



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101939418 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 05

(21) 申请号 200980103922. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 01. 29

*C12N 5/08* (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/062, 921 2008. 01. 30 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 07. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/032411 2009. 01. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02009/097411 EN 2009. 08. 06

(71) 申请人 杰龙公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 康宁股份有限公司

(72) 发明人 C·B·绍戈本 周悦

R·勃兰登布格尔

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 郭辉

权利要求书 4 页 说明书 12 页 附图 2 页

(54) 发明名称

用于培养干细胞衍生的心肌细胞的合成表面

(57) 摘要

适于培养干细胞衍生的心肌细胞的合成表面包含由一种或多种丙烯酸酯单体形成的丙烯酸酯聚合物。在许多情况下,所述丙烯酸酯表面适于在化学限定的介质中培养干细胞衍生的心肌细胞。

1. 一种用于在化学限定的介质中培养干细胞衍生的心肌细胞的细胞培养制品,包括:  
具有表面的基材;  
置于所述表面上的聚合物材料,其中所述聚合物材料包括:  
(i) 由二丙烯酸四(乙二醇)酯、二甲基丙烯酸甘油酯、二甲基丙烯酸三乙二醇酯、1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯或聚(乙二醇)二丙烯酸酯形成的均聚物,或者  
(ii) 由以下物质形成的共聚物:  
二丙烯酸四(乙二醇)酯和1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯;  
二甲基丙烯酸甘油酯和二丙烯酸四(乙二醇)酯;  
二甲基丙烯酸甘油酯和二甲基丙烯酸三(乙二醇)酯;  
二甲基丙烯酸甘油酯和1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯;  
二甲基丙烯酸甘油酯和聚(乙二醇)二丙烯酸酯;  
二甲基丙烯酸三乙二醇酯和1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯;  
聚(乙二醇)二丙烯酸酯和二丙烯酸四(乙二醇)酯;  
二甲基丙烯酸二(乙二醇)酯和二甲基丙烯酸四乙二醇酯;  
二丙烯酸四(乙二醇)酯和三羟甲基丙烷三丙烯酸酯;  
三羟甲基丙烷三丙烯酸酯和新戊二醇乙氧基化二丙烯酸酯;  
二甲基丙烯酸二(乙二醇)酯和二丙烯酸四(乙二醇)酯;  
二甲基丙烯酸二(乙二醇)酯和二甲基丙烯酸三(乙二醇)酯;  
二甲基丙烯酸二(乙二醇)酯和新戊二醇二甲基丙烯酸酯;  
二甲基丙烯酸四(乙二醇)酯和二甲基丙烯酸三(乙二醇)酯;  
二甲基丙烯酸四(乙二醇)酯和1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯;  
二甲基丙烯酸四(乙二醇)酯和1,6-己二醇乙氧基化二丙烯酸酯;  
1,6-己二醇丙氧基化物二丙烯酸酯和聚(乙二醇)二丙烯酸酯;  
1,6-己二醇丙氧基化物二丙烯酸酯和三羟甲基丙烷苯甲酸酯二丙烯酸酯;  
1,6-己二醇丙氧基化物二丙烯酸酯和三羟甲基丙烷乙氧基化(1EO/OH)甲基二丙烯酸酯;  
1,6-己二醇丙氧基化物二丙烯酸酯和1,6-己二醇乙氧基化二丙烯酸酯;  
新戊二醇二丙烯酸酯和三羟甲基丙烷乙氧基化(1EO/OH)甲基二丙烯酸酯;或  
新戊二醇二丙烯酸酯和1,6-己二醇乙氧基化二丙烯酸酯。
2. 如权利要求1所述的制品,其特征在于,所述聚合物材料包括由二丙烯酸四(乙二醇)酯或二甲基丙烯酸甘油酯形成的均聚物,或者由以下物质形成的共聚物:(i) 二甲基丙烯酸二(乙二醇)酯和新戊二醇二甲基丙烯酸酯,(ii) 二甲基丙烯酸甘油酯和二甲基丙烯酸三(乙二醇)酯,(iii) 二甲基丙烯酸甘油酯和1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯,(iv) 二丙烯酸四(乙二醇)酯和三羟甲基丙烷三丙烯酸酯。
3. 如权利要求1所述的制品,其特征在于,所述聚合物材料主要由下述物质构成:由二丙烯酸四(乙二醇)酯或二甲基丙烯酸甘油酯形成的均聚物,或者由以下物质形成的共聚物:(i) 二甲基丙烯酸二(乙二醇)酯和新戊二醇二甲基丙烯酸酯,(ii) 二甲基丙烯酸甘油酯和二甲基丙烯酸三(乙二醇)酯,(iii) 二甲基丙烯酸甘油酯和1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯,(iv) 二丙烯酸四(乙二醇)酯和三羟甲基丙烷三丙烯酸酯。

4. 如权利要求 1 所述的制品,其特征在于,所述置于制品表面上的聚合物材料的表面积大于约  $5\text{mm}^2$ 。

5. 如权利要求 1 所述的制品,其特征在于,所述制品由下述方法制造:

在挥发性有机溶剂中稀释一种或多种单体;

将稀释的单体沉积在制品的基材表面上;

蒸发基本上所有的溶剂;以及

聚合所述单体形成附着在表面上的聚合物层。

6. 如权利要求 6 所述的制品,其特征在于,所述挥发性溶剂是乙醇。

7. 如权利要求 1 所述的制品,其特征在于,它还包括井,其中,其上沉积所述聚合物材料的基材的表面位于所述井中。

8. 如权利要求 1 所述的制品,其特征在于,所述制品选自多井板、皮氏培养皿、烧杯、管和烧瓶。

9. 一种干细胞衍生的心肌细胞的培养物,包括:

包含置于表面上的聚合物材料的制品;

置于所述聚合物材料上的干细胞衍生的心肌细胞;以及

培养介质,其中培养所述干细胞衍生的心肌细胞,

其中,所述聚合物材料包括:

(i) 由二丙烯酸四(乙二醇)酯、二甲基丙烯酸甘油酯、二甲基丙烯酸三乙二醇酯、1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯或聚(乙二醇)二丙烯酸酯形成的均聚物,或者

(ii) 由以下物质形成的共聚物:

二丙烯酸四(乙二醇)酯和 1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯;

二甲基丙烯酸甘油酯和二丙烯酸四(乙二醇)酯;

二甲基丙烯酸甘油酯和二甲基丙烯酸三(乙二醇)酯;

二甲基丙烯酸甘油酯和 1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯;

二甲基丙烯酸甘油酯和聚(乙二醇)二丙烯酸酯;

二甲基丙烯酸三乙二醇酯和 1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯;

聚(乙二醇)二丙烯酸酯和二丙烯酸四(乙二醇)酯;

二甲基丙烯酸二(乙二醇)酯和二甲基丙烯酸四乙二醇酯;

二丙烯酸四(乙二醇)酯和三羟甲基丙烷三丙烯酸酯;

三羟甲基丙烷三丙烯酸酯和新戊二醇乙氧基化二丙烯酸酯;

二甲基丙烯酸二(乙二醇)酯和二丙烯酸四(乙二醇)酯;

二甲基丙烯酸二(乙二醇)酯和二甲基丙烯酸三(乙二醇)酯;

二甲基丙烯酸二(乙二醇)酯和新戊二醇二甲基丙烯酸酯;

二甲基丙烯酸四(乙二醇)酯和二甲基丙烯酸三(乙二醇)酯;

二甲基丙烯酸四(乙二醇)酯和 1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯;

二甲基丙烯酸四(乙二醇)酯和 1,6-己二醇乙氧基化二丙烯酸酯;

1,6-己二醇丙氧基化物二丙烯酸酯和聚(乙二醇)二丙烯酸酯;

1,6-己二醇丙氧基化物二丙烯酸酯和三羟甲基丙烷苯甲酸酯二丙烯酸酯;

1,6-己二醇丙氧基化物二丙烯酸酯和三羟甲基丙烷乙氧基化(1EO/OH)甲基二丙烯酸

酯；

1,6-己二醇丙氧基化物二丙烯酸酯和 1,6-己二醇乙氧基化二丙烯酸酯；  
新戊二醇二丙烯酸酯和三羟甲基丙烷乙氧基化 (1EO/OH) 甲基二丙烯酸酯；或  
新戊二醇二丙烯酸酯和 1,6-己二醇乙氧基化二丙烯酸酯。

10. 如权利要求 9 所述的培养物，其特征在于，所述聚合物材料包括由二丙烯酸四（乙二醇）酯或二甲基丙烯酸甘油酯形成的均聚物，或者由以下物质形成的共聚物：(i) 二甲基丙烯酸二（乙二醇）酯和新戊二醇二甲基丙烯酸酯，(ii) 二甲基丙烯酸甘油酯和二甲基丙烯酸三（乙二醇）酯，(iii) 二甲基丙烯酸甘油酯和 1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯，(iv) 二丙烯酸四（乙二醇）酯和三羟甲基丙烷三丙烯酸酯。

11. 如权利要求 9 所述的培养物，其特征在于，所述聚合物材料主要由下述物质构成：由二丙烯酸四（乙二醇）酯或二甲基丙烯酸甘油酯形成的均聚物，或者由以下物质形成的共聚物：(i) 二甲基丙烯酸二（乙二醇）酯和新戊二醇二甲基丙烯酸酯，(ii) 二甲基丙烯酸甘油酯和二甲基丙烯酸三（乙二醇）酯，(iii) 二甲基丙烯酸甘油酯和 1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯，(iv) 二丙烯酸四（乙二醇）酯和三羟甲基丙烷三丙烯酸酯。

12. 如权利要求 9 所述的培养物，其特征在于，所述培养介质是化学限定的介质。

13. 如权利要求 9 所述的培养物，其特征在于，所述干细胞衍生的心肌细胞是人类胚胎干细胞衍生的心肌细胞。

14. 一种培养干细胞衍生的心肌细胞的方法，包括：

将包含干细胞衍生的心肌细胞的悬浮液沉积在聚合物材料上；以及

在细胞培养介质中培养所述沉积的干细胞衍生的心肌细胞，其中，所述聚合物材料包括：

(i) 由二丙烯酸四（乙二醇）酯、二甲基丙烯酸甘油酯、二甲基丙烯酸三乙二醇酯、1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯或聚（乙二醇）二丙烯酸酯形成的均聚物，或者

(ii) 由以下物质形成的共聚物：

二丙烯酸四（乙二醇）酯和 1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯；

二甲基丙烯酸甘油酯和二丙烯酸四（乙二醇）酯；

二甲基丙烯酸甘油酯和二甲基丙烯酸三（乙二醇）酯；

二甲基丙烯酸甘油酯和 1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯；

二甲基丙烯酸甘油酯和聚（乙二醇）二丙烯酸酯；

二甲基丙烯酸三乙二醇酯和 1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯；

聚（乙二醇）二丙烯酸酯和二丙烯酸四（乙二醇）酯；

二甲基丙烯酸二（乙二醇）酯和二甲基丙烯酸四乙二醇酯；

二丙烯酸四（乙二醇）酯和三羟甲基丙烷三丙烯酸酯；

三羟甲基丙烷三丙烯酸酯和新戊二醇乙氧基化二丙烯酸酯；

二甲基丙烯酸二（乙二醇）酯和二丙烯酸四（乙二醇）酯；

二甲基丙烯酸二（乙二醇）酯和二甲基丙烯酸三（乙二醇）酯；

二甲基丙烯酸二（乙二醇）酯和新戊二醇二甲基丙烯酸酯；

二甲基丙烯酸四（乙二醇）酯和二甲基丙烯酸三（乙二醇）酯；

二甲基丙烯酸四（乙二醇）酯和 1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯；

二甲基丙烯酸四（乙二醇）酯和 1,6- 己二醇乙氧基化二丙烯酸酯；  
1,6- 己二醇丙氧基化物二丙烯酸酯和聚（乙二醇）二丙烯酸酯；  
1,6- 己二醇丙氧基化物二丙烯酸酯和三羟甲基丙烷苯甲酸酯二丙烯酸酯；  
1,6- 己二醇丙氧基化物二丙烯酸酯和三羟甲基丙烷乙氧基化（1EO/OH）甲基二丙烯酸酯；

1,6- 己二醇丙氧基化物二丙烯酸酯和 1,6- 己二醇乙氧基化二丙烯酸酯；  
新戊二醇二丙烯酸酯和三羟甲基丙烷乙氧基化（1EO/OH）甲基二丙烯酸酯；或  
新戊二醇二丙烯酸酯和 1,6- 己二醇乙氧基化二丙烯酸酯。

15. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，在细胞培养介质中培养所述沉积的干细胞衍生的心肌细胞包括在化学限定的介质中培养心肌细胞。

16. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述聚合物材料包含由二丙烯酸四（乙二醇）酯形成的均聚物。

17. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述聚合物材料包含由二甲基丙烯酸二（乙二醇）酯和新戊二醇二甲基丙烯酸酯形成的共聚物。

18. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述聚合物材料包含由二甲基丙烯酸甘油酯形成的均聚物。

19. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述聚合物材料包含由二甲基丙烯酸甘油酯和二甲基丙烯酸三（乙二醇）酯形成的共聚物。

20. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述聚合物材料包含由二甲基丙烯酸甘油酯和 1,4- 丁二醇二甲基丙烯酸酯形成的共聚物。

21. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述聚合物材料包含由二丙烯酸四（乙二醇）酯和三羟甲基丙烷三丙烯酸酯形成的共聚物。

22. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述干细胞衍生的心肌细胞是人类胚胎干细胞衍生的心肌细胞。

## 用于培养干细胞衍生的心肌细胞的合成表面

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求 2008 年 1 月 30 日提交的美国临时申请 61/062,921 的优先权,其内容作为整体在本文中引用作为参考。

[0003] 领域

[0004] 本发明涉及细胞培养制品及其使用方法,更具体地说,涉及适于支持干细胞衍生的心肌细胞的培养的制品。

[0005] 背景

[0006] 多能干细胞如人类胚胎干细胞 (hESC) 具有分化为三种胚层中的任一种的能力,在人体中形成任何成人细胞类型。这种独特的性能提供了用于开发对于大量严重的细胞退化疾病,如糖尿病、脊髓损伤、心脏病等的新治疗方法的潜力。例如,不像诸如皮肤或肝脏的器官,心脏不能再生足量的心肌细胞来进行大修。因此,心脏修补可受益于心肌细胞,其能从 hESC 或其它多能干细胞中分化出来,植入心脏中。

[0007] 但是,在开发这种基于 hESC 的治疗方法的过程中存在阻碍。这些阻碍包括在组织培养中获得并保持适量的未分化的 hESC 并控制其分化以产生特定的细胞类型。干细胞培养,如 hES 细胞培养通常用少量的来自细胞银行或细胞库的细胞做种,然后在未分化的状态下扩增直至分化对于给定的治疗用途是所需的。为了达到这点,hESC 或其分化的细胞目前在含有动物衍生的成分的表面或介质(如滋养层、牛胎儿血清或 MATRIGEL)存在下培养。这些用于培养环境的动物衍生的添加物将细胞暴露于潜在有害的病毒或其它传染性试剂下,这些有害的病毒或其它传染性试剂会转移到患者上或损害 hESC 的一般性培养和维持。另外,这些生物产品具有批变异、免疫响应和存储寿命有限的缺点。

[0008] 已经采取一些步骤来在不含动物衍生的成分的介质中或表面上培养 hESC。但是,hESC 或其分化的衍生物响应能以预测,因为表面或培养基质的成分改变。当然也有一些优点。例如,已经在不含限定的血清的介质中培养 hESC 衍生的心肌细胞。虽然这种培养体系不是完全排外的培养体系(当使用的基体含有动物衍生的成分如动物胶和 MATRIGEL 时),但是其确实提供了朝向 hESC 衍生的心肌细胞最终临床应用的步骤。作为进一步的例子,一些合成表面被证明能够支持人类上皮干细胞分化为上皮细胞。但是,使用的体系依赖于细胞培养的血清介质,其仍然会潜在地导致上述对于所有生物动物衍生的成分的问题。迄今为止,使用化学限定的介质和合成表面的完全不含动物的体系并未被证明可用于培养干细胞或延伸自干细胞的细胞。

[0009] 简述

[0010] 本发明公开了,尤其是,可用于在化学限定的介质中培养干细胞衍生的心肌细胞的合成表面。

[0011] 在一个实施方式中,提供了用于培养干细胞衍生的心肌细胞的方法。该方法包括:在聚合物材料上沉积含有干细胞衍生的心肌细胞的悬浮液,并在细胞培养基质中培养沉积的干细胞衍生的心肌细胞。所述聚合物材料包含选择的一种或多种丙烯酸酯单体的均聚物或共聚物。

[0012] 在一个实施方式中,提供了干细胞衍生的心肌细胞的培养物。所述培养物包括具有置于表面上的聚合物材料的制品。该培养物还包括置于聚合物材料上的干细胞衍生的心肌细胞以及其中培养了干细胞衍生的心肌细胞的培养介质。所述聚合物材料包含选择的一种或多种丙烯酸酯单体的均聚物或共聚物。

[0013] 在一个实施方式中,提供了用于在化学限定的介质中培养干细胞衍生的心肌细胞的细胞培养制品。所述制品包括具有表面和置于表面上的聚合物材料的基材。所述聚合物材料包含选择的一种或多种丙烯酸酯单体的均聚物或共聚物。

[0014] 本文中提供的各种实施方式中的一种或多种提供了一种或多种相比用于培养干细胞衍生的心肌细胞的现有表面的优点。例如,所述合成表面减少了与具有得自或源自动物源的成分的表面相关的污染组织。这些表面还可提供相比具有生物成分的那些表面改善的存储寿命。在化学限定的介质中培养干细胞衍生的心肌细胞的能力还减少了潜在的污染组织。另外,在合成表面或化学限定的介质的能力下,批与批之间的变异会更少,导致培养结果和预期的再现性改善。在结合附图阅读了本文后,这些及其它优点将从下述具体描述中容易明白。

#### 附图说明

[0015] 图 1A-B 是合成聚合物层涂覆的制品的侧视图。

[0016] 图 2A-C 是多壁细胞培养皿的截面图。该培养皿是未涂覆的(图 2A)和涂覆的(图 2B-C)。

[0017] 图 3 是在实施例 1 中描述的制剂 1(A)、制剂 18(B) 和 MATRIGEL(C) 的化学限定的介质中和表面上培养的干细胞衍生的心肌细胞的荧光图像。绿:Nkx 2.5 ;红: $\alpha$ -辅肌动蛋白。

[0018] 所述附图无需按比例绘制。图中使用的相同数字表示相同的成分、步骤等。但是,应明白,在给定的图中使用数字来指代成分并不意味着限制另一张图中标有相同数字的成分。另外,使用不同的数字指代成分并不意味着标有不同数字的成分不能是相同的或类似的。

#### 具体实施方式

[0019] 在以下的详细描述中,对附图的参照构成其一部分,并且通过装置、体系和方法的若干具体实施方式进行说明。要理解,其它实施方式也是可期待的,并且可在不偏离本发明的范围或精神的前提下作出。因此,下述详细描述并非限制性的。

[0020] 本文中使用的所有科学和技术术语具有本领域使用的普通含义,除非另有说明。本文中提供定义有助于理解本文中经常出现的某些术语,并不意味着限制本发明的范围。

[0021] 如本说明书和所附权利要求书中所使用的,单数形式“一”、“一种”和“该”包括复数形式的实施方式,除非文本中清楚地另有说明。如本说明书和所附权利要求书中所使用的,术语“或”通常包括“和/或”,除非文本中清楚地另有说明。

[0022] 除非另有说明,组合物(如溶液)中化合物的比例基于体积比。

[0023] 如本文中使用的,“具有”、“包括”、“包含”等以其开放的形式使用,通常是指“包括,但不限于”。

[0024] 如本文中使用的,术语“丙烯酸酯”包括含有丙烯酸酯部分或甲基丙烯酸酯部分的化合物。丙烯酸酯部分是下式表示的部分:CH<sub>2</sub>CHC(O)O-。甲基丙烯酸酯部分是下式表示的部分:CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)C(O)O-。出于本发明的目的,术语“丙烯酸酯”包括表 1 中公开的具体化合物。本文中使用的“丙烯酸酯”和“甲基丙烯酸酯”可互换,除了文本清楚地另有说明之外,例如,当命名具体的化合物或化合物组时。

[0025] 本发明公开了,尤其是,具有用于培养干细胞衍生的心肌细胞的合成表面的制品以及用于在该表面上培养干细胞衍生的心肌细胞的方法。在一些实施方式中,所述合成表面与化学限定的介质结合使用以培养干细胞衍生的心肌细胞。所述表面可用于将干细胞如 hESC 分化为心肌细胞。

#### [0026] 1. 细胞培养制品

[0027] 参看图 1,示出了用于培养细胞的制品 100。该制品 100 包括具有表面 15 的基底材料基材 10。合成聚合物涂层 20 置于基底材料基材 10 的表面 15 上。尽管未示出,要理解,合成聚合物涂层 20 可置于基底材料基材 10 的一部分上。基底材料 10 可以是任何适于培养细胞的材料,包括陶瓷物质、玻璃、塑料、聚合物或共聚物,它们的任意组合,或者材料之间的涂层。所述基底材料 10 包括玻璃材料,如钠钙玻璃、耐火玻璃、高硼硅酸耐热玻璃、石英玻璃;硅;塑料或聚合物,包括树枝状聚合物如聚(氯乙烯)、聚(乙烯醇)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(乙酸乙烯酯-马来酸酐)、聚(二甲基硅氧烷)单甲基丙烯酸酯、环烯烃聚合物、氟碳聚合物、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯亚胺;共聚物如聚(乙酸乙烯酯-合-马来酸酐)、聚(苯乙烯-合-马来酸酐)、聚(乙烯-合-丙烯酸)或者它们的衍生物等。

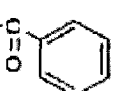
[0028] 适于细胞培养的制品 100 的例子包括单井和多井板,如 6、12、96、384 和 1536 井板、罐、培养皿、烧瓶、烧杯、板、滚瓶、载玻片如有室的和多室的培养载玻片、试管、盖玻片、杯、旋转瓶、灌注室、生物反应器和发酵桶。

[0029] 合成聚合物涂层 20 提供了其上可培养细胞的表面 25。所述合成聚合物涂层 20 包括聚合的(甲基)丙烯酸酯单体,选自下表 1 中提供的一组单体。其它材料(未示出)如肽可加入或结合入合成聚合物表面以产生仿生表面。


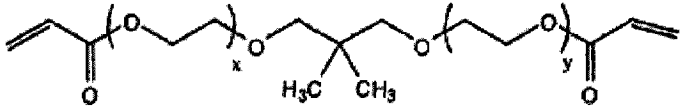
[0030] 表 1:丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯单体列表

[0031]



单体名称	单体结构
二丙烯酸四(乙二醇)酯	$\left( \text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2 \right)_2 \text{O}$
二甲基丙烯酸甘油酯	$\text{H}_2\text{C}=\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{C}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_2-\overset{\text{OH}}{\underset{\text{C}}{\text{C}}}\text{HCH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{C}}{\text{C}}}=\text{CH}_2$
二甲基丙烯酸三乙二醇酯	$\text{H}_2\text{C}=\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{C}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{C}}{\text{C}}}=\text{CH}_2$
1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯	$\text{H}_2\text{C}=\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{C}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{C}}{\text{C}}}=\text{CH}_2$
聚(乙二醇)二丙烯酸酯 (平均 $M_n \sim 258$ )	$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\left( \text{OCH}_2\text{CH}_2 \right)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}=\text{CH}_2$
二甲基丙烯酸二(乙二醇)酯	$\text{H}_2\text{C}=\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{C}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{C}}{\text{C}}}=\text{CH}_2$
二甲基丙烯酸四(乙二醇)酯	$\text{H}_2\text{C}=\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{C}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{C}}{\text{C}}}=\text{CH}_2$
1,6-己二醇丙氧基化物二丙烯酸酯	$\begin{aligned} &\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\left( \text{C}_3\text{H}_8\text{O} \right)_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 \\ &\text{H}_2\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\left( \text{C}_3\text{H}_8\text{O} \right)_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 \end{aligned}$
新戊二醇二丙烯酸酯	$\text{H}_2\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{C}}{\text{C}}}-\text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}-\text{CH}_2$
新戊二醇二甲基丙烯酸酯	$\text{H}_2\text{C}=\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{C}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{C}}{\text{C}}}-\text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{C}}{\text{C}}}=\text{CH}_2$
三羟甲基丙烷苯甲酸酯 二丙烯酸酯	$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_2-\overset{\text{CH}_2\text{CH}_3}{\underset{\text{C}}{\text{C}}}-\text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}=\text{CH}_2$ 

[0032]

三羟甲基丙烷乙氧基化 (1EO/OH)甲基	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2 \\ \text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2-\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2 \end{array}$
三环[5.2.1.0 <sup>2,6</sup> ]癸烷二甲 醇二丙烯酸酯	
新戊二醇乙氧基化二丙 烯酸酯	
三羟甲基丙烷三丙烯酸 酯	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_2 \\ \text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_2-\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_2 \end{array}$

[0033] 表 1 中列举的丙烯酸酯可通过现有技术中已知的方式合成或得自供货商如聚合科学股份有限公司 (Polysciences, Inc.)、西格玛阿帝奇股份有限公司 (Sigma Aldrich, Inc.) 和斯托默股份有限公司 (Sartomer, Inc.)。

[0034] 如图 1B 所示, 中间层 30 可置于基底材料 10 的表面 15 与合成聚合物涂层 20 之间。中间层 30 可构造为改善涂层 20 对基材 10 的粘结, 以促进单体扩散, 赋予表面 10 的未涂覆的部分以细胞厌恶的物质从而促进细胞在涂覆的区域上生长, 以提供与单体或溶剂相容的基材 (其中所述单体或溶剂与基底材料 10 不相容), 从而提供结构特征 (如果需要的话, 例如通过图案印刷等)。例如, 如果基材 10 是玻璃基材, 理想的是用环氧涂层或硅烷涂层处理玻璃基材的表面。对于不同的聚合物基底材料 10, 理想的是提供聚酰胺、聚酰亚胺、聚丙烯、聚乙烯或聚丙烯酸酯的中间层 30。尽管未示出, 要理解, 合成聚合物涂层 20 可置于中间层 30 的一部分上。还要理解, 中间层 30 可置于基底材料 10 的一部分上。

[0035] 在各个实施方式中, 用物理方法或化学方法处理基底材料 10 的表面 15 以赋予表面 15 理想的性能或特性。例如, 如下所述, 表面 15 可用电晕放电处理或等离子体处理。真空或大气压等离子体的例子包括射频 (RF) 和微波等离子体 (原发的和次生的)、介电势垒放电和分子或混合气体中产生的电晕放电, 所述气体包括空气、氧气、氮气、氩气、二氧化碳、一氧化二氮或水蒸气。

[0036] 合成聚合物涂层 20, 无论置于中间层 30 或基底材料 10 上时, 优选均匀地涂覆下层的基材。通过“均匀地涂覆”, 意味着在给定区域如培养皿的井壁的表面上的层 20 以约 5nm 或更大的厚度完全地涂覆该区域。虽然均匀地涂覆的表面的厚度可在表面上改变, 但是没有均匀地涂覆的表面区域, 通过该区域暴露下层 (中间层 30 或基底材料 10)。非均匀的表面上的细胞响应比之均匀表面上的细胞响应更为不定。

[0037] 合成聚合物涂层 20 可具有任何理想的厚度。但是, 已经发现, 较厚的涂层, 如大于约 10 微米的涂层, 在涂层的周边会更为均匀, 由于表面张力的原因。在各个实施方式中, 涂层 20 的厚度小于约 10 微米。例如, 厚度可以小于约 5 微米, 小于约 2 微米, 小于约 1 微米,

小于约 0.5 微米或小于约 0.1 微米。

[0038] 形成合成聚合物层 20 的聚合物材料可以交联至任何合适的程度。较高的交联度会导致减少的废弃物和减少的细胞毒性。

[0039] 制品 100, 在许多实施方式中, 是具有井的细胞培养器皿, 如培养皿、多井板、烧瓶、烧杯或其它具有井的容器。以下参看图 2, 由基底材料 10 形成的制品 100 可包括一个或多个井 50。井 50 包括侧壁 55 和表面 15。参看图 2B-C, 合成聚合物涂层 20 可置于表面 15 或侧壁 55 上 (或者, 如上参看图 1 所述, 一个或多个中间层 30 可置于表面 15 或侧壁 55 与合成聚合物涂层 20 之间) 或其一部分上。

[0040] 在各个实施方式中, 制品 100 包括均匀涂覆的层 20, 其具有面积大于约  $5\text{mm}^2$  的表面 25。当表面 15 的面积太小时, 可靠的细胞响应不会容易观察到, 因为一些细胞如人类胚胎干细胞作种为细胞群体或族 (例如, 具有约 0.5mm 的直径), 并且需要合适的表面以确保足量的群体的附着以产生定量的细胞响应。在大量的实施方式中, 制品 100 具有井 50, 该井具有均匀涂覆的表面 15, 其中表面 15 的面积大于约  $0.1\text{cm}^2$ , 大于约  $0.3\text{cm}^2$ , 大于约  $0.9\text{cm}^2$ , 或者大于约  $1\text{cm}^2$ 。

[0041] 2. 合成聚合物层的涂覆

[0042] 合成聚合物层可通过任何已知的或将要开发的方法置于细胞培养制品的表面上。较佳地, 合成聚合物层提供了在一般的细胞培养条件下不会分层的均匀的层。合成聚合物表面可通过共价或非共价相互作用与基底材料相连。可将合成聚合物表面与基材连接的非共价相互作用的例子包括化学吸附、氢键合、表面渗透、离子键合、范德华力、疏水相互作用、偶极子-偶极子相互作用、机械互锁及其组合。

[0043] 在各个实施方式中, 所述基底材料基材表面根据共同待审的申请的教导来涂覆, 该申请提交于同一日期, 发明人为 Gohman 等, 代理人案卷号为 20726, 发明名称为“干细胞培养制品及筛选”, 其整体在本文中引用作为参考, 前提是其不会与本发明冲突。

[0044] 在许多实施方式中, 单体沉积在细胞培养制品的表面上并就地聚合。在这些实施方式中, 基底材料在本文中被称为“基材”, 其上沉积有合成聚合物材料。聚合可在液相或体相中进行。

[0045] 由于上表 1 中例举的许多单体是粘性的, 理想的是在分散在表面上之前, 在合适的溶剂中稀释单体以降低粘度。降低粘度会允许形成合成聚合物材料的更薄、更均匀的层。本领域技术人员将能够容易地选择合适的溶剂。较佳地, 所述溶剂与形成细胞培养制品和单体的材料是相容的。理想的是选择对要培养的细胞无毒并且不会干扰聚合反应的单体。或者, 理想的是选择能够基本上完全去除或者去除到无毒或不再干扰聚合的程度的溶剂。在这些情况下, 理想的是溶剂能够容易地去除而无需苛刻的条件如真空或极热。可挥发的溶剂是这些容易去除的溶剂的例子。

[0046] 适用于本文中描述的涂层制品用的各种条件的一些溶剂包括: 乙醇、异丙醇、乙酸乙酯、二甲基甲酰胺 (DMF) 和二甲基亚砷 (DMSO)。如共同待审的申请中描述的, 当需要在聚合之前去除溶剂时, 乙醇是特别合适的溶剂。

[0047] 所述单体可用溶剂来稀释, 通过合适量的溶剂达到所需的粘度和单体浓度。通常, 本发明中使用的单体组合物含有约 1-99% 的单体。举例来说, 单体可用乙醇溶剂稀释以提供具有约 1-50% 的单体, 或者约 1-10 体积% 的单体的组合物。单体可用溶剂稀释, 使得聚

合物层 20 达到所需的厚度。如上所述,如果沉积的单体太厚,会形成不均匀的表面。如实施例中所进一步详细描述,当单体-溶剂组合物以大于约 8 微升/cm<sup>2</sup> 的表面 15 的体积沉积在井 50 的表面 15 上时,可观察到不均匀的表面。在各个实施方式中,单体-溶剂组合物以等于或小于约 7 微升/cm<sup>2</sup> 的表面 15 的体积沉积在井 50 的表面 15 上。例如,单体-溶剂组合物以等于或小于约 5 微升/cm<sup>2</sup> 的表面 15 的体积沉积在井 50 的表面 15 上,或者等于或小于约 2 微升/cm<sup>2</sup> 的表面 15 的体积沉积在井 50 的表面 15 上。

[0048] 在各个实施方式中,合成聚合物表面沉积在中间层的表面上,该中间层通过共价或非共价相互作用,直接或者通过一个或多个附加的中间层(未示出)与基底材料连接。在这些实施方式中,中间层在本文中被称为“基材”,其上沉积有合成聚合物表面。

[0049] 在各个实施方式中,处理基底材料的表面。表面可处理以改善合成聚合物表面对基底材料表面的粘结,以促进单体在基底材料表面上的扩散等。当然,基底材料可处理以达到与中间层类似的目的。在各个实施方式中,表面是电晕放电处理或真空等离子体处理的。可得自这些处理的高表面能可促进单体扩散和均匀涂覆。可使用的真空等离子体处理的例子包括微波真空等离子体处理和射频真空等离子体处理。所述真空等离子体处理可在反应性气体如氧气、氮气、氨或一氧化氮存在下进行。

[0050] 为了形成合成聚合物表面,聚合了上表 1 中存在的一种或多种单体。如果使用一种单体,所述聚合物将被称为单体的均聚物。如果使用两种或更多种不同的单体,所述聚合物将被称为单体的共聚物。使用的单体可以是单官能的、二官能的或更高官能的。当使用两种或更多种单体时,可改变单体的比例。在不同的实施方式中,使用两种单体,并且第一种单体与第二种单体的体积比约为 5 : 95 至 95 : 5。例如,第一种单体与第二种单体的体积比约为 10 : 90 至 90 : 10,约为 20 : 80 至 80 : 20,约为 30 : 70 至 70 : 30。在一些实施方式中,第一种单体与第二种单体的体积比约为 50 : 50、30 : 70 或 10 : 90。要理解,聚合物的分子量可通过改变单体的浓度或者二官能或更高官能的单体与单官能单体的比例来控制。二官能或更高官能的单体的浓度增加会增加链中的交联度。

[0051] 除了形成聚合物层的单体,形成所述层的组合物可包括一种或多种其它化合物,如表面活性剂、湿润剂、光引发剂、热引发剂、催化剂、活化剂和交联剂。

[0052] 可使用任何合适的聚合引发剂。本领域技术人员将能容易地选择合适的引发剂,例如自由基引发剂或阳离子引发剂,适于与表 1 中列举的单体一同使用。在各个实施方式中,使用 UV 光以产生自由基单体来引发链聚合。

[0053] 可使用任何合适的引发剂。聚合引发剂的例子包括有机过氧化物、偶氮化合物、醌、亚硝基化合物、酰基卤、脞、巯基化合物、吡喃洋(pyrylium)化合物、咪唑、氯三嗪、苯偶姻、苯偶姻烷基醚、二酮、苯基酮或其混合物。合适的市售紫外活化和可见光活化的光引发剂的例子例如 IRGACURE 651、IRGACURE 184、IRGACURE 369、IRGACURE 819、DAROCUR 4265 和 DAROCUR 1173,得自纽约州塔利顿希巴特殊化学品公司(Ciba Specialty Chemicals),以及 LUCIRIN TPO 和 LUCIRIN TPO-L,得自巴斯夫公司(BASF,北卡罗来纳州夏洛特)。

[0054] 光敏剂也可包括在合适的引发剂体系中。有代表性的光敏剂具有羰基或叔氨基或其混合物。具有羰基的光敏剂包括二苯甲酮、苯乙酮、苯偶酰、苯醛、邻氯苯醛、咕吨酮、噻吨酮、9,10-蒽醌和其它芳香酮。具有叔胺的光敏剂包括甲基二乙醇胺、乙基二乙醇胺、三乙醇胺、苯基甲基乙醇胺和二甲基氨基乙基苯甲酸酯。市售的光敏剂包括 QUANTICURE ITX、

QUANTICURE QTX、QUANTICURE PTX、QUANTICURE EPD, 得自比德尔索尔公司 (Biddle Sawyer Corp.)。

[0055] 通常, 光敏剂或光引发剂体系的量为约 0.01-10 重量%。

[0056] 阳离子引发剂的例子包括镧阳离子的盐, 如芳基钨盐, 以及有机金属盐如离子芳烃体系。

[0057] 在各个实施方式中 (其中单体在沉积在基材表面上之前稀释在溶剂中), 在聚合之前去除溶剂。所述溶剂可以通过任何合适的机制或方法去除。如共同待审的申请中所述, 已经发现, 在固化之前去除基本上所有的溶剂允许更好地控制固化动力学和转化的单体的量。当单体的转化率增加时, 减少了废物产生和细胞毒性。

[0058] 无论在体相 (基本上不含溶剂) 或溶剂相中聚合, 单体通过合适的引发机制聚合。许多这些机制是本领域所熟知的。例如, 可增加温度以活化热引发剂, 通过暴露在合适的光波长下来活化光引发剂等。根据许多实施方式, 单体或单体混合物使用 UV 光固化。固化宜在惰性气体保护 (如氮气保护) 下发生, 以防止氧气抑制。合适的 UV 光与气体保护的结合可增加聚合转化率, 确保涂层完整性并减少毒性。

[0059] 固化的合成聚合物层可用溶剂清洗一次或多次以去除杂质如未反应的单体或低分子量聚合物。在各个实施方式中, 用乙醇溶剂清洗该层, 例如大于约 70% 乙醇、大于约 90% 乙醇、大于约 95% 乙醇或大于约 99% 乙醇。使用乙醇溶剂进行清洗不仅能够用于去除杂质 (该杂质是毒性), 还可用于在用细胞培养之前对表面进行消毒。

[0060] 3. 在合成聚合物层上培养细胞

[0061] 如上所述, 根据任何合适的方案, 干细胞衍生的心肌细胞可在合成聚合物层上培养。本文中使用的“干细胞衍生的心肌细胞”是指得自干细胞的分化的心肌细胞。在一些实施方式中, 干细胞是多能的 (multipotent), 全能的或多能性 (pluripotent) 的干细胞。在一些实施方式中, 所述细胞可存在于个体的器官或组织中。在许多实施方式中, 所述干细胞是胚胎干细胞, 如人类胚胎干细胞。

[0062] 因为人类胚胎干细胞 (hES) 具有在未分化的状态下在培养物中连续生长的能力, 用于本发明中的 hES 细胞可得自创建的细胞系。已创建的人类胚胎干细胞系的例子包括, 但不限于 H1、H7、H9、H13 或 H14 (得自威斯康星大学创建的 WiCell) (Thompson (1998) Science 282 :1145); hESBGN-01、hESBGN-02、hESBGN-03 (佐治亚州雅典 (Athens) 的布雷莎基因股份有限公司 (BresaGen, Inc.)); HES-1、HES-2、HES-3、HES-4、HES-5、HES-6 (得自新加坡的 ES 细胞国际股份有限公司 (ES Cell International, Inc.)); HSF-1、HSF-6 (得自旧金山的加州大学); I 3、I 3.2、I 3.3、I 4、I 6、I 6.2、J 3、J 3.2 (得自以色列海法的技术 - 以色列技术学院 (Technion-Israel Institute of Technology)); UC SF-1 和 UCSF-2 (Genbacev 等, Fertil. Steril. 83(5) :1517-29, 2005); 系 HUES 1-17 (Cowan 等, NEJM 350(13) :1353-56, 2004); 以及系 ACT-14 (Klimanskaya 等, Lancet, 365(9471) :1636-41, 2005)。用于本发明的胚胎干细胞也可直接得自原生胚胎组织。通常, 在胚胎阶段使用冷冻的体外受精卵来进行, 其可以另外地丢弃。

[0063] 本发明的心肌细胞也可从诱发的灵长类多能干 (iPS) 细胞分化。iPS 细胞称为得自幼年或成年哺乳动物如人类的细胞, 是基因改性的, 例如通过用一种或多种合适的载体转染, 使得其重组以获得多能干细胞如 hES 细胞的表型。由这些重组的细胞获得的表型特

点包括分离自胚胎的类似形态的干细胞,以及表面抗原表达、基因表达和末端酶活性类似的胚胎衍生的胚胎干细胞。iPS 细胞通常具有分化为至少一种细胞类型的能力,所述类型选自原生胚层中的每一种:外胚层、内胚层和中胚层,因此适于分化为心肌细胞。iPS 细胞如 hES 细胞在注入免疫缺陷的老鼠如 SCID 老鼠中时也形成畸胎瘤 (Takahashi 等, (2007) Cell 113(1):861; Yu 等, (2007) 科学 (Science) 318:5858)。

[0064] 干细胞衍生的心肌细胞可通过合适的方法得到。获得这些细胞的一种方式描述在 Laflamme 等的“*Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rats*”, Nature Biotechnology, 25:1015-1024 (2007)。简言之,未分化的人类胚胎干细胞如得自磁性 H7 人类胚胎干细胞系的那些细胞可做种在涂覆有 MATRIGEL 的板上,密度约为 100000 细胞/cm<sup>2</sup>,每日用 hES 细胞生长介质 (KO DMEM+20%血清置换,1mM L-谷氨酰胺,1% NEAA,0.1mM 2-ME+hbFGF (80ng/ml) 和 TGFβ1 (0.5ng/ml)) 重复进料。为了诱发分化,可用补充有约 100ng/ml 人类重组苯丙酸诺龙 A (得自 R&D 体系公司 (R&D Systems)) 的 RPMI-B27 介质 (得自英威特根公司 (Invitrogen)) 置换生长介质约 24 小时,然后用 10ng/ml 人类重组 BMP4 (得自 R&D 体系公司) 置换 4 天。当然,也可使用任何其它合适的方法 (参见,例如美国专利 7,425,448)。

[0065] 在种植细胞之前,所述细胞可以是收获的并悬浮在合适的介质中,所述介质例如生长介质,其中要培养的细胞一次种植在表面上。例如,所述细胞可悬浮并培养在含血清的介质中、条件培养基中或化学限定的介质中。本文中使用的“化学限定的介质”是指不含未知组合物的成分的细胞培养介质。在各个实施方式中,化学限定的介质可不含蛋白质、水解物 (hydrolysate) 或未知来源的肽。在一些实施方式中,条件培养基含有未知组成的多肽或蛋白质,例如重组的生长激素。由于化学限定的介质的所有成分具有已知的化学结构和组成,可减少培养条件的可变性,因此细胞响应可变得更有再现性。另外,减少了污染的可能性。此外,放大实验的能力增强了,至少是因为上述原因。化学限定的细胞培养介质可购自英威特根公司 (Invitrogen Corporation, 1600 法拉第大街, PO Box 6482, 卡尔斯巴德, 加州 92008), 商品名为 **StemPro**<sup>®</sup>, 一种完全限定的, 不含血清和饲养物的介质 (SFM), 特别配制用于人类胚胎干细胞 (hESC) 的生长和扩展; 以及干细胞技术股份有限公司 (StemCell Technologies, Inc.), 商品名为 mTeSR<sup>™</sup>1, 用于人类胚胎干细胞的维持介质。

[0066] 所述细胞可以任何合适的浓度做种。通常,细胞以约 10000-500000 细胞/cm<sup>2</sup> 的基材做种。例如,细胞可以约 50000-150000 细胞/cm<sup>2</sup> 的基材做种。但是,可容易地使用更高和更低的浓度。培养时间和条件如温度、CO<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub> 水平、生长介质等将取决于被培养的细胞的性能并且可以容易地改变。在表面上培养的细胞的时间量可根据被研究的细胞响应或所需的细胞响应来改变。

[0067] 可使用任何合适的方法,视需要,以确认干细胞衍生的心肌细胞确实是心肌细胞或者使用的干细胞已经成功地分化为心肌细胞。例如,可研究某些心肌细胞-选择性标记的存在。这些标记包括 Nkx2.5 和 α-辅肌动蛋白、心脏肌钙蛋白 I。对这些标记的抗体可用于标准免疫细胞化学或流式细胞计技术。另外,细胞形态或功能,通过观察培养物中的搏动心肌细胞或者通过进行各种电生理学分析来确定细胞是否具有心肌细胞的特性。

[0068] 培养的干细胞衍生的心肌细胞可用于任何合适的目的,包括在培养物中,在动物中的研究,用于开发治疗用途,用于药物研发和毒物学或者用于心脏损伤 (由于梗死),例

如,如 Laflamme 等的 Nature Biotechnology (25 :1015-1024(2007)) 中所述。所述细胞也可用于根据已知方法产生 cDNA 库。所述 cDNA 库可用于研究分化的心肌细胞中的基因表达。例如,得自分化的心肌细胞的库可比拟得自未分化的干细胞的 cDNA 库(心肌细胞衍生自该库),从而允许与分化和心肌细胞的开发有关的基因验证和分离。

[0069] 下述提供了非限制性的实施例,其描述了上述制品和方法的各种实施方式。

[0070] 实施例

[0071] 实施例 1 :用于在化学限定的介质中培养干细胞衍生的心肌细胞的丙烯酸涂层表面的验证

[0072] 1. 涂层制备

[0073] 由不同丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯单体的均聚物或共聚物来制备丙烯酸涂层表面。对于共聚物,使用两种不同的丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯单体。简言之,将单体与 1% w/w 的光引发剂 Irgacure 819(希巴特殊化学品公司)混合,并以 70 : 30 体积比与其它单体制剂一同使用或掺混(单体与 1% w/w 的光引发剂)。然后,将制剂以 2.5  $\mu$ L 的体积置于经真空等离子体处理的环烯烃共聚物培养皿(由康宁生命科学开发集团(Corning Life Science Development Group)提供)的井中。该培养皿允许水平地躺平 30 分钟以使制剂散布。在氮气吹扫的箱(具有熔融石英窗)中用 13mW/cm<sup>2</sup> 脉冲(100Hz)的紫外光(Xenon RC-700)固化所述涂层。在细胞培养之前用 25-35kGy  $\gamma$  辐射对培养皿进行消毒。

[0074] 2. 细胞制备和分析

[0075] 在实验之前,将 H7hES 细胞以未分化的状态保持在 SR 介质(KO-DMEM, 20% KO-血清置换, 1mM L-谷氨酰胺, 0.1mM  $\beta$ -巯基乙醇, 1%次要的氨基酸, 80ng/ml hbFGF 和 0.5ng/ml TGF $\beta$ 1) 的 MATRIGEL 涂覆的培养皿上。使用直接分化方案产生 hESC 衍生的心肌细胞。简言之,用 200U/ml 胶原酶 IV 获得未分化的 H7 细胞并在 SR 介质中以 100000 细胞/cm<sup>2</sup> 的密度做种在 MATRIGEL 涂覆的培养皿上。每天更换介质对细胞培养 6 天。通过用 SR 介质代替 RPMI-B27 介质,补充 100ng/ml 人类重组苯丙酸诺龙 A24 小时,然后补充 10ng/ml 人类重组 BMP4 四天来引发心脏分化。此时,通过 Acutase 处理分离细胞,再次悬浮在不含生长因子的 RPMI-B27 介质中,并以 100000 细胞/cm<sup>2</sup> 的密度做种在涂覆有不同丙烯酸酯的二元混合物或 MATRIGEL 作为正控制的康宁 CB/TOPAS 96-井培养皿上。每隔 2-3 天同样地更换介质,再培养细胞 2-3 周。用显微镜检查并记录自发的搏动活性。

[0076] 在分化方案的最后,用对心肌细胞(CM)特异性标记免疫性污染的 4%多聚甲醛、Nkx2.5 和  $\alpha$ -辅肌动蛋白固定细胞,并用 4'-6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)复染色以污染细胞核。在用 ArrayScan 扫描各个培养皿之后,对各个表面进行下述定量分析:1) TNC :基于 DAPI 正细胞数的细胞总数;2) TNC :CM 的总数,基于 Nkx2.5-正细胞数;3) CM 产率 = TNC/TNC。

[0077] 3. 结果

[0078] 发现仅有少部分测试的表面支持细胞生长,同时保持一些关键的特征和功能。支持在化学限定的介质中分化的人类胚胎心肌细胞生长的涂层表面的例子示于表 2,其中单体(1)与单体(2)的体积比为 70 : 30。这些表面是特征化的并给定“级别”,基于细胞形貌的定性判定及其对表面的粘附。根据以下标准考虑来进行丙烯酸酯表面定级:1) 总的细胞数;2) 总的 CM 数;3) CM 产率;4) 搏动区域的存在;5) 与 Matrigel 衍生的 CM 形貌的相似

度。观察到的对分化的胚胎肌细胞的定性注释示于表 2, 表 2 还示出了判定的级别。例如, “Sim MA” 是表示细胞生长在与在 Matrigel™ 上生长的细胞类似的表面上的注释。“Sim OP” 是表示细胞生长在与在等离子体处理的环烯烃共聚物表面上生长的细胞类似的表面 (由肯塔基州的佛罗伦萨的 TOPAS 公司出售的 TOPAS® 表面) 上的注释。这些注释还表示一些表面支持开始在培养物中博动的分化的胚胎肌细胞。

[0079] 表 2: 支持在化学限定的介质中的 hES 细胞衍生的心肌细胞的培养的丙烯酸聚合物的实施例组成

[0080]

制剂 ID	单体(I)	单体(2)
95-1	二丙烯酸四(乙二醇)酯 100%	
95-2	二甲基丙烯酸甘油酯 100%	
90-2	二甲基丙烯酸三乙二醇酯 100%	
90-4	1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯 100%	
95-3	聚(乙二醇)二丙烯酸酯 100% (poly(ethylene glycol) diacrylate)	
122-1	二丙烯酸四(乙二醇)酯 70%	二甲基丙烯酸甘油酯 30%
122-3	二丙烯酸四(乙二醇)酯 70%	1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯 30%
27-2	二丙烯酸四(乙二醇)酯 70%	三羟甲基丙烷三丙烯酸酯 30%
123-1	二甲基丙烯酸甘油酯 70%	二丙烯酸四(乙二醇)酯 30%
123-2	二甲基丙烯酸甘油酯 70%	二甲基丙烯酸三(乙二醇)酯 30%
123-3	二甲基丙烯酸甘油酯 70%	1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯 30%
123-4	二甲基丙烯酸甘油酯 70%	二甲基丙烯酸聚(乙二醇)酯 30%
123-6	二甲基丙烯酸三乙二醇酯 70%	二甲基丙烯酸甘油酯 30%
123-7	二甲基丙烯酸三乙二醇酯 70%	1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯 30%
124-2	1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯 70%	二甲基丙烯酸甘油酯 30%
124-3	1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯 70%	二甲基丙烯酸三乙二醇酯 30%
124-5	聚(乙二醇)二丙烯酸酯 70%	二丙烯酸四(乙二醇)酯 30%
133-1	二甲基丙烯酸二(乙二醇)酯 70%	二甲基丙烯酸四乙二醇酯 30%
134-1	二甲基丙烯酸四乙二醇酯 70%	二甲基丙烯酸二(乙二醇)酯 30%
140-1	三羟甲基丙烷三丙烯酸酯 70%	新戊二醇乙氧基化二丙烯酸酯 30%



[0081] 表 3:在丙烯酸酯聚合物表面上培养的 h7 分化的心肌细胞的细胞计数、细胞表面标记和功能

[0082]

ID	级别	搏动	平均细胞 计数/井	平均% Nkx2.5	心脏产率 (基于计数* Nkx2.5)	注释
95-2	A	y	19970	7	1397.9	Sim MA
90-2	C-		5420	14	758.8	Sim MA, 去皮的块
90-4	B-	y	6907	24	1657.68	Sim TOP
95-3	C	y	3788	24	909.12	
122-3	B		6061	3	181.83	Sim MA, 不搏动
123-1	B+	y	5250	5	262.5	Sim MA, 搏动
123-2	A		6327	7	442.89	良好的附着, 不搏动
123-3	A		6223	8	497.84	良好的附着, 搏动
123-4	B-		4954	4	198.16	许多附着, 染色
123-7	C		4246	15	636.9	去皮的
124-2	A	y	3798	21	797.58	Sim TOP, 搏动
124-3	B	y	2267	8	497.84	Sim TOP, 搏动
124-5	C	y	940	27	253.8	搏动, 但是附着较差
140-1	B-	y	2886	33	952.38	Sim TOP

[0083] 对于其它测试的均聚物和共聚物的组合,在分化程序的最后观察到非常低的心肌细胞产率或没有观察到心肌细胞产率,因为在这些表面上存在低总细胞数或低 Nkx2.5<sup>+</sup> 正细胞。

[0084] 图 3 示出了制剂 95-2(A)、制剂 27-2(B) 和 MATRIGEL(C) 的表面上培养的分化的心肌细胞的荧光图像。细胞形貌, Nkx 2.5 标记表述(绿)和  $\alpha$ -辅肌动蛋白标记表述(红)类似于 MATRIGEL。另外,图 3 中描述的细胞显示在用多聚甲醛固定之前显示出搏动。

[0085] 因此,公开了“用于培养干细胞衍生的心肌细胞的合成表面”的各个实施方式。本领域技术人员将会理解,本文中描述的分析、组成、成套设备和方法可用不同于本文中描述的实施方式来实施。所公开的实施方式是用于说明的目的,而并非是显著。

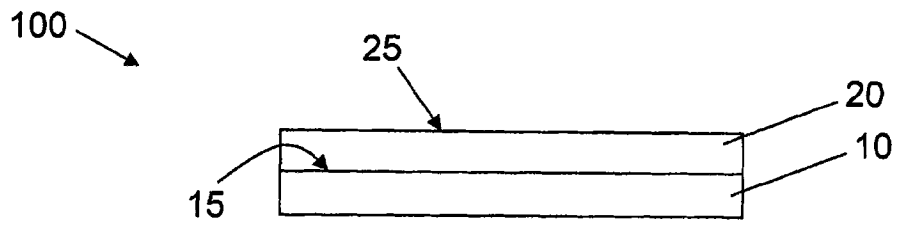


图 1A

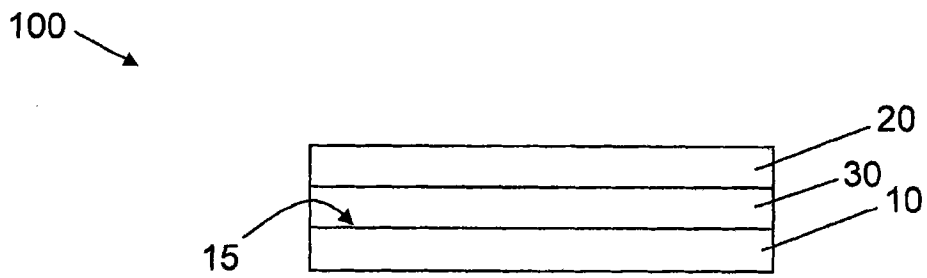


图 1B

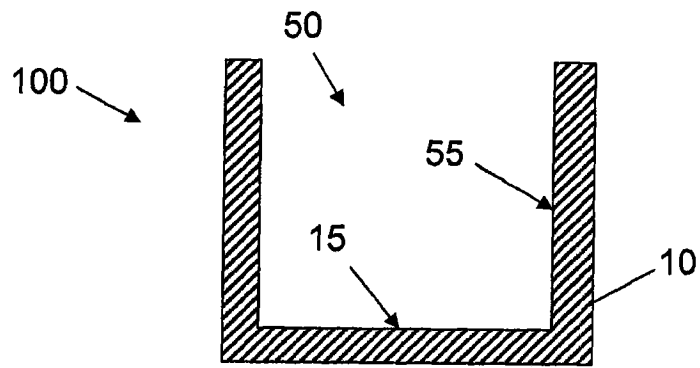


图 2A

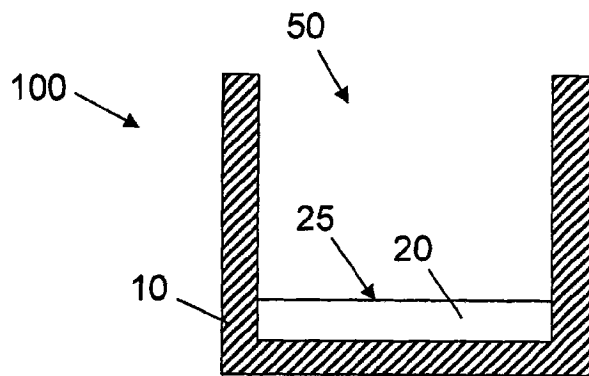


图 2B

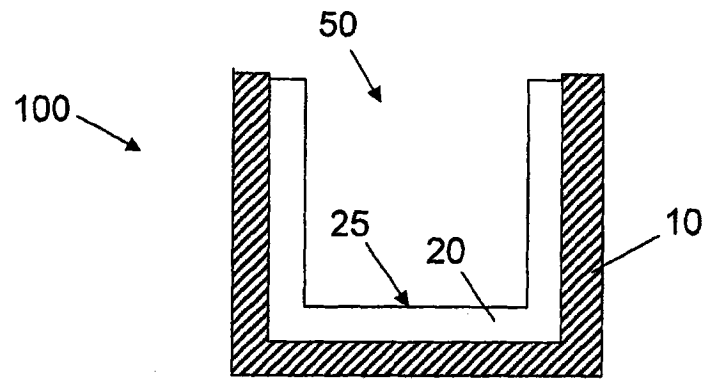


图 2C

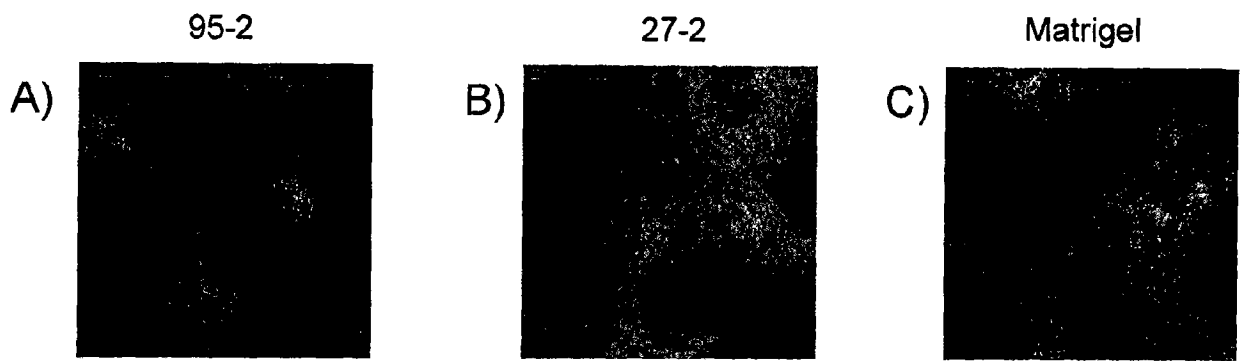


图 3