



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103890167 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 25

(21) 申请号 201280040881. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 06. 21

C12N 5/0735 (2006. 01)

(30) 优先权数据

11170713. 9 2011. 06. 21 EP

61/501351 2011. 06. 27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 02. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/062013 2012. 06. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/175633 EN 2012. 12. 27

(71) 申请人 诺沃—诺迪斯克有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

申请人 塞拉蒂斯股份有限公司

(72) 发明人 N. 富纳 K. 赫斯 J. 伊克伯格

H. 塞姆布

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 林毅斌 黄希贵

权利要求书1页 说明书18页 附图12页

(54) 发明名称

自多潜能干细胞有效诱导定形内胚层

(57) 摘要

本发明涉及使多潜能干细胞分化为原条细胞群的方法,以逐步方式用于进一步成熟为定形内胚层。

1. 用于使干细胞分化为定形内胚层的方法,包括以下步骤:
 - c. 在包含至少 2 μM CHIR 的培养基中孵育干细胞的第一起始步骤,其中在所述起始步骤期间激活素 A 不存在;和
 - d. 在包含激活素 A 的培养基中孵育干细胞的第二后续步骤。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述培养基是 RPMI-1640。
3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述干细胞是胚胎干细胞或诱导的多潜能干细胞。
4. 前述权利要求中任一项的方法,其中 CHIR 的浓度为至少大约 2.5 μM ,或至少大约 3.1 μM ,例如范围在大约 2.5-15 μM ,例如范围在大约 3.1-15 μM ,或例如范围在大约 3.1-7 μM ,或例如范围在大约 3.5-7 μM ,或例如范围在大约 3.5-6 μM ,或例如大约 3.5-5 μM 。
5. 前述权利要求中任一项的方法,其中 CHIR 的浓度为至少大约 3.1 μM 。
6. 前述权利要求中任一项的方法,其中 CHIR 的浓度为至少大约 3.5 μM 。
7. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述与 CHIR 的孵育为至少 24 小时。
8. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述与激活素 A 的孵育为至少 24 小时。
9. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述与激活素 A 的孵育为 48 至 72 小时。
10. 前述权利要求中任一项的方法,其中内胚层细胞得自所述定形内胚层细胞。
11. 权利要求 10 的方法,其中所述内胚层细胞是胰内胚层细胞。
12. 通过权利要求 1-11 的方法可获取的胰内胚层细胞。
13. 在培养基中以下 CHIR 浓度的 CHIR 的用途:至少 2 μM ,至少 3 μM ,例如范围在大约 2-15 μM ,例如大约 3-15 μM ,例如大约 3.1-15 μM ,或例如大约 3.1-7 μM ,或例如大约 3.5-15 μM ,或例如大约 3.5-7 μM 。
14. 在培养基中浓度为至少 2 μM 的 CHIR 在自胚胎干细胞诱导原条细胞中的用途。
15. 浓度范围为 3.5-7 μM 的 CHIR 在自胚胎干细胞诱导定形内胚层细胞中的用途。

自多潜能干细胞有效诱导定形内胚层

发明领域

[0001] 本发明涉及使多潜能干细胞分化为原条细胞群的方法,以逐步方式用于进一步成熟为定形内胚层。

[0002] 发明背景

胰岛的移植对改进 1 型糖尿病的治疗有着巨大前景,但是缺乏可利用的供体胰岛是需要解决的一个障碍。多潜能干细胞原则上可以产生无限数量的移植用 β 细胞,但迄今没有找到产生全功能 β 细胞的可靠方案。前肠衍生器官:胰、肺、甲状腺、肝、食道和胃起源于定形内胚层(DE),其为原肠胚形成期间形成的三个胚层之一。DE 的诱导是自内胚层衍生组织向分化细胞类型(例如产生胰岛素的胰 β 细胞)形成的第一个关键步骤。已针对小鼠和人这二者报告了由多潜能胚胎干(ES)细胞形成 DE 细胞,载于例如 W02005/116073、W02005/063971 和 US 2006/0148081。由 DE 细胞产生胰内胚层(PE)细胞对于产生用于治疗糖尿病的产生胰岛素的 β 细胞而言是必要的。

[0003] 已知胚胎中的 DE 形成经过原条(PS)形成(中内胚层中间体)的中间步骤,所述原条具有形成中胚层或者 DE 的潜力。在细胞水平上,所有发育过程最终都由不同的信号转导途径的协同作用来控制。这其中,Wnt 信号转导对于协调整个发育过程中发生的复杂细胞行为而言是必不可少。Wnt 信号转导控制细胞增殖、干细胞维护和细胞命运的决定以及有组织的细胞运动和细胞极性的建立。它还在人类癌症中被频繁地解除控制并且涉及退行性疾病。作为治疗干预的潜在靶标,它因此给干细胞生物学和再生医学领域带来新的希望。

[0004] 通过与或不与 Wnt 组合使用激活素 A/Nodal,已经描述了 DE 的诱导。具体地讲,先前已经报道了 Wnt 受体配体 Wnt3a 当在 5 天 AA- 介导的 DE 诱导的第 1 天期间(24 h)与激活素 A(AA)孵育时,即,使用常规 D'Amour 方案(Kroon 等人 2008, Nat Biotech, 2006),促进有效的 DE 形成。

[0005] 将各 Wnt 蛋白按其可指定的特定活性分类的试图,已经形成了将 Wnt 分为“标准的(canonical)”或“非标准的(non-canonical)”的细分类,其根据前者(而非后者)的诱导 β -连环蛋白/TCF 信号转导的能力。

[0006] CHIR 是一种糖原合酶激酶 3 β (Gsk3b) 抑制剂和使小鼠胚胎干细胞维持在多潜能状态的限定组织培养基的一种已知成分(Ying 等人 Nature 453, 519-523)。Gsk3b 具有多个靶标,但主要是已知能调节 β -连环蛋白的降解和/或核转移。使用其它糖原合酶激酶 3 β (Gsk3b) 抑制剂例如 BIO 和 Wnt3a,已经描述了稳定的 β -连环蛋白在自人胚胎干细胞(hESC)向 PS 形成中的作用。然而 CHIR 是迄今为止所报道的最具选择性的 Gsk3b-抑制剂。

[0007] AA 和 CHIR 的共孵育降低了 DE 形成的稳定性,导致有效性较差和稳健性较差的方案。本发明涉及与用常规诱导方案获取 DE(D'Amour 方案,描述于 Kroon 等人,2008)相比,在 AA-介导的定形内胚层诱导之前利用限定浓度范围的 CHIR 而无 AA 来处理多潜能干细胞。这种先暴露给 CHIR、再暴露给 AA 的序贯暴露是必不可少的并且反映了依次的 PS 形成(由 CHIR 诱导),然后通过 AA 的更有效和快速的 DE 形成。本发明涉及首先对 PS、然

后对 DE 的不连续的和依次的诱导控制, 导致总体更有效, 具有较早的 SOX17 表达峰和稳健的 DE 方案。用 Wnt3a 处理不能重现 CHIR 的这些效应。

[0008] 附图描述

D0: 在任何处理之前的未分化细胞

Ctrl: 无 Chir 处理 D1。细胞在起始期间留在 RPMI 中, 然后经过 AA D2 替换和从 D3 开始的 AA + 血清替换 (B27)。

[0009] 'Am: 无 Chir 处理, 按照 Kroon 等人, Nat. Biotech., 2008 的方案 (1 天激活素 A 100 ng/ml + Wnt 25ng/ml, 2 天激活素 A100 ng/ml + 0.2% FBS)

D1: Chir 添加之后 1 天

D2-4: AA 添加之后 1-3 天

所有基因表达图都以 Log10 值表示。

[0010] 图 1 显示 CHIR DE 方案的命名法和概述。在下列 7 种不同的多潜能干细胞系中已经证实了该方案: SA121、SA181、SA461、SA167 (人 ESC) 和 chIPS2、chIPS3、chIPS4 (人 iPSC)。

[0011] 图 2 显示, 与未经处理的细胞相比, 在 hES SA121 (图 2A) 和 chIPS4 (图 2B) 中在 CHIR 处理之后 24 小时 (D1) 的 PS 标记 Brachyury (T)、MIXL1、EOMES 和 Goosecoid (GSC) 的转录表达。还用 ICC 证实了 T 蛋白水平 (图 2C)。与未分化的细胞相比, 24 小时 CHIR 处理之后, T fold 诱导跨越 500-100000 ($n > 60$)。柱条显示相对于未分化的细胞 D0 的 Log10 值。

[0012] 图 3 显示与未用 CHIR 预处理的细胞相比, 用激活素 A (AA) 替代 CHIR 之后 1 天的 DE 标记 (SOX17、CXCR4、FOXA2、CER) 的基因表达。在 hESC SA121 (图 3A) 和 iPSC chIPS4 (图 3B) 两者中都显示出表达。柱条显示相对于未分化的细胞 D0 的 Log10 值。

[0013] 图 4 显示单用 CHIR (3 μ M)、BIO (0.5 μ M)、Wnt3a (200ng/ml) 或者 AA (100ng/ml) 处理 24 小时 (D1)、然后是 2 天 AA 处理 (D3) 的 hESC SA121 (4A-B) 和 iPSC chIPS4 (4C) 细胞。另外, 分析了 D'Amour (方案描述于 Kroon 等人, 2008)。分析了 Brachyury 和 SOX17 的表达。前 24 小时用 AA 或 BIO 处理的 hES 细胞直到第 3 天无存活。

[0014] 图 5 显示与 D'Amour 相比, 在 CHIR 诱导之后 DE 标记 SOX17、FOXA2 和 CXCR4 (图 5A-C) 和 OCT4 (图 5E) 的基因表达水平, 以及在 chIPS4 细胞中定量测定的 SOX17/OCT4 的 ICC 蛋白水平 (图 5D, F)。对 OCT4 和 SOX17 呈阳性染色的细胞的相应的 % (D1-3) 也示于表 2 中。使用这两个方案任一个, 使用先前已公布的 PE 分化方案 (Ameri 等人 2010), 使 chIPS/SA121 DE 细胞进一步分化为胰内胚层 (PE)。使用对于 PDX1 蛋白水平的 ICC, 在 PE 诱导 7 天后分析细胞。平行地, 对于 chIPS4 细胞 (图 5G) 和 SA121 细胞 (图 5H) 两者, 从细胞中采集 mRNA 并通过实时 PCR 分析 PDX1 表达。在这两种细胞系中重复 2 次实验 (图 5G, H)。

[0015] 图 6 显示仅用 RPMI、AA 和 Wnt3a 或者 CHIR D1 处理、接着用 AA 或者用 AA 和 Wnt3a D2 和 AA D3 的组合 (图 6A) 处理的 hES SA121 (图 6A) 或 chIPS4 (图 6C) 中的 SOX17 D3 的基因表达。细胞还用 CHIR D1 和 AA D2 ("CHIR")、D'Amour 或者 CHIR 加上 D'Amour 处理, 并分析 SOX17 表达 (图 6B) 和形态学 (图 6C)。

[0016] 图 7 显示在 24 小时 (D1) 之后和在随后的 AA 处理 2 天 (D3) 之后在浓度为 1-7 μ M

之间滴定 CHIR 并分析。CHIR 0.5–1 μ M 和 CHIR 7 μ M D3 无存活。在 SA121 (图 7A) 和 chIPS 细胞 (图 7C) 中,在 24 小时处理之后分析 Brachyury 表达。在 SA121 (图 7B) 和 chIPS 细胞 (图 7D) 中 D3 分析 SOX17 表达。

[0017] 图 8 显示在 CHIR 预处理之后或在 D'Amour 方案之后,在 mTeSR 系统中的 SOX17 D3 基因表达 (图 8)。

[0018] 图 9 显示当在 MEF 饲养细胞上培养时,标记 Brachyury 和 SOX17 在 D0、D2 和 D3 的基因表达水平。

[0019] 发明概述

本发明还涉及用于使干细胞分化为定形内胚层的方法,包括以下步骤:

a. 在包含至少 2 μ M CHIR 的培养基中孵育干细胞的第一起始步骤,其中在所述起始步骤期间激活素 A 不存在;和

b. 在包含激活素 A 的培养基中孵育干细胞的第二后续步骤。

[0020] 本发明涉及更快和更明显的 SOX17 表达峰和分化人类多潜能干细胞以获得定形内胚层的更稳健的方法。

[0021] 发明描述

本发明涉及用于使干细胞分化为定形内胚层的方法,包括以下步骤:在包含至少 2 μ M CHIR 的培养基中孵育多潜能干细胞,和随后在包含激活素 A (AA) 的培养基中孵育这些细胞。

[0022] 本发明人已经发现单用 CHIR 24 小时然后再添加 AA,在这 24 小时期间诱导 PS 标记 (例如 Brachyury、Mixl1、Eomes 和 Goosecoid (GSC)) 的显著和剂量依赖性的上调。

[0023] 本发明人惊奇地发现,当与无 CHIR 预孵育的培养相比或当与常规 D'Amour 方案 (Novocell, Nature Biotech 2006, 2008) 相比时,在用 AA 的后续孵育以诱导 DE 期间,经 SOX17 表达测定的 DE 诱导在更早时间点达到峰值并具有更高倍数的变化。本发明人惊奇地发现本发明的方法更有效并显示出比其它已知的 DE 诱导方案更快的 Sox17 mRNA 表达的诱导。

[0024] CHIR-介导的效应在其他培养系统 (在小鼠胚胎饲养 (MEF) 细胞上的 mTeSR 培养基和常规 ES 培养基) 和跨越不同的细胞系 (SA121、SA181、SA461、SA167、chIPS2、chIPS3、chIPS4) 两者中都已重现,证明所述效应不依赖于细胞系或 DEF 培养基培养系统。人胚胎干细胞可源自单个卵裂球而不破坏胚胎 (Klimanskaya 等人 2006 ;Chung 等人 2008 ;Geens 等人 2009)。细胞系 chIPS2、chIPS3、chIPS4 是 iPS 细胞系。

[0025] 本发明人发现当添加 AA 之后,CHIR 促进高的细胞密度。在 PS 诱导中 CHIR 的剂量依赖性将会允许当启动 AA 处理时未来可能的前-图式发育 (pre-patterning) 影响的优化。随后所添加因子的顺序减少了被平行激活的信号转导途径的数量。使可能影响效率的因子数量最小化将会提高稳健性和重现性。

[0026] 本发明人惊奇地发现,就 SOX17 表达的有效峰和稳健性而言,当与 BIO 或 Wnt3a 相比时,CHIR-起始步骤对于 DE 诱导而言是独特的和优越的。

[0027] 在简单的 RPMI-1640 培养基中,使来自可扩展的多潜能培养物的人胚胎干细胞 (hESC) 和人诱导的多潜能干细胞 (iPSC) 经历 24 小时 CHIR (2–7 μ M) 处理。然后将培养基更换为含有 AA 的 RPMI-1640 培养基,DE 诱导开始,其中 2 天之后 SOX17 mRNA 表达达到峰

值,3-4 天之后 SOX17 蛋白表达达到峰值。低于 2 μM 浓度的 CHIR 导致 Brachyury 的延迟诱导至明显较低的水平,随后 AA 刺激,在 72 小时之后 DE 不被诱导。在 CHIR 浓度低于 1.5 μM 时 PS 的形成被延迟,因此当添加 AA 时不能进一步发展为 DE。本发明人惊奇地发现,浓度范围大于或等于 2 μM 的 CHIR 达 24 小时,对于随后通过 AA 的 DE 诱导而言是重要的。

[0028] 本发明人已经惊奇地发现 CHIR- 起始步骤导致 AA 对 SOX17 的明显快速的诱导,1 天之后就已达到峰值,相比之下,仅用 AA 则在 3-4 天之后才见峰值。用 CHIR 接着用 AA 的序贯孵育对于 DE 形成达到有利水平而言是必不可少的。

[0029] 本发明的实施方案:

1. 用于使干细胞分化为定形内胚层的方法,包括以下步骤:

c. 在包含至少 2 μM CHIR 的培养基中孵育干细胞的第一起始步骤,其中在所述起始步骤期间激活素 A 不存在;和

d. 在包含激活素 A 的培养基中孵育干细胞的第二后续步骤。

[0030] 2. 实施方案 1 的方法,其中所述培养基是 RPMI-1640。

[0031] 3. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述干细胞是胚胎干细胞或诱导的多潜能干细胞。

[0032] 4. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述干细胞是胚胎干细胞。

[0033] 5. 实施方案 3 的方法,其中所述干细胞是人胚胎干细胞。

[0034] 6. 实施方案 3 的方法,其中所述干细胞是诱导的多潜能干细胞。

[0035] 7. 前述实施方案中任一个的方法,其中 CHIR 的浓度为至少大约 2.5 μM ,或至少 3 μM ,例如范围在大约 2-20 μM ,例如范围在大约 3.1-15 μM ,或例如范围在大约 3.5-7 μM ,或例如范围在大约 3.5-6 μM ,或例如范围在大约 3.5-5 μM 。

[0036] 8. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为至少大约 2 μM 。

[0037] 9. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为至少大约 2.5 μM 。

[0038] 10. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为至少大约 3 μM 。

[0039] 11. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为至少大约 3.1 μM 。

[0040] 12. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为至少大约 3.2 μM 。

[0041] 13. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为至少大约 3.3 μM 。

[0042] 14. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为至少大约 3.4 μM 。

[0043] 15. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为至少大约 3.5 μM 。

[0044] 16. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度范围为大约 2-7 μM 。

[0045] 17. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度范围为大约 3-7 μM 。

[0046] 18. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度范围为大约 3.1-7 μM 。

[0047] 19. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度范围为大约 3.2-7 μM 。

[0048] 20. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度范围为大约 3.3-7 μM 。

[0049] 21. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度范围为大约 3.4-7 μM 。

[0050] 22. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度范围为大约 3.5-7 μM 。

[0051] 23. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为 2.5 μM 。

[0052] 24. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为 3 μM 。

[0053] 25. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为 3.1 μM 。

- [0054] 26. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为 3.2 μM 。
- [0055] 27. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为 3.3 μM 。
- [0056] 28. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为 3.4 μM 。
- [0057] 29. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为 3.5 μM 。
- [0058] 30. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为 3.6 μM 。
- [0059] 31. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为 3.7 μM 。
- [0060] 32. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为 3.8 μM 。
- [0061] 33. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为 3.9 μM 。
- [0062] 34. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为大约 4 μM 。
- [0063] 35. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为大约 4.5 μM 。
- [0064] 36. 实施方案 7 的方法,其中 CHIR 的浓度为大约 5 μM 。
- [0065] 37. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述与 CHIR 的孵育为至少 12 小时。
- [0066] 38. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述与 CHIR 的孵育为至少 24 小时。
- [0067] 39. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述与 CHIR 的孵育为至少 48 小时。
- [0068] 40. 实施方案 37 的方法,其中所述与 CHIR 的孵育为介于 24 和 48 小时之间。
- [0069] 41. 实施方案 37 的方法,其中所述与 CHIR 的孵育为 24 小时。
- [0070] 42. 实施方案 37 的方法,其中所述与 CHIR 的孵育为 48 小时。
- [0071] 43. 前述实施方案中任一个的方法,其中激活素 A 的浓度为至少大约 100ng/ml,例如范围为大约 1-5000 ng/ml,例如范围为大约 1-1000 ng/ml,例如范围为大约 10-500 ng/ml 或例如范围为大约 1-200 ng/ml。
- [0072] 44. 实施方案 43 的方法,其中激活素 A 的浓度范围为大约 1-200ng/ml。
- [0073] 45. 实施方案 43 的方法,其中激活素 A 的浓度范围为大约 20-200ng/ml。
- [0074] 46. 实施方案 43 的方法,其中激活素 A 的浓度范围为大约 30-200ng/ml。
- [0075] 47. 实施方案 43 的方法,其中激活素 A 的浓度为至少 25ng/ml。
- [0076] 48. 实施方案 43 的方法,其中激活素 A 的浓度为大约 140ng/ml。
- [0077] 49. 实施方案 43 的方法,其中激活素 A 的浓度为大约 120ng/ml。
- [0078] 50. 实施方案 43 的方法,其中激活素 A 的浓度为大约 100ng/ml。
- [0079] 51. 实施方案 43 的方法,其中激活素 A 的浓度为大约 80ng/ml。
- [0080] 52. 实施方案 43 的方法,其中激活素 A 的浓度为大约 60ng/ml。
- [0081] 53. 实施方案 43 的方法,其中激活素 A 的浓度为大约 40ng/ml。
- [0082] 54. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述与激活素 A 的孵育范围为 12 小时至 5 天,例如至少 12 小时,例如至少 24 小时或至少 48 小时,或例如 3-4 天。
- [0083] 55. 实施方案 54 的方法,其中所述与激活素 A 的孵育为至少 12 小时。
- [0084] 56. 实施方案 54 的方法,其中所述与激活素 A 的孵育为 24 小时。
- [0085] 57. 实施方案 54 的方法,其中所述与激活素 A 的孵育为 48 小时。
- [0086] 58. 实施方案 54 的方法,其中所述与激活素 A 的孵育为 72 小时。
- [0087] 59. 实施方案 54 的方法,其中所述与激活素 A 的孵育为 48 至 72 小时。
- [0088] 60. 实施方案 54 的方法,其中所述与激活素 A 的孵育为 3-4 天。
- [0089] 61. 前述实施方案中任一个的方法,其中内胚层细胞是得自所述定形内胚层细

胞。

[0090] 62. 实施方案 61 的方法,其中所述内胚层细胞是肝内胚层细胞、胰内胚层细胞、肠内胚层细胞和 / 或肺内胚层细胞。

[0091] 63. 实施方案 62 的方法,其中所述内胚层细胞是肝内胚层细胞。

[0092] 64. 实施方案 62 的方法,其中所述内胚层细胞是胰内胚层细胞。

[0093] 65. 通过实施方案 1-64 的方法可获取的定形内胚层细胞。

[0094] 66. 通过实施方案 1-64 的方法可获取的内胚层细胞。

[0095] 67. 实施方案 66 的肝内胚层细胞、胰内胚层细胞、肠内胚层细胞和 / 肺内胚层细胞。

[0096] 68. 实施方案 66 的内胚层细胞,其中所述细胞是肝内胚层细胞。

[0097] 69. 实施方案 66 的内胚层细胞,其中所述细胞是胰内胚层细胞。

[0098] 70. 实施方案 1-64 的方法,其中 β -连环蛋白被 CHIR- 诱导的 Gsk3b 抑制而活化。

[0099] 71. CHIR 的用途,其中在培养基中的 CHIR 的浓度为至少 2 μ M CHIR,例如范围为 3.1-15 μ M,或例如 3.1-7 μ M,或例如 3.5-15 μ M,或例如

72. 在培养基中浓度为至少 3.1 μ M 的 CHIR 在自胚胎干细胞诱导原条细胞中的用途。

[0100] 73. 浓度范围为 3.1-7 μ M 的 CHIR 在自胚胎干细胞诱导定形内胚层细胞中的用途。

[0101] 74. 浓度范围为 3.5-7 μ M 的 CHIR 在自胚胎干细胞诱导定形内胚层细胞中的用途。

[0102] 75. 浓度为 3.5 μ M 的 CHIR 在自胚胎干细胞诱导定形内胚层细胞中的用途。

[0103] 76. 浓度为 4 μ M 的 CHIR 在自胚胎干细胞诱导定形内胚层细胞中的用途。

[0104] 77. 浓度为 4.5 μ M 的 CHIR 在自胚胎干细胞诱导定形内胚层细胞中的用途。

[0105] 78. 浓度为 5 μ M 的 CHIR 在自胚胎干细胞诱导定形内胚层细胞中的用途。

[0106] 79. 实施方案 71-78 的用途,其中所述原条表达一种或多种以下标记 :Brachyury 或 Mixl1。

[0107] 80. 实施方案 71-78 的用途,其中所述定形内胚层表达一种或多种以下标记 : Sox17。

[0108] 本发明的更多实施方案 :

81. 用于使干细胞分化为定形内胚层的方法,包括以下步骤 :

a. 在包含至少 2 μ M CHIR 的培养基中孵育干细胞的第一起始步骤,其中在所述起始步骤期间激活素 A 不存在 ;和

b. 在包含至少 25ng/ml 激活素 A 的培养基中孵育干细胞的第二后续步骤。

[0109] 82. 用于使干细胞分化为定形内胚层的方法,包括以下步骤 :

a. 在包含至少 2 μ M CHIR 的培养基中孵育干细胞的至少 12 小时的第一起始步骤,其中在所述起始步骤期间激活素 A 不存在 ;和

c. 在包含至少 25ng/ml 激活素 A 的培养基中孵育干细胞的至少 12 小时的第二后续步骤。

[0110] 83. 用于使干细胞分化为定形内胚层的方法,包括以下步骤 :

b. 在包含至少 2 μ M CHIR 的培养基中孵育干细胞的至少 24 小时的第一起始步骤,其中在所述起始步骤期间激活素 A 不存在 ;和

d. 在包含至少 25ng/ml 激活素 A 的培养基中孵育干细胞的至少 24 小时的第二后续步

骤。

[0111] 84. 用于使干细胞分化为定形内胚层的方法,包括以下步骤:

a. 在包含至少 3.1 μM CHIR 的培养基中孵育干细胞的第一起始步骤,其中在所述起始步骤期间激活素 A 不存在;和

b. 在包含至少 25ng/ml 激活素 A 的培养基中孵育干细胞的第二后续步骤。

[0112] 85. 用于使干细胞分化为定形内胚层的方法,包括以下步骤:

a. 在包含至少 3.5 μM CHIR 的培养基中孵育干细胞的第一起始步骤,其中在所述起始步骤期间激活素 A 不存在;和

b. 在包含至少 25ng/ml 激活素 A 的培养基中孵育干细胞的第二后续步骤。

[0113] 86. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述干细胞是胚胎干细胞或诱导的多潜能干细胞。

[0114] 87. 实施方案 86 的方法,其中所述干细胞是人胚胎干细胞。

[0115] 88. 实施方案 86 的方法,其中所述干细胞是诱导的多潜能干细胞。

[0116] 89. 前述实施方案中任一个的方法,其中 CHIR 的浓度为至少大约 2,至少大约 2.5 μM ,至少大约 3 μM ,至少大约 3.1 μM ,例如范围为大约 3.1-15 μM ,或例如大约 3.5-7 μM ,或例如大约 3.5-6 μM ,或例如大约 3.5-5 μM 。

[0117] 90. 前述实施方案中任一个的方法,其中 CHIR 的浓度为至少大约 3.1 μM 。

[0118] 91. 前述实施方案中任一个的方法,其中 CHIR 的浓度为至少大约 3.2 μM 。

[0119] 92. 前述实施方案中任一个的方法,其中 CHIR 的浓度为至少大约 3.3 μM 。

[0120] 93. 前述实施方案中任一个的方法,其中 CHIR 的浓度为至少大约 3.4 μM 。

[0121] 94. 前述实施方案中任一个的方法,其中 CHIR 的浓度为至少大约 3.5 μM 。

[0122] 95. 前述实施方案中任一个的方法,其中 CHIR 的浓度范围为大约 3.1-7 μM 。

[0123] 96. 前述实施方案中任一个的方法,其中 CHIR 的浓度范围为大约 3.2-7 μM 。

[0124] 97. 前述实施方案中任一个的方法,其中 CHIR 的浓度范围为大约 3.3-7 μM 。

[0125] 98. 前述实施方案中任一个的方法,其中 CHIR 的浓度范围为大约 3.4-7 μM 。

[0126] 99. 前述实施方案中任一个的方法,其中 CHIR 的浓度范围为大约 3.5-7 μM 。

[0127] 100. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述与 CHIR 的孵育为至少 24 小时。

[0128] 101. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述与 CHIR 的孵育为至少 48 小时。

[0129] 102. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述与 CHIR 的孵育为介于 24 和 48 小时之间。

[0130] 103. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述与 CHIR 的孵育为 24 小时。

[0131] 104. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述与 CHIR 的孵育为 48 小时。

[0132] 105. 前述实施方案中任一个的方法,其中激活素 A 的浓度范围为大约 25-200ng/ml。

[0133] 106. 前述实施方案中任一个的方法,其中激活素 A 的浓度范围为大约 30-200ng/ml。

[0134] 107. 前述实施方案中任一个的方法,其中激活素 A 的浓度为大约 100ng/ml。

[0135] 108. 前述实施方案中任一个的方法,其中激活素 A 的浓度为大约 80ng/ml。

[0136] 109. 前述实施方案中任一个的方法,其中激活素 A 的浓度为大约 60ng/ml。

- [0137] 110. 前述实施方案中任一个的方法,其中激活素 A 的浓度为大约 40ng/ml。
- [0138] 111. 前述实施方案中任一个的方法,其中激活素 A 的浓度为至少大约 110ng/ml。
- [0139] 112. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述与激活素 A 的孵育范围为 12 小时至 5 天,例如至少 12 小时,例如至少 24 小时或至少 48 小时,或例如 3-4 天。
- [0140] 113. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述与激活素 A 的孵育为至少大约 24 小时。
- [0141] 114. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述与激活素 A 的孵育为大约 24 小时。
- [0142] 115. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述与激活素 A 的孵育为大约 48 小时。
- [0143] 116. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述与激活素 A 的孵育为大约 72 小时。
- [0144] 117. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述与激活素 A 的孵育为大约 48 至约 72 小时。
- [0145] 118. 前述实施方案中任一个的方法,其中所述与激活素 A 的孵育为大约 3-4 天。
- [0146] 119. 前述实施方案中任一个的方法,其中内胚层细胞得自所述定形内胚层细胞。
- [0147] 120. 实施方案 119 的方法,其中所述内胚层细胞是肝内胚层细胞、胰内胚层细胞、肠内胚层细胞和 / 或肺内胚层细胞。
- [0148] 121. 实施方案 120 的方法,其中所述内胚层细胞是肝内胚层细胞。
- [0149] 122. 实施方案 120 的方法,其中所述内胚层细胞是胰内胚层细胞。
- [0150] 123. 通过实施方案 81-122 的方法可获取的定形内胚层细胞。
- [0151] 124. 通过实施方案 81-122 的方法可获取的内胚层细胞。
- [0152] 125. 实施方案 124 的肝内胚层细胞、胰内胚层细胞、肠内胚层细胞和 / 肺内胚层细胞。
- [0153] 126. 实施方案 124 的内胚层细胞,其中所述细胞是肝内胚层细胞。
- [0154] 127. 实施方案 124 的内胚层细胞,其中所述细胞是胰内胚层细胞。
- [0155] 128. 实施方案 81-122 的方法,其中 β -连环蛋白被 CHIR- 诱导的 Gsk3b 抑制而活化。
- [0156] 129. 特定浓度的 CHIR 在自干细胞诱导原条细胞中的用途。
- [0157] 130. 特定浓度的 CHIR 在自干细胞诱导定形内胚层细胞中的用途。
- [0158] 131. 实施方案 129-130 的用途,其中培养基中的 CHIR 浓度为至少 2 μ M CHIR。
- [0159] 132. 实施方案 129-131 的用途,其中培养基中的 CHIR 浓度为至少 2 μ M CHIR,例如范围为 2-7 μ M,例如 3 μ M 或例如 4 μ M。
- [0160] 133. 浓度范围为 2-7 μ M 的 CHIR 在自胚胎干细胞诱导定形内胚层细胞中的用途。
- [0161] 134. 浓度范围为 3-7 μ M 的 CHIR 在自胚胎干细胞诱导定形内胚层细胞中的用途。
- [0162] 135. 浓度范围为 3.5-7 μ M 的 CHIR 在自胚胎干细胞诱导定形内胚层细胞中的用途。
- [0163] 在一个实施方案中,通过本发明的方法可获取的胰内分泌细胞是产生胰岛素的细胞,任选与朝着产生胰高血糖素、生长抑素、胰多肽和 / 或生长素释放肽的细胞分化的细胞在一起。如本文所用,“产生胰岛素的细胞”是指产生和贮存或分泌可检测量的胰岛素的细胞。“产生胰岛素的细胞”可以是单一细胞或细胞集合。
- [0164] 在另一个实施方案中,包含胰细胞的细胞群得自体细胞群。在某些方面,所述体细

胞群已经诱导而去分化,成为胚胎-样干(ES,例如多潜能)细胞。这样的去分化细胞也称为诱导的多潜能干细胞(IPS)。

[0165] 在另一个实施方案中,包含胰细胞的细胞群得自胚胎干(ES,例如多潜能)细胞。在某些方面,包含胰细胞的细胞群是多潜能细胞,例如ES样-细胞。

[0166] 在另一个实施方案中,包含胰细胞的细胞群是胚胎分化的干(ES或多潜能的)细胞。分化发生在胚状体中和/或在单层细胞培养中或其组合中。

[0167] 在另一个实施方案中,所述细胞群是干细胞群。在某些方面,所述细胞群是分化为胰内分泌谱系的干细胞群。

[0168] 干细胞是未分化的细胞,其定义为在单细胞水平上既能够自我更新,又能够分化以产生子代细胞,包括自我更新的祖细胞、非自我更新的祖细胞和终末分化的细胞。干细胞还可按以下能力来表征:在体外分化为来自多个胚层(内胚层、中胚层和外胚层)的多个细胞谱系的功能细胞的能力,以及在移植之后产生多个胚层的组织的能力,和在注入胚泡中之后充分促进大部分(如果不是所有的话)组织的能力。

[0169] 按其发育潜力,将干细胞分为:(1)全能干细胞,是指能够产生所有胚胎的和胚胎外的细胞类型;(2)多潜能(pluripotent)干细胞,是指能够产生所有胚细胞类型;(3)多能(multi-potent)干细胞,是指能够产生细胞谱系亚型,但都在特定的组织、器官或生理系统内(例如,造血干细胞(HSC)可产生子代,其包括HSC(自我更新的)、血细胞限制性寡能祖细胞和作为血液正常组分的所有细胞类型和要素(例如,血小板));(4)寡能干细胞,是指能够产生比多能干细胞更受限制的细胞谱系亚型;和(5)单能干细胞,是指能够产生单一的细胞谱系(例如生精干细胞)。

[0170] 用于自干细胞获取胰细胞的方案例如但不限于以下文献中描述的方案:D'Amour, K. A. 等人(2006), Nat Biotechnol 24, 1392-401;Jiang, J. 等人(2007), Stem Cells 25, 1940-53;和 Kroon, E. 等人(2008), Nat Biotechnol 26, 443 - 452。

[0171] 自体细胞或经诱导去分化为多潜能细胞例如ES样-细胞的体细胞获取胰细胞的方案例如但不限于以下文献中描述的方案:Aoi, T. 等人(2008), Science 321(no. 5889), 699 - 702;D'Amour, K. A. 等人(2006), Nat Biotechnol 24, 1392-401;Jiang, J. 等人(2007), 干细胞 25, 1940-53;Kroon, E. 等人(2008), Nat Biotechnol 26, 443 - 452;Takahashi, K. 等人(2007), Cell 131, 861-72;Takahashi, K. 和 Yamanaka, S. (2006), Cell 126, 663-76;和 Wernig, M. 等人(2007), Nature 448, 318-24。

[0172] 如本文所用的“使分化”或“分化”是指细胞从未分化状态向分化状态、从未成熟状态向较成熟状态或从未成熟状态向成熟状态发展的过程。例如,早期未分化的胚胎胰细胞能够增殖和表达特征性标记,例如Pdx1、Nkx6.1和Ptf1a。成熟或分化的胰细胞不增殖,但分泌高水平的胰内分泌激素或消化酶。例如完全分化的 β 细胞在响应葡萄糖时分泌高水平的胰岛素。当细胞失去未分化细胞标记或获得分化细胞标记时,细胞相互作用和成熟的变化发生。失去或获得单个标记可表明细胞已“成熟或完全分化”。术语“分化因子”是指加入胰腺细胞以增强其向成熟内分泌细胞(还包含产生胰岛素的 β 细胞)分化的化合物。示例性的分化因子包括肝细胞生长因子、角化细胞生长因子、毒蜥外泌肽-4、基本成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子-1、神经生长因子、表皮生长因子、血小板衍生生长因子和胰高血糖素样肽1。在某些方面,细胞的分化包括在含有一种或多种分化因子的培养基

中培养细胞。

[0173] 如本文所用,“人多潜能干细胞”(hPS)是指可源自任何来源并且在合适条件下能够产生作为所有3个胚层(内胚层、中胚层和外胚层)的衍生物的不同细胞类型的人的子代的细胞。hPS细胞可具有在8-12周龄SCID小鼠中形成畸胎瘤的能力和/或在组织培养中形成所有3胚层的可鉴定的细胞的能力。人多潜能干细胞的定义中包括不同类型的胚细胞,其包括人胚泡衍生的干(hBS)细胞(在30篇文献中通常称为人胚胎干(hES)细胞),(参见例如Thomson等人(1998),Heins等人.(2004),以及诱导的多潜能干细胞(参见例如Yu等人,(2007) Science 318:5858);Takahashi等人,(2007) Cell 131(5):861)。本文所述的各种方法和其它实施方案可能需要或利用来自各种来源的hPS细胞。例如,适用的hPS细胞可得自发育中的胚胎。此外或备选地,合适的hPS细胞可得自自己建立的细胞系和/或人诱导的多潜能干(hiPS)细胞。

[0174] 如本文所用的“hiPS细胞”是指人诱导的多潜能干细胞。

[0175] 如本文所用,术语“胚泡-衍生的干细胞”命名为BS细胞,人形式称为“hBS细胞”。在文献中,所述细胞通常称为胚胎干细胞,更具体地讲是人胚胎干细胞(hESC)。因此,用于本发明的多潜能干细胞可以是自胚泡制备的胚胎干细胞,如例如WO 03/055992和WO 2007/042225所述,或是市售的hBS细胞或细胞系。然而,进一步设想的是任何人多潜能干细胞都可用于本发明,包括分化的成年细胞,这可通过例如用某些转录因子例如OCT4、SOX2、NANOG和LIN28(公开于Yu等人,2007,Takahashi等人,2007和Yu等人,2009)处理成年细胞,将其重新编程为多潜能细胞。

[0176] 如本文所用“饲养细胞”意指单独使用或组合使用的支持细胞类型。所述细胞类型还可以是人或其它物种来源。饲养细胞可来源的组织包括胚胎、胎儿、新生儿、青少年或成人的组织,并且进一步包括源自皮肤的组织,包括包皮、脐带(umbilical chord)、肌肉、肺、上皮、胎盘、输卵管、腺体、基质或乳腺。饲养细胞可源自以下细胞类型:人成纤维细胞、纤维细胞、肌细胞、角质细胞、内皮细胞和上皮细胞。可用于得到饲养细胞的具体细胞类型的实例包括胚胎成纤维细胞、胚胎外内胚层细胞、胚胎外中胚层细胞、胎儿成纤维细胞和/或纤维细胞、胎儿肌肉细胞、胎儿皮肤细胞、胎儿肺细胞、胎儿内皮细胞、胎儿上皮细胞、脐带间充质细胞、胎盘成纤维细胞和/或纤维细胞、胎盘内皮细胞。

[0177] 如本文所用,术语“MEF细胞”意指小鼠胚胎成纤维细胞。

[0178] 如本文所用,“CHIR”、“Chir”或“Chir99021”是专利US6417185覆盖下的已获专利权的市售糖原合酶激酶3 β (Gsk3b)抑制剂,并由以下文献描述:Goff, D. A. 等人(2002) *Inhibitors of glycogen synthase kinase 3*。

[0179] 本发明的实施方案:

136. 用于使干细胞分化为定形内胚层的方法,包括以下步骤:

- a. 在包含至少2 μ M CHIR的培养基中孵育干细胞;和
- b. 随后在包含激活素A的培养基中孵育干细胞。

[0180] 137. 实施方案136的方法,其中在所述与CHIR的孵育期间激活素A不存在。

[0181] 138. 实施方案136-137的方法,其中所述培养基是RPMI-1640。

[0182] 139. 实施方案136-138中任一个的方法,其中所述干细胞是胚胎干细胞。

[0183] 140. 实施方案136-139中任一个的方法,其中CHIR的浓度为至少2 μ M,例如范围

为 2-7 μM , 或例如 3 μM 或例如 4 μM 。

[0184] 141. 实施方案 136-140 中任一个的方法, 其中所述与 CHIR 的孵育为至少 12 小时, 例如 24 小时。

[0185] 142. 实施方案 136-141 中任一个的方法, 其中所述与激活素 A 的孵育范围为 12 小时至 5 天, 例如至少 12 小时, 例如至少 24 小时或至少 48 小时, 或例如 3-4 天。

[0186] 143. 实施方案 136-142 中任一个的方法, 其中特定的内胚层细胞得自所述定形内胚层细胞。

[0187] 144. 实施方案 143 的方法, 其中所述特定的内胚层细胞是胰内胚层细胞。

[0188] 145. 通过实施方案 136-144 的方法可获取的定形内胚层细胞。

[0189] 146. 通过实施方案 136-145 的方法可获取的特定内胚层细胞。

[0190] 147. 特定浓度的 CHIR 在自干细胞诱导原条细胞中的用途。

[0191] 148. 特定浓度的 CHIR 在自干细胞诱导定形内胚层细胞中的用途。

[0192] 149. 实施方案 147-148 的用途, 其中培养基中的 CHIR 浓度为至少 2 μM CHIR。

[0193] 150. 实施方案 147-148 的用途, 其中培养基中的 CHIR 浓度为至少 2 μM CHIR, 例如范围为 2-7 μM , 例如 3 μM 或例如 4 μM 。

[0194] 151. 浓度范围为 2-7 μM 的 CHIR 在自胚胎干细胞诱导定形内胚层细胞中的用途。

[0195] 152. 浓度范围为 3-7 μM 的 CHIR 在自胚胎干细胞诱导定形内胚层细胞中的用途。

[0196] 153. 浓度范围为 3.5-7 μM 的 CHIR 在自胚胎干细胞诱导定形内胚层细胞中的用途。

[0197] 本文引用的所有参考文献, 包括出版物、专利申请和专利, 通过引用以其整体结合到本文中, 并至如同每篇参考文献各自和明确地指明通过引用予以结合和作为整体在本文中阐明 (至法律所允许的最大程度) 的相同程度。

[0198] 所有标题和小标题在本文仅用于方便目的, 不应视为以任何方式限制本发明。

[0199] 本文给出的任何和所有实施例或示例性语言 (例如, “例如”) 的使用, 仅意指更好地说明本发明, 不得视为对本发明范围的限制, 除非另有说明。本说明书中的语言不应视为指示对本发明的实践必不可少的任何非权利要求的要素。

[0200] 尽管本文已经说明和描述了本发明的某些特征, 但是许多修改、替代、变动和等同方案对于本领域技术人员而言是将会发生的。因此, 可以理解, 所附权利要求书意图覆盖所有这样的修改和变动, 如同落入本发明的真实精神之内。

[0201] 缩略语

AA : 激活素 A

D' Am : D' Amour 方案 (Kroon 等人, 2008)

DE : 定形内胚层

bFGF : 基础成纤维细胞生长因子 (FGF2)

Gsk3b : 糖原合酶激酶 3 β

hBSC : 人胚胎 - 衍生的干细胞

hESC : 人胚胎干细胞

hiPSC : 人诱导的多潜能细胞

hPSC : 人多潜能干细胞

KO-SR :剔除血清替换

RNA :核糖核酸

PCR :聚合酶链式反应

PS :原条

SOX17 :SRY (性别决定区 Y)-box 17

T :Brachyury。

实施例

[0202] 实施例 1 - 人 ES/iPS 细胞的体外培养

在两种不同的无饲养细胞 (DEF, mTeSR) 培养系统和一种饲养细胞依赖的 (MEF-ES) 培养系统中证实了 DE 方案。

[0203] DEF hESC/iPS 培养系统

在 6-96 孔板中, 在含有 30 ng/ml bFGF (Invitrogen) 和 10 ng/ml Noggin (Peprotech) 的 DEF 培养基 (Cellartis) 中, 使人胚胎干 (hES) 细胞 SA121 和 chIPS4 (Cellartis) 生长在人纤连蛋白 (Sigma) 上。细胞是用 Rock 抑制剂 Y-27632 (Calbiochem) 传代的单细胞并以 40000 细胞/cm² 的密度接种, 用于实验。在传代之后 4 天开始实验。

[0204] mTeSR 培养系统

根据培养系统方案, 使 hES 细胞 (SA121) 在 mTeSR1 培养基 (Cell Signaling Technologies) 中从饲养细胞 (MEF) 成簇传代至 Matrigel (BD Biosciences), 并进一步用 Dispase (BD Biosciences) 传代。一旦各簇开始彼此接触, 开始 DE。

[0205] MEF-ES

在 hES 培养基 (KO-DMEM、PEST、Glutamax、NEAA、2- 巯基乙醇、KO 血清替换、10ng/ml bFGF) 中, 将 hES 细胞 (SA121) 在包被明胶并预接种 MEF 的板上传代。在 80% 汇合时开始 DE。

[0206] 实施例 2 - CHIR DE 方案

将汇合的培养物在 RPMI1640 (Invitrogen) 中洗涤一次, 然后在 RPMI 中用 0.5-7 μ M CHIR99021 (Stemgent) 24 小时预处理。根据实验设置, 对照细胞置于 RPMI 中未经处理, D'Amour 细胞置于 RPMI 中或者用 AA (Peprotech) + Wnt3a (R&D Systems) 处理 (不经预处理)。

[0207] 24 小时之后, 预处理的和对照细胞用 RPMI 洗涤一次, 然后添加含 100 ng/ml AA 的 RPMI。D'Amour 细胞也用 100ng/ml AA 处理, 但用 0.2% FBS 替代 B27。24 小时之后, 将 2% B27 (Invitrogen) 添加到 AA 培养基中 2-3 天。根据已公布的方案, 对照细胞用 B27 处理以防细胞死亡, D'Amour 细胞用 2% FBS 处理。每天更换培养基。

[0208] 当细胞进一步分化为 PE 时, 在 T75 细胞培养瓶中应用 DE 方案, 并在 DE 培养 4 天后以 200K 的密度在 DE 培养基中重接种。按照已公布方案 (Ameri 等人 2010), 1 天之后, 将细胞洗涤一次, 然后添加 PE 培养基 (RPMI1640+12% KOSR+64ng/ml bFGF)。

[0209] CHIR 定形内胚层方案的概述可见图 1。已在下列 7 种不同的细胞系中证实了该方案: SA121、SA181、SA461、SA167 (hESC) 和 chIPS2、chIPS3、chIPS4 (hiPSC)。

[0210] 表 1. CHIR DE 细胞培养方案。

	对照	CHIR 方案	D'Amour
第1天培养基	RPMI1640 0.1% PEST	CHIR99021, 3uM RPMI1640 0.1% PEST	激活素 A (AA) 100ng/ml Wnt3a 25ng/ml RPMI1640 0.1% PEST
第2天培养基	激活素 A (AA) 100ng/ml RPMI1640 0.1% PEST	激活素 A (AA) 100ng/ml RPMI1640 0.1% PEST	激活素 A (AA) 100ng/ml RPMI1640 0.2% FBS 0.1% PEST
第3天培养基	激活素 A (AA) 100ng/ml RPMI1640 2% B27 0.1% PEST	激活素 A (AA) 100ng/ml RPMI1640 2% B27 0.1% PEST	激活素 A (AA) 100ng/ml RPMI1640 0.2% FBS 0.1% PEST

[0211] 第1天:将细胞在预保温的(37℃) RPMI 中小心洗涤,然后开始分化。将第1天培养基预混合(CHIR 3μM 在预保温的 RPMI + PEST 中)并轻轻添加到细胞培养物中。按照板的格式调整体积。

[0212] 第2天:将细胞在预保温的(37℃) RPMI 中小心洗涤,然后更换培养基。将第2天培养基预混合(100ng/ml 激活素 A 在预保温的 RPMI + 0.1%PEST 中)并轻轻添加到细胞培养物中。

[0213] 第3天:将第3&4天培养基预混合(100ng/ml 激活素 A 和 2% B27 在预保温的 RPMI + 0.1%PEST 中)并轻轻添加到细胞培养物中。

[0214] 第4天:收获 DE 或者重新接种,用于进一步分化。每天在显微镜下检查细胞。

[0215] 实施例 3

RNA 提取和定量实时 PCR

在 24 小时预处理之后(D1)、AA 处理 1 天之后(D2)和 AA+B27 处理 1-2 天之后(D3-4),采集 RNA 样品。总 RNA 用 Rneasy Plus Mini 试剂盒(Qiagen)提取,然后使用 StepOnePlus 系统(Applied Biosystems)进行定量实时 PCR。

[0216] ICC 染色程序

将细胞在 PBS+/+ 中洗涤并在 4% 甲醛中固定 30 min (10% 福尔马林, VWR)。然后将细胞在 PBS 中再洗涤 3 次并留在 PBS (4℃) 中,直到染色。固定的细胞用 PBS 洗涤一次,然后

用含 0.5% Triton X-100 的 PBS 渗透 6min, 在 PBS 中洗涤并用 TNB 缓冲液 (0.1M Tris-HCL pH 7.5, 0.15M NaCl, 0.5% 封闭试剂 (Perkin Elmer)) 封闭 30min。在 RT 或 4°C 0/N, 在 0.1% TritonX-100 + PBS 中加入第一抗体 (山羊 - 抗 SOX17 (AF1924, RnD Systems); 山羊 - 抗 Brachyury (AF2085, RnD Systems); 小鼠 - 抗 OCT4 (sc5279, SantaCruz Biotechnology); 山羊 - 抗 PDX1 (AB47383, Abcam)) 过 1 小时。在 PBS 中充分洗涤步骤之后, 在室温下加入第二抗体以及在 0.1% Triton X-100 + PBS 中的 DAPI 过 45min, 在 PBS 中充分洗涤并留在 PBS 中, 直到图像记录。

[0217] 实施例 4

速度和效率

将在 DEF 培养基中的未分化的 SA121 hES 和 chIPS4 iPS 细胞 (D0) 在不含 CHIR 的 RPMI 中 (Ctrl D1) 培养, 或者用含 CHIR 的 RPMI 处理 24 小时 (CHIR D1)。然后洗涤细胞, 确保没有 CHIR, 然后这两种情况都用 1d AA 处理 (Ctrl 和 CHIR d2)。1d CHIR 处理之后, 与未经预处理的细胞相比, PS 标记例如 Brachyury (T)、MIXL1、EOMES 和 GSC 被高度上调 (图 2A-C)。与未分化的细胞 (d0) 相比, 24 小时 CHIR 处理之后 T fold 诱导跨越 500-100000。还用 ICC 证实了 T 蛋白水平 (图 2C)。

[0218] AA 添加之后 1 天 (D2), 与未预处理的细胞相比, 尽管这两种情况都添加了 AA (图 3A, B), 共同指示 DE 形成的标记例如 SOX17、CXCR4、FOXA2 和 CER 也被高度上调, 与未分化的细胞 (D0, n>60) 相比, CHIR 预处理之后的 Sox17-fold 诱导跨越 10000-3500000。T 和 SOX17 两者的效率水平是高度稳健的 (n > 60) 并用 IHC 和 SOX17 定量测定而证实 (图 2C 和表 2)。CHIR 预处理步骤导致在 AA 处理之后 SOX17 的明显快速诱导。当 AA 诱导之前细胞经历 CHIR 24 小时, SOX17 表达在 AA 处理 1 天之后就已达到峰值。在含 AA 的培养基中的未用 CHIR 预处理的细胞 (ctrl) 在 Sox17 诱导中未显示出相同的速度或效率。

[0219] 在 24 小时处理 (D1) 之后, CHIR 对于诱导 PS 标记具有直接能力并导致当添加 AA (D2) 时, 对 AA 诱导 DE 而言具有明显更高的能力。一旦加入 AA, Brachyury 被极大地抑制, 表明细胞正以高度逐步顺序分化。

[0220] 表 2. 在未分化的 hES SA121/chIPS4 细胞中 OCT4 和 SOX17 蛋白的 ICC 定量测定

ICC%	OCT4				SOX17			
	SA121		chIPS4		SA121		chIPS4	
	D'Amour	CHIR	D'Amour	CHIR	D'Amour	CHIR	D'Amour	CHIR
未分化	97,5		98,3		0		0	
D1	91,9	97,7	94,3	91,2	0	0	8,3	0,9
D2	55,2	2,4	14	3,1	61,6	72,1	75,2	68,8
D3	44,1	0,2	26,2	3,7	80,4	93,1	77,6	91,5

表 2 显示按照 D'Amour (如 Kroon 等人 2008 所描述的方案) 的 DE 诱导的 D1-3 和用 3uM CHIR 处理细胞 (CHIR D1), 然后添加激活素 A (CHIR D2-3)。

[0221] 实施例 5

CHIR 特异性

将 hES SA121 和 ChIPS4 细胞单用 CHIR (3uM)、BIO (0.5uM)、Wnt3a (200ng/ml) 或者

AA (100ng/ml) 处理 24 小时, 然后添加 AA, 显示出 CHIR 特异性 (d1)。另外, 平行测试了 D' Amour (如 Kroon 等人 2008 所述的方案)。

[0222] CHIR 处理在 24 小时之后明显地上调了 Brachyury 表达 (图 4A, C)。AA 添加之后 (D2), Brachyury 被降低, 而 SOX17 被上调 (图 4B)。用 AA 或 BIO 处理的 hES 细胞直到 d3 无存活。

[0223] 数据清楚表明, 与用生长因子例如 AA 和 Wnt3a 的预处理相比, 在 CHIR 处理之后 PS 的转变 (Brachyury 的上调) 和 DE 的诱导 (SOX17 的上调) 都被加速并且高得多。细胞用另一种小分子 Gsk3b 抑制剂 (BIO) 预处理, 未引起相同效果, 并且所述细胞直到 d3 无存活。与 CHIR 处理相比, 用 Wnt3a 或 BIO 替代 CHIR 的处理延迟了 Brachyury (PS) 响应 (D2 上调) (数据未显示)。此外, 这些物质以显著更低的效率诱导 Brachyury 和 SOX17 两者的基因表达, 并且用 AA 或 BIO 处理的细胞直到 d3 无存活。该方案也大大优于先前已公布的 D' Amour 方案。

[0224] 实施例 6

CHIR 与 D' Amour 方案 (DE 和 PE 诱导)

按照 Kroon 等人 2008, 将未分化的 ChIPS4 细胞 (d0) 用 CHIR (3uM) 预处理 24 小时或者直接暴露于 AA (100ng/ml) 和 Wnt3a (25ng/ml)。然后洗涤细胞并加入 AA 过 1-4 天。详细设置参见表 1。

[0225] 与 D' Amour 相比, 在 CHIR 预处理之后, CHIR 处理在上调 T (mRNA D1) 和 SOX17 (mRNA, ICC D3) 两者中是优越的 (图 5 和表 2)。另外, 依照在 D' Amour 处理期间具有更高程度细胞死亡的形态学可见这些方案之间的最显著差异。为了进一步加强该结果, 由此对 SOX17 蛋白表达进行定量测定。用 CHIR- 方案或者 D' Amour- 方案处理的 chIPS4 细胞经过固定并使用 SOX17- 特异性 ab 染色, 关于 SOX17- 阳性细胞的总量和百分率对图像进行量化。如图 6D 所示, 发现 91.5% 的 CHIR- 处理的细胞对于 SOX17 呈阳性, 而仅 77.6% 的 D' Amour- 处理的细胞显示出 SOX17 阳性染色 d3。另外, CHIR 预处理的细胞的总量比经 D' Amour 处理之后所见的数量高 25%。

[0226] 还使用 qPCR 和 qICC 两者, 在 chIPS4 细胞中分析了 OCT4 表达的减少。数据清楚地表明, CHIR- 方案更充分地在 mRNA 和蛋白两者的水平上减少 OCT4 表达 (图 5E, F)。

[0227] 为了进一步比较 CHIR- 方案和 D' Amour 方案的效率, 使用这两个方案中任一个分化为 DE 的 chIPS4 细胞, 通过使用先前已公布的 PE 分化方案 (Ameri 等人 2010) 被进一步向胰内胚层 (PE) 分化。PE 分化诱导之后 7 天, 将细胞固定并使用 PDX1 特异性抗体通过 ICC 进行分析。结果显示在 D' Amour- 处理的细胞中非常少的 PDX1- 染色, 而在 CHIR 预处理的细胞中染色明显 (数据未显示)。平行地, 从细胞中采集 mRNA 并通过实时 PCR 分析 PDX1 表达。与 ICC 结果相一致, 在 D' Amour- 处理的细胞中几乎没发现 PDX1 mRNA 表达, 而在 CHIR- 分化细胞中却见到明显表达 (图 5G)。在这两种细胞系中重复 2 次实验 (图 5G, H)。

[0228] 实施例 7

时间安排

用 RPMI (ctrl)、CHIR 3uM、CHIR 3uM+AA 100ng/ml 或者 100ng/ml AA + 25ng/ml Wnt3a (D' Amour) 对细胞预处理 1 天, 然后添加 AA +/- Wnt3a (25ng/ml) d2 和 AA d3 (表 3)。将 B27 加入 Ctrl 和 CHIR d3 和将 FBS 加入 D' Amour d2-3。

[0229] 表 3 :用于 DE 诱导的方案

条件	D1	D2	D3
Ctrl	RPMI	AA	AA+B27
D'Amour	AA+Wnt3a	AA + FBS	AA+FBS
DE prot	CHIR	AA	AA+B27
DE prot + Wnt d2	CHIR	AA + Wnt3a	AA+B27
CHIR+AA	CHIR+AA	AA	AA+B27

数据显示 CHIR 处理之后 Wnt3a 不存在,对 SOX17 诱导无负面影响(图 6A, C)。然而, CHIR 处理之后 AA 的排除维持了 Brachyury 表达(数据未显示)和限制了向 DE 的进一步发展。

[0230] 预处理期间添加 AA 加上 CHIR 不显示附加效应,但方案的稳定性却受到负面影响,在实验之间对于 DE 诱导而言具有高差异性。当在预处理期间组合 CHIR 和 AA 时也常见对细胞存活 D1 的负面影响(参见细胞形态学 D1, 图 6D)。与用 CHIR 预处理的细胞相比,添加 CHIR 加上 D' Amour D1 也显示出减少的 SOX17 表达 D2(图 6B)。

[0231] 在向 DE 分化的第一天期间,CHIR 预处理替代对 Wnt3a 和 AA 两者的需要并且也具有稳定效果,产生更稳健的方案。

[0232] CHIR 和外源 AA 可能具有相反效应,其降低了总效率和 / 或分别靶向不同的细胞群,导致在细胞培养内更高水平的异质性并增加了实验之间的差异性。这表明将 AA 添加到培养基之前的 PS 诱导 / 转变是增加方案有效性和稳健性的重要而创新的步骤。

[0233] 实施例 8

剂量依赖性

在 24 小时 CHIR 处理之后 (D1) 和随后 AA 处理 2 天之后 (D3),以 1-7uM 之间的浓度滴定 Chir 并进行分析。CHIR 0.5-1uM 和 CHIR 7uM d3 无存活。

[0234] 1. 在 24 小时处理之后,在 CHIR 3uM 中明显可见 Brachyury 诱导,而在 CHIR 1uM 中则不可见(图 7A, C)。

[0235] 2. 在 AA 处理之后 2 天,在 CHIR 1uM 中 Brachyury 表达的下调被延迟(图 7A),而 Sox17 表达明显降低(7B, D)。

[0236] 数据表明 PS 形成在 Chir 浓度低于 1uM 时被延迟,当添加 AA 时不能进一步向 DE 发展。

[0237] 实施例 9

在其它细胞培养系统中 CHIR 预处理之后的 DE 诱导

在其它无 hESC 饲养细胞培养系统例如 mTeSR (图 8A 表 4) 和在生长在 MEF 饲养细胞上的 hESC 中(图 9),CHIR 预处理之后对 OCT4 下调和 T/SOX17 上调 D3 的效果也优于 D'Amour 方案。

[0238] 表 4. 在 mTeSR 系统中的 Oct4 和 Sox17 表达

免疫染色和 OCT4/SOX17⁺细胞定量

Exp	对照		D'Amour		Chir 7 μ M	
	Oct4	Sox17	Oct4	Sox17	Oct4	Sox17
ME16b	35.51	24.6	9.86	64.77	6.97	62.62
ME18b	79.86	0.43	14.31	57.46	2.53	82.87
ME21a	64.63	13.9	31.13	56.82	0.95	91.36
平均值	60	13.0	18.4	59.7	3.5	79.0

参考文献

Ameri, J., A. Stahlberg 等人 (2010). FGF2 specifies hESC-derived definitive endoderm into foregut/midgut cell lineages in a concentration-independent manner (FGF2 以浓度非依赖性方式指定 hESC- 衍生的定形内胚层到前肠/中肠细胞谱系). Stem Cells 28(1): 45-56.

Chung 等人 (2008). Human embryonic stem cells lines generated without embryo destruction (无胚胎破坏的人胚胎干细胞系的产生). Cell Stem Cells 2.

Geens 等人 (2009). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres of two 4-cell stage embryos (源自 2 个 4- 细胞期胚胎的单个卵裂球的人胚胎干细胞系). Human reproduction.

Hanna, J., A. W. Cheng 等人 (2010). Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs (生物学和表观遗传学特征类似于小鼠 ESC 的人胚胎干细胞). Proc Natl Acad Sci U S A 107(20): 9222-9227.

Jiang, J., M. Au, 等人 (2007). Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells (来自人胚胎干细胞的产生胰岛素的胰岛-样聚簇的产生). Stem Cells 25(8): 1940-1953.

Klimanskaya 等人 (2006). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres (源自单个卵裂球的人胚胎干细胞系). Nature Letters.

Kroon, E., L. A. Martinson, 等人 (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-1 secreting cells in vivo. (源自人胚胎干细胞的胰内胚层在体内产生葡萄糖-响应性胰岛素-1-分泌细胞) Nat Biotechnol 26(4): 443-452.

Mazumdar, J., W. T. O'Brien, 等人 (2010). O2 regulates stem cells through Wnt/beta-1-catenin signalling (O2 通过 Wnt/ β -1- 连环蛋白信号转导而调节干细胞). Nat Cell Biol 12(10): 1007-1013.

Sato, N., L. Meijer, 等人 (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signalling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor (通过药理学的 GSK-3- 特异性抑制剂激活 Wnt 信号转导, 维持人和小鼠胚胎干细胞的多潜能性). Nat Med 10(1): 55-63.

Wagner, R. T., X. Xu, 等人 (2010). Canonical Wnt/beta-1-Catenin Regulation of Liver Receptor Homolog-1 (Lrh-1) Mediates Pluripotency Gene Expression (肝

受体同源物-1 (Lrh - 1) 的标准的 Wnt/ β -1 - 连环蛋白调节介导多潜能性基因表达)。” Stem Cells.

Yang, J., A. L. van Oosten, 等人 (2010). Stat3 Activation is limiting for reprogramming to ground state pluripotency (Stat3 活化限制了基态多潜能性的重新编程). Cell Stem Cells 7(3): 319-328.

LU DE 方案-命名法

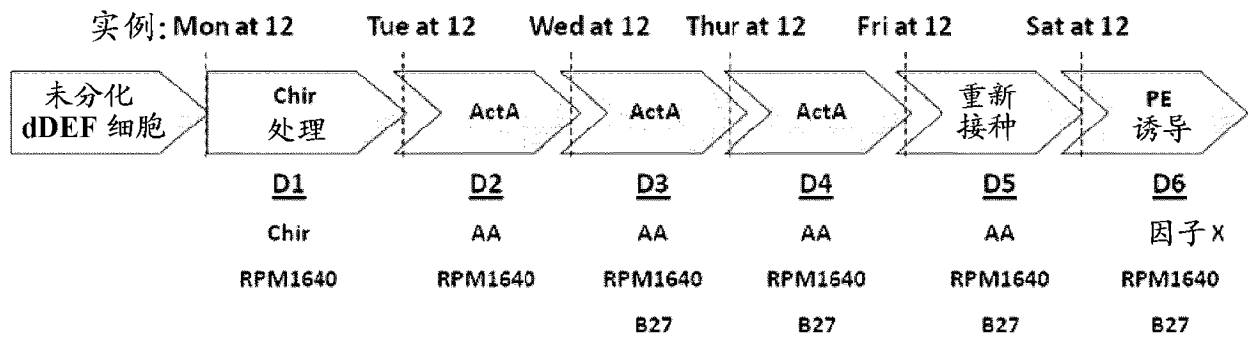


图 1/9

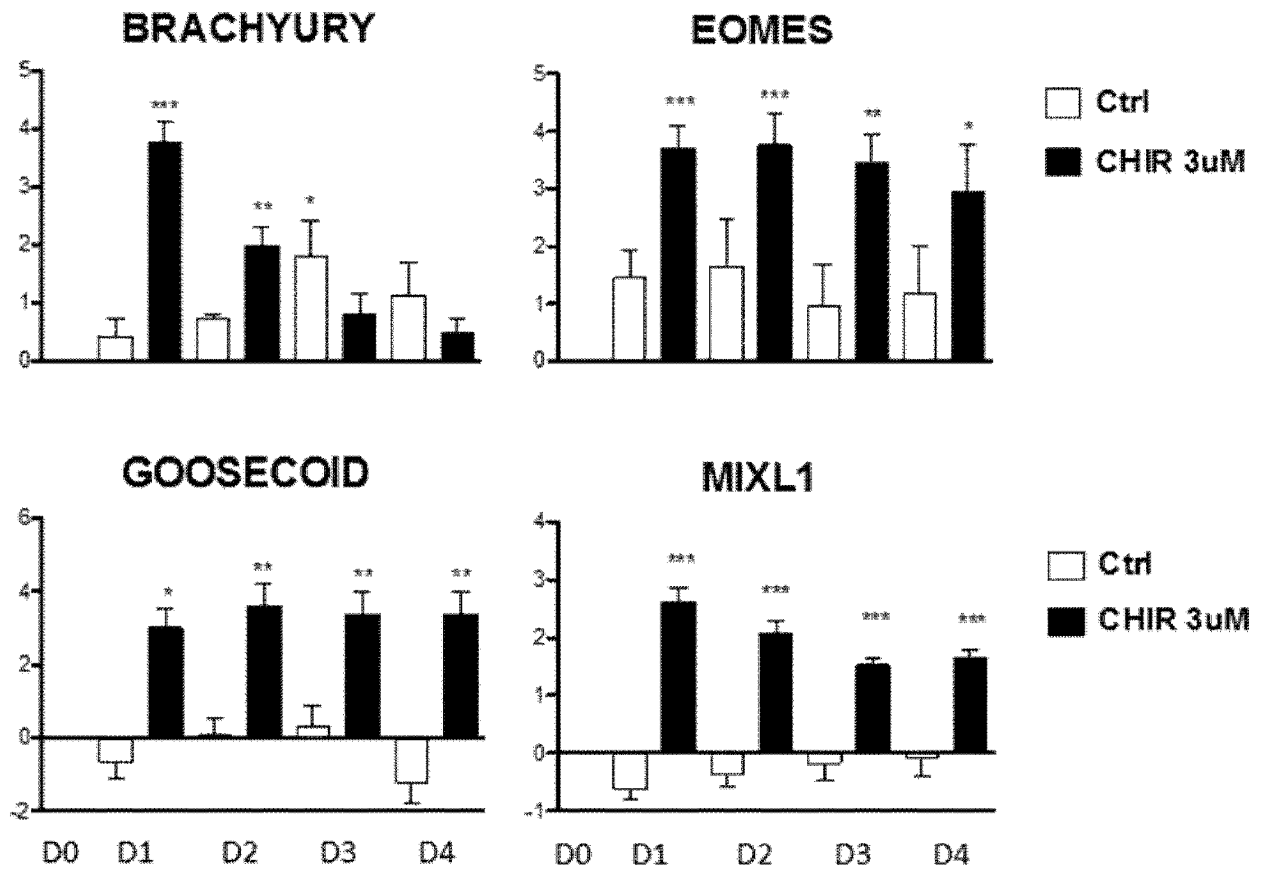


图 2A/9

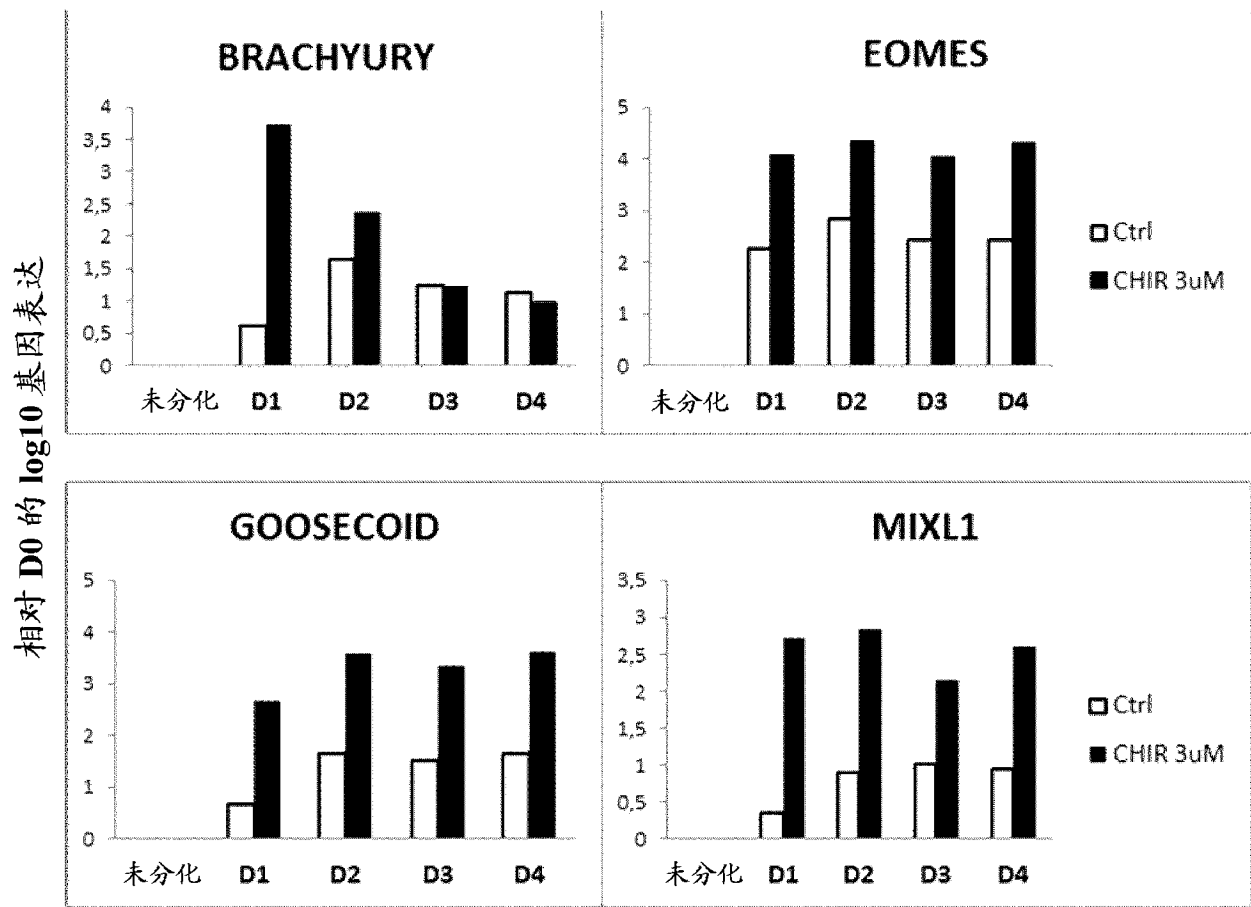
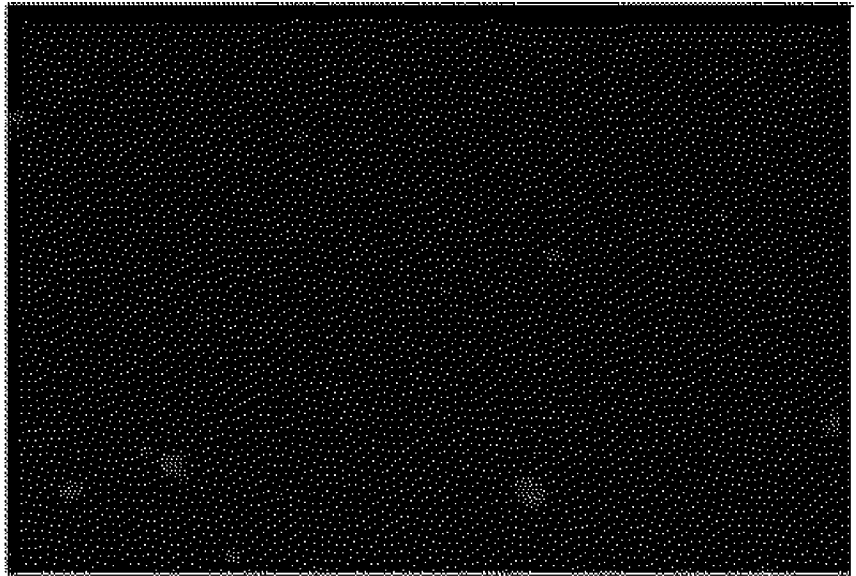


图 2B/9

Brachyury

第 0 天



第 1 天
+CHIR

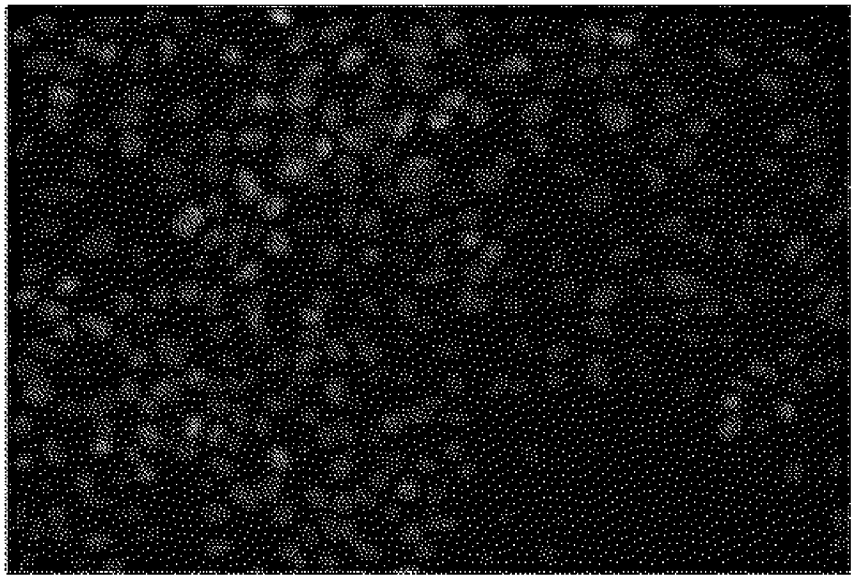


图 2C/9

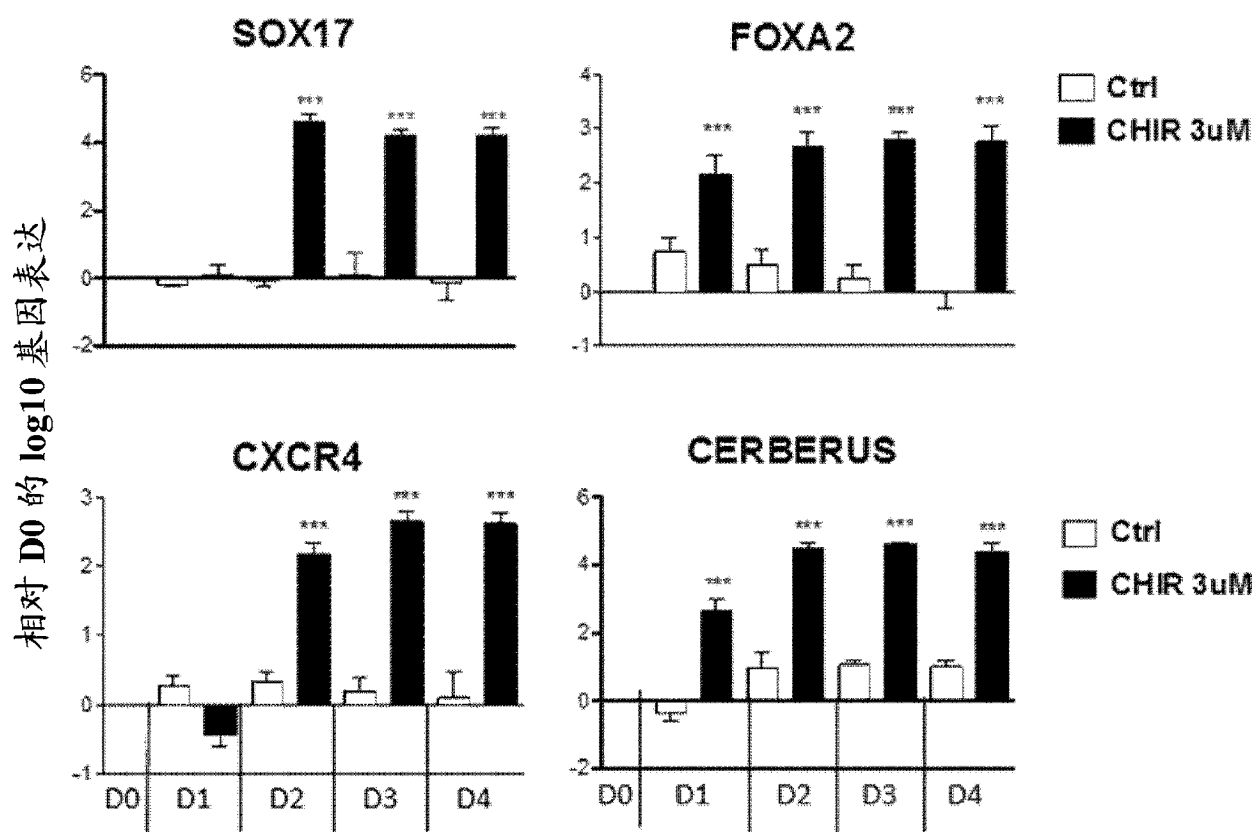


图 3A/9

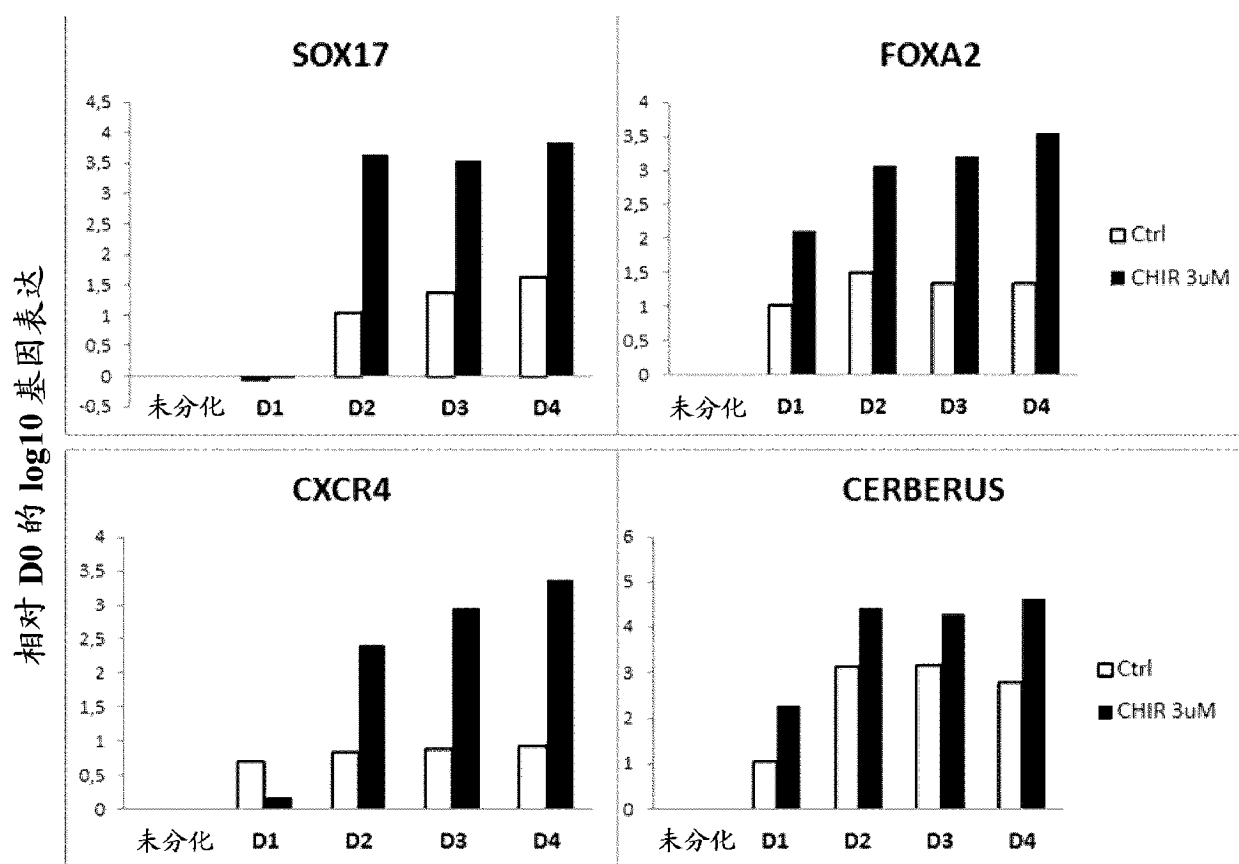


图 3B/9

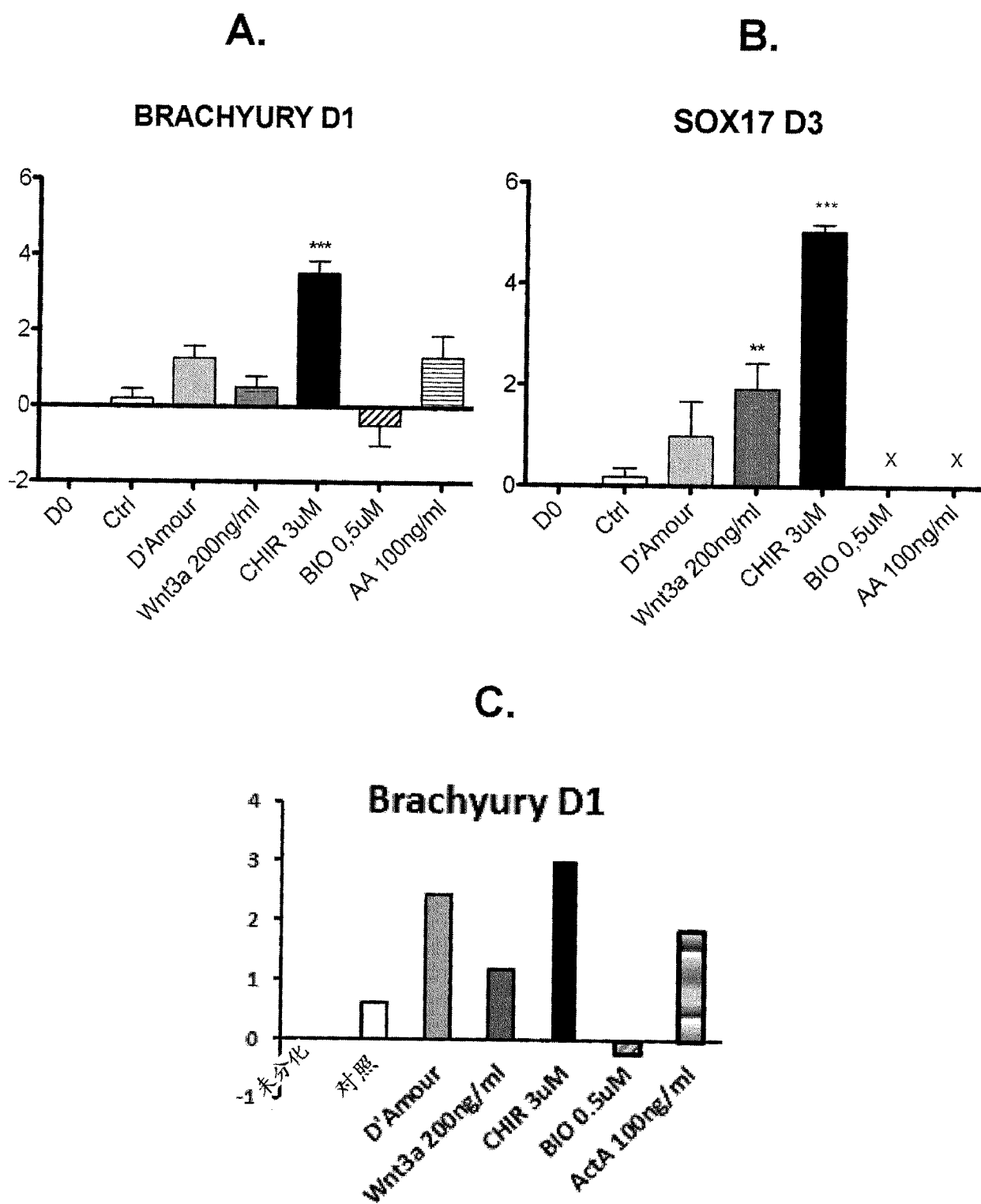


图 4/9

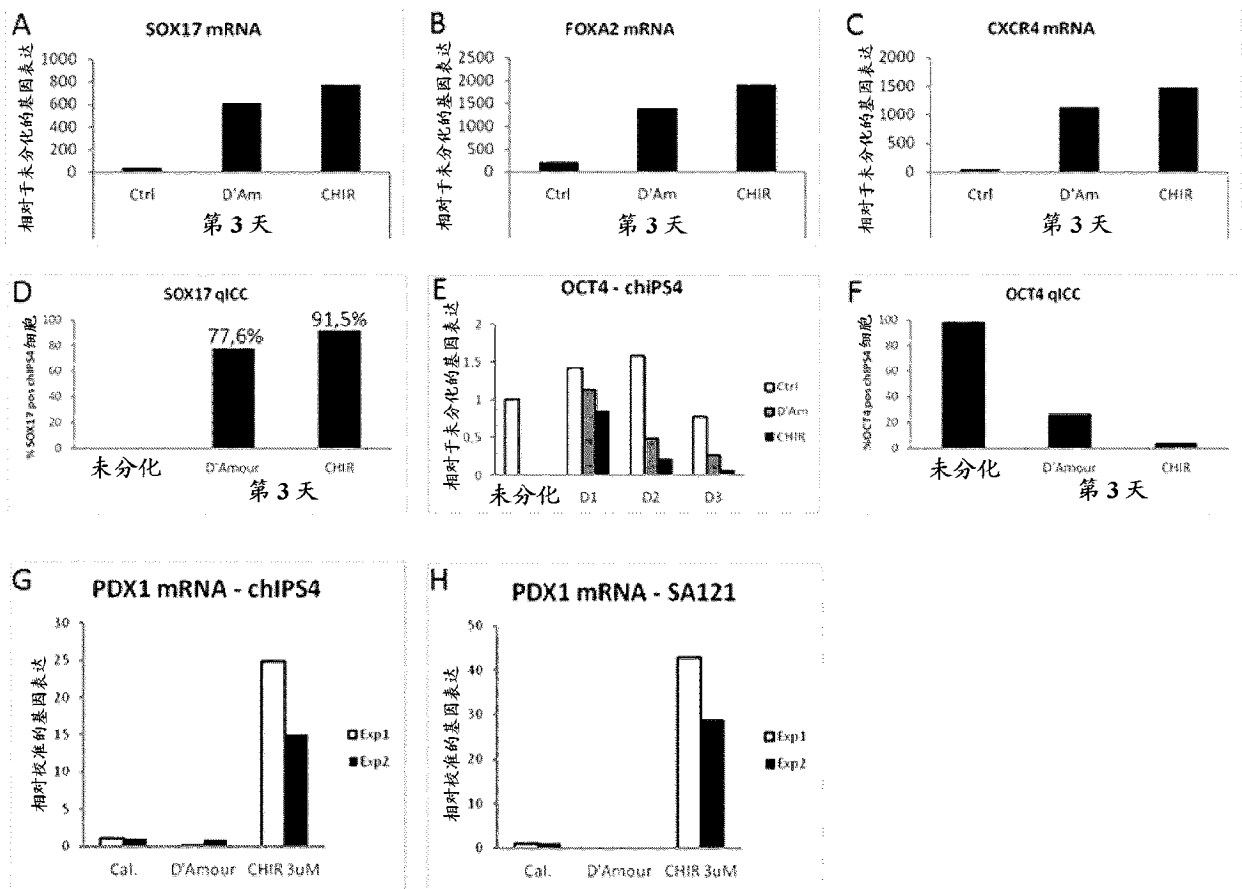
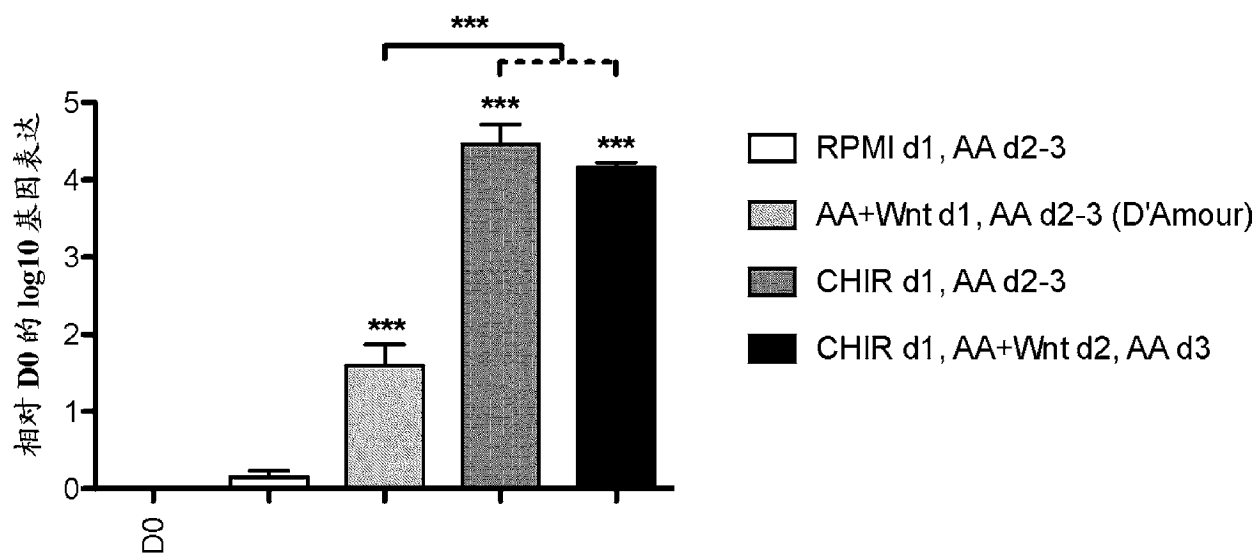


图 5/9

A.**SOX17 D3****B.****SOX17 -SA121**

Exp D14

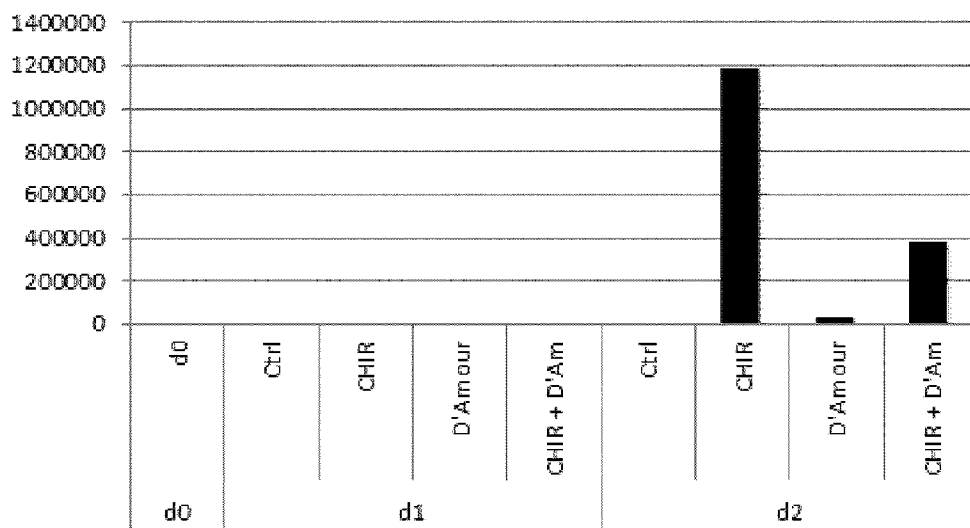


图 6A, B/9

C.

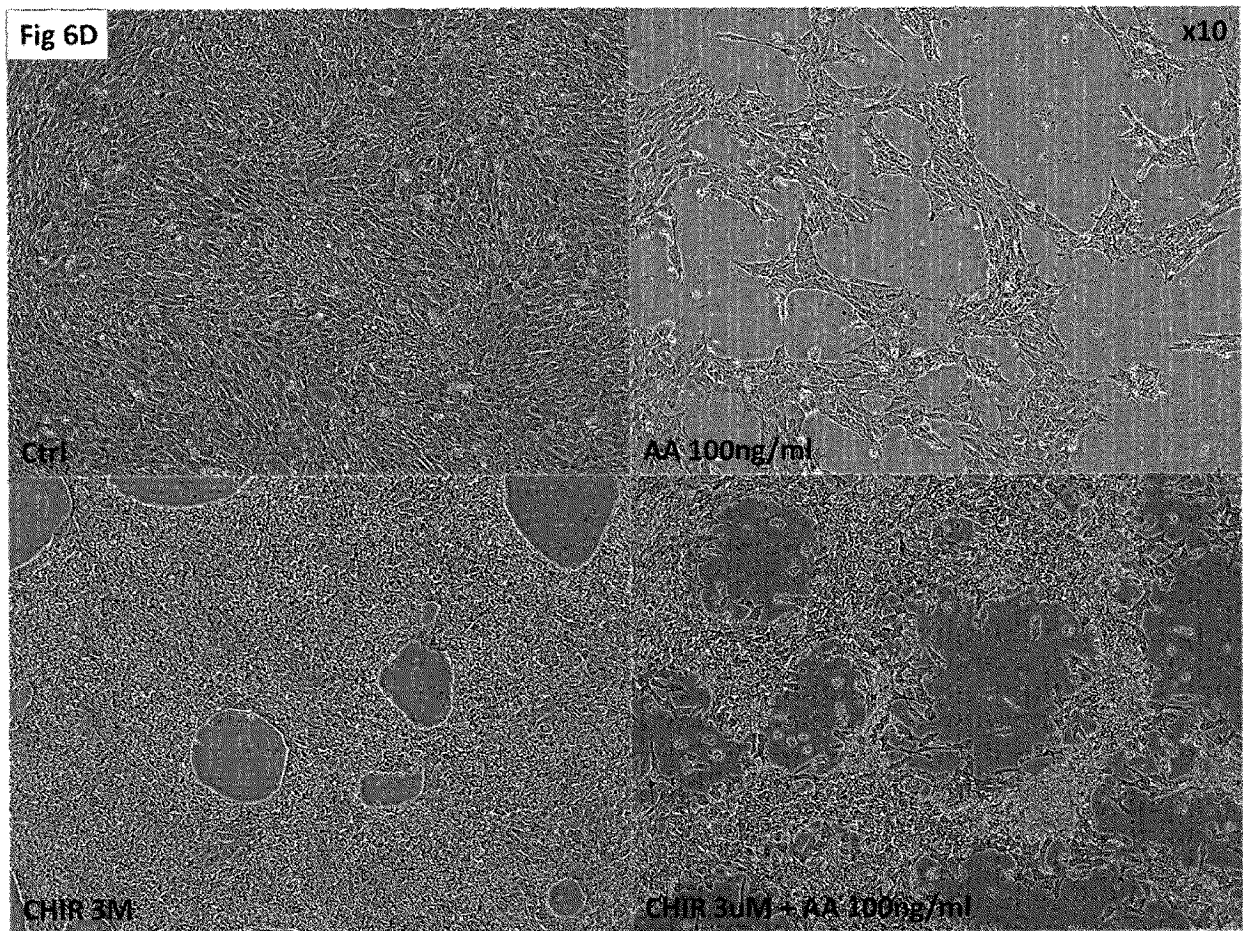
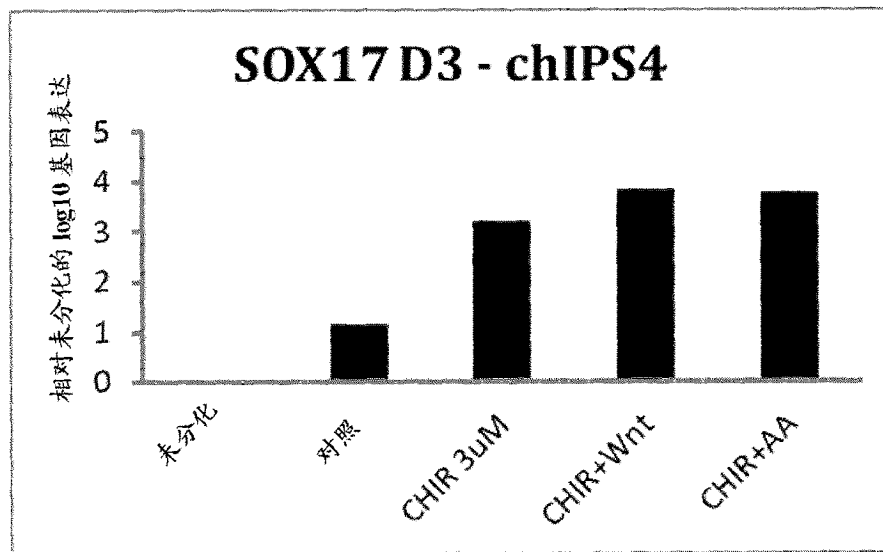


图 6C, D/9

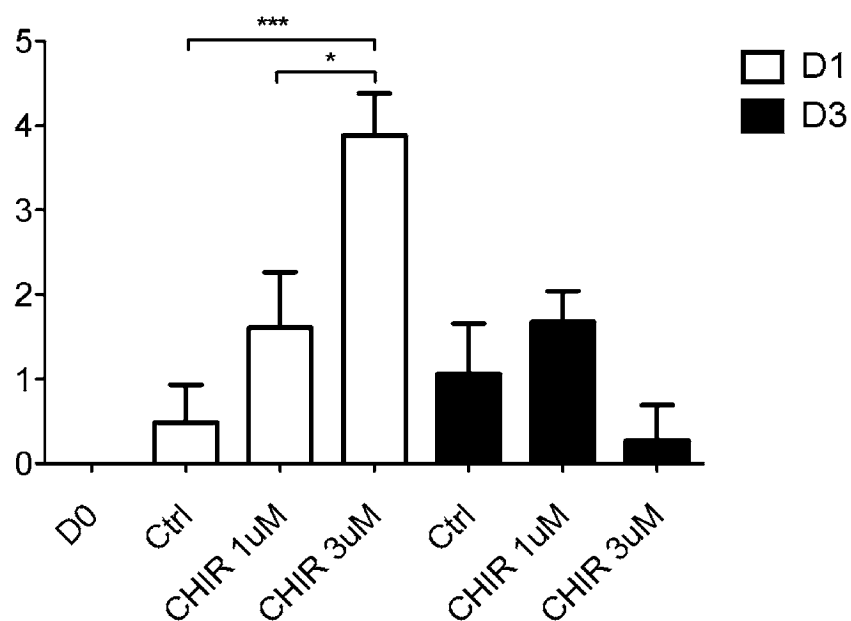
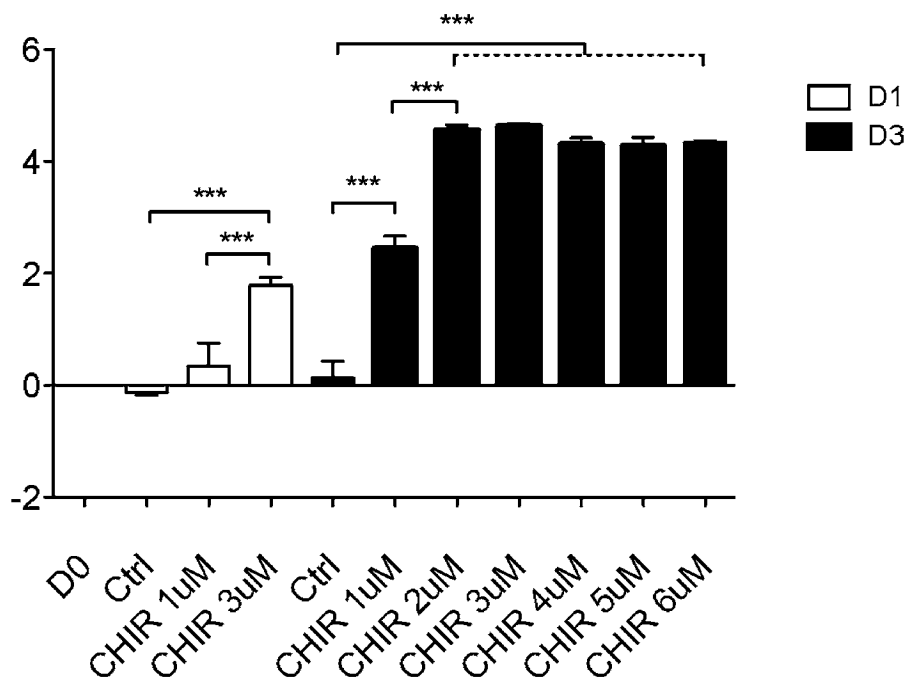
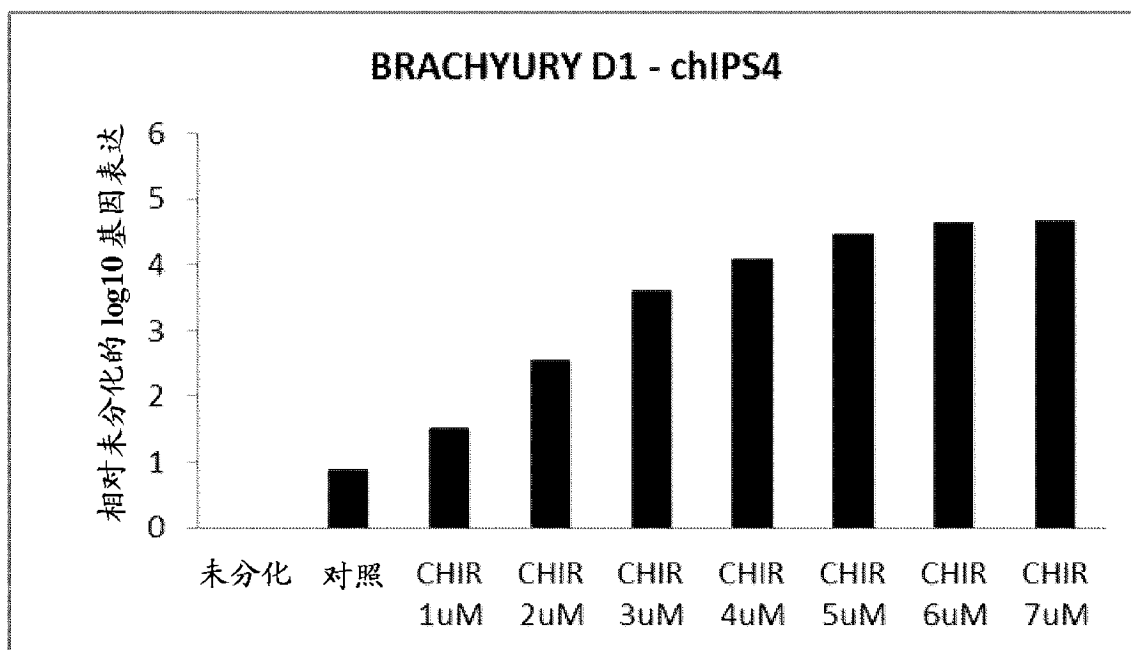
A.**BRACHYURY****B.****SOX17**

图 7A, B/9

C.



D.

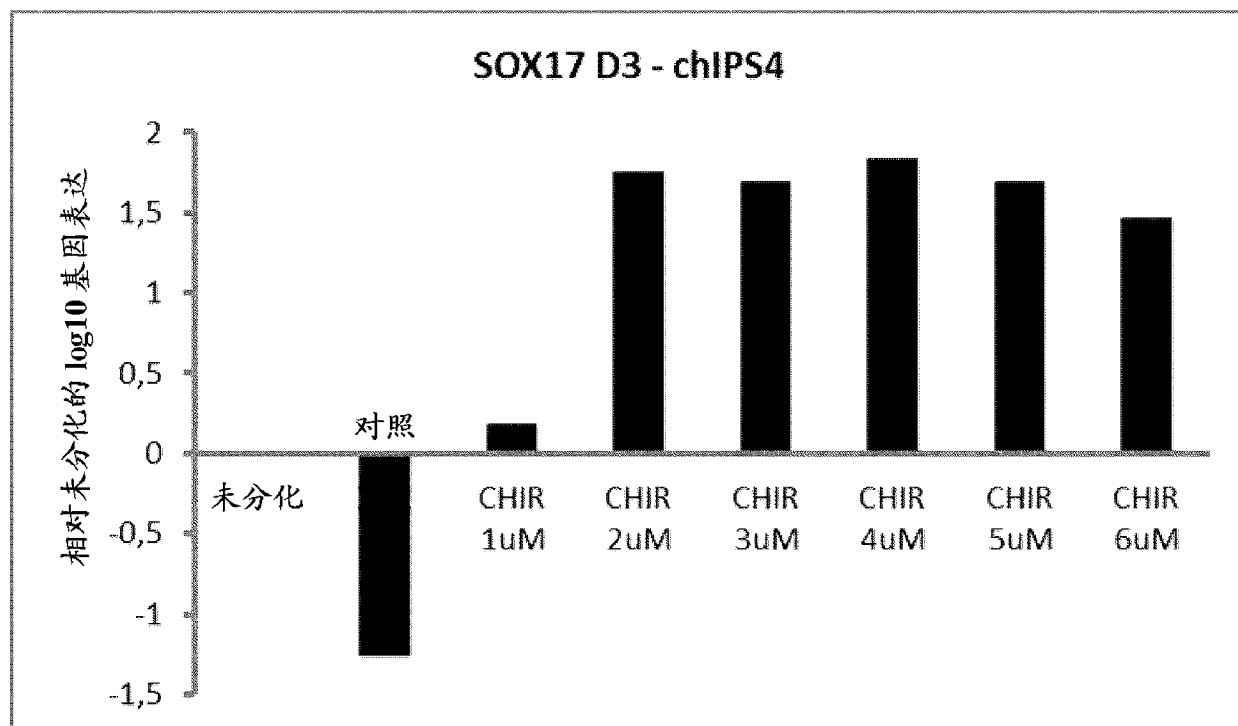


图 7C, D/9

SOX17 D3 (mTeSR)

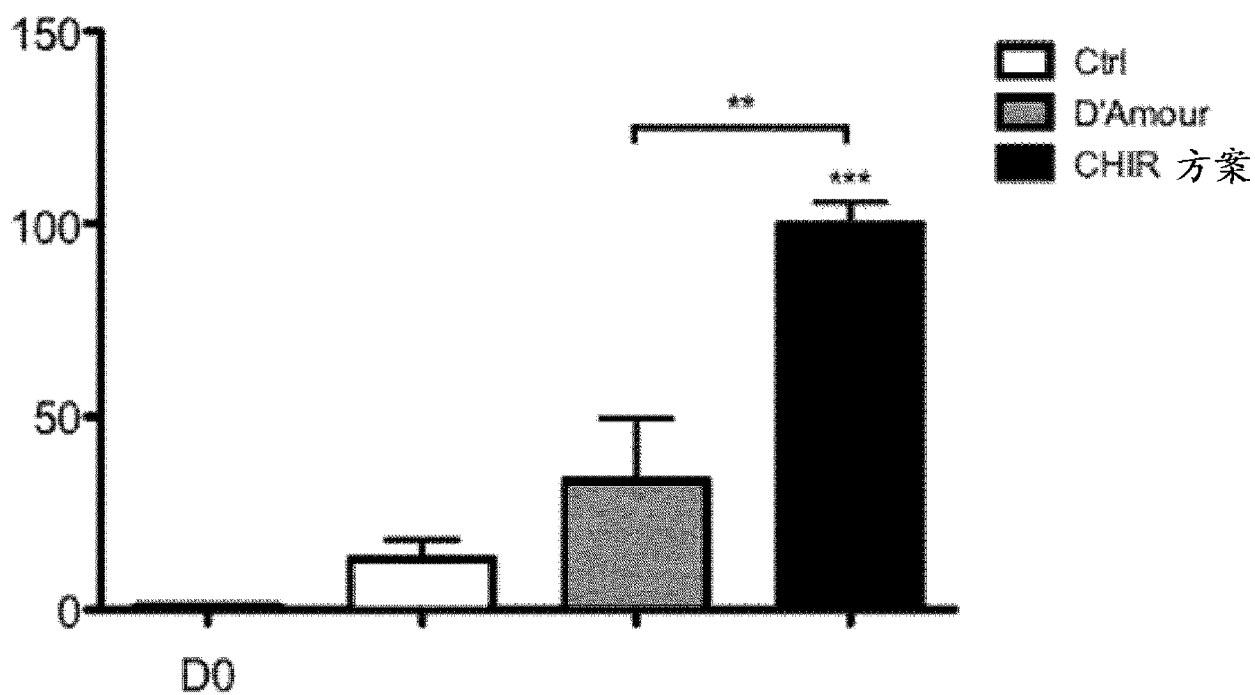


图 8/9

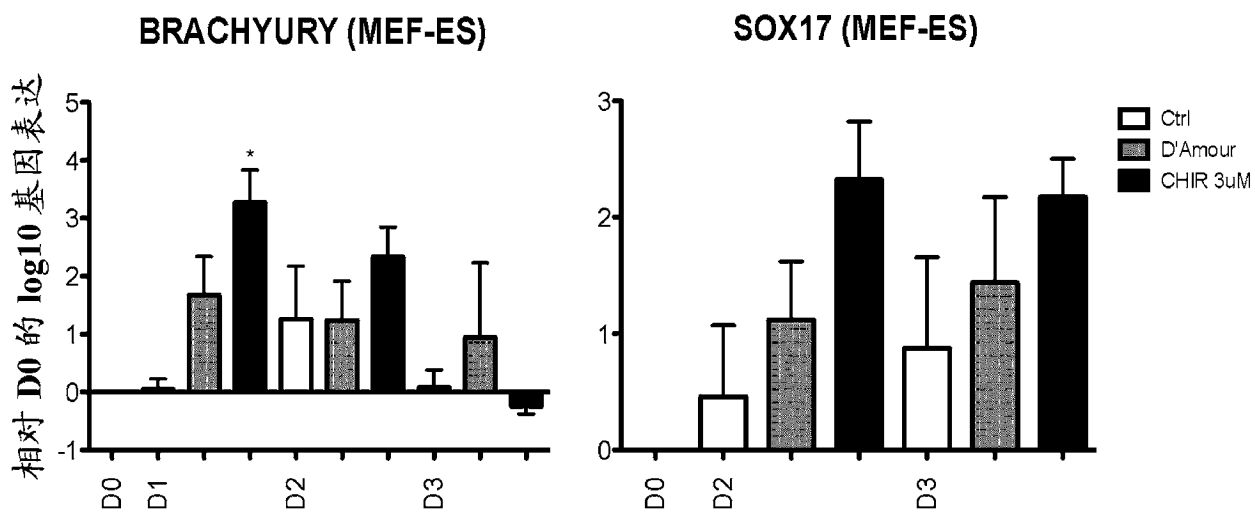


图 9/9