



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110050061 A

(43)申请公布日 2019.07.23

(21)申请号 201780070553.6

(22)申请日 2017.10.05

(30)优先权数据

62/404,430 2016.10.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.05.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/055353 2017.10.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/067826 EN 2018.04.12

(71)申请人 富士胶片细胞动力公司

地址 美国威斯康星

(72)发明人 D·拉杰时 A·斯托鲁瑟

S·伯顿 C·姆恩 B·斯瓦森

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 张小勇

(51)Int.Cl.

C12N 5/0783(2006.01)

C12N 5/0784(2006.01)

C12N 5/0789(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

权利要求书4页 说明书48页 附图59页

(54)发明名称

从具有MeCP2破坏的诱导多能干细胞生成成熟谱系

(57)摘要

本文提供了对具有MeCP2基因的破坏的多能细胞的有效体外维持、扩增、培养和/或分化为各种红细胞样、骨髓样、淋巴样或内胚层谱系,特别是成熟的红细胞的方法。多能细胞可以在确定的条件下维持和分化;因此,在某些实施方案中,不需要使用小鼠饲养细胞或血清用于分化前体细胞。

1. 将衍生自多能干细胞 (PSC) 的造血前体细胞 (HPC) 分化为红细胞样、淋巴样或骨髓样细胞的方法, 包括获得表现出破坏的甲基-CpG结合蛋白2 (MeCP2) 的HPC, 并在促进红细胞样分化、骨髓样分化或淋巴样分化的条件下培养HPC, 从而产生红细胞样、骨髓样细胞或淋巴样细胞。

2. 权利要求1的方法, 其中HPC表达基本上不与甲基化的DNA结合的无功能的MeCP2。

3. 权利要求1的方法, 其中HPC不以足以影响MeCP2 DNA结合活性的水平表达MeCP2。

4. 权利要求2的方法, 其中由于MeCP2基因中的截短、外显子跳跃或突变, MeCP2是无功能的。

5. 权利要求1的方法, 其中获得表现出破坏的MeCP2的HPC包括使HPC与MeCP2的siRNA、shRNA或小分子抑制剂接触。

6. 权利要求5的方法, 其中siRNA或shRNA破坏野生型MeCP2和突变体MeCP2。

7. 权利要求1的方法, 其中获得表现出破坏的MeCP2的HPC包括使PSC与MeCP2的siRNA、shRNA、蛋白质抑制剂或小分子抑制剂接触并分化PSC以产生HPC。

8. 权利要求1的方法, 其中获得表现出破坏的MeCP2的HPC包括工程化改造PSC以破坏MeCP2的表达、活性和/或功能并分化PSC以产生HPC。

9. 权利要求8的方法, 其中工程化改造包括MeCP2基因的遗传破坏。

10. 权利要求9的方法, 其中遗传破坏包括在MeCP2的甲基CpG结合结构域之前插入终止密码子。

11. 权利要求10的方法, 其中插入终止密码子包括引入DNA结合结构域。

12. 权利要求11的方法, 其中DNA结合结构域是锌指、TALE或CRISPR DNA结合结构域。

13. 权利要求7或8的方法, 其中PSC是诱导多能干细胞 (iPSc)。

14. 权利要求13的方法, 其中iPSC是附加体重编程的iPSC。

15. 权利要求13的方法, 其中iPSC是病毒重新编程的iPSC。

16. 权利要求13的方法, 其中iPSC是9025、SONL、TiPS1E、Line A、Line H或Line G iPSC。

17. 权利要求7或8的方法, 其中PSC是哺乳动物多能细胞。

18. 权利要求7或8的方法, 其中分化PSC以产生HPC包括以下顺序步骤:

(a) 在包含至少一种生长因子的第一确定培养基中培养PSC;

(b) 在包含足以促进多个细胞分化的量的BMP4和VEGF和bFGF的第二确定培养基中培养细胞; 和

(c) 在包含足以促进多个细胞分化的量的IL-3、Flt3配体和IL-6的第三确定培养基中培养细胞, 从而产生HPC。

19. 权利要求18的方法, 其中在步骤(a)之前, PSC适应缺氧进行5-10次传代。

20. 权利要求18的方法, 其中HPC表达来自CD43、CD34、CD31、CD41、CD235、DLL4和CD45的至少两种标志物。

21. 权利要求18的方法, 其中表达CD34和CD43的HPC在缺氧条件下培养以促进淋巴样分化。

22. 权利要求1或权利要求18的方法, 其中所述方法包括在小于20%氧气的大气压下培养细胞。

23. 权利要求1或权利要求18的方法,其中所述方法包括在小于5%氧气的大气压下培养细胞。

24. 权利要求18的方法,其中多个多能细胞形成胚状体(EB)。

25. 权利要求1的方法,其中骨髓样细胞是巨噬细胞、肥大细胞、红细胞、巨核细胞、血小板、树突细胞、单核细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、多形核核粒细胞、小胶质细胞或其组合。

26. 权利要求1的方法,其中骨髓样细胞是小胶质细胞。

27. 权利要求1的方法,其中红细胞样细胞是红细胞或成红细胞。

28. 权利要求27的方法,其中红细胞被去核。

29. 权利要求27的方法,其中红细胞具有 β 球蛋白的表达。

30. 权利要求27的方法,其中与 ϵ 球蛋白和/或 γ 球蛋白的表达相比,红细胞具有更高的 β 球蛋白表达。

31. 权利要求1的方法,其中淋巴样细胞是T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞或T/NK细胞。

32. 权利要求1的方法,其中培养细胞以促进红细胞样分化包括:

(i) 在包含excyte和全转铁蛋白的确定培养基中培养HPC以生成红细胞;和

(ii) 在扩增条件下培养成红细胞以产生富集的红细胞样细胞群。

33. 权利要求32的方法,其中确定培养基还包含一种或多种细胞因子。

34. 权利要求33的方法,其中一种或多种细胞因子选自干细胞因子(SCF)、Flt-3配体(Flt3L)、促血小板生成素(TPO)、白细胞介素3(IL-3)和白细胞介素6(IL-6)。

35. 权利要求34的方法,其中扩增条件包括在基本上不含IL-3、IL-6和TPO的确定培养基中进行培养。

36. 权利要求32的方法,其中步骤(i)和/或步骤(ii)包括培养1-2周。

37. 权利要求32的方法,其中富集的红细胞样细胞群包含大于70%的红细胞样细胞。

38. 权利要求32的方法,其中富集的红细胞样细胞群包含大于80%的红细胞样细胞。

39. 权利要求37的方法,其中红细胞样细胞表达CD71、CD235a和/或CD36。

40. 权利要求1的方法,其中培养细胞以促进骨髓样分化包括:

(a) 在包含MCSF、TGF β 和IL-34的确定小胶质细胞培养基中培养HPC足够长的时间以生成小胶质细胞;和

(b) 在还包含CD200和CXCL1的确定小胶质细胞培养基中使小胶质细胞成熟,从而产生小胶质细胞群。

41. 权利要求40的方法,其中小胶质细胞群包含至少25%的IBA、P2RY和/或TREM-2阳性细胞。

42. 权利要求40的方法,其中小胶质细胞群包含至少50%的IBA、P2RY和/或TREM-2阳性细胞。

43. 权利要求1的方法,其中培养细胞以促进淋巴样分化包括:

(i) 在具有Notch配体的包被基质的平板上在确定培养基中培养具有CD34和/或CD43表达的HPC;和

(ii) 在一种或多种细胞因子存在下维持培养物,从而产生淋巴样细胞。

44. 权利要求43的方法,其中细胞在小于5%氧气的大气压下培养。
45. 权利要求43的方法,其中确定培养基包含抗坏血酸和/或烟酰胺。
46. 权利要求45的方法,其中抗坏血酸以50 μ M至1mM的浓度存在。
47. 权利要求45的方法,其中抗坏血酸以100 μ M至200 μ M的浓度存在。
48. 权利要求45的方法,其中烟酰胺以0.1mM至5mM的浓度存在。
49. 权利要求43的方法,其中基质是retronectin、胶原蛋白、层粘连蛋白或纤连蛋白。
50. 权利要求43的方法,其中Notch配体是DLL4。
51. 权利要求49的方法,其中DLL4是DLL4:Fc嵌合蛋白。
52. 权利要求43的方法,其中淋巴样细胞基本上不具有CD4的表达。
53. 权利要求43的方法,其中淋巴样细胞表达选自CD8、CD7、CD45、CD5、TCR $\alpha\beta$ 和CD3的一种或多种标志物。
54. 权利要求53的方法,其中超过5%的淋巴样细胞对于至少两种标志物是阳性的。
55. 权利要求53的方法,其中超过10%的淋巴样细胞对于至少两种标志物是阳性的。
56. 将衍生自PSC的定形内胚层(DE)细胞分化为内胚层细胞的方法,包括获得表现出破坏的甲基-CpG结合蛋白2(MeCP2)的DE细胞,并在促进内胚层分化的条件下培养DE,从而产生内胚层细胞。
57. 权利要求56的方法,其中在促进内胚层分化的条件下培养DE细胞包括将DE细胞分化为内胚层前体细胞(EPC)。
58. 权利要求56或57的方法,其中DE细胞和/或EPC表达基本上不与甲基化的DNA结合的无功能的MeCP2。
59. 权利要求56或57的方法,其中DE细胞和/或EPC不以足以影响MeCP2 DNA结合活性的水平表达MeCP2。
60. 权利要求58的方法,其中由于MeCP2基因中的截短、外显子跳跃或突变,MeCP2是无功能的。
61. 权利要求56或57的方法,其中获得表现出破坏的MeCP2的DE细胞或EPC包括使HPC与MeCP2的siRNA、shRNA或小分子抑制剂接触。
62. 权利要求61的方法,其中siRNA或shRNA破坏野生型MeCP2和突变体MeCP2。
63. 权利要求56或57的方法,其中获得表现出破坏的MeCP2的DE细胞或EPC包括使PSC与MeCP2的siRNA、shRNA、蛋白质抑制剂或小分子抑制剂接触并分化PSC以产生DE细胞或EPC。
64. 权利要求56或57的方法,其中获得表现出破坏的MeCP2的DE细胞或EPC包括工程化改造PSC以破坏MeCP2的表达、活性和/或功能并分化PSC以产生DE细胞或EPC。
65. 权利要求64的方法,其中工程化改造包括MeCP2基因的遗传破坏。
66. 权利要求65的方法,其中遗传破坏包括在MeCP2的甲基CpG结合结构域之前插入终止密码子。
67. 权利要求66的方法,其中插入终止密码子包括引入DNA结合结构域。
68. 权利要求67的方法,其中DNA结合结构域是锌指、TALE或CRISPR DNA结合结构域。
69. 权利要求63或64的方法,其中PSC是诱导多能干细胞(iPSc)。
70. 权利要求63或64的方法,其中PSC是哺乳动物多能细胞。
71. 权利要求56的方法,其中内胚层细胞是 β 细胞、 α 细胞、 δ 细胞或肝细胞。

72. 权利要求64的方法,其中分化PSC以产生DE细胞包括以下顺序步骤:
- (a) 在包含MTG和激活素A的培养基中培养PSC;
 - (b) 在还包含抗坏血酸、BMP4、bFGF和VEGF的培养基中培养细胞;和
 - (c) 在包含BMP4、bFGF、激活素A和VEGF的培养基中进一步培养细胞足以产生DE细胞的一段时间。
73. 权利要求72的方法,还包括将DE细胞分化为EPC。
74. 权利要求73的方法,其中EPC表达CXCR4/CD117和/或CD34。
75. 权利要求56的方法,其中在促进内胚层分化的条件下培养DE细胞包括在包含激活素A、BMP4、TGF β 、EGF、VEGF和HGF的培养基中培养DE细胞足以产生 β 细胞群的一段时间。
76. 权利要求72的方法,其中 β 细胞群包含至少25%的PDX1阳性细胞。
77. 权利要求72的方法,其中 β 细胞群包含至少20%的NeuroD1阳性细胞。
78. 权利要求72的方法,其中 β 细胞群包含至少5%的NKX6.1阳性细胞。
79. 权利要求56的方法,其中在促进内胚层分化的条件下培养DE细胞包括:
- (a) 在缺氧条件下在包含BMP4、bFGF、EGF、VEGF、HGF、Dex、DMSO和/或FGF-10的培养基中培养DE细胞;
 - (b) 在包含DAPT和维生素K的培养基中进一步培养细胞;和
 - (c) 在基本上不含DAPT和维生素K的培养基中分化细胞足以产生肝细胞群的一段时间。
80. 权利要求79的方法,其中肝细胞群包含至少20%的白蛋白阳性细胞。

从具有MeCP2破坏的诱导多能干细胞生成成熟谱系

[0001] 本申请要求2016年10月5日提交的美国临时专利申请号62/404,430的权益,该文献的全部内容通过引用并入本文。

[0002] 发明背景

1. 发明领域

[0003] 本发明一般地涉及分子生物学领域。更具体地,它涉及从具有MeCP2破坏的前体细胞产生中胚层(例如红细胞样、骨髓样、淋巴样细胞)和内胚层谱系的方法和组合物。

[0004] 2. 相关技术描述

[0005] 由于造血前体细胞(HPC)的显著医学潜力,已经进行了大量工作以试图改进将HPC分化为红细胞样、骨髓样和淋巴样谱系的方法。特别地,人红细胞生成的体外模型可用于研究正常和病理条件下红细胞样分化的机制。红细胞生成定义为从造血干细胞(HSC)到成熟红细胞(RBC)的分化和增殖过程。在成年人中,红细胞样分化每天产生约 2×10^{11} 个红细胞。红细胞样谱系发育需要在促增殖因子和分化诱导因子的相反作用之间进行微妙的平衡。红细胞生成的大多数常用的体外测定法基于细胞系,例如鼠MEL或人K562、HEL和UT-7细胞系。然而,细胞系通常不会概括红细胞生成的整个过程,因为许多调节途径在转化过程中已被改变,导致其永生化。此外,这些模型仅显示中度增殖或缺乏终末分化和去核(Scicchitano等人,2003)。

[0006] 目前生产成熟RBC的方法涉及将红细胞样祖细胞与基质细胞如人胚胎肝基质细胞(hFLSC)共培养(Xi等人,2013)。然而,使用饲养细胞系的HPC培养存在意外转化的风险,所述意外转化先前与共培养期间的种间暴露有关。由于人HPC培养的目标之一是产生最终可以移植到人体内的组织,因此非常希望HPC不暴露于另一物种的细胞或已经用于培养另一物种的细胞的培养基。因此,允许将人HPC细胞分化为红细胞样、骨髓样或淋巴样谱系的细胞而无需任何类型的共培养步骤的方法,对于人HPC分化技术的持续发展具有重要意义。因此,目前明确需要在不使用饲养细胞的情况下有效地将HPC分化为红细胞样、骨髓样、淋巴样和内胚层细胞,例如成熟红细胞、T细胞、NK细胞、T/NK细胞和小胶质细胞的方法。

[0007] 发明概述

[0008] 在一个实施方案中,提供了产生具有甲基-CpG结合蛋白2(MeCP2)的破坏表达的PSC(例如诱导多能干细胞(iPSC))的方法。在一些方面,PSC经工程化改造以破坏MeCP2的表达、活性和/或功能。在一些方面,工程化改造包括MeCP2基因的遗传破坏。在特定方面,遗传破坏包括在MeCP2的甲基CpG结合结构域之前插入终止密码子。在某些方面,插入终止密码子包括引入DNA结合结构域。例如,DNA结合结构域是锌指、TALE或CRISPR DNA结合结构域。在一些方面,PSC(例如iPSC)是哺乳动物、例如人iPSC。在一些方面,MeCP2的破坏导致iPSC的甲基化状态的改变,例如产生具有增强的分化为成熟谱系的能力的iPSC。在其他方面,具有MeCP2破坏、例如MeCP2敲除(MeCP2KO)的iPSC分化为前体细胞,例如造血前体细胞(HPC),定形内胚层(DE)细胞或内胚层前体细胞(EPC)。这些前体细胞可进一步分化为成熟谱系细胞,如红细胞、巨核细胞、巨噬细胞、小胶质细胞、T细胞、NK细胞、NK/T细胞、B细胞、 β 细胞、树突

细胞如浆细胞样树突细胞和肝细胞。

[0009] 在另一个实施方案中,本公开内容提供了从HPC生成成熟谱系的细胞(例如红细胞样、骨髓样和淋巴样谱系细胞)的方法。在另一个实施方案中,提供了将衍生自PSC的HPC分化为红细胞样、淋巴样或骨髓样细胞的方法,包括获得表现出破坏的MeCP2的HPC,并在促进红细胞样分化、骨髓样分化或淋巴样分化的条件下培养HPC,从而产生红细胞样、骨髓样或淋巴样细胞。

[0010] 在一些方面,HPC表达无功能的MeCP2,其基本上不与甲基化的DNA结合。在某些方面,HPC不以足以影响MeCP2 DNA结合活性的水平表达MeCP2。在特定方面,由于MeCP2基因中的截短或突变,MeCP2是无功能的。

[0011] 在一些方面,获得表现出破坏的MeCP2的HPC包括使HPC与MeCP2的siRNA、shRNA或小分子抑制剂接触。在一些方面,蛋白质抑制剂用于破坏MeCP2。在某些方面,siRNA或shRNA破坏野生型MeCP2和突变体MeCP2。在其他方面,获得表现出破坏的MeCP2的HPC包括使PSC与MeCP2的siRNA、shRNA或小分子抑制剂接触并分化PSC以产生HPC。

[0012] 在某些方面,获得表现出破坏的MeCP2的HPC包括工程化改造PSC,例如iPSC,以破坏MeCP2的表达、活性和/或功能并分化PSC以产生HPC。在一些方面,工程化改造包括MeCP2基因的遗传破坏。在特定方面,遗传破坏包括在MeCP2的甲基CpG结合结构域之前插入终止密码子。在某些方面,插入终止密码子包括引入DNA结合结构域。例如,DNA结合结构域是锌指、TALE或CRISPR DNA结合结构域。在一些方面,PSC是哺乳动物多能细胞,例如人PSC。在特定方面,PSC是人iPSC,例如病毒重新编程的或附加体重编程的iPSC。例如,iPSC可以是9025、SONL、TiPS1E、Line A、Line H或Line G iPSC。

[0013] 在某些方面,分化PSC以产生HPC包括以下顺序步骤:(a)在包含至少一种生长因子的第一确定(defined)培养基中培养PSC;(b)在包含足以促进多个细胞分化的量的BMP4、VEGF和bFGF的第二确定培养基中培养细胞;和(c)在包含足以促进多个细胞分化的量的IL-3、Flt3配体和IL-6的第三确定培养基中培养细胞,其中多个PSC分化为HPC。在一些方面,HPC表达来自CD43、CD34、CD31、CD41、CD235和CD45的至少两种标志物,例如对于CD43和CD34均为阳性。在一些方面,在步骤(a)之前,PSC适应缺氧,例如进行5-10次传代。

[0014] 在一些方面,表达CD34和CD43的HPC在促进淋巴样分化的条件下培养。在一些方面,淋巴样细胞是T细胞、B细胞、NK细胞或T/NK细胞。

[0015] 在某些方面,该方法包括在小于20%氧气的大气压下培养细胞。在特定方面,该方法包括在小于5%氧气的大气压下培养细胞。在一些方面,多个多能细胞形成胚状体(EB)。

[0016] 在某些方面,骨髓样谱系细胞是巨噬细胞、肥大细胞、红细胞、巨核细胞、血小板、树突细胞、单核细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞或多形核粒细胞。在特定方面,红细胞样谱系细胞是红细胞或成红细胞。在一些方面,红细胞被去核。在某些方面,红细胞具有 β 珠蛋白的表达。在一些方面,与 ϵ 珠蛋白和/或 γ 珠蛋白的表达相比,红细胞具有更高的 β 珠蛋白表达。在特定方面,MeCP2的破坏导致红细胞的产生,所述红细胞比衍生自具有野生型MeCP2的iPSC的红细胞更成熟,例如 β 珠蛋白的更低表达。

[0017] 在一些方面,培养细胞以促进红细胞样分化包括:(i)在包含excyte和全转铁蛋白的确定培养基中培养HPC以生成成红细胞;和(ii)在扩增条件下培养成红细胞以产生富集的红细胞样细胞群。在某些方面,确定培养基还包含一种或多种细胞因子。在一些方面,一

种或多种细胞因子选自干细胞因子 (SCF)、Flt-3配体 (Flt3L)、血小板生成素 (TPO)、白细胞介素3 (IL-3) 和白细胞介素6 (IL-6)。在某些方面,扩增条件包括在基本上不含IL-3、IL-6和TPO的确定培养基中培养。在一些方面,步骤(i)和/或步骤(ii)包括培养1-2周。在某些方面,富集的红细胞样细胞群包含大于70%的红细胞样细胞,例如71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%的红细胞样细胞。在一些方面,富集的红细胞样细胞群包含大于80%的红细胞样,例如85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的红细胞样细胞。在一些方面,红细胞样细胞表达CD71、CD235a和/或CD36。

[0018] 在一些方面,培养细胞以促进骨髓样分化包括(a)在包含MCSF、TGFβ和IL-34的确定小胶质细胞培养基中培养HPC足够长的时间以生成小胶质细胞;和(b)在还包含CD200和CXCL1的确定小胶质细胞培养基中使小胶质细胞成熟,从而产生小胶质细胞群。在一些方面,小胶质细胞群包含至少25%、例如30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%的IBA、P2RY和/或TREM-2阳性细胞。

[0019] 在一些方面,培养细胞以促进淋巴样分化包括:(i)在具有Notch配体的包被基质的平板上在确定培养基中培养具有CD34和/或CD43表达的HPC;和(ii)在一种或多种细胞因子存在下维持培养物,从而产生淋巴样细胞。在一些方面,细胞在小于5%氧气的大气压下培养。在一些方面,确定培养基包含抗坏血酸和/或烟酰胺。抗坏血酸的浓度可以为约50μM至1mM,例如60μM、70μM、80μM、90μM、100μM、150μM或200μM。烟酰胺可以以约0.1mM至5mM,例如0.2mM、0.4mM、0.5mM、0.7mM、1mM、2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM或4.5mM的浓度存在。在某些方面,基质是retronectin、胶原蛋白、层粘连蛋白或纤连蛋白。在特定方面,Notch配体是DLL4。例如,DLL4是DLL4:Fc嵌合蛋白。在一些方面,淋巴样细胞基本上不具有CD4的表达。在某些方面,淋巴样细胞表达选自CD8、CD7、CD45、CD5和CD3的一种或多种标志物。在一些方面,超过5%的淋巴样细胞对于至少两种标志物是阳性的。在某些方面,超过10%,例如15%、20%、25%、30%或更高的淋巴样细胞对于至少两种标志物是阳性的。

[0020] 进一步的实施方案提供了将衍生自PSC的定形内胚层(DE)细胞分化为内胚层细胞的方法,包括获得表现出破坏的甲基-CpG结合蛋白2(MeCP2)的DE细胞,并在促进内胚层分化的条件下培养DE,从而产生内胚层细胞。在一些方面,在促进内胚层分化的条件下培养DE细胞包括将DE细胞分化为EPC。在特定方面,内胚层细胞是β细胞、α细胞、δ细胞或肝细胞。

[0021] 在某些方面,DE细胞和/或EPC表达基本上不与甲基化的DNA结合的无功能的MeCP2。在一些方面,DE细胞和/或EPC不以足以影响MeCP2 DNA结合活性的水平表达MeCP2。在一些方面,由于MeCP2基因中的截短、外显子跳跃或突变,MeCP2是无功能的。在一些方面,获得表现出破坏的MeCP2的DE细胞或EPC包括使HPC与MeCP2的siRNA、shRNA或小分子抑制剂接触。在某些方面,siRNA或shRNA破坏野生型MeCP2和突变体MeCP2。

[0022] 在其他方面,获得表现出破坏的MeCP2的DE细胞或EPC包括使PSC与MeCP2的siRNA、shRNA、蛋白质抑制剂或小分子抑制剂接触并分化PSC以产生DE细胞或EPC。在一些方面,获得表现出破坏的MeCP2的DE细胞或EPC包括工程化改造PSC以破坏MeCP2的表达、活性和/或功能并分化PSC以产生DE细胞或EPC。在特定方面,工程化改造包括MeCP2基因的遗传破坏。在一些方面,遗传破坏包括在MeCP2的甲基CpG结合结构域之前插入终止密码子。在特定方面,插入终止密码子包括引入DNA结合结构域。在一些方面,DNA结合结构域是锌指、TALE或CRISPR DNA结合结构域。

[0023] 在特定方面,PSC是iPSc。在特定方面,PSC是人iPSC,例如病毒重新编程的或附加体重新编程的iPSC。例如,iPSC可以是9025、SONL、TiPS1E、Line A、Line H或Line G iPSC。

[0024] 在一些方面,分化PSC以产生DE细胞包括以下顺序步骤:(a)在包含MTG和激活素A的培养基中培养PSC;(b)在还包含抗坏血酸、BMP4、bFGF和VEGF的培养基中培养细胞;和(c)在包含BMP4、bFGF、激活素A和VEGF的培养基中进一步培养细胞足以产生DE细胞的一段时间。在另外的方面,该方法还包括将DE细胞分化为EPC,例如表达CXCR4/CD117和/或CD34的EPC。

[0025] 在某些方面,在促进内胚层分化的条件下培养DE细胞包括在包含激活素A、BMP4、TGF β 、EGF、VEGF和HGF的培养基中培养DE细胞足以产生 β 细胞群的一段时间。在一些方面, β 细胞群包含至少25%,例如26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%或更高的PDX1阳性细胞。在某些方面, β 细胞群包含至少20%,例如21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%或更高的NeuroD1阳性细胞。在一些方面, β 细胞群包含至少5%,例如6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%或更高的NKX6.1阳性细胞。

[0026] 在一些方面,在促进内胚层分化的条件下培养DE细胞包括(a)在缺氧条件下在包含BMP4、bFGF、EGF、VEGF、HGF、Dex、DMSO和/或FGF-10的培养基中培养DE细胞;(b)在包含DAPT和维生素K的培养基中进一步培养细胞;和(c)在基本上不含DAPT和维生素K的培养基中将细胞分化足以产生肝细胞群的一段时间。在特定方面,肝细胞群包含至少20%,例如21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%或更高的白蛋白阳性的细胞。

[0027] 本文进一步提供了包含具有MeCP2破坏的iPSC,衍生自MeCP2KO iPSC的前体细胞(包括HPC、DE细胞和EPC)的组合物。本文还提供了包含衍生自MeCP2KO iPSC的成熟谱系的细胞的组合物,所述细胞包括红细胞、巨核细胞、巨噬细胞、小胶质细胞、T细胞、NK细胞、NK/T细胞、B细胞、 β 细胞、树突细胞例如浆细胞样树突细胞和肝细胞。本文还提供了使用MeCP2KO iPSC、HPC、DE细胞、EPC、红细胞、巨核细胞、巨噬细胞、小胶质细胞、T细胞、NK细胞、NK/T细胞、B细胞、 β 细胞、树突细胞例如浆细胞样树突细胞和肝细胞的方法,用于体外测定法和治疗,包括体内稳定移植,体外化合物筛选,以及阐明疾病和损伤的机制。

[0028] 根据以下详细描述,本发明的其他目的、特征和优点将变得显而易见。然而,应该理解的是,详细描述和具体实施例虽然表明了本发明的优选实施方案,但是仅以示例说明的方式给出,因为根据本详细描述,在本发明的精神和范围内的多种变化和修改对于本领域技术人员将变得显而易见。

[0029] 附图简要说明

[0030] 以下附图构成本说明书的一部分,并且包括在内以进一步说明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个并结合本文给出的具体实施方案的详细描述,可以更好地理解本发明。

[0031] 图1A-1C:(1A)使用iPSC的3D HPC分化过程的示意图,所述iPSC适应在E8培养基存在和缺氧条件下在Matrigel或玻连蛋白(Vitronectin)上的无饲养细胞生长。HPC分化的第一阶段由BMP4、VEGF和FGF驱动4天,并且分化的第二阶段通过将细胞置于含有肝素、SCF、

TP0、Flt-3配体、IL-3和IL-6的培养基中来驱动。(1B) 工程化改造策略以在雄性iPSC细胞系01279中产生MeCP2K0从而创建9006 (01279.107.3902)。(1C) 衍生自用MeCP2 TALENS和供体质粒p1553转染的01279iPSC的MeCP2变体001、002、005和008的氨基酸比对的描述。所有变体(001、002、005和008)不编码甲基CpG结合结构域。

[0032] 图2A-2B: (2A) 在分化的第12天,跨越许多iPSC细胞系的HPC分化的概述。通过流式细胞术定量HPC (CD43⁺/CD34⁺) 双阳性细胞的百分比。(2B) 通过生成的HPC的绝对数量除以图中所示的iPSC的输入数量来计算HPC生成的效率。

[0033] 图3:从iPSC衍生的HPC的红细胞样谱系分化的示意图概述。第12天HPC在SCF、IL3、TP0和EP0存在下分化8天,然后在EP0和SCF单独存在下进一步培养细胞长达120天以生成红细胞的纯培养物。

[0034] 图4A-4D: (4A) 使用来自脐带血细胞的HPC在体外红细胞样分化期间,球蛋白出现的时间过程。如Orkin等人,2012所描述的, β -胚蛋白表达的出现和发育转换的示意图,从受孕的第一个三个月期间的胚胎到胎儿的球蛋白,以及从出生时的胎儿到成人。(4B) 红细胞样分化的第2-8周之间,脐带血(CB)衍生的HPC、iPSC MeCP2WT和MeCP2K0克隆的CD235表面染色的FACS谱。(4C) 红细胞样分化的第2-7周之间,CB衍生的HPC、iPSC MeCP2WT和MeCP2K0克隆的CD71表面染色的FACS谱。(4D) 红细胞样分化的第2-8周之间,CB衍生的HPC、iPSC MeCP2WT和MeCP2K0克隆的CD36表面染色的FACS谱。

[0035] 图5A-5C: (5A) 衍生自CB、iPSC MeCP2WT和iPSC MeCP2K0克隆的红细胞培养物中,细胞内成人 β 珠蛋白表达的比较分析。(5B) 衍生自CB、iPSC MeCP2WT和iPSC MeCP2K0克隆的红细胞培养物中,细胞内胚胎 ϵ 珠蛋白表达的比较分析。(5C) 衍生自CB、iPSC MeCP2WT和iPSC MeCP2K0克隆的红细胞培养物中,细胞内胎儿 γ 球蛋白表达的比较分析(5C)。

[0036] 图6:衍生自CB、iPSC 01279 (MeCP2WT) 和iPSC 01279.107.3902 (MeCP2K0) 的红细胞分化的第2-7周期间,细胞内球蛋白(β 、 ϵ 和 γ)的定量和比较分析。

[0037] 图7:衍生自CB、iPSC 01279 (MeCP2WT) 和iPSC 01279.107.3902 (MeCP2K0) 的红细胞分化第7周,组合的CD235和细胞内珠蛋白共染色的表面染色的FACS谱。

[0038] 图8:由衍生自CB衍生的HPC和iPSC 01279.107.3902 (MeCP2K0) 的末期红细胞制备的细胞离心涂片用wright染色剂进行染色。在细胞离心涂片中目视捕获去核的红细胞的存在。

[0039] 图9:淋巴样分化的示意图。将从第5-11天收获的HPC在SCF、TP0、IL-7和Flt-3配体存在下以25K/cm²的密度铺板在非组织培养物处理的平板上2-4周。通过流式细胞术定量T细胞、NK细胞和NK/T细胞的出现。

[0040] 图10A-10C:用于鉴定体外生成的淋巴样细胞的门控策略。(10A) 来自成人外周血的淋巴细胞的一般散点图。(10B) 在分化第18天的淋巴样细胞的散点特征。示例显示了FSC-SSC门和淋巴样门。(10C) 使用碘化丙锭在FSC-SSC散点和淋巴样散点内对活细胞进行门控。

[0041] 图11A-11B: (11A) 用于鉴定体外生成的淋巴样细胞的门控策略。显示了在分化第18天的淋巴样细胞的散点图。示例显示了FSC-SSC门和淋巴样门。使用碘化丙锭在FSC-SSC散点和淋巴样散点内对活细胞进行门控,然后通过流式细胞术对CD7和CD5阳性细胞进行染色。(11B) 使用碘化丙锭在FSC-SSC散点和淋巴样散点内对活细胞进行门控,然后通过流式细胞术对CD3、CD8和CD56阳性细胞进行染色。

[0042] 图12A-12B:从第7-11天HPC分化的双阳性CD7⁺/CD5⁺前T (12A) 和前T淋巴样 (12B) 细胞的百分比,置于包被Ret-DLL4的平板上,以25k/cm²的密度维持在缺氧条件或常氧条件下起始淋巴样分化。

[0043] 图13A-13C:在HPC分化的第7-11天收获的前T和前NK细胞的定量,并置于包被Ret-DLL4的平板上,以25k/cm²的密度起始淋巴样分化。测定在缺氧条件下 (13A) 或常氧条件下 (13B) 维持的01279 (MeCP2WT) 细胞以及在缺氧条件下01279.107.3902细胞 (MeCP2K0) (13C) 中CD8⁺CD3⁺ (T细胞)、CD56⁺/CD8⁺/CD3⁺ (NK细胞) 和CD56⁺/CD3⁺ (NK/T细胞) 的百分比。

[0044] 图14A-14B:在HPC分化的第7-11天的T (CD3⁺/CD8⁺) 细胞的定量,并置于包被Ret-DLL4的平板上,以25k/cm²的密度起始淋巴样分化。对于含有MeCP2WT和MeCP2K0状态的iPSC克隆,测定在所有活FSC-SSC门 (14A) 和淋巴样门 (14B) 下的双阳性CD8⁺/CD3⁺的百分比。

[0045] 图15A-15B:在HPC分化的第7-11天的NK (CD3⁻/CD56⁺) 细胞的定量,并置于包被Ret-DLL4的平板上,以25k/cm²的密度起始淋巴样分化。对于含有MeCP2WT和MeCP2K0状态的iPSC克隆,测定在所有活FSC-SSC门 (14A) 和淋巴样门 (15B) 下的CD56⁺/CD3⁻的百分比。

[0046] 图16A-16B:在HPC分化的第7-11天的NK/T (CD3⁺/CD56⁺) 细胞的定量,并置于包被Ret-DLL4的平板上,以25k/cm²的密度起始淋巴样分化。对于含有MeCP2WT和MeCP2K0状态的iPSC克隆,测定在所有活FSC-SSC门 (16A) 和淋巴门 (16B) 下的双阳性CD56⁺/CD3⁺的百分比。

[0047] 图17A-17B:测量分化过程的效率。在HPC分化的第7-11天收获含有MeCP2WT和MeCP2K0的iPSC,并置于包被Ret-DLL4的平板上,以25k/cm²的密度起始淋巴样分化。针对CD8和CD3的表面表达对细胞进行染色。在FSC-SSC门和淋巴样散点门下通过流式细胞术定量细胞百分比。由于已知分化16天结束时细胞的输入数量和活细胞总数,因此测定了T (CD3⁺/CD8) 的绝对数量。该过程的效率通过细胞类型的绝对数量/总细胞的输入数量的比率 (17A) 或通过细胞类型的绝对数量/(CD43⁺/CD34⁺) HPC的输入数量的比率 (17B) 来计算。

[0048] 图18A-18B:测量分化过程的效率。在HPC分化的第7-11天收获含有MeCP2WT和MeCP2K0的iPSC,并置于包被Ret-DLL4的平板上,以25k/cm²的密度起始淋巴样分化。针对CD56、CD8和CD3的表面表达对细胞进行染色。在FSC-SSC门和淋巴样散点门下通过流式细胞术定量细胞百分比。由于已知分化16天结束时细胞的输入数量和活细胞总数,因此测定了NK/T (CD3⁺/CD56⁺) 和NK (CD56⁺/CD3⁻) 的绝对数量。该过程的效率通过细胞类型 (NK/T或NK) 的绝对数量/总细胞的输入数量的比率 (18A) 或通过细胞类型的绝对数量/(CD43⁺/CD34⁺) HPC的输入数量的比率 (18B) 来计算。

[0049] 图19A-19D:确定淋巴样祖细胞的表型特征。HPC从MeCP2K0和MeCP2WT iPSC生成。HPC在不同的分化阶段针对以下标志物进行染色:CD43FITC/CD45PE/CD34APC、CD235FITC/CD7PE/CD34APC、CD31FITC/DLL4PE/CD144APC、CD34FITC/DLL4 PE/APNLR APC、FLK-1FITC/CD34 PE/APNLR APC、CD56 FITC/CD34PE/CD44 APC。在iPSC 01279.107.3902 (MeCP2K0) 中这些多种标志物的表达谱的百分比概述于19A、19B、19C、19D中。

[0050] 图20:MeCP2WT和MeCP2K0克隆的淋巴样分化期间的群体倍增的定量。通过将细胞以25K/cm²铺板在包被Ret-DLL4的平板上来起始淋巴样分化。在2周、4周和6周结束时收获细胞,群体倍增为 $e = 3.32 \times \log(\text{收获时的细胞数量}/\text{接种的细胞数量})$ 。

[0051] 图21:内胚层分化的不同阶段的一般概述。描绘了iPSC向内胚层祖细胞阶段的转化以及培养基中用于驱动分化过程的天数和因子。

[0052] 图22A-22B:01279 (MeCP2WT) 和01279.107.3902 (MeCP2K0) iPSC中EPC纯度的定量。该图表示CXCR-4和CD117以及成熟标志物CD34的表面表达。(22A) 衍生自01279 (MeCP2WT) 的EPC在10-14传代之间进行染色并且(22B) 衍生自01279.107.3902 (MeCP2K0) 细胞的EPC在2-13传代之间进行染色。

[0053] 图23A-23C:在无饲养细胞循环期间,在01279.107.3902 (MeCP2K0) (23A) EPC和01279 (MeCP2WT) (23B) 中细胞数量的增殖和倍数扩增。用于从2D (23C) 中繁殖的EPC生成β细胞的示意图。

[0054] 图24A-24C:衍生自01279 (MeCP2WT) 和01279.107.3902 (MeCP2K0) EPC的第28天末期β细胞的流式细胞术分析。收获细胞,使用4%多聚甲醛进行固定,使用0.1%皂苷进行透化,并通过流式细胞术针对PDX1 (24A)、NeuroD1 (24B) 和Nkx6.1 (24C) 的存在进行染色。

[0055] 图25A-25B:衍生自01279 (MeCP2WT) 和01279.107.3902 (MeCP2K0) EPC的第28天末期β细胞的流式细胞术分析。收获细胞,使用4%多聚甲醛进行固定,使用0.1%皂苷进行透化,并通过流式细胞术针对生长抑素和胰高血糖素 (25A) 和C肽 (25B) 的存在进行染色。

[0056] 图26:在聚集体解离后胰腺分化过程的第22天,C肽、胰高血糖素和生长抑素表达的细胞内染色的FACS谱。散点图表示胰高血糖素、生长抑素和C肽表达的细胞内染色。左边的图显示在收获后染色后细胞的正向和侧向散点。该图显示了在iPSC-01279 (MeCP2WT) 和01279.107.3902 (MeCP2K0) 细胞上C肽对胰高血糖素、C肽对生长抑素和C肽对胰高血糖素染色的双重染色图谱。

[0057] 图27:由iPSC-01279 (MeCP2WT) 和01279.107.3902 (MeCP2K0) 细胞生成的末期β细胞的葡萄糖反应性。数据表示针对各种浓度的葡萄糖的非标准化的C肽释放。未针对细胞数测定法将数据标准化。

[0058] 图28:衍生自指定的MeCP2WT和MeCP2K0 iPSC系的第9天HPC分化的CD43表达。

[0059] 图29:衍生自指定的MeCP2WT和MeCP2K0 iPSC系的第9天HPC分化的CD34表达。

[0060] 图30:衍生自指定的MeCP2WT和MeCP2K0 iPSC系的第9天HPC分化的CD34和CD43阳性细胞的百分比。

[0061] 图31:衍生自指定的MeCP2WT和MeCP2K0 iPSC系的第9天HPC分化的CD45阳性细胞的百分比。

[0062] 图32A-32B:衍生自指定的MeCP2WT和MeCP2K0 iPSC系的第9天HPC分化的CD235阳性细胞的百分比。

[0063] 图33:衍生自指定的MeCP2WT和MeCP2K0 iPSC系的第9天HPC分化的DLL4阳性细胞的百分比。

[0064] 图34:从指定的iPSC MeCP2WT或MeCP2K0系生成HPC的效率。

[0065] 图35:从不同的iPSC克隆分化小胶质细胞,并且通过标志物IBA、P2RY和TREM-2评估它们的纯度,以比较MeCP2WT与MeCP2K0 iPSC细胞衍生的小胶质细胞。

[0066] 图36:末期小胶质细胞纯度的FACS分析。

[0067] 图37:从来自指定的MeCP2WT或MeCP2K0 iPSC系的一种HPC生成小胶质细胞的效率。

[0068] 图38A-38C:前T细胞从MeCP2WT或MeCP2K0 iPSC进行分化。(38A) 通过CD5和CD7测量的前T细胞的FACS谱的快照。(38B) 在2周结束时收获细胞,并通过CD7/CD45 (38C) 或CD7/

CD5定量前T祖细胞的百分比。

[0069] 图39A-39F:图38的前T细胞另外分化2周。(39A)通过CD3和CD8测量的T细胞的FACS谱的快照。在2周结束时收获细胞并定量总CD3阳性细胞、细胞毒性T细胞(CD3⁺/CD8⁺)、NK细胞(CD3⁻/CD56⁺)和NK/T细胞(CD3⁺CD56⁺)。细胞从(39B) SONL iPSC、(39C) 9025iPSC、(39D) iPSC Line A、(39E) iPSC Line F或(39F) iPSC Line H进行分化。

[0070] 图40:描绘从MeCP2WT或MeCP2K0 iPSC系衍生肝细胞的2D方案的示意图。

[0071] 图41:从指定的具有MeCP2K0的iPSC系中分化肝细胞。显示了白蛋白或AAT阳性细胞的百分比。

[0072] 图42:MeCP2K0对红细胞分化的影响。图显示了每种指定细胞系在红细胞样分化期间的CD235阳性细胞的百分比。

[0073] 图43A-43B:(43A)从SONL iPSC分化的MeCP2K0红细胞中的珠蛋白表达,直至7周。(43B)在7周内从SONL iPSC分化的MeCP2WT红细胞中的珠蛋白表达。

[0074] 图44A-44B:(44A)从TiPS iPSC分化的MeCP2K0红细胞中的珠蛋白表达,直至7周。(44B)在7周内从TiPS iPSC分化的MeCP2WT红细胞中的珠蛋白表达。

[0075] 图45A-45B:(45A)从9025iPSC分化的MeCP2K0红细胞中的珠蛋白表达,直至7周。(45B)在7周内从9025iPSC分化的MeCP2WT红细胞中的珠蛋白表达。

[0076] 图46A-46B:(46A)从Line AiPSC分化的MeCP2K0红细胞中的珠蛋白表达,直至7周。(46B)在7周内从Line A iPSC分化的MeCP2WT红细胞中的珠蛋白表达。

[0077] 图47A-47B:(47A)从Line H iPSC分化的MeCP2K0红细胞中的珠蛋白表达,直至7周。(47B)在7周内从Line H iPSC分化的MeCP2WT红细胞中的珠蛋白表达。

[0078] 图48A-48B:(48A)从Line G iPSC分化的MeCP2K0红细胞中的珠蛋白表达,直至7周。(48B)在7周内从Line G iPSC分化的MeCP2WT红细胞中的珠蛋白表达。

[0079] 示例实施方案的详述

[0080] MeCP2基因编码能够结合甲基化的DNA并调节靶基因转录的蛋白质。MeCP2基因具有甲基-CpG结合结构域(MBD)、转录抑制结构域(TRD)、核定位信号(NLS)和C末端区段(Bird等人,2008)。本公开内容的研究提供了MeCP2在指导iPSC分化以有效地生成成熟谱系和高纯度的细胞方面的新作用。还发现MeCP2普遍存在并受到昼夜节律的调节。此外,本研究支持去甲基化在iPSC衍生的谱系中成熟开始的作用。

[0081] 因此,本公开内容提供了工程化改造iPSC以破坏MeCP2表达的方法,例如使用TALEN的敲除,以产生增强的iPSC,其具有增加的分化为包括中胚层、外胚层和内胚层胚层的细胞的特定细胞谱系的能力。具有MeCP2破坏的iPSC可以有效地分化为红细胞、巨核细胞、巨噬细胞、小胶质细胞、T细胞、NK细胞、NK/T细胞、B细胞、β细胞、树突细胞例如浆细胞样树突细胞、和肝细胞。

[0082] 特别地,发现MeCP2被敲除(MeCP2K0)的iPSC克隆更有效地产生造血前体细胞(HPC)以及定形内胚层(DE)细胞和内胚层前体细胞(EPC)。HPC可以以高的效率和纯度进一步分化为红细胞样、淋巴样或骨髓样谱系。例如,HPC可用于生成成熟的红细胞或小胶质细胞以及淋巴样谱系的细胞,例如T细胞、B细胞、NK细胞和T/NK细胞。DE细胞或EPC可以进一步分化为内胚层谱系的细胞,例如β细胞和肝细胞。

[0083] 本研究表明iPSC中的MeCP2破坏导致红细胞具有更高的成熟度,如可见于与具有

野生型 (MeCP2WT) 表达的 iPSC (其表达更多 γ 珠蛋白或 ϵ 珠蛋白) 相比, β 珠蛋白的表达相对于 γ 珠蛋白或 ϵ 珠蛋白是增加的。

[0084] 此外, MeCP2 破坏产生的 iPSC 在产生红细胞样、骨髓样 (例如小胶质细胞) 和淋巴样 (包括 T 细胞和 NK 细胞) 谱系的细胞方面更有效。在几种 iPSC 系中观察到具有 MeCP2 破坏的 iPSC 的增强特性, 其中包括病毒和附加体重编程的 iPSC。因此, 本公开内容提供了从具有 MeCP2 破坏的 PSC 产生中胚层细胞包括淋巴样和红细胞样、骨髓样谱系细胞以及内胚层细胞例如肝细胞和 β 细胞的方法和组合物。

[0085] 在一种方法中, 通过使用 TALEN 工程化改造 iPSC 以在 MeCP2 的甲基结合结构域之前插入终止密码子来产生具有 MeCP2 破坏的 iPSC。然后可以在确定的无饲养细胞、无血清条件下将 MeCP2 敲除的 iPSC 分化为 HPC、DE 细胞或 EPC。然后可以通过本文公开的方法进一步分化 HPC 以制备红细胞样、骨髓样或淋巴样谱系的其他造血细胞, 而 DE 细胞或 EPC 可因此分化为内胚层谱系的细胞。例如, 通过将 HPC 置于红细胞扩增培养基中能够将 MeCP2KO HPC 分化为成熟的红细胞并生成 CD71、CD235a 和 CD36 阳性富集的红细胞样细胞群。重要的是, 本文提供的成熟红细胞表达成人确定性 β -珠蛋白并显示去核。

[0086] 此外, 在另一个示例性方法中, 通过使用 RetroNectin 和 DLL-4 作为无饲养细胞基质, 能够将衍生自含有 MeCP2 破坏的 iPSC 的 HPC 分化为 T 细胞。通过使用抗坏血酸来提高效率和成熟以及通过在缺氧条件下培养, 可以进一步增强 T 细胞分化。有趣的是, 本发明人已经确定了 HPC 分化期间 (例如, 第 7-11 天) 对于红细胞样、骨髓样和淋巴样潜能的最佳时间范围。

[0087] 此外, 衍生自含有 MeCP2 破坏的 iPSC 的 HPC 能够有效地分化为骨髓样分化途径, 以产生末期小胶质细胞和巨噬细胞。

[0088] 因此, 本公开内容的方法可以提供无限数量的造血谱系细胞例如 T 细胞、NK 细胞、T/NK 细胞和成熟红细胞, 以及内胚层谱系细胞例如肝细胞和 β 细胞, 适用于广泛的应用, 如体内稳定移植、体外化合物筛选以及阐明血液疾病和损伤的机制。特别地, 产生的红细胞样细胞的大数量和纯度使得本公开内容的方法可用于红细胞样发育的基础研究和生产用于输血的 RBC。

[0089] I. 定义

[0090] 如本文所用, 就特定组分而言, “基本上不含” 在本文中用于表示没有特定组分被有目的地配制成组合物和/或仅作为污染物或以痕量存在。因此, 组合物的任何无意污染导致的特定组分的总量远低于 0.05%、优选地低于 0.01%。最优选的是其中用标准分析方法不能检测到任何量的特定组分的组合物。

[0091] 如本说明书中所使用的, “一个 (a)” 或 “一种 (an)” 可以表示一个或更多。如本文在权利要求中所使用的, 当与词 “包括” 结合使用时, 词 “一个” 或 “一种” 可以表示一个或超过一个。

[0092] 权利要求中术语 “或” 的使用用于表示 “和/或”, 除非明确指出仅指替代方案或替代方案是相互排斥的, 尽管本公开内容支持仅涉及替代方案的定义和 “和/或”。如本文所用, “另一个” 可以表示至少第二个或更多个。

[0093] 在整个本申请中, 术语 “约” 用于指示数值包括用于确定值的装置、方法的误差的固有变化, 或者研究对象之间存在的变化。

[0094] 当与细胞或生物体中的蛋白质、基因、核酸或多核苷酸相关使用时,术语“外源的”是指通过人工或自然手段已经引入细胞或生物体中的蛋白质、基因、核酸或多核苷酸;或者当与细胞相关时,该术语是指通过人工或天然方法分离并随后引入其他细胞或生物体中的细胞。外源核酸可以来自不同的生物体或细胞,或者它可以是在生物体或细胞内天然存在的核酸的一个或多个另外的拷贝。外源细胞可以来自不同的生物体,或者它可以来自相同的生物体。作为非限制性实例,外源核酸是在不同于天然细胞中的染色体位置的核酸,或者其侧翼是与天然存在不同的核酸序列。

[0095] “表达构建体”或“表达盒”是指能够指导转录的核酸分子。表达构建体至少包括一个或多个转录控制元件(例如启动子、增强子或其功能等同的结构),指导在一种或多种所需细胞类型、组织或器官中的基因表达。还可以包括其他元件,例如转录终止信号。

[0096] “载体”或“构建体”(有时称为基因递送系统或基因转移“媒介物”)是指包含待在体外或体外递送至宿主细胞的多核苷酸的大分子或分子复合物。

[0097] “质粒”是常见类型的载体,是与染色体DNA分开的染色体外DNA分子,其能够独立于染色体DNA复制。在某些情况下,它是环形和双链的。

[0098] “复制的起点”(“ori”)或“复制起点”是一种DNA序列,例如在淋巴细胞性疱疹病毒中,当存在于细胞中的质粒中时能够维持质粒中的相连序列和/或DNA合成起始处或附近的位点。例如,EBV(Ebstein-Barr病毒)的ori包括FR序列(30bp重复序列的20个不完美拷贝),优选地是DS序列;然而,EBV中的其他位点结合EBNA-1,例如Rep*序列可以替代DS作为复制的起点(Kirshmaier和Sugden,1998)。因此,EBV的复制起点包括FR、DS或Rep*序列或通过核酸修饰或由其衍生的合成组合的任何功能等同序列。例如,本发明的方法还可以使用EBV的遗传工程化改造的复制起点,例如通过插入或突变单个元件,如Lindner等人,2008中具体描述的。

[0099] “编码”特定蛋白质的“基因”、“多核苷酸”、“编码区”、“序列”、“区段”、“片段”或“转基因”是被转录的核酸分子,其当置于合适的调节序列控制下时,任选地还可以在体外或体内翻译成基因产物,例如多肽。编码区可以以cDNA、基因组DNA或RNA形式存在。当以DNA形式存在时,核酸分子可以是单链的(即有义链)或双链的。编码区的边界由5’(氨基)末端的起始密码子和3’(羧基)末端的翻译终止密码子决定。基因能够包括但不限于来自原核或真核mRNA的cDNA、来自原核或真核DNA的基因组DNA序列以及合成的DNA序列。转录终止序列通常位于基因序列的3’。

[0100] 术语“控制元件”统指启动子区、多腺苷酸化信号、转录终止序列、上游调节结构域、复制的起点、内部核糖体进入位点(IRES)、增强子、剪接点等,它们共同提供用于受体细胞中编码序列的复制、转录、转录后加工和翻译。并非所有这些控制元件都需要存在,只要所选择的编码序列能够在合适的宿主细胞中复制、转录和翻译即可。

[0101] 本文使用的术语“启动子”在其通常意义上是指包含DNA调节序列的核苷酸区域,其中调节序列衍生自能够结合RNA聚合酶并起始下游(3’方向)基因编码序列的转录的基因。它可以含有调节蛋白和分子(例如RNA聚合酶和其他转录因子)可以结合其上的遗传元件,以起始核酸序列的特异性转录。短语“可操作地定位”、“可操作地连接”、“控制下”和“转录控制下”意指启动子处于与核酸序列相关的正确功能位置和/或方向以控制该序列的转录起始和/或表达。

[0102] “增强子”是指这样的核酸序列,当其位于启动子附近时,相对于不存在增强子结构域由启动子产生的转录活性,赋予增加的转录活性。

[0103] 关于核酸分子的“可操作地连接”或“共表达”是指两个或更多个核酸分子(例如,待转录的核酸分子、启动子和增强子元件)以允许转录核酸分子的方式连接。关于肽和/或多肽分子的“可操作地连接”或“共表达”是指两个或更多个肽和/或多肽分子以产生单个多肽链的方式连接,即融合多肽,具有融合的每种肽和/或多肽组分的至少一种性质。融合多肽优选是嵌合的,即由异源分子组成。

[0104] “同源性”是指两个多核苷酸或两个多肽之间的同一性百分比。一个序列与另一个序列之间的对应关系可以通过本领域已知的技术确定。例如,可以通过比对序列信息和使用容易获得的计算机程序直接比较两个多肽分子之间的序列信息来确定同源性。备选地,可以通过在促进同源区域之间稳定双链体形成的条件下杂交多核苷酸,然后用单链特异性核酸酶进行消化,和消化片段的大小测定来确定同源性。当使用上述方法测定的,在分子的限定长度上至少约80%,优选地至少约90%,最优选地至少约95%的核苷酸或氨基酸分别匹配时,两个DNA或两个多肽序列彼此“基本上同源”。

[0105] 术语“细胞”在本文中以其在本技术领域内最广泛的含义使用并且是指作为多细胞生物体组织的结构单元的活体,其被将其与外部隔离的膜结构包围,具有自我复制的能力,并具有遗传信息和表达它的机制。本文使用的细胞可以是天然存在的细胞或人工修饰的细胞(例如,融合细胞、遗传修饰的细胞等)。

[0106] 术语“干细胞”在本文中是指在合适条件下能够分化为广泛多样的特化细胞类型,而在其他合适的条件下能够自我更新并保持在基本上未分化的多能状态的细胞。术语“干细胞”还包括多能细胞(pluripotent cell)、专能细胞(multipotent cell)、前体细胞和祖细胞。示例性人干细胞能够由从骨髓组织获得的造血干细胞或间充质干细胞、从胚胎组织获得的胚胎干细胞或从胎儿的生殖器组织获得的胚胎生殖细胞获得。示例性多能干细胞也能够通过表达与多能性相关的某些转录因子将体细胞重新编程为多能状态而从体细胞产生;这些细胞被称为“诱导多能干细胞”或“iPSC或iPS细胞”。

[0107] “胚胎干(ES)细胞”是未分化的多能细胞,其在早期阶段从胚胎获得,例如在胚胎阶段的内细胞团,或通过人工方法(例如核移植)产生和可以在胚胎或成人中产生任何分化的细胞类型,包括生殖细胞(例如精子和卵)。

[0108] “诱导多能干细胞(iPSC或iPS细胞)”是通过表达或诱导因子(本文称为重新编程因子)的组合的表达来重新编程体细胞而生成的细胞。使用胎儿、出生后、新生儿、幼年或成年体细胞能够生成iPS细胞。在某些实施方案中,能够用于将体细胞重新编程为多能干细胞的因子包括,例如,Oct4(有时称为Oct3/4)、Sox2、c-Myc、Klf4、Nanog和Lin28。在一些实施方案中,通过表达至少两种重新编程因子、至少三种重新编程因子、至少四种重新编程因子、至少五种重新编程因子、至少六种重新编程因子或至少七种重新编程因子来重新编程体细胞,从而将体细胞重新编程为多能干细胞。

[0109] “造血祖细胞”或“造血前体细胞(HPC)”是指注定成为造血谱系但能够进一步造血分化的细胞,并且包括造血干细胞、专能造血干细胞、常见骨髓祖细胞、巨核细胞祖细胞、红细胞祖细胞和淋巴样祖细胞。造血干细胞(HSC)是专能干细胞,可产生所有血细胞类型,包括骨髓样(如单核细胞和巨噬细胞、粒细胞(如中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和

肥大细胞)、红细胞、巨核细胞/血小板、树突细胞)和淋巴样谱系(例如,T细胞、B细胞和NK细胞)(参见例如,Doulatov等人,2012;Notta等人,2015)。“多淋巴样祖细胞”(MLP)定义为描述产生所有淋巴样谱系(例如B、T和NK细胞),但可能具有或不具有其他(骨髓样)潜能(Doulatov等人,2010)并且是 $CD45RA^+$ / $CD10^+$ / $CD7^-$ 的任何祖细胞。任何B、T和NK祖细胞可以是指MLP。“共同骨髓样祖细胞”(CMP)是指 $CD45RA^-$ / $CD135^+$ / $CD10^-$ / $CD7^-$ 细胞,其能够产生粒细胞、单核细胞、巨核细胞和红细胞。

[0110] “多能干细胞(PSC)”是指具有分化为构成一种或多种组织或器官,或优选地,三种胚层中的任何一种:内胚层(例如,内部胃内膜、胃肠道、肺)、中胚层(例如,肌肉、骨骼、血液、泌尿生殖器)或外胚层(例如,表皮组织和神经系统)的所有细胞的潜力的干细胞。

[0111] 如本文所用,术语“体细胞”是指生殖细胞以外的任何细胞,例如卵、精子等,其不直接将它的DNA转移至下一代。通常,体细胞具有有限的多能性或没有多能性。本文使用的体细胞可以是天然存在的或遗传修饰的。

[0112] “编程”是改变细胞可以产生的后代类型的过程。例如,细胞已经被编程,当它被改变时,它能够形成至少一种新细胞类型的后代,无论是在培养中还是在体内,与它在相同条件下没有编程能够形成的相比。这意味着在充分增殖后,如果在编程之前基本上不形成这样的后代,则观察到具有新细胞类型的表型特征的可测量比例的后代;备选地,具有新细胞类型的特征的比例可测量地大于编程之前的比例。该过程包括分化、去分化和转分化。

[0113] “重新编程”是与在没有重新编程的相同条件下相比,赋予细胞在培养或体内形成至少一种新细胞类型的后代的可测量增加的能力的过程。更具体地,重新编程是赋予体细胞以多能潜力的过程。这意味着如果在重新编程之前基本上不形成这样的后代,则在充分增殖后,可测量比例的具有新细胞类型的表型特征的后代;否则,具有新细胞类型的特征的比例可测量地大于重新编程之前的比例。

[0114] “分化”是较不特化的细胞变成更特化的细胞类型的过程。“去分化”是这样的细胞过程,其中部分或终末分化的细胞恢复到早期发育阶段,例如多能性或专能性。“转分化”是将一种分化的细胞类型转化为另一种分化的细胞类型的过程。通常,通过编程的转分化发生而细胞不经过中间多能性阶段——即,细胞直接从一种分化的细胞类型编程为另一种分化的细胞类型。在某些条件下,具有新细胞类型的特征的后代的比例可以按优先级增加的顺序为至少约1%、5%、25%或更多。

[0115] 术语“正向编程”是指通过向专能或多能细胞提供一种或多种特定谱系决定基因或基因产物来编程专能或多能细胞,与不具有多能性的分化的体细胞相反。例如,正向编程可以描述将ESC或iPSC编程为造血前体细胞或其他前体细胞,或造血细胞或其他分化的体细胞的过程。

[0116] 如本文所用,术语“受试者”或“有此需要的受试者”是指需要细胞或组织移植的在任何年龄的哺乳动物,优选地人,男性或女性。通常,受试者由于对于通过细胞或组织移植的治疗可愈的病症或病理或不希望的病况、状态或综合征,或者身体、形态或生理失常而需要细胞或组织移植(在本文中也是指受体)。

[0117] 如本文所用,基因的“破坏”是指与缺乏破坏的基因产物的表达水平相比,消除或减少细胞中受试基因编码的一种或多种基因产物的表达。示例性基因产物包括由该基因编码的mRNA和蛋白质产物。在某些情况下,破坏是瞬时的或可逆的,并且在其他情况下是永久

的。尽管事实上可能产生截短的或无功能的产品,但在某些情况下的破坏是有功能的或全长的蛋白质或mRNA。在本文的一些实施方案中,与表达相反,基因活性或功能被破坏。基因破坏通常通过人工方法诱导,即通过添加或引入化合物、分子、复合物或组合物,和/或通过破坏基因的核酸或与基因相关的核酸,例如在DNA水平。用于基因破坏的示例性方法包括基因沉默、敲低、敲除和/或基因破坏技术,例如基因编辑。实例包括反义技术,例如RNAi、siRNA、shRNA和/或核酶,其通常导致表达的瞬时减少,以及导致靶基因失活或破坏的基因编辑技术,例如通过诱导断裂和/或同源重组。实例包括插入、突变和缺失。破坏通常导致抑制和/或完全缺少由该基因编码的正常或“野生型”产物的表达。这种基因破坏的实例是基因或基因部分的插入、移码和错义突变、缺失、敲入和敲除,包括整个基因的缺失。这种破坏可以在编码区中发生,例如在一个或多个外显子中,导致不能产生全长产物、功能产物或任何产物,例如通过插入终止密码子。这种破坏也可以通过在启动子或增强子或影响转录激活的其它区域中的破坏而发生,从而阻止基因的转录。基因破坏包括基因靶向,包括通过同源重组的靶向基因失活。

[0118] “Notch配体”是能够结合在许多不同哺乳动物细胞(例如造血干细胞)的膜中存在的Notch受体多肽的蛋白质。已在人细胞中鉴定的Notch受体包括Notch-1、Notch-2、Notch-3和Notch-4。Notch配体通常具有诊断性DSL结构域(D-Delta、S-Serrate和L-Lag2),其在氨基末端包含20至22个氨基酸和在细胞外表面上的3至8个EGF样重复序列(Furie和Furie, 1988;Knust等人,1987;Suzuki等人,1987)。

[0119] II. 多能干细胞

[0120] 在本公开内容的某些实施方案中,公开了用于从PSC提供多谱系HPC、DE细胞或EPC的方法和组合物。PSC可以是干细胞,包括但不限于iPSC和胚胎干细胞(ESC)。

[0121] 本方法中用于产生HPC或EPC的PSC的特征在于通过有丝细胞分裂自我更新的能力和分化为广泛多样特化的细胞类型的能力。两种广泛类型的哺乳动物干细胞是:在胚泡中发现的胚胎干细胞和在成体组织中发现的成体干细胞。在发育中的胚胎中,干细胞能够分化为所有特化的胚胎组织。在成体生物体中,干细胞和祖细胞充当补充特化细胞的身体修复系统,并且还维持再生器官(例如血液、皮肤或肠组织)的正常更新。

[0122] 在特定方面,本文使用的PSC是人ESC或iPSC,其能够在体外长期增殖,同时保留分化为身体的所有细胞类型(包括本公开内容的HPC、DE细胞或EPC)的潜力。因此,这些细胞可潜在地为药物开发和治疗用途提供无限供应的患者特异性功能细胞。某些方面通过经由表达编程基因的组合而正向编程来自人类的PSC(例如ESC和iPSC)来提供多谱系HPC、DE细胞或EPC。

[0123] A. 胚胎干细胞

[0124] 在某些方面,PSC是胚胎干细胞(ESC)。ES细胞衍生自胚泡的内细胞团,并具有高的体外分化能力。通过去除发育中胚胎的外部滋养外胚层,然后在非生长细胞的饲养细胞层上培养内部肥大细胞能够分离ES细胞。重新铺板的细胞能够继续增殖并产生ES细胞的新集落,其能够被移除、解离、再次重新铺板并允许生长。这种“传代培养”未分化的ES细胞的过程可以重复多次以产生含有未分化的ES细胞的细胞系(美国专利号5,843,780;6,200,806;7,029,913)。ES细胞具有增殖潜力,同时保持其多能性。例如,ES细胞可用于研究细胞和研究控制细胞分化的基因。ES细胞的多能性与遗传操作和选择相结合,能够通过转基因、嵌合

和敲除小鼠的生成用于体内基因分析研究。

[0125] 产生小鼠ES细胞的方法是众所周知的。在一种方法中,用小鼠抗血清处理来自小鼠129品系的植入前胚泡以除去滋养外胚层,并在含有胎牛血清的培养基中在化学灭活的小鼠胚胎成纤维细胞的饲养细胞层上培养内细胞团。在胎牛血清存在下,将发育的未分化ES细胞的集落在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上传代培养,以产生ES细胞群。在一些方法中,通过将细胞因子白血病抑制因子(LIF)添加到含血清的培养基中,能够在不存在饲养层的情况下培养小鼠ES细胞(Smith,2000)。在其他方法中,可以在骨形态发生蛋白和LIF存在下在无血清培养基中培养小鼠ES细胞(Ying等人,2003)。

[0126] 通过先前描述的方法(Thomson和Marshall,1998;Reubinoff等人,2000),能够从通过精子和卵细胞的融合、核转移、发病机制或染色质的重新编程以及随后将重新编程的染色质并入到质膜以产生胚胎细胞而产生的受精卵或胚泡期哺乳动物胚胎产生或衍生人ES细胞。在一种方法中,将人胚泡暴露于抗人血清,并且裂解滋养外胚层细胞并从内细胞团中除去,所述内细胞团在小鼠胚胎成纤维细胞的饲养层上培养。此外,衍生自内细胞团的细胞团块被化学或机械解离,重新铺板,并且通过微量移液管选择具有未分化形态的集落,解离并重新铺板。在一些方法中,通过在碱性成纤维细胞生长因子存在下在成纤维细胞的饲养层上培养ES细胞,能够在没有血清的情况下培养人ES细胞(Amit等人,2000)。在其他方法中,通过在含有碱性成纤维细胞生长因子的“条件”培养基存在下在蛋白质基质例如MATRIGEL™或层粘连蛋白上培养细胞,能够在没有饲养细胞层的情况下培养人ES细胞(Xu等人,2001)。

[0127] 通过先前描述的方法(Thomson和Marshall,1998;Thomson等人,1995;Thomson和Odorico,2000;美国专利号5,843,780),从包括恒河猴和绒猴的其他生物体,以及从已经建立的小鼠和人类细胞系能够衍生ES细胞。例如,已经建立的人ES细胞系包括MAOI、MA09、ACT-4、HI、H7、H9、H13、H14和ACT30。作为另一个实例,已经建立的小鼠ES细胞系包括从小鼠品系129胚胎的内细胞团建立的CGR8细胞系,并且CGR8细胞的培养物能够在没有饲养层的LIF存在下生长。

[0128] 通过蛋白质标志物能够检测ES干细胞,所述标志物包括转录因子Oct4、碱性磷酸酶(AP)、阶段特异性胚胎抗原SSEA-1、阶段特异性胚胎抗原SSEA-3、阶段特异性胚胎抗原SSEA-4、转录因子NANOG、肿瘤排斥抗原1-60(TRA-1-60)、肿瘤排斥抗原1-81(TRA-1-81)、SOX2或REX1。

[0129] B. 诱导多能干细胞

[0130] 在其他方面,本文使用的PSC是诱导的多能干(iPS)细胞,通常缩写为iPS细胞或iPSC。多能性的诱导最初是在2006年使用小鼠细胞(Yamanaka等人,2006)和2007年使用人类细胞(Yu等人,2007;Takahashi等人,2007)通过引入与多能性有关的转录因子而重新编程体细胞来实现的。iPSC的使用避免了与大规模临床使用ES细胞相关的大多数伦理和实际问题,并且具有iPSC衍生的自体移植的患者可能不需要终身免疫抑制治疗来预防移植物排斥。

[0131] 除生殖细胞外,任何细胞均能够用作iPSC的起始点。例如,细胞类型可以是角质形成细胞、成纤维细胞、造血细胞、间充质细胞、肝细胞或胃细胞。T细胞也可用作重新编程的体细胞来源(美国专利号8,741,648;美国公开号2015/0191697)。对细胞的分化程度或收集

细胞的动物的年龄没有限制;甚至未分化的祖细胞(包括体干细胞)和最终分化成熟细胞也能够用作本文公开的方法中的体细胞来源。iPS细胞能够在已知将人ES细胞分化为特定细胞类型的条件下培养,并表达人ES细胞标志物,包括:SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60和TRA-1-81。

[0132] 可以使用本领域技术人员已知的方法重新编程体细胞以产生iPS细胞。本领域技术人员能够容易地生产iPS细胞,参见例如公开的美国专利申请号2009/0246875,公开的美国专利申请号2010/0210014;公开的美国专利申请号2012/0276636;美国专利号8,058,065;美国专利号8,129,187;PCT公开号W0 2007/069666 A1,美国专利号8,268,620;美国专利号8,546,140;美国专利号9,175,268;美国专利号8,741,648;美国专利申请号2011/0104125和美国专利号8,691,574,其通过引用并入本文。通常,核重新编程因子用于从体细胞产生多能干细胞。在一些实施方案中,使用Klf4、c-Myc、Oct3/4、Sox2、Nanog和Lin28中的至少三种或至少四种。在其他实施方案中,使用Oct3/4、Sox2、c-Myc和Klf4或Oct3/4、Sox2、Nanog和Lin28。

[0133] 这些核重新编程物质的小鼠和人cDNA序列可参考在W02007/069666和美国专利号8,183,038中提到的NCBI登录号获得,其通过引用并入本文。引入一种或多种重新编程物质,或编码这些重新编程物质的核酸的方法是本领域中是已知的,并且例如公开于美国专利号8,268,620、8,691,574、8,741,648、8,546,140,已公布的美国专利号8,900,871和美国专利号8,071,369,它们都通过引用并入本文。

[0134] 一旦衍生,可以在足以维持多能性的培养基中培养iPSC。iPSC可以与开发用于培养多能干细胞,更具体地,胚胎干细胞的各种培养基和技术一起使用,如美国专利号7,442,548和美国专利公开号2003/0211603中描述的。在小鼠细胞的情况下,通过向普通培养基中添加白血病抑制因子(LIF)作为分化抑制因子来进行培养。在人细胞的情况下,希望加入碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)代替LIF。如本领域技术人员已知的,用于培养和维持iPSC的其他方法可以与本文公开的方法一起使用。

[0135] 在某些实施方案中,可以使用未确定的条件;例如,多能细胞可以在成纤维细胞饲养细胞或已经暴露于成纤维细胞饲养细胞的培养基上培养,以便将干细胞维持在未分化状态。在一些实施方案中,在用放射或抗生素处理的小鼠胚胎成纤维细胞的共存下培养细胞以终止细胞分裂,作为饲养细胞。备选地,可以使用确定的、不依赖于饲养细胞的培养系统(例如TESR™培养基)培养多能细胞并将其维持在基本上未分化的状态(Ludwig等人,2006a; Ludwig等人,2006b)或E8™/Essential 8™培养基(Chen等人,2011)。

[0136] 设计质粒时考虑了许多目标,例如获得调节的高拷贝数和避免细菌中质粒不稳定的潜在原因,并提供与用于哺乳动物细胞(包括人细胞)中相容的质粒选择方法。特别注意用于人细胞的质粒的双重要求。首先,它们适合在大肠杆菌中维持和发酵,因此能够产生和纯化大量的DNA。其次,它们是安全的并且适用于人类患者和动物。第一个要求是需要高拷贝数质粒,其能够在细菌发酵过程中相对容易地选择和稳定维持。第二个要求需要注意诸如可选择标志物和其他编码序列之类的元素。在一些实施方案中,编码标志物的质粒由以下组成:(1)高拷贝数复制起点,(2)可选择标志物,例如但不限于用于通过卡那霉素的抗生素选择的neo基因,(3)转录终止序列,包括酪氨酸酶增强子和(4)用于并入各种核酸盒的多克隆位点;和(5)编码与酪氨酸酶启动子可操作连接的标志物的核酸序列。在特定方面,质

粒不包含酪氨酸酶增强子或启动子。本领域已知有许多质粒载体用于诱导编码蛋白质的核酸。这些包括但不限于在美国专利号6,103,470;美国专利号7,598,364;美国专利号7,989,425;和美国专利号6,416,998和美国专利申请12/478,154中公开的载体,这些文献通过引用并入本文。

[0137] 附加体基因递送系统可以是质粒、基于Epstein-Barr病毒(EBV)的附加体载体(美国专利8,546,140)、基于酵母的载体、基于腺病毒的载体、基于猿猴病毒40(SV40)的附加体载体、基于牛乳头瘤病毒(BPV)的载体或慢病毒载体。病毒基因递送系统可以是基于RNA的或基于DNA的病毒载体(PCT/JP2009/062911、PCT/JP2011/069588)。

[0138] C. 通过体细胞核转移衍生的胚胎干细胞

[0139] 用于产生HPC、DE细胞或EPC的PSC也可以通过体细胞核转移来制备,其中供体细胞核被转移到无纺锤体的卵母细胞中。通过核转移产生的干细胞在遗传上与供体细胞核相同。在一种方法中,通过电融合将来自恒河猴的皮肤成纤维细胞的供体成纤维细胞核引入无纺锤、成熟中期II恒河猴卵母细胞的细胞质中(Byrne等人,2007)。通过暴露于离子霉素来激活融合的卵母细胞,然后孵育直至胚泡阶段。然后培养选择的胚泡的内细胞团以产生胚胎干细胞系。胚胎干细胞系显示正常的ES细胞形态,表达多种ES细胞标志物,并在体外和体内分化为多种细胞类型。

[0140] III. 甲基-CpG结合蛋白2基因破坏

[0141] 在某些方面,MeCP2基因表达、活性或功能在细胞例如PSC(例如,ESC或iPSC)中被破坏。在一些实施方案中,基因破坏通过产生基因中的破坏来进行,例如敲除、插入、错义或移码突变(例如双等位移码突变)、基因的全部或部分(例如一个或更多的外显子或其部分)的缺失、和/或敲入。例如,能够通过特别设计用于靶向MeCP2基因的序列或其部分的序列特异性或靶向核酸酶产生破坏,所述酶包括DNA结合靶向核酸酶如锌指核酸酶(ZFN)和转录激活因子样效应子核酸酶(TALEN)和RNA引导的核酸酶如CRISPR-相关的核酸酶(Cas)。

[0142] 在一些实施方案中,通过破坏基因来破坏基因的表达、活性和/或功能。在一些方面,与在没有基因破坏的情况下或在没有引入以实现破坏的组分的情况下的表达相比,基因被破坏使得其表达降低至少或约20%、30%或40%,通常至少或约50%、60%、70%、80%、90%或95%。

[0143] 在一些实施方案中,破坏是瞬时的或可逆的,使得基因的表达在稍后的时间恢复。在其他实施方案中,破坏不是可逆的或瞬时的,例如是永久性的。

[0144] 在一些实施方案中,通常通过靶向方式诱导基因中的一个或多个双链断裂和/或一个或多个单链断裂来进行基因破坏。在一些实施方案中,双链或单链断裂由核酸酶(例如内切核酸酶,例如基因靶向核酸酶)产生。在一些方面,在基因的编码区中例如在外显子中诱导断裂。例如,在一些实施方案中,诱导发生在编码区的N末端部分附近,例如在第一外显子中、在第二外显子中或在随后的外显子中。

[0145] 在一些方面,双链或单链断裂通过细胞修复过程进行修复,例如通过非同源末端连接(NHEJ)或同源定向修复(HDR)。在一些方面,修复过程易于出错并导致基因破坏,例如移码突变,例如双等位移码突变,其能够导致基因的完全敲除。例如,在一些方面,破坏包括诱导缺失、突变和/或插入。在一些实施方案中,破坏导致早期终止密码子的存在。在一些方面,插入、缺失、易位、移码突变和/或过早终止密码子的存在导致基因的表达、活性和/或功

能的破坏。

[0146] 在一些实施方案中,使用反义技术实现基因破坏,例如通过RNA干扰(RNAi)、短干扰RNA(siRNA)、短发夹(shRNA)和/或核酶用于选择性压制或抑制基因的表达。siRNA技术是RNAi,其使用具有与从基因转录的mRNA的核苷酸序列同源的序列的双链RNA分子,以及与该核苷酸序列互补的序列。siRNA通常与从基因转录的mRNA的一个区域同源/互补,或者可以是包括与不同区域同源/互补的多个RNA分子的siRNA。在一些方面,siRNA包含在多顺反子构建体中。在特定方面,siRNA抑制内源mRNA的野生型和突变体MeCP2翻译。

[0147] 在一些方面,基因破坏通过施用药理学药物或MeCP2的小分子抑制剂来进行。DNA甲基化与染色质的脱乙酰化之间存在联系。存在通过MeCP2的转录抑制的组蛋白脱乙酰酶(HDAC)依赖性和HDAC非依赖性模式。因此,HDAC抑制剂如曲古抑菌素A(TSA)或丙戊酸能够用于破坏MeCP2。另外,可以使用蛋白质抑制剂、抑制转录的DNA结合蛋白质和结合MeCP2蛋白质并抑制功能的蛋白质。此外,在分化的雌性小鼠胚胎干细胞中,与媒介物相比,PDPK1抑制剂降低Xist水平并增加MeCP2 mRNA水平(Bhatnagar等人,2014)。

[0148] A. 内切核酸酶

[0149] 在一些实施方案中,使用DNA靶向分子实现破坏,所述DNA靶向分子例如DNA结合蛋白或DNA结合核酸,或者包含其的复合物、化合物或组合物,其与基因特异性地结合或杂交。在一些实施方案中,DNA靶向分子包含DNA结合结构域,例如锌指蛋白(ZFP)DNA结合结构域,转录激活因子样蛋白(TAL)或TAL效应子(TALE)DNA结合结构域,成簇规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)DNA结合域,或来自兆核酸酶的DNA结合结合域。可以将锌指、TALE和CRISPR系统结合结构域经过工程化改造以结合预定的核苷酸序列,例如通过天然存在的锌指或TALE蛋白的识别螺旋区的工程化改造(改变一个或多个氨基酸)。工程化改造的DNA结合蛋白(锌指或TALE)是非天然存在的蛋白质。设计的合理标准包括应用替换规则和用于处理存储现有ZFP和/或TALE设计和结合数据的信息的数据库中的信息的计算机化算法。参见,例如,美国专利号6,140,081;6,453,242;和6,534,261;也参见WO 98/53058;WO 98/53059;WO 98/53060;WO 02/016536和WO 03/016496以及美国公开号2011/0301073。

[0150] 在一些实施方案中,DNA靶向分子、复合物或组合物含有DNA结合分子和一个或多个另外的结构域,例如效应子结构域,以促进基因的抑制或破坏。例如,在一些实施方案中,基因破坏通过融合蛋白进行,所述融合蛋白包含DNA结合蛋白和异源调节结构域或其功能片段。在一些方面,结构域包括例如转录因子结构域例如激活因子、抑制因子、共激活因子、共抑制因子、沉默子、癌基因、DNA修复酶及其相关因子和修饰物、DNA重排酶及其相关因子和修饰物、染色质相关蛋白及其修饰物例如激酶、乙酰化酶和脱乙酰酶,以及DNA修饰酶例如甲基转移酶、拓扑异构酶、解旋酶、连接酶,激酶、磷酸酶、聚合酶、内切核酸酶及其相关因子和修饰剂。DNA结合结构域和核酸酶切割结构域的融合的细节参见,例如,美国专利申请公开号2005/0064474;2006/0188987和2007/0218528,其全部内容通过引用并入本文。在一些方面,另外的结构域是核酸酶结构域。因此,在一些实施方案中,通过基因或基因组编辑促进基因破坏,其使用工程化改造的蛋白质,例如核酸酶和含核酸酶的复合物或融合蛋白,其由与非特异性DNA切割分子如核酸酶融合或复合的序列特异性DNA结合结构域组成。

[0151] 在一些方面,这些靶向嵌合核酸酶或含核酸酶的复合物通过诱导靶向双链断裂或单链断裂进行精确的遗传修饰,刺激细胞DNA修复机制,包括易错的非同源末端连接(NHEJ)

和同源定向修复 (HDR)。在一些实施方案中,核酸酶是内切核酸酶,例如锌指核酸酶 (ZFN)、TALE核酸酶 (TALEN) 和RNA引导的核酸内切酶 (RGEN) 例如CRISPR相关 (Cas) 蛋白、或兆核酸酶。

[0152] 在一些实施方案中,提供供体核酸,例如供体质粒或编码基因工程化改造的抗原受体的核酸,并在引入DSB后通过HDR在基因编辑位点插入所述核酸。因此,在一些实施方案中,基因的破坏和抗原受体 (例如CAR) 的引入同时进行,由此基因被CAR编码核酸的敲入或插入而部分地破坏。

[0153] 在一些实施方案中,不提供供体核酸。在一些方面,引入DSB后NHEJ介导的修复导致插入或缺失突变,其能够例如通过产生错义突变或移码引起基因破坏。

[0154] 1. ZFP和ZFN

[0155] 在一些实施方案中,DNA靶向分子包括DNA结合蛋白,例如一种或多种锌指蛋白 (ZFP) 或转录激活蛋白样蛋白 (TAL),其与效应子蛋白如内切核酸酶融合。实例包括ZFN、TALE和TALEN。参见Lloyd等人,2013。

[0156] 在一些实施方案中,DNA靶向分子包含一种或多种锌指蛋白 (ZFP) 或其结构域,其以序列特异性方式与DNA结合。ZFP或其结构域是蛋白质或较大蛋白质内的结构域,其以序列特异性方式通过一个或多个锌指结合DNA,结合结构域内的氨基酸序列区域的结构通过锌离子的配位而稳定化。术语锌指DNA结合蛋白通常缩写为锌指蛋白或ZFP。ZFP中的是靶向特定DNA序列的人工ZFP结构域,通常为9-18个核苷酸长,通过单个指 (individual finger) 的组装生成。

[0157] ZFP包括其中单指 (single finger) 结构域长度为约30个氨基酸并且含有 α 螺旋的那些,所述 α 螺旋含有通过锌与单个 β 转角两个半胱氨酸配位的两个不变的组氨酸残基,并且具有两个、三个、四个、五个或六个指。通常,可以通过在锌指识别螺旋上的四个螺旋位置 (-1、2、3和6) 处进行氨基酸取代来改变ZFP的序列特异性。因此,在一些实施方案中,ZFP或含ZFP的分子是非天然存在的,例如,被工程化改造以结合选择的靶位点。参见,例如,Beerli等人,2002;Pabo等人,2001;Isalan等人,2001;Segal等人,2001;Choo等人,2000;美国专利号6,453,242;6,534,261;6,599,692;6,503,717;6,689,558;7,030,215;6,794,136;7,067,317;7,262,054;7,070,934;7,361,635;7,253,273;和美国专利公开号2005/0064474;2007/0218528;2005/0267061,其全部内容均通过引用并入本文。

[0158] 在一些方面,通过使基因中的第一靶位点与第一ZFP接触来进行MeCP2的破坏,从而破坏该基因。在一些实施方案中,基因中的靶位点与包含六个指和调节结构域的融合ZFP接触,从而抑制基因的表达。

[0159] 在一些实施方案中,接触步骤还包括使基因中的第二靶位点与第二ZFP接触。在一些方面,第一和第二靶位点是相邻的。在一些实施方案中,第一和第二ZFP共价连接。在一些方面,第一ZFP是包含调节结构域或至少两个调节结构域的融合蛋白。

[0160] 在一些实施方案中,第一和第二ZFP是融合蛋白,各自包含调节结构域或各自包含至少两个调节结构域。在一些实施方案中,调节结构域是转录抑制因子、转录激活因子、内切核酸酶、甲基转移酶、组蛋白乙酰转移酶或组蛋白脱乙酰酶。

[0161] 在一些实施方案中,ZFP由与启动子可操作地连接的ZFP核酸编码。在一些方面,该方法还包括首先将核酸以脂质:核酸复合物或作为裸核酸施用给细胞的步骤。在一些实施

方案中,ZFP由表达载体编码,所述表达载体包含与启动子可操作地连接的ZFP核酸。在一些实施方案中,ZFP由与诱导型启动子可操作地连接的核酸编码。在一些方面,ZFP由与弱启动子可操作地连接的核酸编码。

[0162] 在一些实施方案中,靶位点位于基因的转录起始位点的上游。在一些方面,靶位点与基因的转录起始位点相邻。在一些方面,靶位点与基因的转录起始位点下游的RNA聚合酶暂停位点相邻。

[0163] 在一些实施方案中,DNA靶向分子是或包含与DNA切割结构域融合的锌指DNA结合结构域以形成锌指核酸酶(ZFN)。在一些实施方案中,融合蛋白包含来自至少一种IIS类型限制酶和一个或多个锌指结合结构域的切割结构域(或切割半结构域),其可以是或可以不是工程化改造的。在一些实施方案中,切割结构域来自IIS类型限制性内切核酸酶Fok I。Fok I通常催化DNA的双链切割,在一条链上从其识别位点的9个核苷酸和另一条链上从其识别位点的13个核苷酸。参见,例如,美国专利号5,356,802;5,436,150和5,487,994;以及Li等人,1992;Li等人,1993;Kim等人,1994a;Kim等人,1994b.269:31,978-31,982]。

[0164] 在一些实施方案中,ZFN靶向在工程化改造的细胞中存在的基因。在一些方面,例如在基因的编码区中的预定位点,ZFN有效地生成双链断裂(DSB)。被靶向的典型区域包括外显子、编码N末端区域的区域、第一外显子、第二外显子和启动子或增强子区域。在一些实施方案中,ZFN的瞬时表达促进工程化改造的细胞中靶基因的高效和永久性破坏。特别地,在一些实施方案中,ZFN的递送导致基因的永久破坏,效率超过50%。

[0165] 许多基因特异性工程化改造的锌指可商购获得。例如,Sangamo Biosciences (Richmond,CA,USA) 与Sigma-Aldrich (St.Louis,MO,USA) 已经合作开发了用于锌指构建的平台(CompoZr),允许研究人员完全地绕过锌指构建和验证,并且为数千种蛋白质提供特异性靶向的锌指(Gaj等人,Trends in Biotechnology,2013,31(7),397-405)。在一些实施方案中,使用市售的锌指或定制设计。(参见,例如,Sigma-Aldrich目录号CSTZFND、CSTZFN、CTi1-1KT和PZD0020)。2.TAL、TALE和TALEN

[0166] 在一些实施方案中,DNA靶向分子包含天然存在的或工程化改造的(非天然存在的)转录激活因子样蛋白(TAL)DNA结合结构域,例如转录激活因子样蛋白效应子(TALE)蛋白。参见,例如,美国专利公开号2011/0301073,其全部内容通过引用并入本文。

[0167] TALE DNA结合结构域或TALE是包含一个或多个TALE重复结构域/单元的多肽。重复结构域参与TALE与其直系同源靶DNA序列的结合。单个“重复单元”(也称为“重复”)的长度通常为33-35个氨基酸,并且与天然存在的TALE蛋白质内的其他TALE重复序列表现出至少一些序列同源性。每个TALE重复单元包括构成重复可变双残基(RVD)的1或2个DNA结合残基,通常在重复的12和/或13位。已确定用于这些TALE的DNA识别的天然(规范)代码,使得在12和13位的HD序列导致与胞嘧啶(C)结合,NG与T结合,NI与A结合,NN与G或A结合,并且NO与T结合,并且非规范(非典型)RVD也是已知的。参见美国专利公开号2011/0301073。在一些实施方案中,通过设计对靶DNA序列具有特异性的TAL阵列,可以将TALE靶向任何基因。靶序列通常以胸苷开始。

[0168] 在一些实施方案中,分子是DNA结合核酸内切酶,例如TALE核酸酶(TALEN)。在一些方面,TALEN是融合蛋白,其包含衍生自TALE的DNA结合结构域和切割核酸靶序列的核酸酶催化结构域。

[0169] 在一些实施方案中,TALEN识别并切割基因中的靶序列。在一些方面,DNA的切割导致双链断裂。在一些方面,断裂刺激同源重组或非同源末端连接(NHEJ)的比率。通常,NHEJ是不完美的修复过程,其经常导致切割位点处的DNA序列的改变。在一些方面,修复机制涉及通过直接重新连接(Critchlow和Jackson,1998)或通过所谓的微同源介导的末端连接来重新连接两个DNA末端的剩余部分。在一些实施方案中,通过NHEJ的修复导致小的插入或缺失,并且能够用于破坏并由此抑制基因。在一些实施方案中,修饰可以是至少一个核苷酸的取代、缺失或添加。在一些方面,能够通过本领域熟知的方法鉴定和/或选择其中发生了切割诱导的诱变事件(即与NHEJ事件连续发生的诱变事件)的细胞。

[0170] 在一些实施方案中,组装TALE重复以特异性地靶向基因(Gaj等人,2013)。已经构建了靶向18,740种人蛋白质编码基因的TALEN文库(Kim等人,2013)。定制设计的TALE阵列可通过Collectis Bioresearch(Paris,France)、Transposagen Biopharmaceuticals(Lexington,KY,USA)和Life Technologies(Grand Island,NY,USA)商购获得。具体地,靶向CD38的TALEN可商购获得(参见Gencopoeia,目录号HTN222870-1、HTN222870-2和HTN222870-3)。示例性分子描述于例如美国专利公开号US 2014/0120622和2013/0315884中。

[0171] 在一些实施方案中,TALEN作为由一种或多种质粒载体编码的反式基因引入。在一些方面,质粒载体可含有选择标志物,其提供对接收所述载体的细胞的鉴定和/或选择。

[0172] 3.RGEN (CRISPR/Cas系统)

[0173] 在一些实施方案中,使用一种或多种DNA结合核酸进行破坏,例如通过RNA引导的核酸内切酶(RGEN)的破坏。例如,可以使用成簇规则间隔的短回文重复序列(CRISPR)和CRISPR相关(Cas)蛋白进行破坏。通常,“CRISPR系统”统指涉及表达或指导CRISPR相关(“Cas”)基因活性的转录物和其他元件,包括编码Cas基因的序列、tracr(反式激活CRISPR)序列(例如tracrRNA或活性部分tracrRNA)、tracr-mate序列(包括“直接重复”和在內源CRISPR系统的背景下的tracrRNA处理的部分直接重复)、指导序列(在內源CRISPR系统的背景下也称为“间隔区”)和/或来自CRISPR基因座的其他序列和转录物。

[0174] CRISPR/Cas核酸酶或CRISPR/Cas核酸酶系统能够包括序列特异性结合DNA的非编码RNA分子(引导)RNA和具有核酸酶功能(例如两个核酸酶结构域)的Cas蛋白(例如Cas9)。CRISPR系统的一个或多个元件能够衍生自I型、II型或III型CRISPR系统,例如衍生自包含內源CRISPR系统的特定生物体,例如化脓性链球菌。

[0175] 在一些方面,将Cas核酸酶和gRNA(包括对靶序列特异的crRNA和固定的tracrRNA的融合)引入细胞中。通常,使用互补碱基配对,在gRNA的5'末端的靶位点将Cas核酸酶靶向靶位点,例如基因。可以基于其紧邻原型间隔物相邻基序(PAM)序列的5'的位置来选择靶位点,例如通常为NGG或NAG。在这方面,通过修饰引导RNA的前20、19、18、17、16、15、14、14、12、11或10个核苷酸以对应于靶DNA序列而将gRNA靶向所需序列。通常,CRISPR系统的特征在于促进靶序列位点处CRISPR复合物形成的元件。通常,“靶序列”通常是引导序列被设计为与其具有互补性的序列,其中靶序列和指导序列之间的杂交促进CRISPR复合物的形成。如果存在足够的互补性以引起杂交并促进CRISPR复合物的形成,则不一定需要完全互补。

[0176] CRISPR系统能够在靶位点诱导双链断裂(DSB),然后是如本文所讨论的破坏。在其他实施方案中,认为是“切口酶”的Cas9变体用于在靶位点切口单链。配对的切口酶能够用

于例如改善特异性,每个切口酶由一对靶向序列的不同gRNA指导,使得引入切口的同时引入5'突出端。在其他实施方案中,无催化活性的Cas9与异源效应子结构域(例如转录抑制因子或激活子)融合,以影响基因表达。

[0177] 靶序列可包含任何多核苷酸,例如DNA或RNA多核苷酸。靶序列可以位于细胞的细胞核或细胞质中,例如位于细胞的细胞器内。通常,可用于重组到包含靶序列的靶向基因座的序列或模板称为“编辑模板”或“编辑多核苷酸”或“编辑序列”。在一些方面,外源模板多核苷酸可以是指编辑模板。在一些方面,重组是同源重组。

[0178] 通常,在内源CRISPR系统的背景下,CRISPR复合物的形成(包含与靶序列杂交并与一种或多种Cas蛋白复合的引导序列)导致一条或两条链在靶序列中或在靶序列附近(例如,在靶序列的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50或更多个碱基对内)的切割。可以包含野生型tracr序列的全部或部分或由野生型tracr序列的全部或部分组成(例如,野生型tracr序列的大约或大于约20、26、32、45、48、54、63、67、85或更多个核苷酸)的tracr序列也可以形成CRISPR复合物的部分,例如通过沿着至少部分tracr序列与可操作地连接于引导序列的tracr配对序列的全部或部分的杂交。tracr序列与tracr配对序列具有足够的互补性以杂交并参与CRISPR复合物的形成,例如最佳比对时,沿着tracr配对序列的长度的至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的序列互补性。

[0179] 可以将驱动CRISPR系统的一个或多个元件表达的一个或多个载体引入细胞中,使得CRISPR系统的元件的表达指导在一个或多个靶位点形成CRISPR复合物。组分也可以作为蛋白质和/或RNA递送至细胞。例如,Cas酶、与tracr-mate序列连接的引导序列和tracr序列可各自与分开的载体上的分开的调节元件可操作地连接。备选地,可以将由相同或不同调节元件表达的两个或更多个元件组合在单一载体中,其中一个或多个另外的载体提供不包含在第一载体中的CRISPR系统的任何组分。载体可包含一个或多个插入位点,例如限制性内切核酸酶识别序列(也称为“克隆位点”)。在一些实施方案中,一个或多个插入位点位于一个或多个载体的一个或多个序列元件的上游和/或下游。当使用多个不同的引导序列时,单个表达构建体可用于将CRISPR活性靶向在细胞内的多个不同的相应靶序列。

[0180] 载体可包含与编码CRISPR酶(例如Cas蛋白)的酶编码序列可操作地连接的调节元件。Cas蛋白的非限制性实例包括Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也称为Csn1和Csn12)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、CsfI、Csf2、Csf3、Csf4、其同源物或其修饰形式。这些酶是已知的;例如,化脓性链球菌Cas9蛋白的氨基酸序列可以在SwissProt数据库中以登录号Q99ZW2找到。

[0181] CRISPR酶能够为Cas9(例如,来自化脓性链球菌或肺炎链球菌)。CRISPR酶能够指导靶序列位置处的一条或两条链的切割,例如靶序列内和/或靶序列的互补序列内。载体能够编码相对于相应的野生型酶而突变的CRISPR酶,使得突变的CRISPR酶缺乏切割含有靶序列的靶多核苷酸的一条或两条链的能力。例如,来自化脓性链球菌的Cas9的RuvC I催化结构域中的天冬氨酸-至-丙氨酸取代(D10A)将Cas9从切割两条链的核酸酶转化为切口酶(切割单链)。在一些实施方案中,Cas9切口酶可以与引导序列组合使用,所述引导序列例如是分别靶向DNA靶标的有义链和反义链的两个指导序列。这种组合允许两条链被切出切口并

用于诱导NHEJ或HDR。

[0182] 在一些实施方案中,编码CRISPR酶的酶编码序列经密码子优化用于在特定细胞(例如真核细胞)中表达。真核细胞可以是特定生物体的那些或衍生自特定生物体,例如哺乳动物,包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔、狗或非人灵长类动物。通常,密码子优化是指通过用在宿主的基因中更频繁或最频繁使用的密码子替换天然序列的至少一个密码子同时保持天然氨基酸序列来修饰核酸序列,用于在目的宿主细胞中的增强表达的过程。多种物种对特定氨基酸的某些密码子表现出特别的偏好。密码子偏好(生物体之间密码子使用的差异)通常与信使RNA(mRNA)的翻译效率相关,而信使RNA(mRNA)的翻译效率又被认为取决于被翻译的密码子的特性和特定转运RNA(tRNA)分子的可用性等等。所选择的tRNA在细胞中的优势通常是肽合成中最频繁使用的密码子的反映。因此,能够基于密码子优化来定制基因用于在给定生物体中的最佳基因表达。

[0183] 通常,引导序列是与靶多核苷酸序列具有足够互补性以与靶序列杂交并且指导CRISPR复合物与靶序列的序列特异性结合的任何多核苷酸序列。在一些实施方案中,当使用合适的比对算法进行最佳比对时,引导序列与其相应的靶序列之间的互补性程度为约或大于约50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%或更多。

[0184] 可以使用用于比对序列的任何合适的算法来确定最佳比对,其非限制性实例包括Smith-Waterman算法、Needleman-Wunsch算法、基于Burrows-Wheeler变换的算法(例如Burrows Wheeler Aligner)、Clustal W、Clustal X、BLAT、Novoalign(Novocraft Technologies、ELAND(Illumina, San Diego, Calif.)、SOAP(可在soap.genomics.org.cn获得)和Maq(可在maq.sourceforge.net获得)。

[0185] CRISPR酶可以是包含一个或多个异源蛋白质结构域的融合蛋白的部分。CRISPR酶融合蛋白可以包含任何另外的蛋白质序列,并且任选地包含任何两个结构域之间的接头序列。可以与CRISPR酶融合的蛋白质结构域的实例包括但不限于表位标签、报告基因序列和具有一种或多种以下活性的蛋白质结构域:甲基化酶活性、去甲基化酶活性、转录激活活性、转录抑制活性、转录释放因子活性、组蛋白修饰活性、RNA切割活性和核酸结合活性。表位标签的非限制性实例包括组氨酸(His)标签、V5标签、FLAG标签、流感血凝素(HA)标签、Myc标签、VSV-G标签和硫氧还蛋白(Trx)标签。报告基因的实例包括但不限于谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、辣根过氧化物酶(HRP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)β-半乳糖苷酶、β-葡糖醛酸酶、萤光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)、HcRed、DsRed、青色荧光蛋白(CFP)、黄色荧光蛋白(YFP)和自发荧光蛋白包括蓝色荧光蛋白(BFP)。CRISPR酶可以与编码结合DNA分子或结合其他细胞分子的蛋白质或蛋白质片段的基因序列融合,所述蛋白包括但不限于麦芽糖结合蛋白(MBP)、S标签、Lex A DNA结合结构域(DBD)融合、GAL4A DNA结合结构域融合和单纯疱疹病毒(HSV)BP16蛋白融合。可以形成包含CRISPR酶的融合蛋白的部分的其他结构域描述于US 20110059502中,其通过引用并入本文。

[0186] B. 核酸的递送

[0187] 在一些方面,将编码DNA靶向分子、复合物或组合的核酸施用给或引入细胞。核酸通常以表达载体例如病毒表达载体的形式施用。在一些方面,表达载体是逆转录病毒表达载体、腺病毒表达载体、DNA质粒表达载体或AAV表达载体。在一些方面,将编码破坏分子或复合物的一种或多种多核苷酸(例如DNA靶向分子)递送至细胞。在一些方面,递送是通过递

送一种或多种载体、其一种或多种转录物和/或由其转录的一种或多种蛋白质至细胞。

[0188] 在一些实施方案中,由于将编码多肽的多核苷酸引入细胞中,多肽在细胞中原位合成。在一些方面,多肽可以在细胞外产生,并然后引入细胞中。用于将多核苷酸构建体引入动物细胞的方法是已知的,并且作为非限制性实例包括其中多核苷酸构建体整合到细胞的基因组中的稳定转化方法,其中多核苷酸构建体未整合到细胞的基因组中的瞬时转化方法,和病毒介导的方法。在一些实施方案中,可以通过例如重组病毒载体(例如逆转录病毒、腺病毒)、脂质体等将多核苷酸引入细胞中。例如,在一些方面,瞬时转化方法包括显微注射、电穿孔或粒子轰击。在一些实施方案中,鉴于在细胞中表达,多核苷酸可包含在载体中,更特别是在质粒或病毒中。

[0189] 在一些实施方案中,基于病毒和非病毒的基因转移方法能够用于在哺乳动物细胞或靶组织中引入核酸。此类方法可用于将编码CRISPR、ZFP、ZFN、TALE和/或TALEN系统的组分的核酸施用给培养物中或在宿主生物中的细胞。非病毒载体递送系统包括DNA质粒、RNA(例如本文所述载体的转录物)、裸核酸和与递送媒介物(例如脂质体)复合的核酸。病毒载体递送系统包括DNA和RNA病毒,其在递送至细胞后具有附加体或整合的基因组。关于基因治疗程序的综述,参见Anderson,1992;Nabel&Feigner,1993;Mitani&Caskey,1993;Dillon,1993年;Miller,1992年;Van Brunt,1988;Vigne,1995;Kremer&Perricaudet,1995;Haddada等人,1995;和Yu等人,1994。

[0190] 非病毒递送核酸的方法包括脂质转染、核转染、显微注射、基因枪、病毒微体(virosome)、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂质:核酸缀合物、裸DNA、人工病毒粒子和DNA的试剂增强摄取。脂质转染描述于(例如,美国专利号5,049,386、4,946,787和4,897,355)中,并且脂质转染试剂是商业销售的(例如,TransfectamTM和LipofectinTM)。适用于多核苷酸的有效受体识别脂质转染的阳离子和中性脂质包括Feigner,WO 91117424;WO 91116024的那些。能够递送至细胞(例如体外或离体施用)或靶组织(例如体内施用)。

[0191] 在一些实施方案中,递送是通过使用基于RNA或DNA病毒的系统用于递送核酸。一些方面的病毒载体可以直接施用给患者(体内),或者它们能够用于体外或离体处理细胞,然后施用给患者。在一些实施方案中,基于病毒的系统包括用于基因转移的逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关和单纯疱疹病毒载体。

[0192] 在一些方面,包括但不限于谷胱甘肽-5-转移酶(GST),辣根过氧化物酶(HRP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT) β -半乳糖苷酶、 β -葡糖醛酸糖苷酶、萤光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)、HcRed、DsRed、青色荧光蛋白(CFP)、黄色荧光蛋白(YFP)和自发荧光蛋白包括蓝色荧光蛋白(BFP)的报告基因可以引入细胞中以编码作为标志物的基因产物,通过其测量基因产物表达的改变或修饰。在另一个实施方案中,可以通过载体将编码基因产物的DNA分子引入细胞中。在一些实施方案中,基因产物是萤光素酶。

[0193] 在某些实施方案中,通过使用转座酶系统整合转基因盒。可转座元件(TE或转座子)是能够改变其在基因组内的位置的DNA序列,有时创建或逆转突变并改变细胞的基因组大小。转座子能够用于遗传研究和重组遗传工程化改造用于插入诱变。插入突变是当转座子作为载体起作用以帮助去除和整合遗传序列时。鉴于其相对简单的设计和移动DNA序列的固有能力和,转座子在转导遗传物质方面高度兼容,使其成为理想的遗传工具。通常,转座酶系统包括Sleeping Beauty、miniTo12和PiggyBac。

[0194] miniTol2质粒系统(Balciunas等人,2006)可用于整合转基因。在双质粒系统中,一个质粒含有驱动报告基因的启动子侧翼的末端Tol2序列,另一个质粒(pTrans)含有在另一个启动子控制下的转座酶序列。用于miniTol2质粒系统的启动子可以是pCAGGS启动子,即CMV IE启动子。在该系统中,将miniTol-报告基因序列并入靶基因组DNA中,而不将pTrans序列并入靶基因组DNA中。

[0195] 可以使用PiggyBac转座子,其是通过“剪切和粘贴”机制在载体和染色体之间有效转座的移动遗传元件。在转座期间,Super PB转座酶识别位于转座子载体两端的转座子特异性反向末端重复序列(ITR),并且将内容物从原始位点移动并有效地将它们整合到TTAA染色体位点中。PiggyBac转座子系统的强大活性使得PB载体中两个ITR之间的目的基因能够容易地移动到靶基因组中。

[0196] IV.成熟谱系细胞的产生

[0197] 在一些实施方案中,本公开内容提供了具有MeCP2破坏(例如MeCP2KO)的iPSC细胞,其可以分化为成熟谱系,例如通过HPC、DE细胞或EPC。HPC可以以高的效率和纯度进一步分化为红细胞样、淋巴样或骨髓样谱系。例如,HPC可用于生成成熟的红细胞或小胶质细胞以及淋巴谱系的细胞,例如T细胞、B细胞、NK细胞和T/NK细胞。DE细胞或EPC可以进一步分化为内胚层谱系的细胞,例如β细胞和肝细胞。

[0198] 本研究还支持去甲基化在iPSC衍生谱系中成熟开始的作用。在哺乳动物基因组中,约60%至90%的CpG被甲基化。剩余的未甲基化的CpG聚集成所谓的CpG岛,其占基因组的约1%。甲基-CpG结合结构域(MBD)家族的蛋白质募集染色质重塑物、组蛋白脱乙酰酶和甲基化酶以作用于甲基化的DNA,导致表观遗传重塑和转录抑制。它们基本上起到生物钟的作用,以组织染色质并协调连贯的转录以响应生态位依赖性信号(Bird,1986;Jones和Takai,2001)。目前的研究表明,在iPSC中敲除MeCP2改变了操纵细胞内的生物钟的甲基化状态以在体外产生成熟谱系。因此,它提供了一个窗口,包括在分化过程中瞬时阶段特异性去甲基化(通过小分子、RNAi或化合物)步骤,以在体外从iPSC产生成熟谱系。由于其引发的发育阶段和独特的体外分化环境,这一发现可能是iPSC独有的。因此,在一些实施方案中,本公开内容提供了通过破坏MeCP2来改变iPSC甲基化状态的方法,以提供能够有效地分化为成熟谱系细胞的iPSC。

[0199] A.HPC的产生

[0200] 经工程化改造以破坏MeCP2的PSC(例如,ES细胞或iPS细胞)能够通过如美国专利号8,372,642中所述的本领域已知的方法分化为HPC,该文献通过引用并入本文。例如,BMP4、VEGF、Flt3配体、IL-3和GM-CSF的组合可用于促进造血分化。在某些实施方案中,将细胞培养物顺序暴露于包含BMP4和VEGF(和任选的FGF-2)的第一培养基,然后在包含Flt3配体、SCF、TPO、IL-3和IL-6的第二培养基中培养,能够将多能细胞分化为造血前体细胞和造血细胞。此外,在含有BMP4和VEGF的培养基中包含FGF-2(50ng/ml)能够增强从多能细胞生成造血前体细胞的效率。

[0201] 可以使用确定的或不确定的条件进行多能细胞向HPC的分化。通常,应当理解,旨在将所得细胞用于人受试者的实施方案中,确定的条件通常是优选的。HPC可以在确定的条件下从PSC培养(例如,使用TeSR培养基和基质组分,例如Matrigel™),并且可以从衍生自多能细胞的胚状体生成造血细胞。在其他实施方案中,多能细胞可以在OP9细胞或小鼠胚胎成

纤维细胞上共培养并随后分化。

[0202] 可以允许多能细胞形成胚状体或聚集体作为分化过程的部分。形成“胚状体”(EB)或生长细胞簇以诱导分化通常涉及人多能干细胞体外聚集成EB并允许人多能干细胞自发和随机分化为代表内胚层、外胚层和中胚层起源的多个组织类型。因此,三维EB能够用于产生一定比例的造血细胞和内皮细胞。

[0203] 可以使用以下方案形成EB。可以在汇合时,在室温使用0.5mM EDTA处理约8-10分钟来收获适于在包被MATRIGEL™或玻连蛋白的平板上的无饲养细胞生长的未分化的hESC或iPSC。孵育后吸出EDTA,可以通过在含有rock抑制剂或布雷他汀的EB基础培养基中收集细胞来形成EB。第二天可以将培养基更换为含有不同细胞因子制剂的EB分化培养基。将细胞以25-50万个细胞/ml的密度放置以促进聚集体形成。

[0204] 为了促进EB形成,可以将细胞转移至低贴壁平板,在无血清分化(SFD)培养基中过夜孵育,所述培养基由75%IMDM(Gibco)、25%不含RA补充剂的补充有0.5%N2和1%B-27的Ham's Modified F12(Cellgro)、200mM1-谷氨酰胺、0.05mg/ml抗坏血酸-2-磷酸镁盐(Asc 2-P)(WAKO)、GlutaMAX、Pen/Strep和 4.5×10^{-4} MTG组成,如前所述(Nat Biotechnol, 2006 Nov; 24(11):1402-11)。第二天,可以从每个孔收集细胞并离心。然后在分化的前四天,将细胞重悬于由补充有约50ng/ml骨形态发生因子(BMP-4)、约50ng/ml血管内皮生长因子(VEGF)和50ng/ml zebrafish FGF的SFD基础培养基组成的“EB分化培养基”中。每48小时给细胞半量送料。在分化的第五天,将培养基替换为由补充有50ng/ml干细胞因子(SCF)、50ng/ml Flt-3配体(Flt-3L)、50ng/ml白细胞介素-6(IL-6)、IL-3, 50ng/ml和50ng/ml血小板生成素(TPO)的SFD培养基组成的第二培养基。每48小时用新鲜的分化培养基给细胞半量送料。通过将分化培养物以300g旋转5分钟并从分化培养物中吸出一半体积并补充相同体积的新鲜培养基来进行培养基更换。在某些实施方案中,EB分化培养基可包括BMP4(例如,约50ng/ml)、VEGF(例如,约50ng/ml)和任选的FGF-2(例如,约25-75ng/ml或约50ng/ml)。可以吸出上清液并用新鲜的分化培养基替换。备选地,可以每两天用新鲜培养基给细胞半量送料。可以在分化过程中的不同时间点收获细胞。

[0205] 可以使用确定培养基从PSC培养HPC。使用确定培养基将多能细胞分化为造血CD34⁺干细胞的方法,例如描述于美国申请12/715,136中,其全部内容无排除地通过引用并入。预期这些方法可以与本公开内容一起使用。

[0206] 例如,确定培养基可用于诱导造血CD34⁺分化。确定培养基可含有生长因子BMP-4、VEGF、Flt3配体、IL-3和/或GM-CSF。多能细胞可以在包含BMP4、VEGF和任选的FGF-2的第一确定培养基中培养,然后在包含(Flt3配体、IL-3和GM-CSF)或(Flt3配体、IL-3、IL-6和TPO)的第二培养基中培养。第一和第二培养基还可包含SCF、IL-6、G-CSF、EPO、FGF-2和/或TPO中的一种或多种。基本上缺氧的条件(例如,小于20%的O₂)可进一步促进造血或内皮分化。

[0207] 细胞可以通过机械或酶促手段(例如,使用胰蛋白酶或TrypLE™)而基本上个体化。ROCK抑制剂(例如,H1152或Y-27632)也可包含在培养基中。预期这些方法可以使用例如机器人自动化来进行自动化。可以通过在缺氧条件下培养iPSC来对iPSC进行条件化。

[0208] 在某些实施方案中,基本上缺氧的条件可用于促进多能细胞分化为造血祖细胞。如本领域技术人员所认识到的,小于约20.8%的大气氧含量将被认为是缺氧的。培养中的人细胞能够在与环境空气相比具有降低的氧含量的大气条件下生长。这种相对缺氧可以通

过减少暴露于培养中细胞的大气氧来实现。胚胎细胞通常在减氧条件下体内发育,通常在约1%至约6%的大气氧气下,具有在环境水平的二氧化碳。不希望受理论束缚,预期缺氧条件可以模拟某些胚胎发育条件的一个方面。如以下实施例中所示,在某些实施方案中可以使用缺氧条件来促进多能细胞(例如iPSC或hESC)进一步分化为更分化的细胞类型,例如造血前体细胞。

[0209] 以下缺氧条件可用于促进多能细胞分化为造血祖细胞。在某些实施方案中,可以使用小于约20%、小于约19%、小于约18%、小于约17%、小于约16%、小于约15%、小于约14%、小于约13%、小于约12%、小于约11%、小于约10%、小于约9%、小于约8%、小于约7%、小于约6%、小于约5%、约5%、约4%、约3%、约2%或约1%的大气氧含量来促进分化为造血前体细胞。在某些实施方案中,缺氧气氛包含约5%的氧气。

[0210] 无论在任何给定的造血祖细胞扩增中使用何种特定培养基,所用培养基优选地补充有至少一种细胞因子,浓度为约0.1ng/mL至约500ng/mL,更通常为10ng/mL至100ng/mL。合适的细胞因子包括但不限于c-kit配体(KL)(也称为钢因子(StI)、肥大细胞生长因子(MGF)和干细胞因子(SCF))、IL-6、G-CSF、IL-3、GM-CSF、IL-1 α 、IL-11、MIP-1 α 、LIF、c-mpl配体/TP0和flk2/flk3配体(Flt2L或Flt3L)(Nicola等人,1979;Golde等人,1980;Lusis, 1981;Abboud等人,1981;Okabe,1982;Fauser等人,1981)。具体地,培养物将包括SCF、Flt3L和TP0中的至少一种。更具体地,培养物将包括SCF、Flt3L和TP0。

[0211] 在一个实施方案中,细胞因子包含在培养基中并通过培养基灌注来补充。备选地,当使用生物反应器系统时,细胞因子可以作为通过分开的入口端口的浓缩溶液在没有培养基灌注的情况下分开添加。当在没有灌注的情况下添加细胞因子时,它们通常以10 $\times$ 至100 $\times$ 溶液添加,其量等于生物反应器中体积的十分之一至1/100,并且大约每2至4天添加新鲜的细胞因子。此外,除了在灌注培养基中的细胞因子外,还可以分开入新鲜浓缩的细胞因子。

[0212] A. 红细胞样分化

[0213] 可以使用例如红细胞样分化培养基将HPC分化为红细胞样细胞。红细胞样分化培养基可以是无血清培养基或确定培养基,并且培养基可含有SCF、EPO、TP0、胰岛素、地塞米松或氢化可的松和转铁蛋白(Slukvin等人,2007)。红细胞样祖细胞可以通过将具有MeCP2破坏的造血前体细胞置于含有氢化可的松、全转铁蛋白和**EXCYTE®**的培养基中来生成。

[0214] 在一个示例性方法中,将HPC转移至低贴壁平板中在含有SFEM(Stem Cell Technologies)、肝素(例如,1至10 U/mL,例如5 U/mL,Sigma)、TP0(例如50至150ng/mL,例如100ng/mL)、人重组SCF(例如,50至150ng/mL,例如100ng/mL)、FLT3L(例如,50至150ng/mL,例如100ng/mL)、IL-3(例如,1至20ng/mL,例如10ng/mL)和IL-6(例如,1至20ng/mL,例如10ng/mL)的培养基中。约4-6天后,红细胞样细胞在含有0.1%至0.5%Excyte例如0.3%Excyte(Serologicals)、全转铁蛋白(例如,0.5至5mg/mL,例如1mg/mL,Sigma)、氢化可的松(例如,0.5至5mM,例如1mM,Sigma)、胰岛素(例如,5至50ng/mL,例如20ng/mL,Sigma)、SCF(例如,10至100ng/mL,例如50ng/mL,R&D Systems)、EPO(例如1至5U/mL,例如2 U/mL,R&D Systems)、IL-3(例如,1至10ng/mL,例如5ng/mL)、IL-6(例如,1至25ng/mL,例如10ng/mL)和TP0(例如,10至100ng/mL,例如50ng/mL)的SFEM培养基中扩增另外的2-3周。随后,从培养基

中除去IL-3、IL-6和TPO,并在SCF和EPO存在下培养细胞。通过流式细胞术通过表面染色CD235a(血型糖蛋白A)、CD36和CD71定量细胞悬浮液中成红细胞的存在。

[0215] 甲基纤维素可用于诱导从HPC的红细胞、巨噬细胞和/或粒细胞的分化。甲基纤维素是一种相对惰性的聚合物,形成具有良好光学透明度的稳定凝胶。其作为集落刺激因子的来源在补充有包括胎牛血清(FBS)、牛血清白蛋白(BSA)、2-巯基乙醇、胰岛素、转铁蛋白和重组细胞因子的化合物的培养基或条件培养基中常用终浓度为0.9-1.2%。涉及细胞的甲基纤维素分化的方法描述于例如Kaufman等人(2001)中。

[0216] 基于甲基纤维素的培养基比其他类型的半固体基质允许红细胞样谱系细胞更好地生长,因此允许在同一培养物中测定红细胞、粒细胞、单核细胞和多潜能CFC。巨核细胞祖细胞适合在补充的基于胶原的培养基中培养,并使用免疫细胞化学染色进行特异性鉴定。

[0217] 通过所述方法产生的红细胞样细胞的特征在于选自:CD31;CD34;CD36;CD41a;CD43;CD45;CD71和CD235a的一种或多种造血/红细胞样标志物的表达。另外,红细胞样细胞的特征在于评估球蛋白的表达,包括胚胎(ϵ)和胎儿(γ)和成年(β)球蛋白。在特定方面,与 γ -球蛋白和 ϵ -球蛋白的表达相比,成熟的红细胞样细胞将具有更高的 β -珠蛋白表达。可以用细胞的细胞离心涂片进行Wright染色以确认成红细胞的去核形态。也可以针对各种球蛋白与细胞表面标志物CD235对红细胞样细胞进行共染色。

[0218] B.骨髓样分化

[0219] 1.巨核细胞分化

[0220] HPC可以进一步分化为巨核细胞。在体内,巨核细胞存在于骨髓中并从过程或在细胞上形成的前血小板产生血小板。人体中的巨核细胞仅代表骨髓细胞的一小部分,但响应于某些疾病能够在数量上增加高至10倍。在体内,巨核细胞通常如下从造血细胞分化:成血细胞分化为成巨核细胞,成巨核细胞然后分化为前巨核细胞,然后前巨核细胞分化为巨核细胞。

[0221] 可以使用各种培养基和方法将多能细胞或造血前体细胞分化为巨核细胞。例如,如US 2007/0077654(其全部内容无排除地通过引用并入)中所述的用于将多能细胞分化为巨核细胞的方法和培养基可以与本公开内容一起使用。

[0222] 生长因子优先地包含在巨核细胞分化培养基中。例如,巨核细胞分化培养基可含有FLT-3配体、干细胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO)、白细胞介素-3(IL-3)和白细胞介素-6(IL-6)中的一种、两种、三种、四种或全部。在某些实施方案中,只有SCF可以包含在巨核细胞分化培养基中。在其他实施方案中,SCF可以与IL-3和/或IL-6中的一种或两种组合使用。在各种实施方案中,FLT-3配体和/或TPO可以从本公开内容的巨核细胞分化培养基中排除。

[0223] 通过将造血前体细胞置于含有100ng/ml TPO、SCF、FLT-3、20%BIT9500的培养基中,可以将造血细胞分化为巨核细胞。巨核细胞分化培养基可用于诱导巨核细胞的生成。已经描述了用于生成巨核细胞的各种产品和方法,并且可以与本公开内容一起使用,例如W02006/050330中所述。另外,Megacult™可从Stem Cell Technologies获得,并且可用于产生/分化巨核细胞。在各种实施方案中,血小板生成素(TPO)、白细胞介素3(IL-3)、白细胞介素6(IL-6)和/或干细胞因子可包含在巨核细胞分化培养基中。细胞的巨核细胞分化的方法描述于例如Kaufman等人(2001)中。

[0224] 2.肥大细胞生成

[0225] HPC可以进一步分化为肥大细胞。多能干细胞暴露于干细胞因子(SCF)、IL-6、IL-3、IL-4、IL-9和/或IL-10可促进肥大细胞分化。

[0226] 在某些实施方案中,以下方案可用于促进分化为肥大细胞。通过将造血前体细胞置于含有各为100ng/ml的TPO、SCF、FLT-3、20%BIT9500的培养基“MK5”中,可首先将造血细胞分化为巨核细胞。随后可以通过在MK5扩增培养基,然后是含50ng/ml SCF、50ng/ml IL-6的培养基中扩增前体来产生肥大细胞。

[0227] 在各种实施方案中,用于将脐带血或外周血分化为肥大细胞的方法也可用于促进巨核细胞分化。例如,Schernthaner等人(2001)描述了在不同时间点使用SCF与IL-6组合或IL-4、IL-6和IL-10的组合将脐带血祖细胞分化为肥大细胞的方法。Lappalainen等人(2007)提供了通过使用SCF和其他添加的细胞因子(例如IL-3、IL-6、IL-9和IL-4)培养细胞不同时间段来将外周血分化为肥大细胞的方法。预期这些方法中的任何一种都可以成功地与本公开内容一起使用。

[0228] 3.巨噬细胞和树突细胞

[0229] 造血前体细胞可以进一步分化为树突细胞。例如,将造血前体细胞HPC转移至低贴壁平板中在含有SFEM(Stem Cell Technologies)、肝素(例如,1至10U/mL,例如5U/mL, Sigma)、TPO(例如,50至150ng/mL,例如100ng/mL)、人重组SCF(例如,50至150ng/mL,例如100ng/mL)、FLT3L(例如,50至150ng/mL,例如100ng/mL)、IL-3(例如,1至20ng/mL,例如10ng/mL)和IL-6(例如,1至20ng/mL,例如10ng/mL)的培养基中,持续8天。随后将细胞置于含有100ng/ml GMCSF的培养基中8天,以生成共同的骨髓祖细胞。然后将细胞置于含有M-CSF(20ng/ml)和IL-1 β (10ng/ml)的培养基中约2周,将这些细胞进一步分化为巨噬细胞,或通过将细胞置于20ng/ml GMCSF、20ng/ml IL-4中,将这些细胞进一步分化为树突细胞。可以通过针对CD163、CD14、CD68和CD45的细胞表面表达的存在进行染色来定量培养物中可能出现的巨噬细胞的存在。

[0230] 4.小胶质细胞生成

[0231] 例如来自分化HPC的第9天的聚集体或在HPC分化的第13天的CD34⁺/CD43⁺磁性分选的纯HPC可以以10-15k/cm²的细胞密度铺板在包被Matrigel的平板上以起始小胶质细胞分化,根据Abud等人,2017描述的方法进行。小胶质细胞分化可以在含氧量正常的条件下进行。

[0232] 在一个示例性方法中,在分化的前22天,向细胞饲喂含有25ng/ml MCSF、50ng/ml TGF β 和100ug/ml IL-34的小胶质细胞分化培养基。然后将细胞置于含有25ng/ml MCSF、50ng/ml TGF β 、100ug/ml IL-34、CD200和CX3CL1的小胶质细胞成熟培养基中。在第27天收获细胞,并通过细胞内流式细胞术针对P2RY、TREM-2、IBA和CXC3CR1的存在进行染色,以证实在末期培养物中出现小胶质细胞。

[0233] C.淋巴样分化

[0234] HPC还可以进一步分化为淋巴样谱系。在一些方面,在分化过程的第7-11天,例如第7天、第8天、第9天、第10天或第11天分离的HPC可以分化为淋巴样细胞,例如T细胞和NK细胞。在一些方面,淋巴样祖细胞起源的时间与HPC分化期间血管内皮祖细胞的减少和红细胞祖细胞的出现一致。在特定方面,第9天HPC可以在生成T细胞方面具有增加的效率。能够淋巴样分化的HPC可以通过特定标志物的表达来分离和/或鉴定。例如,可以选择具有CD34和/

或CD43的表面表达的细胞用于淋巴样细胞分化。用于检测淋巴样祖细胞的其他标志物包括DLL4、CD144、CD31、CD34、CD43^{lo}、CD45^{lo/-}、CD235、CD7、Flk-1、APNLR。在特定方面，CD34/CD7、CD235/CD7、DLL4/CD34、DLL4/CD31、DLL4/CD144或CD34/CD43^{lo}双阳性群体的存在用于鉴定淋巴样祖细胞。

[0235] 可以在确定、无饲养细胞条件下培养HPC用于淋巴样分化。培养基可含有一种或多种基质组分，例如RetroNectin、纤连蛋白或RGD肽。不希望受任何理论束缚，基质组分可为胚胎干细胞的生长提供固体支持。在某些实施方案中，可以将基质组分施加至培养表面并在将细胞接种到培养基中之前与培养基接触。例如，细胞可以在确定培养基（例如TeSR培养基）中在包被有纤连蛋白或Matrigel™的平板上培养，然后将细胞机械分离成团块或个体化细胞并诱导分化为造血前体细胞。

[0236] 各种基质组分可用于培养多能细胞，包括胶原蛋白（例如，胶原蛋白IV）、层粘连蛋白、玻连蛋白、Matrigel™、明胶、聚赖氨酸、血小板反应蛋白（例如，TSP-1、-2、-3、-4和/或-5）和/或ProNectin-F™。在某些实施方案中，由于可能对细胞活力的不利影响，可以避免仅使用Matrigel™、胶原IV或层粘连蛋白与先前使用TeSR培养的细胞；尽管如此，这些组合物可以有利地与其他基质组分组合使用。这些基质分组的组合可以为促进细胞生长和细胞活力提供额外的益处。在某些实施方案中，1、2、3、4、5、6或更多种上述基质组分可用于培养细胞，例如，在造血分化之前。

[0237] 在实施例4中公开了用于淋巴样分化的示例性无饲养细胞基质。在特定方面，非组织培养物处理的平板可以用DLL4:Fc嵌合蛋白和RetroNectin（纤连蛋白片段CH-296；Takara Shuzo, Japan）包被，用于HPC的淋巴样分化。

[0238] 在一些实施方案中，抗坏血酸可用于增强淋巴样分化。确定培养基可以补充有约10μM至约1mM、例如约50μM至约100μM、特别是约95μM的抗坏血酸。

[0239] 1. T细胞分化

[0240] 在一个方面，本公开内容提供了通过施用增加受试者中Notch配体产生的物质而通过改变Notch配体的内源活性来调控造血祖细胞的分化，而在受试者中体内扩增T细胞谱系的细胞的方法。该方法还包括在培养基中培养细胞，其中培养基包括有效量的notch配体和选自IL-7、IL-11、SCF、Flt-3和IL-3的一种或多种细胞因子。在一些特定实施方案中，培养基能够进一步包括IL-6。在一些实施方案中，notch配体是Δ4 notch配体（DLL4），例如DLL4:Fc嵌合体。例如，可以通过流式细胞术针对T细胞的发育监测培养的细胞，其中通过用抗CD3抗体染色细胞。可以使用细胞表面标志物CD4、CD8、CD3、CD94和CD56分析细胞中T和NK细胞的存在。例如，CD8⁺/CD3⁺的细胞将指示分化的T细胞，NK细胞将是CD3⁻/CD56⁺并且NK/T细胞将是CD3⁺/CD56⁺。

[0241] 选择促进和维持T细胞谱系细胞的分化和增殖的Notch配体。Notch配体可以起源于人，或者可以衍生自其他物种，包括哺乳动物物种，例如啮齿动物、狗、猫、猪、绵羊、牛、山羊和灵长类动物。Notch配体的具体实例包括Delta家族。Delta系列包括Delta-1（Genbank登录号AF003522，智人（Homo sapiens））、Delta-3（Genbank登录号AF084576，褐家鼠（Rattus norvegicus））、Delta-like 1（Genbank登录号NM-005618和NP-005609，智人；Genbank登录号X80903，I48324，小鼠（M. musculus））、Delta样3（Genbank登录号NM-053666，N-446118，褐家鼠）、Delta-4（Genbank登录号AF273454，BAB18580，小鼠）；Genbank登录号

AF279305, AAF81912, 智人) 和Delta样4 (Genbank登录号Q9NR61, AAF76427, AF253468, NM-019074, 智人; Genbank登录号NM-019454, 小鼠)。Notch配体可商购获得或可通过重组DNA技术生产并纯化至不同程度。

[0242] 2. NK细胞分化

[0243] 该方法还包括将HPC MeCP2-KO细胞维持在上述培养物中足以产生分化的NK细胞的持续时间的步骤。在一些实施方案中, 分化的NK细胞与T细胞一起在培养物中出现, 然而NK细胞可在第6周后停止增殖。通常, 确定NK细胞数量的增加和/或其分化状态是使用本领域普通技术人员已知的常规方法评估。例如, 可以通过流式细胞术针对NK细胞的发育监测培养的细胞, 其中通过用抗CD56和抗CD3抗体对细胞进行染色。CD56⁺/CD3⁻的细胞将指示分化的NK细胞。

[0244] D. DE细胞和EPC的产生

[0245] 本公开内容的某些实施方案提供了产生DE细胞或EPC的方法, 所述DE细胞或EPC衍生自在无饲养细胞条件下维持的诱导多能干细胞。通过该方法衍生的DE细胞和EPC能够生成单激素β细胞和肝细胞。图21中提供了一个示例性过程的示意图。图23C中提供了胰腺分化过程的阶段。在特定方面, 分化在缺氧条件下进行。

[0246] 定形内胚层(DE)是瞬时状态, 其快速分化, 不能增殖, 不具有独特的形态, 并且可能不完全注定至内胚层命运。另一方面, EPC不是瞬时的, 具有独特的形态, 并且可以无限培养(Cheng等人, 2012)。内胚层祖细胞的特征还在于表达CXCR4、CD117、FOXA1、FOXA2、EOMES、CD34和SOX17。内胚层祖细胞能够生成内胚层谱系例如肝脏、胰腺和肠中的细胞, 但是不能在体外或体内生成中胚层或外胚层。同样, EP细胞在免疫缺陷小鼠中不形成畸胎瘤。因此, DE和EP细胞可以代表独特的发育中间体, 并可具有不同的发育潜力。

[0247] 该方法还包括将衍生自上述培养物中的MeCP2WT和MeCP2KO细胞的DE细胞或EPC维持足以产生分化的葡萄糖应答β细胞的持续时间的步骤。将悬浮培养中生成的DE细胞或EPC置于分化培养基中用于生成胰腺细胞类型。对于EP细胞的胰腺分化, 可以使用Nostro等人(2011)描述的由Cheng等人(2012)进一步修改的方案。在缺氧条件下, 整个过程可以作为3D培养继续进行。

[0248] 在示例性方法中, 将EPC培养物扩增15天并在含有Wnt3A (3ng/ml)、FGF-10 (50ng/ml) 和Dorsomorphin (0.75μM) 的SFD培养基中培养3天以生成前肠/中肠内胚层细胞。在含有GlutaMAX (1%)、不含视黄酸的B27 (1%)、抗坏血酸 (50μg/ml)、Pen/Strep (1%)、KAAD-环巴胺 (0.25μM)、反式维甲酸 (2μM)、Noggin (50ng/ml) 和FGF-10 (50ng/ml) 的高葡萄糖DMEM培养基中培养细胞三天以生成胰腺内胚层细胞。在该步骤之后, 将细胞在含有GlutaMAX (1%)、不含视黄酸的B27 (1%)、抗坏血酸 (50g/ml)、Pen/Strep (1%)、SB431542 (6M) 和Noggin (50ng/ml) 的高葡萄糖DMEM培养基中培养三天。接下来, 将细胞在补充有分泌酶抑制剂(DAPT, 2μM) 的先前的高葡萄糖DMEM培养基中培养一至两天。从该阶段开始, 将细胞在含有葡萄糖 (40mM)、烟酰胺 (10mM)、SB431542 (6μM) 和Noggin (50ng/ml) 的SFD培养基中培养一至两天。最后, 细胞在含有SB431542 (5.4μM)、Noggin (50ng/ml)、胰岛素 (800pM) 和烟酰胺 (10mM) 的SFD培养基中培养, 在接下来的10天内每天在具有另外添加的葡萄糖 (40mM) 和无另外添加的葡萄糖的这种培养基之间交替。烟酰胺可以以约0.1mM至约15mM、例如约10mM的浓度添加。在2D形式分化的第10-15天之间检测单激素β细胞的存在。

[0249] 在分化的第21-25天收获 β 细胞培养物,固定并染色用于通过细胞内流式细胞术定量PDX1/NeuroD1/C肽/胰高血糖素/生长抑素。末期培养物揭示了单激素细胞的存在。末期培养物对于PDX1、NeuroD1和一些水平的NKX6.1呈阳性。末期聚集体揭示了对葡萄糖的反应性。

[0250] 在另一个方面,通过本领域已知的方法将定形内胚层细胞(DE)分化为肝细胞。在一个方法中,肝细胞可以从DE细胞分化,如图40所示。例如,整个分化过程在缺氧条件下进行,直到分化过程的第25天。简言之,在补充有BMP4 (50ng/mL)、bFGF (10ng/mL)、EGF (10ng/mL)、VEGF (10ng/mL)、HGF (100ng/mL)、Dex (0.1 μ M)、DMSO (1%) 和FGF-10 (60ng/mL) 的SFD培养基中以2D培养DE约6天。然后在补充有bFGF (10ng/mL)、EGF (20ng/mL)、VEGF (10ng/mL), HGF (100ng/mL), OSM (20ng/mL)、Dex (0.2 μ M)、DMSO (1%)、DAPT (2 μ M) 和维生素K (6 μ g/ml) 的SFD培养基中将细胞重新铺板在胶原上约6天。对于第3阶段,将细胞在补充有B27 (1x)、EGF (20ng/mL)、OSM (20ng/mL)、Dex (0.1 μ M)、GlutaMAX (1%) 和Pen/Strep (1%) 的William's E培养基中以2D铺板从而产生肝细胞。

[0251] E. 细胞培养

[0252] 在某些实施方案中,基本上缺氧的条件可用于促进PSC向HPC,HPC向红细胞样、骨髓样或淋巴样谱系,或者DE细胞或EPC向内胚层谱系的分化。在某些实施方案中,可以使用大气氧含量小于约20%、小于约19%、小于约18%、小于约17%、小于约16%、小于约15%、小于约14%、小于约13%、小于约12%、小于约11%、小于约10%、小于约9%、小于约8%、小于约7%、小于约6%、小于约5%、约5%、约4%、约3%、约2%或约1%来促进分化。在某些实施方案中,缺氧气氛包含约5%的氧气。

[0253] 如本文所述,一种或多种确定培养基可有利地用于促进本发明细胞的分化;特别地,消除诸如血清和小鼠饲养层的动物产品可以降低与细胞暴露于动物产品相关的风险,并且允许生成可以更安全地施用给人类受试者的细胞。由于传统的干细胞培养开发依赖于血清产品和小鼠饲养层用于将干细胞分化为多种细胞类型,这些传统方法限制了可以进行分化的规模,增加的生物变异性和潜在的污染,并严重受到阻碍ES细胞在翻译疗法中的应用,否则它们可能会被证明是有用的。

[0254] 通常,本发明的细胞在培养基中培养,所述培养基是能够维持细胞生长的富含营养物的缓冲溶液。适用于根据本文所述方法分离、扩增和分化本发明细胞的培养基包括但不限于高葡萄糖Dulbecco's Modified Eagle's培养基(DMEM)、DMEM/F-15、RPMI 1640、Iscove's modified Dulbecco's培养基(IMDM)和Opti-MEM SFM(Invitrogen Inc.)。化学确定培养基包含最低必需培养基,如Iscove's Modified Dulbecco's培养基(IMDM)(Gibco),补充有人血清白蛋白、人ExCyte脂蛋白、转铁蛋白、胰岛素、维生素、必需和非必需氨基酸、丙酮酸钠、谷氨酰胺和有丝分裂原也是合适的。如本文所用,促分裂原是指刺激细胞分裂的试剂。试剂可以是化学物质,通常是某种形式的蛋白质,其促使细胞开始细胞分裂,触发有丝分裂。在一个实施方案中,考虑了无血清培养基,例如美国序列号08/464,599和W096/39487中描述的那些,以及在美国专利号5,486,359中描述的“完全培养基”与本文所述的方法一起使用。在一些实施方案中,培养基补充有10%胎牛血清(FBS)、人自体血清、人AB血清或补充有肝素(2 U/ml)的富含血小板的血浆。

[0255] 通过在增加足以促进细胞分化为红细胞样、骨髓样或淋巴样谱系的因子的细胞内

水平的条件下,在培养基中培养多能干细胞或造血前体细胞,能够生成骨髓样、红细胞样和淋巴样细胞。培养基还可含有一种或多种造血细胞分化和成熟试剂,如多种生长因子。这些试剂可以帮助诱导细胞决定至更成熟的表型——或者优先地促进成熟细胞的存活——或者具有这两种效应的组合。分化和成熟试剂可包括能够促进造血细胞谱系细胞生长的可溶性生长因子(肽激素、细胞因子、配体-受体复合物和其他化合物)。此类试剂的非限制性实例包括但不限于造血或内皮生长因子,例如成纤维细胞生长因子(FGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、干细胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO)、FLT-3配体(FLT3L)、白细胞介素-3(IL-3)、白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-9(IL-9)或粒细胞集落刺激因子(G-CSF),或者其同种型或变体。

[0256] V. 成熟谱系细胞的用途

[0257] 通过本公开内容的方法和组合物提供的成熟谱系细胞(例如,红细胞样、骨髓样、淋巴样和内胚层)能够用于多种应用中。这些包括但不限于在体内移植或植入细胞;在体外筛选细胞毒性化合物、致癌物、诱变生长/调节因子、药物化合物等;阐明血液疾病和损伤的机制;研究药物和/或生长因子的运作机制;诊断和监测患者的癌症;基因疗法;以及生物活性产品的生产,仅举几例。

[0258] A. 测试化合物筛选

[0259] 本文提供的红细胞样、骨髓样、淋巴样和内胚层谱系能够用于筛选影响本文提供的红细胞样、骨髓样和淋巴样细胞的特征的因子(例如溶剂、小分子药物、肽和多核苷酸)或环境条件(例如培养条件或操作)。

[0260] 本公开内容的特定筛选应用涉及在药物研究中药物化合物的测试。读者通常参考标准教科书 *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, 1997。在某些方面,红细胞样、骨髓样、淋巴样和内胚层细胞起用于标准药物筛选和毒性测定法的测试细胞的作用,如同以前曾在短期培养中对造血细胞和前体进行的。对候选药物化合物的活性的评估通常涉及将本公开内容的某些方面中提供的造血细胞或前体与候选化合物组合,确定可归因于该化合物的细胞的形态、标志物表型或代谢活性中的任何变化(与未处理的细胞或用惰性化合物处理的细胞相比),然后将化合物的效果与观察到的变化相关联。筛选可以是因为化合物被设计为对造血细胞或前体具有药理学作用,或者因为设计为在其他地方具有作用的化合物可能对造血细胞或前体具有非预期的作用。可以组合测试两种或更多种药物(通过同时或依次与细胞组合),以检测可能的药物-药物相互作用效应。

[0261] B. 造血细胞疗法

[0262] 实施方案还提供了本文提供的红细胞样、骨髓样、淋巴样和内胚层细胞恢复可能是由于血液疾病或病症或损伤而需要这种疗法的受试者的功能程度的用途。例如,通过本文公开的方法衍生的红细胞样、骨髓样、淋巴样和内胚层细胞可用于治疗血液疾病和病症,例如血红蛋白病、贫血等。此外,红细胞样和骨髓样谱系细胞可用于向需要其的受试者(例如,需要输血的受试者或具有血液病症的受试者)供应血液或血液细胞(例如,红细胞、血小板和嗜中性粒细胞)。此类细胞可用于治疗由细胞抑制疗法(例如化疗)引起的造血细胞缺陷。

[0263] 为了确定本文提供的细胞对治疗应用的适合性,可首先在合适的动物模型中测试细胞。在一个水平上,评估细胞在体内存活和维持其表型的能力。将本文提供的细胞在适于

进一步观察的位点施用给免疫缺陷动物(例如NOD小鼠,或者化学上或通过辐射而免疫缺陷的动物),例如在肾囊下、进入脾脏、进入肝小叶或进入骨髓。在几天至几周或更长时间内收获组织,并评估是否仍存在起始细胞类型如红细胞。这能够通过向施用的细胞提供可检测的标签(例如绿色荧光蛋白或 β -半乳糖苷酶);或者通过测量对施用的人细胞特异的组成型标志物来进行。当在啮齿动物模型中测试本文提供的细胞时,可以评估施用的细胞的存在和表型,通过使用人特异性抗体的免疫组织化学或ELISA或者使用引物和杂交条件的RT-PCR分析,所述引物和杂交条件使得扩增对于人多核苷酸序列具有特异性。用于评估mRNA或蛋白质水平的基因表达的合适标志物在本公开内容的其他地方提供。

[0264] 通过本公开内容的方法提供的红细胞样、骨髓样、淋巴样和内胚层谱系可以在多种动物模型中测试它们治疗血液病症和损伤的能力。例如,镰状细胞贫血小鼠模型或T/B细胞缺陷型Rag-2敲除小鼠可以是用于测试本文公开的红细胞样、骨髓样和淋巴样细胞的特别有用的动物模型。

[0265] 在本公开内容的某些方面中提供的红细胞样、骨髓样、淋巴样和内胚层谱系在动物模型中显示出所需的功能特征或功效,也可适用于直接施用给有此需要的人类受试者。出于止血的目的,可在能够充分进入循环的任何位点施用细胞。造血细胞或其前体也可在损伤或疾病的位点递送。

[0266] 在本公开内容的某些方面中提供的细胞可以用于任何有此需要的受试者的疗法。可能适合于这种疗法的人类病症包括多种贫血和血红蛋白病,以及以造血细胞数量减少为特征的疾病(例如,骨髓增生异常综合征、骨髓纤维化、中性粒细胞减少症、粒细胞缺乏症、格兰兹曼氏血小板减少症、血小板减少症和获得性免疫缺陷综合征)。对于人类治疗,剂量通常在约 10^9 和 10^{12} 个细胞之间,并且通常在约 5×10^9 和 5×10^{10} 个细胞之间,针对受试者的体重、痛苦的性质和严重程度以及所施用细胞的复制能力进行调整。确定治疗方式和适当剂量的最终责任在于管理临床医生。

[0267] 在一些实施方案中,本发明的成熟肝细胞可用于药物代谢和毒性测试,用在靶向肝组织的病毒的研究中,以及用作治疗剂。成熟肝细胞优选表现出功能性肝酶活性。在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:(a)将上述一种或多种成熟肝细胞暴露于化合物,和(b)监测一种或多种成熟肝细胞的毒性迹象。在另一个实施方案中,这种方法包括以下步骤:(a)暴露一种或多种成熟肝细胞,其中所述化合物被肝细胞代谢;(b)使化合物的所得代谢物与一种或多种非肝细胞的接触;和(c)监测非肝细胞的任何代谢物诱导的变化。用于研究化合物代谢的方法可包括以下步骤:(a)暴露一种或多种成熟肝细胞;和(b)确定通过肝脏加工化合物而产生的代谢物。治疗肝病的方法可包括给患有肝病的患者施用一种或多种成熟肝细胞的步骤。可以使用该方法治疗的肝脏疾病的非限制性实例包括急性肝损伤或代谢性肝病,例如 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶缺乏症或威尔森氏病。

[0268] 本公开内容还提供了使用本文公开的方法在细胞治疗方法中生成的成熟 β 细胞的方法,例如,用于治疗其中 β 细胞数量或 β 细胞功能降低是致病或促成的病症。

[0269] 在一些实施方案中,本文提供的成熟小胶质细胞,例如具有M1或M2极化的成熟小胶质细胞可用于筛选神经疾病(例如阿尔茨海默病)的治疗,以及它们的治疗。

[0270] 在一些实施方案中,本公开内容的成熟巨噬细胞,例如具有M1或M2极化的成熟巨噬细胞可用于筛选和疗法。M1和M2具有趋化因子的独特表达谱。术语“极化”在本文中用于

表示巨噬细胞的表型特征和功能特征。表型能够通过由巨噬细胞表达的表面标志物来定义。M1巨噬细胞表达CXCL9和CXCL10趋化因子,其已知用于吸引Th1,而M2巨噬细胞表达CCL17、CCL22和CCL24。趋化因子如CCL2和CXCL4也能够将巨噬细胞极化为M2样表型。

[0271] 另外,成熟淋巴样细胞,例如T细胞、NK细胞、NK/T细胞和B细胞,可用于各种筛选和治疗应用。在一些方面,淋巴样谱系可用于体外筛选用于疗法的化合物。淋巴样谱系也可用作过继细胞疗法,例如用于癌症的治疗。

[0272] C. 用于商业、治疗和研究目的的配送

[0273] 出于制造、配送和使用的目的,本公开内容的红细胞样、骨髓样、淋巴样和内胚层细胞通常以细胞培养物或悬浮液的形式在等渗赋形剂或培养基中提供,任选冷冻至便于运输或储存。

[0274] 本公开内容还包括不同的试剂系统,其包括在制造、配送或使用过程中的任何时间存在的一组细胞或细胞组合。细胞组包含本公开内容中描述的两种或更多种细胞群的任何组合,例示但不限于编程衍生的细胞(造血谱系细胞,它们的前体和亚型),与未分化的干细胞组合,体细胞衍生的造血细胞,或其他分化的细胞类型。组中的细胞群有时共享相同的基因组或其遗传修饰形式。在相同实体或共享业务关系的不同实体的控制下,组中的每个细胞类型可以被包装在一起,或者在相同设施中的不同容器中,或者在相同或不同时间在不同位置。

VI. 实施例

[0275] 包括以下实施例以说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应该理解,以下实施例中公开的技术代表发明人发现的在本发明的实践中很好地起作用的技术,因此可以认为是构成其实践的优选模式。然而,根据本公开内容,本领域技术人员应当理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对所公开的具体实施方案进行许多改变并仍然获得相同或相似的结果。

[0276] 实施例1-生成MeCP2敲除细胞系

[0277] 为了确定MeCP2在造血分化过程中的作用,生成MeCP2敲除iPSC细胞系。工程化改造雄性野生型(WT) 01279iPSC系以敲除MeCP2从而创建**MyCell®**01279.107.3902细胞系。使用TAL核酸酶,通过转染MeCP2 TALEN在MeCP2的甲基CpG结合结构域(图1B)之前插入一系列终止密码子,并且将含有终止密码子插入的供体质粒随后反方向插入侧翼为LoxP的PGKp-嘌呤霉素-SV40pA。用MeCP2TALENs和表达野生型EBNA1的供体质粒p1553转染01279iPSC。包括iPSC 9025、SONL(即,使用Sox-2、Oct-4、Nanog和Lin28重新编程因子进行附加体重新编程的iPSC)、TIPS1e(即,从T细胞分化的iPSC)、HLA-H、Line A和HLA-G的其他iPSC系也用MeCP2TALEN和供体质粒进行转染。

[0278] 选择对于插入是阳性的细胞用于嘌呤霉素选择,然后挑取集落并通过整合PCR进行筛选。在右臂、左臂和主干的所有选择的集落上进行初步筛选。在约第3代(passage3)重新筛选所有集落以通过PCR确认MeCPR2敲除状态。确认PCR后,克隆转变到E8培养基和缺氧条件。在针对筛选所选择的集落中,发现约6-50%被正确地工程化改造。

[0279] 表1:转染后筛选的概述

[0280]

所选集落数量	通过筛选的集落数量	正确地工程化改造的百分比
37	4	10.81%
7	2	28.57%
5	1	20.00%
4	2	50.00%
20	4	20.00%
33	2	6.06%

[0281] 表2工程化改造的MeCPK0 iPSC克隆的概述

[0282]

细胞系	性别	重新编程方法	重新编程因子	用于重新编程的细胞来源	MECP2 状态
9025	雄	附加体	7	祖细胞血液	野生型外显子 3/外显子 4
9025 1553-18-1 P47(3)	雄	附加体	7	祖细胞血液	MeCP2KO 外显子 3
9025 1553-18-4 P47(3)	雄	附加体	7	祖细胞血液	MeCP2KO 外显子 3
9025 1553-18-15 P48(4)	雄	附加体	7	祖细胞血液	MeCP2KO 外显子 3
SONL	雄	病毒	4	祖细胞血液	野生型外显子 3/外显子 4
SONL 1553-7-4 P29(4)	雄	病毒	4	祖细胞血液	MeCP2KO 外显子 3
SONL 1553-8-3 P 29(4)	雄	病毒	4	祖细胞血液	MeCP2KO 外显子 3
Tips1e	雄	病毒	4	T 细胞	野生型外显子 3/外显子 4
Tips1E 1553-9-1 P27(4)	雄	病毒	4	T 细胞	MeCP2KO 外显子 3
HLA-H	雄	附加体	6	祖细胞血液	野生型外显子 3/外显子 4
Line-H 1553-19-1 P20(4)	雄	附加体	6	祖细胞血液	MeCP2KO 外显子 3
Line-H 1553-19-2 P20(4)	雄	附加体	6	祖细胞血液	MeCP2KO 外显子 3
Line A	雄	附加体	6	祖细胞血液	野生型外显子 3/外显子 4
Line A 1553-13-2-A1 P33(11)	雄	附加体	6	祖细胞血液	MeCP2KO 外显子 3
Line A 1553-13-2-A1B2 P33(11)	雄	附加体	6	祖细胞血液	MeCP2KO 外显子 3
Line A 1553-13-2-A1B2 P33(11)	雄	附加体	6	祖细胞血液	MeCP2KO 外显子 3
Line A 1553-14-10-B3 P33(11)	雄	附加体	6	祖细胞血液	MeCP2KO 外显子 3
Line-G	雄	附加体	6	祖细胞血液	野生型外显子 3/外显子 4
Line G 1553-15-17 P21(6)	雄	附加体	6	祖细胞血液	MeCP2KO 外显子 3
Line G 1553-15-20 P21(6)	雄	附加体	6	祖细胞血液	MeCP2KO 外显子 3

[0283] 在对于01279iPSC系的筛选的集落中,96%对于通过两次PCR筛选反应的插入是阳性的。将14个克隆扩增并在第3代筛选,发现8个克隆对于主干质粒的整合是阴性的。因此,通过插入物对剩余的三个克隆进行测序,发现两个克隆是多克隆的。选择一个单克隆系01279.107.3902并进行充分表征以进行进一步研究。还获得了另外的克隆并且表征为正确

工程化改造。MeCP2变体001、002、005和008的氨基酸比对描绘于图1C中。变体008不编码甲基CpG结合结构域。

[0284] 实施例2-用于生产HPC的3D方案

[0285] 将实施例1的01279.107.3902 MeCP2敲除 (MeCP2K0) 细胞和WT 01279细胞进行3D分化方案用于产生HPC (图1A)。首先, iPSC适应缺氧条件, 在Essential8 (E8) 培养基中在包被Matrigel™或玻连蛋白上的无饲养细胞条件下5-10次传代。在补充有5μM布雷他汀的无血清确定 (SFD) 培养基存在下, 以25-50万个细胞/ml的密度, 从亚汇合的iPSC制备聚集体。该过程在含有75% IMDM (Invitrogen 12200-069) (含谷氨酰胺和25mM HEPES+P/S)、25% Hams F12 (Mediatech 10-080-CV)、0.5% N2补充剂 (Invitrogen 17502-048)、不含视黄酸的1% B27补充剂 (Invitrogen 12587-010)、0.05% BSA、50ug/ml 抗坏血酸、GlutaMAX、Pen/Strep 和 4.5×10^{-4} M 单硫代甘油的SFD基础培养基中的超低贴壁 (ULA) 平板或旋转瓶中进行。

[0286] 一旦形成了胚状体 (EB), 通过在前4天用50ng/ml的BMP-4、VEGF和bFGF补充SFD基础培养基来起始分化。在第五天, 将EB培养物置于各自50ng/ml的Flt-3配体、IL3、IL6、SCF和TP0以及5U/ml的肝素存在下。在分化过程中每2天向EB培养物补充一半体积的含有细胞因子的新鲜分化培养基, 直至在缺氧条件下分化的第12-16天。在分化过程后收获细胞, 并通过流式细胞术评估表型, 并使用CFU测定法评估功能能力。

[0287] 对于流式细胞术分析, 收集细胞并用培养基洗涤一次。使用TrypLE™或0.5% 胰蛋白酶在37℃培养箱中消化细胞沉淀5-10分钟, 然后用培养基洗涤并通过70-μm细胞过滤器。将细胞重悬于含有FACS缓冲液的PBS-FBS中, 计数以估计细胞活力并用荧光染料缀合的单克隆抗体进行染色: 抗人CD43 (1G10)、抗人CD31 (WM-59)、抗人CD41 (HIP8); 抗人CD45 (HI30); 抗人CD34 (581, 8G12) (BD Biosciences San Jose, CA); 和抗人CD235。用7-氨基放线菌素D (7-AAD, BD Biosciences) 或PI排除非活细胞。在FACS Calibur™或Accuri流式细胞仪上进行活细胞分析。

[0288] 对于克隆形成造血祖细胞测定法 (CFU测定法), 使用TrypLE或0.5% 胰蛋白酶/EDTA将EB分散到单细胞悬浮液中。对活细胞进行定量, 铺板 (50,000-300,000个细胞/mL), 并使用含有干细胞因子 (SCF) 50ng/mL、促红细胞生成素 (EPO) 3U/mL、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 10ng/mL、白细胞介素-3 (IL-3) 10ng/mL的人甲基纤维素完全培养基 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 在加湿室中测定造血CFC。14天后, 根据它们的形态对集落进行评分, 并定量每铺板 10^5 个细胞的集落。含血清或无血清的MethoCult™培养基 (Stem Cell Technologies) 可用于生成集落。

[0289] 实施例3-MeCP2对红细胞样分化的影响

[0290] 为了确定MeCP2敲除对红细胞样分化的影响, 评估了衍生自iPSC的一组HPC生成成熟红细胞的潜力, 包括MeCP2敲除01279.107.3902 HPC、WT 01279 HPC、iCell® HPC (即, 由正向编程产生的01279细胞)、CD34⁻衍生的级分 (即, 01279细胞的CD34阴性级分)、2D衍生的01279 HPC和脐带血HPC (PCT公开号W02012/109208)。

[0291] 为了诱导造血分化, 使用EDTA收获iPSC细胞, 并将其置于低贴壁平板中的无血清EB基础培养基中12小时, 以促进聚集体形成。SFD在前4天补充骨形态发生因子 (BMP-4)、血管内皮生长因子 (VEGF) 和斑马鱼FGF-2, 然后用补充有Flt-3配体 (Flt-3L)、白细胞介素-3 (IL-3)、白细胞介素-6 (IL-6)、血小板生成素 (TP0)、肝素和干细胞因子 (SCF) 的培养基孵育

接下来的8天。收获得到的HPC,通过流式细胞术定量CD43/CD34细胞的百分比(图2A)。通过将生成的HPC的绝对数量除以iPS细胞的输入数量来计算该过程的效率(图2B)。

[0292] 为了从衍生自iPSC的HPC生成成人成红细胞,将细胞以 $0.5-1 \times 10^6$ 个细胞/mL的密度在原始红细胞扩增培养基(pEEM)中培养1-2周(图3)。pEEM培养基包含补充有0.3%Excyte (Serologicals)、全转铁蛋白(1mg/ml, Sigma)、氢化可的松(1mM, Sigma)、SCF (50ng/ml, R&D Systems)、EPO (2 U/ml, R&D Systems)、IL-3 (5ng/ml)、IL-6 (10ng/ml) 和TPO (50ng/ml) 的SFEM培养基。2周后,观察到该阶段培养的细胞具有CD71、CD235和CD36的表面表达。因此,细胞正在向红细胞样谱系分化。MeCP2KO细胞表现出比MeCP2WT细胞更高水平的CD235阳性细胞(表3)。

[0293] 表3:在分化的第16天,在含有MeCP2KO的iPS细胞克隆中增强的CD235表达

	IPSC 克隆	MeCP 中状态	CD235 表达
[0294]	01279.107.03902	MeCP2KO	26%
	01279	MeCP2 WT	7.5%

[0295] 相反,为了将HPC向红细胞样分化进行分化,在红细胞扩增培养基(EEM)中培养HPC。EEM培养基包含补充有0.3%Excyte (Serologicals)、全转铁蛋白(1mg/ml, Sigma)、氢化可的松(1mM, Sigma)、SCF (50ng/ml, R&D Systems) 和EPO (2U/ml, R&D Systems) 的SFEM培养基。细胞在接下来的1-2周内保留在该培养基中,并且每隔一天用新鲜培养基更换进行送料。在2周结束时观察到富集的红细胞样细胞群的存在,揭示了80-90%表达CD71、CD235a和CD36。

[0296] 通过测量在分化的第2-8周对于细胞表面标志物CD71、CD235a、CD36、CD71/235a、CD235a/36和CD71/36是阳性的细胞的百分比来进行多种HPC细胞系显示的红细胞样分化的进一步分析(图4A-4C)。发现01279.107.3902 HPC具有对于成红细胞的细胞表面标志物是阳性的细胞的显著更高百分比。因此,尽管显示在分化的4周,除了iCell® HPC之外的所有细胞系都分化为红细胞,但MeCP2KO增强了红细胞的产生。

[0297] 接下来,在超过9周的红细胞样分化过程中测量每种HPC细胞系的细胞计数。虽然观察到大多数细胞系在分化过程中细胞数量已经减少,但01279.107.3902细胞从第0周到第4周具有增加的细胞计数。此外,与其他细胞系相比,01279.107.3902细胞从第4周至第6周具有红细胞标志物血型糖蛋白A (CD235a) 的增加表达。

[0298] 然后将细胞针对CD235a和各种球蛋白包括β珠蛋白、γ珠蛋白和ε珠蛋白进行共染色。观察到从01279.107.3902细胞系分化的7和8周龄细胞具有大比例的β珠蛋白阳性细胞和低百分比的ε珠蛋白阳性细胞(图5A-5B、6)。在红细胞样分化过程中,与01279 HPC相比,01279.107.3902细胞具有高水平的β珠蛋白表达。另一方面,01279.107.3902细胞具有低表达的ε表达。此外,从01279.107.3902细胞系分化的红细胞的Wright染色显示去核。因此,01279.107.3902细胞系分化为更成熟的红细胞显示出相对于WT 01279 HPC细胞系具有更高水平的β珠蛋白。因此,MeCP2KO促进衍生自iPSC的红细胞的成熟。

[0299] 实施例4-MeCP2敲除对淋巴样分化的影响

[0300] 为了确定MeCP2敲除对淋巴样分化的影响,使细胞系经历用于T细胞和NK细胞分化的培养条件。首先,在基质依赖性方案中针对T细胞分化测试了几个变量。针对基质系上的T

细胞潜能测试从不同细胞系产生的第12天HPC,所述基质系包括OP9骨髓基质细胞和MS5鼠骨髓基质细胞。将细胞在含有20%FBS、10ng/mL SCF、5ng/mL Flt-3和5ng/mL IL-7的 α MEM培养基中培养。每周三次通过半培养基更换来更新细胞。针对T细胞的存在对细胞的分析表明,细胞具有生产骨髓细胞的倾向,并且不能检测到CD3⁺细胞的存在。此外,基质共培养物在缺氧条件下表现不佳。

[0301] 因此,开发了无饲养细胞T细胞分化方案。将HPC以约5,000至约25,000个细胞/cm²的细胞密度铺板在以0.5 μ g/cm²包被Retronectin和Notch DLL4的未处理组织培养平板上。HPC在补充有1%Glutamax、1%青霉素链霉素、95 μ M抗坏血酸(WAKO labs)以及50ng/mL的IL-7、SCF、Flt-3和TP0 (Peprotech)的StemSpan无血清扩增培养基(SFEM; StemCell Technologies)培养基中培养。每48小时补充培养基,并且在2周将细胞非酶促地分裂成新的包被配体的平板。此外,在2至3周之间,通过细胞表面标志物CD5和CD7针对前T细胞的存在分析细胞。在4周,通过细胞表面标志物CD3、CD4和CD8针对T细胞的存在分析细胞。在6-8周,使用细胞表面标志物CD4、CD8、CD3、CD94和CD56针对T和NK细胞的存在分析细胞。

[0302] 测试其对T细胞分化的影响的参数之一是培养平板上基质涂层的选择。通过在铺板后3周用脐带血细胞使用与具有Notch DLL4的各种基质组合分析无血清条件下的前T细胞的出现来进行比较。结果显示,与玻连蛋白或生腱蛋白的组合相比,retroectin与DLL4的组合在将脐带血细胞分化为前T细胞方面更有效(表4)。

[0303] 表4:针对淋巴样分化的基质选择。在Retronectin-DLL4上铺板的细胞揭示前T细胞(CD5⁺/CD7⁺)细胞的存在

	用于 T 细胞分化的基质	%CD5	%CD7	%CD5/CD7
[0304]	Retronectin-DLL4	11%	40%	11%
	生腱蛋白-DLL4	0.7%	5.2%	0.7%
	玻连蛋白-DLL4	0.6%	6%	0.6%

[0305] 令人惊讶的是,发现缺氧条件增强了无饲养细胞的T细胞分化。具体地,观察到与在常氧条件下分化的细胞相比,缺氧导致CD8阳性细胞百分比的增加和CD4阳性细胞百分比的降低(表5)。

[0306] 表5:缺氧有利于T细胞分化。在缺氧条件下分化的细胞揭示了T细胞和NK细胞的存在。

[0307]

用于 T 细胞分化的基质	CD3	CD4	CD8	CD3/CD4	CD3/CD4	CD4/CD8	CD56+/CD3-(NK 细胞)
缺氧	7%	11.4%	49%	2.6%	2%	5.6%	28%
常氧	0.2	57%	4.7%	0	0	0	6%

[0308] 表6:针对淋巴样分化测试的iPSC细胞系的概述

[0309]

细胞系	重新编程方法	用于重新编程的来源材料	MeCP2 状态	
01279	附加体	祖细胞血液	野生型外显子 3/外显子 4	雄
01279.107.3904	附加体	祖细胞血液	野生型外显子 3/外显子 4	雄
01279.107.3902	附加体	祖细胞血液	MeCP2KO 外显子 3	雄
01279.107.3905	附加体	祖细胞血液	MeCP2KO 外显子 3	雄
01279.107.3906	附加体	祖细胞血液	MeCP2KO 外显子 3	雄
01279.107.3907	附加体	祖细胞血液	MeCP2KO 外显子 3	雄
01279.107.3908	附加体	祖细胞血液	MeCP2KO 外显子 3	雄
TiPS1E	病毒	T 细胞	野生型外显子 3/外显子 4	雄
1.025T	病毒	T 细胞	野生型外显子 3/外显子 4	雌
2.022B	附加体	LCL	野生型外显子 3/外显子 4	雄
2.0224B	附加体	LCL	野生型外显子 3/外显子 4	雌
01501.102	附加体	祖细胞血液	野生型外显子 3/外显子 4	雄

[0310] 实施例2中描述的,通过在HPC分化的第5天、第7天、第9天和第11天收获01279.107.3902、01279.107.3905、01279.107.3906、01279.107.3907和01279.107.3908克隆来分析MeCP2敲除克隆在分化为淋巴样谱系的效率。将在先前描述的时间点冷冻保存的HPC细胞解冻,并铺板在包被Retronectin和DLL4的平板上。每2天用新鲜培养基给细胞送料,并针对HPC细胞解冻后2周的前T细胞标志物(图13A,13B)、4周的T和NK细胞标志物进行分析。在前T细胞标志物的分析中,除野生型01279.107.3904细胞外的所有细胞都存在被鉴定为CD5⁺CD7⁺、CD7⁺CD45⁺和CD5⁺CD45⁺的前T细胞。用于鉴定在分化的第18天体外生成的淋巴样细胞的门控策略描述于图7和8中。使用碘化丙锭进行FSC-SSC散点和淋巴样散点内的活细胞门控,然后通过流式细胞术针对CD7和CD5阳性细胞进行染色以及针对CD3 APC、CD8 PE和CD56 FITC进行染色以鉴定群体中的T细胞(CD3⁺/CD8⁺)和NK/T细胞(CD3⁺/CD56⁺) (图9)。针对CD45、CD7和CD5 (图10) 以及CD56、CD8和CD3 (图11) 的表面表达对细胞进行染色,并定量T、NK和NK/T细胞的存在。

[0311] 由于已知细胞的输入数量,确定了T(CD3⁺/CD8⁺)、NK(CD3⁻/CD56⁺)和NK/T细胞(CD3⁺/CD56⁺)的绝对数量。通过细胞类型(T、NK或NK/T)的绝对数量/总细胞的输入数量的比率(图12A)或通过细胞类型的绝对数量/HPC的输入数量的比率(图12B)来计算该过程的效率。在FSC-SSC门和淋巴样散点门下通过流式细胞术定量T细胞(CD3⁺/CD8⁺)的百分比(图13)和NK细胞(CD3⁻/CD56⁺)的百分比(图14)。也确定出现的NK/T(CD3⁺/CD56⁺) (图15)、(CD3⁺/CD8⁺) (图16)、NK/T(CD3⁺/CD56⁺)和NK(CD3⁻/CD56⁺) (图17)细胞的量。进一步分析显示CD235/CD7、CD144⁺/DLL4⁺和Flk-1⁺/CD34⁺的表达在分化的第11天下降(图18)。由于在分化的第11天不存在淋巴样细胞,这可能意味着这些标志物表达的某些阈值水平对于在DLL4存在下引发细胞向淋巴细胞分化是必需的。

[0312] 最近的研究(Oberlin等人,2010)证明存在表达VE-钙粘蛋白(CD144)的群体,其构成小于总人肝细胞的0.6%。该群体共表达CD34和CD45,并且其表现出比CD144-CD34⁺CD45⁺对应物更大的自我更新、增殖和分化能力,如通过体外造血测定法和非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠的长期移植实验所评估的。

[0313] 在iPSC衍生的HPC生成期间,表达CD144的细胞也表达Notch-DLL4。确定的HSC的定

义是它们在成人受体中长期、多谱系植入的能力此后在动脉血管中被检测到,例如已知为主动脉-性腺-中肾 (AGM) 区域的背主动脉,并随后是至胎儿肝脏的归巢,其中HSC在接种骨髓之前经历进一步成熟和显著的增殖扩增 (Kieusseian等人,2012)。Notch途径对于确定的HSC是必需的。Notch DLL4在双潜能造血祖细胞的亚群中的造血分化期间表达 (Oberlin等人,2010;Ayllon等人,2015)。表达高水平DLL4的细胞显示出注定至内皮命运,而表达低水平DLL4的细胞具有指向造血命运的偏向,但与表达高DLL4的细胞的驻留位置非常接近。由于体外淋巴样分化是在Notch DLL4存在下进行的,因此淋巴祖细胞可以是表达低水平DLL4的VE-钙粘蛋白阳性细胞。另外,人脐带血中的少量淋巴祖细胞被鉴定为CD34^{hi}CD45RA^{hi}CD7⁺ (Haddad等人,2004)。为了在iPSC衍生的HPC分化期间在表型上鉴定淋巴祖细胞,使用VE-钙粘蛋白 (CD144)、泛白细胞抗原CD45、血液内皮标志物CD34和次要淋巴样祖细胞CD7进行分选实验。

[0314] 为了鉴定淋巴样细胞的表型特征,使用来自TiPSC 1E和3902细胞的第8天HPC祖细胞,使用随着淋巴样潜能丧失而下降的标志物的列表,进行磁性分选策略。第8天收获HPC祖细胞并进行个体化,然后置于4种条件下进行磁性分选,如表5所述。分选后获得的阳性和阴性级分以25k/cm²的密度铺板以诱导在包被Ret-DLL4的基质12孔平板以及24孔平板上的T细胞分化。如前所述在缺氧条件下进行T细胞分化。

[0315] T细胞标志物的分析 (图19) 显示MeCP2 KO细胞系而非MeCP2 WT细胞系具有淋巴样分化的潜力。来自MeCP2 WT细胞的第9天HPC祖细胞基本上没有CD3⁺CD8⁺ T细胞,而测试的其他HPC祖细胞分化为CD3⁺CD8⁺ T细胞群。因此,敲除MeCP2的甲基结合结构域增强了HPC祖细胞产生T和NK细胞的潜力。

[0316] 实施例5-分化为β细胞

[0317] MeCP2WT和MeCP2KO iPS细胞也分化为能够生成单激素β细胞的DE细胞和EPC。该过程的示意图在图21中提供。图23C中提供了胰腺分化过程的阶段。整个分化在缺氧条件下进行。

[0318] 将悬浮培养中生成的EPC置于分化培养基中用于生成胰腺细胞类型。对于EP细胞的胰腺分化,使用了由Nostro等人,2011描述的Cheng等人,2012a进一步修改的方案。在缺氧条件下,整个过程继续作为3D培养。

[0319] 将EPC培养物扩增15天,并在含有Wnt3A (3ng/ml)、FGF-10 (50ng/ml) 和Dorsomorphin (0.75μM) 的SFD培养基中培养3天,以生成前肠/中肠内胚层细胞。在含有GlutaMAX (1%)、不含视黄酸的B27 (1%)、抗坏血酸 (50μg/ml)、Pen/Strep (1%)、KAAD-环巴胺 (0.25μM)、反式维甲酸 (2μM)、Noggin (50ng/ml) 和FGF-10 (50ng/ml) 的高葡萄糖DMEM培养基中培养细胞三天以生成胰腺内胚层细胞。在该步骤之后,将细胞在含有GlutaMAX (1%)、不含视黄酸的B27 (1%)、抗坏血酸 (50g/ml)、Pen/Strep (1%)、SB431542 (6μM) 和Noggin (50ng/ml) 的高葡萄糖DMEM培养基中培养三天。接下来,将细胞在补充有分泌酶抑制剂 (DAPT, 2μM) 的先前的葡萄糖DMEM培养基中培养一至两天。从该阶段开始,将细胞在含有葡萄糖 (40mM)、烟酰胺 (10mM)、SB431542 (6μM) 和Noggin (50ng/ml) 的SFD培养基中培养一至两天。最后,将细胞在含有SB431542 (5.4μM)、Noggin (50ng/ml)、胰岛素 (800pM) 和烟酰胺 (10mM) 的SFD培养基中培养,在接下来的10天内每天在具有另外添加的葡萄糖 (40mM) 和没有另外添加的葡萄糖的这种培养基之间交替。在2D形式的分化的第10-15天之间检测到单

激素β细胞的存在。

[0320] 在分化的第21-25天收获β细胞培养物,固定并染色用于通过细胞内流式细胞术来定量PDX1/NeuroD1/C肽/胰高血糖素/生长抑素(图24、25、26)。末期培养揭示单激素细胞的存在。末期培养物对PDX1、NeuroD1和一些水平的NKX6.1是阳性的。末期聚集体揭示对葡萄糖的反应性(图27)。

[0321] 实施例6-MeCP2K0对HPC分化的影响

[0322] 将含有MeCP2WT或MeCP2K0的iPSC克隆在E8/Matrigel上适应缺氧进行5-10次传代,并进行3D分化方案用于产生HPC。在补充有5μM布雷他汀的SFD培养基存在下,以25-50万个细胞/ml的密度,从亚汇合的iPSC制备聚集体。该过程在ULA平板或旋转瓶中在含有75% IMDM、25% Hams F12、N2补充物、不含视黄酸的B27补充物、0.05% BSA、50ug/ml抗坏血酸、GlutaMAX、Pen/Strep和 4.5×10^{-4} M单硫代甘油的SFD基础培养基中进行。一旦EB形成,通过在前4天用50ng/ml的BMP-4、VEGF和bFGF补充SFD基础培养基来起始分化。在分化EB的第五天,将培养物置于各自50ng/ml的Flt-3配体、IL3、IL6、SCF、肝素和TPO存在下。在HPC分化的第9天收获聚集体并定量造血细胞的出现。

[0323] CD43(图28)、CD34(图29)、CD34/CD43(图30)、CD45(图31)、CD235(图32A,图32B)和DLL-4的表达通过流式细胞术进行定量。还定量了将一种iPSC转化为一种HPC(34/43)细胞的效率(图34)。整个HPC分化在缺氧条件下进行。观察到,通常,在HPC分化的第9天,MeCP2K0导致CD43、CD34、CD43/CD34、CD45、CD235和DLL4阳性细胞的更高百分比。此外,敲除MeCP2导致将iPSC分化为HPC的效率提高约2-7倍。

[0324] 实施例7-MeCP2K0对生成小胶质细胞的影响

[0325] 将含有MeCP2WT或MeCP2K0的iPSC克隆在E8/Matrigel上适应缺氧5-10次传代,并进行3D分化方案用于产生HPC。在补充有5μM布雷他汀的SFD培养基存在下,以25-50万个细胞/ml的密度,从亚汇合的iPSC制备聚集体。该过程在ULA平板或旋转瓶中在含有75% IMDM、25% Hams F12、N2补充物、不含视黄酸的B27补充物、0.05% BSA、50ug/ml抗坏血酸、GlutaMAX、Pen/Strep和 4.5×10^{-4} M单硫代甘油的SFD基础培养基中进行。

[0326] 一旦EB形成,通过在前4天用50ng/ml的BMP-4、VEGF和bFGF补充SFD基础培养基来起始分化。在分化EB的第五天,将培养物置于各自50ng/ml的Flt-3配体、IL3、IL6、SCF、肝素和TPO存在下。根据Abud等人,2017描述的方法,在HPC分化的第9天收获聚集体,并以 $10-15k/cm^2$ 的细胞密度铺板在包被Matrigel的平板上,以起始小胶质细胞分化。在缺氧条件下进行HPC分化,而在常氧条件下进行小胶质细胞分化。

[0327] 在分化的前22天,向细胞送料含有25ng/ml MCSF、50ng/ml TGFβ和100ug/ml IL-34的小胶质细胞分化培养基。将细胞置于含有25ng/ml MCSF、50ng/ml TGFβ、100μg/ml IL-34、CD200和CXCL1的小胶质细胞成熟培养基中。在第27天收获细胞,并通过细胞内流式细胞术针对P2RY、TREM-2、IBA和CX3CR1的存在进行染色,以证实在末期培养物中出现小胶质细胞。通过流式细胞术定量分化过程结束时末端小胶质细胞的纯度(图36),并定量从一种HPC产生小胶质细胞的效率(图37)。观察到MeCP2的敲除导致小胶质细胞群的纯度增加,如通过IBA、P2RY和TREM-2阳性细胞的百分比所确定的。

[0328] 实施例8-MeCP2K0对生成淋巴样细胞的影响

[0329] 将含有MeCP2WT或MeCP2K0的iPSC克隆在E8/Matrigel上适应缺氧5-10次传代,并

进行3D分化方案用于生成HPC。在补充有5 μ M布雷他汀的SFD培养基存在下,以25–50万个细胞/ml的密度,从亚汇合的iPSC制备聚集体。该过程在ULA平板或旋转瓶中在含有75%IMDM、25%Hams F12、N2补充物、不含视黄酸的B27补充物、0.05%BSA、50 μ g/ml抗坏血酸、GlutaMAX、Pen/Strep和4.5 $\times 10^{-4}$ M单硫代甘油的SFD基础培养基中进行。

[0330] 一旦EB形成,通过在前4天用50ng/ml的BMP-4、VEGF和bFGF补充SFD基础培养基来起始分化。在分化EB的第五天,将培养物置于各自50ng/ml的Flt-3配体、IL3、IL6、SCF、肝素和TPO存在下。在HPC分化的第9天收获聚集体,并以25k/cm²的细胞密度铺板在包被ret-DLL4的平板上。分化的前14天在缺氧条件下,用含有50ng/ml SCF、TPO、IL-7和Flt-3配体的T细胞分化培养基给细胞送料。在两周结束时收获细胞,并通过流式细胞术定量前T祖细胞(CD45/CD7) (图38B) 和(CD7/CD5) (图38C) 细胞的百分比。用于前T细胞(CD5/CD7)的FACS谱的快照描绘于(图38A)中。

[0331] 将出现的前T细胞置于新鲜的包被Ret-DLL4的平板上,并在含有50ng/ml的SCF、TPO、IL-7、Flt-3配体和10U/ml IL-2的培养基中继续分化另外的2周。在(图39A)中描绘了T细胞(CD3/CD8)的FACS谱的快照。对各种WT和MeCP2K0克隆进行总CD3、细胞毒性T(CD3⁺/CD8⁺)、NK(CD3⁻/CD56)和NK/T细胞(CD3⁺/CD56⁺)的定量。SONL(图39B)、iPSC 9025(图39C)、iPSC Line A(图39D)、Line F(图39E)、Line H(图39F)。因此,MeCP2K0 iPSC能够用于从iPSC有效地生成T和NK/T细胞。

[0332] 实施例9–MeCP2K0对肝细胞成熟的影响

[0333] 如图21中所描述的,MeCP2WT或MeCP2K0 iPSC系分化为定形内胚层细胞。然后按照图40所示的方案将定形内胚层细胞进一步分化为肝细胞。整个分化过程在缺氧条件下进行,直至分化过程的第25天。简而言之,在补充有BMP4 (50ng/mL)、bFGF (10ng/mL)、EGF (10ng/mL)、VEGF (10ng/mL)、HGF (100ng/mL)、Dex (0.1 μ M)、DMSO (1%) 和FGF-10 (60ng/mL)的SFD培养基中,将DE细胞以2D培养约6天。然后在补充有bFGF (10ng/mL)、EGF (20ng/mL)、VEGF (10ng/mL)、HGF (100ng/mL)、OSM (20ng/mL)、Dex (0.2 μ M)、DMSO (1%)、DAPT (2 μ M) 和维生素K (6 μ g/mL)的SFD培养基中将细胞重新铺板在胶原上约6天。对于第3阶段,将细胞以2D在补充有B27 (1x)、EGF (20ng/mL)、OSM (20ng/mL)、Dex (0.1 μ M)、GlutaMAX (1%) 和Pen/Strep (1%)的William's E培养基中铺板。

[0334] 使用Accumax收获末期肝细胞,并染色观察通过进行细胞内流式细胞术针对 α -1-抗胰蛋白酶(AAT)的存在和白蛋白表达。已知AAT和白蛋白是成体肝细胞的标志物,并且观察到与从MeCP2WT iPSC分化的肝细胞相比,从MeCP2K0 iPSC分化的肝细胞具有更高的白蛋白表达。因此,MeCP2K0 iPSC能够用于有效地生成更成熟的肝细胞。

[0335] 实施例10–对从MeCP2K0 iPSC产生成红细胞的表征

[0336] 将含有MeCP2WT或MeCP2K0的iPSC克隆在E8/Matrigel上适应缺氧5–10次传代并进行3D分化方案用于产生HPC。在补充有5 μ M布雷他汀的SFD培养基存在下,以25–50万个细胞/ml的密度,由亚汇合的iPSC制备聚集体。该过程在ULA平板或旋转瓶中在含有75%IMDM (Invitrogen 12200-069) (含谷氨酰胺和25mM HEPES+P/S)、25%Hams F12 (Mediatech10-080-CV)、0.5%N2补充剂 (Invitrogen 17502-048)、不含视黄酸的1%B27补充剂 (Invitrogen 12587-010)、0.05%BSA、50 μ g/ml抗坏血酸、GlutaMAX、Pen/Strep和4.5 $\times 10^{-4}$ M单硫代甘油的SFD基础培养基中进行。

[0337] 一旦EB形成,通过在前4天用50ng/ml的BMP-4、VEGF和bFGF补充SFD基础培养基来起始分化。在分化EB的第五天,将培养物置于各自50ng/ml的Flt-3配体、IL3、IL6、SCF、肝素和TPO存在下。在HPC分化的第9天收获聚集物并定量造血细胞的出现。

[0338] 为了从衍生自iPSC的HPC生成成人成红细胞,将细胞在原始红细胞扩增培养基(pEEM)中以 $0.5-1 \times 10^6$ 个细胞/mL的密度培养1-2周。pEEM培养基包含补充有0.3%Excyte (Serologicals)、全转铁蛋白(1mg/ml, Sigma)、氢化可的松(1mM, Sigma)、SCF(50ng/ml, R&D Systems)、EPO(2U/ml, R&D Systems)、IL-3(5ng/ml)、IL-6(10ng/ml)和TPO(50ng/ml)的SFEM培养基。从分化的2-7周针对糖蛋白(CD235)的存在对细胞进行染色。经历红细胞样分化的每个克隆的CD235表达的动力学描述于图42中。观察到,通常,从具有MeCP2K0的iPSC分化的红细胞在红细胞样分化期间具有更早出现的CD235表达和更高百分比的CD235阳性的细胞。

[0339] 从红细胞样分化的第2-7周,针对CD235a和多种球蛋白包括 β 珠蛋白、 γ 珠蛋白和 ϵ 珠蛋白对细胞进行共染色。iPSC SONL MeCP2K0(图43A)、SONL MeCP2WT(图43B)、iPSC TIPS MeCP2K0(图44A)、TIPS MeCP2WT(图44B)、iPSC 9025 MeCP2K0(图45A)、9025 MeCP2WT(图45B)、iPSC LineA MeCP2K0(图46A)、LineA MeCP2WT(图46B)、iPSC LineH MeCP2K0(图47A)、LineH MeCP2WT(图47B)、iPSC LineG MeCP2K0(图48A)和LineG MeCP2WT(图48B)。对于从MeCP2K0细胞系分化的所有红细胞, β 珠蛋白的表达伴随着胚胎 ϵ 珠蛋白水平的下降,表明从胚胎变为成体球蛋白。这伴随着胎儿 γ 球蛋白水平的降低。因此,来自MeCP2K0 iPSC的红细胞比从MeCP2WT iPSC分化的红细胞更成熟。

[0340] ***

[0341] 根据本公开内容,无需过度实验即可制备和实施本文公开和要求保护的所有方法。虽然已经根据优选实施方案描述了本发明的组合物和方法,但是对于本领域技术人员显而易见的是,可以对本文描述的方法和步骤或步骤顺序进行变化,而不脱离本发明的概念、精神和范围。更具体地,显而易见的是,化学和生理学相关的某些试剂可以代替本文所述的试剂,同时可以获得相同或相似的结果。对于本领域技术人员显而易见的所有这些类似的替代和修改都被认为是在由所附权利要求限定的本发明的精神、范围和概念内。

[0342] 参考文献

[0343] 在以下参考文献中,它们提供了补充本文所述那些的示例性程序或其他细节,通过引用具体地并入本文。

[0344] Abboud et al., Blood, 58:1148-1154, 1981.

[0345] Abdul et al., Neuron, 2017.

[0346] Akkina et al., J. Virol., 70:2581-2585, 1996.

[0347] Alexander et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5092-5096, 1988.

[0348] Anderson, Science 256:808-813, 1992.

[0349] Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., MA, 1996.

[0350] Ayllon et al., Leukemia 29(8):1741-1753, 2015.

[0351] Beerli et al. Nature Biotechnol. 20:135-141, 2002.

- [0352] Bhatnagar, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2014.
- [0353] Bird A. Nature. 1986; 321: 209-13, 1986.
- [0354] Bird, A. Biochem. Soc. Trans., 36: 575-583, 2008.
- [0355] Biswas et al., Annals NY Acad. Sci., 590: 582-583, 1990.
- [0356] Biswas et al., J. Clin. Microbiol., 29: 2228-2233, 1991.
- [0357] Blomer et al., J. Virol., 71 (9): 6641-6649, 1997.
- [0358] Chen and Okayama, Mol. Cell Biol., 7 (8): 2745-2752, 1987.
- [0359] Cheng et al., Cell Stem Cell 10 (4): 371-384, 2012.
- [0360] Choo et al. Curr. Opin. Struct. Biol. 10: 411-416, 2000.
- [0361] Critchlow and Jackson, Trends Biochem Sci. 23 (10): 394-8, 1998.
- [0362] Dillon. TIBTECH 11: 167-175, 1993.
- [0363] Doulatov et al., Cell Stem Cell. 10: 120-36, 2012.
- [0364] Ercolani et al., J. Biol. Chem., 263: 15335-15341, 1988.
- [0365] Evans, et al., In: Cancer Principles and Practice of Oncology, Devita et al. (Eds.), Lippincott-Raven, NY, 1054-1087, 1997.
- [0366] Fauser et al., Stem Cells, 1: 73-80, 1981
- [0367] Fechheimer et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 84: 8463-8467, 1987.
- [0368] Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 3348-3352, 1979.
- [0369] Frisan et al., Epstein-Barr Virus Protocols, Part III, 125-127, 2001
- [0370] Furie and Furie, Cell 53: 505-518, 1988.
- [0371] Gaj et al., Trends in Biotechnology 31 (7), 397-405, 2013.
- [0372] Golde et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 593-596, 1980.
- [0373] Graham and Van Der Eb, Virology, 52: 456-467, 1973.
- [0374] Haddad et al., Blood 104 (13): 3918-3926, 2004.
- [0375] Haddada et al., in Current Topics in Microbiology and Immunology, 1995.
- [0376] International Publication No. WO 94/09699
- [0377] International Publication No. WO 95/06128
- [0378] International Publication No. WO 96/39487
- [0379] Isalan et al. Nature Biotechnol. 19: 656-660, 2001.
- [0380] Jaenisch, Science 240: 1468-1474, 1988.
- [0381] Jones PA and Takai D. Science. 293: 1068-70, 2001.
- [0382] Kaeppler et al., Plant Cell Reports 9: 415-418, 1990.
- [0383] Karin et al. Cell, 36: 371-379, 1989.
- [0384] Kato et al, J. Biol. Chem., 266: 3361-3364, 1991.
- [0385] Kaufman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98: 19, 2001.
- [0386] Kieusseian, A., P. Brunet de la Grange, O. Burlen-Defranoux, I. Godin and A. Cumano (2012). "Immature hematopoietic stem cells undergo maturation in the fetal liver." Development 139 (19): 3521-3530.
- [0387] Kim et al. J. Biol. Chem. 269: 31, 978-31, 982, 1994b.

- [0388] Kim et al.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:883-887,1994a.
- [0389] Kim et al.,J.Virol.,66:3879-3882,1992.
- [0390] Kim et al.,Nature Biotechnology 31,251-258,2013.
- [0391] Knust et al,EMBO J.761-766,1987.
- [0392] Kremer&Perricaudet,British Medical Bulletin 51(1):31-44,1995.
- [0393] Ladi et al.,Nature Immunology,7:338-343,2006.
- [0394] Langle-Rouault et al.,J.Virol.,72(7):6181-6185,1998.
- [0395] Lappalainen et al.Clin.Experim.Allergy,37:1404-1414,2007.
- [0396] Levitskaya et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,94(23):12616-12621,1997.Li et al.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4275-4279,1992.
- [0397] Lloyd et al.,Frontiers in Immunology,4(221):1-7,2013.
- [0398] Ludwig et al.Nature Biotech.,(2):185-187,2006a.
- [0399] Ludwig et al.Nature Methods,3(8):637-646,2006b.
- [0400] Lysis,Blood,57:13-21,1981.
- [0401] Macejak and Sarnow,Nature,353:90-94,1991.
- [0402] Maniatis,et al.,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1988.
- [0403] Mann et al.,Cell,33:153-159,1983.
- [0404] Marshall et al.,Blood,96:1591-1593,2000.
- [0405] Miller,Nature 357:455-460,1992.
- [0406] Minskaia and Ryan,2013
- [0407] Mitani&Caskey,TIBTECH 11:162-166,1993.
- [0408] Nabel&Feigner,TIBTECH 11:211-217,1993.
- [0409] Nabel et al.,Science,244(4910):1342-1344,1989.
- [0410] Naldini et al.,Science,272(5259):263-267,1996.Zufferey et al.,Nat.Biotechnol.,15(9):871-875,
- [0411] Ng,Nuc.Acid Res.,17:601-615,1989.
- [0412] Nicola,et al.,Blood,54:614-627,1979.
- [0413] Nicolas and Rubenstein,In:Vectors:A survey of molecular cloning vectors and their uses,Rodriguez and Denhardt,eds.,Stoneham:Butterworth, pp.494-513,1988.
- [0414] Nicolau and Sene,Biochim.Biophys.Acta,721:185-190,1982.
- [0415] Nicolau et al.,Methods Enzymol.,149:157-176,1987.
- [0416] Nostro et al.,Development 138:861-871,2011.
- [0417] Notta et al.,Science,218-221,2011.
- [0418] Oberlin et al.,Blood 116(22):4444-4455,2010.
- [0419] Okabe,J.Cell.Phys.,110:43-49,1982.
- [0420] Orkin et al.,Blood 120(15):2945-2953,2012.
- [0421] Pabo et al.Ann.Rev.Biochem.70:313-340,2001.

- [0422] Paskind et al., Virology, 67:242-248, 1975.
- [0423] Patent Publication No. EP1507865
- [0424] PCT Publication No. WO 2006/050330
- [0425] PCT Publication No. WO 2007/069666
- [0426] Pelletier and Sonenberg, Nature, 334 (6180):320-325, 1988.
- [0427] Potrykus et al., Mol. Gen. Genet., 199 (2):169-177, 1985.
- [0428] Potter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:7161-7165, 1984.
- [0429] Quitsche et al., J. Biol. Chem., 264:9539-9545, 1989.
- [0430] Richards et al., Cell, 37:263-272, 1984.
- [0431] Rippe, et al., Mol. Cell Biol., 10:689-695, 1990.
- [0432] Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. Cold Spring Harbor
- [0433] Schernthaner et al., Blood, 98:3784-3792, 2001.
- [0434] Scicchitano et al., Exp Hematol. 31:760-9, 2003.
- [0435] Segal et al. Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637, 2001.
- [0436] Slukvin et al. In: Directed Production of Specific Blood Lineages from Human Embryonic Stem Cells, #33, ASCI/AAP Joint Meet. Posters, 2007.
- [0437] Suzuki et al, EMBO J. 6:1891-1897, 1987.
- [0438] Takahashi et al., Cell, 131 (5):861-872, 2007.
- [0439] Temin, In: Gene Transfer, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.
- [0440] Tur-Kaspa et al., Mol. Cell Biol., 6:716-718, 1986.
- [0441] 美国专利申请号 08/464,599
- [0442] 美国专利申请号 12/478,154
- [0443] 美国专利申请号 12/715,136
- [0444] 美国专利申请号 2007/0077654
- [0445] 美国专利申请号 2009/0246875
- [0446] 美国专利申请号 2010/0210014
- [0447] 美国专利申请号 2011/0059502
- [0448] 美国专利申请号 2011/0104125
- [0449] 美国专利申请号 2011/0301073
- [0450] 美国专利申请号 2012/0276636
- [0451] 美国专利申请号 2013/0315884
- [0452] 美国专利申请号 2014/0120622
- [0453] 美国专利申请号 2015/0191697
- [0454] 美国专利申请号 61/088,054
- [0455] 美国专利号 4,683,202
- [0456] 美国专利号 4,897,355
- [0457] 美国专利号 4,946,787

- [0458] 美国专利号5,030,015
- [0459] 美国专利号5,049,386
- [0460] 美国专利号5,302,523
- [0461] 美国专利号5,322,783
- [0462] 美国专利号5,384,253
- [0463] 美国专利号5,464,765
- [0464] 美国专利号5,486,359
- [0465] 美国专利号5,538,877
- [0466] 美国专利号5,538,880
- [0467] 美国专利号5,550,318
- [0468] 美国专利号5,556,954
- [0469] 美国专利号5,563,055
- [0470] 美国专利号5,580,859
- [0471] 美国专利号5,589,466
- [0472] 美国专利号5,591,616
- [0473] 美国专利号5,610,042
- [0474] 美国专利号5,656,610
- [0475] 美国专利号5,702,932
- [0476] 美国专利号5,736,524
- [0477] 美国专利号5,780,448
- [0478] 美国专利号5,789,215
- [0479] 美国专利号5,843,780
- [0480] 美国专利号5,928,906
- [0481] 美国专利号5,945,100
- [0482] 美国专利号5,981,274
- [0483] 美国专利号5,994,136
- [0484] 美国专利号5,994,624
- [0485] 美国专利号6,013,516
- [0486] 美国专利号6,103,470
- [0487] 美国专利号6,200,806
- [0488] 美国专利号6,416,998
- [0489] 美国专利号7,029,913
- [0490] 美国专利号7,442,548
- [0491] 美国专利号7,598,364
- [0492] 美国专利号7,989,425
- [0493] 美国专利号8,058,065
- [0494] 美国专利号8,071,369
- [0495] 美国专利号8,129,187
- [0496] 美国专利号8,183,038

- [0497] 美国专利号8,268,620
- [0498] 美国专利号8,372,642
- [0499] 美国专利号8,546,140
- [0500] 美国专利号8,691,574
- [0501] 美国专利号8,741,648
- [0502] 美国专利号8,900,871
- [0503] 美国专利号9,175,268
- [0504] 美国专利公开号20020055144
- [0505] 美国专利公开号20090148425
- [0506] Van Brunt, Biotechnology 6 (10) :1149-1154, 1988.
- [0507] Vigne, Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36, 1995.
- [0508] Wilson et al., Nature Reviews Immunology, 9:91-105, 2009.
- [0509] Wilson et al., Science, 244:1344-1346, 1989.
- [0510] Wong et al., Gene, 10:87-94, 1980. Kaneda et al., Science, 243:375-378, 1989.
- [0511] Wynn, Nature Immunology, 6:1069-1070, 2005.
- [0512] Xi et al. Biomed Res Int, 2013.
- [0513] Yamanaka et al., Cell, 131 (5) :861-72, 2007.
- [0514] Yu et al. Gene Therapy 1:13-26, 1994.
- [0515] Yu et al. Science, 318 (5858) :1917-1920, 2007.

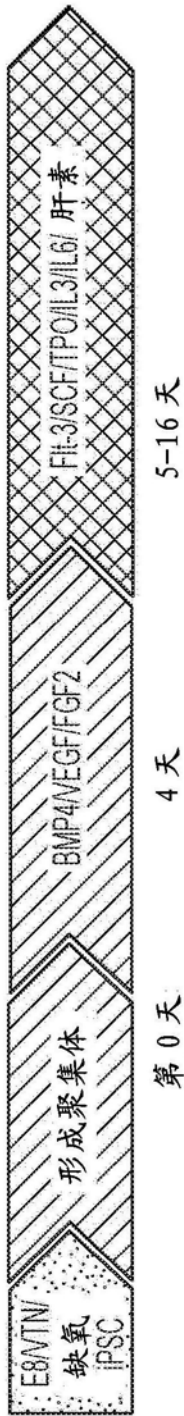


图1A

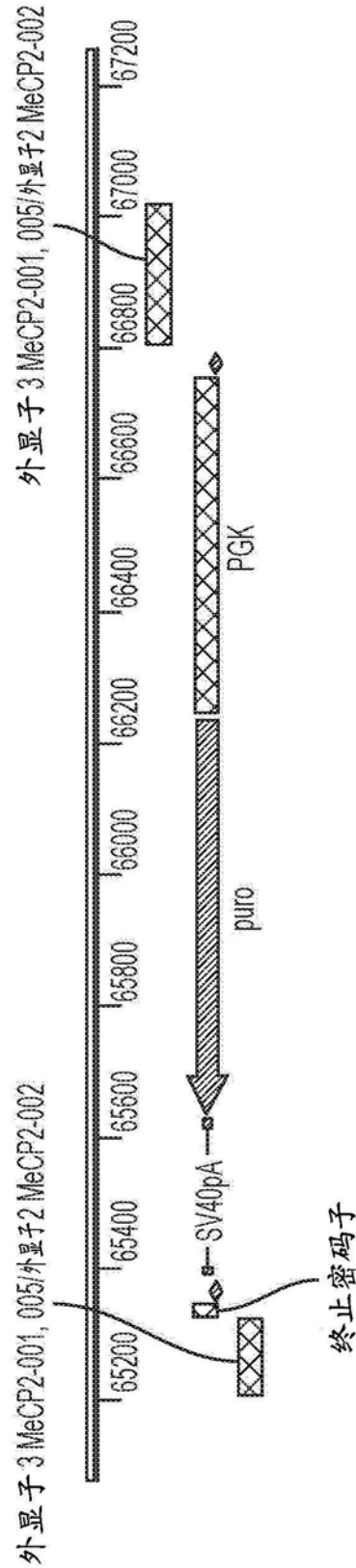


图1B

甲基 CpG 结合结构域

工程化改造位点

```

MECP2_002  MAAAAAAPSGGGGGGEEERLEEKSEDQDLQGLKDKPLKFKKVKKDKKEEKEGKHEPVQP
MECP2_005  -----MVAGMLGLREEKSEDQDLQGLKDKPLKFKKVKKDKKEEKEGKHEPVQP
MECP2_001  -----MVAGMLGLREEKSEDQDLQGLKDKPLKFKKVKKDKKEEKEGKHEPVQP
MECP2_008  -----MVAGMLGLREEKSEDQDLQGLKDKPLKFKKVKKDKKEEKEGKHEPVQP

MECP2_002  S[XXX]AHHSAEPAEAGKAETSESGSAPAVPEASASPKQRRSIIRDGRPMYDDPTLPEGWTRKL
MECP2_005  S[XXX]AHHSAEPAEAGKAETSESGSAPAVPEASASPKQRRSIIRDGRPMYDDPTLPEGWTRKL
MECP2_001  S[XXX]AHHSAEPAEAGKAETSESGSAPAVPEASASPKQRRSIIRDGRPMYDDPTLPEGWTRKL
MECP2_008  S[XXX]A-----

MECP2_002  KQRKSGRSAGKYDVYLINPQGKAFRSKVELIAYFEKVGDTSLDPNDFDFTVTGRGSPSRR
MECP2_005  KQRKSGRSAGKYDVYLINPQGKAFRSKVELIAYFEKLQELAEAGDAP-----KGAA---
MECP2_001  KQRKSGRSAGKYDVYLINPQGKAFRSKVELIAYFEKVGDTSLDPNDFDFTVTGRGSPSRR
MECP2_008  -----

MECP2_002  EQKPPKKPKSPKAPGTGRGRGRPKGSGTTRPKAATSEGVQVKRVLEKSPGKLLVKMPFQT
MECP2_005  -----PRDPRRPRQ-----RVCR-----
MECP2_001  EQKPPKKPKSPKAPGTGRGRGRPKGSGTTRPKAATSEGVQVKRVLEKSPGKLLVKMPFQT
MECP2_008  -----

MECP2_002  SPGGKAEGGGATTSTQVMVIKRPGRKRKAEADPQAIPKKRGRKPGSVVAAAAAEAKKKAV
MECP2_005  -----
MECP2_001  SPGGKAEGGGATTSTQVMVIKRPGRKRKAEADPQAIPKKRGRKPGSVVAAAAAEAKKKAV
MECP2_008  -----

MECP2_002  KESSIRSVQETVLPPIKKRKTRETVSIEVKEVVKPLLVLSTLGEKSGKGLKTCKSPGRKSKE
MECP2_005  -----
MECP2_001  KESSIRSVQETVLPPIKKRKTRETVSIEVKEVVKPLLVLSTLGEKSGKGLKTCKSPGRKSKE
MECP2_008  -----

MECP2_002  SSPKGRSSSASSPPKKEHHHHHHHSESPKAPVLLPPLPPPPPEPESSEDPTSPPEPQDL
MECP2_005  -----
MECP2_001  SSPKGRSSSASSPPKKEHHHHHHHSESPKAPVLLPPLPPPPPEPESSEDPTSPPEPQDL
MECP2_008  -----

MECP2_002  SSSVCKEEKMPRGSLES DGCPKEPAKTQPAVATAATAAEKYKHRGEGERKDIVSSSMR
MECP2_005  -----
MECP2_001  SSSVCKEEKMPRGSLES DGCPKEPAKTQPAVATAATAAEKYKHRGEGERKDIVSSSMR
MECP2_008  -----

MECP2_002  PNREEPVDSRTPVTERVS
MECP2_005  -----
MECP2_001  PNREEPVDSRTPVTERVS
MECP2_008  -----

```

图1C

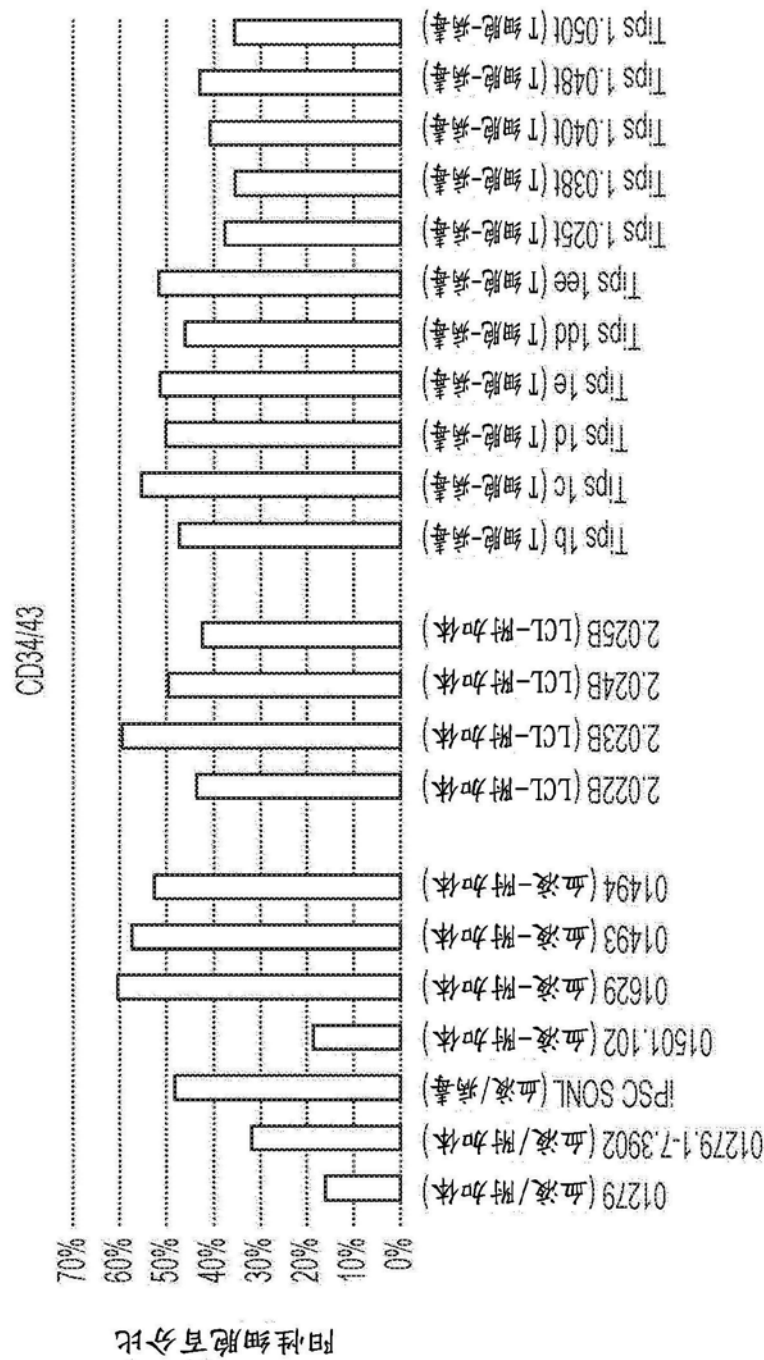


图2A

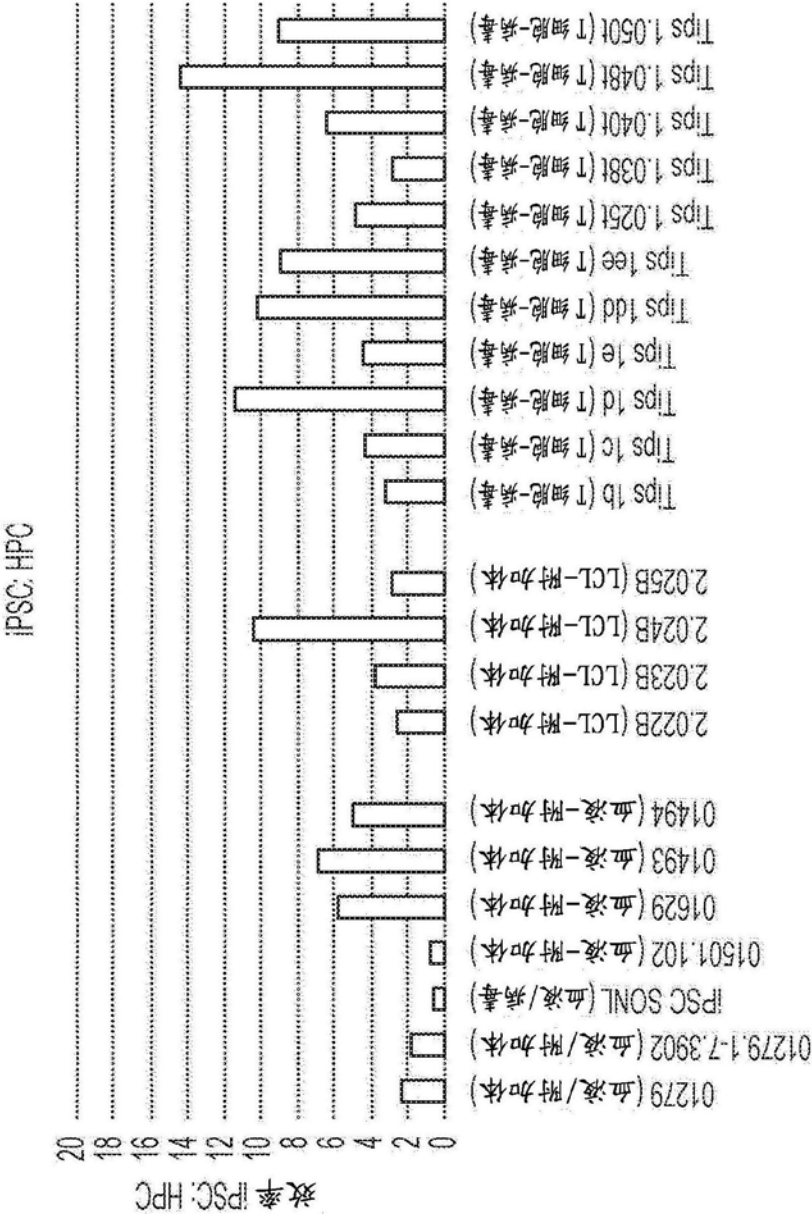


图2B

血细胞样分化

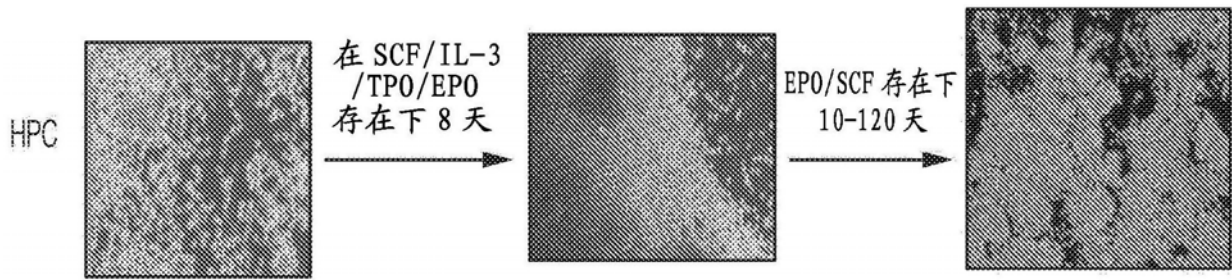


图3

CB 血红蛋白表达

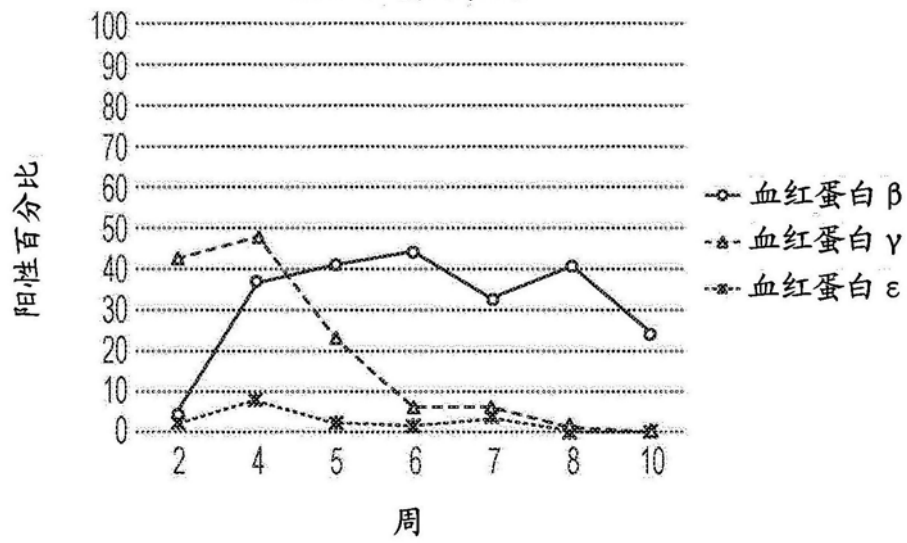


图4A

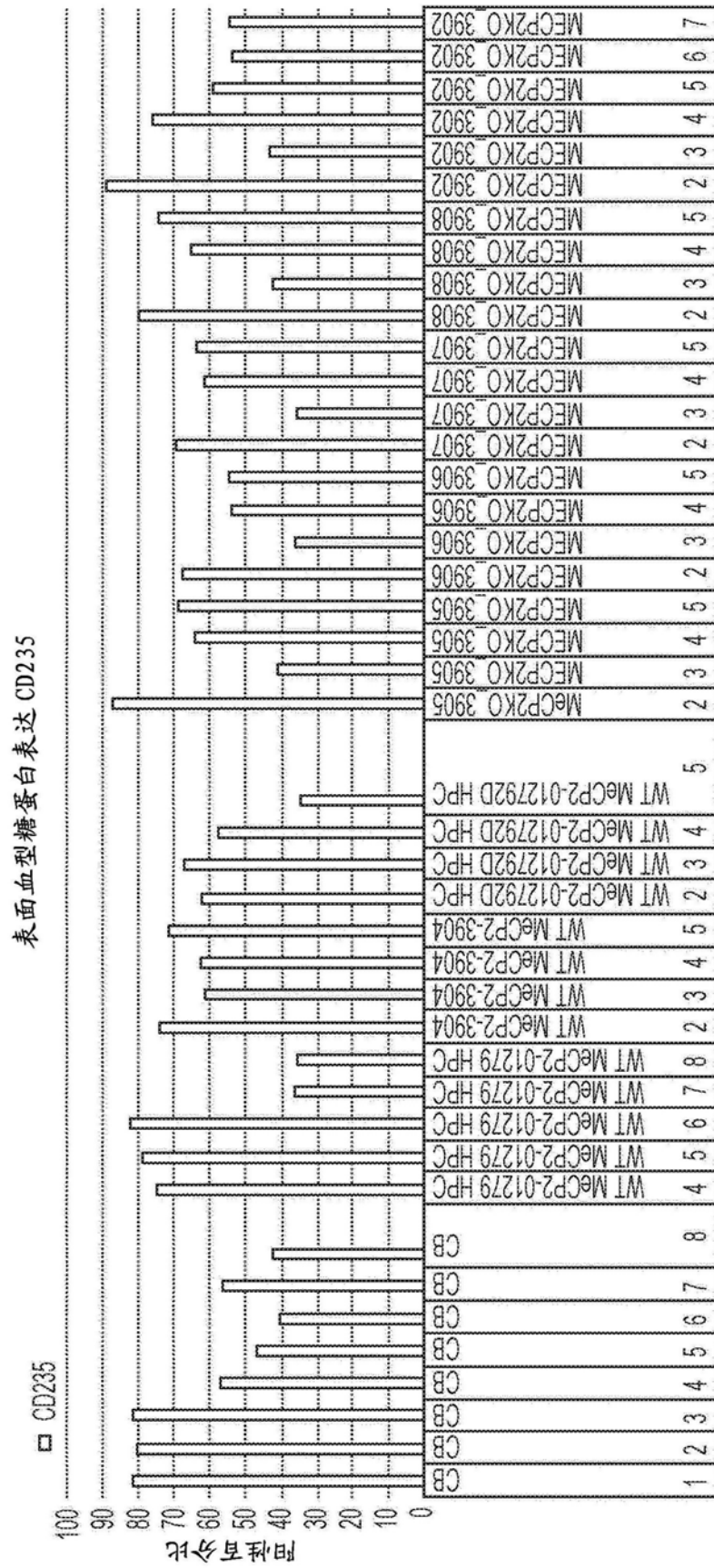


图4B

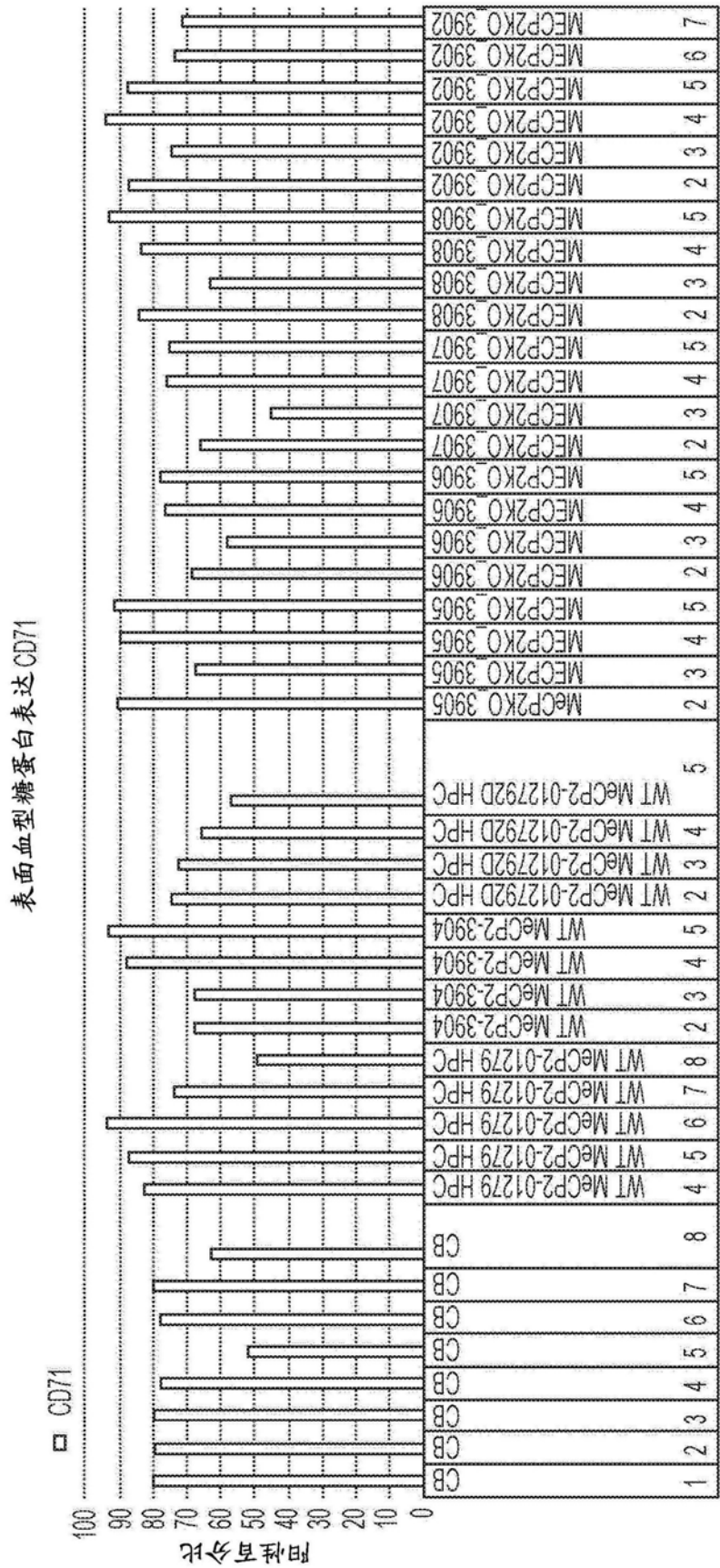


图4C

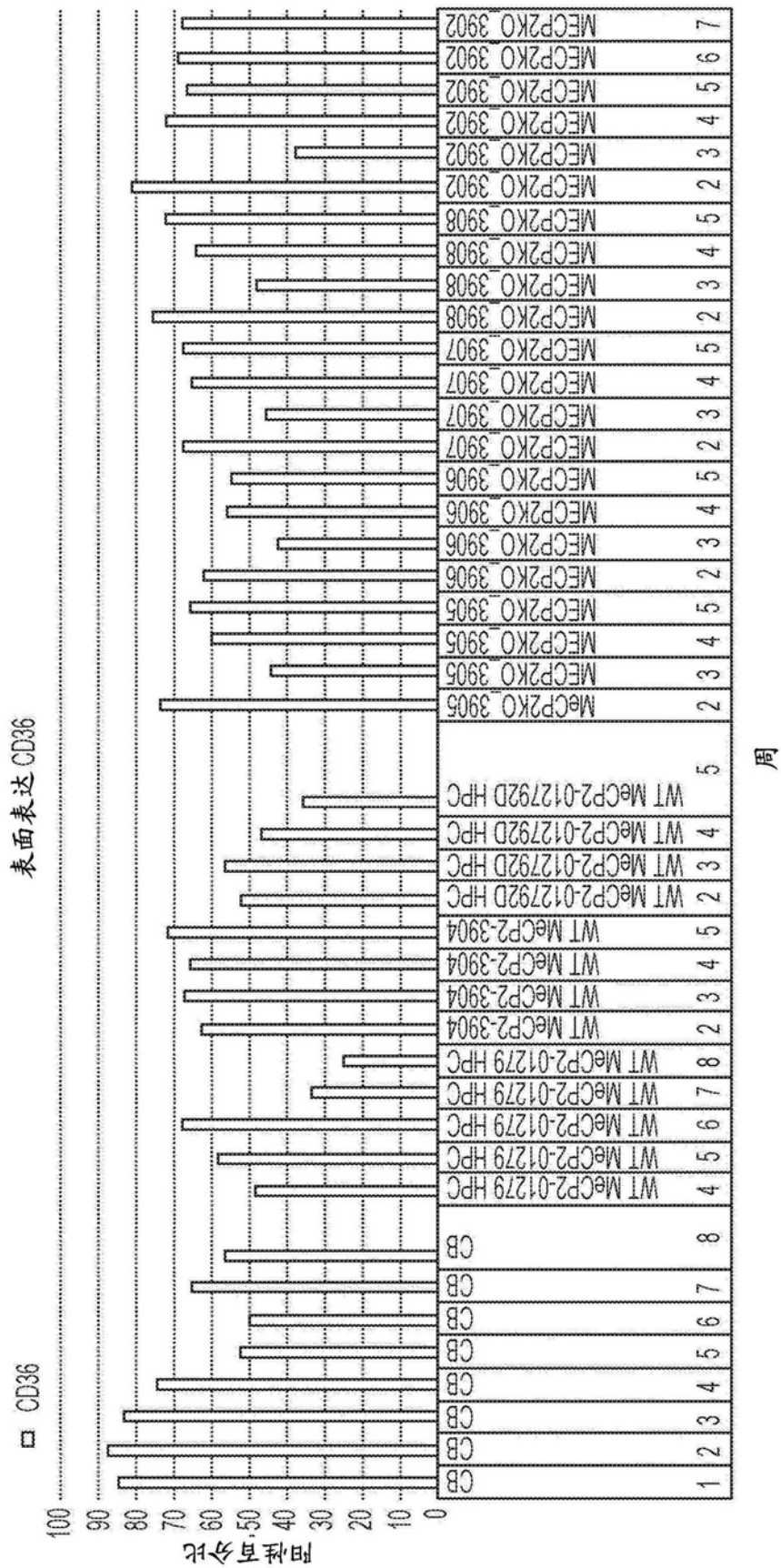


图4D

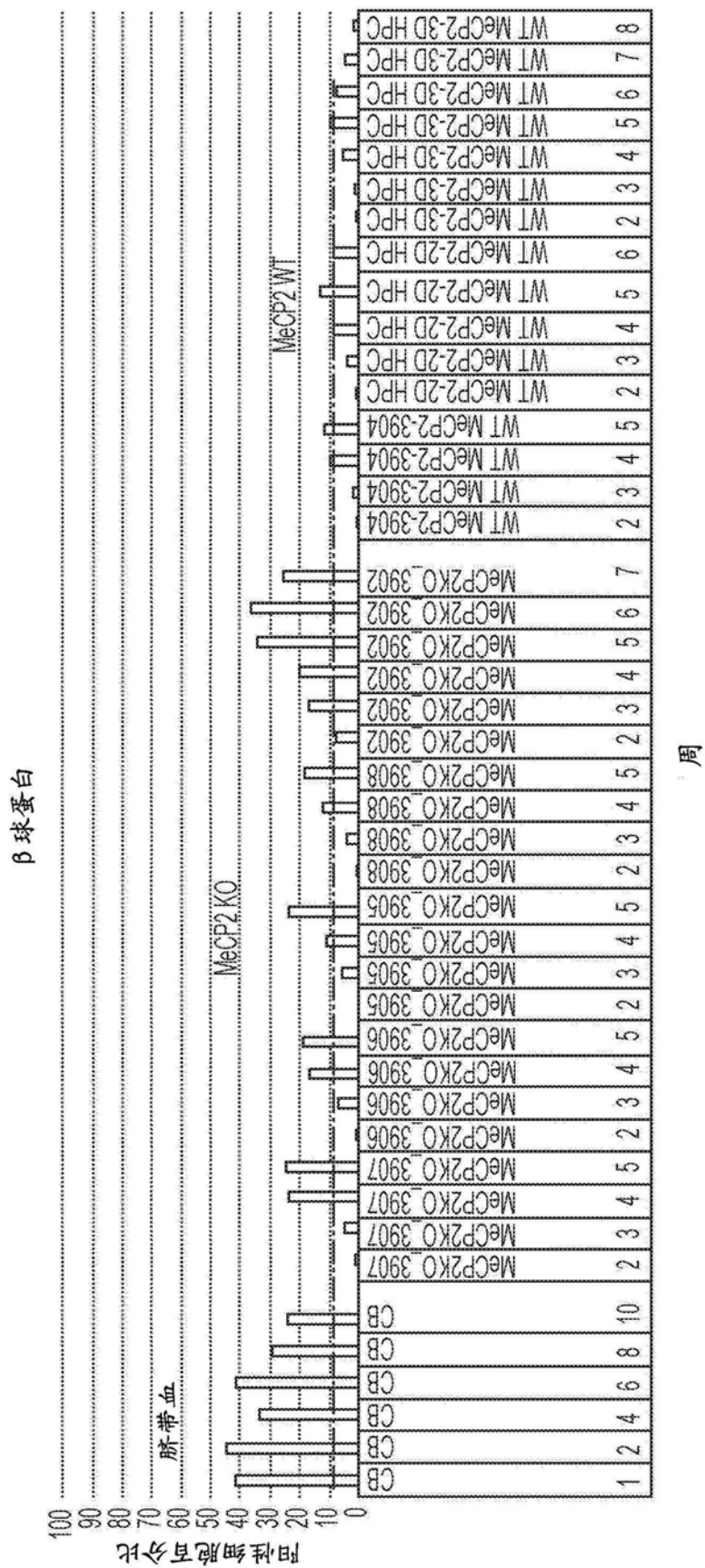


图5A

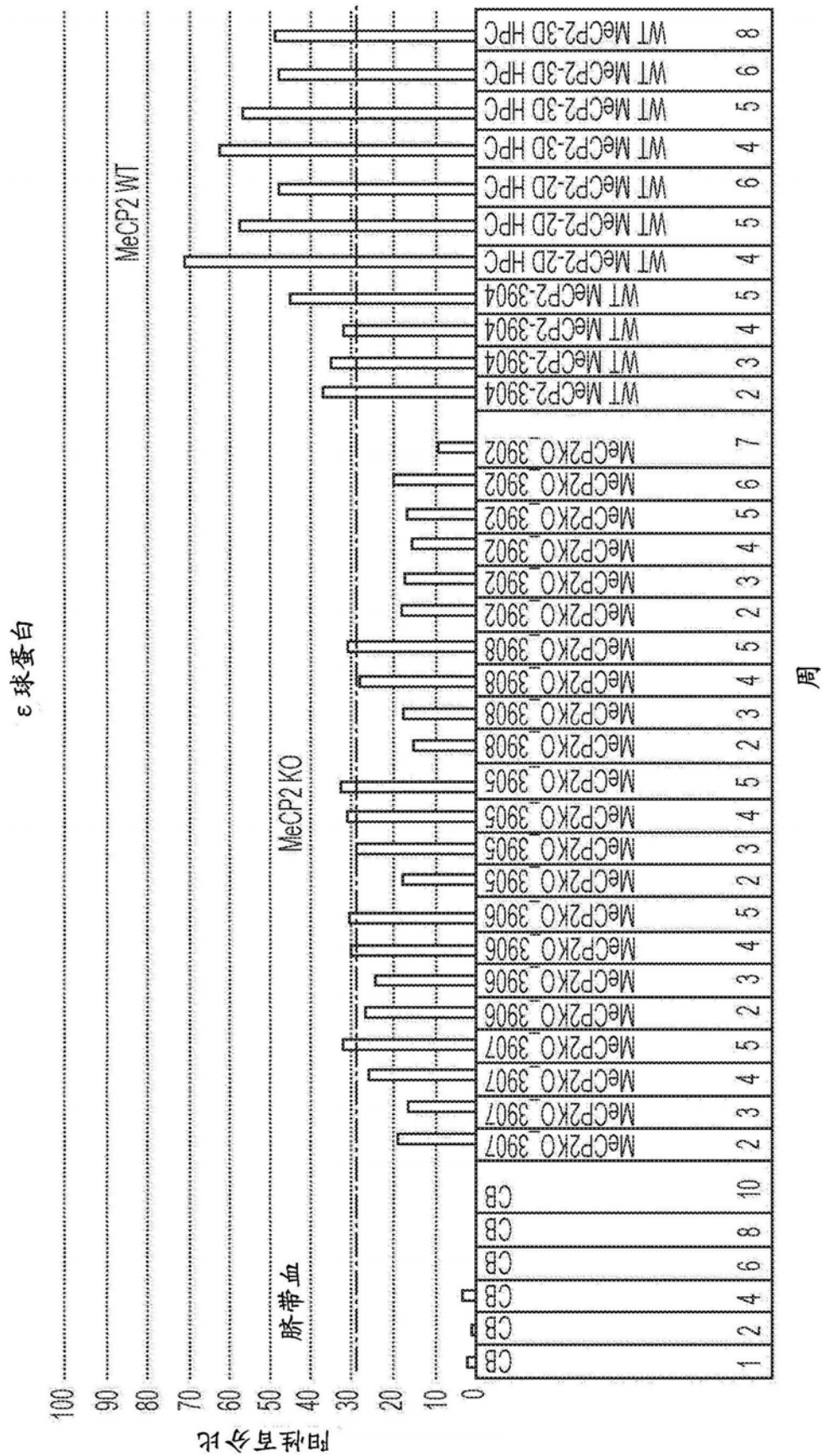


图5B

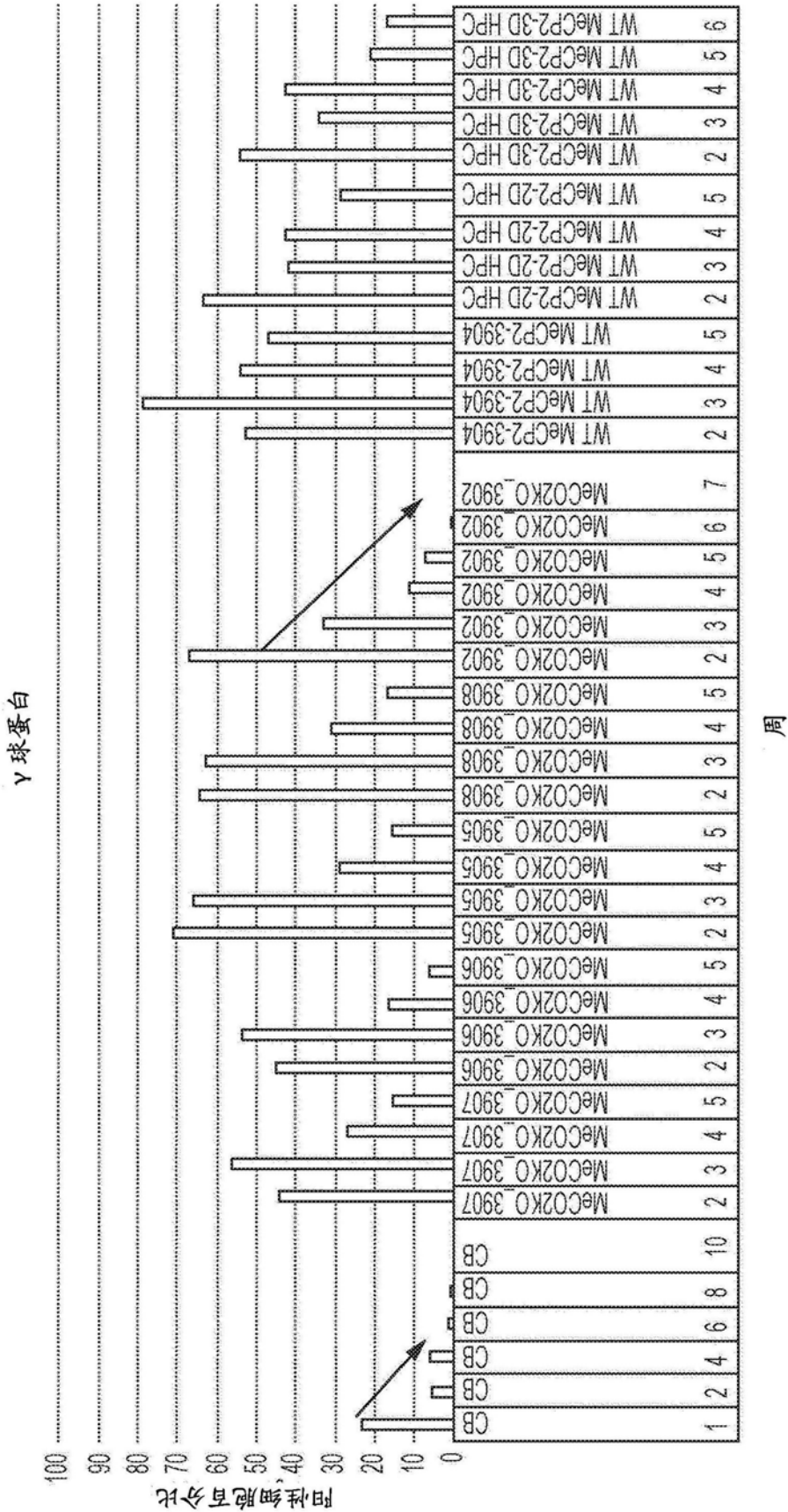


图5C

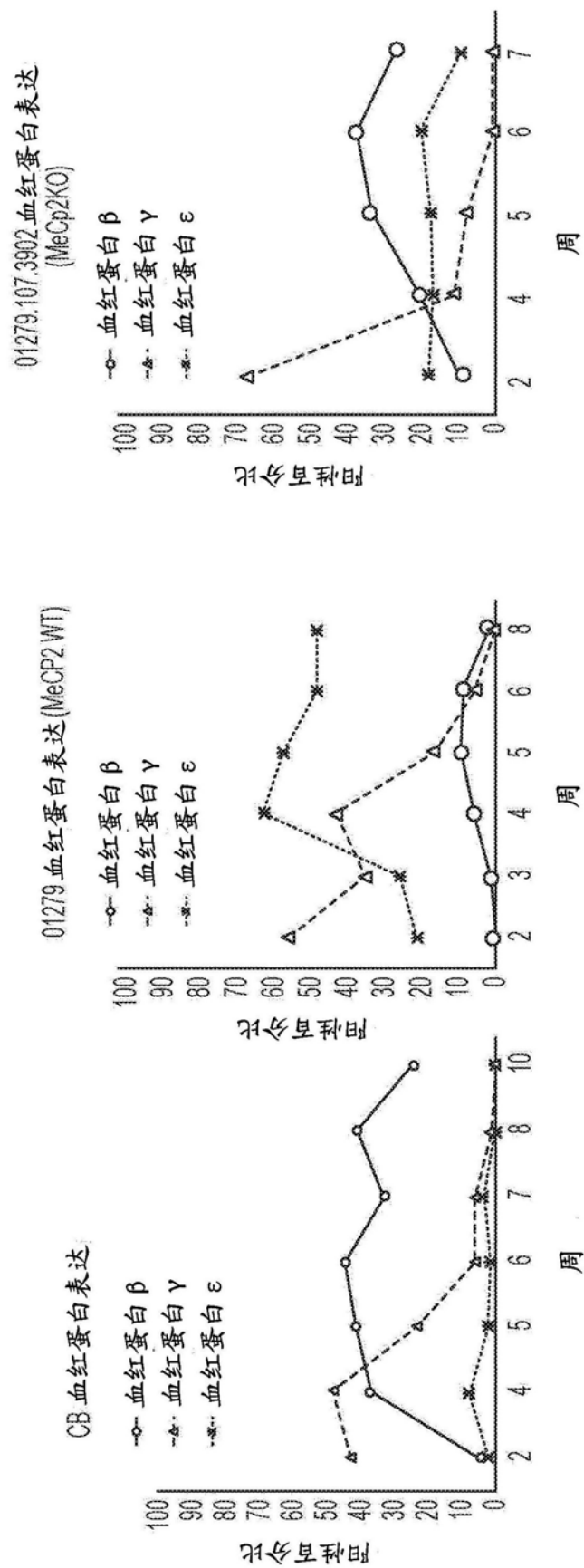


图6

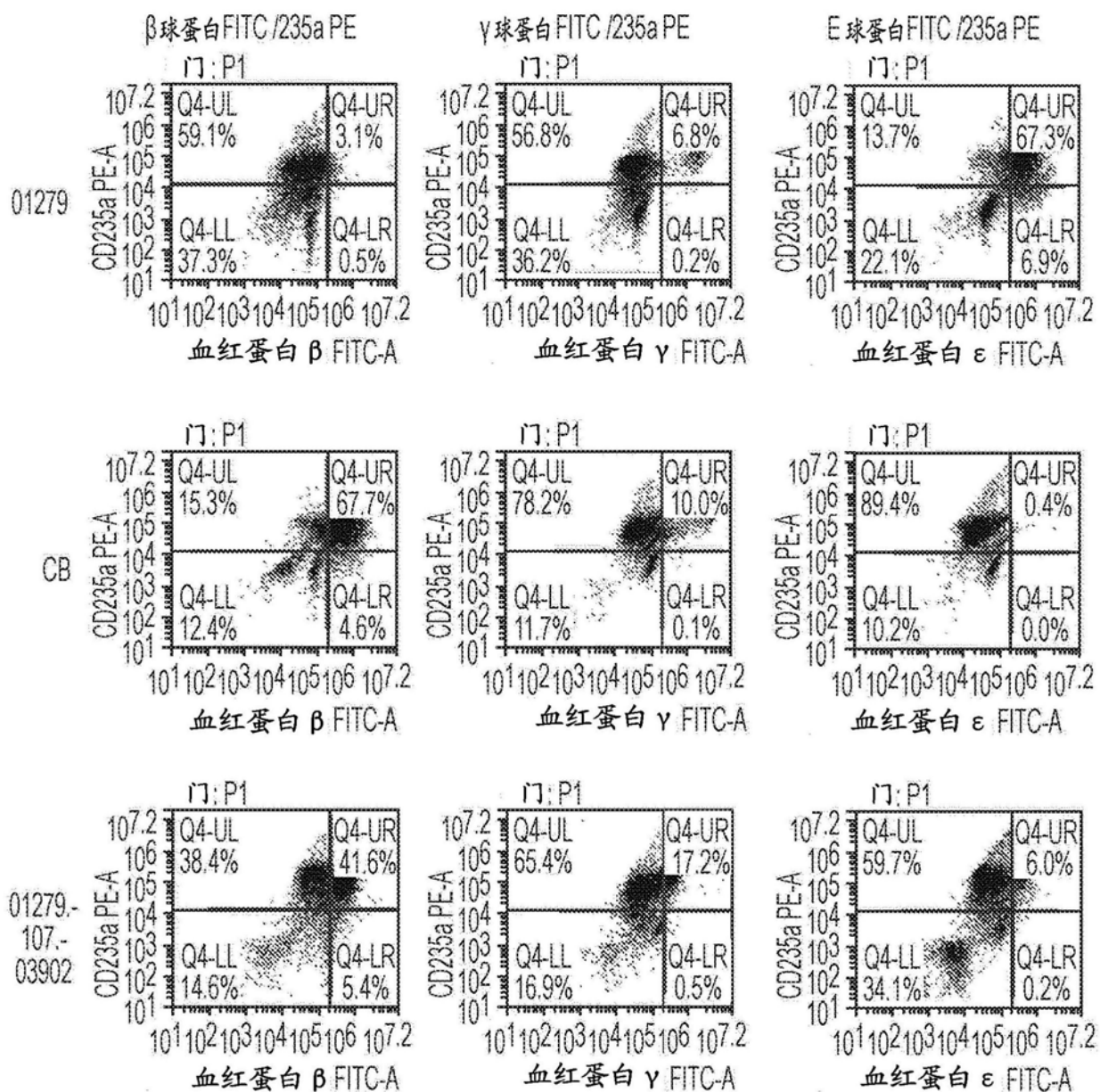


图7

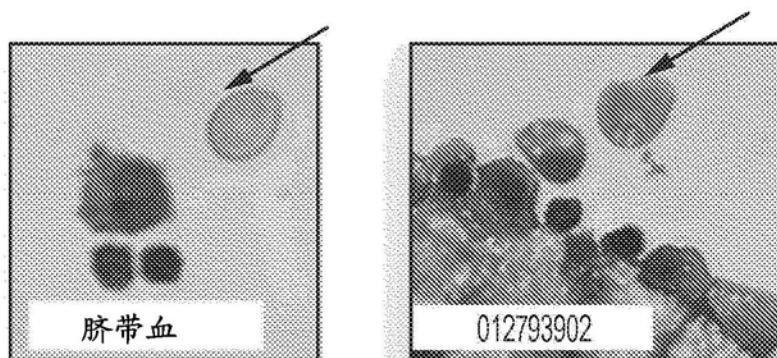


图8

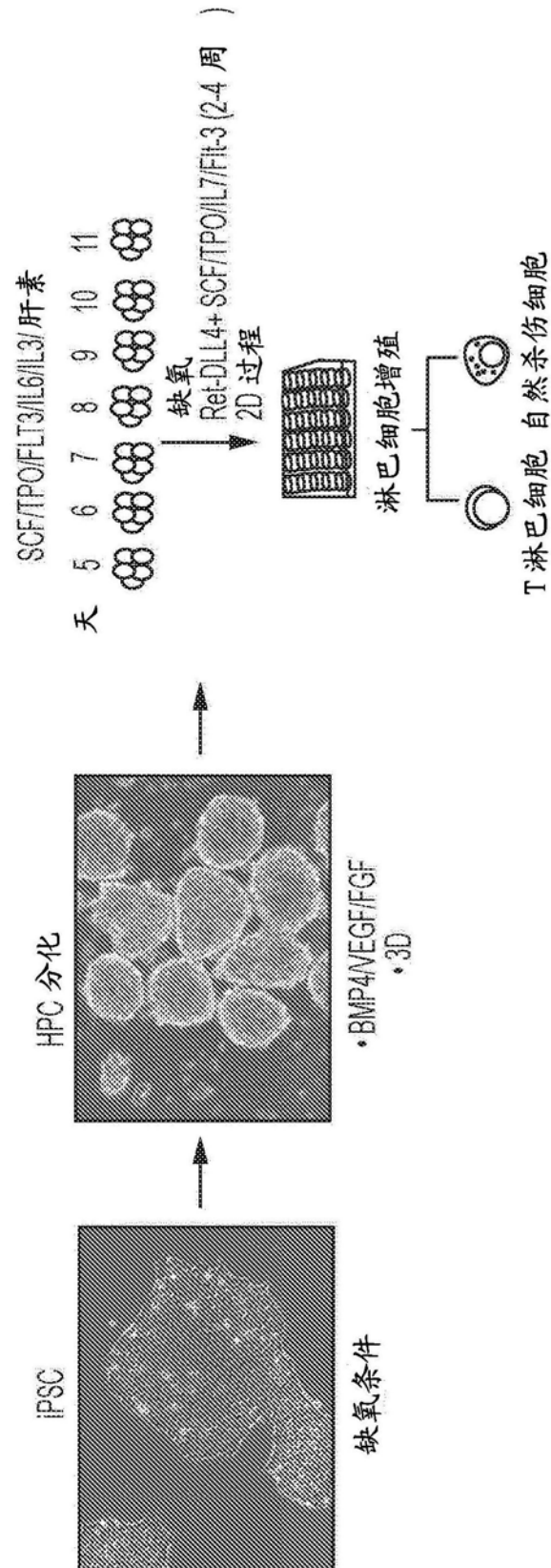


图9

图10A

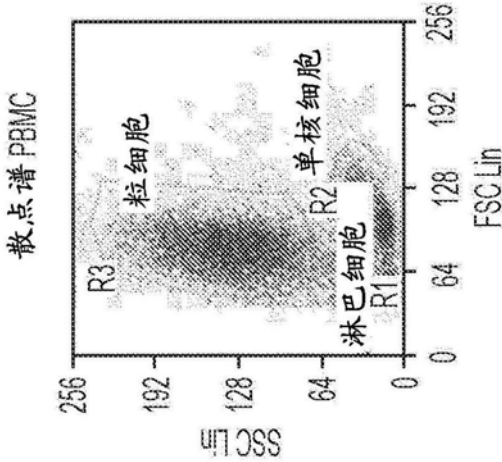


图10B

iPSC 衍生的淋巴样分化的散点谱

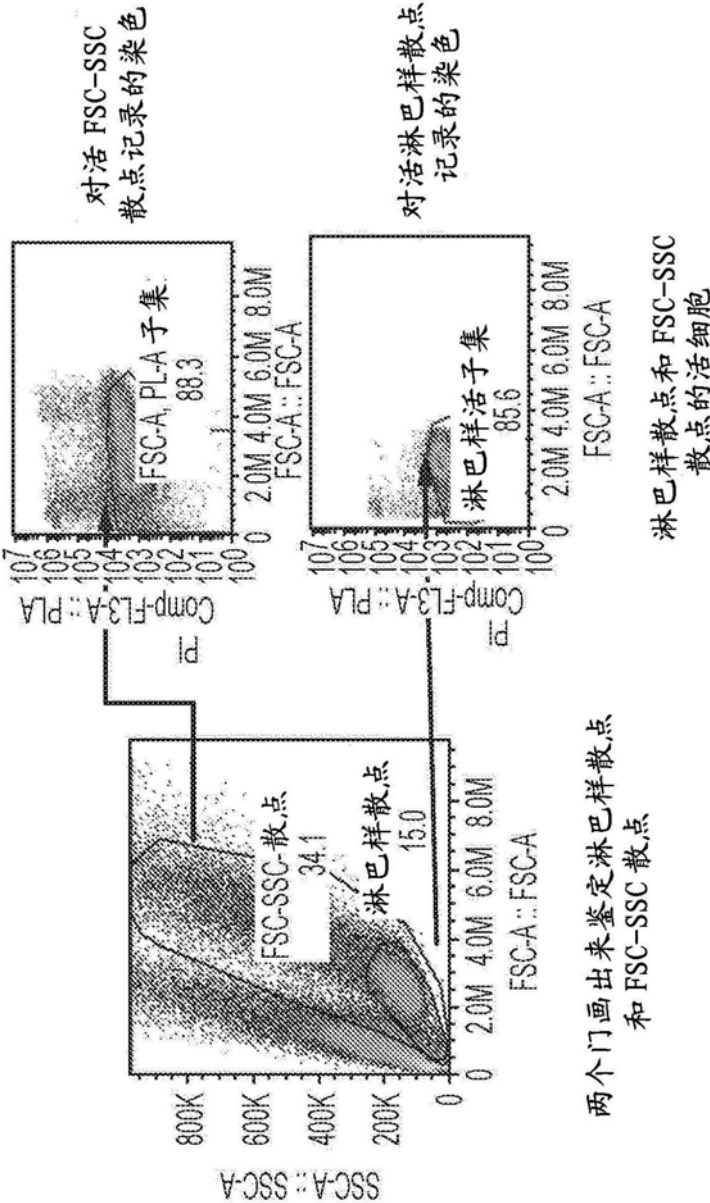


图10A-10C

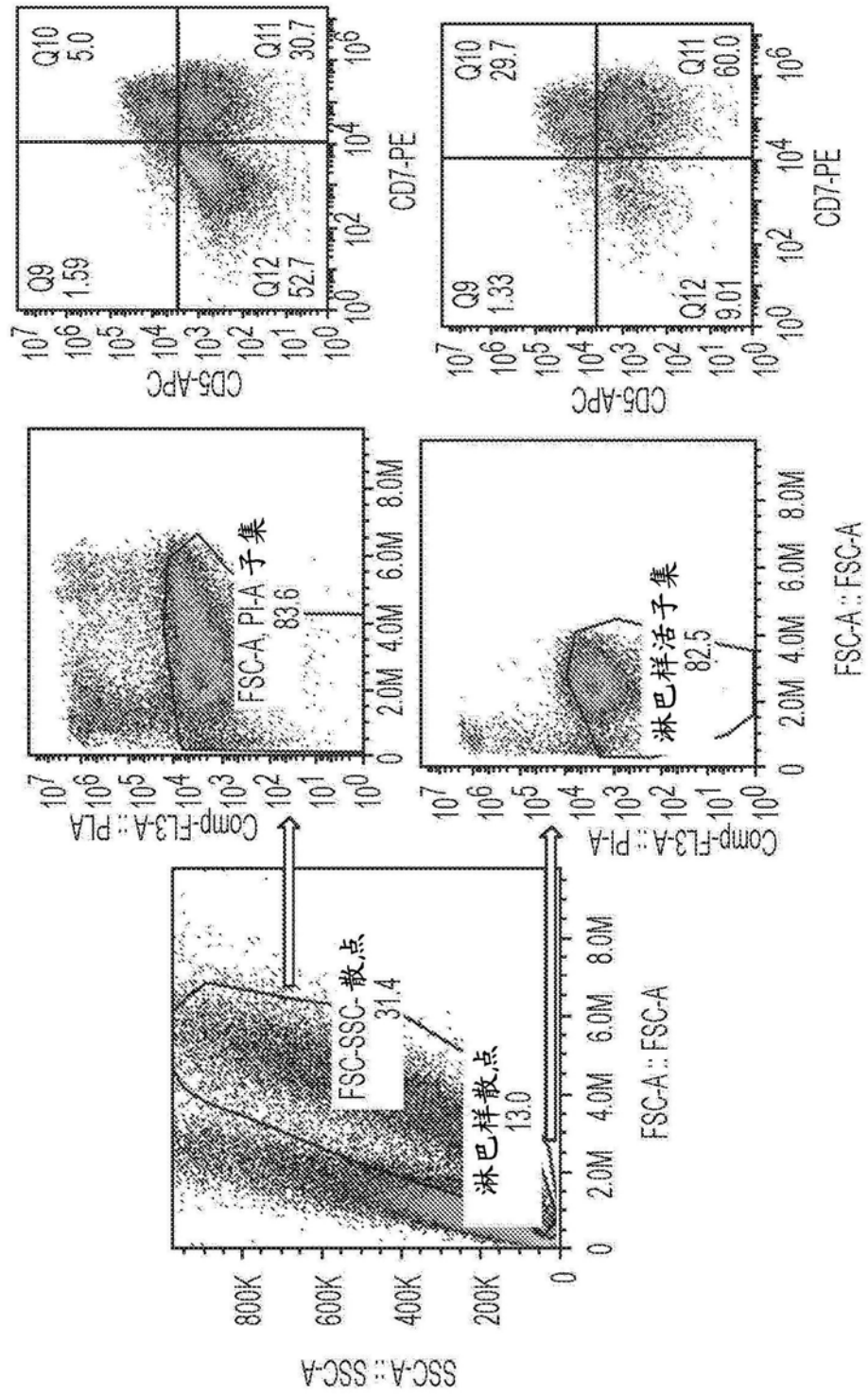


图11A

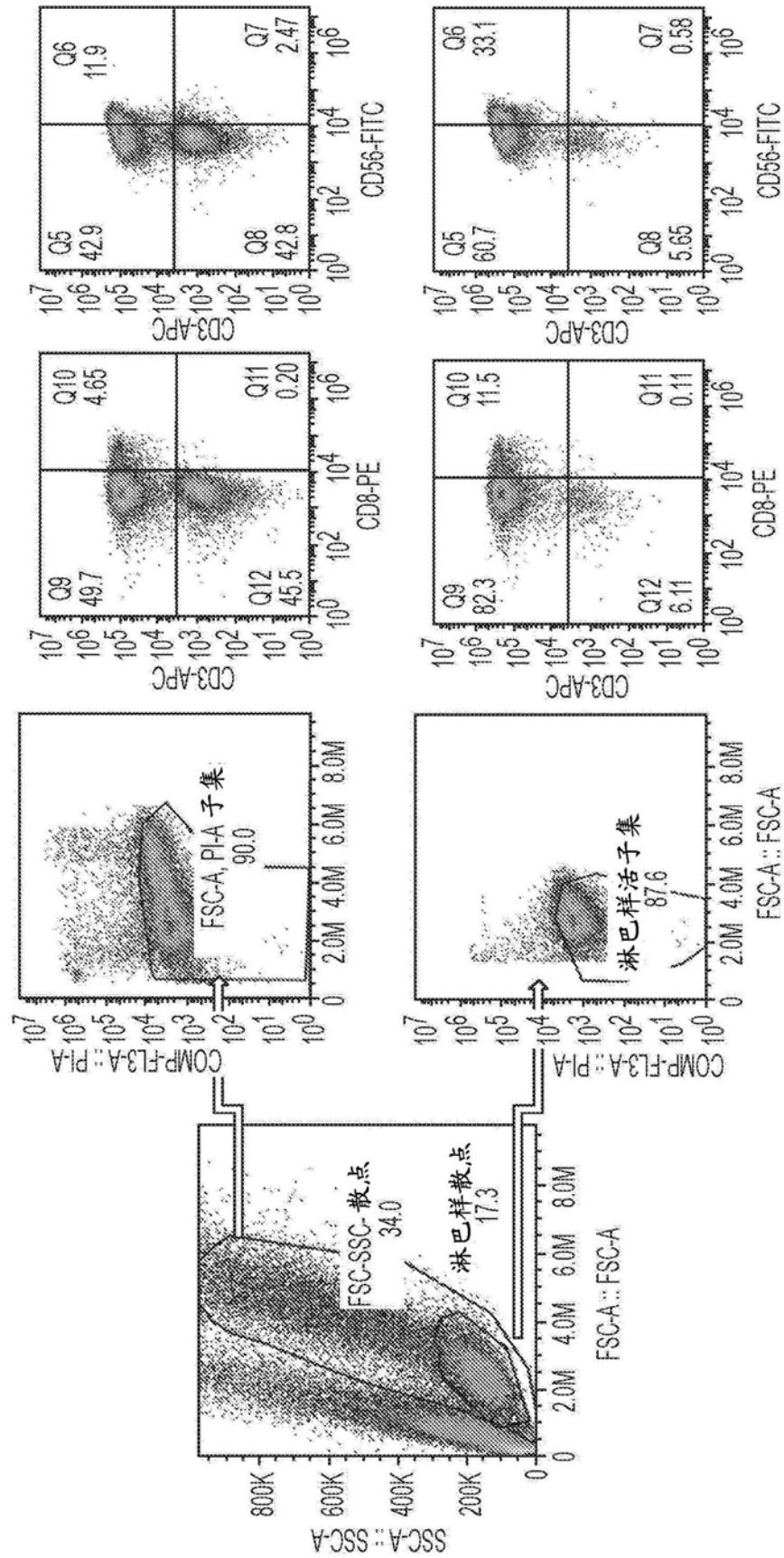
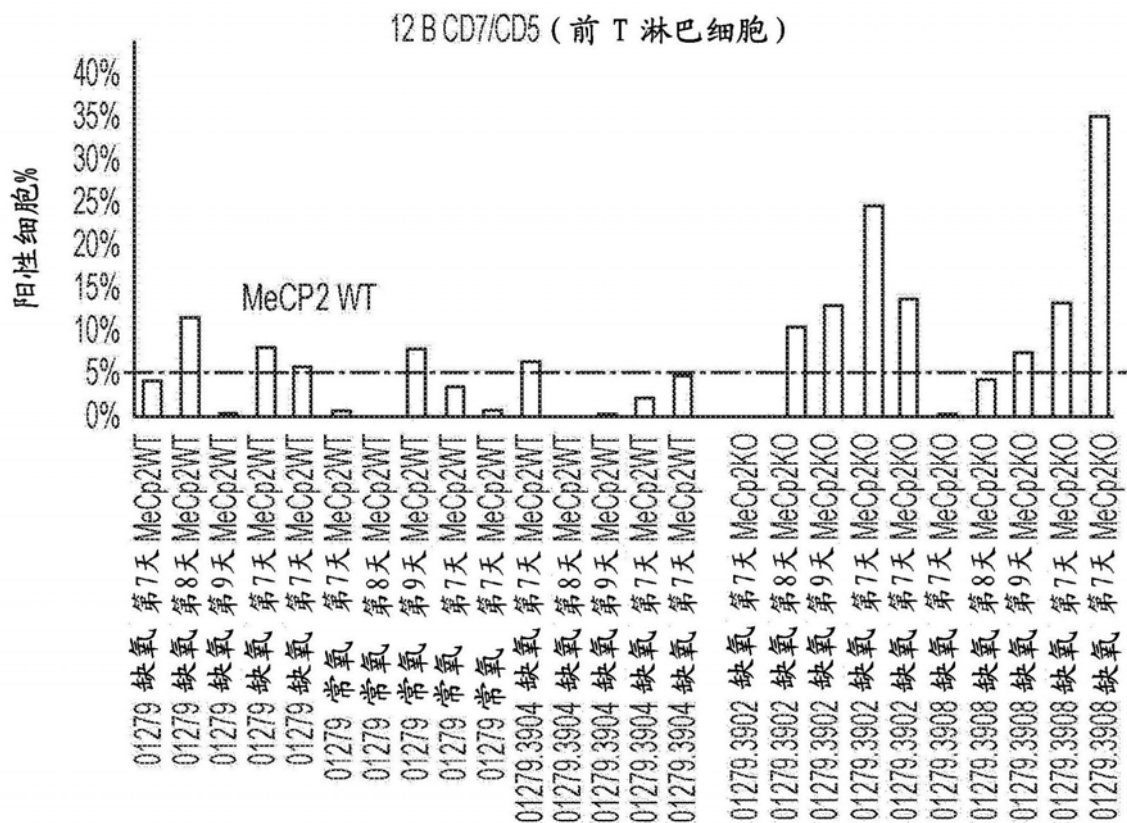


图11B



72

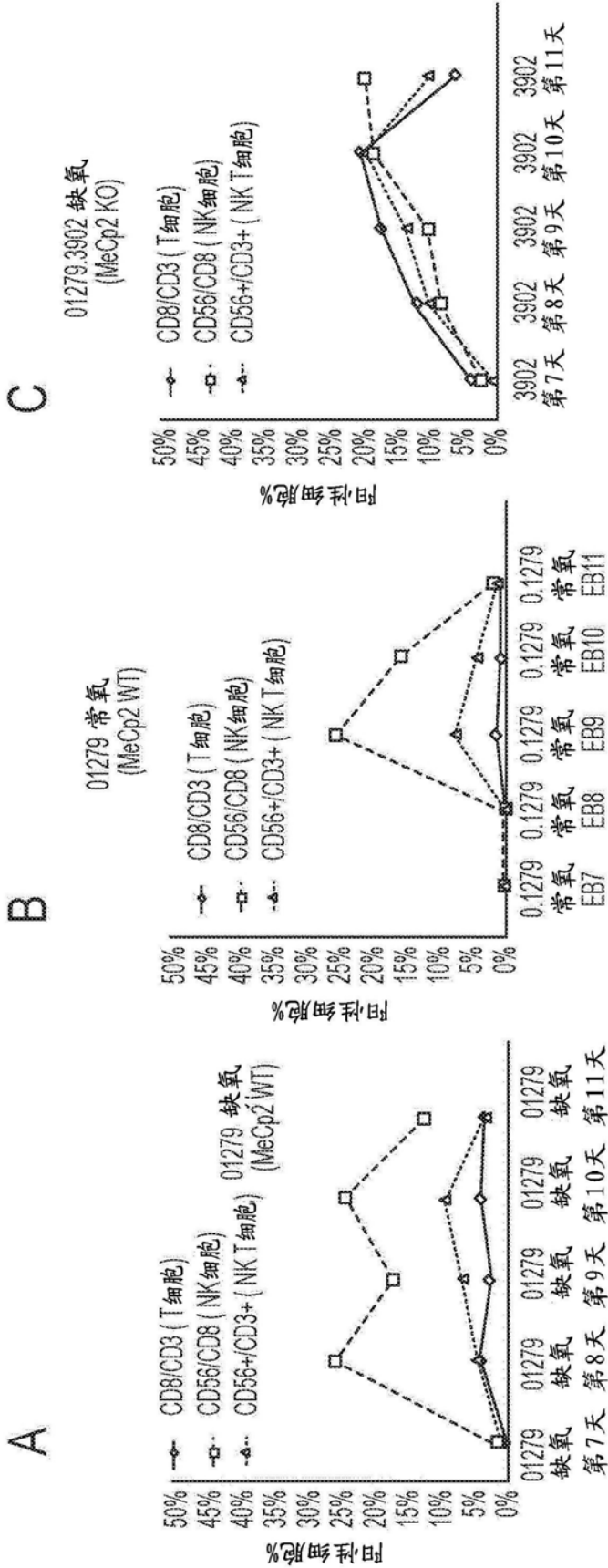


图13A-13C

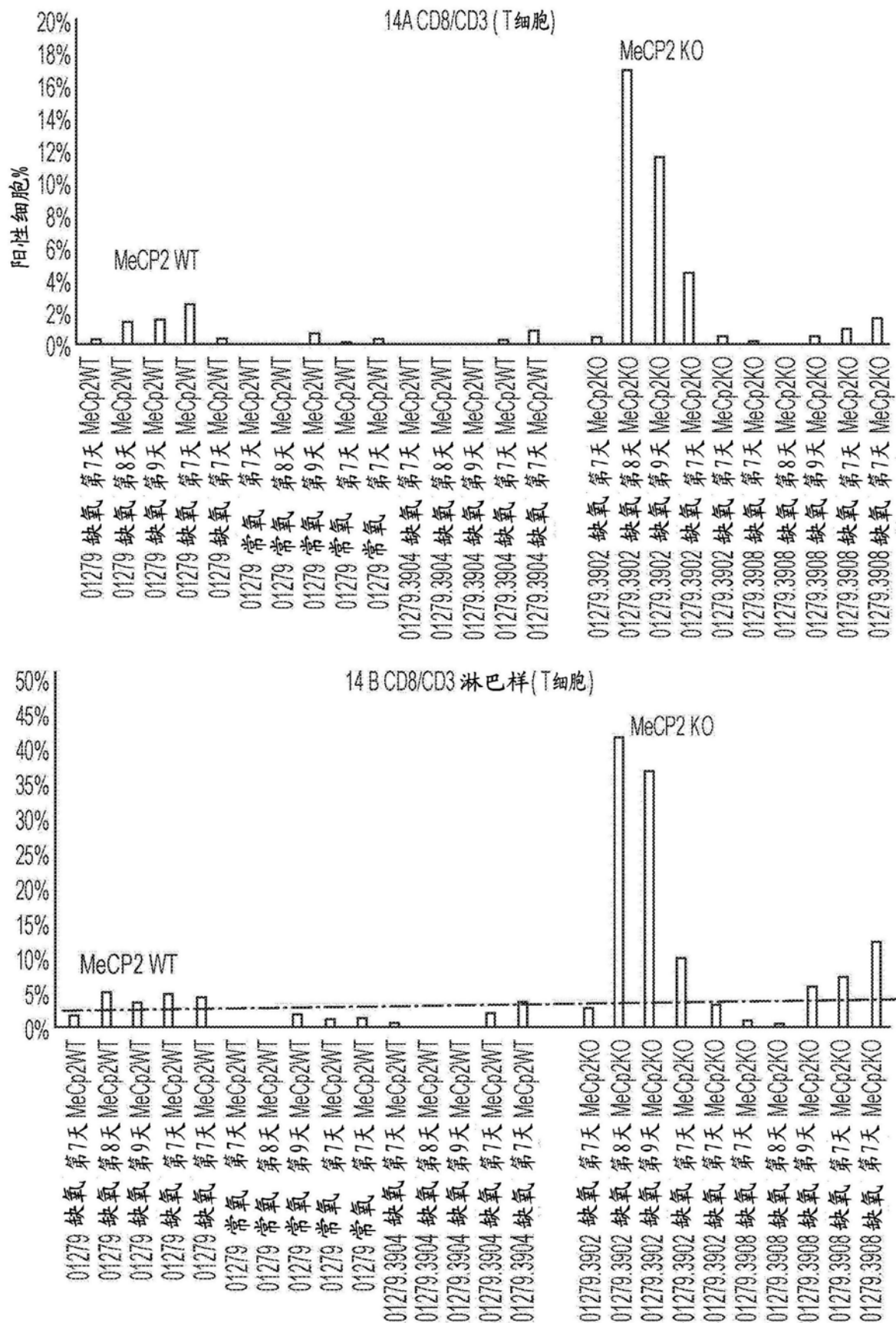


图14A-14B

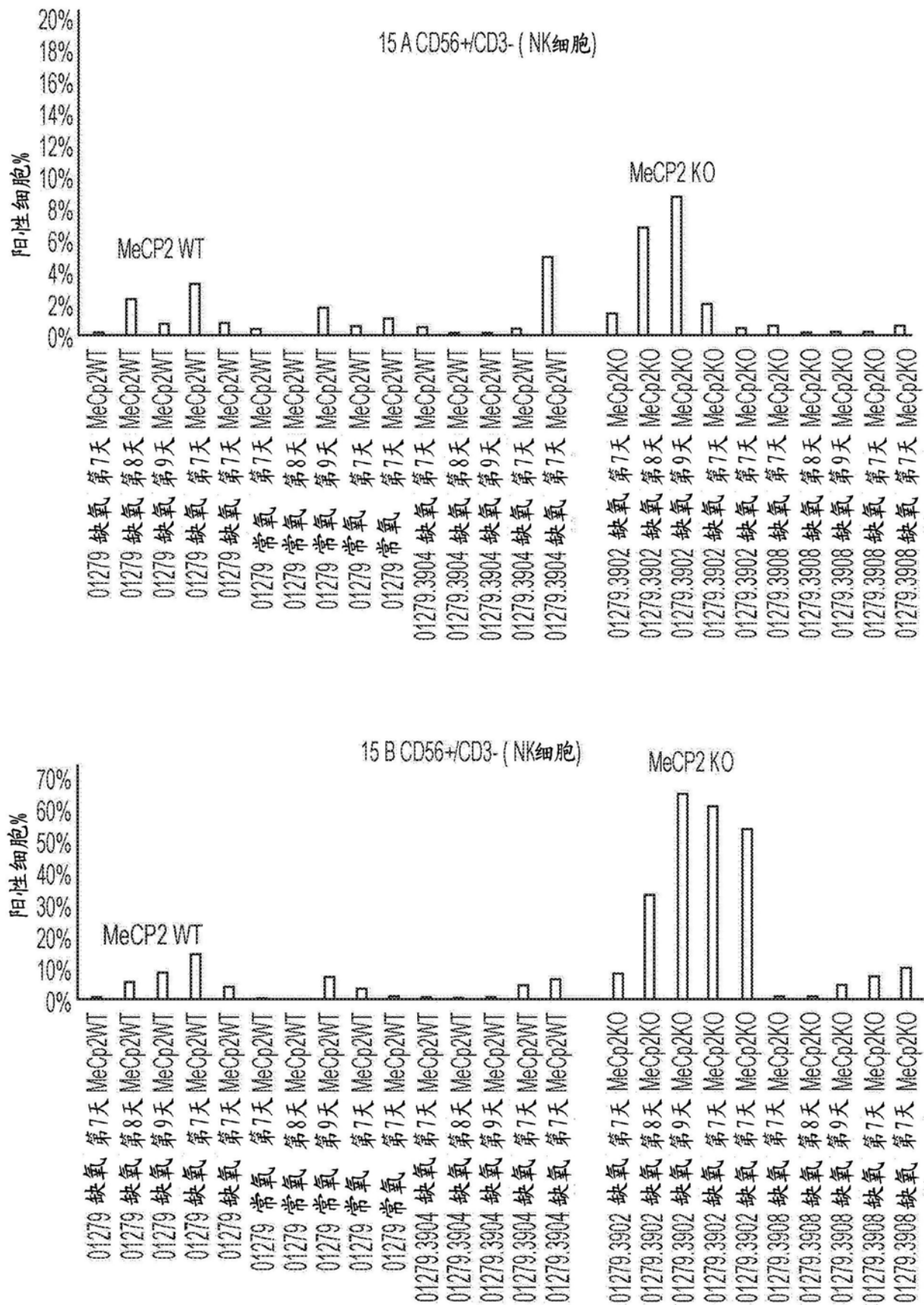


图15A-15B

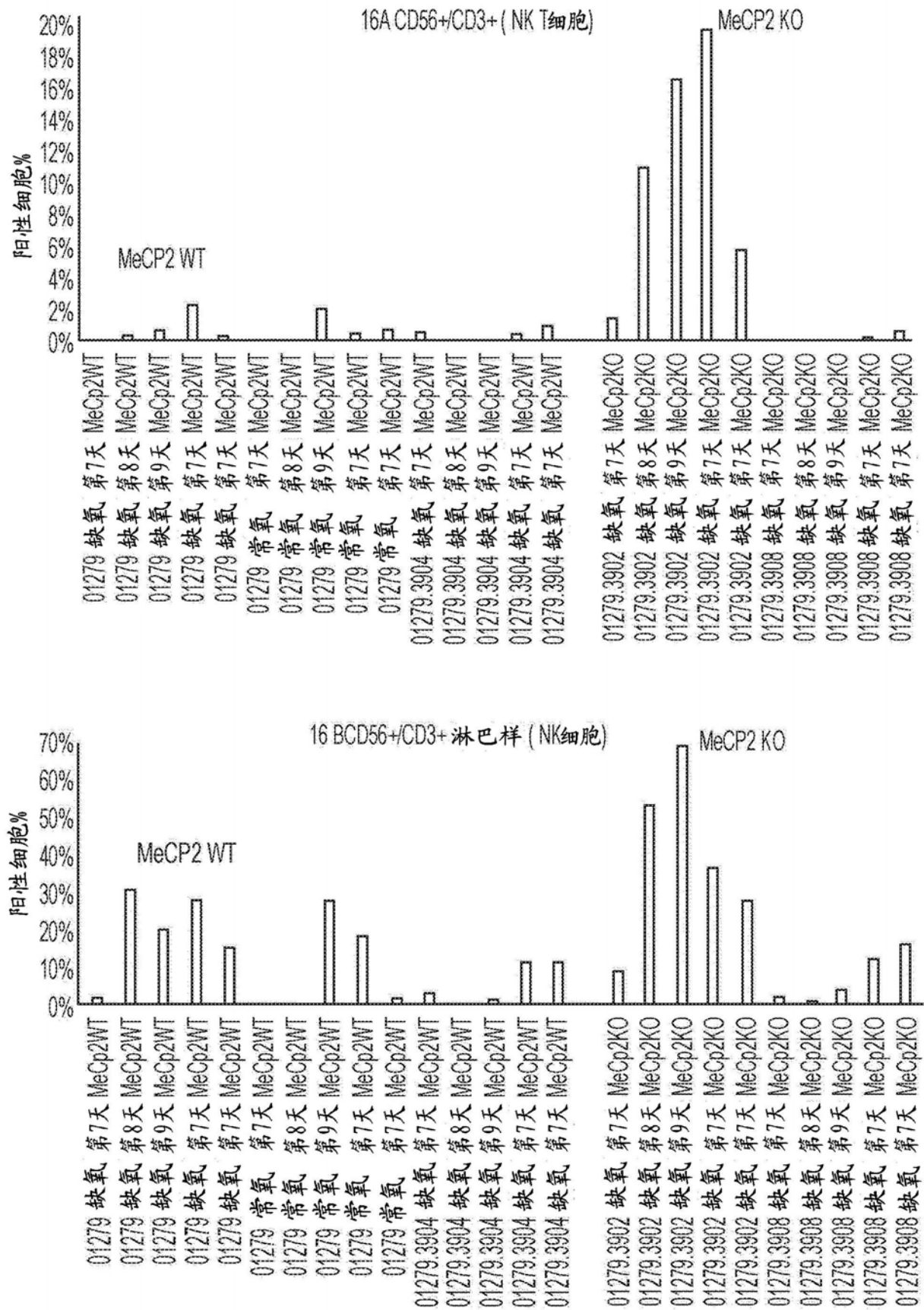


图16A-16B

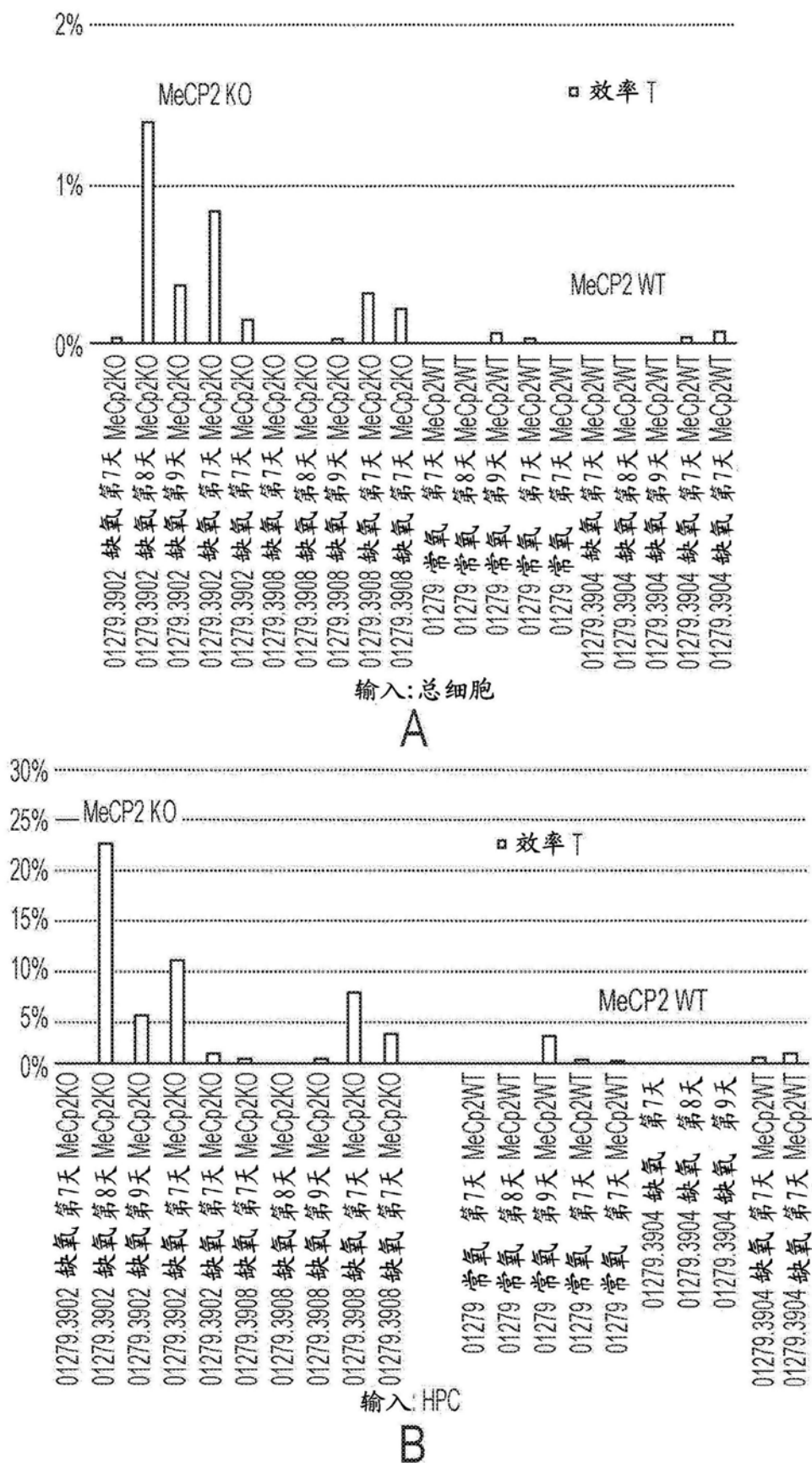


图17A-17B

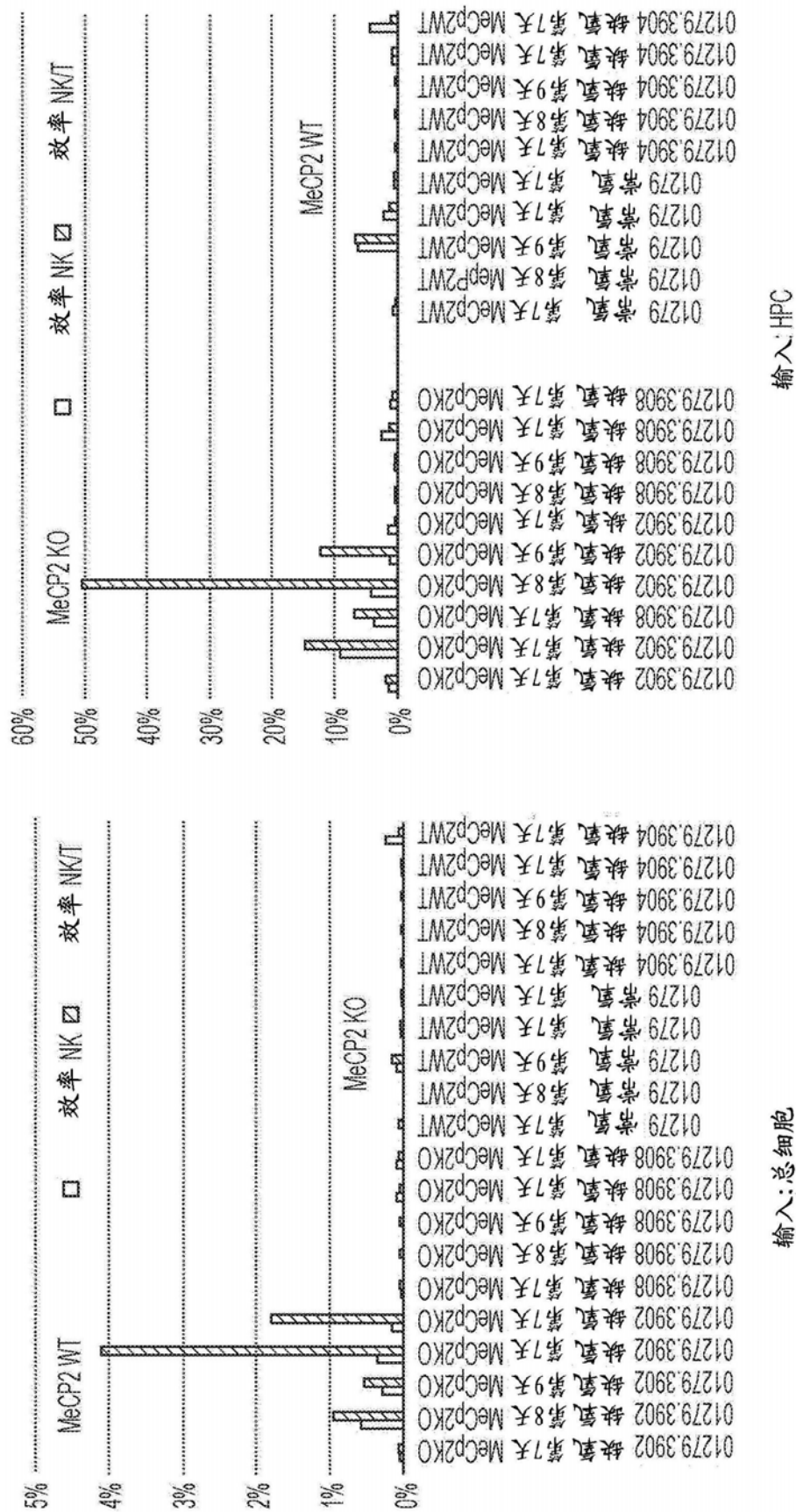


图18A-18B

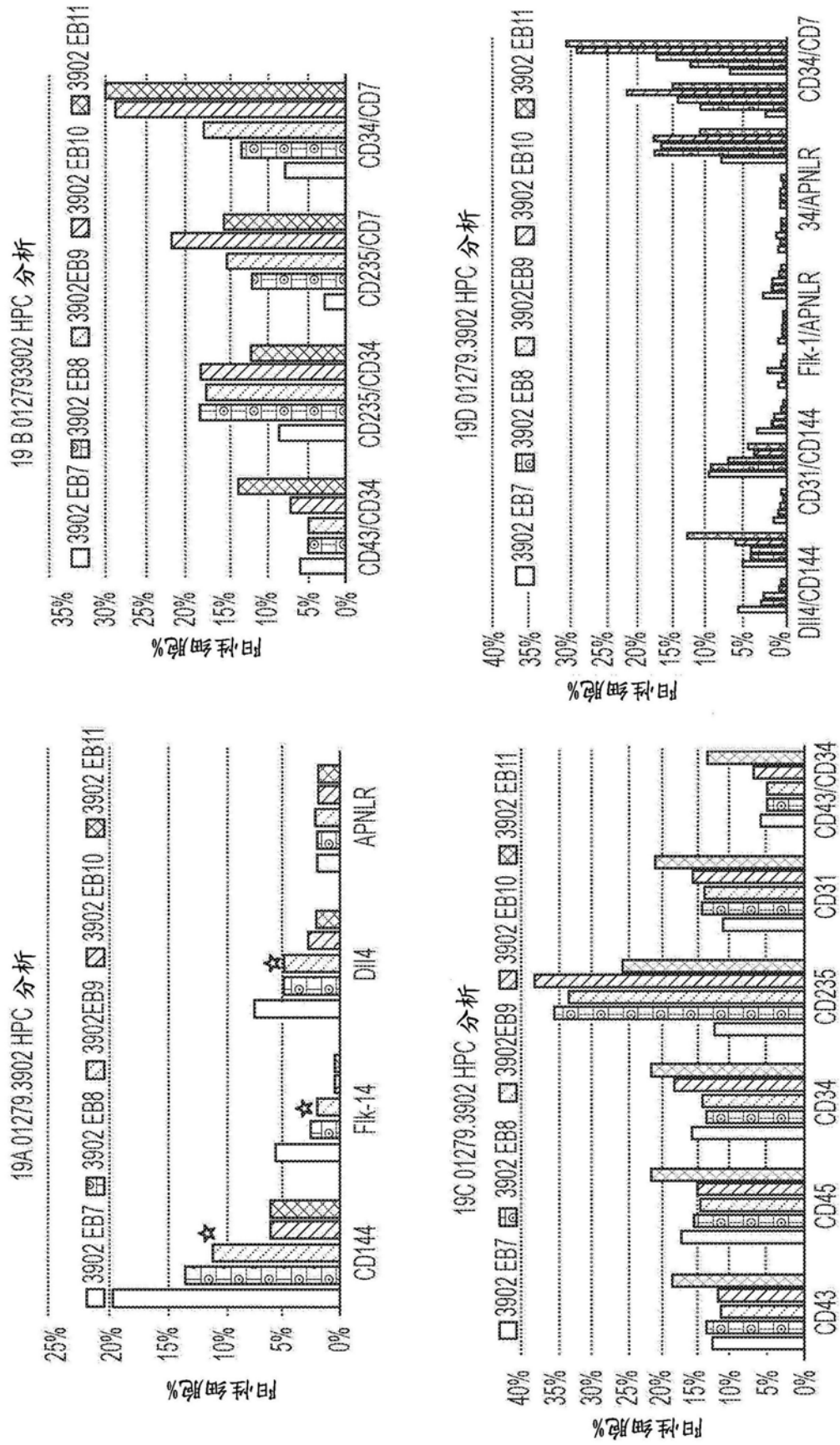


图19A-19D

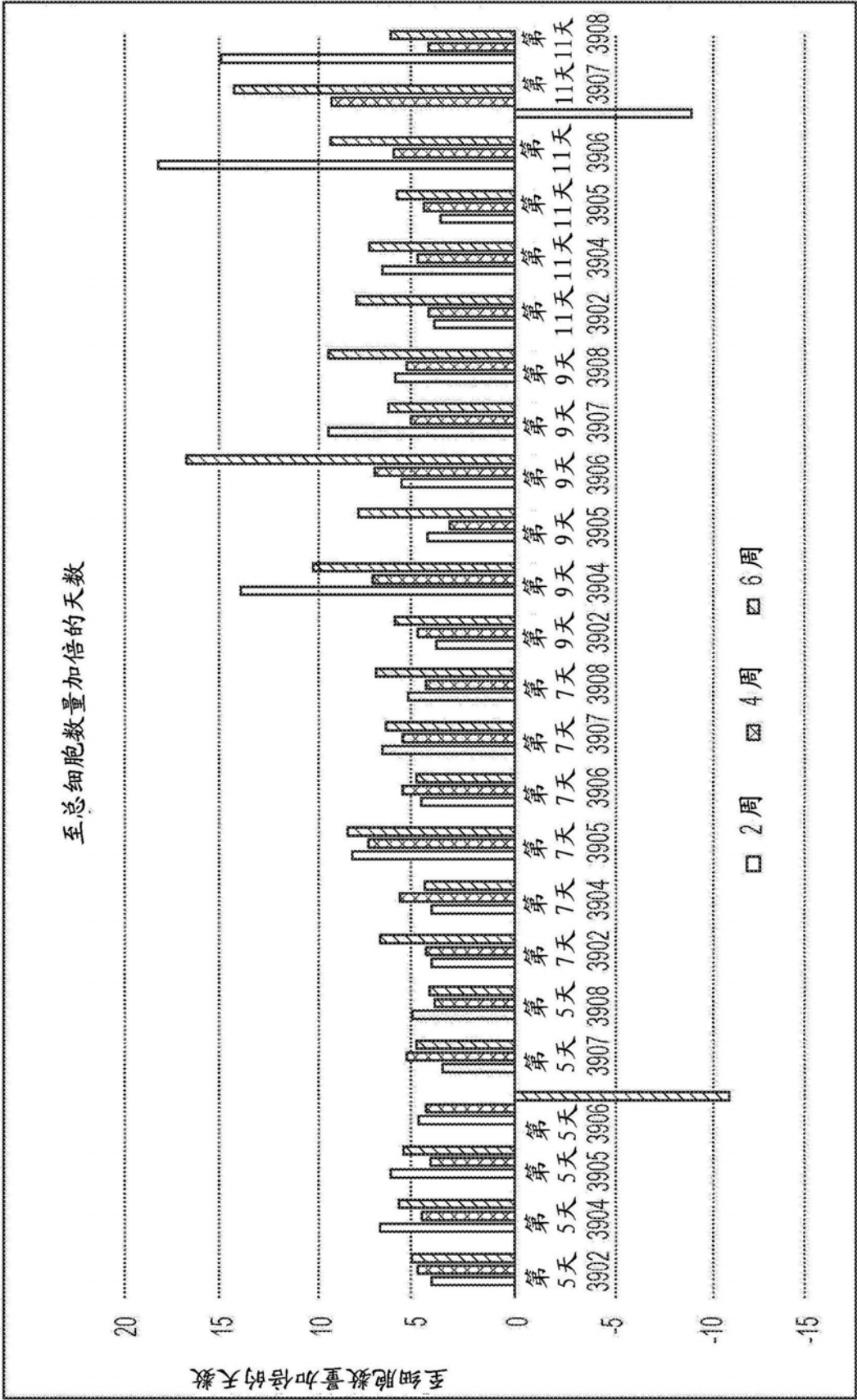


图20

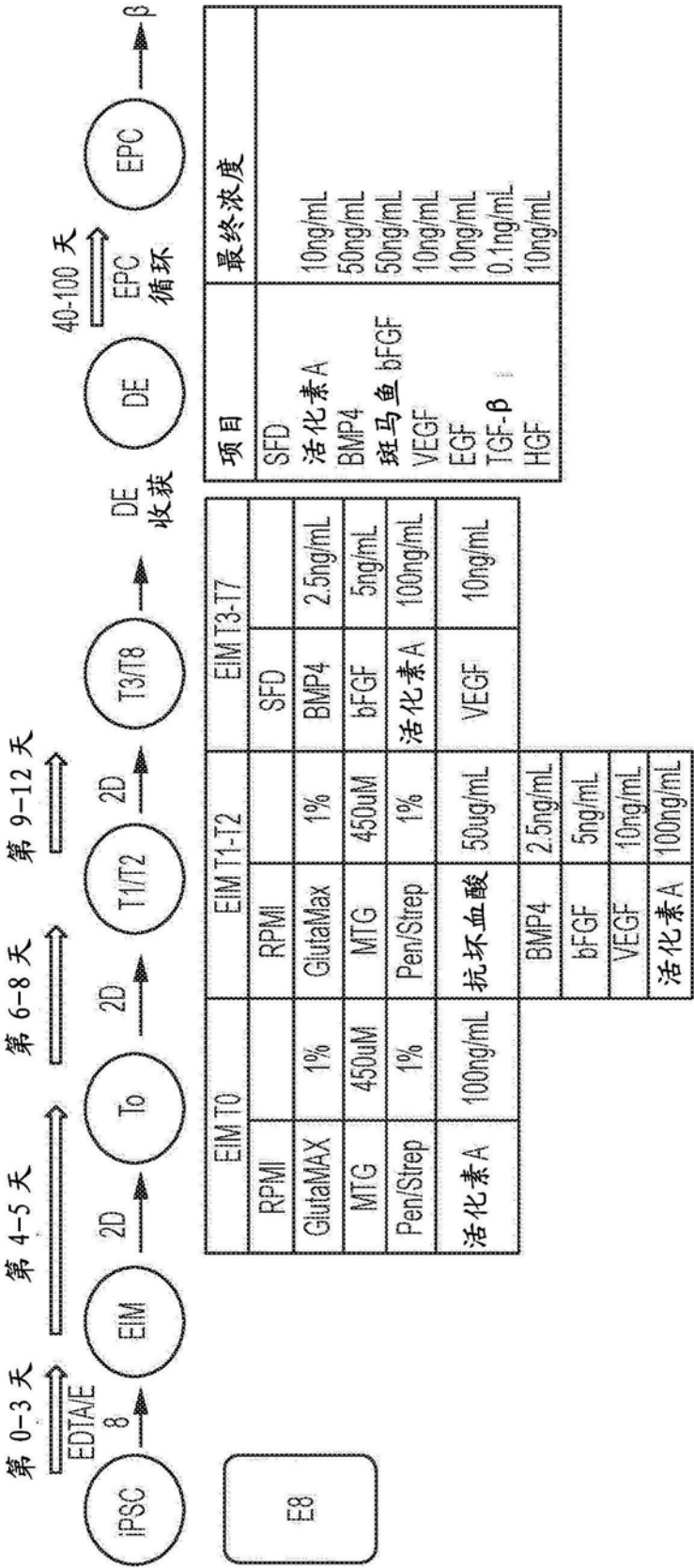


图21

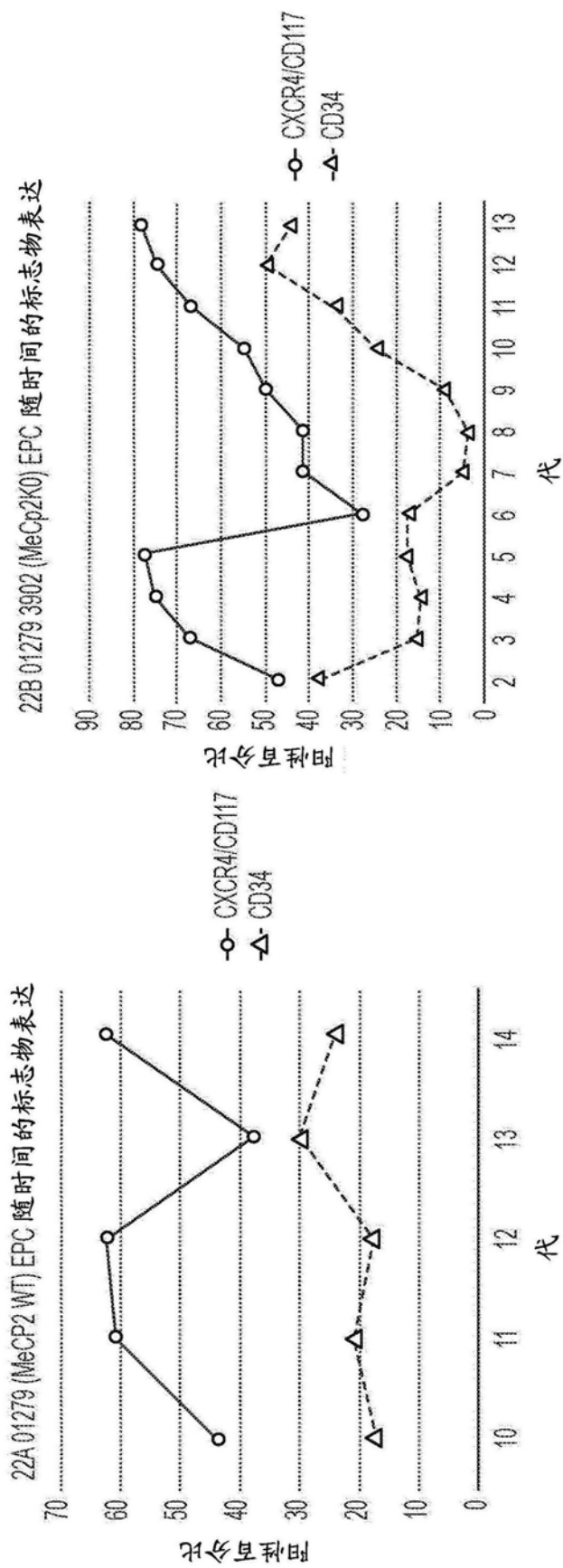


图22A-22B

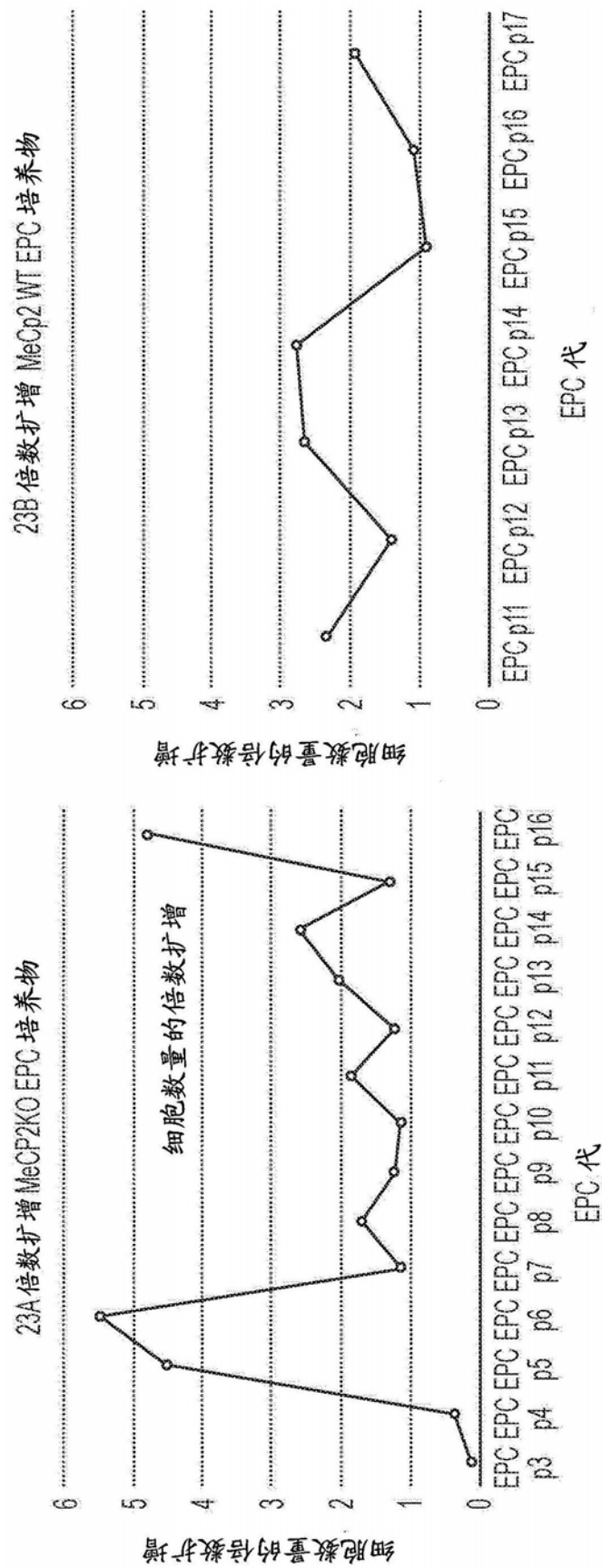


图23A-23B

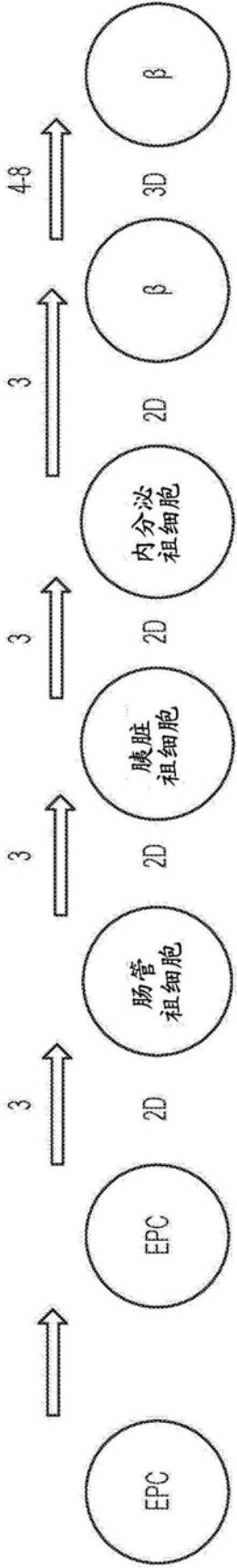


图23C

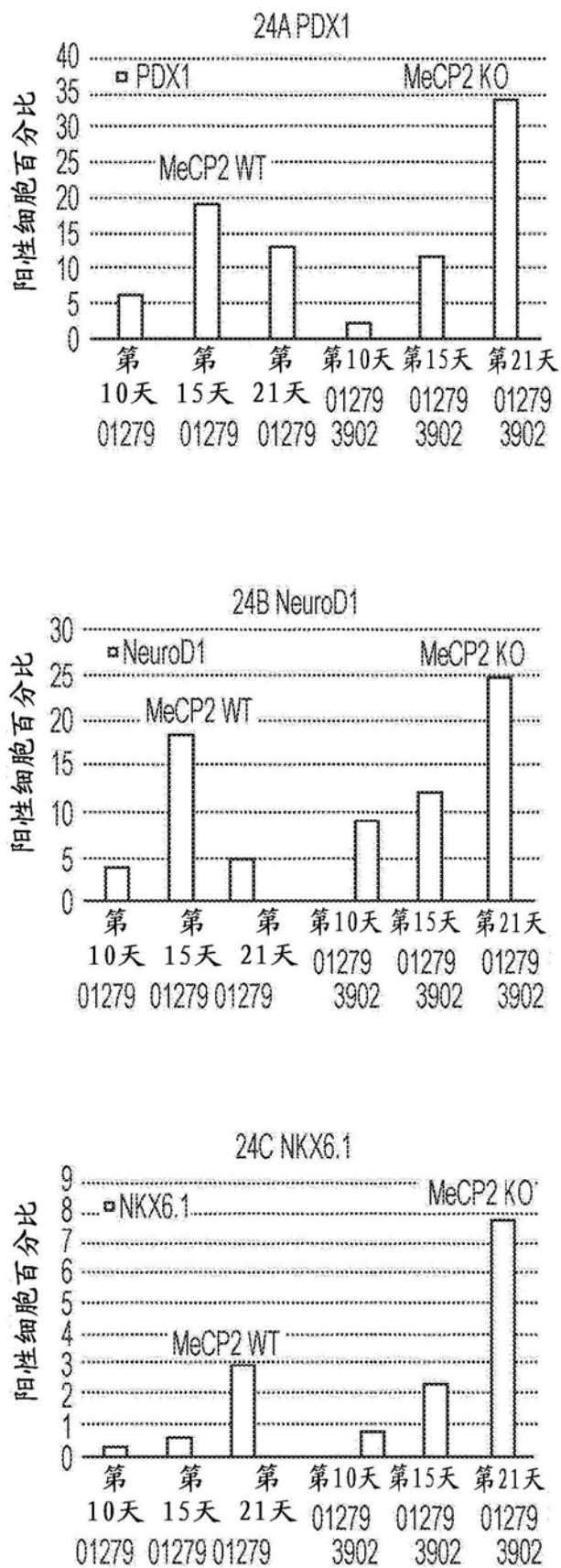


图24A-C

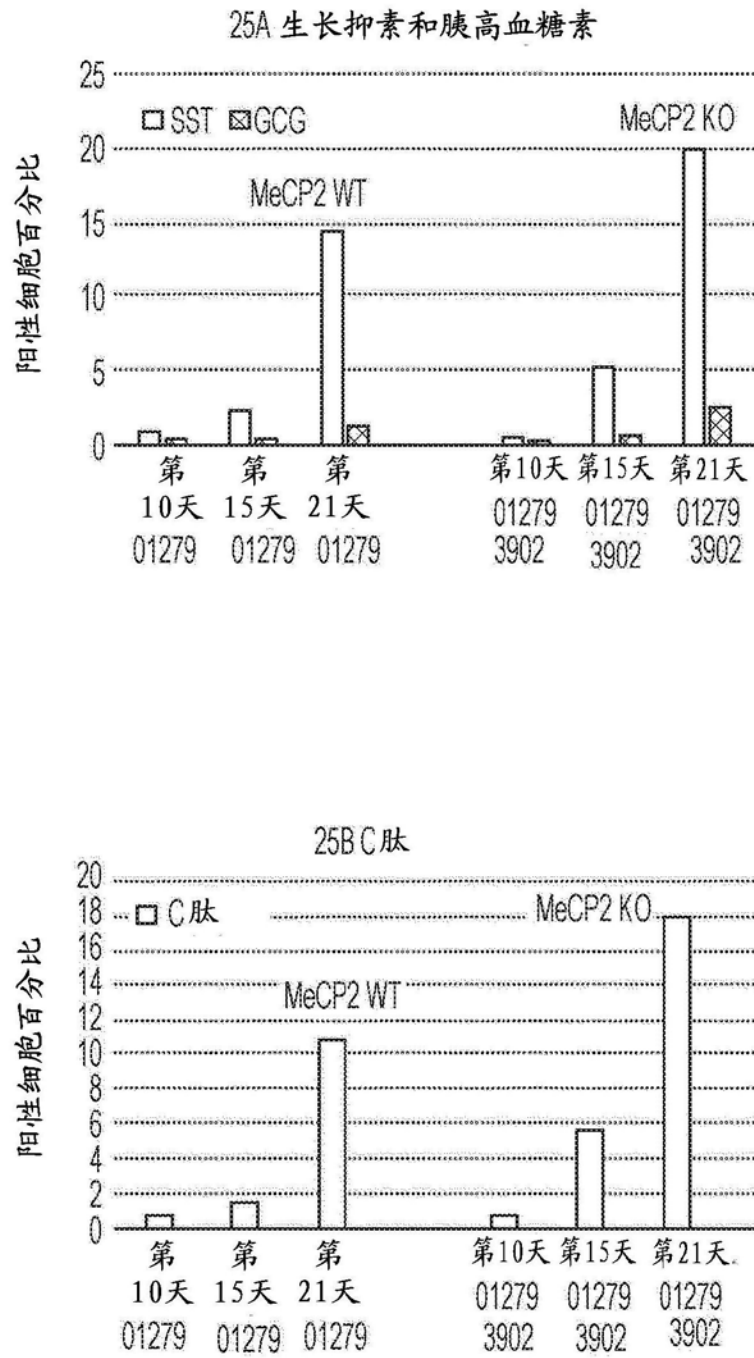


图25A-25B

在 MeCP2WT 和 MeCP2K0 细胞中的激素表达谱

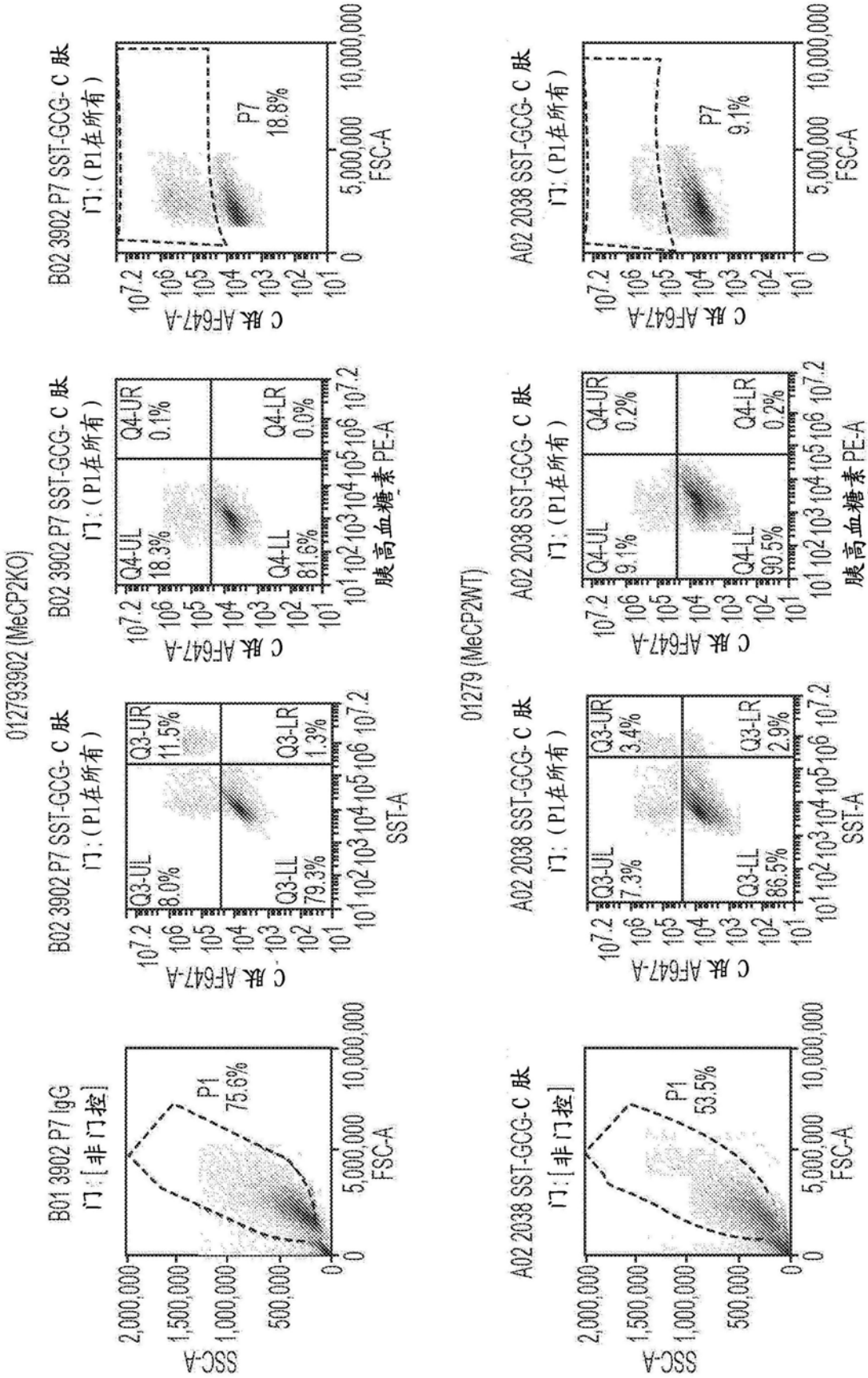
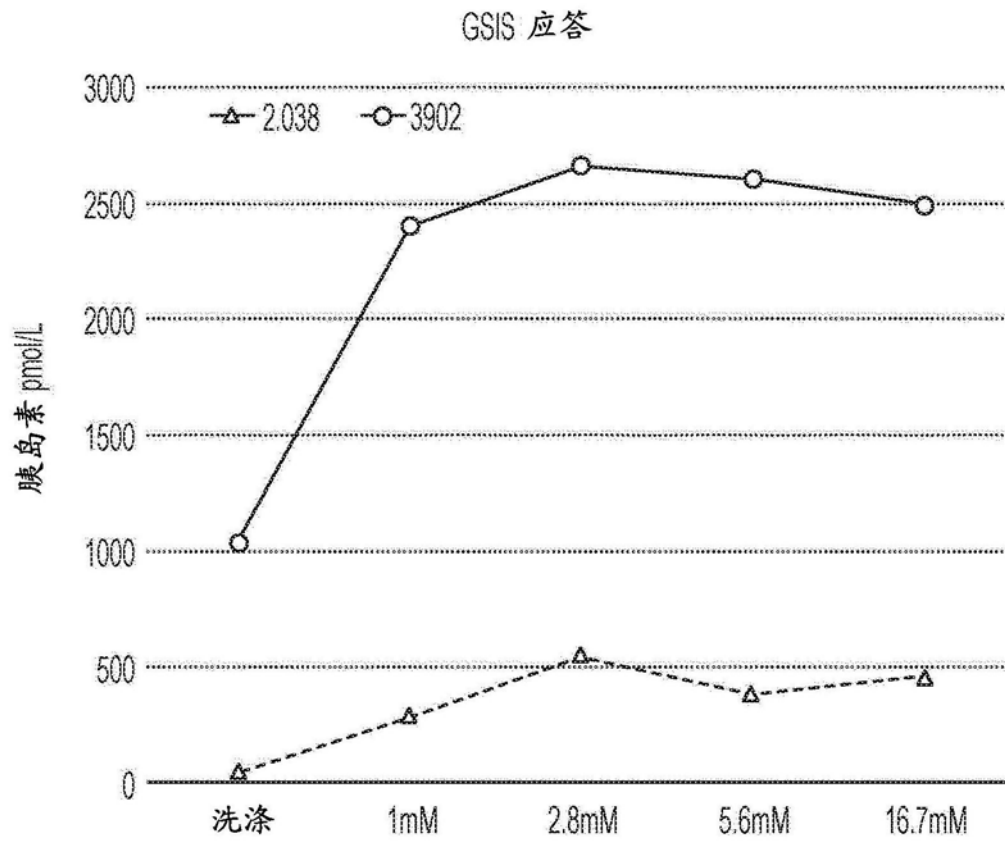


图26



两个独立实验的总结
数据没有针对活细胞数量标准化

图27

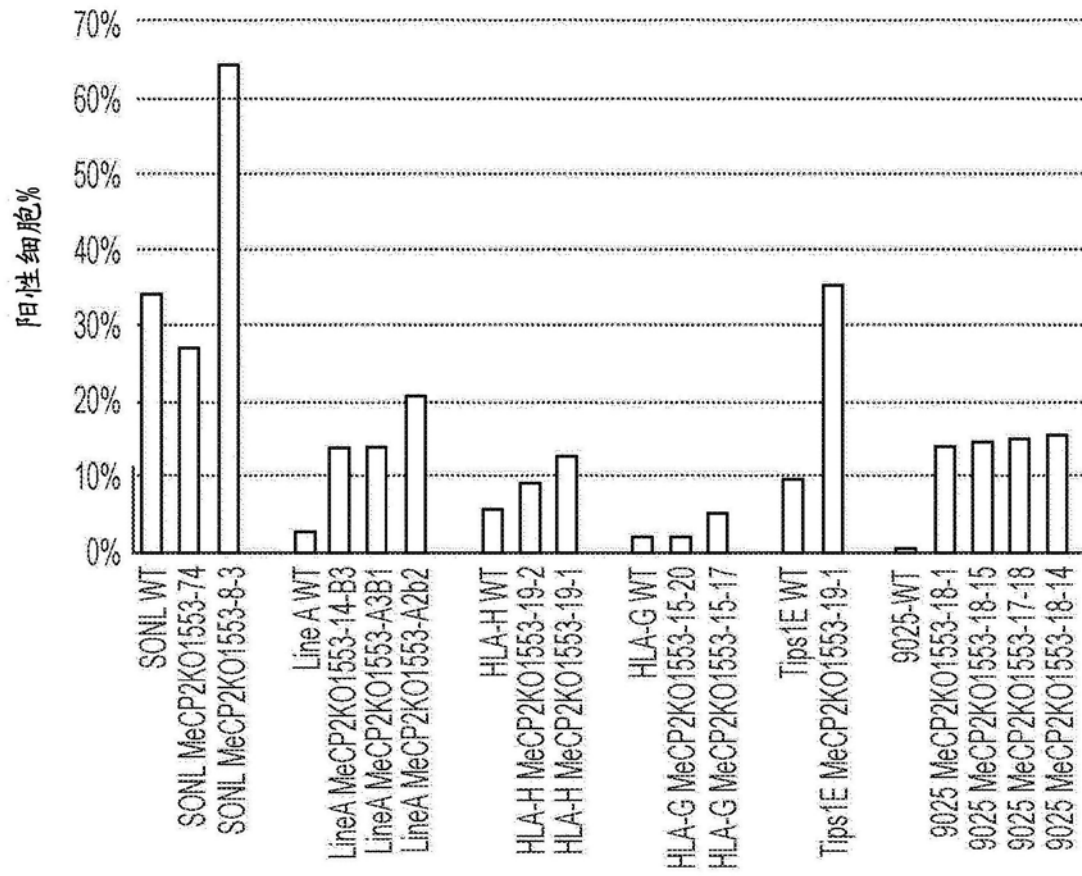


图28

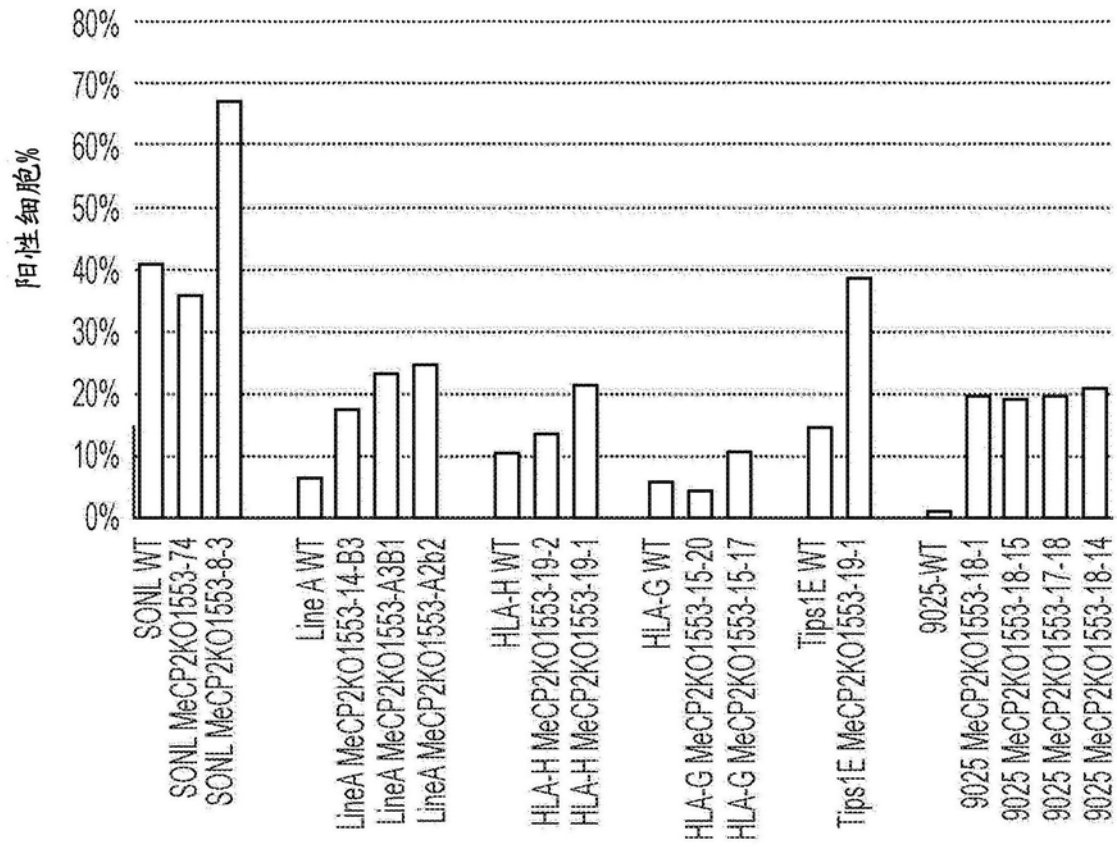


图29

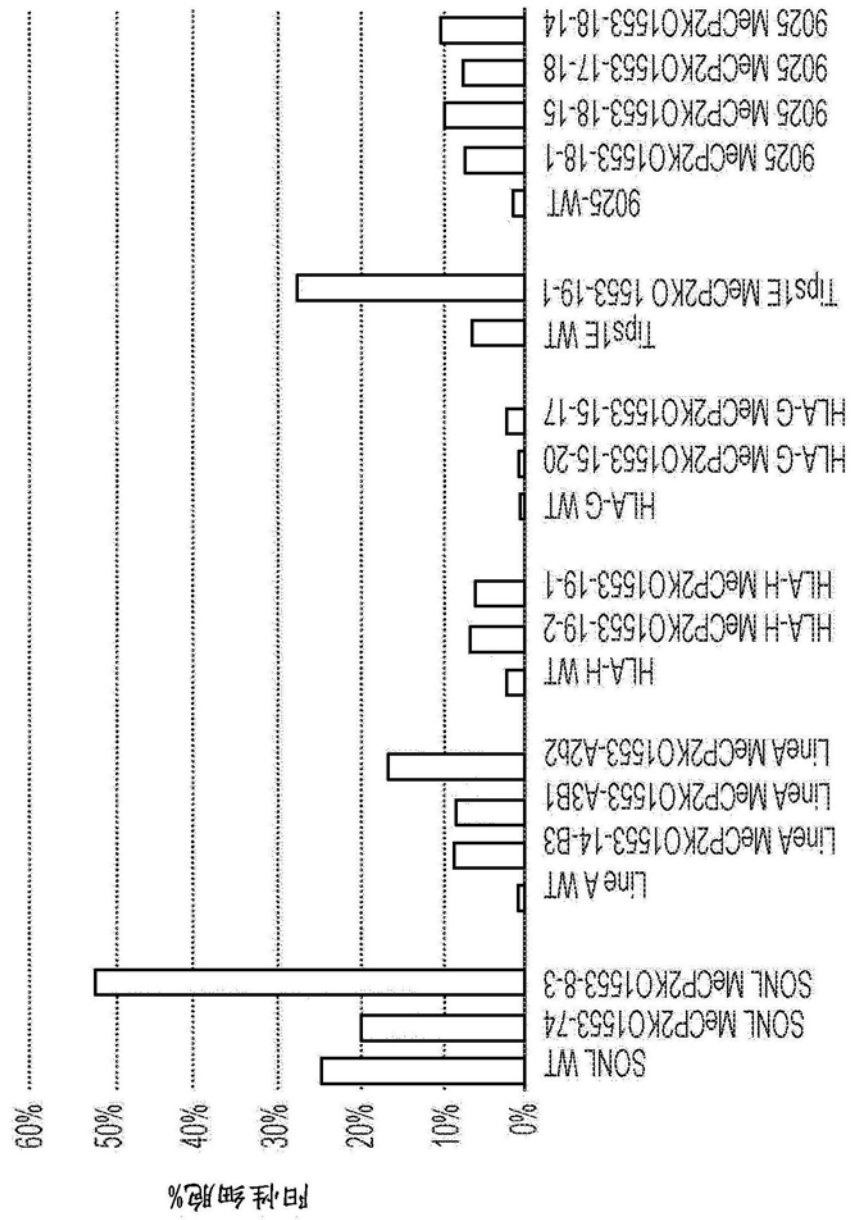


图30

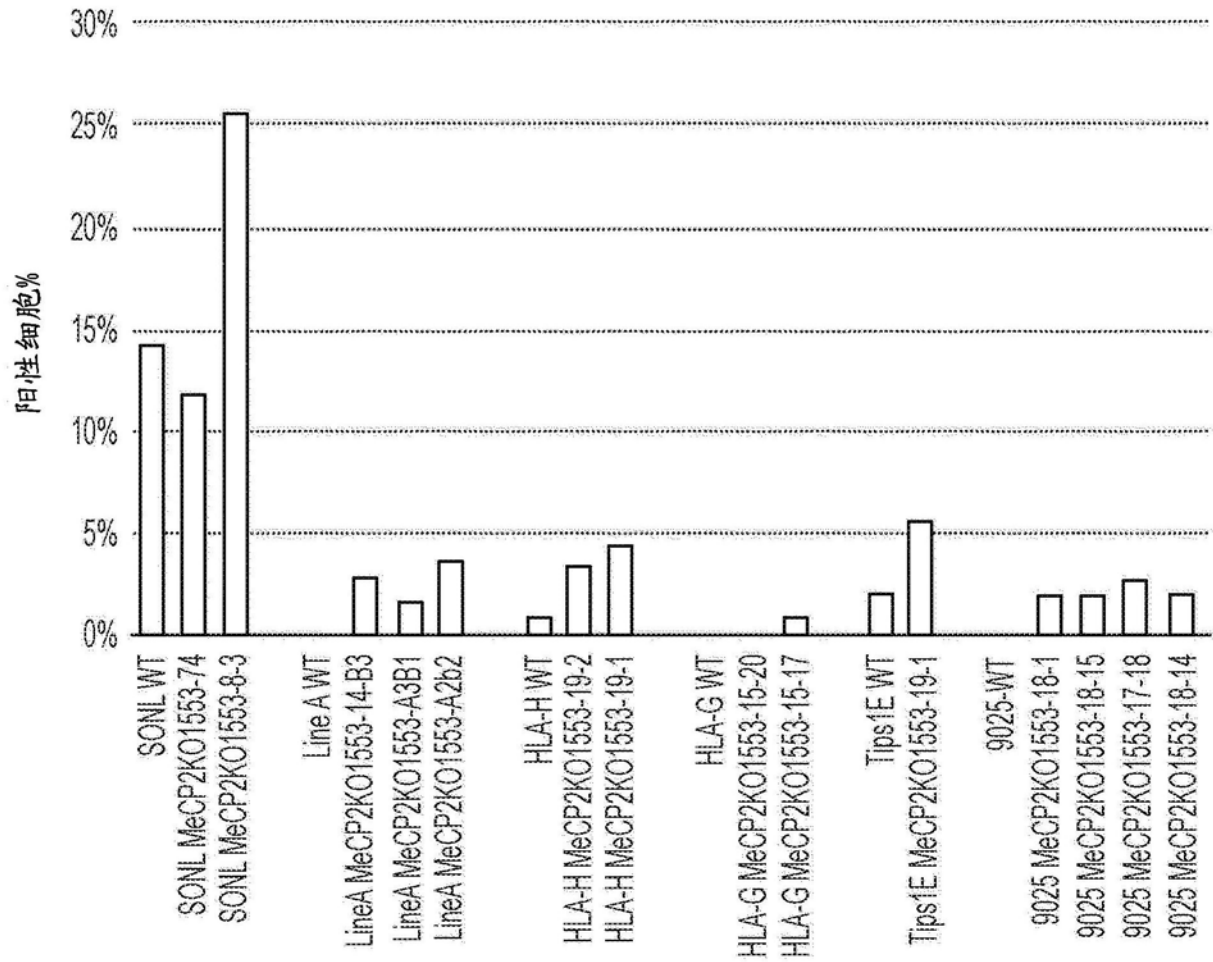


图31

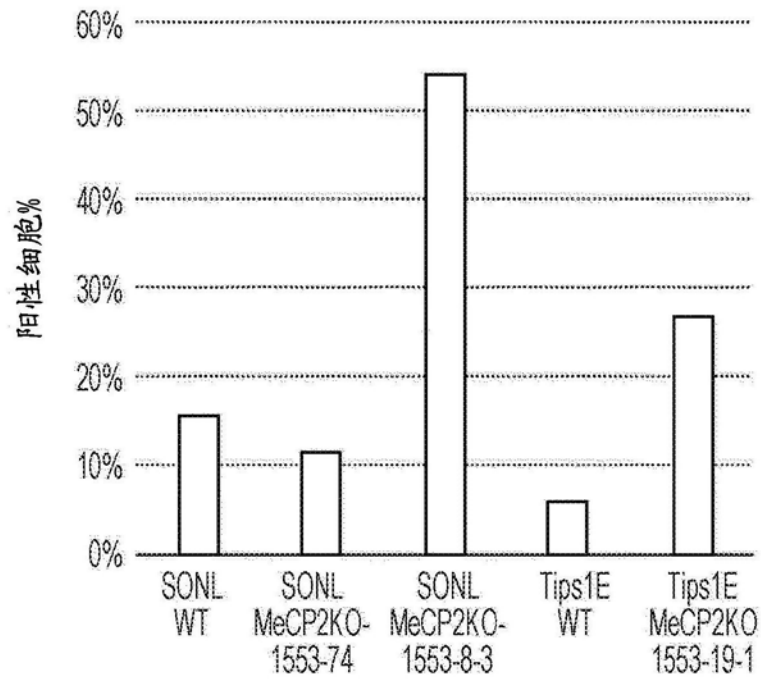


图32A

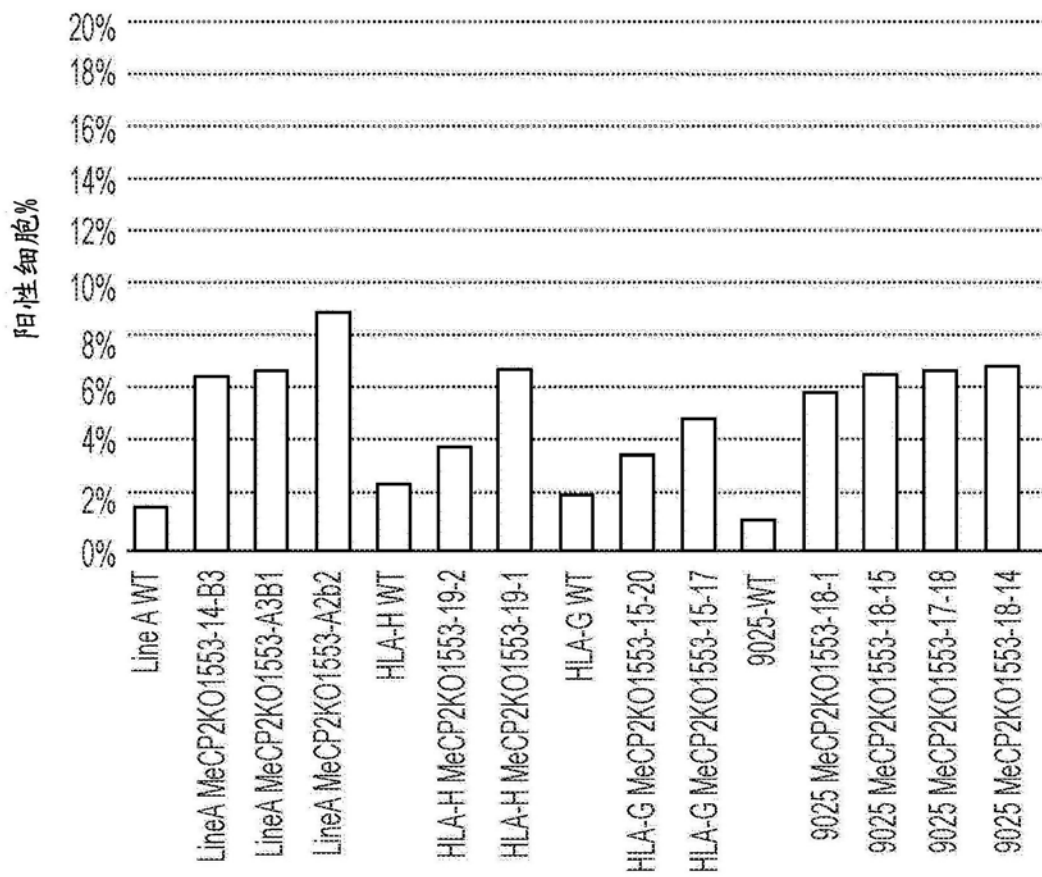


图32B

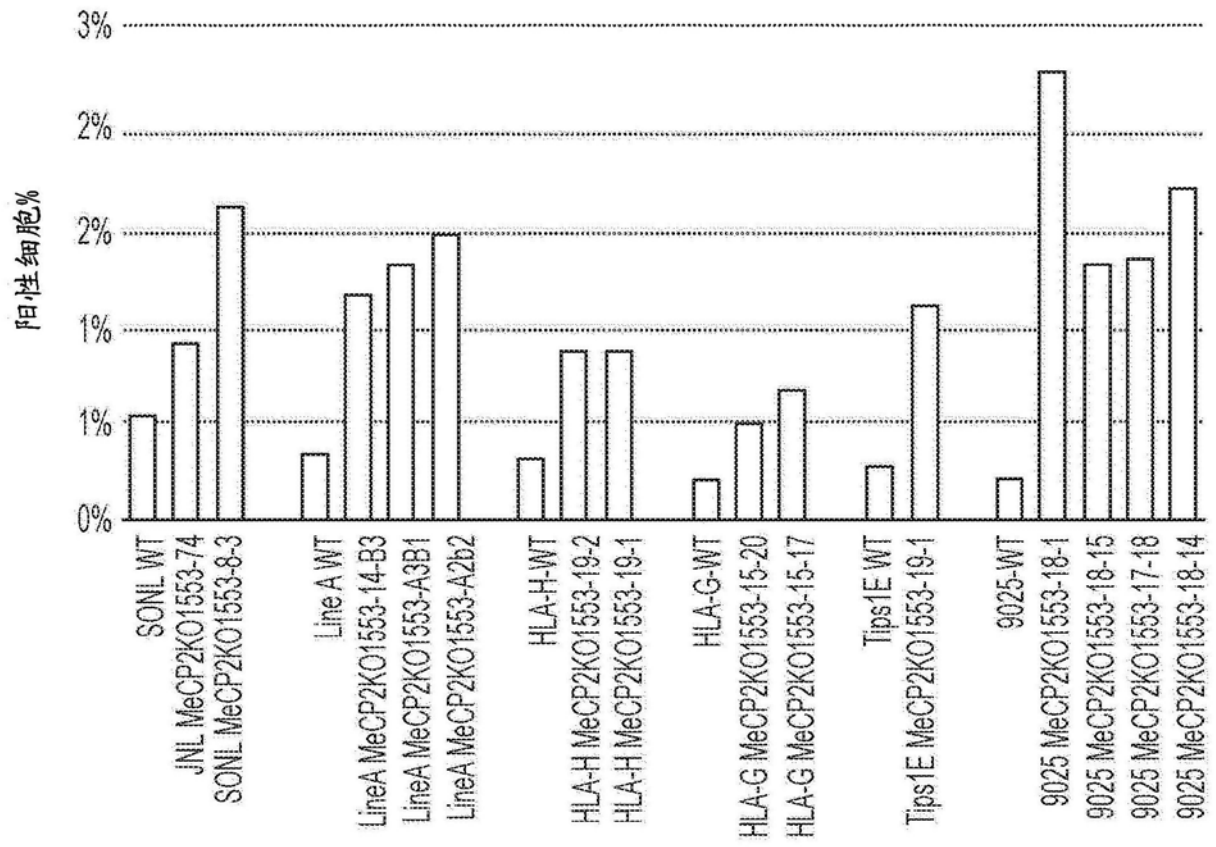


图33

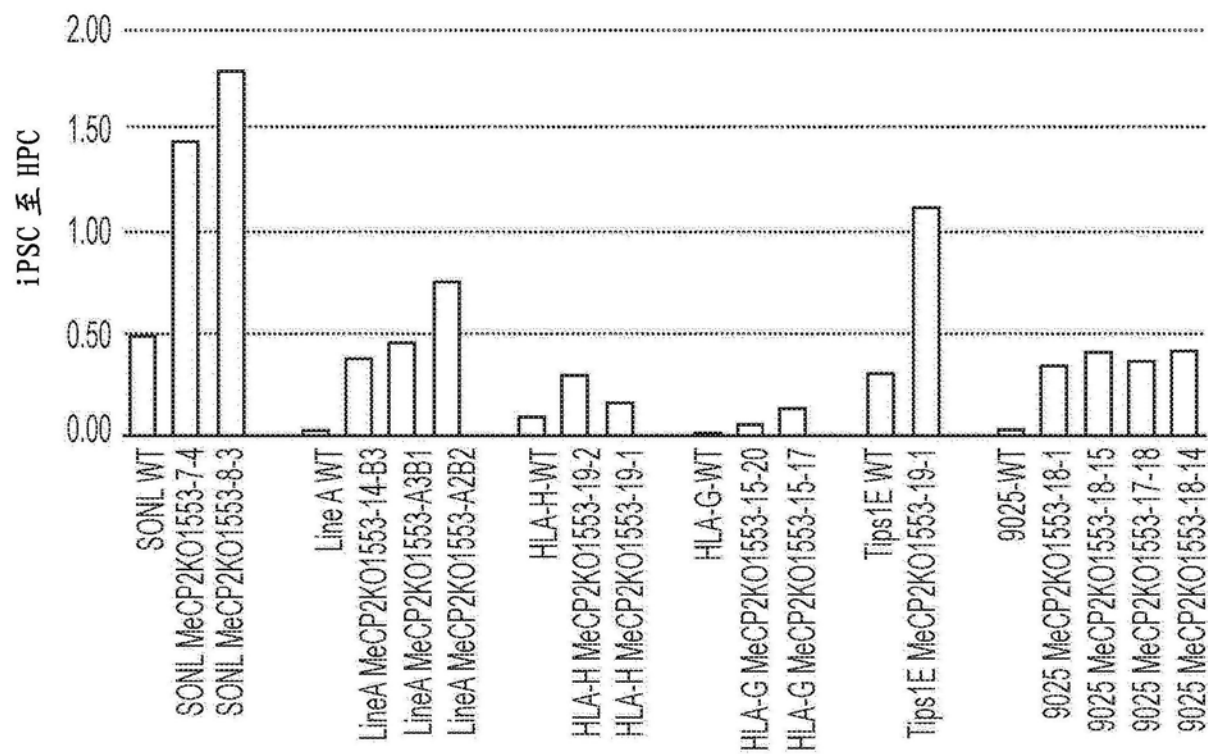


图34

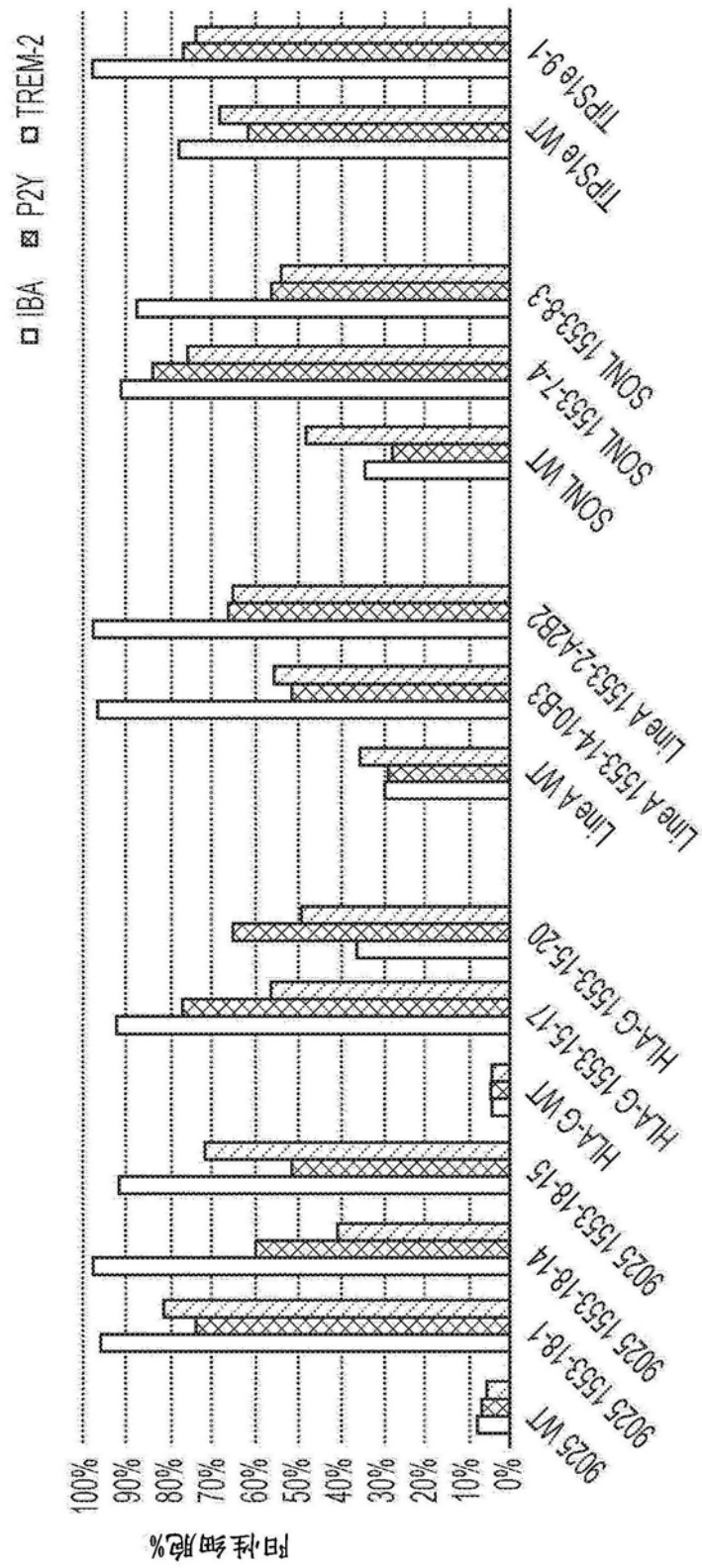


图35

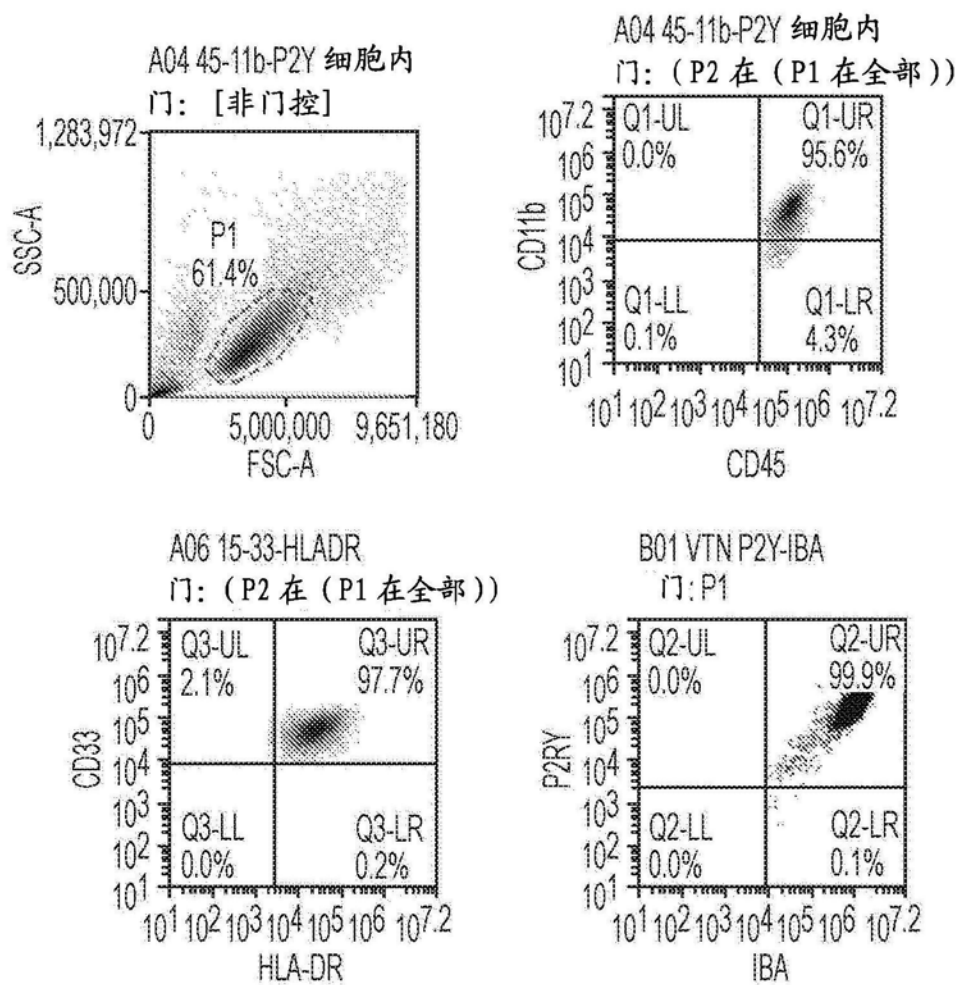


图36

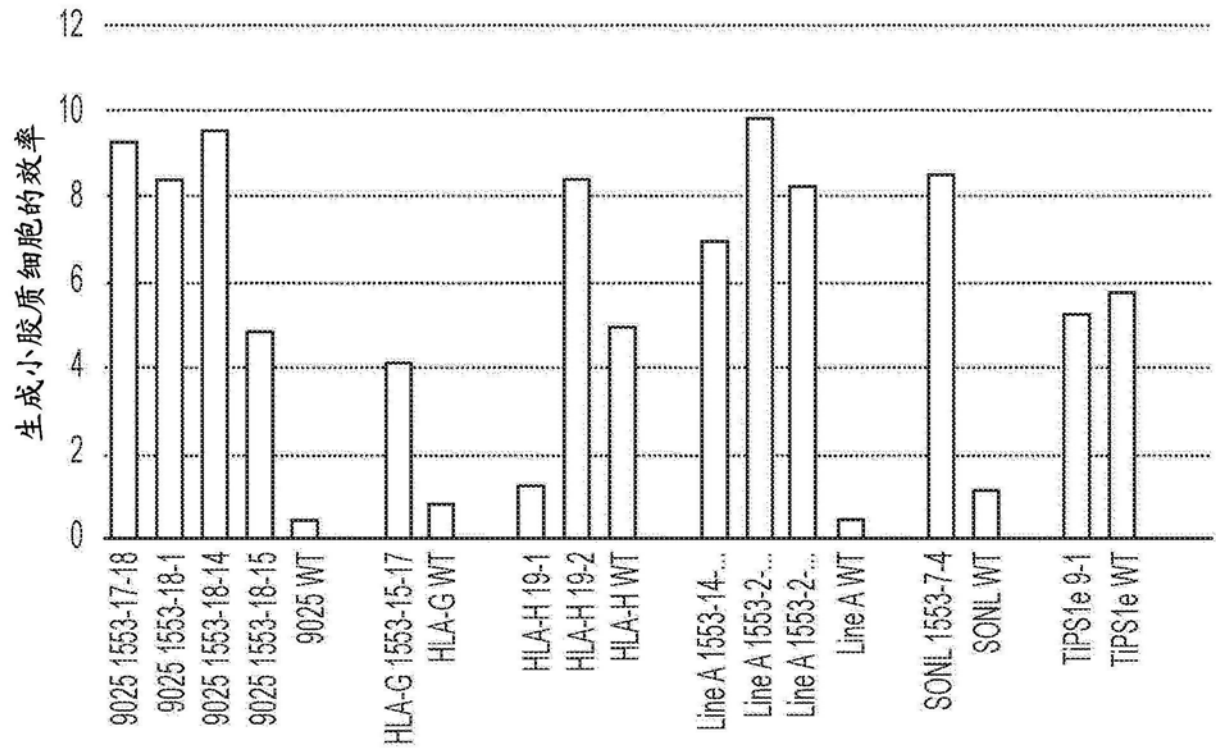


图37

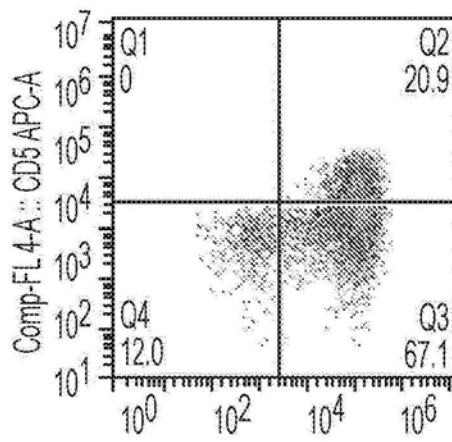


图38A

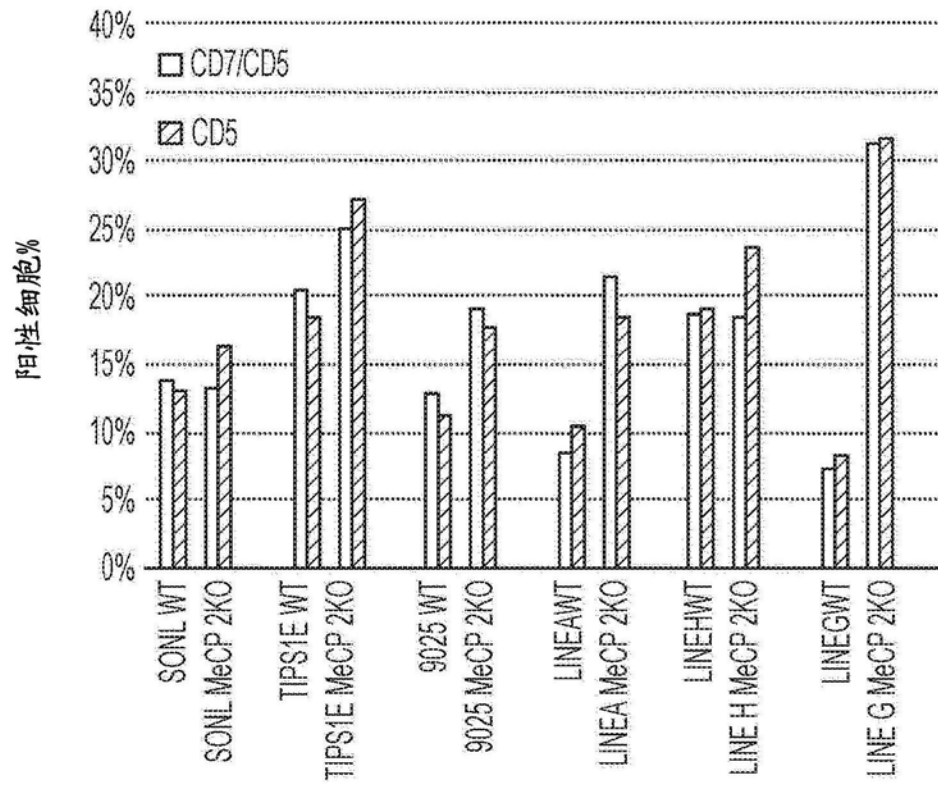


图38B

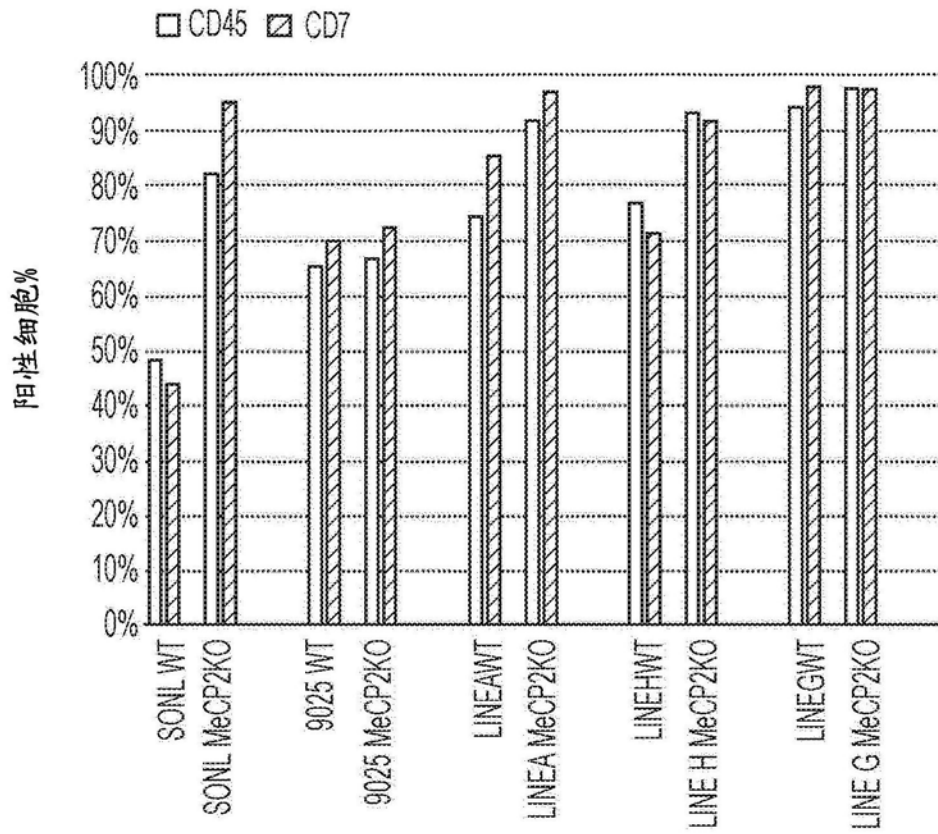


图38C

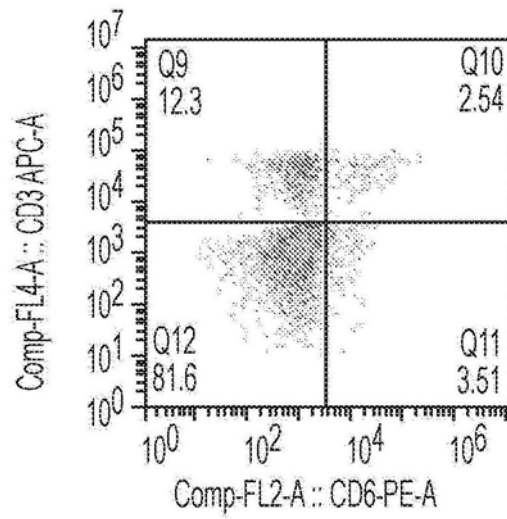


图39A

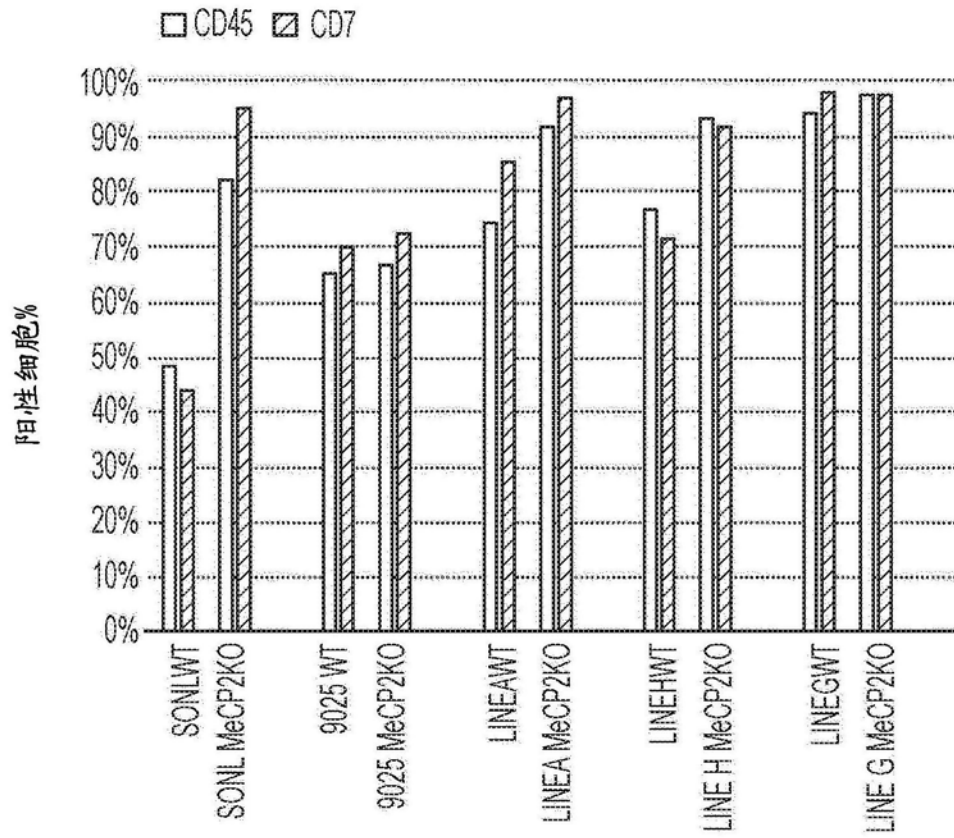


图39B

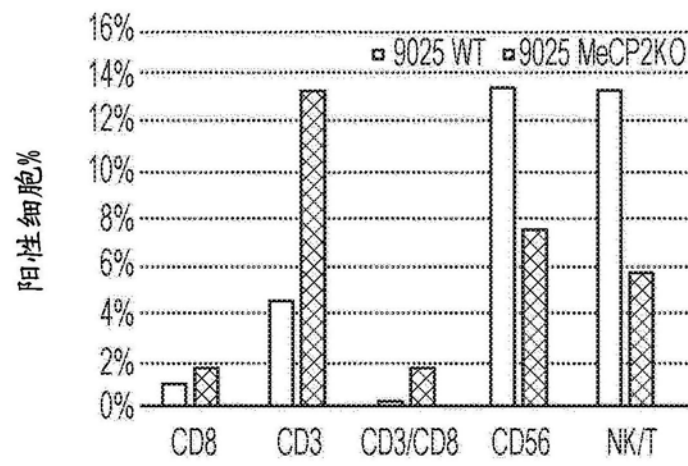


图39C

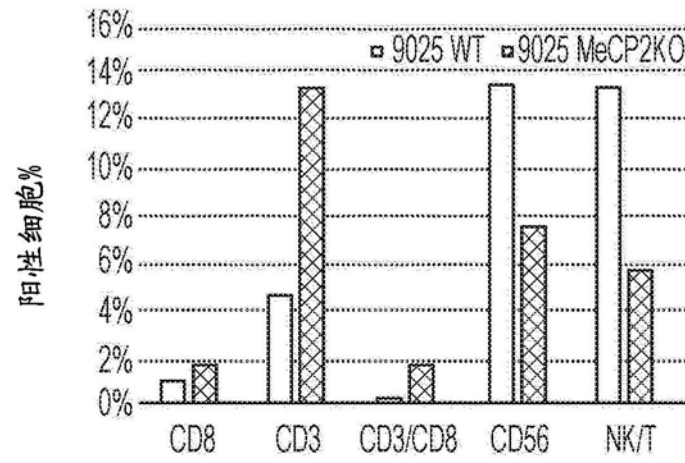


图39D

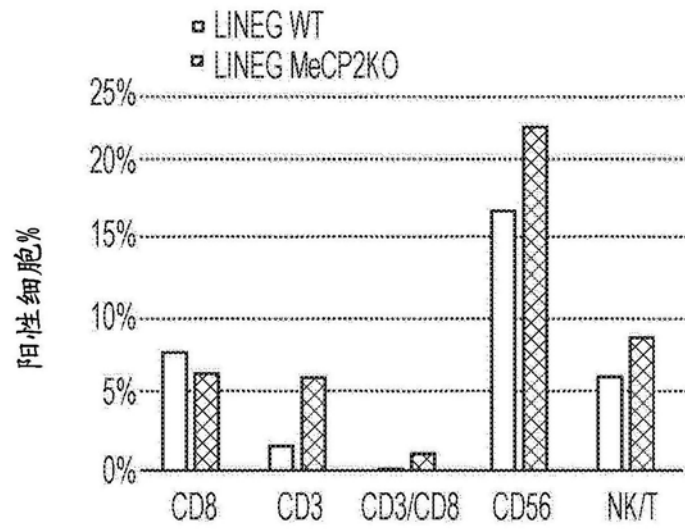


图39E

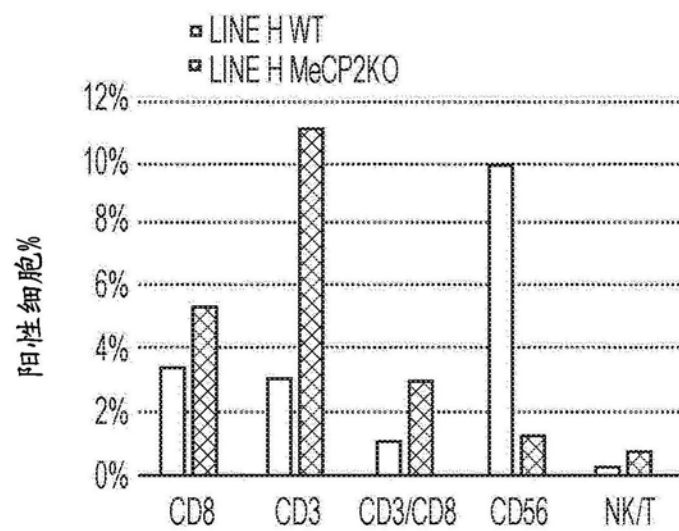


图39F

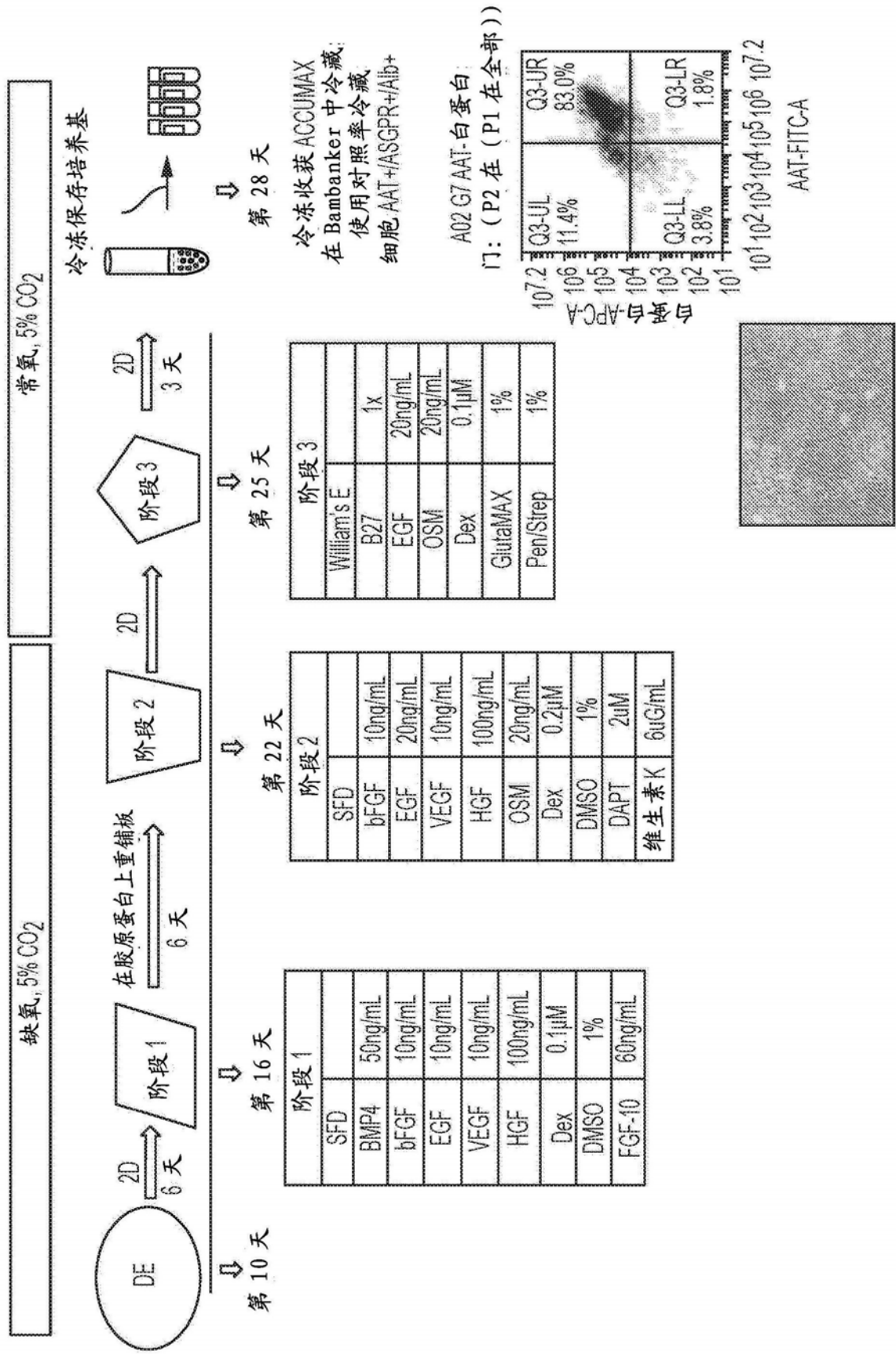


图40

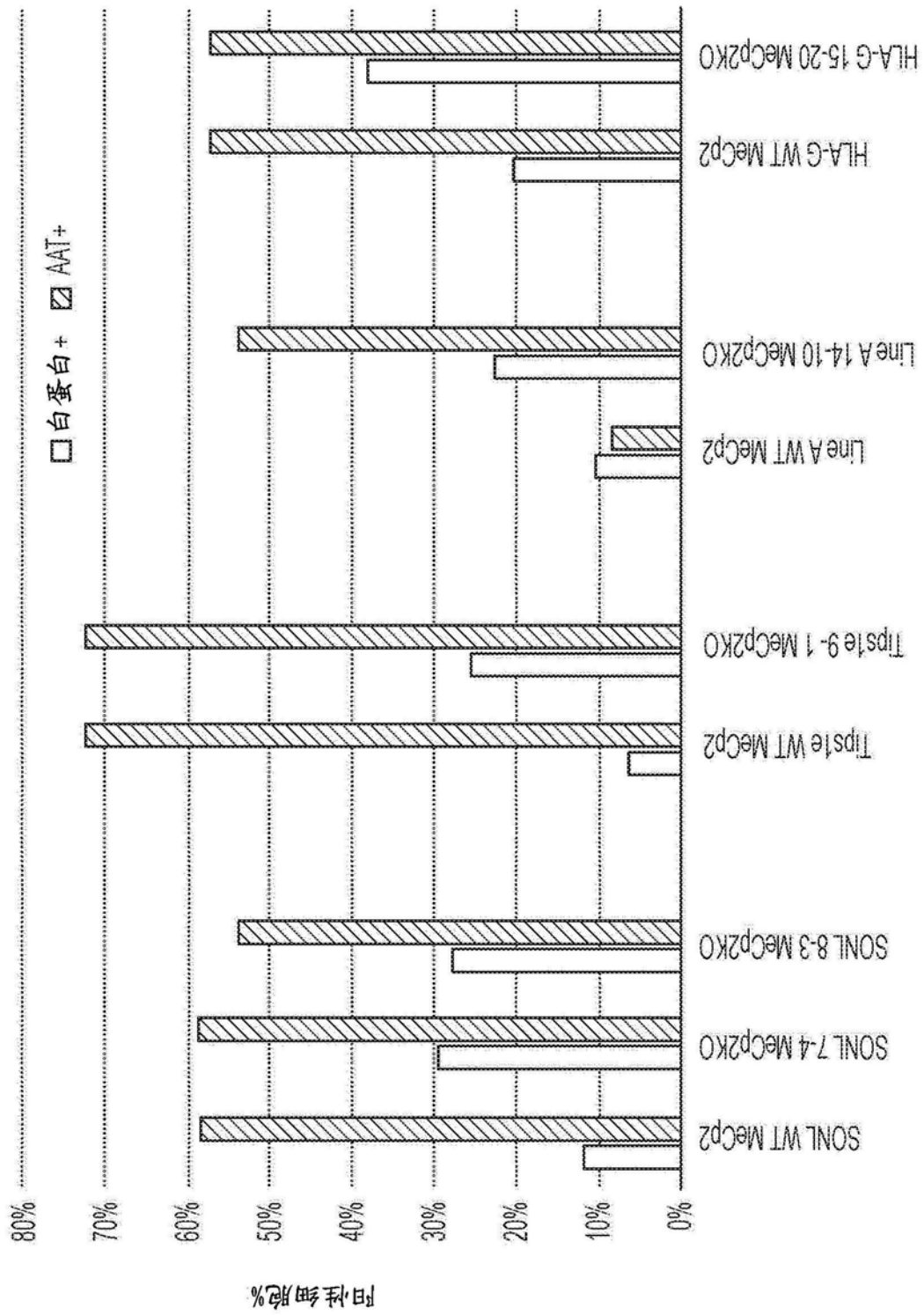


图41

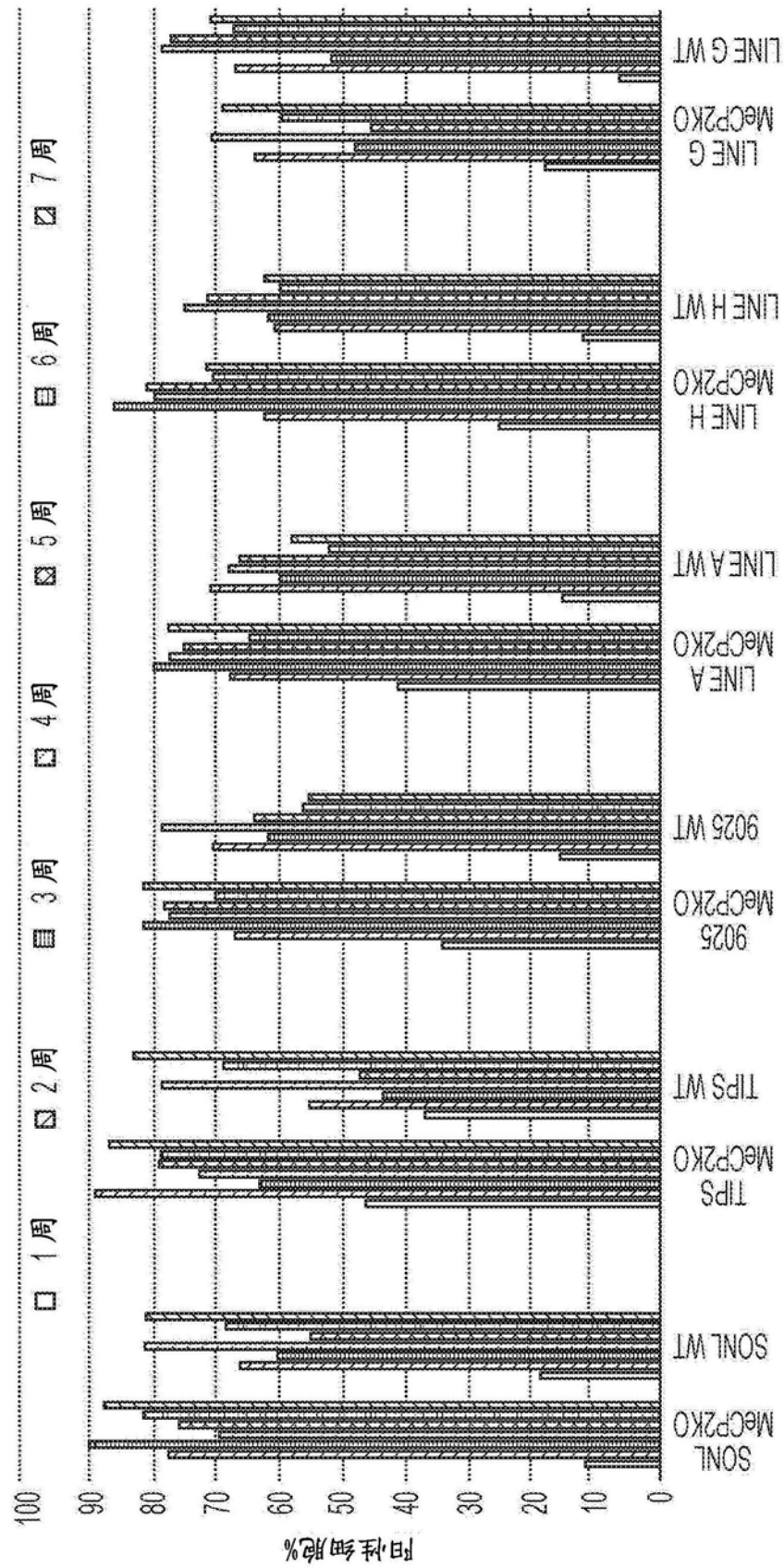


图42

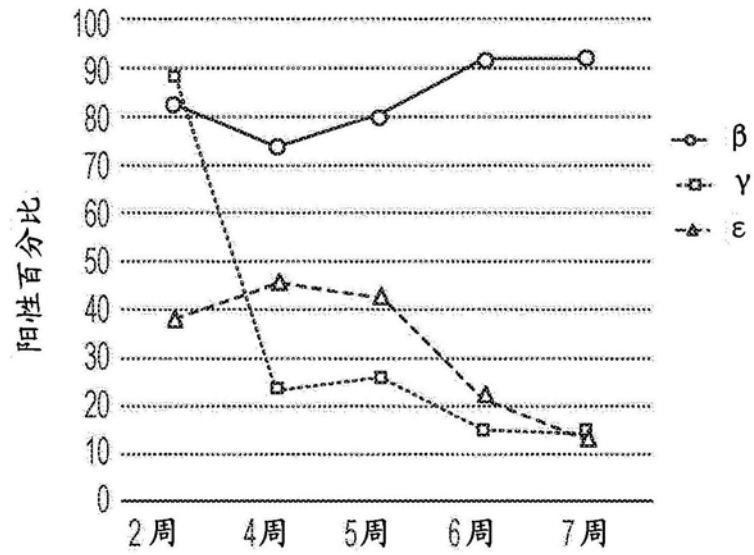


图43A

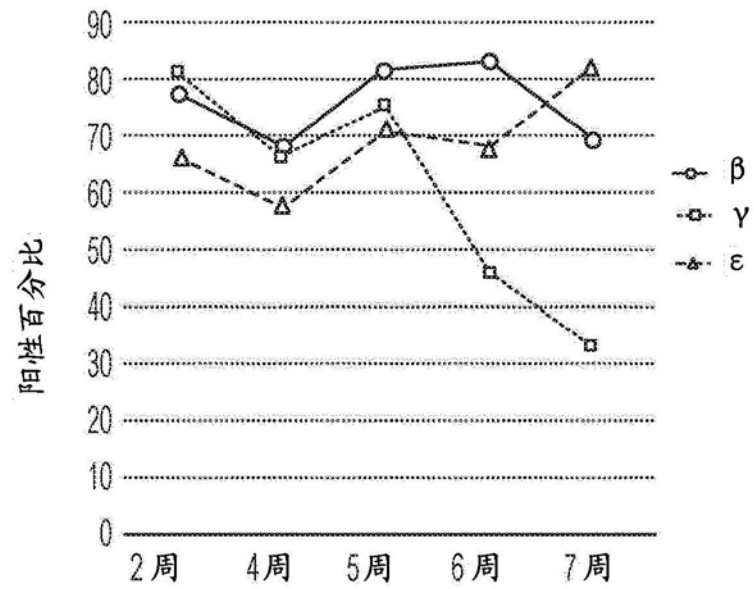


图43B

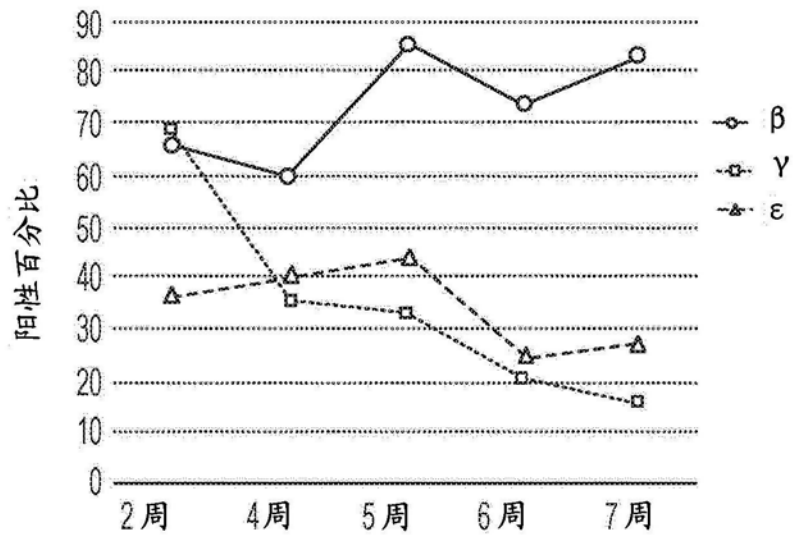


图44A

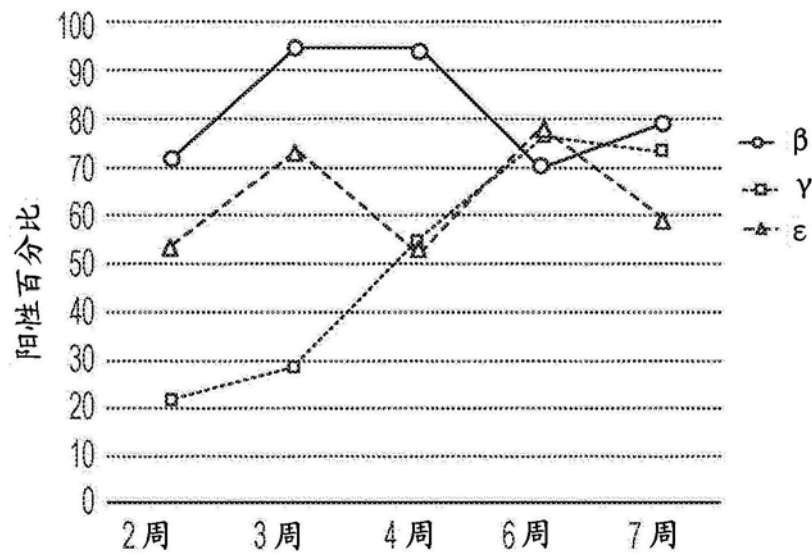


图44B

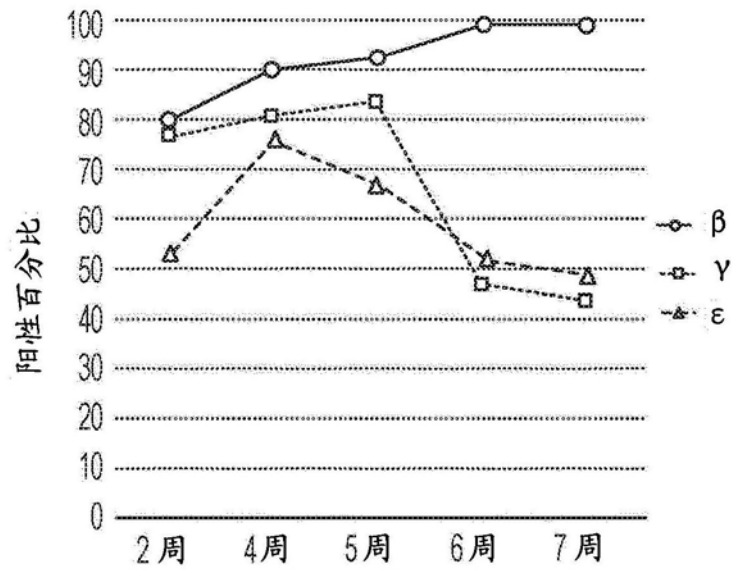


图45A

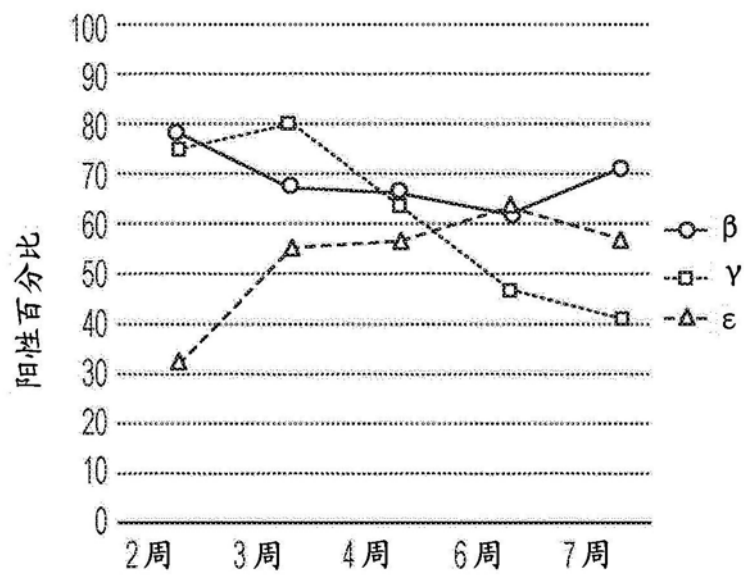


图45B

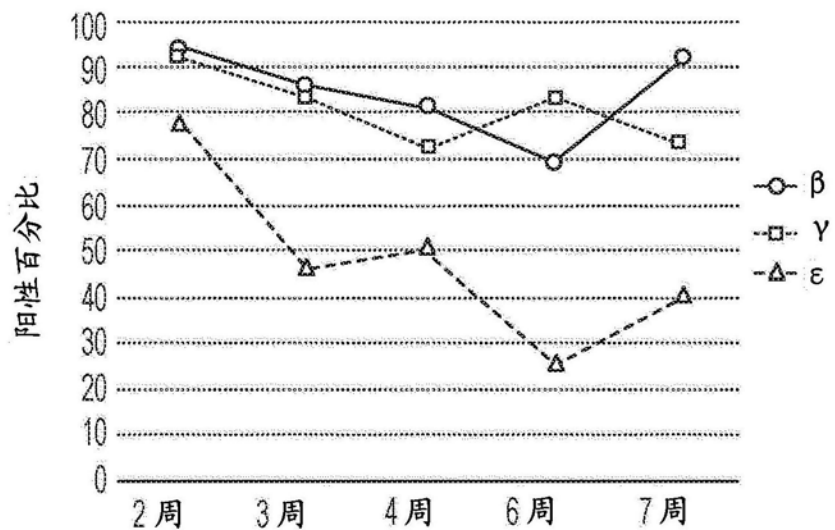


图46A

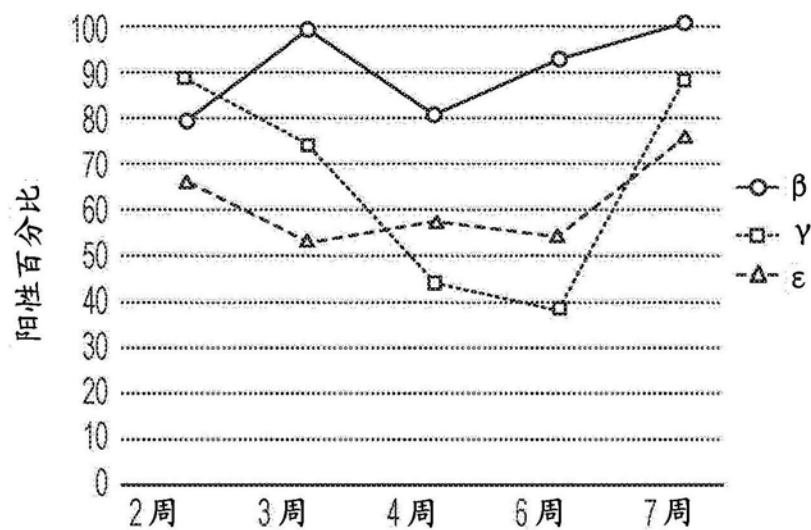


图46B

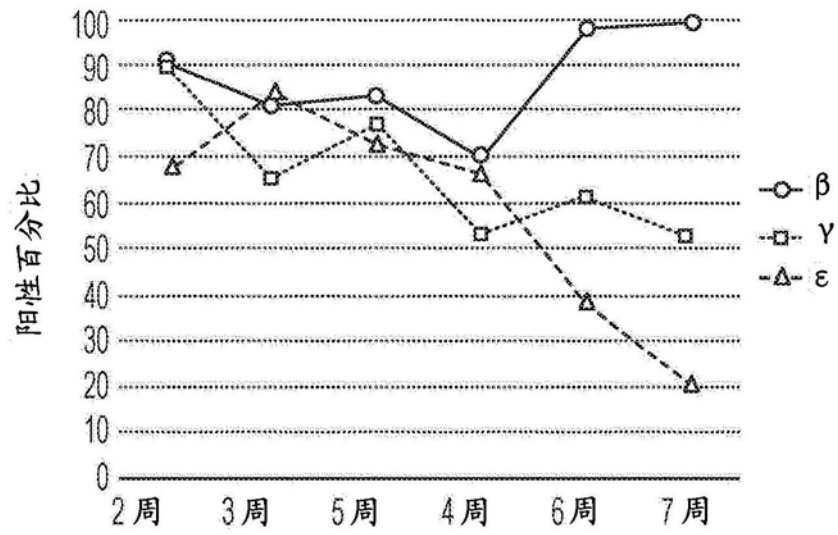


图47A

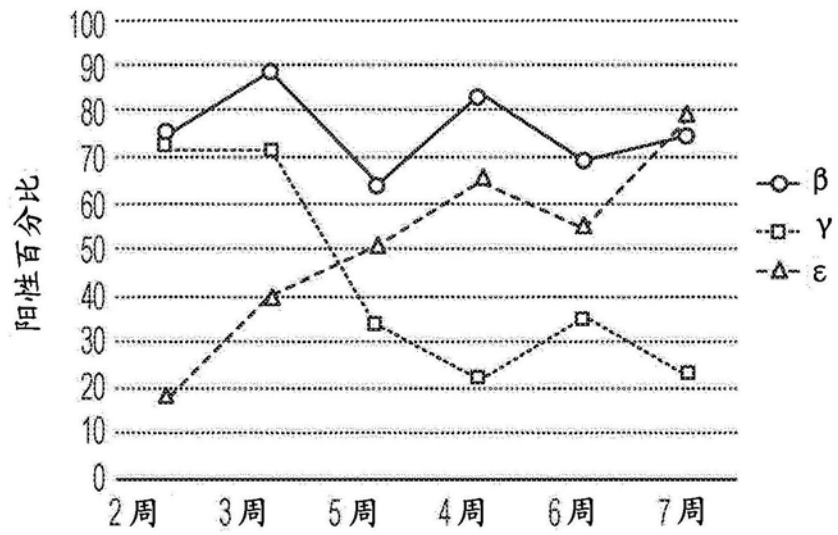


图47B

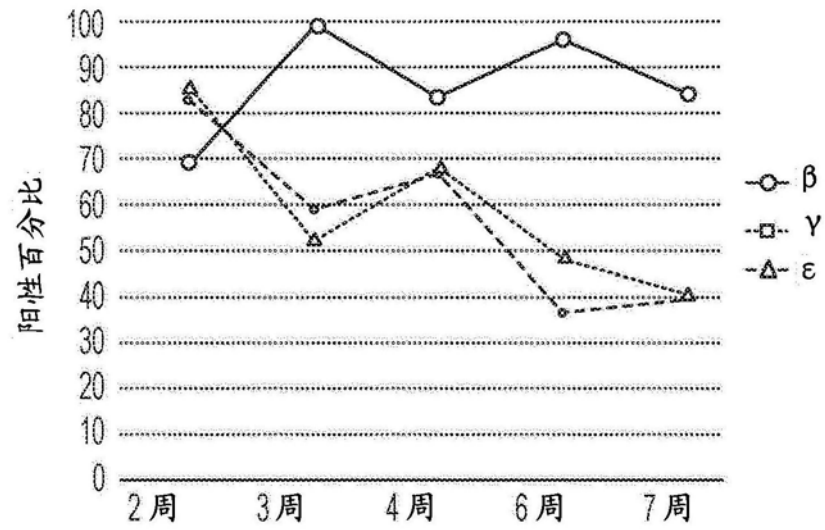


图48A

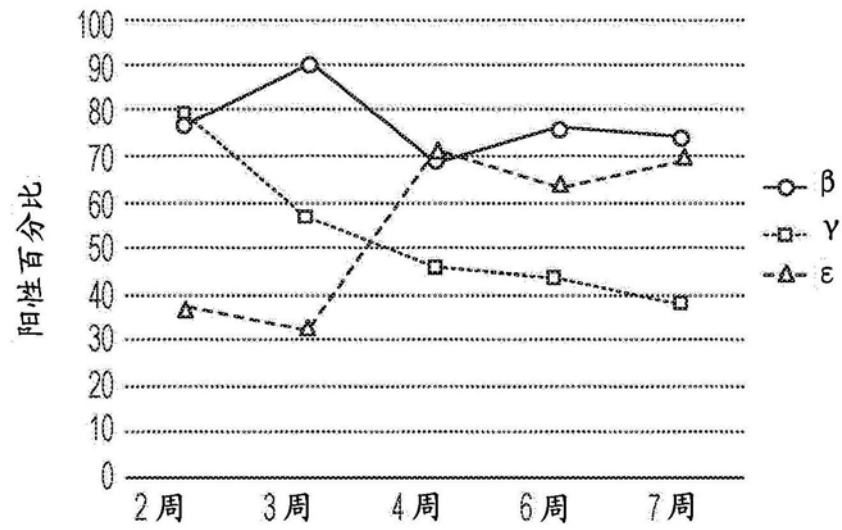


图48B