



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108779435 A

(43)申请公布日 2018.11.09

(21)申请号 201680079866.3

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22)申请日 2016.12.07

代理人 梁谋 周齐宏

(30)优先权数据

62/264311 2015.12.07 US

(51)Int.Cl.

C12N 5/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 5/07(2006.01)

2018.07.24

C12N 5/077(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/065366 2016.12.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/100313 EN 2017.06.15

(71)申请人 生物时间公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 M.D.韦斯特 H.斯特恩伯格

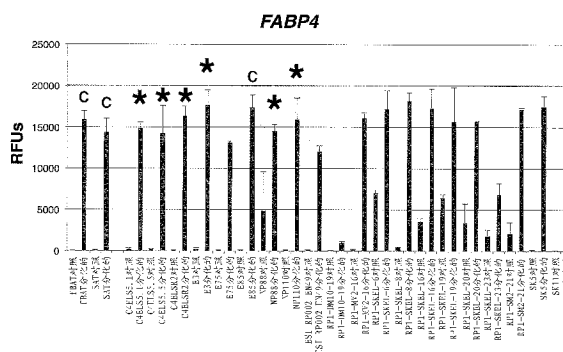
权利要求书4页 说明书65页 附图9页

(54)发明名称

用于重新衍生不同的多能干细胞衍生的褐色脂肪细胞的方法

(57)摘要

本发明的方面包括与可用于产生棕色脂肪细胞组织的细胞组分的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞类型的产生和应用有关的方法和组合物,其用于涉及在肥胖、糖尿病和心血管疾病中的应用的研究和治疗。



1. 一种生产褐色脂肪细胞的方法,其包括:

a. 提供多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述克隆胚胎祖细胞系表达*DIO3*、*DLK1*、*ZIC2*、*SLC1A3*和*SBSN*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA5*、*IL13RA2*、*DLX5*、*CRABP1*、*NEFM*、*PRG4*和*RBP1*中的一种或多种;

b. 在有PPAR γ (PPAR γ)激动剂存在下使所述多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系分化足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段,由此产生分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系;和

c. 针对*UCP1*标志物的表达筛选所述分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述*UCP1*标志物的存在鉴别出褐色脂肪细胞。

2. 一种生产褐色脂肪细胞的方法,其包括:

a. 提供多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述克隆胚胎祖细胞系表达*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*、*HEPH*、*NEFM*和*RBP1*,但是不表达*ZIC2*、*TPR*、*PRG4*、*IL13RA2*、*DLK1*和*SBSN*;

b. 在有PPAR γ 激动剂存在下使所述多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系分化足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段,由此产生分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系;和

c. 针对*UCP1*标志物的表达筛选所述分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述*UCP1*标志物的存在鉴别出褐色脂肪细胞。

3. 一种生产褐色脂肪细胞的方法,其包括:

a. 提供多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述克隆胚胎祖细胞系表达*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*、*DLK1*、*NEFM*和*RBP1*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*ZIC2*、*DLX5*、*PRG4*、*IL13RA2*、*CRABP1*和*SBSN*中的一种或多种;

b. 在有PPAR γ 激动剂存在下使所述多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系分化足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段,由此产生分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系;和

c. 针对*UCP1*标志物的表达筛选所述分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述*UCP1*标志物的存在鉴别出褐色脂肪细胞。

4. 一种生产褐色脂肪细胞的方法,其包括:

a. 提供多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述克隆胚胎祖细胞系表达*HOXA2*、*RBP1*和*ZIC2*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXB2*、*HOXA5*、*NEFM*、*PRG4*、*DLX5*、*IL13RA2*、*CRABP1*和*SBSN*中的一种或多种;

b. 在有PPAR γ 激动剂存在下使所述多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系分化足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段,由此产生分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系;和

c. 针对*UCP1*标志物的表达筛选所述分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述*UCP1*标志物的存在鉴别出褐色脂肪细胞。

5. 一种生产褐色脂肪细胞的方法,其包括:

a. 提供多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述克隆胚胎祖细胞系表达*HOXA2*、*HOXB2*、*DLX5*和*ZIC2*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA5*、*NEFM*、*PRG4*和*RBP1*中的一种或多种;

b. 在有PPAR γ 激动剂存在下使所述多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系分化足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段,由此产生分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系;和

c. 针对UCP1标志物的表达筛选所述分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述UCP1标志物的存在鉴别出褐色脂肪细胞。

6. 一种生产褐色脂肪细胞的方法,其包括:

a. 提供多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述克隆胚胎祖细胞系表达*HOXA2*、*DLK1*、*DLX5*、*PRG4*和*ZIC2*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXB2*、*HOXA5*、*GPC4*、*NEFM*、*IL13RA2*、*NTNG1*和*SBSN*中的一种或多种;

b. 在有PPAR γ 激动剂存在下使所述多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系分化足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段,由此产生分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系;和

c. 针对UCP1标志物的表达筛选所述分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述UCP1标志物的存在鉴别出褐色脂肪细胞。

7. 一种生产褐色脂肪细胞的方法,其包括:

a. 提供多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述克隆胚胎祖细胞系表达*CRABP1*、*SNAP25*、*PPP1R1B*、*PRG4*、*DLK1*、*ZIC2*和*PAPLN*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*、*DLX5*、*RBP1*和*IL13RA2*中的一种或多种;

b. 在有PPAR γ 激动剂存在下使所述多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系分化足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段,由此产生分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系;和

c. 针对UCP1标志物的表达筛选所述分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述UCP1标志物的存在鉴别出褐色脂肪细胞。

8. 一种生产褐色脂肪细胞的方法,其包括:

a. 提供多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述克隆胚胎祖细胞系表达*HOXA2*、*ZIC2*、*THY1*和*EFNB2*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*DLK1*、*PPP1R1B*和*GPC4*中的一种或多种;

b. 在有PPAR γ 激动剂存在下使所述多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系分化足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段,由此产生分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系;和

c. 针对UCP1标志物的表达筛选所述分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述UCP1标志物的存在鉴别出褐色脂肪细胞。

9. 一种生产褐色脂肪细胞的方法,其包括:

a. 提供多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述克隆胚胎祖细胞系表达*HOXA2*、*ZIC2*、*CD24*和*RBP1*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*DLK1*、*PPP1R1B*、*NEFM*和*GPC4*中的一种或多种;

b. 在有PPAR γ 激动剂存在下使所述多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系分化足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段,由此产生分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系;和

c. 针对UCP1标志物的表达筛选所述分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述UCP1标志物的存在鉴别出褐色脂肪细胞。

10. 一种生产褐色脂肪细胞的方法,其包括:

a. 提供多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述克隆胚胎祖细胞系表达*HOXA5*、*SNAP25*、*THY1*、*PAPLN*、*ZIC2*和*DLK1*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*RBP1*、*NEFM*和*DLX5*中的一种或多种;

b. 在有PPAR γ 激动剂存在下使所述多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系分化足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段,由此产生分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系;和

c. 针对UCP1标志物的表达筛选所述分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述UCP1标志物的存在鉴别出褐色脂肪细胞。

11. 一种生产褐色脂肪细胞的方法,其包括:

a. 提供多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述克隆胚胎祖细胞系表达*HOXC6*、*PAPLN*、*THY1*、*RBP1*和*EFNB2*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA5*、*ZIC2*和*NEFM*中的一种或多种;

b. 在有PPAR γ 激动剂存在下使所述多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系分化足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段,由此产生分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系;和

c. 针对UCP1标志物的表达筛选所述分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述UCP1标志物的存在鉴别出褐色脂肪细胞。

12. 一种生产褐色脂肪细胞的方法,其包括:

a. 提供多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述克隆胚胎祖细胞系表达*DLK1*、*DLX5*、*GPC4*和*THY1*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*和*SNAP25*中的一种或多种;

b. 在有PPAR γ 激动剂存在下使所述多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系分化足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段,由此产生分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系;和

c. 针对UCP1标志物的表达筛选所述分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述UCP1标志物的存在鉴别出褐色脂肪细胞。

13. 一种生产褐色脂肪细胞的方法,其包括:

a. 提供多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述克隆胚胎祖细胞系表达*BARX1*、*EPDR1*、*GPC4*、*EFNB2*和*DLK1*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*、*ZIC2*、*CRABP1*和*DLX5*中的一种或多种;

b. 在有PPAR γ 激动剂存在下使所述多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系分化足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段,由此产生分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系;和

c. 针对UCP1标志物的表达筛选所述分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述UCP1标志物的存在鉴别出褐色脂肪细胞。

14. 一种生产褐色脂肪细胞的方法,其包括:

a. 提供多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述克隆胚胎祖细胞系表达 *SNAP25*、*PRG4*、*SBSN*、*GPC4*和*DLK1*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXA5*、*HOXB2*和*CRABP1*中的一种或多种;

b. 在有PPAR γ 激动剂存在下使所述多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系分化足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段,由此产生分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系;和

c. 针对UCP1标志物的表达筛选所述分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述UCP1标志物的存在鉴别出褐色脂肪细胞。

15. 一种生产褐色脂肪细胞的方法,其包括:

a. 提供多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述克隆胚胎祖细胞系表达 *ALDH1A2*、*SBSN*、*CPVL*、*ZIC2*和*THY1*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXA5*、*HOXB2*、*RBP1*和*CRABP1*中的一种或多种;

b. 在有PPAR γ 激动剂存在下使所述多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系分化足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段,由此产生分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系;和

c. 针对UCP1标志物的表达筛选所述分化的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述UCP1标志物的存在鉴别出褐色脂肪细胞。

16. 权利要求1-15的方法,其中所述足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段是约2天至约21天。

17. 权利要求16的方法,其中所述足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段是约5天至约19天。

18. 权利要求17的方法,其中所述足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段是约9天至约17天。

19. 权利要求18的方法,其中所述足以使细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的时间段是约11天至约15天。

20. 权利要求1-15的方法,其中所述PPAR γ 激动剂是罗格列酮。

21. 权利要求1-15的方法,其中通过*ADIPOQ*或*C19orf80*中的一种或多种的表达进一步表征表达UCP1的褐色脂肪细胞。

用于重新衍生不同的多能干细胞衍生的褐色脂肪细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及干细胞生物学的领域。

[0002] 发明背景

干细胞技术中的进展,诸如与原干细胞的分离和体外繁殖有关的那些,构成医学研究和治疗产品开发的一个重要新领域,所述原干细胞包括胚胎干细胞(“ES”细胞,包括人ES细胞(“hES”细胞))和有关的多能或全能干细胞,包括、但不限于,iPS、EG、EC、ICM、上胚层、从单性生殖地活化的卵母细胞或ED细胞衍生出的类似的细胞(包括来自人物种的所述细胞)。尽管在前述多能细胞类型中存在差异,本发明适用于能够分化成不同中胚层细胞类型的它们中的任一种的应用。这些原干细胞中的许多在未分化的状态下是天然地端粒末端转移酶阳性的,由此允许所述细胞无限繁殖并随后在遗传上修饰和所述遗传修饰以后克隆繁殖,然后分化。在许多胚性细胞系中的端粒长度与在精子DNA中观察到的端粒长度相当(大约10-18 kb TRF长度),部分地通过端粒末端转移酶(*TERT*)的催化组分的表达。因此,尽管原干细胞的分化后代通常是必死的(由于*TERT*表达的抑制)和端粒长度随着细胞倍增而缩短,但是它们的长初始端粒长度会给所述细胞提供长复制能力(相对于胎儿或成年人衍生的细胞),并允许制造相对年轻的细胞用于移植。

[0003] 人ES细胞已经表现出这样的潜力:将其以未分化的状态繁殖,并然后对其随后诱导以分化成人体中的任意的和所有的细胞类型,包括复杂组织。hES细胞的多能性已经提示,许多由细胞功能障碍引起的疾病可以适合通过施用不同分化类型的hES衍生的细胞进行治疗(Thomson等人,*Science* 282:1145-1147 (1998)),并且hES衍生的祖先系的长增殖寿命已经允许hES细胞衍生的胚胎祖细胞系的克隆繁殖和初始表征(West等人,*Regen Med* (2008) 3(3), 287-308)。

[0004] 通过不同的重编程技术也可以从体细胞衍生出多能干细胞。一种这样的重编程技术是体细胞核转移(SCNT)。SCNT研究已经证实,可能将体分化细胞转化回原干细胞状态,诸如胚胎干(“ES”)细胞(Cibelli, 等人,*Nature Biotech* 16:642-646 (1998))或胚胎衍生的(“ED”)细胞的状态。可替换地,通过分析型重编程技术(更常见地称作诱导的多能干(iPS)细胞技术)可以将体细胞重编程至全能性或多能性,其中使用转录调节剂将体细胞重编程(参见2006年8月3日提交且标题为“Improved Methods of Reprogramming Animal Somatic Cells”的PCT申请系列号PCT/US2006/030632)。这些方法提供了移植具有患者的核基因型的胚性衍生的体细胞的可能策略(Lanza等人,*Nature Medicine* 5:975-977 (1999))。

[0005] 除了SCNT和分析型重编程技术以外,还存在解决移植排斥问题的其它技术,包括雌核发育和雄核发育的应用(参见:1999年10月28日提交的美国申请号60/161,987;2000年10月27日提交的美国申请号09/697,297;2001年11月29日提交的美国申请号09/995,659;2003年2月27日提交的美国申请号10/374,512;2000年10月27日提交的PCT申请号PCT/US00/29551)。在名为孤雌生殖的一类雌核发育的情况下,可以在没有对配子供体而言外源的抗原的情况下制备多能干细胞,且因此可用于制备可以无排斥地移植进配子供体中

的细胞。另外,可以将孤雌生殖性干细胞系组装成在HLA区域(或非人动物的对应MHC区域)中纯合的细胞系库,以降低干细胞库就HLA单元型而言的复杂性。

[0006] 可以生产全能或多能细胞系或所述细胞系的库(诸如生产成符合cGMP的那些),其被选择或在遗传上修饰成逃脱免疫监视。多种模态是本领域已知的,包括在含有HLA基因的染色质区域(或非人动物的对应MHC区域;参见2006年10月20日提交的标题为“Totipotent, Nearly Totipotent or Pluripotent Mammalian Cells Homozygous or Hemizygous for One or More Histocompatibility Antigen Genes”的PCT申请系列号PCT/US2006/040985)中为半合子的所述细胞的分离。半合子细胞系的库会提供这样的优点:不仅降低正常哺乳动物MHC基因集合中固有的复杂性(从而简化使所述抗原与患者匹配的过程),而且还减小抗原的基因剂量以减少所述抗原的表达,而不是完全消除它们的表达,从而避免针对无HLA I类表达的细胞的天然杀伤应答的刺激。

[0007] 除了通过SCNT或分析型重编程技术(诸如iPS细胞产生以得到组织相容性的细胞移植)重编程以外,可以将多能干细胞遗传修饰以通过调节某些基因的表达而降低免疫原性,诸如HLA基因($\beta 2$ 微球蛋白(*B2M*)的两个等位基因之一)的敲除、增加的*HLA-G*或*HLA-H*、或*CTLA4-Ig*和*PD-L1*的表达(Z. Rong, 等人, An Effective Approach to Prevent Immune Rejection of Human ESC-Derived Allografts, *Cell Stem Cell*, 14: 121-130 (2014), 通过引用并入本文)、以及本领域已知的其它修饰,并随后用于制备分化的细胞用于研究和治疗用途。这样的遗传上修饰的原干细胞(被设计成生产具有降低的免疫原性的细胞)在本文中被命名为“万能供体细胞”。

[0008] 分离人多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系的潜力会提供繁殖新颖的高度纯化的具有出生前基因表达模式的细胞谱系的方式,包括具有胎儿前基因表达模式的那些,诸如缺乏可用于再生组织的*COX7A1*的表达的那些。这样的细胞类型在研究中具有重要应用,并用于制备基于细胞的治疗剂(参见2006年4月11日提交且标题为“Novel Uses of Cells With Prenatal Patterns of Gene Expression”的PCT申请系列号PCT/US2006/013519; 2006年11月21日提交且标题为“Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby”的美国专利申请系列号11/604,047;和2009年7月16日提交且标题为“Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby”的美国专利申请系列号12/504,630;标题为“Differentiated Progeny of Clonal Progenitor Cell Lines”的美国专利申请号14/048,910,通过引用并入本文)。还已经公开了克隆的、寡克隆的和合并的克隆和寡克隆胚胎祖先的群体,所述祖先能够形成表达*EYA4*的胚胎皮肤脂肪细胞祖细胞(ECAPC),其中所述祖细胞能够分化成褐色脂肪组织(BAT)的某些细胞组分(参见标题为“Improved Methods of Screening Embryonic Progenitor Cell Lines”的W02011/150105)以及(标题为“Methods of Screening Embryonic Progenitor Cell Lines”的美国专利申请系列号13/683,241)以及(标题为“Methods for Generating Pluripotent Stem Cell-Derived Brown Fat Cells”的美国专利公开系列号2015/0275177),它们都通过引用并入本文。

[0009] 尽管有上述的进展,仍然需要改进针对分化成所需细胞类型(包括褐色脂肪组织(BAT)的细胞组分)的潜力筛选多能干细胞衍生的细胞的方法。所述BAT祖先当移植在体内

时具有在罹患代谢综合征的症状的患者中产生治疗应答的潜力,所述症状包括糖尿病、冠状动脉疾病、肥胖、血脂异常、高血压和糖尿病并发症诸如肾和视网膜疾病。

[0010] 还需要将多能干细胞有效地分化成位点特异性的祖先和终末分化的细胞类型(包括BAT细胞的位点特异性类型)的方式。此外,对从多能干细胞产生祖细胞类型的改进方法存在逐渐增加的需要,所述多能干细胞在表达出生前或胎儿前基因表达模式的同时展示和维持均匀分化状态并表现出基因表达的位点特异性差异,如*COX7A1*的表达的缺失所证实的。成年人或胎儿衍生的脂肪细胞或脂肪细胞祖先具有降低的BAT或皮下脂肪组织(SAT)再生能力,并且表达*COX7A1*。相反,能够稳健组织再生的BAT或SAT祖先具有胎儿前(即出生前)基因表达模式,如通过*COX7A1*表达的缺失证实的。

[0011] 脂肪细胞是在基因表达中具有重要位点特异性差异的细胞类型的一个例子,在人体内的不同类型的脂肪细胞各自在维持生理学体内稳态中具有独特作用。尽管SAT细胞通常提供为将来代谢需要储存能量的生理功能,但是BAT细胞调节能量消耗或产热并合成脂肪因子诸如lipasin和脂联素。BAT细胞在人类的发育和老化过程中逐渐丢失,所以,它们的丢失导致逐渐增加的年龄依赖性的障碍风险,其中BAT细胞在具有更少BAT的人群中起关键作用(诸如调节体内的脂肪代谢、血压、血糖调节、胰腺中的胰腺β细胞数目、和HDL和LDL脂蛋白和甘油三酯代谢)。因而,需要产生经纯化的脂肪细胞祖先,其能够分化成不同组织类型的位点特异性的脂肪细胞,包括BAT细胞。

[0012] 令人惊奇地,本发明的方法证实,可以分离不同的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其当以未分化的状态培养和繁殖时,在它们通过施用本发明的确定因子而活跃地分化之前不会表达高水平的脂肪细胞标志物,并且在分化之前不会表达可检测水平的BAT脂肪细胞的标志物诸如基因*UCP1*或脂肪因子*ADIPOQ*,但是尽管如此,当使用本文中公开的条件分化时,能够分化成:1)表达*UCP1*的褐色脂肪组织(BAT)细胞,其表达低至不可检测的脂肪因子诸如*C19orf80*(也称作betatrophin或ANGPTL8,在人类中由*C19orf80*基因编码)和脂联素(也被称作AdipoQ或GBP-28,在人类中由*ADIPOQ*基因编码),或2)能够产生脂肪细胞的克隆胚胎祖先,所述脂肪细胞表达*C19orf80*和脂联素的丰富mRNA,但是表达低水平的*UCP1*。另外,令人惊奇地,使用本发明的方法可以将克隆祖细胞系分离并在细胞数目上繁殖,所述克隆祖细胞系具有不同的位点特异性的标志物且彼此在线粒体功能上存在差异。例如,本发明的方法证实,多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系ESI EP004 NP 88SM(也被称作NP 88SM或NP88SM或NP88)(其可以以相对未分化的状态培养和繁殖)不会表达多能性标志物或表达高水平的脂肪细胞标志物,且不会表达可检测水平的BAT脂肪细胞标志物诸如*C19orf80*、脂联素或*UCP1*,尽管如此,当使用本发明的方法分化时,能够同时表达*UCP1*、*C19orf80*和*ADIPOQ*的水平,其水平相当于或高于培养的胎儿组织衍生的BAT细胞,但是不同于以前公开的克隆祖先系NP110SM(也被称作NP 110SM或NP110)(美国专利申请公开号2015/0275177,标题为“Methods for Generating Pluripotent Stem Cell-Derived Brown Fat Cells”,其通过引用并入本文),NP88SM不会表达位点特异性的标志物*HOXA5*,并当分化成褐色脂肪细胞时表现出与NP110SM细胞系相比增加的耗氧速率。

[0013] 需要另外的方法,其允许多能干细胞定向分化成特定祖细胞类型,所述祖细胞类型能够产生褐色脂肪的细胞组分,其可在细胞治疗方案中有效地和再现地施用,这导致可存活的和有功能的BAT细胞的植入,所述BAT细胞可用于治疗以下病症的症状:肥胖、I型和

II型糖尿病、高血压和与内皮细胞功能障碍有关的疾病,包括冠状动脉疾病综合征,其中这些障碍中的许多同时发生在患者中(诸如代谢综合征X和如本文中所述的有关障碍)。此外,需要祖细胞类型和从所述祖细胞类型产生的终末分化的细胞类型,其表达生理学上有益的基因,包括、但不限于,解偶联蛋白1 (*UCP1*)、血管生成素样8 (*ANGPTL8*也被称作*C19orf80*)、脂联素(*ADIPQ*),并配制所述细胞,使得它们可以稳定地皮下植入且可以全身性地递送这样的脂肪因子和有益因子以增加胰岛素敏感性,减少总体脂肪,减轻I型和II型糖尿病的症状,有利地影响冠状动脉疾病的进程,和治疗代谢综合征X。最后,需要促进胚胎祖先分化成脂肪细胞的生物相容基质,以促进所述细胞在合适身体部位中的永久植入,并在体内注射时限制所述褐色脂肪细胞组分位点的不希望的迁移。在下面描述的本发明的不同实施方案满足了这些需要和本领域中的其它需要。

[0014] 发明概述

本发明提供了可用于人胚胎祖细胞类型的分化和使用的化合物、组合物、试剂盒、试剂和方法。本发明通过引用并入美国专利申请号14/554,019(公开为No. 2015/0275177)。

[0015] 在一个实施方案中,本发明提供了制备新颖的、多能干细胞衍生的、褐色脂肪组织的细胞组分的方法、包含它们的组合物、和使用它们的方法。在其它实施方案中,本发明提供了分离的克隆祖细胞系,其产生不同的克隆地纯化的位点特异性类型的褐色脂肪细胞。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生褐色脂肪细胞。所述分离的克隆祖细胞系也可以在体内产生褐色脂肪细胞。

[0016] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其能够分化成BAT的细胞组分,其中所述分化的细胞(源自相对未分化的祖细胞)在如本文中所述分化以后表达一种或多种选自*FABP4*、*C19orf80*、*ADIPQ*、*UCP1*、*PCK1*、*NNAT*、*THRSP*、*CEBPA*或*CIDEA*的标志物,但是不同于胎儿或成年人衍生的BAT细胞,所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系当在体内施用之前在体外培养和分化时不表达基因*COX7A1*。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生褐色脂肪细胞。所述分离的克隆祖细胞系可以在体内产生褐色脂肪细胞。

[0017] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其能够分化成褐色脂肪组织(BAT)的细胞组分,例如,表达*UCP1*的褐色脂肪细胞,其中所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系分离自在有头蛋白(noggin)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*DIO3*、*DLK1*、*ZIC2*、*SLC1A3*和*SBSN*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA5*、*IL13RA2*、*DLX5*、*CRABP1*、*NEFM*、*PRG4*和*RBP1*中的一种或多种。本发明也提供了制备在基因表达模式方面类似于分离的细胞系NP88 SM的所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系的方法。

[0018] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其能够分化成表达*UCP1*的BAT的细胞组分,其中所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系分离自在有头蛋白存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*、*DLK1*、*NEFM*和*RBP1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*ZIC2*、*DLX5*、*PRG4*、*IL13RA2*、*CRABP1*和*SBSN*中的一种或多种。本发明也提供了制备在基因表达模式方面类似于分离的细胞系NPCC SM19的所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系的方法。

[0019] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其能够分化成表达*UCP1*的BAT的细胞组分,其中所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系分离自在有头蛋白存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*RBP1*和*ZIC2*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXB2*、*HOXA5*、*NEFM*、*PRG4*、*DLX5*、*IL13RA2*、*CRABP1*和*SBSN*中的一种或多种。本发明也提供了制备在基因表达模式方面类似于分离的细胞系NPCC SM36的所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系的方法。

[0020] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其能够分化成表达*UCP1*的BAT的细胞组分,其中所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系分离自在有头蛋白存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*HOXB2*、*DLX5*和*ZIC2*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA5*、*NEFM*、*PRG4*和*RBP1*中的一种或多种。本发明也提供了制备在基因表达模式方面类似于分离的细胞系NPCC SM28的所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系的方法。

[0021] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其能够分化成表达*UCP1*的BAT的细胞组分,其中所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系分离自在有头蛋白存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*DLK1*、*DLX5*、*PRG4*和*ZIC2*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXB2*、*HOXA5*、*GPC4*、*NEFM*、*IL13RA2*、*NTNG1*和*SBSN*中的一种或多种。本发明也提供了制备在基因表达模式方面类似于分离的细胞系NPCC SM31的所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系的方法。

[0022] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其能够分化成表达*UCP1*的BAT的细胞组分,其中所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系分离自在有头蛋白存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*CRABP1*、*SNAP25*、*PPP1R1B*、*PRG4*、*DLK1*、*ZIC2*和*PAPLN*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*、*DLX5*、*RBP1*和*IL13RA2*中的一种或多种。本发明也提供了制备在基因表达模式方面类似于分离的细胞系NP111 SM、NP77 EN、NP80 EN和NP85 EN的所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系的方法。

[0023] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其能够分化成表达*UCP1*的BAT的细胞组分,其中所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系分离自在有头蛋白存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*ZIC2*、*THY1*和*EFNB2*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*DLK1*、*PPP1R1B*和*GPC4*中的一种或多种。本发明也提供了制备在基因表达模式方面类似于分离的细胞系NPCC SM23的所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系的方法。

[0024] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其能够分化成表达*UCP1*的BAT的细胞组分,其中所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系分离自在有头蛋白存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*ZIC2*、*CD24*和*RBP1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*DLK1*、*PPP1R1B*、*NEFM*和*GPC4*中的一种或多种。本发明也提供了制备在基因表达模式方面类似于分离的细胞系NPCC SM27的所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系的方法。

[0025] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其能够分化成表达*UCP1*的BAT的细胞组分,其中所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系分离自在有头蛋白存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA5*、*SNAP25*、*THY1*、*PAPLN*、*ZIC2*和*DLK1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*RBP1*、*NEFM*和*DLX5*中的一种或多种。本发明也提供了制备在基因表达模式方面类似于分离的细胞系NP78 EN的所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系的方法。

[0026] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其能够分化成表达*UCP1*的BAT的细胞组分,其中所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系分离自在有头蛋白存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXC6*、*PAPLN*、*THY1*、*RBP1*和*EFNB2*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA5*、*ZIC2*和*NEFM*中的一种或多种。本发明也提供了制备在基因表达模式方面类似于分离的细胞系SK1的所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系的方法。

[0027] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其能够分化成表达*UCP1*的BAT的细胞组分,其中所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系分离自在有头蛋白存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*DLK1*、*DLX5*、*GPC4*和*THY1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*和*SNAP25*中的一种或多种。本发明也提供了制备在基因表达模式方面类似于分离的细胞系NP92 SM的所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系的方法。

[0028] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其能够分化成表达*UCP1*的BAT的细胞组分,其中所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系分离自在有头蛋白存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*BARX1*、*EPDR1*、*GPC4*、*EFNB2*和*DLK1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*、*ZIC2*、*CRABP1*和*DLX5*中的一种或多种。本发明也提供了制备在基因表达模式方面类似于分离的细胞系NP91 SM的所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系的方法。

[0029] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其能够分化成表达*UCP1*的BAT的细胞组分,其中所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系分离自在有头蛋白存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*SNAP25*、*PRG4*、*SBSN*、*GPC4*和*DLK1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXA5*、*HOXB2*和*CRABP1*中的一种或多种。本发明也提供了制备在基因表达模式方面类似于分离的细胞系NP93 SM的所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系的方法。

[0030] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其能够分化成表达*UCP1*的BAT的细胞组分,其中所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系分离自在有头蛋白存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*ALDH1A2*、*SBSN*、*CPVL*、*ZIC2*和*THY1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXA5*、*HOXB2*、*RBP1*和*CRABP1*中的一种或多种。本发明也提供了制备在基因表达模式方面类似于分离的细胞系NP113 SM的所述多能干细胞衍生的克隆祖细胞系的方法。

[0031] 在另一个实施方案中,本发明提供了分离的多能干细胞衍生的克隆的、或合并的

克隆的祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先能够分化成经纯化的表达UCP1的褐色脂肪细胞的群体。

[0032] 在另一个实施方案中,本发明提供了分离的多能干细胞衍生的克隆的、或合并的克隆的祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有助于骨骼肌成肌细胞的生长的培养基诸如补充了EGF、胰岛素、地塞米松、FCS或FBS、bFGF、牛胎球蛋白(牛)的MCDB 120培养基存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先能够分化成经纯化的表达UCP1的褐色脂肪细胞的群体。

[0033] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*DI03*、*DLK1*、*ZIC2*、*SLC1A3*和*SBSN*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA5*、*IL13RA2*、*DLX5*、*CRABP1*、*NEFM*、*PRG4*和*RBP1*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞:其分泌由基因*C19orf80*编码的蛋白,也命名为血管生成素样8 (ANGPTL8)或lipasin或betatrophin。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌lipasin的褐色脂肪细胞,其为了在具有lipasin的低循环水平的患者中的治疗效果,或在lipasin的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常和代谢综合征的情况下。

[0034] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*、*DLK1*、*NEFM*和*RBP1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*ZIC2*、*DLX5*、*PRG4*、*IL13RA2*、*CRABP1*和*SBSN*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞:其分泌由基因*C19orf80*编码的蛋白,也命名为血管生成素样8 (ANGPTL8)或lipasin或betatrophin。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌lipasin的褐色脂肪细胞,其为了在具有lipasin的低循环水平的患者中的治疗效果,或在lipasin的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常和代谢综合征的情况下。

[0035] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*RBP1*和*ZIC2*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXB2*、*HOXA5*、*NEFM*、*PRG4*、*DLX5*、*IL13RA2*、*CRABP1*和*SBSN*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞:其分泌由基因*C19orf80*编码的蛋白,也命名为血管生成素样8 (ANGPTL8)或lipasin或betatrophin。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌lipasin的褐色脂肪细胞,其为了在具有lipasin的低循环水平的患者中的治疗效果,或在lipasin的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常和代谢综合征的情况下。

[0036] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*HOXB2*、*DLX5*和*ZIC2*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA5*、*NEFM*、*PRG4*和*RBP1*

中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞：其分泌由基因*C19orf80*编码的蛋白，也命名为血管生成素样8（ANGPTL8）或lipasin或betatrophin。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌lipasin的褐色脂肪细胞，其为了在具有lipasin的低循环水平的患者中的治疗效果，或在lipasin的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常和代谢综合征的情况下。

[0037] 在其它实施方案中，本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系，其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂（诸如头蛋白）存在下分化的多能干细胞，作为克隆胚胎祖先系繁殖，其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*DLK1*、*DLX5*、*PRG4*和*ZIC2*的标志物，但是不表达*COX7A1*，且不表达*HOXB2*、*HOXA5*、*GPC4*、*NEFM*、*IL13RA2*、*NTNG1*和*SBSN*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞：其分泌由基因*C19orf80*编码的蛋白，也命名为血管生成素样8（ANGPTL8）或lipasin或betatrophin。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌lipasin的褐色脂肪细胞，其为了在具有lipasin的低循环水平的患者中的治疗效果，或在lipasin的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常和代谢综合征的情况下。

[0038] 在其它实施方案中，本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系，其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂（诸如头蛋白）存在下分化的多能干细胞，作为克隆胚胎祖先系繁殖，其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*CRABP1*、*SNAP25*、*PPP1R1B*、*PRG4*、*DLK1*、*ZIC2*和*PAPLN*的标志物，但是不表达*COX7A1*，且不表达*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*、*DLX5*、*RBP1*和*IL13RA2*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞：其分泌由基因*C19orf80*编码的蛋白，也命名为血管生成素样8（ANGPTL8）或lipasin或betatrophin。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌lipasin的褐色脂肪细胞，其为了在具有lipasin的低循环水平的患者中的治疗效果，或在lipasin的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常和代谢综合征的情况下。

[0039] 在其它实施方案中，本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系，其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂（诸如头蛋白）存在下分化的多能干细胞，作为克隆胚胎祖先系繁殖，其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*ZIC2*、*THY1*和*EFNB2*的标志物，但是不表达*COX7A1*，且不表达*DLK1*、*PPP1R1B*和*GPC4*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞：其分泌由基因*C19orf80*编码的蛋白，也命名为血管生成素样8（ANGPTL8）或lipasin或betatrophin。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌lipasin的褐色脂肪细胞，其为了在具有lipasin的低循环水平的患者中的治疗效果，或在lipasin的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常和代谢综合征的情况下。

[0040] 在其它实施方案中，本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系，其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂（诸如头蛋白）存在下分化的多能干细胞，作为克隆胚胎祖先系繁殖，其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*ZIC2*、*CD24*和*RBP1*的标志物，但是不表达*COX7A1*，且不表达*DLK1*、*PPP1R1B*、*NEFM*和*GPC4*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞：其分泌由基因*C19orf80*编码的蛋白，也命名为血管生成素样8（ANGPTL8）或lipasin或betatrophin。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌lipasin的褐色脂肪细胞，其

为了在具有lipasin的低循环水平的患者中的治疗效果,或在lipasin的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常和代谢综合征的情况下。

[0041] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自HOXA5、SNAP25、THY1、PAPLN、ZIC2和DLK1的标志物,但是不表达COX7A1,且不表达RBP1、NEFM和DLX5中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞:其分泌由基因C19orf80编码的蛋白,也命名为血管生成素样8 (ANGPTL8)或lipasin或betatrophin。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌lipasin的褐色脂肪细胞,其为了在具有lipasin的低循环水平的患者中的治疗效果,或在lipasin的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常和代谢综合征的情况下。

[0042] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自HOXC6、PAPLN、THY1、RBP1和EFNB2的标志物,但是不表达COX7A1,且不表达HOXA5、ZIC2和NEFM中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞:其分泌由基因C19orf80编码的蛋白,也命名为血管生成素样8 (ANGPTL8)或lipasin或betatrophin。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌lipasin的褐色脂肪细胞,其为了在具有lipasin的低循环水平的患者中的治疗效果,或在lipasin的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常和代谢综合征的情况下。

[0043] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自DLK1、DLX5、GPC4和THY1的标志物,但是不表达COX7A1,且不表达HOXA2、HOXB2、HOXA5和SNAP25中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞:其分泌由基因C19orf80编码的蛋白,也命名为血管生成素样8 (ANGPTL8)或lipasin或betatrophin。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌lipasin的褐色脂肪细胞,其为了在具有lipasin的低循环水平的患者中的治疗效果,或在lipasin的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常和代谢综合征的情况下。

[0044] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自BARX1、EPDR1、GPC4、EFNB2和DLK1的标志物,但是不表达COX7A1,且不表达HOXA2、HOXB2、HOXA5、ZIC2、CRABP1和DLX5中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞:其分泌由基因C19orf80编码的蛋白,也命名为血管生成素样8 (ANGPTL8)或lipasin或betatrophin。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌lipasin的褐色脂肪细胞,其为了在具有lipasin的低循环水平的患者中的治疗效果,或在lipasin的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常和代谢综合征的情况下。

[0045] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,

其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*SNAP25*、*PRG4*、*SBSN*、*GPC4*和*DLK1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXA5*、*HOXB2*和*CRABP1*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞:其分泌由基因*C19orf80*编码的蛋白,也命名为血管生成素样8 (ANGPTL8)或lipasin或betatrophin。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌lipasin的褐色脂肪细胞,其为了在具有lipasin的低循环水平的患者中的治疗效果,或在lipasin的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常和代谢综合征的情况下。

[0046] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*ALDH1A2*、*SBSN*、*CPVL*、*ZIC2*和*THY1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXA5*、*HOXB2*、*RBP1*和*CRABP1*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞:其分泌由基因*C19orf80*编码的蛋白,也命名为血管生成素样8 (ANGPTL8)或lipasin或betatrophin。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌lipasin的褐色脂肪细胞,其为了在具有lipasin的低循环水平的患者中的治疗效果,或在lipasin的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常和代谢综合征的情况下。

[0047] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*DIO3*、*DLK1*、*ZIC2*、*SLC1A3*和*SBSN*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA5*、*IL13RA2*、*DLX5*、*CRABP1*、*NEFM*、*PRG4*和*RBP1*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞:其分泌由基因*ADIPOQ*编码的蛋白,命名为脂联素。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌脂联素的褐色脂肪细胞,其为了在具有低脂联素血症的患者中的治疗效果,或在脂联素的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常、骨质疏松症、阿尔茨海默氏病和代谢综合征的情况下。

[0048] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*、*DLK1*、*NEFM*和*RBP1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*ZIC2*、*DLX5*、*PRG4*、*IL13RA2*、*CRABP1*和*SBSN*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞:其分泌由基因*ADIPOQ*编码的蛋白,命名为脂联素。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌脂联素的褐色脂肪细胞,其为了在具有低脂联素血症的患者中的治疗效果,或在脂联素的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常、骨质疏松症、阿尔茨海默氏病和代谢综合征的情况下。

[0049] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*RBP1*和*ZIC2*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXB2*、*HOXA5*、*NEFM*、*PRG4*、*DLX5*、

IL13RA2、*CRABP1*和*SBSN*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞：其分泌由基因*ADIPOQ*编码的蛋白，命名为脂联素。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌脂联素的褐色脂肪细胞，其为了在具有低脂联素血症的患者中的治疗效果，或在脂联素的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常、骨质疏松症、阿尔茨海默氏病和代谢综合征的情况下。

[0050] 在其它实施方案中，本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系，其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞，作为克隆胚胎祖先系繁殖，其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*HOXB2*、*DLX5*和*ZIC2*的标志物，但是不表达*COX7A1*，且不表达*HOXA5*、*NEFM*、*PRG4*和*RBP1*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞：其分泌由基因*ADIPOQ*编码的蛋白，命名为脂联素。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌脂联素的褐色脂肪细胞，其为了在具有低脂联素血症的患者中的治疗效果，或在脂联素的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常、骨质疏松症、阿尔茨海默氏病和代谢综合征的情况下。

[0051] 在其它实施方案中，本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系，其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞，作为克隆胚胎祖先系繁殖，其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*DLK1*、*DLX5*、*PRG4*和*ZIC2*的标志物，但是不表达*COX7A1*，且不表达*HOXB2*、*HOXA5*、*GPC4*、*NEFM*、*IL13RA2*、*NTNG1*和*SBSN*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞：其分泌由基因*ADIPOQ*编码的蛋白，命名为脂联素。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌脂联素的褐色脂肪细胞，其为了在具有低脂联素血症的患者中的治疗效果，或在脂联素的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常、骨质疏松症、阿尔茨海默氏病和代谢综合征的情况下。

[0052] 在其它实施方案中，本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系，其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞，作为克隆胚胎祖先系繁殖，其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*CRABP1*、*SNAP25*、*PPP1R1B*、*PRG4*、*DLK1*、*ZIC2*和*PAPLN*的标志物，但是不表达*COX7A1*，且不表达*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*、*DLX5*、*RBP1*和*IL13RA2*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞：其分泌由基因*ADIPOQ*编码的蛋白，命名为脂联素。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌脂联素的褐色脂肪细胞，其为了在具有低脂联素血症的患者中的治疗效果，或在脂联素的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常、骨质疏松症、阿尔茨海默氏病和代谢综合征的情况下。

[0053] 在其它实施方案中，本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系，其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞，作为克隆胚胎祖先系繁殖，其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*ZIC2*、*THY1*和*EFNB2*的标志物，但是不表达*COX7A1*，且不表达*DLK1*、*PPP1R1B*和*GPC4*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞：其分泌由基因*ADIPOQ*编码的蛋白，命名为脂联素。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌脂联素的褐色脂肪细胞，其为了在具有低脂联素血症的患者中的治疗效果，或在脂联素的施

用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常、骨质疏松症、阿尔茨海默氏病和代谢综合征的情况下。

[0054] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*ZIC2*、*CD24*和*RBP1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*DLK1*、*PPP1R1B*、*NEFM*和*GPC4*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞:其分泌由基因*ADIPOQ*编码的蛋白,命名为脂联素。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌脂联素的褐色脂肪细胞,其为了在具有低脂联素血症的患者中的治疗效果,或在脂联素的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常、骨质疏松症、阿尔茨海默氏病和代谢综合征的情况下。

[0055] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA5*、*SNAP25*、*THY1*、*PAPLN*、*ZIC2*和*DLK1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*RBP1*、*NEFM*和*DLX5*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞:其分泌由基因*ADIPOQ*编码的蛋白,命名为脂联素。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌脂联素的褐色脂肪细胞,其为了在具有低脂联素血症的患者中的治疗效果,或在脂联素的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常、骨质疏松症、阿尔茨海默氏病和代谢综合征的情况下。

[0056] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXC6*、*PAPLN*、*THY1*、*RBP1*和*EFNB2*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA5*、*ZIC2*和*NEFM*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞:其分泌由基因*ADIPOQ*编码的蛋白,命名为脂联素。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌脂联素的褐色脂肪细胞,其为了在具有低脂联素血症的患者中的治疗效果,或在脂联素的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常、骨质疏松症、阿尔茨海默氏病和代谢综合征的情况下。

[0057] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*DLK1*、*DLX5*、*GPC4*和*THY1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*和*SNAP25*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞:其分泌由基因*ADIPOQ*编码的蛋白,命名为脂联素。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌脂联素的褐色脂肪细胞,其为了在具有低脂联素血症的患者中的治疗效果,或在脂联素的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常、骨质疏松症、阿尔茨海默氏病和代谢综合征的情况下。

[0058] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,

其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*BARX1*、*EPDR1*、*GPC4*、*EFNB2*和*DLK1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*、*ZIC2*、*CRABP1*和*DLX5*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞:其分泌由基因*ADIPOQ*编码的蛋白,命名为脂联素。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌脂联素的褐色脂肪细胞,其为了在具有低脂联素血症的患者中的治疗效果,或在脂联素的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常、骨质疏松症、阿尔茨海默氏病和代谢综合征的情况下。

[0059] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*SNAP25*、*PRG4*、*SBSN*、*GPC4*和*DLK1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXA5*、*HOXB2*和*CRABP1*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞:其分泌由基因*ADIPOQ*编码的蛋白,命名为脂联素。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌脂联素的褐色脂肪细胞,其为了在具有低脂联素血症的患者中的治疗效果,或在脂联素的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常、骨质疏松症、阿尔茨海默氏病和代谢综合征的情况下。

[0060] 在其它实施方案中,本发明提供了一种分离的多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化的多能干细胞,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*ALDH1A2*、*SBSN*、*CPVL*、*ZIC2*和*THY1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXA5*、*HOXB2*、*RBP1*和*CRABP1*中的一种或多种。所述分离的克隆祖细胞系可以在体外产生这样的褐色脂肪细胞:其分泌由基因*ADIPOQ*编码的蛋白,命名为脂联素。所述分离的克隆祖细胞系可以产生在体内分泌脂联素的褐色脂肪细胞,其为了在具有低脂联素血症的患者中的治疗效果,或在脂联素的施用是为了治疗诸如糖尿病、心脏病、血脂异常、骨质疏松症、阿尔茨海默氏病和代谢综合征的情况下。

[0061] 在其它实施方案中,本发明提供了使所述褐色脂肪细胞中的期望基因的表达最大化的方法、关于它们的组合物和使用它们的方法。

[0062] 在其它实施方案中,本发明提供了一种将分离的多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系分化成表达*UCP1*的细胞的方法,所述方法包括下述步骤: 1) 在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下部分地分化所述多能干细胞; 2) 在体外克隆地分离和繁殖胚胎祖细胞系; 3) 将所述克隆的或合并的胚胎祖先的克隆暴露于PPAR γ 激动剂,包括、但不限于噻唑烷二酮类的小分子诸如罗格列酮,任选地以及以下一种或多种:水凝胶诸如含有I型胶原和透明质酸的水凝胶、三碘甲腺原氨酸(T3)、 β 3-肾上腺素受体激动剂诸如CL-316,243和BMP4或BMP7; 4) 测量*UCP1*的表达以检测能够表达褐色脂肪细胞的期望位点特异性类型的系。

[0063] 在其它实施方案中,本发明提供了一种用于治疗肥胖、糖尿病、高血压、冠状动脉疾病或阿尔茨海默氏病和代谢综合征的方法,所述方法包括下述步骤: 1) 分离多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自多能干细胞; 2) 在有TGF- β 家族的生长因子的

灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*DI03*、*DLK1*、*ZIC2*、*SLC1A3*和*SBSN*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA5*、*IL13RA2*、*DLX5*、*CRABP1*、*NEFM*、*PRG4*和*RBP1*中的一种或多种;和3)将在有PPAR γ 激动剂(包括、但不限于噻唑烷二酮类的小分子诸如罗格列酮)存在下分化的所述祖细胞或表达UCP1的细胞与水凝胶(诸如包含硫酸化透明质酸盐、硫酸化明胶和/或硫酸化透明质酸盐和硫酸化明胶二者和交联剂的水凝胶)组合地施用给患者。

[0064] 在其它实施方案中,本发明提供了一种用于治疗肥胖、糖尿病、高血压、冠状动脉疾病或阿尔茨海默氏病和代谢综合征的方法,所述方法包括下述步骤:1)分离多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自多能干细胞;2)在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*、*DLK1*、*NEFM*和*RBP1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*ZIC2*、*DLX5*、*PRG4*、*IL13RA2*、*CRABP1*和*SBSN*中的一种或多种;和3)将在有PPAR γ 激动剂(包括、但不限于噻唑烷二酮类的小分子诸如罗格列酮)存在下分化的所述祖细胞或表达UCP1的细胞与水凝胶(诸如包含硫酸化透明质酸盐、硫酸化明胶和/或硫酸化透明质酸盐和硫酸化明胶二者和交联剂的水凝胶)组合地施用给患者。

[0065] 在其它实施方案中,本发明提供了一种用于治疗肥胖、糖尿病、高血压、冠状动脉疾病或阿尔茨海默氏病和代谢综合征的方法,所述方法包括下述步骤:1)分离多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自多能干细胞;2)在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*RBP1*和*ZIC2*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXB2*、*HOXA5*、*NEFM*、*PRG4*、*DLX5*、*IL13RA2*、*CRABP1*和*SBSN*中的一种或多种;和3)将在有PPAR γ 激动剂(包括、但不限于噻唑烷二酮类的小分子诸如罗格列酮)存在下分化的所述祖细胞或表达UCP1的细胞与水凝胶(诸如包含硫酸化透明质酸盐、硫酸化明胶和/或硫酸化透明质酸盐和硫酸化明胶二者和交联剂的水凝胶)组合地施用给患者。

[0066] 在其它实施方案中,本发明提供了一种用于治疗肥胖、糖尿病、高血压、冠状动脉疾病或阿尔茨海默氏病和代谢综合征的方法,所述方法包括下述步骤:1)分离多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自多能干细胞;2)在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*HOXB2*、*DLX5*和*ZIC2*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA5*、*NEFM*、*PRG4*和*RBP1*中的一种或多种;和3)将在有PPAR γ 激动剂(包括、但不限于噻唑烷二酮类的小分子诸如罗格列酮)存在下分化的所述祖细胞或表达UCP1的细胞与水凝胶(诸如包含硫酸化透明质酸盐、硫酸化明胶和/或硫酸化透明质酸盐和硫酸化明胶二者和交联剂的水凝胶)组合地施用给患者。

[0067] 在其它实施方案中,本发明提供了一种用于治疗肥胖、糖尿病、高血压、冠状动脉疾病或阿尔茨海默氏病和代谢综合征的方法,所述方法包括下述步骤:1)分离多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自多能干细胞;2)在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*DLK1*、*DLX5*、*PRG4*和*ZIC2*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXB2*、*HOXA5*、*GPC4*、*NEFM*、*IL13RA2*、*NTNG1*和*SBSN*中的一种或多种;和3)将在有PPAR γ 激动

剂(包括、但不限于噻唑烷二酮类的小分子诸如罗格列酮)存在下分化的所述祖细胞或表达UCP1的细胞与水凝胶(诸如包含硫醇化透明质酸盐、硫醇化明胶和/或硫醇化透明质酸盐和硫醇化明胶二者和交联剂的水凝胶)组合地施用给患者。

[0068] 在其它实施方案中,本发明提供了一种用于治疗肥胖、糖尿病、高血压、冠状动脉疾病或阿尔茨海默氏病和代谢综合征的方法,所述方法包括下述步骤:1)分离多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自多能干细胞;2)在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*CRABP1*、*SNAP25*、*PPP1R1B*、*PRG4*、*DLK1*、*ZIC2*和*PAPLN*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*、*DLX5*、*RBP1*和*IL13RA2*中的一种或多种;和3)将在有PPAR γ 激动剂(包括、但不限于噻唑烷二酮类的小分子诸如罗格列酮)存在下分化的所述祖细胞或表达UCP1的细胞与水凝胶(诸如包含硫醇化透明质酸盐、硫醇化明胶和/或硫醇化透明质酸盐和硫醇化明胶二者和交联剂的水凝胶)组合地施用给患者。

[0069] 在其它实施方案中,本发明提供了一种用于治疗肥胖、糖尿病、高血压、冠状动脉疾病或阿尔茨海默氏病和代谢综合征的方法,所述方法包括下述步骤:1)分离多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自多能干细胞;2)在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*ZIC2*、*THY1*和*EFNB2*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*DLK1*、*PPP1R1B*和*GPC4*中的一种或多种;和3)将在有PPAR γ 激动剂(包括、但不限于噻唑烷二酮类的小分子诸如罗格列酮)存在下分化的所述祖细胞或表达UCP1的细胞与水凝胶(诸如包含硫醇化透明质酸盐、硫醇化明胶和/或硫醇化透明质酸盐和硫醇化明胶二者和交联剂的水凝胶)组合地施用给患者。

[0070] 在其它实施方案中,本发明提供了一种用于治疗肥胖、糖尿病、高血压、冠状动脉疾病或阿尔茨海默氏病和代谢综合征的方法,所述方法包括下述步骤:1)分离多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自多能干细胞;2)在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA2*、*ZIC2*、*CD24*和*RBP1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*DLK1*、*PPP1R1B*、*NEFM*和*GPC4*中的一种或多种;和3)将在有PPAR γ 激动剂(包括、但不限于噻唑烷二酮类的小分子诸如罗格列酮)存在下分化的所述祖细胞或表达UCP1的细胞与水凝胶(诸如包含硫醇化透明质酸盐、硫醇化明胶和/或硫醇化透明质酸盐和硫醇化明胶二者和交联剂的水凝胶)组合地施用给患者。

[0071] 在其它实施方案中,本发明提供了一种用于治疗肥胖、糖尿病、高血压、冠状动脉疾病或阿尔茨海默氏病和代谢综合征的方法,所述方法包括下述步骤:1)分离多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自多能干细胞;2)在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXA5*、*SNAP25*、*THY1*、*PAPLN*、*ZIC2*和*DLK1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*RBP1*、*NEFM*和*DLX5*中的一种或多种;和3)将在有PPAR γ 激动剂(包括、但不限于噻唑烷二酮类的小分子诸如罗格列酮)存在下分化的所述祖细胞或表达UCP1的细胞与水凝胶(诸如包含硫醇化透明质酸盐、硫醇化明胶和/或硫醇化透明质酸盐和硫醇化明胶二者和交联剂的水凝胶)组合地施用给患者。

[0072] 在其它实施方案中,本发明提供了一种用于治疗肥胖、糖尿病、高血压、冠状动脉疾病或阿尔茨海默氏病和代谢综合征的方法,所述方法包括下述步骤:1)分离多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自多能干细胞;2)在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*HOXC6*、*PAPLN*、*THY1*、*RBP1*和*EFNB2*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA5*、*ZIC2*和*NEFM*中的一种或多种;和3)将在有PPAR γ 激动剂(包括、但不限于噻唑烷二酮类的小分子诸如罗格列酮)存在下分化的所述祖细胞或表达UCP1的细胞与水凝胶(诸如包含硫酸化透明质酸盐、硫酸化明胶和/或硫酸化透明质酸盐和硫酸化明胶二者和交联剂的水凝胶)组合地施用给患者。

[0073] 在其它实施方案中,本发明提供了一种用于治疗肥胖、糖尿病、高血压、冠状动脉疾病或阿尔茨海默氏病和代谢综合征的方法,所述方法包括下述步骤:1)分离多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自多能干细胞;2)在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*DLK1*、*DLX5*、*GPC4*和*THY1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*和*SNAP25*中的一种或多种;和3)将在有PPAR γ 激动剂(包括、但不限于噻唑烷二酮类的小分子诸如罗格列酮)存在下分化的所述祖细胞或表达UCP1的细胞与水凝胶(诸如包含硫酸化透明质酸盐、硫酸化明胶和/或硫酸化透明质酸盐和硫酸化明胶二者和交联剂的水凝胶)组合地施用给患者。

[0074] 在其它实施方案中,本发明提供了一种用于治疗肥胖、糖尿病、高血压、冠状动脉疾病或阿尔茨海默氏病和代谢综合征的方法,所述方法包括下述步骤:1)分离多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自多能干细胞;2)在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*BARX1*、*EPDR1*、*GPC4*、*EFNB2*和*DLK1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*、*ZIC2*、*CRABP1*和*DLX5*中的一种或多种;和3)将在有PPAR γ 激动剂(包括、但不限于噻唑烷二酮类的小分子诸如罗格列酮)存在下分化的所述祖细胞或表达UCP1的细胞与水凝胶(诸如包含硫酸化透明质酸盐、硫酸化明胶和/或硫酸化透明质酸盐和硫酸化明胶二者和交联剂的水凝胶)组合地施用给患者。

[0075] 在其它实施方案中,本发明提供了一种用于治疗肥胖、糖尿病、高血压、冠状动脉疾病或阿尔茨海默氏病和代谢综合征的方法,所述方法包括下述步骤:1)分离多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自多能干细胞;2)在有TGF- β 家族的生长因子的灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*SNAP25*、*PRG4*、*SBSN*、*GPC4*和*DLK1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXA5*、*HOXB2*和*CRABP1*中的一种或多种;和3)将在有PPAR γ 激动剂(包括、但不限于噻唑烷二酮类的小分子诸如罗格列酮)存在下分化的所述祖细胞或表达UCP1的细胞与水凝胶(诸如包含硫酸化透明质酸盐、硫酸化明胶和/或硫酸化透明质酸盐和硫酸化明胶二者和交联剂的水凝胶)组合地施用给患者。

[0076] 在其它实施方案中,本发明提供了一种用于治疗肥胖、糖尿病、高血压、冠状动脉疾病或阿尔茨海默氏病和代谢综合征的方法,所述方法包括下述步骤:1)分离多能干细胞衍生的克隆祖细胞系,其中所述细胞系分离自多能干细胞;2)在有TGF- β 家族的生长因子的

灭活剂(诸如头蛋白)存在下分化,作为克隆胚胎祖先系繁殖,其中所述祖先在分化之前表达一种或多种选自*ALDH1A2*、*SBSN*、*CPVL*、*ZIC2*和*THY1*的标志物,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXA5*、*HOXB2*、*RBP1*和*CRABP1*中的一种或多种;和3)将在有PPAR γ 激动剂(包括、但不限于噻唑烷二酮类的小分子诸如罗格列酮)存在下分化的所述祖细胞或表达UCP1的细胞与水凝胶(诸如包含硫醇化透明质酸盐、硫醇化明胶和/或硫醇化透明质酸盐和硫醇化明胶二者和交联剂的水凝胶)组合地施用给患者。

[0077] 不同于胎儿或成年人衍生的BAT祖先,本发明的克隆的或合并的克隆胚胎祖细胞不表达*COX7A1*或*ADIRF*。所述克隆祖细胞系可以在水凝胶上生长或包入水凝胶中,例如水凝胶诸如包含硫醇化透明质酸盐、硫醇化明胶和/或硫醇化透明质酸盐和硫醇化明胶二者和交联剂的水凝胶。

[0078] 在其它实施方案中,本发明提供了一种得到表达UCP1的细胞的方法,所述方法包括使克隆祖细胞系与PPAR γ 激动剂(包括、但不限于噻唑烷二酮类的小分子诸如罗格列酮)、任选地以及以下一种或多种接触:水凝胶诸如含有I型胶原和透明质酸的水凝胶、三碘甲腺原氨酸(T3)、 β 3-肾上腺素受体激动剂诸如CL-316,243和BMP4或BMP7,由此得到表达UCP1的细胞。合适的TGF β 家族成员包括BMP家族的成员,诸如BMP4、BMP6或BMP7。在某些实施方案中,所述TGF β 家族成员可以是TGF β 。所述克隆祖细胞系可以在水凝胶上生长或包入水凝胶中,例如包含硫醇化透明质酸盐、硫醇化明胶和/或硫醇化透明质酸盐和硫醇化明胶二者的水凝胶。

[0079] 在其它实施方案中,本发明提供了一种得到表达*C19orf80*的细胞的方法,所述方法包括使克隆祖细胞系与一种或多种TGF β 家族成员接触,由此得到表达*C19orf80*的细胞。合适的TGF β 家族成员包括BMP家族的成员,诸如BMP4、BMP6或BMP7。所述克隆祖细胞系可以在水凝胶上生长或包入水凝胶中,例如包含硫醇化透明质酸盐、硫醇化明胶和/或硫醇化透明质酸盐和硫醇化明胶二者的水凝胶。

[0080] 在其它实施方案中,本发明提供了一种得到表达一种或多种选自*FABP4*、*C19orf80*、*ADIPOQ*或*UCP1*的基因表达标志物的细胞的方法,所述方法包括使本文中公开的克隆祖细胞系与基于硫醇化透明质酸盐和硫醇化明胶的水凝胶(其补充了100ng/ml BMP7和1.0 μ M罗格列酮)接触14天,其中将所述细胞在低于生理温度的温度诸如28 $^{\circ}$ C温育一段时间。

[0081] 在其它实施方案中,本发明提供了一种得到表达一种或多种选自*FABP4*、*C19orf80*、*ADIPOQ*或*UCP1*的基因表达标志物的细胞的方法,所述方法包括在使用10 μ M CL316243之前使本文中公开的克隆祖细胞系与基于硫醇化透明质酸盐和硫醇化明胶的水凝胶(其补充了10 ng/ml BMP4、1.0 μ M罗格列酮、2.0 nM三碘甲腺原氨酸(T3))接触最后4小时。

[0082] 在其它的实施方案中,本发明提供了一种得到表达一种或多种选自*FABP4*、*C19orf80*、*ADIPOQ*或*UCP1*的基因表达标志物的细胞的方法,所述方法包括使本文中公开的克隆祖细胞系与基于硫醇化透明质酸盐和硫醇化明胶的水凝胶(其补充了100ng/ml BMP7和5.0 μ M罗格列酮)接触14天,其中在生理温度温育所述细胞。

[0083] 在其它的实施方案中,本发明提供了一种得到表达一种或多种选自*FABP4*、*C19orf80*、*ADIPOQ*或*UCP1*的基因表达标志物的细胞的方法,所述方法包括使本文中公开的

克隆祖细胞系与基于硫酸化透明质酸盐和硫酸化明胶的水凝胶(其补充了1-50ng/ml BMP4和1.0-5.0 μM罗格列酮)接触14天,其中在生理温度温育所述细胞。

[0084] 在其它的实施方案中,本发明提供了一种得到表达一种或多种选自*FABP4*、*C19orf80*、*ADIPOQ*或*UCP1*的基因表达标志物的细胞的方法,所述方法包括使本文中公开的克隆祖细胞系与基于硫酸化透明质酸盐和硫酸化明胶的水凝胶(其补充了100ng/ml BMP7和1.0-5.0 μM罗格列酮)接触14天,其中将所述细胞在有加入的β3-特异性的肾上腺素受体激动剂(10 μM CL-316243)存在下温育最后4小时。

[0085] 在其它实施方案中,本发明提供了一种治疗受试者中的代谢和血管疾病的方法,所述方法包括给所述受试者施用一种或多种下文所述的细胞。所述代谢或血管疾病可以包括I型或II型糖尿病、X综合征、肥胖、高血压和动脉粥样硬化。可以将所述细胞在制剂中施用给所述受试者,所述制剂包含悬浮在生理学上相容的盐溶液中、或优选地在基质中、最优选地在如下文所述的基于胶原和透明质酸的水凝胶中的细胞。

[0086] 本发明的再其它的实施方案包括试剂盒和试剂,其包含本文描述的细胞和可用于得到和/或培养本文描述的细胞的试剂。

附图说明

[0087] 图1所示的图显示了关于在祖先状态(对照)样品和暴露于在BMP4、罗格列酮、T3和CL- CL-316243中的分化的那些(分化)中的选定细胞的*FABP4*表达的Illumina微阵列RFU值。(>130RFU的RFU值被视作阳性的) (“*”标识*CITED1*阳性的确定脂肪细胞)。

[0088] 图2所示的图显示了关于在祖先状态(对照)样品和暴露于在BMP4、罗格列酮、T3和CL- CL-316243中的分化的那些(分化)中的选定细胞的*UCP1*表达的Illumina微阵列RFU值。(>130RFU的RFU值被视作阳性的) (“*”标识*CITED1*阳性的确定脂肪细胞)。

[0089] 图3所示的图显示了关于在祖先状态(对照)样品和暴露于在BMP4、罗格列酮、T3和CL- CL-316243中的分化的那些(分化)中的选定细胞的*ADIPOQ*表达的Illumina微阵列RFU值。(>130RFU的RFU值被视作阳性的) (“*”标识*CITED1*阳性的确定脂肪细胞)。

[0090] 图4所示的图显示了关于在祖先状态(对照)样品和暴露于在BMP4、罗格列酮、T3和CL- CL-316243中的分化的那些(分化)中的选定细胞的*LIPASIN*表达的Illumina微阵列RFU值。(>130RFU的RFU值被视作阳性的) (“*”标识*CITED1*阳性的确定脂肪细胞)。

[0091] 图5显示了克隆祖细胞系NP88 (A) 和NP110 (B) 的相位差照片,其中插图显示了细胞内脂质的油红-O染色以及用DAPI复染剂(C & D)对*UCP1*蛋白的免疫细胞化学染色。

[0092] 图6所示的图显示了处于不同分化条件下的*fBAT*和*SAT*对照细胞以及不同克隆胚胎祖细胞中的*UCP1*表达的qPCR定量,以鉴别用于诱导*UCP1*表达的最适条件。

[0093] 图7所示的图显示了在BMP4、罗格列酮、T3和CL- CL-316243中分化的另外选定细胞(分化)的*UCP1*表达的Illumina微阵列RFU值。(>130RFU的RFU值被视作阳性的)。

[0094] 图8所示的图显示了在BMP4、罗格列酮、T3和CL- CL-316243中分化的另外选定细胞(分化)的*ADIPOQ*表达的Illumina微阵列RFU值。(>130RFU的RFU值被视作阳性的)。

[0095] 图9所示的图显示了在BMP4、罗格列酮、T3和CL- CL-316243中分化的另外选定细胞(分化)的*LIPASIN*表达的Illumina微阵列RFU值。(>130RFU的RFU值被视作阳性的)。

[0096] 定义和缩写

定义

术语“脂肪衍生的SVF”表示来自脂肪组织来源的间质血管级分细胞。通常,这些是脂肪抽吸物质,其被离心以从更低密度的脂肪细胞分离细胞物质沉淀(SVF)。所述脂肪衍生的SVF也可以表示这样的经沉淀的或以其它方式得到的脂肪抽吸衍生的细胞,其被重新悬浮在液体中以与本文所述的本发明的细胞组合使用。

[0097] 术语“成体干细胞”表示从起源于哺乳动物的组织得到的干细胞,所述哺乳动物处于胚胎发育结束以后的发育阶段(在人类中,这表示大于8周的妊娠发育的组织)。从哺乳动物衍生出的组织可以包括从胎儿或从成年哺乳动物衍生出的组织,且可以包括间充质干细胞、神经元干细胞和骨髓衍生的干细胞。

[0098] 术语“分析型重编程技术”表示将体细胞的基因表达模式重编程至更多能状态(诸如iPS、ES、ED、EC或EG细胞的状态)的多种方法,其中所述重编程发生在多个且离散步骤中,并且不简单地依赖于体细胞向卵母细胞中的转移和该卵母细胞的活化(参见2001年11月26日提交的美国申请号60/332,510;2002年11月26日提交的美国申请号10/304,020;2003年11月26日提交的PCT申请号PCT/US02/37899;2005年8月3日提交的美国申请号60/705625;2005年8月20日提交的美国申请号60/729173;2006年7月5日提交的美国申请号60/818813,2006年8月3日提交的PCT/US06/30632)。

[0099] 术语“卵裂球/桑椹胚细胞”表示哺乳动物胚胎中的卵裂球或桑椹胚细胞、哺乳动物体外受精卵、或体外培养的卵裂球或桑椹胚细胞,具有或没有额外细胞,包括那些细胞的分化衍生物。为了本公开内容的目的,除非另外指出,否则术语“褐色脂肪细胞(brown adipose cell)”或“褐色脂肪细胞(brown adipocyte)”或“褐色脂肪组织(BAT)的细胞组分”表示表达脂肪细胞标志物以及编码蛋白LIPASIN(也被称作BETATROPHIN)的基因UCP1、ADIPOQ或C19orf80(也被称作ANGPTL8或LOC55908[登录号NM_018687.3,在Illumina基因表达微阵列上鉴别为探针ID 1430689]中的一种或多种的任何细胞。该术语包括存在于胎儿或成年褐色脂肪组织中的表达COX7A1的成熟细胞,尽管本发明的细胞不表达成熟标志物COX7A1,但是在其它方面是功能性的褐色脂肪细胞且是对于治疗用途而言合乎需要的,这是相对于胎儿或成年人衍生的褐色脂肪细胞,因为在从胚胎祖细胞产生的BAT细胞中高水平的神经突生长晕促进因子表达诸如Netrin G1表达(促进交感神经系统对组织的神经支配)。该术语也包括部分地分化成褐色脂肪细胞的细胞,其表达最高水平的Netrin G1以促进所述神经支配。

[0100] 术语“候选培养物”表示不同胚胎祖细胞类型的、多能干细胞衍生的异质混合物,从其可以按照描述分离和繁殖克隆的、寡克隆的或合并的克隆的细胞(Regen. Med. (2008) 3(3), 287-308)。根据用户的选择,可以将所述候选培养物冷冻保存用于新的克隆的、寡克隆的或合并的克隆的细胞的连续重新分离。

[0101] 术语“表达基因X的细胞”、“在细胞(或细胞群体)中表达基因X”或其等同描述是指,使用特定测定平台对所述细胞的分析得到阳性结果。反之亦然(即,不表达基因X的细胞或等同描述是指,使用特定测定平台对所述细胞的分析得到阴性结果)。因而,本文所述的任何基因表达结果与针对指定的基因在测定平台(或多个平台)中采用的具体探针相关联。

[0102] 术语“细胞系”表示能够在体外增殖和扩增的细胞的非永生或永生群体。

[0103] 术语“克隆的”表示从单一细胞扩增成细胞的群体所得的细胞群体,全部细胞都源

自该原始单一细胞且不含有其它细胞。

[0104] 术语“集落原位分化”表示细胞(例如, hES、hEG、hiPS、hEC或hED)集落在原位的分化, 不从培养容器移出或分散所述集落, 所述集落在所述容器内作为未分化的干细胞系增殖。集落原位分化不利用形成胚状体的中间步骤, 尽管在集落原位分化阶段以后可以存在胚状体形成或其它聚集技术诸如旋动培养的应用。

[0105] 当提及通过本发明的方法从多能干细胞制备的细胞使用时, 术语“分化的细胞”表示, 与亲本多能干细胞相比, 具有减小的分化所有体细胞类型的潜力的细胞。作为非限制性例子, 人多能干细胞(诸如hES细胞)比本发明的hES衍生的克隆胚胎祖细胞更少地分化, 后者又比本发明的体外生产的褐色脂肪祖先更少地分化, 后者又比胎儿或成年人衍生的褐色脂肪细胞更少地分化, 因为胎儿或成年人衍生的褐色脂肪细胞表达*COX7A1*(处于分化的胎儿或晚期阶段的细胞的一种标志物), 且其中本发明的细胞不表达*COX7A1*。本发明的分化的细胞包含可以进一步分化的细胞(即, 它们可以不是终末分化的)。

[0106] 术语“直接分化”表示, 不经过将分离的未分化的干细胞(诸如hES细胞)作为未分化的细胞系进行繁殖的中间阶段, 将卵裂球细胞、桑椹胚细胞、ICM细胞、ED细胞或体细胞重编程至未分化的状态(诸如在制备iPS细胞的过程中, 但是在已经以未分化的状态纯化这样的细胞之前)直接分化的过程。直接分化的一个非限制性例子是如所述的将完整人胚泡培养成培养物并衍生出ED细胞, 而不产生人ES细胞系(Bongos, 等人, 1994. *人 Reproduction* 9:2110)。

[0107] 术语“胚状体”是在本领域中与“聚集体”同义的术语, 表示当将多能干细胞在单层培养物中生长或维持在悬浮培养物中时出现的分化的和未分化的细胞的聚集体。胚状体是不同细胞类型的混合物, 通常来自几个胚层, 可通过形态学标准和细胞标志物(其可通过免疫细胞化学检测)辨别。术语“胚胎干细胞”(ES细胞)表示从胚泡、卵裂球或桑椹胚的内细胞团衍生出的细胞, 其已经作为细胞系连续传代, 同时维持未分化的状态(例如表达对所述物种的ES细胞特异性的*TERT*、*OCT4*和*SSEA*和TRA抗原)。胚泡、卵裂球、桑椹胚等可以得自体外受精卵。ES细胞可以衍生自具有精子或DNA的卵细胞的体外受精、核转移、孤雌生殖、或产生在MHC区域中具有半合子状态或纯合子状态的hES细胞的方式。尽管ES细胞在历史上已经被定义为当被移植进植入前胚胎中时能够分化成所有体细胞类型以及种系的细胞, 但是来自许多物种(包括人)的候选ES培养物在培养物中具有更扁平的外观, 且通常不会促进种系分化, 且因此被称作“ES-样细胞”。通常认为, 人ES细胞实际上是“ES-样”, 但是, 在本申请中, 我们将使用术语ES细胞来表示ES和ES-样细胞系。

[0108] “饲养细胞”或“饲料(feeder)”是用于描述一类细胞的术语, 所述细胞与另一类细胞共培养, 以提供所述第二类细胞可以在其中生长的环境。某些类型的多能干细胞可以由原代小鼠胚胎成纤维细胞、永生化的小鼠胚胎成纤维细胞、胚胎禽成纤维细胞或从hES细胞分化的人成纤维细胞-样细胞支持。如果多能干细胞在分裂以后已经生长至少一轮, 其中没有加入新鲜饲养细胞来支持所述细胞的生长, 就说所述多能干细胞群体“基本上不含”饲养细胞。

[0109] “生长环境”是目标细胞将在其中在体外增殖、分化或成熟的环境。所述环境的特征包括在其中培养所述细胞的培养基, 可能存在的任何生长因子或诱导分化的因子, 和可能存在的支撑结构(诸如在固体表面上的衬底)。

[0110] 当已经通过任意合适的人工操作方式将多核苷酸转移进细胞中时,或在细胞是原始改变的细胞的已经继承多核苷酸的后代的情况下,就说细胞是“遗传上改变的”、“转染的”或“遗传上转化的”。所述多核苷酸经常包含编码目标蛋白的可转录序列,其使所述细胞能够在升高的水平表达所述蛋白。如果改变的细胞的后代具有相同改变,就说遗传改变是“可遗传的”。

[0111] 术语“人胚胎衍生的”(“hED”)细胞表示卵裂球衍生的细胞、桑椹胚衍生的细胞、胚胎衍生的细胞,包括内细胞团、胚盾或上胚层的细胞,或者早期胚胎(包括原始内胚层、外胚层、中胚层和神经脊)的其它全能或多能干细胞及其衍生物,上限为与正常人发育的前8周的等同状态关联的分化状态,但排除已经作为细胞系传代的hES细胞所衍生的细胞(参见,例如,Thomson的美国专利7,582,479、7,217,569、6,887,706、6,602,711、6,280,718和5,843,780)。hED细胞可以衍生自植入前胚胎,所述植入前胚胎如下产生:用精子或DNA使卵细胞体外受精,核转移,或染色质转移,通过孤雌生殖诱导卵细胞以形成孤雌生殖体(parthenote),或分析型重编程技术。

[0112] 术语“人胚胎生殖细胞”(hEG细胞)表示,衍生自胎儿组织原生殖细胞或者成熟中(maturing)或成熟的(mature)生殖细胞(诸如卵母细胞和精原细胞)的多能干细胞,其可以分化成身体内的不同组织。hEG细胞也可以衍生自通过雌核发育或雄核发育手段所产生的多能干细胞,即,在所述方法中,所述多能细胞衍生自仅含雄性或雌性来源的DNA的卵母细胞并因此将包含全部雌源(female-derived)或雄源(male-derived)DNA(参见1999年10月28日提交的美国申请号60/161,987;2000年10月27日提交的美国申请号09/697,297;2001年11月29日提交的美国申请号09/995,659;2003年2月27日提交的美国申请号10/374,512;2000年10月27日提交的PCT申请号PCT/US/00/29551)。

[0113] 术语“人胚胎干细胞”(hES细胞)表示人ES细胞,其为从植入前人胚胎产生的多能干细胞系,诸如在IVF操作中在胚泡的常规生产中被抛弃的那些。

[0114] 术语“人iPS细胞”表示具有与hES细胞类似的性能的细胞,所述性能包括当被移植进免疫受损的小鼠中时从所有三种胚层(中胚层、外胚层和内胚层)形成至少一种细胞类型的能力,其中所述iPS细胞衍生自暴露于去分化因子以后的不同体细胞谱系的细胞,所述去分化因子例如是hES细胞-特异性的转录因子组合:*KLF4*、*SOX2*、*MYC*和*OCT4*,或*SOX2*、*OCT4*、*NANOG*和*LIN28*。可以使用去分化因子的任意方便组合来产生iPS细胞。所述iPS细胞可以如下产生:用载体诸如本领域已知的逆转录病毒、慢病毒或腺病毒载体表达这些基因,或以蛋白形式引入所述因子,例如,通过透化或其它技术。关于这样的示例性方法的描述,参见:2006年8月3日提交的PCT申请号PCT/US2006/030632;美国申请系列号11/989,988;2000年6月30日提交的PCT申请PCT/US2000/018063;2000年12月15日提交的美国申请系列号09,736,268;2004年4月23日提交的美国申请系列号10/831,599;和美国专利公开20020142397(申请系列号10/015,824,标题为“Methods for Altering Cell Fate”);美国专利公开20050014258(申请系列号10/910,156,标题为“Methods for Altering Cell Fate”);美国专利公开20030046722(申请系列号10/032,191,标题为“Methods for cloning mammals using reprogrammed donor chromatin or donor cells”);和美国专利公开20060212952(申请系列号11/439,788,标题为“Methods for cloning mammals using reprogrammed donor chromatin or donor cells”)。

[0115] 应当理解,胚胎干细胞(诸如hES细胞)、胚胎干细胞样细胞(诸如iPS细胞)和从下述细胞类型衍生出的其它多能干细胞以及祖细胞都可以根据本发明的方法使用。术语“ICM细胞”表示哺乳动物胚胎的内细胞团的细胞或在体外培养的内细胞团的细胞,具有或没有周围滋养外胚层细胞。所述ICM细胞可以衍生自体外受精卵。

[0116] 术语“寡克隆的”表示源自小细胞群体的细胞群体,所述小细胞群体通常是2-1000个细胞,看起来具有类似的特征诸如形态学或分化标志物的存在或不存在,所述特征不同于相同培养物中的其它细胞的特征。将寡克隆细胞与不具有这些共同特征的细胞分离,并使其增殖,从而产生基本上完全衍生自相似细胞的原始群体的细胞群体。

[0117] 术语“多能干细胞”表示能够分化成三种基本胚层内胚层、中胚层和外胚层(包括神经嵴)中的任一种的超过一种分化的细胞类型的哺乳动物细胞。这样的细胞包括hES细胞、卵裂球/桑椹胚细胞和它们的衍生出的hED细胞、hiPS细胞、hEG细胞、hEC细胞。多能干细胞可以是遗传上修饰的或没有遗传上修饰的。作为非限制性例子,遗传修饰的细胞可以包括标志物诸如荧光蛋白(以促进它们的鉴别,当与其它细胞类型混合时)或与免疫监视有关的基因的修饰(以允许所述细胞没有排斥地被同种异体地耐受)。

[0118] 术语“合并的克隆的”表示如下得到的细胞群体:组合两个或更多个克隆群体以产生具有均匀标志物(诸如基因表达的标志物)的类似于克隆群体的细胞群体,但是不产生其中所有细胞衍生自相同原始克隆的群体。所述合并的克隆系可以包括单一或混合基因型的细胞。在克隆系相对早地分化或在它们的增殖寿命的早期以不希望的方式改变的情况下,合并的克隆系是特别有用的。

[0119] 在本发明中与“多能干细胞”同义地使用的术语“原干细胞”共同地表示这样的细胞:其能够分化成所有三种基本胚层(内胚层、中胚层和外胚层)以及神经嵴的细胞。人原干细胞因此表达阶段特异性的胚胎抗原(SSEA) SSEA3和SSEA4,和使用命名为Tra-1-60和Tra-1-81的抗体可检测的标志物(Thomson等人, *Science* 282:1145, 1998)。因此,原干细胞的例子包括但不限于人或非人哺乳动物ES细胞或细胞系、卵裂球/桑椹胚细胞和它们的衍生的ED细胞、iPS和EG细胞,或从孤雌生殖的、雌核发育的或核转移衍生的胚胎衍生出的对应细胞。

[0120] 术语“万能供体细胞”表示从原干细胞衍生出的细胞,所述原干细胞已经经过遗传修饰以通过调节某些基因的表达来降低免疫原性,诸如 $\beta 2$ 微球蛋白(*B2M*)的两个等位基因之一的敲除,HLA基因的敲除,或增加的*HLA-G*或*HLA-H*、或*CTLA4-Ig*和*PD-L1*的表达,以及在本文中包括的或本领域已知的其它修饰,并随后用于产生分化的细胞用于研究和治疗用途,其中所述细胞具有降低的免疫原性。

[0121] 本文中使用的“受试者”包括、但不限于人类、非人灵长类动物和非人脊椎动物,诸如野生、家养和耕作动物,包括任何哺乳动物,诸如猫、狗、奶牛、绵羊、猪、马、兔、啮齿类动物诸如小鼠和大鼠。在某些实施方案中,术语“受试者”、“患者”或“动物”表示雄性。在某些实施方案中,术语“受试者”、“患者”或“动物”表示雌性。

[0122] 本文中使用的术语“治疗”或“处理”可以表示治疗性处理或预防性或防止性措施,其中目的是阻止或减慢(减轻)不希望的生理状况、症状、障碍或疾病,或得到有益的或期望的临床结果。在某些实施方案中,该术语可以表示治疗和预防。为了本公开内容的目的,有益的或期望的临床结果包括、但不限于:症状的减轻;病症、障碍或疾病的程度的减轻;病

症、障碍或疾病的状态的稳定(即,不恶化);病症、障碍或疾病的开始的延迟或进展的减慢;病症、障碍或疾病状态的改善;和可检测的或不可检测的减轻(部分的或完全的),或病症、障碍或疾病的好转或改善。治疗包括引起临床上显著的应答,没有过度的副作用水平。治疗也包括与如果不接受治疗所预期的存活相比延长存活。

[0123] 术语“组织再生”表示组织、器官或其它身体结构或其部分在损失、损伤或退化后的至少部分再生、置换、恢复或再生长,其中所述组织再生若非本发明所述方法就不会发生。组织再生的例子包括断指或断肢的再生长,包括软骨、骨、肌肉、肌腱和韧带的再生长,因损伤或疾病已丧失的骨、软骨、皮肤或肌肉的无疤再生长,受伤或患病器官的大小和细胞数目的增加,使得所述组织或器官接近该组织或器官的正常大小或它在受伤或患病之前的大小。取决于组织类型,组织再生可以通过多种不同机制发生,例如,现有细胞和/或组织的重排(例如,通过细胞迁移),成年成体干细胞或其它祖细胞的分裂和它们后代中至少一些的分化,和/或细胞的去分化、转分化和/或增殖。

[0124] “脂联素”或“ADIPOQ”(也被称作AdipoQ、GBP-28或apM1)是在人类中由ADIPOQ基因编码的蛋白。脂联素调节许多代谢过程,包括葡萄糖调节和脂肪酸氧化。脂联素从脂肪组织分泌进血流中,在此处激素的水平与体脂百分比、II型糖尿病和冠状动脉疾病负相关(Yamamoto等人,“Circulating adiponectin levels and risk of type 2 diabetes in the Japanese”, *Nutr Diabetes*. 2014年8月18日;4:e130)。

[0125] “FABP4(脂肪酸结合蛋白4)”(也被称作aP2或AFABP)是主要在脂肪细胞和巨噬细胞中表达的脂肪酸的载体蛋白,且在人类中由FABP4基因编码。脂肪酸结合蛋白是结合长链脂肪酸和其它疏水配体的、小的、高度保守的、细胞质蛋白的家族。有人认为,FABP作用包括脂肪酸摄取、运输和代谢(Thumser等人,“Fatty acid binding proteins: tissue-specific functions in health and disease”, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2014年3月;17(2):124-9)。

[0126] “Lipasin”(也被称作betatrophin或ANGPTL8)是在人类中由C19orf80基因(也被称作LOC55908、LIPASIN或BETATROPHIN(登录号NM_018687.3,在Illumina基因表达微阵列上鉴别为探针ID 1430689))编码的蛋白。C19orf80是一种假定的肽激素,其被发现在小鼠中会增加胰腺β细胞经历细胞分裂的速率(Yi等人, Betatrophin: a hormone that controls pancreatic beta cell proliferation, *Cell*. 2013年5月9日;153(4):747-58)。给小鼠注射betatrophin cDNA会导致降低的血糖水平,据推测是由于在胰岛细胞处的作用(Yi等人, Betatrophin: a hormone that controls pancreaticβcell proliferation, *Cell*. 2013年5月9日;153(4):747-58)。

[0127] “UCP1(解偶联蛋白1)”(也被称作产热素或SLC25A7)是在褐色脂肪组织的线粒体中发现且在人类中由UCP1基因编码的解偶联蛋白。UCP1通过无寒颤性产热而参与热产生(Golozoubova等人, Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold, *FASEB J*. 2001年9月, 15(11):2048-50)。UCP-1将氧化磷酸化与电子传递解偶联,从而产生热而不是ATP,正如在没有UCP-1的情况下在线粒体中发生的(Fedorenko, 等人, “Mechanism of fatty-acid dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria” *Cell* 2012年10月12日;151(2)400-13)。UCP1在褐色脂肪细胞中通过信号传递级联而活化,所述信号传递级联开始于交感神经系统将去甲肾上腺素释放到质膜的

Beta-3肾上腺素能受体上(Cannon等人,“Brown adipose tissue function and physiological significance”*Physiol Rev.*2004, 84, 277-359)。

[0128] 在更详细地描述本发明之前,应当理解,本发明不限于描述的特定实施方案,因为这些当然可以变化。还应当理解,在本文中使用的术语仅仅用于描述具体实施方案的目的,无意成为限制性的,因为本发明的范围仅由所附权利要求书限定。

[0129] 在提供了值的范围的情况下,应当理解,介于该范围的上限与下限之间的每个居间值(直至下限单位的十分之一,除非上下文另外清楚地指明)以及该所述范围内的任何其它所述值或居间值均被包含在本发明内。这些更小范围的上限和下限可以独立地被包括在所述更小范围中,并且也被包括在本发明中,具有在所述范围中的任何具体地排除的限制。在所述范围包括一个或两个限值的情况下,排除那些被包括的限值中的任一个或两个限值的范围也被包括在本发明中。

[0130] 在本文呈现的某些范围的数值前面存在术语“约”。术语“约”在本文中用于为其后面的确切数字以及在该术语后面的数字附近或靠近的数字提供字面支持。在确定数字是否接近或靠近特别提及的数字时,接近或者靠近的未提及的数字可能是这样的数字:该数字在呈现它的内容中提供了特别提及的数字的实质等同数字。

[0131] 除非另外定义,在本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解相同的含义。尽管在本发明的实践或试验中也可以使用与本文描述的那些类似或等同的任何方法和材料,但是现在描述代表性的示例性方法和材料。

[0132] 应当指出,如在本文中和在所附权利要求书中所使用的,单数形式“一个/种”和“所述”包括复数指示物,除非上下文另外清楚地指明。进一步指出,可以撰写权利要求以排除任何任选的要素。这样,该声明意图充当与权利要求要素的列举结合使用诸如“唯一”、“仅”等排它性术语的前提基础,或使用“否定”限制的前提基础。

[0133] 正如本领域技术人员在阅读本公开内容以后会明白的,本文描述和解释的每个单独实施方案具有离散的组分和特征,所述组分和特征可以容易地与其它几个实施方案中的任一个的特征分离或组合,而不偏离本发明的范围或精神。任何提及的方法可以按提及的事件的顺序进行,或按逻辑上可行的任意其它顺序进行。

[0134] 缩写

BAT - 褐色脂肪组织

bFGF - 碱性成纤维细胞生长因子

BMP - 骨形态发生蛋白

cGMP - 当前良好生产过程

CNS - 中枢神经系统

CT - 计算机体层摄影术

CTLA4-Ig - 细胞毒性T淋巴细胞抗原4-免疫球蛋白融合蛋白

DMEM - Dulbecco氏改良的伊格尔培养基

DMSO - 二甲亚砜

DPBS - Dulbecco氏磷酸盐缓冲盐水

EC - 胚胎性癌

EC细胞- 胚胎性癌细胞; hEC细胞是人胚胎性癌细胞

ECAPC - 胚胎皮肤脂肪细胞祖细胞

ECM - 细胞外基质

ED细胞- 胚胎衍生的细胞; hED细胞是人ED细胞

EDTA - 乙二胺四乙酸

EG细胞- 胚胎生殖细胞; hEG细胞是人EG细胞

EGF - 表皮生长因子

ES细胞- 胚胎干细胞; hES细胞是人ES细胞。为了本发明的目的ES细胞(包括hES细胞)可以处于与人胚泡的ICM细胞对应的原初状态,或与扁平上胚层细胞(有时被称作“ES-样”细胞)对应的预处理状态。

[0135] FACS - 荧光活化细胞分选

fBAT - 胎儿衍生的褐色脂肪组织

FBS - 胎牛血清

FCS - 胎牛血清

³⁰ FDG - F18-氟脱氧葡萄糖

GMP - 良好生产规范

hED细胞- 人胚胎衍生的细胞

hEG细胞- 人胚胎生殖细胞是从胎儿组织的原生殖细胞衍生出的干细胞。

[0136] hEP细胞- 人胚胎祖细胞

hiPS细胞- 人诱导的多能干细胞是在暴露于hES-特异性的转录因子(诸如*SOX2*、*KLF4*、*OCT4*、*MYC*)或由*NANOG*、*LIN28*、*OCT4*和*SOX2*编码的基因、RNA或蛋白以后从体细胞得到的具有与hES细胞类似的性能的细胞。

[0137] hES - 人胚胎干

hESC - 人胚胎干细胞

ICM - 哺乳动物胚泡期胚胎的内细胞团。

iPS细胞-诱导的多能干细胞是在暴露于ES-特异性的转录因子(诸如*SOX2*、*KLF4*、*OCT4*、*MYC*或*NANOG*、*LIN28*、*OCT4*和*SOX2*)以后从体细胞得到的具有与hES细胞类似的性能的细胞。

[0138] ITS - 胰岛素, 转铁蛋白, 硒

IVF - 体外受精

MEM - 最低必需培养基

MSC - 间充质干细胞

NHAC-正常人关节软骨细胞

NT - 核转移

PBS - 磷酸盐缓冲盐水

PCR - 聚合酶链式反应

PD-L1 - 程序性死亡配体-1

PEGDA - 聚乙二醇二丙烯酸酯

²⁵ PET - 正电子发射断层摄影术

PNS - 周围神经系统

qRT-PCR - 定量实时聚合酶链式反应

RFU - 相对荧光单位

SCNT - 体细胞核转移

SFM - 无血清培养基

SVF - 间质血管级分

TRF - 末端限制性片断;在用限制性内切核酸酶消化以后端粒的消化产物

WAT细胞- 白色脂肪组织细胞。

[0139] 发明详述

本发明解决了制备人褐色脂肪组织的高度纯化细胞组分的大群体的问题,这通过证实如何有效地从多能干细胞分化出它们来实现。

[0140] 多能干 (pPS) 细胞诸如人诱导的多能干细胞 (hiPS) 细胞、人胚胎干 (hES) 细胞和人孤雌生殖的多能干细胞 (hPPS) 细胞和其它具有多能性潜力的细胞可以如下在工业规模分化成BAT的正常功能性细胞组分:首先在本文描述的某些确定条件下开始一般分化,然后扩增克隆胚胎祖细胞或合并的克隆胚胎祖细胞、或寡克隆胚胎祖细胞(其可以简单地在传统细胞培养容器中作为粘附细胞在细胞培养物中扩增,或附着于浆中的珠子),冷冻保存,并再次扩增,然后使用本文描述的技术分化以产生可用于研究和治疗的BAT的细胞组分。已经开发了一种策略,其帮助优化在上述生产技术中有用的因子的组合。本发明的技术旨在生产高度富集的细胞的群体,所述细胞能够分化成表达*ADIPOQ*、*C19orf80*和*UCPI*的BAT细胞。

[0141] 从hES细胞有效地生产BAT细胞的方法的开发是重要的,因为可以造成hES细胞无限地增殖且可以将其遗传修饰以允许遗传修饰的引入,所述遗传修饰允许产生货架外(off-the-shelf)同种异体细胞,后者然后可以产生期望的治疗上有用的分化的细胞类型的工业规模生产,只要已知生产所述分化的细胞类型(具有必要的纯度和身份标准)的方式。因此,本发明提供了可以用于产生无限量的BAT细胞的系统。

[0142] 下面的公开内容提供了如何制备本发明的BAT细胞的完整描述。它提供了这些细胞可以如何用在研究和药物开发中的广泛例证。本公开内容也提供了关于将多能干细胞衍生的BAT细胞用于再生和改造BAT以恢复年轻脂肪、脂蛋白和葡萄糖代谢的药物组合物、装置和治疗方法。

[0143] 存在逐渐增加的对改进的从ES和iPS细胞产生祖细胞类型的方法的需要,所述祖细胞类型表现并维持均匀分化状态,并且表现出位点特异性的同源框基因表达。脂肪细胞是具有基因表达的重要位点特异性差异的细胞类型的一个例子。在发育的人体内的不同类型的脂肪细胞各自在维持生理学体内稳态中具有独特作用。例如,皮下脂肪在众多方面不同于内脏脂肪。就皮下脂肪而言,存在多种位点特异性的脂肪细胞,它们也彼此不同。尽管脂肪细胞通常在为将来代谢需要储存能量中提供生理功能,一种被称作褐色脂肪组织(BAT)或简称“褐色脂肪”的专门类型的脂肪组织(通常限于哺乳动物的背面诸如在年轻哺乳动物的肩胛骨之间,或在锁骨上区域或颈区域)在几个方面不同于身体别处皮下脂肪中的白色脂肪细胞。已经报道有代谢活性的BAT在成年人中是可检测的,如使用葡萄糖类似物F18-氟脱氧葡萄糖(FDG-PET/CT)作为成像剂通过PET/CT测定的(van der Lans等人,“Cold-activated brown adipose tissue in human adults: methodological issues” *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2014年7月15日; 307(2)R103-13)。

[0144] 在最近的20年中,已经发现BAT作为产热物以及调节能量、脂质和脂蛋白代谢的器

官起作用。褐色脂肪细胞受交感神经系统 (SNS) 高度地神经支配,且BAT产热几乎排它地在SNS神经支配控制下(Cannon等人,“Brown adipose tissue function and physiological significance”*Physiol Rev.*2004, 84, 277-359)。BAT可以进一步作为产生关键脂肪因子诸如脂联素(也被称作AdipoQ、GBP-28或aPM1,在人类中由*ADIPOQ*基因编码)和*C19orf80*(也称作betatrophin或ANGPTL8,在人类中由*C19orf80*基因编码)的内分泌器官起作用(Shehzad, 等人,“Adiponectin:regulation of its production and its role in human diseases”*Hormone*, 2012, 1-3月,11(1):8-20)。在存在于褐色脂肪中的某些细胞中表达的线粒体膜蛋白UCP1(解偶联蛋白1,也被称作产热素,在人类中由基因*UCP1*编码)似乎在氧化磷酸化的解偶联(其导致BAT的产热)中是关键性的(Fedorenko, 等人,“Mechanism of fatty-acid dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria”*Cell* 2012年10月12日;151(2)400-13)。此外,存在两种不同类型的褐色脂肪细胞,通常命名为“褐色”脂肪细胞和“米色”脂肪细胞。据报道褐色和米色脂肪细胞具有不同的胚胎学起源,其中据报道褐色脂肪细胞衍生自也能够骨骼肌分化的*MYF5+* 祖先(Seale P, Bjork B, Yang W, 等人, *PRDM16* controls a brown fat/ skeletal muscle switch. *Nature* (2008); 454:961-968),且据报道米色脂肪细胞衍生自*MYF5-* 祖先(Wu等人,“Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human”*Cell*, 2012年7月20日, 150(2)366-376)。

[0145] 如在本发明中使用的,所有表达*UCP1*和*ADIPOQ*或*C19orf80*中的一种或多种的本发明的细胞被命名为“褐色”脂肪细胞。尽管小分子药物诸如噻唑烷二酮类的化合物(罗格列酮,也被称作*Avandia*)已经被证实作为抗糖尿病剂的有用性,但是这样的化合物经常可以具有严重的副作用。因此,已经出现了褐色脂肪细胞移植作为治疗方案的概念。报道提示,褐色或米色脂肪细胞的损失可能与肥胖、心血管疾病、高血压和II型糖尿病相关,并且移植对这些细胞的恢复可以在非人动物研究中逆转肥胖和II型糖尿病。但是,仍然需要一种用于在工业规模生产表达*UCP1*的褐色脂肪细胞组分和由褐色脂肪组织表达的某些脂肪因子(诸如脂联素和*C19orf80*)的方法,它们适合用于移植在人中用于治疗这些大的且逐渐增加的健康问题。

[0146] 技术诸如人胚胎祖先(hEP)细胞系的克隆繁殖可以促进经纯化的和规模可变的细胞系的衍生,所述细胞系对应于用在研究和治疗中的不同组织类型的区域原基(anlagen)。另外,围绕这样的确定的和规模可变的祖先的研究的标准化可以改善分化研究在实验室之间的再现性。

[0147] 本发明教导了用于生产BAT组织的特定细胞组分的方法和组合物,包括:1)表达*UCP1*的褐色脂肪细胞,其表达低至不可检测的水平的脂肪因子脂联素和betatrophin;2)脂联素+ betatrophin + 脂肪细胞,其表达低或零水平的*UCP1*;3)表达*UCP1*的褐色脂肪细胞,其在与fBAT细胞相当的水平表达*ADIPOQ*和*C19orf80*,和4)表达*ITLN1*或*ITLN2*的血管内皮细胞;和这三种细胞类型与基于胶原和透明质酸的水凝胶的组合,具有或没有加入的来自自体脂肪衍生的SVF的细胞。

[0148] 干细胞的来源

使用不同类型的干细胞可以实践本发明。适合用在本发明中的干细胞包括从可互换的来源衍生出的多能干细胞,它们都将如本文中所述执行。所述多能干细胞可以是在卵母细

胞的活化以后形成的细胞,诸如胚泡,或通过分析型重编程技术重编程的体细胞。非限制性例子是原代培养物或建立的胚胎干细胞系或胚胎生殖细胞系,如下面举例说明的。

[0149] 本发明的技术也可以用原代胚胎或胎儿组织直接实现,从具有产生软骨细胞的潜力的原代细胞直接衍生出软骨细胞,无需首先建立未分化的细胞系。

[0150] 多能干细胞

哺乳动物多能干细胞能够分化成三种基本胚层内胚层、中胚层和外胚层(包括神经嵴)中的任一种的超过一种分化的细胞类型。为了本发明的目的,这样的细胞包括人诱导的多能干细胞、从孤雌生殖地活化的卵母细胞(即没有精细胞受精而活化的卵细胞)衍生出的人孤雌生殖干细胞、人胚胎干细胞、从胎儿生殖脊衍生出的人胚胎生殖细胞和一些人胚胎性癌细胞。多能干细胞可以是遗传上修饰的或未遗传上修饰的。作为非限制性例子,遗传修饰的细胞可以包括标志物诸如荧光蛋白(以促进它们的鉴别,当与其它细胞类型混合时)或与免疫监视有关的基因的修饰(以允许所述细胞没有排斥地被同种异体地耐受)。

[0151] 胚胎干细胞可以分离自灵长类动物物种的成员的胚泡(美国专利号5,843,780; Thomson等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7844, 1995)以及桑椹胚阶段的胚胎和胚盘的上胚层。使用Thomson等人描述的技术(美国专利号6,200,806; *Science* 282:1145, 1998; *Curr. Top. Dev. Biol.* 38:133 ff., 1998)和Reubinoff, 等人, *Nature Biotech.* 18:399, 2000),可以从人胚泡细胞制备人胚胎干(hES)细胞。

[0152] 简而言之,可以使用在常规IVF操作过程中产生的多余人植入前胚胎,或可以将单细胞人胚胎繁殖至胚泡期(Bongso, 等人, *Hum Reprod* 4:706, 1989)。将胚胎在G1.2和G2.2培养基中培养至胚泡期(Gardner等人, *Fertil. Steril.* 69:84, 1998)。通过短暂地暴露于链霉蛋白酶(Sigma),从发育的胚泡除去透明带。通过免疫外科分离内细胞团,其中将胚泡暴露于兔抗-人脾细胞抗血清的1:50稀释液30 min,然后在DMEM中洗涤3次各5分钟,并暴露于豚鼠补体(Gibco)的1:5稀释液3分钟(Solter, 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:5099, 1975)。在DMEM中洗涤另外2次以后,通过轻轻抽吸从完整内细胞团(ICM)除去裂解的滋养外胚层细胞,并将ICM铺板在有丝分裂灭活的小鼠、人或禽成纤维细胞饲养层上。

[0153] 9-15天以后,如下将内细胞团衍生的生长晕解离成块:暴露于含有1 mM EDTA的、不含钙和镁的磷酸盐缓冲盐水(PBS),暴露于分散酶或胰蛋白酶,或用微量移液器机械解离;并然后在新鲜培养基中重新铺板在饲养细胞上。将具有未分化的形态学的生长中的集落通过微量移液器个别地选择,机械地解离成块,并重新铺板。将ES-样形态学表征为具有明显高的核质比和显著细胞核的紧凑集落。然后将得到的ES细胞每1-2周如下常规地拆分:通过简单胰蛋白酶消化,暴露于Dulbecco氏PBS(含有2 mM EDTA),暴露于IV型胶原酶(约200 U/mL; Gibco),或通过微量移液器选择单个集落。约50-100个细胞的块大小是最佳的。

[0154] 体细胞的重编程

重编程培养基的制备:

为人胚胎干细胞(hESC)培养物开发的大多数培养基不支持RNA重编程,因为包含来自TGF β 超家族的细胞因子对于重编程而言可以是抑制性的。Pluriton重编程培养基(Pluriton Reprogramming Medium, Stemgent)的应用会支持RNA重编程。此外,用重编程合格的人新生儿包皮成纤维细胞(来自Global Stem的NUFFs-RQ)调理Pluriton培养基可以增

加重编程效率。在开始重编程之前1周,在含有10%胎牛血清的DMEM (DMEM 10%FCS) 中将每个T175组织培养物处理过的烧瓶铺板250万个NUFF,并在5%CO₂常氧培养箱中培养过夜。次日,更换培养基,用PBS冲洗一次并除去,然后在经照射的NUFF上覆盖25ml Pluriton培养基。收集培养基,并每天补充25ml新鲜Pluriton培养基持续5天。将每天级分在4℃储存,合并,然后穿过0.5 μ低附着过滤器过滤以除去细胞碎片。经调节的Pluriton培养基然后可以使用或冷冻储存备用。

[0155] 用于重编程的人成纤维细胞的制备:

从患者活组织检查样品衍生出的人真皮成纤维细胞可以用RNA容易地重编程为iPS细胞。在开始重编程之前,在含有10%胎牛血清的DMEM (DMEM 10%FCS) 中将每个T175组织培养物处理过的烧瓶铺板250万个真皮成纤维细胞,并在5%CO₂常氧 (21%O₂) 培养箱中培养过夜。允许所述培养物生长至80%汇合,并然后用0.05%胰蛋白酶EDTA溶液从所述平板解离成单细胞溶液。将胰蛋白酶用DMEM 10%FCS灭活,离心,抽吸,并以25,000个细胞/ml的密度重新悬浮在DMEM 10%FCS培养基中。将50,000个靶成纤维细胞重新铺板在用Matrigel (Corning) 预包被的6-孔板的一个孔上,并在5%CO₂低氧 (3-5%O₂) 培养箱中培养过夜。

[0156] 将人成纤维细胞转移至重编程培养基:

用微RNA的混合液转染的人真皮成纤维细胞对随后用编码Oct4的mRNA重编程是更接受的。除去DMEM 10%FCS培养基,用PBS冲洗一次,并然后用2ml/孔的补充了300ng/ml重组B18R蛋白 (eBioscience) 的经调节的Pluriton培养基替换。将所述平板放在5%CO₂低氧 (3-5%O₂) 培养箱中至少2小时使培养基平衡。

[0157] 用RNA转染人成纤维细胞:

用微RNA的混合液转染人真皮成纤维细胞一次,随后每天用Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Lin28 (OSKML) 合成mRNA's的混合液转染可以提高总RNA重编程效率。为了制备微RNA转染复合物,在两个单独试管中将3.5 μl微RNA混合液 (Stemgent) 加入21.5 μl Stemfect缓冲液,并将4 μl Stemfect转染试剂加入21 μl Stemfect缓冲液。将二者组合并在室温静置15分钟。将50 μl微RNA转染复合物以逐滴方式加入在2ml含有B18R的经调理的Pluriton重编程培养基中的人成纤维细胞的一个孔中。涡旋以混合并将所述平板放在5%CO₂低氧 (3-5%O₂) 培养箱中过夜转染。次日,抽吸并用2ml含有B18R的重编程培养基替换,并继续用mRNA混合液转染。

[0158] 为了制备mRNA转染复合物,将含有1 μg总mRNA (来自OSKML,以3:1:1:1:1:1比率的) 的10 μl mRNA重编程混合液 (Stemgent) 加入15 μl Stemfect缓冲液中。在一个单独试管中,将4 μl Stemfect加入21 μl Stemfect缓冲液中。组合二者并在室温静置15分钟。将50 μl mRNA转染复合物以逐滴方式加入在2ml含有B18R的经调理的Pluriton重编程培养基中的人成纤维细胞的一个孔中。涡旋以混合并将所述平板放在5%CO₂低氧 (3-5%O₂) 培养箱中过夜转染。

[0159] 从人成纤维细胞分离RNA-重编程的iPS细胞系:

将mRNA的该每天转染重复另外7-9次转染。停止一次,原代iPS集落是明显的,并将培养基改成确定的无饲养细胞培养基诸如E8 (LifeTechnologies)。可以手工地挑选原代集落,并在最后一次转染的24-48小时内Matrigel上在无饲养细胞培养系统诸如E8上传代,以扩增克隆的、稳定的RNA-重编程的iPS细胞系,其不含任何病毒或DNA污染物。关于任何人ES

或iPS细胞系,进一步繁殖和表征可以继续,以证实染色体组型稳定性和多能性的保留。

[0160] 处于未分化的状态的人多能干细胞的繁殖

使用促进增殖而不促进分化的培养条件,可以在培养物中连续地繁殖人多能干细胞诸如iPS细胞或hES细胞。用80%DMEM(诸如敲除的DMEM, Gibco)、20%的确定的胎牛血清(FBS, Hyclone)或血清替代物(WO 98/30679)、1%非必需氨基酸、1 mM L-谷氨酰胺和0.1 mMβ-巯基乙醇制备示例性的含血清的ES培养基。在即将使用之前,将人bFGF加入至4 ng/mL(WO 99/20741, Geron Corp.)。

[0161] 传统地,在饲养细胞(通常从胚胎或胎儿组织衍生出的成纤维细胞)层上培养ES细胞。所述饲养细胞可以是人、禽或鼠来源。就鼠而言,在妊娠的13天从CF1小鼠收获小鼠胚胎,转移至2.0 mL胰蛋白酶/EDTA,切碎,并在37°C温育5.0分钟。加入10%FBS,允许碎片沉降,并将所述细胞转移至含有90%DMEM、10%FBS和2 mM谷氨酰胺的组织培养容器。为了制备饲养细胞层,将细胞照射以抑制增殖,但是允许支持ES细胞的因子的合成(4000拉德γ-辐照)。将培养板用0.5%明胶涂布过夜,用375,000个经照射的小鼠胚胎成纤维细胞/孔铺板,并在铺板以后5小时至4天使用。在即将接种人多能干细胞之前,将所述培养基用新鲜hES培养基替换。

[0162] 还可以将人多能干细胞维持在未分化的状态,即使没有饲养细胞。无饲养细胞培养的环境包括合适的培养基质,特别是细胞外基质诸如Matrigel、HyStem或层粘连蛋白。将多能干细胞以>15,000个细胞/cm²(最佳地90,000个细胞/cm²至170,000个细胞/cm²)铺板。通常,在细胞变得完全分散之前停止酶消化(对于胶原酶IV,大约5 min)。然后将约10-2,000个细胞的块不经进一步分散直接铺板在衬底上。可替换地,在所述平板达到汇合之前可以在没有酶的情况下如下收获细胞:将所述培养容器在0.5 mM EDTA于PBS中的溶液中温育约min,或机械地抽吸含有相对未分化的细胞(具有小细胞质与核区比率)的集落。从培养容器洗涤以后,将所述细胞不经进一步分散铺板进新培养物中。无饲养细胞培养物由营养培养基支持,所述营养培养基含有支持细胞增殖(没有分化)的因子。通过用分泌这样的因子的细胞(诸如经照射的(约4,000拉德)原代小鼠胚胎成纤维细胞、端粒化的小鼠成纤维细胞或从多能干细胞衍生出的成纤维细胞-样细胞)调理所述培养基,可以将这样的因子引入所述培养基中。通过以约5-6 x10⁴个细胞/cm²的密度将饲养细胞铺板在无血清培养基(诸如补充了20%血清替代物和4.0 ng/mL bFGF的KO DMEM)中,可以调理培养基。给已经调理了1-2天的培养基补充另外的bFGF,并用于支持多能干细胞培养1-2天。可替换地或另外,可以加入帮助支持增殖(没有分化)的其它因子,诸如FGF-2或FGF-4受体的配体、c-kit(诸如干细胞因子)的配体、与gp130有关的受体的配体、胰岛素、转铁蛋白、脂质、胆固醇、核苷、丙酮酸盐和还原剂诸如β-巯基乙醇。在国际专利公开WO 01/51616和Xu等人, *Nat. Biotechnol.* 19:971, 2001中进一步讨论了无饲养细胞培养方法的特征。

[0163] 相对未分化的多能干细胞是期望的,且在显微镜下,它们显得具有高核/质比、显著的细胞核和具有较差地可辨别的细胞连接部的紧凑集落形成。灵长类动物ES细胞表达阶段特异性的胚胎抗原(SSEA) 3和4以及使用命名为Tra-1-30 60和Tra-1-81的抗体可检测的标志物(Thomson等人, *Science* 282:1145, 1998)。可以将小鼠ES细胞用作SSEA-1的阳性对照,和用作SSEA-4、Tra-1-60和Tra-1-81的阴性对照。SSEA-4一致地呈现在人胚胎性癌(hEC)细胞上。多能干细胞在体外的分化会导致SSEA-4、Tra-1-60和Tra-1-81表达的损失和

增加的SSEA-1(其也存在于未分化的hEG细胞上)表达。

[0164] 本发明的亲本细胞系及其表征和分化

贯穿本发明,针对特定人ES细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系(诸如在本文中命名为E3、E72、E75、C4ELS5.1、C4ELSR2和NP110SM的那些)呈现了数据。另外,实施例6和7涉及命名为NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31和NPCC SM40的人ES细胞衍生的克隆祖细胞系。本文关于本发明的细胞描述的组合物、方法和应用适用于在不同传代水平的这些相同的细胞系,以及多能干细胞衍生的克隆的、合并的克隆的、和寡克隆胚胎祖先(其具有本文描述的相同基因表达模式),包括在临床级GMP相容的生产条件下生产的所述祖细胞系。

[0165] 除了SK1以外,在本发明中描述的所有多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系衍生自多能干细胞系Envy (Costa等人, The hESC line Envy expresses high levels of GFP in all differentiated progeny, *Nat Methods* 2(4):259-260 (2005)),并如下进行繁殖:通过系列胰蛋白酶消化和在用本文所述的明胶涂布的标准细胞培养容器中传代以将所述细胞维持在相对未分化的祖先状态。细胞系SK1以类似的方式衍生出,但是衍生自hESC系H9 (WA09)。用于系NP88 SM、NP111 SM、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31、NPCC SM36、NP92 SM、NP91 SM、NP93 SM、NP95 SM和NP113 SM的所述繁殖的培养基是含有以下生长补充物的MCDB131培养基:5%胎牛血清、0.5 ng/ml EGF、2.0 ng/ml碱性FGF和5.0 µg/ml胰岛素。用于系SK1和ESI-004-EP SK8的繁殖的培养基是含有glutamax 2mM和青霉素/链霉素10,000 U/ml、5%FCS、50 µg/mL牛胎球蛋白、10 ng/mL重组EGF、1.0 ng/mL重组bFGF、10 µg/mL重组胰岛素、0.4 µg/mL地塞米松和2.0 mM GlutaMAX-1补充物的基础MCDB120培养基。

[0166] 然后将所述细胞在用明胶涂布的标准细胞培养容器中繁殖,并通过将来自上述繁殖培养基的培养基改成含有10%正常生长补充物(由供应商提供)的相同培养基来诱导进入静止5天。因此,静止培养基是PromoCell Smooth Muscle Cell Medium 2 (目录号97064)或可替换地(MCDB131培养基)和在10%正常浓度(由供应商推荐)的得自PromoCell GmbH (Heidelberg, 德国)的生长补充物(目录号39267)、或0.5%胎牛血清、0.05 ng/ml EGF、0.2 ng/ml碱性FGF和0.5 µg/ml胰岛素。当从被诱导进入静止5天(在本文中有时被称作“对照”或“Ctrl”的条件)的细胞提取RNA时,所述细胞展示关于处于祖先状态而不是分化的(脂肪细胞)状态的细胞描述的基因表达模式标志物。

[0167] 当在本文描述的条件分化7-21天以诱导细胞分化成BAT细胞时,本发明的BAT细胞祖先会诱导一般脂肪细胞标志物诸如FABP4 (登录号NM_001442.1, Illumina Probe ID 150373)和CD36 (登录号NM_000072.2, Illumina Probe ID 3310538)、以及BAT-特异性的标志物诸如UCP1 (登录号NM_021833.3, Illumina Probe ID 4390348)、LIPASIN (也被称作ANGPTL8或C19orf80或LOC55908 (登录号NM_018687.3, Illumina Probe ID 1430689)和ADIPOQ (登录号NM_004797.2, Illumina Probe ID 4200471)的表达,其水平相当于或大于在相同条件下分化的培养的fBAT细胞。在有1.0 µM罗格列酮、2.0 nM T3激素+最后4小时10 µM CL-316,243并包埋在HyStem珠子(其包含交联的硫酸化透明质酸和明胶)中存在下观察到最高的BAT标志物水平,而当在有10 ng/mL BMP4或100 ng/mL BMP7存在下也培养细胞时观察到更大的细胞生存力水平。

[0168] 对于意图在体内在功能上移植的BAT细胞而言关键性的是,所述细胞将补充交感神经系统的神经支配。为了最佳神经支配,给移植的细胞补充Netrin G1,也被称作轴突导向分子(Axon Guidance Molecule)。Netrin G1 (*NTNG1*)属于在脊椎动物神经系统发育过程中作为轴突导向线索起作用的蛋白的保守家族(Nakashiba, 等人, 2000 (PubMed 10964959))。

[0169] 在本文中已经证实,当在有PPAR γ 激动剂存在下在使所述细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的条件下分化足够的时间段时,多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系NP88会分化成褐色脂肪细胞。所述分化的细胞系表达*UCP1*标志物,其鉴别褐色脂肪细胞。NP88克隆胚胎祖细胞系表达*DIO3*、*DLK1*、*ZIC2*、*SLC1A3*和*SBSN*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA5*、*IL13RA2*、*DLX5*、*CRABP1*、*NEFM*、*PRG4*和*RBP1*中的一种或多种。NP 88、以及在实施例3中讨论的其它克隆胚胎祖细胞系的分化时间可以是约2天- 约21天;约5天- 19天;约9 - 约17;或约11天- 15天。

[0170] 在本文中已经证实,当在有PPAR γ 激动剂存在下在使所述细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的条件下分化足够的时间段时,多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系NPCC SM 19会分化成褐色脂肪细胞。所述分化的细胞系表达*UCP1*标志物,其鉴别褐色脂肪细胞。NPCC SM19克隆胚胎祖细胞系表达*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*、*DLK1*、*NEFM*和*RBP1*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*ZIC2*、*DLX5*、*PRG4*、*IL13RA2*、*CRABP1*和*SBSN*中的一种或多种。NPCC SM19、以及在实施例3中讨论的其它克隆胚胎祖细胞系的分化时间可以是约2天- 约21天;约5天- 19天;约9 - 约17;或约11天- 15天。

[0171] 在本文中已经证实,当在有PPAR γ 激动剂存在下在使所述细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的条件下分化足够的时间段时,多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系NPCC SM23会分化成褐色脂肪细胞。所述分化的细胞系表达*UCP1*标志物,其鉴别褐色脂肪细胞。NPCC SM23克隆胚胎祖细胞系表达*HOXA2*、*ZIC2*、*THY1*和*EFNB2*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*DLK1*、*PPP1R1B*和*GPC4*中的一种或多种。NPCC SM23、以及在实施例3中讨论的其它克隆胚胎祖细胞系的分化时间可以是约2天- 约21天;约5天- 19天;约9 - 约17;或约11天- 15天。

[0172] 在本文中已经证实,当在有PPAR γ 激动剂存在下在使所述细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的条件下分化足够的时间段时,多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系NPCC SM28会分化成褐色脂肪细胞。所述分化的细胞系表达*UCP1*标志物,其鉴别褐色脂肪细胞。NPCC SM28克隆胚胎祖细胞系表达*HOXA2*、*HOXB2*、*DLX5*和*ZIC2*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA5*、*NEFM*、*PRG4*和*RBP1*中的一种或多种。NPCC SM28、以及在实施例3中讨论的其它克隆胚胎祖细胞系的分化时间可以是约2天- 约21天;约5天- 19天;约9 - 约17;或约11天- 15天。

[0173] 在本文中已经证实,当在有PPAR γ 激动剂存在下在使所述细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的条件下分化足够的时间段时,多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系NPCC SM31会分化成褐色脂肪细胞。所述分化的细胞系表达*UCP1*标志物,其鉴别褐色脂肪细胞。NPCC SM31克隆胚胎祖细胞系表达*HOXA2*、*DLK1*、*DLX5*、*PRG4*和*ZIC2*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXB2*、*HOXA5*、*GPC4*、*NEFM*、*IL13RA2*、*NTNG1*和*SBSN*中的一种或多种。NPCC SM31、以及在实施例3中讨论的其它克隆胚胎祖细胞系的分化时间可以是约2天- 约21天;约5天- 19天;约9 - 约17;或约11天- 15天。

[0174] 在本文中已经证实,当在有PPAR γ 激动剂存在下在使所述细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的条件下分化足够的时间段时,多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系NPCC SM36会分化成褐色脂肪细胞。所述分化的细胞系表达*UCP1*标志物,其鉴别褐色脂肪细胞。NPCC SM36克隆胚胎祖细胞系表达*HOXA2*、*RBP1*和*ZIC2*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXB2*、*HOXA5*、*NEFM*、*PRG4*、*DLX5*、*IL13RA2*、*CRABP1*和*SBSN*中的一种或多种。NPCC SM36、以及在实施例3中讨论的其它克隆胚胎祖细胞系的分化时间可以是约2天- 约21天;约5天- 19天;约9 - 约17;或约11天- 15天。

[0175] 在本文中已经证实,当在有PPAR γ 激动剂存在下在使所述细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的条件下分化足够的时间段时,多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系NPCC SM31会分化成褐色脂肪细胞。所述分化的细胞系表达*UCP1*标志物,其鉴别褐色脂肪细胞。NPCC SM31克隆胚胎祖细胞系表达*HOXA2*、*DLK1*、*DLX5*、*PRG4*和*ZIC2*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXB2*、*HOXA5*、*GPC4*、*NEFM*、*IL13RA2*、*NTNG1*和*SBSN*中的一种或多种。NPCC SM31、以及在实施例3中讨论的其它克隆胚胎祖细胞系的分化时间可以是约2天- 约21天;约5天- 19天;约9 - 约17;或约11天- 15天。

[0176] 在本文中已经证实,当在有PPAR γ 激动剂存在下在使所述细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的条件下分化足够的时间段时,多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系NPCC SM27会分化成褐色脂肪细胞。所述分化的细胞系表达*UCP1*标志物,其鉴别褐色脂肪细胞。NPCC SM27克隆胚胎祖细胞系表达*HOXA2*、*ZIC2*、*CD24*和*RBP1*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*DLK1*、*PPP1R1B*、*NEFM*和*GPC4*中的一种或多种。NPCC SM27、以及在实施例3中讨论的其它克隆胚胎祖细胞系的分化时间可以是约2天- 约21天;约5天- 19天;约9 - 约17;或约11天- 15天。

[0177] 在本文中已经证实,当在有PPAR γ 激动剂存在下在使所述细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的条件下分化足够的时间段时,多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系NP78 EN会分化成褐色脂肪细胞。所述分化的细胞系表达*UCP1*标志物,其鉴别褐色脂肪细胞。NP78 EN克隆胚胎祖细胞系表达*HOXA5*、*SNAP25*、*THY1*、*PAPLN*、*ZIC2*和*DLK1*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*RBP1*、*NEFM*和*DLX5*中的一种或多种。NP78 EN、以及在实施例3中讨论的其它克隆胚胎祖细胞系的分化时间可以是约2天- 约21天;约5天- 19天;约9 - 约17;或约11天- 15天。

[0178] 在本文中已经证实,当在有PPAR γ 激动剂存在下在使所述细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的条件下分化足够的时间段时,多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系NP92 SM会分化成褐色脂肪细胞。所述分化的细胞系表达*UCP1*标志物,其鉴别褐色脂肪细胞。NP92 SM克隆胚胎祖细胞系表达*DLK1*、*DLX5*、*GPC4*和*THY1*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*和*SNAP25*中的一种或多种。NP92 SM、以及在实施例3中讨论的其它克隆胚胎祖细胞系的分化时间可以是约2天- 约21天;约5天- 19天;约9 - 约17;或约11天- 15天。

[0179] 在本文中已经证实,当在有PPAR γ 激动剂存在下在使所述细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的条件下分化足够的时间段时,多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系NP93 SM会分化成褐色脂肪细胞。所述分化的细胞系表达*UCP1*标志物,其鉴别褐色脂肪细胞。NP93 SM克隆胚胎祖细胞系表达*SNAP25*、*PRG4*、*SBSN*、*GPC4*和*DLK1*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXA5*、*HOXB2*和*CRABP1*中的一种或多种。NP93 SM、以及在实施例3中讨论的其它克隆胚胎祖细胞系的分化时间可以是约2天- 约21天;约5天- 19天;约9 - 约17;或约11天- 15天。

[0180] 在本文中已经证实,当在有PPAR γ 激动剂存在下在使所述细胞定型为褐色脂肪细

胞谱系的条件下分化足够的时间段时,多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系NP113 SM会分化成褐色脂肪细胞。所述分化的细胞系表达*UCP1*标志物,其鉴别褐色脂肪细胞。NP113 SM克隆胚胎祖细胞系表达*ALDH1A2*、*SBSN*、*CPVL*、*ZIC2*和*THY1*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXA5*、*HOXB2*、*RBP1*和*CRABP1*中的一种或多种。NP113 SM、以及在实施例3中讨论的其它克隆胚胎祖细胞系的分化时间可以是约2天-约21天;约5天-19天;约9-约17;或约11天-15天。

[0181] 在本文中已经证实,当在有PPAR γ 激动剂存在下在使所述细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的条件下分化足够的时间段时,多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系NP91 SM会分化成褐色脂肪细胞。所述分化的细胞系表达*UCP1*标志物,其鉴别褐色脂肪细胞。NP91 SM克隆胚胎祖细胞系表达*BARX1*、*EPDR1*、*GPC4*、*EFNB2*和*DLK1*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA2*、*HOXB2*、*HOXA5*、*ZIC2*、*CRABP1*和*DLX5*中的一种或多种。NP91 SM、以及在实施例3中讨论的其它克隆胚胎祖细胞系的分化时间可以是约2天-约21天;约5天-19天;约9-约17;或约11天-15天。

[0182] 在本文中已经证实,当在有PPAR γ 激动剂存在下在使所述细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的条件下分化足够的时间段时,多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系SK1会分化成褐色脂肪细胞。所述分化的细胞系表达*UCP1*标志物,其鉴别褐色脂肪细胞。SK1克隆胚胎祖细胞系表达*HOXC6*、*PAPLN*、*THY1*、*RBP1*和*EFNB2*,但是不表达*COX7A1*,且不表达*HOXA5*、*ZIC2*和*NEFM*中的一种或多种。SK1、以及在实施例3中讨论的其它克隆胚胎祖细胞系的分化时间可以是约2天-约21天;约5天-19天;约9-约17;或约11天-15天。

[0183] 在本文中已经证实,当在有PPAR γ 激动剂存在下在使所述细胞定型为褐色脂肪细胞谱系的条件下分化足够的时间段时,多能干细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系NP111 SM、NP77 EN、NP80-EN和NP85 EN会分化成褐色脂肪细胞。所述分化的细胞系表达*UCP1*标志物,其鉴别褐色脂肪细胞。NP111 SM、NP77 EN、NP80-EN和NP85 EN克隆胚胎祖细胞系表达*HOXC6*、*PAPLN*、*THY1*、*RBP1*和*EFNB2*,但是不表达*COX7A1*且不表达*HOXA5*、*ZIC2*和*NEFM*中的一种或多种。NP111 SM、NP77 EN、NP80-EN和NP85 EN、以及在实施例3中讨论的其它克隆胚胎祖细胞系的分化时间可以是约2天-约21天;约5天-19天;约9-约17;或约11天-15天。

[0184] 可以将所述细胞配制在水凝胶诸如HyStem-C (BioTime, Inc. Alameda, CA)中,其中所述基质是硫醇改性的明胶和硫醇化透明质烷,其在体内或在体外与(聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)交联,或配制在替代基质中或不含所述基质的溶液中用于研究和治疗用途。例如为了移植细胞用于治疗脂质障碍(诸如用于治疗高脂血症)或用于诱导 β 细胞增殖作为I型或II型糖尿病的治疗模态,可以将所述细胞配制在HyStem-C (BioTime, Inc. Alameda, CA)中并以特定剂量皮下移植,所述特定剂量经计算会造成治疗上有用的脂质减少或 β 细胞和有关胰岛素的诱导。

[0185] 具有降低的免疫原性的亲本和后代细胞系

在本发明的不同实施方案中,在细胞分化之前或之后可以使用几种降低亲本和后代细胞系的免疫原性的方法以便减少同种异体排斥。理想地,屏蔽供体系免于任何免疫排斥会产生万能供体亲本细胞系,从而减少或消除接受者中对有毒免疫排斥预防药物的需要。

[0186] 人白细胞抗原(HLA)分子是存在于大多数细胞中的细胞表面蛋白。它们是高度多形的并被用于将抗原呈递至免疫系统以抵抗疾病和消除异物。I类HLA是由以下两个主要亚

基组成的异源二聚体；细胞表面表达所必需的巨球蛋白 (B2M)，和HLA I类重链亚基HLA-A、B、C、E、F或G。I类HLA-A、B和C是主要组织相容性决定簇且需要在供体之间匹配。I类HLA分子是重要的决定簇，其呈递外来肽以活化细胞毒性的T细胞从而破坏外来细胞。HLA II类蛋白 (HLA-DP、DQ和DR) 被抗原呈递细胞使用并刺激B细胞的抗体生产以消除外来抗原。

[0187] 可以使用几种方法来消除接受者的免疫系统响应于供体细胞的调节或使其最小化。第一种方法包括使供体HLA类型与接受者HLA-型匹配。在本发明的一个实施方案中，可以使用一系列亲本细胞系，其包括纯的选择的HLA-型的文库，它们代表所有可能的HLA变体的全部或子集。这要求制备克隆地衍生的细胞的大文库，所述细胞代表不同的HLA类型，每个克隆系使一组接受者与对应的HLA类型匹配。

[0188] 一个替代方案包括HLA等位基因的除去，所述HLA等位基因负责异物抗原向免疫系统的呈递。可以将单个HLA等位基因个别地敲除，或通过敲除Beta-2微球蛋白 (B2M)，其为所有HLA I类共有的和细胞表面表达所必需的 (Riolobos, L., 等人. HLA engineering of human pluripotent stem cells. *Mol Ther* 21, 1232-1241 (2013)。通过敲除它们的表达所必需的基本转录因子基因RFXANK，可以抑制HLA II类分子 (DeSandro, A.M., Nagarajan, U.M. 和Boss, J.M. Associations and interactions between bare lymphocyte syndrome factors. *Mol Cell Biol* 20, 6587-6599 (2000)。为了避免天然杀伤(NK)细胞对I类-阴性细胞的潜在破坏，可以将供体细胞工程改造成表达非-多形的HLA分子 (HLA-E)，其已经被证实会抑制NK细胞活化 (Lee, N., 等人. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 95, 5199-5204 (1998))。

[0189] 本领域众所周知的几种技术可以用于敲除/编辑各种HLA等位基因且是本领域技术人员会明白的。它们可以包括各种DNA载体，所述DNA载体是裸露的或被包裹在用于通过同源重组特异性地替换或编辑各种基因的载体病毒或脂质体中。可替换地，其它表达敲除方案诸如siRNA、反义寡核苷酸可以单独使用或与其它敲除方案组合使用。

[0190] 可以用于降低供体细胞的免疫原性的另一种方法包括将所述细胞工程改造成过表达HLA-G。HLA-G在妊娠过程中由胎盘细胞表达，并赋予免疫抑制性能。在PCT/US2013/05757专利申请中描述了HLA-G-修饰的细胞和方法。

[0191] 其它免疫调节策略也可以用在本发明的不同实施方案中，以便使同种异体接受者中的供体细胞的长期植入最大化。Rong等人 (An effective approach to prevent immune rejection of human ESC-derived allografts. *Cell Stem Cell* 14, 121-132 (2008)) 已经成功地使用目的在于抑制T-细胞活化的方法来减少人同种异体移植的小鼠模型中的排斥。它们的方案包括过表达细胞毒性的T-淋巴细胞抗原4 (CTLA4) 和程序性细胞死亡配体1 (PD-L1)，已知它们会抑制T-细胞活化。

[0192] 在本发明的某些实施方案中，当长期植入对于提供长期临床益处而言重要时，可以逃避或抑制免疫排斥的供体细胞将是一个独特优点。此外，在本发明的一个优选实施方案中，万能的亲本多能干细胞系 (诸如通过本文所述的方法工程改造的人iPS细胞或ES细胞系) 会减轻开发多个匹配不同接受者的不同遗传背景的后代系的需要或对有毒免疫抑制药物的依赖。

[0193] 可以产生褐色脂肪细胞的祖细胞

在下文所述的不同实施方案中,本发明提供了祖细胞,例如分离的产生褐色脂肪细胞类型的祖细胞系。在某些实施方案中,所述祖细胞能够分化成这样的细胞:其表达由不同褐色脂肪细胞表达的一种或多种标志物。由本发明的任何特定褐色脂肪细胞类型表达的示例性标志物包括以下一种或多种:*FABP4*、*C19orf80*、*ADIPOQ*、*UCP1*、*PCK1*、*NNAT*、*THRSP*、*CEBPA*、*CIDEA*。在移植进人类中以后,在与来自成年人或胎儿来源的体内衍生的褐色脂肪细胞对应的完全成熟的细胞中,表达*COX7A1*。但是,在本发明的祖细胞中或在体内移植之前在体外从所述祖先衍生出的褐色脂肪细胞组分中不表达*COX7A1*,从而反映了本发明的褐色脂肪细胞处于与胚胎(而不是分化的胎儿或成熟体阶段)对应的原始分化状态,且在本领域中在以前没有描述过。

[0194] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的表达*C19orf80*的细胞系。在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的表达*UCP1*的祖细胞系。在某些实施方案中,本发明提供了表达*C19orf80*和*UCP1*的细胞的组合制剂。

[0195] 所述分离的祖细胞系(例如分离的产生褐色脂肪细胞的祖细胞系)可以是多能干细胞的体外分化后代。通过在下文所述的合适培养条件下分化所述分离的祖细胞系,可以得到所述褐色脂肪细胞。因此,本发明的褐色脂肪细胞可以具有与它的来源亲本细胞基本上相同的基因组。所述亲本细胞可以是下文所述的祖细胞系,或下文所述的多能前体。下文所述的多能前体的例子包括ES细胞诸如hES细胞、iPS诸如人iPS细胞等。因而,在某些实施方案中,本发明的褐色脂肪细胞可以包含与它的多能亲本细胞或细胞系具有约95%、96%、97%、98%、99%同一性的基因组。在本发明的某些实施方案中,本发明的褐色脂肪细胞将包含与它的多能亲本细胞或细胞系具有大于90%、大于93%、大于94%、大于95%、大于96%、大于97%、大于98%、大于99%同一性的基因组。

[0196] 祖细胞系

祖细胞和祖细胞系在本文中可互换地使用,且表示可以繁殖至少5代的细胞的培养物,尽管如此是必死的并最终衰老(由于端粒缩短)。本发明的某些实施方案提供了祖细胞系、制备祖细胞系的方法和使用祖细胞系的方法。在某些实施方案中,祖细胞系可以是胚胎干细胞(例如ES细胞诸如hES细胞)或iPS细胞的后代,诸如体外后代。ES细胞或iPS细胞可以得自哺乳动物,诸如灵长类动物。在一个实施方案中,所述ES或iPS细胞具有人来源。所述祖细胞可以得自可从细胞库(诸如WiCell或BioTime, Inc.)得到的建立的ES细胞系。所述祖细胞可以得自在不破坏胚胎或体外受精卵的情况下产生的ES细胞系(Chung等人, *Cell Stem Cell* (2008) 2:113)。

[0197] 祖细胞可以包括克隆的或寡克隆的祖细胞系。祖细胞可以具有通过多次传代而在培养物中复制的能力。在本发明的某些实施方案中,可以将所述祖细胞传代约1-100次、约5-90次、约10-80次、约20-70次、约30-60次、约40-50次。在某些实施方案中,可以将所述祖细胞传代约5次、约10次、约11次、约12次、约13次、约14次、约15次、约16次、约17次、约18次、约19次、约20次、约21次、约22次、约23次、约24次、约25次。

[0198] 在某些实施方案中,本发明提供了祖细胞系,其具有分化成在动物体(诸如人)中发现的细胞的能力。可以诱导分化,例如,通过改变通常在其中维持祖细胞的培养条件。例如,可以向培养基中加入或者从培养基除去生长因子、细胞因子、促分裂原等。

[0199] 在某些实施方案中,所述祖细胞是多潜能细胞。在某些实施方案中,所述祖细胞不

是多能细胞。在某些实施方案中,所述祖细胞不是间充质干细胞(MSC)。在某些实施方案中,所述祖细胞不表达在间充质干细胞中发现的一种或多种标志物,诸如*CD74*或从胎儿或成年来源衍生出的细胞的标志物诸如*COX7A1*。在某些实施方案中,所述祖细胞表达在MSC上发现的一种或多种标志物,其水平低于在MSC上发现的表达水平。在本发明的某些实施方案中,所述祖细胞不表达*CD74*。在本发明的某些实施方案中,所述祖细胞表达*CD74*,其水平低于在MSC上发现的水平。在某些实施方案中,所述祖细胞系表达由软骨细胞或软骨细胞前体表达的一种或多种基因。

[0200] 在某些实施方案中,本发明提供了选自命名为C4ELSR2、C4ELS5.1、E3和NP110SM的细胞系的祖细胞。在其它实施方案中,本发明提供了选自命名为NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31和NPCC SM40的细胞系的祖细胞系(参见实施例6和7)。

[0201] 在其它的实施方案中,本发明提供了一种祖细胞系,其具有表达一种或多种选自以下的基因的细胞系NP110SM的基因表达模式:*DLK1* (登录号NM_003836.4, Illumina ID 6510259), *HOXA5* (登录号NM_019102.2, Illumina ID 6620437), *SLC7A14* (登录号NM_020949.1, Illumina ID 6100717), *NTNG1* (登录号NM_014917.2, Illumina ID 6940053), *HEPH* (登录号NM_138737.1, Illumina ID 1850349), *PGM5* (登录号NM_021965.3, Illumina ID 4480112), *IL13RA2* (登录号NM_000640.2, Illumina ID 5420386), *SLC1A3* (登录号NM_004172.3, Illumina ID 4210403), 和*SBSN* (登录号NM_198538.1, Illumina ID 4480477)。在某些实施方案中,本发明提供了一种祖细胞,其具有不表达一种或多种选自以下的基因的细胞系NP110SM的基因表达模式:*MKX* (登录号NM_173576.1, Illumina ID 6620017), *NNAT* (登录号NM_181689.1, Illumina ID 4010709), *HOXD11* (登录号NM_021192.2, Illumina ID 5290142), 和*DHRS9* (登录号NM_005771.3, Illumina ID 630315)。所述祖细胞系具有分化成高度纯化褐色脂肪细胞的群体的潜力,所述高度纯化褐色脂肪细胞同时表达相对高水平的BAT基因表达标志物*UCP1*以及表达相对高水平的基因表达标志物*LOC55908* (TD26, betatrophin, C19orf80) (登录号NM_018687.5, Illumina ID 1430689), *CIDEA* (登录号NM_022094.2, Illumina ID 780309), *UCP2* (登录号NM_003355.2, Illumina ID 6580059), *ELOVL6* (登录号NM_024090.1, Illumina ID 5670040)、(登录号, Illumina ID), *CKMT1A* (登录号15 NM_001015001.1, Illumina ID 3420661), 和*ADIPOQ* (登录号NM_004797.2, Illumina ID 4200471), 类似于培养的人胎儿BAT衍生的细胞(其被诱导以分化成褐色脂肪细胞),但是不同于处于前体脂肪细胞或分化的脂肪细胞状态的所述人胎儿BAT衍生的细胞,从命名为NP110SM的所述hES细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系衍生出的褐色脂肪细胞在未分化的或分化的状态不表达*COX7A1*,且当命名为NP110SM的所述hES细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系分化14天成为褐色脂肪细胞时,所述细胞表达相对低的或零可检测的基因表达标志物*CIDEA* (登录号NM_001279.2, Illumina ID 10048)的表达,不同于培养的人胎儿BAT衍生的细胞,当诱导所述人胎儿BAT衍生的细胞分化成褐色脂肪细胞时,其诱导相对高水平的*CIDEA*表达。

[0202] 在某些实施方案中,成年衍生的细胞可用于生产BAT细胞用于研究和治疗。使用本文中公开的方法,动脉平滑肌细胞(诸如从暴露于高水平的循环酮体的个体衍生出的冠状动脉平滑肌细胞,诸如可以存在于具有显著长期酒精摄入的个体中)能够BAT细胞分化。另

外,通过端粒末端转移酶(TERT)的催化组分的外源表达,可以使所述能够BAT细胞分化的平滑肌细胞短暂地或永久地永生化,由此允许将所述祖先工业繁殖为BAT细胞。类似地,通过端粒末端转移酶(TERT)的催化组分的外源表达,可以使胎儿或成年BAT组织衍生的前体脂肪细胞短暂地或永久地永生化,由此允许将所述祖先工业繁殖为BAT细胞。

[0203] 下文所述的祖细胞系中的任一种可以用在下文所述的方法中。例如,可以使所述祖细胞系与TGF- β 超家族的成员接触并诱导分化。可以使下文所述的祖细胞系与视黄酸接触并诱导分化。可以使下文所述的祖细胞系与PPAR γ 的激动剂或拮抗剂接触并诱导分化。可以使下文所述的祖细胞系与甲状腺激素诸如T3或T4接触并诱导分化。可以使下文所述的祖细胞系与肾上腺素能激素诸如肾上腺素或去甲肾上腺素接触并诱导分化。可以在实质上低于37°C的温度温育下文所述的祖细胞系并诱导分化。如下文所述,可以在实质上低于正常体温的温度在水凝胶中培养所述祖细胞系,有或没有分化剂诸如TGF- β 超家族的成员、视黄酸、PPAR γ 的激动剂、肾上腺素能激动剂和甲状腺激素。

[0204] 为了提高来自hPS细胞的纯化的体祖先的可扩展性,我们以前报道了>140个不同克隆人胚胎祖先(hEP)细胞系的文库的制备,作为经纯化的具有位点特异性的同源框基因表达的细胞类型的来源。我们将这些新颖的细胞系命名为“胚胎祖先”,因为它们表现出在体外广泛地繁殖的潜力,且可以随后响应于不同生长因子和诱导物而分化。因此,该术语表示具有在多能细胞和终末分化的细胞类型之间的中间分化状态的细胞。

[0205] 在本文公开的某些实施方案中,提供了能够分化成位点特异性脂肪细胞(其具有可用于产生褐色脂肪细胞的基因表达模式)的克隆胚胎祖细胞系的对比位点特异性基因表达以及当在有一种或多种TGF- β 超家族成员存在下分化时它们的不同应答的公开内容,所述TGF- β 超家族成员是例如TGF- β 蛋白(包括TGF β 3)、骨形态发生蛋白(BMP)(包括BMP2、4、6和7)、生长分化因子(GDF)(包括GDF5)、神经胶质衍生的神经营养因子(GDNF)、激活素、Lefty、Müllerian抑制物质(Müllerian Inhibiting Substance, MIS)、抑制素和Nodal。

[0206] 在其它实施方案中,本发明提供了在微团中培养的或在水凝胶中培养的细胞培养物,其包含祖细胞系C4ELSR2、C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163、NP110SM、NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31和NPCC SM40,或具有如本文中所述的C4ELSR2、C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163、NP110SM、NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31和NPCC SM40的基因表达模式的细胞系。所述细胞培养物可以包含一种或多种TGF- β 蛋白,包括TGF β 3、骨形态发生蛋白(BMP)(包括BMP2、4、6和7)、生长分化因子(GDF)(包括GDF5)、神经胶质衍生的神经营养因子(GDNF)、激活素、Lefty、Müllerian抑制物质(Müllerian Inhibiting Substance, MIS)、抑制素和Nodal。

[0207] 因此,本发明描述了包含第一和第二细胞群体的组合物,其中所述第一细胞群体包含相对未分化的克隆的、合并的克隆的或寡克隆的胚胎祖细胞,从其衍生出所述第二群体,且所述第二群体包含所述第一细胞群体的体外分化后代,其中所述第二细胞群体的细胞在与培养的fBAT细胞可比较的水平表达FABP4和UCP1、C19orf80或ADIPOQ。

[0208] 表达ITLN1或ITLN2的克隆胚胎血管内皮细胞

在另一个实施方案中,使多能干细胞(诸如hES或iPS细胞)在体外分化以产生表达网膜素1(ITLN1)或intelectin-2(ITLN2)的血管内皮细胞并与本发明的SVF、水凝胶或褐色脂肪祖先联合使用。在有激活素-A和WNT-3A、随后FGF-4和BMP-2存在下产生表达ITLN1或

*ITLN2*的内皮细胞,并然后在有能够支持血管内皮细胞生长的培养基存在下在Matrigel、明胶或类似的支持性培养支持物上克隆为单克隆细胞谱系。更具体地,将hES或iPS细胞在成纤维细胞饲养细胞上培养为集落,允许其在ES细胞培养基(诸如含有KO-血清替代物的Invitrogen KO-DMEM)中蔓延和原位分化13天。然后,在分化第0天(图6),将培养基更换为包含KO-DMEM/RPMI-1640 (5/1 v/v)的基础分化培养基,且所述基础分化培养基补充了100 ng/mL激活素A和25 ng/mL Wnt3A。在第2天(在图6中命名为第1天)的开始,和对于以后的2天,将所述培养基用仅补充了100 ng/mL激活素A的所述基础分化培养基替换。然后在第4天(在图6中命名为第3天)的开始,将所述培养基用补充了30 ng/mL FGF4和20 ng/mL BMP2的所述基础分化培养基替换。在第8天(在图6中命名为第7天)的开始,将细胞在PBS中冲洗2次并用Accutase解聚,并在能够支持血管内皮细胞增殖的培养基(其补充了TGFβ信号传递抑制剂诸如SB431542)中铺板在Matrigel包被的平板上。所述内皮培养基的一个非限制性例子是补充了5.0 ng/mL VEGF-A、5.0 ng/mL FGF-2、0.75 IU/mL肝素、2%FBS的MCDB 131 (诸如含有补充剂的PromoCell内皮MV2培养基,所述补充剂具有生产商通常推荐的浓度并作为完整试剂盒(目录号C-22022)或作为细胞基础培养基(目录号C-22221)和生长补充物(目录号C-39221)和TGFβ信号传递抑制剂诸如SB431542销售。将细胞作为候选培养物的工作储备液繁殖,所述候选培养物可以为了衍生出连续克隆细胞系的目的而繁殖和冷冻保存。将所述候选培养物以大约500和2,000个细胞铺板在用Matrigel或用于培养内皮细胞的合适衬底包被的15 cm组织培养皿中,并允许其生长成可见细胞集落,随后将其通过本领域已知的多种方式分离,诸如使用克隆圆筒,和作为细胞系连续地繁殖,然后将所述细胞系在相同培养基和基质中繁殖,和冷冻保存用于将来使用。

[0209] 所述细胞(具体地,已经以某种方式生产的那些,所述方式使得所述细胞可以没有排斥地永久地植入宿主中,诸如以产生如本文中所述的万能供体细胞,包括、但不限于从iPS细胞产生的那些,其表达血管内皮标志物诸如*PECAM1*、*CDH5* (VE-钙粘着蛋白)和*vWF*)的用途包括移植以增加移植的脂肪组织中的血流量和为了治疗效果表达*ITLN1* (网膜素)或*ITLN2*。特别有用的是克隆的、合并的克隆的、寡克隆的或合并的寡克隆的内皮细胞系,其表达相对高水平的*ITLN1* (网膜素)或*ITLN2*并且可用于在II型糖尿病、年老的或X综合征患者中赋予增加的对胰岛素的敏感性。可以将所述表达*ITLN1*的内皮细胞系与本发明的水凝胶、SVF和细胞一起共注射以进一步在所述患者中促进血管形成、减少炎症性途径、增加胰岛素敏感性。所述细胞的剂量将随患者而变化,但是可以通过测量患者中的网膜素的血清或血浆水平容易地确定。如已经报道的(Zhong, 等人, *Acta Pharmacol Sin* 32: 873-878),血清网膜素水平在正常患者中接近254 ng/ml ± 72.9 ng/ml,并且在具有急性冠状动脉综合征的患者中观察到为113 ng/ml,和在具有稳定型心绞痛的患者中观察到为155 ng/ml。还已经报道在正常患者中的血浆水平为370 ng/mL (de Souza Batista等人, *Diabetes* 56: 1655-1661),差异可归因于测定技术中的差异。剂量将基于注射部位和患者的疾病状态而变化,但是通常将是 1×10^6 至 1×10^9 个细胞/患者,其配制在合适的缓冲液或基质(诸如由交联的透明质酸和明胶组成的水凝胶诸如HyStem-C (BioTime, Alameda, CA))中。

[0210] 克隆胚胎祖先系命名法:

以前已经描述了在下文所述工作中使用的许多人胚胎祖细胞系,包括系C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163和具有类似基因表达模式的细胞(参见,例如,美国专利公开号20120171171

和20100184033,它们二者通过引用整体并入)。另外,还已经描述了能够分化成BAT的细胞组分(参见W02011/150105标题为“Improved Methods of Screening Embryonic Progenitor Cell Lines”)以及(美国专利申请系列号13/683,241,标题为“Methods of Screening Embryonic Progenitor Cell Lines”)的表达EYA4的细胞。描述了克隆胚胎祖细胞系NP110SM和具有类似基因表达模式的细胞[美国专利公开号2015/0275177]。所述系的命名法包括它们的替代命名以及代表微小修改的同义词其源自由生物信息学分析引起的名称的处理,包括用“-”替换“.”,反之亦然,在以阿拉伯数字开始的细胞系名称前面包括“x”,和后缀诸如“biol”或“bio2”,其指示相同系的生物学副本,它们是将相同系的冷冻安瓿融合、繁殖并用在平行分析中的情况的例子,和“Rep1”或“Rep2”,其指示技术副本,其中将从给定细胞系分离的RNA为了重复分析利用第二次,而不解冻或以其它方式用新的细胞培养物开始。细胞系的传代次数(它是已经将细胞用胰蛋白酶处理和重新铺板的次数)通常用字母“P”和随后的阿拉伯数字命名,且相反,群体倍增次数(其表示细胞系在从一个细胞的克隆繁殖中已经经历的估计倍增的数目)用字母“PD”和随后的阿拉伯数字命名。传代中的PD的数目随实验而变化,但是通常每次胰蛋白酶消化和重新铺板是在1:3至1:4比率(分别对应于1.5和2的PD的增加)。在克隆的繁殖中,将原始集落用克隆圆筒从组织培养板取出,并如上所述转移至24-孔平板,然后12-孔和6-孔。第一个汇合的24孔被命名为P1,第一个汇合的12孔培养物是P2,第一个6-孔培养物是P3,然后将6孔培养物分入第二个6孔板(P4)和T25 (P4)。在P4的第二个6孔用于RNA提取(参见美国专利公开号20100184033,通过引用整体并入本文),并代表克隆繁殖的约18-21 PD。将典型的估计的5个随后代和PD随后分至T75烧瓶(19.5-22.5 PD),将细胞的P6代分至T225烧瓶(21-24 PD),然后P7是细胞向滚瓶的转移(850cm², 23-26 PD),和将P8分入4个滚筒(25-28 PD)。在括号上面显示的范围代表细胞计数的估计范围(由于细胞大小、附着效率和计数误差)。

[0211] 克隆的、合并的克隆的、寡克隆的和合并的寡克隆的细胞系的繁殖。

本发明的方面提供了用于鉴别和分化从单个细胞(克隆的)或细胞系衍生出的胚胎祖细胞系的方法,所述细胞系是“合并的克隆的”,这意味着克隆的细胞系具有不能辨别的标志物,诸如基因表达标志物,并且被组合以产生单细胞培养物,经常为了增加培养物中的细胞的数目的目的,或是寡克隆的,其中从小数目(通常2-1,000个)的类似细胞产生系并繁殖为细胞系,或“合并的寡克隆的”系,其为通过组合两个或更多个具有不能辨别的标志物(诸如基因表达模式)的寡克隆细胞系而产生的系。然后如下在体外繁殖所述克隆的、合并的克隆的、寡克隆的、或合并的寡克隆的细胞系:将所述细胞从它们所附着的衬底除去,并将所述细胞以降低的密度(通常为原始细胞数目的1/3-1/4)重新铺板,以促进进一步增殖。所述细胞系和它们的有关细胞培养基的例子公开在2009年7月16日提交且标题为“Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby”的美国专利申请系列号12/504,630;和West等人, 2008, *Regenerative Medicine* vol. 3 (3) 第287-308页。本发明的组合物和方法涉及除了大于21次克隆繁殖倍增以外按描述培养的所述细胞系。

[0212] 分离具有与胎儿衍生的褐色脂肪细胞可比较的基因表达模式和分化潜力的克隆胚胎祖细胞系的方法

在hES细胞培养基中将人多能干细胞(诸如人ES细胞)维持在小鼠胚胎成纤维细胞饲养

细胞上,所述hES细胞培养基由补充了20%FCS (Invitrogen,16000)、1 x非必需氨基酸 (Invitrogen,目录号12383-014)、2mM L-谷氨酰胺 (Invitrogen,目录号25030-081)、1%(v/v)胰岛素转铁蛋白硒补充物 (Invitrogen,目录号41400-045)和0.1mMβ-巯基乙醇 (Invitrogen,目录号21985-023)的含高葡萄糖的DMEM (Invitrogen,目录号11960-044)组成,具有或没有50ng/ml FGF2 (Strathmann, 130-093-842)补充。为了维持和繁殖,通过手工显微解剖或使用1mg/ml胶原酶NB6 (Serva, 17458)酶促解离将hES细胞传代。

[0213] 用于BAT祖先衍生的hES细胞的初步分化

所述细胞最初在用于产生候选培养物的制品中分化,所述候选培养物作为储备培养物起作用,可以从所述储备培养物分离出具有NP110SM系的基因表达谱的克隆祖细胞。在下面提供的实施例中,将hES细胞系hES3 (Envy)与1mg/ml胶原酶一起温育60分钟,此后将培养皿轻轻敲打以将hES细胞集落释放进混悬液中。将这些集落收集并研磨以产生小块,将其铺板在超低附着平板 (CoStar,Corning, 目录号3471)中用于胚状体 (EB)形成。所述EB在神经分化培养基中形成,所述神经分化培养基由含有Glutamax I (Invitrogen,目录号10565-018)的DMEM/F12和不含维生素A (Invitrogen,目录号12587-010) (此后被称作“NP(-)”培养基)且补充了500ng/ml重组人头蛋白 (R & D systems, 目录号3344-NG-050)和20ng/ml bFGF (Strathmann, 130-093-842)的1x B27补充物组成。在接下来的21天中,每48小时除去用过的培养基,并将补充了500ng/ml头蛋白和20ng/ml bFGF的新鲜培养基加给EB。在第21天,除去用过的培养基,并将仅补充了20ng/ml bFGF的新鲜培养基加给EB。试剂来自Invitrogen,除非另有说明。神经EB形成在培养物中是明显的。

[0214] 储备候选培养物的产生

为了产生用于克隆分离的候选培养物,将上述在第22天 (仅FGF2培养1天以后)的EB用Accutase (Innovative Cell Technologies, AT-104)在37℃解离10分钟,随后研磨以产生单细胞混悬液。将在PBS中的细胞混悬液分入4个试管中,并将每个等分试样用NP(-)培养基(如上所述)+ 20ng/ml bFGF (在本文中命名为NP(+)培养基)稀释。将细胞在180g离心5分钟,并将每份沉淀物在NP(+)培养基中接种进6-孔组织培养板的一个孔中。在初次铺板以后24小时更换培养基,并然后在此后每周3次更换。在汇合后,将6-孔板中的细胞使用TrypLE (Invitrogen,目录号12563-029)在37℃解离5分钟,并在NP(+)培养基中重新铺板在以下逐渐加大的组织培养容器中:T25烧瓶、T75烧瓶和T225烧瓶,历时几周以达到汇合细胞的T225繁殖阶段。然后将T225烧瓶中的汇合细胞的候选培养物使用TrypLE解离,计数,并将该单细胞混悬液的等分试样在用于培养至T225阶段候选培养物阶段的NP(+)培养基中稀释至10,000个细胞/ml的浓度。然后将单细胞混悬液的一个等分试样在NP(+)培养基中以克隆稀释度(500-7000个细胞/50ml,其进入15cm培养皿中)铺板在0.1%明胶包被的(Sigma,目录号G1393)15cm培养皿中。使用控速冰柜程序和冷冻培养基将来自候选培养物的剩余细胞冷冻保存(通常 3×10^6 至 5×10^6 个细胞/瓶)用于冷冻贮存和将来使用。

[0215] 从候选培养物产生克隆胚胎祖细胞系

通过将50ml上述NP(+)培养基加入明胶包被的(0.1%)15cm培养皿中,制备克隆培养皿。向每个培养皿中,然后如下手工地稀释来自在NP(+)培养基中繁殖的候选培养物的单细胞混悬液制品:向15cm培养皿加入通过计数细胞混悬液确定的细胞体积,使得存在以下细胞稀释度的选择:500个细胞/皿,或1000个细胞/皿,或1500个细胞/皿,或3000个细胞/皿、

5000个细胞/皿或7000个细胞/皿,以达到不同的单细胞混悬液密度和辅助从单个细胞生长的单个集落的分离。可替换地,使用自动细胞沉积单元可以将细胞分散为单细胞,或可以在流式筛分或本领域已知的其它亲和纯化技术诸如基于抗体的选择以后使用所述自动沉积,所述基于抗体的选择包括基于单克隆抗体的免疫选择,其使用流式细胞计量术或与磁珠缀合的抗体来选择细胞,以选择出富含在NP110SM细胞上存在的抗原的细胞。这样的抗原可以包括白介素13受体, Alpha 2 (IL13RA2), 也被称作CD213A2, 也被称作癌症/睾丸抗原19。

[0216] 在细胞的手工稀释情况下,优化具有上述密度中的任何三种的三个单独培养皿,使得可以观察到离散的、可容易地分离的单个集落以分离和作为胚胎祖细胞系繁殖。如下将接种的适当稀释度的单个细胞均匀地分布在培养皿中:可替代地在顺时针方向、然后在逆时针方向滑动15cm培养皿,然后进行侧至侧(左至右)运动,随后重复地前后运动,在培养箱内持续约30秒。然后将培养皿在CO₂培养箱(5%CO₂, 20%O₂)中温育,并在没有移动或补料的情况下静置14天以允许单个细胞附着至培养皿表面和使集落生长至足以分离的大小。以前用NP110SM细胞调理24-48小时的NP(+)培养基可以用于增加得到的集落的数目和增殖速率。

[0217] 对培养皿进行肉眼检查,并将充分分离的细胞集落使用25ul TrypLE(对于6mm圆筒)、50ul TrypLE(对于8mm圆筒)和100ul TrypLE(对于10mm圆筒)用无菌克隆圆筒(Sigma, 目录号CLS31666, CLS31668 & CLS316610)挑选。然后将每个分离的细胞集落铺板进0.1%明胶包被的含有1ml Promocell平滑肌细胞生长培养基2或它的等同培养基(在本文中命名为SM培养基)的24孔板(Nunc, 142475)的各一个孔中。在所述方法的该实例中,将分离的胚胎祖细胞在SM培养基中进一步培养。汇合后,将24-孔板中的细胞使用TrypLE在37°C解离5分钟,并在SM培养基中重新铺板在以下逐渐加大的组织培养容器中:6-孔板、T25烧瓶、T75烧瓶和T225烧瓶的一个孔,历时几周(在每次传代之间平均1-2周)。将T225烧瓶中的汇合细胞冷冻保存,并作为分离的胚胎祖细胞系储存,并接种用于免疫染色和RNA分离,诸如用于HOXA5和IL13RA2的转录物的PCR扩增,作为针对具有与克隆细胞系NP110SM类似的基因表达模式细胞的第一次筛选。

[0218] 针对分化成褐色脂肪组织的细胞组分的潜力筛选胚胎祖细胞的方法

细胞诸如克隆的多能干细胞衍生的胚胎祖先、或合并的所述克隆系的群体、或寡克隆的所述祖细胞的培养物是直接地规模可变的细胞培养物,简单地通过将所述细胞在原始培养基(它们在其中从单个细胞克隆地繁殖)中传代,和通过在所述细胞即将达到汇合之前传代时将所述细胞解聚并以更低密度(诸如1:2或1:4拆分)重新铺板,由此阻止在高密度可能发生的不希望的分化。然后可以将所述细胞暴露于如本文中所述的分化条件。作为非限制性实施例,可以在如本文中所述的HyStem Bead分化条件中培养hES细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其中所述分化培养基补充了1.0 μM罗格列酮和2.0 nM三碘甲腺原氨酸(T3),具有或没有另外的10 ng/ml BMP4。然后将平板放在具有环境O₂和10%CO₂的37°C保湿培养箱中,并将细胞每周饲喂3次持续14-21天。对于使用之前的最后4小时,将10 μM CL-316,243加入培养基中。优选地,分化的条件和时间对于不同克隆胚胎祖细胞是恒定的。然后通过本领域已知的方法针对分化标志物测定分化的细胞,所述方法包括基因表达报告构建体、免疫细胞化学、和RNA的分离和通过PCR或基因表达微阵列分析所述样品中的mRNA转录物。认为表达FABP4(登录号NM_001442.1, Illumina ID 150373)和CD36(登录号NM_000072.2,

Illumina ID 3310538) 的样品会分化成脂肪细胞谱系。可以认为所述表达脂肪细胞标志物诸如 *FABP4* 并同时表达基因 *BETATROPHIN* (登录号 NM_018687.3, Illumina ID 1430689) (也被称作 *C19ORF80*、*LOC55908* 和 *C19orf80*) 的细胞培养物命中, 且因此是褐色脂肪组织细胞的祖先的候选物。

[0219] 分化祖细胞的方法

在某些实施方案中, 本发明提供了一种使体外祖细胞 (诸如 hEP 细胞) 分化成相对于开始祖细胞更分化的状态 (例如, 诸如下文所述祖细胞的分化后代中的一种或多种) 的方法, 所述方法包括使所述祖细胞与 TGF β 超家族的一个或多个成员接触。在某些实施方案中, 所述 TGF β 超家族成员可以选自 TGF- β 蛋白 (包括 TGF β 3)、骨形态发生蛋白 (BMP) (包括 BMP2、4、6 和 7)、生长分化因子 (GDF) (包括 GDF5)、神经胶质衍生的神经营养因子 (GDNF)、激活素、Lefty、Müllerian 抑制物质 (Müllerian Inhibiting Substance, MIS)、抑制素和 Nodal。所述祖细胞可以是下文公开的任何祖细胞。在一个实施方案中, 所述祖细胞选自细胞系 C4ELSR2、C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163、NP110SM、NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31 和 NPCC SM40, 或具有如本文中所述的 C4ELSR2、C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163、NP110SM、NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31 和 NPCC SM40 的基因表达模式的细胞系。

[0220] 在其它实施方案中, 本发明提供了一种使体外祖细胞 (诸如 hEP 细胞) 分化成相对于开始祖细胞更分化的状态的方法, 所述方法包括使所述祖细胞与视黄醇 (诸如视黄酸) 接触。所述祖细胞可以是下文公开的任何祖细胞。在一个实施方案中, 所述祖细胞选自细胞系 C4ELSR2、C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163、NP110SM、NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31 和 NPCC SM40, 或具有如本文中所述的 C4ELSR2、C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163、NP110SM、NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31 和 NPCC SM40 的基因表达模式的细胞系。

[0221] 在其它实施方案中, 本发明提供了一种使体外祖细胞 (诸如 hEP 细胞) 分化成相对于开始祖细胞更分化的状态的方法, 所述方法包括使所述祖细胞与甲状腺激素 (诸如 T3 或 T4) 接触。所述祖细胞可以是下文公开的任何祖细胞。在一个实施方案中, 所述祖细胞选自细胞系 C4ELSR2、C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163、NP110SM、NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31 和 NPCC SM40, 或具有如本文中所述的 C4ELSR2、C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163、NP110SM、NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31 和 NPCC SM40 的基因表达模式的细胞系。

[0222] 在其它实施方案中, 本发明提供了一种使体外祖细胞 (诸如 hEP 细胞) 分化成相对于开始祖细胞更分化的状态的方法, 所述方法包括使所述祖细胞与肾上腺素能激动剂诸如肾上腺素、去甲肾上腺素或高度选择性的 β 3-肾上腺素能激动剂 CL316243 接触 (J. D. Bloom, M. D. Dutia, B. D. Johnson, A. Wissner, M. G. Burns, E. E. Largis, J. A. Dolan, and T. H. Claus., *J. Med. Chem.* 35: 3081, 1992)。所述祖细胞可以是下文公开的任何祖细胞。在一个实施方案中, 所述祖细胞选自细胞系 C4ELSR2、C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163、NP110SM、NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31 和 NPCC SM40, 或具有如本文中所述的 C4ELSR2、C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163、NP110SM、NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31 和 NPCC SM40 的基因表达模式的细胞系。

[0223] 在其它实施方案中,本发明提供了一种使体外祖细胞(诸如hEP细胞)分化成相对于开始祖细胞更分化的状态的方法,所述方法包括使所述祖细胞与生理活性浓度的生长因子FGF21接触。所述祖细胞可以是下文公开的任何祖细胞。在一个实施方案中,所述祖细胞选自细胞系C4ELSR2、C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163、NP110SM、NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31和NPCC SM40,或具有如本文中所述的C4ELSR2、C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163、NP110SM、NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31和NPCC SM40的基因表达模式的细胞系。

[0224] 在其它实施方案中,本发明提供了一种使体外祖细胞(诸如hEP细胞)分化成相对于开始祖细胞更分化的状态的方法,所述方法包括在实质上低于正常体温的温度温育所述祖细胞。所述祖细胞可以是下文公开的任何祖细胞。在一个实施方案中,所述祖细胞选自细胞系C4ELSR2、C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163、NP110SM、NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31和NPCC SM40,或具有如本文中所述的C4ELSR2、C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163、NP110SM、NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31和NPCC SM40的基因表达模式的细胞系。

[0225] 在其它实施方案中,本发明提供了一种使体外祖细胞(诸如hEP细胞)分化成相对于开始祖细胞更分化的状态的方法,所述方法包括使所述祖细胞与PPAR γ 激动剂诸如罗格列酮接触。所述祖细胞可以是下文公开的任何祖细胞。在一个实施方案中,所述祖细胞选自细胞系C4ELSR2、C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163、NP110SM、NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31和NPCC SM40,或具有如本文中所述的C4ELSR2、C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163、NP110SM、NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31和NPCC SM40的基因表达模式的细胞系。

[0226] 在其它实施方案中,本发明提供了通过端粒末端转移酶(*TERT*)的催化组分的外源表达延长胎儿或成年人衍生的BAT细胞或动脉平滑肌细胞诸如来自特定个体的冠状动脉平滑肌细胞的寿命的方法,所述特定个体暴露于长期饮酒并导致向相对高的酮体水平的长期暴露,其中所述细胞可以在工业规模繁殖和经过遗传修饰以逃避免疫监视。

[0227] 在其它实施方案中,本发明提供了一种使体外祖细胞(诸如hEP细胞)分化成相对于开始祖细胞更分化的状态的方法,所述方法包括使所述祖细胞与以下物质的组合接触: TGF β 超家族的一个或多个成员诸如TGF- β 蛋白(包括TGF β 3)、骨形态发生蛋白(BMP)(包括BMP2、4、6和7)、生长分化因子(GDF)(包括GDF5)、神经胶质衍生的神经营养因子(GDNF)、激活素、Lefty、Müllerian抑制物质(Müllerian Inhibiting Substance, MIS)、抑制素和Nodal、视黄醇诸如视黄酸、甲状腺激素诸如T3或T4、肾上腺素能激动剂诸如肾上腺素、去甲肾上腺素或高度选择性的 β 3-肾上腺素能激动剂CL316243和PPAR γ 激动剂诸如罗格列酮。所述祖细胞可以是下文公开的任何祖细胞。在一个实施方案中,所述祖细胞选自细胞系C4ELSR2、C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163、NP110SM、NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31和NPCC SM40,或具有如本文中所述的C4ELSR2、C4ELS5.1、E3、E72、E75、E163、NP110SM、NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31和NPCC SM40的基因表达模式的细胞系。

[0228] 在下文公开的方法的一个实施方案中,所述祖细胞包含微团。在另一个实施方案中,所述祖细胞通过本文描述的一种或多种分化条件分化并与所述水凝胶接触。在某些实

实施方案中,所述祖细胞被包封在所述水凝胶内。所述水凝胶可以包含透明质酸盐。所述透明质酸盐可以是硫酸化的。所述水凝胶可以包含明胶。所述明胶可以是硫酸化。优选地,所述水凝胶包含硫酸化透明质酸盐或硫酸化羧甲基透明质酸盐以及硫酸化明胶或硫酸化羧甲基明胶。所述水凝胶可以包含交联剂。所述交联剂可以包含丙烯酸酯。在一个实施方案中,所述丙烯酸酯是PEG二丙烯酸酯。

[0229] 在某些实施方案中,所述更分化的细胞表达下文所述的一个或多个基因,正如祖细胞的体外分化后代所表达的。在某些实施方案中,所述体外分化后代表达由脂肪细胞表达的一个或多个基因,例如*FABP4*和*CD36*。在某些实施方案中,所述体外分化后代表达由BAT细胞祖先或成熟的BAT细胞表达的一个或多个基因,例如*UCP1*、*ADIPOQ*或*C19ORF80* (也被称作*BETATROPHIN*)。在某些实施方案中,所述分化后代表达由脂肪细胞表达的一个或多个基因。

[0230] 祖细胞系的后代

在某些实施方案中,本发明提供了祖细胞系的后代。所述祖细胞系可以是胚胎祖细胞系诸如人胚胎祖细胞系(hEP)。所述祖细胞系的后代可以是所述祖细胞系的体外后代,且可以包括与亲本祖细胞系相比更分化的一个或多个细胞。可以如下确定细胞的分化状态:相对于亲本祖细胞系分析由后代细胞表达的一个或多个基因,和/或登录数据库,其含有关于处于不同发育阶段的细胞的基因表达的信息,诸如LifeMap数据库。所述祖细胞系的后代可以是这样的细胞:其表达通常由在发育中的哺乳动物胚胎诸如灵长类动物(例如人)的细胞表达的一个或多个基因。例如所述祖细胞系的后代可以表达与脂肪细胞命运对应的一个或多个基因,其选自:*FABP4*、*CD36*、*CIDEA*、*ADIPOQ*、*UCP1*、*C19orf80*、*NTNG1*和*THRSP*。

[0231] 在某些实施方案中,本发明提供了一种细胞培养物,其包含祖细胞系(诸如hEP细胞系)的体外后代。在某些实施方案中,所述细胞培养物可以包含一种或多种生长因子、细胞因子和/或促分裂原。在某些实施方案中,所述细胞培养物可以包含TGF- β 超家族的一个或多个成员。TGF β 超家族的示例性成员包括TGF- β 蛋白(包括TGF β 3)、骨形态发生蛋白(BMP)(包括BMP2、4、6和7)、生长分化因子(GDF)(包括GDF5)、神经胶质衍生的神经营养因子(GDNF)、激活素、Lefty、Müllerian抑制物质(Müllerian Inhibiting Substance, MIS)、抑制素和Nodal。在某些实施方案中,所述细胞培养物可以包含在有诱导褐色脂肪细胞分化的细胞因子、因子或条件的组合存在下培养的细胞,包括:在实质上低于正常体温的温度(如下文所述)培养所述细胞,有或没有水凝胶,有或没有分化剂诸如TGF β 超家族的成员、视黄酸、PPAR γ 的激动剂、肾上腺素能激动剂和甲状腺激素。在某些实施方案中,所述细胞培养物可以包含包埋在水凝胶中的细胞。合适的水凝胶可以包含一种或多种聚合物。所述聚合物可以包括已知形成水凝胶的任何聚合物,包括透明质酸盐、明胶、丙烯酸酯等。在某些实施方案中,所述水凝胶包含硫酸化透明质酸盐。在某些实施方案中,所述水凝胶包含硫酸化明胶。在某些实施方案中,所述水凝胶包含丙烯酸酯交联剂诸如PEG二丙烯酸酯。

[0232] 在某些实施方案中,本发明提供了一种细胞培养物,其包含祖细胞系的体外后代,其中祖细胞系的体外后代是脂肪细胞前体或成熟的脂肪细胞。在本发明的某些实施方案中,所述祖细胞系的体外后代例如脂肪前体可以占培养物中的细胞的约5%、培养物中的细胞的约10%、培养物中的细胞的约15%、培养物中的细胞的约20%、培养物中的细胞的约25%、培养物中的细胞的约30%、培养物中的细胞的约35%、培养物中的细胞的约40%、培养物中的

细胞的约45%、培养物中的细胞的约50%、培养物中的细胞的约55%、培养物中的细胞的约60%、培养物中的细胞的约65%、培养物中的细胞的约70%、培养物中的细胞的约75%、培养物中的细胞的约80%、培养物中的细胞的约85%、培养物中的细胞的约90%、培养物中的细胞的约95%、培养物中的细胞的约99%。

[0233] HyStem-C用于冷冻保存珠子中的细胞和修饰人细胞中的*MYH11*和*FABP4*基因表达的用途

HyStem-C (BioTime, Inc. Alameda, CA) 是由在体内或在体外与聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)交联的硫醇改性的明胶和硫醇化透明质烷组成的基质。我们观察到,克隆的人胚胎祖细胞系诸如在本发明中描述的那些,可以在聚合的HyStem-C的珠子(BioTime, Inc. Alameda, CA)内冷冻和解冻,诸如 2.0×10^7 个细胞/mL(在FBS中,其为10%DMSO)在1%w/v HyStem-C (BioTime, Inc. Alameda, CA)中的25 μ l等分试样(500,000个细胞/珠子)。这会促进大数目的珠子(其具有大数目的不同hEP细胞类型)的积累,其可以同时解冻和测定诸如在高通量机器人系统中,其中将所述珠子暴露于不同的分化条件并通过基因表达微阵列或本领域已知的其它方式测定它们的分化。还使得以下成为可能:解冻大数目的冷冻保存的珠子,并温育具有不同类型的包埋细胞的珠子的组合,和随后通过诸如基因表达微阵列或本领域已知的其它方式分析分化状态的变化。

[0234] 另外,在HyStem-C (BioTime, Inc. Alameda, CA)中对hEP细胞系的温育允许积累大量关于HyStem-C (BioTime, Inc. Alameda, CA)对不同细胞类型的生物影响的数据。对于来自超过3,000个分化实验的Illumina基因表达微阵列数据,我们检索了在HyStem-C (BioTime, Inc. Alameda, CA)珠子中经常上调和下调的基因,并将那些图谱与在微团条件下得到的那些进行了对比。例如,我们观察到,在含有BMP4的HyStem-4D (Biotime, Inc. Alameda, CA)珠子中培养的细胞经常表现出肌成纤维细胞标志物诸如MYH11的显著下降和增加的脂肪细胞标志物诸如FABP4和抗炎标志物诸如TIMP4的表达。细胞系E15(其在其它条件下被证实具有软骨形成潜力)和系W10在补充了10 ng/mL BMP4的微团条件下强烈地诱导MYH11,但是该诱导在补充了BMP4的HyStem-C (BioTime, Inc. Alameda, CA)培养中被基本上除去。相反,在HyStem-C (BioTime, Inc. Alameda, CA)珠子中,所述系显著地上调DCN(脑膜的一种标志物)的表达。在许多培养于HyStem-C (BioTime, Inc. Alameda, CA)珠子中的系中看到的对肌成纤维细胞分化的该生理效应(即,MYH11表达的强烈减少)具有体内治疗暗示,诸如在抑制纤维化或附着中。它也在外科手术场合中具有益处,其中可以将细胞移植以再生组织功能,同时抑制在外科手术部位处的附着和有关的纤维化过程。

[0235] 如前面描述的(参见,美国专利申请系列号14/048,910,通过引用并入),不同的克隆胚胎祖细胞系相应地表现出对生长因子(诸如TGF- β 超家族的成员)的不同分化应答。在某些情况下,包括、但不限于在有BMP4存在下在HyStem-C (BioTime, Inc. Alameda, CA)珠子中培养细胞,有些细胞系强烈地表达脂肪细胞的标志物诸如FABP4和CD36。因为能够脂肪细胞分化的克隆祖细胞系代表不同解剖学起源的间质原基,对应的脂肪细胞可以代表具有不同表型的脂肪形成细胞。这些不同表型中的一些会提供如本文中所述的新治疗机会。

[0236] 本发明的表达*C19orf80*的脂肪细胞也可用于治疗I型和II型糖尿病。在所述治疗用途中,可以将本发明的表达*C19orf80*的脂肪细胞注射进体内,作为非限制性例子,所述细胞在HyStem-C (BioTime, Inc. Alameda, CA)中具有 2.5×10^5 个细胞/ml至 1.0×10^8 个

细胞/ml的浓度,优选 1.0×10^7 个细胞/ml,或在可用于促进细胞植入的其它基质中在这些浓度。植入部位可以变化,但是作为例子,可以将所述细胞皮下地注射在人类的褐色脂肪细胞的正常部位,诸如在后背的肩胛间区域。所述细胞也可以是或不是遗传上修饰的,所述修饰用于增加C19orf80表达,诸如下调胰岛素受体基因的那些,或允许移植的细胞的可诱导的细胞凋亡,或所述修饰用于促进所述细胞的同种异体组织相容性。

[0237] 在某些应用中,如本文中所述将所述表达C19orf80的脂肪细胞有丝分裂地灭活以限制它们的寿命和导致C19orf80的短暂表达从而短暂诱导胰腺β细胞的增殖。

[0238] 在年老患者中,通过β细胞或β细胞前体中的端粒长度的延伸(通过端粒末端转移酶逆转录酶(诸如人TERT)的催化组分的外源表达),可以促进响应于移植的分泌C19orf80的脂肪细胞的胰腺β细胞增殖,或可替换地,响应于施用的C19orf80蛋白的胰腺β细胞增殖,或简单的响应于低胰岛素血症的胰腺β细胞增殖。通过本领域已知的不同方法,诸如病毒基因治疗,包括、但不限于腺病毒载体,可以引入端粒末端转移酶的端粒末端转移酶催化组分。

[0239] 本文提供了改进的包含hEP细胞和它们的分化后代的方法和组合物,以及用于指导hEP细胞向成熟褐色脂肪细胞的分化的方法,所述成熟褐色脂肪细胞可用在研究中和用于治疗某些代谢障碍和血管障碍。

[0240] 用于冷冻保存细胞的方法和组合物

在某些实施方案中,本发明提供了用于冷冻保存下文所述细胞的方法。在其它实施方案中,本发明提供了包含冷冻保存的细胞的组合物,其中所述细胞是一个或多个下文所述的细胞。

[0241] 在某些实施方案中,本发明提供了一种包含冷冻保存的祖细胞(诸如下文所述的hEP细胞)的组合物。所述组合物可以包含至少1个祖细胞,至少10个、至少100个、至少1,000个、至少10,000个、至少100,00个、至少1,000,000个活的冷冻保存的祖细胞。所述组合物可以包含约1个祖细胞,约10个、约100个、约1,000个、约10,000个、约100,000个、约1,000,000个活的冷冻保存的祖细胞。所述冷冻保存的祖细胞可以进一步包含水凝胶,其中所述祖细胞接种在所述水凝胶内。所述冷冻保存的祖细胞可以包括合适的培养基,其含有一种或多种冷冻保护剂(诸如DMSO或FBS)以便利冷冻所述细胞。在一个实施方案中,本发明提供了在包含透明质酸盐的水凝胶中冷冻保存的hEP细胞。所述水凝胶可以进一步包含明胶。所述水凝胶可以进一步包含丙烯酸酯诸如PEG丙烯酸酯。所述丙烯酸酯可以充当交联剂。用于在水凝胶中冷冻保存细胞的合适培养基的一个例子可以包含FBS,其为10%DMSO。可以在-80℃冷冻所述细胞。

[0242] 在其它实施方案中,本发明提供了一种组合物,其包含冷冻保存的祖细胞的体外分化后代,诸如下文所述的hEP细胞。所述组合物可以包含至少1个、至少10个、至少100个、至少1,000个、至少10,000个、至少100,00个、至少1,000,000个活的冷冻保存的祖细胞的体外分化后代。所述组合物可以包含约1个、约100个、约1,000个、约10,000个、约100,00个、约1,000,000个活的冷冻保存的祖细胞的体外分化后代。所述冷冻保存的祖细胞的体外分化后代可以进一步包含水凝胶,其中所述祖细胞的体外分化后代接种在所述水凝胶内。所述冷冻保存的祖细胞的体外分化后代可以包括合适的培养基,其含有一种或多种冷冻保护剂(诸如DMSO或FBS)以便利冷冻所述细胞。在一个实施方案中,本发明提供了在包含透明质

酸盐的水凝胶中冷冻保存的hEP细胞的体外分化后代。所述水凝胶可以进一步包含明胶。所述水凝胶可以进一步包含丙烯酸酯诸如PEG丙烯酸酯。所述丙烯酸酯可以充当交联剂。用于在水凝胶中冷冻保存细胞的合适培养基的一个例子可以包含FBS,其为10%DMSO。可以在-80℃冷冻所述细胞。

[0243] 所述冷冻保存的组合物可以用在研究和治疗用途中。例如用下文所述的冷冻保存的组合物可以治疗需要细胞治疗的受试者。可以将所述组合物解冻并施用给需要治疗的受试者。下文所述细胞在所述水凝胶中的放置可以便利冷冻保存所述细胞和增强所述细胞向受试者中的移植。

[0244] 在某些实施方案中,本发明提供了一种冷冻保存细胞的方法,所述方法包括1)使所述细胞与水凝胶接触,2)使1)的细胞与包含胎牛血清(FBS)和二甲亚砜(DMSO)的培养基接触,和3)在-80℃冷冻2)的细胞由此冷冻保存所述细胞。

[0245] 在某些实施方案中,本发明提供了一种冷冻保存细胞的方法,所述方法包括1)使所述细胞与水凝胶接触,2)使1)的细胞与包含胎牛血清(FBS)和甘油的培养基接触,和3)在-80℃冷冻2)的细胞由此冷冻保存所述细胞。

[0246] 在某些实施方案中,使用一种或多种下文所述的细胞实践在以前段落中描述的方法。因而,所述细胞可以是hEP细胞或hEP细胞的体外分化后代。可以使所述细胞在水凝胶有机会固化之前与所述水凝胶接触,例如,可以使其与一种或多种包含水凝胶的液体制剂接触,并且在使所述细胞与一种或多种包含水凝胶的液体制剂接触之后,可以允许所述水凝胶聚合。所述水凝胶可以包含透明质酸盐、明胶和交联剂,诸如丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯,例如,PEG丙烯酸酯。所述透明质酸盐可以是硫酸化。所述明胶可以是硫酸化(参见美国专利号7,928,069; 7,981,871)。可以给所述水凝胶接种约100个细胞、约500个细胞、约1,000个细胞、约10,000个细胞、约100,000个细胞、约1,000,000个细胞、约10,000,000个细胞。在某些实施方案中,给所述水凝胶接种约 10^5 至约 10^7 个细胞。

[0247] 在下文所述的冷冻保存细胞的方法中使用的培养基可以包含任何已知的培养基和合适的冷冻保护剂。合适的冷冻保护剂的例子包括FBS、DMSO、甘油、葡萄糖等。在一个实施方案中,所述培养基包含从10%DMSO制成的FBS。在另一个实施方案中,所述培养基由从10%DMSO制成的FBS组成。

[0248] 一般技术

可用于实践本发明的实验室技术可以参见细胞生物学、组织培养物和胚胎学的标准教科书和综述。干细胞生物学和操作描述在Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach, E. J. Robertson编, IRL Press Ltd. 1987; Guide to Techniques in Mouse Development, P. M. Wasserman等人. 编, Academic Press 1993;和Embryonic Stem Cell Differentiation in Vitro, M. V. Wiles, Meth. Enzymol. 225:900 1993。

[0249] 分子遗传学和基因工程方法描述在Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Sambrook, 等人. 1989; Oligonucleotide Synthesis, M. J. Gait编1984; Animal Cell Culture, R. I. Freshney,编1987; the series Methods in Enzymology, by Academic Press; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, J. M. Miller & M. P. Calos, 编1987; Current Protocols in Molecular Biology and Short

Protocols in Molecular Biology, 第3版, F. M. Ausubel, 等人. 编1987 & 1995; 和 Recombinant DNA Methodology II, R. Wu编, Academic Press 1995。用于在本公开内容中提及的遗传操作的试剂、克隆载体和试剂盒可得自商业卖方诸如BioRad、Stratagene、Invitrogen和ClonTech。在产生抗体、以及免疫测定和免疫组织化学的设计和执​​行中使用的一般技术参见: Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir & C. C. Blackwell编; Current Protocols in Immunology, J. E. Coligan, 等人. 编1991; 和 R. Masseyeff, W. H. Albert, 和 N. A. Staines, 编, Methods of Immunological Analysis, Weinheim: VCH Verlags GmbH 1993。

[0250] 应用

公开的用于培养动物细胞和组织的方法可用于制备用在研究和治疗中的褐色脂肪祖先和分化的褐色脂肪细胞。研究应用包括所述细胞针对可用于治疗代谢障碍的药剂在药物筛选中的应用, 且治疗应用包括所述细胞或其后代在哺乳动物和人细胞治疗中的应用, 例如, 但不限于, 产生人细胞, 其可用于治疗人类和非人动物中的代谢障碍诸如糖尿病和肥胖、血管障碍诸如高血压和动脉粥样硬化和阿尔茨海默氏病。

[0251] 在本发明中使用的方法(其中原始多能干细胞用作主细胞库, 由于分化的细胞类型在工业规模上的无限衍生)具有在质量控制和再现性方面的商业优点。特别实用的是这样的发明, 其中可以将主细胞库遗传修饰以允许得到的体细胞逃避免疫监视, 且其中将具有相对长端粒长度的中间的仍然相对未分化的克隆胚胎祖细胞类型放大作为工业可扩展性的点。还特别实用的是本文描述的制剂, 其中用诱导水凝胶中的BAT细胞分化的因子分化本发明的细胞, 所述水凝胶已经被证实可在人类中安全地皮下施用, 由此提供制剂来在体内产生三维脂肪组织。

[0252] 药物筛选

可以使用本发明的细胞来筛选影响褐色前脂肪细胞前体和成熟褐色脂肪细胞的特征的因子(诸如溶剂、小分子药物、肽、多核苷酸)或环境条件(诸如培养条件或操作)。在一个实施例中, 使用多能干细胞(未分化的或开始进入分化范例)来筛选因子, 所述因子促进成熟为褐色脂肪细胞或促进长期培养物中的褐色脂肪细胞的增殖和维持。例如, 如下试验候选成熟因子或生长因子: 将它们加给不同孔中的细胞, 然后根据对于细胞的将来培养和应用而言合乎需要的标准确定引起的任何表型变化。这可以导致改进的衍生和培养方法, 不仅对于多能干细胞衍生的褐色脂肪细胞, 而且对于从胎儿或成年组织分离的褐色脂肪细胞祖先。

[0253] 另一个实施例是本发明的褐色脂肪细胞祖先或分化的褐色脂肪细胞用于测量小分子药物的作用的用途, 所述小分子药物具有影响褐色脂肪细胞活性(在它们的代谢脂蛋白、分泌脂肪因子或热调节的作用方面)的潜力。为此目的, 可以将所述细胞在体外与试验化合物组合, 并可以确定所述化合物对基因表达或蛋白合成的影响。所述筛选还可以如下在体内完成: 在动物模型中测量所述化合物对细胞的行为的影响。

[0254] 本发明的其它筛选方法涉及试验药物化合物或对褐色脂肪细胞生长、发育的潜在效应或毒性。这类筛选不仅在所述化合物被设计成对褐色脂肪细胞本身具有药理学作用时是适当的, 而且可用于在别处试验为主要药理学作用而设计的化合物的褐色脂肪细胞相关的副作用。读者通常参考标准教科书“*In vitro Methods in Pharmaceutical Research*”,

Academic Press, 1997和美国专利号5,030,015。候选药物化合物的活性的评估通常包含,将本发明的分化的细胞与候选化合物组合,无论是单独地还是与其它药物组合。研究人员会确定可归因于所述化合物的细胞的形态学、标志物表型或功能活性的任何变化(相对于未治疗的细胞或用惰性化合物治疗的细胞),然后将所述化合物的作用与观察到的变化相关联。

[0255] 在第一种情况下可以通过对细胞生存力、存活、形态学和某些标志物和受体的表达的影响来确定细胞毒性。通过测量DNA合成或修复,可以确定药物对染色体DNA的影响。[3H]-胸苷或BrdU掺入(特别是在细胞周期中未计划的时间,或高于细胞复制所需的水平)与药物效应是一致的。不希望的效应还可以包括罕见的姐妹染色单体交换率,其通过分裂中期伸展确定。关于其它阐述,读者参考A. Vickers (“In vitro Methods in Pharmaceutical Research”的第375-410页,Academic Press, 1997)。

[0256] 在本发明的某些实施方案中,下文所述的hEP细胞的分化后代可以用作“饲养细胞”来支持其它细胞类型(包括多能干细胞)的生长。本发明的hEP细胞的分化后代作为饲养细胞的应用会减轻从衍生自其它哺乳动物来源的饲养细胞向靶细胞传播病原体的潜在风险。例如,通过 γ 射线辐照或通过用丝裂霉素C处理,可以将所述饲养细胞灭活以限制复制,并然后与多能干细胞一起共培养。

[0257] 在本发明的某些实施方案中,下文公开的hEP细胞的分化后代的细胞外基质(ECM)可以用于支持更少分化的细胞(参见Stojkovic, 等人, Stem Cells (2005) 23(3):306-14)。可以在基质上的无饲养细胞培养物中支持通常需要饲养层的某些细胞类型(Rosler, 等人, Dev Dyn. (2004) 229(2):259-74)。通过预培养和裂解形成基质的细胞系(参见WO 99/20741),诸如ST0小鼠成纤维细胞系(ATCC登记号CRL- 1503)或人胎盘成纤维细胞,可以沉积基质。

[0258] 在本发明的某些实施方案中,可以将hEP细胞的分化后代的条件培养基收集、合并、过滤和作为条件培养基储存。可以配制该条件培养基并用于研究和治疗。在减小将培养的细胞暴露于从其它哺乳动物来源(即无异种基因的)衍生出的非人动物病原体的潜在风险方面,下文所述的细胞培养物的条件培养基的应用可以是有利的。

[0259] 在本发明的另一个实施方案中,下文所述的单细胞衍生的和寡克隆细胞衍生的细胞和它们的分化后代可以用作鉴别和表征基因的方式,所述基因随着细胞经历分化而在转录上活化或抑制。例如,通过本发明的方法可以制备基因捕获单细胞衍生的或寡克隆细胞衍生的细胞和/或它们的分化后代的文库,并测定以检测基因捕获标志物的表达水平随着所述细胞在体外和在体内分化的变化。用于制备基因捕获细胞和用于检测基因捕获标志物的表达随着细胞分化的变化的方法综述在Durick, 等人(Genome Res. (1999) 9:1019-25)中。可用于制备基因捕获细胞和用于检测基因捕获标志物的表达随着细胞分化的变化的载体和方法也描述在美国专利号5,922,601 (Baetscher, 等人)、美国专利号6,248,934 (Tessier-Lavigne)和美国专利公开号2004/0219563 (West, 等人)中。在本领域中开发了并已知用于遗传修饰细胞、诱导它们的体外分化、和使用它们来产生嵌合的或核转移克隆的胚胎和克隆的小鼠的方法。为了促进基因的鉴别和它们的生理学活性的表征,可以制备基因捕获细胞的大文库,所述基因捕获细胞具有随机地插入在它们的基因组中的基因捕获DNA标志物。已经开发了有效方法来筛选和检测基因捕获标志物的表达水平随着细胞在体

外或在体内分化的变化。用于诱导单细胞衍生的或寡克隆细胞衍生的细胞或它们的分化后代发生分化的体内方法还包括将一个或多个细胞注射进胚胎中以形成允许发育的嵌合胚胎；将干细胞与无核的卵母细胞融合以形成核转移单元 (NTU)，和在导致允许发育的胚胎的产生的条件下培养所述NTU；和将一个或多个产生克隆的分化细胞移植进免疫受损的或组织相容性的宿主动物 (例如，SCID小鼠或同基因的核供体) 中，并允许包含分化的细胞的畸胎瘤形成。用于诱导单细胞衍生的或寡克隆细胞衍生的细胞发生分化的体外方法还包括在单层中、在混悬液中或在三维基质中培养所述细胞 (单独地或与不同类型的细胞共培养)，和将它们暴露于化学、生物和物理因素的许多组合之一，包括与一种或多种不同类型的细胞 (已知其能够诱导或允许分化) 一起共培养。

[0260] 在本发明的另一个实施方案中，可以诱导在任何已知细胞培养条件下不会较好地增殖的细胞类型增殖，使得它们可以根据本发明的方法如下克隆地或寡克隆地分离：通过克服了细胞周期抑制的因子的受调节表达，诸如SV40病毒大T-抗原 (Tag) 的受调节表达，或受调节的E1a和/或E1b，或乳头状瘤病毒E6和/或E7，或CDK4 (参见，例如，2006年11月21日提交且标题为“Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby”的美国专利申请系列号11/604, 047，通过引用并入本文)。

[0261] 在本发明的另一个实施方案中，可以将克服了细胞周期停滞的因子与另外的蛋白或蛋白结构域融合并递送给细胞。例如，可以将克服了细胞周期停滞的因子连接至蛋白转导结构域 (PTD)。与克服了细胞周期停滞的因子共价地或非共价地连接的蛋白转导结构域允许所述因子跨细胞膜的易位，使得所述蛋白可以最终到达细胞的核隔室。可以与克服了细胞周期停滞的因子融合的PTD包括HIV反式激活蛋白 (TAT) (Tat 47-57) 的PTD (Schwarze和Dowdy, 2000 *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 45-48; Kros1, 等人. 2003 *Nature Medicine* (9): 1428-1432)。对于HIV TAT蛋白，赋予膜易位活性的氨基酸序列对应于残基47-57 (Ho等人, 2001, *Cancer Research* 61: 473-477; Vives等人, 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 16010-16017)。单独的这些残基可以赋予蛋白易位活性。

[0262] 在临床治疗中的BAT细胞祖先和BAT细胞

本发明也提供了BAT前体和完全分化的BAT细胞和它们的衍生物在需要这种疗法的患者中保留或恢复正常代谢的用途。可以考虑导致脂肪、脂蛋白、血压或葡萄糖代谢的损害的任何病症。包括通常与代谢综合征X有关的病症。本发明的细胞还可以考虑用于治疗I型糖尿病，其中将分泌betatrophin的细胞注射进胰腺中。也预见到本发明的细胞用于控制肥胖和冠状动脉疾病的用途。

[0263] 在本发明的某些实施方案中，将如下文所述的单细胞衍生的和寡克隆细胞衍生的细胞和它们的分化后代用于治疗与细胞生物学、脂肪细胞分化和脂蛋白代谢有关的障碍。例如，所述hEP细胞和它们的分化后代可以用于产生cDNA文库，后者又可以用于研究发育中的组织 (诸如脂肪，包括表达关键脂肪因子诸如betatrophin或脂联素的褐色脂肪细胞) 中的基因表达和用于研究*IL13RA2*的遗传表达水平作为肥胖和II型糖尿病的风险因素。所述hEP细胞和它们的分化后代可以用在药物筛选中。例如可以使所述细胞诸如hEP细胞的分化后代与试验药物或化合物接触，并如下分析毒性：在显微镜下检查所述细胞和观察它们的形态学，或在培养中研究它们的生长或存活。通过测定*UCP1*、*ADIPOQ*或*C19ORF80*表达，也可

以针对基因表达来筛选细胞以确定所述药物的作用,具体地,用于诱导脂肪的褐变。例如,可以在以下二者之间做出对比:已经与试验药物或化合物接触的hEP细胞的分化后代,相对于尚未如此接触的相同分化后代细胞。

[0264] hEP细胞的分化后代可以用于筛选生长因子、激素、细胞因子、促分裂原等的作用以确定这些试验化合物对hEP细胞的分化后代的分化状态的影响。

[0265] 在本发明的某些实施方案中,可以将hEP细胞的分化后代引入它们通常所在的组织中,以便表现出治疗效用或可替换地诱骗所述细胞进一步分化。在本发明的某些实施方案中,将下文所述的hEP细胞的分化后代用于诱导其它多能或多潜能干细胞的分化。细胞-细胞诱导是在早期胚胎中指导分化的常见方式。在诱导中有用的细胞类型可以模仿本领域众所周知的诱导以在正常胚胎发育中天然地发生。

[0266] 许多潜在地医学上有用的细胞类型受正常胚胎发育过程中的诱导信号影响,包括脊髓神经元、心脏细胞、胰腺β细胞和确定的造血细胞。可以在多种体外或体内培养条件下培养hEP细胞的分化后代以诱导其它多能干细胞的分化,从而变成期望的细胞或组织类型。可以在多种方法中进行诱导,所述方法使所述诱导细胞与靶细胞并置。作为非限制性例子,可以将所述诱导细胞置于组织培养物中并用丝裂霉素C或辐射处理以阻止所述细胞进一步复制。然后将靶细胞铺板在有丝分裂地灭活的诱导细胞的上面。可替换地,可以将hEP细胞的分化后代在来自更大细胞培养物或来自原始单细胞衍生的集落的可除去膜上培养,并可以将靶细胞铺板在诱导细胞的上面,或可以使被靶细胞覆盖的单独膜并置从而夹住直接接触的两个细胞层。可以将得到的细胞双层在体外培养,移植进SPF禽蛋中,或在允许三维生长的条件下培养,同时提供血管支持(参见,例如,2005年7月28日公开的国际专利公开号WO/2005/068610,其公开内容特此通过引用并入)。所述诱导细胞也可以来自hEP细胞的分化后代的来源,其中已经引入自杀构建体,使得所述诱导细胞可以随意除去。当与生物相容的基质诸如HyStem-C (Renevia)组合时,最佳地将本发明的细胞配制成用于治疗用途。通过在组织培养容器表面上或在浆中的珠子上或可替换地在HyStem-C珠子上的细胞培养物中生长来制备BAT细胞,其中将它们冷冻用于在照护点使用。在外科手术过程中,将BAT细胞解冻,与基质组分混合,并将负载细胞的基质注射进期望的放置区域。

[0267] 根据本发明制备的BAT细胞也可以与患者-特异性的脂肪间质血管级分(诸如在腹部脂肪抽吸中得到的那些)一起配制以提供正常脂肪组织脉管系统(包括血管内皮)的细胞组分和血管周围细胞,以辅助血管形成和移植物的存活。另外,可以用表达*ITLN1*和*ITLN2*的多能干细胞衍生的血管祖先诸如以前描述的那些(Compositions and methods relating to clonal progenitor cell lines,WO 2013036969 A1)增强移植物。如一贯的,关于患者选择、施用模式以及支持结构和外科手术选项的选择的最终责任是主治临床医师的责任。

[0268] 为了商业分布的目的,本发明的BAT细胞通常以药物组合物的形式提供,所述药物组合物包含用于人施用的在充分无菌条件下制备的等渗赋形剂。关于细胞组合物的医学制剂的一般原理,读者参考Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, G. Morstyn和W. Sheridan, 编, Cambridge University Press, 1996。

[0269] 所述组合物还可以含有用于在治疗以后的前几个月中将BAT细胞保持就位的基质。生物相容的基质诸如HyStem (BioTime)允许细胞与基质的混合物,以液体形式注射所

述细胞和基质,在体内形成聚合。除了HyStem以外,其它可能的基质包括可生物吸收的聚合物羊毛状物基质(Rudert, 等人, *Cells Tissues Organs* 167:95, 2000);透明质酸衍生物(Grigolo, 等人, *Biomaterials* 22:2417, 2001);从聚(L-丙交酯 ϵ -己内酯)制备的海绵(Honda等人, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 58:767, 2000)和胶原-纤维蛋白基质(*Clin. Exp. Rheumatol.* 18:13, 2000)。

[0270] 可以移植本发明的细胞以增加胰岛素敏感性、减少总体脂肪或降低冠状动脉或中风疾病风险,这通过以一定剂量移植所述细胞实现,作为非限制性实施例,在人类中,可以将细胞在HyStem-C (BioTime, Inc. Alameda, CA)中以 2.5×10^5 个细胞/ml至 1.0×10^8 个细胞/ml的浓度施用在肋间区域(BAT细胞通常在出生时停留在该处)和在这样的BAT细胞的交感神经支配附近,优选 $1.0 - 3.0 \times 10^7$ 个细胞/ml,或以在其它基质中可用于促进细胞植入的这些浓度。施用的所述细胞的总剂量将基于BAT组织的损失程度和疾病的严重程度而变化。例如,基于患者的医师的判断,具有病态肥胖的患者可能需要在本文描述的较高范围施用的细胞。单个剂量将在 $10-100 \times 10^6$ 细胞/注射(0.3 mL - 10.0 mL/注射,取决于细胞的浓度)之间变化。通过在治疗之前和之后监测血清脂联素和/或betatrophin(用ELISA或本领域已知的其它方式),或通过PET扫描(在体内施用2-[18F]氟-2-脱氧葡萄糖(FDG)以后,以评估向BAT组织中的摄取),可以评估治疗的有效性。

[0271] 植入的部位可以变化,但是作为例子,可以将所述细胞皮下地注射在人类的褐色脂肪细胞的正常部位,诸如在后背的肩胛间区域。所述细胞也可以是或不是遗传上修饰的,所述修饰用于增加C19orf80表达,诸如下调胰岛素受体基因的那些,或允许移植的细胞的可诱导的细胞凋亡,或所述修饰用于促进所述细胞的同种异体组织相容性。

[0272] 在动脉粥样硬化诸如冠状动脉疾病的预防中,可以将本发明的BAT细胞(其以本文中公开的可比较浓度配制在HyStem-C中)注射进围绕处于动脉粥样硬化风险或表现出动脉粥样硬化的动脉的血管周围空间中。本发明的BAT细胞的存在通过所述细胞表现出的独特脂蛋白代谢以及脂联素的分泌将给患者提供治疗效果。

[0273] 在I型和II型糖尿病的防治中,可以将本发明的细胞(包括、但不限于,处于分化状态的人ES细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系,其表达如本文中所述的赋予免疫耐受性的基因模式和与NP110SM可比较的基因表达模式且表达相对高水平的C19ORF80)直接注射进胰腺中以诱导 β 细胞增殖。当所述细胞也过表达局限性免疫抑制剂诸如PD-L1时,这样的细胞也可以用于暂停I型糖尿病中由免疫介导的胰腺 β 细胞破坏。

[0274] 所述组合物或装置任选地与关于期望目的(诸如用于防治肥胖、糖尿病和冠状动脉疾病的BAT组织的重构)的书面说明一起包装在合适的容器中。

[0275] 应当理解,本发明的某些改变在本公开内容中被描述为本领域技术人员的常规优化的内容,且可以在不背离本发明的精神或所附权利要求的范围的情况下实现。在本发明的另一个实施方案中,所述hEP细胞系诸如能够褐色脂肪分化的hEP细胞系可以是永生化的,或通过端粒末端转移酶(*TERT*)的催化组分的永久或暂时表达来延长它的细胞寿命。

[0276] 在本发明的另一个实施方案中,使用噬菌体展示技术(参见2005年5月27日提交的美国申请号60/685,758,和PCT US2006/020552),可以使用所述单细胞衍生的和寡克隆细胞衍生的细胞或它们的分化后代来制备配体。

[0277] 可以确定本发明的细胞的基因的表达。通过本领域中的任意已知方法,包括、但不

限于,微阵列基因表达分析、珠子阵列基因表达分析和RNA印迹分析,可以执行基因表达水平的测量。可以将基因表达水平表示为归一化至ADPRT (登录号NM_001618.2)、GAPDH (登录号NM_002046.2)或本领域已知的其它持家基因的相对表达。通过中位值的中位值方法,也可以将基因表达数据归一化。在该方法中,每个阵列给出不同的总强度。使用中位值是在实验中对细胞系(阵列)的稳健方式。作为一个例子,为每个细胞系找到中位值,并然后将那些中位值的中位值变成用于归一化的值。相对于其它细胞系中的每一个得到来自每个细胞系的信号。基于基因表达水平,可以预见到本发明的细胞对对应蛋白的表达。

[0278] 在本发明的另一个实施方案中,下文所述的单细胞衍生的或寡克隆细胞衍生的细胞或它们的分化后代可以表达独特的CD抗原基因表达模式,其为细胞表面抗原。在细胞表面上的CD抗原的差异表达可以用作工具,例如,用于使用商购可得的抗体筛分细胞,这基于所述细胞表达哪些CD抗原。本发明的一些细胞的CD抗原的表达谱显示在West等人, 2008, *Regen Med* vol. 3(3) 第287-308页(通过引用并入本文),包括补充信息。有几种CD抗原在本发明的相对更分化的细胞中表达,但是不在ES细胞中(或在某些情况下,在显著地降低的水平)表达。落入该类别中的抗原包括:CD73、CD97、CD140B、CD151、CD172A、CD230、CD280、CDw210b。这些抗原可用在负选择策略中以生长ES细胞,或可替换地以分离下文所述的某些细胞。

[0279] 在本发明的另一个实施方案中,可以将所述单细胞衍生的和寡克隆细胞衍生的细胞或它们的分化后代注射进小鼠中以产生针对分化抗原的抗体。针对分化抗原的抗体可用于鉴别细胞以证实用于细胞疗法的群体的纯度,用于细胞分化研究,以及用于证实移植以后细胞的存在和命运。一般而言,用于产生抗体的技术是本领域众所周知的。

[0280] 在本发明的另一个实施方案中,可以将所述单细胞衍生的和寡克隆细胞衍生的细胞或其分化后代用于产生增加的量的具有比原始干细胞类型更低的多能性的不同细胞类型的目的,但是不会产生尚未完全分化的细胞。然后可以从这些细胞系制备mRNA或miRNA,并可以如本文中所述执行它们的相对基因表达的微阵列。

[0281] 在本发明的另一个实施方案中,可以将所述单细胞衍生的和寡克隆细胞衍生的细胞或它们的分化后代用在动物移植模型中,例如移植递增剂量的细胞,具有或没有其它分子,诸如ECM组分,以确定所述细胞在移植以后是否增殖,它们迁移至哪里,和它们在安全性研究中的长期分化命运。

[0282] 在本发明的另一个实施方案中,当被诱导以分化成在培养基中表达betatrophin和脂联素的BAT细胞组分时,本发明的细胞可以用作制备用于研究和治疗用途的所述蛋白的工具,其中使用用过的培养基或使用本文描述的方法进行分泌的蛋白的温和尿素提取,或简单地收集用过的培养基和将所述蛋白纯化至不同的纯度水平。

[0283] 在本发明的另一个实施方案中,根据本发明的方法制备的单细胞衍生的和寡克隆细胞衍生的细胞可用于从单个细胞或小数目的细胞(即,克隆)收获mRNA、微RNA和cDNA以产生基因表达信息的数据库。该数据库允许研究人员如下鉴别细胞类型的身份:在数据库中检索哪些细胞类型以在研究的一种或多种细胞类型的可比较水平表达或不表达基因。例如,如本领域众所周知的,可以使用微阵列分析来确定mRNA的相对表达。可以将所述相对值输入软件程序诸如Microsoft Excel中,并将来自不同细胞系的基因表达值使用本领域众所周知的各种技术(诸如平均值、模式、中位值和分位数归一化)归一化。如本领域众所周知

的,可以用软件诸如*The R Project for Statistical Computing*执行使用单一连接方法的分级群聚。可以在线找到这样的文件的一个例子。如本领域众所周知的,然后可以执行分级群聚分析。这些软件程序使用一组不同性(关于正在群聚的对象的数目)执行分级群聚分析。首先,将每个对象放在它自己的簇中,然后迭代地,连接每个类似的簇直到存在一个簇。用Lance-Williams不同性更新公式计算簇之间的距离(Becker, R. A., Chambers, J. M. 和Wilks, A. R. (1988) *The New S Language*. Wadsworth & Brooks/Cole. (S version.); Everitt, B. (1974). *Cluster Analysis*. London: Heinemann Educ. Books)。通常,树状图的垂直轴显示细胞克隆的基因表达谱的相似性程度。也就是说,它们分支越远,它们越相似。垂直轴是一组 $n-1$ 个非减实数值。分簇高度是与特定团聚的分簇方法有关的判据的值。为了确定新细胞系是否与现有细胞系相同,执行两类重复:生物重复和技术重复。生物重复要求,培养新细胞系,收获mRNA,然后对比分析。另一方面,技术重复会将相同RNA分析2次。然后在所述重复分支的地方上面紧挨着绘制截止线,使得在所述截止线下面的细胞分支被视作相同细胞类型。上述数据库的数据的另一个来源可以是下文所述的单细胞衍生的和寡克隆细胞衍生的细胞或它们的分化后代的微RNA谱。微RNA (miRNA) 是约22个核苷酸的内源性RNA,其通过靶向mRNA进行切割或翻译抑制而在动物和植物中起重要的调节作用。已经跨物种鉴别了超过700种miRNA。它们的表达水平在物种和组织之间变化。低丰度miRNA已经难以基于当前技术诸如克隆、RNA印迹杂交和改进的Invader[®]测定进行检测。在本发明中,将使用新实时定量方法(称作环化引物RT-PCR)的替代方案用于准确地和灵敏地检测存在于人胚胎干细胞中和从人胚胎干细胞分化出的细胞系中的miRNA以及其它非编码RNA (ncRNA) 分子。

[0284] 在本发明的另一个实施方案中,可以使用基因表达分析来鉴别体外分化的hES细胞的发育途径和细胞类型。来自人或非人胚胎或胎儿组织的单个细胞或小数目的细胞的基因表达分析会提供另一种方式来产生处于不同分化阶段的细胞的不同群体的独特基因表达谱的数据库。可以如Kurimoto等人, *Nucleic Acids Research* (2006) 第34卷, 第5期, e42在以前描述的执行从特定组织分离的单个细胞的基因表达分析。因而,单独的或与基因表达谱、免疫细胞化学和蛋白组学结合的细胞miRNA谱会提供分子标记,其可以用于鉴别分化中的细胞系的组织和发育阶段。该技术表明,可以使用所述数据库来准确地鉴别细胞类型和将它们与其它细胞类型区分开。本发明的细胞也可用于提供基因表达标志物的子集,所述基因表达标志物在某些细胞系中以相对高的水平表达,而在其它细胞系中根本不表达,这不同于在所有细胞系中表达、但是在不同的表达水平的基因。通过对比表达水平(例如通过使用寡核苷酸探针或本领域已知的其它方式测量),并将一个系中的基因的表达水平与本发明的所有其它系进行对比,可以容易地鉴别“全-或无”标志物的该子集。将在系的子集中以相对高的水平表达且在其它系中根本不表达的那些基因用于产生基因表达标志物的短列表。当应用于本文描述的细胞和基因表达数据时,其中在Illumina 1中的阴性表达 <120 RFU,且阳性表达 >140 RFU。

[0285] 油红-O染色

使用油红-O染色来鉴别脂肪形成分化。油红-O购自Sigma-Aldrich目录号01391-500ML。将细胞、附着于细胞培养容器的细胞、或细胞/基质构建体(诸如含有细胞的HyStem珠子)用4%低聚甲醛固定30分钟。然后将细胞或上述构建体用蒸馏水冲洗,并在室温用经过

滤的油红-O溶液的工作溶液(用2份H₂O稀释3份0.5%储备水性油红-O)染色10分钟,然后用Whatman纸过滤。油红-O的储备溶液是在异丙醇中的0.5% (w/v) 油红-O。然后将所述细胞或构建体用H₂O冲洗至少4次,然后照相以记录显示显著细胞质红色脂滴的细胞的百分比。

[0286] 用于分析胚胎祖细胞和它们的分化后代中的基因表达的方法

在下文所述的本发明的某些实施方案中,下述方法可用于分析胚胎祖细胞和它们的分化后代(例如,它们的体外分化后代)中的基因表达。

[0287] RNA的分离

根据生产商的说明书使用Rneasy小型试剂盒(Qiagen)从细胞裂解物制备RNA。简而言之,将细胞培养物在PBS中冲洗,然后在最小体积的RLT裂解缓冲液中裂解。在冰上温育以后,将细胞碎片通过离心除去并将裂解物与RLT缓冲液混合,此后将乙醇加入所述混合物。然后将合并的混合物加载到Rneasy旋转柱上并离心;然后将负载的柱洗涤并用最小体积的DEPC-处理过的水(通常100 μ l或更少)从所述柱释放纯化的RNA。通过在260 nm的吸光度确定最终的洗脱液中的RNA浓度。

[0288] cDNA合成

使用SuperScript First Strand cDNA试剂盒(InVitrogen; Carlsbad, CA)执行cDNA合成。简而言之,将1 μ g经纯化的RNA在有随机六聚体存在下热变性。冷却后,使用SuperSript逆转录酶和来自所述试剂盒的有关试剂完成第一链反应。根据生产商的说明书使用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen)进一步纯化得到的产物。简而言之,将PB缓冲液加入第一链cDNA反应产物,然后将混合物加载到QIAquick旋转柱上并离心。将所述柱用PE缓冲液洗涤,并将纯化的cDNA用50 μ l水从所述柱洗脱。

[0289] 定量实时PCR (qRT-PCR) 分析

在标准的光学96-孔反应平板(Applied Biosystems Carlsbad, CA, PN 4306737)中制备用于试验的样品(模板),其由30ng cDNA的RNA等同物、0.8 μ M每个基因-特异性的定制寡核苷酸引物集合(Life Technologies, Carlsbad, CA或Eurofins Genomics, Huntsville, AL)、超纯蒸馏水(Life Technologies目录号10977015)组成,用12.5 μ l包含AmpliAq Gold DNA聚合酶的Power SYBR Green PCR主混合物(Applied Biosystems Carlsbad, CA, 目录号4367659) 1:1稀释,总反应体积为25 μ l。使用Applied Biosystems 7500实时PCR系统(其采用SDS2.0.5软件)运行实时qPCR。将扩增条件设定为在50 $^{\circ}$ C保持2 min(阶段1),在95 $^{\circ}$ C保持10 min(阶段2),40个在95 $^{\circ}$ C保持15秒、然后在60 $^{\circ}$ C保持1 min的循环(阶段3),解离阶段(阶段4)是在95 $^{\circ}$ C保持15秒、在60 $^{\circ}$ C保持1 min和在95 $^{\circ}$ C保持15秒。将扩增子的Ct值归一化至GAPDH的平均Ct值。

[0290] qPCR引物

为每个靶基因合成qPCR引物对。简而言之,将靶基因的引物对设计成仅扩增靶mRNA序列,且最佳地具有对于它们的靶序列而言位于65-80 $^{\circ}$ C的范围内的退火温度和在80-500碱基对的大小范围内的独特扩增产物。将引物对在工作浓度(10 μ M)供应至BioTrove, Inc. (Woburn, MA)用于生产定制qPCR Open Array平板。将OpenArray平板设计成容纳56-336个引物对,并将最终制备的具有经干燥的引物对的平板提供给服务提供者。使用OpenArray自动装载装置(BioTrove)将经纯化的cDNA反应产物和SYBR green主混合物加载进OpenArray平板的各个孔中。将所述平板密封,并将qPCR加载进NT Imager/Cycler装置(BioTrove)中

用于扩增。使用OpenArray应用软件计算每个样品的Ct值。

[0291] 使用的引物:

GAPDH (NM_002046.4)

正向 GGCCTCCAAGGAGTAAGACC [SEQ ID NO: 1]

反向 AGGGGTCTACATGGCAACTG (147碱基对) [SEQ ID NO: 2]

UCP1 (NM_021833.4)

正向 AGGCGTGAAGAGCAAGGGAAA [SEQ ID NO: 3]

反向 CCCCATCTTCACTCAGAGACTG (89碱基对) [SEQ ID NO: 4]

FABP4 (NM_001442.2)

正向 GACCTGGACTGAAGTTCGCA 5' - [SEQ ID NO: 5]

反向 ACTTGCTTGCTAAATCAGGGA (94碱基对) [SEQ ID NO: 6]

LOC55908 (TD26, betatrophin, C19orf80) (NM_018687.5)

正向 CTACGGGACAGCGTGCAGC [SEQ ID NO: 7]

反向 CAGCATGATTGGTCCTCAGTTCC (257碱基对) [SEQ ID NO: 8]

-- 该特定引物对被称作1422

LOC55908 (TD26, betatrophin, C19orf80) (NM_018687.5)

正向 GCTGACAAAGGCCAGGAACAGC [SEQ ID NO: 9]

反向 ACCTCCCCCAGCACCTCAGC (180碱基对) [SEQ ID NO: 10]

-- 该特定引物对被称作1424

LOC55908 (TD26, betatrophin, C19orf80) (NM_018687.5)

正向 GCAAGCCTGTTGGAGACTCAG [SEQ ID NO: 11]

反向 CTGTCCCGTAGCACCTTCT (110碱基对) [SEQ ID NO: 12]

-- 该特定引物对被称作1085

[0292] 分泌蛋白分离方案1 - 条件培养基

将细胞在它们的正常繁殖培养基 (West等人, 2008, *Regen Med* vol. 3 (3) 第287-308页) 或本文描述的分化条件下培养。为了在较小规模 (通常1-2 L或更小) 得到条件培养基, 将细胞在具有10%CO₂气氛的37°C培养箱中在T150、T175或T225烧瓶 (Corning或BD Falcon) 内的单层培养物中培养。为了较大体积培养基收集, 通常将细胞在2 L滚瓶中、在旋转烧瓶或其它生物反应器内的微载体混悬液 (多孔的, 诸如来自Sigma-Aldrich, St. Louis, MO的Cytodex种类; 或无孔的, 诸如来自SoloHill Engineering, Ann Arbor, MI) 上、或在中

空纤维筒生物反应器 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 中培养。在条件培养基收集之前, 将培养物用 PBS 冲洗 2 次, 并然后在有无血清培养基存在下在 37°C 温育 2 小时, 其中所述培养基是如本文中所述的用于所述细胞的繁殖或分化的相同基础培养基, 以便除去胎儿血清蛋白。然后将无血清培养基除去并用新鲜培养基替换, 随后如本文中所述继续在 37°C 温育 24-48 小时。

[0293] 然后将培养-条件培养基通过从细胞-结合的容器表面或基质分离 (例如, 通过直接倒出或在沉降以后) 进行收集, 并进一步处理用于分泌蛋白浓缩、富集或纯化。对于收集体积认为适当时, 首先将培养基在 15 或 50 ml 离心管或 250 ml 瓶子中在 500-10,000 x g 离心以除去残余的细胞和细胞碎片。然后将它穿过连续的 1 μm 或 0.45 μm 和 0.2 μm 过滤器单元 (Corning) 以除去另外的碎片, 然后如下浓缩: 对于较小体积, 在搅拌孔或 Centricon 离心过滤器 (Amicon-Millipore) 中使用 10,000 MW 截止超滤; 或对于较大体积, 使用切向流超滤单元 (Amicon-Millipore)。然后将截留的蛋白浓缩物透析进适当缓冲液中用于特定蛋白的随后纯化, 并使用等电聚焦、尺寸排阻色谱法、离子交换色谱法、疏水或反相色谱法、抗体亲和色谱法或其它众所周知的对于具体蛋白适合的方法的组合进一步纯化。在纯化方法的不同步骤中, 通过 ELISA (例如, 使用 BMP-2 或 BMP-7 ELISA 试剂盒, 其来自 R&D Systems, Minneapolis, MN) 针对具体分泌蛋白的存在和量来试验收集级分。然后将纯化的蛋白保持在溶液中或低压冻干, 并然后在 4°C 或 -20-80°C 储存。

[0294] 分泌蛋白分离方案 2 - 尿素介导的蛋白提取

就有些分泌蛋白而言, 与细胞或 ECM 组分的相互作用可能减少因子向上面在分泌蛋白分离方案 1 中所述的培养基中的简单扩散。两种方案中的收率的简单对比将足以确定哪个方案会提供最高的期望因子收率。就分泌蛋白分离方案 2 而言, 加入低浓度的尿素来促进因子的除去。就提供的实施例而言, 在补料以后 2 天执行所有尿素提取。在第二天, 将 T-150 细胞培养烧瓶中的细胞单层用 CMF-PBS 冲洗 2 次, 并然后在有无血清培养基存在下在 37°C 温育 2 小时。用 CMF-PBS 冲洗和在无血清培养基中温育一起辅助胎儿血清蛋白从细胞表面的除去。然后将无血清培养基除去, 并加入 10 ml/T150 的新鲜制备的在 CMF-PBS 中的 200 mM 尿素。然后将烧瓶在 37°C 振荡器上放置 6.0 小时。然后将尿素溶液取出并立即在 -70°C 冷冻。

[0295] 细胞外基质分离方案- DOC 介导的制备

使用 Hedman 等人 (1979) 的方法 (Isolation of the pericellular matrix of human fibroblast cultures. J. Cell Biol. 81: 83-91), 可以提取细胞外基质蛋白。将细胞层在环境温度用 CMF-PBS 缓冲液冲洗 3 次, 并然后在冰上同时在振动平台上用 30 mL 0.5% 脱氧胆酸钠 (DOC)、1 mM 苯基甲基磺酰氟 (PMSF, 来自在 EtOH 中的 0.4M 溶液)、CMF-PBS 缓冲液洗涤 3 次各 10 min。然后将烧瓶以相同方式用 2mM Tris-HCl (pH 8.0) 和 1 mM PMSF 洗涤 3 次各 5 min。然后将保持附着于烧瓶的蛋白用橡胶刮棒除去在 2 mL 凝胶负载缓冲液中。

[0296] 针对生物活性筛选分泌的蛋白或细胞外基质蛋白

本发明的细胞系和它们的分化后代也可用作针对不同生物活性筛选不同胚胎分泌蛋白质组的工具。以克隆繁殖的 18-21 次倍增培养的本发明的细胞系表达宽范围的分泌的可溶性和细胞外基质基因 (参见 2009 年 7 月 16 日提交的标题为 "METHODS TO ACCELERATE THE ISOLATION OF NOVEL CELL STRAINS FROM PLURIPOTENT STEM CELLS AND CELLS OBTAINED THEREBY" 的美国专利申请公开 2010/0184033, 通过引用并入本文)。在克隆繁殖

的21次或更多倍增,本发明的细胞差别地表达分泌的可溶性和细胞外基质基因。通过本领域已知的各种技术,包括下文所述的那些,可以从本发明的胚胎祖细胞系或它们的分化后代收获这些蛋白、蛋白聚糖、细胞因子和生长因子。如本领域已知的,分泌的和细胞外基质蛋白的这些库可以进一步纯化或用作因子的混合物并用在生物活性的各种体外或体内测定中。可以将分泌蛋白用作抗原来产生抗体诸如多克隆或单克隆抗体。所述抗体又可以用于分离分泌蛋白。作为一个例子,表达脂肪因子基因诸如ADIPOQ或C19orf80的基因(betatrophin)的分化后代可以用于从所述细胞分离脂肪因子或产生对它们特异性的抗体。所述脂肪因子可以用于研究或疗法。所述抗体可以用于从下文所述的细胞或表达它们的其它细胞纯化所述脂肪因子。

[0297] 细胞系的常规培养

将细胞解冻,培养,并用0.25%胰蛋白酶(用不含Ca、Mg的PBS 1:3稀释)常规地解离成单个细胞,并铺板在明胶包被的组织培养板上。在10%CO₂和5%O₂的控湿气氛下在37°C维持细胞系,并进行除了HyStem-珠子实验以外的所有后续实验。用于系NP88 SM、NP111 SM、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31、NPCC SM36、NP92 SM、NP91 SM、NP93 SM、NP95 SM和NP113 SM的所述繁殖的培养基是含有以下生长补充物的MCDB131培养基:5%胎牛血清、0.5 ng/ml EGF、2.0 ng/ml碱性FGF和5.0 μg/ml胰岛素。用于系SK1和ESI-004-EP SK8的繁殖的培养基是含有glutamax 2mM和青霉素/链霉素10,000 U/ml、5%FCS、50 μg/ml牛胎球蛋白、10 ng/ml重组EGF、1.0 ng/ml重组bFGF、10 μg/ml重组胰岛素、0.4 μg/ml地塞米松和2.0 mM GlutaMAX-1补充物的基础MCDB120培养基。在PromoCell MV2内皮细胞培养基中培养细胞系NP77 EN、NP78 EN、NP80 EN和NP95 EN。

[0298] 脂肪生成方案1

如下制备HyStem-C基质(BioTime, Alameda, CA)。将HyStem组分(10 mg硫醇改性的透明质烷)溶解在1.0 ml脱气的去离子水中大约20 min以制备1%w/v溶液。将Gelin-S®组分(10 mg硫醇改性的明胶(BioTime))溶解在1.0 ml脱气的去离子水中以制备1%w/v溶液,并将聚乙二醇二丙烯酸酯(10 mg PEGDA)溶解在0.5 ml脱气的去离子水中以制备2%w/v溶液。然后,在即将使用前将HyStem(1 ml, 1%w/v)与Gelin-S(1 ml, 1%w/v)混合。将本发明的沉淀的细胞重新悬浮在上述新制备的HyStem:Gelin-S(1:1 v/v)混合物中。加入PEGDA交联剂以后,将细胞混悬液在部分凝胶化后以 2.0×10^7 个细胞/ml的终浓度等分(25 μl/等分试样)进6-孔平板(Corning® 3516; VWR, PA, USA)中。在完全凝胶化(20 min)后,将分化培养基加入每个孔。分化培养基是高葡萄糖DMEM(CellGro目录号15-013-CV),其含有丙酮酸1mM(Gibco目录号11360)、Pen:Strep 100U/ml:100ug/ml(Gibco目录号504284)、Glutamax 2mM(Gibco目录号35050)、地塞米松0.1μM(Sigma, St. Louis, MO, 目录号D1756-100)、L-脯氨酸0.35mM(Sigma目录号D49752)、2-磷酸-L-抗坏血酸0.17mM(Sigma, 目录号49792, Fluka)和含有终浓度6.25ug/ml胰岛素、6.25ug/ml转铁蛋白、6.25ng/ml硒酸、1.25mg/ml血清白蛋白、5.35 μg/ml亚油酸的ITS预混合物(BD, Franklin Lakes, NJ, 无菌目录号47743-628)。给所述分化培养基补充1.0 μM罗格列酮和2.0 nM三碘甲腺原氨酸(T3),含有或不含有10 ng/ml BMP4。然后将平板放在具有环境O₂和10%CO₂的37°C保湿培养箱中,并将细胞每周饲喂3次。对于使用之前的最后4小时,将10 μM CL-316,243加入培养基。在期望的时间点,将水凝胶构建体固定并处理用于免疫组织化学分析,或使用含有1%β-硫

基乙醇(对于总RNA)的RLT (Qiagen, CA, USA)裂解以使用定量实时PCR (qRT-PCR)和/或整个基因组微阵列分析转录物表达,或冷冻保存用于治疗用途。HyStem珠子作为分化工具的应用会促进大数目的珠子的积累,所述珠子具有大数目的不同hEP细胞类型,其可以同时解冻并在诸如高通量机器人系统中测定,其中将所述珠子暴露于不同分化条件并通过基因表达微阵列或本领域已知的其它方式测定它们的分化。它也使得以下成为可能:解冻大数目的冷冻保存的珠子,并将珠子的组合与不同类型的包埋细胞一起温育,并随后分析分化状态的变化(诸如基因表达微阵列或本领域已知的其它方式)。

[0299] 汇合脂肪细胞分化条件:

将细胞在正常繁殖培养基中培养直到达到汇合,然后转移至不同培养基14天,含有DMEM低葡萄糖培养基、10%FBS、青霉素/链霉素、GLX、ITS、地塞米松1 μ M、IBMX 0.5mM、吡啶美辛60 μ M。使用的ITS浓度是6.25 μ g/ml胰岛素、6.25 μ g/ml转铁蛋白、6.25ng/ml硒酸、1.25mg/ml血清白蛋白、5.35 μ g/ml亚油酸。在指定的时间段,根据生产商的说明书使用Qiagen RNeasy试剂盒(Qiagen, Valencia, CA, USA目录号74104)提取RNA。如下将RNA收率最大化:在RNA提取之前,在用RLT缓冲液裂解微团以后,使用Qiagen的QiaShredder (Qiagen, Valencia, CA, USA目录号79654)将样品匀浆化。

[0300] 基因表达分析

根据生产商的说明书使用Qiagen RNeasy小型试剂盒从在6-孔平板或10cm组织培养皿中生长的细胞直接提取总RNA。使用Beckman DU530或Nanodrop分光光度计测量RNA浓度,并通过变性琼脂糖凝胶电泳或使用Agilent 2100 Bioanalyzer确定RNA质量。使用Illumina Human Ref-8v3或Human HT-12 v4 BeadArrays进行全基因组表达分析,并通过qRT-PCR证实某些基因的RNA水平。关于Illumina BeadArrays,将总RNA线性地扩增,并使用Illumina TotalPrep试剂盒(Life Technologies, Temecula, CA, USA)进行生物素标记,并使用Agilent 2100 Bioanalyzer进行cRNA质量控制。使cRNA与Illumina BeadChips杂交,处理,并根据生产商的说明书(Illumina, San Diego, CA, USA)使用BeadStation阵列读出器读出。将小于120相对荧光单位(RFU)的值视作非特异性的背景信号。

[0301] 在未分化的hEP细胞系中的对比mRNA表达

以前报道的针对胶原II型 α I (COL2A1) mRNA表达对100种不同的hES衍生的克隆的hEP细胞系的筛选鉴别出了7个应答系:具有位点特异性的基因表达的4D20.8、7PEND24、7SM0032、E15、MEL2、SK11和SM30 (Sternberg等人, *Regen Med.* 2013 Mar;8(2):125-44)。7个不同的人胚胎干细胞衍生的软骨形成性克隆胚胎祖细胞系表现出位点特异性的细胞命运。为了筛选能够脂肪细胞分化的位点特异性的hEP细胞系,和具体地,鉴别能够进行褐色脂肪细胞分化的hEP细胞系,使不同的hEP细胞系在以下条件下分化:可以诱导所述BAT细胞分化的条件,诸如在有本文所述的补充了BMP4的HyStem珠子存在下培养所述祖先,和筛选脂肪因子C19ORF80的表达;或条件诸如脂肪细胞分化方案1,其预期会在能够BAT细胞分化的细胞中诱导UCP1表达,并使用Illumina Human HT-12 v4珠子阵列分析通过微阵列分析来分析mRNA。RFU值是归一化的排序不变量,并如本文中所述对比得到的值。关于在本发明中呈现的数据,认为120 RFU或更小的RFU值是与非特异性杂交有关的背景RFU值。

[0302] 试剂盒和培养基

在某些实施方案中,本发明提供了一种试剂盒,其用于分化祖细胞,诸如下文所述的

hEP细胞。在一个实施方案中,所述试剂盒包含补充了一种或多种外源地添加的TGF- β 超家族成员的培养基。所述TGF- β 超家族成员可以包括以下一种或多种:TGF- β 蛋白(包括TGF- β 3)、骨形态发生蛋白(BMP)(包括BMP2、4、6和7)、生长分化因子(GDF)(包括GDF5)、神经胶质衍生的神经营养因子(GDNF)、激活素、Lefty、Müllerian抑制物质(Müllerian Inhibiting Substance,MIS)、抑制素和Nodal。在某些实施方案中,给所述培养基补充了多种外源地添加的TGF- β 超家族成员。在一个实施方案中,给所述培养基补充了BMP4和BMP7。在另一个实施方案中,在条件的组合下培养所述祖细胞系,其中如下文所述在实质上低于正常体温的温度在水凝胶中培养所述细胞,具有或没有分化剂诸如TGF- β 超家族的成员、视黄酸、PPAR γ 的激动剂、肾上腺素能激动剂和甲状腺激素。在上述段落中描述的TGF- β 超家族成员中的一种或多种可以以约1 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、15 ng/ml、20 ng/ml、25 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml、300 ng/ml、400 ng/ml、500 ng/ml、600 ng/ml、700 ng/ml、800 ng/ml、900 ng/ml、1,000 ng/ml的浓度提供在所述培养基中。在本发明的某些实施方案中,在上述段落中描述的TGF- β 超家族成员可以以约大于1,000 ng/ml的浓度提供在所述培养基中。所述TGF- β 超家族成员可以选自TGF- β 蛋白(包括TGF- β 3)、骨形态发生蛋白(BMP)(包括BMP2、4、6和7)、生长分化因子(GDF)(包括GDF5)、神经胶质衍生的神经营养因子(GDNF)、激活素、Lefty、Müllerian抑制物质(Müllerian Inhibiting Substance,MIS)、抑制素和Nodal。

[0303] 在某些实施方案中,所述试剂盒可以包含补充了外源地添加的视黄醇(诸如视黄酸)的培养基。所述外源地添加的视黄酸可以以约0.1 μ M、0.2 μ M、0.3 μ M、0.4 μ M、0.5 μ M、0.6 μ M、0.7 μ M、0.8 μ M、0.9 μ M、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M的浓度提供。在某些实施方案中,所述外源地添加的视黄酸的浓度大于5.0 μ M。

[0304] 在某些实施方案中,所述试剂盒可以进一步包含水凝胶。所述水凝胶可以包含透明质酸盐、明胶和丙烯酸酯。所述透明质酸盐可以是硫酸化。所述明胶可以是硫酸化。所述丙烯酸酯可以是PEG丙烯酸酯诸如PEG二丙烯酸酯。

[0305] 在本发明的某些实施方案中,所述试剂盒可以进一步包含下文所述的细胞。因而,在某些实施方案中,所述试剂盒可以进一步包含祖细胞,诸如hEP细胞。所述hEP细胞可以具有软骨形成潜力。在其它实施方案中,所述试剂盒可以进一步包含祖细胞的分化后代,诸如下文所述的祖细胞的体外分化后代。本发明的试剂盒可以进一步包含使用说明书。

[0306] 例证

实施例1:脂肪细胞分化条件对不同克隆胚胎祖细胞系的影响的分析

如在图1中所示,当在补充了10 ng/ml BMP4、1.0 μ M罗格列酮、2.0 nM三碘甲腺原氨酸(T3)和对于使用前的最后4小时10 μ M CL316243(分化)的HyStem珠子中培养时,许多不同的克隆胚胎祖细胞系(对照)表达增加的脂肪细胞标志物FABP4水平。如在图2-4中所示,这些不同的克隆的hEP细胞系的仅一个子集表现出UCP1、BETATROPHIN(也被称作C19ORF80、LOC55908和C19orf80)或ADIPOQ的上调。当培养时,胎儿褐色脂肪组织(fBAT)衍生的前体脂肪细胞和皮下脂肪组织(SAT)衍生的前体脂肪细胞仅表现出少数的如本文中所述的脂肪细胞标志物油红-O的细胞染色和少数的UCP1的细胞染色,特别是在NP88和NP110系的分化培养物中所有细胞关于所述标志物染色(图5)。如在图6中所示,在以下条件下在HyStem珠子中观察到最适UCP1表达:其中在有1.0 μ M罗格列酮、2.0 nM三碘甲腺原氨酸(T3)和对于使

用前的最后4小时10 μ M CL316243存在下使所述细胞分化。另外,ELISA分析证实了在上述系中的脂联素和lipasin生产的稳健上调。

[0307] 实施例2. 从万能供体cGMP人ES细胞系制备的BAT细胞.

将临床级cGMP-相容的人ES细胞系遗传修饰成组成性地表达CTLA4-Ig和PD-L1 (Z. Rong, 等人, An Effective Approach to Prevent Immune Rejection of Human ESC-Derived Allografts, *Cell Stem Cell*, 14: 121-130 (2014), 通过引用并入本文)。简而言之,使用基于BAC的靶向载体诸如HPRT BAC克隆RP11-671P4 (Invitrogen) 将由J. Crook 等人, The Generation of Six Clinical-Grade Human Embryonic Stem Cell Lines, *Cell Stem Cell* 1 (2007年11月) 描述的人ES细胞系遗传修饰成组成性地表达基因CTLA4-Ig和PDL1, 并如所述的使用重组工程构建所述靶向载体 (Rong等人, A scalable approach to prevent teratoma formation of human embryonic stem cells, *J. Biol. Chem.* 287: 32338-32345; Song等人, Modeling disease in human ESCs using an efficient BAC-based homologous recombination system, *Cell Stem Cell* 6: 80-89, 通过引用并入本文)。将pCAG/CTLA4-Ig/IRES/PD-L1/聚腺苷酸表达盒置于HPRT1终止密码子的下游600碱基对处, 并将侧接Loxp的选择盒pCAG/Neo/IRES/Puro/聚腺苷酸置于HPRT1终止密码子和它的聚腺苷酸位点之间, Cre介导的所述选择盒的删除然后产生HPRT的正常表达。

[0308] 在cGMP条件下执行遗传修饰, 并将hES细胞的基因组测序以记录外源基因的插入位点和记录所述的细胞的正态性 (Funk, W.D., Evaluating the genomic and sequence integrity of human ES cell lines; comparison to normal genomes *Stem Cell Research* (2012) 8, 154-164)。建立主细胞库和工作细胞库, 并使工作细胞库分化成本文描述的BAT细胞组分, 包括表达betatrophin和脂联素的脂肪细胞以及表达UCP1的脂肪细胞, 和如本文中所述的组合的血管内皮细胞。

[0309] 实施例3. 从hESC衍生出的另外的不同胚胎BAT细胞祖先的表征。

在本文中首次公开了许多具体的人ES细胞衍生的克隆胚胎祖细胞系。具体地, 这些细胞系已经获得以下命名: NP88、NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31、NPCC SM36、NP111 SM、NP77 EN、NP78 EN、NP80 EN、NP91 SM、NP92 SM、NP93 SM、NP85 EN、NP113 SM、NPCC SM27和SK1。除了从hESC细胞系H9 (WA09) 衍生出的系SK1以外, 使用在以下地方描述的方法从多能干细胞系Envy (Costa等人, The hESC line Envy expresses high levels of GFP in all differentiated progeny, *NAT Methods* 2 (4): 259-260 (2005)) 衍生出所有克隆胚胎祖细胞系: 标题“具有出生前基因表达模式的细胞的新用途”下; 2006年11月21日提交且标题为“Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby”的美国专利申请系列号11/604,047; 和2009年7月16日提交且标题为“Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby”的美国专利申请系列号12/504,630; 标题为“Differentiated Progeny of Clonal Progenitor Cell Lines”的美国专利申请号14/048,910, 通过引用并入本文。如在以下文献中所述, 针对脂肪形成和BAT细胞分化潜力筛选克隆的、寡克隆的和合并的克隆和寡克隆胚胎祖先群体: 标题为“Methods of Screening Embryonic Progenitor Cell Lines”的美国专利申请系列号13/683,241, 更具体地, 标题为“Methods for Generating

Pluripotent Stem Cell-Derived Brown Fat Cells”的美国专利申请系列号14/554,019。

[0310] 简而言之,将hES细胞系hES3 (Envy)与1mg/ml胶原酶一起温育60分钟,此后将培养皿轻轻敲打以将hES细胞集落释放进混悬液中。将这些集落收集并研磨以产生小块,将其铺板在超低附着平板(CoStar, Corning, 目录号3471)中用于胚状体(EB)形成。所述EB在神经分化培养基中形成,所述神经分化培养基由含有Glutamax I (Invitrogen, 目录号10565-018)的DMEM/F12和不含维生素A (Invitrogen, 目录号12587-010) (此后被称作“NP (-)”培养基)且补充了500ng/ml重组人头蛋白(R & D systems, 目录号3344-NG-050)和20ng/ml bFGF (Strathmann, 130-093-842)的1x B27补充物组成。在接下来的21天中,每48小时除去用过的培养基,并将补充了500ng/ml头蛋白和20ng/ml bFGF的新鲜培养基加给EB。在第21天,除去用过的培养基,并将仅补充了20ng/ml bFGF的新鲜培养基加给EB。试剂来自Invitrogen,除非另有说明。神经EB形成在培养物中是明显的。

[0311] 储备候选培养物的产生

为了产生用于克隆分离的候选培养物,将上述在第22天(仅FGF2培养1天以后)的EB用Accutase (Innovative Cell Technologies, AT-104)在37°C解离10分钟,随后研磨以产生单细胞混悬液。将在PBS中的细胞混悬液分入4个试管中,并将每个等分试样用NP (-)培养基(如上所述)+ 20ng/ml bFGF (在本文中命名为NP (+)培养基)稀释。将细胞在180g离心5分钟,并将每份沉淀物在NP (+)培养基中接种进6-孔组织培养板的一个孔中。在初次铺板以后24小时更换培养基,并然后在此后每周3次更换。在汇合后,将6-孔板中的细胞使用TrypLE (Invitrogen, 目录号12563-029)在37°C解离5分钟,并在NP (+)培养基中重新铺板在以下逐渐加大的组织培养容器中:T25烧瓶、T75烧瓶和T225烧瓶,历时几周以达到汇合细胞的T225繁殖阶段。然后将T225烧瓶中的汇合细胞的候选培养物使用TrypLE解离,计数,并将该单细胞混悬液的等分试样在用于培养至T225阶段候选培养物阶段的NP (+)培养基中稀释至10,000个细胞/ml的浓度。然后将单细胞混悬液的一个等分试样在NP (+)培养基中以克隆稀释度(500-7000个细胞/50ml,其进入15cm培养皿中)铺板在0.1%明胶包被的(Sigma, 目录号G1393) 15cm培养皿中。使用控速冰柜程序和冷冻培养基将来自候选培养物的剩余细胞冷冻保存(通常 3×10^6 至 5×10^6 个细胞/瓶)用于冷冻贮存和将来使用。

[0312] 从候选培养物产生克隆胚胎祖细胞系

通过将50ml上述NP (+)培养基加入明胶包被的(0.1%) 15cm培养皿中,制备克隆培养皿。向每个培养皿中,然后如下手工地稀释来自在NP (+)培养基中繁殖的候选培养物的单细胞混悬液制品:向15 cm培养皿加入通过计数细胞混悬液确定的细胞体积,使得存在以下细胞稀释度的选择:500个细胞/皿,或1000个细胞/皿,或1500个细胞/皿,或3000个细胞/皿、5000个细胞/皿或7000个细胞/皿,以达到不同的单细胞混悬液密度和辅助从单个细胞生长的单个集落的分离。如下将接种的适当稀释度的单个细胞均匀地分布在培养皿中:可替代地在顺时针方向、然后在逆时针方向滑动15cm培养皿,然后进行侧至侧(左至右)运动,随后重复地前后运动,在培养箱内持续约30秒。然后将培养皿在CO₂培养箱(5%CO₂, 20%O₂)中温育,并在没有移动或补料的情况下静置14天以允许单个细胞附着至培养皿表面和使集落生长至足以分离的大小。

[0313] 对培养皿进行肉眼检查,并将充分分离的细胞集落使用25ul TrypLE(对于6mm圆筒)、50ul TrypLE(对于8mm圆筒)和100ul TrypLE(对于10mm圆筒)用无菌克隆圆筒(Sigma,

目录号CLS31666, CLS31668 & CLS316610) 挑选。然后将每个分离的细胞集落铺板进0.1%明胶包被的含有1ml PromoCell平滑肌细胞生长培养基2或它的等同培养基(在本文中命名为SM培养基)的24孔板(Nunc, 142475)的各一个孔中。在所述方法的该实例中,将分离的胚胎祖细胞在SM培养基中进一步培养。汇合后,将24-孔板中的细胞使用TrypLE在37°C解离5分钟,并在SM培养基中重新铺板在以下逐渐加大的组织培养容器中:6-孔板、T25烧瓶、T75烧瓶和T225烧瓶的一个孔,历时几周(在每次传代之间平均1-2周)。将T225烧瓶中的汇合细胞冷冻保存,并作为分离的胚胎祖细胞系储存,并接种用于免疫染色和RNA分离,诸如用于本文描述的转录物的PCR扩增。在本文中衍生和表征了细胞系NP88。

[0314] 从冷冻保存的候选培养物重新衍生褐色脂肪细胞的克隆胚胎祖先

将在该实施例所述的条件下产生的冷冻保存的候选培养物解冻,并如在上面该实施例所述分离另外的克隆胚胎祖细胞系。将这些系的子集命名为NPCC SM19、NPCC SM23、NPCC SM28、NPCC SM31和NPCC SM40。

[0315] 当在第10代从这些克隆胚胎祖细胞系提取RNA并引入静止5天(在本文中有时被称作“对照”或“Ctrl”的条件)时,所述细胞表现出在下面表1中所述的基因表达标志物谱。为了实施例3的目的,微阵列确定的高于背景(在实施例3中定义为大于130 RFU的值)的转录物表达被表征为“表达”。产生120 RFU或更少的转录物表达数据的阵列分析在实施例3中被表征为未表达。

[0316] 如在图7中所示,当在补充了10 ng/ml BMP4、1.0 μM罗格列酮、2.0 nM三碘甲腺原氨酸(T3)和对于使用前的最后4小时10 μM CL316243(分化)的HyStem珠子中分化14天时,这些系中的每一个表达*UCP1*。如在图8中所示,所述系也表达*ADIPOQ*,且如在图9中所示,每个系另外表达*LIPASIN*。

[0317] 下面表1显示了对于处于未分化的祖先状态的本发明的不同克隆胚胎祖细胞系,在Illumina珠子阵列上定量的选定标志物的RFU值的基因表达水平(>130RFU的RFU值被视作阳性的,而<120RFU的RFU值被视作阴性的)。

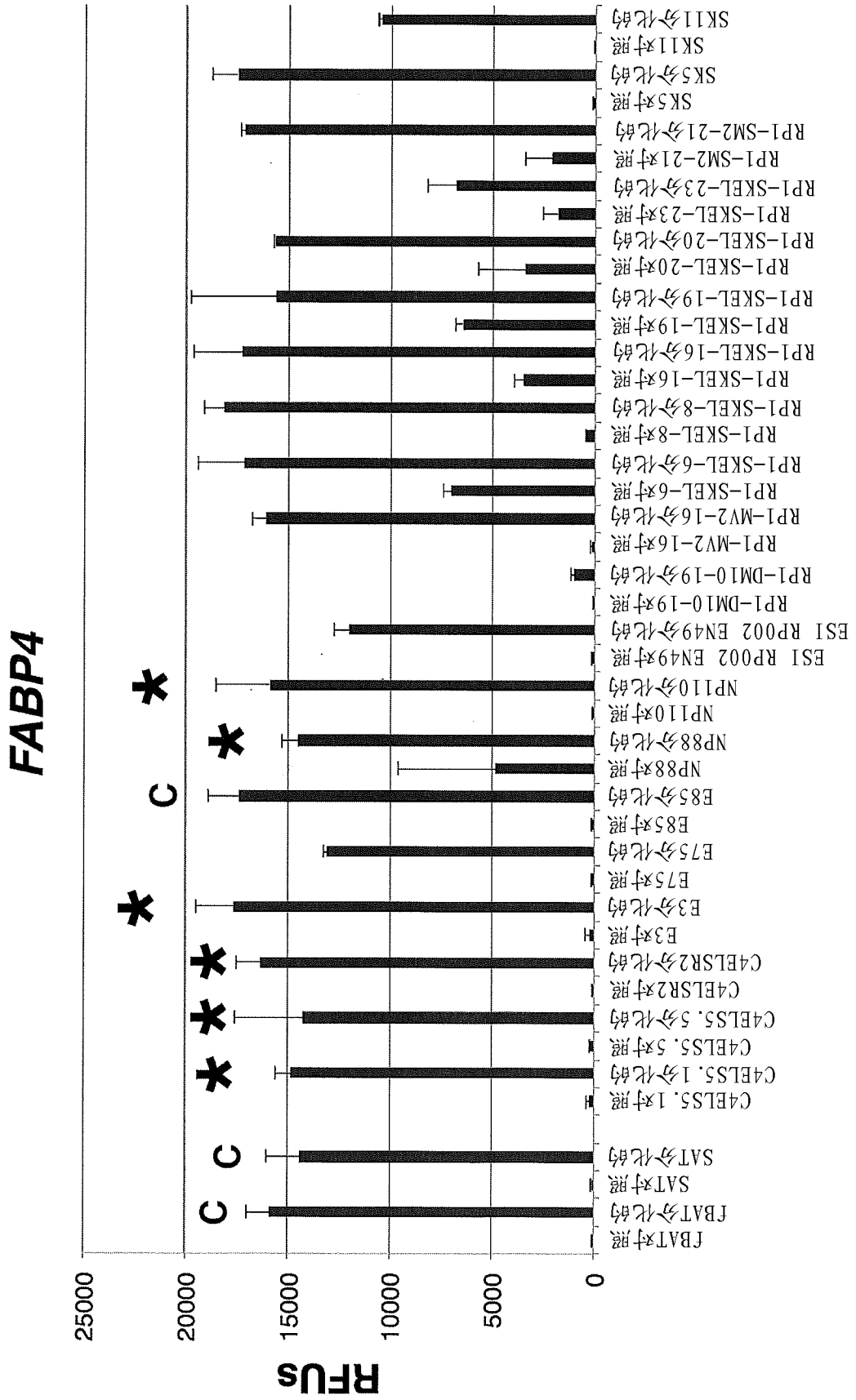


图 1

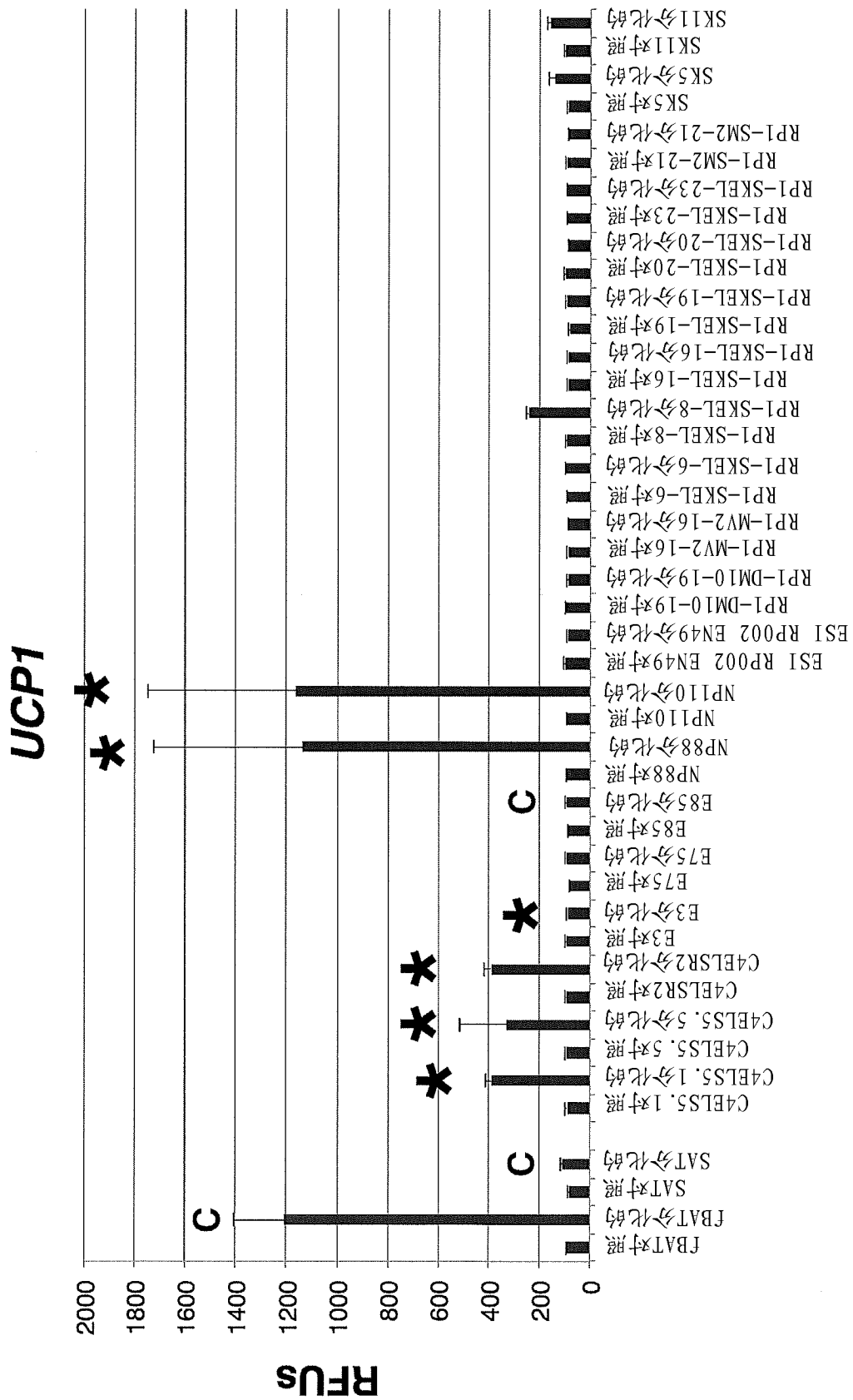


图 2

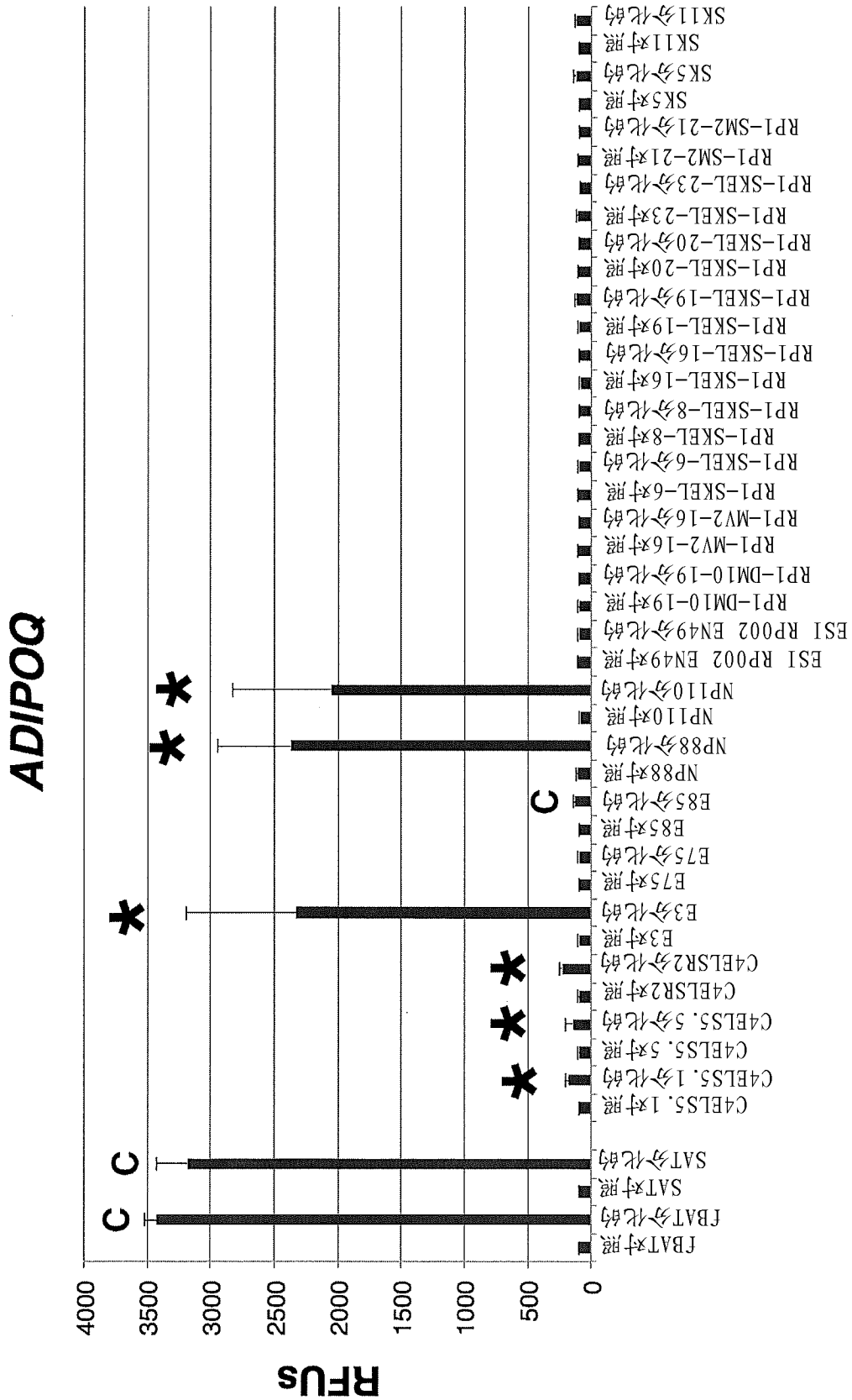


图 3

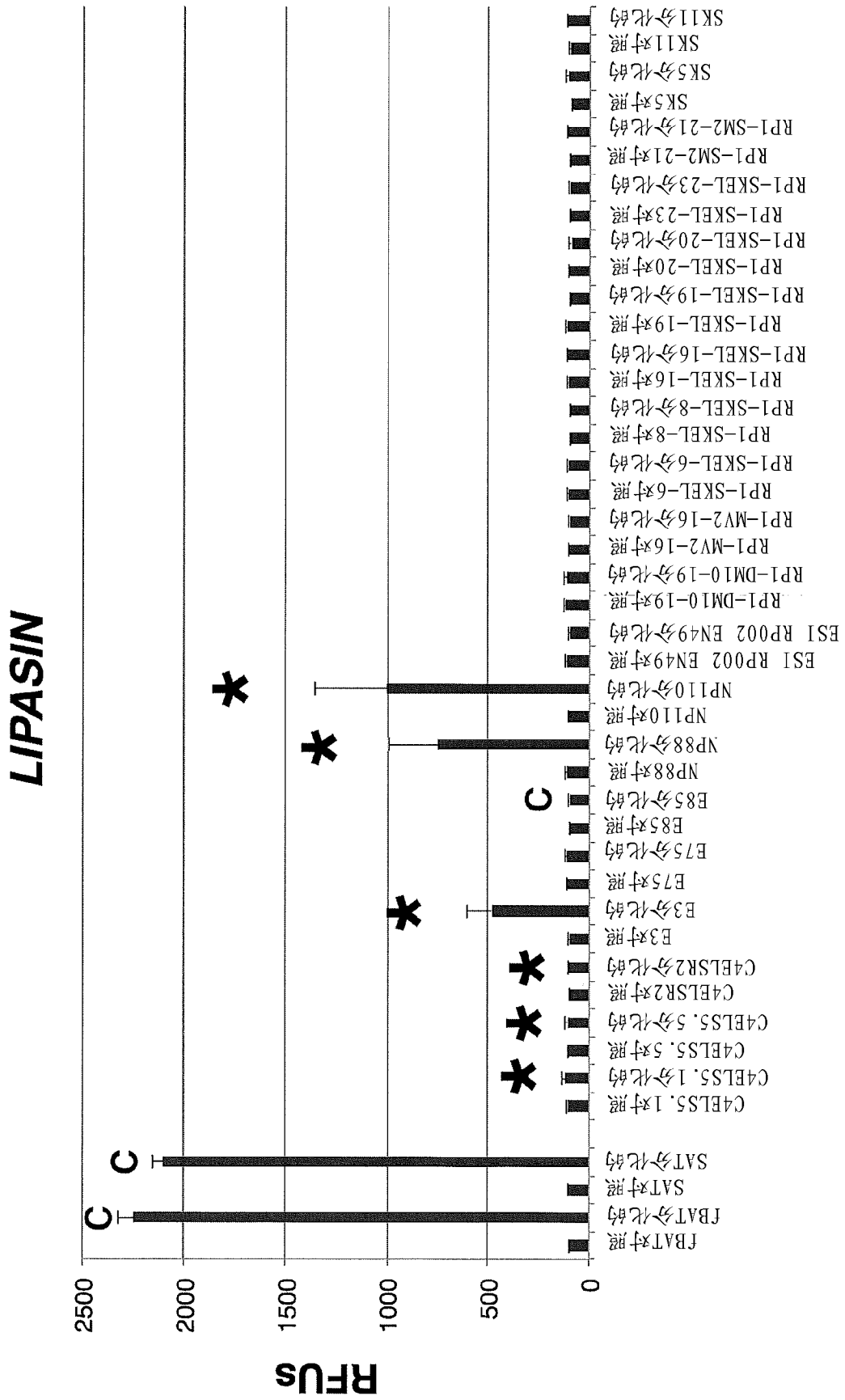


图 4

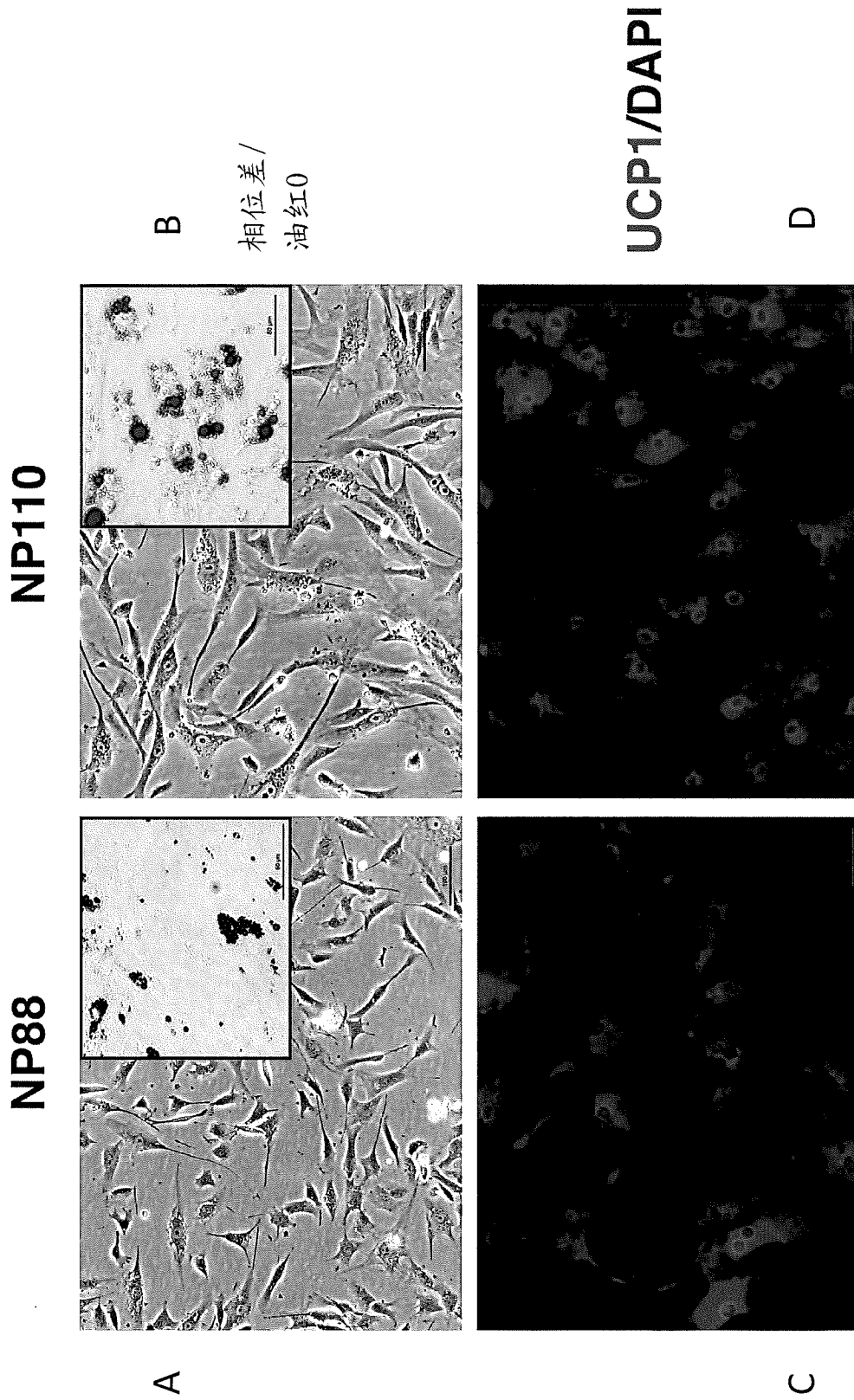


图 5

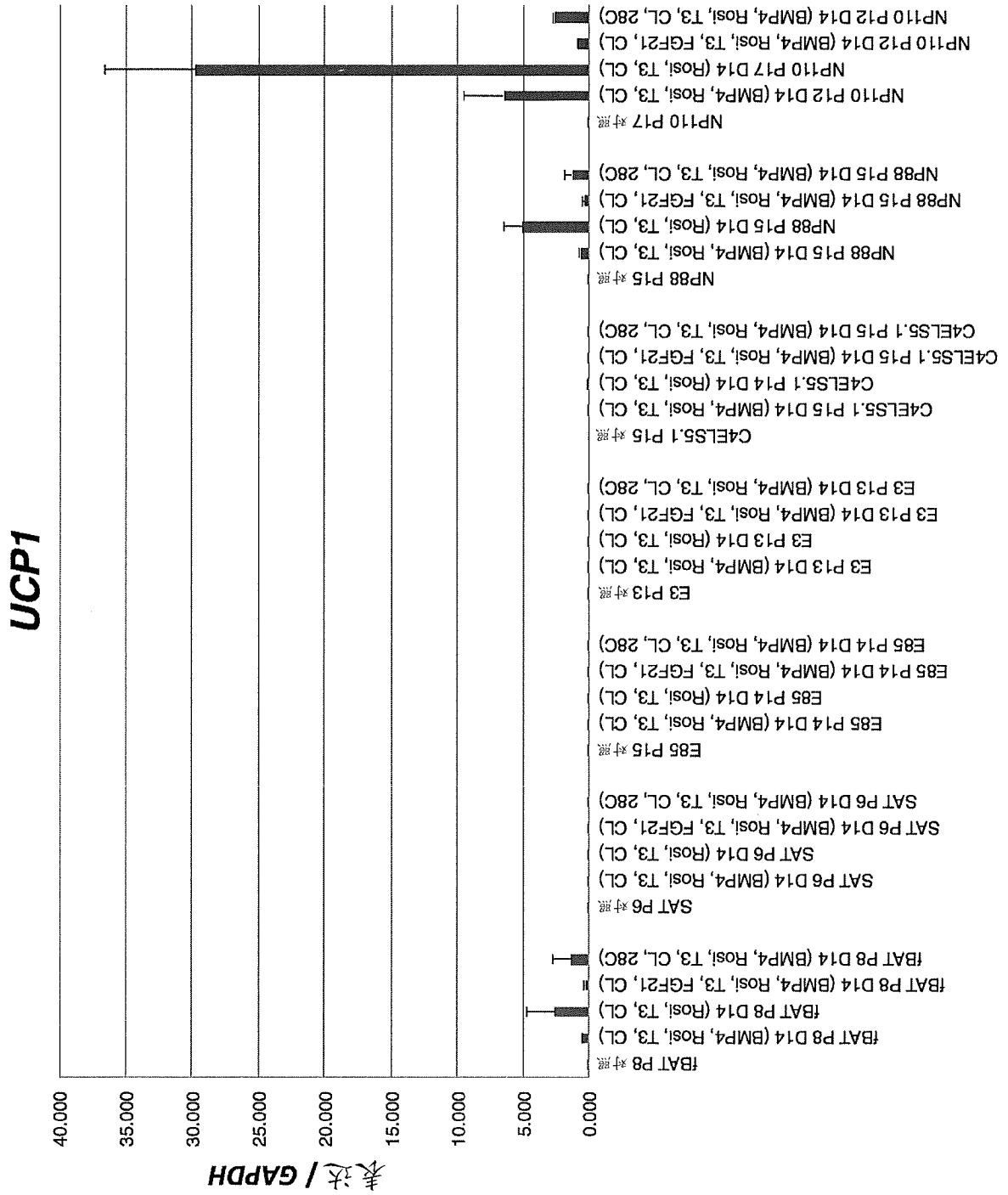


图 9

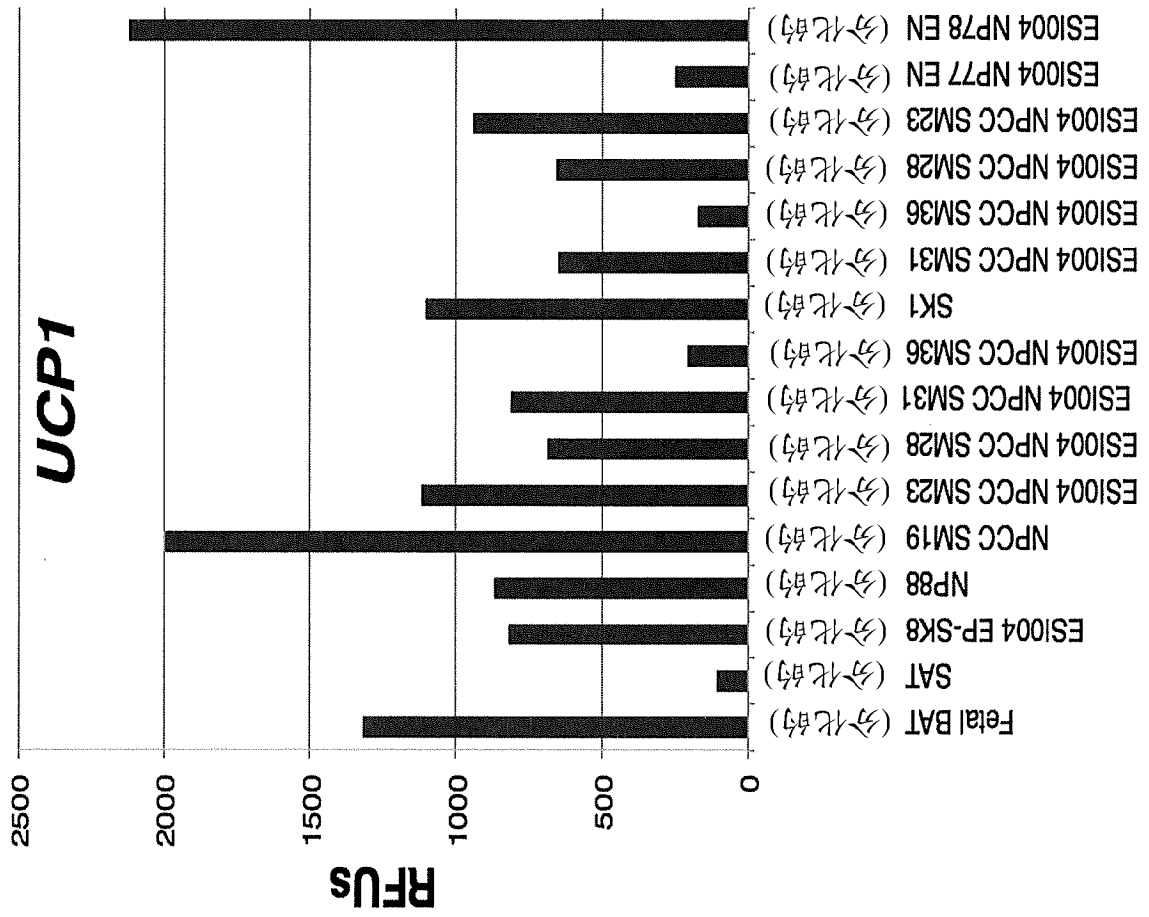


图 7

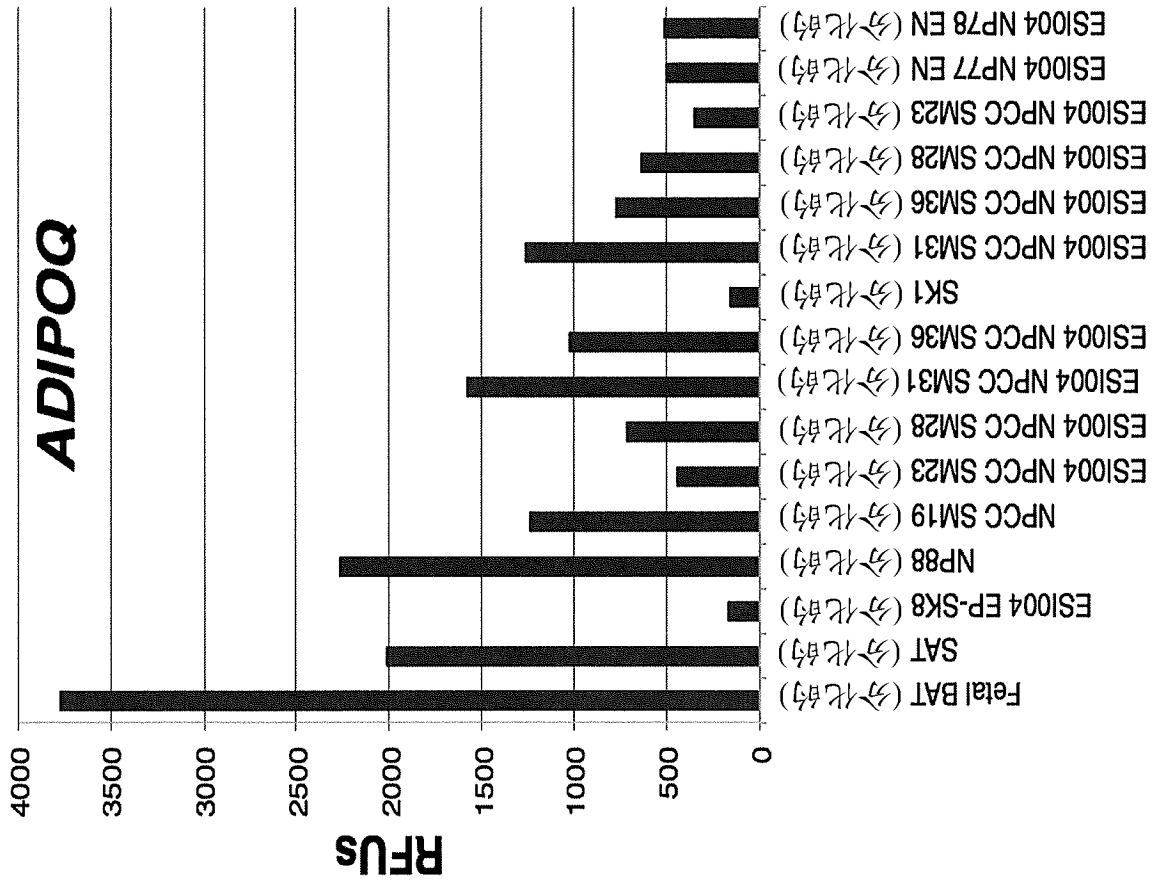


图 8

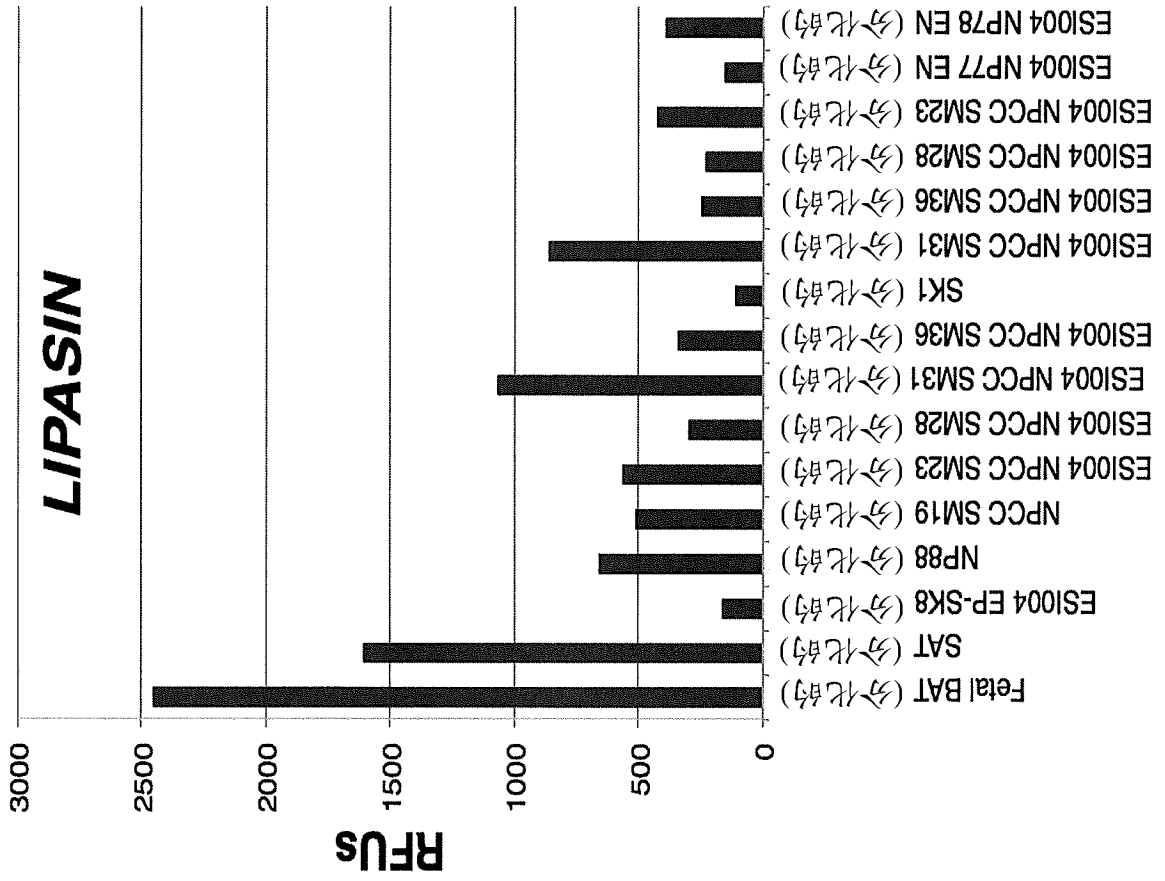


图 6