



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105861443 A

(43)申请公布日 2016.08.17

(21)申请号 201610213311.5

(22)申请日 2008.04.07

(30)优先权数据

60/922,121 2007.04.07 US

60/959,341 2007.07.12 US

61/036,065 2008.03.12 US

(62)分案原申请数据

200880015182.2 2008.04.07

(71)申请人 怀特黑德生物医学研究所

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 鲁道夫·耶尼施 雅各布·汉纳

马里厄斯·韦尼希

克里斯多佛·J·莱恩奈尔

亚历山大·迈斯纳

奥利弗·托比亚斯·布兰布林克

G·格朗特·韦尔斯泰德

鲁思·福尔曼

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 杨青 穆德骏

(51)Int.Cl.

C12N 5/10(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

C12N 15/877(2010.01)

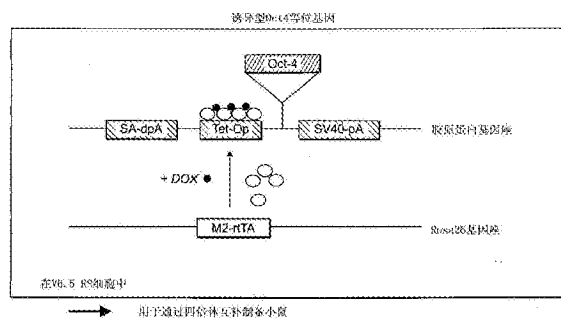
权利要求书2页 说明书68页 附图4页

(54)发明名称

体细胞重编程

(57)摘要

本发明涉及体细胞重编程领域。具体来说，本发明涉及分离的全能重编程人类体细胞的纯化制品，产生重编程的人类体细胞的方法，以及将分化的人类体细胞重编程为全能状态的方法。



1. 分离的全能重编程人类体细胞的纯化制品,其中所述细胞
 - (a)表达内源性Oct4和Nanog;
 - (b)注入SCID小鼠时分化成为具有内胚层、中胚层和外胚层特征的组织;
 - (c)不包含编码可操作连接到内源全能性基因的选择性标记的DNA;
 - (d)通过导入人类体细胞构建物而被重编程,所述人类体细胞构建物包含编码Oct4、Sox2、或Klf4但不编码c-Myc的一种或多种外源多核苷酸;和
 - (e)不是胚胎干细胞。
2. 权利要求1的细胞的纯化制品,其中至少50%的细胞对DNA去甲基化有抗性。
3. 权利要求1的细胞的纯化制品,其中所述细胞在DNA甲基转移酶I的表达减少至少50%的条件下存活。
4. 权利要求1的细胞的纯化制品,其中所述细胞是非遗传修饰的。
5. 权利要求1的细胞的纯化制品,其中所述细胞包含至少一种遗传修饰。
6. 权利要求1的细胞的纯化制品,其中所述细胞与所述体细胞的供体或所述体细胞的前体细胞的供体遗传匹配,其中所述供体是需要细胞治疗的个体。
7. 产生重编程的人类体细胞的方法,包括以下步骤:向人类体细胞导入编码Oct4、Sox2、或Klf4但不编码c-Myc的一种或多种外源导入的多核苷酸;其中所述细胞已经重编程为全能状态,其中所述细胞(i)对DNA去甲基化有抗性;(ii)表达内源性Oct4;(iii)不包含可操作连接到内源全能性基因的选择性标记;和(iv)注入SCID小鼠时分化成为具有内胚层、中胚层和外胚层特征的组织。
8. 权利要求7的方法,其中两种或多种外源导入的编码Oct4、Sox2、或Klf4的多核苷酸导入细胞中。
9. 权利要求8的方法,其中外源导入的编码Oct-4和Sox-2的多核苷酸导入细胞中。
10. 权利要求8的方法,其中外源导入的编码Oct-4和Klf4的多核苷酸导入细胞中。
11. 权利要求7的方法,其中一种或多种外源导入的编码Oct-4、Sox-2和Klf4的多核苷酸导入细胞中。
12. 权利要求7的方法,其中外源导入的多核苷酸是经转染导入的。
13. 权利要求7的方法,其中外源导入的多核苷酸是经病毒感染导入的。
14. 权利要求7的方法,还包括如下步骤:使至少一种所述外源导入的多核苷酸功能失活。
15. 权利要求14的方法,包括通过在所述细胞中导入位点特异性重组酶或在细胞中表达位点特异性重组酶,切除至少一部分所述外源导入的多核苷酸。
16. 将分化的人类体细胞重编程为全能状态的方法,所述方法包括如下步骤:
 - (a)将分化的人类体细胞与至少一种选自Oct4、Sox2和Klf-4、但不选自c-Myc的重编程剂接触,其中所述细胞不包含与内源全能性基因可操作连接的选择性标记;和
 - (b)在适合所述细胞增殖并适合所述至少一种重编程剂活性的条件下维持所述细胞足以开始重编程所述细胞的时间段;由此将细胞重编程为全能性状态。
17. 权利要求16的方法,其中所述至少一种重编程剂是多核苷酸。
18. 权利要求16的方法,其中所述至少一种重编程剂是多肽。

-
19. 权利要求16的方法,其中所述分化的体细胞是部分分化的细胞。
 20. 权利要求16的方法,其中所述分化的体细胞是完全分化的。

体细胞重编程

[0001] 本申请是申请日为2008年4月7日、申请号为200880015182.2、发明名称为“体细胞重编程”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 与相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2008年3月12日提交的美国临时申请No.61/036,065;2007年7月12日提交的美国临时申请No.60/959,341;和2007年4月7日提交的美国临时申请No.60/922,121的优先权。这些申请的说明书合并在此作为参考。

[0004] 政府支持

[0005] 本发明整体或部分受到国立卫生院(National Institutes of Health)的资金5-R01-HD045022、5-R37-CA084198和5-R01-CA087869的支持。美国政府在本发明中享有一定的权利。

[0006] 发明背景

[0007] 由于在细胞命运特化(cell fate specification)期间,细胞经历了渐进性的发育能力丧失,胚胎发育和细胞分化被认为是单向的途经。迄今已知两类全能干细胞:胚胎干细胞和胚胎生殖细胞。胚胎干细胞是直接源于胚胎的全能干细胞。胚胎生殖细胞是直接源于流产胎儿的胎儿组织的全能干细胞。为了简单起见,胚胎干细胞和胚胎生殖细胞在此总称为“ES”细胞。

[0008] 在哺乳动物物种中体细胞核移植(SCNT)实验的成功提供了证据表明,成年分化细胞的表观遗传(epigenetic)状态不是固定不变的,而是通过存在于卵母细胞细胞质中的因子保留了重编程的灵活性(Byrne等,2007;Jaenisch和Young,2008;Wakayama和Yanagimachi,2001)。但是,与试图克隆人类体细胞有关的无效和伦理顾虑,刺激了该领域探索替代方法来达到不使用卵母细胞的核重编程(Jaenisch和Young,2008)。的确,体细胞与胚胎癌细胞或胚胎干(ES)细胞的融合产生体基因组的表观遗传重建(epigenetic resetting),但是涉及产生4N全能细胞,限制了这样的细胞的潜在治疗用途(Cowan等,2005;Tada等,2001)。

[0009] 然而,体细胞通过与ES细胞融合进行重编程提示,ES细胞,类似于卵母细胞细胞质,含有能够诱导核重编程的因子。重要突破是由Yamanaka和同事完成的,他们通过转导四种转录因子Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc,成功地将成纤维细胞直接重编程成为诱导的全能干(iPS)细胞(Takahashi和Yamanaka,2006)。虽然最初获得的iPS细胞不正常,但是从那之后几个团队已经通过产生与胚胎来源的ES细胞在表观遗传上和发育上不能区分开来的iPS细胞,推进了该直接重编程技术(Maherali,2007;Meissner等,2007;Okita等,2007;Wernig等,2007)。此外发现,c-Myc的转基因表达虽然促进和提高了重编程的效率,但对重编程不是必要的(Nakagawa等,2008;Wernig等,2008)。最后,还已经显示,人类iPS细胞能够通过将限定的因子转导到体细胞中而产生(Park等,2008;Takahashi等,2007;Yu等,2007)。

[0010] 尽管迄今已经进行了这项工作,但终末分化细胞是否能够用限定的因子重编程成为全能性,或者是否只有分化程度较低的细胞例如成体干细胞能够经历核重编程达到全能性,尚是未知。此外,也不清楚供体细胞的进行性分化是否影响体外重编程的效率。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供了工程化的体细胞,其中一种或多种内源全能性基因与选择性标记可操作地连接,使得选择性标记的表达基本上和与该标记连接的内源全能性基因的表达匹配。本发明还提供含有这些工程化的体细胞的转基因小鼠。

[0013] 本发明还提供了将体细胞重编程成为分化程度较低状态的方法。在某些方法中,本发明的工程化的体细胞用药剂处理。然后选择表达选择性标记的细胞,并评定全能性特征。用药剂处理可以是将细胞与改变染色质结构的药剂接触,或者可以用至少一种全能性基因转染细胞,或者用二者。

[0014] 本发明还提供了鉴别把体细胞重编程成为分化程度较低状态的药剂的方法。在某些方法中,上面描述的工程化的体细胞与候选剂接触。然后选择表达选择性标记的细胞,并评定全能性特征。存在全能性特征的至少一个亚组表明该药剂能够重编程体细胞成为分化程度较低的状态。本发明鉴定的药剂然后能够通过将体细胞与该药剂接触而用于体细胞的重编程。

[0015] 本发明还提供了鉴别造成至少一种内源全能性基因在体细胞中表达的基因的方法。在某些方法中,用从全能细胞例如ES细胞制备的cDNA文库转染工程化的体细胞。然后选择表达适当的选择性标记的细胞,并检验该适当的内源全能性基因的表达。内源全能性基因的表达表明,该cDNA编码的蛋白在细胞中的表达直接或间接导致内源全能性基因的表达。

[0016] 本发明提供了从尚未经遗传修饰的体细胞衍生出重编程体细胞的方法。本发明提供了不用遗传选择,或在一些实施方案中,不用化学选择,来衍生重编程体细胞的方法。根据本发明,通过例如在未工程化的体细胞中导入重编程剂和/或在其中表达这样的药剂,并通过不需要在细胞内存在外源遗传物质的多种方法中的任一种来选择重编程的细胞,而从未工程化的体细胞衍生出重编程的体细胞。

[0017] 在一些实施方案中,方法采用了形态学标准,从没有重编程的体细胞群中鉴定重编程的体细胞。在一些实施方案中,方法采用了形态学标准,从没有重编程或只部分重编程为ES-样状态的细胞群中,鉴定已经重编程为ES-样状态的体细胞。

[0018] 在一些实施方案中,方法采用了补体介导的裂解,从含有至少一些重编程体细胞的细胞群中消除至少一些未重编程的体细胞。

[0019] 本发明还提供了在需要如此治疗的个体中治疗疾病的方法。在某些实施方案中,体细胞从该个体获得,并通过本发明的方法在适合细胞发育成为所需细胞类型的条件下进行重编程。然后收获所需细胞类型的重编程细胞,并导入到个体中治疗疾病。在某些其它实施方案中,从个体获得的体细胞在一种或多种基因中含有突变。在这些情况下,在某些实施方案中方法是经修正的,使得从个体获得的体细胞首先被处理以恢复细胞的一种或多种正常基因,致使所得细胞携带正常的内源性基因,然后将其导入个体。

[0020] 在某些其它实施方案中,从个体获得的体细胞在从个体取出后,将它们工程化以表达一种或多种基因。细胞可以通过将基因或包含基因的表达盒导入细胞进行工程化。所述基因或其部分可以侧翼带有位点特异性重组酶的位点。

[0021] 基因可以是对鉴别、选择和/或产生重编程细胞的目的有用的基因。在某些实施方案中,基因编码在细胞中引起DNA甲基化降低的表达产物。例如,基因可以编码干扰DNA甲基

转移酶例如DNA甲基转移酶1、3a或3b(Dnmt1, 3a, 3b)表达的RNA。RNA可以是短发夹RNA(shRNA)或微小RNA前体。在某些实施方案中, RNA是一种前体, 其经细胞内加工产生抑制Dnmt1、3a或3b表达的短干扰RNA(siRNA)或微小RNA(miRNA)。在某些实施方案中, 基因编码对阳性和阴性选择有用的标记。

[0022] 在某些实施方案中, 基因是有助于启动和/或保持重编程状态的基因。在某些实施方案中, 基因是其表达产物有助于启动重编程状态(和在某些实施方案中是保持重编程状态所需)的基因, 但是其对保持重编程状态不是必要的。在这些情况下, 在某些实施方案中, 方法包括在重编程后处理工程化细胞的步骤, 以便减少或消除所述基因的表达。在其中重编程细胞于重编程之后在体外或体内分化的方法中, 减少或消除所述基因表达的处理可以发生在重编程细胞分化之前或之后。处理可以包括造成至少一部分导入基因的切除, 例如通过在细胞中导入或表达重组酶。在某些实施方案中, 基因是其表达产物有助于保持重编程状态(和在某些实施方案中是保持重编程状态所需)的基因, 但是一旦重编程细胞已经分化成所需的细胞类型, 其就不是必要的。在这些实施方案中, 方法可以包括在工程化的重编程细胞分化之后, 对它们进行处理的步骤, 从而减少或消除所述基因的表达。

[0023] 在某些其它实施方案中, 本发明的方法可用于治疗需要有功能的器官的个体。在这样方法中, 体细胞从需要有功能的器官的个体获得, 并通过本发明的方法重编程以产生重编程的体细胞。然后在适合所述重编程体细胞发育成所需器官的条件下培养这样的重编程体细胞, 然后将其导入所述个体。该方法可用于治疗下列疾病的任一种: 神经、内分泌、结构、骨骼、血管、泌尿、消化、外皮、血液、自身免疫、炎症或肌肉疾病。

[0024] 本发明还提供了产生克隆动物的方法。在这样方法中, 从具有所需特征的动物分离体细胞, 并使用本发明的方法重编程以产生一种或多种重编程的全能体细胞(“RPSC”)。然后将该RPSCs插入到受体胚胎, 培养所得的胚胎以产生适合移植到受体雌性生物中大小的胚胎, 然后将其转移到受体雌性生物中以产生妊娠的雌性生物。将妊娠的雌性生物维持在适合怀有(carrying)胚胎至妊娠期满的条件下, 以产生嵌合的动物子代, 然后将其与野生型动物配种, 产生克隆动物。

[0025] 在某些实施方案中, RPSCs或者可以低温保存供将来克隆应用。在某些其它实施方案中, 遗传修饰, 例如定向突变, 可以在RPSCs插入到受体胚胎中之前导入到其中。

[0026] 本发明还提供了产生克隆禽类的方法。在该方法中, 从具有所需特征的禽类分离体细胞, 并使用本发明的方法重编程以产生一种或多种重编程的全能体细胞(“RPSC”)。然后将RPSCs插入到不能发育成胚胎的蛋中, 然后孵育所得的蛋以产生具有所述RPSC基因型的禽类后代, 从而产生克隆的禽类。

[0027] 预计上面描述的所有实施方案都可应用于本发明的所有不同方面。还预计只要适当, 任何以上实施方案都能够与一种或多种其它这样的实施方案自由组合。

[0028] 如本文所述, 四种转录因子(Oct4, Sox2, Klf4, 和c-Myc)的转基因的和可诱导的表达用于重编程小鼠B淋巴细胞。这些因子足以将已经经历了部分B细胞受体重排的未终末分化B细胞转变为全能状态。成熟B细胞的重编程需要骨髓转录因子CCAAT/增强子-结合蛋白- α (C/EBP α)的额外异位表达, 所述骨髓转录因子已知其能力为中断保持B细胞身份的转录状态。多个iPS系的克隆起源于未完全和完全分化的成熟B淋巴细胞, 并产生成年嵌合体, 当注入四倍体囊胚细胞时产生晚期胚胎, 并促成生殖系。在此描述的工作提供了终末分化的成

年细胞被直接核重编程成为全能性的明确证据。

[0029] 因此,在一种实施方案中,本发明涉及将分化的体细胞重编程为全能状态的方法,包括下述步骤:将分化的体细胞与至少一种有助于所述细胞重编程为全能状态的重编程剂接触;将所述细胞在适合所述细胞增殖和适合所述至少一种重编程剂的活性的条件下,维持足以开始细胞重编程的一段时间;然后使所述的至少一种重编程剂功能失活。

[0030] 在另一种实施方案中,本发明涉及将分化的体细胞重编程为全能状态的方法,包括下述步骤:提供含有至少一种有助于所述细胞重编程为全能状态的外源导入因子的分化的体细胞;将所述细胞在适合所述细胞增殖和适合所述至少一种外源导入因子的活性的条件下,维持足以激活至少一种内源全能性基因的一段时间;和使所述至少一种外源导入因子功能失活。

[0031] 在另一种实施方案中,本发明涉及筛选已经重编程为全能状态的分化体细胞的方法,包括下述步骤:提供含有至少一种有助于细胞重编程为全能状态的外源导入因子的分化体细胞;所述细胞在适合所述细胞增殖和适合所述至少一种外源导入因子的活性的条件下,维持足以激活至少一种内源全能性基因的一段时间;使所述至少一种外源导入因子功能失活;以及区分或辨别显示一种或多种全能性标记的细胞和不显示的细胞。在一种实施方案中,区分或辨别显示一种或多种全能性标记的细胞和不显示的细胞包括:选择或富集显示一种或多种全能性标记的细胞和/或针对不显示一种或多种全能性标记的细胞进行选择。

[0032] 在本发明的一些实施方案中,分化的体细胞是部分分化的。在本发明的其它实施方案中,分化的体细胞是完全分化的。

[0033] 在本发明的一些实施方案中,分化的体细胞是造血系的细胞;在一些实施方案中,分化的体细胞从外周血获得。在本发明的一种实施方案中,分化的体细胞是免疫系统细胞。在一种实施方案中,分化的体细胞是巨噬细胞。在一种实施方案中,分化的体细胞是淋巴样细胞。在本发明的其它实施方案中,分化的体细胞是B细胞,例如不成熟的(例如,原B细胞或前B细胞)或成熟(例如,非原初)B细胞。

[0034] 在本发明的一些实施方案中,所述至少一种外源导入因子是多核苷酸。在其它实施方案中,所述至少一种外源导入因子是多肽。在一种实施方案中,至少一种外源导入因子选自Oct4, Sox2, Klf-4, Nanog, Lin28, c-Myc及其组合。在本发明的具体实施方案中,分化的体细胞含有外源导入的Oct4、Sox2和Klf-4,外源导入的Oct4、Sox2、Klf-4和c-Myc。

[0035] 在本发明的一种实施方案中,所述至少一种外源导入因子选自Oct4、Sox2、Klf-4、c-Myc及其组合,并且所述分化的体细胞还含有至少一种能够诱导分化的体细胞去分化的外源导入因子(例如,多核苷酸或多肽)。在一些实施方案中,能够诱导所述分化的体细胞去分化的因子选自至少一种下调B细胞晚期特异性标记的多核苷酸、至少一种抑制Pax5表达的多核苷酸、至少一种下调B细胞晚期特异性标记的多肽、至少一种抑制Pax5表达的多肽,及其组合。在本发明的一种实施方案中,能够诱导所述分化的体细胞去分化的因子是C/EBP α 或C/EBP α 的人类同系物。

[0036] 在本发明的具体实施方案中,所述至少一种外源导入因子是利用载体导入的,例如诱导型载体或条件表达载体。在一个方面,所述至少一种外源导入因子利用不受甲基化介导的沉默的载体导入。在又一个实施方案中,所述至少一种外源导入因子是利用病毒载

体例如逆转录病毒或慢病毒载体导入的。

[0037] 在本发明的一种实施方案中,分化的体细胞在造血细胞因子和生长因子的存在下进行维持,或者培养在含有骨髓基质细胞的培养基上。

[0038] 在本发明的一些实施方案中,内源全能性基因选自Nanog,Oct4,Sox2及其组合。在其它实施方案中,内源全能性基因与选择性标记例如抗生素抗性基因或发光标志共表达。在具体的实施方案中,分化的体细胞还包含至少一种多核苷酸,所述多核苷酸编码的选择性标记与调节所述至少一种内源全能性基因表达的表达控制元件可操作地连接。在特定实施方案中,分化的体细胞在Oct4基因座、Nanog基因座或Oct4和Nanog基因座二者中包含选择性基因。在某一实施方案中,所述至少一种外源导入因子利用诱导型载体导入,并且其中功能失活所述至少一种外源导入因子包括提供使细胞的维持不适合所述载体诱导型表达的条件。

[0039] 在本发明的一些实施方案中,全能性标记选自全能性基因表达,其表达是全能性基因表达的直接或间接结果的基因表达,碱性磷酸酶表达,SSEA1表达,SSEA3表达,SSEA4表达,TRAF-60表达,Nanog表达,Oct4表达,Fbx15表达,ES细胞或ES细胞克隆的形态学特征,参与形成存活至妊娠期满的嵌合体的能力,当注射到SCID小鼠中时分化成具有内胚层、中胚层和外胚层特征的细胞的能力,存在两条活性X染色体,对DNA甲基化的抗性,及其组合。

[0040] 本发明还涉及分离的全能细胞,其源于根据本发明方法重编程的分化体细胞。特别是,本发明涉及纯化的体细胞群,其含有至少70%源于重编程分化体细胞的全能细胞。

[0041] 本发明还涉及通过如下方法产生的分离全能细胞,所述方法包括:(a)提供含有至少一种有助于细胞重编程为全能状态的外源导入因子的分化体细胞;(b)将所述细胞在适合所述细胞增殖、并适合所述至少一种外源导入因子的活性的条件下,维持足以激活至少一种内源全能性基因的一段时间;(c)功能失活所述至少一种外源导入因子;和(d)将显示一种或多种全能性标记的细胞与不显示的细胞区分开来。

[0042] 本发明还涉及包含至少70%全能细胞的纯化体细胞群,所述全能细胞源于通过如下方法产生的重编程分化体细胞,所述方法包括:(a)提供含有至少一种有助于所述细胞重编程为全能状态的外源导入因子的分化体细胞;(b)将所述细胞在适合所述细胞增殖、并适合所述至少一种外源导入因子的活性的条件下,维持足以开始所述细胞重编程或激活至少一种内源全能性基因的一段时间;(c)功能失活所述至少一种外源导入因子;和(d)将显示一种或多种全能性标记的细胞与不显示的细胞区分开来。

[0043] 在另一个方面,本发明涉及从体细胞产生全能细胞的方法,包含如下步骤:(a)提供一种或多种体细胞,每种含有至少一种有助于所述细胞重编程为全能状态的外源导入因子,其中所述外源导入因子利用不受甲基化诱导沉默的诱导型载体导入;(b)将所述一种或多种细胞在适合所述细胞增殖、和适合所述至少一种外源导入因子的活性的条件下,维持足以开始重编程所述细胞或激活至少一种内源全能性基因的一段时间;(c)功能失活所述至少一种外源导入因子;(d)选择一种或多种显示全能性标记的细胞;(e)利用所述一种或多种显示全能性标记的细胞产生嵌合胚胎;(f)从所述嵌合胚胎获得一种或多种体细胞;(g)将所述一种或多种体细胞在适合所述细胞增殖、和适合所述至少一种外源导入因子的活性的条件下,维持足以开始重编程所述细胞或激活至少一种内源全能性基因的一段时间;和(h)区分显示一种或多种全能性标记的细胞和不显示的细胞。在具体的实施方案中,

所述方法产生纯化的体细胞群,其含有至少70%源于重编程分化体细胞的全能细胞。

[0044] 本发明还涉及通过如下方法生产的分离的全能细胞,所述方法包括(a)提供一种或多种体细胞,每种含有至少一种有助于所述细胞重编程为全能状态的外源导入因子,其中所述外源导入因子利用不受甲基化诱导沉默的诱导型载体导入;(b)将所述一种或多种细胞在适合所述细胞增殖、和适合所述至少一种外源导入因子的活性的条件下,维持足以开始重编程所述细胞或激活至少一种内源全能性基因的一段时间;(c)功能失活所述至少一种外源导入因子;(d)选择一种或多种显示全能性标记的细胞;(e)利用所述一种或多种显示全能性标记的细胞产生嵌合胚胎;(f)从所述嵌合胚胎获得一种或多种体细胞;(g)将所述一种或多种体细胞在适合所述细胞增殖、和适合所述至少一种外源导入因子的活性的条件下,维持足以激活至少一种内源全能性基因的一段时间;和(h)区分显示一种或多种全能性标记的细胞和不显示的细胞。

[0045] 在本发明的优选实施方案中,所述方法产生纯化的体细胞群,其包含至少70%(例如,70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%)源于重编程的分化体细胞的全能细胞。在具体的实施方案中,全能细胞是遗传学上同源的。

[0046] 本发明还涉及包含至少70%全能细胞的纯化体细胞群,所述全能细胞源于通过如下方法产生的重编程分化体细胞,所述方法包括(a)提供一种或多种体细胞,每种含有至少一种有助于所述细胞重编程为全能状态的外源导入因子,其中所述外源导入因子利用不经受甲基化诱导沉默的诱导型载体导入;(b)将所述一种或多种细胞在适合所述细胞增殖、和适合所述至少一种外源导入因子的活性的条件下,维持足以开始重编程所述细胞或激活至少一种内源全能性基因的一段时间;(c)功能失活所述至少一种外源导入因子;(d)选择一种或多种显示全能性标记的细胞;(e)利用所述一种或多种显示全能性标记的细胞产生嵌合胚胎;(f)从所述嵌合胚胎获得一种或多种体细胞;(g)将所述一种或多种体细胞在适合所述细胞增殖、和适合所述至少一种外源导入因子的活性的条件下,维持足以开始重编程所述细胞或激活至少一种内源全能性基因的一段时间;和(h)区分显示一种或多种全能性标记的细胞和不显示的细胞。

[0047] 本发明还包涵将分化的免疫细胞重编程全能状态的方法,包括如下步骤:(a)提供分化的免疫细胞,所述细胞含有外源导入的、每种都在诱导型载体控制下的Oct4、Sox2、Klf-4和c-Myc,并还含有外源导入的C/EBP α ;(b)将所述细胞在适合所述细胞增殖、并适合Oct4、Sox2、Klf-4、c-Myc和C/EBP α 的活性的条件下,维持足以激活内源性Nanog和/或Oct4的一段时间;和(c)功能失活外源导入的Oct4、Sox2、Klf-4和c-Myc。在方法的一种实施方案中,所述诱导型载体不经受甲基化造成的沉默。

[0048] 本发明还涉及包含至少70%全能细胞的纯化免疫细胞群,所述全能细胞源于通过如下方法产生的重编程分化免疫细胞,所述方法包括下述步骤:(a)提供分化的免疫细胞,所述细胞含有外源导入的、每种都在诱导型载体控制下的Oct4、Sox2、Klf-4和c-Myc,并还含有外源导入的C/EBP α ;(b)将所述细胞在适合所述细胞增殖、并适合Oct4、Sox2、Klf-4、c-Myc和C/EBP α 的活性的条件下维持足以激活内源性Nanog和/或Oct4的一段时间;和(c)功能失活外源导入的Oct4、Sox2、Klf-4和c-Myc。

[0049] 本发明还涉及鉴别重编程剂的方法,包括(a)提供一种或多种体细胞,每种含有至少一种有助于所述细胞重编程为全能状态的外源导入因子,其中所述每种外源导入因子利

用诱导型载体导入,所述诱导型载体不经受甲基化诱导的沉默并且其表达受到独特诱导物诱导的调控元件控制;(b)将所述一种或多种细胞在适合所述细胞增殖、并适合所述至少一种外源导入因子的活性的条件下,维持足以重编程所述细胞或激活至少一种内源全能性基因的一段时间;(c)功能失活所述至少一种外源导入因子;(d)选择一种或多种显示全能性标记的细胞;(e)利用所述一种或多种显示全能性标记的细胞产生嵌合胚胎;(f)从所述嵌合胚胎获得一种或多种体细胞;(g)将所述一种或多种体细胞维持在适合所述细胞增殖、并适合所述至少一种外源导入因子的活性的条件下,其中所述至少一种外源导入因子的活性本身不足以激活至少一种内源全能性基因;(h)将(g)的体细胞与一种或多种候选重编程剂接触;和(i)鉴别与一种或多种候选重编程剂接触,显示出一种或多种全能性标记的细胞,其中诱导(g)的体细胞显示出一种或多种全能性标记的候选重编程剂被鉴定为重编程剂。

附图说明

[0050] 图1是诱导型Oct4等位基因的示意图。第一个整合载体,诱导型Oct4整合载体,含有由四环素诱导型启动子(Tet-Op)驱动的Oct4基因。Tet-Op-Oct4盒在其5'末端侧翼连有剪接受体双聚A信号(SA-dpA)和在其3'末端侧翼连有SV40polyA尾(SV40-pA)。第二个整合载体,四环素活化剂整合载体,含有突变体形式的四环素活化剂M2-rtTA,其对多西环素(Dox)诱导比野生型活化剂更具响应性(Urlinge等,Proc Natl Acad Sci USA 57(14):7963 2000)。

[0051] 图2A-2B显示Oct4-和Nanog-选择的iPS细胞的产生。如图2A所示,IRES-GfpNeo融合盒被插入到Oct4外显子5下游的BclI位点中。正确的靶向ES细胞克隆通过使用5'外部探针,Southern分析NcoI消化的DNA进行筛选。Nanog基因按照Mitsui等,Cell 113(5):631 (2003)所述进行靶定。图2B显示了进行感染和新选择之后4周,Oct4-和Nanogneo MEFs的AP-和强SSEA1-阳性克隆的总数(左标度)和百分数(右标度)。

[0052] 图3显示了Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc在小鼠B细胞系中的转基因诱导型表达,具体是描绘了用于从B细胞系重编程细胞这一研究的策略的示意图。

[0053] 图4显示了试图测量重编程效率的实验的示意图。 3×10^6 CD19+成年B细胞用编码/EBPa-NeoR构建物的逆转录病毒感染,24小时后,我们选择IgM+IgD+成熟成年B细胞,并将它们作为单个细胞在用OP9基质细胞系预铺板的96-孔板中铺板。实验自始至终,细胞在条件培养基+Dox+LIF中生长。在第6天,培养孔进行嘌呤霉素和新霉素选择5天,这样只允许受C/EBPa感染的转基因B细胞生长。在第20天,筛选含有耐药细胞的孔用于通过FACS分析的Nanog-GFP表达。计分为阳性的孔随后在ES培养基中在MEFs上传代,并长成iPS细胞系。

[0054] 发明详述

[0055] 核重编程,涉及将体细胞核的表观遗传状态与另一种细胞类型重新关联的概念,能够通过不同途径实现。最近确定的将体细胞重编程成为全能性的策略包括在体细胞中直接异位表达所限定的转录因子(Okita等,2007;Takahashi和Yamanaka,2006;Wernig等,2007)。这种强制的因子表达看来在培养物中经过相对长的时间段启动了一系列随机事件,最终导致一小部分已经获得稳定全能状态的细胞的产生(Jaenisch和Young,2008)。重编程过程的最初时期需要转导因子(Brambrink等,2008;Stadtfield等,2008),在此期间它们可以与内源全能性基因相互作用(Boyer等,2005;Loh等,2006)并逐渐诱导表观遗传变化,随

后维持与内细胞群来源的ES细胞不可区别的表观遗传状态。在这过程期间,甲基转移酶Dnmt3a和Dnmt3b重新被激活,并接着甲基化和沉默所述病毒转导因子。外源因子的沉默对于iPS细胞的后续分化是关键的(Brambrink等,2008;Takahashi等,2007;Wernig等,2007;Stadfeld等,2008)。

[0056] 在细胞沿着B细胞系发育中,重和轻链免疫球蛋白基因座中顺次的内在基因DNA重排在遗传上标记了B细胞成熟不同的连续阶段(Jung等,2006)。处于原B(Pro-B)发育阶段的细胞启动了免疫球蛋白重排,过程包括V(可变的)、D(多样性)和J(连接)基因区段的组装。重链基因座(IgH)的组装在轻链基因座(IgL)之前(Jung等,2006)。另外,IgH基因座的重排是序贯的,在两个等位基因上发生D_H与J_H连接之后,发生V_H与D_HJ_H区段的重排(Papavasiliou等,1997)。V_H-D_HJ_H可变基因区域的有效组装间接为向下一个阶段分化发出信号,其中IgL链与Igκ重排的组装一般在与Igλ组装之前(Papavasiliou等,1997)。有效IgL链产生最终导致功能性轻和重链蛋白的结合,它们一起在细胞表面上形成B细胞受体。由此产生的B细胞能够迁移到外周,在此遇到相应的抗原后,它们能够发挥恰当的免疫功能(Schlissel,2003)。

[0057] 在此描述的工作使用从这种高度有序的发育途径得到的细胞,所述途径携带独特的、依次获得的基因“指纹”,所述指纹将允许准确地回顾性评价能够产生相应单克隆iPS系的供体B细胞核的发育阶段。具体是,如本文所述,iPS细胞从原B和前B细胞通过用重编程因子Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4转导、以及从成熟B细胞通过表征明确的骨髓转录因子C/EBPα的额外过表达而产生。该工作显示,重编程的细胞携带供体非终末分化和成熟终末分化B细胞的基因重排特征,并能够产生成年嵌合小鼠和有助于生殖系的建立。这些结果表明,重编程因子的特定组合能够将终末分化细胞的基因组复原成全能状态。

[0058] 在此描述的工作提供了从成年小鼠获得的终末分化成熟B细胞能够体外直接重编程成ES-样细胞的决定性证据。最终经历成功重编程的供体B细胞群已经完成了包括表观遗传和遗传变化的复杂分化途径:最初定向为造血系,随后为B细胞系;获得有效重链和轻链重排;在成年小鼠中从骨髓外迁以重新居留于周围淋巴器官,并在一个所获得的细胞系中观察到,B细胞受体基因的可变区中响应抗原刺激获得了体细胞高变。因此,Oct4、Sox2、Klf-4、C/EBPα转录因子的强异位表达,诱导了完全分化的淋巴样细胞以30个细胞中大约1个细胞的相对高效率,经重编程成为全能性。

[0059] 重要的是,在此描述的结果证明,在B细胞系中Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc转基因的相似诱导水平下,非终末分化和终末分化B细胞对这些因子的响应不同。当在粒细胞命运特化中正常发挥作用的C/EBPα转录因子开始过表达时,就实现了完全分化的成熟B淋巴细胞进行强重编程成为全能性(Ramji和Foka,2002)。Thomas Graf和同事(Xie等,2004)已经说明,C/EBPα的过表达通过Pax5的功能和促进抑制早期B细胞调节剂EBF1和E2A转录因子的消失,下调了B细胞晚期特异性标记(例如,CD19),将B细胞转变成巨噬细胞样细胞。另外,C/EBPα诱导骨髓转录网络的组分向上调节(Laiosa等,2006;Xie等,2004)。这些观察结果对于了解重编程机制是相关的,并提示C/EBPα在诱导小鼠成熟B淋巴细胞的重编程过程中的决定性作用。这提示了许多相互的非排他可能性:

[0060] 1)C/EBPα可以交叉拮抗保持成熟B细胞身份的B细胞转录网络的关键调节剂。这可以促进B细胞去分化成为分化程度较低状态,允许Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc转基因诱导的重编程。这种解释与已知供体细胞的分化状态通过核移植影响重编程效率的观察结果一致,

因为神经和角质细胞干细胞的重编程比从相同谱系获得的其它更高分化水平的细胞要更有效率(Blelloch等,2006;Li等,2007)。因为在成熟B细胞中Pax5的条件性缺失导致它们去分化和丧失几种成熟B细胞标记(Cobaleda等,2007a),所以有可能Pax5的缺失也将使成熟B细胞对经Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc重编程成全能性致敏。

[0061] 2)C/EBP α 可以将成熟B细胞转变成具有不同表观遗传状态的巨噬细胞样细胞(Xie等,2004),这可能使得对Oct4、Sox2、Klf4和/或c-Myc的靶基因的可接近性提高,将促进有效地诱导支配全能状态的内源性自动调节环(Boyer等,2005;Loh等,2006)。

[0062] 3)C/EBP α -介导的过表达可以使成熟B细胞在OP9细胞的存在下,能够从悬浮生长的状态转变成成为贴壁细胞,这可能是它们重编程中的限速事件。

[0063] 4)最后,除那些用于实施例之外的其它因子组合也许能在不同培养条件下对成熟B淋巴细胞重编程。

[0064] 申请人已经设计出将体细胞例如部分或完全分化的体细胞重编程以产生全能细胞(pluripotent cells)或多能细胞(multipotent cells)的新方法。应该注意,本发明的方法并不打算包涵现有技术的方法,现有技术的方法包括但不限于体细胞核移植。也就是说,通过将所述细胞的核与卵母细胞的完整细胞质接触,即,通过将所述细胞的核转移到去核的卵母细胞中,而对体细胞重编程,并不在本发明的范围内。虽然本发明的一些实施方案包括将从正常包含它的细胞质中分离的体细胞核进行重编程,并任选随后将所述核转移至相同或不同细胞类型的无核细胞中的方法,但这些实施方案不包括重编程剂是去核卵母细胞的方法。申请人还已经设计了鉴定单独或与其它因子和/或条件组合进行体细胞重编程的药剂的新方法。

[0065] 本发明的某些方法利用ES细胞(例如,使用背景中描述的常规方法产生的ES细胞)和体细胞之间的不同特征。这些特征将ES细胞与尚未重编程的体细胞区别开来,并在某些方法中用作鉴定重编程细胞(诱导的全能细胞)的基础。

[0066] 一个这样的特征是ES细胞相对于体细胞对基因组DNA去甲基化的存活能力增加。体细胞以可以引起重编程的多种方式中的任一种进行处理,并且所述细胞经历导致DNA去甲基化的过程。在本发明的某些实施方案中,能够在该过程下存活的体细胞被鉴定为是重编程的,或相对于不能在该过程下存活的细胞,被重编程的可能性增加。在本发明的某些实施方案中,已经导致至少一部分细胞变为耐受DNA去甲基化(即,能够在DNA甲基化的条件下存活)的候选重编程剂,例如处理或因子,被鉴定为对体细胞重编程有用的作用剂。

[0067] ES细胞将其与体细胞相区分的另一个特征是ES细胞含有两条转录活性的X染色体,而体细胞中一条X染色体通常是大部分或完全转录失活的(参见Avner,P.和Heard,E., Nature Reviews Genetics,2:59-67,2001;Eggan,K.,等,Science,290(5496):1578-81,2000)。根据本发明的一个实施方案,体细胞用可以引起重编程的多种方式的任何进行处理。处理可以是例如,将细胞与候选重编程剂例如处理或因子接触。在本发明的某些实施方案中,两条X染色体是转录活性的细胞被鉴定为是重编程的,或相对于其中只有一条X染色体是转录活性的细胞,被重编程的可能性增加。在本发明的某些实施方案中,已经导致至少一部分细胞具有两条转录活性的X染色体的候选重编程剂,例如处理或因子,被鉴定为对体细胞重编程有用的处理。在一些实施方案中,方法的一个步骤包括选择只有一条转录活性的X染色体的细胞,并且该方法的后续步骤包括选择已经激活了它们的失活X染色体的细

胞。

[0068] 某些其它方法利用申请人设计的工程化的体细胞,其中通常与全能性相关的内源基因(“全能性基因”)被工程化以与选择性标记可操作地连接,使得内源全能性基因的表达基本上匹配选择性标记的表达。因为全能性基因一般只在全能细胞中表达而不在体细胞里表达,内源全能性基因的表达是重编程成功的指示。令选择性标记与内源全能性基因可操作地连接产生了一种选择可能是罕见事件的潜在重编程体细胞的强效机制。由此产生的细胞可以替换或另外地评价其它全能性特征,以证实体细胞是否已经成功重编程成为全能性。

[0069] 因此,在一种实施方案中,本发明涉及将一种或多种体细胞例如部分分化或完全/终末分化的体细胞重编程成为分化程度较低的状态例如全能(pluripotent)或多能(multipotent)状态的方法。通常,方法包括下述步骤:将体细胞或分离的体细胞核与至少一种有助于细胞重编程为全能状态的重编程剂接触;将细胞在适合所述细胞增殖并且适合重编程剂的活性的条件下,维持足以激活内源全能性基因的一段时间,并功能失活所述重编程剂,例如失活或去除重编程剂。在其它实施方案中,本发明还涉及通过本发明的方法产生的重编程体细胞并涉及所述细胞的应用。

[0070] 通过使用本发明的方法产生全能或多能细胞具有至少两个优势。首先,本发明的方法允许产生自身全能细胞,其是对患者有特异性的细胞。在细胞治疗中使用自身细胞提供了优于使用很可能遭受免疫排斥的非自身细胞的重要优点。相反,自身细胞不太可能引起显著的免疫响应。第二,本发明的方法允许不使用胚胎、卵母细胞和/或核移植技术而产生全能细胞。

[0071] 术语

[0072] 不带量词的名词用在这里,除非明确有其它指示,应该理解为包括复数指示物。如果组中的一个、超过一个或所有成员存在、用于或以其它方式与给定产品或过程有关,则权利要求或说明书在组的一种或多种成员之间包括“或”就认为是可以了,除非另有指示或从上下文来看显然不是这样。应该理解,一般说来,在本发明或本发明的方面被指示为包括具体的要素、特征等的情况下,本发明的某些实施方案或本发明的方面由这样的要素特征等等构成,或主要由其构成。为了简单起见,那些实施方案没有每次都对本文的这些单词加以具体说明。还应该理解,本发明的任何实施方案,例如在现有技术内发现的任何实施方案,都可以从权利要求中明确排除,不管这种特定排除是否在说明书中被陈述。例如,任何药剂可以从候选重编程剂组中排除,任何基因可以从全能性基因组中排除。

[0073] 在这里给定范围的情况下,本发明包括其中包括了端点的实施方案、其中排除了两个端点的实施方案和其中包括一个端点并排除另一个端点的实施方案。应该假定包括两个端点,除非另有指示。此外,要理解除非另有指示或以上下文和本领域技术人员的了解来看显然不是这样,以范围表示的值可以在本发明的不同实施方案中采取所述范围内的任何特定值或子范围,直至所述范围下限单位的十分之一,除非上下文另有明确陈述。还要理解在本文陈述一系列数值的情况下,本发明包括与所述系列中任何两个值限定的任何居中值或范围类似相关的实施方案,最低值可以作为低限而最大值可以是作为高限。数字值用在这里包括表示为百分数的值。对于其中数字值以“大约”或“近似”作为前序的本发明的任何实施方案,本发明包括其中叙述精确值的实施方案。对于其中数字值不以“大约”或“近似”

作为前序的本发明的任何实施方案,本发明包括其中以“大约”或“近似”作为前序的实施方案。“近似”或“大约”一般包括落入数字任一方向的1%范围或在一些实施方案中为5%范围(大于或小于该数字),除非另有说明或从上下文来看显然不是这样(除了这样的数字不允许超过可能值的100%的情况)。

[0074] 此外,要理解,本发明包涵所有的变异、组合和置换,所述置换是其中一种或多种限制、要素、条款、说明项等等从一个或多个列出的权利要求被引入到相同的独立权利要求的另一个从属权利要求中(或者,相关的任何其它权利要求),除非另有陈述或除非它对本技术领域普通技术人员来说显然是将产生矛盾或不一致的。在列表介绍要素的情况下,例如以马库什组或类似的形式,要理解该要素的每个子组也被公开,任何要素都可以从该组去除。

[0075] 为了方便起见,某些权利要求以从属形式表现,但是任何从属权利要求可以改写为非从属格式,以包括该独立权利要求和该权利要求所从属的任何其它权利要求的限制,并且这样改写的权利要求将被认为在所有方面与改写成独立权利要求格式之前的从属权利要求(修改过的或未修改过的)等同。还应该理解,除非明确指示与此相反,在本文的权利要求的任何包括超过一种行动的方法中,方法行动的次序不需要限于所叙述的方法的行动的次序,但是本发明包括如此限制次序的实施方案。预期上面描述的所有实施方案都可应用于本发明的所有不同方面。还预期只要适当,任何以上实施方案都能够与一种或多种其它这样的实施方案自由组合。

[0076] 体细胞

[0077] 本发明的体细胞可以是初级细胞(非无限增殖化细胞),例如从动物新鲜分离的那些细胞,或者可以源于细胞系(无限增殖化细胞)。所述细胞在它们从主体分离之后,可以维持在细胞培养物中。在某些实施方案中,细胞在它们用于本发明的方法之前,传代一次或者不止一次(例如,2-5、5-10、10-20、20-50、50-100次之间,或者更多)。在一些实施方案中,细胞在它们用于本发明的方法之前,已传代不超过1、2、5、10、20、或者50次。它们可以被冷冻、解冻等等。在本发明的某些实施方案中,体细胞从雌性生物获得。所用的体细胞可以是天然的体细胞,或者工程化的体细胞,即已经遗传上改变的体细胞。

[0078] 本发明的体细胞典型是哺乳动物细胞,例如人类细胞、灵长类动物细胞或小鼠细胞。它们可以通过公知的方法获得,并且可以从含有活的体细胞的任何器官或组织获得,例如血液、骨髓、皮肤、肺、胰腺、肝、胃、肠、心脏、生殖器官、膀胱、肾、尿道及其他泌尿器官等等。本发明有用的哺乳动物体细胞包括但是不限于支持细胞(Sertoli cells)、内皮细胞、颗粒上皮细胞、神经元、胰岛细胞、表皮细胞、上皮细胞、肝细胞、毛囊细胞、角质细胞、造血细胞、黑色素细胞、软骨细胞、淋巴细胞(B和T淋巴细胞)、红细胞、巨噬细胞、单核细胞(monocytes)、单核细胞(mononuclear cells)、心肌细胞、及其他肌细胞等等。术语“体细胞”,用在这里,还包括成年干细胞。成年干细胞是能够产生具体组织的所有细胞类型的细胞。示例性的成年干细胞包括造血干细胞、神经干细胞和间质干细胞。

[0079] 在一些实施方案中,细胞基于它们表达的已知只在或主要在所需细胞类型中表达的内源性标记加以选择。例如,波形蛋白是成纤维细胞标记。其它有用的标记包括各种角蛋白、细胞粘着分子例如钙粘着蛋白、纤连蛋白、CD分子等等。体细胞群可以具有18和96小时之间的平均细胞周期时间,例如,24-48小时之间、48-72小时之间等等。在一些实施方案中,

至少90%、95%、98%、99%或更多的细胞将预计在预定时间内分裂,例如24、48、72或96小时内。

[0080] 本发明的方法可以用于重编程一种或多种体细胞,例如体细胞的克隆或群。在一些实施方案中,本发明的细胞群是基本上一致的,因为至少90%的细胞表现目的表型或特征。在一些实施方案中,至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、99.95%或更多的细胞表现目的表型或特征。在本发明的某些实施方案中,体细胞具有分裂能力,即所述体细胞不是有丝分裂后的。细胞可以例如,具有18-72小时之间的平均细胞周期时间(即,细胞完成单个细胞增殖周期需要的时间),例如,当在本技术领域已知的标准培养条件下维持时,为24-48小时之间。

[0081] 本发明的分化的体细胞是部分或完全分化的。分化是通过它使较低特化的细胞变成更高特化的细胞类型的过程。细胞分化可以包括细胞的大小、形状、极性、代谢活动、基因表达和/或对信号响应性的变化。例如,造血干细胞分化产生所有的血细胞类型,包括骨髓(单核细胞和巨噬细胞,中性粒细胞,嗜碱性细胞,嗜伊红粒细胞,红细胞,巨核细胞/血小板,树突状细胞)和淋巴系(T细胞,B细胞,NK细胞)。在沿着分化路径进展期间,细胞的最终命运变成更为固定。本文描述的工作显示,部分分化的体细胞(例如,不成熟的B细胞诸如前B细胞和原B细胞)和完全分化的体细胞(例如,成熟B细胞,非原初的成熟B细胞)都可以按照本文所述重编程,产生多能或全能细胞(亦称“诱导的全能细胞”)。

[0082] 重编程和全能细胞

[0083] 细胞的分化状态是一连续谱,这谱的一端是终末分化状态,另一端是去分化状态(全能状态)。重编程,用在这里,是指改变或逆转可以是部分或终末分化的体细胞的分化状态的方法。重编程包括体细胞分化状态的完全逆转以及部分逆转。换句话说,术语“重编程”用在这里,包括细胞的分化状态沿着所述谱朝着较低分化的状态的任何移动。例如,重编程包括使多能细胞逆转回到全能细胞,和终末分化细胞逆转回到多能细胞或全能细胞。在一种实施方案中,体细胞的重编程使体细胞自始至终转回到全能状态。在另一种实施方案中,体细胞的重编程使体细胞转回到多能状态。因此术语“较低分化状态”用在这里是相对术语,包括完全去分化状态和部分分化状态。

[0084] 全能细胞是一种细胞,其具有长时间(例如,大于一年)体外分裂的潜能并具有分化成源于所有三个胚胎胚层——内胚层、中胚层和外胚层的细胞的独特能力。全能细胞具有分化成整套具有特定组织独有的鲜明的不同形态学、细胞学、功能表型的子细胞的潜能。相反,全能细胞后代的分化潜能是渐进性受限的,一些细胞只具有一种命运。多能细胞是能够分化成一些而不是所有来源于所有三个胚层细胞的细胞。因此,多能细胞是部分分化的细胞。成年干细胞也是多能或部分分化的细胞。已知的成年干细胞包括,例如,造血干细胞和神经干细胞。

[0085] 用重编程剂处理体细胞

[0086] 如本文所述,一种或多种(例如群或克隆)体细胞,例如分化的体细胞,用至少一种有助于所述细胞重编程的重编程剂或因因子处理或接触。术语“接触”、“处理”等等在这里可互换使用,并包括令细胞经受任何类型的过程或条件,或者对细胞执行任何类型的程序。作为非限制性实例,处理可以是将细胞与已知的或者候选重编程剂(例如,改变细胞的染色质结构的药剂,降低DNA甲基化的药剂,降低组蛋白乙酰化的药剂)接触,用编码重编程剂的多

核苷酸转染细胞,和/或在与通常维持这样的细胞的标准培养条件不同的条件下培养所述细胞。例如,温度或pH可以变化。多个已知的或候选的重编程剂可以共同/同时或相继使用。在另一种实施方案中,本发明的方法还可以包括用药剂或因子重复处理细胞的步骤。用于重复处理的药剂可以与第一个处理期间使用的药剂相同或不同。本发明的重编程剂可以多核苷酸、多肽、小分子等等。

[0087] 细胞与重编程因子或药剂接触的时间段可以变化。在一些实施方案中,细胞与药剂接触的时间段是1小时和30天之间。在一些实施方案中,细胞与药剂接触的时间段足以重编程所述细胞或激活内源全能性基因。例如,所述时段可以是1天、5天、7天、10天、12天、14天或20天。在执行选择以富集全能细胞或评价细胞的全能性特征之前,可以去除或失活重编程剂。

[0088] 根据本发明的一些实施方案,在体细胞与重编程剂或因子接触之后,它们在适合所述细胞增殖并适合所述重编程剂或因子的活性的条件下,维持足以重编程所述细胞或激活至少一种内源全能性基因的时间。在选择或富集重编程的细胞之前,重编程发生时,细胞可以在培养物中维持不同的时间段。因此,在某些方法中,在鉴别或选择重编程的细胞之前,已经与重编程剂或因子接触的体细胞在培养物中维持3天以上。在一些方法中,在鉴别或选择重编程细胞之前,所述细胞在培养物中维持至少4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或更多天(例如3-5周之间)。

[0089] 另外,在本发明的具体实施方案中,已经与一种或多种重编程剂根据所描述方法接触的体细胞维持在适合所述细胞增殖的条件下。适合维持和增殖具体细胞类型的条件对于技术人员而言将是显而易见的。专门的培养基可以从商业来源获得,或者提高增殖所需要或合意的因子可以加到标准培养基中。其他的因子和药剂也可以被加到培养基中,例如,用于诱导所述细胞中诱导型元件的表达或抑制对特定药剂敏感的细胞的生长。

[0090] 作为非限制性实例,DNA甲基化抑制剂和组蛋白去乙酰抑制剂是可以用于本发明方法的两类药剂;示例性的药剂包括5-氮杂-胞苷、TSA和丙戊酸。如本文所述,DNA甲基化抑制剂对鉴定已经重编程的细胞也有用处,无论DNA甲基化抑制剂是否有助于重编程。因此,在本发明的一些实施方案中,重编程剂不是DNA甲基化抑制剂,例如它对DNA甲基化没有可检测出的影响或对DNA甲基化的降低小于1%。在一些实施方案中,重编程剂对DNA甲基化的降低小于5%和/或对DNMT1、3a和/或3b活性的抑制小于1%或小于5%。

[0091] 在本发明的某些实施方案中,重编程剂或因子对于细胞是外源导入的。“外源导入的”,其使用与其在本技术领域的含意一致,用来指示多核苷酸(或其它物质包括但不限于小分子或蛋白)已经从细胞外面被导入细胞或所述细胞的祖细胞(通常通过包括人类手工的方法)和/或其自然界在该类型的细胞中未发现或发现的序列、环境不同和/或量不同。

[0092] 在一些实施方案中,重编程剂使用病毒转导入细胞,例如逆转录病毒或慢病毒转导。在具体的实施方案中,使用的载体不经受甲基化诱导的沉默。在一些实施方案中,载体是非复制型载体,和在一些实施方案中,载体是非整合型载体。在具体的实施方案中,载体是整合型载体,其能够从细胞的基因组中被切除,例如能够切除使得切除后细胞的基因组与载体整合之前所述细胞的基因组相似或相同。在一些实施方案中,重编程剂使用核酸构建物的蛋白转导或瞬时转染被导入细胞中,所述核酸构建物编码的蛋白本身或与其它重编程剂结合对细胞重编程有效。任选,细胞经受电场和/或与提高细胞渗透性以增加重编程

剂摄取的药剂接触。在一些实施方案中,Oct4、Sox2、Klf4、Nanog、Lin28和c-Myc的至少一种可以使用这样的方法外源导入到体细胞中。在一种实施方案中,Oct4、Sox2和Klf4被导入到细胞中,而在另一种实施方案中,Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc被导入到细胞中。在另一种实施方案中,Oct4、Sox2、Nanog和Lin28被导入到细胞中。

[0093] 影响细胞的全能状态并因此是候选重编程剂的基因包括全能性基因、涉及染色质改造的基因、和对于维持全能性重要的基因,例如LIF、BMP和PD098059(Cell, 115:281-292 (2003);Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2003Aug 29;358(1436):1397-402)。Thomson等使用慢病毒系统,用Oct4、Sox2、Nanog和Lin28对成年人类细胞重编程(Thomson等,Science 5854:1224-1225(11/23/2007))。无论细胞是全能的还是不是,能够施加影响的其它基因包括某些原癌基因,例如c-Myc。其它基因包括端粒酶,例如编码端粒酶催化亚单位的基因。还有的其它基因包括Sox1、Sox2、Sox3、Sox 15、Sox18、FoxD3、Stat3、N-Myc、L-Myc、Kif1、Klf2、Klf4和Klf5。其它目的基因包括编码与多能性或全能性有关和/或在多能或全能细胞中天然表达的微小RNA前体的基因。任选,所述基因由于细胞分化而下调和/或不在成年体细胞中表达。其它目的多核苷酸包括编码RNAi剂例如shRNA的那些,RNAi靶定的基因是在多能或全能细胞中天然表达的内源性微小RNA的靶。

[0094] 另外,其他因子可以在体细胞中过表达或外源表达以促进重编程。例如,协助诱导细胞采取较低分化状态的因子可以在细胞中表达。如本文所述,C/EBP α 已经显示出协助成熟B细胞重编程。C/EBP α 家族的其它成员,例如C/EBP α 的人类同系物,可以有类似的效用。

[0095] 要理解,在本发明全篇的实施方案中,所编码的多肽可以外源导入到细胞中,而不是,或者说是在此之外,外源导入编码所述多肽的多核苷酸,除非上下文另有陈述或暗示。另外,要理解,在这里称“基因”意图是包括有或者没有所述基因的内源性调控元件以及有或者没有内含子序列元件的基因的编码序列,除非上下文另有陈述或暗示。

[0096] 外源导入的多核苷酸的表达可以用几种方式进行。在一种实施方案中,外源导入的多核苷酸可以从不同于所述多核苷酸的内源性染色体基因座(chromosomal locus)的染色体座上表达。这样的染色体基因座可以是带有开放的染色质结构的基因座,并含有对于体细胞不是必要的基因。换句话说,理想的染色体基因座含有被破坏不会引起细胞死亡的基因。示例性的染色体基因座包括,例如,小鼠ROSA 26基因座和II型胶原(Col2a1)基因座(参见Zambrowicz等,1997)。外源导入的多核苷酸可以从诱导型启动子表达,因此其表达能够随意地调节。

[0097] 在替代实施方案中,外源导入的多核苷酸可以单独或作为cDNA表达文库的部分,瞬时转染到细胞中。在一种实施方案中,cDNA表达文库可以从全能细胞制备,全能细胞包括但不限于胚胎干细胞卵母细胞、裂殖细胞、内细胞群细胞、胚胎生殖细胞、胚体(胚胎)细胞、桑椹胚来源的细胞、畸胎瘤(畸形肿瘤)细胞、和后来在胚胎发育过程中得到的多能部分分化胚胎干细胞。候选重编程剂可以从这样的文库中鉴定。

[0098] cDNA文库通过传统技术制备。简单说,mRNA是从目的生物体分离的。RNA-介导的DNA聚合酶使用mRNA作为模板,用于合成第一条链。使用产生cDNA产物的DNA-介导的DNA聚合酶,进行第二条链合成。继促进cDNA克隆的常规加工之后,所述cDNA被插入表达载体中,使得cDNA与至少一个调节序列可操作地连接。用于与cDNA文库连接的表达载体的选择不局限于特定的载体。任何适合用于小鼠细胞的表达载体都是适当的。在一种实施方案中,

从cDNA表达构建物驱动表达的启动子是诱导型启动子。术语调节序列包括启动子、增强子及其他表达控制元件。示例性的调节序列记载于Goeddel;Gene Expression Technology: Methods in Enzymology(基因表达技术:酶学方法),Academic Press,San Diego,CA(1990)中。例如,在与DNA序列可操作地连接时,控制所述DNA序列表达的各式各样表达控制序列的任何一种,都可以用于这些载体以表达cDNAs。这样的有用表达控制序列包括,例如,SV40的早期和晚期启动子、tet启动子、腺病毒或巨细胞病毒立即早期启动子、lac系统、trp系统、TAC或TRC系统、表达受到T7核糖核酸聚合酶指导的T7启动子、 λ 噬菌体的主要操纵子和启动子区域、fd包被蛋白的控制区域、3-磷酸甘油酸激酶或其它糖解酶的启动子、酸性磷酸酶的启动子例如Pho5、酵母 α 交配因子的启动子、杆状病毒系统的多面体启动子及其他已知控制原核或真核细胞或它们的病毒的基因表达的序列,及其不同组合。应该理解,表达载体的设计可以根据这样的因子选择要转化的宿主细胞和/或想要表达的蛋白类型。此外,载体的拷贝数、控制拷贝数的能力、以及载体编码的任何其它蛋白的表达,例如抗菌素标记,应该也要考虑。

[0099] 外源导入的多核苷酸可以从诱导型启动子表达。术语“诱导型启动子”,用在这里是指在不存在诱导物(例如化学和/或生物剂)下,启动子不指导可操作连接的基因(包括cDNA)表达,或指导低水平的表达,而响应诱导物时,其指导表达的能力增强。示例性的诱导型启动子包括,例如,响应重金属(CRC Boca Raton,Fla.(1991),167-220;Brinster等,Nature(1982),296,39-42)、热冲击、激素(Lee等.P.N.A.S.USA(1988),85,1204-1208;(1981),294,228-232;Klock等.Nature(1987),329,734-736;Israel和Kaufman,Nucleic Acids Res.(1989),17,2589-2604)的启动子,响应化学剂例如葡萄糖、乳糖、半乳糖或抗生素(例如,四环素或多西环素)的启动子。

[0100] 四环素诱导型启动子是响应抗生素的诱导型启动子的实例。参见Gossen等,2003。四环素诱导型启动子包括与一种或多种四环素操纵子可操作地连接的最小启动子。存在四环素或其类似物之一导致转录活化剂与四环素操纵子序列结合,激活最小启动子,由此转录相关的cDNA。四环素类似物包括与四环素显示出结构同源性并能够激活四环素诱导型启动子的任何化合物。示例性的四环素类似物包括,例如,多西环素、金霉素和无水四环素。四环素抑制型启动子也有用。

[0101] 前面提到的方法可以用于在体细胞中表达在这里描述的任何外源导入的多核苷酸。例如,它们可以用于表达编码靶定内源性DNA甲基转移酶的RNAi剂的多核苷酸,或可以用于表达位点特异性重组酶。

[0102] 申请人发现,外源导入因子对于维持全能表型可以不是必要的。例如,外源导入的多核苷酸Oct4、Sox2和Klf4的表达对于维持全能表型不是必要的。因此本发明包括可以在重编程后修改重编程的体细胞的识别,从而使得一种或多种导入因子例如多核苷酸无功能,同时维持所述细胞的ES-样表型。

[0103] 在本发明的某些实施方案中,使得导入的多核苷酸无功能降低了与细胞中导入原癌基因有关的潜在顾虑。因此,本发明包括在体细胞中导入一种或多种多核苷酸,其中所述一种或多种多核苷酸至少部分重编程所述细胞成为ES-样状态,鉴别已经重编程成为ES-样状态的细胞,和功能失活一种或多种导入的多核苷酸。在失活导入的多核苷酸之前,细胞可以维持培养适当的时间段。在一种实施方案中,可以选择时间段,使得细胞足以开始显示全

能性标记或特征,足以开始表达内源全能性基因例如Oct-4和/或Nanog,或足以开始表达内源全能性基因的下游靶。在某些实施方案中,外源导入的多核苷酸通过诱导型调控元件调节,功能失活是通过除去所述元件的诱导物实现的。

[0104] 功能失活也意在包括除去或切除导入的多核苷酸。在某些实施方案中,一种或多种导入的多核苷酸的至少一部分侧翼带有位点特异性重组酶的位点。导入的多核苷酸可以通过在细胞中表达重组酶或将重组酶导入细胞进行功能失活。由此产生的重编程体细胞可以没有任何外源导入的编码序列和/或调控元件。除了在重组之后含有一个或多个残留的位点之外,细胞可以与未工程化的体细胞相同。

[0105] 全能性标记

[0106] 已经用一种或多种重编程剂处理过的体细胞维持培养达足以开始所述细胞重编程的一段时间。处理的细胞群可以用多种方式分析,以鉴定重编程发生或未发生。也就是说,处理的细胞群还可以被处理或分析,以选择或富集已经开始重编程过程的细胞,或者选择对抗或减少没有开始重编程过程的细胞。可以评价处理过的体细胞群,以鉴定表现或不表现重编程的例如全能的细胞的一种或多种标记或特征的细胞。例如,可以评价所述细胞群,以鉴定重编程的表型、功能或遗传的标志,包括一种或多种全能性基因的表达、和一种或多种其表达的直接或间接激活是由于全能性基因表达的结果的基因表达。作为非限制性实例,可以评价细胞群以鉴定碱性磷酸酶表达、SSEA1表达、SSEA3表达、SSEA4表达、TRAF-60表达、Nanog表达、Oct4表达、Fxb15表达、ES细胞或ES细胞克隆的形态学特征、参与形成存活至妊娠期满的嵌合体的能力、当注射到SCID小鼠中时分化成具有内胚层、中胚层和外胚层特征的细胞的能力、存在两条活性X染色体、DNA甲基化抗性、及其组合。还可以评价细胞群以鉴定不存在任何重编程标记,鉴别没有经历重编程的细胞。

[0107] 术语“全能性基因”,用在这里是指与全能性有关的基因。全能性基因的表达通常局限于全能细胞,例如全能干细胞,并且对于全能细胞的功能识别是决定性的。要理解,全能性基因编码的蛋白可以作为卵母细胞中的母体因子存在,并且所述基因可以通过经过至少一部分胚胎植入前时期的胚胎的至少一些细胞和/或在成体的生殖细胞前体中表达。

[0108] 在一些实施方案中,全能性基因是这样的基因,其在哺乳动物的ES细胞中的平均表达水平,比起该类型成年哺乳动物(例如,小鼠,人类,家畜)身体中存在的体细胞类型中每个细胞表达水平的平均值,大至少5、10、20、50或100-倍。在一些实施方案中,全能性基因是这样的基因,其在ES细胞中的平均表达水平,比起它在成年哺乳动物(例如,小鼠,人类,家畜)身体中存在的那些终末分化细胞类型中的平均表达水平,大至少5、10、20、50或100-倍。在一些实施方案中,全能性基因是保持使用常规方法得到的ES细胞的成活力或全能状态必不可少的。因此,如果敲除或抑制(即,消除或降低)所述基因,则ES细胞死亡或者,在一些实施方案中,分化。在一些实施方案中,全能性基因的特征在于,抑制其在ES细胞中表达(导致例如RNA转录物和/或所述基因编码的蛋白的平均稳态水平降低至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多)造成细胞可生存但是不再全能。在一些实施方案中,全能性基因的特征在于,当细胞分化成终末分化细胞时,其在ES细胞中的表达降低(导致例如RNA转录物和/或所述基因编码的蛋白的平均稳态水平降低至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多)。

[0109] 转录因子Oct-4(也被称为Pou5f1,Oct-3,Oct3/4)是全能性基因的实例。Oct-4已

经被证明是建立并保持ES细胞的未分化表型需要的,并且在决定胚体发生和细胞分化的早期事件中发挥重要的作用(Nichols等,1998,Cell 95:379-391;Niwa等,2000,Nature Genet.24:372-376)。Oct-4随着干细胞分化成特化细胞而下调。

[0110] Nanog是全能性基因的另一实例。Nanog是指导未分化的ES细胞增殖的趋异同源域蛋白。Nanog mRNA存在于小鼠和人类的全能细胞系中,而分化的细胞不存在。植入前的胚胎中,Nanog只局限于可以派生出ES细胞的生成细胞中。内源性Nanog与Stat3的细胞因子刺激平行起作用,驱动ES细胞自行更新。转基因构建物的Nanog表达升高对于ES细胞的克隆扩增、绕过Stat3和保持Oct4水平是足够的。(参见Chambers等,2003,Cell 113:643-655; Mitsui等,Cell.2003,113(5):631-42)。其它示例性的全能性基因包括Sox2和Stella(see Imamura等,BMC Developmental Biology 2006,6:34,Bortvin等.Development.2003,130(8):1673-80;Saitou等,Nature.2002,418(6895):293-300)。

[0111] 在本发明的某些实施方案中,内源全能性基因与选择性标记共表达。例如,内源全能性基因可以与编码选择性标记的多核苷酸(例如DNA)连接,致使选择性标记和内源全能性基因共表达。用在这里,共表达是用来指选择性标记的表达基本上匹配内源全能性基因的表达。在一种实施方案中,本发明的分化的体细胞包括第一内源全能性基因,其与编码第一种选择性标记的DNA连接,致使第一种选择性标记的表达基本上匹配第一种内源全能性基因的表达。分化的体细胞也可以被工程化,以包含分别与不同选择性标记连接的任意数量的内源全能性基因。因此,在另一种实施方案中,本发明的分化的体细胞包含两个内源全能性基因,每个与编码不同选择性标记的DNA连接。在另一种实施方案中,本发明的分化的体细胞包含三个内源全能性基因,每个与编码不同选择性标记的DNA连接。分化的体细胞可以被进一步工程化,以具有一个或多个在诱导型启动子下作为转基因表达的全能性基因。

[0112] 在一种实施方案中,用于所述方法的体细胞只包含一个与第一种选择性标记连接的内源全能性基因,执行选择步骤以选择表达的第一种选择性标记。在替代实施方案中,用于所述方法的体细胞包含任意数量的内源全能性基因,每个都分别与不同选择性标记连接,执行选择步骤来选择至少一个亚组的选择性标记。例如,可以执行选择步骤来选择与各种内源全能性基因连接的所有选择性标记。

[0113] 在一种实施方案中,用于所述方法的体细胞包含与内源全能性基因连接的选择性标记和在诱导型启动子下作为转基因表达的另外的全能性基因。对于这些细胞,重编程方法可以包括诱导全能性转基因的表达和选择表达的选择性标记。方法还可以包括将体细胞与改变染色质结构的药剂接触。

[0114] 出于本发明的目的,内源全能性基因和选择性标记的表达水平不必要相同乃至相似。所需要的只是,其中内源全能性基因被激活的细胞也将表达足以在重编程的细胞上赋予选择表型的选择性标记水平。例如当选择性标记是赋予对致死药物抗性的标记(“耐药性标记”)时,细胞被工程化的方式是允许其中内源全能性基因被激活的细胞也能表达足够水平的耐药性标记,以赋予重编程的细胞对致死药物的抗性。因此,重编程的细胞将存活和增殖,而未重编程的细胞将死亡。

[0115] 在本发明的某些实施方案中,选择性标记与调节内源全能性基因转录的表达控制元件可操作地连接。编码选择性标记的DNA可以插入到编码想要的内源全能性基因的开放阅读框(ORF)末端的下游,ORF的最后一个核苷酸和聚腺苷酸化位点的第一个核苷酸之间的

任何地方。内部核糖体进入位点(IRES)可以置于编码选择性标记的DNA前面。或者,编码选择性标记的DNA可以与终止信号一起,被插入到启动子下游、所需的内源全能性基因的ORF内的任何地方。内部核糖体进入位点(IRES)可以置于编码选择性标记的DNA前面。在其它实施方案中,编码选择性标记的DNA可以被插入到其表达由于全能性基因的表达而直接或者间接被激活的基因内的任何地方。在一些实施方案中,编码选择性标记的DNA被插入到内含子中。在一些实施方案中,其中已经插入DNA的内源全能性基因表达全能性基因的功能性产物,而在其它实施方案中则不表达。选择性标记可以只被插入到内源全能性基因的一个等位基因中或两个等位基因中。在某些其它实施方案中,外源多核苷酸包括与调节内源全能性基因转录的表达控制元件可操作地连接的选择性标记,将所述外源多核苷酸插入到细胞基因组中内源全能性基因外部的位点,使得适合激活内源全能性基因表达的条件也激活外源多核苷酸的表达。

[0116] 选择性标记,用在这里是指当表达时赋予受体细胞选择表型的标记,例如抗生素抗性、细胞毒药剂抗性、营养原养型或表面蛋白的表达。其表达容易被检测到的其它蛋白例如荧光或发光蛋白,或者作用于底物以产生颜色、荧光或发光物质的酶,也用作选择性标记。存在与内源全能性基因连接的选择性标记,使得有可能鉴别和选择表达内源全能性基因的重编程细胞。可以使用多种选择性标记基因,例如新霉素抗性基因(neo)、嘌呤霉素抗性基因(puro)、鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(gpt)、二氢叶酸还原酶(DHFR)、腺苷脱氨酶(ada)、嘌呤霉素-N-乙酰基转移酶(PAC)、潮霉素抗性基因(hyg)、多药抗性基因(mdr)、胸苷激酶(TK)、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)、和hisD基因。其它标记包括绿色荧光蛋白(GFP),蓝色、天蓝色、黄色、红色、橙色和青色荧光蛋白以及这里面任何一个的变体。发光蛋白例如荧光素酶(例如,萤火虫或海肾荧光素酶)也有用。基于酶报告物例如 β 半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、氯霉素乙酰转移酶等的系统也是有用的。在一些实施方案中,标记是分泌的酶。本领域技术人员显然明白,术语“选择性标记”用在这里是指基因或所述基因的表达产物,例如编码的蛋白。

[0117] 在一些实施方案中,选择性标记赋予表达它的细胞,相对于不表达它或表达它的水平明显较低的细胞来说,增殖和/或存活的优势。这样的增殖和/或存活优势通常发生于细胞维持在一定条件下、即“选择性条件”下之时。为了确保有效选择细胞群,可以维持在不足条件下并维持足够的一段时间,使得不表达标记的细胞不增殖和/或不存活并从群体中被消除或它们的数目减少到只有群体的很小部分。通过将细胞群维持在选择条件下,从而大部分或完全消除不表达标记的细胞,对表达赋予了增殖和/或存活优势的标记的细胞进行选择的过程,在这里被称为“正选择”,并且所述标记据说是“对正选择有用”。对正选择有用的标记在本发明的内源全能性基因与选择性标记连接的实施方案中有特殊的意义。

[0118] 负选择和对负选择有用的标记也是在这里描述的某些方法中所关心的。这样的标记的表达,相对于不表达所述标记或以明显更低的水平表达它的细胞而言,赋予了表达所述标记的细胞增殖和/或存活的劣势(或者,以另一种方式考虑,不表达标记的细胞相对于表达标记的细胞具有增殖和/或存活优势)。因此,当维持在选择条件下足够的一段时间时,表达所述标记的细胞可以从细胞群中被大部分或者完全消除。

[0119] 在这里所关心的某些标记,根据所采用的具体选择条件,对正和负选择有用。因此在一定的条件设置下,表达标记的细胞相对于不表达所述标记的细胞具有增殖和/或存活

优势,而在其它条件设置下,表达标记的细胞相对于不表达所述标记的细胞具有增殖和/或存活劣势。适合于用于本发明的这样的标记的两个实例是次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT),这是催化其中嘌呤类型化合物合成和/或互变的特定反应的酶,和胸苷激酶(TK),其催化其中嘧啶类型化合物合成和/或互变的特定反应。在典型培养条件下,哺乳动物细胞中的DNA合成通过主要(从头)途径进行,其中谷氨酰胺和天冬氨酸用作一系列反应的初始底物,导致嘌呤类型(例如,dATP和dGTP)和嘧啶类型(例如,dCTP和dTTP)核苷酸合成。当从头途径被阻断时,哺乳动物细胞必须利用替代途径来合成需要的核苷酸。嘌呤补救途径包括将次黄嘌呤转变为IMP,这是HPRT催化的反应。第二种途径将胸苷转变为dTMP,这是TK催化的反应。因此,缺乏HPRT表达的细胞(例如,缺乏HPRT基因的功能性拷贝的细胞)或者缺乏TK表达的细胞(例如,缺乏TK基因的功能性拷贝的细胞),可以在标准培养基中生长,但是在含有氨基嘌呤、次黄嘌呤和胸苷的HAT培养基中死亡。在缺乏HPRT内源性表达的细胞中,HPRT能够在HAT培养基中用作可以针对其表达进行选择的选择性标记。类似的,在缺乏内源性TK表达的细胞中,TK能够在HAT培养基中用作可以针对其表达进行选择的选择性标记。

[0120] 除了选择表达HPRT或者TK的细胞的能力之外,它也可能选择缺乏功能性HPRT和/或TK表达的细胞,例如,不表达一个或者两个的这些酶细胞。HPRT将某些本来无毒的化合物,包括各种各样的嘌呤类似物例如8-氮杂鸟嘌呤(8-AZ)和6-硫鸟嘌呤(6-TG),转变成细胞毒化合物。TK将某些嘧啶类似物例如5-溴脱氧尿苷和三氟-甲基-胸苷转变成细胞毒化合物。细胞毒化合物通过例如抑制涉及核酸合成的酶和/或整合到DNA中,导致错配和突变,而可以对细胞具有有害作用。因此,在含有8-AZ、6-TG等等的培养基中,表达HPRT的细胞,相对于不表达HPRT或以不足以完全支持核酸合成的较低水平表达它的细胞而言,处于生长劣势。因此,可以使用这些选择性条件来选择缺乏HPRT活性的细胞。类似的,在含有溴脱氧尿苷或三氟-甲基-胸苷的培养基中,表达TK的细胞,相对于缺乏TK表达或者表达较低和水平不足的TK的细胞而言,处于生长劣势。因此,可以使用这些选择性条件来选择缺乏TK活性的细胞。

[0121] 在本发明的一些实施方案中,对已经用一种或多种重编程剂或因子处理然后维持适当的一段时间的分化体细胞群加以分析,鉴别表现出全能性标记的细胞。

[0122] 如本文所述,用于本发明的分化的体细胞可以是工程分化体细胞,能够从包含这样的工程化的体细胞的转基因小鼠获得。这样的转基因小鼠能够使用本技术领域已知的标准技术产生。例如,Bronson等描述了将单个拷贝的转基因插入到选择的染色体位点(chromosomal site)中的技术。参见Bronson等,1996。简单说,含有所需的整合构建物(例如,含有与全能性基因连接的选择性标记的构建物)通过本技术领域已知的标准技术被导入到ES细胞中。针对想要的整合事件筛选由此产生的ES细胞,其中敲入载体被整合到想要的内源全能性基因的基因座中,使得选择性标记整合到所述全能性基因的基因组基因座中,并处于全能性基因启动子的控制之下。然后将想要的ES细胞用于产生其中所有细胞类型都含有正确的整合事件的转基因小鼠。所需的细胞类型可以从转基因小鼠有选择地获得,并体外维持。在一种实施方案中,可以产生两种或多种转基因小鼠,每种携带不同的整合构建物。这些小鼠然后可以被配种,产生携带多个所需整合构建物的小鼠。例如,可以产生一种类型的转基因小鼠来携带与选择性标记连接的内源全能性基因,而可以产生第二种类型的转基因小鼠来携带在诱导型启动子下作为转基因表达的全能性基因。然后,这两种

类型的小鼠可以被配种,产生的转基因小鼠兼具与内源全能性基因连接的选择性标记和在诱导型启动子下作为转基因表达的另外的全能性基因。这两种全能性基因可以相同或可以不相同。预期有许多变量:与标记连接的内源全能性基因的身份,作为转基因表达的全能性基因的身份,和与选择性标记连接的内源全能性基因的数量,以及作为转基因表达的全能性基因的数量。本发明包括这些变量所有的可能组合。在其它实施方案中,一种小鼠携带与选择性标记连接的内源全能性基因,一种小鼠携带下文进一步论述的编码靶定DNMT基因(从而能够抑制DNMT基因的表达)的RNAi剂的DNA。

[0123] 或者,本发明的工程分化体细胞可以通过将所需构建物直接导入到体细胞中来产生。DNA构建物可以通过本技术领域已知的任何标准技术被导入到细胞中,例如病毒转染(例如,使用腺病毒系统)或脂质体介导的转染。本技术领域已知的用定向整合产生体细胞的任何手段,可用于产生本发明的体细胞,例如其中选择性标记与内源全能性基因可操作地连接的细胞,或其中通过在基因中或附近导入条件启动子或位点特异性重组酶的位点,赋予内源性基因条件性的细胞。

[0124] 在哺乳动物细胞中,同源重组发生的频率与非同源重组相比要低得多。为了便于选择同源重组事件优先于非同源重组事件,已经开发了至少两种富集方法:正-负选择(PNS)方法以及“无启动子”选择方法(Sedivy和Dutriaux,1999)。简单说,PNS,第一种方法,基因术语是负选择:它依靠利用放置在定向载体侧翼上的负选择基因,针对在不正确的(非同源的)基因座处的重组进行选择。另一方面,第二种方法,“无启动子”选择,基因术语是正选择:它依靠利用有条件地对同源靶位点处的重组进行表达的正选择基因,选择在正确的(同源的)基因座处的重组。Sedivy和Dutriaux的公开内容合并在此。

[0125] 如本文所述,评价已经与至少一种重编程剂接触的分化的体细胞,将已经重编程为多能性或全能性的细胞与还没有重编程的细胞区别开来。这可以通过将表现出一种或多种全能性特征或表现出一种或多种全能性标记的细胞与不是这样的细胞区别开来而进行。

[0126] 术语“全能性特征”,用在这里是指与全能性有关的许多特征,包括,例如,分化成所有类型的细胞的能力和全能细胞独特的表达模式,包括全能性基因的表达、其它ES细胞标记的表达、和在整体水平上被称为“干细胞分子特征”或“stemness”的独特表达模式。

[0127] 因此,为了评价重编程体细胞的全能性特征,人们可以分析这样的细胞的不同生长特点和ES细胞样形态。细胞可以皮下注射到免疫受损的SCID小鼠中诱发畸胎瘤(ES细胞的标准分析)。ES-样细胞能够分化成胚体(ES的另一种特异性特征)。此外,ES-样细胞能够通过添加已知用于驱动分化成特定细胞类型的某些生长因子来进行体外分化。以诱导端粒酶活性为标记的自身更新能力,是能够监测的另一种全能性特征。人们可以通过将重编程的体细胞导入胚囊来对它们进行功能分析,并测定所述细胞是否能够产生所有的细胞类型。参见Hogan等,2003。如果重编程的细胞能够形成身体的一些细胞类型,则它们是多能的;如果重编程的细胞能够形成包括生殖细胞的身体所有细胞类型,则它们是全能的。

[0128] 人们也可以在重编程的体细胞中检查个体全能性基因的表达,评价它们的全能性特征。另外,人们可以评价其它ES细胞标记的表达。阶段特异性胚胎15抗原-1、-3和-4(SSEA-1,SSEA-3,SSEA-4)是早期胚胎发育中特异性表达的糖蛋白,并且是ES细胞的标记(Solter和Knowles,1978,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75:5565-5569;Kannagi等,1983,EMBO J 2:2355-2361)。碱性磷酸酶(AP)表达升高是与未分化的胚胎干细胞有关的另一种标记

(Wobus等,1984,Exp.Cell 152:212-219;Pease等,1990,Dev.Biol.141:322-352)。其它干/祖细胞标记包括中间神经丝巢蛋白(Lendahl等,1990,Cell 60:585-595;Dah-Istrand等,1992,J.Cell Sci.103:589-597),膜糖蛋白prominin/AC133(Weigmann等,1997,Proc.Natl.Acad.USA 94:12425-12430;Corbeil等,1998,Blood91:2625-22626),转录因子Tcf-4(Korinek等,1998,Nat.Genet.19:379-383;Lee等,1999,J.Biol.Chem.274.1 566-1572),和转录因子Cdx1(Dupre等,1988,Genes Dev.2:1647-1654;Subramania'n等,1998,Differentiation 64:11-18)。另外的ES细胞标记记载于Ginis,I.,等,Dev.Biol.,269:369-380,2004。例如,有用的有REX-I、TERT、UTF-I、TRF-I、TRF-2、连接蛋白43、连接蛋白45、FGFR-4、ABCG-2和Glut-1。

[0129] 人们可以另外进行重编程体细胞的表达谱分析,评价它们的全能性特征。全能细胞,例如胚胎干细胞,和多能细胞,例如成年干细胞,已知具有整体基因表达谱的独特模式。这种独特的模式被称为“干细胞分子特征”或“stemness”。参见,例如Ramalho-Santos等,Science 298:597-600(2002);Ivanova等,Science 298:601-604。人们可以评价细胞DNA的表观遗传状态。人们可以评价细胞对整体DNA去甲基化的抗性。人们可以评价细胞发育潜力。在一些实施方案中,当注射到SCID小鼠能够形成含有具有内胚层、中胚层和外胚层特征的细胞的畸胎瘤、和/或拥有参与(注射到鼠胚囊中之后)形成存活至妊娠期满的嵌合体的能力的细胞,被认为是全能的。

[0130] 工程化的体细胞和包含这样的细胞的转基因小鼠

[0131] 本发明还提供其中能够调节DNA甲基化的工程化的体细胞。“DNA甲基化”在此使用与它在本领域中的使用一致,是指通过甲基与胞嘧啶相连对真核生物DNA加以修饰。本技术领域已知,DNA的胞嘧啶甲基化在表观遗传基因调节和维持基因组完整性中发挥重要的作用。哺乳动物细胞拥有几种不同的DNA甲基转移酶,其负责将甲基转移到存在于DNA中的胞嘧啶上(Goll,G,和Bestor,T.,Annu Rev.Biochemistry,74:481-514,2005)。在哺乳动物细胞中至少三个基因涉及建立和维持基因组甲基化,即,编码从头甲基转移酶DNMT3a和DNMT3b以及维持酶DNMT1的基因,DNMT1不但将半甲基化的DNA甲基化,而且显示出将未甲基化的DNA甲基化的能力。小鼠中的突变分析证明,这三个基因是必需的,在Dnmt1无效的胚胎中原肠胚形成不久以后,以及在缺乏功能性Dnmt3a或Dnmt3b基因的胚胎情况下是较晚的时间点,发生致死性(Li,1992;Okano,等,Cell,99(3):247-57,1999)。在这些胚胎中已经观察到许多基因异常调节。所述数据符合在哺乳动物发育期间对于许多细胞类型中发生转录沉默的DNA甲基化的要求,并可能是恰当的细胞分化所必需的。

[0132] 本发明提供了这样的细胞:其中内源性DNA甲基转移酶(DNMT)基因例如Dnmt1、Dnmt3a或Dnmt3b的表达能够被调节和/或其中内源性Dnmt基因的表达相对于未工程化的体细胞来说改变了。在某些实施方案中,体细胞含有外源导入的基因,其编码的RNA干扰内源性DNA甲基转移酶(DNMT)基因例如Dnmt1、Dnmt3a或Dnmt3b的表达。在一些实施方案中,所述RNA通过RNA干扰(RNAi)干扰内源性DNA甲基转移酶基因的表达。“RNAi”用在这里与其在本技术领域中的含意一致,是指双链RNA(dsRNA)藉此引发与所述dsRNA的一条链具有互补性的相应mRNA的序列特异性降解或翻译阻抑的现象。要理解,dsRNA的链和mRNA之间的互补性不必是100%,而是只需要足以介导基因表达的抑制(也称为“沉默”或“敲减”)即可。例如,互补性的程度是使得所述链能够(i)在被成为RNA-诱导的沉默复合物(RISC)的蛋白复合物

中,引导mRNA的裂解;或(ii)引起所述mRNA的翻译阻抑。在某些实施方案中,RNA的双链部分小于大约30个核苷酸长度,例如17和29个核苷酸长度之间。在哺乳动物细胞中,RNAi可以通过将适当的双链核酸导入细胞中或在细胞中表达核酸而达成,然后细胞内加工,以在其中产生dsRNA。

[0133] 出于本发明的目的,经历了任选的细胞内加工之后,能够引发基因表达的序列特异性抑制的至少部分双链RNA被称为“RNAi剂”。能够介导RNAi的示例性的核酸是短发夹RNA(shRNA)、短干扰RNA(siRNA)和微小RNA前体。这些术语是公知的,用在这里与它们在本技术领域中的含义一致。siRNAs通常包括两条分开的核酸链,它们彼此杂交形成双链体。它们可以使用例如标准核酸合成技术进行体外合成。它们包括各式各样的修饰核苷、核苷类似物并可以包括化学或生物学修饰的碱基、修饰的骨架等等。本技术领域认可对RNAi有用的任何修饰都能用。一些修饰引起稳定性增加、细胞摄取、潜能等等。在某些实施方案中,siRNA包括大约19个核苷酸长度和一或两个1-5个核苷酸长度的3'突出端的双链体,其可以由脱氧核糖核苷酸构成。shRNA包括单条核酸链,其含有通过主要是非自身互补区域隔开的两个互补部分。互补的部分杂交形成双链体结构,非自身互补区域形成连接双链体一条链的3'末端和另一条链的5'末端的环。shRNAs经历细胞内加工,产生siRNAs。

[0134] 微小RNAs(miRNAs)是大约21-25个核苷酸(哺乳动物系统中)的小的、非编码的单链RNAs,其以序列特异性方式抑制基因表达。它们在细胞内从具有特征性二级结构的前体产生,所述二级结构包括含有双链体的短发夹(大约70个核苷酸长度),双链体经常包括一个或多个不完全互补的区域。天然存在的miRNAs与它们的靶mRNA只部分互补,并通常通过翻译阻抑起作用。用在这里,术语“shRNA”包括模仿内源性微小RNA前体的RNAi剂。在一些实施方案中,编码茎-环结构的茎部分或编码完整茎-环的序列可以被插入包含至少一部分内源性微小RNA初级转录物的核酸中,例如,代替编码内源性微小RNA或最小(约70个)微小RNA发夹的序列。

[0135] 本领域技术人员将能鉴别抑制基因表达的适当RNAi剂。这样的RNAi剂称为是“靶定”所述基因和编码的mRNA。RNAi剂可以充分抑制表达,将所述基因(例如,mRNA)或其编码的蛋白转录的RNA的平均稳态水平减少例如至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多)。RNAi剂可以含有17-29个核苷酸长度之间的序列,例如,19-23个核苷酸长度,所述序列与mRNA 100%互补,或在与mRNA比对以得到最大数量的互补碱基对时,含有最多1、2、3、4或5个核苷酸、或最多大约10-30%的核苷酸不参与Watson-Crick碱基对。RNAi剂可以含有17-29个核苷酸长度之间的双链体,其中所有的核苷酸都参与Watson-Crick碱基对,或者其中最多大约10-30%的核苷酸不参与Watson-Crick碱基对。本领域技术人员将意识到所述序列特征经常与高级的siRNA函数性和算法和规则有关,通过所述函数性和算法和规则可以设计这样的siRNAs(参见,例如,Jagla,B.,等,RNA,11(6):864-72,2005)。本发明的方法可以使用具有这样的特征的siRNAs,当然有用的序列范围不限于满足这些规则的那些。在一些实施方案中,选择RNAi剂的任一条或两条链的序列以避免沉默非靶基因,例如,所述链可以与靶mRNA以外的任何mRNA具有小于70%、80%或90%的互补性。在一些实施方案中,使用了多个不同的序列。下面的表格列出了编码DNMT1、3a和3b的人类和小鼠基因的基因IDs,和用于沉默这些基因的示例性siRNAs的反义序列。对于HPRT也包括类似的信息。本领域技术人员可以在公众可利用的数据库中,容易地找到任何目的基因的Gene ID、登录号和序列信

息。本领域技术人员可以容易地设计siRNAs和shRNAs,用于沉默这些基因或其它。要认识到,序列可以通过在任一或两个末端掺入另外的核苷酸进行变化和/或延长。此外,如果存在多个同工型,人们可以设计出siRNAs或shRNAs,其靶定给定的目的细胞类型或生物体中表达的所有同工型中都存在的区域。

[0136] 表A:以人类基因为靶的siRNA序列

基因	基因 ID	siRNA 序列
Dnmt1	1786	GGAAGAAGAGUUACUAA (SEQ. ID. NO: _____)
[0137]		GAGCGGAGGUGUCCCAAUA (SEQ. ID. NO: _____)
		GGACGACCCUGACCUCAA (SEQ. ID. NO: _____)
		GAACGGUGCUCAUGCUUAC (SEQ. ID. NO: _____)
		UUUCUCCUCAGACACUC (SEQ. ID. NO: _____)
[0138]	Dnmt 3a	GCACAAGGGUACCUACGGG (SEQ. ID. NO: _____)
		CAAGAGAGCGGCUGGUGUA (SEQ. ID. NO: _____)
		GCACUGAAAUGGAAAGGGU (SEQ. ID. NO: _____)
		GAACUGCUUUCUGGAGUGU (SEQ. ID. NO: _____)
	Dnmt3b	GAAAGUACGUCGCUUCUGA (SEQ. ID. NO: _____)
		ACAAAUGGCUUCAGAUGUU (SEQ. ID. NO: _____)
		GCUCUUACCUUACCAUCGA (SEQ. ID. NO: _____)
		UUUACCACCUGCUGAAUUA (SEQ. ID. NO: _____)
	Hprt	3251 CCAGUUUCACUAAUGACACAA (SEQ ID NO: _____)

[0139] 表B:靶定小鼠基因的siRNA

[0140]

基因	基因 ID	siRNA 序列
Dnmt1	13433	GGAAAGAGAUGGCUUAACA (SEQ. ID. NO:) GCUGGGAGAUGGCGUCAUA (SEQ. ID. NO:) GAUAAGAAACGCAGAGUUG (SEQ. ID. NO:) GGUAGAGAGUUACGACGAA (SEQ. ID. NO:)
Dnmt3a	13435	CGCGAUUUCUUGAGUCUAA (SEQ. ID. NO:) CGAAUUGUGUCUUGGUGGA (SEQ. ID. NO:) AAACAUCGAGGACAUUUGU (SEQ. ID. NO:) CAAGGGACUUUAUGAGGGU (SEQ. ID. NO:)
Dnmt3b	13436	GCAAUGAUCUCUCUAAACGU (SEQ. ID. NO:) GGAAUGCGCUGGGUACAGU (SEQ. ID. NO:) UAAUCUGGCUACCUUCAAU (SEQ. ID. NO:) GCAAAGGUUUAUAUGAGGG (SEQ. ID. NO:)
Hprt	15452	CCAGUUUCACUAAUGACACAA (SEQ ID NO:)

[0141] 为了在体细胞中表达RNAi剂,包含编码RNAi剂的序列并与适当的表达控制元件例如启动子可操作地连接的核酸构建物,可以根据本技术领域的知识被导入细胞中。出于本发明的目的,包含编码目的RNA或多肽的序列的核酸构建物,所述序列与表达控制元件例如在目的细胞中指导转录的启动子可操作地连接,这样的核酸构建物被称为“表达盒”。启动子可以是在哺乳动物细胞中起作用的RNA聚合酶I、II或III启动子。在某些实施方案中,启动子是在被导入体细胞时起作用的启动子。在某些实施方案中,RNAi剂的表达是有条件的。在一些实施方案中,通过将编码RNAi剂的序列置于调节型(例如,诱导型或抑制型)启动子的控制之下,来调节表达。

[0142] 在一些实施方案中,DNA甲基转移酶表达的调节依靠位点特异性重组酶。实现控制和可逆表达基因的位点特异性重组酶及其使用方法是本技术领域已知的。这样的重组酶是识别特定核酸序列并介导位于这些位点之间的序列的插入或切除的蛋白。重组酶系统尤其包括Cre-Lox和Flp-Frt系统。在一些实施方案中,RNAi剂的至少一部分编码序列位于重组酶所针对的位点之间。重组酶(例如,Cre)在细胞中的表达,或其外源导入细胞,引起位于所述位点之间的部分编码序列的切除,永久性关闭基因的表达。在一些实施方案中,由于在位于启动子元件和转录起始位点之间或启动子元件的不同部分之间(例如,TATA框和启动子元件的第二部分之间)存在“终止子”序列,阻止了细胞中的基因表达。终止子序列侧翼带有重组酶的位点,这些位点也位于启动子和转录起始位点之间或启动子元件的不同部分之间。重组酶在细胞内表达或导入细胞导致所述终止子序列的切除,从而引起启动子与转录起始位点的可操作连接或重建功能性启动子,藉此允许转录继续进行。在一些实施方案中,细胞包含表达盒,所述表达盒中所述重组酶的表达处于诱导型表达控制元件例如诱导型启

动子控制之下。重组酶的表达是受诱导的,例如,通过向细胞或生物体施用适当的诱导剂例如小分子(例如,四环素或其类似物,激素例如雌激素或糖皮质激素,金属等等),或通过将编码重组酶的表达载体导入细胞或生物体中。参见,例如,美国专利No.6,995,011和Ventura,等。(参考文献组2的参考文献13)。在一种实施方案中,启动子是U6启动子,并且Lox-Stop-Lox序列被插入到近侧序列元件(PSE)和TATA框之间或TATA框和转录起始位点之间。在一些实施方案中,启动子(例如,U6启动子)中的TATA框被双功能lox位点(TATAlox)代替,TATAlox保持经受Cre-介导的重组的能力并含有所使用的功能性TATA框,使得重组之后PSE、TATA和转录起始位点之间的间距不改变(Ventura等,2004)。

[0143] 在一些实施方案中,本发明提供了包含Dnmt基因的第一拷贝和Dnmt基因的第二拷贝的细胞,所述第一拷贝是有功能的,但是能够通过向细胞中表达或导入第一重组酶而使其无功能,而第二拷贝是无功能的,但是能够通过向细胞中表达或导入第二重组酶而使其有功能。基因的第一拷贝或其必要部分可以例如侧翼带有第一重组酶的位点,使得第一重组酶存在时,所述基因或其部分被切除并使所述基因无功能。基因的第二拷贝可以例如包含位于第二重组酶位点之间的终止子序列。所述终止子序列阻止有功能DNMT蛋白的合成。例如所述终止子可以存在于启动子和转录起始位点之间,并阻止转录,或者它可以导致插入到DNMT蛋白中,使得所述蛋白无功能。当第二重组酶存在时,终止子序列被切除,并产生有功能的DNMT。在一些实施方案中,如果检测不到转录,或者即使转录的话,转录水平减少了至少100-倍,则基因被认为是“无功能的”。在一些实施方案中,“无功能的”基因编码的DNMT蛋白缺乏它的至少90%的催化结构域和/或它的至少90%的定位结构域。本领域技术人员将能产生无功能的Dnmt1、3a和/或3b基因。使用标准体外分析或者通过确定所述基因是否能够拯救Dnmt1、3a或3b敲除后的致死性,对基因进行测试,以确定它们是否编码功能蛋白。在一些实施方案中,“无功能的基因”编码的蛋白通过使用本技术领域已知的标准分析了解,其体外针对适当的底物(例如,在DNMT1的情况下是半甲基化DNA)的DNA甲基化活性减少了至少95%、98%、99%或更多。在一些实施方案中,无功能的基因是在作为目的体细胞例如初级哺乳动物成纤维细胞中的唯一DNMT蛋白源存在时,不编码能够允许所述细胞在标准培养条件中存活10天时间的蛋白的基因。DNA甲基化能够如下在细胞中调节。首先,通过导入或表达第一重组酶,从而消除功能DNMT1的表达,来抑制DNA甲基化。细胞维持培养。缺少功能DNMT1的条件下,随着时间发生DNA去甲基化(自发的或是主动去甲基化的结果),并且在细胞分裂之后半甲基化的DNA没有重新甲基化(remethylated)。当想要恢复DNA甲基化时,在细胞中导入或表达第二重组酶,导致除去终止子序列并允许产生功能性DNMT1。在一些实施方案中,应用这种途径提供DNMT1、3a、3b或其任何有条件的表达。

[0144] 在一些实施方案中,所述重组酶瞬时表达,例如,它在大约1-2天、2-7天、1-2周等之后就检测不到。瞬时表达可以通过瞬时转染或通过从调节型启动子表达来实现。

[0145] 在一些实施方案中,重组酶从外源导入。在这些实施方案中,任选重组酶包含提高多肽的细胞摄取的氨基酸序列(也称为“蛋白转导结构域”)。这样的提高摄取的氨基酸序列在例如,HIV-I TAT蛋白、单纯疱疹病毒1(HSV-I)DNA结合蛋白VP22、果蝇触角足(Antp)同源异型转录因子及其他中发现。合成肽,例如具有高碱性氨基酸含量(Lys和Arg)的合成肽,也是有用的。其他的有用序列参见美国专利公布No.20060148104。在一些实施方案中,重组酶的表达是通过用载体例如病毒载体(例如,慢病毒,腺病毒或腺相关病毒载体)感染细胞来

实现的,所述病毒载体含有表达盒,表达盒含有与启动子可操作地连接的编码重组酶的序列。所述载体可以是导致重组酶瞬时表达的载体,例如,没有稳定整合到细胞的基因组中或产生稳定遗传的游离体。在本发明的某些实施方案中,工程化的体细胞含有功能性p53途径(有关p53途径的说明,参见Harris,S.,和Levine,A,Oncogene,24:2899-2908,2005)。这样的细胞含有功能性p53基因,并能够响应各种胁迫例如DNA损伤、缺氧和/或暴露于本技术领域已知在体细胞中诱发p53依赖性凋亡的各种化疗剂(例如,微管抑制剂),经历p53依赖性细胞周期停滞和/或细胞死亡。在一些实施方案中,p53-依赖性途径导致凋亡。在一些实施方案中,p53-依赖性途径导致细胞衰老。通过例如将细胞暴露于已知诱发p53-依赖性细胞周期停滞或死亡的条件,并确定细胞的响应方式是否与已有的功能性p53依赖性途径一致,本领域技术人员将能确定细胞是否具有功能性p53途径。一般说来,从哺乳动物对象获得的非癌性体细胞预计拥有功能性p53途径。

[0146] 在本发明的某些实施方案中,体细胞对DNA去甲基化敏感。用在这里,如果细胞在减少DNA甲基化的条件下表现出存活或增殖能力降低,则细胞是对DNA去甲基化“敏感的”。DNA甲基化是各种各样的不同体细胞类型、特别是将要增殖的那些体细胞类型的存活需要的。例如,当通过Cre-介导的重组使得Dnmt1基因在增殖性成纤维细胞中无功能时,所述细胞在导入表达Cre的构建物之后3-5天之间展现出渐进性的DNA去甲基化,并在导入所述构建物之后5和6天之间死亡(Jackson-Grusby等)。DNA去甲基化是多种多样类型的增殖体细胞共有的性能,这符合Dnmt1、3a和3b是必需基因的事实。相反,ES细胞能够在不存在功能性DNMT1下存活和增殖,除非其被诱导分化。

[0147] 在某些实施方案中,本发明的细胞群的特征在于,细胞的基因组DNA中甲基化胞嘧啶的平均数量相对于其在“标准条件”下将有的水平,减少了至少5%。在一些实施方案中,所述细胞群经受的条件使得基因组DNA中甲基化胞嘧啶的数量相对于其在标准条件下存在的水平,平均减少了介于5%和10%之间、10%和25%之间、25%和50%之间、50%和75%之间、75%和95%之间或95%和100%之间。在本发明的某些实施方案中,相对于没有经受去甲基化条件的原本相同的细胞群,所述细胞群中至少10、20、50或100个基因和/或基因元件例如IAP、L1、LINE或SINE元件或者内源性逆转录病毒元件的甲基化平均量(即,甲基化胞嘧啶的平均数)减少。在某些实施方案中,所述细胞群中Dnmt mRNA例如Dnmt1mRNA的平均表达水平小于其正常水平的50%。在某些实施方案中,所述细胞群中DNMT蛋白例如DNMT1蛋白的平均表达水平小于其正常水平的50%。

[0148] 如果细胞在DNA甲基化降低到将在增殖性体细胞例如初级成纤维细胞中引起细胞周期停滞或者细胞死亡的水平时能够存活和增殖,则所述细胞被称为“DNA去甲基化抗性”。在本发明的某些实施方案中,“增殖性细胞”是如果维持在适当的培养条件之下,预期将在96小时内分裂的细胞。在某些实施方案中,增殖性细胞如果维持在适当的培养条件之下,预计将在72小时内分裂。在一些实施方案中,细胞预期将在48小时内或者24小时内分裂。换句话说,如果所述细胞(和其后代)在适当的条件下维持培养,则细胞的总数将在24、48、72或96小时内加倍。“适当的培养条件”是指本技术领域已知的、适合目的体细胞类型存活和增殖的标准培养条件。参见,例如,Masters,J.(编著)Animal Cell Culture:A Practical Approach,(动物细胞培养:实用方法),第三版,Oxford University Press,2000;Freshey,I.,等,Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique,5th ed.(动物细胞培

养:基本技术手册,第五版),Wiley-Liss,2005。

[0149] 降低DNA甲基化可以如下实现:(a)抑制内源性DNA甲基转移酶的表达或活性或者通过内源性DNA甲基转移酶抑制DNA甲基化,例如,通过用抑制内源性DNA甲基转移酶的表达或活性或者以其它方式抑制DNA甲基化的药剂接触细胞;(b)对抑制内源性DNA甲基转移酶表达或活性或者通过细胞中的DNMT抑制DNA甲基化的药剂进行表达;(c)抑制DNA甲基转移酶以外的内源性蛋白质的表达或活性,所述蛋白是为DNA甲基转移酶将甲基转移到胞嘧啶提供底物的生化途径的任何步骤所需要的;(d)在所述细胞中表达抑制DNA甲基转移酶以外的内源性蛋白质表达或活性的药剂,所述蛋白是为DNA甲基转移酶将甲基转移到胞嘧啶提供底物的生化途径的任何步骤所需要的;和/或(e)在缺乏供DNA甲基转移酶将甲基转移到胞嘧啶上所用的底物合成所需要的营养物(但是存在以其它方式支持细胞存活的足够营养物)的条件下,培养所述细胞。如(b)或(d)所述在细胞中表达药剂,可以通过将所述细胞与引起或去抑制这样的表达或者以其它方式导致这样的表达(例如,通过重组酶介导的机制)的药剂进行接触而实现。已经以在前提到的任何方式(或者本技术领域已知的任何其它方式)处理以减少DNA去甲基化的细胞,被认为已经经受了“DNA去甲基化条件”。例如,已经接触了引起抑制DNMT表达的RNAi剂表达的药剂、或者已经接触了DNA甲基转移酶抑制剂或失活DNMT基因的重组酶的细胞,就已经经受了DNA去甲基化条件。

[0150] DNA甲基转移酶可以是DNMT、3a和/或3b。在一些实施方案中,只有DNMT1的表达和/或活性受到抑制。在其它实施方案中,DNMT1以及任一的DNMT 3a或3b的表达和/或活性被抑制。在一些实施方案中,DNMT1、3a和3b的表达和/或活性受到抑制。在一些实施方案中,DNMT以外的内源性蛋白质是为在细胞中通过DNA甲基转移酶将甲基转移到胞嘧啶上提供底物的生化途径的任何步骤所需要的内源性转运蛋白或酶。在一些实施方案中,使用条件的组合,例如,至少一种DNMT被抑制,并且细胞培养在缺乏DNA甲基化所需要的至少某些营养物的条件下。在另一种实施方案中,细胞与抑制DNA甲基化的小分子(例如5'氮杂胞苷)和抑制DNMT1、3a或3b在细胞中表达的RNAi剂接触。在某些实施方案中,对DNA去甲基化敏感的细胞在导致DNA去甲基化的降低DNA甲基化时和/或抑制DNA甲基转移酶活性时,经历细胞周期停滞或死亡。

[0151] 各种各样的DNA甲基化抑制剂是本技术领域已知的,并用于本发明。参见,例如, Lyko, F. 和 Brown, R., JNCI Journal of the National Cancer Institute, 97(20):1498-1506, 2005。DNA甲基化抑制剂包括核苷DNA甲基转移酶抑制剂例如5-氮杂胞苷、5-氮杂脱氧胞嘧啶和zebularine,非核苷抑制剂例如多酚(-)-表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(EGCG)和小分子RG108(2-(1,3-二氧-1,3-二氢-2H-异吡啶-2-基)-3-(1H-吡啶-3-基)丙酸),描述于WO 2005085196中的化合物以及邻苯二甲酰胺、琥珀酰亚胺和WO 2007007054中所述的相关化合物。其他的三类化合物是:(1)4-氨基苯甲酸衍生物,例如抗心律失常药普鲁卡因胺和局部麻醉剂普鲁卡因;(2)Psammaplins,其也抑制组蛋白脱乙酰基酶(Pina, I. C., J Org Chem., 68(10):3866-73, 2003);和(3)寡核苷酸,包括siRNAs、shRNAs和特异性反义寡核苷酸,例如MG98。DNA甲基化抑制剂可以通过各种各样的不同机制起作用。所述核苷抑制剂在合并到DNA中之前通过细胞途径代谢。合并后,它们起到DNMT酶的自杀底物的作用。已经提出,非核苷抑制剂普鲁卡因、表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(EGCG)和RG108通过掩蔽DNMT靶序列(即,普鲁卡因)或通过酶的活性位点(即,EGCG和RG108)而抑制DNA甲基转移酶。在本

发明的一些实施方案中,使用DNA甲基化抑制剂的组合。在一些实施方案中,对浓度进行选择,使对细胞的毒性作用最小化。在一些实施方案中,不使用合并到DNA中(或其代谢产物合并到DNA中)的药剂。在本发明的某些实施方案中,如果细胞基因组DNA中的甲基化胞嘧啶数量相对于“标准条件”之下应有的水平减少了至少5%,则细胞中的DNA甲基化被认为“降低”,并且细胞的DNA被认为是至少部分“去甲基化”,所述“标准条件”是指哺乳动物对象体内的条件、或本技术领域已知并且常规用于特定的目的细胞类型的适当的细胞培养条件。在一些实施方案中,基因组DNA中甲基化胞嘧啶的数量相对于其在标准条件下存在的水平,例如,施行或诱导DNA甲基转移酶抑制剂的表达之前的水平,减少了介于5%和10%之间、10%和25%之间、25%和50%之间、50%和75%之间、75%和95%之间或95%和100%之间。在本发明的某些实施方案中,如果细胞基因组DNA中的甲基化CpG数量相对于“标准条件”之下应有的水平减少了至少5%,则细胞中的DNA甲基化被认为“降低”,并且细胞的DNA被认为是至少部分“去甲基化”,所述“标准条件”是指哺乳动物对象体内的条件或本技术领域已知并且常规用于特定的目的细胞类型的适当的细胞培养条件。在一些实施方案中,基因组DNA中甲基化CpG序列的数量相对于在标准条件下存在的水平,例如,施行或诱导DNA甲基转移酶抑制剂的表达之前的水平,减少了介于5%和10%之间、10%和25%之间、25%和50%之间、50%和75%之间、75%和95%之间或95%和100%之间。在某些实施方案中,细胞经历了整体DNA去甲基化。“整体DNA去甲基化”是指DNA去甲基化发生于基因组中的许多位置,这与一个或几个特定基因座相反。在本发明的某些实施方案中,整体DNA去甲基化降低了至少10、20、50或100个基因和/或基因元件例如IAP、L1,LINE或SINE元件或内源性逆转录病毒元件的甲基化(即,甲基化胞嘧啶的数量)。本领域技术人员将能够容易地定性确定所述细胞的DNA是否被去甲基化和/或确定去甲基化的程度。例如,本领域技术人员可以利用某些限制性内切酶和/或DNA裂解剂只识别甲基化DNA的事实。在某些实施方案中,利用亚硫酸氢盐测序。在一种实施方案中,采用亚硫酸氢盐处理继之以DNA重复元件的PCR扩增(Yang, A.S., 等, Nucl. Acids Res., 32(3):e38, 2004)。在某些实施方案中, HPLC或最近邻分析用来定量5-甲基胞嘧啶的量。

[0152] 在一些实施方案中,细胞周期停滞或死亡发生于所述细胞经受去甲基化条件之后的30天之内或更短,例如15天之内或更短,10天内,5天内,等等。在一些实施方案中,细胞周期停滞或死亡发生于所述细胞经受去甲基化条件之后的5-6天内。在一些实施方案中,细胞经受去甲基化条件之后,细胞周期停滞或死亡发生于细胞在非去甲基化条件下完成10个细胞周期所需要的时间的10倍以内,例如,5-10个细胞周期时间之间或2-5个细胞周期时间之间。在一些实施方案中,细胞周期停滞或死亡发生于诱导靶定细胞中Dnmt基因的RNAi剂表达之后的30天以内或者更短,例如15天以内或者更短、10天以内、5天以内等等。在一些实施方案中,细胞周期停滞或死亡发生于诱导靶定细胞中Dnmt基因的RNAi剂表达之后的5-6天以内。在一些实施方案中,诱导靶定细胞中Dnmt基因的RNAi剂表达之后,细胞周期停滞或死亡发生于细胞在Dnmt基因正常表达的条件下完成10个细胞周期所需要的时间的10倍以内,例如,5-10个细胞周期时间之间或2-5个细胞周期时间之间。在一些实施方案中,细胞周期停滞或死亡发生于Dnmt mRNA例如Dnmt1mRNA的平均表达水平小于其正常水平的50%期间的30天或者更短天数之后,例如15天或者更短天数之后,或者5天或更短天数之后。在一些实施方案中,在DNMT蛋白例如DNMT1蛋白的平均表达水平小于其正常水平的50%期间的30天

或者更短天数之后,发生细胞周期停滞或死亡,例如15天或者更短天数之后,10天之后,5天之后,等等。在一些实施方案中,细胞周期停滞或死亡发生于DNMT蛋白例如DNMT1蛋白的平均甲基转移酶活性水平小于其正常水平的50%期间的30天或者更短天数之后,例如15天或者更短天数之后,10天或更短天数之后或者5天或更短天数之后。

[0153] 要理解,本发明的方法经常使用体细胞群实施。如果至少90%的细胞对DNA去甲基化敏感,就说所述体细胞群对DNA去甲基化敏感。在一些实施方案中,至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、99.95或更多的细胞对DNA去甲基化敏感。因此,细胞经受去甲基化条件时,至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、99.95%或更多的所述细胞在选定的时间段内,例如30天内、15天内、10天内等等,经历细胞周期停滞或死亡。细胞群可以是单一类型的,并且可以基本上没有其它细胞类型。“基本上没有”,用在这里是指整个细胞群体中想要的细胞至少大约80%纯度的群,优选85%、90%、95%、99%或更高的纯度。在一些实施方案中,细胞在只支持想要的细胞类型生长的培养基中培养一段时间,从而产生基本上没有其它细胞类型的细胞群。

[0154] 在本发明的某些实施方案中,重编程的体细胞通过包括选择抵抗DNA去甲基化的细胞的方法进行鉴定。本发明提供了已经至少部分重编程为ES-样状态的体细胞的鉴定方法,所述方法包括下列步骤:(a)提供体细胞,其中至少一些已经至少部分重编程为ES-样状态;和(b)选择抵抗DNA去甲基化的细胞,从而鉴定已经被重编程的可能性增加的细胞,例如重编程为ES-样状态。在一些实施方案中,使用所述方法鉴定的至少一些细胞已经重编程为ES-样状态。在一些实施方案中,至少一些细胞已经被至少部分重编程为ES-样状态,使得在经受一种或多种附加处理时,它们与不抵抗DNA去甲基化的细胞相比,对重编程为全能状态更敏感。

[0155] 所述方法利用许多或者大多数体细胞类型对DNA去甲基化敏感的事实,即,不具备保持它们的基因组DNA充分甲基化的能力,它们不能长时间存活或者增殖。相反,ES细胞抵抗DNA去甲基化,并可以在内源性DNA甲基转移酶不存在下存活。在一些实施方案中,体细胞群经受了下述条件,在所述条件下,至少70%、至少80%、或者至少90%未重编程的该细胞类型体细胞将预期在经受所述条件之后30天内停止增殖或者死亡。在一些实施方案中,至少90%未重编程的该类型体细胞将预期在经受所述条件之后20天内停止增殖或死亡。在一些实施方案中,体细胞群经受了下述条件,在所述条件下,至少95%未重编程的该细胞类型体细胞将预期在经受所述条件之后15天内停止增殖或死亡。在另一种实施方案中,体细胞群经受了下述条件,在所述条件下,至少99%未重编程的该细胞类型体细胞将预期在经受所述条件之后10天内停止增殖或死亡。在一些实施方案中,所述细胞是人类细胞。在一些实施方案中,体细胞是增殖性细胞。在一些实施方案中,体细胞是成纤维细胞。在某些实施方案中,体细胞表达外源导入的重编程因子。在某些实施方案中,细胞已经与重编程剂接触。在一些实施方案中,细胞经受了DNA被去甲基化的条件。在某些实施方案中,体细胞可逆地表达靶定内源性DNA甲基转移酶的RNAi剂。在某些实施方案中,所述方法在选择细胞之后,还包括抑制(即,减少或消除)所选体细胞中RNAi剂的表达,从而允许所选体细胞的基因组DNA变为甲基化。因此,在所述细胞被维持培养时和/或其后代被诱导分化时,可以发生DNA甲基化。

[0156] 本发明还提供已经至少部分重编程为全能状态的体细胞的鉴别方法,所述方法包

括提供对DNA去甲基化敏感的体细胞;将所述细胞与一种或多种能够重编程体细胞的因子接触;处理所述细胞从而减少基因组DNA的甲基化;将所述细胞维持培养一段时间;和鉴定在所述时间段之后存活的细胞,从而鉴定已经至少部分重编程为全能状态的可能性增加的细胞。在一些实施方案中,使用所述方法鉴定的至少一些细胞已经重编程为ES-样状态。在一些实施方案中,至少一些细胞已经至少部分重编程为ES-样状态,使得它们在经受一种或多种附加处理时,与不抵抗DNA去甲基化的细胞相比,对重编程为全能状态更为易感。在本发明的某些实施方案中,所述细胞然后经受这样的附加处理。本领域技术人员将能够测试体细胞群,以确定使得群中所希望的细胞部分在经受去甲基化条件时不会存活的条件和时间段。

[0157] 例如,人们可以在诱导靶定Dnmt1基因的RNAi剂表达之后培养所述细胞,并计算不同时间点的活细胞数量,以确定至少80%、至少90%、至少95%或至少99%的细胞由于DNA甲基化降低被杀死所需要的时间长度(“X”小时或天)。实施本发明方法时,已经用能够重编程细胞的药剂处理过并在X小时或天之后能存活的细胞是潜在被重编程的。要理解,可能不是所有的活细胞都是重编程的。例如,在足以杀死未重编程的细胞的水平下,一些细胞可能不表达所述RNAi剂。所述细胞可以经受一种或多种附加的选择或测试,以确定它们是否被重编程或者从可能重编程的细胞中选择重编程的那些细胞。例如,时间X之后存活的细胞可以经历筛选或者选择具有两条转录活性的X染色体的细胞(在起源于雌性生物的细胞的情况下),和/或可以筛选或者选择表达ES细胞的一种或多种标记特征的细胞等等。

[0158] 本发明还提供已经重编程为全能状态的分化体细胞的鉴定方法,所述方法包括提供细胞群,其至少一些已经重编程为全能状态,其中所述细胞包含选择性标记的编码多核苷酸,其与调节内源全能性基因表达的表达控制元件可操作地连接,致使所述选择性标记的表达基本上匹配内源全能性基因的表达,并鉴别表达所述选择性标记的细胞,从而鉴定已经被重编程为全能状态的可能性增加的体细胞(相对于不表达选择性标记的细胞)。在一些实施方案中,内源全能性基因是Oct-4或者Nanog。在一些实施方案中,方法还包括选择具有ES细胞或者ES细胞克隆的形态学特征的细胞或克隆。本技术领域已知的形态学标准可用于选择这样的细胞或克隆。

[0159] 在本发明的另一实施方案中,通过选择含有两条转录活性X染色体来鉴定重编程的体细胞。在一种实施方案中,本发明提供了被重编程为ES-样状态的可能性增加的体细胞的鉴定方法,所述方法包括提供含有两条X染色体的体细胞,其中一条是失活的;对所述细胞进行重编程体细胞的一种或多种处理;并鉴别其中失活的X染色体已经变为活性的细胞,从而鉴定被重编程、例如重编程为ES-样状态的可能性增加的细胞。在一些实施方案中,使用所述方法鉴定的至少一些细胞已经被重编程为ES-样状态。在一些实施方案中,至少一些细胞已经被至少部分重编程为ES-样状态,使得它们在受到一种或多种附加处理时,比不具有两条转录活性X染色体的细胞,对重编程为全能状态更敏感。在本发明的某些实施方案中,所述细胞然后进行这样的附加处理。

[0160] 在某些实施方案中,体细胞含有两条X染色体,其中一条是失活的,其中一条X染色体含有选择性标记基因的功能性等位基因,而另一条X染色体不包含所述选择性标记基因的功能性等位基因。在某些实施方案中,选择性标记基因是X染色体上正常存在的内源性基因。在某些实施方案中,体细胞含有两条X染色体,其中一条是失活的,其中两条X染色体都

含有选择性标记基因的功能性等位基因。

[0161] 在某些实施方案中,体细胞含有两条X染色体,其中一条是失活的,其中两条X染色体都含有对正和负选择均有用的选择性标记基因的功能性等位基因,所述方法包括:(a)选择不表达选择性标记基因的细胞,从而获得其中第一条X染色体是转录失活的细胞群;(b)对所述细胞进行重编程细胞的一种或多种处理;(c)使所述第一条X染色体上的选择性标记基因功能失活;和(d)选择表达选择性标记基因的细胞,从而选出其中第二条X染色体是转录活性的细胞。在某些实施方案中,选择性标记基因是X染色体上正常存在的内源性基因,例如Hprt基因。

[0162] 本发明还提供了被重编程为ES-样状态的可能性增加的体细胞的鉴定方法,所述方法包括下述步骤:(a)提供体细胞,所述体细胞具有缺乏选择性标记的功能性等位基因的活性X染色体和含有所述选择性标记的功能性等位基因的失活X染色体;(b)对所述细胞进行能够重编程体细胞的一种或多种处理;和(c)选择表达选择性标记基因的细胞,从而选出其中失活的X染色体已经变为转录活性的细胞。相对于其中失活的X染色体没有变成转录活性的细胞,这样的细胞被重编程为ES-样状态的可能性增加。

[0163] 本发明还提供了被重编程为ES-样状态的可能性增加的体细胞的鉴定方法,所述方法包括下述步骤:(a)提供体细胞,所述体细胞含有两条X染色体,其中一条是失活的,其中一条X染色体含有选择性标记基因的功能性等位基因,而另一条X染色体不包含所述选择性标记基因的功能性等位基因;(b)选择不表达选择性标记基因的细胞,从而选择其中失活的X染色体含有选择性标记基因的功能性等位基因的细胞;(c)对所述细胞进行能够重编程体细胞的一种或多种处理;和(d)选择表达选择性标记基因的细胞,从而选出其中失活的X染色体已经变为转录活性的细胞。相对于其中失活的X染色体没有变为转录活性的细胞,这样的细胞被重编程为ES-样状态的可能性增加。

[0164] 第一条X染色体缺乏选择性标记的功能性等位基因的体细胞可以用各种各样的方式制备。例如,同源重组可用于缺失全部或部分所述等位基因。等位基因被成功失活的细胞可以使用常规方法选择。或者,细胞可以不被遗传工程化,而是可以代之以带有失活所述基因的突变。细胞可以已经暴露于诱变剂或条件例如紫外辐射下,以增加具有这样的突变的细胞比例或所述突变可以在选择压力下自发产生。在一种实施方案中,选择性标记是对于正和负选择有用的选择性标记,例如Hprt。在这样的实施方案中,其中一条X染色体缺乏所述基因的功能性等位基因的细胞在针对表达所述标记的细胞进行选择的条件加以选择。例如,在Hprt的情况下,细胞可以通过将它们培养在含有硫鸟嘌呤的培养基中来选择。在对所述细胞进行能够使体细胞重编程的处理之后,通过例如培养在HAT培养基中,来选择表达所述标记的细胞。这样的细胞将已经使失活的X染色体再活化,因此被重编程的可能性增加。使用所述方法鉴定的至少一些细胞是重编程的体细胞。

[0165] 本发明的某些方法包括选择细胞的步骤,所述细胞表达通过多能或全能细胞表达的标记。所述标记可以在这样的细胞中特异性表达。人们可以在其附着有可检测出的标记物的抗体的存在下,培养有可能重编程的细胞,并使用流式细胞术(例如,荧光激活的细胞分选),将表达所述标记(分离指示重编程的状态)的细胞与不表达的细胞分离开。在其它实施方案中,基于亲合性的分离方法用来将重编程的细胞与没有重编程的细胞分开。在一种实施方案中,重编程的体细胞通过用具有粘合剂的固体或半固体支持体接触所述细胞来选

择,所述粘合剂特异性结合ES细胞附着的表面标记。所述支持体具有可以结合粘合剂的表面。所述表面可以包括例如塑料(聚丙烯,聚氯乙烯,聚偏氯乙烯,聚四氟乙烯,聚乙烯,聚酰胺)、玻璃、金属(例如,硅)、琼脂糖等等。有用支持体包括琼脂糖或基于琼脂糖的基质(例如,琼脂糖或sepharose珠)、至少部分由磁性材料构成的颗粒、包含聚合物例如苯乙烯或乳胶的颗粒、组织培养容器或板、管(例如,微量离心管)、膜等等。在一些实施方案中,支持体是大量的颗粒例如磁珠。这样的颗粒最长轴尺寸经常在100微米以下,例如1和10微米之间,并往往近似球状。磁珠和它们对于细胞分离的使用方法是本技术领域已知的,并可从许多来源买到。例如,Dynabeads(Dynal Biotech,挪威)是超顺磁性的聚合物珠子,其具有磁性材料遍及聚合物薄壳的分散体。粘合剂可以使用常规方法,共价或非共价附着于所述表面。粘合剂可以是天然存在的或人工的肽或多肽、小分子、核酸(例如,适配体),其特异性结合ES细胞表面标记。在一种实施方案中,粘合剂是抗体或抗体片段。在另一种实施方案中,粘合剂是受体的配体。在一些实施方案中,细胞在附着有粘合剂的磁珠的存在下,培养于液体培养基中。磁力用来从培养基中收回珠子。例如,所述珠子可以被吸引到器皿和除去的培养基的侧面。使用标准方法例如与粘合剂竞争,或通过用与珠子表面上存在的分子结合、但不与细胞结合的亲和性试剂,从珠子回收细胞,或者将所述珠子从细胞中除去。

[0166] 替代或者附加地,人们可以选择不表达体细胞标记特征的细胞,所述标记特征衍生出有可能重编程的细胞并且其在使用常规方法产生的ES细胞中不表达。例如,人们可以在第一种粘合剂(例如抗体)的存在下培育细胞,所述粘合剂与体细胞的标记特征结合并且在全能细胞上未发现。如果所述粘合剂是标记过的,流式细胞术可用于分离没有附着抗体的细胞。在另一种实施方案中,与第一种粘合剂结合的第二种粘合剂用来除去结合有第一种粘合剂的细胞。在另一种实施方案中,第一种粘合剂是交联的,并且沉淀以除去表达体细胞标记特征的细胞。分离细胞的其它方法可以利用全能细胞和体细胞之间可能存在的细胞平均大小或者密度的差异。例如,细胞可以滤过具有小孔的材料,所述小孔只允许某些细胞通过。

[0167] 本发明的方法可以用任何次序组合。在一些实施方案中,选择表达第一种ES细胞标记的细胞,然后评价所述细胞的其他全能性特征,例如第二种ES细胞标记的表达、对DNA甲基化的抗性、具有两条转录活性的X染色体等等。在一些实施方案中,选择抵抗DNA甲基化和/或具有两条转录活性的X染色体的细胞,从而提供富集重编程的细胞的细胞群。然后细胞进行包括选择表达第一种ES细胞标记的细胞的其他富集步骤。然后任选测试细胞以确定它们是否表达第二种ES细胞标记。许多标记可以用来富集ES-样细胞和/或所评价它们的表达。

[0168] 因此,本发明使得本领域技术人员可以制备全能的重编程体细胞的纯化制品。体细胞可以被重编程,以获得整套的全能性特征并因而是全能的。或者,体细胞可以被重编程,以只获得所述全能性特征的亚组。在另一种替代方案中,体细胞可以被重编程,成为多能的。

[0169] 本说明书提供了许多方法来鉴别和/或选择重编程的细胞,其中所述细胞具有对于这样的目的有用的遗传修饰和/或其中采用了基于这样的遗传修饰的化学或者遗传选择。但是,如本文所述,不使用这样的化学或者遗传选择就可以被鉴定已经重编程为ES-样状态的体细胞。因此,本发明还提供了从没有遗传修饰的体细胞衍生出重编程的体细胞的

方法, 还提供使用本发明方法衍生的重编程的体细胞。在一些实施方案中, 没有遗传修饰的体细胞可以从各种各样的物种获得。例如, 适当的细胞可以从小鼠、大鼠、兔子、家畜(例如羊, 山羊, 马, 牛等等)、伴侣动物(例如狗、猫等等)、灵长类动物和人类获得并用于衍生ES-样全能或者多能细胞。在一些实施方案中, 方法使用形态学标准, 从细胞群鉴别含有重编程的体细胞的克隆。在某些实施方案中, 所述克隆被亚克隆和/或传代一次或多次, 从而获得富集ES-样细胞的细胞群。所富集的群可包含至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或更多、例如100%的ES-样细胞。本发明提供了已经稳定地和可遗传地重编程为ES-样状态的体细胞的细胞系。

[0170] “遗传选择”包括其中遗传物质(例如DNA)被导入细胞中的方法, 其中所导入的遗传物质使得想要的细胞(例如, 具有一种或多种想要的特征)可以与其它细胞区别开。例如, 内源全能性基因与可检测出的标记例如荧光蛋白的编码DNA连接, 将允许遗传选择。“化学选择”包括的方法涉及将细胞暴露于对不想要的细胞施加负选择压力、例如杀死它们或降低它们的增殖速度和/或只允许想要的细胞存活和/或增殖的化学剂。例如, 内源全能性基因与编码耐药性标记例如neo的编码DNA连接, 将通过在杀死没有表达所述耐药性标记的细胞的化学剂(例如G418)的存在下, 允许进行化学选择。这样的选择也将被认为是遗传选择, 因为它利用导入的遗传物质。在一些实施方案中, 采用化学选择方法, 但是所述方法不取决于没有在所述细胞中天然发现的遗传物质的存在。例如, 化学选择可以针对天然存在的细胞产物, 例如细胞表面标记。在一些实施方案中, 化学选择方法没有使用抗生素。

[0171] 本发明提供了不需要对准备重编程的细胞进行遗传修饰, 而从体细胞衍生重编程的体细胞的方法。在一些实施方案中, 重编程的体细胞不包含通过手工被导入细胞(或所述细胞的祖细胞)的基因组中的外源遗传物质。在一些实施方案中, 重编程的体细胞不包含通过手工被短暂导入细胞或稳定导入细胞(或所述细胞的祖先)的基因组中的遗传物质。在一些实施方案中, 细胞用编码有助于重编程的蛋白的构建物瞬时转染, 其中所述构建物编码耐药性标记或其它选择性标记。选择压力维持足够的一段时间, 用于使细胞变为重编程的。随后, 在细胞变成至少部分重编程的和/或激活内源全能性基因例如Oct4的足够时间段之后, 第二种选择被用于选择失掉所述构建物的细胞。在一些实施方案中, 重编程的体细胞在它们的基因组中确实包含外源导入的遗传物质, 但是导入这样的遗传物质是为了(i)诱导重编程过程和/或(ii)校正这样的细胞中的遗传缺陷或使这样的细胞能够合成用于治疗目的的想要的蛋白, 不论是哪种情况, 都不是用来选择重编程的细胞。要理解, 为了诱发重编程施行遗传修饰与其目的是允许选择重编程的细胞而本身无助于重编程的遗传修饰不同。

[0172] 在一些实施方案中, 方法采用了形态学标准, 从没有重编程的体细胞群中鉴别重编程的体细胞。在一些实施方案中, 方法采用了形态学标准, 从没有重编程或只部分重编程为ES-样状态的细胞群中鉴别已经重编程为ES-样状态的体细胞。“形态学标准”广义上用于指细胞或克隆的大小、形状、结构、组织和/或外观的任何可直观检测的方面。基于形态学的鉴定与基于所述细胞可直观检测的特定选择性标记(例如荧光蛋白)的表达的鉴定不同。形态学标准包括例如克隆的形状、克隆边界的清晰度(清晰的边界是ES-样细胞克隆的特征)、克隆中细胞的密度(密度增加是ES-样细胞克隆的特征)、和/或重编程的细胞相对于未重编程的细胞尺寸小和形状不同等等。本发明包括鉴定和任选分离克隆(或克隆中的细胞), 其中所述克隆表现这些图中描绘的一种或多种这样的特征。

[0173] 重编程的体细胞可以鉴定为在第一个组织培养皿中生长的克隆,将所述克隆或其部分转移到第二个组织培养皿,从而分离重编程的体细胞。“组织培养皿”,用在这里是指任何器皿、板、贮器、容器等等,其中活细胞能够体外维持。组织培养皿的底部可以至少部分包被有基质,例如蛋白或其混合物,例如明胶、Matrigel、纤连蛋白或其它细胞粘着分子、胶原、基于蛋白或不基于蛋白的水凝胶等等,其上放置细胞。在一些实施方案中,所述皿含有喂养细胞(任选辐照过的),其可以至少部分包被皿的底部。

[0174] 在一些实施方案中,方法采用了补体介导的裂解,从含有至少一些重编程的体细胞的细胞群中消除至少一些未重编程的体细胞。在一种实施方案中,体细胞群与结合细胞表面标记的补体固定抗体(例如IgG或IgM抗体)接触,所述细胞表面标记不能由全能细胞例如ES细胞可检测地表达(或这样的细胞的表达低得多,例如无意义的水平),但由未编程的体细胞(例如未编程的成纤维细胞)表达。在本发明的各种实施方案中,所述的较低水平可以是例如小于20%、小于10%、小于5%或者小于1%的在未编程的细胞中发现的平均表达水平,或者这样的水平将不足以支持大多数细胞的补体介导的裂解。细胞进一步与足以介导结合了抗体的细胞进行裂解的补体成分(“补体”)接触。在一种实施方案中,细胞与血清接触,例如含有补体的小鼠或人类血清。在一种实施方案中,细胞与重组补体成分接触(例如,足以介导经典途径例如C1、C2、C3、C4、C5、和C6-C9的补体成分)。在补体和抗体存在下存活的细胞被鉴定为被重编程的可能性增加。所述方法对富集或选择重编程的细胞有用。在一种实施方案中,细胞表面标记是I类MHC抗原(“MHC”)。例如,如实施例9所示,已经重编程为ES-样状态的小鼠细胞(iPS细胞)关闭了MHC。在用引起重编程的因子转导之后随机挑取并针对Oct4活化选择的细胞是MHC阴性的。此外,在用所述因子转导的细胞群体中的MHC阴性细胞更可能是重编程的。针对MHC阴性选择受感染细胞:克隆比高MHC群多很多。补体介导的消除(杀死未重编程的细胞)导致SSEA1阳性细胞的富集。补体介导的选择导致展现出指示重编程的形态特征的克隆数量高得多。

[0175] 在本发明的一些实施方案中,采用均不使用遗传化学选择的两种或多种方法。例如,本发明提供了衍生重编程的细胞的方法,包括以下步骤:(i)提供未遗传修饰的细胞群,其中至少一些被部分或完全重编程为ES-样状态;(ii)使用补体介导的裂解消除至少一些未编程的细胞,富集部分或完全重编程的细胞;和(iii)使用形态学标准鉴别重编程细胞或包含这样的细胞的克隆。

[0176] 涉及产生、选择或分离重编程的体细胞的本发明任何方法,可以包括从需要细胞治疗的供体获得体细胞或获得体细胞群的步骤。从所述获得的细胞或者从获得的细胞传代下来的细胞中,产生、选择或鉴别重编程的体细胞。在产生、选择或鉴别与供体遗传上匹配的重编程体细胞之前,任选在培养中扩增所述细胞。

[0177] 筛选重编程体细胞的药剂的方法

[0178] 本发明还提供了鉴定将体细胞重编程为分化程度较低状态的药剂的方法,以及这样鉴定的药剂。在一种实施方案中,所述方法包括将工程化或选择的本发明体细胞与候选剂接触,选择表达适当的选择性标记的细胞。存在表达适当选择性标记的细胞表明所述药剂重编程体细胞。对于本申请来说,这样的药剂称为“重编程剂”或“细胞重编程剂”。在本发明的一些实施方案中,重编程剂不是Sox2、Oct4、c-myc、Klf4或Nanog。

[0179] 在另一种实施方案中,所述方法包括将本发明的工程化的体细胞与候选剂接触,

选择表达适当选择性标记的细胞,和评价如此选择的细胞的全能性特征。存在整套全能性特征表明所述药剂将体细胞重编程变成全能性的。

[0180] 在另一种实施方案中,本发明提供了鉴定将体细胞重编程成为分化程度较低状态的药剂的方法,所述方法包括以下步骤:(a)将体细胞与候选重编程剂接触,其中所述体细胞对DNA甲基化降低敏感;和(b)确定与如果药剂不重编程体细胞所预期的相比,是否更多细胞抵抗DNA甲基化降低,其中与如果候选重编程剂不重编程体细胞所预期的相比,如果更多细胞对DNA甲基化降低有抗性,则所述候选重编程剂被鉴定为重编程剂。在某些实施方案中,所述方法包括将细胞在降低DNA甲基化的条件下维持培养,并确定与如果所述药剂不重编程体细胞所预期的相比,是否有更多的细胞存活。在本发明的某些实施方案中,细胞是增殖性细胞,即它们不是有丝分裂后的。

[0181] 在另一种实施方案中,本发明提供了鉴定将体细胞重编程成为分化程度较低状态的药剂的方法,所述方法包括以下步骤:(a)将体细胞与候选重编程剂接触,其中所述体细胞对DNA甲基化降低敏感;和(b)确定对DNA甲基化降低有抗性的细胞数量,其中与对照相比,抵抗DNA甲基化降低的细胞数量增加指示所述候选剂是重编程剂。对照可以是没有用候选剂处理的平行样品,或其已经用具有已知效应(例如,正效应、负效应或无效)的候选物处理过。或者,所述对照可以对特定的分析具有预先确定的值。

[0182] 细胞可以被处理,从而降低基因组DNA的甲基化,例如通过抑制DNA甲基转移酶的表达、和/或通过将细胞与抑制DNA甲基转移酶活性或以其它方式抑制导致DNA甲基化的途径中的任何步骤的药剂接触。适当的方法和药剂如上所述。在一种实施方案中,通过可逆地诱导细胞中干扰RNA的表达,降低DNA甲基化,其中所述干扰RNA抑制DNA甲基转移酶例如DNMT1的表达。在一些实施方案中,细胞中Dnmt(例如Dnmt1)mRNA的表达平均降低了至少50%、至少90%或更多。在一些实施方案中,细胞中DNMT蛋白例如DNMT1蛋白的表达平均降低了至少50%、至少90%或更多。实施所述方法有用的工程化的体细胞在上面描述过。

[0183] 细胞在接触候选重编程剂之后但在令所述细胞经受发生DNA去甲基化的条件之前,可以维持培养一段时间。例如,细胞在经受DNA去甲基化条件之前,可以将所述细胞在候选重编程剂的存在下维持1和12小时之间、12和24小时之间、24和48小时之间、48和72小时之间等等。或者,细胞可在施加DNA去甲基化条件之后,已经施加DNA去甲基化条件之后例如最多1、2、5或10天与药剂接触。在细胞受到发生DNA去甲基化的条件时,候选重编程剂可以存在,但是没必要存在。细胞可以在DNA甲基化降低的条件下维持培养,例如,在其中降低一种或多种内源性DNMT蛋白表达的条件下。如果与没有重编程的细胞所预期的相比,如果细胞在这样的条件下能够存活和/或增殖的数量更大,则所述药剂被鉴定为体细胞重编程剂。在降低DNA甲基化的条件下,细胞可以维持培养例如至少5天、最多10天、最多15天、最多30天等等。在一些实施方案中,如果与尚未接触药剂的细胞相比,如果在细胞已经接触候选剂的所述时间段之后,如果有至少2、5或10倍多的活细胞,则所述药剂被鉴定为细胞重编程剂。

[0184] 使用本技术领域已知的评价细胞成活力的任何方法,可以评价存在的活细胞。例如,细胞排斥染料的能力、细胞执行酶促反应的能力、MTT分析、测量标记底物的掺入、或在显微镜下目视观察是可用于确定是否有活细胞并对它们定量的方法的实例。在一些实施方案中,活细胞产生荧光或发光信号。在一些实施方案中,所述分析包括确定细胞是否经历凋

亡。例如,可以评价诱发或参与凋亡的基因例如胱天蛋白酶的表达,或使用检查DNA片段化的分析。

[0185] 在一些实施方案中,方法还包括确定细胞是否具有完整的p53途径,致使细胞可以处于p53依赖性凋亡和/或细胞周期停滞之下。在一些实施方案中,选择抵抗DNA去甲基化但是仍能经受p53依赖性凋亡的细胞。因此,在某些实施方案中,候选剂不是抑制p53或细胞经受p53依赖性凋亡所需要的基因的药剂。

[0186] 本发明还提供了将体细胞重编程成为分化程度较低状态的药剂的鉴定方法,所述方法包括以下步骤:(a)提供含有两条X染色体的体细胞,其中一条是失活的;(b)将所述体细胞与候选重编程剂接触;(c)将细胞维持培养;(d)在培养时,与如果候选剂不重编程体细胞所预期的相比,确定是否更多的细胞使它们的失活X染色体再活化,其中与如果候选剂不重编程体细胞所预期的相比,如果更多的细胞使它们的失活X染色体再活化,则所述候选剂被鉴定为重编程剂。在一种实施方案中,方法包括以下步骤:(a)提供含有两条X染色体的体细胞,其中一条是失活的,其中一条X染色体含有选择性标记基因的功能性等位基因,而另一条X染色体不包含所述选择性标记基因的功能性等位基因;(b)选择不表达选择性标记基因的细胞,从而选择其中含有选择性标记基因的X染色体被失活的细胞;(c)将(b)步骤中选择的体细胞与候选重编程剂接触;(d)与如果含有选择性标记基因的功能性等位基因的X染色体保持失活所预期的相比,确定是否更多细胞表达选择性标记,从而与如果候选重编程剂不重编程体细胞所预期的相比,确定是否更多细胞使它们的失活X染色体再活化,和(e)与如果候选重编程剂不重编程体细胞所预期的相比,如果更多细胞使它们失活的X染色体再活化,则将所述候选剂鉴定为重编程剂。在一种实施方案中,在前提到的方法包括以下步骤:在细胞与候选重编程剂接触之后,选择表达功能形式选择性标记的细胞,从而选择令它们失活的X染色体再活化的细胞。在本发明的某些实施方案中,选择性标记适于正选择和负选择。在某些实施方案中,方法包括在表达功能形式选择性标记的细胞基本上不存活的条件维持细胞;并在用候选重编程剂处理细胞之后,将细胞维持在不表达功能形式选择性标记的细胞基本上不存活的条件。在某些实施方案中,基因是X染色体上存在的内源性基因,例如所述基因编码次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)。在某些实施方案中,缺乏所述基因的功能性等位基因的X染色体含有失活所述基因的工程化遗传修饰。在某些实施方案中,方法包括以下步骤:

[0187] (a)提供含有两条X染色体的体细胞,其中一条是失活的,其中一条X染色体含有能够逆着其表达进行选择的第一选择性标记的功能性等位基因以及能够针对其表达进行选择的第二个选择性标记基因的功能形式,并且其中另一条X染色体缺乏所述每个基因的功能性等位基因;(b)选择不表达第一种选择性标记的功能形式的细胞,从而选择其中含有功能性等位基因的X染色体被失活的细胞;(c)将所述体细胞与候选重编程剂接触;(d)选择表达第二种选择性标记的功能形式的细胞,从而选择令它们失活的X染色体再活化的细胞;(e)与如果候选重编程剂不重编程体细胞所预期的相比,确定是否更多的细胞使它们的失活X染色体再活化;(f)与如果候选重编程剂不重编程体细胞所预期的相比,如果更多细胞使它们失活的X染色体再活化,则将所述候选剂鉴定为重编程剂。

[0188] 用于本发明的候选剂虽然通常是有机分子,包括小的有机化合物(例如,分子量等于或小于1500道尔顿并具有多个碳-碳键),但它们包涵许多化学类别。在包括肽、糖类、脂

肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、核酸和其衍生物、结构类似物或组合的生物分子之中,也发现了候选剂。

[0189] 候选剂可以是天然生成的、重组的或实验室设计的。候选剂可以从微生物、动物或植物分离,或可以重组产生,或通过本技术领域已知的化学方法合成。在一些实施方案中,使用本发明的方法,从合成或天然化合物的文库分离候选剂。例如,许多手段可用于随机和直接合成各式各样的有机化合物和生物分子,包括随机化寡核苷酸和寡肽的表达。或者,可利用或容易产生细菌、真菌、植物和动物提出物形式的天然化合物的文库。另外,天然或合成产生的文库和化合物容易通过传统的化学、物理和生化手段进行修饰,并可以用于产生组合文库。已知药理学剂可以进行直接或随机化学修饰,包括酰化、烷化、酯化、酰胺化,以产生结构类似物。

[0190] 有许多可买到的化合物文库,包括,例如Chembridge DIVERSet。文库也可以从学院的研究人员获得,例如NCI发展性治疗项目(NCI developmental therapeutics program)的各个组。

[0191] 上述的筛选法是基于在细胞上施行的分析。这些基于细胞的分析可以用高通量筛选(HTS)形式施行,其已经记载于现有技术中。例如,Stockwell等描述了在基于哺乳动物细胞的小型化分析中小分子的高通量筛选,涉及翻译后修饰(Stockwell等,1999)。同样,Qian等描述了高通量筛选抗癌药剂的基于白血病细胞的分析(Qian等,2001)。这两篇以其全文参考文献合并在此。

[0192] 重编程剂可以属于许多不同类别的任一种。例如,重编程剂可以是染色质改造剂。染色质改造剂可以是涉及染色质改造的蛋白或已知将染色质向着更开放的结构改变的药剂,例如DNA甲基化抑制剂或组蛋白脱乙酰化抑制剂。示例性的化合物包括5-氮杂-胞苷、TSA和丙戊酸。另一个实例,这样的药剂可以是全能性蛋白,包括例如Nanog、Oct-4和Stella。这样的药剂也可以是在至少一些环境中全能性所必需的基因,包括例如Sox2、FoxD3、和LIF以及Stat3。See Smith等,1988,William等,1988,Ihle,1996,Avilion等,2003,和Hanna等,2002)。要理解,候选重编程剂通常在标准培养基中不存在,或如果存在的话,存在量较低。

[0193] 应该理解,有用的重编程剂或其它形式的重编程处理不需要能够重编程所有类型的体细胞,并且不需要能够重编程给定细胞类型的全部体细胞。相对于未经处理的群,如果处理产生了重编程细胞富集的群(即,重编程细胞的比例比起始群更高),它在本发明中是有用的。举例,并且不作为限制,对.000001%和100%之间的处理细胞重编程的重编程处理是有用的。此外,纵然相当部分的细胞没有重编程,但提供了富集重编程的细胞的体细胞群是有用的。相对于没有经受所述方法的本来等同的细胞群,这样的群中细胞是重编程的细胞的可能性增加。不作为限制,作为例子,致使细胞群中至少5%是重编程细胞的筛选或选择是有用的。不作为限制,所产生的群以2、5、10、50、100或更多倍富集重编程的细胞的方法是有用的(即,群中重编程细胞部分比起始群中存在的多2、5、10、50或100倍以上)。可以采用多个选择和/或筛选程序,提供越来越富集重编程的细胞的细胞群。

[0194] 在本发明的一种实施方案中,用于筛选候选重编程剂的诱导的全能细胞通过下述方法制备,所述方法包括:提供一种或多种体细胞,每种包含至少一种有助于所述细胞重编程为全能状态的外源导入因子,其中每种所述外源导入因子使用诱导型载体导入,所述诱

导型载体不受甲基化诱导的沉默的影响并且其表达受到由不同诱导物诱导的调控元件的控制(即,每种外源导入因子是可单独诱导的);(b)将所述一种或多种细胞在适合所述细胞增殖、并适合所述至少一种外源导入因子的活性的条件下,维持足以重编程所述细胞或激活至少一种内源全能性基因的一段时间;(c)功能失活所述至少一种外源导入因子;(d)选择一种或多种显示全能性标记的细胞;(e)利用所述一种或多种显示全能性标记的细胞产生嵌合胚胎;(f)从所述嵌合胚胎获得一种或多种体细胞,例如分化的体细胞;(g)将所述一种或多种体细胞在适合所述细胞增殖、并适合所述至少一种外源导入因子的活性的条件下,维持足以激活至少一种内源全能性基因的一段时间;和(h)区分显示一种或多种全能性标记的细胞和不显示的细胞。在优选的实施方案中,外源导入因子组合起来足以重编程,但是如果表达不及所述组合,则不够充分。外源导入因子的子组合可以诱导性表达,候选重编程剂例如药剂的文库可以针对它们替代缺失因子的能力进行筛选。

[0195] 在本发明的一些实施方案中,重编程剂选自编码Oct-4、Sox-2、c-Myc和Klf4的基因和/或蛋白自身。在一些实施方案中,至少2种、3种或所有的所述药剂被导入体细胞。本发明的一个方面包括鉴定替代性重编程剂的方法。例如,3种所述药剂可以导入细胞,从而使得这样的细胞对重编程易感。然后,细胞用于有创造性的筛选法,以鉴别将细胞重编程为ES-样状态的第四种药剂或药剂的组合。在一种实施方案中,方法用来鉴别代替c-myc的药剂。在一种实施方案中,方法用来鉴别代替Klf4的药剂。在一种实施方案中,方法用来鉴别代替Sox2的药剂。在一种实施方案中,方法用来鉴别代替Oct-4的药剂。在一些实施方案中,使用人类细胞实施所述方法并表达相关因子的人类类似物。在一些实施方案中,细胞是包含与选择性标记连接的内源全能性基因的本发明工程化细胞。

[0196] 基因鉴定方法

[0197] 本发明提供了在体细胞中激活内源全能性基因表达的基因的鉴定方法。所述方法包括:用从ES细胞或卵母细胞制备的cDNA文库转染本发明的体细胞,选择表达第一种选择性标记的细胞,和评价表达第一种选择性标记的转染细胞中第一种内源全能性基因的表达。第一种内源全能性基因的表达表明,cDNA编码激活体细胞中内源全能性基因表达的基因。

[0198] 该方法适用于鉴定激活体细胞中至少两个内源全能性基因的基因。用于该方法的体细胞进一步包含与第二种选择性标记连接的第二个内源全能性基因。方法加以修改以选择表达这两种选择性标记的转染细胞,其中评价第一和第二个内源全能性基因的表达。第一和第二个内源全能性基因均得到表达表明,所述cDNA编码激活体细胞中至少两个全能性基因的表达的基因。

[0199] 所述方法还适用于鉴定激活体细胞中至少三个内源全能性基因表达的基因。用于该方法的体细胞还包含与第三种选择性标记连接的第三个内源全能性基因。方法加以修改以选择表达所有三种选择性标记的转染细胞,其中评价所有三个内源全能性基因的表达。表达所有三个内源全能性基因表明,所述cDNA编码激活体细胞中至少三个全能性基因表达的基因。

[0200] 除非另有陈述,本发明的实施将使用小鼠遗传学、发育生物学、细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规方法,其在本领域技术人员的范畴之内。这样的技术记载于文献中。参见,例如,Current Protocols in Cell

Biology《细胞生物学现行方法》,Bonifacino,Dasso,Lippincott-Schwartz,Harford和Yamada编著,John Wiley and Sons,Inc.,New York,1999;Hogan等的Manipulating the Mouse Embryos,A Laboratory Manual,3rd Ed.《小鼠胚胎操作,实验手册》第三版,Cold Spring Contain Laboratory Press,Cold Spring Contain,New York,2003;Gene Targeting:A Practical Approach《基因寻靶:实用方法》,IRL Press at Oxford University Press,Oxford,1993;和Gene Targeting Protocols《基因寻靶方案》,Human Press,Totowa,New Jersey,2000。

[0201] 重编程的体细胞和它们的应用

[0202] 本发明因此提供了许多便于重编程体细胞的治疗应用的重大进步,包括下列:(i)将缺乏遗传修饰的体细胞重编程为ES-样状态和将这样的重编程细胞从没有重编程或只部分重编程为ES-样状态的细胞群中选择出来的能力;和(ii)认识到稳定重编程能够通过暂时性存在的重编程剂实现,而不需要稳定和不间断的表达或暴露于这样的药剂。第一个进步尤其允许不需要用于选择目的的遗传修饰,而从供体特异性体细胞有效衍生ES-样细胞。第二个进步尤其允许使用例如瞬时转染(例如编码有助于重编程的蛋白的核酸构建物的瞬时转染)、蛋白转导和在细胞中导入药剂的其它方法重编程,所述方法既不需要基因组修饰也不需要体细胞中导入稳定可遗传的遗传元件。总之,这些进步通过不利用遗传修饰而重编程体细胞,打开了获得供体特异性ES-样细胞的可能性。

[0203] 本发明还提供了通过本发明的方法产生的重编程的体细胞(RSCs),包括重编程的全能体细胞(RPSCs)。产生所需细胞类型的细胞有用的这些方法,具有广泛的应用。作为一个例子,这些方法在家畜管理中具有用,包括出于经济学或健康目的,对动物进行精确的遗传操作。另一个例子,这些方法在治疗或防止疾病中具有医学应用。

[0204] 因此,本发明提供在哺乳动物中治疗或预防疾病的方法。在一种实施方案中,方法始于从个体获得体细胞,通过本发明的方法重编程如此得到的体细胞,以获得RPSCs。然后在适合RPSCs发展成所需细胞类型的细胞的条件下培养所述RPSCs。收获所需细胞类型的发育细胞并导入所述个体以治疗疾病。在替代实施方案中,方法始于从个体获得体细胞,通过本发明的方法重编程如此得到的体细胞。然后在适合RPSCs发育成所需器官的条件下培养所述RPSCs,收获所述器官并导入个体以治疗疾病。所述疾病可以是其中细胞或器官功能异常和/或降低到正常水平之下的任何疾病。因此,本发明包括从需要细胞治疗的供体获得体细胞,所述细胞经受重编程剂例如细胞接触重编程剂,根据本发明的方法选择重编程的体细胞。需要细胞治疗的供体可以罹患任何疾病,其中所述疾病或疾病的一种或多种症状能够通过向供体施用细胞来缓解,和/或其中疾病的进展能够通过向供体施用细胞而减缓。

[0205] 在本发明的某些实施方案中,RPSCs是ES-样细胞,因此根据已知的分化ES细胞的方法可以被诱导分化,获得所需的细胞类型。例如,通过将RPSCs培养在分化培养基中并在针对细胞分化提供的条件下,这样的细胞可以被诱导分化成造血干细胞、肌细胞、心肌细胞、肝细胞、胰腺细胞、软骨细胞、上皮细胞、泌尿道细胞、神经系统细胞(例如神经细胞)等等。引起胚胎干细胞分化的培养基和方法是本技术领域已知的,适当的培养条件也是如此。

[0206] 例如,Palacios等,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,92:7530-37(1995)教导了通过令干细胞经受诱导程序而从胚胎细胞系产生造血干细胞,所述诱导程序包括最初在缺乏维甲酸的悬浮培养基中培养这样的细胞的集合体,然后在含有维甲酸的相同培养基中培养,接

着将细胞集合体转移到提供细胞粘附的基质中。

[0207] 此外,Pedersen,J.Reprod.Fertil.Dev.,6:543-52(1994)是参考了许多论文的综述,公开了胚胎干细胞的体外分化方法,以产生各种分化的细胞类型,尤其包括造血细胞、肌肉、心肌、神经细胞等。

[0208] 另外,Bain等,Dev.Biol.,168:342-357(1995)教导了体外分化胚胎干细胞以产生拥有神经元性质的神经细胞。这些参考是从胚胎或类干细胞获得分化细胞的示例性的报道方法。这些参考文献,特别是其中涉及胚胎干细胞分化方法的公开内容,以它们的全部内容合并在此作为参考。

[0209] 因此,使用已知的方法和培养基,本领域技术人员可以培养目标胚胎或类干细胞以获得想要的分化细胞类型,例如,神经细胞、肌细胞、造血细胞等等。另外,利用可诱导的Bcl-2或Bcl-x1可能对提高特定细胞谱系的体外发育有用。体内,Bcl-2阻止许多,但不是所有形式的发生在淋巴和神经发育期间的凋亡性细胞死亡。对Bcl-2如何可能用于在供体细胞转染之后抑制相关的细胞系凋亡的全面讨论,公开在美国专利No.5,646,008中,其在此合并作为参考。

[0210] 本RPSCs可以用来获得任何想要的分化细胞类型。这样的分化人类细胞的治疗用途是无可比拟的。例如,人类造血干细胞可以用于需要骨髓移植的医学处理。这样的措施用于治疗许多疾病,例如晚期癌症例如卵巢癌和白血病,以及危害免疫系统的疾病,例如AIDS。获得造血干细胞能够例如通过将癌症或AIDS患者的成年体细胞例如上皮细胞或淋巴细胞与去核卵母细胞例如牛卵母细胞融合,获得如上所述的胚胎或类干细胞,和在有利于分化的条件下培养这样的细胞,直到得到造血干细胞。这样的造血细胞可以用于治疗疾病包括癌症和AIDS。

[0211] 本发明的方法还可以用来治疗、预防或稳定神经系统疾病例如阿尔茨海默病、帕金森氏病、亨廷顿氏病、或ALS、溶酶体贮积病、多发性硬化症或脊髓损伤。例如,体细胞可以从需要治疗的个体得到,并重编程以获得全能性,和培养以得到可以用来代替或协助疾病或受损组织的正常功能的神经外胚层细胞。

[0212] 为了治疗或预防内分泌病,产生激素例如生长因子、甲状腺激素、甲状腺刺激激素、甲状旁腺激素、类固醇、5-羟色胺、肾上腺素或去甲肾上腺素的RPSCs,可以施用于哺乳动物。另外,可以施用重编程的上皮细胞以修复体腔或器官例如肺、内脏、外分泌腺或泌尿生殖道的膜的损伤。还预期RPSCs可以施用于哺乳动物以治疗器官中细胞的损伤或缺陷,所述器官例如膀胱、大脑、食道、输卵管、心脏、肠、胆囊、肾、肝、肺、卵巢、胰腺、前列腺、脊髓、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、气管、输尿管、尿道或子宫。

[0213] 本发明具有潜力来提供必需无限制供应的适于移植的等基因或同基因人类细胞。这样的供应将避免与当今移植方法有关的显著问题,即移植组织的排异反应,其可以因宿主对抗移植或移植物抗宿主排异反应而发生。传统上,通过施用抗排斥药物例如环孢菌素来防止或减少排异反应。但是,这样的药物具有明显的不良副作用,例如免疫抑制、致癌性质,并且非常昂贵。本发明可以消除,或至少大幅降低,对于抗排异反应药物的需要,例如环孢菌素、imulan、FK-506、糖皮质激素和雷帕霉素,和其衍生物。

[0214] RPSCs还可以与基质组合,体外或体内形成组织或器官,可以用来修复或代替受体哺乳动物的组织或器官。例如,RPSCs可以在基质存在下体外培养,以产生泌尿生殖系统的

组织或器官,例如膀胱、阴蒂、海绵体、肾、睾丸、输尿管、尿道瓣膜或尿道,然后可以将其移植到哺乳动物中(Atala,Curr.Opin.Urol.9(6):517-526,1999)。在另一种移植应用中,通过在适当的基质存在下培养重编程的细胞而体外形成人造的血管,然后将所述血管移植到哺乳动物中以治疗或预防心血管或循环疾病。为了产生供体软骨或骨组织,RPSCs例如软骨细胞或骨细胞在允许形成软骨或骨的条件于基质存在下进行体外培养,然后将含有供体组织的基质施用于哺乳动物。或者,细胞和基质的混合物可以施用于哺乳动物,用于体内形成想要的组织。优选,细胞附着于基质表面或被所述基质包裹。可以用于形成供体组织或器官的基质实例包括胶原基质、碳纤维、聚乙烯醇海绵、丙烯酸酰胺海绵、纤维蛋白-凝血酶凝胶、基于透明质酸的聚合物和含有聚酐的合成聚合物基质、聚原酸酯、聚乙醇酸或其组合(参见,例如美国专利Nos.4,846,835;4,642,120;5,786,217;和5,041,138)。

[0215] 根据本发明产生的RPSCs可以用来产生遗传上工程化或转基因的分化细胞。基本地,其完成是通过导入想要的基因,或去除根据本发明产生的RPSCs的所有或部分内源性基因,并允许这样的细胞分化成想要的细胞类型实现的。实现这样的改变的优选方法是通过同源重组,因为这样的技术可用于插入、缺失或修饰类干细胞基因组中特定定位点处的基因。

[0216] 这种方法可用于替换有缺陷的基因,例如有缺陷的免疫系统基因、囊性纤维化基因,或用于引入引起治疗有益的蛋白例如生长因子、淋巴因子、细胞因子、酶等的表达的基因。例如,编码大脑来源的生长因子的基因可能导入人类胚胎细胞或类干细胞,所述细胞分化成神经细胞并将细胞移植到帕金森病患者中,推迟该病期间神经细胞的损失。可以使用这些方法拯救的突变实例包括囊性纤维化基因中的突变;与Dunningan氏病有关的突变,例如核纤层蛋白A基因中的R482W、R482Q和R584H突变;与Emery Deyfuss肌营养不良的常染色体显性形式有关的突变,例如核纤层蛋白A基因中的R249Q、R453W和Q6终止突变。在Q6终止突变中,Gln6的密码子突变成终止密码子。

[0217] 以前,用BDNF转染的细胞类型从初级细胞到无限增殖细胞系不等,或是神经或是非神经(成肌细胞和成纤维细胞)衍生的细胞。例如,已经使用逆转录病毒载体,用BDNF基因转染了星形细胞,并将所述细胞移植到帕金森氏病的大鼠模型中(Yoshimoto等,Brain Research,691:25-36,(1995))。这种离体(ex vivo)治疗在移植后32天,减少了大鼠中帕金森样症状高达45%。此外,酪氨酸羟化酶基因也已经放置到星形细胞中,结果类似(Lundberg等,Develop.Neurol.,139:39-53(1996)和其中引用的参考文献)。

[0218] 但是,这样的离体系统有问题。特别是,目前使用的逆转录病毒载体在体内被下调,并且所述转基因只是短暂表达(Mulligan的综述,Science,260:926-932(1993))。还有,这样的研究使用初级细胞,星形细胞,其具有有限的寿命并且复制缓慢。这样的性质不利地影响了转染速度,并妨碍选择稳定转染的细胞。况且,繁殖大批量的基因定向初级细胞用于同源重组技术,几乎是不可能的。

[0219] 相比之下,与逆转录病毒系统有关的困难将会通过利用本发明的RPSCs得以消除,RPSCs是ES-样细胞。使用已知的方法将想要的基因/突变导入ES细胞中,RPSCs可以被遗传工程化,由此产生的工程细胞分化成想要的细胞类型,例如造血细胞、神经细胞、胰腺细胞、软骨细胞等等。可以导入RPSCs的基因包括,例如,表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、神经胶质来源的神经营养性生长因子、类胰岛素生长因子(I和II)、神经营养蛋白3、神经营养蛋白-4/5、睫状神经营养因子、AFT-1、细胞因子基因(白细胞介素,干扰素,克隆刺激

因子,肿瘤坏死因子(α 和 β)等等),编码治疗酶、胶原、人血清白蛋白等等的基因。

[0220] 另外,如有必要,也可能利用本技术领域现在已知的一个负选择系统,从患者消除治疗细胞。例如,用胸苷激酶(TK)基因转染的供体细胞将引起含有TK基因的胚胎(例如ES-样)细胞产生。这些细胞的分化将导致同样表达TK基因的目的治疗细胞的分离。这样的细胞可以在任何时候经施用更昔洛韦而从患者中有选择性地消除。这样的负选择系统记载于美国专利No.5,698,446,在此合并作为参考。在其它实施方案中,细胞被工程化以包含在诱导型启动子控制下表达的有毒产物的编码基因。施用诱导物导致产生所述有毒产物,致使细胞死亡。因此,本发明的任何体细胞可以包含自杀基因,任选包含在可以整合到基因组的表达盒中。自杀基因是其表达对细胞将是致死性的基因。实例包括编码白喉毒素、霍乱菌毒素、蓖麻毒素等基因。自杀基因可以处于特定诱导剂或刺激物不存在的正常环境下不直接表达的表达控制元件的控制之下。但是,表达能够在适当的条件下被诱导,例如,(i)对细胞或生物体施用适当的诱导剂,或者(ii)如果细胞中表达特定的基因(例如致癌基因,参与细胞分裂周期的基因,或指示去分化或分化丧失的基因),或者(iii)如果丧失了基因例如细胞周期控制基因或者指示分化的基因的表达。参见,例如,美国专利No.6,761,884。在一些实施方案中,基因只在位点特异性重组酶介导的重组事件之后表达。这样的事件可以使得编码序列与表达控制元件例如启动子可操作地连接。重组酶可以是不同的重组酶,其用于诱发靶定DNA甲基转移酶的RNAi剂的表达。在细胞(或者它们的祖先细胞)施用于对象之后,如果想要从对象身体中消除所述细胞(或者它们的后代细胞)的话,可以诱导自杀基因的表达。例如,如果重编程的体细胞引起肿瘤,则所述肿瘤能够通过诱导自杀基因的表达而被消除。在一些实施方案中,因为所述细胞经去分化或丧失恰当的细胞周期控制后被自动消除,抑制了肿瘤形成。

[0221] 可以治疗或防止的疾病、失调或病患的例子包括神经学的、内分泌、结构、骨骼、血管、泌尿、消化、外皮、血液、免疫、自身免疫、炎性、内分泌、肾、膀胱、心血管、癌症、循环、消化、造血和肌肉的疾病、失调和病患。另外,重编程的细胞可以用于重建应用,例如修复或替代组织或器官。

[0222] 至于本发明的治疗方法,没有打算将RPSCs施用于哺乳动物限于特定的给药方式、剂量或给药频率;本发明构想了所有的给药方式,包括肌内、静脉内、关节内、病灶内、皮下或足以提供足够预防或治疗疾病的剂量的任何其它途径。RPSCs可以单剂或多剂施用于哺乳动物。施用多剂时,所述剂可以彼此隔开例如一周、一月、一年或十年。在施用所述细胞之前、期间或之后,还可以施用一种或多种生长因子、激素、白细胞介素、细胞因子或其它细胞,以进一步使它们偏向特定的细胞类型。

[0223] 本发明的RPSCs可以用作体外分化模型,特别是用于参与调节早期发育的基因的研究。使用RPSCs的分化细胞组织和器官可以用于药物研究。

[0224] 此外,根据本发明产生的RPSCs可能导入动物例如SCID小鼠、母牛、猪的例如肾小囊下或肌内,用于在其中产生畸胎瘤。畸胎瘤可用于衍生不同的组织类型。此外,通过X-物种核移植产生的内细胞群可以与提供3-维组织形成的可生物降解的、生物相容的聚合物基质一起被导入。组织形成之后,聚合物降解,理想地只留下供体组织,例如心脏、胰腺、神经、肺、肝。一些情况中,包括促进血管生成的生长因子和蛋白也许是有利的。或者,用适当的培养基和条件、生长因子和可生物降解的聚合物基质,组织的形成能够完全体外完成。

[0225] 体细胞重编程方法和RPSCs在动物中的应用

[0226] 在这里公开的重编程方法可以用来产生各种各样的动物物种的RPSCs。产生的RPSCs能够对产生想要的动物有用处。动物包括,例如,禽类和哺乳动物以及任何濒危物种的动物。示例性的鸟类包括家禽(例如鹌鹑,鸡,鸭,鹅,火鸡和珍珠鸡)以及其它鸟类例如掠食鸟类(例如鹰,隼,鱼鹰,秃鹰等)、濒危鸟类(例如鸚鵡,加利福尼亚秃鹰等),鸵鸟等等。示例性的哺乳动物包括鼠科、山羊科、绵羊科、牛科、猪科、犬科、猫科和灵长类动物。其中,优选的成员包括驯养的动物,包括,例如黄牛、水牛、猪、马、牛、兔子、豚鼠、绵羊和山羊。

[0227] 通过本发明的重编程方法产生的RPSCs,允许人们第一次对没有能通过其它手段利用的ES细胞的动物进行遗传工程。RPSCs是ES-样细胞,因此能顺应遗传操作。迄今,尚没有可用于各种各样动物的ES细胞。因此,对于这些动物,目前几乎不可能产生具有定向突变的遗传修饰动物。ES-细胞样的RPSCs能够被操控,引入想要的定向遗传修饰。在小鼠中使用针对ES细胞描述的方法,然后由此产生的工程化RPSCs能用于产生在其种系中带有想要的遗传修饰的克隆动物。参见Capecchi和Thomas,美国专利5,487,992,5,627,059,5,631,153和6,204,061。动物中的遗传工程在各种各样的动物、尤其是家畜中,具有重大应用的潜力。

[0228] 本发明的体细胞重编程方法提供了至少两种方法,用于生产优化的家畜。第一种,体细胞重编程可用于捕捉家畜最好的现有表型。用于产生优化家畜的现有技术基于选择育种,和从优选的良种家畜增殖。基于优越的特征包括例如含肉量、产蛋量(家禽的情况下)、饲料转化率选择的动物,用来繁殖大量随后用于人类食品供应的动物。这种传统工序具有根深蒂固的天生效率低下。个体动物中观察到的表型在该动物的后代中往往只是部分遗传。因此,传统的育种计划在所有后代动物中捕捉真正的最佳表型效率低。相反,本发明的重编程方法通过从带有想要的特征的动物体细胞中产生RPSCs,提供受控和有效的方式来达到相同的目标。所产生的RPSCs可以立即用来生成起源于所述RPSCs的克隆动物。从ES细胞产生小鼠的已知方法能够用于这种程序。或者,产生的RPSCs可以响应生产者的需要低温保存和解冻。

[0229] 第二种方法中,来自带有想要的特征的动物的体细胞被重编程以产生RPSCs。在放置到受体胚胎产生想要的后代之之前,RPSCs被进一步遗传工程化,引入想要的遗传修饰。

[0230] 重编程方法还可以用来拯救濒危物种。体细胞重编程提供了有效的方法来从濒危动物的体细胞产生RPSCs。由此产生的RPSCs能够立即用于扩大濒危动物的数量。或者,RPSCs能够低温保存以产生濒危物种的RPSC原种,作为防备濒危物种灭绝的防护措施。

[0231] 本发明将参考下列非限制性实施例进行更具体的描述。在这里引用的所有专利、专利申请和参考文献以其全文合并作为参考。另外,2003年11月26日提交的美国临时申请No.60/525,612、2003年12月15日提交的美国临时申请No.60/530,042、2007年4月7日提交的美国临时专利申请No.60/922,121、和2004年11月24日提交的美国专利申请No.10/997,146,合并在此作为参考。

实施例

[0232] 实施例1

[0233] 方法

[0234] 细胞培养,MEF分离和病毒感染

[0235] ES和iPS细胞被培养在含有15%胎牛血清、白血病抑制因子(LIF)、青霉素/链霉素、L-谷氨酰胺和非必需氨基酸的DME中辐射过的MEFs上。所有的细胞在RNA、DNA或蛋白分离之前,在0.2%明胶上排除喂养细胞传代两次。胚胎注射Oct4-诱导型KH2ES细胞之后,在2 μ g/ml嘌呤霉素(Sigma)中从E13.5嵌合胚胎分离和选择转基因的MEFs(Hochedlinger等, Cell 121(3):465(2005)),所述ES细胞先前已经用Oct4-IRES-GfpNeo或Nanog-neo构建物靶定(Mitsui等, Cell 113(5):631(2003))。传代3-4次的 2×10^5 MEFs用通过基于Moloney的逆转录病毒载体pLIB(Clontech)转染HEK293T细胞(Fugene, Roche)产生的合并病毒上清液感染过夜,所述逆转录病毒载体pLIB含有Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc的cDNAs加上包装质粒pCL-Eco(Naviaux等, J Virol 70(8):5701(1996))。

[0236] Southern印迹,甲基化和染色质分析

[0237] 为了评价DNA甲基化的水平,用HpaII消化基因组DNA,并与作为次要卫星重复序列的探针的pMR150(Chapman等, Nature 284(1984))杂交,或与IAP-探针杂交(Walsh等, Nat Genet 20(2):116(1998))。亚硫酸氢盐处理用Qiagen EpiTect试剂盒进行。对于Oct4和Nanog启动子的甲基化状态,按照先前的描述施行亚硫酸氢盐测序分析(Blelloch等, Stem Cells 24(9):2007(2006))。每种样品的10-20个克隆双向测序。对于印迹基因实施COBRA分析。PCR引物和条件如以前所述(Lucifero等, Genomics 79(4):530(2002))。PCR产物经凝胶纯化,用BstUI或HpyCH4IV消化并在2%琼脂糖凝胶上分离。通过染色质免疫沉淀然后是如以前所述的定量PCR分析(Boyer等, Nature 441:349(2006)),确定二价结构域的状态。

[0238] 表达分析

[0239] 使用TRIzol试剂(Invitrogen)分离的50ng总RNA被逆转录,并在7000ABI检测系统上使用QuantTect SYBR green RT-PCR试剂盒(Qiagen)定量。按照记载施行Western印迹和免疫荧光分析(Hochedlinger等, Cell 121(3):465(2005);Wernig等, J. Neurosci 24(22):5258(2004))。一级抗体包括Oct4(单克隆小鼠, Santa Cruz)、Nanog(多克隆兔, Bethyl)、肌动蛋白(单克隆小鼠, Abcam)、SSEA1(单克隆小鼠, Developmental Studies Hybridoma Bank)。适当标记的二级抗体购自Jackson ImmunoResearch。从2 μ g总RNA合成微阵列靶,并使用Low RNA Input Linear Amp试剂盒(Agilent)标记,与Agilent全小鼠基因组低聚阵列(G4122F)杂交。在Agilent G2565B扫描仪上扫描阵列,在Agilent FE软件中计算信号强度。数据集使用R script归一化并如以前所述成簇(Brambrink等, Proc Natl Acad Sci USA 103(4):933(2006))。微阵列数据集提交ArrayExpress数据库。

[0240] 结果

[0241] 核移植实验证明,Oct4-诱导的成纤维细胞对重编程比未诱导的成纤维细胞更易感

[0242] A.产生携带诱导型Oct4转基因的转基因小鼠

[0243] 如下构建诱导型Oct4等位基因:首先,构建两种整合载体。第一种整合载体,诱导型Oct4整合载体,含有由四环素诱导型启动子(Tet-Op)驱动的Oct4基因。Tet-Op-Oct4盒侧翼带有在其5'末端的剪接受体双聚A信号(SA-dpA)和在其3'末端的SV40 polyA尾部(SV40-pA)。第二种整合载体,四环素活化剂整合载体,含有突变体形式的四环素活化剂M2-rtTA,其对多西环素(Dox)诱导比野生型活化剂更具响应性。(Urlinger等, Proc Natl Acad Sci USA 97(14):7963(2000))。

[0244] 两种整合载体被导入V6.5ES细胞:诱导型Oct4整合载体和四环素活化剂整合载体通过位点特异性整合分别被导入胶原基因座和Rosa26基因座,如图1所示。由此产生的ES细胞用来通过四倍体互补制造Oct4-诱导型小鼠。

[0245] B. 诱导型Oct4转基因的表达

[0246] 培养得自Oct4-诱导型小鼠尾部活组织检查的成纤维细胞。一部分培养的成纤维细胞用多西环素诱导3天(2微克/ml),通过Northern印迹和Western印迹分析检测Oct4表达。用多西环素处理的成纤维细胞中Oct4表达水平比得上ES细胞中Oct4表达水平,在没有用多西环素处理的成纤维细胞中则检测不到。表达结果证明,诱导型Oct4转基因按计划表达。

[0247] C. 核移植实验

[0248] 在得自携带诱导型Oct4转基因的小鼠的尾部活组织检查的成纤维细胞上,施行核移植。核移植之前进行Dox诱导24小时。然后如以前所述活化克隆的胚胎并培养至胚囊阶段,以得到ES细胞(Hochedlinger和Jaenisch, Nature 415:1035(2002))。平均起来,胚泡形成和ES细胞衍生(以一部分具有原核形成的蛋测量)从Oct4-诱导的成纤维细胞比从未诱导的成纤维细胞有效。这种结果证明在体细胞例如成纤维细胞中诱导的Oct4表达,使得这些细胞对重编程更敏感。

[0249] 通过严格的标准选择ES-样细胞

[0250] 在ES细胞中使用同源重组,我们产生了小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs),其携带插入内源性Oct4(Oct4-neo)或Nanog基因座(Nanog-neo)中的新霉素抗性标记(图2A)。这些培养物对G418敏感,表明正如预期,Oct4和Nanog基因座在体细胞中被沉默。用Oct4-、Sox2-、c-Myc-和Klf4-表达性逆转录病毒载体感染五天之后,细胞传代,G418被加到培养物中,用于选择耐药的细胞。在Nanog-neo和Oct4-neo培养物中均出现耐药克隆,虽然效率悬殊:Nanog-neo培养物中耐药克隆的数量高于Oct4-neo培养物中35倍(图2B)。当克隆对碱性磷酸酶(AP)或SSEA1染色时,明显有更高部分的Oct4-neo克隆是阳性的,并显示出ES细胞样形态。这提示虽然Nanog基因座更易活化,但Oct4-neo培养物中有更高部分的耐药克隆被重编程为全能状态。与这种观念相符,12个随机挑取的Oct4-neo克隆中,十个继续增殖并保持ES-样表型,而其中三个表现强AP活性和SSEA1表达。相反,所有九个继续增殖的Nanog-neo克隆具有扁平或小而圆形状的外观,而罕见的类似ES细胞的克隆只有部分被SSEA1抗体标记。但是,基于本技术领域已知的为ES细胞特征性的标准,从两种选择策略仔细进行克隆的形态选择之后,我们能够繁殖ES-样克隆(对于“诱导的全能细胞”命名为iPS细胞),其在以克隆密度接种在明胶包被的血上时,表现同源Nanog、SSEA1和AP表达并形成未分化的克隆。

[0251] 表征iPS细胞中的基因表达和DNA甲基化

[0252] 为了在分子水平上表征重编程的细胞,我们使用定量RT-PCR(qRT-PCR)测量ES细胞和成纤维细胞特异性基因的表达。Oct4-neo-选择的iPS细胞表达的内源性Nanog和Oct4水平与ES细胞类似,而MEFs不表达任一种基因。使用特异性引物将内源性与病毒Sox2转录物区分开,显示出绝大多数Sox2转录物来源于内源性基因座。相反,HoxA9和Zfp2在MEFs中高度表达,但在iPS或ES细胞中水平非常低。Western分析显示,iPS和ES细胞中Nanog和Oct4蛋白水平类似。最后,我们使用微阵列技术在整体水平上比较基因表达模式。与野生型或供体MEFs相反,iPS细胞与ES细胞聚簇。

[0253] 为了调查Oct4和Nanog启动子的DNA甲基化水平,我们用从ES细胞、iPS细胞和MEFs分离的DNA进行亚硫酸氢盐测序和COBRA分析。这两个位点在ES和iPS细胞中均被去甲基化,而在MEFs中完全甲基化。为了评价基因组印记的保持是否受损,我们评价了四个印记基因H19、Peg1、Peg3和Snrpn的甲基化状态。检测MEFs、iPS细胞和尾梢成纤维细胞中每个基因对应于未甲基化和甲基化等位基因的条带。相反,已经擦掉所有印记的EG细胞(Labosky等, *Development* 120(11):3197(1994)),是未甲基化的。我们的结果表明,Oct4和Nanog基因的表现遗传状态是从转录抑制(体细胞)状态重编程为活性(胚胎细胞)状态的,而在iPS细胞中保持了体细胞印记的模式。

[0254] 最近,通过基因组范围的定位分析,已经在ES细胞中明确了Oct4、Nanog和Sox2的下游靶基因(Boyer等, *Nat Genet* 38(4):431(2006))。这些靶包括许多重要的发育调节子,其一部分还被PcG复合物PRC1和PRC2结合和抑制(Lee等, *Cell* 125(2):301(2006); Boyer等, *Nature* 441(7091):349(2006))。值得注意的是,ES细胞中许多这些非表达靶基因的染色质采用二价构象,携带“活性”组蛋白H3赖氨酸4(H3K4)甲基化标记和“抑制性”组蛋白H3赖氨酸27(H3K27)甲基化标记(Bernstein等, *Cell* 125(2):315(2006); Azuara等, *Nat Cell Biol* 8(5):532(2006))。分化的细胞中,那些基因倾向于根据它们的表达状态,改为携带H3K4或H3K27甲基化标记。

[0255] 对于全能ES细胞中报道为二价的一组基因(Bernstein等, *Cell* 125(2):315(2006)),我们使用染色质免疫沉淀(ChIP)和实时PCR定量H3K4和H3K27甲基化。MEFs中,表达基因Zfp2和HoxA9携带强H3K4甲基化,但H3K27甲基化弱或没有,而Nkx2.2、Sox1、Lbx1h、Pax5和Evx1主要携带H3K27甲基化。但是,分析Oct4-neo iPS细胞时,我们发现这些基因的每个处,带有这两种组蛋白修饰的二价构象如正常ES细胞中一样(Bernstein等, *Cell* 125(2):315(2006))。在选自Oct4-neo和Nanog-neo成纤维细胞的几个iPS克隆中,得到了相同的结果。

[0256] iPS细胞抵抗整体去甲基化

[0257] 耐受基因组去甲基化是ES细胞的独特性质,因为体细胞在丧失甲基转移酶后迅速遭受凋亡。我们调查了iPS细胞在Dnmt1抑制之后是否会抵抗整体去甲基化,和是否能在恢复Dnmt1活性之后重新建立整体甲基化模式。为此,我们利用含有靶定Dnmt1的shRNA和GFP报道基因的条件慢病毒载体(Ventura等, *Proc Natl Acad Sci USA* 101(28):10380(2004))。感染的iPS细胞以低密度铺板,选择GFP-阳性克隆并扩增。使用HpaII消化的基因组DNA水平Southern分析显示,与未感染的iPS细胞或MEFs相反,感染的iPS细胞的整体去甲基化类似于Dnmt1^{-/-}ES,表现正常的甲基化水平。

[0258] 形态学上,GFP-阳性细胞与亲本系或未感染的姐妹亚克隆不可区别的,表明iPS细胞耐受整体DNA脱甲基化。第二个步骤中,按照以前对于ES细胞的报道(Holm等, *Cancer Cell* 8(4):275(2005)),通过Cre介导的重组切除Dnmt1shRNA,恢复正常的DNA甲基化水平。这些观察结果说明iPS细胞中新生甲基转移酶Dnmt3a/b的功能再活化(Okano等, *Cell* 99:247(1999))。正如预期,印记基因Snrpn和Peg3是未甲基化的,并抵抗再次甲基化。

[0259] iPS细胞中通过重新甲基化沉默逆转录病毒载体

[0260] Southern分析表明,Oct4-neo iPS克隆18携带Oct4、c-Myc和Klf4的4-6份拷贝以及Sox2逆转录病毒载体的只1份拷贝。因为这四种因子在组成型表达的逆转录病毒LTR的控

制下,在先的研究不清楚为什么iPS细胞可以被诱导分化(Takahashi和Yamanaka,Cell 126(4):663(2006))。为了解决这一问题,我们设计了对于所述4种病毒编码的因子转录物特异性的引物,并通过qRT-PCR比较了感染之后2天的MEFs中、iPS细胞中、起源于iPS细胞的胚体(EB)中以及去甲基化和重新甲基化的iPS细胞中的表达水平。虽然MEFs表现出未感染的和感染的细胞组成的异质群,但病毒依赖性Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4RNA水平在iPS细胞中比感染的MEFs中低5-倍,提示MEFs重编程后通过重新甲基化沉默病毒LTR。与该结论一致的是下述事实:iPS细胞中总Sox2和Oct4RNA水平类似于野生型(wt)ES细胞中,而且iPS细胞中的Sox2转录物大多数,即使不是唯一地,是从内源性基因转录的。分化为EBs后,病毒和内源性的转录物均被下调。重要的是,Dnmt1敲减的iPS细胞中,所有的病毒Sox2、Oct4和Klf4转录物都上调大约2-倍,并在恢复Dnmt1活性之后再次下调。相反,c-Myc的转录物水平在iPS细胞中比感染的MEFs中低大约20-倍,并在去甲基化的分化后不变。我们的结果提示,成纤维细胞重编程后,逆转录病毒载体通过重新甲基化进行沉默。

[0261] iPS细胞具有与ES细胞类似的发育潜力

[0262] 我们通过畸胎瘤和嵌合体形成测定iPS细胞的发育潜力。SCID小鼠中皮下注射iPS细胞之后3周形成的肿瘤的组织学分析显示,细胞已经分化成代表所有三个胚胎胚层的各种细胞类型。重要的是,Oct4和Nanog只在看起来未分化的细胞中表达,但在分化的细胞中沉默,注射wt ES细胞产生的畸胎瘤中正是如此。为了更严格评估iPS细胞的发育潜力,GFP-标记的亚克隆被注射到二倍体(2N)或四倍体(4N)胚囊中。细胞注射到4N胚囊中是发育潜能的最严格测试,因为由此产生的胚胎只由注射的供体细胞组成(“完全ES胚胎”)。起源于Oct4-neo和Nanog-neo MEFs的iPS细胞可以产生“完全iPS胚胎”。iPS细胞注射到2N胚囊中有效产生有高度贡献的产前和存活的产后嵌合体。这些发现表明,iPS细胞能够贡献胚胎的所有谱系,因此具有与ES细胞类似的发育潜力。

[0263] 实施例1中提出的结果证实,四种转录因子Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4能够诱发体细胞基因组的表观遗传重编程,成为胚胎状态,虽然效率低。这四种因子基于它们诱发体细胞中Fbx15基因表达的能力,进行最初的鉴定。Fbx15在小鼠ES细胞和早期胚胎中特异性表达,但对于保持全能性和小鼠发育不是必要的(Takahashi和Yamanaka,Cell 126(4):663(2006))。与基于它们的Fbx15表达而选择的细胞相反,已经再活化内源性Oct4(Oct4-neo)或Nanog(Nanog-neo)基因座的成纤维细胞生长不依赖饲养细胞,表达正常的Oct4、Nanog和Sox2RNA以及蛋白水平,其在许多标准上与ES细胞表观遗传相同并能够产生存活的嵌合体。从Nanog-neo成纤维细胞转导4种因子产生的耐药细胞比从Oct4-neo成纤维细胞产生的耐药细胞多35-倍,但是更高比例的Oct4-选择细胞展现出所评价的全能ES细胞的所有特征。

[0264] 以上提出的数据提示,iPS细胞的全能状态通过病毒转导因子诱导,但是主要通过内源全能性因子包括Oct4、Nanog和Sox2的活性保持,因为病毒控制的转录物虽然在MEFs中高度表达,但在iPS细胞中大部分沉默。iPS和wt ES细胞中Oct4、Nanog和Sox2的总水平近似。与全能状态通过内源全能性基因保持的结论相一致的是下述事实:与ES中一样,iPS中Oct4和Nanog基因变成低甲基化,并重建发育调节子的二价组蛋白修饰。重要的是,iPS细胞抵抗Dnmt1失活诱导的整体去甲基化,这与ES细胞相似,而与体细胞相反。低甲基化的ES细胞中重新表达Dnmt1导致整体再次甲基化,表明iPS细胞也已经再活化了新生的甲基转移酶Dnmt3a/b。所有这些观察结果符合iPS细胞已经获得与正常ES细胞相似的表观遗传状态的

结论。

[0265] 所述4种因子的表达被证明是诱发体细胞重编程为全能状态的稳固方法。本发明的一个目的是提供不用可能损害遗传物质的基因转移而鉴别细胞重编程的小分子的新方式。

[0266] 实施例2

[0267] 方法

[0268] 细胞培养,MEF分离和病毒感染

[0269] ES和iPS细胞被培养在含有15%胎牛血清、白血病抑制因子(LIF)、青霉素/链霉素、L-谷氨酰胺、 β -巯基乙醇和非必需氨基酸的DME中辐射过的MEFs上。所有的细胞在RNA、DNA或蛋白分离之前,在0.2%明胶上排除喂养细胞传代两次。传代3-4次的 2×10^5 MEFs用通过基于Moloney的逆转录病毒载体pLIB(Clontech)转染HEK293T细胞(Fugene,Roche)产生的合并病毒上清液感染过夜,所述逆转录病毒载体pLIB含有Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc的cDNAs加上包装质粒pCL-Eco(Naviaux等,J Virol 70:5701(1996))。

[0270] 胚囊注射

[0271] 二倍体或四倍体胚囊(HCG注射后94-98小时)被放入矿物油下的一滴带有15%FCS的DMEM中。内径12-15mm的平头微注射管用于ES细胞注射。受控数量的ES细胞注射到胚囊腔中。注射之后,胚囊返回KSOM培养基,并放置在37℃下直到转移至受体雌性动物。

[0272] 受体雌性动物和剖腹产术

[0273] 十至十五个注射过的胚囊被转移至交配后2.5天假怀孕的B6D2F1雌性动物的每个子宫角。为了得到足月的ES或嵌合幼畜,受体母亲在交配后19.5天被处死。存活的幼畜由产奶的BALB/c母亲哺育。

[0274] 病毒整合

[0275] 基因组DNA用SpeI过夜消化,然后电泳和转移。印迹与相应的放射性标记的cDNAs杂交。

[0276] 免疫组化

[0277] 细胞在室温下固定在4%多聚甲醛中10min,用PBS清洗3次,并在含有0.1%Triton的PBS中用5%FBS封闭15min。用对抗Sox2(单克隆小鼠,R&D系统)、Oct4(单克隆小鼠,Santa Cruz)、c-myc(多克隆兔,Upstate)、Nanog(多克隆兔,Bethyl)和SSEA1(单克隆小鼠,Developmental Studies Hybridoma Bank)的一级抗体温育1小时之后,细胞用PBS清洗3次,并与购自Jackson Immunoresearch的荧光团标记的适当二级抗体一起温育。在Olympus荧光显微镜上分析样本,并用Zeiss AxioCam照相机获得图像。

[0278] 结果

[0279] 没有遗传或化学选择的体细胞重编程

[0280] 如上所述,通过将Oct4、Sox2、c-myc和Klf4逆转录病毒转导到鼠成纤维细胞中,已经实现了体细胞体外重编程成为全能ES细胞样状态。这些实验中,通过严格选择插入内源性Oct4或Nanog基因座中的新霉素抗性基因的活化,分离稀少的“受诱导的全能干”(iPS)细胞。从培养的体细胞直接分离全能细胞具有潜在的治疗利益,但是为了将这样的方法转换到非鼠科动物例如人类系统中,开发用于上述iPS分离方案的转基因供体要求的替换物,将是所希望的。这里我们第一次证明,重编程的全能细胞能够仅以形态学标准为基础,从遗传

未修饰的供体体细胞中分离。因此,例如,遗传未修饰的供体体细胞能够从小鼠、大鼠、兔、家畜、伴侣动物、灵长类动物或人类得到,重编程的全能细胞能够起源于这些供体细胞。

[0281] 体细胞核移植和与胚胎干(ES)细胞的细胞融合已经是实现体细胞核重编程为全能状态的非常确定的途径。从培养的体细胞直接体外分离全能ES-样细胞最近是通过将四种转录因子Oct4、Sox2、Klf4和c-myc(下面称为“因子”)转导到遗传修饰的成纤维细胞中而实现的。选择稀少的重编程诱导的全能干(iPS)细胞是基于Fbx15(Takahashi和Yamanaka, Cell 126:663(2006))或Oct4或Nanog基因的再活化,它们全都携带通过同源重组插入相应的内源性基因座中的耐药性标记或含有Nanog启动子的转基因。虽然基于Fbx15活化的iPS细胞分离产生全能的细胞,但它们在分子水平不同于ES细胞,并且不能产生生活的嵌合体。这些实验中,在病毒转导之后3天开始选择。相反,针对Oct4或Nanog活化的选择产生与正常ES细胞在表观遗传和生物学上不可区分的全能iPS细胞。但是,重编程为全能性是一缓慢和渐进的过程,包括在因子转导之后2-4周的时期内,ES细胞标记碱性磷酸酶(AP)、SSEA1和Nanog的相继活化。因此,在因子转导之后3天Oct4-neo或Nanog-neo成纤维细胞的培养物加入G418时,没有形成耐药克隆,而在1周时加入药物产生少许,在2周加入有明显更多的耐药和重编程的克隆。因子转导之后药物选择时间和耐药iPS细胞数量之间的反比关系,符合重编程过程涉及多个随机事件将体细胞的表观遗传状态转变为全能细胞状态这一观念。

[0282] 本实施例中,我们说明,全能iPS细胞能够起源于正常的、遗传未修饰的供体细胞。在第一组实验中,我们使用插入Oct4基因座中的GFP标记监测重编程过程。通过以前所述的逆转录病毒-介导的基因转移,用四种因子Oct4、Sox2、c-myc和Klf4转导Oct4基因座中携带IRES-EGFP盒的小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)。感染之后三天,成纤维细胞变成形态上比未感染的对照细胞更多样,并出现生长提高的灶。第6天,发展出类似ES细胞克隆的紧密堆叠和边缘清晰的小克隆。随后的几天期间,这些克隆继续长成大而更不均质的细胞集合体,一些部分类似ES细胞样生长,同时继续出现更小而紧密的克隆。

[0283] 仅仅基于它们的形态学,第11天挑取这些大克隆的八个,第16天另外挑取十个克隆。在荧光显微镜下检查时,11天时没有可检测出的GFP表达,在16天挑取的十个克隆中只有一个显示出弱GFP表达。11天时挑取的八个克隆中的一个和16天时挑取的十个克隆中的四个产生同源的、ES-样细胞系。正如对完全重编程的iPS细胞的预料,所有五个系在1-3次传代内启动Oct4-EGFP表达(表1),并表现同源AP活性以及SSEA1和Nanog表达。

[0284] 在最初基于形态学标准挑取的剩余克隆中,十个产生主要含有成纤维细胞样细胞的异质培养物,散布着少量ES-样克隆(表1)。我们调查这些异质培养物是否在进一步传代后会产生另外的iPS细胞系。为此,我们从来源于初始生长物的五个混合培养物的每一个中,挑取了三个ES-样克隆,并成功地在2-3次传代之内建立了五个其他的iPS细胞系(表1和2)。为了测试所观察的异质性是否是部分不完全重编程的结果还是没有重编程的成纤维细胞的污染,我们从克隆#5和异质的亚克隆#5.2以FACS-选择GFP阳性和阴性细胞,并使用Southern印迹分析比较原病毒整合模式。结果表明,两个细胞群体源于相同的亲本细胞,表明需要进一步的表观遗传事件。从所挑取的不产生次级iPS系的亚克隆中,三个亚克隆(6.1、6.2和6.3:参见表1和2)表现改变的形态(小细胞,紧密生长的克隆),但是其余Oct4-GFP阴性经多次传代仍表现出对AP、SSEA1或Nanog不染色,提示这些细胞不是全能的。罕见出现ES标记阴性细胞,并且这些细胞表现出与ES或真实的iPS细胞细微的形态差异,例如克

隆边缘的形状。因为所述细胞用所有四种逆转录病毒感染,有可能所述四种因子可能没有以正确的水平表达,产生转化的而不是全能的细胞。例如,c-myc/Klf4高表达并且Oct4/Sox2表达不充分可能导致快速生长的非iPS细胞,符合Oct4和Sox2在重编程过程中的作用可能是抑制c-myc和Klf4转化表型这一观念(Yamanaka, Stem Cells 1:39-49(2007))。

[0285] 所有受测试的iPS细胞系显示,GFP强度比得上Oct4-GFP ES细胞,符合我们先前的观察结果:Oct4蛋白水平在不同的iPS细胞系中相似(Wernig,2007)。为了分析以形态学标准分离的iPS细胞随着时间是否保持表型稳定,在多次传代之后监测GFP荧光。这些结果说明,iPS细胞展现出不变和稳固的Oct4-GFP表达,直至至少九次传代。这些数据明确证明,稳定的iPS系能够不依靠药物选择而有效取得。

[0286] 我们使用病毒感染的输入细胞的比例和ES细胞样克隆的数量来估计重编程的效率。典型的实验中,大约100,000个细胞暴露于病毒。利用对Sox2、Oct4和c-myc的染色作为标准,我们估计大约10.2%的细胞感染了所有四种病毒,产生115个ES细胞样克隆。从挑取的克隆数量取得iPS细胞的效率是44%。因此,推断重编程的总效率是大约0.5%。

[0287] 最后,我们通过畸胎瘤形成评价了未选择的iPS细胞的发育潜力,并注射到二倍体(2N)和四倍体(4N)胚囊中(表3)(Eggan等,Proc Natl Acad Sci USA 98:6209-6214(2001))。皮下注射到SCID小鼠中三周后,8.1和14系发展成肿瘤,通过组织学分析确定,包含来自所有三个胚层的组织类型。注射到2N胚囊中之后,我们产生了毛色具有高嵌合性的活的产后动物。重要的是,注射到4N胚囊中时,这是发育潜力的最严格测试,可以取得活的E14.5胚胎(表4)。这些资料证明,基于形态学标准筛选iPS细胞而不是针对耐药性来选择,能够产生全能iPS细胞,其表现出类似ES细胞的生物学潜力。

[0288] 从遗传未修饰的供体细胞衍生iPS细胞

[0289] 上面描述的实验中,Oct4-GFP标记用于监测重编程过程,而不是筛选重编程的iPS细胞。为了评价iPS细胞是否能够源于遗传未修饰的供体细胞,我们从Balb/c和129SvJae/C57B16(F1)小鼠产生野生型MEFs以及从129SvJae/C57B16(F1)和C57B16/DBA(F1)2-3个月大小鼠产生成年尾稍成纤维细胞。如上所述,所述细胞用编码所述四种因子的逆转录病毒感染,16天或以后挑取大克隆。与先前的实验一样,在挑取初级克隆后一次传代之内,就变得可见ES-样克隆。经继续传代或通过亚克隆,我们容易地建立了带有ES细胞形态和生长性质的同源细胞系。

[0290] 假定重编程的细胞比供体成纤维细胞长得快,我们尝试通过整个板传代而不是按照形态学标准挑取克隆来产生iPS细胞。在受感染细胞群第一次传代后几天之内,出现了许多完全类似ES细胞克隆的小克隆,6个挑取的克隆中5个长成稳定的iPS系(表3)。利用直接挑取或全板传代继之以挑取个体克隆,传代2-3次后,我们建立了来自每个背景的一个或多个iPS系(表3)。所有的遗传未修饰的iPS系表达AP、SSEA1和Nanog。另外,我们从iPS系衍生的Balb/c和129B6MEF产生了嵌合胚胎,证明来自遗传未修饰的成纤维细胞的iPS细胞是全能的(表4)。但是,应该注意,所述因子转导的细胞群的传代,虽然描述了简化的分离方案,但不能排除个体iPS细胞系可以源于相同的重编程亲本细胞。

[0291] 我们的结果提示,成纤维细胞的体外重编程发生的频率足以在非转基因的供体细胞培养物中进行检测,并且不用选择压力就稳定表达Oct4或Nanog。因此,四种因子诱导的重编程能够应用于野生型细胞。不受任何理论的制约,看来Oct4、Sox2、c-myc和Klf4的异位

表达在多次受感染的细胞中启动了渐进的重编程过程,最终经过几个星期的一段时间成为全能性。利用Oct4GFP MEFs监测内源性Oct4基因座的再活化,我们发现所有的克隆,除了一个以外,在挑取的时候都是GFP-阴性的(参见表2),并且只有在几次传代之后变成GFP阳性。这提示,重编程是一个缓慢的过程,涉及ES细胞标记例如AP、SSEA1和Nanog的相继活化,而Oct4活化代表所述过程中最后的表现遗传事件之一。此外,这些观察结果也符合我们先前的发现:当病毒转导之后早期应用针对Oct4活化的药物选择时,重编程克隆的数量较低,但当较晚启动药物选择时则明显升高。最后,通过因子转导诱导的缓慢的重编程过程可以说明,为什么按照初始iPS分离方案中所用的,早在感染3天之后针对Fbx15活化进行药物选择,只产生经历不完全表现遗传重编程的细胞。我们的结果预测,针对晚期Fbx15活化的选择将产生与针对Oct4活化的选择或基于形态学标准的分离的iPS细胞相似的iPS细胞。

[0292] 实施例3

[0293] 方法

[0294] 细胞培养和病毒感染

[0295] ES和建立的iPS细胞被培养在含有15%FCS、白血病抑制因子(LIF)、青霉素/链霉素、L-谷氨酰胺、 β -巯基乙醇和非必需氨基酸的DME中辐射过的MEFs上。用于通过诱导型慢病毒感染衍生初级iPS系的MEFs从ROSA26-M2rtTA小鼠(Beard等,2006)和Nanog-GFP小鼠(Brambrink等,2008)之间的F1交配的13.5dpc处收获。小鼠C/EBP α cDNA克隆到pLib、MSCV-Neo和pMig逆转录病毒载体的EcoRI克隆位点中。编码ES全能性基因的pMXs载体以前有述(Takahashi和Yamanaka,2006)。慢病毒制品和用受TetO/CMV启动子驱动编码Oct4、Klf4、c-Myc和Sox2cDNA的多西环素诱导型慢病毒进行感染以前已有描述(Brambrink,2008)。逆转录病毒原种通过利用Fugene(Roche)瞬时转染Phoenix-Eco细胞而制备,48hr后收获上清液。为了感染,纯化的B细胞亚组再悬浮于带有15%FCS以及IL-4、IL-7、Flt-3L、SCF(各10ng/ml,Peprtech)、抗-CD40(0.1 μ g/ml,BD-Biosciences)、LPS(10ng/ml,Sigma-Aldrich)和Dox(4 μ g/ml)的IMDM中。然后,2ml等份在重组人纤维蛋白片段(retronectin)(Takara)预包被、接着是其中加入了聚凝胺(Sigma)(8 μ g/ml)的2ml逆转录病毒上清液的24孔板上铺板,所述板在37 $^{\circ}$ C温育2小时,然后1ml病毒上清液用重悬浮于上面描述的细胞因子条件培养基中的B细胞替换。板以900RPM离心90min,然后在37 $^{\circ}$ C 5%CO₂温育24小时。然后,感染的细胞转移到补充新鲜的细胞因子和Dox的培养基中的OP9骨髓基质细胞系(ATCC)上。Dox上14天之后,挑取克隆并培养在ES培养基中的MEF饲养细胞上(没有造血细胞因子或Dox),并存在嘌呤霉素(2 μ g/m)以消除任何残余的OP9细胞。

[0296] V(D)J重排分析

[0297] 利用如以前所述的简并引物组,通过PCR扩增IgH、Ig κ 和Ig λ 重排(Chang等,1992; Cobaleda等,2007a,Schlissel等,1991)(表2)。为了表征个体V-DJ重排,PCR片段被克隆到TOP0载体中,对应于相同的PCR片段的至少5个克隆被测序。得到的序列用DNAPLOT搜索引擎分析(在www.dnaplot.de找到)。IgH基因座处的V-DJ和D-J重排通过用EcoRI消化并使用3' JH4探针(质粒JH4.3的1.6-kb HindIII-EcoRI片段)(Alt等,1981),对所指示的iPS系的基因组DNA进行Southern印迹分析来检测。Ig κ 基因座处的V κ -J κ 重排通过使用3' J κ 5探针(质粒pBS-J κ MAR的1-kb XbaI-EcoRV片段)(Lewis等,1982),对BamHI消化的基因组DNA进行Southern印迹分析确定。

[0298] DNA甲基化和组蛋白标记分析

[0299] 对于Oct4和Nanog启动子的甲基化状态,按照先前的描述施行亚硫酸氢盐测序分析(Wernig等,2007)。每个样品总共10-20个克隆双向测序。如以前所述(Bernstein等,2006),H3K4和H3K27二价结构域的状态通过染色质免疫沉淀继以定量PCR分析来确定。

[0300] 胚囊注射和畸胎瘤形成

[0301] 二倍体或四倍体胚囊(HCG注射后94-98小时)被放入矿物油下的一滴带有15%FCS的DMEM中。内径12-15mm的平头微注射管用于iPS细胞注射(使用Piezo显微操作器34)。受控数量的细胞被注入胚囊腔。注射之后,胚囊返回KSOM培养基,并放置在37℃下直到转移至受体雌性动物。十至十五个注射过的胚囊被转移至交配后2.5天假孕的B6D2F1雌性动物的每个子宫角。为了取得足月的幼畜,受体母亲在交配后19.5天被杀死。存活的幼畜由产奶的BALB/c母亲哺育。为了畸胎瘤产生,2*10⁶细胞被皮下注射到受体SCID小鼠两肋,最初注射之后3-6周收获肿瘤用于切片。

[0302] 免疫荧光染色

[0303] 细胞在25℃下固定在4%多聚甲醛中20min,用PBS清洗3次,并在含有0.1% Triton-X的PBS中用5%FBS封闭15min。用对抗Nanog(多克隆兔,Bethyl)和SSEA1(单克隆小鼠,Developmental Studies Hybridoma Bank)的一级抗体在含有0.1Triton-X的PBS中以1%FBS温育1小时之后,细胞用PBS清洗3次,并与购自Jackson Immunoresearch的荧光团标记的适当二级抗体一起温育。在Olympus荧光显微镜上分析样本,并用Zeiss Axiocam照相机获得图像。

[0304] 定量RT-PCR

[0305] 骨髓B细胞在补充有IL-7、SCF、Flt3的培养基中的OP9细胞上生长,而脾B细胞用IL-4、抗CD40和LPS生长。在收获细胞用于mRNA制备之前,通过在明胶包被的板上预先铺板而去除OP9细胞。成纤维细胞(2μg/ml)和B细胞(0.3μg/ml)培养物中加入嘌呤霉素,消除非转基因细胞。总RNA使用Rneasy试剂盒(Qiagen)分离。使用DNA Free RNA试剂盒(Zymo Research,Orange,CA),用DNase I处理3微克总RNA以除去潜在的基因组DNA污染物。1微克DNase I处理的RNA使用第一链合成试剂盒(Invitrogen)逆转录,最终重悬浮于100μl水中。在带有Platinum SYBR green qPCR SuperMix-UDG与ROX(Invitrogen)的ABI Prism 7000(Applied Biosystems,Foster City,CA)中,利用1/50的逆转录反应,一式三份进行定量PCR分析。用于扩增的引物如下:c-Myc:F,5'-ACCTAACTCGAGGAGGAGCTGG-3'(SEQ ID NO:1)和R,5'-TCCACATAGCGTAAAAGGAGC-3'(SEQ ID NO:2);Klf4:F,5'-ACACTGTCTTCCCACGAGGG-3'(SEQ ID NO:3)和R,5'-GGCATTAAGCAGCGTATCCA-3'(SEQ ID NO:4);Sox2:F,5'-CATTAACGGCAGCTGCCC-3'(SEQ ID NO:5)和R,5'-GGCATTAAGCAGCGTATCCA-3'(SEQ ID NO:6);Oct4:F,5'-AGCCTGGCCTGTCTGTCACTC-3'(SEQ ID NO:7)和R,5'-GGCATTAAGCAGCGTATCCA-3'(SEQ ID NO:8)。为了确保相等载荷的cDNA进入RT反应,利用下列引物扩增GAPDH mRNA:F,5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3'(SEQ ID NO:9);和R,5'-CCCTTTTGGCTCCACCCT-3'(SEQ ID NO:10)。数据从扩增的线性范围提取。qRT-PCR数据的所有图表显示了平行DNase处理、逆转录和扩增的RNA代表样品,以避免这些程序中内在的偏差。使用以前发表的引物(Takahashi和Yamanaka,2006),通过PCR进行ES标记的基因表达分析。

[0306] 流式细胞术分析和细胞分选

[0307] 下列荧光结合抗体(PE、FITC、Cy-Chrome或APC标记的)用于FACS分析和细胞分选:抗-SSEA1(RnD系统),抗-Ig κ ,抗-Ig λ 1、2、3,抗-CD19,抗-B220,抗-c-Kit;抗-CD25,抗-sIgM,抗-sIgD(均得自BD-Biosciences)。细胞分选通过使用FACS-Aria(BD-Biosciences)进行,并一致达到细胞分选纯度>97%。为了从脾和淋巴结分离成熟IgM+IgD+B细胞,细胞分选之前,在用谱系标记抗体(CD3 ϵ , CD4, CD8, CD11c, Gr1, c-Kit, Mac1和Ter119)染色之后,通过MACS分选排除Lin+非B细胞的细胞。

[0308] 结果

[0309] 重编程因子在B细胞系中的诱导型表达

[0310] 最初,在这里描述的工作寻求确定的是,被证明足以重编程小鼠和人类成纤维细胞培养物(Meissner等,2007;Okita等,2007;Takahashi等,2007;Takahashi和Yamanaka,2006;Wernig等,2007)与小鼠肝和胃来源的细胞培养物(Aoi等,2008)的Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc转录因子,是否能够重编程B细胞系的细胞。因为病毒对小鼠淋巴细胞的感染性相对较低,我们建立了允许四种重编程因子在B细胞中诱导型转基因表达的系统。

[0311] 为此,我们最近已经证明,编码Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4转录因子的多西环素诱导型(Dox)慢病毒载体能够将小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)重编程成为在收回Dox之后保持它们全能性的稳定iPS细胞(Brambrink等,2008)。注入胚胎时,这些细胞能够产生出生后嵌合体,其含有的体细胞克隆群携带产生“初级”iPS细胞的相同原病毒拷贝(Brambrink等,2008)。我们推论,来源于这些嵌合体的B细胞在适当的培养条件下暴露于Dox时,可能活化诱导初级iPS细胞的原病毒拷贝,因此有可能促进重编程和产生“次级”iPS细胞(图3)。

[0312] 携带受ROSA 26启动子(R26-M2rtTA)驱动的组合型表达的反式四环素激活因子和在内源性Nanog基因座中敲入的GFP(Nanog-GFP)的MEFs,用编码Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4基因的Dox-诱导型慢病毒载体感染(Brambrink等,2008)。挑取Dox处理12天之后出现的肉眼可见的大克隆,并不用Dox进行增殖,建立Nanog-GFP+iPS系,其表达全能性标记碱性磷酸酶(AP)、SSEA1抗原和Oct4。MEF衍生的初级iPS细胞注入胚胎,产生胚胎和成年嵌合体。原B(B220+c-Kit+)和前B细胞(B220+CD25+)(Cobaleda等,2007a)从骨髓分离,成熟IgM+IgD+B细胞从8周龄成年嵌合小鼠中纯化,并在补充有造血细胞因子和Dox的培养基中生长7天。功能性嘌呤霉素抗性基因被插入ROSA26基因座中,作为M2rtTA寻靶策略的一部分(Brambrink等,2008),并允许通过嘌呤霉素选择(0.3 μ g/ml)消除宿主来源的非转基因B细胞。

[0313] 因为来自嵌合体的供体B细胞在Dox存在下诱导所述4种因子的高表达水平,选择源于MEF-iPS-#1细胞系的嵌合体进一步研究。源于MEF-iPS-#1系的成年尾梢成纤维细胞在加入Dox之后也产生Nanog-GFP+iPS系,虽然加入Dox之后所述四种因子的表达水平比在源于相同嵌合体的B细胞中观察到的低。

[0314] 未终末分化的B细胞的重编程

[0315] 对在补充有LIF和Dox的ES培养基中辐射过的饲养细胞上培养的骨髓来源B细胞和脾B细胞进行重编程的最初尝试失败了,因为所述细胞在培养五天之内死亡。我们推论,细胞因子的加入可能是允许B细胞最初增殖所必需的,其将确保通过表达所述四种因子启动表观遗传重编程所必要的足够数量的细胞分裂。因此,我们优化了培养条件,其将支持不成熟和成熟B细胞生长以及ES细胞生长,以确保从B至iPS细胞的重编程过程期间的成活力。

[0316] 细胞在补充有ES细胞生长需要的LIF、支持B细胞发育的IL-7、SCF和Flt-3L(Milne等,2004)、以及对于成熟B细胞增殖重要的IL-4、抗-CD40和LPS(Hayashi等,2005)的培养基中的OP9骨髓基质细胞上生长。最初实验中,Dox处理14天之后,在来源于8周龄成年嵌合体骨髓的分选的前-和原-B细胞亚组的培养物中,我们检测了AP阳性克隆。Dox诱导3天之后出现小的扁平克隆,其随后经历强大的扩增。Dox诱导之后大约11天,观察到粒状大克隆内包埋的平滑的ES-样小克隆,其在14天时变成Nanog-GFP+。Dox诱导之后14天,从3个独立实验挑取克隆,并在没有Dox的ES培养基中生长在MEF饲养细胞上。3次传代之内,超过90%的所挑取的克隆长成同源ES-样Nanog-GFP+iPS细胞。下文中,我们将称呼这些细胞系为iB-iPS细胞(对于来源于“不成熟的”未完全分化的B细胞,包括前-和原-B细胞)。

[0317] 从已建立的iB-iPS细胞系收获的基因组DNA通过PCR分析重和轻链重排。我们使用以前描述的简并引物,其识别大多数重排,包括三个主要家族:重链基因座的V区段(V_HQ52, V_H7183-DJ, V_HGam3.8),D_H-J_H重链重排,以及Ig κ 和Ig λ 轻链重排(Chang等,1992;Cobaleda等,2007a)(表2)。从B220+c-Kit+原B细胞亚群重编程的代表性细胞系显示,一些iPS系携带D_H-J_H重排(#1、2、7、9系),而其它系没有显示出任何IgH重排的证据(#3、4、6系),与对原B细胞发育阶段时供体B细胞亚组中重排的预期相同。从成年骨髓来源的B220+CD25+前B细胞建立的细胞系携带至少一个V_H-DJ_H重排和其他的D_H-J_H或V_H-DJ_H重排(#5、8系),在这样的B细胞群中通常观察到IgH基因座的这两种遗传重排(Jung等,2006)。通过Southern印迹分析证实iB-iPS中的IgH重排。

[0318] 对于后续的分析,我们集中在含有IgH重排的遗传证据的细胞系上,因为只有它们能够明确追踪定向为B细胞谱系的细胞。所有的iB-iPS细胞系都对于ES标记AP、SSEA1和Oct4阳性染色,并且所有的被测细胞系(#5,7,8,9)都在注入免疫缺陷小鼠时产生分化的畸胎瘤。此外,我们从几种iB-iPS细胞系得到成年嵌合体(表1)。来自iB-iPS#8细胞系衍生的嵌合体的尾DNA的代表性Southern印迹显示,重链重排模式与供体iB-iPS细胞系相同,从而证实了嵌合体源于相应的iB-iPS细胞系而不是来自污染性ES-或MEF-衍生的iPS细胞。通过所得到的所有小鼠的鼠灰色毛色证明,源于iB-iPS系#9的嵌合体产生100%种系传递。正如预期,Southern印迹分析证实了在一些小鼠的供体iB-iPS系中发现的重排IgH等位基因的分离。这些结果证明,定向B细胞系的细胞虽然没有完全分化,但携带D_H-J_H或V_H-DJ_H重排,所述细胞能够通过诱导4种转录因子Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc,重编程为全能ES-样状态。

[0319] 终末分化B细胞的重编程

[0320] 在5个独立实验中,我们从成熟的脾IgM+IgD+细胞或骨髓来源的IgK+细胞产生任何重编程的AP+克隆失败了。这是令人费解的,因为IgM+IgD+成熟转基因B细胞可以在我们的培养条件下维持直至6周,并持续表达B细胞标记。看来有可能的是,转基因B细胞由于诱导c-Myc,能够在带有Dox的条件培养基中增殖相对长的时期,已知c-Myc促进B细胞生长并且在B细胞转化中是关键角色(Zhu等,2005)。因此,我们测试了下述假设:其他的全能性因子可能是实现成熟B细胞重编程所需要的。成年IgM+IgD+脾B细胞用编码20种不同全能性因子的逆转录病毒的组合进行感染,原来产生所述因子是为了筛选成纤维细胞重编程(Takahashi和Yamanaka,2006)。然而,这些实验反复产生阴性结果。

[0321] 作为替代途径,我们打算通过改变成熟B细胞的身份来“致敏”B细胞响应Dox依赖性4-因子诱导。已经证明,骨髓转录因子CCAAT/增强子-结合蛋白- α (C/EBP α)的过表达能够

通过破坏转录因子Pax5的功能,将B细胞重编程成为巨噬细胞样细胞(Xie等,2004),Pax5是成熟B细胞发育和免疫功能的主要调节剂(Cobaleda等,2007b)。这些实验中,C/EBP α 转导的B细胞在存在骨髓细胞因子的骨髓基质细胞上生长,并分化为功能性巨噬细胞(Xie等,2004)。因此,我们检验了用C/EBP α 转导是否将促进成熟B细胞的重编程。

[0322] 来源于10周龄嵌合体的成年脾B细胞用编码C/EBP α 和/或IL7-R α 亚单位的逆转录病毒转导,并在Dox存在下在OP9细胞上培养,以诱导四种因子Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc。AP阳性克隆出现在培养14天之后,用C/EBP α 或用C/EBP α 和IL7-R α 转导的细胞中而不是只用IL7-R α 转导的细胞中。OP9上生长3天之后,形成小的粘着克隆,其继续长成更致密的粒状克隆。与Dox诱导的前-和原-B细胞培养物类似,小而圆的ES-样克隆出现在大而致密的粒状克隆之内,大约14天时容易检测到Nanog-GFP+灶。

[0323] 在OP9骨髓基质细胞上铺展开对于回收iPS细胞是关键的,因为细胞在MEF饲养细胞或明胶包被的板上培养时,检测不到iPS细胞。14天时分离的克隆在没有造血细胞因子或Dox的MEF饲养细胞上传代,并在3次传代之内,所有的系表现ES-样形态和对于Nanog-GFP标记阳性。

[0324] 在Dox诱导的骨髓B220+B细胞群和用C/EBP α 逆转录病毒感染的成熟脾IgM+IgD+B细胞中,我们进行了FACS分析,测量SSEA1和Nanog全能性标记活化的动力学。该分析显示相似的重编程动力学,其中最开始在7天时检测到SSEA1+细胞,并在Dox加入之后11天时变为大量。与MEFs重编程期间相继出现全能性标记相似(Brambrink等,2008),15天时检测到Nanog表达。我们的结果提示,用C/EBP α 转导能够致敏成熟B细胞响应Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4的表达,并重新表达全能性标记。

[0325] 我们建立了120个独立的iPS系,它们在加入Dox和C/EBP α 转导之后14天,从含有来自成年脾和淋巴结的IgM+IgD+B细胞的独立组织培养孔中挑取,随机选择9个细胞系用于深入表征(1-6系从成年脾得到,7-9系从成年淋巴结得到)。下文中,我们将称呼这些细胞系为“B-iPS”细胞(源于成熟“B”细胞的iPS细胞)。

[0326] 接下来,我们表征B-iPS细胞系的标记表达、DNA甲基化和组蛋白标记。免疫荧光染色显示,所有的B-iPS细胞系统一表达ES细胞标记AP、SSEA1抗原、Oct4蛋白,并对Nanog-GFP阳性。通过RT-PCR的基因表达分析显示,B-iPS和ES细胞,而不是初级B细胞,表达相当水平的Nanog、Ecat1、Rex1、Zfp296和GDF3基因。进行亚硫酸氢盐测序,确定iB-iPS和B-iPS细胞系的Oct4和Nanog基因启动子的甲基化状态。正如预期,成纤维细胞和B细胞对照样品在这两个启动子处表现广泛的甲基化,而B-iPS和iB-iPS系显示这些区域的普遍去甲基化,这与在ES细胞中看到的类似。

[0327] 为了评价细胞的染色质状态,进行染色质免疫沉淀(ChIP)和实时PCR,在ES细胞中已知是二价(同时携带活性和抑制性甲基化标记)的所选基因组上,定量“活性”组蛋白H3赖氨酸4的三甲基化(H3K4me3)和“抑制性”组蛋白H3赖氨酸27三甲基化(H3K27me3)甲基化标记(Bernstein等,2006)。随着细胞分化,这样的基因能够变成“一价”,并根据它们的表达,携带任一H3K4me3或H3K27me3标记。在供体成熟B细胞中,B细胞转录因子基因Pax5的启动子区域表现出对H3K4me3甲基化的强富集,而H3K27me3甲基化在沉默基因Zfp2和Irx2处是占主导地位的。反之,在B-iPS和ES细胞中,所有这些基因携带同等丰富的这两种组蛋白修饰,符合重编程期间这些二价结构域被重建的观念。

[0328] 总之,我们的结果表明,B-iPS细胞的染色质结构已经从终末分化的成年成熟B细胞的典型结构转变为ES细胞的特征性结构(Bernstein等,2006)。

[0329] B-iPS细胞中免疫球蛋白基因座的重排证实供体细胞的成熟B细胞身份

[0330] 为了表征B-iPS细胞中Ig基因座的基因组重排,通过包括Southern印迹、PCR和单个PCR片段测序的互补途径,对来自明胶上生长的排除MEF的iPS细胞系的基因组DNA分析IgH、Ig κ 和Ig λ 重排(Alt等,1981;Chang等,1992;Cobaleda等,2007a;Lewis等,1982;Schlissel等,1991)(表6)。所有的细胞系包含2种重链重排:一种是有效符合读框的V-DJ重排,另一种是冻结的D-J重排或无效V-DJ重排。这些结果符合非常明确的观察结果:外周成年成熟B细胞具有2个重排的重链基因座(Jung等,2006)。

[0331] 如同对成熟B细胞的预测,轻链基因座具有一种有效符合读框的Ig κ 或Ig λ 轻链重排(Jung等,2006)。虽然已知小鼠中95%的Ig λ +B细胞携带无效Ig κ 重排,但B-iPS细胞系#9起源于带有重排的有效Ig λ 链和种系结构中保留的 κ 基因座的次要B细胞亚群(Nadel等,1990;Oberdoerffer等,2003)。最后,从B-iPS细胞系#4的重和轻链重排得到的序列提供了结论性依据:产生该细胞系的供体B细胞核已经经历体细胞高变,体细胞高变是体内遭遇抗原之后发生的过程,涉及在位于编码免疫球蛋白可变区的全部DNA上的“热点”处获得高比率的体细胞突变(Teng和Papavasiliou,2007)。这种定向高变允许选择表达免疫球蛋白受体的B细胞,所述受体拥有增强的能力来识别和结合特异性外来抗原。该细胞系中所述有效重排的可变区中许许多多大部分非沉默的突变显示,已经在体内遭遇抗原的非原初B细胞也服从直接重编程。

[0332] B-iPS#4细胞系可能在细胞分选过程期间由污染性IgM+IgD⁻细胞产生,因为已经选择IgM+IgD⁺B细胞用于重编程,并且这种选择预期将只产生原初的成熟B细胞,因为经遇到抗原和体细胞高变的细胞下调IgD抗原(Matthias和Rolink,2005)。最后,在来自所有被分析的B-iPS细胞系的基因组DNA中检测C/EBP α 病毒转基因。上面描述的基因组分析提供了无可置疑的证据,iPS细胞系源于终末分化的成年成熟B细胞,所述B细胞已经在骨髓中完成了它们的成熟,携带预期的功能性重和轻链重排,并聚集于外周淋巴器官。

[0333] B-iPS细胞的发育潜能

[0334] 与最初的发育潜能实验一样,我们将8个B-iPS细胞系皮下注射到免疫缺陷(SCID)小鼠的背侧。注射之后六周,总计所有的注射过小鼠中,观察到肉眼可见的畸胎瘤。组织学检查显示,畸胎瘤包含代表所有三个胚胎胚层的细胞类型,包括内脏样上皮组织(内胚层)、横纹肌(中胚层)、软骨(中胚层)、神经组织(外胚层)和含有角蛋白的表皮组织(外胚层)。为了更严格评价它们的发育潜能,将单个B-iPS细胞系注射到二倍体(2N)胚囊中,导致从所有4个测试的B-iPS细胞系产生存活的、高贡献(high-contribution)的嵌合体(表5)。从B-iPS#4-和#1来源的嵌合体分离的基因组DNA的Southern印迹分析显示,所存在的对应于重排的Ig κ 等位基因的基因组片段与注射B-iPS细胞系的供体中观察到的那些相同。重要的是,由于衍生出携带组成型表达的慢病毒转基因EGFP载体的后代,显然B-iPS系#1促成所述种系,所述载体被用来在胚囊注射之前转导B-iPS系#1。

[0335] 通过四倍体互补(tetraploid complementation)产生小鼠代表了发育潜能的最严格测试,因为由此产生的胚胎只起源于注射的供体细胞,所述四倍体互补包括将全能细胞注射到4N宿主胚囊中(Eggan等,2001)。两种被测试的B-iPS系(#4和#9)都能够在注射到

4N胚胎囊中之后,产生中期-和晚期妊娠的“全B-iPS胚胎”。敏感PCR分析用于检测B细胞受体重链基因座的2Kb种系区域,该区域在开始遗传重排后丢失(Chang等,1992),敏感PCR分析显示,四倍体互补来源的B-iPS#4细胞系胚胎的基因组DNA已经丢失了种系条带并只携带D-J重排,这与供体核的所有组成成分进行的预测一样。通过对从B-iPS#4得到的E14.5天四倍体胚胎的基因组DNA进行Southern印迹分析,证实了这种结论,所述B-iPS#4证明有两个重排的Igk基因座等位基因,没有种系等位基因的任何证据。这与从2N嵌合体得到的DNA相反,所述2N嵌合体产生同样的2个重排的IgK等位基因和源于宿主胚胎衍生的细胞的种系条带。

[0336] 我们接下来测试重编程的成熟B细胞体内产生单克隆B细胞的能力,作为它们预重排的IgH和IgL基因座施加的限制的结果(Hochedlinger和Jaenisch,2002;Inoue等,2005;Oberdoerffer等,2003)。为了便于嵌合小鼠中B-iPS衍生细胞的分离,在胚胎注射之前,通过慢病毒载体介导的转导用GFP标记对B-iPS系#4和9进行标记。通过FACS染色评价从外周血纯化的CD19+细胞上表达的Igκ和Igλ轻链蛋白的表面表达。B-iPS#4起源的嵌合体中所有的GFP+B细胞表达Igκ链,而不是Igλ蛋白,与遗传分析显示了该细胞系中功能性Igκ轻链重排一致。相反,B-iPS#9细胞系来源的B细胞只携带功能性Igλ轻链重排。

[0337] 最后,我们建立两种B-iPS细胞系,其通过用Oct-4、Klf4、Sox2、c-Myc和C/EBPα直接感染遗传未修饰的成熟B细胞产生,生长在我们的研究所记载的相同培养条件下,并能够产生成年嵌合体。总之,我们的结果提供了不含糊的分子和功能证据,即含有功能性轻链和重链重排的成熟B细胞供体核被重编程为全能性。细胞系携带有效重链和轻链重排,表达全能性标记,产生活的嵌合体和有助于种系。

[0338] 成熟成年B细胞重编程为全能性的效率

[0339] 为了估算成熟成年B细胞重编程为全能性的效率,从成年嵌合体的脾分离的CD19+B细胞的大起始库(3×10^6)用编码携带新霉素抗性基因的逆转录病毒的C/EBPα感染。24小时之后,IgM+IgD+B细胞以单个细胞铺板在96-孔板中存在Dox和LIF的细胞因子条件培养基中的OP9基质细胞上。铺板五天后,嘌呤霉素和新霉素被加到培养基中,以便选择同样已经被C/EBPα感染的转基因B细胞(图4)。20天时,通过FACS筛选显示细胞生长的孔,用于检测Nanog-GFP+细胞。扩增计分为阳性的孔,3次传代以内出现Nanog-GFP iPS细胞。得到的B-iPS系的PCR分析证实,从两个独立实验得到的所有细胞系起源于C/EBPα感染的成熟B细胞,所述B细胞具有不同的B细胞受体重排。基于这些资料,我们能够通过将得到的GFP+孔的数量除以含有C/EBPα感染的转基因B细胞的孔(嘌呤霉素和新霉素双重抗性孔=输入)的数量,计算重编程效率。该计算提示,成熟B细胞直接重编程的相对效率是27-34个细胞中大约1个。我们把重编程的比较高的效率归于5种异位表达因子中4种的强Dox介导的诱导,所述诱导不依靠逆转录病毒载体感染和随机原病毒整合。

[0340] 表1. 初级iPS系概要

[0341]

最初长出 (挑取日)	GFP 表达	挑取后 生长	初级 iPS 系	GFP 阳性
1 (11)	-	+	-	-
2 (11)	-	+	-	-
3 (11)	-	-		
4 (11)	-		-	-
5 (11)	-	+	-	-
6 (11)	-	+	-	-
7 (11)	-	+	+	18
8 (11)	-	+	-	-

[0342]

9 (16)	-	+	+	20
10 (16)	-	+	+	20
11 (16)	+	+	+	18
12 (16)	-	-		
13 (16)	-	+	-	-
14 (16)	-	+	+	26
15 (16)	-	+	-	-
16 (16)	-	-		
17 (16)	-	+	-	-
18 (16)	-	+	-	-

[0343] 表2.次级iPS系概要

[0344]

第 16 天挑取的亚克隆	GFP 表达	挑取后生长	次级 iPS 系	GFP 阳性
1.1	-	+	+	28
1.2	-	+	-	-
1.3	-	+	+	30
4.1	-	+	-	-
4.2	-	-		
4.3	-	+	-	-
5.1	-	+	+	32
5.2	-	-		
5.3	-	-		
6.1	-	+	-	* **
6.2	-	+	-	* **
6.3	-	+	-	* **
8.1	-	+	+	28
8.2	-	+	+	36
8.3	-	-		

[0345] 表3. 遗传未修饰的iPS衍生的概要

[0346]

背景/类型	第 16 天挑取的	扩增的#	初级/次级 iPS 系
129/B6 F1/ MEFs	8	3	2
129/B6 F1/ TT	8	3	1
Balb/ MEFs	8	3	2
B6/DBA F1/ TT	8	3	1
全板 129/B6 F1/ MEF	-	5	5

[0347]

[0348] 表4. 胚囊注射概要

[0349]

细胞系	2N 注射			4N 注射		
	注射的胚 囊	活嵌合体	嵌合(%)	注射的胚 囊	死胚(停滞)	活胚(分析的)
OG-7	25	2	15-60	74	4 (E11-15) *	-
OG-7.3	18	1	40	-	-	-
OG-8.1	16	3	30-60	-	-	-
OG-9	nd	-	-	14	1 (E12.5)**	-
OG-10	18	3	20-40	-	-	-
OG-14	nd	-	-	42	4 (E11-14)	3 (E14.5)
129/B6 F1/MEFs	18	1 * * *	* * *	-	-	-
Balb/c MEFs	22	3 * * *	* * *	-	-	-

[0350] 表5. 胚囊注射概要

[0351] 基于毛色或EGFP表达估算嵌合的程度。ND, 不确定。4N注射的胚囊在E10.5和E14.5天之间分析。“分析”是指分析出的胚胎发育的日子;“停滞”是指估算的死胚发育阶段。

[0352]

细胞系	2N 注射				4N 注射		
	注射的胚囊	活嵌合体	嵌合	种系	注射的胚囊	死胚(停滞)	活胚(分析的)
iB-iPS #1	36	1	10-30	ND	ND	ND	ND
iB-iPS #4	95	5	40-70	是	ND	ND	ND
iB-iPS #8	20	2	50-70	否	ND	ND	ND
B-iPS #1	40	3	20-60	是	ND	ND	ND
B-iPS #2	24	2	30-50	否	ND	ND	ND
B-iPS #4	135	6	30-80	ND	115	7 (E10-14.5)	3 (E12.5) 2 (E14.5)
B-iPS #9	95	8	30-80	ND	90	5 (E9-12.5)	5 (E12.5)
B-iPS #121	46	3	30-60	ND	ND	ND	ND

[0353] 表6. 用于PCR分析Ig重排的引物

[0354] K:G或T, M:A或C, S:C或G, R:A或G, W:A或T, Y:C或T.

[0355]

正义寡核苷酸		
Igh 基因座	V _H J558	CGAGCTCTCCARCACAGCCTWCATGCARCTCARC
	V _H 7183	CGGTACCAAGAASAMCCTGTWCCTGCAAATGASC
	V _H Q52	CGGTACCAGACTGARCATCASCAGGACAAYTCC
	V _H Gam3.8	CAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAA
	DSF	AGGGATCCTTGTGAAGGGATCTACTACTGTG
IgL 基因座	V _λ 1	GCCATTTCCTCCAGGCTGTTGTGACTCAGG
	V _κ	GGCTGCAGSTTCAGTGGCAGTGGRTCWGGGRAC
反义寡核苷酸		
Igh 基因座	J _H 4	TCTCAGCCGGCTCCCTCAGGG
	J _H 4 (使用 DSF 引物)	AAAGACCTGCAGAGGCCATTCTTACC
IgL 基因座	J _λ 1,3	ACTCACCTAGGACAGTCAGCTTGGTTCC
	J _κ 5	ATGCGACGTCAACTGATAATGAGCCCTCTCC

[0356] 参考文献

[0357] 在此引用下列参考文献,它们的教导出于所有目的合并作为参考。

[0358] Alt,F.,et al.,Organization and reorganization of immunoglobulin genes in A-MULV-transformed cells:rearrangement of heavy but not light chain genes. (A-MULV转化的细胞中免疫球蛋白基因的组织 and 改组:重链而不是轻链基因的重排)Cell 27,381-390(1981).

- [0359] Aoi,T.,et al.,Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells.(从成年小鼠肝和胃细胞产生全能干细胞)Science.Science Online Express(2008).
- [0360] Avilion,J.,et al.,Nat.Biotechnol.20:1240-45(2003).
- [0361] Azuara,V.,et al.,Nat Cell Biol 8(5),532(2006).
- [0362] Bernstein,B.E.,et al.,A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells.(二价染色质结构标志胚胎干细胞中关键的发育基因)Cell 125,315-326(2006).
- [0363] Blelloch,R.,et al.,Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus.Stem cells(体细胞核移植之后重编程效率受到供体核的分化和甲基化状态的影响)Stem cells(Dayton,Ohio)24,2007-2013(2006).
- [0364] Boyer,L.A.,et al.,Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells.(人类胚胎干细胞中的核心转录调节线路)Cell 122,947-956 (2005)
- [0365] Boyer,L.A.,et al.,Nature 441(7091),349(2006).
- [0366] Brambrink,T.,et al.,Sequential Expression of Pluripotency Markers during Direct Reprogramming of Mouse Somatic Cells.(小鼠体细胞直接重编程期间全能性标记的相继表达)Cell Stem Cell 2,151-159(2008).
- [0367] Brambrink,T.,et al.,Proc Natl Acad Sci U S A 103(4),933(2006).
- [0368] Byrne,J.A.,et al.,Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer.(通过体细胞核移植产生灵长类动物胚胎干细胞)Nature 450, 497-502(2007).
- [0369] Chang,Y.,et al.,Enumeration and characterization of DJH structures in mouse fetal liver.(小鼠胎肝中DJH结构的列举和表征)The EMBO journal 11,1891-1899(1992).
- [0370] Chapman,V.,et al.,Nature,284(1984).
- [0371] Cobaleda,C,et al.,(2007a).Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors.(成熟B细胞通过去分化为未定向的祖细胞而转化成T细胞)Nature 449,473-477.
- [0372] Cobaleda,C,et al.,(2007b).Pax5:the guardian of B cell identity and function.(Pax5:B细胞身份与作用的护卫者)Nature immunology 8,463-470.
- [0373] Cowan,CA.,et al.,Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells.(与人类胚胎干细胞融合后体细胞的核重编程)Science(New York,NY 309,1369-1373(2005).
- [0374] Eads,CA.and P.W.Laird,Methods Mol Biol 200,71(2002).
- [0375] Eggan,K.,et al.,Hybrid vigor,fetal overgrowth,and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation.(通过核克隆和四倍体胚胎互补衍生的小鼠的杂交优势、胎儿过度生长和成活力)Proceedings of the

National Academy of Sciences of the United States of America 98(美国国家科学
研究院会议录98),6209-6214(2001).

[0376] Eggan,K.,et al.,Mice cloned from olfactory sensory neurons.(从嗅觉感
觉神经元克隆的小鼠)Nature 428,44-49(2004).

[0377] Gossen M.et al.,Transcriptional activation by tetracyclines,in
mammalian cells,(哺乳动物细胞中通过四环素转录激活)Science 268:1766-1769
(1995).

[0378] Grompe,M.(2005).The origin of hepatocytes.(肝细胞的起源)
Gastroenterology 128,2158-2160.

[0379] Gurdon,J.B.(2006).From nuclear transfer to nuclear reprogramming:the
reversal of cell differentiation.(从核移植到核重编程:细胞分化的反转)Annual
review of cell and developmental biology 22,1-22.

[0380] Hanna,J.,et al.,(2007).Treatment of sickle cell anemia mouse model
with iPS cells generated from autologous skin.(用从自身皮肤产生的iPS细胞治疗
镰刀形红细胞贫血病小鼠模型)Science 318,1920-1923.

[0381] Hanna,L.A.,et al.,Genes Dev.16:2650-61(2002).

[0382] Hayashi,E.A.,et al.,(2005).Role of TLR in B cell development:
signaling through TLR4promotes B cell maturation and is inhibited by TLR2.
(TLR在B细胞发育中的作用:通过TLR4发信号促进B细胞成熟并通过TLR2加以抑制)J
Immunol 174,6639-6647.

[0383] Hochedlinger,K.,and Jaenisch,R.(2002).Monoclonal mice generated by
nuclear transfer from mature B and T donor cells.(通过核移植从成熟B和T供体细
胞产生单克隆小鼠)Nature 415,1035-1038.

[0384] Hochedlinger,K.,and Jaenisch,R.,Nature 441(7097),1061(2006).

[0385] Hochedlinger,K.,et al.,Cell 121(3),465(2005).

[0386] Hochedlinger,K.&Jaenisch,R.Nuclear reprogramming and pluripotency.(核
重编程和全能性)Nature 441,1061-1067(2006).

[0387] Hogan et al.,Cold Spring Contain Laboratory Press,Cold Spring
Contain,New York,2003.

[0388] Holm,T.M.,et al.,Cancer Cell 8(4),275(2005).

[0389] Ihle,J.H.,Cell 84:331-334(1996).

[0390] Inoue,K.,et al.,(2005).Generation of cloned mice by direct nuclear
transfer from natural killer T cells.(通过从自然杀伤T细胞直接产生克隆小鼠)
Curr Biol 15,1114-1118.

[0391] Jaenisch,R.,Young(2008).Stem Cells,the Molecular Circuitry of
Pluripotency and Nuclear Reprogramming.(干细胞,全能性和核重编程的分子线路)
Cell 132.

[0392] Jaenisch,R.,N Engl J Med 351(27),2787(2004).

[0393] Jackson-Grusby,L.,et al.,Nat.Genet.27(1),31(2001).

- [0394] Jung,D.,et al.,(2006).Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus.(免疫球蛋白重链基因座处V(D)J重组的机制和控制)Annual review of immunology 24,541-570.
- [0395] Labosky,P.A.,et al.,Development 120(11),3197(1994).
- [0396] Laiosa,CV.,et al.,(2006).Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1transcription factors.(通过C/EBP α 和PU.1转录因子将定向的T细胞祖细胞重编程为巨噬细胞和树突状细胞)Immunity 25,731-744.
- [0397] Lee,T.I.,et al.,Cell 125(2),301(2006).
- [0398] Lengner,C.et al.Oct4is dispensable for somatic stem cell self-renewal.(Oct4对于体干细胞自我更新不是必要的)Cell Stem Cells submitted(2007).
- [0399] Lewis,S.,et al.,(1982).Continuing kappa-gene rearrangement in a cell line transformed by Abelson murine leukemia virus.(由Abelson鼠白血病病毒转化的细胞系中持续的 κ 基因重排)Cell 30,807-816.
- [0400] Li,E.,et al.,Cell 69,915(1992).
- [0401] Li,J.,et al.,(2007).Mice cloned from skin cells.(从皮肤细胞克隆的小鼠)Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(美国国家科学研究院会议录104),2738-2743.
- [0402] Li,J.,et al.,(2004).Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons.(通过从小鼠嗅觉感觉神经元核移植,重新安排气味受体基因)Nature 428,393-399.
- [0403] Loh,Y.H.,et al.,(2006).The Oct4and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells.(Oct4和Nanog转录网络调节小鼠胚胎干细胞中的全能性)Nature genetics 38,431-440.
- [0404] Lucifero,D.,et al.,Genomics 79(4),530(2002).
- [0405] Maherali,N.et al.(2007).Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution.(直接重编程的成纤维细胞显示整体表观遗传改造和广泛的组织贡献)Cell Stem Cells 1,55-70.
- [0406] (2)Maherali,N.et al.Global epigenetic remodeling in directly reprogrammed fibroblasts.(直接重编程的成纤维细胞中整体表观遗传改造)Cell Stem Cells in press(2007).
- [0407] Matthews,V.B.,et al.,(2004).Genetic manipulations utilizing albumin and alpha-fetoprotein promoter/enhancers affect both hepatocytes and oval cells.(利用白蛋白和 α 甲胎蛋白启动子/增强子影响肝细胞和卵圆细胞的遗传操纵)Hepatology 40,759-760.
- [0408] Matthias,P.,and Rolink,A.G.(2005).Transcriptional networks in developing and mature B cells.(发育和成熟B细胞中的转录网络)Nature reviews 5, 497-508.
- [0409] Meissner,A.,et al.,(2007).Direct reprogramming of genetically

unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells.(遗传未修饰的成纤维细胞直接重编程成为全能干细胞)Nature biotechnology 25,1177-1181.

[0410] Meissner,A.,et al.,Nucleic Acids Res 33(18),5868(2005).

[0411] Milne,CD.,et al.,(2004).IL-7does not prevent pro-B/pre-B cell maturation to the immature/sIgM(+)stage.(IL-7不阻止原-B/前B细胞成熟至不成熟/sIgM(+)阶段)European journal of immunology 34,2647-2655.

[0412] Mitsui,K.,et al.,Cell 113(5),631(2003).

[0413] Munsie M.J.,et al.,Curr.Biol.10:989(2000).

[0414] Nadel,B.,et al.,(1990).Murine lambda gene rearrangements:the stochastic model prevails over the ordered model.(鼠 λ 基因重排:随机模式胜过有序模式)The EMBO journal 9,435-440.

[0415] Nakagawa,M.,et al.,(2008).Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts.(从小鼠和人类成纤维细胞产生没有Myc的诱导全能干细胞)Nature biotechnology26,101-106.

[0416] Naviaux,R.K.,et al.,The pCL vector system:rapid production of helper-free,high-titer,recombinant retroviruses.(pCL载体系统:迅速产生没有辅助病毒、高滴度的重组逆转录病毒)J Virol 70,5701-5705(1996).

[0417] Oberdoerffer,P.,et al.,(2003).Expression of a targeted lambda 1light chain gene is developmentally regulated and independent of Ig kappa rearrangements.(定向 λ 1轻链基因的表达是受发育调节的并且不依赖Ig κ 重排)The Journal of experimental medicine 197,1165-1172.

[0418] Okano,M.,et al.,Cell 99,247(1999).

[0419] Okita,K.,et al.,(2007).Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells.(产生种系有效的诱导全能干细胞)Nature 448,313-317.

[0420] Papavasiliou,F.,et al.,(1997).V(D)J recombination in mature B cells:a mechanism for altering antibody responses(成熟B细胞中V(D)J重组:改变抗体反应的机制),Science 278,298-301.

[0421] Park,I.H.,et al.,(2008).Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors.(用确定的因子将人类体细胞重编程为全能性)Nature 451,141-146.

[0422] Peitz,M.,et al.,Proc Natl Acad Sci U S A 99(7),4489(2002).

[0423] Postic,C,et al.,(1999).Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase.(通过使用Cre重组酶敲除肝和胰腺 β -细胞特异性基因确定葡萄糖体内平衡中葡萄糖激酶的双重作用)The Journal of biological chemistry 274,305-315.

[0424] Ramji,D.P.,and Foka,P.(2002).CCAAT/enhancer-binding proteins: structure,function and regulation.(CCAAT/增强子结合蛋白:结构,功能和调节)The Biochemical journal 365,561-575.

- [0425] Rountree,CB.,et al.,(2007).A CD133-expressing murine liver oval cell population with bilineage potential.(CD133表达具有双种系潜能的鼠肝卵圆细胞群) Stem cells(Dayton,Ohio)25,2419-2429.
- [0426] Schlissel,M.S.(2003).Regulating antigen-receptor gene assembly.(调节抗原-受体基因组装)Nature reviews 3,890-899.
- [0427] Schlissel,M.S.,et al.,(1991).Virus-transformed pre-B cells show ordered activation but not inactivation of immunoglobulin gene rearrangement and transcription.(病毒转化的前B细胞显示有序活化而不是失活免疫球蛋白基因重排和转录)The Journal of experimental medicine 173,711-720.
- [0428] Shmblott,M.J.,et al.,Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells.(从培养的人类原始生殖细胞衍生全能干细胞) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:13726-13731(1998).
- [0429] Smith A.G.,et al.Nature 336:688-690(1988).
- [0430] Stadtfeld,M.,et al.,(2008).Defining Molecular Cornerstones during Fibroblast to iPS Cell-Reprogramming in Mouse.(定义小鼠中成纤维细胞至iPS细胞重编程期间的分子基石)Cell Stem Cell Advance Online Publication.
- [0431] Tada,M.,et al.,(2001).Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells.(体细胞通过与ES细胞体外杂交的核重编程)Curr Biol 11,1553-1558.
- [0432] Takahashi,K.,et al.,(2007).Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.(通过确定的因子从成年人类成纤维细胞诱导全能干细胞)Cell 131,861-872.
- [0433] Takahashi,K.,and Yamanaka,S.(2006).Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.(通过确定的因子从小鼠胚胎和成年成纤维细胞培养物诱导全能干细胞)Cell 126,663-676.
- [0434] Tan,D.S.,et al.,S.L.J.Am.Chem.Soc.120,8565-8566(1998).
- [0435] Teng,G.,and Papavasiliou,F.N.(2007).Immunoglobulin somatic hypermutation.(免疫球蛋白体细胞高变)Annual review of genetics 41,107-120.
- [0436] Thomson,J.A.,et al.,Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.(来源于人类胚囊的胚胎干细胞系)Science,282:1145-1147(1998).
- [0437] Urlinger S.,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.97(14):7963-8(2000).Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity.(探查四环素依赖性转录激活因子的序列空间:新突变产生扩大的范围和灵敏度)
- [0438] Ventura,A.,et al.,Proc Natl Acad Sci U S A 101(28),10380(2004).
- [0439] Wakayama,T.,and Yanagimachi,R.(2001).Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type.(用不同年龄和类型的核供体细胞的小鼠克隆) Molecular reproduction and development 58,376-383.

- [0440] Walsh,CP.,et al.,Nat.Genet.20(2),p116(1998).
- [0441] Wang,X.,et al.,(2003).The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells.(鼠卵圆细胞的起源和肝脏重定居能力)Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100(美国国家科学研究院会议录100)Suppl 1,11881-11888.
- [0442] Wang,Z.&Jaenisch,R.At most three ES cells contribute to the somatic lineages of chimeric mice and of mice produced by ES-tetraploid complementation.(至多三种ES细胞对嵌合小鼠和通过ES-四倍体互补产生的小鼠的体细胞系有贡献)Dev Biol 275,192-201(2004).
- [0443] Wernig,M.,et al.,(2007).In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state.(成纤维细胞体外重编程成为全能ES细胞样状态)Nature 448,318-324.
- [0444] Wernig,M.A.,et al.,(2008).c-Myc Is Dispensable for Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts.(C-Myc对于小鼠成纤维细胞的直接重编程不是必要的)Cell Stem Cell 2,10-12.
- [0445] Wernig,M.,et al.,J Neurosci 24(22),5258(2004).
- [0446] William R.L.,et al.,Nature 336:684-687(1988)
- [0447] Wilmut,I.,et al.,(1997).Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells.(源于胎儿和成年哺乳动物细胞的存活后代)Nature 385,810-813.
- [0448] Xie,H.,et al.,(2004).Stepwise reprogramming of B cells into macrophages.(B细胞逐步重编程成为巨噬细胞)Cell 117,663-676.
- [0449] Yamada,Y.,et al.,(1990).Regulation of the collagen II gene in vitro and in transgenic mice.(胶原II基因体外和在转基因小鼠中的调节)Ann.New York Acad.Sci.580,81-87.
- [0450] Yamanaka,S.Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells.(产生患者特异性全能干细胞的策略和新发展)Cell Stem Cells 1,39-49(2007).
- [0451] Yang,X.et al.Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning.(克隆胚胎的核重编程及其对于治疗克隆的意义)Nat Genet 39,295-302(2007).
- [0452] Yu,J.,et al.(2007).Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.(源于人类体细胞的诱导的多潜能干细胞系)Science(New York,NY 318,1917-1920.
- [0453] Zambrowicz B.P.et al.,Disruption of overlapping transcripts in the ROSA bgeo 26gene trap strain leads to widespread expression of b-galatosidase in mouse embryos and hematopoietic cells.(破坏ROSA bgeo 26基因陷阱株中的重叠转录物导致小鼠胚胎和造血细胞中b-半乳糖苷酶的广泛表达)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:3789-3794(1997).
- [0454] Zhu,D.,et al.,(2005).Deregulated expression of the Myc cellular

oncogene drives development of mouse "Burkitt-like" lymphomas from naive B cells. (Myc 细胞原癌基因的表达失调驱动小鼠从原初 B 细胞发育 "Burkitt 样" 淋巴瘤) Blood 105, 2135-2137.

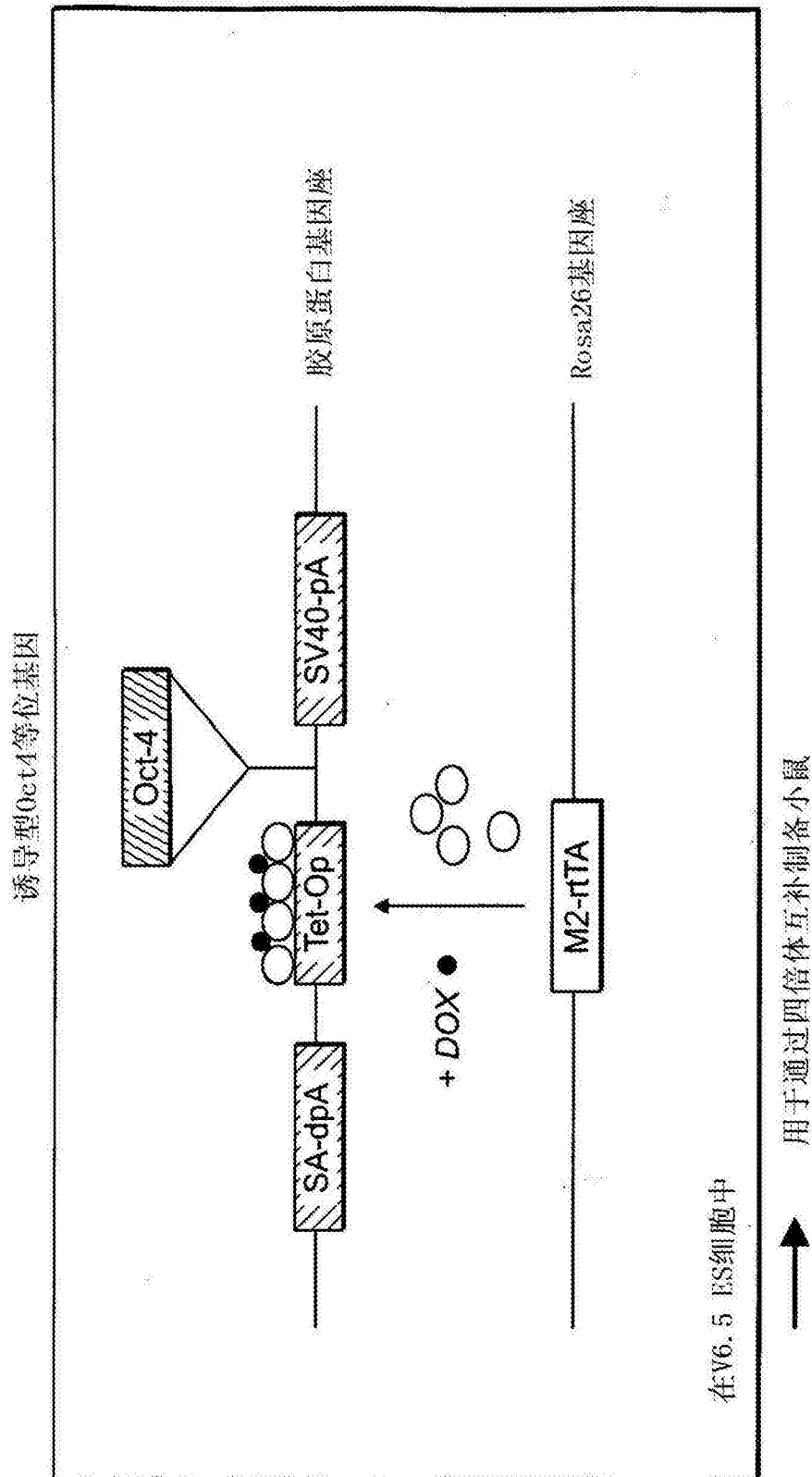


图1

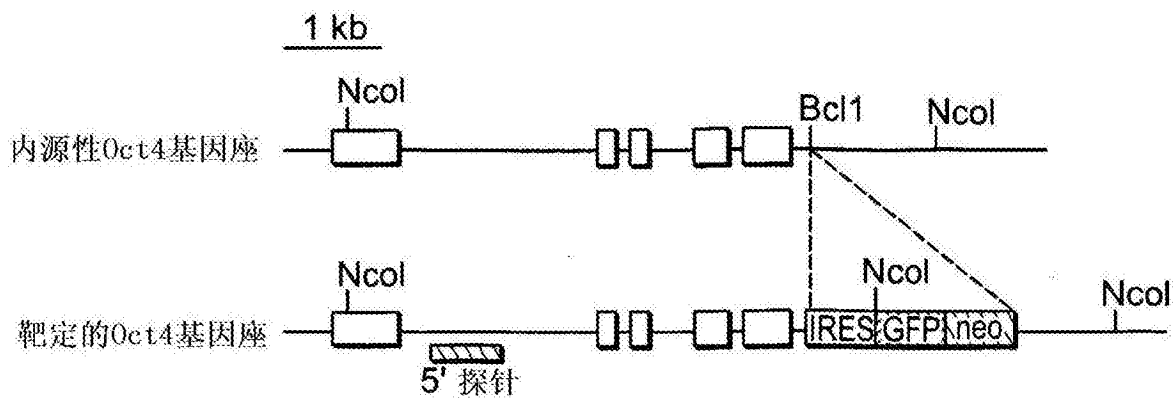


图2A

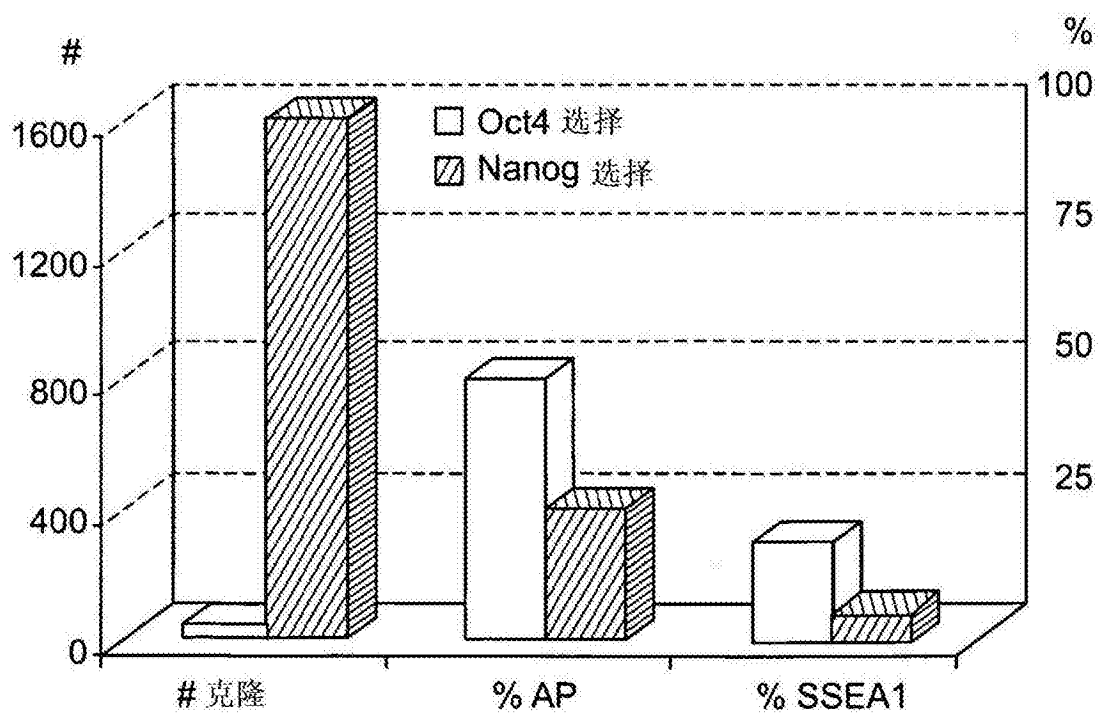


图2B

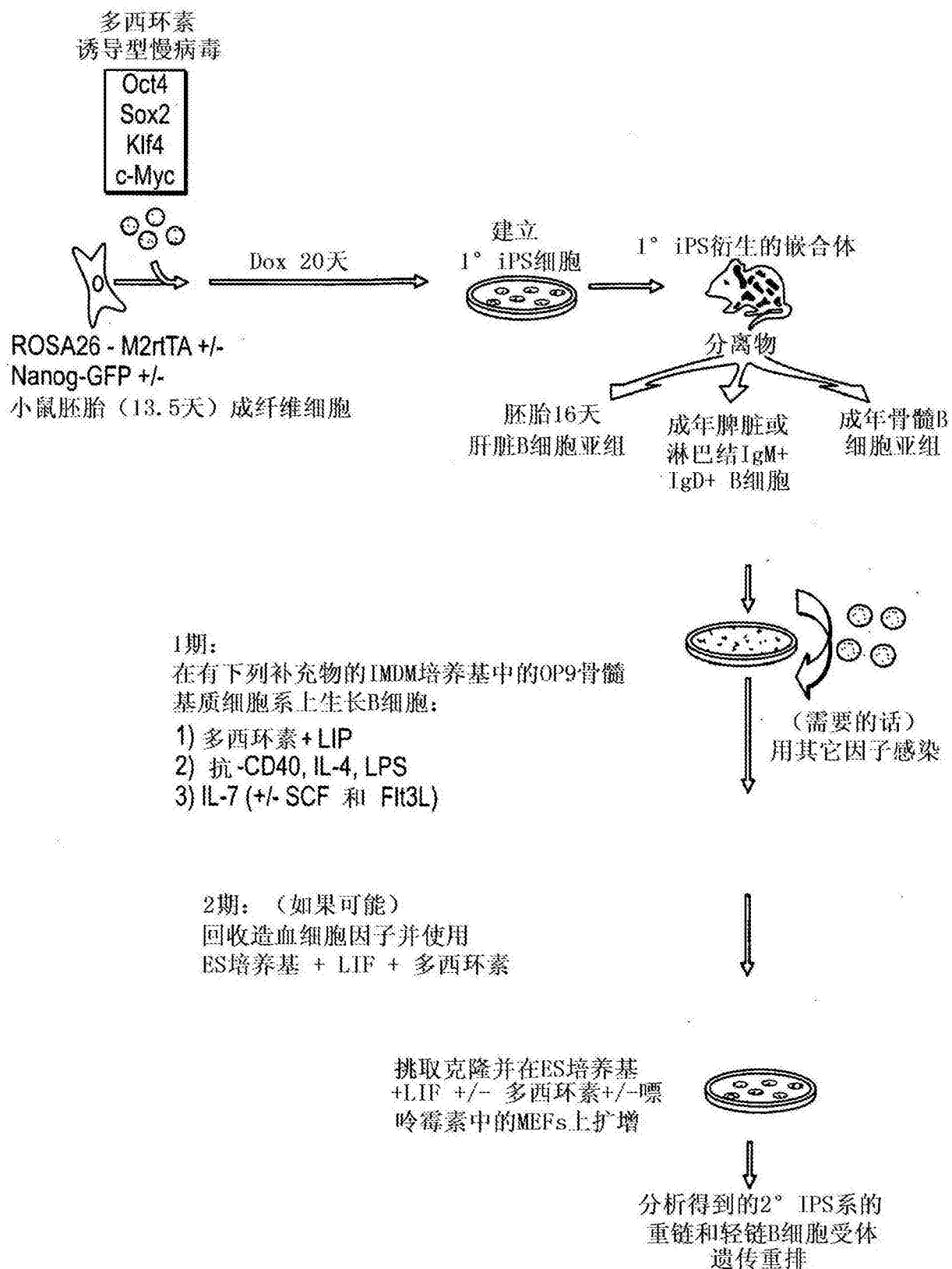
A

图3

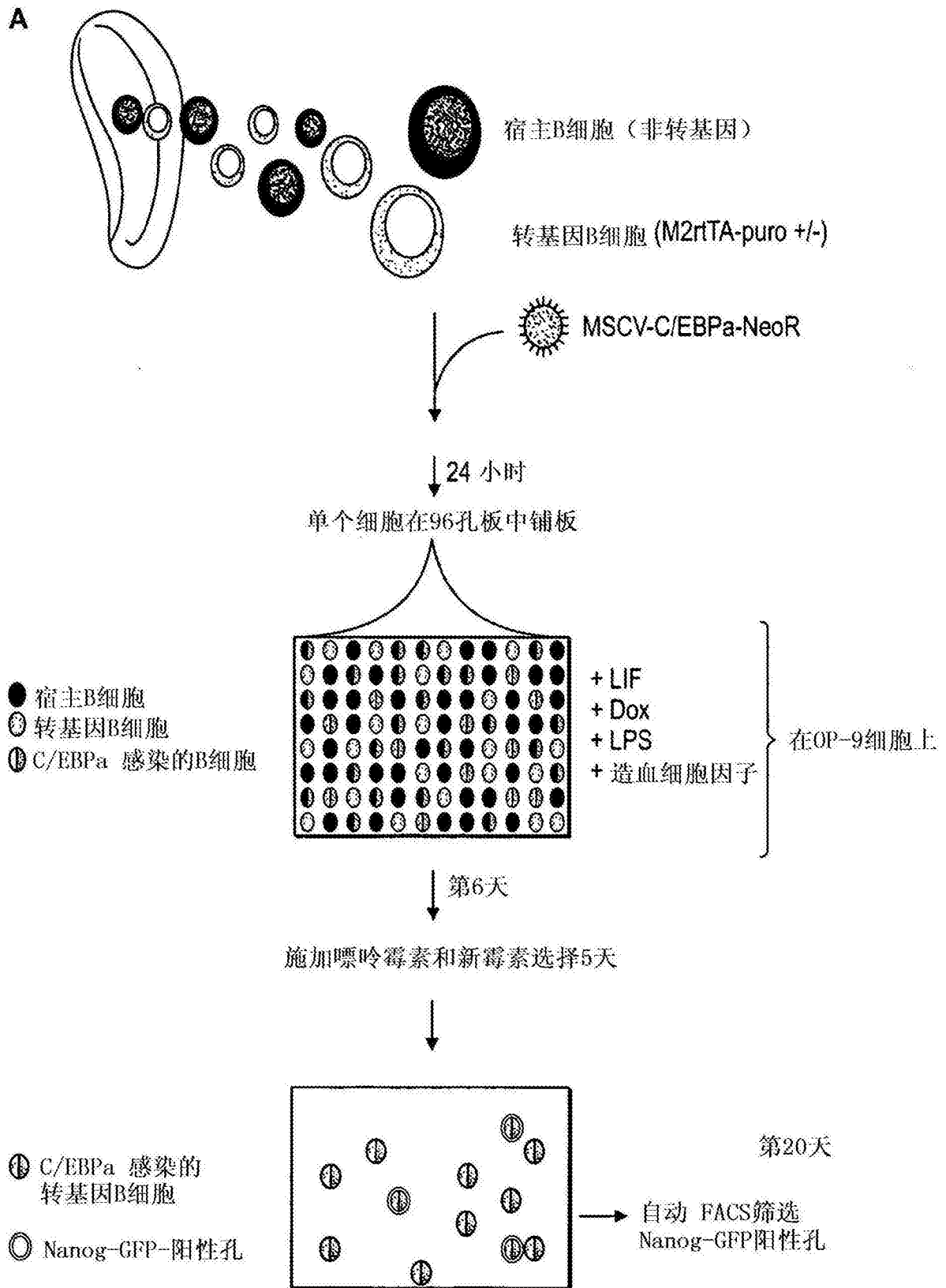


图4