



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109689859 A

(43)申请公布日 2019.04.26

(21)申请号 201880003455.5

(22)申请日 2018.05.18

(30)优先权数据

17173816.4 2017.05.31 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/063036 2018.05.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/219684 EN 2018.12.06

(71)申请人 普乐思尔活性生物科学有限公司

地址 德国海德堡

(72)发明人 哈根·维兰德

(74)专利代理机构 北京弘权知识产权代理事务
所(普通合伙) 11363

代理人 郭放 许伟群

(51)Int.Cl.

C12N 5/074(2006.01)

C12N 5/00(2006.01)

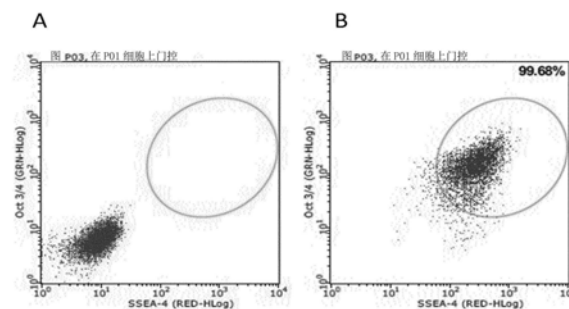
权利要求书2页 说明书23页 附图6页

(54)发明名称

用于亚全能干细胞的培养基

(57)摘要

本发明涉及一种用于真核细胞培养的化学成分确定的培养基,其在人亚全能干细胞培养中的应用,包括人亚全能干细胞和所述化学成分确定的培养基的细胞培养系统,以及用于增殖和/或维持人亚全能干细胞的试剂盒,所述化学成分确定的培养基包含水、至少一种碳源、一种或多种维生素、一种或多种盐、一种或多种脂肪酸、一种或多种缓冲组分、硒、具有抑制干细胞分化能力的TGF- β 超家族的至少一种多肽和酸性鞘磷脂酶功能性抑制剂(FIASMA)组的至少一种物质。



1. 一种用于真核细胞培养的化学成分确定的培养基,其包含水、至少一种碳源、一种或多种维生素、一种或多种盐、一种或多种脂肪酸、一种或多种缓冲组分、硒、具有抑制干细胞分化能力的TGF- β 超家族的至少一种多肽和酸性鞘磷脂酶功能性抑制剂(FIASMA)组的至少一种物质。

2. 根据权利要求1所述的化学成分确定的培养基,其中所述FIASMA选自曲米帕明、米帕林、异丙嗪和普罗吩胺,优选地,所述FIASMA是曲米帕明。

3. 根据权利要求1或2所述的化学成分确定的培养基,其中所述TGF- β 超家族的至少一种多肽选自活化素、nodal、肌肉生长抑制素和GDF3。

4. 根据权利要求3所述的化学成分确定的培养基,其中所述TGF- β 超家族的至少一种多肽选自活化素,优选所述多肽是活化素a。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的化学成分确定的培养基,其中所述化学成分确定的培养基完全不含人或动物来源的物质。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的化学成分确定的培养基,其中所述化学成分确定的培养基不含FGF-2、白蛋白和/或TGF- β 1中的任意组分。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的化学成分确定的培养基,其中所述至少一种FIASMA的浓度在0.1mg/L至10mg/L的范围内,优选在0.5mg/L至5mg/L的范围内。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的化学成分确定的培养基,其中所述TGF- β 超家族的至少一种多肽的浓度在0.2 μ g/L至200 μ g/L的范围内,优选在1 μ g/L至100 μ g/L的范围内,更优选在2 μ g/L至20 μ g/L的范围内。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的化学成分确定的培养基,其中所述一种或多种缓冲组分选自无机碳酸氢盐、无机磷酸盐或4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的化学成分确定的培养基,其中硒的浓度在1 μ g/L至100 μ g/L的范围内,优选在10 μ g/L至50 μ g/L的范围内。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的化学成分确定的培养基,还包含胰岛素和/或转铁蛋白,其中转铁蛋白的浓度在0.1mg/L至100mg/L的范围内,优选在1mg/L至50mg/L的范围内,更优选5mg/L至25mg/L的范围内,并且/或者胰岛素的浓度在0.1mg/L至100mg/L的范围内,优选在1mg/L至10mg/L的范围内。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的化学成分确定的培养基,还包含抗坏血酸,其中抗坏血酸的浓度在3mg/L至300mg/L的范围内,优选在10mg/L至100mg/L的范围内。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的化学成分确定的培养基的用途,其用于培养真核细胞,优选人亚全能干细胞,更优选人诱导亚全能干细胞。

14. 根据权利要求13所述的化学成分确定的培养基的用途,其中亚全能干细胞的培养按照贴壁细胞培养进行,优选地亚全能干细胞的培养在细胞外基质上进行,更优选在无异种成分的细胞外基质上进行。

15. 一种细胞培养系统,其包含人亚全能干细胞,优选人诱导亚全能干细胞,和根据权利要求1至12中任一项所述的化学成分确定的培养基。

16. 根据权利要求15所述的细胞培养系统,还包含细胞外基质,优选无异种成分的细胞外基质。

17. 一种用于细胞培养中增殖和/或维持人亚全能干细胞的试剂盒,包括:

- 第一组合物,包含细胞外基质制剂,优选无异种成分的细胞外基质制剂,
- 第二组合物,包含水、至少一种碳源、一种或多种维生素、一种或多种盐、一种或多种脂肪酸和一种或多种缓冲组分,
- 第三组合物,包含抗坏血酸、硒、胰岛素、转铁蛋白、活化素a和曲米帕明,以及
- 任选地,用于细胞解离的第四组合物。

用于亚全能干细胞的培养基

技术领域

[0001] 本发明涉及用于真核细胞培养的化学成分确定的培养基,该培养基用于增殖和/或维持亚全能干细胞的用途,包含亚全能干细胞和该化学成分确定的培养基的细胞培养系统,以及用于增殖和/或维持亚全能干细胞的试剂盒。

背景技术

[0002] 自我更新和分化成各种终末成熟细胞类型的能力是所有类型的干细胞共有的标志。这些机制在正常干细胞中受到严格控制,但在干细胞向终末分化成熟细胞的逐步多阶段分化过程中,潜力逐渐丧失 (Sanges等人,2010)。

[0003] 干细胞的效力指定其分化成不同细胞类型的潜力。干细胞可根据其效力进行分类,例如全能干细胞可以分化成所有细胞类型,包括胚胎细胞和胚外细胞。全能干细胞由卵子和精子细胞的融合而产生,并且可以构建完整的、有活力的生物体。相反,单能干细胞只能产生一种细胞类型,但其具有自我更新的特性,这使它们与非干细胞区别开来。可以分化成一些但不是所有细胞类型的干细胞类型是多能 (multipotent) 干细胞,其可以分化成许多种细胞类型,但仅限于密切相关的细胞家族的细胞类型。亚全能 (pluripotent, 多能) 干细胞可以分化成几乎所有细胞,但不能分化成胚外组织,例如胎盘 (Schöler, 2007)。

[0004] 亚全能干细胞 (PSC) 的两个最熟知的实例是胚胎干细胞 (ESC) 和诱导亚全能干细胞 (iPS) (Sanges等人,2010)。

[0005] 胚胎干细胞是第一种被分离并培养的亚全能干细胞,并且最初来源于1981年发育中的小鼠胚胎的内细胞团 (ICM) (Pauklin等人,2011)。这些细胞无限增殖并具有遗传稳定性。

[0006] 1998年人类胚胎干细胞的出现 (Thomson等人,1998) 将干细胞研究推向了新的高度。胚胎干细胞研究以惊人的速度征服了科学,带来细胞和发育生物学的重大进展 (Wobus等人,2005)。

[0007] 今天,来自不同物种的胚胎干细胞代表了多功能的生物学工具,例如,用于向各种细胞类型的定向分化,基因靶向和转基因动物的产生 (Wobus等人,2005)。重要的是,它们无限的自我更新能力与分化成具有治疗价值的细胞的能力相结合,为许多不可治疗的医学病症的治疗带来了新的希望。

[0008] 2006年在小鼠系统 (Takahashi和Yamanaka,2006) 和2007年在人类中 (Takahashi等人,2007; Yu等人,2007) 被首次描述, iPS细胞是通过将成熟的体细胞重编程 (reprogram) 为亚全能状态而人工生成的。该原理基于通过各种技术方法诱导不同的亚全能性 (pluripotency) 基因的表达 (González等人,2011)。这种简炼的和革命性的技术允许规避与胚胎衍生的hESC相关的伦理问题,并为产生患者特异性干细胞和疾病模型开辟了新的可能性。初看时, iPSC与ESC共有许多特性,例如:形态学、亚全能性和标记物表达。然而,详细的分析揭示了hESC与其人工生成的对应物之间的一些基本差异,例如体细胞阶段 (somatic stage) 期间的突变积累和表观遗传修饰/DNA甲基化 (“印记”) 的变异 (Puri和Nagy,2012)。

[0009] 重要的是要注意,多能细胞系也可以直接从外胚层细胞建立,或通过体外去分化成多能胚胎生殖细胞(EGC)而间接地从它们的单能后代即原始生殖细胞(PGC)建立。

[0010] 将成熟体细胞重编程为亚全能状态的另外但很少使用的技术是体细胞核移植(SCNT)和细胞融合(Sanges等人,2010)。SCNT通过将体细胞核转移到去核卵母细胞中来实现重编程过程。该技术产生功能完全的胚胎,并有时用于克隆(转基因)动物,例如,“多莉羊(Dolly the sheep)”(“生殖性克隆”)(Wilmut等人,1997),但也可用于建立患者特异性多能细胞系(“治疗性克隆”)。

[0011] 最后,细胞融合通过亚全能干细胞与体细胞的融合来产生四倍体或多倍体多能细胞杂种。

[0012] 尽管多能细胞具有显著的治疗潜力,但目前科学尚未达到基于多能细胞的安全有效治疗所需的阈值。

[0013] 具有讽刺意味的是,这些细胞几乎无限的可能性代表着它们在广泛的治疗应用中的主要障碍:用于移植的细胞制剂中的残留多能细胞造成了患癌症/肿瘤的高风险,并且目前没有安全的技术来保证没有这种危险的细胞杂质(Puri和Nagy,2012)。此外,即使经过15年的hESC培养,提供功能性可移植细胞的整体优化分化方案仍然很少(Bilic和Izpisua Belmonte,2012)。

[0014] PSC的亚全能性可通过各种直接和间接技术方法进行评估。动物细胞的黄金标准是嵌合体的产生和测试对包括种系传递在内的所有组织的贡献(Sheridan等人,2012; Jaenisch和Young,2008)。

[0015] 对于人亚全能干细胞,由于明显的伦理原因,不能进行这些对亚全能性的严格测试。因此,间接方法(例如在免疫受损小鼠或分化成所有三个胚层的胚胎体中形成畸胎瘤)被用作人PSC亚全能性测试的替代方法(Sheridan等人,2012)。这些方法费力、昂贵/耗时且技术上具有挑战性。因此,亚全能性标记物表达模式(例如,Oct-3/4、Nanog、SSEA和Tra抗原)的测试,目前也被广泛接受为多能状态的间接证据(Wenxiu等人,2012)。实际上,迄今为止还没有技术可用于通过功能手段最终验证现有hPSC系的亚全能性。

[0016] 因此,干细胞培养的一大挑战是维持亚全能性。在第一次PSC研究中,胚胎干细胞在含有FCS的不确定培养基中的饲养细胞层(主要是鼠胚胎成纤维细胞(MEF))上培养(Wobus等人,2005)。然而,培养基中存在不确定的物质经常导致培养细胞的自发分化,从而导致亚全能性丧失。后来,FCS可以在某种程度上被更明确的血清替代物取代。支持ESC自我更新的细胞外基质涂层的引入允许使用饲养层细胞条件培养基进行无饲养层细胞培养。然而,培养过程仍然耗时,费力且不好定义。

[0017] 近年来,PSC培养经历了重大的技术进步。确定的培养基组合物成为标准,然后是第一种无异种成分的确定的配方。然而,所有这些培养系统仍然依赖于不确定的异种且标准化很差的细胞外基质(ECM)制剂-在使用确定的/无异种成分的培养基时,这是矛盾的。实际上,研究最近克服了这一障碍,并鉴定出支持未分化PSC扩增的天然/合成ECM分子和肽。科学家现在能够完全定义/人源化hPSC的衍生和培养。

[0018] 第一种为人亚全能干细胞(hPSC)建立的确定的且无饲养层的体外培养系统含有FGF-2(FGFR配体)和TGFβ-1(ALK5配体),以稳定地支持它们的扩增、持续的自我更新和亚全能性的维持(Ludwig等人,2006)。虽然FGF-2或TGFβ-1本身不能在确定的且无饲养层的培养

条件下稳定地将hPSC保持在未分化状态,但FGF/TGF- β 信号传导的组合激活却可以。

[0019] 然而,用于培养未分化的人干细胞的这些培养基尚未完全开发用于大规模细胞培养。它们很昂贵,并且可能发生批次间的变化。

[0020] 因此,尽管有这些最近的技术进步,但已建立的hPSC培养系统仍然具有以下一种或多种不利特性:使用超生理学的大量的生长因子,含有从人或动物来源纯化的物质,或依赖于动物来源的和/或不确定的ECM。

[0021] 正在进行的研究试图规避这些不利特性。科学工作表明,hPSC的自我更新支持也可以-至少部分地-通过参与如US 8,211,699 B2中描述的ErbB3信号传导途径或Nodal/活化素信号传导的替代信号传导途径来实现(Vallier等人,2005;Xiao等人,2006)。活化素a,一种ActRIIA/ALK4配体,能够自行扩展有限数量的hPSC系的亚全能性(Xiao等人,2006),但对于其它已建立的细胞系则不能(Vallier等人,2005)。相反,活化素a与FGF-2的组合可以在这些培养条件下稳定地将hPSC维持在多能状态(Vallier等人,2009)。

[0022] 最近的科学进步导致出现能够特异性地操纵细胞信号传导的小分子,例如,以帮助重编程体细胞从而产生iPS细胞系(Zhang等人,2012)。这些有机化学物质中的一些还具有支持在没有经典细胞因子例如FGF-2和TGF β -1的情况下维持hPSC的自我更新和亚全能性的潜力。

[0023] 二苯并氮杂卓类物质的不同三环类抗抑郁药神经递质拮抗剂,如曲米帕明,已被证明可在没有添加FGF-2和确定的无饲养层细胞培养条件的情况下特异性地扩展某些hPSC系的亚全能性(Kumagai等人,2013)。然而,这似乎仅适用于选定的hPSC系,而一般情况下不适用。在曲米帕明的存在下,其它已建立的细胞系表现出逐渐分化,并且不能繁殖。

[0024] 因此,本发明的一个目的是提供一种改进的化学成分确定的细胞培养基,用于培养广谱的已建立的亚全能干细胞系,当使用所述培养基连续传代时亚全能干细胞系保持亚全能性。

发明内容

[0025] 该目的通过本发明的主题得到解决。本发明提供用于真核细胞培养的化学成分确定的培养基,其包含水、至少一种碳源、一种或多种维生素、一种或多种盐、一种或多种脂肪酸、一种或多种缓冲组分、硒、具有抑制干细胞分化能力的TGF- β 超家族的至少一种多肽和FIASMA组的至少一种物质。

[0026] 发明人已经鉴定了根据本发明的化学成分确定的培养基中的FIASMA与TGF- β 超家族成员的组合的协同效应,其允许在标准化培养环境中扩增和维持未分化状态下的hPSC。根据本发明的化学成分确定的培养基能够实现表明了维持hPSC自我更新的hPSC培养物的持续增殖和连续传代。一旦启动hPSC培养,细胞可以持续传代。

[0027] 培养基制剂不仅是化学物质明确/无异种成分的,而且完全排除了从人或动物来源纯化的物质。此外,培养基以在较低生理范围内的所用化合物的浓度起作用。最佳的培养环境允许受控良好的培养过程,一致且可重复的性能以及对已建立的亚全能干细胞系的亚全能性的稳定支持。

[0028] 本发明进一步提供了化学成分确定的培养基用于培养真核细胞,优选人亚全能干细胞,更优选人诱导亚全能干细胞的用途。因此,本发明还提供了细胞培养系统,其包含人

亚全能干细胞,优选人诱导亚全能干细胞,和化学成分确定的培养基。

[0029] 另外,本发明提供了用于细胞培养中增殖和/或维持人亚全能干细胞的试剂盒,包括:

[0030] -第一组合物,包含细胞外基质制剂,优选无异种成分的细胞外基质制剂,

[0031] -第二组合物,包含水、至少一种碳源、一种或多种维生素、一种或多种盐、一种或多种脂肪酸和一种或多种缓冲组分,

[0032] -第三组合物,包含抗坏血酸、硒、胰岛素、转铁蛋白、活化素a和曲米帕明,和

[0033] -任选地,用于细胞解离的第四组合物。

附图说明

[0034] 图1显示在含有10 μ g/L活化素a的干细胞培养基(如实施例4中所定义)中扩增1代(5天)的hPSC的放大50倍的光学显微镜图像。细胞经历显著增殖但表现出高度异质的形态模式。细胞大小急剧增加(低核质比),并且在培养基变化之间观察到大量分离的细胞,表明显著的分化以及活化素a不能维持hPSC处于未分化状态。

[0035] 图2显示在含有曲米帕明的干细胞培养基(如实施例5中所定义)中培养5天的hPSC的放大50倍的光学显微镜图像。细胞保留了典型的亚全能干细胞表型,具有高核质比和光滑边缘的群落。然而,使用曲米帕明,接种的细胞团块在整个培养期期间保持几乎相同的大小,表明完全没有细胞增殖。

[0036] 图3显示在含有活化素a和曲米帕明的干细胞培养基(如实施例1中所定义)中扩增三代的hPSC在放大50倍的高汇合度下(A)和放大200倍的低汇合度下(B)的光学显微镜图像。均质培养物稳定地表现出人亚全能干细胞的原型形态生长模式,显示高核质比和光滑的群落边界。没有分化的迹象。

[0037] 图4显示在含有活化素a和曲米帕明的干细胞培养基(如实施例1中所定义)中三次传代后hPSC亚全能性标记物表达的流式细胞术分析结果。x轴表示SSEA-4表达,y轴表示Oct-3/4表达。A) 阴性对照,B) Oct-3/4和SSEA-4的双重染色。在没有外源添加的FGF-2的情况下,在建立的hPSC培养基中连续三次传代后,超过99%的扩增的hPSC针对亚全能性标记物谱(profile) Oct-3/4/SSEA-4是双阳性的。

[0038] 图5显示在含有曲米帕明和活化素a的干细胞培养基(如实施例1中所定义)中连续9次传代培养(A)以及在包含FGF-2和TGF- β 1的hPSC培养基(如实施例9中所定义)中8次传代培养用于比较(B)的hPSC系WTS1i026-A的放大100倍的光学显微镜图像。

[0039] 图6显示在含有曲米帕明和活化素a的干细胞培养基(如实施例1中所定义)中9次传代后(A+B)以及在含有FGF-2和TGF- β 1的hPSC培养基(如实施例9中所定义)中8次传代后(C+D) hPSC系WTS1i026-A中hPSC亚全能性标记物表达的流式细胞术分析结果。x轴表示SSEA-4表达,y轴表示Oct-3/4表达。A+C代表阴性对照,B+D代表Oct-3/4和SSEA-4的双重染色。

具体实施方式

[0040] 为了提供对说明书和权利要求的清楚和一致的理解,以及给出这些术语的范围,提供以下定义。

[0041] 如本文所用的术语“成分”是指可用于细胞培养基中以维持或促进细胞的生长或增殖的任何化学或生物来源的化合物。术语“组分”和“成分”可互换使用,并且都意指这些化合物。用于细胞培养基的典型成分包括氨基酸、盐、金属、糖、脂质、核酸、激素、维生素、脂肪酸、蛋白质等。根据特定需要,本领域技术人员可以选择促进或维持离体细胞生长的其它成分。

[0042] 本文所用的术语“培养基 (medium)”、“细胞培养基”、“培养基 (culture medium)”和“培养基配方”是指用于培养或生长细胞的营养液。

[0043] 如本文所用的“细胞培养物”是指在人工体外环境中得到维持、培养或生长的细胞或组织。术语“培养 (cultivating)”和“培养 (culturing)”是同义词。

[0044] 术语“人亚全能干细胞”或“hPSC”是指人源的未分化的生物细胞,其可以分化成除胚外组织之外的几乎所有细胞。hPSC可分为人胚胎干细胞 (ESC) 和诱导亚全能干细胞 (iPS)。ESC是源自囊胚的内细胞团的亚全能干细胞,囊胚是早期胚胎植入前胚胎。因此,术语“人胚胎干细胞”或“hESC”是指源自人胚胎的亚全能干细胞。相反,诱导亚全能干细胞可以从成体细胞产生。因此,如本文所用的术语“诱导亚全能干细胞”或“iPSC”涉及可以直接从成体细胞产生的一类亚全能干细胞。因此,术语“人诱导亚全能干细胞”或“hiPSC”是指直接从人成体细胞产生的iPCS。

[0045] 未界定的干细胞转化为更特化的细胞类型称为“分化”。因此,如本文所用的术语“干细胞分化”描述了未界定的干细胞的特化。分化成更特化的细胞类型的潜力称为效力。因此,术语“效力”或“分化潜能”指定为干细胞转化为更特化的细胞类型的潜力。干细胞可根据其分化潜能进行分类。具有分化成胚胎细胞类型和胚外细胞类型的能力的干细胞被称为全能细胞。这类细胞可以构建完整的有活力的生物体。全能细胞的后代是可分化成几乎所有细胞即源自三个胚层中任一者的细胞的亚全能 (pluripotent, 多能) 干细胞。更特化的细胞被称为多能 (multipotent) 干细胞,它可以分化成许多细胞,但只能分化为密切相关的细胞家族。只能分化成少数细胞的干细胞,如淋巴或骨髓干细胞,是寡能干细胞。单能细胞只能产生自身的细胞类型,但具有自我更新的特性,这使它们与非干细胞区别开来。

[0046] 如本文所用的“化学成分确定的培养基”是其中所有成分和浓度都是已知的培养基。它特别是“无血清的”,即培养基不含血清 (例如胎牛血清 (FBS)、人血清、马血清、山羊血清等)。

[0047] 术语“无血清培养条件”和“无血清条件”是指排除任何类型的血清的细胞培养条件。

[0048] “培养容器”是指各种尺寸的玻璃容器、塑料容器或其它容器,其可以为生长细胞提供无菌环境。例如,可以使用烧瓶、单孔或多孔板、单孔或多孔盘或者多孔微孔板。

[0049] 本文所用的术语“流加 (feeding)”和“培养基更换”是指替换在其中培养细胞的培养基。本文所用的术语“代 (passage)”和“传代 (passaging)”是指将一些或所有细胞从先前的培养物转移到新鲜的细胞培养基中。对于已建立的hPSC培养物,必须根据经验确定每个hPSC系的流加间隔。根据本发明的化学成分确定的培养基支持长达72小时的培养基更换间隔。然而,在培养开始时,建议在最初的2-3天内每天更换培养基。

[0050] 如本文所用的术语“盐”或“无机盐”是指存在于细胞培养基中的元素的盐。

[0051] 如本文所用的“缓冲组分”是用于将溶液 (即培养基) 的酸度 (pH) 维持在选定值附

近的物质。组织培养物中缓冲组分的功能是将pH保持在窄的合适范围内,并防止有害的pH波动,有害的pH波动可能因细胞代谢物(例如乳酸)的培养基酸化而发生。

[0052] “生理范围”描述了物质在生物体或其部分中以天然存在的浓度而存在。在这些浓度范围内,所述物质参与生物体或其部分中的生物化学过程。通常,生物体或其部分中的物质的浓度以平均浓度给出。因此,术语“较低生理范围”或“较高生理范围”是指分别低于或高于物质的平均浓度的物质的浓度。

[0053] 本发明尤其基于以下发现:在化学成分确定的细胞培养基中,酸性鞘磷脂酶功能性抑制剂(FIASMA)组的化合物即曲米帕明与TGF- β 超家族成员即活化素a的组合,支持未分化的亚全能干细胞的有效体外扩增。特别地,该培养基不需要外源添加的FGF-2。

[0054] 本发明提供用于真核细胞培养的化学成分确定的培养基,其包含水、至少一种碳源、一种或多种维生素、一种或多种盐、一种或多种脂肪酸、一种或多种缓冲组分、硒、具有抑制干细胞分化的能力的TGF- β 超家族的至少一种多肽和FIASMA组的至少一种物质。

[0055] 如实施例中所示,根据本发明的化学成分确定的培养基是用于扩增和/或维持亚全能干细胞的有价值的工具。在根据本发明的化学成分确定的培养基中,FIASMA曲米帕明和作为TGF- β 超家族成员的活化素a的特定组合允许hESC的快速扩增,同时维持亚全能干细胞的典型特性。细胞具有光滑边缘群落的典型生长模式,并且在几次传代后仍然表达亚全能性标记物Oct-3/4和SSEA-4。

[0056] 如本文所用的“活化素a”是指如UniProtKB数据库(<http://www.uniprot.org/uniprot/>)的登录号P08476所定义的抑制素BA亚基的同型二聚体及其功能等同物。活化素a是TGF- β 超家族的成员。TGF- β 超家族是一大组结构相关的细胞调节蛋白。TGF- β 超家族成员在例如许多细胞类型中的增殖、分化和其它功能中起重要作用。通常,蛋白质是同源二聚体或异源二聚体,但二聚体代表蛋白质的活性形式,由通过单个二硫键连接的两条链构成。

[0057] 在已建立的干细胞培养基配方中,TGF- β 超家族中最突出的成员TGF- β 已被用于支持hPSC的自我更新。在没有TGF- β 的情况下,单独地或与其它活性物质组合地,在包含TGF- β 超家族的其它成员即Nodal、肌肉生长抑制素、生长分化因子3(GDF3)或活化素的培养基中培养的细胞,也可以观察到自我更新。然而,经鉴定的蛋白质不会激活经典的TGF- β 激活的下游信号传导途径,而是触发替代的信号传导途径例如ErbB3-信号传导途径或Nodal/活化素信号传导途径(Pera和Tam,2010)。该发现表明存在调节干细胞分化的不同的细胞内信号传导途径。

[0058] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明的化学成分确定的培养基包含具有抑制干细胞分化的能力的TGF- β 超家族的多肽和FIASMA。根据进一步的实施方案,TGF- β 超家族的多肽不是TGF- β 。

[0059] 例如,活化素a与ActRIIA受体结合并启动ActRI受体的快速募集、磷酸化和活化。然后通过磷酸化和随后的细胞质SMAD蛋白质的活化来激活SMAD2/3级联。这些蛋白质转位至细胞核并与SMAD4相互作用,导致包括负责调节细胞分化的基因在内的各种基因的基因表达。

[0060] 因此,在本发明的一个实施方案中,TGF- β 超家族的至少一种多肽选自活化素、nodal、肌肉生长抑制素和GDF3。

[0061] 在本发明的另一个实施方案中,TGF- β 超家族的成员选自活化素,因为活化素激活

相似的异聚丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶,该蛋白激酶负责调节干细胞分化。在一个优选的实施方案中,TGF- β 超家族的成员是活化素a。

[0062] 本实施例表明单独使用活化素a导致hPSC的快速分化。除了本文测试的细胞系之外,活化素a不能扩展其它已建立的hPSC特别是hESC的亚全能性(Vallier等人,2005)。

[0063] FIASMA在该类别的所有分子中共有保守的物理化学性质。迄今为止所有经鉴定的FIASMA都含有碱性氮原子和亲脂性部分,导致分子的阳离子两亲特征。由于这些结构和功能的相似性,可以合理地预期其它FIASMA表现出与实施例曲米帕明所示相同的效果。

[0064] 在FIASMA中,存在一组与曲米帕明具有增大的结构相似性的分子,例如米帕林(mepacrine)、异丙嗪(promethazine)和普罗吩胺(profenamine)。令人关注的是,这组分子,特别是曲米帕明、米帕林、异丙嗪和普罗吩胺,已经被鉴定为在没有FGF2的情况下培养时的干细胞中诱导已知的亚全能性标记物SSEA-3、SSEA-4TRA-1-60、TRA-1-81和OCT4的表达(Kumagai等人,2013)。该相关性允许在实施例中呈现的结果转移至FIASMA组的其它成员,特别是米帕林、异丙嗪和普罗吩胺。

[0065] 因此,在本发明的另一个实施方案中,FIASMA选自曲米帕明、米帕林、异丙嗪和普罗吩胺。在本发明的一个优选实施方案中,FIASMA是曲米帕明。

[0066] 实施例揭示单独的曲米帕明对于维持hPSC的未分化增殖不是完全有效的。事实上,细胞保持未分化状态,而hPSC的增殖受到抑制。因此,单独使用曲米帕明仅延长未分化干细胞的亚全能性。

[0067] 由于单独的曲米帕明和活化素a都不足以支持未分化的亚全能干细胞的增殖和维持,因此当组合使用时,这两种物质可具有协同效应。

[0068] 实际上,本发明人惊奇地发现,曲米帕明和活化素a的组合允许亚全能干细胞的增殖和维持。曲米帕明和活化素a在化学成分确定的细胞培养基中的组合可以触发信号传导途径,从而允许对范围广泛的亚全能干细胞的长期培养。

[0069] 在根据本发明的另一个实施方案中,化学成分确定的培养基中的FIASMA是曲米帕明,并且TGF- β 超家族的多肽是活化素a。

[0070] 根据一个实施方案,FIASMA的分子量在250g/mol至500g/mol的范围内。曲米帕明是一种相对较小的分子,分子量为294.4g/mol。普罗吩胺的分子量为312.4g/mol,米帕林的分子量为399.9g/mol,异丙嗪的分子量为284.4g/mol。由于分子尺寸相对较小,因此FIASMA可以进入多层组织。在细胞内,FIASMA可以直接与细胞分化的重要调节剂相互作用。已知抑制干细胞分化的其它活性剂,如生长因子,依赖于受体分子将信号转导到细胞中。当达到某个阈值时,通过受体的信号转导通常被激活,而FIASMA与调节蛋白的直接相互作用可以以浓度依赖性方式发生。

[0071] 传统上用于激活亚全能性和自我更新信号传导途径的生长因子,例如,FGF-2和TGF- β 1,代表高度效力但非常不稳定的小蛋白质,在细胞培养条件下其生物半衰期短,FGF-2仅为约5至7小时,TGF- β 1仅为约50分钟。结果,添加的生长因子的生物活性迅速降低。为了防止hPSC的分化,传统的hPSC培养系统需要每日的培养基更换间隔。

[0072] 此外,为了减少每日的培养基更换间隔内潜在的分化效应(由于使用的生长因子的半衰期短),在一些确定的无饲养层的hPSC培养基如mTeSR或Essential 8中使用高达100ng/ml FGF-2的超生理浓度。然而,已证实超生理浓度的FGF会损害hPSC的增殖和自我更

新(Furue等人,2008)。实际上,研究致力于开发具有改善的热稳定性的生长因子变体。

[0073] 相比之下,FIASMA,作为有机性的合成化学品,不仅是与传统生长因子的受体介导的作用相比以更直接的机制起作用,而且在其半衰期方面也显示出显著的优势,从而允许显著延长的培养基更换间隔。曲米帕明的半衰期为23小时,与FGF-2的半衰期相比,其值高出三倍。一致地,根据本发明的化学成分确定的培养基甚至在高细胞密度下也能支持长达72小时的培养基更换间隔,伴随对hPSC分化的强烈抑制-对常规hPSC培养具有显著的技术益处。

[0074] 已经观察到使用根据本发明的培养基在FIASMA浓度为0.1mg/L时对维持干细胞亚全能性的积极效果,并且当以高达10mg/L的浓度应用时可以获得显著的结果。当浓度高于15mg/L时,FIASMA可能会产生细胞毒性作用。

[0075] 因此,在根据本发明的一个实施方案中,化学成分确定的培养基中至少一种FIASMA的浓度在0.1mg/L至10mg/L的范围内。

[0076] 取决于使用何种FIASMA,随着FIASMA浓度从约0.5mg/L增加直至浓度为约5mg/L,观察到保持亚全能性的效力提高。因此,在本发明的另一个实施方案中,FIASMA的浓度范围为0.5mg/L至5mg/L。

[0077] 对于曲米帕明,当以1mg/L至4mg/L的浓度使用时,可获得稳定的结果。因此,在另一个实施方案中,根据本发明的化学成分确定的培养基中FIASMA的浓度在1mg/L至4mg/L的范围内。特别地,根据本发明的化学成分确定的培养基中FIASMA的浓度为1mg/L、1.5mg/L、2mg/L、2.5mg/L、3mg/L、3.5mg/L或4mg/L。

[0078] 在一个实施方案中,根据本发明的化学成分确定的培养基包含浓度范围为1mg/L至4mg/L的曲米帕明,特别地,曲米帕明的浓度为1mg/L、1.5mg/L、2mg/L、2.5mg/L、3mg/L、3.5mg/L或4mg/L。在另一个实施方案中,根据本发明的化学成分确定的培养基包含浓度为1mg/L、1.5mg/L、2mg/L、2.5mg/L、3mg/L、3.5mg/L或4mg/L的米帕林。在另一个实施方案中,根据本发明的化学成分确定的培养基包含浓度为1mg/L、1.5mg/L、2mg/L、2.5mg/L、3mg/L、3.5mg/L或4mg/L的异丙嗪。在另一个实施方案中,根据本发明的化学成分确定的培养基包含浓度为1mg/L、1.5mg/L、2mg/L、2.5mg/L、3mg/L、3.5mg/L或4mg/L的普罗吩胺。

[0079] 本发明人还发现,取决于使用何种成员,可以将相对宽的浓度范围的TGF- β 超家族成员应用于根据本发明的化学成分确定的培养基中,从而积极地控制所培养的细胞的增殖潜力。浓度为0.2 μ g/L的TGF- β 超家族成员已经似乎具有效果。不希望受到理论束缚,假设TGF- β 超家族成员的浓度高于200 μ g/L可能部分地通过非常规的“非典型信号传导”而对细胞具有有害的非特异性作用。因此,根据一个实施方案,在根据本发明的化学成分确定的培养基中TGF- β 超家族的至少一种多肽的浓度在0.2 μ g/L至200 μ g/L的范围内。

[0080] 此外,浓度范围为1 μ g/L至100 μ g/L的TGF- β 超家族成员足以支持未分化的亚全能干细胞的增殖和维持。浓度从1 μ g/L开始获得稳定的结果。然而,高于100 μ g/L的浓度超过大多数TGF- β 超家族成员的生理浓度。因此,在另一个实施方案中,根据本发明的化学成分确定的培养基中TGF- β 超家族的至少一种多肽的浓度在1 μ g/L至100 μ g/L的范围内。

[0081] 在补充有2 μ g/L至20 μ g/L的活化素a的根据本发明的化学成分确定的培养基中培养的细胞,有力地显示多次传代后大多数细胞表达典型的亚全能性标记物Oct3/4、Nanog、SSEA-4和TRA-1-60。浓度范围为1 μ g/L至50 μ g/L的GDF3和/或肌肉生长抑制素在体外触发所

述亚全能性标记物的表达。特别地,浓度范围为10 μ g/L至20 μ g/L的GDF3和/或肌肉生长抑制素在体外培养的细胞中显示出所述标记基因的强烈表达。对于nodal,当以10 μ g/L至500 μ g/L的浓度应用时,可以观察到亚全能性标记物表达,特别是当在根据本发明的培养基中存在浓度范围为50 μ g/L至200 μ g/L的nodal时,实现稳定表达。

[0082] 在另一个实施方案中,TGF- β 超家族成员的浓度在2 μ g/L至20 μ g/L的范围内。特别地,浓度为2 μ g/L、5 μ g/L、7.5 μ g/L、10 μ g/L、12.5 μ g/L、15 μ g/L或20 μ g/L。

[0083] 在一个优选的实施方案中,根据本发明的化学成分确定的培养基包含浓度为2 μ g/L至20 μ g/L的活化素a,特别是浓度为2 μ g/L、5 μ g/L、7.5 μ g/L、10 μ g/L、12.5 μ g/L、15 μ g/L或20 μ g/L。

[0084] 不希望受到理论束缚,可能有益的是以确定的比例应用FIASMA和TGF- β 超家族成员,以微调对于调节干细胞到成熟细胞的分化很重要的下游细胞过程。

[0085] 这种调节机制可涉及激活和/或抑制信号传导级联的同步,所述信号传导级联对于调节细胞向某些组织的分化是重要的。调节亚全能干细胞分化的典型信号传导级联是AKT-、SMAD-、Wnt/ β /连环素-和PI(3)K-信号传导以及MEK/ERK级联。

[0086] 如上所述,FIASMA和TGF- β 超家族成员可以以广泛的浓度应用。然而,存在限制,其中浓度太低而不能激活必需的信号传导途径,或者当浓度太高时,物质变得具有细胞毒性或细胞失去其亚全能性。在浓度比为50:1(FIASMA:TGF- β 超家族成员)时,FIASMA能够诱导各自的信号传导途径,并且TGF- β 超家族成员的浓度允许抑制分化而不影响亚全能性。在浓度比为2000:1时,细胞是有活力的,因此FIASMA没有细胞毒性,并且TGF- β 超家族成员的浓度足以维持亚全能性。

[0087] 必须指出的是,该比例基于FIASMA和TGF- β 超家族成员的浓度(W/V)。由于与TGF- β 超家族成员相比其较低的分子量,因此化学成分确定的培养基中的摩尔比甚至更高。

[0088] 在本发明的一个实施方案中,至少一种FIASMA和TGF- β 超家族的至少一种多肽以2000:1至50:1的比例在根据本发明的化学成分确定的培养基中应用。

[0089] 在本发明的另一个实施方案中,化学成分确定的培养基包含比例为2000:1至50:1的曲米帕明和活化素a。

[0090] 从实施例中可以看出,当细胞在包含约1000:1比例的浓度的曲米帕明和活化素a的化学成分确定的培养基中培养时,实现了未分化的亚全能干细胞的增殖和维持。在本发明的另一个实施方案中,至少一种FIASMA和TGF- β 超家族的至少一种多肽以1000:1的比例应用。在另一个实施方案中,曲米帕明和活化素a以1000:1的比例应用于根据本发明的化学成分确定的培养基中。

[0091] 本发明人还观察到,改变FIASMA和TGF- β 超家族成员的浓度导致浓度比为400:1,在增殖和亚全能性维持方面使细胞培养物进一步稳定。因此,在另一个实施方案中,至少一种FIASMA和TGF- β 超家族的至少一种多肽以400:1的比例应用于根据本发明的化学成分确定的培养基中。在优选的实施方案中,曲米帕明和活化素a在化学成分确定的培养基中的比例为400:1。

[0092] 此外,根据本发明的化学成分确定的培养基普遍适用于不同的干细胞系。已建立的细胞系表现出可变的培养基要求。化学成分确定的培养基涵盖了hPSC的一系列可变代谢需求。

[0093] 为了提供化学成分确定的培养基,避免了血清的使用。这导致需要替代培养基中的血清。具有血清替代物的培养基补充有纯化蛋白、蛋白胨或水解产物,主要是动物或人来源。在细胞培养系统中使用人或动物来源的物质会带来将污染物或病原体/病毒引入该过程从而潜在地进入最终产品的潜在风险。因此,只有非动物来源产品完全替代动物来源的物质才能得到安全的无血清培养基。

[0094] 因此,在根据本发明的一个实施方案中,化学成分确定的培养基完全不含包括蛋白质、氨基酸、脂质、脂肪酸和碳水化合物的人或动物来源的物质。因此,在一个实施方案中,本发明的化学成分确定的培养基中的TGF- β 超家族成员是重组活化素a。

[0095] 本发明的化学成分确定的培养基提供了用于受控良好的培养过程的最佳培养环境、一致且可重复的性能,而不以不利的高浓度应用生长因子如FGF-2 (bFGF) 或TGF- β 。高浓度生长因子的使用会引起不想要的副作用,因为除生长和分化外,生长因子还可能引发其它几种非特异性细胞反应。当在补充了生长因子的培养基配方中培养干细胞时,减少不想要的副作用是一个挑战,特别是当需要和/或优选延长的培养基更换间隔时。根据本发明的化学成分确定的培养基以关键生长因子FGF-2的更稳定的化学替代物起作用,以维持亚全能性和自我更新。对相关关键信号传导途径的直接细胞内作用模式以及在细胞培养条件下改善的热稳定性产生了相似或甚至更好的结果,而没有所提及的副作用。此外,与基于经典生长因子的hPSC培养基相比,通过更稳定的化学模拟物替代FGF-2允许伴随选择延长的培养基更换间隔。

[0096] 因此,在本发明的一个实施方案中,根据本发明的化学成分确定的培养基不含FGF-2和/或TGF- β 。

[0097] 白蛋白是无血清细胞培养系统的另一种重要补充物。通常,通过所谓的血清替代物将白蛋白引入培养基中。源自人(HSA)或牛(BSA)的天然白蛋白以及重组白蛋白通常用于细胞培养。体外发现的许多分子在其不与复杂配偶体结合时是不稳定或破坏性的。白蛋白的功能是结合、隔离和稳定一系列重要的小分子和离子。然而,并非所有白蛋白在细胞培养中都具有相同的功效。因此,必须严格控制包含白蛋白的细胞培养系统。

[0098] 为了避免对细胞培养系统的这些劳动密集的控制,发明人开发了一种培养基配方,其允许在没有白蛋白的稳定环境中进行细胞培养。根据进一步的实施方案,根据本发明的化学成分确定的培养基不含白蛋白。

[0099] 在本发明的另一个实施方案中,根据本发明的化学成分确定的培养基不含FGF-2、白蛋白和/或TGF- β 1。在本发明的另一个实施方案中,根据本发明的化学成分确定的培养基不含FGF-2、白蛋白和TGF- β 1。

[0100] 在另一个实施方案中,化学成分确定的培养基的组分各自以足以支持亚全能干细胞增殖和/或维持的浓度存在,其中亚全能干细胞的分化受到抑制。任何成分的浓度基于化学成分确定的培养基的总体积。

[0101] 根据本发明的化学成分确定的培养基-如同用于真核细胞培养的每种培养基-含有水、至少一种碳源、一种或多种维生素、一种或多种盐和硒。这些组分在本文中也称为“基础培养基成分”。在根据本发明的化学成分确定的培养基的制备中,基础培养基成分可以由基础培养基提供。术语“基础培养基”是指支持真核细胞生长的任何培养基,和通过补充其它成分可以用于形成根据本发明的用于细胞培养的任何培养基。基础培养基提供盐,例如

镁、钙、钠和钾的盐和任选的微量元素的盐,以及维生素,碳源,缓冲系统和必需氨基酸。可在本发明中使用的基础培养基包括但不限于杜氏改良Eagle培养基(DMEM)、Ham F12、DMEM:F12、最小必需培养基(MEM)、基础培养基Eagle(BME)、RPMI 1640、F-10、 α 最小必需培养基(α MEM)、格拉斯哥最小必需培养基(G-MEM)和Iscove改良杜氏培养基以及它们的组合。优选的基础培养基配方是杜氏改良Eagle培养基(DMEM)、Ham F-12或DMEM:F12。

[0102] 因此,化学成分确定的培养基包含至少一种碳源。碳源优选为己糖,选自葡萄糖、半乳糖、甘露糖和果糖。糖特别是D-葡萄糖。碳源的浓度范围为 $5.8 \times 10^2 \text{mg/L}$ 至 $5.8 \times 10^3 \text{mg/L}$ 。优选地,培养基中碳源的浓度为 $8.8 \times 10^2 \text{mg/L}$ 至 $4.8 \times 10^3 \text{mg/L}$,更优选为 $1.8 \times 10^3 \text{mg/L}$ 至 $3.8 \times 10^3 \text{mg/L}$ 。

[0103] 化学成分确定的培养基还包含一种或多种盐。盐优选地选自二水合氯化钙、六水合氯化镁、无水硫酸镁、氯化钾、氯化钠、无水磷酸氢二钠、无水磷酸二氢钠。

[0104] 盐优选以足以支持亚全能干细胞的增殖和/或维持的浓度存在,其中亚全能干细胞的分化受到抑制。所述盐例如以下列浓度包含在培养基中:二水合氯化钙,范围为40mg/L至400mg/L;六水合氯化镁,范围为9mg/L至98mg/L;无水硫酸镁,范围为8mg/L至88mg/L;氯化钾,范围为37.4mg/L至374mg/L;氯化钠,范围为 $1.11 \times 10^3 \text{mg/L}$ 至 $1.11 \times 10^4 \text{mg/L}$;无水磷酸氢二钠,范围为7.8mg/L至78mg/L;无水磷酸二氢钠,范围为12.4mg/L至124mg/L。

[0105] 正确调节培养基的渗透度是非常重要的,因为已经表明,当渗透度太低或太高时,细胞生长受到影响。通常,真核细胞培养基的渗透质量摩尔浓度在260mOSM/kg至360mOSM/kg的范围内。因此,在一个实施方案中,根据本发明的细胞培养基的渗透质量摩尔浓度在260mOSM/kg至360mOSM/kg的范围内,优选在270mOSM/kg至290mOSM/kg的范围内。

[0106] 其它基础培养基成分是一种或多种维生素。一种或多种维生素优选地选自D-生物素、D-泛酸钙、叶酸、烟酰胺、盐酸吡哆醛、盐酸吡哆醇、核黄素、盐酸硫胺素、维生素B12和抗坏血酸,包括抗坏血酸-2-磷酸盐。

[0107] 维生素以足以支持亚全能干细胞增殖和/或维持的浓度存在,其中亚全能干细胞的分化受到抑制。维生素例如以下列浓度包含在培养基中:D-生物素,范围为 $1.4 \times 10^{-3} \text{mg/L}$ 至 $1.4 \times 10^{-2} \text{mg/L}$;D-泛酸钙,范围为0.5mg/L至5mg/L;叶酸,范围为0.4mg/L至4mg/L;烟酰胺,范围为0.4mg/L至4mg/L;盐酸吡哆醛,范围为0.2mg/L至2mg/L;盐酸吡哆醇,范围为 $5.6 \times 10^{-3} \text{mg/L}$ 至 $5.6 \times 10^{-2} \text{mg/L}$;核黄素,范围为 $7.8 \times 10^{-2} \text{mg/L}$ 至 $7.8 \times 10^{-1} \text{mg/L}$;盐酸硫胺素,范围为0.8mg/L至8mg/L;维生素B12,范围为0.2mg/L至2mg/L。

[0108] 化学成分确定的培养基包含一种或多种氨基酸。术语“一种或多种氨基酸”是指天然氨基酸或其衍生物(例如氨基酸类似物),以及它们的D-和L-形式。一种或多种氨基酸优选地选自甘氨酸、L-丙氨酸、L-精氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-半胱氨酸、L-胱氨酸、L-谷氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸。更优选地,化学成分确定的培养基含有所有这些氨基酸。

[0109] 氨基酸优选地以以下定义的浓度范围包含在培养基中:甘氨酸,范围为4.5mg/L至45mg/L;L-丙氨酸,范围为1.7mg/L至17mg/L;L-精氨酸盐酸盐,范围为23mg/L至230mg/L;L-天冬酰胺一水合物,范围为2.5mg/L至25mg/L;L-天冬氨酸,范围为1.7mg/L至17mg/L;L-半胱氨酸盐酸盐一水合物,范围为2.4mg/L至24mg/L;L-胱氨酸二盐酸盐,范围为3.7mg/L至

37mg/L; L-谷氨酸, 范围为1.1mg/L至11mg/L; L-组氨酸盐酸盐一水合物, 范围为3.7mg/L至37mg/L; L-异亮氨酸, 范围为17mg/L至170mg/L; L-亮氨酸, 范围为8.2mg/L至82mg/L; L-赖氨酸盐酸盐, 范围为16mg/L至160mg/L; L-蛋氨酸, 范围为2mg/L至20mg/L; L-苯丙氨酸, 范围为9.9mg/L至99mg/L; L-脯氨酸, 范围为5.8mg/L至58mg/L; L-丝氨酸, 范围为4.2mg/L至42mg/L; L-苏氨酸, 范围为7.4mg/L至74mg/L; L-色氨酸, 范围为2.5mg/L至25mg/L; L-酪氨酸二钠盐二水合物, 范围为14.5mg/L至145mg/L; L-缬氨酸, 范围为9.5mg/L至95mg/L。

[0110] 根据一个实施方案, 化学成分确定的培养基还包含一种或多种二肽, 选自L-丙氨酰-L-谷氨酰胺、甘氨酰-L-谷氨酰胺和N-乙酰-L-谷氨酰胺。优选地, 根据本发明的化学成分确定的培养基包含浓度范围为65mg/L至650mg/L的L-丙氨酰-L-谷氨酰胺。

[0111] 根据本发明的微量元素硒是基础组分。在本发明的一个实施方案中, 含硒盐的浓度范围为1μg/L至100μg/L。在进一步的实施方案中, 硒以10μg/L至50μg/L的浓度存在。

[0112] 化学成分确定的培养基可另外包含选自铜(Cu)、铁(Fe)、锌(Zn)的标准微量元素。化学成分确定的培养基优选含有Fe。化学成分确定的培养基可以例如包含标准微量元素Cu和Fe。或者, 化学成分确定的培养基可包含Fe和Zn。更优选地, 化学成分确定的培养基包含Cu、Fe和Zn。

[0113] 将Cu、Fe和Zn作为盐引入化学成分确定的培养基中。优选地, Cu作为五水合硫酸铜引入, Fe作为九水合硝酸铁和/或七水合硫酸亚铁引入, Zn作为七水合硫酸锌引入。

[0114] Cu、Fe和Zn优选以足以支持亚全能干细胞增殖和/或维持的浓度存在, 其中亚全能干细胞的分化受到抑制。例如, 培养基含有以下浓度: 五水合硫酸铜, 范围为 2×10^{-4} mg/L至 1.6×10^{-3} mg/L; 九水合硝酸铁, 范围为 1.2×10^{-2} mg/L至 1.2×10^{-1} mg/L; 七水合硫酸亚铁, 范围为 7.5×10^{-2} mg/L至 7.5×10^{-1} mg/L; 七水合硫酸锌, 范围为 4.7×10^{-2} mg/L至 4.7×10^{-1} mg/L。

[0115] 根据本发明的一种或多种脂肪酸可选自饱和和不饱和脂肪酸。所述一种或多种脂肪酸可以例如选自亚油酸、花生四烯酸、亚麻酸(linolenic acid)、肉豆蔻酸、油酸、棕榈酸、硬脂酸、肉豆蔻油酸、棕榈油酸、十六碳烯酸(sapienic acid)、反油酸、异油酸、反式亚麻酸(linoelaidic acid)、二十碳五烯酸、芥酸、辛酸、癸酸、月桂酸、花生酸、山嵛酸、木蜡酸、蜡酸。优选地, 脂肪酸是亚油酸。

[0116] 在根据本发明的一个实施方案中, 化学成分确定的培养基包含一种脂肪酸, 优选浓度范围为 4.6×10^{-3} mg/L至 4.6×10^{-2} mg/L。

[0117] 在无血清环境中培养细胞是一项挑战, 因为大多数细胞依赖血清蛋白来增殖和维持健康。然而, 通过使用替代血清关键组分的物质, 细胞可以成功地从血清中移出。胰岛素和转铁蛋白是血清的两种关键组分, 并且通常用于去除培养物中的血清。胰岛素支持细胞生长并调节葡萄糖、氨基酸和脂质的细胞摄取和代谢。转铁蛋白是铁结合糖蛋白。它有利于细胞外铁的储存和运输。转铁蛋白也是一种重要的抗氧化剂, 可以防止生理条件下自由基的形成。

[0118] 根据一个实施方案, 化学成分确定的培养基还包含胰岛素或胰岛素取代物和/或转铁蛋白或转铁蛋白取代物。这些组分中的每一种优选以足以支持亚全能干细胞增殖和/或维持的浓度存在于化学成分确定的培养基中, 其中亚全能干细胞的分化受到抑制。

[0119] 在根据本发明的进一步的实施方案中, 化学成分确定的培养基包含胰岛素和转铁

蛋白。在本发明的一个优选实施方案中,化学成分确定的培养基包含重组胰岛素和重组转铁蛋白。

[0120] 根据本发明的另一个实施方案,转铁蛋白的浓度在0.1mg/L至100mg/L的范围内,优选在1mg/L至50mg/L的范围内,更优选在5mg/L至25mg/L的范围内,和/或胰岛素的浓度在0.1mg/L至100mg/L的范围内,优选在1mg/L至10mg/L的范围内。

[0121] 化学成分确定的培养基的其它组分优选以下列浓度范围使用:腐胺二盐酸盐优选以 3×10^{-2} mg/L至 3×10^{-1} mg/L的范围存在于化学成分确定的培养基中,丙酮酸钠优选以6.6mg/L至66.0mg/L的范围存在于化学成分确定的培养基中,硫辛酸优选以 3×10^{-2} mg/L至 3×10^{-1} mg/L的范围存在于化学成分确定的培养基中,胸苷优选以 5×10^{-2} mg/L至 5×10^{-1} mg/L的范围存在于化学成分确定的培养基中,次黄嘌呤优选以0.33mg/L至3.3mg/L的范围存在于化学成分确定的培养基中,肌醇优选以4.2mg/L至42mg/L的范围存在于化学成分确定的培养基中,氯化胆碱优选以1mg/L至11mg/L的范围存在于化学成分确定的培养基中。

[0122] 根据一个实施方案,化学成分确定的培养基包含缓冲组分,其选自无机碳酸氢盐、无机磷酸盐或4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)。

[0123] 根据本发明的化学成分确定的培养基优选另外包含一种或多种自由基清除剂。这种自由基清除剂的实例是谷胱甘肽、生育酚乙酸酯、 β -巯基乙醇、二硫苏糖醇(DTT)、N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAC)、维生素抗坏血酸、L-抗坏血酸或其稳定的磷酸盐形式。

[0124] 根据一个实施方案,化学成分确定的培养基的另一成分是抗坏血酸,优选其浓度足以支持亚全能干细胞的增殖和/或维持,其中亚全能干细胞的分化受到抑制。抗坏血酸在化学成分确定的培养基中的浓度范围为3mg/L至300mg/L,优选10mg/L至100mg/L。抗坏血酸是几种氧化还原反应的重要辅助因子。例如,它通过提供电子和防止氧化而充当还原剂以使铁原子和铜原子保持其还原状态。作为自由基清除剂,抗坏血酸具有使潜在细胞毒性地过氧自由基的形成最小化的优点。

[0125] 本发明的优选实施方案是包含下列组分的化学成分确定的培养基:二水合氯化钙、六水合氯化镁、无水硫酸镁、五水合硫酸铜、九水合硝酸铁、七水合硫酸亚铁、氯化钾、氯化钠、无水磷酸氢二钠、无水磷酸二氢钠、七水合硫酸锌、无水D-葡萄糖、甘氨酸、L-丙氨酸、L-丙氨酰-L-谷氨酰胺、L-精氨酸盐酸盐、L-天冬酰胺一水合物、L-天冬氨酸、L-半胱氨酸盐酸盐一水合物、L-胱氨酸二盐酸盐、L-谷氨酸、L-组氨酸盐酸盐一水合物、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸盐酸盐、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、氯化胆碱、D-生物素、D-泛酸钙、叶酸、肌醇、烟酰胺、盐酸吡哆醛、盐酸吡哆醇、核黄素、盐酸硫胺素、维生素B12、次黄嘌呤、亚油酸、酚红钠盐、腐胺二盐酸盐、丙酮酸钠、硫辛酸、胸苷、抗坏血酸-2-磷酸盐、重组胰岛素、亚硒酸钠、曲米帕明马来酸盐、重组活化素a、重组转铁蛋白。

[0126] 在一个实施方案中,组分以下列浓度范围存在:脱水氯化钙40mg/L至400mg/L,六水合氯化镁9mg/L至98mg/L,无水硫酸镁8mg/L至88mg/L,五水合硫酸铜 2×10^{-4} mg/L至 1.6×10^{-3} mg/L,九水合硝酸铁 1.2×10^{-2} mg/L至 1.2×10^{-1} mg/L,七水合硫酸亚铁 7.5×10^{-2} mg/L至 7.5×10^{-1} mg/L,氯化钾37.4mg/L至374mg/L,氯化钠 1.11×10^3 mg/L至 1.11×10^4 mg/L,无水磷酸氢二钠7.8mg/L至78mg/L,无水磷酸二氢钠12.4mg/L至124mg/L,七水合硫酸锌 4.7×10^{-2} mg/L至 4.7×10^{-1} mg/L,无水D-葡萄糖 1.8×10^3 mg/L至 3.8×10^3 mg/L,甘氨酸4.5mg/L至

45mg/L, L-丙氨酸1.7mg/L至17mg/L, L-丙氨酰-L-谷氨酰胺65mg/L至650mg/L, L-精氨酸盐酸盐23mg/L至230mg/L, L-天冬酰胺一水合物2.5mg/L至25mg/L, L-天冬氨酸1.7mg/L至17mg/L, L-半胱氨酸盐酸盐一水合物2.4mg/L至24mg/L, L-胱氨酸二盐酸盐3.7mg/L至37mg/L, L-谷氨酸1.1mg/L至11mg/L, L-组氨酸盐酸盐一水合物3.7mg/L至37mg/L, L-异亮氨酸17mg/L至170mg/L, L-亮氨酸8.2mg/L至82mg/L, L-赖氨酸盐酸盐16mg/L至160mg/L, L-蛋氨酸2mg/L至20mg/L, L-苯丙氨酸9.9mg/L至99mg/L, L-脯氨酸5.8mg/L至58mg/L, L-丝氨酸4.2mg/L至42mg/L, L-苏氨酸7.4mg/L至74mg/L, L-色氨酸2.5mg/L至25mg/L, L-酪氨酸14.5mg/L至145mg/L, L-缬氨酸9.5mg/L至95mg/L, 氯化胆碱1mg/L至11mg/L, D-生物素 1.4×10^{-3} mg/L至 1.4×10^{-2} mg/L, D-泛酸钙0.5mg/L至5mg/L, 叶酸0.4mg/L至4mg/L, 肌醇4.2mg/L至42mg/L, 烟酰胺0.4mg/L至4mg/L, 盐酸吡哆醛0.2mg/L至2mg/L, 盐酸吡哆醇 5.6×10^{-3} mg/L至 5.6×10^{-2} mg/L, 核黄素 7.8×10^{-2} mg/L至 7.8×10^{-1} mg/L, 盐酸硫胺素0.8mg/L至8mg/L, 维生素B12 0.2mg/L至2mg/L, 次黄嘌呤0.33mg/L至3.3mg/L, 亚油酸 4.6×10^{-3} mg/L至 4.6×10^{-2} mg/L, 酚红钠盐0.16mg/L至1.6mg/L, 腐胺二盐酸盐 3×10^{-2} mg/L至 3×10^{-1} mg/L, 丙酮酸钠6.6mg/L至66.0mg/L, 硫辛酸 3×10^{-2} mg/L至 3×10^{-1} mg/L, 胸苷 5×10^{-2} mg/L至 5×10^{-1} mg/L, 抗坏血酸-2-磷酸盐10mg/L至100mg/L, 重组胰岛素1mg/L至10mg/L, 亚硒酸钠10 μ g/L至50 μ g/L, 曲米帕明马来酸盐1mg/L至4mg/L, 重组活化素a 2 μ g/L至20 μ g/L, 重组转铁蛋白5mg/L至25mg/L。

[0127] 优选地, 组分以下列浓度存在: 二水合氯化钙 2.01×10^2 mg/L, 六水合氯化镁 4.90×10^1 mg/L, 无水硫酸镁 4.40×10^1 mg/L, 五水合硫酸铜 7.80×10^{-4} mg/L, 九水合硝酸铁 6.00×10^{-2} mg/L, 七水合硫酸亚铁 3.75×10^{-1} mg/L, 氯化钾 1.87×10^2 mg/L, 氯化钠 5.60×10^3 mg/L, 无水磷酸氢二钠 3.91×10^1 mg/L, 无水磷酸二氢钠 6.24×10^1 mg/L, 七水合硫酸锌 2.38×10^{-1} mg/L, 无水D-葡萄糖 2.90×10^3 mg/L, 甘氨酸 2.25×10^1 mg/L, L-丙氨酸8.90mg/L, L-丙氨酰-L-谷氨酰胺 3.25×10^2 mg/L, L-精氨酸盐酸盐 1.18×10^2 mg/L, L-天冬酰胺一水合物 1.28×10^1 mg/L, L-天冬氨酸8.65mg/L, L-半胱氨酸盐酸盐一水合物 1.23×10^1 mg/L, L-胱氨酸二盐酸盐 1.88×10^1 mg/L, L-谷氨酸5.88mg/L, L-组氨酸盐酸盐一水合物 1.89×10^1 mg/L, L-异亮氨酸 8.72×10^1 mg/L, L-亮氨酸 4.13×10^1 mg/L, L-赖氨酸盐酸盐 8.21×10^1 mg/L, L-蛋氨酸 1.03×10^1 mg/L, L-苯丙氨酸 4.97×10^1 mg/L, L-脯氨酸 2.93×10^1 mg/L, L-丝氨酸 2.10×10^1 mg/L, L-苏氨酸 3.74×10^1 mg/L, L-色氨酸 1.26×10^1 mg/L, L-酪氨酸 7.25×10^1 mg/L, L-缬氨酸 4.76×10^1 mg/L, 氯化胆碱5.39mg/L, D-生物素 6.83×10^{-3} mg/L, D-泛酸钙2.69mg/L, 叶酸2.39mg/L, 肌醇 2.14×10^1 mg/L, 烟酰胺2.22mg/L, 盐酸吡哆醛1.20mg/L, 盐酸吡哆醇 2.79×10^{-2} mg/L, 核黄素 3.94×10^{-1} mg/L, 盐酸硫胺素4.12mg/L, 维生素B12 1.09mg/L, 次黄嘌呤1.68mg/L, 亚油酸 2.31×10^{-2} mg/L, 酚红钠盐 8.25×10^{-1} mg/L, 腐胺二盐酸盐 1.58×10^{-1} mg/L, 丙酮酸钠 3.30×10^1 mg/L, 硫辛酸 1.58×10^{-1} mg/L, 胸苷 2.56×10^{-1} mg/L, 抗坏血酸-2-磷酸盐 2.75×10^1 mg/L, 重组胰岛素2.80mg/L, 亚硒酸钠 3.32×10^{-2} mg/L, 曲米帕明马来酸盐2.00mg/L, 重组活化素a 2.55×10^{-3} mg/L, 重组转铁蛋白 1.76×10^1 mg/L。

[0128] 化学成分确定的培养基的成分可以通过本领域已知的任何方法组合。

[0129] 根据本发明的化学成分确定的培养基可根据以下方案制备。首先, 将最终体积90%的细胞培养级水置于混合容器中。随后在永久搅拌下加入称重量的或适当量的参考物质的储备溶液。最后, 调节体积并使用0.22 μ m过滤单元对培养基进行过滤灭菌。

[0130] 根据本发明的化学成分确定的培养基适用于真核细胞培养。因此,本发明进一步提供了化学成分确定的培养基用于培养真核细胞的用途。如在实施例可见,根据本发明的化学成分确定的培养基特别适用于培养人亚全能干细胞。因此,在另一个实施方案中,本发明的化学成分确定的培养基可以用于培养人亚全能干细胞,优选人诱导亚全能干细胞。

[0131] 根据化学成分确定的培养基的用途的实施方案,细胞不是胚胎干细胞,并且不源自胚胎干细胞。如实施例所示,化学成分确定的培养基特别适用于培养源自人包皮成纤维细胞的hiPSC(SBI#SC101A-1)以及两种hiPS参照细胞系WTSli026-A和WTSli046-A。

[0132] 已经充分表征了各种类型的干细胞,并且已经开发了可靠地鉴定这些细胞的技术。例如,对亚全能性标记物表达模式,例如Oct-3/4、Nanog、SSEA和Tra抗原的测试目前也被广泛接受为多能状态的间接证据。

[0133] 因此,在一个实施方案中,亚全能干细胞分化的抑制由亚全能性标记物Oct-3/4、Nanog、Sox2、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-54和/或SSEA-4的表达来表示。

[0134] 通常,源自脊椎动物的细胞是锚定依赖的,诸如亚全能干细胞,并且必须在合适的底物上培养,所述基质经过特殊处理以允许细胞粘附和支持自我更新。然而,许多细胞系也可以适用于悬浮培养。与悬浮培养相反,贴壁细胞培养具有多种益处。贴壁细胞培养适用于包括干细胞在内的大多数细胞类型。它还允许进行显微镜分析,以便于目视检查。根据一个实施方案,亚全能干细胞的培养按照贴壁细胞培养进行。

[0135] 对于贴壁细胞培养,培养容器优选细胞外基质蛋白涂覆,以提供细胞可以使用粘附性跨膜分子如整联蛋白来结合的支架。本文所用的术语“细胞外基质”、“ECM”或“基底膜样基质”描述了可用于涂覆培养容器以提供这种支架的各种生物活性分子的组合物。对于用作细胞外基质,糖蛋白如层粘连蛋白、玻连蛋白,纤维蛋白如胶原蛋白或弹性蛋白,合成肽-所谓的ECM模拟物、E-钙粘蛋白、明胶以及蛋白质混合物如基底膜基质(Matrigel)已被建立。

[0136] 如本文所用,术语“无异种成分”描述了使用不是源自除细胞培养物中使用的细胞之外的另一动物来源的物质或成分。合成或重组产生的物质也称为“无异种成分”。例如,人层粘连蛋白或玻连蛋白可用作人细胞培养中的ECM,代表“无异种成分”的ECM。

[0137] 根据进一步的实施方案,亚全能干细胞的培养在细胞外基质上进行。在优选的实施方案中,亚全能干细胞的培养在无异种成分的细胞外基质上进行。

[0138] 应注意,涉及化学成分确定的培养基的用途的实施方案也适用于在化学成分确定的培养基中培养亚全能干细胞的方法。因此,术语“方法”对于术语“用途”是同义的,并且其中一个术语可以由另一个术语替换。

[0139] 本发明进一步涉及细胞培养系统,其包含亚全能干细胞和根据本发明的化学成分确定的培养基。根据细胞培养系统的一个实施方案,亚全能干细胞是人亚全能干细胞,优选人诱导亚全能干细胞(hiPSC)。根据细胞培养系统的另一个实施方案,细胞不是胚胎干细胞,并且不源自胚胎干细胞。

[0140] 根据一个实施方案,细胞培养系统还包含细胞外基质。在细胞培养系统的优选实施方案中,细胞外基质是无异种成分的。

[0141] 本发明进一步提供了用于细胞培养中增殖和/或维持亚全能干细胞的试剂盒,包括:

[0142] -第一组合物,包含细胞外基质制剂,优选无异种成分的细胞外基质制剂,

[0143] -第二组合物,包含水、至少一种碳源、一种或多种维生素、一种或多种盐、一种或多种脂肪酸和一种或多种缓冲组分,以及

[0144] -第三组合物,包含抗坏血酸、硒、胰岛素、转铁蛋白、活化素a和曲米帕明。

[0145] 对于亚全能干细胞的培养,第一组合物用于准备用于贴壁细胞培养的培养容器。将第二组合物和第三组合物在无菌条件下合并,并加入到准备好的培养容器中。为了培养亚全能干细胞,将相应的亚全能干细胞加入到准备好的培养容器中。然后根据所用的多能细胞系在合适的条件下培养细胞。

[0146] 已经证明,特别是基础培养基配方适合于培养人亚全能干细胞。因此,在根据本发明的试剂盒的一个实施方案中,第二组合物包含水、至少一种碳源、一种或多种维生素、一种或多种盐、一种或多种脂肪酸和一种或多种缓冲组分。在优选的实施方案中,第二组合物是选自杜氏改良Eagle培养基(DMEM)、Ham F-12或DMEM:F12的基础培养基。

[0147] 用曲米帕明和活化素a补充基础培养基配方,允许在细胞培养中增殖和/或维持亚全能干细胞。已经表明,用硒和抗坏血酸以及胰岛素和/或转铁蛋白补充基础培养基,支持体外亚全能干细胞的扩增。因此,在进一步的实施方案中,第三组合物包含抗坏血酸、硒、胰岛素、转铁蛋白、活化素a和曲米帕明。

[0148] 根据试剂盒的一个实施方案,第一组合物包含无异种成分的细胞外基质制剂。为了促进亚全能干细胞的温和但有效的传代培养,可以解离培养的细胞。因此,在另一个实施方案中,试剂盒任选地包含用于细胞解离的第四组合物。

[0149] 细胞的解离可以通过酶法或非酶法方式实现,两者都支持细胞的单细胞传代以及团块。可以使用已建立的酶组合物如胶原酶IV和Accutase™以及促进非酶法细胞解离的组合物如PBS/EDTA溶液、维尔烯(versene)、EDTA/甘油/柠檬酸钠。

[0150] 在试剂盒的进一步的实施方案中,任选地使用用于细胞解离的非酶组合物。

[0151] 因此,在本发明的一个实施方案中,用于在细胞培养中增殖和/或维持亚全能干细胞的试剂盒包括:

[0152] -第一组合物,包含细胞外基质制剂,优选无异种成分的细胞外基质制剂,

[0153] -第二组合物,包含水、至少一种碳源、一种或多种维生素、一种或多种盐、一种或多种脂肪酸和一种或多种缓冲组分,

[0154] -第三组合物,包含抗坏血酸、硒、胰岛素、转铁蛋白、活化素a和曲米帕明,以及

[0155] -任选地,用于细胞解离的第四组合物。

[0156] 通过以下非限制性实施例进一步定义本发明。

[0157] 实施例

[0158] 实施例1-制备根据本发明的化学成分确定的培养基

[0159] 干细胞培养基是根据本发明的化学成分确定的培养基,以下列方式制备。首先,用细胞培养级水将混合容器填充至最终体积的90%。随后在永久搅拌下加入称重量的或适当的组分的储备溶液。使用NaCl溶液将渗透质量摩尔浓度调节至280mOSM/kg。在溶解所有组分后,调节体积并对培养基进行过滤灭菌。最终培养基具有以下组成:二水合氯化钙 2.01×10^2 mg/L,六水合氯化镁 4.90×10^1 mg/L,无水硫酸镁 4.40×10^1 mg/L,五水合硫酸铜 7.80×10^{-4} mg/L,九水合硝酸铁 6.00×10^{-2} mg/L,七水合硫酸亚铁 3.75×10^{-1} mg/L,氯化钾 $1.87 \times$

10²mg/L,氯化钠5.60×10³mg/L,无水磷酸氢二钠3.91×10¹mg/L,无水磷酸二氢钠6.24×10¹mg/L,七水合硫酸锌2.38×10⁻¹mg/L,无水D-葡萄糖2.90×10³mg/L,甘氨酸2.25×10¹mg/L,L-丙氨酸8.90mg/L,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺3.25×10²mg/L,L-精氨酸盐酸盐1.18×10²mg/L,L-天冬酰胺一水合物1.28×10¹mg/L,L-天冬氨酸8.65mg/L,L-半胱氨酸盐酸盐一水合物1.23×10¹mg/L,L-胱氨酸二盐酸盐1.88×10¹mg/L,L-谷氨酸5.88mg/L,L-组氨酸盐酸盐一水合物1.89×10¹mg/L,L-异亮氨酸8.72×10¹mg/L,L-亮氨酸4.13×10¹mg/L,L-赖氨酸盐酸盐8.21×10¹mg/L,L-蛋氨酸1.03×10¹mg/L,L-苯丙氨酸4.97×10¹mg/L,L-脯氨酸2.93×10¹mg/L,L-丝氨酸2.10×10¹mg/L,L-苏氨酸3.74×10¹mg/L,L-色氨酸1.26×10¹mg/L,L-酪氨酸7.25×10¹mg/L,L-缬氨酸4.76×10¹mg/L,氯化胆碱5.39mg/L,D-生物素6.83×10⁻³mg/L,D-泛酸钙2.69mg/L,叶酸2.39mg/L,肌醇2.14×10¹mg/L,烟酰胺2.22mg/L,盐酸吡哆醛1.20mg/L,盐酸吡哆醇2.79×10⁻²mg/L,核黄素3.94×10⁻¹mg/L,盐酸硫胺素4.12mg/L,维生素B12 1.09mg/L,次黄嘌呤1.68mg/L,亚油酸2.31×10⁻²mg/L,酚红钠盐8.25×10⁻¹mg/L,腐胺二盐酸盐1.58×10⁻¹mg/L,丙酮酸钠3.30×10¹mg/L,硫辛酸1.58×10⁻¹mg/L,胸苷2.56×10⁻¹mg/L,抗坏血酸-2-磷酸盐2.75×10¹mg/L,重组胰岛素2.80mg/L,亚硒酸钠3.32×10⁻²mg/L,曲米帕明马来酸盐2.00mg/L,重组活化素a 2.55×10⁻³mg/L,重组转铁蛋白1.76×10¹mg/L。

[0160] 实施例2-启动hPSC培养

[0161] 2.1培养容器的细胞外基质 (ECM) 涂层

[0162] 培养容器用0.5μg/cm²的重组人玻连蛋白作为ECM涂覆。为此,以每cm²培养容器表面100μl稀释的玻连蛋白溶液应用于培养容器。将涂覆后的培养容器在室温下放置2小时。在接种细胞之前吸出玻连蛋白溶液。

[0163] 2.2铺板细胞 (第0天)

[0164] 在该实验中使用的细胞系是人包皮成纤维细胞衍生的hiPS细胞系SBI#SC101A-1 (根据限定的参考编号可从System Biosciences (SBI), Palo Alto获得)。

[0165] 如实施例1中所述制备干细胞培养基。对于冷冻保存的细胞,将ROCK-抑制剂(10μM Y-27632或2μM Thiazovivin)加入干细胞培养基中。或者,对于现有的增殖培养物,如下文实施例3中所述进行团块传代(clump passage)。

[0166] 使用适当量的培养基将hPSC以1:2至1:3的比例(相对于组织培养容器的体积)接种到ECM涂覆的组织培养容器中。例如,对于6孔板,每孔2至3ml,对于T-75烧瓶,使用15至25ml。

[0167] 2.3使细胞附着 (第0天)

[0168] 铺板后,使传代培养后的hPSC附着过夜(12至24小时)。

[0169] 2.4培养基更换 (第1天)

[0170] 进行培养基更换:吸出包含未附着细胞的干细胞培养基,用无(w/o) Ca²⁺/Mg²⁺的杜氏PBS洗涤一次,并向细胞提供新鲜培养基(无ROCK-抑制剂)。

[0171] 2.5细胞扩增 (第1天以后)

[0172] 每1至3天进行一次培养基更换。hPSC扩增直至单个群落相互接触(通常在3至7天后)或群落显示出由它们的大尺寸引发的分化的最初迹象。

[0173] 实施例3-hPSC培养物的连续传代

[0174] 吸出干细胞培养基,用无Ca²⁺/Mg²⁺的杜氏PBS洗涤hPSC两次。接下来,加入200至300 μ l/cm²的解离缓冲液,将溶液在37℃和5%CO₂的培养箱中温育6至10分钟。小心吸出解离缓冲液,加入1至5ml新鲜培养基。使用血清移液管将群落从表面冲洗掉。为了保持足够大小的细胞团块,避免超过4至5次的冲洗。然后,将细胞团块分配到具有新鲜干细胞培养基的新ECM涂覆的培养容器中,并根据实施例2的细胞附着步骤(步骤2.3)继续培养。

[0175] 实施例4-在活化素a的存在下培养hPSC

[0176] 在不含曲米帕明的根据实施例1的干细胞培养基的存在下培养诱导亚全能干细胞,以再现已发表的观察结果,即活化素a本身不能完全支持大多数hPSC系的未分化维持(Vallier等人,2005;Xiao等人,2006)。根据实施例2进行hPSC培养的启动,然后根据实施例3对细胞进行传代培养。

[0177] 虽然培养物显示出显著的细胞增殖,但显微镜分析揭示出甚至在第一次传代之前的指示分化的典型的形态变化。培养物最初的同质形态模式转变为明显的异质外观:存在大量细长/扩大的细胞(反映在图1中的核质比降低)以及许多漂浮的分离细胞。在hPSC中,这些形态学特征描述了广泛认可的干细胞分化和亚全能性丧失的明显迹象。

[0178] 结果,活化素a不能在确定的和无饲养层培养条件下稳定地支持所测试的hPSC系维持在未分化状态下。

[0179] 实施例5-在曲米帕明的存在下培养hPSC

[0180] 还旨在重现已发表的曲米帕明在人亚全能干细胞中的部分自我更新支持能力(Kumagai等人,2013)。为此目的,在缺少活化素a的根据实施例1制备的干细胞培养基中培养hPSC。根据实施例2进行hPSC培养的启动,然后根据实施例3对细胞进行传代培养。

[0181] 显微镜图像显示,与活化素a相反,单独的曲米帕明能够维持由具有光滑边缘的圆形群落代表的典型多能形态表型,该群落由具有高核质比的细胞组成。然而,曲米帕明不足以有效地扩增人亚全能干细胞。从图2中可以看出,最初被铺板的细胞团块在培养5天后保持几乎相同的大小,表明基本上不存在细胞增殖。

[0182] 因此,在化学成分确定的培养条件下,单独使用曲安咪明的干细胞培养基中的亚全能干细胞保持其亚全能性,但不会增殖。

[0183] 实施例6-在活化素a和曲米帕明的组合的存在下培养hPSC

[0184] 每种组分本身,即活化素a或曲米帕明,不允许未分化的hPSC的在体外适当扩增和维持,而是分别导致被培养的细胞的亚全能性的快速丧失或增殖失败。在转换到具有相应化合物的培养基后2天内,即使在hPSC的原代培养物中,所述效果也是明显的。

[0185] 然而,由于活化素a和曲米帕明似乎独立且积极地作用于/模拟两种不同的关键信号传导途径以维持亚全能性,因此推测这两种化合物的组合可能通过同时参与两种类型的信号来协同地传达hPSC的完全自我更新和扩增支持。

[0186] 为了测试这一点,在包含根据实施例1的包括活化素a和曲米帕明的干细胞培养基的培养系统中培养亚全能干细胞。根据实施例2进行hPSC培养的启动,然后根据实施例3对细胞进行传代培养。

[0187] 6.1形态学的生长模式

[0188] 显微镜分析显示,用活化素a和曲米帕明的组合补充干细胞培养基允许所测试的hPSC系以3至4天的恒定传代间隔快速扩增。从图3中可以看出,培养物在单细胞水平上表现

出高的核质比以及光滑边缘群落的典型生长模式。培养基更换之间几乎不存在漂浮的分化细胞。

[0189] 6.2亚全能性标记物的表达

[0190] 为了在分子水平上确认未分化状态的适当维持,在含有活化素a和曲米帕明的干细胞培养基中三次传代后进行人亚全能性标记物Oct-3/4和SSEA-4的染色。

[0191] 为此,在开始染色程序前1小时,在根据实施例1制备的干细胞培养基中,根据实施例2和实施例3对在T25TC-烧瓶中生长的80%至90%汇合的hPSC培养物进行培养基更换。5ml人AB-血清(除去凝块)用45ml无Ca²⁺/Mg²⁺的杜氏PBS(以下称为“PBS”)稀释,并通过0.22微米PES膜注射器式过滤器过滤。从细胞中吸出干细胞培养基并丢弃。然后,用5ml PBS/0.5%BSA/2mM EDTA洗涤细胞两次。向细胞中加入5ml hPSC解离缓冲液,并在37℃和5%CO₂的培养箱中温育8分钟。显微镜评估显示附着的群落的闪亮边界指示细胞分离过程的开始。立即吸出解离缓冲液,用10ml PBS经3至5次反复冲洗将松散附着的hPSC群落从表面洗去。然后,使用10ml血清移液管通过将细胞悬浮液上下吸移5至10次来完全解离细胞团块。使用Viacount测定试剂和Muse细胞分析仪(Millipore)对细胞计数。通过以200×g离心5分钟沉淀(pellet)细胞悬浮液。细胞以100000个细胞/ml重悬于人AB-血清(PBS中10%)中,并在室温下温育10分钟。通过以200×g离心5分钟沉淀3ml细胞悬浮液。吸出上清液,并将细胞重悬于300μl人AB-血清(PBS中10%)中。将100μl细胞悬浮液转移到两个15ml锥形管(样品1和样品2)的每一个中。

[0192] 向样品2中加入10μl PerCP缀合的SSEA-4抗体(R&D Systems No.FAB1435C)并于黑暗在4℃下温育30分钟。将未处理的阴性对照样品1与样品2共温育。将2ml含0.5%BSA和2mM EDTA的PBS加入到样品1和样品2的每一个中,并通过以200×g离心5分钟沉淀。将样品1和样品2的细胞沉淀各自重悬于1ml固定缓冲试剂(固定/渗透细胞透化试剂盒,Thermo Fisher No.GAS004)中,并于黑暗在4℃下温育20分钟。将2ml洗涤缓冲试剂(固定/渗透细胞透化试剂盒,Thermo Fisher No.GAS004)加入到样品1和样品2中,并通过以200×g离心5分钟沉淀细胞。然后用2ml洗涤缓冲试剂重复洗涤步骤一次。将样品2的细胞沉淀重悬于90μl洗涤缓冲试剂中,并加入10μl FITC标记的Oct-3/4抗体(R&D Systems No.IC-1759F)。将样品1的细胞沉淀重悬于100μl洗涤缓冲试剂中。将两个样品于黑暗在室温下温育60分钟。向样品1和样品2中的每一个中加入2ml洗涤缓冲试剂,并通过以200×g离心5分钟来沉淀细胞。然后再用2ml洗涤缓冲试剂重复洗涤步骤一次。将样品1和样品2中的每一个的细胞沉淀重悬于含有0.5%BSA和2mM EDTA的0.5ml PBS中,并立即使用配备有蓝色激光的Guava流式细胞仪(Millipore)进行分析。

[0193] 图4显示,超过99%的细胞被染色为对两种标记物是双阳性的,有力地证实了表明维持了干细胞特性的先前的形态学/扩增发现。

[0194] 可以得出结论,根据本发明的干细胞培养基中曲米帕明和活化素a的组合足以维持hPSC的未分化扩增,如通过自我更新的延长、多次传代后培养物的亚全能性标记物谱和典型的形态学生长模式表达所证明的。

[0195] 实施例7-培养其它的诱导亚全能干细胞

[0196] 为了证实根据本发明的干细胞培养基对广谱亚全能干细胞系的适用性,用表1中列出的其它干细胞系重复实施例4、5和6的实验。这些细胞系的生长实验显示出与SBI#

SC101A-1相当的结果。

[0197] 表1:在根据本发明的干细胞培养基中培养的其它hPSC系。

[0198]

hPSC 系	描述
WTShi026-A (欧洲诱导亚全能干细胞库(EBiSC)中的登录号)	源自人真皮成纤维细胞的 HipSci 参考品 (reference panel) hiPSC 系
WTShi046-A (EBiSC 中的登录号)	源自人真皮成纤维细胞的 HipSci 参考品 hiPSC 系

[0199] 实施例8-可以使用适合于hPSC培养的所有已建立的ECM类型

[0200] 为了测试在细胞培养中其它已建立的ECM类型与根据本发明的干细胞培养基的相容性,使用常规用于hPSC培养的基底膜样基质进行实验。经测试的ECM是Matrigel™、基于层粘连蛋白的基质、玻连蛋白、基于钙粘蛋白的基质和已建立的ECM模拟肽基质。

[0201] 将每种经测试的ECM用于包含干细胞培养基的细胞培养物中,所述干细胞培养基包括活化素a和曲米帕明(如实施例1中所定义)。作为对照,测试没有活化素a的和没有曲米帕明的培养基制剂。

[0202] 在含有活化素a和曲米帕明的干细胞培养基中培养的细胞经几次传代后表现出hPSC的典型形态学生长模式和亚全能性标记物谱表达,类似于实验6中呈现的结果,而与使用哪种ECM无关。

[0203] 因此,根据本发明的干细胞培养基可以与几乎所有适用于hPSC培养的已建立的ECM组合使用,并且不限于与无异种成分的ECM组合使用。

[0204] 实施例9-在含有活化素a和曲米帕明的干细胞培养基中和在含有FGF-2和TGF-β1的hPSC培养基中培养的hPSC的比较

[0205] 如实施例6中所证明的,根据本发明的干细胞培养基中曲米帕明和活化素a的组合足以维持hPSC的未分化扩增。

[0206] 为了比较根据本发明的干细胞培养基和包含FGF-2和TGF-β1的hPSC培养基对hPSC扩增的适用性,在分别包含含有活化素a和曲米帕明的干细胞培养基(如实施例1中所定义)的培养系统和包含FGF-2和TGF-β1的hPSC培养基的培养系统中扩增hPSC。根据实施例1制备包含FGF-2和TGF-β1的hPSC培养基,但用10ng/ml FGF-2和1ng/ml TGF-β1代替曲米帕明和活化素a。根据实施例2进行hPSC培养的启动,然后根据实施例3对细胞进行传代培养。

[0207] 9.1形态学生长模式

[0208] 在上述培养基中培养的hPSC的显微镜分析证实,两种培养基分别允许测试的hPSC系经过8次传代和9次传代快速扩增(参见图5)。从图5中可以看出,两种培养物稳定地表现出人亚全能干细胞的典型形态学生长模式,表现为高核质比和光滑的群落边界。培养基更换之间几乎不存在漂浮的分化细胞。

[0209] 在含有曲米帕明和活化素a的干细胞培养基中培养的细胞看起来略大,特别是在细胞密度较低的区域,这是由于与在包含FGF-2和TGF-β1的hPSC培养基中培养的细胞相比有更明显的扩散。这一观察结果由以下支持,即当在含有曲米帕明和活化素a的干细胞培养基中培养时,从培养物表面释放细胞所需的用解离缓冲液的温育时间更长。然而,随着细胞密度的增加,观察到的细胞尺寸效应减小。

[0210] 9.2亚全能性标记物的表达

[0211] 为了在分子水平上比较在含有曲米帕明和活化素a的干细胞培养基(如实施例1中所定义)中培养的hPSC和在含有FGF-2和TGF- β 1的hPSC培养基中培养的hPSC的未分化状态的维持,分别在8次和9次传代后,如实施例6.2中所述进行人亚全能性标记物Oct-3/4和SSEA-4的染色。

[0212] 在含有曲米帕明和活化素a的干细胞培养基中连续9次传代后,超过96%的扩增的hPSC对于亚全能性标记物谱Oct-3/4和SSEA-4是双阳性的(参见图6)。从图6中可以看出,在包含FGF-2和TGF- β 1的hPSC培养基中相同细胞系连续8次传代后,获得了相当的结果。

[0213] 可以得出结论,根据本发明的干细胞培养基中曲米帕明和活化素a的组合足以维持hPSC的未分化扩增,如通过与包含FGF-2和TGF- β 1的hPSC培养基相当的自我更新的延长,多次传代后培养物的典型的形态学生长模式和亚全能性标记物谱的表达所证明的。

[0214] 本发明所属领域的技术人员将会想到本文所阐述的本发明的许多修改和其它实施方案具有前述说明和相关附图中呈现的教导的益处。因此,应当理解的是,本发明不限于所公开的特定实施方案,并且修改和其它实施方案旨在包括在所附权利要求的范围内。尽管本文采用了特定术语,但它们仅用于一般性和描述性意义,而不是用于限制的目的。

[0215] 参考文献

[0216] 1.Sanges,D.and M.P.Cosma,Reprogramming cell fate to pluripotency:the decision-making signalling pathways.(将细胞命运重编程为亚全能性:决策信号传导途径)Int J Dev Biol,2010.54(11-12):p.1575-87.

[0217] 2.**Schöler**,H.R.,The Potential of Stem Cells:An Inventory.(干细胞的潜力:盘点)Humanbiotechnology as Social Challenge.Ashgate Publishing 2007.p.28.ISBN 978-0-7546-5755-2.

[0218] 3.Pauklin S,Pedersen RA,Vallier L.,Mouse pluripotent stem cells at a glance.(简述小鼠亚全能干细胞)J Cell Sci,2011,124(22):3727-32.

[0219] 4.Thomson JA,Itskovitz-Eldor J,Shapiro SS,Waknitz MA,Swiergiel JJ,Marshall VS,Jones JM.,Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.(源自人囊胚的胚胎干细胞系)Science,1998,282(5391):1145-7.

[0220] 5.Puri MC,Nagy A.,Concise review:Embryonic stem cells versus induced pluripotent stem cells:the game is on.(简要综述:胚胎干细胞与诱导亚全能干细胞:竞争中)Stem Cells,2012,(1):10-4.

[0221] 6.Wilmut I,Schneke AE,McWhir J,Kind AJ,Campbell KH.,Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells.(源自胎儿和成年哺乳动物细胞的存活后代)Nature,1997,385(6619):810-3.

[0222] 7.Bilic J,Izpisua Belmonte JC.,Concise review:Induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells:close enough or yet too far apart?(简明综述:诱导亚全能干细胞与胚胎干细胞:足够接近或相隔太远?)Stem Cells,2012,(1):33-41.

[0223] 8.Wenxiu Zhao,Xiang Ji,Fangfang Zhang,Liang Li,Lan Ma.,Embryonic Stem Cell Markers.(胚胎干细胞标记物)Molecules,2012,(17):6196-6236.

- [0224] 9.Wobus AM,Boheler KR.,Embryonic stem cells:prospects for developmental biology and cell therapy.(胚胎干细胞:发育生物学和细胞疗法的前景)Physiol Rev,2005,85(2):635-78.
- [0225] 10.Takahashi K,Tanabe K,Ohnuki M,Narita M,Ichisaka T,Tomoda K,Yamanaka S.,Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.(通过确定的因子诱导来自成年人成纤维细胞的亚全能干细胞)Cell,2007,131(5):861-72.
- [0226] 11.Yu J,Vodyanik MA,Smuga-Otto K,Antosiewicz-Bourget J,Frane JL,Tian S,Nie J,Jonsdottir GA,Ruotti V,Stewart R,Slukvin II,Thomson JA.,Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.(源自人体细胞的诱导亚全能干细胞系)Science,2007,318(5858):1917-20.
- [0227] 12.González F,Boué S,Izpisua Belmonte JC.,Methods for making induced pluripotent stem cells:reprogramming à la carte(制备诱导亚全能干细胞的方法:选择性重编程).Nat Rev Genet,2011,12(4):231-42.
- [0228] 13.Takahashi K,Yamanaka S.,Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors(通过确定的因子诱导来自小鼠胚胎和成体成纤维细胞培养物的亚全能干细胞).Cell,2006,126(4):663-76.
- [0229] 14.Sheridan SD,Surampudi V,Rao RR.,Analysis of embryoid bodies derived from human induced pluripotent stem cells as a means to assess pluripotency.(分析源自人诱导亚全能干细胞的胚状体作为评估亚全能性的手段).Stem Cells Int.,2012,2012:738910.
- [0230] 15.Jaenisch R,Young R.,Stem cells,the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming(干细胞、亚全能性的分子回路和核重编程).Cell,2008,132(4):567-82.
- [0231] 16.Ludwig,T.E.,et al.,Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions.(在确定条件下衍生人胚胎干细胞)Nat Biotechnol,2006,24(2):185-187.
- [0232] 17.US 8,211,699 B2(VIACYTE,INC.)3 July 2012(03.07.2012)
- [0233] 18.Vallier,L.,et al.,Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells.(活化素/Nodal和FGF途径协同维持人胚胎干细胞的亚全能性)J Cell Sci,2005,118(Pt 19):4495-4509.
- [0234] 19.Xiao,L.,et al.,Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor,Wnt,and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells.(活化素A维持自我更新并调节人胚胎干细胞中的成纤维细胞生长因子,Wnt和骨形态发生蛋白途径)Stem Cells,2006,24(6):1476-1486.
- [0235] 20.Vallier,L.,et al.,Signaling pathways controlling pluripotency and early cell fate decisions of human induced pluripotent stem cells.(控制人诱导亚全能干细胞的亚全能性和早期细胞命运决定的信号传导途径)Stem Cells,2009,27

(11):2655-2666.

[0236] 21.Zhang,Y.,et al.,Small molecules,big roles-the chemical manipulation of stem cell fate and somatic cell reprogramming.(小分子,大作用-干细胞命运和体细胞重编程的化学操作)J Cell Sci,2012,125(Pt 23):5609-5620.

[0237] 22.Kumagai,H.,et al.,Identification of small molecules that promote human embryonic stem cell self-renewal.(鉴定促进人胚胎干细胞自我更新的小分子)Biochem Biophys Res Commun,2013,434(4):710-716.

[0238] 23.Furue MK,Na J,Jackson JP,et al.Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium.(肝素促进人胚胎干细胞在确定的无血清培养基中的生长)Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2008;105(36):13409-13414.

[0239] 24.Pera MF and Tam PPL.Extrinsic regulation of pluripotent stem cells.(亚全能干细胞的外在调节)Nature,2010,465,713-720.

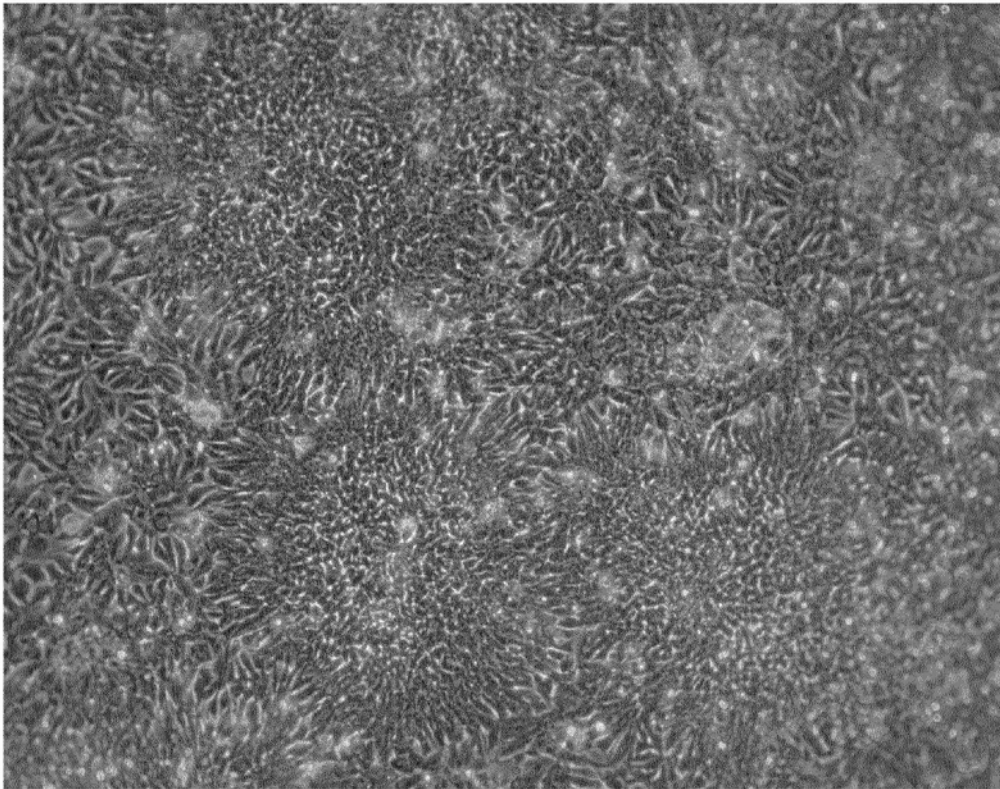


图1

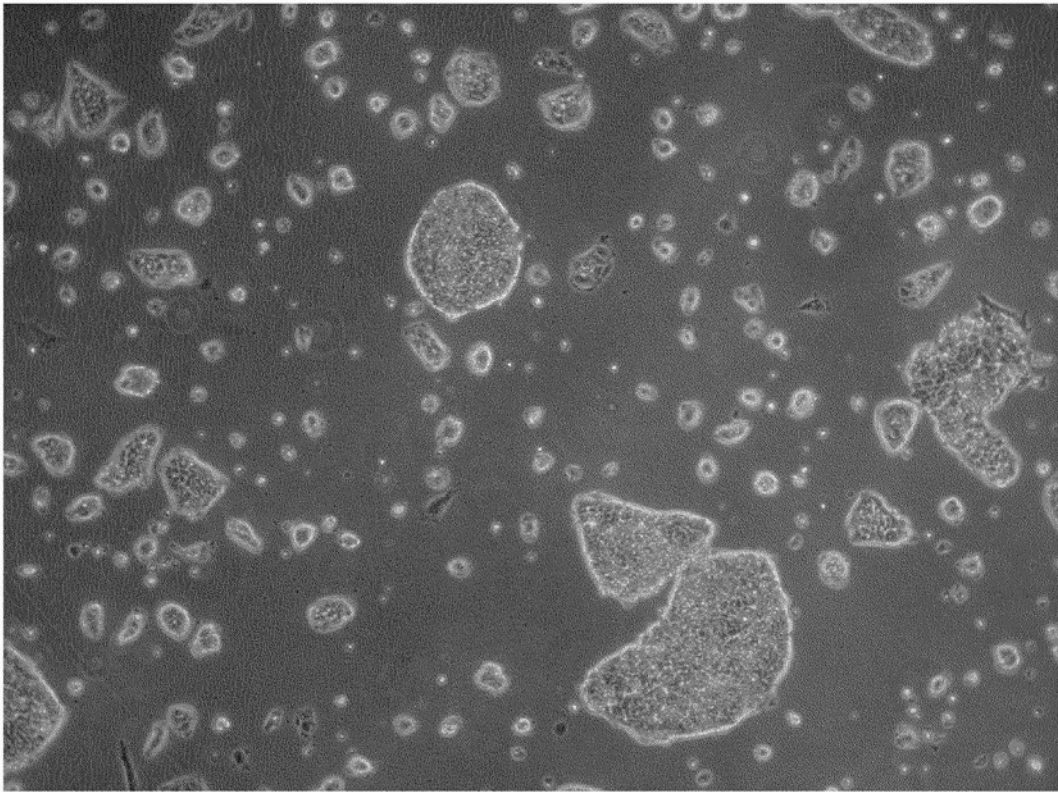


图2

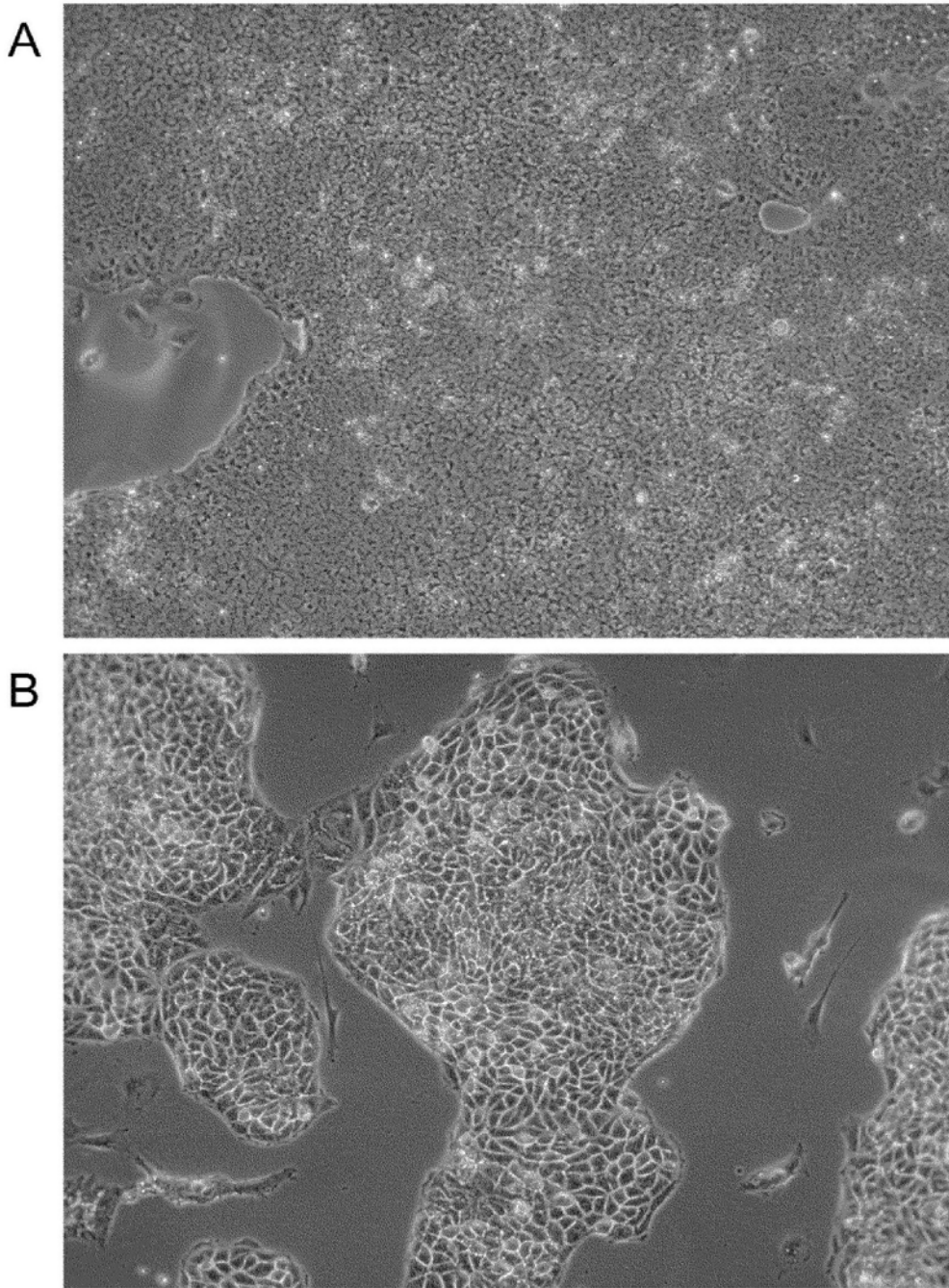


图3

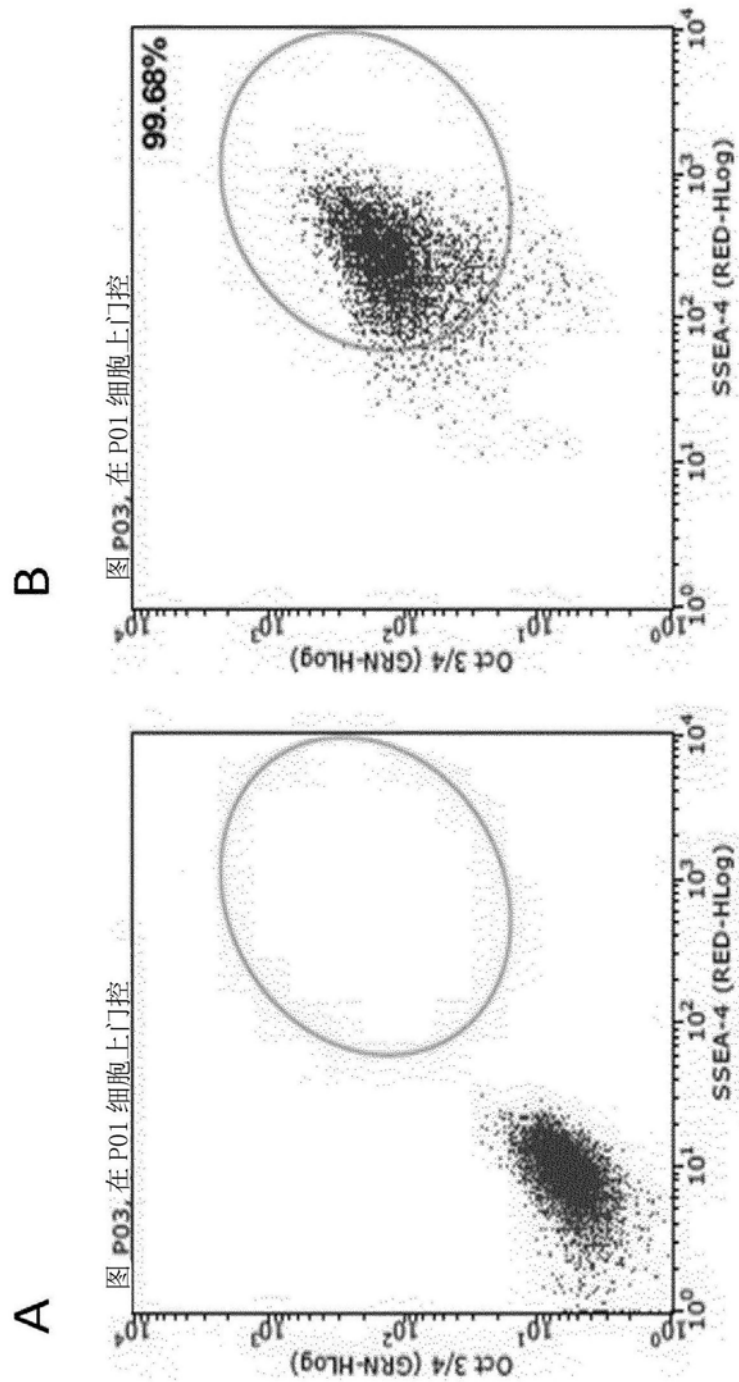


图4

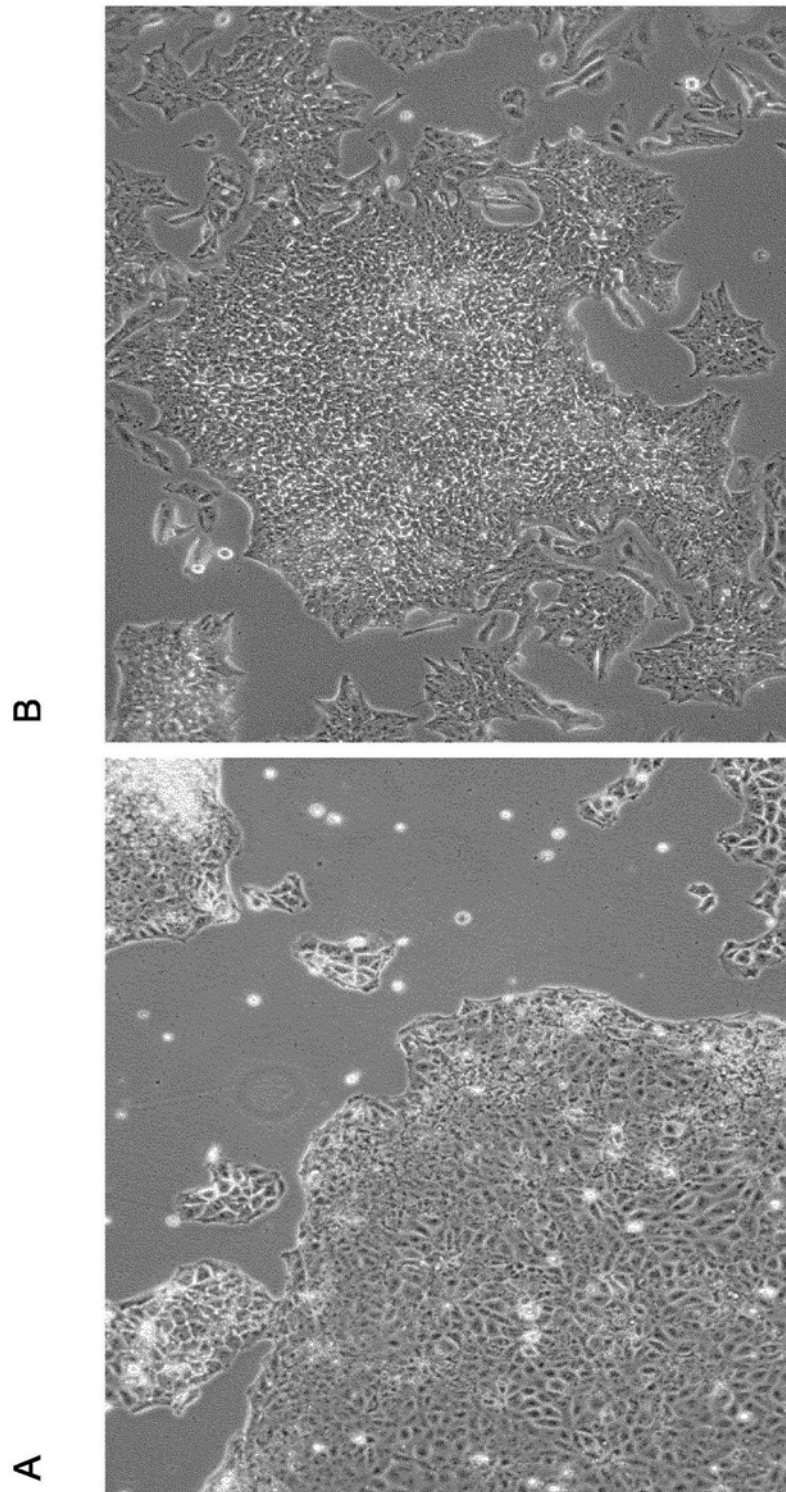


图5

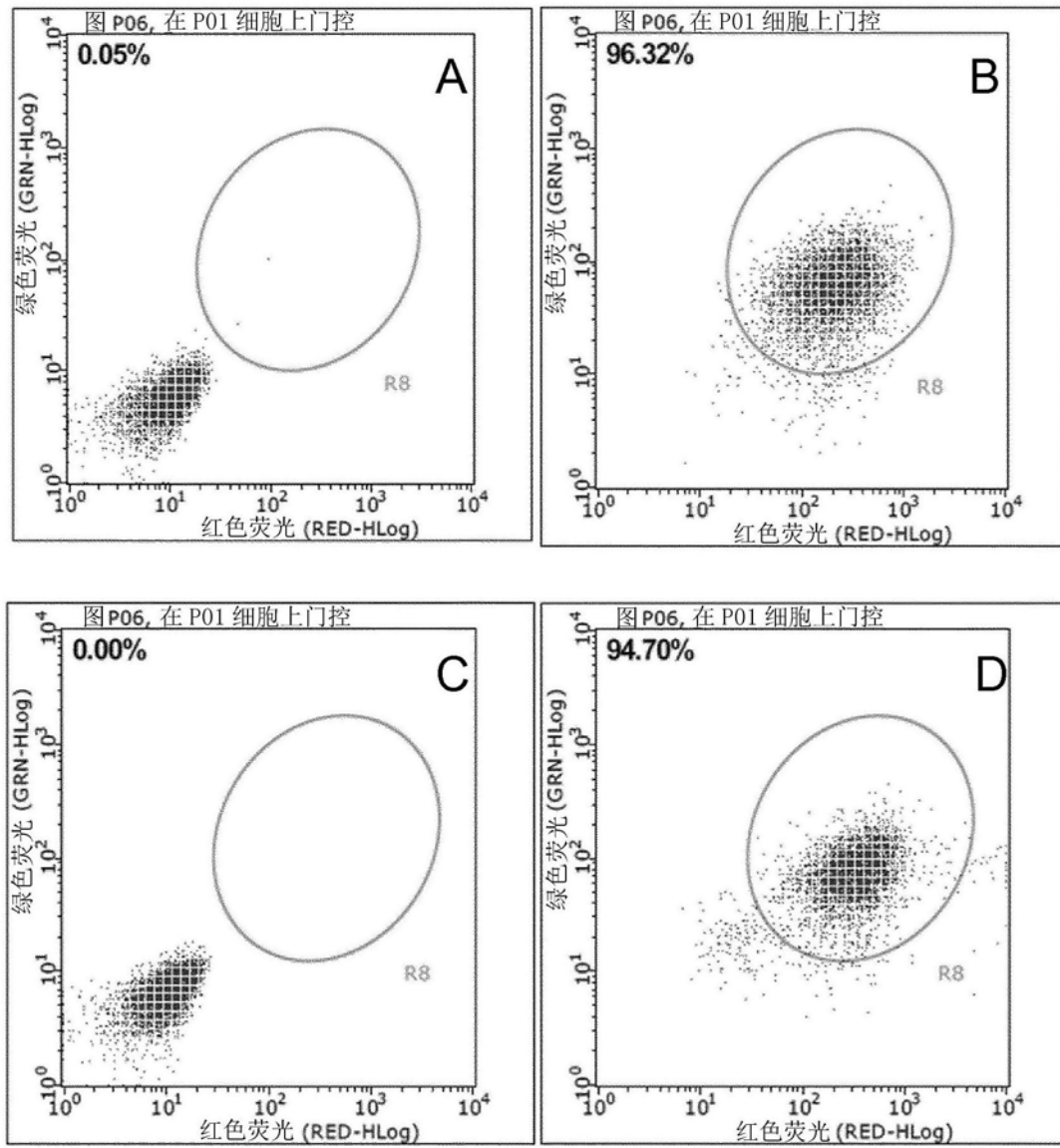


图6