

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 12 月 12 日 (12.12.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/251268 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 5/0735 (2010.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01) *A61K 45/00* (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01) *A61P 29/00* (2006.01)

NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚
(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO,
PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/098193

(22) 国际申请日: 2024 年 6 月 7 日 (07.06.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(30) 优先权:

202310670136.2 2023年6月7日 (07.06.2023) CN

(71) 申请人: 浙江大学 (ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路
866号, Zhejiang 310058 (CN)。

(72) 发明人: 祝赛勇 (ZHU, Saiyong); 中国浙江省杭州市
西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。
陈希 (CHEN, Xi); 中国浙江省杭州市西湖区余
杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。

(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司
(XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀
区真北路958号天地科技广场1号楼106
室, Shanghai 200333 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,
IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

(54) Title: CELL FAST CHEMICAL REPROGRAMMING TECHNIQUE

(54) 发明名称: 细胞快速化学重编程技术

(57) Abstract: Provided is a cell fast chemical reprogramming technique. By means of a provided chemical reprogramming accelerator and culture method, the time for chemical reprogramming is significantly shortened, and the reprogramming efficiency is improved by more than 10 times. The provided method can be applied to a wider range of genetic backgrounds and more types of mouse cells.

(57) 摘要: 提供一种细胞快速化学重编程技术。通过提供的化学重编程促进剂和培养方法, 使得化学重编程的用时被明显缩短; 重编程效率提高10倍以上; 提供的方法可以应用于更广泛的遗传背景和更多类型的小鼠细胞。

WO 2024/251268 A1

细胞快速化学重编程技术

5 技术领域

本发明涉及诱导多能干细胞领域。具体地，涉及一种细胞快速化学重编程技术。

背景技术

小分子可用于促进体细胞重编程为诱导多能干细胞（iPSC）。2013年，完全使用小分子实现将体细胞重编程为诱导多能干细胞（iPSC）的技术最早被邓宏魁课题组报道，使用到的小分子名称为VPA、CHIR99021、RepSox、Forskolin、Tranylcypromine和DZNep。这一技术被称为化学重编程。最早的化学重编程技术需要约60天实现这个过程（Hou P.P., et al., Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. Science, 2013. 341(6146): p. 651-54.）。之后，对这一技术改进的主要进步分别有三个报道。其一，2015年，邓宏魁课题组将AM580、EPZ004777、SGC0946和5-aza-dc这4个小分子加入到这一重编程体系中，将化学重编程过程缩短到约40天（Zhao Y., et al., A XEN-like State Bridges Somatic Cells to Pluripotency during Chemical Reprogramming. Cell, 2015. 163(7): p. 1678-91.）；其二，2018年，裴端卿课题组独立建立了一个化学重编程体系，同样需要约40天实现这一过程，相较邓宏魁课题组2015年的报道效率更高（Cao S., et al., Chromatin Accessibility Dynamics during Chemical Induction of Pluripotency. Cell Stem Cell, 2018. 22(4): p. 529-42 e5.）；其三，2018年，邓宏魁课题组进一步优化2015年的化学重编程体系，并将时间缩短到约20天，但是形成诱导多能干细胞效率偏低（Zhao T., et al., Single-Cell RNA-Seq Reveals Dynamic Early Embryonic-like Programs during Chemical Reprogramming. Cell Stem Cell, 2018. 23(1): p. 31-+.）。在2018年之后，本领域未见更快速高效技术的报道。

现有技术中，需要较长时间才能完成整个化学重编程过程。效率较高的技术需要约40天完成。20天左右可以完成化学重编程的技术效率偏低，例如每50000个初始细胞仅能形成约20-30个诱导多能干细胞克隆。

因此，本领域需要提供一种高效、快速的细胞化学重编程技术。

30

发明内容

本发明的目的在于提供一种细胞快速化学重编程技术。

在本发明的第一方面，提供了一种化学重编程促进剂，所述化学重编程促进剂选自下组A：

35 (A1) SR11237;

(A2) CD3254;
(A3) CCT129202;
(A4) R406;
(A5) DMH1;
5 (A6) BML-277;
(A7) AZD9291 mesylate;
(A8) TSA;
(A9) SGC-CBP30
(A10) Citarinostat;
10 (A11) TMP269;
(A12) WS6;
(A13) (A1)~(A12)的任意组合。

在另一优选例中, 所述化学重编程促进剂为选自下组的化合物:

- (1) SR11237, CD3254;
15 (2) CCT129202, R406;
(3) DMH1, BML-277, AZD9291 mesylate, TSA, SGC-CBP30, Citarinostat;
(4) DMH1, BML-277, AZD9291 mesylate, TSA, TMP269; 和
(5) WS6。

在另一优选例中, 在重编程培养基中, 所述化学重编程促进剂具有选自下组的浓度:

20 SR11237: 0.05-0.5 μM ;
CD3254: 0.05-0.5 μM ;
CCT129202: 0.2-2 μM ;
R406: 0.5-2 μM ;
DMH1: 0.1-5 μM ;
25 BML-277: 5-20 μM ;
AZD9291 mesylate: 1-5 μM ;
TSA: 5-20 nM;
SGC-CBP30: 0.5-5 μM ;
Citarinostat: 1-3 μM ;
30 TMP269: 1-10 μM ;
WS6: 0.1-2 μM 。

在本发明的第二方面, 提供了一种化学重编程促进剂的用途, 用于制备使成纤维细胞向诱导多能干细胞转化的试剂或试剂盒; 其中, 所述的化学重编程促进剂选自下组:

35 (A1) SR11237;

(A2) CD3254;
(A3) CCT129202;
(A4) R406;
(A5) DMH1;
5 (A6) BML-277;
(A7) AZD9291 mesylate;
(A8) TSA;
(A9) SGC-CBP30
(A10) Citarinostat;
10 (A11) TMP269;
(A12) WS6;
(A13) (A1)~(A12)的任意组合。

在另一优选例中，所述成纤维细胞为哺乳动物成纤维细胞；较佳地为小鼠、大鼠、兔子、猴、人的成纤维细胞。

15 在另一优选例中，所述成纤维细胞为小鼠成纤维细胞，较佳地为小鼠背部成纤维细胞（MDF）、小鼠肺成纤维细胞（MLF）、小鼠肝脏成纤维细胞、小鼠心脏成纤维细胞或小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）。

在本发明的第三方面，提供了一种用于化学重编程的培养基，包含基础培养成分和
20 化学重编程促进剂，所述的化学重编程促进剂选自下组A：

(A1) SR11237;
(A2) CD3254;
(A3) CCT129202;
(A4) R406;
25 (A5) DMH1;
(A6) BML-277;
(A7) AZD9291 mesylate;
(A8) TSA;
(A9) SGC-CBP30
30 (A10) Citarinostat;
(A11) TMP269;
(A12) WS6;
(A13) (A1)~(A12)的任意组合。

在另一优选例中，所述基础培养成分包括基础培养基、血清或血清替代物、非必须
35 氨基酸溶液、青霉素/链霉素混合液、1× N2添加剂，1× B27添加剂、谷氨酰胺替代物溶液

或Vc。

在另一优选例中，所述基础培养基选自下组：DMEM basic培养基、Neurobasal培养基、或DMEM/F12培养基。

在另一优选例中，所述用于化学重编程的培养基还包括其他的生长因子和化合物，
5 包括但不限于： β -巯基乙醇、碱性成纤维细胞生长因子、CHIR99021、616452、Forskolin、AM580、EPZ004777、VPA、5-aza-dC、SGC0946、小鼠白血病抑制因子、PD0325901。

在本发明的第四方面，提供了一种将成纤维细胞重编程为诱导多能干细胞的方法，
包括：

- 10 (S1) 提供一成纤维细胞；
(S2) 利用第一重编程细胞培养基，预培养(S1)中的成纤维细胞，获得第一中间态细胞；
(S3) 利用第二重编程细胞培养基，培养上述的第一中间态细胞，获得第二中间态细胞；
15 (S4) 利用第三重编程细胞培养基，培养上述的第二中间态细胞，获得第三中间态细胞；
(S5) 利用第四重编程细胞培养基，培养上述的第三中间态细胞，获得第四中间态细胞；和
(S6) 扩增上述第四中间态细胞，获得诱导多能干细胞。

20 在另一优选例中，(S1) 中，所述成纤维细胞的密度为 10^4 - 10^6 个细胞/孔。

在另一优选例中，(S2) 中，所述第一重编程细胞培养基包含选自下组的化合物：
SR11237，CD3254。

在另一优选例中，(S2) 中，所述第一重编程细胞培养基还包含选自下组的化合物：
碱性成纤维细胞生长因子，CHIR99021，616452，Forskolin，AM580，EPZ004777。

25 在另一优选例中，(S2) 中，所述SR11237的浓度为0.05-0.5 μ M；

在另一优选例中，(S2) 中，所述CD3254的浓度为0.05-0.5 μ M。

在另一优选例中，(S2) 中，培养时间为 t_1 ， t_1 为0-3天；较佳地为0.5-2天。

在另一优选例中，(S3) 中，所述第二重编程细胞培养基包含选自下组的化合物：
CCT129202，R406。

30 在另一优选例中，(S3) 中，所述第二重编程细胞培养基还包含选自下组的化合物：
碱性成纤维细胞生长因子，CHIR99021，616452，Forskolin，AM580，SR11237，CD3254，
VPA。

在另一优选例中，(S3) 中，所述CCT129202的浓度为0.2-2 μ M。

在另一优选例中，(S3) 中，所述R406的浓度为0.5-2 μ M。

35 在另一优选例中，(S3) 中，培养时间为 t_2 ， t_2 为0-3天；较佳地为0.5-2天。

在另一优选例中，(S4) 中，所述第三重编程细胞培养基包含选自下组的化合物：DMH1、BML-277、AZD9291 mesylate、TSA、SGC-CBP30，Citarinostat。

在另一优选例中，(S4) 中，所述第三重编程细胞培养基还包含选自下组的化合物：碱性成纤维细胞生长因子，CHIR99021，616452，5-aza-dC，SGC0946。

5 在另一优选例中，(S4) 中，所述DMH1的浓度为0.1-5 μM ；

BML-277的浓度为5-20 μM ；

AZD9291 mesylate的浓度为1-5 μM ；

TSA的浓度为5-20 nM；

SGC-CBP30的浓度为1-10 μM ；

10 Citarinostat的浓度为1-3 μM 。

在另一优选例中，(S4) 中，培养时间为 t_3 ， t_3 为0-3天；较佳地为0.5-2天。

在另一优选例中，(S5) 中，所述第四重编程细胞培养基包含选自下组的化合物：DMH1、BML-277、AZD9291 mesylate、TSA、TMP269。

在另一优选例中，(S5) 中，所述第四重编程细胞培养基还包含选自下组的化合物：

15 碱性成纤维细胞生长因子，小鼠白血病抑制因子，CHIR99021，616452，5-aza-dC。

在另一优选例中，(S5) 中，所述DMH1的浓度为0.1-5 μM ；

BML-277的浓度为5-20 μM ；

AZD9291 mesylate的浓度为1-5 μM ；

TSA的浓度为5-20 nM；

20 TMP269的浓度为1-10 μM 。

在另一优选例中，(S5) 中，培养时间为 t_3 ， t_3 为0-3天；较佳地为0.5-2天。

在另一优选例中，从(S1)的成纤维细胞培养获得(S5)的第四中间态细胞的培养时间为5-10天，较佳地6-8天。

在另一优选例中，(S6) 中，包括：

25 利用第五重编程细胞培养基培养第四中间态细胞，获得第五中间态细胞。

在另一优选例中，所述第五重编程细胞培养基包含WS6。

在另一优选例中，(S6) 中，还包括：利用第六重编程细胞培养基培养第五中间态细胞，获得诱导多能干细胞。

在另一优选例中，所述第六重编程细胞培养基包含WS6。

30 在另一优选例中，(S6) 中，所述第五重编程细胞培养基还包含选自下组的化合物：小鼠白血病抑制因子，CHIR99021，616452，Vc，PD0325901。

在另一优选例中，所述第六重编程细胞培养基还包含选自下组的化合物：小鼠白血病抑制因子，CHIR99021，Vc，PD0325901。

在另一优选例中，(S6) 中，所述WS6的浓度为0.1-2 μM 。

35 在另一优选例中，(S6) 中，培养时间为 t_4 ， t_4 为0-6天，较佳地0.5-4天。

在另一优选例中，所述成纤维细胞为哺乳动物成纤维细胞；较佳地为小鼠、大鼠、兔子、猴、人的成纤维细胞。

在另一优选例中，所述成纤维细胞为小鼠成纤维细胞，较佳地为小鼠背部成纤维细胞（MDF）、小鼠肺成纤维细胞（MLF）、小鼠肝脏成纤维细胞、小鼠心脏成纤维细胞或小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）。

在本发明的第五方面，提供了一种用本发明的第四方面的方法制备获得的胚胎干细胞，所述细胞表达以下的标志物：Oct4、Sox2、Rex1、Nanog。

10 应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

15 图 1 (a) 快速化学重编程（FCR）过程图示，每2天使用不同的小分子组合实现12天内获得iPSC。(b) 每2天移除单个小分子或生长因子后的重编程效率变化散点图。数据以平均值 $\pm$ 标准差呈现。生物学重复 $n = 3$ 。C: CHIR99021; 6: 616452; F: Forskolin; A: AM580; E: EPZ004777; SR: SR11237; CD: CD3254; V: VPA; CCT: CCT129202; R: R406; D: 5-aza-dC; S: SGC0946; DMH: DMH1; BML: BML-277; AZD: AZD9291 mesylate; CBP: SGC-CBP30; Cit: Citarinostat; TMP: TMP269; WS: WS6; PD: PD0325901。(c) FCR第8天、第10天、第12天，pOct4-GFP（左）、Oct4免疫荧光染色（中）和pOct4-GFP、Oct4染色与Hoechst染色合并（右）图像。比例尺为100 μm 。(d) FCR过程中iPSC克隆数的折线图。数据以平均值 $\pm$ 标准差呈现。生物学重复 $n = 3$ 。

25 图 2 (A) 由快速化学重编程建立的iPSC细胞系图像，左边为明场，右边为绿色荧光。比例尺为200 μm 。(B) iPSC免疫荧光染色结果图像，分别检测多能性基因Oct4、Nanog和Sox2的表达。Hoechst是细胞核染料。比例尺为100 μm 。(C) MEF、小鼠胚胎干细胞（R1 mESC）和3个iPSC细胞系的RT-qPCR结果，分别检测多能性基因Oct4、Nanog、Sox2和Rex1的表达。数据以平均值 $\pm$ 标准差呈现。生物学重复 $n = 3$ 。(D) 火山图展示iPSC与R1 mESC（左图）、iPSC与MEF（右图）所有基因的表达相对值。R，皮尔森相关系数。

30 图 3 (A) 129 $\times$ C57 MEF和CF1 MEF在快速化学重编程第0天、第12天的明场图像。(B) 129 $\times$ C57 MEF和CF1 MEF在快速化学重编程第12天的Oct4免疫荧光染色图像。(C) 129 $\times$ C57 MEF和CF1 MEF经由快速化学重编程获得的iPSC细胞系的明场图像。(D) 129 $\times$ C57 MEF和CF1 MEF经由快速化学重编程获得的iPSC细胞系的Oct4、

Nanog、Sox2的免疫荧光染色图像。以上所有图片比例尺为200 μm 。

图 4 (A) 来源于成年小鼠的MLF和来源于胚胎期18.5天MDF的明场图像。(B) MLF和MDF在快速化学重编程第12天的明场和pOct4-GFP荧光图像。(C) MLF和MDF经由快速化学重编程获得的iPSC细胞系的明场和pOct4-GFP荧光图像。(D) MLF和MDF经由快速化学重编程获得的iPSC细胞系的Oct4、Nanog、Sox2的免疫荧光染色图像。以上所有图片比例尺为200 μm 。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入地研究，首次意外发现，利用本发明中的化学重编程促进剂，本发明的方法相比较现有技术，化学重编程的用时被明显缩短；第7天时即可完成化学重编程，并且每10000个初始细胞可以形成40-90个诱导多能干细胞克隆；重编程效率提高10倍。本发明的方法，相较于20天的化学重编程体系，可以应用于具有更广泛的遗传背景和更多类型的小鼠细胞。在此基础上完成了本发明。

术语

除非另有定义，否则本文中所用的全部技术术语和科学术语均具有如本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义。

术语“约”可以是指在本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成，其将部分地取决于如何测量或测定值或组成。

如本文所用，术语“含有”或“包括(包含)”可以是开放式、半封闭式和封闭式的。换言之，所述术语也包括“基本上由...构成”、或“由...构成”。

如本文所用，术语“胚胎干细胞”是指分离自小鼠囊胚期内细胞团的细胞，具有向体内任意一种细胞分化的潜能。

如本文所用，术语“诱导多能干细胞”是指利用过表达转录因子或使用小分子等手段，将体细胞重编程获得的多能干细胞，具有向体内任意一种细胞分化的潜能，因此在药物筛选、疾病模型和再生医学等领域有巨大应用潜能。诱导多能干细胞的标志基因有Oct4、Nanog、Sox2、Rex1等。

如本文所用，术语“pOct4-GFP”是指Oct4基因启动子所驱动的绿色荧光蛋白基因。在细胞内Oct4被激活时产生绿色荧光蛋白，从而可以在荧光显微镜下观察到绿色荧光。

如本文所用，术语“RT-qPCR”是指一种检测特定基因表达水平的技术。

如本文所用，术语“RNA-seq”是指一种检测细胞内所有基因表达水平的技术。

本发明的化学重编程促进剂

如本文所用，术语“化学重编程促进剂”用于促进成纤维细胞向诱导多能干细胞转

化，较佳地选自下组A：

(A1) SR11237；

(A2) CD3254；

(A3) CCT129202；

5 (A4) R406；

(A5) DMH1；

(A6) BML-277；

(A7) AZD9291 mesylate；

(A8) TSA；

10 (A9) SGC-CBP30

(A10) Citarinostat；

(A11) TMP269；

(A12) WS6；

(A13) (A1)~(A12)的任意组合。

15 如本文所述，术语“本发明的诱导多能干细胞的方法”、“本发明的小鼠成纤维细胞的化学重编程方法”、“本发明的快速化学重编程（FCR）的方法”可以互换使用，具体地，指本发明中利用化学重编程促进剂促进成纤维细胞向诱导多能干细胞转化的方法。优选地，包括：

(S1) 提供一成纤维细胞；

20 (S2) 利用第一重编程细胞培养基，预培养(S1)中的成纤维细胞，获得第一中间态细胞；

(S3) 利用第二重编程细胞培养基，培养上述的第一中间态细胞，获得第二中间态细胞；

25 (S4) 利用第三重编程细胞培养基，培养上述的第二中间态细胞，获得第三中间态细胞；

(S5) 利用第四重编程细胞培养基，培养上述的第三中间态细胞，获得第四中间态细胞；和

(S6) 扩增上述第四中间态细胞，获得诱导多能干细胞。

30 较佳地，第一重编程细胞培养基中包含选自下组的化学重编程促进剂：SR11237，CD3254；

第二重编程细胞培养基中包含选自下组的化学重编程促进剂：CCT129202，R406；

第三重编程细胞培养基中包含选自下组的化学重编程促进剂：DMH1，BML-277，AZD9291 mesylate，TSA，SGC-CBP30，Citarinostat；

35 第四重编程细胞培养基中包含选自下组的化学重编程促进剂：DMH1，BML-277，AZD9291 mesylate，TSA，TMP269；

第五重编程细胞培养基中包含选自下组的化学重编程促进剂：WS6。

如本文所用，术语“中间态细胞”是指，从成纤维细胞培养为诱导多能干细胞的过程中，在不同培养条件下获得的中间状态的细胞。其中，第四中间态细胞不同程度地表达小鼠胚胎干细胞的标志物Oct4。

5

本发明的主要优点包括

(1) 本发明首次发现小分子CCT129202、BML-277、TSA、DMH1、AZD9291 mesylate、SGC-CBP30、TMP269、Citarinostat、WS6可以促进化学重编程效率。

10 (2) 本发明的方法可以应用于小鼠胚胎成纤维细胞，小鼠背部成纤维细胞、小鼠肝脏成纤维细胞、小鼠心脏成纤维细胞和小鼠肺成纤维细胞。

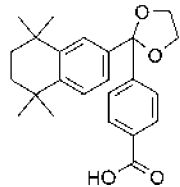
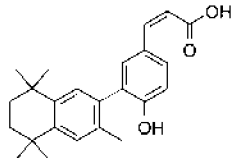
(3) 本发明的方法可以应用于遗传背景为129XOG2，129XC57和CF1的小鼠胚胎成纤维细胞。

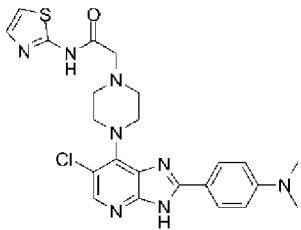
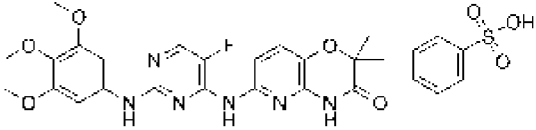
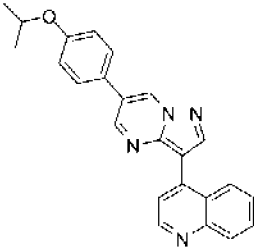
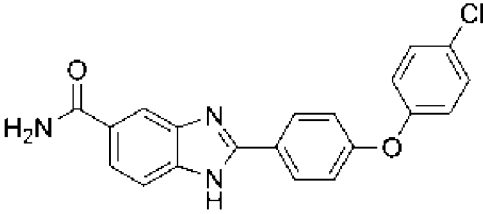
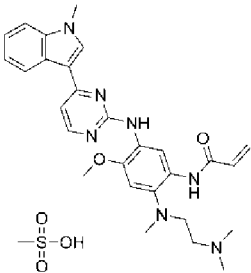
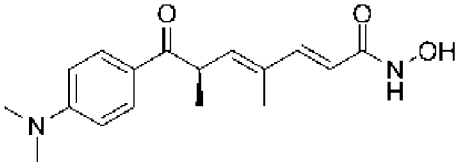
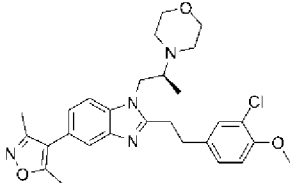
15 (4) 本发明的方法实现在7-12天内实现较高效率完成化学重编程，每10000个初始细胞可以形成40-90个诱导多能干细胞克隆，比现有技术中的技术方案快8-13天，同时效率高10倍。

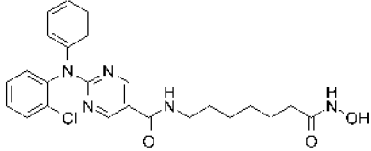
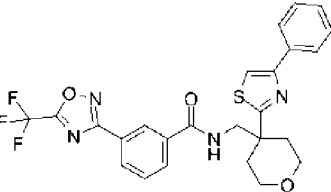
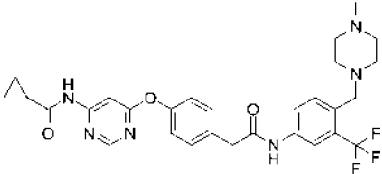
20 下面结合具体实施例，进一步陈述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明详细条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

本发明涉及的化合物的名称和结构

表1

名称	结构式
SR11237	
CD3254	

CCT129202	
R406	
DMH1	
BML-277	
AZD9291 mesylate	
TSA	
SGC-CBP30	

Citarinostat	
TMP269	
WS6	

本发明的快速化学重编程（FCR）的方法

(1) 将遗传背景为129XOG2的小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）按照每板 2.5×10^5 个细胞的密度种到6孔细胞培养板中,并使用MEF培养基培养过夜。培养条件为21% O₂, 5% CO₂和37°C。

(2) 一天以后,将细胞培养基替换为快速化学重编程0-2天培养基,记为重编程第0天。

(3) 重编程第2天,将细胞培养基替换为快速化学重编程2-4天培养基。

(4) 重编程第4天,将细胞培养基替换为快速化学重编程4-6天培养基,并在第5天更新培养基。

(5) 重编程第6天,将细胞培养基替换为快速化学重编程6-8天培养基,并在第7天更新培养基。

(6) 重编程第8天,将细胞培养基替换为快速化学重编程8-10天培养基。

(7) 重编程第10天,将细胞培养基替换为快速化学重编程10-12天培养基。

(8) 重编程第12天,根据GFP荧光在显微镜下数多能干细胞细胞克隆的数目。也可传代到种有饲养层细胞的细胞培养板上扩增,获得诱导多能干细胞细胞系。

本发明涉及的培养基如下:

MEF培养基: DMEM basic培养基 (Gibco, Cat#11965092), 10% 胎牛血清(v/v) (Gibco, Cat#10099), 1% 青霉素/链霉素混合液(v/v) (Gibco, Cat#15140163)。

快速化学重编程 0-2 天培养基: DMEM basic 培养基, 10% 胎牛血清(v/v), 10% 血清替代物(v/v) (Gibco, Cat# 10828028), 1% 非必须氨基酸溶液(v/v) (Cat# 11140050), 1% 青霉素/链霉素混合液(v/v), 0.055 mM β-巯基乙醇, 100 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子,

20 μ M CHIR99021, 10 μ M 616452, 50 μ M Forskolin, 0.5 μ M AM580, 0.1 μ M SR11237, 0.1 μ M CD3254, 5 μ M EPZ004777。

快速化学重编程 2-4 天培养基: DMEM basic 培养基, 10% 胎牛血清, 10% 血清替代物, 1% 非必须氨基酸溶液, 1% 青霉素/链霉素混合液, 0.055 mM β -巯基乙醇, 100
5 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子, 20 μ M CHIR99021, 10 μ M 616452, 50 μ M Forskolin, 0.5 μ M AM580, 0.1 μ M SR11237, 0.1 μ M CD3254, 0.2 mM VPA, 0.5 μ M CCT129202, 1 μ M R406。

快速化学重编程 4-6 天培养基: DMEM basic 培养基, 10% 胎牛血清, 10% 血清替代物, 1% 非必须氨基酸溶液, 1% 青霉素/链霉素混合液, 0.055 mM β -巯基乙醇, 20 ng/mL
10 碱性成纤维细胞生长因子, 10 μ M CHIR99021, 10 μ M 616452, 1 μ M DMH1, 10 μ M BML-277, 0.5 μ M 5-aza-dC, 5 μ M AZD9291 mesylate, 10 nM TSA, 5 μ M SGC0946, 1 μ M SGC-CBP30, 2 μ M Citarinostat。

快速化学重编程 6-8 天培养基: DMEM basic 培养基, 10% 胎牛血清, 10% 血清替代物, 1% 非必须氨基酸溶液, 1% 青霉素/链霉素混合液, 0.055 mM β -巯基乙醇, 20 ng/mL
15 碱性成纤维细胞生长因子, 1000 U/mL 小鼠白血病抑制因子, 10 μ M CHIR99021, 10 μ M 616452, 1 μ M DMH1, 10 μ M BML-277, 0.5 μ M 5-aza-dC, 5 μ M AZD9291 mesylate, 10 nM TSA, 2 μ M TMP269。

快速化学重编程8-10天培养基: 47% DMEM/F12培养基(v/v) (Gibco, Cat#11320033), 47% Neurobasal 培养基 (v/v) (Gibco, Cat#21103049), 1 $\times$ N2 添加剂 (Gibco, Cat#17502048), 1 $\times$ B27添加剂 (Gibco, Cat#17504044), 1% 谷氨酰胺替代物溶液(v/v) (Gibco, Cat#35050079), 1% 非必须氨基酸溶液, 0.055 mM β -巯基乙醇, 1% 青霉素/链霉素混合液, 1000 U/mL 小鼠白血病抑制因子, 5 μ M CHIR99021, 0.5 μ M WS6, 250 μ M Vc。
20

快速化学重编程 10-12 天培养基: 47% DMEM/F12 培养基, 47% Neurobasal 培养基, 1 $\times$ N2 添加剂, 1 $\times$ B27 添加剂, 1% 谷氨酰胺替代物溶液, 1% 非必须氨基酸溶液, 0.055 mM β -巯基乙醇, 1% 青霉素/链霉素混合液, 1000 U/mL 小鼠白血病抑制因子, 2 μ M CHIR99021, 0.5 μ M WS6, 250 μ M Vc, 1 μ M PD0325901。
25

实施例1 单个小分子对重编程效率的影响探索

30 1.1 单个小分子对重编程效率的影响

利用遗传背景为129XOG2的小鼠胚胎成纤维细胞,根据本发明的快速化学重编程(FCR)的方法,每2天移除单个小分子或生长因子后,检测细胞的重编程效率变化。

实验方法:将129XOG2小鼠胚胎成纤维细胞种到数个24孔细胞培养板中并进行快速化学重编程。每2天,每一个该阶段培养基中添加的小分子或生长因子都在3个孔中被单独移除,用以检测在该阶段移除该小分子或生长因子后对重编程效率的影响。第
35

12天，对获得的诱导多能干细胞克隆进行计数。

结果如图1所示。其中，图1B中的纵坐标“iPSC克隆数”表示每10000个初始细胞可以形成诱导多能干细胞克隆的数量。“All”为阳性对照，表示利用本发明的化学重编程因子组合时，每10000个初始细胞可以形成约90个诱导多能干细胞克隆。经多次实验，每10000个初始细胞可以形成约40-90个诱导多能干细胞克隆。

图1B的表格数据如下表2所示：

表2

		重复 1	重复 2	重复 3	平均
	All	86	87	82	85.00
D0-2	-bFGF	59	61	73	64.33
	-C	0	0	0	0.00
	-6	18	30	25	24.33
	-F	34	42	34	36.67
	-A	47	43	49	46.33
	-E	41	33	34	36.00
	-SR	38	35	29	34.00
	-CD	32	46	35	37.67
D2-4	-bFGF	31	46	35	37.33
	-C	1	0	1	0.67
	-6	9	6	9	8.00
	-F	12	17	14	14.33
	-A	74	75	61	70.00
	-V	28	31	27	28.67
	-CCT	27	23	27	25.67
	-R	32	40	42	38.00
	-SR	28	32	44	34.67
	-CD	72	63	64	66.33
D4-6	-bFGF	69	72	77	72.67
	-C	12	11	15	12.67
	-6	25	19	13	19.00
	-DMH	53	56	50	53.00
	-BML	19	22	21	20.67
	-D	0	0	0	0.00
	-S	35	30	36	33.67
	-CBP	42	37	34	37.67
	-Cit	8	8	13	9.67
	-AZD	38	39	34	37.00
	-TSA	26	26	27	26.33
D6-8	-mLIF	49	36	47	44.00
	-bFGF	56	58	60	58.00
	-C	69	59	71	66.33
	-6	10	27	15	17.33
	-DMH	66	57	70	64.33
	-BML	33	33	32	32.67
	-D	25	17	24	22.00
	-TSA	65	66	65	65.33

	-AZD	18	21	11	16.67
	-TMP	32	28	38	32.67
D8-10	-mLIF	38	32	24	31.33
	-C	47	43	51	47.00
	-WS	64	62	61	62.33
	-Vc	60	44	63	55.67
D10-12	-mLIF	16	17	15	16.00
	-C	45	43	42	43.33
	-WS	35	41	29	35.00
	-Vc	46	51	62	53.00
	-PD	25	33	32	30.00

结果表明，小分子CCT129202、BML-277、TSA、DMH1、AZD9291 mesylate、SGC-CBP30、TMP269、Citarinostat、WS6可以有效提高化学重编程效率。

此外，图1C和图1D的结果表明iPSC克隆在FCR第6-7天已经逐渐出现，这提示本发明的方法可以在第7天时以较高效率完成化学重编程。

5

1.2 小分子浓度对结果的影响的内容

利用本发明的快速化学重编程（FCR）的方法，经实验，在不同的快速化学重编程培养基中，本发明涉及的小分子浓度适合的范围如下：

- SR11237: 0.05-0.5 μM;
- 10 CD3254: 0.05-0.5 μM;
- CCT129202: 0.2-2 μM;
- R406: 0.5-2 μM;
- DMH1: 0.1-5 μM;
- BML-277: 5-20 μM;
- 15 AZD9291 mesylate: 1-5 μM;
- TSA: 5-20 nM;
- SGC-CBP30: 0.5-5 μM;
- Citarinostat: 1-3 μM;
- TMP269: 1-10 μM;
- 20 WS6: 0.1-2 μM。

实施例2 获得的iPSC的鉴定

实验方法：（1） 将遗传背景为129XOG2的小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）按照每板2.5×10⁵个细胞的密度种到6孔细胞培养板中，并使用MEF培养基培养过夜。培养条件为21% O₂，5% CO₂和37℃。

（2） 一天以后，将细胞培养基替换为快速化学重编程0-2天培养基，记为重编程第0天。

(3) 重编程第2天, 将细胞培养基替换为快速化学重编程2-4天培养基。

(4) 重编程第4天, 将细胞培养基替换为快速化学重编程4-6天培养基, 并在第5天更新培养基。

5 (5) 重编程第6天, 将细胞培养基替换为快速化学重编程6-8天培养基, 并在第7天更新培养基。

(6) 重编程第8天, 将细胞培养基替换为快速化学重编程8-10天培养基。

(7) 重编程第10天, 将细胞培养基替换为快速化学重编程10-12天培养基。

(8) 重编程第12天, 根据GFP荧光在显微镜下数多能干细胞细胞克隆的数目。观察获得的iPSC形成的克隆形态和pOct4-GFP表达情况。

10 如图2A所示, iPSC形成与小鼠胚胎干细胞类似的拱状克隆, 并且广泛表达pOct4-GFP。之后, 利用免疫荧光染色和RT-qPCR技术分别检测目的标志物的蛋白质和mRNA表达水平。如图2B、2C所示, iPSC高表达与小鼠胚胎干细胞水平接近的标志物Oct4、Sox2、Rex1、Nanog。进一步, 利用RNA-seq技术, 检测细胞所有基因表达情况。如图2D所示, iPSC全基因表达模式与小鼠胚胎干细胞高度接近, 与小鼠胚胎成纤维细胞呈现较大差异。整体结果证明iPSC与小鼠胚胎干细胞的分子水平高度接近。

结果表明, 获得的iPSC和原始的小鼠iPSC类似, 表达以下的标志物: Oct4、Sox2、Rex1、Nanog。

20 实施例3 在其他遗传背景和类型的小鼠细胞上的应用

本发明的方法可用于其他遗传背景小鼠胚胎成纤维细胞(129XC57 MEF, CF1 MEF)和其他类型小鼠细胞(MLF, MDF)进行快速化学重编程。

实验方法同上。其他遗传背景小鼠胚胎成纤维细胞(129XC57 MEF, CF1 MEF)通过快速化学重编程获得的iPSC细胞系的免疫荧光染色图像如图3所示。

25 来源于成年小鼠的小鼠肺成纤维细胞(MLF)和来源于胚胎期18.5天小鼠背部成纤维细胞(MDF), 通过快速化学重编程获得的iPSC细胞系的免疫荧光染色图像如图4所示。

结果表明: 其他遗传背景小鼠胚胎成纤维细胞(129XC57 MEF, CF1 MEF)利用快速化学重编程技术也可以被重编程为iPSC, 证明了快速化学重编程技术不受细胞遗传背景限制。小鼠肺成纤维细胞和小鼠背部成纤维细胞利用快速化学重编程技术也可以被重编程为iPSC, 证明了快速化学重编程技术可以应用到多种类型细胞。

讨论

35 本发明的方法利用小鼠作为模式动物, 利用小鼠胚胎成纤维细胞进行实验。除小鼠胚胎成纤维细胞以外, 本发明的方法也可以用于其他类型小鼠细胞进行快速化

学重编程，包括小鼠背部成纤维细胞（MDF）和小鼠肺成纤维细胞（MLF）。具体地，本发明的方法可以用于多种遗传背景小鼠胚胎成纤维细胞（129XOG2 MEF，129XC57 MEF，CF1 MEF）进行快速化学重编程。

5 本发明的小分子组合能够促进利用转录因子诱导的重编程，并且对用人细胞进行的化学重编程存在促进作用。因此，可以进一步地推广至人的胚胎成纤维细胞中的应用，进而建立人的iPSC细胞的重编程诱导。

10 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求 书

1. 一种化学重编程促进剂，其特征在于，所述化学重编程促进剂选自下组A：

(A1) SR11237；

(A2) CD3254；

(A3) CCT129202；

(A4) R406；

(A5) DMH1；

(A6) BML-277；

(A7) AZD9291 mesylate；

(A8) TSA；

(A9) SGC-CBP30

(A10) Citarinostat；

(A11) TMP269；

(A12) WS6；

(A13) (A1)~(A12)的任意组合。

2. 如权利要求1所述的化学重编程促进剂，其特征在于，所述化学重编程促进剂为选自下组的化合物：

(1) SR11237，CD3254；

(2) CCT129202，R406；

(3) DMH1，BML-277，AZD9291 mesylate，TSA，SGC-CBP30，Citarinostat；

(4) DMH1，BML-277，AZD9291 mesylate，TSA，TMP269；或

(5) WS6。

3. 一种化学重编程促进剂的用途，其特征在于，用于制备使成纤维细胞向诱导多能干细胞转化的试剂或试剂盒；其中，所述的化学重编程促进剂选自下组：

(A1) SR11237；

(A2) CD3254；

(A3) CCT129202；

(A4) R406；

(A5) DMH1；

(A6) BML-277；

(A7) AZD9291 mesylate；

(A8) TSA；

(A9) SGC-CBP30

(A10) Citarinostat；

(A11) TMP269;

(A12) WS6;

(A13) (A1)~(A12)的任意组合。

4. 如权利要求3所述的用途，其特征在于，所述成纤维细胞为哺乳动物成纤维细胞；
5 较佳地为小鼠、大鼠、兔子、猴、人的成纤维细胞。

5. 如权利要求3所述的用途，其特征在于，所述成纤维细胞为小鼠成纤维细胞，较佳地为小鼠背部成纤维细胞（MDF）、小鼠肺成纤维细胞（MLF）、小鼠肝脏成纤维细胞、小鼠心脏成纤维细胞或小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）。

6. 一种用于化学重编程的培养基，其特征在于，包含基础培养成分和化学重编程促进剂，所述的化学重编程促进剂选自下组A：

(A1) SR11237;

(A2) CD3254;

(A3) CCT129202;

(A4) R406;

15 (A5) DMH1;

(A6) BML-277;

(A7) AZD9291 mesylate;

(A8) TSA;

(A9) SGC-CBP30

20 (A10) Citarinostat;

(A11) TMP269;

(A12) WS6;

(A13) (A1)~(A12)的任意组合。

7. 如权利要求6所述的培养基，其特征在于，所述用于化学重编程的培养基还包括
25 其他的生长因子和化合物，包括但不限于： β -巯基乙醇、碱性成纤维细胞生长因子、CHIR99021、616452、Forskolin、AM580、EPZ004777、VPA、5-aza-dC、SGC0946、小鼠白血病抑制因子、PD0325901。

8. 一种将成纤维细胞重编程为诱导多能干细胞的方法，其特征在于，包括：

(S1) 提供一成纤维细胞；

30 (S2) 利用第一重编程细胞培养基，预培养(S1)中的成纤维细胞，获得第一中间态细胞；

(S3) 利用第二重编程细胞培养基，培养上述的第一中间态细胞，获得第二中间态细胞；

35 (S4) 利用第三重编程细胞培养基，培养上述的第二中间态细胞，获得第三中间态细胞；

(S5) 利用第四重编程细胞培养基，培养上述的第三中间态细胞，获得第四中间态细胞；和

(S6) 扩增上述第四中间态细胞，获得诱导多能干细胞。

5 9. 如权利要求8所述的方法，其特征在于，(S1) 中，所述成纤维细胞的密度为 10^4 - 10^6 个细胞/孔。

10. 如权利要求8所述的方法，其特征在于，(S2) 中，所述第一重编程细胞培养基包含选自下组的化合物：SR11237，CD3254。

11. 如权利要求8所述的方法，其特征在于，(S2) 中，培养时间为 t_1 ， t_1 为0-3天；较佳地为0.5-2天。

10 12. 如权利要求8所述的方法，其特征在于，(S3) 中，所述第二重编程细胞培养基还包含选自下组的化合物：碱性成纤维细胞生长因子，CHIR99021，616452，Forskolin，AM580，SR11237，CD3254，VPA。

13. 如权利要求8所述的方法，其特征在于，(S3) 中，培养时间为 t_2 ， t_2 为0-3天；较佳地为0.5-2天。

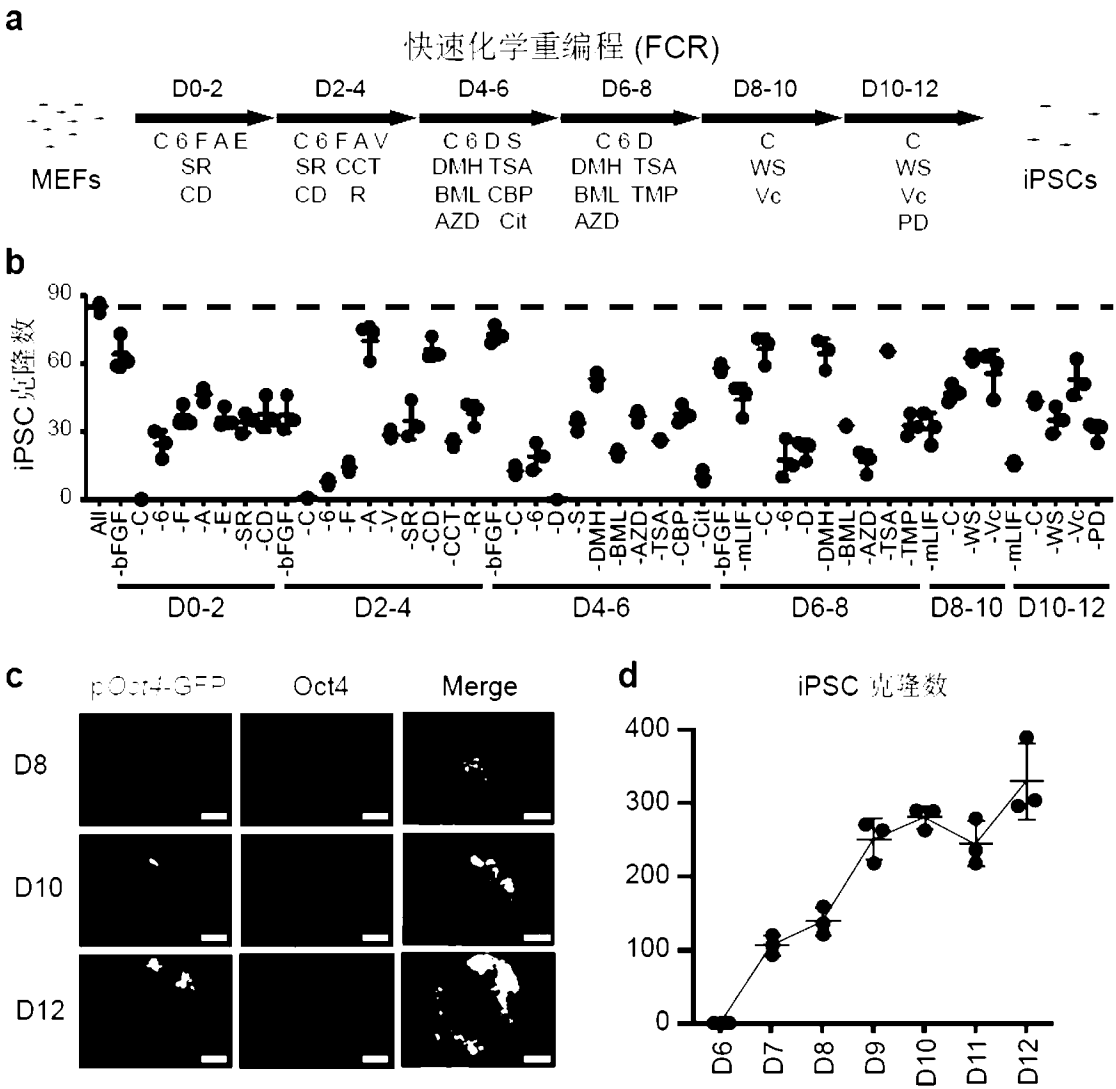
15 14. 如权利要求8所述的方法，其特征在于，(S4)中，所述第三重编程细胞培养基包含选自下组的化合物：DMH1、BML-277、AZD9291 mesylate、TSA、SGC-CBP30，Citarinostat。

15. 如权利要求14所述的方法，其特征在于，(S4) 中，所述DMH1的浓度为0.1-5 μ M；
BML-277的浓度为5-20 μ M；
20 AZD9291 mesylate的浓度为1-5 μ M；
TSA的浓度为5-20 nM；
SGC-CBP30的浓度为1-10 μ M；
Citarinostat的浓度为1-3 μ M。

25 16. 如权利要求8所述的方法，其特征在于，(S5)中，所述第四重编程细胞培养基包含选自下组的化合物：DMH1、BML-277、AZD9291 mesylate、TSA、TMP269。

17. 如权利要求8所述的方法，其特征在于，(S4)中，所述成纤维细胞为小鼠成纤维细胞，较佳地为小鼠背部成纤维细胞（MDF）、小鼠肺成纤维细胞（MLF）、小鼠肝脏成纤维细胞、小鼠心脏成纤维细胞或小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）。

30 18. 一种用权利要求8所述的方法制备获得的胚胎干细胞，其特征在于，所述细胞表达以下的标志物：Oct4、Sox2、Rex1、Nanog。



图

1

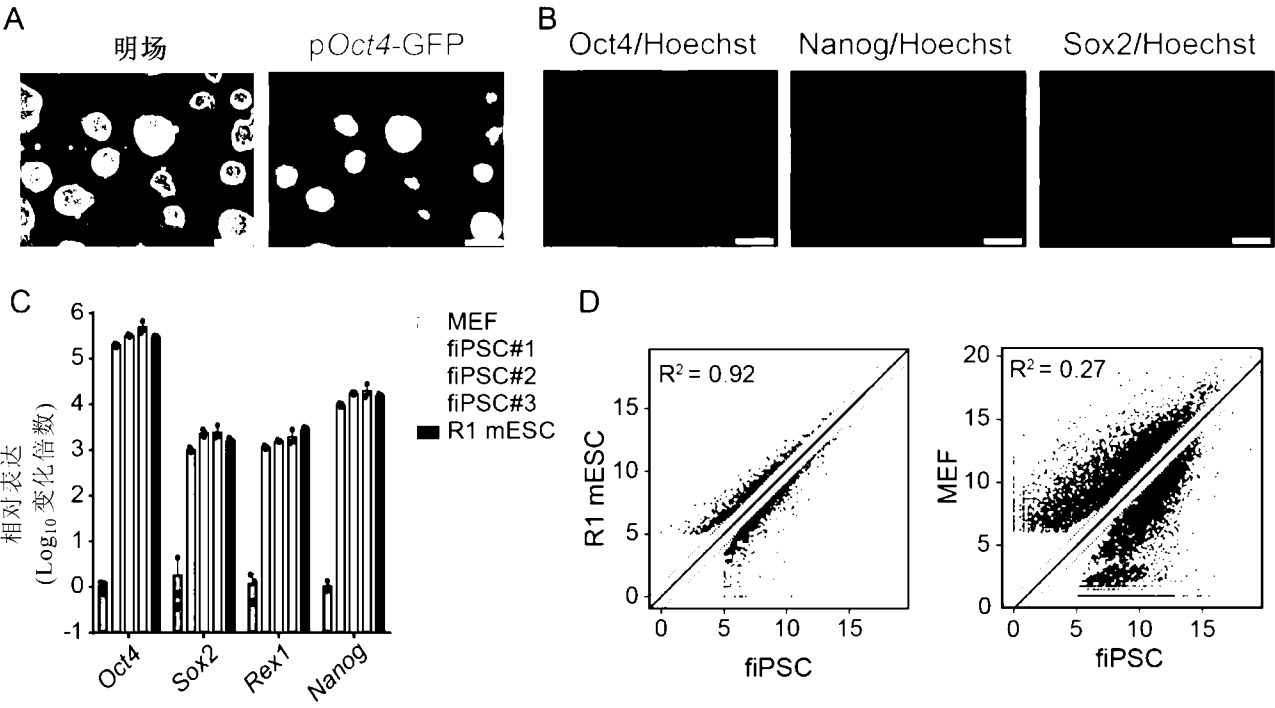


图 2

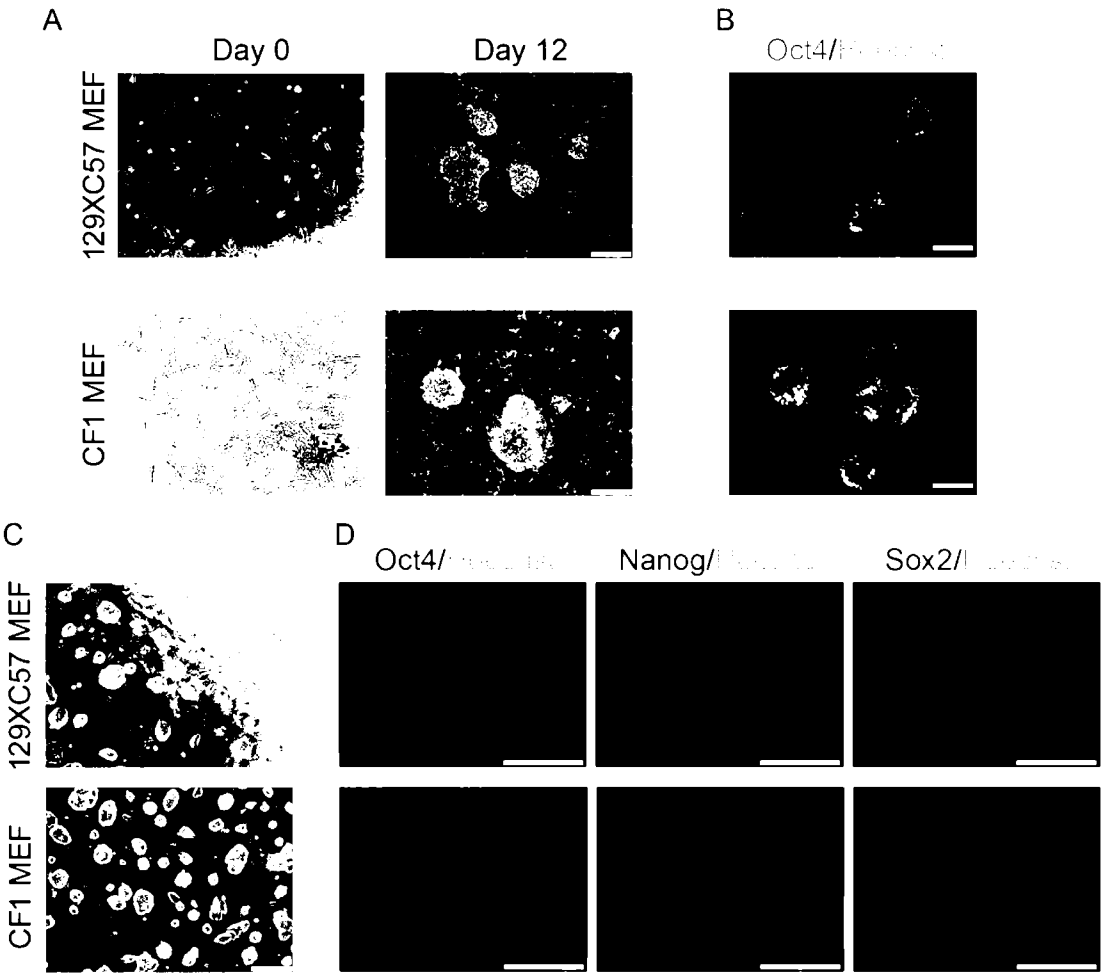


图 3

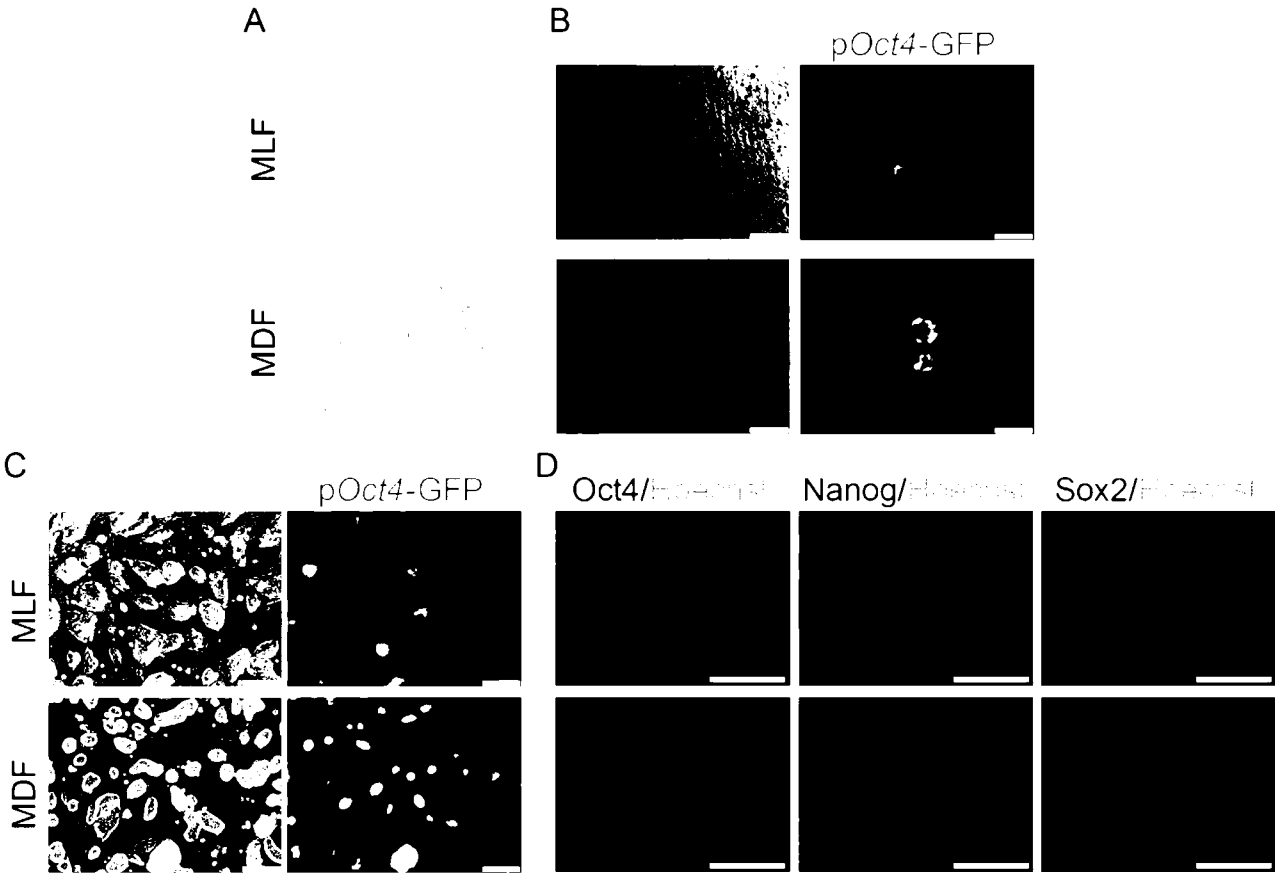


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/098193

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/0735(2010.01)i; C12N 5/077(2010.01)i; C12N 5/074(2010.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C12N C12Q A61K A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNTXT, ENTXT, ENTXTC, VEN, CNKI, 万方数据库, WANFANG DATABASE, pubmed, ISI web of science: 奥西丁尼, 奥希替尼, 编程, 干细胞, 迈瑞替尼, 培养基, 曲古抑菌素, 去分化, 西他司他, 抑制, 抑制剂, 永生, 重编, 重编程, acy241, aurora, azd9291, cct129202, CCT129202, cd3254, CD3254, chk2, Citarinostat, CN116981768, dmh1, DMH1, hdac, inhibitor, mereletinib, osimertinib, R406, sr11237, SR11237, tmp269, tsa, ws6, cct-129202, acy-241, cd 3254, cd-3254, sgc-cbp30, reprogramm+, BML-277, trichostatin a, azd 9291, cct 129202, ws-6, ws 6, "crebbp/ep300", sr-11237, dmh-1, dmh 1, sr 11237, bml-277, azd-9291, bms-649		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JIN, Yan et al. "Harnessing endogenous transcription factors directly by small molecules for chemically induced pluripotency inception" <i>PNAS</i> , Vol. 120, No. 21, 16 May 2023 (2023-05-16), abstract, page 2, left-hand column, paragraph 4, page 10, right-hand column, page 11, right-hand column, paragraph 2, table S1, and figure S1	1, 3-7
X	SODRE, A. L. et al. "Epigenetic reprograming of immune cells through selective inhibition of HDAC6 reduces suppressive phenotypes and augments anti-tumor properties of T-cells" <i>Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017</i> , 01 July 2017 (2017-07-01), abstract	1
X	CN 108998417 A (GUANGZHOU MEDICAL UNIVERSITY NEW DRUG MANUFACTURING CO., LTD.) 14 December 2018 (2018-12-14) claims 1-10, description, paragraphs 0035-0036, and embodiment 1	1, 3-7
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 August 2024		Date of mailing of the international search report 03 September 2024
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/098193

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2022213731 A1 (PEKING UNIVERSITY) 13 October 2022 (2022-10-13) description, pages 2-4	1, 3-9, 11, 13, 17-18
X	CN 115725495 A (TSINGHUA UNIVERSITY) 03 March 2023 (2023-03-03) claims 1-20	1-7
X	CN 104530413 A (XIAMEN SINOPEG BIOTECH INC.) 22 April 2015 (2015-04-22) description, paragraphs 885 and 892	1
X	CN 116024162 A (SHANDONG UNIVERSITY) 28 April 2023 (2023-04-28) claim 5	1
X	WO 2022173932 A1 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.) 18 August 2022 (2022-08-18) embodiment 5	1
PX	CN 116676256 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 01 September 2023 (2023-09-01) claims 1-10, and description, paragraphs 0005-0119	1-18
PX	CN 116574674 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 11 August 2023 (2023-08-11) claims 1-10	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/098193

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	108998417	A	14 December 2018	US	2021095259	A1	01 April 2021
				WO	2020007036	A1	09 January 2020
WO	2022213731	A1	13 October 2022	KR	20230165858	A	05 December 2023
				US	2024182867	A1	06 June 2024
				EP	4320223	A1	14 February 2024
				CA	3213219	A1	13 October 2022
				JP	2024513094	A	21 March 2024
				AU	2022255867	A1	05 October 2023
CN	115725495	A	03 March 2023	EP	4394030	A1	03 July 2024
				WO	2023025302	A1	02 March 2023
				TW	202328432	A	16 July 2023
				AR	126901	A1	29 November 2023
CN	104530413	A	22 April 2015	None			
CN	116024162	A	28 April 2023	None			
WO	2022173932	A1	18 August 2022	CA	3210477	A1	18 August 2022
				JP	2024508692	A	28 February 2024
				AU	2022218771	A1	24 August 2023
				AU	2022218771	A9	18 July 2024
				EP	4291175	A1	20 December 2023
CN	116676256	A	01 September 2023	None			
CN	116574674	A	11 August 2023	None			

A. 主题的分类

C12N 5/0735(2010.01)i; C12N 5/077(2010.01)i; C12N 5/074(2010.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12N C12Q A61K A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNTEXT,ENTXT,ENTXTC,VEN,CNKI,万方数据库,pubmed,ISI web of science:奥西丁尼,奥希替尼,编程,干细胞,迈瑞替尼,培养基,曲古抑菌素,去分化,西他司他,抑制,抑制剂,永生,重编,重编程,acy241,aurora,azd9291,cct129202,CCT129202,cd3254,CD3254,chk2,Citarinostat,CN116981768,dmh1,DMH1,hdac,inhibitor,merleletinib,osimertinib,R406,sr11237,SR11237,tmp269,tsa,ws6,cct-129202,acy-241,cd 3254,cd-3254,sgc-cbp30,reprogramm+,BML-277,trichostatin a,azd 9291,cct 129202,ws-6,ws 6,"crebbp/ep300",sr-11237,dmh-1,dmh 1,sr 11237,bml-277,azd-9291,bms-649

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	JIN, Y. 等. "Harnessing endogenous transcription factors directly by small molecules for chemically induced pluripotency inception" PNAS, 第120卷, 第21期, 2023年5月16日 (2023 - 05 - 16), 摘要, 第2页左栏第4段, 第10页右栏, 第11页右栏第2段, 表S1, 图S1	1, 3-7
X	SODRE, A.L. 等. "Epigenetic reprogramming of immune cells through selective inhibition of HDAC6 reduces suppressive phenotypes and augments anti-tumor properties of T-cells" Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017, 2017年7月1日 (2017 - 07 - 01), 摘要	1
X	CN 108998417 A (广州医大新药创制有限公司) 2018年12月14日 (2018 - 12 - 14) 权利要求1-10, 说明书第0035-0036段, 实施例1	1, 3-7
X	WO 2022213731 A1 (PEKING UNIVERSITY) 2022年10月13日 (2022 - 10 - 13) 说明书第2-4页	1, 3-9, 11, 13, 17-18

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

★ 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年8月27日

国际检索报告邮寄日期

2024年9月3日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

赵鹏

电话号码 (+86) 010-53961965

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 115725495 A (清华大学) 2023年3月3日 (2023 - 03 - 03) 权利要求1-20	1-7
X	CN 104530413 A (厦门赛诺邦格生物科技有限公司) 2015年4月22日 (2015 - 04 - 22) 说明书第885和892段	1
X	CN 116024162 A (山东大学) 2023年4月28日 (2023 - 04 - 28) 权利要求5	1
X	WO 2022173932 A1 (DANA-FARBER CANCER INST., INC.) 2022年8月18日 (2022 - 08 - 18) 实施例5	1
PX	CN 116676256 A (浙江大学) 2023年9月1日 (2023 - 09 - 01) 权利要求1-10, 说明书第0005-0119段	1-18
PX	CN 116574674 A (浙江大学) 2023年8月11日 (2023 - 08 - 11) 权利要求1-10	1-7

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2024/098193

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	108998417	A	2018年12月14日	US	2021095259	A1	2021年4月1日
				WO	2020007036	A1	2020年1月9日
WO	2022213731	A1	2022年10月13日	KR	20230165858	A	2023年12月5日
				US	2024182867	A1	2024年6月6日
				EP	4320223	A1	2024年2月14日
				CA	3213219	A1	2022年10月13日
				JP	2024513094	A	2024年3月21日
				AU	2022255867	A1	2023年10月5日
CN	115725495	A	2023年3月3日	EP	4394030	A1	2024年7月3日
				WO	2023025302	A1	2023年3月2日
				TW	202328432	A	2023年7月16日
				AR	126901	A1	2023年11月29日
CN	104530413	A	2015年4月22日	无			
CN	116024162	A	2023年4月28日	无			
WO	2022173932	A1	2022年8月18日	CA	3210477	A1	2022年8月18日
				JP	2024508692	A	2024年2月28日
				AU	2022218771	A1	2023年8月24日
				AU	2022218771	A9	2024年7月18日
				EP	4291175	A1	2023年12月20日
CN	116676256	A	2023年9月1日	无			
CN	116574674	A	2023年8月11日	无			