胞系。

[0122] 衍生的人ES细胞在形态上具有高核/胞质比例,以细胞表面标志物,例如SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, OCT-4,碱性磷酸酶,端粒末端转移酶,核型,CD-30, cripto-1, GDNF, c-kit 和 CD-90 进行特征描述。

[0123] 2) 培养和扩增人胚胎干细胞:

[0124] 在标准生长条件下培养和增殖来源于冷冻贮存物的人 ES 细胞。将来源于冷冻贮存物瓶中的未分化人 ES 细胞再次悬浮在含有 LIF 的 ES 培养基中。ES 培养基的组成为添加了 20% ES 细胞优等胎牛血清 (FCS) (Hyclone), 1% 非必需氨基酸 (NEAA) 溶液, 2mM L-谷氨酰胺, 0.1mM β -巯基乙醇, 50U/ml 青霉素和 1000U/ml LIF 的 Dulbecco's 改良 Eagles 培养基 (DMEM)。使细胞形成沉淀并用 ES 培养基将其接种于凝胶包被的塑料培养皿上的小鼠饲养细胞层上。根据 Thomson et al., 1998, Science 282:1145-1147; Shamblott et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:13726-13731; 和 Reubinoff et al., 2000, Nature Biotech. 18:399-403 中描述的方法, 此 ES 培养基的组成为添加了 10-20% FCS, 2mM L-谷氨酰胺, 1% MEM 非必需氨基酸溶液, 0.1mM β -巯基乙醇, 50U/ml 青霉素, 50 μ g/ml 链霉素, 1000U/ml LIF 和 4 ng/ml bFGF 的高葡萄糖 DMEM。

[0125] 通过培养和定期传代 ES 细胞以抑制其分化来扩增人 ES 细胞。先用不含 Ca^{++} 和 Mg^{++} 的 Dulbecco's 磷酸盐缓冲液盐水溶液洗涤细胞 10 秒钟, 接着用 0.05% 胰蛋白酶处理细胞 5 秒钟来传代 ES 细胞。5 秒钟之后, 通过加入含有血清的 ES 培养基抑制胰蛋白酶的活性。随后, 刮下细胞并将其分散成小团。然后将细胞团接种于两个涂有 0.1% 凝胶并用饲养细胞包被的 100mm 培养皿上置于含有 LIF 和 bFGF 的如上所述 ES 培养基中。扩增细胞 4-6 天。

[0126] 3) 胚状体的形成:

[0127] 在繁殖和扩增未分化的人 ES 细胞后, 将其培养以形成为胚状体。首先, 用 0.05% 胰蛋白酶-EDTA 解离 ES 细胞, 接着刮下细胞并将细胞分散成小团。然后以大约 1×10^5 细胞/ml 的密度将这些细胞团接种于无饲养细胞的细菌培养皿上。所使用的细菌培养皿具有防止附着的不粘着表面, 由此刺激 ES 细胞的分化和胚状体的形成。在不含 LIF 和 bFGF 的 ES 培养基中悬浮培养这些细胞。用来培养这些细胞的 ES 培养基含有添加了 10-20% FCS 或 Knockout 血清替代物, 以及其他的添加因子, 例如 β -巯基乙醇, L-谷氨酰胺和抗生素的高葡萄糖 DMEM 或 Knockout DMEM。ES 培养基中未加入 bFGF。使胚状体生长 4-8 天。期间, 通过沉降法每 2 天更换一次 ES 培养基。通过将聚集物的悬液转移到离心管中, 允许聚集物沉降到管的底部, 吸出培养基, 并将其替换为新鲜培养基来实施该沉降法。然后将新鲜培养基中的聚集物返回培养皿。4-8 天结束时, 收集胚状体, 低速离心, 再次悬浮在 ES 细胞培养基中。然后将大约 20-30 个胚状体接种于用 0.1% 凝胶包被的组织培养皿的不含有 LIF 的 ES 培养基中, 孵育 24 小时。

[0128] 4) 选择和扩增巢蛋白阳性神经祖细胞:

[0129] 24 小时后, 通过用无血清已知成分的 ITSFn (选择巢蛋白) 培养基替换 ES 培养基来选择巢蛋白阳性细胞 (神经祖细胞)。ITSFn 培养基的组成为添加了生长因子胰岛素 (5-25 μ g/ml) (Sigma), 亚硒酸钠 (10-50nM) (Sigma), 转铁蛋白 (1-10 μ g/ml) (Gibco) 和纤连蛋白 (1-5 μ g/ml) 的 DMEM:F12 培养基 (Gibco)。这种培养基可筛选巢蛋白阳性细胞, 可实施 6-10 天, 通常 8-9 天, 每 2 天补充一次 ITSFn 培养基。在选择完成后, 采用免疫荧光技术针对巢蛋白表达而对神经祖细胞进行表征, 显示大约 95% 的细胞表达巢蛋白 (图 1A)。

[0130] 随后扩增巢蛋白阳性细胞并使用磁性细胞分选术 (MACS) 进行分选以富集神经细胞粘连分子 (NCAM) 阳性细胞。

[0131] 5) 采用磁性分选分选 NCAM 阳性细胞:

[0132] 随后,分离巢蛋白阳性细胞并实施扩增或用磁性细胞分选术(MACS)进行分选以富集神经细胞粘连分子(NCAM)阳性细胞。NCAM是一种神经元特异性表面标志物。为了使用MACS通过NCAM分选巢蛋白阳性细胞,首先通过0.05%胰蛋白酶-EDTA孵育细胞从组织培养皿中收获巢蛋白阳性细胞。然后,用PBS洗涤解离的活细胞,然后用抗表面标志物NCAM的抗体(Chemicon)染色30分钟。然后将细胞和MACS山羊抗兔IgG微珠(Miltenyi Biotec)一起孵育15分钟。在用PBS仔细洗涤后对细胞进行磁性分选。为了分选细胞,将磁性标记的细胞悬液(大约 2×10^8 个细胞)吸取至MACS MS分离柱(Miltenyi Biotec)上,让细胞流过柱子,收集流出液(阴性级分)。然后通过PBS洗脱来收集含有NCAM阳性细胞的阳性级分。

[0133] 在免疫分选之前,用FACS分析巢蛋白阳性细胞,大约50-60%的巢蛋白阳性细胞表达神经细胞表面标志物NCAM(图2A和2B)。在通过MACS免疫分选后,表达NCAM的存活巢蛋白阳性细胞群被富集至约80-85%(图3A和3B)。

[0134] 6) NCAM阳性神经祖细胞的扩增:

[0135] 通过首先用0.05%胰蛋白酶-EDTA离解细胞,和然后将细胞接种于含有扩增培养基的聚-L-鸟氨酸/层粘连蛋白包被的培养皿上来扩增分离的NCAM阳性细胞。以这种方式培养NCAM阳性细胞使得细胞在扩增培养基中可以更好地贴壁和增殖。扩增培养基包括DMEM:F12,胰岛素(10-100 μ g/ml),亚硒酸钠(10-50nM),转铁蛋白(1-10mg/ml),腐胺(50-200 μ M),黄体酮(5-40nM)和层粘连蛋白(10-50 μ g/ml)。此无血清扩增培养基也包含两种或多种生长因子,例如bFGF(10-50ng/ml),EGF(10-50ng/ml),BDNF(50-200ng/ml),FGF-8(50-200ng/ml)和/或SHH(200-400ng/ml)。扩增培养基中存在的这些多种因子促成了神经细胞百分比整体增高,而且能够进一步诱导这些中脑神经元前体细胞采取多巴胺能表型。每2天补充一次扩增培养基,使巢蛋白阳性、NCAM阳性细胞增殖6-10天(图1B)。

[0136] 在这些培养条件下,大约50-60%的细胞伸出了神经突起并且NCAM染色呈阳性,这证明了其形成神经元的能力(图3)。这些细胞还呈现出早期神经元标志物 β -微管蛋白的免疫反应性(图4B)。然后将这些神经祖细胞连续传代,申请人发现这些神经祖细胞可传代多达10次并仍保持分化成多巴胺能神经元的能力,而对细胞分化成定型成熟多巴胺能神经元的潜能无任何明显影响。

[0137] 7) 多巴胺能神经元的分化和成熟:

[0138] 体内多巴胺能神经元的发育依赖于细胞外信号分子的调节作用。这些分子激活具有谱系限制性表达的转录因子的级联。这些转录因子负责增加多巴胺能表型发育所涉及的一组特定基因的表达。为了促进使用上述方法制备的扩增的神经祖细胞形成有功能的多巴胺能神经元,首先从这些细胞中撤出生长因子bFGF和EGF。然后,通过在Neurobasal培养基中培养细胞30-50天,诱导神经祖细胞分化成多巴胺能神经元。Neurobasal培养基包括NeurobasalA培养基(Gibco),FCS(10-20%)(HYCLONE)和B27(2-10%)(Gibco),以及多种生长因子。这种培养基中包含的生长因子有白细胞介素-1 β (IL-1 β)(1-2 μ g/ml)(Sigma),抗坏血酸(50-150nM)(Sigma),N-乙酰半胱氨酸(50-150nM)(ICN),db-cAMP(500-1000 μ M)(Sigma),GDNF(1-5 μ g/ml)(Sigma),TGF- β 3(1-5 μ g/ml)(Sigma),Neurturin(100-500 μ g/ml)(Chemicon),BDNF(50-200ng/ml)(Sigma),FGF-8(50-200ng/ml)(R&D Systems)和/或SHH(200-400ng/ml)(R&D Systems)。Neurobasal培养基用

0.22 μm 的微孔注射过滤器进行无菌过滤。

[0139] 酪氨酸羟化酶 (TH) 是多巴胺合成的限速酶。特定谱系限制性生长因子能促进 TH 合成的诱导。将这些因子加入到培养基中导致较高百分比的表现多巴胺能表型的细胞。这些因子可以在神经元分化过程中的不同时间点加入, 参见表 1。IL-1 β (存在于 Neurobasal 培养基中) 似乎在神经祖细胞分化成多巴胺能神经元的过程中起重要作用。虽然不希望受限于任何特定的机制, 但 IL-1 β 似乎能够增加 TH 阳性神经元的数量, 以及这些细胞对培养基中信号分子的反应性。在进行组织培养的 30-50 天期间, 这些生长因子的应用与每 3 天换一次 Neurobasal 培养基相联合。

[0140] 下面的表 1 描述了神经祖细胞分化期间在不同时间加入到 Neurobasal 培养基中的生长因子组合:

[0141] 表 1: 神经祖细胞的分化条件

[0142]

用于分化的培养条件				
1-4 天	4-7 天	8-50 天	TH 阳性细胞 (%)	
Neurobasal 培养基, FCS, B27, IL-1 β	Neurobasal 培养基, FCS, B27, Shh, FGF-8, IL-1 β , db-cAMP, GDNF, BDNF	Neurobasal 培养基, FCS, B27, Shh, FGF-8, IL-1 β , db-cAMP, GDNF, BDNF, TGF- β 3, Neurturin	65%	
Neurobasal 培养基, FCS, B27, IL-1 β	Neurobasal 培养基, FCS, B27, Shh, FGF-8, IL-1 β , db-cAMP, GDNF, BDNF	Neurobasal 培养基, FCS, B27, Shh, FGF-8, IL-1 β , db-cAMP, GDNF, BDNF, TGF- β 3, Neurturin	55%	
Neurobasal 培养基, FCS, B27, IL-1 β	Neurobasal 培养基, FCS, B27, Shh, FGF-8, IL-1 β , db-cAMP, GDNF, BDNF, 抗坏 血酸	Neurobasal 培养基, SHH, FGF-8, FCS, B27, IL-1 β , db-cAMP, GDNF, BDNF, TGF- β 3, Neurturin, 抗坏 血酸	42%	
Neurobasal 培养基, FCS, B27, IL-1 β	Neurobasal 培养基, Shh, FGF-8, FCS, B27, IL-1 β , db- cAMP, GDNF, BDNF, N- 乙酰半 胱氨酸	Neurobasal 培养基, Shh, FGF-8, FCS, B27, IL-1 β , db-cAMP, GDNF, BDNF, TGF- β 3, Neurturin, N- 乙 酰半胱氨酸	64%	
Neurobasal 培养基, FCS, B27	Neurobasal 培养基, FCS, B27,	Neurobasal 培养基, FCS, B27,	20%	

[0143] 当使用 Neurobasal 培养基诱导 ES 细胞分化时, ES 细胞发展成多种神经元细胞类

型,包括多巴胺能神经元,5-羟色胺能神经元和少突胶质细胞(图5,6和7)。在标准培养条件下分化成多巴胺能神经元的细胞的百分比相对较低,而添加了如表1所示的生长因子的培养基导致产生的多巴胺能神经元的百分比增高。例如,超过60%的ES细胞分化成TH(多巴胺能神经元的特异性标志物)阳性的细胞。

[0144] 8) 分化神经元的表征

[0145] 通过细胞的整体形态学以及采用免疫荧光法确定的表型来评估根据本发明公开所制备的分化神经元细胞类型。采用本领域技术人员众所周知的标准方法,在神经祖细胞扩增阶段(NCAM阳性细胞的扩增),和多个其它分化时间点实施免疫荧光分析。首先,在预先用细胞外基质包被的2-孔室玻片(chamber slide)上生长分离的细胞,用PBS冲洗细胞,在室温下用4%低聚甲醛固定10分钟。然后,用含0.2% Triton X-100的PBS透化处理细胞5分钟,用1%牛血清白蛋白(BSA)/PBS封闭2小时,在4℃用一抗(在1% BSA/TBS中制备的抗体稀释液)孵育过夜。用下列一抗对细胞进行染色:早期神经元标志物 β 微管蛋白, NCAM, 神经丝, 晚期神经元标志物微管相关蛋白2(MAP-2), 神经元细胞表面抗原A2B5, Nurr-1, 酪氨酸羟化酶, 多巴胺转运蛋白DAT, 多巴胺 β -羟化酶(DBH), 星形胶质细胞标志物胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP), GABA, 少突胶质细胞, 5-羟色胺和突触小泡蛋白, 所有这些一抗均获自CHEMICON。最后,将细胞和FITC标记的二抗一起孵育。上述每一步骤完成后,均用PBS洗涤细胞三次。

[0146] 在荧光显微镜下观察室玻片对免疫阳性区域进行评价。这种免疫荧光分析证明大百分比的分化细胞具有神经元特异性标志物NCAM(图3), MAP-2(图4A)和 β -微管蛋白(图4B)的免疫反应性。这些关键抗原的表达随分化培养基中较高孵育次数而增加。免疫荧光分析也证明较低百分比的细胞表达5-羟色胺(图7),以及存在于星形胶质细胞中的非神经元标志物胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)和存在于少突胶质细胞中的GABA和谷氨酸(图6)。

[0147] 还通过采用抗TH的一抗(绿色)和分别抗MAP-2, DAT, Nurr-1, β -Tubulin的用FITC标记的二抗(德克萨斯红)双标记细胞,对分化细胞进行了分析(图8)。这种分析证明表达TH的MAP-2阳性细胞的比例较高。通过用40 $\times$ 物镜对随机选择的视野中每视野内TH阳性细胞和MAP-2阳性细胞进行计数,对多巴胺能神经元的细胞密度定量。计算出TH阳性细胞的百分比(图9)。TH阳性神经元也表达Nurr-1和DAT,但无TH和DBH的共同定位,这证实了细胞的多巴胺能表型。另外,通过用突触小泡蛋白免疫染色鉴定了突触的形成。

[0148] 免疫荧光分析还显示大约60%的分选NCAM阳性细胞表达TH,而大约30%表达5-羟色胺(图10)。另外,大约40%的巢蛋白阳性细胞呈TH染色阳性,大约30%的细胞呈5-羟色胺染色阳性,大约28%的细胞呈少突胶质细胞染色阳性(图11)。表3中显示了在分化的不同阶段使用的免疫标志物,其指示未分化和已分化ES细胞的表型特征。

[0149] 表3:未分化和已分化ES细胞的表型特征

[0150]

未分化ES集落	神经元细胞	多巴胺能神经元	胶质细胞

SSEA-1	NCAM	Nurr-1	A285
SSEA-3	β 微管蛋白	TH	GFAP
SSEA-4	神经丝	DAT	04
Tra-1-60	A2B5	DBH	
Tra-1-81	MAP-2		
Oct-4	5- 羟色胺		
GCTM-2	GABA		
CD-30	突触小泡蛋白		
cripto-1			
GCNF			
c-Kit			

[0151] 9) 基因表达谱

[0152] 还分析了在不同阶段收集的细胞的基因表达谱。从所公开方法的以下每一阶段收集细胞通过逆转录酶聚合酶链反应 (RT-PCR) 进行分析:未分化 ES 细胞,胚状体,巢蛋白阳性神经祖细胞,NCAM 阳性细胞和在 Neurobasal 培养基中分化 12,17,22,27 和 37 天后分离出的分化细胞。收集细胞后,使其形成沉淀,使用 RNeasy Qiagen 试剂盒从细胞沉淀中抽提细胞总 RNA。分离的 RNA 储存在 -20°C 。

[0153] 用 Moloney 白血病病毒 superscript II 逆转录酶和 Oligo(dT)₁₂₋₁₈ 从分离的总 RNA 合成 cDNA。通过该逆转录酶反应合成的 cDNA 用不同的特异引物对进行 PCR 扩增,以确定在收集的细胞中表达何种基因。在标准的 PCR 条件下,使用 cDNA 作为模板和铂 Taq 聚合酶实施这些 PCR 反应,所述 PCR 条件为本领域技术人员众所周知的。用来扩增 DNA 产物的一般循环参数如下:

[0154] 1. 94°C 变性模板 cDNA 30 秒;

[0155] 2. $55-65^{\circ}\text{C}$ 引物退火 1 分钟,这依赖于所使用的引物;和

[0156] 3. 72°C 孵育反应 1 分钟,重复步骤 1-3 (循环) 25-40 次。

[0157] 在 PCR 反应后,对产物和 DNA 大小梯实施 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。TH, D2RL, DBH, En-1, Nurr-1 和 β -微管蛋白的表达均采用表 4 中列出的引物通过 RT-PCR 进行分析。

[0158] 表 4:扩增多巴胺特异性基因的引物对

[0159]

基因	引物序列
TH(417bp)	TGT CAG AGC AGC CCG AGG TC (SEQ ID NO:1) CCA AGA GCA GCC CAT CAA AG (SEQ ID NO:2)
D2RL(404bp)	GCA GTC GAG CTT TCA GAG CC (SEQ ID NO:3) TCT GCG GCT CAT CGT CTT AAG (SEQ ID NO:4)
DBH(447bp)	CAC GTA CTG GTG CTA CAT TAA GGA GC (SEQ ID NO:5) AAT GGC CAT CAC TGG CGT GTA ACA CC (SEQ ID NO:6)
En-1(390bp)	TGG TCA AGA CTG ACT CAC AGC A (SEQ ID NO:7) TCT CGT CTT TGT CCT GAA CCG T (SEQ ID NO:8)
Nurr1(255bp)	TGA AGA GAG CGG AGA AGG AGA T (SEQ ID NO:9) TCT GGA GTT AAG AAA TCG GAG CT (SEQ ID NO:10)
β -微管蛋白(317bp)	GGA ACA TAG CCG TAA ACT GC (SEQ ID NO:11) TCA CTG TGC CTG AAC TTA CC (SEQ ID NO:12)

[0160] 通过 RT-PCR 进行的上述分析证明,在 ES 细胞的神经元分化后直至终末分化成多巴胺能神经元,观察到多巴胺能表型特异性基因 (TH) 的表达 (图 12)。如预期地,在所有细胞样品中均见到 β -微管蛋白 (遍在表达的基因),而 DBH 在任何细胞样品中都不表达。

[0161] 10) 反相 HPLC 进行多巴胺检测

[0162] 多巴胺能神经元的一个确定的特征是产生多巴胺。因此,通过使用反相

HPLC(RP-HPLC) 直接测定细胞内的多巴胺水平来评价源于胚胎干细胞的多巴胺能神经元产生多巴胺的功能活性。通过与紧靠每次实验前和后注入柱中的标准多巴胺溶液进行比较来确定每份样品中检测到的多巴胺浓度。

[0163] 首先,在所述方法的不同阶段收集细胞:未分化 ES 细胞,胚状体,巢蛋白阳性神经祖细胞,NCAM 阳性细胞和在 Neurobasal 培养基中分化 7, 22 和 37 天后分离出的分化细胞。在收集之前,首先通过加入含 56mMKCl 的 HBSS 对在 Neurobasal 培养基中分化的细胞刺激 15 分钟以诱导分泌多巴胺。用胰蛋白酶处理约 5×10^6 个细胞,通过离心得到沉淀物。然后在含有抗氧化剂 (0.2g/l 偏亚硫酸氢钠) 的冷 1N 高氯酸中超声处理细胞,4℃ 下 15,000rpm/分离心 20 分钟。收集上清液并保存于 -70℃ 用于随后通过 RP-HPLC 确定细胞内的多巴胺水平。测定细胞裂解物和培养上清液 (最后一次更换培养基后 48 小时) 中的多巴胺水平。培养上清液立即用 7.5% 正磷酸和偏亚硫酸氢钠稳定。

[0164] 来源于所公开方法早期阶段的细胞裂解物,例如未分化 ES 细胞,胚状体,巢蛋白阳性神经祖细胞和 NCAM 阳性细胞通过 RP-HPLC 分析发现不含任何可检测水平的多巴胺。但是,在 Neurobasal 培养基中分化第一周后,用 RP-HPLC 分析的所有细胞裂解物均含有多巴胺。随着细胞裂解物中多巴胺能神经元数量随时间在分化 Neurobasal 培养基中的增加和最终成熟,细胞内多巴胺水平显著增高。与未处理的培养物相比,在如图 13 所示时间点用生长因子处理过的细胞培养物中细胞内多巴胺水平甚至更高。在将细胞培养物和 N-甲基-4-苯基 1,2,3,6-四氢吡啶盐酸盐 (MPTP) (靶向多巴胺能神经元的神经毒素) 一起孵育后,显示出对这些细胞培养物产生多巴胺的进一步证实。在用 MPTP 孵育的细胞培养物中,通过 RP-HPLC 分析在细胞裂解物中没有检测到多巴胺。相反,用 56mM KCl 刺激的细胞培养物中释放到条件培养基中的多巴胺增加 (图 14)。将一组生长因子加入到分化 Neurobasal 培养基中也增加了细胞裂解物的细胞内多巴胺水平 (表 5)。

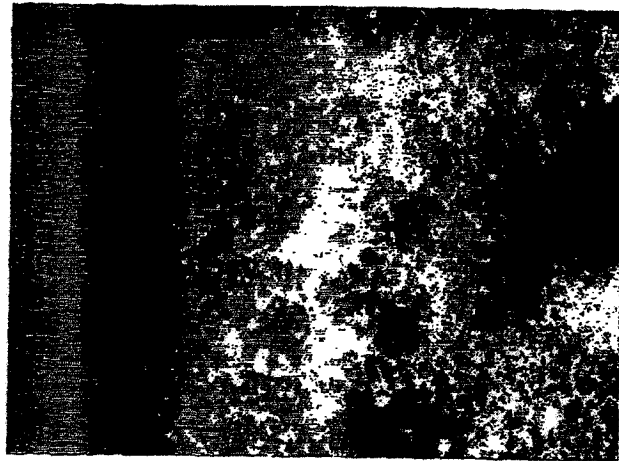
[0165] 表 5:通过 HPLC 确定的细胞裂解物中多巴胺浓度 ($\mu\text{g/ml}$)

[0166]

#	分化培养条件	分化天数		
		7 天	22 天	37 天
1	没有生长因子	0.5	1.3	1.1
2	加入生长因子	5.0	21.5	5.5
3	用 56mM KCl 刺激	5.5	22	7.2
4	N-乙酰半胱氨酸联合生长因子	4.93	20.9	9
5	用 56mM KCl 刺激	8.8	30.9	10
6	抗坏血酸联合生长因子	6.2	3.7	9.7
7	用 56mM KCl 刺激	6.9	5.5	10

[0167] 在本发明公开的启示下此处公开和要求保护的所有组合物和方法无需过度实验就可以制备和实施。虽然本发明的组合物和方法已通过优选实施方案的方式进行了描述,但对本领域技术人员来说显而易见地,在不背离本发明的概念,精神和范围的情况下,对此处描述的组合物和 / 或方法以及方法的步骤或步骤顺序可以实施改变。更具体地,显然可以用化学或生理学上相关联的某些试剂代替此处描述的试剂并同时取得相同或相似的结果。所有这种对本领域技术人员来说显而易见的类似替代或修饰都应被认为处于所附权利要求限定的本发明的精神,范围和概念之内。

A



B

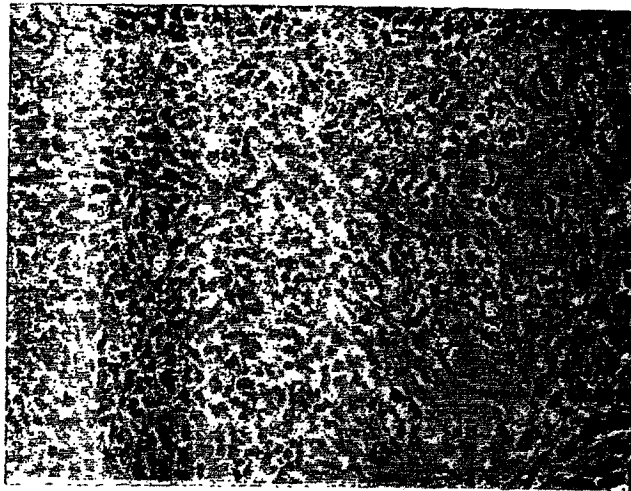


图1: A-巢蛋白阳性细胞
B-巢蛋白阳性细胞的扩增

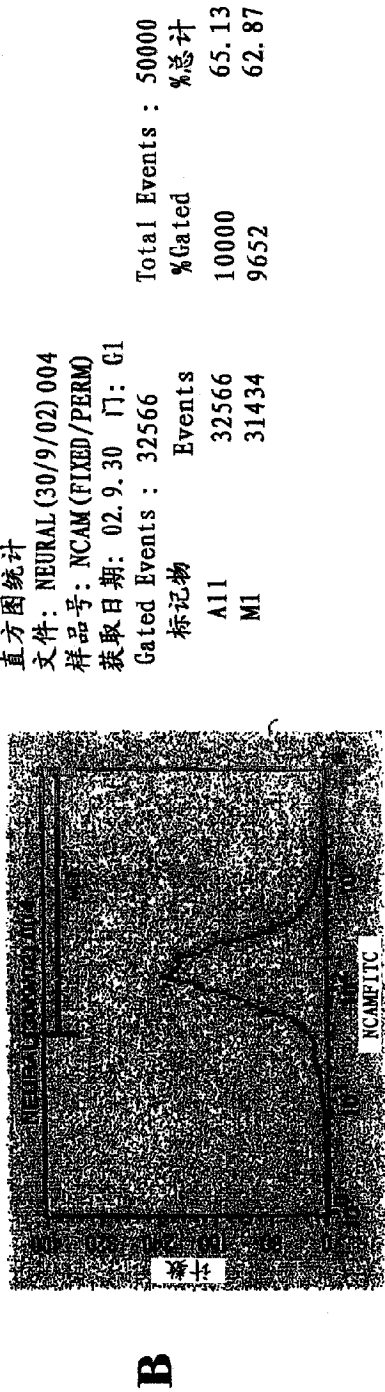
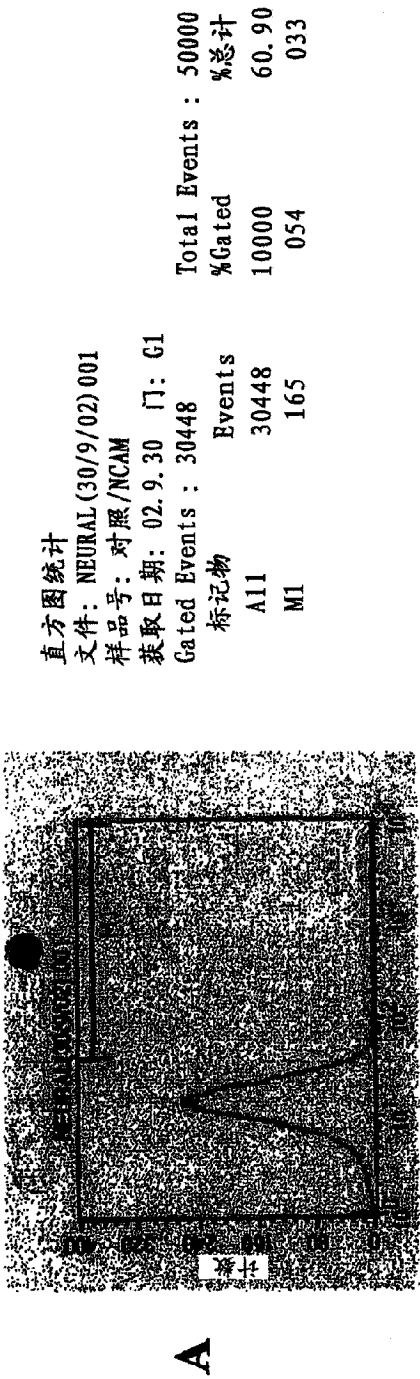


图2: FACS分析
A-对照 (未标记细胞)
B-NCAM阳性细胞

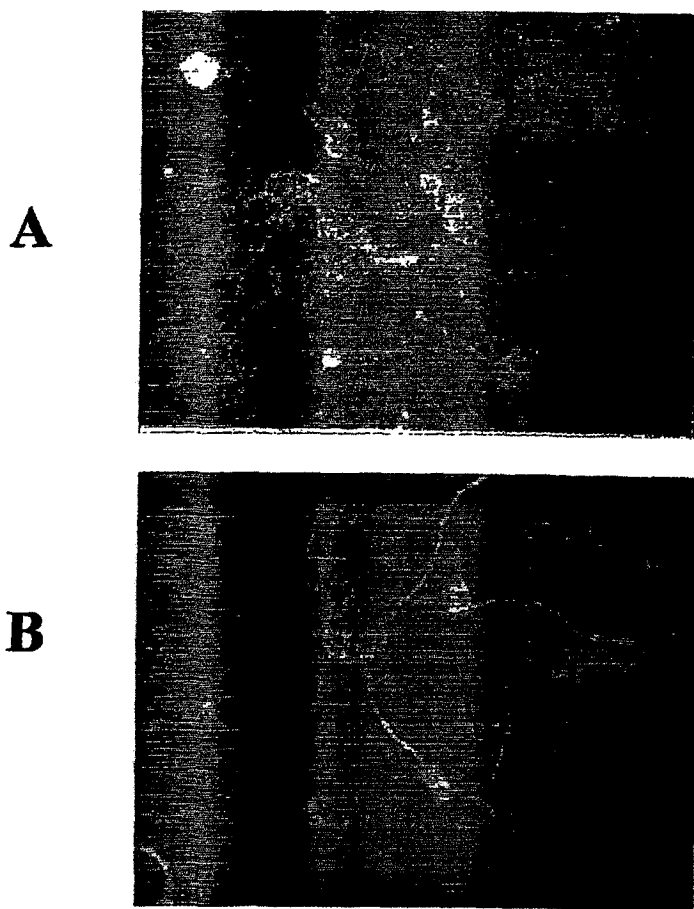


图3: NCAM阳性细胞的磁性分选
A, B-NCAM阳性细胞

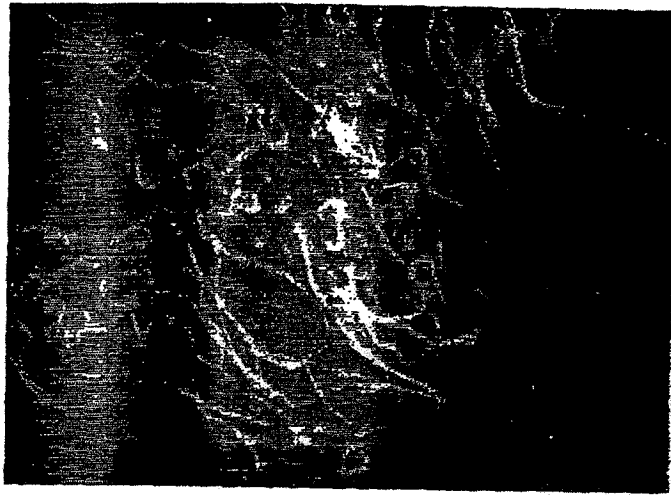


图4A: MAP-2阳性细胞

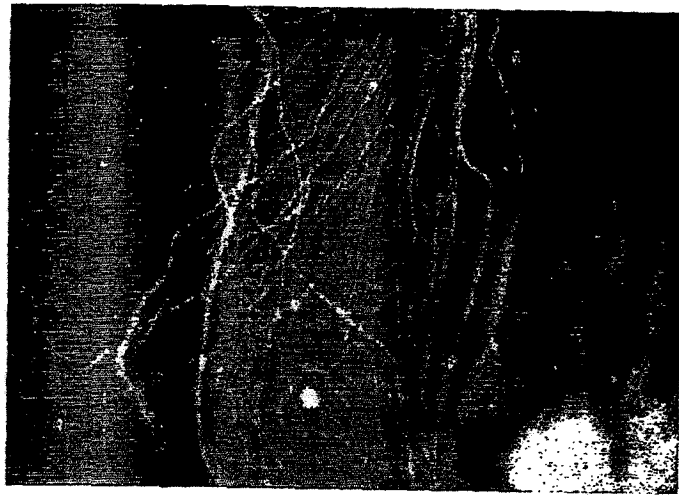


图4B: β 微管蛋白阳性细胞

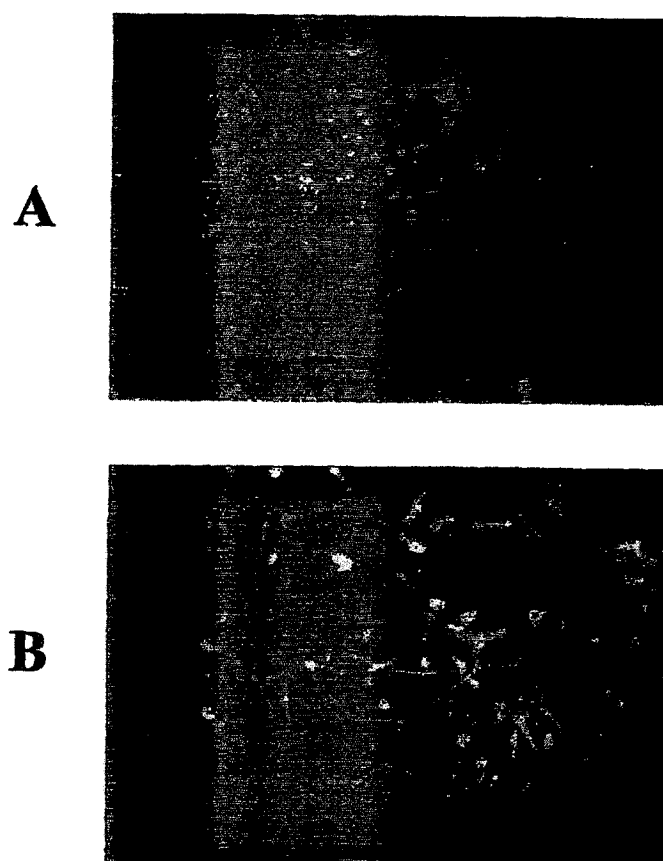


图5: 酪氨酸羟化酶阳性细胞



图6 少突胶质细胞

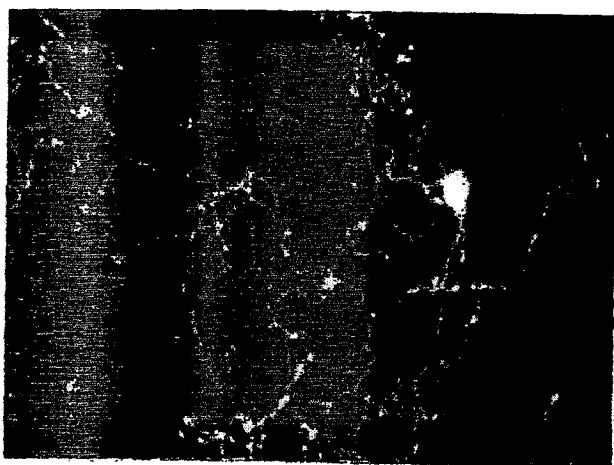


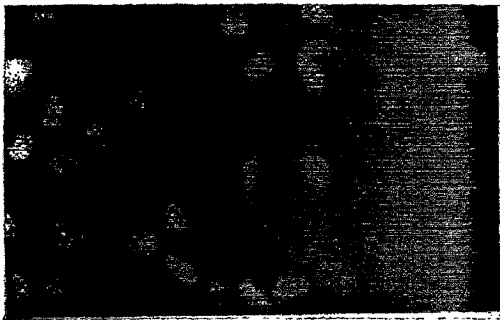
图7 5-羟色胺



TH/ β 微管蛋白



TH/MAP-2



TH/Nurr1



TH/DAT

图8 TH和其他神经抗原的共同定位

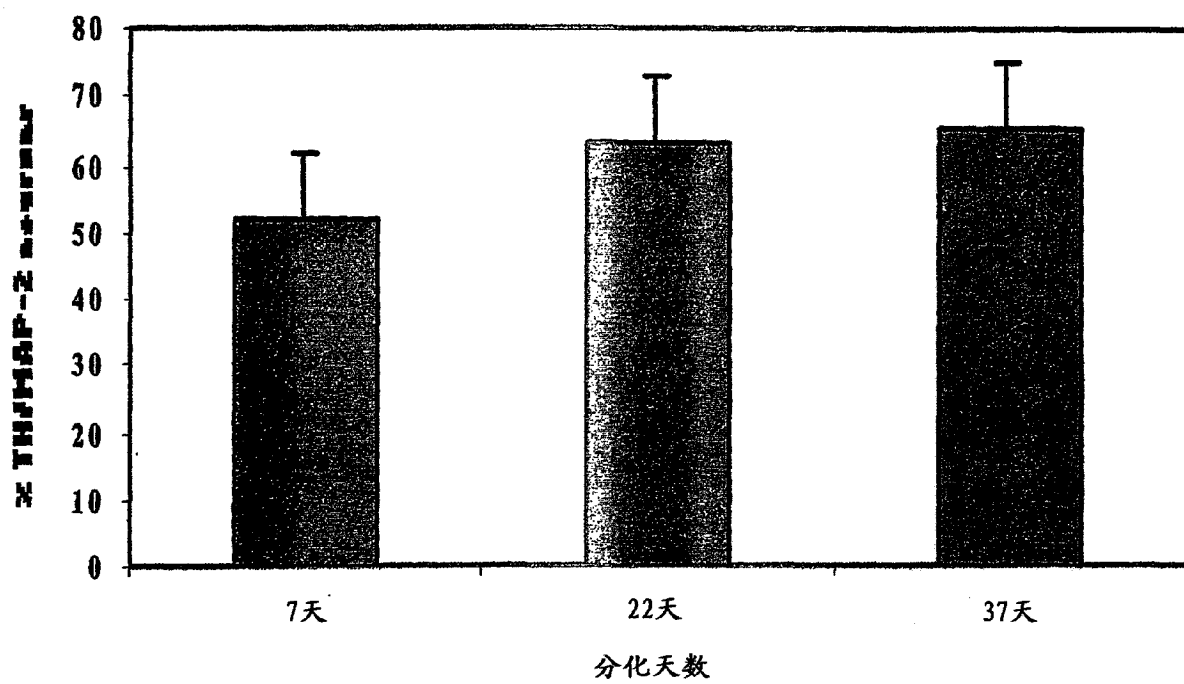


图9: TH阳性神经元的百分比

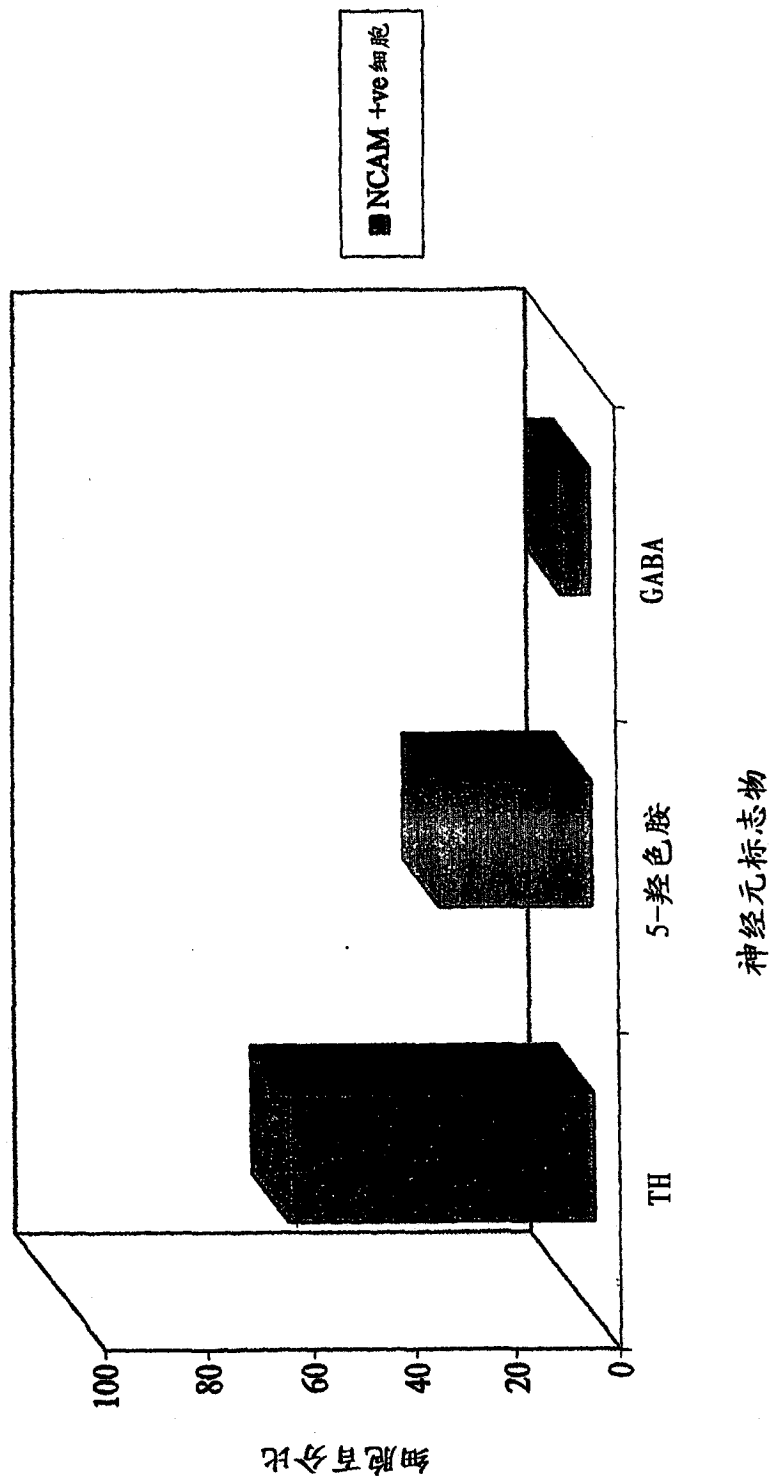


图10: 从NCAM富集细胞得到的神经元群的定量分析。发现酪氨酸羟化酶阳性细胞占60%

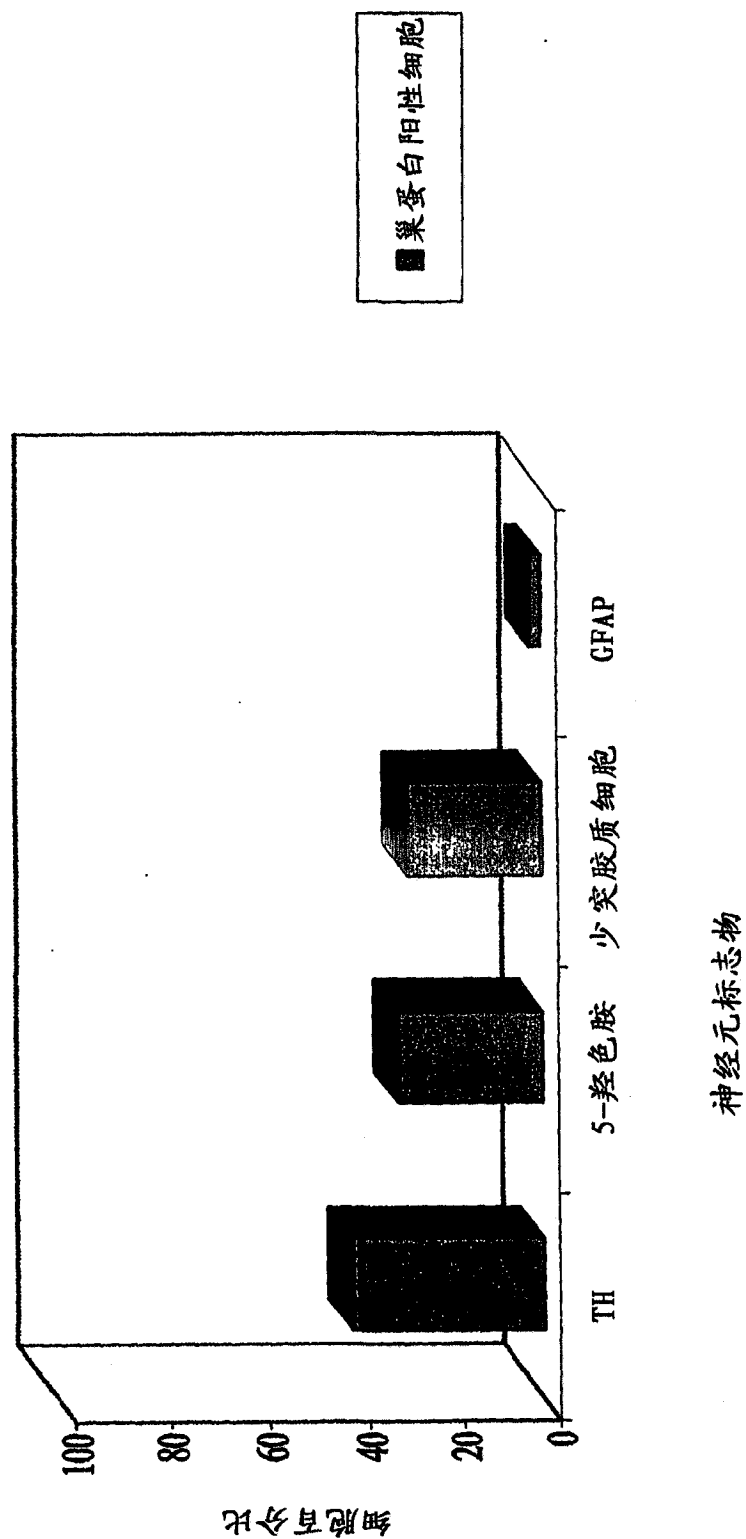


图11: 从巢蛋白阳性细胞扩增和分化得到的神经元群的定量分析。
发现酪氨酸羟化酶阳性细胞占40%

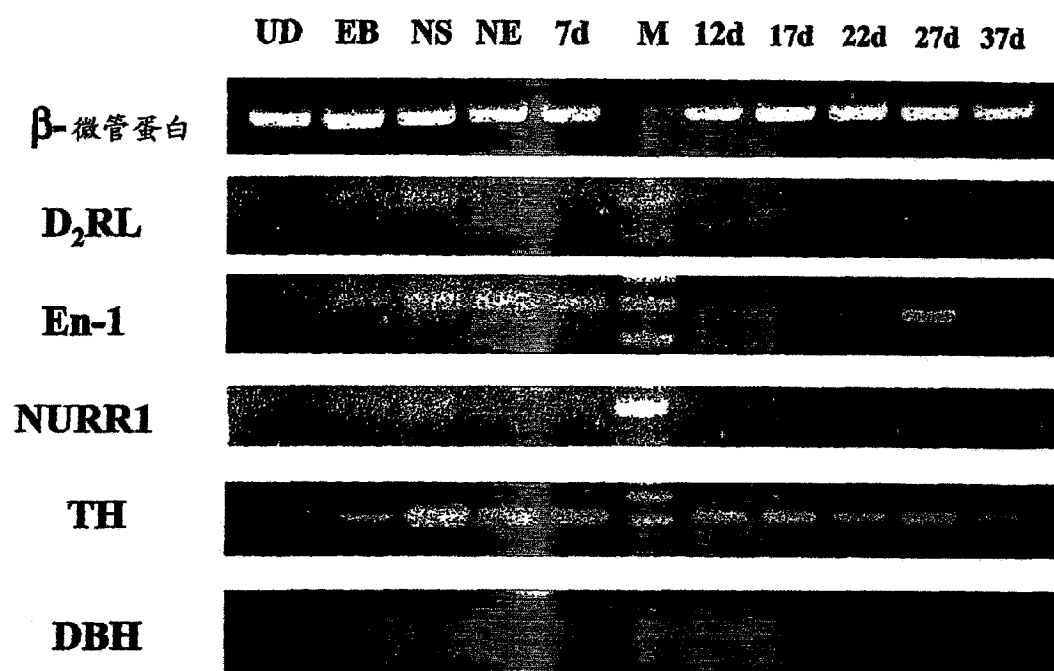


图12: ES衍生细胞中多巴胺特异性基因的表达

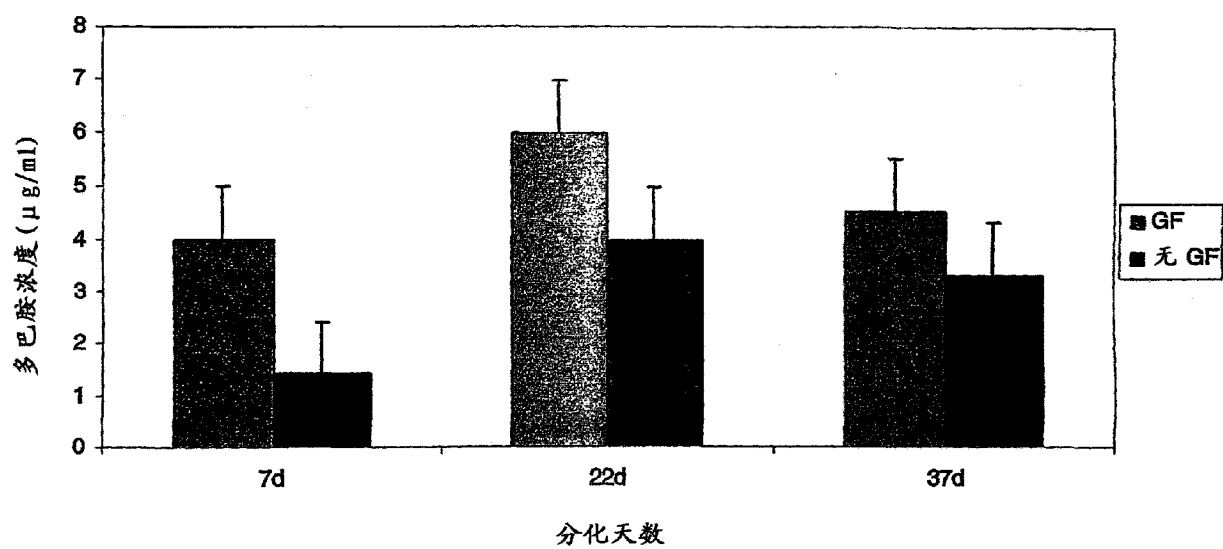


图13: 细胞裂解物的胞内多巴胺分析

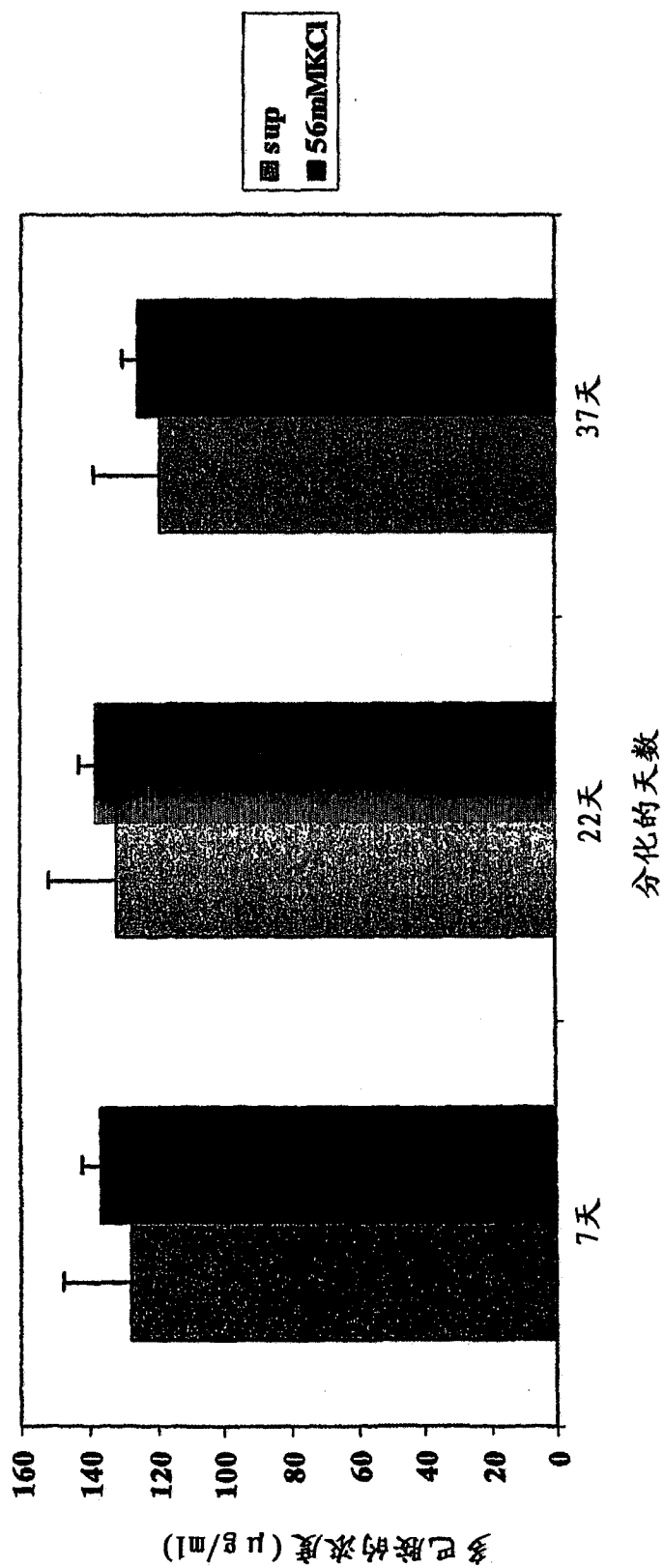


图14: 在条件培养基中氯化钾引发的多巴胺释放