



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103228782 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 31

---

(21) 申请号 201080067389. 1 (51) Int. Cl.  
(22) 申请日 2010. 11. 11 C12N 5/00 (2006. 01)  
(66) 本国优先权数据 C12N 5/071 (2006. 01)  
201010207603. 0 2010. 06. 13 CN A61K 35/12 (2006. 01)  
(85) PCT申请进入国家阶段日 A61K 35/48 (2006. 01)  
2012. 12. 12 A61P 9/00 (2006. 01)  
(86) PCT申请的申请数据  
PCT/CN2010/078645 2010. 11. 11  
(87) PCT申请的公布数据  
W02011/157029 EN 2011. 12. 22  
(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 中国北京市朝阳区大屯路 15  
号  
(72) 发明人 马跃  
(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021  
代理人 王旭

权利要求书4页 说明书20页 附图4页

---

(54) 发明名称  
由干细胞制备心肌细胞的方法和组合物及其用途

(57) 摘要  
本发明涉及应用骨形态发生蛋白 (BMP) 拮抗剂如 Noggin 提高干细胞心肌分化效率的新组合物和方法。本发明还涉及分别通过刺激或不抑制维甲酸信号通路、或通过抑制干细胞内维甲酸信号通路而促进由干细胞形成心房及心室心肌细胞的新组合物和方法。本发明进一步涉及由所述干细胞形成的心房心肌细胞和心室心肌细胞, 以及所述心肌细胞的应用, 如用于心脏损伤修复以及筛选用于治疗心脏损伤的新疗法。

1. 一种提高干细胞的心肌分化效率的方法,所述方法包括已分化形成中胚层的干细胞与骨形态发生蛋白 (BMP) 拮抗剂相接触,据此所述与 BMP 拮抗剂接触的干细胞的心肌分化效率高于未与 BMP 拮抗剂接触的干细胞的心肌分化效率。
2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述干细胞是全能干细胞、多能干细胞、专能干细胞、寡能干细胞或单能干细胞。
3. 权利要求 1 所述的方法,其中所述干细胞是胚胎干细胞、诱导的多能干细胞、胎儿干细胞或成体干细胞。
4. 权利要求 1 所述的方法,其中所述干细胞是哺乳动物干细胞。
5. 权利要求 4 所述的方法,其中所述哺乳动物干细胞是人类干细胞。
6. 权利要求 1 所述的方法,其中所述干细胞是人类胚胎干细胞或人类诱导多能干细胞。
7. 权利要求 1 所述的方法,其中所述干细胞已通过未分化干细胞与碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、BMP 4 和 / 或 Activin A 接触而分化形成中胚层。
8. 权利要求 1 所述的方法,其中所述干细胞已通过未分化干细胞与碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、BMP 4 和 Activin A 接触而分化形成中胚层。
9. 权利要求 1 所述的方法,其中所述干细胞已通过未分化干细胞与 Activin A 接触之前与碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、BMP 4 接触而分化形成中胚层。
10. 权利要求 1 所述的方法,其中所述 BMP 拮抗剂是 BMP 4 拮抗剂。
11. 权利要求 1 所述的方法,其中所述 BMP 拮抗剂是 Noggin。
12. 权利要求 1 所述的方法,其进一步包含在所述干细胞中抑制维甲酸信号通路。
13. 权利要求 12 所述的方法,其中所述维甲酸信号通路通过所述干细胞与维甲酸拮抗剂、维甲酸受体拮抗剂或维甲酸 X 受体拮抗剂相接触而抑制,或通过降低或消耗干细胞培养基中的维生素 A 而抑制。
14. 权利要求 12 所述的方法,其中所述维甲酸信号通路通过所述干细胞与维甲酸受体拮抗剂相接触而抑制。
15. 权利要求 12 所述的方法,其中所述维甲酸受体拮抗剂是 BMS-189453。
16. 权利要求 1 所述的方法,其中与 BMP 拮抗剂相接触干细胞的心肌分化效率比未与 BMP 拮抗剂相接触干细胞的心肌分化效率高至少约 30-40%。
17. 权利要求 1 所述的方法,其中所述干细胞是人类胚胎干细胞或人类诱导多能干细胞,所述 BMP 拮抗剂是 Noggin 并且与 BMP 拮抗剂相接触干细胞的心肌分化效率为约 50%。
18. 权利要求 15 所述的方法,其中所述干细胞是人类胚胎干细胞或人类诱导多能干细胞,所述 BMP 拮抗剂是 Noggin 并且与 BMP 拮抗剂相接触干细胞的心肌分化效率为约 70%。
19. 权利要求 1 所述的方法,其进一步包含所述干细胞与 wnt 抑制剂相接触以使所述干细胞分化为心肌细胞。
20. 权利要求 19 所述的方法,其中所述 wnt 抑制剂是 dickkopf 同系物 1 (DKK1)。
21. 权利要求 1-20 中任一项的方法所产生的心肌细胞。
22. 包含已分化形成中胚层并经外源性 BMP 拮抗剂处理的干细胞的组合物。
23. 一种用于促进心室心肌细胞由干细胞形成的方法,其中所述方法包括抑制已分化形成中胚层的干细胞中的维甲酸信号通路。

24. 权利要求 23 所述的方法,其中所述干细胞是全能干细胞、多能干细胞、专能干细胞、寡能干细胞或单能干细胞。

25. 权利要求 23 所述的方法,其中所述干细胞是胚胎干细胞、诱导的多能干细胞、胎儿干细胞或成体干细胞。

26. 权利要求 23 所述的方法,其中所述干细胞是哺乳动物干细胞。

27. 权利要求 26 所述的方法,其中所述哺乳动物干细胞是人类干细胞。

28. 权利要求 23 所述的方法,其中所述干细胞是人类胚胎干细胞或人类诱导多能干细胞。

29. 权利要求 23 所述的方法,其中所述干细胞已通过未分化干细胞与碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、BMP 4 和 / 或 Activin A 接触而分化形成中胚层。

30. 权利要求 23 所述的方法,其中所述干细胞已通过未分化干细胞与碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、BMP 4 和 Activin A 接触而分化形成中胚层。

31. 权利要求 23 所述的方法,其中所述干细胞已通过未分化干细胞与 Activin A 接触之前与碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、BMP 4 接触而分化形成中胚层。

32. 权利要求 23 所述的方法,其进一步包括所述干细胞与 BMP 拮抗剂相接触以提高心肌分化效率。

33. 权利要求 32 所述的方法,其中所述 BMP 拮抗剂是 BMP4 拮抗剂。

34. 权利要求 33 所述的方法,其中所述 BMP 拮抗剂是 Noggin。

35. 权利要求 23 所述的方法,其中所述维甲酸信号通路通过所述干细胞与维甲酸拮抗剂、维甲酸受体拮抗剂或维甲酸 X 受体拮抗剂相接触而抑制,或通过降低或消耗干细胞培养基中的维生素 A 而抑制。

36. 权利要求 23 所述的方法,其中所述维甲酸信号通路通过所述干细胞与泛视黄酸受体拮抗剂相接触而抑制。

37. 权利要求 23 所述的方法,其中所述维甲酸受体拮抗剂是 BMS-189453。

38. 权利要求 32 所述的方法,其中所述干细胞是人类胚胎干细胞或人类诱导多能干细胞,所述 BMP 拮抗剂是 Noggin 并通过所述干细胞与 BMS-189453 相接触而抑制维甲酸信号通路。

39. 权利要求 23 所述的方法,其进一步包含所述干细胞与 wnt 抑制剂相接触以使所述干细胞分化为心室心肌细胞。

40. 权利要求 39 所述的方法,其中所述 wnt 抑制剂是 dickkopf 同系物 1(DKK1)。

41. 权利要求 23-40 中任一项的方法所产生的心室心肌细胞。

42. 权利要求 41 所述的心室心肌细胞,其具有心室特异性基因的表达水平升高、胚胎心室样动作电位(AP)和 / 或心室心肌细胞典型的  $Ca^{2+}$  火花模式。

43. 权利要求 42 所述的心室心肌细胞,其中所述心室特异性基因是 IRX-4 或 MLC-2v。

44. 一种包含干细胞的组合物,所述干细胞已分化形成中胚层并经抑制所述干细胞内维甲酸信号通路的外源性试剂处理。

45. 权利要求 44 所述的组合物,其中所述抑制干细胞内维甲酸信号通路的外源性试剂是维甲酸受体拮抗剂。

46. 权利要求 45 所述的组合物,其中所述泛视黄酸受体拮抗剂是 BMS-189453。

47. 一种用于促进由干细胞形成心房心肌细胞的方法,所述方法包括刺激或不抑制已分化形成中胚层的干细胞内的维甲酸信号通路。

48. 权利要求 47 所述的方法,其中所述干细胞是全能干细胞、多能干细胞、专能干细胞、寡能干细胞或单能干细胞。

49. 权利要求 47 所述的方法,其中所述干细胞是胚胎干细胞、诱导的多能干细胞、胎儿干细胞或成体干细胞。

50. 权利要求 47 所述的方法,其中所述干细胞是哺乳动物干细胞。

51. 权利要求 47 所述的方法,其中所述哺乳动物干细胞是人类干细胞。

52. 权利要求 47 所述的方法,其中所述干细胞是人类胚胎干细胞或人类诱导多能干细胞。

53. 权利要求 47 所述的方法,其中所述干细胞已通过未分化干细胞与碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、BMP 4 和 / 或 Activin A 接触而分化形成中胚层。

54. 权利要求 47 所述的方法,其中所述干细胞已通过未分化干细胞与碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、BMP 4 和 Activin A 接触而分化形成中胚层。

55. 权利要求 47 所述的方法,其中所述干细胞已通过未分化干细胞与 Activin A 接触之前与碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、BMP 4 接触而分化形成中胚层。

56. 权利要求 47 所述的方法,其进一步包括所述干细胞与 BMP 拮抗剂相接触以提高心肌分化效率。

57. 权利要求 56 所述的方法,其中所述 BMP 拮抗剂是 BMP4 拮抗剂。

58. 权利要求 57 所述的方法,其中所述 BMP 拮抗剂是 Noggin。

59. 权利要求 47 所述的方法,其中所述维甲酸信号通路通过所述干细胞与维甲酸或维生素 A 相接触而刺激。

60. 权利要求 56 所述的方法,其中所述干细胞是人类胚胎干细胞或人类诱导多能干细胞,所述 BMP 拮抗剂是 Noggin 并通过所述干细胞与维甲酸或维生素 A 相接触而刺激维甲酸信号通路。

61. 权利要求 47 所述的方法,其进一步包含所述干细胞与 wnt 抑制剂相接触以使所述干细胞分化为心房心肌细胞。

62. 权利要求 61 所述的方法,其中所述 wnt 抑制剂是 dickkopf 同系物 1 (DKK1)。

63. 权利要求 47-62 中任一项的方法产生的心房肌细胞。

64. 权利要求 63 所述的心房肌细胞,其具有胚胎心房样动作电位 (AP) 和 / 或心房心肌细胞典型的  $Ca^{2+}$  火花模式。

65. 一种包含干细胞的组合物,所述干细胞已分化形成中胚层并经刺激干细胞内维甲酸信号通路的外源性试剂处理。

66. 权利要求 65 所述的组合物,其中所述刺激干细胞内维甲酸信号通路的外源性试剂是维甲酸或维生素 A。

67. 一种由干细胞生产心室心肌细胞的方法,所述方法包括:

1) 干细胞与 bFGF 和 BMP 4 相接触以起始干细胞分化;

2) 经 bFGF 和 BMP 4 处理的干细胞与 Activin A 相接触以形成中胚层;

3) 已分化形成中胚层的干细胞与 Noggin 相接触以提高所述干细胞的心肌分化效率;

4) 抑制经 Noggin 处理的干细胞内的维甲酸信号通路以促进心室心肌细胞形成；

5) 经 Noggin 处理的干细胞与 DKK1 相接触以使所述干细胞分化形成心室心肌细胞。

68. 权利要求 67 所述的方法,其中所述维甲酸信号通路通过所述干细胞与泛视黄酸受体拮抗剂相接触、或通过降低或消耗干细胞培养基中的维生素 A 而抑制。

69. 权利要求 68 所述的方法,其中所述泛视黄酸受体拮抗剂是 BMS-189453。

70. 权利要求 67-69 中任一项的方法产生的心室心肌细胞。

71. 一种由干细胞生产心房心肌细胞的方法,所述方法包括：

1) 干细胞与 bFGF 和 BMP 4 相接触以起始干细胞分化；

2) 经 bFGF 和 BMP 4 处理的干细胞与 Activin A 相接触以形成中胚层；

3) 已分化形成中胚层的干细胞与 Noggin 相接触以提高所述干细胞的心肌分化效率；

4) 刺激或不抑制经 Noggin 处理的干细胞内的维甲酸信号通路以促进心房心肌细胞形成；

5) 经 Noggin 处理的干细胞与 DKK1 相接触以使所述干细胞分化形成心房心肌细胞。

72. 权利要求 71 所述的方法,其中所述干细胞内的维甲酸信号通路通过所述干细胞与维甲酸或维生素 A 相接触而刺激。

73. 权利要求 71 和 72 中任一项的方法产生的心房心肌细胞。

74. 一种用于治疗心脏损伤或紊乱的药物组合物,所述药物组合物包含有效量的权利要求 21 所述的心肌细胞、权利要求 41 所述的心室心肌细胞或权利要求 63 所述的心房心肌细胞,以及药学上可接受的载体或赋形剂。

75. 一种用于治疗受试者中心脏损伤或紊乱的方法,所述方法包括给有此治疗需要或期望的受试者施用有效量的权利要求 74 所述的药物组合物。

76. 权利要求 75 所述的方法,其中所述受试者是人类。

77. 一种用于鉴定心肌细胞的调节剂的方法,所述方法包括：

1) 将权利要求 21 所述的心肌细胞、权利要求 41 所述的心室心肌细胞或权利要求 63 所述的心房心肌细胞与候选调节剂相接触,并检测候选调节剂在所述心肌细胞特性上的影响；

2) 检测未与所述候选调节剂接触的心肌细胞的特性；

据此,与候选调节剂相接触心肌细胞的特性不同于未与候选调节剂相接触心肌细胞的特性,鉴定了所述候选调节剂是心肌细胞特性的调节剂。

## 由干细胞制备心肌细胞的方法和组合物及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2010 年 6 月 13 日提交的、名称为“干细胞高效分化为心房和心室的心肌细胞的方法”的中国专利申请 201010207603.0 的优先权。上述中国专利申请的公开内容通过引用整体并入。

### 技术领域

[0003] 本申请涉及用于提高干细胞的心肌分化效率以及促进干细胞形成心房肌细胞和心室肌细胞的新组合物和方法,以及所述干细胞分化的心房肌细胞、心室肌细胞本身及其应用,例如用于心脏损伤修复与筛选治疗心脏损伤的新疗法。

### 背景技术

[0004] 利用现有的技术从人类胚胎干细胞 (hESCs) 分化心肌细胞只能获得非特异性分化的由胚胎心房样心肌、心室样心肌以及起搏细胞亚型组成的混合心肌细胞<sup>6-9</sup>。猪移植研究表明,植入这样的由人类胚胎干细胞分化的混合心肌细胞具有起搏活性,这种活性使心肌细胞移植具有导致室性心律失常的潜在风险<sup>10</sup>。因此,hESCs 分化得到的心肌细胞的这种心肌亚型异质性阻碍了 hESCs 在心肌修复中的应用<sup>1</sup>。为引导 hESCs 分化为所需的心肌亚型,必须揭开心肌亚型特化的分子调控机制。尽管已确定多种生长因子如 Activin A、骨形态发生蛋白 4 (BMP4)、wnt-3a、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 以及 dickkopf 同系物 1 (DKK1) 可促进心脏发生并用于多种 hESC 心肌分化方案<sup>7,8,11</sup>,至今仍没有证据表明这些或其它生长因子在 hESC 分化期间调节心肌亚型特化。确定心肌亚型特化的主要调节因素是降低 hESC 衍生心肌细胞群体异质性的关键,这对于其以后在再生医学中或作为药物测试系统的应用很重要<sup>6,12</sup>。

[0005] 中胚层和心脏发育期间,骨形态发生蛋白 (BMP) 信号被严密控制。在小鼠胚胎中,BMP 拮抗剂头蛋白 (Noggin) 短暂但强表达于 E7.5 至 E8.0 日龄胚胎的新月形生心区<sup>13</sup>。Dkk1,一种心脏发育强效诱导物<sup>8,14,15</sup>,协同增强 BMP 拮抗剂在爪蟾胚胎的非心源性中胚层特化心脏组织<sup>16</sup>。已经表明,以 BMP4 长期处理 hESCs 将诱导滋养层样细胞分化<sup>17</sup>,而短期处理可起始中胚层形成<sup>18</sup>。综合来看,这些结果提示,中胚层形成后抑制 BMP 信号可以促进心脏的发育。

[0006] 维甲酸 (Retinoic acid, RA) 信号制约着心脏祖细胞池,且在斑马鱼胚胎中可以利用 RA 的抑制剂 BMS-89453 将心区附近侧板中胚层的非心肌前体细胞诱导分化成心肌细胞<sup>19</sup>,同时 RA 还调节心脏的前后轴极化<sup>20</sup>。鸡胚胎实验揭示在胚胎发育的 4-6HH 阶段心房前体组织经移植可以发育成心室,反之亦然<sup>21,22</sup>。4HH 阶段心原性组织的 RA 处理激活了心房特异性基因 AMHC1 在原定发育成为心脏流出道组织的前组细胞中表达<sup>23</sup>。并且,在小鼠和鸡胚胎中,关键时期抑制 RA 信号引起发育具有过大心室和变小或缺失心房的胚胎,并且外源性加入 RA 导致胚胎心脏发育成过大的心房和过小或缺失的心室<sup>5,24</sup>。此外,小鼠胚胎干细胞研究提示维甲酸促进心房相关基因的表达<sup>25</sup>。

## 发明内容

[0007] 一方面,本发明提供了一种用于提高干细胞的心肌分化效率的方法,所述方法包括在干细胞的分化起始之后,或干细胞心肌分化起始之后抑制 BMP 信号。在一个特定的实施方式中,本发明提供了用于提高干细胞的心肌分化效率的方法,所述方法包括将已分化形成中胚层的干细胞与骨形态发生蛋白 (BMP) 拮抗剂相接触,据此所述与 BMP 拮抗剂相接触的干细胞的心肌分化效率高于未与 BMP 拮抗剂相接触的干细胞。还提供了由上述方法产生的心肌细胞。进一步提供了包含已分化形成中胚层并经外源性 BMP 拮抗剂处理的干细胞的组合物。

[0008] 另一方面,本发明提供了用于促进由干细胞形成心室肌细胞的方法,所述方法包括抑制已分化形成中胚层的干细胞内的维甲酸信号通路。还提供了由上述方法产生的心室肌细胞。进一步提供了包含已分化形成中胚层并经抑制维甲酸信号通路的外源性试剂处理的干细胞的组合物。

[0009] 又一方面,本发明提供了用于促进由干细胞形成心房肌细胞的方法,所述方法包括刺激或不抑制已分化形成中胚层的干细胞内的维甲酸信号通路。还提供了由上述方法产生的心房肌细胞。进一步提供了包含已分化形成中胚层并经刺激维甲酸信号通路的外源性试剂处理的干细胞的组合物。

[0010] 又一方面,本发明提供了由干细胞生成心室肌细胞的方法,所述方法包括:1) 将干细胞与试剂如 bFGF 和 BMP 4 相接触以起始干细胞分化;2) 经所述试剂如 bFGF 和 BMP 4 处理的干细胞与另一种试剂如激活素 A (Activin A) 相接触以形成中胚层;3) 已分化形成中胚层的干细胞与 BMP 拮抗剂例如 Noggin 相接触,以提高所述干细胞的心肌分化效率;4) 抑制经 BMP 拮抗剂如 Noggin 处理的干细胞内的维甲酸信号通路以促进心室肌细胞形成;以及 5) 经 BMP 拮抗剂如 Noggin 处理的干细胞与 wnt 抑制剂例如 DKK1 相接触,使所述干细胞分化为心室肌细胞。还提供了由上述方法产生的心室肌细胞。

[0011] 又一方面,本发明提供了由干细胞生成心室肌细胞的方法,所述方法包括:1) 将干细胞与 bFGF 和 BMP 4 相接触;2) 经 bFGF 和 BMP 4 处理的干细胞与 Activin A 相接触;3) 经 Activin A 处理的干细胞与 Noggin 相接触;4) 抑制经 Noggin 处理的干细胞内的维甲酸信号通路;以及 5) 经 Noggin 处理的干细胞与 DKK1 相接触。还提供了由上述方法产生的心室肌细胞。

[0012] 又一方面,本发明提供了由干细胞生成心房肌细胞的方法,所述方法包括:1) 将干细胞与试剂如 bFGF 和 BMP 4 相接触以起始干细胞分化;2) 经所述试剂如 bFGF 和 BMP 4 处理的干细胞与另一种试剂如 Activin A 相接触以形成中胚层;3) 已分化形成中胚层的干细胞与 BMP 拮抗剂例如 Noggin 相接触,以提高所述干细胞的心肌分化效率;4) 刺激或不抑制经 Noggin 处理的干细胞内的维甲酸信号通路以促进心房肌细胞形成;以及 5) 经 Noggin 处理的干细胞与 DKK1 相接触使所述干细胞分化为心房肌细胞。还提供了由上述方法产生的心房肌细胞。

[0013] 又一方面,本发明提供了由干细胞生成心房肌细胞的方法,所述方法包括:1) 将干细胞与 bFGF 和 BMP 4 相接触;2) 经 bFGF 和 BMP 4 处理的干细胞与 Activin A 相接触;3) 经 Activin A 处理的干细胞与 Noggin 相接触;4) 刺激或不抑制经 Noggin 处理的干细胞

内的维甲酸信号通路;以及5)经Noggin处理的干细胞与DKK1相接触。还提供了由上述方法产生的心房肌细胞。

[0014] 又一方面,本发明提供了用于治疗心脏损伤或紊乱的药物组合物,所述药物组合物包括有效量的由上述方法产生的心肌细胞,以及任选的药学上可接受的载体或赋形剂。

[0015] 又一方面,本发明提供了用于治疗受试者如人类的心脏损伤或紊乱的方法,所述方法包括给有此治疗需要或期望的受试者施用有效量的上述药物组合物。

[0016] 又一方面,本发明提供了用于鉴定心肌细胞调节剂的方法,所述方法包括:1)经上述方法产生的心肌细胞与测试物质相接触,并检测测试物质对所述心肌细胞特性的影响;2)检测未与所述测试物质相接触的心肌细胞的特性;据此,与测试物质相接触的心肌细胞特性不同于未与测试物质相接触的心肌细胞特性,鉴定了所述测试物质是心肌细胞特性的调节剂如刺激剂或抑制剂。

### 附图说明

[0017] 图1展示了Noggin(Ngn)和RA抑制剂促进hESC心肌分化。(A)人类ESCs分化为心肌细胞系方案的概述。(B)第14天CTNT<sup>+</sup>细胞的频率;在指定时间间隔添加Ngn的心肌诱导培养物;基础方案(BP)用作对照。(C)在指定时间间隔添加RA抑制剂(RAi)的心肌诱导培养物在第14天的CTNT<sup>+</sup>细胞频率;BP用作对照。(D)以BP作为对照的培养物中CTNT<sup>+</sup>细胞的流式细胞分析;在第4天和第5天添加Ngn的BP培养物,以及在第4天和第5天添加Ngn并从第6天至第8天添加RAi的BP培养物(Ngn+RAi)。(E)如(D)中所指定的BP、Ngn处理以及Ngn+RAi处理的培养物在第14天的定量RT-PCR基因表达分析,以GADPH归一化的平均表达量如图所示。(F)心肌诱导培养物的免疫染色分析。其中所显示的线表示三组独立实验平均值的标准差。CM,条件培养基。与BP对照比较或其它方式显示的P值,\*P < 0.05,\*\*P < 0.005,\*\*\*P < 0.0005。

[0018] 图2展示了已分化心肌细胞的形态和搏动率。(A)第14天培养物的CTNT<sup>+</sup>细胞的流式细胞分析,由基础方案分化,并在第4天和第5天增添Ngn处理,以及第6天至第8天的RA(Ngn+RA)或RAi(Ngn+RAi)处理。(B)以ImageJ软件测量的经Ngn+RA(n = 35)和Ngn+RAi(n = 31)处理的60日龄培养物的单个心肌细胞大小的统计分析。(C)60日龄已分化培养物(n = 4)的搏动率(搏动/分钟)的统计分析。(D)60日龄已分化培养物的单个细胞的免疫染色。

[0019] 图3展示了Ngn+RA和Ngn+RAi诱导的hESC衍生心肌细胞的特征。(A)Ngn+RA和Ngn+RAi培养物中的irx4基因表达动力学的定量RT-PCR分析。以GADPH归一化的平均表达量如图所示,其中所显示的线表示三组独立实验平均值的标准差。\*\*\*P < 0.0005。(B)60日龄Ngn+RA和Ngn+RAi诱导的培养物的免疫染色,证明了MLC-2V在Ngn+RAi处理培养物的大多数CTNT阳性细胞中表达而不在Ngn+RA处理培养物的那些细胞中表达。(C)60日龄Ngn+RA和Ngn+RAi处理培养物的免疫印迹(Western blotting),表明即使CTNT在两种培养物中均匀表达,MLC-2V在Ngn+RAi处理培养物中高表达但不表达于Ngn+RA处理的培养物。

[0020] 图4展示了Ngn+RA和Ngn+RAi诱导的心肌细胞的动作电位(AP)形态及Ca<sup>2+</sup>释放特性。(A)在hESC衍生的心肌细胞中观察到三种主要类型的APs:起搏样、心房样以及



心室样 APs。通过应用硝苯地平,心室样 AP 的持续时间大大降低 (B, 左侧);未观察到硝苯地平对心房样 AP 持续时间的显著影响 (B, 右侧)。(C) 标明了由 Ngn+RAi 和 Ngn+RA 培养物记录的 AP 类型的百分数。(D) 由 Ngn+RA 培养物 (左) 和 Ngn+RAi 培养物 (右) 中的心肌细胞记录的典型  $\text{Ca}^{2+}$  图像。从所述图像获取荧光剖面图像 (箭头所示位置)。由 Ngn+RA 和 Ngn+RAi 处理培养物中心肌细胞记录的典型  $\text{Ca}^{2+}$  释放事件的特性总结于 (E) 中 (检测到 Ngn+RA 处理培养物中 18 个细胞的 98 次触发, 以及 Ngn+RAi 处理培养物中 14 个细胞的 348 次触发)。与 Ngn+RAi 培养物相比,  $*P < 0.05$ 。电生理研究中应用的所有细胞是 60-90 日龄的。N 样, 起搏 AP; A 样, 心房样 AP; V 样, 心室样 AP。

[0021] 图 5 展示了不同的维甲酸处理培养物中的 MLC-2v 表达。(A) 经 Noggin+RA、Noggin 单独以及 Noggin+RAi 处理的 60 日龄培养物以 MLC-2v 和 cTNT 双染色。(B) 经 Noggin+RA、Noggin 单独以及 Noggin+RAi 处理 60 日龄培养物的 MLC-2v、cTNT 和  $\beta$ -actin 的免疫印迹。

[0022] 图 6 展示了不同处理培养物中的心脏基因表达。经 Noggin+RA、Noggin 单独以及 Noggin+RAi 处理 60 日龄培养物的 MLC-2a、ANF、 $\beta$ -MHC 和  $\beta$ -actin 的免疫印迹。

[0023] 发明详述

[0024] 定义

[0025] 除非另有界定, 本文所应用的所有技术和科技术语与本领域普通技术人员通常所理解的具有相同含义。本发明所引用的所有专利、专利申请 (公开的或未公开的) 以及其它出版物在此通过引用整体并入。如果本节中阐述的定义与在此通过引用并入的专利、申请、已公开申请及其它出版物所阐述的相矛盾或其它方式的不一致, 本节中所设置的定义优先于在此通过引用并入的定义。

[0026] 如本文所应用的, “一个” 指 “至少一个” 或 “一个或多个”。

[0027] 如本文所应用的, “哺乳动物” 指任意种类的哺乳动物。通常, 本文所应用的术语 “哺乳动物” 指代人类、人类受试者或人类患者。

[0028] 如本文所应用的, “用于治疗特定疾病的化合物的有效剂量” 是足以改善或以某些方式减轻所述疾病相关症状的剂量。该剂量可作为单剂量施用或根据治疗方案施用, 只要它是有效的。所述剂量可以治愈所述疾病, 但通常为改善所述疾病的症状而施用。可能需要重复施用以获得所需的症状改善。

[0029] 如本文所应用的, “治疗” 指某种状况、紊乱或疾病症状的任意方式的改善或其它有益改变。治疗还可以涵盖本文所述组合物的任意药学应用。

[0030] 如本文所应用的, 通过施用特定药物组合物的特定状况的症状 “改善” 是指, 可归结于或与所述组合物施用相关的无论是永久或者临时的、持久或短暂的任意减少。

[0031] 如本文所应用的, “通过重组方式生产” 指应用重组核酸方法的生产方法, 所述重组核酸方法依赖于表达克隆核酸所编码蛋白的已知分子生物学方法。

[0032] 如本文所应用的, 术语 “受试者” 不限于特定的物种或样品类型。例如, 术语 “受试者” 可以指患者, 并且通常是人类患者。然而, 该术语并不限于人类并因而涵盖各种哺乳动物物种。

[0033] 如本文所应用的, “药学上可接受的盐、酯或其它衍生物” 包括任意种类的盐、酯或衍生物, 其可方便地由本领域技术人员应用已知用于此类衍生化和生产可施用给动物或人类而不具有实质毒性作用并且或者是药物学活性或者是前药的化合物的方法而制备。

[0034] 如本文所应用的,“前药”是一种在体内施用时代谢为或者转化为所述化合物的生物学、药理学或治疗等活性形式的化合物。为生产前药,修饰所述药物活性化合物使得所述活性化合物可通过代谢过程再生。所述前药可被设计为改变药物的代谢稳定性或输送特征,以掩盖副作用或毒性,以改善药物的味道或改变药物的其它特征或特性。一旦知晓某种药理学活性化合物,本领域技术人员凭借药物动力学过程以及药物体内代谢的知识,能够设计所述化合物的前药(参见例如, Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, 第 388-392 页)。

[0035] 如本发明所应用的,“测试物质(或候选化合物)”指已有化学定义的化合物(如有机分子、无机分子、有机/无机分子、蛋白质、肽、核酸、寡核苷酸、脂类、多糖类、糖类、或这些分子的杂合物例如糖蛋白等等)或化合物的混合物(如测试化合物的文库、天然提取物或培养物上清等等),其在 PTH 拮抗剂上的作用通过本文公开和/或要求的方法测定。

[0036] 如本发明所应用的,高通量筛选(HTS)指测试大量样品、例如针对疾病靶的具有多种化学结构的样品,以鉴定“命中”的过程(参见例如, Broach 等, High throughput screening for drug discovery, *Nature*, 384:14-16(1996); Janzen 等, High throughput screening as a discovery tool in the pharmaceutical industry, *Lab Robotics Automation*:8261-265(1996); Fernandes, P. B., Letter from the society president, *J. Biomol. Screening*, 2:1(1997); Burbaum 等, New technologies for high-throughput screening, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1:72-78(1997))。HTS 操作是高度自动化以及计算机化的,以处理样品制备、分析步骤以及大容量数据的后续处理。

[0037] 提高干细胞的心肌分化效率的方法和组合物及其生产的心肌细胞

[0038] 一方面,本发明提供了一种用于提高干细胞的心肌分化效率的方法,所述方法包括已分化形成中胚层的干细胞与骨形态发生蛋白(BMP)拮抗剂相接触,由此所述与 BMP 拮抗剂相接触的干细胞的心肌分化效率高于未与 BMP 拮抗剂相接触的干细胞。还提供了由上述方法生产的心肌细胞。进一步提供了包含已分化形成中胚层并经外源性 BMP 拮抗剂处理的干细胞的组合物。

[0039] 该方法可用于提高任意适宜干细胞的心肌分化效率。例如,该方法可用于提高全能、多能、专能、寡能或单能干干细胞的心肌分化效率。在另一例子中,该方法可用于提高胚胎干细胞、诱导的多能干细胞、胎儿干细胞或成人干细胞的心肌分化效率。在又一例子中,该方法可用于提高哺乳动物干细胞例如人类干细胞的心肌分化效率。在又一例子中,该方法可用于提高人类胚胎干细胞或人类诱导多能干细胞的心肌分化效率。

[0040] 所述干细胞可通过任意适宜方法获得、制备和/或保持。例如,小鼠 ES 细胞可在明胶层上生长并需要白血病抑制因子(LIF)的存在。人类 ES 细胞可在小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)饲养层上生长并可能需要碱性成纤维细胞生长因子(bFGF 或 FGF-2)的存在(参见例如, Chambers I, Colby D, Robertson M 等, (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells". *Cell* 113(5):643-55)。

[0041] 干细胞如人类胚胎干细胞通常由数种转录因子和细胞表面蛋白所确定。例如,转录因子 Oct-4、Nanog 以及 Sox2 形成确保抑制导致分化的基因以及保持多能性的核心调节网络。通常用于鉴定 hES 细胞的细胞表面抗原是糖脂 SSEA3 和 SSEA4 以及硫酸角质素抗原

Tra-1-60 和 Tra-1-81。

[0042] 通常缩写为 iPS 细胞或 iPSCs 的诱导多能干细胞是一种衍生自非多能干细胞、通常是成人体细胞的经诱导特定基因“强制”表达的人工多能干细胞。各种基因或其组合可用于由成人体细胞诱导 iPS 细胞。例如，Oct-3/4 以及 Sox 基因家族 (Sox1, Sox2, Sox3 和 Sox15) 的某些成员可用于由成人体细胞诱导 iPS 细胞。其它基因，包括 Klf 家族 (Klf1, Klf2, Klf4 和 Klf5) 的某些成员、Myc 家族 (C-myc, L-myc, 和 N-myc)、Nanog 和 LIN28 可用于增加诱导效率。可以通过任意适宜方法将各种基因或其编码蛋白递送入所述成人体细胞。例如各种基因可通过病毒转染系统例如逆转录病毒系统、慢病毒系统或腺病毒系统，或不合任何病毒转染系统的质粒递送入所述成人体细胞。或者，可将所述基因编码的蛋白直接递送入所述成人体细胞，如以某些蛋白质重复处理而通过聚精氨酸锚引导进入所述细胞。

[0043] 所述干细胞可通过任意适宜处理或试剂诱导分化形成中胚层。在一个例子中，通过未分化干细胞与碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、BMP 4 和 / 或 Activin A 相接触，所述干细胞分化以形成中胚层。在另一例子中，通过未分化干细胞与碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、BMP 4 和 Activin A 相接触，所述干细胞分化以形成中胚层。所述干细胞经 bFGF、BMP 4 和 Activin A 以任意适宜顺序处理。例如，通过未分化干细胞与 Activin A 接触前与碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和 BMP 4 相接触，所述干细胞分化以形成中胚层。在另一例子中，通过未分化干细胞与 wnt-3a (Tran, T.H 等. Wnt3a-induced mesoderm formation and cardiomyogenesis in human embryonic stem cells. Stem Cells 27, 1869-1878 (2009)) 或一种作用或功能类似于 wnt-3a 的小分子例如 Bio 或 CHIR99021 相接触，所述干细胞分化以形成中胚层。

[0044] 任意适宜的 BMP 拮抗剂可用于该方法以提高干细胞的心肌分化效率。例如，可应用 BMP4 拮抗剂。在另一例子中，所述 BMP 拮抗剂是 Noggin。在又一例子中，所述 BMP 拮抗剂是 Chordin, Tsg、DAN 家族成员 (Yanagita, M. BMP antagonists: their roles in development and involvement in pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rev 16, 309-317, (2005)), BMP 可溶性受体例如 BMPRI A 和 BMPRI B, 或一种作用或功能类似于 BMP 拮抗剂的小分子例如 Dorsomorphin (Hao, J 等. Dorsomorphin, a selective small molecule inhibitor of BMP signaling, promotes cardiomyogenesis in embryonic stem cells. PLoS One 3, e2904 (2008))。

[0045] 该方法可进一步包括在所述干细胞中抑制维甲酸信号通路。可通过任意适宜处理或试剂抑制干细胞中的维甲酸信号通路。在一个例子中，通过所述干细胞与维甲酸拮抗剂、维甲酸受体拮抗剂或维甲酸 X 受体拮抗剂相接触而抑制维甲酸信号通路。在另一例子中，通过所述干细胞与泛视黄酸受体拮抗剂如 BMS-189453 相接触而抑制维甲酸信号通路。在又一例子中，通过所述干细胞与 BMS-453、AGN194310、ANG193109、Ro41-5253、SR11335、9- 顺式视黄酸或抑制维甲酸合成的小分子例如双硫仑和柠檬醛相接触而抑制维甲酸信号通路。在又一例子中，通过减少或消耗干细胞培养基中的维生素 A 而抑制维甲酸信号通路。

[0046] 该方法可用于提高干细胞的心肌分化效率至合适程度。在一个例子中，与 BMP 拮抗剂相接触的干细胞的心肌分化效率，比未与 BMP 拮抗剂相接触的干细胞的心肌分化效率高至少约 30%。在特定的具体实施方式中，与 BMP 拮抗剂相接触的干细胞的心肌分化效

率,是未与 BMP 拮抗剂相接触的干细胞的心肌分化效率的约 40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍或更高。

[0047] 在一个特定例子中,所述干细胞是人类胚胎干细胞或人类诱导多能干细胞,所述 BMP 拮抗剂是 Noggin,并且与 BMP 拮抗剂相接触的干细胞的心肌分化效率是约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%或 80%。在另一特定例子中,所述干细胞是人类胚胎干细胞或人类诱导多能干细胞,所述 BMP 拮抗剂是 Noggin,并且与 BMP 拮抗剂相接触的干细胞的心肌分化效率是约 60%、70%、80%、90%、95%或 100%。

[0048] 该方法可进一步包括所述干细胞与 wnt 抑制剂相接触以使所述干细胞分化为心肌细胞。可应用任意适宜的 wnt 抑制剂。在一个例子中,所述 wnt 抑制剂是 dickkopf 同系物 1 (DKK1)。

[0049] 还提供了通过上述方法生产的心肌细胞。

[0050] 进一步提供了包含已分化形成中胚层并经外源性 BMP 拮抗剂处理的干细胞的组合物。

[0051] 促进心室肌细胞形成的方法和组合物及其生产的心室肌细胞

[0052] 另一方面,本发明提供了促进干细胞向心室肌细胞分化的方法,其中所述方法包括抑制已分化形成中胚层的干细胞内的维甲酸信号通路。

[0053] 该方法可用于促进心室肌细胞由任意适宜干细胞形成。在一个例子中,该方法可用于促进心室肌细胞由全能、多能、专能、寡能或单能干细胞形成。在另一例子中,该方法可用于促进心室肌细胞由胚胎干细胞、诱导的多能干细胞、胎儿干细胞或成人干细胞形成。在又一例子中,该方法可用于促进心室肌细胞由哺乳动物干细胞例如人类干细胞形成。在又一例子中,该方法可用于促进心室肌细胞由人类胚胎干细胞或人类诱导多能干细胞形成。

[0054] 所述干细胞可通过任意适宜处理或试剂诱导以分化形成中胚层。在一个例子中,通过未分化干细胞与碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、BMP 4 和 / 或 Activin A 相接触,所述干细胞被诱导分化以形成中胚层。在另一例子中,通过未分化干细胞与碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、BMP 4 和 Activin A 相接触,所述干细胞被诱导分化以形成中胚层。所述干细胞可经 bFGF、BMP 4 和 Activin A 以任意适宜顺序处理。例如,通过未分化干细胞与 Activin A 接触前与碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和 BMP 4 相接触,所述干细胞可被诱导分化以形成中胚层。在另一例子中,通过未分化干细胞与 wnt-3a (Tran, T. H 等 .Wnt3a-induced mesoderm formation and cardiomyogenesis in human embryonic stem cells. Stem Cells 27,1869-1878(2009)) 或一种作用或功能类似于 wnt-3a 的小分子例如 Bio 或 CHIR99021 相接触,所述干细胞可分化形成中胚层。

[0055] 该方法可进一步包括所述干细胞与 BMP 拮抗剂相接触以提高心肌分化效率。任意适宜的 BMP 拮抗剂可用于该方法。例如,可应用 BMP4 拮抗剂。在另一例子中,所述 BMP 拮抗剂是 Noggin。在又一例子中,所述 BMP 拮抗剂是 Chordin, Tsg、DAN 家族成员 (Yanagita, M. BMP antagonists: their roles in development and involvement in pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rev 16,309-317, (2005)), BMP 可溶性受体例如 BMPRI A 和 BMPRI B, 或一种作用或功能类似于 BMP 拮抗剂的小分子例如 Dorsomorphin (Hao, J 等 .Dorsomorphin, a selective small molecule inhibitor of BMP signaling, promotes cardiomyogenesis in embryonic stem cells. PLoS One 3,

e2904(2008))。

[0056] 可通过任意适宜处理或试剂抑制干细胞中的维甲酸信号通路。在一个例子中,通过所述干细胞与维甲酸拮抗剂、维甲酸受体拮抗剂或维甲酸 X 受体拮抗剂相接触而抑制维甲酸信号通路。在另一例子中,通过所述干细胞与泛视黄酸受体拮抗剂如 BMS-189453 相接触而抑制维甲酸信号通路。在又一例子中,通过所述干细胞与 BMS-453、AGN194310、ANG193109、Ro41-5253、SR11335、9- 顺式视黄酸或抑制维甲酸合成的小分子例如双硫仑和柠檬醛相接触而抑制维甲酸信号通路。在又一例子中,通过减少或消耗干细胞培养基中的维生素 A 而抑制维甲酸信号通路。

[0057] 在一个特定例子中,所述干细胞是人类胚胎干细胞或人类诱导多能干细胞,所述 BMP 拮抗剂是 Noggin,并且通过所述干细胞与 BMS-189453 接触抑制维甲酸信号通路。

[0058] 该方法进一步包括所述干细胞与 wnt 抑制剂相接触以使干细胞分化为心肌细胞。可应用任意适宜的 wnt 抑制剂。例如,所述 wnt 抑制剂是 dickkopf 同系物 1(DKK1)。

[0059] 在一个具体实施方式中,本发明提供了一种由干细胞产生心肌细胞的方法,所述方法包括:1) 将干细胞与试剂如 bFGF 和 BMP 4 相接触以起始干细胞分化;2) 经所述试剂如 bFGF 和 BMP 4 处理的干细胞与另一种试剂如 Activin A 相接触以形成中胚层;3) 已分化形成中胚层的干细胞与 BMP 拮抗剂例如 Noggin 相接触,以提高所述干细胞的心肌分化效率;4) 抑制经 BMP 拮抗剂如 Noggin 处理的干细胞内的维甲酸信号通路以促进心肌细胞形成;以及 5) 经 BMP 拮抗剂如 Noggin 处理的干细胞与 wnt 抑制剂例如 DKK1 相接触,使所述干细胞分化为心肌细胞。还提供了由上述方法产生的心肌细胞。

[0060] 在另一具体实施方式中,本发明提供了一种由干细胞产生心肌细胞的方法,所述方法包括:1) 将干细胞与 bFGF 和 BMP 4 相接触;2) 经 bFGF 和 BMP 4 处理的干细胞与 Activin A 相接触;3) 经 Activin A 处理的干细胞与 Noggin 相接触;4) 抑制经 Noggin 处理的干细胞内的维甲酸信号通路;以及 5) 经 Noggin 处理的干细胞与 DKK1 相接触。还提供了由上述方法产生的心肌细胞。

[0061] 还提供了由上述方法产生的心肌细胞。所述心肌细胞可以有一种心室特定基因例如 IRX-4 或 MLC-2v 表达水平升高、胚胎心室样动作电位 (AP) 和 / 或心肌细胞的典型  $Ca^{2+}$  火花模式。

[0062] 进一步提供了包含已分化形成中胚层并经抑制干细胞内维甲酸信号通路的外源性试剂处理的干细胞的组合物。所述外源性试剂可以是任意适宜的抑制干细胞内维甲酸信号通路的试剂。在一个例子中,所述抑制干细胞内维甲酸信号通路的外源性试剂是泛视黄酸受体拮抗剂如 BMS-189453。在另一个例子中,通过所述干细胞与 BMS-453、AGN194310、ANG193109、Ro41-5253、SR11335、9- 顺式维甲酸或抑制维甲酸合成的小分子例如双硫仑和柠檬醛相接触以抑制维甲酸信号通路。

[0063] 促进心房肌细胞形成的方法和组合物及其生产的心房肌细胞

[0064] 在又一方面,本发明提供了一种促进心房肌细胞由干细胞形成的方法,所述方法包括刺激或不抑制已分化形成中胚层的干细胞的维甲酸信号通路。

[0065] 该方法可用于促进任意适宜干细胞向心房肌细胞的分化形成。该方法可用于促进心房肌细胞由全能、多能、专能、寡能或单能干细胞形成。在另一例子中,该方法可用于促进心房肌细胞由胚胎干细胞、诱导的多能干细胞、胎儿干细胞或成人干细胞形成。在又一例子

中,该方法可用于促进心房肌细胞由哺乳动物干细胞例如人类干细胞形成。在又一例子中,该方法可用于促进心房肌细胞由人类胚胎干细胞或人类诱导多能干细胞形成。

[0066] 所述干细胞可通过任意适宜处理或试剂诱导以分化形成中胚层。在一个例子中,通过未分化干细胞与碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、BMP 4 和 / 或 Activin A 相接触,所述干细胞被诱导分化以形成中胚层。在另一例子中,通过未分化干细胞与碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、BMP 4 和 Activin A 相接触,所述干细胞被诱导分化以形成中胚层。所述干细胞可经 bFGF、BMP 4 和 Activin A 以任意适宜顺序处理。例如,通过未分化干细胞与 Activin A 接触前与碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和 BMP 4 相接触,所述干细胞可被诱导分化以形成中胚层。在另一例子中,通过未分化干细胞与 wnt-3a (Tran, T. H 等 .Wnt3a-induced mesoderm formation and cardiomyogenesis in human embryonic stem cells. Stem Cells 27,1869-1878 (2009)) 或一种作用或功能类似于 wnt-3a 的小分子例如 Bio 或 CHIR99021 相接触,所述干细胞可被诱导分化以形成中胚层。

[0067] 该方法可进一步包括所述干细胞与 BMP 拮抗剂相接触以提高心肌分化效率。任意适宜的 BMP 拮抗剂可用于该方法。例如,可应用 BMP4 拮抗剂。在另一例子中,所述 BMP 拮抗剂是 Noggin。在又一例子中,所述 BMP 拮抗剂是 Chordin, Tsg、DAN 家族成员 (Yanagita, M. BMP antagonists: their roles in development and involvement in pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rev 16,309-317, (2005)), BMP 可溶性受体例如 BMPRI A 和 BMPRI B, 或一种作用或功能类似于 BMP 拮抗剂的小分子例如 Dorsomorphin (Hao, J 等 .Dorsomorphin, a selective small molecule inhibitor of BMP signaling, promotes cardiomyogenesis in embryonic stem cells. PLoS One 3, e2904 (2008))。

[0068] 可通过任意适宜处理或试剂刺激干细胞中的维甲酸信号通路。在一个例子中,通过所述干细胞与维甲酸或维生素 A 相接触而刺激干细胞中的维甲酸信号通路。在另一例子中,通过所述干细胞与维甲酸受体激动剂例如 LG100268 和 LGD1069 相接触而刺激干细胞中的维甲酸信号通路。

[0069] 在一个特定的例子中,所述干细胞是人类胚胎干细胞或人类诱导多能干细胞,所述 BMP 拮抗剂是 Noggin, 并且通过所述干细胞与维甲酸或维生素 A 相接触刺激维甲酸信号通路。

[0070] 该发明可以进一步包括所述干细胞与 wnt 抑制剂相接触以使所述干细胞分化为心房肌细胞。可应用任意适宜的 wnt 抑制剂。在一个例子中,所述 wnt 抑制剂是 dickkopf 同系物 1 (DKK1)。

[0071] 在一个具体实施方式中,本发明提供了一种用于由干细胞产生心房肌细胞的方法,所述方法包括:1) 将干细胞与试剂如 bFGF 和 BMP 4 相接触以起始干细胞分化;2) 经所述试剂如 bFGF 和 BMP 4 处理的干细胞与另一种试剂如 Activin A 相接触以形成中胚层;3) 已分化形成中胚层的干细胞与 BMP 拮抗剂例如 Noggin 相接触,以提高所述干细胞的心肌分化效率;4) 刺激或不抑制经 Noggin 处理的干细胞内的维甲酸信号通路以促进心房肌细胞形成;以及 5) 经 Noggin 处理的干细胞与 DKK1 相接触使所述干细胞分化为心房肌细胞。还提供了由上述方法产生的心房肌细胞。

[0072] 在另一具体实施方式中,本发明提供了一种用于由干细胞生成心房肌细胞的方法

法,所述方法包括:1)将干细胞与bFGF和BMP 4相接触;2)经bFGF和BMP 4处理的干细胞与Activin A相接触;3)经Activin A处理的干细胞与Noggin相接触;4)刺激或不抑制经Noggin处理的干细胞内的维甲酸信号通路;以及5)经Noggin处理的干细胞与DKK1相接触。还提供了由上述方法产生的心房肌细胞。

[0073] 还提供了由上述方法生产的心房肌细胞。在一个例子中,心房肌细胞可具有胚胎心房样动作电位(AP)和/或心房肌细胞典型的Ca<sup>2+</sup>火花模式。

[0074] 进一步提供了包含已分化形成中胚层并经刺激所述干细胞内维甲酸信号通路的外源性试剂处理的干细胞的组合物。可应用任意适宜的外源性试剂刺激干细胞内的维甲酸信号通路。在一个例子中,所述刺激干细胞内维甲酸信号通路的外源性试剂是维甲酸或维生素A。

[0075] 心肌细胞的药物组合物及其用途

[0076] 所述心肌细胞可用于任何合适的目的。一方面,本发明提供了一种用于治疗心脏损伤或紊乱的药物组合物,其中所述药物组合物包含有效量的经上述方法生产的心肌细胞,以及任选的药学上可接受载体或赋形剂。在一个具体实施方式中,所述药物组合物包含心房肌细胞和心室肌细胞的混合物。在另一个具体实施方式中,所述药物组合物包含至少约50%,优选至少约60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%的心房肌细胞。在又一个具体实施方式中,所述药物组合物包含至少约50%,优选至少约60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%的心室肌细胞。

[0077] 另一方面,本发明提供了一种用于治疗受试者如人类的心脏损伤或紊乱的方法,其中所述方法包含给有此需要或期望的受试者施用有效量的上述药物组合物。

[0078] 所述心肌细胞的配方、剂量以及施用途径,是否主要是心房肌细胞、主要是心室肌细胞或者是心房肌细胞与心室肌细胞的混合物,优选的药物组合物形式,可通过本领域已知的方法确定(参见例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro(编辑)Mack Publishing Company,1997年4月;Therapeutic Peptides and Proteins:Formulation, Processing, and Delivery Systems, Banga,1999;以及Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, Hovgaard和Frkjr(编辑), Taylor & Francis, Inc.,2000;Medical Applications of Liposomes, Lasic和Papahadjopoulos编辑), Elsevier Science,1998;Textbook of Gene Therapy, Jain, Hogrefe & Huber Publishers,1998;Adenoviruses:Basic Biology to Gene Therapy, 第15卷, Seth, Landes Bioscience,1999;Biopharmaceutical Drug Design and Development, Wu-Pong和Rojanasakul(编辑), Humana Press,1999;Therapeutic Angiogenesis:From Basic Science to the Clinic, 第28卷,Dole等(编辑), Springer-Verlag New York,1999)。在特定的具体实施方式中,所述心肌细胞可以与内皮细胞、平滑肌细胞和/或成纤维细胞组合或配制,并移植入心脏。所述细胞或组织补片可通过直接注射至梗死区移植,以导管注射或作为心脏补片通过手术移植。优选地,所述心肌细胞由待治疗受试者的干细胞形成。另外,优选所述内皮细胞、平滑肌细胞和/或成纤维细胞也从待治疗受试者获得或衍生,如从待治疗受试者的干细胞形成。

[0079] 所述心肌细胞可被配制用于任意适宜的施用途径。在一个例子中,所述心肌细胞通过手术或细胞移植来施用。在任意给定案例中的最适施用途径取决于待治疗状况的性质

和严重程度,以及取决于待应用特定心肌细胞的性质。

[0080] 所述心肌细胞可单独施用。或者并且更好,所述心肌细胞与药学上可接受的载体或赋形剂共施用。任意适宜的药学上可接受载体或赋形剂可用于该发明(参见例如, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro(编辑) Mack Publishing Company, 1997年4月)。

[0081] 该方法可单独应用。或者,该方法可用于与适于预防、治疗或延迟心脏损伤、疾病或紊乱的其它试剂组合。此种其它试剂可以在所述心肌细胞施用之前、同时或之后应用。例如,所述心肌细胞可以与此种其它试剂共施用。

[0082] 根据本发明,单独或与其它试剂、载体或赋形剂组合的所述心肌细胞可被配制用于任意适宜施用途径,例如手术或细胞移植。所述方法可应用于单剂量形式施用的配方,在安瓿中或多剂量容器中,具有添加的防腐剂。所述配方可采用例如在油性或水性载体中的悬浮液、溶液或乳液的形式,并且可含有配制剂例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者,所述活性成分可以是在使用前与合适载体、无菌无热原水或其它溶剂组合的粉末形式。

[0083] 可用于本发明应用的药学上可接受的组合物及其施用方法包括但不限于美国专利 5,736,154 ;6,197,801 B1 ;5,741,511 ;5,886,039 ;5,941,868 ;6,258,374 B1 ;以及 5,686,102 所描述的那些。

[0084] 治疗或预防中治疗剂量的大小随待治疗状况的严重程度及施用途径变化。所述剂量并且也许剂量频率也根据年龄、体重、状况以及单个患者的反应而变化。

[0085] 应当注意的是,主治医生应当知晓依据毒性或不良反应如何以及何时终止、中止或调整疗法以降低剂量。反之,如果临床反应不足,医生也应当知晓如何以及何时调整治疗至更高水平(排除毒副反应)。

[0086] 可以应用任意适宜的施用途径。制剂形式包括片剂、锭剂、扁囊剂、分散液、悬浮液、溶液、胶囊、贴片等等。参见 Remington's Pharmaceutical Sciences。

[0087] 在特定应用中,单独或与其它试剂组合的心肌细胞可根据传统药物配制技术,在紧密混合物中作为活性成分与药学载体或赋形剂例如  $\beta$ -环糊精以及 2-羟基-丙基- $\beta$ -环糊精组合。所述载体可采用合适的给药所需的广泛制剂形式。在制备用于胃肠外制剂形式诸如静脉注射或滴注的组合物时,可应用本领域技术人员已知的类似水、二醇类、油、缓冲液、糖、防腐剂、脂质体等等的药物基质。此类胃肠外组合物的例子包括但不限于 5% w/v 的葡萄糖、生理盐水或其它溶液。单独或与其它待施用试剂组合的心肌细胞的总剂量可以以约  $1 \times 10^3$  至  $1 \times 10^{10}$  细胞范围的小瓶液体施用,如  $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$  或  $1 \times 10^{10}$  细胞,或  $1 \times 10^3$  至  $1 \times 10^{10}$  细胞范围内的任意子区间。

[0088] 本发明还提供了执行本发明治疗方案的试剂盒。这种试剂盒包含一个或多个容器内的药学可接受形式的单独或与其它试剂组合的治疗有效量心肌细胞。优选的药物形式是与无菌生理盐水、葡萄糖溶液或缓冲溶液或其它药学可接受无菌液体相组合。或者,所述组合物可以是冻干或干燥的,在这种情况下,所述试剂可选地进一步包含容器内的药学上可接受溶液,优选无菌的,以重新组成复合物而形成注射用溶液。示例性的药学上可接受溶液是生理盐水和葡萄糖溶液。

[0089] 在另一个具体实施方式中,本发明的试剂盒进一步包含用于注射所述组合物的优选无菌形式包装的针或注射器,和/或包装的酒精垫。可选地包括由医生或病人施用组合



物的说明书。

#### [0090] 心肌细胞的其它应用

[0091] 所述心肌细胞可用于任何合适的目的。在一个具体实施方式中,本发明提供了用于鉴定心肌细胞调节剂的方法,所述方法包括:1) 经上述方法产生的心肌细胞与测试物质相接触,并检测测试物质对所述心肌细胞特性的影响;2) 检测未与所述测试物质相接触的心肌细胞的特性;据此,与测试物质相接触的心肌细胞特性不同于未与测试物质相接触的心肌细胞特性,鉴定了所述测试物质是心肌细胞特性的调节剂如刺激剂或抑制剂。在一个例子中,与测试物质接触心肌细胞的特性相对于未与测试物质接触心肌细胞特性的增长,鉴定了所述测试物质是心肌细胞特性的刺激剂。在另一例子中,与测试物质接触心肌细胞的特性相对于未与测试物质接触心肌细胞特性的降低,鉴定了所述测试物质是心肌细胞特性的抑制剂。

[0092] 所述方法可以以任何适当的形式进行。优选所述方法以高通量筛选 (HTS) 形式进行。

## 实施例

### [0093] 摘要

[0094] 尽管细胞移植研究已提示心肌梗塞治疗潜力的前景,无法获得用于移植的相对均匀的心室肌细胞是心肌修复临床治疗发展的主要障碍<sup>1</sup>。人类胚胎干细胞 (hESC) 是心肌细胞的有前景的来源。在此,我们报道了维甲酸信号调节 hESCs 心肌分化期间的心房肌细胞与心室肌细胞的分化命运。我们发现,Noggin 和维甲酸受体拮抗剂 BMS-189453 (RAi) 显著增加 hESCs 的心肌分化效率<sup>2</sup>。通过比较 Noggin+RAi 处理培养物与 Noggin+RA 处理培养物调查维甲酸功能,我们的结果显示,在 Noggin+RAi 处理培养物中,心室特异性基因 IRX-4 的表达水平得到根本提升<sup>3</sup>,而另一种心室特异性标记 MLC-2v<sup>4,5</sup>,在 Noggin+RAi 处理培养物的大多数心肌细胞中表达,但不表达于 Noggin+RA 处理培养物。流式细胞分析及电生理研究提示,在 64±0.88% (平均值 ± 均数标准误差) 心肌分化效率情况下,Noggin+RAi 处理培养物中 83% 的心肌细胞具有胚胎心室样动作电位 (AP);然而,在 50±1.76% 心肌分化效率情况下, Noggin+RA 处理培养物中 94% 的心肌细胞具有胚胎心房样 APs。两种不同处理培养物中心肌细胞 Ca<sup>2+</sup> 火花模式及特性的图形研究进一步确证了这些结果。这些发现证明了维甲酸信号指定了 hESCs 的心房肌细胞与心室肌细胞分化,并且相对均匀的胚胎心房样肌细胞及心室样肌细胞群可通过特异性调节 Noggin 及维甲酸信号由 hESCs 高效分化产生。

### [0095] 总结

[0096] 尽管细胞移植研究已提示心肌梗塞治疗潜力的前景,无法获得用于移植的相对均匀的心室肌细胞是心肌修复临床治疗发展的主要障碍<sup>1</sup>。人类胚胎干细胞 (hESC) 是心肌细胞的有前景的来源。在此,我们报道了维甲酸信号调节 hESCs 心肌分化期间的心房肌细胞与心室肌细胞的分化命运。我们发现,Noggin 和维甲酸受体拮抗剂 BMS-189453 (RAi) 显著增加 hESCs 的心肌分化效率<sup>2</sup>。通过比较 Noggin+RAi 处理培养物以及 Noggin+RA 处理培养物调查维甲酸功能,我们的结果显示,在 Noggin+RAi 处理培养物中,心室特异性基因 IRX-4 的表达水平得到根本提升<sup>3</sup>,而另一种心室特异性标记 MLC-2v<sup>4,5</sup>,在 Noggin+RAi 处理培养物的大多数心肌细胞中表达,但不表达于 Noggin+RA 处理培养物。流式细胞分析及电生理研

究提示,在  $64 \pm 0.88\%$  (平均值  $\pm$  均数标准误差) 心肌分化效率情况下, *Noggin*+*RAi* 处理培养物中  $83\%$  的心肌细胞具有胚胎心室样动作电位 (AP); 然而, 在  $50 \pm 1.76\%$  心肌分化效率情况下, *Noggin*+*RA* 处理培养物中  $94\%$  的心肌细胞具有胚胎心房样 APs。两种不同处理培养物中心肌细胞  $\text{Ca}^{2+}$  火花模式及特性的图形研究进一步确证了这些结果。这些发现证明了维甲酸信号指定了 hESCs 的心房肌细胞与心室肌细胞分化, 并且相对均匀的胚胎心房样肌细胞及心室样肌细胞群可通过特异性影响 BMP 与维甲酸信号级联由 hESCs 高效分化产生。

#### [0097] 材料和方法

[0098] hESCs 的维持培养和分化。WiCell 研究所来源的未分化 hESC 细胞系 H7 如前所述培养在基底膜涂层平板上<sup>37</sup>。在基础的心肌诱导方案中, 未分化 hESCs 以  $1-5 \times 10^5$  细胞/ $\text{cm}^2$  的密度植于明胶涂层平板上, 并以小鼠胚胎成纤维细胞条件培养基培养 3 天直至完全融合。为起始细胞分化, 所述培养基更换为添加 B27 (Invitrogen) 的 RPMI1640 (Invitrogen)。在第 1 天以  $25\text{ng/ml}$  BMP4 和  $6\text{ng/ml}$  bFGF、第 2 天以  $100\text{ng/ml}$  activin A、并且在第 6-11 天以  $200\text{ng/ml}$  DKK1 (R&D Systems) 处理细胞。第 11 天后每 3 天更换一次培养基 (图 1)。在图 1A-C 所指定的时间点向细胞培养液添加  $250\text{ng/ml}$  *Noggin*、 $1\ \mu\text{M}$  *RA* (Sigma) 或  $1\ \mu\text{M}$  *RAi*。通常在第 10-11 天观察自发跳动的集群。在第 14 天以 CTNT 抗体染色和流式细胞仪分析心肌分化效率。

[0099] hESC 分化产生心肌细胞的单细胞制备。在低  $\text{Ca}^{2+}$  溶液中洗涤 60-90 日龄的分化培养物, 并随后在酶溶液中  $37^\circ\text{C}$  孵育 20 分钟。通过在 KB 溶液中室温轻轻振摇 40 分钟完成解离。分离的细胞在添加  $10\%$  FBS 的 DMEM 中重悬, 并转移至  $0.1\%$  明胶涂层盖玻片上, 并随后保留在孵育箱,  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$ 。所述低  $\text{Ca}^{2+}$  溶液组合物是 (单位为 mM)  $120\text{NaCl}$ 、 $5.4\text{KCl}$ 、 $5\text{MgSO}_4$ 、 $5$  丙酮酸钠、 $20$  葡萄糖、 $20$  牛磺酸、 $10\text{HEPES}$ 。以 NaOH 调节 pH 至 7.3。KB 溶液含有 (单位为 mM)  $85\text{KCl}$ 、 $30\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $5\text{MgSO}_4$ 、 $1\text{EGTA}$ 、 $2\text{Na}_2\text{ATP}$ 、 $5$  丙酮酸钠、 $20$  葡萄糖、 $20$  牛磺酸、 $5$  肌酸, 以 KOH 调节至 pH7.3。

[0100] 电生理测量以及  $\text{Ca}^{2+}$  共聚焦图像。室温下应用 Axon 200B 放大器 (Axon Instruments), 心肌细胞的动作电位记录于全细胞膜片钳。数据在  $20\text{kHz}$  数字化并在  $2\text{kHz}$  过滤, 并且通过 PClamp 9.0 分析。膜片钳移液器 ( $2-4\text{M}\Omega$  电阻) 中装满含有 (为 mM)  $50\text{KCl}$ 、 $60\text{K-Aspartate}$ 、 $1\text{MgCl}_2$ 、 $3\text{Na}_2\text{ATP}$ 、 $10\text{EGTA}$ 、 $10\text{mM}$  HEPES 的细胞内液, 以 KOH 调节至 pH 7.3。普通台氏液 (Tyrode's solution) 用作细胞外溶液并且含有 (为 mM)  $140\text{NaCl}$ 、 $\text{KCl}$ 、 $1\text{CaCl}_2$ 、 $1\text{MgCl}_2$ 、 $10$  葡萄糖、 $10\text{HEPES}$ , 以 NaOH 调节至 pH 7.4。

[0101] 对于  $\text{Ca}^{2+}$  共聚焦图像, 心肌细胞与 Fluo-4AM ( $10\ \mu\text{M/L}$ ; 分子探针) 在室温共孵育 10 分钟, 并随后以细胞外缓冲液灌注约 30 分钟。在装配有氩离子激光器 ( $488\text{nm}$ ) 的 Leica SP5 共聚焦显微镜上应用  $1.25\text{NA}$  油浸物镜以  $40\times$  放大倍数进行  $\text{Ca}^{2+}$  图像研究。应用线扫描记录自发的  $\text{Ca}^{2+}$  火花以及  $\text{Ca}^{2+}$  瞬变,  $0.5\text{ms}$  每行获取。应用 MATLAB 7.1 软件 (MathWorks) 和 ImageJ (Scioncorp) 处理和分析图像。 $\text{Ca}^{2+}$  火花的检测标准设置为  $3.8 \times \text{SD}$ , 并应用于 ImageJ 的 Sparkmaster 插件进行  $\text{Ca}^{2+}$  火花的自动计数<sup>38</sup>。

[0102] 流式细胞术。分化的细胞群以  $0.25\%$  胰蛋白酶-EDTA 解离为单个细胞, 其随后以抗人 CTNT 抗体 (R&D Systems) 和山羊抗小鼠 FITC 偶联第二抗体 (Santa Cruz) 在添加  $0.5\%$  BSA 和  $0.1\%$  皂素 (Sigma) 的 PBS 中  $4^\circ\text{C}$  固定及染色。染色的细胞保存在  $4\%$  多聚甲醛中用于后续的定量分析。应用 FACScalibur (Becton Dickinson) 收集数据并以 FlowJo

软件 (Treestar) 分析。

[0103] 实时 RT-PCR。应用 Qiagen 公司的 RNeasy Plus Mini 试剂盒由已分化 hESC 细胞 24 孔板的单孔中提取总 RNA。然后, 1  $\mu$ g 的总 RNA 以 SuperScript III First-Strand 合成系统 (Invitrogen) 逆转录。应用 rTaq DNA 聚合酶 (Takara) 进行 RT-PCR。实时 PCR 应用 2x QuantiFast SYBR Green I PCR Master Mix (Qiagen) 在 Rotor Gene 6200 实时 PCR 仪 (Corbett) 上一式三份进行, 退火温度为 60 $^{\circ}$ C。每种基因的表达以 GAPDH 基因表达标准化。表 2 中列出了引物序列。

[0104] 免疫荧光。60 日龄的分化培养物以 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化, 并且所述细胞置于明胶涂层盖玻片上 5 天, 以使完全贴附发生。随后细胞在 4% 多聚甲醛中固定, 并与第一抗体小鼠抗人 CTNT (R&D systems)、小鼠抗人  $\alpha$ -辅肌动蛋白 (Sigma)、小鼠抗人  $\beta$ -MHC (ATCC)、小鼠抗人 MLC-2a (Synaptic Systems) 或兔抗人 MLC-2v (ProteinTech Group) 孵育。需要时, 应用与 DyLight 488 偶联的山羊抗小鼠第二抗体 (Santa Cruz Biotechnology) 以及与 Tritec 偶联的山羊抗兔第二抗体 (Santa Cruz Biotechnology)。在细胞核以 4', 6-二脒-2-苯基吲哚 (DAPI, Sigma) 染色后, 可应用 Olympus 显微镜系统 X51 或 Olympus LSCM FV1000 观察并记录免疫荧光图像。

[0105] 免疫印迹 (Western blotting)。60 日龄分化细胞 24 孔板的一个孔以 RIPA 裂解缓冲液 (Biomiga) 裂解用于免疫印迹。印迹与小鼠抗人 CTNT、小鼠抗人  $\beta$ -MHC、兔抗人 MLC-2v、山羊抗 ANF、小鼠抗人 MLC-2a、小鼠抗人  $\beta$ -actin、兔抗磷酸化 smad1/5/8 以及兔抗 smad1/5/8 分别孵育, 并随后与 HR 缀合的山羊抗小鼠或抗兔抗体孵育。

[0106] 表 1 由 hESC 衍生心肌细胞记录的 AP 参数。

[0107]

	n(细胞)	Vmax(V/s)	APA(mV)	APD90(ms)	MDP(mV)
起搏	6	7.3 $\pm$ 4.2	74.5 $\pm$ 8.9#	147.6 $\pm$ 26.8\$	-51.3 $\pm$ 8.2†
心房样	36	12.8 $\pm$ 3.1*	81.6 $\pm$ 11.5#	168.8 $\pm$ 26.8 \$	-55.5 $\pm$ 6.5†
心室样	42	11.4 $\pm$ 2.8*	86.8 $\pm$ 12.4#	285.8 $\pm$ 52.6\$	-62.3 $\pm$ 8.6†

[0108] 表 1 由 hESC 衍生心肌细胞记录的 AP 参数。数据为平均值  $\pm$  标准误差。n 表示测试细胞数。Vmax, AP 增长的最大速率; APA, AP 振幅; APD90, 90% 再极化时测得的 AP 持续时间; MDP, 最大舒张电位。\*P < 0.05 与起搏比较; #P < 0.05 互相比; \$P < 0.01 互相比; 以及 †P < 0.05 互相比。

[0109] 表 2 用于 qPCR 的引物序列。

[0110]

基因	正向引物	反向引物	Tm
NXK2.5	Aacctcaacagctccctgactct	ataatcgccgccacaaactctcc	60 $^{\circ}$ C
CTNT	Ttcaccaagatctgctcctcgct	ttattactggtgtggagtgggtgtgg	60 $^{\circ}$ C
IRX4	Ttccgttctgaagcgtggtc	tgaagcaggcaattattggtgt	60 $^{\circ}$ C

GAPDH	Gaaatcccatcaccatcttccagg	gagccccagccttctccatg	60°C
-------	--------------------------	----------------------	------

[0111] 结果

[0112] 基于以往的研究,我们猜想 hESC 分化起始之后 BMP 通路的抑制以及维甲酸信号的阻断促进了心脏发生;维甲酸信号还调节 hESCs 的心房与心室分化。为证实这些猜想,我们尝试在不同时间间隔内将 Noggin、RA 及其抑制剂 RAi 加入培养的向心肌分化的人胚胎干细胞中,并探讨它们在心脏发生以及 hESC 细胞心肌分化过程中对的心肌亚型特化上的影响。我们的结果显示,利用 Noggin 和 RAi 对 BMP 和 RA 信号抑制可以显著促进干细胞向心肌细胞分化,并且维甲酸信号调控 hESCs 向心房肌细胞与心室肌细胞的特化。本方法不仅揭示了心肌亚类特化的调控机制,而且还提供了将 hESCs 定向分化成相对均匀胚胎心房样肌细胞及心室样肌细胞的方法。

[0113] Noggin 和 RA 拮抗剂 BMS189453 促进已分化 hESCs 的心脏发生。为探讨心肌分化中 Noggin 的功能,第 2-5 天以不同时间间隔系统地向心肌细胞分化 hESC 培养物添加 Noggin,所述培养物是由我们实验室开发的方案生产的(参见发明详述的方法部分)。结果显示,当第 2 天和第 3 天之间存在 Noggin 时,心肌分化被轻微抑制,但在第 2.5 天和第 4.5 天之间被显著促进。第 4 天和第 5 天之间达到最高心肌分化效率(图 1B)。磷酸化 Smad1,5,8 的免疫印迹表明,Noggin 降低了 BMP 信号的活性(未显示数据)。因此,分化起始后 BMP 信号的抑制促进了 hESCs 的心脏发生。

[0114] 以往发现证明 RA 信号限制胚胎心脏祖细胞生成,提示通过抑制 RA 信号可以提高 hESCs 向心肌细胞分化的效率。维生素 A,既 RA 合成的底物,以及 RALDH2,负责 RA 合成的酶<sup>24</sup>,均存在于我们的干细胞培养物(未显示数据),提示在干细胞培养物 RA 信号可能已被激活。我们通过在图 1C 所示的时间点向我们的第 4-9 天间的干细胞心肌分化培养物添加 RAi,从而测试了 RA 抑制在促进 hESC 心肌分化上的影响。流式细胞分析显示,当 RAi 在第 6-9 天间加入后,心肌分化显著提高(图 1C),证明 RA 信号抑制促进了 hESCs 的心肌分化。

[0115] 接下来,我们结合了第 4 天和第 5 天的 Noggin 处理,以及第 6-8 天的 RAi 处理。第 14 天培养物中 CTNT<sup>+</sup> 细胞的流式细胞分析显示,仅以 Noggin 处理,分化效率为 50% ± 3.06% (平均值 ± 平均数标准误),而当以 RAi 和 Noggin 同时处理时,分化效率增加至 73% ± 2.08% (图 1D)。这一结果也得到了对第 14 天培养物的定量 RT-PCR 分析实验结果的确认。Noggin+RAi 处理培养物中的 CTNT 及 NKX2.5 表达水平显著高于仅以 Noggin 处理的培养物(图 1E)。免疫染色表明了包括 CTNT、 $\alpha$ -辅肌动蛋白、MLC-2a、MLC-2v 和  $\beta$ -MHC 的典型心脏标志物在培养细胞中表达(图 1F)。

[0116] 调节维甲酸信号诱导 hESCs 分化为两种不同亚型的心肌细胞。由于鸡和小鼠的胚胎研究提示维甲酸信号调节心脏流入及流出区域组织的特化命运<sup>5,20-24</sup>,我们提出,激活或抑制维甲酸信号诱导已分化 hESC 心脏祖细胞向心房肌细胞或心室肌细胞的特化命运,并且这种机制可用于有效利用 hESC 产生的心房样或心室样肌细胞。

[0117] 为证实这种猜想,在平行实验的第 6-8 天的 Noggin 处理培养物中加入 RA 或其拮抗剂 RAi(图 1A)。在分化 14 天后,Noggin+RA 和 Noggin+RAi 处理培养物中 CTNT<sup>+</sup> 细胞的百分比分别为 50.7% ± 1.76% 和 64.7% ± 0.88% (图 2A)。虽然分化效率仅有约 14% 的差异,Noggin+RA 处理培养物中的搏动心肌细胞的大小比 Noggin+RAi 处理培养物中的小

(图 2B, D)。Noggin+RA 处理培养物中心肌细胞的搏动速率也比 Noggin+RAi 处理培养物中的快(图 2C 以及表 1),提示这两种不同培养物中存在两种不同亚型的心肌细胞。接下来,我们检测了两种培养物中的心室特异性表达基因 IRX4 和 MLC-2v 的表达。定量 RT-PCR 显示 Noggin+RAi 处理的培养物中,IRX4 表达在第 8 天开始上升,并且到第 14 天,其比 Noggin+RA 处理培养物中的高 10 倍(图 3A)。60 日龄培养物的免疫染色显示,MLC-2v 在经 Noggin+RAi 处理的大多数 CTNT<sup>+</sup> 细胞中表达,但在 Noggin+RA 处理的培养物中不表达(图 3B),与免疫的结果印迹相一致,提示着尽管 CTNT 在这两种培养物中表达水平相似,但是仅在 Noggin+RAi 处理的培养物中有 MLC-2v 高表达(图 3C)。我们还通过免疫染色和免疫印迹比较了 Noggin+RAi 处理、Noggin 处理及 Noggin+RA 处理培养物中的 cTNT 及 MLC-2v 的表达。结果表明,Noggin 单独处理的培养物中仅约 35% 的 cTNT 阳性细胞同时表达 MLC-2v,以及经免疫印迹检测到 MLC-2v 微弱表达(图 5)。这些结果表明 Noggin+RAi 处理培养物中的大多数心肌细胞是胚胎心室样肌细胞,而在 Noggin+RA 处理培养物中分化的心肌细胞是不表达 MLC-2v 的胚胎起搏心肌细胞或心房样心肌细胞。我们还通过免疫印迹检测了 RA 和 RAi 处理培养物中  $\beta$ -MHC、MLC-2a 以及心房营养因子 (ANF) 的表达,并且结果显示, $\beta$ -MHC 在两种培养物中均等表达,但 MLC-2a 和 ANF 在 RA 处理培养物中的表达水平高于 RAi 处理培养物中的表达水平(图 6)。

[0118] 电生理特性鉴定了由另一种维甲酸信号诱导的胚胎心房样及心室样肌细胞群。由于哺乳动物系统中缺乏内源性的早期心房肌细胞的特异性基因标记<sup>5</sup>,我们选择应用电生理特征以严格鉴定这两种心肌亚群。基于 AP 特性的形态及分类(表 1)<sup>6,26</sup>,在我们的研究中观察到三种主要类型的 AP(起搏、心房样以及心室样)(图 4A)。然而,Noggin+RA 处理以及 Noggin+RAi 处理培养物之间的三种主要类型 APs 的比例不同;Noggin+RAi 处理培养物中 83% 的心肌细胞(n = 23)具有心室样 APs(图 4A, C),其 APs 的持续时间可通过硝苯吡啶——一种钙通道抑制剂来缩短(图 4B, 左侧),而 Noggin+RA 处理培养物中 94% 的心肌细胞(n = 19)展示为心房样 AP,并且所述 AP 的持续时间不能被硝苯吡啶所缩短(图 4A, B 右侧以及 C)。这些结果证明 Noggin+RA 处理的培养物中的大多数心肌细胞是胚胎心房样肌细胞,以及 Noggin+RAi 处理的培养物中的大多数心肌细胞是胚胎心室样肌细胞。有趣的是,在 Noggin+RA 以及 Noggin+RAi 处理的培养物中,我们都没有观察到以往研究报道的高百分数的具有起搏 APs 的心肌细胞<sup>6,9</sup>。

[0119] 在心房与心室肌细胞中,心肌细胞 Ca<sup>2+</sup> 信号基本单位——Ca<sup>2+</sup> 火花中存在重要的动力学差异。心房肌细胞中的 Ca<sup>2+</sup> 火花显著地比心室肌细胞中的更大且更持久<sup>28,29</sup>。图像研究的结果提示,在 Noggin+RAi 处理的培养物中,87.5% (14/16) 的测试细胞展示了相对低振幅、上升时间快、半衰期衰减短以及小尺寸的 Ca<sup>2+</sup> 火花,典型的心室样肌细胞 Ca<sup>2+</sup> 火花特征(图 4D, E)。另一方面,在 Noggin+RA 处理的培养物中,81.8% (18/22) 的测试细胞展示了更高振幅、上升时间慢、半衰期衰减长以及更大尺寸的 Ca<sup>2+</sup> 火花(图 4D, E),提示 Noggin+RA 处理培养物中的心肌细胞是心房样肌细胞。两种不同处理培养物中 Ca<sup>2+</sup> 释放的动力学研究以及具有两种模式的心肌细胞的比例吻合并支持以往基于 AP 表型的心肌亚型分类。

[0120] 讨论

[0121] 我们的结果显示,心肌分化起始后 BMP 信号的抑制促进了 hESCs 的心脏发生。这与显示分化起始前施用 Noggin 促进了心脏发生的小鼠胚胎干细胞研究部分地一致<sup>13</sup>。Noggin

处理细胞与非处理细胞的进一步比较揭示,粒细胞集落刺激因子(G-CSF)促进了小鼠胚胎干细胞衍生的正在发育的心肌细胞的增殖<sup>30</sup>。Noggin支持hESCs的未分化增殖<sup>31</sup>,并且BMP4是小鼠胚胎干细胞自我更新所需的<sup>32</sup>。这些不同的自我更新机制可能是在人类及小鼠胚胎干细胞的心肌分化研究中所观察到的差异的原因。

[0122] 尽管免疫印迹揭示了ANF与MLC-2a的差异表达,两种基因均表达于60日龄的Noggin+RA及Noggin+RAi处理的培养物(图6)。这与Rosenthal博士的研究结果相一致,其表明在小鼠系统中没有早期心房特异性标记。取而代之的,他们应用接近840bp的鹌鹑SMYHC3启动子标记心脏发育最早期的窦房组织(sino-atrial tissue)<sup>5</sup>。

[0123] 鸡胚胎和小鼠胚胎的以往研究已提出,RA信号决定着窦房细胞的命运,而心室命运在缺乏RA的情况下指定<sup>20</sup>。我们的研究显示,阻断RA信号诱导了心室特异性标记MLC-2v在大多数hESC衍生的心肌细胞中表达,并且这些细胞具有心肌细胞典型的APs和Ca<sup>2+</sup>火花。外源性RA处理引导着hESCs分化为保留心房样APs以及大的Ca<sup>2+</sup>火花或Ca<sup>2+</sup>瞬变的心肌细胞。我们的结果证明了维甲酸信号的激活或抑制指示了已分化hESCs的向心房肌细胞与心肌细胞的特化。与我们的结果不同,以往研究显示,RA增强了由小鼠胚胎干细胞衍生的心肌细胞的发育<sup>33</sup>。这可能代表了这两个研究中应用的分化培养体系上的差异,拟胚体过程与平板培养体系,以及接纳RA的时间。

[0124] 由hESC衍生心肌细胞异质性所引起的室性心律失常的潜在风险是hESCs在心脏修复应用上的主要障碍<sup>1,6,10</sup>。由hESCs产生的相对均质心肌细胞在心肌修复中的应用具有降低这种风险的巨大潜力,解除了基于心肌修复策略开发hESC的主要障碍。组织工程的最新进展显示小鼠心室祖细胞可应用遗传标记途径从小鼠胚胎干细胞衍生物中分离出来,并用于产生功能性心室肌<sup>34</sup>,提示了人类功能性心室心脏肌肉可通过由hESCs直接分化的胚胎心室样肌细胞产生。通过一个成分确定的培养体系并且无须遗传操作,我们开发的直接分化步骤可以便捷地应用于心肌修复的临床研究。基于心肌修复开发hESC的另一挑战是快速产生移植所需大量心室肌细胞的生物技术的开发。我们的研究证实了通过减少拟胚体步骤,胚胎心房样及心室样肌细胞由hESCs有效分化,所述拟胚体步骤是通常用于胚胎干细胞心肌分化中的耗时步骤。如果与诱导多能干细胞(iPS)技术组合<sup>35,36</sup>,心房样与心室样肌细胞的程序性分化不仅可用于开发个性心脏修复的安全细胞来源,还可以开发提供心房或心室遗传疾病的细胞模型。

[0125] 参考文献:

[0126] 1Chen, H. S., Kim, C. & Mercola, M. Electrophysiological challenges of cell-based myocardial repair. *Circulation* 120, 2496-2508 (2009).

[0127] 2Schulze, G. E 等. BMS-189453, a novel retinoid receptor antagonist, is a potent testicular toxin. *Toxicol Sci* 59, 297-308 (2001).

[0128] 3Bao, Z. Z., Bruneau, B. G., Seidman, J. G., Seidman, C. E. & Cepko, C. L. Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by *Irx4*. *Science* 283, 1161-1164 (1999).

[0129] 4Fu, J. D 等. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger is a determinant of excitation-contraction coupling in human embryonic stem cell-derived ventricular cardiomyocytes. *Stem Cells Dev* (2009).

- [0130] 5Xavier-Neto, J 等 .A retinoic acid-inducible transgenic marker of sino-atrial development in the mouse heart. *Development* 126,2677-2687(1999).
- [0131] 6He, J. Q., Ma, Y., Lee, Y., Thomson, J. A. & Kamp, T. J. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* 93,32-39(2003).
- [0132] 7Laflamme, M. A 等. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 25,1015-1024(2007).
- [0133] 8Yang, L 等. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* 453,524-528(2008).
- [0134] 9Zhu, W. Z 等 .Neuregulin/ErbB Signaling Regulates Cardiac Subtype Specification in Differentiating Human Embryonic Stem Cells. *Circ Res* (2010).
- [0135] 10Kehat, I 等 .Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22,1282-1289(2004).
- [0136] 11Tran, T. H 等 .Wnt3a-induced mesoderm formation and cardiomyogenesis in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27,1869-1878(2009).
- [0137] 12Reppel, M 等 .Effect of cardioactive drugs on action potential generation and propagation in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* 19,213-224(2007).
- [0138] 13Yuasa, S 等 .Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23,607-611(2005).
- [0139] 14Marvin, M. J., Di Rocco, G., Gardiner, A., Bush, S. M. & Lassar, A. B. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev* 15, 316-327(2001).
- [0140] 15Schneider, V. A. & Mercola, M. Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev* 15,304-315(2001).
- [0141] 16Korol, O., Gupta, R. W. & Mercola, M. A novel activity of the Dickkopf-1 amino terminal domain promotes axial and heart development independently of canonical Wnt inhibition. *Dev Biol* 324,131-138(2008).
- [0142] 17Xu, R. H 等. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol* 20,1261-1264(2002).
- [0143] 18Zhang, P 等. Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. *Blood* 111,1933-1941(2008).
- [0144] 19Keegan, B. R., Feldman, J. L., Begemann, G., Ingham, P. W. & Yelon, D. Retinoic acid signaling restricts the cardiac progenitor pool. *Science* 307, 247-249(2005).
- [0145] 20Xavier-Neto, J 等 .Retinoid signaling and cardiac

anteroposteriorsegmentation. *Genesis* 31,97-104(2001).

[0146] 21Patwardhan, V. , Fernandez, S. , Montgomery, M. & Litvin, J. Therostro-caudal position of cardiac myocytes affect their fate. *Dev Dyn* 218,123-135(2000).

[0147] 22Orts-Llorca F, J. C. J. Determination of heart polarity (arterio venousaxis) in the chicken embryo. *Roux Arch Entwickl-lungsmechanik* 113,17(1967).

[0148] 23Yutzey, K. , Gannon, M. & Bader, D. Diversification of cardiomyogenic cell lineages in vitro. *Dev Biol* 170,531-541(1995).

[0149] 24Hochgreb, T 等. A caudorostral wave of RALDH2 conveysanteroposterior information to the cardiac field. *Development* 130,5363-5374, (2003).

[0150] 25Gassanov, N 等 . Retinoid acid-induced effects on atrial and pacemaker cell differentiation and expression of cardiac ion channels. *Differentiation* 76,971-980(2008).

[0151] 26Maltsev, V. A. , Rohwedel, J. , Hescheler, J. & Wobus, A. M. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* 44,41-50(1993).

[0152] 27Cheng, H. & Lederer, W. J. Calcium sparks. *Physiol Rev* 88,1491-1545(2008).

[0153] 28Woo, S. H. , Cleemann, L. & Morad, M. Spatiotemporal characteristics of junctional and nonjunctional focal Ca<sup>2+</sup> release in rat atrial myocytes. *Circ Res* 92, e1-11(2003).

[0154] 29Cleemann, L. , Wang, W. & Morad, M. Two-dimensional confocal images of organization, density, and gating of focal Ca<sup>2+</sup> release sites in rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95,10984-10989(1998).

[0155] 30Shimoji, K 等 . G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ESCs and iPSCs. *Cell Stem Cell* 6,227-237(2010).

[0156] 31Xu, R. H 等 . Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* 2, 185-190(2005).

[0157] 32Ying, Q. L. , Nichols, J. , Chambers, I. & Smith, A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115,281-292(2003).

[0158] 33Wobus, A. M 等 . Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29,1525-1539(1997).

[0159] 34Domian, I. J 等 . Generation of functional ventricular heart muscle from mouse ventricular progenitor cells. *Science* 326,426-429(2009).

[0160] 35Takahashi, K 等 . Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131,861-872(2007).

[0161] 36Yu, J 等. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic



cells. *Science* 318,1917-1920(2007).

[0162] 37Xu, C 等. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotech* 19,971-974(2001).

[0163] 38Picht, E., Zima, A. V., Blatter, L. A. & Bers, D. M. SparkMaster : automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C1073-1081(2007).

[0164] 上述出版物或文件的引用并非意在认可上述任何一项是相关的现有技术,其也不构成对这些出版物或文件的内容或日期的任何认可。

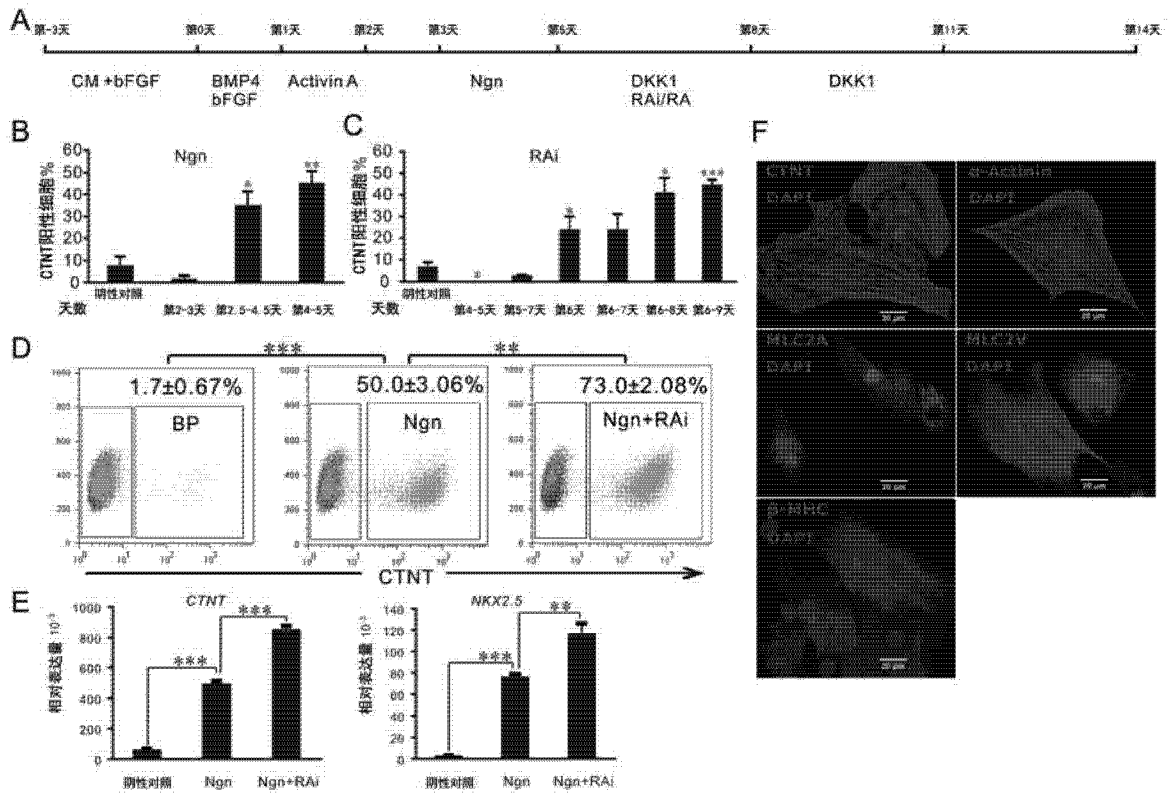


图 1Noggin(Ngn) 和 RA 抑制促进了 hESC 心肌分化

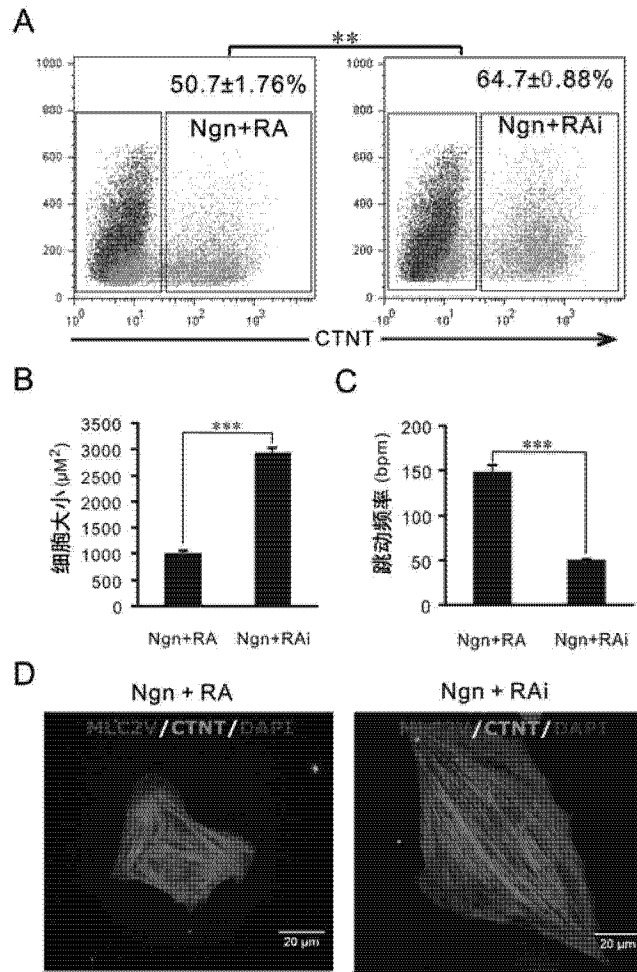


图 2 不同处理分化心肌细胞的形态和搏动速率

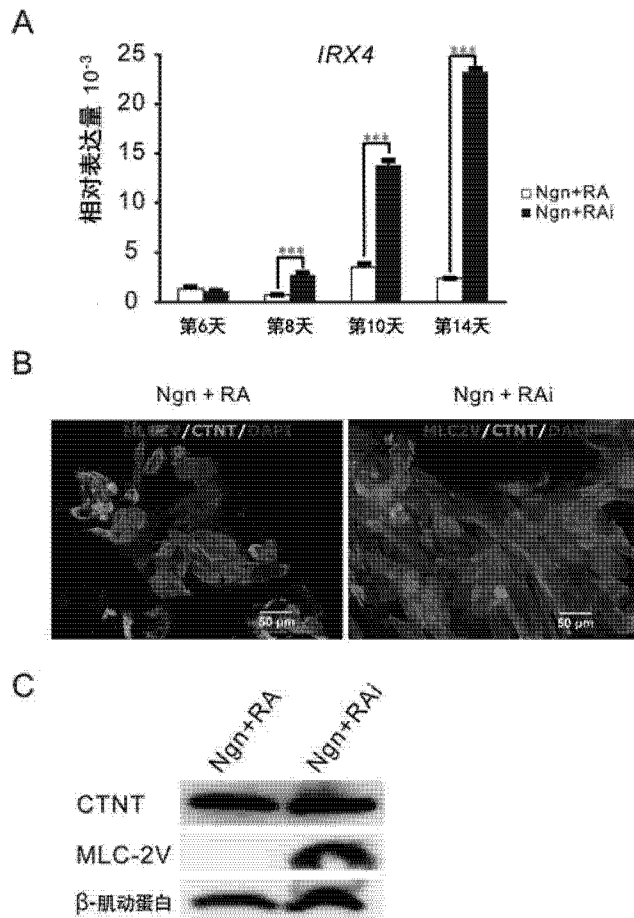


图 3 经 Ngn+RA 和 Ngn+RAi 诱导的 hESC 衍生心肌细胞的特征

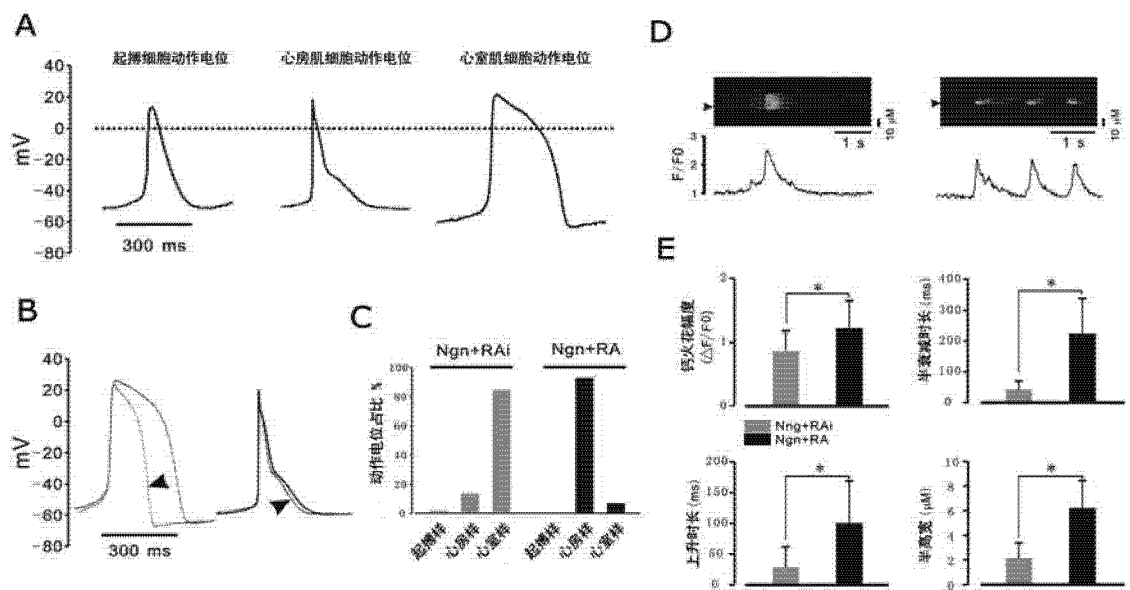


图 4 由 Ngn+RA 及 Ngn+RAi 诱导的心肌细胞的 AP 形态及 Ca<sup>2+</sup> 释放特性

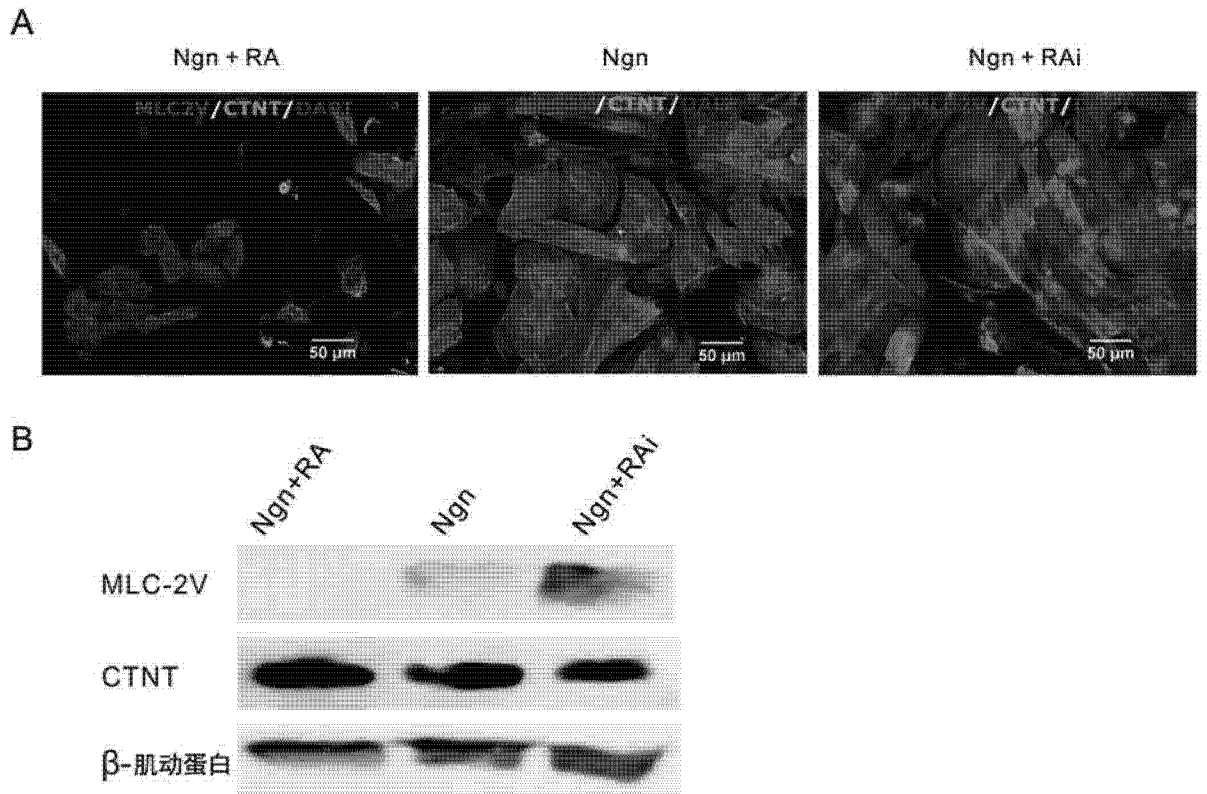


图 5 不同维甲酸处理的培养物中的 MLC-2v 表达

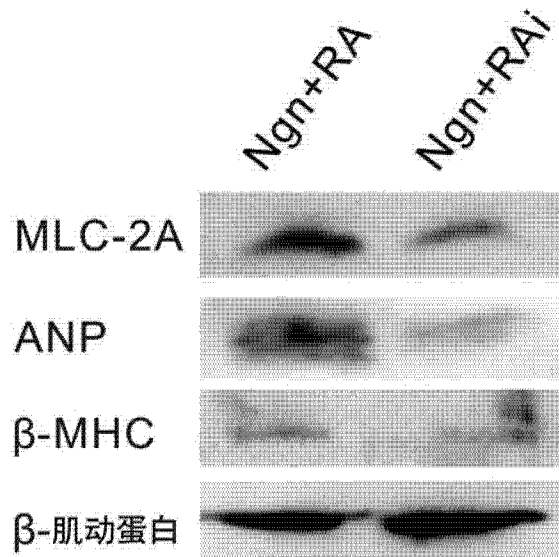


图 6 不同处理培养物中的心脏基因表达