(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103415614 A
(43)申请公布日 2013.11.27

(21)申请号 201280011967.9
(22)申请日 2012.02.14
(30)优先权数据
61/442,711 2011.02.14 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2013.09.06
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2012/025134 2012.02.14
(87)PCT申请的公布数据
WO2012/112620 EN 2012.08.23
(71)申请人 国际干细胞公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 R·舍么茨肯 D·伊萨耶夫
(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 赵蓉民 陆惠中
(51)Int.Cl.
C12N 5/00(2006.01)

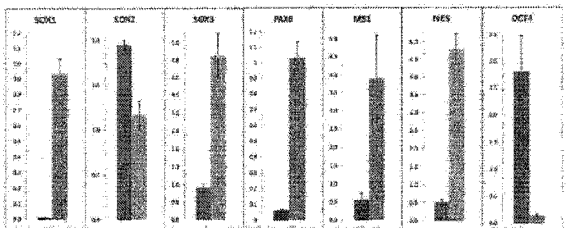
权利要求书5页 说明书33页 附图2页

(54)发明名称

产生患者特异性多能神经元干细胞的方法和组合物

(57)摘要

本发明涉及产生NSC的组合物和方法的开创性发现，所述NSC是从以孤雌生殖方式激活的人类卵母细胞(phNSC)得到的干细胞中获得。本发明的phNSC在培养和扩增期间维持增殖和分化潜能。本发明提供了一种分离的神经元干细胞，其是从以孤雌生殖方式激活的卵母细胞中分化的。



CN 103415614 A

1. 一种分离的神经元干细胞，其中所述细胞是从以孤雌生殖方式激活的卵母细胞中分化的。

2. 如权利要求 1 所述的神经元干细胞，其中所述细胞是与所述卵母细胞供体组织相容的。

3. 如权利要求 2 所述的神经元干细胞，其中所述细胞是与基于匹配单元型的种群组组织相容的。

4. 如权利要求 1 所述的神经元干细胞，其中所述细胞具有与 ESC 不同的接合性模式。

5. 如权利要求 1 所述的神经元干细胞，其中所述细胞仅含有母本基因组。

6. 如权利要求 1 所述的神经元干细胞，其中所述细胞是与所述卵母细胞供体组织相容的、具有与 ESC 不同的接合性模式、并且仅含有所述母本基因组。

7. 如权利要求 1 所述的神经元干细胞，其中所述细胞可移植到人类中。

8. 如权利要求 1 所述的神经元干细胞，其中所述细胞是未分化的、部分分化的或完全分化的。

9. 如权利要求 1 所述的神经元干细胞，其中所述细胞可分化为神经元细胞。

10. 如权利要求 9 所述的神经元干细胞，其中所述细胞可分化为神经元细胞，所述神经元细胞选自由以下组成的组 ：神经元、胶质细胞、少突胶质细胞以及星形胶质细胞。.

11. 如权利要求 10 所述的分化的神经元细胞，其中所述细胞是神经元。

12. 如权利要求 11 所述的神经元，其中所述神经元选自由以下组成的组 ：胆碱能神经元、γ - 氨基丁酸能神经元、谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元以及血清素能神经元。

13. 如权利要求 12 所述的神经元，其中所述神经元为多巴胺能神经元。

14. 如权利要求 1 所述的神经元干细胞，其中所述细胞表达神经标记物，所述神经标记物选自由以下组成的组 ：SOX2、巢蛋白、Mushashi-1、TUBB3、MAP2、FOXO4、GFAP、CD113 以及 CD15。

15. 一种用于通过分化以孤雌生殖方式得到的人类干细胞来产生神经元干细胞的方法，所述方法包括 ：

a) 在成纤维细胞的饲养层上使以孤雌生殖方式得到的人类干细胞生长至少 2 天 ；

b) 在培养皿上在没有成纤维细胞饲养层的情况下使以孤雌生殖方式得到的人类干细胞生长至少 1 天 ；

c) 在神经元诱导培养基中培养所述细胞 ；

d) 获得来自 (c) 的所述细胞的单细胞悬液 ；以及

e) 在培养皿上在没有成纤维细胞饲养层的情况下在神经元增殖培养基中培养来自步骤 (d) 的所述单细胞。

16. 如权利要求 15 所述的方法，其中所述神经元诱导培养基包含 ：

a) 青霉素 - 链霉素 - 两性霉素溶液

b)DMEM/F12 ；

c)MEM 非必需氨基酸溶液 ；

d)L- 谷氨酰胺 ；

e)N2 补充剂 ；以及

f)bFGF。

17. 如权利要求 15 所述的方法，其中所述神经元增殖培养基包含：

a) 青霉素 - 链霉素 - 两性霉素；

b)DMEM/F12；

c)GlutaMAX™-I；

d) StemPro® 神经补充剂；

e)bFGF；以及

f)EGF。

18. 如权利要求 15 所述的方法，其中所述培养皿用 CELLstart 涂覆。

19. 一种通过权利要求 15 所述的方法而产生的神经元干细胞。

20. 如权利要求 15 所述的方法，其中神经上皮花结在约 1 至 2 周内形成。

21. 使用包括以下的方法从以孤雌生殖方式得到的人类干细胞中得到的分离的神经元干细胞：

a) 在成纤维细胞的饲养层上使以孤雌生殖方式得到的人类干细胞生长至少 2 天；

b) 在培养皿上在没有成纤维细胞饲养层的情况下使以孤雌生殖方式得到的人类干细胞生长至少 1 天；

c) 在神经元诱导培养基中培养所述细胞；

d) 获得来自 (c) 的所述细胞的单细胞悬液；以及

e) 在培养皿上在没有成纤维细胞饲养层的情况下在神经元增殖培养基中培养来自步骤 (d) 的所述单细胞。

22. 如权利要求 21 所述的细胞，其中所述细胞表达神经标记物，所述神经标记物选自由以下组成的组：SOX2、巢蛋白、Mushashi-1、TUBB3、MAP2、FOXO4、GFAP、CD113 以及 CD15。

23. 如权利要求 21 所述的细胞，其中所述神经元干细胞维持神经元表型至少 27 次传代。

24. 如权利要求 21 所述的细胞，其中所述神经元干细胞可分化为神经元细胞。

25. 如权利要求 24 所述的细胞，其中所述神经元细胞选自由以下组成的组：神经元、胶质细胞、星形胶质细胞以及少突胶质细胞。

26. 如权利要求 25 所述的分化的神经元细胞，其中所述细胞是神经元。

27. 如权利要求 26 所述的神经元，其中所述神经元选自由以下组成的组：胆碱能神经元、γ - 氨基丁酸能神经元、谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元以及血清素能神经元。

28. 如权利要求 27 所述的神经元，其中所述神经元为多巴胺能神经元。

29. 如权利要求 21 所述的细胞，其中所述细胞是与所述卵母细胞供体组织相容的。

30. 如权利要求 21 所述的细胞，其中所述细胞具有与 ESC 不同的接合性模式。

31. 如权利要求 21 所述的细胞，其中所述细胞仅含有母本基因组。

32. 如权利要求 21 所述的神经元干细胞，其中所述细胞是与所述卵母细胞供体组织相容的、具有与 ESC 不同的接合性模式、并且仅含有所述母本基因组。

33. 如权利要求 21 所述的神经元干细胞，其中所述细胞可移植到人类中。

34. 一种使用神经元干细胞来治疗神经病症的方法，所述神经元干细胞是从以孤雌生殖方式得到的卵母细胞产生。

35. 如权利要求 34 所述的方法，其中所述神经病症选自由以下组成的组：癫痫、抽搐、

神经毒性损伤、低氧、缺氧症、局部缺血、中风、脑血管意外、脑或脊髓创伤、心肌梗塞、物理创伤、淹溺、窒息、围产期窒息、低血糖事件、神经变性、阿尔茨海默病、老年性痴呆、肌萎缩性侧索硬化症、多发性硬化、帕金森氏病、亨廷顿病、唐氏综合症、科尔萨科夫病、精神分裂症、AIDS 痴呆、多发梗塞性痴呆、宾斯万格痴呆、神经元损伤、癫痫发作、化学中毒、成瘾、吗啡耐受、阿片剂耐受、阿片样物质耐受、巴比妥酸盐耐受、急性和慢性疼痛、偏头痛、焦虑症、严重抑郁症、躁狂抑郁症、强迫症、精神分裂症和情绪障碍、双相障碍、单相抑郁症、心境恶劣、季节性情绪失调、肌张力障碍或其它运动障碍、睡眠障碍、肌肉松弛以及尿失禁。

36. 如权利要求 34 所述的方法，其中所述神经元干细胞被植入需要所述治疗的患者中。

37. 一种分化神经元干细胞的方法，所述方法包括在神经元分化培养基中培养神经元干细胞。

38. 如权利要求 37 所述的方法，其中所述神经元分化培养基包含：

a) 青霉素 - 链霉素 - 两性霉素；

b) DMEM/F12；

c) GlutaMAX™-I；以及

d) StemPro® 神经补充剂。

39. 如权利要求 37 所述的方法，其中所述神经元干细胞分化为神经元细胞，所述神经元细胞选自由以下组成的组：神经元、胶质细胞、少突胶质细胞以及星形胶质细胞。

40. 如权利要求 39 所述的分化的神经元细胞，其中所述细胞是神经元。

41. 如权利要求 40 所述的神经元，其中所述神经元选自由以下组成的组：胆碱能神经元、γ - 氨基丁酸能神经元、谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元以及血清素能神经元。

42. 如权利要求 41 所述的神经元，其中所述神经元为多巴胺能神经元。

43. 通过权利要求 37 所述的方法产生的分化的细胞。

44. 如权利要求 37 所述的细胞，其中所述细胞是从以孤雌生殖方式激活的卵母细胞中分化的。

45. 一种用于通过分化以孤雌生殖方式得到的人类干细胞来产生神经元干细胞的方法，所述方法包括：

a) 在无饲养层条件下培养人类多潜能干细胞；

b) 将所述细胞暴露至神经元诱导培养基；

c) 机械分离部分分化的细胞；以及

d) 进一步扩增并维持所述细胞直到成熟。

46. 如权利要求 45 所述的方法，其中所述神经元诱导培养基包含：

a) 青霉素 - 链霉素 - 两性霉素溶液；

b) DMEM/F12；

c) MEM 非必需氨基酸溶液；

d) L- 谷氨酰胺；

e) N2 补充剂；以及

f) bFGF。

47. 如权利要求 45 所述的方法，其中所述神经元增殖培养基包含：

a) 青霉素 - 链霉素 - 两性霉素 ;

b)DMEM/F12 ;

c)GlutaMAX™-I ;

d) StemPro® 神经补充剂 ;

e)bFGF ;以及

f)EGF。

48. 如权利要求 45 所述的方法,其中无饲养层条件利用 ECM 基质,所述 ECM 基质包括但不限于 :CELLstart、Matrigel、层粘连蛋白、明胶、纤连蛋白。

49. 如权利要求 45 所述的神经元干细胞。

50. 如权利要求 45 所述的方法,其中神经上皮花结在 1 至 2 周之后形成。

51. 使用包括以下的方法从以孤雌生殖方式得到的人类干细胞中得到的分离的神经元干细胞 :

a) 在无饲养层条件下培养人类多潜能干细胞 ;

b) 将所述细胞暴露至神经元诱导培养基 ;

c) 机械分离部分分化的细胞 ;以及

d) 进一步扩增并维持所述细胞直到成熟。

52. 如权利要求 51 所述的细胞,其中所述细胞表达神经干细胞标记物,所述神经干细胞标记物选自由以下组成的组 :SOXB1 家族 NES、MSH-1、CXCR4、CCND1、LHX2、PAX6 以及 GAP43。

53. 如权利要求 51 所述的细胞,其中所述神经元干细胞维持神经元表型至少 30 次传代。

54. 如权利要求 51 所述的细胞,其中所述神经元干细胞可分化为神经元细胞。

55. 如权利要求 54 所述的细胞,其中所述神经元细胞选自由以下组成的组 :神经元、星形胶质细胞以及少突胶质细胞。

56. 一种使用神经元干细胞来治疗神经病症的方法,所述神经元干细胞是从以孤雌生殖方式得到的卵母细胞得到的。

57. 如权利要求 56 所述的方法,其中所述神经病症选自由以下组成的组 :癫痫、抽搐、神经毒性损伤、局部缺血、中风、脑血管意外、脑或脊髓创伤、物理创伤、阿尔茨海默病、老年性痴呆、肌萎缩性侧索硬化症、多发性硬化、帕金森氏病、亨廷顿病、精神分裂症、神经元损伤、偏头痛、焦虑症、严重抑郁症、躁狂抑郁症、强迫症、精神分裂症和情绪障碍、双相障碍、单相抑郁症、肌张力障碍或其它运动障碍、睡眠障碍、肌肉松弛。

58. 如权利要求 56 所述的方法,其中所述神经元干细胞被植入需要所述治疗的患者中。

59. 一种分化神经元干细胞的方法,所述方法包括在神经元分化培养基中培养神经元干细胞。

60. 如权利要求 59 所述的方法,其中所述神经元分化培养基包含 :

a) 青霉素 - 链霉素 - 两性霉素 ;

b)DMEM/F12 ;

c)GlutaMAX™-I ;以及

d) StemPro®神经补充剂。

61. 如权利要求 59 所述的方法，其中所述神经元干细胞分化为神经元细胞，所述神经元细胞选自由以下组成的组：神经元、少突胶质细胞以及星形胶质细胞。

62. 如权利要求 59 所述的分化的细胞。

63. 如权利要求 59 所述的细胞，其中所述细胞是从以孤雌生殖方式激活的卵母细胞中分化的。

产生患者特异性多能神经元干细胞的方法和组合物

[0001] 发明背景

发明领域

[0002] 本发明总体上涉及干细胞，并且更具体地说涉及一种使用人类干细胞来产生神经元干细胞的方法和组合物。

[0003] 背景信息

[0004] 人类胚胎干细胞 (hESC) 是可分化为一系列细胞类型的多潜能细胞。当注射到免疫缺陷小鼠的体内时，胚胎干细胞形成分化的肿瘤（畸胎瘤）。然而，体外诱导以形成类胚体 (EB) 的胚胎干细胞提供胚胎干细胞系的来源，所述胚胎干细胞系在某些生长条件下服从分化而成为具有若干组织的特征的多种细胞类型。例如，hESC 已分化为内胚层衍生细胞、外胚层衍生细胞以及中胚层衍生细胞。

[0005] 人类 ES 细胞及它们的分化的子代是用于治疗性移植以及用于药物测试和开发的人类细胞的重要来源。这两个目标所需的是提供分化为适于患者需要或适当的药理学测试的组织类型的足够细胞。与此相关的是需要一种从胚胎干细胞产生分化细胞的有效且可靠的方法。

[0006] 哺乳动物卵母细胞的孤雌生殖激活可用来制备用于胚胎干细胞生成的卵母细胞。孤雌生殖激活是在不存在来自雄配子的任何贡献的情况下从雌配子产生胚胎细胞。

[0007] 目前，干细胞研究的焦点为人造器官、康复设备或代替自然身体组织的假体的开发。这种开发总体上设想使用用于工程改造干细胞的生物相容性材料来控制扩增 / 分化；即，使用 3-D 支架（例如 PLG 支架、壳聚糖支架、PCL/PEG 支架）来建造设备，所述设备通过为增殖提供机械支持来模拟类组织功能。

[0008] 或者，培养的干细胞或分化的干细胞的移植被预想作为一种治疗模式。这些方法总体上被称为体内组织工程或原位生成。虽然这个领域的许多工作旨在直接移植培养的细胞，但是实际情况是这类模式经常需要将分化的干细胞接种到多孔支架生物材料（例如，从干细胞得到的心肌细胞以及明胶或多孔藻酸盐）内。

[0009] 未受精的人类卵母细胞可通过适当的化学刺激而被人工地激活，以便发育成孤雌囊胚。所述囊胚的内细胞团可被分离并扩增为干细胞系。由 Revazova 等首次有意获得的人类孤雌生殖干细胞 (hpSC) 在其增殖能力和多向体外分化上类似于人类胚胎干细胞 (hESC) [1、2]。根据基因组仅从母本染色体组形成的方式，hpSC 可为杂合的抑或纯合的。纯合的 hpSC 可适用作用于移植的细胞来源，因为 hpSC 中的 HLA 基因组能够产生较不易受免疫排斥反应的分化的衍生细胞。此外，如果 HLA 型是常见的，那么分化的衍生细胞将匹配数以百万的个体 [2、3]。除这些免疫遗传优点之外，由于孤雌生殖不涉及破坏存活的人类胚胎，所以 hpSC 的使用不引起与常规 hESC 相同的伦理关注。因此，hpSC 是对其它多潜能干细胞的有吸引力的替代而作为体细胞系（包括多能神经干细胞 (NSC)）的来源。

[0010] NSC 为神经系统的自我更新的多能干细胞，其具有分化为神经元、少突胶质细胞以及星形胶质细胞的能力 [4]。NSC 可直接从胎儿和成人中枢神经系统中获得或者借助于诱

导从多潜能干细胞的神经分化而获得。作为细胞培养物获得的NSC能够在体外增殖，而在相当长时间中不丧失其分化的能力，并且因此为进一步应用提供细胞材料的储备。NSC被视为是对神经变性疾病如阿尔茨海默病、帕金森氏病、亨廷顿病等的恢复治疗以及对导致不动性的脊髓损伤有前景的疗法。使用动物模型成功的实验证实了使用NSC的细胞疗法的功效[5]。

[0011] 在实验上证明了小鼠[6]、灵长类动物[7]以及人类孤雌生殖干细胞[1、2、8]分化为神经元和胶质细胞的能力。孤雌生殖干细胞携带有两组母本印迹基因，所述母本印迹基因被认为是对分化为全部三个胚层的衍生细胞的障碍。然而，用嵌合体动物进行的实验揭露了在包括神经系统的外胚层起源的组织和器官中的较低程度的孤雌生殖细胞消除[9]。Cibelli等描述了非人类的灵长类动物食蟹猴孤雌生殖干细胞的建立，这个细胞系被称为Cyno-1[7]。进行了Cyno-1体外分化作为多潜能状态的证据，并且尤其获得了神经衍生细胞。后来，Sánchez-Pernaute等借助于定向分化在体外从Cyno-1获得了多巴胺神经元，并且展示了所述多巴胺神经元对大鼠和猴的帕金森氏病模型的有效疗法[10]。phSC的体外神经分化由Revazova等[1、2]和Harness等[8]展示。尽管有了这些研究，但仍未获得长期增殖的人类孤雌生殖NSC。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明涉及产生NSC的组合物和方法的开创性发现，所述NSC从以孤雌生殖方式激活的人类卵母细胞(phNSC)得到的干细胞中获得。本发明的phNSC在培养和扩增期间维持增殖和分化潜能。

[0014] 在一个实施方案中，本发明提供一种分离的神经元干细胞，所述神经元干细胞从以孤雌生殖方式激活的卵母细胞中分化。在另一个方面，神经元干细胞是与卵母细胞供体组织相容的。在一个额外方面，神经元干细胞具有与ESC不同的接合性模式。在另一个方面，神经元干细胞仅含有母本基因组。在一个方面，神经元干细胞是与卵母细胞供体组织相容的、具有与ESC不同的接合性模式、并且仅含有母本基因组。在一个额外方面，神经元干细胞是与基于匹配单元型的种群组组织相容的。在又一个方面，神经元干细胞可移植到人类中。在一个额外方面，神经元干细胞是未分化的、部分分化的或完全分化的。在又一个方面，神经元干细胞可分化为神经元细胞。所述神经元干细胞可分化为神经元细胞，所述神经元细胞选自由以下组成的组：神经元、胶质细胞、少突胶质细胞以及星形胶质细胞。在一个方面，分化的神经元细胞是神经元。在又一个方面，神经元选自由以下组成的组：胆碱能神经元、γ-氨基丁酸能神经元、谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元以及血清素能神经元。分化的神经元细胞是与卵母细胞供体组织相容的、具有与ESC不同的接合性模式、并且仅含有母本基因组。在又一个方面，神经元干细胞表达神经标记物，所述神经标记物选自由以下组成的组：SOX2、巢蛋白、Mushashi-1、TUBB3、MAP2、FOXO4、GFAP、CD113以及CD15。

[0015] 在另一个实施方案中，本发明提供了一种用于通过分化以孤雌生殖方式得到的人类干细胞而产生神经元干细胞的方法，所述方法通过以下步骤实现：a)在成纤维细胞的饲养层上使以孤雌生殖方式得到的人类干细胞生长至少2天；b)在培养皿上在没有成纤维细胞饲养层的情况下使以孤雌生殖方式得到的人类干细胞生长至少1天；c)在神经元诱导培养基中培养细胞；d)获得来自(c)的细胞的单细胞悬液；以及e)在培养皿上在没有成纤维细胞饲养层的情况下在神经元增殖培养基中培养来自步骤(d)的单

细胞。在一个方面，神经元诱导培养基由以下制成：青霉素－链霉素－两性霉素溶液(VWR,Radnor PA)；DMEM/F12(Invitrogen Grand Island,NY)；L－谷氨酰胺(Invitrogen Grand Island,NY)；MEM非必需氨基酸溶液(Invitrogen Grand Island,NY)；N2补充剂(Invitrogen Grand Island,NY)；以及bFGF(Peprotech Rocky Hill,NJ)。在又一个方面，在神经元诱导培养基中L－谷氨酰胺以2mM存在，MEM非必需氨基酸溶液以0.1mM存在，并且bFGF以4ng/ml至20ng/ml存在。在另一个方面，神经元增殖培养基由以下制成：青霉素－链霉素－两性霉素溶液(VWR,Radnor PA)；DMEM/F12(Invitrogen Grand Island,NY)；GlutaMAX™-I(Invitrogen Grand Island,NY)；StemPro®神经补充剂(Invitrogen Grand Island,NY)；20ng/ml bFGF(Peprotech Rocky Hill,NJ)；以及20ng/ml EGF(Invitrogen Grand Island,NY)。在一个额外方面，FGF和EGF在神经元增殖培养基中以20ng/ml存在。在又一个方面，培养皿用CELLstart™(Invitrogen Grand Island,NY)涂覆。本发明还提供通过这种方法产生的神经元干细胞。在一个额外方面，在神经元诱导培养基中，神经上皮花结在约1至2个培养周内形成。

[0016] 在又一个实施方案中，本发明提供了分离的神经元干细胞，所述神经元干细胞从以孤雌生殖方式得到的人类干细胞中通过以下步骤得到：a)在成纤维细胞的饲养层上使以孤雌生殖方式得到的人类干细胞生长至少2天；b)在培养皿上在没有成纤维细胞饲养层的情况下使以孤雌生殖方式得到的人类干细胞生长至少1天；c)在神经元诱导培养基中培养细胞；d)获得来自(c)的细胞的单细胞悬液；以及e)在培养皿上在没有成纤维细胞饲养层的情况下在神经元增殖培养基中培养来自步骤(d)的单细胞。在一个方面，神经元干细胞表达神经标记物，所述神经标记物选自由以下组成的组：SOX2、巢蛋白、Mushashi-1、TUBB3、MAP2、FOXO4、GFAP、CD113以及CD15。在另一个方面，神经元干细胞维持神经元表型至少27次传代。在另一个方面，神经元干细胞是与卵母细胞供体组织相容的。在一个额外方面，神经元干细胞具有与ESC不同的接合性模式。在另一个方面，神经元干细胞仅含有母本基因组。在又一个方面，神经元干细胞可移植到人类中。在一个额外方面，神经元干细胞是未分化的、部分分化的或完全分化的。在又一个方面，神经元干细胞可分化为神经元细胞。在另一个方面，从神经元干细胞分化的神经元细胞可为神经元、胶质细胞、少突胶质细胞以及星形胶质细胞。在一个方面，分化的神经元细胞是神经元。在又一个方面，神经元选自由以下组成的组：胆碱能神经元、γ－氨基丁酸能神经元、谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元以及血清素能神经元。

[0017] 在一个实施方案中，本发明提供了一种使用神经元干细胞治疗神经病症的方法，所述神经元干细胞是从以孤雌生殖方式得到的卵母细胞中产生。在一个方面，所述神经病症选自由以下组成的组：癫痫、抽搐、神经毒性损伤、低氧、缺氧症、局部缺血、中风、脑血管意外、脑或脊髓创伤、心肌梗塞、物理创伤、淹溺、窒息、围产期窒息、低血糖事件、神经变性、阿尔茨海默病、老年性痴呆、肌萎缩性侧索硬化症、多发性硬化、帕金森氏病、亨廷顿病、唐氏综合症、科尔萨科夫病、精神分裂症、AIDS痴呆、多发梗塞性痴呆、宾斯万格痴呆、神经元损伤、癫痫发作、化学中毒、成瘾、吗啡耐受、阿片剂耐受、阿片样物质耐受、巴比妥酸盐耐受、急性和慢性疼痛、偏头痛、焦虑症、严重抑郁症、躁狂抑郁症、强迫症、精神分裂症和情绪障碍、双相障碍、单相抑郁症、心境恶劣、季节性情绪失调、肌张力障碍或其它运动障碍、睡眠障碍、肌肉松弛以及尿失禁。在又一个方面，神经元干细胞被植入需要所述治疗的患者

中。

[0018] 在又一个实施方案中，本发明提供一种通过在神经元分化培养基中培养神经元干细胞来分化神经元干细胞的方法。在一个方面，神经元分化培养基含有以下各项：青霉素－链霉素－两性霉素（VWR, Radnor PA）；DMEM/F12（Invitrogen Grand Island, NY）；GlutaMAX™-I（Invitrogen Grand Island, NY）；以及StemPro®神经补充剂（Invitrogen Grand Island, NY）。在又一个方面，神经元干细胞分化为神经元细胞，所述神经元细胞选自由以下组成的组：神经元、胶质细胞、少突胶质细胞以及星形胶质细胞。本发明还提供从神经元干细胞分化的神经元细胞。在一个方面，神经元干细胞从以孤雌生殖方式得到的人类干细胞中产生。在另一个方面，神经元干细胞是与卵母细胞供体组织相容的。在一个额外方面，神经元干细胞具有与ESC不同的接合性模式。在另一个方面，神经元干细胞仅含有母本基因组。在又一个方面，神经元干细胞可移植到人类中。在一个额外方面，神经元干细胞是未分化的、部分分化的或完全分化的。在一个方面，分化的神经元细胞是神经元。在又一个方面，神经元选自由以下组成的组：胆碱能神经元、γ－氨基丁酸能神经元、谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元以及血清素能神经元。在一个方面，分化的神经元细胞是神经元。在又一个方面，神经元选自由以下组成的组：胆碱能神经元、γ－氨基丁酸能神经元、谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元以及血清素能神经元。

[0019] 在一个实施方案中，本发明提供了一种用于通过分化以孤雌生殖方式得到的人类干细胞来产生神经元干细胞的方法，所述方法通过以下步骤实现：a）在无饲养层条件下培养人类多潜能干细胞；b）将所述细胞暴露至神经元诱导培养基；c）机械分离部分分化的细胞；以及d）进一步扩增并维持所述细胞直到成熟。在一个方面，神经元诱导培养基包含以下各项：a）青霉素－链霉素－两性霉素溶液；b）DMEM/F12；c）MEM非必需氨基酸溶液；d）L-谷氨酰胺；e）N2补充剂；以及f）bFGF。在又一个方面，在神经元诱导培养基中L-谷氨酰胺以2mM存在，MEM非必需氨基酸溶液以0.1mM存在，并且bFGF以4ng/ml至20ng/ml存在。在另一个方面，神经元增殖培养基包含以下各项：a）青霉素－链霉素－两性霉素；b）DMEM/F12；c）GlutaMAX™-I；d）StemPro®神经补充剂；e）bFGF；以及f）EGF。在一个额外方面，在神经元增殖培养基中FGF和EGF以20ng/ml存在。在一个额外方面，无饲养层条件利用ECM基质，所述ECM基质包括但不限于：CELLstart；Matrigel；层粘连蛋白；明胶；纤连蛋白。本发明还提供通过所述方法产生的神经元干细胞。在又一个方面，神经上皮花结在1至2周之后形成。

[0020] 在一个额外实施方案中，本发明提供了分离的神经元干细胞，所述神经元干细胞从以孤雌生殖方式得到的人类干细胞中使用包括以下步骤的方法得到：a）在无饲养层条件下培养人类多潜能干细胞；b）将所述细胞暴露至神经元诱导培养基；c）机械分离部分分化的细胞；以及d）进一步扩增并维持所述细胞直到成熟。在一个方面，所述细胞表达神经干细胞标记物，所述神经干细胞标记物选自由以下组成的组：SOXB1家族NES；MSH-1；CXCR4；CCND1；LHX2；PAX6；GAP43。在又一个方面，神经元干细胞维持神经元表型至少30次传代。在一个方面，神经元干细胞可分化为神经元细胞。在一个额外方面，神经元细胞选自由以下组成的组：神经元、星形胶质细胞以及少突胶质细胞。在一个方面，分化的神经元细胞是神经元。在又一个方面，神经元选自由以下组成的组：胆碱能神经元、γ－氨基丁酸能

神经元、谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元以及血清素能神经元。

[0021] 在又一个实施方案中，本发明提供了一种使用神经元干细胞治疗神经病症的方法，所述神经元干细胞是从以孤雌生殖方式得到的卵母细胞中得到。在一个方面，所述神经病症选自由以下组成的组：癫痫、抽搐、神经毒性损伤、局部缺血、中风、脑血管意外、脑或脊髓创伤、物理创伤、阿尔茨海默病、老年性痴呆、肌萎缩性侧索硬化症、多发性硬化、帕金森氏病、亨廷顿病、精神分裂症、神经元损伤、偏头痛、焦虑症、严重抑郁症、躁狂抑郁症、强迫症、精神分裂症和情绪障碍、双相障碍、单相抑郁症、肌张力障碍或其它运动障碍、睡眠障碍、肌肉松弛。在又一个方面，神经元干细胞被植入需要所述治疗的患者中。

[0022] 在一个实施方案中，本发明提供了一种分化神经元干细胞的方法，所述方法包括在神经元分化培养基中培养神经元干细胞。在一个方面，神经元分化培养基包含以下各项：a) 青霉素 - 链霉素 - 两性霉素；b)DMEM/F12；c)GlutaMAX™-I；以及 d) StemPro® 神经补充剂。在一个额外方面，神经元干细胞分化为神经元细胞，所述神经元细胞选自由以下组成的组：神经元、少突胶质细胞以及星形胶质细胞。在一个方面，分化的神经元细胞是神经元。在又一个方面，神经元选自由以下组成的组：胆碱能神经元、γ - 氨基丁酸能神经元、谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元以及血清素能神经元。本发明还提供通过这种方法产生的分化的细胞。在一个方面，所述细胞是从以孤雌生殖方式激活的卵母细胞中分化的。

[0023] 附图简述

[0024] 图 1 为展示在神经诱导第 7 天时在 hpSC（黑条）和在 NEP 花结（灰条）中的相对基因表达的图表。

[0025] 图 2 为展示在 phNSC（黑条）和在 hNSC H9（灰条）中的重要基因的相对转录活性水平的图表。

[0026] 图 3 为展示在自发分化的 phNSC（黑条）和 hNSC（灰条）中的神经元标记物 TUBB3 和 MAP2 以及胶质标记物 GFAP 和 FOXO4 表达的图表。

[0027] 图 4 为展示以孤雌生殖方式得到的多巴胺能神经元能够发放动作电位的图表。

[0028] 发明详述

[0029] 本发明涉及产生 NSC 的组合物和方法的开创性发现，所述 NSC 是从以孤雌生殖方式激活的人类卵母细胞 (phNSC) 得到的干细胞中获得。本发明的 phNSC 在培养和扩增期间维持增殖和分化潜能。

[0030] 在描述本组合物和方法之前，要理解的是，本发明不限于所描述的具体组合物、方法、以及实验条件，因为所述组合物、方法、以及条件可以变化。还要理解的是，本文所使用的术语仅出于描述具体实施方案的目的，并且不旨在有限制性，因为本发明的范围将仅受限于所附权利要求书。

[0031] 除非上下文另有清楚指示，否则如在本说明书和所附权利要求书中所用的单数形式“一个（种）(a/an)”、以及“所述 (the)”包括复数引用。因此，例如“所述方法”的引用包括一种或多种方法、和 / 或本文所描述的类型的步骤，在阅读完本公开等之后，这对本领域技术人员而言将变得显而易见。

[0032] 除非另有定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明属于的领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。虽然类似于或等同于本文所述的那些方法和材料的任何方法和材料可用于本发明的实践或测试中，但现描述优选方法和材料。

[0033] “分化”是指细胞中发生的改变从而致使这些细胞呈现某些特定功能并且失去改变为某些其它特定功能单元的能力。能够分化的细胞可为全能细胞、多潜能或多能细胞中的任一种。相对于成熟的成人细胞而言，分化可以是部分的或完全的。

[0034] “孤雌生殖”（“以孤雌生殖方式激活 (parthenogenically activated)”和“以孤雌生殖方式激活 (parthenogenetically activated)”可交换地使用）是通过其在不存在精子穿入下发生卵母细胞激活的过程，并且是指包含滋养外胚层和通过激活包含所有女性来源的 DNA 的卵母细胞或胚胎细胞（例如卵裂球）而获得的内细胞团的早期胚胎的发育。在一个相关方面，“孤雌生殖体”是指通过所述激活而获得的所产生的细胞。在另一个相关方面，“囊胚”是指受精的或激活的卵母细胞的卵裂期，所述卵母细胞包含由外滋养层细胞和内细胞团 (ICM) 构成的细胞空心球。在又一个相关方面，“囊胚形成”是指在卵母细胞受精或激活后的过程，在这个过程中所述卵母细胞随后在培养基中培养一段时间（例如，5 至 6 天），以使得它能够发育成为由外滋养层细胞和 ICM 构成的细胞空心球。

[0035] 孤雌生殖体基因组可含有单组或双组表观遗传印迹的母本染色体。不存在父本基因组，并且因此，“孤雌生殖的囊胚样结构不具有可被视为人类胚胎的特色的功能基因组”[17]。由于父本 DNA 对胚外组织的发育的影响，所以在不存在父本 DNA 下，哺乳动物的卵无法在自然的胚胎发育阶段进展……”[18]。此外，孤雌生殖体不是全能的 [17]。此外，成为人类的过程要求母本和父本两者的 DNA 印迹。因为孤雌生殖体仅含有母本基因组，所以孤雌生殖激活显然不涉及父本 DNA 印迹，并且因此是不同的过程，从而导致不同的生物体。适当的 DNA 印迹的缺少可在分子水平（在胚细胞阶段）以及在宏观水平上通过观察适当胚外组织（即，胎盘）的缺少来测量。

[0036] 另外，孤雌生殖干细胞与使用其它方法得到的干细胞在几个重要方面（包括核移植）不同。第一，以孤雌生殖方式得到的干细胞是与卵母细胞供体组织相容的。以孤雌生殖方式得到的干细胞提供与卵母细胞基因组的核和线粒体两方面的精确匹配。通过核移植得到的干细胞可提供与核供体的免疫身份的近乎精确匹配，其中匹配核基因但不匹配线粒体基因。第二，以孤雌生殖方式得到的干细胞具有独特的接合性模式，所述接合性模式是由在减数分裂和有丝分裂期间明显的凝聚染色体中的基因组 DNA 中的单核苷酸多态性的杂合性分布来反映的。与从受精的胚胎、成人干细胞、或核移植细胞得到的干细胞（及它们的衍生细胞）相比，孤雌生殖体展示了在 DNA 的着丝粒和远端周围区域发现的基因组的独特的接合性模式。如 Kim 等 [19] 所展示的，孤雌生殖细胞保留孤雌生殖纯合性但显示远侧区的杂合性（反映出在卵母细胞减数分裂 II 期间姐妹染色体自主分离的失败）、或保留基因标记物的着丝粒的杂合性并具有特征性的远侧区的纯合性（反映出在父本染色体的卵母细胞减数分裂 I 期间同源染色体组分离的失败）。染色体的着丝粒和远端周围的这些纯合性和杂合性模式区分了孤雌生殖干细胞及其衍生细胞与由受精胚胎得到的细胞或由贯穿整个染色体长度显示杂合性的受精胚胎得到的干细胞得到的细胞。第三，以孤雌生殖方式得到的干细胞仅含有母本 DNA。正常的哺乳动物的发育要求母本和父本双方染色体的贡献。孤雌生殖体排他地从激活的卵母细胞中得到。孤雌生殖体基因组（通过孤雌生殖产生的一个）含有本质上单组或双组表观遗传印迹的母本染色体，这分别取决于是否允许或抑制卵母细胞在激活后试图放出的极体中染色体的排驱。孤雌生殖体仅含有母本染色体，因此不存在父本基因组或其它外加的遗传物质。第四，以孤雌生殖方式得到的干细胞将总是具有

母本染色体组型 XX。

[0037] 此外，孤雌生殖体仅含有单一前核。所述单一前核仅含有受精所需的遗传物质的一半，即母本基因组。此外，与使用从开始并成功成为人类的过程得到的生物材料的体细胞核移植不同，孤雌生殖体从不使用在成为人类的过程中曾有的生物材料。

[0038] “多潜能细胞”是指从通过激活含有所有的女性或男性起源的 DNA 的细胞而产生的胚胎得到的细胞，所述细胞可在体外长时间、理论上无限时间内保持为未分化状态，这可引起不同的分化组织类型，即外胚层、中胚层、以及内胚层。细胞的多潜能状态优选在适当的条件（例如，通过在成纤维细胞饲养层或另一个饲养层上或在包括白血病抑制因子 (LIF) 的培养基中进行培养）下通过培养经由雄核发育或雌核发育方法产生的胚胎的内细胞团或从所述胚胎的内细胞团得到的细胞来维持。所述培养的细胞的多潜能状态可通过不同的方法来证实，例如，(i) 确认表达为多潜能细胞的特征的标记物；(ii) 含有表达多潜能细胞的基因型的细胞的嵌合体动物的产生；(iii) 将细胞注射到动物（例如，SCID 小鼠）中，其中在体内产生了不同的分化的细胞类型；以及 (iv) 观察所述细胞在体外分化（例如，当在不存在饲养层或 LIF 下培养时）为类胚体及其它分化的细胞类型。

[0039] 如本文所用，“多能”或“多能细胞”是指可引起有限数量的其它特定的细胞类型的细胞类型。如上所述，限定的内胚层细胞不分化为由外胚层或中胚层产生的组织，而是分化为肠道以及从所述肠道得到的器官。在一个实施方案中，限定的内胚层细胞是从 hESC 中得到的。所述过程可为人类内胚层衍生组织如胰腺、肝脏、肺脏、胃、肠、以及甲状腺的有效产生提供基础。例如，限定的内胚层的产生可为干细胞分化为功能性的产胰岛素的 β 细胞中的第一步。为了获得有用数量的产胰岛素的 β 细胞，所希望的是针对在到达胰岛 / β 细胞归宿之前发生的分化步骤的每个的高效率的分化。由于干细胞分化为限定的内胚层细胞也许代表了产生功能性胰岛 / β 细胞的最早的步骤，因此在这个步骤中高效率的分化是尤其希望的。

[0040] “二倍体细胞”是指具有所有男性或女性起源的二倍体 DNA 含量的细胞，例如卵母细胞或卵裂球。

[0041] “单倍体细胞”是指具有单倍体 DNA 含量的细胞，例如卵母细胞或卵裂球，其中所述单倍体 DNA 具有所有男性或女性起源。

[0042] “激活”是指这样的过程，即其中受精的或未受精的卵母细胞例如但不限于在减数分裂的中期 II 经历通常包括染色单体对的分离、第二极体的排出的过程，从而导致卵母细胞具有单倍体数的染色体，每个染色体具有一个染色单体。激活包括多种方法，借此诱导含有所有男性或女性起源的 DNA 的细胞发育为具有可辨别的内细胞团和滋养外胚层的胚胎，这对于产生多潜能细胞是有用的但其本身有可能无法发育为能存活的后代。激活可在（例如）以下条件中的一个下来执行：(1) 不导致第二极体排出的条件；(ii) 导致极体排出但其中所述极体排出是受抑制的的条件；或 (iii) 抑制单倍体卵母细胞的第一次细胞分裂的条件。

[0043] “中期 II”是指细胞发育的阶段，其中细胞的 DNA 含量由单倍体数的染色体组成，其中每个染色体由两个染色单体来表示。

[0044] 在一个实施方案中，中期 II 卵母细胞通过在不同的 O_2 张力气体环境下进行孵育来激活 / 培养。在一个相关方面，低 O_2 张力气体环境由包括约 2%、3%、4%、或 5%O_2 浓度的气

体混合物制造。在另一个相关方面，所述气体混合物包含约 5%CO_2。此外，所述气体混合物包含约 90%N_2、91%N_2、或 93%N_2。这种气体混合物是待与 5%CO_2 空气区分的，所述 5%CO_2 空气是大概约 5%CO_2、20%O_2、以及 75%N_2。

[0045] “O_2 张力”是指在流体（即，液体或气体）中氧分压（经由气体混合物的单一组分所施加的压力）。低张力是当氧分压 (pO_2) 较低时，并且高张力是当 pO_2 较高时。

[0046] “确定成分培养基条件”是指详细列出为最佳生长所需的其中的组分浓度的用于培养细胞的环境。例如，根据细胞的用途（例如治疗性应用），从含有异基因蛋白质的条件移除细胞是重要的，即，所述培养条件是无动物成分的条件或无非人类的动物蛋白质的。在一个相关方面，“体外受精 (IVF) 培养基”是指含有化学上确定成分的物质的营养系统，受精的卵母细胞可在其上或其中生长。

[0047] “胞外基质 (ECM) 基质”是指细胞下的表面，其支持最佳生长。例如，所述 ECM 基质包括但不限于 Matrigel 基质、层粘连蛋白基质、明胶基质、以及纤连蛋白基质。在一个相关方面，所述基质可包括 IV 型胶原、巢蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白多糖，以包括不同的生长因子（例如，bFGF、表皮生长因子、胰岛素样生长因子 -1、血小板衍生的生长因子、神经生长因子、以及 TGF-β-1）。

[0048] “胚胎”是指在细胞激活后产生的胚胎，所述细胞例如为含有所有男性或女性起源的 DNA 的卵母细胞或其它胚胎细胞，所述胚胎可任选地为修饰的，所述胚胎包含可辨别的滋养外胚层和内细胞团，所述胚胎不能产生能存活的后代并且其中 DNA 是所有男性或女性起源的。如前所述，所述内细胞团或其中所含的细胞对于多潜能细胞的产生是有用的。

[0049] “内细胞团 (ICM)”是指产生胎儿组织的胚胎的内部部分。本文中，这些细胞是用以在体外提供多潜能细胞的持续来源。此外，所述 ICM 包括由雄核发育或雌核发育产生的胚胎（即激活含有所有男性或女性起源的 DNA 的细胞后产生的胚胎）的内部部分。所述 DNA 例如将为人类 DNA，例如人类的卵母细胞 DNA 或精子 DNA，所述人类的卵母细胞 DNA 或精子 DNA 可为或可不为经过基因修饰的。

[0050] “滋养外胚层”是指产生胎盘组织的早期胚胎的另一个部分，包括由雄核发育或雌核发育产生的胚胎（即激活含有所有男性或女性起源的 DNA 的细胞后得到的胚胎，例如人类的卵巢或精子）的组织。

[0051] “分化的细胞”是指拥有特别的分化的（即非胚胎的）状态的非胚胎细胞。这三种最早分化的细胞类型是内胚层、中胚层、以及外胚层。

[0052] “大致相同”是指就具体特征而言的同一性的品质，其在测量差异的能力内（例如，通过 HLA 分型、SNP 分析等等）是如此相近以至于是基本上相同的。

[0053] “组织相容的”是指生物体将容忍外来组织的移植物的程度。

[0054] 在另一个实施方案中，干细胞是从以孤雌生殖方式激活的人类卵母细胞中产生。在一个方面，由从以孤雌生殖方式激活的人类卵母细胞得到的干细胞中分化的神经元干细胞获得神经元干细胞。

[0055] 在原生环境中，来自卵巢的未成熟的卵母细胞（卵子）经历成熟的过程，所述过程使得进展通过减数分裂而到达减数分裂的中期 II。所述卵母细胞然后停留在中期 II。在中期 II 中，细胞的 DNA 含量由单倍体数的染色体组成，每个染色体由两个染色单体来表示。

[0056] 以孤雌生殖方式激活的卵母细胞、囊胚、ICM、以及自体干细胞可被以一种方式储

存或“储备”以便允许所述细胞在未来需要时复苏。以孤雌生殖方式激活的卵母细胞和自体干细胞的等分部分可在任何时间被移除，以生长为许多未分化的细胞的培养物，然后分化成特定的细胞类型或组织类型，并且然后可用来治疗疾病或更换受试者的故障组织。由于所述细胞是以孤雌生殖方式从供体得到的，因此所述细胞可被储存，以便个体或近亲属可在很长时间内获取细胞。

[0057] 在一个实施方案中，提供了用于储存以孤雌生殖方式激活的卵母细胞、囊胚、ICM、和 / 或自体干细胞样品的细胞库。在另一个实施方案中，提供了用于管理所述细胞库的方法。美国公开专利申请号 20030215942 提供了干细胞库系统的一个实例，所述申请的全部内容以引用方式并入本文。

[0058] 在一个实施方案中，本发明提供了一种分离的神经元干细胞，所述神经元干细胞是从以孤雌生殖方式激活的卵母细胞中分化的。在另一个方面，神经元干细胞是与卵母细胞供体组织相容的。在一个额外方面，神经元干细胞具有与 ESC 不同的接合性模式。在另一个方面，神经元干细胞仅含有母本基因组。在一个方面，神经元干细胞是与卵母细胞供体组织相容的、具有与 ESC 不同的接合性模式、并且仅含有母本基因组。在一个额外方面，神经元干细胞是与基于匹配单元型的种群组组织相容的。在又一个方面，神经元干细胞可移植到人类中。在一个额外方面，神经元干细胞是未分化的、部分分化的或完全分化的。在又一个方面，神经元干细胞可分化为神经元细胞。神经元干细胞可分化为神经元细胞，所述神经元细胞选自由以下组成的组 :神经元、胶质细胞、少突胶质细胞以及星形胶质细胞。在一个方面，分化的神经元细胞是神经元。在又一个方面，神经元选自由以下组成的组 :胆碱能神经元、γ- 氨基丁酸能神经元、谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元以及血清素能神经元。分化的神经元细胞是与卵母细胞供体组织相容的、具有与 ESC 不同的接合性模式、并且仅含有母本基因组。在又一个方面，神经元干细胞表达神经标记物，所述神经标记物选自由以下组成的组 :SOX2、巢蛋白、Mushashi-1、TUBB3、MAP2、FOXO4、GFAP、CD113 以及 CD15。

[0059] “神经元细胞”是指与脑部、脊椎或中枢神经系统的任何其它部分有关联的任何细胞。神经元细胞包括但不限于神经元、星形胶质细胞、胶质细胞、以及少突胶质细胞。

[0060] 神经元是拥有电信号和化学信号并通过电信号和化学信号传递信息的电可兴奋性细胞。化学信号传递经由突触（与其它细胞的专门连接）来进行。神经元彼此连接以形成神经网络。神经元是神经系统的核心组分，所述神经系统包括脑、脊髓、以及外周神经节。存在一定数量的专门类型的神经元 :感觉神经元响应触摸、声音、光亮以及影响感觉器官的细胞的众多其它刺激，感觉器官然后将信号传送到脊髓和脑。运动神经元接收来自脑和脊髓的信号，引起肌肉收缩，并且影响腺体。中间神经元将神经元连接到在脑部或脊髓的相同区域内的其它神经元。

[0061] 神经元在它们制造的神经递质的类型上不同。一些实例是 :

[0062] 胆碱能神经元制造乙酰胆碱。乙酰胆碱从突触前神经元释放到突触间隙中。它充当配体门控离子通道和代谢 (GPCR) 毒蕈碱受体两者的配体。烟碱受体是由结合尼古丁的 α 和 β 亚单位构成的五聚配体门控离子通道。配体结合打开通道，从而引起 Na^+ 的去极化流入，并且增加突触前神经递质释放的可能性。

[0063] γ- 氨基丁酸能神经元制造 γ- 氨基丁酸 (GABA)。GABA 是 CNS 中的两种神经抑制剂中的一种，另一种是甘氨酸。GABA 具有与 ACh 的同源性功能，即门控允许 Cl- 离子进入突

触后神经元的阴离子通道。Cl-在神经元内引起超级化，减少了随着电压负性变得更大而发放的动作电位的可能性。

[0064] 谷氨酸能神经元制造谷氨酸。谷氨酸是两种主要兴奋性氨基酸中的一种，另一种是天冬氨酸。谷氨酸受体是四个种类中的一种，其中的三种是配体门控离子通道，并且其中的一种是 G- 蛋白偶联受体（通常称为 GPCR）。AMPA 受体和红藻氨酸受体两者都起着阳离子通道的作用，所述阳离子通道对 Na^+ 阳离子通道是可渗透的，从而介导快速兴奋性突触传递。NMDA 受体是更可渗透 Ca^{2+} 的另一个阳离子通道。NMDA 受体的功能取决于在通道孔内结合作为协同激动剂的甘氨酸受体。NMDA 受体在这两个配体均不存在下不起作用。代谢型受体（即 GPCR）调控实触传递和实触后兴奋性。当到脑部的血流被中断时，谷氨酸可引起兴奋性毒性，从而导致脑损伤。当血流被抑制时，谷氨酸从突触前神经元中释放，造成 NMDA 受体和 AMPA 受体在应力条件之外更甚于正常情况下的激活，从而引起升高的 Ca^{2+} 和 Na^+ 进入突触后神经元以及细胞损伤。

[0065] 多巴胺能神经元制造多巴胺。多巴胺是神经递质，其充当 D1 型 (D1 和 D5)Gs 偶联的受体，所述受体增加 cAMP 和 PKA，并且充当 D2 型 (D2、D3、以及 D4) 受体，所述受体激活减少 cAMP 和 PKA 的 Gi 偶联的受体。多巴胺与情绪和行为相关联，并且调控突触前和突触后两者的神经传递。黑质中多巴胺神经元的损失已与帕金森氏症有关。

[0066] 血清素能神经元制造血清素。血清素 (5- 羟色胺、5-HT) 可充当兴奋性物质或抑制性物质。在四种 5-HT 受体类别中，3 种是 GPCR，并且 1 种是配体门控阳离子通道。血清素是通过色氨酸羟化酶并且然后进一步通过芳香酸脱羧酶而从色氨酸合成的。在突触后神经元处 5-HT 的缺乏已与抑郁症有关。阻断突触前的血清素转运体的药物如百忧解和左洛复被用于治疗。

[0067] 星形胶质细胞（也统称为星形胶质）是在脑部和脊髓中的特征性星状胶质细胞。它们执行许多功能，包括生化支持形成血 - 脑屏障的内皮细胞、向神经组织提供营养物质、维持细胞外离子平衡、以及在外伤后脑和脊髓的修复和结疤过程中的作用。

[0068] 胶质细胞（有时被称为神经胶质或简单地称为胶质）是维持体内平衡、形成髓磷脂、并且为脑部神经元以及神经系统的其它部分（如在自主神经系统）中的神经元提供支持和保护的非神经元细胞。

[0069] 少突胶质细胞是一种脑细胞类型。它们是各种各样的神经胶质。它们的主要功能是在一些脊椎动物的中枢神经系统（脑和脊髓）中的轴突（神经细胞的长突起）的绝缘。

[0070] “神经元干细胞”或“NSC”、或“神经元前体细胞”或“NPC”是指在神经元细胞中任何可分化的细胞。

[0071] “以孤雌生殖方式得到的神经元干细胞”或“phNSC”是指在神经元细胞中任何可分化的细胞，其曾是从以孤雌生殖方式得到的人类干细胞产生的神经元干细胞。

[0072] 在另一个实施方案中，本发明提供了一种用于通过分化以孤雌生殖方式得到的人类干细胞来产生神经元干细胞的方法，所述方法通过以下步骤实现 ：a) 在成纤维细胞的饲养层上使以孤雌生殖方式得到的人类干细胞生长至少 2 天 ；b) 在培养皿上使以孤雌生殖方式得到的人类干细胞在没有成纤维细胞饲养层的情况下生长至少 1 天 ；c) 在神经元诱导培养基中培养细胞 ；d) 获得来自 (c) 的细胞的单细胞悬液 ；以及 e) 在培养皿上在没有成纤维细胞饲养层的情况下在神经元增殖培养基中培养来自步骤 (d) 的单细胞。在一个

方面，神经元诱导培养基由以下制成：青霉素－链霉素－两性霉素溶液（VWR, Radnor PA）、DMEM/F12（Invitrogen Grand Island, NY）、L-谷氨酰胺（Invitrogen Grand Island, NY）、MEM 非必需氨基酸溶液（Invitrogen Grand Island, NY）、N2 补充剂（Invitrogen Grand Island, NY）以及 bFGF（Peprotech Rocky Hill, NJ）。在又一个方面，在神经元诱导培养基中 L-谷氨酰胺以 2mM 存在，MEM 非必需氨基酸溶液以 0.1mM 存在，并且 bFGF 以 4ng/ml 至 20ng/ml 存在。在另一个方面，神经元增殖培养基由以下制成：青霉素－链霉素－两性霉素溶液（VWR, Radnor PA）、DMEM/F12（Invitrogen Grand Island, NY）、GlutaMAX™-I（Invitrogen Grand Island, NY）、StemPro® 神经补充剂（Invitrogen Grand Island, NY）、20ng/ml bFGF（Peprotech Rocky Hill, NJ）以及 20ng/ml EGF（Invitrogen Grand Island, NY）。在一个额外方面，在神经元增殖培养基中 FGF 和 EGF 以 20ng/ml 存在。在又一个方面，培养皿用 CELLstart™（Invitrogen Grand Island, NY）涂覆。本发明还提供通过这种方法产生的神经元干细胞。在一个额外方面，在神经元诱导培养基中，神经上皮花结在约 1 至 2 个培养周内形成。

[0073] 在又一个实施方案中，本发明提供了从以孤雌生殖方式得到的人类干细胞中得到的分离的神经元干细胞，这是通过以下步骤来实现：a）在成纤维细胞的饲养层上使以孤雌生殖方式得到的人类干细胞生长至少 2 天；b）在培养皿上在没有成纤维细胞饲养层的情况下使以孤雌生殖方式得到的人类干细胞生长至少 1 天；c）在神经元诱导培养基中培养细胞；d）获得来自（c）的细胞的单细胞悬液；以及 e）在培养皿上在没有成纤维细胞饲养层的情况下在神经元增殖培养基中培养来自步骤（d）的单细胞。在一个方面，神经元干细胞表达神经标记物，所述神经标记物选自由以下组成的组：SOX2、巢蛋白、Mushashi-1、TUBB3、MAP2、FOXO4、GFAP、CD113 以及 CD15。在另一个方面，神经元干细胞维持神经元表型至少 27 次传代。在另一个方面，神经元干细胞是与卵母细胞供体组织相容的。在一个额外方面，神经元干细胞具有与 ESC 不同的接合性模式。在另一个方面，神经元干细胞仅含有母本基因组。在又一个方面，神经元干细胞可移植到人类中。在一个额外方面，神经元干细胞是未分化的、部分分化的或完全分化的。在又一个方面，神经元干细胞可分化为神经元细胞。在另一个方面，从神经元干细胞分化的神经元细胞可为神经元、胶质细胞、少突胶质细胞以及星形胶质细胞。在一个方面，分化的神经元细胞是神经元。在又一个方面，神经元选自由以下组成的组：胆碱能神经元、γ－氨基丁酸能神经元、谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元以及血清素能神经元。

[0074] 正常地，卵母细胞在这个阶段是排卵的并且通过精子来受精。精子在被称为激活的过程中发起减数分裂的完成。在激活期间，染色单体对分离，第二极体被排出，并且卵母细胞保留单倍体数的染色体，其中每个染色体具有一个染色单体。精子促成染色体的其它单倍体补充，以得到具有单一染色单体的全二倍体细胞。然后染色体在第一细胞周期期间进展通过 DNA 合成。然后这些细胞发育为胚胎。

[0075] 相反，本文所描述的胚胎通过细胞的人工激活而发育，所述细胞通常是含有所有男性或女性起源的 DNA 的哺乳动物卵母细胞或卵裂球。如本发明的背景中所讨论，在文献中已报导了很多关于人工激活未受精的卵母细胞的方法。所述方法包括物理方法，例如机械法如戳刺、操纵、或培养卵母细胞，热力法如冷却和加热、反复电脉冲，酶促处理如胰蛋白酶、链霉蛋白酶、透明质酸酶，渗透处理，离子处理如用二价阳离子和钙离子载体如离子霉

素和 A23187，使用麻醉药如乙醚、乙醇、丁卡因、利多卡因、普鲁卡因、吩噻嗪、镇定剂如甲硫哒嗪、三氟拉嗪、氟非那嗪、氯丙嗪，使用蛋白质合成抑制剂如环己酰亚胺、嘌呤霉素，使用磷酸化抑制剂例如蛋白激酶抑制剂如星形孢菌素、2- 氨基嘌呤、鞘氨醇、以及 DMAP，其组合，以及其它方法。

[0076] 所述激活方法在本领域中是熟知的并且论述在美国专利号 5,945,577, 中，所述专利通过引用并入本文。

[0077] 在一个实施方案中，在中期 II 中的人类细胞（通常是包含所有男性或女性起源的 DNA 的卵母细胞或卵裂球）是人工激活的，以实现卵母细胞的人工激活。

[0078] 在一个相关方面，允许所激活的细胞（例如卵母细胞，其为二倍体）发育为包含滋养外胚层和内细胞团的胚胎。这可使用已知的方法和促进囊胚发育的培养基来实现。

[0079] 在雌核发育胚胎已被培养来产生可辨别的滋养外胚层和内细胞团后，然后使用内细胞团的细胞来产生所需的多潜能细胞系。这可通过将从内细胞团得到的细胞或整个内细胞团转移到抑制分化的培养物上来实现。这可通过将内细胞团细胞转移到抑制分化的饲养层上来实现，所述饲养层例如为成纤维细胞或上皮细胞，如从出生后的人类组织得到的成纤维细胞等、或产生 LIF 的其它细胞。为了维持细胞为未分化的状态，可采用其它因子 / 组分来提供适合的培养条件，包括但不限于加入条件培养基 [20]、bFGF 和 TGF-β1（有 LIF 或无 LIF)[21]、激活 gp130/STAT3 途径的因子 [22]、激活 PI3K/Akt、PKB 途径的因子 [23]、作为骨形态发生蛋白 (BMP) 超家族的成员的因子 [22] 以及激活正则 / β- 连环蛋白 Wnt 信号传导途径的因子（例如 GSK-3 特异性抑制剂 ;[24])。在一个相关方面，所述因子可包含包括饲养细胞和 / 或 ECM 基质 [22] 的培养条件。

[0080] 在一个方面，内细胞团细胞在人类出生后的包皮上或真皮成纤维细胞上、或产生白血病抑制因子的其它细胞上、或在白血病抑制因子的存在下培养。在一个相关方面，饲养细胞在用 ICM 接种前被灭活。例如，饲养细胞可使用抗生素来有丝分裂地灭活。在一个相关方面，抗生素可为但不限于丝裂霉素 C。

[0081] 培养将在保持细胞为长时间、理论上无限期的未分化的、多潜能状态的条件下实现。在一个实施方案中，卵母细胞是在高 O_2 张力下用钙离子载体、接着在低 O_2 张力下使卵母细胞与丝氨酸 - 苏氨酸激酶抑制剂接触而以孤雌生殖方式激活的。将由以孤雌生殖方式激活的卵母细胞所产生的 ICM 在高 O_2 张力下培养，其中（例如）使用含有 20%O_2 的气体混合物来维持细胞。在一个方面，可培养的是指能够或适合被培养。在一个相关方面，ICM 分离是在囊胚培养四天后以机械方式来进行，其中所述培养是在饲养细胞上进行。所述培养（例如）排除了使用从动物来源得到的材料的需要，如同免疫外科的情况一样。

[0082] 在一个相关方面，用于 ICM 的培养基是用非动物血清补充的，所述非动物血清包括但不限于人类脐血清，其中所述血清是存在于确定成分培养基（例如，IVF，其可从 MediCult A/S,Denmark ;Vitrolife,Sweden ;或 Zander IVF,Inc.,Vero Beach,FL 购买）中。在另一个方面，所提供的培养基和方法是不含动物产品的。在一个相关方面，动物产品是包括血清、干扰素、趋化因子、细胞因子、激素、以及生长因子的来自非人类来源的那些产品。

[0083] 本发明所产生的细胞的多潜能状态可通过不同的方法来确认。例如，可检测所述细胞存在或不存在特征性 ES 细胞标记物。在人类 ES 细胞的情况下，所述标记物的实例是

上文所确定的，并且包括 SSEA-4、SSEA-3、TRA-1-60 以及 TRA-1-81，并且在本领域中是已知的。

[0084] 多潜能性还可通过将这些细胞注射入适合的动物（例如 SCID 小鼠）中并且观察分化的细胞和组织的产生来确认。确认多潜能性的又一种方法是使用受试多潜能细胞来产生嵌合体动物并且观察所引入的细胞对不同的细胞类型的作用。产生嵌合体动物的方法在本领域中是熟知的并且描述在美国专利号 6,642,433, 中，所述专利通过引用并入本文。

[0085] 确认多潜能性的又一种方法是观察 ES 细胞当在有利于分化的条件（例如，除去成纤维细胞饲养层）下培养时分化为类胚体和其它分化的细胞类型。这种方法已被利用并且已确认受试多潜能细胞在组织培养中产生类胚体和不同的分化的细胞类型。

[0086] 从全部女性起源的 DNA 得到的所产生的多潜能细胞和细胞系、优选人类多潜能细胞和细胞系具有为数众多的治疗应用和诊断应用。所述多潜能细胞可在众多的疾病情况中用于细胞移植疗法或基因疗法（如果是基因修饰的）。

[0087] 在这点上，已知的是小鼠胚胎干 (ES) 细胞能够分化为几乎任何细胞类型，例如神经元干细胞。因此，根据本发明所产生的人类多潜能 (ES) 细胞应拥有类似的分化能力。根据本发明的多潜能细胞将根据已知的方法被诱导来分化以获得所需的细胞类型。例如，通过在分化培养基中并且在为细胞分化所提供的条件下培养所述细胞，根据本发明所产生的人类 ES 细胞可被诱导来分化为神经元干细胞、造血干细胞、肌细胞、心肌细胞、肝细胞、胰岛细胞、视网膜细胞、软骨细胞、上皮细胞、尿道细胞等。引起 ES 细胞分化的培养基和方法作为适合的培养条件在本领域中是已知的。

[0088] 例如，Palacios 等 [25] 教导了通过使干细胞经受诱导工序从胚胎细胞系产生造血干细胞，所述诱导工序包括在缺少视黄酸的悬浮培养基中初步培养所述细胞聚集体，接着在含有视黄酸的相同培养基中培养，随后使细胞聚集体转移到为细胞附着所提供的基质上。

[0089] 此外，Pedersen 等 [26] 的综述文章引用了众多的文章，其中公开了用于胚胎干细胞的体外分化以产生各种分化细胞类型（尤其包括造血细胞、肌肉、心脏肌肉、神经细胞等）的方法。

[0090] 在又一个实施方案中，本发明提供了一种通过在神经元分化培养基中培养神经元干细胞来分化神经元干细胞的方法。在一个方面，神经元分化培养基含有以下各项：青霉素 - 链霉素 - 两性霉素 (VWR, Radnor PA)；DMEM/F12(Invitrogen Grand Island, NY)；GlutaMAX™-I(Invitrogen Grand Island, NY)；以及 StemPro® 神经补充剂 (Invitrogen Grand Island, NY)。在又一个方面，神经元干细胞分化为神经元细胞，所述神经元细胞选自由以下组成的组：神经元、胶质细胞、少突胶质细胞以及星形胶质细胞。本发明还提供从神经元干细胞分化的神经元细胞。在一个方面，神经元干细胞从以孤雌生殖方式得到的人类干细胞中产生。在另一个方面，神经元干细胞是与卵母细胞供体组织相容的。在一个额外方面，神经元干细胞具有与 ESC 不同的接合性模式。在另一个方面，神经元干细胞仅含有母本基因组。在又一个方面，神经元干细胞可移植到人类中。在一个额外方面，神经元干细胞是未分化的、部分分化的或完全分化的。在一个方面，分化的神经元细胞是神经元。在又一个方面，神经元选自由以下组成的组：胆碱能神经元、γ - 氨基丁酸能神经元、谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元以及血清素能神经元。

[0091] 此外，Bain 等 [27] 教导了胚胎干细胞的体外分化以产生拥有神经元特性的神经细胞。这些参考文献所报告的是用于从胚胎或干细胞获得分化细胞的示例性方法。这些参考文献以及具体地说其中涉及用于分化胚胎干细胞的方法的公开以引用的方式全部并入本文。因此，使用已知的方法和培养基，本领域的技术人员可培养受试 ES 细胞，包括以基因方式改造的或转基因的 ES 细胞，从而获得所需的分化细胞类型，例如神经细胞、肌细胞、造血细胞等。通过本文所述的方法产生的多潜能细胞可用于获得任何所需的分化细胞类型。分化的人类细胞的治疗使用是空前的。例如，人类造血干细胞可用在需要骨髓移植的医学治疗中。所述工序被用于治疗许多疾病，例如晚期癌症如卵巢癌和白血病、以及损害免疫系统的疾病如 AIDS。造血干细胞可通过以下方式获得 ：将从男性或女性癌症或 AIDS 患者得到的男性或女性 DNA 与去核的卵母细胞合并，从而获得如上所述的多潜能细胞，并且在有利于分化的条件下培养这所述细胞直到获得造血干细胞。所述造血细胞可用在包括癌症和 AIDS 的疾病的治疗中。

[0092] 或者，受试多潜能细胞可通过在产生神经细胞系的分化条件下培养所述细胞而用在治疗患有神经病症的患者。可通过移植所述人类神经细胞来治疗的特定疾病尤其包括（举例来说）帕金森氏病、阿尔茨海默病、ALS、以及脑性麻痹等。在帕金森氏病的特定情况下，已展示了移植的胎儿脑神经细胞与周围的细胞进行适当的连接并产生多巴胺。这可引起帕金森氏病症状的长期逆转。

[0093] 干细胞治疗是将新细胞引入受损的组织中以便治疗疾病或损伤的一类干预策略。干细胞的自我更新及引起随后在不同级别的分化能力下的生成的能力对可能替换身体中的患病和受损区域的组织的生成提供显著的潜能，其中排斥反应和副作用的风险为最小限度。通常，被移植到所需患者的干细胞是用于治疗的。

[0094] 在一个实施方案中，本发明提供了一种使用神经元干细胞治疗神经病症的方法，所述神经元干细胞是从以孤雌生殖方式得到的卵母细胞得到。神经病症是身体的神经系统的病症。脑、脊髓或其它神经的结构异常、生化异常或电异常可导致一系列症状。症状的实例包括麻痹、肌无力、协调性差、感觉丧失、癫痫发作、神志不清、疼痛、以及改变的意识水平。存在许多公认的神经病症，一些相对常见，但许多很罕见。它们可通过神经学检查来评定并且在神经学和临床神经心理学的专业内进行研究和治疗。

[0095] 在一个方面，神经病症选自由以下组成的组 ：癫痫、抽搐、神经毒性损伤、低氧、缺氧症、局部缺血、中风、脑血管意外、脑或脊髓创伤、心肌梗塞、物理创伤、淹溺、窒息、围产期窒息、低血糖事件、神经变性、阿尔茨海默病、老年性痴呆、肌萎缩性侧索硬化症、多发性硬化、帕金森氏病、亨廷顿病、唐氏综合症、科尔萨科夫病、精神分裂症、AIDS 痴呆、多发梗塞性痴呆、宾斯万格痴呆、神经元损伤、癫痫发作、化学中毒、成瘾、吗啡耐受、阿片剂耐受、阿片样物质耐受、巴比妥酸盐耐受、急性和慢性疼痛、偏头痛、焦虑症、严重抑郁症、躁狂抑郁症、强迫症、精神分裂症和情绪障碍、双相障碍、单相抑郁症、心境恶劣、季节性情绪失调、肌张力障碍或其它运动障碍、睡眠障碍、肌肉松弛以及尿失禁。在又一个方面，神经元干细胞被植入需要所述治疗的患者中。

[0096] 本发明的一个目标是在于，它提供了基本上无限供应的多潜能人类细胞，所述细胞可用于产生分化的神经细胞。从不孕症治疗后剩余的囊胚中得到的、或使用 NT 生成的人类胚胎干细胞及它们的分化子代在用在同种异体细胞移植疗法中时将很可能被受者的免

疫系统所排斥。以孤雌生殖方式得到的干细胞将产生可减轻与现有移植方法有关的显著问题的分化细胞，即移植的组织的排斥反应，其发生的原因是因为关于卵母细胞供体的宿主对抗移植物或移植物对抗宿主的排斥反应。照惯例，通过施用抗排斥反应药物如环孢菌素来防止或减少排斥反应。然而，所述药物具有显著的不良副作用，例如免疫抑制、致癌性，并且这些药物很昂贵。通过所公开的方法产生的细胞应消除、或至少极大地减少关于卵母细胞供体的抗排斥反应药物的需要。

[0097] 本发明的另一个目标是在于，它提供了基本上无限供应的多潜能人类细胞，所述细胞可用于产生适合于向卵母细胞供体的家庭成员进行同种异体移植的分化的神经元细胞。所述细胞将是与卵母细胞供体的直系家庭成员在免疫上和基因上类似的，并且因此不太可能被供体家庭成员所排斥。

[0098] 例如，基因编码的脑源性生长因子可被引入根据本发明所产生的人类多潜能细胞中，所述细胞分化为神经细胞，并且这些细胞被移植到帕金森氏病患者中以延缓在所述疾病期间神经细胞的损失。

[0099] 在一个实施方案中，公开了在不存在用于控制分化和 / 或增殖的机械支持（即，不存在 3-D 支架）下在体外产生的神经元干细胞。在一个方面，公开了神经元干细胞，其包括但不限于在体外终末分化的神经元细胞。

[0100] 在另一个实施方案中，神经元干细胞是从以孤雌生殖方式激活的人类卵母细胞得到，其中从以孤雌生殖方式激活的卵母细胞得到的干细胞是被人工操纵的以产生神经元干细胞。

[0101] 在一个方面，产生了神经元干细胞，包括在用 DNA 抑制剂处理的成纤维细胞饲养层上在包含血清替代物 (M/SR)、细胞质基因 (plasmonate)、以及激活 gp130/STAT 途径和 / 或 MAP 激酶途径的至少一种促细胞分裂剂的培养基中培养从以孤雌生殖方式激活的卵母细胞得到的分离的干细胞；在包含细胞质基因 (M/SRP)（无外加的促细胞分裂剂）的 M/SR 中培养用促细胞分裂剂处理过的细胞到接近汇合，其中用 M/SR 周期性地更换 1/2 容量的 M/SRP 直到接近汇合的细胞发育出着色和半球形外观，并且将 M/SR 中着色的 / 半球形的细胞转移到明胶涂布的基质，其中用 M/SR 周期性地更换 1/2 容量的 M/SR 直到发育出浮动细胞团，其中所述浮动细胞团是神经元干细胞。在一个相关方面，所述 M/SR 包括 KO 高葡萄糖 DMEM、链霉素、非必需氨基酸、Glutamax-I、β - 巯基乙醇、以及血清替代物。在另一个相关方面，M/SRP 包含 M/SR 组分和细胞质基因。

[0102] 本发明在一个方面涉及展示 NSC 可有效地从 hpSC 中得到。为了这个目的，我们已选择了附着模型 [11]，因为与使用类胚体 [12] 的方案相比，它提供神经外胚层的更统一和更同步的形成。与原方案 [11] 不同，饲养细胞不被用于生长用于神经诱导的干细胞集落。在我们的研究中，在 CELLstart 上生长的 hpSC 集落中的 NEP 花结的发育出现在用用于神经诱导的培养基来更换 ES 培养基之后的一周内。从 hpSC 获得的 NEP 花结已良好地形成腔并表达适当的神经标记物集，这提供了充分形成神经上皮的证据。值得注意的是，在源于 hpSC 的 NEP 花结中观察到了增加的 SOX1 表达和 SOX3 表达，而发现了 SOX2 表达的略微减少（图 1），这可能与 OCT4 下调 [13] 有关。

[0103] 将 phNSC 的特性与 hNSC 相比较，其中 hNSC 是从 hESC H9 得到的。对于两种细胞系，特定于 NSC 的主基因的转录活性是可比的。尽管如此，phNSC 中与 hNSC 中的 SOXB1 基

因的表达是不同的（图 2）。SOXB1 基因在维持神经祖细胞上和在限制它们的分化能力上的确切作用还不清楚。已显示，这些基因的作用是冗余的 [13、14]，因此可能的是，在维持 NSC 的特性上，SOXB1 基因彼此相互补偿。

[0104] 所获得的大多数 phNSC 表达了神经外胚层的表面标记物 CD113 和 CD15，但这种表达是不统一的。Sun 等 [15] 展示了未分化的人类和鼠科 NSC 可表示异质的 CD113 和 CD15 种群，并且标记物的表达取决于细胞周期的阶段。尽管如此，CD113 阴性细胞能够维持它们的增殖潜能和神经源性潜能 [15]。

[0105] 为了支持 NSC 增殖，需要生长因子 bFGF，但其抑制内源性 SHH，导致分化成神经元的能力急剧下降，并且促进 NSC 变态为神经嵴外胚间充质细胞 [16]。神经嵴标记物基因 FOXD3 和 SNAI2 以及中胚层标记物 ACTA1 在高达 27 次传代的 phNSC 中的表达水平不高，并且与 hNSC 相比甚至更低（图 2）。这些数据指示不存在 hNSC 大规模变态为外胚间充质细胞。

[0106] 在无生长因子下在培养基中自发分化所产生的细胞种群的显著部分由在 phNSC 情况下以及在 hNSC 情况下的神经元来表示。神经元分化通过 Tuj1（微管蛋白 βIII）的阳性免疫细胞化学染色并且通过 TUBB3 和 MAP2 基因的由 qRT-PCR 分析（图 3）所揭示的高转录活性来确认。特定的少突胶质细胞标记物 FOXO4 和星形胶质细胞标记物 GFAP 的转录活性指示在分化细胞中胶质衍生物的存在。因此，我们得出这样的结论：所获得的 phNSC 可被视为所有三种主要类型的神经衍生物的前体。

[0107] 因此，本发明已表明多潜能 hpSC 可充当 NSC 的良好来源。所获得的 phNSC 能够相对长期的增殖，同时维持它们的神经源性的潜能和能力，以提供用于深低温保存 (cryopreservation) 和进一步实施的充分数量的细胞。

[0108] 多能神经前体细胞 (NPC) 已从神经外胚层中得到，所述神经外胚层是从纯合的或杂合的孤雌生殖干细胞中得到的。以孤雌生殖方式得到的 NPC 分化为神经元如中脑多巴胺能神经元 (DA)。这些 DA 神经元展示了中脑表型并且表达 TH、GIRK2、PITX3、NURR1、LMXA1、以及 EN1，如由免疫细胞化学和 RT-PCR 所测量。如从现有技术已知，多巴胺能神经元的主要功能是释放多巴胺。多巴胺在身体中的主要功能是奖励驱动的学习。如由 LC/MS/MS 所测定，从 hpNPC 得到的 DA 神经元也释放多巴胺。全细胞电生理学证实了以孤雌生殖方式得到的多巴胺能神经元能够发放动作电位。

[0109] 在一个实施方案中，本发明提供了一种用于通过分化以孤雌生殖方式得到的人类干细胞来产生神经元干细胞的方法，所述方法通过以下步骤实现：a) 在无饲养层条件下培养人类多潜能干细胞；b) 将所述细胞暴露至神经元诱导培养基；c) 机械分离部分分化的细胞；以及 d) 进一步扩增并维持所述细胞直到成熟。在一个方面，神经元诱导培养基包含以下各项：a) 青霉素 - 链霉素 - 两性霉素溶液；b)DMEM/F12；c)MEM 非必需氨基酸溶液；d) L- 谷氨酰胺；e)N2 补充剂；以及 f)bFGF。在又一个方面，在神经元诱导培养基中 L- 谷氨酰胺以 2mM 存在，MEM 非必需氨基酸溶液以 0.1mM 存在，并且 bFGF 以 4ng/ml 至 20ng/ml 存在。在另一个方面，神经元增殖培养基包含以下各项：a) 青霉素 - 链霉素 - 两性霉素；b)DMEM/F12；c)GlutaMAX™-I；d) StemPro® 神经补充剂；e)bFGF；以及 f)EGF。在一个额外方面，在神经元增殖培养基中 FGF 和 EGF 以 20ng/ml 存在。在一个额外方面，无饲养层条件利用 ECM 基质，所述 ECM 基质包括但不限于：CELLstart；Matrigel；层粘连蛋白；明胶；纤连蛋白。本

发明还提供通过所述方法产生的神经元干细胞。在又一个方面，神经上皮花结在 1 至 2 周之后形成。

[0110] 在一个额外实施方案中，本发明提供了分离的神经元干细胞，所述神经元干细胞从以孤雌生殖方式得到的人类干细胞中使用包括以下步骤的方法得到 ：a) 在无饲养层条件下培养人类多潜能干细胞 ；b) 将所述细胞暴露至神经元诱导培养基 ；c) 机械分离部分分化的细胞 ；以及 d) 进一步扩增并维持所述细胞直到成熟。在一个方面，所述细胞表达神经干细胞标记物，所述神经干细胞标记物选自由以下组成的组 ：SOXB1 家族 NES ；MSH-1 ；CXCR4 ；CCND1 ；LHX2 ；PAX6 ；GAP43。在又一个方面，神经元干细胞维持神经元表型至少 30 次传代。在一个方面，神经元干细胞可分化为神经元细胞。在一个额外方面，神经元细胞选自由神经元、星形胶质细胞以及少突胶质细胞组成的组。在一个方面，分化的神经元细胞是神经元。在又一个方面，神经元选自由以下组成的组 ：胆碱能神经元、γ - 氨基丁酸能神经元、谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元以及血清素能神经元。

[0111] 在又一个实施方案中，本发明提供了一种使用神经元干细胞来治疗神经病症的方法，所述神经元干细胞从以孤雌生殖方式得到的卵母细胞得到。在一个方面，神经病症选自由以下组成的组 ：癫痫、抽搐、神经毒性损伤、局部缺血、中风、脑血管意外、脑或脊髓创伤、物理创伤、阿尔茨海默病、老年性痴呆、肌萎缩性侧索硬化症、多发性硬化、帕金森氏病、亨廷顿病、精神分裂症、神经元损伤、偏头痛、焦虑症、严重抑郁症、躁狂抑郁症、强迫症、精神分裂症和情绪障碍、双相障碍、单相抑郁症、肌张力障碍或其它运动障碍、睡眠障碍、肌肉松弛。在又一个方面，神经元干细胞被植入需要所述治疗的患者中。

[0112] 在一个实施方案中，本发明提供了一种分化神经元干细胞的方法，所述方法包括在神经元分化培养基中培养神经元干细胞。在一个方面，神经元分化培养基包含以下各项 ：a) 青霉素 - 链霉素 - 两性霉素 ；b)DMEM/F12 ；c)GlutaMAX™-I ；以及 d) StemPro® 神经补充剂。在一个额外方面，神经元干细胞分化为神经元细胞，所述神经元细胞选自由以下组成的组 ：神经元、少突胶质细胞以及星形胶质细胞。在一个方面，分化的神经元细胞是神经元。在又一个方面，神经元选自由以下组成的组 ：胆碱能神经元、γ - 氨基丁酸能神经元、谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元以及血清素能神经元。本发明还提供通过这种方法产生的分化的细胞。在一个方面，所述细胞是从以孤雌生殖方式激活的卵母细胞中分化的。

[0113] 以下实施例旨在说明而不是限制本发明。

[0114] 实施例 1

[0115] 人类孤雌生殖胚胎发生的干细胞的产生

[0116] 材料和方法

[0117] 供体自愿捐献卵子和血液（用于 DNA 分析）而无金融支付。供体签署了全面的知情同意文件并且被告知所有捐献的材料将用于研究且不用于生殖目的。在卵巢刺激之前，卵母细胞供体经历了关于适用性的健康检查，所述检查是根据对于人类细胞、组织、以及基于细胞和组织的产品的供体的 FDA 资格鉴定指导（食品和药物管理局，(草案) 行业指南 ：对于人类细胞、组织、以及基于细胞和组织的产品 (HCT/P) 的供体的资格鉴定，日期为 2004 年 5 月）以及俄罗斯公共卫生部的命令 N67(02.26.03)。它包括 X 光、血液和尿液分析、以及肝功能检验。供体还进行了梅毒、HIV、HBV、以及 HCV 的筛查。

[0118] 卵母细胞使用标准荷尔蒙刺激来产生受试供体的超数排卵而获得。每个供卵从它

们的月经周期的第 3 天至第 13 天经历了经由 FSH 的卵巢刺激。总共给出了 1500IU 的 FSh。从供体的月经周期的第 10 天至第 14 天，以 0.25mg/ 天注射促性腺素释放素拮抗剂柔妊孕(gonadoliberin antagonist Orgalutran)(Organon,Holland)。从供体的月经周期的第 12 天至第 14 天，每天注射 75IU FSH+75IU LH(Menopur,Ferring GmbH,Germany)，如果超声检查显示直径在 18mm 与 20mm 之间的卵泡，那么在供体的月经周期的第 14 天施用 8000IU 单剂量的 hGC(Choragon,Ferring GmbH,Germany)。在大约第 16 天，在 hCG 注射后 35 小时进行经阴道穿刺。将卵泡液从麻醉的供体的有腔卵泡通过超声引导针吸引术收集到无菌试管中。

[0119] 从卵泡液挑选出卵丘卵母细胞复合体 (COC)，在冲洗培养基 (MediCult) 中洗涤，然后在通用 IVF 培养基 (MediCult，参见表 1) 中孵育，其中在 37℃下，在 20%O_2、5%CO_2 的湿润大气中用液体石蜡 (MediCult) 覆盖 2 小时。

[0120] 表 1. IVF 培养基

[0121]

组成
氯化钙
EDTA
葡萄糖
人血清白蛋白
硫酸镁
青霉素 G
氯化钾
磷酸氢二钾
碳酸氢钠
氯化钠
乳酸钠
丙酮酸钠
水

[0122] 在激活之前，将卵丘卵母细胞复合体 (COC) 用透明质酸酶 (SynVitro Hyadase) (MediCult) 进行处理以去除卵丘细胞，接着在通用 IVF 培养基中孵育，其中用石蜡覆盖 30 分钟。

[0123] 从这时起，在37℃的湿润大气中使用O_2减少的气体混合物（90%N_2+5%O_2+5%CO_2）执行对卵母细胞和胚胎的培养，离子霉素处理除外。通过将卵母细胞在CO_2孵育箱中在37℃下在20%O_2、5%CO_2的气体环境中在5μM离子霉素中孵育5分钟、接着在37℃下在90%N_2、5%O_2、以及5%CO_2的气体环境中用1mM 6-二甲基氨基嘌呤（DMAP）在石蜡覆盖的IVF培养基中培养4小时来激活。激活和培养在用液体石蜡油（MediCult,A/S,Denmark）覆盖的500μl培养基中在4孔培养盘（Nunclon,A/S,Denmark）中执行。

[0124] 将激活的卵母细胞在包含5%O_2、5%CO_2、以及90%N_2的气体环境中在IVF培养基中培养，并且将从激活的卵母细胞生成的胚胎在相同的气体混合物中培养。

[0125] 允许激活的卵母细胞在上述条件下在IVF中进行孵育，直到观察到根据囊胚评分修改1AA或2AA(Shady Grove Fertility Center,Rockville,MD，以及Georgia Reproductive Specialists,Atlanta,GA)的完全扩张的含有内细胞团（ICM）的囊胚。

[0126] 透明带通过0.5%链霉蛋白酶（Sigma,St.Louis）处理而除去。将来自囊胚的ICM通过免疫外科来分离，在所述手术中囊胚用人类脾脏细胞的马抗血清进行孵育，接着暴露于豚鼠补体。通过轻轻吸移处理过的囊胚将滋养外胚层细胞从ICM中去除。

[0127] 为了从整个囊胚得到phESC，将所述囊胚置于设计用于phESC培养的培养基中的饲养层（即，VitroHES(Vitrolife)补充有4ng/ml hrbFGF、5ng/ml hrLIF以及10%人脐带血血清）上。当囊胚附着并且滋养外胚层细胞展开时，ICM变得可见。通过三天至四天的额外培养，使用精拉的玻璃吸移管经由ICM的机械切片将所述ICM从滋养外胚层外生长中分离。此外，在37℃下在5%CO_2和20%O_2中在96孔培养盘中，将所述IMC细胞在补充有10%人脐带血血清、5ng/ml人类重组LIF(Chemicon Int'l,Inc.,Temecula,CA)、4ng/ml重组人类FGF(Chemicon Int'l,Inc.,Temecula,CA)以及青霉素-链霉素（100U/100μg）的VITROHES™培养基（例如，DMEM/高葡萄糖培养基，VitroLife,Sweden）中，在有丝分裂灭活的出生后人类真皮成纤维细胞的饲养细胞层上进行培养。这种气体混合物被用来培养干细胞。人类成纤维细胞培养使用非动物材料进行。使用10μg/ml丝裂霉素C(Sigma,St.Louis,MO)执行3小时的成纤维细胞的灭活。

[0128] 在单独的方法中，通过将囊胚用人类脾脏细胞的马抗血清孵育、接着暴露于兔补体来执行免疫外科。通过轻轻吸移处理过的囊胚将滋养外胚层细胞从ICM中去除。在从基因上无关的个体获得的人类新生儿皮肤成纤维细胞（HSF）（经父母同意）的饲养层上执行所分离的ICM的进一步培养，所述HSF是使用含有人类脐带血血清的培养基得到的。使用丝裂霉素C来有丝分裂地灭活所述HSF饲养层。

[0129] 用于培养HSF的培养基是由90%DMEM（高葡萄糖，含有L-谷氨酰胺(Invitrogen)、10%人类脐带血血清以及青霉素-链霉素（100U/100mg)Invitrogen）组成。

[0130] 为了培养ICM和phESC，使用了补充有4ng/ml hrbFGF、5ng/ml hrLIF以及10%人类脐带血血清的VitroHES(Vitrolife)。将ICM以机械方式铺在新鲜的饲养层上并且培养三至四天。将第一集落以机械方式切割并在培养五天后再次铺盘。在五至六天的培养后进行所有后续的传代。对于早期的传代，将集落以机械方式划分为团簇并且再次铺盘。用胶原酶IV处理和机械解离执行phESC的进一步传代。在37℃下在5%CO_2的湿润大气中执行phESC的增殖。

[0131] 卵母细胞激活

[0132] 将来自最初 4 个供体的激活的卵母细胞在包含 5%O_2、5%CO_2 以及 90%N_2 的气体环境中在 IVF 培养基中进行培养且历时超过五 (5) 天。表 2 示出了激活的卵母细胞的成熟进程。每个卵母细胞被分离在 4 孔培养盘中。

[0133] 表 2. 培养的激活的卵母细胞 *

[0134]

	第一天	第二天	第三天	第五天
N1	1 个前核(pn), 1 个极体(pb)	2 个均等的卵裂球(bl), 裂解(fr)-0%	4 个均等的 bl, fr-2%	1 个桑葚胚, fr-15%
N2	0 个 pn, 1 个 pb	4 个不均等的 bl, fr-4%	5 个不均等的 bl, fr-20%	4 个不均等的 bl, fr-40%
N3	1 个 pn, 1 个 pb	2 个不均等的 bl, fr-0%	6 个均等的 bl, fr-0%	早期囊胚
N4	1 个 pn, 1 个 pb	4 个均等的 bl, fr-10%	4 个均等的 bl, fr-20%	完全扩张的囊胚, 具有良好的 ICM 1AA

[0135] *在第 1 天,将细胞在 M1 培养基 (MediCult) 中进行孵育,并且在第 2 至 5 天,将细胞在 M2 培养基 (MediCult) 中进行孵育。每天更换培养基。M1 和 M2 含有人类血清白蛋白、葡萄糖和衍生代谢物、生理盐、必需氨基酸、非必需氨基酸、维生素、核苷酸、碳酸氢钠、链霉素 (40mg/l)、青霉素 (40.000IU/l) 以及酚红。

[0136] 将内细胞团从 N4 中分离并转移到如上所概述的人类成纤维细胞饲养细胞中。N1 和 N2 在第 6 天退化。此外,在第 6 天,N3 产生完全扩张的具有 ICM2AB 的囊胚。然后,在第 6 天将 N3 转移到人类成纤维细胞饲养细胞中。来自 N4 的 ICM 未改变。N3 用于分离干细胞。

[0137] 将 ICM 细胞在 5%CO_2 和 95%N_2 的气体环境中在 NitroHES 培养基中培养且历时超过四十五 (45) 天。表 2a 示出了 N3ICM 细胞培养的进程。

[0138] 表 2a. N3-ICM 培养的进程 *

[0139]

第 3 天	将 ICM 移植到新鲜的饲养细胞上。
第 8 天	细胞集落以机械方式划分为 6 块并在 96 孔培养盘的 3 个孔中培养-第 1 次传代。
第 14 天	将来自第 1 次传代的五(5)个集落的细胞以机械方式划分，并且将第 2 次传代的 20 个集落在 24 孔培养盘的 3 个孔中培养。
第 20 天	将细胞铺在 35 mm 培养皿中-第 3 次传代。
第 24 天	用细胞接种五(5)个 35 mm 培养皿-第 4 次传代。在室温下，一个培养皿被以化学方式用 5%链霉蛋白酶(Sigma)划分。
第 30 天	用细胞接种二十五(25)个 35 mm-第 5 次**传代。
第 34 天	第 6 次**细胞传代。
第 35 天	将来自第 6 次传代的 11 个安瓿冷冻。
第 37 天	第 7 次**细胞传代。
第 44 天	将来自第 7 次传代的 12 个安瓿冷冻。
第 45 天	第 8 次细胞传代。

[0140] * 细胞在 M2 培养基 (MediaCult) 上生长。

[0141] ** 这些传代是用链霉蛋白酶消化进行的。

[0142] 干细胞分离

[0143] 对来自 5 个供体的卵母细胞使用 MediCult 培养基，接着是在减少的氧气下培养，所述培养允许在培养的第五或第六天产生 23 个囊胚。囊胚中的十一个具有可见的 ICM（表 3）。

[0144] 表 3. 孤雌生殖体和孤雌生殖胚胎干细胞系的生成

[0145]

供体数	收获的卵母细胞	捐献的卵母细胞	正常激活的卵母细胞	生成的孤雌生殖体	得到的囊胚		所生成的系
					有 ICM	无可见的 ICM	
1	8	4	4	4	2	-	phESC-1 免疫外科
2	15	8	8	8	3	3	phESC-3 phESC-4 phESC-5 全部来自整个囊胚
3	27	14	12[1]	11[2]	3	2	phESC-6，来自整个囊胚
4	22	11	10[3]	10	2	3	phESC-7，来自整个囊胚
5	20	9[4]	7	7	1	4	不生成细胞系

[0146] [1]- 两个卵母细胞未激活 ;[2]- 一个卵母细胞在激活后退化 ;[3]- 一个卵母细胞未激活 ;[4]- 两个卵母细胞处于中期阶段 I 并被丢弃。

[0147] 这些结果表明在来自以孤雌生殖方式激活的卵母细胞的囊胚形成中有约 57.5% 的成功率。

[0148] 实施例 2

[0149] 人类孤雌生殖干细胞的维持

[0150] 将以如上所述的类似方式产生的人类孤雌生殖干细胞系 phESC-1、phESC-3[1] 以及 hpSC-Hhom-4[2] 维持在 ES- 培养基中的丝裂霉素 C 灭活的小鼠胚胎成纤维细胞 (Millipore) 饲养层上，所述培养基包含 :KDMEM/F12(Invitrogen)，补充有 15%KSR(Invitrogen Grand Island,NY)、2mM L- 谷氨酰胺 (GlutaMAX-I,Invitrogen Grand Island,NY)、0.1mM MEM 非必需氨基酸 (Invitrogen)、0.1mM β - 巯基乙醇 (Invitrogen Grand Island,NY)、青霉素 / 链霉素 / 两性霉素 B(100U/100μg/250ng)(MP Biomedicals) 以及 5ng/ml bFGF(Peprotech)。每 5 至 7 天用分散酶或胶原酶 IV(两者都来自 Invitrogen Grand Island,NY) 使细胞传代，其中分流比为 1:4 或 1:6。在我们的研究中来自所使用的 hpSC 系的实验结果不存在明显差异，因此汇集了数据。

[0151] 将 hESC 维持在饲养层上可在神经上皮花结的获得上实现良好结果。神经诱导 hESC 之前的一次传代是在 CELLstart™ 涂覆的容器上进行的。最好的结果已使用 60mm 培养皿实现。传代的那天被认为是“第 0 天”。将 hESC 在用于 ES 细胞的含 15%KSR 和 5ng/ml 的 bFGF 的培养基中维持 4 至 7 天时间。集落将良好地形成。

[0152] 实施例 3

[0153] 用于培养基制备和培养皿涂覆的材料和方法

[0154] 材料

[0155] Knockout DMEM/F12,Invitrogen,12660-012

[0156] DMEM/F12,Invitrogen,10565-018，(补充有 GlutaMAX™-I 补充剂作为 L- 谷氨酰胺的来源)。

[0157] GlutaMAX™-I 补充剂，Invitrogen，35050-061

[0158] 10mM(100X) 的 MEM 非必需氨基酸溶液，Invitrogen，11140-050

[0159] CELLstart™，Invitrogen，A10142-01

[0160] StemPro ® Accutase ®细胞解离试剂，Invitrogen，A11105-01

[0161] StemPro 神经补充剂，Invitrogen，A10508-01

[0162] N2 补充剂 (100X)，Invitrogen，17502-048

[0163] 杜尔贝科磷酸盐缓冲盐水 (D-PBS)(1X)，Invitrogen，14040-133，(其中有 Ca2+ 和 Mg2+)

[0164] 重组人类 EGF，Invitrogen，PHG0314

[0165] 重组人类碱性 FGF，Peprotech，100-18B

[0166] 青霉素 - 链霉素 - 两性霉素溶液 (100X)，VWR，1674049

[0167] 杜尔贝科磷酸盐缓冲盐水 (D-PBS)(1X)，w/o Ca2+、Mg2+，VWR，16777-150

[0168] 用于神经诱导的培养基

[0169] Shin 等 [11] 描述了所述培养基的名称和组成。用于神经诱导的培养基 DN2 是基于补充有 N2 的 DMEM/F12。

[0170] 向容量 500ml 的含有 DMEM/F12 培养基的新瓶中添加 5ml 的 100x 青霉素 - 链霉素 - 两性霉素溶液。在 +4 下储存。为了制备 DN2 培养基：

[0171] - 将含有 PSA 溶液的 98ml 的 DMEM/F12 无菌地转移到无菌培养基瓶中；

[0172] - 添加 1ml 的 100x MEM 非必需氨基酸溶液；

[0173] - 添加 1ml 的 100x N2 补充剂；

[0174] - 培养基 DMEM/F12 已含有 L- 谷氨酰胺，因此不应添加 GlutaMAX™-I 补充剂

[0175] - 在 +4 下储存。在使用之前添加 bFGF 溶液直到 4ng/ml-20ng/ml 的最终浓度。

[0176] 用于神经增殖的培养基

[0177] 按照 StemPro ® NSC SFM 试剂盒的手册所指示来制备用于神经增殖的培养基。StemPro ® NSC SFM 培养基还可从单独的组分来制备。

[0178] 向容量 500ml 的含有 DMEM/F12 培养基的新瓶中添加 5ml 的 100x 青霉素 - 链霉素 - 两性霉素溶液。在 +4 下储存。为了制备 StemPro ® NSC SFM 培养基：

[0179] - 将含有 PSA 溶液的 97ml 的 DMEM/F12 无菌地转移到无菌培养基瓶中；

[0180] - 添加 1ml 的 100x GlutaMAX™-I 补充剂 (1.1.3.)；

[0181] - 添加 2ml 的 StemPro ®神经补充剂 (1.1.7.)；

[0182] - 在 +4 下储存。在使用之前添加生长因子 bFGF 和 EGF 直到 20ng/ml 的最终浓度。

[0183] 注意：根据 Invitrogen 指导，不应添加 MEM 非必需氨基酸溶液。

[0184] 用 CELLstart™ 基质涂覆培养容器

[0185] 在 PBS 中稀释 CELLstart™ 溶液，其中稀释因数为 50，即每 1ml PBS20ul 的 CELLstart™ 溶液。Ca2+ 和 Mg2+ 的存在是必要的！不要存储所述溶液，在使用前立即制备。

[0186] 每一个 35mm 培养皿添加 0.7ml 至 1.0ml 溶液或每一个 60mm 培养皿添加 2.0ml 溶液。在 +37℃下在孵育箱中放置 2 小时。孵育小于 2 小时或长于 4 小时、使用等于 100 的稀释因数、或在 +4℃下储存导致在传代之后或在长期培养期间细胞附着的减少。

[0187] 在使用前吸出 CELLstart™ 溶液。不要冲洗。立即添加培养基。

[0188] 生长因子溶液将生长因子 EGF 和 bFGF 的 0.1%HAS 溶液在 PBS 中稀释为 10ug/ml 的浓度。例如，将 50ug 冻干的生长因子的 5ml0.1%HSA 溶液在 PBS 中进行无菌稀释。在 500ul 离心管中等分试样并在 -20℃下储存。避免重复的冷冻 - 解冻循环，在解冻后不长于 14 天进行使用。在使用前立即向培养基中添加生长因子。例如，每 1ml 培养基将添加 2ul 生长因子溶液以得到 20ng/ml 的最终浓度。

[0189] 实施例 4

[0190] hpESC、phNSC 以及 hNSC 分析

[0191] 使用 QIAsymphony 自动纯化系统，根据制商造指导 (Qiagen) 对总 RNA 进行分离。100ng 至 500ng 的总 RNA 被用来用 iScript cDNA 合成试剂盒 (Biorad) 进行反转录。为了分析基因的转录活性，一式两份执行 PCR 反应，使用每反应 1/25-th cDNA 以及 QuantiTect 引物分析（表 4 中报告所使用的引物）以及 Quantitest SYBR Green 预混液 (Qiagen)。使用 Rotor-Gene Q(Qiagen) 执行反转录酶实时定量 PCR(qRT-PCR)。针对标准曲线执行相对定量，并且将量化值针对通过 PPIG（亲环蛋白 G) 所测定的输入输入来归一化。在归一化后，计算 2 至 7 个基因表达测量值的平均值的标准误差。

[0192] 对 APC 染色的小鼠抗人 CD133 抗体 (eBioscience) 和小鼠抗人 CD15 抗体 (BD Pharmingen) 进行表面标记物的 FACS 分析（参见表 5)。

[0193] 为了免疫染色，将 NSC 用 4% 多聚甲醛固定，在固定后 1 小时用含有 0.1%Tween20 的溶液、并且用 0.3% 的 Triton X-100 进行透化。在透化后，将细胞用 3% 的正常山羊血清在 +4℃下阻断过夜。在 +4℃下以如下稀释度施加抗 SOX2、巢蛋白和 Musashi-1 的第一抗体过夜：分别为 1:100、1:200 以及 1:300。在室温下施加 2 小时的第二抗体 (1:500)。为了对分化的神经元进行一步染色，根据制造商指导 (Covance)，应用了抗微管蛋白 βIII Alexa Fluor488 偶联的抗体。细胞核用 DAPI 染色。第一和第二抗体的清单由表 5 给出。

[0194] 表 4. 实时 PCR 引物

[0195]

基因	目录号	生产商
ACTA1	QT00199815QuantiTect 引物分析	Qiagen
AFP（α - 胎蛋白）	QT00085183QuantiTect 引物分析	Qiagen
FOXD3	QT01018794QuantiTect 引物分析	Qiagen
FOXO4	QT00029141QuantiTect 引物分析	Qiagen
GFAP	QT00081151QuantiTect 引物分析	Qiagen
MAP2	QT00057358QuantiTect 引物分析	Qiagen
MS1(Musashi-1)	QT00025389QuantiTect 引物分析	Qiagen

NES(巢蛋白)	QT00235780QuantiTect引物分析	Qiagen
OLIG2	QT01156526QuantiTect引物分析	Qiagen
PAX6	QT00071169QuantiTect引物分析	Qiagen
POU5F1(OCT4)	QT00210840QuantiTect引物分析	Qiagen
SNAI2(Slug)	QT00044128QuantiTect引物分析	Qiagen
SOX1	QT01008714QuantiTect引物分析	Qiagen
SOX2	QT00237601QuantiTect引物分析	Qiagen
SOX3	QT00212212QuantiTect引物分析	Qiagen
TUBB3	QT00083713QuantiTect引物分析	Qiagen
PPIG(亲环蛋白G)	QT01676927QuantiTect引物分析	Qiagen

[0196] 表5. 用于免疫染色和FACS的抗体

[0197]

抗原	目录号	生产商
CD133	17-1338	eBioscience
同种型对照	17-4714	eBioscience
CD15	551376	BD Pharmingen
同种型对照	555585	BD Pharmingen
微管蛋白 βIII	A488-435L	Covance
Sox-2	Ab92494	AbCam
Musashi1	ab52865	AbCam
巢蛋白	MAB5326	Mihoore
山羊抗小鼠,-488	35503	ThermoScientific
山羊抗兔,-488	35553	ThermoScientific

[0198]

山羊抗小鼠,-549	35508	ThermoScientific

山羊抗兔,-549	35558	ThermoScientific

[0199] 实施例 5

[0200] 神经诱导和神经干细胞

[0201] 附着模型已由 Shin 等 [11] 提出,在人类胚胎干细胞准备传代前,将它们维持在饲养层或基质上。这时,用一种用于神经诱导的培养基更换培养基。在所述条件下,在 1 至 2 周的维持后形成神经上皮细胞花结,其被认为是神经管的重演。下文描述了在无饲养层条件下在 CELLstart™ 上获得神经上皮花结的方案。

[0202] 当 hESC 培养物准备传代时,用补充有 20ng/ml bFGF 的 DN2 培养基更换培养基。培养基更换的那天被认为是“第 NI 天”。应至少每隔一天或更频繁地用新鲜的培养基来更换培养基。

[0203] 在 3 至 4 天后,细胞的死亡率显著增加,培养基的颜色将快速从橘红色变为黄色。在此期间,应至少每天更换一次培养基。

[0204] 在细胞死亡稳定约 7 至 10 天之后,可发现以下区域,其中细胞形成密集的“小山”或“脊”而不是单层。在这些“小山”中发现了早期神经上皮花结。

[0205] 在花结已开始形成后,培养物应培养额外的 3 至 7 天时间,直到形成具有在中心带有小管腔的多个 NEP 花结的清晰可见的区域。这些是晚期花结或发育完全的神经外胚层。含有花结结构的区域可形成被柱状神经上皮细胞围绕的具有长管腔的分支嵴。

[0206] 为了神经分化,附着模型 [11] 被以独特和重要的修改来使用。使维持在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上 5 天的 hpSC 用 Dispase(Invitrogen Grand Island,NY) 在涂覆了 CELLstart(Invitrogen Grand Island,NY) 的 60mm 培养皿上进行传代。接下来的 4 天期间,将 hpSC 集落在 ES 培养基中培养,接着用用于神经诱导的培养基更换 ES 培养基。用于神经诱导的培养基是基于含有 N2 补充剂 (Invitrogen Grand Island,NY)、0.1mM MEM 非必需氨基酸、2mM L- 谷氨酰胺 (GlutaMAX-I, Invitrogen Grand Island,NY)、抗生素溶液以及 20ng/ml bFGF 的 DMEM/F12。更换培养基的那天被认为是神经诱导的第 0 天。将良好形成神经上皮细胞花结的区域以机械方式分离,使用 TrypLE(Invitrogen Grand Island,NY) 解离为单细胞悬液,并且转移到 CELLstart™(Invitrogen Grand Island,NY) 涂覆的 24 孔培养盘的孔中的 StemPro NSC SFM 培养基 (Invitrogen Grand Island,NY) 中,其中补充有 20ng/ml 的 bFGF 和 20ng/ml 的 EGF(两者都来自 Peprotech)。在获得足量的细胞之后,在 CELLstart 涂覆的 60mm 培养皿上、在如上所述补充过的 StemPro NSC SFM 培养基中执行 NSC 的进一步的维持和传代。在传代期间已通过 Accutase(Invitrogen Grand Island,NY) 解离了细胞。在相同的条件下维持 H9hESC 衍生的 GIBCO ®人类神经干细胞 (进一步称为 hNSC ;Invitrogen Grand Island,NY)。

[0207] 在 CELLstart 上生长 5 天之后,可见 hpSC 集落完全形成并且与在饲养层上生长的集落相比无任何视觉差异。在更换培养基后,神经上皮 (NEP) 花结的第一迹象在神经诱导的第 2 天出现。在用于神经诱导的培养基中培养的第 7 天,细胞集落作为含有 NEP 花结丛簇的较大区域而出现。在这些丛簇中,大多数花结已良好地形成管腔。qRT-PCR 分析揭示关键神经外胚层基因 PAX6 和 SOX1 的转录活性与未分化的 hpSC 相比在这个阶段有增加,而多潜能标记物 OCT4 急剧下调 (图 1)。特异性神经标记物 NES(巢蛋白) 和 MSI(Musashi-1)

的表达也很高。内胚层标记物 AFP 和中胚层标记物 ACTA1 未被 qRT-PCR 在含有细胞丛簇的 NEP 花结中检测到（数据未示出）。

[0208] 为了制备 35mm 培养皿，首先用如上所述的 CELLstart™ 对它们进行处理，然后添加 2ml 的用于神经增殖的补充有 20ng/ml bFGF 和 20ng/ml EGF 的 StemPro® NSC SFM 培养基。将培养皿置于 +37℃、5%CO_2、湿润大气下的孵育箱中。

[0209] 将在神经诱导期间（接种在 CELLstart™ 处理的容器上之后约第 21 天）获得的具有管腔的晚期花结 NEP 在立体显微镜下以机械方式分离。可使用注射器针头。应切割具有花结的区域，因为不可能以机械方式分离单细胞。应丢弃没有花结的区域以及单层区域。收集在最小容量的培养基中所获得的细胞团簇。每一个 35mm 培养皿接种尺寸为 100um 至 300um 的 15 至 20 个团簇。

[0210] 然后应将细胞团簇湿磨为单细胞悬液。为了这个目的，将 300ul 的 StemPro® Accutase® 放置在具有圆锥底部的 15ml 离心管中并加温至 37℃。将得到的细胞团簇转移到具有 StemPro® Accutase® 的管中的最小体积的培养基中，在室温下孵育 3 至 4 分钟并且用 200ul 的尖端上下轻轻吸移约 100 次。在 StemPro® Accutase® 中用于细胞的总时间不应超过 10 分钟。

[0211] 然后添加 6ml 的用于神经增殖的无生长因子的温 StemPro® NSC SFM 培养基。将盖子关闭并轻轻摇晃管 6 至 8 次以冲洗细胞。

[0212] 在 120g 至 130g 下离心 4 分钟，然后小心地抽吸出尽量多的上清液。将 2ml 的培养基从所制备的培养皿转移到离心管中，将沉淀重悬并将管的内容物转移到培养容器中。通过摇晃培养皿将细胞均匀分布在培养皿中，将所述培养皿放置在 +37℃、5%CO_2、湿润大气下的孵育箱中。

[0213] 在分离后第二天对细胞附着和存活力进行估计，用新鲜的培养基更换培养基。所收到的细胞可被认为是 0 传代的 NSC。

[0214] 实施例 6

[0215] phNSC 的无性系分离

[0216] 通常，从 NEP 花结分离的增殖细胞的种群不是同类的。它们可被间叶型细胞污染，所述间叶型细胞诱导 NSC 的分化并且由于高增殖率而代替它们。单个细胞克隆的分离允许获得同类的 NSC 种群。为了制备培养皿 35mm，用 CELLstart™ 对它们进行处理，然后在每个培养皿上添加 2ml 的用于神经诱导的培养基 DN2，所述培养基补充有 20ng/ml 的 bFGF，将培养皿放置在 37°、5%CO_2 润湿大气下的孵育箱中。如上所述，将具有管腔的晚期 NEP 花结（hESC 在 CELLstart™ 上接种之后约 21 天）在立体显微镜下以机械方式进行分离。具有 NEP 花结的片段的尺寸应从 100μm 至 300μm 进行变化。将具有 NEP 花结的 15 至 20 个片段接种在每个培养皿 35mm 中，将所述片段均匀地分布在培养皿上，在 2 天期间不更换培养基的情况下进行培养。在这 2 天期间，当片段附着并趋于平铺在用 CELLstart™ 处理的培养皿表面上时，许多细胞将迁移到细胞丛簇外围并得到类似于间充质细胞（“扁平细胞”）的形态。同时，从附着的细胞丛簇的中央部分逐出的细胞的一些部分形成二次花结。为了制备 24 孔培养盘，将孔用 CELLstart™ 进行处理，然后添加补充有生长因子（20ng/ml 的 bFGF

和 20ng/ml 的 EGF) 的 0.5ml 用于神经增殖的 StemPro ® NSC SFM 培养基（参见 1.3.）并置于孵育箱中。将具有二次花结的扁平细胞从 35mm 培养皿上移除。用 200μl 塑料尖端刮去所有不需要的细胞。将培养皿用 1ml-2ml 的不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的温 D-PBS 进行冲洗，添加新鲜的温培养基 DN2。使用注射器针头切割具有二次花结的区域，并且将它们在最小体积的培养基中转移到含有 0.1ml 的温 StemPro ® Accutase ®的 0.5ml 离心管中。每一个管放置不超过 10 个具有二次花结的片段。在室温下孵育 3 至 4 分钟，然后用 200μl 尖端轻轻吸移约 100 次。细胞在 StemPro ® Accutase ®中的总时间不应超过 10 分钟。每小瓶添加 0.4ml 的温 StemPro ® NSC SFM 培养基。在 120g 至 130g 下将管离心 4 分钟，然后小心地抽吸出尽量多的上清液而不干扰细胞沉淀。将 250ul 的培养基从所制备的 24 孔培养盘的孔中转移到具有细胞沉淀的管中，用 200ul 的尖端使所述细胞沉淀重悬并将细胞悬液转移回所述孔中。将细胞从一个管转移到单孔中。由此方式所获得的细胞克隆被认为是 0 传代。在接下来的 4 至 6 天期间，观察细胞增殖，标记含有类似于 NSC 形态（即特定角形状）的大量细胞的孔，所述细胞能够形成小花结样结构（星号）、能够自发地在细胞的低密度区域分化为神经元样细胞。在开始的 2 至 5 次传代期间，将细胞维持在 24 孔培养盘的孔中，以 1:2 或 1:1 的比率进行分裂。丢弃那些孔，其中细胞开始失去特定形态。在获得足量的细胞之后，将它们在 35mm 培养皿上、然后在 60mm 培养皿上进行培养。

[0217] 实施例 7

[0218] phNSC 的分化

[0219] 在 Neurobasal 培养基 (Invitrogen) 中执行 NSC 的自发分化，所述培养基补充有不含视黄酸的 B27(Invitrogen)、0.1mM MEM 非必需氨基酸、2mM L- 谷氨酰胺 (GlutaMAX-I, Invitrogen) 以及抗生素溶液。

[0220] 在不含生长因子 bFGF 和 EGF 的 B27 补充的培养基中，phNSC 和 hNSC 的自发分化发生在 4 周内，从而生成显著的神经元样细胞。免疫细胞化学分析显示了在 phNSC 衍生细胞中的神经元特异性微管蛋白 βIII 的存在。转录活性分析显示了在 phNSC 和 hNSC 衍生细胞中的神经元特异性标记物 TUBB3（微管蛋白 βIII）和 MAP2 以及星形胶质细胞标记物 GFAP（图 3）。同时，少突胶质细胞标记物 FOXO4 的表达高于从 phNSC 细胞种群中所分化的。

[0221] 实施例 8

[0222] phNSC 的维持和表型

[0223] 分离和 NEP 花结解离为单细胞悬液的结果是增殖细胞种群；通常，使这些细胞在 4.5 个月中以分裂率 1:2 每 4 至 5 天进行传代。在至少 27 次传代期间，phNSC 维持与 hNSC 类似的特定形态。

[0224] 具体地说，如其中有一些修改的 GIBCO-Invitrogen 用户手册 (MAN0001758) 中所述来执行 NSC 的维持和传代。

[0225] 使 NSC 以 1:2 分裂率（取决于增殖率）每 3 至 5 天进行一次传代。接种密度应为每 cm^2 至少 $5x10^4$，因为细胞倾向于在低密度下分化。

[0226] 当形成松散的单层时，细胞就准备开始传代了。细胞的过度生长和致密的单层可导致亚系的分化和损失。为了传代细胞：

[0227] - 制备所需量的 60mm 培养皿，在传代前用 CELLstart™ 处理 2 至 3 小时；

[0228] - 在 +37℃、5%CO_2、湿润大气下的孵育箱中将所需量的StemPro® NSC SFM 培养基加温，每一个 60mm 培养皿 6ml 培养基；

[0229] - 制备具有 10ml StemPro® NSC SFM 培养基的 15ml 离心管，每 1 至 2 个 60mm 培养皿用一个管。将管放置在 +37℃、5%CO_2、湿润大气下的孵育箱中；

[0230] - 在离心管中添加所需量的StemPro® Accutase®，每个培养皿有 1ml 待传代。在传代前将其在水浴中加温 20 至 30 分钟；

[0231] - 添加 CELLstart™ 后 2 至 3 小时，添加生长因子 EGF 和 bFGF 直至两者的最终浓度都为 20ng/ml；

[0232] - 用 6ml 的StemPro® NSC SFM 培养基更换 CELLstart™ 溶液，所述培养基补充有生长因子，将培养皿放置回孵育箱中；

[0233] - 拿取待传代的培养皿、具有StemPro® Accutase®和无生长因子的StemPro® NSC SFM 培养基的管；

[0234] - 从培养皿中抽吸出培养基并添加 1ml 的温StemPro® Accutase®，在室温下孵育 4 分钟。在孵育期间小心地摇晃培养皿；

[0235] - 在 4 分钟后，在倒置显微镜下检查细胞是否开始从表面分离。如果没有，那么需要额外的孵育，将培养皿放入孵育箱中 1 分钟；

[0236] - 将 1ml 的无生长因子的StemPro® NSC SFM 培养基添加到培养皿中并用 1000ul 的尖端轻轻吸移细胞悬液来分离细胞；

[0237] - 将所述细胞悬液转移到含有StemPro® NSC SFM 培养基、不含生长因子的管中。一个管适用于最多 2 个 60mm 培养皿；

[0238] - 小心地摇晃所述管以将内容物混合；

[0239] - 将细胞在 120g-130g 下离心 4 分钟，小心地抽吸出所有上清液。

[0240] - 拿取所需量的新 CELLstart™ 处理过的培养皿。通常细胞以 1:2 进行传代，所以如果存在来自一个 60mm 培养皿的细胞，那么使用 2 个新培养皿；

[0241] - 将 1ml 的培养基从每个培养皿转移到离心管中以使沉淀再悬。将 1ml 的细胞悬液转移回每个培养皿。

[0242] - 通过摇晃培养皿将细胞均匀地分布在培养皿中。将所述培养皿放置在 +37℃、5%CO_2、湿润大气下的孵育箱中。

[0243] 在传代后第二天用新鲜的培养基更换培养基。稍后，应将培养基至少每隔一天更换一次。

[0244] 转录活性 qRT-PCR 分析显示在 phNSC 中 SOX2、NES、MS1 以及 PAX6 的表达水平与在 hNSC 中的那些接近。在 phNSC 或 hNSC 中，OCT4 的表达水平为可检测的但非常低；在所有 NSC 细胞系中内胚层标记物 AFP 未被检测到（数据未示出）。基因 FOXD3 的转录活性水平和特异于神经嵴外胚层间质的 SNAI2 以及中胚层标记物 ACTA1 在 phNSC 中与在 hNSC 中相比更低，而神经管神经源性域标记物 OLIG2 表达在 phNSC 中显示为高水平的。通过免疫细胞化学还确认了 SOX2、NES 和 MS1 在蛋白质水平下的表达。表面标记物 CD133 和 CD15 分

析显示 phNSC 呈现阳性和阴性的 CD133 和 CD15 细胞的混合种群（数据未显示）。

[0245] 实施例 9

[0246] 以孤雌生殖方式得到的多巴胺能神经元的产生

[0247] 多能神经前体细胞 (NPC) 已从神经外胚层中得到，所述神经外胚层是从纯合的或杂合的孤雌生殖干细胞得到的。以孤雌生殖方式得到的 NPC 分化为神经元如中脑多巴胺能神经元 (DA)。这些 DA 神经元展示了中脑表型并且表达 TH、GIRK2、PITX3、NURR1、LMXA1、以及 EN1，如由免疫细胞化学和 RT-PCR 所测量。如从现有技术已知的，多巴胺能神经元的主要功能是释放多巴胺。多巴胺在身体中的主要功能是奖励驱动的学习。如由 LC/MS/MS 所测定，从 hpNPC 得到的 DA 神经元也释放多巴胺。全细胞电生理学证实了以孤雌生殖方式得到的多巴胺能神经元能够发放动作电位。

[0248] 由 LC/MS/MS 测定多巴胺的释放

[0249] 使用 2.1X100mm Atlantis-dC182.1X100mm 柱 (Waters)，通过 LC-MS/MS 分析培养物中的多巴胺水平。从由干细胞得到的多巴胺能神经元的培养物收集条件培养基，其中所述培养基补充有 1mM EDTA，并在 -80℃下冷冻。在室温下解冻样品，并且将 200μL 样品和标准品与 500μL 的络合剂混合，所述络合剂为 0.2% 的在 2M NH_4Cl-NH_4OH(pH8.5) 中的 DPBA 乙醇胺酯 +5g/L 的 EDTA。将 Oasis HLB 微洗脱盘 30μm(Waters) 以 0.5mL 甲醇、接着是 0.5mL 的 0.2M NH_4Cl-NH_4OH(pH8.5) 作为条件。将复合的样品和标准品在符合条件的 Oasis HLB 微洗脱盘中以 <0.5mL/min 的速率缓慢地进行提取。将提取盘用 0.5mL 的 0.2M NH_4Cl-NH_4OH(pH8.5)、接着是 0.5mL 的 20:80 甲醇 :0.2M NH_4Cl-NH_4OH(pH8.5) 进行洗涤。然后将多巴胺用 100μL 的 4% 甲酸水溶液进行洗脱并收集到 96 孔培养盘中。将 20μL 加载到 Atlantis DC-182.1X100mm i.d. 柱中，并且所注入的样品的分离在 0.1% 甲酸 - 乙腈流动相中以流动速率 300μL/min 经由梯度洗脱 8 分钟来实现。用 PE SCIEX API4000LC/MS/MS 质谱仪 (SpectraLab Scientific Inc.) 来分析峰并通过多反应监测 (MRM) 来量化。如由 LC/MS/MS 所测定，从 hpNPC 得到的 DA 神经元也释放多巴胺。

[0250] 样品 #5 为由从 phNSC 得到的 DA 神经元所释放的多巴胺水平。（表 6）

[0251] 表 6

[0252]

样品 ID	浓度 (ng/mL)
样品 1	BLQ
样品 2	12.2
样品 3	BLQ
样品 4	0.864
样品 5	2.15
样品 6	BLQ

[0253] BLQ 低于定量限度

[0254] 电生理学

[0255] 将其中神经元生长的盖玻片切成较小的段以适合梭形测试室，所述测试室最宽处

大小为 5mm 且长 1cm。所述测试室灌注有 Tyrodes 溶液，所述溶液含有 1.8mM CaCl2；1mM MgCl2；4mM KCl；140mM NaCl；10mM 葡萄糖；10mM HEPES；305 至 315mOsm；pH7.4（用 5M NaOH 调整）。当填充有 140mM KCl；10mM MgCl2；6mM EGTA；5mM HEPES-Na；5mM ATP-Mg；295 至 305mOsm；pH7.25（用 1M KOH 调整）时，用 3 至 5MOhm 电阻来制备电极。用 5KHz 贝塞尔滤波器对数据进行处理并且使用 Multiclamp700A 放大器 (Axon Intruments) 和 Pclamp 软件在 10KHz 至 20KHz 下获取数据。所有实验均在室温下在显微镜下在连续流动室中进行。数据展示于图 4 中。全细胞电生理学证实了以孤雌生殖方式得到的多巴胺能神经元能够发放动作电位。

[0256] 参考文献

[0257] 1. E. S. Revazova, N. A. Turovets, O. D. Kochetkova, L. B. Kindarova, L. N. Kuzmichev, J. D. Janus, M. V. Pryzhkova, Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts, Cloning Stem Cells9(2007)432-449.

[0258] 2. E. S. Revazova, N. A. Turovets, O. D, Kochetkova, L. S. Agapova, J. L. Sebastian, M. V. Pryzhkova, V. L Smolnikova, L. N Kuzmichev, J. D. Janus, HLA homozygous stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts, Cloning Stem Cells10(2008)11-24.

[0259] 3. CJ. Taylor, E. M. Bolton, S. Pocock, LJD. Sharpies, R. A. Pedersen, J. A. Bradley, Banking on human embryonic stem cells;estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching, Lancet366(2005)2019-2025.

[0260] 4. B. A. Reynolds, S. Weiss, Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system, Science225(1992)1707-1710.

[0261] 5. H. Okano, Neural stem cells and strategies for the regeneration of the central nervous system, Proc. Jpn Acad. Se. r B Phys. Biol. Sci. 86(2010)438-450.

[0262] 6. S. Eckardt, T. C. Dinger, S. Kurosaka, N. A. Leu, A. M. Müller, K. J. McLaughlin, In vivo and in vitro differentiation of uniparental embryonic stem cells into hematopoietic and neural cell types, Organogenesis4(2008)33-41.

[0263] 7. J. B. Cibelli, K. A. Grant, K. B. Chapman, K. Cunniff, T. Worst, H. L. Green, S. L. Walker, P. H. Gutin, L. Vilner, V. Tabar, T. Dominko, J. Kane, P. J. Wettstein, R. P, Lanza, L. Studer, K. E. Vrana, M. D. West, Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates, Science, 295(2002)819.

[0264] 8. J. V. Harness, N. A. Turovets, M. J. Seiler, G. Nistor, G. Altun, L. S. Agapova, D. Ferguson, L. C. Laurent, J. F. Loring, H. S. Keirstead, Equivalence of conventionally-derived and parthenote-derived human embryonic stem cells, PLoS One. 6(2011)e14499.

[0265] 9. A. Nagy, M. Sass, M. Markkula, Systematic non-uniform distribution of parthenogenetic cells in adult mouse chimaeras, Development106(1989)321-324.

[0266] 10. R. Sánchez-Pemaute, L. Studer, D. Ferrari, A. Perrier, H. Lee, A. Viñuela, O. Isacson, Long-term survival of dopamine neurons derived from parthenogenetic

primate embryonic stem cells(cyno-1)after transplantation,Brain.128(2005)1498-1510.

[0267] 11.S.Shin,M.Mitalipova,S.Noggle,D.Tibbitts,A.Venable,R.Rao,S.L.Stice,Long-term proliferation of human embryonic stem cell-derived neuroepithelial cells using defined adherent culture conditions,Stem Cells24(2006)125-138.

[0268] 12.S.K.Dhara,S.L.Stice,Neural differentiation of human embryonic stem cells,J.Cell Biochem.105(2008)633-640.

[0269] 13.T.C.Archer,J.Jin,E.S.Casey,Interaction of Sox1,Sox2,Sox3and Oct4 during primary neurogenesis,Dev.Biol.350(2011)429-440.

[0270] 14.V.Graham,J.Khudyakov,P.Ellis,L.Pevny,SOX2 functions to maintain neural progenitor identity,Neuron39(2003)749-765.

[0271] 15.Y.Sun,W.Kong,A.Falk,J.Hu,L.Zhou,S.Pollard,A.Smith,CD133(Prominin) negative human neural stem cells are clonogenic and tripotent,PLoS One4(2009) e5498.

[0272] 16.S.Colleoni,C.Galli,S.G.Giannelli,M.T.Armentero,F.Blandini,V.Broccoli,G.Lazzari,Long-term culture and differentiation of CNS precursors derived from anterior human neural rosettes following exposure to ventralizing factors,Exp.Cell Res.316(2010)1148-1158.

[0273] 17.T.Brevini 和 F.Gamdolfi,Parthenotes as a Source of Embryonic Stem Cells,Cell Prolif.41(2008)20-30.

[0274] 18.Z Kastenberg 和 J.Odorico,Altenative Sources of Pluripotency:Scienc,Ethics and Stem Cells,Transplant.Rev.22(2008)215-222.

[0275] 19.K.Kim,K.Ng,P.Rugg-Gunn,J.Shish,O.Kirak,R.Jaenisch,T.Wakayama,M.Moore,R.Pedersen 以 及 G.Daley,Recombination Signatures Distinguish Embryonic Stem Cells Derived by Parthenogenesis and Somatic Cell Nuclear Transfer,Cell Stem Cell1(2007)1-7.

[0276] 20.M.Amit,M.Carpenter,M.Inokuma,C.Chiu,C.Harris,M.Waknitz,J.Itskovitz-Eldor以及J.Thomson,Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture,Dev.Biol(2000)227:271-278.

[0277] 21.M.Amit,C.Shariki,V.Margulets以及J.Itskovitz-Eldor,Feeder layer-and serum-free culture of human embryonic stem cells,Biol Reprod(2004)70:837-845.

[0278] 22.D.Hoffman 和 M.Carpenter,Characterization and culture of human embryonic stem cells,Nature Biotech(2005)23(6):699-708.

[0279] 23.S.Kim,S.Cheon,S.Yoo,J.Kwon,J.Park,C.Kim,K.Rhee,S.You,J.Lee,S.Roh,H.Yoon,Contribution of the PI3K/Akt/PKB signal pathway to maintenance of self-renewal in human embryonic stem cells,FEBS Lett(2005)579:534-540.

[0280] 24.N.Sato,L.Meijer,L.Skaltsounis,P.Greengard 以 及

A.Brivanlou,Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor,Nat Med(2004)10:55-63.

[0281] 25.R.Palacios,E,Golunski 以 及 J.Samaridis,In vitro generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line,Proc.Natl Acad. Sci.,92(1995)7530-7537.

[0282] 26.J.Pedersen,Studies of in vitro differentiation with embryonic stem cells,Reprod.Fertil.Dev.(1994)6:543-552.

[0283] 27.G.Bain,D.Kitchens,M.Yao,J.Huettner 以 及 D.Gottlieb,Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro,Dev.Biol.(1995)168:342-357.

[0284] 虽然已参考上述实施例对本发明进行了描述，但是将理解，修改和变化是包涵在本发明的精神和范围内的。因此，本发明仅由所附权利要求书进行限制。

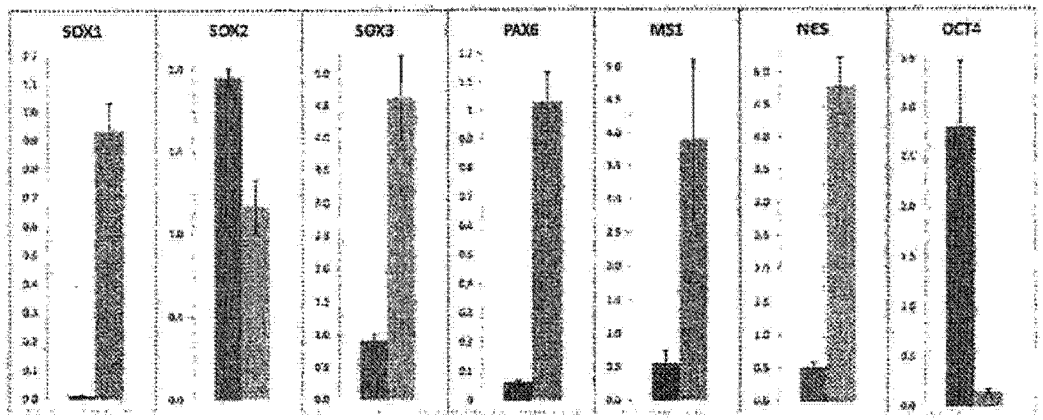

SOX1
SOX2
SOX3
PAX6
MS1
NES
OCT4

图 1

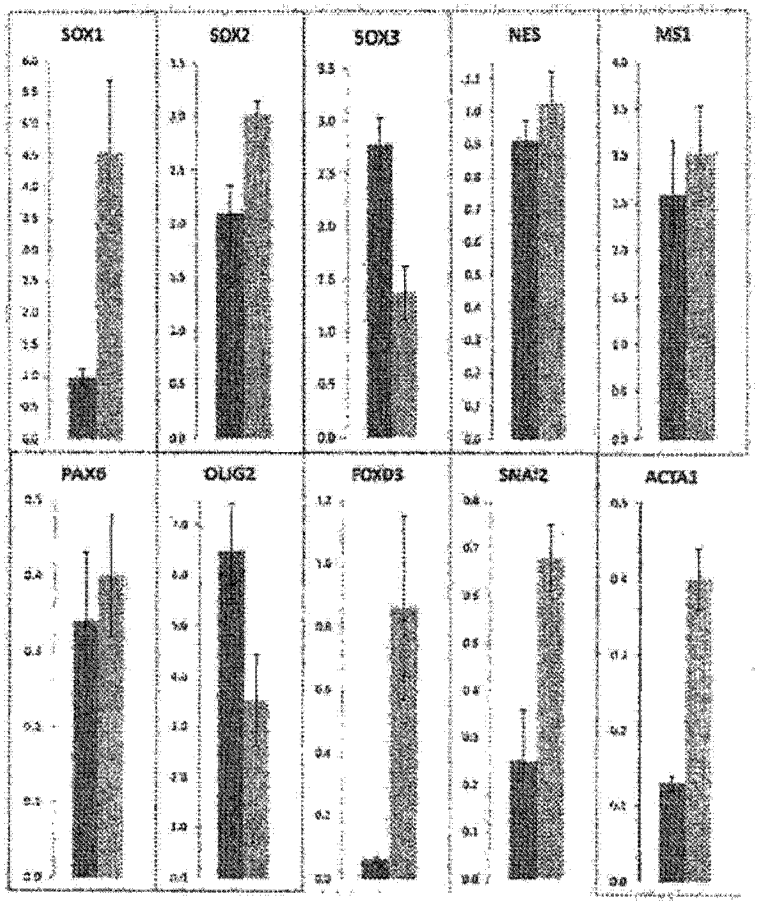

SOX1
SOX2
SOX3
NES
MS1
PAX6
OLIG2
FOXD3
SNAI2
ACTA1

图 2

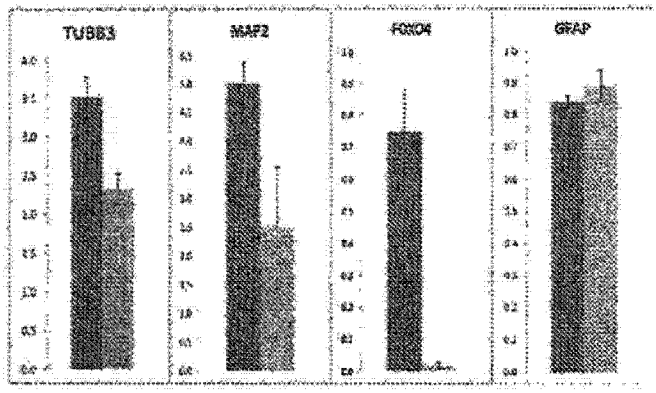

TUBB3
MAP2
FOXO4
GFAP

图 3

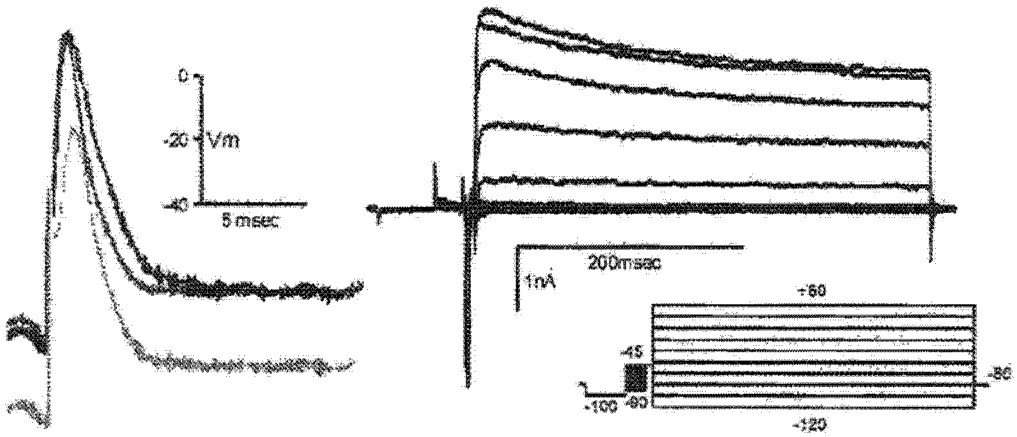

0
-20
-40
Vm
5 msec
200msec
1nA
+60
-45
-80
-100
-120

图 4