



(21) 申請案號：111132108 (22) 申請日：中華民國 111 (2022) 年 08 月 25 日
(51) Int. Cl. : C12N5/071 (2010.01) C12N5/078 (2010.01)
C12N5/0783 (2010.01)
(30) 優先權：2021/08/26 中國大陸 202110989429.8
2022/06/09 中國大陸 202210654031.3
(71) 申請人：清華大學(中國大陸) (CN)
中國大陸
(72) 發明人：丁 勝 DING, SHENG (US)；劉康 LIU, KANG (CN)；胡妍妍 HU, YANYAN
(CN)；楊媛媛 YANG, YUANYUAN (CN)；譚彭丞 TAN, PENGCHENG (CN)；馬
天驊 MA, TIANHUA (CN)
(74) 代理人：呂紹凡；洪珮瑜；翁啟達
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：30 項 圖式數：10 共 98 頁

(54) 名稱

誘導全能性幹細胞及其製備方法

(57) 摘要

本發明涉及用於誘導產生全能性幹細胞的小分子再程式化試劑組合，製備誘導全能性幹細胞的方法，以及誘導產生的誘導全能性幹細胞。

【發明摘要】

【中文發明名稱】 誘導全能性幹細胞及其製備方法

【中文】

本發明涉及用於誘導產生全能性幹細胞的小分子再程式化試劑組合，製備誘導全能性幹細胞的方法，以及誘導產生的誘導全能性幹細胞。

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 誘導全能性幹細胞及其製備方法

【技術領域】

【0001】 本發明涉及用於誘導產生全能性幹細胞的小分子再程式化試劑組合，製備誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）的方法，以及誘導產生的誘導全能性幹細胞。

【先前技術】

【0002】 哺乳動物胚胎的發育起始於卵母細胞和精子結合形成的受精卵，之後透過卵裂發育為二細胞，四細胞，八細胞，桑椹胚（morula）等各個時期。

【0003】 以小鼠為例，只有受精卵和二細胞期的卵裂球具有胚內和胚外雙向發育的潛能，且具有獨立發育成完整個體的能力即全能性（totipotency），被稱為全能性細胞（totipotent cell）。

【0004】 隨著胚胎發育的進行，全能性細胞分化成內細胞團（inner cell mass，ICM）和滋養層細胞（trophoblast cell，TE）這兩種細胞類型，此時的胚胎稱為囊胚（blastocyst）。

【0005】 滋養層細胞位於囊胚期胚胎外側，可發育成胎盤等胚外部分。滋養層細胞對於內細胞團的進一步分化起到重要作用。內細胞團的細胞進一步分化成原始內胚層（primitive endoderm，PE）和上胚層（epiblast，EPI）。其中，原始內胚層進一步發育成胚外組織-卵黃囊，而上胚層進一步發育成胎兒的各種組織和器官，最終發育成完整的胎兒。

【0006】 由於上胚層細胞僅可以發育成胚內部分，喪失了向胚外部分發育的能力，具有的是多能性（pluripotency）而非胚內/外雙向發育的全能性，因此被稱為多能性細胞（pluripotent cell）。從內細胞團體外培養得到的胚胎幹細胞（embryonic stem cell，ESC）也是多能性的，可以分化為所有的胚內組織並能在體外無限增殖。

【0007】 1981年，來自劍橋大學的Martin Evans和Matthew Kaufman首次成功從小鼠的胚胎中分離得到了第一株小鼠多能性胚胎幹細胞系（mESC），由此引發了胚胎幹細胞研究的熱潮。

【0008】 2006年，山中伸彌透過利用病毒載體將四個轉錄因子（Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc）的組合轉入體細胞中，使原本已經高度分化的體細胞再程式化為具有多能性的誘導多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell，iPSC），因此獲得2012年的諾貝爾獎。

【0009】 自小鼠多能性胚胎幹細胞系（mESC）建立後的40年間，所有培養的小鼠胚胎幹細胞都處於多能性狀態。人們一直試圖體外獲得具有更高發育潛能的幹細胞。然而迄今為止，體外誘導並長時間培養在分子水準和功能上都類似於體內全能性胚胎細胞的全能性幹細胞依然是一個巨大的挑戰。

【0010】 SHEN Hui等（Shen H, Yang M, Li S, et al. Mouse totipotent stem cells captured and maintained through spliceosomal repression[J]. Cell, 2021, 184（11）：2843-2859. e20.）公開了小鼠胚胎幹細胞中的剪切體抑制驅動了多能性狀態向全能性狀態的轉化。使用剪切抑制劑pladienolide B，該論文獲得了一種新的細胞類型，其在轉錄組水準上類似於小鼠2-細胞和4-細胞卵裂球，稱為全能性卵裂球樣細胞（totipotent blastomere-like cell，TBLC）。透過小鼠嵌合實驗並結合RNA測序（RNA-

seq) 結果表明，該TBLC具有穩健的雙向發育能力，以產生多重胚胎和胚胎外細胞系。在機制上，剪切體抑制導致多能性基因的廣泛剪切抑制，而含有很少的短內含子的全能性基因被有效剪切和轉錄啟動。然而，該論文使多能性幹細胞轉變為具有一定全能性的幹細胞的剪切抑制技術需要多次繼代，花費相當長的時間。而且，透過分析該論文得到的全能性卵裂球樣細胞（TBLC）與正常小鼠胚胎的單細胞RNA測序（scRNA-seq）資料，發明人發現該全能性卵裂球樣細胞與具有全能性的受精卵和二細胞並不接近，反而與發育更晚階段的植入後胚胎的細胞更為接近，因此並不能被認為其是全能性細胞。更為重要的是，該全能性卵裂球樣細胞沒有被證明具備獨立發育成小鼠胚胎，進而產生完整生命個體的能力，並不符合嚴格的全能性細胞的定義（可以獨立發育成完整生命體），因此不能被定義為全能性幹細胞。

【0011】 本領域內普遍公認，具有全能性的細胞應該符合以下中的一項或多項，較佳兩項，更佳全部三項：1) 細胞在轉錄水準上與全能性胚胎細胞即受精卵和二細胞相似；2) 進一步地，細胞具有分化為胚內和胚外各種細胞類型的雙向發育潛能；3) 更進一步且最嚴格的，一個或一種細胞可以發育成一個完整的胚胎或生命個體。

【0012】 本領域仍然需要誘導產生更加理想的全能性幹細胞，特別是更加快速、有效地誘導產生，所得的誘導全能性幹細胞符合上文對於全能性的定義。

【發明內容】

【0013】 發明人令人驚訝地發現，透過採用特定的化合物組合作為用於多能性幹細胞基礎培養基的添加劑，可以將多能性幹細胞誘導成全能性幹細胞（在

第 3 頁，共 68 頁(發明說明書)

本文中稱為ciTotiSC，即chemical induced totipotent stem cell，化學誘導全能性幹細胞，或簡稱誘導全能性幹細胞），且該誘導非常快速、有效。

【0014】 因此，在一個方面，本發明提供了一種組合物，其包含：

【0015】 (a) RA訊號通路啟動劑；和

【0016】 (b) 以下中的一種或多種：GSK-3抑制劑、IKK訊號通路抑制劑、HDAC抑制劑、組蛋白甲基轉移酶抑制劑、Src激酶抑制劑、cAMP啟動劑、和細胞代謝調節劑。

【0017】 在另一個方面，本發明提供了一種試劑盒，其包含：

【0018】 (a) RA訊號通路啟動劑；和

【0019】 (b) 以下中的一種或多種：GSK-3抑制劑、IKK訊號通路抑制劑、HDAC抑制劑、組蛋白甲基轉移酶抑制劑、Src激酶抑制劑、cAMP啟動劑、和細胞代謝調節劑。

【0020】 在另一個方面，本發明提供了 (a) RA訊號通路啟動劑；和 (b) 以下中的一種或多種：GSK-3抑制劑、IKK訊號通路抑制劑、HDAC抑制劑、組蛋白甲基轉移酶抑制劑、Src激酶抑制劑、cAMP啟動劑、和細胞代謝調節劑，用於製造誘導全能性幹細胞的用途。

【0021】 在前述方面中的一個或多個的一些實施方式中，所述RA訊號通路啟動劑選自TTNPB、Tretionin/RA/ATRA、AM580、Taza、9-cis-RA、Acitretin、CD437、Tamibarotene、Tazarotene、視黃酸、Isotretinoin、Acitretin sodium、ch55和AC55649等相同通路小分子。

【0022】 在前述方面中的一個或多個的一些實施方式中，所述GSK-3抑制劑選自1-Azakenpaullone、AZD2858、CHIR99021和AZD1080等相同通路小分子。

【0023】 在前述方面中的一個或多個的一些實施方式中，所述IKK訊號通路抑制劑選自WS6、sc-514、PF184和IKK16等相同通路小分子。

【0024】 在前述方面中的一個或多個的一些實施方式中，所述HDAC抑制劑選自Trichostatin A (TSA)、Valproic acid (VPA)、Vorinostat (SAHA) 和Entinostat (MS-275) 等相同通路小分子。

【0025】 在前述方面中的一個或多個的一些實施方式中，所述組蛋白甲基轉移酶抑制劑選自BIX 01294、3-deazaneplanocin A (DZNeP) HCl、A-366、UNC0638 和SGC 0946等相同通路小分子。

【0026】 在前述方面中的一個或多個的一些實施方式中，所述Src激酶抑制劑選自Dasatinib (BMS-354825)、WH-4-023、Ponatinib (AP24534)、Bosutinib (SKI-606) 等相同通路小分子。

【0027】 在前述方面中的一個或多個的一些實施方式中，所述cAMP啟動劑選自Colforsin (Forskolin、HL 362) 和8-Br-cAMP等相同通路小分子。

【0028】 在前述方面中的一個或多個的一些實施方式中，所述細胞代謝調節劑選自2-Deoxy-D-glucose (2-DG)、乙酸鈉、L-乳酸鈉和D-核糖等細胞代謝調節劑。

【0029】 在另一個方面，本發明提供了一種培養基，其包含本文所述的組合物。

【0030】 在前述方面中的一個或多個的一些實施方式中，所述培養基包含基礎培養基。

【0031】 在前述方面中的一個或多個的一些實施方式中，所述基礎培養基選自DMEM、Knockout DMEM、RPMI 1640和DMEM/F12等常用基礎培養基。

【0032】 在另一個方面，本發明一種製造誘導全能性幹細胞的方法，所述方法包含本文所述的培養基中培養多能性幹細胞，由此製造所述誘導全能性幹細胞。

【0033】 在前述方面中的一個或多個的一些實施方式中，所述多能性幹細胞是胚胎幹細胞或誘導多能性幹細胞。

【0034】 在前述方面中的一個或多個的一些實施方式中，所述方法包含將非多能性細胞再程式化為多能性幹細胞。

【0035】 在前述方面中的一個或多個的一些實施方式中，所述非多能性細胞選自體細胞和/或成體幹細胞。

【0036】 在前述方面中的一個或多個的一些實施方式中，所述將非多能性細胞再程式化為多能性幹細胞包含在所述非多能性細胞內表現選自Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc中的一種或多種再程式化因子。

【0037】 在前述方面中的一個或多個的一些實施方式中，所述培養多能性幹細胞進行1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。

【0038】 在另一個方面，本發明提供了一種培養物，其包含本文所述的培養基和多能性幹細胞。

【0039】 在前述方面中的一個或多個的一些實施方式中，所述多能性幹細胞是胚胎幹細胞或誘導多能性幹細胞。

【0040】 在另一個方面，本發明提供了一種培養物，其包含本文所述的培養基和全能性幹細胞。

【0041】 在前述方面中的一個或多個的一些實施方式中，所述全能性幹細胞是誘導全能性幹細胞，較佳可透過根據本文所述的方法製造。

【0042】 在另一個方面，本發明提供了一種誘導全能性幹細胞，其透過以下中的一種或多種來表徵：

【0043】 (a) 選自以下中的一種或多種全能性轉錄標誌物的增加的轉錄：MERVL，Zscan4c、Zscan4d、Zscan4f，Zfp352，Tctst1，Tctst3，Teme92，Gm6763；

【0044】 (b) 選自以下中的一種或多種多能性轉錄標誌物的減少的轉錄：
POU5f1、ZFP42、NANOG、KLF4、ESRRB；和

【0045】 (c) 向胚外細胞類型分化的能力；

【0046】 較佳地，所述誘導全能性幹細胞可透過本文所述的方法製造。

【0047】 在另一個方面，本發明提供了一種誘導全能性幹細胞，其可透過如前述權利要求中任一項所述的方法製造。

【0048】 在另一個方面，本發明提供了一種生物體，其產生自本文所述的誘導全能性幹細胞，較佳其中所述生物體是齧齒動物或哺乳動物。

【0049】 在另一個方面，本發明提供了一種類器官，其產生自本文所述的誘導全能性幹細胞。

【0050】 在另一個方面，本發明提供了一種組織，其產生自本文所述的誘導全能性幹細胞，較佳所述組織是血液。

【0051】 在另一個方面，本發明提供了一種分化細胞，其分化自本文所述的誘導全能性幹細胞，較佳其中所述分化細胞是血液細胞或免疫細胞，如T細胞或NK細胞。

【圖式簡單說明】

【0052】 圖1.1：本發明的小鼠誘導全能幹細胞 (ciTotiSC) 的繼代培養；

【0053】 圖1.2：本發明的小鼠誘導全能幹細胞 (ciTotiSC) 的高表現全能性標誌基因；

【0054】 圖2.1：在本發明的小鼠誘導全能幹細胞 (ciTotiSC) 和小鼠多能性胚胎幹細胞 (mESC) 中的特定基因集的富集情況分析 (GSEA) (上圖)；

【0055】 本發明的小鼠誘導全能幹細胞 (ciTotiSC) 與小鼠多能性胚胎幹細胞 (mESC)、全能性卵裂球樣細胞 (TBLC)、全能性幹細胞樣細胞(TLSCs)、擴增潛能幹細胞(EPSC)相比, 高表現母源基因、ZGA基因、全能性基因, 低表現多能性特異性基因 (下圖) ;

【0056】 圖2.2: 本發明的小鼠誘導全能幹細胞 (ciTotiSC) 和小鼠多能性胚胎幹細胞 (mESC) 的全轉錄組水準的集群分析;

【0057】 圖2.3: 本發明的小鼠誘導全能幹細胞 (ciTotiSC) 和小鼠多能性胚胎幹細胞 (mESC) 的全轉錄組水準的主成分分析 (PCA) ;

【0058】 圖2.4: 本發明的小鼠誘導全能幹細胞 (ciTotiSC) 和小鼠多能性胚胎幹細胞 (mESC) 和全能性卵裂球樣細胞 (TBLC) 以及正常小鼠各個階段胚胎的胚胎發育各階段特異表現基因集的富集情況分析 (GSEA) ;

【0059】 圖2.5: 本發明的小鼠誘導全能幹細胞 (ciTotiSC) 和小鼠多能性胚胎幹細胞 (ESC) 和全能性卵裂球樣細胞 (TBLC) 以及正常小鼠各個階段胚胎的單細胞RNA測序 (scRNA-seq) UMAP分析;

【0060】 圖2.6: 本發明的小鼠誘導全能幹細胞 (ciTotiSC) 和小鼠多能性胚胎幹細胞 (mESC) 的染色質可及性測序 (ATAC-seq) 分析;

【0061】 圖2.7: 本發明的小鼠誘導全能幹細胞 (ciTotiSC) 和小鼠多能性胚胎幹細胞 (mESC) 的特定位點的染色質可及性測序 (ATAC-seq) 分析;

【0062】 圖2.8: RRBS分析小鼠誘導全能性幹細胞 (ciTotiSC) 和小鼠多能性胚胎幹細胞 (mESC) 的基因組甲基化水準;

【0063】 圖2.9: 基於RRBS資料的小鼠誘導全能性幹細胞 (ciTotiSC) 和小鼠多能性胚胎幹細胞 (mESC) 的全甲基化主成分分析;

【0064】 圖2.10: 小鼠誘導全能性幹細胞 (ciTotiSC) 和小鼠多能性胚胎幹細胞 (mESC) 的基因組中特定位點附近的甲基化水準分析;

【0065】 圖2.11：對小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）的代謝組的分析；

【0066】 圖3.1：滋養外胚層幹細胞分化實驗流程示意圖；

【0067】 圖3.2：RT-qPCR檢測小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）、小鼠胚胎幹細胞（mESC）和小鼠潛能擴展多能性幹細胞（mEPSC）中的小鼠滋養外胚層幹細胞特異性基因的轉錄；

【0068】 圖3.3：免疫螢光染色檢測小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）、小鼠胚胎幹細胞（mESC）和小鼠潛能擴展多能性幹細胞（mEPS）中的小鼠滋養外胚層幹細胞特異性蛋白的表現；

【0069】 圖3.4：不同代數的（P1-P8）全能性的小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）在換入mESC培養基(2i/LIF)後的全能性基因和多能性基因的表現分析；

【0070】 圖4.1：小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）和小鼠胚胎幹細胞（mESC）來源的擬胚體（EB）免疫螢光染色分析；

【0071】 圖4.2：擬胚體中全部檢測到的CDX2陽性細胞的比例統計；

【0072】 圖4.3：小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）和小鼠胚胎幹細胞（mESC）來源的畸胎瘤三胚層分化能力分析；

【0073】 圖4.4：小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）的畸胎瘤胚外譜系分化能力分析；

【0074】 圖5.1：嵌合實驗流程示意圖；

【0075】 圖5.2：小鼠全能幹細胞（ciTotiSC）和小鼠胚胎幹細胞（mESC）在E4.5時的嵌合能力；

【0076】 圖5.3：小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）和小鼠胚胎幹細胞（mESC）在內細胞團（ICM）和滋養外胚層（TE）中的嵌合比例統計；

【0077】 圖5.4：小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）和小鼠胚胎幹細胞（mESC）的嵌合胚胎滋養外胚層（TE）經典標誌物染色確認；

【0078】 圖6.1：小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）和小鼠胚胎幹細胞（mESC）的嵌合胚胎體內發育至E7.5的免疫螢光染色分析；

【0079】 圖7.1：小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）和小鼠胚胎幹細胞（mESC）的嵌合胚胎體內發育至E12.5的嵌合情況分析；

【0080】 圖7.2：流式細胞術分析小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）和小鼠胚胎幹細胞（mESC）在E12.5的各組織中的嵌合比例；

【0081】 圖7.3：小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）和小鼠胚胎幹細胞（mESC）的E12.5嵌合胎盤冰凍切片免疫螢光染色分析嵌合細胞與胎盤胚外譜系細胞標誌物CK8和proliferin的共定位分析；

【0082】 圖7.4：小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）和小鼠胚胎幹細胞（mESC）的E12.5胚內三胚層（中、內、外胚層）嵌合能力分析；

【0083】 圖8.1：單個小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）的發育潛力檢測；

【0084】 圖8.2：小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）E12.5胚內外嵌合形成的細胞類型分析；

【0085】 圖8.3：小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）具有向生殖脊嵌合和產生健康的嵌合體後代的能力；

【0086】 圖8.4：由小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）得到誘導囊胚；

【0087】 圖8.5：小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）誘導形成的小鼠囊胚具有體內正常囊胚的三種細胞譜系；

【0088】 圖8.6：小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）誘導形成的小鼠囊胚可在體外進行植入後發育；

【0089】 圖8.7：小鼠誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）誘導形成的小鼠囊胚體內在小鼠子宮內著床並進行進一步發育；

【0090】 圖9.1：Dux和p53在全能性幹細胞（ciTotiSC）誘導中的作用；

【0091】 圖9.2：多種小分子組合誘導產生小鼠全能幹細胞（ciTotiSC）的2C:tdTomato+細胞比例；

【0092】 圖9.3：多種常用基礎培養基用於誘導產生小鼠全能性幹細胞（ciTotiSC）的2C:tdTomato+和OCT4表現測試；

【0093】 圖9.4：對一些小分子再程式化試劑進行單獨替換並測試其誘導產生小鼠全能性幹細胞（ciTotiSC）的性能的測試

【0094】 圖10：多種小分子在全能細胞誘導中對基因表現的影響。

【實施方式】

【0095】 A. 概述

【0096】 用於全能性幹細胞的生產和維持的現有方法仍未實現符合全能性的公認定義中的一項或多項條件的全能性幹細胞，更不用說用於工業或臨床應用的全能性幹細胞。本發明實現了誘導多能性幹細胞產生符合公認定義中的一項或多項條件的全能性幹細胞。

【0097】 發明人誘導培養的全能性幹細胞表現出1) 和小鼠胚胎受精卵、二細胞期卵裂球類似的轉錄組特徵，在染色質可及性、DNA甲基化水準和細胞代謝方式上都轉變成了與體內全能性細胞相似的水準。2) 體外單層細胞直接分化、懸浮狀態下擬胚體分化及體內畸胎瘤分化實驗證明，發明人誘導培養的全能性幹細胞具有在多能性幹細胞不具備的，向胚外部分細胞分化的能力。體內嵌合實驗同樣有力地證明了發明人誘導培養的全能性幹細胞具有高效的向胚內、胚外

組織雙向的發育潛能。3) 更為重要的是，該誘導全能性幹細胞可在體外獨立誘導發育成小鼠囊胚，且正確表現小鼠囊胚標誌性基因。該誘導得到的囊胚在體外繼續培養可展現胚胎植入後的一系列特徵；該誘導得到的囊胚移植到小鼠體內後也可以植入到子宮繼續發育。因而，該小鼠誘導全能性幹細胞具有不經過傳統的精卵結合的方式，獨立發育成整個完整生命體的潛能。

【0098】 因此，本文考慮的組合物和方法使符合要求的全能性幹細胞的製造成為可能，所述全能性幹細胞適合於工業和臨床用途。

【0099】 除非另有特別指出，否則本發明的實施將採用在本領域技術內的化學、生物化學、有機化學、分子生物學、微生物學、重組DNA技術、遺傳學、免疫學、細胞生物學、幹細胞方案、細胞培養和轉基因生物學的常規方法，其中許多在下文描述用於舉例說明的目的。這樣的技術在文獻中充分說明。參見例如 Sambrook, et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, updated July 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); Guthrie and Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, New York, 1991); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, Ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, Ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Fire et al., *RNA Interference Technology: From Basic Science*

to Drug Development (Cambridge University Press, Cambridge, 2005) ; Schepers, RNA Interference in Practice (Wiley-VCH, 2005) ; Engelke, RNA Interference (RNAi) : The Nuts & Bolts of siRNA Technology (DNA Press, 2003) ; Gott, RNA Interference, Editing, and Modification: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology; Human Press, Totowa, NJ, 2004) ; Sohail, Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application (CRC, 2004) ; Clarke and Sanseau, microRNA: Biology, Function & Expression (Nuts & Bolts series; DNA Press, 2006) ; Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986) ; the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.) ; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory) ; Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) ; Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987) ; Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. Blackwell, eds., 1986) ; Riott, Essential Immunology, 6th Edition, (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988) ; Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2002) ; Embryonic Stem Cell Protocols: Volume I: Isolation and Characterization (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2006) ; Embryonic Stem Cell Protocols: Volume II: Differentiation Models (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2006) ; Human Embryonic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen Ed., 2006) ; Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Darwin J. Prockop, Donald G. Phinney, and Bruce A. Bunnell Eds., 2008) ; Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Medicine) (Christopher A. Klug, and Craig T. Jordan Eds., 2001) ; Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kevin

D. Bunting Ed., 2008) Neural Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Leslie P. Weiner Ed., 2008); Hogan et al., Methods of Manipulating the Mouse Embryo (2nd Edition, 1994); Nagy et al., Methods of Manipulating the Mouse Embryo (3rd Edition, 2002), 和The Zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio), 4th Ed., (Univ. of Oregon Press, Eugene, OR, 2000)。

【0100】 本文引用的所有公開檔、專利和專利申請透過引入全文併入本文。

【0101】 B. 定義

【0102】 除非另有定義，否則本文使用的所有技術和科學術語具有與本發明所屬領域之具備通常知識者通常理解的相同的含義。為了本發明的目的，下文定義了下述術語。

【0103】 冠詞「一個/一種 (a/an)」和「該/所述 (the)」在本文中用於指一個/一種或超過一個/一種(即至少一個/一種)所述冠詞的語法物件。例如，「要素」意指一個/一種要素或超過一個/一種要素。

【0104】 替代(例如「或」)的使用應理解為意指替代方案中任一、兩者或其任何組合。

【0105】 術語「和/或」應理解為意指替代方案中任一或兩者。

【0106】 如本文使用的，術語「約」或「大約」是指與參考數量、水準、值、數量、頻率、百分比、尺度、大小、量、重量或長度相比較，改變多達15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的數量、水準、值、數量、頻率、百分比、尺度、大小、量、重量或長度。在一個實施方式中，術語「約」或「大約」是指圍繞參考數量、水準、值、數量、頻率、百分比、尺度、大小、量、重量或長度±15%、±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%或±1%的數量、水準、值、數量、頻率、百分比、尺度、大小、量、重量或長度範圍。

【0107】如本文使用的，術語「實質上（substantially/essentially）」是指與參考數量、水準、值、數量、頻率、百分比、尺度、大小、量、重量或長度相比較，是約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更高的數量、水準、值、數量、頻率、百分比、尺度、大小、量、重量或長度。在一個實施方式中，術語「實質上相同」是指與參考數量、水準、值、數量、頻率、百分比、尺度、大小、量、重量或長度大約相同的數量、水準、值、數量、頻率、百分比、尺度、大小、量、重量或長度範圍。

【0108】如本文使用的，術語「實質上不含」當用於描述組合物例如細胞群或培養基時，指不含指定物質，例如95%不含、96%不含、97%不含、98%不含、99%不含指定物質的組合物，或如透過常規手段測量是無法檢測的。類似含義可應用於術語「不存在」，當指不存在組合物的特定物質或組分時。

【0109】如本文使用的，術語「可觀的」是指透過一種或多種標準方法可容易地檢測到的數量、水準、值、數量、頻率、百分比、尺度、大小、量、重量或長度範圍。術語「不可觀的（not-appreciable）」和「不可觀的（unappreciable）」以及等價方式是指透過標準方法無法容易地檢測到或無法檢測到的數量、水準、值、數量、頻率、百分比、尺度、大小、量、重量或長度範圍。在一個實施方式中，如果事件以小於5%、4%、3%、2%、1%、0.1%、0.01%、0.001%或更少的次數發生，則它是不可觀的。

【0110】在本說明書全文，除非上下文另有要求，否則術語「包含」，「包括」、「含有」和「具有」應理解為暗示包含所述步驟或要素或者步驟或要素組，但不排除任何其他步驟或要素或者步驟或要素組。在特定實施方式中，術語「包含」、「包括」、「含有」和「具有」同義使用。

【0111】 「由……組成」意指包含但限於在短語「由……組成」後的任何。因此，短語「由……組成」是指示所列出的要素是需要的或強制性的，並且沒有其他要素是可以存在的。

【0112】 「實質上由……組成」意指包含在短語「實質上由……組成」後列出的任何要素，並且限於不干擾或貢獻於所列出的要素的公開內容中指定的活動或動作的其他要素。因此，短語「實質上由……組成」是指示所列出的要素是需要的或強制性的，但沒有其他要素是任選的，並且取決於它們是否影響所列出的要素的活動或動作而可以存在或不存在。

【0113】 在本說明書全文，提到「一個實施方式」、「實施方式」、「特定實施方式」、「相關實施方式」、「某個實施方式」、「另外的實施方式」或「進一步的實施方式」或其組合意指與所述實施方式結合描述的特定特徵、結構或特性被包含在本發明的至少一個實施方式中。因此，前述短語在本說明書全文的各個地方的出現不一定全部指相同實施方式。此外，特定特徵、結構或特性可以以任何合適方式在一個或多個實施方式中組合。

【0114】 術語「離體」一般指在生物體外發生的活動，例如在生物體外的人工環境中在活組織中或活組織上完成的實驗或測量，較佳伴隨天然條件的最低限度改變。在特定實施方式中，「離體」程序涉及從生物體中獲得的活細胞或組織，在實驗室儀器中培養，通常在無菌條件下，且通常為數小時或高達約24小時，但包含高達48或72小時，取決於環境。在某些實施方式中，可收集且冷凍這樣的組織或細胞，隨後解凍用於離體處理。使用活細胞或組織的持續長於數天的組織培養實驗或程式通常視為「體外」，儘管在某些實施方式中，該術語可與離體互換使用。

【0115】 術語「體內」一般指在生物體內發生的活動。

【0116】如本文使用的，術語「再程式化」或「去分化」或「增加細胞潛能」或「增加發育潛能」是指增加細胞的潛能或使細胞去分化為較少分化狀態的方法或過程。例如，與非再程式化狀態的相同細胞相比較，具有增加的細胞潛能的細胞具有更多發育可塑性（即可分化成更多細胞類型）。換言之，再程式化細胞是處於比非再程式化狀態的相同細胞較少分化狀態的細胞。在一些實施方式中，再程式化包含使多能性幹細胞再程式化為全能性幹細胞。在一些實施方式中，再程式化包含使非多能性幹細胞再程式化為多能性幹細胞。在一些實施方式中，再程式化包含使非多能性幹細胞再程式化為全能性幹細胞。

【0117】如本文使用的，術語「潛能」是指細胞可至的所有發育選項的總和（即發育潛能）。本領域之具備通常知識者將認識到細胞潛能是連續體，範圍從最多可塑性細胞，即全能性幹細胞，其具有最多發育潛能，到最少可塑性細胞，即終末分化細胞，其具有最少發育潛能。細胞潛能的連續體包含但不限於全能細胞、多能細胞（pluripotent、multipotent）、寡能細胞、單能細胞和終末分化細胞。

【0118】如本文使用的，術語「多能性的」是指細胞形成機體或軀體（即胚體）的所有譜系的能力。例如，胚胎幹細胞是能夠形成來自三個胚層（外胚層、中胚層和內胚層）各自的細胞的一類多能幹細胞。

【0119】如本文使用的，術語「全能性的」是指細胞符合以下中的一項或多項，較佳兩項，更佳全部三項：1) 細胞在轉錄水準上與全能性胚胎細胞即受精卵和二細胞相似；2) 進一步地，細胞具有向胚內和胚外細胞類型雙向發育的潛能；3) 更進一步且最嚴格的，一個或一種細胞可以發育成一個完整的胚胎或生命個體。例如，如本發明證明的，本發明的誘導全能性幹細胞表現出1) 和小鼠胚胎受精卵、二細胞期卵裂球類似的轉錄組特徵，在染色質可及性、DNA甲基化水準和細胞代謝方式上都轉變成了與體內全能性細胞相似的水準。2) 體外單

層細胞直接分化、懸浮狀態下擬胚體分化及體內畸胎瘤分化實驗證明，發明人誘導培養的全能性幹細胞具有在多能性幹細胞不具備的，向胚外部分細胞分化的能力。體內嵌合實驗同樣有力地證明了發明人誘導培養的全能性幹細胞具有高效的向胚內、胚外組織雙向的發育潛能。3) 更為重要的是，該誘導全能性幹細胞可在體外獨立誘導發育成小鼠囊胚，且正確表現小鼠囊胚標誌性基因。該誘導得到的囊胚在體外繼續培養可展現胚胎植入後的一系列特徵；該誘導得到的囊胚移植到小鼠體內後也可以植入到子宮繼續發育。因而，該小鼠誘導全能性幹細胞具有不經過傳統的精卵結合的方式，獨立發育成整個完整生命體的潛能。

【0120】 全能性可以部分地透過評價細胞的全能性特徵進行測定。全能性特徵包含但不限於：(1) 全能性幹細胞形態；(2) 全能性轉錄標誌物的增加的轉錄，例如MERVL, Zscan4c、Zscan4d、Zscan4f, Zfp352, Tcstv1, Tcstv3, Teme92, Gm6763；(3) 多能性轉錄標誌物的減少的轉錄，例如POU5f1、ZFP42、NANOG、KLF4、ESRRB；(4) 向胚內細胞類型分化的能力；(5) 向胚外細胞類型分化的能力；(6) 發育為獨立個體的能力。本發明的誘導全能性幹細胞可以透過這些特徵中的一項或多項來表徵。本發明的誘導全能性幹細胞的這些全能性特徵可以與天然或人工的全能性幹細胞和/或天然或人工的多能性幹細胞進行比較，例如與受精卵和/或二細胞期卵裂球的天然的全能性幹細胞，和/或與胚胎幹細胞或誘導多能幹細胞進行比較；或者與缺乏相同培養條件的對照全能性和/或多能性幹細胞進行比較。

【0121】 在特定實施方式中，給定的培養條件引起的轉錄標誌物的增加或減少的轉錄，可以是與適當的對照相比，至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000%或更多的增加或減少。

【0122】如本文使用的，「基因表現」或「基因轉錄」是指生物樣品例如全能細胞或包含全能細胞的細胞群中的基因表現/轉錄和/或表現/轉錄模式的相對水準。在特定實施方式中，全能細胞是誘導全能性幹細胞。

【0123】本文涵蓋本領域可用的用於檢測表徵本發明細胞的基因的表現/轉錄的任何方法。如本文使用的，術語「檢測表現/轉錄」意指測定基因的RNA轉錄物或其表現產物的數量或存在。用於檢測基因的表現/轉錄的方法，即基因表現/轉錄譜分析，包含基於多核苷酸的雜交分析的方法、基於多核苷酸的測序的方法、免疫組織化學方法、和基於蛋白質組學的方法。所述方法一般檢測感興趣的基因的表現/轉錄產物（例如mRNA）。在一些實施方式中，使用基於PCR的方法例如逆轉錄PCR（RT-PCR）（Weis等人，TIG8:263-64，1992），以及基於陣列的方法例如微陣列（Schena等人，Science270:467-70，1995）。

【0124】「貼壁」是指在適當培養基的存在下，細胞附著至容器，例如細胞附著至無菌塑膠（或塗布塑膠）細胞培養皿或燒瓶。某些類別的細胞在培養中無法維持或不生長，除非它們貼壁至細胞培養容器。某些類別的細胞（「非貼壁細胞」）在培養中維持和/或增殖而無需貼壁。

【0125】「培養（culture）」或「細胞培養」是指在體外環境中的細胞的維持、生長和/或分化。「細胞培養基」、「培養基」、「培養介質」、「介質」、「補充物」和「培養基補充物」是指培養細胞培養物的營養組合物。

【0126】「培養物（culture）」或「細胞培養物」是指被培養的物質如細胞，和/或其中存在有被培養的物質如細胞的培養基。

【0127】「培養（cultivate）」是指在組織或機體外，例如在無菌塑膠（或經塗覆塑膠）細胞培養皿或燒瓶中的細胞的維持、繁殖（生長）和/或分化。「培養」可利用培養基作為營養素、激素和/或幫助使細胞繁殖和/或維持細胞的其他因子的來源。

【0128】如本文使用的，「解離的」細胞是指已經從其他細胞或表面（例如培養板表面）實質上分開或者純化的細胞。例如，細胞可透過機械或酶促方法從動物或組織解離。或者，體外聚集的細胞可以被酶促地或機械地彼此解離，例如透過解離成簇、單細胞或單細胞和簇的混合物的懸浮液。在另外一個可替代實施方式中，貼壁細胞從培養板或其他表面解離。解離因此可涉及破壞細胞與細胞外基質（ECM）和基底（例如培養表面）的相互作用，或破壞細胞之間的ECM。

【0129】如本文使用的，術語「富集（enrich）」是指增加組合物例如細胞組合物中的指定組分的量，並且當用於描述細胞的組合物例如細胞群時，「富集的」是指與富集前細胞群中的這樣的組分的比例相比較，具有按比例增加的量的指定組分的細胞群。例如，組合物例如細胞群可就靶細胞類型（即具有指定特徵的細胞）而言進行富集，因此與富集前細胞群中存在的靶細胞的比例相比較，具有增加的比例或百分比的靶細胞類型。細胞群可透過本領域已知的細胞選擇和分選方法就靶細胞類型進行富集。在一些實施方式中，細胞群透過分選或選擇方法進行富集。在一個特定實施方式中，就靶細胞群進行富集的方法使細胞群就靶細胞群而言富集至少約20%，從而意指富集的細胞群包含比細胞群被富集前細胞群中按比例多約20%的靶細胞類型。在一個實施方式中，就靶細胞群富集的方法使細胞群就靶細胞群而言按比例富集至少約30+%、40+%、50+%、60+%、70+%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%，或至少約98%，或在特定實施方式中，約99%。

【0130】在某些實施方式中，細胞群就全能細胞或顯示出全能性特徵的細胞的量而言進行富集。在本發明的特定實施方式中，經歷再程式化的細胞群就具有全能性特徵的靶細胞進行富集，所述全能性特徵，例如全能性標記物的表現，包含但不限於MERV1，Zscan4c、Zscan4d、Zscan4f、Zfp352、Tctv1、Tctv3、Teme92、Gm6763。

【0131】 在特定實施方式中，富集細胞包含不同的基因或蛋白質表現譜，例如一種或多種全能性標記物例如MERVL，Zscan4c、Zscan4d、Zscan4f、Zfp352、Tcstv1、Tcstv3、Teme92、Gm6763的細胞表面表現。在一些實施方式中，在一個實施方式中，細胞群包含至少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、70%、75%、80%、90%、95%、97%、98%或99%的富集細胞例如全能細胞。

【0132】 因此，在一些實施方式中，就全能細胞富集細胞群的方法包含基於全能性標記物例如MERVL，Zscan4c、Zscan4d、Zscan4f、Zfp352、Tcstv1、Tcstv3、Teme92、Gm6763的細胞表面表現來分選細胞群，並且收集表現這樣的標記物的細胞級分，以獲得富含全能細胞的細胞群。在其他實施方式中，透過基於多能細胞標記物例如POU5f1、ZFP42、NANOG、KLF4、ESRRB的細胞表面表現來分選細胞群，並且耗盡這樣的細胞的細胞群以獲得富含全能細胞的細胞群，使細胞群富含全能細胞。

【0133】 如本文使用的，「飼養細胞（feeder cell或feeder）」是用於描述與第二類型的細胞一起共培養的一個類型的細胞，以提供第二類型的細胞可在其中生長的環境，因為飼養細胞提供用於支援第二細胞類型的生長因子和營養素。飼養細胞任選來自與它們支援的細胞不同的物種。例如，包含幹細胞的某些類型的人細胞可透過小鼠胚胎成纖維細胞和永生化小鼠胚胎成纖維細胞的原代培養物得到支持。當與其他細胞共培養時，飼養細胞通常可透過照射或用抗有絲分裂劑例如絲裂黴素C處理而失去活性，以防止其生長超過它們支援的細胞。不限於前文，一個具體飼養細胞類型可為人飼養細胞，例如人皮膚成纖維細胞。另一飼養細胞類型可以是小鼠胚胎成纖維細胞（MEF）。

【0134】 如本文使用的，「無飼養細胞」（feeder-free，FF）環境是指實質上不含飼養細胞和/或未透過飼養細胞培養而預條件化的環境例如細胞培養或培養基。「預條件化的」培養基是指在飼養細胞已在培養基內培養一段時間例如至

少一天后收穫的培養基。預條件化的培養基含有許多介質物質，包含透過在培養基中培養的飼養細胞分泌的生長因子和細胞因子。

【0135】 基因組穩定性是指細胞忠實複製DNA且維持DNA複製過程的完整性的能力。如本文使用的，術語「基因組穩定的細胞」和「具有基因組穩定性的細胞」是指顯示出一定頻率的突變和染色體異常（例如易位、非整倍體、拷貝數變異和重複）的細胞，所述頻率實質上類似於相對於正常人體細胞的突變和染色體異常的頻率。

【0136】 「成分」是指可用於細胞培養基中以維持和/或促進細胞生長和/或分化的任何化合物或其他材料，無論其來源是化學還是生物的。術語「組分」、「營養素」和「成分」可互換使用。用於細胞培養基的常規成分可包含但不限於胺基酸、鹽、金屬、醣、脂質、核酸、激素、維生素、脂肪酸、蛋白質等等。促進和/或維持離體或體外細胞培養的其他成分可透過本領域之具備通常知識者根據期望效果的需要而加以選擇。

【0137】 「分離(isolate)」是指使組合物或材料與其天然環境分開且收集，例如個體細胞或細胞培養物與組織或機體的分開。在一個方面，細胞群或組合物實質上不含其在自然界中可與之結合的細胞和材料。就靶細胞群而言，「分離的」或「純化的」或「實質上純的」是指就構成總細胞群的靶細胞而言，至少約50%、至少約75%、至少約85%、至少約90%，並且在特定實施方式中，至少約95%純的細胞群。細胞群或組合物的純度可透過本領域眾所周知的適當方法進行評價。例如，實質上純的全能細胞群是指就構成總細胞群的全能細胞而言，至少約50%、至少約75%、至少約85%、至少約90%，並且在特定實施方式中，至少約95%，並且在某些實施方式中，約98%純的細胞群。

【0138】 「繼代(passage)」是指當細胞已增殖至所需程度時，將細胞細分且鋪板到多個細胞培養表面或容器內的動作。在一些實施方式中，「繼代」是

指將細胞細分、稀釋且鋪板。當細胞從原代培養表面或容器繼代到後續組的表面或容器時，後續培養在本文中可被稱為「繼代培養」或「第一次繼代」等。每個細分和鋪板到新培養容器內的動作被視為一次繼代。

【0139】「鋪板 (plating)」是指將一個或多個細胞置於培養容器內，使得細胞貼壁至細胞培養容器且在細胞培養容器上鋪展。

【0140】「多能性因子」是指單獨或與其他試劑組合，能夠增加細胞的發育潛能到多能性的程度的試劑。多能性因子包含但不限於能夠增加細胞的發育潛能到多能性的程度的多核苷酸、多肽和小分子。示例性多能性因子包含例如轉錄因子和小分子再程式化試劑。

【0141】「全能性因子」是指單獨或與其他試劑組合，能夠增加細胞的發育潛能到全能性的程度的試劑。全能性因子包含但不限於能夠增加細胞的發育潛能到全能性的程度的多核苷酸、多肽和小分子。示例性全能性因子包含例如轉錄因子和小分子再程式化試劑。

【0142】「增殖」是指一個細胞分裂成兩個實質上等同的細胞或者細胞群數量增加（例如，以進行複製）的性質。

【0143】「繁殖」是指使組織或機體外的細胞例如在無菌容器例如塑膠（或經塗覆塑膠）細胞培養皿或燒瓶中生長（例如經由細胞增殖來複製）。

【0144】「原代培養物」是指其中經分離的細胞被置於具有培養基的第一培養容器中的細胞、組織和/或培養物。然而，所述細胞、組織和/或培養物可以維持和/或可以增殖，只要所述細胞、組織和/或培養物保留在所述第一容器中。所述細胞、組織和/或培養物被稱為原代培養物。

【0145】術語「小分子再程式化試劑」或「小分子再程式化化合物」在本文中可互換使用，是指單獨或與其他因子組合，可以增加細胞的發育潛能的小分子。小分子包含但不限於：核酸、擬肽、類肽、碳水化合物、脂質或者其他有機

或無機分子。化學和/或生物混合物例如真菌、細菌或藻類提取物的文庫是本領域已知的，在某些實施方式中可用作小分子來源。

【0146】 C. 細胞

【0147】 在一個特定實施方式中，可使用本文考慮的組合物和方法進行培養、解離和繼代一個或多個細胞。在一個實施方式中，使用本文考慮的組合物和方法進行培養、解離和繼代單細胞。在另一個實施方式中，使用本文考慮的組合物和方法進行培養、解離和繼代細胞群或多個細胞。

【0148】 適用於特定實施方式的起始細胞可來源於實質上任何合適的來源，就細胞類型或全能性狀態而言可以是異質或同質的。合適的所述細胞包含胎兒細胞和成人細胞。另外，合適的所述細胞在來源方面可以是哺乳動物，例如來自齧齒類動物、貓、犬、豬、山羊、綿羊、馬、牛，或靈長類動物，例如人。在一個實施方式中，所述細胞是人細胞。

【0149】 所述細胞可以是體細胞、非多能、不完全或部分多能幹細胞、多潛能細胞、寡能細胞、單能細胞、終末分化細胞、或包含前述的任何組合的混合細胞群。適用於特定實施方式的多能細胞包含但不限於天然存在的幹細胞、胚胎幹細胞或iPSC。「混合」細胞群是具有不同程度的發育潛能的細胞群。例如，混合細胞群可包含經歷再程式化的細胞，使得混合群包含多能細胞、部分多能細胞和非多能細胞例如完全分化細胞，如體細胞。在一些實施方式中，多能性幹細胞用於誘導本文所述的全能性幹細胞。在一些實施方式中，所述多能性幹細胞是胚胎幹細胞或誘導多能性幹細胞。在一些實施方式中，所述多能性幹細胞再程式化自非多能性幹細胞。在一些實施方式中，所述非多能性幹細胞選自體細胞和/或成體幹細胞。在一些實施方式中，將非多能性細胞再程式化為多能性幹細胞包含在所述非多能性細胞內表現選自Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc中的一種或多種再程式化因子。

【0150】 在一個實施方式中，起始細胞群選自成人或新生兒幹/祖細胞。在特定實施方式中，起始幹/祖細胞群選自：中胚層幹/祖細胞、內胚層幹/祖細胞和外胚層幹/祖細胞。

【0151】 中胚層幹/祖細胞的示意性例子包含但不限於：中胚層幹/祖細胞、內皮幹/祖細胞、骨髓幹/祖細胞、臍帶幹/祖細胞、脂肪組織衍生的幹/祖細胞、造血幹/祖細胞（HSC）、間充質幹/祖細胞、肌肉幹/祖細胞、腎幹/祖細胞、成骨細胞幹/祖細胞、軟骨細胞幹/祖細胞等等。

【0152】 外胚層幹/祖細胞的示意性例子包含但不限於神經幹/祖細胞、視網膜幹/祖細胞、皮膚乾/祖細胞等等。

【0153】 內胚層幹/祖細胞的示意性例子包含但不限於肝幹/祖細胞、胰腺幹/祖細胞、上皮幹/祖細胞等等。

【0154】 在某些實施方式中，起始細胞群可以是選自以下的異質或同質的細胞群：胰島細胞、CNS細胞、PNS細胞、心肌細胞、骨骼肌細胞、平滑肌細胞、造血細胞、骨細胞、肝細胞、脂肪細胞、腎細胞、肺細胞、軟骨細胞、皮膚細胞、濾泡細胞、血管細胞、上皮細胞、免疫細胞、內皮細胞等等。

【0155】 D. 可用於誘導全能性和誘導產生全能性幹細胞的培養平臺

【0156】 細胞建庫、疾病建模和細胞療法應用已對製造高品質全能細胞提出持續增加的需求。本發明提供了可用於誘導全能性和誘導產生全能性幹細胞的培養平臺，其採用特定小分子再程式化試劑。

【0157】 在一個方面中本發明提供了一種組合物，其包含：

【0158】 (a) RA訊號通路啟動劑；和

【0159】 (b) 以下中的一種或多種：GSK-3抑制劑、IKK訊號通路抑制劑、HDAC抑制劑、組蛋白甲基轉移酶抑制劑、Src激酶抑制劑、cAMP啟動劑、和細胞代謝調節劑。

【0160】 在另一個方面，本發明提供了一種試劑盒，其包含：

【0161】 (a) RA訊號通路啟動劑；和

【0162】 (b) 以下中的一種或多種：GSK-3抑制劑、IKK訊號通路抑制劑、HDAC抑制劑、組蛋白甲基轉移酶抑制劑、Src激酶抑制劑、cAMP啟動劑、和細胞代謝調節劑。

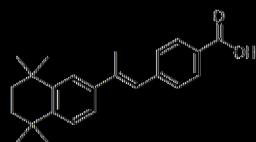
【0163】 在又一個方面，本發明提供了 (a) RA訊號通路啟動劑；和 (b) 以下中的一種或多種：GSK-3抑制劑、IKK訊號通路抑制劑、HDAC抑制劑、組蛋白甲基轉移酶抑制劑、Src激酶抑制劑、cAMP啟動劑、和細胞代謝調節劑，用於製造誘導全能性幹細胞的用途。

【0164】 1. RA訊號通路啟動劑

【0165】 RA（視黃酸，Retinoic acid）訊號通路啟動劑可以是能夠啟動RA通路的各種各樣的試劑。示例性RA訊號通路啟動劑包含，但不限於，TTNPB、Tretionin/RA/ATRA、AM580、Taza、9-cis-RA、Acitretin、CD437、Tamibarotene、Tazarotene、視黃酸、Isotretinoin、Acitretin sodium、ch55和AC55649。在一些實施方式中，RA訊號通路啟動劑選自TTNPB、Tretionin/RA/ATRA、AM580、Taza、9-cis-RA、Acitretin、CD437、Tamibarotene、Tazarotene、視黃酸、Isotretinoin、Acitretin sodium、ch55和AC55649。較佳地，在一些實施方式中，RA訊號通路啟動劑為TTNPB，如下式所示。

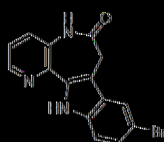
【0166】 2. GSK-3抑制劑

【0167】 GSK-3（醣原合成酶激酶-3，Glycogen synthase kinase-3）抑制劑可以是能夠抑制GSK-3的各種各樣的試劑。GSK-3抑制劑包含，但不限於，1-Azakenpaullone、AZD2858、CHIR99021和AZD1080。在一些實施方式中，GSK-3抑制劑選自1-Azakenpaullone、AZD2858、CHIR99021和AZD1080。較佳地，在一些實施方式中，GSK-3抑制劑是1-Azakenpaullone，如下式所示。



[(0168)] 3. JAK訊號通路抑制劑

[(0169)] JAK (JAK3激酶/NIK3, JAK/JAK3) 訊號通路抑制劑可以是能夠抑制JAK訊號通路的各種各樣的試劑。示范性JAK訊號通路抑制劑包含，但不限於，WS6、sc 514、PF184和MKK16。在一些實施方式中，JAK訊號通路抑制劑選自WS6、sc 514、PF184和MKK16。較佳地，在一些實施方式中，JAK訊號通路抑制劑是WS6，如下式所示。



[(0170)] 4. HDAC抑制劑

[(0171)] HDAC (組蛋白脫乙酰酶，Histone deacetylase) 抑制劑可以是能夠抑制HDAC的各種各樣的試劑。示范性HDAC抑制劑包含，但不限於，Trichostatin A (TSA)、Valproic acid (VPA)、Vorinostat (SAHA) 和Uintinostat (MS 275)。在一些實施方式中，HDAC抑制劑選自Trichostatin A (TSA)、Valproic acid (VPA)、Vorinostat (SAHA) 和Uintinostat (MS 275)。

[(0172)] 5. 組蛋白H3H2轉移酶抑制劑

[(0173)] 組蛋白H3H2轉移酶抑制劑可以是能夠抑制組蛋白H3H2轉移酶的各種各樣的試劑。示范性組蛋白H3H2轉移酶抑制劑包含，但不限於，BIX 01294、3-deazaneplanocin A (DZNcP) HCl、A 366、UNC0638和ISGC 0946。在一些實施方式中，組蛋白H3H2轉移酶抑制劑選自BIX 01294、3-deazaneplanocin A (DZNcP) HCl、A 366、UNC0638和ISGC 0946。

[(0174)] 6. Src激酶抑制劑

【0175】 Src激酶抑制劑可以是能夠抑制Src的各種各樣的試劑。示例性Src激酶抑制劑包含，但不限於，Dasatinib（BMS-354825）、WH-4-023、Ponatinib（AP24534）、Bosutinib（SKI-606）。在一些實施方式中，Src激酶抑制劑選自Dasatinib（BMS-354825）、WH-4-023、Ponatinib（AP24534）、Bosutinib（SKI-606）。

【0176】 7. cAMP啟動劑

【0177】 cAMP啟動劑可以是能夠啟動cAMP的各種各樣的試劑。示例性cAMP啟動劑包含，但不限於，olforsin（Forskolin、HL 362）和8-Br-cAMP。在一些實施方式中，cAMP啟動劑選自Colforsin（Forskolin、HL 362）和8-Br-cAMP。

【0178】 8. 細胞代謝調節劑

【0179】 細胞代謝調節劑可以是能夠調節細胞代謝的各種各樣的試劑。示例性細胞代謝調節劑包含，但不限於，2-Deoxy-D-glucose（2-DG）、乙酸鈉、L-乳酸鈉和D-核糖。在一些實施方式中，細胞代謝調節劑選自2-Deoxy-D-glucose（2-DG）、乙酸鈉、L-乳酸鈉和D-核糖。

【0180】 9. 組分的量

【0181】 本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中的小分子再程式化試劑的量可以發生變化，可以根據具體培養條件進行最佳化，包含所用具體分子和組合、在培養基中培養的細胞的類型，以及具體應用。在一個實施方式中，小分子再程式化試劑以足以誘導全能性、改善再程式化效率、增加或維持細胞的潛能、或者誘導或維持基態全能性的濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。

【0182】 在一些實施方式中，RA訊號通路啟動劑以足以單獨或與其他小分子再程式化試劑組合誘導全能性的量或濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。在一些實施方式中，RA訊號通路啟動劑以0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、

2.6、2.8、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、8.2、8.4、8.6、8.8、9.0、9.2、9.4、9.6、9.8、10.0 μM 或更高或前述數值中的任意兩者組成的範圍的濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。較佳地，RA訊號通路啟動劑以0.05-5 μM ，較佳0.1-1 μM ，更佳0.2 μM 的濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。最較佳地，在一個實施方式中，TTNPB以0.2 μM 的濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。

【0183】 在一些實施方式中，GSK-3抑制劑以足以單獨或與其他小分子再程式化試劑組合誘導全能性的量或濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。在一些實施方式中，GSK-3抑制劑以0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、8.2、8.4、8.6、8.8、9.0、9.2、9.4、9.6、9.8、10.0 μM 或更高或前述數值中的任意兩者組成的範圍的濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。較佳地，GSK-3抑制劑以0.5-10.0 μM ，較佳2.0-3.0 μM ，更佳2.5 μM 的濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。最較佳地，在一個實施方式中，1-Azakenpaullone以2.5 μM 的濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。

【0184】 在一些實施方式中，IKK訊號通路抑制劑以足以單獨或與其他小分子再程式化試劑組合誘導全能性的量或濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。在一些實施方式中，IKK訊號通路抑制劑以0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、8.2、8.4、8.6、

8.8、9.0、9.2、9.4、9.6、9.8、10.0 μM 或更高或前述數值中的任意兩者組成的範圍的濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。較佳地，IKK訊號通路抑制劑以0.1-10.0 μM ，較佳0.3-1 μM ，更佳0.5 μM 的濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。最較佳地，在一個實施方式中，WS6以0.5 μM 的濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。

【0185】 在一些實施方式中，HDAC抑制劑以足以單獨或與其他小分子再程式化試劑組合誘導全能性的量或濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。在一些實施方式中，HDAC抑制劑以0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、8.2、8.4、8.6、8.8、9.0、9.2、9.4、9.6、9.8、10.0 μM 或更高或前述數值中的任意兩者組成的範圍的濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。

【0186】 在一些實施方式中，組蛋白甲基轉移酶抑制劑以足以單獨或與其他小分子再程式化試劑組合誘導全能性的量或濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。在一些實施方式中，組蛋白甲基轉移酶抑制劑以0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、8.2、8.4、8.6、8.8、9.0、9.2、9.4、9.6、9.8、10.0 μM 或更高或前述數值中的任意兩者組成的範圍的濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。

【0187】 在一些實施方式中，Src激酶抑制劑以足以單獨或與其他小分子再程式化試劑組合誘導全能性的量或濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。在一些實施方式中，Src激酶抑制劑以0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、

0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、8.2、8.4、8.6、8.8、9.0、9.2、9.4、9.6、9.8、10.0 μM 或更高或前述數值中的任意兩者組成的範圍的濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。

【0188】 在一些實施方式中，cAMP啟動劑以足以單獨或與其他小分子再程式化試劑組合誘導全能性的量或濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。在一些實施方式中，cAMP啟動劑以0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、8.2、8.4、8.6、8.8、9.0、9.2、9.4、9.6、9.8、10.0 μM 或更高或前述數值中的任意兩者組成的範圍的濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。

【0189】 在一些實施方式中，細胞代謝調節劑以足以單獨或與其他小分子再程式化試劑組合誘導全能性的量或濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。在一些實施方式中，細胞代謝調節劑以0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、8.2、8.4、8.6、8.8、9.0、9.2、9.4、9.6、9.8、10.0 μM 或更高或前述數值中的任意兩者組成的範圍的濃度存在於本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中。

【0190】 在特定實施方式中，在本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中的小分子再程式化試劑的較佳組合在表1中列出。

【0191】 表1. 本發明的組合物、試劑盒、培養基或培養物中的小分子再程式化試劑的較佳組合

1#	TTNPB
2#	TTNPB、TSA、BIX01294
3#	TTNPB、VPA、A366
4#	TTNPB、TSA、BIX01294、Dasatinib
5#	TTNPB、VPA、A366、Dasatinib
6#	TTNPB、TSA、BIX01294、Dasatinib、AZD2858
7#	TTNPB、Dasatinib、AZD2858
8#	TTNPB、WS6、1-Azakenpaullone
9#	AZD2858、Forskolin、PGE2
10#	1-Azakenpaullone、WS6、WH4-023、Forskolin、PGE2
11#	TTNPB、Dasatinib、AZD2858、JQ-1、CH5138303
12#	BMP6、Metformin、AZD1080、PGE2、WH4-023
13#	TTNPB、WS6、1-Azakenpaullone、TGFb-2
14#	TTNPB、WS6、1-Azakenpaullone、Metformin
15#	TTNPB、WS6、1-Azakenpaullone、Forskolin、PGE2
16#	TTNPB、WS6、1-Azakenpaullone、PS48
17#	TTNPB、WS6、1-Azakenpaullone、IndolactamV
18#	TTNPB、Dasatinib、AZD2858、bpv
19#	TTNPB、WS6、1-Azakenpaullone、Dasatinib、AZD2858
20#	TTNPB、WS6、1-Azakenpaullone、PBS
21#	TTNPB、WS6、1-Azakenpaullone、Quercetin
22#	TTNPB、WS6、1-Azakenpaullone、2-DG
23#	TTNPB、WS6、1-Azakenpaullone、DMOG

【0192】較佳地，在一個實施方式中，根據本發明的組合物、試劑盒或用途包含或更佳由以下組成：RA訊號通路啟動劑、GSK-3抑制劑和IKK訊號通路抑制劑。

【0193】更佳地，在一個實施方式中，RA訊號通路啟動劑是TTNPB，GSK-3抑制劑是1-Azakenpaullone，且IKK訊號通路抑制劑是WS6。

【0194】最較佳地，在一個實施方式中，RA訊號通路啟動劑是0.2 μ M TTNPB，GSK-3抑制劑是2.5 μ M 1-Azakenpaullone，且IKK訊號通路抑制劑是0.5 μ M WS6。

【0195】 E. 培養基

【0196】在一個方面，本發明提供了一種培養基，其包含本文所述的組合物。所述組合物包含：(a) RA訊號通路啟動劑；和(b)以下中的一種或多種：GSK-3抑制劑、IKK訊號通路抑制劑、HDAC抑制劑、組蛋白甲基轉移酶抑制劑、Src激酶抑制劑、cAMP啟動劑、和細胞代謝調節劑。

【0197】在一些實施方式中，本發明的培養基包含基礎培養基。示例性基礎培養基包含，但不限於，DMEM、Knockout DMEM、RPMI 1640和DMEM/F12。在一些實施方式中，所述基礎培養基選自DMEM、Knockout DMEM、RPMI 1640和DMEM/F12。

【0198】在特定實施方式中，本發明的培養基含有細胞因子和/或生長因子。在特定實施方式中，本發明的培養基實質上不含或不含細胞因子和/或生長因子。在某些實施方式中，培養基含有一種或多種補充物，包含但不限於血清、提取物、生長因子、激素、細胞因子等等。

【0199】在一個示意性實施方式中，培養基包含以下細胞因子或生長因子中的一種或多種：表皮生長因子(EGF)、酸性成纖維細胞生長因子(aFGF)、鹼性成纖維細胞生長因子(bFGF)、白血病抑制因子(LIF)、肝細胞生長因子

(HGF)、胰島素樣生長因子-1 (IGF-1)、胰島素樣生長因子2 (IGF-2)、角化細胞生長因子 (KGF)、神經生長因子 (NGF)、血小板衍生的生長因子 (PDGF)、轉化生長因子 β (TGF- β)、血管內皮細胞生長因子 (VEGF)、轉鐵蛋白、各種白介素 (如IL-1至E-18)、各種集落刺激因子 (如粒細胞/巨噬細胞集落刺激因子 (GM-CSF))、各種干擾素 (如IFN- γ) 以及對幹細胞具有作用的其他細胞因子例如幹細胞因子 (SCF) 和促紅細胞生成素 (Epo)。這些細胞因子可在商業上得自例如R&D Systems Minneapolis, Minn, 並且可以是天然的或重組的。在特定實施方式中, 生長因子和細胞因子可以以本文設想用於小分子再程式化試劑的濃度添加。

【0200】 任何合適的容器或細胞培養容器均可用作基礎培養基和/或細胞培養補充物中的細胞培養的支持物。在支持物上的基質塗層不是必要的。然而, 用貼壁促進基質 (例如膠原、纖維蛋白、含RGD多肽、明膠等等) 塗布培養容器的表面促進細胞的附著, 並且在特定實施方式中, 可增強本文公開的培養基和補充物的效應。用於培養和繼代細胞的合適基質是本領域已知的, 並且包含但不限於玻璃蛋白、明膠、層粘連蛋白、纖維蛋白、膠原、彈性蛋白、骨橋蛋白、天然存在的細胞系生產的基質的混合物例如Matrigel™以及合成或人造表面例如聚胺單層和羧基封端單層。

【0201】 F. 細胞製造方法

【0202】 在一個方面, 本發明提供了一種製造誘導全能性幹細胞的方法, 所述方法包含在本文所述的培養基中培養細胞, 由此製造所述誘導全能性幹細胞。在一些實施方式中, 所述培養基包含本文所述的組合物。在一些實施方式中, 所述組合物包含: (a) RA訊號通路啟動劑; 和 (b) 以下中的一種或多種: GSK-3抑制劑、IKK訊號通路抑制劑、HDAC抑制劑、組蛋白甲基轉移酶抑制劑、Src激酶抑制劑、cAMP啟動劑、和細胞代謝調節劑。

【0203】 用作本發明的方法的起始材料的細胞可以是如本文所述的各種各樣的細胞。例如，本發明的方法可以從多能細胞例如多能性幹細胞如誘導全能性幹細胞開始，或者是本發明的方法可以從非多能細胞例如非多能性幹細胞如體細胞開始。

【0204】 在一些實施方式中，本發明的方法包含在本文所述的培養基中培養多能性幹細胞，由此製造所述誘導全能性幹細胞。

【0205】 在一些實施方式中，所述多能性幹細胞是胚胎幹細胞或誘導多能性幹細胞。

【0206】 在一些實施方式中，本發明的方法包含在本文所述的培養基中培養非多能性幹細胞，由此製造所述誘導全能性幹細胞。

【0207】 在一些實施方式中，所述方法包含將非多能性細胞再程式化為多能性幹細胞。

【0208】 在一些實施方式中，所述非多能性細胞選自體細胞和/或成體幹細胞。

【0209】 在一些實施方式中，所述將非多能性細胞再程式化為多能性幹細胞包含在所述非多能性細胞內表現選自Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc中的一種或多種再程式化因子。

【0210】 在一些實施方式中，所述培養多能性幹細胞進行1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。

【0211】 G. 培養物

【0212】 在一個方面，本發明提供了一種培養物，其包含本文所述的培養基和多能性幹細胞。在一些實施方式中，所述培養基包含本文所述的組合物。在一些實施方式中，所述組合物包含：(a) RA訊號通路啟動劑；和(b) 以下中的

一種或多種：GSK-3抑制劑、IKK訊號通路抑制劑、HDAC抑制劑、組蛋白甲基轉移酶抑制劑、Src激酶抑制劑、cAMP啟動劑、和細胞代謝調節劑。

【0213】 包含在本文所述的培養物中的細胞可以是如本文所述的各種各樣的細胞。例如，所述細胞可能是用於本文所述的培養或誘導的起始細胞，例如多能細胞例如多能性幹細胞如iPSC，或者非多能細胞例如非多能性幹細胞如體細胞開始。或者，所述細胞可以是本文所述的培養或誘導產生的中間細胞或最終細胞。所述中間細胞可以是具有不同於起始細胞和最終細胞的各種各樣發育潛能的細胞。所述最終細胞可以是如本文所述的全能性幹細胞。

【0214】 在一些實施方式中，根據本發明的培養物包含本文所述的培養基和多能性幹細胞。

【0215】 在一些實施方式中，所述多能性幹細胞是胚胎幹細胞或誘導多能性幹細胞。

【0216】 在一些實施方式中，根據本發明的培養物包含本文所述的培養基和全能性幹細胞。

【0217】 在一些實施方式中，所述全能性幹細胞是誘導全能性幹細胞。

【0218】 較佳地，在一些實施方式中，所述全能性幹細胞可透過本文所述的方法製造。

【0219】 H. 全能細胞及其表徵

【0220】 近日，一項刊登在國際雜誌Nature Cell Biology上的研究報告（Posfai, E. et al. Evaluating totipotency using criteria of increasing stringency. Nature Cell Biology 23, 49-60, doi:10.1038/s41556-020-00609-2 (2021).）中，來自瑞典卡洛琳學院等機構的科學家們定義了區分多能幹細胞和全能幹細胞的金標準。

【0221】 該研究指出，自然界中，哺乳動物的全能性細胞僅存在於發育早期的胚胎中。相應的，對於小鼠來說，只有受精卵和二細胞期的卵裂球具有全能

性 (totipotency)，隨著胚胎發育的進行，這種全能性會逐步喪失。對於全能性最為嚴格的定義，是指一個或一種細胞可以發育成一個完整的胚胎或生命個體。對於全能性較為寬泛的定義，是指該細胞具有向胚內和胚外細胞類型雙向發育的潛能。截至目前為止，科學家們已經製造出了具有多能狀態的小鼠幹細胞系，然而這些細胞只能發育成胚內組分的細胞，並不具有向胚外類型的細胞發育的潛能。

【0222】該研究中，研究人員透過聯合研究設定了一種標準來評估細胞是否具有真正的全能性；他們共同確定了小鼠幹細胞系具有全能性的四個標準：1) 這些細胞的轉錄組特性或基因表現譜需要更接近於早期全能性胚胎的細胞而並非發育更晚階段胚胎的細胞；2) 在體外能分化進入胚外細胞譜系，進而分化成胚外的細胞類型；3) 經過體外誘導發育，這些細胞能夠形成類囊胚，且能模擬一些早期胚胎發育事件；4) 把這些細胞注射到小鼠早期胚胎中，這些細胞可以參與胚內、胚外的分化，並且分化為正常表現相應基因標誌物的細胞類型（又稱胚內胚外嵌合）。隨後研究人員測試了兩種此前被報導擁有潛在全能性的小鼠幹細胞系（潛能擴展多能幹細胞：L-EPSC和D-EPSC），並利用這些金標準進行了評估，發現這兩種細胞都不符合全能幹細胞的標準。

【0223】發明人誘導培養的全能性幹細胞表現出1) 和小鼠胚胎受精卵、二細胞期卵裂球類似的轉錄組特徵，在染色質可及性、DNA甲基化水準和細胞代謝方式上都轉變成了與體內全能性細胞相似的水準。2) 體外單層細胞直接分化、懸浮狀態下擬胚體分化及體內畸胎瘤分化實驗證明，發明人誘導培養的全能性幹細胞具有在多能性幹細胞不具備的，向胚外部分細胞分化的能力。體內嵌合實驗同樣有力地證明了發明人誘導培養的全能性幹細胞具有高效的向胚內、胚外組織雙向的發育潛能。3) 更為重要的是，該誘導全能性幹細胞可在體外獨立誘導發育成小鼠囊胚，且正確表現小鼠囊胚標誌性基因。該誘導得到的囊胚在體外

第 37 頁，共 68 頁(發明說明書)

繼續培養可展現胚胎植入後的一系列特徵；該誘導得到的囊胚移植到小鼠體內後也可以植入到子宮繼續發育。因而，該小鼠誘導全能性幹細胞具有不經過傳統的精卵結合的方式，獨立發育成整個完整生命體的潛能。

【0224】 在一個方面，本發明提供了一種誘導全能性幹細胞，其可透過本文所述的方法製造。在一些實施方式中，所述方法包含在本文所述的培養基中培養細胞，由此製造所述誘導全能性幹細胞。在一些實施方式中，所述培養基包含本文所述的組合物。在一些實施方式中，所述組合物包含：(a) RA訊號通路啟動劑；和(b) 以下中的一種或多種：GSK-3抑制劑、IKK訊號通路抑制劑、HDAC抑制劑、組蛋白甲基轉移酶抑制劑、Src激酶抑制劑、cAMP啟動劑、和細胞代謝調節劑。

【0225】 使用本文所述的培養平臺製造的誘導全能性幹細胞可以在各種各樣的方面進行表徵。

【0226】 可以透過RT-qPCR反應，檢測所得誘導全能性幹細胞的經典全能性標誌基因和重複序列（例如，MERVL、Zscan4、ZFP352、Tctst3、Gm6763）的轉錄。與起始細胞如胚胎幹細胞（mESC）相比，根據本發明的誘導全能性幹細胞可以呈現全能性標誌基因和重複序列（例如，MuERVL、Zscan4、ZFP352、Tst3、Gm6763）的高表現，這意味著多能性胚胎幹細胞發生了向全能性幹細胞的細胞命運轉變。在一些實施方式中，誘導全能性幹細胞中的全能性標誌基因和重複序列中的一個或多個的表現水準與起始細胞相比為1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000或更高倍或前述數值中的任意兩者組成的範圍。

【0227】 為了進一步探索誘導全能性幹細胞的分子生物學特徵，還可以利用轉錄組測序（RNA-seq）和單細胞RNA測序（scRNA-seq）來分析起始細胞如胚

胎幹細胞獲得全能性之後轉錄水準的變化。這可以包含分析全能性標誌基因和多能性標誌基因在起始細胞如胚胎幹細胞和誘導全能性幹細胞中的富集情況（GSEA分析）。可以發現全能性標誌基因例如在二細胞期胚胎特異表現可以在根據本發明的誘導全能性幹細胞中顯著富集，而多能性標誌基因在起始細胞如胚胎幹細胞中顯著富集。

【0228】 可以透過集群分析來分析起始細胞如胚胎幹細胞和根據本發明的誘導全能性幹細胞與胚胎發育各個階段的全轉錄組水準的相似性。可以發現根據本發明的誘導全能性幹細胞可以在全轉錄組水準上接近具有全能性的一細胞和二細胞期胚胎，因此在轉錄水準上是全能性狀態。

【0229】 可以透過全轉錄組的主成分分析（PCA），確認根據本發明的誘導全能性幹細胞可以在發育階段方面處於具有全能性的一細胞和二細胞期胚胎之間，而起始細胞如胚胎幹細胞更接近發育更晚階段的囊胚。

【0230】 可以透過分析胚胎發育受精卵、2細胞期、4細胞期、8細胞期、16細胞期的特異表現的基因集在根據本發明的誘導全能性幹細胞相對於起始細胞如胚胎幹細胞的富集情況，受精卵和2細胞期特異表現的全能性標誌基因集可以在根據本發明的誘導全能性幹細胞中顯著富集。

【0231】 可以透過對根據本發明的誘導全能性幹細胞和對照細胞的單細胞RNA測序（scRNA-seq）結果進行UMAP分析，根據本發明的誘導全能性幹細胞可以與具有全能性的2細胞胚胎十分接近，且高表現全能性的標誌基因，低表現多能性的標誌基因，具有全能性轉錄組特徵。

【0232】 為了探索根據本發明的誘導全能性幹細胞的染色質可及性特徵，可以利用染色質可及性測序ATAC-seq（Assay for Transposase- Accessible Chromatin using sequencing）來分析根據本發明的誘導全能性幹細胞。染色質可及性指示基因的啟動或抑制。根據本發明的誘導全能性幹細胞可以顯示在轉錄起始位元點

(TSS)附近5kb的封閉峰和開放峰與2細胞胚胎(2C)時期相似的開放或封閉狀態。此外，與起始細胞如胚胎幹細胞相比，根據本發明的誘導全能性幹細胞中的一些重要的全能性基因和逆轉錄原件附近，如Zscan4c、Zscan4d、Zscan4f、ZFP352、MERVL等，可以展示出更高的開放性，而經典的多能性基因，例如POU5f1、ZFP42、NANOG、KLF4、ESRRB等，可以呈現封閉狀態。這意味著根據本發明的誘導全能性幹細胞可以具有與具有全能性的2細胞期胚胎相似的染色質可及性。

【0233】為了根據本發明的誘導全能性幹細胞的基因組甲基化水準，可使用RRBS，即次代表性亞硫酸鹽定序法(Reduced representation bisulfite sequencing)，來表徵根據本發明的誘導全能性幹細胞的DNA甲基化組。透過對RRBS測序結果進行全甲基化主成分分析，與起始細胞如胚胎幹細胞相比，根據本發明的誘導全能性幹細胞可以在發育階段方面更接近具有全能性的一細胞和二細胞期胚胎。

【0234】多能性幹細胞不具有向胚外細胞分化的能力。為了驗證根據本發明的誘導全能性幹細胞向胚外細胞類型分化的能力，可以以商業化滋養層幹細胞(TSC)作為陽性對照，透過免疫螢光染色檢測滋養外胚層幹細胞特異性蛋白(CDX2)的表現。CDX2是經典的小鼠滋養外胚層幹細胞特異性基因，透過免疫螢光檢測其蛋白水準表現情況，結合多能性幹細胞標誌物Oct4的變化，可以判斷是否發生了向滋養外胚層幹細胞譜系的分化。根據本發明的誘導全能性幹細胞可以被高效誘導成顯著表現CDX2，且Oct4表現下調，因而具有向胚外部分即滋養外胚層幹細胞分化的能力。

【0235】可以採用RT-qPCR分析根據本發明的誘導全能性幹細胞在向滋養外胚層幹細胞誘導過程中的滋養外胚層幹細胞特異性基因的轉錄。根據本發明的誘導全能性幹細胞可以在誘導過程中逐步提高轉錄滋養外胚層幹細胞特異性標記基因，包含但不限於CDX2、Elf5、TFAP2C及Esx1，與作為陽性對照的滋養層幹細胞(TSC)相似。

【0236】 CDX2是經典的小鼠滋養外胚層幹細胞特異性基因。可以透過免疫螢光染色檢測CDX2陽性細胞（代表胚外細胞，指示全能性幹細胞向胚外細胞類型分化），從而確定根據本發明的誘導全能性幹細胞分化為擬胚體的能力。擬胚體分化實驗證明了根據本發明的誘導全能性幹細胞在體外具有多能性幹細胞不具備的，向胚外部分即滋養外胚層幹細胞分化的能力。

【0237】 畸胎瘤實驗是檢驗細胞向胚內三個胚層和胚外譜系隨機分化能力的經典實驗。可以透過在顯微鏡下觀察組織切片結果，尋找三胚層和胚外細胞譜系特異性組織結構，從而確定根據本發明的誘導全能性幹細胞分化為畸胎瘤的能力。畸胎瘤分化實驗證明了根據本發明的誘導全能性幹細胞在體內具有多能性幹細胞不具備的，向胚外部分細胞分化的能力。

【0238】 可以使用嵌合胚胎發育實驗，證明根據本發明的誘導全能性幹細胞具有向胚內和胚外細胞類型兩者分化的發育潛能。可以採用Rosa26-tdTomato小鼠的囊胚建立小鼠誘導全能性幹細胞或小鼠胚胎幹細胞(mESC)的螢光細胞系，用於8細胞期胚胎注射，從而使幹細胞穩定表現tdTomato螢光。如果注射到胚胎的幹細胞隨胚胎一併發育並向胚內或胚外部分分化，則可在相應的胚內或胚外部分觀察到螢光。在誘導全能性幹細胞嵌合胚胎體內發育實驗(例如發育至E4.5)中，根據本發明誘導全能性幹細胞可以嵌合到胚內的內細胞團(ICM)和胚外的滋養外胚層(TE)兩者，如透過tdTomato陽性細胞嵌合情況來確定的。向胚外細胞類型的分化還可以透過tdtomato螢光與CDX2螢光的共定位來進一步確認。在使用根據本發明的誘導全能性幹細胞的嵌合胚胎體內發育實驗(例如發育至E4.5、E7.5和E12.5)中，可以觀察到tdtomato螢光和CDX2螢光的共定位。確認根據本發明的誘導全能性幹細胞可以參與了滋養外胚層(TE)的發育，具有向胚外部分分化的能力。

【0239】對於進一步的嵌合胚胎（例如E7.5）發育，還可以透過對胚胎外胚層（EPI）經典標誌物Oct4、胎盤錐（EPC）和胚外外胚層（ExE）經典標誌物ELF5進行免疫螢光染色來確認根據本發明的誘導全能性幹細胞可以具有向胚外部分分化的能力。根據本發明的誘導全能性幹細胞可以嵌合到胚內胚胎上胚層（EPI）、胚外的胎盤錐（EPC）和胚外外胚層（ExE）。證明在胚胎植入後，根據本發明的誘導全能性幹細胞可以依然具有參與胚胎的胚外組織發育的能力。

【0240】對於更進一步的嵌合胚胎（例如E12.5）發育，還可以透過分析tdTomato陽性細胞的嵌合情況來確認根據本發明的誘導全能性幹細胞可以嵌合到胚胎（Em）、胚外組織胎盤（Pl）和卵黃囊（Yo）。證明在胚胎植入後，根據本發明的誘導全能性幹細胞可以依然具有參與胚胎的胚外組織發育的能力。

【0241】可以採用用於誘導囊胚的培養條件，檢查根據本發明的誘導全能性幹細胞獨立發育成囊胚的能力。從根據本發明的誘導全能性幹細胞誘導產生的囊胚可以與正常囊胚有著高度相似的形態學特徵。如透過免疫螢光染色驗證的，從根據本發明的誘導全能性幹細胞誘導產生的囊胚可以具有體內正常囊胚的三種細胞譜系，證明根據本發明的誘導全能性幹細胞可被高效誘導成結構正確且基因表現正確的囊胚。

【0242】從根據本發明的誘導全能性幹細胞誘導產生的囊胚可以體外進行進一步培養，以產生與著床後胚胎（例如E4.5-E5.5時期）相似的三維結構，包含作為兩個半球被內胚層（染色呈現SOX17陽性）包圍的外胚層（染色呈現TFAP2C陽性）和EPI（染色呈現Oct4陽性）。

【0243】從根據本發明的誘導全能性幹細胞誘導產生的囊胚可以體內植入到子宮進行進一步發育，可以在子宮內植入後觸發蛻膜化反應並繼續生長。

【0244】如前所述，根據本發明的誘導全能性幹細胞可以透過以上特徵中的一種或多種進行表徵。該等表徵可以使用本文所述或者本領域之具備通常知識者熟知的方法進行。

【0245】 I. 應用

【0246】根據本發明的誘導全能性幹細胞可以用於科學研究、產業和臨床上期望的各種各樣的用途。例如，可以從本發明的誘導全能性幹細胞分化產生各種各樣的產物，其可用於例如構建模型、研究靶點、開發代用品，以及其他潛在治療或診斷應用。

【0247】根據本發明的誘導全能性幹細胞可以用於誘導產生生物體。所述生物體可用於構建疾病模型等潛在科學研究、治療和診斷應用。在一個方面，本發明提供了一種生物體，其產生自本文所述的誘導全能性幹細胞。所述生物體可以是真核生物，包含但不限於動物、植物、真菌、和其他本領域已知的真核生物。所述動物可以包含但不限於哺乳動物，例如靈長類動物，如人類，非人類靈長類動物、非靈長類動物、牛科動物、馬科動物、羊科動物、豬科動物、犬科動物、兔科動物、齧齒動物，諸如猴、奶牛、綿羊、豬、狗、兔、大鼠或小鼠。較佳地，在一些實施方式中，所述生物體是齧齒動物或哺乳動物。在一些實施方式中，所述哺乳動物不是人類。

【0248】所述植物可以是單子葉植物或雙子葉植物，也可以是作物或穀物植物，諸如木薯、玉米、高粱、大豆、小麥、燕麥或水稻。植物也可以是藻類、樹木或生產植物、水果或蔬菜(例如，樹木諸如柑橘屬樹，例如橙樹、葡萄柚樹或檸檬樹；桃樹或油桃樹；蘋果樹或梨樹；堅果樹諸如扁桃樹或胡桃樹或開心果樹；茄屬植物；芸苔屬(Brassica)植物；萵苣屬(Lactuca)植物；菠菜屬(Spinacia)植物；辣椒屬(Capsicum)植物；棉花、煙草、蘆筍、胡蘿蔔、捲心菜、西蘭花、花

椰菜、番茄、茄子、胡椒、生菜、菠菜、草莓、藍莓、覆盆子、黑莓、葡萄、咖啡、可可等)。

【0249】 根據本發明的誘導全能性幹細胞可以用於誘導產生類器官 (organoid)。所述類器官可用於構建疾病模型、移植治療或其他潛在科學研究、治療和診斷應用。在一個方面，本發明提供了一種類器官，其產生自本文所述的誘導全能性幹細胞。所述類器官可以是包含但不限於以下的器官的類器官：

【0250】 肌肉骨骼系統，包含人體骨架，如骨骼、腕骨、鎖骨、股骨、腓骨、肱骨、下顎、掌骨、蹠骨、聽小骨、髕骨、指骨、橈骨、顱骨、跗骨、脛骨、尺骨、肋骨、脊椎、骨盆、胸骨、軟骨；關節，如纖維性關節、軟骨性關節、滑液關節；肌肉系統，如肌肉、腱、橫膈膜；

【0251】 循環系統，包含心血管系統，如周邊血液供應（動脈、靜脈、淋巴管）、心臟；淋巴系統，主要（骨髓、胸腺）、次要（脾臟、淋巴結）、膠淋巴系統；

【0252】 神經系統，包含腦，如後腦（延髓、橋腦、小腦）、中腦、前腦（間腦（視網膜、視神經）大腦、邊緣系統）、脊髓、神經、感覺系統（耳、眼）；

【0253】 表皮系統，包含皮膚、皮下組織、乳房（乳腺）；

【0254】 免疫系統，包含髓細胞、淋巴細胞；

【0255】 呼吸系統，包含上呼吸道（鼻、咽、喉）、下呼吸道（氣管、支氣管、肺）；

【0256】 消化系統，包含嘴巴（唾腺、舌部）、上消化道（口咽、喉咽、食道、胃）、下消化道（小腸、闌尾、大腸、直腸、肛門）、附屬消化腺（肝臟、膽道、胰臟）；

【0257】 泌尿系統，包含泌尿生殖系統、腎、輸尿管、膀胱、尿道；

【0258】 生殖系統，包含女性生殖系統（子宮、陰道、女陰、卵巢、胎盤），男性生殖系統（陰囊、陰莖、前列腺、睪丸、精囊）；

【0259】 內分泌系統，包含腦下垂體、松果體、甲狀腺、副甲狀腺、腎上腺、胰島。

【0260】 根據本發明的誘導全能性幹細胞可以用於誘導產生組織(tissue)。所述組織可用於構建疾病模型、移植治療或其他潛在科學研究、治療和診斷應用。在一個方面，本發明提供了一種組織，其產生自本文所述的誘導全能性幹細胞。所述組織包含但不限於動物組織和植物組織。所述動物組織包含但不限於上皮組織、肌肉組織、神經組織和結締組織。所述結締組織包含但不限於固有結締組織，包含疏鬆結締組織（蜂窩組織）、緻密結締組織、脂肪組織，網狀結締組織、彈性結締組織；骨或軟骨組織；血液；和淋巴。血液為迴圈流動在心血管系統內的液態組織。血液由血漿和多種血細胞和組成。淋巴則為流動在淋巴管內的液體，由組織液流入淋巴形成。淋巴最終匯入靜脈。淋巴中含有淋巴細胞，在不同的生理情況下，淋巴的組成也不同。較佳地，在一些實施方式中，所述組織是血液。

【0261】 根據本發明的誘導全能性幹細胞可以用於誘導產生分化細胞（differentiated cell）。所述分化細胞可用於構建疾病模型、移植治療或其他潛在科學研究、治療和診斷應用。在一個方面，本發明提供了一種分化細胞，其分化自本文所述的誘導全能性幹細胞。所述分化細胞可以是前文所述的任何器官或組織的細胞。較佳地，在一些實施方式中，所述細胞是免疫細胞，更佳T細胞或NK細胞。較佳地，在一些實施方式中，所述細胞是神經細胞，更佳神經元或神經膠質細胞。較佳地，在一些實施方式中，所述細胞是血液細胞，更佳紅細胞或白細胞。

【0262】 本說明書中引用的所有公開檔、專利申請和授權專利以引用的方式併入本文，如同每個個體公開檔、專利申請或授權專利特別且各自指出以引用的方式併入。

【0263】 儘管本發明已透過舉例說明和例子略微詳細地進行描述用於明確理解的目的，但對於本領域之具備通常知識者顯而易見的是，根據本發明的教導，可對其作出某些改變和修飾，而不背離所附申請專利範圍的精神或範圍。提供下述實施例僅作為例子而不是限制。本領域之具備通常知識者容易認識到可改變或修飾各種非關鍵參數以獲得實質上相似的結果。

【0264】 實施例

【0265】 實施例1：小鼠誘導全能性幹細胞的誘導及初步鑒定

【0266】 發明人令人驚奇地發現，小鼠多能性幹細胞經過小分子再程式化試劑處理後，具有與小鼠受精卵或二細胞期胚胎細胞高度相似性的全能性細胞特徵，這樣的幹細胞被發明人稱為小鼠誘導全能性幹細胞。

【0267】 1.1 小鼠全能性幹細胞的誘導產生

【0268】 當小鼠多能性胚胎幹細胞或小鼠誘導多能性幹細胞（均可透過商業化途徑購買或透過標準化實驗自行建立）在標準培養基中生長至接近70%培養皿密度後，採用0.05%（體積比）胰蛋白酶進行消化以變為懸浮單細胞，並以1:10左右的比例將其繼代（1代即可）接種於全能性幹細胞培養基（在商業化小鼠多能性幹細胞基礎培養基中額外添加小分子再程式化試劑）。

【0269】 此處使用的商業化多能性幹細胞基礎培養基含有：Knockout DMEM基礎培養基，以及5% KSR，1% N2，0.2% 化學成分確定的脂質濃縮物（CDL），1% GlutaMAX™（L-麩醯胺酸替代物），1% 雙抗（青黴素/鏈黴素），1% 非必須胺基酸，0.1mM β -巰基乙醇，50ng/ml Sodium L-ascorbyl-2-phosphate以及1000U/mL小鼠白血病抑制因子（mLIF）(Yang, Y. et al. Derivation of pluripotent

stem cells with in vivo embryonic and extraembryonic potency. Cell 169, 243-257. e225 (2017).)。

【0270】發明人測試了各種小分子再程式化試劑的組合以確定其對全能性幹細胞的誘導的影響。各種小分子再程式化試劑如本文具體實施方式部分所述。測試的一些組合在表1中列出。發明人測試了所述組合的多個方面的性能，包含全能性幹細胞的誘導比例即圖示2C:tdTomato細胞比例，如圖9.2所示。還對其中的一些小分子再程式化試劑進行了單獨替換並測試性能，如圖9.4所示。需要注意的是，全能性幹細胞的誘導比例不是評價組合優劣的唯一要素。在評價多個方面的性能後，發明人選擇最優組合即3個小分子化合物TTNPB、1-Azakenpallone和WS6的組合用於其他實驗。向前述商業化多能性幹細胞基礎培養基中添加2.5 μ M 1-Azakenpallone、0.5 μ M WS6和0.2 μ M TTNPB，以獲得下文所用的全能性幹細胞培養基。

【0271】發明人還測試了各種基礎培養基（包含DEME、Knockout DMEM、RPMI 1640和DMEM/F12）以確定其類型是否對全能性幹細胞的誘導產生影響。如圖9.3所示，在2C::td（2C:tdTomato）和OCT4螢光測定中，未見有明顯差異。可見基礎培養基的類型對於本文所述的全能性幹細胞的誘導沒有實質性影響。在其他實驗中，使用Knockout DMEM。

【0272】在接種於該全能性幹細胞培養基中約兩天後，小鼠多能性胚胎幹細胞逐漸獲得小鼠全能性幹細胞特性，該特性在下文中表徵。待小鼠全能性幹細胞生長密度接近70%後，採用0.05%胰蛋白酶進行消化，並以1:3-1:5的比率進行繼代培養。所得小鼠全能性幹細胞中的多能性基因標誌物Oct4表現下調，且該小鼠全能性幹細胞可維持繼代培養10代以上而不喪失其全能性，並維持較好的克隆形態（圖1.1）。

【0273】 為了研究全能性幹細胞 (ciTotiSC) 誘導是否需要Dux和p53，發明人敲除了mESC中的Dux或p53。不出所料，Dux的缺失使mESC中MERVL+細胞的比例顯著降低(圖9.1a)，TAW誘導的MERVL+細胞幾乎沒有增加(見下圖b)。在Dux敲除細胞中，TAW始終不能誘導Dux、Zscan4、Zfp352和Tcstv3等全能基因(圖9.1c)。這些結果證明Dux對於MERVL+ ciTotiSCs誘導是必不可少的。在較小的程度上，p53敲除也導致了經TAW處理或未經TAW處理的mESC中MERVL+細胞的百分比降低(圖9.1a和9.1b)。進一步分析顯示，與TAW誘導的WT細胞相比，p53敲除也降低了全能性標記基因MERVL、Dux、Zscan4、Zfp352和Tcstv3的表現(圖9.1d)。這些證據共同表明全能性幹細胞 (ciTotiSC) 的誘導部分依賴於p53。

【0274】 1.2 透過RT-PCR分析小鼠誘導全能性幹細胞的全能性標誌基因的轉錄

【0275】 1) 使用iQTM SYBR Green Supermix進行RT-qPCR反應，檢測所得小鼠誘導全能性幹細胞的經典全能性標誌基因和重複序列 (MERVL、Zscan4、ZFP352、Tcstv3、Gm6763) 的轉錄。RT-qPCR反應在Bio-Rad CFX384 Real-Time PCR System中進行。資料結果在Prism 8軟體中進行分析和圖表製作。

【0276】 2) qPCR反應體系

成分	體積 (μl)
iQTM SYBR® Green supermix (2x)	5
正向引子 (10pmol)	1
反向引子 (10pmol)	1
cDNA模版	0.5
去離子水	2.5
總體積	10

【0277】 3) qPCR引子序列：

第 48 頁，共 68 頁(發明說明書)

MuERVL 正向引子	ATCTCCTGGCACCTGGTATG
MuERVL 反向引子	AGAAGAAGGCATTTGCCAGA
Zscan4 正向引子	GAGATTCATGGAGAGTCTGACTGATGAGTG
Zscan4 反向引子	GCTGTTGTTTCAAAGCTTGATGACTTC
Zfp352 正向引子	AAGGTCCCACATCTGAAGAA
Zfp352 反向引子	GGGTATGAGGATTCACCCA
Tcstv3 正向引子	ACCAGCTGAAACATCCATCC
Tcstv3 反向引子	CCATGGATCCCTGAAGGTAA
Gm6763 正向引子	CTGGTGGGAAGCTCTTCTTG
Gm6763 反向引子	TCAACGTTCCAAATTCAGCA
GAPDH 正向引子	CATGGCCTTCCGTGTTCTTA
GAPDH 反向引子	GCCTGCTTCACCACCTTCTT

【0278】 4) qPCR反應程式

步驟	溫度	時間/迴圈	迴圈數
DNA 聚合酶 啟動與模版 變性	95°C	3 分鐘	1
變性	95°C	10 秒	40
退火/延伸	60°C	30 秒	
溶解曲線分析	55-95°C，每個迴圈增加 0.5°C，每個步驟 5 秒		

【0279】 RT-qPCR分析結果顯示，與作為起始細胞的小鼠多能性胚胎幹細胞（mESC）相比，小鼠誘導全能性幹細胞呈現全能性標誌基因和重複序列

(MuERVL、Zscan4、ZFP352、Tstv3、Gm6763)的顯著性高表現，這意味著小鼠多能性胚胎幹細胞發生了向小鼠全能性幹細胞的細胞命運轉變(圖1.2)。

【0280】 實施例2：小鼠誘導全能性幹細胞的分子生物學鑒定：透過RNA-seq和scRNA-seq分析小鼠誘導全能性幹細胞的轉錄組特性

【0281】 為了進一步探索小鼠誘導全能性幹細胞的分子生物學特徵，發明人利用轉錄組測序(RNA-seq)和單細胞RNA測序(scRNA-seq)來分析小鼠多能性胚胎幹細胞獲得全能性之後轉錄組水準的變化。

【0282】 透過分析小鼠二細胞胚胎期特異性表現的266個全能性標誌基因，以及47個小鼠多能性標誌基因，在小鼠多能性胚胎幹細胞(mESC)和小鼠誘導全能性幹細胞中的富集情況(GSEA分析)，發明人發現這些二細胞胚胎期特異表現的全能性標誌基因在小鼠誘導全能性幹細胞中顯著富集(圖2.1，上左圖)，而小鼠多能性標誌基因在小鼠多能性胚胎幹細胞中顯著富集(圖2.1，上右圖)。利用轉錄組測序(RNA-seq)分析發現，小鼠全能幹細胞母源基因、ZGA基因和全能基因高表現，證實該細胞處於全能性狀態(圖2.1，下圖)。

【0283】 透過集群分析小鼠多能性胚胎幹細胞，小鼠誘導全能性幹細胞及小鼠胚胎發育各個階段的全基因轉錄組水準，發明人發現小鼠多能性胚胎幹細胞在全基因轉錄組水準上更接近於具有多能性的小鼠3.5天(E3.5)胚胎期內細胞團(ICM)，因此在轉錄水準上呈現多能性狀態；而小鼠誘導全能性幹細胞在全基因轉錄組水準上更接近於具有全能性的小鼠1-細胞和2-細胞期胚胎，因此在轉錄水準上呈現全能性狀態(圖2.2)。

【0284】 透過全基因轉錄組的主成分分析(PCA)，發明人進一步確認小鼠誘導全能性幹細胞處於具有全能性的小鼠1-細胞和2-細胞期胚胎之間，而小鼠多能性胚胎幹細胞(mESC)和小鼠擴展潛能幹細胞(EPS)則更接近於發育更晚階段的小鼠囊胚(圖2.3)。

【0285】 透過分析小鼠早期胚胎發育的受精卵、2-細胞期、4-細胞期、8-細胞期及16-細胞期特異表現的基因集，分別在小鼠誘導全能性幹細胞相對於小鼠多能性胚胎幹細胞的富集情況，發明人更進一步確認受精卵和2-細胞期特異表現的全能性標誌基因集在小鼠誘導全能性幹細胞中顯著富集（圖2.4）。

【0286】 透過對小鼠誘導全能性幹細胞、全能性卵裂球樣細胞(TBLC, Shen, H. et al. Mouse totipotent stem cells captured and maintained through spliceosomal repression. Cell, doi:10.1016/j.cell.2021.04.020 (2021).)、以及正常小鼠各個階段胚胎（Deng, Q., Ramskold, D., Reinius, B. & Sandberg, R. Single-cell RNA-seq reveals dynamic, random monoallelic gene expression in mammalian cells. Science 343, 193 – 196 (2014).）的單細胞RNA測序（scRNA-seq）結果進行UMAP分析發現，小鼠誘導全能性幹細胞與小鼠體內具有全能性的2-細胞胚胎十分接近（圖2.5所示的TPSC與Late 2C），且高表現全能性的標誌基因，低表現多能性的標誌基因，具有全能性轉錄組特徵；而全能性卵裂球樣細胞（TBLC, Shen, H. et al. Mouse totipotent stem cells captured and maintained through spliceosomal repression. Cell, doi:10.1016/j.cell.2021.04.020 (2021).）並不接近於具有全能性的小鼠受精卵和2-細胞胚胎，反而與發育更晚階段的植入後E4.5-E5.5天的胚胎更為接近（圖2.5所示的TBLC與E4.5、E5.5），且全能性的標誌基因沒有被顯著啟動，多能性的標誌基因沒有被有效抑制，因此並不能被認為是全能性細胞（圖2.5）。

【0287】 2.2 透過ATAC-seq分析小鼠誘導全能性幹細胞的染色質可及性

【0288】 為了探索小鼠誘導全能性幹細胞的染色質可及性特徵（染色質可及性指示基因的啟動或抑制）。發明人利用染色質可及性測序ATAC-seq（Assay for Transposase- Accessible Chromatin using sequencing）來分析小鼠誘導全能性幹細胞、小鼠多能性胚胎幹細胞及小鼠2-細胞期胚胎、小鼠囊胚期內細胞團的染色質可及性。

【0289】 分析結果顯示，與小鼠多能性胚胎幹細胞相比，小鼠誘導全能性幹細胞在轉錄起始位點(TSS)附近5kb的封閉峰和開放峰與小鼠2-細胞胚胎(2C)時期具有相似的開放或封閉狀態；而小鼠多能性胚胎幹細胞(mESC)則與小鼠囊胚期內細胞團(ICM)更為相似(圖2.6)。此外，與小鼠多能性胚胎幹細胞相比，小鼠誘導全能性幹細胞中的一些重要的全能性基因和逆轉錄元件附近，如Zscan4c、Zscan4d、Zscan4f、ZFP352、MERVL等，呈現出更高的開放性；而經典的多能性基因，例如POU5f1、ZFP42、NANOG、KLF4、ESRRB等則呈現封閉狀態(圖2.7)。

【0290】 這些結果表明小鼠誘導全能性幹細胞具有與小鼠體內全能性的2-細胞胚胎期相似的染色質可及性。

【0291】 2.3 透過RRBS分析小鼠誘導全能性幹細胞的基因組甲基化水準

【0292】 為了檢測小鼠誘導全能性幹細胞的基因組甲基化水準，發明人利用RRBS(次代表性亞硫酸鹽定序法(Reduced representation bisulfite sequencing))，來表徵小鼠誘導全能性幹細胞和小鼠多能性胚胎幹細胞的基因組甲基化水準。

【0293】 發明人發現小鼠多能性胚胎幹細胞的整體甲基化水準為23.9%，接近小鼠胚胎植入後的E6.5-E7.5時期(整體甲基化程度分別為23.2%、26.6%)；而小鼠誘導全能性幹細胞的甲基化水準則大幅降低至12.1%，類似於小鼠胚胎植入前的受精卵、2細胞和4細胞期(整體甲基化程度分別為15.4%、13.2和14.8%)(圖2.8)。

【0294】 透過對RRBS測序結果進行全基因組甲基化主成分(PCA)分析，與小鼠多能性胚胎幹細胞相比，發明人再次確認了小鼠誘導全能性幹細胞在發育階段方面更接近於小鼠具有全能性的1-細胞和2-細胞期胚胎(圖2.9)。

【0295】 透過進一步分析基因組中特定位點附近的甲基化水準，結果發現一些全能性的重複序列、Zscan4基因家族附近和X染色體上，小鼠誘導全能性幹

細胞和小鼠全能性的胚胎都處於低甲基化狀態，而小鼠多能性胚胎幹細胞和小鼠植入後E6.5-E7.5時期胚胎中均未發現甲基化的降低（圖2.10）。

【0296】 由於全能狀態的細胞具有獨特的代謝特徵，因此除了對轉錄組和表觀基因組的分析外，發明人下一步測定了全能性幹細胞（ciTotiSC）的代謝組。發明人發現，全能性幹細胞（ciTotiSC）和mESC之間的最高差異顯示的代謝物與全能性2C胚胎和囊胚之間的代謝物非常相似(圖2.11上)。進一步的分析表明，全能性幹細胞（ciTotiSC）和2C胚胎更傾向於利用單碳代謝和與還原狀態相關的途徑進行代謝，而多能的mESC和囊胚具有更高水準的嘌呤代謝和線粒體三羧酸(TCA)迴圈代謝產物，展示出更高的氧化狀態(圖2.11下)。

【0297】 實施例3：小鼠誘導全能性幹細胞體外向滋養層細胞分化能力的分析

【0298】 小鼠多能性幹細胞不具備滋養層細胞分化的能力。圖3.1顯示小鼠誘導全能性幹細胞、多能性胚胎幹細胞（mESC，Ying, Q. L. et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. Nature 453, 519-523, doi:10.1038/nature06968 (2008).）和潛能擴展多能性幹細胞（mEPS，Yang, Y. et al. Derivation of pluripotent stem cells with in vivo embryonic and extraembryonic potency. Cell 169, 243-257. e225 (2017).）在滋養外胚層幹細胞（TSC）培養基中向滋養層幹細胞分化的實驗示意圖。

【0299】 本實驗驗證了本發明的小鼠誘導全能性幹細胞具有多能性幹細胞所不具備的，向胚外部分即滋養層幹細胞分化的能力。

【0300】 使用0.05%的胰酶消化在飼養層細胞（小鼠胚胎成纖維細胞，被廣泛應用於幹細胞培養）上培養的小鼠誘導全能性幹細胞、胚胎幹細胞（mESC）和潛能擴展多能性幹細胞（mEPS），將消化後的細胞鋪於0.3%明膠覆蓋的細胞

培養板上，半小時後收取懸浮細胞，使飼養層細胞貼壁於細胞培養板從而將飼養層細胞去除。

【0301】 將去除飼養層細胞的小鼠誘導全能性幹細胞、胚胎幹細胞(mESC)和潛能擴展多能性幹細胞(mEPS)以 1×10^5 個細胞每12孔板一個孔的密度分別接種於小鼠滋養層幹細胞培養基(下文詳述)中。該培養基每天更換一次。在第0、4、8天收取細胞進行RT-qPCR以檢測小鼠滋養層幹細胞特異性基因的轉錄(CDX2、Elf5、Tfap2c、Esx1;圖3.2)，以商業化滋養層幹細胞(TSC)作為陽性對照。在第12天進行免疫螢光染色以檢測小鼠滋養外胚層幹細胞特異性蛋白(CDX2)的表現(圖3.3)。

【0302】 小鼠滋養層幹細胞(TSC)的培養基(Posfai, E. et al. Evaluating totipotency using criteria of increasing stringency. Nature Cell Biology 23, 49-60, doi:10.1038/s41556-020-00609-2 (2021).): RPMI 1640基礎培養基(Gibco, C11875500BT), 20%胎牛血清, 1X GlutaMAX (L-麩醯胺酸替代物), 1% 雙抗(青黴素/鏈黴素), 1% 非必須胺基酸, 1X 丙酮酸鈉(Gibco, 11360070), 1mM β -巰基乙醇, 25ng/ml FGF4 (R&D systems, 235-F4)和1 μ g/ml肝素(Sigma-Aldrich, H3149)。

【0303】 3.1 透過免疫螢光染色分析小鼠滋養層幹細胞特異性蛋白CDX2表現

【0304】 CDX2是經典的小鼠滋養層幹細胞特異性基因，透過免疫螢光檢測其蛋白水準表現情況，並結合小鼠多能性幹細胞的標誌物Oct4的變化，判斷是否發生了向小鼠滋養層幹細胞譜系的分化。

【0305】 透過該實驗(圖3.3)，發明人發現小鼠誘導全能性幹細胞經誘導分化後可顯著表現CDX2，且下調Oct4表現，因而其具有向胚外部分即滋養層幹細胞分化的能力；而胚胎幹細胞(mESC)和潛能擴展多能性幹細胞(mEPS)雖

然在誘導分化後也可發生Oct4基因表現下調，但幾乎不表現CDX2，因而不具備向胚外部分即滋養層幹細胞分化的能力。

【0306】發明人還發現不同代數的(P1-P8)全能性幹細胞(ciTotiSC)在換入mESC培養基(2i/LIF)後都可以逐漸分化為多能胚胎幹細胞(rESC^{ciTotiSC})，體現在全能性基因的下調和多能性基因的上調，從而模擬正常的胚胎發育過程(圖3.4)。

【0307】免疫螢光染色步驟：

【0308】固定：用磷酸鹽緩衝溶液(DPBS)清洗細胞培養板中的樣品後，用4%多聚甲醛溶液固定細胞，於4°C靜置30分鐘，DPBS清洗4次；

【0309】封閉：加入封閉液(10%驢血清+1%BSA+0.3%Triton-X100，稀釋於DPBS中)室溫封閉1小時，DPBS清洗3次；

【0310】一抗孵育：一抗為mouse anti-CDX2(1:150, BioGenex, MU392A-UC)。抗體用含1%BSA的DPBS按照要求濃度進行稀釋，室溫孵育2小時或4°C孵育過夜，DPBS清洗5分鐘×3次；

【0311】二抗孵育：二抗為Donkey anti Mouse 555(1:500, Life Technology, A-31570)。用含1%BSA的DPBS按1:1000稀釋相應螢光標記二抗，室溫避光孵育1小時；

【0312】核染色：DPBS稀釋DAPI(細胞核染料，4',6-二脒基-2-苯基吡啶二鹽酸鹽)至1μg/ml，室溫孵育5分鐘

【0313】成像：DPBS清洗5分鐘×3次後，放置於Olympus倒置螢光顯微鏡IX83下進行觀察和拍照。

【0314】3.2 透過RT-qPCR分析小鼠滋養層幹細胞特異性基因表現

【0315】採用RT-qPCR分析小鼠誘導全能性幹細胞、胚胎幹細胞(mESC)和潛能擴展多能性幹細胞(mEPS)在第0、4、8天向小鼠滋養層幹細胞誘導過程

中的小鼠滋養層幹細胞特異性基因的轉錄。發明人發現，小鼠誘導全能性幹細胞在誘導分化過程中逐步啟動滋養層幹細胞特異性標記基因，包含CDX2、Elf5、TFAP2C及Esx1，與作為陽性對照的滋養層幹細胞（TSC）相似。相反，胚胎幹細胞（mESC）和潛能擴展多能性幹細胞（mEPS）在誘導過程中，未被檢測到滋養層幹細胞特異性標記基因在轉錄水準上的顯著升高（圖3.2）。

【0316】 實施例4：比較小鼠誘導全能性幹細胞與小鼠胚胎幹細胞（mESC）的體外擬胚體分化和體內畸胎瘤分化的能力

【0317】 4.1 比較小鼠誘導全能性幹細胞與小鼠胚胎幹細胞（mESC）體外的擬胚體分化能力

【0318】 使用0.05%的胰酶消化小鼠誘導全能性幹細胞與小鼠胚胎幹細胞（mESC）後，將其鋪於0.3%明膠覆蓋過的細胞培養板中，半小時後收取懸浮細胞，使飼養層細胞貼壁於細胞培養板從而將飼養層細胞去除。

【0319】 將去除過飼養層細胞的小鼠誘導全能性幹細胞或胚胎幹細胞（mESC）以 1×10^5 個細胞每毫升的密度重新懸浮於小鼠擬胚體形成培養基（Knockout DMEM基礎培養基，其中進一步添加10%胎牛血清（FBS），1% GlutaMAX™（L-麩醯胺酸替代物），1%雙抗（青黴素/鏈黴素），1%非必須胺基酸，0.1mM β -巰基乙醇）中。然後採用懸滴法進行擬胚體形成實驗：在10cm培養盤蓋上進行懸滴，每20ul細胞混合液為一個懸滴，置於5% CO₂、37°C培養箱中進行培養。兩天後，將懸滴的細胞收集後放置於6孔低吸附培養板中繼續培養，並在第0、3、6天收取擬胚體進行免疫螢光染色鑒定。

【0320】 透過免疫螢光染色，發明人發現，在第6天小鼠誘導全能性幹細胞來源的擬胚體中可檢測到CDX2陽性細胞（代表胚外滋養層細胞，指示全能性幹細胞可向胚外細胞類型進行分化），而來自於小鼠胚胎幹細胞（mESC）的擬胚體中未檢測到CDX2陽性細胞（指示多能性幹細胞未向胚外細胞類型分化）（圖

4.1)。透過統計免疫螢光染色結果，發明人發現，在第3和6天所有來自於小鼠誘導全能性幹細胞的擬胚體均檢測到CDX2陽性細胞（在第3天為6/6，在第6天為17/17），而小鼠胚胎幹細胞（mESC）來源的擬胚體中均未檢測到CDX2陽性細胞（在第3天為0/7，在第6天為0/21）（圖4.2）。

【0321】 CDX2是經典的小鼠滋養層幹細胞特異性基因。擬胚體分化實驗證明了小鼠誘導全能性幹細胞在體外具有多能性幹細胞所不具備的，向胚外部分即滋養層幹細胞分化的能力。

【0322】 4.2 比較小鼠誘導全能性幹細胞與小鼠胚胎幹細胞（mESC）的體內畸胎瘤分化能力

【0323】 畸胎瘤實驗是檢驗細胞向胚內三個胚層和胚外譜系隨機分化能力的經典實驗。

【0324】 畸胎瘤分化實驗流程：

【0325】 將在飼養層細胞培養條件下的小鼠誘導全能性幹細胞或小鼠胚胎幹細胞（mESC）用0.05%胰蛋白酶-EDTA消化成單細胞後，分別用小鼠誘導全能性幹細胞或小鼠胚胎幹細胞（mESC）的培養基重新懸浮，將其鋪於0.3%明膠覆蓋過的細胞培養板中，在37°C培養箱中孵育30分鐘，去除飼養層細胞。

【0326】 收集含有小鼠誘導全能性幹細胞或小鼠胚胎幹細胞（mESC）單細胞的上清，用DPBS重新懸浮細胞。

【0327】 將重新懸浮後的細胞注射到免疫缺陷SCID小鼠後腿的腹股溝皮下，每只小鼠注射細胞數約為 1.0×10^6 個。

【0328】 細胞經皮下注射5周後將小鼠脫頸處死，從皮下取出畸胎瘤，用4%多聚甲醛溶液固定，並進行石蠟切片和HE染色。

【0329】 在顯微鏡下觀察組織切片結果，尋找胚內三胚層和胚外細胞譜系特異性組織結構。

【0330】發明人將小鼠誘導全能性幹細胞或小鼠胚胎幹細胞（mESC）注射到免疫缺陷SCID小鼠的皮下，兩株細胞系均能形成畸胎瘤。這些畸胎瘤經石蠟切片和HE染色後，均能夠在顯微鏡下觀察到典型的外胚層（左列）、中胚層（中列）和內胚層（右列）的組織結構。這也就表明小鼠誘導全能性幹細胞與小鼠胚胎幹細胞（mESC）都具備胚內三胚層分化能力（圖4.3）。

【0331】接下來，發明人進一步觀察了小鼠誘導全能性幹細胞或小鼠胚胎幹細胞（mESC）形成的畸胎瘤HE染色切片中是否具有經典的胚外譜系組織結構。經觀察發現，小鼠誘導全能性幹細胞形成的畸胎瘤中，在內出血豐富區域可觀察到經典的胚外譜系—胎盤巨大細胞，這種細胞呈現典型的形態學特徵即具有更大的細胞核和更大細胞體積，且表現胎盤巨大細胞標誌基因PL-1（圖4.4）。而在小鼠胚胎幹細胞（mESC）形成的畸胎瘤中未見胚外譜系的組織結構。

【0332】體內畸胎瘤分化實驗證明了小鼠誘導全能性幹細胞具有多能性幹細胞所不具備的，向胚外細胞分化的能力。

【0333】實施例5：小鼠誘導全能性幹細胞體內嵌合實驗（體外E4.5胚胎期）

【0334】嵌合實驗流程示意圖（圖5.1）

【0335】嵌合實驗步驟：

【0336】利用Rosa26-tdTomato小鼠囊胚建立帶有紅色螢光標記的小鼠誘導全能性幹細胞系及小鼠多能性胚胎幹細胞系（mESC），用於8-細胞期胚胎注射。如果注射進小鼠8-細胞胚胎的幹細胞隨胚胎發育並向胚內或胚外部分進行分化，則可在相應的胚內或胚外部分觀察到紅色螢光（tdTomato）。兩種細胞系分別用0.05%胰蛋白酶-EDTA消化成單細胞後，並用相應的培養基重新懸浮，將其鋪於0.3%明膠覆蓋過的細胞培養板中，在37°C培養箱中孵育30分鐘，去除飼養層細胞。細胞收集後重新懸浮在相應的培養基中。

【0337】 將購買的商業化ICR雌鼠進行超排卵後與商業化ICR雄鼠合籠交配，1.5天后，從交配成功的雌鼠輸卵管中收集8-細胞時期胚胎。向每個8-細胞期胚胎中分別注射5-10個去除飼養層細胞後的小鼠誘導全能性幹細胞或小鼠胚胎幹細胞（mESC），從而獲得嵌合胚胎。

【0338】 對於小鼠誘導全能性幹細胞嵌合胚胎E4.5實驗（實施例5、圖5.2、5.3和5.4），將注射後的8-細胞期胚胎放置於KSOM培養基中，並在5% CO₂、37°C培養箱中培養48小時後，分析tdTomato陽性細胞在內細胞團（ICM）和滋養外胚層（TE）中的嵌合情況。

【0339】 對於小鼠誘導全能性幹細胞嵌合胚胎體內發育至E7.5和E12.5實驗（實施例6-7、圖6-7），將注射後的8-細胞期胚胎放置於KSOM培養基中，並在5% CO₂、37°C培養箱中恢復培養1-2小時，隨後將其移植到與結紮ICR雄鼠交配後0.5天的假孕ICR雌鼠的子宮內進一步進行發育。

【0340】 5.1 早期胚胎發育過程中，具有全能性的受精卵逐步發育為胚內的內細胞團（ICM）和胚外的滋養外胚層（TE）。用於8-細胞注射的小鼠誘導全能性幹細胞與小鼠胚胎幹細胞（mESC）穩定表現紅色螢光（tdTomato）。透過分析tdTomato陽性細胞嵌合情況，發明人觀察到小鼠誘導全能性幹細胞既可嵌合到胚內的內細胞團（ICM），又可嵌合到胚外的滋養外胚層（TE）；而小鼠胚胎幹細胞（mESC）只可嵌合到胚內的內細胞團（ICM），未能嵌合到胚外的滋養外胚層（TE）（圖5.2）。

【0341】 5.2 統計小鼠誘導全能性幹細胞與小鼠胚胎幹細胞（mESC）在內細胞團（ICM）和滋養外胚層（TE）中的嵌合比例（圖5.3）。

【0342】 小鼠誘導全能性幹細胞：同時嵌合到TE和ICM：18/21（85.7%）；只嵌合到TE：2/21（9.5%）；只嵌合到ICM：1/21（4.8%）。即小鼠誘導全能性幹細胞具有胚內（內細胞團）和胚外（滋養外胚層）雙向發育潛能。

【0343】 小鼠胚胎幹細胞（mESC）：同時嵌合到TE和ICM：0/21（0%）；只嵌合到TE：0/21（0%）；只嵌合到ICM：21/21（100%）。即小鼠多能性幹細胞僅具備胚內（內細胞團）發育能力。

【0344】 5.3 CDX2是滋養外胚層（TE）的經典標誌物。發明人透過CDX2的免疫螢光染色進一步確認嵌合到滋養外胚層（TE）中的tdtomato螢光標記的小鼠誘導全能性幹細胞是否可表現滋養外胚層關鍵的標誌物CDX2。染色結果顯示（圖5.4），tdtomato螢光標記的細胞同時可表現CDX2。這也就進一步說明小鼠誘導全能性幹細胞在E4.5天嵌合胚胎中確實參與了滋養外胚層（TE）的發育，即具有向胚外部分分化的能力。

【0345】 實施例6：小鼠誘導全能性幹細胞嵌合胚胎體內發育至E7.5

【0346】 在將上文的小鼠誘導全能性幹細胞或小鼠胚胎幹細胞（mESC）注射8-細胞期胚胎得到的嵌合胚胎移植到假孕小鼠7天后，分離移植後發育至E7.5的胚胎。該時期胚胎（E7.5）包含三個部分：上胚層（epiblast，EPI；胚胎植入後，EPI產生包含三個胚層的胚胎組織）、胎盤錐（EPC）和胚外外胚層（Extraembryonic ectoderm，ExE）。實驗方案參見圖5.1。透過分析tdTomato陽性細胞的嵌合情況，並對胚胎上胚層（EPI）經典標誌物OCT4、胎盤錐（EPC）和胚外外胚層（ExE）經典標誌物ELF5進行免疫螢光染色（圖6.1）。發明人發現小鼠誘導全能性幹細胞幾乎可嵌合到整個E7.5胚胎，其中包含胚內胚胎上胚層（EPI）、胚外的胎盤錐（EPC）和胚外外胚層（ExE）。此外，透過免疫螢光染色進一步發現來源於小鼠誘導全能幹細胞的tdTomato陽性細胞可表現胚胎上胚層標誌物OCT4及胚外（胎盤錐EPC和胚外外胚層EXE）標誌物ELF5。該實驗證明在小鼠胚胎植入後的E7.5天，小鼠誘導全能性幹細胞依然具有參與胚內及胚外組織發育的能力。

【0347】 實施例7：小鼠誘導全能性幹細胞嵌合胚胎體內發育至E12.5

【0348】 在將小鼠誘導全能性幹細胞或小鼠胚胎幹細胞（mESC）注射8細胞期胚胎得到的嵌合胚胎移植到假孕小鼠13天后，分離移植後發育至E12.5-E13.5小鼠的胚胎（Em）、胎盤（Pl）及卵黃囊（Yo）。實驗方案參見圖5.1。透過分析tdTomato陽性細胞的嵌合情況，發明人發現小鼠誘導全能性幹細胞可高比例的嵌合到小鼠胚胎（Em）及胚外組織胎盤（Pl）和卵黃囊（Yo）中（圖7.1）。該實驗證明在小鼠胚胎植入的E12.5-13.5天，小鼠誘導全能性幹細胞依然具有參與胚胎及胚外組織（胎盤和羊膜）發育的能力。

【0349】 為了進一步分析來源於小鼠誘導全能性幹細胞的tdTomato陽性細胞向胚內/外各部分嵌合的比例，發明人分別消化小鼠胚胎（Em）、胚外組織胎盤（Pl）和卵黃囊（Yo）並透過流式細胞術來分析小鼠誘導全能性幹細胞（其為tdTomato陽性細胞）在各組織中的嵌合比例。

【0350】 流式分析步驟：

【0351】 在小鼠胚胎（Em）、胚外組織胎盤（Pl）和卵黃囊（Yo）進行流式分析前，分別用DPBS清洗2遍，並且用顯微操作剪將其剪成大約1mm的小塊。用膠原酶IV（添加1U/ml的DNase）在37°C培養箱中消化小鼠胚胎（Em）細胞30分鐘，再用TrypLE消化5分鐘；用accutase在37°C培養箱中消化胎盤（Pl）細胞10分鐘；用膠原酶IV添加1U/ml的DNase在37°C培養箱中消化卵黃囊（Yo）細胞5分鐘，再用TrypLE消化3分鐘。用3倍酶體積的DPBS+10%胎牛血清終止消化反應。800rpm離心5分鐘後，用DPBS重新懸浮細胞沉澱，用70 μ m細胞篩網過濾細胞，收集單細胞濾液。將細胞濾液轉移至流式分析管中，根據實驗要求在BD FACS Aria III上進行分析或分選。

【0352】 使用FlowJo v10軟體對資料進行分析處理。分析發現，未注射組無法在小鼠胚胎（Em）、胚外組織胎盤（Pl）和卵黃囊（Yo）中檢測到tdTomato陽性細胞的存在，作為陰性對照；小鼠胚胎幹細胞（mESC）注射組僅在小鼠胚胎

(Em) 中可檢測到tdTomato陽性細胞，而胚外組織胎盤 (Pl) 和卵黃囊 (Yo) 中幾乎無法檢測到tdTomato陽性細胞的存在；而對於小鼠誘導全能性幹細胞注射組，在小鼠胚胎 (Em)、胚外組織胎盤 (Pl) 和卵黃囊 (Yo) 中均可檢測到高比例的tdTomato陽性細胞的存在。這也就表明，小鼠誘導全能性幹細胞可高效的向小鼠胚胎 (Em)、胚外組織胎盤 (Pl) 和卵黃囊 (Yo) 嵌合 (圖7.2)。

【0353】 對嵌合胎盤進行冰凍切片後進行免疫組化分析發現，未注射組無法在胎盤中檢測到tdTomato陽性細胞的存在，作為陰性對照；小鼠胚胎幹細胞 (mESC) 注射組僅能在胎盤的Laby區 (該區雖然屬於胚外胎盤的一部分，但存在少量的胚內部分細胞) 觀察到極少的tdTomato陽性細胞，且tdTomato螢光訊號無法與胎盤胚外譜系細胞標誌物CK8和proliferin的螢光訊號共定位；而小鼠誘導全能性幹細胞注射組可在胎盤的胚外部分 (JZ區和Laby區) 均可觀察到高比例的tdTomato陽性細胞，且tdTomato螢光訊號可很好地與胎盤胚外譜系細胞標誌物CK8和proliferin的螢光訊號共定位 (圖7.3)。

【0354】 對嵌合小鼠胚胎部分經冰凍切片後進行免疫組化分析發現，小鼠誘導全能性幹細胞注射組和小鼠胚胎幹細胞 (mESC) 注射組均可高比例的嵌合到胎兒的各個組織 (其中包含腦部，心臟和肝臟)，但小鼠誘導全能性幹細胞注射組有更高的嵌合效率 (圖7.4)。

【0355】 實施例8：小鼠誘導全能性幹細胞獨立發育成小鼠胚胎和生命個體

【0356】 8.1 單個小鼠誘導全能性幹細胞 (ciTotiSC) 具有向胚內外細胞的雙向嵌合能力

【0357】 為了更嚴格地檢測全能性幹細胞 (ciTotiSC) 的發育潛力，發明人將單個tdtomato標記的mESC或ciTotiSC注射到小鼠8細胞胚胎中。體外培養48小時後，嵌合胚胎發育至囊胚晚期(E4.5)。正如預期的那樣，mESC只能嵌合至胚胎ICM。相比之下，全能性幹細胞 (ciTotiSC) 對ICM和TE均有嵌合。透過進一步免

疫染色TE特異性標記CDX2，發明人證實單個全能性幹細胞（ciTotiSC）確實可以發育到胚外的TE譜系，且正確表現該譜系標誌物CDX2（圖8.1上）。此外，發明人將注射單全能性幹細胞（ciTotiSC）或mESC的8細胞胚胎移植到假孕母鼠的輸卵管中，進一步觀察E6.5-E7.5的嵌合體。發明人觀察到單個全能性幹細胞（ciTotiSC）可以嵌合到胚胎內譜系（EPI）和胚外譜系（ExE和EPC），且tdTomato與OCT4或ELF5的共表現證實了這一點。相比之下，mESC僅嵌合至OCT4+ EPI（圖8.1下）。這些資料表明，單個全能性幹細胞（ciTotiSC）具有胚內和胚外譜系的嵌合能力，滿足嚴格的全能性標準。

【0358】 8.2誘導全能性幹細胞（ciTotiSC）可嵌合發育成E13.5胚胎胚內外的多種細胞類型

【0359】 為了充分表徵E13.5前後胚胎外組織中全能性幹細胞（ciTotiSC）發育而來的細胞類型，發明人利用scRNA-seq分析了嵌合胎盤和卵黃囊中來自全能性幹細胞（ciTotiSC）的tdTomato+細胞。透過與胚胎外的譜系的特定基因進行比對後，發明人確認全能性幹細胞（ciTotiSC）來源的細胞可以發育成胚胎外的滋養層和卵黃囊細胞類型，如內臟卵黃囊細胞（Apoa4+ Fxyd2+ Entpd2+），海綿滋養層細胞（Tpbpa+ Rhox9+）和合胞體滋養層細胞（Itm2a+），胚胎起源細胞包含紅細胞、巨噬細胞和單核細胞（圖8.2）。

【0360】 8.3小鼠誘導全能性幹細胞的種系傳遞能力分析

【0361】 全能性幹細胞（ciTotiSC）具有向生殖脊嵌合和產生健康的嵌合體後代的能力（圖8.3）。

【0362】 8.4 小鼠誘導全能性幹細胞在體外獨立發育成誘導小鼠囊胚

【0363】 將在有飼養層細胞條件下培養的小鼠誘導全能性幹細胞用0.05%胰蛋白酶-EDTA消化成單細胞，用實施例1所述的全能性幹細胞培養基重新懸浮，轉移至以0.3%明膠覆蓋過的6孔板上，在37°C培養箱中孵育30分鐘，去除飼養層

細胞。收集小鼠誘導全能性幹細胞，重新懸浮於用於誘導小鼠囊胚的培養基中，以40µm濾器過濾以去掉雜質及未消化完全的細胞團塊。AggreWell 400 (STEMCELL Technologies, 34415) 根據說明書進行預處理。大約6000個小鼠誘導全能性幹細胞種植於6孔板AggreWell 400 (其中包含1200個小室) 的一個孔並放置於誘導小鼠囊胚的培養基中進行培養。將AggreWell 400培養板100 g 離心3分鐘使細胞沉降，而後將培養板置於37°C培養箱中培養4-5天，即可得到誘導小鼠囊胚。發明人觀察發現誘導囊胚與正常囊胚有著高度相似的形態學特徵 (圖8.4)。經統計發現，由小鼠誘導全能性幹細胞得到誘導囊胚的效率大約在70%左右 (圖8.4)。

【0364】 用於誘導小鼠囊胚的培養基 (Li, R. et al. Generation of Blastocyst-like Structures from Mouse Embryonic and Adult Cell Cultures. Cell 179, 687-702 e618, doi:10.1016/j.cell.2019.09.029 (2019)) : 25% 滋養外胚層幹細胞基礎培養基 (RPMI 1640基礎培養基, 添加20%胎牛血清 (FBS), 1X GlutaMAX (L-麩醯胺酸替代物), 1X 丙酮酸鈉 (Gibco, 11360070), 和0.1 mM 2-巰基乙醇), 25% N2B27 基礎培養基 (1:1 mixture of DMEM/F-12 和Neurobasal 1:1混合作為基礎培養基, 添加0.5X N2 (17502-048), 0.5X B27 (17504-044), 1X 非必須胺基酸), 1X GlutaMAX (L-麩醯胺酸替代物), 0.1 mM 2-巰基乙醇, 0.1% BSA或5% KSR), 以及50% KSOM (NaCl (95 mM), KCl (2.5 mM), KH₂PO₄ (0.35 mM), MgSO₄ (0.2 mM), NaHCO₃ (25 mM), CaCl₂ (1.71 mM), Na₂-EDTA (0.01 mM), L-麩醯胺酸 (1.0 mM), 乳酸鈉 (10 mM), 丙酮酸鈉 (0.2 mM), 葡萄糖 (5.56 mM), 必需胺基酸 (EAA; 10.0 mL/l), 非必須胺基酸 (NEAA; 5.0 mL/l), BSA (4 g/l).). 額外添加2 mM Y-27632 (只有第一天加), 12.5 ng/mL rhFGF4 (R&D, 235F4025), 0.5 mg/mL Heparin (Sigma-Aldrich, H3149), 3 mM GSK3抑制劑CHIR99021 (Reagents Direct, 27-H76), 5 ng/mL BMP4 (Proteintech, HZ-1040), 和0.5 mM A83-01.

【0365】 8.5 小鼠誘導全能性幹細胞誘導形成的小鼠囊胚具備小鼠正常囊胚的三種細胞譜系。

【0366】 正常小鼠晚期囊胚(E4.5)主要包含三個細胞譜系:內細胞團(ICM, 特異性表現OCT4), 滋養外胚層(TE, 特異性表現CDX2), 和原始內胚層(PrE, 特異性表現SOX17)。

【0367】 為檢測小鼠誘導全能性幹細胞來源的誘導囊胚是否具有小鼠正常囊胚的三種細胞譜系, 發明人對誘導4天的囊胚進行了免疫螢光染色。染色發現, 誘導囊胚可表現內細胞團標誌物OCT4, 滋養外胚層標誌物CDX2及原始內胚層標誌物SOX17, 並且表現的模式與正常小鼠囊胚一致。經統計發現, 正確表現三種細胞標誌物的誘導囊胚占比約為82% (圖8.5)。

【0368】 因此, 這些結果表明小鼠誘導全能性幹細胞可被高效誘導成具有正確結構和基因表現模式的小鼠囊胚。

【0369】 8.6 小鼠誘導全能性幹細胞來源的誘導囊胚可在體外進行植入後發育

【0370】 發明人採用體外胚胎培養體系對從小鼠誘導全能性幹細胞來源的誘導囊胚進行進一步培養, 發現誘導囊胚經過體外培養可以產生一個圓筒結構。外胚層(染色呈現TFAP2C陽性)和EPI(染色呈現Oct4陽性)作為兩個半球被內胚層(染色呈現SOX17陽性)包圍, 與小鼠E4.5-E5.5時期的著床後胚胎相似(圖8.6)。

【0371】 具體培養方法如下: 採用口吸管將誘導囊胚挑出, 在IVC-1培養基(Cell Guidance Systems, M11)中清洗兩次, 然後轉移至添加了IVC-1培養基的u-Slide 8-孔板(ibidi, 80826)。大約20 - 30枚誘導囊胚置於u-Slide 8-孔板的一個孔。當誘導囊胚貼壁後, 培養基換成IVC-2(Cell Guidance Systems, M12)。大概2-4

天后，植入後胚胎樣結構出現，將其採用4% PFA室溫固定15 min後，進行下一步的免疫螢光染色分析。

【0372】 8.7 從小鼠誘導全能性幹細胞來源的誘導囊胚體內植入到小鼠子宮進行進一步發育

【0373】 目前，公認的標準來驗證囊胚是否真正具有功能：就是將體外獲得的囊胚移植到假孕小鼠子宮中，以觀察其是否可發生著床並進一步發育形成胎兒。為此，發明人將誘導囊胚移植到2.5天的假孕小鼠的子宮中，在7.5 dpc時，誘導囊胚移植的小鼠子宮內可形成蛻膜著床點。誘導囊胚產生的蛻膜的大小參差不齊，但大多與正常小鼠蛻膜相似，有些略小。由於初始的小鼠誘導全能性幹細胞攜帶tdTomato紅色螢光標記，因此，將蛻膜組織進一步剖開發現蛻膜內胚胎結構為tdTomato陽性，證明該結構是由小鼠誘導全能性幹細胞來源的誘導囊胚在子宮內著床並進一步發育形成的（圖8.7）。這些結果證明小鼠誘導全能性幹細胞來源的誘導囊胚可以在子宮內著床觸發蛻膜化反應並進一步發育成一定的胚胎結構。

【0374】 實施例9：多種小分子試劑對基因表現的影響

【0375】 透過RNA-seq資料分析特定基因集的表現，很明顯，發明人發現TTNPB、1-AKP、WS6和mLIF對於誘導全能幹細胞都是十分重要的，反映在全能性基因、母源基因和ZGA基因的顯著上調(圖10a)。

【0376】 在這三種化合物中，RA激動劑TTNPB可以直接啟動大量富含RAR結合基序的全能性、母源和ZGA基因(圖10d-g)。TTNPB或另一種廣泛使用的RA激動劑Trans-RA展示了類似的對全能性基因的誘導效果，進一步證實了RA訊號通路在全能性細胞誘導中的特異性，而存在RA拮抗劑AGN193109時，全能性基因不能被誘導(圖10e,f)。這些結果證實了維甲酸訊號通路在細胞建立全能性中的核心作用。

【0377】 1-Azakenpaullone (1-AKP)是一種選擇性的GSK3 β 和CDK1/cyclinB雙抑制劑。研究表明，1-AKP處理可誘導特異性Wnt訊號下游基因表現和G2/M阻滯同時發生。GO分析一致顯示，在全能性幹細胞 (ciTotiSC) 培養條件中撤掉1-AKP後，特定的Wnt訊號靶向基因未見上調(圖10h)。同時，發明人還觀察到全能性幹細胞 (ciTotiSC) 誘導後細胞週期的G2期延長，這與2C早期胚胎與囊胚的差異一致(圖10i)。在全能性幹細胞 (ciTotiSC) 培養條件中將1-Azakenpaullone撤掉後全能性幹細胞 (ciTotiSC) 的G2期延長減少，這意味著1-Azakenpaullone在一定程度上維持了全能性幹細胞 (ciTotiSC) 中全位元性相關的特徵——G2期延長(圖10i)。這些結果表明，1-Azakenpaullone促進全能性誘導的機制至少部分是透過特定的Wnt訊號啟動和細胞週期G2期延長。

【0378】 WS6是一種IKK-NF- κ B抑制劑，此前被證明可促進有絲分裂後細胞增殖。在全能性幹細胞 (ciTotiSC) 培養條件中將WS6撤掉後對差異基因的GO分析富集了多個先天免疫相關通路，尤其是NF- κ B訊號通路(圖10j)。有趣的是，之前的一些研究表明，內源性逆轉錄病毒(ERV)的表現可以透過TLR或cGAS識別ERV衍生的細胞質雙鏈RNA (dsRNA)或雙鏈DNA (dsDNA)觸發NF- κ B訊號 (Chiappinelli等，2015; Lima-Junior等，2021年;Mao等人，2022)。一致地，NF- κ B訊號下游基因的表現也在WS6撤掉時上調(圖10k)。此外，有報導稱，NF- κ B在受精卵發育過程中的下調是其全能性狀態的關鍵，而NF- κ B的活化引發了ZGA後的後續發育 (Akihiko Nishikimi, 1999;Paciolla等人，2011)。因此，WS6可能部分地透過抑制ERV啟動引發的NF- κ B介導的免疫反應，發揮促進和穩定全能性幹細胞 (ciTotiSC) 誘導的作用(圖10k, j)。

【符號說明】

【0379】 無

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種組合物，其包含：

(a) RA 訊號通路啟動劑；和

(b) 以下中的一種或多種：GSK-3 抑制劑、IKK 訊號通路抑制劑、HDAC 抑制劑、組蛋白甲基轉移酶抑制劑、Src 激酶抑制劑、cAMP 啟動劑、和細胞代謝調節劑。

【請求項2】 一種試劑盒，其包含：

(a) RA 訊號通路啟動劑；和

(b) 以下中的一種或多種：GSK-3 抑制劑、IKK 訊號通路抑制劑、HDAC 抑制劑、組蛋白甲基轉移酶抑制劑、Src 激酶抑制劑、cAMP 啟動劑、和細胞代謝調節劑。

【請求項3】 一種 (a) RA 訊號通路啟動劑；和 (b) 以下中的一種或多種：GSK-3 抑制劑、IKK 訊號通路抑制劑、HDAC 抑制劑、組蛋白甲基轉移酶抑制劑、Src 激酶抑制劑、cAMP 啟動劑、和細胞代謝調節劑，用於製造誘導全能性幹細胞的用途。

【請求項4】 如請求項 1 至 3 中任一項所述的組合物、試劑盒或用途，其中該 RA 訊號通路啟動劑選自 TTNPB、Tretionin/RA/ATRA、AM580、Taza、9-cis-RA、Acitretin、CD437、Tamibarotene、Tazarotene、視黃酸、Isotretinoin、Acitretin sodium、ch55 和 AC55649 的相同通路小分子。

【請求項5】 如請求項 1 至 3 中任一項所述的組合物、試劑盒或用途，其中該 GSK-3 抑制劑選自 1-Azakenpaullone、AZD2858、CHIR99021 和 AZD1080 等相同通路小分子。

【請求項6】 如請求項 1 至 3 中任一項所述的組合物、試劑盒或用途，其中該 IKK 訊號通路抑制劑選自 WS6、sc-514、PF184 和 IKK16 等相同通路小分子。

【請求項7】 如請求項 1 至 3 中任一項所述的組合物、試劑盒或用途，其中該 HDAC 抑制劑選自 Trichostatin A (TSA)、Valproic acid (VPA)、Vorinostat (SAHA) 和 Entinostat (MS-275) 等相同通路小分子。

【請求項8】 如請求項 1 至 3 中任一項所述的組合物、試劑盒或用途，其中該組蛋白甲基轉移酶抑制劑選自 BIX 01294、3-deazaneplanocin A (DZNeP) HCl、A-366、UNC0638 和 SGC 0946 等相同通路小分子。

【請求項9】 如請求項 1 至 3 中任一項所述的組合物、試劑盒或用途，其中該 Src 激酶抑制劑選自 Dasatinib (BMS-354825)、WH-4-023、Ponatinib (AP24534)、Bosutinib (SKI-606) 等相同通路小分子。

【請求項10】 如請求項 1 至 3 中任一項所述的組合物、試劑盒或用途，其中該 cAMP 啟動劑選自 Colforsin (Forskolin、HL 362) 和 8-Br-cAMP 等相同通路小分子。

【請求項11】 如請求項 1 至 3 中任一項所述的組合物、試劑盒或用途，其中該細胞代謝調節劑選自 2-Deoxy-D-glucose (2-DG)、乙酸鈉、L-乳酸鈉和 D-核糖等細胞代謝調節劑。

【請求項12】 一種培養基，其包含如前述請求項 1 所述的組合物。

【請求項13】 如請求項 12 所述的培養基，其中該培養基包含基礎培養基。

【請求項14】 如請求項 12 所述的培養基，其中該基礎培養基選自 DMEM、Knockout DMEM、RPMI 1640 和 DMEM/F12 等常用基礎培養基。

【請求項15】 一種製造誘導全能性幹細胞的方法，該方法包含在如前述請求項 12 至 14 中任一項所述的培養基中培養多能性幹細胞，由此製造該誘導全能性幹細胞。

【請求項16】 如請求項 15 所述的方法，其中該多能性幹細胞是胚胎幹細胞或誘導多能性幹細胞。

【請求項17】 如請求項 15 所述的方法，其包含將非多能性細胞再程式化為多能性幹細胞。

【請求項18】 如請求項 15 所述的方法，其中該非多能性細胞選自體細胞和/或成體幹細胞。

【請求項19】 如請求項 15 所述的方法，其中該將非多能性細胞再程式化為多能性幹細胞包含在該非多能性細胞內表現選自 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 中的一種或多種再程式化因子。

【請求項20】 如請求項 15 所述的方法，其中該培養多能性幹細胞進行 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 天。

【請求項21】 一種培養物，其包含如請求項 12 至 14 中任一項所述的培養基和多能性幹細胞。

【請求項22】 如請求項 21 所述的培養物，其中該多能性幹細胞是胚胎幹細胞或誘導多能性幹細胞。

【請求項23】 一種培養物，其包含如請求項 12 至 14 中任一項所述的培養基和全能性幹細胞。

【請求項24】 如請求項 12 所述的培養物，其中該全能性幹細胞是誘導全能性幹細胞，較佳係透過如請求項 15 至 20 中任一項的方法所製造誘導。

【請求項25】 一種誘導全能性幹細胞，其透過以下中的一種或多種來表徵：

(a) 選自以下中的一種或多種全能性轉錄標誌物的增加的轉錄：
MERV1, Zscan4c、Zscan4d、Zscan4f、Zfp352、Tcstv1、Tcstv3、Teme92、Gm6763；

(b) 選自以下中的一種或多種多能性轉錄標誌物的減少的轉錄：
POU5f1、ZFP42、NANOG、KLF4、ESRRB；和

(c) 向胚外細胞類型分化的能力；

較佳地，其中，該誘導全能性幹細胞係透過如請求項 15 至 20 中任一項的方法所製造。

【請求項26】 一種誘導全能性幹細胞，其可透過如請求項 15 至 20 中任一項的方法所製造。

【請求項27】 一種生物體，其產生自如請求項 24 或 25 所述的誘導全能性幹細胞，較佳其中該生物體是齧齒動物或哺乳動物。

【請求項28】 一種類器官，其產生自如請求項 24 或 25 所述的誘導全能性幹細胞。

【請求項29】 一種組織，其產生自如前述請中 24 或 25 所述的誘導全能性幹細胞，較佳該組織是血液。

【請求項30】 一種分化細胞，其分化自如請求項 24 或 25 所述的誘導全能性幹細胞，較佳其中該分化細胞是血液細胞或免疫細胞，如 T 細胞或 NK 細胞。

(發明圖式)

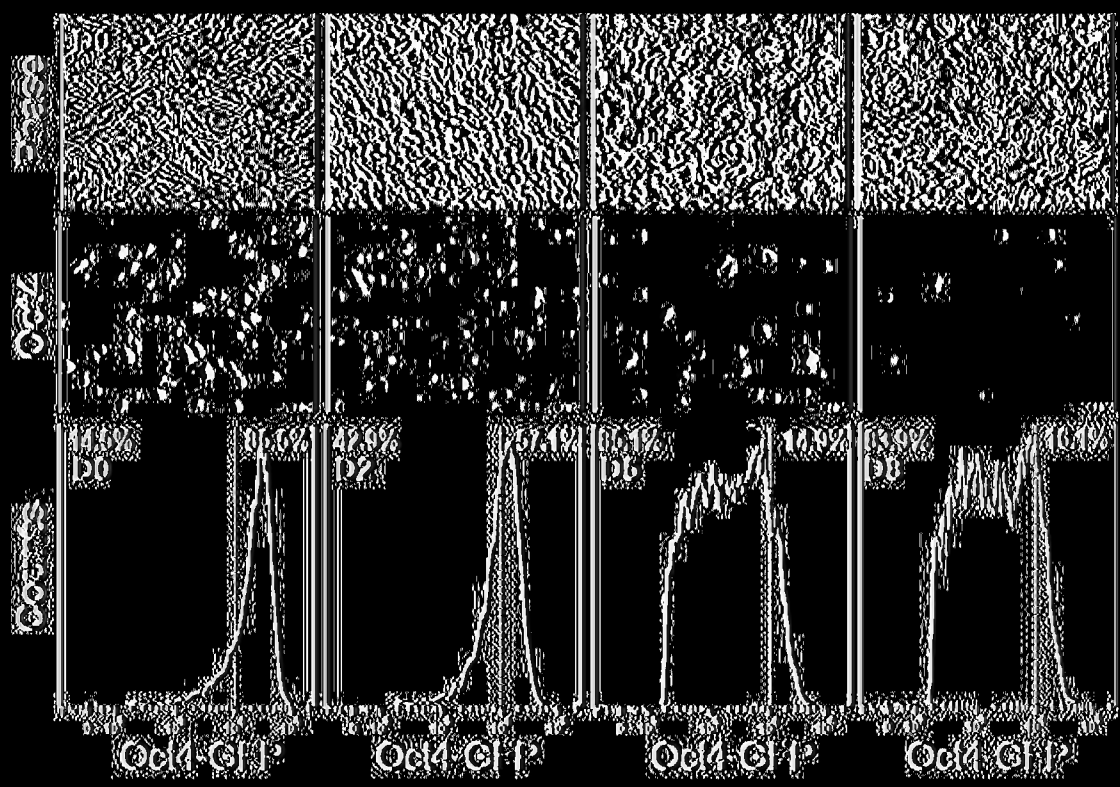


圖 1.1

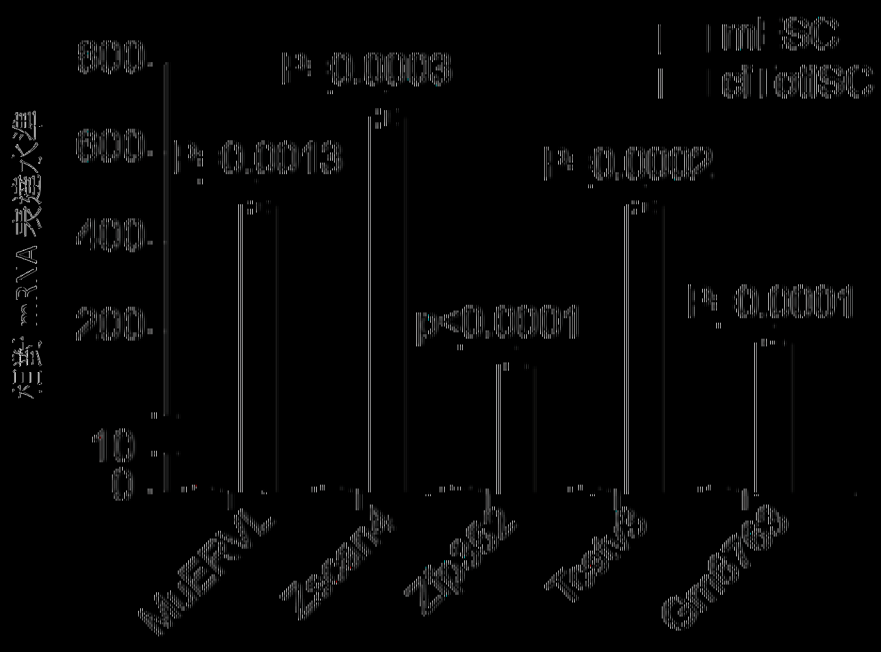
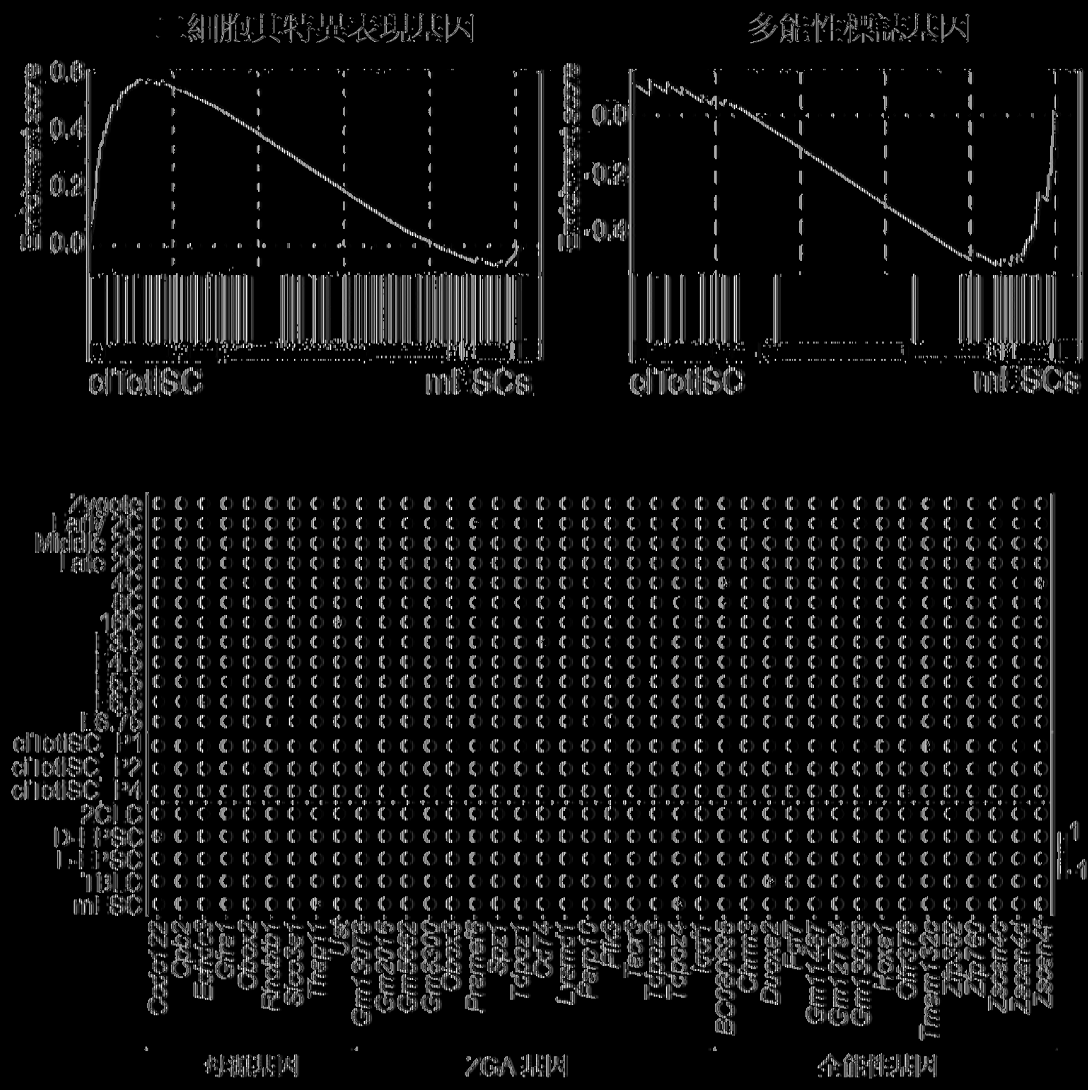
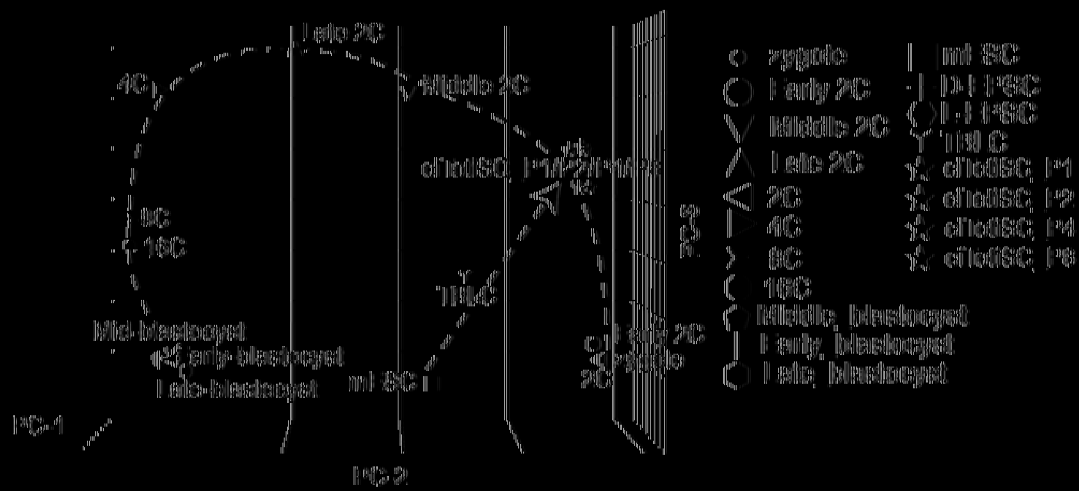
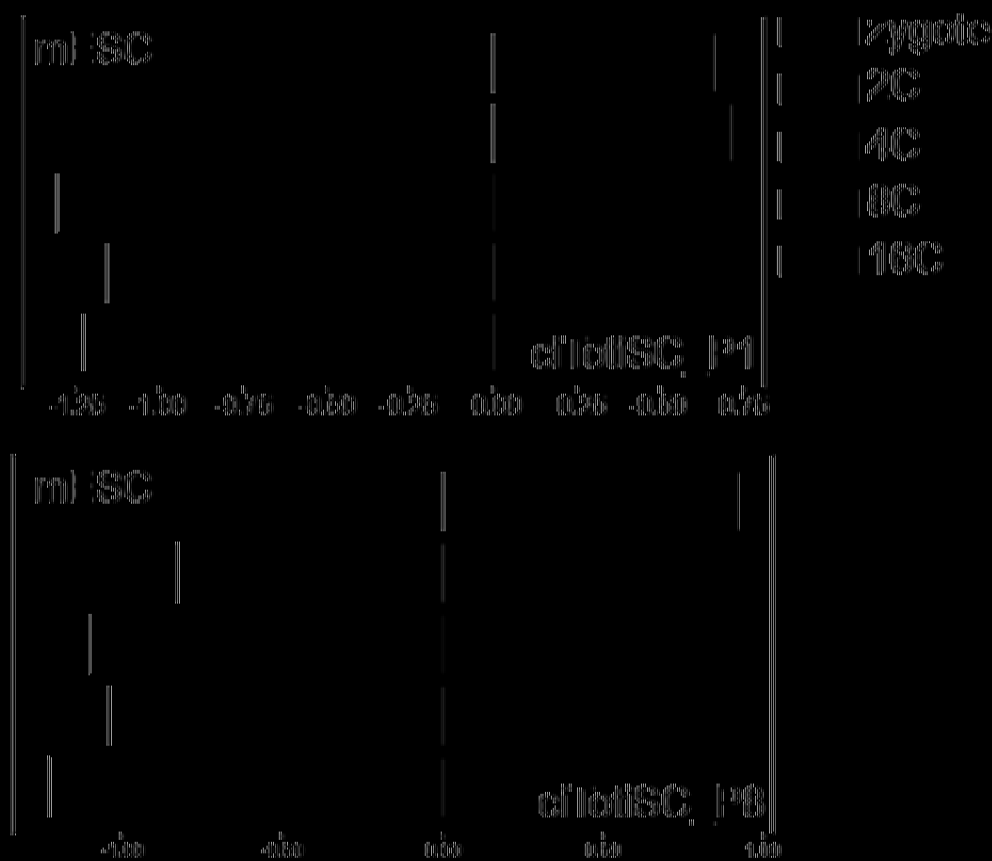


圖 1.2





【図】 23



【図】 24

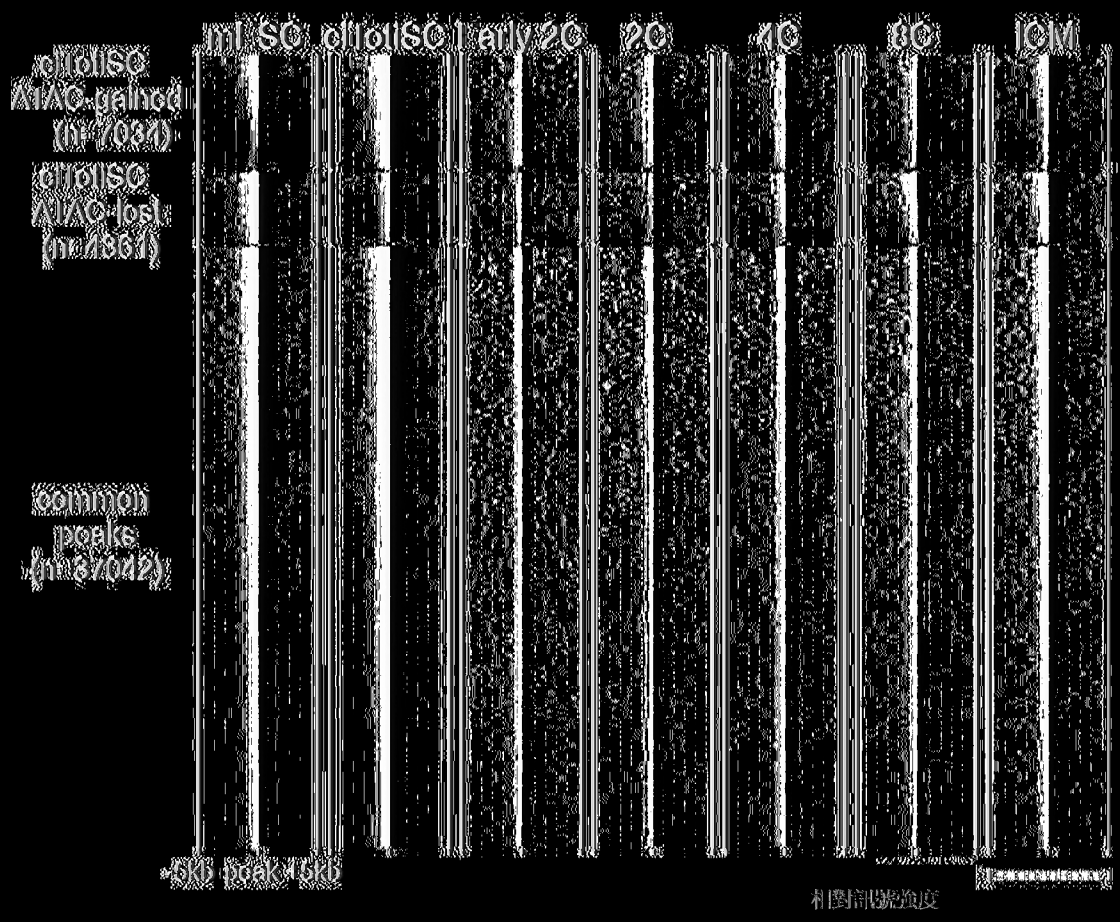
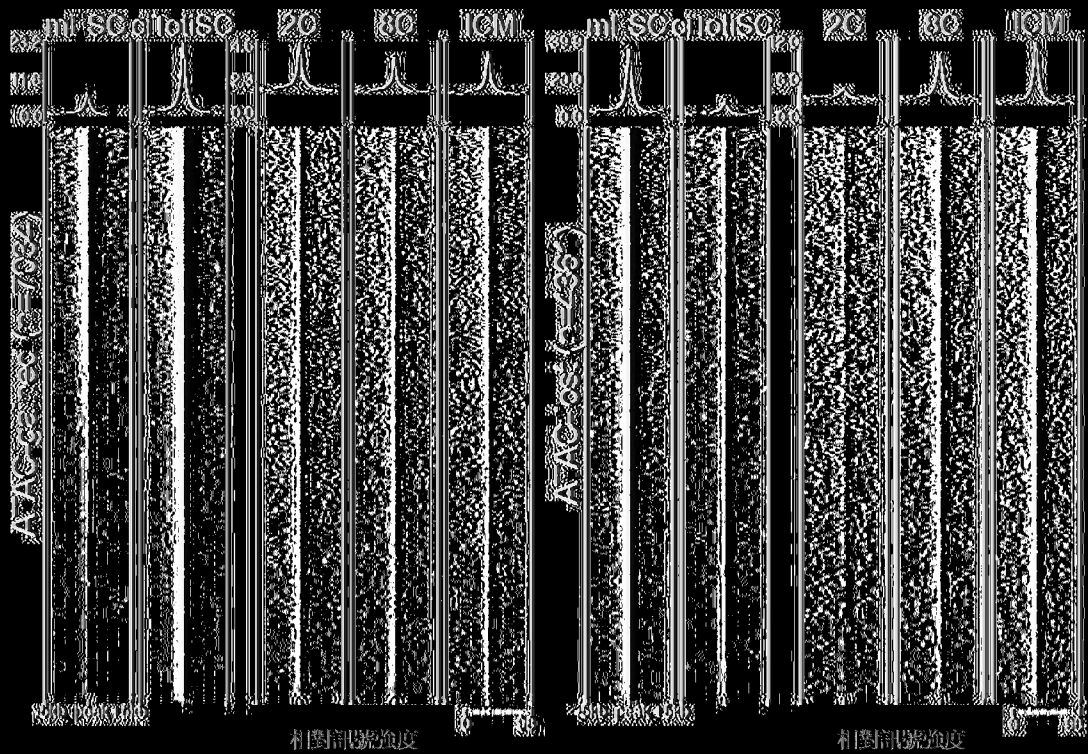
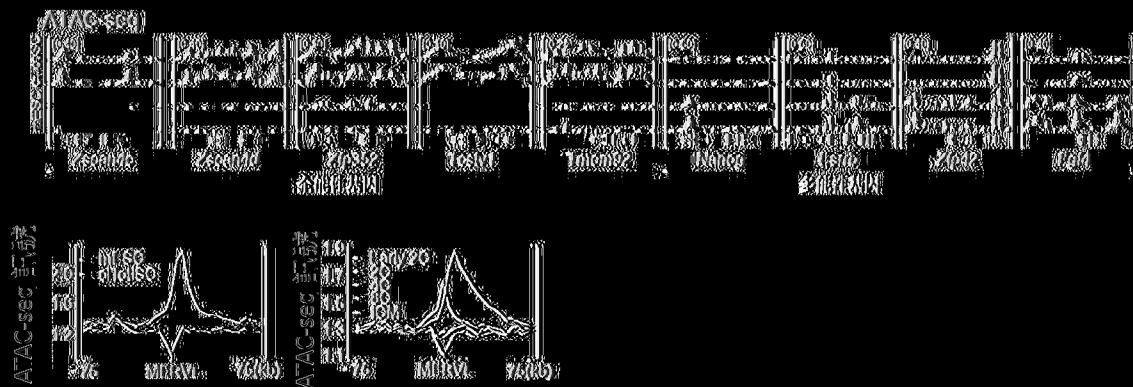
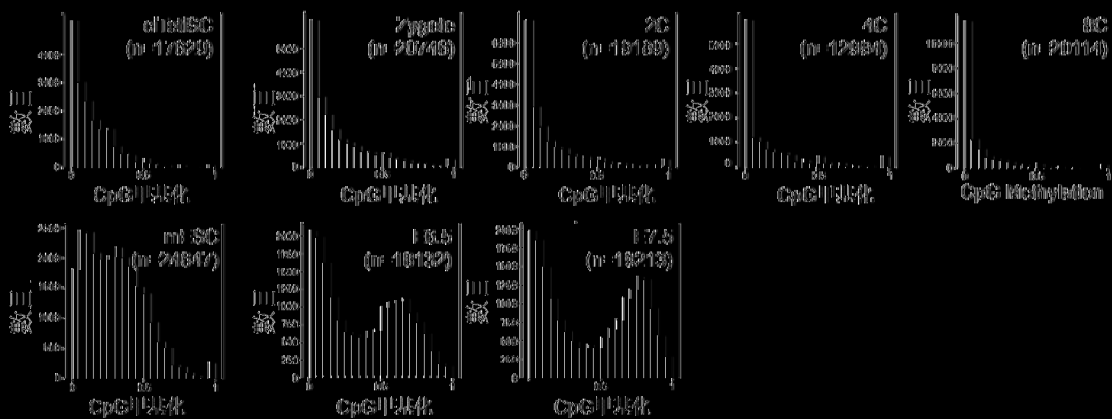
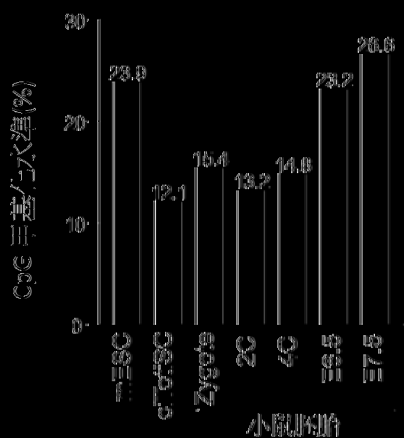


圖 2.6



[圖] 27



[圖] 28

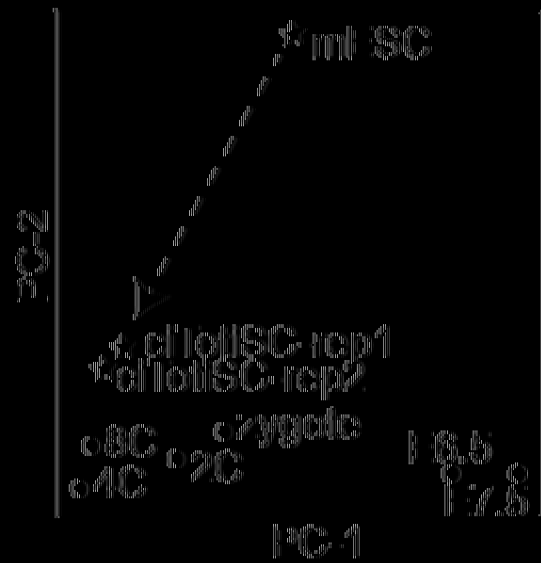
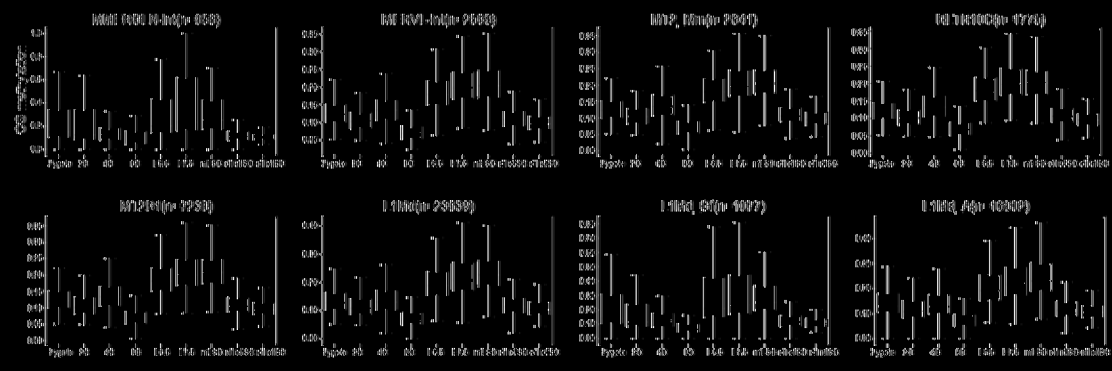
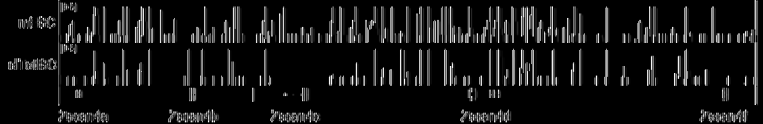


圖 2.9

特定重複序列附近中具化水準



Zscan3 基因家族附近中具化水準



X 染色體上具化水準



圖 2.10

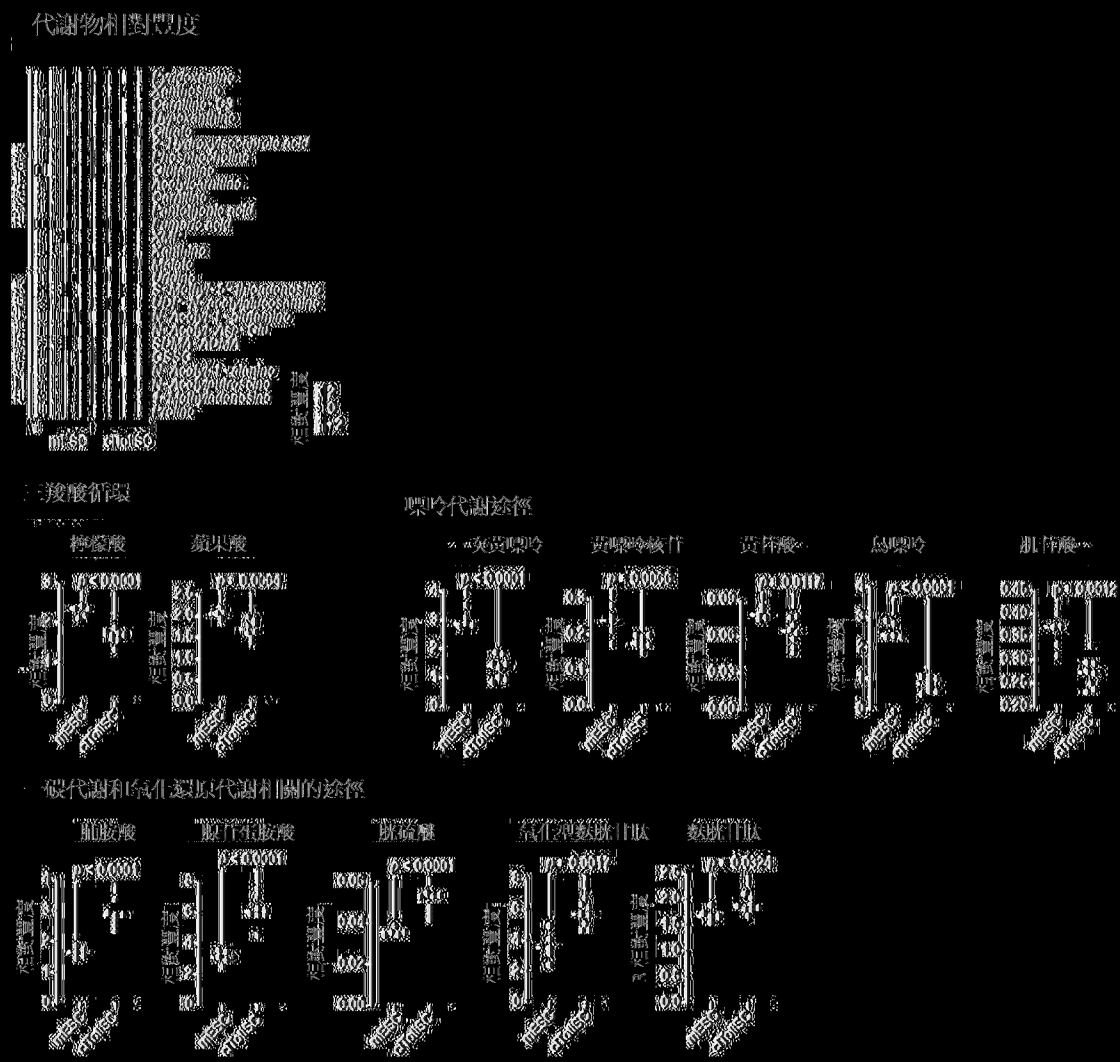


圖 2.11

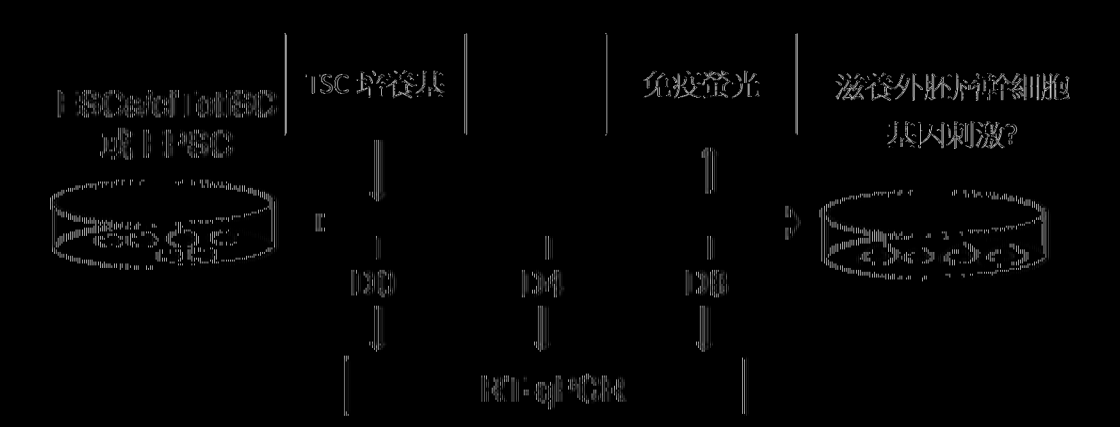


圖 3.1

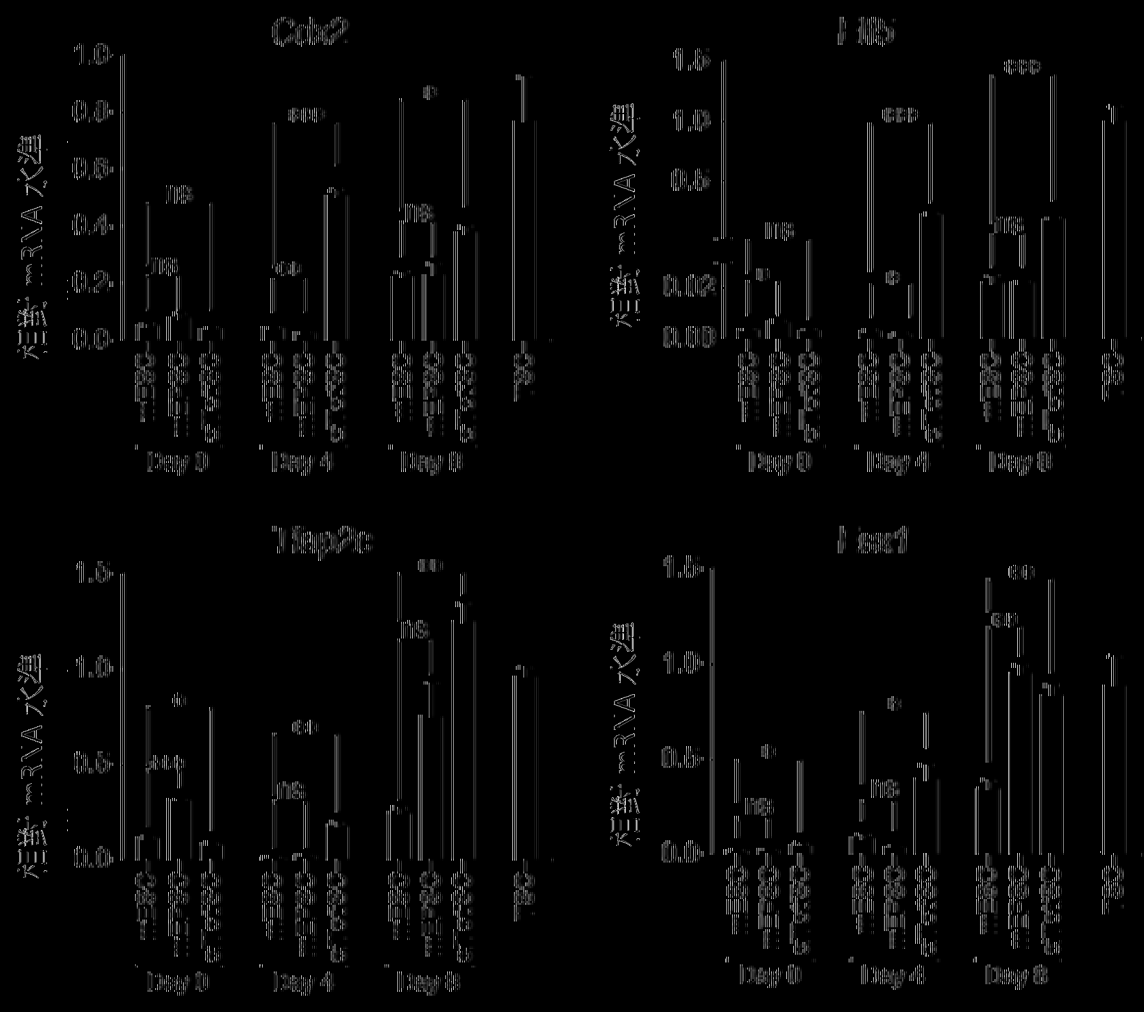


圖 3.2

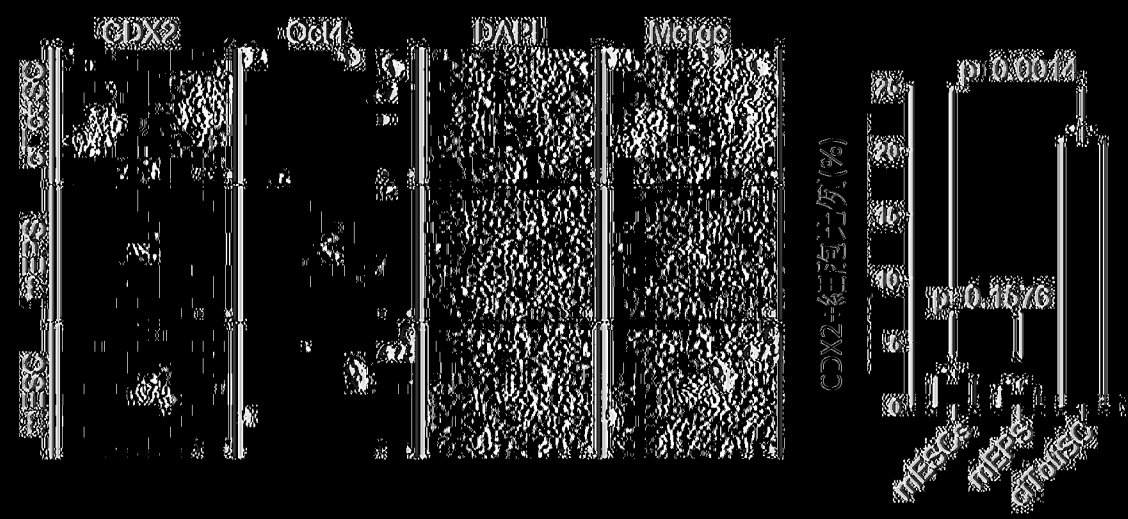


圖 3.3

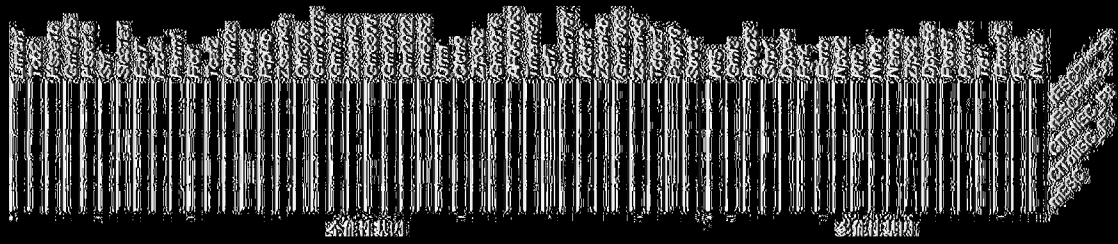


圖 3.4

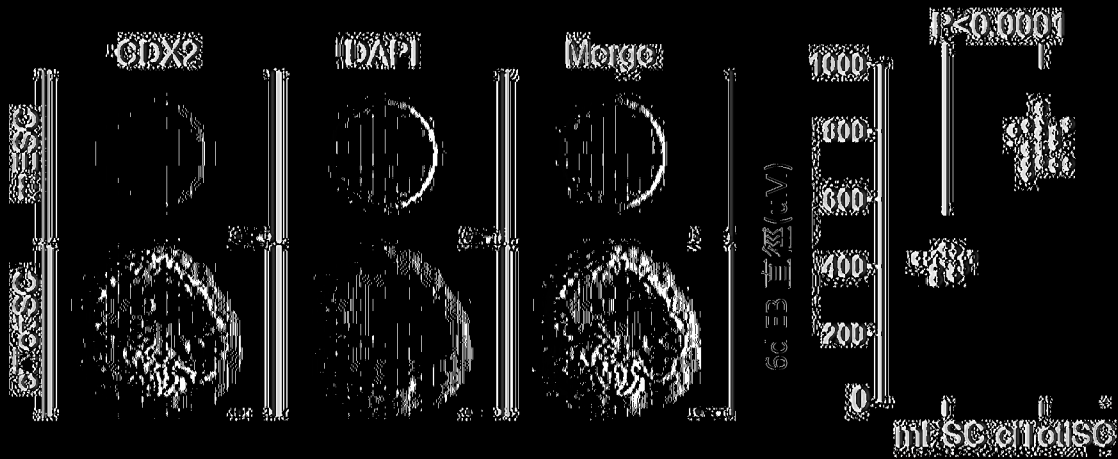


圖 4.1

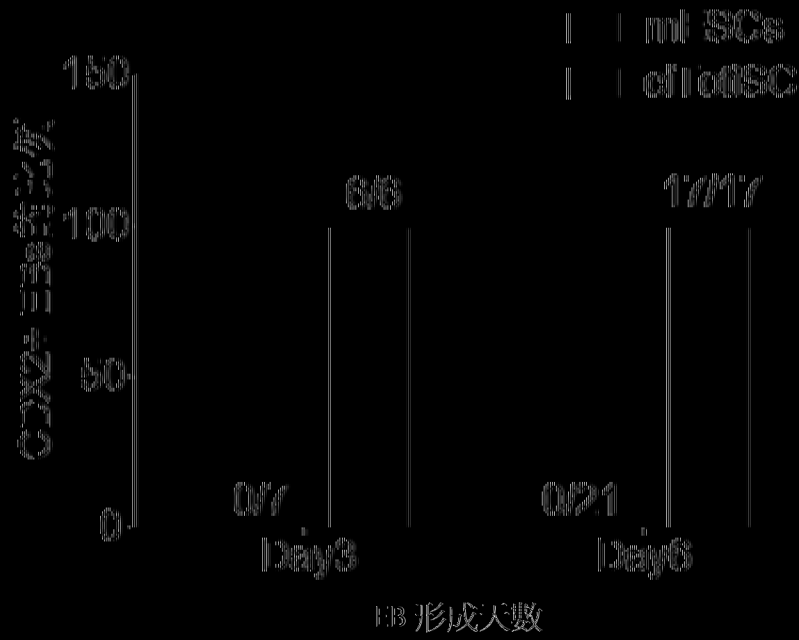


圖 4.2

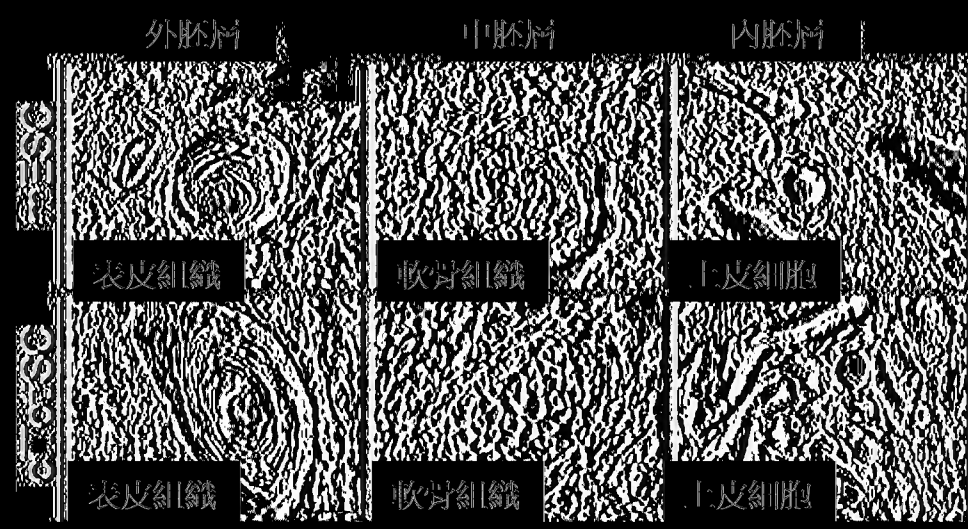


圖 4.3

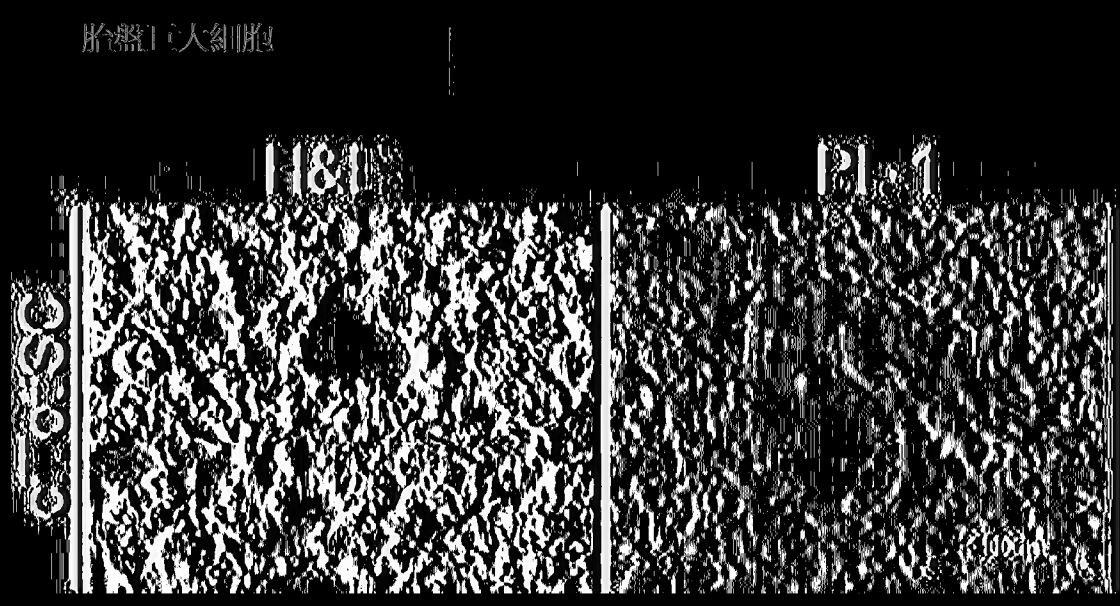


圖 4.4

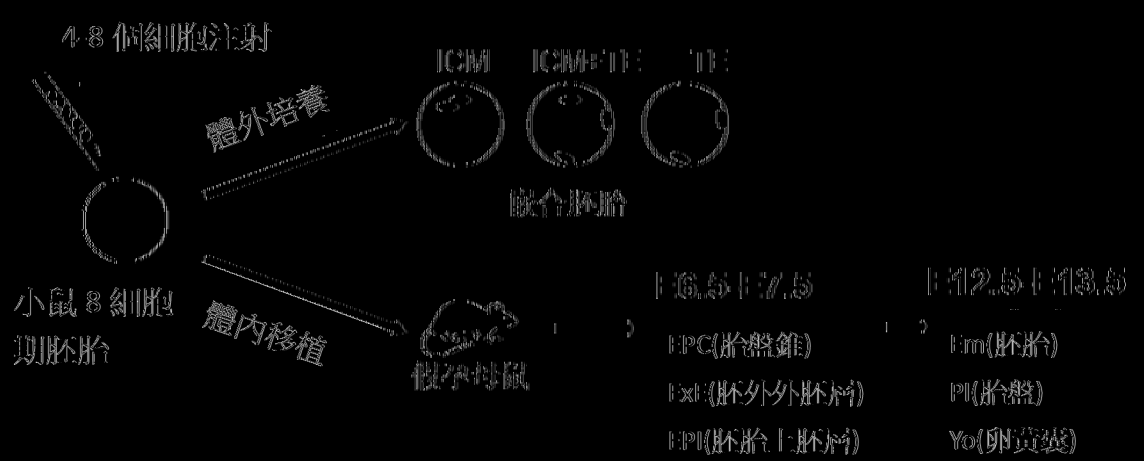


圖 5.1

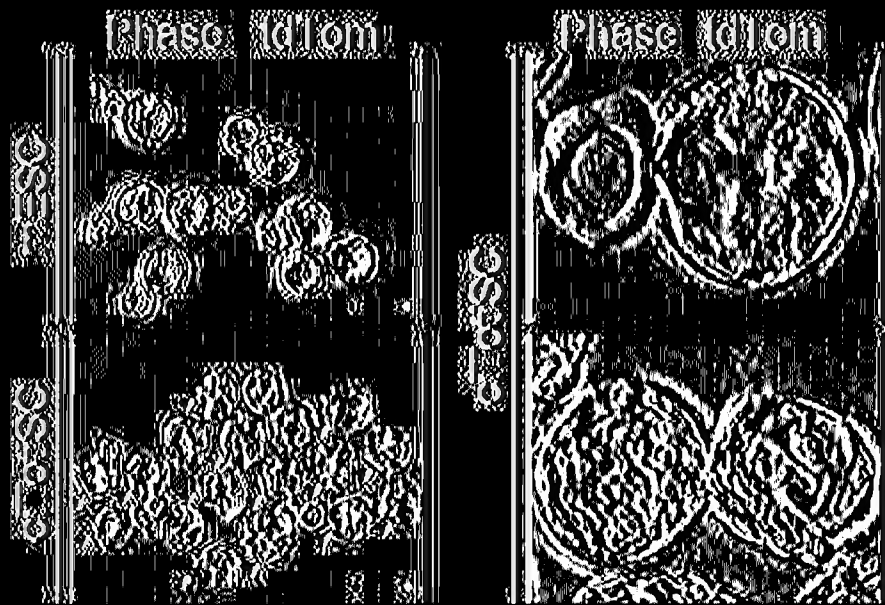


圖 5.2

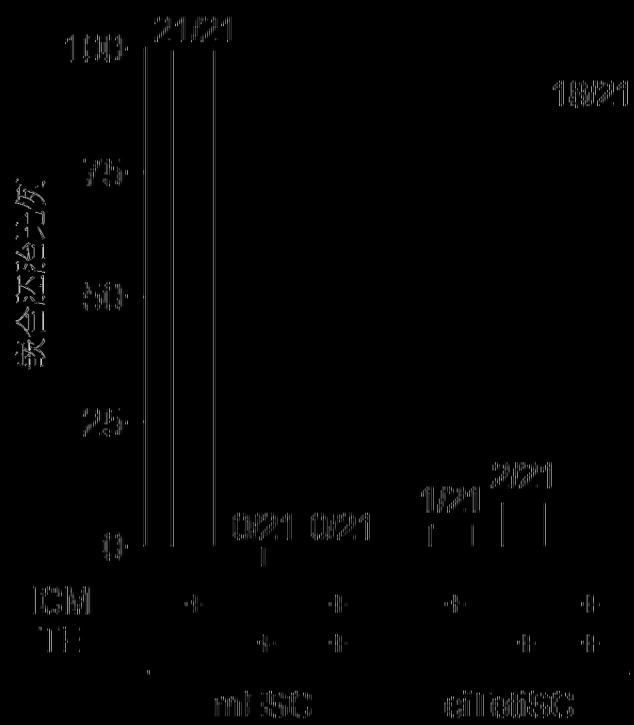


圖 5.3

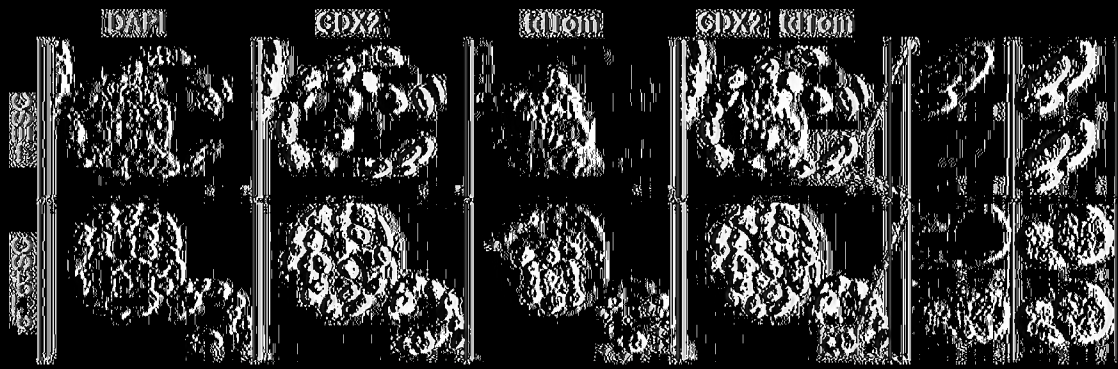


圖 5.4

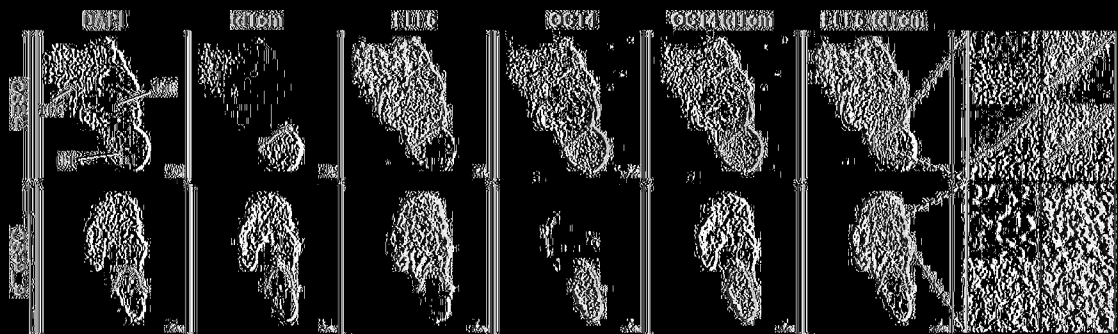


圖 6.1

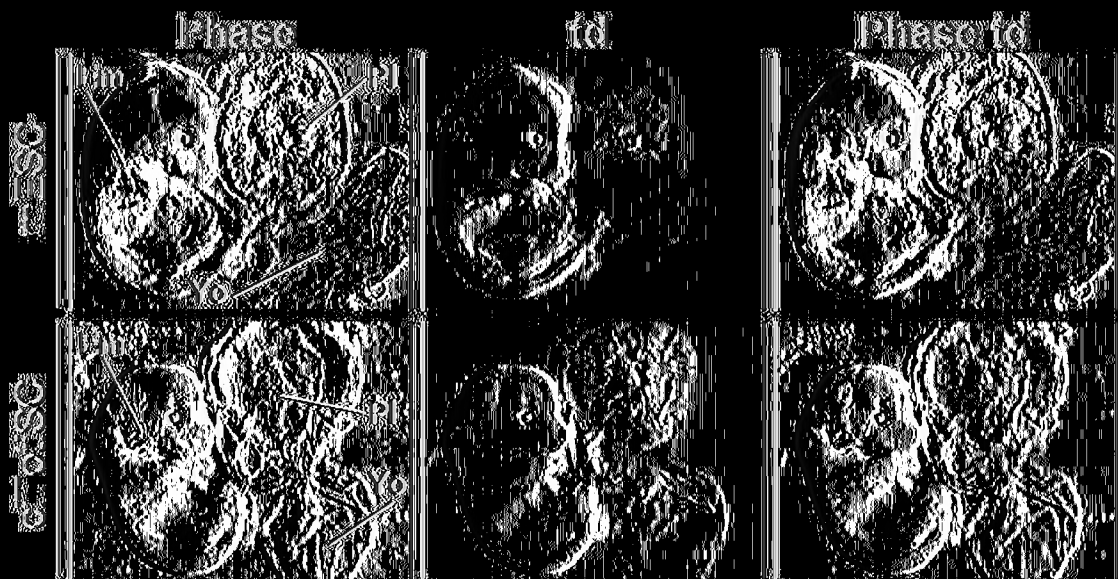


圖 7.1

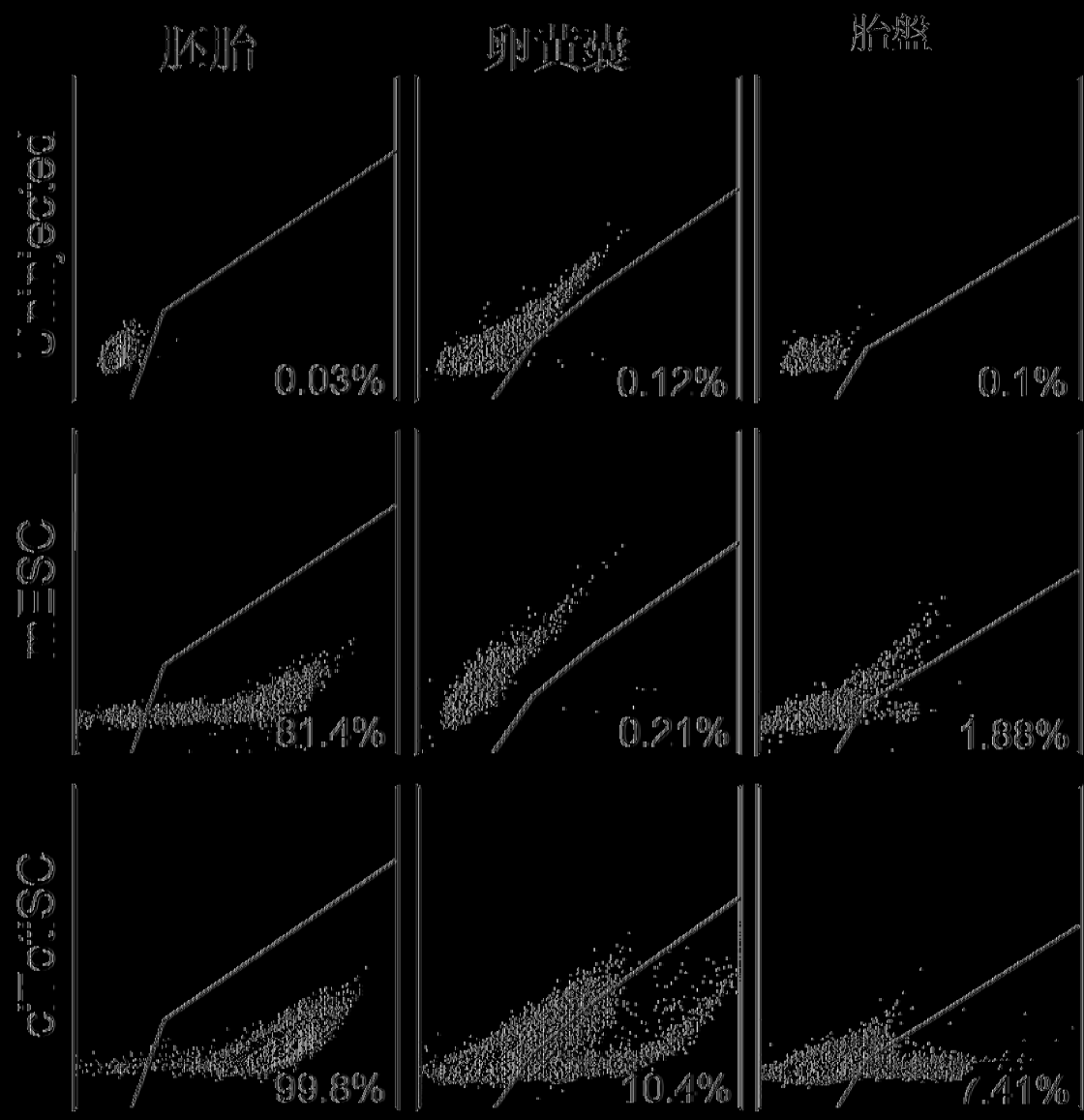


圖 12

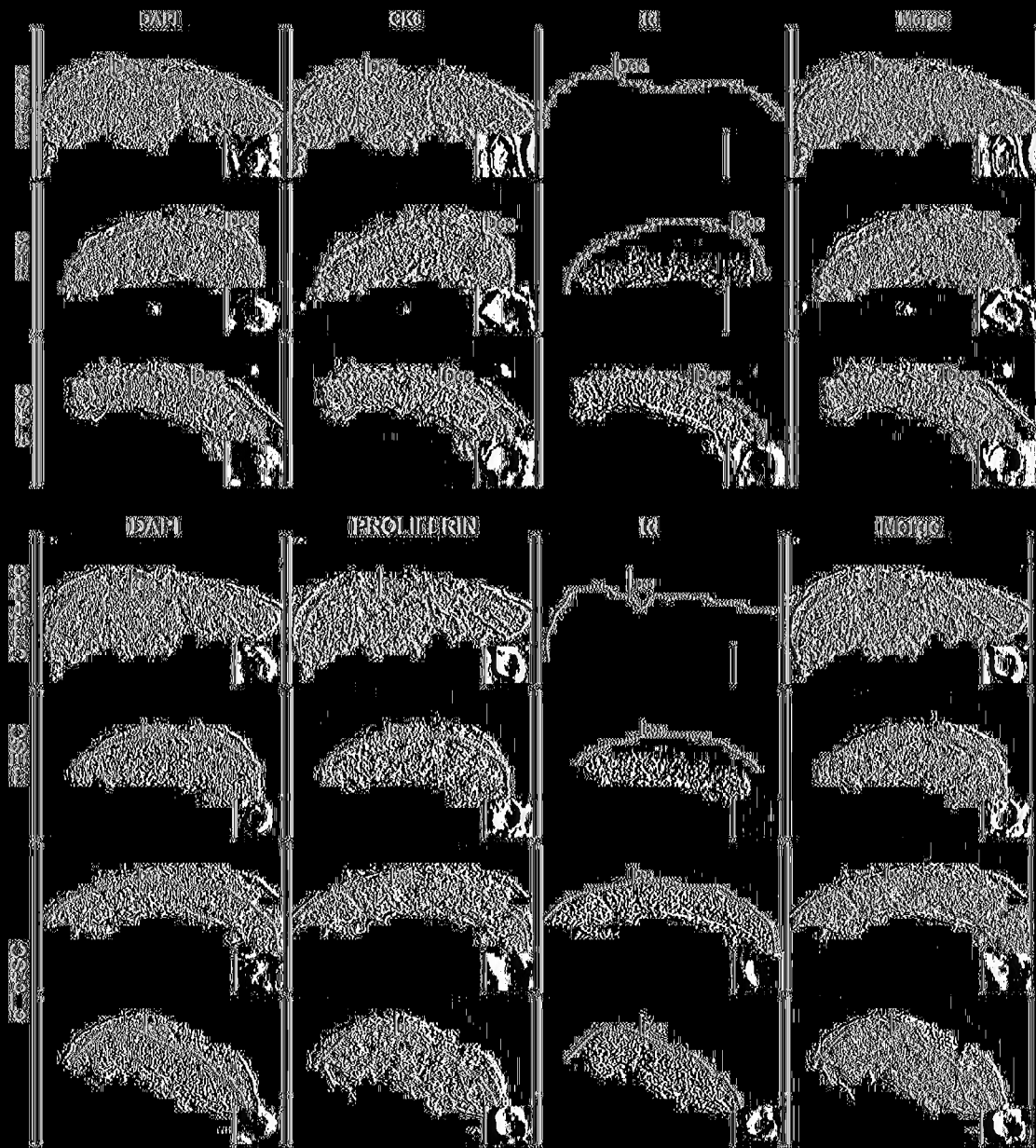


圖 7.3

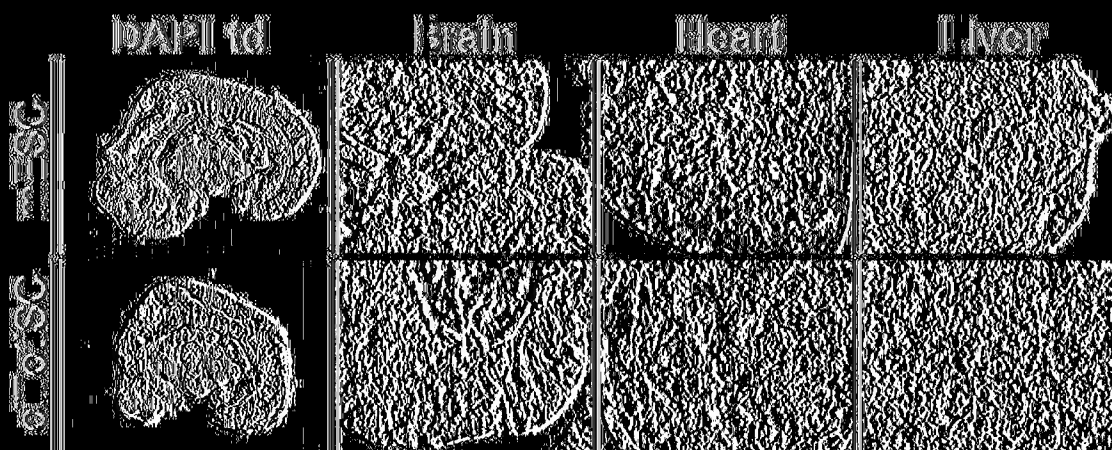
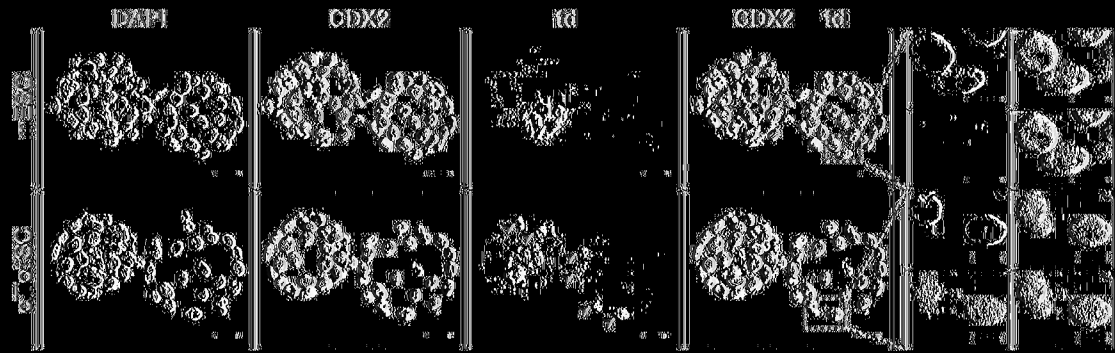


圖 7.4

單個細胞注射



單個細胞注射

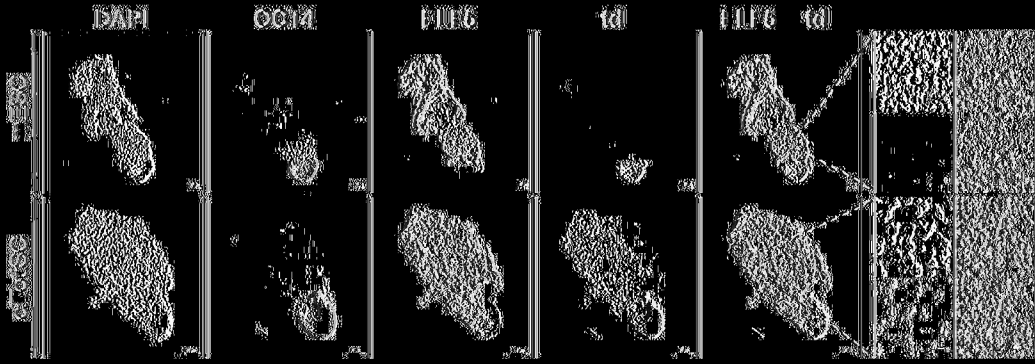


圖 8.1

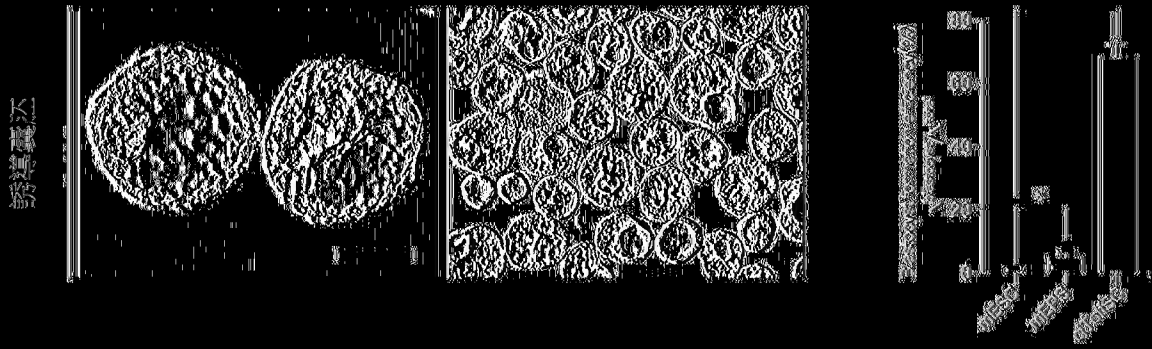


圖 8.4

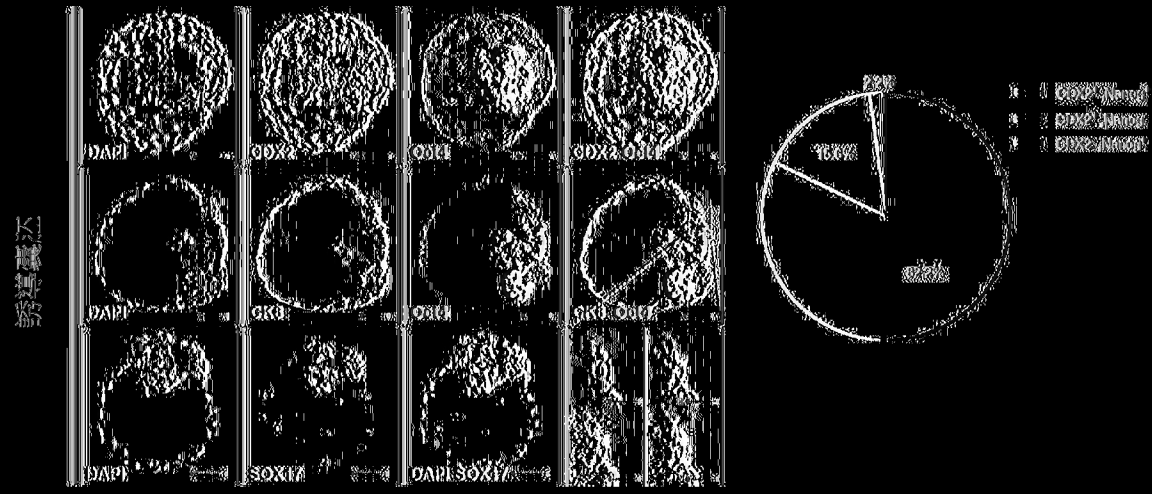


圖 8.5

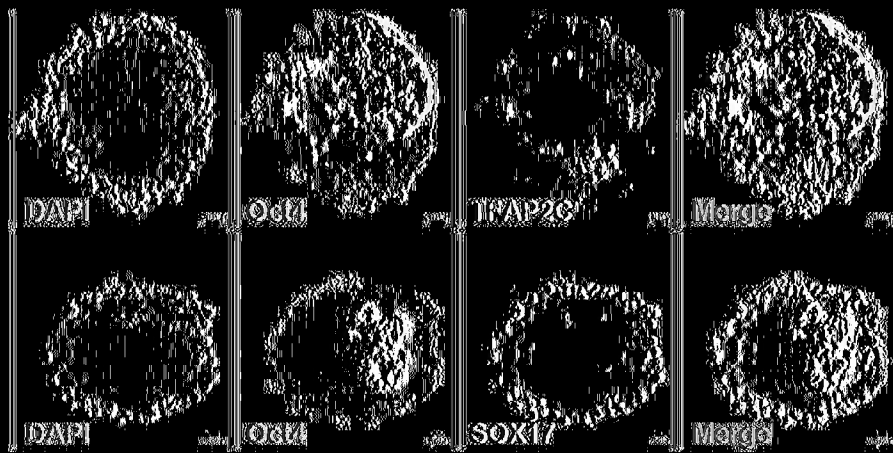
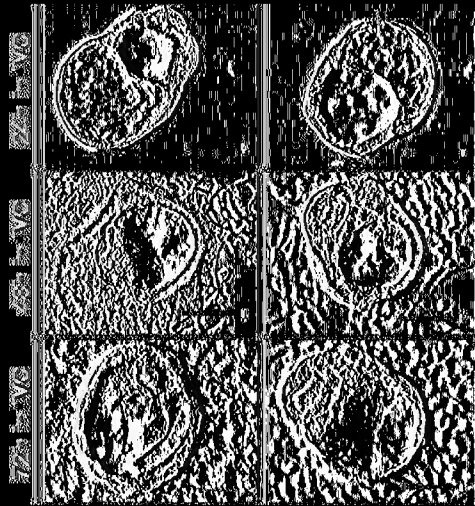


圖 8.6

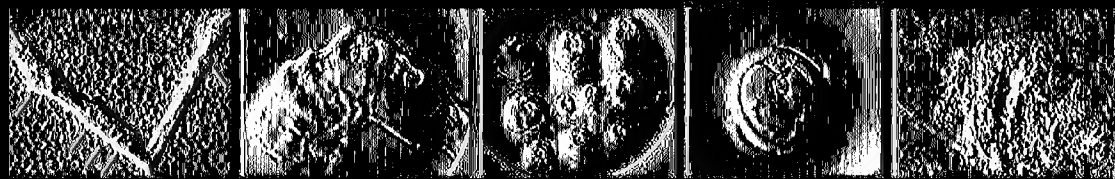
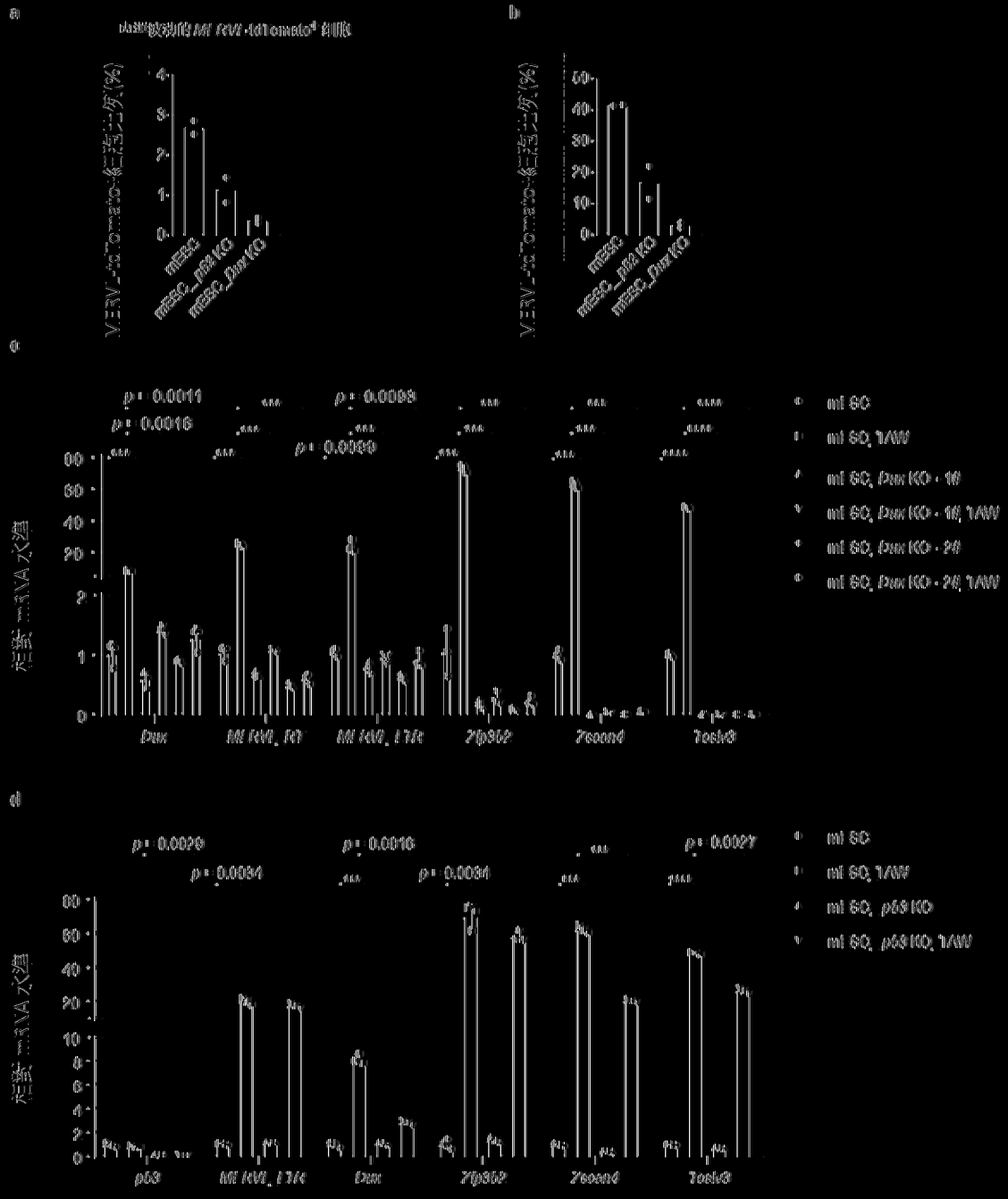
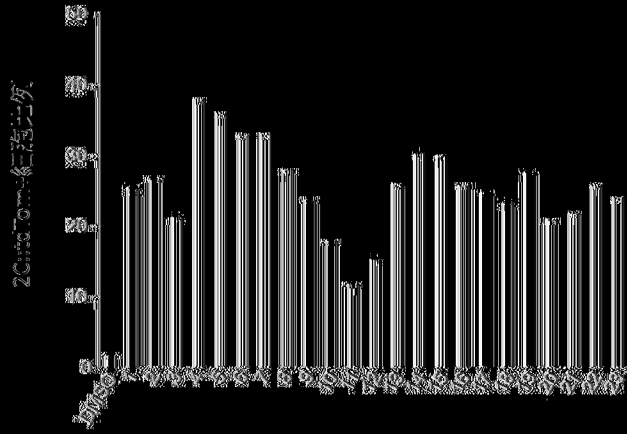
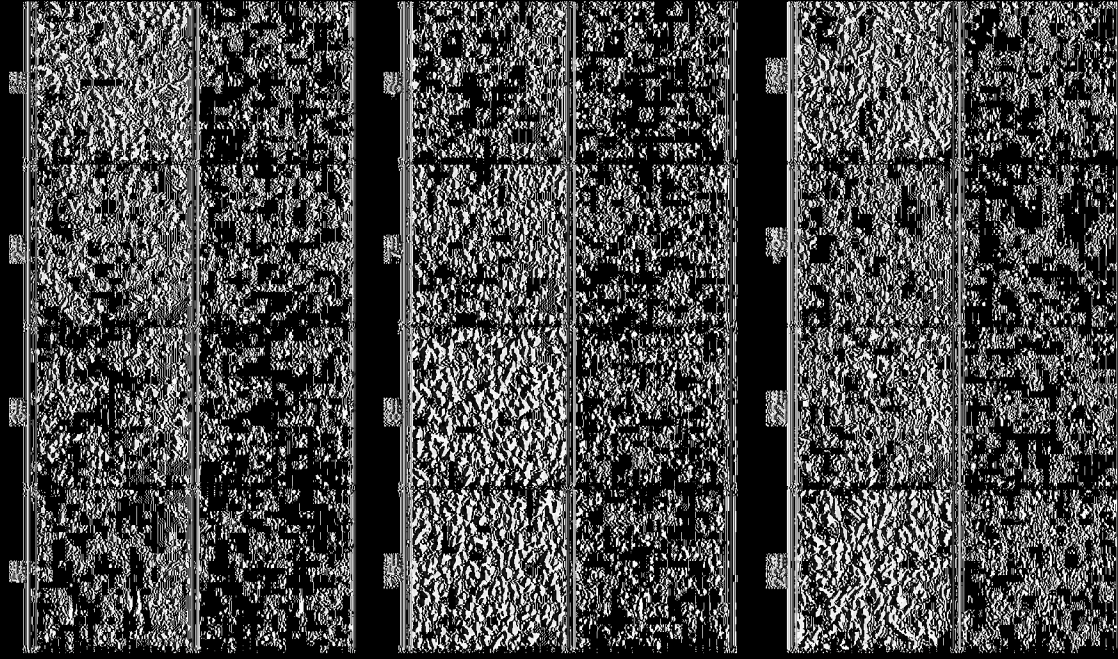


圖 8.7

內源波動的 MIRV1-tetTomato 細胞



[圖 9.1]



92

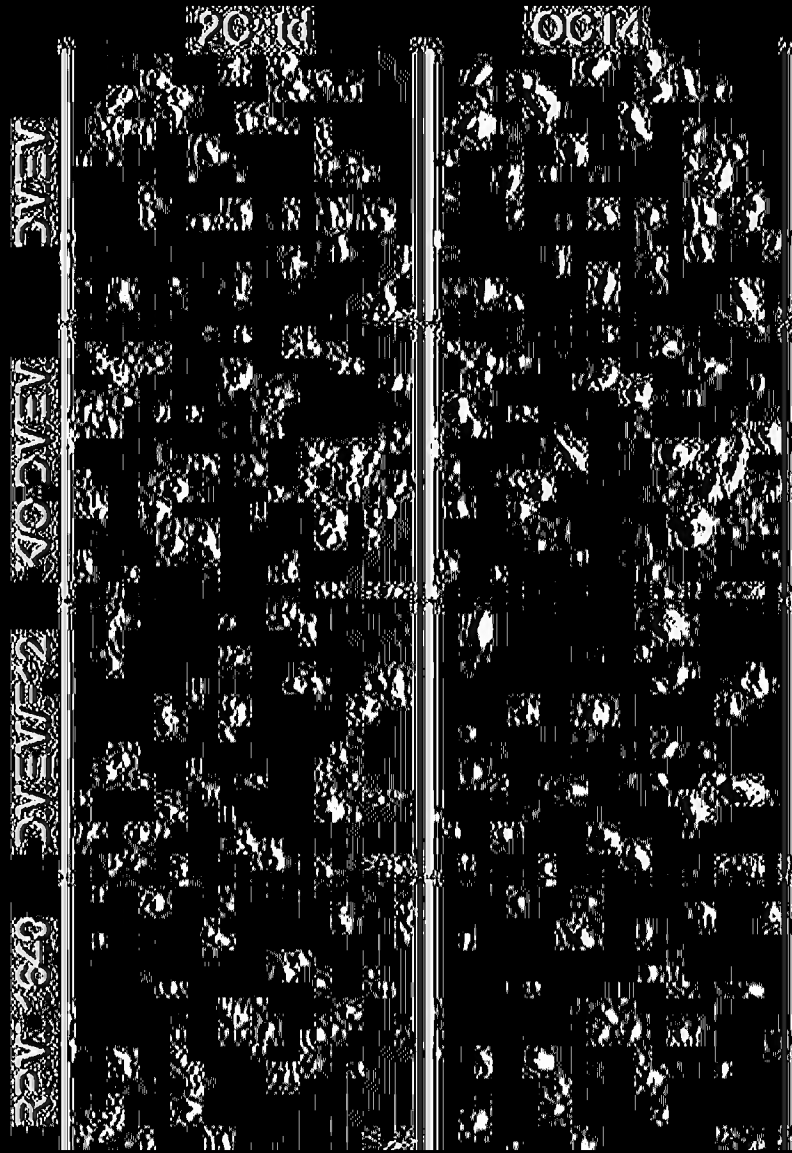
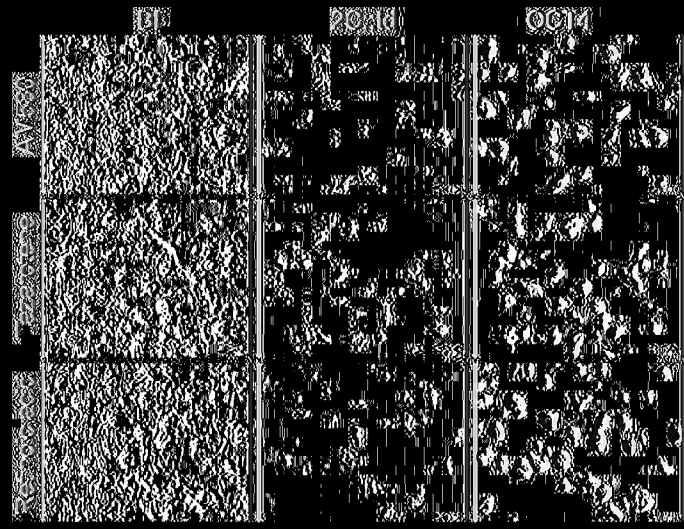
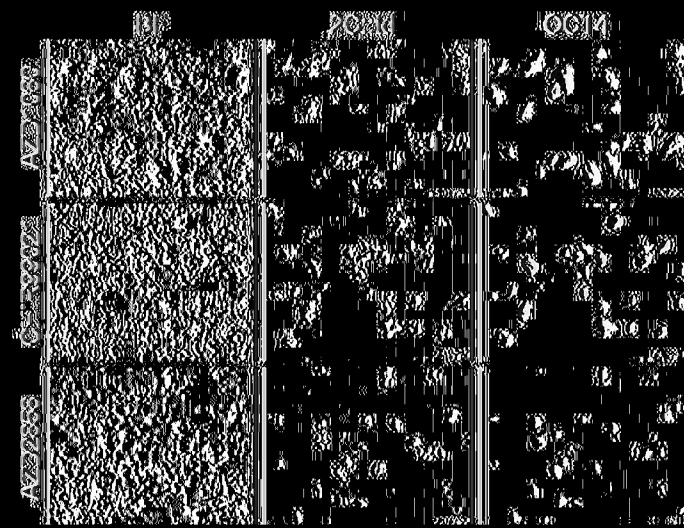


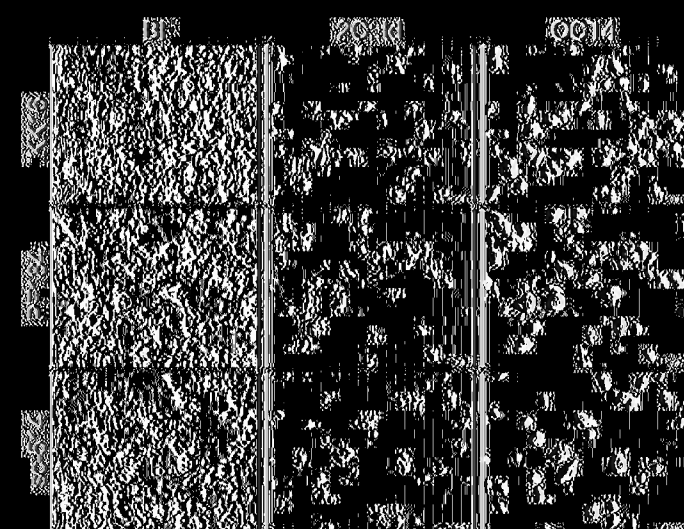
圖 9.3



單獨使用 RA 訊號通路啟動劑替代 T1NP3

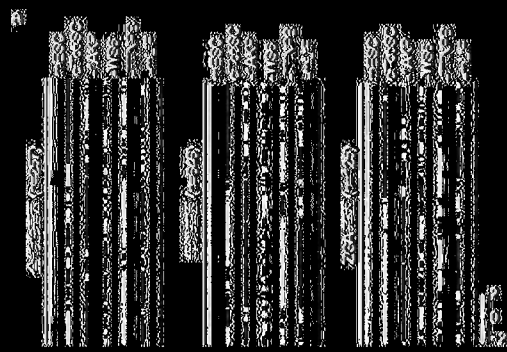


單獨使用 GSK3 訊號通路啟動劑替代 1-Avakenpaullone



單獨使用 KR 訊號通路抑制劑替代 WS6

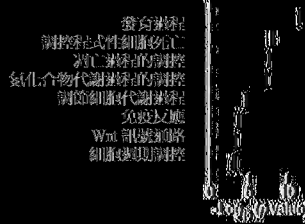
圖 9.4



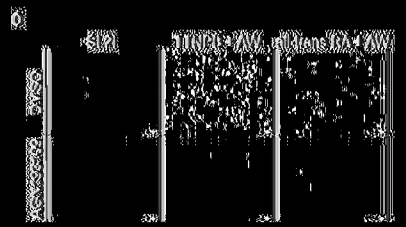
2C 胚胎與變態期相比富集的 GO term



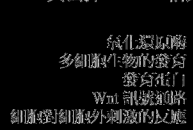
cf/iDfSCs 與 mDfSCs 相比富集的 GO term



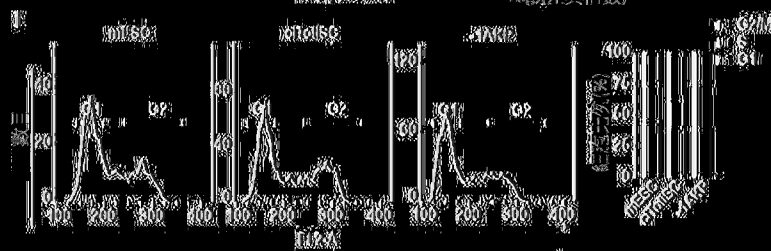
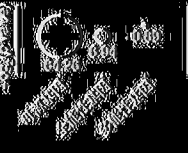
cf/iDfSCs 與大掉 T/NPB 相比富集的 GO term



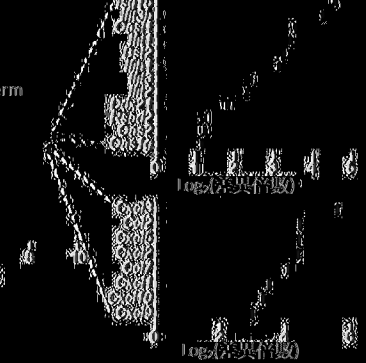
cf/iDfSCs 與大掉 1-A/KP 相比富集的 GO term



RARE 結合因子富集情況



cf/iDfSCs 與大掉 W56 相比富集的 GO term



dsRNA 的創傷感測器
DNA 的創傷感測器
NCB 相關的基因
T 程序素相關通路
T 程序素相關基因