(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102317442 B
(45)授权公告日 2014.08.13

(21)申请号 200980156917.8
(22)申请日 2009.12.16
(30)优先权数据
61/138,407 2008.12.17 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2011.08.17
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2009/068274 2009.12.16
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2010/077955 EN 2010.07.08
(73)专利权人 斯克里普斯研究所
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 李文林 周宏彦 丁生
(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
代理人 张国梁
(51)Int.Cl.
C12N 5/02(2006.01)
(56)对比文件
US 20080066197 A1,2008.05.13,
US 20060182724 A1,2006.08.17,
Masayoshi tojo et al..The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor-β.《cancer sci》.2005,第96卷(第11期),
李宗海等.Ras_Raf_MEK_Erk通路调控细胞功能的机制.《国外医学-生理、病理科学与临床分册》.2000,第20卷(第1期),
审查员 张丽玮

权利要求书2页 说明书40页 附图19页

(54)发明名称

干细胞的产生和保持

(57)摘要

本发明提供通过在存在ALK5抑制剂时培养细胞而产生并且保持多能细胞。

CN 102317442 B

1. 通过至少一次细胞分裂培养多能细胞的方法，所述方法包括：

在充足量的：

a. 白血病抑制因子 (LIF)，

b. ALK5 抑制剂，

c. MEK 抑制剂，

d. GSK3β 抑制剂，和

e. 充分的营养足够的时间，

存在时培养多能动物细胞，以允许至少一次细胞分裂同时保持细胞的多能性，

其中所述多能动物细胞不是人胚胎干细胞。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述 GSK3β 抑制剂是 CHIR99021。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述 MEK 抑制剂是 PD0325901。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述 ALK5 抑制剂是 A-83-01。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述 ALK5 抑制剂是 SB431542。

6. 权利要求 1 的方法，其中所述多能动物细胞进一步在存在足量成纤维细胞生长因子 (FGF) 受体抑制剂时培养。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述 FGF 受体抑制剂是 PD173074。

8. 权利要求 1 的方法，其中所述多能细胞通过至少 5 次细胞分裂进行培养，同时保持细胞多能性。

9. 权利要求 1 的方法，其还包括向所述多能细胞中引入异源核酸，并且培养所得到的细胞，以允许至少一次另外的细胞分裂，同时保持多能性。

10. 权利要求 9 的方法，其中将异源核酸引入到动物细胞中，然后诱导多能性，再然后进行培养步骤。

11. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞是大鼠细胞或人细胞。

12. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞是灵长类、羊、牛、猫、狗、或猪的细胞。

13. 权利要求 1 的方法，其中所述多能细胞是胚胎干细胞。

14. 权利要求 1 的方法，其中所述多能细胞是诱导的多能干细胞。

15. 多能哺乳动物细胞的培养物，其包括充足量的：

a. 白血病抑制因子 (LIF)，

b. ALK5 抑制剂，

c. MEK 抑制剂，和

d. GSK3β 抑制剂，

以允许至少一次细胞分裂，同时保持细胞多能性，

其中所述多能动物细胞不是人胚胎干细胞。

16. 权利要求 15 的培养物，其中所述 GSK3β 抑制剂是 CHIR99021。

17. 权利要求 15 的培养物，其中所述 MEK 抑制剂是 PD0325901。

18. 权利要求 15 的培养物，其中所述 ALK5 抑制剂是 A-83-01。

19. 权利要求 15 的培养物，其中所述 ALK5 抑制剂是 SB431542。

20. 权利要求 15 的培养物，其还包括足量成纤维细胞生长因子 (FGF) 受体抑制剂。

21. 权利要求 20 的培养物，其中所述 FGF 受体抑制剂是 PD173074。

22. 权利要求 15 的培养物，其中所述细胞是人细胞或大鼠细胞。

23. 权利要求 15 的培养物，其中所述多能细胞是胚胎干细胞。

24. 一种细胞培养基，其包括充足量的下述：

a. 白血病抑制因子 (LIF)，

b. ALK5 抑制剂，

c. MEK 抑制剂，和

d. GSK3β 抑制剂；

从而在所述培养基中培养多能细胞时，允许至少一次细胞分裂，同时保持细胞多能性。

25. 权利要求 24 的培养基，其中所述 GSK3β 抑制剂是 CHIR99021。

26. 权利要求 24 的培养基，其中所述 MEK 抑制剂是 PD0325901。

27. 权利要求 24 的培养基，其中所述 ALK5 抑制剂是 A-83-01。

28. 权利要求 24 的培养基，其中所述 ALK5 抑制剂是 SB431542。

29. 权利要求 24 的培养基，其还包括足量成纤维细胞生长因子 (FGF) 受体抑制剂。

30. 权利要求 29 的培养基，其中所述 FGF 受体抑制剂是 PD173074。

31. 权利要求 24 的培养基，其中所述培养基在预先包装的、密封容器中。

32. 通过权利要求 1-14 中任一项的方法获得的分离的多能动物细胞，条件是所述分离的多能动物细胞不是胚胎干细胞 (ESC)。

33. 权利要求 32 的分离的细胞，其中所述分离的多能动物细胞是人细胞。

34. 权利要求 32 的分离的细胞，其中所述分离的多能动物细胞是大鼠细胞。

干细胞的产生和保持

[0001] 发明背景

[0002] 尽管从 1981 年就已经由小鼠建立了胚胎干细胞 (ESCs)，但是由各种其它哺乳动物（包括大鼠）衍生它们的对应体的尝试尚未成功。近来，从小鼠和大鼠的植入后卵圆柱期上胚层衍生了多能干细胞 (Brons 等，Nature（自然）448，191-195(2007)；Tesar 等，Nature（自然）448，196-199(2007))。这些新型的干细胞被命名为上胚层干细胞 (EpiSCs)。在群落形态和对保持多能性的培养 / 信号传导需要方面，EpiSCs 似乎非常接近地对应于人胚胎干细胞 (hESCs)，但是表现出一定范围的与小鼠 ES 细胞 (mESCs) 不同的显著的表型和信号传导反应差异。

[0003] 白血病抑制因子 (LIF) 是在存在血清的条件下通过 JAK-STAT3 途径保持 mESCs 多能性所必需的 (Niwa 等，Genes Dev（基因发育）12，2048-2060(1998))。然而，在不含血清的培养基中，还需要 BMP4，以及 LIF，以通过诱导分化 (Id) 蛋白表达的抑制剂 (Ying 等，Cell（细胞）115，281-292(2003)) 和抑制 ERK 激活 (Qi 等，Proc Natl Acad Sci U S A（美国国家科学院学报）101，6027-6032(2005)) 来保持 mESC 的自我更新。与 mESCs 相反，LIF 不能支持 EpiSCs/hESCs，其典型地需要碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)/ 激活蛋白 A(Activin A) 进行长期的自我更新。未分化的 hESCs 通过 bFGF 信号传导表现出高水平的基本 ERK 活性 (Dvorak 等，Stem Cells（干细胞）23，1200-1211(2005))。BMP4 也不支持 EpiSC/hESC 自我更新，但是相反诱导 EpiSC/hESC 分化成滋养层或原始内胚层 (Brons 等，Nature（自然）448，191-195(2007)；Tesar 等，Nature（自然）448，196-199(2007)；Xu 等，Nat Biotechnol（自然生物技术）20，1261-1264(2002))。除了 bFGF 之外，已经表明激活蛋白 A/Nodal 信号传导支持 hESCs/EpiSCs 的未分化状态 (Brons 等，Nature（自然）448，191-195(2007)；Sato 等，Dev Biol（发育生物学）260，404-413(2003)；Tesar 等，Nature（自然）448，196-199(2007))，而对于 mESCs 不是必要的。这些结果强烈支持下述观点：EpiSCs 和 hESCs 本质上是相似的，并且提出一种吸引人的假说，即，mESCs 和 EpiSCs/hESCs 代表两种不同的多能状态：表示植入前内细胞群 (ICM) 的 mESC- 样状态，和表示后期上胚层细胞的 EpiSC- 样状态。

[0004] mESCs 通常可以使用基于滋养层的细胞培养条件而来源于某些小鼠品系 (Martin,G.R.,Proc Natl Acad Sci U S A(美国国家科学院学报)78,7634-7638(1981))。然而，已经证明在相似条件下很难由大鼠衍生真正的 ES 细胞。已经报道了大鼠 ESC- 样细胞的建立 (Demers 等，Cloning Stem Cells（克隆干细胞）9，512-522(2007)；Ruhnke 等，Stem Cells（干细胞）21，428-436(2003)；Schulze 等，Methods Mol Biol（分子生物学方法）329，45-58(2006)；Ueda 等，PLoS ONE 3，e2800(2008))，但是这些细胞不能稳定地保持或者缺少真正的体内多能性（例如，不能形成畸胎瘤或对嵌合体没有 / 有很少的贡献）。类似地，尽管已经衍生了（体外）多能性大鼠 EpiSCs，但是大鼠和小鼠 EpiSCs 都表现出很少的能力或没有能力再结合到植入前的胚胎中并且形成嵌合体 (Brons 等，Nature（自然）448，191-195(2007)；Tesar 等，Nature（自然）448，196-199(2007))。

[0005] 最近，通过确定的遗传转导由小鼠和人体细胞产生的诱导的多能干细胞 (iPSCs)

吸引了众多兴趣(Dimos 等,Science(科学)321,1218-1221(2008);Han,J.,和 Sidhu,K.S.Curr Stem Cell Res Ther(现代干细胞研究和治疗)3,66-74(2008);Takahashi 等,Cell(细胞)131,861-872(2007);Takahashi,K.,和 Yamanaka,S.,Cell(细胞)126,663-676(2006);Yu 等,Science(科学)318,1917-1920(2007))。

[0006] 发明简述

[0007] 本发明提供经过至少一次细胞分裂培养多能细胞的方法。在一些实施方案中,所述方法包括在充足量的:

[0008] a.ALK5 抑制剂(或其它 TGFβ/激活蛋白途径抑制剂),和

[0009] b. 第二化合物,其选自 MEK 抑制剂、Erk 抑制剂、p38 抑制剂、和 FGF 受体抑制剂中的一种或多种;和

[0010] c. 充分的营养足够的时间;

[0011] 存在时培养多能动物细胞,以允许至少一次细胞分裂同时保持细胞的多能性。

[0012] 在一些实施方案中,所述培养步骤还包括在存在一定量的 GSK3β 抑制剂时培养细胞。在一些实施方案中,所述 GSK3β 抑制剂是 CHIR99021。

[0013] 在一些实施方案中,所述第二化合物是 MEK 抑制剂。在一些实施方案中,所述 MEK 抑制剂是 PD0325901。

[0014] 在一些实施方案中,所述第二化合物是 Erk 抑制剂。

[0015] 在一些实施方案中,所述培养步骤在还存在白血病抑制因子(LIF)时进行。

[0016] 在一些实施方案中,所述 ALK5 抑制剂是 A-83-01。在一些实施方案中,所述 ALK5 抑制剂是 SB431542。

[0017] 在一些实施方案中,所述多能细胞通过至少 5 次细胞分裂培养同时保持细胞多能性。

[0018] 在一些实施方案中,所述方法还包括向所述多能细胞中引入异源核酸,并且培养所得到的细胞,以允许至少一次另外的细胞分离,同时保持多能性。在一些实施方案中,将异源核酸引入到动物细胞中,然后诱导多能性,再然后进行培养步骤。

[0019] 在一些实施方案中,所述细胞是大鼠细胞或人细胞。在一些实施方案中,所述细胞是灵长类、羊、牛、猫、狗、或猪的细胞。

[0020] 在一些实施方案中,所述多能细胞是胚胎干细胞。在一些实施方案中,所述多能细胞是诱导的多能干细胞。

[0021] 在一些实施方案中,所述细胞是非人动物细胞,并且所述方法还包括将所述多能细胞引入到胚泡中,其中所述胚泡与所述细胞来自相同的动物物种,并且将所述胚泡引入到相同物种的动物的子宫内。在一些实施方案中,所述方法还包括基于来自所述多能细胞的核酸的存在而选择所述动物的嵌合后代。

[0022] 本发明还提供多能哺乳动物细胞的培养物。在一些实施方案中,所述培养物包括充足量的下述:

[0023] a.ALK5 抑制剂(或其它 TGFβ/激活蛋白途径抑制剂),和

[0024] b. 第二化合物,其选自 MEK 抑制剂、Erk 抑制剂、p38 抑制剂、和 FGF 受体抑制剂中的一种或多种;

[0025] 以允许至少一次细胞分裂,同时保持细胞多能性。

[0026] 在一些实施方案中，所述培养物还包括 LIF。

[0027] 在一些实施方案中，所述培养物还包括一定量的 GSK3β 抑制剂。在一些实施方案中，所述 GSK3β 抑制剂是 CHIR99021。

[0028] 在一些实施方案中，所述第二化合物是 MEK 抑制剂。在一些实施方案中，所述 MEK 抑制剂是 PD0325901。

[0029] 在一些实施方案中，所述第二化合物是 Erk 抑制剂。在一些实施方案中，所述 ALK5 抑制剂是 A-83-01。在一些实施方案中，所述 ALK5 抑制剂是 SB431542。

[0030] 在一些实施方案中，所述细胞是大鼠细胞或人细胞。在一些实施方案中，所述细胞是灵长类动物、绵羊、牛、猫、狗、或猪的细胞。在一些实施方案中，所述细胞是诱导的多能干细胞或胚胎干细胞。

[0031] 本发明还提供一种细胞培养基。在一些实施方案中，所述培养基包括充足量的下述：

[0032] a. ALK5 抑制剂（或其它 TGFβ / 激活蛋白途径抑制剂），和

[0033] b. 第二化合物，其选自 MEK 抑制剂、Erk 抑制剂、p38 抑制剂、和 FGF 受体抑制剂中的一种或多种；

[0034] 从而在所述培养基中培养多能细胞时，允许至少一次细胞分裂，同时保持细胞多能性。

[0035] 在一些实施方案中，所述培养基还包括 LIF。

[0036] 在一些实施方案中，所述培养基还包括一定量的 GSK3β 抑制剂。在一些实施方案中，所述 GSK3β 抑制剂是 CHIR99021。

[0037] 在一些实施方案中，所述第二化合物是 MEK 抑制剂。在一些实施方案中，所述 MEK 抑制剂是 PD0325901。

[0038] 在一些实施方案中，所述第二化合物是 Erk 抑制剂。在一些实施方案中，所述 ALK5 抑制剂是 A-83-01。在一些实施方案中，所述 ALK5 抑制剂是 SB431542。

[0039] 在一些实施方案中，所述培养基在预先包装的、密封容器中。在一些实施方案中，所述培养基包括 DMEM 或其它对生长人、大鼠、小鼠或其它动物的细胞相容的培养基。

[0040] 本发明还提供分离的多能动物细胞，所述细胞在存在白血病抑制因子 (LIF) 和骨形态发生蛋白 (BMP) 时，或在抑制 TGFβ 和激活蛋白信号传导途径，抑制 MAPK 信号传导途径，和任选地抑制 FGF 途径时，进行复制并且保持多能性。在一些实施方案中，所述分离的多能动物细胞不是鼠胚胎干细胞 (mESC)。在一些实施方案中，所述细胞是人细胞。在一些实施方案中，所述细胞是人 iPS 细胞。在一些实施方案中，所述细胞是大鼠细胞。在一些实施方案中，所述细胞是大鼠胚胎干细胞。在一些实施方案中，所述细胞是大鼠 iPS 细胞。在一些实施方案中，所述细胞在抑制 ALK5 和 MEK 时保持多能性。在一些实施方案中，所述细胞包括异源表达盒，其包括但不限于，编码可选择或可检测的标记（例如，碱性磷酸酶）的表达盒。

[0041] 与常规培养的 hESCs、上胚层干细胞和人诱导的多能细胞相比，本发明的分离的多能细胞表达更高水平的 E- 钙粘着蛋白 (E-cadherin)。例如，与常规培养的 hESCs、上胚层干细胞和人诱导的多能细胞相比，所述分离的多能动物细胞表达 2 倍更高水平的 E- 钙粘着蛋白。在一些实施方案中，与常规培养的 hESCs、上胚层干细胞和人诱导的多能细胞相比，所述

分离的多能动物细胞表达更高水平的标记，其中所述标记包括 Gbx2，Dppa3，Klf4，和 Rex1。

[0042] 在一些实施方案中，在存在 ALK5 抑制剂，存在选自 MEK 抑制剂、Erk 抑制剂、p38 抑制剂、和 FGF 受体抑制剂的第二化合物时，培养本发明所述分离的多能细胞。在一些实施方案中，本发明的分离的多能细胞通过在存在 ALK5 抑制剂，和选自 MEK 抑制剂、Erk 抑制剂、p38 抑制剂、和 FGF 受体抑制剂中的一种或多种的第二化合物时培养所述细胞获得或可通过在存在 ALK5 抑制剂，和选自 MEK 抑制剂、Erk 抑制剂、p38 抑制剂、和 FGF 受体抑制剂中的一种或多种的第二化合物时培养所述细胞获得。例如，本发明的分离的多能细胞通过培养常规培养的 EpiSCs、大鼠 ESCs、或灵长类动物 ESCs 而获得或可通过培养常规培养的 EpiSCs、大鼠 ESCs、或灵长类动物 ESCs 而获得。

[0043] 本发明还提供了增加部分多能哺乳动物细胞的多能性至更加完全多能的细胞的方法。在一些实施例中，所述方法包括：

[0044] (a) 使所述部分多能细胞与外遗传修饰剂接触，所述外遗传修饰剂选自组蛋白脱乙酰酶抑制剂、组蛋白 H3K4 去甲基化抑制剂或 H3K4 甲基化激活剂；

[0045] (b) 在步骤 (a) 后，在不存在所述外遗传修饰剂时和用下述中的两种或多种培养所述细胞：(i)ALK5 抑制剂，(ii)MEK 抑制剂，Erk 抑制剂，或 p38 抑制剂，和 (iii)FGF 受体抑制剂，由此产生比所述部分多能哺乳动物细胞更加完全多能的细胞。

[0046] 在一些实施方案中，所述方法还包括：

[0047] (c) 在步骤 (b) 后用下述培养所述部分多能哺乳动物细胞：(i)ALK5 抑制剂，(ii)MEK 抑制剂，Erk 抑制剂，或 p38 抑制剂，和 (iii)FGF 受体抑制剂和 (iv)GSK3 抑制剂。

[0048] 在一些实施方案中，培养步骤 (a) 和 / 或 (b) 和 / 或 (c) 还包括在存在白血病抑制因子 (LIF) 时培养所述部分多能哺乳动物细胞。

[0049] 在一些实施方案中，所述部分多能细胞是上胚层干细胞。

[0050] 在一些实施方案中，所述部分多能细胞不表达至少一种下述标记，所述标记选自由 Oct4，Nanog，SSEA-1，和 REX-1 组成的组，并且所述更加完全多能的细胞表达一种或多种或所有所述标记。

[0051] 在一些实施方案中，所述部分多能细胞不表达 ALP-1，并且所述更加完全多能的细胞表达 ALP-1。

[0052] 在一些实施方案中，所述外遗传修饰剂是丙戊酸或硫酸反苯环丙胺 (parnate)。

[0053] 附图简述

[0054] 图 1.mESC- 样 riPSCs 可以由通过反转录病毒转导 Oct4，Sox2 和 Klf4 后的大鼠 WB-F344 细胞产生，并且在 LIF，0.5μM PD0325901，0.5μM A-83-01 和 3μM CHIR99021 的组合下捕获 / 保持。在转导后 10 天观察到 ESC- 样的群落 (A)，但是不能在常规 mESC 培养条件下保持 (B)。在存在 0.5μM PD0325901 和 3μM CHIR99021 时，riPSCs 可以短期保持在培养物中但是表现出广泛的自发性分化 (C)。使用 0.5μM PD0325901，3μM CHIR99021，和 0.5μM A-83-01 的组合，riPSCs 可以长期且同质自我更新 (D)，并且在培养物中形成 mESC- 样圆顶群落 (E)。免疫细胞化学揭示 riPSCs 表达典型的 mESC 标记，诸如 Oct4(F)，Sox2(G)，SSEA-1(H，绿色) 和 Nanog(H，红色)。4 个克隆的 riPSC 株系的 RT-PCR 分析证实内源性典型多能标记的表达 (I)，但是病毒转导的基因在很大程度上被沉默。riPSC 克隆的 Oct4 启动子表现出去甲基化模式并且与亲本 WB-F344 细胞的模式明显不同 (J)。

[0055] 图 2. riPSCs 在体外和体内具有多能发育潜能。免疫染色显示 riPSCs 在体外可以分化成内胚层（白蛋白和 Pdx1）(A 和 B)，神经外胚层（βIII- 微管蛋白，Tuj1）(C) 和中胚层 (Brachyury) (D) 衍生物。并且，在 SCID 小鼠中，riPSCs 可以形成畸胎瘤，所述畸胎瘤由所有三个胚层组成 (E ～ H)。另外，在注射到 Brown-Norway 大鼠胚泡中后，具有 WB F344 背景的 riPSCs 能够产生嵌合体大鼠 (I)。相对放大倍率 :A ～ E(100×)，F ～ H 和 J ～ Q(200×)。

[0056] 图 3. 产生新型“mESC- 样”hiPSCs。将 IMR90 人成纤维细胞通过慢病毒转导 Oct4，Sox2，Nanog，和 Lin28。转导后 3 周观察到 hiPSC 群落 (A)，在转导后第 4 周挑取群落并且稳定保持在 hLIF，0.5μM PD0325901，0.5μM A-83-01，和 3μM CHIR99021 的混合物中。这样的 hiPSCs 与 mESCs 类似形成圆顶群落 (B)。在这样的条件下，hiPSCs 对 ALP(C) 和其它典型的多能标记 (D ～ I) 是阳性的。4 个克隆的 riPSC 株系的 RT-PCR 分析证实内源性多能基因的表达 (J)，但是病毒转导的基因在很大程度上被沉默。hiPSCs 克隆的 Oct4 启动子表现出与常规培养的人 ES 细胞相似的去甲基化模式，但是与亲本 IMR90 成纤维细胞的模式明显不同 (K)。提供了 hiPSCs 的核型分析 (L)。

[0057] 图 4. 免疫染色显示 hiPSCs 在体外可以有效地分化成内胚层（白蛋白）(A)，神经外胚层（βIII- 微管蛋白，Tuj1）(B) 和中胚层 (Brachyury) (C) 衍生物。在植入到 SCID 小鼠中后，hiPSCs 可以形成畸胎瘤，所述畸胎瘤由所有三个胚层组成，包括神经上皮样结构（外胚层）(D)，微管样结构（内胚层）(D)，软骨样结构（中胚层）(E)。相对放大倍率 :A(100×)，B ～ E(200×)。

[0058] 图 5. 不同的小分子组合对保持 riPSCs 在培养中的多能性的作用。将 riPSCs 胰蛋白酶化为单细胞，并且以 103 个细胞 / 孔的密度接种到 6- 孔板中，并且用不同的抑制剂组合处理。5 天后，进行 ALP 染色以显现 riPSC 群落 (A)。从 10 个随机的 40× 视野计数每种条件的 ALP 阳性群落，并且相对群落数目总结在 B 中。

[0059] 图 6. EpiSCs 在 mESC 生长条件下分化，并且不容易转化为 ICM/mESC- 样状态。(A) 在补充了 LIF 的常规 mESC 生长培养基中，鼠 ESCs R1 生长为致密的圆顶群落，并且所述群落表现出阳性 ALP 活性（上左图）。在补充了 bFGF 的常规 hESC 培养基中，EpiSCs 生长为大而扁平的群落，并且所述群落表现出阴性 ALP 活性（上右图）。EpiSCs 在补充了 LIF 的常规 mESC 生长培养基中分化（下左图）；EpiSCs 在补充了 LIF 和 0.5μM MEK 抑制剂 PD0325901，0.1μM EGFR 抑制剂 PD173074 与 3μM GSK3 抑制剂 CHIR99021(m/MFGi) 的常规 mESC 生长培养基中分化（下右图）。(B) 产生转化的细胞的示意图。将 EpiSCs 胰蛋白酶化成单细胞，并且在 mESC 自我更新条件下接种到饲养细胞上，补充所示的化学化合物约 4 天，以诱导转化，然后再选择 4 天。随后再次平板接种培养物并且进一步选择和再扩增 2 周，在该时间过程中挑取稳定的克隆。(C) 通过选择性 ALK4/5/7 抑制剂 A-83-01(0.5μM) 抑制 TGFβ 信号传导诱导 EpiSCs 形成表达 ALP 的更致密的圆顶群落。(D) 这些群落可以在补充了 LIF 和 0.5μM A-83-01，0.5μM PD0325901，0.1μM PD173074 与 3μM CHIR99021(mAMFGi) 的 mESC 生长培养基中进一步稳定扩增。(E)LSD 抑制剂硫酸反苯环丙胺诱导 EpiSCs 形成表达 ALP 的更致密的圆顶群落。这些群落可以在 mMFGi 或 (F)mAMGi 条件下进一步稳定扩增。注意 mESC- 样圆顶群落和阳性 ALP 活性。刻度条，50μm。

[0060] 图 7. 通过用硫酸反苯环丙胺与 ALK4/5/7，MEK，FGFR 和 GSK3 的抑制剂处理，EpiSCs 转化为 ICM/mESC- 样状态。(A) 由三种类型的化合物 - 处理的细胞产生嵌合体的效

率。(B) 在将聚集的胚胎植入到假孕小鼠中后，在成体小鼠中通过硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 的条件由 EpiSCs 转化的稳定的 mESC- 样细胞形成嵌合体。野鼠色涂膜色源自硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞。(C) 在多个成体组织中存在 GFP 整合的 PCR 基因型。(D) 通过由用 GFP 标记的硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞产生的荧光检查 E13.5 胚胎，并且在多个胚胎组织中观察到 GFP- 阳性细胞（较高分辨率的图片显示在图 10A 中）。(E) 通过 FACS 分离性腺中的 GFP/SSEA-1 双重阳性细胞，并且通过实时 PCR 检验种系标记。结果证明在硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞 - 形成的种系谱系中种系标记 Blimp1 和 Stella 的特异性表达。条 :± STDV。

[0061] 图 8. 转化的硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞的分子表征。(A) 免疫细胞化学表明多能标记 Oct4（绿色），Nanog（红色），和 SSEA-1（红色）在硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞中的均匀表达。(B) 通过半定量 RT-PCR 分析特异性 ICM 标记基因 (Rex-1，Pecam1，Dax 1，Dppa5，Esrrb，Fgf4，和 Fbxo15)、种系能力相关的标记基因 (germline competence associated marker genes)(Stella 和 Stra8)、和 Epiblast 基因 (fgf5) 在 mESCs，EpiSCs，和硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞中的表达。(C)mESCs，EpiSCs，和硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞的转录组 (transcriptome) 分析表明，与 EpiSCs 相比，硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞要与 mESCs 相似得多。两种生物学复本用于所有三种细胞类型。(D) 通过亚硫酸氢盐基因组测序甲基化分析 Stella 和 Fgf4 启动子。空心圆和实心圆分别表示未甲基化的和甲基化的 CpGs。(E) 多种细胞中在 stella 基因座中所示的组蛋白修饰的 ChIP-QPCR 分析。用所示的抗体由不含饲养细胞培养的 EpiSCs，R1-mESCs，和硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞免疫沉淀基因组 DNAs，然后使用对编码 Stella 的内源性基因组基因座特异性的引物组进行 Q-PCR 分析。将组蛋白修饰的水平表示为插入 (input) 的百分数。IgG 作为无抗体对照。

[0062] 图 9. 转化的硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞的功能表征。(A) 硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 具有与 mESCs 相似的生长速率。将 R1-mESCs 和硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞每 3 天传代，并且每 24 小时计数细胞数目。(B) 硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞在体外可以有效地分化成三个胚层中的细胞，包括特征性的神经细胞（β III- 微管蛋白和 MAP2ab 阳性的），心肌细胞（心脏肌钙蛋白和 MHC 阳性的），和内胚层细胞 (Sox17 或白蛋白阳性的）。细胞核用 DAPI 染色。(D)BMP4 对在 EpiSCs，mESCs，和硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞中引入中胚层标记 (Brachyury)，滋养层标记 (Cdx2)，和原始内胚层标记 (Gata6) 表达有不同的影响。(E) 在单层和化学限定的条件下的定向逐步心肌细胞分化表明，硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞与 R1-mESCs 共有相似的分化反应，并且与 EpiSCs 不同。将细胞用 CT3 染色和搏动表型 (beating phenotype) 进行表征。

[0063] 图 10. 硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞有效地形成嵌合体小鼠。(A) 来自嵌合体胚胎的组织。在性腺、脑、心脏、肠、肺和肾中观察到由硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞形成的 GFP 阳性细胞。(B) 嵌合体成体小鼠的 GFP 基因型。随机挑选 5 只小鼠，并且通过基因组 PCR 分析在 5 种不同的组织，即，心脏、肺、肝、脑、和脾中的 GFP 整合。在 2 只成体小鼠的所有 5 种组织，在 3 只小鼠的 4 种组织中的 GFP 整合的阳性检测，证实硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞在体内可能形成三个胚层（中胚层、内胚层和外胚层）。

[0064] 图 11. 在有饲养细胞或无饲养细胞的条件下，多能标记在转化的硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞中的均匀表达。(A) 将硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞用 GFP 标记，并且在饲养细胞上增殖。免疫染色结果表明 GFP 和多能标记 Oct4（红色），Nanog（红色），和 SSEA-1（红

色）的均匀表达。(B) 由单一的硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞发育未分化的 Oct4- 阳性群落与由单一的 OG2-ES 细胞发育一样有效。在不含饲养细胞和 N2B27- 化学限定的条件下进行单细胞接种后，将群落扩增几代。刻度条，50μm。(C) 在不存在 LIF 时，硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞分化并且失去 Oct4 表达。在不含饲养细胞和 N2B27- 化学限定的条件下进行单细胞接种后，硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞扩增；显示补充生长因子。

[0065] 图 12. 在转化的硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞和 R1-mESC 细胞中检测到 STELLA 表达，但是在 EpiSCs 中没有检测到。免疫染色结果显示 STELLA 和 DAPI 的表达。

[0066] 定义

[0067] 术语“多能”或“多能性”指具有产生这样的后代的能力的细胞，所述后代能够在适当条件下经历分化成为共同展示与来自全部三胚层（内胚层、中胚层和外胚层）的细胞谱系相关的特征的细胞类型。多能干细胞可以形成出生前、出生后或成年动物的许多或全部组织。标准的本领域公认测试，诸如在 8-12 周龄 SCID 小鼠中形成畸胎瘤的能力，可以用于确定细胞群的多能性，然而，不同多能干细胞特征的鉴定也可以用于检测多能细胞。细胞多能性是一种连续体，范围从可以正确形成每种胚胎细胞的完全多能细胞（例如，胚胎干细胞和 iPSCs）到不完全或部分多能细胞，所述不完全或部分多能细胞可以形成所有三种胚层，但是可能不表现出完全多能细胞的所有特征，诸如例如，种系传递 (germline transmission) 或产生完整的生物体的能力。在具体的实施方案中，细胞的多能性由不完全或部分多能细胞增加至更加多能的细胞，或者，在某些实施方案中，增加至完全多能细胞。例如，多能性可以通过畸胎瘤形成、种系传递、和四倍体配体互补测定。在一些实施方案中，多能性基因或多能性标记的表达，如本文其它地方所讨论的，可以用来测定细胞的多能性。

[0068] “多能干细胞特征”意指将多能干细胞与其他细胞相区别的细胞特征。产生能够在适当条件下经历分化成为共同展示与来自全部三胚层（内胚层、中胚层和外胚层）的细胞谱系相关的特征的细胞类型的后代的能力是多能干细胞特征。表达或不表达某些分子标记物组合也是多能干细胞特征。例如，人多能干细胞表达来自以下非限制性列表的标记物中的至少一些，且任选地表达其全部：SSEA-3，SSEA-4，TRA-1-60，TRA-1-81，TRA-2-49/6E，ALP，Sox2，E- 钙粘着蛋白，UTF-1，Oct4，Rex1，和 Nanog。与多能干细胞相关的细胞形态学也是多能干细胞特征。

[0069] 术语“文库”，根据其在本领域中的一般用法，用于表示分子集合，其任选地以可以鉴别各成员的方式来组织和 / 或分类。文库可以包括，但不仅限于，组合化学药品文库，天然产物文库，和肽文库。

[0070] “重组”多核苷酸是不以其天然状态存在的多核苷酸，例如，所述多核苷酸包括自然界中不存在的核苷酸序列，或所述多核苷酸处于除其天然存在的背景以外的背景中，例如，与其在自然界中典型接近的核苷酸序列分开，或与其典型不接近的核苷酸序列相邻（或相连）。例如，可以将研究的序列克隆至载体中，或否则与一种或多种另外的核酸重组。

[0071] “表达盒”指包括启动子或与编码蛋白的序列可操作相连的其他调控序列的多核苷酸。

[0072] 术语“启动子”和“表达控制序列”在本文中用于指指导核酸转录的核酸控制序列阵列。用于本文中时，启动子包括接近转录起始点的必需核酸序列，诸如在聚合酶 II 型启动子的情形中，包括 TATA 元件。启动子还任选地包括远端增强子或阻抑子元件，其可以位

于距转录起始点多至数千碱基对处。启动子包括组成型和诱导型启动子。“组成型”启动子是在大部分环境和发育条件下有活性的启动子。“诱导型”启动子是在环境或发育调节下有活性的启动子。术语“可操作相连”指核酸表达控制序列（诸如启动子、或转录因子结合位点阵列）和第二核酸序列之间的功能性连接，其中所述表达控制序列指导对应于所述第二序列的核酸转录。

[0073] “异源序列”或“异源核酸”，用于本文中时，是来源于与特定宿主细胞异源的来源的序列或核酸，或如果来自相同来源，则由其初始形式进行修饰。因此，细胞中的异源表达盒不是特定宿主细胞内源的表达盒，例如通过与来自表达载体的核酸序列而非染色体 DNA 相连，与异源启动子相连，与报道基因相连等。

[0074] 术语“试剂”或“测试化合物”指用于本文所述的筛选测定中的任一化合物。试剂可以是，例如，有机化合物，多肽（例如，肽或抗体），核酸（例如，DNA、RNA、双链、单链、寡核苷酸、反义 RNA、小抑制 RNA、微小 RNA、核糖核酸酶等），寡糖，脂质。通常，本发明筛选方法中使用的试剂具有小于 10,000 道尔顿，例如，小于 8000，6000，4000，2000 道尔顿，例如，50-1500，500-1500，200-2000，500-5000 之间道尔顿的分子量。测试化合物可以采用测试化合物文库的形式，诸如提供充足多样性范围的组合文库或随机文库。测试化合物任选地与融合配偶体，例如靶向化合物，拯救化合物，二聚化合物，稳定化合物，可寻址化合物 (addressable compounds)，和其他功能结构部分相连。常规地，具有有用特性的新化学个体通过下述来产生：鉴定具有一些理想特性或活性，例如在某些条件下诸如本文中所述的条件下诱导多能性的能力的测试化合物（称为“前导化合物”），产生所述前导化合物的变体，和评估那些变体化合物的特性和活性。通常，将高通量筛选 (HTS) 方法用于所述分析。

[0075] 术语“核酸”和“多核苷酸”在本文中可互换地用于指采用单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。该术语包括包含已知的核苷酸类似物或修饰的主链残基或连锁的核酸，其是合成的、天然存在的、和非天然存在的，其具有与参照核酸类似的结合特性，且其以与参照核苷酸类似的方式代谢。所述类似物的实例包括，但不仅限于，硫代磷酸酯，磷酰胺，甲基膦酸酯 (methyl phosphonates)，手性 - 甲基膦酸酯，2-O- 甲基核糖核酸，肽 - 核酸 (PNAs)。

[0076] 除非另外指出，特定核酸序列还包括其保守修饰变体（例如，简并密码子置换）和互补序列，以及明确指出的序列。特别地，简并密码子置换可以通过产生这样的序列来获得，在所述序列中，一个或多个所选（或全部）密码子的第三个位置被混合碱基和 / 或脱氧肌苷残基取代 (Batzer 等，Nucleic Acid Res.（核酸研究）19 :5081(1991) ;Ohtsuka 等，J.Biol.Chem.（生物化学杂志）260 :2605-2608(1985) ;Rossolini 等，Mol.Cell.Probes（分子细胞探针）8 :91-98(1994))。

[0077] 表达或活性的“抑制剂”、“活化剂”和“调节剂”分别用来指利用关于所述靶蛋白（或编码多核苷酸）表达或活性的体外和体内测定所鉴定的抑制分子、活化分子或调节分子，例如，配体、激动剂、拮抗剂、及其同系物和模拟物。术语“调节剂”包括抑制剂和活化剂。抑制剂是，例如，抑制所述靶蛋白表达或与之结合，部分或全部阻断刺激或蛋白酶抑制剂活性，降低、防止、延迟活化，失活，脱敏，或下调所述靶蛋白活性的试剂，例如拮抗剂。活化剂是例如，诱导或活化所述靶蛋白表达或与之结合，刺激、增加、开放、活化、促进、增强活化或蛋白酶抑制剂活性，致敏或上调所述靶蛋白（或编码多核苷酸）的活性，例如，激动剂。

调节剂包括天然存在的和合成的配体，拮抗剂和激动剂（例如，起激动剂或拮抗剂功能的小化学分子、抗体等）。所述关于抑制剂和活化剂的测定包括，例如，将推定的调节剂化合物应用到表达所述靶蛋白的细胞，然后确定对所述靶蛋白活性的功能性作用，如上所述。将用潜在的活化剂、抑制剂、或调节剂处理的包括所述靶蛋白的样品或测定与无抑制剂、活化剂、或调节剂的对照样品进行比较，以检验作用程度。对照样品（未用调节剂处理）被赋予 100％的相对活性值。当活性值相对于对照为约 80％，任选 50％或 25，10％，5％或 1％时，实现所述靶蛋白的抑制。当活性值相对于对照为约 110％，任选 150％，任选 200，300％，400％，500％，或 1000-3000％或更高时，实现所述靶蛋白的活化。

[0078] “Oct 多肽”指 Octomer 转录因子家族的任一天然存在成员，或其保留与最接近的相关天然存在家族成员相类似的转录因子活性（在至少 50％，80％，或 90％活性之内）的变体，或至少包括天然存在家族成员的 DNA 结合结构域的多肽，并且可以进一步包括转录活化结构域。示范性 Oct 多肽包括，例如，Oct-1，Oct-2，Oct-3/4，Oct-6，Oct-7，Oct-8，Oct-9，和 Oct-11。Oct3/4（本文中称为″ Oct4″），其包含 POU 结构域，其为在 Pit-1，Oct-1，Oct-2，和 uric-86 之间保守的 150 个氨基酸序列。参见 Ryan，A.K.& Rosenfeld，M.G.Genes Dev.（基因发育）11，1207-1225(1997)。在一些实施方案中，与天然存在 Oct 多肽家族成员诸如与以上列出的那些或诸如 Genbank 登记号 NP_002692.2（人 Oct4）或 NP_038661.1（小鼠 Oct4）列出的那些相比，变体在其整个序列上具有至少 85％、90％或 95％的氨基酸序列同一性。Oct 多肽（例如，Oct3/4）可以来自于人、小鼠、大鼠、牛、猪、或其它动物。一般地，将使用与所操作的细胞物种为相同物种的蛋白。

[0079] “Klf 多肽”指 Krüppel 样因子（Klfs）家族的任一天然存在成员，含有与果蝇（Drosophila）胚胎模式调控子 Krüppel 类似的氨基酸序列的锌指蛋白，或保留与最接近相关的天然存在家族成员相类似的转录因子活性（在至少 50％，80％，或 90％活性之内）的天然存在的成员的变体，或至少包括天然存在家族成员的 DNA 结合结构域的多肽，并且可以进一步包括转录活化结构域。参见，Dang，D.T，Pevsner，J.& Yang，V.W..Cell Biol.（细胞生物学）32，1103-1121(2000)。示范性 Klf 家族成员包括，Klf1，Klf2，Klf3，Klf-4，Klf5，Klf6，Klf7，Klf8，Klf9，Klf10，Klf11，Klf12，Klf13，Klf14，Klf15，Klf16，和 Klf17。发现 Klf2 和 Klf-4 是能够在小鼠中产生 iPS 细胞的因子，并且相关的基因 Klf1 和 Klf5 也能够在小鼠中产生 iPS 细胞，虽然效率降低。参见，Nakagawa，等，Nature Biotechnology（自然生物技术）26：101-106(2007)。在一些实施方案中，与天然存在 Klf 多肽家族成员诸如与以上列出的那些或诸如 Genbank 登记号 CAX16088（小鼠 Klf4）或 CAX14962（人 Klf4）列出的那些相比，变体在其整个序列上具有至少 85％、90％或 95％的氨基酸序列同一性。Klf 多肽（例如，Klff1，Klf4，和 Klf5）可以来自于人、小鼠、大鼠、牛、猪、或其它动物。一般地，将使用与所操作的细胞物种为相同物种的蛋白。就本文中描述的 KLF 多肽而言，其可以用雌激素－相关受体 β（Essrb）多肽替换。因此，意欲对于本文中所述的各种 Klf 多肽实施方案同等地描述使用 Essrb 替代 Klf4 多肽的相应的实施方案。

[0080] “Myc 多肽”指 Myc 家族的任一天然存在成员（参见，例如 Adhikary，S.& Eilers，M.Nat.Rev.Mol Cell Biol.（自然分子细胞生物学综述）6：635-645(2005)），或其保留与最接近相关的天然存在家族成员相类似的转录因子活性（在至少 50％，80％，或 90％活性之内）的变体，或至少包括天然存在家族成员的 DNA 结合结构域的多肽，并且可以进一步包括

转录活化结构域。示范性 Myc 多肽包括，例如，c-Myc，N-Myc 和 L-Myc。在一些实施方案中，与天然存在 Myc 多肽家族成员诸如与以上列出的那些或诸如 Genbank 登记号 CAA25015（人 Myc）列出的那些相比，变体在其整个序列上具有至少 85％、90％或 95％的氨基酸序列同一性。Myc 多肽（例如，c-Myc）可以来自于人、小鼠、大鼠、牛、猪、或其它动物。一般地，将使用与所操作的细胞物种为相同物种的蛋白。

[0081] “Sox 多肽”指 SRY- 相关的 HMG-box(Sox) 转录因子的任一天然存在成员，其特征在于存在高运动基团 (high-mobility group)(HMG) 结构域，或其保留与最接近相关的天然存在家族成员相类似的转录因子活性（在至少 50％，80％，或 90％活性之内）的变体，或至少包括天然存在家族成员的 DNA 结合结构域的多肽，并且可以进一步包括转录活化结构域。参见，例如，Dang，D.T.，等 Int.J.Biochem.Cell Biol.（国际生物化学细胞生物学杂志）32：1103-1121(2000)。示范性 Sox 多肽包括，例如，Sox1，Sox-2，Sox3，Sox4，Sox5，Sox6，Sox7，Sox8，Sox9，Sox10，Sox11，Sox12，Sox13，Sox14，Sox15，Sox17，Sox18，Sox-21，和 Sox30。已经表明 Sox1 以与 Sox2 相似的效率产生 iPS 细胞，并且还已经表明基因 Sox3，Sox15 和 Sox18 也产生 iPS 细胞，虽然其效率略低于 Sox2。参见，Nakagawa，等，Nature Biotechnology（自然生物技术）26：101-106(2007)。在一些实施方案中，与天然存在 Sox 多肽家族成员诸如与以上列出的那些或诸如 Genbank 登记号 CAA83435（人 Sox2）列出的那些相比，变体在其整个序列上具有至少 85％、90％或 95％的氨基酸序列同一性。Sox 多肽（例如，Sox1，Sox2，Sox3，Sox15，或 Sox18）可以来自于人、小鼠、大鼠、牛、猪、或其它动物。一般地，将使用与所操作的细胞物种为相同物种的蛋白。

[0082] 发明详述

[0083] I. 介绍

[0084] 本发明基于意外的发现，即，ALK5 抑制剂显著提高细胞的保持，且任选地在细胞中诱导多能性。组合 ALK5 抑制剂和 MAPK 抑制剂（例如，MEK 抑制剂，Erk 抑制剂或 p38 抑制剂）或组合 ALK5 抑制剂与 FGF 途径抑制剂（例如，FGF 受体抑制剂）允许：

[0085] 以新的功能特征保持细胞的多能性，所述新的功能特征在下文中定义，并且显著不同于常规的人胚胎干细胞或先前所述的诱导的多能干细胞（例如，在美国专利号 5,843；6,200,806；和 7,029,913 中），并且更类似于 mESC 特征；和

[0086] 例如，与先前已知的保持多能性的方法（例如，包括 GSK3 和 MEK 抑制剂 - 参见 WO2008/015418）相比，极大地提高细胞的效率和稳定性。实际上，令人惊讶的是，ALK5 的抑制剂有效地部分提高多能性的保持，因为本领域目前集中在激动而不是拮抗 TGFβ 途径从而刺激多能性。参见，例如，WO 2008/056173。

[0087] 本发明部分提供细胞培养物，其包含 ALK5 抑制剂（或其它 TGFβ / 激活蛋白途径抑制剂）和 MAPK 抑制剂或 FGF 信号传导途径抑制剂，任选地包含哺乳动物细胞，所述哺乳动物细胞在存在所述抑制剂的条件下已经是多能性的或将是多能性的或已经被诱导为多能性的。任选地，所述细胞培养物还可以包括 GSK3β 抑制剂和 / 或白血病抑制因子 (LIF)。其它培养基成分和条件可以是本领域通常已知的且包括，例如，基本培养基成分，维生素，矿物质等。

[0088] 保持细胞为多能性的能力允许以另外将是不可能的多种方式研究和使用所述细胞。例如，多种多能干细胞在培养中迅速分化或死亡，并且因此不允许进行筛选测定、遗传

改造、和其它需要或便利地保持多能性某段时间或经过多次细胞传代（例如，细胞分裂）的应用。本发明允许人们克服这样的问题。

[0089] II. 培养物

[0090] 提供细胞培养物，其包括 ALK5 抑制剂（或其它 TGFβ / 激动蛋白途径抑制剂），任选地具有 MAPK（例如，MEK 或 Erk 或 p38 抑制剂）或 FGF 信号传导抑制剂（例如，FGF 受体抑制剂），从而诱导或保持哺乳动物细胞的多能性。在一些实施方案中，用所述抑制剂培养的细胞具有在实施例中所述的特征，包括但不限于，在培养物中形成圆顶群落，表达 ESC 标记（例如，Oct4，Sox2，和 Nanog），具有几乎完全的 Oct4 启动子去甲基化，表达 Rex-1 和 ALP（例如，在植入后阶段的上胚层和 EpiSCs 中不存在的 ESCs 和早期上胚层标记），在体外分化为内胚层、神经外胚层、和中胚层的能力以及体内多能性特征，诸如形成畸胎瘤（例如，在 SCID 小鼠中）的能力，并且对于非人细胞，当注射到胚泡中并且植入到接受体子宫内时，形成嵌合体后代的能力。此外，在一些实施方案中，培养中的细胞在相同的培养条件中时保持所述特征持续多次细胞传代，例如，至少 1，2，3，4，5，7，10，20，30，或更多代。

[0091] 所述细胞培养物可以任选地还包括 GSk3β 抑制剂和 LIF 中的一种或两种。如在实施例中所解释的，在一些实施方案中，存在 LIF 可以提高多能细胞的长期保持（例如，超过 10 代），并且因此充足量的 LIF 可以包含在培养物中，从而允许长期保持多能性。此外，有或无 LIF，还可以包括充足量的 GSK3β 抑制剂。在一些实施方案中，GSK3β 抑制剂的量足以提高培养效率，即，提高所形成的阳性多能群落的数量。

[0092] 每种抑制剂的量可以不同，并且可以取决于精确的培养条件、所用的具体抑制剂、和培养的细胞类型，为最佳优点而确定。在一些实施方案中，本发明的培养物包括 0.05-10μM，例如，0.1-1μM，例如，0.5μM 的 ALK5 抑制剂（例如，A-83-01，和 0.1 ～ 20μM，例如，2 ～ 10μM SB431542）。本发明人已经发现 TGF-βRI 激酶抑制剂 II[2-(3-(6- 甲基吡啶 -2- 基)-1H- 吡唑 -4- 基)-1,5- 二氮杂萘] 可以用作 ALK5 抑制剂，如本文所述，例如以约 1.5μM 的浓度使用。因此，在一些实施方案中，本发明的培养物包括 0.05-20μM，例如，0.1-10μM 的 TGF-βRI 激酶抑制剂 II。在一些实施方案中，本发明的培养物包括 10nM-5μM，例如，50nM-1μM 的 FGF 途径抑制剂（例如，PD173074）。在一些实施方案中，本发明的培养物包括 0.05-50μM，例如，0.1-5μM，例如，0.5μM 的 MEK 抑制剂（例如，PD0325901）。在一些实施方案中，本发明的培养物包括 0.05-20μM，例如，0.5-5μM，例如，3μM 的 GSK3β 抑制剂（例如，CHIR99021）。

[0093] TGFβ 受体（例如，ALK5）抑制剂可以包括抗体，其显性阴性变体和靶向 TGFβ 受体（例如，ALK5）的反义核酸。示例性的 TGFβ 受体 /ALK5 抑制剂包括，但不限于，SB431542（参见，例如，Inman，等，Molecular Pharmacology（分子药理学）62(1)：65-74(2002)），A-83-01，也已知为 3-(6- 甲基 -2- 吡啶基)-N- 苯基 -4-(4- 喹啉基)-1H- 吡唑 -1- 硫代酰胺（参见，例如，Tojo，等，Cancer Science（癌症科学）96(11)：791-800(2005)，并且例如可从 Toicris Bioscience(Toicris 生物科学）商购获得）；TGF-βRI 激酶抑制剂 II[2-(3-(6- 甲基吡啶 -2- 基)-1H- 吡唑 -4- 基)-1,5- 二氮杂萘];2-(3-(6- 甲基吡啶 -2- 基)-1H- 吡唑 -4- 基)-1,5- 二氮杂萘，Wnt3a/BIO（参见，例如，Dalton，等，WO2008/094597，通过引用结合于此），BMP4（参见，Dalton，同前所述），GW788388(-{4-[3-(吡啶 -2- 基)-1H- 吡唑 -4- 基] 吡啶 -2- 基 }N-(四氢 -2H- 吡

喃-4-基)苯甲酰胺)(参见,例如,Gellibert,等,Journal of Medicinal Chemistry(医学化学杂志)49(7):2210-2221(2006)),SM16(参见,例如,Suzuki,等,Cancer Research(癌症研究)67(5):2351-2359(2007)),IN-1130(3-((5-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(喹喔啉-6-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)苯甲酰胺)(参见,例如,Kim,等,Xenobiotica 38(3):325-339(2008)),GW6604(2-苯基-4-(3-吡啶-2-基-1H-吡唑-4-基)吡啶)(参见,例如,de Gouville,等,Drug News Perspective(药物信息观点)19(2):85-90(2006)),SB-505124(2-(5-苯[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-2-叔-丁基-3H-咪唑-4-基)-6-甲基吡啶氢氯化物)(参见,例如,DaCosta,等,Molecular Pharmacology(分子药理学)65(3):744-752(2004))和嘧啶衍生物(参见,例如,在Stiefl,等,WO2008/006583中列出的那些,通过引用结合于此)。不意欲限制本发明的范围,据信ALK5抑制剂影响间质向上皮的转化/转变(MET)过程。TGFβ/激活蛋白途径是上皮向间质转变(EMT)的推动剂。因此,抑制TGFβ/激活蛋白途径可以促进MET(即,重编程)过程。

[0094] 考虑本文中显示抑制ALK5的作用的数据,据信TGFβ/激活蛋白途径的抑制将具有相似的作用。因此,TGFβ/激活蛋白途径的任何抑制剂(例如,上游或下游)可以与本文每段中所述的ALK5抑制剂组合使用或替代ALK5抑制剂使用。示例性的TGFβ/激活蛋白途径抑制剂包括,但不限于:TGFβ受体抑制剂,SMAD 2/3磷酸化抑制剂,SMAD 2/3和SMAD 4相互作用抑制剂,以及SMAD 6和SMAD 7的激活剂/激动剂。此外,下文所述的分类仅是为了组织目的,并且本领域技术人员已知化合物可以影响途径中的一点或多点,并且因此化合物可以在多于一种所定义的分类中起作用。

[0095] TGFβ受体抑制剂可以包括抗体,其显性阴性变体和靶向TGFβ受体的反义核酸。抑制剂的具体实例包括但不限于,SU5416;2-(5-苯[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-2-叔-丁基-3H-咪唑基-4-基)-6-甲基吡啶氢氯化物(SB-505124);乐地单抗(lerdelimumb)(CAT-152);美替木单抗(metelimumab)(CAT-192);GC-1008;ID11;AP-12009;AP-11014;LY550410;LY580276;LY364947;LY2109761;SB-505124;SB-431542;SD-208;SM16;NPC-30345;Ki26894;SB-203580;SD-093;格列卫(Gleevec);3,5,7,2′,4′-五羟黄酮(3,5,7,2′,4′-pentahydroxyflavone)(桑色素(Morin));激活蛋白-M108A;P144;可溶TBR2-Fc;和靶向TGFβ受体的反义转染的肿瘤细胞。(参见,例如,Wrzesinski,等,Clinical Cancer Research(临床癌症研究)13(18):5262-5270(2007);Kaminska,等,Acta Biochimica Polonica 52(2):329-337(2005);和Chang,等,Frontiers in Bioscience(生物科学前沿)12:4393-4401(2007))。

[0096] SMAD 2/3磷酸化的抑制剂可以包括抗体,其显性阴性变体和靶向SMAD2或SMAD3的反义核酸。抑制剂的具体实例包括PD169316;SB203580;SB-431542;LY364947;A77-01;和3,5,7,2′,4′-五羟黄酮(桑色素(Morin))。(参见,例如,Wrzesinski,同前所述;Kaminska,同前所述;Shimanuki,等,Oncogene(癌基因)26:3311-3320(2007);和Kataoka,等,EP1992360,通过引用结合于此。)

[0097] SMAD 2/3和smad4相互作用的抑制剂可以包括抗体,其显性阴性变体和靶向SMAD2,SMAD3和/或smad4的反义核酸。SMAD 2/3和SMAD4相互作用抑制剂的具体实例包括但不限于,Trx-SARA,Trx-xFoxH1b和Trx-Lef1.(参见,例如,Cui,等,Oncogene(癌基因)24:3864-3874(2005)和Zhao,等,Molecular Biology of the Cell(分子分子生物

学),17:3819-3831(2006))。

[0098] MEK的抑制剂可以包括抗体,其显性阴性变体和靶标MEK的反义核酸。MEK抑制剂的具体实例包括,但不限于,PD0325901,(参见,例如,Rinehart,等,Journal of Clinical Oncology(临床肿瘤学杂志)22:4456-4462(2004)),PD98059(例如,可从Cell Signaling Technology(细胞信号传导技术)获得),U0126(例如,可从Cell Signaling Technology(细胞信号传导技术)获得),SL 327(例如,可从Sigma-Aldrich (西格玛-奥地里奇)获得),ARRY-162(例如,可从Array Biopharma获得),PD184161(参见,例如Klein,等,Neoplasia(瘤形成)8:1-8(2006)),PD184352(CI-1040)(参见,例如,Mattingly,等,The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics(药理学和实验治疗学杂志)316:456-465(2006)),舒尼替尼(sunitinib)(参见,例如,Voss,等,US2008004287,其通过引用并入本文),索拉非尼(sorafenib)(参见,Voss同前所述),凡德他尼(Vandetanib)(参见,Voss同前所述),帕唑帕尼(pazopanib)(参见,例如,Voss同前所述),阿昔替尼(Axitinib)(参见,Voss同前所述)和PTK787(参见,Voss同前所述)。

[0099] 目前,一些MEK抑制剂正在进行临床实验评估。CI-1040已经在I期和II期癌症临床实验中进行评估(参见,例如,Rinehart,等,Journal of Clinical Oncology(临床肿瘤学杂志)22(22):4456-4462(2004))。临床实验中评估的其它MEK抑制剂包括PD184352(参见,例如,English,等,Trends in Pharmaceutical Sciences(制药科学趋势)23(1):40-45(2002)),BAY 43-9006(参见,例如,Chow,等,Cytometry(血细胞计数)(Communications in Clinical Cytometry(临床血细胞技术通讯))46:72-78(2001)),PD-325901(也为PD0325901),GSK1120212,ARRY-438162,RDEA119,AZD6244(也为ARRY-142886或ARRY-886),RO5126766,XL518和AZD8330(也为ARRY-704)。(参见,例如,来自全国卫生研究所(National Institutes of Health)位于万维网www.clinicaltrials.gov的信息以及来自全国癌症研究所(Nation Cancer Institute)位于万维网www.cancer.gov/clinicaltrials的信息。

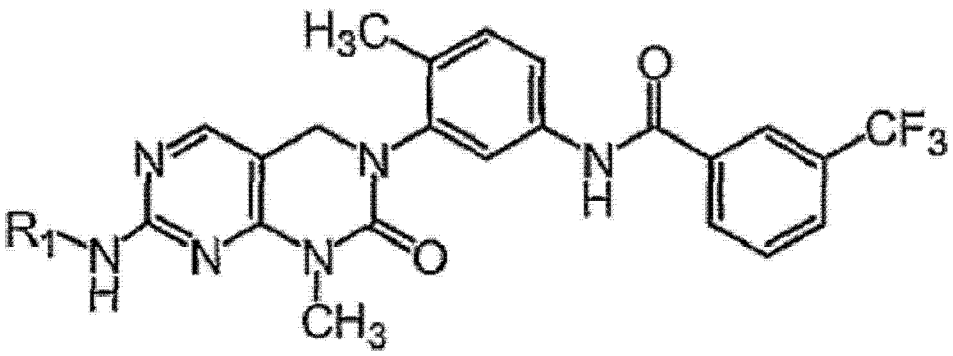
[0100] p38(还已知为CSBP,mHOG1,RK和SAPK2)抑制剂可以包括抗体,其显性阴性变体和靶向p38的反义核酸。抑制剂的具体实例包括但不限于SB203580(4-(4-氟苯基)-2-(4-甲基亚磺酰苯基)-5-(4-吡啶基)1H-咪唑);SB202190(4-(4-氟苯基)-2-(4-羟苯基)-5(4-吡啶基)-1H-咪唑);SB 220025;N-(3-叔-丁基-1-甲基-5-吡唑基)-N′-(4-(4-吡啶基甲基)苯基)脲;RPR 200765A;UX-745;UX-702;UX-850;SC10-469;RWJ-67657(RW Johnson Pharmaceutical Research Institute(RW约翰逊制药研究所));RDP-58(SangStat Medical Corp.(SangStat医药公司);由Genzyme Corp.(Genzyme公司)获得);Scios-323(SCIO 323;Scios Inc.(Scios公司));Scios-469(SCIO-469;Scios Inc.(Scios公司));MKK3/MKK6抑制剂(Signal Research Division(信号研究部门));p38/MEK调节剂(Signal Research Division(信号研究部门));SB-210313类似物;SB-238039;HEP-689(SB 235699);SB-239063;SB-239065;SB-242235(SmithKline Beecham Pharmaceuticals(SmithKline Beecham制药));VX-702和VX-745(Vertex Pharmaceuticals Inc.(Vertex制药公司));AMG-548(Amgen Inc.(Amgen公司));Astex p38激酶抑制剂(Astex Technology Ltd.(Astex技术有限公司));RPR-200765类似物(Aventis SA);Bayer p38激酶抑制剂(Bayer Corp.(Bayer公司));

BIRB-796(Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc.(Boehringer Ingelheim 制药公司));Celltech p38 MAP 激酶抑制剂(Celltech Group plc.(Celltech 集团股票上市公司));FR-167653(Fujisawa Pharmaceutical Co.Ltd.(Fujisawa 制药有限公司));SB-681323 和 SB-281832(GlaxoSmithKline plc(GlaxoSmithKline 股票上市公司));LEO 制药 MAP 激酶抑制剂(LEO Pharma A/S);Merck Co.(默克公司)p38MAP 激酶抑制剂(Merck research Laboratories(默克研究实验室));SC-040 和 SC-XX906(Monsanto Co.(Monsanto 公司));腺苷 A3 拮抗剂(Novartis AG);p38 MAP 激酶抑制剂(Novartis Pharma AG);CNI-1493(Picower Institute for Medical Research(Picower 医药研究所));RPR-200765A(Rhone-Poulenc Rorer Ltd.(Rhone-Poulenc Rorer 有限公司));和 Roche p38 MAP 激酶抑制剂(例如,RO3201195 和 RO4402257;Roche Bioscience(罗氏生物科学))。参见,例如,Roux,等,Microbiology and Molecular Biology Reviews(微生物和分子生物学综述)68(2):320-344(2004);Engelman,等,Journal of Biological Chemistry(生物化学杂志)273(48):32111-32120(1998);Jackson,等,Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics(药理学和实验治疗学杂志)284(2):687-692(1998);Kramer,等,Journal of Biological Chemistry(生物化学杂志)271(44):27723-27729(1996);和 Menko,等,US20080193504。

[0101] 另外的 p38 抑制剂包括但不限于,1,5- 二芳基 - 取代的吡唑和取代的吡唑化合物(US6509361 和 US6335336);取代的吡啶基化合物(US20030139462);喹唑啉衍生物(US6541477,US6184226,US6509363 和 US6635644);芳基脲和杂芳基类似物(US6344476);杂环脲(WO1999/32110);其它脲化合物(WO1999/32463,WO1998/52558,WO1999/00357 和 WO1999/58502);以及取代的咪唑化合物和取代的三唑化合物(US6560871 和 US6599910)。

[0102] Erk 抑制剂可以包括抗体,其显性阴性变体和靶向 Erk 的反义核酸。Erk 抑制剂的具体实例包括但不限于 PD98059(参见,例如,Zhu,等,Oncogene(癌基因)23:4984-4992(2004)),U0126(参见,Zhu,同前所述),FR180204(参见,例如,Ohori,Drug News Perspective(药物信息观点)21(5):245-250(2008)),舒尼替尼(参见,例如,Ma,等,US2008004287,其通过引用结合于此),索拉非尼(参见,Ma,同前所述),凡德他尼(参见,Ma,同前所述),帕唑帕尼(参见,Ma,同前所述),阿昔替尼(参见,Ma,同前所述)和 PTK787(参见,Ma,同前所述)。Erk 抑制剂可以包括仅抑制 Erk 的分子或还抑制第二靶标的分子。例如,在一些实施方案中,所述 Erk 抑制剂是:

[0103]



[0104] 其中:

[0105] R_1 选自氢,C_{1-6} 烷基,C_{2-6} 烯基,C_{6-10} 芳基 -C_{0-4} 烷基,C_{5-10} 杂芳基 -$_{0-4}$ 烷基,C_{3-10} 环

烷基 $-C_{0-4}$ 烷基和 C_{3-10} 杂环烷基 $-C_{0-4}$ 烷基；其中 R_1 的任何烷基或烯基任选地被 1-3 个独立选自卤、羟基、C_{1-6} 烷基和 $-NR_2R_3$ 的基团取代；其中 R_1 的任意芳基、杂芳基、环烷基或杂环烷基任选地被 1-3 个选自下述的基团取代：卤、羟基、氰基、C_{1-6} 烷基、C_{1-6} 烷氧基，C_{2-6} 烯基，卤代 - 取代的 - 烷基，卤代 - 取代的 - 烷氧基，$-XNR_2R_3$，$-XOXNR_2R_3$，$-XNR_2S(O)_{0-2}R_3$，$-XC(O)NR_2R_3$，$-XNR_2C(O)XOR_2$，$-XNR_2C(O)NR_2R_3$，$-XNR_2XNR_2R_3$，$-XC(O)NR_2XNR_2R_3$，$-XNR_2XOR_2$，$-XOR_2$，$-XNR_2C(=NR2)NR_2R_3$，$-XS(O)_{0-2}R_4$，$-XNR_2C(O)R_2$，$-XNR_2C(O)XNR_2R_3$，$-XNR_2C(O)R_4$，$-XC(O)R_4$，$-XR_4$，$-XC(O)OR_3$ 和 $-XS(O)_{0-2}NR_2R_3$；其中 X 是键或 C_{1-4} 亚烷基；R_2 和 R_3 独立选自氢，C_{1-6} 烷基和 C_{3-12} 环烷基；并且 R_4 是任选地用 1-3 个选自下述的基团取代的 C_{3-10} 杂环烷基 (heterocycloallcyl)：C_{1-6} 烷基，$-XNR_2R_3$，$-XNR_2XNR_2R_2$，XNR_2XOR_2 和 $-XOR_2$；其中 X，R_2 和 R_3 如上文所述；并且 N- 氧化物衍生物，前体药物衍生物，保护的衍生物，个体异构体及其异构体混合物；以及所述化合物的药用盐和溶剂化物（例如水合物）或另外如 WO 06/135824 中所述。

[0106] FGF 信号传导途径的抑制剂包括，但不限于，FGF 受体抑制剂。FGF 受体 (FGFR) 抑制剂可以包括抗体，其显性阴性变体和靶向 FGFR 的反义核酸。FGFR 抑制剂的具体实例包括，但不限于，SU6668（参见，例如，Klenke，BMC Cancer(BMC 癌症)7：49(2007))，SU5402(3-[3-(2- 羧乙基)-4- 甲基吡咯 -2- 次甲基 (methylideny1)]-2- 吲哚满酮）和 PD173074（参见，例如，Bansal，等，J.Neuro.Res.（神经学研究杂志）74(4)：486-493(2003))。

[0107] GSK3 的抑制剂包括抗体、其显性阴性变体、和靶向 GSK3 的反义核酸。GSK3 抑制剂的具体实例包括，但不限于，CHIR99021，CHIR98014，AR-A014418（参见，例如，Gould，等，The International Journal of Neuropsychopharmacology（国际神经心理病理学杂志）7：387-390(2004))，CT 99021（参见，例如，Wagman，Current Pharmaceutical Design（当前药物设计）10：1105-1137(2004))，CT 20026（参见，Wagman，同前所述），SB216763（参见，例如，Martin，等，Nature Immunology（自然免疫学）6：777-784(2005))，AR-A014418（参见，例如，Noble，等，PNAS 102：6990-6995(2005))，锂（参见，例如，Gould，等，Pharmacological Research（药理学研究）48：49-53(2003))，SB 415286（参见，例如，Frame，等，Biochemical Journal（生物化学杂志）359：1-16(2001)) 和 TDZD-8（参见，例如，Chin，等，Molecular Brain Research（分子脑研究），137(1-2)：193-201(2005))。其他可获自 Calbiochem 的示例性 GSK3 抑制剂（参见，例如，Dalton，等，WO2008/094597，其通过引用并入本文），包括但不限于 BIO(2′ Z,3′ £)-6- 溴靛玉红 -3′ - 肟 (GSK3 抑制剂 IX)；BIO- 丙酮肟 (2′ Z,3′ E)-6- 溴靛玉红 -3′ - 丙酮肟 (GSK3 抑制剂 X)；(5- 甲基 -1H- 吡唑 -3- 基)-(2- 苯基喹唑啉 -4- 基）胺 (GSK3- 抑制 XIII)；吡啶并咔唑 - 环戊二烯合钌复合物 (GSK3 抑制剂 XV)；TDZD-8 4- 苄基 -2- 甲基 -1,2,4- 噻二唑 -3,5- 二酮 (GSK3β 抑制剂 I)；2- 硫代 (3- 碘苄基)-5-(1- 吡啶基)-[1,3,4]- 噁二唑 (GSK3β 抑制剂 II)；OTDZT 2,4- 二苄基 -5- 氧代噻二唑 -3- 硫酮 (GSK3β 抑制剂 III)；α -4- 二溴乙酰苯 (GSK3β 抑制剂 VII)；AR-AO 14418 N-(4- 甲氧基苄基)N′ -(5- 硝基 -1,3- 噻唑 -2- 基）脲 (GSK-3β 抑制剂 VIII)；3-(1-(3- 羟丙基)-1H- 吡咯并 [2,3-b] 吡啶 -3- 基]-4- 吡嗪 -2- 基 - 吡咯 -2,5- 二酮 (GSK-3β 抑制剂 XI)；TWS1 19 吡咯并嘧啶化合物 (GSK3β 抑制剂 XII)；L803 H-KEAPPAPPQSpP-NH2 或其肉豆蔻酰化形式 (GSK3β 抑制剂 XIII)；2- 氯 -1-(4,5- 二溴 - 噻

吩 -2- 基)- 乙酮 (GSK3β 抑制剂 VI) ;AR-AO144-18 ;SB216763 ;和 SB415286。已经鉴定了与抑制剂相互作用的 GSK3b 残基。参见,例如,Bertrand 等,J.Mol Biol.(分子生物学杂志)333(2) :393-407(2003)。

[0108] 当本文描述特定基因产物的抑制剂时,应该理解,所述抑制剂可以用靶向编码所述基因产物的基因的 siRNA 替代。例如,本发明提供抑制 ALK5 表达的 siRNA 替代 ALK5 抑制剂的应用。类似地,MEK 抑制剂,Erk 抑制剂,p38 抑制剂,FGF 受体抑制剂和 GSK3β 抑制剂可以分别用 MEK siRNA,Erk siRNA,p38 siRNA,FGF 受体 siRNA 和 GSK3β siRNA 替代。此外,抑制性抗体 (例如,人源化的或嵌合抗体) 可以用作 ALK5,MEK,Erk,p38,FGF 受体,和 GSK3β 的抑制剂。

[0109] 在一些实施方案中,细胞先用外遗传修饰剂培养,然后通过缺少所述修饰剂但是包括本文所述的抑制剂 (例如,AKL5 抑制剂,MEK 抑制剂,Erk 抑制剂,p38 抑制剂,FGF 受体抑制剂和 GSK3β 抑制剂,白血病抑制因子 (LIF),等) 的培养步骤培养。示例性的外遗传调节剂包括组蛋白 H3K4 去甲基化的抑制剂或 H3K4 甲基化的激活剂。示例性的外遗传修饰剂 (epigenetic modifier) 包括,例如,组蛋白去甲基酶抑制剂,诸如 LSD1 抑制剂 (例如,硫酸反苯环丙胺) 或 MAO 抑制剂。

[0110] 术语“组蛋白脱乙酰酶抑制剂”,“组蛋白脱乙酰酶的抑制剂”和“HDAC 抑制剂”指能够与组蛋白脱乙酰酶相互作用并且抑制其酶活性的化合物。“抑制组蛋白脱乙酰酶的酶活性”意指减少组蛋白脱乙酰酶去除组蛋白上的乙酰基的能力。在一些实施方案中,所述组蛋白脱乙酰酶活性的减少为至少约 50%,更优选至少约 75%,并且更优选至少约 90%。在其它优选的实施方案中,组蛋白脱乙酰酶活性减少至少 95%,且更优选减少至少 99%。

[0111] 一些代表性的 HDAC 抑制剂包括丁酸,MS-27-275,SAHA,曲古抑菌素 A(Trichostatin A),apicidin,oxanflatin,FK228,和 trapoxin。这些抑制剂可以基于其结构分成几组,包括短链脂肪酸 (丁酸酯和丙戊酸),异羟肟酸 (曲古抑菌素 A 和 SAHA),环四肽 (缩酚酸肽 (depsipeptide)),本甲酰胺 (MS-27-275),和含有环氧化物的试剂 (trapoxin)。除 trapoxin 外,它们中的大部分以可逆方式抑制 HDACs,所述 trapoxin 具有能够不可逆地烷基化 HDACs 的环氧化物基团。可逆抑制剂通常具有包含亲核末端的长的脂肪尾,诸如 -SH 或 -OH,其与位于 HDAC 结合口袋底部的活性锌中心相互作用。基于所示结构的修饰,产生其它 HDAC 抑制剂。大部分的新试剂是异羟肟酸的衍生物,包括曲古抑菌素 A(TSA) 和硫 / 磷 - 基 SAHA 的酰胺类似物。用氨磺酰取代 MS-27-275 结构中的酰胺键导致发现新种类的有效 HDAC 抑制剂。已经进入临床试验的有希望的 HDAC 抑制剂包括异羟肟酸衍生物 LAQ824,丁酸衍生物 Titan,丙戊酸,MS-27-275,SAHA,和缩酚酸肽 FK228。

[0112] 组蛋白去甲基酶抑制剂包括赖氨酸 - 特异性去甲基酶 I(LSD1 ;也已知为赖氨酸 - 特异性组蛋白去甲基酶,BHC110 和 KIAA0601) 的抑制剂。国际专利申请号 WO 2006/071608 涉及监测真核组蛋白去甲基酶活性的方法,上调和下调甲基化的组蛋白 - 活化基因的方法,和通过调节蛋白水平或组蛋白去甲基酶活性而治疗或预防疾病 (例如,过量增殖性疾病,诸如癌症) 的方法。考虑到基因调控的重要性,和通过抑制或调节 LSD1 而影响基因调控的能力,该酶的抑制剂可能具有显著的治疗潜力 ;Bi,X. 等,Bioorg.Med. Chem.Lett.(医学化学通信)16 :3229-3232(2006) 和国际专利申请号 WO2007/021839 与 WO2008/127734 记述了某些有效用作 LSD1 抑制剂的化合物。

[0113] 本发明还提供用于保持细胞多能性的培养基。所述细胞培养基任选地不包括细胞。所述培养基可以包括上述培养基内容物，虽然具有细胞。所述培养基用于培养本文所述的细胞。

[0114] 如本文其它地方提供的，培养中的细胞可以选自胚胎干细胞（例如，灵长类动物胚胎干细胞，大鼠胚胎干细胞，或来自其它动物的胚胎干细胞，任选非－小鼠胚胎干细胞）。备选地，所述细胞包括诱导的多能干细胞(iPSCs)。在一些实施方案中，所述 iPSCs 来自人、灵长类动物、大鼠、或小鼠、或其它非－小鼠动物。所述 iPSCs 可以由最近处于早先细胞分裂中的非多能细胞产生，或者备选地，所述细胞可以已经预先作为 iPSCs 保持 1,2,3,4,5,7,10,20，或更多次细胞分裂或传代。换言之，所述细胞培养物可以包含预先（例如，一周，一月，或更早）产生的 iPSCs。本文提供的小分子组合的一个优点在于，除了它们在重编程中的应用之外并且与它们在重编程中的应用不同，它们允许保持理想的多能性似乎无限期的时间阶段。

[0115] 本发明提供在具有一种或多种本文所述的抑制剂的混合物中的多能细胞。在一些实施方案中，所述化合物在混合物中的浓度足以诱导多能性或提高诱导多能性的效率。例如，在一些实施方案中，所述化合物的浓度为至少 0.1nM，例如，至少 1,10,100,1000,10000，或 100000nM，例如，0.1nM-100000nM 之间，例如，1nM-10000nM 之间，例如，10nM-10000nM 之间，0.01μM-5μM 之间，0.1μM-5μM 之间。例如，A-83-01 可以以约 0.1μM-约 0.5μM，例如，0.25μM-约 0.5μM 的浓度使用。在一些实施方案中，A-83-01 的浓度为 0.25μM。在一些实施方案中，A-83-01 的浓度为 0.5μM。CHIR99021 可以以约 3μM 的浓度使用。PD325901 可以以约 0.5μM 的浓度使用。PD173074 可以以约 0.1μM 的浓度使用。在一些实施方案中，所述混合物可以存在于合成的容器（例如，检测管、培养皿等）中。因此，在一些实施方案中，所述细胞是分离的细胞（不是动物的一部分）。在一些实施方案中，所述细胞由动物（人或非人）分离，置于容器中，接触一种或多种本文所述的化合物。可以随后培养所述细胞，并且任选地，将其放回到相同的或不同的动物中，任选地在已经刺激所述细胞变成特定的细胞类型或品系之后。

[0116] 在一些实施方案中，所述细胞包括用于异源表达 Oct 多肽、Myc 多肽、Sox 多肽和 Klf 多肽中的至少一种或多种的表达盒。在一些实施方案中，所述细胞不包括表达 Oct，Myc，Sox 或 Klf 多肽的任一种的表达盒。具有或不具有所述表达盒的细胞是有用的，例如，用于本文所述的筛选方法。

[0117] III. 细胞

[0118] 细胞可以在与本发明的抑制剂初始接触之前是多能性的，或者所述细胞可以与本发明的一种或多种抑制剂接触，然后被诱导成多能性的（例如，通过引入适当的转录因子和／或通过与适当的小分子接触从而诱导多能性）。

[0119] 任何动物细胞可以用于本发明的方法。因此，例如，在一些实施方案中，所述细胞是哺乳动物细胞。示例性的哺乳动物细胞包括，但不限于，人细胞或非人细胞，包括但不限于，大鼠、小鼠（例如，SCID 或其它小鼠）、猪、牛、绵羊、狗、猫、和灵长类动物（例如，恒河猴、黑猩猩等）。

[0120] 按照本发明的方法使用的多能细胞可以是天然存在的干细胞或可以是诱导的多能细胞。示例性的天然存在的干细胞包括，例如，胚胎干细胞。分离配体干细胞的方法

是公知的。参见，例如，Matsui 等，Cell（细胞）70 :841，1992 ;Thomson 等，美国专利号 5,843,780 ;Thomson 等，Science（科学）282 :114，1998 ;Shamblott 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA（美国国家科学院学报）95 :13726，1998 ;Shamblott 等，美国专利号 6,090,622 ;Reubinoff 等，Nat.Biotech.（自然生物技术）18 :399，2000 ;PCT WO00/27995，Iannaccone 等，Dev.Biol.（发育生物学）163 :288，1994 ;Loring 等，PCT WO99/27076，Pain 等，Development（发育）122 :2339，1996 ;美国专利号 5,340,740 ;美国专利号 5,656,479，Wheeler 等，Reprod.Fertil.Dev.（繁衍生殖和发育）6 :563，1994 ;Shim 等，Biol.Reprod.（生物繁衍）57 :1089，1997。在一些实施方案中，干细胞来源于胚泡（例如，由胚泡获得），其随后在存在至少 ALK5 抑制剂和 Erk 或 MEK 抑制剂，任选存在本文所述的其它抑制剂的条件下培养。

[0121] 现在已经报道了多种方法来诱导细胞中的多能性。例如，可以通过引入转录因子或另外诱导或模拟某些转录因子的表达而诱导多能性。在一些实施方案中，一种或多种下述转录因子内源性表达或重组表达（例如，通过引入表达一种或多种转录因子的异源表达盒）。诱导多能性的示例性的技术包括，但不限于，引入至少一种或多种用来表达 Oct3/4，Sox2，c-Myc，和 Klf4 中的至少一种的表达盒（参见，例如，Takahashi，Cell（细胞）131(5) :861-872(2007) ;Cell Stem Cell（细胞干细胞）2,10-12(2008)），任选地使用一种或多种小分子，包括但不限于，抑制 H3K9 甲基化的试剂，例如，G9a 组蛋白甲基转移酶，诸如 BIX01294。参见，例如，Kubicek，等，Mol.Cell（分子细胞）473-481(2007)。

[0122] 本发明的多能细胞可以通过一些标准来表征。除了本文所述的基因表达、甲基化、和体外与体内特征之外，在存在白血病抑制因子 (LIF) 和骨形态发生蛋白 (BMP) 的条件下或者，备选地，在抑制 TGF β 和激活蛋白信号传导途径、抑制 MAPK 信号传导途径、和任选地抑制 FGF 途径的条件下，本发明的多能细胞将保持多能性至少一次（例如，1，2，3，4，5，10，20 次，等）细胞分裂。例如，如本文所述，与 ALK5 抑制剂和 MEK 抑制剂接触的动物细胞（例如，人和大鼠细胞）经历多次分裂保持多能性。此外，如本文所述，TGF β 和激活蛋白信号传导途径（例如，TGF β 信号传导）的抑制连同 MEK、FGFR 和 GSK3 的抑制具有强烈的重编程活性，并且可以促使 EpiSCs 向 mESC- 样状态的部分转化。相反，在常规条件下培养的常规的 hESCs、上胚层干细胞 (EpiSCs) 和人诱导的多能细胞在与 ALK5 的抑制剂接触时分化。参见，例如，Saha，等，Biophys.J.（生物物理学杂志）94 :4123-4133(2008)。已经报道在常规条件下培养的常规的 hESCs、EpiSCs 和人诱导的多能细胞似乎依赖于 MAPK，FGF，和 TGF β / 激活蛋白 /Nodal 途径活性进行自我 - 更新，并且在用 MEK，FGFR 和 / 或 ALK4/5/7 抑制剂处理时迅速分化 (Brons 等，Nature（自然）448，191-195，2007 ;Li 等，Differentiation（分化）75，299-307，2007 ;Peerani 等，EMBO J（胚胎学杂志）26，4744-4755，2007 ;Tesar 等，Nature（自然）448，196-199，2007)。另外，本发明人已经发现，本发明的细胞（例如，按实施例所述培养的人或大鼠细胞）在存在 FGF 信号传导途径的抑制剂（例如，PD173074) 时保持多能性（即，不分化）。相反，在常规条件下培养的 hESCs、EpiSCs 和人诱导的多能细胞在与 PD173074 接触时分化。显著地，mESCs 在与 PD173074 接触时不分化。因此，与常规培养的 hESCs、EpiSCs 和人诱导的多能细胞相比，本发明的细胞（例如，按本文所述培养）处于更类似于 mESCs 的状态。与 mESCs 相似，本发明的细胞具有更加致密、圆顶的群落形态，而常规培养的 hESCs、EpiSCs 和人诱导的多能细胞具有扁平的群落形态。如同 mESCs，本发

明的细胞具有在体外产生所有细胞类型的能力，并且当放回到胚泡中时，在体内形成完整的动物，包括种系。相反，常规培养的 hESCs、EpiSCs 和人诱导的多能细胞不能结合到内细胞团 (ICM) 中和形成嵌合体。应该理解，使用本文所述的方法，可以产生具有相似特征的除大鼠和人之外的其它动物细胞。示例性的其它动物细胞包括，例如，狗、猫、猪、牛、绵羊、山羊、猴和黑猩猩。

[0123] 特定的标记辅助区分本发明的细胞与常规培养的 hESCs、EpiSCs 和人诱导的多能细胞。例如，与它们在常规培养的 hESCs、EpiSCs 和人诱导的多能细胞中的表达水平相比，Stra8，Dppa3，Gbx2，Pecam1，和 Klf4 在本发明的人细胞中以更高的水平表达。相反，与它们在本发明的细胞中的表达水平相比，多种品系特异性基因，例如，Foxa2，Otx2，Lefty1，Gata6，Sox17，Cer1，在 episCs 和常规人 ES 细胞中以更高的水平表达。当用 MEK，FGFR 和 / 或 ALK4/5/7 抑制剂处理时，常规培养的人 iPSC 或 ESC 细胞分化 (Brons 等，Nature (自然) 448，191-195，2007 ；Li 等，Differentiation (分 化) 75，299-307，2007 ；Peerani 等，EMBO J (胚胎学杂志) 26，4744-4755，2007 ；Tesar 等，Nature (自然) 448，196-199，2007)。

[0124] 特别地，Gbx2，Dppa3 和 Klf4 是表征本发明的多能动物细胞的有用标记。这些标记在本发明的多能细胞中高度表达。例如，在一些实施方案中，本发明的细胞以它们在常规培养的 hESCs、EpiSCs 和人诱导的多能细胞 (例如，Hues9 细胞 (hES facility，哈佛大学 (Harvard University)，http://mcb.harvard.edu/melton/hues/)) 中的水平至少 2 倍的水平表达这些标记。在一些实施方案中，这些标记在本发明的多能细胞中的表达水平至少 2 倍、2.5 倍、3 倍、4 倍、5 倍或更高。其它有用的标记包括 ICM 标记 Rex1。

[0125] 在一些实施方案中，Gbx2 在本发明的多能细胞中以是在 Hues9 细胞中的水平至少 5 倍的水平表达。在一些实施方案中，Klf4 在本发明的多能细胞中以是在 Hues9 细胞中的水平至少 2.5 倍的水平表达。在一些实施方案中，Dppa3 在本发明的多能细胞中以是在 Hues9 细胞中的水平至少 2 倍的水平表达。

[0126] 对于本发明的多能细胞的另一种有用的标记是 E- 钙粘着蛋白。不意欲限制本发明的范围，据信 E- 钙粘着蛋白在本发明的多能细胞中起作用。在一些实施方案中，E- 钙粘着蛋白在本发明的多能细胞中以是在 Hues9 细胞中的水平 2 倍的水平表达。

[0127] 可以使用其它典型的多能标记来表征本发明的细胞，例如，Oct4，Sox2，Nanog，SSEA-1，SSEA-3，SSEA4，TRA-1-61，TRA-1-81，和碱性磷酸酶 (ALP)。这些典型的多能标记，或它们的子集，可以用于区分本发明的多能细胞与常规培养的 hESCs、EpiSCs 和人诱导的多能细胞。

[0128] 本领域已知的方法可以用来表征本发明的细胞。基因表达水平可以通过，例如，实时 PCR 或实时 RT-PCR (例如，以检测 mRNA)，和 / 或通过蛋白质印迹或其它蛋白检测技术来检测。

[0129] 在响应 BMP 处理时，本发明的多能细胞分化成中胚层。相反，常规培养的 hESCs、EpiSCs 和人诱导的多能细胞产生滋养层或原始内胚层细胞 (Brons 等，Nature (自然) 448，191-195，2007 ；D′ Amour 等，Nat Biotechnol (自然生物技术) 23，1534-1541，2005 ；Xu 等，Nat Biotechnol (自然生物技术) 20，1261-1264，2002)。

[0130] IV. 转化

[0131] 在需要转化的细胞的情形中 (例如，产生 iPSCs 或表达需要的蛋白或核酸)，与本

发明的抑制剂（例如，ALK5 抑制剂，MAPK 抑制剂，FGF 途径抑制剂，和任选的 GSK3β 抑制剂）相接触的细胞可以在接触之前转化和 / 或可以在接触之后转化。例如，本发明的一个优点在于，其允许保持多能细胞经历多次细胞传代并且因此允许对后代的操作和后续选择同时保持所述细胞的多能特征。这对于产生转基因动物，包括通过本文所述的序列 - 特异性重组事件产生敲除动物，是特别有用的。

[0132] 本发明依赖于重组遗传学领域中的常规技术。公开本发明中使用的一般方法的基础教科书包括 Sambrook 等 .Molecular Cloning, A Laboratory Manual（分子克隆，实验室手册）（第 3 版，2001）；Kriegler, Gene Transfer and Expression :A Laboratory Manual（基因转移和表达：实验室手册）(1990)；和 Current Protocols in Molecular Biology（现代分子生物学方法）(Ausubel 等，编，1994))。

[0133] 在一些实施方案中，在需要蛋白的阳性表达的情形中，细胞的物种和待表达的蛋白的物种是相同的。例如，如果使用小鼠细胞，则将小鼠直向同源物引入到小鼠中。如果使用人细胞，则将人直向同源物引入到细胞中。

[0134] 应该理解当要在细胞中表达两种或更多蛋白时，可以使用一个或多个表达盒。例如，当一个表达盒用于表达多种多肽时，可以使用多顺反子表达盒。

[0135] A. 质粒载体

[0136] 在某些实施方案中，预期质粒载体用于转化宿主细胞。通常，包含复制子和源自与宿主细胞相容物种的控制序列的质粒载体可以连同这些宿主一起使用。载体可以携带复制位点，以及能够在转化细胞中提供表型选择的标记序列。

[0137] B. 病毒载体

[0138] 某些病毒通过受体介导的胞吞作用感染细胞或进入细胞、并且整合进入宿主细胞基因组并稳定且有效表达病毒基因的能力已经使其成为将外源核酸转移至细胞（例如，哺乳动物细胞）中的具有吸引力的候选者。可以用于递送本发明的核酸的病毒载体的非限制性实例记述如下。

[0139] i. 腺病毒载体

[0140] 一种用于递送核酸的具体方法涉及使用腺病毒表达载体。尽管已知腺病毒载体具有低整合进入基因组 DNA 的能力，但是该特性被这些载体提供的高基因转移效率所弥补。“腺病毒表达载体”意欲包括含有这样的腺病毒序列的那些构建体，所述腺病毒序列足以 (a) 支持所述构建体的包装和 (b) 最终表达已经克隆在其中的组织或细胞特异性构建体。关于遗传组织或腺病毒（即一种～ 36kb 线性双链 DNA 病毒）的知识容许用至多 7kb 的外源序列来置换腺病毒 DNA 的大片段 (Grunhaus 等，Seminar in Virology（病毒学研究会），200(2)：535-546，1992))。

[0141] ii. AAV 载体

[0142] 核酸可以利用腺病毒辅助的转染引入细胞中。已经在利用腺病毒偶联的系统的细胞系统中报告了增加的转染效率 (Kelleher 和 Vos，Biotechniques（生物技术），17(6)：1110-7，1994；Cotten 等，Proc Natl Acad Sci USA（美国国家科学院学报），89(13)：6094-6098，1992；Curiel, Nat Immun（自然免疫学），13(2-3)：141-64，1994.）。腺伴随病毒 (AAV) 是有吸引力的载体系统，因为其具有高频整合并且其可以感染未分裂细胞，由此使其有效用于将基因递送至哺乳动物细胞中，例如，在组织培养中 (Muzyczka, Curr Top

Microbiol Immunol(当前顶尖微生物免疫学),158:97-129,1992)或体内进行。关于产生和使用 rAAV 载体的详细信息记述在美国专利号 5,139,941 和 4,797,368,它们分别通过引用并入本文。

[0143] iii. 反转录病毒载体

[0144] 反转录病毒容许作为基因递送载体,这归因于其将它们的基因整合进入宿主基因组、转移大量外源遗传物质、感染广谱物种和细胞类型和被包装在特定细胞系中的能力(Miller 等,Am. J. Clin. Oncol(美国临床肿瘤学杂志),15(3):216-221,1992)。

[0145] 为了构建反转录病毒载体,将核酸(例如,编码目的基因的核酸)插入病毒基因组中替代某些病毒序列,从而生成复制缺陷型病毒。为了生成毒粒,构建含有 gag、pol、和 env 基因但无 LTR 和包装成分的包装细胞系(Mann 等,Cell(细胞),33:153-159,1983)。当将含有 cDNA,以及反转录病毒 LTR 和包装序列的重组质粒引入特定细胞系(例如,通过例如磷酸钙沉淀)时,包装序列容许重组质粒的 RNA 转录物包装在病毒颗粒中,所述病毒颗粒随后分泌到培养基中(Nicolas 和 Rubinstein,在:Vectors:A survey of molecular cloning vectors and their uses(载体:分子克隆载体及其应用的调查)中,Rodriguez 和 Denhardt,编,Stoneham:Butterworth,第 494-513 页,1988;Temin,在:Gene Transfer(基因转移),Kucherlapati(编),纽约:Plenum Press,第 149-188 页,1986;Mann 等,Cell(细胞),33:153-159,1983)。然后收集含有重组反转录病毒的培养基,任选地浓缩,并用于基因转移。反转录病毒载体能够感染广泛多样的细胞类型。然而,整合和稳定表达典型地涉及宿主细胞的分裂(Paskind 等,Virology(病毒学),67:242-248,1975)。

[0146] 慢病毒是复杂的反转录病毒,其除普通的反转录病毒基因 gag、pol、和 env 外,包含其他具有调节或结构功能的基因。慢病毒载体是本领域中公知的(参见,例如,Naldini 等,Science(科学),272(5259):263-267,1996;Zufferey 等,Nat Biotechnol(自然生物技术),15(9):871-875,1997;Blomer 等,J Virol(病毒学杂志),71(9):6641-6649,1997;美国专利号 6,013,516 和 5,994,136)。慢病毒的一些实例包括人免疫缺陷病毒:HIV-1,HIV-2 和猿免疫缺陷病毒:SIV。慢病毒载体已经通过加强地减弱 HIV 毒力基因来产生,例如,删除基因 env,vif,vpr,vpu 和 nef,以使载体是生物学安全的。

[0147] 重组慢病毒载体能够感染未分裂细胞并可以用于核酸序列的体内和离体基因转移和表达。例如,能够感染未分裂细胞的重组慢病毒,其中用两种或更多携带包装功能的载体,即 gag,pol 和 env,以及 rev 和 tat 转染合适的宿主细胞,记述在美国专利号 5,994,136,其通过引用并入本文。人们可以通过使包膜蛋白与靶向特殊细胞类型的受体的抗体或特殊配体相连接来靶向重组病毒。通过将目的序列(包括调节区),以及例如编码特异性靶细胞上受体的配体的另一种基因插入病毒载体中,所述载体现在是靶标特异性的。

[0148] iv. 利用修饰的病毒递送

[0149] 待递送的核酸可以居于传染性病毒中,所述传染性病毒已经被改造为表达特异性结合配体。病毒颗粒应该因此特异性结合靶细胞的同源受体并将内容物递送至细胞。基于通过向病毒包膜化学添加乳糖残基进行的反转录病毒化学修饰,开发了一种设计用于容许特异性靶向反转录病毒载体的新方法。该修饰可以允许通过唾液酸糖蛋白受体特异性感染肝细胞。

[0150] 设计另一种靶向重组反转录病毒的方法,其中使用生物素化的抗反转录病毒包膜

蛋白的抗体和抗特异性细胞受体的抗体。所述抗体通过利用链霉抗生物素经由生物素成分偶联(Roux等,Proc.Nat′ l Acad.Sci.USA(美国国家科学院学报),86:9079-9083,1989)。利用抗主要组织相容性复合物I类和II类抗原的抗体,它们证明多种具有那些表面抗原的人细胞在体外被亲嗜性病毒感染(Roux等,1989)。

[0151] C.载体递送和细胞转化

[0152] 认为核酸递送以转化细胞、组织或生物体从而用于本发明的合适方法实质上包括任何这样的方法,通过该方法可以将核酸(例如,DNA)引入至细胞、组织或生物体,如本文中所述或本领域中普通技术人员应该已知的那样。所述方法包括,但不限于,直接递送DNA,诸如通过离体转染(Wilson等,Science(科学),244:1344-1346,1989,Nabel和Baltimore,Nature(自然)326:711-713,1987),任选地使用Fugene6(Roche(罗氏))或Lipofecyamine(Invitrogen),通过注射(美国专利号5,994,624,5,981,274,5,945,100,5,780,448,5,736,524,5,702,932,5,656,610,5,589,466和5,580,859,每个通过引用并入本文),包括显微注射(Harland和Weintraub,J.Cell Biol.(细胞生物学杂志),101:1094-1099,1985;美国专利号5,789,215,通过引用并入本文);通过电穿孔(美国专利号5,384,253,通过引用并入本文;Tur-Kaspa等,Mol.Cell Biol.(分子细胞生物学),6:716-718,1986;Potter等,Proc.Nat′ l Acad.Sci.USA(美国国家科学院学报),81:7161-7165,1984);通过磷酸钙沉淀(Graham和Van Der Eb,Virology(病毒学),52:456-467,1973;Chen和Okayama,Mol.Cell Biol.(分子细胞生物学),7(8):2745-2752,1987;Rippe等,Mol.Cell Biol.(分子细胞生物学),10:689-695,1990);通过使用DEAE-葡聚糖及随后使用聚乙二醇(Gopal,Mol.Cell Biol.(分子细胞生物学),5:1188-1190,1985);通过直接声速加样(sonic loading)(Fechheimer等,Proc.Nat′ l Acad.Sci.USA(美国国家科学院学报),84:8463-8467,1 987);通过脂质体介导的转染(Nicolau和Sene,Biochim.Biophys.Acta(生物化学生物物理学报),721:185-190,1982;Fraley等,Proc.Nat′ l Acad.Sci.USA(美国国家科学院学报),76:3348-3352,1979;Nicolau等,Methods Enzymol(酶学方法),149:157-176,1987;Wong等,Gene(基因),10:87-94,1980;Kaneda等,Science(科学),243:375-378,1989;Kato等,J Biol Chem.(生物化学杂志),266:3361-3364,1991)和受体-介导的转染(Wu和Wu,Biochemistry(生物化学),27:887-892,1988;Wu和Wu,J.Biol.Chem.(生物化学杂志),262:4429-4432,1987);每个通过引用并入本文);和所述方法的任意组合。

[0153] V.培养细胞

[0154] 多能细胞,包括胚胎干细胞和诱导为多能性的细胞、或待诱导多能性的细胞可以按照本领域中已知的任何方法来培养。如本文所述,在一些实施方案中,用ALK5抑制剂和MEK或Erk抑制剂中的一种,任选地用GSK3β抑制剂和/或LIF培养多能细胞。培养基可以包括本领域已知的任意其它培养基成分。在一些实施方案中,培养基包括细胞存活所需的基本培养基成分(例如,维生素和矿物质,任选地在等张条件下)。示例性的基本培养基是DMEM或其变化,诸如DMEM敲除(DMEM Knockout)。培养物可以进一步补充Knock-out血清替代物(KSP)。本发明的培养物可以包括一种或多种碳源。在一些实施方案中,培养物包括L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(L-analyl-L-glutamine)。培养物可以包含血清或可以不包含血清。

[0155] 在一些实施方案中，细胞与饲养细胞相接触来培养。示例性饲养细胞包括，但不限于成纤维细胞，例如，小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 细胞，或 x- 射线灭活的 CF1 饲养细胞。在饲养细胞上培养细胞的方法是本领域中已知的。

[0156] 在一些实施方案中，细胞在缺乏饲养细胞的条件下培养。细胞，例如，可以例如，通过分子粘连，直接附着于固体培养物表面（例如，培养板）。本发明人已经发现，与在饲养细胞上培养的其他方面相同处理的细胞的效率相比，当细胞直接附着于固体培养物表面时，培养诱导多能性的细胞的诱导多能性效率高得多（即，更大部分的细胞获得多能性）。示例性分子粘连包括，但不限于，基质胶，细胞外基质 (ECM)，ECM 类似物，层粘连蛋白，纤连蛋白，或胶原蛋白。然而，本领域中技术人员公认这是非限制性列表，且可以使用其他分子使细胞附着于固体表面。该束缚最初附着于固体表面的方法是本领域中已知的。

[0157] VI. 多能细胞的应用

[0158] 本发明容许进一步研究和开发干细胞技术，包括但不仅限于，预防或治疗应用。例如，在一些实施方案中，将本发明的细胞（在本发明的抑制剂中培养的多能细胞或来源于诱导沿着需要的细胞命运分化的细胞的细胞）引入有此需要的个体中，包括但不仅限于，需要再生器官、组织、或细胞类型的个体。在一些实施方案中，细胞最初以活检方式由个体获得；如本文所述诱导多能性，任选地诱导分化（例如分化为特别需要的祖细胞）并然后移植回该个体中。在一些实施方案中，细胞在其引入个体前进行遗传修饰。

[0159] 在一些实施方案中，按照本发明的方法产生的多能细胞随后被诱导，以形成，例如，造血（干 / 祖）细胞，神经（干 / 祖）细胞（和任选地，更加分化的细胞，诸如亚型特异性神经细胞，少突胶质细胞，等），胰腺细胞（例如，内分泌祖细胞或胰腺激素表达细胞），肝细胞，心血管（干 / 祖）细胞（例如，心肌细胞，内皮细胞，平滑肌细胞），视网膜细胞，等。

[0160] 已知多种诱导多能干细胞分化为需要的细胞类型的方法。描述诱导干细胞分化为不同细胞命运的方法的近期专利公开文件的非限制列表如下：美国专利公开 号 2007/0281355；2007/0269412；2007/0264709；2007/0259423；2007/0254359；2007/0196919；2007/0172946；2007/0141703；2007/0134215。

[0161] 许多疾病可以通过将本发明的多能细胞引入、任选地靶向具体的受伤组织或多能细胞在其中将产生益处的其它组织而改善。由组织损伤引起的疾病实例包括，但不限于，神经变性疾病 (neurodegeneration disease)，脑梗死 (cerebral infarction)，阻塞性血管病 (obstructive vascular disease)，心肌梗死 (myocardial infarction)，心力衰竭 (cardiac failure)，慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive lung disease)，肺气肿 (pulmonary emphysema)，支气管炎 (bronchitis)，间质肺病 (interstitial pulmonary disease)，哮喘 (asthma)，乙型肝炎 (hepatitisB)（肝损伤），丙型肝炎 (hepatitis C)（肝损伤），酒精性肝炎 (alcoholic hepatitis)（肝损伤），肝硬化 (hepatic cirrhosis)（肝损伤），肝功能不全 (hepatic insufficiency)（肝损伤），胰腺炎 (pancreatitis)，糖尿病 (diabetes mellitus)，局限性回肠炎 (Crohn disease)，炎性结肠炎 (inflammatory colitis)，IgA 肾小球肾炎 (IgA glomerulonephritis)，肾小球肾炎 (glomerulonephritis)，肾功能不全 (renal insufficiency)，褥疮 (decubitus)，烧伤，缝合伤口 (sutural wound)，撕裂 (laceration)，切伤伤口，咬伤伤口，皮炎 (dermatitis)，瘢痕性瘢痕疙瘩 (cicatricial keloid)，瘢痕疙瘩 (keloid)，糖尿病性溃疡 (diabetic

ulcer)，动脉溃疡 (arterial ulcer) 和静脉溃疡 (venous ulcer)。

[0162] 在一些实施方案中，由用本发明的抑制剂培养的多能细胞产生转基因动物（例如，非人动物）。所述细胞可以是转基因细胞、敲除系（例如，包含通过位点特异性重组引入选择性标记的一个或多个基因敲除）。可以将用本文所述的抑制剂培养的多能细胞引入到相容动物的胚泡中并且随后引入到动物的接受子宫中，并且可以关于来源于所述多能细胞的细胞选择所得到的后代（例如，通过选择标记或其它表型特征诸如毛皮颜色）。可以鉴定嵌合体后代，并且建立将所述多能细胞的特征（例如，转基因）传给后代的品系。可以通过繁殖同胞动物而建立纯合子动物品系。

[0163] 本发明提供按照本发明的方法产生任意类型的转基因动物。示例性的动物包括非人哺乳动物，和非人灵长类动物。示例性的动物包括，例如，小鼠（包括 SCID 小鼠）、大鼠、狗、猫、猪、牛、绵羊、山羊、猴和黑猩猩。

[0164] 用本发明的抑制剂培养细胞，并且因此保持细胞的多能性，便利地允许筛选细胞表型、药物反应，并且还允许针对调控多能细胞表型或诱导所需要的细胞反应的能力而筛选化合物或其它试剂（例如，蛋白、核酸、或抗体）的文库。文库筛选可以设计成筛选文库成员基本上影响任意所需要的表型的能力。示例性的表型可以包括，例如，细胞分化、凋亡或其它细胞死亡、细胞存活、死亡、或在存在另外的目的化合物或药物的条件下的其它表型等。

[0165] 文库中的试剂可以是任何小的化学化合物，或生物学实体，诸如蛋白、糖、核酸或脂质。典型地，检测试剂是小的化学分子和肽。基本上任何化学化合物可以用作本发明测定中的潜在的试剂，尽管使用可以溶解在水溶液或有机溶液（特别是基于 DMSO 的溶液）中的最常见的化合物。通过使测定步骤自动化并且提供来源于任何便利来源的化合物进行测定而将测定设计为筛选大的化学品文库，所述测定典型地平行进行（例如，以在自动测定中在微量滴定板上的微量滴定形式进行）。应该理解，存在多家化学化合物供应商，包括 Sigma（西格玛）(St.Louis，MO)，Aldrich（奥德里奇）(St.Louis，MO)，Sigma-Aldrich（西格玛-奥德里奇）(St.Louis，MO)，Fluka Chemika-Biochemica Analytika(Buchs，Switzerland) 等。

[0166] 组合化学品文库是通过经由组合多种化学“结构单元”如试剂的化学合成或生物合成而产生的不同化学化合物的集合。例如，线性组合化学品文库，诸如多肽文库，通过以每种可能的方式组合化学结构单元（氨基酸）至给定的化合物长度（即，在多肽化合物中的氨基酸数目）而形成。通过所述组合混合化学结构单元可以合成数百万的化学化合物。

[0167] 制备和筛选组合化学品文库是本领域技术人员公知的。这样的组合化学品文库包括，但不限于，肽文库（参见，例如，美国专利 5,010,175，Furka，Int.J.Pept.Prot.Res.（国际肽蛋白研究杂志）37 :487-493(1991) 和 Houghton 等，Nature（自然）354 :84-88(1991)）。还可以使用产生化学品多样性文库的其它化学品。这样的化学品包括，但不限于 :拟肽（例如，PCT 公布号 WO 91/19735)，编码的肽（例如，PCT 公布 WO 93/20242)，随机生物低聚物（例如，PCT 公布号 WO 92/00091)，苯并二氮杂䓬 (benzodiazepines)（例如，美国专利号 5,288,514)，多样体 (diversomers) 诸如乙内酰脲 (hydantoins)，苯并二氮杂䓬和二肽 (Hobbs 等，Proc.Nat.cad.Sci.USA（美国国家科学院学报）90 :6909-6913(1993))，插烯多肽 (vinylogous polypeptides)(Hagihara 等，J.Amer.Chem.Soc.（美国化学学会

杂志)114:6568(1992)),具有葡萄糖构架的非肽假肽(nonpeptidal peptidomimetics)(Hirschmann 等,J.Amer.Chem.Soc.(美国化学学会杂志)114:9217-9218(1992)),小化合物文库的类似有机综合体(Chen 等,J.Amer.Chem.Soc.(美国化学学会杂志)116:2661(1994)),低聚氨基甲酸酯(oligocarbamates)(Cho 等,Science(科学)261:1303(1993)),和/或肽基磷酸酯(peptidyl phosphonates)(Campbell 等,J.Org.Chem.(有机化学杂志)59:658(1994)),核酸文库(参见 Ausubel,Berger 和 Sambrook,均同上所述),肽核酸文库(参见,例如,美国专利 5,539,083),抗体文库(参见,例如,Vaughn 等,Nature Biotechnology(自然生物技术),14(3):309-314(1996) 和 PCT/US96/10287),碳水化合物文库(参见,例如,Liang 等,Science(科学),274:1520-1522(1996) 和美国专利 5,593,853),小有机分子文库(参见,例如,苯并二氮杂䓬,Baum C&EN,1 月 18 日,第 33 页(1993);类异戊二烯(isoprenoids),美国专利 5,569,588;噻唑烷酮(thiazolidinones)和间噻嗪烷酮(metathiazanones),美国专利 5,549,974;吡咯烷(pyrrolidines),美国专利5,525,735和5,519,134;吗啉代化合物(morpholino compounds),美国专利5,506,337;苯并二氮杂䓬,5,288,514,等)。

[0168] 用于制备组合文库的装置是可商购获得的(参见,例如,357MPS,390 MPS,Advanced Chem Tech(高级化学技术),Louisville KY,Symphony,Rainin,Woburn,MA,433A Applied Biosystems(应用生物系统),Foster City,CA,9050 Plus,Millipore,Bedford,MA)。另外,许多组合文库本身是可商购获得的(参见,例如,ComGenex,Princeton,N.J.,Tripos,Inc.,St.Louis,MO,3D Pharmaceuticals,(3D 制药)Exton,PA,Martek Biosciences,Columbia,MD,等)。

实施例

[0169] 概述:这里我们报道成功建立新型的大鼠 iPSCs(riPSCs),其可以通过 ALK5 抑制剂,GSK3 抑制剂和 MEK 抑制剂的混合物与 LIF 而均匀地保持。riPSCs 共有小鼠 ESC 的特征,并且最重要的是,可以广泛地形成嵌合体。我们还产生具有“小鼠 ESC- 样”特征的新型人 iPSCs (hiPSCs),在存在MEK 抑制剂和ALK5 抑制剂时,令人吃惊地,其可以保持在培养物中。我们提议我们的实验为通过由大鼠或其它物种重编程而产生多能干细胞提供了框架,所述大鼠或其它物种的真正的胚胎干细胞是仍然不能获得。

[0170] 实施例 1:

[0171] 本实施例表明大鼠多能细胞的产生和保持。

[0172] 通过 Oct4/Klf4/Sox2 病毒转导和化合物混合物由 WB-F344 细胞产生新型的 riPSCs。将双倍体大鼠肝祖细胞系 WB-F344(Grisham 等,Proc Soc Exp BiolMed(实验生物医学学会进展)204,270-279(1993)) 通过反转录病毒用 Oct4,Sox2 和 Klf4 转导,然后分散到在常规 mESC 培养基中的 MEF 饲养细胞上。在转导后 10 天观察到致密且为碱性磷酸酶(ALP) 阳性的 ESC- 样群落(效率为约 0.4%)(图 1A)。然而,当将挑取所述 ESC- 样群落并且在相同的培养基中传代培养时,它们迅速分化并且失去 ESC 形态(图 1B),这表明常规 mESC 培养基条件不足以保持 riPSCs 的多能性。假定小分子可以抑制主要的分化 - 诱导途径的观点,我们和他人先前已经鉴定并且使用小分子来以多种强健的方式支持 mESC 的自我更新(Schugar 等,Gene Ther(基因治疗)15,126-135(2008);Xu 等,Nat Biotechnol(自

然生物技术)20,1261-1264(2002))。基于这样的化学策略和保持 mESC 和 EpiSC/hESC 自我更新的信号传导差异,我们选择 MEK 抑制剂 PD0325901,ALK5(TGF β 信号传导的主要 I 型受体)抑制剂 A-83-01,GSK3 β 抑制剂 CHIR99021,和 FGFR 抑制剂 PD173074,并且检测不同小分子组合对保持 riPSCs 多能性的作用。使用 0.5μM PD0325901 和 3μM CHIR99021 的组合,riPSCs 可以短期保持在培养物中,但是表现出广泛的自发分化(图 1C)。在连续传代后,在这种条件下生长的细胞增殖较缓慢,并且由于分化细胞的增殖,培养物恶化。最近的研究表明 PD0325901 与 CHIR99021 和 FGFR 抑制剂 PD173074 组合可以以不依赖 LIF 的方式保持 mESC 的多能性 (Ying 等, Cell(细胞)115,281-292(2003))。然而,与 PD0325901 和 CHIR99021 组合类似,在培养基中包含 PD173074(0.1μM) 没有表现出其它的益处。因为激活蛋白 A/Nodal 信号传导对于保持 hESCs 和 EpiSCs 的未分化状态是重要的,但是对于 mESC 的自我更新不是必要的,然后我们检测 PD0325901,CHIR99021 和 TGF-β 抑制剂 A-83-01 的组合是否能够抑制分化并且促进 riPSCs 的自我更新。有趣地,使用 0.5μM PD0325901,3μM CHIR99021 和 0.5μM A-83-01 的组合,riPSCs 生长为更均匀的群体,并且自发分化基本上被抑制(图 1D)。与 PD0325901 和 CHIR99021 组合相比,在这样的条件下,克隆表达效率也显著提高(图 5)。此外,尽管 LIF 本身不足以保持 riPSC 自我更新,仅观察到非常小的 ALP 阳性群落,并且在不存在 LIF 的条件下不能长期保持(图 5)。此外,对于 riPSCs 的长期自我更新,需要特有的化学抑制剂混合物。riPSCs 已经在存在 LIF, PD0325901, A-83-01,和 CHIR99021 的条件下培养多于 30 代,没有明显的分化和增殖减少,但是在从培养基中去除所述化学抑制剂后,它们失去 ESC 形态并且在一代内分化。在这种条件下, riPSCs 与常规 mESCs 相似在培养中形成典型的圆顶群落(图 1E)。免疫细胞化学揭示 riPSCs 表达典型的 mESC 标记,诸如 Oct4(图 1F),Sox2(图 1G),SSEA-1(图 1H,绿色),Nanog(图 1H 红色),但是对 hESC 标记(诸如 SSEA3,SSEA4 和 TRA-1-81)是阴性的。使用大鼠基因引物进行的 4 个克隆的 riPSC 品系的 RT-PCR 分析证实内源性大鼠 Oct4,Sox2,Nanog,Klf4,Rex-1,TDGF2,FGF4 和 Eras 的表达(图 1I)。通过使用对转基因特异性的引物, RT-PCR 分析揭示转导的小鼠 Oct4,Sox2 和 Klf4 基因很大程度上被沉默(图 1I)。分析大鼠 Oct4 启动子甲基化状态表明 riPSCs 和 WB-F344 细胞之间的不同的甲基化。riPSC 克隆表现出几乎完全的去甲基化模式,并且与亲本 WB-F344 细胞的去甲基化模式不同(图 1J)。特别地,riPSCs 与 mESCs 享有共同的分子特征,特别是表达 Rex-1 和 ALP,在植入后阶段的上胚层和 EpiSCs 中不存在的 ESCs 和早期上胚层的标记。

[0173] riPSCs 在体外和体内是多能细胞。为了检验 riPSCs 的发育潜能,进行体外分化测定。免疫染色表明在标准胚状体分化方法下 riPSCs 可能分化成内胚层(白蛋白和 Pdx1)(图 2A,2B),神经外胚层(β III- 微管蛋白, Tuj1)(图 2C) 和中胚层 (brachyury)(图 2D) 衍生物。接着,我们检验 riPSC 的体内发育潜能。在移植到重症联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠中后,riPSCs 形成畸胎瘤,所述畸胎瘤由所有三个胚层组成,包括神经上皮样结构(外胚层),呼吸道上皮(内胚层),软骨样结构(中胚层)和平滑肌(中胚层)(图 2E ～ 2H)。最显著的,在注射到 Brown-Norway 大鼠(黑色毛皮)胚泡中后 (n = 18),三只大鼠出生,并且全部表现出彻底的毛色嵌合(图 2I)。然而,尚未检测到种系转换。综上所述,上述结果定义我们的 riPSCs 不同于大鼠 EpiSCs,是多能 mESC- 样大鼠干细胞系。

[0174] 实施例 2 :

[0175] 本实施例表明用于诱导并且保持人多能细胞处于与小鼠胚胎干细胞类似的状态的培养基。

[0176] 与 mESCs 相反，bFGF 和 TGFβ/激活蛋白 /Nodal 信号传导是保持常规 hESCs 和 EpiSCs 自我更新所必需的。抑制 TGFβ/激活蛋白 /Nodal 或 FGFR 信号引起在常规 hESC 培养条件下的 hESCs 和 EpiSCs 的显著的并且迅速的分化。最近，已经通过在 bFGF 培养条件下表达 Oct4，Sox2，c-Myc，和 Klf4 或 Oct4，Sox2，Nanog，和 Lin28 而从成纤维细胞产生人诱导的多能干细胞 (hiPSCs)(Dimos 等，Science(科学)321,1218-1221(2008) ;Lowry 等，Proc Natl Acad Sci U S A(美国国家科学院学报)105,2883-2888(2008) ;Nakagawa 等，NatBiotechnol(自然生物技术)26,101-106(2008) ;Takahashi 等，Cell(细胞)131,861-872(2007) ;Yu 等，Science(科学)318,1917-1920(2007))。在自我更新和细胞形态的信号传导需要方面，所述 hiPSCs 非常类似于常规 hESCs 和 EpiSCs。基于大鼠研究，我们研究了人多能干细胞的 mESC- 样多能状态是否能够被捕获和保持。显著地，我们发现 hiPSCs 可以通过在含有 hLIF 的 mESC 培养基中病毒表达 Oct4，Sox2，Nanog，和 Lin28 而由 IMR90 人成纤维细胞有效产生，具有与在常规条件下的时间和效率相似的时间和效率 (图 3A，平均由 $1x10^5$ 个转导的细胞产生 15 ～ 20 个 iPS 细胞)(Yu 等，Science(科学)318,1917-1920(2007))，并且随后通过加入 ALK5，GSK3 和 MEK 抑制剂的化学混合物而选择和扩增。所述 hiPSCs 在 PD0325901，A-83-01 和 CHIR99021 的化学混合物和 hLIF 下长期、均匀的自我更新 (＞ 20 代)(图 3B)。与常规 hESCs 相反，与 mESCs 相似形成 ALP- 阳性圆顶群落的这些 hiPSCs(图 3C) 耐受 MEK 抑制剂和 ALK5 抑制剂，然而，在相同条件下常规 hESC 品系 H1 迅速分化。这些 hiPSCs 均匀表达典型的多能性标记，诸如 Oct4，Sox2，Nanog，TRA-1-81，SSEA3 和 SSEA-4(图 3D-3I)。在所述条件下的 4 个克隆的 hiPSC 品系的 RT-PCR 分析证实内源性人 Oct4，Sox2，Nanog，Rex-1，TDGF2 和 FGF4 的表达 (图 3J)。通过使用转基因特异性的引物，RT-PCR 分析揭示转导的 Oct4，Sox2 和 Nanog 基因很大程度上被沉默 (图 3J)。此外，这些 hiPSCs 对 Oct4 启动子表现出与 H1 人 ESCs 相似的 DNA 甲基化模式，并且不同于亲本 IMR90 成纤维细胞 (图 3K)。与 riPSCs 相似，对于保持 hiPSCs 的圆顶群落形态和长期的体外自我更新，需要所述抑制剂混合物。去除所述抑制剂混合物使得细胞在一代内失去群落形态。由培养基去除 hLIF 对细胞没有表现出即时的 / 明显的影响。然而，hLIF 似乎对 hiPSCs 的长期培养有用。当在含有所述化学抑制剂但无 hLIF 的培养基中培养时，hiPSC 培养物逐渐恶化，并且不能均匀地传代超过 10 代。然而，还需要确定在所述新型 hiPSCs 的自我更新中的准确的信号传导机制。

[0177] 重要地，免疫细胞化学证实所述新型 hiPSCs 在体外可以分化成内胚层 (白蛋白)(图 4A)，神经外胚层 (βIII- 微管蛋白，Tuj1)(图 4B) 和中胚层 (brachyury)(图 4C) 衍生物。此外，在植入到 SCID 小鼠中后，所述 hiPSCs 形成畸胎瘤，其由所有三个胚层组成，包括神经上皮样结构 (外胚层)(图 4D)，上皮管状结构 (内胚层)(图 4D)，和软骨样结构 (中胚层)(图 4E)。综合考虑，上述结果表明 mESC- 样人多能干细胞可以被捕获并且长期保持。

[0178] 讨论

[0179] 尽管从 1981 年就已经由小鼠建立了胚胎干细胞 (Martin，G.R.，Proc Natl Acad Sci U S A(美国国家科学院学报)78,7634-7638(1981))，但是由其它动物 (诸如大鼠) 衍生其对应体的尝试尚未完全成功 (Demers 等，Cloning Stem Cells(克隆干细胞)9，

512-522(2007) ;Ruhnke 等, Stem Cells(干细胞)21,428-436(2003),2003 ;Schulze 等, Methods Mol Biol(分子生物学方法)329,45-58(2006) ;Ueda 等,“Establishment of rat embryonic stem cells and making of chimera rats,(建立大鼠胚胎干细胞并且制备嵌合体大鼠)”PLoS ONE 3, e2800(2008))。通过结合遗传重新编程和化学方法,我们能够产生新型的 mESC- 样大鼠和人多能干细胞,它们在群落形态和培养需要 / 信号传导反应方面共有常规 mESCs 的主要特征。在独特的小分子混合物中,我们的稳定的 riPSCs 能够在体内广泛形成嵌合体。大鼠更适合生理学和行为研究,并且是用于多基因人疾病的极佳模型。然而,由于在体内是多能性的大鼠干细胞的不可获得性,这种宝贵的模型的应用受到妨碍。我们建立大鼠多能细胞和使用合适的化学混合物的策略将为产生用于生物医学研究的基因 - 靶向大鼠铺平道路。我们的 hiPSCs 生长更加强健并且似乎代表一种与常规 mESCs 相似且不同于常规 hESCs 的新型的多能状态。

[0180] 综合考虑,这样的发现强调了化学方法的特有的优点,并且指出抑制 TGF-β 途径对于保持大鼠和人细胞的 mESC- 样多能状态的重要性。我们的研究综合提供了通过重新编程或者衍生来自大鼠或其它物种 (其胚胎干细胞尚不能获得) 的早期 ICM- 阶段 ESCs 而产生多能干细胞的框架。

[0181] 实验步骤

[0182] 细胞培养和病毒转导 :将第 7 代二倍体大鼠 WB-F344 细胞 (Grisham 等, Proc Soc Exp Biol Med(实验生物医学进展)204,270-279(1993))(其为北卡罗莱纳大学 (University of North Carolina)William B.Coleman 教授的馈赠) 按所述通过基于 pMXs 的反转录病毒转导小鼠 Oct4, Klf4 和 Sox2(Addgene)(Takahashi, K., 和 Yamanaka, S., Cell(细胞)126,663-676(2006))。24 小时后,将 $1x10^5$ 个转导的 WB-F344 细胞接种到在 100mm 培养皿中的 X- 射线灭活的 CF1 MEFs 中,并且用 mESC 生长培养基温育 :Knockout™ DMEM,20％敲除缺陷替代物,1％ Glutamax,1％非必需氨基酸,1％青霉素 / 链霉素,0.1mM β- 巯基乙醇和 10^3U/ml mLIF(Millipore)。10 天后,挑取 riPSC 群落并且在 mESC 生长培养基中在 MEF 饲养细胞上扩增,并且用 MEK 抑制剂 PD0325901(Stemgent,0.5μM), ALK5 抑制剂 A-83-01(Tocris Bioscience(Tocris 生物科学),0.5μM),和 GSK3β 抑制剂 CHIR99021(Stemgent,3μM) 处理。

[0183] 培养人成纤维细胞 IMR90(ATCC No.CCL-186) 并且按所述通过基于 pSin-EF2-Puro 的慢病毒转导人 Oct4,Sox2,Nanog 和 Lin28(Addgene)(Yu 等,Science(科学)318,1917-1920(2007))。24 小时后,将 $1x10^5$ 个转导的 IMR-90 细胞接种到在 100mm 培养皿中的 X- 射线灭活的 CF1MEF 饲养细胞中。24 小时后,将培养基更换为补充了 10^3U/ml hLIF(Millipore) 的 mESC 培养基。在 3 周后,观察 hiPSC 群落,并且在感染后第 4 周挑取群落用于在包含 MEK 抑制剂 PD0325901(0.5μM), ALK5 抑制剂 A-83-01(0.25μM),和 GSK3β 抑制剂 CHIR99021(3μM) 的相同的培养基中在饲养细胞上扩增。

[0184] 胚泡注射 :在交配后 4.5 天的 Brown-Norway(BN) 雌鼠的子宫回收胚泡。将胚泡置于矿物油中的 HEPES 滴中。使用显微注射移液管将 8 ～ 15 个 riPSCs 注射到所述胚泡中。在注射后,将胚泡转移到假孕接受体雌鼠中。所有的动物步骤均是按照全国卫生研究所的指导进行的。

[0185] 补充的数据

[0186] 补充的数据包括补充的实验步骤，一个表格和一副附图。

[0187] 补充的实验步骤：

[0188] iPSCs 体外分化：通过标准胚状体分化方法进行 riPSCs 或 hiPSCs 的体外分化。通过 0.05％胰蛋白酶 -EDTA 解离 riPSCs 或 hiPSCs，并且在超低附着的 100-mm 培养皿中在补充了 10％ FBS 的 DMEM 培养基中培养从而形成胚状体 (EBs)。每隔一天更换培养基。一周后，收集 EBs 并且转移到基质胶 (Matrigel) 包被的 6 孔平板中的具有 10％ FBS 的 DMEM 培养基中。3-7 天后，将细胞固定，用于免疫细胞化学分析。除了提及之外，所有的细胞培养产品均来自 Invitrogen/Gibco BRL。

[0189] 细胞化学和免疫荧光测定：按照供应商的流程使用碱性磷酸酶检测试剂盒 (Millipore) 进行碱性磷酸酶染色。对于免疫荧光测定，将细胞在 4％低聚甲醛中固定 10 分钟，并且用含有 0.1％ Triton X-100(Sigma-Aldrich(西格玛 - 奥德里奇)) 的 PBS 洗涤三次。然后，将固定的细胞在封闭缓冲液，即在 PBS 中的 0.1％ Triton X-100 和 10％正常驴血清 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc) 中在室温 (RT) 下温育 30 分钟。然后将细胞用一级抗体在封闭缓冲液中在 4℃温育过夜。次日，将细胞用 PBS 洗涤，并且用在包含 0.1％ Triton X-100 的 PBS 中的二级抗体在 RT 温育 1 小时。将小鼠抗 -Oct4 抗体 (1 ： 250)(Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz 生物技术))，大鼠抗 -Sox2 抗体 (1 ： 2000)(Chemicon)，小鼠抗 -SSEA1 抗体 (1 ： 250)(Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz 生物技术))，兔抗 -Nanog 抗体 (1 ： 500)(Abcam)，大鼠抗 -SSEA3 抗体 (1 ： 1000)(Chemicon)，小鼠抗 -SSEA4 抗体 (1 ： 1000)(Chemicon)，小鼠抗 -TRA-1-81 抗体 (1 ： 1000)(Chemicon)，兔抗 -Pdx1(1 ： 1500)(其由 C.Wright 博士 (Vanderbilt University，TN) 馈赠)，小鼠抗 - βIII- 微管蛋白 (Tuj1) 抗体 (1 ： 1000)(Covance Research Products(Covance 研究产品))，兔抗 - 白蛋白抗体 (1 ： 1000)(DAKO) 用作一级抗体。二级抗体是 Alexa Fluor 486/555 驴抗 - 小鼠、抗 - 大鼠、抗 - 山羊或抗 - 兔 IgG(1 ： 500)(Invitrogen)。细胞核通过 DAPI(Sigma-Aldrich(西格玛 - 奥德里奇)) 染色显现。使用 Nikon Eclipse TE2000-U 显微镜捕获图像。

[0190] RT-PCR 分析：使用 RNeasy+ 迷你试剂盒 (RNeasy Plus Mini Kit) 结合 QIAshredder(Qiagene) 由 riPSCs 和 hiPSCs 提取 RNA。使用 iScriptTMcDNA 合成试剂盒 (BioRad) 用 1μg RNA 进行反转录。使用表 1 所示的引物进行特定基因的扩增。PCR 条件为 95℃ 5 分钟，94℃ 30 秒，退火温度下 30 秒，和 72℃ 30 秒，25 ～ 35 个循环，然后 72℃ 10 分钟。对于使用亚硫酸氢盐 - 测序进行的 Oct4 启动子甲基化研究，使用非有机 DNA 分离试剂盒 (Millipore) 由 WB-F344 细胞、riPSCs、IMR90、和 hiPSCs 分离 DNAs。然后，将 DNAs 用 EZ DNA 甲基 -Gold 试剂盒 (Zymo Research Corp.(Zymo 研究公司)，Orange，CA) 处理。然后，将处理的 DNAs 用作模板来扩增目的序列。用于 Oct4 启动子片段扩增的引物显示在表 1 中。使用用于测序的 TOPO TA 克隆试剂盒 (Invitrogen) 克隆所得到的片段并且测序。

[0191] 畸胎瘤形成：通过使用 0.05％胰蛋白酶 -EDTA 收集连续传代的 riPSCs 或 hiPSCs。在 SCID 小鼠 (n ＝ 3) 的肾囊下注射三百万至五百万的细胞。在 4-5 周后，所有的小鼠发展了畸胎瘤，去除畸胎瘤然后进行组织学分析。

[0192] 表 1：PCR 引物信息列表

[0193]

基因	正向引物	反向引物	大 小 (bp)
对于RT-RCR (大鼠细胞)			
大鼠 Oct4	TACTGCCCGCCCCAGCG	GCTGCTTGGCAATGCTAGT	449
大鼠 Sox2	AAGGCCGTGCACGCCGACGA	ACCACACCATGAAGGCATTCAT	285
大鼠 Nanog	TAGCCCTGATTCTTCTAGCA	TTTGCTGCAACGGCACATAA	617
大鼠 Rex-1	AAATCATGACGAGGCAAGGC	TGAGTTCGCTCCAACAGTCT	350
大鼠 Klf4	CAGACCTGGAAAGTGGTGG	ACCTGTGTTGCCCGCAGCC	283
大鼠	AACACCAACAATATTTTATGTGGCC	TCATTTCTAGGAAAAGGCAGATGC	511

[0194]

基因	正向引物	反向引物	大 小 (bp)
TDGF2			
大鼠 FGF-4	TGTGGTGAGCATCTTCG GAGTGG	CCTTCTTGGTCCGCCCGTTC TTA	198
大鼠 Eras	GCTGCCCCTCAGCCGAC TGCTACT	CACTGCCTTGTACTCCGGTA GCTG	210
转基因 Oct4	GGGGTGGACCATCCTCT A	CCTCCGCAGAACTCGTAT	271
转基因 Sox2	CCCACCGCCCTCAAAGT A	GGACCATACCATGAAGGCG TT	278
转基因 Klf4	CCCACCGCCCTCAAAGT A	GCTGGACGCAGTGTCTTCT	190
GADPH	CCTTCATTGACCTCAAC TAC	GGAAGGCCATGCCAGTGAG C	594
对于RT-RCR (人细胞)			
内源性 Oct4	AGTTTGTGCCAGGGTTT TTG	ACTTCACCTTCCCTCCAACC	113
内源性 Nanog	TTTGGAAGCTGCTGGGG AAG	GATGGGAGGAGGGGAGAGG A	194
内源性 Sox2	CAAAAATGGCCATGCAG GTT	AGTTGGGATCGAACAAAAG CTATT	162
Rex-1	CAGATCCTAAACAGCTC GCAGAAT	GCGTACGCAAATTAAAGTCC AGA	307
FGF-4	CTACAACGCCTACGAGT CCTACA	GTTGCACCAGAAAAGTCAG AGTTG	369
TDGF2	CTGCTGCCTGAATGGGG GAACCTGC	GCCACGAGGTGCTCATCCAT CACAAGG	242
转基因 Oct4	CAGTGCCCGAAACCCAC AC	AGAGGAACTGCTTCCTTCAC GACA	656
转基因 Sox2	TACCTCTTCCTCCCACTC CA	AGAGGAACTGCTTCCTTCAC GACA	467
转基因 Nanog	CAGAAGGCCTCAGCACC TAC	AGAGGAACTGCTTCCTTCAC GACA	732
GADPH	GTGGACCTGACCTGCCG TCT	GGAGGAGTGGGTGTCGCTG T	152
对于亚硫酸氢盐-测序			
大鼠 Oct4	ATGGGATTTTGGAGGAT TTTTAG	CTCAAACCCAAATACCCCTA CTT	206
人 Oct4	GGATGTTATTAAGATGA AGATAGTTGG	CCTAAACTCCCCTTCAAAAT CTATT	406

[0195] 实施例 3 衍生大鼠胚胎干细胞

[0196] 为了由胚泡衍生大鼠 ES 细胞，将透明带 - 去除的大鼠胚泡 (E4.5) 接种到具有敲除 DMEM 培养基的 x- 射线灭活的 CF1 饲养细胞上，所述敲除 DMEM 培养基补充 20％敲除血清替代物 (KSR)，1％非必需氨基酸，1000U/ml 小鼠 LIF，1％ Glutmax，3μM CHIR99021，0.5μM PD0325901，0.25μM A-83-01（或 2μM SB431542）。3-5 天后，将 ICM 来源的细胞

簇通过 Accutase 解离并且转移到新的饲养细胞上。挑取具有典型的 ES 细胞形态的群落，用 Accutase 解离，然后接种到新的饲养细胞上。将建立的大鼠 ES 细胞用上述培养基培养，并且大约每 3 天传代 (1 ： 6)。大鼠 ES 细胞和 riPSCs 二者均需要存在抑制剂混合物 (CHIR99021,PD0325901,A-83-01) 和 LIF 进行长期的自我更新。大鼠 ES 细胞和 riPSCs 表达小鼠 ES 细胞的多能标记，诸如 Oct4,Sox2,Nanog 和 SSEA-1 等，但不表达由常规培养的人 ES 细胞表达的标记，诸如 SSEA-3,SSEA-4,TRA-1-61 和 TRA-1-81。大鼠细胞和 riPSCs 二者均表达 ICM 标记 Rex-1 和 ALP，所述标记在小鼠 EpiSCs 中不表达。

[0197] 实施例 4 衍生猴子胚胎干细胞

[0198] 为了将猴子 ES 细胞转化为小鼠 ES 细胞样 (早期 ICM) 多能状态，将猴子 ES 细胞 (R366.4) 用补充了 20％敲除血清替代物 (KSR)，1％非必需氨基酸，1％ Glutmax，10ng/ml bFGF 的 DMEM/F-12 培养基培养。当所述细胞至 50％汇合时，将培养基更换为补充了 2μM 赖氨酸 - 特异性去甲基酶 1 抑制剂 (硫酸反苯环丙胺) 的 Advance DMEM/F-12，1×N2，1×B27，1％ Glutmax，50μg/ml BSA 培养基中。3 天后，将细胞用包含 10μg/ml 人 LiF，3μM CHIR99021，0.5μM PD0325901，和 2μM SB431542，但不含硫酸反苯环丙胺的相同的培养基培养。除了广泛分化之外，约一周的处理显现致密的小鼠 ES 细胞样群落。用上述培养基培养转化的猴子 ES 细胞，并且约每 4 ～ 5 天传代 (1 ： 6)。所述细胞表达多能标记，诸如 Oct4，Sox2，Nanog，SSEA-3，SSEA-4，TRA-1-61，TRA-1-81 以及 ICM 标记 Rex-1 和 ALP。

[0199] 实施例 5 通过小分子将上胚层干细胞转化为胚胎干细胞

[0200] 常规鼠胚胎干细胞 (ESCs) 来源于植入前胚泡的内细胞团 (ICM) 的多能细胞并且代表植入前胚泡的内细胞团 (ICM) 的多能细胞。它们可以无限地自我更新，并且在体外具有产生所有细胞类型的能力，并且更重要地是当放回到胚泡中时，在体内形成完整的动物，包括种系。更近来，一种不同类型的多能细胞来源于植入后阶段的上胚层，称为上胚层干细胞 (EpiSCs)(Brons 等，Nature(自然)448,191-195,2007 ;Tesar 等，Nature(自然)448,196-199,2007)。尽管 EpiSCs 可以长期自我更新并且在畸胎瘤测定中似乎在体外和体内是多能性的，但是与 mESCs 相反，它们不能结合到 ICM 中并且形成嵌合体，这证实 EpiSCs 来源于比 ICM- 来源的 ESCs 晚 / 迟的多能性发育阶段并且代表比 ICM- 来源的 ESCs 晚 / 迟的多能性发育阶段，并且表明甚至在体内环境中，它们不能“重新编程”回到 ICM- 阶段的多能细胞。常规人 ESCs，尽管是用胚泡衍生的，似乎在许多特征上非常接近对应于 EpiSCs，所述特征包括一些基因表达、群落形态学 (即，扁平群落) 和在自我更新和分化中的信号传导反应。在许多其它方式中，EpiSCs/hESCs 也在功能和机制上不同于 mESCs(其具有更加致密和圆顶的群落形态)。例如，尽管 mESCs 在白血病抑制因子 (LIF) 和骨形态发生蛋白 (BMP) 下 (Ying 等，Cell(细胞)115,281-292,2003)，或在 MEK 和 / 或 FGFR 的抑制下 (Ying 等，Nature(自然)453,519-523,2008) 自我更新，但是 EpiSCs/hESCs 似乎依赖于 MAPK，FGF，和 TGFβ / 激活蛋白 /Nodal 途径活性进行自我更新，并且当用 MEK，FGFR 和 / 或 ALK4/5/7 抑制剂处理时迅速分化 (Brons 等，Nature(自然)448,191-195,2007 ;Li 等，Differentiation(分化)75,299-307,2007 ;Peerani 等，EMBO J(胚胎学杂志)26,4744-4755,2007 ;Tesar 等，Nature(自然)448,196-199,2007)。另外，在有限的分化条件下响应 BMP 处理，mESCs 分化为中胚层品系，而 EpiSCs/hESCs 产生滋养层或原始内胚层细胞 (Brons 等，Nature(自然)448,191-195,2007 ;D′ Amour 等，Nat Biotechnol(自然生物技

术)23,1534-1541,2005;Xu 等,Nat Biotechnol(自然生物技术)20,1261-1264,2002)。这些观察强烈支持这样的观点:EpiSCs 和 hESCs 本质上相似,并且产生有吸引力的假说:因为 mESCs 和 EpiSCs/hESCs 代表两种不同的多能性状态:mESC-样状态代表植入前胚泡的 ICM,EpiSC-样状态代表植入后上胚层,上胚层状态(包括常规 hESCs)是否可以转化回到 ICM 状态。由于在它们由 mESCs 或 mEpiSCs 形成嵌合体的能力的截然不同(其可能为 EpiSCs 向 mESCs 的功能转化提供确定性的证实),鼠系统代表研究这样引人兴趣的过程的一个理想的平台,并且提供由常规 hESCs 产生可能的新型 ICM/mESC-样人多能细胞的基础。

[0201] EpiSCs 表达主要的多能性基因,包括 Oct4,Sox2 和 Nanog。已经表明过量表达 Oct4,Sox2 和 Klf4 诱导鼠体细胞重新编程,从而变成种系-能力多能细胞(Nakagawa 等,Nat Biotechnol(自然生物技术)26,101-106,2008)。另外,已经表明,表达较少多能性基因(例如,缺少 Nanog 表达)的种系干细胞可以在培养中转化为 mESC-样细胞(Chambers 等,Nature(自然)450,1230-1234,2007;Kanatsu-Shinohara 等,Cell(细胞)119,1001-1012,2004)。此外,最近一种非多能细胞类型(称为 FAB-SC)来源于胚泡,并且显示出仅在 LIF 和 BMP 条件下产生多能 mESC-样细胞(Chou 等,Cell(细胞)135,449-461,2008)。此外,最近的研究表明,在 mESC 群落中的细胞的亚群体表现出几种主要转录因子(例如 Nanog,Rex1,和 Stella)的动态表达,这使得它们在不同状态之间(例如,在 ESC-和上胚层-样表型之间)不断地波动(Chambers 等,Nature(自然)450,1230-1234,2007;Hayashi 等,Cell Stem Cell(细胞干细胞)3,391-401,2008;Singh 等,Stem Cells(干细胞)25,2534-2542,2007;Toyooka 等,Development(发育)135,909-918,2008)。这些研究产生这样的可能性,即,在体外培养波动下,比 ICM-mESCs 表现出更少“稳定的”多能性的 EpiSCs 可能“自发”具有转换回到 mESC 状态的能力。为了检验这一假说,将 EpiSCs 胰蛋白酶处理成单细胞,并且在 mESC 自我更新条件下涂板,基于这样的观点:在 EpiSC 群落内的“转化的”mESC-样细胞将在促进 mESCs 自我更新但是诱导 EpiSCs 分化的条件下被捕获/选择和扩增。我们发现,当它们在具有饲养细胞且补充 LIF 的常规 mESC 生长条件下培养时,EpiSCs 在第一代分化(例如,细胞扩展/迁移出群落),并且在几代之后群落不能鉴定(图 6A)。假定由 EpiSCs 到 mESCs 的“自发”转化效率可能是非常低的,可能需要更强且更严格的分化性自我更新促进和分化诱导条件来从 EpiSCs 选择/捕获和扩增那些“稀有的”转化的 mESC-样细胞(例如,实现更清楚的表型区分并且最小化分化的 EpiSCs 的生长过度)。基于在 FGF 和 MAPK 信号途径的情形中在 mESCs 和 EpiSCs 之间的分化性信号传导反应(自我更新相对于分化),以及抑制 MEK-ERK 信号传导促进细胞向更原始状态重新编程的观察(Chen 等,Proc Natl Acad Sci U S A(美国国家科学院学报)104,10482-10487,2007;Shi 等,Cell Stem Cell(细胞干细胞)2,525-528,2008;Silva 等,PLoS Biol(PLoS 生物学)6,e253,2008),我们接着在常规 mESC 自我更新条件下用选择性的 FGFR 抑制剂 PD173074(0.1μM)和 MEK 抑制剂 PD0325901(0.5μM)组合处理 EpiSCs。在这种促进强健的 mESCs 克隆生长并且抑制分化的细胞的生长的 2PD/LIF 条件下,我们观察到加速的 EpiSCs 分化和整体细胞培养的减少的生长。当保持在 2PD/LIF 培养基中培养时,大部分细胞死亡,并且在连续传代后没有鉴定到 mESC-样群落。类似地,向 2PD/LIF 条件加入 CHIR99021(3μM)以提高 mESC 生长/存活不促进或者捕获 EpiSCs 向 mESC-样状态的转化(图 6A)。这些结果表明,EpiSCs 表现出在促进 mESC 自我更新条件下不容易自发转化为 ESC-样状态的“稳定的”多能性状态。这也与更近

来的研究相一致，其中表明 EpiSCs 向 mESC- 样状态的转化仅可以通过过量表达 Klf4 联合使用 MEK 和 GSK3 的化学抑制剂实现 (Guo 等，Development（发育）136，1063-1069，2009)。

[0202] 在小鼠胚胎发生过程中，TGFβ / 激活蛋白 /Nodal 活性被暂时地、空间上动力学调控，并且在植入过程中需要 TGFβ / 激活蛋白 /Nodal 活性来控制上胚层中早期祖细胞的命运 (Mesnard 等，Development（发育）133，2497-2505，2006)。EpiSCs 的衍生需要 FGF 和 TGFβ / 激活蛋白 /Nodal 途径活性表明 TGFβ / 激活蛋白 /Nodal 为 EpiSCs 提供抗分化信号 (Brons 等，Nature（自然）448，191-195，2007 ；Tesar 等，Nature（自然）448，196-199，2007)。另外，报道 E- 钙粘着蛋白在一细胞阶段的胚胎中表达，并且通过信号传导下调 E- 钙粘着蛋白有助于胚泡的植入 (Li 等，J Biol Chem（生物化学杂志）277，46447-46455，2002)。此外，TGFβ / 激活蛋白 /Nodal 活性还在原肠胚形成过程中通过下调 E- 钙粘着蛋白而促进上皮 - 间质转化 (EMT)(Derynck 和 Akhurst，Nat Cell Biol（自然细胞生物学）9，1000-1004，2007 ；Gadue 等，Proc Natl Acad Sci U S A（美国国家科学院学报）103，16806-16811，2006 ；Sirard 等，Genes Dev（基因发育学）12，107-119，1998)。基于这些研究，我们假设对 TGFβ / 激活蛋白 /Nodal 信号传导的抑制可能促进间质 - 上皮转化 (MET) 的过程并且因此促进 EpiSC 向 mESC- 样状态的转化。A-83-01 是一种选择性 ALK4/5/7 抑制剂，其对 BMP 受体没有交叉抑制作用 (Tojo 等，Cancer Sci（癌症科学）96，791-800，2005)。与先前的报道相一致，在补充 bFGF 的 EpiSC/hESC 培养条件下，通过 0.5μM A-83-01 阻断 TGFβ / 激活蛋白 /Nodal 信号传导诱导迅速的 EpiSCs 分化。明显相反，在补充 LIF 的 mESC 培养条件下，A-83-01 诱导整个 EpiSCs 群体形成更加致密和圆顶的群落，所述群落类似于 mESC 群落形态并且表达 ALP （一种在 mESCs 中但不在 EpiSCs 中高度表达的多能性标记）（图 6C)。；另一种广泛使用的特异性 ALK4/5/7 抑制剂 SB431542 对 EpiSCs 具有相似的作用。当将 A-83-01 处理的群落暴露于用于选择的 2PD/LIF 条件时，多于 50％的群落可以自我更新并且保持 ALP 活性，这表明所述细胞获得一些 mESC 特性。这些圆顶的 ALP 阳性群落在补充了 ALK5，MEK，FGFR 和 GSK3 的抑制剂（称为 mAMFGi 条件）的 mESC 生长培养基中进一步保持并且扩增。这些细胞在 mAMFGi 条件下可以长期自我更新，具有不能区别的 mESC 群落形态（图 6D)，并且表达多能性标记，诸如 Oct4，Nanog，SSEA-1，以及重新获得 ICM 标记 Rex-1。然而，当将这些细胞通过慢病毒用组成型活性的 GFP 标记，并且用桑椹胚聚集时，在将得到的胚胎植入到小鼠中后，我们没有获得嵌合体动物（图 7A)。这些结果表明，TGFβ 信号传导的抑制联合 MEK、FGFR 和 GSK3 的抑制具有强烈的重新编程活性并且可以促进 EpiSCs 向 mESC- 样状态的部分转化。

[0203] 已经建立组蛋白修饰，诸如乙酰化和甲基化，从而在基因调控中起重要作用。已经表明，Stella 是 mESC 种系能力中的重要基因，并且在 EpiSCs 中和在 mESCs 内的上胚层样细胞中转录沉默。此外，组蛋白修饰调控 Stella 在 mESCs 中的表达 (Hayashi 等，Cell Stem Cell（细胞干细胞）3，391-401，2008 ；Tesar 等，Nature（自然）448，196-199，2007)。我们假设负责真实的体内多能性的沉默的基因座的阻抑解除可能促使 EpiSCs 克服向 mESC- 样状态的外遗传限制 / 阈值。因此，我们选择小分子硫酸反苯环丙胺，其已经表现出通过抑制组蛋白去甲基酶 LSD1 而增加整体的 H3K4 甲基化，所述组蛋白去甲基酶 LSD1 特异性将单甲基化的和二甲基化的组蛋白 H3K4 去甲基化 (Lee 等，Chem Biol（化学生物）13，563-567，2006)。显著地，在 2μM 硫酸反苯环丙胺处理 4 天后，在 mESC 生长条件下，多至 70-80％的

EpiSCs 形成小且致密的群落。当然后用 2PD/LIF 选择硫酸反苯环丙胺 - 处理的细胞时，大约 20％的细胞在选择中以圆顶的和 ALP 阳性群落存活下来。将这些群落进一步用 MEK，FGFR 和 GSK3 的抑制剂（称为 mMFGi 条件）或用 mAMFGi 条件扩增。两种条件均产生稳定的细胞培养物（在 8 个月内＞ 80 次传代），这与 mESCs 在形态学上不能区分（图 6E，F）。接着，我们通过桑椹胚聚集和所得到的胚胎的移植而在体内检验 GFP- 标记的硫酸反苯环丙胺 /mMFGi 细胞和硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞。显著地，我们由硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞获得 7 个（在 9 个出生的小狗中）成体嵌合体，这通过毛色和对于在多个成体组织中存在 GFP 整合的 PCR 基因型而确定（图 7A，B，C）。一致地，在来自移植硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞 - 聚集的桑椹胚的 E13.5 胚胎的多个组织（即，三个胚层，包括性腺）中观察到广泛分布的 GFP 阳性细胞（图 7A，D，10A）。为了检验来自硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞的种系贡献，通过 FACS 分离来自性腺的 GFP/SSEA-1 双阳性细胞，并且通过实时 PCR 证实表达种系标记 Blimp1 和 Stella（图 7E）。这些数据表明，由 EpiSCs 转化的硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞重新获得真实的体内多能性。相反，GFP- 阳性细胞仅在由移植硫酸反苯环丙胺 /mMFGi 细胞 - 聚集的桑椹胚复苏的 E13.5 胚胎的卵黄囊中存在（图 7A）。

[0204] 因此，进一步表征硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞。免疫细胞化学证实多能性 - 相关标记在长期扩增的硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞中的均匀表达，其包括 Oct4，Nanog，SSEA1，和 STELLA（图 8A，11A，12）。另外，半定量 RT-PCR 分析证实在硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞中恢复特异性 ICM 和种系 - 能力标记（其在 mESCs 中表达，但不在 EpiSCs 中存在）的基因表达，包括 Rex1，Pecam1，Stella，Stra8，Dax1，Fbxo15，Esrrb，和 Fgf4（图 8B）。相反，在硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞中，与上胚层和早期胚层相关的基因（诸如 Fgf5 和 Brachyury(T)）的转录物减少或不能检测（图 8B，9C）。此外，通过微阵列的转录组分析表明，转化的硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞更加类似于 mESCs(Pearson 相关性值：0.87)，而初始 EpiSCs 与 mESCs 关系较远 (Pearson 相关性值 :0.74)（图 8C），这与先前的报道一致。为了进一步分析与转化相关的特定的外遗传改变，我们使用亚硫酸氢盐基因组测序检验 Stella 和 Fgf4 的启动子 DNA 甲基化，其表达与 ICM 特性很近地相关 (Hayashi 等，Cell Stem Cell（细胞干细胞）3，391-401，2008 ；Imamura 等，BMC Dev Biol(BMC 发育生物学）6，34，2006）。揭示在硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞和 mESCs 中 Stella 和 Fgf4 的启动子区在很大程度上是未甲基化的，但是在 EpiSCs 在是高度甲基化的（图 8D）。为了进一步检验 Stella 的外遗传状态，其局限于 mESC- 样状态，我们在 EpiSCs、转化的硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞、和 mESCs 中进行其启动子区的 ChIP-QPCR 分析。我们发现，在硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞中 Stella 的 H3K4 和 H3K27 甲基化模式与在 mESCs 中观察到相似，但是与在 EpiSCs 中的不同，这证实在转化的硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞中 Stella 的外遗传状态转换为 mESC- 样状态（图 8E）。

[0205] 还检验硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞的体外功能性特性。发现它们具有与 mESCs 相似的生长速率（图 9A）。当硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞在混悬液中通过胚状体分化时，它们能够在三个主要的胚层中有效地产生细胞衍生物，如通过免疫细胞化学显示的，包括特征性神经细胞（β III- 微管蛋白和 MAP2ab 阳性的），搏动心肌细胞（心脏肌钙蛋白和 MHC 阳性的），和内胚层细胞 (Sox17 或白蛋白阳性的）（图 9B）。因为 mESCs 和 EpiSCs/hESCs 在自我更新和分化中具有不同的针对信号传导输入（例如，生长因子）的反应，开发的并且

对 mESC 分化有效作用的条件通常可能在诱导相应的 EpiSCs/hESCs 分化中是无效的。将 EpiSC/hESC 转化为 mESC- 样状态的一个优点在于分化条件可以更容易地由 mESC 作用转换为 EpiSC/hESC 作用。针对 BMP4 处理的分化反应代表区分 mESCs 和 EpiSCs 之间的功能测定。与先前的研究一致 (Beddington 和 Robertson, Development (发育) 105, 733-737, 1989 ; Czyz 和 Wobus, Differentiation (分化) 68, 167-174, 2001 ; Qi 等, Proc Natl Acad Sci U S A (美国国家科学院学报) 101, 6027-6032, 2004 ; Winnier 等, Genes Dev9, 2105-2116, 1995), 我们发现, 当如 mESCs 一样用 BMP4 处理时, 硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞被诱导表达中胚层特异性标记基因 Brachyury(T), 但是在相同条件下不能如 EpiSCs 那样产生滋养外胚层 (没有诱导滋养层标记 Cdx2) 或原始内胚层细胞 (Gata6), 这表明硫酸反苯环丙胺 / mAMFGi 细胞与 mESCs 的相似的体外分化潜力 / 反应 (图 9C)。为了进一步证明这一点, 我们在单层化学限定的定向逐步心脏分化过程中尝试并且比较 EpiSCs、转化的硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞、和 mESCs。在这一多步骤过程中, 其中 BMP 活性在中胚层分化的早期步骤中起重要作用, 我们发现硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞如同 mESCs 一样有效地分化为搏动心肌细胞, 但是在相同条件下的 EpiSCs 分化几乎不产生表达适当的心脏标记的细胞或具有特征性搏动表型的细胞 (图 9D), 这再次证实硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 与 mESCs 功能相似。此外, 单细胞存活测定也证明硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞群落在不含饲养细胞和 N2/B27- 化学限定的条件中如 mESCs 一样有效地扩增为 Oct4- 阳性群落, 而在相同条件下, 来自单细胞的 EpiSCs 存活很差 (图 11B)。这些数据进一步表明, 通过靶向 mESCs 或 EpiSCs 所需要的外遗传修饰和分化信号传导途径的药理学操作, EpiSCs 可以功能性转化为 mESC- 样状态。

[0206] 与我们的研究一致的, 最近已经报道 EpiSC 细胞通过过量表达重新编程基因 (即 Klf4) 联合化学化合物而转化为 mESC- 状态 (Guo 等, Development (发育) 136, 1063-1069, 2009)。在这一研究中, 我们设计化学限定的处理在没有任何遗传操作的条件下将稳定的 EpiSCs 转化为 mESC- 样的、发育较早的多能性状态。尽管研究提供证据表明存在上胚层样细胞并且在常规 mESCs 的群落内来回转化 (Hayashi 等, Cell Stem Cell (细胞干细胞) 3, 391-401, 2008) ; mESCs 和 EpiSCs 共有多能性转录因子的基本组合, 包括 Oct4, Sox2 和 Nanog ; 并且 mESCs 在培养中更稳定, 但是在本研究中, 我们发现 EpiSCs 在常规 mESC 培养条件下迅速分化, 并且在群体或克隆水平的连续传代中不能容易地鉴定和分离“自发”转化的 mESC。显著地, 我们发现用小分子抑制剂进行的 TGF β 途径的阻断或 H3K4 去甲基酶 LSD1 的抑制诱导 EpiSCs 向 mESC- 样表型的显著的形态改变, 伴有激活一些 ICM- 特异性基因表达。然而, 可以仅用 LSD1, ALK5, MEK, FGFR, 和 GSK3 的抑制剂的组合而容易地产生 EpiSCs 向具有形成嵌合体能力的 mESC- 样状态的完全转化。这些观察强调了通过信号传导和直接的外遗传调控的协同作用对由发育晚期阶段的 EpiSCs 向 ICM- 阶段的 mESCs 的重新编程的有力的且直接的诱导。还突出了 TGF β 途径的抑制在促进重新编程和保持真实的多能性的重要作用, 其还支持我们最近在产生嵌合体 - 能力的大鼠多能细胞中的研究 (Li 等, Cell Stem Cell (细胞干细胞) 4, 16-19, 2009)。总之, 我们的研究提供了一种观念证据证明, 即, 在不存在任何遗传操作的条件下, 通过同时区分两种多能性状态和外遗传靶标的对信号传导途径的精确的药理学控制, 多能性 - 限制的 EpiSCs 可以容易地转化为 mESC- 样状态, 并且提供了进一步研究所述机制的便利的实验系统。所述方法和观念还可以为产生新型的

mESC- 样人多能细胞而提供途径。

[0207] 实验步骤

[0208] 细胞培养：鼠 EpiSC 细胞系由 Paul Tesar 博士 (Case Western Reserve University) 馈赠。如先前所述，将 EpiSCs（细胞系 EpiSC-5，雄鼠）保持在人 ESC 培养基中经放射处理的 CF1 MEFs 上，所述人 ESC 培养基补充 10ng/ml bFGF(Tesar 等，Nature（自然）448，196-199，2007)。将 EpiSCs 每 3-4 天用 1mg/ml IV 型胶原蛋白酶 (Invitrogen) 传代。将 R1mESCs 用常规 mESC 生长培养基在经放射处理的 CF1 MEFs 上培养，所述常规 mESC 生长培养基由补充了 20％ KSR(Invitrogen)，0.1mM 2-ME(Sigma-Aldrich（西格玛 - 奥德里奇））,2mM L- 谷氨酰胺 (Invitrogen)，0.1mM NEAA(Invitrogen)，和 10^3 单位 /ml 重组鼠白血病抑制因子 (LIF)(ESGRO，Millipore) 的敲除 DMEM(Invitrogen) 组成。将 mESCs 和转化的细胞每 3 天用 0.05％胰蛋白酶 /EDTA 作为单细胞混悬液传代，并且以 $1.0X10^4$ 个细胞 /cm^2 接种进行常规培养。对于不含饲养细胞的培养，将细胞在化学限定的培养基中在明胶包被的组织培养皿上生长，所述化学限定的培养基由补充了 1XN2(Invitrogen)，1XB27(Invitrogen)，0.1mM 2-ME，2mM L- 谷氨酰胺，0.1mM NEAA，50μg/ml BSA 级分 V(GIBCO)，10^3 单位 /ml LIF 和 10ng/ml BMP4(R&D) 敲除 DMEM 组成。对于生长曲线实验，将细胞在不含饲养细胞的条件下在明胶 - 包被的 12 孔板中培养。将一式两份细胞样品以 $1X10^5$ 个细胞 / 孔的密度接种。对于每个时间点（间隔 24 小时），将来自两个孔的细胞胰蛋白酶处理，并且使用血细胞计数器计数。将这些计数平均并且绘图。ALK 抑制剂 A-83-01，SB431542，MEK 抑制剂 PD0325901，GSK3 抑制剂 CHIR99021，和 FGF 受体抑制剂 PD173074 购自 Stemgent Inc.(Stemgent 公司）。硫酸反苯环丙胺购自 Sigma（西格玛）(P8511)。

[0209] 半定量 RT-PCR 和实时 PCR：通过使用 RNeasy+ 迷你试剂盒 (RNeasy Plus Mini Kit)(Qiagen) 提取总 RNA，使用 iScript cDNA 合成试剂盒 (Bio-Rad) 用 oligo dT 引物按照供应商的使用说明反转录。将 PCR 产物在 (15％）琼脂糖凝胶上分离，并且通过溴化乙锭染色显现。使用 Bio-Rad 凝胶文件系统拍照图片。在具有 IQ SYBR Green 的 Bio-Rad 实时 PCR 检测系统 (Bio-Rad) 上在一式两份定量 PCRs 的每一份中使用稀释的 cDNA。所用的引物在补充的表 2 中列出。

[0210] 亚硫酸氢盐测序分析：使用非有机 DNA 分离试剂盒 (Millipore) 分离来自 R1 mESCs，EpiSCs，和硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞的 DNAs。然后，使用 EZ DNA 甲基化 -Gold 试剂盒 (Zymo Research Corp.，Orange，CA)，将所述 DNAs 进行处理以用于亚硫酸氢盐测序。然后，将处理的 DNAs 用于扩增目的序列。用于启动子片段扩增的引物如先前公布的 (Hayashi 等，Cell Stem Cell（细胞干细胞）3，391-401，2008；Imamura 等，BMC Dev Biol(BMC 发育生物学）6，34，2006) 并且在补充的表 2 中列出。将得到的片段使用用于测序的 TOPO TA 克隆试剂盒 (Invitrogen) 克隆并且测序。

[0211] 流式细胞计数和细胞分选：将粘附的细胞在 PBS 中洗涤两次，然后在 37℃在细胞解离缓冲液 (Invitrogen) 中温育 20 分钟。将细胞解离并且重悬在 PBS+3％正常山羊血清（封闭缓冲液）中。将细胞在 4℃用抗体抗 -SSEA1(1 ： 50，Santa Cruz) 温育 40 分钟，然后用相对应的二级抗体温育，然后进行洗涤步骤。用 FACSAria 细胞分选器和 FACSDiva 软件 (BDBiosciences(BD 生物技术）) 分析并且分选细胞。使用 488-nm 的激光进行激发，按照在 GFP 通道中的荧光强度确定 GFP 阳性。SSEA-1 阳性按照在红色通道中的荧光确定。

[0212] 体外分化：将硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 细胞胰蛋白酶处理成单细胞，并且悬浮培养以在低粘附板 (Corning) 中在补充了 10％ FBS 的 DMEM 培养基中形成胚状体 /EBs。每个一天更换培养基，并且允许 EBs 在混悬液中生长 6 天。然后，将 EBs 再次平板接种到 0.1％明胶 - 包被的平板上。通过用指示的抗体在不同时间点 (3-16 天) 对代表性的品系特异性标记免疫染色而检验自发分化。对于定向的心脏分化，将细胞以 $2x10^4/cm^2$ 接种在基质胶包被的平板上。接种后 24 小时，将细胞更换到化学限定的培养基 (CDM) 中 [由 RPMI 1640，0.5xN2，1xB27(无维生素 A)，0.5x Glutamax，0.55mM β - 巯基乙醇，和 1x 非必需氨基酸组成]，并且用 3μM BIO(Calbiochem) 和 20ng/ml BMP-4(R&D) 处理 5 天。然后，将培养基更换为包含 100ng/ml Dkk-1 的 CDM，并且将细胞再培养 5 天。在第 11 天，将细胞暂时胰蛋白酶化 / 解离 (0.05％胰蛋白酶) 并且再次平板接种到明胶包被的 6 孔板中的无另外的生长因子的 CDM 中，并且再培养 4-6 天，此时，在大部分心脏群落中出现搏动表型。

[0213] 表征测定：ALP 染色按照供应商的指导由碱性磷酸酶检测试剂盒 (Alkaline Phosphatase Detection Kit)(Chemicon) 来进行。使用标准流程进行免疫细胞化学。简言之，将细胞在 4％低聚甲醛 (Sigma-Aldrich(西格玛 - 奥德里奇)) 中固定，用 PBS 清洗三次，并然后在含有 0.3％ TritonX-100(Sigma-Aldrich(西格玛 - 奥德里奇)) 和 5％正常驴血清 (Jackson ImmunoResearch(杰克逊免疫研究)) 的 PBS 中室温温育 1 小时。然后将细胞用下述一级抗体在 4℃温育过夜：白蛋白 (Abcam，AB19188，1 ： 200)；Brachyury(Santa Cruz，C-19，1 ： 200)；心脏肌钙蛋白抗体 (CT3)(Developmental Studies Hybridoma Bank(发育学研究杂交瘤库)，1 ： 700)；MAP2ab(Abcam，ab5392，1 ： 1000)；MF20(Developmental Studies Hybridoma Bank(发育学研究杂交瘤库)，1 ： 200)；Nanog(Abcam，ab21603，1 ： 500)；Oct4(Santa Cruz，sc-5279，1 ： 100)；Sox17(R&D systems，AF1924，1 ： 300)；SSEA1(Santa Cruz，sc-21702，1 ： 100)；Stella(Millipore，MAB4388，1 ： 200)；Tuj-1(Covance，MMS-435P，1 ： 1000)。用 PBS 洗涤 3 次后，将细胞用适当的 Alexa Fluor 缀合的二级抗体 (Invitrogen) 在 RT 下温育 2 小时。通过 DAPI(Sigma(西格玛)) 染色检测细胞核。图像由 Zeiss HXP 120 捕获。

[0214] 嵌合体形成：将转化的细胞使用慢病毒通过 GFP 稳定标记。细胞用 8- 细胞阶段的小鼠胚胎聚集，并且然后植入到 2.5dpc 假孕 CD1 小鼠的子宫中。

[0215] 微阵列分析：使用 Illumina Sentrix BeadChip Array MouseRef-8 v2(Illumina，CA，USA) 进行微阵列杂交以检验鼠 ES 细胞，EpiSCs 细胞和硫酸反苯环丙胺 / mAMFGi 细胞的整体基因表达。用 Illumina TotalPrep RNA 扩增试剂盒 (Ambion AMIL1791，Foster City，CA，USA) 由 500ng 总 RNA 合成生物素 -16-UTP- 标记的 cRNA。按照 Illumina BeadStation 500X 系统手册 (Illumina，San Diego，CA，USA)，使用提供的试剂和 GE 卫生保健 (GE Healthcare) 的链霉抗生物素蛋白 -Cy3 染色溶液，制备包含 750ng 标记的扩增的 cRNA 的杂交混合物。与 Illumina Array MouseRef-8 v2 的杂交在 BeadChip Hyb Wheel 上在 55℃进行 18 小时。使用 Illumina BeadArray 读数仪扫描所述阵列。所用样品以两份生物学重复制备。微阵列数据的处理和分析使用 Illumina BeadStudio 软件进行。R1-mESC 细胞的微阵列数据来自我们早先的研究 GEO DataSet(GSM402334 和 GSM402335)。所有原始数据减去背景并且使用等级不变选项 (rank invariant option) 一起归一化。我们已经向 GEO DataSets 保存了硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 和 EpiSCs 的微阵列数据，登记号为 (关

于 R1 小鼠 ES 细胞为 GSM402334 和 GSM402335 ;关于硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi 和 EpiSCs 为 GSE17664)。

[0216] 关于染色质免疫沉淀的实时 PCR(ChIP-qPCR) :使用商购 Magna ChIP™ G 试剂盒(目录号 #17-611, Millipore) 进行 ChIP。简言之,将无饲养细胞培养的 1X10^6 个细胞用 1%甲醛固定,裂解,并且声波处理以获得 200-500bp 的与核小体缀合的 DNA 片段。将声波处理的裂解物用预先与缀合在磁珠上的二级抗体反应的抗 - 三甲基 - 组蛋白 H3 赖氨酸 4(Millipore, Cat.#17-614,3ul/ 反应)或抗 - 三甲基 - 组蛋白 H3 赖氨酸 27(Millipore, Cat.#17-622,4μg/ 反应)免疫沉淀。在用每种抗体温育 24 小时后,回收免疫沉淀物,并且通过用蛋白酶 K 温育而纯化所包含的 DNA 片段。将 DNA 片段进行实时 PCR。将在用抗体温育前的全细胞裂解物用作输入。将 1 微升来自全裂解物和免疫沉淀物的 DNA 片段进行实时 PCR 反应。将具有正常兔 IgG 的免疫沉淀物作为阴性对照样品,并且没有表现出可检测的背景。引物序列在表 2 中列出。

[0217] 表 2. 用于 PCR 的引物

[0218]

基因	正向	反向
用于 RT-PCR		

[0219]

Blimp1	TCAGCCTCTTCCCTAGGTTGTATC	AATCTTAAGGATCCATCGGTTCAAC
Brachyury	ATGCCAAAGAAAGAAACGAC	AGAGGCTGTAGAACATGATT
Cdx2	AGGCTGAGCCATGAGGAGTA	CGAGGTCCATAATTCCACTCA
Dax1	GTGGCAGGGCAGCATCCTCTACAA	CAAAAGAAGCGGTACA
Esrrb	CGC CAT CAA ATG CGA GTA CAT GC	GAATCACCATCCAGGCAC TCTG
Fbxo15/ECAT3	TAGATTCTTGGACTTCCGTTCA	ACCAAGGTCACCGCATCCAA
Fgf4	CGTGGTGAGCATCTTCGGAGTGG	CCTTCTTGGTCCGCCCGTTCTTA
Fgf5	CTGTACTGCAGAGTGGGCATCGG	GACTTCTGCGAGGCTGCGACAGG
GAPDH	GTGTTCCTACCCCCAATGTGT	ATTGTCATACCAGGAAATGAGCTT
Gata6	ACCTTATGGCGTAGAAATGCTGAGGGTG	CTGAATACTTGAGGTCACTGTTCTCGGG
Pecam1	GTCATGGCCATGGTCGAGTA	AGCAGGACAGGTCCAACAAC
Rex-1	TGAAAGTGAGATTAGCCCCGAG	GTCCCATCCCCTTCAATAGCAC
Stella	GAAACTCCTCAGAAGAAA	CTCTTGTTCTCCACAGGTAC
Stra8	GCAACCAACCCAGTGATGATGG	CATCTGGTCCAACAGCCTCAG
用于亚硫酸氢盐-测序PCR		
Fgf4	TTTAGGTTTTAAGAGTGTTGGGGAGAAGAT	TACAAAACAAAAACATCAAACCCATTCTAA
Stella	ATTTTGTGATTAGGGTTGGTTTAGAA	CCAAAACATCCTCTTCATCTTTCTTCT
Stella巢式	TTTTTGGAATTGGTTGGGATTG	CTTCTAAAAAATTTCAAAATCCTTCATT
用于ChIP-Q PCR		
Stella	GATCCAGCTGGTCTGAGCTA	GTGCAGGGATCATAGGAGTG

[0220] 实施例 6 :表征复制并且保持多能性的多能动物细胞

[0221] 为了表征新产生的 hiPSCs,利用实时 PCR 来分析 hiPSCs 的基因表达。将人 ES 细胞系 Hues9(hES 机构, Harvard University(哈佛大学), http://mcb.harvard.edu/melton/hues/) 用作对照。实时 PCR 分析揭示,与 Hues9 细胞相比较,本发明的 hiPSCs 以更高的水平表达某些基因,诸如 Gbx2(5- 倍),Dppa3(2- 倍) 和 Klf4(2.5- 倍)。还发现这些标记在

小鼠 ES 细胞中高度表达，但是不在小鼠 EpiSCs 中表达。实时 PCR 测定所用的引物为：

[0222] Dppa3：5’-CAACCTACATCCCAGGGTCT-3’；

[0223] 5’-TCAACGTCTCGGAGGAGATT-3’；

[0224] Gbx2：5’-AAAGGCTTCCTGGCCAAAG-3’；

[0225] 5’-TTGACTCGTCTTTCCCTTGC-3’；

[0226] Klf4：5’-AGCCTAAATGATGGTGCTTGGT-3’；

[0227] 5’-TTGAAAACTTTGGCTTCCTTGTT-3’。

[0228] 利用蛋白质印迹分析，我们还已经分析了 E-钙粘着蛋白在 hiPSCs 中的表达。E-钙粘着蛋白在 hiPSCs 中的表达是 Hues9 人 ES 细胞表达的两倍。

[0229] 提供上述实施例举例说明本发明而不是限制其范围。本发明的其它变体对于本领域普通技术人员将容易清楚，并且由后附的权利要求所涵盖。本文所引用的所有的公布、数据库、Genbank 序列、专利、和专利申请通过引用结合于此。

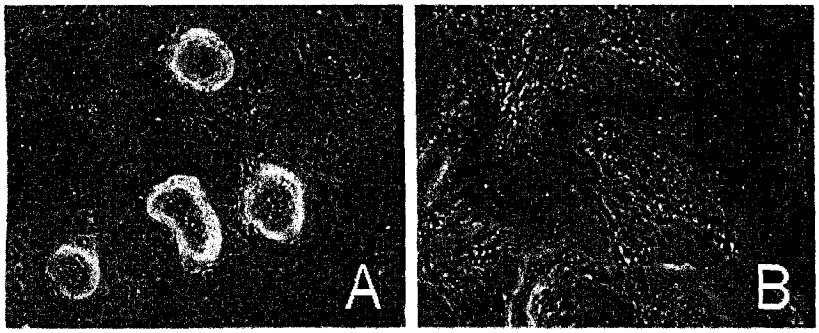


图 1A 图 1B

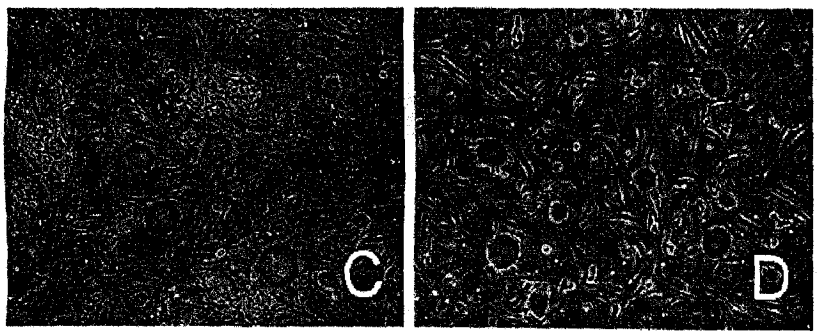


图 1C 图 1D

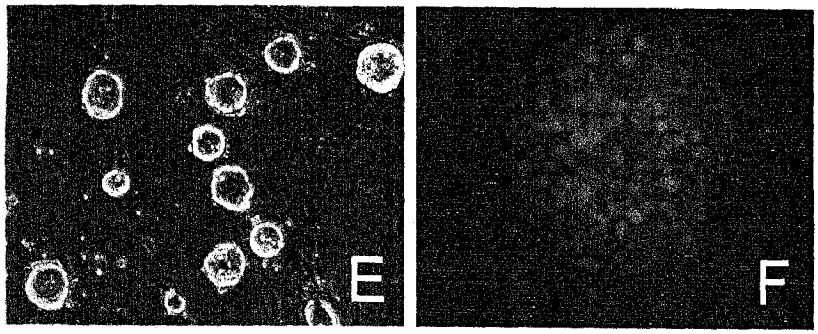


图 1E 图 1F

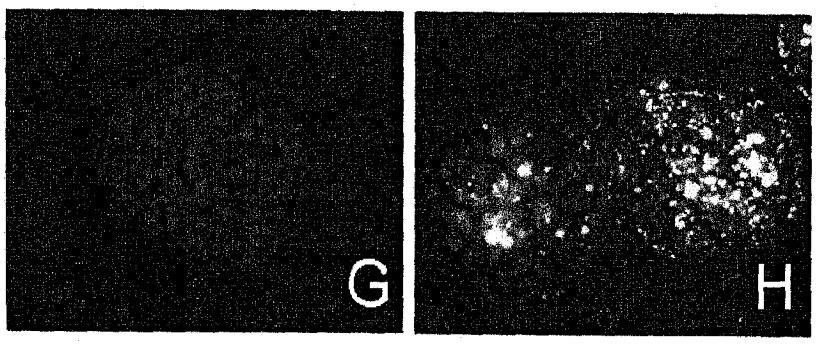

G
H

图 1G 图 1H

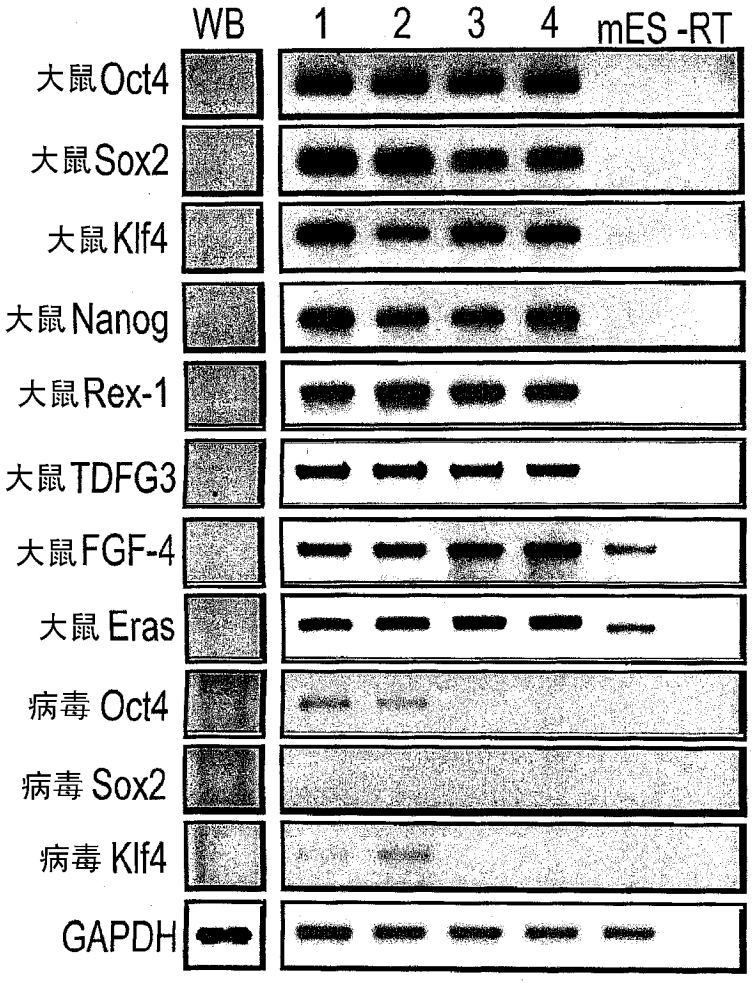

WB
1
2
3
4
mES -RT
大鼠Oct4
大鼠Sox2
大鼠Klf4
大鼠Nanog
大鼠Rex-1
大鼠TDFG3
大鼠FGF-4
大鼠 Eras
病毒 Oct4
病毒 Sox2
病毒 Klf4
GAPDH

图 1I

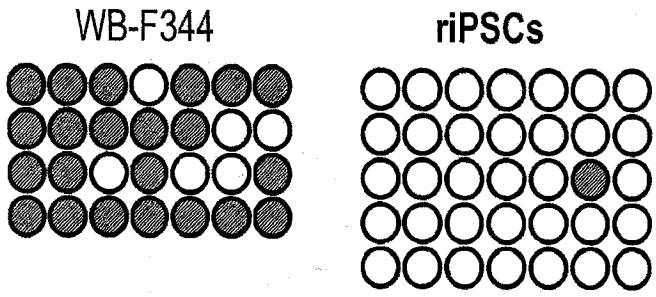


图 1J

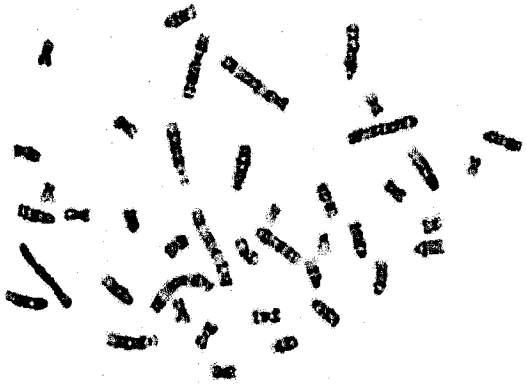


图 1K

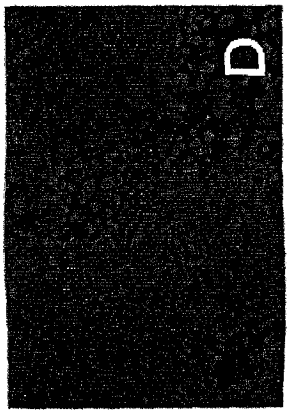


图 2D

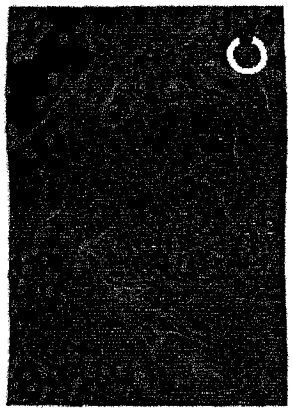


图 2C

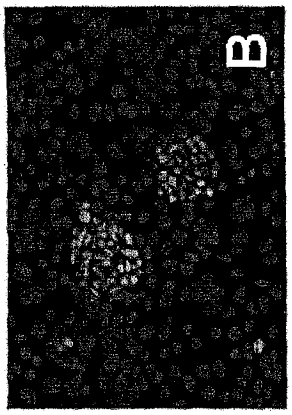


图 2B

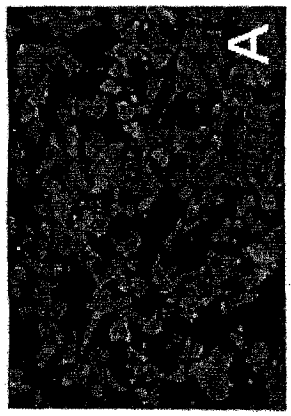


图 2A



图 2E



图 2F

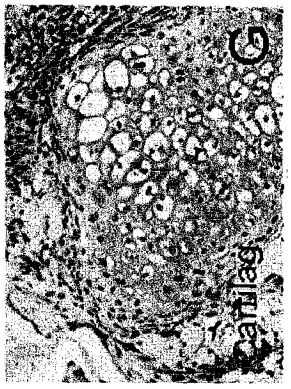


图 2G



图 2H

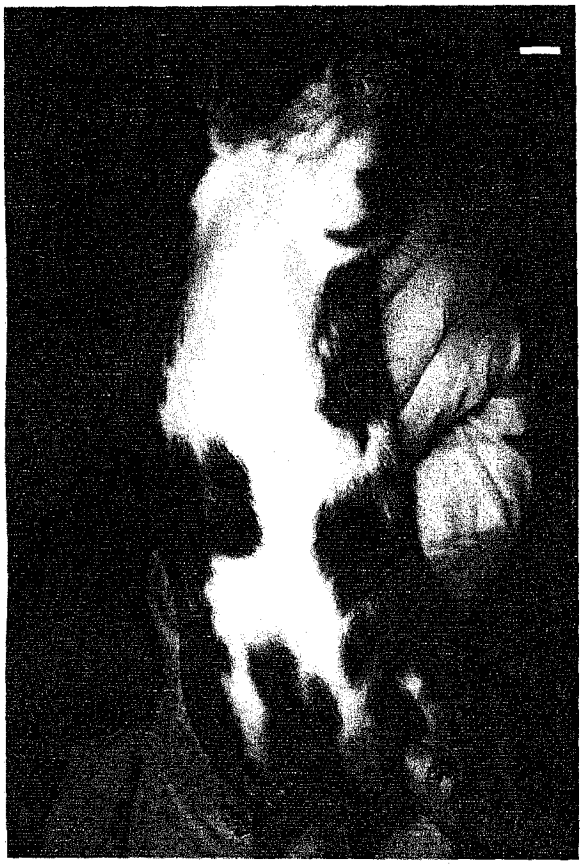


图 2I

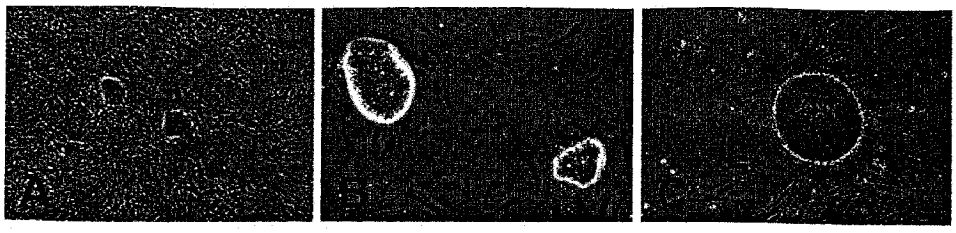


图 3A 图 3B 图 3C

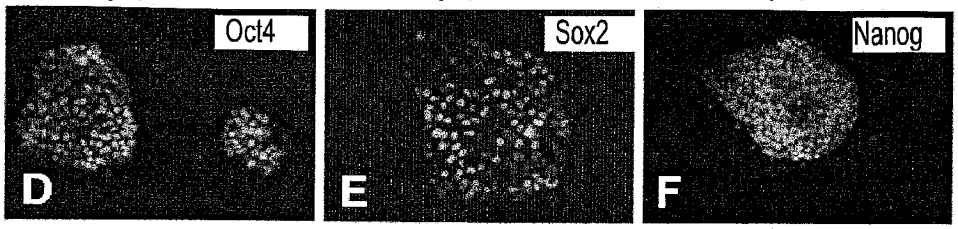


图 3D 图 3E 图 3F

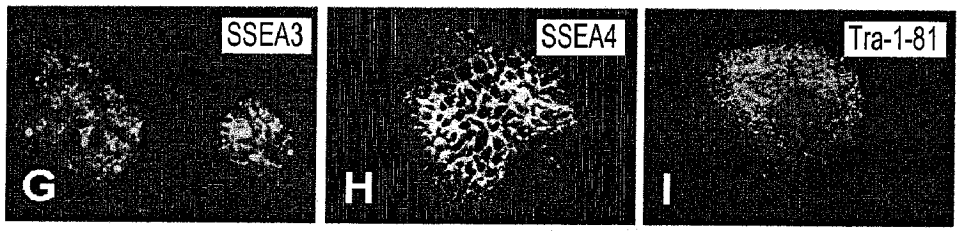


图 3G 图 3H 图 3I

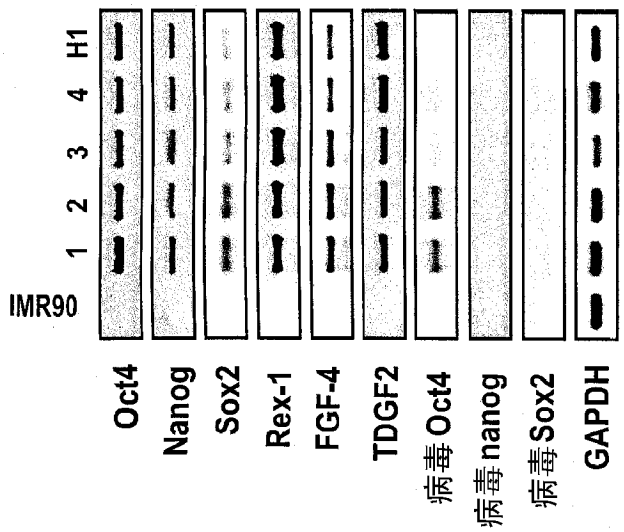


图 3J

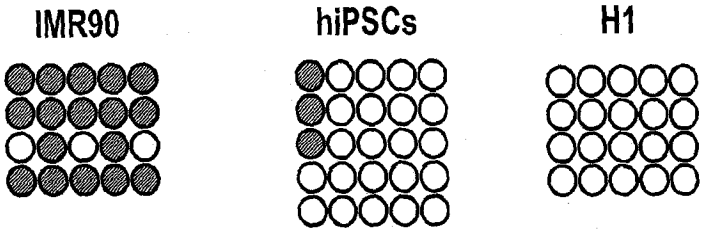

IMR90
hiPSCs
H1

图 3K

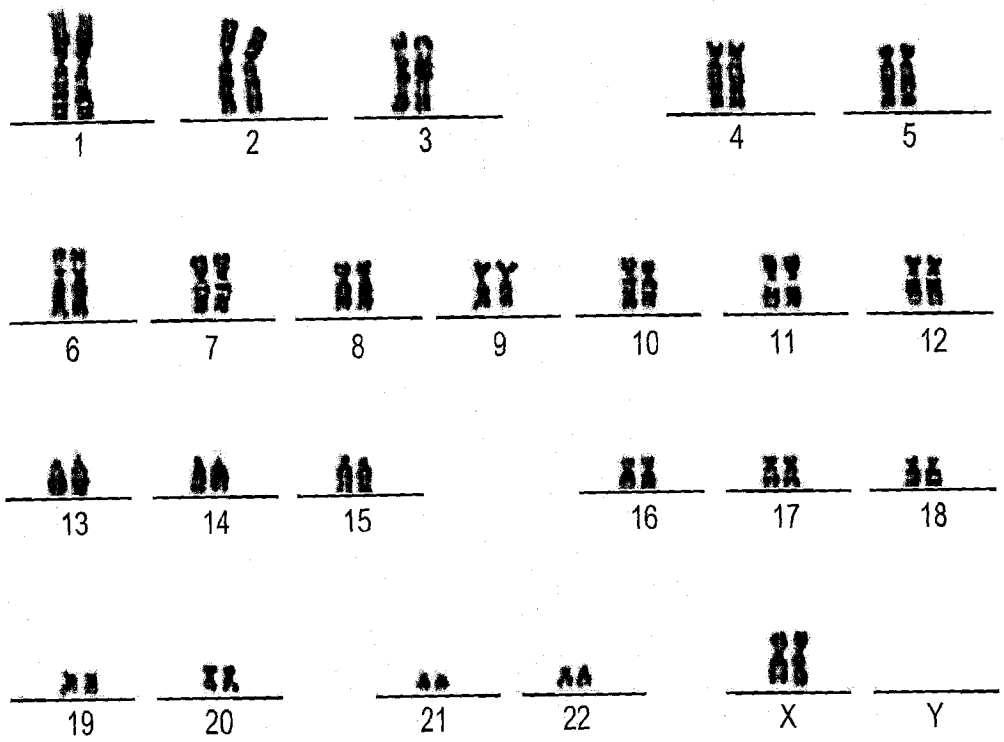

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
X
Y

图 3L

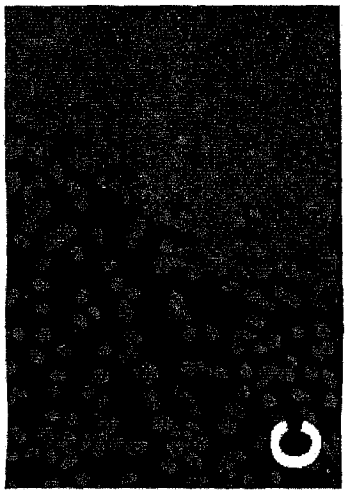


图 4C

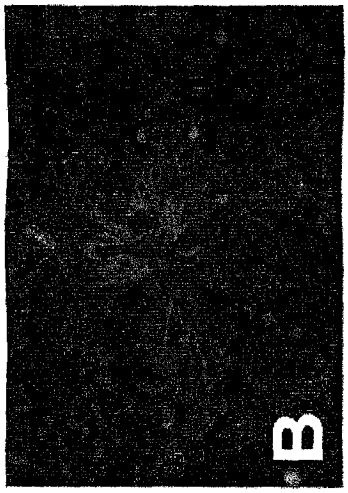


图 4B

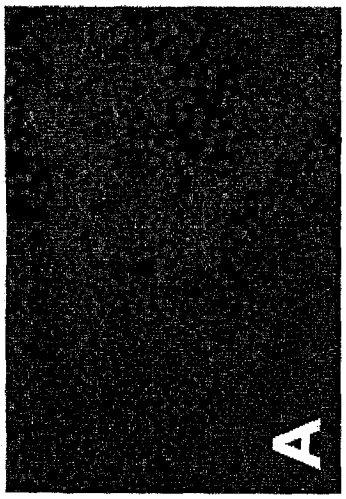


图 4A

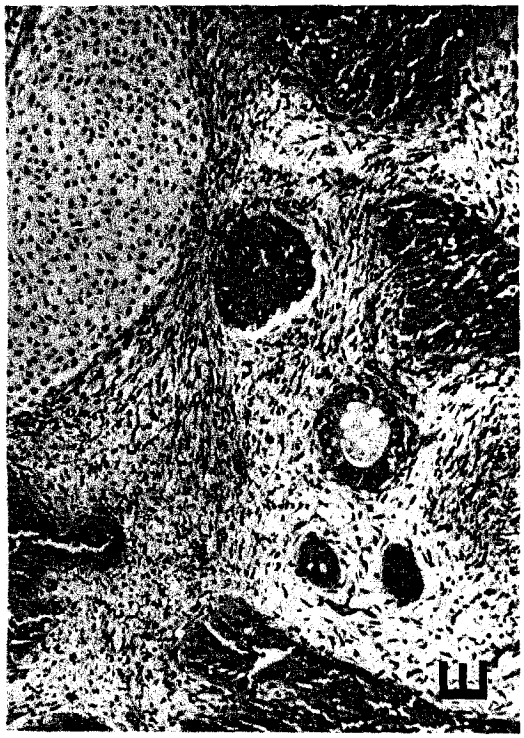


图 4E

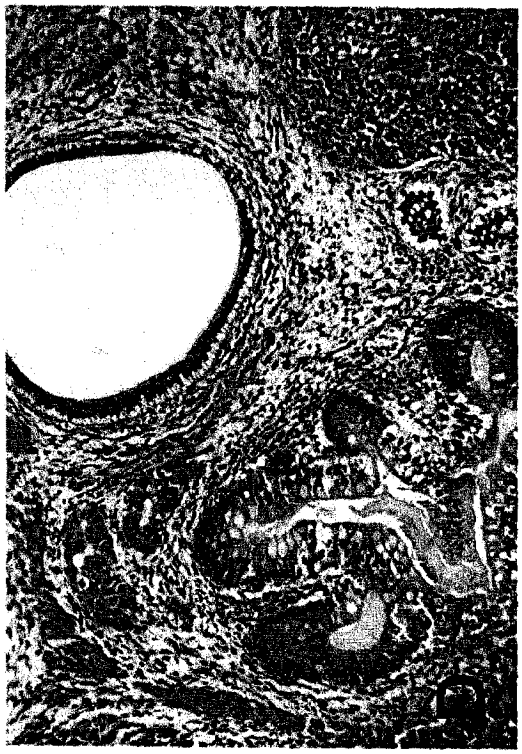


图 4D

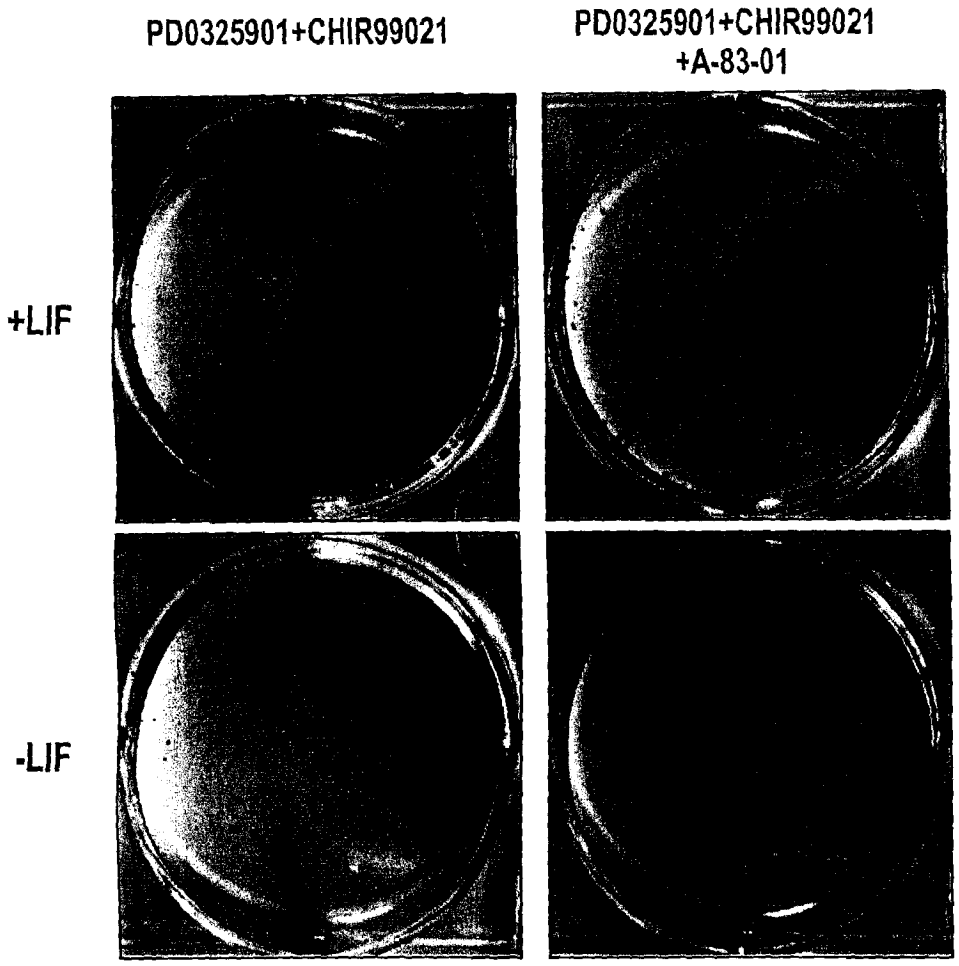

PD0325901+CHIR99021
PD0325901+CHIR99021
+A-83-01
+LIF
-LIF

图 5A

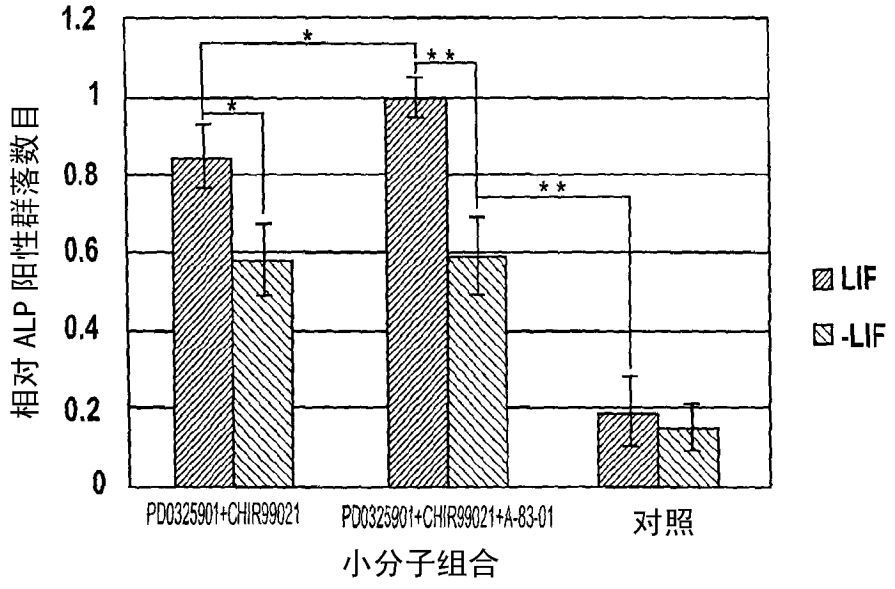

1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
相对 ALP 阳性群落数目
*
**
*
**
LIF
-LIF
PD0325901+CHIR99021
PD0325901+CHIR99021+A-83-01
对照
小分子组合

图 5B

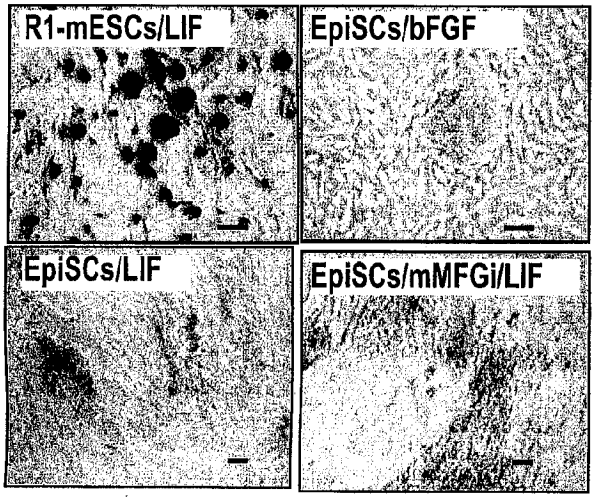


图 6A

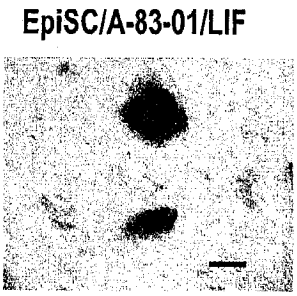


图 6C

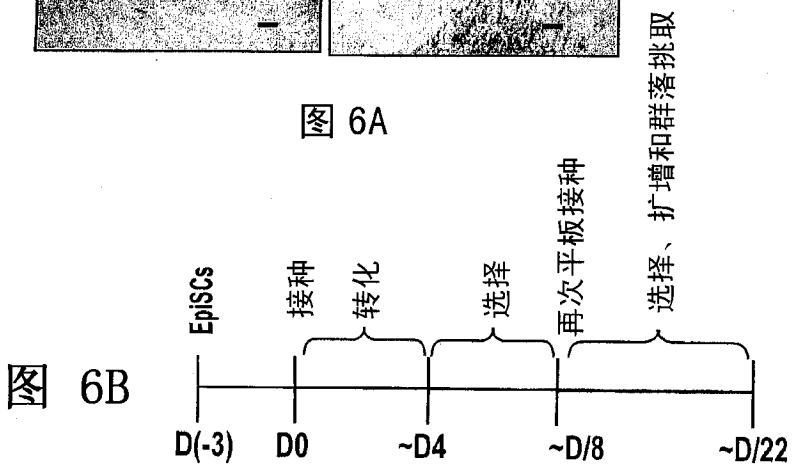


图 6B

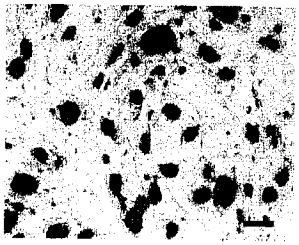


图 6D

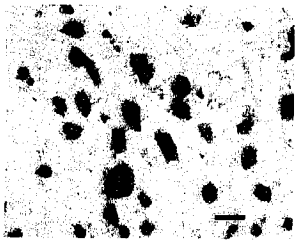


图 6E

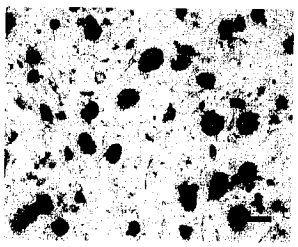


图 6F

嵌合体产生的效率

克隆	转移的胚胎的数目	回收的胚胎数目／小鼠	嵌合体数目
mAMFGi	32	2（胚胎）	0
	21	3（胚胎）	0
硫酸反苯环丙胺/mMFGi	29	0（胚胎）	0
	43	4（胚胎）	2
硫酸反苯环丙胺/mAMFGi	15	3 (活的成体)	2
	21	6 (活的成体)	5

图 7A

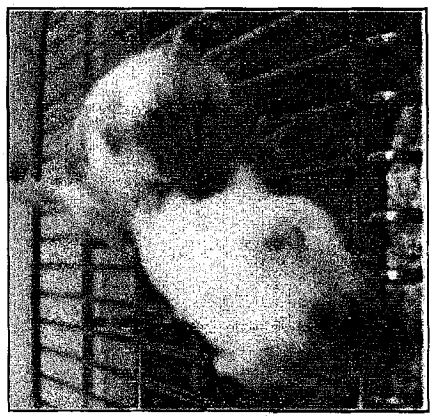


图 7B

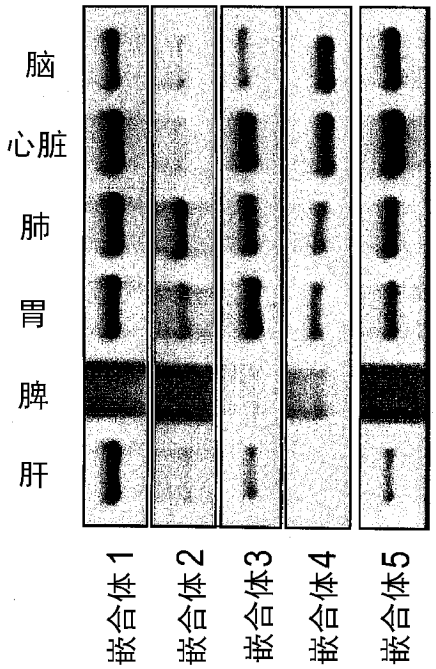

脑
心脏
肺
胃
脾
肝
嵌合体 1
嵌合体 2
嵌合体3
嵌合体4
嵌合体5

图 7C


完整的胚胎

图 7D

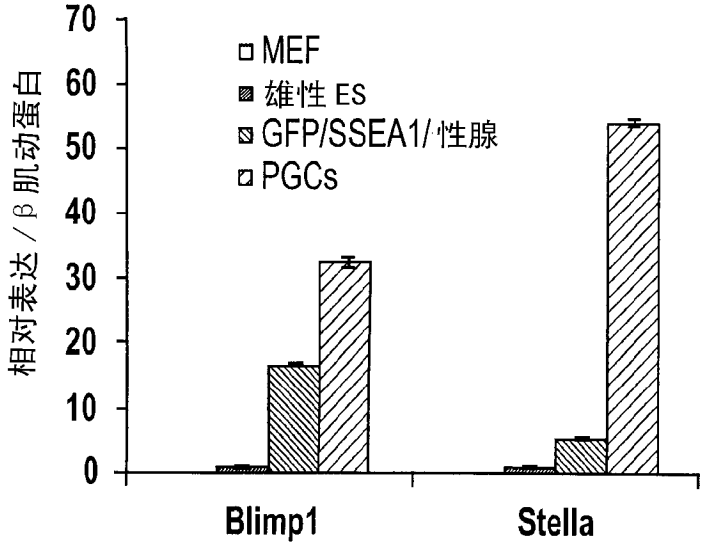

70
60
50
40
30
20
10
0
相对表达 / β 肌动蛋白
MEF
雄性 ES
GFP/SSEA1/ 性腺
PGCs
Blimp1
Stella

图 7E

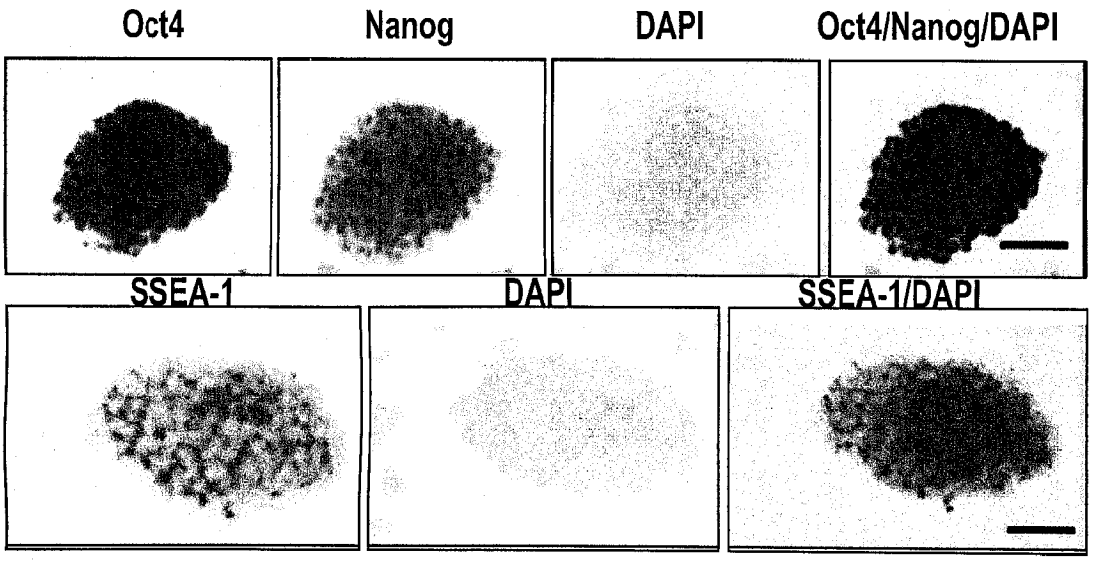


图 8A

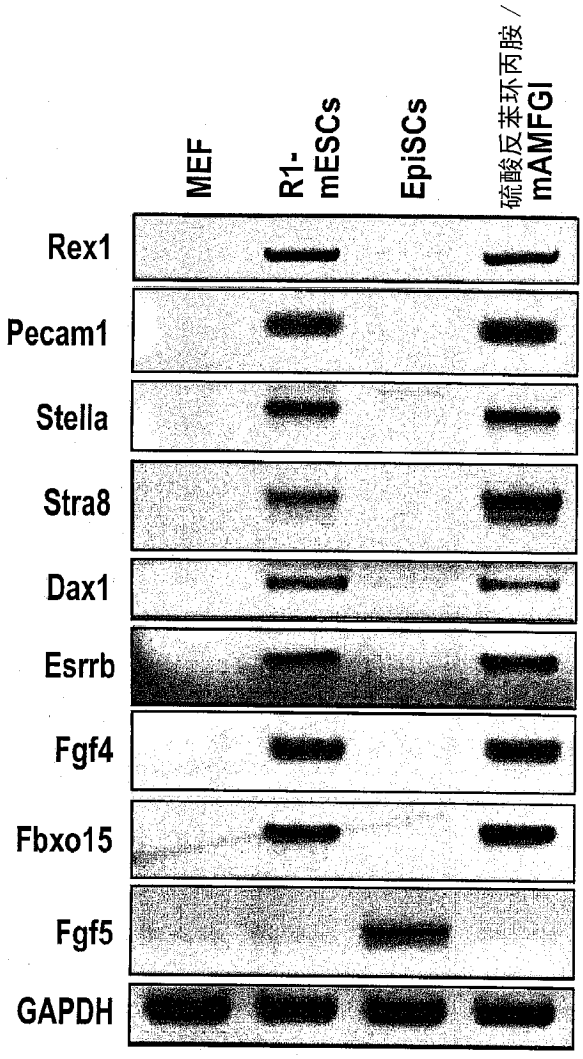

MEF
R1-mESCs
EpiSCs
硫酸反苯环丙胺／mAMFGI
Rex1
Pecam1
Stella
Stra8
Dax1
Esrrb
Fgf4
Fbxo15
Fgf5
GAPDH

图 8B

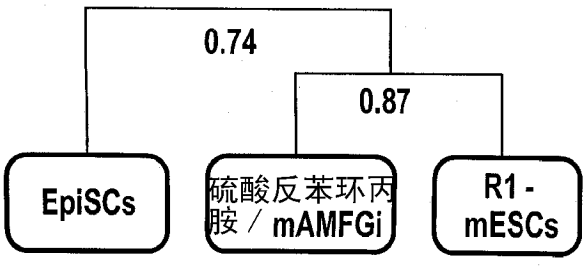

0.74
0.87
EpiSCs
硫酸反苯环丙胺／mAMFGi
R1-mESCs

图 8C

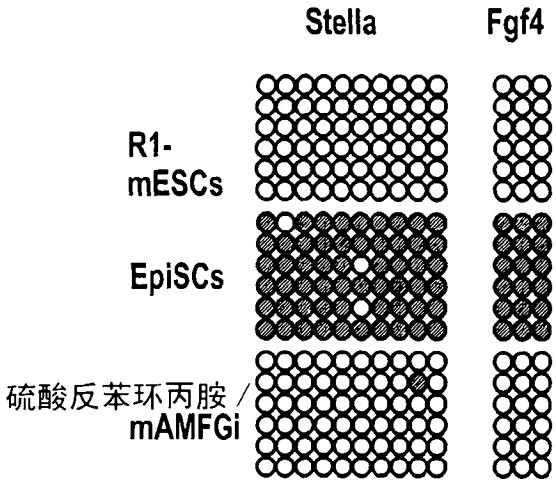

Stella
Fgf4
R1-mESCs
EpiSCs
硫酸反苯环丙胺／mAMFGi

图 8D

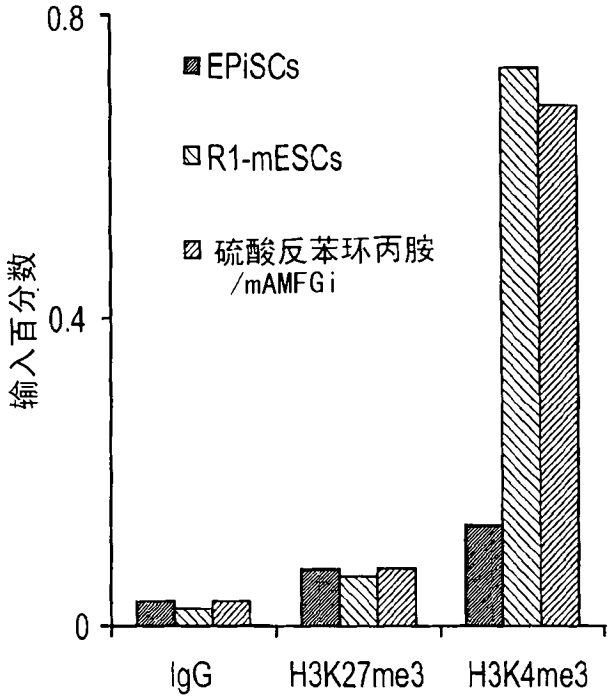

0.8
0.4
0
输入百分数
EPiSCs
R1-mESCs
硫酸反苯环丙胺
/mAMFGi
IgG
H3K27me3
H3K4me3

图 8E

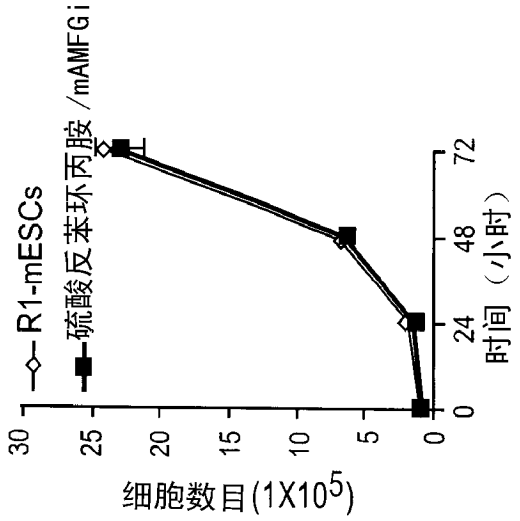

R1-mESCs
硫酸反苯环丙胺 /mAMFGi
30
25
20
15
10
5
0
细胞数目(1X10^5)
0
24
48
72
时间（小时）

图 9A

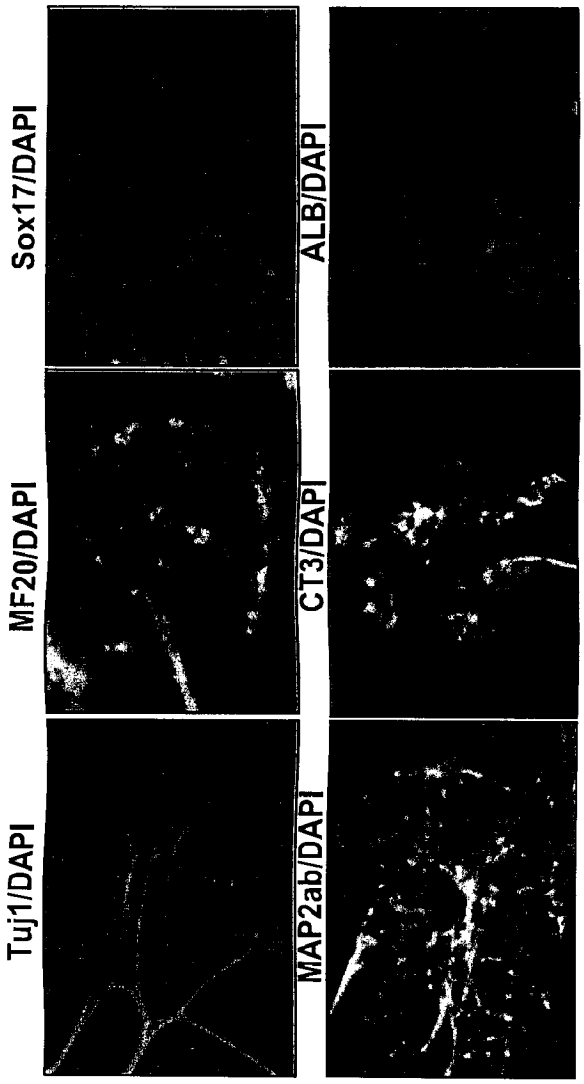

Tuj1/DAPI
MF20/DAPI
Sox17/DAPI
MAP2ab/DAPI
CT3/DAPI
ALB/DAPI

图 9B

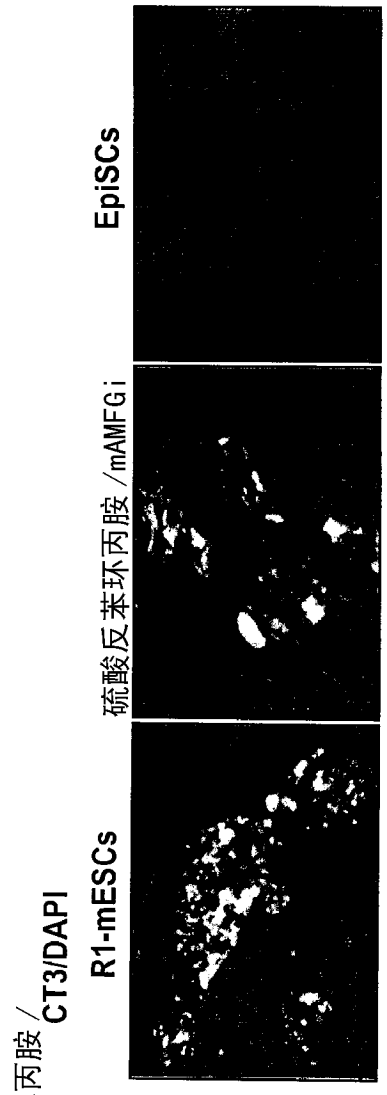

R1-mESCs
硫酸反苯环丙胺/mAMFGi
EpiSCs
CT3/DAPI

图 9D

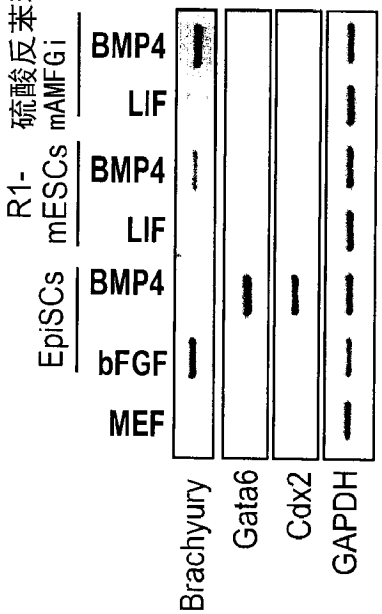

EpiSCs
MEF
bFGF
BMP4
R1-mESCs
LIF
BMP4
硫酸反苯环丙胺 mAMFGi
LIF
BMP4
Brachyury
Gata6
Cdx2
GAPDH

图 9C

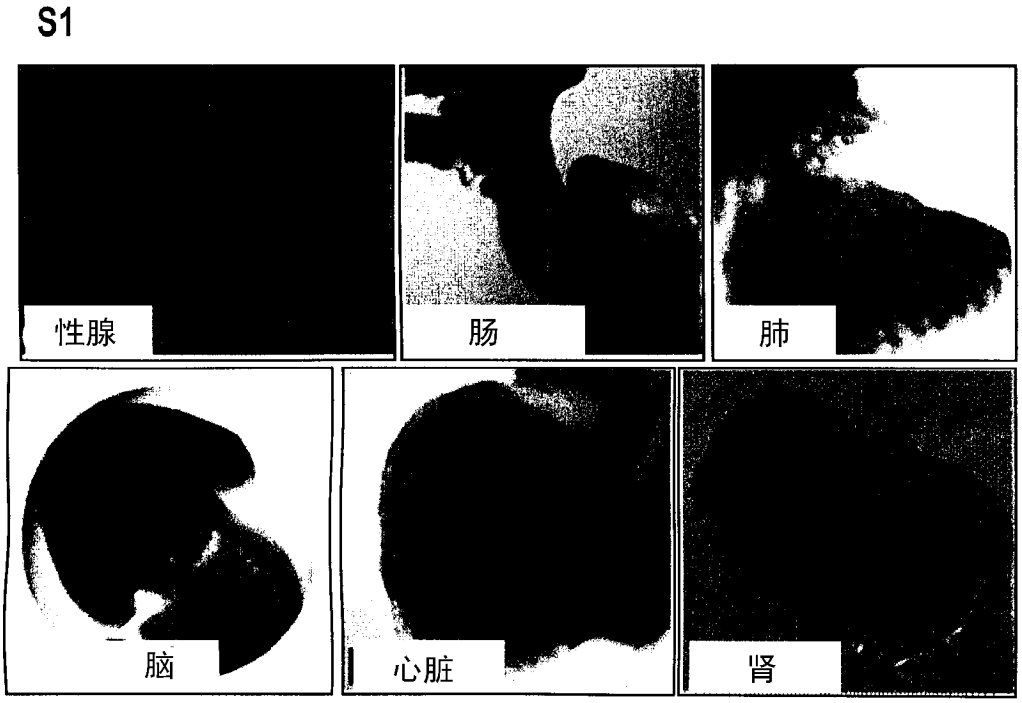


图 10A

GFP 基因型总结

	心脏	肺	肝	脑	脾
嵌合体-1	+	+	+	+	-
嵌合体-2	+	+	+	+	-
嵌合体-3	+	+	+	+	+
嵌合体-4	+	+	+	+	+
嵌合体-5	+	+	+	+	-

图 10B

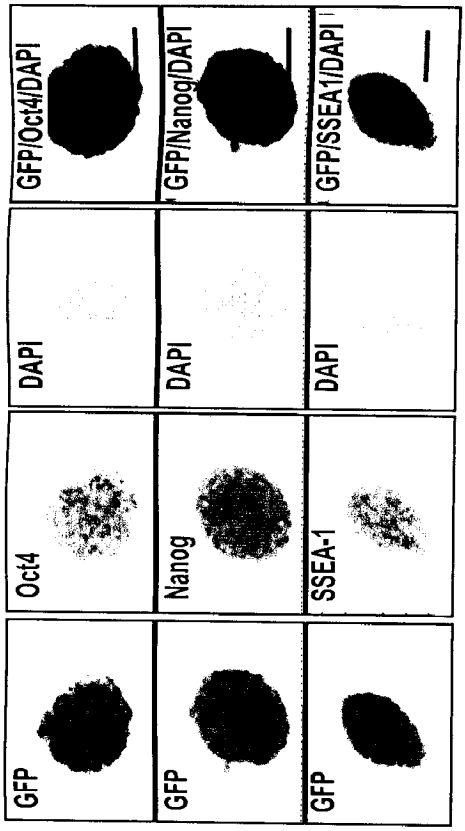

GFP/Oct4/DAPI
GFP/Nanog/DAPI
GFP/SSEA1/DAPI
DAPI
DAPI
DAPI
Oct4
Nanog
SSEA-1
GFP
GFP
GFP

图 11A

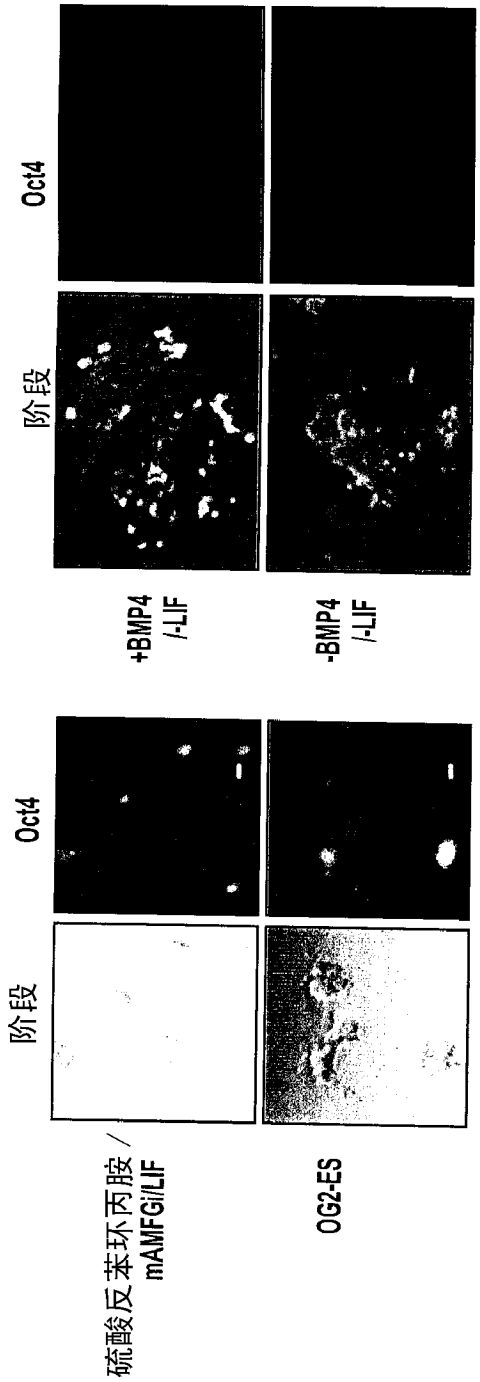

Oct4
阶段
+BMP4
/-LIF
-BMP4
/-LIF
Oct4
阶段
硫酸反苯环丙胺 /
mAMFGi/LIF
OG2-ES

图 11B

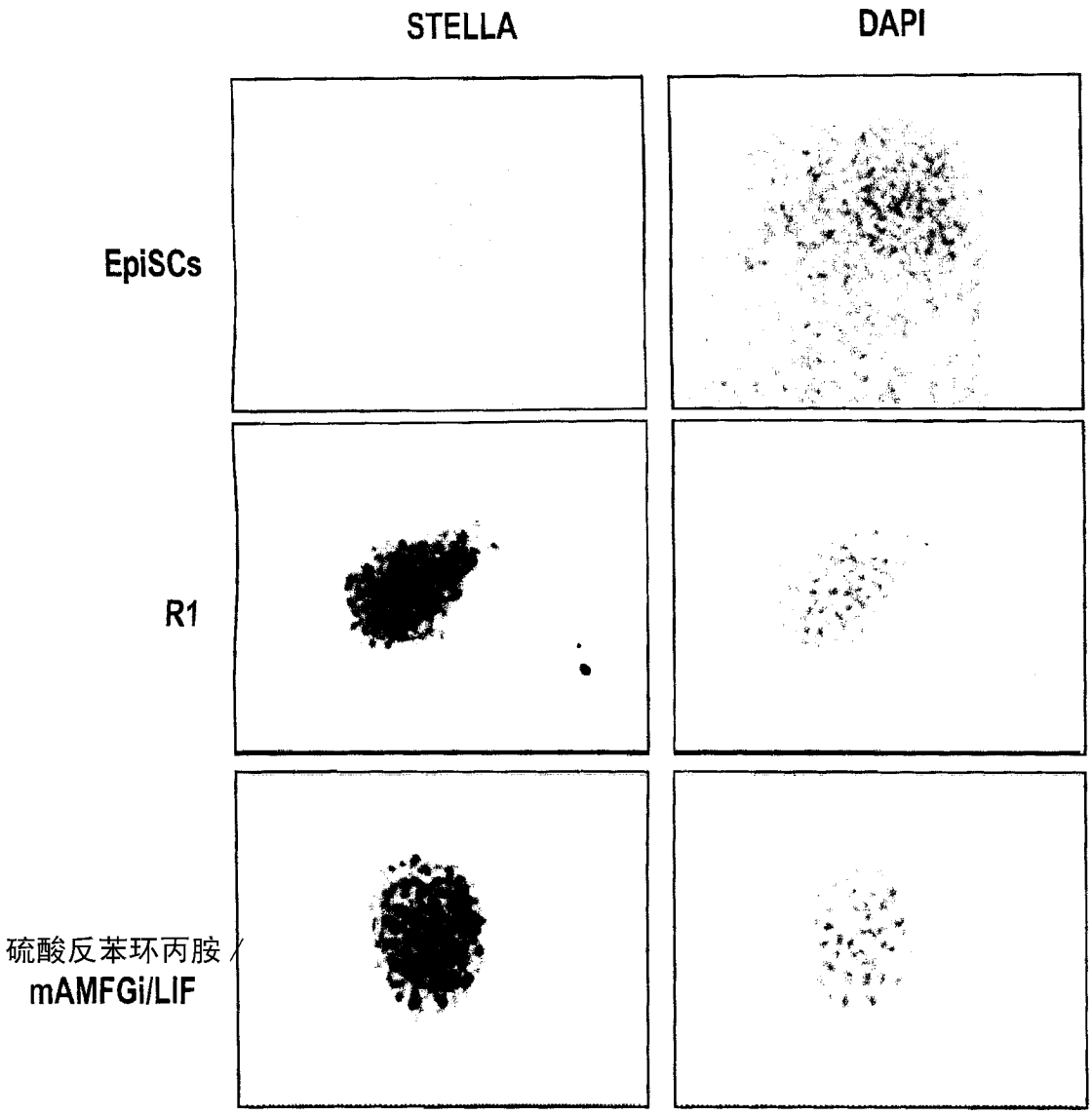


图 12