(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102803473 A
(43)申请公布日 2012.11.28

(21)申请号 201080031517.7

(22)申请日 2010.05.25

(30)优先权数据
61/181,547 2009.05.27 US
12/700,545 2010.02.04 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2012.01.13

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2010/036086 2010.05.25

(87)PCT申请的公布数据
WO2010/138517 EN 2010.12.02

(71)申请人 先进细胞技术公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 I·克利曼斯卡雅 S-J·陆
R·兰扎

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 罗菊华

(51)Int.Cl.
C12N 5/07(2006.01)
C12N 5/00(2006.01)

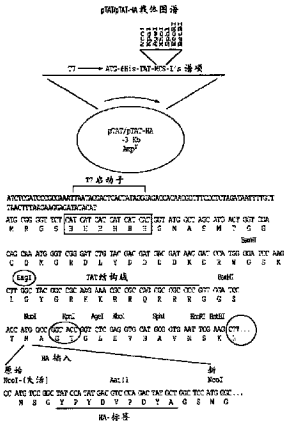
权利要求书 3 页 说明书 88 页 附图 24 页

(54)发明名称

基因完整诱导的多能细胞或转分化细胞及其产生方法

(57)摘要

本公开涉及对受体细胞（优选人体细胞）去分化和转分化的方法。这些方法将非所需基因组序列变异的风险降到最低。这些方法采用可单独使用或相互以某些组合方式使用的重编程因子。这些方法尤其应用于基于细胞的治疗、建立细胞系和产生基因修饰细胞的情况。



CN 102803473 A

1. 一种将非多潜能或非多能受体人或非人动物体细胞或其细胞核转化为多潜能或多能细胞或转化为细胞核或转化为不同细胞命运或细胞谱系的细胞或细胞核的方法，其包括：

提供非多潜能或非多能受体人或非人动物体细胞或非多潜能或非多能受体人或非人动物体细胞的细胞核；和

用包含至少一种重编程因子的至少一种重编程组合物处理所述受体细胞或所述非多潜能或非多能受体人或非人动物体细胞的细胞核，处理时间足以将所述人或非人动物受体细胞或含有所述经处理细胞核的胞质体转化为多潜能细胞或转化为不同细胞命运或细胞谱系的细胞。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中至少一种所述重编程因子由将至少一种重编程因子分泌至含有所述受体细胞或细胞核的水介质中的源细胞提供或者其中至少一种所述重编程因子由从多能细胞获得的细胞提取物提供。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述用重编程组合物处理所述受体细胞或细胞核的步骤包括使所述受体细胞接触所述重编程组合物不止一次和／或延长孵育期。

4. 根据权利要求 3 所述的方法，其进一步包括对所述受体细胞或细胞核进行表型监测以测量其出现一种或多种与多潜能或多能细胞有关的表型。

5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述表型监测包括选自以下的一项或多项测量：检测与多潜能或多能细胞有关的一个或多个基因的表达；检测一个或多个与多潜能状态有关的基因的启动子的甲基化状态和／或组蛋白乙酰化状态；测量工程化多潜能性或多能性报告子构建体的表达；和检测细胞形态。

6. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述重编程组合物包含 Oct4 多肽。

7. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述重编程组合物包含 Oct4 和／或 Nanog，所述 Oct4 和／或 Nanog 含有与报告子和／或促进所述多肽内化于所述细胞核中的部分任选地融合的多肽。

8. 根据权利要求 6 所述的方法，其中所述工程化多潜能性或多能性报告子构建体为 pOCT4-GFP 构建体。

9. 根据权利要求 6 所述的方法，其中通过所述表型监测确定使所述受体细胞或细胞核接触所述重编程组合物的间隔，以将所述受体细胞变成多潜能细胞所需的总持续时间缩到最短。

10. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述重编程因子基本上不含能够对所述受体细胞进行基因修饰的病毒。

11. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述重编程组合物包含重编程多肽。

12. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述重编程多肽基本上不含编码所述重编程多肽的多核苷酸。

13. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述重编程多肽包括至少一种促进所述重编程多肽进入所述受体细胞和／或促进所述重编程多肽进入所述受体细胞核中的蛋白质转导域。

14. 根据权利要求 13 所述的方法，其中每个蛋白质转导域均包括独立选自 SEQ ID NO：1-10 的任一多肽或其任一组合的多肽。

15. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述重编程多肽基本上不含能够对所述受体细胞进行基因修饰的病毒、转染培养基、链球菌溶血素 O、毛地黄皂苷、阴离子两亲性化合物、脂质体和促进多核苷酸进入受体细胞的其它组分。

16. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述重编程组合物包含一种或多种选自以下的多肽：Nanog、c-Myc、Oct4、Klf4、Sox2 和 Lin28。

17. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述重编程组合物包含 Oct4 或至少一种选自 Nanog、c-Myc、Klf4、Sox2 和 Lin28 的重编程多肽。

18. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述重编程多肽包含于供体细胞的细胞质中。

19. 根据权利要求 18 所述的方法，其中所述供体细胞选自卵母细胞、内细胞团细胞、桑葚胚细胞、胚泡细胞、ES 细胞、成人干细胞和原生殖细胞。

20. 根据权利要求 19 所述的方法，其中所述供体细胞已经过基因修饰以增强一种或多种选自 Nanog、c-Myc、Klf4、Sox2 和 Lin28 的重编程多肽的表达。

21. 根据权利要求 18 所述的方法，其中所述供体细胞的细胞质与所述受体细胞或细胞核为相同物种。

22. 根据权利要求 18 所述的方法，其中所述供体细胞的细胞质与所述受体细胞或细胞核为不同物种。

23. 根据权利要求 22 所述的方法，其中对于所述 Nanog、c-Myc、Oct4、Klf4、Sox2 和 Lin28 多肽而言，所述供体和受体细胞或细胞核物种之间蛋白质序列相似性的平均程度为至少 95%。

24. 根据权利要求 1 或 18 中任一项所述的方法，其中所述受体细胞或细胞核为人的，而所述供体细胞的细胞质或编程因子为人或非人灵长类来源。

25. 根据权利要求 24 所述的方法，其中所述非人灵长类选自人、黑猩猩、狒狒、猩猩、猕猴和大猩猩。

26. 根据权利要求 1 所述的方法，其中用重编程组合物处理所述受体细胞或细胞核的所述步骤选自以下：与脂质体融合；与去核的供体细胞融合；与含有至少一种重编程因子的细胞质泡囊融合或接触；电穿孔；显微注射；和在含有所述重编程组合物且任选包含细胞和／或细胞核进入试剂的培养基中培养所述受体细胞或细胞核。

27. 根据权利要求 26 所述的方法，其中所述细胞和／或细胞核进入试剂选自链球菌溶血素 O、毛地黄皂苷和阴离子两亲性化合物。

28. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述受体细胞为原代细胞或者其中所述受体细胞核源自原代细胞。

29. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述受体细胞选自成纤维细胞、神经细胞、星形细胞、胶质细胞和 Sox2 表达细胞。

30. 根据权利要求 1 所述的方法，其进一步包括用一种或多种选自以下的方法测试所述多潜能或多能细胞：

测量 DNA 甲基化、测量组蛋白乙酰化、核型分析、基因组测序、测量基因表达等，

由此确认所述多潜能细胞的同一性。

31. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述受体细胞或细胞核为人的，并且所述方法产生多能人干细胞或干细胞样细胞。

32. 一种治疗疾病的方法，其包括：

提供源自细胞供体的受体细胞或细胞核；

通过根据权利要求 1 至 31 中任一项所述的方法使所述受体细胞转变为多潜能或多能细胞；

任选地，对所述多潜能或多能细胞进行基因修饰；

任选地，通过引起、促进和 / 或加强分化为一种或多种细胞类型的处理来处理所述多潜能或多能细胞；和

将所述多潜能或多能细胞或源自其的分化细胞引入需要其的人或非人动物患者中；

其中所述多潜能或多能细胞与所述患者具有组织相容性。

33. 根据权利要求 32 所述的方法，其中所述细胞供体和所述患者为相同个体。

34. 根据权利要求 32 所述的方法，其中所述细胞供体和所述患者为不同个体。

35. 根据权利要求 32 所述的方法，其中所述多潜能或多能细胞的基因修饰包括提高与所述患者的组织相容性的修饰。

36. 一种重编程组合物，其包含至少两种选自 Nanog、c-Myc、Oct4、Klf4、Sox2 和 Lin28 的重编程多肽。

37. 根据权利要求 36 所述的重编程组合物，其包含 Oct4 和至少一种选自 Nanog、c-Myc、Klf4、Sox2 和 Lin28 的重编程多肽。

38. 根据权利要求 36 或 37 中任一项所述的重编程组合物，其进一步包含受体细胞或受体细胞核。

39. 根据权利要求 36 或 37 中任一项所述的重编程组合物，其中一种或多种所述重编程多肽连接至少一个蛋白质转导域。

40. 根据权利要求 39 所述的重编程组合物，其中每个所述蛋白质转导域均独立选自 SEQ ID NO：1-10 的任一多肽或其任一组合的多肽。

41. 根据权利要求 36 或 37 中任一项所述的重编程组合物，其中所述重编程多肽包含于供体细胞的细胞质中。

42. 根据权利要求 41 所述的重编程组合物，其中所述供体细胞的细胞质源自选自以下的细胞：未受精卵母细胞、受精卵母细胞、胚胎干细胞、iPS 细胞、畸胎瘤细胞、卵裂球和内细胞团细胞。

43. 根据权利要求 41 或 42 中任一项所述的重编程组合物，其中所述供体细胞的细胞质源自经处理而引起一种或多种选自 Nanog、c-Myc、Oct4、Klf4、Sox2 和 Lin28 的重编程多肽表达的细胞。

44. 根据权利要求 41 所述的重编程组合物，其中所述供体细胞的细胞质与所述受体细胞或细胞核为相同物种。

45. 根据权利要求 41 所述的方法，其中所述供体细胞的细胞质与所述受体细胞或细胞核为不同物种。

46. 根据权利要求 45 所述的方法，其中对于所述 Nanog、c-Myc、Oct4、Klf4、Sox2 和 Lin28 多肽而言，供体和受体细胞物种之间蛋白质序列相似性的平均程度为至少 95%。

47. 根据权利要求 1 所述的方法，其产生多能人细胞或细胞核。

基因完整诱导的多能细胞或转分化细胞及其产生方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请为美国序列号12/700,545的部分继续申请(律师签号75820.005011,2010年2月4日提交),其要求2009年5月27日提交的美国临时申请序列号61/181,547(律师签号75820.000002)的权益。上述各申请的内容据此通过引用整体并入,并入程度使得所述申请内容不与本文所含的公开内容相抵触。

[0003] 背景

1. 技术领域

[0004] 本公开涉及对受体细胞或受体细胞核(优选人体细胞或人体细胞核)重编程(去分化和转分化)的方法和材料。这些方法尤其应用于基于细胞的治疗、组织移植、建立细胞系和产生基因修饰细胞和嵌合体动物或转基因动物的情况。

[0005] 另一方面,本公开涉及"去分化"和/或改变所需受体细胞(优选人体细胞)寿命的方法。这些方法尤其应用于基于细胞的治疗和产生基因修饰细胞的情况。

[0006] 另一方面,本公开涉及实现体细胞转分化的方法。转分化是将细胞由一种分化细胞类型转化为另一种分化细胞类型。

[0007] 另一方面,本公开通常涉及将动物体细胞由一种特定分化状态重编程为另一种状态的方法,和这种细胞和组织在治疗人疾病和年龄相关病状中的用途。更具体地讲,本公开涉及利用三步法的改进方法,由此首先将体细胞核的核被膜重塑为未分化细胞或生殖谱系细胞的核被膜,然后第二步将重塑的细胞核转移至卵母细胞或未分化细胞的细胞质中。该核重塑步骤明显提高了重塑细胞核转移至胚胎或生殖谱系细胞质内以便干细胞衍生时的细胞重建效率。另外,去除对分化细胞有特异性的核被膜组分(例如核纤层蛋白A)和重编程染色质导致端粒酶活性再激活,加长端粒长度和修复串联重复DNA序列的同源重组机制。当通过这些方法得到多能干细胞时,多能干细胞可用于治疗心脏、神经、内分泌、血管、视网膜、皮肤、肌肉骨骼病症和其它疾病的新型治疗策略中。

[0008] 2. 相关技术描述

[0009] 干细胞技术的进展,例如人胚胎干(hES)细胞的分离和使用,已成为医学研究中的新的重要主题。hES细胞具有经证实分化为人体各种细胞类型(包括复合组织)的潜能。hES细胞的这种能力表明由细胞功能异常引起的许多疾病可通过施用各种分化类型的hES源细胞来进行治疗(Thomson等,Science.1998年11月6日;282(5391):1145-7)。核移植研究证明了可将分化的体细胞转化回全能状态,例如ES或ED细胞的全能状态(Cibelli等,Nat Biotechnol.1998年7月;16(7):642-6)。通过核移植将体细胞重编程回全能ES细胞状态的技术发展提供了一种递送具有患者核基因型的ES源体细胞的方法(Lanza等,Nat Med.1999年9月;5(9):975-7)。尽管存在同种异体线粒体,但期望此类细胞和组织不被排斥(Lanza等,Nat Biotechnol.2002年7月;20(7):689-96)。核移植还允许通过再激活早期胚胎中端粒酶催化组分来改造细胞中的端粒重复长度(Lanza等,Science.2000年4月28日;288(5466):665-9)。

[0010] 由于获得足够数量的人卵母细胞相对困难，人们对确定其它生殖谱系细胞，例如培养的ES细胞或来自所述细胞的细胞质是否可用于重编程体细胞产生了极大兴趣。由于这种细胞可易于在数量上体外扩增，所以在作为诱导重编程的方式上优于卵母细胞很多。与ES细胞融合后，在体细胞中观察到至少一些测量的胚胎特异性基因的表达恢复（Do和Scholer，Stem Cells.2004；22(6)：941-9；Do和Scholer，Reprod Fertil Dev.2005；17(1-2)：143-9）。然而，所得到的细胞为杂种且通常具有四倍体基因型，因此不适合作为用于移植的正常或组织相容性细胞。实际上，提出的生成自体全能细胞的一个目的是为了防止排斥ES源细胞。使用这些公开研究中描述的技术，因此用于重编程患者细胞的ES细胞很可能增加可产生导致排斥的免疫反应的等位基因。尽管如此，ES细胞可重编程体细胞染色体的证据令研究者兴奋并且形成了称为“融合生物学”的新研究领域（Dennis，Nature 426：490-491，(2003)）。

[0011] 然而，ES细胞研究受到围绕使用非期望IVF胚胎生成ES细胞和并不打算用于受精和妊娠而用于替代性方法以生成患者免疫相容细胞供再生医学应用的捐赠卵母细胞的争论的阻碍。目前许多国家对胚胎干细胞研究加以限制，包括对可用国家基金的限制以及对卵母细胞和胚胎使用的严格方针，从而导致该领域进展缓慢。而且，基于ES细胞治疗的临床有用性将受限制，除非可用不同组织相容性细胞来匹配个体患者。

[0012] 能够重编程比人卵母细胞更具可用性的人体细胞的另一潜在细胞来源为动物物种的卵母细胞。可通过跨物种核移植恢复体细胞全能性的证实（Lanza等，Cloning.2000；2(2)：79-90）为鉴定可易于获得用于重编程人细胞的动物卵母细胞开创了可能性（Byrne等，Curr Biol.2003年7月15日；13(14)：1206-13）。然而，尽管跨物种核移植是可能的，但其通常比同物种核移植效率更低，这可能是由于物种间的分子差异。

[0013] 因此，各种重编程人体细胞的方法均存在困难。SCNT提供了令人满意的重编程水平，但受到研究者可用的人卵母细胞数量的限制。跨物种核移植和细胞融合技术通常不受用于重编程的细胞限制，但受成功重编程程度或所得到的重编程细胞的生长强度限制。

[0014] 使用供体细胞的细胞质进行去分化的替代方案是引入限定因子。为鉴定一组可使用的去分化因子，Takahashi和Yamanaka(2006年8月25日；126(4)：663-76）通过逆转录病毒转导将候选基因引入小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）。每个逆转录病毒载有单个候选基因，并且候选基因的组合通过多次感染引入。还对MEF进行工程改造，以在ES细胞特异性Fbx15启动子的控制下表达选择性标记，使得在抗生素G418存在下的细胞存活依赖于成功去分化。通过测试不同因子的组合，作者证实4种转录因子基因（Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4）的组合产生称为诱导的多能（iPS）细胞的ES样多能细胞。Yu等使用类似方法（Science.2007年12月21日；318(5858)：1917-20）、通过病毒整合编码Oct4、Sox2、Nanog和Lin28的基因生成人iPS细胞。

[0015] 虽然逆转录病毒转染是同时将多个基因递送至体细胞内的有效方法，但将其用于去分化出现安全忧虑。因为这些方法导致多个基因在多个位点整合，难以使用切除转基因（例如，Cre-Lox和FLP-FRT）的靶向技术，因为可能导致非期望的缺失和其它染色体内和染色体间基因组重排。而且，插入逆转录病毒载体可能威胁转染的细胞基因组的完整性，（例如）通过影响非靶向基因，通过整合非所需病毒序列和通过异常表达导致恶性肿瘤的整合基因。实际上，再激活逆转录病毒携带的c-Myc导致在约50％由iPS细胞培育的嵌合体小

鼠体内形成肿瘤(Okita 等,Nature.2007 年 7 月 19 日;448(7151):313-7)。

[0016] 鉴于上述,需要安全有效的方法对细胞去分化或转分化。所需方法要避免使用胚胎或胚胎源物质,并且还要避免非所需的基因组序列变异。尤其是需要提高重编程分化体细胞和生成重编程细胞的频率和质量的方法,所述重编程细胞能够体外扩增以获得可用数量的细胞进行研究、测试以便质量控制和用于基于细胞的治疗。优选地,这些方法提供了用于治疗的患者来源的细胞的可行来源。

[0017] 发明概述

[0018] 申请人描述了用于对体细胞(优选人体细胞)重编程或转分化的方法和材料,所述体细胞可任选地经基因修饰,使其包含异种核酸序列,并且可通过新方法生成 iPS 细胞将基因组序列变异的风险降到最低,并且延长细胞寿命和减轻衰老。这些方法采用包含或编码一种或多种内源性或重组重编程因子或功能片段、变异体或融合多肽或细胞提取物的组合物,所述细胞提取物含有所述内源性重编程因子以"重编程"所需供体或受体细胞或细胞核或其染色体 DNA,优选地人体细胞或细胞核或其染色体 DNA。如以下所定义,本公开中"重编程"预期涵盖任何使用含有或编码一种或多种内源性或重组重编程因子或功能片段、变异体或含有的融合多肽的组合物将供体或受体细胞或细胞核转化为低分化或去分化或恢复细胞(例如,诱导的多能细胞或胚胎干细胞或成人干细胞或相对于亲本细胞寿命延长的细胞,证据为,例如,相对于亲本细胞端粒增多或细胞分裂增加)或将体细胞或细胞核转分化为含有所述细胞核的细胞或胞质体或不同细胞类型或谱系的细胞的方法。在示例性实施方案中,重编程因子包括内源性或重组的重编程多肽或功能片段、变异体或含有的融合多肽,例如其可构成供体细胞的细胞质,可经重组合成或生成,可任选包括一个或多个修饰,并且可任选被纯化。在某些实施方案中,重编程多肽包括 Nanog、Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4 和 Lin28 的一个或多个多肽或含有的功能片段、变异体或融合多肽。另外,一个或多个重编程多肽可连接促进 ES 细胞进入和/或核易位的细胞核或蛋白质易位域。

[0019] 由这些方法制备的复原或转分化或重编程细胞和细胞核可用于许多应用,包括(例如)基于细胞的治疗和异源蛋白质的表达。用于基于细胞的治疗的细胞可源自患者或组织相容性供体。另外,用于基于细胞的治疗的细胞可被基因改造以改变其组织相容性特征。如前所述,细胞任选包括所需基因修饰,例如避免与特定遗传性疾病(例如囊性纤维化、ALD、镰刀形红细胞贫血病、癌症、自身免疫疾病)有关的基因异常的基因修饰,和/或基因修饰以供治疗多肽或免疫调节子表达(组成型、调节或组织特异性)。

[0020] 在一个优选实施方案中,本公开提供了通过用包含来自未分化或大体上未分化细胞(优选卵母细胞或卵裂球或另一胚细胞类型(例如,胚胎干细胞))的细胞质的细胞源性提取物并置或孵育供体细胞或其细胞核来生成已去分化和/或改变(延长)其寿命的重编程细胞核和细胞(优选哺乳动物细胞并且最优选人细胞)的新方法。在一个特别优选的实施方案中,本发明将用于生成更具原始状态的细胞,尤其是胚胎干细胞或内细胞团细胞。

[0021] 另一方面,本公开提供了通过向这些细胞或其细胞核引入或使其接触含有来自更原始的低分化细胞类型(例如,卵母细胞或卵裂球或 ES 细胞)的细胞质的组合物来对所需"受体"细胞(例如,人体细胞)去分化或改变其寿命的方法。在示例性实施方案中,这些方法可用于通过使所需细胞受多次基因修饰而不衰老以生成胚胎干细胞并提高基因治疗功效。这种细胞质可分离和/或进行扣除杂交并且通过重组方法鉴定和生成活性物质(足以

去分化）。

[0022] 另一方面，本申请提供用于对所需细胞重编程即“去分化”和／或改变其寿命的方法，（例如）通过向细胞或细胞核引入或以足以实现去分化或延长细胞或含有该细胞核的细胞的寿命的时间使其接触来自另一细胞（例如，低分化细胞）的细胞质，然后将去分化细胞或细胞核移植至替代胞质体，例如来自低分化细胞的ES细胞，优选卵母细胞或卵裂球或另一胚细胞类型。

[0023] 另一方面，本申请提供了在基因修饰之前、同时或之后改变所需细胞寿命和／或对所需细胞去分化的方法，所述所需细胞通常为哺乳动物分化细胞。

[0024] 另一方面，本申请提供了细胞治疗的改进方法，其中改进包括施用已经通过引入从低分化或未分化状态的细胞（优选卵母细胞或卵裂球）获得的细胞质去分化或寿命改变的细胞，或将来自所述体细胞的细胞核置于含有卵母细胞或卵裂球胚胎提取物或ES细胞或从中纯化的蛋白质的溶液中。

[0025] 另一方面，本申请提供了（例如）通过分离或扣除杂交，即分离蛋白质、RNA或DNA来鉴定卵母细胞细胞质中负责去分化和／或改变细胞寿命的组分。

[0026] 另一方面，本申请提供了通过施用治疗有效量的从大体上未分化或未分化细胞（优选卵母细胞或卵裂球）获得的细胞质或其纯化活性组分来治疗（尤其皮肤）的方法。

[0027] 另一方面，本申请提供了供治疗、皮肤病学和／或美容使用的新型组合物，所述组合物含有从大体上未分化或未分化细胞，优选卵母细胞或卵裂球获得的细胞质或其纯化活性组分。

[0028] 另一方面，本申请提供了用于基于细胞的治疗的细胞，已通过引入包含来自大体上未分化或未分化细胞，优选卵母细胞或卵裂球获得的细胞质或其纯化活性组分而“去分化”所述细胞或改变其寿命。

[0029] 另一方面，本申请提供了通过核移植克隆的改进方法，其中所述改进包括将供体细胞或细胞核用作已通过接触包含来自大体上未分化或未分化细胞的细胞质或其纯化活性组分的组合物或用所述组合物孵育或向其中引入所述组合物而被去分化或其寿命被改变的细胞，或跨物种NT，其中表达所述纯化活性组分以促进重编程。

[0030] 另一方面，本申请提供了通过使细胞核接触包含来自卵母细胞、卵裂球、ES或其它胚胎细胞类型的细胞质的组合物而恢复细胞核的方法。

[0031] 另一方面，本申请提供了鉴定蛋白质或核酸序列的筛选测定，所述蛋白质或核酸序列是与细胞质或源自来自卵母细胞、卵裂球、ES细胞或所有重编程中涉及的其它胚胎细胞类型的细胞质成分接触后由分化细胞所释放。

[0032] 另一方面，本申请提供了筛选测定，例如差示杂交或扣除杂交以鉴定细胞编程中涉及的卵母细胞细胞质或胚胎细胞类型中表达的mRNA。

[0033] 所得的细胞用于基因和细胞治疗，并且作为供体细胞或细胞核用于核移植。

[0034] 本公开还提供了一种实现体细胞或细胞核转分化（即，将一种细胞类型的体细胞或细胞核转化为不同细胞类型的体细胞或细胞核）的方法。可通过在选自以下的至少一种试剂的存在下培养体细胞或细胞核来实施所述方法：(a) 细胞骨架抑制剂和 (b) 乙酰化抑制剂和 (c) 甲基化抑制剂；并且还在诱导分化为不同细胞类型的试剂或条件存在下培养细胞。所述方法可用于生成用于细胞治疗的组织相容性细胞。

[0035] 本公开还涉及获得具有与哺乳动物发育胚胎或胎儿类似的基因表达模式的哺乳动物细胞和组织的方法，和这种细胞和组织在治疗人疾病和年龄相关病状中的用途。更特别地，本公开包括鉴定、在培养中扩增和制备基因表达模式不同于成人细胞的哺乳动物多能干细胞和分化细胞的方法，因此提出了提供治疗变性疾病的新型治疗策略的独特特征。

[0036] 本公开还提供了动物体细胞的重编程方法，衍生、制备方法和所得到的重编程细胞和工程化组织在预防和治疗疾病的治疗方案中的用途。更具体地讲，本公开提供了将分化细胞重编程为未分化状态、延长端粒长度并因此延长复制寿命，从而生成具有与原始分化细胞基因型相同的核基因型的多种干细胞和所得到的分化细胞的改进方法。

[0037] 本方法也可用于分析核重编程和/或生成供研究和治疗用的分化细胞的机制。所述方法代表现有技术的改进，例如人体细胞核移植 (SCNT)，所述技术用于将动物体细胞去分化为胚胎状态，从而生成 hES 细胞。本公开提供了通过将细胞重编程分为至少 2 个单独步骤或优选 3 个单独步骤，将来自供体细胞源的细胞质组分用于一些所述步骤中改进现有技术的方法，其中所述供体源为来自与卵母细胞不同物种的分化细胞。使用来自与卵母细胞不同物种的供体细胞源使易于进入重编程物质，降低成功重编程程度和分化细胞重编程过程的扩大比例。在一个实施方案中，通过由以下 3 个步骤组成的新型重编程技术将分化体细胞重编程为未分化状态：在第一步骤（称为核重塑步骤）中，提高了体细胞基因组的重编程程度，并且通过使用若干新型重编程方法的任一种或其组合缓和了进入与体细胞相同物种的卵母细胞的问题。在所有这些新方法中，重塑体细胞核以用未分化细胞组分代替核被膜组分。同时，或在足够早以防止体细胞分化组分并入核被膜的时间点，重编程所述细胞的染色质以表达未分化细胞的基因。第一步骤优于现有 SCNT 技术，因为不需要与体细胞相同物种的卵母细胞；进一步地，可达到更高的重编程质量。

[0038] 在第二步骤（本文称为细胞重建步骤）中，含第一步骤中的重塑核被膜的细胞核转移到未分化胚胎细胞的去核细胞质中，或与含有必需有丝分裂器的细胞质泡囊融合，所述有丝分裂器能够与转移的细胞核一起生成未分化干细胞群，例如能够增殖的 ES 或 ED 样细胞。第二步骤优于 SCNT，因为第一步骤中重塑的大量细胞核或染色体团块可能同时与第二步骤的细胞质泡囊融合，以增加获得能够在体外成功增殖的重编程细胞的可能性，从而形成大量培养的重编程细胞。在第三步骤中，由第二步骤产生的一个或大量细胞产生的细胞集落特征在于重编程程度和核型正常，并且选择高质量的集落。虽然这第三步骤成功编程细胞并不需要并且在本方法的一些应用中并不必要，所述应用例如在分析用于多种用途的重编程分子机制中，例如当重编程用于人移植的细胞时，但优选包括第三步质量控制。通过重复步骤 1-2 或 1-3 可回收核型正常但重编程程度不足的重编程细胞集落。

[0039] 在另一个实施方案中，在第一步骤中通过将一个或大量渗透化或非渗透化体细胞转移至另一物种的卵母细胞中来重塑细胞核。然后去除所得到的重塑细胞核，并在第二步骤和第三步骤中进一步加工。在另一个实施方案中，在第一步骤中通过将分离的体细胞核暴露于来自有丝分裂细胞，例如中期 II 卵母细胞、中期生殖谱系细胞（例如 EC 细胞系 NTera-2）的提取物或相同或不同物种的有丝分裂体细胞的提取物凝聚为染色体团块而重塑体细胞的基因组。然后在第二步骤和第三步骤中进一步加工所述染色体团块，并且如果细胞未显示可接受的重编程程度，则重复前述步骤。在另一个实施方案中，在第一步骤中通过将分离的体细胞核暴露于来自有丝分裂细胞，例如中期 II 卵母细胞、中期生殖谱系细胞

（例如 EC 细胞系 NTera-2）的提取物或相同或不同物种的有丝分裂体细胞的提取物凝聚为染色体团块而重塑体细胞的基因组。然后接着使用来自未分化细胞的提取物将所述染色体团块封装在体外的新核被膜中。然后在第二步骤和第三步骤中进一步加工所得到的重塑细胞核，如果细胞未显示可接受的重编程程度，则重复前述步骤。另外，重塑细胞核和细胞可用于分析重编程机制的测定中。

[0040] 在另一个实施方案中，未分化细胞（例如，EC 细胞、ES 细胞等）中表达的一个或多个因子在未分化细胞提取物中瞬时表达或过度表达，或者将步骤 1 和 / 或步骤 2 的细胞作为蛋白质加入所述细胞提取物中。这些因子的表达可赋予体细胞未分化细胞的特征并且促进体细胞重编程。这种因子包括（例如）NANOG、SOX2、DNMT3B、CROC4、H2AFX、HIST1H2AB、HIST1H4J、HMGB2、LEFTB、MYBL2、MYC、MYCN、NANOG、OCT3/4(POU5F1)、OTX2、SALL4、TERF1、TERT、ZNF206 或上述因子的任一组合或赋予未分化细胞状态的特征的任何其它因子（例如转录调节子）。尤其，可使用任何数量的上述因子或其组合，其选择可取决于重编程或去分化体细胞的谱系。在另一个实施方案中，本方法第一步骤中各种体外重编程用作核重编程的体外模型用于分析重编程的分子机制。例如，可向提取物加入或从其中去除特定分子组分以确定某些组分在重编程和细胞谱系确定中的作用。

[0041] 在另一个实施方案中，然后相应地将经确定在以上测定中或通过其它方式鉴定的重编程中起重要作用的各种组分并入重编程提取物或从其中去除以提高相同物种或跨物种重编程法中的重编程效率。这种分子包括但不限于人蛋白质组分、纯化 RNA，包括来自卵母细胞、卵裂球、桑葚胚、ICM、胚盘、ES 细胞、EG 细胞、EC 细胞或其它生殖谱系细胞的 miRNA。在 1-3 任一步骤期间均可加入或去除所述组分。可通过例如免疫沉淀反应等方法去除特定组分。在另一个实施方案中，重复步骤 1-2，如第一步骤，然后第二步骤，然后第一步骤，然后第二步骤，直至第三步骤中的表征证实体细胞重编程成功。另一方面，来自未分化或生殖谱系细胞的胞质体耗尽线粒体以使得在第二步骤之前、期间或之后向细胞系中加入供体细胞线粒体而产生重编程细胞，其中线粒体基因型以及核基因型与供体分化细胞相同。在另一个实施方案中，将未分化细胞因子，例如 SOX2、NANOG、DNMT3B、CROC4、H2AFX、HIST1H2AB、HIST1H4J、HMGB2、LEFTB、MYBL2、MYC、MYCN、NANOG、OCT3/4(POU5F1)、OTX2、SALL4、TERF1、TERT、ZNF206 加入到来自步骤 2 的未分化或生殖谱系细胞的胞质体或细胞质泡囊中。在特定实施方案中，向胞质体加入 2、3、4 或 5 种因子。在其它实施方案中，向胞质体加入 6 种或更多种因子。另一方面，由于使用步骤 1-2 或 1-3 产生的重编程细胞在若干体外、体内或体外分化条件下分化，以获得 3 种原胚层（内胚层、中胚层或外胚层）的任一种或其组合的细胞，包括复合组织，例如畸胎瘤内形成的组织。在某些实施方案中，分化细胞类型源自本方法的重编程细胞，而不生成 ES 细胞系。例如，通过在至少一种分化因子存在下培养未分化的重编程细胞并从培养物中选择分化细胞获得分化细胞。可根据表现型，例如表达分化细胞上存在的某些细胞标记，或者通过功能测定（例如，实现特定分化细胞类型的一种或多种功能的能力）。通过本方法获得的分化细胞包括但不限于成人干细胞、胰腺 β 细胞和胰腺前体细胞。在另一个实施方案中，通过添加、缺失或修饰其 DNA 序列对根据本方法重编程的细胞进行基因修饰。可通过任意并入外源载体，通过基因打靶或通过使用人工染色体进行这种修饰。在本方法的另一个实施方案中，通过加入来自已知同源重组水平较高的细胞（例如，DT40）的提取物修饰第一步骤中进行重塑的细胞核。步骤 2 重建和步骤 3 筛选之

后，加入 DNA 靶向构建体和来自容许较高同源重组水平的细胞的提取物将获得具有所需基因修饰的细胞。

[0042] 另一个实施方案为将使用所述方法生成的细胞商业化的商业模型。商业模型包括将人分化体细胞转移至区域中心，其中进行重编程步骤 1、2、1-2 或 1-3。在另一个实施方案中，冷冻储藏应用步骤 1、2、1-2 或 1-3 产生的分化体细胞或重编程细胞供将来使用。在另一个实施方案中，将应用步骤 1、2、1-2 或 1-3 产生的重编程细胞运至医疗机构，在那里将重编程细胞分化为用于研究和移植的医用细胞类型。在另一个实施方案中，将含有用于实施步骤 1、2 或 3 活动的成分的试剂盒运至研究、生物医学或医疗机构，在那里试剂盒用于将分化细胞重编程为用于研究和移植的细胞类型。

[0043] 在另一个实施方案中，在将应用步骤 1、2、1-2 或 1-3 产生的重编程细胞分化为有用细胞类型的组合物之后运送至医疗机构。

[0044] 尽管实施方案也可能实现比以上例示的全部优点更少的优点或与其不同的优点，但通过以下描述和权利要求，本发明的其它特征和优点将显而易见。

[0045] 附图简述

[0046] 图 1 说明了用于某些重编程蛋白质的克隆和细菌表达的 pTAT-HA 载体。

[0047] 图 2 示出了染色电泳凝胶上经镍柱纯化的 TAT-hOCT4 和 TAT-hNanog 构建体。

[0048] 图 3 示出了染色电泳凝胶上经镍柱纯化的 TAT-Klf4、TAT-Sox2 和 TAT-cMyc。

[0049] 图 4 示出了用 TAT-hOct4 融合蛋白处理人 ES 细胞之后碱性磷酸酶的减少的强度。

[0050] 图 5 说明了用于某些重编程蛋白质的哺乳动物表达的 pSecTag2B 载体。

[0051] 图 6 示出了 pSecTag2B 载体多克隆位点。

[0052] 图 7 示出了染色电泳凝胶上的 Oct4 和 Nanog 融合蛋白（由 293 细胞免疫纯化）。

[0053] 图 8 示出了蛋白质转染 36h 之后，Oct4 和 Nanog 融合蛋白进入人新生儿皮肤成纤维细胞。

[0054] 图 9 使用优化方法通过 SLO 渗透化 293T 细胞摄取荧光若丹明标记的清蛋白。在若丹明标记的清蛋白存在下使用 SLO 渗透化的人 293T 细胞。左图：明视场显微镜图像；右图：相同视场的荧光显微镜视图。

[0055] 图 10 未分化 hES 细胞培养物用于生成全细胞提取物的表征。通过 (a) 相差显微术；(b) 碱性磷酸酶活性测定；和表达 hES 细胞标记的免疫荧光法；(c) Oct-4；(e) SSEA-3 和 (f) Tra-1-81 检查 hES 细胞系 ACT-4 的培养物。图 (d) 描述了与 (c) 中 Oct-4 染色相同视场的细胞核的 DAPI 染料。

[0056] 图 11 使用 hES 细胞提取物和渗透化 293T 细胞重编程孵育物之后获得的细胞集落形态。涂于 MEF 饲养层之前，渗透化 293T 细胞并在 hES 细胞培养条件下用对照 293T 提取物（左列，图 11A 和 11C）或 hES 细胞提取物（右列，图 11B 和 11D）孵育 293T 细胞。通过相差显微术检查获得集落。所示结果来自两次实验（第一次实验，11A-B；第二次实验，11C-D）。放大倍数：40X。

[0057] 图 12 和 13：通过以 2.5-7.5μg/m CB 处理胎牛成纤维细胞并且在诱导神经分化的条件下培养生成的具有神经元形态的细胞。通过相差显微术观察到图 12 中的细胞；通过 DIC 观察到图 14 中的细胞。图 12：(A) 对照、(B) 2.5μg/ml、(C) 5.0μg/ml、(D) 7.5μg/ml。

[0058] 图 14 和 15：通过以 10.0μg/m CB 处理成牛成纤维细胞而生成的具有神经元形态

的细胞并且其在诱导神经分化条件的培养。

[0059] 图 16：通过以 5.0μg/m CB 处理人胎儿成纤维细胞而生成的具有神经元形态的细胞并且其在诱导神经分化条件的培养。(A) 对照、(B)2.5μg/ml、(C)5.0μg/ml、(D)7.5μg/ml。

[0060] 图 17：显示在经 5.0μg/m CB 处理并且在诱导神经分化的条件下培养的人胎儿成纤维细胞中存在的神经特异性标记 nestin 和 Tuj1 的照片。

[0061] 图 18 显示重塑一个卵母细胞内的多个体细胞核，然后溶解卵母细胞以恢复重塑的细胞核，并且其与 ES 细胞细胞质泡囊融合以获得 ES 细胞系。

[0062] 图 19 示出了显示分离染色体、染色质或细胞核的体外改变的图。纯化重组酶或无细胞提取物示为球形。

[0063] 发明详述

[0064] 重编程试剂

[0065] 如上所述，本文的“重编程”指通过向所需受体或供体细胞或受体细胞核或其染色体 DNA 引入含有或编码一种或多种重编程因子的组合物或用所述组合物孵育，将所需受体或供体细胞或受体细胞核或其染色体 DNA 转化为低分化细胞或细胞核（例如，包含所述重编程细胞或细胞核的去分化细胞（例如，iPS 或 ESC 或成人干细胞））或不同类型或谱系的细胞的方法。由原始细胞细胞质诱导去分化或转分化的体细胞和体细胞核的成功去分化和转分化确认了其中存在能够促进或引起细胞或细胞核重编程的物质或因子。已显示当原始细胞中表达的某些基因产物（包括 Oct4）的量足够且存在时间足够长时，这些基因产物足以引起体细胞和体细胞核去分化，例如其中通过病毒转化诱导这些基因产物表达。这些结果已证实早期发育状态或原始状态下的细胞的细胞质含有足以引起或促进细胞分化的基因。

[0066] 可用于本文所述方法的示例性重编程试剂包括重编程多肽和小分子，并且任选包括促进剂。重编程多肽包括 Oct4、Sox2、Nanog、c-Myc、Klf4 和 Lin28 以及含有上述的任何功能片段、变异体和融合物。编码这些和其它重编程多肽的基因分别示于表 1 和 2。这些重编程多肽可单独或组合使用。

[0067] 在一个示例性实施方案中，可通过本文所述方法测试不同重编程多肽的组合以鉴定哪些单独或组合的重编程多肽引起特定供体或受体细胞或细胞核成功重编程。尽管可能组合的数量很多，但可使用合并法以大大降低鉴定有效组合所需的工作强度。例如，上文 Takahashi 和 Yamanaka 使用含有多达 24 个基因的逆转录酶病毒混合物去分化体细胞；随后，“留一法 (leave one out)”实验允许鉴定有效基因组。可使用类似方法鉴定起作用的重组重编程多肽及其混合物。一种补充方法采用类似逆转录病毒法，但利用了分化细胞群体异种性的优点，通过测试所得到的去分化细胞鉴定哪些逆转录病毒组合实际上并入每个去分化细胞系。本领域已知的方法，尤其是高通量法（例如微阵列和 PCR)（使用逆转录病毒构建体内包含的候选基因特异性序列和 / 或条码）可用于鉴定引起去分化细胞的整合构建体组合。例如，基于病毒的方法可用于鉴定重编程基因的有效组合，然后可使用不会引起基因组序列修饰的方法，例如通过接触这些基因编码的多肽，使用有效组合重编程细胞。

[0068] 使用这些方法，可由一种或多种重编程试剂及其组合最有效地重编程不同类型的体细胞和不同物种的细胞。本文所述方法将使这种物种特异性和细胞类型特异性重编程试

剂组合易于鉴别。在鉴定起作用的重编程因子组合的同时，这些方法可依据待重编程的特定细胞产生不同结果。例如，因为某些受体细胞（例如成人干细胞）可内源性表达一种或多种重编程多肽（重编程水平足以实现，而无需外源添加重编程多肽），使用很少（例如，单个）重编程因子就可重编程这些细胞。相反，重编程不会内源性表达任何重编程因子的细胞可能需要使用含若干重编程因子的混合物。例如，已证实神经祖细胞和星形神经胶质内源性表达 Sox2(Komitova 和 Eriksson，Neurosci Lett.2004 年 10 月 7 日；369(1)：24-7；Ellis 等，Dev Neurosci.2004 年 3 月 -8 月；26(2-4)：148-65；Avilion 等，Genes Dev.2003 年 1 月 1 日；17(1)：126-40；D'Amour 和 Gage，Proc Natl Acad Sci U S A.2003 年 9 月 30 日；100Suppl 1：11866-72；Miyagi 等，Mol Cell Biol.2004 年 5 月；24(10)：4207-20)，因此期望在不添加外源 Sox2 情况下被有效重编程。

[0069] 本方法的其它示例性重编程试剂包括引起候选重编程多肽表达的试剂。这些包括诱导基因表达的传统方法，例如 mRNA、逆转录病毒以及可诱导细胞表达重编程基因的小分子。例如，使用 siRN 技术可抑制重编程基因表达的抑制基因。可通过筛选法，优选本领域熟知的高通量筛选法鉴定这些试剂。

[0070] 在某些示例性实施方案中，重编程试剂可包括一种或多种促进重编程的试剂（“重编程促进剂”）。示例性重编程促进剂有助于促进重编程期间发生的后生变化。示例性重编程促进剂包括脱乙酰基酶抑制剂和 DNA 甲基化抑制剂，例如组蛋白脱乙酰基化和 DNA 甲基化中涉及的 RNAi 靶向基因。脱乙酰基酶抑制剂还包括制滴菌素 A(Yoshida 等，Bioessays.1995 年 5 月；17(5)：423-30)、伏立诺他 (Zolinza，可从 Merck & Co.，Inc. 购买）和丙戊酸。DNA 甲基化抑制剂包括甲基转移酶抑制剂，例如 5- 氮杂 - 胞苷 (Boukamp，Semin Cell Biol.1995 年 6 月；6(3)：157-63) 和 5- 氮杂 -2′ - 脱氧胞苷。

[0071] 表 1

[0072] 小鼠候选重编程基因

[0073]

基因	检索号（小鼠）
c-Myc	NM_010849
Dnmt3l	NM_019448
Dppa2	NM_028615
Dppa3(Stella)	NM_139218
Dppa4	NM_028610
Dppa5(Esg1)	NM_025274
Ecat1	AB211060
Ecat8	AB211061

ERas	NM_181548
Fbxo15	NM_015798
Fthl17	NM_031261
Gdf3	NM_008108
Grb2	NM_008163
Klf4	NM_010637
Nanog	AB093574
Oct3/4(Pou5f1)	NM_013633
Rex1(Zfp42)	NM_009556
Sall4	NM_175303
Sox15	NM_009235
Sox2	NM_011443
Stat3	NM_213659
Tcl1	NM_009337
Utf1	NM_009482
β-连环蛋白	NM_007614

[0074]

[0075] 表 2

[0076] 人候选重编程基因

[0077]

基因	检索号（人）
ACRBP	NM_032489
AKT	NM_005163
BARX1	NM_021570
BCL2	NM_000633

C10orf96	NM_198515
C14orf115	NM_018228
C9orf135	NM_001010940
CCNF	NM_001761
CER1	NM_005454
CLDN6	NM_021195
CROC4	NM_006365
CTSL2	NM_001333
DDX25	NM_013264
DKFZp761P0423	XM_291277
DNMT3B 同种型 1	NM_006892
DNMT3B 同种型 2	NM_175848
DNMT3B 同种型 3	NM_175849
DNMT3B 同种型 6	NM_175850
DNMT3L	NM_013369
DPPA2	NM_138815
DPPA3	NM_199286
DPPA4	NM_018189
DPPA5	NM_001025290
ECAT1	NM_001017361
ECAT11	NM_019079
ECAT8	XM_117117
EMID2	NM_133457

[0078]

FLJ35934	NM_207453
FLJ40504	NM_173624
FLJ43965	NM_207406
FOXD3	NM_012183
FOXH1	NM_003923
GAP43	NM_002045
GBX2	NM_001485
GDF3	NM_020634
GPC2	NM_152742
GPR176	NM_007223
GPR23	NM_005296
H2AFX	NM_002105
HES3	NM_001024598
HESX1	NM_003865
HHEX	NM_002729
HIST1H2AB	NM_003513
HIST1H4J	NM_021968
HMGB2	NM_002129
HRASLS5	NM_054108
hsa-miR-106a	MI0000113
hsa-miR-107	MI0000114
hsa-miR-141	MI0000457
hsa-miR-183	MI0000273
hsa-miR-187	MI0000274

hsa-miR-18a	MI0000072
hsa-miR-18b	MI0001518
hsa-miR-203	MI0000283
hsa-miR-20b	MI0001519
hsa-miR-211	MI0000287
hsa-miR-217	MI0000293
hsa-miR-218-1	MI0000294
hsa-miR-218-2	MI0000295
hsa-miR-302a	MI0000738
hsa-miR-302c	MI0000773
hsa-miR-302d	MI0000774
hsa-miR-330	MI0000803
hsa-miR-363	MI0000764
hsa-miR-367	MI0000775
hsa-miR-371	MI0000779
hsa-miR-372	MI0000780
hsa-miR-373	MI0000781
hsa-miR-496	MI0003136
hsa-miR-508	MI0003195

[0079]

hsa-miR-512-3p	MIMAT0002823
hsa-miR-512-5p	MIMAT0002822
hsa-miR-515-3p	MIMAT0002827
hsa-miR-515-5p	MIMAT0002826

hsa-miR-516-5p	MI0003172
hsa-miR-517	MIMAT0002851
hsa-miR-517a	MI0003161
hsa-miR-518b	MI0003156
hsa-miR-518c	MI0003159
hsa-miR-518e	MI0003169
hsa-miR-519e	MI0003145
hsa-miR-520a	MI0003149
hsa-miR-520b	MI0003155
hsa-miR-520e	MI0003143
hsa-miR-520g	MI0003166
hsa-miR-520h	MI0003175
hsa-miR-523	MI0003153
hsa-miR-524	MI0003160
hsa-miR-525	MI0003152
hsa-miR-526a-1	MI0003157
hsa-miR-526a-2	MI0003168
hsa-miR-96	MI0000098
LEFTB	NM_020997
LHX1	NM_005568
LHX5	NM_022363
LHX6	NM_014368
LIN28	NM_024674
LIN28B	NM_001004317

LIN41	NM_001039111
LOC138255	NM_001010940
LOC389023	BC032913
LOC643401	BC039509
MDK	NM_001012334
MGC27016	NM_144979
MIRH1	XM_931068
MIXL1	NM_031944
Mybl2	NM_002466
MYC	NM_002467
MYCN	NM_005378
NANOG	NM_024865
NFIX	NM_002501
NHLH2	NM_005599
NODAL	NM_018055

[0080]

NPM2	NM_182795
NPM3	NM_006993
NROB1	NM_000475
NUT	NM_175741
OCT3/4(POU5F1)	NM_002701
OCT6(POU3F1)	NM_002699
OTX2	NM_172337
PHB	NM_002634

PHC1	NM_004426
PIWIL2	NM_018068
POU3F2	NM_005604
POU6F1	NM_002702
PRDM14	NM_024504
PRTG	NM_173814
PUNC	NM_004884
RABGAP1L	NM_014857
RKHD3	NM_032246
RPGRIP1	NM_020366
SALL1	NM_002968
SALL2	NM_005407
SALL3	NM_171999
SALL4	NM_020436
SCGB3A2	NM_054023
SLITRK1	NM_052910
SOX10	NM_006941
SOX11	NM_003108
Sox15	NM_006942
SOX2	NM_003106
SOX21	NM_007084
SP8	NM_198956
SPANXC	NM_022661
SYT6	NM_205848

T(短尾基因同源物)	NM_003181
TCL1A	NM_021966
TDGF1	NM_003212
TDRD5	NM_173533
TERF1	NM_003218
TERF1	NM_017489
TERT	NM_198254
TGIF	NM_003244
TSGA10IP	NM_152762
UNC5D	NM_080872
USP44	NM_032147
UTF1	NM_003577
VENTX2	NM_014468
ZFP42	NM_174900
ZIC2	NM_007129
ZIC3	NM_003413
ZIC5	NM_033132
ZNF124	NM_003431
ZNF206	NM_032805
ZNF342	NM_145288
ZNF677	NM_182609
ZNF738	BC034499

[0081]

[0082] 将重编程试剂引入细胞或使用其重编程细胞核的方法

[0083] 本领域技术人员已知许多方法,用于实现将所需多肽或核酸或小分子转移并递送

至受体细胞或细胞核中，并且可用于有效地将重编程试剂递送至细胞或细胞核中。举例而言，这些方法包括电穿孔、显微注射、脂质体、阳离子脂质、细胞渗透化、用供体细胞的细胞质或细胞质泡囊孵育或接触和／或使其连接一个或多个蛋白质转导域（PTD）或核易位域或核定位信号部分（NTD 或 NTM 或 NTS 部分）。举例而言，这种促进与之连接的取代基的核递送的部分的实例包括 SV40T 抗原定位信号、凋亡素 C 端、吖啶核定位信号、聚精氨酸（polyargine）（arg11）、s4 13-PV、腺病毒六联体蛋白质、PV-S4(13)，RR-S4(13) 等。NLS 通常为带正电（碱性）的短小域，其用作将与之相连的部分指向细胞的细胞核。据报道，大量 NLS 氨基酸序列包括单碱基 NLS 的氨基酸序列，例如 SV40（猴病毒）大 T 抗原的氨基酸序列（Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val），Kalderon(1984) 等 Cell，39：499-509；人视黄酸受体 β 核定位信号（ARRRRP）；NF κB p50(EEVQRKRQKL；Ghosh 等，Cell 62：1019(1990)；NF κBp65(EEKRKRTYE；Nolan 等，Cell 64：961(1991)；和其它（参见，例如，Boulikas，J.Cell.Biochem.55(1)：32-58(1994)，因此通过引用并入）和双碱基 NLS 的氨基酸序列，例证为非洲爪蟾（非洲有爪蟾蜍）蛋白质、核质蛋白的氨基酸序列（Ala Val Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys Leu Asp)(Dingwall 等，Cell，30：449-458，1982 和 Dingwall 等，J.Cell Biol.，107：641-849；1988)。大量定位研究已证明并入合成肽或移植于一般并未靶向细胞核的报告蛋白上的 NLS 引起这些肽和报告蛋白在细胞核中富集。参见，例如，Dingwall 和 Laskey，Ann.Rev.Cell Biol.，2：367-390，1986；Bonnerot 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，84：6795-6799，1987；Galileo 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，87：458-462，1990。

[0084] 例如，电穿孔可用于将 DNA 引入哺乳动物细胞（Neumann，E. 等（1982)EMBO J.1，841-845)，以及植物和细菌细胞，并且也可用于引入蛋白质（Marrero，M.B. 等（1995) J.Biol.Chem.270，15734-15738；Nolkrantz，K. 等（2002)Anal.Chem.74，4300-4305；Rui，M. 等（2002)Life Sci.71，1771-1778)。细胞（例如本公开的细胞）可悬浮于置于脉冲电场中的含有蛋白质、DNA 或其它目标分子的缓冲溶液中。简言之，高压电脉冲导致细胞膜上形成小（纳米大小）孔。分子通过这些小孔进入细胞或当孔关闭并且细胞恢复其正常状态时膜重组过程中进入细胞。递送效率取决于所用电场的强度、脉冲长度、缓冲介质的温度和组成。尽管总效率常常十分低，但对各种细胞类型，甚至一些对其它递送方法有抗性的细胞系也成功进行了电穿孔。一些细胞系甚至保持难以进行电穿孔，除非部分活化。

[0085] 显微注射可用于将含有目标分子的毫微微升体积直接引入细胞的细胞核中。已用于将 DNA 直接引入细胞的细胞核（Capecchi，M.R.(1980)Cell 22，470-488)，在所述细胞中 DNA 直接并入宿主细胞基因组，从而产生载有目标序列的确定细胞系。通过显微注射也可将蛋白质，例如抗体（Abarzua，P. 等（1995)Cancer Res.55，3490-3494；Theiss，C. 和 Meller，K.(2002)Exp.Cell Res.281，197-204）和突变体蛋白质（Naryanan，A. 等（2003)J.Cell Sci.116，177-186）直接递送至细胞内。通过类似方法也可将包括 RNA、游离基因 DNA、小分子、蛋白质等的其它目标分子引入细胞。显微注射具有将大分子直接引入细胞的优点，从而避免暴露于可能非所需的细胞区室，例如低 pH 核内体。可人工进行显微注射和使用例如本文以下描述的半自动和全自动显微注射系统进行显微注射：Matsuoka 等，Journal of Biotechnology，第 116 卷，第 2 期，2005 年 3 月 16 日，第 185-194 页；Zhang 和 Yu，Current Opinion in Biotechnology，第 19 卷，第 5 期，2008 年 10 月，第 506-510 页；Wang

等，PLoS One.2007 年 9 月 12 日；2(9)：e862；Ito 等，美国授权前公开 No.2008/0299647；Ito 等，美国授权前公开 No.2008/0268540；日本专利 No.2624719；Ando 等，美国授权前公开 No.2008/0002868；Myiawaki 等，美国授权前公开 No.2007/0087436。

[0086] 脂质体也可用于将分子引入细胞。脂质体已用于将寡核苷酸、DNA（基因）构建体和药物小分子递送至细胞内（Zabner，J. 等（1995）J.Biol.Chem.270，18997-19007；Felgner，P.L. 等（1987）Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84，7413-7417）。某些脂质在置于水溶液中并经超声处理时形成由环绕含水区室的环形脂质双分子层组成的闭合小泡。这些小泡或脂质体可在包含待递送的分子的溶液中形成。除将 DNA 封装于水溶液外，阳离子脂质体还可与 DNA、脂质上与带负电的 DNA 骨架相互作用的带正电的头部基团自发有效地形成复合物。可根据目标大分子和所用细胞类型改变所用阳离子脂质的准确组合物和／或混合物（Felgner，J.H. 等（1994）J.Biol.Chem.269，2550-2561）。阳离子脂质体策略也已成功应用于蛋白质递送（Zelphati，O. 等（2001）J.Biol.Chem.276，35103-35110）。因为蛋白质比 DNA 有更多异种，蛋白质的物理特征，例如其电荷和疏水性，将影响蛋白质与阳离子脂质相互作用的程度。

[0087] 阳离子脂质也可用于将分子引入细胞。例如，也可使用 Pro-Ject 蛋白质转染试剂。Pro-Ject 蛋白质转染试剂利用无细胞毒性并且能够将各种蛋白质递送至许多细胞类型的阳离子脂质制剂。待引入的分子与脂质体试剂混合并涂在培养的细胞上。人们认为脂质体：分子复合物通过与细胞膜融合促进进入细胞或通过核内体促进内化。从复合物将目标分子释放至无脂质的细胞质内（Zelphati，O. 和 Szoka，Jr.，F.C.（1996）Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93，11493-11498）并且避免溶酶体降解。这些复合物的非共价性质是脂质体策略的主要优点，因为所递送的蛋白质并未被修饰，因此不太可能失去活性。用于将分子引入细胞的其它阳离子脂质系统包括 PULSin™（Polyplus Transfection，由 Genesee Scientific 配 销，8430 Juniper Creek Lane，San Diego，CA 92126）和 SAINT-PhD（Synvolux Therapeutics B.V.，L.J.Zielstraweg 1，9713 GX Groningen，The Netherlands）。PULSin™ 含有与蛋白质和抗体形成非共价复合物的专利阴离子两亲性化合物分子。人们认为复合物通过阴离子细胞粘着受体内化并且释放至细胞质内，在细胞质内复合物分解。该过程是无毒的并且递送了功能蛋白质。SAINT-PhD 由专利阳离子吡啶盐两亲分子和辅助脂质组成。SAINT-PhD 与蛋白质混合后，就形成直径约 200nm 的颗粒。在这种颗粒中，蛋白质被至少一种脂质双层包裹。而且，在形成的复合物中，SAINT-PhD 和蛋白质之间仅存在一次非共价相互作用。颗粒表面上的阴离子两亲性化合物对带负电的细胞表面有高亲和性。融合或捕获颗粒后，就将蛋白质释放至细胞的细胞质内。SAINT-PhD 递送的蛋白质具有功能性并且未修饰。

[0088] 通过细胞或核被膜渗透化，例如通过使用毛地黄皂苷或链球菌溶血素 O，也可将分子引入细胞或细胞核中。链球菌溶血素 O 可在哺乳动物细胞的原生质膜上形成大小达 35nm 的孔，这对于细胞通常是致命的（Bhakdi 等，Adv Exp Med Biol.1985；184：3-21；Bhakdi 等，Infect Immun.1985 年 1 月；47(1)：52-60；Walev 等，Proc Natl Acad Sci U S A.2001 年 3 月 13 日；98(6)：3185-90；Walev 等，FASEB J.2002 年 2 月；16(2)：237-9）。然而，当钙离子不存在时用链球菌溶血素 O 进行瞬时低剂量处理使得瞬时形成足够大使得蛋白质被动扩散的膜孔。随后，加入钙离子修复这些孔，从而形成活细胞。链球菌溶血素 O 已用于将

分子（包括反义寡核苷酸和功能蛋白）引入细胞（Fawcett 等，Exp Physiol. 1998 年 5 月；83(3)：293-303；Walev 等，参见上文）。在一个实施方案中，链球菌溶血素 O 可用于渗透化细胞膜以使细胞装载另一细胞类型的细胞提取物。对于用链球菌溶血素 O 进行渗透化，通常于室温下在链球菌溶血素 O 溶液中（参见，例如，Maghazachi 等，FASEB J. 1997 年 8 月；11(10)：765-74）孵育细胞 15-30min。对于毛地黄皂苷渗透化，将细胞悬浮于含有浓度约为 0.001-0.1％的毛地黄皂苷的培养基中并于冰上孵育 10min。渗透化后，通常在 400×g 下离心 10min 来洗涤细胞。通常，通过在 PBS 中再悬浮和沉降来重复该洗涤步骤两次。使用之前，通常于室温下将细胞保存在 PBS 中。可选地，当置于盖玻片上时可渗透化细胞以将细胞处理减到最少并避免细胞离心，在一些情况下这样可提高细胞的生存力。然后使渗透化细胞接触所需物质（例如，细胞提取物、纯化蛋白等）。该步骤之后，在钙存在下可释放经链球菌溶血素 O 处理的细胞的细胞膜。

[0089] 通过连接例如已提到的蛋白质转导域（PTD）或核易位域或核定位信号也可将分子引入细胞或细胞核。例如，可将蛋白质表达为包括 PTD 或 NLS 的融合蛋白。另外，使用本领域已知的其它方式，例如，使用化学连接、亲和素 - 生物素连锁、链霉亲和素 - 生物素连锁、蛋白质 A/Fc 键连锁、蛋白质 G/Fc 键连锁等可将待引入细胞的分子共价或非共价连接至 PTD 或 NLS。在下文标题“融合蛋白”下描述了可用于将目标分子引入细胞的示例性 PTD。可将多个 PTD（可相同或不同）连接至待引入细胞的分子。

[0090] 另一种将分子引入受体细胞或细胞核的方法包括引入或接触源自供体细胞的细胞质泡囊。

[0091] 受体细胞可为任一物种并且可与供体细胞异源，例如两栖动物、哺乳动物、鸟类，优选哺乳动物细胞。特别优选的受体细胞包括人和其它灵长类细胞，例如黑猩猩、猕猴、狒狒、其它旧世界猴细胞、山羊、马科动物、猪、绵羊和其它有蹄类动物、鼠科动物、犬、猫科动物和其它哺乳动物物种。

[0092] 将供体细胞的细胞质引入受体细胞的示例性方法包括显微注射，使供体细胞接触脂质体封装细胞质，去核供体细胞和用供体细胞的细胞质提取物孵育受体细胞。例如，这可通过用微量移液管经显微手术去除部分或全部供体细胞的细胞质和向受体细胞的细胞质显微注射这种细胞质来实现。人们还可能希望在这样引入之前从受体细胞去除细胞质。可通过熟知的显微手术法实现这种去除。可选地，可使用脂质体递送系统引入细胞质和 / 或端粒酶或端粒酶 DNA。

[0093] 在一个实施方案中，可在由工程化细胞生成和分泌的受体细胞介质内提供多肽。例如，可将饲养细胞工程化为表达和分泌一个或多个所需的重编程多肽。任选地，例如通过选择性屏障将工程化细胞和受体细胞物理分离，所述选择性屏障含有允许重编程多肽扩散但太小而不能使细胞通过的孔。重编程多肽的分泌可通过本领域已知的方法实现，例如通过与分泌信号融合。例如，蛋白质可融合或工程化为包含信号肽或促进蛋白质输出和分泌的疏水性序列。无论使用何种方法在细胞培养基中提供重编程蛋白质和其它重编程试剂，然后通过上述任一方法，优选通过连接蛋白质转导域、细胞渗透化和 / 或加入阳离子脂质将那些重编程试剂引入受体细胞。

[0094] 疾病治疗

[0095] 由细胞功能异常引起的许多疾病可通过施用各种分化类型的 hES 源细胞进行治

疗。这些疾病包括心脏、神经、内分泌、血管、视网膜、皮肤和肌肉骨骼系统的疾病和其它疾病。

[0096] 将患者自身的细胞转化为需要替换的所需细胞类型，重编程将允许生成移植时不受免疫排斥的自体、基因匹配的细胞。另外，根据本文所述方法产生的干细胞系可为用于移植的细胞源。

[0097] 在一个实施方案中，由患者的亲属，例如组织相容性亲属制备干细胞。例如，为了治疗患有遗传性疾病患者，可由没有遗传性疾病的移植相容性亲属制备干细胞。

[0098] 优选地，细胞与各个受体组织相容，从而减少或避免免疫抑制的不良使用。例如，可从患者、与患者相关的供体或无关供体获得组织相容性细胞。任选地，基因修饰细胞，从而改变其组织相容性特征，使得所述细胞与患者更加相容。

[0099] 通过本文的方法可创建不同干细胞系的“库”，并且可提供用于治疗移植的细胞源，所述细胞源与需要细胞移植的人或非人患者高度组织相容。例如，可由患者、患者亲属或无关个体建立干细胞系。在一个更具体的实施方案中，可生成不同干细胞系（例如不同类型的成人干细胞系）的库以便当需要时可能用于细胞治疗或移植治疗。因此，本公开的目的在于制备一批可用于治疗性移植的全能、几乎全能和／或多能干细胞系。某些干细胞系为至少一种组织相容性抗原的纯合子，人们尤其希望所述抗原增加与指定系组织相容的个体的数量。另外，在重编程之前、期间或之后可基因修饰这些细胞以消除与特定疾病相关联的遗传缺陷，从而阻止在使用由所述重编程方法生成的细胞（例如，胰腺细胞或骨髓细胞）进行移植治疗时疾病复发。

[0100] 任选地，将在引入患者之前诱导干细胞系分化为一种或多种所需细胞类型。可体外生成的分化衍生物中为这些探索的细胞，例如心肌细胞、神经元、少突胶质细胞、视网膜色素上皮细胞、胰岛素生成细胞等。如果这种细胞和组织主要由 ES 细胞生成，则满足未得到满足的组织和器官医疗需要，并且可通过储存各种遗传多样性细胞质或通过患者特异性核移植技术生成这种细胞和组织以降低免疫排斥的风险。

[0101] 细胞可用于本领域的各种已知方法中，包括注射到患者体内，在支架上生长和经手术植入，直接涂至受伤部位等。

[0102] 例如，神经退化性疾病通常包括神经元细胞损失，并且由于不存在内源性再生，有效的功能恢复极其有限或不存在。本公开的重编程细胞可用作神经退化性疾病基于细胞的治疗的来源，包括帕金森病 (Parkinson′ s disease)、肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis)、多系统萎缩症 (Multiple System Atrophy)、泰氏－萨氏病 (Tay-Sachs Disease)、阿耳茨海默氏病 (Alzheimer′ s disease)、亚历山大症 (Alexander′ s disease)、脑灰质营养不良 (Alper′ s disease)、共济失调毛细血管扩张 (Ataxia telangiectasia)、贝敦氏症 (Batten disease)、牛绵状脑病 (BSE)、海绵状脑白质营养不良症 (Canavan disease)、脑性麻痹 (Cerebral palsy)、科克因综合症 (Cockayne syndrome)、皮层基底节变性 (Corticobasal degeneration)、克劳伊氏病 (Creutzfeldt-Jakob disease)、致死性家族失眠症 (Familial Fatal Insomnia)、额颞叶变性 (Frontotemporal lobar degeneration)、亨廷顿氏舞蹈病 (Huntington′ s disease)、HIV 伴发痴呆、甘乃迪氏症 (Kennedy′ s disease)、Krabbe 病 (Krabbe′ s disease)、路易体痴呆症 (Lewy body dementia)、神经疏螺旋体病 (Neuroborreliosis)、

马查多-约瑟夫病(Machado-Joseph disease)(3型小脑萎缩症)、多系统萎缩症、多发性硬化、嗜眠病、尼曼皮克病(Niemann Pick disease)、帕金森病、佩-梅病(Pelizaeus-Merzbacher Disease)、皮克病(Pick′ s disease)、原发性侧索硬化、普里昂疾病(Prion diseases)、进行性核上麻痹、雷弗素姆氏病(Refsum′ s disease)、山德霍夫氏病(Sandhoff disease)、谢耳德氏病(Schilder′ s disease)、恶性贫血继发的亚急性联合脊髓退化、脊髓小脑性共济失调、脊髓性肌萎缩、进行性核上性麻痹(Steele-Richardson-Olszewski disease)、脊髓痨和中毒性脑病。

[0103] 同样地,所述方法可用于生成可在组织损伤或选择性手术的情况下使用的自体移植片,例如皮肤移植片。

[0104] 本申请的另一个应用是用于治疗按年代顺序和UV诱导的老化对皮肤的影响。随着皮肤老化,可能显示出各种物理变化,包括褪色、失去弹性、失去光泽、出现细纹和皱纹。预计通过局部滴施含重编程因子的组合物可减轻或者甚至逆转这种老化作用。例如,一旦局部滴施,就可将任选地进一步包括端粒酶或端粒酶DNA构建体的含重编程因子的组合物包装在脂质体内以促进内化于皮肤细胞内。同样,可能有利的是在这种组合物中包括促进皮肤吸收的化合物,例如DMSO。通常可将这些组合物局部涂于老化作用最显著的皮肤区域,例如眼、颈部和手周围的皮肤。

[0105] 本公开还提供了减轻老化作用的方法。正如哺乳动物细胞在组织培养中的寿命有限,类似地其在体内的寿命也有限。假定寿命有限以解释至少一些非期望的老化作用(包括免疫系统功能降低)。本公开通过提供经接触重编程因子在原位重编程细胞的方法提供了减轻老化作用的方法。另外,本公开通过提供恢复的细胞源,例如,干细胞或由重编程产生的分化细胞提供了减轻老化作用的方法。例如,干细胞可用于在组织培养中生成分化细胞类型,并且然后可将这些细胞引入个体。例如,可用于恢复个体的免疫系统。这种恢复可用于治疗被认为是免疫起源的疾病,例如一些癌症、年龄相关的免疫功能疾病等。

[0106] 基因修饰细胞

[0107] 本公开的另一重要应用是用于基因治疗。至今,已鉴定和克隆了许多具有极其重要治疗价值的不同基因。而且,已熟知稳定地将这种DNA引入预期细胞(例如哺乳动物细胞,和更优选人体细胞类型)的方法。同样,本领域熟知通过同源重组实现预期DNA定点插入的方法。

[0108] 本方法使得可能培育出具有复合基因修饰的克隆和嵌合体动物。这尤其利于产生用于人疾病的动物模型。同样,本方法将有利于预期基因产物的表达或表现型取决于不同DNA序列表达的情况,或有利于涉及不同基因相互之间相关效应的基因研究。而且,由于不同基因表达相互之间相关效应更为人们所了解,预计本方法将变得至关重要。

[0109] 另一示例性基因修饰为引入条件性“自杀基因”,例如条件性启动子下的自杀基因。例如,如果因任何原因移植细胞以可损伤受体的方式作用,可诱导自杀基因表达以杀伤一些或全部移植细胞。本领域已知以这种方式使用可诱导自杀基因。适合的自杀基因包括编码HSV胸苷激酶和胞苷脱氨酶的基因,分别用更昔洛韦(gancyclovir)和5-氟胞嘧啶诱导细胞死亡。也可将自杀基因置于谱系特异性启动子的控制下,使得消除其中启动子被活化的细胞。

[0110] 示例性基因修饰包括(例如)通过改变一个或多个HLA基因,例如通过等位基因

置换或删除来改变细胞的组织相容性特征的修饰。例如，这种方法可用于生成适于移植至具有不同组织相容性特征的患者体内的细胞系的“库”。

[0111] 其它示例性基因修饰减少了免疫排斥反应，例如引起抑制免疫排斥反应的蛋白质（例如 CD40-L(CD154 或 gp139)）表达的修饰，防止可引起免疫排斥反应的抗原（例如猪或其它细胞表达的糖基化抗原）生成的修饰。

[0112] 示例性基因修饰包括用野生型或抗病序列置换疾病相关或易感疾病的基因组序列。例如，引入基因或置换对疾病提供抗性的细胞系中含有的基因的等位基因（例如，CCR5 的抗 HIV 等位基因（例如 CCR5δ32 等位基因）、致癌基因或肿瘤抑制基因的抗癌等位基因）。另一个示例性基因修饰为引入增多拷贝的肿瘤抑制基因 p53，已证实所述肿瘤抑制基因 p53 降低小鼠癌症发病率并延长健康期 (Garcia-Cao 等，EMBO J. 2002 年 11 月 15 日；21(22)：6225-35)。其它示例性基因修饰包括消除与肿瘤性、自身免疫性或其它遗传性疾病（例如囊性纤维化、镰刀形红细胞贫血病、乳腺癌、前列腺癌等）相关的突变的基因修饰。另一个示例性基因修饰为引入增多拷贝数的 DSCR1 基因和／或 Dyrk1a，这是位于大大降低受唐氏综合征 (Down’s Syndrome) 影响的个体癌症发病率中牵涉的人染色体 21 上的基因 (Baek 等，Down′ s syndrome suppression of tumor growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. Nature advance online publication(Nature 最新成果在线发表)，2009 年 5 月 20 日 |doi：10.1038/nature08062)。某些实施方案包括增多拷贝数的肿瘤抑制基因（例如 p53 或 Rb)。其它实施方案包括引起预计促进健康和／或抵御疾病的某些基因表达增强的增多拷贝数和／或修饰，所述基因包括涉及 DNA 修复的基因、抗氧化剂防御基因（例如，过氧化物歧化酶（例如 SOD1、SOD2、SOD3)、过氧化氢酶）、涉及 DNA 修复或染色体维持的基因、端粒酶基因等。

[0113] 其它实施方案包括引入预计对细胞移植受体健康有益的外源基因。例如，某些实施方案可包括引入编码能够选择性降解病原物质的酶的基因，所述致病物质随年龄累积并且牵涉到年龄相关疾病中。这些致病物质包括胆固醇、氧化胆固醇和 7- 酮胆固醇（心脏病和中风中牵涉）、脑部 β- 淀粉样斑块和神经纤维缠结（阿耳茨海默氏病中牵涉）、视网膜色素上皮细胞中的脂褐质（例如 A2E)（年龄相关黄斑变性中牵涉）和由于组织暴露于高含糖水平而引起的细胞外基质蛋白交联，例如羧甲基赖氨酸、羧乙基赖氨酸、精氨嘧啶和其它渐进性糖基化终产物（糖尿病中牵涉）。

[0114] 也可基因修饰本公开的细胞以提供患者需要的治疗性基因产物，例如由于先天性代谢障碍。已知许多遗传性疾病由于患者的细胞不能生成特定基因产物引起。例如，可基因修饰干细胞以合成增多量的患者所需基因产物。例如，可制备经基因改造而生成并分泌腺苷脱氨酶的造血干细胞以供向患有腺苷酸脱氨酶缺乏症的患者移植。

[0115] 优选地，前面提到的基因修饰为靶向修饰，所述靶向修饰避免插入基因组 DNA 的一个位点而破坏正常细胞功能的风险，例如可引起肿瘤性转化的生长控制破坏。可选地，可使用非靶向方法，例如使用重组逆转录病毒，并且然后可鉴定插入位点，以（例如）通过淘汰插入可能破坏细胞正常生长控制和／或含有非所需的病毒序列的细胞以评估细胞作特定用途的适合性。

[0116] 鉴定和检验去分化细胞的方法

[0117] 可使用各种方法鉴定和检验候选干细胞。这些方法包括检查细胞和集落形态；例

如通过长期在培养基中生长，测量端粒长度和／或测量端粒酶活性确定细胞是否是永生的；确定细胞含有的多能标记蛋白和／或 mRNA 含量是否升高，例如碱性磷酸酶、SSEA-1、Sox2、Oct4、Nanog、c-Myc、E-cad、Lin28 和 Rex-1 增多；减少多能基因（例如 Oct4 和 Nanog）启动子中的 DNA 甲基化；测量全局基因表达；和检测体外和／或体内分化为三胚层细胞的能力。

[0118] 例如，通过将细胞引入发育胚胎（例如通过注射至胚泡，胚细胞凝聚和本领域已知的其它方式）和检测源自引入细胞的分化细胞的存在可确定体外分化。可检测的分化细胞包括神经祖细胞（例如，表达 Pax6）、特征神经元（例如，表达 TUJ1）、成熟心肌细胞（例如，表达 CT3）、定形内胚层细胞（例如，表达 Sox17）、胰腺细胞（例如，表达 Pdx1）和肝细胞（例如，表达 ALB）。也可通过将细胞注入免疫缺陷小鼠确定体内分化，形成类似于注入人 ES 细胞时形成的畸胎瘤样物质证明了细胞具有发育全能性（Adewumi，O. 等，Nature Biotechnol.25,803-816(2007)；Lensch 等，Cell Stem Cell 1,253-258(2007)；Lensch 等，Nature Biotechnol.25,1211(2007)）。

[0119] 另外，可分析候选干细胞以确定是否存在有害基因和／或后生改变。例如，可通过细胞学方法（包括传统和光谱核型分析法）和／或通过测序法分析细胞核型。例如也可通过比较未处理细胞和重编程细胞之间的全基因组 SNP 谱，对细胞进行测试以确定是否发生杂合性缺失，杂合性缺失表明出现可能非所需的重组事件（尽管在一些情况下，可能需要杂合性缺失，例如为消除特定有害等位基因）。另外，可对细胞进行测试以确定是否存在特定非所需的序列，例如非期望的病毒序列、细胞暴露其中的编码重编程因子的核酸、支原体和其它病原体。也可对细胞进行测试以检测致癌基因和／或肿瘤抑制基因表达异常。也可通过部分或全基因组测序测试细胞的非所需的基因组序列，任选将其靶向特定基因的序列（例如，涉及生长调节的基因）。也可测试细胞的非所需的后生变化，例如非所需的组蛋白改变（Jenuwein 等，Science.2001 年 8 月 10 日；293(5532)：1074-80；Strahl 等，Nature.2000 年 1 月 6 日；403(6765)：41-5；Turner，Nat Cell Biol.2007 年 1 月；9(1)：2-6）。

[0120] 融合蛋白

[0121] 在本方法和组合物的某些示例性实施方案中包括融合蛋白。这些融合蛋白含有（例如）通过连接不同多肽部分其排列不同于天然发现的蛋白质域或区。

[0122] 示例性蛋白质易位域（PTD）包括 HIV 反式激活蛋白（TAT）(Tat 47-57)（Schwarze 和 Dowdy 2000 Trends Pharmacol.Sci.21：45-48；Krosl 等 2003 Nature Medicine(9)：1428-1432）。对于 HIV TAT 蛋白，足以赋予膜易位活性的氨基酸序列与残基 47-57(YGRKKRRQRRR，SEQ ID NO：1) 相对应（Ho 等，2001，Cancer Research 61：473-477；Vive 等，1997，J.Biol.Chem.272：16010-16017）。当与另一多肽连接时，仅该序列可赋予蛋白质转导活性。TAT PTD 也可为 9 个氨基酸的肽序列 RKKRRQRRR(SEQ ID NO：2)(Park 等 Mol Cells 2002(30)：202-8)。TAT PTD 序列可为 Ho 等，2001，Cancer Research 61：473-477（因此其内容通过引用并入本文）中公开的任一个肽，其包括 YARKARRQARR(SEQ ID NO：3)、YARAAARQARA(SEQ ID NO：4)、YARAARRAARR(SEQ ID NO：5) 和 RARAARRAARA(SEQ ID NO：6)。含有 PTD 的其它蛋白质包括单纯疱疹病毒 1(HSV-1)DNA 结合蛋白 VP22 和果蝇触角足（Antp）同源异型转录因子（Schwarze 等 2000 Trends Cell Biol.(10)：290-295）。对

于 Antp，氨基酸 43-58（表示为 RQIKIWFQNRRMKWKK，SEQ ID NO：7）足以进行蛋白质转录，并且对于 HSV VP22，PTD 用残基 DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVE（SEQ ID NO：8）表示。可选地，可将赋予转导活性的 7 个精氨酸（RRRRRRR，SEQ ID NO：9）或更长聚精氨酸肽（例如，有 8、9、10、11 个，多达 20 个或更多个精氨酸残基）或人工肽用作本公开的 PTD。

[0123] 在另外的实施方案中，PTD 可为二聚体化或多聚体化的 PTD 肽。在某些实施方案中，PTD 为一个或多个 TAT PTD 肽 YARAAARQARA（SEQ ID NO：4）。在某些实施方案中，PTD 为由 3 个 TAT PTD 肽 YARAAARQARAYARAAARQARAYARAAARQARA（SEQ ID NO：10）组成的多聚体。与多聚体 PTD，例如三聚体合成蛋白质转导域（tPTD）融合或连接的蛋白质可在细胞中表现出不稳定性降低和稳定性升高。在无血清培养基中和在 hES 细胞存在下，这种构建体可能也稳定。

[0124] 表 3 示例性蛋白质易位域（PTD）

[0125]

蛋白质易位域序列	SEQ ID NO：
YGRKKRRQRRR	1
RKKRRQRRR	2
YARKARRQARR	3
YARAAARQARA	4
YARAARRAARR	5
RARAARRAARA	6
RQIKIWFQNRRMKWKK	7
DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVE	8
RRRRRRR	9
YARAAARQARAYARAAARQARAYARAAARQARA	10

[0126] 若干蛋白质和小肽能够转导或通过生物膜，而不依赖于传统受体或内吞介导的途径。这些蛋白质的实例包括 HIV-1 TAT 蛋白、单纯疱疹病毒 1（HSV-1）DNA 结合蛋白 VP22 和果蝇触角足（Antp）同源异型转录因子。来自这些蛋白质的小分子蛋白质转导域（PTD）可融合其它大分子、肽或蛋白质以将其成功转运至细胞内（Schwarze，S.R. 等（2000）Trends Cell Biol.10，290-295）。对来自这些蛋白质的转导域进行序列比对显示碱性氨基酸含量高（Lys 和 Arg），这可促进这些区域与膜内带负电的脂质相互作用。二级结构分析显示所有三个结构域之间没有一致的结构。使用这些转导域的融合物的优点在于蛋白质进入迅速，依赖于浓度并且似乎与困难细胞类型起作用（Fenton，M. 等（1998）J.Immunol.Methods 212，41-48.）。

[0127] 可选地或除促进核定位外，重编程因子可融合一个或多个核定位序列。如前所述，举例而言其实例包括 SV40 T 抗原定位信号、凋亡素 C 端、吖啶核定位信号、聚精氨酸(arg11)、s4 13-PV、腺病毒六联体蛋白质、PV-S4(13)，RR-S4(13) 等。一般地说，NLS 通常为带正电（碱性）的短小域，用作将与之相连的部分导入细胞的细胞核。据报道，大量 NLS 氨基酸序列包括单碱基 NLS 的氨基酸序列，例如 SV40（猴病毒）大 T 抗原的氨基酸序列 (Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val)，Kalderon(1984) 等 Cell，39：499-509；人视黄酸受体 β 核定位信号 (ARRRRP)；NF κB p50(EEVQRKRQKL；Ghosh 等，Cell 62：1019(1990)；NF κB p65(EEKRKRTYE；Nolan 等，Cell 64：961(1991)；和其它（参见，例如，Boulikas，J.Cell.Biochem.55(1)：32-58(1994)，因此通过引用并入）和双碱基 NLS 的氨基酸序列，例证为非洲爪蟾（非洲有爪蟾蜍）蛋白质、核质蛋白的氨基酸序列 (Ala Val LysArg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys Leu Asp)(Dingwall 等，Cell，30：449-458，1982 和 Dingwall 等，J.Cell Biol.，107：641-849；1988)。大量定位研究已证明并入合成肽或移植于一般并未靶向细胞核的报告蛋白上的 NLS 引起这些肽和报告蛋白在细胞核中富集。参见，例如，Dingwall 和 Laskey，Ann.Rev.Cell Biol.，2：367-390，1986；Bonnerot 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，84：6795-6799，1987；Galileo 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，87：458-462，1990。

[0128] 本领域熟知用于制备编码融合蛋白的融合基因的技术。基本上，根据传统技术连接编码不同多肽序列的各种 DNA 片段。在另一个实施方案中，可通过传统技术，包括自动化 DNA 合成仪，合成融合基因。可选地，使用在随后可退火生成嵌合基因序列的两个保守基因片段之间产生互补突出端的锚定引物进行基因片段的 PCR 扩增（参见，例如，Current Protocols in Molecular Biology，Ausubel 等编，John Wiley & Sons：1992)。

[0129] 在某些实施方案中，编码纯化前导序列（例如聚（组氨酸）序列）的融合基因可连接至所需多肽或融合蛋白部分的 N 端，允许使用 Ni++ 金属树脂通过亲和色谱法纯化融合蛋白。随后通过用肠激酶处理去除纯化前导序列以提供纯化多肽（例如，参见 Hochuli 等，(1987)J.Chromatography 411：177；和 Janknecht 等，PNAS USA 88：8972)。

[0130] 在某些实施方案中，蛋白质或其功能变异体或活性域连接第二蛋白质或蛋白质结构域（例如，PTD) 的 C 端或 N 端和 / 或有或无插入连接子序列的 NLS。连接子的精确长度和序列及其方向相对于所连序列的可能不同。连接子可包含（例如）2、10、20、30 或更多个氨基酸并且可根据例如溶解性、长度、空间分离等所需性质进行选择。在特定实施方案中，连接子可包含用于（例如）融合蛋白的纯化、检测或修饰的功能序列。在某些实施方案中，连接子包含两个或更多个甘氨酸的多肽。

[0131] 可修饰蛋白质结构域和 / 或连接子（结构域通过其融合）以改变蛋白质的有效性、稳定性和 / 或功能特征。

[0132] 转分化

[0133] 近期研究表明重编程成人体细胞或“终末”分化细胞可呈现不同的细胞命运。需要时，通过将一种类型的患者细胞直接转化为另一所需类型，将分化细胞或其细胞核变成另一种类型的分化细胞或细胞核使得产生患者特异性细胞类型。这些方法的实施方案包括将体细胞直接转分化为另一种体细胞和去分化为之后可分化为所需细胞类型的祖细胞或 ES 细胞。

[0134] 去分化因子的鉴定

[0135] 本方法的另一个应用是用于鉴定细胞质内发现的诱导去分化的物质。这可通过分离细胞质并筛选这些成分实现，以鉴定哪些成分含有转移至受体细胞（例如人分化细胞类型）时引起有效恢复或重编程的物质。

[0136] 在适当条件下，供体细胞的细胞质内存在的化合物供受体细胞重编程或去分化。这些化合物很可能包括核酸和/或蛋白质化合物。分离供体细胞的细胞质允许富集（和最终鉴定）这些化合物。成分可包括本领域已知多种方法的任一种，包括基于大小、等电点、电荷、疏水性等的方法。任选地，可处理怀疑含有重编程试剂的成分以有选择地去除特定种类的试剂（使用核酸酶、蛋白酶、辐射等），从而帮助确定怀疑的重编程试剂的性质。任选地，去除或灭活细胞质或细胞质成分中的已知重编程试剂（例如，通过免疫亲和性去除或加入中和抗体）以便于检测新型重编程试剂。

[0137] 例如，可用一组已知不足以用于稳健重编程的重编程因子处理细胞，并且进一步用候选重编程因子处理，重编程成功率升高表明候选因子可为重编程因子。候选重编程因子包括可源自文库、分离的供体细胞的细胞质的蛋白质、核酸、小分子、siRNA（包括类似物）等，这些由于与已知重编程因子的同源性而被选择，由于已知在原始细胞或经受重编程的细胞内的表达水平提高而被选择。

[0138] 细胞质转移以对受体细胞进行去分化、重编程或恢复

[0139] 介绍

[0140] 本公开一方面提供通过引入来自更原始的细胞类型，通常为未分化或大体上未分化细胞（例如，卵母细胞或卵裂球）的细胞质，来对所需细胞（优选哺乳动物细胞，并且最优选人或其它灵长类细胞）去分化和/或改变其寿命的新方法。

[0141] 20 世纪 60 年代，通过两栖动物核移植核移植首次得到认可。(Diberardino, M.A.1980, " Genetic stability and modulation of metazoan nuclei transplanted into eggs and ooctyes" ,Differentiation,17-17-30 ;Diberardino,M.A.,N.J.Hoffner 和 L.D.Etkin,1984 ; " Activation of dormant genes in specialized cells " , Science,224 :946-952 ;Prather, R.S. 和 Robl, J.M.,1991, " Cloning by nuclear transfer and splitting in laboratory and domestic animal embryos" ,在 Animal Applications of Research in Mammalian Development 中，R.A.Pederson,A.McLaren 和 N.First（编），Cold Spring Harbor Laboratory Press.）。最初对两栖动物进行核移植，部分原因是相对于哺乳动物，两栖动物卵母细胞大小相对较大。这些实验结果向本领域技术人员表明供体细胞核的去分化程度十分有助于（若非决定性因素）含有这种细胞或细胞核的受体卵母细胞是否能有效重编程所述细胞核并生成可存活胚胎。(Diberardino,M.A., N.J.Hoffner 和 L.D.Etkin,1984, " Activation of dormant genes in specialized cells. " , Science,224 :946-952 ;Prather, R.S. 和 Robl, J.M.,1991, " Cloning by nuclear transfer and splitting in laboratory and domestic animal embryos" , 在 Animal Applications of Research in Mammalian Development 中，R.A.Pederson, A.McLaren 和 N.First（编），Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

[0142] 很久以后，20 世纪 80 年代中期，已经完善显微手术技术之后，研究人员研究是否可将核移植外推至哺乳动物。Robl 等报道了首个克隆牛的方法 (Robl, J.M., R.Prather,

F.Barnes，W.Eyestone，D.Northey，B.Gilligan 和 N.L.First,1987， ″ Nuclear transplantation in bovine embryos″，J.Anim.Sci.,64:642-647)。事实上，Dr.Robl 的实验室通过使用来自早期胚细胞的供体细胞核进行核移植首先克隆了兔子(Stice，S.L. 和 Robl，J.M.,1988，″ Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos″，Biol.Reprod,39:657-664)。同样，使用类似技术，通过将非常早期胚胎的细胞或细胞核移植至去核的卵母细胞内克隆了牛(Prather,R.S.,F L.Barnes,M L.Sims,Robl，J.M.，W.H.Eyestone 和 N.L.First,1987，″ Nuclear transplantation in the bovine embryo:assessment of donor nuclei and recipient oocyte ″，Biol.Reprod.,37:859-866)、羊(Willadsen,S.M.,1986,″ Nuclear transplantation in sheep embryos″，Nature，(Lond)320:63-65) 和推定的猪(Prather，R.S.，M.M.Sims and N.L.First，1989，″ Nuclear transplantation in pig embryos″，Biol.Reprod.,41:414)。

[0143] 在 20 世纪 90 年代早期，研究了生成具有从渐进性更加分化的细胞获得的供体细胞核的核移植胚胎的可能性。这些实验的初步结果暗示当胚胎发育至胚泡时期（出现最初两个不同细胞谱系的胚胎期）时，核移植效率显著降低(Collas，P. 和 J.M.Robl，1991，″ Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos″，Biol.Reprod.,45:455-465)。例如，人们发现饲养外胚层细胞（形成胎盘的细胞）不支持核融合物发育至胚泡期(Collas，P. 和 J.M.Robl，1991，″ Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos″，Biol.Reprod.,45:455-465)。相反，人们发现内细胞团细胞（形成体细胞和生殖谱系细胞的细胞）支持低速率发育至胚泡期，获得一些子代(Collas P，Barnes F L，″ Nuclear transplantation by microinjection of inner cell mass and granulosa cell nuclei″，Mol Reprod Devel.,1994,38:264-267)。而且，进一步工作暗示短时间培养的内细胞团细胞可支持发育至该期限。(Sims M,First N L,″ Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells″，Proc Natl Acad Sci,1994,91:6143-6147)。

[0144] 根据这些结果，在当时本领域技术人员一致认为对两栖动物核移植实验进行的观察很可能在哺乳动物中观察到。即，20 世纪 90 年代早期在克隆领域工作的研究人员广泛认为一旦细胞成为特定体细胞谱系，其细胞核就不可逆转地失去变得“重编程”的能力，即当用作供核移植的核供体时支持全期发育。虽然不知道体细胞明显地不能被有效重编程的准确分子解释，但猜测是细胞分化期间发生的 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化和控制染色质结构转变的因子变化的结果。而且，人们认为这些分子变化不可逆。因此，十分令人震惊的是，1998 年 Roslin Institute 报道当指定为体细胞谱系的细胞用作核移植供体时可支持胚胎发育。同样惊人并且更具商业意义的是，之后不久在美国麻省大学和先进细胞科技公司工作的科学家报道产生了使用转基因成纤维细胞供体细胞进行核移植产生的转基因牛。

[0145] 据报道在日本石川县家畜研究中心，由采自宰牛的输卵管的细胞生成了两头小牛(Hadfield，P. 和 A.Coghlan，″ Premature birth repeats the Dolly mixture″，New Scientist,1998 年 7 月 11 日)。进一步，来自法国 INRA 的 Jean-Paul Renard 报道使用来自胎儿的肌细胞生成小牛。(MacKenzie,D. 和 P.Cohen,1998，″ A French calf answers some of the questions about cloning″，New Scientist,3 月 21 日。）同样，来自新西

兰的David Wells报道使用从成牛获得的成纤维细胞供体细胞生成了小牛。(Wells,D.N.,1998,"Cloning symposium:Reprogramming Cell Fate--Transgenesis and Cloning",Monash Medical Center,Melbourne,Australia,4月15-16日。)

[0146] 据报道,分化细胞也已被成功用作核移植供体生成克隆小鼠。(Wakayama T、Perry A C F、Zucconi M、Johnsoal K R、Yanagimachi R.,"Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei",Nature,1998,394:369-374。)

[0147] 进一步地,1999年1月New York Times在头条新闻中报道了美国麻省大学和先进细胞科技公司研究人员进行的实验,其中通过将成人分化细胞(从成人供体的颊部获得的细胞)插入去核的牛卵母细胞中生成核移植融合胚胎。因此,根据这些结果,似乎至少在一些条件下可重编程或去分化已分化细胞。

[0148] 相关的是,最近通俗报刊中还报道从年轻女性供体卵母细胞转移的细胞质"恢复"了年长妇女的卵母细胞,使得其能够进行复制。

[0149] 然而,如果方法可发展为将分化细胞转化为胚细胞类型,而无需克隆,并且生成尤其可能用于核移植的胚胎和生成不同分化细胞类型供治疗使用,这十分有益。同样,如果可通过重组法鉴定和产生负责分化细胞的去分化和重编程的细胞物质,从而提高细胞重编程的效率,这十分有益。

[0150] 细胞质转移以对受体细胞进行去分化、重编程或恢复的方法

[0151] 如上所述,通俗报刊中已报道在人工受孕和不育症领域工作的一组人员成功地将来自年轻妇女的卵母细胞的细胞质转移至年长妇女卵母细胞内,并且从而恢复年长卵母细胞能够进行受精和胚胎发育的能力。根据该轶事证据,加上科学文献中表明可通过核移植有效"重编程"成人分化细胞的新近论文,从理论上讲通过引入来自未分化或大体上未分化细胞,例如卵母细胞或卵裂球或其它胚细胞类型的细胞质,可有效"重编程"或"去分化"已分化细胞和/或改变(延长)其寿命。

[0152] 虽然目前未知一个细胞的细胞质如何影响另一个细胞的寿命或分化状态,但理论上讲在发育早期或原始状态下的细胞的细胞质含有一种或多种物质,例如转录因子和/或起到引起细胞去分化作用的其它物质。例如,其中很可能含有的一种影响细胞分化状态的物质为端粒酶。另一种物质为OCT-4和REX。然而,申请人并不希望受该理论限制,因为这对于理解本公开来说不是必要的。

[0153] 在本公开的一方面,通常通过引入有效量的来自供体细胞的细胞质(即未分化或大体上未分化细胞,例如卵母细胞或卵裂球)在体外使受体细胞去分化。细胞质的引入或转移可通过不同方法实现,例如通过显微注射或通过使用脂质体递送系统。优选方式包括将来自ES细胞、卵母细胞或其它胚细胞的细胞质泡囊引入所需分化细胞(例如达到或接近衰老的哺乳动物细胞或其它细胞)内。例如,可将这种细胞质泡囊引入经基因修饰的哺乳动物细胞内以恢复这些细胞,例如在将其用于细胞治疗之前。可选地,可使细胞质泡囊接触来自分化细胞的细胞核以诱导恢复。

[0154] 受体细胞可为任一物种并且可与供体细胞异源,例如两栖动物、哺乳动物、鸟类,优选哺乳动物细胞。特别优选的受体细胞包括人和灵长类细胞,例如黑猩猩、猕猴、狒狒、其它旧世界猴细胞、山羊、马科动物、猪、绵羊和其它有蹄类动物、鼠科动物、犬、猫科动物和其

它哺乳动物物种。

[0155] 同样，受体细胞可为任一分化的细胞类型。其适合的实例包括上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、角化细胞、黑素细胞和其它皮肤细胞类型，肌细胞、骨细胞、免疫细胞（例如T和B淋巴细胞）、少突胶质细胞、树突细胞、红细胞和其它血细胞，胰腺细胞、神经和神经细胞类型，胃部、肠、食道、肺部、肝脏、脾、肾脏、膀胱、心脏、胸腺、角膜和其它眼部细胞类型等。通常，所述方法应用于其中需要处于低分化状态的细胞源的任何应用中。

[0156] 如前所述，从比受体细胞分化状态更低或更具原始状态的“供体”细胞获得转移细胞质。通常，细胞质将源自卵母细胞或早期胚胎细胞，例如源自早期胚胎的卵裂球或内细胞团细胞。通常，优选从处于未分化或大体上未分化状态下的卵母细胞或其它胚细胞获得供体细胞质。牛卵母细胞为优选来源，因为牛卵母细胞可易于从屠宰场大量获得。

[0157] 文献中有报道关于生成含有胚胎干细胞的培养物，据报道所述培养物包含表达或不表达胚胎干细胞的某些标记特征的胚胎干细胞。因此还优选从表达或不表达细胞标记的卵母细胞或其它细胞获得供体细胞质，所述细胞标记是未分化胚细胞类型的特征。举例而言，灵长类ES细胞上的这种标记包括SSEA-1(-)、SSEA-3(+)、SSEA-4(+)、TRA-1-60(+)、TRA-1-81(+)和碱性磷酸酶(+)。（参见美国专利No.5,843,780，Thomson，1998年12月1日发表。）

[0158] 如上所述，人们还希望将端粒酶和/或DNA序列或供端粒酶表达的其它化合物引入受体细胞，例如哺乳动物细胞，更优选人或非人细胞。先前已报道了端粒酶的分离和相应DNA的克隆。例如，Cech等于1998年4月9日公开的WO 98/14593报道了源自纤毛虫(Eeuplotes aediculatus)、酵母菌(Saccharomyces)、裂殖酵母(Schizo saccharomyces)和人的端粒酶核酸序列以及含有端粒酶蛋白质亚基的多肽。同样，Cech等于1998年4月9日公开的WO 98/14592公开了含有人端粒酶逆转录酶、人端粒酶催化蛋白亚基的组合物。同样，美国专利No.5,837,857和5,583,414描述了编码哺乳动物端粒酶的核酸。更进一步地，West等发表的美国专利No.5,830,644、Kzolowski等发表的美国专利No.5,834,193和Harley等发表的美国专利No.5,837,453描述了测量端粒酶长度和端粒酶活性的测定和影响端粒酶活性的试剂。这些专利和PCT申请通过引用整体并入本文。

[0159] 因此，本公开的一个方面，在组织培养中通过单独或与端粒酶一起引入更原始的细胞类型（例如卵母细胞或胚细胞类型）的细胞质来去分化或重编程所需细胞（例如培养的人体细胞）。来自供体卵母细胞或胚细胞（例如，卵裂球）的细胞质可通过各种方法完成引入。例如，这可通过用微量移液管经显微手术去除部分或全部供体卵母细胞或卵裂球或其它胚细胞类型的细胞质，并且将这种细胞质显微注入受体哺乳动物细胞的细胞质来实现。也可能希望在引入之前从受体细胞去除细胞质。这种去除可通过已知显微手术法完成。可选地，可使用脂质体递送系统引入细胞质和/或端粒酶或端粒酶DNA。

[0160] 本方法应提供通过在组织培养中重编程或去分化所需细胞而生成胚胎干细胞（例如哺乳动物胚胎干细胞和最期望人胚胎干细胞）的方式。由于这种细胞可用于生成任何分化细胞类型，所以从治疗角度看这些细胞是所需的。所得到的分化细胞类型可用于细胞移植治疗。

[0161] 本公开的另一重要应用是用于基因治疗。至今，已鉴定并克隆了许多具重要治疗价值的不同基因。而且，熟知将这些DNA稳定地引入所需细胞（例如哺乳动物细胞和最优

选人体细胞类型）的方法。同样，本领域熟知通过同源重组实现所需 DNA 定点插入的方法。

[0162] 然而，虽然已知将特定 DNA 引入所需体细胞并检测的适合载体和方法，但是对这种方法的效率有显著妨碍的是组织培养中正常（即，非永生性）细胞的寿命有限。在需要引入多个 DNA 修饰，例如缺失、取代和 / 或添加的情况下这尤其成问题。基本上，虽然已知实现靶向 DNA 修饰的方法，实现和选择这些修饰所必需的时间可以十分长。因此，在实现所需 DNA 修饰之前，细胞可能变老或死亡。本公开提供了可通过在基因修饰之前、同时或之后将卵母细胞或其它胚细胞类型的细胞质引入受体细胞来减轻基因和细胞治疗的这种固有限制的方法。单独或与端粒酶或 DNA 或另一种引起端粒酶表达的化合物组合引入这种细胞质将重编程基因修饰细胞并且使其在组织培养中的寿命更长。在受体细胞基因修饰期间可一次或重复实现这种重编程。例如，在非常复杂的基因修饰的情况下，可能必需通过重复引入供体细胞质“重编程”受体细胞多次以防止衰老。通过监测组织培养中细胞的倍增时间确定这种重编程的最佳频率，使得在细胞变老之前重编程细胞。

[0163] 所得到的重编程基因修饰细胞，由于重编程其寿命更长，可用于细胞和基因治疗。而且，这些细胞可用作核移植法或生成嵌合体动物的供体细胞。本方法使得可能生成具有复杂基因修饰的克隆嵌合体动物。这将特别有利于生成人疾病的动物模型。同样，本方法将有益于所需基因产物的表达或表现型取决于不同 DNA 序列的表达，或者有益于涉及不同基因相互影响的基因研究。而且，随着不同基因表达的相互影响更为人们所了解，预计本方法将变得十分重要。

[0164] 本公开的又一个应用是用于减轻老化作用。正如哺乳动物细胞在组织培养中的寿命有限，同样在体内的寿命也有限。假设寿命有限以解释为什么生物（包括人）的正常最长寿命由人体细胞有限寿命所确定。

[0165] 本申请提供了通过从个体取得哺乳动物细胞并通过引入来自卵母细胞或其它胚细胞类型（例如，卵裂球）的细胞质改变（延长）这些细胞的寿命而减轻老化作用的方法。所得到的恢复细胞可用于在组织培养中生成分化细胞类型，并且然后可将这些细胞引入个体。这可用于（例如）恢复个体的免疫系统。这种恢复可用于治疗被认为是免疫起源的疾病，例如一些癌症。

[0166] 同样，所述方法可用于生成可在组织损伤或选择性手术的情况下使用的自体移植片，例如皮肤移植片。

[0167] 本公开的另一个应用是用于治疗按年代顺序和 UV 诱导的老化对皮肤的影响。随着皮肤老化，可能出现各种物理变化，包括褪色、失去弹性、失去光泽、出现细纹和皱纹。预计通过局部施用含细胞质的组合物可减轻或者甚至逆转这种老化作用。例如，局部施用后，就可将来自卵母细胞（例如牛卵母细胞）的任选进一步包括端粒酶或端粒酶 DNA 构建体的细胞质包装在脂质体内以促进内化至皮肤细胞内。同样，可能有利的是在这种组合物中包括促进皮肤吸收的化合物，例如 DMSO。可将这些组合物局部涂于老化作用最显著的皮肤区域，例如眼、颈部和手周围的皮肤。

[0168] 本公开的又一应用是用于鉴定细胞质内诱导去分化的物质。这可通过分离细胞质并筛选这些成分实现，以鉴定哪些成分含有转移至受体细胞（例如人分化细胞类型）时引起有效恢复或重编程的物质。

[0169] 可选地，可通过比较早期胚胎和卵母细胞与更高分化胚胎中的 mRNA 表达进行扣

除杂交鉴定卵母细胞细胞质内含有的负责重编程或恢复的组分。

[0170] 尽管在一些实验系统中鉴定了足以实现体细胞去分化的因子，但并未完全鉴定胚细胞细胞质内含有的负责细胞重编程或去分化的组分或化合物。实际上，甚至不确定全部这种组分的具体性质，例如所述组分是氨基酸还是蛋白质。

[0171] 这些组分可包含核酸，尤其是母体 RNA 或由其编码的蛋白质。在这一点上，不同小组报道极早期胚胎含有一类称为母体 RNA 的 RNA，其储存于卵的极早期，但经过囊胚期并未检测到。(Kontrogianni-Konstantopoulos 等，Devel.Biol.，177(2)：371-382(1996).) 不同物种（即兔、牛、猪、羊和小鼠）的母体 RNA 含量已定量。(Olszanska 等，J.Exp.Zool.，265(3)：317-320(1993)。与之有关的是，已报道果蝇卵母细胞内的母体 RNA 编码可结合相邻卵泡细胞内存在的酪胺酸激活酶受体的蛋白质，酪胺酸激活酶受体发起导致脊部卵泡细胞分化的各种事件，起到限定和定向胚胎将来的背腹轴的作用。(Schupbach 等，Curr.Opin.Genet.Dev.，4(4)：502-507(1994).)

[0172] 同样，分离卵母细胞显示分裂素活化的蛋白激酶在小卵母细胞中表达水平更高，表明这是储存用于早期胚胎形成的母体 RNA。据估计，这涉及胚胎以及成人细胞内的信号转导。(Zaitsevskaya 等，Cell Growth Differ.，3(11)：773-782(1992).)

[0173] 更进一步地，已报道蚕卵母细胞中的母体 mRNA 编码可能是形成胚胎的细胞胚盘所必须的结构组分的蛋白质，并且这种母体 mRNA 与皮层细胞骨架的联合可参与胚盘发育期间合成新的细胞骨架或相关结构。(Kastern 等，Devel.，108(3)：497-505(1990).)

[0174] 而且，已报道海胆卵和两栖动物卵母细胞中存在的母体聚 (A)+RNA 分子包括 U1RNA、体细胞核前 mRNA 剪接中的辅助因子辅助因子，并且这种 RNA 含有散布有单拷贝元件的重复序列。(Calzone 等，Genes Devel.，2(3)：305-318(1988)；Ruzdijic 等，Development，101(1)：107-116(1987).)

[0175] 因此，基于此并且观察到细胞质显然含有一些引起细胞重编程的组分，可能鉴定化合物，很可能是在适当条件下供所需细胞重编程或去分化的卵母细胞和早期胚胎的细胞质中存在的核酸和／或蛋白质化合物。这可通过（例如）基于大小或等电点将细胞质分离为不同成分并确定那些转移至分化细胞类型时实现去分化或重编程的因子而实现。

[0176] 可选地，可通过扣除杂交或差示杂交，基本上通过鉴定胚胎分化经过某一阶段，例如经过发育囊胚期之后丧失而在卵母细胞内存在的那些 mRNA 和鉴定哪些 mRNA 涉及去分化或重编程而鉴定负责重编程的因子。

[0177] 因此，本公开包括鉴定当转移至分化细胞内供去分化或重编程的特异性细胞质物质，例如多肽和／或核酸序列。根据有关母体 RNA 的报道，预计负责去分化或重编程的活性物质可包括母体 RNA 及由其编码的多肽。

[0178] 在这种核酸或多肽经鉴定并测序之后，可通过重组法生成。预计这些重组生成的核酸或多肽将足以诱导所需细胞重编程或去分化。

[0179] 本公开进一步涵盖（例如）根据分子量、等电点、凝胶过滤和盐沉淀将卵母细胞细胞质或来自 ES 细胞的细胞质分为不同成分的测定和为鉴定从细胞核释放的 mRNA（例如 REX 或 OCT-4) 进行的筛选测试，其中将所述不同成分加入含有一种或多种来自所需分化细胞（例如，哺乳动物、两栖动物、鸟类或昆虫细胞）的分离细胞核的不同微孔中。例如，可通过 PCR 扩增和检测来鉴定 mRNA。

[0180] 可选地，可进行 PCR 筛选测定，其中可将卵质加入所需分化细胞中，并且可进行测定以鉴定引入卵母细胞细胞质之后从细胞核释放出哪些 mRNA，例如 REX 或 OCT-4。

[0181] 可通过已知方法，例如扣除杂交、差异显示和差示杂交技术鉴定这些 mRNA。基本上，这些方法供比较不同细胞或不同时期细胞的不同 mRNA 群体，并且按照惯例用于鉴定仅在特定条件下表达或由特定类型的细胞表达的基因。

[0182] 尤其，可通过使用卵母细胞 RNA 实现扣除杂交，所述卵母细胞 RNA 用从正常体细胞 RNA 获得的 RNA 的进行扣除。从而，可鉴定涉及细胞重编程的 RNA。

[0183] 另外，本公开进一步包括通过使分离的细胞核接触从卵母细胞、卵裂球或 ES 细胞分离的细胞质而重建来自所需分化细胞的细胞核，例如源自组织培养中可被基因修饰的分化细胞的细胞核，和将这种重建细胞核加入胞质体，从而生成增殖潜能提高和寿命增加的恢复细胞。

[0184] 体细胞转分化和再分化和产生用于细胞治疗的细胞

[0185] 介绍

[0186] 从成人获得的（间叶、造血、神经元）干细胞作为用于细胞和组织移植以治疗人疾病的物质来源越来越受关注。在很大程度上，通过发现在体外的非期望组织区室内存在某些类型的干细胞（例如，骨髓内的神经元干细胞）刺激了这种关注。另外，一些类型的干细胞展示出当从其小生态环境移植至异种组织区室时能够转化为其他类型细胞的意想不到的可塑性。尽管有这些进展，干细胞可用性和数量问题仍存在。

[0187] 成人细胞的转分化潜能已受到更多关注 (Eguchi 和 Kodama，1993)。转分化是在发育期间发生的生理过程，但也在许多成人器官，包括肝脏、甲状腺、乳腺 (Hay 和 Zuk，1999) 和肾脏 (Strutz 等，1995) 也有描述。已经证明用细胞骨架破坏剂、激素和钙离子载体处理细胞培养物可在体外人工诱导细胞形态和功能改变。转分化是在发育期间发生的生理过程，但在许多成人器官，包括肝脏、甲状腺、乳腺 (Hay 和 Zuk，1999) 和肾脏 (Ng 等，1999) 中也有描述。可在体外人工诱导细胞命运改变，并且存在大量描述转分化的公开资料。例如，在微丝抑制剂存在下可诱导胚胎卵裂球分化 (Okado 和 Takahashi，1988，1990；Wu 等，1990；Pratt 等，1981)。向用于体细胞的生长培养基补充细胞骨架抑制剂 (Brown 和 Benya，1988；Takigawa 等，1984；Shea，1990；Tamai 等，1999；Cohen 等，1999；Fernandez-Valle 等，1997；Yujiri 等，1999；Ulloa 和 Avila，1996；Ferreira 等，1993；Sato 等，1991；Zanetti 和 Solursh，1984；Kishkina 等，1983；Hamano 和 Asofsky，1984；Holtzer 等，1975；Cohen 等，1999)、钙离子载体 (Shea，1990；Sato 等，1991)、皮质类固醇 (Yeomans 等，1976) 和 DMSO(Hallows 和 Frank，1992) 引起细胞形状和功能变化。可诱导乳腺上皮细胞获得肌样形状和功能 (Paterson 和 Rudland，1985)，可诱导脾细胞生成 IgM 和 IgG 免疫球蛋白 (van der Loo 等，1979)，胰腺外分泌管细胞可获得胰岛素分泌、内分泌、表现型 (Bouwens，1998a，b)，3T3 细胞变成脂肪细胞 (Pairault 和 Lasnier，1987)，间叶细胞变成成软骨细胞 (Rosen 等，1986)，骨髓细胞变成肝细胞 (Theise 等，2000)，胰岛变成管细胞 (Yuan 等，1996)，肌细胞变成 7 种非肌细胞类型（包括消化、分泌、腺、神经细胞）(Schmid 和 Alder，1984)，肌肉变成软骨 (Nathanson，1986)，神经细胞变成肌肉 (Wright，1984)，骨髓变成神经元细胞 (Black，2000)。

[0188] 体细胞转分化和再分化和生成用于细胞治疗的细胞的方法

[0189] 本部分描述了用于细胞体外转分化的组合物和方法，所述组合物和方法可避免使用植入前早期胚胎、胎儿组织或成人干细胞并且可使用患者自身细胞作为供体而专用于患者个体。

[0190] 这些方法利用细胞在体外“活化 (primed)”之后对环境因子起反应的能力。在这种情况下活化可通过破坏细胞骨架结构的稳定性，从而去除细胞形状和核功能之间的反馈机制而实现。形状和功能限定了任一细胞类型的特异性。用作源的人细胞类型为分化的体细胞，例如来自皮肤活体组织检查的成纤维细胞和角化细胞，及来自血样的白细胞。首先用细胞骨架抑制剂破坏细胞结构的稳定性，从而其核结构变得容许改变并且暴露于促进或支持所需细胞类型的条件后，活化细胞获得这种新形态和功能。活化细胞具多潜能性，并且应用于诱导中枢神经系统形成的因子后就能够分化为不同神经元、星形细胞或少突胶质细胞。产物是与从供体采样得到的成纤维细胞基因相同的新分化神经元细胞类型群体。这些方法克服了对患者特异性细胞衍生的障碍和限制，所述障碍和限制是：需要胚胎作为胚胎干细胞源，供体和受体之间的组织相容性，通过异种移植传播病毒的风险，供移植的细胞 / 组织的量不足，生成胚胎和胚胎干细胞相关的成本高，终身免疫抑制和需要重复治疗。

[0191] 这些方法可用于实现任一类型的体细胞转分化为任一其它类型的体细胞。这种可使用或生成的细胞实例包括成纤维细胞、B 细胞、T 细胞、树突细胞、角化细胞、脂肪细胞、上皮细胞、表皮细胞、软骨细胞、卵丘细胞、神经细胞、胶质细胞、星形细胞、心肌细胞、食道细胞、肌细胞、黑素细胞、造血细胞、巨噬细胞、大单核细胞和单核细胞。

[0192] 与这些方法一起使用的细胞可为任一动物物种，例如哺乳动物、鸟类、爬行动物、鱼和两栖动物。可通过这些方法转分化的哺乳动物细胞的实例包括但不限于人和非人灵长类细胞、有蹄类动物细胞、啮齿动物细胞和兔类动物细胞。可用其实施这些方法的灵长类动物细胞包括但不限于人、黑猩猩、狒狒、猕猴和任一其它新或旧世界猴的细胞。可用其实施这些方法的有蹄类动物细胞包括但不限于牛、猪、绵羊、山羊、马科动物、水牛和野牛的细胞。可用其实施这些方法的啮齿动物细胞包括但不限于小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠和沙鼠细胞。兔细胞的实例为可用其实施这些方法的兔类动物细胞。

[0193] 使用本方法，可将一种分化细胞类型的细胞转化为不同分化细胞类型，而不必转化为干细胞样细胞中间体。可在不丧失细胞生存能力的前提下做到这一点，并且同时使转化细胞保持其全部生化活性和染色质稳定性。

[0194] 本方法的示例性实施方案包括依次评估转分化所需的每个步骤。所述步骤包括：1. 原代细胞培养物的生长，“活化”剂的有效性和可靠性，体外活化状态的评估；2. 诱导时活化细胞转分化的能力；3. 设计重复性和可靠性好的诱导方法；4. 保持细胞功能稳定的能力，和 5. 细胞移植时，新转分化细胞类型与患者细胞相互作用的能力。在帕金森病的大鼠模型中，活化的和新诱导细胞类型特征在于其基因表达、细胞表面抗原、形态、应激性、分泌功能、形成突触和稳定的功能性移植。

[0195] 目前治疗各种神经元紊乱的药物策略是可用的，但全部有机化学药品的临床疗效有限。例如，治疗帕金森病使用最广泛的药物左旋多巴为多巴胺前体并且引起能由神经元生成的多巴胺增多。然而，左旋多巴的副作用是使人衰弱并且包括幻觉、严重的恶心和呕吐。长期使用引起诱导耐受性，其依次转化为随时间剂量增加，最终导致更低的临床受益：风险比率。由于治疗剂必须穿过血脑屏障，这对于血流中存在的多数蛋白质和肽而言不会

发生，所以使用生物制剂治疗脑部功能障碍不可行。由于传统药物和生物干预的限制，所以正积极寻求替代方法。体外细胞培养和操作技术的最新进展已产生了使用细胞移植作为修复因由于疾病进展而受损的细胞或组织的方法的前景。这种方法不仅提出了治疗疾病的前景，而且如果移植细胞在移植至宿主组织时变得充分融合且具功能性，则可能最终治愈。目前，有 3 个主要目标区域用于获得用于细胞移植治疗候选疾病，例如帕金森病和其它神经系统病症。依次讨论每种方法。

[0196] 首先，最近由胚泡内细胞团衍生的猴和人胚胎干细胞样细胞使得能够研究分化事件，之前这在灵长类动物中是不可能的。已证实胚胎干细胞样细胞在体外发育成具完整三胚层的谱系。因此，许多研究小组将其资源集中于使用治疗性克隆方法，所述方法将哺乳动物卵母细胞用作开发基因组重编程的重要因子的媒介物。然而，还必须评估将由 ES 样细胞衍生的特化细胞用于人异体移植的可能性 (Bain 等，1995 ;Brustle 等，1999 ;Fairchild 等，1995 ;Keller，1995)。

[0197] 其次，为患者提供高度特化细胞类型的替代方法依赖于作为中间体的非胚胎干细胞。从成人患者的特定部位获得组织特异性祖细胞群体，例如间叶、造血和神经元干细胞。这些成人组织特异性干细胞已被分离、体外增殖，并且对间叶细胞和神经元前体细胞分别分化为脂肪细胞、软骨细胞、骨细胞、血细胞和神经元取得惊人的进展 (Pittenger 等，1999 ;Black 等，2000)。使用这种方法，降低了供体细胞和受体之间的组织相容性。主要缺点是此过程需要并未完全确立的繁琐临床和实验室步骤以从成人获得足够量的祖代干细胞。

[0198] 最后，第三种策略包括将猪细胞用作供体进行异种移植。最先进的程序包括从猪胎儿获得神经元并通过最少的体外操作将其移植至人患者体内。治疗一位患者平均需要 8 个胎儿，从而限制了这种方法的实用性 (Studer，个人传播)。另外，最近对猪病毒向人的传播的关注减慢了该领域其它有希望的有效研究 (Imaizium 等，2000)。

[0199] 尽管有这些发现，但未描述不需要胚胎或其它干细胞作为中间体的各种组织特异性细胞类型的发育途径。因此，在整个生化研究范围内极有理由发展生成患者相容或自体特异性细胞类型的方法。为治疗上百万患有以下疾病的患者将需要可靠的细胞来源 :帕金森病、亨廷顿氏舞蹈病、阿耳茨海默氏病、多发性硬化、脊髓损伤、中风、烧伤、心脏病、糖尿病、关节炎和许多遗传性疾病和可能受益于细胞 / 组织治疗和其它病症。在生成用于人细胞 / 组织治疗的特化细胞类型和组织的可靠且有效策略中使用胚胎和 / 或成人干细胞的能力有待证实。虽然有这些成功和令人兴奋的前景，但干细胞供体和受体之间组织相容性问题仍未解决，用于胚胎干细胞衍生的植入前胚胎的可用性也是如此。

[0200] 可由从单个供体 (原代细胞培养物) 取得的单一类型的体细胞来生成各种类型的分化神经元细胞，并且将所得到的细胞移植至相同个体内。本方法供实现在体外将高度特化的体细胞 (例如，皮肤成纤维细胞) 转分化为不同的完整功能性特化细胞 (多巴胺能神经元、星形细胞、少突胶质细胞、GABA 神经元、羟色胺神经元、乙酰胆碱转移酶神经元等)。本方法不需要利用卵母细胞、植入前早期胚胎或胎儿组织的任何部分作为去分化和重编程的媒介物。可专用于个体患者。

[0201] 本方法利用了个体的所有细胞均含有发育所需的全部遗传信息的事实。限定细胞形态和功能的特定基因的表达主要由基因编程和环境信号所确定，但也可因环境损害而改

变（正如伤口愈合、骨再生和癌症中）。为了改变细胞的功能，本方法使用细胞骨架破坏剂“活化”分化细胞。假设活化改变了细胞骨架，其破坏了细胞的运输结构，并且最终干扰细胞核从细胞周围接收的细胞类型特异性反馈机制。这种破坏使得细胞核变得对来自环境的不同或替代提示起反应。活化之后，细胞暴露于诱导并支持其分化为所需细胞类型的环境（即，神经元的神经基础培养基）中。

[0202] 本方法的益处明显且包括：

[0203] (i) 不需要胚胎或胎儿组织。使用本方法，生成转分化细胞不必生成、损坏或使用人胚胎因此消除了生产成本、时间限制和对伦理方面的关注。

[0204] (ii) 不需要患者免疫抑制。在许多临床前动物模型和一些临床人受试者中已经证明了有效的异体和异种细胞治疗法。然而，在多数情况下，仅与药物免疫抑制组合时出现移植存活期延长（超过几天）。这包括用设计为排除组织相容性分子的人造基质材料（例如，藻酸盐）封装细胞的情况。虽然基质封装法可能减少短期移植排斥，最后移植细胞由于囊周纤维化引起的营养和氧气缺乏而被破坏。这导致需要重复治疗。因此，使用基于细胞的治疗进行长期持久治疗的优选方法涉及最初源自患者的细胞。

[0205] (iii) 不存在由于可能传播动物病毒的健康风险。本方法避免考虑关于猪内源性逆转录病毒 (PERVS) 异种移植。PERVS 是位于由逆转录病毒 DNA 整合产生的猪基因组内的祖先基因。在人体内存在猪细胞可能诱导 PERV 在免疫抑制患者体内表达，这可能引起重组，从而生成新的病原体。如果新病毒可传染，这将不仅对患者，而且对周围群体也造成新的健康威胁。由于在所述方法中未曾使用动物细胞的组分，所以不用担心动物基因组 DNA 序列（例如 PERVS) 的威胁。

[0206] (iv) 大量特化细胞在相对较短时间内可用。本方法与仅获得少量起始干细胞（来自胚泡的 10-15 个细胞）的胚胎法形成对比。我们的竞争对手 (Geron，Menlo Park，Calif.) 正在研发的现有策略利用确立的人胚胎干细胞系作为其产品的基础。因为用于衍生原始细胞系的细胞数量非常小，必须进行大量体外增殖以满足上百万待用细胞疗法进行治疗的患者的需要。已知大量体外增殖导致获得的基因突变和甚至自发永生化。因为本方法中从个体患者获得大量细胞（不再需要单个普通干细胞源）作为原材料，体外增殖的程度仅仅是为了活化细胞，转分化细胞和生成足以进行所需临床应用的细胞。

[0207] (v) 更低成本。本方法将通过消除为减少超急性（异种移植中）和延时排斥（异体和异种移植中）对患者免疫抑制的需要而显著降低细胞治疗的成本。使用现有移植方法，患者依赖于终身免疫抑制治疗，这不仅昂贵，而且导致感染风险和更低生活质量。很可能减少对重复移植操作的需要。

[0208] 以“活化”供体细胞进行转分化而不必使其恢复为干细胞样细胞的方式处理供体细胞。这样做不会失去细胞生存能力并且使细胞保持其全部生化活性和染色质稳定性；简而言之，确保细胞可保持其全部功能性。

[0209] 在体内，分化细胞类型在生理需要时进行增殖和继续循环的能力不同。已知若干细胞类型最终停止在细胞周期的 G0 期并且在出生之后并不增殖。实例为心脏平滑肌细胞、神经细胞、男性睾丸中的塞尔托利细胞和女性卵巢内的卵母细胞。然而，已知其它细胞类型在出生后保持很高的再生能力。包括肝细胞、若干结缔组织细胞类型（软骨、骨和成纤维细胞）、上皮细胞（皮肤和肠）、造血细胞（骨髓和脾），并且这种再生通常可受外伤诱导。这

些细胞不仅可自身再生，而且可生成表现型明显不同的细胞。成人细胞的转分化潜能已受到越来越多的关注（Eguchi 和 Kodama，1993；Strutz 和 Muller，2000）。

[0210] 本方法描述了用细胞骨架抑制剂（细胞松弛素 A、B、D 和 E、拉春库林（latrunculin）、促微丝聚合剂（jasplakinolide）等）进行体外培养将一种类型的体细胞转分化为另一种类型的技术。进一步描述了用于保持新转分化细胞类型、稳定细胞形态和细胞特异性基因和蛋白质表达的技术。本方法的用途在于研发可靠地指导分化为所需细胞类型的特异性生长因子、基质和细胞因子组合。这为捐赠原始体细胞样品的相同个体的细胞移植提供了自体（同基因）细胞类型。本方法克服了细胞移植受体的免疫排斥，显著缩短了“新”细胞用于治疗所需的时间，不使用胚胎或胎儿中间体作为重编程的媒介物，并且不需要生成胚胎或任何其它干细胞前体。本方法生成被活化发育为神经细胞谱系的细胞。细胞“活化”期间，可将其作为部分去分化细胞用于衍生其它非神经细胞类型。

[0211] 1. 研发供体细胞类型、最佳细胞周期和活化剂之间的相互作用矩阵

[0212] 基本原理：大多数哺乳动物组织的终末分化体细胞在发育期间失去基因组可塑性。根据细胞在体内的位置、形态学外观（形状和大小）、特异性蛋白质的表达和特化功能将细胞特征化为属于特异性组织。当细胞从个体分离并在培养中增殖时保持了一些特征。已确立支持各种细胞类型在培养中大量扩张的条件，正如需要保持其形态和功能主要是因为实验目的是为了保持所需细胞类型（Basic Cell Culture Protocols，1997）。人们还认为在各因子中这决定了细胞在发育和分化期间的命运，环境和来自相邻细胞和细胞外基质的提示（Hohn 和 Denker，1994）不仅促进某些细胞类型增殖，而且决定其终末分化表现型（Fuchs 等，2000）。可诱导若干细胞类型在培养时转分化，例如骨髓细胞转分化为脑细胞（Black 等，2000）和肝细胞（Theise 等，2000），肌细胞转分化为软骨细胞（Nathanson，1986），甲状腺细胞转分化为神经元（Clark 等，1995）和乳腺上皮细胞转分化为肌细胞（Paterson 和 Rudland，1985）。虽然可能，但尚未检验成纤维细胞的转分化，并且尚未描述任一细胞类型允许发生转分化的“活化”状态。

[0213] 实验：可设计析因实验以研究供体细胞类型、引物、引物浓度、活化持续时间和供体细胞的细胞周期之间的相互作用。使用标准细胞培养条件（DMEM，补充以氨基酸、L-谷氨酰胺、β-巯基乙醇、10％胎牛血清；Gibco，Gaitherburg，Md.）体外孵育从商购来源（Clonetics，Calif. 和 ATCC，Rockville，Md.）获得的人原代角化细胞、成纤维细胞、白细胞和肝细胞并扩张至 1×10^7。培养物补充提高剂量的细胞松弛素 B（CB，0.1-10μg/ml；Sigma Chemical Co，St.Louis，Mo.）并在 72h 内每隔 12h 记录一次细胞的形态。可在抑制剂不存在时或在用于溶解 CB 的 DMSO（Sigma）单独存在下体外孵育对照细胞。在实验的相同时间点，根据公开的方法通过 RT-PCR 和免疫细胞化学（ICC）检查细胞的它们的特异基因/蛋白质表达下调/丧失。用于这些研究的多数寡核苷酸引物和抗体均是商购。表 4 中总结了一些标记。关联地，在以上所述浓度和时间检查其它微丝抑制剂（细胞松弛素 A、D 和 E）的影响。

[0214] 使用公开的方法在细胞周期的 G1、S、G2 和 M 期同步细胞（Leno 等，1992）。简言之，通过用 2.5mM 胸苷阻滞于初始 S 期 20h，然后在间隔 5h 之后用脱羰秋水仙碱阻滞于有丝分裂 9h 而同步化生长的原代培养物。摇落有丝分裂细胞，并且在细胞离心涂片器制玻片上检测有丝分裂指数。两次胸苷阻滞（胸苷 17h，放行 9h，胸苷 15h）用于在 S 期开始时同步

细胞。预计在放行第二次胸苷阻滞后 7h，细胞将积聚于 G2 期。然后将同步细胞群体暴露于描述为非同步、随机循环细胞群体的 CB。

[0215] 表 4 供体细胞类型和相关内源性、表现型特异性标记

[0216]

供体细胞类型	内源性标记
皮肤成纤维细胞(中胚层)	FSP-1、波形蛋白、纤连蛋白
角化细胞(外胚层)	角蛋白、黑色
肝细胞(内胚层)	纤维蛋白原、清蛋白、细胞角蛋白 8、18、19
血细胞(中胚层)	免疫球蛋白、CD 抗原

[0217] 数据收集和分析：细胞形状和一般形态的变化用作“活化”的第一指标并且通过延时视频成像（冷却式 CCD 照相机，放大 40x，正置 Olympus 的 DIC 光学元件，Metamorph 成像软件）顺次记录图像。通过 RT-PCR 和 ICC 评估原代细胞特异性基因表达和因此进行的蛋白质合成的下调 / 丧失的模式，并且与在培养中生长了相同时间但未暴露于抑制剂或暴露于相同浓度的用作细胞松弛素 B 溶剂的 DMSO 的对照原代细胞进行比较。

[0218] 粘附细胞（例如成纤维细胞）将因为细胞骨架抑制而改变形态。悬浮生长的细胞（血细胞）可能展示更少的形态改变或无形态改变。在整个细胞周期和核分裂，细胞很可能继续核进展，而胞质分裂受抑制。根据 CB 剂量，在不存在细胞分裂的情况下细胞可完成一轮或多轮 DNA 复制和核分裂。经细胞松弛素 B “活化”的细胞失去其细胞特异性基因表达，并且预料这种下调与活化剂浓度和暴露持续时间相关。低浓度和高浓度 CB 活化法均有优缺点。CB 的较低浓度可诱导细胞结构慢慢地、逐步地被破坏。这将依次使细胞逐渐减少细胞将组织特异性因子转运至其细胞质或原生质膜靶标。如果之后抑制持续更长时间，细胞核的功能将变得失去源于靶向位点的反馈信号。

[0219] 在没有这种反馈调节的情况下，细胞核将采用变得更少依赖从直接环境收到的提示的不同基因表达谱。低剂量法可能的缺点是随着孵育时间延长，细胞生存能力可能下降。可按照有益于神经元发育的因子（抗坏血酸、全反式视黄酸、神经基本生长培养基、bFGF 和纤连蛋白）允许逐渐（非突然）为细胞强加变化的方式操纵环境。另一方面，当短时间需要大量特异性蛋白质以维持细胞功能（例如分泌激素的内分泌细胞）时，较短时间的高浓度 CB 可能有利。暴露于高浓度 CB 期间，细胞继续复制其 DNA 并且在没有胞质分裂的情况下仅进行一次有丝分裂（核分裂）。低剂量法之后预计活化细胞内有多个细胞核，并且必须评估多个细胞核对细胞功能的影响。在高浓度 CB 下，预计双核细胞为主要产物。除细胞类型外，活化之后在特定细胞类型暴露于“引物”的细胞周期将产生不同产物。我们的初步结果显示在 CB 存在下细胞可保持生存至少 72h，而对其存活率无不利影响。

[0220] 使用本文所公开的方法可进行实验以测试影响转分化过程的各个参数值而开发

相互作用的数据库。这个数据库将允许人们根据获得所需形态和基因下调模式的细胞来预测使用特定细胞类型、特异性引物、特定浓度和暴露时间的结果。

[0221] 已表明DMSO可诱导其自身功能变化(Hallows和Frank,1992)。如果对照实验显示这的确可能,我们将更详细地单独检查DMSO的作用并据此设计实验。使用所公开的方法,我们已经发现成纤维细胞以高度重复性对CB起反应并且实际上所有细胞均展示出表现型变化,使其成为选择用于转分化的细胞类型。然而,也可使用替代细胞类型,例如角化细胞或白细胞。选择使用的源细胞易于获得,对于患者而言极少侵入和不适。如果在不同供体细胞类型之间无明显差异,可使用成纤维细胞。

[0222] 不同细胞骨架抑制剂在活化期间将诱导明显不同的细胞改变。适合用于本方法的细胞骨架抑制剂包括微丝破坏剂(细胞松弛素B、D、A、E;波形蛋白、拉春库林、促微丝聚合剂)。这些抑制剂通过不同细胞靶点起作用以解聚微丝网,并且特定作用模式可对“活化”有利/不利。预料不同活化剂诱导不同“活化”状态:例如,CB可能是供神经元发育的“活化”细胞,而细胞松弛素D可能是进行造血发育的相同细胞(保密原始数据,未公开)。

[0223] 在本方法中微管抑制剂,例如秋水仙素、秋水仙胺、诺考达唑和紫杉酚,也可用作引物。可在已证实诱导细胞功能变化的浓度下使用(Cohen等,1999)。活化剂可单独使用或组合使用。例如,可单独或一起使用一种或多种微管抑制剂,或与一种或多种微丝抑制剂组合使用(Shea,1990)。经实验确定的浓度的微丝和微管抑制剂的组合可用于实现完成细胞骨架的去稳定作用。

[0224] 提供成纤维细胞的供体的年龄可能是决定“活化”反应的另一个因子。来自年轻患者的成纤维细胞可展示比来自年长患者的成纤维细胞更高的“活化”潜能,并且将在最初实验中进行检查。动物中的核移植(NT)实验表明源自年轻供体的细胞重编程更好并且导致完成产前发育的NT胚胎比例比由成人体细胞产生的胚胎更高(Yang等,2000)。

[0225] 证明自身活化程度有限。这可能是由于细胞不能将核记忆消除至功能变化所需的程度。类似地,仅可将从一个细胞谱系(即,外胚层)获得的供体细胞活化发育成另一种外胚层源细胞类型。为克服这种潜在缺陷,细胞将有条件地永生/分化。已证实通常在各种癌症中存在的转化、永生化细胞具多潜能性并且可视为“活化”细胞。通过转染表达突变体(SV40大T抗原的不耐热形式)的转基因实现培养的原代细胞的条件性永生(Bond等,1996;SV40tsA58)。通过在33℃下培养可使转基因这种抗原的细胞永生,其中大T抗原完整且具生物活性。然后,通过将孵育温度升至37℃可将细胞恢复至原始功能状态,其中抗原被截断并且在较高温度下没有活性。由于永生细胞展示出去分化细胞的性质,所以更易于活化,然后通过提供所需细胞类型的适当培养条件而诱导分化。诱导分化的同时,通过升温可使细胞回到非永生状态。如果转分化原始培养物(以上)出现困难,将采用该策略。最后,如果证明这种方法可行,则转基因一侧为loxp位点,使得可使用Cre重组酶从最终产物去除转基因。我们将首先尝试诱导供体细胞获得癌症样特征,并使其易受活化和/或诱导分化(Cohen等,1999)。

[0226] 第二种加强活化的方法包括用干扰乙酰化和/或甲基化的药物进行核结构操作。有大量公开文献描述了脱乙酰基酶抑制剂(制滴菌素A;Yoshida等,1995)和甲基化酶抑制剂(5-氮杂-胞苷;Boukamp,1995)对核染色质对基因组转录中涉及的转录因子、转录增强子和其它蛋白质的容许度的有益影响(Kikyo和Wolffe,2000)。组合使用干扰乙酰化和

/ 或甲基化的试剂和破坏细胞骨架的试剂可使活化孵育时间更短，核功能逆转更完全，并且因此扩大了可源自活化细胞群体的细胞范围。所选供体细胞应具有稳定的核型，必须能够支持体外扩张和在低温贮藏和后来解冻条件下存活。一些细胞类型可能比其它细胞类型更适于作此用途。同样，必须确定对转分化细胞诱导的倍性变化的长期影响。

[0227] 2. 利用实现诱导干细胞分化的方法实现活化细胞的转分化

[0228] 已描述了使胚胎干细胞和成人干细胞形成若干终末分化表现型的条件 (Bain 等，1995 ；Pittenger 等，1999 ；Fuchs 和 Segre，2000 ；Lee 等，2000 ；Bjornson 等，2000 ；Schuldiner 等，2000 ；Brustle 等，1999)。即使我们认为“活化”不会使体细胞转变成任一类型的干细胞，可使用支持干细胞分化的培养条件支持“活化”细胞的分化，记载最简单的分化方法包括使用视黄酸诱导分化为神经元细胞前体。获得 CNS 的分化细胞（例如，多巴胺能神经元、星形细胞、少突胶质细胞）是测试活化细胞潜能好的开始，不但因为这是获得分化细胞最直接的方法，而且是因为治疗帕金森病、亨廷顿氏舞蹈病、阿耳茨海默氏病、多发性硬化和修复脊髓损伤中神经细胞类型商业市场的大小。

[0229] 研究用于诱导小鼠 ES 细胞和人神经元干细胞中神经元前体的方法可用于诱导活化成纤维细胞转分化 ：补以视黄酸、5mM 抗坏血酸、bFGF2、PDGF 的无血清培养基，置于涂有纤维蛋白原的培养皿上。可在 36.8℃下将所有培养物保持于低氧环境 (2-5％)、5％ CO_2，正如已证实细胞培养期间降低 O_2 浓度，显著提高分化为多巴胺能神经元的神经元前体的比例 (15 至 56％ ；L. Studer，个人传播)。同时，活化细胞可在已描述支持造血细胞和肌细胞分化途径的培养条件下培育 (Fuchs 和 Segre，2000 中进行了评论)。通过延时视频成像检查细胞的形态，并且分别通过 RT-PCR 和 ICC 检查预期基因的诱导和蛋白质表达。

[0230] 表 5 活化细胞和预期基因标记的初始诱导培养条件

[0231]

预期产物	培养条件	诱导标记
Neuronal 神经元	**bFGF、FGF8、SHH、EGF、PDGF、T3、CNTF**	**TH、Nurr-1、Pax 3、5、8、En-1、FGFR3、GDNF、TUJ1、CalR 4B3、SMP**
造血细胞	**RPMI-40、白细胞介素、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、促红细胞生成素、血栓形成素**	**CD14、CD34、CD45**
肌细胞	**BMP-2**	**myoD1、骨骼肌球蛋白 LC、心肌动蛋白、肌间线蛋白、平滑肌肌动蛋白**

[0232] 可如所述诱导多巴胺释放 (Cibelli 等，2001)。简言之，去除培养基并用无 Ca、无 Mg 的 HBSS 代替。15 分钟后，用无 Ca、无 Mg 的 HBSS 代替这种培养基，并补充 56mM KCl 并且在孵育 15-20min 之后收集培养基样品并在测定之前保存在 -80℃下。

[0233] 数据收集和分析 ：可在相同培养条件下孵育对照非活化细胞并测定内源性基因和蛋白质的下调以及由培养条件诱导的基因表达。可通过其它地方描述的 HPLC 进行多巴胺测定。KCl 诱导释放之前采集的样品可用于对照测量。除多巴胺之外，可常规测定样品的羟色胺、乙酰胆碱和 GABA。

[0234] 细胞类型设计的培养条件可获得类似预期细胞类型的细胞。神经元细胞类型表现出诱导以上所述基因和蛋白质标记。例如，神经元以与细胞形态相关的以随时间变化的方式分泌神经递质。需要时，可设计电生理学实验以测试可激发性。预计对照细胞保持其最初表现型，维持相应基因和蛋白质表达并显示不存在非特异性基因和蛋白质表达。由于实际上所有细胞均对活化响应，有足够量的细胞可用于这些分析，因此在活化之前可通过扩张来操控其数量。

[0235] 活化期间可停止仅对供体细胞有特异性的基因表达谱，而不逆转为干细胞样状态。另外，在转分化期间，仅开启对预测转分化细胞类型相对应的特定基因表达。

[0236] 3. 对细胞内组分和细胞外基质起作用可再生地诱导单一细胞类型的试剂组合

[0237] 表征所形成的细胞类型是本发明的一个方面。本方法允许分析并定义使能够由成纤维细胞生成功能性神经元的所有条件。可用于确定在整个诱导细胞群体的一些细胞中是否生成神经元。由诱导胚胎干细胞已知，主要使用特异性生长因子 (GF) 或细胞因子生成某些细胞类型。然而，这些群体不纯并且存留了其它细胞类型。动物血清含有过多数量不明确的蛋白质和肽。因此，血清含有支持基本上体内所有细胞类型生长和分化的生长因子和细胞因子。因此，可研发无血清培养条件以正确评估 GF 和细胞因子的特定组合对活化细胞分化的影响。另外，可测试各种人工细胞外基质 (ECM) 的影响。无血清培养条件不一定必须诱导增殖，但必须维持细胞在体外的生存能力。也可评估特定类型的培养表面。由于在不同物种中许多细胞因子的活性并非总是相当，所以无论何时可用，可使用人所需生长因子。

[0238] 由于人基因组计划，大多数可商购的 GF 来自重组人基因。首先，可逐渐使原代细胞培养适应于无血清条件。然后，通过以上所述条件诱导活化。可使无血清条件下的活化细胞经受产生或支持特异性神经细胞类型的培养条件。可使用的生长因子 / 细胞因子包括 bFGF、FGF8、SHH、EFG、PDGF、T3 和 CNTF。可使用的细胞培养表面和 ECM 物质包括组织培养塑料、细菌培养塑料、玻璃、甲基纤维素、纤维蛋白原、纤连蛋白、凝胶、胶原蛋白、层粘连蛋白、聚 L- 赖氨酸和聚 L- 鸟氨酸。可评估所选单个 GF 组合单个 ECM 基质的作用以优化条件。可使用 ICC 测定细胞是否存在特定细胞类型的主要标记 :星形细胞 (GFAP)、少突胶质细胞 (O4) 和神经元 (TH)。可对诱导为神经元所生成的细胞进一步测定多巴胺、羟色胺、乙酰胆碱和 GABA 的释放。确定导致特定神经细胞类型富集的个体生长因子 / 细胞因子和 ECM 之间的相互作用后，可评估 GF/ 细胞因子与最佳 ECM 的组合。因此，实验上可确定产生最纯多巴胺能神经元群体的 GF/ 细胞因子和 ECM 组合结果。

[0239] 可通过 RT-PCR 确定 RNA 水平的基因表达，并且通过免疫细胞化学和 / 或蛋白质印迹法测定翻译产物。可根据细胞类型鉴定用于在分化状态表达特异性基因的标记。也可使用免疫细胞化学确定细胞群体的纯度。RT-PCR 引物和用于 ICC 和蛋白质印迹的杂交探针和抗体可购买得到。可通过 RNA 印迹分析基因表达的定量分析。可使用延时视频成像定期间隔记录暂时的形态变化。可在实验上确定的时间点监测主要标记基因的表达以评估活化和分化事件的时间。这种方法可获得关于供体体细胞花多长时间变得对新信号起反应和各种分化细胞类型花多长时间分化的信息。

[0240] 通过以上所述方法，可鉴定主要产生特定神经细胞类型的 GF/ 细胞因子和 ECM 的组合。例如，可鉴定产生多巴胺能神经元的最佳条件。除通过设计的分化方法生成所需细胞类型外，可能产生非所需细胞类型。特定生长因子和细胞因子组合可产生一系列可能必需

特征化的细胞类型。可连同研究追踪细胞反应的综合数据库进行三维实验析因设计（细胞因子 × 生长因子 × 基质）。合理信息数据库的组成包括有关供体细胞类型的编目信息、引物、活化条件、基因 / 蛋白质下调时间、这些基因 / 蛋白质的列表、诱导组分、转分化细胞类型特异性基因 / 蛋白质的时间和表达、这些基因 / 蛋白质的列表、细胞存活和分泌性质（如果有）。

[0241] 如果细胞转分化为一种以上细胞类型，可使用单细胞克隆生成纯细胞群体。已确认单细胞培养有挑战性并且许多细胞在其体外不存活。因此应努力研究在维持相同培养条件的同时保持细胞物理分离的单细胞培养。转分化细胞的寿命可能改变。可通过例行寿命分析确定寿命是缩短还是延长。如果转分化细胞展示出比对照供体细胞的寿命短，可在培养期间将 O_2 浓度降至 < 2%，设计较短活化法或避免供体细胞在活化之前过量体外增殖而维持寿命。

[0242] 除上述以外，还可将活化细胞注入活体模型（小鼠）促进某些细胞类型的部位，作为实现活化细胞转分化的方式。

[0243] 最后，由于旁分泌作用，可通过在能够诱导其相邻细胞表达特异性标记的其它细胞存在下培养活化细胞而实现活化细胞的转分化。例如，已证实转基因为 Pax-8 的细胞引起相邻细胞变成多巴胺能神经元 (L. Studer，个人传播）。

[0244] 4. 维持新分化细胞形态和功能稳定

[0245] 为使新分化细胞可用于细胞治疗，新分化细胞必须不但在体外保持所需细胞形状和功能，而且必须能够在转分化之后维持新确立的表现型 / 功能。通过最终使细胞周期停止于 G_0（由自身分化在体内诱导的事件）可实现维持细胞表现型稳定。虽然转分化细胞可保持一定的核可塑性，体外或体内适当条件应允许稳定化其表现型。维持相同环境信号（相同培养基、相同补充因子、温度和基质条件）稳定细胞表现型。

[0246] 可继续培养新转分化细胞并在特定时间点监测细胞类型特异性标记的表达。在不存在“活化”剂并且在符合“新”细胞类型的条件下进行培养。另外，可在不符合新细胞类型的培养基（或条件）中培养细胞以评估稳定性。新转分化细胞在对原供体细胞类型有特异性的培养条件下的特性尤其重要。

[0247] 数据收集和分析：可监测诱导细胞的形态并通过视频成像记录进展。可通过 RT-PCR 和 ICC 分别评估神经元抗原（神经丝、烯醇酶、酪氨酸羟化酶、GFAP、多巴胺受体、髓磷脂）、肌肉特异性抗原（β - 肌动蛋白、肌间线蛋白、肌球蛋白重链）和造血细胞标记 (CD34) 的基因表达和蛋白质表达 / 定位。

[0248] 回收活化剂（例如，微丝抑制剂）之后，细胞保持其新获得的表现型并且根据细胞表现型重新进入细胞周期或保持停在 G_0 期。预计新神经元保持在 G_0 期并且不增殖，保持神经元形态，分泌神经递质，建立突触和保持在体外存活长达 4 天 (Lorenz Studer，个人传播）。

[0249] 保持纯细胞群体可能有挑战，因为细胞在体内并非如此生长。为维持体内功能稳定，细胞必须与通常具不同表现型的相邻细胞相互作用（例如，神经元与神经胶质，肌肉与相连组织和血管内皮等）。必须在以下两种条件之一孵育新细胞类型：(1) 在三维基质上生长。这将使细胞建立更具生理性的 3-D 结构，引起空间相互作用和开始生成其自身的细胞外基质。在诱导分化期间使用这种策略。(2) 在体内与之相互作用的单层细胞类型上孵育

新分化细胞。

[0250] 5. 通过体内细胞移植至动物模型来评估转分化细胞的疗效。

[0251] 通过由体细胞转分化生成的神经细胞的体内功能对于评估治疗潜能至关重要。已对啮齿动物研发了若干标准化实验，其可可靠地模拟特定神经障碍的临床症状，例如帕金森病、亨廷顿氏舞蹈病、脊髓损伤、癫痫或中风。移植源自发育的 CNS 的神经元可显著增强许多这些动物模型的临床症状。对于缺失定义明确的特异性神经元较小群体的帕金森病，细胞治疗尤其令人期待。已对全世界 300 多名患者临床移植了胎儿多巴胺神经元，并且已证明移植后对患者长期有益，至少达 10 年 (Piccini 等，1999)。新近还报道了在亨廷顿氏舞蹈病中进行胎儿组织移植的成果令人鼓舞 (Bachoud-Levi 等，2000)。然而，使用胎儿组织引起妨碍更广泛使用该技术的重要伦理和技术关注 (Freeman 等，2000)。易于获得和更新的神经细胞源可用将显著改善 CNS 细胞移植在神经退化性疾病中的技术和社会前景。这种细胞源可用性还可能避免对进行 CNS 移植的受试者使用免疫抑制并且减少正如在猪胎儿多巴胺神经元的情况下对植入源自另一个体或物种的脑细胞的一些伦理和心理关注 (Deacon 等，1997)。

[0252] 实验：通过单侧立体定向注入特别为多巴胺能末梢占据并且向后运至细胞体内诱导凋亡性细胞死亡的神经毒素 6-OHDA 以产生帕金森病大鼠和小鼠。使用包括旋转流量计测定在内的最先进的行为测试评定移植细胞的行为结果。用模拟多巴胺作用的药物刺激后，帕金森病动物就表现出行为不对称，姿势不对称、同侧旋转和对侧忽略。注射 6-OHDA 2-4 周之后，动物受重复行为测试。随即选择有稳定行为缺陷的动物进行细胞移植或作对照组（每组 12 只动物，对照：注射非多巴胺能细胞或盐水）。移植之前使用多巴胺释放的非侵入性测量测试细胞的多巴胺生成 (Studer 等，1996；Studer 等，1998)。经纹状体植入功能性多巴胺神经元后，在 4-16 周内帕金森病症状，例如旋转行为就逐渐消失。完成行为研究之后，向动物灌注多聚甲醛并对脑部进行免疫组织化学分析 (Studer 等，1998)。通过免疫组织化学法鉴定宿主纹状体内存活的多巴胺神经元中合成多巴胺的酪氨酸羟化酶、限速酶。使用基于立体学的计算机辅助计算程序进行细胞数量的定量。

[0253] 数据采集和分析：手术数据：我们已经很详细地描述了诱导神经退化性病变以及进行先前所述移植的方法 (Tabar 和 Studer 1997)。建立与行为和组织结果相联系的分级计算机数据库以记录研究所包括的每个动物的所有相关数据。行为数据：用可商购的旋转流量计系统 (San Diego Instruments) 采集旋转数据。将 ASCII 文件输入统计软件做进一步分析 (Microsoft Excel 和 Statistica，Statsoft)。移植之前的体外功能测试：使用反相 HPLC 和先前所述的电化学检测来测定待移植细胞的多巴胺和羟色胺生成 (Studer 等 1998；Studer 等 1996)。用 ESA 专有软件采集数据并输出至 Statistica(Statsoft) 做进一步分析。组织学分析：使用立体学计数纹状体内酪氨酸羟化酶 (TH+) 细胞测定移植脑部中存活的多巴胺神经元数量 (Studer 等 1998；Gundersen 等 1988)。

[0254] 预期结果：在啮齿动物中建立帕金森病变：通常约 60-80％定向注射了 6-OHDA 的动物在术后 3 周注射安非他后变现出稳定旋转反应。丧失功能的恢复取决于移植细胞的数量和功能。在胎儿组织移植中，已确定完全恢复 6-OHDA 啮齿动物的旋转行为需要约 1000 只啮齿动物多巴胺神经元。多巴胺神经元的存活率通常约为 5-10％。

[0255] 可能的困难、限制和替代方案：动物模型：因为某些株系对一些麻醉剂（例如巴比

妥酸盐）表现出超敏性或在一些情况下对使用的神经毒性药物表现出各种敏感性，所以必须仔细选择小鼠或大鼠株系。需要替代株系和适应神经毒性药物的剂量。行为测试：帕金森病症状的程度可根据动物而不同。尤其在小鼠中，诱导稳定帕金森病变的成功率更低并且报道了自发恢复。在这种情况下可利用替代株系或神经毒素。组织学：如果遵循最先进的技术步骤，预计没有难度。替代疾病模型：生成特异性多巴胺神经元有挑战性。成人脑部中仅仅约 1 ： 10^4-1 ： 10^5 个神经元为中脑多巴胺神经元（Hynes 和 Rosenthal 2000）。如果没有多巴胺神经元，但其它神经元亚型可用于移植，选择替代疾病模型，例如啮齿动物鹅膏蕈氨酸病变，以模拟亨廷顿氏舞蹈病（Tabar 和 Studer 1997），随后移植神经元展示出更普遍的神经递质 GABA。

[0256] 重编程动物体细胞

[0257] 介绍

[0258] 干细胞技术的进展，例如人胚胎干（hES）细胞的分离和使用，已成为医学研究重要的新主题。hES 细胞具有经证实分化为人体内各种细胞类型，包括复合组织的潜能。hES 细胞的这种能力导致暗示由细胞功能异常引起的许多疾病可通过施用各种分化类型的 hES 源细胞治疗（Thomson 等，Science 282(5391)：1145-7(1998)）。核移植研究证明了可能将分化的体细胞转化回全能状态，例如 ES 或 ED 细胞的全能状态（Cibelli 等，Nature Biotech. 16：642-646，(1998)）。通过核移植将体细胞重编程回全能 ES 细胞状态的技术发展提供了一种递送具有患者核基因型的 ES 源体细胞的方法（Lanza 等，Nature Medicine 5：975-977，(1999)）。尽管存在同种异体线粒体，但人们期望不排斥这种细胞和组织（Lanza 等，Nature Biotech 20：689-696，(2002)）。核移植还允许通过再激活早期胚胎中端粒酶催化组分改造细胞中的端粒重复长度（Lanza 等，Science 288：665-669，(2000)）。尽管如此，仍需要改进重编程动物细胞的方法，提高成功率，完成重编程并减少对人卵母细胞可用性的依赖。

[0259] 由于获得大量人卵母细胞相对困难，人们对确定其它生殖谱系细胞，例如培养的 ES 细胞或来自所述细胞的细胞质是否可用于重编程体细胞产生极大兴趣。由于这种细胞数量可易于在体外扩增，所以在作为诱导重编程的方式上优于卵母细胞很多。与 ES 细胞融合后，在体细胞中观察到至少一些测量的胚胎特异性基因的表达恢复（Do 和 Scholer，Stem Cells 22：941-949，(2004)；Do 和 Scholer，Reprod Fertil Dev. 17：143-149，(2005)）。然而，所得到的细胞为杂种，通常具有四倍体基因型，因此不适合作为正常或组织相容性细胞用于移植目的。实际上，提出的生成自体全能细胞的目的是为了防止排斥 ES 源细胞。使用这些公开研究中描述的技术，因此用于重编程患者细胞的 ES 细胞很可能增加可产生导致排斥的免疫反应的等位基因。尽管如此，ES 细胞可重编程体细胞染色体的证据令研究者兴奋并且形成了称为“融合生物学”的新研究领域（Dennis，Nature 426：490-491，(2003)）。能够重编程比人卵母细胞更具可用性的人体细胞的另一可能细胞来源为动物卵母细胞。证实通过跨物种核移植恢复体细胞全能性（Lanza 等，Cloning 2：79-90，(2000)）使得可能鉴定可易于获得用于重编程人细胞的动物卵母细胞（Byrne 等，Curr Biol 13：1206-1213，(2003)）。然而，很可能由于物种间的分子差异，尽管可能，但跨物种核移植通常比同物种核移植效率更低。在体细胞核移植后发生的许多分子改变中，一些更关键的改变是受体卵母细胞内通过尚不清楚的机制重编程染色质和重塑核被膜蛋白质。核被膜包括内核被膜

(INM) 和外核被膜 (ONM)、核孔复合体 (NPC) 和核纤层。在体细胞和生殖谱系细胞之间核被膜的蛋白质，尤其是核纤层的那些蛋白质不同，并且在调节细胞周期，检测 DNA 损伤检测点途径和调节细胞分化中起重要作用。尤其，核纤层的蛋白质亚基包括在 INM 内部形成网状物的 V 型中间丝蛋白、核纤层蛋白 A/C 和 B(Foisner，J. Cell Sci. 114 ：3791-3792，(2001))。一些这些蛋白质的，例如核纤层蛋白 A/C，通过与 WRN 解螺旋酶、POT1、Tel1 和 Tel2 相互作用发送信号而在调节染色体完整性、DNA 损伤检测点和端粒状态中起重要作用。在端粒酶阳性生殖谱系细胞中或在利用端粒酶的生殖谱系细胞中，核基质缺乏核纤层蛋白 A/C 或以其它方式使 DNA 串联重复序列被修复，在为端粒的情况下，允许用端粒酶加长。与 INM 相关的其它蛋白质包括核纤层相关多肽 (LAP) 家族，包括核纤层相关蛋白 1(LAP1，其存在 3 种同种型（α、β 和 Y))、LAP2（至少 6 种同种型）和伊默菌素（突变时引起肌肉异常分化和 Emery-Dreifuss 肌肉萎缩症）。与 INM 相关的其它蛋白质包括环指结合蛋白 (RFBP)、otefin 蛋白、少生殖细胞蛋白 (GCL) 和核被膜蛋白。已知核纤层蛋白在调节转录调节子功能中起重要作用，例如可依次结合异染色质蛋白 1(HP1) 的成视网膜细胞瘤蛋白 (pRB) 和 LBR。举例而言，为了将分化体细胞重编程为未分化状态需要重塑核被膜，未分化生殖谱系细胞通常缺乏核纤层蛋白 A，而生殖谱系细胞含有通常在分化体细胞内不表达的蛋白质，例如少生殖细胞蛋白 (GCL) 和核纤层蛋白 C2(Furukawa 等，Exp. Cell Res. 212 ：426-430，1994)。核被膜重塑不完全造成使用现有技术重编程细胞的效率低或不完全。

[0260] 因此，本领域已知的重编程人体细胞的每种技术均有其自身特有的困难。SCNT 提供令人满意的重编程水平，但受到研究者可用的人卵母细胞数量限制。跨物种核移植和细胞融合技术通常不受用于重编程的细胞限制，但受成功重编程程度或所得到的重编程细胞的生长强度限制。因此，仍需改进技术以提高重编程去分化体细胞和生成能够体外扩增的重编程细胞的频率和质量，以获得可用数量的细胞进行研究、测试质量控制和用于细胞治疗。本方法以新的和非显见的方式组合本领域已知若干现有技术的各方面，以提供了一种与 SCNT 一样有效或比 SCNT 更有效的重编程分化细胞的方式并且提供了更易接受和更有成本效益的卵母细胞替代品作为重编程媒介物。本方法通过使用易于廉价无限量获得的细胞和使用可按比例扩大使得可同时进行数千或数百万次融合的技术达到这些目的，从而提高最后结果成功的可能性。另外，本方法提供促进端粒酶再激活和端粒长度延长的技术，从而恢复细胞复制寿命。本方法进一步提供了允许分析未分化生殖谱系细胞中哪些组分对于核重编程至关重要的测定。本方法还提供了可通过机器人技术自动化以降低成本并提高质量控制的步骤。

[0261] <u>重编程动物体细胞的方法</u>

[0262] 本部分描述通过利用包括不同的核重塑步骤和细胞重建步骤的多步法将分化细胞重编程为更多能状态的方法。

[0263] 步骤 1 ：核重塑

[0264] 本方法利用三步法提高将分化细胞重编程为未分化状态的效率。

[0265] 在第一步骤（称为核重塑步骤）中，分化细胞的核被膜和染色质分别重塑为更类似于未分化细胞或生殖谱系细胞核被膜和染色质的分子组成。该重塑步骤可按多种方式进行，但本方法独特且不显见的特征在于按与将重塑基因组转移至胞质体分开的步骤进行该重塑步骤 ；进一步地，胞质体为易于获得的胞质体，例如非人动物卵母细胞胞质体或由胚胎

性癌 (EC) 细胞系制备的胞质体，包括经基因改变使得提取物和胞质体在本方法下重编程能力提高的 EC 细胞系和之后产生最终增殖细胞类型的 EC 细胞系。可通过将细胞核转移至相同物种的卵母细胞（尽管基因型与所述体细胞不同）或不同物种的卵母细胞，例如鱼、两栖动物（例如，非洲爪蟾）卵母细胞或卵，或来自能够重建未分化或种系核被膜（其周围为最初来自分化细胞的基因组）的细胞的分散提取物内进行体细胞细胞核的重塑。

[0266] 将核重塑步骤和细胞重建步骤分开解决了现有重编程技术所固有的问题。如果按与细胞重建步骤分开的步骤进行核重塑以生成能够增殖的细胞，则可能消除对与分化细胞物种相同的卵母细胞的依赖并提高效率。

[0267] 在 SCNT 的情况下，卵母细胞为相对较大细胞并且因此将分化细胞转移至中期 II 卵母细胞时，确保破坏核被膜和染色体凝聚和重新装配主要来自卵细胞源组分的核被膜导致形成重塑核被膜以及使核调节因子（例如转录因子）用于重编程染色质。如果卵细胞在核移植时被激活，也可能发生细胞分裂，导致胚胎能够引起 ES 细胞的培养。然而，核移植中固有的问题是尽管卵母细胞体积相对较大和卵母细胞细胞核组分并入重建细胞，核移植需要显微操作（高技能程序）以及使用一个细胞一次性成批产生。进一步地，核移植受可用卵母细胞数量限制。在本方法中，通过利用替代核重塑技术解决了这些困难，虽然获得能够进行细胞分裂的完整细胞需要一步以上的步骤，然而易于使用细胞质并且能够重塑细胞核。而且，这些替代技术允许同时重塑许多细胞核或基因组。

[0268] 进行第一步核重塑的一种方式是通过使用鱼或两栖动物卵母细胞。来自非洲爪蟾的卵母细胞或卵的优点在于其受到广泛研究，尽管多数来自脊椎动物的卵母细胞或卵将以类似方式起作用，除有大量卵黄的卵细胞外。虽然非洲爪蟾卵母细胞仅或多或少用于重编程哺乳动物分化细胞细胞核的染色质 (Byrne 等，Curr Biol 13：1206-1213，(2003))，但可用于几乎完全重新组装大量分化体细胞周围的种系核被膜。使用非洲爪蟾卵母细胞或非洲爪蟾卵母细胞提取物，在这种未分化或种系蛋白质存在下通过各种方式，包括将一个或多个完整或渗透化的分化细胞注入卵母细胞，或将来自所述细胞的分离细胞核注入卵母细胞而重塑体细胞的核被膜和染色质。进一步地，可将其它未分化蛋白质或其它因子加入卵母细胞或卵母细胞提取物，或者可将卵母细胞修饰为表达这种促进细胞核重塑的附加因子。

[0269] 重编程的分化细胞可为脊椎动物的任一分化细胞，例如人、犬、马科动物或猫科动物体细胞，包括成纤维细胞、角化细胞、淋巴细胞、单核细胞、上皮细胞、造血细胞或其它细胞。

[0270] 使用来自另一物种的卵母细胞，例如非洲爪蟾卵母细胞，重塑这些分化细胞的核被膜的一种方法是将渗透化的分化细胞注入分裂间期非洲爪蟾卵母细胞，从而使多个分化细胞核被膜经过若干天被重塑。在 MBS（镁盐缓冲液）中经手术去除经麻醉成熟雌性的非洲爪蟾卵母细胞并且如本领域熟知的那样检查其质量 (Gurdon，Methods Cell Biol 16：125-139，(1977))。然后用 MBS 洗涤卵母细胞两次并在 14℃下保存于 MBS 中过夜。次日，选择优质的期 V 或 VI 卵母细胞 (Dumont，J. Morphol. 136：153-179，(1972)) 并且在 MBS 中于解剖显微镜下去除卵泡细胞。去除卵泡之后，再次在 14℃下将卵母细胞保存于具有 1μg/mL 庆大霉素 (Sigma) 的 MBS 中过夜。次日，再用 MBS 洗涤形态健康的卵母细胞并在 14℃下保存于 MBS 中直到使用。然后用破膜剂，例如链球菌溶血素 O(SLO) 或毛地黄皂苷，渗透化分化细胞 (Chan & Gurdon，Int. J. Dev. Biol. 40：441-451，(1996)；Adam 等，Methods Enzymol. 219：

97-110，(1992))。渗透化约 1×10^4 分化细胞，并悬浮于冰冷裂解液（含 10mM EGTA 的无 1xCa2+ 的 MBS(Gurdon，(1977)]。加入 SLO(Wellcome diagnostics)，最终浓度为 0.5 单位/mL。将悬浮液保持于冰上 7min，然后加入 4 体积含 1％牛血清蛋白 (Sigma) 的无 1xCa2+ 的 MBS。然后可去除等分试样的细胞，于含 1％牛血清蛋白的无 1xCa2+ 的 MBS 中稀释 1 倍并在室温下孵育 5min 以激活渗透化。然后将细胞放回冰上以转移至非洲爪蟾卵母细胞。然后如本领域熟知的那样将渗透化细胞转移至非洲爪蟾卵母细胞内 (Gurdon，J.Embryol. Exp.Morphol.36 :523-540，(1976)。简言之，将如上所述制备的卵母细胞置于高盐 MBS 中的琼脂上 (Gurdon，J.Embryol.Exp.Morphol.36 :523-540，(1976))。通过所述 UV 灭活卵细胞内的DNA(Gurdon，Methods in Cell Biol 16 :125-139，1977)，除了不进行第二次暴露于 Hanovia UV 源。简言之，将卵细胞置于载玻片上，动物极向上，并暴露于 Mineralite UV 灯 1min 以灭活雌性胚泡。连续将渗透化的分化细胞置于直径为细胞 3-5 倍的移植移液管中并注入卵母细胞内，优选对准灭活原核。孵育含细胞核的卵 1h 至 7 天，然后去除细胞核并冷藏或立即用于第二步骤以重建能够增殖的细胞。

[0271] 另一种方式是在能够由裸露 DNA 或染色质形成核被膜的无细胞提取物中重塑核被膜和染色质。本领域已知装配 DNA 或染色质周围核被膜的技术 (Marshall & Wilson，Trends in Cell Biol 7 :69-74，(1997))。例如，如本领域熟知可从非洲爪蟾卵母细胞分离这种提取物 (Lohka，Cell Biol Int.Rep.12 :833-848(1988))。可选地，可使用来自相同物种未分化细胞（例如 Mil 卵母细胞、处于其它发育期的卵母细胞、ES 细胞、EC 细胞、EG 细胞或处于相对未分化状态的其它细胞）的提取物。EC 细胞优点在于可易于大量增殖，并且人 EC 细胞而不是非人 EC 细胞减少了对未特征化病原体传播的关注。这种人 EC 细胞的非限制性实例包括 NTera-2、NTera-2 Cl.D1、NCCIT、Cates-1B、Tera-1 和 TERA-2，并且鼠科动物 EC 细胞的非限制性实例包括 MPRO、EML、F9、F19、D1 ORL UVA、NFPE、NF-1 和 PFHR9。EC 系易于从例如美国模式培养物保藏所 (American Type Culture Collection) 等来源获得，并且在 37℃下用特征在于细胞类型和易于从网上购买 (http://stemcells.atcc.org) 的培养基（完全培养基）进行单层培养。

[0272] 在某些实施方案中，可修饰重塑细胞核的基因组。这种修饰包括但不限于修正影响疾病的突变和减轻疾病症状或病因的其它基因修饰（例如，在基因治疗靶向或使用的基因中）。通过加入来自细胞的提取物，例如已知同源重组水平较高的 DT40，可修饰在第一步骤中重塑的细胞核。加入来自容许与 DNA 靶向构建体高水平同源重组的细胞的提取物。

[0273] 然后，在步骤 2 重建和步骤 3 筛选之后将获得具有所需基因修饰的细胞。例如，在某些实施方案中，重编程细胞可用于生成基于细胞的治疗和 / 或移植的细胞或组织。

[0274] 在其它实施方案中，一个或多个因子在用于获得细胞核重塑提取物的未分化细胞内（例如，在 EC 细胞内）表达或过度表达，或者可将一个或多个因子加入未分化细胞。这种因子包括（例如）SOX2、NANOG、cMYC、OCT4、DNMT3B、胚胎组蛋白以及表 7 所列其它因子及其非人对应物。这些因子的表达增强可赋予体细胞核以未分化细胞的特征和 / 或去除分化细胞因子，从而提高重编程频率。因此本方法还可包括添加、表达或过度表达赋予未分化细胞特征的任何其它蛋白质。除上述蛋白质外，本方法可包括诱导或增强未分化细胞内蛋白质表达和提高重编程频率的其它因子（例如转录调节子和调节 RNA)。进一步地，可使用上述因子的任何组合。例如，可修饰本方法的未分化细胞以增强表 7 所列 2、3、4 或更多个因

子的表达。同样，可将表 7 所列 2、3、4 或更多个因子加入重塑提取物。

[0275] 在其它实施方案中，相对于未修饰细胞内，用于获得核重塑提取物的未分化细胞内一个或多个因子的水平降低。细胞因子水平的这种降低可通过已知方法实现，例如通过使用转录调节子、调节 RNA 或对细胞因子有特异性的抗体。

[0276] 在某些实施方案中，使用标准技术将编码表 7 所列蛋白质的基因构建体或其它因子或诱导这些因子表达的调节蛋白或 RNA 转染至细胞内。这些技术包括通过化学转染（例如，通过磷酸钙、脂质、树状聚合物等）、电穿孔和显微注射进行病毒感染（例如，慢病毒、乳头瘤病毒、腺病毒等）和转染质粒和其它载体。可选地，可使用靶向因子的内源性启动子的构建体诱导或增强因子的表达。其它实施方案可使用包含这些因子的一个或多个的人工染色体。在另外的实施方案中，染色体介导的基因转移或细胞融合 / 微细胞融合可用于将这些因子引入未分化细胞内。在其它实施方案中，修饰基因调节序列的同源重组可实现这些因子的一个或多个表达增强。

[0277] 在一些实施方案中，可通过原核显微注射覆盖有重组酶的 DNA 将编码目标细胞因子的转基因递送至细胞内。参见，例如，Maga 等，Transgenic Research 12 :485-496(2003)。提高转基因细胞生成效率的其它已知方法同样可用于本方法的用途。可选地，可从表达人重编程因子（例如，表 7 所列因子）的转基因动物获得本方法的卵母细胞和 / 或未分化细胞提取物。例如，使用携带表 7 所列一个或多个基因的表达构建体生成转基因动物。

[0278] 在一些实施方案中，可通过直接细胞内递送将细胞因子或改变细胞内细胞因子水平的试剂引入未分化细胞。例如，可使用蛋白质转导域或细胞渗透性肽（例如，聚精氨酸）递送因子。参见 Noguchi 等，Acta Med.Okayama 60 :1-11(2006)。因此已引入因子的细胞可用于以上方法进行核重塑。

[0279] 在替代实施方案中，将未分化细胞因子（例如表 7 所列蛋白质和蛋白质相等物）或影响细胞因子水平的试剂直接引入核重塑提取物。在某些实施方案中，将重组蛋白质加入提取物中以提高重编程效率。

[0280] 可使用本方法通过以下步骤有效重编程的分化细胞，所述分化细胞包括来自脊椎动物（包括人）的任何种类的分化细胞，包括但不限于皮肤成纤维细胞、角化细胞、粘膜上皮细胞或外周有核血细胞。

[0281] 制备核重塑提取物

[0282] 如本领域已知在前中期制备来自生殖谱系细胞的提取物，例如 ES、EG 或 EC 细胞，包括但不限于 NTera-2 细胞 (Burke & Gerace，Cell 44 :639-652，(1986))。简言之，在对数生长期 2 天之后和仍在对数生长期时，用 100mL 含 2mM 胸苷（使细胞停在 S 期）的完全培养基更换所述培养基。11h 后，用 25mL 完全培养基冲洗细胞一次，然后用 75mL 完全培养基孵育 4h，此时从 DMSO 的 10,000X 原液加入诺考达唑至最终浓度为 600ng/mL。1h 后，通过有丝分裂摇落去除松散连接细胞 (Tobey 等，J.Cell Physiol.70 :63-68，(1967))。丢弃去除细胞的首次收集，同样用 50mL 含 600ng/mL 诺考达唑的完全培养基更换所述培养基。然后在 2-2.5h 后通过摇落来收集前中期细胞。然后在 37℃下于 20mL 含 600ng/mL 诺考达唑和 20μM 细胞松弛素 B 的完全培养基中孵育收集的细胞 45min。此次孵育之后，用冰冷的杜比可氏磷酸缓冲液 (Dulbecco′ s PBS) 洗涤细胞两次，然后用 KHM(78mM KCl、50mM Hepes-KOH[pH 7.0]、4.0mM MgCl2、10mM EGTA、8.37mM CaCl2、1mM DTT、20μM 细胞松弛素

B) 洗涤一次。然后在 1000g 下离心细胞 5min，弃上清液并将细胞重新悬浮于原体积的 KHM 中。然后，用杜恩斯匀浆器于冰上匀化细胞约 25 次并通过显微观察确定进展。当至少 95% 的细胞为匀化提取物时，如本领域已知将提取物存于冰上用于膜重新装配或冻藏。

[0283] 由分化细胞制备凝聚的染色质

[0284] 将供体分化细胞暴露于去除原生质膜的条件下，引起细胞核分离。依次将这些细胞核暴露于引起核被膜溶解和染色质凝聚的细胞提取物。这种溶解和凝聚导致释放对重编程过程有害的染色质因子（例如 RNA)、核被膜蛋白和转录调节子（例如转录因子）。在适当培养基中培养分化细胞直至达到融合。然后如本领域所熟知，通过胰蛋白酶收获 1×10^6 个细胞，将胰蛋白酶灭活并且将细胞悬浮于 50mL 磷酸盐缓冲盐水 (PBS)，通过在 4℃下 500g 离心细胞 10min 使细胞成团块，弃 PBS，并将细胞置于团块 50 倍体积的冰冷 PBS 中并如上述离心。离心之后，弃上清液并将团块重新悬浮于团块 50 倍体积的低渗缓冲液中 (10mM HEPES，pH 7.5；2mM MgCl2、25mM KCl、1mM DTT、10μM 抑肽酶、10μM 亮肽素、10μM 抑胃肽 A、10μM 大豆胰蛋白酶抑制剂和 100μM PMSF) 并且再次在 4℃下 500g 离心 10min。弃上清液并加入团块 20 倍体积的低渗缓冲液，并且小心地使细胞重新悬浮并在冰上孵育 1h。然后使用本领域熟知的方法物理溶解细胞。简言之，将 5ml 细胞悬液置于玻璃杜恩斯匀浆器内并匀化 20 次。用显微镜监测细胞溶解以观察何时产生分离且产生仍未损坏的细胞核。加入蔗糖至蔗糖最终浓度为 250mM（低渗缓冲液中 2M 原液的 1/8 体积）。通过轻轻倒置小心混合溶液，然后在 4℃下 400g 离心 30min。弃上清液，然后轻轻地将细胞核重新悬浮于 20 体积的核缓冲液中 (10mM HEPES，pH 7.5；2mM MgCl2、250mM 蔗糖、25mM KCl、1mM DTT、10μM 抑肽酶、10μM 亮肽素、10μM 抑胃肽 A、10μM 大豆胰蛋白酶抑制剂和 100μM PMSF)。再如上述离心细胞核并将其重新悬浮于团块 2 倍体积的核缓冲液中。然后可将所得到的细胞核直接用于以下所述细胞核重塑或冻藏供将来使用。

[0285] 凝聚提取物的制备

[0286] 将凝聚提取物加入分离的分化细胞核时，将导致核被膜破坏和染色质凝聚。因为步骤 1 的目的是用未分化细胞的核组分重塑分化体细胞的核组分，所用凝聚提取物来自可为或可不为同样用于衍生供以上核被膜重建的提取物的未分化细胞。这导致来自分化细胞的组分稀释于含有将细胞重编程为未分化状态所需的相应组分的提取物中。易于从例如美国模式培养物保藏所等来源获得生殖谱系细胞，例如 ES、EG 或 EC 细胞（例如 NTera-2 cl.D1 细胞）并且在 37℃下于适当培养基（完全培养基）中进行单层培养。在对数生长期时，将细胞接种在于 200mL 完全培养基中的组织培养瓶上，5×10^6 个细胞 /cm^2。本领域熟知获得能够诱导核被膜破坏和染色质凝聚的提取物的方法 (Collas 等，J.Cell Biol.147：1167-1180，(1999))。

[0287] 简言之，通过在 1μg/ml 诺考达唑中培养如上所述对数生长期的生殖谱系细胞 20h，使其有丝分裂同步化。通过有丝分裂摇落分离处于细胞周期的有丝分裂期的细胞。在 4℃下 500g 离心收获的分离细胞 10min。将细胞重新悬浮于 50ml 冷 PBS 中，并且再在 4℃下 500g 离心 10min。PBS 洗涤步骤重复一次。然后将细胞团块重新悬浮于 20 体积的冰冷细胞裂解液中 (20mM HEPES，pH 8.2；5mM MgCl2、10mM EDTA、1mM DTT、10μM 抑肽酶、10μM 亮肽素、10μM 抑胃肽 A、10μM 大豆胰蛋白酶抑制剂、100μM PMSF 和 20μg/ml 细胞松弛素 B) 并在 4℃下 800g 离心细胞 10min。弃上清液，并小心地将细胞团块重新悬浮于 1 体积的

细胞裂解液中。将细胞置于冰上 1h，然后用杜恩斯匀浆器溶解。通过显微分析监测进展直到 90％的细胞和细胞核溶解。在 4℃下 15,000g 离心所得到的溶解产物 15min。然后移去管并立即置于冰上。用小口径移液管尖端轻轻去除上清液，并且将来自若干管的上清液汇集于冰上。如果不立即使用，立即用液氮将提取物瞬间冷冻并保存在 -80℃下直到使用。然后将细胞提取物置于超速离心管中并在 4℃下 200,000g 离心 3h 以沉淀核被膜囊泡。然后轻轻去除上清液并置于冰上的管中且立即用于制备凝聚染色质或如上述冻藏。

[0288] 凝聚提取物的使用方法

[0289] 如果从冷冻等分凝聚提取物开始，则在冰上解冻冷冻提取物。然后将 ATP 生成系统加入提取物使得最终浓度为 1mM ATP、10mM 磷酸肌酸和 25μg/ml 肌酸激酶。然后将如上所述从分化细胞分离的细胞核加入提取物，每 10μl 提取物 2,000 个细胞核，轻轻混合，于 37℃水浴孵育。通过轻拍管不时移动管以轻轻重新悬浮细胞。提取物和细胞源随核被膜破坏和染色体凝聚的时间而不同。因此通过用显微镜周期性监测样品而监测进展。当大多数细胞失去其核被膜并且有染色体凝聚开始的证据时，将含有凝聚染色体团的提取物置于离心管中，核缓冲液中有相等体积的 1M 蔗糖溶液。通过在 4℃下 1,000g 离心 20min 使染色质团沉淀。弃上清液，并且轻轻地将染色质团重新悬浮于以上所得核重塑提取物中。然后在 33℃下水浴孵育样品长达 2h 并用显微镜定期监测所述凝聚和重塑染色质周围重塑核被膜的形成 (Burke & Gerace，Cell 44 :639-652，(1986)。很大比例的染色质封装在核被膜内后，可使用以下任一所述技术将重塑细胞核用于步骤 2 的细胞重建。

[0290] 步骤 2- 细胞重建

[0291] 使用通过本公开 (例如实施例 14 和 15) 所述任一技术或如本公开更全面描述的实施例 14 和 15 中所述技术的组合重塑的细胞核或染色质进行步骤 2(在本方法中也称为“细胞重建”)。

[0292] 使用本方法步骤 1 重塑的细胞核进行步骤 2 的一种方式是融合重塑细胞核和生殖谱系细胞的去核胞质体，所述生殖谱系细胞例如本领域已知的卵裂球、桑葚胚细胞、内细胞团细胞、ES 细胞 (包括 hES 细胞、EG 细胞和 EC 细胞)(Do & Scholer，Stem Cells 22 : 941-949(2004))。简言之，在标准条件下培养人 ES 细胞 (Klimanskaya 等，Lancet 365 : 4997(1995))。通过在操作之前 20h 加入 10μM 细胞松弛素 B 增加细胞的细胞质体积。通过使用加压 50％ (wt/vol)Ficoll-400 水溶液的原液进行 Ficoll 密度梯度离心胰蛋白酶化细胞制备胞质体。将 Ficoll 400 原液稀释于 DMEM，并且最终浓度为 10μM 细胞松弛素 B。在 36℃下通过 30％、25％、22％、18％和 15％ Ficoll-400 溶液梯度离心细胞。上层为 0.5mL 的 12.5％ Ficoll-400 溶液，有 10×10ˆ6 个 ES 细胞。在 36℃下于 MLS-50 转筒中 40,000rpm 离心细胞 30min。从管上标记的 15％和 18％梯度区域收集胞质体，用 PBS 冲洗并与来自本方法第一步的重塑细胞核按 1 ： 1 比例混合或冻藏。使用本领域已知的大量技术进行胞质体与细胞核的融合，包括聚乙二醇 (参见Ponteco rvo″ Polyethylene Glycol(PEG)in the Production of Mammalian Somatic Cell Hybrids″ Cytogenet Cell Genet.16(1-5) : 399-400(1976))、直接注入细胞核、仙台病毒介导的融合或本领域已知的其它技术。暂时将胞质体和细胞核置于 1mL 预热的 50％聚乙二醇 1500(Roche)1min。然后，在 5min 内加入 20mL 的 DMEM 以慢慢去除聚乙二醇。在 130g 下离心细胞 5min，然后放回 50μL 的 ES 细胞培养基中并置于促进 ES 细胞集落生长的条件下的成纤维细胞饲养层下。

[0293] 用于进行步骤 2(在本方法中也称为“细胞重建”)的另一种技术是融合重塑细胞核和生殖谱系细胞(例如附着于本领域熟知的物理基质的 hES 细胞)的无核细胞质泡囊(Wright & Hayflick, Exp.Cell Res.96:113-121, (1975);& Wright & Hayflick, Proc. Natl.Acad.Sci.,USA,72:1812-1816,(1975)。简言之,通过在操作之前 20h 加入 10μM 细胞松弛素 B 增加生殖谱系细胞的细胞质体积。然后胰蛋白酶化细胞并重新接种于无菌 18mm 盖玻片、圆柱体或其它涂有促进附着的物质的物理基质上。以使得在 37℃孵育过夜并用培养基轻轻冲洗一次后细胞占盖玻片或其它基质表面积的一部分(优选 90%)的密度接种细胞。然后将基质置于离心管的一个位置使得离心将导致从含有 8mL、10% Ficoll-400 溶液的胞质体去除细胞核并在 36℃下 20,000g 离心 60min。然后将本方法第一步得到的重塑细胞核涂在盖玻片或基质上,密度至少与胞质体相同,优选为胞质体密度的至少 5 倍。使用聚乙二醇进行胞质体与细胞核的融合(参见Pontecorvo" Polyethylene Glycol(PEG)in the Production of Mammalian Somatic Cell Hybrids" Cytogenet Cell Genet.16(1-5):399-400(1976))。

[0294] 简言之,将盖玻片或基质置于培养基中 1mL 预热的 50%聚乙二醇 1500(Roche) 中 1min。然后在 5min 内滴加 20mL 培养基以慢慢去除聚乙二醇。然后抽吸全部培养基并用培养基更换。还可使用除离心外的技术,例如振荡或使用微量移液管物理去除细胞核。

[0295] 在某些实施方案中,可首先操作步骤 2 中使用的未分化细胞以表达或过度表达因子(例如,SOX2、NANOG、cMYC、OCT4、DNMT3B)、表 7 所列任何因子及其非人同源物和/或赋予未分化细胞行为并促进重编程的其它因子(例如,靶向表 7 所列基因启动子的调节 RNA 或构建体及其非人同源物)。可通过本领域已知的标准技术将编码这些因子的构建体转染至未分化细胞,例如生殖谱系细胞(例如,卵裂球、桑葚胚细胞、内细胞团细胞、ES 细胞(包括 hES 细胞、EG 细胞或 EC 细胞))。以上步骤 1 中描述了操作未分化细胞以表达细胞因子的实例。在替代实施方案中,通过注射或其它方法将这些因子引入未分化细胞。以上步骤 1 中同样描述了操作未分化细胞的方法的实例。

[0296] 在替代实施方案中,在修饰了靶染色体的同源重组反应之后发生核被膜重组。因此,在一个实施方案中,作为核被膜破坏和染色质凝聚之后而在核被膜重建之前的任选步骤,将 DT40 提取物或其它重组功能完好的提取物或蛋白质制剂与 DNA 靶向构建体一起加入凝聚染色体内,使得重组将导致一个或多个基因组 DNA 序列被构建体中提供的序列所取代。实施例 16、17、18 和 19 中提供了这些方法的示例性实施方案。

[0297] 步骤 3- 分析核型和重编程程度

[0298] 可使用本领域熟知的技术(包括转录组学)表征遵循本方法步骤 1 和 2 重建的细胞以确定基因表达模式和重编程细胞是否表现出与未分化细胞(例如 ES 细胞系)的预期表达模式相似的基因表达模式(Klimanskaya 等,Cloning and Stem Cells,6(3):217-245(2004))。可借助于从有丝分裂细胞进行染色体分散、光谱核型分析、端粒长度测定、全基因组杂交和本领域熟知的其它技术进行核型分析。在核型正常,但端粒长度或重编程程度不完全的情况下,可将细胞用作核供体并重复步骤 1 和 2 任意次。

[0299] 例如,可比较重编程细胞的基因表达模式和胚胎干细胞或其它未分化细胞的基因表达模式。如果基因表达模式并不相似,则可将重编程细胞用于随后的重编程步骤直至其基因表达与未分化细胞(例如,胚胎干细胞)的表达模式相似。与重编程细胞进行比较的

未分化或胚胎干细胞可来自与供体分化体细胞相同的物种；可选地，与重编程细胞进行比较的未分化或胚胎干细胞可来自与步骤 2 中使用的胞质体或细胞质泡囊相同的物种。在一些实施方案中，如果未分化细胞内表达的某些基因也在重编程细胞内表达，那么重编程细胞和未分化细胞（例如，胚胎干细胞）之间存在基因表达模式相似性。例如，分化体细胞内通常不可检测到的某些基因（例如，端粒酶）可用于监测重编程程度。同样，对于某些基因而言，缺乏表达可用于评定重编程程度。在某些实施方案中，如果细胞表达 (1)E- 钙粘蛋白（对于人细胞而言，CDH1；检索号 NM_004360.2)mRNA，表达水平至少为管家基因 GAPD 的 5%（对于人细胞 NM_004360.2 而言）（数据未示出）；(2) 可检测端粒酶逆转录酶 mRNA 或经 TRAP 测定 (TRAPeze) 评定表现出端粒酶活性；和 (2)LIN28(NM_024674.3；或对于非人细胞而言，其非人相等物)，表达水平至少为管家基因 GAPD 的 5%（对于人细胞 NM_004360.2 而言）（数据未示出），则认为细胞被重编程。

[0300] 进行本方法步骤 1 和 2 的不同方式的可组合途径的其它实例包括用 SLO 渗透化体细胞，重新密封细胞和分离所得到的部分重塑细胞核，然后使用第二步细胞重建中的细胞核。同样，然后可将通过分离分化细胞的细胞核，然后将细胞核暴露于来自细胞周期有丝分裂期细胞的提取物以引起核被膜破坏和染色质凝聚而获得的重塑染色质转移至 ES 细胞、EC 细胞或 EG 细胞的胞质体内，而在细胞重建之前不重新形成核被膜。另外，可如上所述渗透化分化体细胞并暴露于来自卵母细胞或生殖谱系细胞的提取物。然后可获得来自这些细胞的凝聚染色质，并且之后可使所述染色质与受体胞质体融合以产生重编程细胞。通过显微注射实现或用本领域已知基因融合化合物辅助染色质与胞质体的融合（参见，例如，美国专利 No.4,994,384 和 5,945,577）。基因融合试剂包括但不限于聚乙二醇 (PEG)、亲脂性化合物，例如 Lipofectin™、Lipofectamin™、DOTAP™、DOSPA™ 或 DOPE™。为将染色质插入胞质体内，紧靠胞质体膜放置涂覆染色质并且将复合物保持在 20-30℃ 并用显微镜监测。发生融合后，就以用于培养未分化细胞的培养基更换培养基并且在促进所述未分化细胞生长的培养条件下培养。

[0301] 本文所列细胞因子和使用方法可用于替代的重编程技术中，例如由 Collas 和 Robl，美国专利申请 No.10/910,156 中公开的方法中，其通过引用整体并入本文。例如，可将因子加入用于在允许将来自未分化细胞的细胞核或细胞质组分加入供体细胞核或染色质团的条件下孵育来自供体细胞的细胞核或染色质的培养基（或可选地在用于获得提取物培养基的细胞内表达）。

[0302] 本方法第一步中体细胞源 DNA 的体外重塑被用作重编程体细胞的模型和用于分析重编程分子机制的测定。选择性添加、改变、去除或隔离特定分子组分和随后的重编程程度或端粒酶引发程度打分和延长端粒长度使得表征了特定分子在 SCNT 期间发生的重编程中的作用。然后通过相应添加或缺失（例如，如果促进重编程则添加或者如果抑制重编程则缺失）可使用特征在于本方法的这种应用的关键分子。例如，可通过第一步中使用的卵母细胞或重编程提取物中免疫剔除实现缺失。

[0303] 可通过本领域熟知的技术引入特定分子改变，所述技术包括但不限于例如加入蛋白质组分、通过免疫沉淀反应去除蛋白质组分，加入其它细胞组分，例如脂质、离子、DNA 或 RNA。可由卵母细胞、卵裂球、桑葚胚细胞、ICM 细胞、ED 细胞或生殖谱系细胞（例如，ES、EG 或 EC 细胞）制备 RNA。如本领域熟知制备全部或部分 RNA，例如微小 RNA。然后在室温下孵

育细胞时将这种“种系 RNA”引入实施例 14 的渗透化细胞以使 RNA 扩散至细胞内并且在植入卵母细胞时增进体细胞重编程为胚胎状态。

[0304] 本方法的共同特征在于不管使用何种技术重塑分化细胞的核被膜和染色质，均至少使用两步，并且在一些实施方案中使用三步：第一步，其中重塑染色质和／或核被膜；第二步，其中将重塑染色质和／或核被膜重建至胞质体以使细胞能够进行细胞分裂；和第三步，其中分析所得到的增殖重编程细胞以确定重编程程度和核型。如果重编程程度不足，细胞循环回第一步。

[0305] 如本文所述被重编程的体细胞可用于生成 ES 细胞或 ES 细胞系，包括但不限于人 ES 细胞系。因为分离的人 ES 细胞生成细胞系的效率低，可将本方法的重编程细胞聚集在一起以促进稳定 ES 细胞系生成。这种聚集可包括高密度接种细胞，将细胞置于培养皿中处于减压状态使得重力使细胞紧靠，或可与饲养细胞或现有 ES 细胞系一起共同培养细胞。

[0306] 可在饲养细胞，例如小鼠胚胎成纤维细胞或人饲养细胞（例如，成纤维细胞（例如，包皮成纤维细胞、人皮肤成纤维细胞、人子宫内膜成纤维细胞、人输卵管成纤维细胞）和胎盘细胞）上培养人胚胎细胞，例如人 ES 细胞。在一个实施方案中，人饲养细胞可为通过直接分化或无性分离用于 ES 细胞衍生的细胞从重编程细胞相同培养物获得的自体饲养细胞。在 ES 细胞培养基或支持胚胎细胞生长的任何培养基，例如 Knockout DMEM(Invitrogen Cat # 10829-018) 中孵育人胚胎细胞。

[0307] 可选地，由本方法获得的重编程细胞可与现有 ES 细胞系并置共同培养。示例性人胚胎细胞包括但不限于例如来自已确定株系的胚胎干细胞、胚胎癌细胞、鼠科动物胚胎成纤维细胞、其它胚胎样细胞、胚胎来源的细胞或源自胚胎的细胞，许多是细胞本领域已知的并且可从美国模式培养物保藏所，Manassas，VA 20110-2209，USA 和其它来源获得。

[0308] 可将胚胎细胞直接加入培养的重编程细胞中或者可在紧靠但不直接接触培养的重编程细胞中生长。所述方法包括使培养的重编程细胞直接或间接接触胚胎细胞的步骤。可选地，间接连接或合并重编程细胞培养物和胚胎细胞培养物。这可通过本领域已知的方法实现，包括（例如）使用轻质矿物油，例如 Cooper Surgical ACT# ART4008，石蜡油或 Squibb 油。可使用玻璃毛细管或类似装置进行连接。培养的重编程细胞和胚胎细胞之间的这种间接连接使得胚胎培养基（在其中培养重编程细胞）和 ES 细胞培养基（在其中生长人胚胎细胞）逐渐混合。

[0309] 在另一个实施方案中，重编程细胞可与人胚胎一起共同培养。例如，重编程细胞与胚胎一起在本领域已知的微滴培养系统或其它培养系统中共同培养，但所述微滴培养系统或其它培养系统不允许细胞与细胞接触，但可允许细胞分泌因子和／或细胞基质接触。微滴体积可（例如）从 50μl 减少到约 5μl 以增强信号。在另一个实施方案中，胚胎细胞可来自除人以外的物种，例如非人灵长类动物或小鼠。

[0310] 约 3-4 天之后，重编程细胞表现出 ES 细胞的性质。虽然不希望受任何特定理论限制，人们认为数天或数周后，培养的重编程细胞表现出促进 ES 细胞生长，这可能是由于人胚胎细胞或细胞外基质分泌的因子。申请 PCT/US05/39776，美国 11/267,555 和 60/831,698 中描述了以上所述生成 ES 细胞的方法，其整体并入本文。ES 细胞或 ES 细胞系的性质可包括但不限于表达端粒酶和／或端粒酶活性和表达一种或多种已知 ES 细胞标记。

[0311] 在某些实施方案中，重编程细胞培养条件可包括使细胞接触可抑制或者以其它方

式加强细胞分化（例如防止细胞分化为非 ES 细胞、滋养外胚层或其它细胞类型）的因子。这种条件可包括使培养的细胞接触肝素或将重编程因子引入本文所述细胞或提取物中。在又一个实施方案中，通过本领域已知的任何方式防止 cdx-2 表达，所述方式包括但不限于将 CDX-2 RNAi 引入重编程细胞，从而抑制重编程细胞分化为 TS 细胞，从而确保所述细胞不会产生感受态胚胎。

[0312] 在另一个实施方案中，由本方法步骤 1 和 2 得到的重编程细胞可直接用于生成分化子代，而不生成 ES 细胞系。因此，一方面，本方法提供了生成分化祖细胞的公开内容，其包括：

[0313] (i) 用本公开的方法的步骤 1-2 或步骤 1-3 获得重编程细胞；和 (ii) 诱导重编程细胞分化以生成分化祖细胞，而不生成胚胎干细胞系。分化祖细胞可用于衍生利于用于细胞、组织和 / 或器官移植领域的细胞、组织和 / 或器官，其包括本文对 ES 源细胞和组织描述的全部细胞和应用。

[0314] 过去，内细胞团细胞长期培养物用于生成胚胎干细胞系。随后，培养胚胎干细胞并进行有条件地基因修饰，并且诱导分化以生成用于细胞治疗的细胞。共有待决美国待决申请 2005/0265976A1 描述了通过直接诱导细胞分化由内细胞团细胞或桑葚胚源性细胞生成分化祖细胞，而不生成胚胎干细胞的方法。该申请还描述了所述分化细胞、组织和器官在移植治疗中的用途。在本公开的方法中，诱导源自本文所述步骤 1-2 或 1-3 的重编程细胞直接分化为分化祖细胞，然后将分化祖细胞用于细胞治疗和生成供移植的细胞、组织和器官。若需要，在重编程之前可将基因修饰引入（例如）体细胞或引入本文所述提取物内的染色质中。因此，本方法的分化祖细胞不具有胚胎干细胞或胚胎生殖细胞的多能性并且大体上为组织特异性的部分或完全分化细胞。这些分化祖细胞可产生来自三个胚层（即内胚层、中胚层和外胚层）的任一个的细胞。例如，可使用本领域已知的技术或使用 2006 年 4 月 11 日提交的待决申请 PCT/US2006/013573 和 2006 年 6 月 11 日提交的美国申请 No.60/811,908（均通过引用整体并入本文）中描述的技术使分化祖细胞分化为骨、软骨、平滑肌、具产前基因表达模式并能够促进伤口无疤愈合的真皮和造血或成血管细胞（中胚层），定形内胚层、肝脏、原肠、胰腺 β 细胞、胰腺 β 细胞祖代和呼吸上皮（内胚层）或神经元、胶质细胞、毛囊或包括视网膜神经元和视网膜色素上皮细胞的眼部细胞。

[0315] 这些方法的一个优点是步骤 1-2 或步骤 1-3 获得的细胞可分化，无需预先纯化或建立细胞系。通过本文所公开的方法获得的细胞可分化，无需选择或纯化细胞。同样地，在某些实施方案中，包含重编程细胞的异种细胞群体分化为所需细胞类型。在一个实施方案中，将由本文所述步骤 1-2 获得的混合细胞暴露于一个或多个分化因子并在体外培养。因此在某些实施方案中，在分化之前不需要纯化重编程细胞或建立 ES 或其它细胞系。在一个实施方案中，渗透化包含重编程细胞的异种细胞群体以促进接近分化因子和随后的分化。

[0316] 而且，对于本方法的分化祖细胞而言，不必表达端粒酶的催化组分 (TERT) 并且不必永生化，或者祖细胞表达胚胎干细胞上存在的细胞表面标记，例如灵长类胚胎干细胞特有的细胞表面标记：对 SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 呈阳性，碱性磷酸酶活性，并且对 SSEA-1 呈阴性。而且，本方法的分化祖细胞可能不同于胚状体，即源自胚胎干细胞的胚状体，然而本方法的分化干细胞可能源自重编程细胞，而不产生 ES 细胞系。

[0317] 应用

[0318] 如本领域熟知，在促进ES细胞（例如，hES细胞）生长的条件下接种由本方法步骤1和2所得到的细胞。简言之，可将细胞留在制备去核胞质体的基质上，或者可胰蛋白酶化并在700xg下离心3min，吸入无菌巴氏移液管并置于饲养单层下以浓缩和共同定位细胞。细胞可与其它强势生长的ES细胞系一起共同培养，所述ES细胞系在促进重编程干细胞生长之后易于通过例如自杀式诱导去除。也可通过接种于小克隆环将重编程细胞集中在小面积的生长表面，已经使用本领域熟知的其它技术培养。

[0319] 另一方面，所述方法包括将源自本方法重编程细胞的细胞用于研究和治疗。这种重编程多能或全能细胞可分化为体内任何细胞，包括但不限于皮肤、软骨、骨骼肌、心肌、肾、肝、血和造血细胞、血管前体和血管内皮细胞、胰腺β、神经元、神经胶质、视网膜、内耳囊、肠、肺部细胞。

[0320] 在一个特定实施方案中，可使重编程细胞分化为具有高度弹性基因的产前皮肤基因表达模式或能够再生但不引起疤痕形成的细胞。尤其相应于体被得益于高度弹性的区域，例如在关节周围部位的哺乳动物胎儿皮肤的真皮成纤维细胞负责重新合成作用多年无需更新的弹性纤丝复杂结构。另外，早期胚胎皮肤能够再生而不形成疤痕。由本方法重编程细胞制备的来自该胚胎发育期的细胞可用于促进皮肤无疤再生，包括形成正常弹性蛋白结构。这对治疗人正常衰老过程的症状或光化性皮肤损伤尤其有用，其中可存在深度的皮肤弹性组织离解，导致衰老现象，包括皮肤下垂和起皱。

[0321] 在另一个实施方案中，将重编程细胞暴露于分化诱导剂以产生其它治疗上有用的细胞，例如视网膜色素上皮细胞、定形内胚层、胰腺β细胞和胰腺β细胞前体、造血前体和成血管细胞祖细胞、神经元、呼吸细胞、肌祖细胞、软骨和成骨细胞、内耳细胞、神经嵴细胞及其衍生物、胃肠细胞、肝细胞、肾细胞、平滑肌和心肌细胞、具产前基因表达模式用于促进伤口无疤愈合的真皮祖代以及内胚层、中胚层和外胚层的许多其它有用细胞类型。这种诱导剂包括但不限于：细胞因子，例如白细胞介素-αA、白细胞介素-αA/D、白细胞介素-β、白细胞介素-γ、白细胞介素-γ-诱导蛋白-10、白细胞介素-1-17，角化细胞生长因子、瘦素、白血病抑制因子、巨噬细胞集落刺激因子、巨噬细胞炎性蛋白-1α、1-β、2、3α、3β和单核细胞趋化蛋白1-3、6Ckine、激活素A、双向调节蛋白、血管生成素、B-内皮细胞生长因子、β动物纤维素、脑源性神经营养因子、C10、心肌营养蛋白-1、睫状神经营养因子、细胞因子诱导的中性粒细胞化学趋化因子-1、嗜酸性粒细胞趋化因子、表皮生长因子、上皮中性粒细胞激活肽-78、促红细胞生成素、雌激素受体-α、雌激素受体-β、成纤维细胞生长因子（酸性和碱性）、肝素、FLT-3/FLK-2配体、胶质细胞系源性神经营养因子、Gly-His-Lys、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、GRO-α/MGSA、GRO-β、GRO-γ、HCC-1、肝素结合表皮生长因子、肝细胞生长因子、调蛋白-α、胰岛素、胰岛素生长因子结合蛋白-1、胰岛素样生长因子结合蛋白-1、胰岛素样生长因子、胰岛素样生长因子II、神经生长因子、神经营养因子-3，4、制瘤素M、胎盘生长因子、多效生长因子、rantes、干细胞因子、基质细胞衍生因子1B、血栓形成素、转化生长因子-(α、β1、2、3、4、5)、肿瘤坏死因子(α和β)、血管内皮生长因子和骨形态形成蛋白、改变激素和激素拮抗剂表达的酶，例如17B-雌二醇、促肾上腺皮质激素、肾上腺髓质素、促α-黑素细胞激素、绒膜促性腺激素、结合皮质甾类球蛋白、皮质酮、地塞米松、雌三醇、促卵泡激素、胃分泌素1、高血糖素、促性腺激素、L-3，3′，5′-三碘甲腺原氨酸/黄体化激素、L-甲状腺素、退黑激素、MZ-4、催产素、

甲状旁腺激素、PEC-60、垂体生长激素、孕酮、催乳素、分泌素、性激素结合球蛋白、促甲状腺激素、促甲状腺激素释放因子、甲状腺结合球蛋白和加压素，细胞外基质组分（例如纤连蛋白、纤连蛋白的蛋白水解片段、层粘连蛋白、肌腱蛋白、凝血栓蛋白），和蛋白聚糖类（例如聚集蛋白聚糖、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖、硫酸软骨素蛋白聚糖和多配体聚糖）。其它诱导剂包括来自限定组织的细胞或源自细胞的组分，用于为源自本方法重编程细胞的分化细胞提供诱导信号。这种诱导细胞可源自人、非人哺乳动物或鸟类，例如无特异病原（SPF）的胚胎或成年细胞。

[0322] 分化子代也可能源自重编程 ES 细胞系或使用 2006 年 4 月 11 日提交的待决申请 PCT/US2006/013573 和 2006 年 6 月 7 日提交的美国申请 No.60/811,908 中描述的分离方法直接由重编程细胞分化得到，所述申请通过引用并入本文。分化通过本文所公开的方法获得的重编程细胞的方法可能包括渗透化重编程细胞的步骤。例如，在暴露于一种或多种分化因子或包含分化因子的细胞提取物或其它制剂之前，可渗透化通过本文所述重编程技术生成的 ES 细胞系或包含重编程细胞的不均匀细胞混合物。例如，渗透化技术包括用洗涤剂（例如，毛地黄皂苷）或细菌毒素（例如，链球菌溶血素 O）或通过 2006 年 4 月 11 日提交的 PCT/US2006/013573 和 2006 年 6 月 7 日提交的美国申请 No.60/811,908 中描述的方法孵育细胞，所述申请以引用的方式并入。在某些实施方案中，渗透化重编程细胞，然后暴露于来自 β 细胞（例如，牛 β 细胞）的提取物。

[0323] 这些方法也能够生成 MHC 抗原的纯合或半合子细胞系。在被去分化而生成 HLA 基因座为纯合子的全能或多能干细胞系的分化细胞系中可生成半合或纯合子 HLA 细胞系。参见例如 2004 年 5 月 14 日提交的美国专利申请 No.US 2004/0091936，其公开内容通过引用并入本文。例如，可使用本文公开的重编程方法去分化已分化细胞以生成全能或多能干细胞。可通过如本公开所述重塑抗原的纯合子体细胞的细胞核，然后重建重塑细胞核而生成组织相容性抗原，例如 MHC 抗原的纯合子全能和多能干细胞。可将来自未分化细胞的细胞质加入来自分化细胞或经渗透化的分化细胞的分离细胞核或染色质。重编程体细胞后，所得到的去分化多能纯合子干细胞或干细胞样细胞可分化为所需细胞类型。例如，在 2002 年 4 月 2 日提交的共有且共同待决美国公布 20030027330 中描述了诱导除初始分化细胞外的细胞类型再分化的方法，其内容通过引用整体并入本文。进一步地，在步骤 1 去分化期间，可通过同源重组修饰第一步中重塑的细胞核。在步骤 2 重建和步骤 3 筛选之后，加入来自例如 DT40 等已知与 DNA 靶向构建体同源重组水平较高的细胞的提取物然后将产生具有所需基因修饰且为 MHC 抗原纯合子的细胞。

[0324] 本方法中的许多步骤极耗费时间并且需要熟练的技术人员以高质量完成所述步骤。为降低成本并提高质量和可再现性，可通过使用机器人自动化以上所述许多步骤。例如，在步骤 2 中机器人平台可培养细胞，引入缓冲液和其它试剂，解冻并引入提取物和重建细胞。

[0325] 地区中心将本方法商业化，从需要细胞治疗的动物或人得到分化细胞并进行这些方法的步骤 1-2 或 1-3，并且将重编程多能干细胞送回临床中心，在那里将细胞分化为治疗用细胞类型，或者在地区中心进行分化，并且以活体培养或冻藏状态将准备好进行移植的细胞运至保健服务机构。

[0326] 定义

[0327] “iPS 细胞”(诱导的多能细胞)—在本公开中,这指通过接触重编程试剂转化体细胞,例如使用病毒转导引起体细胞表达一个或多个重编程多肽而产生的多能细胞。

[0328] “基因完整的 iPS 细胞”—在本公开中,这指不引入非所需基因修饰而产生的 iPS 细胞。例如,可使用包含在供体细胞的细胞质内的重组重编程多肽和/或重编程试剂产生基因完整的 iPS 细胞。基因完整的 iPS 细胞任选包括一个或多个所需基因修饰。

[0329] 术语“蛋白质转导域”(“PTD”)指穿过细胞膜进入细胞或赋予或提高(例如)与 PTD 相连的另一分子(例如,蛋白质结构域)穿过细胞膜移位至细胞内的速率的任一氨基酸序列。蛋白质转导域可为天然形成的作为较大蛋白质的一部分的结构域或序列(例如,病毒蛋白质的 PTD,例如 HIV TAT)或者可为合成或人工的氨基酸序列。

[0330] “去分化”—在本公开中,去分化指将细胞的分化状态逆转为胚胎或祖代状态。去分化实例为由于引入来自更具原始状态的、低分化细胞类型,例如卵母细胞或其它胚胎细胞的细胞质引起组织培养中分化细胞例如人体细胞变化(也称为“去分化”),然后这些早期细胞可分化为所需细胞类型。

[0331] “转分化”—在本公开中,转分化指一种分化细胞类型转化为另一种所需分化细胞类型。转分化实例为由于引入来自不同于受体细胞的分化细胞类型的细胞质引起组织培养中分化细胞例如人体细胞变化。

[0332] “卵母细胞”—在本公开中,这指由卵原细胞发育并且在减数分裂之后变成成熟卵的任何卵母细胞,优选哺乳动物卵母细胞。

[0333] “中期 II 卵母细胞”—用于核移植的卵母细胞的优选成熟期(First 和 Prather, Differentiation,48:1-8)。在这个时期,卵母细胞充分“准备”以像它受精精子一样处理引入的供体细胞或细胞核。

[0334] “供体细胞”—在本公开中,这指一部分或全部细胞质被转移至另一个细胞(“受体细胞”)的细胞。供体细胞通常为原始或胚胎细胞类型,例如卵母细胞、卵裂球、内细胞团细胞、畸胎瘤细胞、精原细胞、成蛙细胞等或处于低分化状态或更原始状态下的另一细胞类型或不同于受体细胞的细胞类型。通常,优选从卵母细胞或处于未分化或大体上未分化状态的其它胚胎细胞获得供体细胞质。

[0335] “受体细胞”—这指引入了重编程试剂的细胞。受体细胞可为任一分化细胞类型。其适合的实例包括上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、角化细胞、黑素细胞和其它皮肤细胞类型,肌细胞、骨细胞、免疫细胞(例如 T 和 B 淋巴细胞)、少突胶质细胞、树突细胞、红细胞和其它血细胞,胰腺细胞、神经系统和神经细胞类型,胃部、肠、食道、肺、肝、脾、肾、膀胱、心脏、胸腺、角膜和其它眼部细胞类型等。通常,所述方法应用于需要处于低分化状态的细胞源的任何应用中。

[0336] 本文“重编程”广泛涵盖将细胞或细胞核转化为低分化细胞(去分化细胞),优选转化为全能或多能细胞,或者可选地指将细胞或细胞核转化为不同细胞谱系或细胞类型的细胞。在本公开中,这优选使用一个或多个可能包括内源性重编程因子的重编程因子或含有另外可能包含一个或多个 NLS 或 PTD 序列的重编程因子的融合物促进细胞内化和细胞核内化而实现。

[0337] “重编程试剂”—示例性重编程试剂包括多肽、小分子、核酸等。示例性重编程试剂包括 Oct4、Sox2、Nanog、Klf4、c-Myc 和 Lin28 和表 1 和 2 所列基因及其同源物或功能

片段或变异体，可呈多肽和／或编码这些多肽的核酸的形式，并且可包含在细胞提取物内。例如，重编程试剂可包含在来自自然表达重编程试剂或经诱导表达重编程试剂的细胞的提取物内。重编程试剂还包括抑制基因表达的试剂，例如其敲低促进重编程的 siRNA 靶向基因。可使用一套规定试剂进行重编程，例如一种或多种重组融合蛋白或任选分离以富集其中含有的重编程试剂的细胞提取物或细胞提取物与规定试剂的混合物（例如，通过将规定试剂加入细胞提取物中或通过工程化从其中制备提取物的细胞使其生成规定试剂而制成）进行重编程。例如，通过转移供体细胞的全部或部分细胞质而实现重编程，其中相对于受体细胞，这种供体细胞为更原始的细胞类型或不同细胞类型。

[0338] “卵裂球”—胚泡期胚胎内含有的大体上未分化胚胎细胞。

[0339] “胚胎细胞或胚胎细胞类型”—在本公开中，这将指从中将细胞质引入组织培养中的分化细胞（例如人体细胞）导致这种分化细胞去分化和／或寿命延长的任何细胞，例如卵母细胞、卵裂球、胚胎干细胞、内细胞团细胞或原生殖细胞。

[0340] “寿命改变的细胞”—在本公开中，这指将更原始或低分化细胞类型，例如胚胎细胞或胚胎细胞类型（例如，卵母细胞或卵裂球）的细胞质引入所需分化细胞（例如，培养的人体细胞）时引起的细胞寿命的变化（延长）。

[0341] “胚胎干细胞（ES 细胞）”—在本公开中，这指具有发育为完整生物体潜能的未分化细胞，即能够无限增殖，保持其未分化状态并且在诱导分化时能够产生体内任一细胞类型的细胞。ES 细胞，胚泡内细胞团（ICM）的子代在培养中多次传代后保持多能，维持正常核型并且在体内和体外分化为三胚层的衍生物，而且可使实验动物产生畸胎瘤。

[0342] “核移植”—供体细胞的细胞或细胞核 DNA 引入去核的卵母细胞，然后其中细胞或细胞核与卵母细胞融合以生成核移植融合或细胞核融合胚胎。这种 NT 融合可用于生成克隆胚胎或子代或生成 ES 细胞。

[0343] “端粒酶”—将其部分内部 RNA 部分用作端粒重复 DNA 合成模板的核糖核蛋白（RNP）颗粒和聚合酶（美国专利 No.5,583,016；Yu 等，Nature，344：126(1990)；Singer 和 Gottschling，Science，266：404(1004)；Autexier 和 Greider，Genes Develop.，8：563(1994)；Gilley 等，Genes Develop.，9：2214(1995)；McEachern 和 Blackburn，Nature，367：403(1995)；Blackburn，Ann.Rev.Biochem.，61：113(1992)；Greider，Ann Rev. Biochem.，65：337(1996).）。这种酶的活性依赖于其 RNA 和蛋白质组分而规避了使用 RNA（即，与 DNA 相反）作为端粒 DNA 合成模板进行末端复制出现的问题。端粒酶延长了端粒 DNA 的 G 链。因子的组合，包括端粒酶持续性、在各端粒的作用频率和端粒 DNA 降解速率、归因于端粒尺寸（即，是否延长、缩短或保持为某种尺寸）。在体外端粒酶极具持续性，酶离解之前四膜虫端粒酶向 G 链引物添加平均约 500 个碱基（Greider，Mol.Cell.Biol.，114572(1991)）。1998 年 4 月 9 日 Cech 等公布的 WO 98/14593 报道了源自纤毛虫、酵母、裂殖酵母和人的端粒酶核酸序列以及包含端粒酶蛋白质亚基的多肽。同样，1998 年 4 月 9 日 Cech 等公布的 WO 98/14592 公开了含有人端粒酶逆转录酶、人端粒酶催化蛋白亚基的组合物。同样，美国专利 No.5,837,857 和 5,583,414 描述了编码哺乳动物端粒酶的核酸。更进一步地，West 等发布的美国专利 No.5,830,644、Kzolowski 等发布的美国专利 No.5,834,193 和 Harley 等发布的美国专利 No.5,837,453 描述了测量端粒酶长度和端粒酶活性的测定和影响端粒酶活性的试剂。

[0344] “基因修饰或改变”—在本公开中，这指细胞的基因组 DNA 含有一个或多个修饰，例如添加、取代和／或缺失。

[0345] “全能”—在本公开中，这指产生发育体的全部细胞的细胞，例如胚胎、胎儿或动物。术语“全能”也可指产生动物的全部细胞的细胞。当全能细胞用于由一步或多步核移植步骤生成胚胎的方法中时，可产生发育细胞团块的全部细胞。动物可为在宫外活动的动物。例如，动物可作为生活动物而存在。全能细胞也可用于生成不完整动物，例如用于获取器官的动物，例如具有基因修饰以通过操作同源异型基因以消除头部生长。

[0346] “有蹄类动物”—在本公开中，这指四足有蹄动物。在其它优选的实施方案中，有蹄类动物选自牛科、ovids、鹿科、猪科、马科和骆驼科动物的家养或野生代表。这些代表的实例为奶牛或公牛、野牛、水牛、绵羊、大角羊、马、小马、驴、骡、鹿、麋鹿、北美驯鹿、山羊、水牛、骆驼、美洲驼、羊驼和猪。牛中特别优选的是黄牛、瘤牛和水牛或奶牛或公牛。

[0347] “永生化”或“永存”细胞—本公开使用的这些关于细胞的术语可指细胞超出海弗利克极限 (Hayflick limit)。海弗利克极限可定义为细胞系衰老之前发生的细胞分裂次数。Hayflick 将多数非永生化细胞设定的分裂极限为约 60 次。参见，例如，Hayflick 和 Moorhead，1971，Exp. Cell. Res.，25：585-621；和 Hayflick，1965，Exp. Cell Research，37：614-636，其通过引用整体并入本文，包括所有数字、表和附图。因此，如果细胞系中的细胞能够进行 60 次以上的分裂，则可区别永生化细胞系和非永生化细胞系。如果细胞系中的细胞能够进行 60 次以上的分裂，则细胞系为永生化或永存细胞系。本公开的永生化细胞系优选能够进行 70 次以上的分裂，并且更优选能够进行 90 次以上的细胞分裂，最优选能够进行 90 次以上的细胞分裂。通常，可根据永生化和永存细胞可在低于非永生化细胞的密度下传代而区别永生化或永存细胞和非永生化或非永存细胞。特别地，当接种条件不允许细胞之间物理性接触时，可培育永生化细胞以汇合（例如，当单层细胞遍布整个平板时）。因此，按细胞之间不会物理性接触的细胞密度接种细胞时，可区别永生化细胞和非永生化细胞。

[0348] “培养物”—在本公开中，该术语指液体培养基中一个或多个静态的细胞或进行细胞分裂的细胞。几乎可将任一类型的细胞置于细胞培养条件下。可在具有一个或多个大体相似细胞的悬浮液和／或单层中培养细胞。可在具有异源群体细胞的悬浮液和／或单层中培养细胞。上一句中所用的术语异源可涉及任何细胞特征，例如细胞类型和细胞周期。可在具有饲养细胞的悬浮液和／或单层中饲养细胞。

[0349] “饲养细胞”—这指与其他细胞一起共同培养的细胞。饲养细胞包括（例如）成纤维细胞、胎儿细胞、输卵管细胞，并且可为与之一起共同培养的细胞提供肽、多肽、电信号、有机分子（例如，类固醇）、核酸分子、生长因子、细胞因子和代谢营养源。一些细胞需要在组织培养中培育的饲养细胞。

[0350] “胚胎”—在本公开中，这指未植入母体宿主子宫膜的发育细胞团。因此，本文所使用的术语“胚胎”可指受精卵母细胞、胞质杂种（本文定义）、胚泡期前发育细胞团和／或处于植入母体宿主子宫膜之前的发育期的其它发育细胞群。本公开的胚胎可能不显露生殖嵴。因此，从胚胎分离和／或由胚胎产生“胚胎细胞”。

[0351] “胎儿”—在本公开中，指已植入母体宿主子宫膜的发育细胞团。胎儿可包括例如生殖嵴等定义特征。生殖嵴是本领域普通技术人员易于鉴定的特征并且是多数动物物种胎儿的可识别特征。

[0352] “胎儿细胞”—如本文所使用的，可指从胎儿分离和／或由胎儿产生或源自胎儿的任何细胞。

[0353] “非胎儿细胞”—指并非源自胎儿或从胎儿分离的细胞。

[0354] “衰老”—在本公开中，这指长时间保持细胞培养后，非永生体细胞生长减慢的特征。特征上，非永生细胞在衰老和死亡之前其寿命有限。本公开通过将来自供体细胞（通常卵母细胞或卵裂球）的细胞质引入受体细胞例如培养的人体细胞而减缓或防止衰老。

[0355] 术语“细胞重建”指将细胞核或染色质转移至细胞的细胞质以获得功能细胞。

[0356] 术语“染色质转移”(CT) 指凝聚染色质的细胞重建。

[0357] 术语“凝聚染色质”指未被核被膜封装的 DNA。例如，通过将细胞核暴露于（例如）来自 M1 或 Mi1 卵母细胞的有丝分裂提取物或其它有丝分裂细胞提取物，通过将细胞核转移至 M1 或 MII 卵母细胞或其它有丝分裂细胞并且在核被膜破坏之后回收所得到的凝聚染色质而产生凝聚染色质。凝聚染色质指压缩度比除中期外的任一细胞周期高的染色体。

[0358] 术语“细胞质泡囊”指受完整或渗透化但完整的原生质膜束缚、但没有细胞核的细胞的细胞质。可替换地用作术语“去核胞质体”和“去核细胞质”的同义词，除非术语“去核细胞质”明确用于去除了原生质膜的提取物的情况下。

[0359] 术语“细胞质转移”(CyT) 指本领域已知用于并置体细胞的细胞核和未分化细胞的细胞质的一些技术。这种技术包括但不限于直接将所述未分化细胞质转移至分化细胞的细胞质内，渗透化体细胞以使未分化细胞细胞质扩散至体细胞内或将体细胞细胞核转移至未分化细胞的细胞质泡囊内。

[0360] 术语“分化细胞”指来自脊椎动物的处于分化为体细胞谱系进程中或已最终分化为成年生物体内的细胞类型的任何细胞。

[0361] 术语“多能干细胞”指能够分化为一种以上的分化细胞类型的动物细胞。这种细胞包括 ES 细胞、EG 细胞、EDC、ED 样细胞和成人源性细胞（包括间叶干细胞、神经元干细胞和骨髓源性干细胞）。多能干细胞可被基因修饰或不被修饰。基因修饰细胞可包括促进其在卵内的识别的标记，例如荧光蛋白。

[0362] 术语“胚胎干细胞”(ES 细胞）指（例如）源自已连续传代为细胞系的胚泡或桑葚胚内细胞团的细胞。可通过用精子或 DNA 使卵细胞受精、核移植、孤雌生殖或借助生成 MHC 区域为纯合性的 ES 细胞而获得 ES 细胞。hES 细胞为人 ES 细胞。

[0363] 术语“基因融合化合物”指提高染色质或细胞核与受体细胞质泡囊融合并且并入其中产生随后能够进行细胞分裂的活细胞的可能性的化合物。非限制性举例而言，这种基因融合化合物可增强凝聚染色质或细胞核与原生质膜的亲和性。可选地，基因融合化合物可提高靶细胞质泡囊脂质双层与凝聚染色质、分离细胞核的核被膜或供体细胞原生质膜的结合可能性。

[0364] 术语“异质体”指由于含有细胞核和细胞质的细胞与另一个细胞的胞质体融合产生的细胞。

[0365] 术语“人胚源性细胞”(hEDC) 指卵裂球、桑葚胚源性细胞、胚泡源性细胞（包括内细胞团细胞）、胚盾或外胚叶或早期胚胎（包括原始内胚层、外胚层和中胚层及其衍生物）的其它全能或多能干细胞，但不包括已传代为细胞系的 hES 细胞。可通过用精子或 DNA 使卵细胞受精、核移植、孤雌生殖或借助生成 HIA 区域为纯合性的 hES 细胞而获得 hEDC 细胞。

[0366] 术语“人胚源性细胞样细胞”(hED 样细胞）指本发明生成的未进行培养而保持 ES 细胞特征的多能干细胞，但如同桑葚胚源性细胞、胚泡源性细胞（包括内细胞团细胞）、胚盾或外胚叶或早期胚胎（包括原始内胚层、外胚层和中胚层及其衍生物）的其它全能或多能干细胞，未经培养以保持稳定的 hES 系并且能够分化为任一体细胞分化类型。可通过基因修饰获得 hED 样细胞，包括修饰使得缺乏 MHC 区基因，该区域为半合或纯合。

[0367] 术语“核重塑”指人工改变核纤层或细胞染色质的分子组成。

[0368] 术语“渗透化”指改变细胞的原生质膜使得其中形成扩大或生成的孔或部分或完全去除原生质膜。

[0369] 术语“多能”指干细胞能够分化为许多分化细胞类型的特征。

[0370] 术语“未分化细胞”指卵母细胞，未分化细胞例如 ES、EG、ICM、ED、EC、畸胎瘤细胞、卵裂球、桑葚胚或生殖谱系细胞。

[0371] 遍及本说明书和权利要求，词“包含”或其变型应理解为指包含规定的整体或整个群体，但不排除任何其他整体或群体。

[0372] 进一步地，除非上下文另有要求，单数术语应包括复数并且复数术语应包括单数。

[0373] 除非另有定义，本文所使用的所有技术和科学术语的含意与本领域普通技术人员通常理解的一样。如有冲突，以本说明书（包括定义）为准。

[0374] 缩写

[0375] 3-D- 三维

[0376] BFF- 牛成纤维细胞

[0377] bFGF- 基底成纤维细胞生长因子

[0378] BMP-2- 骨形态形成蛋白 -2

[0379] Ca1R1- 神经胶质标记

[0380] CB- 细胞松弛素 B

[0381] CD14- 脂多糖受体

[0382] CD34- 白细胞共同抗原

[0383] CD45- 血细胞标记

[0384] CNF- 坏死因子

[0385] CNS- 中枢神经系统

[0386] CNTF- 纤毛神经营养因子

[0387] CT- 染色质转移

[0388] CyT- 细胞质转移

[0389] BSA- 牛血清蛋白

[0390] ECM- 细胞外基质

[0391] ESC- 胚胎干细胞

[0392] FCS- 胎牛血清

[0393] GF- 生长因子

[0394] DMAP- 二甲基氨基嘌呤

[0395] DMEM- 杜尔贝科改良的最基本培养基

[0396] DMSO- 二甲亚砜

[0397] EGF- 表皮生长因子

[0398] En-1- 烯醇酶

[0399] FGFR3- 成纤维细胞生长因子受体 3

[0400] G1/G0- 细胞周期间期

[0401] GABA- γ - 氨基丁酸

[0402] GFAP- 神经胶质核纤蛋白结合蛋白

[0403] HPLC- 高压液相色谱法

[0404] ICC- 免疫细胞化学

[0405] ICM- 内细胞团

[0406] IgG- 免疫球蛋白 G

[0407] Nurr-1- 核受体

[0408] Pax8- 神经元诱导剂

[0409] PDGF- 血小板源性生长因子

[0410] PERVS- 猪内源性逆转录酶病毒

[0411] RT-PCR- 逆转录 - 聚合酶链式反应

[0412] SCID- 重症综合性免疫缺陷

[0413] SHH- 音猬因子

[0414] T3- 酪素

[0415] TH- 酪氨酸羟化酶

[0416] TUJ1- 神经胶质标记

[0417] EC 细胞 - 胚胎癌性细胞

[0418] ED 细胞 - 胚源性细胞为源自通过精子和卵细胞融合、核移植、孤雌生殖或重编程染色质并且随后将重编程染色质并入卵母细胞或卵裂球的原生质膜生成细胞系而产生的受精卵、卵裂球、桑葚胚或胚泡期哺乳动物胚胎。所得到的细胞系可为分化细胞系或者可将所述细胞保持为未分化 ES 细胞。因此，ED 细胞包括 ES 细胞和通过直接使来自哺乳动物植入前胚胎的细胞分化而获得的细胞。hED 细胞为例如源自人植入前胚胎的人胚源性细胞。人胚源性细胞可能指桑葚胚源性细胞、胚泡源性细胞（包括内细胞团细胞）、胚盾或外胚叶或早期胚胎（包括原始内胚层、外胚层和中胚层及其衍生物）的其它全能或多能干细胞，但不包括已传代为细胞系的 hES 细胞。可通过用精子或 DNA 使卵细胞受精、核移植、孤雌生殖或借助生成 HIA 区域为纯合性的 hES 细胞而获得 hED 细胞。

[0419] ES 细胞 - 胚胎干细胞源自通过精子和卵细胞融合、核移植、孤雌生殖或重编程染色质并且随后将重编程染色质并入原生质膜生成细胞而产生的受精卵、卵裂球、桑葚胚或胚泡期哺乳动物胚胎。hES 细胞为例如源自人植入前胚胎的人胚胎干细胞。hES 细胞可能源自已连续传代为细胞系的人胚泡或桑葚胚的内细胞团。可通过用精子或 DNA 使卵细胞受精、核移植、孤雌生殖或借助生成 HLA 区域为纯合性的 hES 细胞而获得 hES 细胞。

[0420] GCL- 原生殖细胞

[0421] HSE- 人皮肤相等物为制备用于试验用或促进伤口愈合的治疗应用中的细胞和生物或合成基质的混合物。

[0422] INM- 内核被膜

[0423] MBS- 镁盐缓冲液

[0424] MiRNA- 微小 RNA

[0425] NPC- 核孔复合体

[0426] NT- 核移植

[0427] ONM- 外核被膜

[0428] PEG- 聚乙二醇

[0429] PS 成纤维细胞 - 结疤前成纤维细胞为源自早期妊娠皮肤或源自表现出产前基因表达模式的 ED 细胞的成纤维细胞，所述细胞促进真皮伤口快速愈合而不形成疤痕。

[0430] SCNT- 体细胞核移植

[0431] SLO- 链球菌溶血素 O

[0432] SPF- 无特异性抗原

[0433] 参考

[0434] 参考

[0435] Bachoud-Levi A C 等，Lancet(2000)356

[0436] Bain G 等，Dev Biol(1995)168 :342-357

[0437] Basic Cell Culture Protocols(Pollard 和 Walker 编)，HumanaPress，1997

[0438] Bjornson C R R 等，Science(1999)283 :534-537

[0439] Black I 等，J Neurosci(2000)

[0440] Bond J A 等，Int J Cancer(1996)67 :563-572

[0441] Boukamp P，Semin Cell Biol(1995)6 :157-163

[0442] Bouwens L，J Pathol(1998b)184 :234-239

[0443] Bouwens L，Microsc Res Tech(1998a)43 :332-336

[0444] Brown P D 和 Benya P D，J Cell Biol(1988)106 :171-179

[0445] Brustle O 等，Science(1999)285 :754-756

[0446] Cibelli J 等，Science(2001)，印刷中

[0447] Clark M S 等，J Neurosci(1995)15 :6167-6178

[0448] Cohen E 等，J Cell Sci(1999)112 :2657-2666

[0449] Deacon T 等，Nature Med(1997)3 :350-353

[0450] Eguchi G 和 Kodama R，Curr Opin Cell Biol(1993)5 :1023-1028

[0451] Fernandez-Valle C 等，J Neurosci(1997)17 :241-250

[0452] Fraichard A 等，J Cell Sci(1995)108 :3181-3188

[0453] Freeman T B 等，Proc Natl Acad Sci USA(2000)97 :13877-13882

[0454] Fuchs E 和 Segre J A，Cell(2000)100 :143-155

[0455] Gundersen H J G 等，APIMS(1988)96 :379-394

[0456] Hallows K R 和 Frank R C，Biorheology(1992)29 :295-309

[0457] Hamano T 和 Asofsky R，J Immunol(1984)132 :122-128

[0458] Hay E D 和 Zuk A，Am J Kidney Dis(1995)26 :678-690

[0459] Hoerger T J 等，Pharmacokinetics(1998)14 :541-557

[0460] Hohn H P 和 Denker H W，Exp Cell Res(1994)215 :40-50

[0461] Holtzer h 等,Proc Natl Acad Sci USA(1975)72 :513-517

[0462] Hynes M 和 Rosenthal A,Neuron(2000)28 :11-14

[0463] Imaizumi T 等,Nature Biotech(2000)18 :949-953

[0464] Keller G M,Curr Opin Cell Biol(1995)7 :862-869

[0465] Kikyo N 和 Wolffe A P,J Cell Sci(2000)113 :11-20

[0466] Kishkina V B 等,Biull Eksp Biol Med(1983)96 :97-99

[0467] Kopyov O V 等,Cell Transplantation(1996)5 :327-337

[0468] Lang A E,Archives Neurol(2000)57 :1118-1125

[0469] Lee S H 等,Nature Biotech(2000)18 :675-679

[0470] Leno G H 等,Cell(1992)69 :151-158

[0471] Levit K 等,Health Affairs(1998)17 :99-110

[0472] Nathanson M A,Curr Top Dev Biol(1986)20 :39-62

[0473] Ng Y Y 等,Nephrol Dial Transplant(1999)14 :28602872

[0474] Okado H 和 Takahashi K,Proc Natl Acad Sci USA(1988)85 :6197-6201

[0475] Okado H 和 Takahashi K,J Physiol(1990)427 :583-602

[0476] Okado H 和 Takahashi K,J Physiol(1990)427 :603-623

[0477] Pairault J 和 Lasnier F,Biol Cell(1987)61 :149-154

[0478] Paterson F C 和 Rudland P S,J Cell Physiol(1985)125 :135-150

[0479] Piccini P 等,Nature Neurosci(1999)2 :1137-1140

[0480] Pittenger M F 等,Science(1999)284 :143-147

[0481] Pratt H P 等,Cell(1981)26 :279-292

[0482] Rosen D M 等,Exp Cell Res(1986)165 :127-138

[0483] Sato K 等,Rinsho Shinkeigaku(1991)31 :809-814

[0484] Schmidt V 和 Alder H,Cell(1984)38 :801-809

[0485] Schuldiner M 等,Proc Natl Acad Sci USA(2000)97 :11307-11312

[0486] Shea T B,Cell Biol Int Rep(1990)14 :967-979

[0487] Siderowf A D 等,Movement Disorders(2000)15 :439-455

[0488] Strutz F 和 Muller G A,Nephrol DialTransplant(2000)15 :1729-1731

[0489] Studer L 等,Brain Res Bull(1996)41 :143-150

[0490] Studer L 等,Nature Neurosci(1998)1 :290-295

[0491] Tabar V 和 Studer L(1997)Transplantation into the adult rodent brain,in Current Protocols in Neuroscience(McKay R D 和 Gerfen CR 编),John Wiley & Sons Inc.,New York

[0492] Takigawa M 等,Cell Differ(1984)14 :197-204

[0493] Tamai K 等,Dev Growth Differ(1999)41 :41-49

[0494] Theise N D 等,Hepatology(2000)32 :11-16

[0495] Ulloa L 和 Avila J,Eur J Neurosci(1996)8 :1441-1451

[0496] van der Loo W 等,J Immunol 91979)122 :1203-1208

[0497] Whetton-Goldstein K 等,JAGS(1997)45 :844-849

[0498] Wright W E,J Cell Biol(1984)98:427-435

[0499] Wu C F 等,J Neurobiol(1990)21:499-507

[0500] Yan J 等,J Neurochem(2001)76:307-311

[0501] Yang X 等,Biol Reprod(2000)

[0502] Yeomans N D 等,Gastroenterology(1976)71:770-777

[0503] Yoshida M 等,BioEssays(1995)17:423-430

[0504] Yuan S 等,Differentiation(1996)61-:67-75

[0505] Yujiri T 等,J Biol Chem(1999)274:12605-12610

[0506] Zanetti N C 和 Solursh M,J Cell Biol(1984)99:115-123

[0507] Zawada W M 等 Nature Med(1998)4:569-573

[0508] 现就以下特定非限制性实施例对本发明进行更详细地描述。

实施例

[0509] 实施例 1

[0510] 融合蛋白构建体

[0511] 生成编码重编程多肽的表达载体。生成的重编程多肽为人和小鼠 Oct4、Nanog、Klf-4、c-Myc 和 Sox-2。每个基因的检索号示于表 1 和 2。为促进纯化、检测和引入受体细胞,表达构建体包括蛋白质转导域 (PTD) 的框内融合物、HA 标签和 6xHis 标签。从 ATCC 获得编码开放阅读框的人和小鼠克隆。通过将涵盖人和小鼠 Oct4 基因开放阅读框的 PCR 片段克隆至 pTAT-HA 表达载体的 NcoI 和 EcoRI 位点生成 pTAT-HA-hOct4 和 pTAT-HA-mOct4 表达载体(图 1)。通过大体上相同的方法克隆编码 Nanog、Klf-4、c-Myc、Sox-2 和 Lin28 融合蛋白的载体,PCR 产物插入 pTAT-HA 载体,产生以下构建体(顺便指出插入位点):pTAT-HA-hNanog(KpnI/EcoRI 位点)、pTAT-HA-mNanog(NcoI/EcoRI 位点)、c-Myc(NcoI/EcoRI 位点)、pTAT-HA-hSox-2(KpnI/EcoRI 位点)、pTAT-HA-mSox-2(KpnI/EcoRI 位点)、pTAT-HA-hKlf4(NcoI/EcoRI 位点)和 pTAT-HA-mKlf4(NcoI/EcoRI 位点)。表 6 示出了用于扩增每个开放阅读框的 PCR 引物。通过序列分析确认生成的质粒。

[0512] 表 6 用于扩增靶基因并生成融合构建体的 PCR 引物

[0513]

引物	序列
人 Oct4 有义	5'-TTCCATGGCGGGACACCTGGCTT-3'
人 Oct4 反义	5'-TTGAATTCTCAGTTTGAATGCATGGGAGAGC-3'
小鼠 Oct4 有义	5'-TTCCATGGCTGGACACCTGGCTTCA-3'
小鼠 Oct4 反义	5'-TTGAATTCTCAGTTTGAATGCATGGGAGAGC-3'
人 Nanog 有义	5'-ATACTGGTACCAGTGTGGATCCAGCTTG-3'
人 Nanog 反义	5'-TTCACTCGAATTCACACGTCTTCAG-3'

[0514]

小鼠 Nanog 有义	5'-GAACGCCTCATCCATGGCTGCAGTTT-3'
小鼠 Nanog 反义	5'-CAGATGTTGCGGAATTCTCATATT-3'
c-Myc 有义	5'-CTCCCGCGACCATGGCCCTCAACGTT-3'
c-Myc 反义	5'-GACATTTCTGTTAGAAGGAATTCTTTT-3'
人 Sox-2 有义	5'-CGCCCGCATGGGTACCATGATGGAGA-3'
人 Sox-2 反义	5'-CTCCAGTTCGAATTCCGGCCCTCACA-3'
小鼠 Sox-2 有义	5'-TTTTTGGTACCATGTATAACATGATGGAGACG-3'
小鼠 Sox-2 反义	5'-TTTTTGAATTCTCACATGTGCGAGAGGGGCA-3'
人 Klf4 有义	5'-GCGAGTCTGCCATGGCTGTCAG-3'
人 Klf4 反义	5'-CACTGTCTGGAATTCAAAAATGCCT-3'
小鼠 Klf4 有义	5'-TTTTTCCATGGCTGTCAGCGACGCTCTGC-3'
小鼠 Klf4 反义	5'-TTTTTGAATTCTTAATGCCTCTTCATG-3'

[0515] 实施例 2

[0516] 纯化细菌细胞内表达的重组蛋白

[0517] 质粒 pTAT-HA-hOct4 和 pTAT-HA-mOct4、pTAT-HA-hNanog 或 pTAT-HA-mNanog 各自转化至含有 T7RNA 聚合酶的 IPTG- 诱导基因的大肠杆菌株 BL21(DE3)pLysS(Invitrogen)。通过在 30℃下添加 1mM IPTG 诱导融合蛋白表达 4h。观察到 6xHis 融合的重组蛋白被宿主细菌隔离至内含体中。为了获得纯化蛋白质，在变性液中 (6M 胍盐、20mM $NaPO_4$ 和 0.5M NaCl，pH 7.8) 经超声处理破坏细胞，然后 6xHis 融合的重组蛋白被束缚至镍树脂上 (ProBond resin，Invitrogen)。洗涤几次后，于 20mM $NaPO_4$，pH 4.0，0.5M NaCl，8M 尿素和 100mM 咪唑中洗提融合蛋白。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳确定融合蛋白的纯度和浓度，并且经考马斯蓝染色显现 (图 2)。TAT-Oct4 和 TAT-Nanog 极不溶于天然水溶液，但可溶于 6-8M 尿素。

[0518] 利用大体上相同的方法表达 Klf-4、c-Myc、Sox-2 和 Lin28 融合蛋白。与 Oct4 和 Nanog 构建体不同，这些蛋白质不形成内含体并且可溶于天然水溶液中。用镍树脂柱纯化这些融合蛋白，并且通过 SDS-PAGE 分析并且经斯蓝染色显现 (图 3)。

[0519] 实施例 3

[0520] 用 TAT-Oct-4 处理 ES 细胞

[0521] 为测试假设添加重编程蛋白可帮助将干细胞系维持在未分化状态，则测试 TAT-Oct-4 对人 ES 细胞的影响。在标准条件下培育 ES 细胞，并且将在实施例 2 中生成的纯 TAT-Oct-4 加入培养基 (由于 TAT-Nanog 溶解性差，未测试)。然后将 ES 送回 CO2 孵育箱并进行目测。ES 细胞集落扩大并显示分化的形态信号。通过碱性磷酸酶 (AP) 染色确认分

化。相对于对照人 ES 细胞集落，TAT-Oct-4 处理的细胞显示 AP 染色强度降低（图 4）。

[0522] 这些结果表明单独加入 TAT-OCT-4 不足以将 ES 细胞维持在未分化状态，并且暗示重编程蛋白的组合更有效。

[0523] 实施例 4

[0524] 来自哺乳动物细胞的重组重编程蛋白的表达和纯化

[0525] 如上所述，当从细菌表达系统纯化时，Oct4 和 Nanog 融合蛋白溶解性极差。为提高溶解性，在哺乳动物细胞内表达人蛋白质。将以上所述表达构建体亚克隆至哺乳动物表达载体 pSecTag2B(Invitrogen)（图 5 和 6），所述表达载体包含预计促进纯化表达的融合蛋白的 N 端分泌信号（Igκ 前导序列）。通过用 Hind III 和 EcoRI 进行限制性酶消化来释放来自 pTAT-HA-hOct-4 和 pTAT-HA-hNanog 构建体的 TAT-HA-hOct-4 和 TAT-HA-hNanog cDNA，通过琼脂凝胶电泳分离和纯化，然后再克隆至 pSecTag2B 载体的相应位点。通过序列分析确认克隆基因的同一性。然后将所述构建体转染至 293 细胞并且用博莱霉素选择阳性细胞。尽管存在分泌信号，表达的融合蛋白并未分泌至培养基中，但相反被转移至细胞核内。还观察由 pSecTag2B 表达的 GFP 蛋白质的核定位（未示出）。

[0526] 大体上如先前所述制备细胞提取物（Agarwal S.，Methods Enzymol.2006；420：265-83），但不添加蛋白酶抑制剂。在 293 细胞条件培养基、全细胞溶解产物、核溶解产物和细胞质溶解产物中制备重组蛋白质并且用 HA 琼脂糖进行免疫沉淀。然后用 pH2.2 的 200mM 甘氨酸洗提蛋白质，之后用 pH8.0 的 1M Tris 中和。

[0527] 通过比较染色电泳凝胶和已知量的 BSA 原液确定融合蛋白浓度（图 7）。

[0528] 实施例 5

[0529] 将重组融合蛋白递送至受体细胞

[0530] 使用蛋白质转染试剂将重编程蛋白融合构建体（实施例 2 和 4 所述）递送至受体细胞内。受体细胞为人新生儿真皮成纤维细胞（NHDF）和小鼠胚胎成纤维细胞（MEF），其在 24 孔细胞培养板（BD Biosciences，San Jose，Ca.；Corning，Lowell，Ma.）上培育直至约 50-70％汇合并且根据厂商的说明将其暴露于蛋白质递送融合蛋白混合物中 1-3h。然后将培养基换为含 10％ FBS 的 DMEM。可选地，将细胞悬浮液与蛋白质－蛋白质递送试剂混合 2h，之后将细胞接种于上述培养基中。在不同的时间间隔固定和染色细胞样品，以检测融合蛋白进入细胞。所用重编程蛋白为单个地和相互以各种组合方式引入细胞的 Oct4、Nanog、Lin28、KLF4、c-myc 和 Sox2。

[0531] 一种用于蛋白质递送的转染试剂为 PULSin™(Polyplus Transfection，Genesee Scientific 供销，8430 Juniper Creek Lane，San Diego，CA 92126)。根据厂商说明，PULSin™ 含有与蛋白质和抗体形成非共价复合物的专有阳离子两亲性化合物分子。通过阴离子细胞粘着受体使复合物内化并释放至细胞质内，复合物在细胞质内分解。该过程无毒并且递送了功能性蛋白。根据如下厂商说明使用 PULSin™：

[0532] 24 孔板的每个孔

[0533] a) 将 0.5-4μg 蛋白质稀释于微量离心管中 100μl 的 20mM 羟乙基哌嗪乙硫磺酸 (Hepes) 中。轻轻涡旋并暂时减速。

[0534] b) 加入 0.5-4μl 的 PULSin™（在将蛋白质组合转染至细胞的一些实验中，PULSin™ 增加至 4-8μl）。立即涡旋并暂时减速。

[0535] c) 室温孵育 15min。

[0536] d) 用 1X PBS 或无血清培养基洗涤细胞 1 次。洗涤步骤是去除所有血清痕迹的关键。

[0537] e) 加入 900μl 无血清培养基。

[0538] f) 每孔加入 100μl 的 PULSin™/ 蛋白质混合物并通过轻轻旋转板使匀化。

[0539] g) 在 37℃下于 5% CO2 孵育箱内孵育。

[0540] h)4h 后，去除含生物分子 /PULSin™ 复合物的培养基并更换为新鲜的完全培养基。

[0541] i) 立即或在一定孵育期后分析细胞。可通过检测蛋白质活性或目测细胞内荧光来分析递送。

[0542] 另一种用于蛋白质递送的转染试剂为 SAINT-PhD(Synvolux Therapeutics B.V.，L.J.Zielstraweg 1,9713 GX Groningen，The Netherlands)。根据厂商说明，SAINT-PhD 由专有阳离子吡啶盐两亲分子和辅助脂质组成。SAINT-PhD 与蛋白质混合后，就形成直径约 200nm 的颗粒。该颗粒中，蛋白质被至少一个双层脂质包裹。而且，在形成的复合物中，SAINT-PhD 和蛋白质之间仅存在非共价相互作用。颗粒表面的阳离子两亲性化合物对带负电的细胞表面的亲和性高。融合或捕获颗粒后，蛋白质就释放至细胞的细胞质内。SAINT-PhD 递送的蛋白质具功能性且未修饰。根据如下厂商说明使用 SAINT-PhD：

[0543] 1. 用 HBS(包装内)将 0.5-4μg 蛋白质稀释至 30μL 体积。如果蛋白质过于稀，完全不用 HBS 缓冲液。

[0544] 2. 将 10-30μL 的 SAINT-PhD 吸取至蛋白质 /HBS 溶液中。

[0545] 3. 吸取 SAINT-PhD 后，制剂可能如同复合制剂那样出现浑浊。

[0546] 4. 直接向每孔加入制备的 SAINT-PhD/ 蛋白质复合物(步骤 2)。不必去除生长培养基。

[0547] 5. 轻轻旋转板以确保在整个板表面均匀分布。

[0548] 6. 在 37℃下于 5% CO2 孵育箱内孵育。

[0549] 7. 在适当孵育时间后进行测定。

[0550] 进行这些实验以优化蛋白质递送条件从而实现蛋白质向细胞核的有效递送，同时最大化细胞成活率。在约 0.5-4μg/ml 的浓度下对融合蛋白进行试验。转染后，通过用一级抗体，抗 Oct-2 和抗 Nanog(均来自 Santa Cruz Biotechnology，Inc.，Santa Cruz，Ca.)，每种均按 1 ： 100 至 1 ： 200 稀释进行免疫染色来固定和分析细胞样品，使用二级生物素标记的抗小鼠或抗兔抗体 (Jackson Immunoresearch ;West Grove，Pa. ;GE Healthcare(Amersham Biosciences))，然后用链霉亲和素 -FITC 进行检测。细胞中可检测到 Oct-4、Nanog 和若丹明标记的 BSA，转染 48h 后检测到免疫染色呈阳性(图 8)。

[0551] 细胞通常耐受用转染试剂进行 3h 的蛋白质递送，每次反应用 1-4μl 转染试剂。在受体细胞内可检测到比作为未纯化提取物添加时更高含量的纯化 Oct4 和 Nanog 蛋白质(由 293 细胞生成)。

[0552] 实施例 6

[0553] 通过接触重组重编程蛋白使细胞分化

[0554] 在这个实施例中，通过引入重组重编程蛋白重编程分化细胞。

[0555] 将人新生儿真皮成纤维细胞 (NHDF) 接种于 24 孔板并培育至 50% -70%汇合。向

培养基加入均与蛋白质易位域 (PTD) 和 / 或核定位信号 (NLS) 基因融合的重组重编程蛋白，最终浓度为约 0.1-100 μ g/ml。中间试验中确定单个多肽和多肽组合的浓度为细胞所耐受（不引起不可接受的高水平细胞死亡）并优选足以引起可检测的细胞进入。在某些实验中，蛋白质转染试剂也用于促进多肽进入细胞。细胞传代至有丝分裂灭活的 MEF 并且在首次加入重编程蛋白几天后转到 hESC 培养基上。

[0556] 定期采集细胞样品并通过免疫荧光和蛋白质印迹法监测细胞核内是否存在加入的重编程蛋白，根据需要加入重编程蛋白以维持易于检测的水平。

[0557] 目测细胞是否出现干细胞形态。还通过免疫荧光、RT-PCR 和与 IP/Western 结合的放射性代谢标记定期测试细胞样品是否表达多能性标记。

[0558] 重组重编程蛋白包括人 Oct4、Nanog、Sox2、c-Myc、Klf4 和 Lin28。对重编程蛋白的总计 17 个不同组合进行了测试 ：一个组合含有所有这 6 种蛋白质，6 个不同组合含有 5 种蛋白质，10 个不同组合包括 Oct4 和另外 3 种蛋白质。加入丙戊酸培育每个组合，每个组合两份。用所述方法对每个组合测试 3-4 次。如果重编程效率不尽人意，测试对方法的变化，包括依次加入重编程蛋白，而不同时加入，提高所用重编程试剂的浓度，增加加入重编程试剂的频率。测试以上所列 6 种重编程蛋白的其它组合和测试包括以上表 1 和 2 所列重编程蛋白的组合。

[0559] 当鉴定导致成功重编程的组合时，进行“留一法”实验以确定对于相同重编程效率，组合的每种组成是否都需要。

[0560] 然后对通过这些方法制备的推定 iPS 细胞系进行测试以确认其表现出预期性质，包括 ：检查细胞和集落形态的特征形状和外观 ；长期在培养中培育 (60-70 加倍) 以确认永生 ；检测端粒酶活性 ；检测多能性标记碱性磷酸酶、SSEA-1、Sox2、Oct4、Nanog 和 Rex-1（相对于亲本原代细胞系）含量升高 ；检测多能性基因 Oct4 和 Nanog 的启动子中 DNA 甲基化程度降低 ；确定全局基因表达（通过微阵列）与 ES 和 iPS 细胞系的相似度高于亲本原代细胞系 ；和检测体外和 / 或体内分化为三胚层细胞的能力。另外，通过 G 显带和光谱核型分析对细胞进行分析以确认没有基因组重排，通过 PCR 和 DNA 印迹法确认没有非所需病毒和微生物（包括对腺病毒和慢病毒序列和支原体进行测试），并且确认编码重编程因子的序列并非无意地并入 iPS 细胞基因组。

[0561] 实施例 7

[0562] 通过接触重组重编程蛋白质使人供体细胞去分化

[0563] 从人供体获取皮肤活体组织，洗涤并切成小片段，将其分布于组织培养瓶的底部。然后加入成纤维细胞培养基（具 10-15％ FBS 的 DMEM)，将细胞培养瓶置于 CO2 孵育箱中并进行监测，每 2-3 天更换一次培养基直至观察到成纤维细胞在组织培养瓶底部生长为止。此后，使用标准生长技术维持原代真皮成纤维细胞。冷冻保存培养的原代真皮成纤维细胞供以后使用。

[0564] 然后将原代真皮成纤维细胞接种于组织培养板上并且培育至约 50-70％汇合。然后按对重编程成纤维细胞有效的组合、浓度和频率加入重编程试剂（例如，如通过实施例 6 中描述的方法鉴定的那样）。监测细胞出现 iPS 细胞集落，然后使 iPS 细胞集落分散、传代和扩大以建立单独的 iPS 细胞系。

[0565] 由于这样处理，获得源自人供体的 iPS 细胞系。使用实施例 6 中描述的方法，然后

对细胞系进行测试以确认其表现出预期的 iPS 细胞性质，并且进行测试确认没有基因组重排、其它非所需基因组序列变化和病原体或病原体序列。从而确认了供治疗使用，例如植入患者体内的适用性。

[0566] 实施例 8

[0567] 通过接触供体细胞的细胞质使细胞去分化

[0568] 通过引入供体细胞的细胞质在体外去分化受体细胞。将受体细胞，人新生儿真皮成纤维细胞 (NHDF) 接种于 24 孔板上并培育至 50-70％汇合。通过用链球菌溶血素 O 进行受体细胞渗透化 (Agarwal S.，Methods Enzymol.2006；420：265-83)、与细胞质泡囊融合、与脂质体融合和使用蛋白质转染试剂将供体细胞的细胞质引入不同受体细胞群体中。定期向每个受体细胞群体再次加入供体细胞的细胞质，频率为细胞耐受而无过多细胞死亡。目测细胞出现干细胞形态。

[0569] 供体细胞的细胞质的来源为卵母细胞、卵裂球细胞、iPS 细胞、人 ES 细胞和 293 细胞，已使所述细胞表达经实施例 6 中的方法证实对重编程有效的重编程多肽组合。以将细胞质引入受体细胞的前述每种方法使用每种类型的细胞质。另外，加入丙戊酸培育每个组合，每个组合两份。

[0570] 由于这样处理，获得 iPS 细胞系。使用实施例 6 中描述的方法，然后对细胞系进行测试以确认其表现出预期的 iPS 细胞性质，并且进行测试以确认没有基因组重排、其它非所需基因组序列变化和病原体或病原体序列。

[0571] 实施例 9

[0572] 通过接触供体细胞的细胞质使人供体细胞去分化

[0573] 如实施例 7 所述由人供体培育原代真皮成纤维细胞。然后按对重编程成纤维细胞有效的浓度和频率（例如，如通过实施例 8 中描述的方法鉴定的那样）加入供体细胞的细胞质。监测细胞出现 iPS 细胞集落，然后使 iPS 细胞集落分散、传代和扩大以建立单独的 iPS 细胞系。

[0574] 由于这样处理，获得源自人供体的 iPS 细胞系。使用实施例 6 中描述的方法，然后对细胞系进行测试以确认其表现出预期的 iPS 细胞性质，并且进行测试以确认没有基因组重排、其它非所需基因组序列变化和病原体或病原体序列。从而确认了供治疗使用，例如植入患者体内的适用性。

[0575] 实施例 10

[0576] 介绍

[0577] 该实施例描述了通过在体外将渗透化体细胞暴露于所需细胞类型的细胞核和细胞质提取物，同时将其暴露于诱导性培养条件而指导重编程渗透化体细胞的方法。虽然不想受理论限制，假设每个指定细胞类型含有决定其基因表达谱和同一性的关键调节因子（包括转录因子）；因此将一种类型的细胞暴露于源自不同类型的细胞的调节因子可改变不同类型细胞的表达模式和同一性。另外，可用特异性诱导因子、细胞培养条件、染色质重塑剂和／或转录改性剂促进这种转化。除非另有说明，大体上如 Agarwal，“Cellular Reprogramming”(2006)Methods Enzymol.420：265-283所述进行细胞提取物生成和受体细胞渗透化，其通过引用整体并入本文。

[0578] 方法

[0579] 通过使用成孔、钙敏感细菌毒素链球菌溶血素 O(SLO) 可逆渗透化受体细胞并将这些细胞暴露于重编程细胞提取物而将细胞提取物引入受体细胞。在没有钙离子的情况下，细胞有限且瞬时暴露于低剂量的 SLO 使得形成膜孔，所述膜孔足够大允许尺寸达 100kDa 的蛋白质被动扩散，但对于细胞器而言不够大。随后，通过加入钙离子逆转这种膜渗透化使得膜自我修复，并且重新密封的细胞能存活并且可增殖。渗透化期间，任选在渗透化 / 重编程促进剂例如产能系统和细胞骨架破坏剂存在下，用所需细胞类型（“供体细胞”）的全细胞提取物或细胞核或细胞质提取物孵育靶细胞。全细胞提取物可提供由渗透化靶细胞摄取的调节因子。然后重新密封原生质膜，使细胞恢复并在有助于所需重编程的条件下进一步培养。因此，受体细胞的基因表达谱变得更加类似于供体细胞。随着时间推移可能出现所产生的基因表达谱方面的变化，并且可通过随后用供体细胞提取物循环处理而进一步促进。

[0580] 荧光结合蛋白（70kDA 若丹明 - 葡聚糖或 68KDa 若丹明 - 清蛋白）可用于方便地监测细胞渗透化效率和外源因子的摄取。我们发现 SLO 介导的膜渗透化效率和蛋白质摄取可对若干因素敏感，包括细胞密度、附着与悬浮细胞培养的使用、SLO 浓度、SLO 活化、暴露于 SLO 和外源因子的时长、细胞提取物的质量（如果使用了细胞提取物）和重新密封膜孔和恢复的指定时间。可为指定细胞类型常规性优化这些因子。

[0581] 重编程细胞提取物生成

[0582] hES 细胞或对照 293T 细胞培养物是健康的指数生长细胞。不使用汇合或过度生长的培养物。

[0583] 然后收获细胞，用 PBS（无钙和镁）洗涤两次，洗涤间期通过离心（水平转头中 1000rpm 离心 5min）沉淀。注意完全抽吸洗涤培养基以去除可能干扰随后在细胞渗透化和重编程反应中的使用的血清蛋白或钙离子。洗涤后，任选将细胞团块速冻于液氮中并保存在 -80℃下。从这一刻起，将细胞及其提取物保持在冰上。

[0584] 吸取 1-2 体积新制备的冰冷裂解液（20mM HEPES，pH 8.2，5mM MgCl2、1mM DTT、1x 蛋白酶抑制剂：新制备并保存于冰上）使细胞团块重新悬浮。然后在冰上孵育细胞 1h。在低渗裂解液中培育细胞将使细胞膨胀，从而促使其在超声处理中破裂。然后用 100 型 Fisher Scientific 超声波破碎仪以短脉冲超声处理细胞直至溶解。通过用水和酒精清洗并在不同类型的细胞之间转换之前洗涤保持超声波仪探针无菌。超声处理的功率和时间可能随细胞类型而改变并且可通过（例如，用显微镜）监测溶解程度而常规性确定。如果对于给定的细胞类型需要多脉冲，则在两次脉冲之间于冰上冷却细胞以避免不必要的加热。可由溶解产物粘性降低判断超声处理完成。还可在显微镜下检查溶解产物失去完整细胞和细胞核。

[0585] 然后将经超声处理的细胞溶解产物转移至 1.5ml 微量离心管（如果不在微量离心管中），然后速冻于液氮中，之后于 37℃水浴中快速解冻以使任何剩余基因组 DNA 成片段，然后在 4℃下用固定角微型离心机 14,000rpm 离心 15-30min。然后将上清液等分为 200-500μl 体积并于 -80℃下保存。

[0586] 然后确定细胞提取物的蛋白质浓度。通常，我们获得的浓度为 6-9mg/ml。对于重编程反应，我们通常使用 1.5-6mg/ml 的细胞提取物。可通过常规实验确定给定的提取物对给定的受体细胞类型的毒性并且可能限制使用较高浓度的提取物。

[0587] 另外，可通过电泳和用考马斯蓝染色检查一般蛋白质图谱而确定提取物的质量以

确保无可见蛋白质降解。还可通过免疫印迹法检验细胞提取物中细胞类型特异性的蛋白质（细胞核和细胞质）的存在。例如，可检查已知对特定细胞类型有关键性“主要调节”作用的蛋白质。

[0588] 受体细胞渗透化和用重编程提取物处理

[0589] 使用之前，通过用如 Agarwal（第 272 页）描述的还原剂孵育激活的 SLO。通过胰蛋白酶处理从培养皿分离的受体 293T 细胞（先前已适应 hES 细胞生长培养基）的指数生长培养物，并且当已确定渗透化提高了摄取效率时在悬浮液中进行渗透化。洗涤细胞，计数并且每次反应孵育 1-3x10^5 个细胞的等分试样。在细胞团块形成之前小心处理细胞。在室温下使受体细胞等分试样沉淀（水平转头中 1000RPM 离心 5min）。然后向每个细胞团块依次加入以下（添加期间歇性轻轻敲拍反应管以防止细胞沉降）。

[0590] a. 重编程细胞提取物或对照提取物（1.5-6μg/l）：73μl。以上描述了重编程细胞提取物的制备。

[0591] b. 0.5M EDTA：2μl（最终浓度：10mM）

[0592] c. 0.1M $MgCl_2$：5μl（最终浓度：5mM）

[0593] d. 25mM NTP 存储混合物：4μl（最终浓度：每种 NTP 均为 1mM）

[0594] e. 1.5mg/ml 肌酸激酶：1.5μl（最终浓度：25μg/ml）

[0595] f. 1M 磷酸肌酸：1μl（最终浓度：10mM）

[0596] g. 100mM ATP：1μl（最终浓度：1mM）

[0597] h. 10mM GTP：1μl（最终浓度：100μM）

[0598] i. 2mg/ml 细胞松弛素 B：0.75μl（最终浓度：15μg/ml）

[0599] j. 向每根反应管加入 10μl、0.5 单位 / μl 活化 SLO（SLO 最终浓度：50 单位 /ml）。如上所述，SLO 介导的渗透化效率随细胞类型而改变，在中间试验中使用荧光结合标记蛋白（若丹明标记的葡聚糖（70kDa）或若丹明标记的清蛋白（68kDa），最终浓度 10-50μg/ml）作为示踪物来确定最适 SLO 浓度并且可任选为细胞提取物所具有或作为确认摄取量的阳性对照。重新密封受体细胞膜后，可通过荧光显微镜检术或其它已知方法检测荧光蛋白质的摄取量以证实细胞渗透化有效、膜重新密封和细胞存活。

[0600] 然后在 37℃下孵育反应混合物 3h。为了防止细胞在此培育期间沉降或形成团块，我们在孵育期间使用了轻微振荡器。

[0601] 孵育后，轻轻吸取每次反应的所有内含物并稀释于有丝分裂灭活 MEF 上 4 孔或 24 孔培养皿的一个孔内 0.75ml 的 hES 细胞培养基中。细胞培养基含有至少 2mM CaCl2 以引起渗透化细胞膜重新密封。

[0602] 然后在 37℃下于标准培养条件下孵育细胞过夜以便回收；然后抽吸培养基（包括任何未分离的死细胞）并更换为新培养基。然后将培养物保持在 hES 细胞培养基中标准培养条件下。任选地可如上述对细胞进行第二轮或后一轮的渗透化和提取处理。

[0603] 图 9 描述了优化渗透化条件之后 SLO 渗透化人成纤维细胞（293T 细胞）中若丹明 - 清蛋白的强力摄取（90-100％）。为人新生儿原代真皮成纤维细胞（NHDF 细胞）和小鼠 NIH 3T3 成纤维细胞确定最佳处理条件。在所有情况下，细胞强力摄取荧光蛋白，恢复并生长至汇合且似乎通过连续倍增保持和分开输入蛋白。

[0604] 从 hES 细胞系 H9（WA09）和 ACT4 获得 hES 细胞提取物。为预防自发分化，不允许

细胞过度生长；而且，定期检查培养物的 hES 细胞形态和 hES 细胞特征标记的表达。图 10 描述了典型 hES 细胞培养特征化的实例：(a) 相差显微术；(b) 碱性磷酸酶活性检测；和表达 hES 细胞标记的免疫荧光法；(c)Oct-4；(e)SSEA-3 和 (f) 所示 Tra-1-81。图 (d) 描述了与 (c) 中 Oct-4 染色相同视场的细胞核的 DAPI 染色。如所示，经免疫荧光确定 hES 集落展现出典型的未分化细胞形态、碱性磷酸酶活性计分呈阳性并表达特征 hES 细胞标记 Oct-4、SSEA-3 和 TRA-1-81。细胞表达大量 hES 细胞多能标记和关键转录因子 Oct-4。

[0605] 结果

[0606] 在 hES 细胞培养条件下用 hES 细胞提取物孵育渗透化 293T 成纤维细胞。处理之前，使 293T 细胞适应 ES 细胞培养基。用 hES 细胞全细胞提取物、SLO 和 ATP 生成系统和细胞骨架破坏剂细胞松弛素 B 孵育受体细胞。用 293T 细胞（“自身”）提取物同步处理对照细胞。孵育后，将细胞接种于 hES 细胞生长条件下，即接种于 hES 细胞培养基和有丝分裂灭活小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 饲养层。

[0607] 显微镜检查显示处理后在 MEF 层生长的细胞集落。通过 hES 细胞提取物处理和对照处理观察集落，然而用 hES 细胞提取物获得的集落外观比对照更像 hES 细胞（图 11）。用对照提取物获得的集落倾向于出现多层，更小、更圆的细胞相互堆叠（图 11A 和 11C）。相反，用 hES 细胞提取物获得的集落出现更平的单层，hES 细胞的特征为细胞核：细胞质比例大，核仁明显且可见细胞亚核结构（“斑点”）（图 11B 和 11D）。两次实验获得的结果相似（第一次实验 11A-B；第二次实验 11C-D）。

[0608] 将所得到的细胞保持在培养基中并使其扩大，并且任选地再次或随后用 hES 细胞提取物处理所得到的细胞。由于 SLO 处理的毒性，可能允许在处理间期回收细胞，或者可用更多细胞进行实验以允许回收更多受多次处理的活细胞。

[0609] 监测经处理细胞在 MEF 上形成具有上述 hES 细胞形态特征的集落的能力。另外，通过免疫荧光法、RT-PCR 或其它检测基因表达的已知方法测试具有这种形态的细胞表达 hES 细胞标记。这种 hES 细胞标记可能包括 Oct4、Nanog、Sox2、SSEA-3 和 Tra-1-81。还可测试细胞的碱性磷酸酶活性、ES 细胞的标记。还可通过确定在体外或在体内产生不同类型的分化细胞的能力测试细胞的多能性（例如，在免疫抑制动物体内形成畸胎瘤；胚泡注射后产生子代细胞；或四倍体互补后产生完整的子代动物）。还可测试细胞 Oct4 和 Nanog 基因启动子中的去甲基化，从而表明重新激活这些基因的表达。还可通过微阵列法检查全局基因表达模式并与现有 ES 细胞系的表达谱进行比较，其中相似性进一步确认重编程形成 ES 细胞。

[0610] 实施例 11

[0611] 培育胎牛成纤维细胞 (BFF) 至汇合并接种至 100mm 板上，约 250,000 个细胞 / 板。在补以 0.03% L- 谷氨酰胺 (Sigma)、100μM 非必需氨基酸 (Gibco)、10 单位 /L 青霉素 - 链霉素 (Gibco)、154μM 2- 巯基乙醇 (Gibco) 和 15% FBS(HyClone) 的 DMEM(Gibco) 中培育细胞。使用了 4 种处理：

[0612] 1. 在上述培养基中培育对照

[0613] 2. 具有 2.5μg/ml CB 的 DMEM

[0614] 3. 具有 5.0μg/ml CB 的 DMEM

[0615] 4. 具有 7.5μg/ml CB 的 DMEM

[0616] 在 DMSO 单独存在下培育对照细胞以评估其对引发和转分化的影响。

[0617] 处理 1 中培养的 BFF 开始快速分裂并且如同预期那样生长至汇合。处理 2 中培养的 BFF 不进行胞质分裂，然而进行细胞核分裂导致形成多核成纤维细胞。处理 3 和 4 中培养的 BFF 开始改变形态并且在处理第 2 天开始呈现神经元细胞外观。在处理第 3 天，从每组所述处理固定已在玻璃盖玻片上培育的一小群细胞，并且用酪氨酸羟化酶（多巴胺生成涉及的限速酶，对神经元细胞有特异性）抗体孵育。在荧光下目测细胞以检测抗体标记。对照细胞不发荧光，并且来自组 2、3 和 4 的细胞以剂量依赖性方式发荧光，这与 CB 增量直接相关。

[0618] 总之，用 2.5-7.5μg/ml 的 CB 处理 BFF 有效诱导胎牛成纤维细胞朝神经元样谱系进行形态变化，以及诱导酪氨酸羟化酶表达。这些结果表明可用微丝抑制剂引发转分化。我们的初步数据表明实际上可在 12-24h 内于体外培养基中引发所有原代成纤维细胞（来自单个患者样品的百万个细胞）。结果示于图 12 和 13。

[0619] 实施例 12

[0620] 按照实施例 11 中对 BFF 描述的方式处理成牛成纤维细胞 (BAF)，使用 10.0μg/ml CB 引发 72h。和 BFF 一样，用引发剂处理 BAF 和在诱导神经分化的条件下培养使细胞朝神经元样谱系进行形态变化。参见图 14 和 15。注意 BFF 和 BAF 获得神经类型的不同形态。

[0621] 实施例 13

[0622] 人新生儿成纤维细胞的转分化。从 Cambrex company(Clonetics 细胞系 #CC-2509) 购买成纤维细胞并在 37℃、5% CO_2 和 5% O_2 下于补以 20%胎牛血清 (HyClone) 的伊思考夫改良杜尔贝科培养基 (IMDM，Gibco) 中扩增。第 14 代时，2 周内每隔一天用一半浓度的血清更换培养基使细胞脱离血清。当细胞缺乏血清 48h 时，按 50%汇合度将细胞接种于 24 孔培养皿。传代 24h 后，去除 IMDM 并更换为有益培养基（向一半培养物加入角化细胞生长培养基 (KGM，Clonetics) 而向另一半加入神经祖细胞生长培养基 (NPMM，Clonetics))。于有益培养基中 24h 后，向每组培养基的一半补充 5μg/ml 的细胞松弛素 B(CB，CalBiochem)。另外培养细胞 72h，此时全组的一半被固定于杜尔贝科磷酸盐缓冲盐水 (DPBS，Biowhittaker) 中的多聚甲醛 (Sigma) 中，另一半更换为无 CB 的新鲜培养基（分别为 KGM 和 NPMM)。然后再培养这些细胞 72h，此时细胞被固定在 DPBS 中的多聚甲醛中。如同 BFF 和 BAF 一样，用 5μg/ml 的 CB 处理人胎儿成纤维细胞 BFF 并在诱导神经分化的条件下培养有效诱导成纤维细胞朝神经元样谱系进行形态变化（参见图 16)。

[0623] 使用针对巢蛋白、神经胶质纤丝酸性蛋白 (GFAP)、Oligo 4(O4)、β 微管蛋白 III、Tuj1、γ 丁氨酸 (GABA)、酪氨酸羟化酶、MAP2ab、钙网膜蛋白、原肌球蛋白的抗体进行免疫细胞化学。经细胞松弛素 B 处理的细胞对神经元谱系细胞的标记—巢蛋白、Tuj-1 和 β 微管蛋白 III 呈阳性（参见图 17)。未经 CB 处理的对照成纤维细胞对所有标记呈阴性。巢蛋白为终末分化之前神经干细胞内存在的中间微丝。Tuj-1 为神经元特异性微管蛋白，并且 β 微管蛋白 III 为仅存在于神经元中的微管。

[0624] 实施例 14：核重塑

[0625] 如本领域所熟知，使用经聚蔗糖梯度离心产生主要由淋巴细胞和单核细胞组成的血沉棕黄层从血液纯化的人外周血单核细胞进行第一步骤（本文也称为“核重编程步骤”)。将具有重排免疫球蛋白基因座位的淋巴细胞用作本方法的供体将产生具有相同重

排基因座位的干细胞。在实验预期产物不是免疫球蛋白基因进行了重排的细胞的情况下，如本领域所熟知，用流式细胞仪从淋巴细胞纯化单核细胞并室温保存于杜尔贝科最基本培养基 (DMEM) 或冻藏至使用。如本领域所熟知，在 MBS 缓冲液中经手术去除来自 MS222 麻醉成熟雌性的非洲爪蟾卵母细胞并检查质量 (Gurdon，Methods Cell Biol 16 :125-139，(1977))。然后用 MBS 洗涤卵母细胞两次并在 14℃下保存于 MBS 中过夜。次日，选择优质期 V 或 VI 卵母细胞 (Dumont，J.Morphol.136 :153-179，(1972)) 并且在 MBS 中于解剖显微镜下去除卵泡细胞。去除卵泡之后，再次在 14℃下将卵母细胞保存于具有 1μg/mL 庆大霉素 (Sigma) 的 MBS 中过夜。次日，再用 MBS 洗涤形态健康的卵母细胞并在 14℃下保存于 MBS 中直到使用。通过如 Chan & Gurdon，Int.J.Dev.Biol.40 :441-451，(1996) 描述的 SLO 处理来渗透化约 1×10^4 单核细胞。简言之，将细胞悬浮于冰冷裂解液 (含 10mM EGTA 的无 1xCa2+ 的 MBS(Gurdon，(1977)]。加入 SLO(Wellcome diagnostics)，最终浓度为 0.5 单位 /mL。将悬浮液保持于冰上 7min，然后加入 4 体积含 1％牛血清蛋白 (Sigma) 的无 1xCa2+ 的 MBS。然后可去除等分试样的细胞，于含 1％牛血清蛋白的无 1xCa2+ 的 MBS 中稀释 1 倍并在室温下培育 5min 以激活渗透化。然后将细胞放回冰上以转移至非洲爪蟾卵母细胞。然后如本领域所熟知的那样将渗透化细胞转移至非洲爪蟾卵母细胞内 (Gurdon，J.Embryol.Exp. Morphol.36 :523-540，(1976)。简言之，将如上所述制备的卵母细胞置于高盐 MBS 中的琼脂上 (Gurdon，J.Embryol.Exp.Mo rphol.36 :523-540，(1976))。通过所述 UV 灭活卵细胞内的 DNA(Gurdon，Methods in Cell Biol 16 :125-139，1977)，除了不第二次暴露于 Hanovia UV 源。简言之，将卵细胞置于载玻片上，动物极向上，并暴露于 Mineralite UV 灯 1min 以灭活雌性胚泡。连续将渗透化的分化细胞置于直径为单核细胞 3-5 倍的移植移液管中并注入卵母细胞内，优选对准灭活原核。孵育含细胞核的卵 1h 至 7 天，优选 7 天，然后去除细胞核并用于步骤 2。如果需要，使用之前可操作卵母细胞以改变如上所述一个或多个细胞因子的水平。

[0626] 实施例 15 :核重塑

[0627] 在该实施例中，对来自与分化细胞相同物种的未分化细胞的提取物进行第一步核重塑 ;使用来自人胚胎癌细胞系 NTera-2 的有丝分裂细胞提取物在体外重塑人真皮成纤维细胞核。然而，可交替使用来自不同物种细胞的提取物。

[0628] 制备核重塑提取物

[0629] 易于从例如美国模式培养物保藏所 (CRL-1973) 等来源获得 NTera-2cl.D1 细胞，并且在 37℃下于含 4mM L- 谷氨酰胺、1.5g/L 碳酸氢钠和 4.5g/L 葡萄糖、10％胎牛血清的 DMEM(完全培养基中) 中进行单层培养。在对数生长期时，将细胞接种在于组织培养瓶 200mL 完全培养基中，5×10^6 个细胞 /cm^2。如本领域已知，制备来自前中期细胞的提取物 (Burke & Gerace，Cell 44 :639-652，(1986))。简言之，在对数生长期 2 天之后和仍在对数生长期时，用 100mL 含 2mM 胸苷 (使细胞停在 S 期) 的完全培养基更换所述培养基。11h 后，用 25mL 完全培养基冲洗细胞一次，然后用 75mL 完全培养基孵育细胞 4h，此时从 DMSO 的 10,000X 原液加入诺考达唑至最终浓度为 600ng/mL。1h 后，通过有丝分裂摇落来去除松散附着的细胞 (Tobey 等，J.Cell Physiol.70 :63-68，(1967))。丢弃去除的细胞的首次收集，用 50mL 同样含 600ng/mL 诺考达唑的完全培养基更换所述培养基。然后在 2-2.5h 后通过摇落收集前中期细胞。然后在 37℃下于 20mL 含 600ng/mL 诺考达唑和 20μM 细胞松弛

素B的完全培养基中孵育收集的细胞45min。此次孵育之后，用冰冷杜尔贝科氏PBS洗涤细胞两次，然后用KHM(78mM KCl、50mM Hepes-KOH[pH 7.0]、4.0mM MgCl2、10mM EGTA、8.37mM CaCl2、1mM DTT、20μM细胞松弛素B)洗涤一次。然后在1000g下离心细胞5min，弃上清液并将细胞重新悬浮于原体积的KHM中。然后，用杜恩斯匀浆器于冰上匀化细胞约25次并通过显微观察确定进展。当至少95%的细胞被匀化时，如本领域已知将提取物存于冰上用于膜重新装配或冻藏。

[0630] 由分化细胞制备凝聚染色质

[0631] 将供体真皮成纤维细胞暴露于去除原生质膜的条件，引起细胞核分离。将这些细胞核依次暴露于引起核被膜分解和染色质凝聚的细胞提取物。这引起释放染色质因子，例如RNA、核被膜蛋白质和转录调节子，例如对重编程过程有害的转录因子。在具有10%胎牛血清的DMEM中培养真皮成纤维细胞至细胞汇合。然后如本领域已知通过胰蛋白酶处理收获1×10^6个细胞，灭活胰蛋白酶，并且将细胞悬浮于50mL的磷酸缓冲盐水(PBS)中，通过在4℃下500g离心10min使细胞成团块，弃PBS，并将细胞置于团块50倍体积的冰冷PBS中并如上述离心。离心之后，弃上清液并将团块重新悬浮于团块50倍体积的低渗缓冲液中(10mM HEPES，pH 7.5；2mM MgCl2、25mM KCl、1mM DTT、10μM抑肽酶、10μM亮肽素、10μM抑胃肽A、10μM大豆胰蛋白酶抑制剂和100μM PMSF)并且再次在4℃下500g离心10min。弃上清液并加入团块20倍体积的低渗缓冲液，并且小心地使细胞重新悬浮并在冰上孵育1h。然后使用本领域所熟知的方法物理溶解细胞。简言之，将5ml细胞悬液置于玻璃杜恩斯匀浆器内并匀化20次。用显微镜监测细胞溶解以观察何时产生分离且仍未损坏的细胞核。加入蔗糖使蔗糖最终浓度为250mM(低渗缓冲液中2M原液的1/8体积)。通过轻轻倒置小心混合溶液，然后在4℃下400g离心30min。弃上清液，然后轻轻地将细胞核重新悬浮于20体积的核缓冲液中(10mM HEPES，pH 7.5；2mM MgCl2、250mM蔗糖、25mM KCl、1mM DTT、10μM抑肽酶、10μM亮肽素、10μM抑胃肽A、10μM大豆胰蛋白酶抑制剂和100μM PMSF)。如上述再次离心细胞核并将其重新悬浮于团块2倍体积的核缓冲液中。然后可将所得到的细胞核直接用于以下所述细胞核重塑或冻藏供将来使用。

[0632] 制备凝聚提取物

[0633] 将凝聚提取物加入分离的分化细胞核时，将导致核被膜破坏和染色质凝聚。因为步骤1的目的是用未分化细胞的核组分重塑分化体细胞的核组分，该实施例中使用的凝聚提取物来自可同样为用于获取供以上核被膜重建的提取物的NTera-2细胞。这导致来自分化细胞的组分稀释于含有将细胞重编程为未分化状态所需的相应组分的提取物中。易于从例如美国模式培养物保藏所(CRL-1973)等来源获得NTera-2 cl.D1细胞并且在37℃下于含4mM L-谷氨酰胺、1.5g/L碳酸氢钠和4.5g/L葡萄糖、10%胎牛血清的DMEM(完全培养基中)中进行单层培养。在对数生长期时，将细胞接种在于组织培养瓶200mL完全培养基中，5×10^6个细胞/cm^2。本领域熟知获得能够诱导核被膜破坏和染色质凝聚的提取物的方法(Collas等，J.Cell Biol.147：1167-1180，(1999))。简言之，在1μg/ml诺考达唑中孵育如上所述对数生长期的NTera-2细胞20h，使其有丝分裂同步化。通过有丝分裂摇落来分离处于细胞周期有丝分裂期的细胞。在4℃下500g离心10min收获的分离细胞。将细胞重新悬浮于50ml冷PBS中，并且另外在4℃下500g离心10min。PBS洗涤步骤重复一次。然后将细胞团块重新悬浮于20体积的冰冷细胞裂解液中(20mM HEPES，pH 8.2；5mM MgCl2、

10mM EDTA、1mM DTT、10μM 抑肽酶、10μM 亮肽素、10μM 抑胃肽 A、10μM 大豆胰蛋白酶抑制剂、100μM PMSF 和 20μg/ml 细胞松弛素 B) 并在 4℃下 800g 离心细胞 10min。弃上清液，并小心地将细胞团块重新悬浮于 1 体积的细胞裂解液中。将细胞置于冰上 1h，然后用杜恩斯匀浆器溶解。通过显微分析监测进展直到 90％以上的细胞和细胞核溶解。在 4℃下 15,000g 离心所得到的溶解产物 15min。然后移去管并立即置于冰上。用小口径移液管尖端轻轻去除上清液，并且将来自若干管的上清液汇集于冰上。如果不立即使用，立即用液氮将提取物瞬间冷冻并保存在 -80℃下直到使用。然后将细胞提取物置于超速离心管中并在 4℃下 200,000g 离心 3h 以沉淀核被膜囊泡。然后轻轻去除上清液并置于冰上的管中且立即用于制备凝聚染色质或如上述冻藏。

[0634] 凝聚提取物的使用方法

[0635] 如果从凝聚提取物的冷冻等分试样开始，则在冰上解冻冷冻提取物。然后将 ATP 生成系统加入提取物使得最终浓度为 1mM ATP、10mM 磷酸肌酸和 25μg/ml 肌酸激酶。然后将如上所述从分化细胞分离的细胞核加入提取物，每 10μl 提取物 2,000 个细胞核，轻轻混合，于 37℃水浴孵育。通过轻拍管不时移动管以轻轻重新悬浮细胞。提取物和细胞源随核被膜破坏和染色体凝聚的时间而不同。因此通过用显微镜周期性监测样品而监测进展。当大多数细胞失去其核被膜并且有染色体凝聚开始的证据时，将含有凝聚染色体团的提取物置于离心管中，核缓冲液中有相等体积的 1M 蔗糖溶液。通过在 4℃下 1,000g 离心 20min 使染色质团沉淀。弃上清液，并且轻轻地将染色质团重新悬浮于以上所得核重塑提取物中。然后在 33℃下水浴孵育样品长达 2h 并用显微镜定期监测所述凝聚和重塑染色质周围重塑核被膜的形成 (Burke & Gerace，Cell 44 :639-652，(1986)。很大比例的染色质封装在核被膜内后，可使用本方法中描述的任何技术将重塑细胞核用于细胞重建。

[0636] 细胞提取物的修饰

[0637] 如同对本文所述方法的任选修改，使一个或多个因子在用于获得核重塑和 / 或凝聚提取物的未分化细胞（例如，EC 或其它细胞）中表达或过度表达。这种因子包括（例如）诱导或增强在未分化细胞内表达的蛋白质的表达并且提高重编程频率的 SOX2、NANOG、cMYC、OCT4、DNMT3B、胚胎组蛋白以及下表 7 所列的其它因子和调节 RNA。可使用以上提及的因子的任何组合。例如，可将本方法的未分化细胞修饰以使表 7 所列 2、3、4 或更多个任一因子的表达增强。可选地，在用于获得核重塑提取物的未分化细胞内的一个或多个因子的水平可能相对于未修饰细胞内的水平降低。可通过已知方法，例如通过使用转录调节子、调节 RNA 或对细胞因子有特异性的抗体实现细胞因子的降低。

[0638] 通过标准技术将编码表 7 所列蛋白质的基因构建体或其非人同源物或改变这些因子的表达的调节蛋白或 RNA 转染至细胞内。可选地，直接将重组蛋白或其它试剂加入提取物。

[0639] 实施例 16 :重塑细胞核或染色质的基因修饰

[0640] 可任选通过涉及重组酶处理的靶载体或寡核苷酸的方法修饰分离的细胞核或凝聚染色质。可用靶载体或寡核苷酸，使用纯化重组酶、纯化 DNA 修复蛋白或包含这种蛋白质的蛋白质或细胞提取物制剂酶促基因修饰来自无细胞染色体和染色质的 DNA。靶 DNA 可能有 10,000 个寡核苷酸碱基对，至少 50 个碱基对与靶染色体同源。可用其它纯化重组或 DNA 修复蛋白酶促溶解形成的介于靶染色体和载体 DNA 之间的重组酶催化重组中间体以生

成经基因修饰的染色体。可重新将这些修饰染色体引入细胞中或在引入细胞/修饰凝聚染色质可用于核被膜重建(参见以下步骤2)之前在体外形成细胞核。也可通过显微注射或扩散至渗透化细胞核直接将重组酶处理的载体或寡核苷酸引入分离的细胞核内,以使得在核移植至完整细胞内或与受体细胞融合时原位形成可体外溶解的重组中间体。

[0641] 这种方法中,首先在靶载体或寡核苷酸和重组酶蛋白之间形成具有酶活性的核蛋白丝。重组酶蛋白为催化细胞内形成异源双链体重组中间体并且可在无细胞体系内形成类似中间体的细胞蛋白质。深入研究的原型重组酶是来自大肠杆菌的RecA蛋白和来自真核生物的Rad51蛋白。重组酶蛋白协同结合单链DNA并且积极促进寻求其它靶染色体DNA上的同源DNA序列。也可形成异源双链体并使用来自具有重组表现型的细胞的无细胞提取物(例如,DT40提取物)溶解。在第二步中,通过用纯化重组和DNA修复蛋白质处理将供体靶载体DNA或寡核苷酸重组为靶染色体DNA使异源双链体中间体溶解于无细胞提取物中(图19)。也可使用来自正常细胞的无细胞提取物或来自具有重组表现型的细胞的提取物实现分解。最后,在修饰染色体和补充引入受体细胞或卵母细胞的剩余未修饰细胞染色体周围重新形成核被膜。

[0642] 可使用可用于重编程细胞的基因修饰的若干技术。一种技术是Cre-Lox靶向系统。Cre重组酶已经用于有效删除哺乳动物细胞DNA兆碱基对的几百个碱基对。LoxP和FRT重组酶识别序列允许重组酶介导的同源重组细胞基因修饰。

[0643] 形成重组酶涂覆的核蛋白丝

[0644] 首先通过用限制性内切核酸酶处理来线性化环状DNA靶载体,或可选地通过PCR由基因组DNA或载体DNA生成线性DNA分子。通过琼脂糖凝胶电泳从载体序列去除所有DNA靶向载体和常规DNA构建体并且用Elutip-D柱纯化(Schleicher & Schuell,Keene,NH)。对于DNA的RecA蛋白质涂层,在98℃下使线性双链DNA(200ng)热变性5min,于冰上冷却1min并加入含有三羟甲基氨基甲烷醋酸盐缓冲液、2mM醋酸镁和2.4mM ATP-γ-S的蛋白质涂层混合物中。立即加入RecA蛋白(8.4μg),在37℃下孵育反应15min,并且醋酸镁浓度升高至最终浓度为11mM。用未涂覆的双链DNA作为对照通过琼脂糖凝胶电泳监测DNA的RecA蛋白质涂层。与未涂覆的双链DNA相比,RecA-DNA的电泳迁移率明显下降。

[0645] 如上述实现对无细胞染色体和染色质的分离。将凝聚提取物加入分离的分化细胞核时,将导致核被膜破坏和染色质凝聚。然后可将所得到的细胞核直接用于刚才描述的基因修饰,核重塑或冻藏以供将来使用。无细胞同源重组反应修饰靶染色体后可将分离提取物用于核被膜重建。可由任一成熟哺乳动物细胞系制备用于核被膜破坏、染色质凝聚和核被膜重建的提取物。然而,来自人胚胎癌细胞系NTera-2的提取物可能用于凝聚提取物和核被膜重建提取物以及将分化染色质重塑为未分化状态,从而提高了由分化人真皮细胞开始产生经基因修饰的人ES细胞。

[0646] 在预制重组酶涂覆的核蛋白靶向载体和寡核苷酸以及无细胞染色体和染色质之间形成异源双链体重组中间体

[0647] 通过向上述RecA涂覆的核蛋白丝加入约1-3μg双链染色体DNA或染色质团并且在37℃下孵育20min完成靶向载体/染色体异源双链体的形成。如果在另外的体外重组步骤之前使核蛋白异源双链体结构脱去蛋白质,对其进行以下处理:加入SDS至最终浓度为1.2%或加入蛋白酶K至10mg/ml,并在37℃下孵育15-20min,然后加入SDS至最终浓度

为 0.5-1.2% (wt/vol)。在后续步骤之前通过对 100-1000 体积的蛋白质涂层混合物进行微量渗析去除剩余 SDS。

[0648] 用无细胞提取物溶解重组中间体

[0649] 可由正常成纤维细胞或 hES 细胞系制备无细胞提取物，或者可由经证明具有重组表现型的细胞制备。在体内表现出高度重组水平的细胞系为鸡前 B 细胞系 DT40 和人淋巴 DG75 细胞系。在 4℃下进行无细胞提取物的制备。从培养皿或悬浮培养收获约 10^8 个活跃生长的细胞。用磷酸盐缓冲盐水 (PBS；140mM NaCl、3mM KCl、8mM NaH2PO4、1mM K2HPO4、1mM MgCl2、1mM CaCl2) 洗涤细胞 3 次，重新悬浮于 2-3ml 的低渗缓冲液 A(10mM 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 [pH 7.4]、10mM MgCl2、10mM KCl、1mM 二硫苏糖醇）并在冰上保存 10-15min。加入苯甲基磺酰氟至浓度为 1mM，用杜恩斯匀浆器 B 杵破碎细胞 5-10 次。在 Beckman TJ-6 离心机中 2,600rpm 离心释放的细胞核 8min。小心去除上清液并在 -70℃下保存于 10% 甘油 -100mM NaCl 中（细胞质部分）。将细胞核重新悬浮于 2ml 含有 350mM NaCl 的缓冲液 A 中，并且加入以下蛋白酶抑制剂：0.25μg/ml 浓度的抑胃肽；0.1μg/ml 浓度的亮肽素；0.1μg/ml 浓度的抑肽酶；1mM 浓度的苯甲基磺酰氟（均来自 Sigma Chemicals)。在 0℃下孵育 1h 后，在 2℃下于 Beckman TL-100/3 转筒中 70,000rpm 离心提取的细胞核。在 -70℃保存之前将上清液调节至 10% 甘油、10mM β- 巯基乙醇并且立即在液氮中冷冻（部分 1)。

[0650] 为了体外溶解重组中间体，用 3-5μg 提取蛋白在含有 60mM NaCl、2mM 2- 巯基乙醇、2mM KCl，12mM 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (pH 7.4)、1mM ATP、0.1mM 每种脱氧核苷三磷酸 (dNTP)、2.5mM 磷酸肌酸、12mM MgCl2、0.1mM 亚精胺、2% 甘油和 0.2mM 二硫苏糖醇的反应混合物中孵育染色体异源双链体中间体。于 37℃下 30min 后，加入 EDTA 至浓度为 25μM、十二烷基磺酸钠 (SDS) 至浓度为 0.5% 并加入 20μg 蛋白酶 K 终止反应并在 37℃下孵育 1h。后续步骤之前通过微量渗析去除 SDS。将等体积的 1M 蔗糖加入处理的染色质团并通过在 4℃下 1,000×g 离心沉淀。

[0651] 在重组染色体和染色质周围重新形成核被膜

[0652] 弃上清液，并且轻轻地将染色质团重新悬浮于上述核重塑提取物中。然后在 33℃下水浴孵育样品长达 2h 并用显微镜定期监测所述凝聚和重塑染色质周围重塑核被膜的形成 (Burke & Gerace，Cell 44：639-652，(1986)。很大比例的染色质封装在核被膜内后，可使用本发明所述任一技术将重塑细胞核用于细胞重建。

[0653] 检测含经基因修饰染色体的细胞

[0654] 培育重建细胞 7-14 天并使用 PCR 和 Southern 杂交筛选重组体。

[0655] 实施例 17 用靶向载体或寡核苷酸修饰分离细胞核中的染色体和染色质以工程化细胞

[0656] 可基因修饰来自细胞的分离细胞核中的染色体和染色质。在这个方法中，从生长细胞分离完整细胞核并可逆渗透化以使得核蛋白靶向载体和寡核苷酸扩散至细胞核内部。通过用重组成熟细胞提取物、纯化重组和 DNA 修复蛋白处理或通过用细胞核进行细胞重建将核蛋白靶向载体和寡核苷酸与染色体 DNA 之间形成的异源双链中间体溶解于重组成熟细胞中。

[0657] 细胞核分离和渗透化

[0658] 如先前所述进行制备核细胞培养的同步群体并进行同步化 (Leno 等，Cell 69：

151-158(1992))。如所述制备细胞核,除了在 HE 缓冲液 (50mM Hepes-KOH, pH 7.4 ;50mM KCl、5mM MgCl2、1mM EGTA、1mM DTT、1μg/ml 抑肽酶、抑胃肽、亮肽素、抑凝乳蛋白酶素) 中进行孵育外。

[0659] 在 23℃下用 20μg/ml 溶血卵磷脂 (Sigma Immunochemicals) 和 10μg/ml 细胞松弛素 B 于 HE 中不时轻轻搅拌来孵育核被膜渗透化链球菌溶血素 O(SLO)- 制备的细胞核 (Leno 等,Cell 69 :151-158(1992))10min,浓度为～ 1.5×10^4 个细胞核 /ml。加入 1%无核酸酶 BSA(Sigma Immunochemicals) 终止反应。于 RC5B 转筒中 500rpm 离心 5min 轻轻将细胞核团块化,然后通过稀释于 1ml HE 中洗涤 3 次。在少量缓冲液中回收团块化细胞核并重新悬浮至～ 1×10^4 个细胞核 / μ l。

[0660] 在预制重组酶涂覆的核蛋白靶向载体和寡核苷酸以及无细胞染色体和染色质之间形成异源双链体重组中间体

[0661] 向上述 RecA 涂覆的核蛋白丝加入约 1×10^5 至 1×10^6 个渗透化细胞核形成靶载体 / 染色体异源双链体,并在 37℃下培育 20min。

[0662] 用无细胞提取物溶解重组中间体

[0663] 可由正常成纤维细胞或 hES 细胞系制备无细胞提取物,或者可由经证明具有重组表现型的细胞制备。在体内表现出高度重组水平的细胞系为鸡前 B 细胞系 DT40 和人淋巴 DG75 细胞系。在 4℃下进行无细胞提取物的制备。

[0664] 从培养皿或悬浮培养收获约 10^8 个活跃生长的细胞。用磷酸盐缓冲盐水 (PBS ; 140mM NaCl、3mM KCl、8mM NaH2PO4、1mM K2HPO4、1mM MgCl2、1mM CaCl2) 洗涤细胞 3 次,重新悬浮于 2-3ml 的低渗缓冲液 A(10mM 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 [pH 7.4]、10mM MgCl2、10mM KCl、1mM 二硫苏糖醇) 并在冰上保存 10-15min。加入苯甲基磺酰氟至浓度为 1mM,用杜恩斯匀浆器 B 杵破碎细胞 5-10 次。在 Beckman TJ-6 离心机中 2,600rpm 离心释放的细胞核 8min。小心地去除上清液并在 -70℃下保存于 10%甘油 -100mM NaCl 中 (细胞质部分)。将细胞核重新悬浮于 2ml 含有 350mM NaCl 的缓冲液 A 中,并且加入以下蛋白酶抑制剂 :抑胃肽,0.25μg/ml ;亮肽素,0.1μg/ml ;抑肽酶,0.1μg/ml ;和苯甲基磺酰氟,1mM(均来自 Sigma Chemicals)。在 0℃下孵育 1h 后,将提取的细胞核在 2℃下于 Beckman TL-100/3 转筒中 70,000rpm 离心。在 -70℃保存之前将上清液调节至 10%甘油、10mM β- 巯基乙醇并且立即在液氮中冷冻 (部分 1)。

[0665] 为了使重组中间体溶解于渗透化细胞核中,用 3-5μg 提取蛋白在含有 60mM NaCl、2mM 2- 巯基乙醇、2mM KCl,12mM 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (pH 7.4)、1mM ATP、0.1mM 每种脱氧核苷三磷酸 (dNTP)、2.5mM 磷酸肌酸、12mM MgCl2、0.1mM 亚精胺、2%甘油和 0.2mM 二硫苏糖醇的反应混合物中培育染色体异源双链体中间体。于 37℃下 30min 后,终止反应。

[0666] 核被膜修复

[0667] 制备并分离核修复提取物

[0668] 基本上根据 Blow 和 Laskey Cell 21 ;47 :577-87(1986)) 描述的方法制备低速非洲爪蟾卵提取物 (LSS)1。使用之前,解冻提取缓冲液 (50mM Hepes-KOH,pH 7.4 ;50mM KCl、5mM MgCl2) 并且立即补充 1mM DTT、1μg/ml 亮肽素、抑胃肽 A、抑凝乳蛋白酶素、抑肽酶和 10μg/ml 细胞松弛素 B(Sigma Immunochemicals, St.Louis, MO)。为提取物补充 2%甘油并于液氮中速冻为 10-20μl 珠子或进行进一步分离。由所述低速卵提取物制备高速上清

液(HSS)和膜部分(Sheehan 等,J Cell Biol.106:1-12(1988))。通过用 5ml 提取缓冲液稀释洗涤经离心 1-2ml 低速提取物分离的膜材料至少 2 次。于 SW50 转筒中 10k rpm 离心稀释膜 10min(SW50;Beckman Instruments,Inc.,Palo Alto,CA)以获得囊泡部分 1。然后再以 30k rpm 离心上清液 30min 以获得囊泡部分 2。向经洗涤的膜补充 5%甘油并于液氮中速冻为 5μl 珠子。用于核被膜修复反应之前,按相等比例混合囊泡部分 1 和 2。

[0669] 核被膜修复处理

[0670] 通过用由非洲爪蟾卵提取物制备的膜组分孵育来修复溶血卵磷脂-渗透化细胞核。浓度约为 5000/μl 的细胞核与相等体积的汇集的囊泡部分 1 和 2 混合并补充 1mM GTP 和 ATP。在 23℃下培育 10-20μl 反应物长达 90min 并不时轻轻搅拌。不时取等分试样并测定核渗透性。

[0671] 很大比例的染色质封装在核被膜内后,可使用本方法中所述的任一技术将重塑细胞核用于细胞重建。

[0672] 检测含有经基因修饰的染色体的细胞

[0673] 培育重建细胞 7-14 天并使用 PCR 和 Southern 杂交筛选重组体。

[0674] 实施例 18 使用无细胞提取物修饰分离的染色体、染色质和细胞核以工程化具有外源遗传物质的细胞

[0675] 在这个方法中,用来自具有重组表现型的细胞(例如鸡前 B 细胞系 DT40 和人淋巴细胞系 DG75)的重组成熟无细胞提取物直接处理靶向载体或寡核苷酸和靶染色体 DNA。这些无细胞提取物可用于分离的染色体和染色质或分离的渗透化细胞核。基本上,用分离的染色体、染色质或细胞核和无细胞重组提取物培育靶向载体/寡核苷酸。在重组染色体或染色质或重组体核被膜周围重建核被膜,或在细胞重建之前用重建或修复细胞核修复渗透化细胞核。

[0676] 制备无细胞提取物

[0677] 如上述制备来自 DT40 或 DG75 细胞的无细胞提取物。

[0678] 制备染色体、染色质或细胞核

[0679] 如上所述从成纤维细胞、hES 细胞系或生殖细胞系分离染色体、染色质和渗透化细胞核。

[0680] 使用来自重组细胞的无细胞提取物重组靶载体和寡核苷酸、无细胞染色体和染色质

[0681] 首先通过用限制性内切核酸酶处理来线性化环状 DNA 靶载体,或者可选地通过 PCR 由基因组 DNA 或载体 DNA 生成线性 DNA 分子。通过琼脂糖凝胶电泳从载体序列去除所有 DNA 靶向载体和常规 DNA 构建体并且用 Elutip-D 柱纯化(Schleicher & Schuell,Keene,NH)。在 98℃下使双链 DNA(200ng)热变性 5min,于冰上冷却 1min 并加入含有 60mM NaCl、2mM 2-巯基乙醇、2mM KCl、12mM 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(pH 7.4)、1mM ATP、0.1mM 每种脱氧核苷三磷酸(dNTP)、2.5mM 磷酸肌酸、12mM MgCl2、0.1mM 亚精胺、2%甘油和 0.2mM 二硫苏糖醇的反应混合物中约 1-3μg 双链染色体 DNA 或染色质团或约 1x10^5 至 1x10^6 渗透化细胞核和 3-5μg 提取蛋白。在 37℃下孵育反应混合物至少 30min,并且在重建细胞膜或修复渗透化细胞核之前如上述进行处理。

[0682] 在重组染色体和染色质周围重新形成核被膜

[0683] 如上述在重组染色体和染色质周围重建核被膜并且将重建细胞核用于细胞重建。

[0684] 核被膜修复

[0685] 如上述修复重组渗透化细胞核并且将修复的重组细胞核用于细胞重建

[0686] 检测含经基因修饰染色体的细胞

[0687] 培育重建细胞 7-14 天并使用 PCR 和 Southern 杂交筛选重组体。

[0688] 实施例 19 用经重组酶处理的靶向载体或寡核苷酸修饰完整细胞内的染色体和染色质以工程化具有外源遗传物质的细胞

[0689] 在这个方法中，为双链靶向载体、靶向 DNA 片段或寡核苷酸涂覆细菌或真核生物重组酶并将其引入哺乳动物细胞或卵母细胞内。活化的核蛋白丝与染色体靶 DNA 形成异源双链体重组中间体，所述染色体靶 DNA 随后经细胞同源重组或 DNA 修复途径分解为同源重组结构。虽然大多数核蛋白丝的直接递送是通过直接核 / 原核显微注射，可使用其它递送技术，包括电穿孔、化学转染和单细胞电穿孔。

[0690] 为了形成人 Rad51 核蛋白丝，在 98℃下使线性双链 DNA(200ng) 热变性 5min，于冰上冷却 1min 并加入含有 25mM 三羟甲基氨基甲烷醋酸盐 (pH 7.5)、100μg/ml BSA、1mM DTT、20mM KCl(添加蛋白质原料)、1mM ATP 和 5mM CaCl2 或 AMP-PNP 和 5mM MgCl2 的蛋白质涂层混合物中。立即加入 hRad51 蛋白质 (1μM) 并在 37℃下孵育反应 10min。用未涂覆的双链 DNA 作为对照通过琼脂糖凝胶电泳监测 DNA 的 hRad51 蛋白质涂层。与未涂覆的双链 DNA 相比，hRad51-DNA 核蛋白丝的电泳迁移率明显下降。hRad51-DNA 核蛋白丝稀释至浓度为 5ng/μl 并用于人成纤维细胞或体细胞的核显微注射，或用于经体细胞核移植或体外受精产生的活化卵母细胞的原核显微注射。

[0691] 检测含经基因修饰染色体的细胞

[0692] 培育注入的细胞或卵母细胞 7-14 天并使用 PCR 和 Southern 杂交筛选重组体。

[0693] 实施例 20：细胞重建

[0694] 使用通过本公开(例如以上实施例 14 和 15) 中所述任一技术或如本公开更全面描述的实施例 14 和 15 中所述技术的组合重塑的细胞核或染色质进行步骤 2(在本方法中也称为“细胞重建”)。在该实施例细胞重建期间，如本领域已知使重塑细胞核与去核的 hES 细胞胞质体融合 (Do & Scholer，Stem Cells 22：941-949(2004))。简言之，在标准条件下培养人 ES 细胞系 H9(Klimanskaya 等，Lancet 365：4997(1995))。操作之前 20h 随着添加 10μM 细胞松弛素 B，细胞的细胞质体积增加。通过使用加压 50% (wt/vol)Ficoll-400 水溶液的原液进行 Ficoll 密度梯度离心胰蛋白酶化细胞制备胞质体。将 Ficoll 400 原液稀释于 DMEM，最终浓度为 10μM 细胞松弛素 B。在 36℃下通过 30%、25%、22%、18%和 15% Ficoll-400 溶液梯度离心细胞。上层为 0.5mL 的 12.5% Ficoll-400 溶液，有 10×10^6 个 ES 细胞。在 36℃下于 MLS-50 转筒中 40,000rpm 离心细胞 30min。从管上标记的 15%和 18%梯度区域收集胞质体，用 PBS 冲洗并与来自本方法第一步的重塑细胞核按 1 ： 1 比例混合或冻藏。使用聚乙二醇进行胞质体与细胞核的融合(参见 Pontecorvo" Polyethylene Glycol(PEG)in the Production of Mammalian Somatic Cell Hybrids" Cytogenet Cell Genet.16(1-5)：399-400(1976))，暂时置于 1mL 预热的 50%聚乙二醇 1500(Roche)1min。然后，在 5min 期间内加入 20mL 的 DMEM 以慢慢去除聚乙二醇。在 130g 下离心细胞一次 5min，然后放回 50μL 的 ES 细胞培养基中并置于促进 ES 细胞集落长出的条件下的成纤维细胞饲

养层下。

[0695] 实施例 21：细胞重建

[0696] 该实施例中如同以上实施例 15 一样使用通过本公开所述任一技术及其细胞重建步骤重塑的细胞核进行步骤 2（在本方法中也称为“细胞重建”）。如本领域所熟知，使细胞核与 hES 细胞的无核细胞质泡囊融合（Wright & Hayflick，Exp.Cell Res.96：113-121，(1975)；& Wright & Hayflick，Proc.Natl.Acad.Sci.，USA，72：1812-1816，(1975)。简言之，通过在操作之前 20h 加入 10μM 细胞松弛素 B 增加 hES 细胞的细胞质体积。然后如所述将胰蛋白酶化细胞并重新接种于涂有小鼠胚胎成纤维细胞饲养细胞外基质的 18mm 无菌盖玻片上（Klimanskaya 等，Lancet 365：4997(2005)。细胞接种密度为在 37℃培育过夜并用培养基轻轻冲洗一次后，细胞占盖玻片表面积约 90％。然后将盖玻片面朝下置于含有 8mL、10％ Ficoll-400 溶液的离心管中并在 36℃下 20,000g 离心 60min。然后将本方法第一步得到的重塑细胞核分散在盖玻片上，密度至少与胞质体相同，优选为胞质体密度的至少 5 倍。使用聚乙二醇进行胞质体与细胞核的融合（参见 Pontecorvo″ Polyethylene Glycol(PEG)in the Production of Mammalian Somatic Cell Hybrids″ Cytogenet Cell Genet.16(1-5)：399-400(1976)）。简言之，将盖玻片置于培养基中 1mL 预热的 50％聚乙二醇 1500(Roche) 中 1min。然后在 5min 内滴加 20mL 培养基以慢慢去除聚乙二醇。然后抽吸全部培养基并用培养基更换。

[0697] 实施例 22：分析重编程的分子机制

[0698] 将本方法实施例 15 中所述的体细胞源性 DNA 的体外重塑用作体细胞重编程的模型和用于分析重编程分子机制的测定。加入来自有丝分裂 NTera2 细胞的提取物后紧接着进行实施例 15 的方法。加入有丝分裂 NTera2 细胞提取物之前，加入与人成纤维细胞有丝分裂细胞提取物浓度 10^-6、10^-4、10^-3、10^-2、10^-1、1X 和 10X 相对应的量的来自人皮肤成纤维细胞的纯化核纤层蛋白 A 蛋白。步骤 2 细胞重建之后，核纤层蛋白 A 降低了成功重编程程度，并且使用这种分析系统确定核纤层蛋白 A 对成功重编程的干扰程度。

[0699] 实施例 23：重编程因子

[0700] 通过增强本方法步骤 1 和 2 未分化细胞或细胞提取物中未分化细胞因子的表达可提高获得重编程细胞的频率。可使用本领域所熟知和本文所述的技术将这些因子引入步骤 1 的提取物中，或引入步骤 2 的去核胞质体中。所述因子的最终浓度应至少为在标准条件下生长的人 ES 细胞培养物中观察的浓度，或优选比在所述标准 hES 细胞培养物中观察到的浓度高 2-50 倍。表 7 提供了示例性未分化细胞因子的列表。该表提供了人基因的名称和检索号；然而其它物质中存在的同源物也可使用。

[0701] 表 7 示例性未分化细胞因子的列表

[0702]

BARX1	**NM_021570.2**
CROC4	**NM_006365.1**
DNMT3B	**NM_175849.1**
H2AFX	**NM_002105.1**
HHEX	**NM_002729.2**
HIST1H2AB	**NM_003513.2**
HIST1H4J	**NM_021968.3**
HMGB2	**NM_002129.2**
hsa-miR-18a	**MI0000072**
hsa-miR-18b	**MI0001518**
hsa-miR-20b	**MI0001519**
hsa-miR-106a	**MI0000113**
hsa-miR-107	**MI0000114**

[0703]

hsa-miR-141	**MI0000457**
hsa-miR-183	**MI0000273**
hsa-miR-187	**MI0000274**
hsa-miR-203	**MI0000283**
hsa-miR-211	**MI0000287**
hsa-miR-217	**MI0000293**
hsa-miR-218-1	**MI0000294**
hsa-miR-218-2	**MI0000295**
hsa-miR-302a	**MI0000738**
hsa-miR-302c	**MI0000773**
hsa-miR-302d	**MI0000774**
hsa-miR-330	**MI0000803**
hsa-miR-363	**MI0000764**
hsa-miR-367	**MI0000775**
hsa-miR-371	**MI0000779**
hsa-miR-372	**MI0000780**
hsa-miR-373	**MI0000781**
hsa-miR-496	**MI0003136**
hsa-miR-508	**MI0003195**
hsa-miR-512-3p	
hsa-miR-512-5p	
hsa-miR-515-3p	
hsa-miR-515-5p	
hsa-miR-516-5p	
hsa-miR-517	
hsa-miR-517a	**MI0003161**
hsa-miR-518b	**MI0003156**
hsa-miR-518c	**MI0003159**
hsa-miR-518e	**MI0003169**
hsa-miR-519e	**MI0003145**
hsa-miR-520a	**MI0003149**
hsa-miR-520b	**MI0003155**
hsa-miR-520e	**MI0003143**
hsa-miR-520g	**MI0003166**
hsa-miR-520h	**MI0003175**
hsa-miR-523	**MI0003153**
hsa-miR-524	**MI0003160**
hsa-miR-525	**MI0003152**
hsa-miR-526a-1	**MI0003157**
hsa-miR-526a-2	**MI0003168**
LEFTB	**NM_020997.2**
LHX1	**NM_005568.2**

[0704]

LHX6	**NM_014368.2**
LIN28	**NM_024674.3**
MYBL2	**NM_002466.2**
MYC	**NM_002467.2**
MYCN	**NM_005378.3**
NANOG	**NM_024865.1**
NFIX	**NM_002501.1**
OCT3/4 (POU5F1)	**NM_002701.2**
OCT6 (POU3F1)	**NM_002699.2**
OTX2	**NM_172337.1**
PHC1	**NM_004426.1**
SALL4	**NM_020436.2**
SOX2	**NM_003106.2**
TERF1	**NM_003218.2**
TERT	**NM_198254.1**
TGIF	**NM_003244.2**
VENTX2	**NM_014468.2**
ZIC2	**NM_007129.2**
ZIC3	**NM_003413.2**
ZIC5	**NM_033132.2**
ZNF206	**NM_032805.1**

[0705] 本领域熟知用于细胞内表达蛋白质或表达增强这些蛋白质的表达的调节 RNA 的方法或将这些因子引入细胞提取物的方式，包括但不限于各种技术。

[0706] 用于瞬时稳定表达蛋白质和调节 RNA 的病毒感染，例如包括但不限于以下病毒：牛乳头状瘤慢病毒和其它乳头状瘤病毒、腺病毒和腺相关病毒。另外，通过转染瞬时稳定表达蛋白质和调节 RNA 引入所述基因或 RNA，通过使用质粒载体、哺乳动物人工染色体 BACS/PACS 直接加入所列基因、所列 miRNA 或 mRNA 编码的蛋白质，使用 CaPO4 沉淀介导的内吞作用、树状聚合物、脂质、电穿孔、显微注射、同源重组以修饰基因或其启动子或增强子、染色体介导的基因转移、细胞融合、微细胞融合或加入含有所述有用因子的细胞提取物，这些所有技术本领域所熟知，并且研究人员易于在文献和网络中得到实施用于管理所述因子的所述技术的方法。

[0707] 实施例 24：由重编程细胞诱导 β 细胞分化而不生成 ES 细胞系

[0708] 从需要胰腺 β 细胞的患者获得外周血有核细胞。使用流式细胞仪纯化细胞以使用本领域熟知的技术获得单核细胞。

[0709] 然后通过将细胞置于低渗缓冲液中制备来自单核细胞的细胞核，并且如本领域所述将细胞进行杜恩斯匀化。然后将来自患者的分离单核细胞细胞核暴露于来自人 EC 细胞系 Tera-2 的有丝分裂提取物中并进行孵育，同时如本文所述监测提取物样品以观察核被膜破坏和随后核被膜重新形成。然后所得到的重编程细胞细胞核与来自经质粒而转染过度表达本文所述 OCT4、SOX2 和 NANOG 基因的 EC 细胞系 Tera-2 的 EC 细胞的胞质体融合。然后渗透化重编程和非重编程细胞的不均匀混合物中所得到的重建细胞并暴露于从如本文所述牛胰腺分离的 β 细胞提取物，然后直接分化为内胚层谱系而不产生 ES 细胞系。然后

将一百万细胞不均匀混合物加至表达高水平 NODAL 的有丝分裂的灭活饲养细胞或表达活化与NODAL相同的受体的TGF β 家族成员的细胞系，例如表达相对较高水平的活化素A，较低水平的抑制素或卵泡抑素的 CM02 细胞。然后在含 0.5％人血清的 DMEM 培养基中孵育细胞 5 天。5 天后，用流式细胞仪或其它基于亲和性的细胞分离技术，例如使用对 CXCR4 受体有特异性的抗体进行磁珠分选来纯化包括定形内胚层细胞在内的所得细胞，然后使用 2006 年 4 月 11 日提交的待决专利申请 PCT/US2006/013573 和 2006 年 6 月 7 日提交的美国申请 No.60/811,908 中描述的技术克隆，所述申请通过引用并入。然后使用本领域已知分化来自人胚胎干细胞系的所述细胞的技术或如 2006 年 4 月 11 日提交的 PCT/US2006/013573 和 2006 年 6 月 7 日提交的美国申请 No.60/811,908 所述通过在诱导细胞和中胚层细胞系上培养细胞使细胞直接分化为胰腺 β 细胞或 β 细胞前体，所述申请均通过引用并入。

[0710] 设想所公开的重编程动物体细胞的改进方法通常用于哺乳动物和人细胞治疗，例如用于治疗皮肤、心血管、神经、内分泌、骨骼和血细胞病症的人细胞。

[0711] 实施例 25

[0712] 由哺乳动物细胞表达和纯化重组重编程蛋白质

[0713] 该实施例描述了生成全长重编程蛋白质并将这些蛋白质递送至细胞内。这些重编程蛋白质可用于生成上述实施例中所述的基因完整 iPS 细胞。

[0714] 蛋白质纯化

[0715] 建立了 3 个用于蛋白质纯化的系统，哺乳动物表达系统、细菌表达系统和杆状病毒表达系统。通常本领域熟知这些蛋白子表达系统，在此不需详细描述。在编码目标蛋白的 cDNA 的 N 或 C 端工程化编码蛋白质转导域 (PTD) 的序列。另外，还在工程化各种标签序列的每一端以促进纯化目标蛋白。

[0716] 在 pCMV-Tag2B 中生成蛋白质表达构建体（图 20）。将 A 9R(9 个精氨酸)PTS 引入 EcoRI/XhoI 位点之间的多克隆位点，并且将蛋白质编码序列引入 BamHI 和 EcoRI 位点之间。所得到的构建体驱动表达包含 N 端 Flag 标签和 C 端 9R PTD 的蛋白质。生成表达 Oct4、Sox2、Klf4、C-Myc、C-Myc(T58A)、Nanog、Lin28 和 GFP（对照）的构建体。将 c-Myc 中存在的 Thr58 取代为 Ala(T58A) 产生更稳定的 c-Myc 蛋白，虽然受 c-Myc 中被认为对其降解尤为重要的 Thr58 残基的磷酸化干扰（虽然前者作为泛素连接酶 Fbw7 的识别位点起作用）。这些构建体称为 FL-cDNA-9R，其中“cDNA”更换为特定基因名称。

[0717] 将这些表达载体转染至哺乳动物细胞内。制备含有重组融合蛋白的全细胞提取物或核提取物并且与具有标签特异性抗体进行免疫沉淀反应。随后通过竞争结合对标签蛋白有特异性的肽洗提而纯化重组融合蛋白。另外，可将质粒载体转化至 BL21 表达感受态大肠杆菌细胞中。确认正确集落后，进行小规模诱导以确定正确表达和溶解性。随后进行大规模诱导，并且在亲和性降低后纯化目标蛋白。

[0718] 进一步地，将质粒载体转化至 DH10Bac 感受态大肠杆菌中以生成重组杆粒。将正确重组杆粒 DNA 转染至昆虫细胞系内以生成重组杆状病毒。扩增每种重组杆状病毒后生成杆状病毒原液并用于感染昆虫细胞以表达目标蛋白。在亲和性降低后纯化目标蛋白。

[0719] 然后通过抗 FLAG 蛋白质印迹法分析从哺乳动物细胞 (293T 细胞）纯化的重组 FLAG-cDNA-9R 融合蛋白（图 21）。易于检测纯化的 Oct4、Klf4、cMyc、cMyc(T48A) 和 Lin28，然而难以检测 Sox2、Nanog 和 GFP 表达。为了提高 Sox2、Nanog 和 GFP 的表达，生成

在 FLAG 标签和蛋白质编码序列之间含有短肽编码序列的修饰的表达载体。这些构建体称为 FLi-GFP-9R、FLi-Sox2-9R 和 FLi-Nanog-9R。然后从表达 FL-Oct4-9R、FLi-Sox2-9R、FL-Klf4-9R、FL-cMyc-9R、FL-cMyc(T58A)-9R、FLi-Nanog-9R、FL-Lin28-9R 的哺乳动物细胞(293T 细胞)制备全细胞提取物。使用固定的抗 FLAG 抗体亲和纯化提取物并使用 FLAG 肽洗提。纯化蛋白的平均浓度为约 0.15μg/μL,而平均体积为约 3ml。两次示例性纯化示于图 22 和图 23。

[0720] 生成另外的蛋白质表达构建体,其包含 N 端 FLAG 标签和作为 PTD 的 C 端 HIV TAT 肽。这些构建体称为 FL-Oct4-TAT、FL-Sox2-TAT、FL-Klf4-TAT、FL-cMyc(T58A)-TAT、FL-Nanog-TAT、FL-Lin28-TAT 和 FL-GFP-TAT。然后在哺乳动物细胞(293T 细胞)内表达重组 FLAG-cDNA-TAT 融合蛋白,使用固定的抗 FLAG 抗体纯化并使用 FLAG 肽洗提。然后通过抗 FLAG 蛋白质印迹法分析纯化的蛋白(图 24)。易于检测纯化的 Oct4、Klf4、cMyc、cMyc(T48A) 和 GFP,然而难以检测 Sox2、Nanog 和 Lin28 表达。

[0721] 还构建了 Lin28-9R 和 Lin28-TAT 的细菌表达载体,然后在细菌内表达这些蛋白质。然后评估了通过 IPTG 诱导表达的时程。图 25 示出了总蛋白染色凝胶,并且图 26 示出了由蛋白质印迹法检测的 Lin28。

[0722] 细胞处理

[0723] 将 RhO 阴性成纤维细胞、前成脂肪细胞和羊水细胞暴露于前面段落中描述的重组重编程蛋白。首先,在用纯化的标记的 GFP 蛋白处理细胞后通过荧光显微镜检术确定蛋白质转导域 (PTD) 的活性和特性。其次,通过免疫荧光染色确定每个纯化的转录因子的摄取量。

[0724] 用不同量的 6 种纯化蛋白质的混合剂 (FL-Oct4-9R、FLi-Sox2-9R、FL-Klf4-9R、FL-cMyc(T58A)-9R、FLi-Nanog-9R 和 FL-Lin28-9R) 处理细胞系 ASC(培养的人前成脂肪细胞)。使混合物透析至基础培养基,至最终量为 0.94、1.88、3.75、7.5、15、30、60 和 120μL/mL。处理存活细胞量达 30μL/mL。60 和 120μL/mL 处理导致大量细胞死亡。还生成剂量反应曲线以确定引起最多蛋白质进入细胞的剂量。

[0725] 进行另外的实验旨在使用单独的 9R 和 TAT 标记蛋白确定摄取和毒性的剂量反应曲线。任选地使用另外的纯化方法进一步纯化重组重编程蛋白。任选地,生成包括其它 PTD 和其它纯化标签的构建体并测试表达水平、细胞毒性和细胞内的摄取量。

[0726] 对 9R 和/或 TAT 标记蛋白的各种组合进行测试以鉴定引起重编程的组合和浓度。如果所得到的细胞集落表现出一种或多种重编程现象,包括形态变化、阳性碱性磷酸酶染色和内源性干细胞标记(例如 Oct4 和 Nanog(通过 RT-PCR))的转录,选择所得到的细胞集落做进一步分析和进一步培养。

[0727] 本文引用的每个文件在此通过引用整体并入本文,并入程度使得所述文件内容不会与本文所含公开内容相抵触。

[0728] 虽然经由实施例和优选实施方案描述了本发明,但是应了解本文所用文字为描述性文字,而非限制性文字。由以上描述,显然可对本文所述方法进行变化和修改以使其适应各种应用和条件。在其更广方面,在不背离本发明范围和精神的前提下可在所附权利要求范围内进行变化。尽管根据特定方法、材料和实施方案描述了本发明,但是应了解本发明不限于公开的详细资料。本发明延伸至所附权利要求范围的所有等同结构、方法和用途。

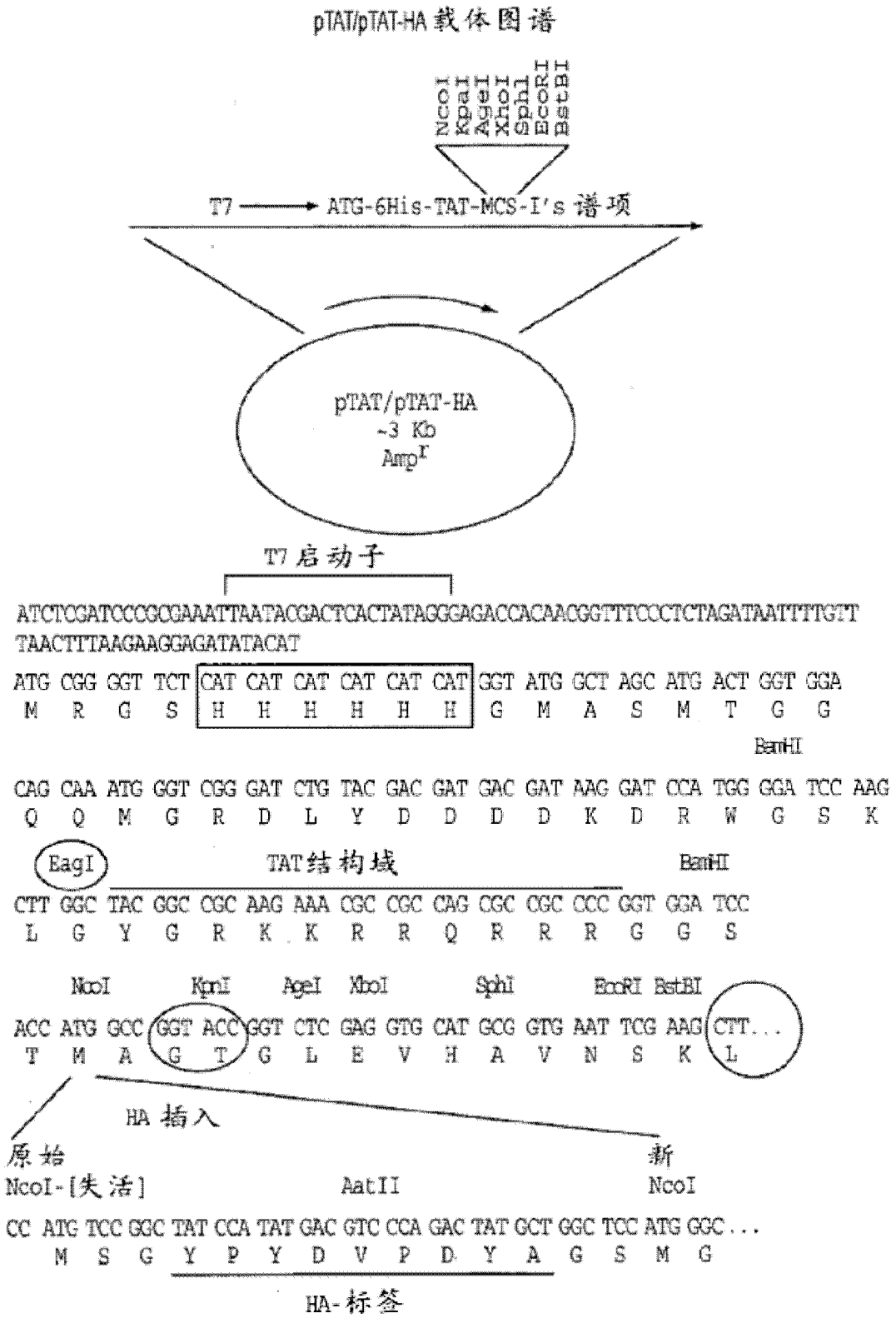

pTAT/pTAT-HA 载体图谱
NcoI
KpnI
AgeI
XhoI
SphI
EcoRI
BstBI
T7
ATG-6His-TAT-MCS-I's 谱项
pTAT/pTAT-HA
~3 Kb
AmpR
T7 启动子
ATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGATAATTTTGTT
TAACTTTAAGAAGGAGATATACAT
ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA
M R G S H H H H H H G M A S M T G G
BamHI
CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CCA TGG GGA TCC AAG
Q Q M G R D L Y D D D D K D R W G S K
EagI
TAT结构域
BamHI
CTT GGC TAC GGC CGC AAG AAA CGC CGC CAG CGC CGC CCC GGT GGA TCC
L G Y G R K K R R Q R R R G G S
NcoI
KpnI
AgeI
XhoI
SphI
EcoRI BstBI
ACC ATG GCC GGT ACC GGT CTC GAG GTG CAT GCG GTG AAT TCG AAG CTT...
T M A G T G L E V H A V N S K L
HA 插入
原始
新
NcoI-[失活]
AatII
NcoI
CC ATG TCC GGC TAT CCA TAT GAC GTC CCA GAC TAT GCT GGC TCC ATG GGC...
M S G Y P Y D V P D Y A G S M G
HA-标签

图 1

纯化的细菌表达的TAT-hNanog的SDS-PAGE电泳

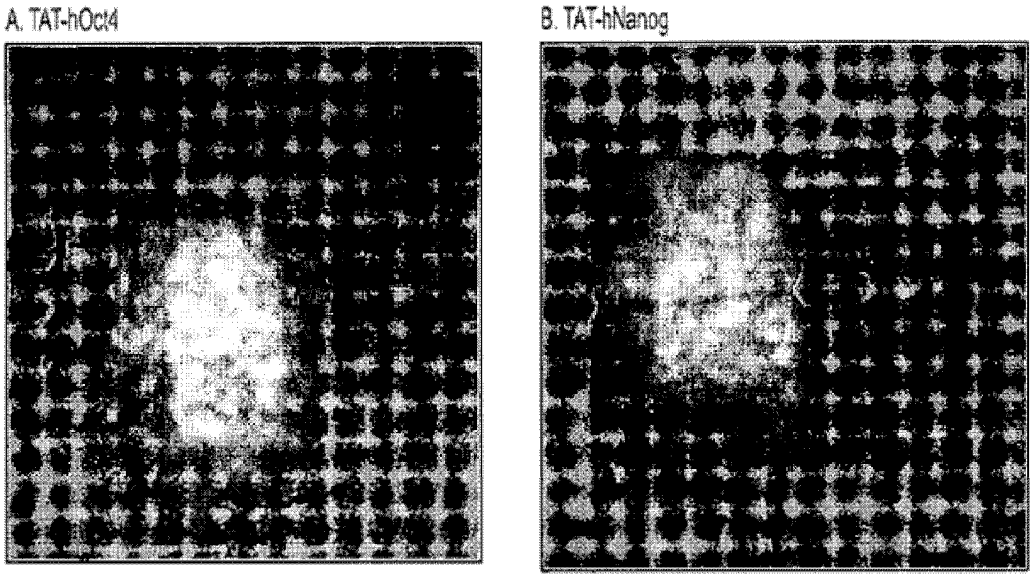


图 2

大肠杆菌中表达并用镍树脂柱纯化的
TAT-Klf4、TAT-Sox2和TAT-cMyc融合蛋白

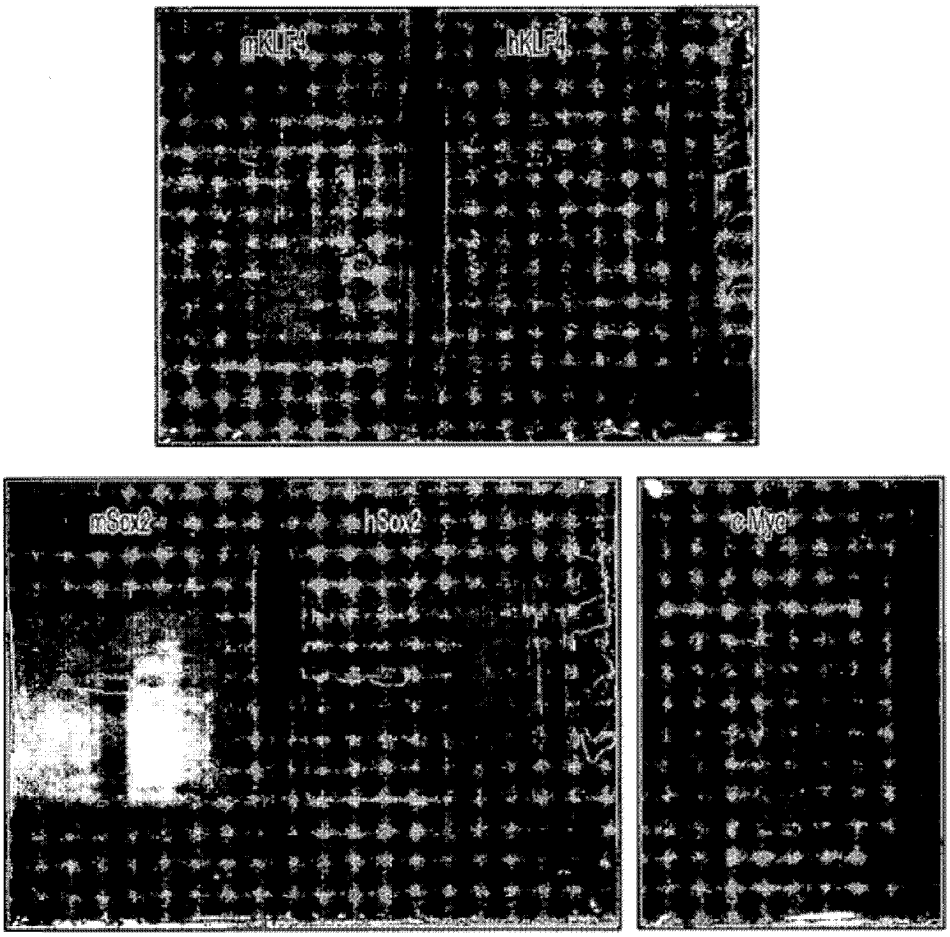


图 3

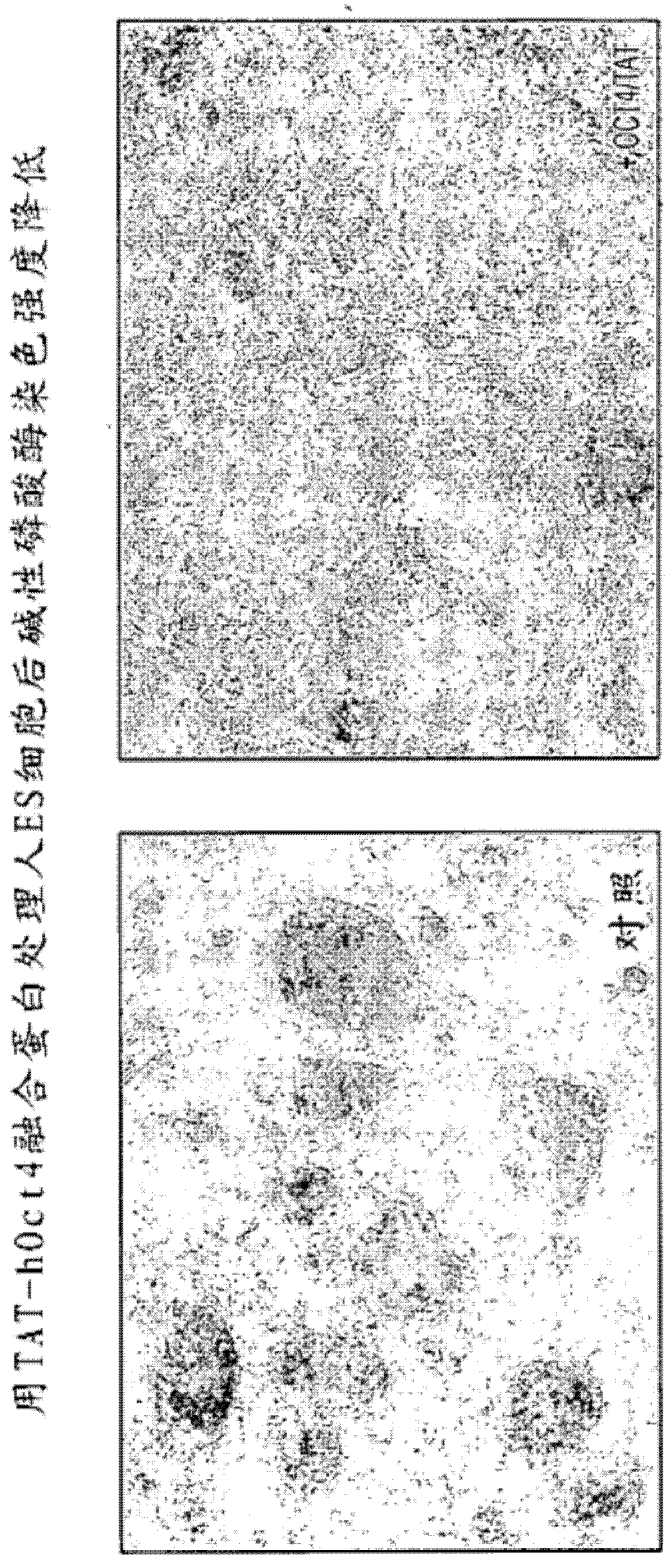
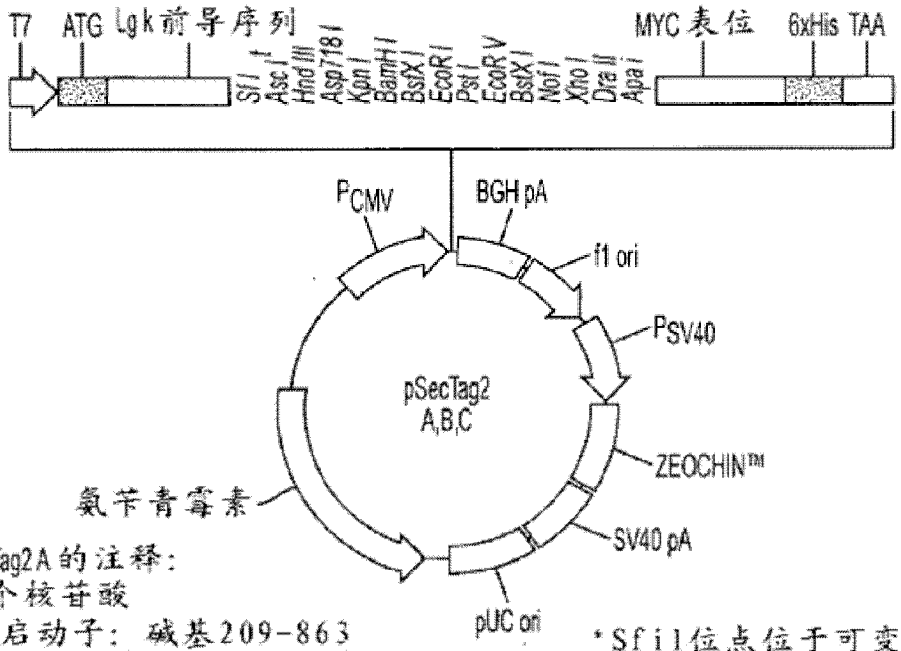


图 4

pSecTag2B 载体图谱



pSecTag2A 的注释：
5159个核苷酸
CMV启动子：碱基209-863
T7启动子/引发位点：碱基863-882
鼠Igk链V-J2-C信号肽：碱基905-967
多克隆位点：碱基970-1081
c-myc表位：碱基1082-1114
多组氨酸标签：碱基1127-1144
BGH反向引发位点：碱基1167-1184
BGH聚腺苷酸化序列：碱基1166-1380
f1原点：碱基1443-1856
SV40启动子和原点：碱基1924-2245
EM-7动子：碱基2261-2327
Zeocin™抗性基因：碱基2328-2702
SV40聚腺苷酸化序列：碱基2832-2961
pUC原点：碱基3345-4018
氨苄青霉素抗性基因：碱基4163-5023(C)

*Sfi I位点位于可变区前。
框依赖性可变区Asc I仅以A型存在。

图 5

pSecTag2B载体多克隆位点

增强子区(3'端)

699 AATGGGAGTT TGTTTTGGCA CCAAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTCG TAACAACTCC

CAAT TATA hCMV的3'端

759 GCCCCATTGA CGCAAATGGG CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT AAGCAGAGCT

推定转录开始 T7启动子引物结合位点

819 CTCTGGCTAA CTAGAGAACC CACTGCTTAC TGGCTTATCG AAATTAATAC GACTCACTAT

Igk链末端序列

879 AGGGAGACCC AAGCTGGCTA GCCACC ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp

SfiI

932 GTA CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC GCG GCC CAGCCG
Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp

信号裂解位点

HindIII Asp718I KpnI BamHI BstXI* EcoRI

980 GCCAGGCGC GCGCGCCG TACGAAG CTTGGTACCG AGCTCGGATC CACTCCAGTG TGGTGGA

PstI EcoRV BstXI* NotI XhoI DraII ApaI

1041 ATTCTGCAGA TATCCAGCAC AGTGGCGGCC GCTCGAGGAG GGCCC GAA CAA AAA CTC
Glu Gln Lys Leu

myc表位 多组氨酸标签

1098 ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His

BGH反向引发位点

1146 CAT TGA GTTTAAACCC GCTGATCAGC CTCGACTGTG CCTTCTAGTT GCCAGCCATC
His ***

1202 TGTTGTTTGC CCCTCCCCCG TGCCTTCCTT GACCCTGGAA GGTGCCACTC CCACTGTCCT

BGH聚(A)添加位点

1262 TTCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT AGGTGT

*注意：多聚接头中有两个BstX1位点。

图 6

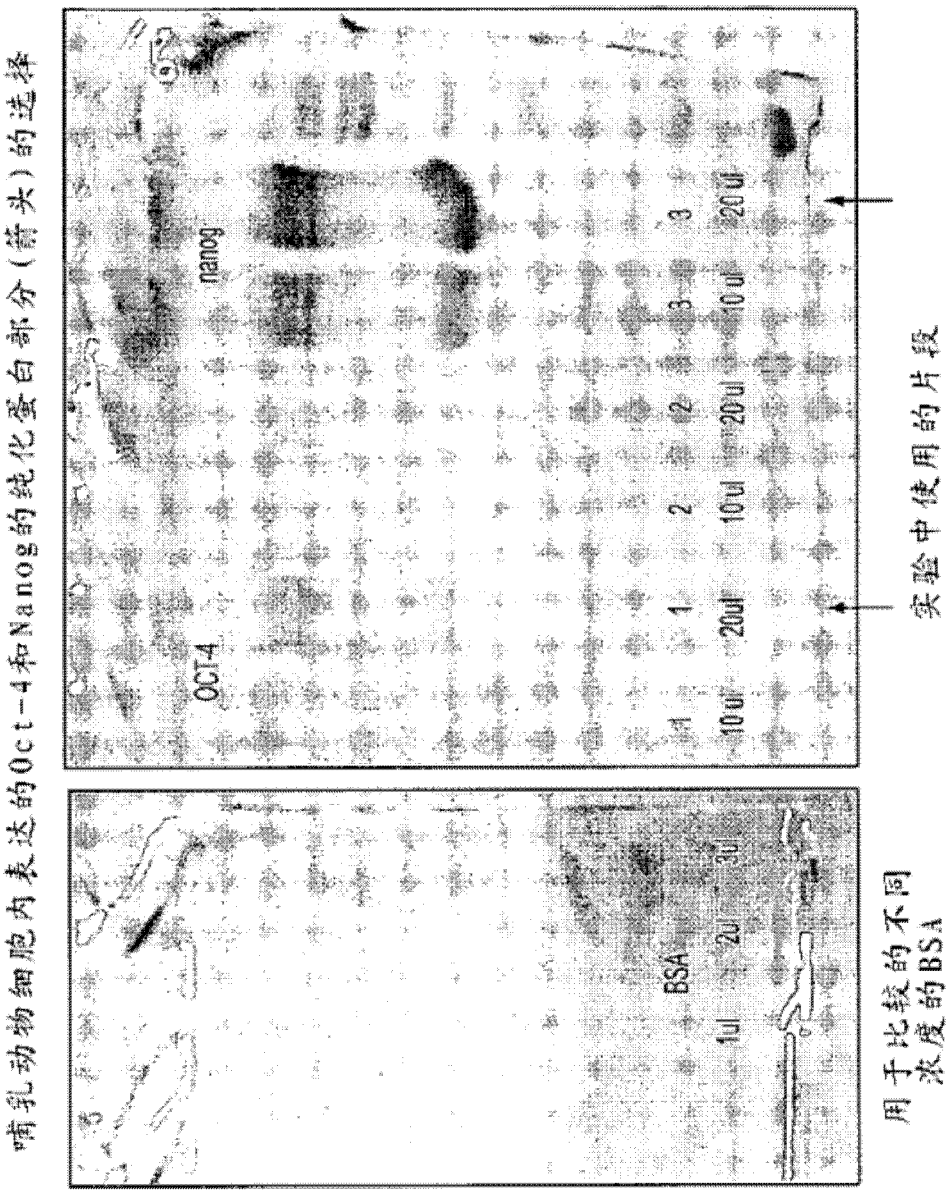

哺乳动物细胞内表达的Oct-4和Nanog的纯化蛋白部分(箭头)的选择
OCT-4
nanog
BSA
1ul
2ul
3ul
10ul
20ul
1
2
3
10ul
20ul
10ul
20ul
用于比较的不同
浓度的BSA
实验中使用的片段

图 7

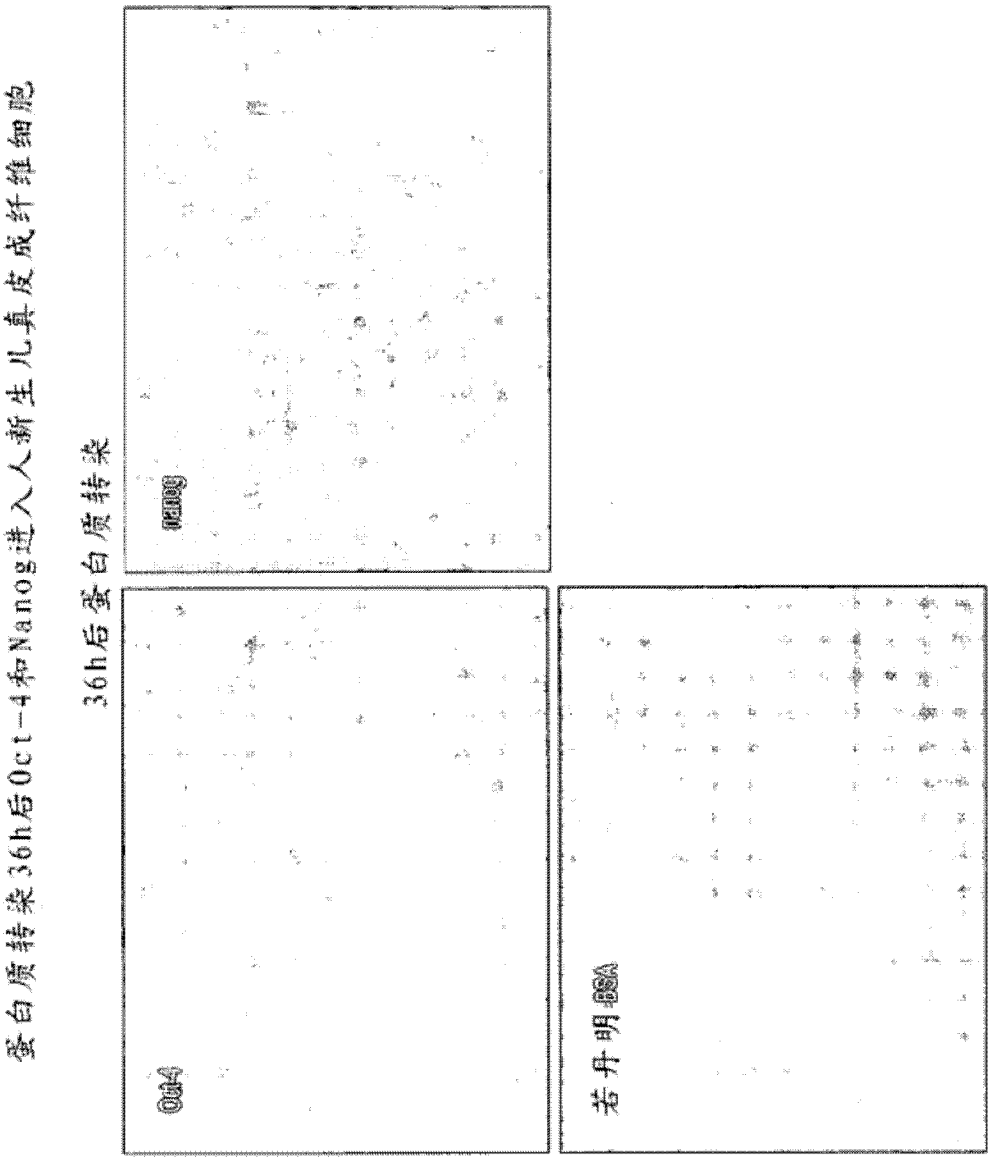

蛋白质转染36h后Oct-4和Nanog进入人新生儿真皮成纤维细胞
36h后蛋白质转染
Oct4
Nanog
若丹明BSA

图 8

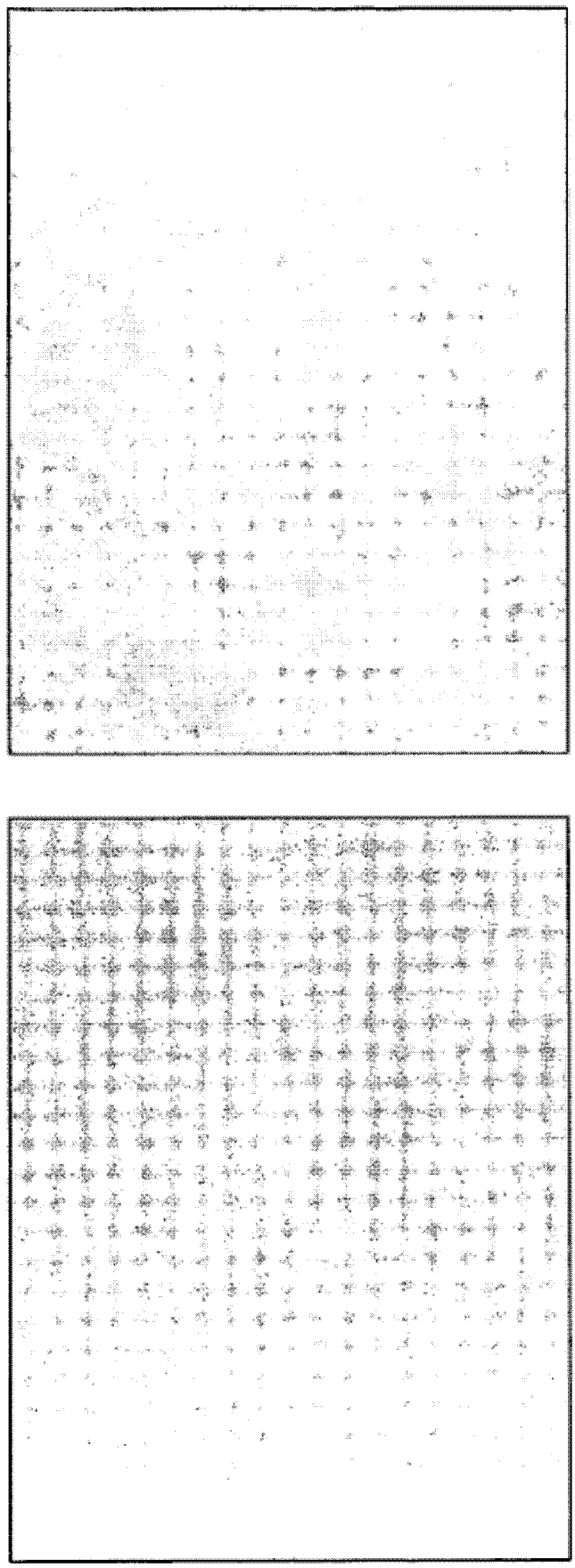


图 9

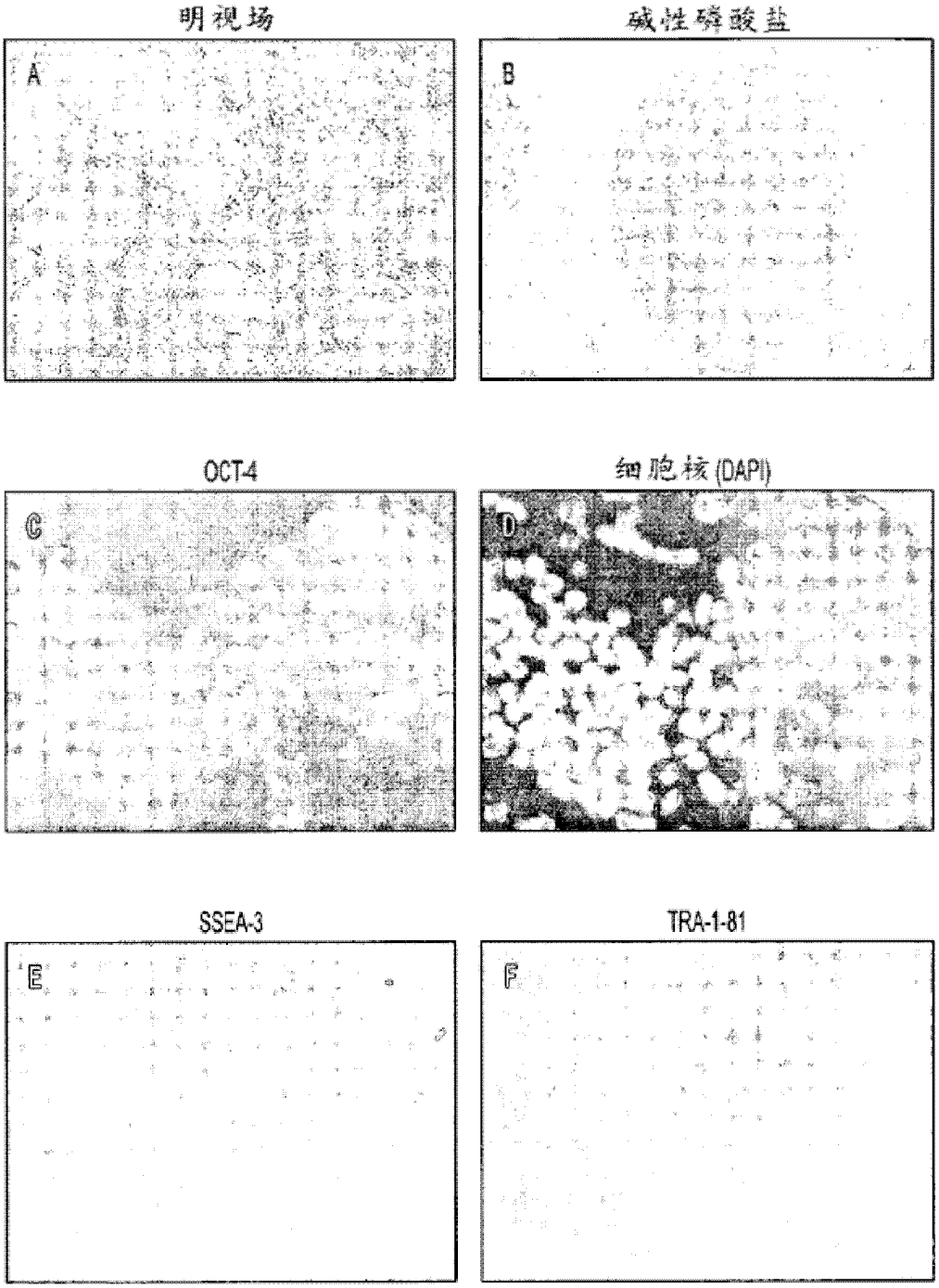


图 10

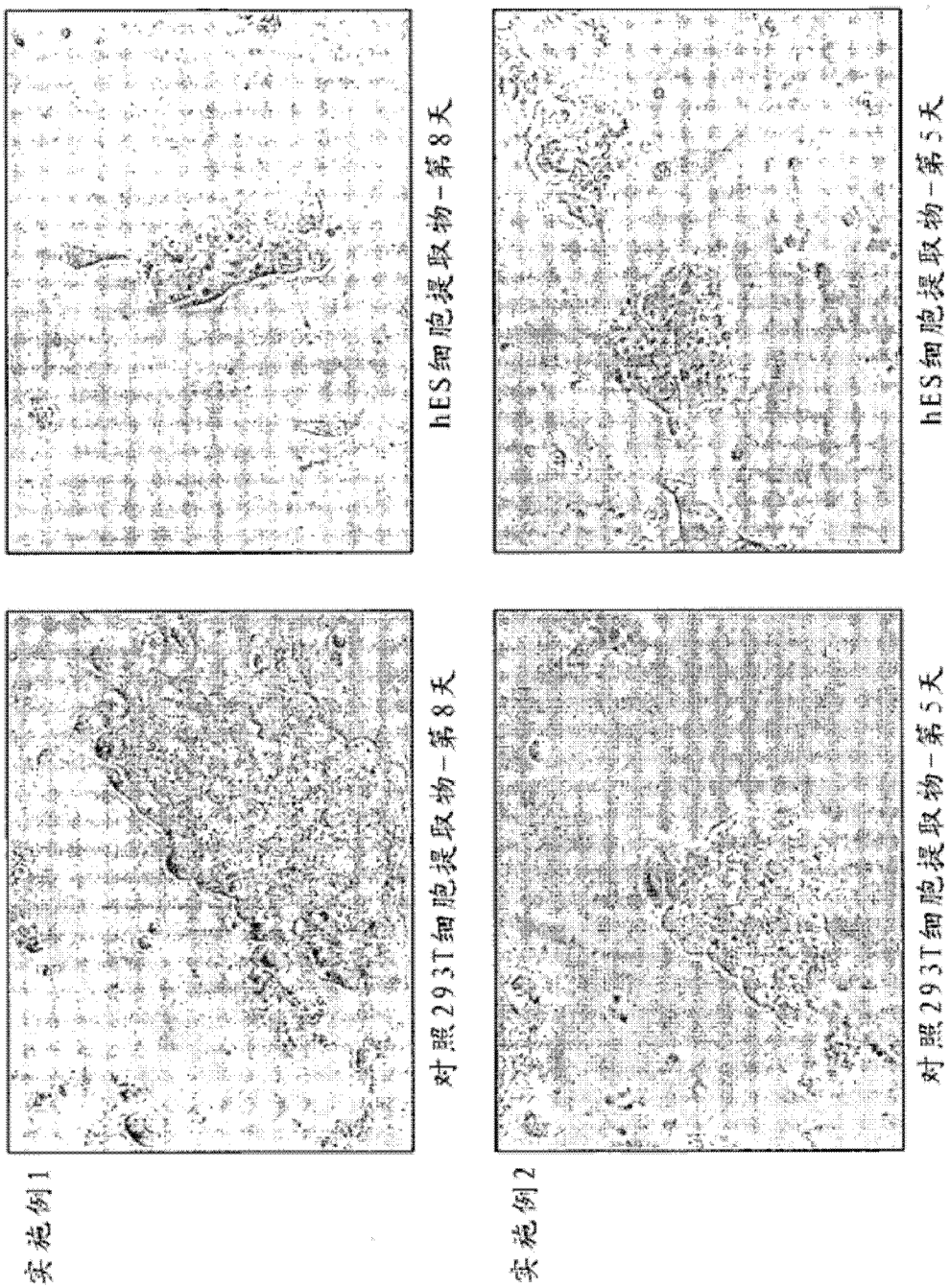

实施例1
对照293T细胞提取物-第8天
hES细胞提取物-第8天
实施例2
对照293T细胞提取物-第5天
hES细胞提取物-第5天

图 11

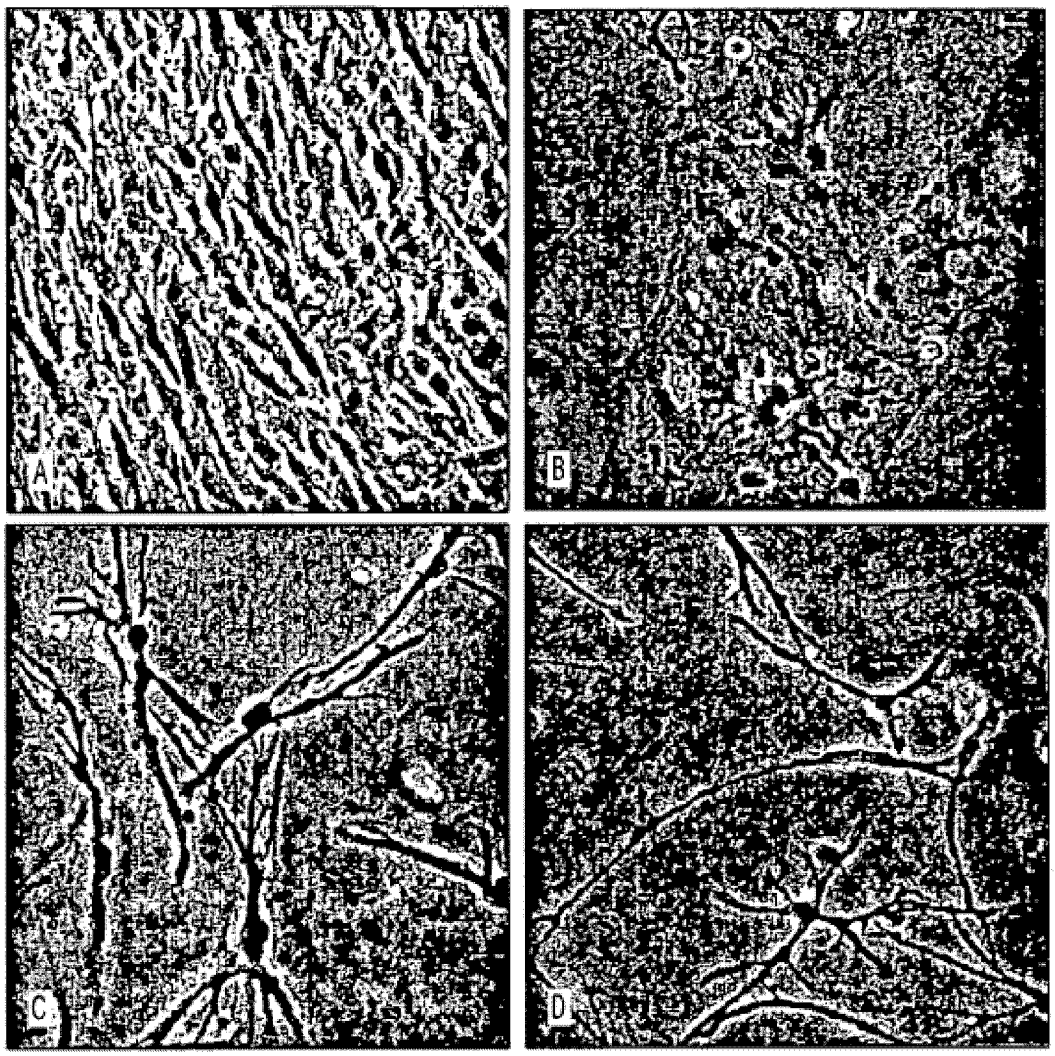


图 12

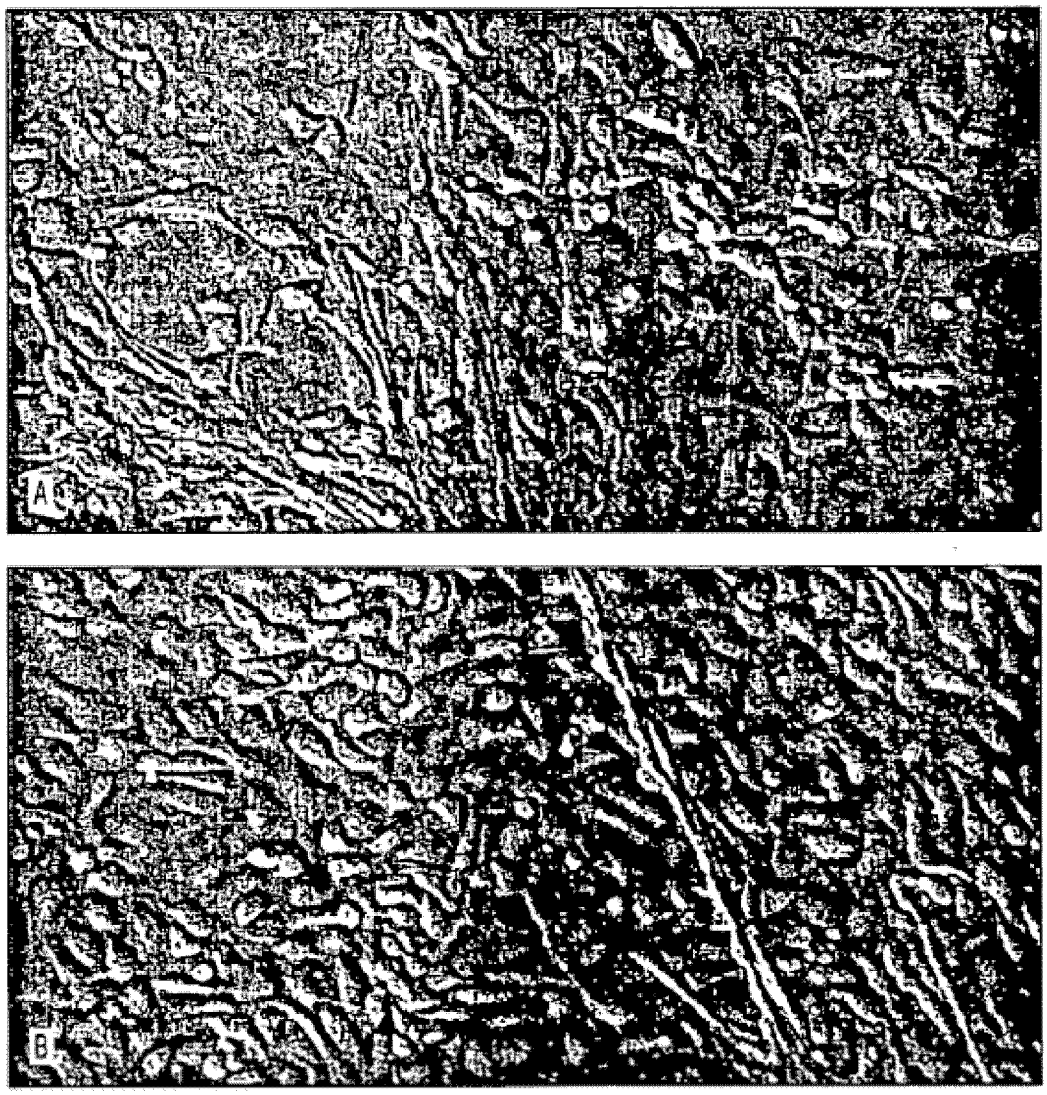


图 13

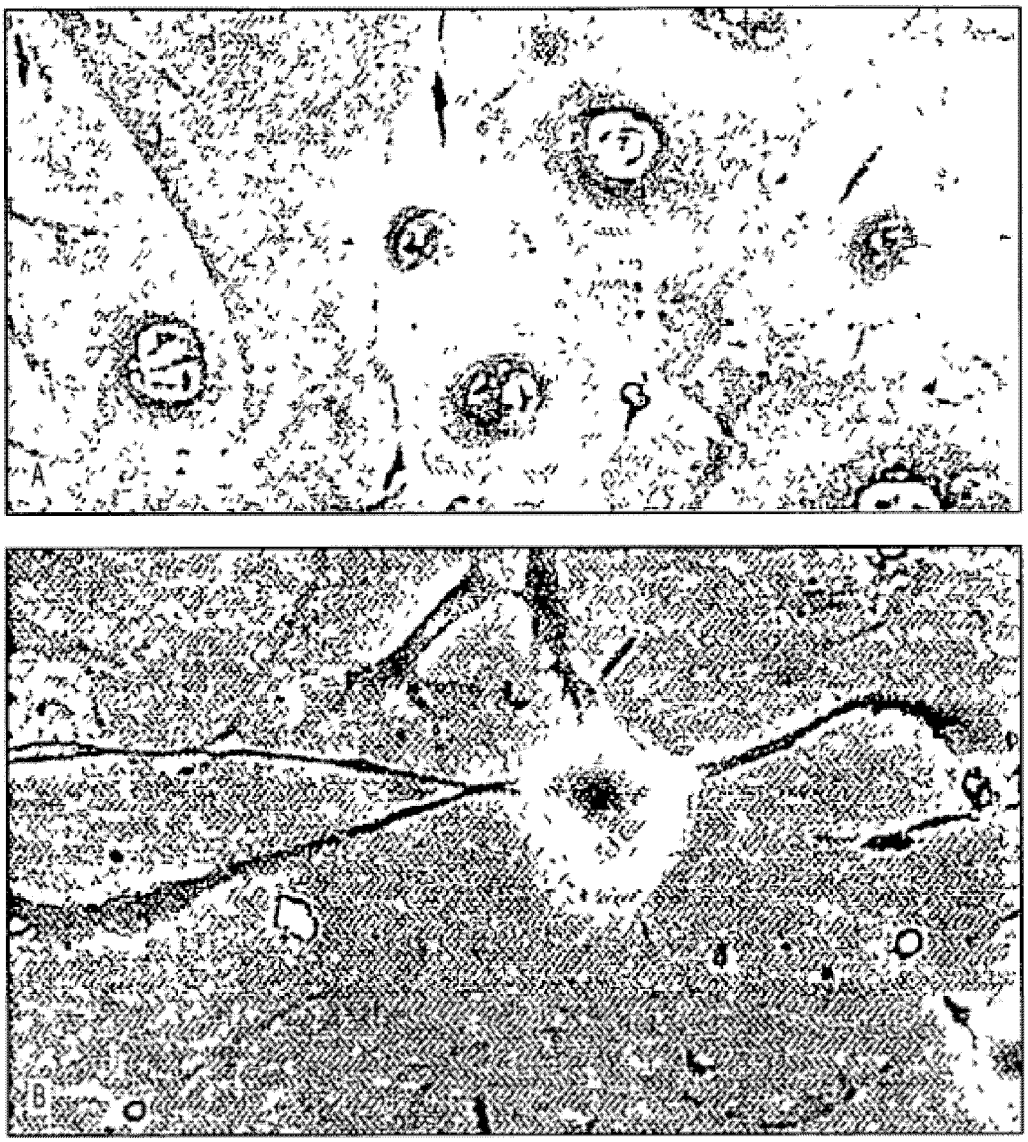


图 14

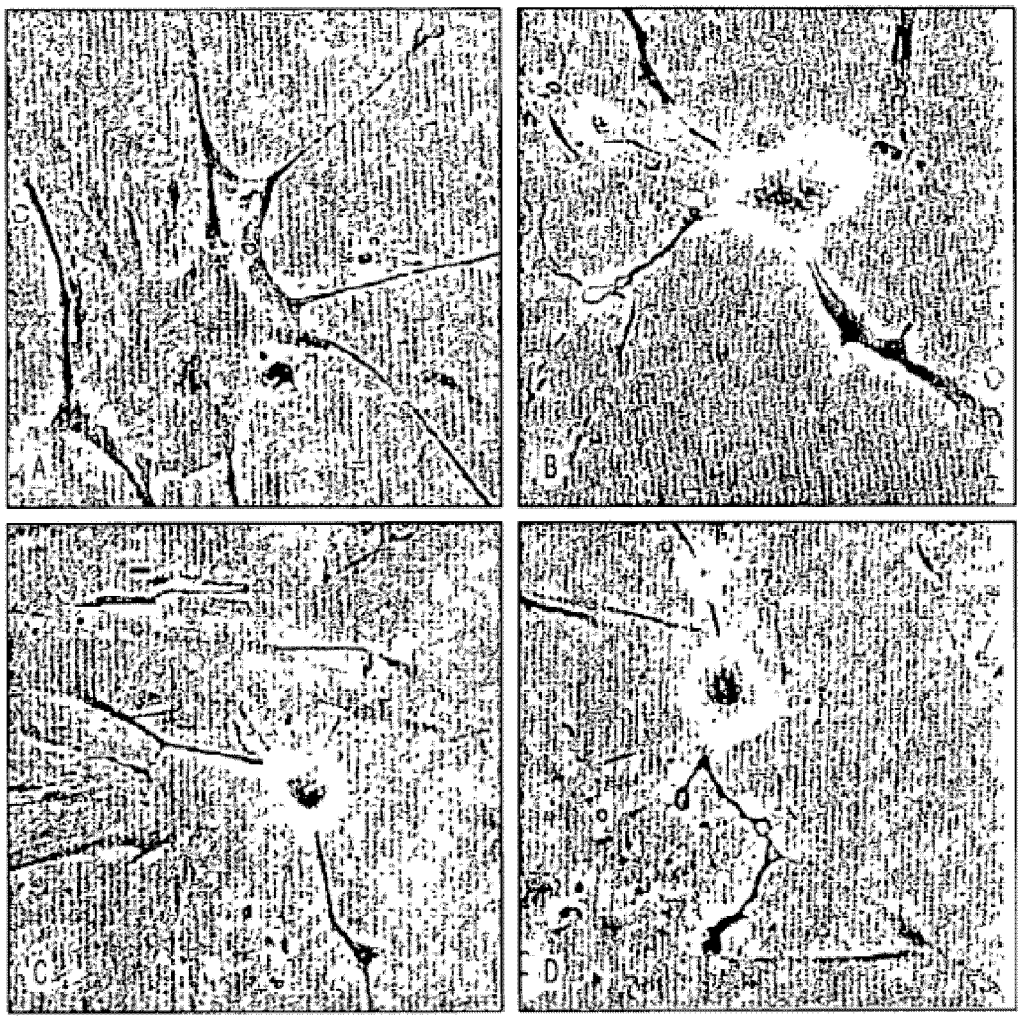


图 15

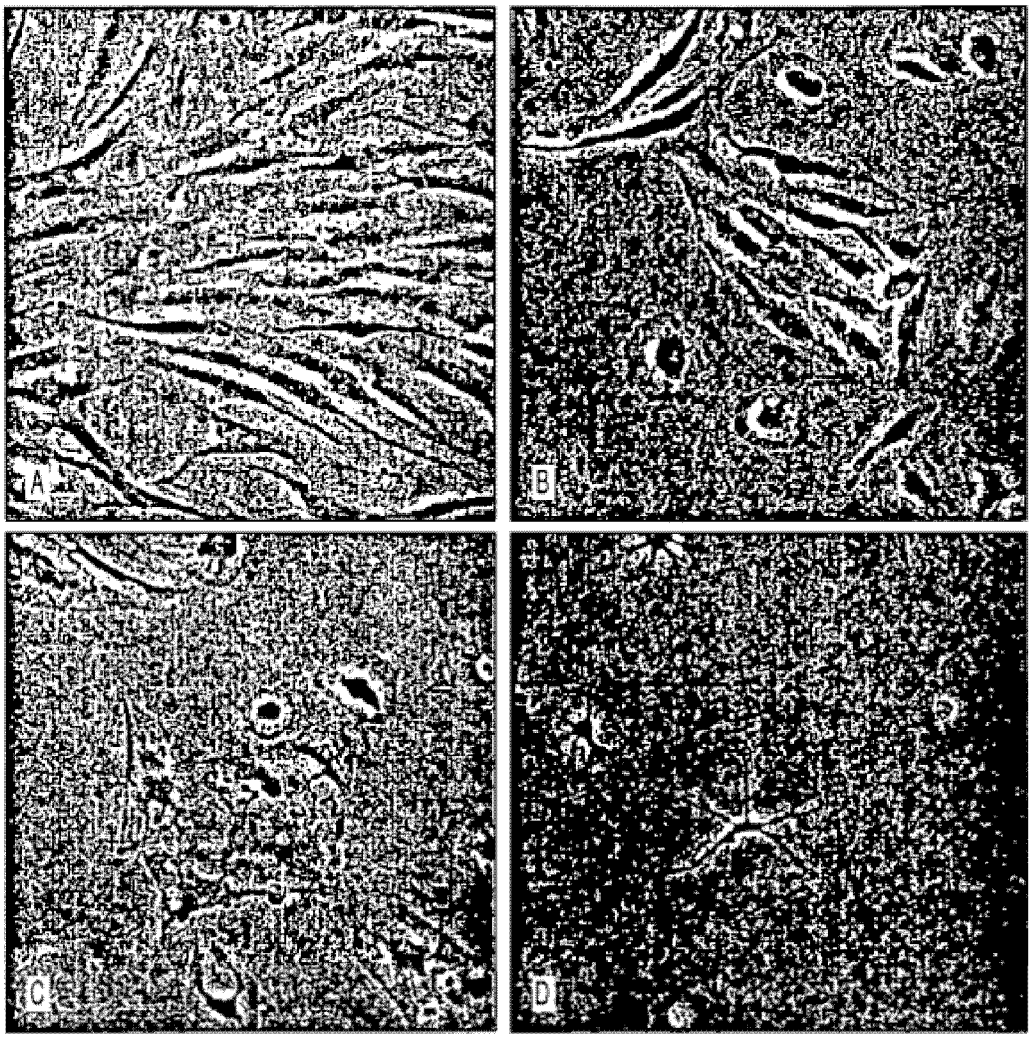


图 16

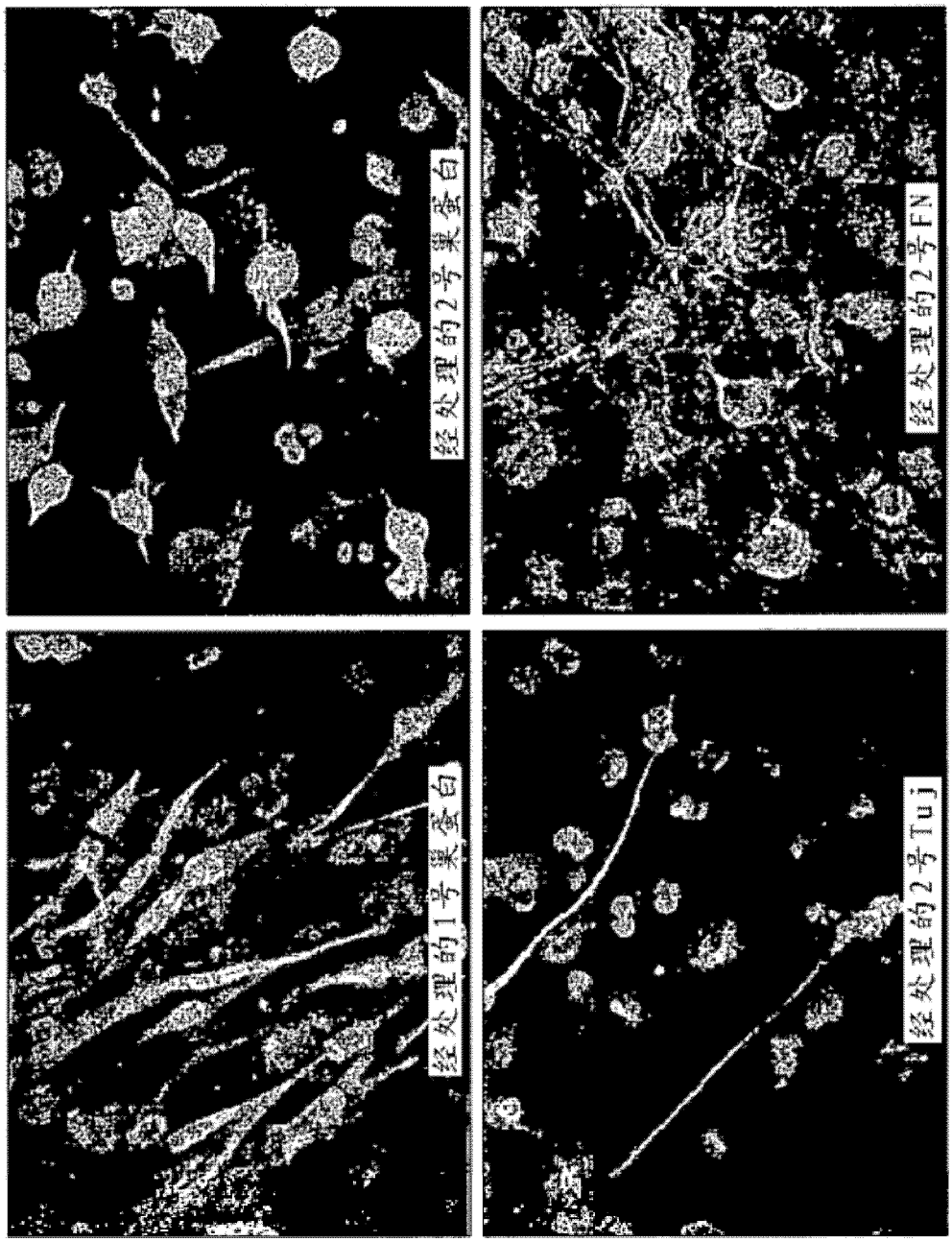


图 17

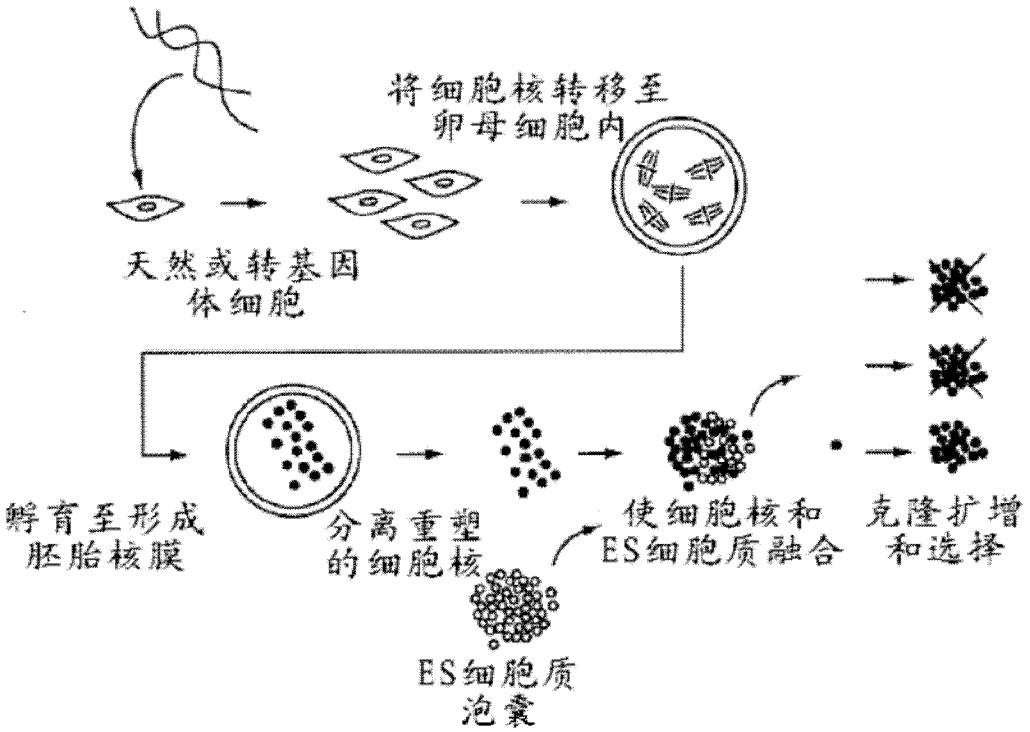

将细胞核转移至
卵母细胞内
天然或转基因
体细胞
孵育至形成
胚胎核膜
分离重塑
的细胞核
使细胞核和
ES细胞质融合
克隆扩增
和选择
ES细胞质
泡囊

图 18

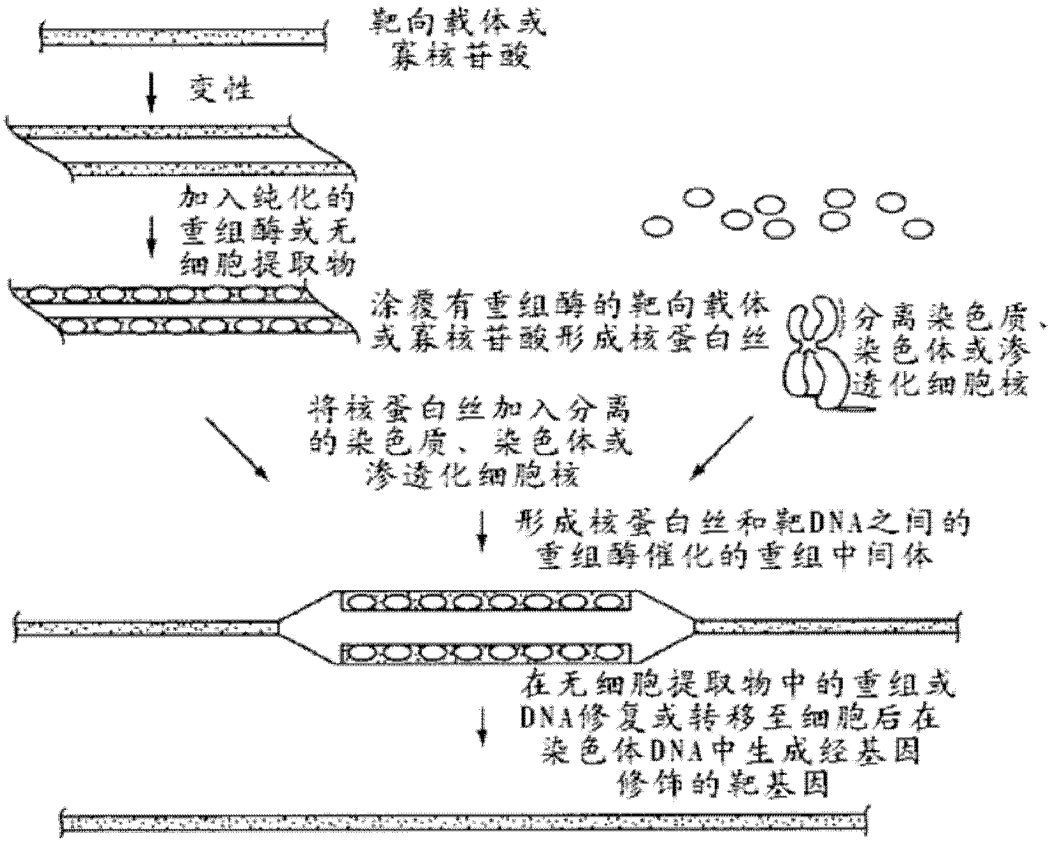

靶向载体或
寡核苷酸
变性
加入纯化的
重组酶或无
细胞提取物
涂覆有重组酶的靶向载体
或寡核苷酸形成核蛋白丝
分离染色质、
染色体或渗
透化细胞核
将核蛋白丝加入分离
的染色质、染色体或
渗透化细胞核
形成核蛋白丝和靶DNA之间的
重组酶催化的重组中间体
在无细胞提取物中的重组或
DNA修复或转移至细胞后在
染色体DNA中生成经基因
修饰的靶基因

图 19

pCMV标签2B多克隆位点区域
(所示序列620-844)

T3启动子

AA TTA ACC CTC ACT AAA GGG AAC AAA AGC TGG AGC TCC ACC GCG GTG GCG GCC GCC ACC ATG...

M

KOZAK

FLAG标签

D Y K D D D D K SrfI BamHI PstI EcoRI

...GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG AGC CCG GGC GGA TCC CCC GGG CTG CAG GAA TTC...

EcoRV HindIII AccI/SacI XhoI ApaI

...GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC CTC GAG GGG GGG CCC GGT ACC T...

T7启动子

...TAATTAATTAAGGTACCAGGTAAGTGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA

多个终止密码子

图 20

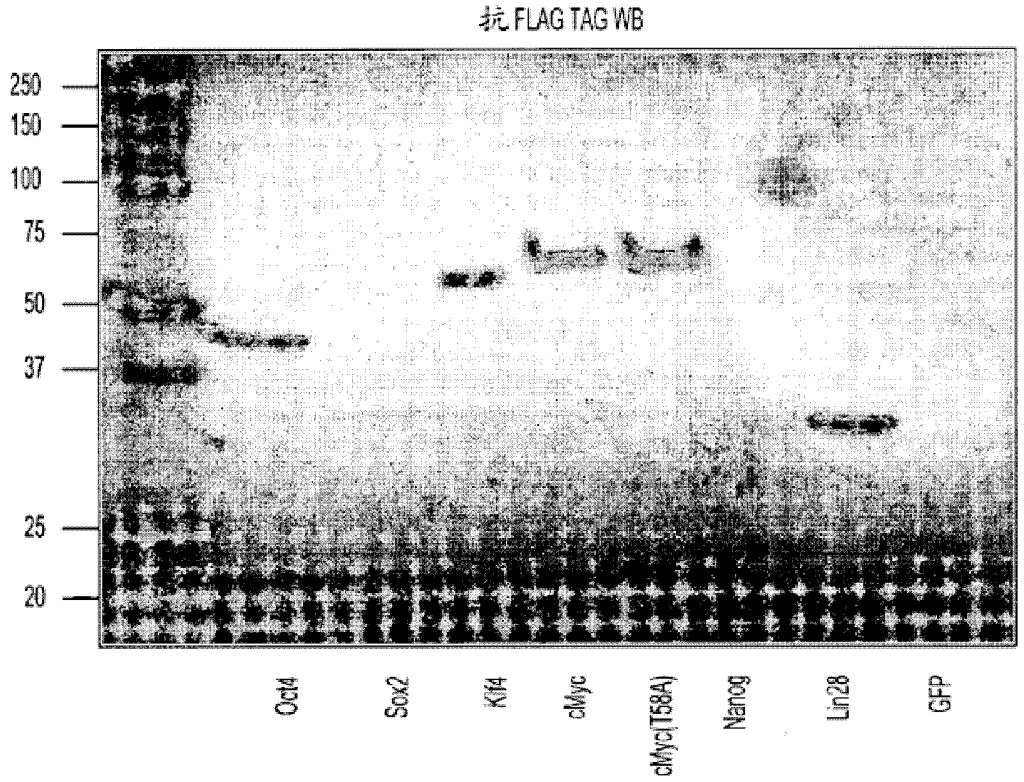


图 21

亲和纯化的FL-9R-蛋白质

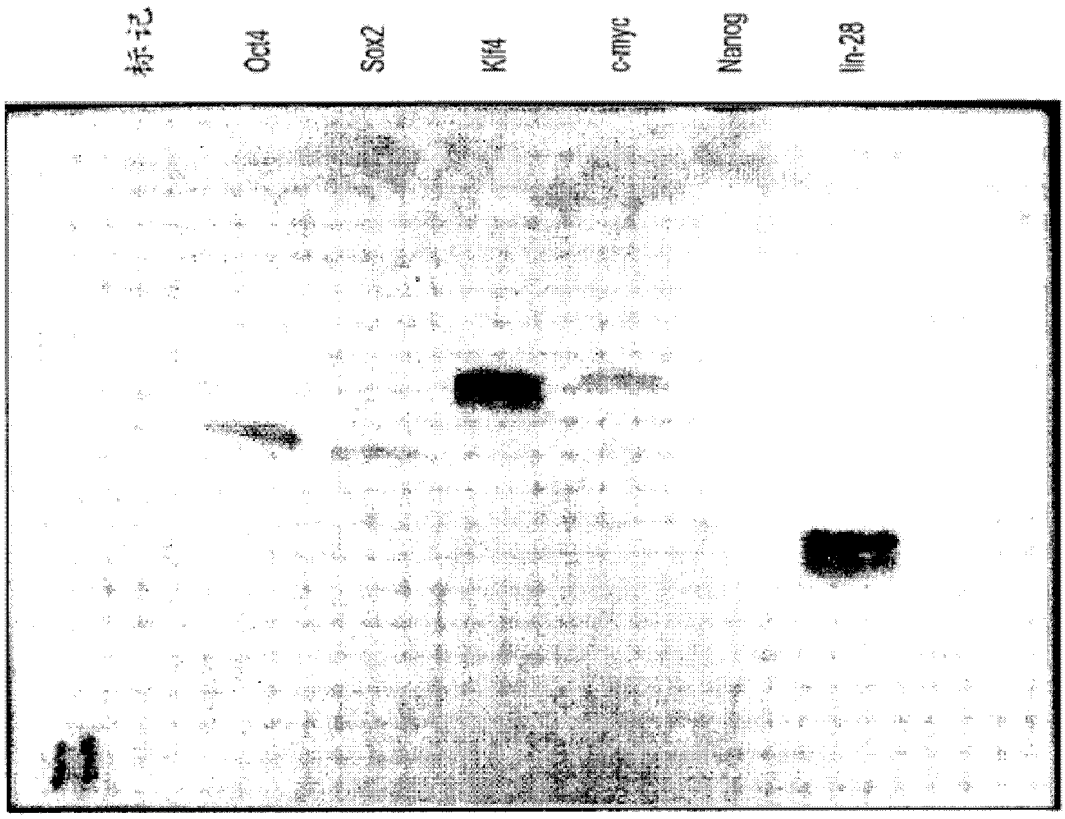


图 22

亲和纯化的FL-9R-蛋白质

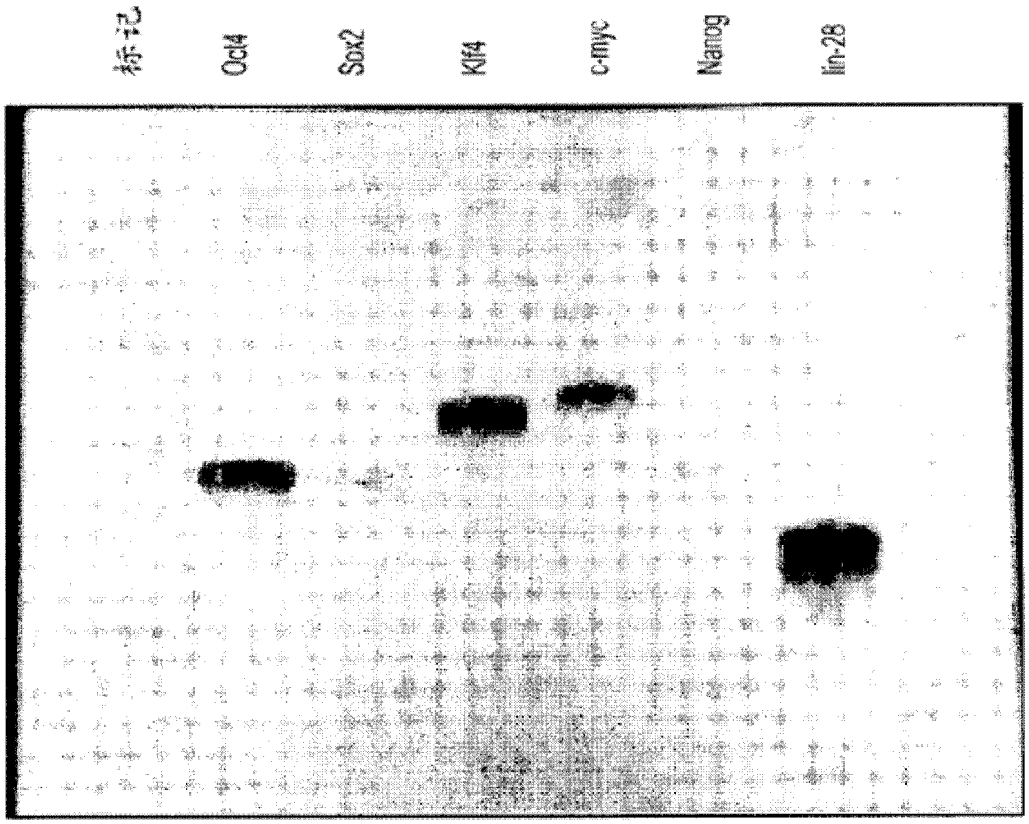


图 23

FLAG-TAT 蛋白质的表达

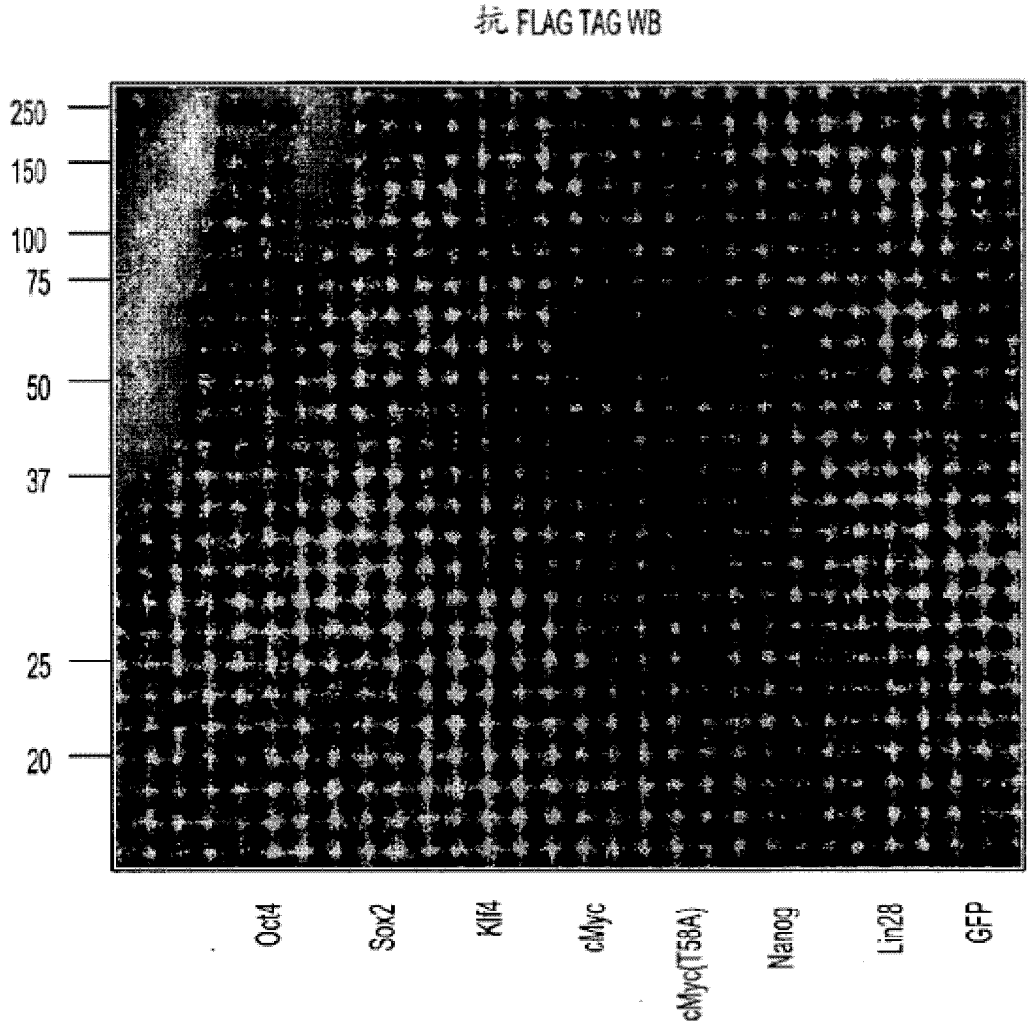


图 24

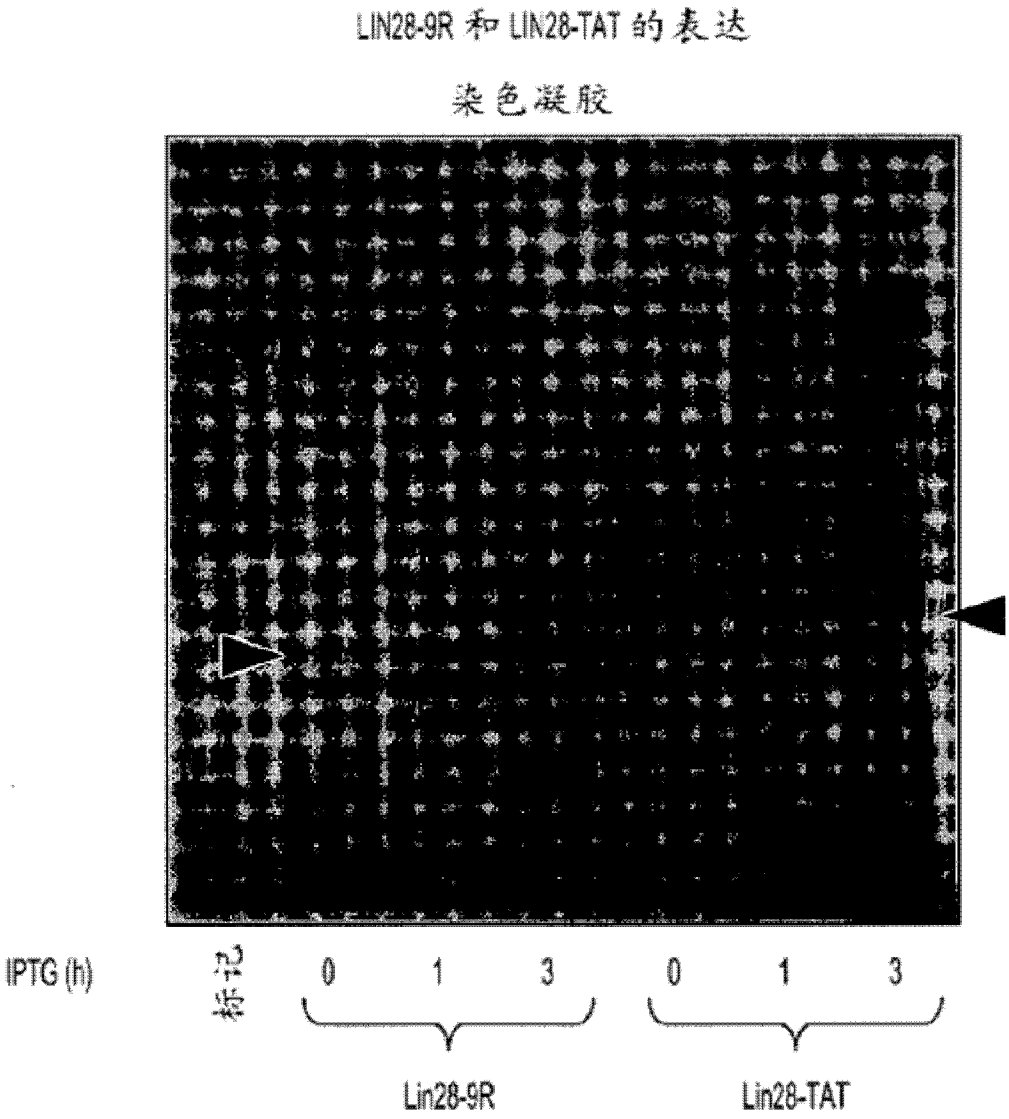

LIN28-9R 和 LIN28-TAT 的表达
染色凝胶
IPTG (h)
标记
0
1
3
0
1
3
Lin28-9R
Lin28-TAT

图 25

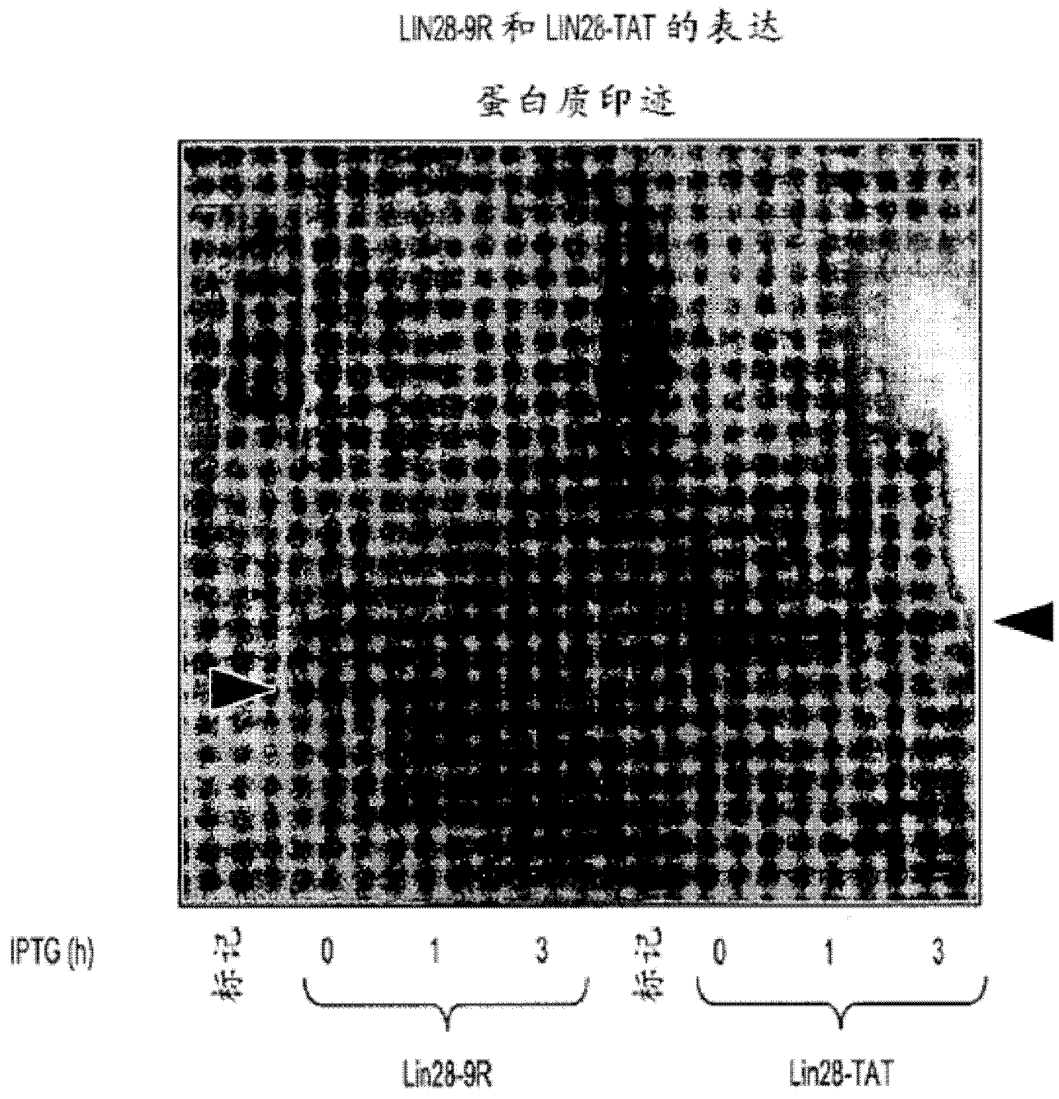

LIN28-9R 和 LIN28-TAT 的表达
蛋白质印迹
IPTG (h)
标记
0
1
3
标记
0
1
3
Lin28-9R
Lin28-TAT

图 26