(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 112048466 A
(43) 申请公布日 2020.12.08

(21) 申请号 202010907822.3

(22) 申请日 2013.04.24

(30) 优先权数据
61/637,631 2012.04.24 US
61/779,533 2013.03.13 US

(62) 分案原申请数据
201380033613.9 2013.04.24

(71) 申请人 细胞疗法有限责任公司
地址 美国马里兰州

(72) 发明人 查尔斯·A·维坎提
马丁·P·维坎提 小岛宏司

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
代理人 姚亮 张德斌

(51) Int.Cl.
C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/074 (2010.01)

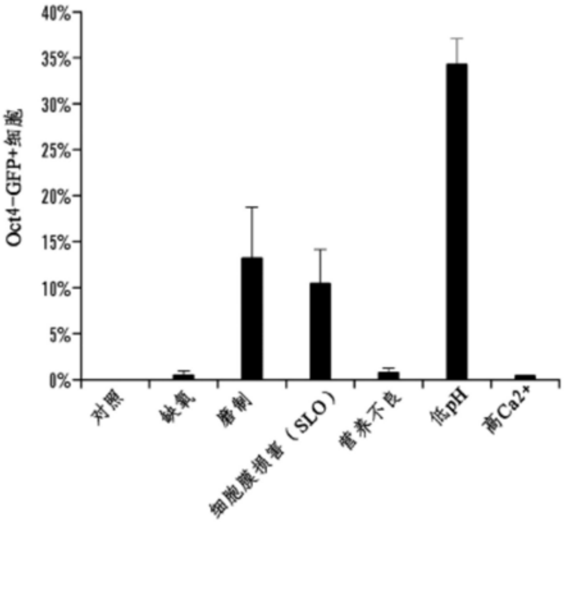
权利要求书1页 说明书38页
序列表19页 附图18页

(54) 发明名称

从头生成多能细胞

(57) 摘要

本文所述的技术涉及与例如无需引入外来遗传物质而使细胞呈现出更加多能状态相关的方法、测定法和组合物。



CN 112048466 A

1.一种用于增加非胚胎的分化的体细胞群中表达一种或多种多能性标志物的细胞的数量的方法，所述方法包括使所述非胚胎的分化的体细胞群接受有效量的包括ATP的应激，以增加应激可诱导的基因的水平，从而增加所述群中的表达多能性标志物的细胞的数量。

2.根据权利要求1所述的方法，其中，无需引入外源基因、转录物、蛋白、核组分或细胞质、或者无需细胞融合而生成所述表达一种或多种多能性标志物的细胞。

3.根据权利要求1所述的方法，所述方法进一步包括选择表达一种或多种多能性标志物的细胞。

4.根据权利要求1所述的方法，其中所述一种或多种标志物选自于由Oct4、Nanog、E-钙粘蛋白和SSEA4所组成的组。

5.根据权利要求1所述的方法，其中所述应激包括将细胞暴露至约3.0至约6.8的pH。

6.根据权利要求1所述的方法，其中将细胞暴露至低于35℃或高于42℃的温度。

7.根据权利要求6所述的方法，其所述温度为处于或低于冰点、或至少约85℃。

8.根据权利要求1所述的方法，其中所述细胞群中的细胞膜被机械破坏。

9.根据权利要求1所述的方法，其中将所述细胞群体暴露于机械应激，从而破坏孔并导致所述细胞损失至少约40％的细胞质或线粒体。

10.根据权利要求1所述的方法，其中所述细胞群体暴露于所述应激约1分钟至约1小时之间的时间。

11.根据权利要求1所述的方法，其中应激的施加通过包括DNA和组蛋白的去甲基化和甲基化的表观遗传变化来诱导染色质的细胞重编程。

12.根据权利要求1所述的方法，其中ATP的浓度在20nM至200mM尔之间。

13.根据权利要求1所述的方法，其中ATP的有效量为约0.02mM至200mM。

14.根据权利要求1所述的方法，其进一步包括使所述非胚胎的分化的体细胞群接受选自以下的组的应激：约3.0至约6.0，约4.5至约6.0，或5.4至5.8，或约5.4至5之间的低pH、缺氧和对细胞膜孔的机械破坏。

15.根据权利要求14所述的方法，其中所述细胞群体暴露于所述应激约1分钟至3周之间的时间。

从头生成多能细胞

[0001] 本申请是申请号为201380033613.9(PCT申请号为PCT/US2013/037996)、申请日为2013年04月24日、发明名称为从头生成多能细胞的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 根据35 U.S.C.§119(e),本申请要求2012年4月24日提交的美国临时申请号61/637,631和2013年3月13日提交的美国临时申请号61/779,533的权益,以引用的方式将其内容整体并入本文。

技术领域

[0004] 本文所述的技术涉及生产多能细胞。

背景技术

[0005] 当前获得多能干细胞的方法主要依赖于具有受限的可得性的组织(例如,胎组织或脐带血)或重编程因子的加入(Hanna,J.等,Cell 2008 133,250-264;Hockemeyer,D.等,Cell stem cell 2008 3,346-353;Kim,D.等,Cell stem cell 2009 4,472-476;Kim,J.B.,Nature 2009 461,649-643;Okabe,M.等,Blood 2009 114,1764-1767),所述方法涉及引入外源性核酸。易于生产干细胞、特别是自体干细胞的方法(而无由加入外源性重编程因子引起的并发症),将加快细胞分化研究和基于干细胞的疗法的开发。虽然推测由暴露于刺激物(如烧伤、化学损伤、创伤和辐射)导致的细胞受损可使正常体细胞变为癌细胞,然而,并无直接证据可将健康的成体体细胞转化为其它状态,而无需重编程因子的特定操控。

[0006] 研究人员之前已经报道了在成体组织内发现“成体干细胞”(Reynolds,B.A.&Weiss,S.Science 1992 255,1707-1710;Megeney,L.A.等,Genes&development 1996 10,1173-1183;Caplan,A.I.Journal of orthopaedic research 1991 9,641-650;Lavker,R.M.&Sun,T.T.The Journal of investigative dermatology 1983 81,121s-127s)。这些报道仍然存在争议。例如,寻找表达干细胞标志物Oct4的细胞的研究人员未能在正常内稳态的成体骨髓中找到Oct4表达细胞(Lengner,C.J.等,Cell Cycle 2008 7,725-728;Berg,J.S.&Goodell,M.A.,Cell stem cell 2007 1,359-360),而其他人报道了能够从不同的成体组织中分离Oct4表达细胞(Jiang,Y.等,Nature 2010 418,41-49;D'Ippolito,G.等,Journal of cell science 2004 117,2971-2981;Johnson,J.等,Cell 2005 122,303-315;Kucia,M.等,Leukemia 2006 20,857-869;Kuroda,Y.等,PNAS 2011 107,8639-8643;Obokata,H.等,Tissue engineering.2011Part A 17,607-615;Rahnemai-Azar,A.等,Cytotherapy,2011 13,179-192;Huang,Y.等,Transplantation 2010 89,677-685;Zuba-Surma,E.K.等,Journal of cellular and molecular medicine 2011 15,1319-1328;Paczkowska,E.等,Annals of transplantation 2011 16,59-71)。据推测,这些细胞代表成体干细胞群,或仅为所使用技术的人工效应物。在任一情况下,它们均是罕见的,而并不代表用于研究和治疗目的的多能细胞的适当来源。

发明内容

[0007] 本文描述了由例如分化细胞或成体细胞从头(de nove)生成或生产多能细胞的方法。本文所述的方法可进一步涉及提高细胞的多能性(或者,例如降低细胞的成熟性),例如使专能(multipotent)细胞变为多能(pluripotent)细胞。本文所述的涉及生产多能细胞的技术方面是基于发明人的如下认识,环境应激能够诱导细胞呈现出更加多能的表型。

[0008] 在一个方面,本文描述了生成多能细胞的方法,所述方法包括使细胞接受应激。在一些实施方式中,所述方法可进一步包括选择表现出多能性的细胞。在一些实施方式中,细胞并不作为组织的部分而存在。在一些实施方式中,应激包括将至少约40%的细胞质从细胞中移除。在一些实施方式中,应激包括将至少约40%的线粒体从细胞中移除。在一些实施方式中,应激足以将暴露至所述应激的细胞中的至少10%的细胞膜破坏。在一些实施方式中,细胞为体细胞、干细胞、祖细胞或胚胎细胞。在一些实施方式中,细胞是经分离的细胞。在一些实施方式中,细胞存在于细胞的异质群中。在一些实施方式中,细胞存在于细胞的同质群中。在一些实施方式中,选择表现出多能性的细胞包括对表达Oct4或Nanog、或者表达Oct4和Nanog的细胞进行选择。在一些实施方式中,选择表现出多能性的细胞包括对不粘附的细胞进行选择。

[0009] 在一些实施方式中,将至少约50%的细胞质从细胞中移除。在一些实施方式中,将至少约60%的细胞质从细胞中移除。在一些实施方式中,将约60%-80%的细胞质从细胞中移除。在一些实施方式中,将至少约80%的细胞质从细胞中移除。在一些实施方式中,将至少约90%的细胞质从细胞中移除。

[0010] 在一些实施方式中,应激包括将细胞暴露至选自下述的至少一种环境刺激:创伤、机械刺激、化学暴露、超声刺激、氧剥夺、辐射和暴露至极端温度。在一些实施方式中,应激包括将细胞暴露至约4.5至约6.0的pH。在一些实施方式中,应激包括将细胞暴露至约5.4至约5.8的pH。在一些实施方式中,将细胞暴露1天以内。在一些实施方式中,将细胞暴露1小时以内。在一些实施方式中,将细胞暴露约30分钟。

[0011] 在一些实施方式中,暴露至极端温度包括将细胞暴露至低于35℃或高于42℃的温度。在一些实施方式中,暴露至极端温度包括将细胞暴露至处于或低于冰点的温度、或者将细胞暴露至至少约85℃的温度。在一些实施方式中,机械刺激包括使细胞通过具有小于细胞尺寸的孔的至少一个装置。在一些实施方式中,机械刺激包括使细胞通过具有逐渐变小的孔的数个装置。

[0012] 在一些实施方式中,移除部分细胞质为将至少约50%的线粒体从细胞质中移除。在一些实施方式中,移除细胞质或线粒体为将约50%-90%的线粒体从细胞质中移除。在一些实施方式中,移除细胞质或线粒体为将超过90%的线粒体从细胞质中移除。

[0013] 在一些实施方式中,所述方法可进一步包括培养多能细胞,从而使多能细胞增殖。在一些实施方式中,多能细胞表达一种或多种多能干细胞标志物,所述标志物选自于由Oct4和Nanog所组成的组。

[0014] 在一些实施方式中,细胞为哺乳动物细胞。在一些实施方式中,细胞为人细胞。在一些实施方式中,细胞为成体细胞或新生儿细胞。在一些实施方式中,所述方法可进一步包括将多能细胞在体外进行维持。在一些实施方式中,细胞的表观遗传状态变为更接近于类似胚胎干细胞的表观遗传状态。在一些实施方式中,表观遗传状态包括甲基化模式。

[0015] 在一个方面，本文描述了测定法，所述测定法包括将通过本文所述方法生产的多能细胞与候选试剂接触。在一些实施方式中，所述测定法可用于识别如下试剂，所述试剂影响多能细胞的存活力、分化和增殖中的一种或多种。

[0016] 在一个方面，本文描述了通过本文所述方法生产的多能细胞在用于受试者的细胞疗法中的用途。

[0017] 在一个方面，本文描述了在需要细胞疗法的受试者中进行的自体细胞治疗的方法，所述方法包括根据本文所述方法从细胞生成多能细胞，其中，所述细胞获取自所述受试者，并向所述受试者给予包含多能细胞或多能细胞的分化后代的组合物。在一些实施方式中，所述方法可进一步包括在向受试者给予组合物前，使多能细胞沿预定细胞系分化。

[0018] 在一个方面，本文描述了包含多能细胞的组合物，其中，所述多能细胞通过本文所述方法从细胞生成。

[0019] 在一个方面，本文描述了提高多能细胞自我更新能力的方法，所述方法包括在促肾上腺皮质激素(ACTH)或3i培养基存在的情况下，对细胞进行培养。在一些实施方式中，在含ACTH的LIF培养基中培养细胞。在一些实施方式中，ACTH以约0.1μM至约100μM的浓度存在。在一些实施方式中，细胞为通过本文所述方法生成的细胞。在一些实施方式中，细胞为全能细胞(totipotent cell)。在一些实施方式中，在ACTH或3i培养基的存在的情况下，将细胞培养至少3天。在一些实施方式中，在ACTH或3i培养基存在的情况下，将细胞培养至少5天。在一些实施方式中，在ACTH或3i培养基存在的情况下，将细胞培养至少7天。在一些实施方式中，在培养步骤后，细胞表达出可检测水平的干细胞标志物，所述干细胞标志物选自于由Oct3/4、Nanog、Rex1、Klf4、Sox2、Klf2、Esrr-β、Tbx3和Klf5所组成的组。

[0020] 在一些实施方式中，本文所述方法中使用的细胞处于体内。在一些实施方式中，本文所述方法中使用的细胞处于体外。

附图说明

[0021] 图1A-图1D描述了从CD45阳性体细胞生成的Oct4表达细胞。图1A描述了经应激处理的细胞的Oct4-GFP表达。经应激处理的细胞表达Oct4-GFP，而未经处理的对照不表达Oct4-GFP。应激处理组的右上方示出Oct4表达集落的放大图。比例尺表示100μm。图1B描述了经应激处理的细胞和未经应激处理的对照群的分析。在第5天，仅在应激处理组中观察到GFP表达细胞群。图1C描述了在第7天，在应激处理前和应激处理后的CD45阳性细胞的细胞尺寸分析。图1D描述了在应激处理后CD45阳性细胞随时间发生的变化。

[0022] 图2A-图2B描述了动物愈伤组织细胞(ACCs)的特征。图2A描述了多能标志物基因随时间发生的基因表达变化。将信使RNA水平归一化为GAPDH(n＝3，平均值+S.D.)。图2B描述了Oct4和Nanog启动子基因的甲基化分析。

[0023] 图3A-图3D描述了应激处理后的细胞修饰。图3A描述了在ACCs生成阶段中应激防御基因的相对基因表达。在第3天和第7天收集样品，并与CD45阳性细胞进行比较(n＝3，平均值+S.D.)。图3B描述了全部的细胞ATP测量(n＝3，平均值+S.D.)。图3C描述了ROS测量。误差棒表示S.D.。图3D描述了mtDNA复制因子的相对基因表达(n＝3，平均值+S.D.)。

[0024] 图4A-图4B描述了由ACCs生成的嵌合体小鼠。图4A描述了生成嵌合体小鼠的示意图。小组(i)显示了用胰蛋白酶使ACs离解为单个细胞，或者(小组ii)将ACs切割为小块，然

后注射入囊胚。图4B描述了嵌合体分布分析。通过FACS分析了来自9只幼兽的组织。

[0025] 图5A-图5C为以ACC生成条件进行实验。图5A显示了将CD45阳性细胞暴露至多种应激,并通过FACS对Oct4-GFP表达进行分析。在应激处理后,存活细胞中的Oct4-GFP表达细胞的百分比(n=3,平均值+S.D.)。图5B描述了pH条件的确定。将CD45阳性细胞暴露至不同的pH溶液。在应激处理后第3天,通过FACS对Oct4-GFP表达进行分析。图5C描述了培养条件的确定。在多种培养基中对经应激处理的细胞进行培养。在第14天,对表达GFP的ACs数量进行计数(n=3,平均值+S.D.)。

[0026] 图6A-图6B描述了由来源于ICR小鼠的CD45阳性细胞生成ACCs。图6A描述了在应激处理后CD45阳性细胞随时间发生的变化。通过FACS对E-钙粘蛋白和SSEA-1的表达进行分析。图6B显示出通过RT-PCR证实E-钙粘蛋白/SSEA1双阳性细胞的Oct4基因表达(n=3,平均值+S.D.)。

[0027] 图7A-图7B描述了由来源于GOF小鼠的多种组织生成ACC。图7A描述了在应激处理后Oct4-GFP表达细胞的比例。从多种组织中分离体细胞,并暴露至多种应激。通过FACS对Oct4-GFP的表达进行分析。图7B描述了来源于多种组织的ACCs的胚胎基因表达。通过GAPDH对基因表达进行归一化(n=3,平均值+S.D.)。

[0028] 图8描述了在前7天中应激防御基因的相对基因表达。在应激处理后,在第1天、第3天和第7天收集细胞,并与天然的CD45阳性细胞进行基因表达方面的比较。蓝色图表示热休克蛋白的基因表达。绿色图表示DNA修复基因的表达。红色图表示氧化还原基因的表达。Y轴表示表达的相对倍数。

[0029] 图9描述了ACCs的分化。该图描述了对嵌合体分布进行分析。通过FACS对用源自多种体细胞的ACCs生成的嵌合体胎儿进行分析。图中示出了处于E13.5至15.5的5个嵌合体胎儿的平均值。

[0030] 图10显示出应激处理引起通过间充质-上皮转化(MET)进行的体细胞重编程。在天然细胞中、以及在开始应激处理后第3天和第7天的细胞中显示出MET相关基因的表达。y轴示出表达百分比,用该基因的表达水平将该表达百分比归一化为样品中的水平。

[0031] 图11描述了在应激前和在应激后细胞群的FACS分析。在来自各测试组织类型的应激后细胞群中的GFP表达明显,表明生成多能细胞。

具体实施方式

[0032] 本文所述技术方面涉及由细胞生产或生成多能细胞。本文所述技术方面是基于发明人的如下发现,应激能够诱导由细胞生产多能干细胞,而无需将外源基因、转录物、蛋白、核组分或细胞质引入至细胞中,或者无需细胞融合。在一些实施方式中,应激诱导细胞中细胞质和/或线粒体的量减少,触发脱分化过程并产生多能细胞。在一些实施方式中,应激造成例如暴露至该应激的细胞中的至少10%的细胞膜破坏。这些多能细胞的特征在于如下的一种或多种:分化为三层胚层中的各层的能力(在体外和/或在体内)、在体内生成畸胎瘤样细胞团块、以及生成有活力的胚胎和/或嵌合体小鼠的能力。

[0033] 本文描述了如下实验,所述实验显示出用特定环境应激(包括但不限于,减少细胞中的细胞质和/或线粒体的量的应激)对细胞进行处理,能够降低线粒体活性,使与脱分化相关的基因组区域去甲基化,从而使细胞显示出已知的脱分化途径的标志物。因此,在一些

实施方式中，本文提供了从细胞生成多能细胞的方法，所述方法包括将至少约40％细胞质和/或线粒体从细胞中移除，并选择多能性或表现出多能性标志物的细胞，其中，所述细胞并不存在于组织中。本文还描述了能够从细胞生成多能细胞的其它应激处理。

[0034] 为了方便起见，将本文在说明书、实施例和所附的权利要求中使用的特定术语集中于此。除非另有说明或在上、下文中有所暗示，下列术语和短语包括下文提供的含义。除非另有明确说明或从上、下文中可明显看出，下列术语和短语不排除在其所属领域已具有的含义。提供所述定义以辅助描述具体实施方式，而由于本发明的范围仅受权利要求所限，因此并不意味着限制所请求保护的发明。除非另有定义，本文使用的所有科技术语具有与本发明所属技术领域中的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0035] 本文所使用的术语“包含/包括(comprising或comprises)”表示对方法或组合物而言必要的组合物、方法及其各自的组成部分，并且无论是否必要都仍然对未指定的要素保持开放。

[0036] 本文所使用的术语“基本上由…组成”涉及给定的实施方式所需的要素。该术语允许存在实质上不影响所述实施方式的基础和新颖性或功能性特征的要素。

[0037] 术语“由…组成”涉及本文所述的组合物、方法及其各自的组成部分，排除没有在实施方式描述中列出的任何要素。

[0038] 除非上、下文中明确地另有所指，本申请文件和所附权利要求中所用的单数术语“一(a/an)”和“该/所述(the)”涵盖复数的所指物。因此，例如，提及“所述方法/该方法(the method)”时，其包括一种或多种本文所述的方法和/或步骤类型和/或本领域技术人员阅读本公开内容等后将变得显而易见的方法和/或步骤类型。类似地，除非上、下文中明确地另有所指，否则“或”一词旨在包括“和”。虽然可将与本文所述的方法和材料类似或等同的方法和材料用于本公开内容的实施或测试，然而下文中对合适的方法和材料进行了描述。缩写“e.g.”源自于拉丁文exempli gratia，并在本文中用于指代非限制性实例。因此，缩写“e.g.”与术语“例如”具有相同的含义。

[0039] 细胞生物学和分子生物学中常用术语的定义可在如下著作中找到：“The Merck Manual of Diagnosis and Therapy”，第19版，Merck Research Laboratories出版，2006(ISBN 0-911910-19-0)；Robert S.Porter等(著)，The Encyclopedia of Molecular Biology，Blackwell Science Ltd.出版，1994(ISBN 0-632-02182-9)。分子生物学中常用术语的定义也可在如下著作中找到：Benjamin Lewin，Genes X，Jones&Bartlett Publishing出版，2009(ISBN-10:0763766321)；Kendrew等(著)，Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference，VCH Publishers，Inc.出版，1995(ISBN 1-56081-569-8)；以及Current Protocols in Protein Sciences 2009，Wiley Intersciences，Coligan等著。

[0040] 除非另有说明，否则本发明使用例如在下列出版物中描述的标准程序来实施：Sambrook等，Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第3版)，Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，N.Y.，USA(2001)；Davis等，Basic Methods in Molecular Biology，Elsevier Science Publishing，Inc.，New York，USA(1995)；Current Protocols in Cell Biology(CPCB)(Juan S.Bonifacino等著，John Wiley and Sons，Inc.)，以及Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique，R.Ian Freshney，

出版商:Wiley-Liss;第5版(2005),Animal Cell Culture Methods(Methods in Cell Biology,第57卷,Jennie P.Mather and David Barnes editors,Academic Press,第1版,1998);以引用的方式将全部所述出版物的整体并入本文。

[0041] 本文所使用的术语“降低/减少(decrease/reduce/reduced/reduction)”通常都意味着与参比水平相比统计学上显著量的降低。然而,为避免疑义,“减少”或“降低”一般表示与不存在给定处理相比,降低至少10%,并可包括降低至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或者上至并包括,例如,与不存在给定处理的情况相比,给定实体(entity)或参数的完全缺乏,或与不存在给定处理的情况相比在10%-99%之间的任意降低。

[0042] 本文所使用的术语“增加(increased/increase)”或“增强(enhance)”通常都意味着统计学上显著量的增加;为避免任何疑义,术语“增加(increased/increase)”或“增强(enhance)”表示与参比水平相比,增加至少10%,例如,与参比水平相比,增加至少约20%、或至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%、或上至并包括增加100%,或10%-100%之间的任意增加;或与参比水平相比,增加至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍、或至少约10倍,或2倍-10倍之间的任意增加,或更高量的增加。

[0043] 当涉及疾病、紊乱或病情时,本文所使用的术语“治疗(treat/treatment/treating)”或“改善(amelioration)”是指对病症的治疗处理,其中,使受试者的症状或病症的进展或严重程度得以逆转、缓和、改善、抑制、减缓或停止。术语“治疗”包括减轻或缓和病症的至少一种症状或不良影响。如果一种或多种症状或临床标志物减少,治疗通常“有效”。或者,如果病症的进展得以减轻或停止,治疗“有效”。也就是说,“治疗”不仅包括症状或标志物的改善,也包括使在不进行治疗的情况下所预期到的症状进展或恶化中止或至少减慢。有利或所期望的临床结果包括但不限于,一种或多种症状的缓和、缺陷程度减小、健康状态稳定(即,不再恶化)、疾病进展的延缓或显示出减慢、以及症状的改善或缓解。“治疗”还可包括受试者的存活超出统计学上预期的死亡时间。

[0044] 本文所使用的术语“给药/给予”是指将根据本文所述方法生产的多能细胞和/或此类多能细胞的至少部分分化的后代通过如下方法或途径放置入受试者中,所述方法或途径使所述细胞至少部分定位于期望的位点。可通过任何适合的途径给予包含根据本文所述方法生产的多能细胞和/或此类多能细胞的至少部分分化的后代的药物组合物,从而在受试者中产生有效治疗。

[0045] 本文所使用的术语“受试者”意味着人或动物。通常,动物为脊椎动物,如灵长类动物、啮齿动物、家畜或狩猎动物(game animal)。灵长类动物例如包括黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴和猕猴(如恒河猴)。啮齿动物包括小鼠、大鼠、旱獭、雪貂、兔和仓鼠。家畜和狩猎动物包括奶牛、马、猪、鹿、野牛、水牛、猫科物种(如,家猫)、犬科物种(如,狗、狐狸、狼)、鸟类物种(如,鸡、鸸鹋、鸵鸟)和鱼类(如,鳟鱼、鲶鱼和鲑鱼)。患者或受试者包括前面所述的任何子集,例如上述所有。在某些实施方式中,受试者是哺乳动物,例如,灵长类动物、如人类。

[0046] 优选地,受试者是哺乳动物。所述哺乳动物可为人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、

狗、猫、马或牛，但不仅限于这些实例。除人以外的哺乳动物可有利地用作代表与给定细胞或组织的缺陷、功能失常和/或不足相关、或与干细胞区室(stem cell compartment)的缺陷、功能失常或不足相关的疾病动物模型的受试者。此外，本文描述的方法可用于治疗家畜和/或宠物。受试者可为雄性或雌性。受试者可为先前诊断或识别为患有或具有细胞类型、组织或干细胞区室的缺陷、功能失常和/或不足，或者与此类病症相关的一种或多种疾病或病症，并任选但需要未经历过对此类病症进行的治疗的个体。受试者还可为诊断或识别为患有包括细胞类型、组织或干细胞区室的缺陷、功能失常和/或不足在内的病症，但由于接受对此类病症进行的一种或多种治疗而在已知的风险因素方面显示出改善的个体。或者，受试者可为先前未被诊断为患有此类病症的个体。例如，受试者可为表现出此类病症的一种或多种风险因素的个体，或者未表现出此类病症的风险因素的受试者。

[0047] 当涉及细胞或细胞群而使用时，本文使用的术语“选择”意味着挑选、分离、分开和/或选择性地增殖具有期望特征的一种或多种细胞。本文使用的术语“选择”并不必需暗含无期望特征的细胞不能在所提供的条件下增殖。

[0048] 本文使用的术语“维持”是指继续组织或细胞群的活力。被维持的群体将具有大量代谢活跃的细胞。这些细胞的数量能在至少1天的时间内大体稳定或者能够增长。

[0049] 本文使用的术语“可检测水平”是指样品中的物质或活性水平使得该物质的量或活性得以与参比水平(例如，未暴露至应激的细胞中的物质或活性的水平)相区别。在一些实施方式中，可检测水平可为高于参比水平至少10％、例如大于10％、大于20％、大于50％、大于100％、大于200％或大于300％。

[0050] 术语“统计学上显著(statistically significant)”或“显著地(significantly)”是指统计学显著性，并且通常意味着高于或低于参比的两个标准差(2SD)的差异，所述参比例如标志物(例如干细胞标志物或分化标志物)的浓度或丰度。该术语是指表明存在差异的统计学证据。将其定义为当零假设事实上为真时，作出拒绝零假设的决定的几率。通常使用p值作出所述决定。

[0051] 除了在操作实施例中或在另有指明的地方，本文所用的表示成分量或反应条件的全部数值在所有情况下都应该被理解为被术语“约”修饰。当与百分比结合使用时，术语“约”可意味着±1％。

[0052] 本文中的其它术语在本文所述技术各方面的描述内加以定义。

[0053] 本文所述的技术方面涉及从细胞生成多能细胞的方法以及使用这些多能细胞的用途和方法。与依赖于提高重编程因子表达而生成多能细胞(例如，诱导多能干细胞或iPS细胞)的现有方法(例如，通过引入编码一个或多个重编程因子(例如Oct4)的核酸构建物)相比之下，本文所述方法使细胞接受应激，而无需引入外源重编程作用物。

[0054] 在一些实施方式中，应激减小了细胞的细胞质体积和/或细胞的线粒体数量。细胞的细胞质体积或细胞的线粒体数量的减少诱导应激应答，在所述应激应答中细胞获得至少多能的能力。一方面，本文描述了生成多能细胞的方法，所述方法包括将至少约40％的细胞质从细胞中移除，并选择表现出多能性的细胞，其中，所述细胞并不存在于组织中。一方面，本文所述的发明涉及生成多能细胞的方法，所述方法包括将至少约40％的线粒体从细胞中移除，并选择表现出多能性的细胞，其中，所述细胞并不存在于组织中。

[0055] 本文所述方法、测定法和组合物中使用的细胞可为任意类型的细胞，例如成体细

胞、胚胎细胞、分化细胞、干细胞、祖细胞和/或体细胞。可通过上述术语的组合对细胞进行描述，例如细胞可为胚胎干细胞或分化体细胞。可从受试者获得本文所述方法、测定法和组合物中使用的细胞。在一些实施方式中，细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方式中，细胞是人细胞。在一些实施方式中，细胞是成体细胞。在一些实施方式中，细胞是新生细胞。在一些实施方式中，细胞是胎儿细胞。在一些实施方式中，细胞是羊水细胞。在一些实施方式中，细胞是脐带血细胞。

[0056] "成体"是指来源于出生后任意时间的动物受试者或来源于出生后任意时间的动物受试者体内的组织和细胞。"胚胎"是指来源于出生前任意时间的动物受试者或来源于出生前任意时间的动物受试者体内的组织和细胞。

[0057] 本文使用的术语"体细胞"是指除了生殖细胞、存在于或从植入前胚胎获得的细胞、或由该细胞体外增殖获得的细胞以外的任何细胞。换句话说，体细胞是指相对于生殖系细胞的、构成生物体的机体的任何细胞。在哺乳动物中，生殖系细胞(也称为"配子")是精子和卵子在受精过程中融合产生的细胞(称为合子)，从其发育成整个哺乳动物胚胎。在哺乳动物机体中，除了精子和卵子、制造它们的细胞(配子)和未分化的干细胞以外的其它各细胞类型均为体细胞：内脏、皮肤、骨、血液、和结缔组织均由体细胞构成。在一些实施方式中，体细胞是"非胚胎体细胞"，意味着不存在于胚胎或并非从胚胎获得的体细胞、以及并非从该细胞体外增殖得到的体细胞。在一些实施方式中，体细胞是"成体体细胞"，意味着存在于或从除胚胎或胎儿以外的生物体得到的细胞、或者从该细胞体外增殖得到的细胞。需要注意，可通过构造差别对成体细胞、新生细胞或胚胎细胞进行区分，所述构造差别例如表观遗传组织，例如甲基化模式。在一些实施方式中，体细胞是哺乳动物体细胞。在一些实施方式中，体细胞是人体细胞。在一些实施方式中，体细胞是成体体细胞。在一些实施方式中，体细胞是新生体细胞。

[0058] 本文使用的术语"分化细胞"是指与其发育的在先时间点相比在命运或功能方面更加特化的细胞，并且包括终末分化的细胞以及尽管未终末分化但与其发育的在先时间点相比更加特化的细胞。细胞从未定型细胞(例如，干细胞)发育成具有增高的定型程度的细胞、特定分化的细胞类型、并最终发育成终末分化细胞被称为进行性分化或进行性定型。在细胞个体发育(ontogeny)的背景下，形容词"分化的(differentiated/differentiating)"是相对的概念，"分化细胞"是比与其进行比较的细胞在发育通路上进展更远的细胞。因此，干细胞可分化为谱系限制的前体细胞(如，中胚层干细胞)，并可依次沿进一步的途径分化为其它类型前体细胞(例如，心肌细胞前体)，然后分化成末期分化细胞，所述末期分化细胞在特定组织类型中起到特征性作用，并可能会或可能不会保留进一步增殖的能力。

[0059] 本文使用的术语"干细胞"是指处于未分化状态或部分分化状态、具有自我更新性质并具有自然分化为更加分化的细胞类型的发育潜能的细胞，而并非特指关于发育潜能(即，全能、多能、专能等)的含义。自我更新是指干细胞能够增殖，产生更多此类干细胞并维持其发育潜能。因此，术语"干细胞"是指在特定环境下具有分化为更加特化或更加分化的表型的发育潜能、并在特定环境下保持增殖而无实质上分化的能力的细胞的任何子集。本文使用的术语"体性干细胞(somatic stem cells)"是指来源于非胚胎组织的任何干细胞，所述非胚胎组织包括胎儿组织、青少年组织和成体组织。从多种成体组织(包括血液、骨髓、脑、嗅上皮、皮肤、胰腺、骨骼肌和心肌)分离出天然体性干细胞。示例性的天然存在的体性

干细胞包括但不限于间充质干细胞和造血干细胞。在一些实施方式中，干细胞或祖细胞可为胚胎干细胞。本文使用的术语“胚胎干细胞”是指来源于在受精后但在妊娠结束前所形成的组织的干细胞，所述组织包括在妊娠期间任意时间(通常但并不必需在约10-12周妊娠前)取得的胚胎前期组织(例如，囊胚)、胚胎组织或胎儿组织。最常见的是，胚胎干细胞是来源于早期胚胎或囊胚的全能细胞。胚胎干细胞可直接从适合的组织(包括但不限于人组织)或从已建立的胚胎细胞系中获得。在一个实施方式中，根据Thomson等所述获得胚胎干细胞(美国专利号5,843,780和6,200,806;Science 282:1145,1998;Curr.Top.Dev.Biol.38:133ff,1998;Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.92:7844,1995，以引用的方式将其整体并入本文)。

[0060] 示例性的干细胞包括胚胎干细胞、成体干细胞、多能干细胞、神经干细胞、肝干细胞、肌肉干细胞、肌肉前体干细胞、内皮祖细胞、骨髓干细胞、软骨形成干细胞、淋巴干细胞、间充质干细胞、造血干细胞、中枢神经系统干细胞、外周神经系统干细胞等。可在如下以及其它地方找到对干细胞的描述(包括分离和培养它们的方法):Embryonic Stem Cells, Methods and Protocols,Turksen著,Humana Press,2002;Weisman等,Annu.Rev.Cell.Dev.Biol.,17:387 403;Pittinger等,Science,284:143 47,1999;Animal Cell Culture,Masters著,Oxford University Press,2000;Jackson著,PNAS 96(25):14482 86,1999;Zuk等,Tissue Engineering,7:211 228,2001(“Zuk等”);Atala等,particularly Chapters 33 41;以及美国专利号5,559,022、5,672,346以及5,827,735。还可在如下以及其它地方发现对基质细胞(stromal cells)的描述(包括分离和培养它们的方法):Prockop,Science,276:71 74,1997;Theise等,Hepatology,31:235 40,2000;Current Protocols in Cell Biology,Bonifacino等著,John Wiley&Sons,2000(包括直至2002年3月的更新);以及美国专利号4,963,489。

[0061] 本文使用的术语“祖细胞”是指处于未分化或部分分化状态并具有分化为至少一种以上分化表型的发育潜能的细胞，并不特指关于发育潜能(即，全能、多能、专能等)的含义，并且不具有自我更新的性质。因此，术语“祖细胞”是指在特定环境下具有分化为更加特化或更加分化的表型的发育潜能的细胞的任何子集。在一些实施方式中，干细胞或祖细胞为多能干细胞。在一些实施方式中，干细胞或祖细胞为全能干细胞。

[0062] 术语“全能”是指能够产生机体中的任何组织或细胞类型的干细胞。“多能”干细胞能够产生机体中的除生殖系细胞外的任何类型的细胞。能够产生更少或有限数量的不同细胞类型的干细胞通常称为“专能”。因此，全能细胞分化出多能细胞，所述多能细胞能够产生胎儿发育所需要的大部分(但不是全部)组织。多能细胞进一步分化出专能细胞，所述专能细胞致力于产生具有特定功能的细胞。例如，专能造血干细胞产生血液中的红血胞、白血胞和血小板。

[0063] 本文使用的术语“多能(pluripotent)”是指具有在不同的条件下分化为全部三个胚细胞层(即，内胚层(例如肠道组织)、中胚层(例如血液、肌肉和血管)和外胚层(例如皮肤和神经))的特征性细胞类型的能力的细胞。使用例如裸鼠畸胎瘤形成测定法，通过它们分化为全部三个胚层的能力初步表征多能细胞。还通过胚胎干(ES)细胞标志物的表达证明了多能性，尽管优选的多能性测试是证明分化成三个胚层中各胚层的细胞的能力。

[0064] 本文实施例中所述的“ACC”和“STAP”细胞为多能细胞的非限制性实例。“STAP干细

胞”为多能干细胞的非限制性实例。由于两种细胞均可适用于本发明的目的，因此，本文中的术语多能细胞和术语多能干细胞可互换使用。

[0065] 本文中使用的术语“多能性”或“多能状态”是指具有分化为全部三个胚胎胚层(内胚层(肠组织)、中胚层(包括血液、肌肉和血管)、以及外胚层(如皮肤和神经))的能力的细胞。

[0066] 提及“专能细胞”时使用的术语“专能”是指能够分化成一些但并非来自所有三个胚层的全部细胞的细胞。因此，专能细胞是部分分化的细胞。专能细胞在本领域是公知的，专能细胞的非限制性实例可包括成体干细胞，例如造血干细胞和神经干细胞。专能意味着干细胞可形成给定谱系中的许多类型细胞，但不形成其它谱系的细胞。例如，专能血液干细胞可形成许多不同类型的血细胞(红细胞、白细胞、血小板等)，但它不能形成神经元。术语“专能性”是指细胞具有程度低于全能和多能的发育变通性(developmental versatility)。

[0067] 术语“全能性”是指细胞具有如下分化程度，所述分化程度描述了制造成体内以及包括胎盘的胚外组织中的全部细胞的能力。受精卵(合子)作为早期核裂细胞(卵裂球(blastomeres))是全能的。

[0068] 本文所述的方法中使用的细胞可为不存在于组织中的细胞。本文使用的“组织”是指相似的特化细胞组合的有序生物材料(例如，组、层或聚集体)，行使至少一种特定功能。当将细胞从有序超结构中移除，或者从体内存在的有序超结构中分离出来，这些细胞不再存在于组织中。例如，当将血样分入两个以上的不同部分中，或将脾脏切碎并用巴斯德吸管进行机械解离，细胞不再存在于组织中。在一些实施方式中，不存在于组织中的细胞为经分离的细胞。提及细胞时，本文中使用的术语“分离”是指将细胞与体内通常相关的另一组细胞机械或物理地相分离。将一种或多种细胞与另一组细胞相分离的方法是本领域公知的，参见例如Culture of Animal Cells:a manual of basic techniques(第3版),1994,R.I.Freshney(著),Wiley-Liss,Inc.;Cells:a laboratory manual(第1卷),1998,D.L.Spector,R.D.Goldman,L.A.Leinwand(著),Cold Spring Harbor Laboratory Press;Animal Cells:culture and media,1994,D.C.Darling,S.J.Morgan,John Wiley and Sons,Ltd.。任选，例如在其它细胞存在的情况下，在体外对经分离的细胞进行培养。

[0069] 在一些实施方式中，细胞虽然不存在于组织中，但是存在于细胞群中。在一些实施方式中，细胞群是细胞的群体。本文中使用的“细胞群”是指至少2个细胞的群组，例如2个细胞、3个细胞、4个细胞、10个细胞、100个细胞、1000个细胞、10,000个细胞、100,000个细胞、或该范围内任意值、或更多细胞的群组。任选地，细胞群可为具有共同起源的细胞，例如，细胞群可为相同亲代细胞的后裔；细胞群可为克隆；细胞群可分离自从相同组织中分离的细胞、或为从相同组织中分离的细胞的后裔；或者细胞群可分离自从相同组织样品中分离的细胞、或为从相同组织样品中分离的细胞的后裔。细胞群可包含一种或多种细胞类型，例如1种细胞类型、2种细胞类型、3种细胞类型、4种细胞类型或更多细胞类型。细胞群可为异质的或同质的。如果包含至少90％的相同细胞类型(例如90％、92％、95％、98％、99％)，或群体中更多的细胞具有相同的细胞类型，细胞群可为实质上同质。如果群体中少于90％的细胞具有相同的细胞类型，细胞群可为异质的。

[0070] 在一些实施方式中，本文中所述的方法可涉及制备呈现出多能表型的非多能细胞

(例如,分化细胞)。在一些实施方式中,生成多能细胞可包括生成具有更加多能的表型的细胞,即,使细胞呈现出具有更广泛的分化潜能的表型。通过非限制性实例的方式,极少的胚胎样细胞(VSEL)可为单能细胞而非多能细胞,和/或在它们分化为某些分化细胞类型方面的能力受到限制(可能是由于比起胚胎干细胞,VSEL的表观遗传状态与分化细胞更加极为相似)。根据本文中所述的方法,单能细胞和/或分化能力有限的细胞可被诱发而呈现出更加多能的表型。更加多能的表型可为能够分化为更多数量的分化细胞类型(例如,两种单能细胞)的表型、能够分化为具有更加多能的谱系和/或比单能细胞更加多能的多能细胞的大量的分化细胞类型。

[0071]　生成本文所述的多能细胞(或更加多能的细胞)的方法可包括,例如将细胞质的部分从细胞中移除和/或将线粒体从细胞中移除。在一些实施方式中,将细胞质的部分或线粒体从细胞中移除为移除细胞的部分表观遗传控制。在一些实施方式中,将至少约40%的细胞质移除,例如将细胞的细胞质中的至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或更多移除。在一些实施方式中,将细胞的细胞质中的60%-80%移除。在一些实施方式中,将至少约40%的线粒体去除,例如将细胞的线粒体中的至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或更多移除。在一些实施方式中,将细胞的线粒体中的50%-90%移除。

[0072]　使细胞接受应激和/或将线粒体或细胞质的部分从细胞中移除的方法可为引起低于致死性阈值的细胞膜穿孔和/或细胞膜破裂的任何环境刺激。应激可包括在组织或细胞培养物中的非生理性应激。适合的环境刺激的非限制性实例包括:创伤、机械刺激、化学暴露、超声刺激、氧剥夺、营养剥夺、辐射、暴露至极端温度、解离、磨制、物理应激、高渗透压、低渗透压、膜损害、毒素、极端离子浓度、活性氧、UV暴露、强可见光、必需营养的剥夺或非生理性的酸性环境。在一些实施方式中,可对细胞施加一种环境刺激。在一些实施方式中,可对细胞施加多种环境刺激,例如施加2种刺激、3种刺激、4种刺激或更多刺激。可同时或分别施加多种环境刺激。

[0073]　在一些实施方式中,应激可为将引起暴露至该应激的细胞中的至少10%发生膜破裂的应激。本文使用的“膜破裂”是指使膜受到危害、破裂或破坏,从而形成足以将可检测量的细胞器和/或细胞物质(包括但不限于线粒体和DNA)释放入胞外环境的孔或间隙。本领域已知对释放的细胞物质(例如线粒体)进行检测的方法,并在本文其它部分加以描述。所释放的细胞物质可为游离的、被封装的或由膜包裹。

[0074]　应激可引起暴露至该应激的细胞中的至少10%(例如10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上或90%以上)的膜破裂。在一些实施方式中,暴露至应激的细胞可为与如本文所述带制备的更加多能的细胞具有相同的类型和特征的细胞,例如,适合于一种类型细胞的应激可能不适合于另一类型的细胞。

[0075]　根据所使用的刺激,细胞暴露至应激的时长可变化。例如,当根据本文所述的方法使用低营养条件对细胞进行应激时,可将细胞在低营养条件下培养1周以上,例如1周、2周、3周或更长。在一些实施方式中,将细胞在低营养条件下培养约3周。在另一非限制性实例中,根据本文所述的方法暴露至低pH或缺氧条件的细胞可暴露数分钟或更长,例如包括数小时,例如至少2分钟、至少5分钟、至少20分钟、至少1小时、至少2小时、至少6小时或更长。

[0076]　诱导多能细胞生成的机械刺激可包括细胞膜与物质或表面的任意形式接触,这将

机械性地破坏细胞膜的完整性。机械刺激可包括将细胞暴露至剪切应力和/或高压。机械刺激的示例形式为磨制。磨制是通过摩擦对颗粒表面进行碾磨和/或打磨的工艺。细胞磨制工艺的非限制性实例为使细胞通过具有小于细胞尺寸的孔的装置。例如,通过真空压力和/或流体流动,可使细胞通过吸管,其中该吸管的至少部分内部空间具有的直径小于细胞直径。在一些实施方式中,使细胞通过具有小于细胞尺寸的孔的至少一个装置。在一些实施方式中,使细胞通过具有逐渐变小的孔的多个装置。在一些实施方式中,可将细胞磨制5分钟以上,例如5分钟、10分钟、20分钟、30分钟或60分钟。在一些实施方式中,通过使细胞通过内径为50μm的巴斯德吸管,可对细胞进行磨制。在一些实施方式中,通过使细胞通过内径为50μm的巴斯德吸管20分钟,可对细胞进行磨制。

[0077] 施加所需的应激以诱导细胞生成多能细胞的其它方法包括,例如将细胞暴露至某些化学或物理化学环境(例如,高pH或低pH、渗透压休克、极端温度、氧剥夺等)。下文中将进一步讨论此类和其它诱发多能细胞生成的处理。化学暴露可包括,例如破坏或危害细胞膜完整性的孔形成化合物、pH、和/或渗透压的任意组合。通过非限制性实例的方式,可将细胞暴露至非生理性的酸性环境或低pH、链球菌溶血素O、或蒸馏水(即,渗透压休克)。

[0078] 低pH可包括低于6.8的pH,例如6.7、6.5、6.3、6.0、5.8、5.4、5.0、4.5、4.0或更低。在一些实施方式中,低pH为约3.0至约6.0。在一些实施方式中,低pH为约4.5至约6.0。在一些实施方式中,低pH为约5.4至约5.8。在一些实施方式中,低pH为约5.4至约5.6。在一些实施方式中,低pH为约5.6。在一些实施方式中,低pH为约5.7。在一些实施方式中,低pH为约5.5。在一些实施方式中,可将细胞暴露于低pH条件至多数天,例如6天以内、4天以内、3天以内、2天以内、1天以内、12小时以内、6小时以内、3小时以内、2小时以内、1小时以内、30分钟以内、20分钟以内、或小于10分钟。在一些实施方式中,可将细胞暴露至pH5.4至5.6下3天以内。在一些实施方式中,可将细胞暴露于pH为约5.6至6.8下3天以内。在一些实施方式中,可将细胞暴露于pH为约5.6至6.8下1小时以内。在一些实施方式中,可将细胞暴露于pH为约5.6至6.8下约30分钟。在一些实施方式中,可将细胞暴露于pH为约5.6至6.8下约20分钟。在一些实施方式中,可将细胞暴露至pH为约5.6至5.8下3天以内。在一些实施方式中,可将细胞暴露于pH为约5.6至5.8下1小时以内。在一些实施方式中,可将细胞暴露于pH为约5.6至5.8下约30分钟。在一些实施方式中,可将细胞暴露至pH为约5.6至5.8下约20分钟。

[0079] 在一些实施方式中,可将细胞暴露至ATP,从而诱导生成多能细胞。在一些实施方式中,可将细胞暴露至浓度为约20μM至约200mM的ATP。在一些实施方式中,可将细胞暴露至浓度为约200μM至约20mM的ATP。在一些实施方式中,可将细胞暴露至约2.4mM的ATP。在一些实施方式中,可将细胞暴露至稀释于HBSS中的ATP。在一些实施方式中,可将细胞暴露于ATP下1分钟或更长,例如至少1分钟、至少2分钟、至少5分钟、至少15分钟、至少30分钟、至少45分钟、至少1小时或更长。在一些实施方式中,可将细胞暴露至ATP下约5分钟至约30分钟。在一些实施方式中,可将细胞暴露至ATP约15分钟。在一些实施方式中,可将细胞暴露至约2.4mM的ATP下约15分钟。

[0080] 在一些实施方式中,可将细胞暴露至$CaCl_2$,从而诱导生成多能细胞。在一些实施方式中,可将细胞暴露至浓度为约20μM至约200mM的$CaCl_2$。在一些实施方式中,可将细胞暴露至浓度为约200μM至约20mM的$CaCl_2$。在一些实施方式中,可将细胞暴露至浓度为约2mM的$CaCl_2$。在一些实施方式中,可将细胞暴露至稀释于HBSS中的$CaCl_2$。在一些实施方式中,可将

细胞暴露至$CaCl_2$下1天以上，例如至少1天、至少2天、至少1周、至少2周、至少3周或更长。在一些实施方式中，可将细胞暴露至$CaCl_2$约1周至3周。在一些实施方式中，可将细胞暴露至$CaCl_2$约2周。在一些实施方式中，可将细胞暴露至约2mM的$CaCl_2$约2周。在一些实施方式中，可将细胞暴露至约2mM的$CaCl_2$约1周。

[0081] 孔形成化合物的实例包括链球菌溶血素O(SLO)、皂苷、毛地黄皂苷、菲律宾菌素、Ae I、海葵(sea anemone)的溶细胞素、气单胞菌溶素、鹅膏毒素、变形虫穿孔肽(amoebapore)、来自迪斯帕内阿米巴(Entamoeba dispar)的变形虫穿孔肽同系物、brevinin-1E、brevinin-2E、barbatolysin、粪肠球菌(Enterococcus faecalis)的溶细胞素、δ溶血素、白喉毒素、霍乱弧菌(Vibrio cholerae)的El Tor溶细胞素、马痘毒素(equinatoxin)、嗜水气单胞菌(Aeromonas hydrophila)的肠毒素、esculentin、颗粒溶素、副溶血性弧菌(Vibrio parahaemolyticus)溶血素、中间链球菌(Streptococcus intermedins)的中间链球菌溶素(intermedilysin)、慢病毒裂解肽、伴放线放线杆菌(Actinobacillus actinomycetemcomitans)白细胞毒素、爪蟾抗菌肽、蜂毒肽、膜相关淋巴毒素、Met-脑啡肽、neokyotorphin、neokyotorphin片段1、neokyotorphin片段2、neokyotorphin片段3、neokyotorphin片段4、NK溶素、paradaxin、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)的α溶细胞素、败毒梭状芽孢杆菌(Clostridium septicum)的α溶细胞素、苏云金芽孢杆菌(Bacillus thuringiensis)毒素、大肠杆菌素、补体、防卫素、溶组织素、李斯特菌溶血素、爪蟾抗菌肽、蜂毒肽、肺炎球菌溶血素、酵母杀手毒素、缬氨霉素、Peterson's crown ethers、穿孔素、产气荚膜梭菌溶素O(perfringolysin O)、产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)的θ毒素、鬼笔溶血素(phallolysin)、鬼笔毒素(phallotoxin)和其它分子，例如Regen等，Biochem Biophys Res Commun 1989 159:566-571中描述的分子，以引用的方式将其整体并入本文。纯化或合成孔形成化合物的方法对本领域普通技术人员来说是公知的。另外，孔形成化合物可商购，例如链球菌溶血素O(Cat No.S5265;Sigma-Aldrich;St.Louis,MO)。通过非限制性实例的方式，可将细胞暴露至SLO约5分钟或更长，例如至少5分钟、至少10分钟、至少20分钟、至少30分钟、至少45分钟、至少1小时、至少2小时、至少3小时或更长。在一些实施方式中，将细胞暴露至SLO约30分钟至2小时。在一些实施方式中，将细胞暴露至SLO约50分钟。通过非限制性实例的方式，可将细胞暴露至浓度为约10ng/mL至1mg/mL的SLO。在一些实施方式中，可将细胞暴露至浓度为约1μg/mL至100μg/mL的SLO。在一些实施方式中，可将细胞暴露至浓度为约10μg/mL的SLO。在一些实施方式中，可将细胞暴露至浓度为约10μg/mL浓度的SLO约50分钟。

[0082] 诱导多能细胞生成的氧剥夺条件可包括在降低的氧气条件下对细胞进行培养，例如，在10％以下的氧气中对细胞进行培养。在一些实施方式中，在5％以下的氧气下对细胞进行培养。在降低的氧气条件下进行的培养时长可为1小时或更长，例如1小时、12小时、1天、2天、1周、2周、3周、1个月、2个月或更长。在一些实施方式中，可在降低的氧气条件下对细胞培养1周至1个月。在一些实施方式中，可在降低的氧气条件下对细胞培养约3周。

[0083] 诱导多能细胞生成的营养剥夺条件可包括对细胞生长有益的任意因子或营养的缺乏。在一些实施方式中，营养剥夺条件包括在基础培养基中对细胞进行培养，所述基础培养基例如无另外的补充物(如FBS或生长因子)的F12或DMEM。在营养剥夺条件下的培养时长为1小时或更长，例如1小时、12小时、1天、2天、1周、2周、3周、1个月、2个月或更长。在一些实

施方式中，可在营养剥夺条件下对细胞培养1周至1个月。在一些实施方式中，可在营养剥夺条件下对细胞培养约2周。在一些实施方式中，可在营养剥夺条件下对细胞培养约3周。在一些实施方式中，营养剥夺条件可包括无生长因子的条件、或者具有低于对给定细胞类型而言的一种或多种生长因子的标准浓度的50％的条件。

[0084] 暴露至极端温度(诱导多能细胞生成)可包括暴露至低温或高温。对哺乳动物细胞来说，极端低温可为低于35℃的温度，例如34℃、33℃、32℃、31℃或更低。在一些实施方式中，极端低温可为低于冰点的温度。细胞的冰冻可导致膜被冰晶穿孔，并提供减少细胞质的途径。对哺乳动物细胞来说，极端高温可为高于42℃的温度，例如43℃、44℃、45℃、46℃或更高。在一些实施方式中，极端高温可为约85℃或更高的温度。在极端温度下的培养时长可为20分钟或更长，例如20分钟、30分钟、1小时、12小时、1天、2天、1周、2周、3周、1个月、2个月或更长。清楚的是，温度越高，通常所能容忍的使多能细胞生成的暴露越短。

[0085] 可用于本文所述方法中的应激的另外实例可包括但不限于超声刺激和辐射刺激。

[0086] 在一些实施方式中，在暴露至应激后，可在根据下文所述方法进行的选择之前，对细胞进行培养。可在选择之前，对细胞培养至少1小时，例如在本文所述的选择之前，移除应激性刺激并对细胞培养至少1小时、至少2小时、至少6小时、至少12小时、至少1天、至少2天、至少7天或更长。通过非限制性实例的方式，可将细胞暴露至SLO约50分钟，随后在选择之前，在无SLO的培养基中培养约7天。在一些实施方式中，用于在选择之前对细胞进行培养的培养基不含分化因子或者不会促进分化。在一些实施方式中，培养基为适合于对干细胞和/或多能细胞进行培养的培养基。此类培养基的实例在下文中描述。

[0087] 在一些实施方式中，减少细胞中的细胞质的量。可通过监测细胞尺寸来确定细胞中的细胞质减少。确定细胞尺寸的方法为本领域普通技术人员所公知，并且通过非限制性实例的方式，该方法包括细胞荧光分析(cytofluorimetric analysis)。简单来说，将单细胞用碘化丙啶进行染色、过滤和测量，所述测量例如使用FLOMAX™软件在DAKO GALAXY™(DAKO)分析仪上进行。随后，可进行细胞荧光分析以确定细胞尺寸。将预定尺寸的微珠重悬在等渗磷酸盐生理盐水(pH 7.2)中，并用作使用细胞荧光分析对球体中所含细胞的尺寸进行比较的标准。使用相同的仪器设定对细胞和珠子进行分析(前向散射代表细胞和珠子的尺寸，侧向散射代表细胞的粒度)。可基于利用x轴上的珠子尺寸、y轴上的前向散射值的曲线对细胞尺寸进行计算。

[0088] 在一些实施方式中，减少细胞中的线粒体的量。确定细胞中的线粒体数量的方法为本领域普通技术人员所公知，并且该方法包括：用线粒体特异性染料进行染色，并且当在显微镜下观测时，对各细胞中的可视线粒体进行计数。线粒体特异性染料可商购，例如MITOTRACKER™(Cat No M7512 Invitrogen;Grand Island,NY)。在一些实施方式中，在根据上文所述方法进行处理后，线粒体数量或来自线粒体特异性染料的信号强度可减少至少40％。在一些实施方式中，选择如下细胞，在根据上文所述的方法进行处理后，该细胞中的线粒体数量或来自线粒体特异性染料的信号强度减少至少40％。

[0089] 还可通过对胞外环境中的氧化还原活性进行测量，对线粒体和/或膜破坏的量进行检测。由于通过本文所述的应激使线粒体释放入胞外环境中，胞外环境中的ROS水平可增高，并可用于对给定应激的有效性进行测量。

[0090] 在本文所述任何方面的一些实施方式中，在LIF(白血病抑制因子)存在的情况下，

可使细胞接受应激。

[0091] 在一些方面，在将一部分细胞质和/或线粒体从细胞中移除后，该方法进一步包括选择表现出多能性的细胞。通过对呈示出多能细胞的标志物、表型或功能的细胞进行选择，可选择多能细胞。对细胞的选择可包括：对呈示出期望特征的细胞进行分离和增殖，或者在使具有期望特征的细胞存活和/或以高于其不具期望特征的细胞的速度增殖的条件下，对具有未知特征的细胞群进行培养。多能细胞的标志物和特征的非限制性实例在下文进行描述。在一些实施方式中，对多能性细胞的选择至少部分包括：选择表达Oct4的细胞。在一些实施方式中，对多能性细胞的选择至少部分包括：选择表达Nanog的细胞。在一些实施方式中，对多能性细胞的选择至少部分包括：选择表达Oct4、Nanog、E-钙粘蛋白和/或SSEA的细胞。在一些实施方式中，通过利用FACS和标志物的特异性抗体选择表达SSEA-1和E-钙粘蛋白的细胞，可对多能细胞进行选择。在一些实施方式中，可利用FACS或本领域已知和/或本文所述的其它细胞分选装置，基于尺寸对细胞进行选择。还可通过细胞不粘附至培养皿的能力，对细胞进行选择。

[0092] 还可基于接受应激后更小的尺寸大小对细胞进行选择。也就是说，向着多能性发展的应激细胞比起其非多能性体细胞前体更小。在一些实施方式中，选择直径小于8μm的细胞，例如直径为8μm以下、7μm以下、6μm以下、5μm以下或更小。可在短期培养(例如数分钟至数天)后，或者在能够随应激处理而放置后，基于尺寸对细胞进行选择。在一些实施方式中，可基于紧接在应激处理后的尺寸，对细胞进行选择。通过本领域已知的任何方法(例如，使用过滤器或通过FACS)，可基于尺寸对细胞进行选择。

[0093] 在本文所述方法的一些实施方式中，可对根据本文所述方法生成的多能细胞进行培养，从而使多能细胞增殖(即，干细胞增殖)。在一些实施方式中，可在体外对根据本文所述方法生成的多能细胞进行维持。一方面，本文所述的技术涉及包含多能细胞和/或其至少部分分化的后代的组合物。在一些实施方式中，可在体外对多能细胞和/或其至少部分分化的后代进行维持(例如，作为细胞系)。如下文所述，可将细胞系用来筛选和/或测试对于给定疾病而言的候选试剂(例如治疗剂)、和/或调节干细胞的试剂。在一些实施方式中，多能细胞和/或其至少部分分化的后代可来源于从患有如下疾病的受试者中获得的细胞，所述疾病例如为与天然存在的细胞或组织类型、或者天然存在的多能细胞和/或专能细胞(如下文所述)的不足相关的疾病，和/或涉及具有遗传突变的细胞的疾病(例如癌症)。可将本文所述的组合物用于例如疾病建模、药物发现、诊断和个性化疗法。

[0094] 本领域已知适合于干细胞和/或多能细胞增殖和/或维持的条件。干细胞的增殖使细胞数量扩大，但不会在实质上诱导分化或容许分化。通过非限制性实例的方式，适合于多能细胞增殖的条件包括：以1×10^6个细胞/cm^2将细胞接种于补充有2％B27、20ng/mL碱性成纤维细胞生长因子和10ng/mL上皮生长因子的F12/DMEM(1:1,v/v)中。在培养期间，可每2-3天更换约50％的培养基。在一些实施方式中，适合于干细胞和/或多能细胞增殖的条件包括：在如Hitoshi,S.等,Genes&development 2004 18,1806-1811中描述的B27-LIF中培养细胞，所述B27-LIF为含有LIF(1×10^3单位/mL,Chemicon;Cat No:ESG1107 EMD Millipore,Billerica,MA)和B27补充物(Cat No:0080085-SA;Invitrogen;Grand Island,NY)的无血清培养基，以引用的方式将其整体并入本文。在本文的实施例中对适合于培养本文所述细胞的其它培养基进行了描述，例如ES建立培养基(ES establish culture medium)、2i、3i和ACTH、ES培养条件、ES-LIF、胚胎神经干细胞培养条件、以及EpiSCs培养条件。在一些实施方式中,用于多能细胞增殖或维持的条件可包括在LIF(白血病抑制因子)存在的情况下对细胞进行培养。

[0095] 在增殖期间,根据本文所述方法生成的多能细胞将继续表达相同的多能干细胞标志物。多能干细胞标志物的非限制性实例包括SSEA-1、SSEA-2、SSEA-3、SSEA-4(本文统称为SSEA)、AP、E-钙粘蛋白抗原、Oct4、Nanog、Ecat1、Rex1、Zfp296、GDF3、Dppa3、Dppa4、Dppa5、Sox2、Esrrb、Dnmt3b、Dnmt3l、Utf1、Tcl1、Bat1、Fgf4、Neo、Cripto、Cdx2和Slc2a3。确定细胞是否表达多能干细胞标志物的方法为本领域普通技术人员所公知,并且该方法包括例如RT-PCR、使用报告基因构建物(例如,结合FACS或荧光显微术,表达本文所述的Oct4-GFP构建物)、以及使用对感兴趣的细胞表面标志物而言特异的抗体的荧光显微术或FACS。

[0096] 多能细胞标志物还包括与细胞相比增长的端粒。可通过例如如下方法确定端粒的长度:分离基因组DNA,用限制性内切酶(例如Hinf1和Rsa1)消化gDNA,并利用端粒长度测定试剂对端粒进行检测。此类试剂在本领域中已知且可商购,例如TELOTAGGG™TELOMERE LENGTH ASSAY试剂盒(Cat No.12209136001 Roche;Indianapolis,IN)。

[0097] 在一些实施方式中,比起在根据本文公开的方法处理前的细胞,根据本文所述方法处理的细胞可变得更加极为类似于胚胎干细胞的表观遗传状态。细胞的表观遗传状态是指与基因组核酸序列中的变化相对的基因组的化学标志物。表观遗传标志物可包括DNA甲基化(印记)以及DNA相关蛋白(例如组蛋白)的甲基化和乙酰化。术语“DNA甲基化”是指向DNA中的特定碱基引入甲基(CH_3)基团。在哺乳动物中,甲基化几乎全部出现在胞嘧啶的5位,该胞嘧啶后紧接着鸟嘌呤(CPG)。在一些实施方式中,表观遗传状态可包括表观遗传甲基化模式,例如DNA甲基化模式。本领域已知对表观遗传标志物的存在和定位进行确定的测定法,并且该测定法可包括亚硫酸氢盐测序。简单来说,用CpGenome™DNA Modification试剂盒(Chemicon,Temecula,CA)对DNA进行处理,对感兴趣的区域(例如,Nanog和Oct4基因)进行扩增和测序。

[0098] 本文所述技术的一些方面涉及利使用通过本文所述方法生产的多能干细胞的测定法。例如,可将通过本文所述方法生产的多能干细胞用于筛选和/或识别调节多能干细胞的存活力、分化或增殖的试剂。此类测定法可包括:将根据本文所述方法生产的多能细胞与候选试剂接触,与未和候选试剂接触的多能细胞的存活力、分化和/或增殖相比,确定与候选试剂接触的多能细胞的生存活力、分化和/或扩增是否变化。在一些实施方式中,试剂可提高多能干细胞的存活力、分化和/或扩增。在一些实施方式中,试剂可降低多能干细胞的存活力、分化和/或扩增。在一些实施方式中,可将多能干细胞与多种候选试剂接触,例如从而确定协同作用或拮抗作用,或者从而对候选试剂进行集中筛选。

[0099] 如果在候选试剂存在的情况下,与不存在候选试剂相比,有活力的多能细胞(即,活细胞)的数量更多或更少,认为该候选试剂是调节所生产的多能细胞的存活力的试剂。确定细胞存活力的方法为本领域所公知,通过非限制性实例的方式,该方法包括通过检测来自活细胞标志物的信号强度、或通过活细胞标志物得以染色的细胞的数量或比例,确定在至少两个时间点的有存活力的细胞的数量。活细胞标志物可商购,例如PRESTO BLUE™(Cat No A-13261;Life Technologies;Grand Island,NY)。如果在候选试剂存在的情况下,多能细胞的增值率发生改变,即在给定时间内所产生的后代细胞的数量更高或更低,认为该候

选试剂是调节所生产的多能细胞的增殖的试剂。确定细胞增殖率的方法为本领域所已知，通过非限制性实例的方式，该方法包括确定活细胞数量随时间的增高。

[0100] 如果在候选试剂存在的情况下，多能细胞的分化率或分化特征更高或更低，认为该候选试剂是调节多能细胞的分化的试剂。确定细胞的分化率或分化特征的方法为本领域所已知，通过非限制性实例的方式，该方法包括检测特定细胞系的标志物或形态，并将与候选试剂接触的群体中具有此类标志物或形态的细胞的数量和/或具有此类标志物或形态的细胞的出现率与未和候选试剂接触的群体进行比较。多种细胞命运谱系和成熟细胞类型的标志物和形态特征为本领域所已知。通过非限制性实例的方式，中胚层细胞通过表达肌动蛋白、肌球蛋白和结蛋白，从而区别于多能细胞。可通过用番红O和/或FASTGREEN™染料(Fisher;Pittsburg,PA;F99)进行染色，将软骨细胞与其前体细胞类型进行区别。可通过用茜素红S(Sigma;St.Louis,MO:Cat No A5533)进行染色，将骨细胞与其前体细胞类型进行区别。

[0101] 在一些实施方式中，候选试剂可为肿瘤干细胞的潜在抑制剂，例如可将本文所述的方法用于从成熟肿瘤细胞生成多能细胞，并用于筛选抑制肿瘤细胞生成和/或存活力的试剂。还可将本文所述的方法用于筛选杀死成熟肿瘤细胞而不会促进肿瘤干细胞的发育和/或存活的试剂。

[0102] 在一些实施方式中，将多能细胞与一种或多种候选试剂接触，并在促进特定细胞谱系或成熟细胞类型分化的条件下培养。本领域已知适合分化的条件。通过非限制性实例的方式，适合分化为中胚层谱系的条件包括补充有20％胎牛血清(FCS)的DMEM，每3天更换该培养基。通过另外的非限制性实例的方式，适合分化为神经谱系的条件包括：将细胞接种至处于F12/DMEM(1:1,v/v)中的包被鸟氨酸(ornithin)的腔室玻片上，所述F12/DMEM补充有2％B27、10％FCS、10ng/mL bFGF和20ng/mL EGF。每3天更换该培养基。

[0103] 本文中使用的术语“候选试剂”是指通常不存在、或不会以给予细胞、组织或受试者的水平存在的任何实体。候选试剂可选自包含如下试剂的组：化学品；小的有机分子或无机分子；核酸序列；核酸类似物；蛋白；肽；适体；拟肽、肽衍生物、肽类似物、抗体；胞内抗体；生物大分子、从生物材料(例如细菌、植物、真菌、或者动物细胞或组织)制备的提取物；天然存在的组合物或合成的组合物或它们的功能片段。在一些实施方式中，候选试剂是任何化学实体或部分(moiety)，包括但不限于合成和天然存在的非蛋白质实体。在某些实施方式中，候选试剂是具有化学部分的小分子。例如，化学部分包括未取代或取代的烷基部分、芳香部分或杂环部分，包括大环内酯、来普霉素(leptomycin)和相关的天然产物或其类似物。候选试剂可已知具有期望的活性和/或性质、或可选自多种化合物的库。

[0104] 可对候选试剂调节多能细胞的存活力、增殖和/或分化的能力进行筛选。在一个实施方式中，使用上文和本文实施例中所述的用于存活力、分化和/或增殖的测定法对候选试剂进行筛选。

[0105] 通常，可以能在合适的时间段内对细胞功能、基因表达或蛋白活性(相对于对照)进行调节的任何浓度测试化合物。在一些实施方式中，可以约0.1nM至约1000mM的浓度测试化合物。在一个实施方式中，以约0.1μM至约20μM、约0.1μM至约10μM、或约0.1μM至约5μM测试化合物。

[0106] 依赖于被实施的特定实施方式，候选试剂或测试试剂可以溶液中的游离形式提

供,或者可粘附至载体或固体支持物(例如,珠子)。大量的合适的固体支持物可用于测试试剂的固定。合适的固体支持物的实例包括琼脂糖、纤维素、葡聚糖(例如,作为Sephadex,Sepharose而可商购)、羧甲基纤维素、聚苯乙烯、聚乙二醇(PEG)、滤纸、硝化纤维素、离子交换树脂、塑料膜、聚胺甲基乙烯基醚(polyaminemethylvinylether)马来酸共聚物、玻璃珠、氨基酸共聚物、乙烯-马来酸共聚物、尼龙、丝等。另外,对于本文所述的方法,测试试剂可单独筛选、成组筛选或集中筛选。在预期有效测试试剂的命中率低,从而对于给定组不预期会有超过1个的阳性结果的情况下,成组筛选特别有用。

[0107] 开发基于小分子、聚合物和基因组的库的方法在例如Ding等,J Am.Chem.Soc.124:1594-1596(2002)和Lynn等,J.Am.Chem.Soc.123:8155-8156(2001)中加以描述。可商购的化合物库可通过例如ArQule(Woburn,MA)、Invitrogen(Carlsbad,CA)、Ryan Scientific(Mt.Pleasant,SC)以及Enzo Life Sciences(Farmingdale,NY)获得。可对这些库中的成员的调节多能干细胞的存活力、增殖和/或分化的能力进行筛选。候选试剂可为天然存在的蛋白或其片段。可从天然来源(例如细胞或组织裂解物)获得此类候选试剂。还可制备多肽试剂库,例如从可商购的cDNA文库制备或利用常规方法生成。候选试剂还可为肽,例如约5个氨基酸至约30个氨基酸的肽、优选约5个氨基酸至约20个氨基酸的肽、特别优选约7个氨基酸至约15个氨基酸。肽可为天然存在蛋白、随机肽或“偏性”随机肽的消化物。在一些实施方式中,候选试剂可为多肽或蛋白。在无序列偏好性或无任何位置恒定性的情况下,肽库(例如肽或其它化合物的组合库)可完全随机化。或者,可将库偏置,即序列中的某些位置或保持不变,或选自有限数目的可能性。例如,在一些情况下,在设定类别内将核酸或氨基酸残基随机化,所述设定的类别例如疏水氨基酸、亲水残基、空间位阻偏置(小或大)的残基,所述核酸或氨基酸残基随机化以生成用于交联的半胱氨酸、用于SH-3结构域的脯氨酸、用于磷酸化位点的丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸或组氨酸、或者随机化为嘌呤。

[0108] 候选试剂还可为核酸。核酸候选试剂可为天然存在的核酸、随机核酸或“偏性”随机核酸。例如,原核基因组或真核基因组的消化物可类似于上文对蛋白的描述加以使用。

[0109] 在一些实施方式中,相比于未处理的对照,根据本文所述方法筛选并识别出的调节多能细胞的存活力、增殖和/或分化的候选试剂能够将多能细胞的存活力、增殖和/或分化提高至少5%、优选至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、1.1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍、100倍以上。在一些实施方式中,相比于未处理的对照,根据本文所述方法筛选并识别出的调节多能细胞的存活力、增殖和/或分化的候选试剂能够将多能细胞的存活力、增殖和/或分化降低至少5%、优选至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%以上、直至并包括完全减少(即,零存活力、零生长、零增殖或零分化)。

[0110] 在一些实施方式中,候选试剂直接以其给予的形式起作用。或者,候选试剂可被修饰或胞内利用,从而产生调节期望活性的形式,例如将核酸序列引入细胞中,并且其转录使得在细胞内产生基因表达或蛋白活性的抑制子或激活子。

[0111] 在考虑之列的是,可将本文所述的方法和组合物用于例如开发癌症疫苗。如本文所述(例如,通过根据本文所述方法对成熟肿瘤细胞进行处理)获得的多能肿瘤细胞生成至少部分分化的后代,能够提供多样且变化的抗原性质,从而能够开发更有力的基于APC(抗原呈递细胞)的癌症疫苗。

[0112] 在一些实施方式中，本文所述的方法涉及提高细胞的转化效率。对细胞进行应激(例如，如本文所述诱导多能性)能够使细胞更易接受遗传修饰方法，所述遗传修饰方法包括但不限于转基因插入、病毒载体和/或锌指蛋白核酸内切酶。在考虑之列的是，本文所述的方法能够使待修饰细胞至遗传学上的接受状态，从而使裸DNA能够被用于转化所得到的多能细胞。

[0113] 本文所述技术的一些方面涉及细胞治疗的方法，所述方法包括向需要细胞治疗的受试者给予通过本文所述方法生产的多能细胞、或者此类细胞的至少部分分化的后代。在一些实施方式中，提供治疗有效量的多能细胞或该多能细胞的至少部分分化的后代。在一些实施方式中，多能细胞和/或其后代为自体的。在一些实施方式中，多能细胞和/或其后代为同种异体的。在一些实施方式中，多能细胞和/或其后代为自体的。在一些实施方式中，多能细胞和/或其后代为HLA匹配同种异体的。在一些实施方式中，多能细胞和/或其后代为同基因的(syngeneic)。在一些实施方式中，多能细胞和/或其后代为异基因的(xenogenic)。在一些实施方式中，细胞治疗可为自体治疗，例如，根据本文所述的方法可将来自受试者的细胞用于生成多能细胞，并且可向受试者给予所述多能细胞和/或该多能细胞的至少部分分化的后代。本文中使用的“需要细胞治疗的受试者”是指诊断为患有与天然存在细胞或组织类型或者天然存在多能细胞和/或专能细胞(例如干细胞)的不足相关的疾病、或者处在患有或发展出所述疾病的风险中的受试者。

[0114] 在一些实施方式中，可将本文所述的方法用于例如通过给予如本文所述获得的同种异体多能细胞和/或其后代来治疗遗传紊乱，例如Tay-Sachs或血友病。

[0115] 一方面，本文所述的是制备与待给予受试者的细胞治疗相容的细胞或组织的方法，所述方法包括：根据本文所述的方法从细胞生成多能细胞(或更加多能的细胞)，其中，所述细胞是自体细胞或HLA匹配同种异体细胞。在一些实施方式中，在向受试者给予细胞或组织之前，多能细胞(或更加多能的细胞)可沿预定细胞系分化。

[0116] 可将根据本文所述方法生成的多能细胞(例如，多能干细胞)用于癌症治疗中。例如，使用如本文所述生成的多能细胞可有利于通过高剂量化疗结合造血干细胞移植使骨髓造血系统再生。

[0117] 与天然存在的细胞或组织类型或者天然存在的多能细胞和/或专能细胞的不足相关的疾病的非限制性实例包括再生障碍性贫血、范科尼贫血、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)。其它实例包括例如：急性白血病，包括急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、急性双表型白血病和急性未分化白血病；慢性白血病，包括慢性骨髓性白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、青少年慢性骨髓性白血病(JCML)和青少年骨髓单核细胞性白血病(JMML)；骨髓增生异常，包括急性骨髓纤维化、血管生成髓样化生(骨髓纤维化)、真性红细胞增多症和原发性血小板增多症；溶酶体贮积病，包括粘多醣累积病(MPS)、赫尔勒氏综合征(MPS-IH)、沙伊综合征(MPS-IS)、亨特氏综合征(MPS-II)、圣菲利柏氏综合征(MPS-III)、莫尔基奥综合征(MPS-IV)、马-拉综合症(MPS-VI)、Sly综合征、β-葡萄糖醛酸酶缺乏症(MPS-VII)、脑白质肾上腺萎缩症、粘多糖症II(I-细胞病)、Krabbe病、高歇病、尼-皮二氏病、沃尔曼病和异染性脑白质营养不良；组织细胞紊乱，包括家族性噬红细胞性淋巴组织细胞增多症、组织细胞增多症-X和吞噬血细胞；吞噬细胞紊乱，包括切-东二氏综合征、慢性肉芽肿病、嗜中性粒细胞肌动蛋白缺乏症和网状组织发育不全；遗传性血小板

异常，包括amegakaryocytosis/先天性血小板减少症；浆细胞紊乱，包括多发性骨髓瘤、浆细胞白血病和Waldenstrom's巨球蛋白血症。可用干细胞疗法治疗的其它恶性肿瘤包括但不限于：乳腺癌、Ewing肉瘤、神经母细胞瘤和肾细胞癌等。干细胞疗法还可治疗：肺部紊乱，包括COPD和支气管哮喘；先天性免疫紊乱，包括共济失调毛细血管扩张症、Kostmann综合征、白细胞粘附缺陷、DiGeorge综合征、裸淋巴细胞综合征、Omenn's综合征、重症联合免疫缺陷症(SCID)、伴随腺苷脱氨酶缺陷的SCID、T细胞和B细胞缺失的SCID、T细胞缺失、正常B细胞的SCID、常见变异型免疫缺陷病和X-连锁淋巴组织增生症；其它遗传性紊乱，包括莱-萘二氏综合征、软骨毛发发育不全症、血小板无力症(Glanzmann's thrombasthenia)和骨硬化病；神经病症，包括急性中风和慢性中风、创伤性脑损伤、脑性麻痹、多发性硬化症、肌萎缩性侧索硬化症和癫痫；心脏病症，包括动脉粥样硬化症、充血性心力衰竭和心肌梗塞；代谢紊乱，包括糖尿病；和眼部紊乱，包括黄斑变性和视神经萎缩。可通过如下方法对此类疾病或紊乱进行治疗：给予多能细胞本身，所述多能细胞能够在给予或不给予促进期望分化的试剂的条件下在体内分化为期望的细胞类型；和/或给予在体外分化为或至少部分分化为期望细胞类型的多能细胞。诊断此类症状的方法为具有本领域普通技术的医师所公知。在一些实施方式中，受试者可为用辐射疗法或其它疗法(切除干细胞或细胞群)治疗的受试者，例如，受试者可为其骨髓已通过放射疗法切除的患有癌症的受试者。

[0118] 在一些实施方式中，向受试者给予多能细胞。在一些实施方式中，向受试者给予至少部分分化的细胞。在一些实施方式中，细胞治疗的方法可进一步包括在给予细胞前使多能细胞沿预定细胞谱系分化。使干细胞沿期望的细胞谱系分化的方法为本领域所已知，并且其实例在本文中加以描述。

[0119] 在一些实施方式中，向受试者给予包含根据本文所述方法获得的多能细胞或至少部分分化的细胞(多能细胞的后代)的组合物。

[0120] 在一些实施方式中，包含根据本文所述方法获得的多能细胞或至少部分分化的细胞(多能细胞的后代)的组合物可任选地进一步包含G-CSF、GM-CSF和/或M-CSF，和/或可将该组合物给予至已经或将要被给予处于独立组合物中的G-CSF、GM-CSF和/或M-CSF的受试者。G-CSF、GM-CSF和/或M-CSF的给予可例如诱导有利于器官再生以及组织碎片、废弃物和构造物移除的炎症状态。

[0121] 在一些实施方式中，可在根据本文所述方法生产处于培养物中的多能细胞后的相对短的时间内(例如，生产后1小时、2小时、5小时、10小时、24小时或48小时)，给予多能细胞和/或其至少部分分化的后代。在一些实施方式中，可在根据本文所述方法使处于培养物中的多能细胞分化后的相对短的时间内(例如，分化后1小时、2小时、5小时、10小时、24小时或48小时)，给予至少部分分化的后代。在一些实施方式中，在给予前，可将多能细胞和/或其至少部分分化的后代在低温保存。

[0122] 在一些方面，本文所述的技术涉及包含根据本文所述方法生成的多能细胞和/或该多能细胞的至少部分分化的后代的组合物。在一些实施方式中，药物组合物包含根据本文所述方法生成的多能细胞和/或该多能细胞的至少部分分化的后代，并且任选包含药学上可接受的载体。该组合物可进一步包含至少一种药学上可接受的赋形剂。

[0123] 药物组合物可包含合适的赋形剂或稳定剂，并可为例如溶液剂、混悬剂、凝胶剂或乳剂。一般，组合物可含有约0.01％-99％、优选5％-95％的细胞，并含有载体。当与药学上

或生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂组合时，可通过胃肠道外、皮下、经移植或经注射给予细胞。对于大部分治疗目的而言，可作为处于液体形式的溶液剂或混悬剂，通过注射给予细胞。术语“药学上可接受的载体”是指用于给予根据本文所述方法生成的多能细胞和/或该多能细胞的至少部分分化的后代的载体。此类载体包括但不限于生理盐水、生理盐水缓冲液、葡聚糖、水、甘油及它们的组合。在与制剂的其它成分相容的意义上，各载体必须为“可接受的”，例如，载体不会降低试剂对受试者的作用。换句话说，载体为药学上非活性的并与活细胞相容。

[0124] 合适的制剂还包括水性或非水性无菌注射溶液剂，所述无菌注射溶液剂可含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂、杀菌性抗生素以及使制剂与预期接受者体液等渗的溶质。水性和非水性无菌混悬剂可包含悬浮剂和增稠剂。制剂可存在于单位剂量或多剂量的容器中。

[0125] 胃肠道外剂型的实例包括但不限于：准备用于注射的溶液剂、准备用于注射的混悬剂、以及乳剂。例如，可使用生物可吸收(bioresorbable)的支架材料来支撑根据本文所述方法生成的多能细胞和/或该多能细胞的至少部分分化的后代，制备胃肠道外剂型。

[0126] 术语“表观遗传修饰”是指基因组的化学标志物。表观遗传标志物可包括DNA甲基化(印记)以及DNA相关蛋白(例如，组蛋白)的甲基化和乙酰化。亲本来源的特异性基因的表达(来自母系或父系染色体)通常在哺乳动物中观察到，并且归因于表观遗传修饰。在亲本种系中，表观遗传修饰可导致稳定的基因沉默或活化。

[0127] 本文使用的术语“给予”或“移植”是指通过使细胞至少部分定位于期望位点从而产生期望效果的方法或途径，将细胞放置于受试者中。

[0128] 可由临床医师认为合适的任何方式给予本文所述的多能干细胞和/或其至少部分分化的后代，所述方式可包括局部给予，例如通过注射细胞的混悬剂，或例如通过植入沉积在或生长在可植入支架或支持物上或者沉积在可植入支架或支持物内或在其内生长的细胞制剂。可入植支架可包括任意数量的可降解聚合物或可吸收聚合物、或者例如丝支架等。给予包含本文所述的多能干细胞和/或其至少部分分化的后代的药物组合物的合适途径包括但不限于局部给予，例如腹膜内给予、胃肠道外给予、腔内给予或皮下给予。本文使用的短语“胃肠道外给药(parenteral administration/administered parenterally)”是指除肠内给予和局部给予以外的给予方式，通常通过注射，并且非限制性地包括腹膜内注射、皮内注射、皮下注射和灌注。给予可涉及使用适用于注射或外科植入的针、导管和注射器，或者外科植入。考虑使用递送方式和递送位点的组合来实现期望的临床效果。

[0129] 术语“表观遗传修饰”是指基因组的化学标志物。表观遗传标志物可包括DNA甲基化(印记)以及DNA相关蛋白(例如组蛋白)的甲基化和乙酰化。亲本来源的特异性基因的表达(来自母系或父系染色体)通常在哺乳动物中观察到，并且归因于表观遗传修饰。在亲本种系中，表观遗传修饰可导致稳定的基因沉默或活化。

[0130] 在一个实施方式中，向受试者给予治疗有效剂量的本文所述的多能干细胞和/或其至少部分分化的后代。“治疗有效剂量”是足以对所治疗的病症的症状或标志物产生可测量的改善的本文所述的多能干细胞和/或其至少部分分化的后代的量。治疗组合物中的细胞的实际剂量水平可发生变化，从而给予对特定受试者而言有效地实现期望的治疗应答的细胞的量。所选剂量水平依赖于多种因素，包括但不限于：治疗组合物的活性、剂型、给药途径、与其它药物或处理的组合、所治疗病症的严重度、受试者的身体状况、所治疗的受试者

的在先病史、以及执行疗法的临床医师或从业者的经验和判断。一般来说，所安排的剂量和给予应足以减缓、并优选抑制病症的进展，并且优选引起病症的一种或多种症状或标志物降低。医学领域的普通技术人员已知确定并调整治疗有效剂量，以及评估何时和以何种方式进行此类调整。

[0131] 可由医师确定根据本文所述方法给予的本文所述的多能干细胞和/或其至少部分分化的后代的剂量，并在必要时将该剂量调整至与观察到的治疗效果相适应。关于治疗的时长和频率，对技术临床医师来说典型的是，对受试者进行监测，从而确定治疗在何时提供了治疗益处，并确定是否给予另一剂细胞、增加或减少剂量、中断治疗、重新开始治疗或对治疗方案进行其它变更。当期望所给予的细胞移入并存活中、长时间时，重复用药可为必要的。然而，可根据需要和受试者的容忍度，重复给予。剂量不应大到引起实质上有害的副作用。在任何并发症的情况下，可由个人的医师对剂量进行调整。然而，对成人而言，剂量一般可为100至1×10^9个本文所述的多能干细胞和/或其至少部分分化的后代，例如100至10,000个细胞、1,000至100,000个细胞、10,000至1,000,000个细胞、或1,000,000至1×10^9个细胞。可由来自例如动物模型测试生物测定法或体系的剂量-应答曲线推导出有效剂量。

[0132] 根据本领域公知的方法，在一种或多种合适的体外和/或体内动物疾病模型(例如，SCID小鼠模型)中，任选对包含本文所述的多能干细胞和/或如本文所述制备的多能干细胞的至少部分分化的后代的治疗组合物进行测试，从而确认效力、评价移植细胞的体内生长、并估计剂量。具体而言，在相关的测定法中，可通过相对于未经处理而言的经处理的活性、稳定性或其它合适的测量结果(例如，比较经处理和未经处理的动物模型)，初步确定剂量。在确定本文所述的多能干细胞和/或其至少部分分化的后代的有剂量时，医师以移植细胞的生长和体积、以及所治疗的病症的进展等标准进行评价。剂量可随着所使用的剂型以及所用的给予途径而变化。

[0133] 对于本文所述的治疗方法，并不打算将本文所述的多能干细胞和/或其至少部分分化的后代的给予限定至特定的给予模式、剂量或给药频率。所有的给药模式都在考虑之列，包括肌内、静脉内、腹膜内、囊内、关节内、病灶内、皮下、或足以提供适于对所治疗病症进行处理的剂量的任何其它途径。

[0134] 在一些实施方式中，可将本文所述的方法用于在体内生成多能细胞，例如可使存在于受试者中的细胞接受本文所述的应激，从而获得多能表型。对体内细胞施加本文所述的应激的方法是显而易见的，例如，可通过注射和/或直接施加将弱酸溶液引入组织中；可通过能够加热或冷却周围组织的探针、或通过使用无创伤性方法(例如，聚焦光束辐射)，改变温度。可将多能性的体内调节用于例如加快组织再生或伤口愈合。非限制性实例可包括将弱酸注射入关节炎性膝关节中，从而诱导膝关节细胞(例如，滑膜细胞或软骨细胞)呈现出多能表型，并生成新的组织。进一步的非限制性实例可包括对中风或中枢神经系统损伤(例如，脊髓损伤)的受试者进行治疗。在解决炎症后，可用本文所述的应激对损伤区域附近的细胞进行处理，生成能够重建受损组织和/或再生或修复受损组织的多能细胞。

[0135] 在进一步的非限制性实例中，表观遗传状态的变化(例如，通过用去甲基化酶进行处理)可引起非胰岛素分泌细胞(例如，胰腺的α胰高血糖素细胞)转化成胰岛素分泌细胞(例如，β细胞)。因此，根据本文所述方法在体外或体内对非胰岛素分泌细胞(例如，胰腺的α胰高血糖素细胞)进行处理，可使细胞成为胰岛素分泌细胞，例如β样细胞。

[0136] 另外，在考虑之列的是，本文所述的多能细胞可与其它细胞(即“受体细胞”)融合，所述其它细胞例如未经本文所述方法处理的细胞、非多能细胞、成熟细胞、恶性细胞和/或受损细胞。与融合前相比，细胞融合可引起受体细胞中的增高水平的细胞修复酶的表达和/或活性。例如通过提高对细胞损害、突变和/或受体细胞表观遗传状态修饰的修复，可提高受体细胞的健康状况和/或功能。

[0137] 在一些实施方式中，通过增高体内的细胞多能性，可调节这些细胞的表观遗传标志物(例如，DNA甲基化、去甲基化和/或羟甲基化状态)。对表观遗传标志物的调节可涉及例如恶性肿瘤、关节炎、自体免疫疾病、衰老等，根据本文所述方法对此类表观遗传相关病症进行的治疗也在考虑之列。

[0138] 在一些实施方式中，可在体内同时对多种组织进行处理。例如，可相继或同步地在多个器官(例如，脑、心脏、肝、肺和/或甲状腺)内诱发弱酸状态，从而对广泛的损害或衰老进行治疗。

[0139] 进一步在考虑之列的是，本文所述的细胞体内处理可与如本文所述生产的多能细胞和/或其至少部分分化的后代的给予相结合。

[0140] 在本文考虑之列的是，可将本文所述方法用于对例如子宫内的胎儿或胚胎进行治疗。

[0141] 可通过例如测量如本文所述治疗的病症的标志物、指示物、症状或发生率、或任何其它合适的可测量参数(例如，多能细胞后代的数量)，对治疗效力进行评价。对本领域技术人员而言力所能及的是，通过测量此类参数中的任一个或者参数的任意组合来监测治疗或预防的效力。

[0142] 当在所治疗病症的一个或多个标志物、指示物或症状方面具有统计学上显著的改善，或者未如所预期的发生恶化或症状进展时，明显是有效治疗。作为实例，在病症可测量参数方面至少约10％、优选至少约20％、约30％、约40％、约50％或更多的有利变化可表示有效的治疗。还可使用本领域已知的用于本文所述病症的实验动物模型，对根据本文所述方法生成的多能细胞和/或多能细胞的至少部分分化的后代的效力进行评判。当使用实验动物模型时，当观察到标志物(例如，存在于骨髓切除并用本文所述的干细胞处理后的小鼠中的造血细胞的数量)在统计学上显著的变化时，处理效力是明显的。

[0143] 一方面，本文所述的是生产能够分化为胎盘细胞的多能细胞的方法，所述方法包括：在FGF4存在的情况下，对根据本文所述方法获得的多能细胞进行培养。在一些实施方式中，多能细胞能够分化为胚胎干细胞。在一些实施方式中，FGF4的浓度为约1nM至约1μM。在一些实施方式中，FGF4的浓度为1nM至1μM。在一些实施方式中，FGF4的浓度为约5nM至约500nM。在一些实施方式中，FGF4的浓度为约10nM至约100nM。

[0144] 在一些方面，本文所述的技术涉及从细胞生成多能细胞的系统，所述技术包括将线粒体和/或细胞质的部分从细胞中移除。

[0145] 根据本文所述的方法，用于从细胞生成多能细胞的系统可包含使细胞在其中接受应激的容器。该容器可适于对体细胞和/或多能细胞进行培养，作为实例，为了根据本文所述的方法减少细胞质和/或线粒体的量，将细胞在低氧条件下培养数天或更长。或者，容器可适于对细胞进行应激，但不适于培养细胞，作为实例，将细胞在具有窄孔的装置中磨制有限的时间，例如小于1小时。容器可为例如皿、管、微流装置、吸管、生物反应器或细胞培养

皿。可将容器维持在提供适于体细胞和/或多能细胞培养的条件的环境中(例如,处于培养箱中)、或在提供针对细胞引起环境应激的条件的环境中(例如,处于提供低氧含量环境的培养箱中)。可将容器设置为提供一种或多种本文上述的环境应激,例如1种应激、2种应激、3种或更多应激。适于对体细胞和/或多能细胞进行操作和/或培养的容器为本领域普通技术人员所公知,并可商购(例如,Cat No CLS430597Sigma-Aldrich;St.Louis,MO)。在一些实施方式中,容器是微流装置。在一些实施方式中,容器是细胞培养皿、细胞培养瓶或细胞培养板。

[0146]　在一些实施方式中,该系统可进一步包含用于对多能细胞进行选择的工具,例如,系统可包含FACS系统,所述FACS系统能够对表达多能性标志物(例如Oct4-GFP)的细胞进行选择、或通过如本文上述的尺寸进行选择。对细胞进行选择的方法和装置为本领域普通技术人员所公知,并且可商购,例如BD Biosciences;Franklin Lakes,NJ生产的、配合有BD LSRII™和BD FACSDIVA™软件(Cat No.643629)的BD FACSARIA SORP™。

[0147]　在一些实施方式中,将不存在于组织中的细胞提供至系统。在一些实施方式中,将组织提供至系统,并且,该系统进一步包含对一种或多种类型细胞进行分离的工具。通过非限制性实例的方式,系统可包含组织匀浆器。组织匀浆器和使用组织匀浆器的方法为本领域所已知,并且可商购(例如,FASTH21™,Cat No.21-82041Omni International;Kennesaw,GA)。或者,系统可包含离心机,从而对血液或流体样品进行处理。

[0148]　在一些实施方式中,系统可为自动化的。自动化的细胞分离、细胞培养和选择的方法和装置为本领域所已知,并且可商购。例如,FASTH21™Tissue Homogenizer(Cat No.21-82041Omni International;Kennesaw,GA)和BD FACSARIA SORP™。

[0149]　在一些实施方式中,系统可为无菌的,例如,可在无菌环境中进行操作,或者系统可作为封闭、无菌的系统进行操作。

[0150]　一方面,本文所述的是提高多能细胞自我更新能力的方法,所述方法包括:在促肾上腺皮质激素(ACTH)、2i或3i培养基存在的情况下,对细胞进行培养。本文使用的术语“自我更新能力”是指细胞能够在体外培养和传代的时长,例如,细胞及其后代能够被传代并继续产生有活力的细胞的数量。根据本文所述的方法,被赋予增高的自我更新能力的细胞可为例如全能细胞和/或通过暴露至如本文其它地方所述的应激而生成的细胞。

[0151]　在一些实施方式中,在ACTH存在的情况下进行的培养可包括在包含约0.1μM至约1,000μM(例如,约0.1μM至约100μM、约0.1μM至约10μM或约10μM)ACTH的细胞培养基中对细胞进行培养。在一些实施方式中,在ACTH存在的情况下对细胞进行培养可包括在含ACTH的LIF培养基中对细胞进行培养。LIF、ACTH、2i和3i可商购,并为本领域所公知,例如,可从Sigma-Aldrich(Cat No.A0673;St.Louis,MO)购买ACTH;可从Millipore(例如,Cat Nos ESG 1107;Billerica,MA)购买LIF培养基;并且可从Stem Cells Inc.(例如,作为“iSTEM Stem Cell Culture Medium”,Cat No.SCS-SF-ES-01;Newark,CA)购买3i。

[0152]　在一些实施方式中,培养步骤可进行至少3天,例如至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天或更长。在培养步骤之后,可将细胞维持在如本文其它地方所述的适于对多能细胞进行维持的条件下。

[0153]　在一些实施方式中,在培养步骤后,细胞能够表达可检测水平和/或增高水平的干细胞标志物。在本文其它地方描述了干细胞标志物及其检测方法。在一些实施方式中,干细

胞标志物可选自于由Oct3/4、Nanog、Rex1、Klf4、Sox2、Klf2、Esrr-β、Tbx3和Klf5所组成的组。

[0154] 对本公开内容的实施方式的描述并不打算穷举或将本公开内容限制在所公开的确切形式。尽管本文出于说明目的对本公开内容的具体实施方式和实施例进行了描述，本领域技术人员将会认识到，各种等同修改均有可能落入本公开内容的范围内。例如，虽然方法的步骤或功能以给定顺序存在，但是其它实施方式可以不同的顺序来实施功能、或可实质上同时实施功能。本文所提供的本公开内容的教导可以适当的方式应用于其它程序或方法。可将本文所述的各种实施方式组合以提供进一步的实施方式。如有需要的话，可对本公开内容的方面进行修改，从而利用上述参考和应用的组合、功能和概念来提供本公开内容更进一步的实施方式。可根据详细描述，对本公开内容进行上述改变和其它改变。

[0155] 任何前述实施方式中的具体要素均可进行组合或替代其它实施方式中的要素。此外，尽管与本公开内容的特定实施方式相关的优点已经在这些实施方式的上、下文中给出，但是其它实施方式也可表现出此类优点，但不是所有实施方式都必须展现出此类优点以落入本公开内容的范围内。

[0156] 为描述和公开的目的，以引用的方式将所标明的所有专利和其它出版物明确并入本文，例如，此类出版物中描述的可与本发明一起使用的方法学。这些出版物仅由于它们的公开早于本申请的申请日而提供。在这一方面不应当视作承认本发明人没有权利借助先前的发明或因为任何其它原因而将公开的内容提前。所有关于这些文件的日期的声明或这些文件的内容的表述是基于申请人可得的信息，并且不构成关于这些文件的日期或这些文件的内容的正确性的任何承认。

[0157] 通过下文的实施例对本发明进行进一步说明，所述实施例不应视为是限制性的。

[0158] 本文所述技术的一些实施方式可由以下编号段落中的任一段进行限定。

[0159] 1.一种生成多能细胞的方法，所述方法包括使细胞接受应激。

[0160] 2.如段落1所述的方法，其中，无需引入外源基因、转录物、蛋白、核组分或细胞质、或者无需细胞融合而生成所述多能细胞。

[0161] 3.如段落1-2中任一段所述的方法，所述方法进一步包括选择表现出多能性的细胞。

[0162] 4.如段落1-3中任一段所述的方法，其中，所述细胞并不作为组织的部分而存在。

[0163] 5.如段落1-4中任一段所述的方法，其中，所述细胞是体细胞、干细胞、祖细胞或胚胎细胞。

[0164] 6.如段落1-5中任一段所述的方法，其中，所述细胞是经分离的细胞。

[0165] 7.如段落1-6中任一段所述的方法，其中，所述细胞存在于细胞的异质群中。

[0166] 8.如段落1-7中任一段所述的方法，其中，所述细胞存在于细胞的同质群中。

[0167] 9.如段落1-8中任一段所述的方法，其中，所述选择表现出多能性的细胞包括对表达干细胞标志物的细胞进行选择。

[0168] 10.如段落9所述的方法，其中，所述干细胞标志物选自于由Oct4、Nanog、E-钙粘蛋白和SSEA4所组成的组。

[0169] 11.如段落1-10中任一段所述的方法，其中，所述选择表现出多能性的细胞包括对不粘附的细胞进行选择。

[0170] 12.如段落1-11中任一段所述的方法，其中，所述应激包括在组织或细胞培养物中的非生理性应激。

[0171] 13.如段落1-12中任一段所述的方法，其中，所述应激包括将细胞暴露至选自如下的至少一种环境刺激中：创伤、机械刺激、化学暴露、超声刺激、氧剥夺、辐射、暴露至极端温度、解离、磨制、物理应激、高渗透压、低渗透压、膜损害、毒素、极端离子浓度、活性氧、UV暴露、强可见光、必需营养物的剥夺或非生理性酸性环境。

[0172] 14.如段落1-13中任一段所述的方法，其中，所述应激包括将细胞暴露至约3.0至约6.8的pH。

[0173] 15.如段落1-14中任一段所述的方法，其中，所述应激包括将细胞暴露至约4.5至约6.0的pH。

[0174] 16.如段落15所述的方法，其中，所述应激包括将细胞暴露至约5.4至约5.8的pH。

[0175] 17.如段落12-16中任一段所述的方法，其中，将细胞暴露2-3天。

[0176] 18.如段落12-17中任一段所述的方法，其中，将细胞暴露1天或更短。

[0177] 19.如段落12-18中任一段所述的方法，其中，将细胞暴露1小时或更短。

[0178] 20.如段落12-19中任一段所述的方法，其中，将细胞暴露约30分钟。

[0179] 21.如段落13所述的方法，其中，暴露至极端温度包括将细胞暴露至低于35℃或高于42℃的温度。

[0180] 22.如段落21所述的方法，其中，所述暴露至极端温度包括将细胞暴露至处于或低于冰点的温度、或将细胞暴露至至少约85℃的温度。

[0181] 23.如段落13所述的方法，其中，所述机械刺激包括将细胞暴露至剪切应力和/或高压。

[0182] 24.如段落23所述的方法，其中，所述机械刺激包括使细胞通过具有小于细胞尺寸的孔的至少一个装置。

[0183] 25.如段落23所述的方法，其中，所述机械刺激包括使细胞通过具有逐渐变小的孔的多个装置。

[0184] 26.如段落1-25中任一段所述的方法，所述方法进一步包括对多能细胞进行培养，从而使所述多能细胞增殖。

[0185] 27.如段落1-26中任一段所述的方法，其中，所述多能细胞表达干细胞标志物。

[0186] 28.如段落27所述的方法，其中，所述干细胞标志物选自于由Oct4、Nanog、E-钙粘蛋白和SSEA4所组成的组。

[0187] 29.如段落1-28中任一段所述的方法，其中，所述细胞是哺乳动物细胞。

[0188] 30.如段落1-29中任一段所述的方法，其中，所述细胞是人细胞。

[0189] 31.如段落1-30中任一段所述的方法，其中，所述细胞是成体细胞、新生儿细胞、胎儿细胞、羊膜细胞或脐带血细胞。

[0190] 32.如段落1-31中任一段所述的方法，所述方法进一步包括将多能细胞在体外进行维持。

[0191] 33.如段落1-32中任一段所述的方法，其中，细胞的表观遗传状态变为更加极为类似于胚胎干细胞的表观遗传状态。

[0192] 34.如段落33所述的方法，其中，所述表观遗传状态包括甲基化模式。

[0193]　35.如段落1-34中任一段所述的方法，其中，所述应激包括将至少约40％的细胞质从细胞中移除。

[0194]　36.如段落35所述的方法，其中，将至少约50％的细胞质从细胞中移除。

[0195]　37.如段落36所述的方法，其中，将至少约60％的细胞质从细胞中移除。

[0196]　38.如段落37所述的方法，其中，将60％-80％的细胞质从细胞中移除。

[0197]　39.如段落37所述的方法，其中，将至少约80％的细胞质从细胞中移除。

[0198]　40.如段落39所述的方法，其中，将至少约90％的细胞质从细胞中移除。

[0199]　41.如段落1-40中任一段所述的方法，其中，所述应激包括将至少约40％的线粒体从细胞中移除。

[0200]　42.如段落41所述的方法，其中，移除细胞质的部分是将至少约50％的线粒体从细胞质中移除。

[0201]　43.如段落42所述的方法，其中，移除细胞质或线粒体是将约50％-90％的线粒体从细胞质中移除。

[0202]　44.如段落42所述的方法，其中，所述移除细胞质或线粒体是将多于90％的线粒体从细胞质中移除。

[0203]　45.如段落1-44中任一段所述的方法，其中，所述应激足以将暴露至所述应激的细胞中的至少10％的细胞膜破坏。

[0204]　46.一种测定法，所述测定法包括，将根据段落1-45中任一段所述的方法生产的多能细胞与候选试剂接触。

[0205]　47.如段落46所述的测定法，所述测定法用于识别影响多能细胞的存活力、分化和增殖中的一种或多种的试剂。

[0206]　48.通过段落1-45中任一段所述的方法生产的多能细胞在用于受试者的细胞治疗方法中的用途。

[0207]　49.一种制备与待给予受试者的细胞治疗相容的细胞或组织的方法，所述方法包括：

[0208]　根据段落1-45中任一段从细胞生成多能细胞；

[0209]　其中，所述细胞是自体细胞或HLA匹配同种异体细胞。

[0210]　50.如段落49所述的方法，所述方法进一步包括，在向受试者给予细胞或组织之前，使所述多能细胞沿预定细胞谱系分化。

[0211]　51.一种包含多能细胞的组合物，其中，所述多能细胞通过段落1-45中任一段所述的方法从细胞生成。

[0212]　52.一种生产多能干细胞的方法，所述方法包括，在促肾上腺皮质激素(ACTH)、2i或3i培养基存在的情况下，对细胞进行培养。

[0213]　53.如段落52所述的方法，其中，在含ACTH的LIF培养基中对所述细胞进行培养。

[0214]　54.如段落52或53所述的方法，其中，所述ACTH以约0.1μM至约100μM的浓度存在。

[0215]　55.如段落52-54中任一段所述的方法，其中，所述细胞为通过段落1-45中任一段所述的方法生成的细胞。

[0216]　56.如段落52-55中任一段所述的方法，其中，所述细胞为全能细胞。

[0217]　57.如段落52-56中任一段所述的方法，其中，在ACTH、2i或3i培养基存在的情况

下,对所述细胞培养至少3天。

[0218] 58.如段落52-57中任一段所述的方法,其中,在ACTH、2i或3i培养基存在的情况下,对所述细胞培养至少5天。

[0219] 59.如段落52-58中任一段所述的方法,其中,在ACTH、2i或3i培养基存在的情况下,对所述细胞培养至少7天。

[0220] 60.如段落52-59中任一段所述的方法,其中,在所述培养步骤后,细胞表达可检测水平的干细胞标志物,所述干细胞标志物选自于由Oct3/4、Nanog、Rex1、Klf4、Sox2、Klf2、Esrr-β、Tbx3和Klf5所组成的组。

[0221] 61.一种增高多能细胞自我更新能力的方法,所述方法包括在促肾上腺皮质激素(ACTH)、2i或3i培养基存在的情况下,对细胞进行培养。

[0222] 62.如段落61所述的方法,其中,在含ACTH的LIF培养基中对所述细胞进行培养。

[0223] 63.如段落61-62中任一段所述的方法,所述ACTH以约0.1μM至约100μM的浓度存在。

[0224] 64.如段落61-63中任一段所述的方法,其中,所述细胞为通过段落1-45中任一段所述的方法生成的细胞。

[0225] 65.如段落61-64中任一段所述的方法,其中,所述细胞为全能细胞。

[0226] 66.如段落61-65中任一段所述的方法,其中,在ACTH、2i或3i培养基存在的情况下,对所述细胞培养至少3天。

[0227] 67.如段落61-66中任一段所述的方法,其中,在ACTH、2i或3i培养基存在的情况下,对所述细胞培养至少5天。

[0228] 68.如段落61-67中任一段所述的方法,其中,在ACTH、2i或3i培养基存在的情况下,对所述细胞培养至少7天。

[0229] 69.如段落61-68中任一段所述的方法,其中,在所述培养的步骤后,细胞表达可检测水平的干细胞标志物,所述干细胞标志物选自于由Oct3/4、Nanog、Rex1、Klf4、Sox2、Klf2、Esrr-β、Tbx3和Klf5所组成的组。

[0230] 70.一种在需要细胞治疗的受试者中进行的自体细胞治疗的方法,所述方法包括:

[0231] a.根据段落1-45中任一段所述的方法从细胞生成多能细胞,其中,所述细胞获取自所述受试者;以及

[0232] b.向受试者给予包含多能细胞或其分化后代的组合物。

[0233] 71.如段落70所述的方法,所述方法进一步包括,在向受试者给予所述组合物之前,使所述多能细胞沿预定细胞谱系分化。

[0234] 72.一种生产能够分化为胎盘细胞的多能细胞的方法,所述方法包括,在FGF4存在的情况下,对通过段落1-45中任一段所述的方法生成的多能细胞进行培养。

[0235] 73.如段落72所述的方法,其中,所述FGF4的浓度为1nM至1μM。

[0236] 74.如段落72或73所述的方法,其中,所述多能细胞有能力分化为胚胎干细胞。

[0237] 实施例

[0238] 实施例1

[0239] 所有的生物体拥有原始的存活本能。当植物接受显著的外部应激,它们将激活引起细胞脱分化、并使损伤区域或整个生物体再生的存活机制。该机制看起来对于低等生物

体在极端环境变化下的存活很必要。然而在哺乳动物中尚未有该机制的记载。

[0240] 发明人假定，与在植物或低等生物体中看到的相似，物理应激可引起成熟动物细胞逆转至干细胞状态。为了检验该假定，研究了从7个成体体细胞组织获得的成熟细胞。首先关注何种物理应激可能在使成熟细胞逆转至成熟度较低的状态方面最有效，研究了从Oct4-GFP小鼠收集的CD45阳性淋巴细胞。当干细胞特异性Oct4启动子活化时，来自这些小鼠的细胞提供了逆转至干细胞表型的结果输出。将成熟、完全分化的细胞暴露至多种显著的外部刺激。

[0241] 例如，将CD45阳性淋巴细胞暴露至低pH溶液，从而提供强的化学应激。在暴露的3天内，观察到GFP表达细胞；在5天内，观察到由GFP表达细胞组成的球形集落。在本实施例中，将以这一方式生成的细胞称为应激改变的干细胞(Stress Altered Stem cell,SASCs或SACs)。SACs还可指恢复活力的干细胞(RSCs)或动物愈伤组织细胞(ACCs)。SACs表达通常与胚胎干细胞相关的多种标志物。SACs表现出与ES细胞等同的分化潜能，有助于嵌合体小鼠的生成，并且在注射入4N囊胚中时能够生成整个胎儿。以这一方式生成的细胞最初显示出低的线粒体活性和通常与诱导基于细胞的损伤防御机制相关的其它情况。然后，表现出Oct4和Nanog基因启动子的去甲基化。看起来通过间充质-上皮转化诱导了应激改变细胞的重编程。这些发现与对植物愈伤组织中含有的细胞在应答损伤(外部刺激)时的描述相一致。从应激诱导的细胞至多能植物干细胞的转化而形成植物愈伤组织，该植物愈伤组织能够形成克隆体。本文将成熟的完全分化的哺乳动物体细胞在应答显著的外部刺激而生成的此类球形集落称为动物愈伤组织，并将在此类集落或愈伤组织中含有的应激改变细胞称为“动物愈伤组织细胞”(ACCs)或SACs。

[0242] 因此，显著的物理和化学应激引起正常的成熟成体细胞重编程为能够进行胚胎发生的多能干细胞。然而不希望受理论的束缚，重编程的机制看起来包括诱导通常在损伤应答中常见的细胞存活和修复处理。本文显示出，哺乳动物细胞具有非常类似于植物的存活机制，从而在对显著的应激性外部刺激应答时逆转至重编程状态。

[0243] 已报道，通过对特定基因进行诱导或强制表达，将多种类型的细胞重编程为多能干细胞状态[1-5]。据认为，作为暴露至刺激物(例如，烧伤、化学损伤、创伤和辐射)而损害细胞，可将正常细胞变为癌细胞。

[0244] 介绍

[0245] 通过使它们自身适应于环境并使机体再生，所有的生物体看起来具有与应激刺激相关的共同的损伤存活本能。在植物中，不仅在合子中，而且还在完全分化的细胞和不成熟的花粉中观察到个体发生。在脊椎动物中，蝾螈能够再生数种解剖结构和器官，包括其肢体[1]。特别值得注意的是，植物和蝾螈显示出的显著的再生能力通过外部刺激加以诱导，该外部刺激引起先前完全分化的体细胞的细胞脱分化。从最早的生命起已经过了数十亿年，不同的生物体以其独特的方式进化，该存活本能可从共同的祖先遗传至现代生物体。虽然通常认为终末分化的哺乳动物细胞不能逆转分化过程，哺乳动物可保留此前不重视的程序，从而在对强烈的环境变化进行应答时逃避死亡。

[0246] 植物愈伤组织为对外部刺激(例如伤害)进行应答形成的增殖细胞团块，可通过植物激素，在培养中刺激植物愈伤组织的形成[2]。愈伤组织含有重编程的体细胞(称为愈伤组织细胞)，各愈伤组织细胞能够克隆再生为整个机体。在植物中，愈伤组织细胞并非与生俱

来，而是在对外部刺激进行应答中由体细胞生成。虽然最近的研究显示出可通过外源处理(例如基因诱导[3-7])对哺乳动物体细胞进行重编程，在以类似于植物的方式应答外部物理和/或化合物刺激时，对哺乳动物体细胞进行重编程未被报道。有趣的是，据认为，极端的外部刺激，例如暴露至刺激物(包括烧伤、化学损伤、创伤和辐射)可将正常体细胞变为癌细胞。此类经验看起来表明了外部刺激将导致哺乳动物细胞变化。

[0247] 在这一研究中，假定哺乳动物细胞以与植物相同的方式保留了暴露至显著的外部应激得以存活的机制。该报道给出了如下证据：施加显著的物理和化学刺激可引起从多种组织中获得的成熟的、完全分化的哺乳动物体细胞重编程，并且该应激改变的细胞能够形成含有“动物愈伤组织细胞”的动物愈伤组织，所述动物愈伤组织可再生为克隆体。

[0248] 结果

[0249] 对成熟体细胞施加显著的物理和化学刺激。由于认为胚胎转录因子Oct4对细胞多能状态的调控很关键，初步策略为识别何种外部刺激最有效地将成熟细胞变为通过重编程表达Oct4。为避免被未分化的细胞污染，首先对CD45阳性造血谱系细胞进行了研究。将从Oct4-GFP(GOF)小鼠[8]获得的脾中收集的CD45阳性细胞暴露至多种显著的物理和化学刺激。所述暴露包括：渗透压处理、显著的机械磨制处理、暴露至低pH、使用链球菌溶血素O(SLO)施加细胞膜损害、暴露至营养不良、以及暴露至缺氧和高Ca^{2+}浓度。然后，使用FACS对GFP表达细胞进行识别、分选和收集。通过RT-PCR对Oct4的基因表达进行确认。暴露至所施加的各刺激引起成熟细胞的重编程从而在一定程度上表达GFP(图5A)。在使成熟细胞变为表达Oct4方面，将成熟细胞暴露至低pH的化学应激和显著机械磨制的物理应激看起来是最有效的处理。为确定诱导转变为Oct4表达细胞的最佳pH，将CD45阳性细胞暴露至pH4.0至pH6.8的酸度变化溶液。在暴露至酸性溶液3天后，使用FACS分析细胞的GFP表达。pH5.4-5.6的酸性溶液最有效地将细胞变为表达GFP(图5B)。作为结果，作为对本研究剩余部分的应激处理的选择集中于暴露至低pH。

[0250] 随后，确定了对应激改变的Oct4表达细胞进行维持的最佳培养条件。研究了前述的多种培养基，所述培养基包括：ES建立培养基、3i[9]和ACTH[10]、ES培养条件、ES-LIF[11]、胚胎神经干细胞培养条件、B27-LIF[12]、以及EpiSCs培养条件[13]。将细胞涂板于在各培养基，对表达GFP的集落进行计数(图5C)。在生成GFP表达球形集落方面，B27-LIF培养基看起来最有效。因此，将B27-LIF培养基用于培养经处理的细胞。

[0251] 在B27-LIF培养基中对经应激处理的CD45阳性细胞进行培养，并且在5天内观察到GFP表达球形集落，而在未经处理的对照中没有观察到表达GFP的集落(图1A)。在最初的7天，球形集落生长至直径约70μm，并且在该培养条件下可将该球形集落再维持另外的7天。集落的外形有些复杂，看起来更类似于植物中可见的愈伤组织的形态，而非球形。因此，将通过应激处理生成的细胞集落称为动物愈伤组织(AC)。将经培养的细胞解离，并随后利用FACS进行群体分析。分析表明，施加某些显著刺激引起应激改变的细胞的生成，所述应激改变的细胞在此称为动物愈伤组织细胞(ACCs)，该动物愈伤组织细胞之前并不存在于CD45阳性细胞群(图1B)。在单细胞水平观察到作为应激处理结果的CD45阳性细胞的表型变化。尽管CD45阳性细胞并不表达GFP，但是ACCs表达GFP与CD45表达减弱相关(数据未示出)。对单细胞的检查表明，经处理的细胞的细胞尺寸看起来比未经处理的细胞更小。因此，通过FACS对ACCs群的细胞尺寸进行分析。ACCs的细胞尺寸非常小，80％的细胞的直径小于8μm(图

1C)。

[0252] 为检查与CD45减少和Oct4表达相关的随时间发生的表型变化，在第1天、第3天和第7天对经应激处理的CD45阳性细胞进行分析。在第1天，大部分细胞仍然表达CD45，但不表达Oct4。在第3天，标志物的表达转变成显示为CD45阴性细胞或CD45阴性/Oct4阳性(微弱)细胞。在第7天，CD45表达消失，并观察到Oct4表达细胞(图1D)。尤其是，在培养的最初7天，PI阳性细胞(死细胞)的数量逐渐增高(数据未示出)，这表明应激处理和培养条件逐渐改变了细胞的特征，并选择了成功改变的细胞(表达Oct4)。

[0253] 对ACCs进行表征。为确认作为暴露至外部刺激的结果的体细胞重编程，对ACCs的早期胚胎发生标志物基因的表达进行了研究。作为早期胚胎发生的阳性对照，将ES细胞用于下述实验中。对标志物表达和DNA甲基化进行如下表征：在第7天的免疫荧光染色显示出，含有ACCs的球形集落一致地表达多能细胞标志物E-钙粘蛋白抗原、Nanog、SSEA-1、PCAM-1和AP，并且该球形集落为Oct4-GFP阳性(数据未示出)。基因表达分析显示出，ACCs和ES细胞而非原代CD45阳性细胞表达出可比水平的Oct4、Nanog、Sox2、Ecat1、Esg1、Dax1、Fgf5、Klf4和Rex1基因(图2A)。在第7天，ACCs中的ES特异性基因的基因表达达到峰值(图2A)。为确定ACCs中的Oct4和Nanog基因启动子的状态，进行亚硫酸氢盐测序。天然淋巴细胞和培养的淋巴细胞对照样品在二者的启动子中均呈现出广泛的甲基化，而ACCs类似于ES细胞可见的，显示出在这些区域的广泛去甲基化(图2B)。因此，说明了通过外部应激使哺乳动物体细胞得以重编程。

[0254] 为确认不仅在GOF小鼠、而且在野生型小鼠中，由对成熟细胞进行应激处理引起的Oct4基因表达，从ICR小鼠获得的脾中收集CD45阳性淋巴细胞。随后，将淋巴细胞暴露至应激处理，并利用FACS进行时程分析直至第7天。在应激处理组中，看到SSEA-1阳性/E-钙粘蛋白阳性细胞群，而在未经应激处理的对照组中未观察到SSEA-1/E-钙粘蛋白表达(图6A)。通过RT-PCR证实了这些双阳性细胞示出了Oct4基因表达(图6B)。这些结果表明，无论小鼠的品系，作为应激处理的结果，从CD45阳性细胞生成ACCs、Oct4阳性和多能标志物表达细胞。

[0255] 这些结果表明，作为应激处理的结果，成熟的完全分化的成体体细胞逆转至“干细胞性”。

[0256] 为评价ACCs的干细胞性，对其自我更新潜能和其分化潜能进行检查。为研究其自我更新潜能，将来源于之前为成熟的CD45阳性淋巴细胞的ACCs集落解离为单个细胞，并以每孔一个细胞接种于96孔板中，从而生成无性系衍生群体。在接种后10天，在96个孔的4个孔中看到球形集落。各孔中的ACCs分裂时间不同。一些在12-16h内分裂，另外的在30-34h内分裂。将ACCs传代至少5次，同时观察到Oct4的连续表达。作为结果，ACCs示出了自我更新的潜能、以及在体外分化为全部三个胚层的细胞的潜能。

[0257] 再次将来源于成熟GOF淋巴细胞的ACs解离为单个细胞，分选为仅含有表达GFP的细胞群，并随后在分化培养基中培养。在涂板后第14-21天，细胞表达外胚层标志物(βIII-微管蛋白和GFAP)、中胚层标志物(α-平滑肌肌动蛋白)和内胚层标志物(α-甲胎蛋白和细胞角蛋白7)(数据未示出)。因此，ACCs在体外分化为代表三个胚层的细胞。

[0258] 从多种成体组织获得的成熟体细胞的应激改变。为检查是否不仅能够从成熟的淋巴细胞，还能够从其它类型的体细胞生成ACCs，从Oct4-GFP(GOF)小鼠收集脑、皮肤、肌肉、脂肪、骨髓、肺和肝[8]。从组织样品中分离细胞，解离为单个细胞，并用不同的物理和/或化学

应激条件进行处理。改变细胞的处理的效力作为细胞来源和细胞所暴露至的应激条件的函数而变化(图7A)。依赖于细胞的衍生作用,应激将成熟细胞改变为表达Oct4的能力不同,然而在来源于全部三个胚层的成熟细胞中,应激能够在一定程度上将细胞改变为表达Oct4(图7A)。来源于任何成熟组织的ACC集落表达多能标志物E-钙粘蛋白、Nanog、PCAM-1和AP(数据未示出),以及ES特异性标志物基因(图7B)。不论组织的来源和胚层的衍生作用,显著的物理和化学应激改变成熟体细胞从而逆转至干细胞状态。

[0259] 在ACCs生成的最初阶段的细胞修饰。这些结果示出强的物理和化学刺激引起体细胞的重编程。观察到经应激处理的淋巴细胞在5天内形成AC。假定作为应激暴露的结果,发生分子事件的剧烈变化。因此,研究关注于重编程最初阶段,所述最初阶段为暴露至刺激后的最初7天。

[0260] 由于ACCs在显著的应激暴露后存活,推测在ACCs生成过程中,诱导了用来修复细胞损害的存活机制的正常开启。首先,在第1天、第3天和第7天,对天然CD45阳性细胞和经应激处理的CD45阳性细胞中涉及DNA修复[14]和应激的细胞应答的大量候选基因的的表达进行比较。当对ACC生成细胞和其它细胞的混合物进行分析时,在第1天已观察到细胞应答基因的表达,并且这些基因上调超过7天(图8)。由于细胞应答基因的上调与ACCs生成相关,对在第3天和第7天的ACCs进行分选,并对基因表达进行分析。在ACCs生成过程中,除Hif3a外,所有的候选基因均上调的不同程度(图3A)。在ACCs生成过程中,发现四个热休克基因和一个DNA修复基因被上调。此外,已知上调基因中的7个直接参与对细胞氧化还原状态的调控。这些结果表明,在ACCs生成过程中诱导了自我更新潜能或自我防御潜能。

[0261] 由于ACCs表现出细胞氧化还原相关基因的上调,随后检查了ACCs的线粒体功能。线粒体是在真核细胞内负责通过利用氧气进行氧化还原反应从而产生绝大多数ATP的细胞器。当对集落进行培养而不传代时,在7天后,ACC球形集落的GFP表达从位于周边的细胞开始逐渐降低。在第10天,所包含的ACCs含有GFP表达中心细胞和非GFP分化周边细胞(数据未示出)。通过用线粒体特异性染料MitoTracker Red染色,在ACCs和分化细胞中对线粒体形态进行评价。观察到ACC线粒体作为表现为点状和球形的核周团簇,而分化细胞含有呈细丝状并在细胞质中广泛分布的许多线粒体。ACCs的ATP生产低于CD45阳性细胞(图3B)。并且,ACCs的活性氧(ROS)生产低于天然CD45阳性细胞(图3C)。最后,对参与mtDNA复制的关键因子进行评价,所述关键因子为线粒体转录因子A(Tfam)、线粒体特异性DNA聚合酶γ(Polg)及其辅助单元(Polg2)。ACCs中的Tfam、Polg和Polg2的基因表达低于分化细胞(图3D)。作为结果,ACCs含有少量的线粒体,并且ACCs的线粒体活性低于分化细胞。这些结果表明,在剧烈的应激应答后,为了存活,ACCs获得了不同于分化细胞的代谢系统。

[0262] ACCs的发育潜能。最后,评价了ACCs是否具有有类似于植物愈伤组织细胞的发育潜能。作为对发育潜能的初步测试,研究了免疫缺陷(SCID)小鼠中的经皮下植入的ACCs。在移植后六周,ACCs生成表现出全部三个胚层的组织(数据未示出)。

[0263] 在体内和体外,ACCs分化为代表全部三个胚层的细胞。因此,评价了ACCs的嵌合体分布潜能。使用来源于F1 GFP(C57BL/6GFP×DBA/2或129/SvGFP×C57BL/6GFP)或GOF的CD45阳性细胞制备用于嵌合体生成研究中的ACCs。由于基因表达分析表明在第7天时ACCs表达最高水平的多能标志物基因,将第7天的ACCs用于嵌合体小鼠生成研究。首先,利用生成嵌合体的传统方法。通过用胰蛋白酶处理将ACs解离为单个细胞。随后,将ACCs注射入囊

胚中(图4A)。应用这一方式,经解离的ACCs的嵌合体分布非常低(表1)。因此,将未经在先的胰蛋白酶处理(所述胰蛋白酶处理经常导致细胞损害[15])的ACCs注射入囊胚中。在显微镜下使用显微刀将ACs切分为小团簇。随后,将ACs的小团簇注射入囊胚中(图4A)。应用这一方式,ACCs的嵌合体分布显著增高(数据未示出)。由ACCs生成的嵌合体小鼠健康成长(数据未示出),并观察到种系传递。通过FACS对各组织的嵌合体分布率进行分析。结果显示出,来源于淋巴细胞的ACC分布至所有的组织(图4B)。

[0264] 如上文所示,可由来源于全部三个胚层的多种细胞生成ACCs(图7A-7B)。为检查来源于多种组织的ACCs是否具有不同的分化倾向,由来源于F1 GFP小鼠的多种组织生成ACCs,并注射入ICR囊胚中。随后,使用FACS对所生成的嵌合体小鼠中的各组织的分布比例进行分析。发现来源于任何组织的ACCs均有助于嵌合体小鼠的生成(图9)。此外,在使用来源于多种组织的ACCs生成的嵌合体小鼠中,对分布至皮肤、脑、肌肉、脂肪、肝和肺的比例进行了分析。来源于任何组织的ACCs均有助于生成代表全部三个胚层的组织,未观察到分化倾向(图9)。

[0265] 通过四倍体互补生成小鼠涉及将多能细胞注射入4N宿主囊胚中,由于所得到的胚胎仅来源于所注射的供体细胞,通过四倍体互补生成小鼠代表了对发育潜能的最严格测试[16]。由来源于DBA×B6GFP F1小鼠或129/SvGFP×B6GFP F1的淋巴细胞生成ACCs。在注射入4N囊胚后,ACCs引起(中)晚期妊娠“全ACC胚胎”的生成(数据未示出)。基因分型分析显示出,“全ACC胚胎”具有用于生成ACCs的品系的特异性基因。因此,ACCs具有如同植物愈伤组织细胞的、生成克隆体的潜能。

[0266] 讨论

[0267] 作为暴露至显著的外部刺激的结果,哺乳动物体细胞以非常类似于植物的方式表现出形成动物愈伤组织(AC)的能力。包含在这些愈伤组织中的细胞(动物愈伤组织细胞,ACCs)具有生成嵌合体小鼠和生成完全仅由ACCs生成的细胞构成的新胚胎的能力。本文所述的结果表明,通过外部刺激,哺乳动物体细胞重新获得分化为三个胚层中的任一层的能力。这表明,体细胞具有比先前认为的更大的可塑性。此外,该研究示出了无基因诱导或外源蛋白引入时的体细胞重编程的潜能,并提供了对成体干细胞的潜能的新见解;代表了干细胞生物学的阐释中的重要的里程碑。

[0268] 材料和方法

[0269] 组织收集和细胞培养。为分离成熟的淋巴细胞,用剪刀将来源于GOF小鼠或ICR小鼠的脾剪碎,并用巴斯德吸管进行机械解离。将经解离的脾通过细胞滤过器(BD Biosciences,San Jose)进行过滤。将收集的细胞在DMEM培养基中重悬,并加入相同体积的淋巴细胞(CEDARLANE®,Ontario,加拿大),随后以1000g离心15min。将淋巴细胞层取出,并用CD45抗体(ab25603,abcam,Cambridge,MA)加以获取。通过FACS Aria(BD Biosciences)对CD45阳性细胞进行分选。随后,对CD45阳性细胞进行应激处理(pH5.5溶液,进行15min),并涂板于补充有1000U LIF(Sigma)和10ng/ml FGF2(Sigma)的B27培养基。

[0270] 暴露至外部刺激-应激处理。为向成熟细胞给予机械应激,将巴斯德吸管加热并随后拉伸,从而产生直径约50微米的管腔,随后打破。随后,将成熟的体细胞通过这些吸管对磨制20min,并培养7天。为向成熟细胞提供低氧刺激,将细胞在5%氧气培养箱中培养3周。通过将细胞在基础培养基中培养3周,向成熟细胞提供营养不良刺激。为将成熟细胞暴露至

生理应激，将该成熟细胞用低pH(pH5.5)溶液处理，并培养7天。此外，使细胞受到更严重的损害。为在成熟细胞膜中生成孔，用SLO(链球菌溶血素O)对细胞进行处理。

[0271] 将经SLO处理的细胞在含有10μg/mL SLO的HBSS中于37℃下孵育50min，并随后在无SLO的培养基中培养7天。将暴露至营养不良应激的细胞在基础培养基中培养2-3周。将暴露至“ATP”应激的细胞在含有2.4mM ATP的HBSS中于37℃下孵育15min，并随后在培养基中培养7天。将暴露至“Ca”应激的细胞在含有2mM $CaCl_2$的培养基中培养2周。

[0272] 亚硫酸氢盐测序。将从GOF小鼠获得的细胞解离为单个细胞。使用FACS Aria收集GFP阳性细胞。从ACCs提取基因组DNA并进行研究。按照制造商的说明，使用CpGenome DNA Modification试剂盒(Chemicon,Temecula,CA,http://www.chemicon.com)对DNA进行亚硫酸氢盐处理。使用两条正向引物(F)和一条反向引物(R)通过巢式聚合酶链式反应PCR对所得到的经修饰的DNA进行扩增：Oct4(F1，

[0273] GTTGTTTTGTTTTGGTTTTGGATAT (SEQ ID NO: 1 ; F2, ATGGGTTGAAATATTGGGTTTATTTA (SEQ ID NO: 2) ; R,CCACCCTCTAACCTTAACCTCTAAC (SEQ ID NO: 3)) ；和 nanog（F1, GAGGATGTTTTTTAAGTTTTTTTT (SEQ ID NO:4); F2, AATGTTTATGGTGGATTTTGTAGGT (SEQ ID NO: 5); R, CCCACACTCATATCAATATAATAAC (SEQ ID NO:6)) 。

[0274] 使用TaKaRa Ex Taq Hot Start Version(RR030A)进行PCR。使用M13引物并借助GRAS(基因组资源和分析单元)进行DNA测序。

[0275] 免疫组化。将所培养的细胞使用4％多聚甲醛进行固定，并在用1％BSA溶液(Life Technology,Tokyo,日本)封闭前，用0.1％Triton X-100/PBS透化。二抗为偶联至Alexa-488或Alexa-594的山羊抗小鼠抗体或山羊抗兔抗体(Invitrogen)。用DAPI(Sigma)将细胞核可视化。将SlowFade Gold抗淬灭试剂(Invitrogen)加在载玻片上。

[0276] 荧光活化的细胞分选和流式细胞术。根据标准方案制备细胞，并在FACS之前将细胞悬浮于冰上的0.1％BSA/PBS中。用PI(BD Biosciences)排除死细胞。将细胞在BD FACSAria SORP上进行分选，并在具有BD FACSDiva软件的BD LSRII(BD Biosciences)上进行分析。

[0277] RNA制备和RT-PCR分析。用RNeasy Micro试剂盒(QIAGEN)对RNA进行分离。用SupeSACript III First Strand Synthesis试剂盒(Invitrogen)进行逆转录。将SYBR Green Mix I(Roche Diagnostics)用于扩增，并将样品在Lightcycler-II仪器(Roche Diagnostics)上运行。

[0278] 动物研究。为研究致瘤性，将悬浮于100mL PBS中的细胞经皮下注射入年龄匹配的免疫缺陷SCID小鼠的侧部。在6周后处死小鼠并进行尸体解剖。

[0279] ATP和ROS测定法。按照供应商的方案，通过ATP Bioluminescene Assay Kit HS II(Roche)对胞间ATP水平进行测量。通过使用Gelomax 96 Microplate Luminometer (Promega,Madison,WI)对发光强度进行测量，并通过细胞计数将发光读数归一化。为测量ROS水平，将细胞在含有2μM二氢乙锭(Molecular Probes)的培养基中于37℃下避光孵育15

分钟。随后，将细胞用PBS进行漂洗，并悬浮于含0.5%BSA的PBS中。借助于BD Biosciences LSR II(BD Bioscience,Spark,MD)记录30000个细胞的荧光强度。

[0280] 嵌合体小鼠的生成和分析。二倍体嵌合体和四倍体嵌合体的生产。由ICR品系雌性与ICR雄性交配获得二倍体胚胎，由BDF1品系雌性与BDF1雄性交配获得四倍体胚胎。通过2-细胞胚胎的电融合产生四倍体胚胎[17]。在该研究中，由于胰蛋白酶处理诱发低的嵌合性，在显微镜下使用显微刀将ACCs球形集落切成小块，随后通过大的吸管将ACCs小团簇注射入4.5天的囊胚中。次日，将嵌合囊胚转移入2.5天的假孕的雌性中。

[0281] 参考文献

[0282] 1.Brockes,J.P.&Kumar,A.Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration.Nature reviews.Molecular cell biology 3,566-574,doi:10.1038/nrm881(2002).

[0283] 2.Sinnott,J.J.&Burklund,C.W.The treatment of carotid insufficiency.The Nebraska state medical journal 45,357-359(1960).

[0284] 3.Hanna,J.et al.Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency.Cell 133,250-264,doi:10.1016/j.cell.2008.03.028(2008).

[0285] 4.Hockemeyer,D.et al.A drug-inducible system for direct reprogramming of human somatic cells to pluripotency.Cell stem cell 3,346-353,doi:10.1016/j.stem.2008.08.014(2008).

[0286] 5.Kim,D.et al.Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins.Cell stem cell 4,472-476,doi:10.1016/j.stem.2009.05.005(2009).

[0287] 6.Kim,J.B.et al.Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4.Nature 461,649-643,doi:10.1038/nature08436(2009).

[0288] 7.Okabe,M.et al.Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency.Blood 114,1764-1767,doi:10.1182/blood-2009-02-203695(2009).

[0289] 8.Ohbo,K.et al.Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice small star,filled.Developmental biology 258,209-225(2003).

[0290] 9.Ying,Q.L.et al.The ground state of embryonic stem cell self-renewal.Nature 453,519-523,doi:10.1038/nature06968(2008).

[0291] 10.Ogawa,K.,Matsui,H.,Ohtsuka,S.&Niwa,H.A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells.Genes to cells:devoted to molecular&cellular mechanisms 9,471-477,doi:10.1111/j.1356-9597.2004.00736.x(2004).

[0292] 11.Gough,N.M.et al.LIF:a molecule with divergent actions on myeloid leukaemic cells and embryonic stem cells.Reproduction,fertility,and development 1,281-288(1989).

[0293] 12.Hitoshi,S.et al.Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling.Genes&development 18,1806-1811,doi:10.1101/gad.1208404(2004).

[0294] 13.Tesar,P.J.et al.New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells.Nature 448,196-199,doi:10.1038/nature05972(2007).

[0295] 14.Saretzki,G.,Armstrong,L.,Leake,A.,Lako,M.&von Zglinicki,T.Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells.Stem Cells 22,962-971,doi:10.1634/stemcells.22-6-962(2004).

[0296] 15.Mitalipova,M.M.et al.Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells.Nature biotechnology 23,19-20,doi:10.1038/nbt0105-19(2005).

[0297] 16.Nagy,A.,Rossant,J.,Nagy,R.,Abramow-Newerly,W.&Roder,J.C.Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90,8424-8428(1993).

[0298] 17.Nagy,A.et al.Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse.Development 110,815-821(1990).

[0299] 表1:从ACCs生成嵌合体小鼠

[0300]

小鼠品系	用于注射的细胞制品	SACs的培养时长	注射的受精胚胎的数量	后代的数量	获得的嵌合体小鼠的数量	
					总数	高分布**
BDF1	单个细胞	7天	40	32	1	0
BDF1	团簇	7天	58	48*	16	4
129B6F1	团簇	7天	98	64	20	6
GOF	团簇	7天	73	35	24	2
GOF	团簇	10天	35	20	4	0

[0301] *全部胎儿均在13.5dpc至15.5dpc收集,并通过FACS检查ACCs在各器官中的分布率。

[0302] **SACs在各嵌合体中的分布打分为高(>50%具有GFP表达的毛色)。

[0303] 表2:引物序列。中间列从上至下含有SEQ.ID.NOs.7-39,右列从上至下含有序列SEQ.ID.NOs.40-72。

[0304]

基因	5′引物	3′引物
Txni	gtcatccttgatctgcccct	gagacgacctgctacacctg
Bmi1	ggtacttacgatgcccagca	tccctacctgactgcttacg

Prdx2	ccctgaatatccctctgct	tatgtctgctcgtaccccctt
Hspb1	agatggctacatctctcggt	tcagacctcggttcatcttc
Hif3a	cactctggacttggagatgc	cttggaccttcgaaggacga
Hspa1b	cttgtcgttggtgatggtga	tcaaagcgcagaccacctcg
Hspa9a	gttgaagcagttaatatggc	gcatgtcgtccgcagtaact
Ercc4	agatgagaccaacctggacc	tcgacttcgtcttgttcggt
Hpas1a	aggtggagatcatcgccaac	tctacctgttccgcgtctag
Gapdh	cgttgaatttgccgtgagtg	tggtgaaggtcggtgtgaac
Gpx2	attgccaagtcgttctacga	gtaggacagaaacggatgga
Sod2	aggtcgcttacagattgctg	gtgtcgatcgttcttcact
Tgr	gtctctttagaaaagtgtga	attgcagctgcaaatccctg
Gsta	tacagctttcttcctggcca	tacgattcacggaccgtgcc
Pdha2	atgtcagccttgtggaaatt	aacgataactgatccctggg
Gpx3	gtctgacagaccaataccat	cagttctacctgtaggacag
Gpx4	aacggctgcgtggtgaagcg	cctccttccaggtctccgga
Polg	ggacctcccttagagaggga	agcatgccagccagagtcact
Pol2	acagtgccttcaggttagtc	actccaatctgagcaagacc
Tfam	gcatacaaagaagctgtgag	gttatatgctgaacgaggtc
Oct4	tctttccaccaggcccccggct	tgcgggcggacatggggagatcc
Ecat1	tgtggggccctgaaaggcgagctgagat	atgggccgccatacgacgacgctcaact
Esg1	gaagtctggttccttggcaggatg	actcgatacactggcctagc
Nanog	caggtgtttgagggtagctc	cggttcatcatggtacagtc
ERas	actgcccctcatcagactgctact	cactgccttgtactcgggtagctg
Gdf3	gttccaacctgtgcctcgcgtctt	agcgaggcatggagagagcggagcag
Fgf4	cgtggtgagcatcttcggagtgg	ccttcttggtccgcccgttctta
Rex1	acgagtggcagtttcttcttggga	tatgactcacttccagggggcact
Cripto	atggacgcaactgtgaacatgatgttcgca	ctttgaggtcctggtccatcacgtgaccat
Dax1	tgctgcggtccaggccatcaagag	gggcactgttcagttcagcggatc
Sox2	tagagctagactccgggcgatga	ttgccttaaacaagaccacgaaa
Klf4	gcgaactcacacaggcgagaaacc	tcgcttcctcttcctccgacaca
Fgf5	gctgtgtctcaggggattgt	cactctcggcctgtcttttc

[0305] 表3:在应激处理1周后,示出多能表型的细胞的百分数。在第一列中示出处理,在第二行中示出体细胞来源的组织。数字为百分比。

[0306]

	1周龄					
	骨髓	脑	肺	肌肉	脂肪	成纤维细胞
对照	0	0	0	0	0	0
缺氧	2	3	3.2	2.8	1.6	1.2
磨制	19.5	20.5	19.8	20.6	18.4	9.5
SLO	13.2	10.3	18.4	20.5	32.8	15.2
营养不良	2	3.4	1.8	4.5	2.4	1.5
ATP	12.3	15.4	9.8	68.4	79.6	25.10
Ca	1.2	0.8	1.3	1.5	2.7	3.5

[0307] 实施例2

[0308] 不希望受理论的束缚，本文所述方法被认为活化了与凋亡或受控的细胞死亡相关的过程。细胞的轻微损伤可诱导修复基因的活化。细胞的严重损伤可活化之前不明确的存活机制。在考虑之列的是，当细胞暴露至显著的应激(例如本文所述的应激)时，细胞组分(例如，线粒体、囊泡、核、核糖体、内质网、外泌体、核内体、细胞膜、线粒体、溶酶体、ATP、蛋白、酶、糖、脂质等)从受损害的细胞释放入“cellieu”中。本文所述的数据表明，该“cellieu”能够重构和/或促进细胞存活。进一步在考虑之列的是，不希望受理论的束缚，线粒体(以及其它细胞器)能够指导细胞重构。由于小的尺寸、简单性、指导细胞分化的能力以及类似原核的性质，线粒体可在证明对亲代细胞而言致死性的应激下存活。线粒体可从细胞中释放而游离、包裹于膜中和/或结合至其它细胞组分。

[0309] 或者，不希望受理论的束缚，核可保持完整、包裹于细胞膜中，所述细胞膜可包含一些线粒体。随后，这些具有极少的细胞质和极少的细胞器的受损害细胞可与挤出的细胞器相互并可能发生融合，该受损害细胞丧失了对核的表观遗传控制。这为细胞提供了生长和复制所必须的亚细胞组分，然而细胞丧失了表观遗传控制，因此诱导了更原始(例如，更加多能)的状态。

序列表
<110> 细胞疗法有限责任公司
<120> 从头生成多能细胞
<130> GCI20HK5259-1
<140>
<141>
<150> PCT/US2013/037996
<151> 2013-04-24
<150> 61/779,533
<151> 2013-03-13
<150> 61/637,631
<151> 2012-04-24
<160> 90
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 1
gttgttttgt tttggttttg gatat 25
<210> 2
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 2
atgggttgaa atattgggtt tattta 26
<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 3
ccaccctcta accttaacct ctaac 25

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 4
gaggatgttt tttaagtttt tttt 24
<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 5
aatgtttatg gtggattttg taggt 25
<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 6
cccacactca tatcaatata ataac 25
<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 7
gtcatccttg atctgcccct 20
<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 8

ggtacttacg atgcccagca 20
<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 9
ccctgaatat ccctctgct 19
<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 10
agatggctac atctctcggt 20
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 11
cactctggac ttggagatgc 20
<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 12
cttgtcgttg gtgatggtga 20
<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物

<400> 13
gttgaagcag ttaatatggc 20
<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 14
agatgagacc aacctggacc 20
<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 15
aggtggagat catcgccaac 20
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 16
cgttgaattt gccgtgagtg 20
<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 17
attgccaagt cgttctacga 20
<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 18
aggtcgctta cagattgctg 20
<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 19
gtctctttag aaaagtgtga 20
<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 20
tacagctttc ttcctggcca 20
<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 21
atgtcagcct tgtggaaatt 20
<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 22
gtctgacaga ccaataccat 20
<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 23
aacggctgcg tggtgaagcg 20
<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 24
ggacctccct tagagaggga 20
<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 25
acagtgcctt caggttagtc 20
<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 26
gcatacaaag aagctgtgag 20
<210> 27
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 27
tctttccacc aggcccccgg ct 22
<210> 28
<211> 28
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 28
tgtggggccc tgaaaggcga gctgagat 28
<210> 29
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 29
gaagtctggt tccttggcag gatg 24
<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 30
caggtgtttg agggtagctc 20
<210> 31
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 31
actgcccctc atcagactgc tact 24
<210> 32
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 32
gttccaacct gtgcctcgcg tctt 24
<210> 33
<211> 23

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 33
cgtggtgagc atcttcggag tgg 23
<210> 34
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 34
acgagtggca gtttcttctt ggga 24
<210> 35
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 35
atggacgcaa ctgtgaacat gatgttcgca 30
<210> 36
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 36
tgctgcggtc caggccatca agag 24
<210> 37
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 37
tagagctaga ctccgggcga tga 23
<210> 38

<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 38
gcgaactcac acaggcgaga aacc 24
<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 39
gctgtgtctc aggggattgt 20
<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 40
gagacgacct gctacacctg 20
<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 41
tccctacctg actgcttacg 20
<210> 42
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 42
tatgtctgct cgtacccctt 20

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 43
tcagacctcg gttcatcttc 20
<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 44
cttggacctt cgaaggacga 20
<210> 45
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 45
tcaaagcgca gaccacctcg 20
<210> 46
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 46
gcatgtcgtc cgcagtaact 20
<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 47

tcgacttcgt cttgttcggt 20
<210> 48
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 48
tctacctgtt ccgcgtctag 20
<210> 49
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 49
tggtgaaggt cggtgtgaac 20
<210> 50
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 50
gtaggacaga aacggatgga 20
<210> 51
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 51
gtgtcgatcg ttcttcact 19
<210> 52
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物

<400> 52
attgcagctg caaatccctg 20
<210> 53
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 53
tacgattcac ggaccgtgcc 20
<210> 54
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 54
aacgataact gatccctggg 20
<210> 55
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 55
cagttctacc tgtaggacag 20
<210> 56
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 56
cctccttcca ggtctccgga 20
<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 57
agcatgccag ccagagtcac t 21
<210> 58
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 58
actccaatct gagcaagacc 20
<210> 59
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 59
gttatatgct gaacgaggtc 20
<210> 60
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 60
tgcgggcgga catggggaga tcc 23
<210> 61
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 61
atgggccgcc atacgacgac gctcaact 28
<210> 62
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 62
actcgataca ctggcctagc 20
<210> 63
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 63
cggttcatca tggtacagtc 20
<210> 64
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 64
cactgccttg tactcgggta gctg 24
<210> 65
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 65
agcgaggcat ggagagagcg gagcag 26
<210> 66
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 66
ccttcttggt ccgcccgttc tta 23
<210> 67
<211> 24
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成引物

<400> 67

tatgactcac ttccaggggg cact 24

<210> 68

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成引物

<400> 68

ctttgaggtc ctggtccatc acgtgaccat 30

<210> 69

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成引物

<400> 69

gggcactgtt cagttcagcg gatc 24

<210> 70

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成引物

<400> 70

ttgccttaaa caagaccacg aaa 23

<210> 71

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成引物

<400> 71

tcgcttcctc ttcctccgac aca 23

<210> 72

<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 72
cactctcggc ctgtcttttc 20
<210> 73
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 73
gttgttttgt tttggttttg gatat 25
<210> 74
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 74
atgggttgaa atattgggtt tattta 26
<210> 75
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 75
ccaccctcta accttaacct ctaac 25
<210> 76
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 76
gaggatgttt tttaagtttt tttt 24
<210> 77

<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 77
aatgtttatg gtggattttg taggt 25
<210> 78
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 78
cccacactca tatcaatata ataac 25
<210> 79
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 79
gttgttttgt tttggttttg gatat 25
<210> 80
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 80
atgggttgaa atattgggtt tattta 26
<210> 81
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 81
ccaccctcta accttaacct ctaac 25

<210> 82
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 82
gaggatgttt tttaagtttt tttt 24
<210> 83
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 83
aatgtttatg gtggattttg taggt 25
<210> 84
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 84
cccacactca tatcaatata ataac 25
<210> 85
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 85
gcacctgtgg ggaagaaact 20
<210> 86
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 86

tgagagctgt ctcctactat cgatt 25
<210> 87
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 87
agaactggga ccactccagt g 21
<210> 88
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 88
ttcaccctct ccactgacag atct 24
<210> 89
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 89
ctaggccaca gaattgaaag atct 24
<210> 90
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成引物
<400> 90
gtaggtggaa attctagcat catcc 25

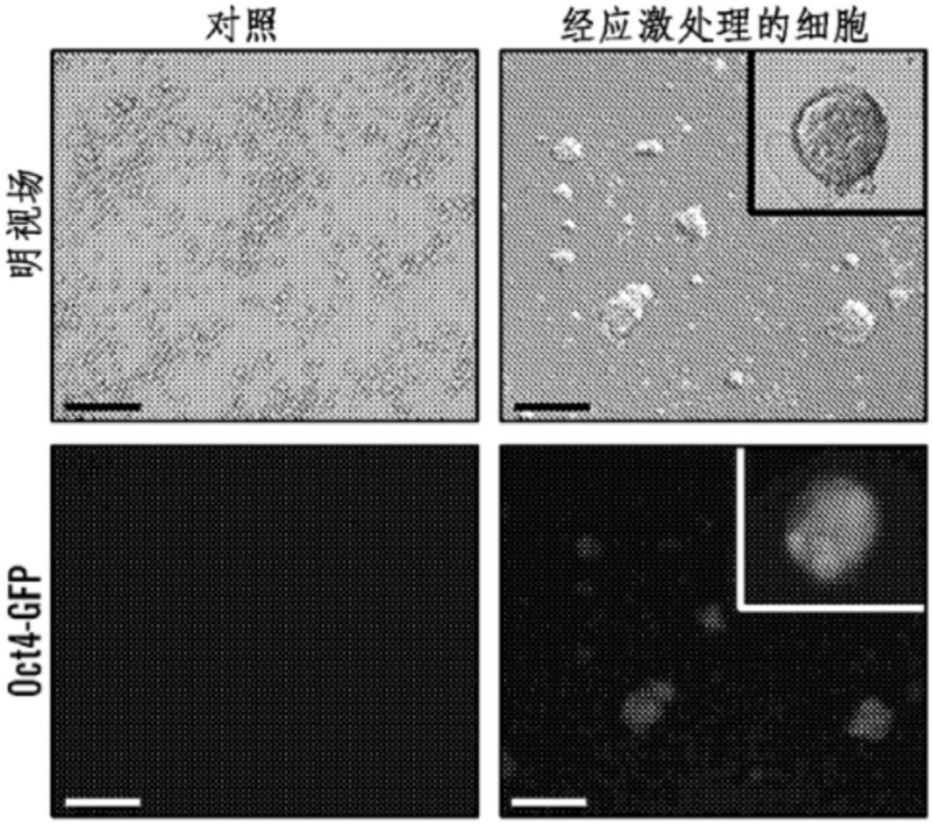

对照
经应激处理的细胞
明视场
Oct4-GFP

图1A

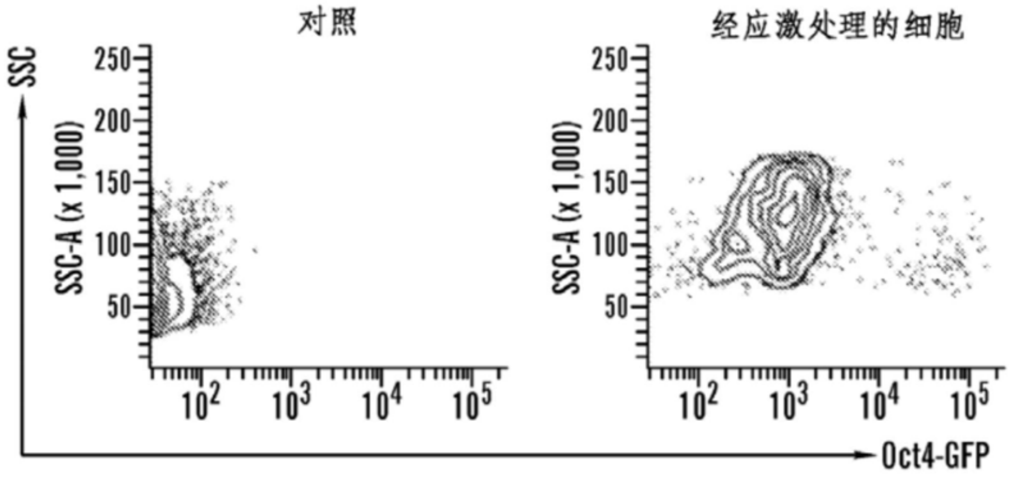

对照
经应激处理的细胞
SSC
SSC-A (x 1,000)
250
200
150
100
50
10^2
10^3
10^4
10^5
Oct4-GFP

图1B

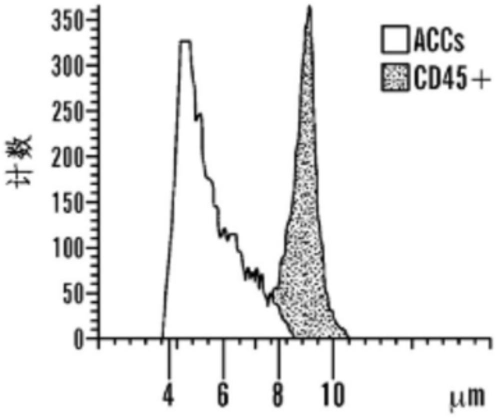


图1C

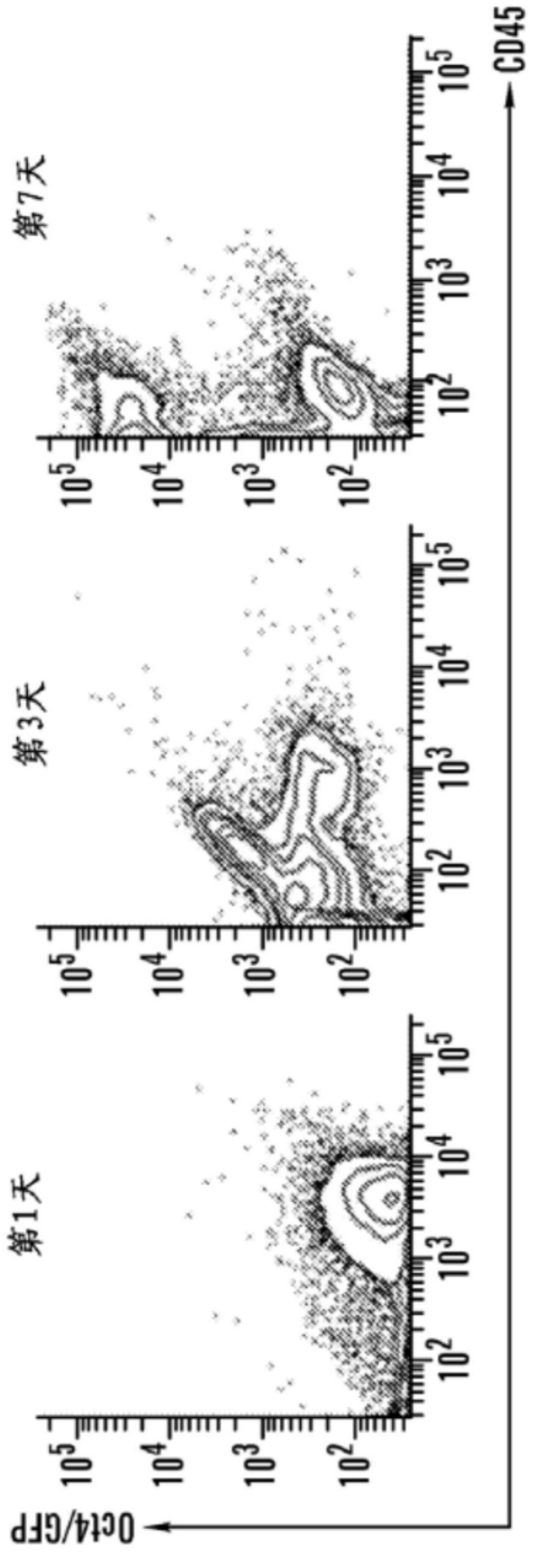


图1D

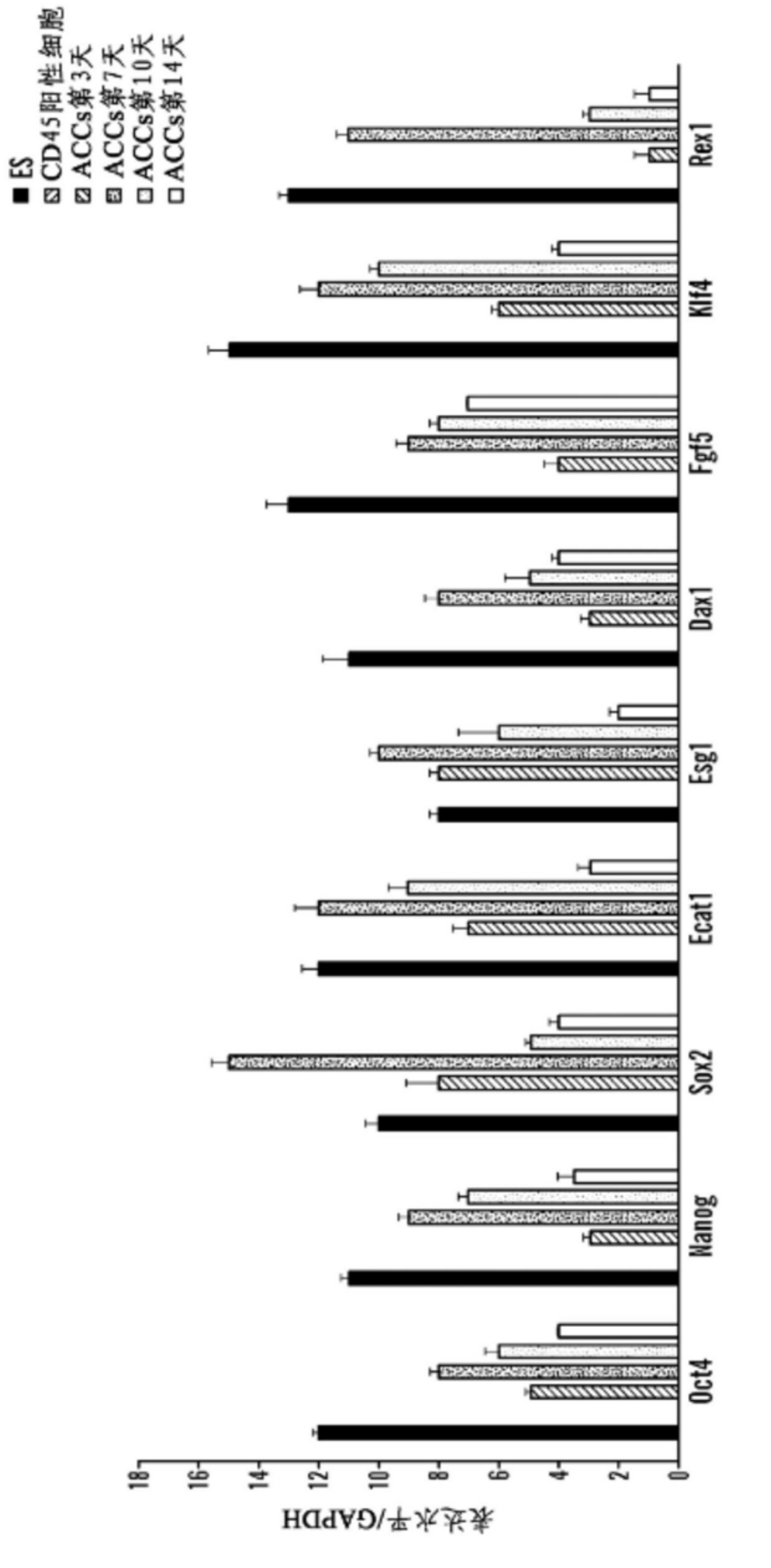

ES
CD45阳性细胞
ACCs第3天
ACCs第7天
ACCs第10天
ACCs第14天
表达水平/GAPDH
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
Oct4
Nanog
Sox2
Ecat1
Esg1
Dax1
Fgf5
Klf4
Rex1

图2A

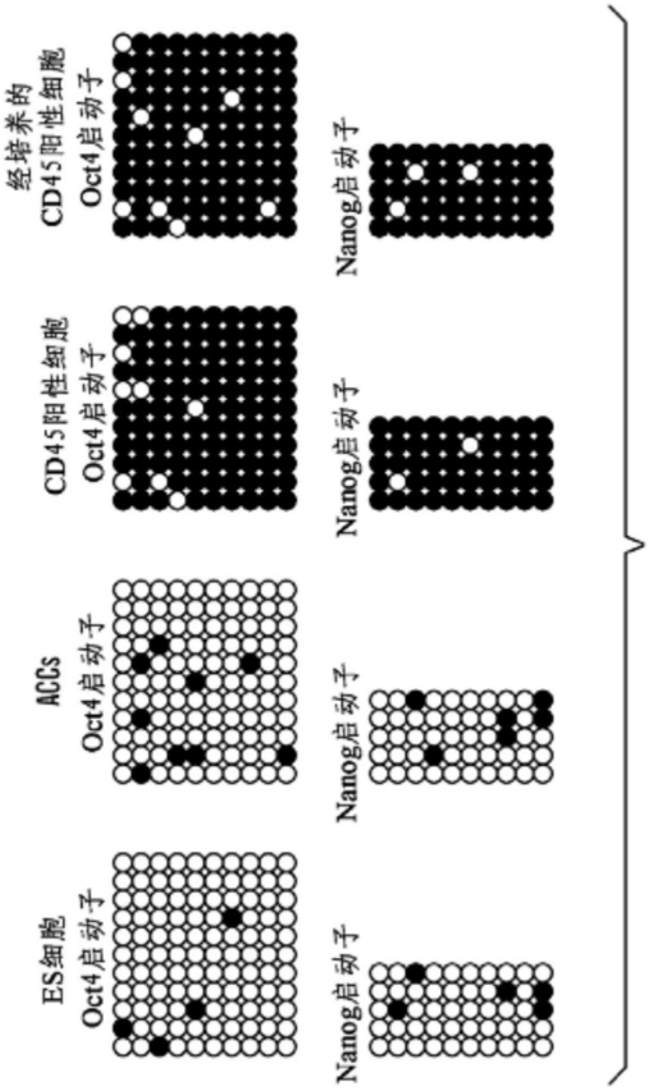

ES细胞
Oct4启动子
Nanog启动子
ACCs
Oct4启动子
Nanog启动子
CD45阳性细胞
Oct4启动子
Nanog启动子
经培养的
CD45阳性细胞
Oct4启动子
Nanog启动子

图 2B

图2B

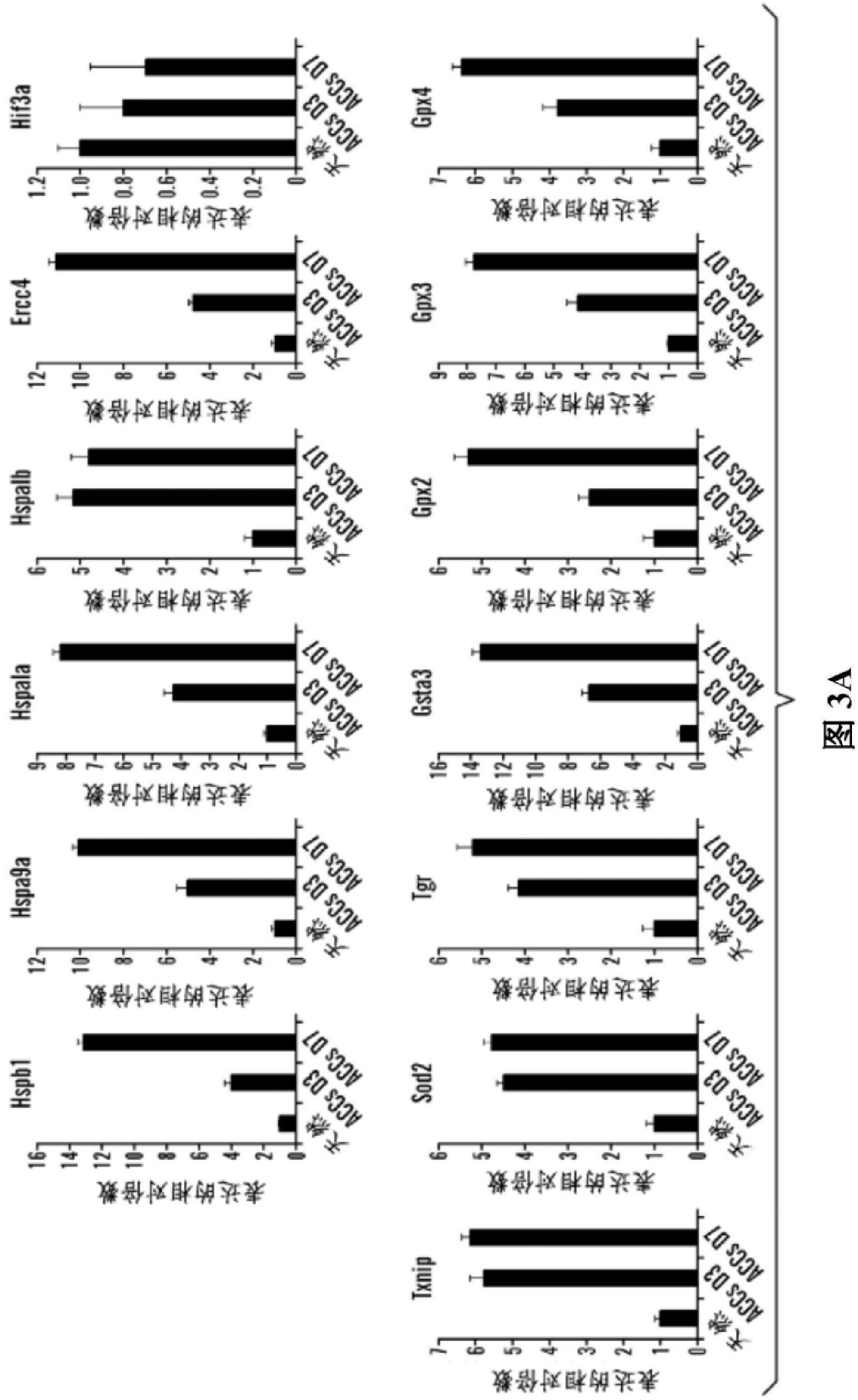

Hspb1
Hspa9a
Hspala
Hspalb
Ercc4
Hif3a
Txnip
Sod2
Tgr
Gsta3
Gpx2
Gpx3
Gpx4
表达的相对倍数
ACCs D3
ACCs D7
图 3A

图3A

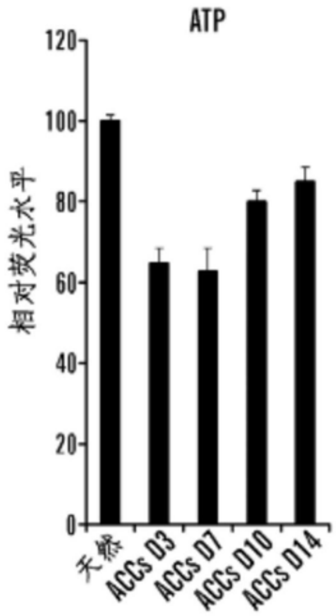

ATP
120
100
80
60
40
20
0
相对荧光水平
天然
ACCs D3
ACCs D7
ACCs D10
ACCs D14

图3B

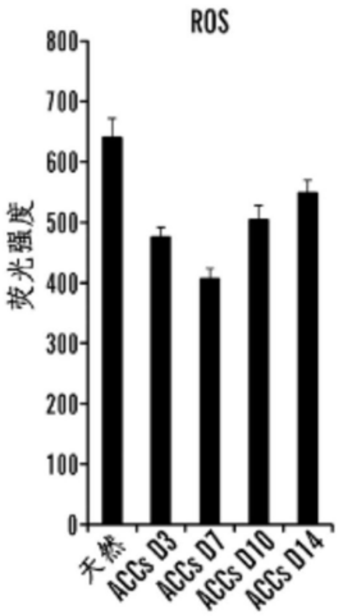

ROS
800
700
600
500
400
300
200
100
0
荧光强度
天然
ACCs D3
ACCs D7
ACCs D10
ACCs D14

图3C

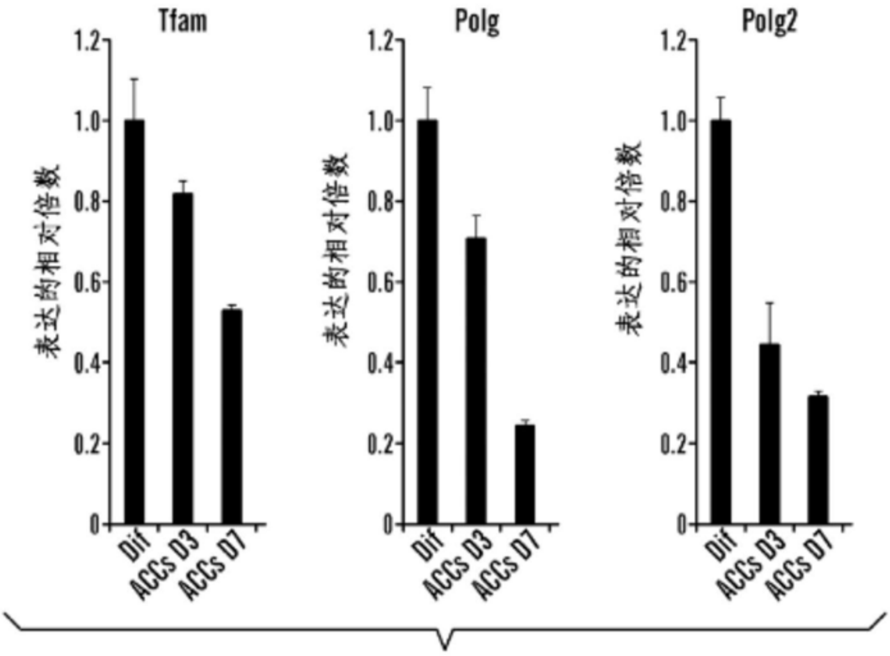


图 3D

图3D

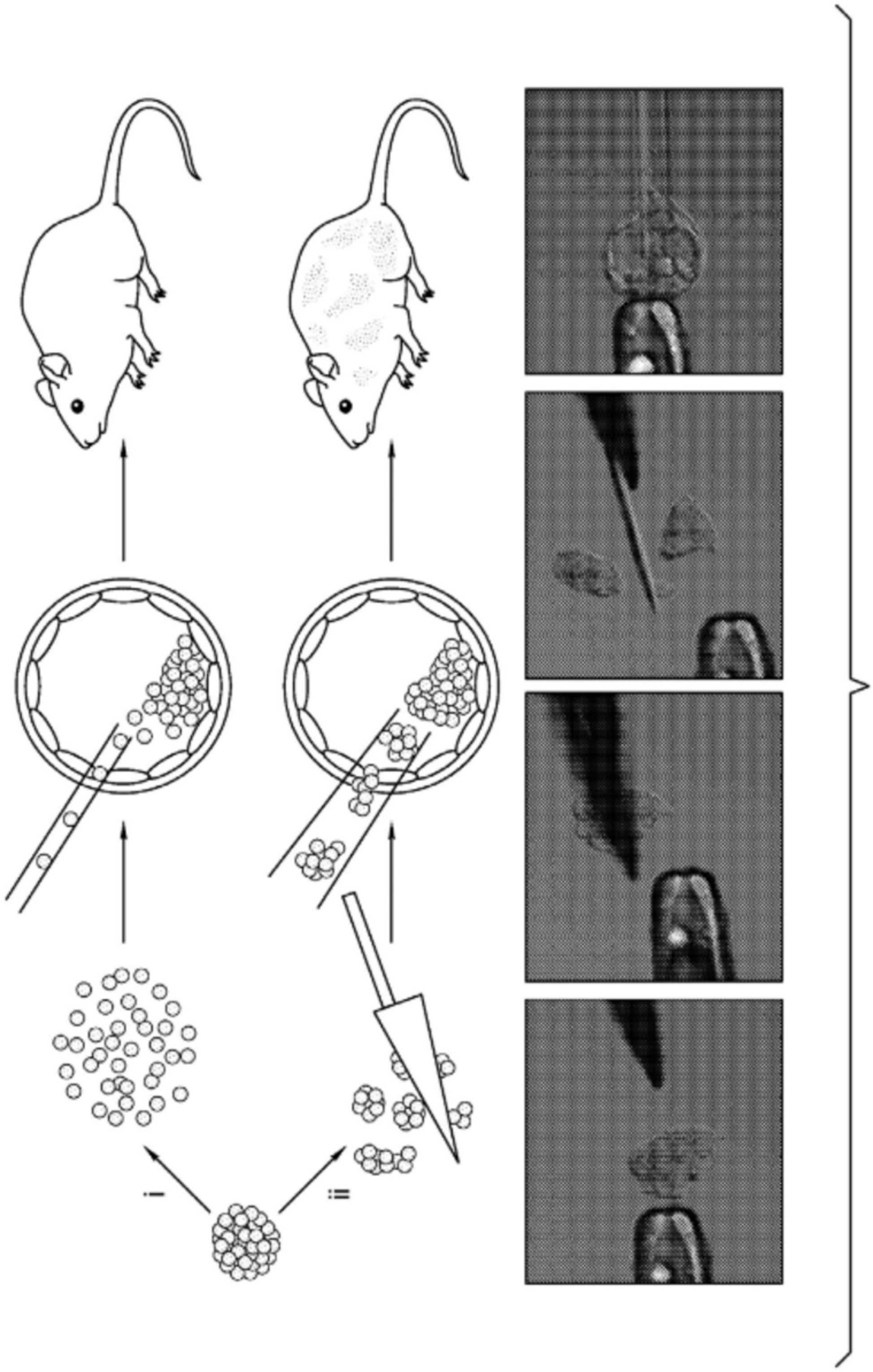


图 4A

图4A

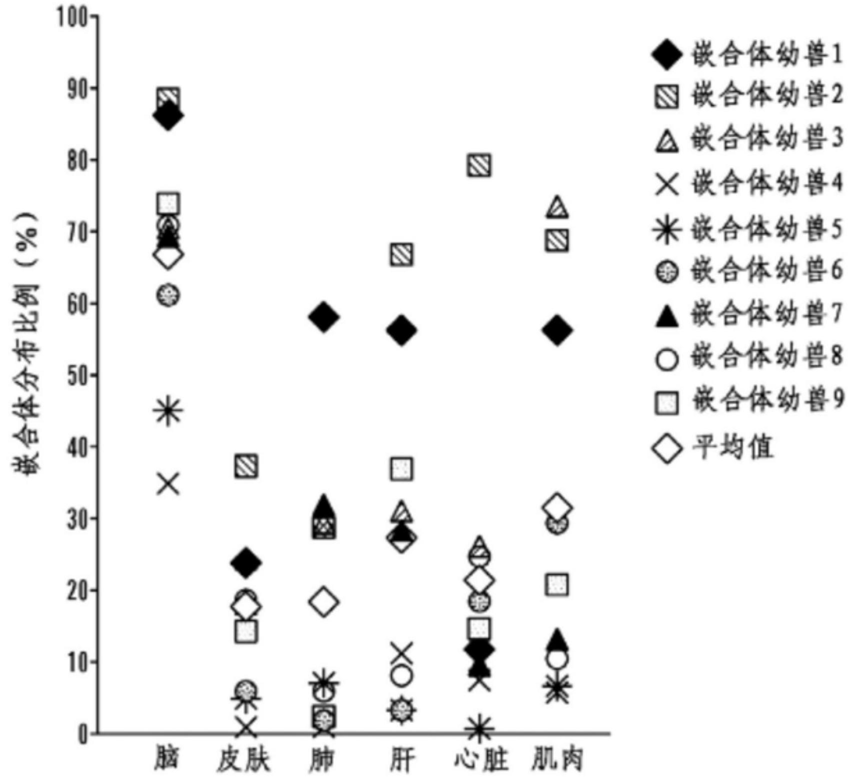

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
嵌合体分布比例（%）
脑
皮肤
肺
肝
心脏
肌肉
嵌合体幼兽1
嵌合体幼兽2
嵌合体幼兽3
嵌合体幼兽4
嵌合体幼兽5
嵌合体幼兽6
嵌合体幼兽7
嵌合体幼兽8
嵌合体幼兽9
平均值

图4B

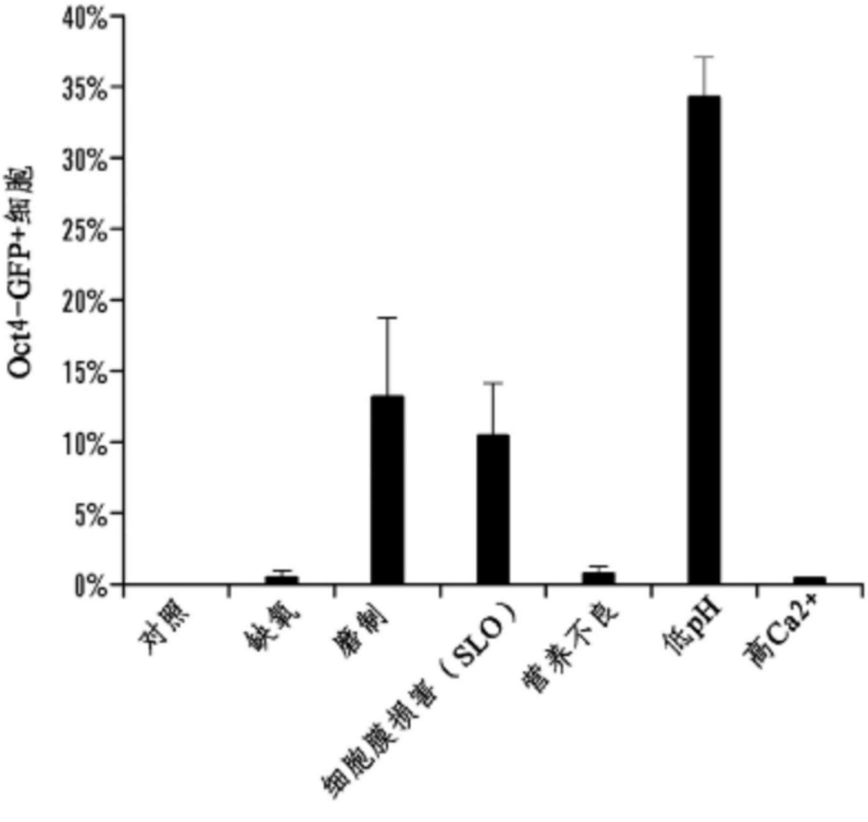

40%
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
Oct4-GFP+细胞
对照
缺氧
磨制
细胞膜损害（SLO）
营养不良
低pH
高Ca2+

图5A

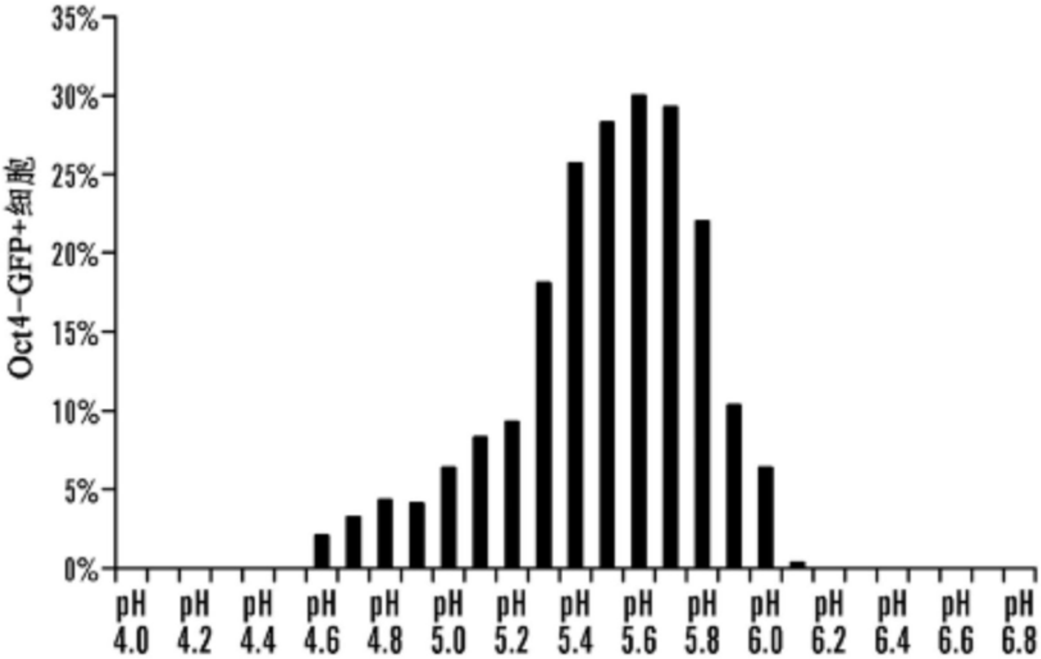

35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
Oct4-GFP+细胞
pH 4.0
pH 4.2
pH 4.4
pH 4.6
pH 4.8
pH 5.0
pH 5.2
pH 5.4
pH 5.6
pH 5.8
pH 6.0
pH 6.2
pH 6.4
pH 6.6
pH 6.8

图5B

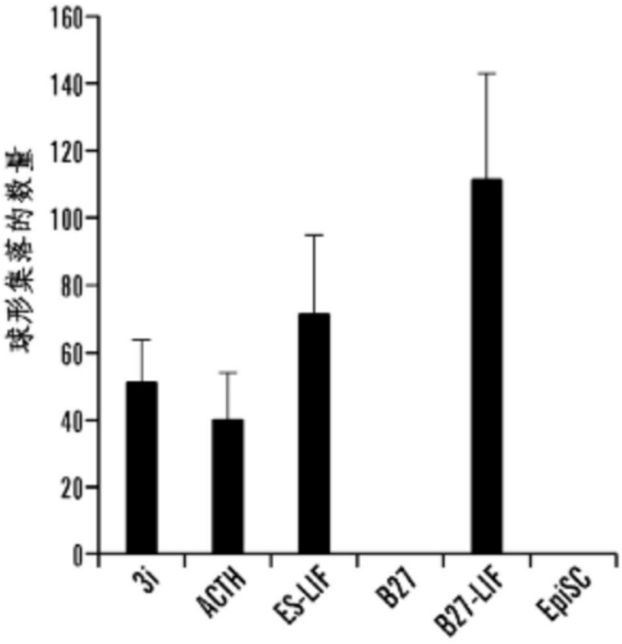

160
140
120
100
80
60
40
20
0
球形集落的数量
3i
ACTH
ES-LIF
B27
B27-LIF
EpiSC

图5C

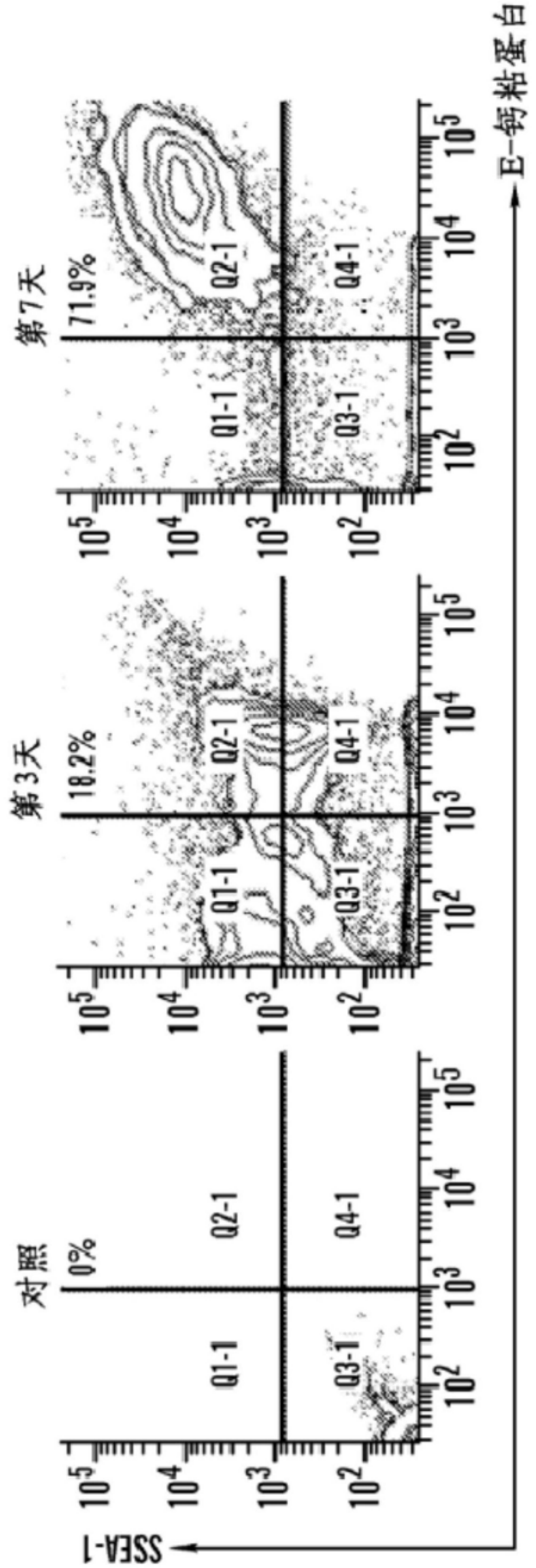


图6A

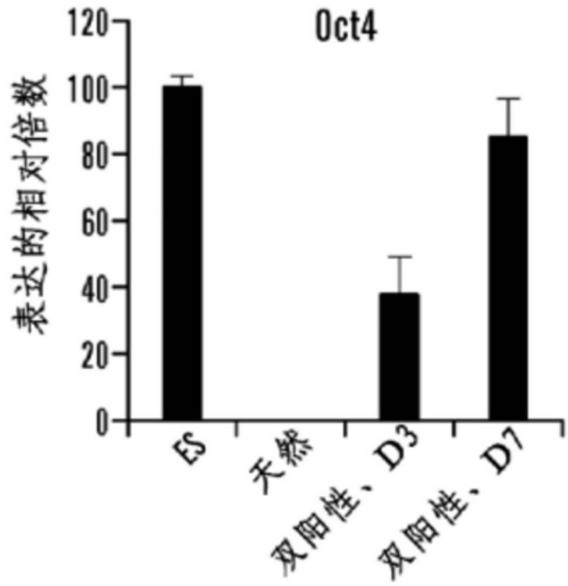

Oct4
表达的相对倍数
0
20
40
60
80
100
120
ES
天然
双阳性、D3
双阳性、D7

图6B

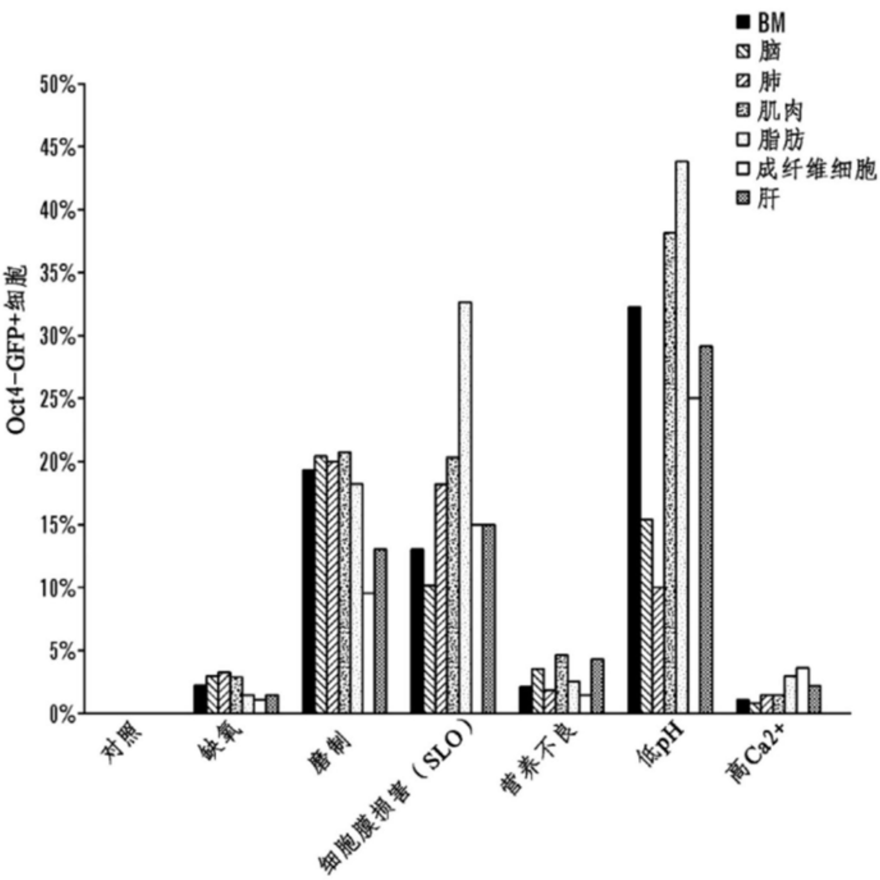

BM
脑
肺
肌肉
脂肪
成纤维细胞
肝
Oct4-GFP+细胞
0%
5%
10%
15%
20%
25%
30%
35%
40%
45%
50%
对照
缺氧
磨制
细胞膜损害（SLO）
营养不良
低pH
高Ca2+

图7A

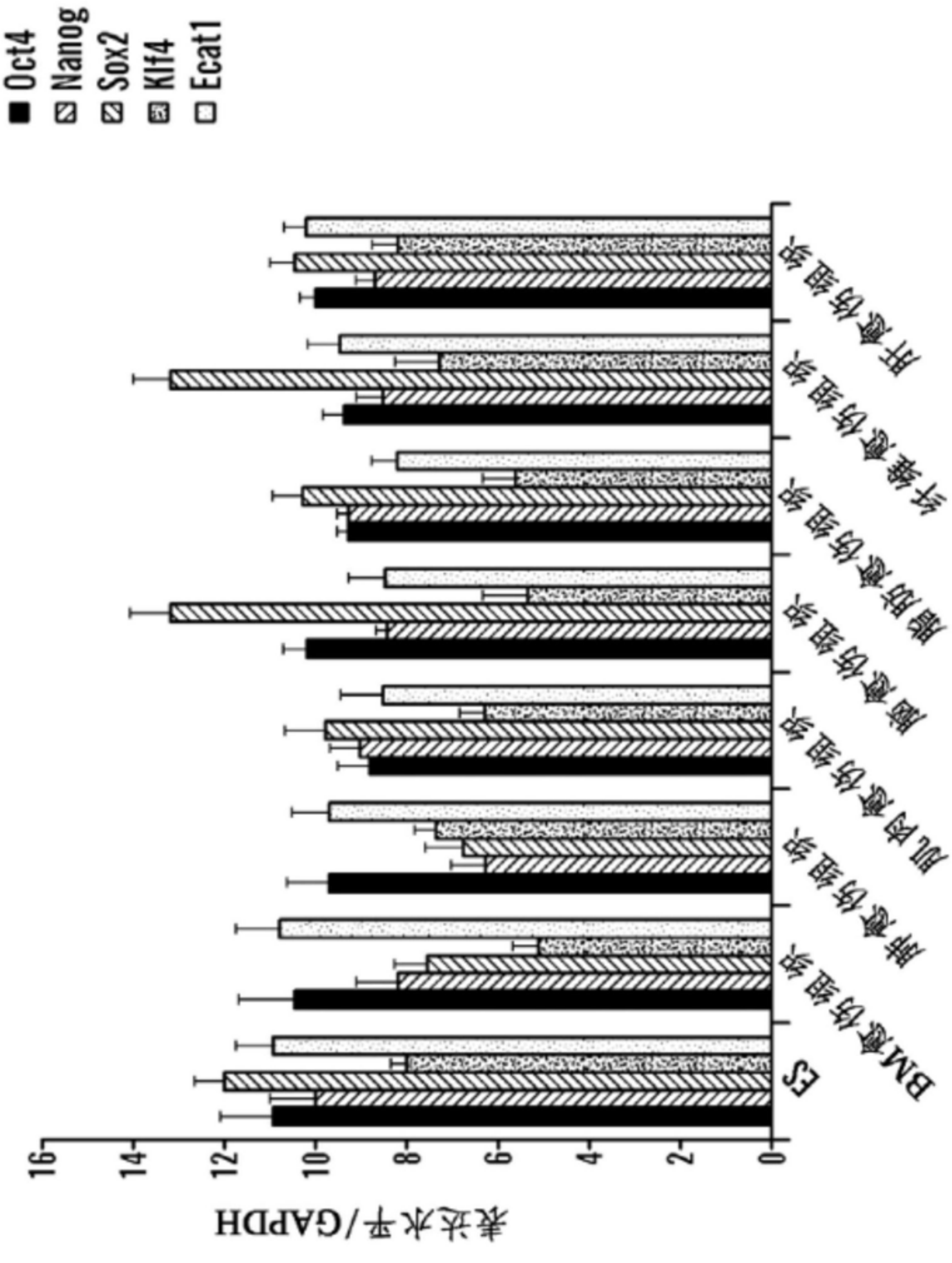


图7B

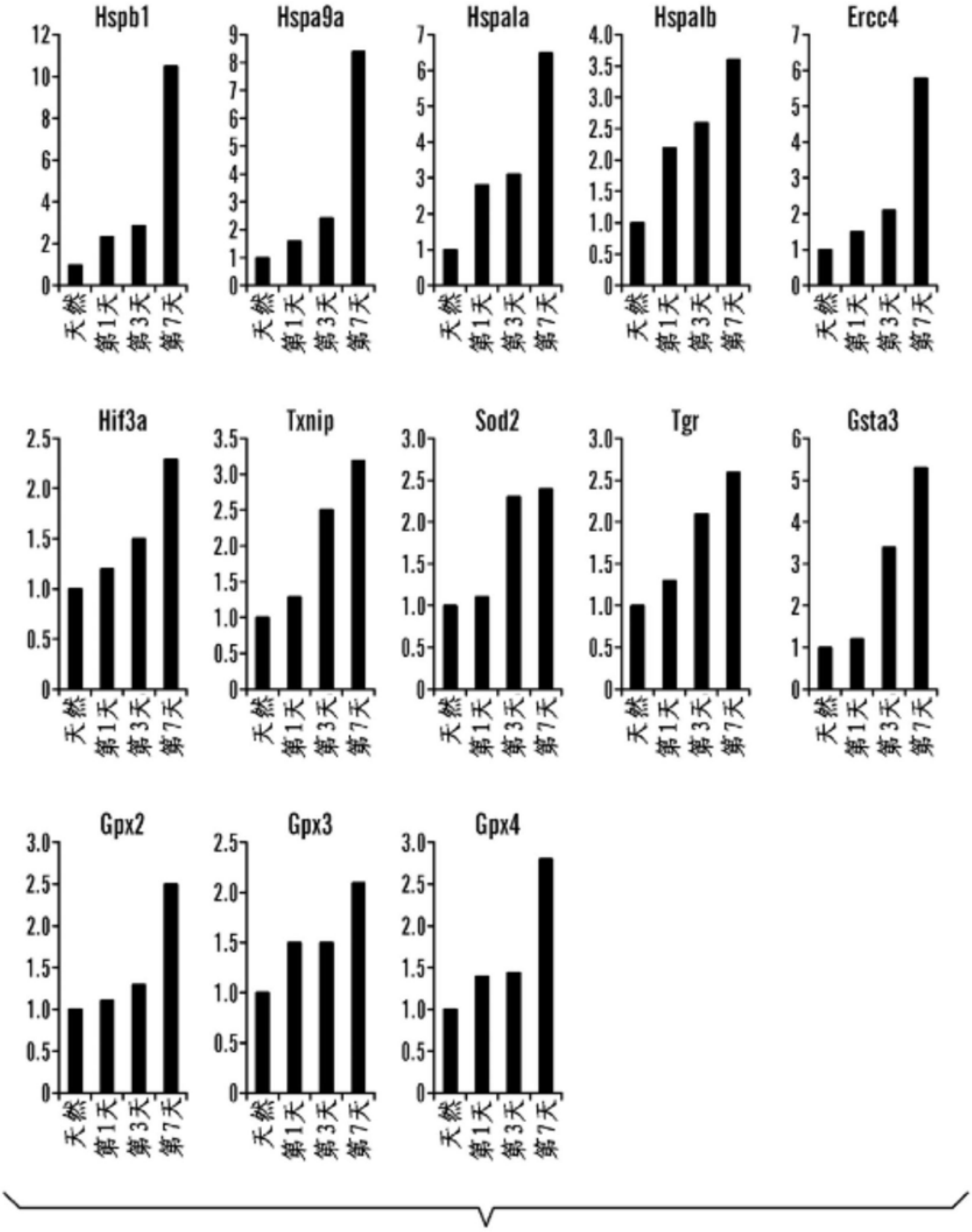

Hspb1
Hspa9a
Hspala
Hspalb
Ercc4
Hif3a
Txnip
Sod2
Tgr
Gsta3
Gpx2
Gpx3
Gpx4
天然
第1天
第3天
第7天

图 8

图8

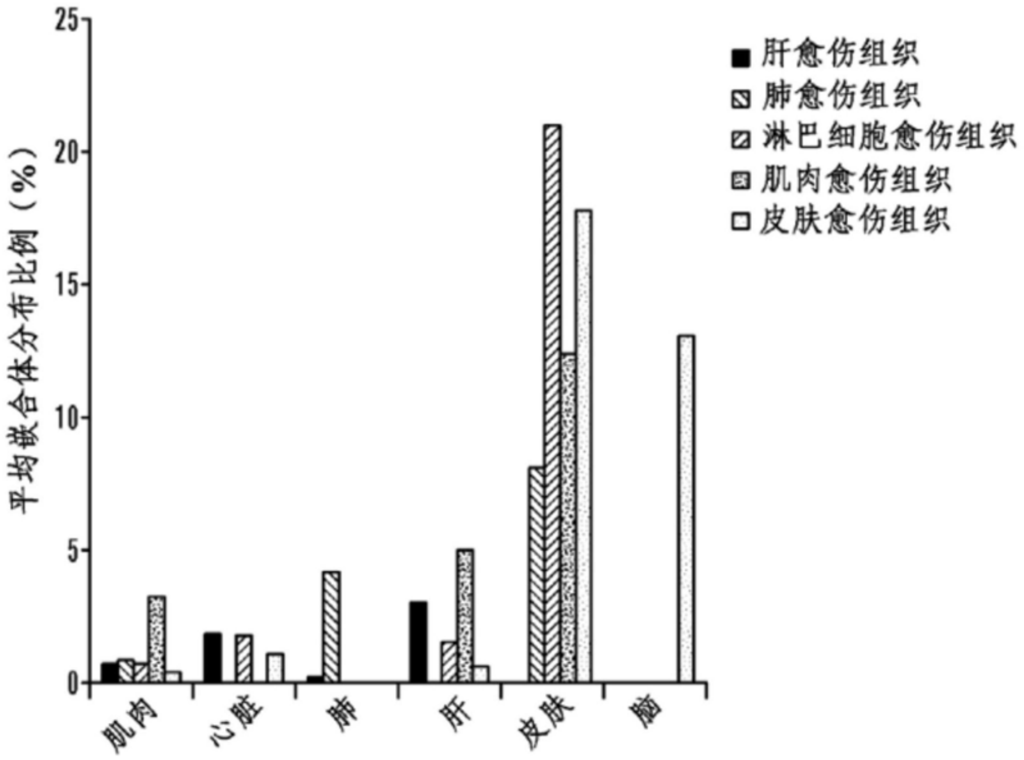

平均嵌合体分布比例（%）
25
20
15
10
5
0
肝愈伤组织
肺愈伤组织
淋巴细胞愈伤组织
肌肉愈伤组织
皮肤愈伤组织
肌肉
心脏
肺
肝
皮肤
脑

图9

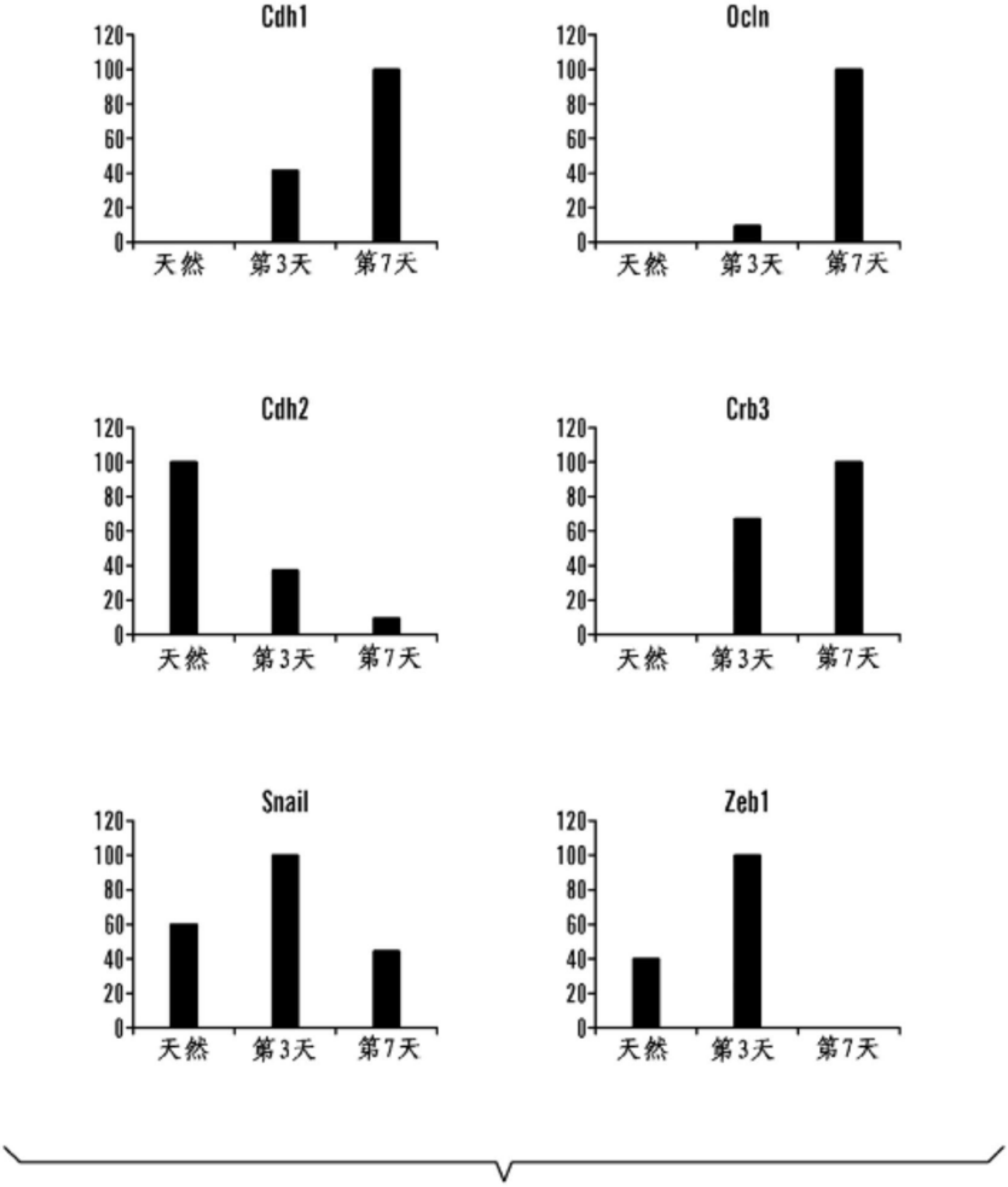

Cdh1
120
100
80
60
40
20
0
天然
第3天
第7天
Ocln
120
100
80
60
40
20
0
天然
第3天
第7天
Cdh2
120
100
80
60
40
20
0
天然
第3天
第7天
Crb3
120
100
80
60
40
20
0
天然
第3天
第7天
Snail
120
100
80
60
40
20
0
天然
第3天
第7天
Zeb1
120
100
80
60
40
20
0
天然
第3天
第7天

图 10

图10

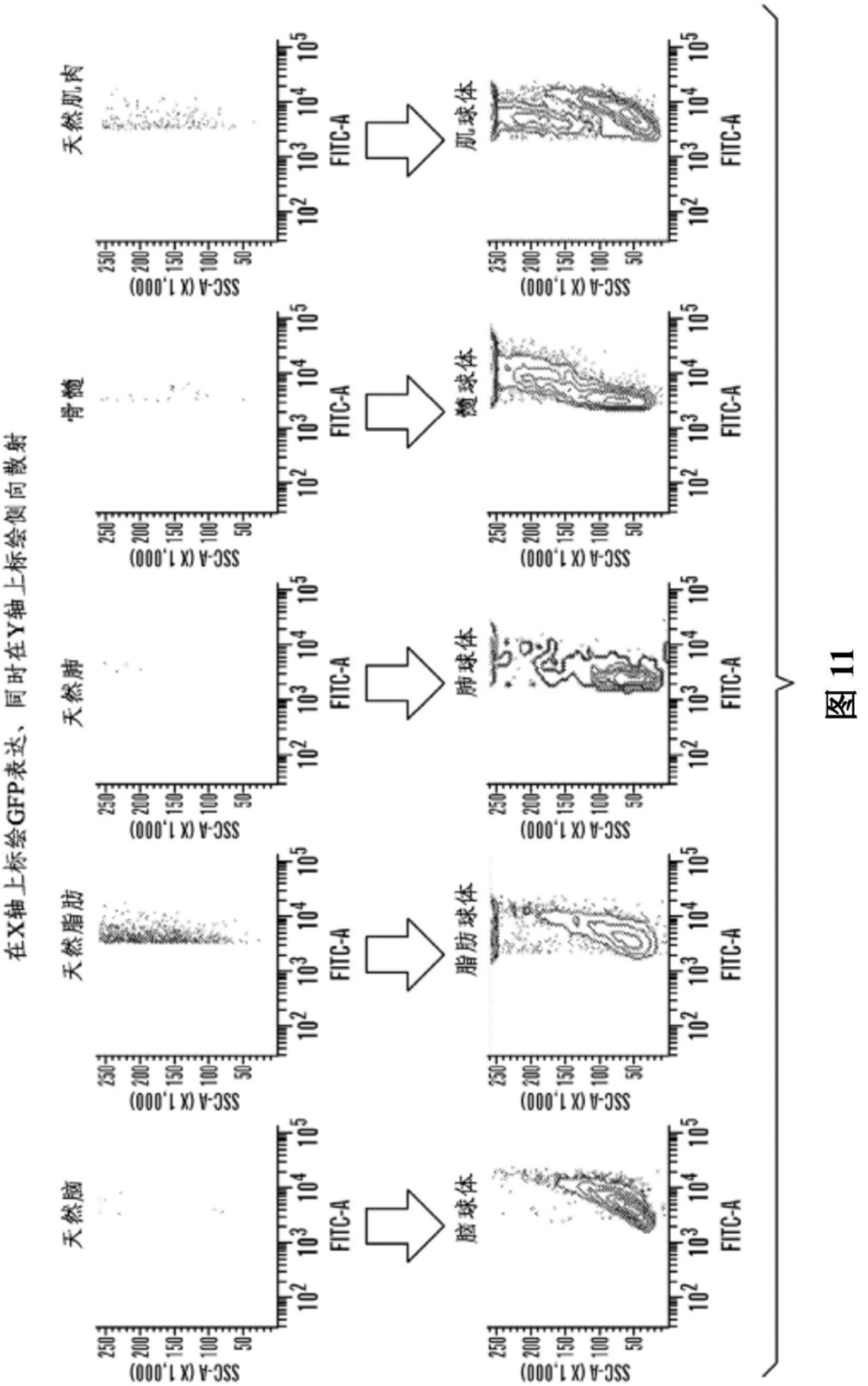

在X轴上标绘GFP表达、同时在Y轴上标绘侧向散射
天然脑
脑球体
天然脂肪
脂肪球体
天然肺
肺球体
骨髓
髓球体
天然肌肉
肌球体
SSC-A (X 1,000)
FITC-A
图 11

图11