



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117737124 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 22

(21) 申请号 202311446081.3

C12N 15/867 (2006.01)

(22) 申请日 2016.10.14

C12N 15/86 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 5/10 (2006.01)

62/242,842 2015.10.16 US

(62) 分案原申请数据

201680066023.X 2016.10.14

(71) 申请人 菲特治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 B·瓦拉末赫 M·鲁滨逊

R·阿布加罗尔

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

专利代理师 王宇宁

(51) Int. Cl.

C12N 15/85 (2006.01)

权利要求书2页 说明书58页

序列表(电子公布) 附图81页

(54) 发明名称

用于诱导和维护基态多能性的平台

(57) 摘要

本发明的名称是用于诱导和维护基态多能性的平台。本发明提供用于制造多能细胞的组合物和方法。确切地说,本发明提供用于制造具有基态多能性的多能细胞的改良的培养平台。

1. 一种用于再编程非多能细胞的方法, 包含:

a) 将以下各者引入到所述非多能细胞中: (i) 一种或多种编码选自由以下组成的群组的一种或多种多肽的多核苷酸: OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1; 以及 (ii) 一种或多种编码选自由以下组成的群组的一种或多种多肽的多核苷酸: (ii) HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1, 或

b) 使所述非多能细胞与以下各者接触: (i) 一种或多种选自由以下组成的群组的多肽: OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1; 以及 (ii)

一种或多种选自由以下组成的群组的多肽: HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中a) (i) 和a) (ii) 的所述一种或多种多核苷酸通过一种或多种载体引入; 且其中各载体中的所述一种或多种多核苷酸编码相同或不同多肽。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其中将一种或多种多核苷酸引入到所述非多能细胞中包含引入一种或多种载体, 各载体包含 (i) 至少两种编码OCT4的多核苷酸; (ii) 至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码NANOG的多核苷酸; (iii) 至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码ESRRB的多核苷酸; (iv) 至少一种编码ECAT1的多核苷酸和至少一种编码UTF1的多核苷酸; (v) 至少一种编码OCT4的多核苷酸、至少一种编码ESRRB的多核苷酸和至少一种编码NANOG的多核苷酸; (vi) 编码CDH1、ZIC3和HESRG的多核苷酸中的至少一种; (vii) 编码L1TD1、DPPA4和TDGF1的多核苷酸中的至少一种; 或 (viii) 至少一种编码DNMT3B的多核苷酸。

4. 根据权利要求3所述的方法, 其中将一种或多种多核苷酸引入到所述非多能细胞中包含:

(a) 引入一种或多种载体, 其中各载体包含: (i) 至少两种编码OCT4的多核苷酸; (ii) 至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码NANOG的多核苷酸; (iii)

至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码ESRRB的多核苷酸; (iv) 至少一种编码ECAT1的多核苷酸和至少一种编码UTF1的多核苷酸; 或 (v) 至少一种编码OCT4的多核苷酸、至少一种编码ESRRB的多核苷酸和至少一种编码NANOG的多核苷酸; 以及

(b) 引入一种或多种载体, 其中各载体包含: (i) 至少一种编码CDH1的多核苷酸、至少一种编码ZIC3的多核苷酸和至少一种编码HESRG的多核苷酸; (ii) 至少一种编码L1TD1的多核苷酸、至少一种编码DPPA4的多核苷酸和至少一种编码TDGF1的多核苷酸; 或 (iii) 至少一种编码DNMT3B的多核苷酸。

5. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述一种或多种多核苷酸通过包含以下各者的载体中的至少一种引入:

(a) 一种或多种编码Nanog、ESRRB和Oct4中的一种或多种的多核苷酸;

(b) 一种或多种编码ECAT1和UTF1中的一种或两种的多核苷酸;

(c) 一种或多种编码L1TD1、DPPA4和TDGF1中的一种或多种的多核苷酸; 或

(d) 一种或多种编码CDH1、ZIC3和HESRG中的一种或多种的多核苷酸。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述一种或多种多核苷酸通过包含一种或多种编

码Oct4的多核苷酸的载体且通过以下各者中的至少一者引入：

- (a) 包含编码Nanog、ESRRB和Oct4的多核苷酸的载体；
- (b) 包含编码ECAT1和UTF1的多核苷酸的载体；
- (c) 包含编码L1TD1、DPPA4和TDGF1的多核苷酸的载体；以及
- (d) 包含编码CDH1、ZIC3和HESRG的多核苷酸的载体。

7. 根据权利要求3所述的方法，其中所述一种或多种载体通过逆转录病毒、仙台病毒、腺病毒、游离基因、小环、具有表达盒的载体系统或mRNA引入。

8. 根据权利要求7所述的方法，其中所述载体中的至少一种通过仙台病毒引入。

9. 根据权利要求1所述的方法，其中所述一种或多种多核苷酸通过至少一种自我裂解多肽连接。

10. 根据权利要求1所述的方法，其中所述非多能细胞重编程成多能细胞。

用于诱导和维护基态多能性的平台

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请日是2016年10月14日、申请号是201680066023.X、发明名称为“用于诱导和维护基态多能性的平台”。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求2015年10月16日提交的美国临时申请第62/242,842号的优先权,其公开内容以全文引用的方式并入本文中。

技术领域

[0004] 本发明大体上涉及用于制造多能细胞的组合物和方法。确切地说,本发明涉及用于制造具有基态多能性的多能细胞的改良的培养平台。

背景技术

[0005] 当今的基于多能干细胞的疾病和毒理学筛选努力和明天的自体/同种异体多能干细胞疗法将需要人类胚胎干细胞(hESC)和人类诱导多能干细胞(hiPSC)的细胞株产生和扩增的稳固可重复方法。hiPSC通过经由基因组整合逆转录和慢病毒表达系统引入的多能性因子的异位表达产生。消除尽可能多的整合事件的努力包括用小分子抑制剂取代多种再编程因子。然而,非整合方法已证实为低效和劳动密集型的,或在需要额外再编程因子的再编程体细胞中为无效的(Lee等人,2013)。

[0006] 与多能干细胞培养相关的若干挑战亟需解决以准许适用于工业和临床应用的细胞的衍生。在最常使用的常规培养系统中,hESC和hiPSC维持在饲养细胞上,同时以凝集块形式传代,从而防止广泛细胞死亡和基因组偏差(Thomson等人,1998)。不能实现无饲料(FF)环境中的单一细胞培养hiPSC严重限制了工业规模筛选或细胞疗法应用的可能性(Skottman等人,2007;Valamehr等人,2011)。另外,近期改良hiPSC的努力集中于非无转基因的慢病毒衍生的hiPSC,限制此类努力的治疗相关性。

[0007] 另一亟需成功解决的挑战(不用基因组修饰)为培养物中的人类多能干细胞的自发分化倾向(Pera和Trounson,2004;Sathananthan和Trounson,2005;Valamehr等人,2011)。

[0008] 已描述hESC和hiPSC研究,但需要多能性基因的连续异位表达以维持产生基因组经修饰的人类多能干细胞的基态(Hanna等人,2010a),其不适用于工业和临床级别多能细胞。

[0009] 另外,再编程已知为具有较长等待时间的低效和随机方法。表达时序和水准以及更重要的再编程因子的化学计量决定再编程的完成度。化学计量测量反应方法中的试剂之间的定量关系,且用于测定给定反应中需要的试剂量以及有时所产生的产物量。化学计量考虑反应剂的化学计算量或试剂的化学计量比,其为完成反应的反应剂的最佳量或比率。

[0010] 再编程因子化学计量不仅在再编程的早期阶段中为重要的,且在后期阶段中也是重要的,且对于中间细胞状态的建立和成熟为重要的。不同再编程因子化学计量影响再编程效率,且也可产生具有不同质量的iPSC。举例而言,再编程因子的化学计量影响包括iPSC

的多能性水准、自我更新、均匀性和自发分化的生物学特性。

[0011] 因此,迄今不存在用于产生高质量人类多能细胞产物的高通量有效无转基因或印迹的组合物和方法已证实为将来多能干细胞疗法的发展和商业化的一大障碍。

发明内容

[0012] 本发明一般提供用于再编程非多能细胞的改良方法和组合物。一般方法包含将以下各者引入到非多能细胞中:(i)一种或多种编码选自以下组成的群组的一种或多种多肽的多核苷酸:OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1;以及(ii)一种或多种编码选自以下组成的群组的一种或多种多肽的多核苷酸:HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。替代地,一般方法包含使非多能细胞与以下各者接触:(i)一种或多种选自以下组成的群组的多肽:OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1;以及(ii)一种或多种选自以下组成的群组的多肽:HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。在一些实施例中,非多能细胞为体细胞。在一些实施例中,非多能细胞包含成人干细胞。在一些实施例中,非多能细胞重编程成多能细胞。在其它实施例中,非多能细胞重编程成诱导多能干细胞(iPSC)。在又其它实施例中,iPSC包含重编程成人干细胞。

[0013] 在上述方法的一个实施例中,通过一种或多种载体引入上述一种或多种多核苷酸。在一些实施例中,各载体中的一种或多种多核苷酸编码相同或不同多肽。在一些实施例中,通过逆转录病毒、仙台病毒、腺病毒、游离基因、小环、具有表达盒的载体系统或mRNA引入一种或多种载体。在特定实施例中,通过慢病毒载体引入一种或多种多核苷酸。在一些实施例中,通过游离型载体引入一种或多种多核苷酸。在不同其它实施例中,通过仙台病毒载体引入一种或多种多核苷酸。

[0014] 在上述方法的一些实施例中,一种或多种多核苷酸包含在相同构建体或载体中。在一些其它实施例中,一种或多种多核苷酸包含在不同载体中。在一个实施例中,两种或更多种多核苷酸包含在具有一对或多对编码如所公开通过自我裂解肽或IRES连接的再编程因子的相邻多核苷酸的多顺反子载体中。在又一实施例中,多顺反子载体包含两种或更多种各自编码OCT4多肽的多核苷酸。在一个特定实施例中,至少一种编码OCT4多肽的多核苷酸连接到可选择标记物。

[0015] 在另一实施例中,所述方法包含将包含至少两种编码OCT4的多核苷酸的一种载体引入到非多能细胞中。在又一实施例中,所述方法包含将包含至少两种编码OCT4的多核苷酸的第一载体和包含至少一种编码OCT4的多核苷酸的第二载体引入到非多能细胞中。在所述方法的一些实施例中,第一载体和第二载体中的至少一种为多顺反子的。在所述方法的一些其它实施例中,第一载体和第二载体中的两者为多顺反子的。在又一些其它实施例中,包含将包含至少两种编码OCT4的多核苷酸的第一载体和包含至少一种编码OCT4的多核苷酸的第二载体引入到非多能细胞中的方法进一步包含将包含至少一种编码OCT4的多核苷酸的第三或更多种载体引入到非多能细胞中。在又一些其它实施例中,包含将包含编码OCT4的多核苷酸的载体中的一种或多种引入到非多能细胞中的方法进一步包含引入一种或多种编码选自以下组成的群组的一种或多种再编程因子的多核苷酸:SOX2、NANOG、

KLF4、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。在一些实施例中,引入到非多能细胞中的再编程因子并不包括SOX2和/或KLF4。在一些实施例中,SOX2和/或KLF4不包括在引入到非多能细胞中的再编程因子中。在一些实施例中,SOX2和/或KLF4在一种或多种编码选自以下组成的群组的一种或多种再编程因子的多核苷酸存在的情况下为可分配的:NANOG、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。在又一些其它实施例中,包含引入包含两种或更多种编码OCT4的多核苷酸的第一载体的方法进一步包含引入至少一种包含一种或多种编码选自以下组成的群组的一种或多种再编程因子的多核苷酸的载体:NANOG、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。在又一些其它实施例中,所述方法包含将一种或多种包含一种或多种编码OCT4的多核苷酸的载体引入到非多能细胞中,且进一步包含引入一种或多种包含一种或多种编码选自以下组成的群组的一种或多种再编程因子的多核苷酸的载体:HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。

[0016] 在一般方法的一个实施例中,包含将一种或多种编码选自OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB和SV40LT组成的群组的再编程因子中的一种或多种的多核苷酸引入到非多能细胞中的方法进一步包含引入一种或多种编码选自以下组成的群组的再编程因子中的一种或多种的多核苷酸:HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。

[0017] 在某些实施例中,根据一般方法再编程非多能细胞包含将一种或多种编码选自以下组成的群组的再编程因子中的一种或多种的多核苷酸引入到非多能细胞中:OCT4、NANOG、ECAT1、UTF1和ESRRB。在一些实施例中,再编程非多能细胞包含将一种或多种编码OCT4、NANOG、ECAT1、UTF1和/或ESRRB的多核苷酸和一种或多种编码选自以下组成的群组的再编程因子中的一种或多种的多核苷酸引入到非多能细胞中:HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。

[0018] 在某些实施例中,根据一般方法再编程非多能细胞包含将一种或多种编码选自以下组成的群组的再编程因子中的一种或多种的多核苷酸引入到非多能细胞中:OCT4、ECAT1和UTF1。在一些实施例中,再编程非多能细胞包含将一种或多种编码OCT4、ECAT1和/或UTF1的多核苷酸和一种或多种编码选自以下组成的群组的再编程因子中的一种或多种的多核苷酸引入到非多能细胞中:HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。

[0019] 因而,根据本申请的一般方法,在一些实施例中,将一种或多种多核苷酸引入到非多能细胞中包含引入一种或多种载体,各载体包含(i)至少两种编码OCT4的多核苷酸;(ii)至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码NANOG的多核苷酸;(iii)至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码ESRRB的多核苷酸;(iv)至少一种编码ECAT1的多核苷酸和至少一种编码UTF1的多核苷酸;(v)至少一种编码OCT4的多核苷酸、至少一种编码ESRRB的多核苷酸以及至少一种编码NANOG的多核苷酸;(vi)编码CDH1、ZIC3和HESRG的多核苷酸中的至少一种;(vii)编码L1TD1、DPPA4和TDGF1的多核苷酸中的至少一种;或(viii)至少一种编码DNMT3B的多核苷酸。在一些特定实施例中,引入到非多能细胞中的再编程因子并不包括SOX2、KLF4和c-Myc中的一种或多种。在一些实施例中,包含将一种或多种上述载体引入到非多能细胞中的再编程非多能细胞的方法进一步包含将一种或多种编码一种或多种再编

程因子的额外多核苷酸引入到非多能细胞中。在一些其它特定实施例中,SOX2、c-Myc和/或KLF4不包括在引入到非多能细胞中的再编程因子中。在又其它特定实施例中,SOX2、c-Myc和/或KLF4在一种或多种编码选自由以下组成的群组的一种或多种再编程因子的多核苷酸存在的情况下为可分配的:NANOG、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。

[0020] 在一些其它实施例中,引入到非多能细胞中的一种或多种多核苷酸包含(a)引入一种或多种载体,其中各载体包含:(i)至少两种编码OCT4的多核苷酸;(ii)至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码NANOG的多核苷酸;(iii)至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码ESRRB的多核苷酸;(iv)至少一种编码ECAT1的多核苷酸和至少一种编码UTF1的多核苷酸;或(v)至少一种编码OCT4的多核苷酸、至少一种编码ESRRB的多核苷酸以及至少一种编码NANOG的多核苷酸;以及(b)引入一种或多种载体,其中各载体包含:(i)至少一种编码CDH1的多核苷酸、至少一种编码ZIC3的多核苷酸以及至少一种编码HESRG的多核苷酸;(ii)至少一种编码L1TD1的多核苷酸、至少一种编码DPPA4的多核苷酸和至少一种编码TDGF1的多核苷酸;或(iii)至少一种编码DNMT3B的多核苷酸。在一些实施例中,包含将一种或多种上述载体引入到非多能细胞中的再编程非多能细胞的方法进一步包含将一种或多种额外再编程因子引入到非多能细胞中。在一些特定实施例中,将再编程因子引入到非多能细胞中的方法并不包括SOX2、c-Myc和/或KLF4。在一些其它特定实施例中,SOX2、c-Myc和/或KLF4不包括在引入到非多能细胞中的再编程因子中。在又其它特定实施例中,SOX2、c-Myc和/或KLF4在一种或多种编码选自由以下组成的群组的一种或多种再编程因子的多核苷酸存在的情况下为可分配的:NANOG、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。在一些其它实施例中,所述一般方法中使用的一种或多种多核苷酸通过包含以下各者的载体中的至少一种引入:(a)一种或多种编码Nanog、ESRRB和Oct4中的一种或多种的多核苷酸;(b)一种或多种编码ECAT1和UTF1中的一种或两种的多核苷酸;(c)一种或多种编码L1TD1、DPPA4和TDGF1中的一种或多种的多核苷酸;或(d)一种或多种编码CDH1、ZIC3和HESRG中的一种或多种的多核苷酸。在一个实施例中,通过包含一种或多种编码Oct4的多核苷酸的载体和通过以下各者中的至少一种载体引入一种或多种多核苷酸:(a)包含编码Nanog、ESRRB和Oct4的多核苷酸的载体;(b)包含编码ECAT1和UTF1的多核苷酸的载体;(c)包含编码L1TD1、DPPA4和TDGF1的多核苷酸的载体;以及(d)包含编码CDH1、ZIC3和HESRG的多核苷酸的载体。

[0021] 本申请的另一个方面涉及一种产生多能细胞的方法,其中所述方法包含将以下各者引入到非多能细胞中:(i)一种或多种编码选自由以下组成的群组的一种或多种多肽的多核苷酸:OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1;以及(ii)一种或多种编码选自由以下组成的群组的一种或多种多肽的多核苷酸:HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。在替代性实施例中,产生多能细胞的方法包含使非多能细胞与以下各者接触:(i)选自由以下组成的群组的一种或多种多肽:OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1;以及(ii)选自由以下组成的群组的一种或多种多肽:HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1,且由此将非多能细胞再编程成多能细胞。在某些实施例中,通过提高细胞中的内源性OCT4的表达,将非多能细胞重编程

成多能状态。在其它实施例中,非多能细胞重编程成诱导多能干细胞。在又其它实施例中,一种或多种iPSC包含重编程成人干细胞。

[0022] 在一些实施例中,产生多能细胞的方法包含将一种或多种载体中包含的一种或多种多核苷酸引入到非多能细胞中,各载体包含 (i) 至少两种编码OCT4的多核苷酸; (ii) 至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码NANOG的多核苷酸; (iii) 至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码ESRRB的多核苷酸; (iv) 至少一种编码ECAT1的多核苷酸和至少一种编码UTF1的多核苷酸; (v) 至少一种编码OCT4的多核苷酸、至少一种编码ESRRB的多核苷酸和至少一种编码NANOG的多核苷酸; (vi) 编码CDH1、ZIC3和HESRG的多核苷酸中的至少一种; (vii) 编码L1TD1、DPPA4和TDGF1的多核苷酸中的至少一种; 或 (viii) 至少一种编码DNMT3B的多核苷酸。在一些实施例中,包含将一种或多种上述载体引入到非多能细胞中的产生多能细胞的方法进一步包含将一种或多种编码一种或多种再编程因子的额外多核苷酸引入到非多能细胞中。

[0023] 在一些其它实施例中,产生多能细胞的方法包含 (a) 引入一种或多种载体,各载体包含: (i) 至少两种编码OCT4的多核苷酸; (ii) 至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码NANOG的多核苷酸; (iii) 至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码ESRRB的多核苷酸; (iv) 至少一种编码ECAT1的多核苷酸和至少一种编码UTF1的多核苷酸; 或 (v) 至少一种编码OCT4的多核苷酸、至少一种编码ESRRB的多核苷酸和至少一种编码NANOG的多核苷酸; 以及 (b) 引入一种或多种载体,各载体包含: (i) 至少一种编码CDH1的多核苷酸、至少一种编码ZIC3的多核苷酸和至少一种编码HESRG的多核苷酸; (ii) 至少一种编码L1TD1的多核苷酸、至少一种编码DPPA4的多核苷酸和至少一种编码TDGF1的多核苷酸; 或 (iii) 至少一种编码DNMT3B的多核苷酸。在一些实施例中,产生多能细胞的方法不包括使用SOX2、Klf4和c-Myc中的一种或多种。在一些实施例中,所述方法中的一种或多种多核苷酸通过包含以下各者的载体中的至少一种引入: (a) 一种或多种编码Nanog、ESRRB和Oct4中的一种或多种的多核苷酸; (b) 一种或多种编码ECAT1和UTF1中的一种或两种的多核苷酸; (c) 一种或多种编码L1TD1、DPPA4和TDGF1中的一种或多种的多核苷酸; 或 (d) 一种或多种编码CDH1、ZIC3和HESRG中的一种或多种的多核苷酸。在一些其它实施例中,通过包含一种或多种编码Oct4的多核苷酸的载体和以下载体中的至少一种引入一种或多种多核苷酸: (a) 包含编码Nanog、ESRRB和Oct4的多核苷酸的载体; (b) 包含编码ECAT1和UTF1的多核苷酸的载体; (c) 包含编码L1TD1、DPPA4和TDGF1的多核苷酸的载体; 以及 (d) 包含编码CDH1、ZIC3和HESRG的多核苷酸的载体。在所述方法的一些实施例中,一种或多种载体通过逆转录病毒、仙台病毒、腺病毒、游离基因、小环、具有表达盒的载体系统或mRNA引入。在一个特定实施例中,通过仙台病毒引入载体。

[0024] 本发明的另一个方面提供用于将非多能细胞再编程成多能细胞的混合物。在一个实施例中,所述混合物包含一种或多种非多能细胞,其中所述非多能细胞包含 (i) 一种或多种编码选自由以下组成的群组的一种或多种多肽的外源性多核苷酸: OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1; 以及 (ii) 一种或多种编码选自由以下组成的群组的一种或多种多肽的外源性多核苷酸: (ii) HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。在一个实施例中,所述混合物包含一种或多种非多能细胞,其中所述非多能细胞包含 (i) 一种或多种载体,各载体包含一

种或多种编码OCT4、ESRRB、ECAT1、UTF1和/或NANOG的多核苷酸；且所述非多能细胞进一步包含(ii)一种或多种载体，各载体包含一种或多种编码CDH1、ZIC3、HESRG、L1TD1、DPPA4、TDGF1和/或DNMT3B的多核苷酸。

[0025] 在用于再编程的混合物的又一实施例中，所述非多能细胞包含一种或多种载体，各载体包含(i)至少两种编码OCT4的多核苷酸；(ii)至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码NANOG的多核苷酸；(iii)至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码ESRRB的多核苷酸；(iv)至少一种编码ECAT1的多核苷酸和至少一种编码UTF1的多核苷酸；(v)至少一种编码OCT4的多核苷酸、至少一种编码ESRRB的多核苷酸和至少一种编码NANOG的多核苷酸；(vi)至少一种编码CDH1的多核苷酸、至少一种编码ZIC3的多核苷酸和至少一种编码HESRG的多核苷酸；(vii)至少一种编码L1TD1的多核苷酸、至少一种编码DPPA4的多核苷酸和至少一种编码TDGF1的多核苷酸；或(viii)至少一种编码DNMT3B的多核苷酸。在用于再编程的混合物的一些实施例中，包含一种或多种上述载体的非多能细胞进一步包含一种或多种编码一种或多种再编程因子的额外多核苷酸。

[0026] 在用于再编程的混合物的再一实施例中，非多能细胞包含(a)一种或多种载体，其中至少一种载体包含：(i)至少两种编码OCT4的多核苷酸；(ii)至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码NANOG的多核苷酸；(iii)至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码ESRRB的多核苷酸；(iv)至少一种编码ECAT1的多核苷酸和至少一种编码UTF1的多核苷酸；或(v)至少一种编码OCT4的多核苷酸、至少一种编码ESRRB的多核苷酸和至少一种编码NANOG的多核苷酸；且非多能细胞进一步包含(b)一种或多种载体，其中各载体包含：(i)至少一种编码CDH1的多核苷酸、至少一种编码ZIC3的多核苷酸和至少一种编码HESRG的多核苷酸；(ii)至少一种编码L1TD1的多核苷酸、至少一种编码DPPA4的多核苷酸和至少一种编码TDGF1的多核苷酸；或(iii)至少一种编码DNMT3B的多核苷酸。

[0027] 在一个特定实施例中，本发明提供一种或多种核酸，各核酸包含以下各者中的至少一种、二种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种或十一种：(i)编码OCT4多肽的cDNA、(ii)编码ECAT1多肽的cDNA、(iii)编码UTF1多肽的cDNA、(iv)编码NANOG多肽的cDNA、(v)编码ESRRB多肽的cDNA、(vi)编码HESRG多肽的cDNA、(vii)编码CDH1多肽的cDNA、(viii)编码TDGF1多肽的cDNA、(ix)编码DPPA4多肽的cDNA、(x)编码DNMT3B多肽的cDNA、(xi)编码ZIC3多肽的cDNA以及(xii)编码L1TD1多肽的cDNA。

[0028] 在一个实施例中，核酸包含编码OCT4多肽的cDNA、编码ECAT1多肽的cDNA、编码UTF1多肽的cDNA、编码NANOG多肽的cDNA和编码ESRRB多肽的cDNA。

[0029] 在另一实施例中，核酸包含编码OCT4多肽的cDNA、编码ECAT1多肽的cDNA和编码UTF1多肽的cDNA。

[0030] 在另一实施例中，核酸包含编码OCT4多肽的cDNA、编码NANOG多肽的cDNA和编码ESRRB多肽的cDNA。

[0031] 在另一实施例中，核酸包含编码CDH1多肽的cDNA、编码ZIC3多肽的cDNA和编码HESRG多肽的cDNA。

[0032] 在另一实施例中，核酸包含编码L1TD1多肽的cDNA、编码DPPA4多肽的cDNA和编码TDGF1多肽的cDNA。

[0033] 在另一实施例中，核酸包含编码DNMT3B多肽的cDNA。

[0034] 本发明的又一方面提供一种包含以下各者的细胞：(i) 编码选自由以下组成的群组的一种或多种多肽的一种或多种外源性多核苷酸：OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1；以及(ii) 编码选自由以下组成的群组的一种或多种多肽的一种或多种外源性多核苷酸：HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。在一些实施例中，细胞为分化全能细胞、多能细胞、多潜能细胞、寡能细胞、单能细胞或末端分化细胞。在一个实施例中，细胞为非多能细胞。在另一实施例中，细胞为经诱导的多能干细胞。在又一实施例中，细胞为母细胞。在一些实施例中，本发明提供一种包含以下各者的细胞：(i) 一种或多种编码选自由以下组成的群组的一种或多种多肽的多核苷酸：NANOG、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB和SV40LT；以及(ii) 一种或多种编码选自由以下组成的群组的一种或多种多肽的多核苷酸：HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。在一些实施例中，所述细胞并不包含外源性SOX2、Klf4和c-Myc中的一种或多种。

[0035] 本申请的一个方面提供一种用于产生多能细胞的套组，且所述套组包含：一种或多种载体，各载体包含(i) 一种或多种编码选自由以下组成的群组的一种或多种多肽的多核苷酸：OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1；以及(ii) 一种或多种编码选自由以下组成的群组的一种或多种多肽的多核苷酸：HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。在替代性实施例中，所述套组包含(i) 选自由以下组成的群组的一种或多种多肽：OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1；以及(ii) 选自由以下组成的群组的一种或多种多肽：HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。

[0036] 在一些实施例中，本文所公开的套组包含一种或多种载体，各载体包含(i) 至少两种编码OCT4的多核苷酸；(ii) 至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码NANOG的多核苷酸；(iii) 至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码ESRRB的多核苷酸；(iv) 至少一种编码ECAT1的多核苷酸和至少一种编码UTF1的多核苷酸；(v) 至少一种编码OCT4的多核苷酸、至少一种编码ESRRB的多核苷酸和至少一种编码NANOG的多核苷酸；(vi) 编码CDH1g、ZIC3和HESRG的多核苷酸中的至少一种；(vii) 编码L1TD1、DPPA4和TDGF1的多核苷酸中的至少一种；或(viii) 至少一种编码DNMT3B的多核苷酸。在一些实施例中，包含一种或多种上述载体的套组进一步包含一种或多种编码一种或多种再编程因子的额外多核苷酸。

[0037] 在又一些其它实施例中，所述套组包含(a) 一种或多种载体，其包含：(i) 至少两种编码OCT4的多核苷酸；(ii) 至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码NANOG的多核苷酸；(iii) 至少一种编码OCT4的多核苷酸和至少一种编码ESRRB的多核苷酸；(iv) 至少一种编码ECAT1的多核苷酸和至少一种编码UTF1的多核苷酸；或(v) 至少一种编码OCT4的多核苷酸、至少一种编码ESRRB的多核苷酸和至少一种编码NANOG的多核苷酸；以及(b) 一种或多种载体，其包含：(i) 至少一种编码CDH1的多核苷酸、至少一种编码ZIC3的多核苷酸和至少一种编码HESRG的多核苷酸；(ii) 至少一种编码L1TD1的多核苷酸、至少一种编码DPPA4的多核苷酸和至少一种编码TDGF1的多核苷酸；或(iii) 至少一种编码DNMT3B的多核苷酸。在一些实施例中，套组载体包含(a) 一种或多种编码Nanog、ESRRB和Oct4中的一种或多种的多核苷酸；(b) 一种或多种编码ECAT1和UTF1中的一种或两种的多核苷酸；(c) 一种或多种编码

L1TD1、DPPA4和TDGF1中的一种或多种的多核苷酸；或(d)一种或多种编码CDH1、ZIC3和HESRG中的一种或多种的多核苷酸。在一些其它实施例中，所述套组包含：包含一种或多种编码Oct4的多核苷酸的载体和以下各者中的至少一种载体：(a)包含编码Nanog、ESRRB和Oct4的多核苷酸的载体；(b)包含编码ECAT1和UTF1的多核苷酸的载体；(c)包含编码L1TD1、DPPA4和TDGF1的多核苷酸的载体；以及(d)包含编码CDH1、ZIC3和HESRG的多核苷酸的载体。在一些实施例中，套组载体通过逆转录病毒、仙台病毒、腺病毒、质粒、小环或mRNA携带。在一些实施例中，套组载体通过仙台病毒携带。

[0038] 本发明的另一个方面提供一种再编程组合物，其包含(a)一种或多种编码以下各者的多核苷酸：(i)选自由以下组成的群组的一种或多种肽：OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1；以及(ii)选自由以下组成的群组的一种或多种肽：HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1；或(b)选自由以下组成的群组的一种或多种多肽：(i)OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1；以及(ii)HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。在一些实施例中，所述再编程组合物的一种或多种多核苷酸包括于包含以下各者的至少一种载体中：(a)一种或多种编码Nanog、ESRRB和Oct4中的一种或多种的多核苷酸；(b)一种或多种编码ECAT1和UTF1中的一种或两种的多核苷酸；(c)一种或多种编码L1TD1、DPPA4和TDGF1中的一种或多种的多核苷酸；或(d)一种或多种编码CDH1、ZIC3和HESRG中的一种或多种的多核苷酸。在一些其它实施例中，再编程组合物包含：包含一种或多种编码Oct4的多核苷酸的载体和以下各者中的至少一者：(a)包含编码Nanog、ESRRB和Oct4的多核苷酸的载体；(b)包含编码ECAT1和UTF1的多核苷酸的载体；(c)包含编码L1TD1、DPPA4和TDGF1的多核苷酸的载体；以及(d)包含编码CDH1、ZIC3和HESRG的多核苷酸的载体。在一些实施例中，再编程组合物中的载体通过逆转录病毒、仙台病毒、腺病毒、质粒、小环或mRNA携带。在一些实施例中，再编程组合物中的载体通过仙台病毒携带。

[0039] 本发明的另一个方面提供一种再编程非多能细胞的方法，其包含(a)将一种或多种编码Oct4以及任选地Klf、Sox2、Myc、Nanog和ESRRB中的一种或多种的多核苷酸引入到非多能细胞中；以及(b)将一种或多种编码ECAT1、UTF1、L1TD1、DPPA4、TDGF1、CDH1、ZIC3和HESRG中的至少一种的多核苷酸引入到非多能细胞中；由此获得多能细胞。在一些实施例中，一种或多种多核苷酸通过一种或多种载体引入，且一种或多种多核苷酸可编码相同或不同多肽。在一些实施例中，所述方法的载体包含至少一种构建体，其包含：(a)一种或多种编码Nanog、ESRRB和Oct4中的一种或多种的多核苷酸；(b)一种或多种编码ECAT1和UTF1中的一种或两种的多核苷酸；(c)一种或多种编码L1TD1、DPPA4和TDGF1中的一种或多种的多核苷酸；或(d)一种或多种编码CDH1、ZIC3和HESRG中的一种或多种的多核苷酸。在一些其它实施例中，经由包含一种或多种编码Oct4的多核苷酸的载体和以下载体中的至少一种引入一种或多种多核苷酸：(a)包含编码Nanog、ESRRB和Oct4的多核苷酸的载体；(b)包含编码ECAT1和UTF1的多核苷酸的载体；(c)包含编码L1TD1、DPPA4和TDGF1的多核苷酸的载体；以及(d)包含编码CDH1、ZIC3和HESRG的多核苷酸的载体。在一些实施例中，通过逆转录病毒、仙台病毒、腺病毒、质粒、小环或mRNA引入载体。在一些特定实施例中，通过仙台病毒引入载体。

[0040] 本发明的另一个方面提供一种使用仙台病毒再编程非多能细胞的方法,其包含:(a)将一种或多种编码Oct4以及任选地Klf、Sox2、Myc、Nanog和ESRRB中的一种或多种的多核苷酸引入到非多能细胞中;以及(b)将一种或多种编码ECAT1、UTF1、L1TD1、DPPA4、TDGF1、CDH1、ZIC3和HESRG中的至少一种的多核苷酸引入到非多能细胞中;由此获得多能细胞。在一些实施例中,一种或多种多核苷酸通过一种或多种载体引入;且其中一种或多种多核苷酸编码相同或不同多肽。在一些实施例中,所述载体包含构建体,其包含:(a)一种或多种编码Nanog、ESRRB和Oct4中的一种或多种的多核苷酸;(b)一种或多种编码ECAT1和UTF1中的一种或两种的多核苷酸;(c)一种或多种编码L1TD1、DPPA4和TDGF1中的一种或多种的多核苷酸;或(d)编码CDH1、ZIC3和HESRG中的一种或多种的多核苷酸中的一种或多种。在一些其它实施例中,经由包含一种或多种编码Oct4的多核苷酸的载体和以下载体中的至少一种引入一种或多种多核苷酸:(a)包含编码Nanog、ESRRB和Oct4的多核苷酸的载体;(b)包含编码ECAT1和UTF1的多核苷酸的载体;(c)包含编码L1TD1、DPPA4和TDGF1的多核苷酸的载体;以及(d)包含编码CDH1、ZIC3和HESRG的多核苷酸的载体。

[0041] 本发明的又一方面提供一种使用仙台病毒再编程非多能细胞的方法,其包含:(a)将编码Oct4以及任选地Klf、Sox2、Myc、Nanog和ESRRB中的一种或多种的多核苷酸引入到非多能细胞中;以及(b)将包含以下各者的构建体中的一种引入到非多能细胞中:(i)编码ECAT1和UTF1中的一种或两种的多核苷酸;(ii)编码L1TD1、DPPA4和TDGF1中的一种或多种的多核苷酸;或(iii)编码CDH1、ZIC3和HESRG中的一种或多种的多核苷酸,且由此获得多能细胞。在一些实施例中,经由包含一种或多种编码Oct4的多核苷酸的载体和以下载体中的至少一种引入一种或多种多核苷酸:(a)包含编码Nanog、ESRRB和Oct4的多核苷酸的载体;(b)包含编码ECAT1和UTF1的多核苷酸的载体;(c)包含编码L1TD1、DPPA4和TDGF1的多核苷酸的载体;以及(d)包含编码CDH1、ZIC3和HESRG的多核苷酸的载体。

[0042] 在各种特定实施例中,本发明提供一种制造诱导多能干细胞(iPSC)的方法,其包含通过再编程非多能细胞获得一种或多种多能干细胞。在其它特定实施例中,再编程一种或多种非多能细胞包含使一种或多种非多能细胞与Wnt路径促效剂接触,任选地其中Wnt路径促效剂为GSK3抑制剂;MEK抑制剂;以及TGF β R抑制剂,且任选地ROCK抑制剂。制造诱导多能干细胞(iPSC)的上述方法进一步包含在不包含TGF β R抑制剂的细胞培养基中培养一种或多种多能干细胞,由此产生基态iPSC。在相关特定实施例中,细胞培养基包含Wnt路径促效剂,任选地其中Wnt路径促效剂为GSK3抑制剂;MEK抑制剂;以及ROCK抑制剂。在某些额外实施例中,在无饲料环境中培养一种或多种多能细胞。在额外实施例中,iPSC包含iPSC的群体。在特定实施例中,iPSC的群体为iPSC的均匀群体。

[0043] 在本文所提供的方法和组合物的特定实施例中,多能细胞群体中至少95%表达SSEA4-FITC和TRA1-81或TRA1-60。在额外实施例中,在细胞培养基中培养多能细胞减少经培养细胞的自发分化。

[0044] 在一个实施例中,相比于在包含TGF β R抑制剂的培养基中经培养的多能细胞中的一种或多种分化标记基因的表达,经培养细胞中的一种或多种、两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种或五种或更多种分化标记基因表达降低至少约10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,其中分化标记基因选自自由以下组成的群组:FOXA2、FGF5、SOX17、XIST、NODAL、COL3A1、OTX2、DUSP6、EOMES、NR2F2、NR0B1、CXCR4、CYP2B6、GATA3、

GATA4、ERBB4、GATA6、HOXC6、INHA、SMAD6、RORA、NIPBL、TNFSF11、CDH11、ZIC4、GAL、SOX3、PITX2、APOA2、CXCL5、CER1、FOXQ1、MLL5、DPP10、GSC、PCDH10、CTCFL、PCDH20、TSHZ1、MEGF10、MYC、DKK1、BMP2、LEFTY2、HES1、CDX2、GNAS、EGR1、COL3A1、TCF4、HEPH、KDR、TOX、FOXA1、LCK、PCDH7、CD1D、FOXG1、LEFTY1、TUBJ1、T基因(短尾基因(Brachyury))和ZIC3。在另一实施例中,一种或多种分化标记基因选自以下各者组成的群组:T基因、CXCR4、NODAL、GATA4、SOX17、FOXA2、OTX2和TUBJ1。

[0045] 在某一实施例中,在细胞培养基中培养多能细胞维持或诱导多能性基态。在特定实施例中,一种或多种多能细胞的多能性基态维持至少5代。在某些特定实施例中,一种或多种多能细胞的多能性基态维持至少10代。在其它特定实施例中,一种或多种多能细胞的多能性基态维持至少50代。在额外特定实施例中,一种或多种多能细胞的多能性基态维持至少100代。

[0046] 在各种实施例中,前述方法进一步包含在传代期间使一种或多种多能细胞解离。在某些实施例中,一种或多种多能细胞的存活力在传代期间维持。

[0047] 在某些特定实施例中,使用本申请所提供的方法获得的一种或多种多能细胞包含正常核型。

[0048] 在某些其它实施例中,一种或多种多能细胞的基因组稳定性维持至少10代。在某些相关实施例中,一种或多种多能细胞的基因组稳定性维持至少50代。在某些其它实施例中,一种或多种多能细胞的基因组稳定性维持至少100代。

[0049] 在各种实施例中,本发明部分地涵盖一种使多能细胞适应无饲料培养物的方法,其包含:(a)在饲养细胞存在下分离一种或多种经培养的多能细胞;(b)在包含以下各者的化学成分确定的细胞培养基中培养一种或多种多能细胞:Wnt路径促效剂,任选地其中Wnt路径促效剂为GSK3抑制剂;MEK抑制剂;以及ROCK抑制剂,其中培养基不包含TGF β R抑制剂。

[0050] 在各种特定实施例中,本发明部分地涵盖一种培养以酶促方式传代作为单一细胞的多能细胞的方法,其包含:(a)以酶促方式处理一种或多种多能细胞以使单一多能细胞传代;(b)在无饲料环境中培养单一多能细胞;(c)在包含Wnt路径促效剂、任选地(且不限于)GSK3抑制剂、MEK抑制剂和ROCK抑制剂的化学成分确定的细胞培养基中培养单一多能细胞。在一些实施例中,培养基不包含TGF β R抑制剂。

[0051] 在各种某些实施例中,本发明部分地涵盖一种减少一种或多种多能细胞的自发分化的方法,其包含:(a)在无饲料环境中培养一种或多种多能细胞;(b)在包含以下各者的化学成分确定的细胞培养基中培养一种或多种多能细胞:Wnt路径促效剂,任选地其中Wnt路径促效剂为GSK3抑制剂;MEK抑制剂;以及ROCK抑制剂,其中培养基不包含TGF β R抑制剂。

[0052] 在各种额外实施例中,本发明部分地涵盖一种制造诱导多能干细胞(iPSC)的方法,其包含:(a)获得一种或多种非多能细胞;(b)将一种或多种非多能细胞再编程成多能状态;(c)在不包含TGF β R抑制剂的细胞培养基中培养多能细胞,由此产生iPSC。

附图说明

[0053] 图1显示增强的再编程和hiPSC维持的多阶段培养平台的结果。(A)慢病毒产生的hiPSC克隆株FTi088维持SMC4中的未分化细胞的均匀群体,同时在SMC4中经培养的慢病毒产生的hiPSC株系FTi096中可见自发分化。当FTi096转变为FMM持续3代时,自发分化降到最

低,如SSEA4和TRA1-81的形态(上图)和流式细胞测量(下图)所示。(B)病毒元素WPRES的转基因表达的qRT-PCR。表达标准化为GAPDH且与慢病毒感染四天后(P.I.4天)胃肠外成纤维细胞株系的WPRES表达相关。未感染的成纤维细胞株系(成纤维细胞)和人类ESC株系HUES9用作阴性对照。每一组的值在条柱上指明。(C)各种培养基组分对10代后无慢病毒的转基因诱导的hiPSC的SSEA4和TRA1-81群体的作用的筛检;SB431542(-TGF β Ri)的去除,从10提高到100ng/mL bFGF,添加10ng/mL LIF。(D)用含有基因组OCT4/KLF4/SOX2的慢病毒构建体转染成纤维细胞细胞株且拆分成各种培养基(常规培养基;Conv.),培养17天且在第17天针对SSEA4和TRA1-81双重阳性群体分类。分选门以蓝色突出显示。在相应培养基(除了拆分成FMM和SMC4的SMC4组以外)中培养每一组额外10天。在第27天,再分选培养物的SSEA4和TRA1-81双重阳性群体,在分选的事件的标准化密度下接种且在相应培养基中维持额外9天。常规培养组选通扩增以获得标准化数目细胞。在第36天,各培养物染色OCT4和NANOG表达。代表性免疫细胞化学图像显示于每一组的右图中。(E)第36天的群落计数染色如(D)中所论述。误差条表示FRM到FMM的三次实验以及FRM和FMM和hESC的两次实验。

[0054] 图2显示有效地选择个别游离型重编程hiPSC且接种于96孔培养板中以便于克隆扩增。(A)说明游离型诱导、多阶段培养平台、流式细胞测量分选和克隆扩增的示意时序。(B)在FF培养物(概述在A中)中,在转染后指定天,维持在FRM到FMM转变中的游离型诱导再编程的流式细胞测量曲线。用于各亲本株系(SSEA4+/TRA1-81+/CD30+群体)的分选选通策略以相应颜色说明,对应于代表含有个别hiPSC纯系的96孔培养板的孔百分比的底部直方图。含有多个纯系或分化纯系的孔不评分。实线表示所有求导的平均百分比,点线代表标准差。(C)在MEF细胞存在下维持在常规培养基中转染后19天经诱导以重编程的FTC007流动曲线。诱导群体取自(B)中的FTC007的相同群体,然而其后在不同培养物中处理。(D)96孔培养板中的分选菌落的各种多能性标记物的免疫细胞化学分析。右拐角图表示DAPI染色。(E)以每孔3个细胞,SSEA4/TRA1-81/CD30直接分选的(FACS)96孔培养板的各孔的NANOG表达的qRT-PCR。相对于H1人类ESC,表达范围在零与四次表达之间,如图例中所描述且标准化为GAPDH。

[0055] 图3显示游离型重编程hiPSC纯系维持其未分化状态且不含转基因序列。(A)在单一细胞传代之后hiPSC克隆24小时的典型的形态。(B)在培养期间hiPSC克隆株的代表性图像。(C)衍生自各种hiPSC克隆株的游离型DNA的PCR分析。泳道1,FTC007-c1p4;泳道2,FTC007-c21 p4;泳道3,FTC016-c25 p5;泳道4,FTC016-c36 p5;泳道5,FTC017-c11 p7;泳道6,FTC017-c14 p7;泳道7,FTC017-c17 p6(使用阳性对照维持游离型构建体的株系);泳道8,未转染FTC007;泳道9,使用慢病毒构建体产生hiPSC(以充当针对交叉污染的对照);泳道10,游离型载体用作阳性对照。100ng基因组DNA和35PCR循环的输入用于所有组。(D)通过免疫荧光检测多能性标记物的OCT4、NANOG、TRA1-81和TRA160的表达。(E)来自各种亲本株系的所选hiPSC克隆株的流式细胞测量曲线。上行分布SSEA4/TRA1-81表面表达。下行分布OCT4/NANOG细胞内表达。(F)内源性多能基因表达的qRT-PCR分析。数据标准化为GAPDH且相对于HUES9 hESC。在KLF4表达的情况下,两个数据点比HUES9大15倍且在图上指出。误差条表示重复的标准偏差。

[0056] 图4显示在连续单一细胞和FF培养期间维持基因组稳定性和多能性。(A)对来自在FF和单一细胞培养物中维持的各种hiPSC克隆株的20到40G带中期细胞的细胞遗传学分析。

(B) FF和单一细胞培养物中的长期传代 (p25-30) 的hiPSC克隆株的流式细胞测量曲线和细胞遗传学分析。(C) FTC017-c11的三到四天定向分化。(D) 表明三谱系分化的hiPSC克隆株的胚状体形成和分化。免疫细胞化学在分化后28天进行: 外胚层, TUJ1; 中胚层, α 平滑肌肌动蛋白 (aSMA); 内胚层, AFP。(E) 衍生自代表各体细胞谱系的FTC007-c21和FTC016-c25的畸胎瘤的组织学切片。黑色箭头, 内胚层; 白色箭头, 外胚层; 灰色箭头, 中胚层。

[0057] 图5显示具有极小数目再编程因子的hiPSC克隆株的衍生物。(A) OCT4、SOX2和NANOG以各种形式克隆到pCEP4中。表表示载体系统和缩写。(B) 在诱导后第13天, 通过各种基因组合诱导的再编程动力学的SSEA4和TRA1-81流式细胞测量曲线。再编程因子化学计量作用通过比较使用OS+ONS+T与2x0+ONS+T (0.1%:1.03%) 再编程的效率; 比较2x0+ONS+T与2x0+ONS+OS+T (1.03%:3.53%); 比较2x0+OS+T与2x0+ONS+OS+T (0.58%:3.53%); 比较ONS+T与2x0+ONS+T (0.6%:1.03%); 比较OS+T与2x0+OS+T (0.06%:0.58%) 显示; (C) 在每孔3和9个细胞下, 代表96孔培养板的孔中的TRA1-81阳性hiPSC克隆株的存在的效率直方图。(D) 衍生自各种hiPSC克隆株的游离型DNA的PCR分析。泳道1, 2x0+OS+ONS+T-c7 p6; 泳道2, 2x0+OS+ONS+T-c10 p6; 泳道3, 2x0+ONS+T-c5 p5; 泳道4, 2x0+ONS+T-c9 p5; 泳道5, 2x0+OS+T-c7 p7; 泳道6, 2x0+OS+T-c9 p6; 泳道7, 未转染的FTC007; 泳道8, 使用慢病毒构建体产生的hiPSC; 泳道9, 用作阳性对照的游离型载体。100ng基因组DNA和35PCR循环的输入用于所有组。(E) 衍生自2x0+OS+T的克隆株9的形态。(F) 通过免疫荧光检测多能性标记物的OCT4、NANOG、TRA1-81和TRA160的表达。在10 \times 放大率下获取图像。(G) 衍生自所选基因组的hiPSC克隆株的流动曲线。上行分布SSEA4/TRA1-81表面表达。下行分布OCT4/NANOG细胞内表达。(H) 诱导后大约72到96小时所选hiPSC克隆株的定向分化。(I) 对来自在FF和单一细胞培养物中维持的各种hiPSC克隆株的G带中期细胞的细胞遗传学分析。(J) 衍生自代表各体细胞谱系的hiPSC克隆株2x0+OS+ONS+T-c10的畸胎瘤的组织学切片。左图, 内胚层; 中图, 中胚层; 右图, 外胚层。

[0058] 图6显示FMM中的极小因子游离型诱导的hiPSC的相对基因表达谱。热度图结果衍生自富鲁达 (Fluidigm) 动态阵列, 其描绘常规地维持的hiPSC株系、常规地维持的H1 hESC和使用FMM中维持的各种基因组合衍生的游离型hiPSC株系的多能性 (A) 和分化 (B) 基因的相对基因表达水准 (RQ)。在各方框内指出各株系的相对基因表达且基于图例 (右下方) 中概述的三个表现水准编码颜色。所有组进行两次, 标准化为两个管家基因 (GAPDH和HPRT1) 的平均表达且参考代表1 \times 值的六个对照常规株系 (MEF上的OSK hiPSC和H1 hESC) 的中值表达水平。

[0059] 图7显示, FMM维持的hiPSC的分化基因表达降低且表示基态。(A) 总共339个探针组常规和FMM培养物之间的差异表达相差大于或小于2.5倍。使用完全连接方法, 基于欧几里得距离测量, 进行339个探针组的分级聚类。(B) 213个探针的基因本体生物方法富集分析 (D.A.V.I.D.) 建立与常规培养物相比 (与FMM培养物相比) 经调节的2.5倍或更多。(C) 基因列表代表基态或亚稳定的多能性状态。清单来源于文本中指出的参考文献。(D) 使用完全连接方法, 基于欧几里得距离测量, 对应于 (C) 中的基因的231个探针组的分级聚类。(E) 对应于 (C) 中的基因的探针组的RMA (log2) 强度。左图表示39个探针组 (针对基态), 右图表示188个探针组 (针对亚稳定的状态)。在X轴上绘制平均常规培养强度水准, 而平均FMM/SMC4强度在Y轴上, 黑线指示相同表达。(F) 位于在常规培养基培养物中衍生经培养的hiPSC克隆株与使

用昂飞(Affymetrix)探针组调适成SMC4培养物的其对应物之间的基因的X染色体的基因表达比较。突出显示与XIST基因表达相关的探针组。(G)在FMM中维持或调适成常规培养物持续5代的hiPSC克隆株上的HEK27me3的代表性图像。左图中的虚线箭头表明代表性原子核不存在H3K27me3染色,而右图中的实线箭头表明原子核H3K27me3染色阳性。原子核阳性染色百分比在各图的左下方指出。经FMM培养的细胞具有较大细胞核。比例尺=50 μ m。

[0060] 图8显示利用FRM和FMM的游离型诱导再编程。(A)再编程池的第10天SSEA4和TRA1-81流动曲线。(B)在再编程期间可见的典型群落的代表性形态。在转染后第13天获取图像。(C)分离在FRM中维持的游离型重编程成纤维细胞持续前14天且维持在FRM中或切换为FMM。随后在转染后第21天分选再编程培养物的SSEA4/TRA1-81/CD30且在分析前维持在FRM或FMM中持续额外10天。(D)FRM或FMM中的代表性培养物的形态和流动曲线。白色箭头指明由未分化和分化群体的混合物组成的培养物中的分化细胞区域。黑色箭头指明大部分未分化群体的锐边缘。下图为代表性流动曲线。FSC;前向散射。

[0061] 图9显示各种亲本株系的再编程。(A)在本研究中使用的起始细胞株系的汇总表。除了有关各株系的特定信息之外,还指出在游离型转染后分选时阳性SSEA4/TRA1-81/CD30群体百分比。(B)描绘富含CD34的脐带血细胞的分选和培养的图示。此前维持在库中的体积0.5ml脐带血用于提取65,000个CD34+CD45+Lin⁻细胞,其在游离型转染之前,在悬浮液中培养6天。

[0062] 图10显示在再编程和维持过程期间hiPSC的特征。(A)单一细胞96孔培养板分选后三天的典型的群落形态。比例尺表示400 μ m。(B)各种起始细胞分选后7-9天单一细胞衍生的hiPSC类群落的代表性形态。比例尺表示1000 μ m。(C)96孔培养板中的hiPSC类菌落的NANOG表达的免疫细胞化学。(D)经诱导以重编程且维持在涂布基质胶或玻璃连结蛋白的培养板上的FTC007的第16天流动曲线分析。(E)亮场图像,(F)OCT4和NANOG的免疫荧光或(g)维持在FMM中连续地在基质胶上的FTC016-c28的SSEA4和TRA1-81或5代玻璃连结蛋白的流式细胞测量分析。

[0063] 图11显示用FMM培养平台再编程的极小基因的实例。(A)用含有游离型构建体的潮霉素选择盒转染后第2天到第5天,经潮霉素处理的细胞的形态。(B)再编程库维持更长持续时间且在转染后第16天进行描绘。(C)维持在基质胶或玻璃连结蛋白上的培养物外观。

[0064] 图12显示在多重条件下培养的hiPSC的特征。(A)慢病毒衍生和SMC4维持的FTi111呈现多能性特点且维持基因组完整性。(B)描绘FTi111 p43的解冻策略。将单一小瓶解冻到如所提及的四个培养环境中。存活培养物在相应培养物中传代,在饲养细胞上补充有噻唑维的常规培养物除外,其在饲养细胞存在下转变为不具有噻唑维的常规培养物且以结块形式传代。(C)解冻后各种培养物中的复原细胞的形态。在饲养细胞存在下,在不具有噻唑维的常规培养物中未鉴别出存活细胞。(D)解冻后3代时培养物组的形态。较大群落形态与常规培养物相关。比例尺1000 μ m。(E)各培养物组的内源性多能基因表达的qRT-PCR分析。数据标准化为GAPDH且相对于H1 hESC。

[0065] 图13显示在各种条件下培养的hiPSC的基因表达谱的基因本体。(A)描述全球基因表达研究中描述的各株系的衍生和维持。(B)总共300个探针组常规和小分子(FMM和SMC4)培养条件之间的差异表达相差大于或小于2.5倍。使用完全连接方法,基于欧几里得距离测量,进行300个探针组的分级聚类。(C)133个探针的基因本体生物方法富集分析

(D.A.V.I.D.) 建立与常规培养物相比 (与小分子培养物相比) 经调节的2.5倍或更多。(D) 167个探针的基因本体生物方法富集分析 (D.A.V.I.D.) 建立与小分子培养物相比 (与常规培养物相比) 经调节的2.5倍或更多。(E) 126个探针的基因本体生物方法富集分析 (D.A.V.I.D.) 建立与FMM培养物相比 (与常规培养物相比) 经调节的2.5倍或更多。

[0066] 图14显示说明用于再编程的慢病毒构建体 (A-B) 和游离型构建体 (C-F) 的实例的克隆图。慢病毒构建体包括用于CRE介导的转基因切除的EF1 α 启动子和LOXP位点。游离型构建体也包括EF1 α 启动子。

[0067] 图15A-C显示在第8天到第15天各种再编程因子组合的代表性流程分析。用慢病毒介导的再编程因子 (包括OCT4、ECAT1和UTF1) 的各种组合诱导人类成纤维细胞。

[0068] 图16A-D显示在第21天到第27天各种再编程因子组合的代表性流程分析和iPSC形态特征。数据显示独特再编程组合可用于衍生SSEA4+/TRA181+hiPSC。

[0069] 图17A和B显示如流程分析 (SSEA4+/TRA181+和CD30+群体) 所说明的高度增强的慢病毒再编程效率和iPSC形态特征。人类成纤维细胞用OCT4、ECAT1、UTF1、ESRRB和NANOG重编程。使用FRM重编程细胞且维持在FMM中。

[0070] 图18A-D显示96孔分选之后7-9代后现有四个iPSC克隆株的代表性流程分析和阶段图像。用慢病毒再编程因子 (OCT4、ECAT1、UTF1、ESRRB和NANOG) FRM产生克隆株且维持在FMM中。表现较高SSEA4+/TRA181+的群体指示多能性。

[0071] 图19A-B显示在用慢病毒再编程因子OCT4、ECAT1、UTF1、NANOG和ESRRB重编程的人类成纤维细胞中用于表达OCT4和NANOG的代表性流程分析。使用FRM重编程克隆株且维持在FMM中。表现较高OCT4+/NANOG+的群体指示多能性。

[0072] 图20A-C显示衍生自用慢病毒再编程因子OCT4、ECAT1、UTF1、NANOG和ESRRB重编程的人类成纤维细胞的hiPSC克隆株的核型分析。使用FRM重编程克隆株且维持在FMM中。克隆株展现正常雄性核型。

[0073] 图21显示与再编程因子组合OCT4/NANOG/SOX2/LARGE T相比的再编程因子组合OCT4/ESRRB/NANOG/ECAT1/UTF1的96孔板分选效率。

[0074] 图22A和B显示 (A) 在第4天、第6天和第11天用OCT4-P2A-OCT4/NANOG-P2A--ESRRB-T2A-LIN28/ECAT1-T2A-UTF1和 (B) 在第7天两孔的OCT4-P2A-ESRRB/OCT4-P2A-NANOG/ECAT1-T2A-UTF1和在第10天的一个孔细胞重编程的扩增出96孔期间的菌落图像。

[0075] 图23显示 (A) 表明再编程因子化学计量作用和使用基因标记物选择具有异位OCT4表达的细胞的流程分析的结果汇总, (B) 用不具有OCT4选择的游离型OCT4-P2A-NANOG-T2A-SOX2/SV40较大T抗原重编程的人类成纤维细胞的流程分析, 和 (C) 用游离型OCT4-P2A-NANOG-T2A-SOX2/SV40较大T抗原/OCT2-P2A-OCT4-嘌呤霉素重编程的人类成纤维细胞的流程分析。

[0076] 图24显示CRE介导的切除后SSEA4+/TRA181+/CD30+96孔培养板分选的克隆株的图像。从最初衍生自人类成纤维细胞, 用慢病毒因子OCT4、ECAT1、UTF1、NANOG和ESRRB重编程, 且随后切除转基因的iPSC克隆株分选菌落。分选的菌落显示iPSC表型。

[0077] 图25显示仙台病毒载体NANOG-P2A-ESRRB-T2A-OCT4 (NEO) 和CDH1-P2A-ZIC3-T2A-HESRG (CZH) 的组合早在第7天就有效地产生SSEA4和TRA181阳性细胞群体。

[0078] 图26显示用于表达iPSC标记物SSEA4+/TRA181+的转染后七天的流式细胞测量分

析,指示成纤维细胞再编程为iPSC使用仅含有再编程因子Oct4、Klf和Sox2(A)且补充有EcU(B)、LDT1(C)和CZH(D)的仙台病毒载体。

[0079] 图27显示用于表达使用OKS的再编程成纤维细胞中的iPSC标记物SSEA4+/TRA181+和包括00、EcU、NEO、CZH和LDT1的额外因子组合中的一种的转染后20天的流式细胞测量分析。

[0080] 图28显示在第0天和第7天使用相应因子组合的双重转导重编程的细胞在第25天检测到的iPSC标记物SSEA4+/TRA181+。

具体实施方式

[0081] A.概述

[0082] 用于产生和维持多能细胞的现有方法暂时无法实现无印迹多能细胞的均匀培养物,而不会自发分化,且能够实现高分辨率/高克隆性单一细胞传代和大规模扩增。基态多能细胞可赋予克服这些挑战的品质和特征。然而,迄今为止,在无饲料条件下,不存在用于基态多能细胞的高通量生产的可靠或稳固的方法。因此,本领域中的现有方法可能不适用于产生工业或临床级别多能细胞。本发明在本文中涵盖解决稳固产生含有或具有基态多能性特征的稳定多能细胞的需要且解决制造适用于工业和临床用途的稳定多能细胞的问题。

[0083] 一般来说,本发明涉及用于改良制造多能细胞,尤其具有降低的自发分化的细胞,包括基态多能细胞的组合物和方法。更确切地说,本发明涉及以阶段特定方式利用蜂窝信号转导路径的小分子调节因子的多阶段培养平台,且实现多能细胞衍生且维持直到培养方法和衍生多能细胞方法不再为下游使用的可变性和/或选通活性的来源。此外,本文中涵盖的培养平台在无饲料条件下实现多能细胞的衍生和维持,其具有改良的基因组稳定性、改良的未分化状态、降低的自发分化、改良的培养均匀性、改良的培养存活率、解离以及单一多能细胞的传代,以及改良的无转基因或印迹再编程细胞到基态多能性的方法。因此,本文中涵盖的组合物和方法使得能够制造适于工业和临床用途的多能细胞和/或基态多能细胞。

[0084] 迄今为止,无小分子驱动平台证明增强再编程和支持衍生自人类细胞的无印迹诱导多能干细胞(iPSC)的单一细胞和FF培养(Nichols和Smith,2012)的能力。本文中涵盖的培养平台部分地提供以阶段特定方式应用小分子抑制剂的特定组合以实现多能干细胞的快速和稳固再编程和稳定长期培养。在各种实施例中,提供用于诱导或维持改良的未分化多能状态(包括基态多能性)的培养平台。本文中涵盖的平台还提供一种用于产生和维持人类iPSC(hiPSC)的基态多能性的稳固培养系统。在一个实施例中,培养平台实现再编程的无转基因或印迹方法。在特定实施例中,本文中涵盖的平台表示用于制造克服多重衍生物和维持无转基因hiPSC的关键挑战的hiPSC的改良方法。

[0085] 除非尤其相反指定,否则本发明的实践将采用本领域内的化学、生物化学、有机化学、分子生物学、微生物学、重组DNA技术、遗传学、免疫学、细胞生物学、干细胞方案、细胞培养和转基因生物学的常规方法,其中的多种出于说明的目的描述于下文中。在文献中全面解释了此类技术。参见例如Sambrook等人《分子克隆实验指南(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》(第3版,2001)。

[0086] 本文中引用的所有公开案、专利和专利申请以全文引用的方式并入本文中。

[0087] B. 定义

[0088] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语均具有与本发明本领域的一般技术人员通常所理解相同的含义。为了本发明的目的,下文定义以下术语。

[0089] 冠词“一个(种)(a/an)”和“所述”在本文中用来指所述冠词的一个或一个以上(即,至少一个)语法宾语。作为实例,“一元件”是指一个元件或一个以上元件。

[0090] 替代物(例如,“或”)的使用应理解为意指替代方案中的一者、两者或其任何组合。

[0091] 术语“和/或”应理解WEI意指替代方案中的一者或两者。

[0092] 如本文所使用,术语“约”或“大约”是指与参考数量、水准、值、数目、频率、百分比、维度、尺寸、量、重量或长度相比变化高达15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的数量、水准、值、数目、频率、百分比、维度、尺寸、量、重量或长度。在一个实施例中,术语“约”或“大约”是指关于参考数量、水准、值、数目、频率、百分比、维度、尺寸、量、重量或长度,数量、水准、值、数目、频率、百分比、维度、尺寸、量、重量或长度范围±15%、±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%或±1%。

[0093] 如本文所使用,术语“实质上”或“基本上”是指为参考数量、水准、值、数目、频率、百分比、维度、尺寸、量、重量或长度的约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更高的数量、水准、值、数目、频率、百分比、维度、尺寸、量、重量或长度。在一个实施例中,术语“基本上相同”或“实质上相同”是指与参考数量、水准、值、数目、频率、百分比、维度、尺寸、量、重量或长度大约相同的数量、水准、值、数目、频率、百分比、维度、尺寸、量、重量或长度范围。

[0094] 如本文所使用,术语“实质上不含”和“基本上不含”可互换使用,用当用于描述组合物,如细胞群体或培养基时,是指不含特定物质,如95%、96%、97%、98%、99%不含特定物质的组合物,或如通过常规手段测量为不可检测的。类似意义可应用于术语“不存在”,其中提及不存在组合物的特定物质或组分。

[0095] 如本文所使用,术语“可观的”是指可通过一种或多种标准方法容易地检测出的数量、水准、值、数目、频率、百分比、维度、尺寸、量、重量或长度或事件的范围。术语“非可观的”和“不可观的”和等效物是指通过标准方法不为容易检测或不可检测的数量、水准、值、数目、频率、百分比、维度、尺寸、量、重量或长度或事件的范围。在一个实施例中,如果其发生时间小于5%、4%、3%、2%、1%、0.1%、0.01%、0.001%或更短,那么事件不为可观的。

[0096] 在本说明书通篇中,除非上下文另外要求,否则措辞“包含(comprise/comprises/comprising)”应理解成暗示包括所陈述的步骤或要素或步骤或要素的群组,但不排除任何其它步骤或要素或步骤或要素的群组。在特定实施例中,术语“包括”、“具有”、“含有”和“包含”同义地使用。

[0097] “由……组成”打算包括且限于短语“由……组成”之后的任何事物。因此,短语“由……组成”指示所列要素为需要或必需的,且不能存在其它要素。

[0098] “基本上由……组成”打算包括短语后所列的任何要素,且限于不干扰或影响本发明中规定的所列要素的活性或作用的其它要素。因此,短语“主要由……组成”指示所列要素为需要或必需的,但其它要素是任选的且可视其是否影响所列要素的活性或作用而存在或不存在。

[0099] 贯穿本说明书提及“一个实施例”、“一实施例”、“特定实施例”、“相关实施例”、“某

一实施例”、“额外实施例”或“另一实施例”或其组合是指结合实施例描述的特定特征、结构或特征包括于本发明的至少一个实施例中。因此,贯穿本说明书中的各处出现的前述短语不一定全部参考同一实施例。此外,在一个或多个实施例中,特定特征、结构或特性可以任何合适方式组合。

[0100] 术语“或体外”一般是指在生物体外部发生的活动,如在生物体外部的人造环境(优选具有最低变化天然条件)中,在活组织之中或之上进行的实验或测量。在特定实施例中,“活体外”程序涉及通常在无菌条件下取自生物体且在实验室设备中培养的活细胞或组织,且典型地持续几小时或高达约24小时,但包括高达48或72小时,取决于情况。在某些实施例中,可采集和冷冻此类组织或细胞,且稍后解冻以便活体外处理。使用活细胞或组织持续时间长于几天的组织培养实验或程序典型地被视为“活体外”,但在某些实施例中,此术语可与活体外互换使用。

[0101] 术语“活体内”一般是指在生物体内部进行的活动。

[0102] 如本文所使用,术语“再编程”或“去分化”或“提高细胞效能”或“提高发育效能”是指一种提高细胞效能或使细胞去分化以减少分化状态的方法。举例来说,具有提高的细胞效能的细胞具有与非重编程状态下相同细胞相比更大的发育可塑性(即,可分化成较多细胞类型)。换句话说,重编程细胞为与非重编程状态下相同细胞相比分化状态减少的一种细胞。

[0103] 如本文所使用,术语“效能”是指可进入细胞的所有发育选项的总和(即,发育效能)。本领域的技术人员将认识到,细胞效能为连续区,在大部分塑性细胞、分化全能干细胞(其对最少的塑性细胞具有最大发育效能)、末端分化细胞(其具有最小发育效能)范围内。细胞效能的连续区包括(但不限于)分化全能细胞、多能细胞、多潜能细胞、寡能细胞、单能细胞和末端分化细胞。

[0104] 如本文所使用,术语“多能的”是指细胞形成主体或胞体(即,胚胎本身)的所有谱系的能力。举例来说,胚胎干细胞为一种类型的多能干细胞,其能够由三个病菌层中的每一个形成细胞:外胚层、中胚层和内胚层。

[0105] 多能性可部分地通过评定细胞的多能性特征测定。多能性特征包括(但不限于): (i) 多能干细胞形态; (ii) 无限自我更新的可能性; (iii) 多能干细胞标记物的表达,所述标记物包括(但不限于) SSEA1 (仅小鼠)、SSEA3/4; SSEA5、TRA1-60/81; TRA1-85、TRA2-54、GCTM-2、TG343、TG30、CD9、CD29、CD133/凸素(prominin)、CD140a、CD56、CD73、CD90、CD105、OCT4、NANOG、SOX2、CD30和/或CD50; (iv) 使所有三个体细胞谱系(外胚层、中胚层和内胚层)分化的能力; (v) 由三个体细胞谱系组成的畸胎瘤形成; 以及 (vi) 由来自三个体细胞谱系的细胞组成的胚状体的形成;

[0106] 此前已描述两种类型多能性:多能性的“预致敏”或“亚稳定”状态等效于后囊胚的外胚层干细胞(EpiSC),且多能性的“天然”或“基底”状态等效于早期/植入前囊胚的内部细胞块。尽管两种多能状态展现如上文所描述的特征,天然或基态进一步展现; (i) 雌性细胞中的X-染色体的前非活化或再活化; (ii) 在单一细胞培养期间改良的克隆性和存活率; (iii) DNA甲基化的总体降低; (iv) 沉积于发育监管基因启动子上的H3K27me3抑制性染色质标记的减少; 以及 (v) 相对于预致敏状态多能细胞,分化标记物的降低表达。细胞再编程的标准方法(其中将外源多能性基因引入到体细胞中,表达,且随后沉默或从所得多能细胞去

除)一般可见具有多能性的预致敏状态的特征。在标准多能细胞培养条件下,除非维持外源性转基因表达,此类细胞保持预致敏状态,其中观测到基态的特征。

[0107] 如本文所使用,术语“多能干细胞形态”是指胚胎干细胞的经典形态特征。正常胚胎干细胞形态的特征在于形状为圆形且较小,具有较高原子核与细胞质比率,核仁明显存在,且具有典型的细胞间间距。

[0108] 如本文所使用,术语“基因表达谱”、“基因表达标签”、“基因表达图”、“基因图”或“基因标签”是指用以区分一种细胞或细胞群体与另一种细胞或细胞群体的多种基因的表达或表达水准。举例来说,维持在培养基中以防止自发分化的多能细胞的群体可显示包含相对于未维持在相同培养基中的相同来源的多能细胞的对照群体分化基因的降低表达的基因表达谱。

[0109] 如本文所使用,术语“分化标记基因”或“分化基因”是指表达说明在细胞,如多能细胞内出现细胞分化的基因。分化标记基因包括(但不限于)以下基因:FOXA2、FGF5、SOX17、XIST、NODAL、COL3A1、OTX2、DUSP6、EOMES、NR2F2、NR0B1、CXCR4、CYP2B6、GATA3、GATA4、ERBB4、GATA6、HOXC6、INHA、SMAD6、RORA、NIPBL、TNFSF11、CDH11、ZIC4、GAL、SOX3、PITX2、APOA2、CXCL5、CER1、FOXQ1、MLL5、DPP10、GSC、PCDH10、CTCF、PCDH20、TSHZ1、MEGF10、MYC、DKK1、BMP2、LEFTY2、HES1、CDX2、GNAS、EGR1、COL3A1、TCF4、HEPH、KDR、TOX、FOXA1、LCK、PCDH7、CD1D、FOXG1、LEFTY1、TUBJ1、T基因(短尾基因)和ZIC3。

[0110] 如本文所使用,术语“分化标记基因谱”或“分化基因谱”、“分化基因表达谱”、“分化基因表达标签”、“分化基因表达图”、“分化基因图”或“分化基因标签”是指多种分化标记基因的表达或表达水准。

[0111] 在特定实施例中,显示自发分化降低的多能细胞的群体的特征可在于分化标记基因或分化标记基因谱的表达减少。举例来说,可指定多能细胞或多能细胞群体中降低的自发分化,其中给定组培养条件造成一种或多种分化标记基因表达与不具有相同培养条件的对照多能细胞或多能细胞群体的分化标记基因表达相比降低至少10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。

[0112] 如本文所使用,“基因表达”是指生物样品,如多能细胞或包含多能细胞的细胞群体中的基因的表达和/或表达模式的相对水平。在特定实施例中,多能细胞为iPSC。

[0113] 本文中涵盖用于检测表征本发明的细胞的基因表达的本领域中可用的任何方法。如本文所使用,术语“检测表达”是指测定RNA转录物或其基因表达产物的数量或存在。用于检测基因表达,即,基因表达谱分析的方法包括基于多核苷酸杂交分析的方法、基于多核苷酸测序的方法、免疫组织化学方法和基于蛋白质组研究的方法。所述方法一般检测相关基因的表达产物(例如mRNA)。在一些实施例中,使用基于PCR的方法,如逆转录PCR(RT-PCR)(Weis等人,TIG 8:263-64,1992);和基于阵列的方法,如微阵列(Schena等人,《科学(Science)》270:467-70,1995)。

[0114] “粘着”是指细胞附着到容器上,例如在适当的培养基存在下细胞附着到无菌塑料(或经涂布的塑料)细胞培养盘或烧瓶上。某些类别细胞不持续或并不在培养物中生长,除非其粘着于细胞培养容器上。某些类别细胞(“非粘着性细胞”)在培养物中维持和/或增殖,而无粘着。

[0115] “培养”或“细胞培养”是指在活体外环境中细胞的维持、生长和/或分化。“细胞培

养基”、“培养基”（在各情况下，单个“培养基”）、“补充剂”和“培养基补充剂”是指培养细胞培养物的营养组合物。

[0116] “培养”是指例如在无菌塑料（或经涂布的塑料）细胞培养盘或烧瓶中组织或主体外部的细胞的维持、繁殖（生长）和/或分化。“培养”可利用培养基作为有助于繁殖和/或维持细胞的养分、激素和/或其它因子的来源。

[0117] 如本文所使用，“解离”细胞是指已实质上与其它细胞或表面（例如培养板表面）分离或纯化的细胞。举例来说，细胞可通过机械或酶方法从动物或组织解离。替代地，活体外聚集的细胞可彼此解离，如通过以酶促或机械方式解离到群集、单一细胞或单一细胞与群集的混合物的悬浮液中。在又一替代实施例中，粘着细胞从培养板或其它表面解离。因此，解离可能涉及破坏与胞外基质（ECM）和衬底（例如培养表面）的细胞相互作用，或破坏细胞之间的ECM。

[0118] 如本文所使用，术语“富集(enrich)”和“富集(enriching)”是指组合物，如细胞组合物中的特定组分的量提高，且当使用“富集”来描述细胞，如细胞群体的组合物时，是指相比于富集之前细胞群体中此类组分的比例，细胞群体具有量成比例提高的特定组分。举例来说，相对于靶细胞类型（即，具有特定特征的细胞），如细胞群体的组合物可富集，因此相比于富集之前细胞群体中存在的靶细胞的比例，具有提高比例或百分比的靶细胞类型。细胞群体可通过本领域中已知的细胞选择和分选方法相对于靶细胞类型富集。在一些实施例中，细胞群体通过如本文实例中所描述的分选或选择方法富集。在一个特定实施例中，使靶细胞群体富集的方法使细胞群体相对于靶细胞群体富集至少约20%，意味着富集的细胞群体成比例地包含比群体富集之前的群体多约20%的靶细胞类型。在一个实施例中，相对于靶细胞群体富集的方法使细胞群体相对于靶细胞群体成比例地富集至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%，或至少约99.5%，或在特定实施例中，约99.9%。

[0119] 在某些实施例中，细胞群体相对于多能细胞或展现多能性特征的细胞的量富集。在本发明的特定实施例中，经受再编程的细胞群体相对于具有多能性特征，如包括（但不限于）SSEA3、SSEA4、TRA 1-60、TRA-1-81、CD30或CD50的多能性标记物表达的靶细胞富集。

[0120] 在特定实施例中，使用对可包括（例如）CD13、CD26、CD34、CD45、CD31、CD46或CD7的分化细胞谱系或非多能细胞具有特异性的表面标记物，使细胞群体，如经受再编程的细胞群体中的非多能细胞耗尽。所得细胞群体可因此描述为多能细胞富集的细胞群体。

[0121] 在特定实施例中，富集细胞包含相异的基因或蛋白质表达谱，例如至少两种多能性标记物，如SSEA3、SSEA4、TRA 1-60、TRA-1-81、CD30和CD50的细胞表面表达。在一些实施例中，富集细胞包含两种或更多种多能性标记物。在特定实施例中，富集细胞表达SSEA4与TRA-181或TRA-160。在更特定的实施例中，富集细胞表达SSEA4、TRA181和CD30。在一个实施例中，细胞群体包含至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、70%、75%、80%、90%、95%、97%、98%或99%的富集细胞，如多能细胞。

[0122] 因此，在一些实施例中，使细胞群体富集多能细胞的方法包含基于多能性标记物，如SSEA3、SSEA4、TRA 1-60、TRA-1-81、CD30和CD50的细胞表面表达，分选细胞群体，以及采集表达此类标记物的细胞馏份以获得多能细胞富集的细胞群体。在其它实施例中，通过基于分化中的或已分化细胞的标记物，如CD13、CD26、CD34、CD45、CD31、CD46和CD7的细胞表面

表达分选细胞群体,且使此类细胞的细胞群体耗尽以获得多能细胞富集的细胞群体,使细胞群体富集多能细胞。在特定实施例中,基于CD13的表达,分选细胞群体,且从细胞群体去除CD13⁺细胞以获得多能细胞富集的细胞群体。

[0123] 如本文所使用,“饲养细胞”或“饲料”为用于描述与第二类型的细胞共培养的一种类型的细胞的术语以提供第二类型的细胞可生长的环境,因为饲养细胞提供支持第二细胞类型的生长因子和养分。饲养细胞任选地来自与其支持的细胞不同的物质。举例来说,某些类型人类细胞,包括干细胞可通过小鼠胚胎成纤维细胞和永生化小鼠胚胎成纤维细胞的主要培养物支持。当与其它细胞共培养时,饲养细胞可典型地通过照射或用如丝裂霉素c的抗有丝分裂剂处理灭活以防止其生长超出其支持的细胞。不限于前述,一种特定饲养细胞类型可为人类饲料,如人类皮肤成纤维细胞。另一饲养细胞类型可为小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)。

[0124] 如本文所使用,“无饲料”(FF)环境是指基本上不含饲养细胞和/或尚未通过饲养细胞的培养预调节的环境,如细胞培养物或培养基。“预调节”培养基是指在培养基内培育饲养细胞一段时间,如至少一天之后收集的培养基。预调节培养基含有多种介体物质,包括在培养基中培育的饲养细胞分泌的生长因子和细胞因子。

[0125] 基因组稳定性是指细胞精确地复制DNA且维持DNA复制过程的完整性的能力。如本文所使用,术语“基因组稳定细胞”和“具有基因组稳定性的细胞”是指展现基本上与相对于正常体细胞人类细胞的突变和染色体畸变频率类似的突变和染色体畸变(如易位、非整倍体、拷贝数变化和复制)频率。

[0126] “成分”是指可用于细胞培养基中以维持和/或促进细胞生长和/或分化的化学或生物学来源的任何化合物或其它材料。术语“组分”、“养分”和“成分”可互换使用。用于细胞培养基的常规成分可包括但不限于氨基酸、盐、金属、糖、脂质、核酸、激素、维生素、脂肪酸、蛋白质和其类似者。本领域的一般技术人员可视所需作用需要来选择促进和/或维持活体外细胞的培养的其它成分。

[0127] “分离(isolate)”或“分离(isolate)”是指从天然环境分离和采集组合物或材料,如从组织或主体分离个别细胞或细胞培养物。在一个方面中,细胞的群体或组合物实质上不含在自然界中可能与其相连的细胞和材料。相对于细胞的目标群体,“分离”或“纯化”或“实质上纯的”是指相对于构成总细胞群体的靶细胞至少约50%、至少约75%、至少约85%、至少约90%和在特定实施例中,至少约95%纯的细胞群体。可通过本领域中众所周知的适当的方法评估细胞的群体或组合物的纯度。举例来说,实质上纯的多能细胞群体是指相对于构成总细胞群体的多能细胞至少约50%、至少约75%、至少约85%、至少约90%和在特定实施例中至少约95%且在某些实施例中约98%纯的细胞群体。术语“基本上纯的”在本文中可与“实质上纯的”互换使用。

[0128] “传代(passage)”或“传代(passaging)”是指当细胞增殖到所需程度时,使细胞再分和接种到多重的细胞培养表面或容器中的行为。在一些实施例中,“传代(passage)”或“传代(passaging)”是指使细胞再分、稀释和接种。当细胞从初代培养表面或容器传代到后续组表面或容器中时,后续培养物可在本文中称为“第二培养物”或“第一代”等。再分和接种到新培养容器中的每次行为考虑为一次传代。

[0129] “接种”是指将一个或多个细胞放置到培养容器中以使得细胞粘着于且扩散在细

胞培养容器上。

[0130] “多能性因子”是指能够单独或与其它试剂组合提高细胞发育效能的试剂。多能性因子包括(但不限于)能够提高细胞发育效能的多核苷酸、多肽和小分子。示例性多能性因子包括例如转录因子和小分子再编程试剂。

[0131] “增殖”是指一种细胞分裂成两个基本上相同的细胞或数目提高(例如再生)的细胞群体的特性。

[0132] “增长”是指在组织或主体外部,例如在如塑料(或经涂布的塑料)细胞培养盘或烧瓶的无菌容器中使细胞生长(例如经由细胞增殖复制)。

[0133] “初代培养物”是指在将经分离的细胞放置于具有培养基的第一培养容器中的情况下的细胞、组织和/或培养物。细胞、组织和/或培养物可为持续的和/或可增殖,然而,只要细胞、组织和/或培养物保持在第一容器中,细胞、组织和/或培养物称为初代培养物。

[0134] 术语“小分子再编程试剂”或“小分子再编程化合物”在本文中可互换使用且是指可单独或与其它多能性因子组合提高细胞发育效能的小分子。“小分子”是指分子量小于约5kD、小于约4kD、小于约3kD、小于约2kD、小于约1kD或小于约0.5kD的试剂。小分子包括(但不限于):核酸、肽模拟物、类肽、碳水化合物、脂质或其它有机或无机分子。化学和/或生物学混合物,如真菌、细菌或海藻提取物的库为本领域中已知的,且在某些实施例中,可用作小分子来源。在特定实施例中,本文所使用的小分子再编程试剂具有小于10,000道尔顿,例如小于8000、6000、4000、2000道尔顿,例如50到1500、500到1500、200到2000、500到5000道尔顿之间的分子量。

[0135] 感染倍率(MOI)是指在感染期间每个细胞添加的病毒粒子数目。如果将一百万个病毒粒子添加到一百万细胞中,那么MOI为一。如果添加一千万个病毒粒子,那么MOI为十。添加100,000病毒粒子,且MOI为0.1。

[0136] C. 细胞

[0137] 在一个特定实施例中,一种或多种细胞可使用本文中涵盖的组合物和方法培养、解离和传代。在一个实施例中,单一细胞使用本文中涵盖的组合物和方法培养、解离和传代。在另一实施例中,细胞群体或多种细胞使用本文中涵盖的组合物和方法培养、解离和传代。

[0138] 适用于特定实施例中的起始细胞群体可基本上衍生自任何适合的来源,且可相对于细胞类型或多能性状态为非均匀或均匀的。适合的细胞包括胚胎细胞和成年细胞。另外,适合的细胞可为例如啮齿动物、猫、狗、猪、山羊、绵羊、马、牛或灵长类动物来源的哺乳动物。在一个实施例中,所述细胞为人类细胞。

[0139] 细胞可为躯体的、非多能的、不完全地或部分多能干细胞、多潜能细胞、寡能细胞、单能细胞、末端分化细胞或包含前述的任何组合的细胞的混合群体。适用于特定实施例中的多能细胞包括(但不限于)天然存在的干细胞、胚胎干细胞或iPSC。细胞的“混合”群体为具有不同程度发育效能的细胞群体。举例来说,细胞的混合群体可包含经受再编程的细胞,以使得混合群体包含多能细胞、部分多能细胞和非多能细胞,如完全分化细胞。

[0140] 在一个实施例中,细胞的起始群体选自成人或新生儿干/祖细胞。在特定实施例中,干/祖细胞的起始群体选自由以下各者组成的群组:中胚层干/祖细胞、内胚层干/祖细胞和外胚层干/祖细胞。

[0141] 中胚层干/祖细胞的说明性实例包括(但不限于):中胚层干/祖细胞、内皮干/祖细胞、骨髓干/祖细胞、脐带干/祖细胞、脂肪组织衍生的干/祖细胞、造血干/祖细胞(HSC)、间叶细胞干/祖细胞、肌肉干/祖细胞、肾脏干/祖细胞、成骨细胞干/祖细胞、软骨细胞干/祖细胞和其类似者。

[0142] 外胚层干/祖细胞的说明性实例包括(但不限于)神经干/祖细胞、视网膜干/祖细胞、表皮干/祖细胞和其类似者。

[0143] 内胚层干/祖细胞的说明性实例包括(但不限于)肝脏干/祖细胞、胰腺干/祖细胞、上皮干/祖细胞和其类似者。

[0144] 在某些实施例中,细胞的起始群体可为细胞的非均匀或均匀群体选自以下组成的群组:胰岛细胞、CNS细胞、PNS细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞、造血细胞、骨细胞、肝细胞、脂肪细胞、肾脏细胞、肺脏细胞、软骨细胞、表皮细胞、滤泡性细胞、血管细胞、上皮细胞、免疫细胞、内皮细胞和其类似者。

[0145] D. 用于减少自发分化和诱导基态多能性的培养平台

[0146] 细胞储备、疾病建模和细胞疗法应用对制造高质量多能细胞的需求逐渐提高。举例来说,无印迹iPSC的高通量衍生物和其在允许规模生产的系统中扩增在技术上仍为难以实现的。在特定实施例中,涵盖在阶段特定培养基组合物中使用小分子路径抑制剂,允许多能细胞的快速并联生产、选择和扩增的培养平台。本文中涵盖的平台支持在完全无饲料环境中使用极小再编程因子的有效且加速的再编程;实现单一细胞培养和多能细胞扩增,而维持均匀和基因组稳定多能的群体。此外,本文中涵盖的培养平台提供培养多能细胞(包括hESC和hiPSC)以降低自发分化状态和多能性通用基态,与基因背景无关且独立于转基因表达。

[0147] 本文中涵盖的培养平台部分地适用于产生在培养物中具有降低的自发分化工业或临床级别多能细胞。在一个实施例中,诱导非多能细胞以成为多能细胞且经培养以维持多能性。在另一实施例中,诱导非多能细胞以成为多能细胞且经培养以实现和/或维持在培养物中的降低的自发分化。在另一实施例中,诱导非多能细胞以成为多能细胞且经培养以实现和/或维持基态多能性。

[0148] 在各种实施例中,本文中涵盖的培养平台维持一种或多种多能细胞的基态多能性、正常核型和基因组稳定性持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100或更多代,包括任何中间数目的代数。

[0149] 在其它实施例中,本文中涵盖的培养平台维持一种或多种多能细胞中的降低的自发分化持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100或更多代,包括任何中间数目的代数。

[0150] 在一个实施例中,培养平台包含细胞培养基,其包含细胞培养基和GSK-3抑制剂、MEK抑制剂和Rho激酶(ROCK)抑制剂。在各种实施例中,本文中涵盖的细胞培养基并不包含TGF β /活化素信号传导路径的抑制剂,包括TGF β 受体(TGF β R)抑制剂和ALK5抑制剂。不希望受任何特定理论束缚,本发明人出人意料地发现,尽管TGF β R/ALK5抑制剂提高再编程效率,这些抑制剂抵消多能细胞群体的长期维持、质量和均匀性,即TGF β 路径信号传导的抑制改

良细胞再编程效率,但需要之后在活体外培养物系统中,尤其在使用无饲料细胞和单一细胞的系统中,维持多能细胞群体来释放此抑制,其中具有降低的自发分化的均匀多能群体的酶传代为优选的,且更尤其其中不存在转基因表达。如本文所使用,如所测量的术语“长期的”不限于传代数,通常是指至少10、15、20、25、30、35、40、45、50或更多代。如所定义,“传代”是指当细胞增殖到所需程度时,使细胞再分和接种到多重细胞培养表面或容器中的行为。另外,在包含如本文所公开的GSK-3抑制剂和MEK抑制剂以及任选地ROCK抑制剂,但不具有TGF β R/ALK5抑制剂的培养基中培养亚稳定的多能细胞转变多能细胞以实现降低的自发分化和/或实现基态多能性。本文中涵盖的培养基平台也能够无饲料环境中实现多能细胞的有效再编程和长期培养。另外,尽管“ALK5抑制剂”不意图涵盖非特异性激酶抑制剂,“ALK5抑制剂”应理解为涵盖除ALK5外还抑制ALK4和/或ALK7的抑制剂,例如SB-431542(参见例如Inman等人,《分子药理学杂志(J Mol. Pharmacol.)》62(1):65-74(2002))。

[0151] 在优选实施例中,培养平台包含细胞培养基,其包含GSK-3抑制剂、MEK抑制剂、Rho激酶(ROCK)抑制剂以及任选地LIF和/或bFGF,且不包含TGF β /活化素信号传导路径的小分子抑制剂,包括(但不限于)TGF β R或ALK5抑制剂。

[0152] 在额外实施例中,细胞培养基实质上不含细胞因子和/或生长因子,且任选地为无饲料环境。在其它实施例中,细胞培养基含有补充剂,如血清、提取物、生长因子、激素、细胞因子和其类似者。

[0153] 在一个优选实施例中,培养平台包含无饲料培养物。

[0154] 本文中涵盖的培养平台也提供大量优点,如制造具有降低的自发分化的工业或临床级别多能细胞的均匀群体,和/或获得基态多能性。如本文所使用,术语“均匀”是指细胞群体,其中各细胞与群体中的其它细胞相同或实质上相同。在一个实施例中,如果各细胞表达如本文所预期的相同多能性标记物中的一种或多种,例如SSEA4和TRA1-81,那么细胞与群体中的其它细胞相同。在一个实施例中,如果至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更多细胞与群体中的其它细胞相同或实质上相同,那么群体为均匀的。

[0155] 1. TGF β 受体/ALK5抑制剂

[0156] TGF β 受体(例如ALK5)抑制剂可包括TGF β 受体(例如ALK5)的显性失活变异体抗体和抑制TGF β 受体表达的反义核酸。示例性TGF β 受体/ALK5抑制剂包括(但不限于)SB431542(参见例如Inman等人,《分子药理学(Molecular Pharmacology)》62(1):65-74(2002));A-83-01,其也称为3-(6-甲基-2-吡啶基)-N-苯基-4-(4-喹啉基)-1H-吡唑-1-硫代碳酰胺(参见例如Tojo等人,《癌症科学(Cancer Science)》96(11):791-800(2005)且可购自例如托克里斯生命科学(Toicris Bioscience));2-(3-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,5-萘啶、Wnt3a/BIO(参见例如Dalton等人,WO2008/094597,其以引用的方式并入本文中);BMP4(参见上文Dalton);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等人,《医药化学杂志(Journal of Medicinal Chemistry)》49(7):2210-2221(2006));SM16(参见例如Suzuki等人,《癌症研究(Cancer Research)》67(5):2351-2359(2007));IN-1130(3-((5-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(喹啉-6-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)苯甲酰胺)(参见例如Kim等人,《外来物(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 Gouvillie等人,《药物新闻视角(Drug News Perspective)》19(2):85-90(2006));SB-505124(2-(5-苯并[1,3]二氧杂环戊烯-5-基-2-叔丁基-3H-咪唑-4-基)-6-甲基吡啶盐酸盐) (参见例如DaCosta等人,《分子药理学》65(3):744-752(2004));以及嘧啶衍生物(参见例如Stiefl等人的W02008/006583中列出的那些,其以引用的方式并入本文中)。另外,尽管“ALK5抑制剂”不意图涵盖非特异性激酶抑制剂,“ALK5抑制剂”应理解为涵盖除ALK5外还抑制ALK4和/或ALK7的抑制剂,例如SB-431542(参见例如Inman等人,《分子药理学杂志》62(1):65-74(2002))。不希望限制本发明的范围,据相信,ALK5抑制剂影响间质向上皮转化/转变(MET)的过程。TGFβ/活化素路径为上皮向间质转变(EMT)的驱动子。因此,抑制TGFβ/活化素路径可促进MET(即,再编程)过程。

[0157] 鉴于显示抑制ALK5的作用的本文中的数据,据相信,抑制TGFβ/活化素路径将具有抑制ALK5的类似作用。因此,TGFβ/活化素路径的任何抑制剂(例如上游或下游)可与如本文各段落中所描述的ALK5抑制剂组合或替代使用。示例性TGFβ/活化素路径抑制剂包括(但不限于):TGFβ受体抑制剂、SMAD 2/3磷酸化的抑制剂、SMAD 2/3和SMAD 4的相互作用的抑制剂以及SMAD 6和SMAD 7的活化剂/促效剂。此外,下文所描述的分类仅出于组织目的且本领域的技术人员将知道,化合物会影响路径内的一个或多个点,且因此化合物可能在限定类别中超过一个方面起作用。

[0158] TGFβ受体(TGFβR)抑制剂可包括靶向TGFβ受体的显性失活变异体抗体和靶向TGFβ受体的siRNA或反义核酸。TGFβ受体抑制剂的特定实例包括(但不限于)SU5416;2-(5-苯并[1,3]二氧杂环戊烯-5-基-2-叔丁基-3H-咪唑-4-基)-6-甲基吡啶盐酸盐(SB-505124);乐迪木单抗(lerdelimab)(CAT-152);美替木单抗(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'-五羟基黄酮(桑色素(Morin));活化素-M108A;P144;可溶性TBR2-Fc;以及靶向TGFβ受体的反义经转染肿瘤细胞。(参见例如Wrzesinski等人,《临床癌症研究(Clinical Cancer Research)》13(18):5262-5270(2007);Kaminska等人,《生物化学真菌学报(Acta Biochimica Polonica)》52(2):329-337(2005);以及Chang等人,《生物科学前沿杂志(Frontiers in Bioscience)》12:4393-4401(2007)。

[0159] SMAD 2/3磷酸化的抑制剂可包括靶向SMAD2或SMAD3的显性失活变异体抗体和反义核酸。抑制剂的特定实例包括PD169316;SB203580;SB-431542;LY364947;A77-01;以及3,5,7,2',4'-五羟基黄酮(桑色素)。(参见例如上文Wrzesinski;上文Kaminska;Shimanuki等人,《致癌基因(Oncogene)》26:3311-3320(2007);以及Kataoka等人的EP1992360,其以引用的方式并入本文中)。

[0160] SMAD 2/3和smad4的相互作用的抑制剂可包括靶向SMAD2、SMAD3和/或smad4的显性失活变异体抗体和反义核酸。SMAD 2/3和SMAD4的相互作用的抑制剂的特定实例包括(但不限于)Trx-SARA、Trx-xFoxH1b和Trx-Lef1。(参见例如Cui等人,《致癌基因》24:3864-3874(2005)和Zhao等人,《细胞分子生物学(Molecular Biology of the Cell)》,17:3819-3831(2006)。

[0161] SMAD 6和SMAD 7的活化剂/促效剂包括(但不限于)靶向SMAD 6或SMAD 7的显性失活变异体抗体和反义核酸。抑制剂的特定实例包括(但不限于)smad7-as PT0-寡核苷酸。

(参见例如Miyazono等人的US6534476和Steinbrecher等人的US2005119203,两者都以引用的方式并入本文中)。

[0162] 2.WNT路径促效剂

[0163] 如本文所使用,术语“Wnt信号促进剂”、“Wnt路径活化剂”或“Wnt路径促效剂”是指Wnt信号传导路径的促效剂,包括(但不限于)Wnt1、Wnt2、Wnt2b/13、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt7c、Wnt8、Wnt8a、Wnt8b、Wnt8c、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、Wnt14、Wnt15或Wnt16中的一种或多种促效剂。Wnt路径促效剂进一步包括(但不限于)以下多肽或其片段中的一个或多个:Dkk多肽、新月多肽、刻耳柏洛斯(cerberus)多肽、轴蛋白多肽、Frzb多肽、T细胞因子多肽或显性失活散乱多肽。

[0164] Wnt路径促效剂的非限制性实例进一步包括以下各者中的一个或多个:包含编码Wnt多肽的核苷酸序列的核酸、包含Wnt多肽氨基酸序列的多肽、包含编码活化Wnt受体的核苷酸序列的核酸、包含活化Wnt受体氨基酸序列的多肽、促进Wnt/ β -连环蛋白信号传导的较小有机分子、抑制Wnt拮抗剂表达或活性的较小有机分子、抑制Wnt拮抗剂表达的反义寡核苷酸、抑制Wnt拮抗剂表达的核糖核酸酶、RNAi构建体、siRNA或抑制Wnt拮抗剂表达的shRNA、结合于且抑制Wnt拮抗剂活性的抗体、包含编码 β -连环蛋白多肽的核苷酸序列的核酸、包含 β -连环蛋白多肽氨基酸序列的多肽、包含编码Lef-1多肽的核苷酸序列的核酸、包含Lef-1多肽氨基酸序列的多肽。

[0165] Wnt路径促效剂进一步包括GSK3抑制剂,例如包含编码显性失活GSK-3、GSK3 α 或GSK3 β 多肽的核苷酸序列的核酸;包含显性失活GSK-3、GSK3 α 或GSK3 β 多肽氨基酸序列的多肽;结合于且抑制GSK-3、GSK3 α 或GSK3 β 的表达或活性的较小有机分子;结合于且抑制GSK-3、GSK3 α 或GSK3 β 的表达和/或活性的RNAi构建体、siRNA或shRNA;结合于且抑制GSK-3、GSK3 α 或GSK3 β 的表达的反义寡核苷酸;结合于且抑制GSK-3、GSK3 α 或GSK3 β 的表达和/或活性的抗体;结合于且抑制GSK-3、GSK3 α 或GSK3 β 的表达的核糖核酸酶;以及使作用上类似于GSK-3抑制的活化 β -连环蛋白靶基因的任何GSK-3非依赖性反应剂。

[0166] 3.GSK-3 β 抑制剂

[0167] GSK-3 β 抑制剂为适用于本文中涵盖的组合物中的特定示例性Wnt路径促效剂,且可包括(但不限于)多核苷酸、多肽和小分子。本文中涵盖的GSK-3 β 抑制剂可能降低GSK-3 β 表达和/或GSK-3 β 活性。本文中涵盖的GSK-3 β 抑制剂的说明性实例包括(但不限于)抗GSK-3 β 抗体、显性失活GSK-3 β 变体、靶向GSK-3 β 的siRNA、shRNA、miRNA和反义核酸。

[0168] 其它说明性GSK-3 β 抑制剂包括(但不限于):坎帕罗酮(Kenpauillone)、氮杂坎帕罗酮(1-Azakenpauillone)、CHIR99021、CHIR98014、AR-A014418、CT 99021、CT 20026、SB216763、AR-A014418、锂、SB 415286、TDZD-8、BIO、BIO-丙酮肟、(5-甲基-1H-吡唑-3-基)-(2-苯基喹唑啉-4-基)胺、吡啶并咪唑-环戊二烯基钌络合物、TDZD-8 4-苯甲基-2-甲基-1,2,4-噻二唑啉-3,5-二酮、2-巯基(3-碘苯甲基)-5-(1-吡啶基)-[1,3,4]-噁二唑、OTDZT、 α -4-二溴苯乙酮、AR-A0144-18、3-(1-(3-羟丙基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)-4-吡啶-2-基-吡咯-2,5-二酮;TWS1 19吡咯并咪唑化合物、L803 H-KEAPPAPPQSpP-NH₂或其豆蔻酰化形式;2-氯-1-(4,5-二溴-噻吩-2-基)-乙酮;GF109203X;R0318220;TDZD-8;TIBPO;以及OTDZT。

[0169] 在特定说明性实施例中,GSK-3 β 抑制剂为CHIR99021、BIO或坎帕罗酮。

[0170] 在优选实施例中,GSK-3 β 抑制剂为CHIR99021。

[0171] 4. ERK/MEK抑制剂

[0172] 适用于本文中涵盖的组合物中的ERK/MEK抑制剂包括(但不限于)多核苷酸、多肽和小分子。本文中涵盖的ERK/MEK抑制剂可降低MEK或ERK表达和/或MEK或ERK活性。本文中涵盖的MEK/ERK抑制剂的说明性实例包括(但不限于)抗MEK或抗ERK抗体、显性失活MEK或ERK变异体、靶向MEK或ERK的siRNA、shRNA、miRNA和反义核酸。

[0173] 其它说明性ERK/MEK抑制剂包括(但不限于)PD0325901、PD98059、U0126、SL327、ARRY-162、PD184161、PD184352、舒尼替尼(sunitinib)、索拉非尼(sorafenib)、凡德他尼(Vandetanib)、帕唑帕尼(pazopanib)、阿西替尼(Axitinib)、GSK1120212、ARRY-438162、R05126766、XL518、AZD8330、RDEA119、AZD6244、FR180204和PTK787。

[0174] 额外说明性MEK/ERK抑制剂包括国际公布专利申请WO 99/01426、WO 02/06213、WO 03/077914、WO 05/051301和WO2007/044084中所公开的那些化合物。

[0175] MEK/ERK抑制剂的其它说明性实例包括以下化合物:6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-5-羧酸(2,3-二羟基-丙氧基)-酰胺;6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-(四氢-吡喃-2-基甲-基)-3H-苯并咪唑-5-羧酸(2-羟基-乙氧基)-酰胺;1-[6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-5-基]-2-羟基-乙酮;6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-5-羧酸(2-羟基-1,1-二甲基-乙氧基)-酰胺;6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-(四氢-呋喃-2-基-甲基)-3H-苯并咪唑-5-羧酸(2-羟基-乙氧基)-酰胺;6-(4-溴-2-氟-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-5-羧酸(2-羟基-乙氧基)-酰胺;6-(2,4-二氯-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-5-羧酸(2-羟基-乙氧基)-酰胺;6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-5-羧酸(2-羟基-乙氧基)-酰胺(在下文中称为MEK抑制剂1);2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-N-(2-羟乙氧基)-1,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢吡啶-3-羧酰胺(在下文中称为MEK抑制剂2);以及4-(4-溴-2-氟苯基氨基)-N-(2-羟乙氧基)-1,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢哒嗪-3-羧酰胺或其医药学上可接受的盐。

[0176] 在优选实施例中,MEK/ERK抑制剂为PD98059。

[0177] 5. ROCK抑制剂

[0178] Rho相关激酶(ROCK)为提供Rho激酶下游效应子的丝氨酸/苏氨酸激酶(其中三种同功异型物存在--RhoA、RhoB和RhoC)。适用于本文中涵盖的组合物中的ROCK抑制剂包括(但不限于)多核苷酸、多肽和小分子。本文中涵盖的ROCK抑制剂可降低ROCK表达和/或ROCK活性。本文中涵盖的ROCK抑制剂的说明性实例包括(但不限于)抗ROCK抗体、显性失活ROCK变异体、靶向ROCK的siRNA、shRNA、miRNA和反义核酸。

[0179] 本文中涵盖的说明性ROCK抑制剂包括(但不限于):噻唑维(thiazovivin)、Y27632、法舒地尔(Fasudil)、AR122-86、Y27632 H-1152、Y-30141、Wf-536、HA-1077、羟基-HA-1077、GSK269962A、SB-772077-B、N-(4-吡啶基)-N'-(2,4,6-三氯苯基)脲、3-(4-吡啶基)-1H-吡啶和(R)-(+)-反式-N-(4-吡啶基)-4-(1-氨基乙基)-环己烷甲酰胺和美国专利第8,044,201号(其以全文引用的方式并入本文中)中所公开的ROCK抑制剂。

[0180] 在一个实施例中,ROCK抑制剂为噻唑维、Y27632或吡啶特(pyrintegrin)。

[0181] 在优选实施例中,ROCK抑制剂为噻唑维。

[0182] 本文中涵盖的组合物和细胞培养基中的小分子的量可根据特定培养条件改变且可优化,所述培养条件包括所使用的特定分子和组合、在培养基中经培养的细胞类型以及特定应用。在一个实施例中,小分子以足以诱导多能性,改进再编程效率,提高或维持细胞效能,或诱导或维持基态多能性的浓度存在于组合物中。

[0183] 在特定实施例中,优选的浓度和本发明的细胞培养基中的小分子组合显示于表1中作为去向维持培养基(FMM)。培养基的组分可以表1中所显示的最佳浓度周围的最佳范围内的量存在于培养基中。去向再编程培养基(FRM)适用于本文中涵盖的包括细胞再编程的培养平台,但不适用于基态多能细胞的建立和长期维持。

[0184] 表1

常规 hESC 培养基 (Conv.)	去向再编程培养基 (FRM)	去向维持培养基 (FMM)
DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12
基因剔除血清置换 (20%)	基因剔除血清置换 (20%)	基因剔除血清置换 (20%)
	N2 (1×)	
	B27 (1×)	
谷氨酰胺 (1×)	谷氨酰胺 (1×)	谷氨酰胺 (1×)
非必需氨基酸 (1×)	非必需氨基酸 (1×)	非必需氨基酸 (1×)
[0185] β -巯基乙醇 (100 μ M)	β -巯基乙醇 (100 μ M)	β -巯基乙醇 (100 μ M)
bFGF (10 ng/mL)	bFGF (100 ng/mL)	bFGF (100 ng/mL)
	LIF (10 ng/mL)	LIF (10 ng/mL)
	噻唑维 (5.0 μ M)	噻唑维 (5.0 μ M)
	PD0325901 (0.4 μ M)	PD0325901 (0.4 μ M)
	CHIR99021 (1.0 μ M)	CHIR99021 (1.0 μ M)
	SB431542 (2.0 μ M)	
与 MEF 饲养细胞组合	无饲料, 与基质胶或玻璃连结蛋白组合	

[0186] 6. 细胞因子和生长因子

[0187] 在特定实施例中,本发明的细胞培养基实质上不含细胞因子和/或生长因子。在某些实施例中,细胞培养基含有一种或多种补充剂,包括(但不限于)血清、提取物、生长因子、激素、细胞因子和其类似者。

[0188] 在一个示例性实施例中,培养基可包含以下各者中的一种或多种:ECM蛋白质、层粘连蛋白1、纤维结合蛋白、胶原蛋白IV同型、蛋白酶、蛋白酶抑制剂、细胞表面粘着蛋白质、细胞信号传导蛋白质、钙粘蛋白、氯化物细胞内通道1、跨膜受体PTK7、胰岛素样生长因子或抑制素 β A,但不包含TGF β /活化素/结点信号传导路径或活化素A的诱导物。在其它实施例中,培养基可包含TGF β /活化素/结点信号传导路径的诱导物。

[0189] 在另一示意性实施例中,培养基包含以下细胞因子或生长因子中的一个或多个:表皮生长因子(EGF)、酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)、碱性纤维母细胞生长因子(bFGF)、白血病抑制性因子(LIF)、肝细胞生长因子(HGF)、胰岛素样生长因子1(IGF-1)、胰岛素样生长因子2(IGF-2)、角质细胞生长因子(KGF)、神经生长因子(NGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、转化生长因子 β (TGF- β)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)传递蛋白、各种介白素(如IL-1到IL-18)、各种群落刺激因子(如粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF))、各种干扰素(如IFN- γ)和对如干细胞因子(SCF)的干细胞具有作用的其它细胞因子以及红血球生成

素(Epo)。这些细胞因子可商业上,例如由安迪生物公司(R&D Systems)(美国明尼苏达州明尼阿波利斯)获得,且可为天然或重组的。在特定实施例中,可以本文中涵盖的浓度添加生长因子和细胞因子。在某些实施例中,生长因子和细胞因子可以凭经验测定或通过现有细胞因子领域指导的浓度添加。

[0190] 7. 培养衬底

[0191] 任何适合的容器或细胞培养容器可用作基础培养基中的细胞培养支撑物和/或细胞培养物补充剂。在一些实施例中,在支撑物上不需衬底涂层。在一些其它实施例中,用粘合促进底物(例如胶原蛋白、纤连蛋白、含有RGD的多肽、明胶和其类似者)涂层培养容器表面,然而,促进细胞附着,且在特定实施例中,可增强本文所公开的细胞培养基和补充剂的作用。用于培养和传代细胞的适合的衬底为本领域中已知的且包括(但不限于)玻璃连结蛋白、明胶、层粘连蛋白、纤维结合蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白、骨桥蛋白、天然存在的细胞株产生的基质的混合物(如Matrigel™)和合成或人造表面,如多元胺单层和羧基封端的单层。

[0192] 在一个实施例中,本文中涵盖的培养平台包含衬底,其包含Matrigel™或玻璃连结蛋白。

[0193] 8. 无饲料环境

[0194] 用于培养多能细胞的现有方法很大程度上依赖于经饲养细胞预调节且含有胎牛血清的饲养细胞或培养基;然而,此类环境可为不适用于产生用于临床和治疗用途的细胞。举例来说,在此类异种污染的环境中培育的细胞一般被认为是不适用于人类细胞移植,因为暴露于动物组分可能存在严重的免疫排斥风险且将未鉴别出的病原体传输给经治疗的患者,且可能潜在地使动物逆转录病毒再活化。使用无动物培养基的培养系统,如本文中涵盖的无饲料环境,促进制造临床级别细胞株,尤其hESC和hiPSC细胞株。

[0195] 在特定实施例中,无饲料环境基本上不含人类饲养细胞且不通过饲养细胞,包括(但不限于)小鼠胚胎成纤维细胞、人类成纤维细胞、角化细胞和胚胎干细胞预调节。无饲料细胞培养基适用于培养多能细胞、再编程细胞、单一细胞培养物、多能细胞的解离和传代、多能细胞的细胞分选、基态多能细胞的产生和维持基态多能性。在特定实施例中,无饲料环境用于诱导多能性,改良再编程效率,和/或提高或维持细胞效能。在某些实施例中,无饲料环境实质上不含细胞因子和生长因子,包括bFGF。

[0196] 9. 解离

[0197] 本文中涵盖的培养平台提供的优点之一为单一基态多能细胞培养、传代和解离的增强的存活力和存活率。使细胞解离成单一细胞,如单一细胞悬浮液,可通过酶促或机械手段实现。本领域中已知允许细胞解离成单一细胞的任何酶试剂都可用于本发明的方法中。在一个实施例中,解离试剂选自胰蛋白酶/EDTA、TrypLE-Select、胶原蛋白酶IV和分散酶。

[0198] 根据本文中涵盖的方法,在细胞解离过程中,还可单独或与酶试剂组合使用螯合剂,如EDTA、细胞消化液(Accutase)或阿麦斯(AccuMax)。可使解离试剂溶解于无钙和镁PBS中以便于解离单一细胞。

[0199] 为了增强解离期间和之后细胞的存活率,在一些实施例中,添加存活率促进物质,例如一种或多种生长因子、涉及细胞死亡和细胞凋亡的细胞路径的抑制剂或经调节的培养基。在一个实施例中,存活率促进物质为ROCK抑制剂,包括(但不限于)噻唑维。

[0200] 细胞培养物和培养基收集技术概述于Hu等人,《现代生物技术观点

(Curr.Opin.Biotechnol.)》8:148,1997;K.Kitano,《生物技术(Biotechnology)》17:73,1991;《现代生物技术观点》2:375,1991;Birch等人,《生物工艺技术(Bioprocess Technol)》.19:251,1990;“畸胎癌和胚胎干细胞:实际途径(Teratocarcinomas and embryonic stem cells:Apractical approach)”(E.J.Robertson编,IRL印刷公司1987);“小鼠发展技术指南(Guide to Techniques in Mouse Development)”(P.M.Wasserman等人编,《学术出版社(Academic Press)》1993);“活体外胚胎干细胞分化(Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro)”(M.V.Wiles,《酶学方法(Meth.Enzymol.)》225:900,1993);“胚胎干细胞的特性和用途:人类生物学和基因疗法应用展望(Properties and uses of Embryonic Stem Cells:Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy)”(P.D.Rathjen等人,1993)。

[0201] 干细胞分化评述于Robertson,《细胞生物学方法(Meth.Cell Biol.)》75:173,1997;以及Pedersen,《生殖、受精和发育(Reprod.Fertil.Dev.)》10:31,1998中。

[0202] 10. 富集和耗尽策略

[0203] 在特定实施例中,提供使细胞群体富集多能细胞,例如iPSC的策略。在一个实施例中,富集提供一种在相对较短时间内衍生克隆iPSC菌落的方法,由此改良iPSC产生效率。富集可包含分选细胞群体,其已经诱导以重编程,以鉴别且获得表达多能性标记物的细胞,由此获得多能细胞富集的细胞群体。额外富集方法包含使分化的细胞表达标记物或非多能细胞耗尽以获得多能细胞的富集群体。在一些实施例中,在再编程之后经培养的细胞诱导至少1、2、3、4、5、6、7、8或更多天,但不超过10、11、12、15、18、20、22、24、26、28、30、32、35、40天或任何中间的天数。在一些实施例中,在再编程之后经培养的细胞诱导约4到30天,约4到24天,约6到22天,或约8到约12天。

[0204] 在一个实施例中,使细胞群体富集多能细胞包含通过使群体中的细胞且使细胞再悬浮解离来制造单一细胞悬浮液。解离的细胞可再悬浮于用于维持细胞或进行细胞分选的任何适合的溶液或培养基中。在特定实施例中,单一细胞悬浮液含有GSK3抑制剂、MEK抑制剂和Rock抑制剂且不含TFG β 抑制剂。在某些实施例中,GSK3抑制剂为CHIR99021,MEK抑制剂为PD0325901,和/或Rock抑制剂为噻唑维。

[0205] 在一个特定实施例中,分选细胞群体以积极地选择多能细胞,和/或群体耗尽非重编程或非多能细胞,由此获得多能细胞富集的细胞群体。在一个实施例中,制备单一细胞悬浮液,且随后制备单一细胞用于分选,如通过使用例如适当的抗体,染色多能性标记物。可通过任何适合的分选细胞方法,如通过磁珠或流式细胞测量(FACS)分选来分选细胞。

[0206] 可基于一种或多种多能性标记物,包括(但不限于)SSEA3/4、TRA1-60/81、TRA1-85、TRA2-54、GCTM-2、TG343、TG30、CD9、CD29、CD133/凸素、CD140a、CD56、CD73、CD105、OCT4、NANOG、SOX2、KLF4、SSEA1(小鼠)、CD30、SSEA5、CD90和/或CD50的表达来分选细胞。在各种实施例中,基于至少两种、至少三种或至少四种多能性标记物分选细胞。在某些实施例中,基于SSEA4表达,且在某些特定实施例中基于SSEA4以及TRA1-81和/或TRA1-60的表达分选细胞。在某些实施例中,基于SSEA4、TRA1-81或TRA1-60和/或CD30表达分选细胞。在一个实施例中,基于SSEA4、TRA1-81和CD30分选细胞。在另一实施例中,基于SSEA4、TRA1-60和CD30分选细胞。在某些实施例中,细胞首先使用分化细胞的一种或多种表面标记物,包括(但不限于)CD13、CD26、CD34、CD45、CD31、CD46和CD7来使非重编程细胞耗尽,且随后富集多能标记

物,如SSEA4、TRA1-81和/或CD30。

[0207] 可将多能细胞富集的群体放置于细胞培养系统,如常规hESC培养基或本发明的细胞培养基中。细胞培养系统可补充有饲养细胞,或任选地为无饲料环境。在一些实施例中,将表达多能性标记物的经分选的细胞放置于补充培养系统的饲养细胞中,且随后转移到无饲料环境。在一个实施例中,细胞培养基为无饲料环境且包含GSK3抑制剂、MEK抑制剂和Rock抑制剂,且不含TGF β 抑制剂。在特定实施例中,GSK3抑制剂为CHIR99021,MEK抑制剂为PD0325901,和/或Rock抑制剂为噻唑维。在本发明的其它特定实施例中,细胞培养系统为包含经MatrigelTM涂布的组织培养板的无饲料环境。在一个实施例中,细胞培养系统包含表1中描述的FMM培养基。

[0208] 可在本文所描述的细胞培养系统中培养富集的细胞群体以获得基态iPSC菌落,典型地在分选后约3到约25天;分选后约5到20天;分选后5到15天;分选后5到12天;分选后约5到9天,或分选后约5到7天呈现。可选取或分选iPSC菌落用于克隆扩增。使用本文中涵盖的富集策略,使细胞群体富集多能细胞至少约3倍、5倍或10倍或更多倍。

[0209] 在一些实施例中,经受再编程的细胞群体或多能细胞的群体的分化细胞耗尽。在一个实施例中,多能细胞或经诱导以重编程细胞的群体可耗尽具有一种或多种分化细胞的细胞表面标记物的细胞。分化细胞的细胞表面标记物的说明性实例包括(但不限于)CD13、CD26、CD34、CD45、CD31、CD46和CD7。在特定实施例中,CD13用作分化细胞的表面标记物。

[0210] 在其它实施例中,诱导细胞群体以分化成所需谱系且耗尽多能细胞以获得分化中或已分化细胞的富集群体。在一些实施例中,分化细胞的群体包含细胞群体,如已经诱导以分化成特定谱系的ESC或iPSC。在一些实施例中,细胞群体可使用上文所描述的阴性细胞分选技术(“淘选”),如根据基于多能性标记物的磁珠或FAC分选群体中的细胞,使多能细胞耗尽。在一些实施例中,通过FAC,使用多能性标记物分选包含分化细胞的细胞群体,且获得表达多能性标记物的细胞耗尽的馏份。在其它实施例中,通过FAC,基于分化的标记物,如谱系特定标记物,包括(但不限于)CD13、CD26、CD34、CD45、CD31、CD46和CD7分选细胞群体以获得多能性标记物耗尽的馏份。在本发明的一些特定实施例中,CD13用作分化细胞的表面标记物。

[0211] E. 用于再编程细胞的培养平台

[0212] 实行各种策略以诱导多能性,或提高细胞效能(Takahashi,K.和Yamanaka,S.,《细胞(Cell)》126,663-676(2006);Takahashi等人,《细胞》131,861-872(2007);Yu等人,《科学(Science)》318,1917-1920(2007);Zhou等人,《细胞干细胞(Cell Stem Cell)》4,381-384(2009);Kim等人,《细胞干细胞》4,472-476(2009);Yamanaka等人,2009;Saha,K.,Jaenisch,R.,《细胞干细胞》5,584-595(2009)),且改良再编程效率(Shi等人,《细胞干细胞》2,525-528(2008a);Shi et al.,Cell Stem Cell 3,568-574(2008b);Huangfu et al.,Nat Biotechnol 26,795-797(2008a);Huangfu等人,《自然生物技术(Nat Biotechnol)》26,1269-1275(2008b);Silva等人,《生物科学公共图书杂志(Plos Bio)》6,e253.doi:10.1371/杂志.pbio.0060253(2008);Lyssiotis等人,PNAS106,8912-8917(2009);Ichida等人,《细胞干细胞》5,491-503(2009);Maherali,N.,Hochedlinger,K.,《当代生物学(Curr Biol)》19,1718-1723(2009b);Esteban等人,《细胞干细胞》6,71-79(2010);Feng等人,《细胞干细胞》4,301-312(2009))。然而,现有方法已实现用于制造工业或临床级别多能细胞的

高通量解决方案,即,具有均匀多能性、无显著自发分化和使用单一细胞培养和扩增细胞群体的能力、限定的无异种饲养细胞培养系统中的酶传代的克隆无转基因多能细胞群体。

[0213] 本文中涵盖的培养平台部分地适用于产生较高级别诱导多能干细胞(iPSC)。在一个实施例中,非多能细胞重编程成多能性且经培养以维持多能性。在另一实施例中,将iPSC培养出基态多能性。

[0214] 在各种实施例中,培养平台实现再编程的转基因和/或无印迹方法。本文中涵盖的培养平台提供高效游离型再编程,其中hiPSC产生所需的时间和工作量显著降低。不希望受任何特定理论束缚,预期通过阻挡再编程过程中的早期分化线索和促进间叶向上皮转变(MET),经由特定路径(MEK、ERK、TGF β 和ROCK)的小分子抑制,在FF和单一细胞培养系统中使用游离型载体明显改良hiPSC产生效率。

[0215] 在一个实施例中,培养平台包含将一种或多种非多能细胞再编程成多能状态,包含提高细胞中的内源性OCT4的表达。可通过引入一种或多种多核苷酸、多肽或OCT4表达的小分子诱导物来提高细胞中的内源性OCT4的表达。在一个实施例中,将编码OCT4或OCT4多肽的多核苷酸引入细胞中足以诱导细胞中的OCT4的内源性表达。

[0216] 在一个实施例中,培养平台包含再编程一种或多种非多能细胞,包含将一种或多种编码选自由以下组成的群组的一种或多种再编程因子的多核苷酸引入到一种或多种非多能细胞中:OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC和SV40LT。在另一实施例中,培养平台包含再编程一种或多种非多能细胞,包含将一种或多种选自由以下组成的群组的多肽引入到一种或多种非多能细胞中:OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、SV40LT、hTERT、SALL4、GLIS、ESRRB、DPPA2、ECAT1、SOX1、SOX3、KLF2、KLF5、L-MYC、N-MYC、LRH1、UTF1、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。

[0217] 在一个实施例中,培养平台包含再编程一种或多种非多能细胞,包含将一种或多种编码选自由以下组成的群组的一种或多种再编程因子的多核苷酸引入到一种或多种非多能细胞中:OCT4、NANOG、ESRRB、ECAT1和UTF1。在另一实施例中,培养平台包含再编程一种或多种非多能细胞,包含将一种或多种选自由以下组成的群组的多肽引入到一种或多种非多能细胞中:OCT4、NANOG、ESRRB、ECAT1和UTF1。在一些实施例中,包含一种或多种编码选自由OCT4、NANOG、ESRRB、ECAT1和UTF1组成的群组的再编程因子中的一种或多种的多核苷酸的一种或多种非多能细胞进一步包含一种或多种编码选自由以下组成的群组的一种或多种再编程因子的多核苷酸:HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。在一些其它实施例中,包含一种或多种编码选自由HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1组成的群组的再编程因子中的一种或多种的多核苷酸的一种或多种非多能细胞进一步包含一种或多种编码选自由以下组成的群组的再编程因子中的一种或多种的多核苷酸:OCT4、NANOG、ECAT1、UTF1和ESRRB。

[0218] 如本文所使用,在特定实施例中,术语“引入”是指包含使细胞与多核苷酸、多肽或小分子接触的方法。引入步骤也可包含将多核苷酸或多肽微注射到细胞中,使用脂质体将多核苷酸或多肽递送到细胞中,或使多核苷酸或多肽融合到细胞可渗透部分中以将其引入细胞中。

[0219] 在特定实施例中,可将编码选自由以下组成的群组的再编程因子中的1种、2种、3种、4种、5种或更多种的一种或多种多核苷酸引入非多能细胞中以重编程细胞:OCT4、SOX2、

NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、SV40LT、hTERT、SALL4、GLIS、ESRRB、DPPA2、ECAT1、SOX1、SOX3、KLF2、KLF5、L-MYC、N-MYC、LRH1、UTF1、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。编码引入到细胞中的各再编程因子的多核苷酸数目在适合于实现如本文所预期的基态多能性的任何组合中可相同或不同。

[0220] 在一个实施例中,将一种或多种编码选自OCT4、SOX2和NANOG组成的群组的一种或多种再编程因子中的每一种的多核苷酸引入到非多能细胞中。

[0221] 在一个实施例中,将一种或多种编码OCT4、SOX2和NANOG中的每一个的多核苷酸引入到非多能细胞中。

[0222] 在一个实施例中,将一种或多种编码OCT4和SOX2中的每一个的多核苷酸引入到非多能细胞中。

[0223] 在一个实施例中,将一种或多种编码OCT4的多核苷酸引入到非多能细胞中。

[0224] 在一个实施例中,将两个编码OCT4、SOX2和NANOG中的每一个的多核苷酸引入到非多能细胞中,其中SV40LT任选地引入到非多能细胞中。

[0225] 在另一实施例中,将三种编码OCT4、SOX2和NANOG中的每一个的多核苷酸和一种编码UTF1的多核苷酸引入到非多能细胞中。

[0226] 在各种说明性实施例中,包含再编程非多能细胞的培养平台包含引入一种到五种编码OCT4的多核苷酸;以及任选地,一种到三种编码SOX2的多核苷酸和/或一种到两种编码NANOG的多核苷酸。多个多核苷酸可以相同或单独构建体或载体中的任何组合形式引入到细胞中。在一个非限制性实例中,将一种到四种编码OCT4的多核苷酸、一种或两种编码SOX2的多核苷酸和一种编码NANOG的多核苷酸引入到非多能细胞中。在另一非限制性实例中,将非多能细胞再编程成多能状态包含将包含两个编码OCT4的多核苷酸的第一载体、包含编码OCT4的多核苷酸和编码SOX2的多核苷酸的第二载体;以及包含编码OCT4的多核苷酸、编码SOX2的多核苷酸和编码NANOG的多核苷酸的第三载体引入到非多能细胞中。在另一非限制性实例中,再编程一种或多种非多能细胞包含将包含两个编码OCT4的多核苷酸的第一载体和包含编码OCT4的多核苷酸、编码SOX2的多核苷酸和编码NANOG的多核苷酸的第二载体引入到非多能细胞中。在又一非限制性实例中,将包含两个编码OCT4的多核苷酸的第一载体和包含编码OCT4的多核苷酸和编码SOX2的多核苷酸的第二载体引入到非多能细胞中以产生多能细胞。

[0227] 在一个实施例中,将一种或多种构建体(或载体)引入到非多能细胞中,其中构建体包含(i)两个编码OCT4的多核苷酸;(ii)编码ECAT1的多核苷酸和编码UTF1的多核苷酸;(iii)编码NANOG的多核苷酸、编码ESRRB的多核苷酸和编码OCT4的多核苷酸;(iv)编码CDH1的多核苷酸、编码ZIC3的多核苷酸和编码HESRG的多核苷酸;(v)编码L1TD1编码多肽的多核苷酸、编码DPPA4的多核苷酸和编码TDGF1的多核苷酸;或(vi)编码DNMT3B的多核苷酸。在一些实施例中,引入到非多能细胞中的再编程因子并不包括SOX2和/或KLF4。在一些实施例中,SOX2和/或KLF4不包括在引入到非多能细胞中的再编程因子中。在一些实施例中,SOX2和/或KLF4在一种或多种编码选自以下组成的群组的一种或多种再编程因子的多核苷酸存在的情况下为可分配的:NANOG、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。

[0228] 在一个实施例中,将包含任何数目和编码本文中涵盖的多肽的再编程因子的组合

的单一构建体(或载体)引入到非多能细胞中且足以将细胞重编程成多能状态。

[0229] 在一个实施例中,将一种或多种构建体(载体)(其中的每一个包含任何数目和组合的编码本文中涵盖的多肽的再编程因子)引入到非多能细胞中且足以将细胞重编程成多能状态。

[0230] 在优选实施例中,一种或多种包含用于再编程非体细胞的本文中涵盖的一种或多种多核苷酸的载体用于将一种或多种多核苷酸引入到细胞中且足以重编程细胞。

[0231] 在最优选实施例中,一种或多种包含用于再编程非体细胞的本文中涵盖的一种或多种多核苷酸的游离型载体用于将一种或多种多核苷酸引入到细胞中且足以重编程细胞。呈现降低的自发分化和/或基态的多能细胞可用如本文所预期的游离型载体制造,且随后培养直到载体损失以获得呈现降低的自发分化和/或基态的多能细胞,其并不包含编码再编程因子的外源性核酸。

[0232] 进一步预期,当包含编码至少两种再编程因子的多核苷酸或包含至少两种编码一种再编程因子的多核苷酸的构建体或载体时,构建体/载体包含编码多肽中的每一个之间的自我裂解多肽序列的IRES序列或多核苷酸。

[0233] 在一些方面中,通过在将再编程因子多核苷酸引入到非多能细胞中之后选择一种或多种再编程因子多核苷酸的异位表达提高再编程非多能细胞的效率。可例如通过使再编程因子多核苷酸中的一种或多种连接到可选择标记物,将再编程因子多核苷酸和可选择标记物引入到非多能细胞中,以及选择表达可选择标记物的那些细胞来进行此类选择,其中选择鉴别具有相对于缺乏标记物和其相关再编程因子多核苷酸表达的细胞提高的再编程效率的细胞。本领域的技术人员应了解,可使用通过非多能细胞鉴别引入的再编程多核苷酸的表达的任何可选择标记物。此类可选择标记物的一个非限制性实例包括(但不限于)抗生素抗性基因,如嘌呤霉素抗性。可选标记物可连接到以下再编程因子多核苷酸中的一个或多个:OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、SV40LT、hTERT、SALL4、GLIS、ESRRB、DPPA2、ECAT1、SOX1、SOX3、KLF2、KLF5、L-MYC、N-MYC、LRH1、UTF1、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。在一些实施例中,引入再编程因子多核苷酸的特定组合作为多顺反子载体(或构建体),其中可选择标记物连接到再编程因子多核苷酸。载体中包含的多核苷酸可编码两种或多于两种本文所公开的再编程因子。在一个非限制性实施例中,多顺反子载体包含两种或更多种编码OCT4的多核苷酸,且多核苷酸连接到可选择标记物,如编码嘌呤霉素抗性的基因

[0234] 在一些方面中,除了一种或多种包含一种或多种编码再编程因子的多核苷酸的多顺反子载体之外,将编码一种或多种再编程因子和可选择标记物的多顺反子载体引入到非多能细胞中,其中选择表达可选择标记物的细胞产生再编程效率高于缺乏可选择标记物表达的细胞的细胞群体。在一个非限制性实例中,除了包含两种或更多种编码OCT4的多核苷酸的多顺反子载体之外,将OCT4、NANOG和SOX2多核苷酸引入到非多能细胞中,且多核苷酸连接到嘌呤霉素抗性基因。表达可选择标记物的非多能细胞的后续选择鉴别再编程效率高于并不表达可选择标记物的非多能细胞的非多能细胞。所选细胞可具有至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%或至少40%的再编程效率。

[0235] 小分子通常包括于特定优选实施例的再编程步骤中。不希望受任何特定理论束缚,预期包括各种分化路径的小分子抑制剂提高再编程的效率和动力学。因此,在特定实施

例中,再编程非多能细胞包含将一种或多种再编程因子引入到如本文所预期的细胞中且使细胞与GSK3抑制剂、MEK抑制剂、TGF β R抑制剂和ROCK抑制剂接触。

[0236] 再编程效率改良可通过(1)降低再编程和产生多能细胞所需的时间(例如通过与不具有小分子的类似或相同过程相比,使产生多能细胞的时间缩短至少一天),或者,或在组合中,(2)提高特定方法产生的多能细胞数目(例如与不具有小分子的类似或相同过程相比,使在给定时间段中重编程的细胞数目提高至少10%、30%、50%、100%、200%、500%等)测量。在一些实施例中,观测到再编程效率改良2倍到20倍。在一些实施例中,再编程效率改良超过20倍。在一些实施例中,在不具有小分子再编程试剂的方法过程内观测到效率改良超过100倍(例如产生的多能细胞数目提高超过100倍)。

[0237] 在一个实施例中,本文中涵盖的培养平台包含通过将一种或多种再编程因子引入到如本文所预期的细胞中且使细胞与一种或多种包含GSK3抑制剂、MEK抑制剂以及TGF β R抑制剂和/或ROCK抑制剂的小分子抑制剂接触来再编程非多能细胞。

[0238] 在一个实施例中,本文中涵盖的培养平台包含通过将一种或多种再编程因子引入到如本文所预期的细胞中且使细胞与GSK3抑制剂、MEK抑制剂、TGF β R抑制剂和ROCK抑制剂接触来再编程非多能细胞。

[0239] 在另一实施例中,本文中涵盖的培养平台包含通过将一种或多种再编程因子引入到如本文所预期的细胞中且使细胞与GSK3抑制剂、MEK抑制剂、TGF β R抑制剂和ROCK抑制剂接触来再编程非多能细胞,其中ROCK抑制剂为噻唑维。

[0240] 为了在具有降低或不显著的自发分化的无饲养细胞和酶传代培养系统中实现多能细胞的长期培养,或为了诱导和/或维持基态多能性,在一个实施例中,iPSC需要包含在GSK3抑制剂、MEK抑制剂和任选地Rho激酶(ROCK)抑制剂的细胞培养基中进行后续培养,其中细胞培养基不包含或不含TGF β /活化素信号传导路径抑制剂,包括如本文所预期的TGF β 受体(TGF β R)抑制剂和ALK5抑制剂。不希望受任何特定理论束缚,预期具有TGF β R/ALK5抑制剂的多能细胞的长期培养导致经培养的无转基因iPSC的自发分化和基态多能性的最终损失。

[0241] 在各种实施例中,利用两步培养平台以稳定地重编程体细胞,从而实现降低的培养物中的自发分化,包括基态多能性。在某些实施例中,通过本领域中所公开的任何适合的方法重编程非多能细胞,且随后,通过在包含GSK3抑制剂、MEK抑制剂和Rho激酶(ROCK)抑制剂的培养基中培养细胞,培养重编程的体细胞以实现培养物中降低的自发分化,其中培养基不含TGF β R/ALK5抑制剂。在一些实施例中,培养重编程的体细胞以提供基态多能细胞。

[0242] 在特定实施例中,通过本文所公开的方法重编程非多能细胞,且随后通过在包含GSK3抑制剂、MEK抑制剂和Rho激酶(ROCK)抑制剂的培养基中培养细胞,将重编程的体细胞培养到稳定多能性基态,其中培养基不含TGF β R/ALK5抑制剂。

[0243] 在一些实施例中,通过引入一种或多种再编程因子且在包含GSK3抑制剂、MEK抑制剂、Rho激酶(ROCK)抑制剂和TGF β R/ALK5抑制剂的培养基中培养细胞来重编程非多能细胞,且随后,通过在包含GSK3抑制剂、MEK抑制剂和Rho激酶(ROCK)抑制剂的培养基中培养细胞,培养重编程的体细胞以提供具有降低的自发分化的细胞,其中培养基不含TGF β R/ALK5抑制剂。

[0244] 在一些实施例中,通过引入一种或多种再编程因子且在包含GSK3抑制剂、MEK抑制

剂、Rho激酶 (ROCK) 抑制剂和TGFβR/ALK5抑制剂的培养基中培养细胞来重编程非多能细胞,且随后,通过在包含GSK3抑制剂、MEK抑制剂和Rho激酶 (ROCK) 抑制剂的培养基中培养细胞,将重编程的体细胞培养出稳定多能性基态,其中培养基不含TGFβR/ALK5抑制剂。

[0245] 在优选实施例中,通过引入一种或多种再编程因子且在包含GSK3抑制剂、MEK抑制剂、Rho激酶 (ROCK) 抑制剂和TGFβR/ALK5抑制剂的培养基中培养细胞来重编程非多能细胞,且随后通过在包含GSK3抑制剂、MEK抑制剂和Rho激酶 (ROCK) 抑制剂的培养基中培养细胞,将重编程的体细胞培养成稳定多能性基态,其中培养基不含TGFβR/ALK5抑制剂,且其中再编程转基因无显著残余表达。

[0246] 在一个实施例中,通过引入一种或多种选自由如本文中其它地方所公开的OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、SV40LT、hTERT、SALL4、GLIS、ESRRB、DPPA2、ECAT1、SOX1、SOX3、KLF2、KLF5、L-MYC、N-MYC、LRH1、UTF1、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1组成的群组的再编程因子,和在包含GSK-3抑制剂、MEK抑制剂、Rho激酶 (ROCK) 抑制剂和TGFβR/ALK5抑制剂的培养基中培养细胞来重编程非多能细胞,且随后,在包含GSK-3抑制剂、MEK抑制剂和Rho激酶 (ROCK) 抑制剂的培养基中培养重编程的体细胞,其中培养基不含TGFβR/ALK5抑制剂。

[0247] 在优选实施例中,通过引入一种或多种选自由如本文中其它地方所公开的OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、SV40LT、hTERT、SALL4、GLIS、ESRRB、DPPA2、ECAT1、SOX1、SOX3、KLF2、KLF5、L-MYC、N-MYC、LRH1、UTF1、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1组成的群组的再编程因子来重编程非多能细胞且在包含GSK-3抑制剂、MEK抑制剂、Rho激酶 (ROCK) 抑制剂和TGFβR/ALK5抑制剂的培养基中培养细胞,且随后,在包含GSK-3抑制剂、MEK抑制剂和Rho激酶 (ROCK) 抑制剂的培养基中培养重编程的体细胞,其中Rock抑制剂为噻唑维,其中培养基不含TGFβR/ALK5抑制剂。

[0248] 在各种实施例中,使用本文中涵盖的培养平台,提供制造具有降低的自发分化和/或基态诱导多能干细胞 (iPSC) 的多能细胞的方法。

[0249] 在特定实施例中,使用包含一种或多种非多能或部分多能干细胞的起始材料,且在不包含TGFβR抑制剂的培养基中培养一种或多种多能或部分多能干细胞来制造具有降低的自发分化的多能细胞和/或基态诱导多能干细胞 (iPSC)。起始材料可获得或产生。举例来说,非多能或部分多能干细胞可由工业供应商或其它来源提供,或可重新获得:非多能细胞也可从组织或器官分离得到;且部分多能细胞也可通过再编程体细胞或成体干细胞产生。在一些实施例中,可使用本文所描述的培养基和平台诱导多能胚胎干细胞或通过体细胞核转移获得的多能细胞实现基态多能性。

[0250] 在特定实施例中,一种或多种iPSC的群体可包含重编程的体细胞或重编程的成体干细胞。在特定实施例中,可通过任何已知的方法,通过执行方法或获得方法产生的iPSC来产生iPSC。

[0251] 产生iPSC的示例性方法包括(但不限于):提高非多能细胞中的内源性OCT4表达;将一种或多种编码选自由以下组成的群组的一种或多种再编程因子的多核苷酸引入到一种或多种非多能细胞中:OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、SV40LT、hTERT、SALL4、GLIS、ESRRB、DPPA2、ECAT1、SOX1、SOX3、KLF2、KLF5、L-MYC、N-MYC、LRH1、UTF1、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1;或将一种或多种编码选自由以下组成的群组的一种或

多种再编程因子的多核苷酸引入到非多能细胞中:OCT4、SOX2和NANOG。产生iPSC的方法可进一步包含使非多能细胞或部分多能细胞与GSK3抑制剂、MEK抑制剂以及TGF β R抑制剂,且任选地ROCK抑制剂接触以产生一种或多种iPSC。

[0252] 在某些实施例中,细胞培养基包含GSK3抑制剂、MEK抑制剂以及ROCK抑制剂。

[0253] 在优选实施例中,细胞培养基包含GSK3抑制剂、MEK抑制剂以及ROCK抑制剂,其中ROCK抑制剂为噻唑维。

[0254] 在特定实施例中,在细胞培养基中培养一种或多种多能细胞,例如iPSC维持或诱导多能性基态、存活力、正常核型、基因组稳定性和降低的自发分化速率,其可维持至少5代、至少10代、至少50代、至少100代或更多代,包括任何中间的代数。

[0255] F. 表征多能细胞

[0256] 使用本文中涵盖的培养平台制造的多能细胞可进一步包含选择或验证多能细胞产物,包括例如基态多能细胞或具有降低的自发分化的多能细胞。可在用本文中涵盖的组合物和方法再编程和后续培养之后或如果多能细胞未重编程,那么在多能细胞转变为本文中涵盖的培养方法之后选择和/或验证多能细胞。细胞多能性可基于相关和可检测的形态、与多能性相关的分子和/或生物化学改变来进行表征和/或选择。

[0257] 可在评定细胞效能时单独或组合监测细胞多能性的特定特征包括(但不限于)基因表达、甲基化,以及活体内和活体外特征,如:i)圆形的多能干细胞形态;ii)包括SSEA3/4(人类多能干细胞)、TRA1-60/81、TRA1-85、TRA2-54、GCTM-2、TG343、TG30、CD9、CD29、CD133/凸素、CD140a、CD56、CD73、CD105、OCT4、NANOG、SOX2、CD30、SSEA5、CD90和/或CD50以及前述的组合的多能干细胞标记物的表达;iii)多能干细胞的畸胎瘤形成;iv)胚状体形成和活体外三谱系分化;以及v)非活性X染色体再活化。在某些实施例中,以上特征中的任一种的子组用于监测细胞效能。在一个实施例中,多能细胞通过具有圆形菌落形态、SSEA4、TRA1-81和OCT4的表达和形成胚状体和畸胎瘤的能力来表征。

[0258] 在另一实施例中,可通过基因表达标签鉴别活体外培养物中具有降低的自发分化的多能细胞,所述标签包含与在TGF β R抑制剂存在下经培养的多能细胞相比以下分化标记物基因中的一个或多个的表达降低至少约10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%:FOXA2、FGF5、SOX17、XIST、NODAL、COL3A1、OTX2、DUSP6、EOMES、NR2F2、NR0B1、CXCR4、CYP2B6、GATA3、GATA4、ERBB4、GATA6、HOXC6、INHA、SMAD6、RORA、NIPBL、TNFSF11、CDH11、ZIC4、GAL、SOX3、PITX2、APOA2、CXCL5、CER1、FOXQ1、MLL5、DPP10、GSC、PCDH10、CTCFL、PCDH20、TSHZ1、MEGF10、MYC、DKK1、BMP2、LEFTY2、HES1、CDX2、GNAS、EGR1、COL3A1、TCF4、HEPH、KDR、TOX、FOXA1、LCK、PCDH7、CD1D FOXG1、LEFTY1、TUG1、T基因(短尾基因)和ZIC3。

[0259] 在一个实施例中,具有降低的自发分化的多能细胞通过一种或多种分化标记物基因的降低的表达来表征,所述基因包括(但不限于):T基因、CXCR4、NODAL、GATA4、SOX17、FOXA2、OTX2和TUG1。在特定实施例中,可通过基因表达标签鉴别具有降低的自发分化的多能细胞,所述标签包含与在TGF β R抑制剂存在下经培养的多能细胞相比一种或多种分化标记物基因(例如T基因、CXCR4、NODAL、GATA4、SOX17、FOXA2、OTX2、TUG1)的表达降低至少约10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%。在另一特定实施例中,可通过基因表达标签鉴别具有降低的自发分化的多能细胞,所述标签包含一种或多种分化标记物基因(例如T基因、CXCR4、NODAL、GATA4、SOX17、FOXA2、OTX2、TUG1)的表达降低至少约10%、

20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%。

[0260] 在特定实施例中,基态多能细胞具有明显受抑制的Xist表达和分化细胞早期标记物,例如Foxa2、Sox17和短尾基因的表达,而常规经培养的多能细胞仅显示Xist表达的中度抑制和早期分化标记物的显著表达。

[0261] 在特定实施例中,基态多能细胞保留基态多能性特征持续多次细胞传代,如至少1、3、5、7、10、15、20或更多代。

[0262] G. 多核苷酸

[0263] 在各种说明性实施例中,本发明部分地涵盖多核苷酸、编码多肽的多核苷酸和本文中涵盖的融合多肽以及包含其的组合物。在各种其它说明性实施例中,本发明部分地涵盖用一种或多种编码一种或多种再编程因子中的每一种的多核苷酸再编程非多能细胞。与本文所描述的培养平台一起使用的再编程因子包括(但不限于):OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、SV40LT、hTERT、SALL4、GLIS、ESRRB、DPPA2、ECAT1、SOX1、SOX3、KLF2、KLF5、L-MYC、N-MYC、LRH1、UTF1、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1。在优选实施例中,多核苷酸包含如本文所阐述的再编程因子序列。

[0264] 如本文所使用,术语“基因”可指包含增强子、启动子、内含子、外显子和其类似者的多核苷酸序列。在特定实施例中,术语“基因”是指编码多肽的多核苷酸序列,无论多核苷酸序列与编码多肽的基因组序列是否一致。

[0265] 如本文所使用,“分离的多核苷酸”是指已经从在天然存在的状态下侧接其的序列纯化的多核苷酸,例如从通常与片段相邻的序列移出的DNA片段。在特定实施例中,“分离的多核苷酸”是指互补DNA(cDNA)、重组DNA或在自然界中不存在且已通过人力制得的其它多核苷酸。

[0266] 在特定实施例中,一种或多种多核苷酸可以任何适合的次序布置在较大多核苷酸,如载体内。在优选实施例中,载体为游离型载体。

[0267] 如本文其它地方所公开或如本领域中已知,本文中涵盖的多核苷酸(无关于编码序列本身的长度)可与其它DNA序列组合,所述序列如表达控制序列、启动子和/或增强子、非翻译区(UTR)、Kozak序列、聚腺苷酸化信号、其它限制酶位点、多个克隆位点、内部核糖体进入位点(IRES)、重组酶识别位点(例如LoxP、FRT和Att位点)、终止密码子、转录终止信号和编码自我裂解多肽的多核苷酸、抗原决定基标签,使得其总长度可以显著变化。因此设想可利用几乎任何长度的多核苷酸片段,总长度优选受预期重组DNA方案的制备和使用便利性限制。

[0268] 多核苷酸可使用本领域中已知且可用的多种公认技术中的任一种制备、操纵和/或表达。为了表达所需多肽,编码多肽的核苷酸序列可插入到适当载体中。载体的实例为质粒、自主复制序列和转座元件。其它示例性载体包括(但不限于)质粒;噬菌粒;粘粒;人工染色体,如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1衍生的人工染色体(PAC);噬菌体,如λ噬菌体或M13噬菌体;和动物病毒。适用作载体的动物病毒的类别的实例包括(但不限于)逆转录病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(例如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒和乳多泡病毒(例如SV40)。表达载体的实例为用于哺乳动物细胞中的表达的pCIneo载体(普洛麦格(Promega));用于哺乳动物细胞中的慢病毒介导的基因转移和表达的pLenti4/V5-DESTTM、pLenti6/V5-DESTTM和pLenti6.2/V5-GW/lacZ(英杰

(Invitrogen))。在特定实施例中,本文所公开的多肽的编码序列可接合到用于表达哺乳动物细胞中的多肽的此类表达载体中。

[0269] 在特定实施例中,载体为游离型载体或维持在染色体外的载体。如本文所使用,术语“游离型”是指载体能够复制而不整合到宿主的染色体DNA中且不由分裂宿主细胞逐渐丧失,还意指所述载体在染色体外或游离地复制。载体经工程改造以具有编码淋巴疱疹病毒或 γ 疱疹病毒、腺病毒、SV40、牛乳头瘤病毒或酵母的DNA复制起点或“ori”(具体来说,淋巴疱疹病毒或 γ 疱疹病毒的复制起点,对应于EBV的oriP)的序列。在一个特定方面中,淋巴疱疹病毒可为埃-巴二氏病毒(Epstein Barr virus,EBV)、卡波西氏肉瘤疱疹病毒(Kaposi's sarcoma herpes virus,KSHV)、松鼠猴疱疹病毒(Herpes virus saimiri,HS)或马立克氏病病毒(Marek's disease virus,MDV)。埃-巴二氏病毒(EBV)和卡波西氏肉瘤疱疹病毒(KSHV)还是 γ 疱疹病毒的实例。典型地,宿主细胞包含活化复制的病毒复制反式活化蛋白。

[0270] 存在于表达载体中的“表达控制序列”、“控制元件”或“调节序列”为载体的那些非翻译区-复制起点、选择盒、启动子、增强子、翻译起始信号(Shine Dalgarno序列或Kozak序列)、内含子、聚腺苷酸化序列、5'和3'非翻译区-其与宿主细胞蛋白相互作用以执行转录与翻译。所述元件可在其强度和特异性方面变化。取决于所利用的载体系统和宿主,可使用多种适合的转录与翻译元件,包括遍在启动子和诱导型启动子。

[0271] 术语“可操作地连接”是指所描述的组分处于允许其以其预期方式起作用的关系的并接。在一个实施例中,术语是指表达对照序列(如启动子和/或增强子)与第二多核苷酸序列之间的官能性连接,其中对应于第二序列,表达对照序列引导核酸转录。

[0272] 适用于本发明的特定实施例中的说明性普遍存在的表达控制序列包括(但不限于)细胞巨大病毒(CMV)即刻早期启动子、病毒猿猴病毒40(SV40)(例如早期或晚期)、莫洛尼鼠白血病毒(MoMLV)LTR启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)LTR、单纯疱疹病毒(HSV)(胸苷激酶)启动子、来自牛痘病毒的H5、P7.5和P11启动子、延伸因子1- α (EF1a)启动子、早期生长反应1(EGF1)、铁蛋白H(FerH)、铁蛋白L(FerL)、甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、真核翻译引发因子4A1(EIF4A1)、热休克70kDa蛋白质5(HSPA5)、热冲击蛋白质90kDa β 、元件1(HSP90B1)、热冲击蛋白质70kDa(HSP70)、 β -驱动蛋白(β -KIN)、人类ROSA 26基因座(Irions等人,《自然生物技术》25,1477-1482(2007))、泛素C启动子(UBC)、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子、细胞巨大病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白(CAG)启动子和 β -肌动蛋白启动子。

[0273] 诱导型启动子/系统的说明性实例包括(但不限于)类固醇诱导型启动子,例如用于编码糖皮质激素或雌激素受体的基因的启动子(通过用相应激素处理而诱导);金属硫蛋白启动子(通过用各种重金属处理而诱导);MX-1启动子(通过干扰素诱导);“GeneSwitch”米非司酮可调节系统(Sirin等人,2003,《基因(Gene)》,323:67);二甲氨基二硫代甲酸铜(cumate)诱导型基因开关(WO 2002/088346);四环素依赖性调节系统等。

[0274] 条件表达还可通过使用位点特异性DNA重组酶实现。根据本发明的某些实施例,多核苷酸包含至少一个(典型地两个)用于由位点特异性重组酶介导的重组的位点。如本文所使用,术语“重组酶”或“位点特异性重组酶”包括参与涉及一个或多个(例如二、三、四、五、六、七、八、九、十或更多)重组位点的重组反应的切除型或整合型蛋白质、酶、辅因子或相关蛋白,其可为野生型蛋白质(参看Landy,《生物技术新见(Current Opinion in Biotechnology)》3:699-707(1993))或其突变体、衍生物(例如含有重组蛋白序列或其片段

的融合蛋白)、片段和其变异体。适用于本发明的特定实施例中的重组酶的说明性实例包括(但不限于):Cre、Int、IHF、Xis、Flp、Fis、Hin、Gin、ΦC31、Cin、Bxb1、Tn3解离酶、TndX、XerC、XerD、TnpX、Hjc、Gin、SpCCE1和ParA。

[0275] 在特定实施例中,本文中涵盖的多核苷酸包括一种或多种编码一种或多种多肽的多核苷酸。在特定实施例中,为了实现多种多肽中的每一种的高效翻译,多核苷酸序列可通过一个或多个编码自我裂解多肽的IRES序列或多核苷酸序列隔开。如本文所使用,“内部核糖体进入位点”或“IRES”是指促进直接内部核糖体进入到顺反子(蛋白质编码区)的起始密码子(如ATG),由此导致基因的帽非依赖性翻译的元件。参看例如Jackson等人,1990.《生化科学趋势(Trends Biochem Sci)》15(12):477-83以及Jackson和Kaminski.1995.RNA 1(10):985-1000。本领域的技术人员一般采用的IRES的实例包括美国专利第6,692,736号中所描述的那些。本领域中已知的“IRES”的其它实例包括(但不限于)获自小核糖核酸病毒(Jackson等人,1990)的IRES。

[0276] H. 多肽

[0277] 本发明部分地涵盖包含多肽的组合物、融合多肽和表达多肽的载体。在优选实施例中,多肽包含本文中阐述的氨基酸序列。除非有相反说明,否则“多肽”、“多肽片段”、“肽”和“蛋白质”可互换使用,且根据常规即,作为氨基酸序列。在一个实施例中,“多肽”包括融合多肽和其它变异体。多肽可使用多种熟知重组和/或合成技术中的任一种制备。多肽不限于特定长度,例如其可包含全长蛋白质序列、全长蛋白质片段或融合蛋白,且可包括多肽的翻译后修饰,例如糖基化、乙酰化、磷酸化和其类似者,以及本领域中已知的天然存在的和非天然存在的其它修饰。

[0278] 如本文所使用,“经分离的肽”或“经分离的多肽”和其类似者是指从细胞环境和与细胞的其它组分的相连活体外分离和/或纯化肽或多肽分子,即,不与活体内物质明显相连。

[0279] 在一个实施例中,在需要两种或更多种多肽的表达的情况下,编码其的多核苷酸序列可通过如本文中其它地方所论述的IRES序列分离。在另一实施例中,两种或更多种多肽可表达为包含本文所描述的相邻多肽之间的多肽裂解信号的融合蛋白。示例性多肽裂解信号包括多肽裂解识别位点,如蛋白酶裂解位点、核酸酶裂解位点(例如罕见限制酶识别位点、自我裂解核糖核酸酶识别位点)和自我裂解病毒寡肽(参见deFelipe和Ryan,2004.《交通(Traffic)》,5(8):616-26)。

[0280] 适合的蛋白酶裂解位点和自我裂解肽为本领域的技术人员已知的(参见例如Ryan等人,1997.《普通病毒学杂志(J. Gener. Virol.)》78,699-722;Scymczak等人(2004)《自然生物技术(Nature Biotech.)》5,589-594)。示例性蛋白酶裂解位点包括(但不限于)马铃薯Y病毒属NIa蛋白酶(例如烟草蚀刻病毒蛋白酶)、马铃薯Y病毒属HC蛋白酶、马铃薯Y病毒属P1(P35)蛋白酶、byo病毒NIa蛋白酶、byo病毒RNA-2-经编码蛋白酶、口疮病毒属L蛋白酶、肠病毒2A蛋白酶、鼻病毒2A蛋白酶、细小核糖核酸3C蛋白酶、豇豆花叶病毒组24K蛋白酶、线虫传多面体病毒24K蛋白酶、RTSV(水稻东格鲁球状病毒)3C样蛋白酶、PYVF(欧防风黄点病毒)3C样蛋白酶、肝素、凝血酶、因子Xa和肠激酶的裂解位点。归因于其较高裂解严格度,TEV(烟草蚀刻病毒)蛋白酶裂解位点为优选的,在一个实施例中,例如EXXYXQ(G/S)(SEQ ID NO:1; Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Xaa,其中第2、3、5位Xaa表示任何氨基酸,第7位Xaa表示Gly或

Ser),例如ENLYFQG (SEQ ID NO:2)和ENLYFQS (SEQ ID NO:3),其中X表示任何氨基酸(通过TEV裂解发生在Q与G或Q与S之间)。

[0281] 在某些实施例中,自我裂解多肽位点包含2A或2A样位点、序列或结构域(Donnelly等人,2001.《普通病毒学杂志》82:1027-1041)。在一个特定实施例中,病毒2A肽为口疮病毒属2A肽、马铃薯Y病毒属2A肽或心病毒属2A肽。

[0282] 在一个实施例中,病毒2A肽选自自由以下组成的群组:口蹄疫病毒(FMDV)2A肽、马鼻肺炎A病毒(ERAV)2A肽、明脉扁刺蛾 β 四体(Thosea asigna)(TaV)2A肽、猪捷申病毒-1(PTV-1)2A肽、泰勒病毒(Theilovirus)2A肽和脑心肌炎病毒2A肽。

[0283] 表2:示例性2A位点包括以下序列:

[0284]	SEQ ID NO:4	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO:5	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO:6	LLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO:7	NFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO:8	QLNFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO:9	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO:10	VTELLYRMKRAETYCPRLLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
	SEQ ID NO:11	LNFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO:12	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO:13	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

[0285] 在优选实施例中,编码一种或多种再编程因子多肽的载体包含再编程因子中的每一个之间的相同或不同蛋白酶裂解位点中的一个或多个。

[0286] 本说明书中所引用的所有公开、专利申请和授权专利都以引用的方式并入本文中,其引用的程度如同每个个别公开、专利申请或授权专利经特定且独立地指示以引用的方式并入一般。

[0287] 尽管已经出于清楚理解的目的通过说明和实例相当详细地描述了前述发明,但根据本发明的传授内容,本领域一般技术人员将容易地显而易见,可以在不脱离所附权利要求书的精神或范围的情况下对其作出某些改变和修改。提供以下实例仅作为说明且不具有限制性。本领域的技术人员将容易识别出多种可以被改变或修改以产生基本类似结果的非关键参数。

[0288] 实例

[0289] 本文所公开的实例描述一种使用阶段特定培养基组合物中的小分子路径抑制剂,快速并联生产、选择和扩增hiPSC的平台。所述平台在完全无饲料环境中使用极小再编程因子支持有效和加速的游离型再编程。所得hiPSC不含转基因,容易培养且以单一细胞形式扩增,同时维持均匀和基因组稳定的多能群体。实例中涵盖的培养基组合物中产生或维持的hiPSC展现与多能性基态相关的特性且表现用于制造均匀的工业或临床级别hiPSC的稳固高通量系统。

[0290] 实例1-用于IPSC的长期维持和扩增的培养基平台的鉴别

[0291] 概述

[0292] 补充SMC4的培养物中的大部分慢病毒衍生的hiPSC株系维持未分化细胞的均匀群

体;然而;株系子组中的转基因再编程因子的沉默呈现延伸的培养物中不同程度的自发分化(图1A和B)。因此,评估各种细胞培养物组分以便鉴别在连续FF培养和单一细胞酶传代期间与残余转基因表达无关维持多能性的条件。在再编程和维持过程的不同阶段靶向独特路径的多阶段培养系统鉴别为hiPSC产生的有效且稳固的途径。

[0293] 结果

[0294] 在长期维持期间TGF β 路径的抑制鉴别为具有沉默转基因表达的hiPSC株系的自发分化的显著因子(图1C)。发现经历自发分化的iPSC细胞株中的一种在新培养基调配物(去向维持培养基(FMM)(表1))中转变为培养物。自发分化消除且在2-3代内形成SSEA4/TRA1-81阳性细胞的均匀群体(图1A)。

[0295] 还比较在常规培养物(具有MEF饲养细胞的hESC培养基)、FF培养物中补充SMC4的培养基或FF培养物中新调配的FMM(图1D)中的OCT4/KLF4/SOX2(OKS)慢病毒再编程。在诱导慢病毒再编程十七天之后,通过FAC和再接种于SMC4或FMM中选择SSEA4/TRA1-81阳性细胞以便比较(图1D)。与用FMM再编程相比,SMC4改良再编程的动力学且在诱导后第17天产生明显更多的SSEA4/TRA1-81阳性细胞(2.72%相对于0.76%(对于FMM)和0.10%(对于常规培养物);图1D)。

[0296] 在初始分选之后,将细胞维持在其相应条件下持续10天,继而进行第二次SSEA4/TRA1-81阳性流式细胞测量选择(图1D)。培养物维持额外9天(总计感染后36天)且基于OCT4和NANOG共表达,评估未分化菌落(图1D和1E)。相对于连续维持在SMC4中,SMC4中的初始再编程,继而转变为FMM的组合最终产生更多的OCT4/NANOG阳性菌落,且OCT4/NANOG阴性菌落的数目明显减少(图1D和1E)。尽管在仅仅维持在FMM中的培养物中检测出OCT4/NANOG阳性菌落,但菌落的数目和尺寸似乎不如阶段特定培养基途径。

[0297] 这些结果显示,在再编程和维持过程的不同阶段靶向独特路径的新颖多阶段培养系统使得能够有效制造高质量hiPSC。

[0298] 实例2-用于以单一细胞传代和FF形式制造无转基因hiPSC的平台

[0299] 概述

[0300] 使用游离型载体系统的非整合再编程方法的效率极低(<0.001%),尤其在FF环境中更是如此(Narsinh等人,2011;O'Doherty等人,2013)。在包括以下两个培养基的多阶段培养系统中测试游离型诱导:去向再编程培养基(FRM),其含有SMC4和显示改良再编程的培养基添加剂;以及FMM(图2A和表1)。

[0301] 结果

[0302] 使用由基因组合OCT4/SOX2/NANOG/KLF4/LIN28/MYC/SV40LT(OSNKLMT)组成的游离型表达系统来转染各种成纤维细胞。在诱导游离型表达之后二十四小时,将再编程培养物转变为FRM以增强再编程动力学。在第一周内观测到早期菌落形成,且截至第10天,检测到SSEA4/TRA1-81阳性细胞的较大群体(>1%)(图8A和8B)。在第14天,将FRM支持的再编程培养物拆分成FRM或FMM培养基。在第21天,使用FACS来鉴别培养物中的SSEA4/TRA1-81/CD30阳性细胞(图8C)。FRM维持的培养物含有分化和未分化细胞两者,而FMM培养物含有大部分未分化细胞(图8D)。

[0303] 用由极小体积来自不同年龄、性别和种族的供体脐带血扩增的成纤维细胞和CD34+细胞测试此途径的通量和稳固性(图9A和9B)。如图2A中所概述诱导体细胞再编程,其中游

离型基因组合设为OSNKLMT,且在第16天与第21天之间96孔培养板流式细胞测量分选个别hiPSC(图2B)。大部分测试株系观测到SSEA4/TRA1-81/CD30阳性细胞的较大群体。与使用常规培养基和饲养细胞的并联再编程实验相比,FRM和FMM培养基系统使得hiPSC克隆株数目显著提高(对于FTC007成纤维细胞株,FRM/FMM中的8.55%相对于常规培养物中的0.02%;图2B和2C)。对于各体细胞株,每96孔培养板可见平均22个克隆hiPSC(图2B、10A和10B),包括此前观测到用SMC4培养基再编程的慢病毒顽固性成纤维细胞FTC008。随后通过细胞内和表面标记物表达分析和NANOG的直接qRT-PCR,菌落确认为真正的hiPSC克隆株(图2D、2E和10C)。使用96孔分选和选择方法的再编程效率同样提高(图2E)。在限定的表面涂层玻璃连接蛋白的情况下,也观测到类似再编程效率(图10D)。

[0304] 这些数据显示,当应用于游离型再编程时,所述平台为稳固且可重复的,且允许以高通量方式、以极小的工作量并联进行多重再编程实验,而不损害iPSC最终产物的质量。

[0305] 实例3-FMM中无转基因hiPSC株系的长期传代和扩增

[0306] 概述

[0307] 使用来自实例2、以单一细胞形式在FF培养物中扩增的hiPSC克隆株研究使用FRM和FMM的多阶段培养基平台的hiPSC长期传代和扩增(图3A和3B)。

[0308] 结果

[0309] 根据实例2重编程的hiPSC株系经4代到7代损失游离型DNA且因此,多能与基于转基因的再编程因子无关(图3C)。hiPSC株系维持SSEA4、TRA1-81、OCT4和NANOG阳性的未分化细胞的均匀群体。此外,在通常用于多能培养物中的任何清理策略不存在下,这些株系维持多能特征(图3F)(图3D和3E)。当在常规单一细胞传代培养期间用限定的表面涂层玻璃连接蛋白替换基质胶时,观测到均匀的hiPSC培养物的类似扩增(图S10E-10G)。

[0310] 通常在FF环境中以单一细胞形式培养的hESC和hiPSC株系中检测到基因组异常(Laurent等人,2011;Taapken等人,2011)。所有经分析的hiPSC株系的核型分析证明FMM培养物中的基因组稳定性(图4A)。另外,在FMM中维持延长的时间段(25到30代)的单一细胞和经FF培养的hiPSC克隆株继续维持其未分化特征和基因组稳定性,而不需要培养物清洁或选择(图4B)。

[0311] FMM中维持的游离型衍生的hiPSC克隆株也容易导致所有三种体细胞谱系、经由胚状体的活体外分化以及通过畸胎瘤形成的活体内分化(图4C-E)。

[0312] 这些数据证明,FRM和FMM多阶段培养基平台能够使得容易产生无转基因hiPSC克隆株且以FF和单一细胞酶传代形式扩增,而维持多能基因组稳定的细胞的均匀群体。

[0313] 实例4-多阶段培养基平台使得能够用极小基因实现游离型再编程

[0314] 概述

[0315] 具有降低的致癌基因(如KLF4、MYC和LIN28)相关性的有效无印迹表达系统或再编程方法中的阻断基因表现P53的需要对于多能干细胞疗法将具有极大价值(Lee等人,2013;Okita等人,2011;Yu等人,2009)。因为多阶段培养基平台证明为使用OSNKLMT再编程因子的无转基因hiPSC细胞的产生和扩增的极其有效且稳固的平台,针对再编程因子需求测量平台稳固性。

[0316] 结果

[0317] 构建含有极小基因组的若干游离型表达盒,其包括OCT4/NANOG/SOX2(ONS)、OCT4/

SOX2 (OS) 或OCT4/OCT4 (2x0) 以试图改变基因表达组合和剂量 (图5A)。用OCT4、NANOG、SOX2 和SV40LT的组合转染成纤维细胞株且使用FRM/FMM平台培养。在再编程的第13天,单独的SV40LT不产生任何真实SSEA4/TRA1-81阳性细胞,但改良转染后细胞存活率 (图5B和11A)。各种再编程因子组合产生有效再编程,如早期再编程方法中出现SSEA4/TRA1-81阳性群体所展现 (>0.5% (截至第13天,对于OCT4/SOX2/SV40LT) 和>3.5% (对于OCT4/NANOG/SOX2/SV40LT);图5B)。通过比较使用OS+ONS+T相对于2x0+ONS+T再编程的效率 (0.1%:1.03%);比较2x0+ONS+T相对于2x0+ONS+OS+T (1.03%:3.53%);比较2x0+OS+T相对于2x0+ONS+OS+T (0.58%:3.53%);比较ONS+T相对于2x0+ONS+T (0.6%:1.03%);以及比较OS+T相对于2x0+OS+T (0.06%:0.58%) 来显示再编程因子化学计量的作用,其一致地显示向再编程添加2x0的价值。再编程因子化学计量作用表现为来自载体和/或载体组合、包含OCT4的多个载体组合中编码OCT4的多核苷酸的数目和/或相同或所有用于转染的载体中包括的OCT4与其它再编程因子之间的比率。重编程额外几天的培养物的SSEA4/TRA1-81阳性群体明显增加 (截至第16天,>4.0% (对于OCT4/SOX2/SV40LT);图11B)。出人意料地,观测到重编程的细胞的百分比与含有致癌基因KLF4和MYC的慢病毒和游离型诱导的系统相当 (图2B、5B和11B)。

[0318] 在个别hiPSC克隆株的流式细胞测量分选和选择之前,向前携带若干再编程因子组合且转变为FMM培养基。类似于OSNKLMT游离型再编程,克隆hiPSC株系容易衍生自含有极小基因OCT4、SOX2和SV40LT (2x0+OS+T) 的组合以及其它组合 (图5C)。向前携带经过5到7代损失转基因和游离型载体标记物的hiPSC克隆株以便进一步分析 (图5D)。所选克隆株连续地以单一细胞形式在FF环境中传代且维持基因组稳定的未分化细胞的均匀群体且呈现有效地分化成三种体细胞谱系的能力 (图5E-J)。

[0319] 共同地,这些数据指示,通过FRM/FMM中的极小再编程基因的瞬时表达、基于流式细胞测量的再编程平台,容易产生hiPSC。

[0320] 实例5-FMM平台支持基态多能性

[0321] 概述

[0322] 为了进一步评估FMM平台,将通过现有方法重编程的体细胞的基因表达特征与使用本文中涵盖的FMM平台重编程的体细胞的基因表达特征进行比较。评估小分子与常规维持的hiPSC培养物 (Hanna等人,2010b;Saha和Jaenisch,2009) 之间的基因表达差异。

[0323] 结果

[0324] 在一组实验中,评估介导的小分子与常规培养物之间的基因表达模式。产生慢病毒诱导的hiPSC克隆株FTi111且维持在小分子培养物中且显示为多能的。将克隆株直接解冻到包括以下两者的各种培养环境中:i) 具有饲养细胞的常规培养基和ii) 具有饲养细胞或在FF表面上的含有小分子抑制剂的培养基 (图12A和12B)。常规培养物中的hiPSC菌落仅在噻唑维、ROCK抑制剂存在下回收,且随后将回收的细胞转化成结块培养物 (图12B和12C)。每一组培养条件证明独特菌落形态 (图12D) 和多能标记物的基因表达的不同模式 (图12E)。与小分子中维持的其对应培养物相比,饲养细胞上的常规维持的培养物更紧密类似于常规培养物中维持的hESC对照H1和HUES9 (图12E)。这些数据显示,介导的小分子与常规培养物之间存在相异的基因表达模式。

[0325] 同样评估使用慢病毒诱导衍生的hiPSC与常规ESC/饲料培养物和游离型衍生株系以及进一步用在FRM/FMM平台中维持的再编程因子的不同组合衍生的游离型株系之间的基

因表达差异。高含量qRT-PCR分析用于定量与多能性和分化相关的基因表达。大部分调查的多能性基因在FMM培养物中维持的hiPSC与含有饲养细胞的常规培养物之间呈现相当的表达谱(图6A)。然而,在评定与分化相关的基因时,观测到细胞株之间的差异(图6B)。当与在常规培养基中和在饲养细胞上维持的hiPSC和H1 hESC相比较时,FMM维持的hiPSC呈现与三种体细胞谱系相关的大部分基因的较低表达。通过游离型基因组OSNKLMT诱导的株系子组似乎显示外胚层谱系OTX2和TUX1的表达,而此表达在不使用Lin28、KLF4和c-MYC的情况下游离衍生的hiPSC中为可忽略的(图6B)。出人意料地,所测试的所有分化基因的表达在所有衍生自游离型极小基因组且维持在FMM中的hiPSC中受到完全遏制(图6B)。共同地,这些数据指明,FRM/FMM平台可稳固地用极少游离型基再编程因子重编程细胞且可将hiPSC维持在稳定基底多能状态下。

[0326] 测定衍生自以下方法的hiPSC的总体基因表达模式:i)游离型诱导维持在FMM中,ii)游离型诱导维持在FMM中,但切换到常规培养基持续三代,iii)慢病毒诱导维持在SMC4中;以及iv)慢病毒诱导维持在常规培养物(图13A、13B)中。在评定基因表达谱之前,所有株系都测定为多能的、基因组稳定的;且能够分化成所有三种体细胞谱系。小分子培养物与常规培养物之间区别表达的基因的聚类分析揭示,hiPSC株系基于当前培养条件且不通过初始衍生方法和培养物分群(图13B)。呈现2.5倍表达差异的300个基因的基因本体分类将分化和发育鉴别为常规培养物群组中高度富集的主要类别,而小分子培养物群组中的基因上调主要与细胞增殖调控和性征发育相关(图13C和13D)。

[0327] 重复基因表达分析且直接比较FMM、常规或转变培养系统(FMM、Conv、FMM→Conv、Conv→FMM;图13A)。聚类分析产生基于当前培养系统分离的两个群组,不管产生方法或先前培养系统(图7A)。举例来说,产生hiPSC cloneFTC016-c28且在FRM/FMM平台下维持,之后转变为常规培养物。与培养物一起分群的此克隆株仅维持在常规培养物中且不与其亲本株系一起维持在FMM中;如OKS慢病毒诱导的hiPSC克隆株的株系可见相当的结果,所述克隆株产生于常规培养物中且分群于常规组内直到转变为FMM为止,其后其分群于FMM集群内(图7A)。基因本体将常规培养物分类为富集有与分化和发育相关的基因(即, p 值=2.2E-10,模式说明方法;图7B和13E)。共同地,这些数据显示,与分化倾向相关的基因在FMM培养物中明显减少且hiPSC可被调适成用于FMM培养平台以降低自发分化可能性。

[0328] 汇编基因列表以表现人类多能干细胞的基态和亚稳定状态(De Los Angeles等人,2012;Han等人,2011;Hanna等人,2010a;Hirata等人,2012;Nichols和Smith,2012;Valamehr等人,2012;Zhou等人,2010)(图7C)。针对FMM或常规培养物中的hiPSC株系,进行基于这些基因列表的基因聚类(图7D)。类似于总体基因表达比较,基于其当前培养条件,集中基因聚类显示细胞株分离,其中谱呈现为可互相转化的。举例来说,hiPSC克隆株FTC016-c28从FMM转变到与H1 hESC一起分群且不与其亲本hiPSC株系维持在FMM中常规培养物(图7D)。类似地,衍生自成纤维细胞株系的慢病毒hiPSC克隆株维持在与HUES9 hESC和常规培养物中的其它hiPSC克隆株一起分群的常规培养物中;然而,当切换到FMM时,其与衍生自脐带血以及其它经FMM培养的株系的游离型hiPSC一起分群(图7D)。通过绘制相对于小分子(SMC4/FMM)与常规培养物的各探针组的平均强度测定代表两个群集内的基底和亚稳定状态的基因分布(图7E)。出人意料地,与基态相关的大部分基因显示小分子培养物集群中的表达提高,且在常规培养物集群中检测出与亚稳定状态相关的基因的表达提高(图7E)。

[0329] 将在常规培养物中培养和维持的hiPSC的X不活化状态与其被调适成用于小分子培养物且维持10代的对应物进行比较(图7F)。当与常规培养物相比较时,小分子培养物中维持的hiPSC显示X染色体基因表达提高,其表明沉默X染色体的再活化(图7F)。显著异常为X非活性特定转录物(XIST),其在开关中下调为小分子培养物(图7F)。X活化的进一步证据通过FMM中相对于其被调适成用于常规培养基的对应培养物经培养的hiPSC中的H3K27me3的差异染色提供(图7G)。FMM中的大部分hiPSC缺乏H3K27me3染色;而,常规培养物中的大部分hiPSC呈现具有降低的核尺寸外观的H3K27me3核焦点,其表明X不活化(与常规培养物中的>90% H3K27me3染色相比FMM中<10% H3K27me3染色;图7G)。。

[0330] 实例6-小分子培养物中的hiPSC维持

[0331] 在培养物融合度达到75-90%后,衍生的hiPSC(用再编程因子的各种组合诱导的成纤维细胞或血液-细胞,所述再编程因子包括OCT4/NANOG/SOX2、OCT4/ECAT1/UTF1或OCT4/ECAT1/UTF1/ESRRB/NANOG)常规地以单一细胞形式传代。对于单一细胞解离,hiPSC用磷酸盐缓冲盐水(PBS)(美的泰克(Mediatech))洗涤一次且在37°C下经细胞消化液(密理博)处理3到5分钟,之后移液以确保单一细胞解离。随后以与常规培养基相等的体积混合单一细胞悬浮液,在225g下离心4分钟,再悬浮于去向维持培养基(FMM)中且接种于hESC限定的基质胶(康宁)涂布的表面上。制备基质胶且用于根据制造商的说明涂布表面。代数典型地为1:3-1:6,在37°C下组织培养板此前涂布有基质胶1到4小时,且每隔两到三天喂食FMM。在设定在37°C下和5%CO₂的含湿气培育箱中维持细胞培养物。常规培养基由DMEM/F12(美的泰克)、20%基因敲除血清置换(生命技术公司)、1×GlutaGro(美的泰克)、1×非必需氨基酸(NEAA)(美的泰克)、1×Pen/Strep(美的泰克)和100μMβ-巯基乙醇组成。FMM由补充有5μM噻唑维(内部合成)的常规培养基、0.4μM PD0325901(生物视野(Biovision))、1μM CHIR99021(生物视野)、100ng/mL bFGF(生命技术公司)和10ng/mL hLIF(密理博)组成。FMM中扩增的培养物的流程分析和形态呈现在图18A-D和19A-B中。FMM中扩增的细胞也证明历经多代的正常核型,如图20A-C中所示。

[0332] 实例7-用小分子培养物中的极小基因再编程

[0333] 为了引发再编程,通过慢病毒转导,使用NIL、传统的整合慢病毒或游离型载体的电穿孔诱导再编程因子的异位表达。如图14A-B中所示,慢病毒表达系统由包括EF1α启动子、特定基因组合(表3)和3'端处的LOXP位点的若干特征组成以允许整合转基因的CRE介导的切除。在CRE切除后,衍生的hiPSC基因组不再含有转基因且基本上为无印迹的。如图14C-F中所示,游离型构建体具有独特特征,包括EF1α启动子和独特再编程因子。在转染后,游离型构建体残留于原子核中且以不整合到基因组中的反式介导的方式起作用。

[0334] 对于慢病毒感染,根据制造商的说明,起始人类成纤维细胞以每孔涂布有基质胶(康宁)的6孔板接种 7×10^4 - 1×10^5 个细胞。以1:2(一个部分慢病毒上清液:一个部分成纤维细胞培养基)的稀释度将来自293T细胞的新鲜慢病毒上清液添加到起始细胞中。NIL病毒上清液以1×浓度使用且不经稀释。如果使用此前冷冻的病毒,那么其不经稀释且以1×浓度使用。将各种因子的病毒上清液组合(表3)直到每6孔总共2mL培养基。此补充有5μg/mL凝聚胺(密理博)和10mM羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes)(美的泰克(Mediatech)),继而自旋感染。用石蜡膜密封六个孔培养板且在600g下在32°C下离心90分钟。随后将培养板转移到37°C和5%CO₂培育箱持续12-16小时。在与慢病毒一起培育之后,用PBS洗涤细胞且将培养基切换

为含有一个部分去向再编程培养基 (FRM) 和一个部分成纤维细胞培养基的50/50培养基。在感染后4到6天之间,将培养基完全切换为FRM。FRM由补充有5 μ M噻唑维 (内部合成)、0.4 μ M PD0325901 (生物视野)、1 μ M CHIR99021 (生物视野)、2 μ M SB431542 (生物视野)、100ng/mL bFGF (生命技术公司)、10ng/mL hLIF (密理博) 1 \times N2补充剂 (生命技术公司) 和1 \times B27补充剂 (生命技术公司) 的常规培养基 (上文所描述) 组成。在孔融合后,细胞传代于此此前涂布有基质胶的10cm盘上。传代由用经基质胶涂布的表面与细胞消化液 (密理博) 解离组成 (如上文所描述)。在第14天与第18天之间或当iPSC菌落开始出现时,将培养基从FRM切换到FMM。单一细胞解离的细胞扩增于具有FMM的经基质胶涂布的培养板上且维持直到流式细胞测量分选为止。hiPSC表型的表达结果呈现于表3、图15A-C (第8天到第15天)、图16A-D和图17A-B (第4周的Oct4/Ecat1/Utf1/Esrrb/Nanog) 中。图24显示SSEA4+/TRA181+/CD30+96孔培养板分选的克隆株图像,显示CRE介导的切除后的iPSC表型。从最初衍生自人类成纤维细胞,用慢病毒因子OCT4、ECAT1、UTF1、NANOG和ESRRB重编程,且随后切除转基因的iPSC克隆株分选这些菌落。本领域技术人员将容易地了解,本文所描述的方法、组合物和产物代表示例性实施例,且不预期限制本发明的范围。本领域技术人员将显而易见,可在不脱离本发明的范围和精神的情况下,对本文所公开的本发明作出不同取代和修饰。

[0335] 表3:再编程因子组合和多能表型表达

载体系统	通过流式细胞测量进行 SSEA4/Tra181 表达		iPSC 形态
	第 13 天到第 18 天流量 (%)	第 21 天到第 27 天流量 (%)	
OCT4-P2A-OCT4 ECAT1-P2A-UTF1	0.00	0.06	+
OCT4-P2A-OCT4 NANOG-P2A-ESRRB-T2A-LIN28 ECAT1-P2A-UTF1	0.02	0.19	++
OCT4-P2A-ESRRB OCT4-P2A-NANOG ECAT1-P2A-UTF1	0.10	1.29	++
[0336] OCT4-P2A-NANOG ECAT1-P2A-UTF1	0.05	0.14	++
OCT4 -P2A-NANOG-T2A-SOX2 SV40LT	0.14	0.90	++
OCT4-P2A-OCT4 OCT4-P2A-NANOG-T2A-SOX2 SV40LT	0.00	1.46	++
OCT4-P2A-OCT4 ECAT1-P2A-UTF1 SV40LT	0.03	0.90	+
OCT4-P2A-DPPA2 OCT4-P2A-ESRRB ECAT1-P2A-UTF1	0.03	0.11	+
OCT4-P2A-OCT4	0.02	0.12	+
[0337] OCT4-P2A-ESRRB ECAT1-P2A-UTF1			

[0338] 对于游离型载体再编程,使用NEON转染系统 (生命技术公司) 进行图13中说明的使用质粒转染成纤维细胞或脐带血细胞。大致地,在如产品手册所描述的适当的缓冲剂中,使用设置1650v/10ms/3脉冲,用EBNA (呈mRNA形式或作为克隆质粒pCDNA中的盒) 将总共3 μ g含

有再编程因子的游离型质粒共转染到 5×10^5 个成纤维细胞或 2.5×10^5 个脐带血细胞中。经转染的细胞直接接种于涂布有基质胶、含有成纤维细胞培养基或脐带血培养基(取决于细胞类型)的一孔板的孔上,所述培养基补充有4ng/mL bFGF和5 μ g/mL纤维结合蛋白(BD生物科学(BD Biosciences)),无抗生素。脐带血培养基由SFMI+CC110(干细胞技术)组成。转染后二十四小时,以相等体积将FRM添加到培养物中。对于成纤维细胞培养物,转染后四十八小时,将50 μ g/mL潮霉素(康宁)添加到培养物中。在第5天,将培养基完全切换为FRM,其中潮霉素在转染后7天去除。在转染后14天,将所有再编程培养物切换为FMM。对于脐带血培养物,在转染后二十四小时,FRM以相等体积添加且每隔几天连续地添加直到转染后14天为止,其中抽吸培养物且完全替换为FMM。在两种情况下,在转染后约5到7天可见粘着圆形细胞群集。在FMM中后,维持所有再编程培养物且使用细胞消化液在经基质胶涂布的表面(上文所描述)上使单一细胞传代。单一细胞解离的细胞扩增于具有FMM的经基质胶涂布的培养板上且维持直到流式细胞测量分选为止。

[0339] 实例8-再编程因子和其化学计量的影响

[0340] 人类成纤维细胞自旋感染有含有若干再编程因子的慢病毒。使用不含有抗生素选择因子的慢病毒质粒,使所有样品感染有OCT4、SOX2、NANOG和SV40LT。细胞共感染有含有嘌呤霉素选择盒以及各种再编程因子的单一慢病毒质粒。这些因子包括OCT4-P2A-SOX2、OCT4-P2A-NANOG-T2A-SOX2或OCT4-P2A-OCT4。感染后两天,将50/50培养基中的500ng/mL嘌呤霉素(生命技术公司)各自添加到孔中。在第5天,在三天嘌呤霉素选择之后,将培养基改变为不具有嘌呤霉素的FRM。在第14天,将培养基切换为FMM。第24天与第27天之间,针对SSEA4+/TRA181+群体,进行流程分析。观测到,提高的OCT4表达(包括使用编码构建体中的OCT4的多个多核苷酸或在相同载体中使用重复OCT4多核苷酸)明显提高再编程效率(图23A)。

[0341] 实例9-实验程序

[0342] 常规培养系统中的hiPSC维持

[0343] 常规地培养的hiPSC维持在经丝裂霉素C处理的MEF(密理博)饲养细胞上且用含有DMEM/F12(美的泰克)、20%v/v基因剔除血清置换(生命技术公司)、1%v/v非必需氨基酸(美的泰克)、2mM-谷氨酰胺(美的泰克)、100 μ M β -巯基乙醇(生命技术公司)和10ng/mL bFGF(生命技术公司)的常规培养基(在本文中称为常规培养基)培养。在融合后,常规地培养的hiPSC使用1mg/mL胶原蛋白酶IV(生命技术公司)以酶促方式在37 $^{\circ}$ C下解离7分钟,继而机械解离成较小碎片(称为结块传代),采集且每隔5到7天,在每天添加常规培养基的情况下,稀释传代1:3-1:4于新鲜接种的饲养细胞上。在过度自发分化的情况下,手动地挑取菌落且使用胰岛素注射器的尖端(百克顿迪金森公司(Becton Dickinson))切割成较小碎片且转移到新鲜接种的饲养细胞中。在设定在37 $^{\circ}$ C下和5%CO₂的含湿气培育箱中维持细胞培养物。

[0344] 体细胞再编程

[0345] 为了引发再编程,通过慢病毒转导或游离型载体转染诱导再编程因子的异位表达。慢病毒转染如先前所描述进行(Valamehr等人,2012)。简单来说,在经基质胶(BD生物科学)涂布的表面上以6孔板的每孔 1×10^5 个细胞来接种起始细胞。除非说明,否则所有基质胶涂层由将基质胶溶液(1等分试样再悬浮于25mL DMEM/F12中的基质胶)添加到组织培养

物表面且允许在37℃下培育2到4小时组成。以1:2的稀释度(一个部分慢病毒上清液:一个部分成纤维细胞培养基)将产生表达转基因OCT4/SOX2/KLF4的慢病毒的293T细胞的上清液(补充有4μg/mL凝聚胺(密理博))添加到起始细胞中,且转移到37℃和5%CO₂持续12到16小时。成纤维细胞培养基:DMEM(美的泰克)、10%FBS(生命技术公司)、1×格魯塔玛(生命技术公司)、1×非必需氨基酸(美的泰克)。在与慢病毒一起培育之后,细胞用PBS洗涤三次且用成纤维细胞培养基喂养。转染后48小时,将培养基切换为含有一个部分FRM(或SMC4)和一个部分成纤维细胞培养基的50/50培养基。在培养物传代到较大容器中后,通常感染后第4天到第6天之间,培养基完全切换为FRM(或SMC4)。传代由用细胞消化液解离于经基质胶涂布的表面上组成(如下文所描述)。培养物维持在FRM(或SMC4)中直到下一应用为止。

[0346] 对于游离型载体再编程,使用基因组OCT4/SOX2/NANOG/KLF4/LIN28/MYC/SV40LT(A14703,生命技术公司)的成纤维细胞或脐带血细胞转染使用NEON转染系统(生命技术公司)进行。大致地,在如产品手册所描述的适当的缓冲剂中,使用设置1650v/10ms/3脉冲,将4μg载体组转染到5×10⁵个成纤维细胞或2.5×10⁵个脐带血细胞中。将经转染的细胞直接接种到10cm盘(成纤维细胞)或涂布有基质胶且含有成纤维细胞培养基或脐带血培养基(取决于细胞类型)(补充有10ng/mL bFGF和5μg/mL纤维结合蛋白(BD生物科学))的6孔板的孔(脐带血)中。脐带血培养基:SFMII+CC110(干细胞技术)。转染后二十四小时,以相等体积将FRM添加到培养物中。对于成纤维细胞培养物,转染后四十八小时,将50μg/mL潮霉素(美的泰克)添加到培养物中。在第5天,将培养基完全切换为FRM,其中潮霉素在转染后第7天去除。在转染后第14天,将所有再编程培养物切换为FMM。对于脐带血培养物,在转染后二十四小时,FRM以相等体积添加且每隔几天连续地添加直到转染后14天为止,其中抽吸培养物且完全替换为FMM。在两种情况下,在转染后约第5天到第7天可见粘着圆形细胞群集。在FMM中后,维持所有再编程培养物且使用细胞消化液单一细胞传代。单一细胞解离的细胞扩增于具有FMM的经基质胶涂布的培养板上且维持直到流式细胞测量分选为止。在玻璃连结蛋白(生命技术公司)表面涂层研究中,所有方面保持相同,不同之处在于玻璃连结蛋白取代基质胶。对于降低的因子游离型再编程,构建pCEP4(生命技术公司)载体主链以在EF1α启动子的调控下含有OCT4-P2A-OCT4、OCT4-P2A-SOX2或OCT4-P2A-NANOG-T2A-SOX2。除了极少修饰之外,降低的因子游离型载体的转染遵循如上文所描述的相同方案。EBNA共转染为EBNA mRNA(20μg)或载体盒(2μg)(Howden等人,2006)。潮霉素选择维持10天且在第16天引入FMM。

[0347] 产生慢病毒

[0348] 293T(ATCC)维持在不具有抗生素的成纤维细胞培养基中且不允许达到超过80%融合度。成纤维细胞培养基由DMEM(美的泰克)、10%胎牛血清(FBS)(生命技术公司)、1×GlutaGro(美的泰克)和1×NEAA(美的泰克)组成。通过首先用PBS洗涤,继而在37℃下用0.05%胰蛋白酶(美的泰克)培育4分钟来使细胞传代。使解离的细胞再悬浮于成纤维细胞培养基中,在225g下离心4分钟且接种于所需培养板上。为了产生整合慢病毒,对于各病毒制备,在第1天,以每10cm盘3.5×10⁶个细胞使293T传代。在第2天,在转染之前1小时,将培养基改变为10mL新鲜成纤维细胞培养基。使用CalPhos套组(克隆科技公司(Clontech))转染DNA。组合以下以便转染:5μg含有相关基因的慢病毒克隆质粒、3.2μg封装质粒pPAX、630ng封装质粒pMDG、87μL钙溶液和水直到700μL。添加700μL HBS溶液,同时使用1mL血清学移液管产生气泡。此在室温下培育15分钟,且随后逐滴添加到10cm 293T培养板上。在第3

天,去除病毒上清液,丢弃,且将15mL新鲜成纤维细胞培养基添加到培养板中。在第4天,转染后48小时,采集病毒上清液且储存在4℃下。将15mL成纤维细胞培养基添加到培养板中。在第5天,转染后72小时,采集病毒上清液且添加到第4天上清液中。使用0.45μm过滤器过滤此病毒池且使用Lenti-X GoStix(克隆科技公司)检查效价。病毒用于感染或在-80℃下冷冻在等分试样中。为了产生非整合慢病毒(NIL)(英伟杰),根据制造商说明,使用各病毒制备的T75烧瓶,遵循方案。转染后48、72和96小时采集病毒上清液,混合,过滤且滴定,如上文所描述。NIL病毒用于感染或在-80℃下冷冻在等分试样中。

[0349] hiPSC维持在小分子培养物中

[0350] 在培养物融合度达到75-90%后,衍生的hiPSC常规地以单一细胞形式传代。应注意,过度融合可能导致分化。对于单一细胞解离,hiPSC用磷酸盐缓冲盐水(PBS)(美的泰克)洗涤一次且在37℃下经细胞消化液处理3到5分钟,之后移液以确保单一细胞解离。随后以与常规培养基相等的体积混合单一细胞悬浮液,在225g下离心4分钟,再悬浮于FMM中且接种于经基质胶涂布的表面上。代数典型地为1:4-1:8,转移此前在37℃中涂布有基质胶2-4小时的组织培养板且每隔一天用FMM喂饲。在设定在37℃下和5%CO₂的含湿气培育箱中维持细胞培养物。FMM和FRM的培养基调配物描述于表1中。此前论述SMC4培养物(Valamehr等人,2012)。简单来说,将小分子0.4mM PD0325901(生物视野)、1mM CHIR99021(生物视野)、5mM噻唑维和2mM SB431542(生物视野)添加到常规培养基中且根据方案传代。

[0351] 流式细胞测量分析和分选

[0352] 使单一细胞解离的(上文所描述的)再编程库再悬浮于冷却的染色缓冲液中,所述缓冲液含有汉克氏平衡盐溶液(美的泰克)、4%胎牛血清(英杰公司(Invitrogen))、1×青霉素/链霉素(美的泰克)和10mM羟乙基哌嗪乙硫磺酸(美的泰克)。将共轭的第一抗体(包括SSEA4-FITC、TRA1-81-Alexa荧光剂-647和CD30-PE(BD生物科学))添加到细胞溶液中且在冰上培育15分钟。每一百万细胞以7-10μL在100μL染色缓冲液中使用所有抗体。在染色缓冲液中洗涤溶液一次,在225g下旋转减慢持续4分钟且再悬浮于含有10μM噻唑维的染色缓冲液中且维持在冰上以用于流式细胞测量分选。使用上文所描述的分选策略,在FACS Aria II(BD生物科学)上进行流式细胞测量分选。使用100μm喷嘴,以每孔3和9个事件的浓度,将分选的细胞直接弹射到96孔培养板中。每孔分选3个细胞为优选的浓度,因为我们注意到,分选的事件不一定与分选后各孔中可见的实际细胞数目相关且每孔3个细胞为我们提供含有个别菌落的优选孔数。各孔预填充有200μL FMM,其补充有5μg/mL纤维结合蛋白和1×青霉素/链霉素(美的泰克)且此前经5×基质胶涂布隔夜。5x基质胶预涂布包括将一个等分试样基质胶添加到5mL DMEM/F12中,随后在4℃下培育隔夜以允许恰当再悬浮且最终以50μL每孔添加到96孔培养板中,继而在37℃下培育隔夜。紧接在将培养基添加到各孔之前抽吸5×基质胶。在完成分选后,在培育之前在225g下离心96孔培养板1到2分钟。培养板保持不受干扰七天。在第七天,从各孔去除150μL培养基且替换为100μL FMM。在分选后第10天孔再馈送额外100μL FMM。早在第2天就检测出菌落形成且大部分菌落在分选后第7天到第10天之间扩增。在第一次传代中,用PBS洗涤孔且在37℃下用30μL细胞消化液解离大约10分钟。延长的细胞消化液处理的需要反映已在培养物中闲置较长时间的菌落的紧密性。在见到细胞解离之后,将200μL FMM添加到各孔中且用移液管移取若干次以打碎菌落。将解离的菌落转移到此前涂布有5×基质胶的96孔培养板的另一孔,且随后在培育之前在225g下离心2分

钟。进行此1:1传代以传播早期菌落。后续传代常规地用细胞消化液处理3到5分钟进行且1:4扩增到此前在FMM中涂布有1×基质胶的较大孔中。流式细胞测量分析在Guava EasyCyte 8HT (密理博) 上进行且使用FCS表达4 (De Novo软件) 分析。

[0353] 实时RT-PCR和富鲁达分析

[0354] 使用Pico Pure RNA分离套组 (生命技术公司) 分离总RNA。使用iScript cDNA合成套组 (拜耳雷德 (Bio-Rad)), 由100ng经分离的总RNA逆转录互补DNA (cDNA)。使用塔克曼PreAmp预混液套组 (生命技术公司) 和0.2×浓度的混合塔克曼分析, cDNA随后用于22个特定靶基因和两个参考对照基因的预扩增。使用14次扩增循环进行cDNA的特异性目标扩增 (STA), 其中标准循环条件陈述在制造商的方案中。预扩增的cDNA反应物 (n=48) 以1:5稀释 (在无菌水中) 且用作实时定量PCR反应的模板。使用NanoFlex IFC控制器MX (富鲁达) 装载48.48动态阵列 (富鲁达), 其中塔克曼分析装载两次且实时反应使用生物标记实时PCR系统 (富鲁达) 进行。使用生物标记实时PCR分析软件 (富鲁达) 分析结果。计算不包括循环阈值 (Cts) 高于32的样品。针对六个对照MEF细胞株 (MEF上的OSK hiPSC和H1 ESC) 的中值, 由两次分析计算平均Cts且使用两个参考基因 (GAPDH和HPRT1) 的平均值计算 δ - δ Cts ($\Delta \Delta$ Ct)。相对基因表达 (RQ) 结果以热图形式呈现在Excel (微软) 中。

[0355] 表4.FAM标记的塔克曼探针

[0356]

分析 ID	目录号 (生命科技)	基因符号	RefSeq*
Hs00232764_m1	4331182	FOXA2	NM_021784.4;NM_153675.2
Hs00173490_m1	4331182	AFP	NM_001134.1
Hs00171403_m1	4331182	GATA4	NM_002052.3
Hs00751752_s1	4331182	SOX17	NM_022454.3
Hs00610080_m1	4331182	T	NM_003181.2
Hs00607978_s1	4331182	CXCR4	NM_003467.2;NM_001008540.1
Hs00415443_m1	4331182	NODAL	NM_018055.4
Hs02330075_g1	4331182	MYOD1	NM_002478.4

[0357]

Hs00240871_m1	4331182	PAX6	NM_001127612.1
Hs00801390_s1	4331182	TUBB3	NM_001197181.1;NM_006086.3
Hs00374280_m1	4331182	STAT3	NM_139276.2;NM_213662.1;NM_003150.3
Hs04260366_g1	4331182	NANOG	NM_024865.2
Hs00602736_s1	4331182	SOX2	NM_003106.3
Hs00399279_m1	4331182	ZFP42	NM_174900.3
Hs01003405_m1	4331182	DNMT3B	NM_001207055.1;NM_001207056.1;NM_006892.3;NM_175848.1;NM_175850.2;NM_175849.1
Hs00702808_s1	4331182	LIN28A	NM_024674.4
Hs99999003_m1	4331182	MYC	NM_002467.4
Hs01081364_m1	4331182	DNMT3L	NM_013369.2;NM_175867.1
Hs00360439_g1	4331182	KLF2	NM_016270.2
Hs00222238_m1	4331182	OTX2	NM_172337.1;NM_021728.2
Hs00242962_m1	4331182	PAX7	NM_001135254.1;NM_002584.2;NM_013945.2
Hs00414521_g1	4331182	DPPA2	NM_138815.3
Hs00216968_m1	4331182	DPPA4	NM_018189.3
Hs99999905_m1	4331182	GAPDH	NM_002046.4
Hs01003267_m1	4331182	HPRT1	NM_000194.2
定制的塔克曼基因表达分析			
基因	正向引物	反向引物	
OCT4	GGGTTTTTGGGATT AAGTTCTTCA (SEQ ID NO: 14)	GCCCCCACCCTTTGT GTT (SEQ ID NO: 15)	
KLF4	AGCCTAAATGATGG TGCTTGGT (SEQ ID NO: 16)	TTGAAACTTTGGCT TCCTTGTT (SEQ ID NO: 17)	

[0358] *RefSeq是指各基因的NCBI参考序列鉴别。

[0359] 测试转基因的存在

[0360] 使用QIAamp®DNA微型套组和蛋白酶K消化(凯杰)分离基因组DNA。使用转基因特异性引物组(下文表5)(Yu等人,2007),使用Taq PCR预混液套组(凯杰)使100ng基因组DNA扩增。PCR反应操作35次如下循环:94℃持续30秒(变性),60-64℃持续30秒(退火)和72℃持续1分钟(延伸)。来自成纤维细胞的基因组DNA和使用慢病毒方法产生的hiPSC用作阴性对照。游离型构建体的DNA用作阳性对照。

[0361] 表5.转基因特异性引物组

[0362]

扩增区域	正向	反向
游离型转基因的Oct4-Oct4区域	CAGGCCCGAAAGAGAAAGCG (SEQ ID NO: 18)	GGAGGGCCTTGGAAGCTTAG (SEQ ID NO: 19)
游离型转基因的Oct4-NANOG区域	TATACACAGGCCGATGTGGG (SEQ ID NO: 20)	TTGACCGGGACCTTGTCTTC (SEQ ID NO: 21)

[0363]

游离型转基因的 OCT4-SOX2 区域	GTGGTCCGAGTGTGGTTCTG (SEQ ID NO: 22)	GTTCTCCTGGGCCATCTTGC (SEQ ID NO: 23)
Lin28-SV40pA 游离 型转基因	AAGCGCAGATCAAAAGGAGA (SEQ ID NO: 24)	CCCCCTGAACCTGAAACATA (SEQ ID NO: 25)
WPRES 慢病毒元件	TGCTTCCCGTATGGCTTTC (SEQ ID NO: 26)	AAAGGGAGATCCGACTCGTCTG (SEQ ID NO: 27)
EBNA1	ATCGTCAAAGCTGCACACAG (SEQ ID NO: 28)	CCCAGGAGTCCCAGTAGTCA (SEQ ID NO: 29)
人类 GAPDH	GTGGACCTGACCTGCCGTCT (SEQ ID NO: 30)	GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT (SEQ ID NO: 31)

[0364] 免疫细胞化学分析

[0365] 使用4% v/v多聚甲醛(阿法埃莎(Alfa Aesar))固定细胞,用含有0.2% v/v吐温(PBST)(飞世尔科技公司(Fisher Scientific))的PBS洗涤三次且使用0.15% v/vTritonX-100(西格玛-阿尔德里奇)在PBS中在25℃下透化1小时。在透化之后,在25℃下用1% v/vBSA(英杰公司)在PBST(PBSTB)(飞世尔科技公司)中封端细胞30分钟。在轻微去除PBSTB之后,在4℃下用PBSTB中的初级抗体培育细胞隔夜。在本研究中使用的的第一抗体包括OCT4(圣克鲁兹(Santa Cruz))、NANOG(圣克鲁兹)、TRA160(密理博)、TRA1-81(密理博)、SSEA4(密理博)、 β -III微管蛋白(TUJ1,安迪生物公司)、 α -平滑肌肌动蛋白(西格马)、FoxA2(安迪生物公司)、Sox17(安迪生物公司)、NESTIN(艾博抗(Abcam))和 α -1-胎蛋白(达科公司(Dako))。在培育隔夜之后,细胞用PBST洗涤三次且在PBSTB中在37℃下用1:250稀释的二级抗体(Alexa荧光剂488或555;英杰公司)染色1小时。在PBST中洗涤细胞三次且用赫斯特染料(英杰公司)染色。对于H3K27me3染色分析,在盖玻片上使hiPSC生长72到96小时,且在25℃下用PBS中的4%多聚甲醛(电子显微科学,EMS)固定15分钟。在25℃下,用PBS中的0.1% Triton X-100进行细胞透化1小时,且随后在25℃下用阻断溶液(1% BSA在PBS中)培育细胞30分钟。在阻断之后,用阻断溶液中的1:1600稀释度的抗三甲基组蛋白H3(Lys27)抗体(密理博07-449,H3K27me3)培育盖玻片,在4℃下隔夜。第二抗体为Alexa荧光剂555山羊抗兔IgG(生命技术公司,A21429)。用DAPI复染细胞核且用Axio观测器倒置显微镜(卡尔蔡司(Carl Zeiss))观看。用AxioVS40 v4.8.1.0(卡尔蔡司成像解决方案公司)捕获图像。

[0366] 使用4% v/v多聚甲醛(阿法埃莎)固定根据实例7重编程的细胞,用PBS(美的泰克)洗涤且在25℃下使用PBS中的0.15% v/v TritonX-100(西格玛-阿尔德里奇)透化1小时。在透化之后,在25℃下用PBS(PBSB)中的1% v/v BSA(西格马)封端细胞30分钟。在轻微去除PBSB之后,在4℃下用PBSB中的初级抗体培育细胞隔夜。在本研究中使用的的第一抗体包括OCT4(圣克鲁兹)和TRA181(密理博)。在培育隔夜之后,细胞用PBS洗涤三次且在PBSB中在37℃下用1:250稀释的二级抗体(Alexa荧光剂488或555;生命技术公司)染色1小时。在PBS中洗涤细胞三次且用赫斯特染料(英杰公司)染色。用Axio观测器倒置显微镜(卡尔蔡司)观看染色细胞。用AxioVS40 v4.8.1.0(卡尔蔡司成像解决方案公司)捕获图像。

[0367] 分化分析(EB和导入)

[0368] 在含有DMEM/F12(美的泰克)、20%胎牛血清(英杰公司)、1%非必需氨基酸(美的泰克)、2mM L-谷氨酰胺(美的泰克)和100 μ M β -巯基乙醇的分化培养基中hiPSC分化为EB。简单来说,为了形成EB,第二天将hiPSC接种于FMM中且切换为常规的以填充细胞。在常规培养基中3到4天之后,培养物用细胞消化液(密理博)单一细胞解离且再悬浮于包括10 μ M

Y27632的分化培养基中达到100,000个细胞/毫升的最终浓度。应注意,使用ROCK抑制剂Y27632而非噻唑维来形成EB。以100 μ L/孔将细胞接种于V型底96孔非组织培养板(能肯(Nunc))且在950g下离心5分钟。第二天,在分化培养基中,使用P1000,以大约30-40EB/孔,将紧凑型“球类凝集块”转移到超低粘结6孔板(康宁)。在7天之后,以1:1将EB转移到基质胶涂布的6孔板中且每三天用分化培养基喂养。在培养物中3周之后,固定且染色细胞。对于导入的单层分化,在FMM中将hiPSC接种于基质胶涂布的孔以在第二天达到50%和90%融合度。诱导两种密度以分化。对于神经诱导,FMM培养基替换为补充有10 μ M SB431542和100nM LDN-193189(两种SMAD抑制剂,生物视野)的hESC培养基。在第2天之后,除了双重SMAD抑制剂之外,补充有3 μ M CHIR99021(生物视野)的分化培养基。两天后固定细胞且染色巢蛋白(艾博抗)。对于中胚层分化,培养基替换为补充有1 \times B27培养基添加剂(生命技术公司)、3 μ M CHIR99021、4ng/ml bFGF和10ng/ml BMP4的RPMI(美的泰克)。每隔一天改变培养基且在第4天固定细胞且染色 α SMA(西格马)。使用人类多能干细胞功能鉴别套组(安迪生物公司)进行内胚层分化。hiPSC用内胚层分化培养基培育3天,且固定和染色SOX17(安迪生物公司)。

[0369] 基因表达分析

[0370] 使用PicoPure RNA分离套组(生命技术公司),使用制造商建议的方案提取RNA。使用Nanodrop 2000分光光度计(赛默科技)定量总RNA。简单来说,使用MessageAmp II aRNA扩增套组(应用生物系统公司/安必逊,奥斯汀,德克萨斯州)的标准协议,利用任选的第二轮扩增,由大致100ng总RNA制备生物素化aRNA,且随后使用MessageAmp II生物素增强套组(应用生物系统公司/安必逊,奥斯汀,德克萨斯州),使用标准协议转录成生物素标记的aRNA。纯化生物素标记的aRNA且根据昂飞(Affymetrix)建议碎片化。在45 $^{\circ}$ C下,使用20 μ g碎片化aRNA来与人类基因组U133-加-2.0芯片(昂飞公司,圣克拉拉,加利福尼亚州)杂交16小时。洗涤阵列且在昂飞流体学工作台450中染色且使用昂飞基因芯片扫描仪3000 7G扫描。原始表达数据文件可用于高通量基因表达数据库(GSE50868)上。使用昂飞表达控制台软件,使用默认分析设置,分析图像数据。通过对数尺度稳固多阵列分析(RMA,昂飞)使阵列标准化,且在基因组学4.5(Tibco Spotfire,帕洛阿尔托,加利福尼亚州)的Spotfire中进行目测。有差异地表达的探针的生物学路径富集分析针对基因本体(GO)数据库(GO生物方法的单个富集且p值<0.01),使用注释、目测和整合发现(DAVID v6.7)的数据库进行。使用具有欧几里得距离测量的完全连接聚类方法(基因组学4.5的Spotfire),基于Log2表达水平进行分级聚类以比较样品之间的基因表达谱。通过表达水平(>2.5倍)的总体差异或限定基底或亚稳定状态的靶向基因列表的存在选择聚类的探针组。对于X染色体基因表达比较,通过获取 $2^{[RMA \log_2 \text{强度}]}$,将RMA标准化昂飞基因芯片强度转化成线性表达值。线性表达比率经计算为原初表达组除以预致敏表达组。映射到X染色体的所有探针组的表达比率在Spotfire 4.5中目测,其中探针组突出多于或小于2倍富集比率。

[0371] 核型分析

[0372] 通过WiCell研究院(麦迪逊,威斯康星州)对二十到四十G带中期细胞进行细胞遗传学分析。

[0373] 畸胎瘤形成

[0374] 以每200 μ L溶液(100 μ L FMM和100 μ L基质胶)50万和300万细胞的浓度,将单一细胞

解离的hiPSC皮下注射到NOD/SCID/ γ 缺陷型小鼠中。在5-6周(300万细胞注射液)和7-8周(50万细胞注射液)之后,在PBS中收集畸胎瘤,在室温下在4%多聚甲醛中固定隔夜,且其后在室温下维持在70%乙醇中以供处理。将样品提交到切片和苏木精和伊红染色的UCSD组织学核心设备。检测切片,解释且使用装备有尼康DS-Fi1摄影机的尼康Eclipse TS100显微镜进行拍照。

[0375] 统计分析

[0376] 史都登氏t测试用于关于标准差的统计评估。StepOne软件v2.2(生命技术公司)用于测定关于qRT-PCR数据的RQ最小值和最大值(误差条)。

[0377] 一般来说,在以下权利要求书中,所用术语不应被解释为将权利要求书限于本说明书和权利要求书中所公开的特定实施例,而应被解释为包括所有可能的实施例以及这份权利要求书所有权获得的等效物的全部范围。因此,权利要求书不受本公开限制。

[0378] 实例10-鉴别适用作再编程因子的基因

[0379] 通过如上文所描述的昂飞分析,鉴别适用作再编程因子的多种基因。观测到所有七个基因在再编程期间上调且在分化期间下调(表6)。在表6中,“多能性”指示当与其亲本成纤维细胞株系相比较时iPSC中的基因的提高了的表达的倍数变化;而“分化”指示当iPSC分化且失去多能性时基因的降低的表达的倍数变化。通过取自自发分化引发后第3天和第8天的基因表达的平均值计算分化且与多能iPSC基因表达进行比较。更高值指示在分化后基因表达的更多损失。

[0380] 表6:鉴别适用作再编程因子的基因

[0381]

基因符号	RefSeq	多能性	分化
HESRG	NR_027122.1	1311.793576	9.816086757
CDH1	NM_004360.3	349.3283693	2.306595459
TDGF1	NM_001174136.1	252.708083	34.34190107
DPPA4	NM_018189.3	227.5790587	10.87017303
DNMT3B	NM_001207056.1	112.3955417	29.48821317
ZIC3	NM_003413.3	100.9282337	48.41809793
L1TD1	NM_001164835.1	66.29393573	23.27340672

[0382] 已知HESRG(hES细胞相关的基因蛋白质;UniProtKB登录号:Q1W209)在胚胎卵巢和未分化ES细胞中表达且在ES细胞分化期间下调。编码钙依赖性细胞粘着蛋白质的CDH1(钙粘素-1;UniProtKB登录号:P12830)涉及调控上皮细胞的细胞-细胞粘着、迁移率和增生的机制。相信TDGF1(畸胎瘤衍生的生长因子1;UniProtKB登录号:P13385)在随后产生中胚层的测定外胚层细胞中起作用。DPPA4(发育多能性相关蛋白质4;UniProtKB登录号:Q7L190)可能涉及维持靶基因的表现遗传状态,且抑制胚胎细胞分化到原始外胚层谱系中。全基因组重新甲基化需要DNMT3B(DNA(胞嘧啶-5-)-甲基转移酶3 β ;UniProtKB登录号:Q9UBC3)且对在发育期间建立DNA甲基化模式为至关重要的。已知ZIC3(锌指蛋白质ZIC 3;UniProtKB登录号:O60481)充当转录活化剂,且在最早阶段中在两个轴向中线发展和左侧-右侧(LR)不对称性说明书中需要。L1TD1(含有LINE-1类型转座酶结构域的蛋白质1;UniProtKB登录号:Q5T7N2)可涉及人类胚胎干细胞的自我更新和分化。上述基因中无一者公开于本领域中作为体细胞再编程的可能性转录因子。

[0383] 含有表6中鉴别的再编程基因的组合示例性构建体显示于表7中。

[0384] 表7:用于iPSC再编程的含有化学计量因子的构建体:

[0385]		构建体
	1	OCT4-P2A-OCT4 (00)
	2	ECAT1-T2A-UTF1 (EcU)
	3	NANOG-P2A-ESRRB-T2A-OCT4 (NEO)
	4	CDH1-P2A-ZIC3-T2A-HESRG (CZH)
	5	L1TD1-P2A-DPPA4-T2A-TDGF1 (LDT1)
	6	DNMT3B

[0386] 通过转染各种成纤维细胞,测试由衍生自一种或多种选自表7的表达构建体的基因组合组成的游离型、慢病毒和仙台病毒表达系统中的每一个的再编程效率。通过选择构建体1和3;1和4;1和5;1和6;1、4和5;1、4、5和6;1、4和6;1、5和6;1、2和4;1、3和4;2、5和6;1、2、3、5和6;以及表7中的构建体的任何其它组合获得再编程因子的各种组合。经设计的构建体考虑编码OCT4的多核苷酸数目、包含OCT4的多种载体的组合和/或OCT4与其它再编程因子之间的比率以实现用于提高再编程效率的再编程因子的适当或最佳的化学计量。如所公开的构建体的各种组合不包括在以高效率获得再编程时使用SOX2和Klf4,通过包含OCT4、NANOG、ECAT1、ESRRB、UTF1、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3和L1TD1中的一种或多种的构建体的示例性组合,显示SOX2和Klf4为可分配或可更换的,其中构建体中的OCT4的比率高于其它所包括的因子。

[0387] 当使用游离型表达系统时,在诱导一种或多种构建体的游离型表达之后二十四小时,将再编程培养物转变为FRM以增强再编程动力学。在第一周内观测到早期菌落形成且截至第14天,使用流式细胞测量来检测SSEA4/TRA1-81阳性细胞的群体。在第14天,将FRM支持的再编程培养物转移为FMM培养基。在第21天,使用FACS来将SSEA4/TRA1-81/CD30阳性克隆株分选到96孔培养板中。细胞扩增且维持在FMM中。通过细胞内和表面标记物表达和NANOG的直接qRT-PCR的分析确认hiPSC克隆株数目。通过如表7中所示的游离型构建体的特定组合,同样评估使用96孔分选和选择方法的再编程的效率。

[0388] 此游离型途径以及慢病毒和仙台病毒途径(参见下文)的通量和稳固性进一步用成纤维细胞测试且由极小体积的来自不同年龄、性别和种族的供体的脐带血扩增CD34⁺细胞。在测试的所有株系中观测到SSEA4/TRA1-81/CD30阳性的细胞群体的存在。通过细胞内和表面标记物表达和NANOG的直接qRT-PCR的分析确认hiPSC克隆株数目。通过如表7中所示的游离型构建体的特定组合,同样评估使用96孔分选和选择方法的再编程的效率。

[0389] 当使用慢病毒表达系统时,在诱导一种或多种构建体的慢病毒表达之后二十四小时,将再编程培养物转变为FRM以增强再编程动力学。在第一周内观测到早期菌落形成且截至第14天,使用流式细胞测量来检测SSEA4/TRA1-81阳性细胞的群体。在第14天,将FRM支持的再编程培养物转移为FMM培养基。在第20天到第30天之间,使用FACS来将SSEA4/TRA1-81/CD30阳性克隆株分选到96孔培养板中。替代地,在第20天到第24天之间,针对SSEA4/TRA1-81/CD30阳性细胞,将细胞成批分选到盘中。当融合时,在第10天到第14天之间,使用FACS,针对SSEA4/TRA1-81/CD30阳性细胞,96孔分选细胞。细胞扩增且维持在FMM中。通过细胞内和表面标记物表达和NANOG的直接qRT-PCR的分析确认hiPSC克隆株数目。通过如表7中所示

的慢病毒构建体的特定组合,同样评估使用96孔分选和选择方法的再编程的效率。测试由极小体积脐带血扩增的成纤维细胞和CD34+细胞的此慢病毒途径的通量和稳固性。

[0390] 当使用仙台病毒表达系统时,在使用一种或多种构建体诱导仙台病毒之后二十四小时,将再编程培养物转变为FRM以增强再编程动力学。在第一周内观测到早期菌落形成且截至第14天,使用流式细胞测量来检测SSEA4/TRA1-81阳性细胞的群体。在第14天,将FRM支持的再编程培养物转移为FMM培养基。在第20天到第30天之间,使用FACS来将SSEA4/TRA1-81/CD30阳性克隆株分选到96孔培养板中。替代地,在第20天到第24天之间,针对SSEA4/TRA1-81/CD30阳性细胞,将细胞成批分选到盘中。当融合时,在第10天到第14天之间,使用FACS,针对SSEA4/TRA1-81/CD30阳性细胞,96孔分选细胞。细胞扩增且维持在FMM中。通过细胞内和表面标记物表达和NANOG的直接qRT-PCR的分析确认hiPSC克隆株数目。通过如表7中所示的仙台病毒构建体的特定组合,同样评估使用96孔分选和选择方法的再编程的效率。测试由极小体积脐带血扩增的成纤维细胞和CD34+细胞的此仙台病毒途径的通量和稳固性。

[0391] 实例11-经由仙台病毒载体使用化学计量因子的再编程

[0392] 使用表达再编程因子的仙台病毒来产生来自成纤维细胞的iPSC。如表7中所描绘,将构建体1-5并入到仙台病毒载体(ID药厂,筑波,日本)中。在如先前所描述的条件下用相应病毒载体和各种载体组合转导成纤维细胞以引发再编程(表8)。

[0393] 表8:

[0394]	#	条件
	1	OKS
	2	OKS +OO
[0395]	3	OKS +EcU
	4	OKS +NEO
	5	OKS +CZH
	6	OKS +LDT1
	7	MYC +OO
	8	MYC +NEO
	9	MYC +NEO +OO
	10	MYC +NEO +OO +EcU
	11	NEO
	12	NEO +OO
	13	NEO +EcU
	14	NEO +CZH
	15	NEO +LDT1

[0396] 将再编程培养物转变为FRM以增强再编程动力学。感染后七天,分析细胞的iPSC标记物SSEA4/TRA181的表达。早在第7天,以约1%的比率,仙台病毒载体NANOG-P2A-ESRRB-T2A-OCT4(NEO)与CDH1-P2A-ZIC3-T2A-HESRG(CZH)的组合有效地产生SSEA4和TRA181阳性的细胞群体,指示在不具有Sox和Klf的情况下成功且有效的iPSC再编程(图25)。此外,Myc+NEO+OO+EcU也呈现在不具有Sox和Klf的情况下成功且有效的iPSC再编程(数据未示出)。

[0397] 另外,观测到,含有再编程因子Oct4、Klf和Sox2的仙台病毒以相对较低效率(第7天,0.25%)将成纤维细胞再编程为iPSC(图26A)。通过用表7中列出的再编程因子补充仙台

载体OKS,然而,甚至在感染后第7天再编程的效率明显提高。通过流式细胞测量,在转染后七天,分析成纤维细胞的iPSC标记物SSEA4+/TRA181+的表达。如图26B-D中所示,早在第7天,当OKS分别补充有EcU、LDT1和CZH时,iPSC再编程速率为42.9%、67%和74.3%。iPSC标记物诱导伴有成纤维细胞标记物CD13的下调(数据未示出)。截至转染后第20天,如图27中所示,再编程中CZH与常规因子的协同效应稳定地维持且甚至改良。与仅使用OKS的再编程(0.21%)相比,仍保持EcU(2.01%)和LDT1(45.8%)的协同效应;然而,当与第7天的数据相比较时,作用降低。在不受理论限制的情况下,此类降低可能与携带相应因子组合的相对不佳稳定性相关。且如下文所示,一些病毒载体中可见的稳定性问题可至少部分地通过多重病毒转导分解。

[0398] 当单独用于体细胞再编程的与(1)Oct4和Sox2、(2)Oct4和Klf和(3)Oct4一起使用时,同样评估EcU、LDT1和CZH中的一种或多种的增强作用。在使用一种或多种构建体诱导仙台病毒之后二十四小时,将再编程培养物转变为FRM以增强再编程动力学。当在的第一周内观测到菌落形成时,使用流式细胞测量来检测第7天和/或第14天的SSEA4/TRA1-81阳性细胞的群体。单独的Oct4和Sox2、Oct4和Klf和Oct4分别此前已显示实现不同效率的再编程。考虑EcU、LDT1和CZH的较强增强作用,合理的为预期将那些中的任一种添加到Oct4和Sox2、Oct4和Klf或Oct4将同样成功且如使用Oct4、Sox2和Klf时可见的有效再编程。

[0399] 测试多重转导作为使含有再编程因子的病毒稳定化的策略,且因此进一步改良再编程效率。在第6天,将首先在第0天转导的成纤维细胞拆分成两个样品,且其中的一者在第7天使用第0天使用的相同MOI(感染倍率)再转导。截至第25天检测的iPSC标记物显示在各种测试的再编程因子组合中,OO+EcU+NEO+CZH+LDT1的双重转导具有最高效率,因为与约0.1-0.5%的通常可见的水准相比,SSEA4和TRA181阳性的细胞群体达到10.3%(图28)。另外,使用表9中的各种因子组合,改变各载体的不同MOI的转导以使单一或多重转导再编程最佳化。

[0400] 表9:

#	条件
1	NEO+EcU+CZH+LDT1
2	OO+ EcU+CZH+LDT1
3	NEO+CZH+LDT1
4	OO+ CZH+LDT1
[0401] 5	OO+NEO+EcU+CZH+LDT1
6	O+NEO+EcU+CZH+LDT1
7	NEO+CZH
8	OO+CZH
不同 MOI; 单一或多重转导。	

[0402] 因而,当使用包括OCT4、KLF4、SOX2、NANOG和MYC的一种或多种常规再编程因子时,ECAT1、ESRRB、UTF1、LDT1、CDH1、ZIC3、DPPA4、TDGF1和HESRG确认为可高效地且有效地增强再编程的再编程因子。

[0403] 本领域技术人员将容易地了解,本文所描述的方法、组合物和产物代表示例性实施例,且不预期限制本发明的范围。本领域技术人员将显而易见,可在不脱离本发明的范围

和精神的情况下,对本文所公开的本发明作出不同取代和修饰。

[0404] 本说明书中提到的所有专利和公开案都指示本发明所属领域的技术人员的技能水平。所有专利和公开案以引用的方式并入,其程度如同每一个别公开案专门且单独指定为以引用方式并入。

[0405] 可适当地在不存在本文未具体公开的任何一个多个要素、一个或多个限制的情况下实践本文说明性地描述的公开内容。因此,例如,在本文中的每一种情况下,术语“包含”、“主要由…组成”和“由组成”中的任一个可由其它两个术语中的任一个替换。所采用的术语和表达用作描述而非限制的术语,且在这类术语及表达的使用中不意欲排除所示出和描述的任何等效特征或其部分,但应认识到在在所要求的本发明的范围内的各种修改是可能的。因此,应理解,虽然已通过优选实施例和任选的特征具体地公开了本公开,但本文中所公开概念的修改和变化可由本领域的技术人员采用,且认为这类修改和变化在如由所附权利要求书界定的本公开的范围內。

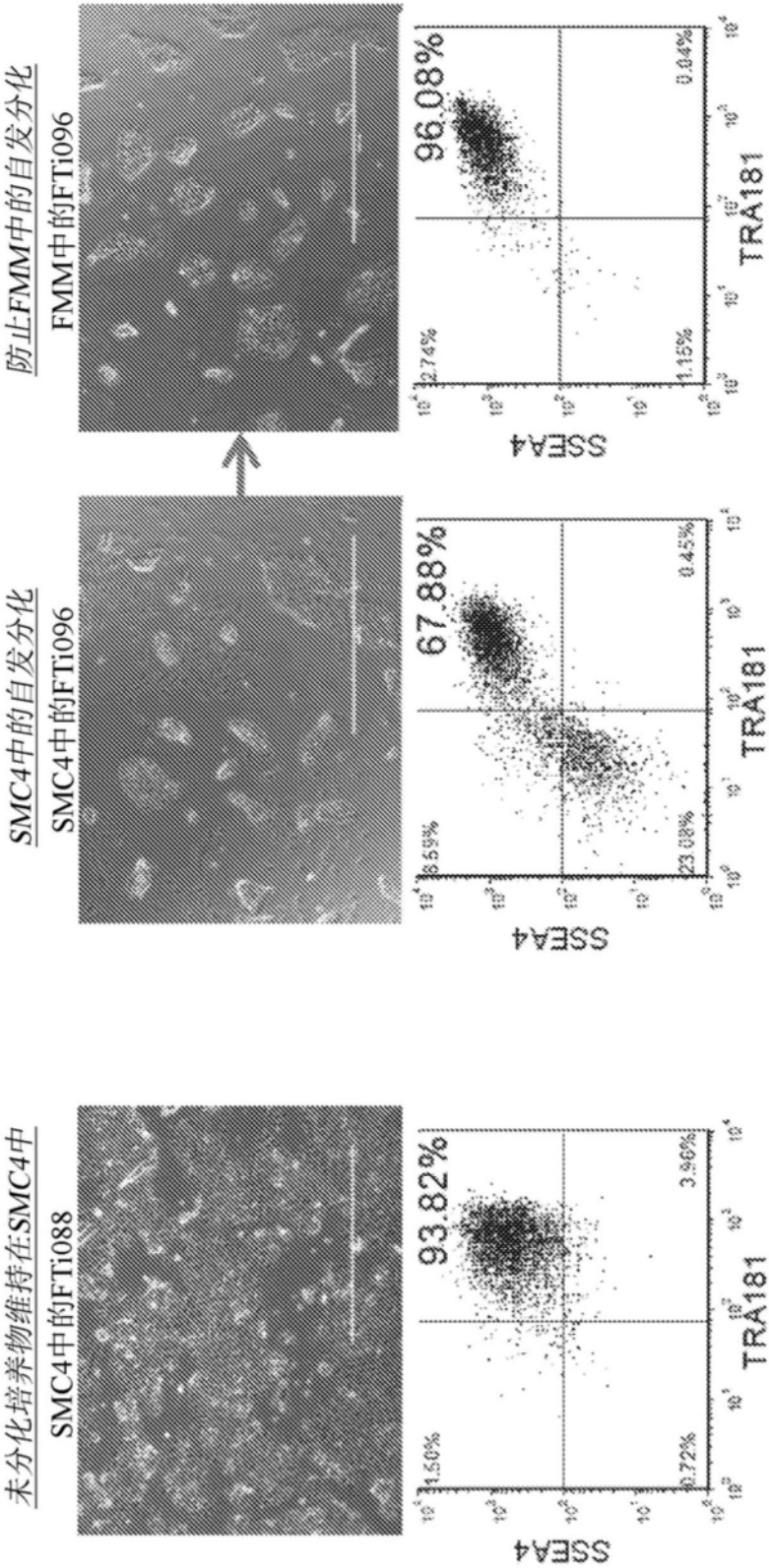


图1A

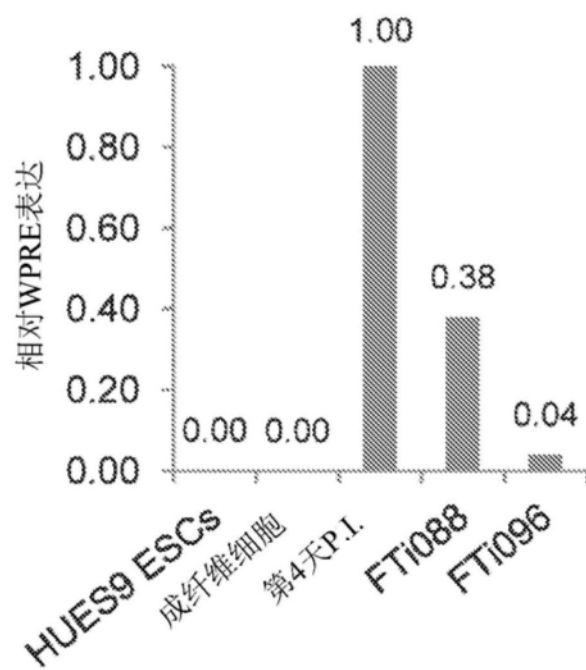


图1B

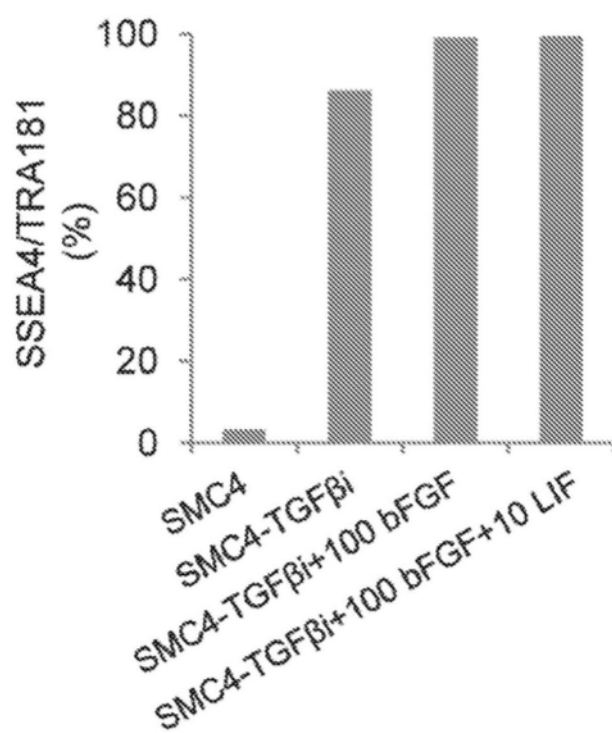


图1C

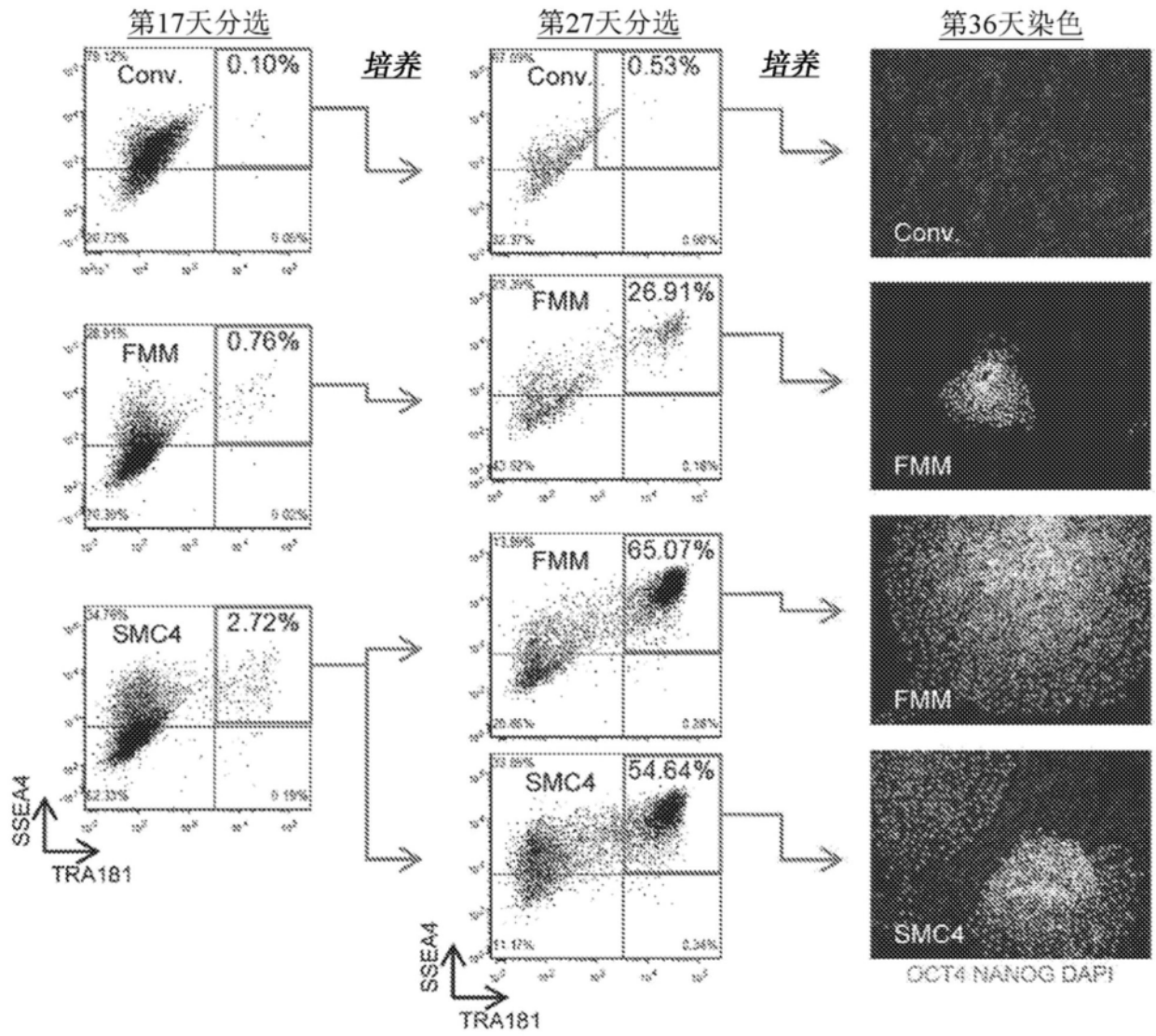


图1D

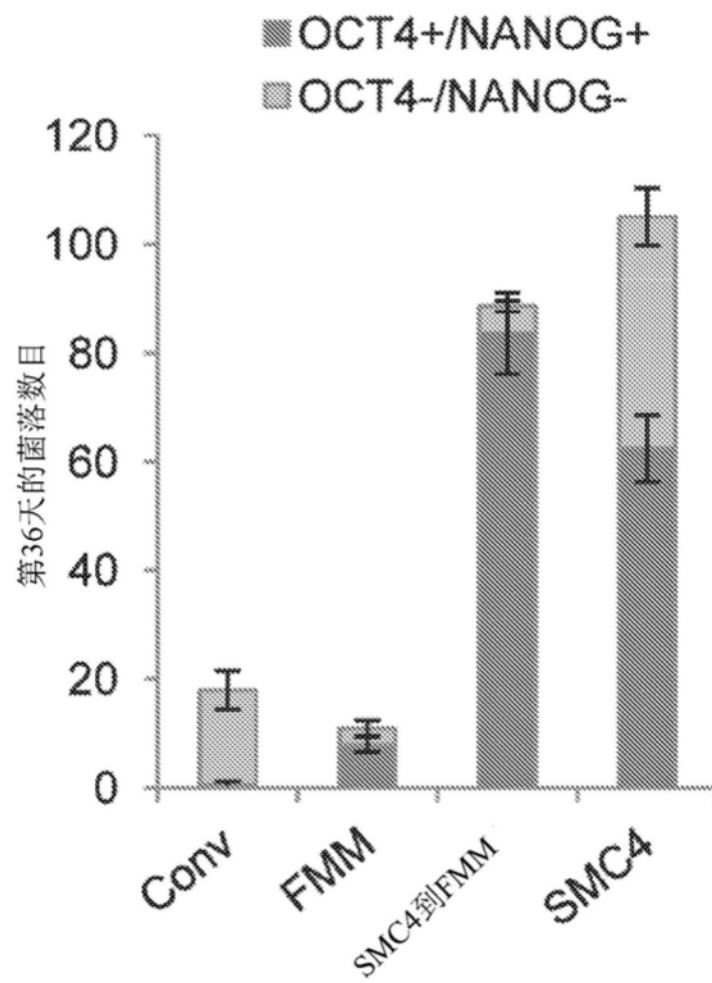


图1E

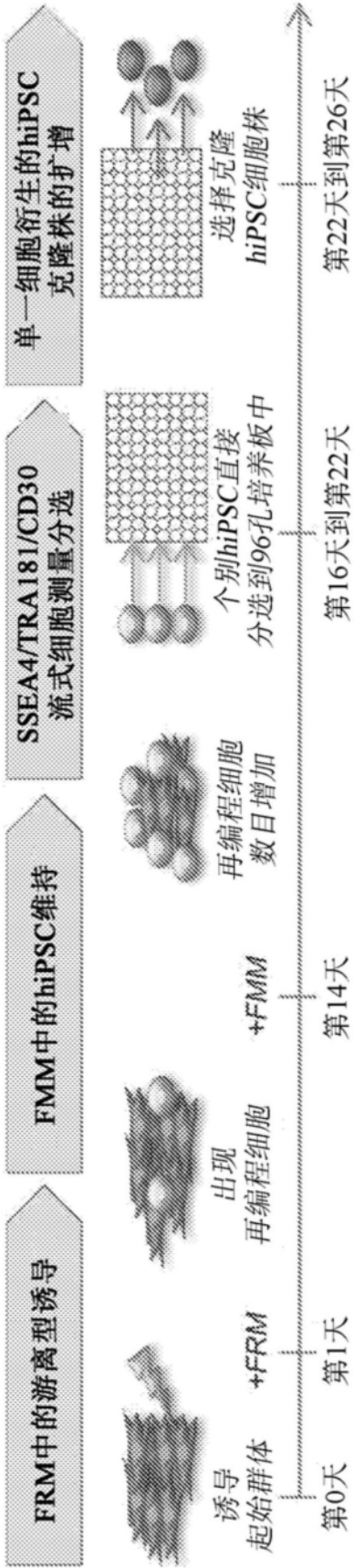


图2A

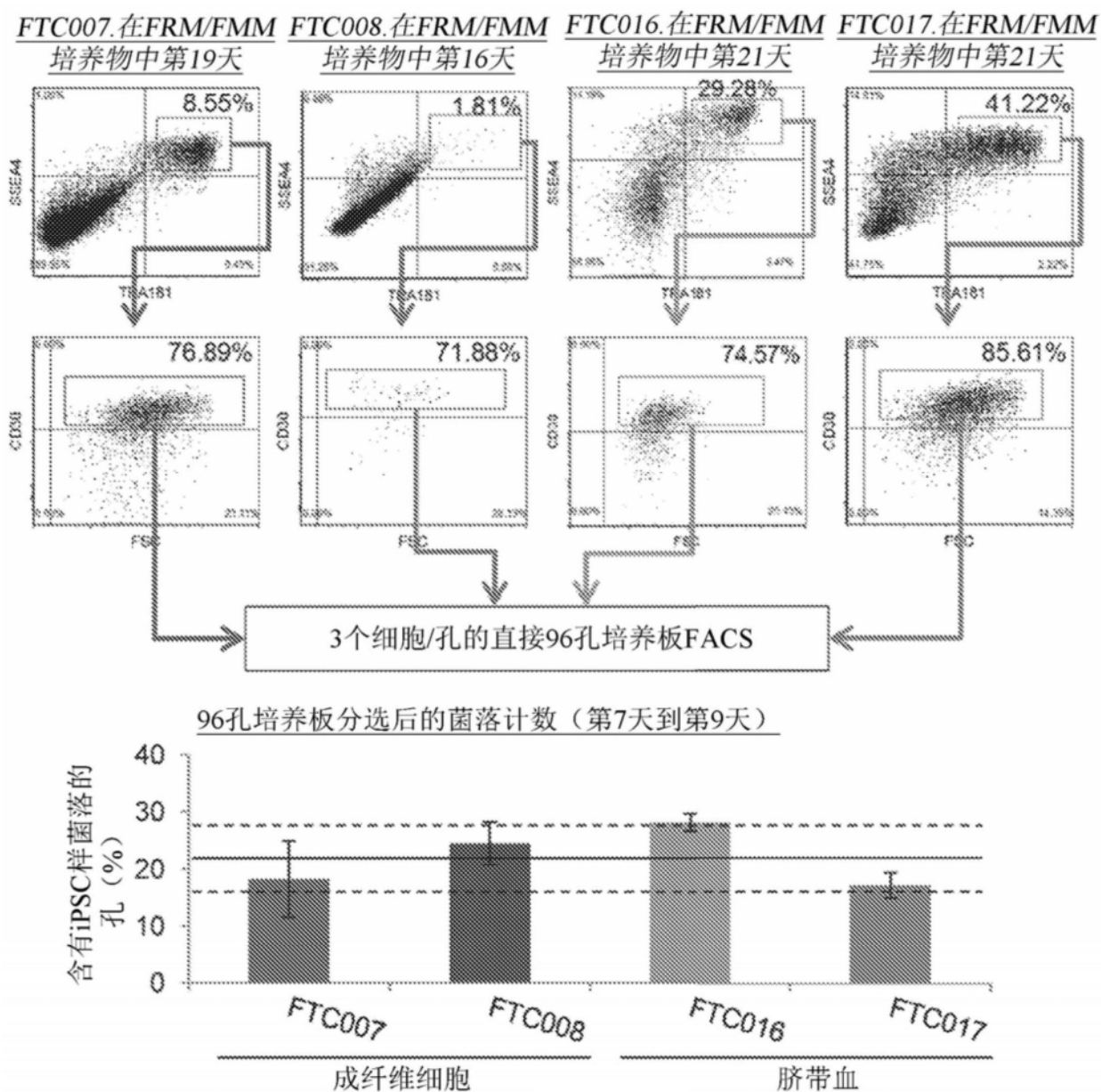


图2B

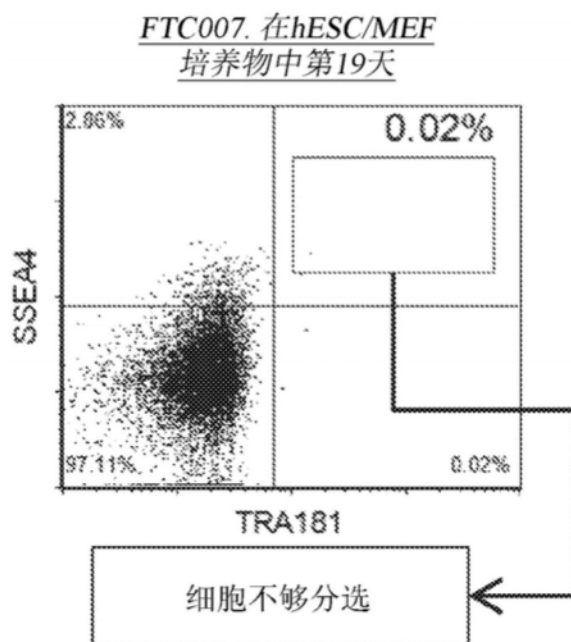


图2C

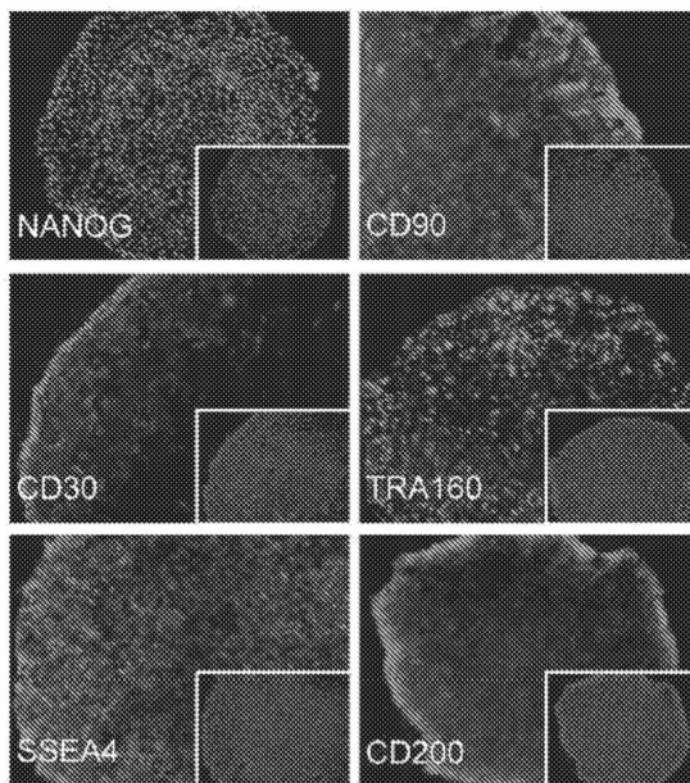


图2D

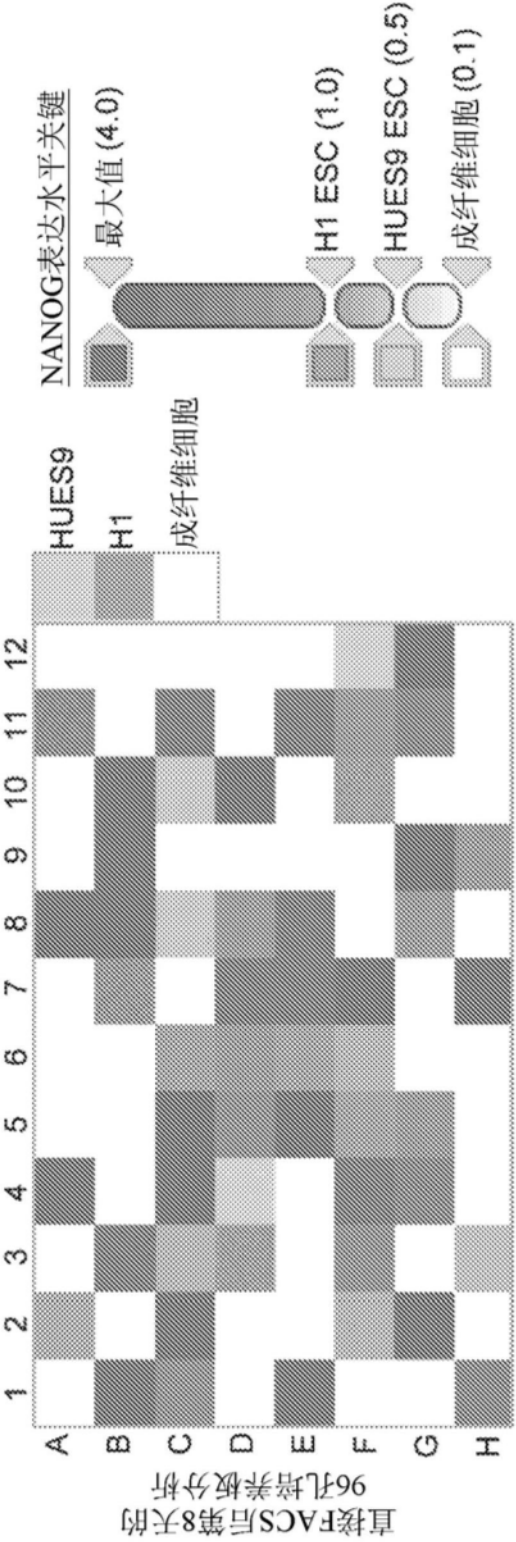


图2E

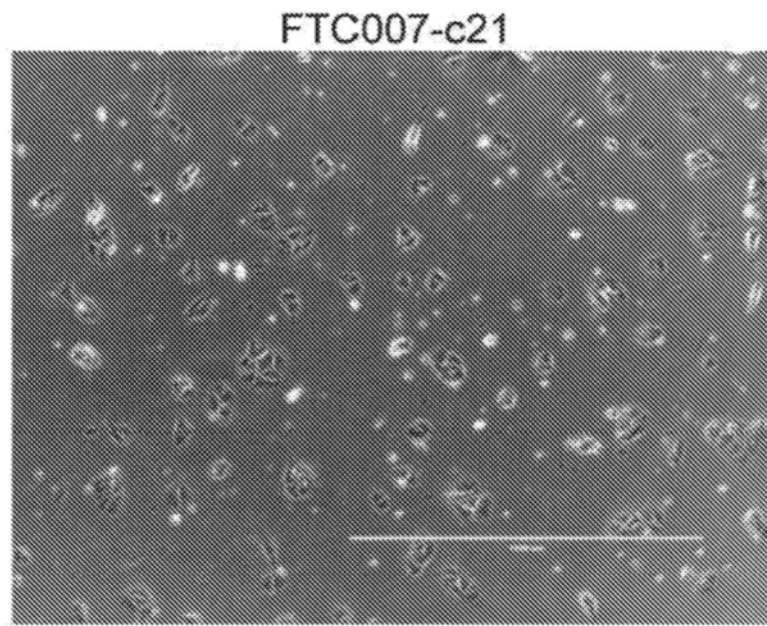


图3A

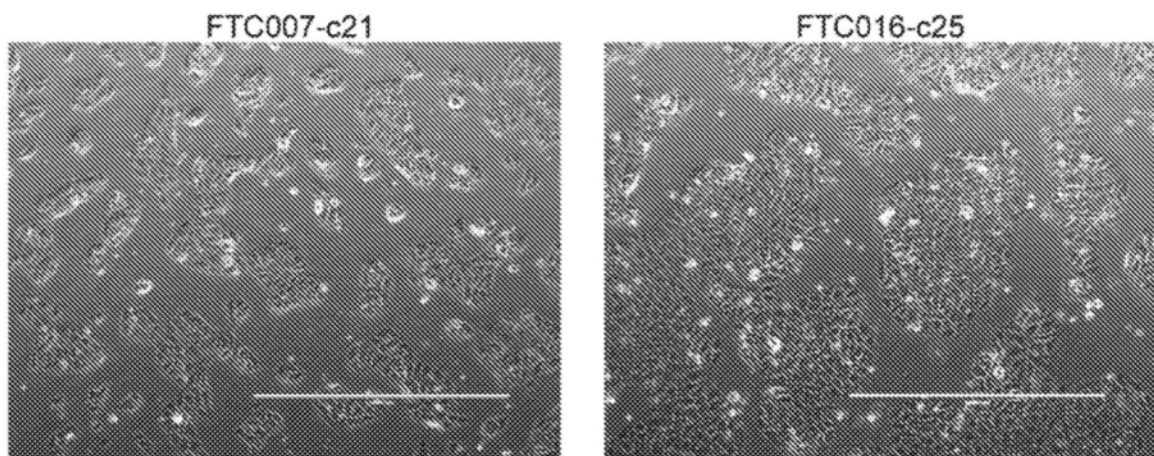


图3B

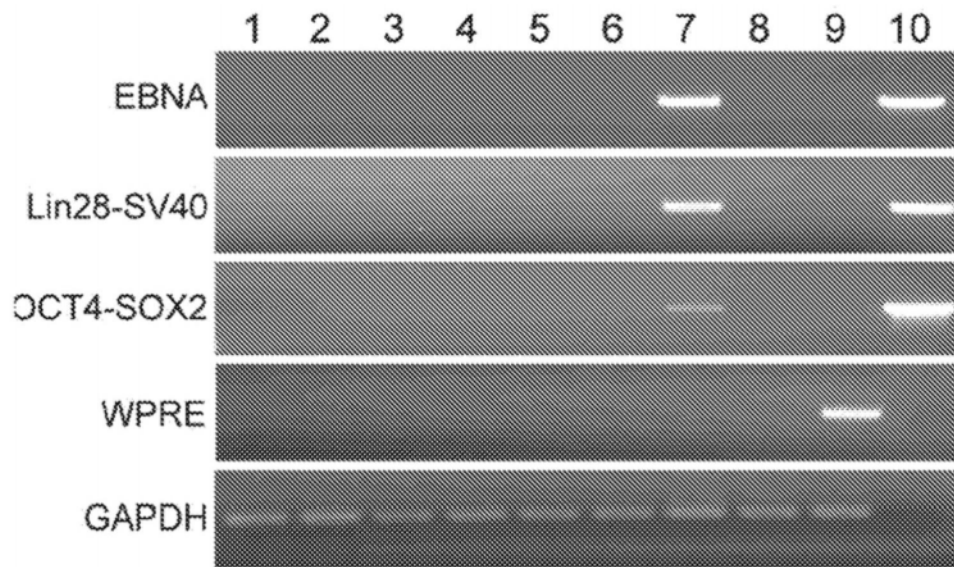


图3C

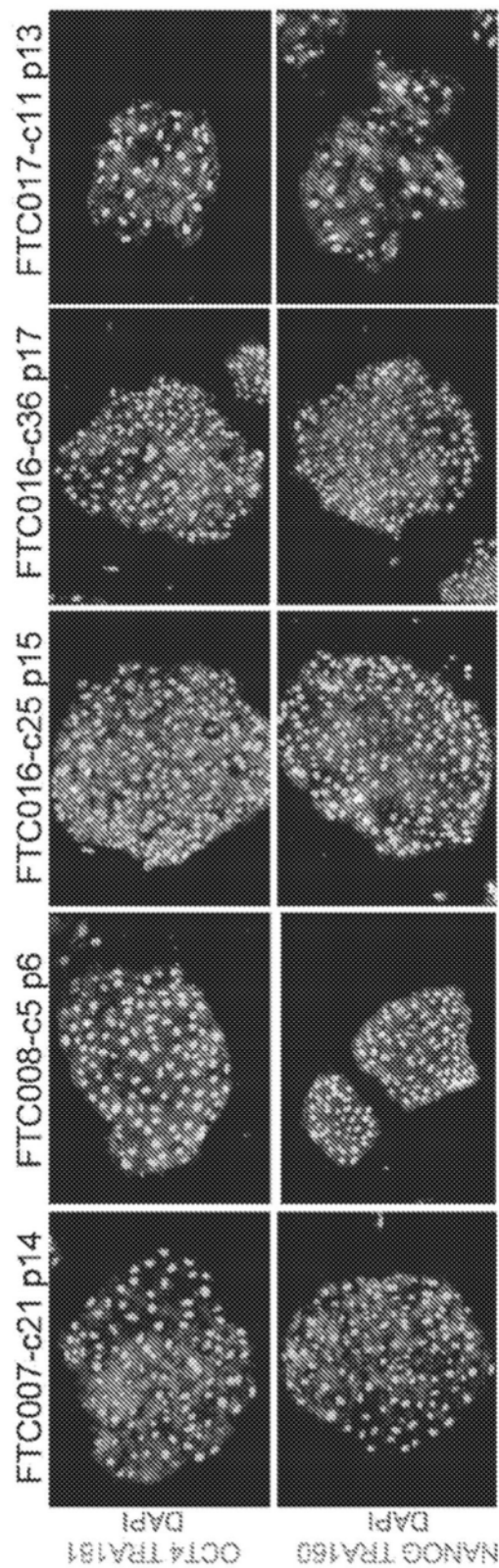


图3D

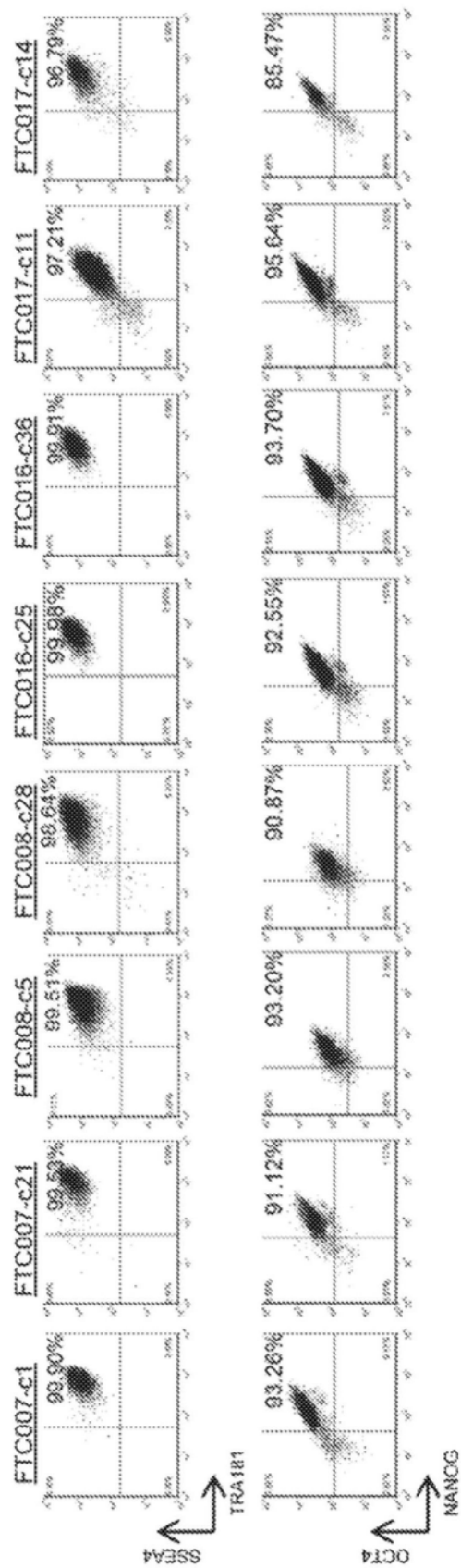


图3E

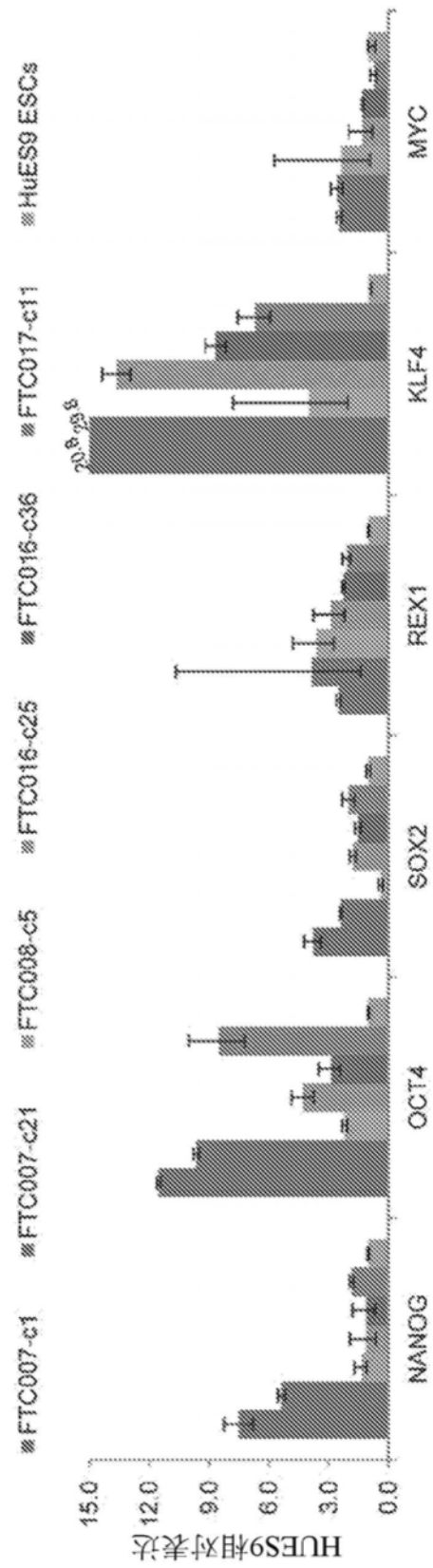


图3F

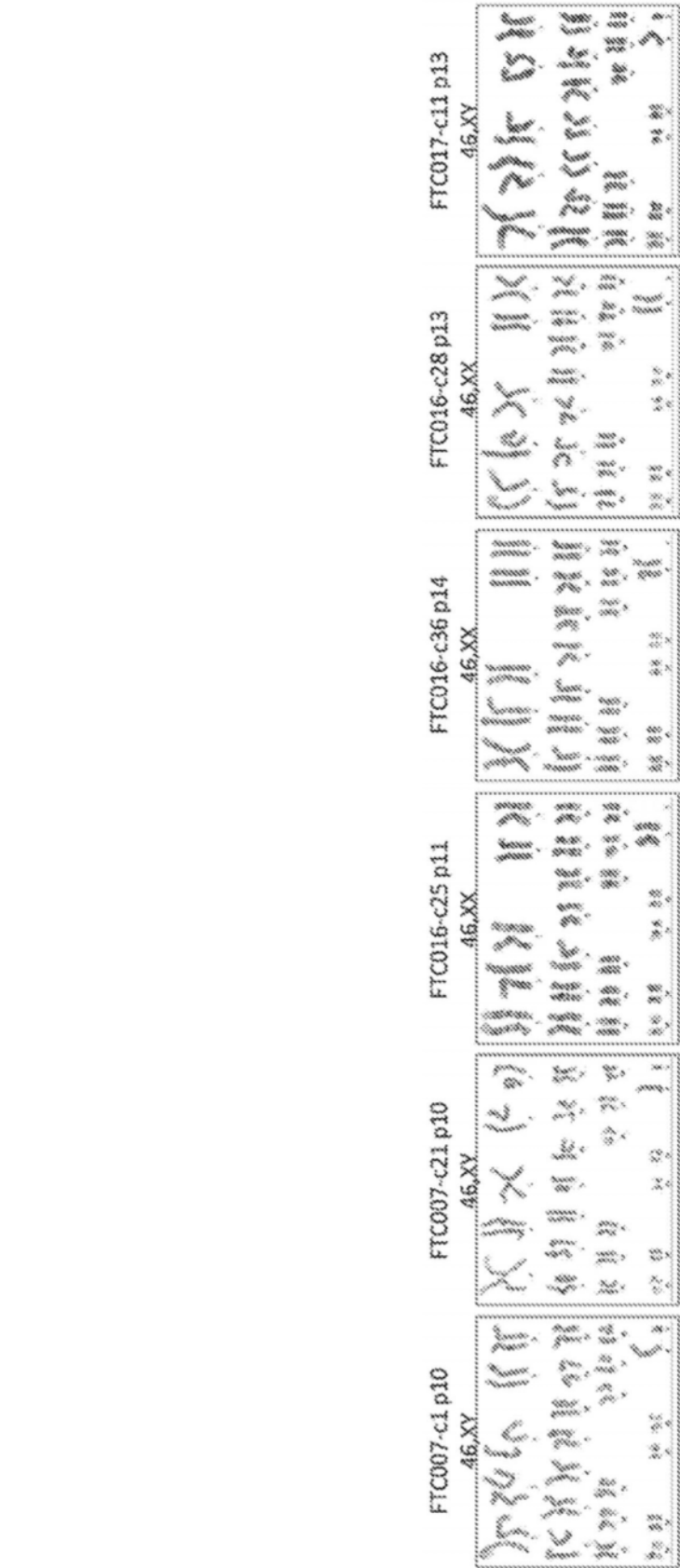


图4A

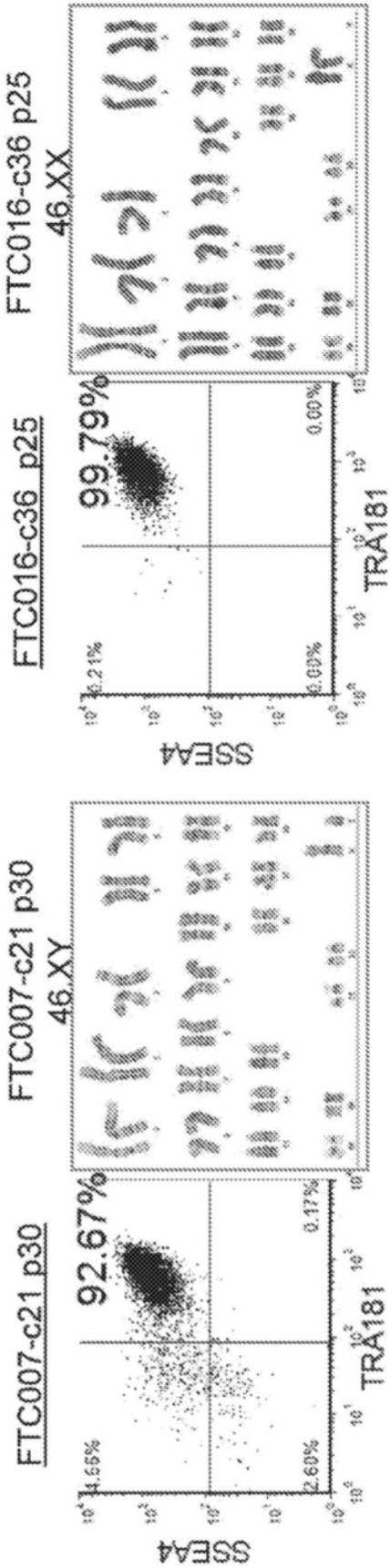
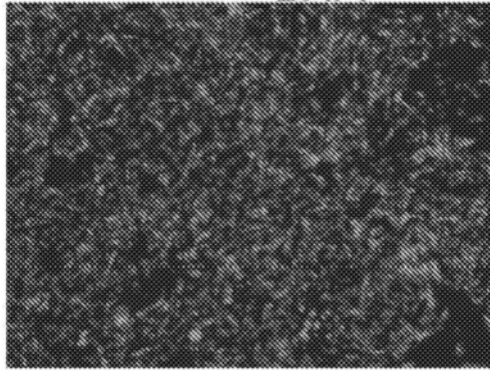


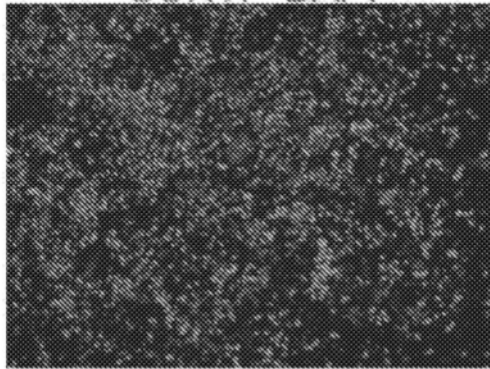
图4B

FTC017-c11 p15

巢蛋白 DAPI



SOX17 DAPI



α SMA DAPI

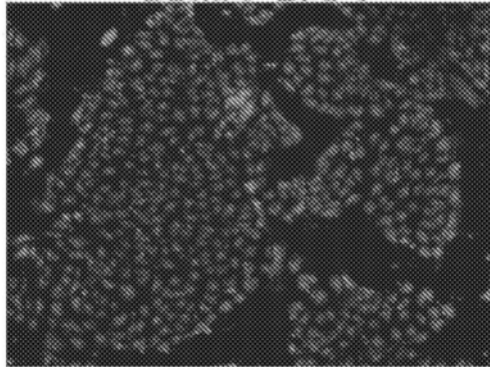


图4C

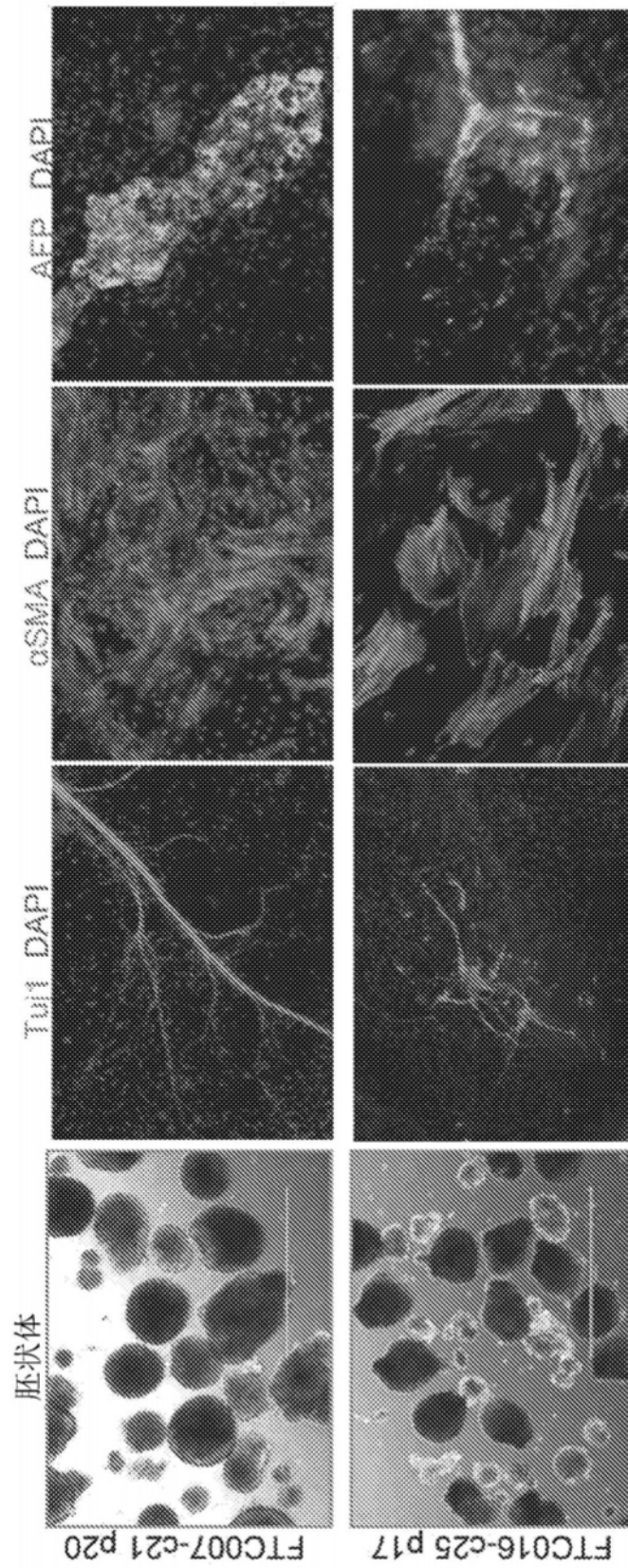


图4D

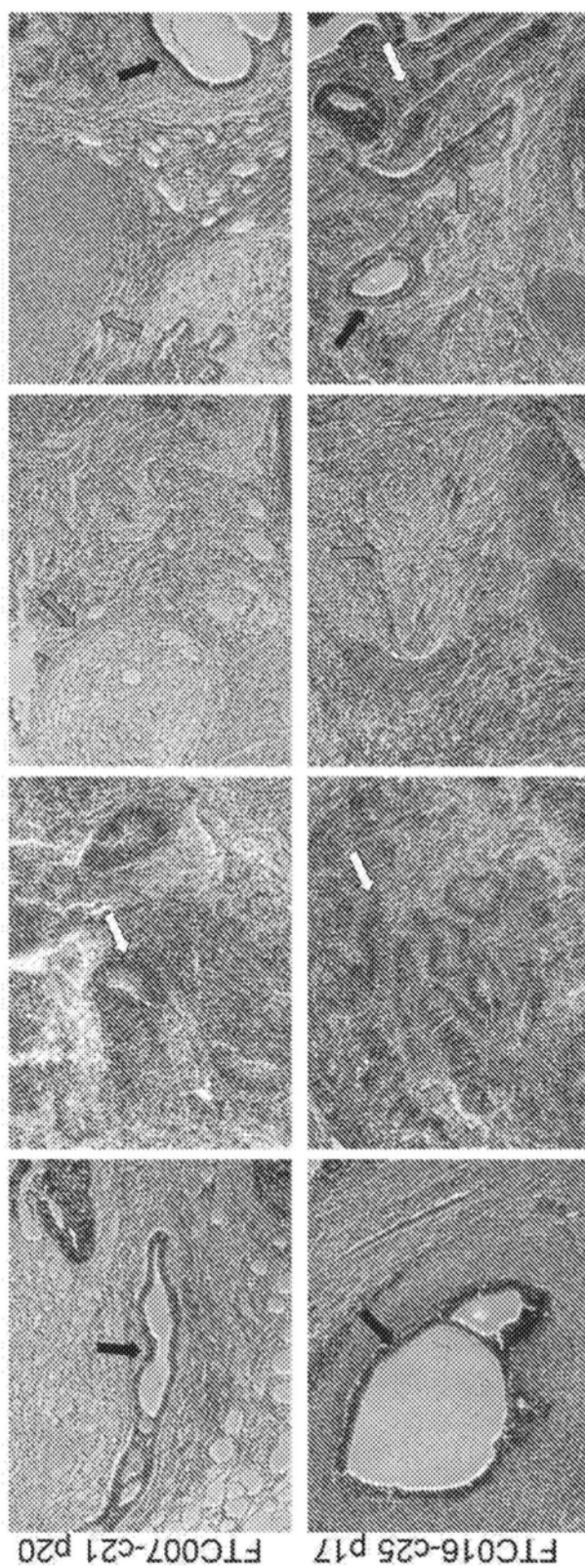


图4E

载体系统	缩写
EF1a-OCT4-2A-NANOG-2A-SOX2	ONS
EF1a-OCT4-2A-SOX2	OS
EF1a-OCT4-2A-OCT4	2xO
EF1a-SV40LT	T

图5A

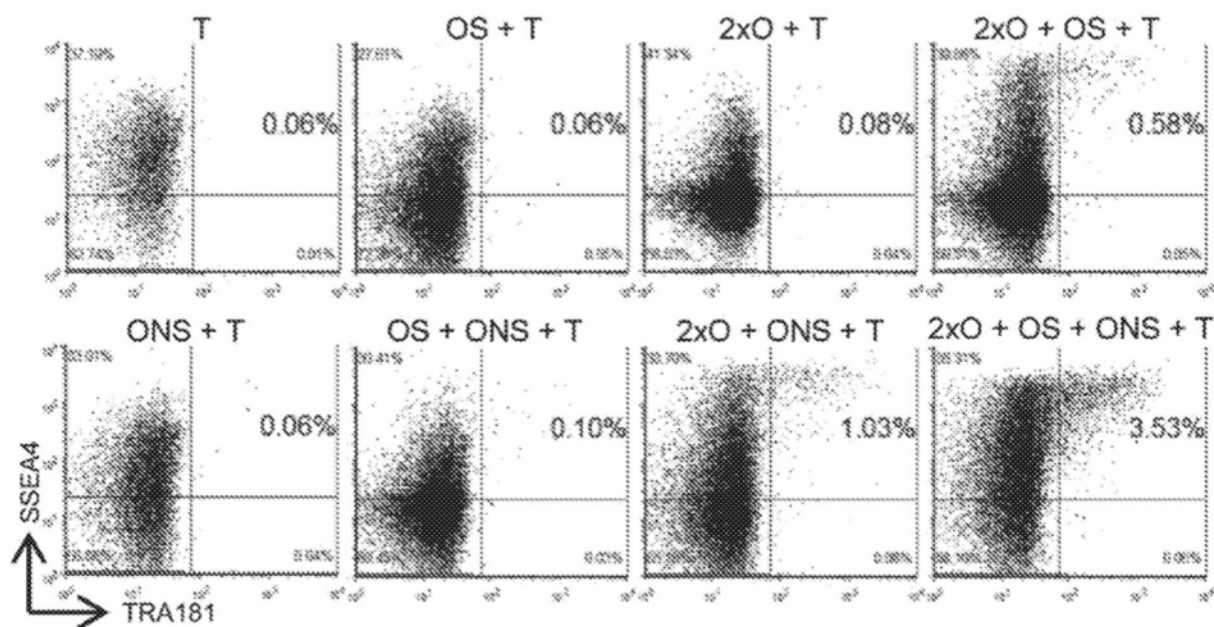


图5B

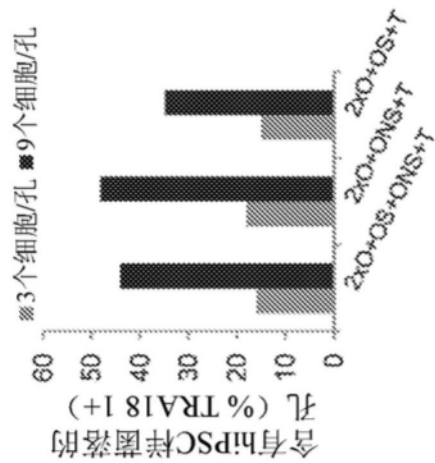


图5C

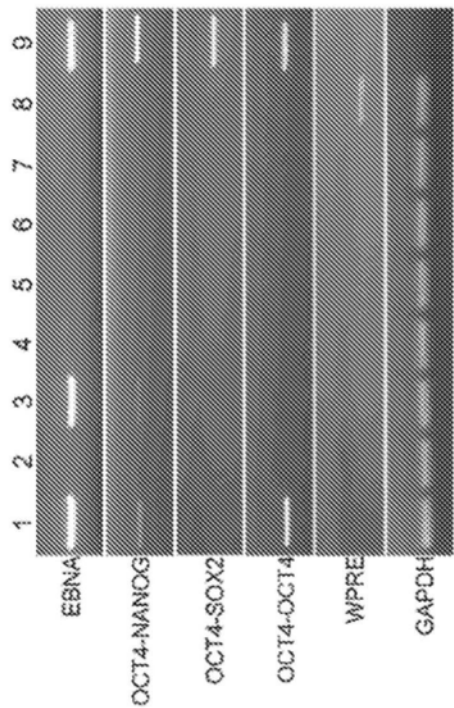


图5D

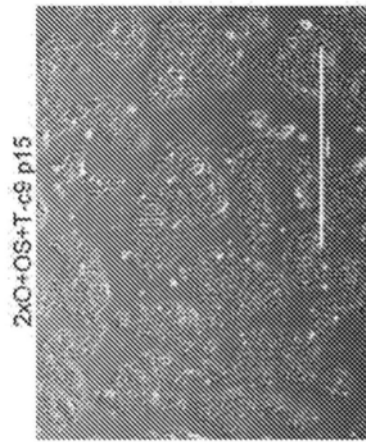


图5E

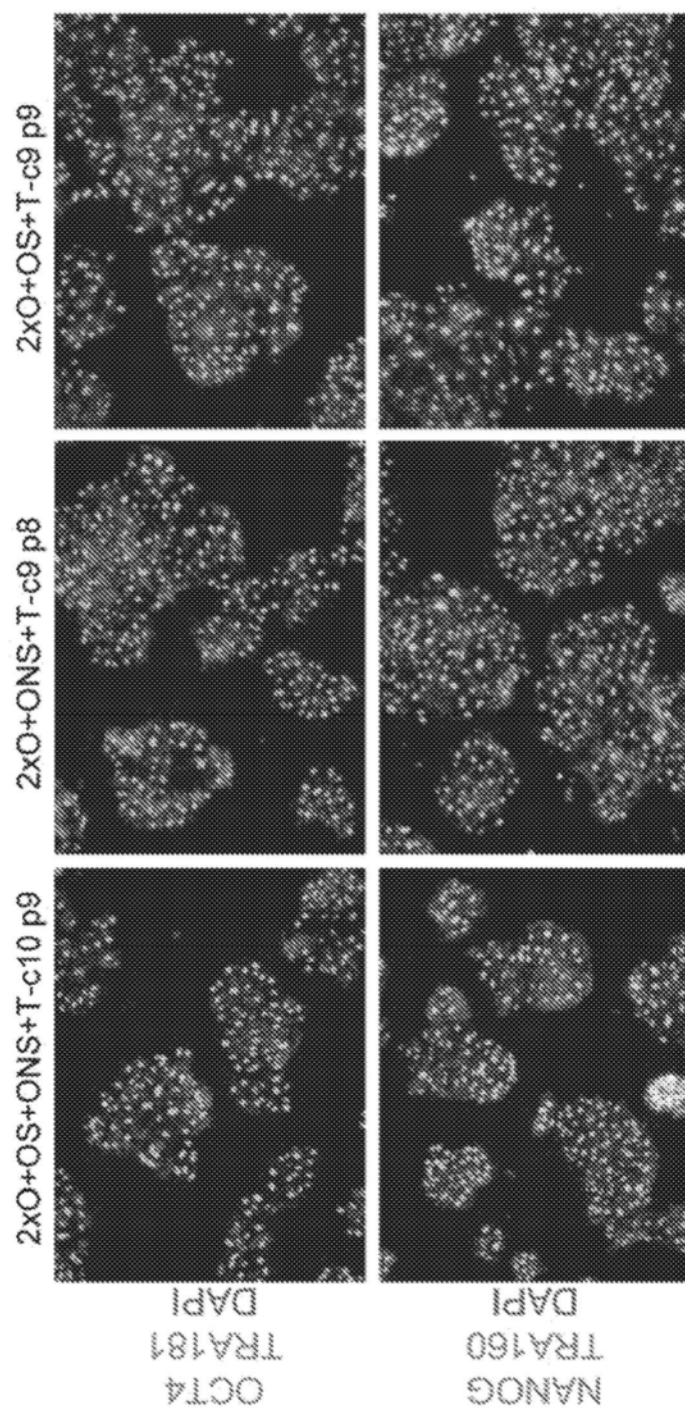


图5F

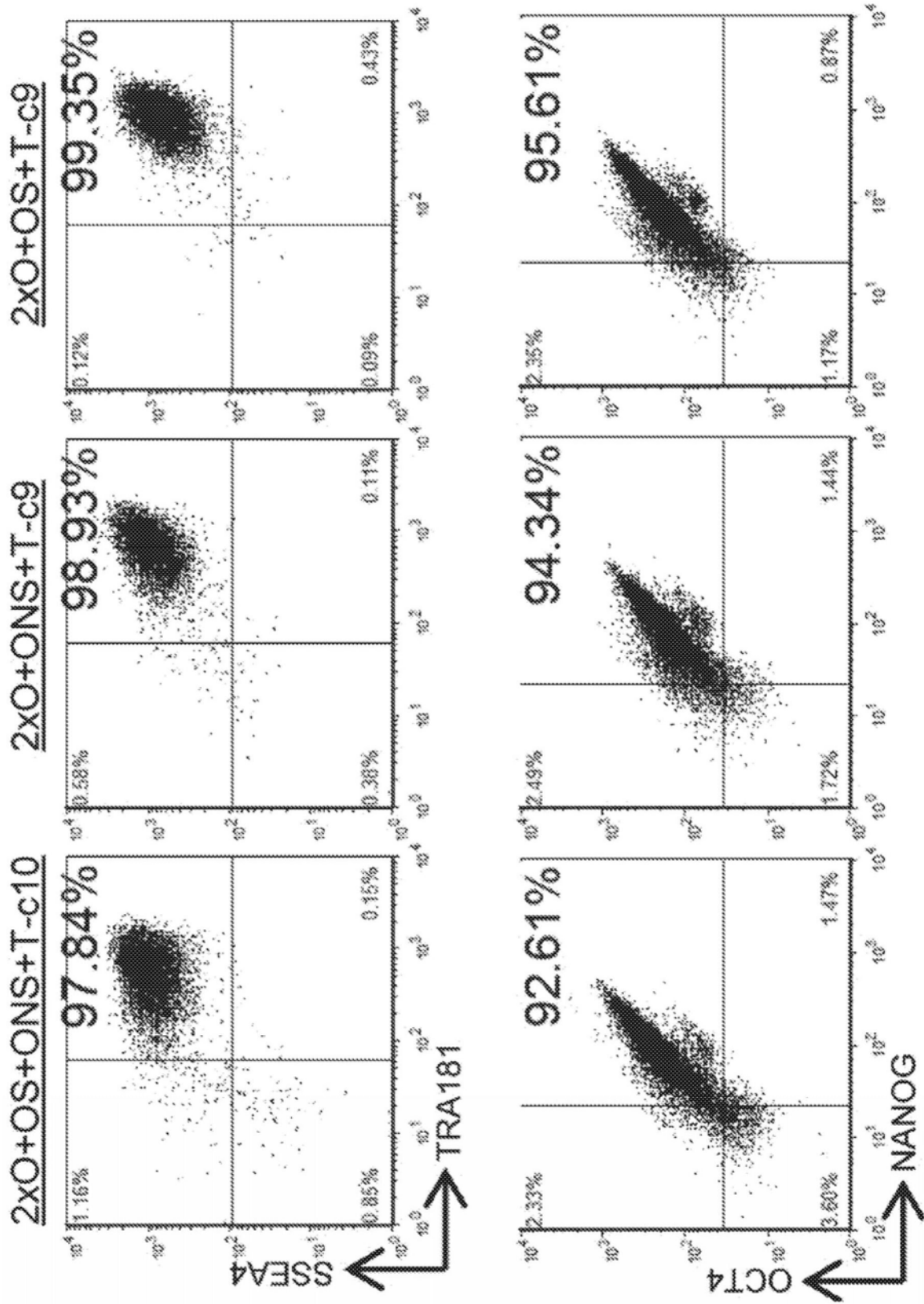


图5G

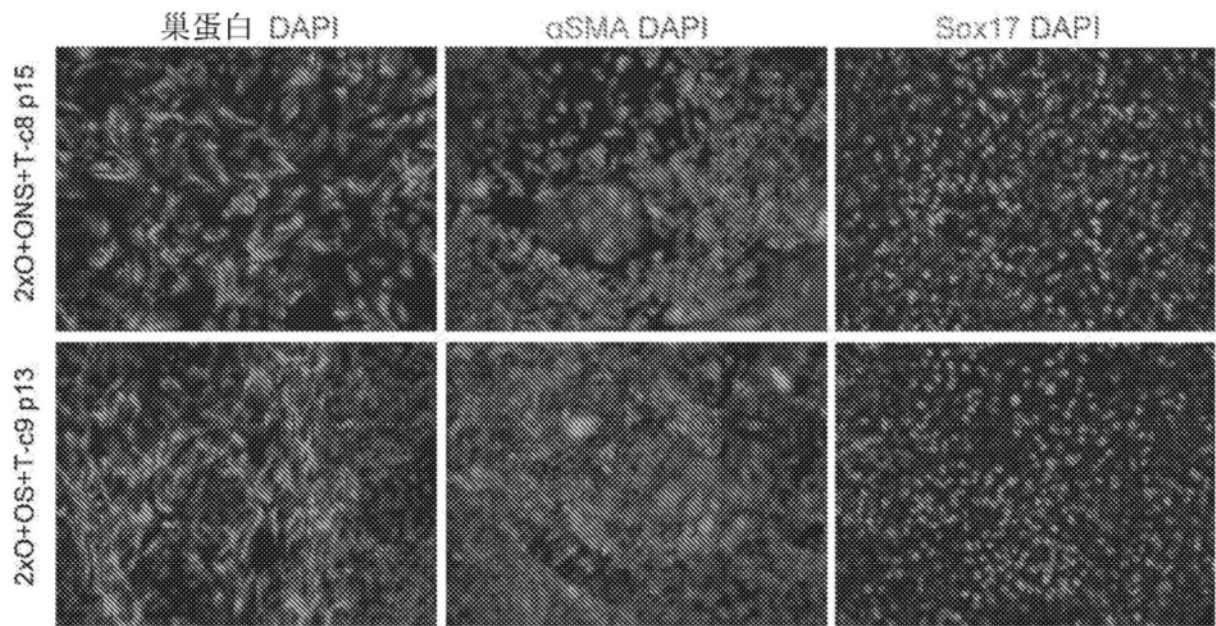


图5H

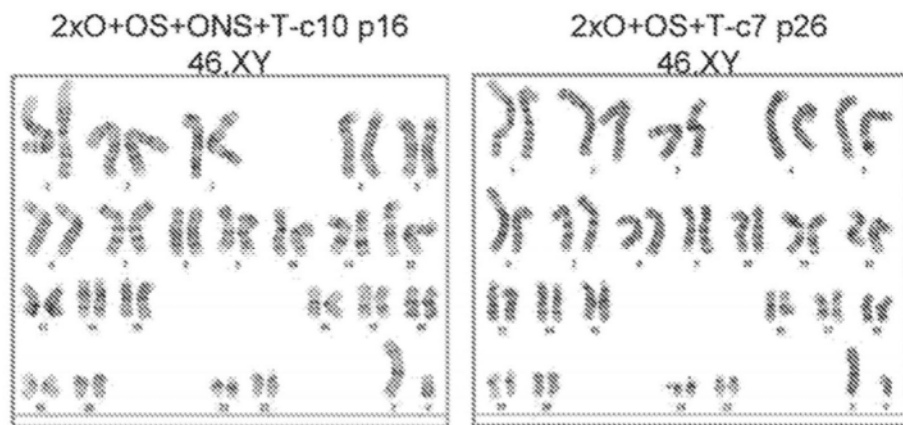


图5I

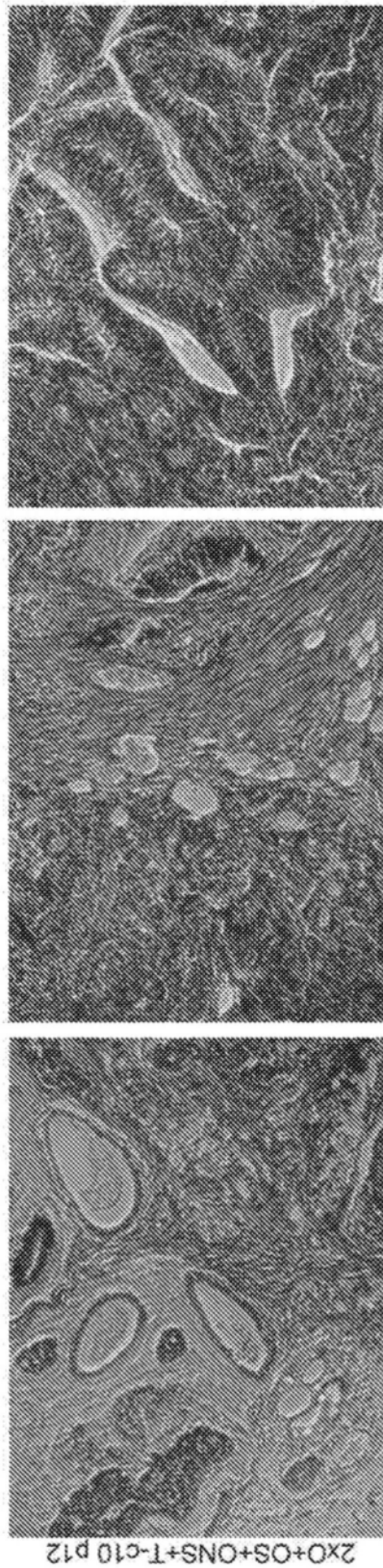


图5J

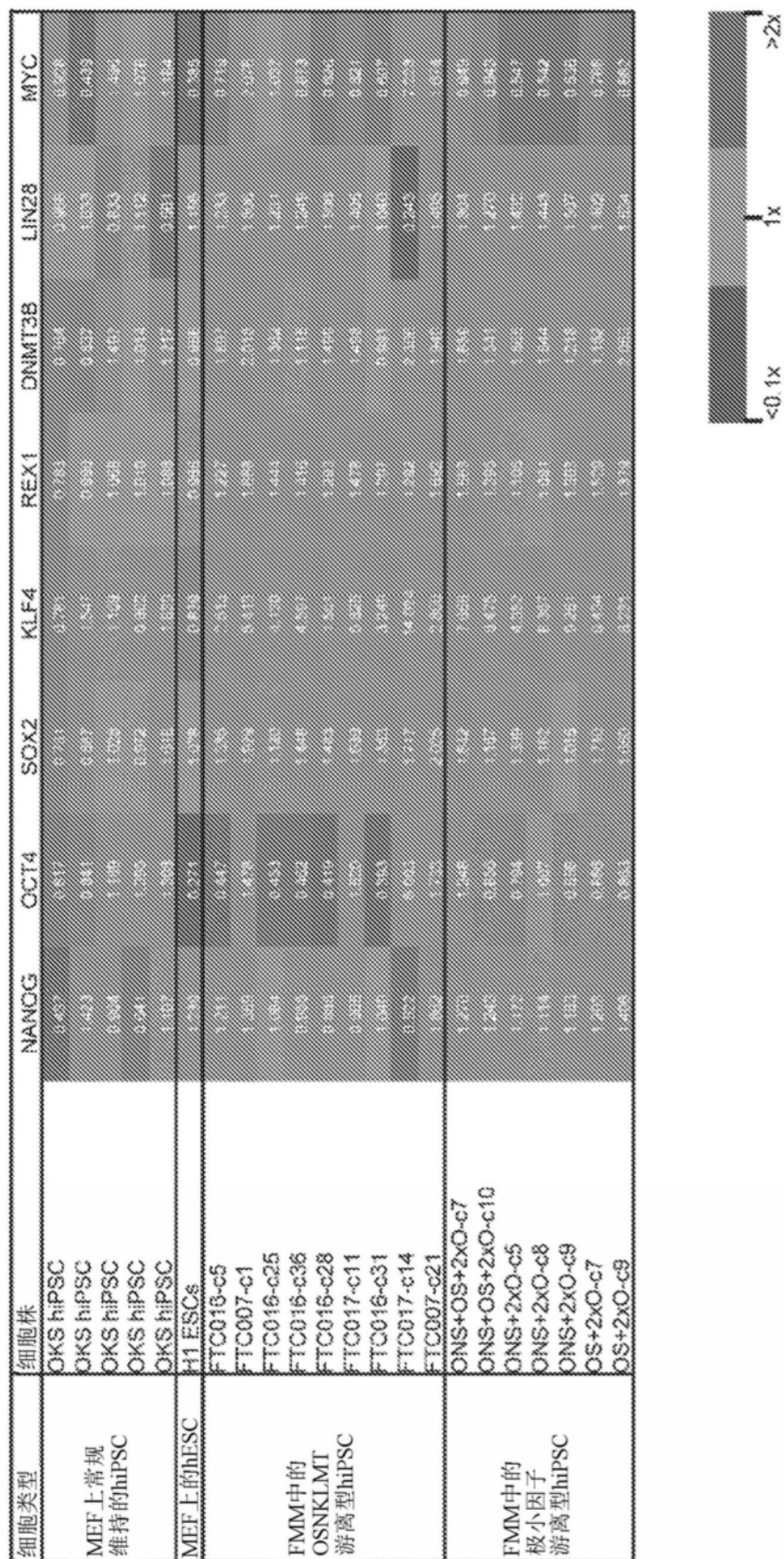


图6A

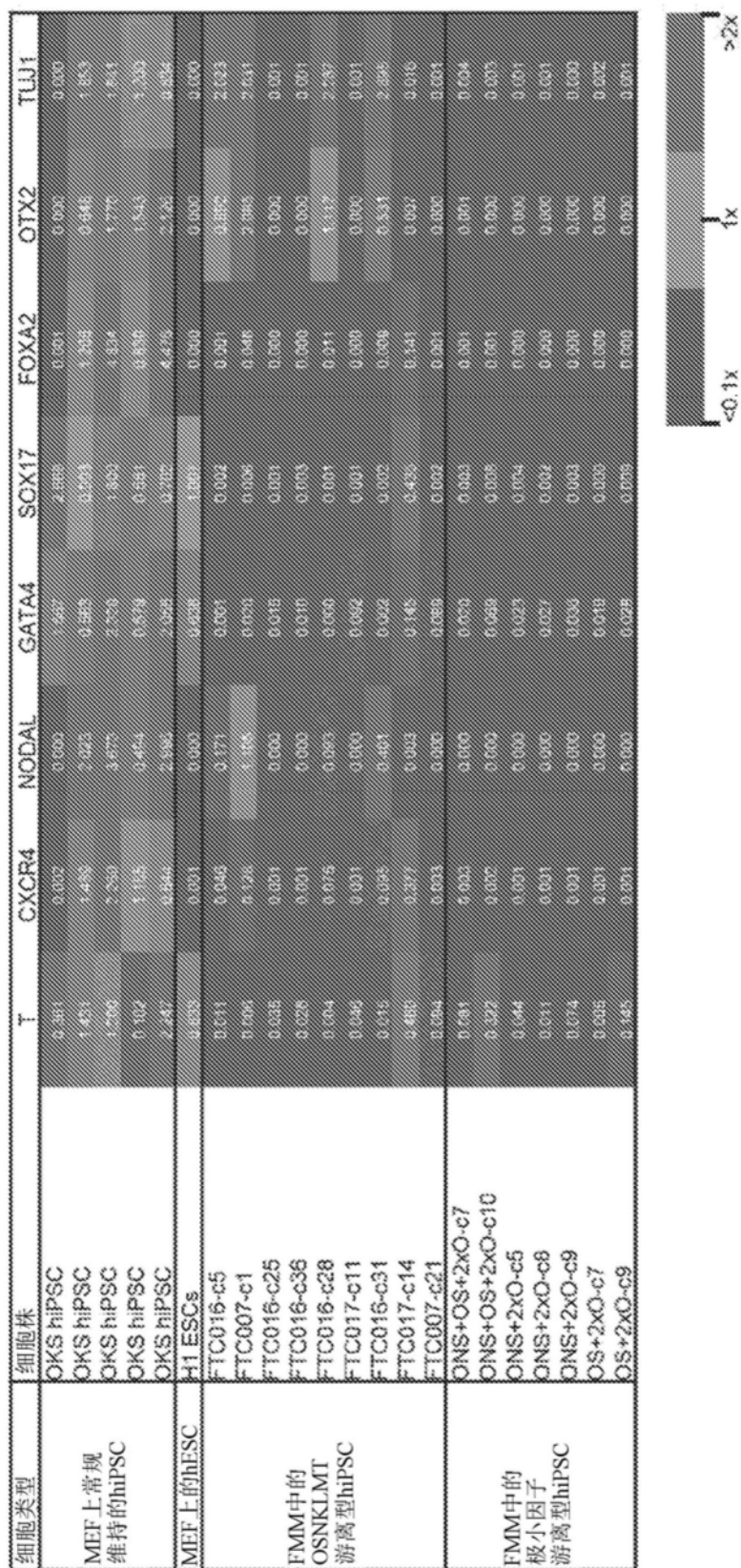


图6B

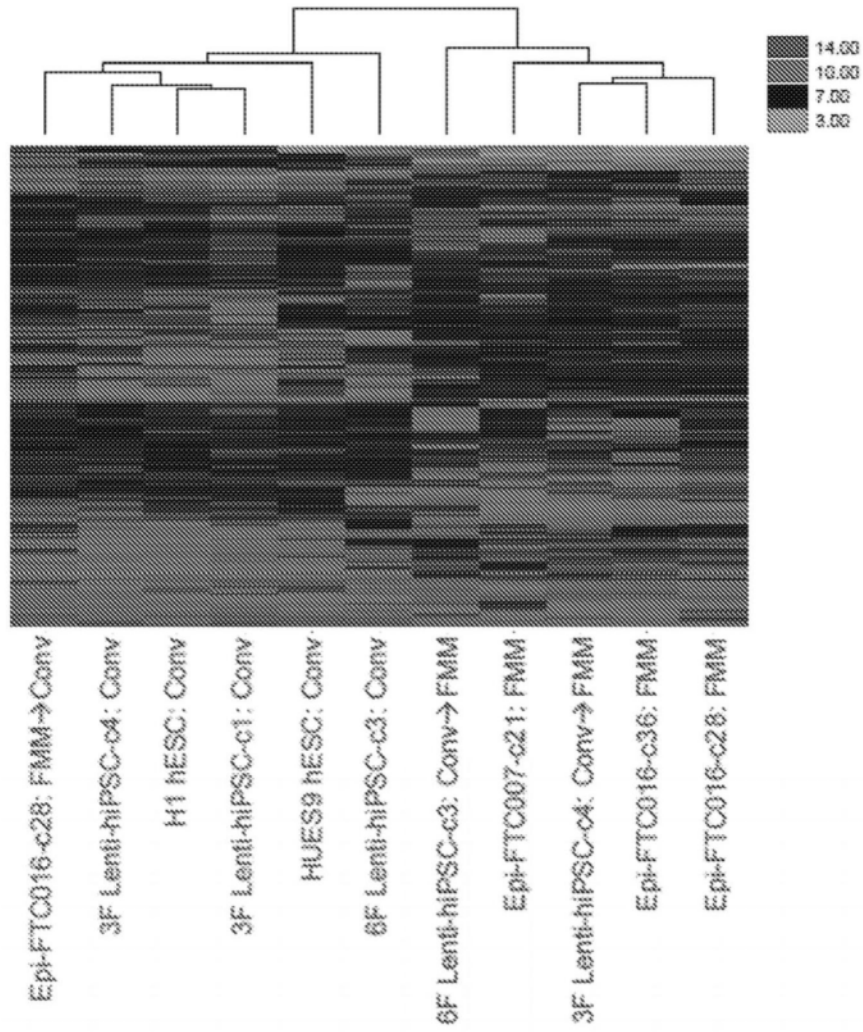


图7A

常规hESC培养物群与FMM培养物群中上调的213个探针组			
GO ID	GO术语	%	p值
GO:0007389	模式说明方法	11.2	2.20E-10
GO:0003002	区域化	8.1	1.90E-07
GO:0048598	胚胎形态发生	8.1	1.90E-05
GO:0009952	先前/之后的模式形成	5.6	3.60E-05
GO:0043009	脊索动物胚胎发育	6.2	2.90E-03
GO:0009792	出生或卵孵化时结束的胚胎发育	6.2	3.10E-03
GO:0001756	体节发生	2.5	3.40E-03
GO:0001775	细胞活化	5.6	4.20E-03
GO:0001667	变形虫细胞迁移	2.5	4.30E-03
GO:0048568	胚胎器官发育	4.4	4.50E-03
GO:0040029	基因表达调节, 表观遗传	3.1	5.00E-03
GO:0010557	大分子生物合成加工的正调节	8.8	5.70E-03
GO:0010628	基因表达的正调节	8.1	5.80E-03
GO:0045321	白细胞活化	5	6.00E-03
GO:0048562	胚胎器官形态发生	3.8	6.80E-03
GO:0030111	Wnt受体信号传导路径的调节	2.5	8.00E-03
GO:0031328	细胞生物合成加工的正调节	8.8	8.20E-03
GO:0046649	淋巴细胞活化	4.4	8.90E-03
GO:0035282	细胞分裂	2.5	9.00E-03
GO:0009891	生物合成加工的正调节	8.8	9.20E-03
GO:0010604	大分子新陈代谢过程的正调节	10	9.40E-03

图7B

基态相关基因组

KLF4
KLF2
POU5F1
STAT3
UTF1
FGF4
ID4
TBX3
GDF3
DNMT3L
ESRRB
DPPA2
DPPA3
DPPA5
ZFP42
ZSCAN4
TRIM43
TFCP2L1

亚稳定状态相关基因组

MYC	FOXA2	T
DKK1	FGF5	SOX17
BMP2	XIST	NODAL
LEFTY2	COL13A1	OTX2
HES1	DUSP6	EOMES
CDX2	NR2F2	NR0B1
GNAS	CXCR4	CYP2B6
EGR1	GATA3	ERBB4
COL3A1	GATA6	HOXC6
TCF4	INHA	SMAD6
HEPH	RORA	NIPBL
KDR	TNFSF11	CDH11
TOX	ZIC4	GAL
FOXA1	SOX3	PITX2
LCK	APOA2	CXCL5
PCDH7	CER1	FOXQ1
CD1D	MLL5	DPP10
FOXP1	GSC	PCDH10
LEFTY1	CTCFL	PCDH20
ZIC1	TSHZ1	MEGF10

图7C

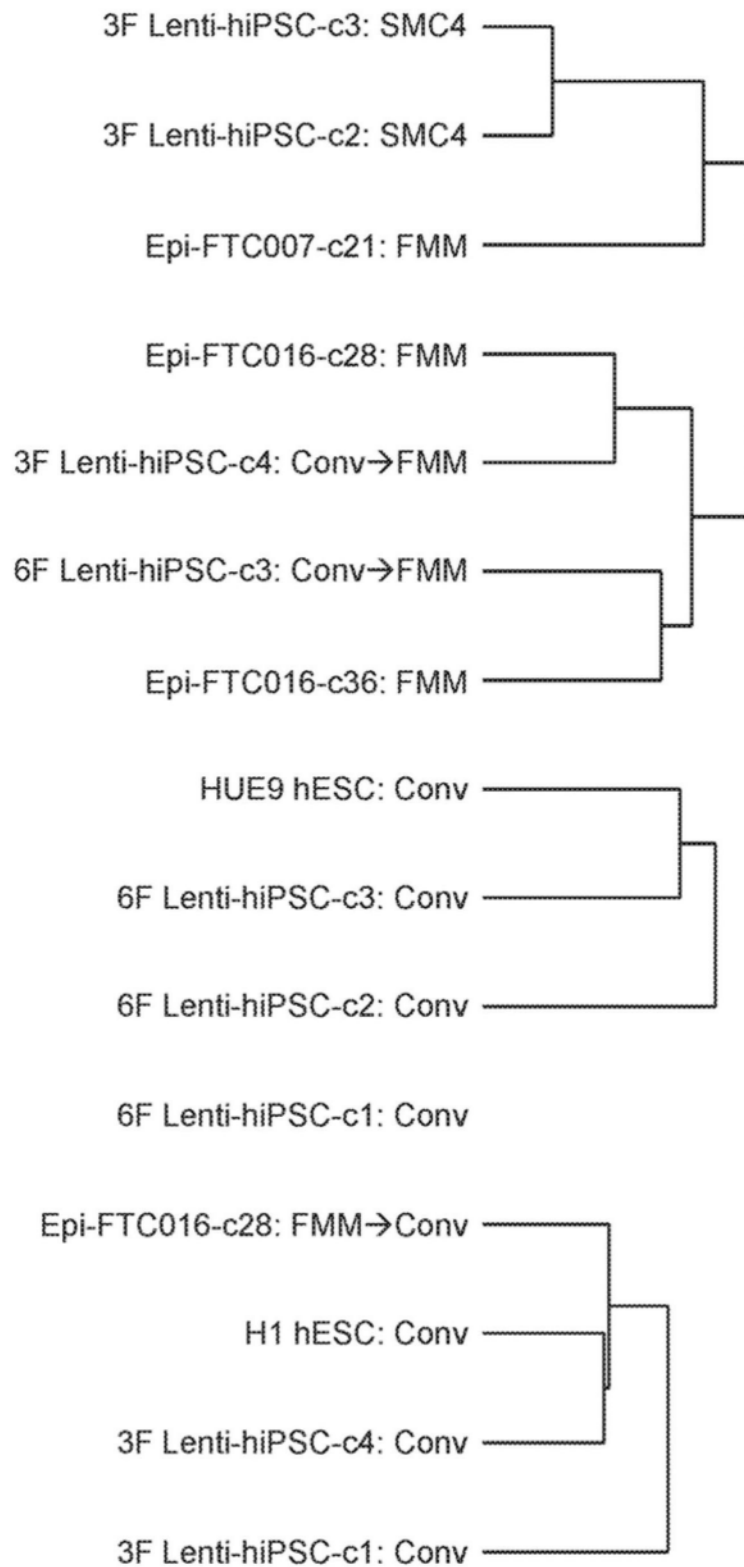


图7D

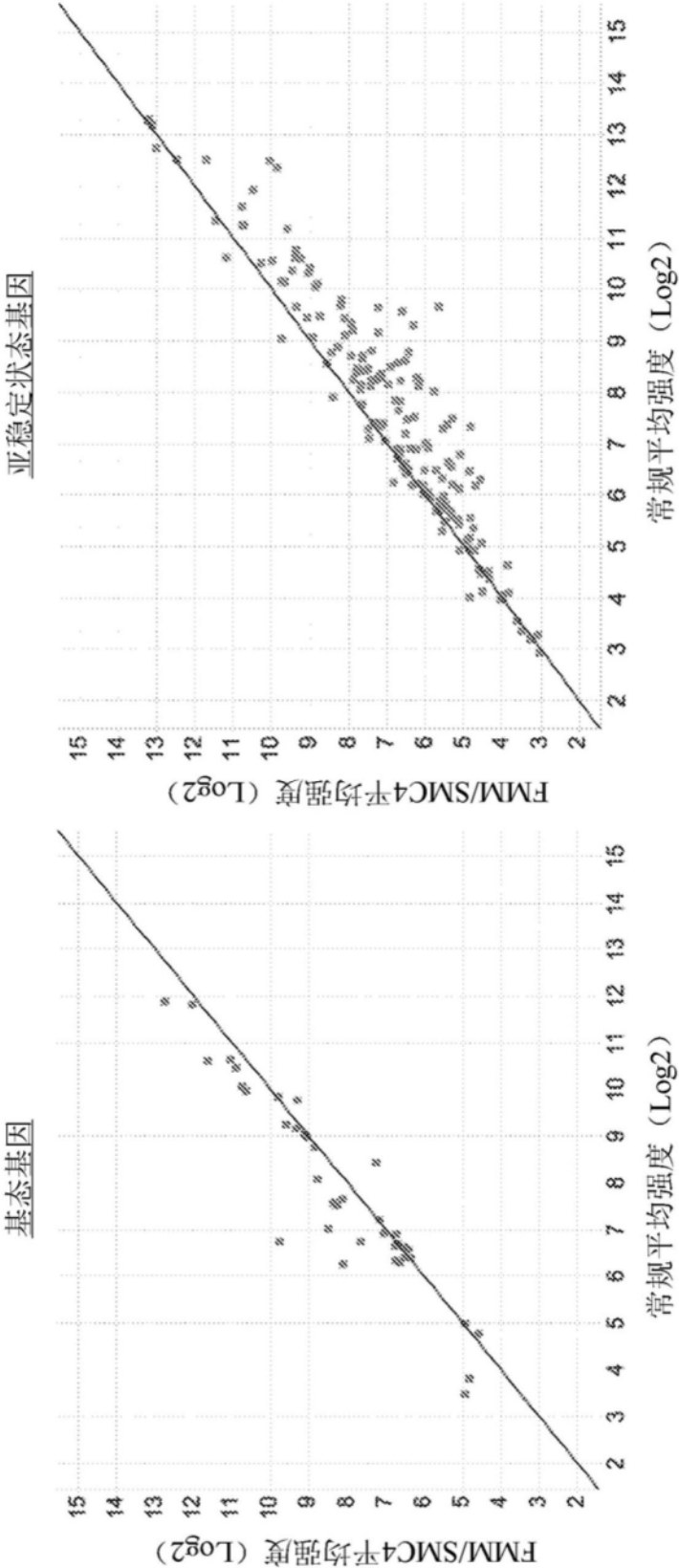


图7E

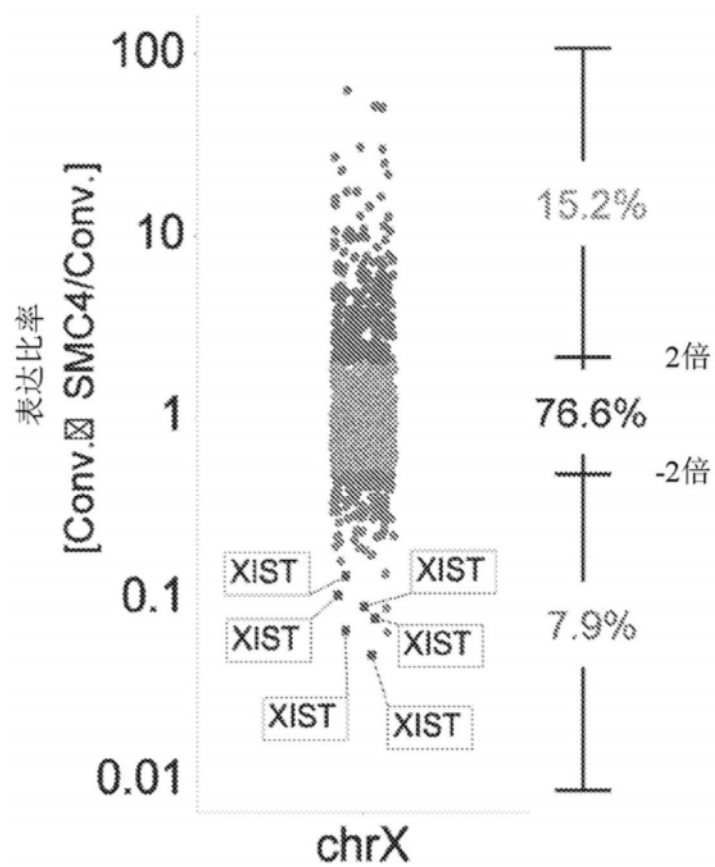


图7F

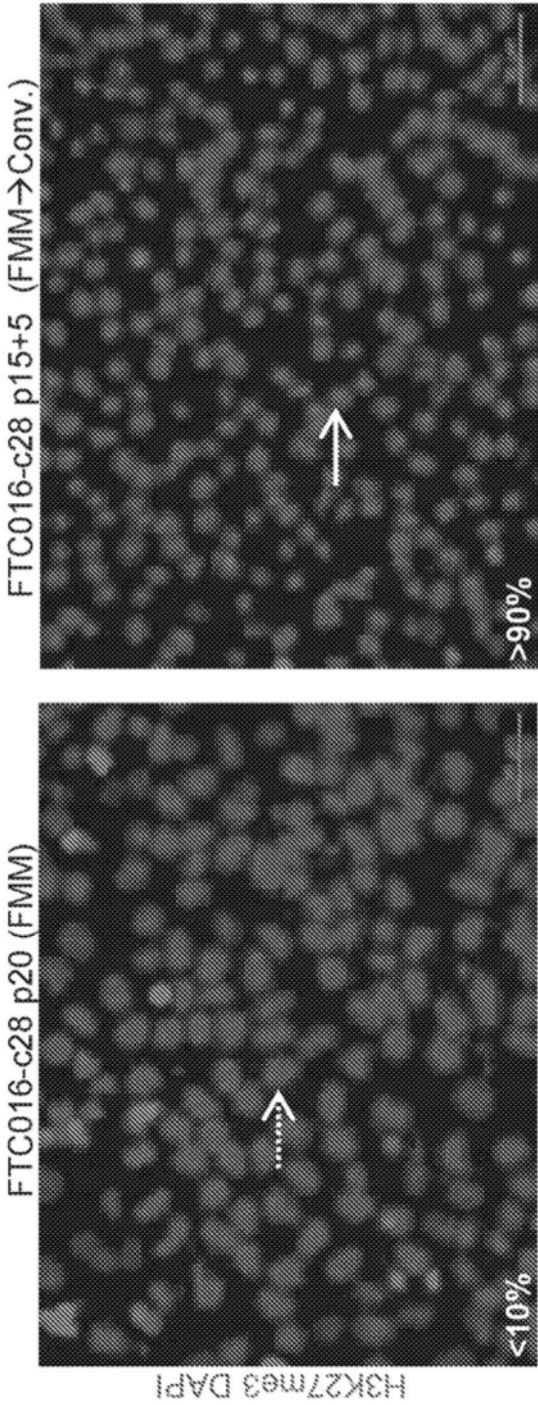


图7G

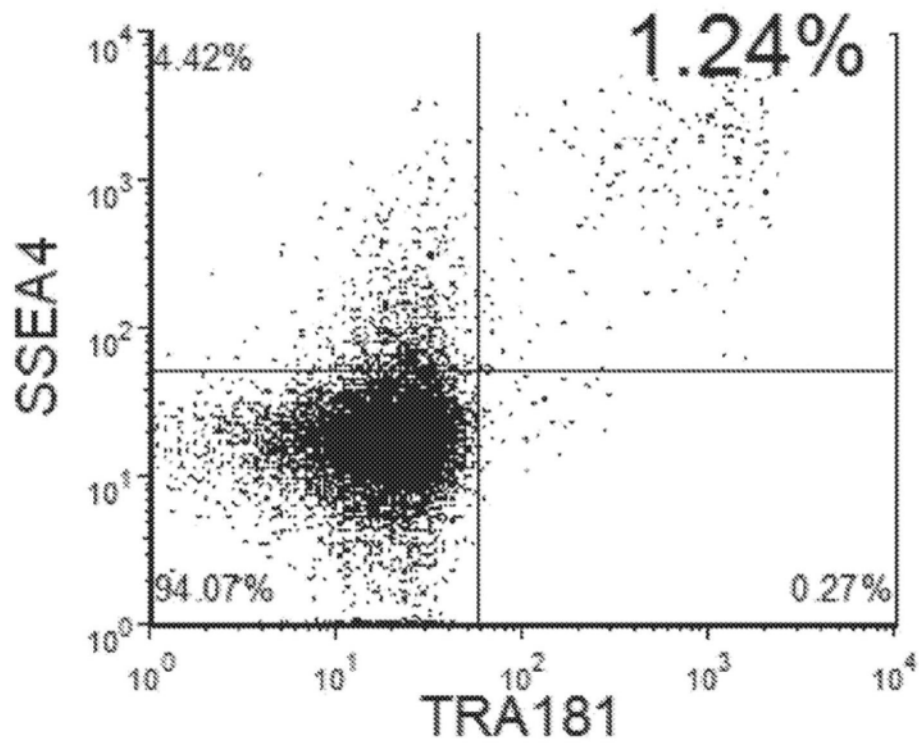


图8A

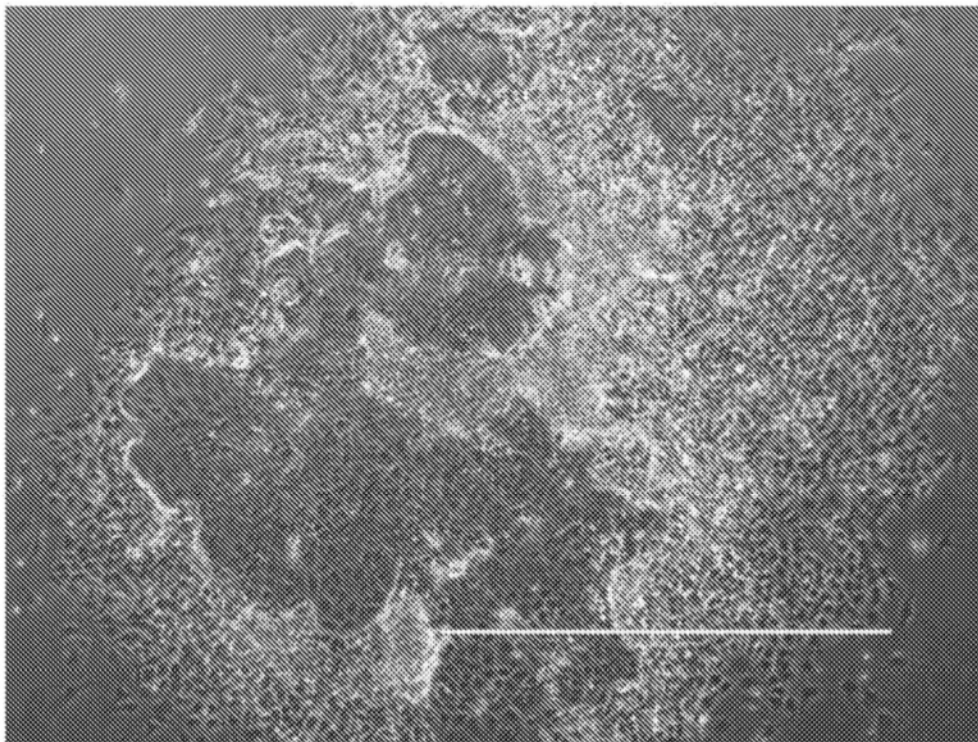


图8B

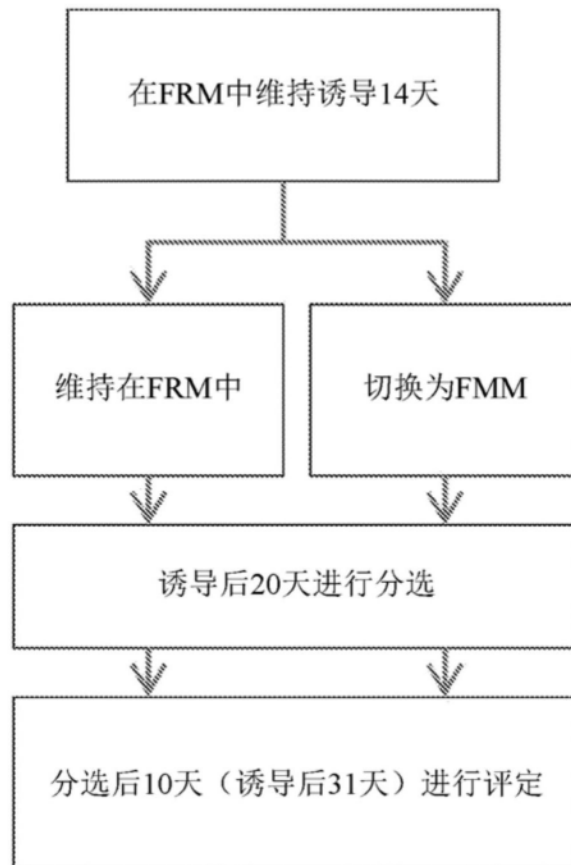


图8C

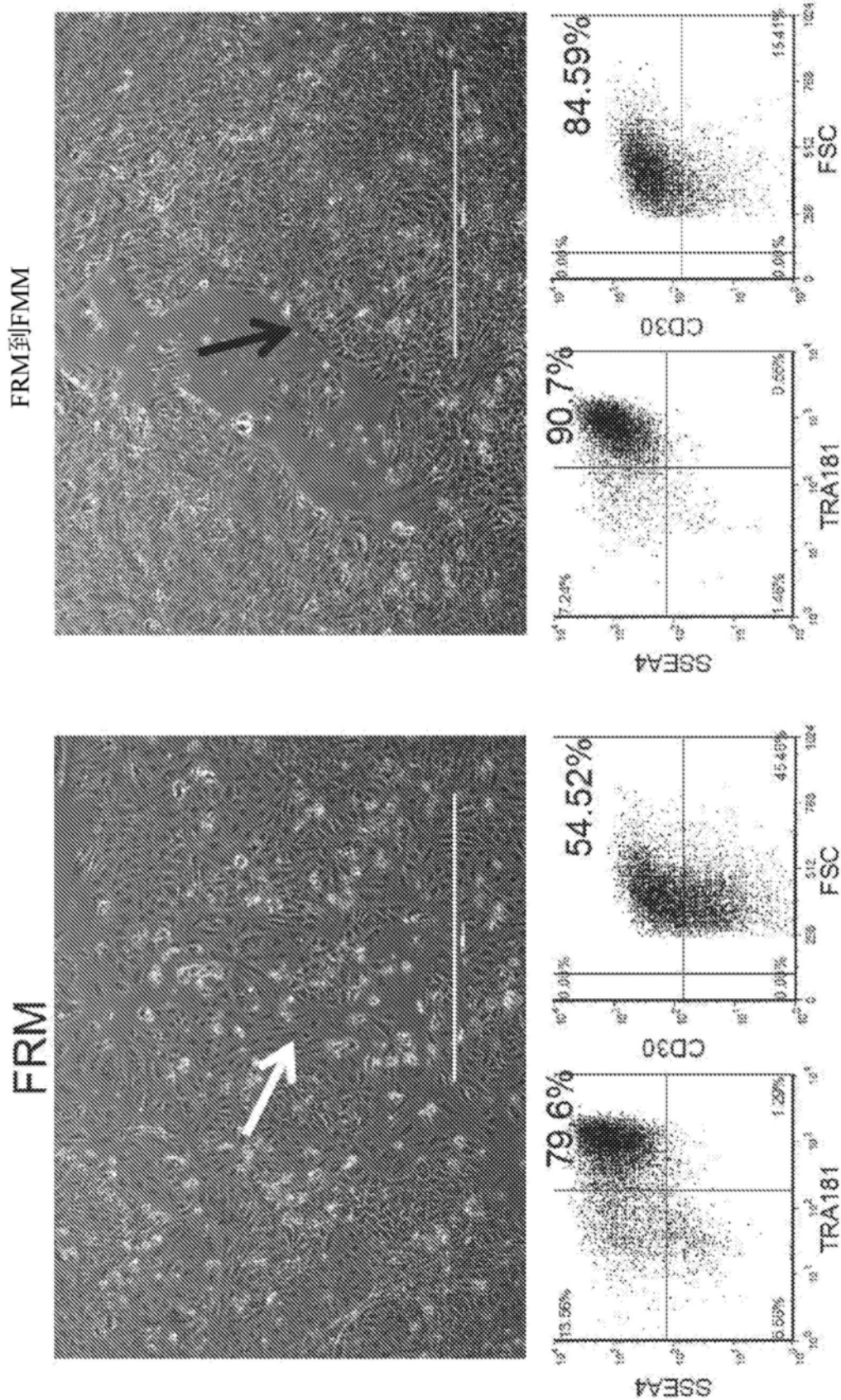


图8D

命名	细胞类型	来源	种族	性别	年龄	培养基	96孔培养板FACS时的 SSEA4/TRA181阳性群体 百分比
FTC007	成纤维细胞	新生儿包皮	白人	男性	新生儿	DMEM + 10%FBS	8.55% (诱导后第19天)
FTC008	成纤维细胞	表皮	亚洲人	女性	成人	DMEM + 10%FBS	1.81% (诱导后第16天)
FTC016	CD34+ 造血细胞	脐带血, 所有细胞	库	库	新生儿	Stempro + CC110	29.3% (诱导后第19天)
FTC017	CD34+ 造血细胞	脐带血, 去向衍生的	非裔 美国人	男性	新生儿	Stempro + CC110	41.2% (诱导后第21天)

图9A

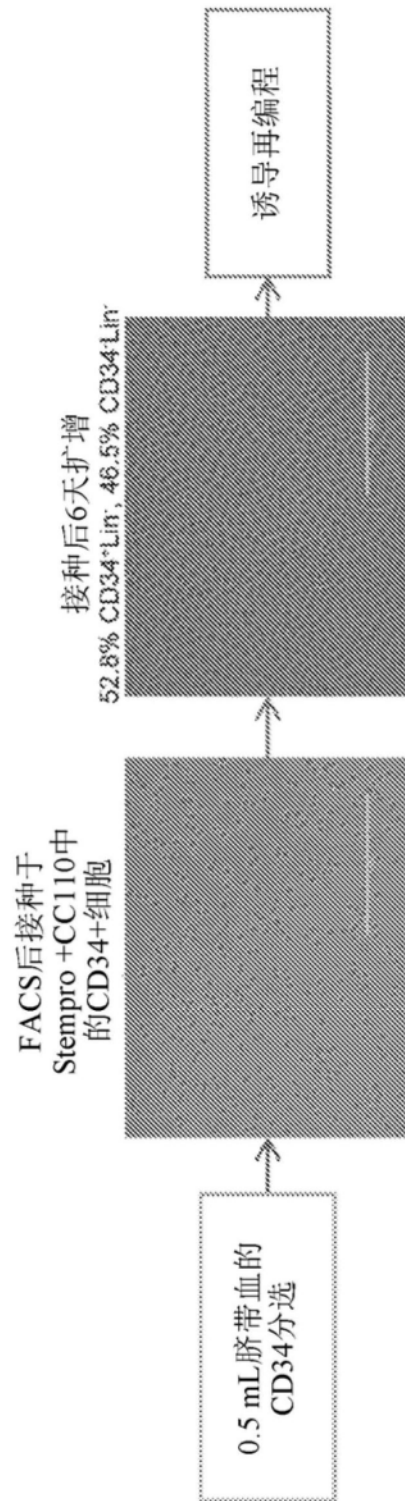


图9B

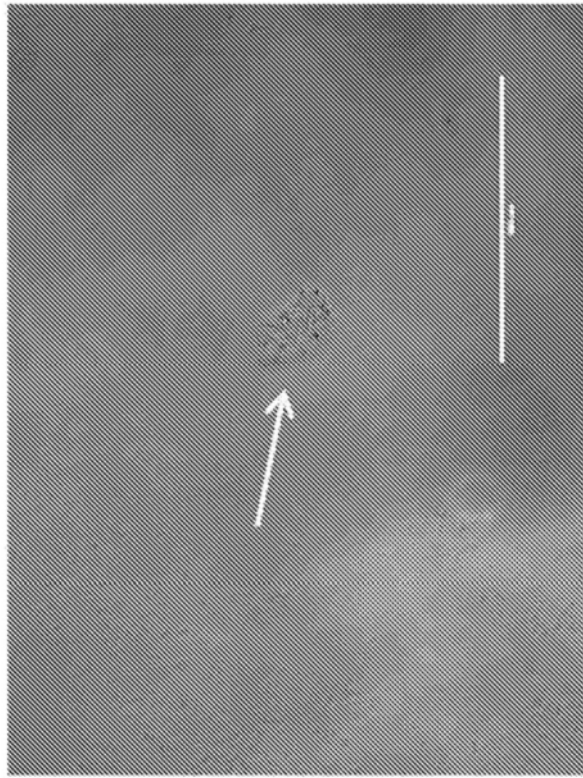


图10A

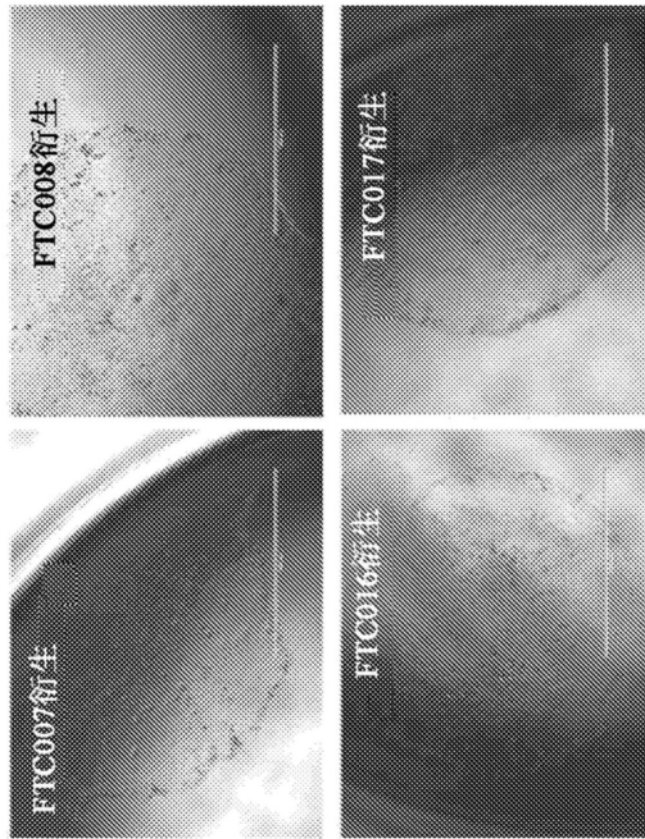


图10B

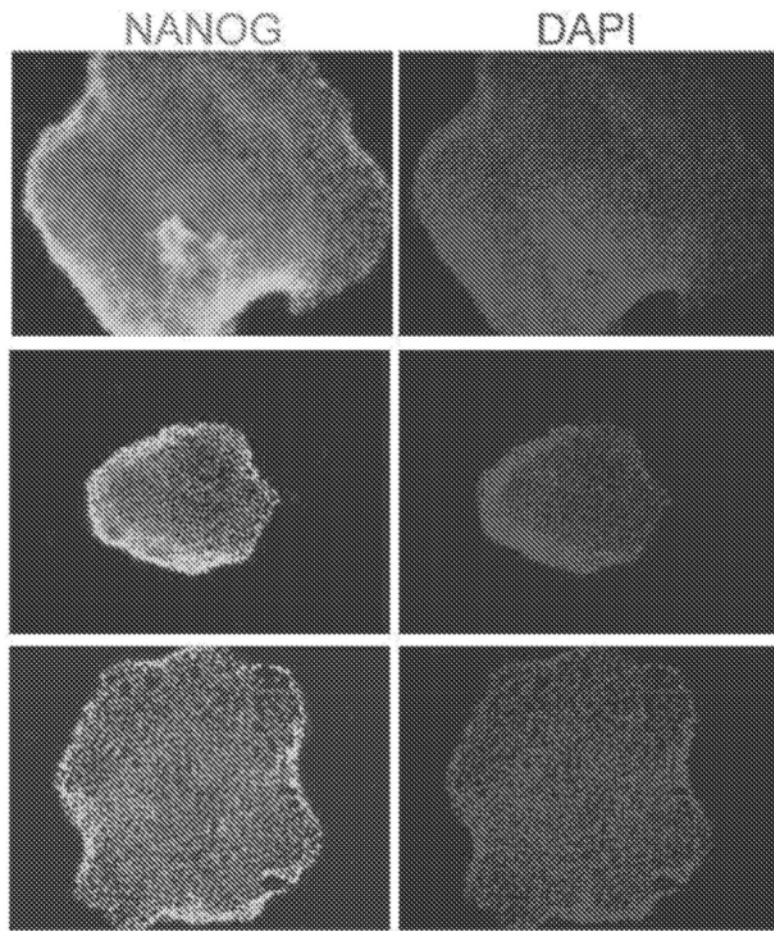


图10C

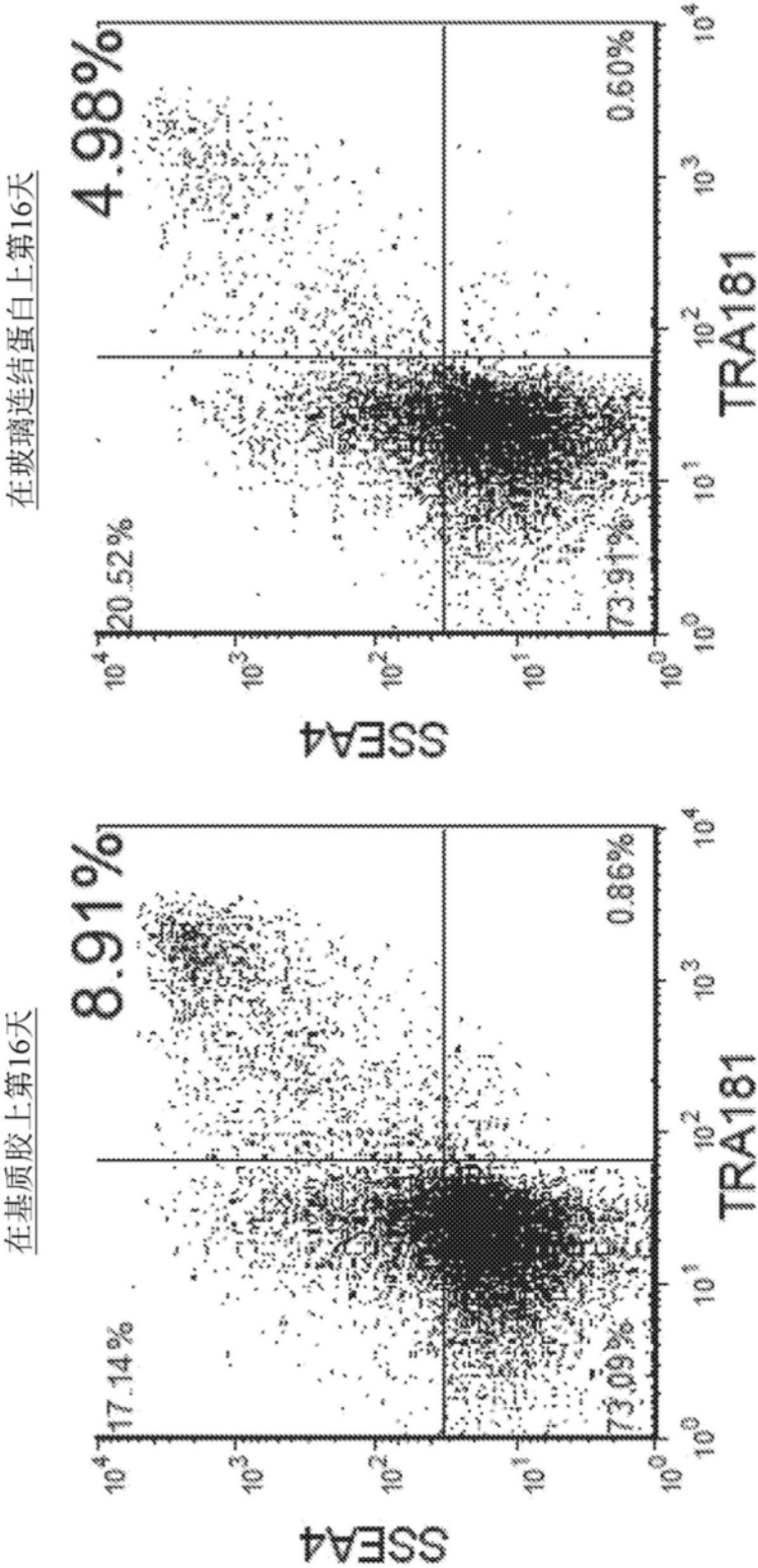


图10D

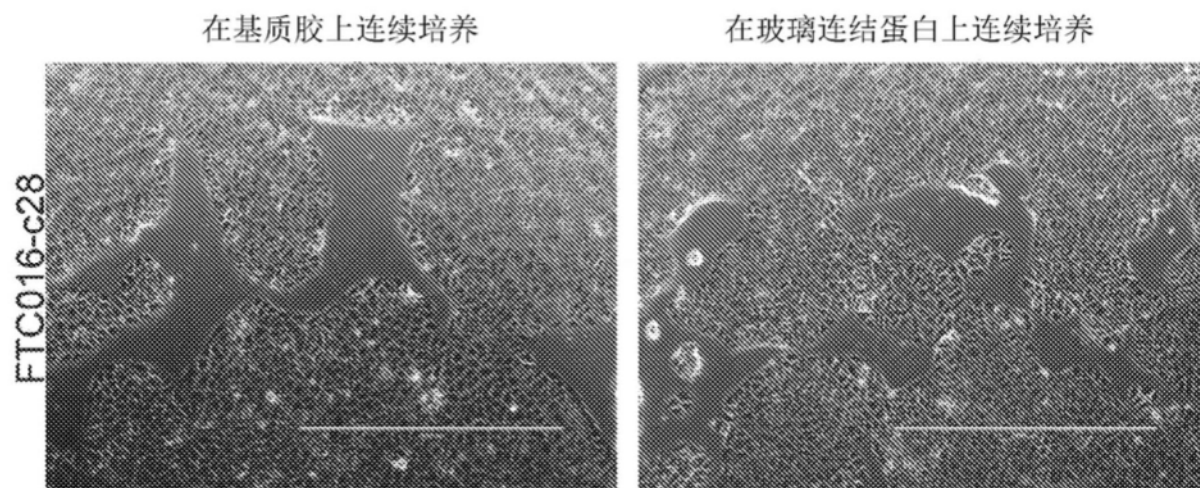


图10E

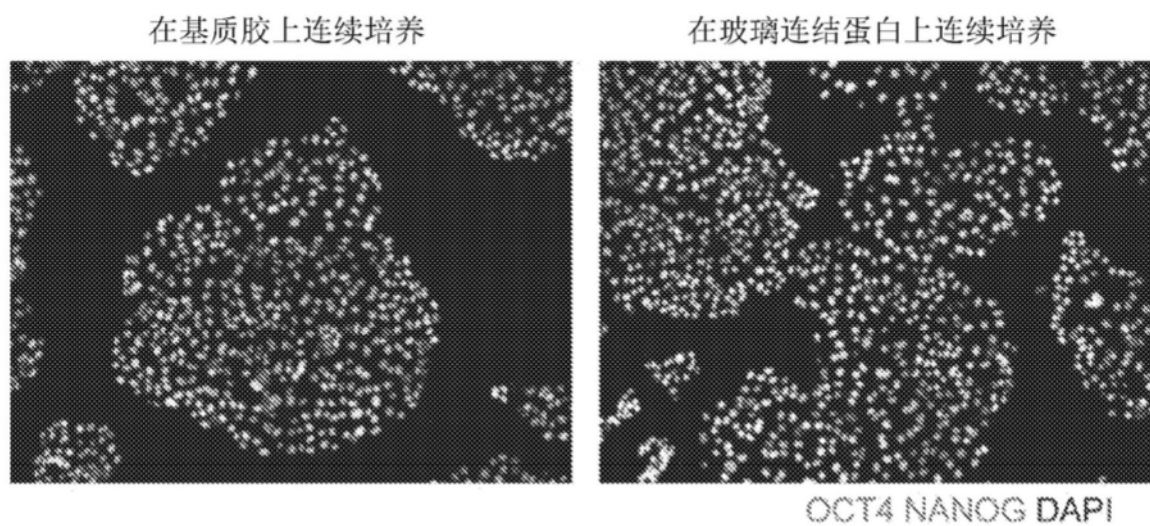


图10F

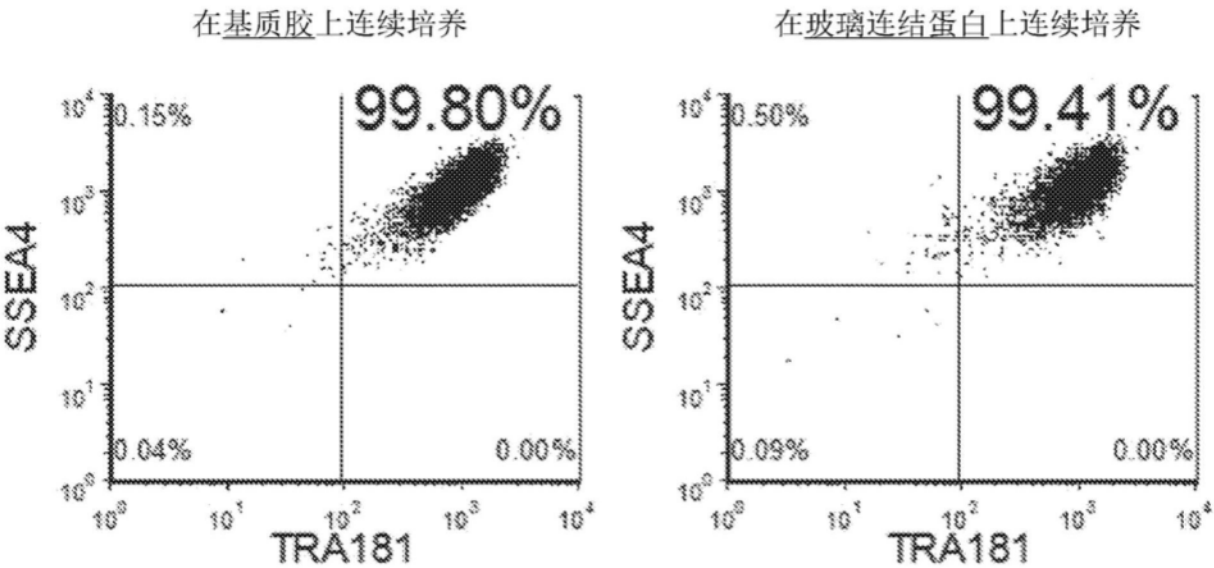


图10G

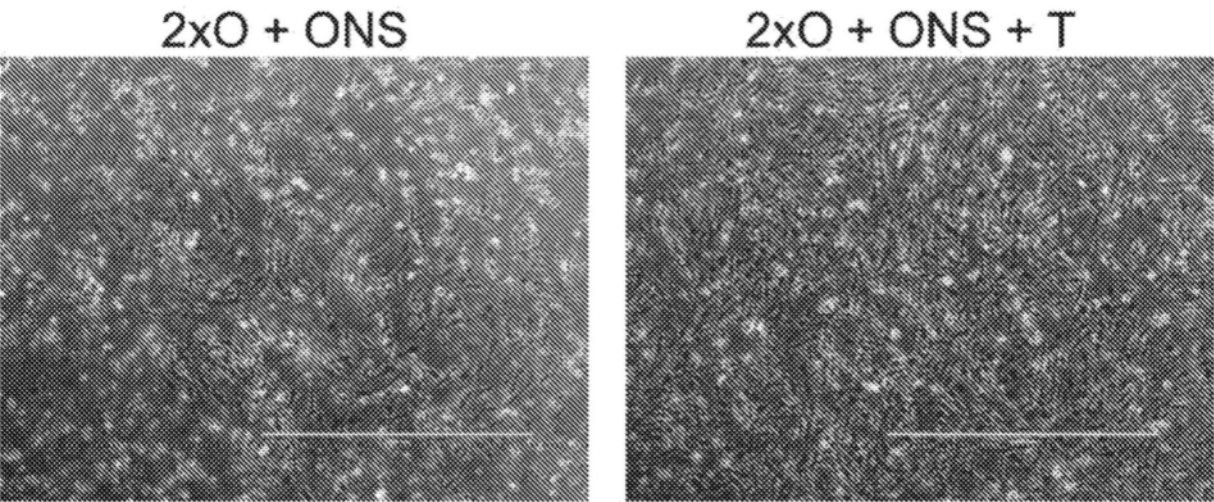


图11A

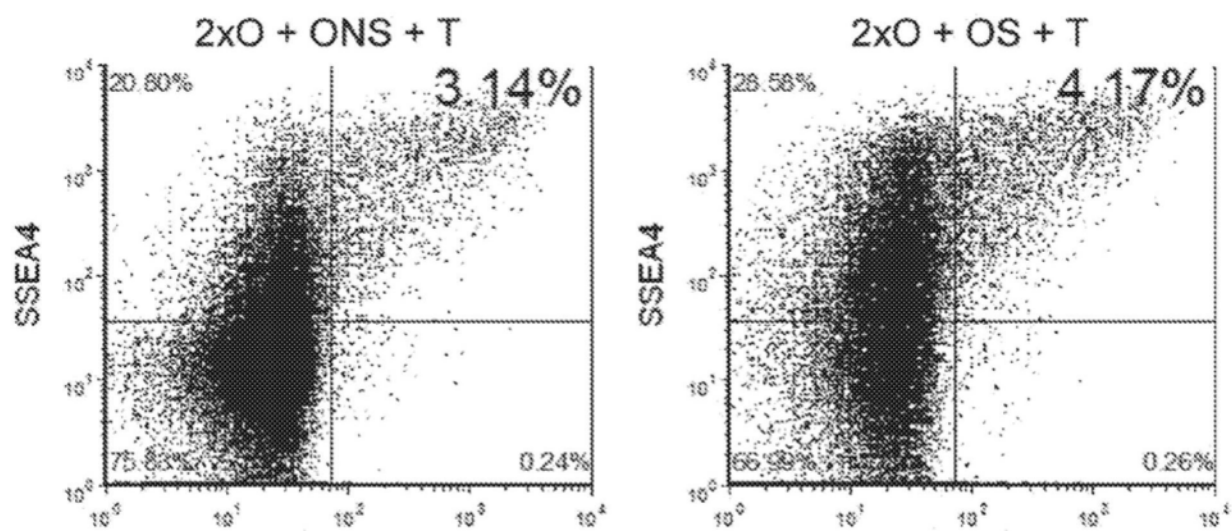


图11B

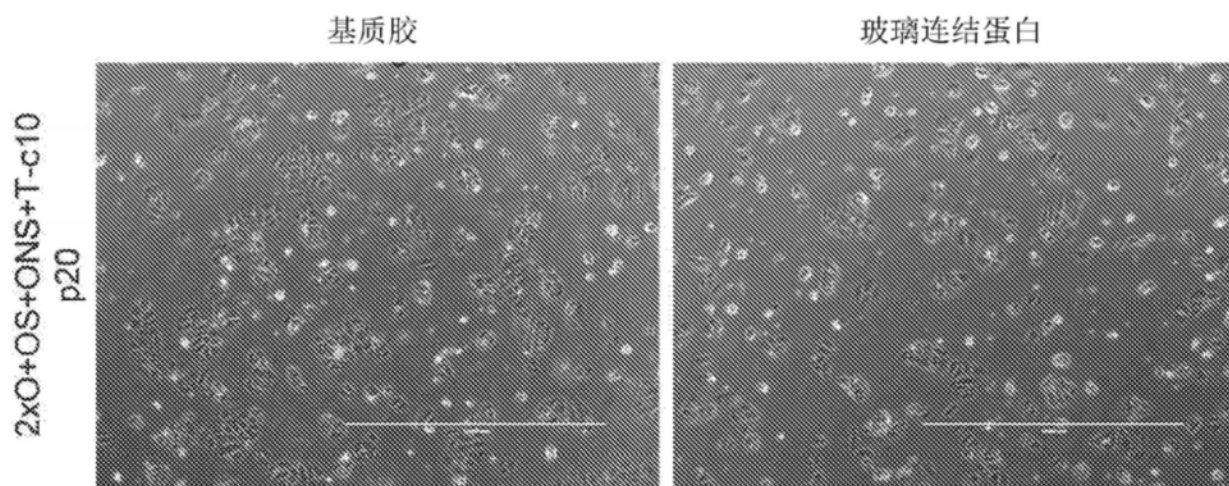


图11C

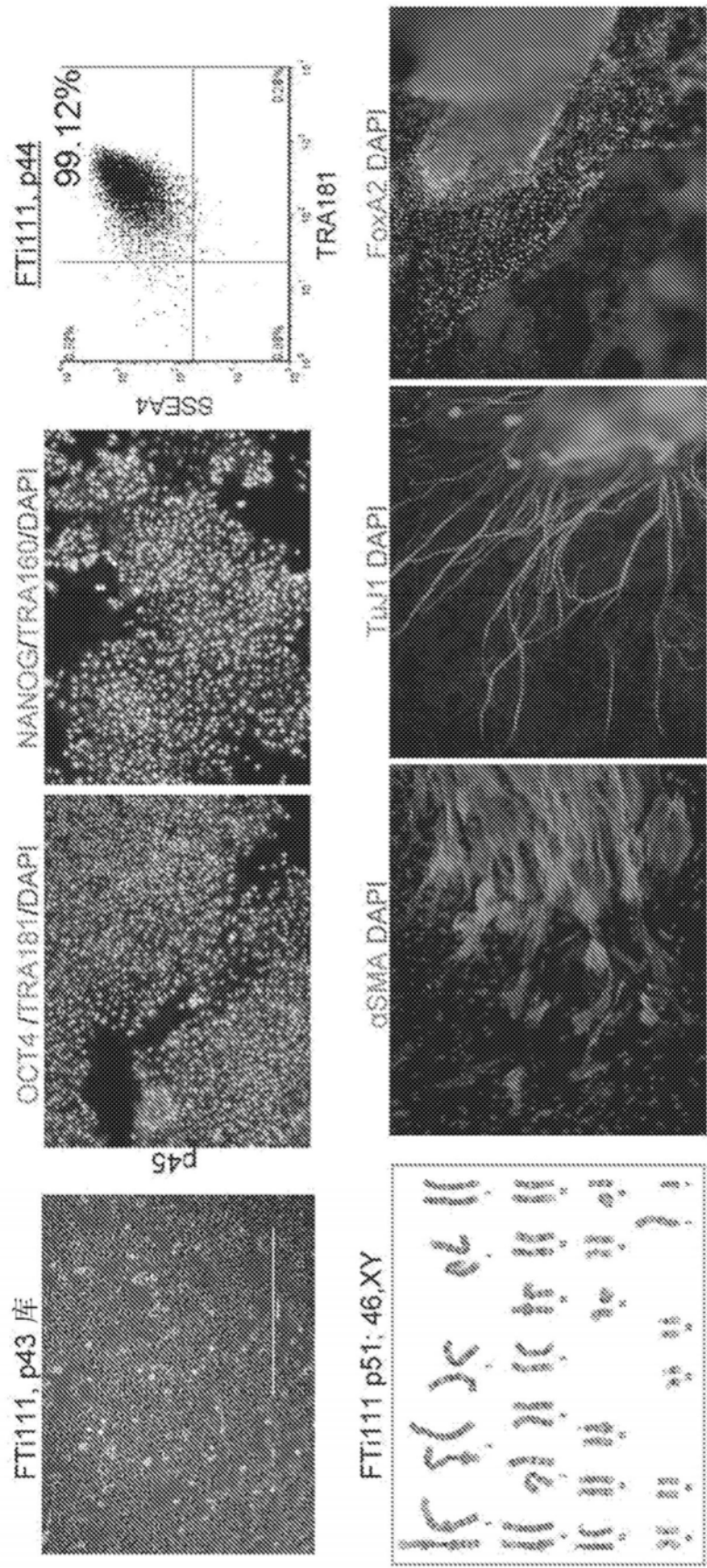


图12A

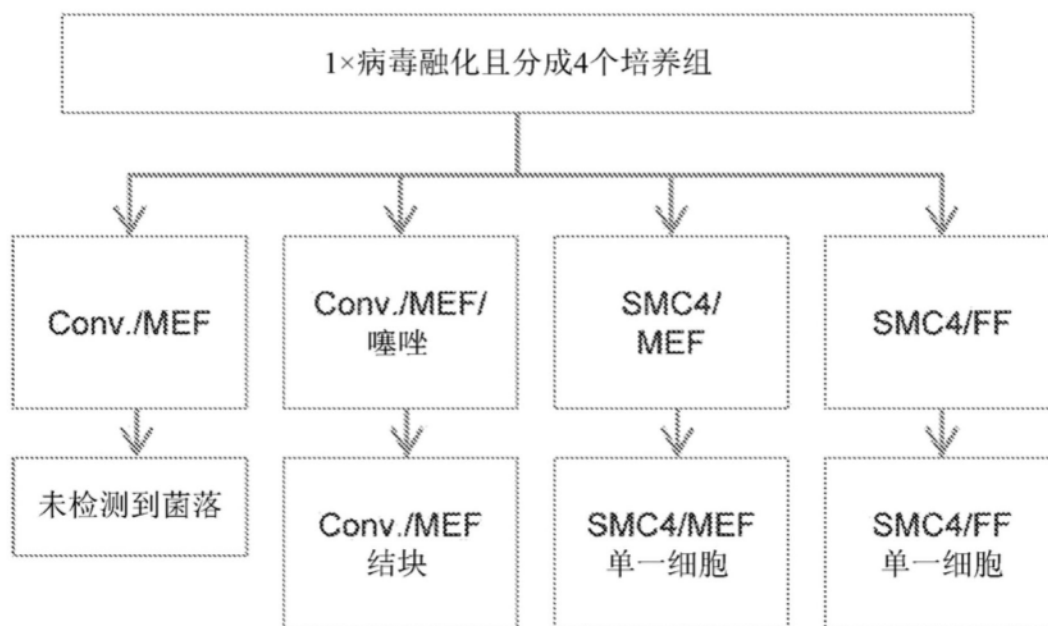


图12B

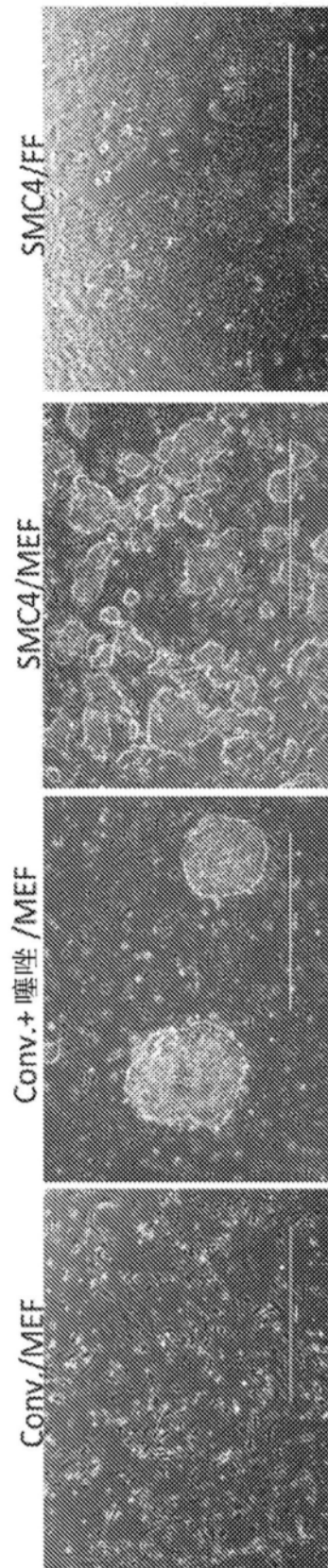


图12C

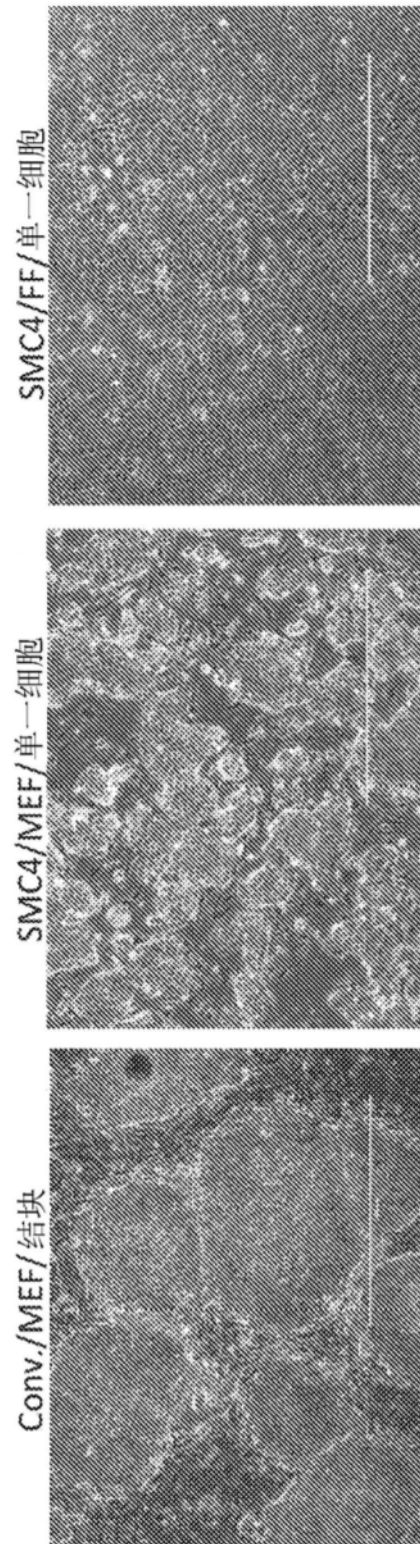


图12D

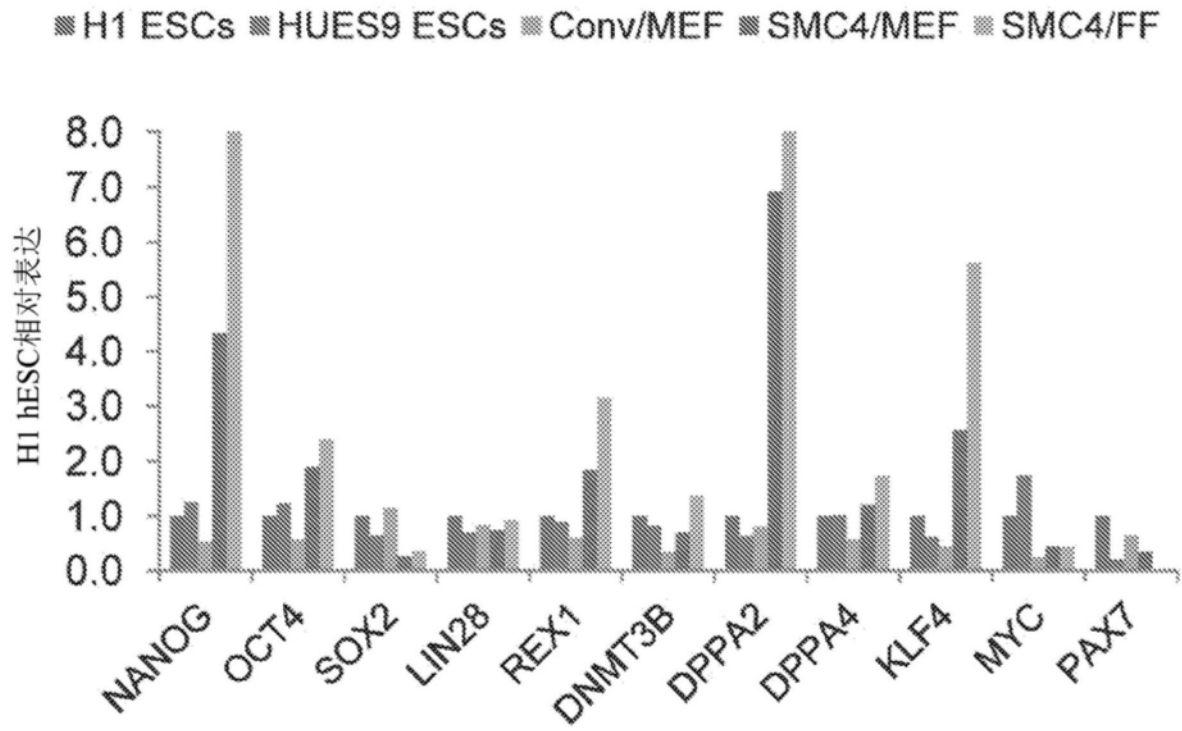


图12E

细胞株	描述		细胞株	描述
FTC018-c28 & -c36	亲本游离基因产生且维持在FRM/FMM中的脐带血		3F Lenti-hiPSC-c1, -c2 & -c3	亲本OKSMNL慢病毒hiPSC克隆株产生且维持在常规hESC培养物中的成纤维细胞
FTC007-C21	亲本游离基因产生且维持在FRM/FMM中的成纤维细胞		3F Lenti-hiPSC-c1 & -c4	亲本OKS慢病毒hiPSC克隆株产生且维持在常规hESC培养物中的成纤维细胞
3F Lenti-hiPSC-c2 & -c3	亲本OKS慢病毒hiPSC克隆株产生且维持在SMC4中的成纤维细胞			

图13A

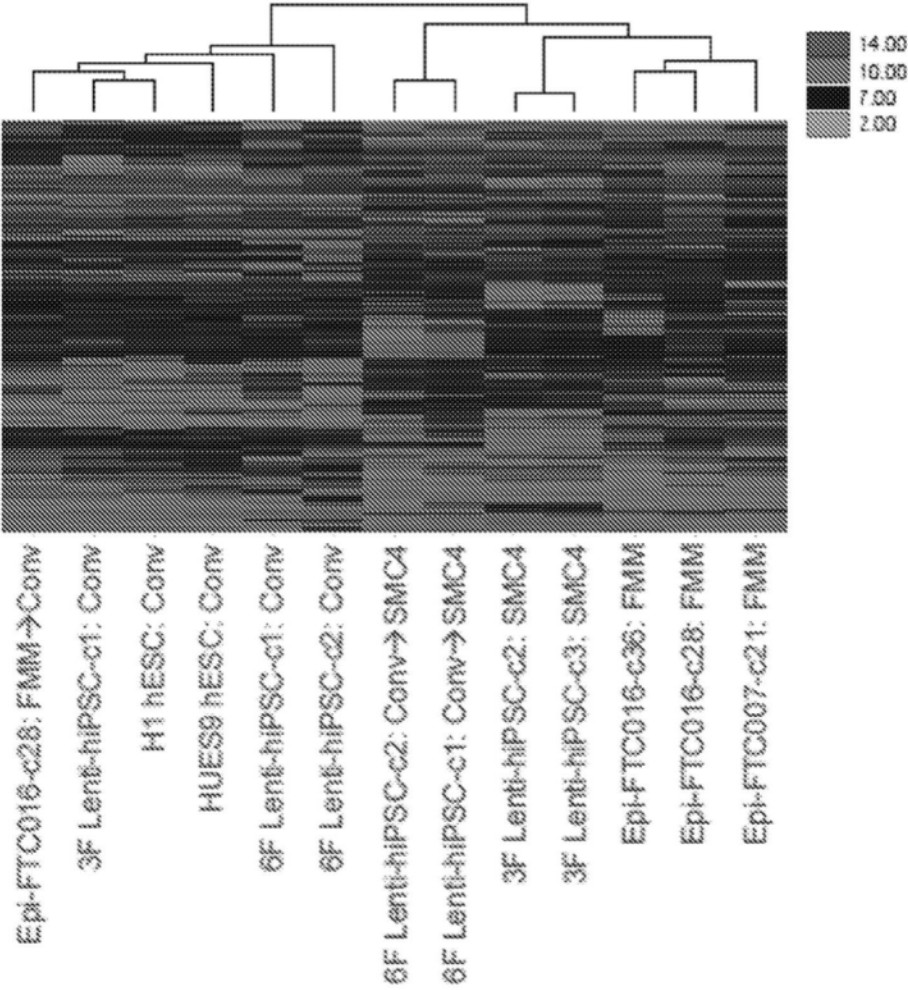


图13B

常规hESC培养物群与FMM//SMC4培养物群中上调的133个探针组			
GO ID	GO术语	%	p值
GO:0007389	模式说明方法	9.7	3.50E-05
GO:0048598	胚胎形态发生	8.6	5.90E-04
GO:0001775	细胞活化	7.5	2.30E-03
GO:0046649	淋巴细胞活化	6.5	2.50E-03
GO:0042110	T细胞活化	5.4	3.00E-03
GO:0002521	白细胞分化	5.4	3.40E-03
GO:0030217	T细胞分化	4.3	3.60E-03
GO:0030097	造血	6.5	5.10E-03
GO:0045321	白细胞活化	6.5	5.70E-03
GO:0007610	行为	8.6	6.50E-03
GO:0048534	造血或淋巴器官发育	6.5	7.60E-03
GO:0048568	胚胎器官发育	5.4	8.90E-03
GO:0002520	免疫系统发育	6.5	9.80E-03

图13C

小分子培养物群与常规培养物群中上调的167个探针组			
GO ID	GO术语	%	p值
GO:0042127	细胞增殖的调节	12.4	5.20E-04
GO:0051205	蛋白质插入膜中	2.5	1.50E-03
GO:0009725	对激素刺激作出反应	7.4	2.60E-03
GO:0051668	膜内定位	2.5	4.20E-03
GO:0009719	对内源性刺激作出反应	7.4	4.80E-03
GO:0008284	细胞增殖的正调节	7.4	5.50E-03
GO:0008406	性腺发育	4.1	6.10E-03
GO:0009636	对毒素作出反应	3.3	7.30E-03
GO:0014070	对有机循环物质作出反应	4.1	8.00E-03
GO:0043066	细胞凋亡的反调节	6.6	8.20E-03
GO:0048545	对类固醇激素刺激作出反应	5	8.30E-03
GO:0008585	女性性腺发育	3.3	8.30E-03
GO:0043069	经编程的细胞死亡的反调节	6.6	8.80E-03
GO:0060548	细胞死亡的反调节	6.6	9.00E-03
GO:0048608	再生结构发育	4.1	9.20E-03
GO:0045137	第一性征的发育	4.1	9.40E-03
GO:0046660	女性性别分化	3.3	1.00E-02
GO:0046545	第一女性性征的发育	3.3	1.00E-02

图13D

FMM样品群与常规培养物群中上调的126个探针组			
GO ID	GO术语	%	p值
GO:0007267	细胞间信号传导	16.5	8.20E-07
GO:0040008	生长调节	10.3	1.10E-04
GO:0042981	细胞凋亡调节	15.5	1.20E-04
GO:0043067	经编程的细胞死亡的调节	15.5	1.30E-04
GO:0010941	细胞死亡的调节	15.5	1.30E-04
GO:0010817	激素含量的调节	7.2	1.90E-04
GO:0045926	生长的反调节	6.2	3.60E-04
GO:0031100	器官再生	4.1	3.90E-04
GO:0001558	细胞生长调节	7.2	7.10E-04
GO:0043066	细胞凋亡的反调节	9.3	7.40E-04
GO:0043069	经编程的细胞死亡的反调节	9.3	8.20E-04
GO:0060548	细胞死亡的反调节	9.3	8.30E-04
GO:0016358	树突发育	4.1	9.40E-04
GO:0006916	抗细胞凋亡	7.2	9.70E-04
GO:0045596	细胞分化的反调节	7.2	1.20E-03
GO:0030308	细胞生长的反调节	5.2	1.70E-03
GO:0050768	神经形成的反调节	4.1	2.00E-03
GO:0045792	细胞大小的反调节	5.2	2.20E-03
GO:0010721	细胞发育的反调节	4.1	2.40E-03
GO:0042445	激素新陈代谢过程	5.2	2.80E-03
GO:0032535	细胞组分大小的调节	7.2	3.90E-03
GO:0034754	细胞激素新陈代谢过程	4.1	4.30E-03
GO:0051270	细胞运动调节	6.2	4.30E-03
GO:0048754	管分支形态发生	4.1	5.60E-03
GO:0008361	细胞大小调节	6.2	5.70E-03
GO:0001569	血管图案形成	3.1	5.90E-03
GO:0031099	再生	4.1	6.60E-03
GO:0035295	管发育	6.2	7.50E-03
GO:0009991	对细胞外刺激作出反应	6.2	7.50E-03
GO:0001763	分支结构的形态发生	4.1	8.00E-03
GO:0006917	诱导细胞凋亡	7.2	8.60E-03
GO:0012502	诱导经编程的细胞死亡	7.2	8.70E-03

图13E

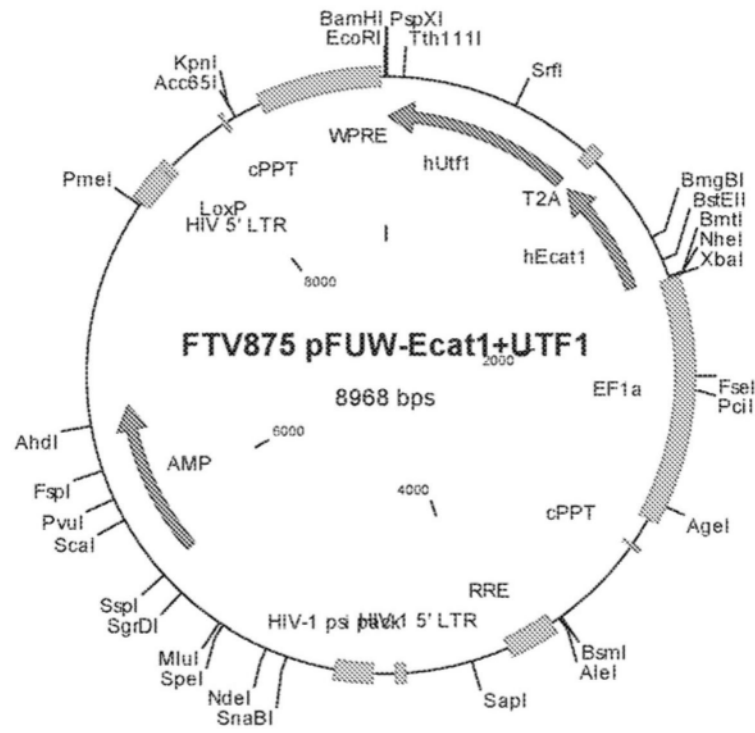


图14A

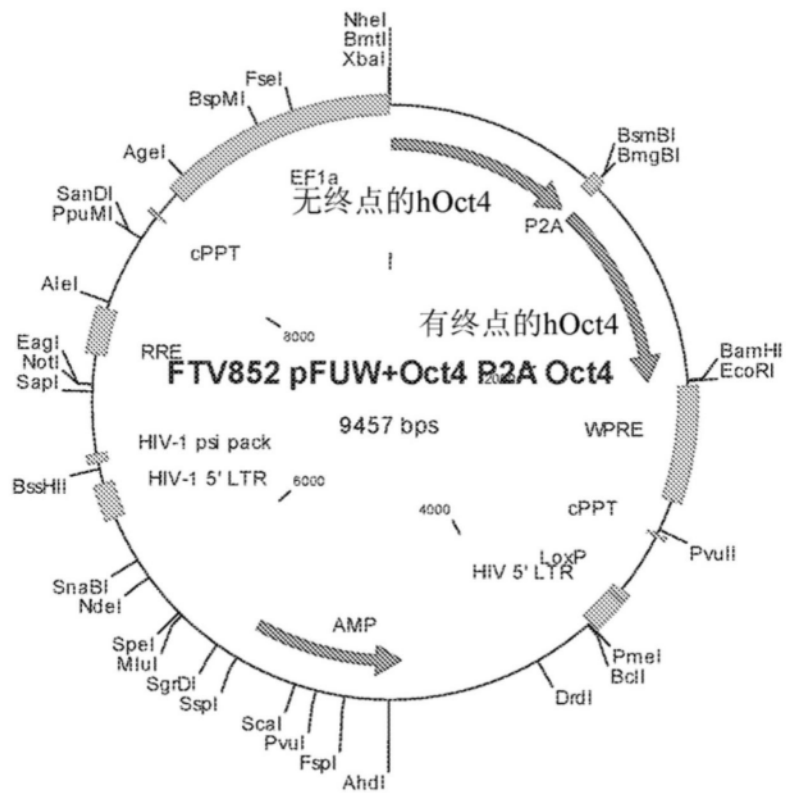


图14B

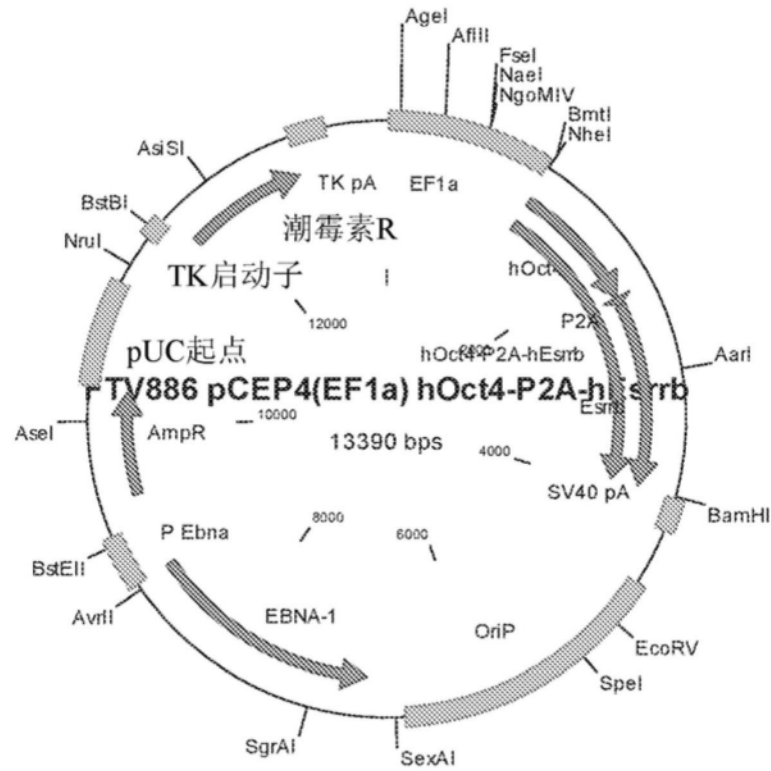


图14C

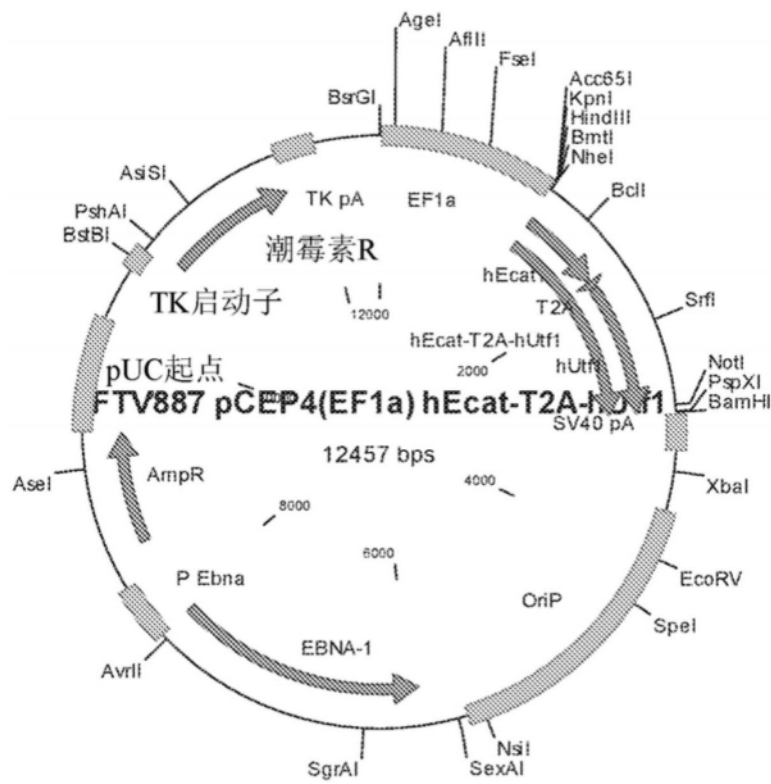


图14D

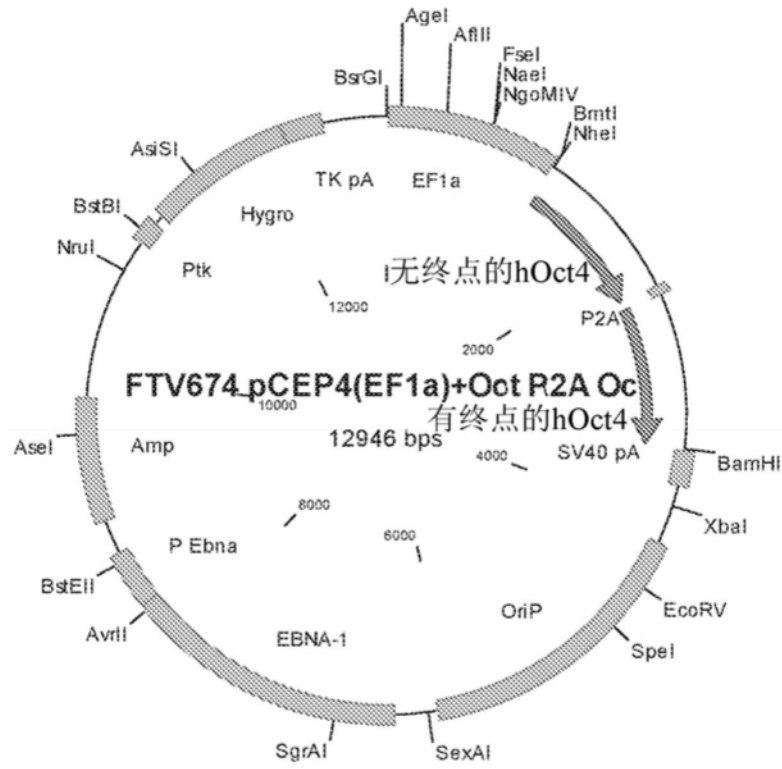


图14E

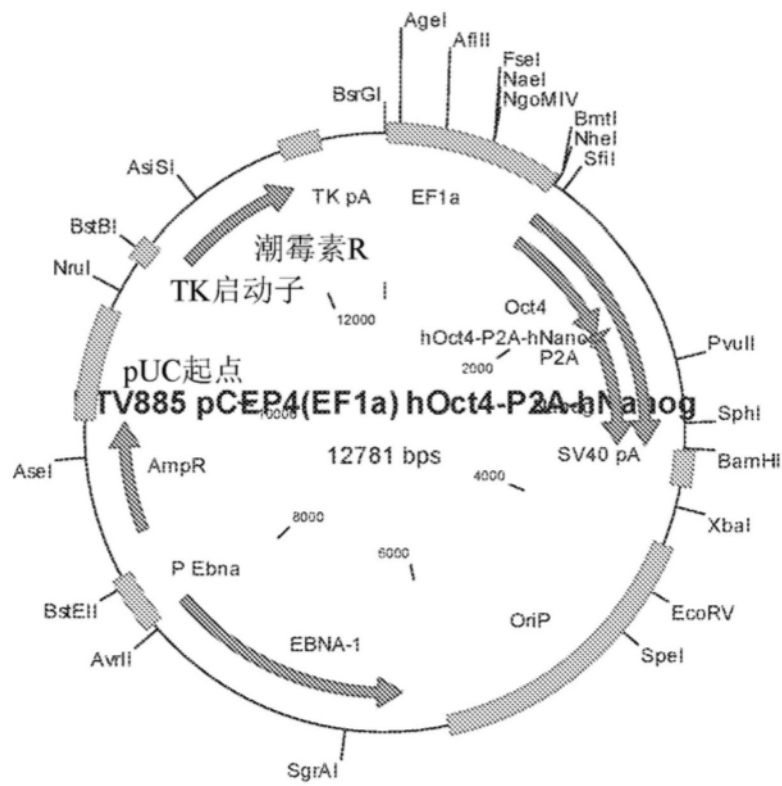


图14F

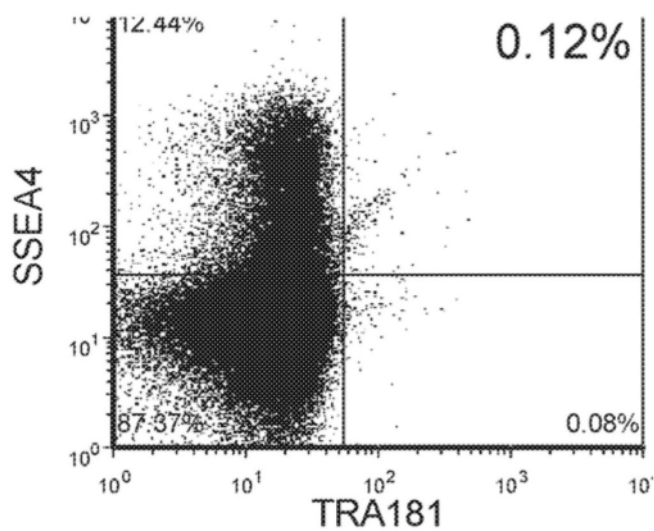
OCT4/NANOG/ECAT1/UTF1

图15A

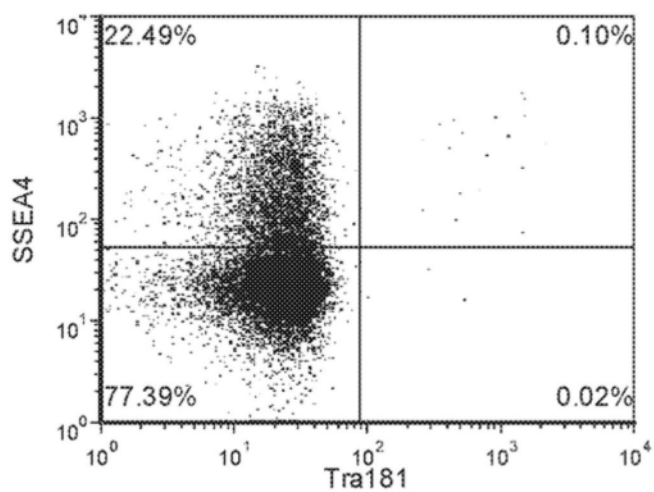
OCT4/ESRRB/NANOG/ECAT1/UTF1

图15B

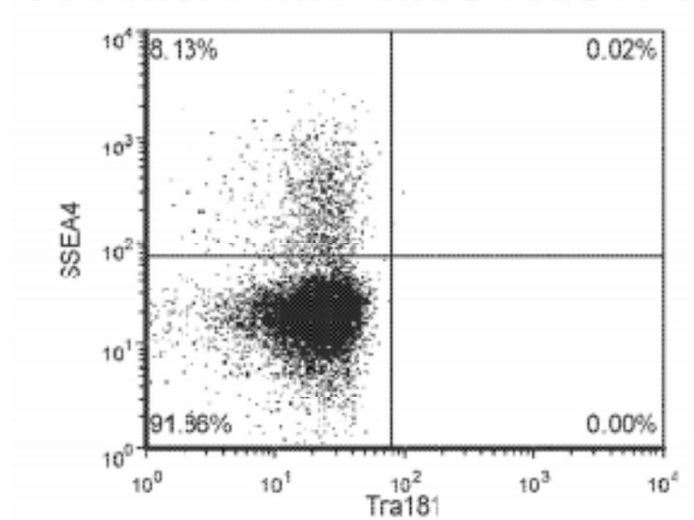
OCT4/ESRRB/LIN28/ECAT1/UTF-1

图15C

**OCT4-P2A-OCT4 / NANOG-P2A-ESRRB-P2A-LIN28 /
ECAT1-T2A-UTF1**

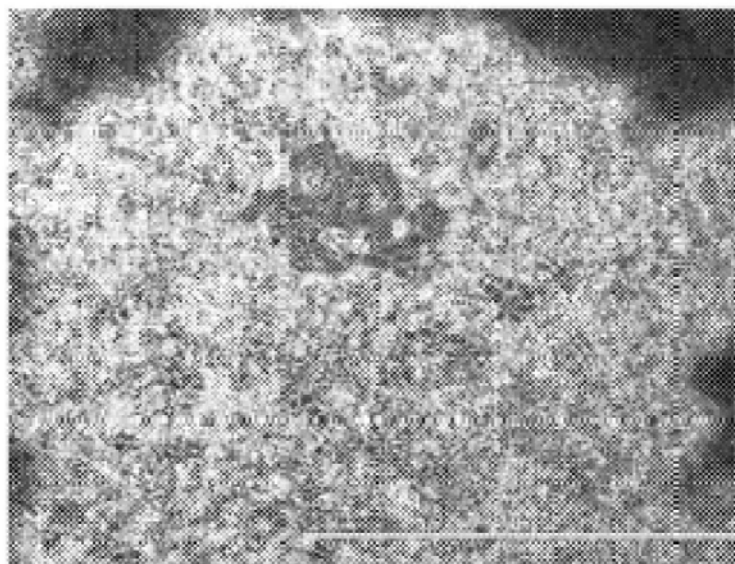
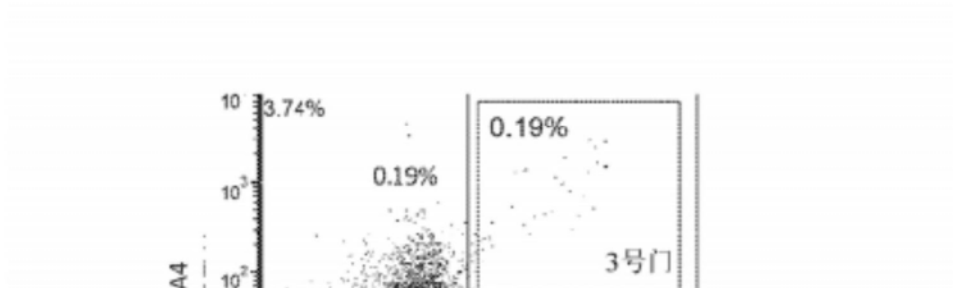


图16A

**OCT4-P2A-ESRRB / OCT4-P2A-NANOG / ECAT1-T2A-
UTF1**

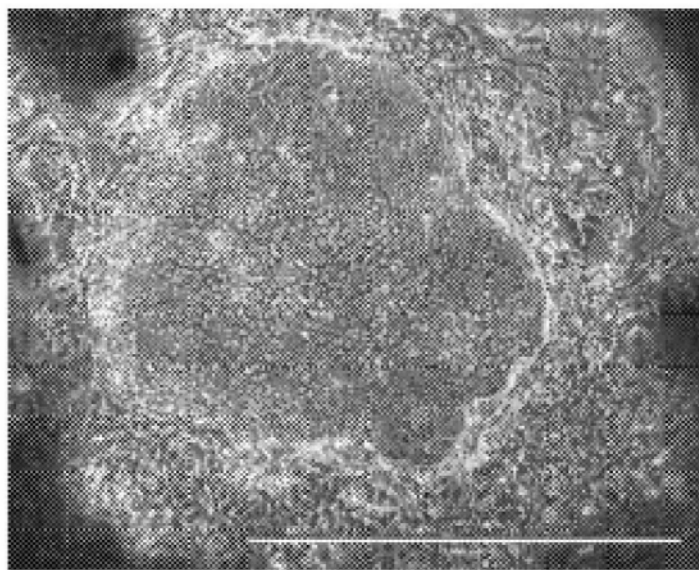
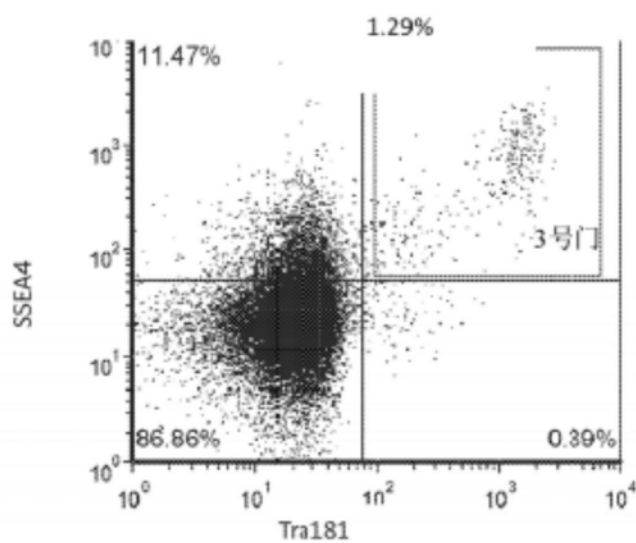


图16B

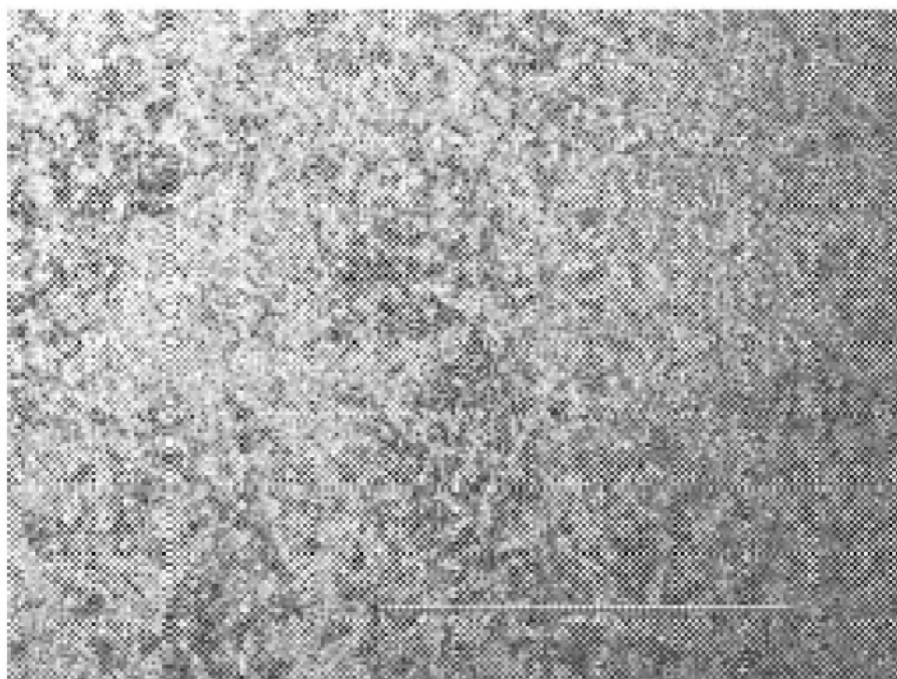
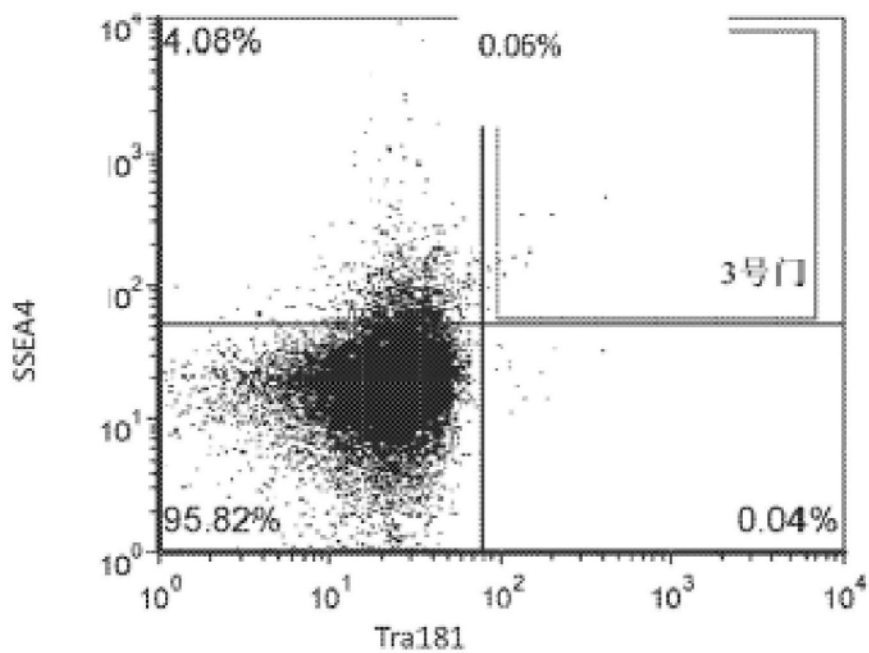
OCT4-P2A-OCT4 / ECAT1-T2A-UTF1

图16C

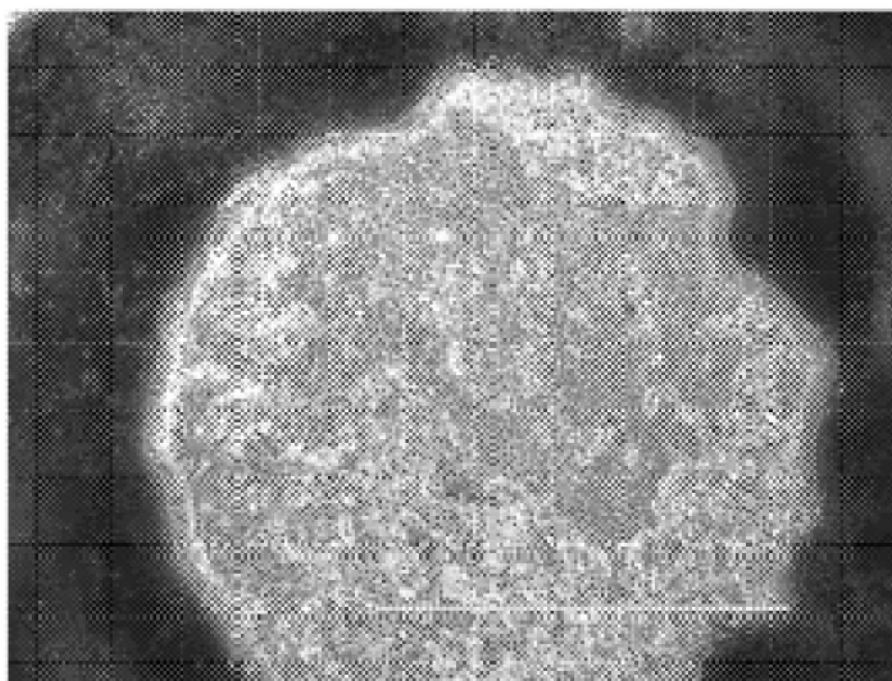
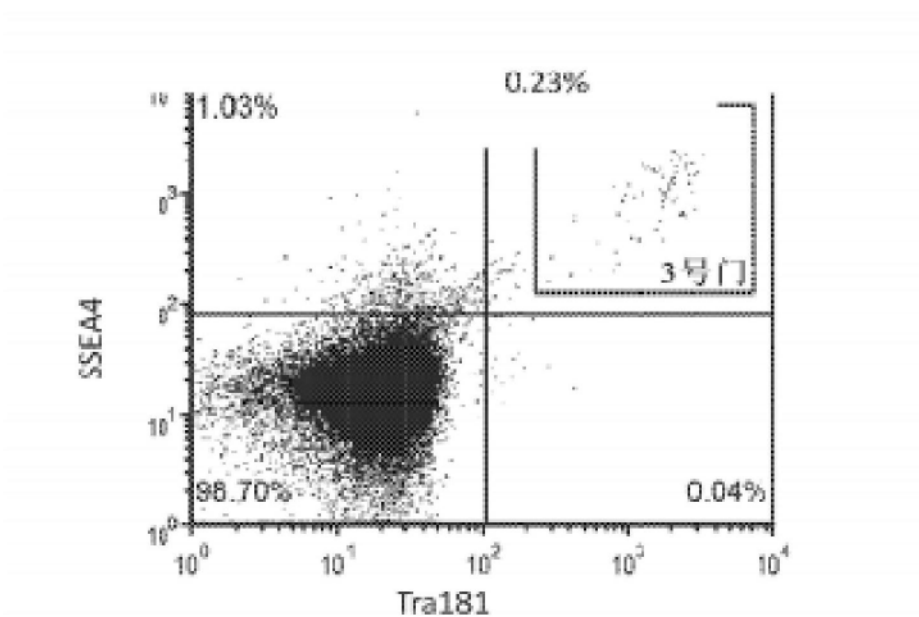
OCT4-P2A-NANOG / ECAT1-T2A-UTF1

图16D

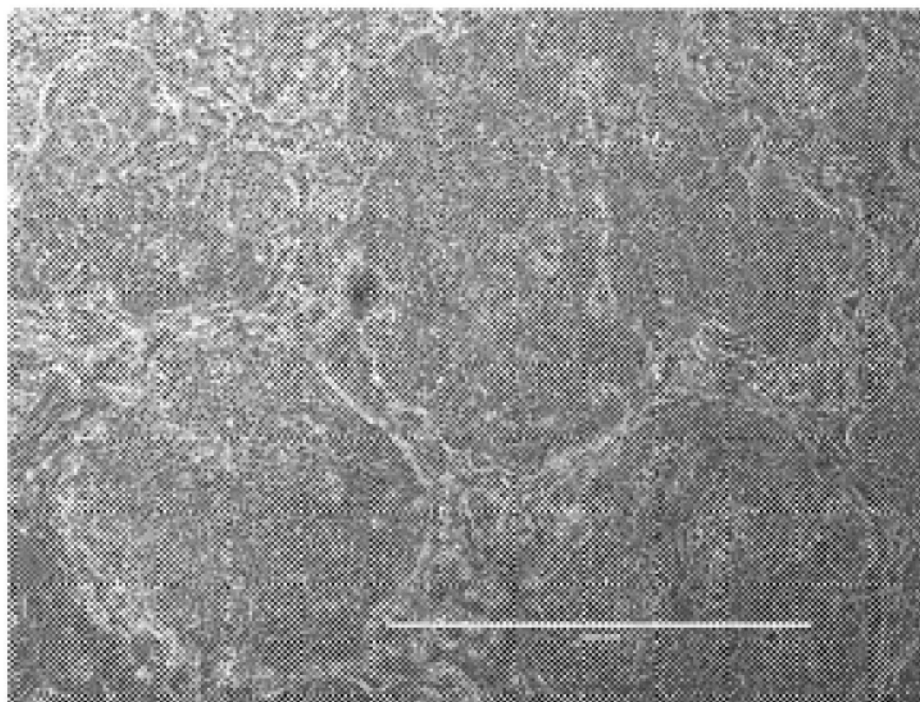
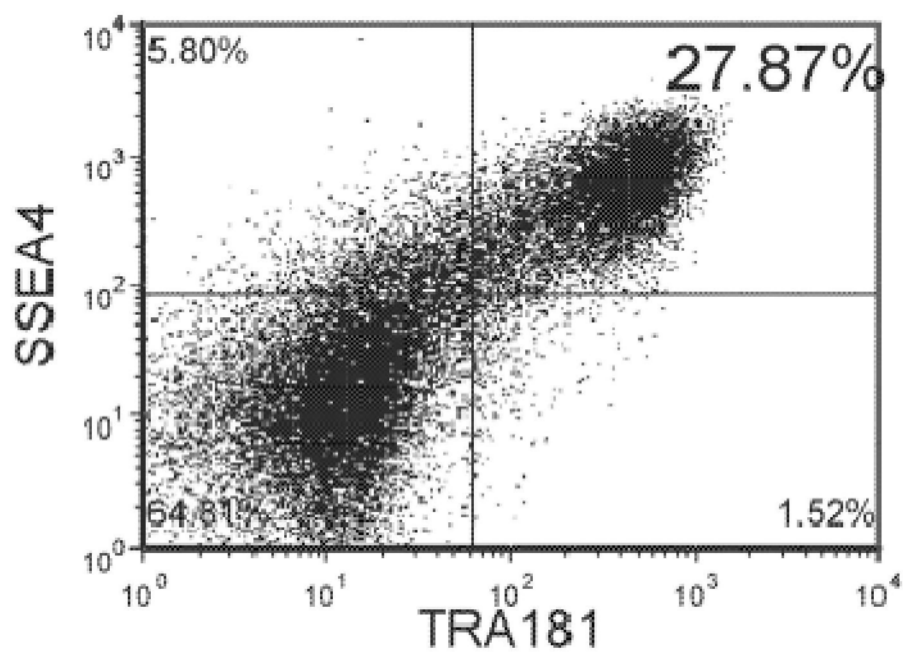


图17A

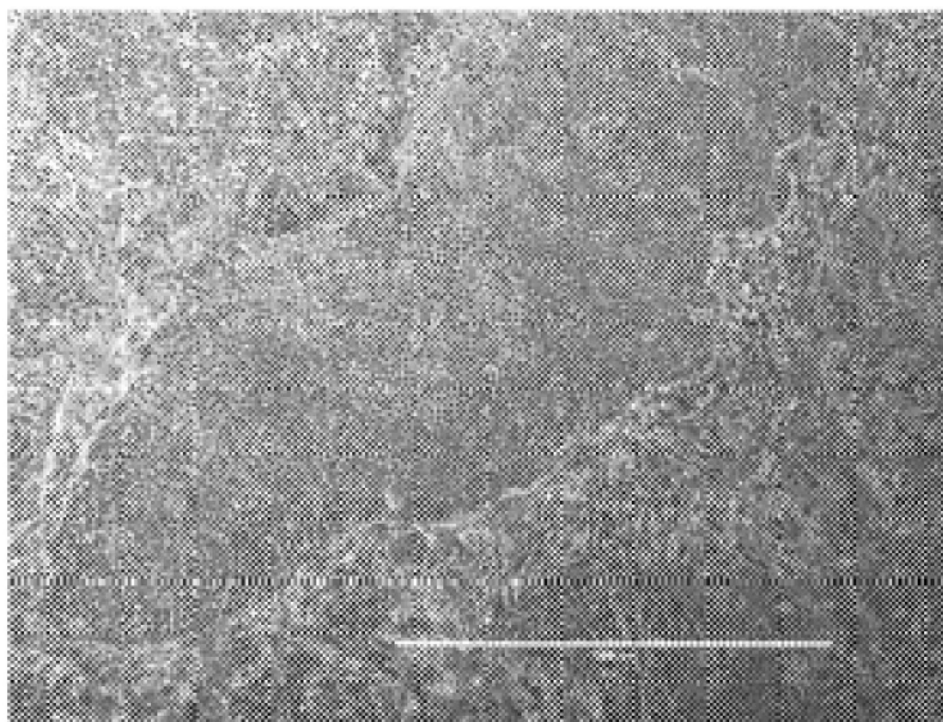
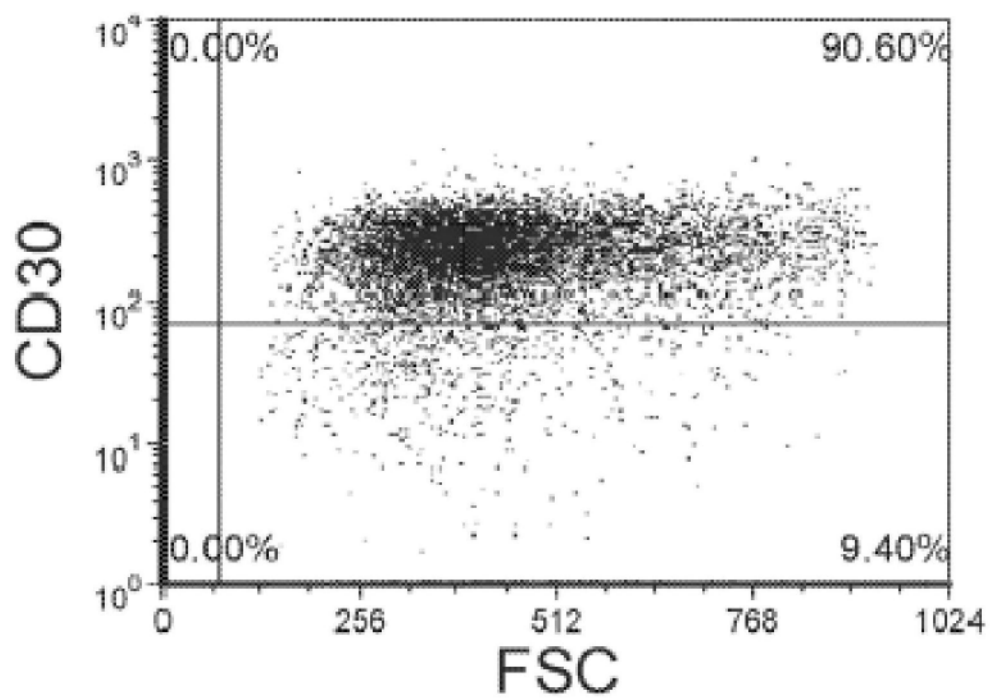


图17B

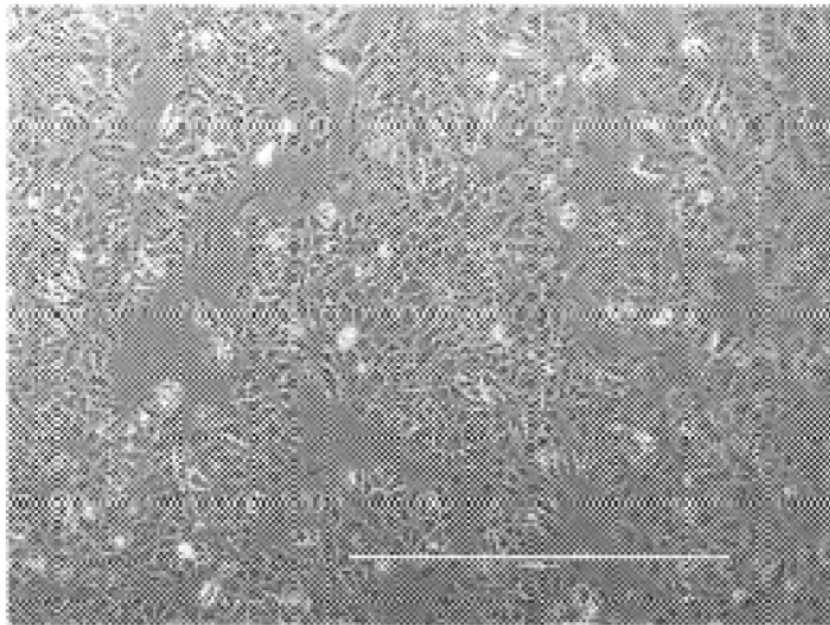
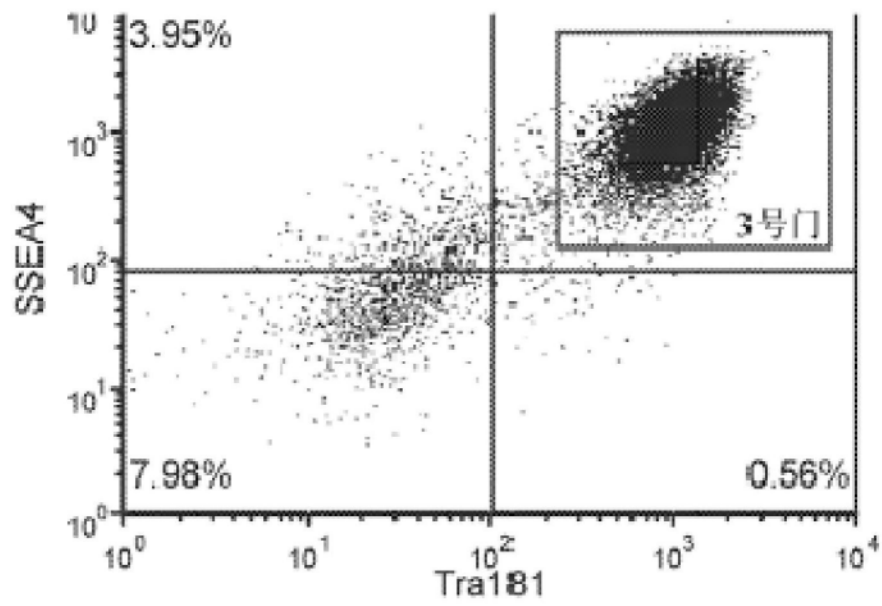


图18A

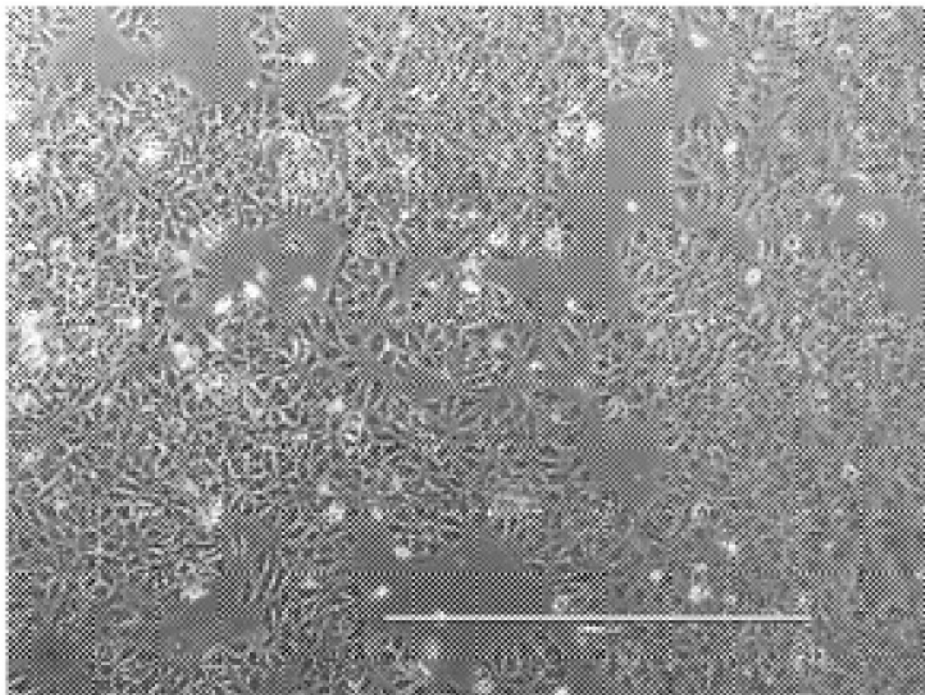
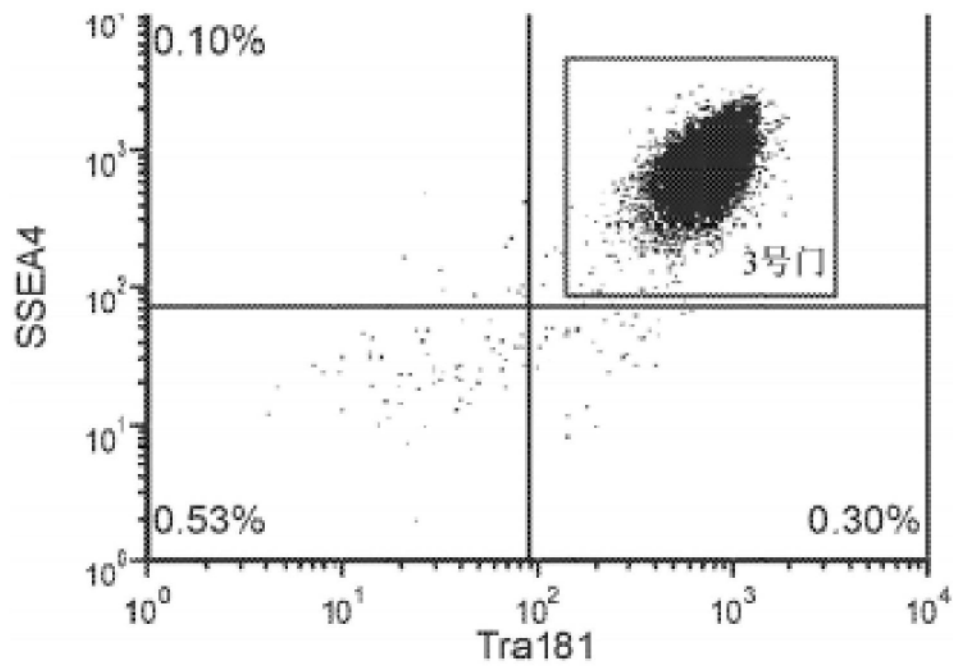


图18B

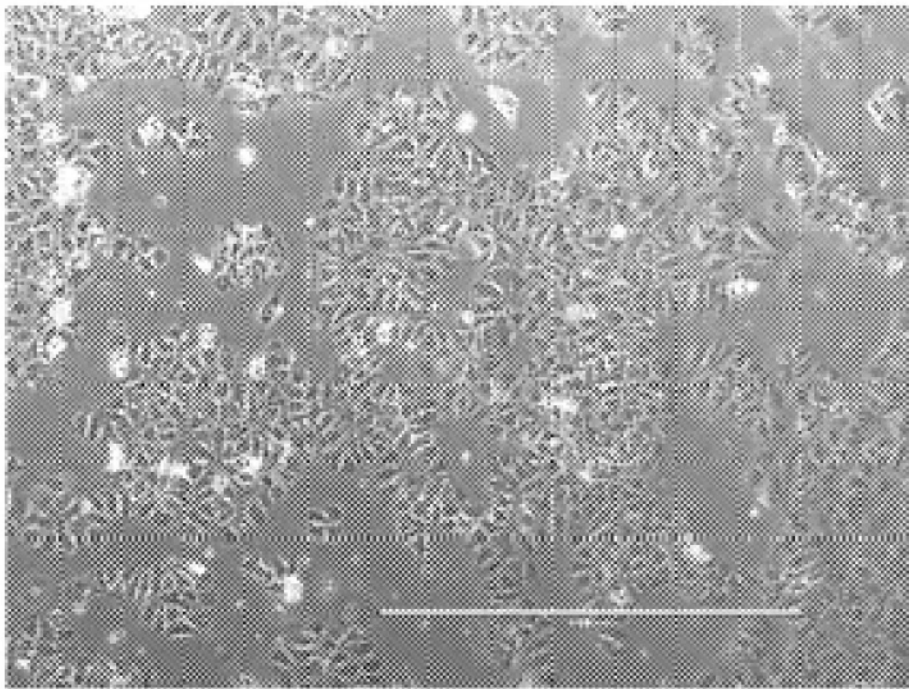
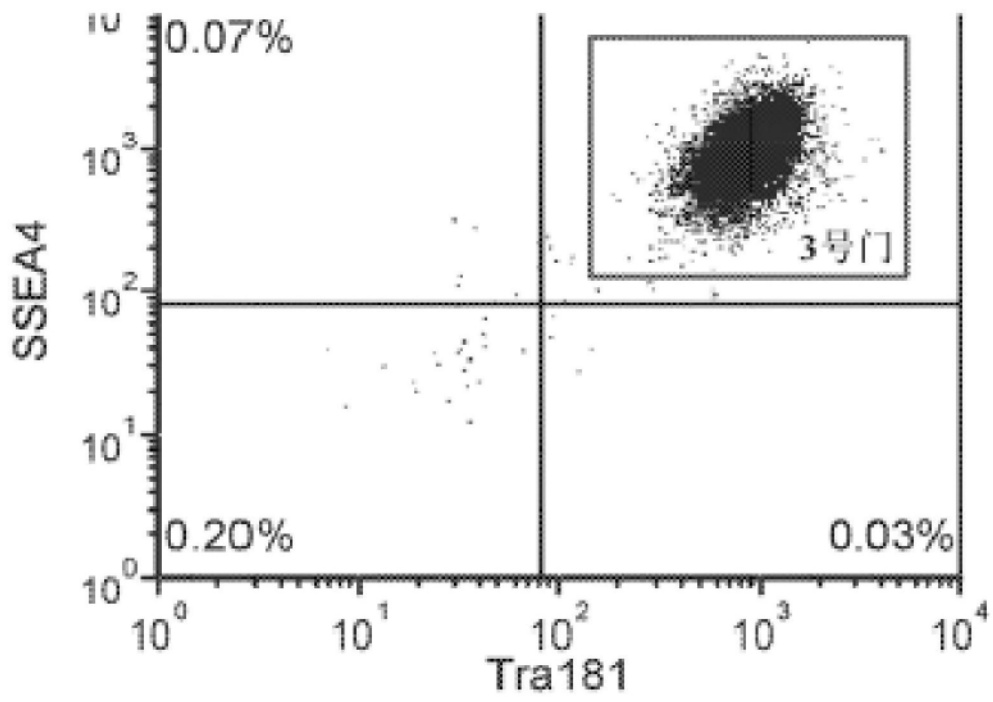


图18C

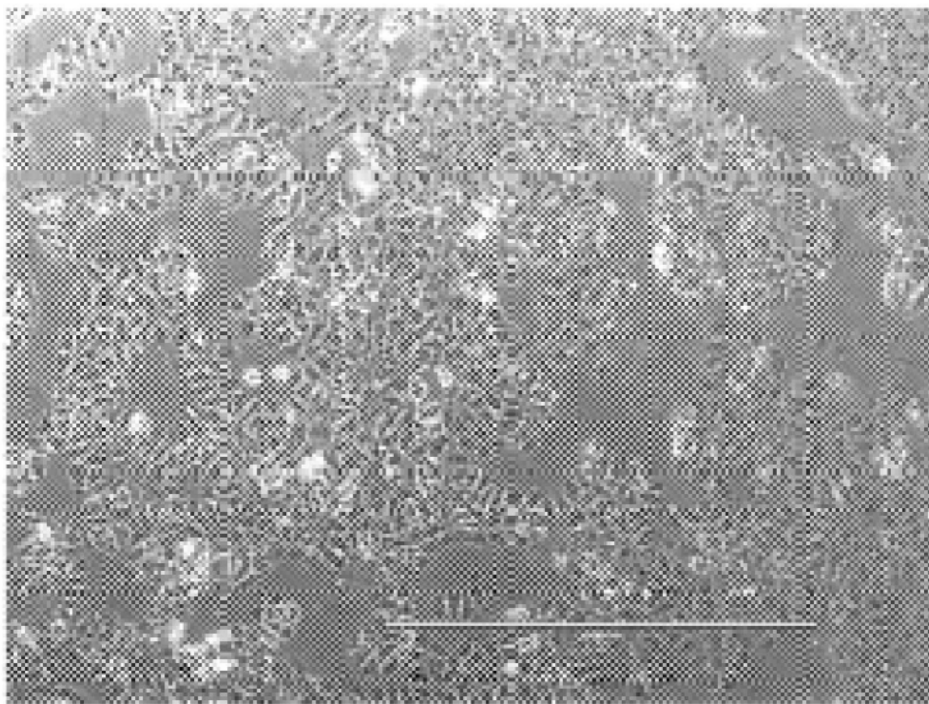
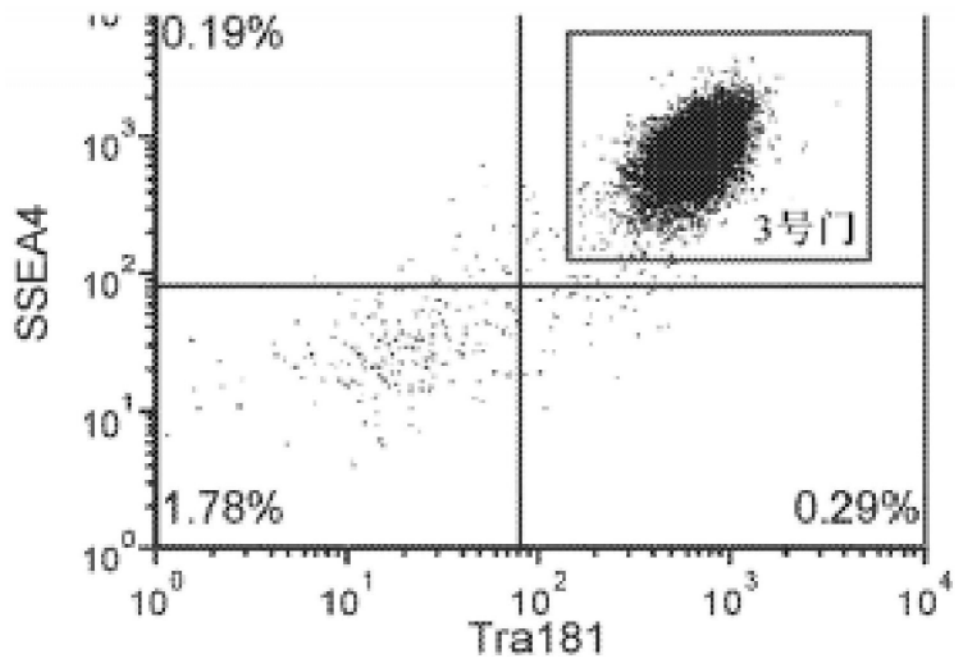


图18D

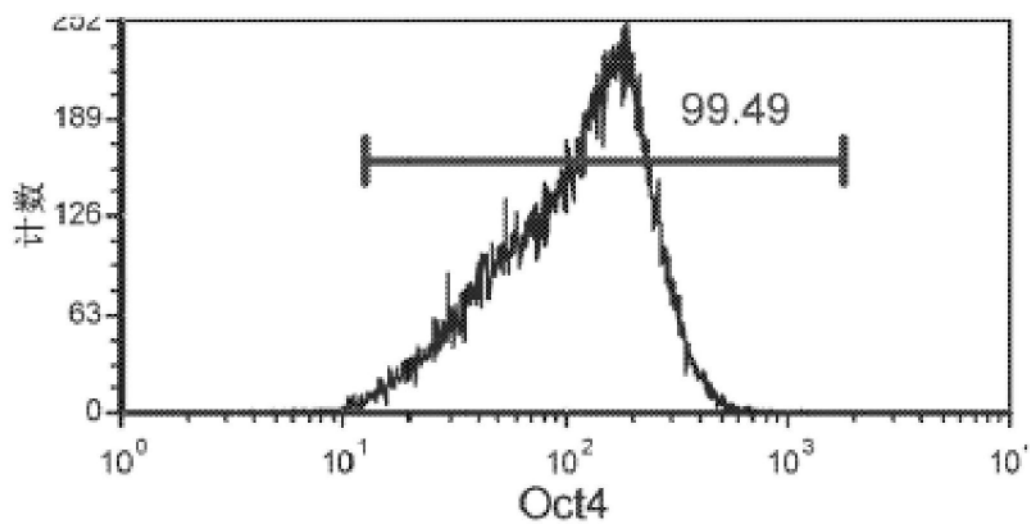


图19A

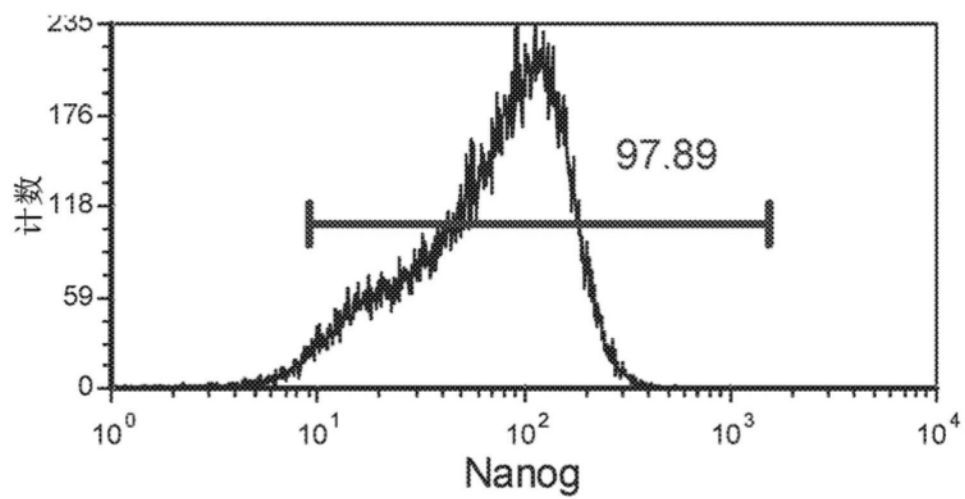


图19B

克隆株5，第9代

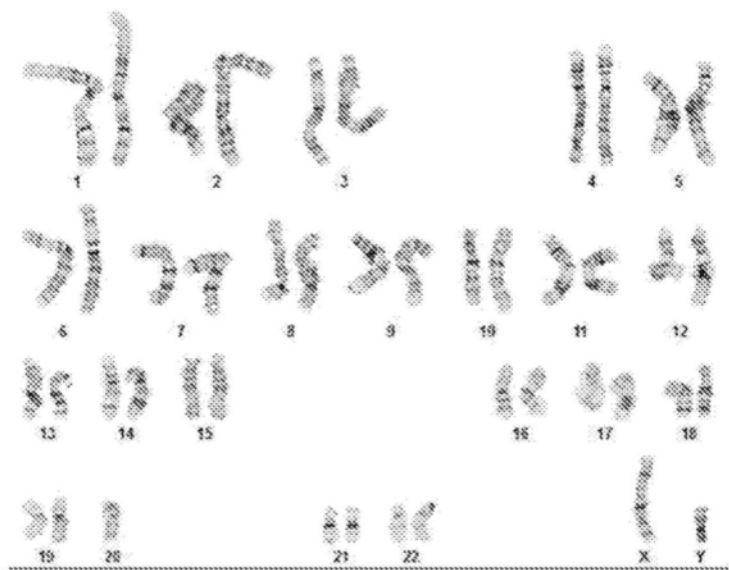


图20A

克隆株10，第8代

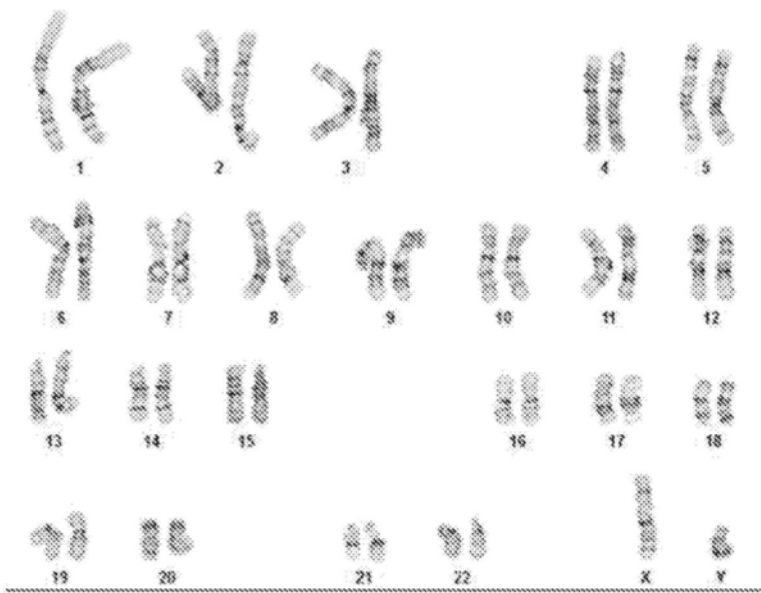


图20B

克隆株3，第9代

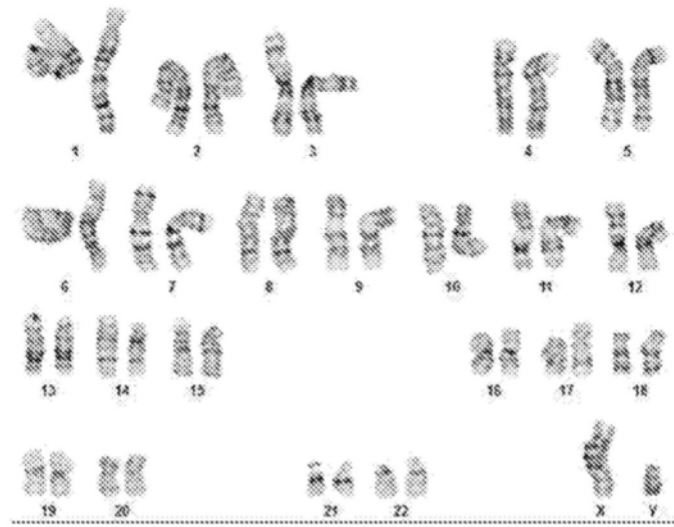


图20C

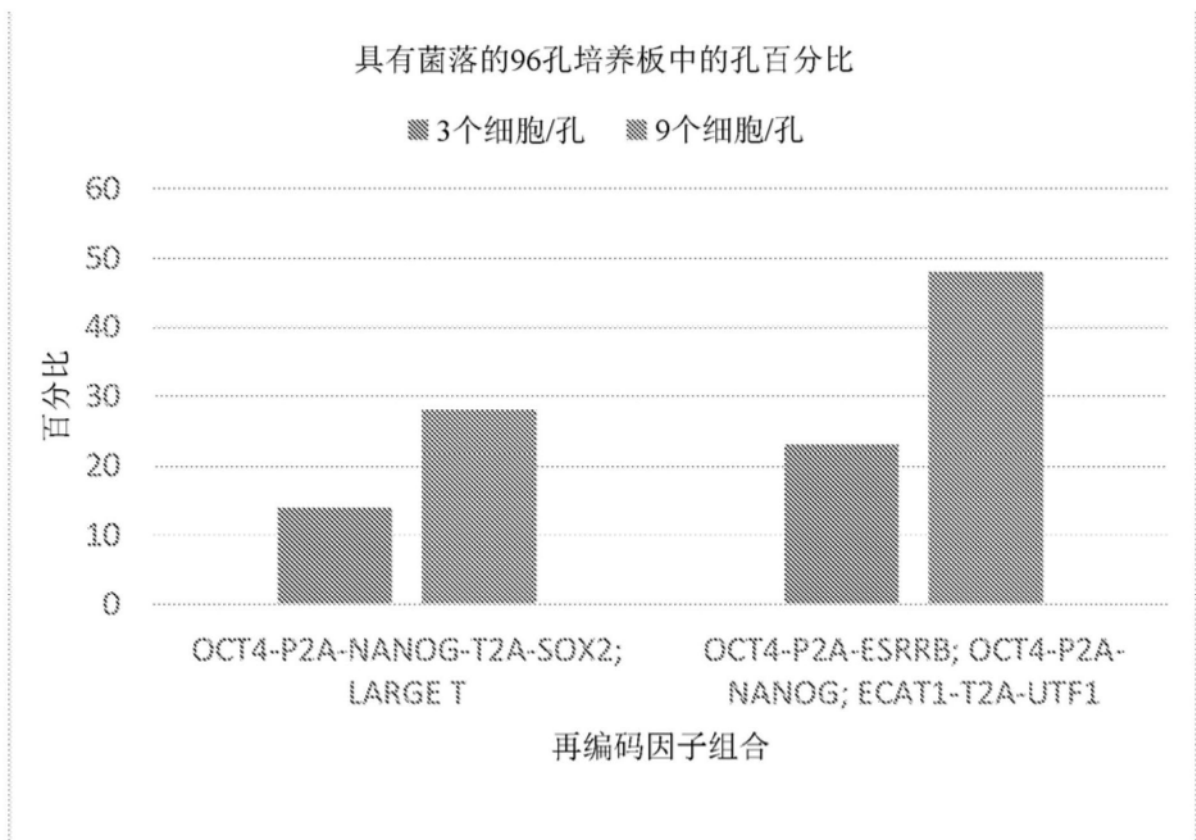


图21

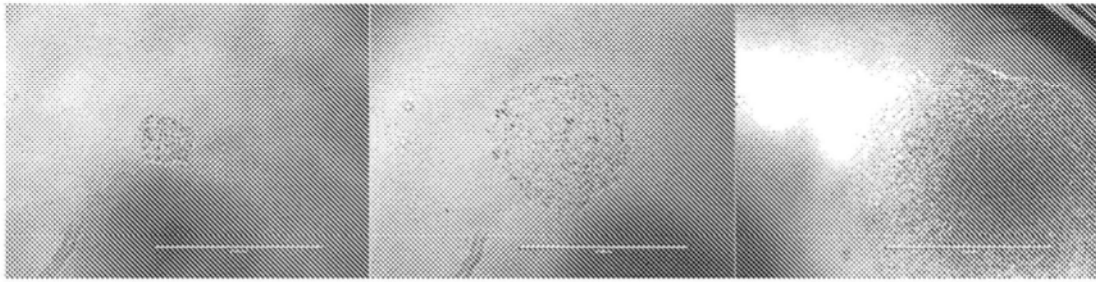
OCT4-P2A-OCT4 / NANOG-P2A-ESRRB-T2A-LIN28 / ECAT1-T2A-UTF1

图22A

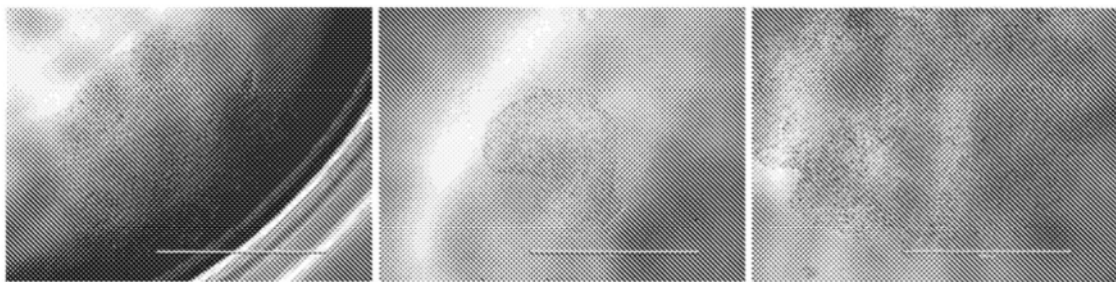
OCT4-P2A-ESRRB / OCT4-P2A-NANOG / ECAT1-T2A-UTF1

图22B

常用表达	选择	流式分析SSEA4/ Tra181阳性的
OCT4-P2A-NANOG-T2A-SOX2 SV40 大T抗原	无选择	0.9%
OCT4-P2A-NANOG-T2A-SOX2 SV40 大T抗原 OCT4-P2A-SOX2-Puro	OCT4/SOX2	0.24%
OCT4-P2A-NANOG-T2A-SOX2 SV40 大T抗原 OCT4-P2A-NANOG-T2A-SOX2-Puro	OCT4/NANOG/SOX2	0.86%
OCT4-P2A-NANOG-T2A-SOX2 SV40 大T抗原 OCT2-P2A-OCT4-Puro	OCT4	13.93%

图23A

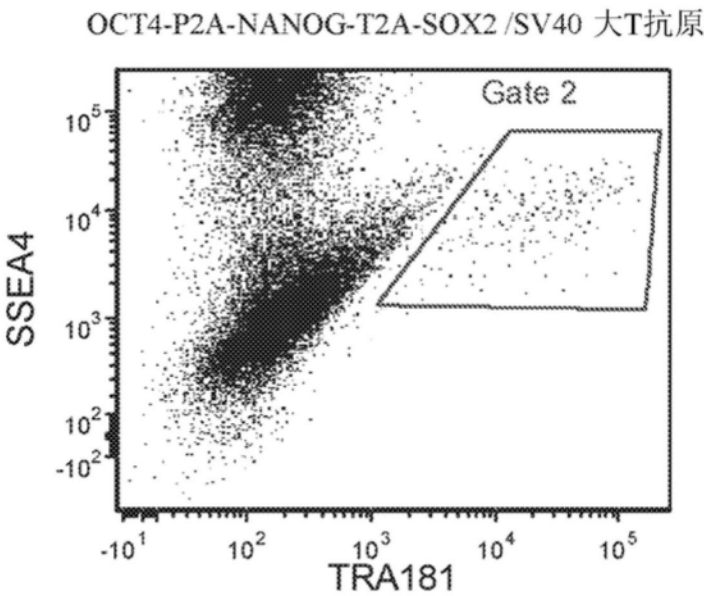


图23B

OCT4-P2A-NANOG-T2A-SOX2 / SV40 大T抗原 / OCT2-P2A-OCT4-Puro

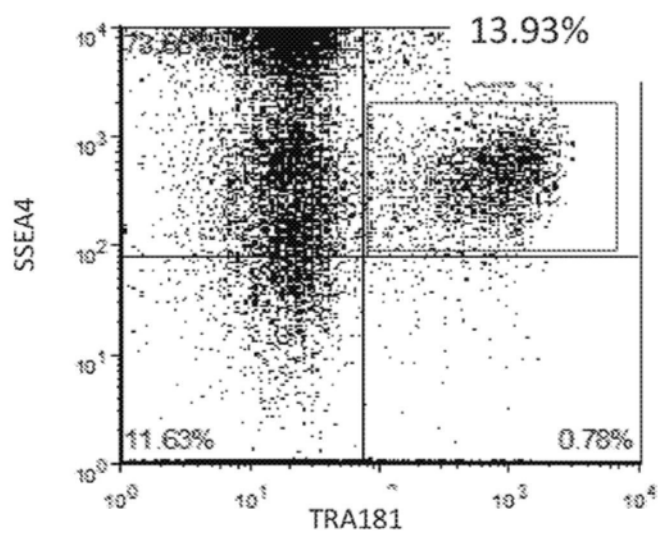


图23C

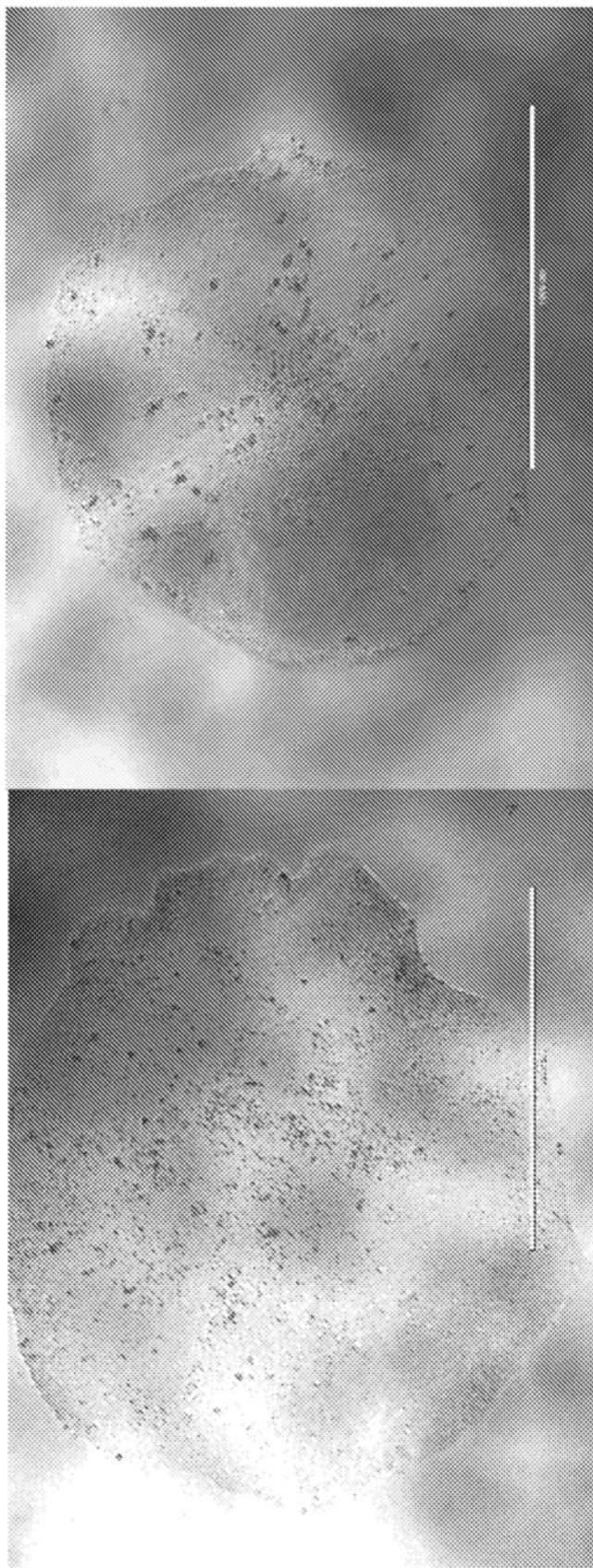


图24

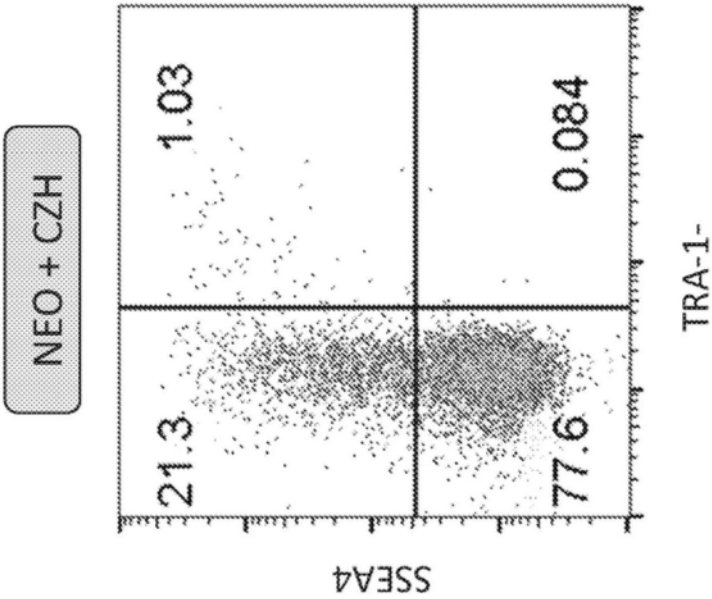


图25

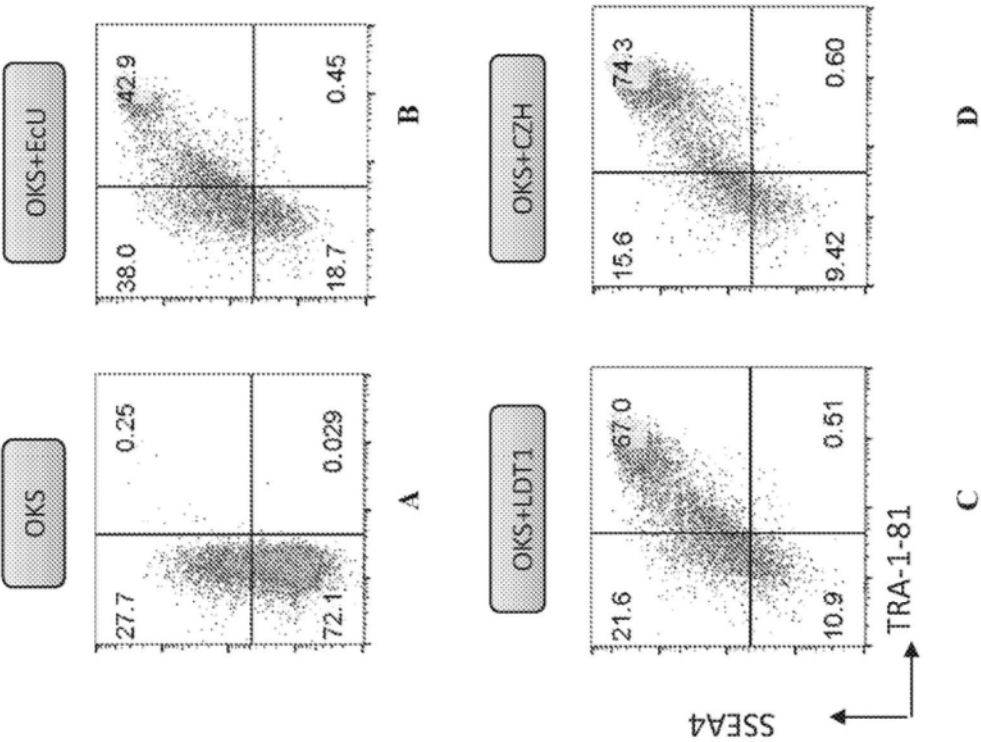


图26

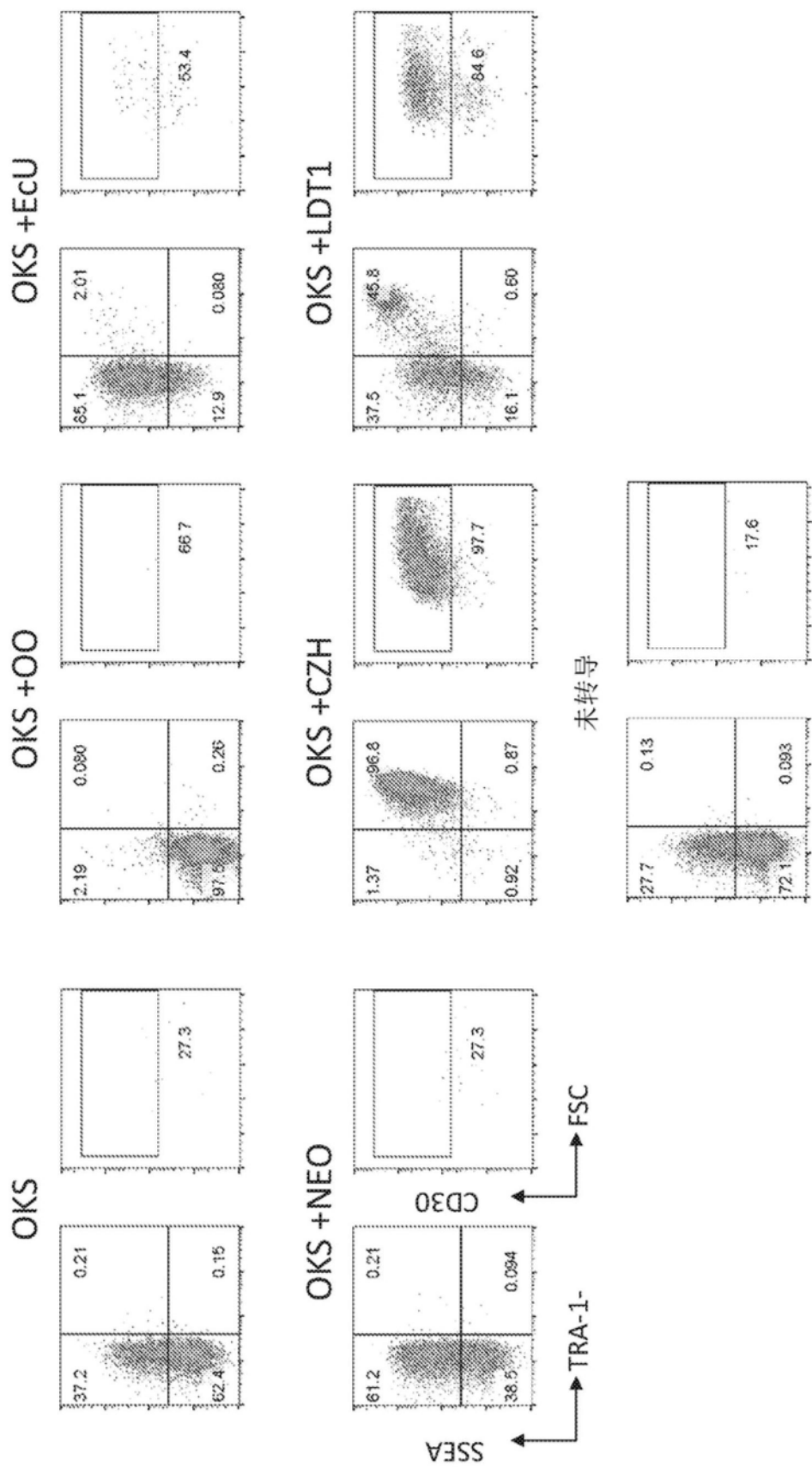


图27

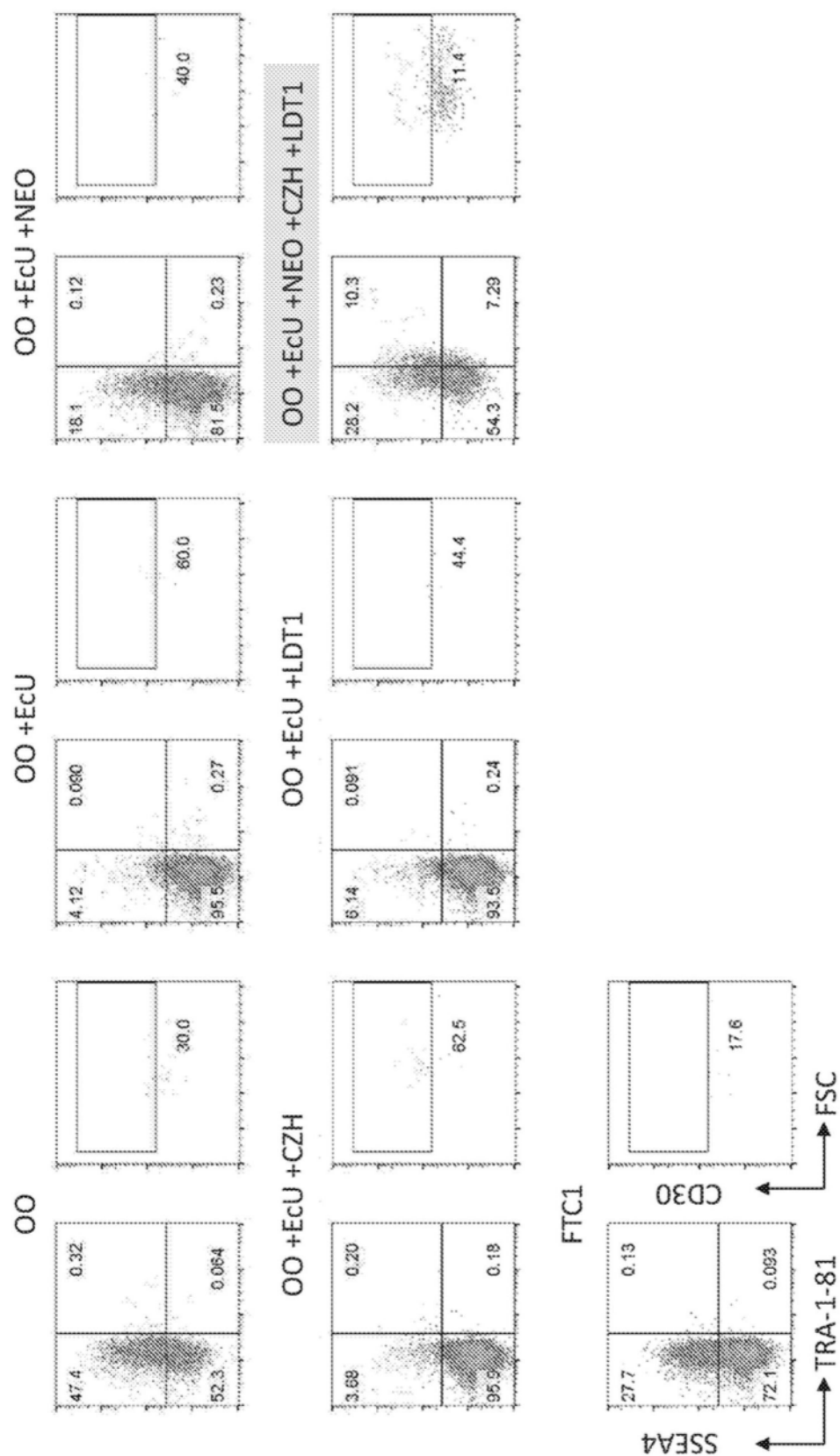


图28